



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106479944 B

(45)授权公告日 2018.08.10

(21)申请号 201710016591.5

(22)申请日 2017.01.10

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106479944 A

(43)申请公布日 2017.03.08

(83)生物保藏信息
GDMCC No:60084 2016.09.28

(73)专利权人 潘韵
地址 516000 广东省惠州市惠城区东湖花园4号小区410-214房

(72)发明人 李莉玲 李昆 郑文官 潘韵
李永新

(74)专利代理机构 深圳市惠邦知识产权代理事务所 44271
代理人 孙菊梅

(51)Int.Cl.
C12N 1/20(2006.01)
A23K 10/18(2016.01)
C12R 1/07(2006.01)

(56)对比文件

CN 102719383 A,2012.10.10,权利要求1-6,10-11,实施例1.

CN 102719383 A,2012.10.10,权利要求1-6,10-11,实施例1.

CN 105219669 A,2016.01.06,权利要求1-3,说明书第3-4、7-11、13、15、77-78段.

CN 103589655 A,2014.02.19,权利要求1-2.

CN 104830711 A,2015.08.12,权利要求1-10.

CN 103451117 A,2013.12.18,全文.

CN 105567598 A,2016.05.11,权利要求1,说明书第8、77-84、.

CN 103966118 A,2014.08.06,全文.

栾素军等.解淀粉芽孢杆菌在畜禽养殖中的应用研究进展.《中国畜牧兽医》.2016,第43卷(第10期),第2615-2620页,正文第2616右栏至2617页左栏.

审查员 王涛

权利要求书1页 说明书11页
序列表2页

(54)发明名称

一种解淀粉芽孢杆菌及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种解淀粉芽孢杆菌(Bacillus amyloliquefaciens)SC008,保藏于广东省微生物菌种保藏中心,保藏编号为GDMCC No:60084。本发明还公开了上述菌株SC008在饲料中的应用。本发明公开的解淀粉芽孢杆菌SC008可用于调节动物肠内微生态平衡,具有增强非特异性免疫功能来预防疾病的作用,同时还可以提供消化酶和营养因子,促进营养物的消化吸收、促进动物生长和提高饲料转化率。

1. 一种解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) SC008, 保藏于广东省微生物菌种保藏中心, 保藏编号为GDMCC No:60084。

2. 权利要求1所述解淀粉芽孢杆菌SC008在制备饲料添加剂中的应用。

3. 利用权利要求1所述解淀粉芽孢杆菌SC008制备的固体发酵产品。

4. 权利要求3所述固体发酵产品的制备方法, 其特征在于: 将解淀粉芽孢杆菌SC008菌种按5%的接种量接种到高密度固态发酵培养基中, 于30~40℃的条件下密闭发酵72小时, 再将发酵产物于50℃烘干即可; 所述高密度固态发酵培养基的配方以重量计为: 为玉米粉49.8%, 玉米蛋白粉6.2%, 豆粕6.2%, 葡萄糖0.3%和水37.5%。

5. 含有权利要求4所述固体发酵产品的饲料添加剂。

6. 权利要求4所述固体发酵产品在制备饲料添加剂中的应用。

一种解淀粉芽孢杆菌及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于添加剂技术领域,具体地涉及了一种解淀粉芽孢杆菌分离鉴定及在饲料中的应用。

背景技术

[0002] 随着人口的增长,粮食危机进一步加剧,人畜争粮愈演愈烈。据美国世界观察研究所统计资料表明,如果全世界畜牧业饲料用量减少10%,就能维持全球人口生活26个月。近年来,畜牧业环境污染问题日益严重,环保压力越来越大。饲料中N、P等对土壤、水体和大气造成极大的危害。上述现象产生的最直接的原因在于:饲料消化利用率低。目前,业内提高饲料消化利用率的方法主要是在饲料中添加一种或多种酶制剂来提高饲料营养物质的消化利用率,然而酶制剂的稳定性是制约饲用酶制剂产品的关键问题,尤其是在饲料加工制粒过程中的高温、高压和高湿环境导致酶活损失最大,其次是在动物体内被胃酸和胰蛋白酶等分解失活。

[0003] 益生菌是指能够在动物肠道内定植并且繁殖,对机体本身没有毒副作用的一类细菌。其定植在动物肠道内,产生多种抑菌物质,抑制病原菌的生长,并且在其繁殖代谢过程中,分泌多种消化酶类,促进动物对饲料的吸收利用,降低料肉比,提高动物生产性能。益生菌在畜牧业饲料上的应用受到广泛的关注和研究。

发明内容

[0004] 本发明公开了一种解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) SC008,保藏于广东省微生物菌种保藏中心,保藏编号为GDMCC No:60084。

[0005] 本发明还公开了上述解淀粉芽孢杆菌SC008在抑菌中的应用。

[0006] 本发明还公开了上述解淀粉芽孢杆菌SC008在提高动物免疫蛋白中的应用

[0007] 本发明还公开了上述解淀粉芽孢杆菌SC008在制备饲料添加剂中的应用。

[0008] 本发明还公开了利用权利要求1所述解淀粉芽孢杆菌SC008制备的固体发酵产品。

[0009] 所述固体发酵产品的制备方法,具体为:将解淀粉芽孢杆菌SC008菌种按5%的接种量接种到高密度固态发酵培养基中,于30~40℃的条件下密闭发酵72小时,再将发酵产物于50℃烘干即可;所述高密度固态发酵培养基的配方以重量计为:为玉米粉49.8%,玉米蛋白粉6.2%,豆粕6.2%,葡萄糖0.3%和水37.5%。

[0010] 本发明还公开了含有上述固体发酵产品的饲料添加剂。

[0011] 本发明还公开了上述固体发酵产品在制备饲料添加剂中的应用。

[0012] 本发明公开的解淀粉芽孢杆菌SC008可用于调节动物肠内微生态平衡,具有增强非特异性免疫功能来预防疾病的作用,同时还可以提供消化酶和营养因子,促进营养物的消化吸收、促进动物生长和提高饲料转化率。

[0013] 保藏信息

[0014] 本发明提供的一种解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) SC008,于

2016年9月28日保藏于广东省微生物菌种保藏中心(GDMCC),保藏编号为GDMCC No:60084。

具体实施方式

[0015] 下面将结合具体实施例对本发明作进一步的说明。

[0016] 实施例1:解淀粉芽孢杆菌的分离、筛选、鉴定及保存

[0017] 1、目标菌株的获得

[0018] 收集广东省清远市尖峰岭附近富含有机质的土壤,将样品过筛,除去石砾,草等杂物后,取1克样品于99ml无菌生理盐水中稀释到 $10^{-3} \sim 10^{-7}$,梯度稀释后涂布至筛选培养基,37℃培养至长出单菌落。刚果红染色并NaCl洗涤后观察,挑取透明圈与菌落直径比较大的菌落接种至添加20g/L葡萄糖的无琼脂筛选培养基中,培养24h后测酶活,选取酶活较高的菌株。在脱脂奶琼脂平板中就表现出较强的蛋白酶活性,且经过6次传代试验,其产生的蛋白酶活性基本保持稳定,同时,菌株代谢产生的纤维素酶,包括(羟甲基纤维素酶)CM-Case和(β -葡萄糖苷酶) β -Gase活力也较强。继续培养得到外观一致的菌株。将得到的外观一致的菌株再进行抑菌试验,采用牛津杯法,将指示菌株分别涂布于MRS琼脂平板上,每杯加入0.4mL培养24小时的菌株,恒温37℃培养箱中培养,观察培养结果,测定平皿内抑菌圈直径大小,指示菌株分别为大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌。结果表明:该筛选的菌株能够明显抑制上述3种指示菌株。

[0019] 2、菌株形态学特征鉴定

[0020] 取纯化菌株(命名为SC008)的单菌落,转接到营养琼脂平板上,于37℃恒温培养箱中培养24h、36h和48h,分别观察其菌落的大小、颜色、边缘、凸起、光滑度、粘性、透明度等特点。结果显示,菌株SC008在营养琼脂平板上形成边缘不整齐,表面干燥不透明的菌落。在显微镜下观察为杆状。

[0021] 挑取幼龄((18-24h))培养的菌落涂抹固定后,直接用结晶紫染液染色,在显微镜下用油镜观察芽孢的形态,芽孢为椭圆形,中生或偏端生。

[0022] 3、菌株的生理生化特征

[0023] 3.1革兰氏染色

[0024] 挑取幼龄(18-24h)培养的菌落分别涂片,自然风干后再火焰上固定。再进行革兰氏染色实验:初染(结晶紫)——媒染(碘液)——脱色(95%酒精)——复染(沙黄)。光学显微镜下,用油镜观察菌体颜色,结果显示SC008为革兰氏阳性菌。

[0025] 3.2、接触酶实验

[0026] 将24小时培养的斜面菌种,用接种环挑取一小环涂抹于已滴有3%过氧化氢的玻璃片上,结果显示:有气泡产生,为阳性。

[0027] 3.3、氧化酶实验

[0028] 在干净的培养皿里放置一张滤纸,滴上二甲苯对苯撑二胺的1%水溶液,仅使滤纸湿润即可,不可过湿。用灭菌玻棒取18-34小时的菌苔,涂抹在湿润的滤纸上,在10秒内涂抹的菌苔现红色者为阳性,10-60秒现红色者为延迟反应,60秒以上现红色者不计,按阴性处理。结果显示为阴性。

[0029] 3.4、厌氧生长试验

[0030] 接种营养肉汁固体培养基置于厌氧培养箱中适温培养,结果显示为阳性。

- [0031] 3.5、V-P测定
- [0032] 1) V-P测定用培养基;
- [0033] 2) 试剂:为40%NaOH,肌酸;
- [0034] 3) 培养与接种:接种试验菌于以上的培养液中,每次二个重复,置适温培养2、6天(如为阴性可适当延长培养时间)。
- [0035] 4) 操作与观察:取培养液和40%NaOH等量相混,加少许肌酸,10min如培养液出现红色,即为试验阳性反应。
- [0036] 5) 结果:显示为阳性。
- [0037] 3.6、硝酸盐还原试验
- [0038] 1) 培养基:在肉汁胨培养基中加入0.1%硝酸钾,pH为7.0-7.6,每管分装4-5毫升,121℃灭菌15分钟。
- [0039] 2) 试剂:格里斯氏(Griess)试剂、二苯胺试剂
- [0040] 3) 接种:将测定菌种接种于硝酸盐液体培养基中,适温培养1,3,5天,每管做两个重复,另留两管不接种作为空白对照。
- [0041] 4) 操作:取两支干净的空试管或在比色瓷盘小窝口中倒入少许培养1,3,5天的培养物,再各加一滴A液及B液,在对照管中同样加入A液和B液一滴。5) 结果观察:当培养基中滴入A,B液后,溶液如变为红色、玫瑰红色、橙色、棕色等表示亚硝酸盐存在,为硝酸盐还原阳性。
- [0042] 6) 结果:显示为阳性
- [0043] 根据以上形态特征及生理生化试验结果,查《柏杰细菌鉴定手册》第九版及《常见细菌系统鉴定手册》可知,菌株SC008属于Bacillus(芽孢杆菌属),根据此菌种的生理生化特性,进行试验以鉴定到种。
- [0044] 3.7、淀粉水解实验
- [0045] 1) 培养基:在肉汁胨中加0.2%可溶性淀粉,分装三角瓶,121℃蒸汽灭菌20分钟,倒平板备用。
- [0046] 2) 试剂:卢哥氏碘液(与革兰氏染液中的碘液相同)。
- [0047] 3) 接种:取新鲜斜面培养物点种于上述平板,置30℃恒温箱培养72小时。
- [0048] 4) 观察:在平板上滴加碘液呈蓝黑色,菌落周围如有不变色透明圈,表示淀粉水解阳性;仍是蓝黑色为阴性。
- [0049] 5) 结果:显示为阳性
- [0050] 3.7、明胶液化试验
- [0051] 1) 培养基:明胶蛋白胨培养基
- [0052] 2) 接种:取18-24小时的培养物穿刺接种,并有两管未接种的空白对照。
- [0053] 3) 结果观察:于20℃温箱中培养2,7天。在20℃以下的室温观察的生长情况和明胶是否液化。
- [0054] 4) 结果:显示为阳性
- [0055] 3.9、糖、醇类发酵试验
- [0056] 1) 培养基:配制休和利夫二氏(半固体)培养物,加入1%的糖类,分装试管,灭菌备用。

[0057] 2) 接种与观察:以幼龄斜面培养物穿刺接种于上述培养基中,37℃恒温箱培养72小时后观察。如指示剂变黄,表示产酸,为阳性;不变或变蓝(紫)则为阴性。

[0058] 3) 结果如表1所示:

[0059] 表1. 菌株SC008生化鉴定结果

[0060]

菌株名称	SC008
D-葡萄糖	+
L-阿拉伯糖	+
D-甘露醇	+
D-木糖	+
葡萄糖产气	-
运动	+

[0061] (“+”表示为阳性反应,“-”表示为阴性反应)

[0062] 3.10、苯丙氨酸脱氨酶试验

[0063] 1) 培养基:苯丙氨酸脱氨酶培养基

[0064] 2) 试剂:10% (W/V) 的FeCl₃溶液。

[0065] 3) 接种与培养:适当的浓度接种,37℃培养20小时测定。

[0066] 4) 结果观察:将试剂4滴滴到生长菌的斜面上,当斜面上和冷凝水中产生绿色时为阳性反应,即表明已形成了苯丙酮酸,不变则为阴性。结果显示为阴性。

[0067] 3.11、耐盐性

[0068] 1) 培养基:营养琼脂加不同的浓度的NaCl (2%、5%、7%、10%)。

[0069] 2) 接种与观察:取幼龄菌种液接种到培养物3和7天,与未接种的对照管对比,目测生长情况。

[0070] 3) 结果如表2所示:

[0071] 表2. 对不同浓度NaCl溶液的生长情况

[0072]

菌株名称	2%NaCl	5%NaCl	7%NaCl	10%NaCl
SC008	+	+	+	+

[0073] (“+”表示为阳性反应,“-”表示为阴性反应)

[0074] 3.12、柠檬酸盐利用

[0075] 1) 培养基:柠檬酸盐培养基(适用于芽孢菌)

[0076] 2) 接种与观察:在斜面上划线接种,适温培养3~7天。培养基为碱性(指示剂桃红色)者为阳性,否则为阴性。

[0077] 3) 结果:显示为阴性

[0078] 3.13、生长pH试验

[0079] 1) 培养基:pH6.8营养肉汤、pH 5.7营养肉汤

[0080] 2) 结果如表3所示:

[0081] 表3. 两种pH值下的生长情况

[0082]

菌株名称	pH6.8营养肉汤	pH 5.7营养肉汤
SC008	+	+

[0083] (“+”表示为阳性反应，“-”表示为阴性反应)

[0084] 3.14、生长温度

[0085] 1) :方法:将幼龄培养物接种至营养琼脂培养基上置30℃、40℃、45℃、50℃和60℃条件下培养观察。

[0086] 2) 结果如表4所示:

[0087] 表4.不同温度条件下的生长情况

[0088]

菌株名称	30℃	40℃	45℃	50℃	60℃
SC008	+	+	+	+	-

[0089] (“+”表示为阳性反应，“-”表示为阴性反应)

[0090] 3.15、卵磷脂酶试验

[0091] 1) 培养基:无菌条件下取卵黄加等量的生理盐水,摇匀后,取10ml上述悬液加入到融化的约(50~55℃)的200ml肉汁琼脂中,混合均匀后倒入培养皿内。制成的卵黄平板过夜后即可使用。

[0092] 2) 步骤:取18~24小时的斜面或培养液中的菌体点种在上述平板上,点的直径约为2~3mm。适温培养18~24小时观察。如菌落四周和下面有不透明的区出现,表示卵磷脂分解生成脂肪,说明有卵磷脂酶。

[0093] 3) 结果:显示为阴性

[0094] 3.16、吡啶试验

[0095] 1) 培养基:1%胰液水溶液,调pH7.2~7.6,分装1/3试管,115℃蒸汽灭菌30分钟。

[0096] 2) 接种:把新鲜的菌种接种于上述培养基中,于适温培养。

[0097] 3) 试剂:对二甲基氨基苯甲醛试剂

[0098] 4) 测定:培养1,2,4,7天的培养液,沿管壁缓缓加入3~5mm高的试剂于培养液表面,在液层界面发生红色即为阳性反应(若颜色不明显可加入4~5滴的乙醚摇匀后观察)。

[0099] 5) 结果:显示为阴性

[0100] 3.17、酪素水解试验

[0101] 1) 培养基:牛奶培养基

[0102] 2) 方法:将菌种点接在平板上,适温培养1,3,5天,记录菌落周围和下面酪素是否已被分解而呈透明。

[0103] 3) 结果:显示为阳性

[0104] 3.18、酪氨酸水解

[0105] 1) 培养基:酪氨酸培养基

[0106] 2) 方法:将测试菌种接种于平皿上,培养7~14天,记录酪氨酸结晶是否被水解而变透明。

[0107] 3) 结果:显示为阴性

[0108] 3.19、脲酶试验

[0109] 1) 培养基:尿素生化管

[0110] 2) 接种与观察:以幼龄斜面培养物接种于上述培养基中,30℃恒温箱培养24小时。培养基变为红色则脲酶阳性,不变色则为脲酶阴性。

[0111] 3) 结果:显示为阳性

[0112] 3.20、丙酸盐利用

[0113] 1) 培养基:丙酸钠培养基

[0114] 2) 接种与观察:用幼龄菌种接种,适温培养1~2天,培养基由绿变蓝者为阳性,培养基不变色者为阴性。

[0115] 3) 结果:显示为阴性

[0116] 4、菌株的分子生物学鉴定

[0117] 4.1、16S rDNA测序

[0118] 1) 试剂与培养基的配制

[0119] TE、DNA抽提Buffer、20%SDS、氯仿:异戊醇(24:1)、70%乙醇、营养琼脂培养基。

[0120] 2) 分离纯培养物

[0121] 在营养琼脂培养基上培养,分离纯化单菌落。

[0122] 3) DNA的提取

[0123] 将纯培养物接种于5ml新鲜配制的灭菌培养基,30℃恒温摇床培养1天。培养物全部转至10ml离心管中,6000r/min,室温离心5min收集菌体。弃上清,离心管倒置于干净的吸水纸上晾干残余的液体,加入2.7mlDNA抽提Buffer,充分悬浮菌体后,加入20μl10mg/ml的蛋白酶K,混匀,置恒温水浴摇床水平震荡,225r/min,37℃,30min。加入0.3ml 120%SDS,轻轻颠倒几次混匀,置恒温水浴箱静置,65℃温浴2小时。期间每隔15~20min上下颠倒几次混匀直至裂解完全后,于室温离心10min,6000r/min。将上清转至新的离心管中,加入等体积的氯仿-异戊醇(24:1)抽提10min。6000r/min,室温离心10min。重复上述3个步骤两到三次。将上清转至新的离心管中,加入0.6倍体积的异丙醇,混匀,室温静置1小时后于14000r/min,室温离心20min收集粗DNA。沉淀的粗DNA用70%冰乙醇轻轻涮洗,弃涮洗液后置于干净工作台晾干。加入100~200μl无菌超纯水(或TE)溶解DNA后,转至灭菌的1.5ml离心管中,-20℃保存备用。

[0124] 4) DNA纯度和浓度检测

[0125] 采用核酸/蛋白分析仪于Nucleic Acid程序下测定:用双蒸水在260,280nm两个波长下校零。取1μlDNA样品,加水至100μl,混匀。在260,280nm两个波长分别读出样品的吸光值为 $OD_{260}=0.5928$, $OD_{280}=0.3401$, $OD_{260}/OD_{280}=1.74$;由此计算核酸浓度 $[C]=OD_{260} \times 50 \times \text{稀释倍数}=0.5928 \times 50 \times 100=2964\text{ng}/\mu\text{l}$ 。

[0126] 5) PCR扩增

[0127] 表5.PCR反应体系:(每50μl反应体积所含组分如下):

[0128]

成分	终浓度	实际用量(μl)
浓缩反应缓冲液(10*Buffer)	1*工作浓度	5
dNTP混合物(10mmol)	各0.2mmol/l	1
Taq DNA聚合酶(2.5μ/μl)	0.5~1.0U/50μl	0.5

氯化镁 (MgCl ₂) (25mmol)	1.5mmol/l	5
上游引物 (10μmol/μl)	1μmol/l	1
下游引物 (10μmol/μl)	1μmol/l	1
模板 (-)	10 ² ~10 ⁵ 拷贝/50μl	1
无菌水	将反应体积补足至50μl	35.5

[0129] 设空白对照:空白对照中应含有除模板核酸外的所有组分。(引物为F27及R1492)

[0130] PCR反应程序:

[0131] 30个循环

94C°	5min
94C°	1min
56C°	1min
72C°	2min
72C°	7min

[0132] 6) 凝胶电泳检测:

[0133] 制备一块0.8%的琼脂糖凝胶 (GoldviewDNA染料5μl/100ml), 取扩增产物5μl与1μl Loading Buffer混合, 点样, 5V/cm电泳45min, 于UVI凝胶成像系统分析结果。

[0134] 扩增产物测序: 扩增产物送至上海英骏生物技术有限公司进行测序。结果见基因序列列表:

[0135] 7) Genbank对比:

[0136] 将得到的基因列表通过因特网在Genbank等国际核酸序列数据库内进行同源序列搜索 (blastsearch), 找出该菌株与数据库中同源性最高的模式菌株或保藏于ATCC或DSM等国际菌种保藏中心的菌株。对比结果显示: 菌株SC008与枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 及解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 具有最高同源性均达100%。

[0137] 4.2、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 及解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 的区分:

[0138] 1) 选择特异性引物Bsu (Bsu-man-IF和Bsu-man-IR) \ Bam (Bam-man-IF和Bam-man-IR) 对目标菌进行PCR扩增。结果判别如下:

[0139] Bsu: 为枯草芽孢杆菌特异引物, 如能扩增出长约1300bp的但一条带, 则目的菌为枯草芽孢杆菌

[0140] Bam: 为解淀粉芽孢杆菌特异引物, 如能扩增出长约1300bp的单一条带, 则目的菌为解淀粉芽孢杆菌

[0141] 2) PCR扩增:

[0142] 表6.PCR反应体系: (每50μl反应体积所含组分如下):

[0143]

成分	实际用量(μl)
10*Taq DNA聚合酶Buffer	5
10pmol/μl dNTP混合物	1
2.5U/μl Taq DNA聚合物	0.5
上游引物	1

下游引物	1
DNA模板	1
无菌水(将反应体积补足至50 μ l)	40.5

[0144] 设置空白对照:空白对照中应含有除模板核酸外的所有组分。

[0145] 3) PCR反应程序:

[0146] Bsu:94 $^{\circ}$ C 5min;94 $^{\circ}$ C 30s,55 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 1min30s;35个循环;72 $^{\circ}$ C 10min Bam:94 $^{\circ}$ C 5min;94 $^{\circ}$ C 30s,58 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 1min30s;35个循环;72 $^{\circ}$ C 10min

[0147] 4) 凝胶电泳检测:

[0148] 制备一块0.8%的琼脂糖凝胶(含Goldview DNA染料5 μ l/100ml),取扩增产物5 μ l与1 μ l Loading Buffer混合,点样,5V/cm电泳45min,于UVI凝胶成像系统分析结果,结果显示:菌株SC008用特异性引物Bsu未能扩增出相应大小的单一条带,而用特异性引物Bam能扩增出长约1300bp的单一条带,因此,菌株SC008为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。

[0149] 实施例2:菌株的功能筛选

[0150] 1、耐酸性试验

[0151] 将菌株SC008保藏斜面接种于装10mL PY液体培养基的试管中,37 $^{\circ}$ C静置培养24小时,按10%接种量分别接种于10mL pH 2.0、3.0和4.0的人工胃液中,0小时计数作对照,2小时和6小时取样用磷酸缓冲液按10倍系列稀释,进行平板活菌计数,计算存活率。

[0152] 表7.3种pH条件下分别培养2小时和6小时后的情况

[0153]

pH	活菌数(2h) 10 ⁸ cfu/ml	存活(2h) %	活菌数(6h) 10 ⁸ cfu/ml	存活率(6h) %
2.0	6.06	97.2	5.94	96.8
3.0	6.04	97.1	6.02	97.0
4.0	6.86	98.0	6.84	98.0

[0154] 2、耐胆盐试验

[0155] 将菌株SC008接种装有10mL BPY液体培养基的试管中,37 $^{\circ}$ C静置培养24小时,按10%接种量分别接种于10mL 0.03%、0.1%、0.2%和0.3%不同浓度的猪胆盐溶液中,0小时计数作对照,2小时和6小时取样用生理盐水按10倍系列稀释计数,进行平板活菌计数,并计算存活率。

[0156] 表8.不同胆盐浓度下菌株的生长情况

[0157]

菌株	不同胆盐浓度							
	0.03%		0.1%		0.2%		0.3%	
SC008	活菌数	存活率	活菌数	存活率	活菌数	存活率	活菌数	存活率
		6.48	100	6.44	99.8	6.28	98.2	5.98

[0158] 备注:活菌数:(10^8 cfu/ml);存活率(%)

[0159] 3、抑菌试验

[0160] 试验菌株选取分离自肉鸡养殖场附近土壤、仔猪肠道中段及市售同类产品等来源的解淀粉芽孢杆菌,指示菌株选取大肠杆菌(*Escherichia coli* ATCC8739)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* ATCC 6538)、伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi* CMCC(B) 50071)和创伤弧菌(*Vibrio vulnificus* ATCC27562)。采用牛津杯法,将指示菌株分别涂布于MRS琼脂平板上,每杯加入0.4mL培养24小时的解淀粉芽孢杆菌培养液,恒温37℃培养箱中培养,观察培养结果,测定皿内抑菌圈直径大小,试验结果见表9。

[0161] 表9. 菌株SC008抑菌试验对比结果

菌株编号	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	沙门氏菌
	直径 (mm)	直径 (mm)	直径 (mm)
SC008	27.45±1.2	40.26±1.7	30.02±1.8
SC001	16.23±0.7	26.27±1.0	19.43±0.9
SC002	18.62±0.5	30.22±2.1	24.03±1.1
SC003	12.34±0.2	25.76±1.4	10.45±0.1
SC004	9.87±0.1	16.97±0.8	19.25±0.4

[0164] 注:试验设3个重复,取值为平均值。

[0165] 由试验结果可知,各菌株对致病菌均有良好的抑制作用,其中菌株SC008对致病菌的抑制作用强于其他同类菌株。

[0166] 实施例3:菌株SC008固体发酵产品的制备方法

[0167] 1) 菌种及其种子液制备

[0168] 解淀粉芽孢杆菌菌株在YPD琼脂平板活化,挑取单克隆接种于YPD液体培养基中,37℃培养24小时。

[0169] YPD培养基主要成分

[0170] 固体:酵母粉1%,蛋白胨2%,葡萄糖2%,琼脂粉2%

[0171] 液体:酵母粉1%,蛋白胨2%,葡萄糖2%

[0172] 2) 接种

[0173] 以5%的接种量将制备的液体种子接种到配置的固体培养基。

[0174] 固体培养基配方为:玉米粉49.8%,玉米蛋白粉6.2%,豆粕6.2%,葡萄糖0.3%和水37.5%。

[0175] 3) 发酵

[0176] 将接好菌种的培养基在30~40℃发酵72h。然后将发酵产物在50℃下烘干,即得固体发酵产品。

[0177] 取上述固体发酵产品,梯度稀释,涂布YPD培养基,培养24小时后,计算菌落数,实验结果活菌数为: 5.0×10^{10} cfu/g。

[0178] 实施例4:菌株SC008固体发酵产品对保育猪生产性能及成活率的影响

[0179] 1、试验动物与分组

[0180] 选取28日龄断奶的仔猪600头,平均分为三组,每组200头。试验设预饲期7天,正式试验为期45天,直至饲喂断奶仔猪至80日龄结束试验。试验从2016年2月20日开始至2016年4月12日结束。

[0181] 2、试验设计

[0182] 对照组:饲喂基础日粮;

[0183] 试验组1:基础日粮添加0.1%市售同类产品;

[0184] 试验组2:基础日粮添加0.1%菌株SC008固体发酵产品

[0185] 3、结果与分析

[0186] 3.1菌株SC008固体发酵产品对保育猪生长性能的影响见表10

[0187] 表10. 菌株SC008固体发酵产品对保育猪生产水平的影响

[0188]

组别	初始均重 (kg)	末均重 (kg)	平均日采食 (g)	平均日增重 (g)	料肉比
对照组	9.26	23.56	590.88	317.68	1.86
试验组1	9.18	23.77	596.56	324.22	1.84
试验组2	9.10	26.13	654.63	378.40	1.73

[0189] 由表10可知:对照组的初始均重为9.26kg,末均重为23.56kg,日均增重317.68g;试验组1初始均重为9.18kg,末均重为23.77kg,日增重324.22g。试验组2初始均重为9.10kg,末均重为26.13kg,日增重378.40g。试验组2日增重比对照组和试验组1分别多60.72g和54.18g;在整个试验期间每头净增重比对照组和试验组1分别多2.73kg和2.44kg;料肉比:试验组2、试验组1和对照组分别为1.73、1.84和1.86,分别低于对照组和试验组1为0.13和0.11,试验组2料肉比下降明显。

[0190] 3.2菌株SC008固体发酵产品对保育猪成活率的影响

[0191] 表11. 菌株SC008固体发酵产品对保育猪成活率的影响

[0192]

组别	试验初头数	试验末头数	成活率(%)
对照组	200	187	93.50
试验组1	200	190	95.00
试验组2	200	196	98.00

[0193] 保育猪育成成活率情况如表11所示,各试验组均选取200头断奶仔猪,试验期间试验组2、试验组1和对照组分别死亡了4头、10头和13头;成活率分别为98.00%、95.00%和93.5%。试验组2比对照组和试验组1成活率明显提高。

[0194] 4、效果讨论与说明

[0195] 本试验表明试验组2每头保育猪较基础日粮对照组平均体重提高了2.73kg,平均日增重提高了60.72g,死亡淘汰率降低了4.50%,料肉比降低了0.13。试验证明,菌株SC008固体发酵产品能够有效的提高保育猪的生产性能,且显著优于对比的市售同类产品。另外菌株SC008能明显提高断奶仔猪的免疫水平和抗病能力,可减少抗生素及其他药物的使用。

[0196] 综上所述,本发明解淀粉芽孢杆菌可用于调节动物肠内微生态平衡,具有增强非特异性免疫功能来预防疾病的作用,同时还可以提供消化酶和营养因子,促进营养物的消化吸收、促进动物生长和提高饲料转化率。

[0197] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

- [0001] SEQUENCE LISTING
- [0002] <110> 深圳市善成生物技术有限公司
- [0003] <120> 一种解淀粉芽孢杆菌及其应用
- [0004] <130>
- [0005] <160> 1
- [0006] <170> PatentIn version 3.3
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 1428
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> *Bacillus amyloliquefaciens*
- [0011] <400> 1
- [0012] ttccggcggct ggtccataa aggttacctc accgacttcg ggtgttaca actctcgtgg 60
- [0013] tgtgacgggc ggtgtgtaca aggcccgga acgtattcac cgcggcatgc tgatcccgga 120
- [0014] ttactagcga ttccagcttc acgcagtcga gttgcagact gcgatccgaa ctgagaacag 180
- [0015] atttgtggga ttggetaac ctccgggttt cgtgccectt tgttctgtcc attgtagcac 240
- [0016] gtgtgtagcc caggtcataa ggggcatgat gatttgact catccccacc ttctccggt 300
- [0017] ttgtcaccgg cagtcacct agagtccca actgaatgct ggcaactaag atcaagggtt 360
- [0018] gcgctcgttg cgggacttaa cccaacatct caccacacga gctgacgaca accatgcacc 420
- [0019] acctgtcact ctgccccga aggggacgct ctatctctag gattgtcaga ggatgtcaag 480
- [0020] acctggtaag gttcttcgct ttgcttcgaa ttaaaccaca tgcctccacc cttgtgcggg 540
- [0021] cccccgtaa ttctttgag ttccagtctt gcgaccgtac tccccaggcg gactgcttaa 600
- [0022] tgcgttagct gcagcactaa ggggcggaaa ccccctaaca cttagcactc atcgtttacg 660
- [0023] gcgtggacta ccagggtatc taatctgtt cgtccccac gcttctgctc ctccagctca 720
- [0024] gttacagacc agagagtcgc ctccgacct ggtgttctc cacatctcta cgcatttcac 780
- [0025] cgctacacgt ggaattccac tctctcttc tgcactcaag tccccagtt tccaatgacc 840
- [0026] ctccccggtt gagccggggg ctttcacatc agacttaaga aaccgcctgc gagcccttta 900
- [0027] cgcccaataa ttccggacaa cgtttgccac ctacttatta ccgcggtgc tggcacgtag 960
- [0028] ttagecgtgg ctttctgggt aggtaccgct aaggtgcegc cctatttgaa cggcacttgt
1020
- [0029] tcttccctaa caacagagct ttacgatccg aaaaccttca tcactcacgc ggcgttgctc
1080
- [0030] cgtcagactt tegtccattg cggaagattc cctactgctg cctcccgtag gactctgggc
1140
- [0031] cgtgtctcag tcccagtggt gccgatcacc ctctcaggct ggtacgcat cgtcgccttg
1200
- [0032] gtgagccgtt acctaccaa ctactaatg cgccgggggt ccatctgtaa gtggtagccg
1260
- [0033] aagccacctt ttatgtctga acctgcggt tcaacaacc atccggtatt agccccggtt

1320

[0034] tcccggagtt atcccagtct tacaggcagg ttaccacagt gttactcacc cgtccgccgc

1380

[0035] taacatcagg gagcaagctc ccatctgtcc gctcgactgc atgtatag 1428