



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109749957 B

(45) 授权公告日 2022.07.12

(21) 申请号 201910026659.7

(22) 申请日 2019.01.11

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 109749957 A

(43) 申请公布日 2019.05.14

(83) 生物保藏信息  
CGMCC No.17004 2018.12.19

(73) 专利权人 江苏省苏微微生物研究有限公司  
地址 214063 江苏省无锡市钱荣路7号

(72) 发明人 张维娜 施大林 高亮 于丹  
孙梅 匡群 张一平

(74) 专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所  
(普通合伙) 32104

专利代理师 时旭丹 张仕婷

(51) Int.Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

G02F 3/34 (2006.01)

C12R 1/25 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 104855703 A, 2015.08.26

CN 107568506 A, 2018.01.12

王利等. 三种益生菌复方发酵制剂的制备及对养殖水体水质的作用比较.《科学养鱼》. 2016, (第11期), 全文.

审查员 王雅倩

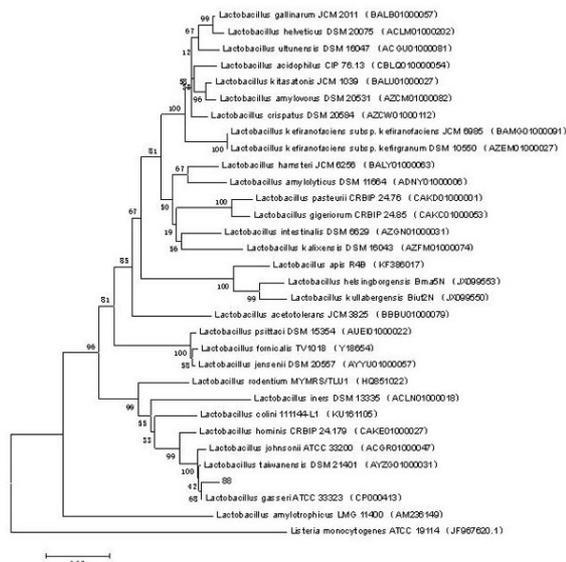
权利要求书1页 说明书7页  
序列表1页 附图1页

(54) 发明名称

一种具有水产病原菌拮抗特性的格氏乳杆菌制剂的制备及应用

(57) 摘要

一种具有水产病原菌拮抗特性的格氏乳杆菌制剂的制备及应用,属于微生物技术领域。本发明筛选得到一株格氏乳杆菌菌株88,分类命名为格氏乳杆菌(*Lactobacillus gasseri*),曾用名:加氏乳杆菌或戈氏乳杆菌。该菌株能够在养殖池塘水体及底泥中生长,在淡水养殖中对多种水产常见病原菌有广谱拮抗作用。通过菌种活化、发酵培养和制剂制备得到粉剂和水剂,将粉剂和水剂配合使用有效降解水体中的COD、氨氮、亚硝酸盐、总磷、总氮的含量,促进水产养殖动物的生长。本发明制备所得格氏乳杆菌制剂作为水产养殖水质改良剂能够有效降低水体中的污染物含量,改善养殖水质;其作为渔业养殖饲料添加剂能够显著提高水生动物的增重率、特定增长率,显著降低饵料系数。



1. 一株格氏乳杆菌菌株88,分类命名为格氏乳杆菌 (*Lactobacillus gasseri*),保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心CGMCC,地址北京市朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所,保藏日期2018年12月19日,保藏编号CGMCC No.17004。

2. 采用权利要求1所述菌株制备具有水产病原菌拮抗特性制剂的方法,其特征在于步骤如下:

(1) 菌种活化:无菌开启格氏乳杆菌菌株88的冻干保藏菌种,接种于装有MRS肉汤的试管中,于34-38℃静置培养24-48h,然后转接于MRS肉汤三角瓶中,34-38℃培养24-48h;反复活化2-3次,镜检,计数,当菌体浓度 $>10^8$ CFU/mL,作为种子液;

MRS肉汤培养基组成以g/L计:酪蛋白酶消化物10,牛肉膏粉10,酵母膏粉4,柠檬酸三铵2,乙酸钠5,硫酸镁0.2,硫酸锰0.05,磷酸氢二钾2,葡萄糖20,吐温-80 1.08,以蒸馏水定容配制,pH  $5.7 \pm 0.2$ ;

(2) 发酵培养:

一级培养:将步骤(1)所得种子液以体积比1%-10%接种量接入装有发酵培养基的100L发酵罐中,发酵罐装液量为体积比70%-80%,厌氧静置培养,34-38℃恒温培养24-48h,得到一级培养发酵液;

一级发酵培养基组成以g/L计:蛋白胨5-15,酵母膏5-15,葡萄糖5-20,番茄汁50-200,磷酸氢二钾1-5,吐温-80 0.5-1.0,碳酸钙5-20,以蒸馏水定容配制,pH 6.5-7.0;

二级培养:将一级培养发酵液作为种子液以体积比1%-5%接种量接入2000L发酵罐中,发酵罐装液量为体积比70%-80%,厌氧静置培养,34-38℃恒温培养24-48h,当发酵液pH降至4.0-5.0,培养结束,得到发酵液;

二级发酵培养基组成以g/L计:红糖15-25,酵母膏0.5-1.0, $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5-1.0,以蒸馏水定容配制,pH 6.5-7.0;

(3) 具有水产病原菌拮抗特性的格氏乳杆菌制剂的制备:

粉剂的制备:将步骤(2)所得发酵液经高速离心收集湿菌体,湿菌体与脱脂奶粉及淀粉以质量比1:2-5:2-5进行混合,经真空干燥24-48h,粉碎机粉碎,过0.9mm筛,包装,抽真空,得到菌粉制剂;

水剂的制备:将步骤(2)所得发酵液进行灌装,获得菌液水剂。

3. 根据权利要求2所述制备具有水产病原菌拮抗特性制剂的方法,其特征在于:步骤(3)中所述菌粉制剂菌浓度不低于 $5.0 \times 10^9$  CFU/g;所述菌液水剂菌浓度不低于 $5.0 \times 10^8$  CFU/mL。

4. 根据权利要求2所述制备具有水产病原菌拮抗特性制剂的方法,其特征在于:采用粉剂和水剂配合使用,用作水产养殖水质改良剂;所述粉剂按50~100g/亩·米的用量全池泼洒,水剂按50-200mL/亩·米的用量全池泼洒。

## 一种具有水产病原菌拮抗特性的格氏乳杆菌制剂的制备及应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种具有水产病原菌拮抗特性的格氏乳杆菌制剂的制备及应用,属于微生物技术领域。

### 背景技术

[0002] 近些年来,我国的水产动物养殖发展迅猛,极大地丰富了人们的物质生活。随着养殖业集约化程度的不断提高,各种病害频繁发生,各类化学药物及抗生素滥用,由此产生的病原菌耐药性问题、动物体内菌群失调以及抗生素残留问题越来越严重,使得抗生素成为全球性的污染物,其巨大的负面效应给养殖者带来了严重的经济损失,给消费者的食品安全带来了可怕隐患,也阻碍了世界养殖业的可持续发展。微生物制剂在这样的市场需求下应运而生。微生物制剂中的活菌进入水体或水生动物体内后,可以修复与调控动物体内外的微生态环境,抑制病害的发生,促进动物生长,增强动物免疫机能,提高抗病能力,以及改善水产品的肉质和风味,利用微生物制剂来调节动物体内的微生态平衡,恢复机体正常生理功能,防治病害,增进健康,正逐渐成为世界范围内的热点。

[0003] 乳酸菌 (*Lactic acid bacteria, LAB*) 是一类能利用可发酵糖产生乳酸的细菌的总称,是目前应用最为广泛的益生菌,为动物和人的胃肠道中的优势菌群,在鱼的肠道中也是正常的菌群成员。乳杆菌作为乳酸菌其中一个属,目前,已有报道可促进养殖鱼类生长提高免疫能力的乳杆菌有植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)、鼠李糖乳杆菌 (*L. rhamnosus*)、嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*)、乳酸链球菌 (*Lactococcus lactis*)、乳酸片球菌 (*Pediococcus acidilactici*)、干酪乳杆菌 (*L. casei*) 和粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) 等。乳酸菌在水产养殖上的作用机制主要表现为:一方面可以作为水质改良剂泼洒到水体中起到净化水质的效果;另一方面,由于其较好的定植能力,可以通过其自身的生长繁殖及代谢,降低肠道pH值,抑制有害菌的生长,起到改善胃肠道环境的作用,对水产动物疾病的预防和治疗以及免疫力的提高有一定的效果。如张孝东等提供三株乳酸菌菌株胚芽乳杆菌BCRC 910435、戊糖片球菌BCRC 910480以及发酵乳杆菌LF26的混合物提升水产养殖池的溶氧量。沈锦玉等提供了一株植物乳杆菌GRLP-25可以对水产动物养殖中出现的病原菌(菌阴沟肠杆菌、费氏柠檬酸杆菌、普通变形杆菌、嗜水气单孢菌、副溶血弧菌和哈维氏弧菌)具有敏感的抑菌活性,并且能提高水产动物免疫功能,提高动物健康水平,还可以降低养殖水体中部分有害因子(氨氮和亚硝酸盐)的含量,改善养殖生态环境。由于乳杆菌多属厌氧菌,大多营养要求高,难扩培,不易保存、易失活、使用成本高等问题,在水产养殖实践中存在一定的应用局限性。

[0004] 目前在水产养殖中主要使用好氧芽孢杆菌来拮抗水产病原菌及净化水质,容易出现因过度使用好氧芽孢而造成养殖水体缺氧的弊端,急需不与水产养殖动物争夺氧气的厌氧有益菌,尤其是缺乏成本低且具有广谱拮抗水产常见病原菌及净化水体多种污染物,促进养殖动物生长的乳杆菌菌种及其制剂。

[0005] 格氏乳杆菌 (*Lactobacillus gasseri*) 是一种人类肠道和阴道中的内在菌, 杆状、圆端, 有时呈链状, 大小为  $(0.6-0.8) \times (3.0-5.0) \mu\text{m}$ , 革兰氏阳性菌, 目前已被卫生部批准作为益生菌在食品中应用, 同时也被美国食品药品监督管理局 (FDA) 表列安全菌种之一。格氏乳杆菌有多种益生功能, 如格氏乳杆菌可以在女性阴道中分泌产生 lactocillin, 以此来杀灭阴道中的致病菌; 格氏乳杆菌细胞壁可以调节因致病菌引起的不良炎症反应; 格氏乳杆菌可以拮抗幽门螺杆菌感染等。

[0006] 目前格氏乳杆菌多应用于食品及医药卫生领域, 张文杰将格氏乳杆菌用于预防和/或治疗阴道炎的药物、阴道护理用品、外生殖器卫生用品中, 有效实现对多种致病菌的拮抗作用。泽田大辅等提供格氏乳杆菌及衍生株的制备方法, 制备含有衍生株、菌体处理物或混合物作为有效成分的压力性肠紊乱减轻剂, 应用于食品添加剂、动物添加剂、动物饲料和药物组合物。目前, 有关格氏乳杆菌在水产养殖中的应用尚无专利报道。本发明提供一种具有水产病原菌拮抗特性的格氏乳杆菌 (*Lactobacillus gasseri*) 及其制剂在水产养殖中的应用。格氏乳杆菌 88 营养要求简单, 规模化发酵培养基仅需红糖、酵母膏等简单组分, 耐氧, 非严格厌氧培养, 易培养, 规模化扩培成本低, 水剂及菌粉制剂制备成本低, 易于推广应用。格氏乳杆菌 88 具有广谱拮抗水产常见病原菌及水质净化调控的双重作用, 在水产养殖的病害防治及水质净化方面具有广阔的应用前景。

## 发明内容

[0007] 本发明的目的是提供一种具有水产病原菌拮抗特性的格氏乳杆菌 (*Lactobacillus gasseri*) 制剂的制备及应用, 其具有拮抗作用, 能够净化养殖水体, 还能够促进水产养殖动物生长。

[0008] 本发明的技术方案, 一株格氏乳杆菌菌株 88, 分类命名为格氏乳杆菌 (*Lactobacillus gasseri*), 保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 CGMCC, 地址北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所, 保藏日期 2018 年 12 月 19 日, 保藏编号 CGMCC No.17004。

[0009] 本发明的格氏乳杆菌菌株 88, 革兰氏阳性菌, 镜检呈杆状, 不产生孢子, 该菌株属于非严格厌氧菌, 生长温度范围广,  $20^{\circ}\text{C}-45^{\circ}\text{C}$  均能生长。在 LB 平板上菌落直径为 0.5-1.0mm, 形态规则, 表面光滑、不透明、无色素。在 MRS 培养基上可得大量圆形、表面光滑、不透明、白色的菌落。

[0010] 本发明涉及格氏乳杆菌 88 属于非严格厌氧菌, 能够在养殖池塘水体及底泥中生长, 在淡水养殖中对多种水产常见病原菌 (鳃利斯顿氏菌、爱德华氏菌、副溶血性弧菌、大肠杆菌、溶藻弧菌、豚鼠气单胞菌、维氏气单胞菌、嗜水气单胞菌) 有广谱拮抗作用, 其中对鳃利斯顿氏菌、副溶血弧菌、溶藻弧菌、嗜水气单胞菌、维氏气单胞菌、豚鼠气单胞菌的拮抗作用显著。同时该菌株还能够有效降解水体中的 COD、氨氮、亚硝酸盐、总磷、总氮的含量, 促进水产养殖动物的生长, 是一种新型的多功能微生物。

[0011] 所述菌株制备具有水产病原菌拮抗特性的制剂的方法, 步骤如下:

[0012] (1) 菌种活化: 无菌开启格氏乳杆菌 88 的冻干保藏菌种, 接种于装有 MRS 肉汤的试管中, 于  $34-38^{\circ}\text{C}$  静置培养 24-48h, 然后转接于 MRS 肉汤三角瓶中,  $34-38^{\circ}\text{C}$  培养 24-48h。反复活化 2-3 次, 镜检, 计数, 当菌体浓度  $>10^8 \text{CFU/mL}$ , 作为种子液;

[0013] MRS肉汤培养基组成以g/L计:酪蛋白酶消化物 10,牛肉膏粉 10,酵母膏粉 4,柠檬酸三铵 2,乙酸钠 5,硫酸镁 0.2,硫酸锰 0.05,磷酸氢二钾 2,葡萄糖 20,吐温-80 1.08,以蒸馏水定容配制,pH  $5.7 \pm 0.2$ 。

[0014] (2)发酵培养:

[0015] 一级培养:将步骤(1)所得种子液以体积比1%-10%接种量接入装有发酵培养基的100L发酵罐中,发酵罐装液量为体积比70%-80%,厌氧静置培养,34-38℃恒温培养24-48h,得到一级培养发酵液;

[0016] 一级发酵培养基组成以g/L计:蛋白胨 5-15,酵母膏 5-15,葡萄糖5-20,番茄汁 50-200,磷酸氢二钾 1-5,吐温-80 0.5-1.0,碳酸钙5-20,以蒸馏水定容配制,pH 6.5-7.0。

[0017] 二级培养:将一级培养发酵液作为种子液以体积比1%-5%接种量接入2000L发酵罐中,发酵罐装液量为体积比70%-80%,厌氧静置培养,34-38℃恒温培养24-48h,当发酵液pH降至4.0-5.0,培养结束,得到发酵液;

[0018] 二级发酵培养基组成以g/L计:红糖15-25,酵母膏0.5-1.0, $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5-1.0,以蒸馏水定容配制,pH 6.5-7.0。

[0019] (3)具有水产病原菌拮抗特性的格氏乳杆菌制剂的制备:

[0020] 粉剂的制备:将步骤(2)所得发酵液经高速离心收集湿菌体,湿菌体与脱脂奶粉及淀粉以质量比1:2-5:2-5进行混合,经真空干燥24-48h,粉碎机粉碎,过0.9mm筛,包装,抽真空,得到菌粉制剂;获得的菌粉制剂的菌浓度不低于 $5.0 \times 10^9$ 个(CFU)/克。

[0021] 水剂的制备:将步骤(2)所得发酵液进行灌装,获得菌液水剂;获得的菌液水剂的菌浓度不低于 $5.0 \times 10^8$ 个(CFU)/mL。

[0022] 用所述方法制备的格氏乳杆菌制剂的应用:粉剂和水剂配合使用用作水产养殖水质改良剂,粉剂按50-100g/亩·米的用量全池泼洒,水剂按50-200mL/亩·米的用量全池泼洒。

[0023] (4)抑菌性测定:将致病菌与格氏乳杆菌88菌液共同接入MRS肉汤中,使培养基中格氏乳杆菌起始菌浓度为 $10^5$ CFU/mL,致病菌起始菌浓度为 $10^7$ CFU/mL,30℃静置培养48h,于0h、24h、48h取样计数,观察格氏乳杆菌对致病菌的拮抗作用。

[0024] 本发明的有益效果:格氏乳杆菌88营养要求简单,规模化发酵培养基仅需红糖、酵母膏等简单组分,耐氧,非严格厌氧培养,易培养,规模化扩培成本低,水剂及菌粉制剂制备成本低,易于推广应用。

[0025] 格氏乳杆菌88对水产常见病原菌具有广谱拮抗特性,能够有效抑制鳃利斯顿氏菌、爱德华氏菌、副溶血性弧菌、大肠杆菌、溶藻弧菌、豚鼠气单胞菌、维氏气单胞菌、嗜水气单胞菌的生长,其中对鳃利斯顿氏菌、副溶血弧菌、溶藻弧菌、嗜水气单胞菌、维氏气单胞菌、豚鼠气单胞菌的抑制效果尤为显著。因此,在水产养殖中使用格氏乳杆菌88制剂能够有效防控由病原菌引发的水产养殖动物病害,保护水生动物健康生长。

[0026] 格氏乳杆菌制剂作为水产养殖水质改良剂能够有效降低水体中的污染物含量,改善养殖水质。

[0027] 格氏乳杆菌菌粉作为渔业养殖饲料添加剂能够显著提高水生动物的增重率、特定增长率,显著降低饵料系数。

## 附图说明

[0028] 图1是格氏乳杆菌菌株88基于16S rRNA基因序列比对结果以*Listeria monocytogenes* ATCC 19114 (JF967620.1)为外枝构建的Neighbor-Joining系统发育树。

## 具体实施方式

[0029] 实施例1:菌种的筛选

[0030] 在无锡鹅湖养殖池塘采集异育银鲫样品,将鱼体解剖取肠道,加入生理盐水,研磨制成匀浆液,取移液枪吸取0.1mL于MRS固体培养基上,涂布,覆盖一层培养基,37℃培养。根据菌落大小选取生长良好的菌落反复接种筛选,直至得到均匀的单个菌落,命名为88。

[0031] 实施例2:菌种鉴定

[0032] (1)形态特征:格氏乳杆菌菌株88,革兰氏染色为阳性,呈球形或卵圆形,(0.5-1.2)μm×(0.5-1.5)μm,无芽孢,无荚膜,不运动。在MRS平板上菌体呈短杆状,二端呈圆形,通常单独出现,成对短链状。

[0033] (2)生化特性:格氏乳杆菌菌株88,革兰氏染色为阳性,能产生H<sub>2</sub>S,丙酮酸盐、色氨酸、明胶、葡萄糖、蔗糖,苦杏仁苷为阳性。

[0034] 该菌株能利用半乳糖、葡萄糖、甘露糖、乳糖、七叶灵、柳醇、纤维二糖、麦芽糖、N-乙酰-葡萄糖胺、蔗糖、海藻糖、牻牛儿糖、D-塔格糖发酵产酸。

[0035] (3)16S rRNA序列分析和系统发育树的构建:格氏乳杆菌菌株88的16S rRNA基因序列,16S rRNA 基因长度为1149bp,如SEQ ID NO.1所示;与从GenBank中已知的核酸序列进行Blast分析,挑选同源性较高的序列在Cluster X软件完成序列比对,比对结束后使用MEGA 4.1软件构建系统发育树。

[0036] 格氏乳杆菌菌株88基因序列测序结果:将菌株所扩增的16S rRNA基因序列在NCBI通过Blast进行同源性检索,结果检索出为乳杆菌属的16S rRNA基因序列,采用邻接法构建菌株分子发育树,分离菌株在系统发育树上与格氏乳杆菌(*Lactobacillus gasseri* ATCC 33323) (登录号:CP000413) 属同一支(见图1)。结合形态学和生理生化特征将所分离菌株鉴定为格氏乳杆菌。

[0037] 实施例3:抑菌性测定

[0038] 将致病菌与格氏乳杆菌88菌液共同接入MRS培养基中,30℃静置培养48 h,于0 h、24 h、48 h取样计数,观察格氏乳杆菌对致病菌的拮抗作用。测定结果如表1所示:

[0039] 表1格氏乳杆菌88与致病菌的共培养测定结果(CFU/mL)

菌种	0h		24h		48h	
	88	致病菌	88	致病菌	88	致病菌
鳎利斯顿氏菌+88	9.5E+05	2.7E+07	1.7E+09	4.9E+06	1.1E+08	1.0E+04
鳎利斯顿氏菌		2.7E+07		4.6E+08		<10 <sup>5</sup>
爱德华氏菌+88	9.5E+05	2.4E+07	2.0E+09	2.0E+07	2.7E+08	2.0E+05
爱德华氏菌		2.4E+07		6.5E+08		2.5E+08
副溶血性弧菌+88	9.5E+05	2.4E+07	1.8E+09	1.4E+06	1.7E+08	1.0E+04
副溶血性弧菌		2.4E+07		4.3E+08		5.0E+06
大肠杆菌+88	9.5E+05	2.4E+07	1.7E+09	2.4E+08	3.0E+08	6.6E+04
大肠杆菌		2.4E+07		7.3E+08		1.4E+07
溶藻弧菌+88	9.5E+05	3.3E+07	4.8E+07	4.5E+06	3.6E+07	5.0E+02
溶藻弧菌		3.3E+07		5.7E+08		<10 <sup>5</sup>
维氏气单胞菌+88	9.5E+05	2.5E+07	1.1E+09	2.0E+04	3.2E+08	<10 <sup>3</sup>
维氏气单胞菌		2.5E+07		8.9E+08		7.6E+07
豚鼠气单胞菌+88	9.5E+05	2.2E+07	9.6E+08	<10 <sup>3</sup>	7.8E+07	<10 <sup>3</sup>
豚鼠气单胞菌		2.2E+07		5.5E+07		3.8E+06
嗜水气单胞菌+88	9.5E+05	2.2E+07	6.9E+08	2.0E+04	3.4E+06	<10 <sup>3</sup>
嗜水气单胞菌		2.2E+07		1.7E+07		2.4E+06
88	9.5E+05		7.4E+08		6.4E+07	

[0041] 由表1可知,低浓度(9.5E+05)的格氏乳杆菌88对高浓度的不同种类的致病菌生长均能起到一定的抑制作用。共培养至24h,格氏乳杆菌88对鳎利斯顿氏菌、副溶血弧菌、溶藻弧菌、嗜水气单胞菌、维氏气单胞菌、豚鼠气单胞菌的抑制效果显著。共培养至48h,格氏乳杆菌88菌浓虽然较24h有所下降,但仍能够显著抑制致病菌的生长,至培养后期,致病菌菌浓均大幅降低。

[0042] 实施例4:格氏乳杆菌制剂的制备

[0043] 菌种活化:无菌开启格氏乳杆菌88的冻干保藏菌种,接种于装有MRS肉汤的试管中,于36±2℃静置培养24-48 h,然后转接于MRS肉汤三角瓶中,36±2℃培养24-48h。反复活化2-3次,镜检,计数,当菌体浓度>10<sup>8</sup>CFU/mL,作为种子液;

[0044] MRS肉汤培养基组成以g/L计:酪蛋白酶消化物 10,牛肉膏粉 10,酵母膏粉 4,柠檬酸三铵 2,乙酸钠 5,硫酸镁 0.2,硫酸锰 0.05,磷酸氢二钾 2,葡萄糖 20,吐温-80 1.08,以蒸馏水定容配制,pH 5.7±0.2。

[0045] 发酵培养:

[0046] 一级培养:将步骤(1)所得种子液以体积比1%-10%接种量接入装有发酵培养基的100L发酵罐中,发酵罐装液量为体积比70%-80%,厌氧静置培养,36±2℃恒温培养24-48h,得到一级培养发酵液;

[0047] 一级发酵培养基组成以g/L计:蛋白胨 5-15,酵母膏 5-15,葡萄糖5-20,番茄汁

50-200,磷酸氢二钾 1-5,吐温-80 0.5-1.0,碳酸钙5-20,以蒸馏水定容配制,pH 6.5-7.0。

[0048] 二级培养:将一级培养发酵液作为种子液以体积比1%-5%接种量接入2000L发酵罐中,发酵罐装液量为体积比70%-80%,厌氧静置培养,36±2℃恒温培养24-48h,当发酵液pH降至4.0-5.0,培养结束,得到发酵液;

[0049] 二级发酵培养基组成以g/L计:红糖 15-25,酵母膏 0.5-1.0,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5-1.0,以蒸馏水定容配制,pH 6.5-7.0。

[0050] (3) 格氏乳杆菌制剂的制备:

[0051] 粉剂的制备:10000rpm高速离心步骤(2)所得发酵液收集湿菌体,湿菌体与脱脂奶粉以及干淀粉以质量比1:2:2进行混合,经真空干燥24-48h,粉碎机粉碎,过0.9mm筛,包装,抽真空,得到菌粉制剂;获得的菌粉制剂的菌浓度不低于5.0×10<sup>9</sup>个(CFU)/克。

[0052] 水剂的制备:将步骤(2)发酵培养获得的格氏乳杆菌菌液进行灌装,封盖,获得获得菌液水剂;菌液水剂的菌浓度不低于5.0×10<sup>8</sup>个(CFU)/mL。

[0053] 实施例5:格氏乳杆菌制剂净化水质方面的应用

[0054] 随机选取养殖河蟹池塘6个,3个为试验组,3个为对照组。池塘水面积均为20亩,平均水深1米,试验池晴天巡塘时泼洒格氏乳杆菌制剂(粉剂),50-100g/亩·米,每隔5天使用1次,同时全池泼洒格氏乳杆菌(水剂),50-200mL/亩·米,每隔10天使用1次,对照池不添加菌剂。

[0055] 表2 格氏乳杆菌对养殖青鱼池塘水质的影响(mg/L)

指标	试验前	试验后	
		对照组	试验组
COD	108.0±0.0 <sup>a</sup>	91.7±8.5 <sup>a</sup>	54.7±7.5 <sup>b</sup>
氨氮	0.48±0.00 <sup>a</sup>	0.55±0.055 <sup>a</sup>	0.38±0.024 <sup>b</sup>
亚硝酸盐	0.73±0.00 <sup>a</sup>	0.68±0.05 <sup>a</sup>	0.58±0.05 <sup>c</sup>
总磷	1.05±0.05 <sup>b</sup>	1.54±0.06 <sup>a</sup>	0.49±0.07 <sup>c</sup>
总氮	3.82±0.0 <sup>a</sup>	3.55±0.3 <sup>a</sup>	1.23±0.1 <sup>b</sup>

[0056] 注:同一行数据中有不同字母表示差异显著 ( $P<0.05$ )。

[0058] 从表2中可以看出,试验组各项水质指标较试验前均显著降低( $P<0.05$ ),且明显低于对照组( $P<0.05$ )。因此,可以说明格氏乳杆菌88能够有效降低水体中的污染物含量,改善养殖水质,能够作为水质净化剂应用于水产养殖。

[0059] 实施例6:格氏乳杆菌菌粉制剂的养殖应用

[0060] 试验用异育银鲫幼鱼采用循环流水控温系统进行养殖。试验选择健康、规格、重量基本一致的异育银鲫,初始体重为(19.6±1.01)g的异育银鲫随机分为3组,每组3个平行,每个平行30尾鱼。对照组饲喂基础日粮为鲫鱼商品料,由通威公司提供(表3)。试验日粮为基础日粮分别添加0.3%-0.5%格氏乳杆菌粉剂(实施例4中制备)。

[0061] 饲养管理:试验前,先用基础饲料驯养2周后进行正式试验。试验期间,每天投喂2次(8:00-8:30,15:30-16:00),直至表观饱食为止,日投饵量为鱼体重的3%-4%,并且根据生长和摄食的情况作适当调整。每日定时测定水温、pH、氨氮、溶氧,养殖期间水温为23℃左

右,pH7.6-7.8,溶氧大于7.5 mg/L,氨氮小于0.01 mg/L。待投喂试验日粮30d时称重等。

[0062] 具体实验数据如表3和表4所示。

[0063] 表3 异育银鲫基础日粮

日粮组成 Diet ingredients	含量/% Content/%
鱼粉 Fish meal	9
豆粕 Soybean meal	20
棉粕 Cotton meal	10
菜粕 Rapeseed meal	23
小麦 Wheat	16
大豆油 Soybean oil	3
酒糟蛋白(DDGS) Lees protein	8
米糠 Rice bran	10
添加剂 Additive	1
合计 Total	100

[0065] 表4 饲喂格氏乳杆菌制剂对异育银鲫幼鱼生长性能的影响 (n=3)

	对照组	格氏乳杆菌饲喂组
增重率 WG/(%)	62.31±3.28 <sup>a</sup>	92.23±6.31 <sup>b</sup>
特定生长率 SGR/(%/d)	1.02±0.38 <sup>a</sup>	1.71±0.05 <sup>b</sup>
饵料系数 FCR	1.76±0.25 <sup>a</sup>	1.21±0.09 <sup>b</sup>
存活率 SR/(%)	98.4±1.31	100.00±0.00
肝体比 HSI/(%)	1.91±0.18	1.94±0.23
肥满度 CF/(%)	2.91±0.08	2.99±0.04

[0067] 养殖结果表明:与对照组相比,在基础日粮中添加格氏乳杆菌制剂能够显著提高鱼体的增重率、特定增长率 ( $P<0.05$ ),并能够显著降低饵料系数 ( $P<0.05$ ),存活率、肝体比、肥满度无显著差异 ( $P>0.05$ ),结果表明在饲料中添加格氏乳杆菌制剂能显著提高异育银鲫的生长。

[0001]	序列表	
[0002]	<110>	江苏省苏微微生物研究有限公司
[0003]	<120>	一种具有水产病原菌拮抗特性的格氏乳杆菌制剂的制备及应用
[0004]	<141>	2019-01-11
[0005]	<160>	1
[0006]	<170>	SIP0SequenceListing 1.0
[0007]	<210>	1
[0008]	<211>	1149
[0009]	<212>	RNA
[0010]	<213>	2 <i>Ambystoma laterale</i> x <i>Ambystoma jeffersonianum</i>
[0011]	<400>	1
[0012]	ggcaacagca gcgagcgagc gccagagaag ggcgcaccaa agaaacagaa caagcgagcg	60
[0013]	gcggacgggg agaacacggg gaaccgcca agagacggga aacaccggaa acagagcaaa	120
[0014]	ccggaacaa cacagacgca gcagagaaaa gaggcgcaca ccggaggacc gcgggcaaac	180
[0015]	aggaaggaa cggcaccaag gcaagagcaa gccgaagaaa gacgacggcc acagggacga	240
[0016]	aacacggccc aaaccacgg gaggcagcag agggaaacca caaggacgca agcgaggagc	300
[0017]	aacgccgagg aggaagaagg gcggccgaaa gccgggagga agaaagaaga ggagaacggc	360
[0018]	cagacgaaa caaaaagcac ggcaacacgg ccagcagccg cggaaacgaa gggcaagcgg	420
[0019]	ccggaagggc gaaagcgagg caggcggcaa aagcgaggaa agcccggcca accggagaag	480
[0020]	cacagaaacg gaacgaggca gaagaagaga gggaaccag gagcggggaa gcgagaaagg	540
[0021]	aagaacacca gggcgaaggc ggcccggcgc aacgacgcga ggccgaaagc agggagcga	600
[0022]	caggaagaac ccggagccag ccgaaacgag aggcaagggg gaggccgcc caggcgcagc	660
[0023]	aacgcaaagc accgccggg gagacgaccg caagggaac caaaggaaga cgggggccc	720
[0024]	cacaagcggg gagcagggaa cgaagcaacg cgaagaacca ccaggcgaca ccaggcaaac	780
[0025]	caagagaagg agccccggg acgcgagaca gggggcaggc gcgcagccgg cggagagggg	840
[0026]	aagcccga cgcagcgaac ccgcaaggcc acaaaggggc accaagagac gccgggaca	900
[0027]	accggaggaa ggggggagac gcaagcacag cccagaccg ggcacacacg gcacaaggac	960
[0028]	ggacaacgag aagcgaaccg cgaaggcaag cggaccgaaa gccgccagcg gacgaggcgc	1020
[0029]	aaccgccaca cgaagcggaa cgcagaacgc ggacagcacg ccgcgggaaa cgcccgggc	1080
[0030]	gacacaccgc ccgcacacca gagagcgaac acccaaagcc gggggaaacc aaggagcagc	1140
[0031]	cgcaagaga	1149

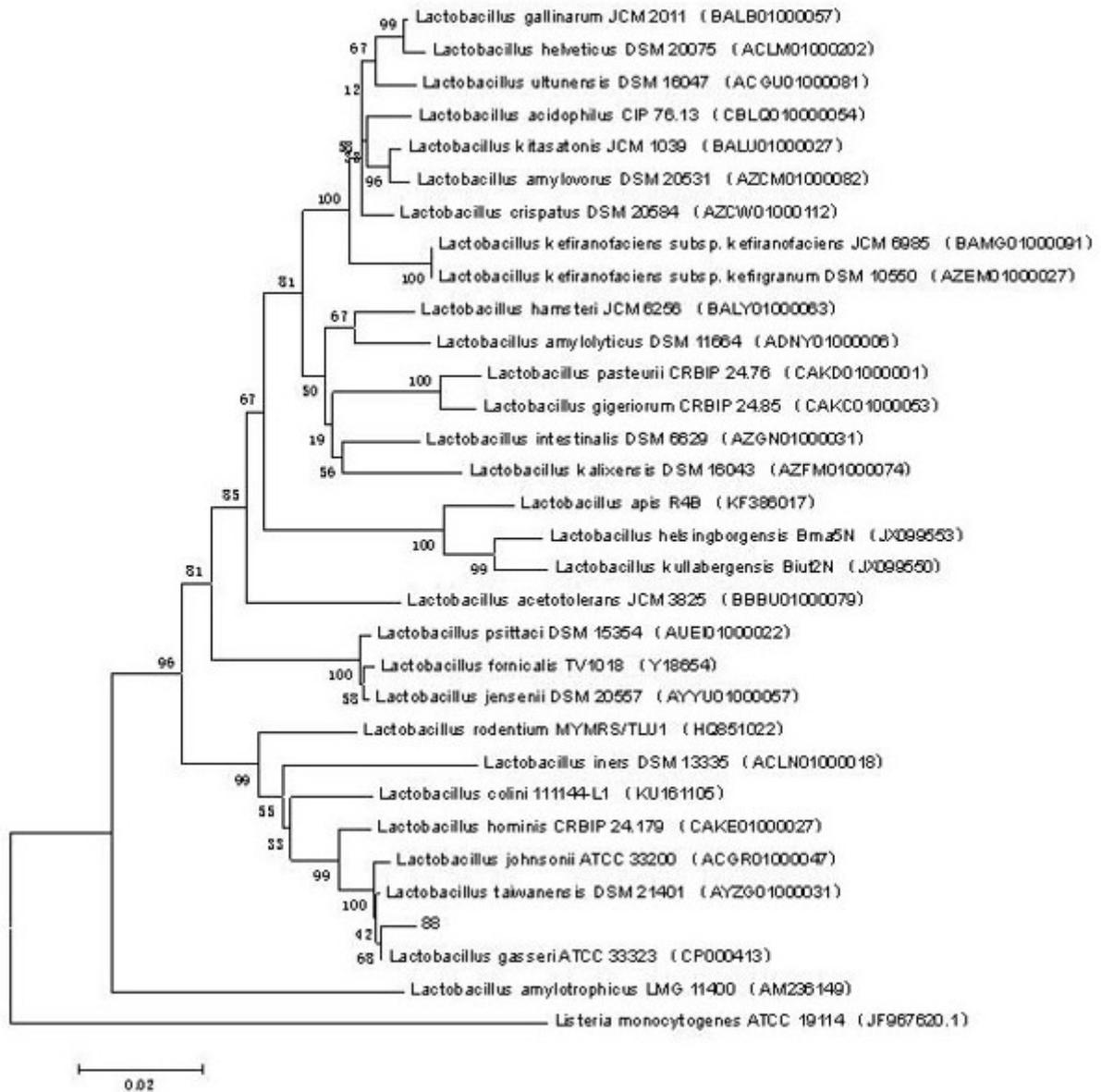


图1