



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112512309 A

(43) 申请公布日 2021.03.16

(21) 申请号 201980036322.2

(22) 申请日 2019.05.29

(30) 优先权数据

62/677372 2018.05.29 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.11.27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/034366 2019.05.29

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/232026 EN 2019.12.05

(71) 申请人 美国宝微技术股份有限公司

地址 美国俄亥俄州

(72) 发明人 R·S·卡彭特 J·巴恩斯

J·K·克罗克特

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 翟建伟 黄希贵

(51) Int.Cl.

A01K 61/13 (2006.01)

A01K 61/59 (2006.01)

A23K 20/10 (2006.01)

A23K 50/80 (2006.01)

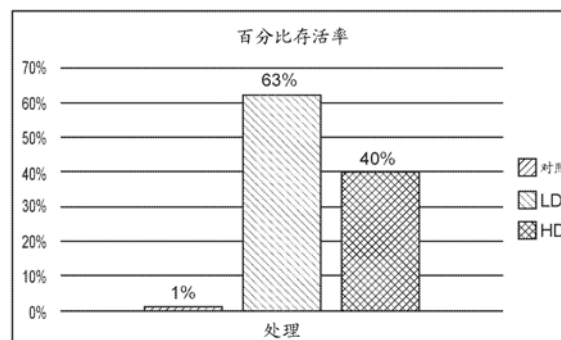
权利要求书2页 说明书17页  
序列表2页 附图2页

(54) 发明名称

用于提高水生动物的存活率的组合物和方法

(57) 摘要

本发明涉及在水产养殖系统中饲养水生动物的方法,所述方法包括:(a)在第一时间段内使所述水产养殖系统与水处理组合物接触,其中所述水处理组合物包含枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、摩加夫芽孢杆菌、乳酸片球菌、戊糖片球菌和植物乳杆菌;和(b)在第二时间段内使所述水产养殖系统与饲料添加剂组合物接触以饲喂所述水生动物,其中所述饲料添加剂组合物包含乳酸片球菌、戊糖片球菌、植物乳杆菌和枯草芽孢杆菌34KLB。



1. 在水产养殖系统中饲养水生动物的方法,所述方法包括:
  - a. 在第一时间段内使所述水产养殖系统与水处理组合物接触,其中所述水处理组合物包含枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、摩加夫芽孢杆菌、乳酸片球菌、戊糖片球菌和植物乳杆菌;和
  - b. 在第二时间段内使所述水产养殖系统与饲料添加剂组合物接触以饲喂所述水生动物,其中所述饲料添加剂组合物包含乳酸片球菌、戊糖片球菌、植物乳杆菌和枯草芽孢杆菌34KLB。
2. 权利要求1的方法,其中所述水处理组合物呈液体或固体的形式。
3. 权利要求1或2的方法,其中所述水处理组合物中的所述枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、短小芽孢杆菌和摩加夫芽孢杆菌与所述乳酸片球菌、戊糖片球菌和植物乳杆菌的重量比为1:10至10:1。
4. 权利要求1-3中任一项的方法,其中将所述水处理组合物中的所述枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、短小芽孢杆菌和摩加夫芽孢杆菌单独地有氧发酵、收获、冷冻干燥和研磨,以产生具有约200微米的平均粒径的粉末,其中大于60%的所述混合物在100-800微米之间的大小范围内。
5. 权利要求1-4中任一项的方法,其中将所述水处理组合物中的所述乳酸片球菌、戊糖片球菌和植物乳杆菌单独地有氧发酵、收获、冷冻干燥和研磨,以产生具有约200微米的平均粒径的粉末,其中大于60%的所述混合物在100-800微米之间的大小范围内。
6. 权利要求1-5中任一项的方法,其中所述水处理组合物进一步包含至少90重量%的水溶性稀释剂。
7. 权利要求6的方法,其中所述水溶性稀释剂选自葡萄糖一水合物、无水葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、麦芽糖糊精、氯化钠、氯化钾、氯化钙、氯化镁、硫酸钠、硫酸钾和硫酸镁。
8. 权利要求1-7中任一项的方法,其中所述枯草芽孢杆菌包括枯草芽孢杆菌34KLB。
9. 权利要求1-8中任一项的方法,其中所述饲料添加剂组合物呈液体或固体的形式。
10. 权利要求1-9中任一项的方法,其中将所述饲料添加剂组合物中的所述乳酸片球菌、戊糖片球菌、植物乳杆菌和枯草芽孢杆菌34KLB单独地有氧发酵、收获、冷冻干燥和研磨,以产生具有约200微米的平均粒径的粉末,其中大于60%的所述混合物在100-800微米之间的大小范围内。
11. 权利要求1-10中任一项的方法,其中植物乳杆菌、戊糖片球菌和乳酸片球菌的重量比为约1:1:1。
12. 权利要求1-11中任一项的方法,其中所述饲料添加剂组合物包含约0.15重量%的枯草芽孢杆菌34KLB。
13. 权利要求1-12中任一项的方法,其中所述饲料添加剂组合物包含至少90重量%的水溶性稀释剂。
14. 权利要求13的方法,其中所述水溶性稀释剂选自葡萄糖一水合物、无水葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、麦芽糖糊精、氯化钠、氯化钾、氯化钙、氯化镁、硫酸钠、硫酸钾和硫酸镁。
15. 权利要求1-14中任一项的方法,其中所述水产养殖系统每天用所述水处理组合物给药。
16. 权利要求15的方法,其中所述水处理组合物以每天约0.2 ppm至10 ppm的剂量提

供。

17. 权利要求1-16中任一项的方法,其中所述水产养殖系统每天用所述饲料添加剂组合物给药。

18. 权利要求17的方法,其中所述饲料添加剂组合物的有效量是每天约0.5 ppm至50 ppm。

19. 权利要求1-18中任一项的方法,其中所述第一时间段是至少7天。

20. 权利要求1-19中任一项的方法,其中所述第二时间段是至少7天。

21. 权利要求1-20中任一项的方法,其中所述水处理组合物与所述饲料添加剂组合物的重量比为约1:1至150:1。

22. 权利要求1-21中任一项的方法,其中所述水生动物是虾或有鳍鱼。

23. 权利要求22的方法,其中当所述水生动物是有鳍鱼时,所述水处理组合物与所述饲料添加剂组合物的重量比是70:1至105:1。

24. 权利要求22的方法,其中当所述水生动物是虾时,在孵化阶段,所述水处理组合物与所述饲料添加剂组合物的重量比是1:1至2:1。

25. 权利要求1-24中任一项的方法,其中与其中不使用所述水处理组合物和饲料添加剂组合物的对照相比,所述方法将所述水生动物的存活率增加至少5%。

26. 权利要求1-24中任一项的方法,其中与其中不使用所述水处理组合物和饲料添加剂组合物的对照相比,所述方法将所述水生动物的生物量增加至少5%。

27. 权利要求1-26中任一项的方法,其中所述水产养殖系统与所述水处理组合物和所述饲料添加剂组合物同时接触。

28. 权利要求27的方法,其中将所述水处理组合物喷涂至所述饲料添加剂组合物上。

29. 权利要求27的方法,其中在生产所述饲料添加剂组合物期间添加所述水处理组合物。

30. 权利要求1-29中任一项的方法,其进一步包括在步骤(b)之前用所述饲料添加剂组合物涂覆或混合常规的虾或鱼饲料。

31. 权利要求1-29中任一项的方法,其中所述饲料添加剂组合物进一步包含对所述水生动物具有营养价值的组分。

32. 权利要求1-29中任一项的方法,其进一步包括使所述水产养殖系统与常规的虾或鱼饲料接触。

## 用于提高水生动物的存活率的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

本申请要求在2018年5月29日提交的美国临时申请号62/677,372(其内容在此以其整体通过引用并入)的优先权权益。

[0002] 序列表的通过引用并入

在2019年5月2日创建且大小为2.5 KB的命名为“BIOW-018\_SEQ\_LISTING.txt”的文本文件的内容在此以其整体通过引用并入。

### 发明领域

[0003] 本发明涉及微生物组合物用于提高水生动物的存活率的用途。

[0004] 发明背景

水产养殖是鱼、甲壳动物、软体动物、水生植物、藻类和其他生物的养殖。水产养殖涉及在受控条件下养殖淡水和咸水种群,并且可以与商业捕鱼(其为野生鱼类的收获)形成对比。在2017年,全球水产养殖市场价值为1764.5亿美元。

[0005] 需要用于提高在水产养殖中饲养的水生动物的存活率的新的组合物和方法。

[0006] 发明概述

本发明的一个方面涉及在水产养殖系统中饲养水生动物的方法,所述方法包括:  
(a) 在第一时间段内使所述水产养殖系统与水处理组合物接触,其中所述水处理组合物包含枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、摩加夫芽孢杆菌、乳酸片球菌、戊糖片球菌和植物乳杆菌;和(b) 在第二时间段内使所述水产养殖系统与饲料添加剂组合物接触以饲喂所述水生动物,其中所述饲料添加剂组合物包含乳酸片球菌、戊糖片球菌、植物乳杆菌和枯草芽孢杆菌34KLB。

[0007] 在一些实施方案中,所述水处理组合物呈液体或固体的形式。

[0008] 在一些实施方案中,所述水处理组合物中的所述枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、短小芽孢杆菌和摩加夫芽孢杆菌与所述乳酸片球菌、戊糖片球菌和植物乳杆菌的重量比为1:10至10:1。

[0009] 在一些实施方案中,将所述水处理组合物中的所述枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、短小芽孢杆菌和摩加夫芽孢杆菌单独地有氧发酵、收获、冷冻干燥和研磨,以产生具有约200微米的平均粒径的粉末,其中大于60%的所述混合物在100-800微米之间的大小范围内。

[0010] 在一些实施方案中,将所述水处理组合物中的所述乳酸片球菌、戊糖片球菌和植物乳杆菌单独地有氧发酵、收获、冷冻干燥和研磨,以产生具有约200微米的平均粒径的粉末,其中大于60%的所述混合物在100-800微米之间的大小范围内。

[0011] 在一些实施方案中,所述水处理组合物进一步包含至少90重量%的水溶性稀释剂。所述水溶性稀释剂可以选自葡萄糖一水合物、无水葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、麦芽糖糊精、氯化钠、氯化钾、氯化钙、氯化镁、硫酸钠、硫酸钾和硫酸镁。

[0012] 在一些实施方案中,所述枯草芽孢杆菌包括枯草芽孢杆菌34KLB。

[0013] 在一些实施方案中,所述饲料添加剂组合物呈液体或固体的形式。

[0014] 在一些实施方案中,将所述饲料添加剂组合物中的所述乳酸片球菌、戊糖片球菌、植物乳杆菌和枯草芽孢杆菌34KLB单独地有氧发酵、收获、冷冻干燥和研磨,以产生具有约200微米的平均粒径的粉末,其中大于60%的所述混合物在100-800微米之间的大小范围内。

[0015] 在一些实施方案中,植物乳杆菌、戊糖片球菌和乳酸片球菌的重量比为约1:1:1。

[0016] 在一些实施方案中,所述饲料添加剂组合物包含约0.15重量%的枯草芽孢杆菌34KLB。

[0017] 在一些实施方案中,所述饲料添加剂组合物包含至少90重量%的水溶性稀释剂。所述水溶性稀释剂可以选自葡萄糖一水合物、无水葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、麦芽糖糊精、氯化钠、氯化钾、氯化钙、氯化镁、硫酸钠、硫酸钾和硫酸镁。

[0018] 在一些实施方案中,所述水产养殖系统每天用所述水处理组合物给药。例如,所述水处理组合物可以以每天约0.2 ppm至10 ppm的剂量提供。

[0019] 在一些实施方案中,所述水产养殖系统每天用所述饲料添加剂组合物给药。例如,所述饲料添加剂组合物可以以每天约0.5 ppm至50 ppm的剂量提供。

[0020] 在一些实施方案中,所述第一时间段是至少7天。

[0021] 在一些实施方案中,所述第二时间段是至少7天。

[0022] 在一些实施方案中,所述水处理组合物与所述饲料添加剂组合物的重量比为约1:1至150:1。

[0023] 在一些实施方案中,所述水生动物是虾或有鳍鱼。当所述水生动物是有鳍鱼时,所述水处理组合物与所述饲料添加剂组合物的重量比可以是70:1至105:1。当所述水生动物是虾时,在孵化阶段,所述水处理组合物与所述饲料添加剂组合物的重量比是1:1至2:1。

[0024] 在一些实施方案中,与其中不使用所述水处理组合物和饲料添加剂组合物的对照相比,所述方法可以将所述水生动物的存活率增加至少5%。

[0025] 在一些实施方案中,与其中不使用所述水处理组合物和饲料添加剂组合物的对照相比,所述方法可以将所述水生动物的生物量增加至少5%。

[0026] 在一些实施方案中,所述水产养殖系统与所述水处理组合物和所述饲料添加剂组合物同时接触。可以将所述水处理组合物喷涂至所述饲料添加剂组合物上。或者,可以在生产所述饲料添加剂组合物期间添加所述水处理组合物。

[0027] 在一些实施方案中,在步骤(b)之前,所述方法进一步包括用所述饲料添加剂组合物涂覆或混合常规的虾或鱼饲料。

[0028] 附图简述

图1显示根据当前最佳养殖实践饲养的鲶鱼(对照(ct1))相比于使用本文所述的方法饲养的鲶鱼的百分比存活率。中间柱(LD)是指所述饲料添加剂组合物的低剂量(500 g/公吨),且右侧柱(HD)是指所述饲料添加剂组合物的高剂量(1000 g/公吨)。

[0029] 图2显示来自图1中所述的每种处理的所有存活的鲶鱼的重量。

[0030] 图3显示未处理的孵化槽中的总氨氮(TAN)水平(对照)与用本文所述的水处理组合物处理的那些的比较。

[0031] 图4显示与图3中所述相同的槽中的总亚硝酸盐水平。

[0032] 发明详述

本公开尤其基于以下发现：水处理组合物和饲料添加剂组合物的组合使用可以增加水生动物的存活率，其中所述水处理组合物包括枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、摩加夫芽孢杆菌、乳酸片球菌、戊糖片球菌和植物乳杆菌，且所述饲料添加剂组合物包括乳酸片球菌、戊糖片球菌、植物乳杆菌和枯草芽孢杆菌34KLB。

[0033] 因此，本公开的一个方面提供了在水产养殖系统中饲养水生动物的方法，所述方法包括：(a) 在第一时间段内使所述水产养殖系统与水处理组合物接触，其中所述水处理组合物包含枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、摩加夫芽孢杆菌、乳酸片球菌、戊糖片球菌和植物乳杆菌；和 (b) 在第二时间段内使所述水产养殖系统与饲料添加剂组合物接触以饲喂所述水生动物，其中所述饲料添加剂组合物包含乳酸片球菌、戊糖片球菌、植物乳杆菌和枯草芽孢杆菌34KLB。

[0034] 下面显示枯草芽孢杆菌34 KLB的序列。

枯草芽孢杆菌菌株34KLB
AGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGCCCTTAGAAAAGGAGGTGATCCA
GCCGCACC'TCCGATACGGCTACCTTGTACGACTTCACCCCAATCATCTGTCCCACCTTCGGCGGCT
GGCTCCATAAAGGTTACCTCACCAGCTTCGGGTGTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTAC
AAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTC
GAGTTGCAGACTGCGATCCGAACAGAGATTTGTGRGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTCGCTGCC
CTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCC
CACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAA
GGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCT
GTCACTCTGCCCCGAAGGGGACGTCTATCTCTAGGATTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTT
CTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCCTTTGAGTT
TCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAAGGGCGGAAA
CCCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCTGTTCGCTCCCCA
CGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTC
TACGCATTTACCGCTACACGTGGAATTCACCTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATG
ACCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAGCCCTTACGCCCA
ATAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTC
TGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCGCCCTATTTGAACGGCACTTGTTCTTCCCTAACACAGAGCTTTAC
GATCCGAAAACCTTCATCACTCACGGCGGTTGCTCCGTGAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCT
ACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCGGTGCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCC'CTCAGGTTCGG
CTACGCATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAG
TGGTAGCCGAAGCCACCTTTTATGTCTGAACCATGCGGTTGAGACAACCATCCGGTATTAGCCCCGGTT
TCCCGGAGTTATCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACATCAG
GGAGCAAGCTCCCATCTGTCCGCTCGACTTCGATGTATTAGGCACGCCGCGGAGGTTGCTCCTGAGCCA
TGAACAAACTCTAAGGGCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGA
GGGCCCAATCGCCCTAT (SEQ ID NO.: 1)

[0035] 所述水处理组合物可以呈液体或固体的形式。所述水处理组合物可以含有浓度为

约 $10^6$ 至 $10^{11}$ 菌落形成单位(CFU)/克的细菌。优选地,所述细菌浓度为至少 $10^9$  CFU/克。在一些实施方案中,所述水处理组合物中的细菌浓度为约 $10^9$ 至 $10^{11}$  CFU/克。细菌活性或细菌浓度可以通过使用琼脂、诸如De Man、Rogosa和Sharpe (MRS)琼脂的传统板计数来测量。

[0036] 在一些实施方案中,所述水处理组合物可以由碳和/或氮源活化。所述水处理组合物的活化可以“唤醒”呈内生孢子形式的微生物(例如芽孢杆菌),由此允许所述水处理组合物开始起作用并更快地产生结果。在一些实施方案中,所述碳和/或氮源包括糖蜜、红糖或其组合。所述活化过程可以进一步包括使所述水处理组合物与碱和/或矿物质混合物接触。所述碱保持pH中性,用于所述活化过程。在一些实施方案中,所述碱是 $\text{NaHCO}_3$ 。所述矿物质混合物可以为所述活化过程提供营养补充。在一些实施方案中,所述矿物质混合物包含磷酸氢二钾、丙酸钙、甘氨酸锰、硒盐、甘氨酸铁、甘氨酸铜、甘氨酸锌、氯化钴或其组合。在一些实施方案中,所述矿物质混合物包含约64重量%磷酸氢二钾、约20重量%丙酸钙、约4.5重量%甘氨酸锰、约2.7重量%硒盐、约3.1重量%甘氨酸铁、约2.8重量%甘氨酸铜、约2.7重量%甘氨酸锌和约0.08重量%氯化钴。

[0037] 在所述水处理组合物的一些实施方案中,所述枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、短小芽孢杆菌和摩加夫芽孢杆菌与所述乳酸片球菌、戊糖片球菌和植物乳杆菌的重量比为1:10至10:1。例如,所述枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、短小芽孢杆菌和摩加夫芽孢杆菌与所述乳酸片球菌、戊糖片球菌和植物乳杆菌的重量比可以是约1:10、1:9、1:8、1:7、1:6、1:5、1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1或10:1。

[0038] 在所述水处理组合物的一些实施方案中,所述枯草芽孢杆菌可以包括枯草芽孢杆菌34 KLB。

[0039] 在一些实施方案中,所述水处理组合物可以包含约0.1重量%至10重量%,例如,约0.1重量%,0.2重量%,0.3重量%,0.4重量%,0.5重量%,0.6重量%,0.7重量%,0.8重量%,0.9重量%,1重量%,2重量%,3重量%,4重量%,5重量%,6重量%,7重量%,8重量%,9重量%,或10重量%的枯草芽孢杆菌。例如,所述水处理组合物可以包含约0.1重量%至9重量%,0.1重量%至8重量%,0.1重量%至7重量%,0.1重量%至6重量%,0.1重量%至5重量%,1重量%至5重量%,1重量%至6重量%,1重量%至7重量%,1重量%至8重量%,1重量%至9重量%,或1重量%至10重量%的枯草芽孢杆菌。

[0040] 在一些实施方案中,所述水处理组合物可以包含约0.1重量%至10重量%,例如,约0.1重量%,0.2重量%,0.3重量%,0.4重量%,0.5重量%,0.6重量%,0.7重量%,0.8重量%,0.9重量%,1重量%,2重量%,3重量%,4重量%,5重量%,6重量%,7重量%,8重量%,9重量%,或10重量%的解淀粉芽孢杆菌。例如,所述水处理组合物可以包含约0.1重量%至9重量%,0.1重量%至8重量%,0.1重量%至7重量%,0.1重量%至6重量%,0.1重量%至5重量%,1重量%至5重量%,1重量%至6重量%,1重量%至7重量%,1重量%至8重量%,1重量%至9重量%,或1重量%至10重量%的解淀粉芽孢杆菌。

[0041] 在一些实施方案中,所述水处理组合物可以包含约0.1重量%至10重量%,例如,约0.1重量%,0.2重量%,0.3重量%,0.4重量%,0.5重量%,0.6重量%,0.7重量%,0.8重量%,0.9重量%,1重量%,2重量%,3重量%,4重量%,5重量%,6重量%,7重量%,8重量%,9重量%,或10重量%的地衣芽孢杆菌。例如,所述水处理组合物可以包含约0.1重量%至9重量%,0.1重量%至8重

量%,0.1重量%至7重量%,0.1重量%至6重量%,0.1重量%至5重量%,1重量%至5重量%,1重量%至6重量%,1重量%至7重量%,1重量%至8重量%,1重量%至9重量%,或1重量%至10重量%的地衣芽孢杆菌。

[0042] 在一些实施方案中,所述水处理组合物可以包含约0.1重量%至10重量%,例如,约0.1重量%,0.2重量%,0.3重量%,0.4重量%,0.5重量%,0.6重量%,0.7重量%,0.8重量%,0.9重量%,1重量%,2重量%,3重量%,4重量%,5重量%,6重量%,7重量%,8重量%,9重量%,或10重量%的短小芽孢杆菌。例如,所述水处理组合物可以包含约0.1重量%至9重量%,0.1重量%至8重量%,0.1重量%至7重量%,0.1重量%至6重量%,0.1重量%至5重量%,1重量%至5重量%,1重量%至6重量%,1重量%至7重量%,1重量%至8重量%,1重量%至9重量%,或1重量%至10重量%的短小芽孢杆菌。

[0043] 在一些实施方案中,所述水处理组合物可以包含约0.1重量%至10重量%,例如,约0.1重量%,0.2重量%,0.3重量%,0.4重量%,0.5重量%,0.6重量%,0.7重量%,0.8重量%,0.9重量%,1重量%,2重量%,3重量%,4重量%,5重量%,6重量%,7重量%,8重量%,9重量%,或10重量%的摩加夫芽孢杆菌。例如,所述水处理组合物可以包含约0.1重量%至9重量%,0.1重量%至8重量%,0.1重量%至7重量%,0.1重量%至6重量%,0.1重量%至5重量%,1重量%至5重量%,1重量%至6重量%,1重量%至7重量%,1重量%至8重量%,1重量%至9重量%,或1重量%至10重量%的摩加夫芽孢杆菌。

[0044] 在一些实施方案中,所述水处理组合物可以包含约0.1重量%至10重量%,例如,约0.1重量%,0.2重量%,0.3重量%,0.4重量%,0.5重量%,0.6重量%,0.7重量%,0.8重量%,0.9重量%,1重量%,2重量%,3重量%,4重量%,5重量%,6重量%,7重量%,8重量%,9重量%,或10重量%的乳酸片球菌。例如,所述水处理组合物可以包含约0.1重量%至9重量%,0.1重量%至8重量%,0.1重量%至7重量%,0.1重量%至6重量%,0.1重量%至5重量%,1重量%至5重量%,1重量%至6重量%,1重量%至7重量%,1重量%至8重量%,1重量%至9重量%,或1重量%至10重量%的乳酸片球菌。

[0045] 在一些实施方案中,所述水处理组合物可以包含约0.1重量%至10重量%,例如,约0.1重量%,0.2重量%,0.3重量%,0.4重量%,0.5重量%,0.6重量%,0.7重量%,0.8重量%,0.9重量%,1重量%,2重量%,3重量%,4重量%,5重量%,6重量%,7重量%,8重量%,9重量%,或10重量%的戊糖片球菌。例如,所述水处理组合物可以包含约0.1重量%至9重量%,0.1重量%至8重量%,0.1重量%至7重量%,0.1重量%至6重量%,0.1重量%至5重量%,1重量%至5重量%,1重量%至6重量%,1重量%至7重量%,1重量%至8重量%,1重量%至9重量%,或1重量%至10重量%的戊糖片球菌。

[0046] 在一些实施方案中,所述水处理组合物可以包含约0.1重量%至10重量%,例如,约0.1重量%,0.2重量%,0.3重量%,0.4重量%,0.5重量%,0.6重量%,0.7重量%,0.8重量%,0.9重量%,1重量%,2重量%,3重量%,4重量%,5重量%,6重量%,7重量%,8重量%,9重量%,或10重量%的植物乳杆菌。例如,所述水处理组合物可以包含约0.1重量%至9重量%,0.1重量%至8重量%,0.1重量%至7重量%,0.1重量%至6重量%,0.1重量%至5重量%,1重量%至5重量%,1重量%至6重量%,1重量%至7重量%,1重量%至8重量%,1重量%至9重量%,或1重量%至10重量%的植物乳杆菌。

[0047] 所述水处理组合物可以进一步包含至少80重量%的惰性载体。例如,所述水处理组



合物可以包含至少80重量%、85重量%、90重量%、91重量%、92重量%、93重量%、94重量%、95重量%、96重量%、97重量%、98重量%、或99重量%的惰性载体。所述惰性载体包括,例如,无水葡萄糖、葡萄糖一水合物、麦芽糖糊精、树突盐(dendritic salt)、米麸、麦麸、燕麦麸、大豆粉、稻壳或其混合物。在一些实施方案中,所述惰性载体可以是水溶性稀释剂。所述水溶性稀释剂的实例包括但不限于葡萄糖一水合物、无水葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、麦芽糖糊精、氯化钠、氯化钾、氯化钙、氯化镁、硫酸钠、硫酸钾和硫酸镁。在一些实施方案中,所述惰性载体是葡萄糖一水合物。在一些实施方案中,所述惰性载体是无水葡萄糖。

[0048] 在一些实施方案中,所述水处理组合物可以包含约0.1重量%至1重量%的枯草芽孢杆菌、约0.1重量%至1重量%的解淀粉芽孢杆菌、约0.1重量%至1重量%的地衣芽孢杆菌、约0.1重量%至1重量%的短小芽孢杆菌、约0.1重量%至1重量%的摩加夫芽孢杆菌、约1重量%至5重量%的乳酸片球菌、约1重量%至5重量%的戊糖片球菌和约1重量%至5重量%的植物乳杆菌。

[0049] 在一些实施方案中,所述水处理组合物可以包含约0.2重量%的枯草芽孢杆菌、约0.6重量%的解淀粉芽孢杆菌、约0.3重量%的地衣芽孢杆菌、约0.6重量%的短小芽孢杆菌、约0.3重量%的摩加夫芽孢杆菌、约0.1重量%的枯草芽孢杆菌34KLB、约3.3重量%的乳酸片球菌、约3.3重量%的戊糖片球菌和约3.3重量%的植物乳杆菌。任选地,所述水处理组合物可以包含约87.9重量%的葡萄糖一水合物。

[0050] 所述水处理组合物可以降低总氨氮(TAN)的水平和/或亚硝酸盐的水平。

[0051] 所述饲料添加剂组合物可以呈液体或固体的形式。所述饲料添加剂组合物可以含有浓度为约 $10^6$ 至 $10^{11}$  CFU/克的细菌。优选地,所述饲料添加剂组合物中的细菌浓度为至少 $10^9$  CFU/克。在一些实施方案中,所述细菌浓度为约 $10^9$ 至 $10^{11}$  CFU/克。乳酸计数可以在MRS琼脂上获得。芽孢杆菌计数可以在胰酪胨琼脂上获得。

[0052] 在一些实施方案中,所述饲料添加剂组合物可以进一步包含对所述水生动物具有营养价值的组分。

[0053] 在使所述饲料添加剂组合物与所述水产养殖系统接触之前,可以将所述饲料添加剂组合物与常规动物饲料、例如虾饲料或鱼饲料混合或涂覆至常规动物饲料、例如虾饲料或鱼饲料上。在一些实施方案中,所述饲料添加剂组合物可以以约1:10000至1:1000的重量比与常规虾饲料或鱼饲料混合或涂覆至常规虾饲料或鱼饲料上。

[0054] 所述饲料添加剂组合物和常规虾饲料或鱼饲料也可以作为两种分开的组合物使用。例如,本文所述的方法可以进一步包括使所述水产养殖系统与常规虾饲料或鱼饲料接触。

[0055] 在一些实施方案中,所述饲料添加剂组合物可以包含约1重量%、2重量%、3重量%、4重量%、5重量%、6重量%、7重量%、8重量%、9重量%、10重量%、15重量%、20重量%、25重量%或更多的包含乳酸片球菌、戊糖片球菌和植物乳杆菌的混合物。所述饲料添加剂组合物可以进一步包含约0.1重量%、0.15重量%、0.2重量%、0.3重量%、0.4重量%、0.5重量%、0.6重量%、0.7重量%、0.8重量%、0.9重量%、1重量%、2重量%、3重量%、4重量%、5重量%或10重量%或更多的枯草芽孢杆菌34KLB。

[0056] 在一些实施方案中,所述饲料添加剂组合物可以包含0.1重量%至10重量%,例如,0.1重量%、0.2重量%、0.3重量%、0.4重量%、0.5重量%、0.6重量%、0.7重量%、0.8重量%、0.9重量%、1重量%、2重量%、3重量%、4重量%、5重量%、6重量%、7重量%、8重量%、9重量%或10重量%的

乳酸片球菌。例如,所述饲料添加剂组合物可以包含约0.1重量%至9重量%、0.1重量%至8重量%、0.1重量%至7重量%、0.1重量%至6重量%、0.1重量%至5重量%、1重量%至5重量%、1重量%至6重量%、1重量%至7重量%、1重量%至8重量%、1重量%至9重量%、或1重量%至10重量%的乳酸片球菌。

[0057] 在一些实施方案中,所述饲料添加剂组合物可以包含0.1重量%至10重量%,例如,0.1重量%、0.2重量%、0.3重量%、0.4重量%、0.5重量%、0.6重量%、0.7重量%、0.8重量%、0.9重量%、1重量%、2重量%、3重量%、4重量%、5重量%、6重量%、7重量%、8重量%、9重量%或10重量%的戊糖片球菌。例如,所述饲料添加剂组合物可以包含约0.1重量%至9重量%、0.1重量%至8重量%、0.1重量%至7重量%、0.1重量%至6重量%、0.1重量%至5重量%、1重量%至5重量%、1重量%至6重量%、1重量%至7重量%、1重量%至8重量%、1重量%至9重量%、或1重量%至10重量%的戊糖片球菌。

[0058] 在一些实施方案中,所述饲料添加剂组合物可以包含0.1重量%至10重量%,例如,0.1重量%、0.2重量%、0.3重量%、0.4重量%、0.5重量%、0.6重量%、0.7重量%、0.8重量%、0.9重量%、1重量%、2重量%、3重量%、4重量%、5重量%、6重量%、7重量%、8重量%、9重量%或10重量%的植物乳杆菌。例如,所述饲料添加剂组合物可以包含约0.1重量%至9重量%、0.1重量%至8重量%、0.1重量%至7重量%、0.1重量%至6重量%、0.1重量%至5重量%、1重量%至5重量%、1重量%至6重量%、1重量%至7重量%、1重量%至8重量%、1重量%至9重量%、或1重量%至10重量%的植物乳杆菌。

[0059] 在一些实施方案中,所述饲料添加剂组合物可以包含0.05重量%至10重量%,例如,0.05重量%、0.1重量%、0.2重量%、0.3重量%、0.4重量%、0.5重量%、0.6重量%、0.7重量%、0.8重量%、0.9重量%、1重量%、2重量%、3重量%、4重量%、5重量%、6重量%、7重量%、8重量%、9重量%或10重量%的枯草芽孢杆菌34KLB。例如,所述饲料添加剂组合物可以包含约0.05重量%至9重量%、0.05重量%至8重量%、0.05重量%至7重量%、0.05重量%至6重量%、0.05重量%至5重量%、0.1重量%至9重量%、0.1重量%至8重量%、0.1重量%至7重量%、0.1重量%至6重量%、0.1重量%至5重量%、1重量%至5重量%、1重量%至6重量%、1重量%至7重量%、1重量%至8重量%、1重量%至9重量%、或1重量%至10重量%的枯草芽孢杆菌34KLB。

[0060] 所述饲料添加剂组合物可以进一步包含至少80重量%的惰性载体。例如,所述饲料添加剂组合物可以包含至少80重量%、85重量%、90重量%、91重量%、92重量%、93重量%、94重量%、95重量%、96重量%、97重量%、98重量%、或99重量%的惰性载体。在一些实施方案中,所述惰性载体可以是水溶性稀释剂。

[0061] 在一些实施方案中,所述饲料添加剂组合物可以包含约0.1重量%至10重量%的包含乳酸片球菌、戊糖片球菌和植物乳杆菌的混合物(其中所述细菌各自以按重量计相等的量存在于所述混合物中),和约0.05重量%至5重量%的枯草芽孢杆菌34KLB。

[0062] 在一些实施方案中,所述饲料添加剂组合物可以包含约2重量%的包含乳酸片球菌、戊糖片球菌和植物乳杆菌的混合物(其中所述细菌各自以按重量计相等的量存在于所述混合物中),和0.15重量%的枯草芽孢杆菌34KLB。任选地,所述饲料添加剂组合物可以进一步包含约97.85重量%的米麸或Nutri-Sure。

[0063] 在一些实施方案中,所述饲料添加剂组合物可以包含约0.40重量%的包含乳酸片球菌、戊糖片球菌和植物乳杆菌的混合物(其中所述细菌各自以按重量计相等的量存在于

所述混合物中),和0.15重量%的枯草芽孢杆菌34KLB。任选地,所述饲料添加剂组合物可以进一步包含约93.85重量%的葡萄糖一水合物和约4重量%的硅藻土。

[0064] 所述水处理组合物或所述饲料添加剂组合物中的细菌可以使用本领域中已知的任何标准发酵方法、诸如固体基质或浸没液体发酵来产生。发酵的培养物可以是混合培养物,微生物复合物或单一分离株。益生菌乳酸细菌可以进行厌氧发酵。在一些实施方案中,所述细菌在碳水化合物存在的情况下进行厌氧发酵。合适的碳水化合物包括菊粉、低聚果糖和低聚葡萄糖。

[0065] 在发酵后,所述细菌通过本领域中的任何已知方法收获。例如,所述细菌通过过滤或离心收获,或简单地作为发酵物提供。所述细菌可以通过本领域中已知的任何方法干燥。例如,所述细菌可以通过液氮干燥,随后冻干。根据本公开的组合物被冷冻干燥至水分含量小于20重量%、15重量%、10重量%、9重量%、8重量%、7重量%、6重量%、5重量%、4重量%、3重量%、2重量%或1重量%。在一些实施方案中,根据本发明的组合物已经被冷冻干燥至水分含量小于5重量%。在一些实施方案中,将冷冻干燥的粉末研磨以减小粒径。通过在低于10°C、9°C、8°C、7°C、6°C、5°C、4°C、3°C、2°C、1°C或0°C的温度下进行圆锥研磨来研磨所述细菌。优选地,所述温度小于4°C。例如,所述粒径小于1500、1400、1300、1200、1100、1000、900、800、700、600、500、400、300、200或100微米。优选地,将所述冷冻干燥的粉末研磨以减小粒径,使得所述粒径小于800微米。最优选的是小于约400微米的粒径。在最优选的实施方案中,干燥的粉末具有200微米的平均粒径,其中60%或更多的混合物在100-800微米之间的大小范围内。可以根据ANSI/ASAE S319.4方法使用筛分测量粒径。

[0066] 在所述水处理组合物的一些实施方案中,将所述枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、摩加夫芽孢杆菌、乳酸片球菌、戊糖片球菌和植物乳杆菌单独地有氧发酵、收获、冷冻干燥和研磨,以产生具有约200微米的平均粒径的粉末,其中大于60%的所述混合物在100-800微米之间的大小范围内。

[0067] 在所述饲料添加剂组合物的一些实施方案中,将所述乳酸片球菌、戊糖片球菌、植物乳杆菌和枯草芽孢杆菌34KLB单独地有氧发酵、收获、冷冻干燥和研磨,以产生具有约200微米的平均粒径的粉末,其中大于60%的所述混合物在100-800微米之间的大小范围内。

[0068] 所述水处理组合物可以一天一次、一天几次(例如,2、3、4或更多次)或每几天一次(例如,一周一次)添加至所述水产养殖系统中。在一些实施方案中,以每天约0.1 ppm至50 ppm、例如每天约0.1 ppm至40 ppm、每天约0.1 ppm至30 ppm或每天约0.2 ppm至10 ppm的剂量提供所述水处理组合物。在一些实施方案中,以每天约0.2 ppm、每天约1 ppm、每天约2 ppm、每天约3 ppm、每天约4 ppm、每天约5 ppm、每天约6 ppm、每天约7 ppm、每天约8 ppm、每天约9 ppm或每天约10 ppm的剂量提供所述水处理组合物。

[0069] 可以根据需要长期地将所述水处理组合物添加至所述水产养殖系统中。根据本公开的处理可以包括初步评价所述水产养殖系统。作为处理过程的一部分,可以测量、观察和/或建立各种特征。处理水的合适特征可以包括但不限于透明度、水温、pH、溶解氧、盐度、电导率、总碱度、硬度、总氨、亚硝酸盐和/或硝酸盐。因此,使用所述水处理组合物的持续时间可以取决于上述特征中的一种或多种。可以将所述水处理组合物添加至所述水产养殖系统中,持续至少7天、例如一周或更长、两周或更长、三周或更长、四周或更长的时间段。还可以对水和沉积物进行采样,以确定弧菌细菌的水平(弧菌细菌的低水平是优选的)。可以随

时间监测水质。

[0070] 所述饲料添加剂组合物可以一天一次、一天几次(例如,2、3、4或更多次)或每几天一次(例如,一周一次)添加至所述水产养殖系统中。在一些实施方案中,以每天约0.5 ppm至100 ppm,例如每天约0.5 ppm至80 ppm、每天约0.5 ppm至50 ppm、每天约2 ppm至60 ppm或每天约2 ppm至50 ppm的剂量提供所述饲料添加剂组合物。所述剂量可以取决于水生动物的类型和/或生长阶段。在一些实施方案中,以每天约2 ppm、每天5 ppm、每天10 ppm、每天15 ppm、每天20 ppm、每天25 ppm、每天30 ppm、每天35 ppm、每天40 ppm、每天45 ppm或每天50 ppm的剂量提供所述饲料添加剂组合物。

[0071] 可以根据需要长期地将所述饲料添加剂组合物添加至所述水产养殖系统中。可以将所述饲料添加剂组合物添加至所述水产养殖系统中,持续至少7天、例如一周或更长、两周或更长、三周或更长、四周或更长的时段。

[0072] 在一些实施方案中,所述水产养殖系统可以与所述水处理组合物和所述饲料添加剂组合物同时接触。在这种情况下,所述水处理组合物和所述饲料添加剂组合物可以是两种不同的组合物。或者,可以将所述水处理组合物喷涂至所述饲料添加剂组合物上。也可以在生产所述饲料添加剂组合物期间添加所述水处理组合物。在一些实施方案中,所述水产养殖系统可以在所述饲料添加剂组合物之前与所述水处理组合物接触。在一些实施方案中,所述水产养殖系统可以在所述饲料添加剂组合物之后与所述水处理组合物接触。

[0073] 对于给定日,所述水处理组合物与所述饲料添加剂组合物的重量比是约1:1至150:1,这取决于所述水生动物的类型。所述水处理组合物与所述饲料添加剂组合物的重量比可以是约1:1至140:1、1:1至130:1、1:1至120:1、1:1至110:1、10:1至140:1、10:1至130:1、10:1至120:1、10:1至110:1、50:1至140:1、50:1至130:1、50:1至120:1或50:1至110:1。例如,当所述水生动物是有鳍鱼时,所述水处理组合物与所述饲料添加剂组合物的重量比可以是70:1至105:1。当所述水生动物是虾时,在孵化阶段,所述水处理组合物与所述饲料添加剂组合物的重量比可以是1:1至2:1。

[0074] 本文公开的方法可用于水产养殖系统,包括但不限于池塘、水塘、泻湖、河口和海洋中的封闭区域。本文公开的方法可以提高适合于水产养殖的任何生物(包括但不限于鱼(例如,小龙虾(crayfish)、底栖鱼(bottom dwelling fish)或有鳍鱼)、虾、龙虾、大虾(prawns)、牡蛎、贻贝、鸟蛤(cockles)、软体动物和海胆)的存活率。

[0075] 在一些实施方案中,与其中不使用所述水处理组合物和饲料添加剂组合物的对照相比,所述方法可以将所述水生动物的存活率增加至少5%。在一些实施方案中,与其中不使用所述水处理组合物和饲料添加剂组合物的对照相比,所述方法可以将所述水生动物的存活率增加至少6%、至少7%、至少8%、至少9%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%或至少50%。在一些实施方案中,与其中不使用所述水处理组合物和饲料添加剂组合物的对照相比,所述方法可以将所述水生动物的存活率增加约10%至200%。

[0076] 在一些实施方案中,与其中不使用所述水处理组合物和饲料添加剂组合物的对照相比,所述方法可以将所述水生动物的生物量增加至少5%。在一些实施方案中,与其中不使用所述水处理组合物和饲料添加剂组合物的对照相比,所述方法可以将所述水生动物的生物量增加至少6%、至少7%、至少8%、至少9%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%或至少50%。在一些实施方案中,与其中不使用所述水处理组合物和饲料添加剂组合物的对照相比,所

述方法可以将所述水生动物的生物量增加约10%至200%。

[0077] 本发明的细节在以下所附描述中阐明。尽管与本文描述的方法和材料类似或等效的那些可以用于本发明的实践或测试中,但现在描述说明性的方法和材料。本发明的其他特征、目标和优点将从说明书和权利要求书变得显而易见。在说明书和所附权利要求书中,单数形式也包括复数,除非上下文另外明确指出。除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的不同含义。本说明书中引用的所有专利和出版物都通过引用以其整体并入本文。

[0078] 定义

如本文所用的术语“包含”与“包括”或“含有”同义,并且是包括性的或开放式的,并且不排除额外的、未记载的成员、要素或方法步骤。“由...组成”意指包括且限于短语“由...组成”之后的任何内容。因此,短语“由...组成”表明所列出的要素是需要的或强制性的,并且可以不存在其他要素。“基本上由...组成”意指包括在该短语之后列出的任何要素,并且限于不干扰本公开中针对所列要素所指明的活性或作用或对本公开中针对所列要素所指明的活性或作用有贡献的其他要素。因此,短语“基本上由...组成”表明所列出的要素是需要的或强制性的,但其他要素是任选的并且可以存在或可以不存在,这取决于它们是否实质上影响所列出的要素的活性或作用。

[0079] 在本公开中,冠词“一个/种(a)”和“一个/种(an)”用于指代该冠词的语法对象中的一个/种或多于一个/种(即,至少一个/种)。通过实例的方式,“一个/种要素”意指一个/种要素或多于一个/种要素。

[0080] 如本文在说明书和权利要求书中使用的短语“和/或”应被理解为意指如此连接的要素中的“任一个/种或两个/种”,即,在一些情况下结合地存在和在其他情况下分离地存在的要素。用“和/或”列出的多个/种要素应以相同的方式解释,即,如此连接的要素中的“一个/种或多个/种”。除了由“和/或”条款明确标识的要素以外,还可以任选地存在其他要素,无论与那些具体标识的要素相关还是无关。因此,作为非限制性实例,当与开放式语言、诸如“包含”结合使用时,对“A和/或B”的提及在一个实施方案中可以仅指A(任选地包括除了B以外的要素);在另一个实施方案中,仅指B(任选地包括除了A以外的要素);在又一个实施方案中,是指A和B两者(任选地包括其他要素);等。

[0081] 如本文在说明书和权利要求书中使用,“或”应被理解为具有与如以上定义的“和/或”相同的含义。例如,当分开列表中的项目时,“或”或“和/或”应被解释为包括性的,即包括许多要素或要素列表中的至少一个/种,但也包括多于一个/种,和任选地额外未列出的项目。仅明确指出相反的术语,诸如“仅之一”或“恰好之一”,或当在权利要求书中使用时,“由...组成”将指包括许多要素或要素列表中的恰好一个/种要素。通常,如本文所用的术语“或”应当仅当前置排他性术语、诸如“任一”、“之一”、“仅之一”或“恰好之一”时被解释为指示排他性替代方案(即“一者或另一者,但不是两者”)。当在权利要求书中使用时,“基本上由...组成”应具有专利法领域中所使用的普通含义。

[0082] 术语“约”意指在给定值或范围的 $\pm 10\%$ 内。

[0083] 权利要求书不应该被解读为限于所描述的顺序或要素,除非对该效果说明。应当理解,本领域普通技术人员可以在形式和细节中进行各种改变,而不脱离所附权利要求的精神和范围。请求保护落入以下权利要求书及其等同方案的精神和范围内的所有实施方

案。

## 实施例

[0084] 本公开通过以下实施例进一步举例说明,所述实施例不应被解释为将本公开在范围或精神上限制于本文所述的具体程序。应理解的是,提供所述实施例以举例说明某些实施方案,并且由此并不意欲限制本公开的范围。进一步应理解的是,在不脱离本公开的精神和/或所附权利要求的范围的情况下,可以采用各种其他实施方案、修改及等同方案(其可能向本领域技术人员提示自身)。

[0085] 实施例1. 鲶鱼中的生长性能研究

收集卵并带至SPF设施,在此处,将它们根据标准方案进行消毒。孵化后,鱼苗将开始食用商业膳食。孵化后,将鱼苗在槽中保持30天,然后池塘放养。将鱼苗放养入三个槽中,用于处理,如下所详述。

[0086] 槽1. 对照饲料(无微生物添加剂产品)。

[0087] 槽2. 将本发明的饲料添加剂组合物以500g/mT当量涂覆至饲料上。将本发明的水处理组合物每天以5mg/L的当量最终浓度直接添加至槽水中。

[0088] 槽3. 将本发明的饲料添加剂组合物以1000g/mT当量涂覆至饲料上。将本发明的水处理组合物每天以15mg/L的当量最终浓度直接添加至槽水中。

[0089] 长大(grow out)参数:根据密西西比州立大学标准的放养和饲喂方案,放养鲶鱼小鱼并进行饲喂和长大方案。池塘为1/10英亩,每个池塘4个网围(重复)。放养密度:1000尾鱼苗/网围(研究长度-长大4个月)。

[0090] 具有疾病攻击的长大处理:在攻击前,使鱼苗适应池塘2个月。对于攻击前测量,存在4个网围/处理,且对于攻击后测量存在4个网围/处理。

[0091] 生长部分:1. 对照饲料(无微生物产品)池塘。2. 将本发明的饲料添加剂组合物以每公吨饲料500g的当量涂覆至饲料上。将本发明的水处理组合物以1 kg/Ha/周(1/10英亩 = 0.04047 Ha = 404.7m<sup>2</sup>)的当量、最终浓度添加至池塘水中。3. 将本发明的饲料组合物以每公吨饲料1000g的当量涂覆至饲料上。将本发明的水处理组合物以1 kg/Ha/周(1/10英亩 = 0.04047 Ha = 404.7m<sup>2</sup>)的当量、最终浓度添加至池塘水中。

[0092] 对于疾病攻击:除了如下添加额外的商业益生菌组合物外,处理3保持相同:(1) 饲料涂覆:将本发明的饲料添加剂组合物和商业益生菌涂覆至漂浮的饲料上。将所述饲料添加剂组合物以1kg/mT饲料的当量涂覆,并且将商业益生菌以50克/公吨饲料涂覆;和(2) 水添加:将水处理组合物以1mg/Ha/周的当量、最终浓度添加至池塘水中,并且将商业益生菌以150g/Ha/周的当量最终浓度添加至池塘水中。

[0093] 生长时段:使对照和处理鲶鱼生长至每个模型系统的大小。

[0094] 在长大(grow out)时段期间,以规律间隔评估鲶鱼健康和水质以确保健康的生产。对于水质,每周监测总氨、亚硝酸盐和pH。对于鲶鱼健康,在疾病攻击之前和攻击之后针对以下评价鲶鱼:平均重量增加(AWG)、比生长速率(SGR)、饲料转化率(FCR)、存活率。对于鲶鱼爱德华氏菌(*Edwardsiella ictaluri*)抗性,测量组织学参数(小肠、大肠的空泡形成(个别室(cell)肿胀))。

[0095] 实施例2. 用于将本发明的饲料添加剂组合物涂覆至漂浮的鱼饲料上的方案

步骤1. 确保所有设备是清洁和彻底干燥的。

[0096] 步骤2. 称出1kg待涂覆的饲料(减去将用于涂覆的饲料添加剂组合物的量)。

[0097] 步骤3. 当涂覆500克/mT饲料当量时:(i) 称出5克饲料添加剂组合物。(ii) 测量出120 mL DI水。(iii) 将5克饲料添加剂组合物添加至120 mL DI水中,并使用共混器、搅拌混合器或具有搅拌棒的搅拌板彻底混合。一旦混合完成,就将此溶液转移至喷涂单元。(iv) 每kg待涂覆的饲料将接受12 mL来自步骤(iii)的溶液。1000克饲料- 12克涂层= 988克所需饲料。(v) 将所需量的待涂覆的饲料添加至饲料混合器中。(vi) 在饲料混合器打开的情况下,开始将含有饲料添加剂组合物的溶液喷涂至饲料床上。避免喷涂至混合器叶片和混合器壁上。建议不断摇动喷涂单元,以保持未溶解的固体分散。监测喷涂上的量是至关重要的。这可以体积计量地 - 通过监测来自喷涂系统的液体体积的减少来进行,或重量计量地-通过测量喷涂系统的重量损失来进行。(vii) 一旦涂覆完成(将12 mL溶液涂覆至988克饲料上),关闭混合器,并将涂覆的饲料散布至干燥筛网或铝箔上,并允许风干30分钟。

[0098] 或者,当涂覆1000克/mT饲料当量时:(i) 称出10克饲料添加剂组合物。(ii) 测量出120 mL DI水。(iii) 将10克饲料添加剂组合物添加至120 mL DI水中,并使用共混器、搅拌混合器或具有搅拌棒的搅拌板彻底混合。一旦混合完成,就将此溶液转移至喷涂单元。(iv) 每kg待涂覆的饲料将接受12 mL来自步骤(iii)的溶液。1000克饲料- 12克涂层= 988克所需饲料。(v) 将所需量的待涂覆的饲料添加至饲料混合器中。(vi) 在饲料混合器打开的情况下,开始将饲料添加剂组合物的溶液喷涂至饲料床上。避免喷涂至混合器叶片和混合器壁上。建议不断摇动喷涂单元,以保持未溶解的固体分散。监测喷涂上的量是重要的。这可以体积计量地 - 通过监测来自喷涂系统的液体体积的减少来进行,或重量计量地-通过测量喷涂系统的重量损失来进行。(vii) 一旦涂覆完成(将12 mL溶液涂覆至988克饲料上),关闭混合器,并将涂覆的饲料散布至干燥筛网或铝箔上,并允许风干30分钟。

[0099] 注意:涂覆也可以通过如下进行:将饲料作为单层向外散布至清洁的托盘(塑料或金属)上,然后将饲料添加剂组合物溶液均匀地喷涂在饲料的表面上,直到饲料看起来发亮和湿润。用戴手套的手将饲料翻动几次以混合,均匀地向外散布在平底锅上,并继续涂覆。

[0100] 实施例3. 用于用本发明的饲料添加剂组合物和商业益生菌涂覆1 kg鱼饲料的方案

步骤1. 确保所有设备是清洁和彻底干燥的。

[0101] 步骤2. 称出1kg待涂覆的饲料(减去将用于涂覆的饲料添加剂组合物的量)。

[0102] 步骤3. 当涂覆1000克/mT和50克商业益生菌/mT饲料当量时:(i) 称出100克本发明的饲料添加剂组合物和5克商业益生菌。(ii) 测量出1.2升DI水。(iii) 将100克本发明的微生物组合物和5克商业益生菌添加至1.20 L DI水中,并使用共混器、混合搅拌器或具有搅拌棒的搅拌板彻底混合。一旦混合完成,就将此溶液转移至喷涂单元。(iv) 每kg待涂覆的饲料将接受12 mL来自步骤(iii)的溶液。1000克饲料- 12克涂层= 988克所需饲料。(v) 将所需量的待涂覆的饲料添加至饲料混合器中。(vi) 在饲料混合器打开的情况下,开始将微生物饲料添加剂溶液喷涂至饲料床上。避免喷涂至混合器叶片和混合器壁上。建议不断摇动喷涂单元,以保持未溶解的固体分散。监测喷涂上的量是重要的。这可以体积计量地 - 通过监测来自喷涂系统的液体体积的减少来进行,或重量计量地-通过测量喷涂系统的重量损失来进行。(vii) 一旦涂覆完成(将12 mL溶液涂覆至988克饲料上),关闭混合器,并将

涂覆的饲料散布至干燥筛网或铝箔上,并允许风干30分钟。

[0103] 注意:涂覆也可以通过如下进行:将饲料作为单层向外散布至清洁的托盘(塑料或金属)上,然后将微生物饲料添加剂溶液均匀地喷涂在饲料的表面上,直到饲料看起来发亮和湿润。用戴手套的手将饲料翻动几次以混合,均匀地向外散布在平底锅上,并继续涂覆。

[0104] 实施例4. 南美白虾(Vannamei Shrimp)的一般水产养殖方案

(1) 孵化方案:孵卵储备鱼(Broodstock)是经认证的SPF。所有孵卵储备鱼新鲜饲料被测试为没有绿色弧菌细菌,疾病(弧菌病、EMS、WSSV和EHP),并且黄色弧菌细菌的水平低。

[0105] 对于孵卵储备鱼,对于1kg新鲜饲料,使用10克本发明的饲料添加剂组合物。在制成的20分钟内将混合的饲料添加至孵卵储备鱼槽中。

[0106] 孵卵储备鱼槽和水应当是清洁的。测试所述孵卵储备鱼槽,以证实它们也没有绿色弧菌细菌,疾病且黄色弧菌细菌的水平低。对于1升槽水,添加2mg/天的本发明的水处理组合物。例如,对于1 m<sup>3</sup>槽,在清洁海水中混合2克本发明的水处理组合物。孵化槽和水应当是清洁的。孵化槽被测试为没有绿色弧菌细菌,疾病(弧菌病、EMS、WSSV和EHP),并且黄色弧菌细菌的水平低。

[0107] 对于孵化槽,每1立方米槽水体积使用0.5 ppm本发明的饲料添加剂组合物,其直接混合至槽水中。在无节幼体阶段开始到溞幼体3阶段和在糠虾幼体阶段开始到PL (1-4)阶段,使用该剂量。

[0108] 使用本发明的水处理组合物来维持孵化槽水质并抑制弧菌生长。活化本发明的水处理组合物,然后添加至孵化槽水中。

[0109] 表1. 使用糖蜜的活化配方

水处理组合物 (g)	NaHCO <sub>3</sub> (g)	矿物质混合物 (g)	糖蜜 (g)	水 (g)
1	1	1	1	1

[0110] 表2. 使用红糖的活化配方

水处理组合物 (g)	NaHCO <sub>3</sub> (g)	矿物质混合物 (g)	红糖 (g)	水 (g)
1	1	1	0.247	1

[0111] 表3. 本发明的活化的微生物组合物的应用率

阶段	活化溶液的体积 (L)	水体积 (m <sup>3</sup> )
无节幼体期至溞幼体期3	1	1
糠虾幼体期1至幼体后期(PL)	2	1

[0112] 矿物质混合物包括磷酸氢二钾、丙酸钙、甘氨酸锰、硒盐、甘氨酸铁、甘氨酸铜、甘氨酸锌和氯化钴。在一些实施方案中,所述矿物质混合物包含约64重量%磷酸氢二钾、约20重量%丙酸钙、约4.5重量%甘氨酸锰、约2.7重量%硒盐、约3.1重量%甘氨酸铁、约2.8重量%甘氨酸铜、约2.7重量%甘氨酸锌和约0.08重量%氯化钴。

[0113] 准备用于活化水处理组合物:(1)为了制备20 L坛瓶(carboy)的活化混合物,称出20克水处理组合物;(2)将适量的NaHCO<sub>3</sub>、矿物质混合物、糖蜜或红糖添加至适量的消毒淡水中并混合(如果使用盐水,则应当将其彻底消毒以消除弧菌);(3)添加所述水处理组合物并混合;和(4)将混合物充气18小时。在高总氨氮(TAN > 1 ppm)或高弧菌计数(超过10<sup>3</sup> CFU/mL)的情况下,将水处理组合物、NaHCO<sub>3</sub>和高质量矿物质混合物的剂量增加至2 g/L。



[0114] 使用说明：(1) 在放养无节幼体之前三小时应用；(2) 在活化完成之后，在幼体槽水表面上应用混合物，以确保产品均匀散布；(3) 用消毒的水冲洗活化容器，并将此冲洗液添加至幼体槽；和(4) 在孵化周期期间每天一次应用活化的水处理组合物。在高总氨氮(TAN > 1 ppm)或高弧菌计数(超过 $10^3$  CFU/mL)的情况下，将水处理组合物、 $\text{NaHCO}_3$ 和高质量矿物质混合物的剂量增加至2 g/L。

[0115] 一旦虾从PL4转变至PL5，就引入富集的活饲料和人工饲料。在该阶段，将本发明的饲料添加剂组合物以0.02g/升槽水的比率添加至活饲料中。还以0.6克/升槽水的比率添加化合物二十二碳六烯酸(DHA)。在20-24小时后收获富集的活饲料，并饲喂至PL 5-10，直至收获。

[0116] 当引入人工饲料时，槽水质量可能开始下降，并且弧菌水平可能上升。在该阶段，本发明的水处理组合物的剂量增加至2 ppm。在正使用人工饲料的阶段，将水处理组合物剂量增加至2克/1立方米槽水体积/天。

[0117] 在育苗放养(nursery stocking)之前，将虾苗(shrimp seed)进行质量测试，并通过盐度胁迫测试。

[0118] 当虾达到PL10时，实施另一盐度胁迫测试。建议在蜕皮阶段期间不进行盐度胁迫测试。

[0119] 一旦PL达到PL(12)阶段，就将它们转移至育苗槽用于进一步成熟，然后长大。

[0120] 在育苗放养前测试来自孵化的PL(PL12)，以便没有绿色弧菌细菌、疾病(弧菌病、EMS、WSSV和EHP)，且黄色弧菌细菌的水平低。

[0121] (2) 育苗方案：育苗槽(或池塘)和水应当清洁。测试槽(或池塘土壤)，以便没有绿色弧菌细菌、疾病(弧菌病、EMS、WSSV和EHP)，且黄色弧菌细菌的水平低。

[0122] 为了维持水质并抑制弧菌生长，在育苗放养之前，在放养PL之前，将所述槽(或池塘)水用本发明的活化的水处理组合物预调节3-5天。

[0123] 如果育苗使用槽，则在放养之前，使用以1ppm/槽的比率添加至每个槽中的本发明的活化的水处理组合物将槽水预调节3-5天。每天检查水质。为了增加氨水平(TAN)、降低水质或增加弧菌生长，将本发明的水处理组合物根据表4或5给药。

[0124] 表4. 对于用糖蜜活化

水处理阶段	水处理组合物 (g)	糖蜜 (g)	米麸 (g)	矿物质混合物 (g)	$\text{NaHCO}_3$ (g)	水 (L)
每日微生物成熟 (7天)	1	5	5	1	1	1
成熟后每日应用剂量 (Secchi 盘 > 35 cm)	1	5	5	1	1	1
成熟后每日应用剂量 (Secchi 盘 < 35 cm)	1	5	0	1	1	1

[0125] 表5. 对于用红糖活化

水处理阶段	水处理组合物 (g)	红糖 (g)	米麸 (g)	矿物质混合物 (g)	$\text{NaHCO}_3$ (g)	水 (L)
每日微生物成熟 (7天)	1	1.37	5	1	1	1
成熟后每日应用剂量 (Secchi 盘 > 35 cm)	1	1.37	5	1	1	1
成熟后每日应用剂量 (Secchi 盘 < 35 cm)	1	1.37	0	1	1	1

[0126] 如果对于育苗使用池塘而不是槽，则使用以每个池塘1kg/Ha的比率向每个池塘添加的本发明的活化的水处理组合物将池塘水预调节3-5天。每天检查水质。为了增加氨水平(TAN)、降低水质或增加弧菌生长，将本发明的水处理组合物根据表6给药。

[0127] 表6.

条件	剂量 (g/m <sup>2</sup> )	米麸 (g)
对于微生物成熟	1	-
微生物成熟后的 Secchi 盘读数 > 35 cm	1	5.0
微生物成熟后的 Secchi 盘读数 ≤ 35 cm	1	-
微生物成熟后水交换率 > 10%	1	-
微生物成熟后的最佳条件 (TAN < 2.5 ppm, 亚硝酸盐 < 5 ppm, Secchi 盘读数 < 35 cm, 弧菌计数为 < 10 <sup>3</sup> CFU/mL, 且总异养菌 > 10 <sup>5</sup> CFU/mL)	0.5	-
微生物成熟后的次优条件 (TAN ≥ 2.5 ppm, 亚硝酸盐 ≥ 5 ppm, 弧菌计数为 ≥ 10 <sup>3</sup> CFU/mL, 或总异养菌 ≤ 10 <sup>5</sup> CFU/mL)	2.0	-

[0128] 对于在育苗阶段的人工饲料, 将本发明的饲料添加剂组合物直接涂覆至饲料上, 并根据以下以 0.5g/kg 饲料的比率根据饲喂方案递送: 为了涂覆化合物挤出或制粒的饲料, (1) 将 0.5 g 本发明的饲料添加剂组合物溶解于 12 毫升水或 12 毫升 1:1 比率的水+糖蜜中; 和 (2) 将混合物均匀地喷涂至饲料上。在喷涂的同时混合所述饲料, 以确保用喷涂混合物均匀地涂覆饲料。

[0129] 将 PL 以与养殖实践一致的放养密度放养至育苗槽或池塘中。在阶段 PL10-12 放养 PL, 其中大小均一的虾具有深或浅棕色。丢弃具有红色、蓝色或绿色的 PL。

[0130] 在育苗期期间定期监测育苗槽水质。

[0131] 根据养殖实践, 育苗 PL 长大至成熟。

[0132] 在收获时, 测试每个育苗槽或池塘的虾 PL (25-30), 以便没有绿色弧菌细菌、疾病 (弧菌病、EMS、WSSV 和 EHP), 且黄色弧菌细菌的水平低。

[0133] 还对 PL 进行取样并针对计数和生长进行分析, 然后放养长大。

[0134] 长大池塘方案: 从育苗槽/池塘收获来自育苗期的虾, 并以根据养殖实践的放养密度转移至长大池塘。对于池塘准备, 在重新放养之前, 将长大池塘进行清洁, 准备和针对可接受性进行评价。

[0135] 塑料内衬池塘准备: 在填充和重新放养之前, 将塑料内衬池塘排干, 清除碎屑并冲洗 (用氯溶液) 以消毒池塘并除去可能粘附至塑料的生物膜。将池塘进水口和出水口密封, 以防止海水的进入。将塑料内衬修复并密封, 以防止渗漏水泄漏至池塘中。然后将池塘干燥并扫净所有残余的有机碎屑, 死虾, 并清除所有甲壳动物或潜在的携带疾病的有害生物, 包括侧壁。

[0136] 土制池塘准备: 在填充和重新放养之前, 将池塘完全排干。收获后, 除去所有死虾。污泥和有机物质从池塘泵出或手动除去。池塘需要在填充前进行干燥, 在每次长大之后撒石灰, 并且每年至少一次翻耕。测试池塘土壤的 pH, 撒石灰 (其中适当的石灰应用率由土壤 pH 定义), 并在重新填充之前干燥至少 7 天, 或者直至土壤 pH 恢复至接近中性。还测试池塘土壤, 以便没有绿色弧菌细菌、疾病 (弧菌病、EMS、WSSV 和 EHP), 且黄色弧菌细菌的水平低, 然后用水重新填充和放养。

[0137] 在干燥之后, 将清洁的过滤水添加至池塘, 填充至 100 cm 的深度。

[0138] 然后, 水处理组合物根据表 7 给药。

[0139] 表7.

条件	剂量 (g/m <sup>3</sup> )	米麸 (g)
对于微生物成熟	0.8	-
微生物成熟后的 Secchi 盘读数 > 35 cm	0.15	0.75
微生物成熟后的 Secchi 盘读数 ≤ 35 cm	0.15	-
微生物成熟后水交换率 > 10%	0.15	-
微生物成熟后的最佳条件 (TAN < 2.5 ppm, 亚硝酸盐 < 5ppm, Secchi 盘 读数 < 35 cm, 弧菌计数为 < 10 <sup>3</sup> CFU/mL, 或 总异养菌 > 10 <sup>5</sup> CFU/mL)	0.075	-
微生物成熟后的次优条件 (TAN ≥ 2.5 ppm, 亚硝酸盐 ≥ 5 ppm, 弧菌计数 为 ≥ 10 <sup>3</sup> CFU/mL, 或总异养菌 ≤ 10 <sup>5</sup> CFU/mL)	0.3	-

[0140] 如果适用,定期测试水库、运河和池塘水,以便没有疾病(弧菌病、EMS、WSSV和EHP)。如果可能,用于重新放养长大池塘的水也应当保留在水库中,直到其变得被次级生产力物种、诸如桡足类和轮虫类居植(populate)。定期将本发明的水处理剂应用于水库以维持有益异养细菌的种群。在填充过程期间应用1 kg/ha的剂量本发明的水处理剂,然后其后可应用500g/ha的每周维持剂量。

[0141] 每周至少一次,采集水质测量值,包括:水pH,温度,盐度和碱度 - 同时还对水和沉积物进行采样,用于细菌学分析(弧菌物种形成)。

[0142] 为了在长大期间维持最佳水质并补救有机废物的增长,以根据表7的每日比率将本发明的活化水处理组合物添加至每个长大池塘。

[0143] 对于胁迫的池塘管理,根据表7中的给药说明应用本发明的活化水处理剂以允许水成熟。

[0144] 可以将本发明的饲料添加剂组合物直接涂覆至饲料上。为了涂覆化合物挤出或制粒的饲料:(1)将适量的本发明的饲料添加剂组合物溶解于12毫升水或12毫升1:1比率的水+糖蜜中;和(2)将混合物均匀地喷涂至饲料上。在喷涂的同时混合所述饲料,以确保用喷涂混合物均匀地涂覆饲料。

[0145] 在长大期间,常规测试长大池塘的水质和弧菌水平。也定期监测虾的质量、外观、生长和重量。

[0146] 实施例5

实验在四个18 m<sup>3</sup>槽中进行,其中每个槽有500万无节幼体。所述槽中的两个是对照,并且所述槽中的两个是BiOWiSH处理的(即,用本发明的组合物处理)。在所有对照槽中,给无节幼体(虾的第一幼体期)饲喂标准膳食,但在BiOWiSH槽中,用本发明的饲料添加剂组合物加强膳食。结果显示于表8中。

[0147] 表8.

批次	详情	收获的总 PL (组合的 2 个槽)	
		对照	BiOWiSH
3月25日-4月12日	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 18 m<sup>3</sup> 槽</li> <li>• 每个槽 5 百万无节幼体</li> <li>• 2 个 BiOWiSH 槽和 2 个对照槽</li> <li>• 在 PL 10 收获</li> </ul>	417 万	425 万
3月31日-4月18日	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 18 m<sup>3</sup> 槽</li> <li>• 每个槽 5 百万无节幼体</li> <li>• 2 个 BiOWiSH 槽和 2 个对照槽</li> <li>• 在 PL 9 收获</li> </ul>	380 万	400 万

[0148] 在上文中,PL意指“幼体后”,并且数字表示幼体期后的天数。在BiOWiSH槽中,回收更多的PL(更多存活)。对收获的PL进行pH、盐度和温度胁迫测试,如表9中所示。

[0149] 表9.

	PL 大小		身体: 肠道比率		胁迫测试		
	PL 8	PL 10	PL 9	PL 10	pH	盐度	温度
BiOWiSH	7.55	7.97	98%	98%	82.06%	47.84%	73.04%
对照	7.27	7.86	92%	94%	70.44%	32.76%	56.71%

[0150] 在pH胁迫测试中,将pH从7.8提高至9.7-10 (30分钟升高,且30分钟返回),并且记录死亡开始的pH。注意,BiOWiSH PL在比对照更碱性的pH下显示死亡。

[0151] 在盐度测试中,将PL置于淡水中10分钟,然后回至正常的海水盐度(29 ppt),并记录存活率。与对照PL相比,更多的BiOWiSH PL在盐度测试后存活。

[0152] 在温度测试中,温度下降10°C,持续10分钟,然后回升至24°C,持续20分钟,并且对存活的PL进行计数。BiOWiSH PL显示更好的存活率。

[0153] 等同方案

尽管已经结合上面阐述的具体实施方案描述了本发明,但其许多替代、修改和其他变型对于本领域普通技术人员将是显而易见的。所有此类替代、修改和变型意欲落入本发明的精神和范围内。

## 序列表

<110> BiOWiSH Technologies, Inc.  
 <120> 用于提高水生动物的存活率的组合物和方法  
 <130> BIOW-018/001W0 322049-2106  
 <150> US 62/677,372  
 <151> 2018-05-29  
 <160> 1  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 1668  
 <212> DNA  
 <213> 枯草芽孢杆菌  
 <400> 1  
 agctcggatc cactagtaac ggccgccagt gtgctggaat tcgcccttag aaaggaggtg 60  
 atccagccgc accttcgat acggtacct tgttacgact tcacccaat catctgtccc 120  
 accttcggcg gctggctcca taaaggttac ctcaccgact tcgggtgtta caaactctcg 180  
 [0001] tgggtgtgacg ggcggtgtgt acaaggcccg ggaacgtatt caccgeggca tgctgatccg 240  
 cgattactag cgattccagc ttcacgcagt cgagttgcag actgcgatcc gaactgagaa 300  
 cagatttgtg rgattggctt aacctcgcgg tttcgtgcc ctttgttctg tccattgtag 360  
 cacgtgtgta gccagggtca taaggggcat gatgatttga cgtcatcccc accttcctcc 420  
 ggtttgtcac cggcagtcac cttagagtgc ccaactgaat gctggcaact aagatcaagg 480  
 gttgcgctcg ttgcgggact taaccaaca tctcagaca cgagctgacg acaaccatgc 540  
 accacctgtc actctgcccc cgaaggggac gtcctatctc taggattgtc agaggatgtc 600  
 aagacctggt aaggttcttc gcggttcttc gaattaaacc acatgtcca ccgcttgtgc 660  
 gggcccccg t caattccttt gagtttcagt cttgcgaccg tactccccag gcggagtgtc 720  
 taatgcgta gctgcagcac taaagggcg gaaacccct aacacttagc actcatcgtt 780  
 tacggcgtgg actaccaggg tatctaatcc tgttcgctcc ccacgcttcc gctcctcagc 840  
 gtcagttaca gaccagagag tcgccttcgc cactggtgtt cctccacatc tctacgatt 900  
 tcaccgctac acgtggaatt cactctcct cttctgcact caagttcccc agtttccaat 960  
 gaccctcccc ggttgagccg ggggcttcca catcagactt aagaaaccgc ctgcgagccc 1020  
 tttacgccc aataattccgg acaacgcttg ccacctacgt attaccgagg ctgctggcac 1080

---

	gtagttagcc gtggctttct ggtaggtac cgtcaaggtg cgcacctatt tgaacggcac	1140
	ttgtttcttc ctaacaacag agctttacga tccgaaaacc ttcatcactc acgeggcggt	1200
	gctccgtag actttcgtec attgcggaag attccctact gctgcctccc gtaggagtct	1260
	gggccgtgtc tcagtcccag tgtggccgat caccctctca ggteggctac gcatcgtcgc	1320
[0002]	cttggtgagc cgttacctca ccaactagct aatgcgccgc gggtecatct gtaagtggta	1380
	gccgaagcca ccttttatgt ctgaacctg cggttcagac aacctccgg tattagcccc	1440
	ggtttcccgg agttatccca gtcttacagg caggttacce acgtgttact cacccgtccg	1500
	ccgctaacat caggagcaa gctccatct gtccgctcga cttgcatgta ttaggcacgc	1560
	cgccagcggt cgtcctgagc catgaacaaa ctctaagggc gaattctgca gatatccatc	1620
	acactggcgg ccgctcgagc atgcatctag agggccaat cgcctat	1668

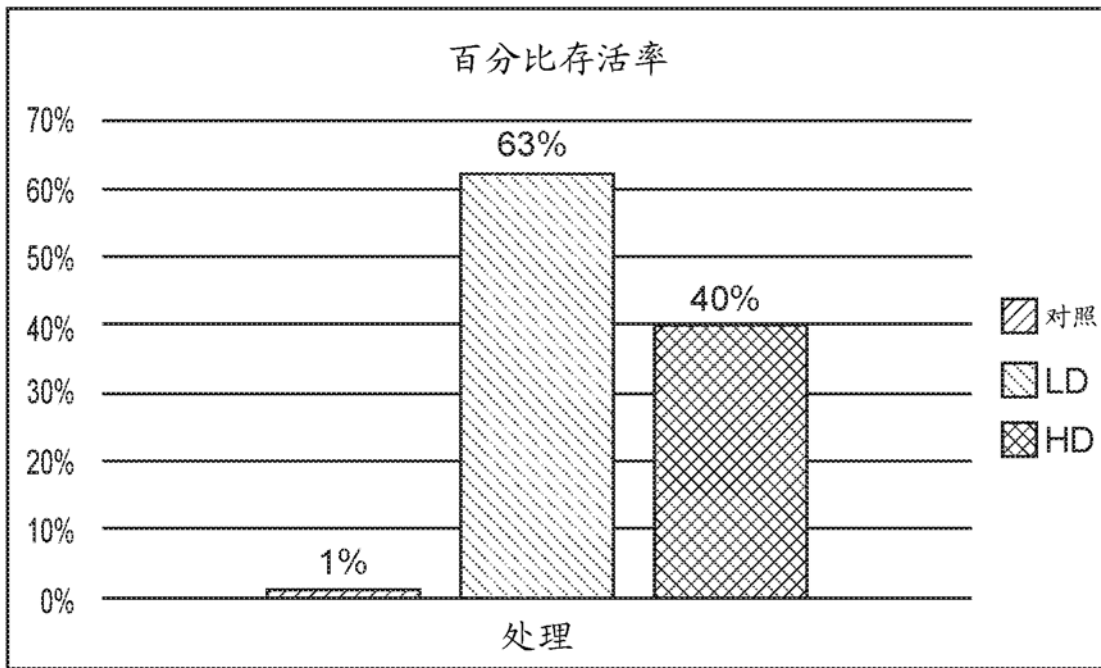


图 1

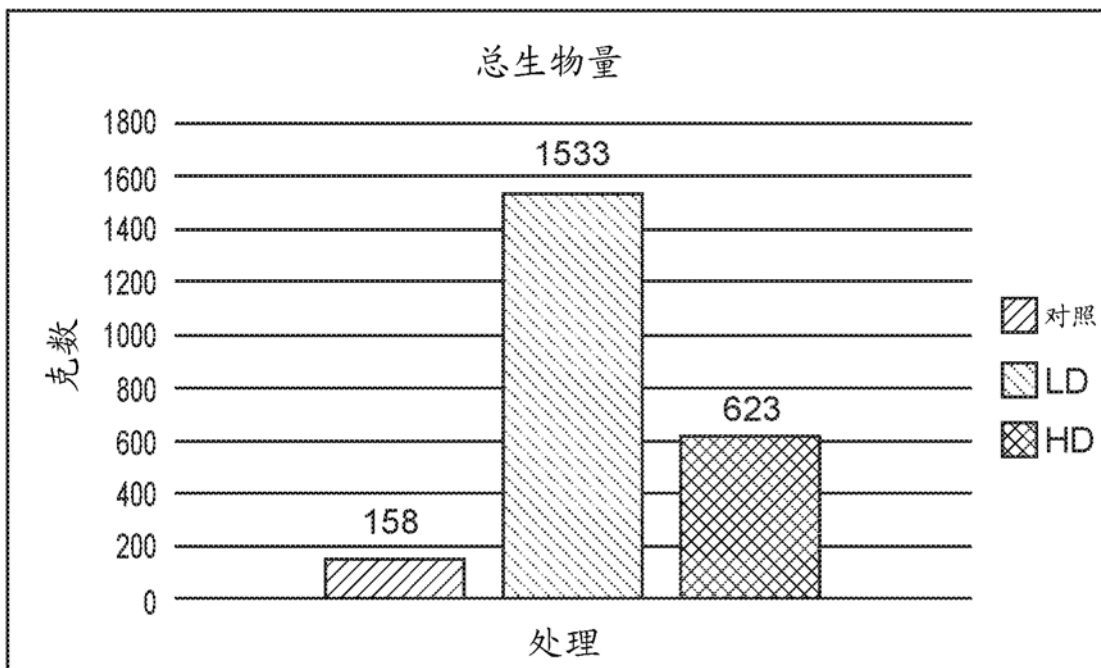


图 2

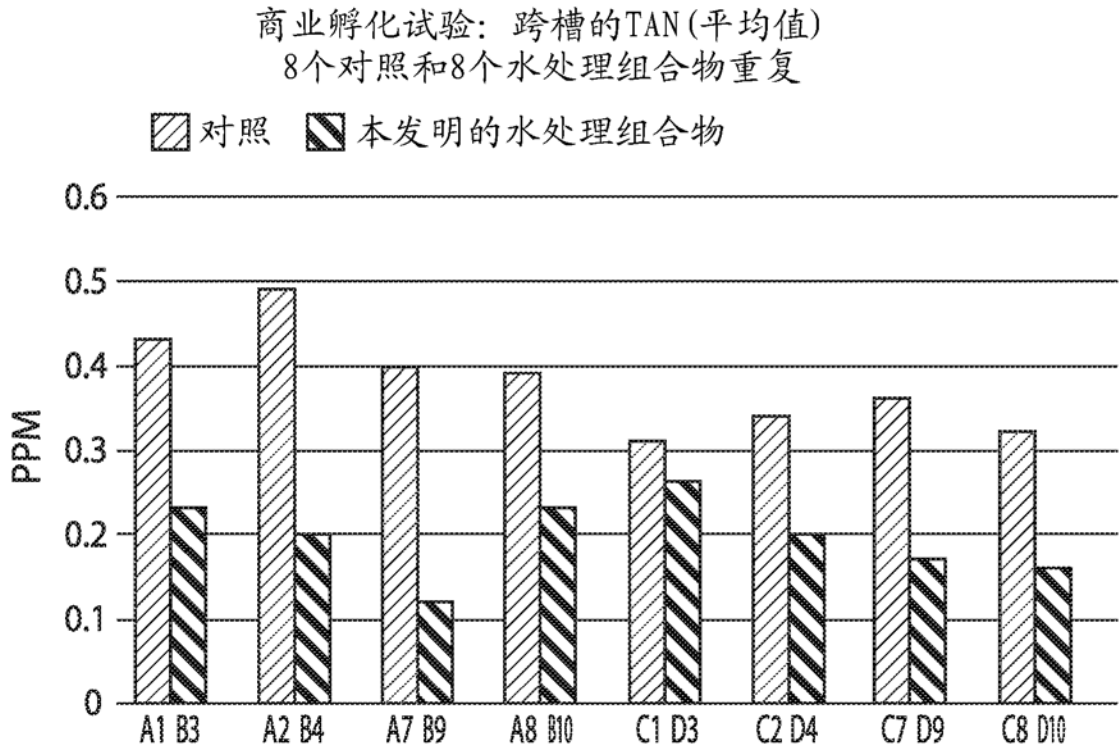


图 3

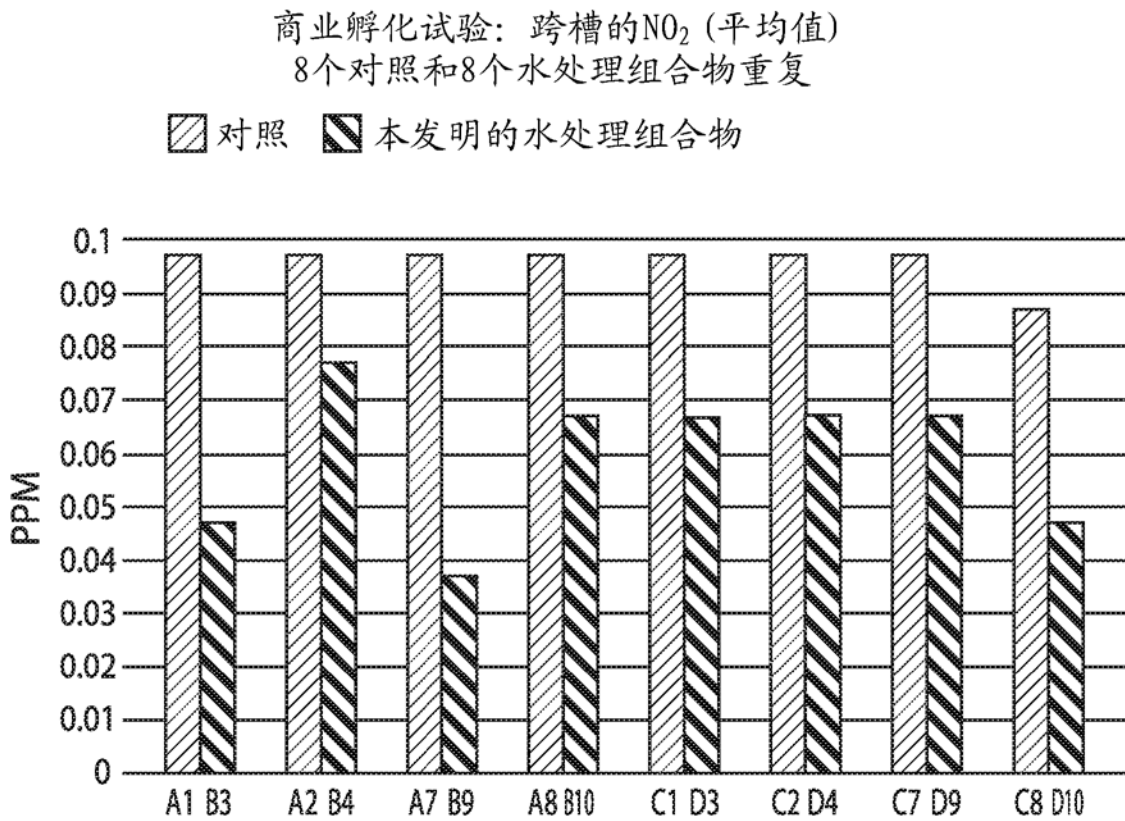


图 4