



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103193329 B

(45) 授权公告日 2014. 06. 18

(21) 申请号 201310129034. 6

CN 101078003 A, 2007. 11. 28,

(22) 申请日 2013. 04. 15

CN 101215540 A, 2008. 07. 09,

CN 101898836 A, 2010. 12. 01,

(73) 专利权人 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心

审查员 尹玮

地址 214081 江苏省无锡市滨湖区滨湖街道山水东路9号

(72) 发明人 吴伟 王琼 瞿建宏

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

代理人 殷红梅

(51) Int. Cl.

C02F 3/34 (2006. 01)

C02F 3/00 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 103013886 A, 2013. 04. 03,

CN 101125712 A, 2008. 02. 20,

权利要求书1页 说明书5页

(54) 发明名称

一种控制养殖水体蓝藻过度繁殖的生物制剂及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种控制养殖水体蓝藻过度繁殖的生物制剂及制备方法,属于水产养殖技术领域。其主要取市售高活性的溶菌酶、多功能微生物菌株、赖氨酸和载体,将上述组分按比例称重,然后在20℃下混合均匀后经自动包装机包装封口,每个包装净含量为250~500g。本发明可直接投入养殖水体,快速降解养殖环境中的蛋白质等大分子有机物质,去除水质和底质环境中的氮磷等植物性营养元素,抑制蓝藻的过度生长繁殖,加速蓝藻细胞的衰亡,降低水体中叶绿素的含量,降低藻类密度,提高透明度,快速修复养殖水体环境的富营养化,为水产养殖生物营造一个良好的水体环境。

1. 一种控制养殖水体蓝藻过度繁殖的生物制剂,其特征是按重量份计配方如下:

溶菌酶粉末 0.05~0.2 份,多功能微生物菌粉 45~65 份, L- 赖氨酸 10~25 份,脱脂米糠 25~30 份;

将上述物质充分混合均匀装入成品袋,即得产品控制养殖水体蓝藻过度繁殖的生物制剂;

所述多功能微生物菌粉为侧孢芽孢杆菌菌粉、枯草芽孢杆菌菌粉和蜡质芽孢杆菌菌粉按照质量比 45~55 :20~30 :20~30 的混合物;

多功能微生物菌粉的制备:取侧孢芽孢杆菌菌粉 45~55 份、枯草芽孢杆菌菌粉 20~30 份和蜡质芽孢杆菌菌粉 20~30 份,于 15~25℃下放在混合机中混合均匀,混合时间为 5~8min,混合成均匀的粉末即得多功能微生物菌粉。

2. 权利要求 1 所述控制养殖水体蓝藻过度繁殖的生物制剂的制备方法,其特征是按重量份计步骤如下:

(1) 多功能微生物菌粉的制备:取侧孢芽孢杆菌菌粉 45~55 份、枯草芽孢杆菌菌粉 20~30 份和蜡质芽孢杆菌菌粉 20~30 份,于 15~25℃下放在混合机中混合均匀,混合时间为 5~8min,混合成均匀的粉末即得多功能微生物菌粉,备用;

(2) 混合:取溶菌酶粉末 0.05~0.2 份,步骤(1)制备的多功能微生物菌粉 45~60 份, L- 赖氨酸 10~25 份,脱脂米糠 25~30 份,于 15~25℃下放在混合机中混合均匀,混合时间为 2~5min,得到混合粉末;混合粉未经自动包装机包装成 250~500g/包,即得产品控制养殖水体蓝藻过度繁殖的生物制剂;

所述侧孢芽孢杆菌菌粉、枯草芽孢杆菌菌粉和蜡质芽孢杆菌菌粉目数均为 80 目,其数目  $\geq 10^9$  个 /g;所述溶菌酶粉末活性大于 2 万 U/mg。

## 一种控制养殖水体蓝藻过度繁殖的生物制剂及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种控制养殖水体蓝藻过度繁殖的生物制剂及制备方法,属于水产养殖技术领域。

### 背景技术

[0002] 随着经济的快速发展和养殖业者对高产高效益的追求,中国的水产养殖朝着高密度、集约化、规模化的方向发展,形成了高生物负载量和高投入量的养殖模式,使得水体的富营养化日益严重。自 20 世纪 90 年代以来,国内的养殖水体经常出现蓝藻爆发性生长,形成严重的蓝藻水华。

[0003] 水华是指富营养化的水体在适宜的环境条件下,水体中的藻类,主要是蓝藻短时间内大量繁殖并聚集的生态异常现象。造成蓝藻水华的原因包括化学、物理和生物等多种因素,但其中化学因素是最主要的影响因素。从本质上说,水体蓝藻水华是水体富营养化导致水生生物物种失衡的结果,主要是植物性营养元素(氮、磷)含量过高。而氮磷等植物性营养元素来自工业废水、生活污水的不当排放以及水产养殖中过量投入饲料、渔肥等产生的自身污染。同时,蓝藻水华的形成离不开合适的光照、气温、气象等物理因素。蓝藻生性喜高温,当天气连续出现高温阴雨、闷热、弱风时更有助于其繁殖生长,从而形成优势藻种,抑制了其他水生生物的生长。蓝藻的生理生长特性在一定程度上也决定其作为水体优势藻种的地位。

[0004] 当养殖水体中蓝藻爆发性生长时,大面积增殖的蓝藻漂浮于水面降低了水体透明度,降低了水体中溶解氧含量,抑制水层中其他藻类的繁殖生长,从而造成了水体的藻类生物多样性指数偏低,导致水体自净能力减弱,破坏了水体的生态平衡。大面积增殖的蓝藻可堵塞养殖生物(如鱼、虾、贝)的呼吸和滤食器官;蓝藻爆发后期释放藻毒素(包括环肽、生物碱、脂多糖内毒素)可引发养殖生物产生肝毒性、神经毒性、皮炎毒性以及遗传毒性等。藻毒素在鱼虾体内可通过食物链进行累积,最终危害到人类的健康。为了控制蓝藻水华,国内外主要采用物理、化学和生物三大类的方法。物理法以絮凝沉淀技术为主,还有人工机械打捞,粘土除藻等,虽然效果好,但工程量大、运作周期长、一次性投入成本较高,也不能从根本上解决水体富营养化的状态;化学方法很多,如化学药剂杀藻法、化学絮凝沉降法、紫外光降解法等等,虽然除藻速度快、效果明显,但化学药品所存在的生物富集可能对整个生态系统造成长期的不良影响,再者蓝藻死亡可把已经被生物吸收的有机和无机污染物重新释放到水体中,造成了水体的二次污染。生物法有植物法、动物法和微生物法,如采用栽种生长快的水生高等植物(荷花、菖蒲、芦苇等)、放养水生动物(鲢、鳙)、投加光合细菌(PSB)或高效微生物复合制剂、生物栅和人工生物浮岛、生物滤构法等措施。生物法具有成本低、可操作性强的优点,但同样存在受环境影响比较大、效果不稳定、见效比较慢等据点。因此在养殖水体蓝藻过度繁殖的控制上急需开发一种集物理、化学和生物方法的优点于一身的新型生物制剂,达到成本低、见效快、无污染、使用方便、控藻效果显著的目的,以满足产业发展的需要。

## 发明内容

[0005] 本发明的目的在于克服现有技术中的不足,提供一种控制养殖水体蓝藻过度繁殖的生物制剂及制备方法,利用高活性的溶菌酶、多功能微生物菌株、赖氨酸和载体,经合理复配后直接投入养殖水体,可快速降解养殖环境中的蛋白质等大分子有机物质,去除水质和底质环境中的氮磷等植物性营养元素,抑制蓝藻的过度生长繁殖,加速蓝藻细胞的衰亡,降低水体中叶绿素的含量,快速修复养殖水体环境的富营养化,为水产养殖生物营造一个良好的水体环境。

[0006] 按照本发明提供的技术方案,一种控制养殖水体蓝藻过度繁殖的生物制剂,按重量份计配方如下:

[0007] 溶菌酶粉末 0.05~0.2 份,多功能微生物菌粉 45~65 份,L-赖氨酸 10~25 份,脱脂米糠 25~30 份;

[0008] 将上述物质充分混合均匀装入成品袋,即得产品控制养殖水体蓝藻过度繁殖的生物制剂。

[0009] 所述控制养殖水体蓝藻过度繁殖的生物制剂,所述多功能微生物菌粉为侧孢芽孢杆菌菌粉、枯草芽孢杆菌菌粉和蜡质芽孢杆菌菌粉按照质量比 45~55:20~30:20~30 的混合物。

[0010] 所述控制养殖水体蓝藻过度繁殖的生物制剂的制备方法,按重量份计步骤如下:

[0011] (1)多功能微生物菌粉的制备:取侧孢芽孢杆菌菌粉 45~55 份、枯草芽孢杆菌菌粉 20~30 份和蜡质芽孢杆菌菌粉 20~30 份,于 15~25℃下放在混合机中混合均匀,混合时间为 5~8min,混合成均匀的粉末即得多功能微生物菌粉,备用;

[0012] (2)混合:取溶菌酶粉末 0.05~0.2 份,步骤(1)制备的多功能微生物菌粉 45~60 份,L-赖氨酸 10~25 份,脱脂米糠 25~30 份,于 15~25℃下放在混合机中混合均匀,混合时间为 2~5min,得到混合粉末;混合粉未经自动包装机包装成 250~500g/包,即得产品控制养殖水体蓝藻过度繁殖的生物制剂。

[0013] 所述侧孢芽孢杆菌菌粉、枯草芽孢杆菌菌粉和蜡质芽孢杆菌菌粉目数均为 80 目,其数目 $\geq 10^9$  个/g。

[0014] 所述溶菌酶粉末活性大于 2 万 U/mg。

[0015] 本发明中各组分的作用原理如下:

[0016] 1、溶菌酶(lysozyme):又称胞壁质酶(muramidase)或N-乙酰胞壁质聚糖水解酶(N-acetylmuramide glycanohydrilase),是一种能水解致病菌中黏多糖的碱性酶。主要通过破坏细胞壁中的N-乙酰胞壁酸和N-乙酰氨基葡萄糖之间的 $\beta$ -1,4糖苷键,使细胞壁不溶性黏多糖分解成可溶性糖肽,导致细胞壁破裂内容物逸出而使细菌溶解。溶菌酶还可与带负电荷的病毒蛋白直接结合,与DNA、RNA、脱辅基蛋白形成复盐,使病毒失活。因此,该酶具有抗菌、消炎、抗病毒等作用。

[0017] 溶菌酶是采用生物工程技术进行克隆、提取而制取,它是一种天然酶,安全绿色的添加剂,无抗药性。溶菌酶是很稳定的蛋白质,有较强的抗热性,不会因为有机溶剂的处理而失活,当转移到水溶液中时,溶菌酶的活力可全部恢复;溶菌酶可被冷冻或干燥处理,且活力稳定;溶菌酶适宜pH5.3~6.4,可用于低酸性食品防腐;溶菌酶的抗菌谱较广,不仅局

限于 G<sup>+</sup> 菌,对部分 G 菌也有抑制效果;作为防腐剂安全性高。溶菌酶是一种天然蛋白质,1992 年 FAO/WTO 的食品添加剂协会已经认定溶菌酶在食品中应用是安全的。

[0018] 本发明利用其来破坏蓝藻细胞的细胞壁,加速蓝藻的死亡和分解。

[0019] 2、L- 赖氨酸:L- 赖氨酸的化学结构简式为:

[0020]  $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ , 白色或近白色自由流动的结晶性粉末,几乎无臭。263~264℃ 融化并分解,通常较稳定,高温下易结块,稍着色。相对湿度 60% 以下时稳定,60% 以上则生成二水合物。与维生素 C 和维生素 K3 共存则着色。碱性条件及直接与还原糖存在下加热则分解。易溶于水(40g/100mL, 35℃),水溶液呈中性至微酸性,与磷酸、盐酸、氢氧化钠、离子交换树脂等一起加热,起外消旋作用。光照条件下对铜绿微囊藻细胞色素有显著影响,可抑制叶绿素 A 的生成,改变藻胆蛋白各组分的比例,刺激其细胞坏死和细胞凋亡。

[0021] 本发明利用其来抑制蓝藻叶绿素 A 的生成,加速蓝藻细胞凋亡。

[0022] 3、侧孢芽孢杆菌菌粉:学名为 *Brevibacillus laterosporu*,芽孢杆菌属的一种。其在延迟期为革兰氏染色阴性,菌体呈细长的杆状;在对数生长期,为革兰氏染色阳性,菌体成短而粗的杆状;在静止期革兰氏染色又转为阴性,菌体成细长的杆状,偶尔也能观察到椭圆形的芽孢。菌体杆状、周生鞭毛、大小约  $0.88 \mu\text{m} \times 2.2 \mu\text{m}$ 。生理生化特征为:不从碳水化合物产气;不水解淀粉;兼性厌氧,葡萄糖培养液中培养物的 pH 小于 8.0。具有杀线虫能力。研究证实,这种能力与菌体在形成芽孢过程中的伴孢晶体相关。从该菌株的发酵液里提取的粗蛋白酶液在 12h 内能杀死所有测试线虫并在 24h 内完全降解。从侧孢芽孢杆菌菌株中纯化出的丝氨酸胞外蛋白酶可水解多种底物,包括胶原和线虫体壁,具有很强的杀线虫能力,可严重破坏线虫体壁。而且,蛋白酶将线虫体壁分解成为一些氨基酸或小肽,这些营养物质使细菌更好的生长繁殖。

[0023] 本发明利用侧孢芽孢杆菌来抑制和破坏蓝藻细胞。

[0024] 4、枯草芽孢杆菌菌粉:枯草芽孢杆菌是芽孢杆菌属的一种,单个菌体  $0.7 \sim 0.8 \mu\text{m} \times 2 \sim 3 \mu\text{m}$ ,着色均匀。无荚膜,周生鞭毛,能运动。革兰氏阳性菌,芽孢大小为  $0.6 \sim 0.9 \mu\text{m} \times 1.0 \sim 1.5 \mu\text{m}$ ,椭圆至柱状,位于菌体中央或稍偏,芽孢形成后菌体不膨大。菌落表面粗糙不透明,污白色或微黄色。枯草芽孢杆菌菌粉是枯草芽孢杆菌的发酵生产的,在菌体生长过程中能产生枯草菌素、多粘菌素、制霉菌素、短杆菌肽等活性物质,对水环境中的病原微生物有明显的抑制作用;枯草芽孢杆菌可刺激水产养殖动物生长发育,提高免疫球蛋白和抗体水平,增强细胞免疫和体液免疫功能,提高群体免疫力;枯草芽孢杆菌菌体自身合成  $\alpha$ -淀粉酶、脂肪酶、纤维素酶等酶类,

[0025] 在消化道中与动物体内的消化酶类一同发挥作用;枯草芽孢杆菌在生长过程中可吸收利用水中的 COD、氨氮、亚硝酸盐等,具有较好的净水效果。本发明利用其抑菌、净水等多种功能来修复水体环境。

[0026] 5、蜡质芽孢杆菌:蜡质芽孢杆菌学名为 *Bacillus cereus*,菌体细胞杆状,末端方,成短或长链, $1.0 \sim 1.2 \times 3.0 \sim 5.0$  微米。产芽孢,芽孢圆形或柱形,中生或近中生, $1.0 \sim 1.5$  微米,孢囊无明显膨大。革兰氏阳性,无荚膜,运动。菌落大,表面粗糙,扁平,不规则。蜡质芽孢杆菌粉剂外观为灰白色或浅灰色粉末,细度 90%,通过 325 目筛,水分含量  $\leq 5\%$ ,悬浮率  $\geq 85\%$ ,pH7.2。有特殊腥味,密度 1.08 克/立方厘米,pH6.5-8.4,45℃ 以下稳

定。蜡质芽孢杆菌能通过体内的 SOD 酶,调节作物细胞微生境,维持细胞正常的生理代谢和生化反应,提高抗逆性,加速生长,提高产量和品质。

[0027] 本发明利用蜡质芽孢杆菌抑藻、净水等多种功能来修复水体环境。

[0028] 本发明具有如下优点:本发明利用对水产养殖生物无害的高活性溶菌酶、多功能微生物菌剂、赖氨酸及载体,经合理复配后直接投入养殖水体,可快速降解养殖环境中的蛋白质、脂肪、碳水化合物等大分子有机物质,去除水质和底质环境中的氮磷等植物性营养元素,抑制蓝藻的过度生长繁殖,加速蓝藻细胞的衰亡,降低水体中叶绿素的含量,增加水体氧气含量,快速修复养殖水体环境的富营养化,为水产养殖生物营造一个良好的水体环境。

[0029] 本发明的生物制剂使用方便,不受环境条件的影响,使用量小,每亩水面每米水深的用量仅为 250~500g;使用后见效快且效果稳定,可显著降低水体中有机物质、氨氮、亚硝酸盐、磷酸盐、硫化氢等有害物质的含量,增加水体溶氧,加速蓝藻的分解,降低藻类密度,提高透明度,改善水质和底质的环境质量,改善养殖生物生存条件,有效防止养殖生物病害和突发性死亡,提高养殖生物的产量和质量。

### 具体实施方式

[0030] 下述的混合机、自动包装机等均为常规设备,在市场上购买,无任何特殊要求,采用通常的加工方法。本发明所采用的物料来源方便,均可在市场上购买。

[0031] 下面本发明将结合实施例作进一步描述:

[0032] 实施例 1

[0033] 本发明一种控制养殖水体蓝藻过度繁殖的生物制剂及制备方法,采用以下工艺步骤:其组份比例按重量份数计:

[0034] (1)多功能微生物菌粉的制备:取侧孢芽孢杆菌菌粉(80目,  $\geq 10^9$  个/g)50份、枯草芽孢杆菌菌粉(80目,  $\geq 10^9$  个/g)20份和蜡质芽孢杆菌菌粉(80目,  $\geq 10^9$  个/g)30份,于 20℃下放在混合机中混合均匀,混合时间为 5min,混合成均匀的粉末即得多功能微生物菌粉,备用;

[0035] (2)混合:取溶菌酶粉末(2万 U/mg)粉末 0.1份,步骤(1)制备的多功能微生物菌粉 60份, L-赖氨酸 12份,脱脂米糠 27.9份,于 20℃下放在混合机中混合均匀,混合时间为 3min,得到混合粉末;混合粉末经自动包装机包装成 500g/包,即得产品控制养殖水体蓝藻过度繁殖的生物制剂。

[0036] 实施例 2

[0037] 本发明一种控制养殖水体蓝藻过度繁殖的生物制剂及制备方法,采用以下工艺步骤:其组份比例按重量份数计:

[0038] (1)多功能微生物菌粉的制备:取市售侧孢芽孢杆菌菌粉(80目,  $\geq 10^9$  个/g)55份、枯草芽孢杆菌菌粉(80目,  $\geq 10^9$  个/g)20份和蜡质芽孢杆菌菌粉(80目,  $\geq 10^9$  个/g)25份,于 20℃下放在混合机中混合均匀,混合时间为 6分钟,混合成均匀的粉末即得多功能微生物菌粉,备用;

[0039] (2)混合:取市售高活性溶菌酶(2万 U/mg)粉末 0.15份,步骤(1)制备的多功能微生物菌粉 58份, L-赖氨酸 15份,脱脂米糠 26.85份,于 20℃下放在混合机中混合均匀,混合时间为 5min,得到混合粉末;混合粉末经自动包装机包装成 250g/包,即得产品控制养

殖水体蓝藻过度繁殖的生物制剂。

[0040] 实施例 3:本发明一种控制养殖水体蓝藻过度繁殖的生物制剂及制备方法,采用以下工艺步骤:其组份比例按重量份数计:

[0041] (1) 多功能微生物菌粉的制备:取市售侧孢芽孢杆菌菌粉(80 目,  $\geq 10^9$  个/g) 52 份、枯草芽孢杆菌菌粉(80 目,  $\geq 10^9$  个/g) 25 份和蜡质芽孢杆菌菌粉(80 目,  $\geq 10^9$  个/g) 23 份,于 20℃ 下放在混合机中混合均匀,混合时间为 7 分钟,混合成均匀的粉末即得多功能微生物菌粉,备用;

[0042] (2) 混合:取市售高活性溶菌酶(2 万 U/mg) 粉末 0.2 份,步骤(1)制备的多功能微生物菌粉 55 份,L-赖氨酸 14.8 份,脱脂米糠 30 份,于 20℃ 下放在混合机中混合均匀,混合时间为 5min,得到混合粉末;混合粉末经自动包装机包装成 350g/包,即得产品控制养殖水体蓝藻过度繁殖的生物制剂。

[0043] 应用实施例 1

[0044] 取实施例 1 制备的产品在浙江某一南美白对虾养殖池塘使用。

[0045] 面积 10 亩,夏季高温(6~8 月)时池塘水质过浓,水色不好,蓝藻呈现爆发性生长,水体中叶绿素含量达 44  $\mu$ g/L,底质发黑发臭,透明度仅为 13cm,影响南美白对虾的生长,虾的“转塘”现象严重。在一天上午 10 点将上述配方的生物制剂用于养殖池中,用量为 250g/亩·米水深。用后一天半水色大为好转,由浓绿色转为浅黄绿色,水体中叶绿素含量降为 21  $\mu$ g/L,透明度增大至 28cm,底质臭味消失,虾类活动恢复正常。

[0046] 应用实施例 2

[0047] 取实施例 2 制备的产品在江苏高邮某一罗氏沼虾养殖池塘使用。

[0048] 面积 10 亩,夏季高温(7~8 月)时池塘水质过浓,水色不好,蓝藻呈现爆发性生长,水体中叶绿素含量达 38  $\mu$ g/L,底质发黑发臭,透明度仅为 15cm,影响罗氏沼虾的生长,虾的“转塘”现象严重。在一天上午 10 点将上述配方的生物制剂用于养殖池中,用量为 400g/亩·米水深。用后一天半水色大为好转,由浓绿色转为浅黄绿色,水体中叶绿素含量降为 18  $\mu$ g/L,透明度增大至 30cm,底质臭味消失,虾类活动恢复正常。

[0049] 应用实施例 3

[0050] 取实施例 3 制备的产品在浙江湖州某地一个鳊鱼养殖池塘使用。

[0051] 面积 10 亩,夏季高温(6~8 月)时池塘水质过浓,水色不好,蓝藻呈现爆发性生长,水体中叶绿素含量达 40  $\mu$ g/L,底质发黑发臭,透明度仅为 18cm,影响鳊鱼的生长,鱼的“游塘”现象严重。在一天上午 10 点将上述配方的生物制剂用于养殖池中,用量为 500g/亩·米水深。用后一天半水色大为好转,由浓绿色转为浅黄绿色,水体中叶绿素含量降为 16  $\mu$ g/L,透明度增大至 32cm,底质臭味消失,鱼类活动恢复正常。