(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103497907 B
(45)授权公告日 2015.11.18

(21)申请号 201310333942.7
(22)申请日 2013.08.02
(83)生物保藏信息
CCTCC NO:M 2013292 2013.06.25
(73)专利权人 国家海洋局第三海洋研究所
地址 361005 福建省厦门市思明区大学路178号
(72)发明人 邵宗泽　王丽萍
(74)专利代理机构 厦门南强之路专利事务所（普通合伙）35200
代理人 马应森
(51)Int.Cl.
C12N 1/20(2006.01)
A23K 1/16(2006.01)
A23K 1/18(2006.01)
C02F 3/34(2006.01)
A61K 35/742(2015.01)
A61P 31/04(2006.01)
A61P 43/00(2006.01)
C12R 1/07(2006.01)

(56)对比文件
CN 86107242 A,1987.05.13, 全文.
林小涛等. 芽孢杆菌及其在对虾养殖中的应用.《水产动物无公害养殖原理与水环境调控技术 以对虾养殖为实例》.2009,112-116.
智水专栏. 芽孢杆菌在水产养殖中的作用机制.《科学养鱼》.2009,84.

审查员　周茂新

权利要求书1页　说明书8页
序列表3页　附图1页

(54)发明名称

高空芽孢杆菌在对虾养殖中的应用

(57)摘要

高空芽孢杆菌在对虾养殖中的应用，涉及水产养殖。所述高空芽孢杆菌Bacillus altitudinis1A08373的保藏编号为CCTCC NO：M2013292，分离自印度洋深海表层沉积物，可用于制备高空芽孢杆菌制剂，所述高空芽孢杆菌制剂包括致病性弧菌抑菌制剂、对虾生长促进剂、对虾饲料添加剂、对虾养殖水质改良剂中的一种。所制得的高空芽孢杆菌制剂包含的活菌数不低于1×10^{9}CFU/mL，最高可达到1×10^{10}CFU/mL以上。提高对虾消化道酶活，促进对虾生长，提高对虾抗病力，减少对虾病害发生，特别是对于对虾弧菌病害的防治和对虾产量的增加具有很好的效果。

CN 103497907 B

1.高空芽孢杆菌，其特征在于为高空芽孢杆菌 Bacillus altitudinis 1A08373，已于 2013 年 06 月 25 日保藏于中国典型培养物保藏中心，地址：中国，武汉，武汉大学；保藏编号：CCTCC NO：M 2013292。

2.如权利要求 1 所述高空芽孢杆菌在制备高空芽孢杆菌制剂中的应用，所述高空芽孢杆菌为高空芽孢杆菌 Bacillus altitudinis 1A08373。

3.如权利要求 2 所述应用，其特征在于所述高空芽孢杆菌制剂为致病性弧菌抑菌制剂、对虾生长促进剂、对虾饲料添加剂、对虾养殖水质改良剂中的一种。

4.如权利要求 2 所述应用，其特征在于所述高空芽孢杆菌制剂的制备方法的具体步骤为：将高空芽孢杆菌 Bacillus altitudinis 1A08373 按斜面、液体种子、液体发酵的顺序培养，斜面和种子培养基为常规的营养琼脂培养基或肉汤培养基；发酵培养基配方，W/V：豆饼粉 3%，淀粉 1.5%，玉米浆 1%，葡萄糖 0.5%，$(NH_4)_2SO_4$ 1%，NH_4Cl 0.1%，KH_2PO_4 0.05%，NaH_2PO_4 0.5%，$MgSO_4$ 0.05%，$MnSO_4$ 0.05%。

高空芽孢杆菌在对虾养殖中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及水产养殖,尤其是涉及一种应用于对虾养殖的制剂,具体是由高空芽孢杆菌制成的制剂在抑制弧菌,促进对虾生长,增强对虾抗病力,防治对虾弧菌病中的应用。

背景技术

[0002] 集约化、高密度水产养殖的迅猛发展,使养殖生态环境遭到严重破坏,水产养殖病害越来越复杂,发病率越来越高,危害越来越严重,抗生素饲料添加剂的使用量日益增加。2010 年,全国水产养殖面积 764 万公顷,其中有 24 万公顷遭受病害,产量损失近 30 万吨。在 95% 养殖面积中,为了防止疾病发生,生产中盲目、大规模地投放各类抗生素,如氯霉素、土霉素、呋喃唑酮等。氯霉素直接加入水中,土霉素拌饲料投喂或直接泼洒养殖水体。2000 年抗生素用量约为 16200 吨,约 70% 用于畜牧业和水产养殖业。由于药物滥用、药物残留和细菌耐药性等问题日趋严重,引发了人们对食品和环境安全的关注。寻找一种新型、安全、绿色的抗生素替代品成为当前水产研究的热点之一,其中益生菌因其具有抑菌、促生长、提高免疫等作用日益受到重视。

[0003] 微生态制剂是通过“以菌治菌”达到防治水产养殖动物病害的目地。一方面,通过有益微生物产生代谢产物和生理活性物质来抑制或者杀灭病原菌,同时在养殖水体和养殖动物肠道中与病原菌竞争营养,占据生态位,形成优势菌群,达到防治病害的目的。另一方面,有益微生物通过产生多种消化酶,帮助蛋白质、碳水化合物、脂肪的代谢,提高饲料的利用率和转化率,达到减少资源消耗和增产的目的。

[0004] 中国专利 CN101993843A 公开一种坚强芽孢杆菌菌株及其应用。坚强芽孢杆菌(Bacillus firmus)SSL065 菌株,保藏编号为 :CCTCC NO :M2010192。该菌株制备的坚强芽孢杆菌 SSL065 菌粉,可用于增强对虾细胞和体液的免疫水平。该发明的坚强芽孢杆菌 SSL065 菌株筛选自对虾消化道,是一种内源性的菌株,具有明显的提高养殖对虾非特异性免疫水平,大大增强养殖对虾抗病原菌感染力,特别是可以显著提高对虾抵御病毒病原感染能力等多种生物学功能。

[0005] 中国专利 CN102586144A 公开一种短小芽孢杆菌、益生菌制剂及其制备方法和应用。短小芽孢杆菌 (Bacillus pumilus)LV149 于 2011 年 11 月 23 日保藏于中国典型培养物保藏中心 (CCTCC),保藏编号 :CCTCC NO :M2011411。该发明的短小芽孢杆菌 (Bacillus pumilus)LV149 具有强的胞外蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶活性,对弧菌具有广泛的抑制性,且不具有溶血活性。以此菌作为发酵菌株,经固态发酵、干燥粉碎制得以短小芽孢杆菌 (Bacillus pumilus)LV149 作为活性成分的短小芽孢杆菌益生菌制剂,将其添加到对虾饲料中,饲喂对虾,不仅可以起到抑制对虾肠道病原弧菌生长、减少对虾弧菌病的发生,同时促进对虾生长、降低饵料系数、提高商品品质、缩短养殖周期,从而减少养殖风险、降低养殖成本,且生物安全性高,在水产养殖中具有广泛的应用前景。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种对于对虾弧菌病害具有较好防治效果、并能促进对虾生长的高空芽孢杆菌 Bacillus altitudinis1A08373。

[0007] 本发明的另一目的在于提供高空芽孢杆菌在对虾养殖中的应用。

[0008] 所述高空芽孢杆菌 Bacillus altitudinis1A08373 已于 2013 年 06 月 25 日保藏于中国典型培养物保藏中心,地址 :中国,武汉,武汉大学 ;保藏编号 :CCTCC NO :M2013292。

[0009] 高空芽孢杆菌Bacillus altitudinis1A08373是从印度洋深海表层沉积物分离获得,高空芽孢杆菌 Bacillus altitudinis1A08373 具有下述特征 :

[0010] 1、形态特征 :高空芽孢杆菌 Bacillus altitudinis1A08373CCTCC NO :M2013292 为杆状,大小为(0.3 ~ 0.6)μm×(1.2 ~ 1.9)μm,革兰氏阳性,能运动,有侧生鞭毛,产芽孢。在 2216E 固体培养基上 28℃培养 48h,菌落呈白色不透明,表面光滑湿润,边缘规则,菌落直径大小约为 2 ~ 3mm。

[0011] 2、生理生化特征 :菌株生长盐度范围为 0 ~ 15%,18% 以上不生长,最适范围为 1% ~ 5% ;生长 pH 范围为 5 ~ 12,最适范围为 6 ~ 8。氧化酶(+),接触酶(+),硝酸盐还原(-),吲哚试验(-),不能发酵 D- 葡萄糖产酸,明胶液化(+),尿素酶(-),β - 葡萄糖苷酶(+),β - 半乳糖苷酶(+),能利用 D- 葡萄糖、L- 阿拉伯糖、D- 甘露糖、D- 甘露醇、N- 乙酰 - 葡萄糖胺、苹果酸、柠檬酸,不能利用麦芽糖、癸酸、己二酸、苯乙酸。

[0012] API ZYM 结果显示,高空芽孢杆菌 Bacillus altitudinis1A08373 具有碱性磷酸酶、酯酶、类脂酯酶、亮氨酸氨肽酶、α - 胰凝乳蛋白酶、酸性磷酸酶、β - 葡(萄)糖苷酶,α - 甘露糖苷酶,不具有脂肪酶、缬氨酸氨肽酶、胱氨酸氨肽酶、胰蛋白酶、α - 半乳糖苷酶、β - 半乳糖苷酶、β - 葡(萄)糖苷酸酶、α - 葡(萄)糖苷酶、N- 乙酰 - 葡萄糖胺酶、α - 岩藻糖苷酶等酶活性。

[0013] 3、16S rRNA、pyrE 和 aroE 基因序列分析 :按照常规方法抽提高空芽孢杆菌(Bacillus altitudinis)1A08373 的基因组 DNA,并对 16S rRNA、pyrE 和 aroE 基因序列进行测定,高空芽孢杆菌 1A08373 的 16S rRNA、pyrE 和 aroE 基因序列如 SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2 和 SEQ ID NO.3 所示。

[0014] 经 BLAST 比对分析,高空芽孢杆菌 Bacillus altitudinis1A08373 与 Bacillusaltitudini41KF2b(T) 的 16S rDNA 序列同源性为 99.93%,与 B.pumilus ATCC7061(T) 的 16S rDNA 序列同源性为 99.67%,与 B.safensis FO-036b(T) 的 16S rDNA 序列同源性为 99.54%。pyrE 基因序列的比对结果表明,高空芽孢杆菌 Bacillus altitudinis1A08373 与 B.altitudini41KF2b(T)、B.pumilus ATCC7061(T) 和 B.safensis FO-036b(T) 三株模式种的同源性分别为 98.53%、85.53% 和 83.70%。aroE 基因序列的比对结果表明,高空芽孢杆菌 Bacillus altitudinis1A08373 与 B.altitudini41KF2b(T)、B.pumilus ATCC7061(T) 和 B.safensis FO-036b(T) 三株模式种的同源性分别为 98.53%、85.89% 和 86.67%。

[0015] 综合菌株的形态特征、生理生化特性以及 16S rRNA、pyrE 和 aroE 基因序列分析结果,本发明的菌株 1A08373 鉴定为高空芽孢杆菌,具体为高空芽孢杆菌 1A08373(CCTCC NO :M2013292)。

[0016] 本发明的高空芽孢杆菌(Bacillus altitudinis)1A08373 对致病性弧菌有

显著的抑菌效果，对对虾生长有明显的促进作用。本发明的高空芽孢杆菌 Bacillus altitudinis1A08373 能产生蛋白酶、脂肪酶和纤维素酶等，并且具有较强的活性。

[0017] 本发明的高空芽孢杆菌 Bacillus altitudinis1A08373 对哈维氏弧菌 SF1、坎贝氏弧菌 VH1、鳗弧菌 W1、副溶血弧菌 1937、欧文氏弧菌 VH2、需钠弧菌 FS-1 等对虾致病性弧菌具有广泛的抑制性。

[0018] 本发明的高空芽孢杆菌 Bacillus altitudinis1A08373 在提高对虾抗病力、促进对虾生长方面有显著效果。在用致病性坎贝氏弧菌 VH1 浸浴感染对虾的实验中发现，添加高空芽孢杆菌 1A08373 的实验组对虾存活率显著高于对照组，提高了 32%。将高空芽孢杆菌 1A08373 进行液体发酵，以 10^7cfu/g（每 g 饲料的活菌含量）的浓度添加至饲料中投喂南美白对虾，同时以 10^5cfu/mL（每毫升海水的活菌含量）的浓度泼洒至养殖水体中，结果发现，经过 30 天的饲养，投喂添加了高空芽孢杆菌 1A08373 饲料的实验组与不添加益生菌的对照组相比，对虾平均体重增长率提高了 18.7%，益生菌 1A08373 实验组的对虾肠道胰蛋白酶和脂肪酶均显著高于对照组（$P<0.05$）。弧菌含量动态监测结果表明，1A08373 实验组的养殖海水中弧菌含量低于对照组；菌株 1A08373 能在养殖海水和对虾肠道中存活，养殖海水中检测到的活菌含量在 10^4cfu/mL 以上，对虾肠道中芽孢杆菌含量在 10^4cfu/g 以上。

[0019] 所述高空芽孢杆菌 Bacillus altitudinis1A08373 可用于制备高空芽孢杆菌制剂，所述高空芽孢杆菌制剂包括致病性弧菌抑菌制剂、对虾生长促进剂、对虾饲料添加剂、对虾养殖水质改良剂中的一种。

[0020] 所述高空芽孢杆菌制剂的制备方法的具体步骤为：将高空芽孢杆菌（Bacillus altitudinis）1A08373 按斜面、液体种子、液体发酵的顺序培养，斜面和种子培养基为常规的营养琼脂培养基或肉汤培养基；发酵培养基配方（W/V）：豆饼粉 3%，淀粉 1.5%，玉米浆 1%，葡萄糖 0.5%，$(NH_4)_2SO_4$1%，NH_4Cl0.1%，$KH_2PO_4$0.05%，$NaH_2PO_4$0.5%，$MgSO_4$0.05%，$MnSO_4$0.05%。

[0021] 所制得的高空芽孢杆菌制剂包含的活菌数不低于 1×10^9CFU/mL，最高可达到 1×10^{10}CFU/mL 以上。

[0022] 所述高空芽孢杆菌制剂按对虾饲料重量的 0.5 ～ 5% 添加。

[0023] 所述高空芽孢杆菌制剂在养殖水体中的接种浓度为 10^3～ 10^4cfu/mL。

[0024] 本发明所述高空芽孢杆菌（Bacillus altitudinis）1A08373 对水产养殖病原弧菌具有广泛抑制性。以高空芽孢杆菌 1A08373 发酵液作为活菌制剂，泼洒到养殖水体 / 添加到饲料中饲喂对虾，可以起到抑制养殖水体中病原弧菌的繁殖，提高对虾消化道酶活，促进对虾生长，提高对虾抗病力，减少对虾病害发生，特别是对于对虾弧菌病害的防治和对虾产量的增加具有很好的效果。

附图说明

[0025] 图 1 为高空芽孢杆菌 Bacillus altitudinis1A08373 的胞外酶活检测图。1、蛋白酶；2、脂肪酶；3、纤维素酶。

[0026] 图 2 为高空芽孢杆菌 Bacillus altitudinis1A08373 抑菌活性检测图。1、指示菌：坎贝氏弧菌 VH1；2、指示菌：哈维氏弧菌 SF1。

[0027] 图 3 为高空芽孢杆菌 Bacillus altitudinis1A08373 发酵上清液对坎贝氏弧菌 VH1 生长的抑制。在图 3 中，◆为对照：VH1，■为处理：VH1+1A08373。

[0028] 图 4 为养殖水体中弧菌含量的动态监测。在图 4 中,标记◆为 1A08373,■为空白对照。

具体实施方式

[0029] 以下实施例将结合附图对本发明作进一步的说明,但并不因此将本发明限制在所述的实施例范围之中。下述的实施例中的方法,如无特别说明,均为常规方法。

[0030] 实施例 1 高空芽孢杆菌的分离、鉴定和抑菌谱测定

[0031] (1)菌株分离:在无菌超净台中取印度洋深海沉积物样品 1g,加入 9ml 无菌生理盐水(0.9%NaCl)制成悬浮液,依次 10 倍梯度稀释至 10^{2}、10^{3}、10^{4},取梯度稀释液 100μL 涂布 Marine Agar 固体培养基(2216E 培养基),28℃培养 48h 后,挑取单菌落划线纯化,分离获得菌株 BS1,保藏至中国海洋微生物菌种保藏管理中心(MCCC),保藏编号为 MCCC1A08373。

[0032] (2)菌株的生理生化特征和分子鉴定

[0033] 形态特征:高空芽孢杆菌(Bacillus altitudinis)1A08373CCTCC NO:M2013292 为杆状,大小为 (0.3 ～ 0.6)μm×(1.2 ～ 1.9)μm,革兰氏阳性,能运动,有侧生鞭毛,产芽孢。在 2216E 固体培养基上 28℃培养 48h,菌落呈白色不透明,表面光滑湿润,边缘规则,菌落直径大小约为 2 ～ 3mm。

[0034] 生理生化特征:菌株生长盐度范围为 0 ～ 15%,18% 以上不生长,最适范围为 1% ～ 5%;生长 pH 范围为 5 ～ 12,最适范围为 6 ～ 8。氧化酶(+),接触酶(+),硝酸盐还原(-),吲哚试验(-),V.P 试验(+),不能发酵 D- 葡萄糖产酸,明胶液化(+),尿素酶(-),β-葡萄糖苷酶(+),β-半乳糖苷酶(+),能利用 D- 葡萄糖、L- 阿拉伯糖、D- 甘露糖、D- 甘露醇、N- 乙酰-葡萄糖胺、苹果酸、柠檬酸,不能利用麦芽糖、癸酸、己二酸、苯乙酸。菌株 1A08373 和模式种 Bacillus altitudini41KF2b(T) 部分生理生化特性见表 1。

[0035] API ZYM 结果显示,菌株 1A08373 具有碱性磷酸酶、酯酶、类脂酯酶、亮氨酸氨肽酶、α-胰凝乳蛋白酶、酸性磷酸酶、β-葡(萄)糖苷酶,α-甘露糖苷酶,不具有脂肪酶、缬氨酸氨肽酶、胱氨酸氨肽酶、胰蛋白酶、α-半乳糖苷酶、β-半乳糖苷酶、β-葡(萄)糖苷酸酶、α-葡(萄)糖苷酶、N- 乙酰-葡萄糖胺酶、α-岩藻糖苷酶等酶活性。

[0036] 分子鉴定:按照常规方法抽提高空芽孢杆菌(Bacillus altitudini)1A08373 的基因组 DNA,并对 16S rRNA、pyrE 和 aroE 基因序列进行测定,高空芽孢杆菌 1A08373 的 16S rDNA、pyrE 和 aroE 基因序列如 SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2 和 SEQ ID NO.3 所示。

[0037] 经 BLAST 比对分析,高空芽孢杆菌 (Bacillus altitudini)1A08373 与 Bacillusaltitudini41KF2b(T) 的 16S rDNA 序列同源性为 99.93%,与 B.pumilus ATCC7061(T) 的 16S rDNA 序列同源性为 99.67%,与 B.safensis FO-036b(T) 的 16S rDNA 序列同源性为 99.54%。pyrE 基因序列的比对结果表明,1A08373 与 B.altitudini41KF2b(T)、B.pumilus ATCC7061(T) 和 B.safensis FO-036b(T) 三株模式种的同源性分别为 98.53%、85.53% 和 83.70%。aroE 基因序列的比对结果表明,1A08373 与 B.altitudini41KF2b(T)、B.pumilus ATCC7061(T) 和 B.safensis FO-036b(T) 三株模式种的同源性分别为 98.53%、85.89% 和 86.67%。

[0038] 综合菌株的形态特征、生理生化特性以及 16S rRNA、pyrE 和 aroE 基因序列分析结果,本发明的菌株 1A08373 鉴定为高空芽孢杆菌,保藏于中国典型培养物保藏中心

(CCTCC),保藏编号分别为 CCTCC NO :M2013292。高空芽孢杆菌 1A08373 的 16S rDNA、pyrE 和 aroE 基因基因序列如 SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2 和 SEQ ID NO.3。

[0039] 表 1 :沙福芽孢杆菌 1A07588 的生理生化特性

[0040]

特性		1A08373	*Bacillus altitudini* 41KF2b(T)
革兰氏染色		阳性	阳性
氧化酶		+	+
接触酶		+	+
硝酸盐还原		-	-
V.P 试验		+	+
吲哚试验		-	-
明胶液化		+	+
柠檬酸盐利用		+	+
精氨酸双水解酶		+	+
脲酶		-	-
发酵葡萄糖产酸		-	-
碳源利用:	D-葡萄糖	+	+
	蔗糖	+	+
	麦芽糖	-	-
	D-甘露糖	+	+
	D-甘露醇	+	+
	L-阿拉伯糖	+	+
	N-乙酰-葡萄糖胺	+	+
	苹果酸	+	+

[0041] 注 :"+",表示阳性反应或可利用 ;"-",表示阴性反应或不可利用

[0042] (3) 产酶和抑菌活性检测

[0043] 胞外酶活检测 :

[0044] 对沙高空芽孢杆菌 1A08373 进行胞外蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶和纤维素酶活性检测,结果发现,高空芽孢杆菌 1A08373 具有胞外蛋白酶、脂肪酶和纤维素酶活性,但是不具有淀粉酶活性。

[0045] 抑菌活性检测 :

[0046] 采用琼脂平板扩散法对高空芽孢杆菌 1A08373 的抑菌活性以及抑菌谱进行测

定。所用培养基为海水216L培养基，指示菌包括致病性弧菌如哈维氏弧菌SF1、坎贝氏弧菌VH1、鳗弧菌W1、副溶血弧菌1937、欧文氏弧菌VH2、需钠弧菌FS-1以及藤黄微球菌CGMCC1.2299、金黄色葡萄球菌FDA209、大肠杆菌CGMCC1.2389、嗜水气单胞菌SHI和铜绿假单菌1A06466。指示菌和受试菌分别在216L培养基中过夜培养，取适量指示菌用无菌生理盐水稀释至10^7cfu/ml，吸取100μL涂布216L平板，在平板上打孔(孔径6mm)，在孔中加入受试菌发酵液50μL，30℃培养24h，观察结果，用游标卡尺测量抑菌圈直径。结果表明，高空芽孢杆菌1A08373对11株指示菌均有不同程度的抑制作用，结果如表2所示。

[0047] 高空芽孢杆菌1A08373胞外酶活性检测图和抑菌活性见图1和2。

[0048] 表2：菌株1A08373的抑菌活性

[0049]

指示菌编号	指示菌名称	抑菌活性（mm）
1	哈维氏弧菌SF1	13
2	坎贝氏弧菌VH1	10
3	鳗弧菌W1	19
4	副溶血弧菌1937	13
5	欧文氏弧菌VH2	13
6	需钠弧菌FS-1	10
7	藤黄微球菌CGMCC1.2299	22
8	金黄色葡萄球菌FDA209	20
9	大肠杆菌CGMCC1.2389	12
10	嗜水气单胞菌SHI	20
11	铜绿假单胞菌1A06466	9

[0050] 注：1～5均为致病性弧菌，对南美白对虾有较强的致病性。表格中数值代表抑菌圈直径(mm)，数值越大，抑菌效果越强。-，表示观察不到抑菌圈。

[0051] 实施例2 高空芽孢杆菌1A08373发酵上清液对弧菌生长的抑制

[0052] 将高空芽孢杆菌1A08373和指示菌坎贝氏弧菌VH1分别在216L液体培养基中28℃培养24h。然后取1A08373发酵液用0.22um滤膜过滤除菌，取1mL过滤上清液加入4mL新鲜的216L培养基中，再在试管中接种50μl的指示菌VH1。同时接种指示菌VH1(50μl)至5mL216L液体培养基中作为对照。每组试验三个平行。分别在3，6，9，12，15，18，21，24h取样测定指示菌VH1的生长(以OD_{600}表示)。实验结果如图3所示，添加1A08373发酵上清液的实验组指示菌VH1生长明显弱于对照组，说明1A08373对弧菌VH1生长有抑制作用。实施例3 高空芽孢杆菌1A08373对南美白对虾抗病性的生物测定

[0053] 将高空芽孢杆菌1A08373以及指示菌坎贝氏弧菌VH1分别在216L液体培养基中28℃培养24h。取各菌发酵液在5000rpm下离心5min，去掉上清液，收集菌体，用无菌生理盐水制备成菌悬液，测定菌体OD_{600}，按照实验所需用量加入养殖水体中。

[0054] 实验在30L水族缸中开展，每个水族缸中放入10L新鲜海水和50尾南美白对虾幼苗PL-40(体重约为0.1g)，保证足够充气。实验设置空白组(养殖水体中不加任何菌)，对照

组(养殖水体中接种 10^6cfu/ml 的坎贝氏弧菌 VH1)和实验组(养殖水体中同时接种 10^6cfu/ml 等浓度的高空芽孢杆菌和坎贝氏弧菌 VH1)。实验期间不换水,每日统计对虾死亡情况。结果如表 3 所示,经过 7 天的观察,结果表明,高空芽孢杆菌 1A08373 能显著提高对虾存活率,降低弧菌感染对虾的死亡率。

[0055] 表 3 :高空芽孢杆菌对坎贝氏弧菌 VH1 感染对虾的保护作用

[0056]

实验设置	对虾平均存活率（%）
实验组（高空芽孢杆菌 1A08373+VH1）	87
对照组（坎贝氏弧菌 VH1）	55
空白组（不加菌）	90

[0057] 实施例 4 高空芽孢杆菌 1A08373 对南美白对虾生长的影响

[0058] 高空芽孢杆菌的培养 :将出发菌株高空芽孢杆菌(Bacillus altitudini1A08373)保藏编号 CCTCC NO :M2013292 按斜面、液体种子、液体发酵的顺序培养,斜面和种子培养基为常规的营养琼脂培养基或肉汤培养基 ;发酵培养基配方(W/V):豆饼粉 3%,淀粉 1.5%,玉米浆 1%,葡萄糖 0.5%,$(NH_4)_2SO_4$1%,NH_4Cl0.1%,$KH_2PO_4$0.05%,$NaH_2PO_4$0.5%,$MgSO_4$0.05%,$MnSO_4$0.05%。将上述获得的高空芽孢杆菌发酵液用生理盐水进行 10 倍梯度稀释后,取 100μL 涂布 MA 平板,28℃培养 24h,计算活菌含量为 7.2×10^9cfu/mL。

[0059] 实验所用南美白对虾苗购买自厦门厦金龙育苗公司,体长 0.8cm 左右,在实验室暂养至体长4cm左右,体重1.3g左右即转移至养殖池开展实验。养殖池体积为500L,有效水体为 375L,每个养殖池放养对虾 100 尾。实验分为对照组和实验组,每组三个平行。实验组对虾每日投喂添加有高空芽孢杆菌制剂的对虾商品饲料(“福星”牌南美白对虾 2 号饲料),对照组仅投喂不加菌的上述对虾商品饲料 ;同时每 7 天往实验组水体中泼洒 10^5cfu/mL 的高空芽孢杆菌。实验组对虾饲料制备方法 :取 10mL 上述高空芽孢杆菌发酵液,用无菌生理盐水适当稀释后均匀喷洒到 500g 饲料表面,搅拌均匀,保证饲料中活菌浓度在 1×10^7cfu/g。实验为期 30 天,每日投喂 2 次饲料,每日换水 20%。30 天后统计对虾体重增长量,测定肠道蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶活性同时检测水体和肠道芽孢杆菌数目、弧菌数目等。

[0060] 表 4 :高空芽孢杆菌 1A08373 对南美白对虾生长的影响

[0061]

	对照组	实验组（1A08373）
初始体重（g/虾）	1.28 ± 0.16^a	1.37 ± 0.07^a
最终体重（g/虾）	3.96 ± 0.09^a	4.54 ± 0.10^b
体重增长量（g/虾）	2.67 ± 0.08^a	3.17 ± 0.09^b
相对体重增长率*	2.12 ± 0.3^a	2.31 ± 0.14^b

[0062] 注 :* 相对体重增长率 = (最终体重 - 初始体重) / 初始体重。上标不同字母代表差异显著($P<0.05$)

[0063] 表 5 :高空芽孢杆菌 1A08373 对南美白对虾肠道消化酶活性的影响

[0064]

	对照组	实验组（1A08373）
肠道胰蛋白酶（U/mgprot）	3089.17±181.21[a]	31552.47±407.29[b]
肠道脂肪酶（U/mgprot）	1480.24±136.05[a]	3964.85±179.12[b]
肠道淀粉酶（U/mgprot）	3589.34±44.79[a]	3496.82±178.28[a]
肠道芽孢杆菌数（cfu/g）	5.3×10^{3}	5.69×10^{4}
水体芽孢杆菌数（cfu/mL）	2.1×10^{3}	3.4×10^{4}

[0065] 由表4和表5可知，经过30天的饲喂，结果表明，高空芽孢杆菌1A08373能显著提高对虾的平均体重增长量，比对照组提高了18.7%。另外，1A08373益生菌处理组的对虾肠道胰蛋白酶和肠道脂肪酶显著高于对照组($P<0.05$)。此外，1A08373实验组水体中芽孢杆菌含量在10^{4}cfu/mL以上，对虾肠道芽孢杆菌数在10^{4}cfu/g以上。水体弧菌含量动态监测结果表明(图4)，实验组养殖水体中弧菌含量远低于对照组，说明高空芽孢杆菌1A08373具有抑制水体弧菌繁殖的作用。综上，高空芽孢杆菌1A08373具有促进对虾生长、抑制弧菌的作用。

[0066] 实施例5 急性毒性试验

[0067] 按照实施例2将菌株1A08373在216L液体培养基中28℃培养24h制备菌液。取SPF级KM小鼠，体重18～22g，雌雄各10只，用菌液进行灌胃，每只每次灌胃0.4ml，24h内灌胃5次，共2ml/只。连续观察7天，第7天称重。结果表明，实验小鼠均未出现异常情况，体重增长正常。说明高空芽孢杆菌1A08373是安全无毒的。

[0001]

序列表

<110> 国家海洋局第三海洋研究所

<120> 高空芽孢杆菌在对虾养殖中的应用

<130> 1

<160> 3

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1513

<212> DNA

<213> Bacillus altitudini

<400> 1

agagtttgat cctggctcag gacgaacgct ggcggcgtgc ctaatacatg caagtcgagc 60

ggacagaagg gagcttgctc ccggatgtta gcggcggacg ggtgagtaac acgtgggtaa 120

cctgcctgta agactgggat aactccggga aaccggagct aataccggat agttccttga 180

accgcatggt tcaaggatga aagacggttt cggctgtcac ttacagatgg acccgcggcg 240

cattagctag ttggtgaggt aacggctcac caaggcgacg atgcgtagcc gacctgagag 300

ggtgatcggc cacactggga ctgagacacg gcccagactc ctacgggagg cagcagtagg 360

gaatcttccg caatggacga aagtctgacg gagcaacgcc gcgtgagtga tgaaggtttt 420

cggatcgtaa agctctgttg ttagggaaga acaagtgcaa gagtaactgc ttgcaccttg 480

acggtaccta accagaaagc cacggctaac tacgtgccag cagccgcggt aatacgtagg 540

tggcaagcgt tgtccggaat tattgggcgt aaagggctcg caggcggttt cttaagtctg 600

atgtgaaagc ccccggctca accggggagg gtcattggaa actgggaaac ttgagtgcag 660

aagaggagag tggaattcca cgtgtagcgg tgaaatgcgt agagatgtgg aggaacacca 720

gtggcgaagg cgactctctg gtctgtaact gacgctgagg agcgaaagcg tggggagcga 780

acaggattag ataccctggt agtccacgcc gtaaacgatg agtgctaagt gttagggggt 840

ttccgcccct tagtgctgca gctaacgcat taagcactcc gcctggggag tacggtcgca 900

agactgaaac tcaaaggaat tgacgggggc ccgcacaagc ggtggagcat gtggtttaat 960

[0002]

tcgaagcaac gcgaagaacc ttaccaggtc ttgacatcct ctgacaaccc tagagatagg 1020

gctttccctt cggggacaga gtgacaggtg gtgcatggtt gtcgtcagct cgtgtcgtga 1080

gatgttgggt taagtcccgc aacgagcgca acccttgatc ttagttgcca gcatttagtt 1140

gggcactcta aggtgactgc cggtgacaaa ccggaggaag gtggggatga cgtcaaatca 1200

tcatgcccct tatgacctgg gctacacacg tgctacaatg gacagaacaa agggctgcga 1260

gaccgcaagg tttagccaat cccacaaatc tgttctcagt tcggatcgca gtctgcaact 1320

cgactgcgtg aagctggaat cgctagtaat cgcggatcag catgccgcgg tgaatacgtt 1380

cccgggcctt gtacacaccg cccgtcacac cacgagagtt tgcaacaccc gaagtcggtg 1440

aggtaacctt tatggagcca gccgccgaag gtggggcaga tgattggggt gaagtcgtaa 1500

caaggtagcc gta 1513

<210> 2

<211> 546

<212> DNA

<213> Bacillus altitudini

<400> 2

atcaaagctg tctctttaaa accagatgaa ccatttacat gggcgagcgg tatcaaatca 60

ccgatttact gtgacaatcg cctcaccttg tcttatcctg aggtcagagg agacattgcg 120

gaaggtttaa aagacttgat tctcactcat tttgaagaag cggacgttgt cgcaggtaca 180

gctacagccg gcattcctca tgcggcatta gcagctgatc gtctgaatgt accgatgtgt 240

tatgtaagaa gtaaaccaaa agcacacgga aaaggaaatc aaattgaagg agccgtatca 300

cctggacaaa aggtggttgt cgtagaagac ctcatctcaa ctggaggcag cgttcttgaa 360

gttgtggctg cgctagaaga agaaggctgt gacgtactcg gagttgttgc gatcttcact 420

tatggactgc caaaagcagc tgcggctttt caagagaaaa acattcccta tgtcacgctg 480

acagactatg acacactgac agaagtggca cttgagctaa aagcaattga gccttctgct 540

atgaat 546

<210> 3

<211> 900

[0003]

<212> DNA

<213> Bacillus altitudini

<400> 3

atcttggctg gctgtgagtt ccacagtacg ctgatcggag acgaaagtat tgccaaaaga 60

ccgatgaaac gggtaacagg tccgctaaga caattaggag ccaagataga tggcagagca 120

agtggcgagt atacaccgct ttctatacgt gggggcaatt taaaagctat ctcttatgag 180

tctccggttg caagtgcgca aattaaatcg gctgtccttt tagctggact gcaggcagaa 240

ggaacaacga cgttaactga accgcataaa tcaagagacc ataccgaaag aatgttatca 300

atgtttggtg tctcgctaca tgaagatgca caaagtgttt caattgaagg tggacaaacg 360

ttaaaagcaa cagatgtatt tgtccctgga gatatttctt cagctgcatt tttcttagtg 420

gctggatcta tcgttccaaa cagccggatt gtattgagaa atgtcggttt gaacaaaacg 480

agaactggta ttatagatgt gctaaaacaa atgggtgcag acctcgacat tcaagaagtg 540

gatgctaaag gcggagaacc gtacggtgat ttaacgatct ctacctcttc attaaaaggg 600

atcgacattt caggtgatat gatctctaga ctgatcgacg aaattcctat tattgcgctc 660

ctagctactc aagcagaagg aacaacgatc attaaagatg ccgctgaatt aaaagtgaaa 720

gaaaccaatc gtattgatac agtcgtttca gaacttaaaa aactaggtgc tcatattgaa 780

gcaacagatg atggaatgaa gattcatggt aaaacgagcc ttaaaggcgg cgcagtcgtc 840

tcaagctacg gagatcatcg aattggtatg atgttaggaa ttgcggcatg tataacagag 900

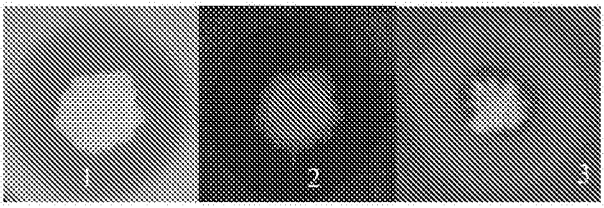
1
2
3

图 1

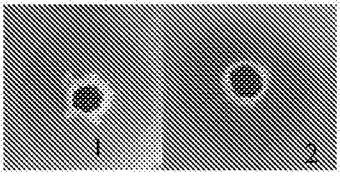
1
2

图 2

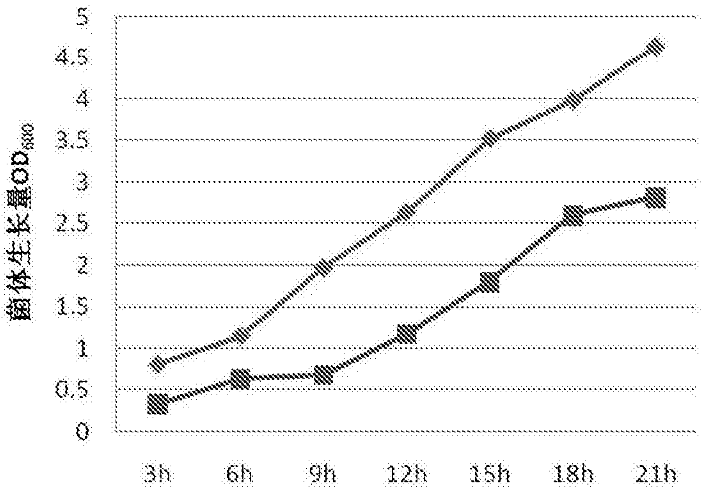
菌体生长量OD600
5
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
3h
6h
9h
12h
15h
18h
21h

图 3

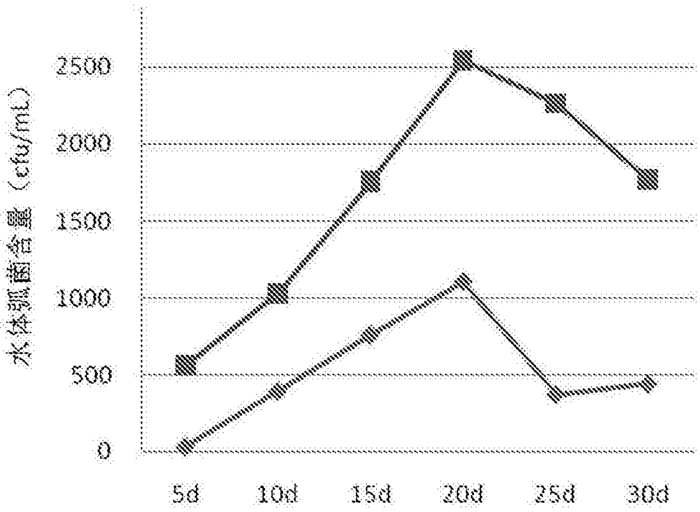
水体弧菌含量（cfu/mL）
2500
2000
1500
1000
500
0
5d
10d
15d
20d
25d
30d

图 4