



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103966118 A

(43) 申请公布日 2014. 08. 06

(21) 申请号 201310711090. 0

(22) 申请日 2013. 12. 20

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 8433 2013. 11. 05

(71) 申请人 中国水产科学研究院黄海水产研究所

地址 266071 山东省青岛市南京路 106 号

(72) 发明人 莫照兰 李贵阳 黄捷 李杰

(74) 专利代理机构 沈阳科苑专利商标代理有限公司 21002

代理人 周秀梅 李颖

(51) Int. Cl.

*C12N 1/20* (2006. 01)

*A23K 1/16* (2006. 01)

*C12R 1/07* (2006. 01)

权利要求书1页 说明书6页

序列表2页 附图1页

(54) 发明名称

解淀粉芽孢杆菌及其应用

(57) 摘要

本发明公开一株海洋解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) M001 及其应用, 所述的解淀粉芽孢杆菌 M001 保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 保藏日期 2013 年 11 月 4 日, 保藏号为 CGMCC No. 8433。该菌株分离筛选自牙鲆鱼肠道, 能明显提高养殖鱼非特异性免疫水平, 增强养殖鱼抵御细菌病原感染的能力。

1. 一种海洋解淀粉芽孢杆菌,其特征在於:海洋解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)M001 保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏日期 2013 年 11 月 5 日,保藏号为 CGMCC No. 8433。

2. 一种权利要求 1 所述的解淀粉芽孢杆菌的应用,其特征在於:所述解淀粉芽孢杆菌用于制备微生物制剂。

3. 按权利要求 2 所述的解淀粉芽孢杆菌的应用,其特征在於:所述解淀粉芽孢杆菌作为添加剂用于抑制海水鱼类病原菌、增强鱼类免疫功能的微生物制剂。

4. 按权利要求 2 或 3 所述的解淀粉芽孢杆菌的应用,其特征在於:将所述解淀粉芽孢杆菌制成干菌粉。

5. 按权利要求 4 所述的解淀粉芽孢杆菌的应用,其特征在於:

将解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)M001 在 Zobell2216E 海水固体培养基上划线,取一单菌落接种于 2216E 液体培养基中,在 25-30℃ 培养 6-8 小时,即为种子液,将所得种子液按体积比 1:100 转接于新鲜的 2216E 液体培养基,在 25-30℃、120-200rpm 培养 24-36 小时,即为发酵液;所得发酵液在 5000g 离心 30min,取菌泥在 60℃ 恒温干燥至衡重,而后与玉米淀粉混合制成干菌粉。

## 解淀粉芽孢杆菌及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及水产微生物应用技术领域,具体的说是一种解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)及其应用。

### 背景技术

[0002] 我国水产养殖产量连续十多年居世界首位,成为大农业中发展最快的产业之一。由于养殖业多年的集约式快速发展,加上养殖环境不断恶化、养殖品种抗逆性衰退,最终导致养殖动物病害频繁发生,直接造成巨大的经济损失。病害已成为限制水产养殖产业持续健康发展的瓶颈。我国水产病害的防治手段主要依赖抗生素等化学药物,由于抗生素带来的生态、环境以及食品安全等的不良影响,其在水产养殖的应用在国内外受到很多限制。益生菌是一类能够抑制病原微生物、改善养殖生态环境、调节动物体内生态平衡、增强肌体免疫功能、提高饲料利用效率等作用的有益微生物,许多商品化的益生菌制剂已在畜牧养殖业中广泛应用,以达到减少抗生素使用、控制疾病发生、促进动物生长的目的。目前用于水产养殖的益生菌多数来源于陆生环境或陆生动物,这些益生菌多数不适合在水生环境特别是海洋环境中生长和繁殖,导致其益生效应难以有效发挥。因此,从海洋环境或海洋动物中分离筛选土著菌作为益生菌来源,对保证海洋益生菌制剂的高效性和安全性特别关键。

### 发明内容

[0003] 本发明目的在于提供一种海洋解淀粉芽孢杆菌及其应用。

[0004] 为实现上述目的,本发明采用的技术方案为:

[0005] 一种海洋解淀粉芽孢杆菌,海洋解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)M001保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏日期2013年10月5日,保藏号为CGMCC No. 8433,保藏单位地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号。

[0006] 一种解淀粉芽孢杆菌的应用,所述解淀粉芽孢杆菌用于制备微生物制剂。

[0007] 所述解淀粉芽孢杆菌作为添加剂用于抑制海水鱼类病原菌、增强鱼类免疫功能的微生物制剂。

[0008] 将所述解淀粉芽孢杆菌制成干菌粉。

[0009] 进一步的,将解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)M001在Zobel12216E海水固体培养基上划线,取一单菌落接种于2216E液体培养基中,在25-30℃培养6-8小时,即为种子液,将所得种子液按体积比1:100转接于新鲜的2216E液体培养基,在25-30℃、120-200rpm培养24-36小时,即为发酵液;所得发酵液在5000g离心30min,取菌泥在60℃恒温干燥至衡重,而后与玉米淀粉混合制成干菌粉。

[0010] 海洋解淀粉芽孢杆菌,即来源于牙鲆鱼类消化道的内源性解淀粉芽孢杆菌M001,该菌株不仅有抑制病原菌的效果,还能增强养殖鱼非特异性免疫水平和抵御病原菌感染的能力。

[0011] 本发明所涉及的菌株信息如下:

[0012] 1. 来源。该菌株分离自健康牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)消化道,经高剂量注射和投喂确定对养殖大菱鲆、牙鲆、舌鳎、小白鼠等安全,无致病性。

[0013] 2. 形态学特征。革兰氏染色阳性,在 Zobel12216E 海水固体培养基上、28℃培养 2 天的菌落形态直径大小为 2~3mm,圆形,凸起,乳白色,表面粗糙,边缘不整。具有荚膜和芽孢,芽孢呈椭圆形。

[0014] 3. 生理生化特征。氧化酶反应阴性,过氧化氢酶反应阳性,鸟氨酸脱羧酶反应阴性,精氨酸双水解酶阳性,赖氨酸脱羧酶反应阳性,脲酶反应阴性,L-阿拉伯糖醇反应阴性,半乳糖酸盐反应阴性,5-酮基-葡萄糖酸钠反应阴性,脂肪酶反应阳性,酚红反应阴性, $\beta$ -葡萄糖苷反应阳性,甘露醇反应阳性,麦芽糖反应阳性,吲哚产生阴性,N-乙酰- $\beta$ -葡萄糖反应阴性, $\beta$ -半乳糖苷酶反应阴性,葡萄糖反应阳性,蔗糖反应阳性,L-阿拉伯糖反应阴性, $\alpha$ -葡萄糖反应阳性, $\alpha$ -半乳糖苷酶反应阳性,海藻糖反应阳性,鼠李糖反应阳性,肌醇反应阳性,侧金盏花醇反应阴性,帕拉金糖反应阴性, $\beta$ -葡萄糖酸酶反应阳性,纤维二糖反应阴性,山梨醇反应阳性, $\alpha$ -麦芽糖苷反应阳性,丙二酸利用阳性,L-天门冬素芳胺酶反应阳性。

[0015] 1) 16SrRNA 基因序列如 SEQ ID :1 所示。

[0016] 2) 抗生素敏感性。用药敏纸片扩散法检测解淀粉芽孢杆菌 M001 对抗生素的敏感性,结果表 1 所示,该菌对 6 种抗生素敏感。

[0017] 表 1M001 的抗生素敏感性

[0018]

抑菌圈半径 (mm)					
痢特灵	四环素	利福平	氨苄西林	丙氟哌酸	氯霉素
13.67±	6.17±	10.17±	13.67±	13.17±	15.67±
0.58	0.76	0.29	0.58	0.76	0.58
(敏感)	(敏感)	(敏感)	(敏感)	(敏感)	(敏感)

[0019] 3) 抑菌特性。利用牛津杯法检测解淀粉芽孢杆菌 M001 在 2216E 海水液体培养基的培养物上清对常见海水病原菌的抑菌作用,结果表 2 所示,该菌可以抑制迟缓爱德华氏菌、海豚链球菌、坎贝氏弧菌、鳗弧菌、副溶血弧菌、创伤弧菌。

[0020] 表 2M001 的抑菌特性

[0021]

抑菌圈直径(mm)					
海豚链球菌	迟缓爱德华氏菌	鳗弧菌	坎贝氏弧菌	创伤弧菌	副溶血弧菌
21.3±1.2	20±0	13.3±1.2	14.7±0.6	11.7±0.6	15.3±0.6

[0022] 4) 产酶特性。如表 3 所示,解淀粉芽孢杆菌 M001 能够产生较强的蛋白酶、脂肪酶、纤维素酶和淀粉酶。

[0023] 表 3M001 的产酶特性

[0024]

酶活直径 (mm)			
蛋白酶	脂肪酶	纤维素酶	淀粉酶
27.0±2.2	13.3±0.5	23.4±2.1	27.4±2.3

[0025] 5) 生长特性。如图 1—图 4 所示,解淀粉芽孢杆菌 M001 在 20℃-40℃、pH6-8、1%-4%NaCl 的条件下具有良好的生长能力(参见图 1-图 4)。

[0026] 6) 抗逆特性。解淀粉芽孢杆菌 M001 在不同浓度胆盐的生长及在人工胃液的存活情况如图 5 所示,该菌在 0.03%胆盐条件下具有良好的生长能力;在 pH4 人工胃液中作用 1 小时、3 小时后,数量分别下降了 2 个、3 个数量级,在 pH2 人工胃液作用 1 小时、3 小时后,数量均下降了 5 个数量级。结果说明该菌具有较好的耐受胆盐和胃酸的能力(参见图 5)。

[0027] 本发明所具有的优点:

[0028] 1. 本发明的海洋解淀粉芽孢杆菌 M001 制备的微生物制剂,能够抑制海水鱼类病原菌,增强鱼类免疫功能,减少疾病发生,适合水产养殖生产。

[0029] 2. 本发明的解淀粉芽孢杆菌 M001 具有生长速度快、抑菌谱广、抗逆性强等特点,生产工艺简单、成本低,具有良好的商业前景。

[0030] 3. 本发明的解淀粉芽孢杆菌 M001 来源于海洋鱼类肠道,为内源性肠道益生菌,不仅适合在海洋环境生长繁殖,而且对养殖动物和人类不存在危险,在应用方面具有高效性和安全性。

[0031] 附图说明书

[0032] 图 1 为本发明实施例提供的解淀粉芽孢杆菌 M001 的生长曲线图。培养基为 2216E 液体培养基,培养温度 25℃。

[0033] 图 2 为本发明实施例提供的解淀粉芽孢杆菌 M001 在不同温度条件下的生长图。培养基为 2216E 液体培养基, pH7.6。

[0034] 图 3 为本发明实施例提供的解淀粉芽孢杆菌 M001 在不同 pH 值条件下的生长图。培养基为 2216E 液体培养基,培养温度 25℃。

[0035] 图 4 为本发明实施例提供的解淀粉芽孢杆菌 M001 在不同 NaCl 含量条件下的生长图。培养基为 2216E 液体培养基, pH7.6,培养温度 25℃。

[0036] 图 5 为本发明实施例提供的解淀粉芽孢杆菌 M001 在不同胆盐含量条件下的生长图。培养基为 2216E 液体培养基, pH7.6,培养温度 25℃。

## 具体实施方式

[0037] 现参照下列实施例对本发明作进一步说明,实施例对本发明进行举例描述,而非以任何形式对本发明进行限制。

[0038] 实施例 1

[0039] 解淀粉芽孢杆菌 M001 的干菌粉制备:

[0040] 从 -80℃保存的菌种在 2216E 海水固体培养基划线,在 25℃-30℃培养,挑取单菌

落接种在 2216E 海水液体培养基摇瓶培养 6-8 小时后获得种子液,所得种子液按体积比为 1:100 的比例转接在新鲜的 2216E 海水液体培养基中,在 25-30℃、120-200rpm 发酵培养 24-36 小时获得发酵液,所得发酵液在 5000g 离心 30min,收获菌泥在 60℃恒温干燥至衡重,所得细菌与玉米淀粉按重量 1:5 的比例混合制成干菌粉,每克干菌粉的 M001 活菌数不低于 10<sup>12</sup>CFU。

[0041] 所述的 2216E 海水培养基的组成,按质量百分比为:蛋白胨 0.5%,酵母粉 0.1%,硫酸亚铁 0.01%,其余为陈海水。

[0042] 实施例 2

[0043] 解淀粉芽孢杆菌 M001 干菌粉的应用:

[0044] 步骤 1) 饲料制备。将解淀粉芽孢杆菌 M001 干菌粉添加在鱼类基础饲料(按质量百分比为:鱼粉 40%、花生仁粕 10%、大豆粕 10%、菜籽粕 8.4%、面粉 26%、鱼油 2%、预混料 2%)中,配制成每克饲料含活解淀粉芽孢杆菌 M001 在 10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup>CFU 的有益菌饲料,以蛋清为粘合剂,加适量水混合,用小型绞肉机挤压制成颗粒饲料,在 60℃烘干至水分含量低于 10%,分袋包装保存在 4℃备用。

[0045] 步骤 2) 大菱鲆养殖。平均体重为 40.7g 的健康大菱鲆 180 尾,暂养在循环水养殖系统 2 周后随机分为实验组和对照组两个处理组,每个处理组 3 个平行,每个平行组放鱼 30 尾。实验组投喂 M001 益生菌饲料,对照组投喂基础饲料,每日投喂饲料 2 次,日投饵量为鱼总体重的 3%;每日换水 1 次,日换水量 1/3。每隔 2 周停食 24 小时,对每组鱼称重以矫正日投喂量。实验期间养殖水温 16-18℃,连续充气。整个养殖试验周期为 6 周。

[0046] 步骤 3) 血清免疫指标检测。步骤 2) 试验鱼在养殖第 6 周时,从每组鱼随机取 5 尾鱼采血制备血清,检测血清溶菌酶活力、一氧化氮合成酶活力、超氧化物歧化酶活力、酸性磷酸酶活力、碱性磷酸酶活力、血清总蛋白含量。结果如表 4 所示,实验组鱼的血清在一氧化氮合成酶和超氧化物歧化酶活力、总蛋白含量方面显著高于对照组。因此,解淀粉芽孢杆菌 M001 干粉制剂能增强大菱鲆血液的非特异性免疫因子能力。

[0047] 表 4 大菱鲆血清免疫指标

[0048]

	酶活力 (单位/ml)					总蛋白 (mg/ml)
	溶菌酶	一氧化氮 合成酶	超氧化物 歧化酶	酸性磷酸 酶	碱性性磷 酸酶	
对照组	114.5±14.7	34.6±7.5	33.7±3.2	2.43±0.35	2.36±0.31	33.7±2.8
实验组	112.7±13.8	43.9±8.3*	44.8±3.6*	2.54±0.24	2.74±0.22	37.8±4.2*

[0049] \* p < 0.05

[0050] 步骤 4) 消化酶活力检测。同步采集步骤 3) 样品鱼的胃、肠道、肝脏检测蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶活力。结果如表 5 所示,实验组鱼肠道蛋白酶活力明显高于对照组鱼;同时,实验组鱼肝脏的蛋白酶和脂肪酶活力也明显高于对照组鱼。因此,解淀粉芽孢杆菌 M001 干粉能增强消化系统的部分酶活力。

[0051] 表 5 大菱鲆消化道及肝脏消化酶活力

[0052]

		酶活力检测 ( 单位/mg 蛋白 )		
组织		蛋白酶	脂肪酶	淀粉酶
胃	对照组	2.3±0.2	3.2±0.3	0.037±0.002
	实验组	2.2±0.1	4.2±0.5	0.031±0.002
肠	对照组	2352.7±78.2	66.3±11.7	0.175±0.03
	实验组	3648.4±63.1*	56.7±22.4*	0.287±0.04
肝	对照组	412.5±73.2	18.7±0.6	0.27±0.06
	实验组	843.7±17.3*	33.9±0.5*	0.28±0.06

[0053] \* p < 0.05

[0054] 步骤 5) 养殖大菱鲆的抗病力。取活的鳃弧菌 M3 株细胞用无菌海水悬浮至浓度为  $4.8 \times 10^4$  CFU/mL, 即为攻毒菌液, 取步骤 2) 的各组实验鱼, 各组取鱼 25 尾, 每尾腹部肌肉注射 100  $\mu$ l 上述攻毒菌液。14 天后, 统计各组鱼的累积死亡率: 实验组为 (33.3 ± 2.5)%, 对照组为 (89.3 ± 8.3) %。因此, 解淀粉芽孢杆菌 M001 大干菌粉能提高大菱鲆抵御鳃弧菌感染的能力。

[0055] SEQ ID :1

[0056] CTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTG  
 [0057] AGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGG  
 [0058] ATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGAC  
 [0059] CCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTG  
 [0060] AGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGG  
 [0061] GAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGA  
 [0062] TCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTAC  
 [0063] CTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT  
 [0064] GTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAAGCCCCG  
 [0065] GCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACCTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCC  
 [0066] ACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTC  
 [0067] TGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAKCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC  
 [0068] GCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATT  
 [0069] AAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGCA  
 [0070] CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCCTACCAGGTCTTGACATCC  
 [0071] TCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTC  
 [0072] GTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTG  
 [0073] CCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAAACCGAGGAAGGTGGGGATGAC  
 [0074] GTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGC  
 [0075] AGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAAC  
 [0076] TCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCC

[0077] GGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAAC

[0078] CTTT TAGGAGCCAGCCCGCGAA



[0001]

Untitled1.ST25.txt

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; 中国水产科学研究院黄海水产研究所

&lt;120&gt; 解淀粉芽孢杆菌及其应用

&lt;130&gt;

&lt;160&gt; 1

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1430

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 淀粉芽孢杆菌M001

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; DNA

&lt;222&gt; (I), (1430)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 1

```

cfaatacatg caagtcgagc ggacagatgg gagcttgctc cctgatgtta gggcgggacg      60
ggtagtaac acgtgggtaa cctgcctgta agactgggat aactcggga aaccggggct      120
aataceggat ggttgttga accgcattgt tcagacataa aaggtggett cggctaccac      180
ttacagatgg acccggcg cattagctag ttggtgaggt aacggctcac caagcgacg      240
atgcgtagcc gacctgagag ggtgatcggc cacactggga ctgagacacg gccagactc      300
ctacgggagg cagcagtagg gaattcttcg caatggacga aagtctgacg gagcaacgcc      360
gcgtgagtga tgaaggtttt cggatcgtaa agctctgttg ttagggaaga acaagtgccg      420
ttcaaatagg gcggcacctt gacggtacct aaccagaaag ccacggctaa ctacgtgcca      480
gcagccgcgg taatfacgtag gtggcaagcg ttgtccggaa ttattggcg taaagggctc      540
gcagcggtt tcttaagctf gatgtgaaag cccccggctc aaccggggag ggtcattgga      600
aactggggaa cttgagtcca gaagaggaga gtggaattcc acgtgtagcg gtgaaatgcg      660
tagagatgtg gaggaacacc agtggcgaag gcgactctct ggtctgtaac tgacctgag      720
gagcgaakc gtggggagcg aacaggaita gataacctgg tagtcacgc cgtaaacgat      780
gagtctaaag tgtaggggg ttctccccc ttagtctgc agctaacga ttaagcactc      840
cgctfggga gtacggtcgc aagactgaaa ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag      900

```

[0002]

Untitled1.ST25.txt  
cggtaggagca tgtggtttaa ttcgaagcaa egcgaagaac cttaccaggt cttgacatec 960  
tctgacaatc ctagagatag gacgtccctt tcgggggcag agtgacaggt ggtgcatggt 1020  
tgtcgtcagc tcgtgtcgtg agatgttggg ttaagtcccg caacgagcgc aacccttgat 1080  
cttagttgcc agcattcagt tgggcactct aaggtagctg ccggtgacaa accggaggaa 1140  
ggtgggatg acgtcaaate atcatgccce ttatgaccig ggctacacac gtgetacaat 1200  
ggacagaaca aagggcagcg aaaccgcgag gttaagccaa tcccacaaat ctgttctcag 1260  
ttcggatcgc agtetgcaac tcgactgctg gaagctggaa tcgctagtaa tcgeggatca 1320  
gcatgccgcg gtgaatacgt tcccggcctt tgtacacacc gcccgteaca ccaegagagt 1380  
ttgtaacacc cgaagtcggt gaggtaacct tttaggagcc agccgccgaa 1430

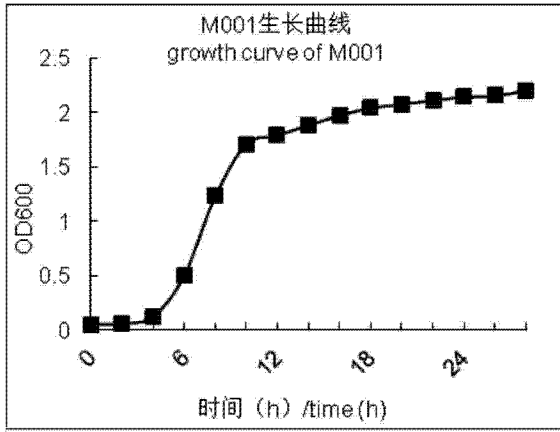


图 1

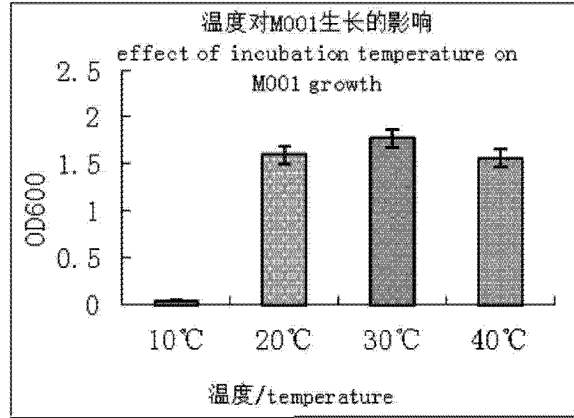


图 2

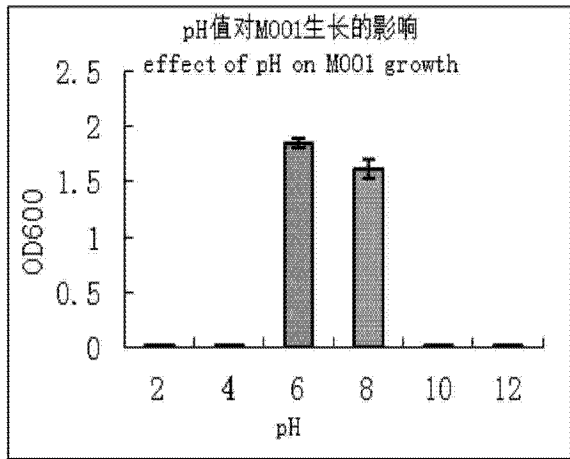


图 3

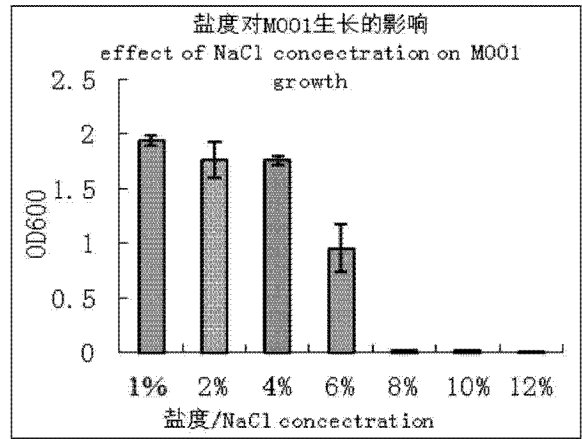


图 4

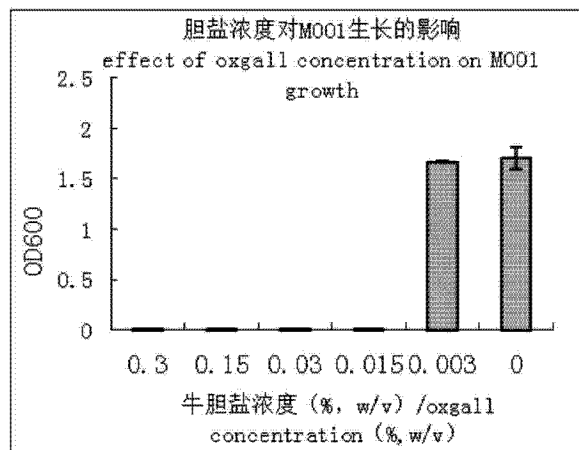


图 5