



(10) 授权公告号 CN 119242540 B

(45) 授权公告日 2025. 05. 16

(21) 申请号 202411774387.6

(22) 申请日 2024.12.05

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 119242540 A

(43) 申请公布日 2025.01.03

(83) 生物保藏信息

CGMCC NO.31535 2024.08.02

(73) 专利权人 山东省海洋资源与环境研究院
(山东省海洋环境监测中心、山东省水产品质量检验中心)

地址 264006 山东省烟台市经济开发区长江路216号

(72) 发明人 黄会 徐英江 王共明 张秀珍
陈建强 王小涵 胡乃波 王明磊
韩慧宗 张健 孙琰晴 刘永春

(74) 专利代理机构 北京中济纬天专利代理有限公司 11429

专利代理师 马国冉

(51) Int.Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

C02F 3/34 (2023.01)

C12R 1/01 (2006.01)

C02F 101/38 (2006.01)

C02F 101/36 (2006.01)

C02F 101/34 (2006.01)

C02F 101/30 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 116574657 A, 2023.08.11

CN 117603887 A, 2024.02.27

审查员 唐亚丽

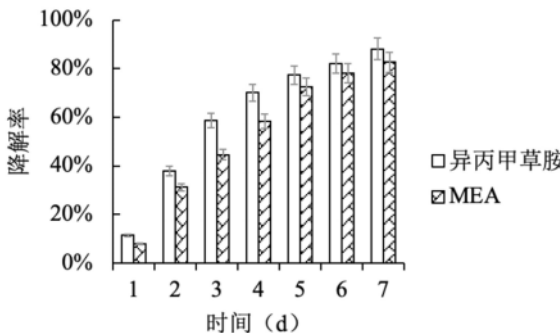
权利要求书1页 说明书7页 附图4页

(54) 发明名称

假单胞杆菌WH-3及其应用

(57) 摘要

本发明公开了假单胞杆菌WH-3及其应用,属于微生物技术领域。该假单胞杆菌WH-3,拉丁文名称为Pseudomonas juntendi WH-3,保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏日期为2024年08月02日,保藏编号为CGMCC No.31535,保藏单位地点为中国北京。本发明提供的假单胞杆菌WH-3分离、筛选自异丙甲草胺污染海域的海水,该菌株适应盐度广、可高效降解异丙甲草胺和2-甲基-6-乙基苯胺,对受异丙甲草胺和2-甲基-6-乙基苯胺污染海洋环境具有高效的生物修复作用。



1. 假单胞杆菌WH-3, 拉丁文名称为*Pseudomonas juntendi* WH-3, 保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 保藏日期为2024年08月02日, 保藏编号为CGMCC No.31535, 保藏单位地址为中国北京。

2. 权利要求1所述假单胞杆菌WH-3在降解异丙甲草胺和2-甲基-6-乙基苯胺中的应用。

假单胞杆菌WH-3及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一株海洋细菌及其应用,具体涉及一株假单胞杆菌WH-3及其在降解异丙甲草胺和2-甲基-6-乙基苯胺(MEA)中的应用,属于微生物技术领域。

背景技术

[0002] 异丙甲草胺是一种氯乙酰胺类选择性除草剂,其分子式为 $C_{15}H_{22}ClNO_2$ 。因异丙甲草胺具有广谱、高效、选择性强等特点,被广泛应用于旱地作物、蔬菜作物、果园和水稻移栽田等。

[0003] 2-甲基-6-乙基苯胺(MEA)是异丙甲草胺、乙草胺等氯乙酰胺类合成的中间体,同时也是氯乙酰胺类光解、水解和生物降解的重要的代谢产物,其在自然环境下能长期存在并蓄积于生物体内,且具有较强毒性,对生物和人体健康产生危害。

[0004] 国内海洋环境中频繁检出酰胺类除草剂,黄河三角洲贝类增殖养殖区海水中异丙甲草胺检出浓度和检出率均较高,部分站位存在中度风险。东营广饶附近小清河等下游河道及其邻近海域海水及沉积物中均不同程度检出异丙甲草胺,且海水中检出率超过50%,部分区域高达91.4%。乳山海域临近海水中检出异丙甲草胺。山东沿岸海洋贝类中检出异丙甲草胺,可见其污染已经扩展到海洋生态环境。

[0005] 酰胺类除草剂对水生动物毒性主要表现为致畸、致死及影响酶活性等,对水生植物的毒性主要表现为降低植物细胞生物量、干扰细胞分裂、抑制光合作用等,酰胺类除草剂的大量使用引起的潜在海洋环境生态风险不容忽视。氯乙酰胺类除草剂化学性质较稳定,可长时间存在于海洋环境和海洋生物体内,异丙甲草胺和MEA在环境中降解缓慢,其中,异丙甲草胺在夏季海水中水解半衰期为67天、非生物降解半衰期为50天,在冬季海水中水解半衰期为277天、非生物降解半衰期为193天。目前,海洋环境中除草剂的污染修复工作是近年来关注的重点。因此,亟需开发快速、高效、安全的海洋环境中氯乙酰胺类除草剂污染的修复方法。

[0006] 专利申请CN116042443A公开了一种厌氧降解菌株(*Trichococcus* sp. SRB-2),该菌株对浓度为 $20\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的异丙甲草胺的厌氧降解半衰期为2.0天,未涉及该菌株对MEA的降解情况。

[0007] 现有文献《异丙甲草胺降解菌株Y4-6的分离、鉴定及降解特性研究》(南京农业大学硕士学位论文,董旻,2013年)公开了一株假黄单胞菌(*Pseudoxanthomonas* sp.),该菌株可降解异丙甲草胺,未涉及该菌株对MEA的降解情况。

[0008] 可见,在现有的农药降解微生物中,尚未见到能同时降解异丙甲草胺和MEA的菌株。

发明内容

[0009] 为解决现有技术的不足,本发明的目的在于提供一株能同时降解异丙甲草胺和MEA且降解效率高、适应盐度广的海洋细菌。

[0010] 为了实现上述目标,本发明采用如下的技术方案:

[0011] 假单胞杆菌WH-3,拉丁文名称为*Pseudomonas juntendi* WH-3,保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏日期为2024年08月02日,保藏编号为CGMCC NO.31535,保藏单位地点为中国北京。

[0012] 前述假单胞杆菌WH-3在降解异丙甲草胺和2-甲基-6-乙基苯胺中的应用。

[0013] 本发明的有益之处在于:本发明提供的假单胞杆菌WH-3分离、筛选自异丙甲草胺污染海域的海水,该菌株适应盐度广、可高效降解异丙甲草胺和MEA,对受异丙甲草胺和MEA污染海洋环境(包括海水和海洋沉积物)具有高效的生物修复作用,其中,利用该菌株处理受异丙甲草胺(浓度为 $50\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)和MEA(浓度为 $50\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)污染的海水7天后,异丙甲草胺和MEA的生物降解率分别达到了88.1%、82.7%,降解半衰期分别为2.67天、3.53天,利用该菌株处理受异丙甲草胺(浓度为 $50\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)和MEA(浓度为 $50\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)污染的海洋沉积物7天后,异丙甲草胺和MEA的生物降解率分别达到了82.7%、78.6%,降解半衰期分别为3.27天、4.02天。

附图说明

[0014] 图1是假单胞杆菌WH-3的菌落形态图;

[0015] 图2是假单胞杆菌WH-3的菌体形状图;

[0016] 图3是假单胞杆菌WH-3的系统发育树图;

[0017] 图4是假单胞杆菌WH-3在不同温度下的菌株生长量检测结果图;

[0018] 图5是假单胞杆菌WH-3在不同盐度下的菌株生长量检测结果图;

[0019] 图6是假单胞杆菌WH-3在不同pH下的菌株生长量检测结果图;

[0020] 图7是假单胞杆菌WH-3在不同接种量下对异丙甲草胺和MEA的降解率统计结果图;

[0021] 图8是受污染的海水样品中异丙甲草胺和MEA的生物降解率统计结果图;

[0022] 图9是受污染的海洋沉积物样品中异丙甲草胺和MEA的生物降解率统计结果图。

具体实施方式

[0023] 以下结合附图和具体实施例对本发明作具体的介绍。

[0024] 一、样品采集

[0025] 2022年10月,从受异丙甲草胺污染的黄河三角洲近岸海域某站位(N38°07′28.86″,E118°13′51.07″)采集表层海水样品并用无菌滤膜过滤,将滤膜放入100mL无菌离心管中,旋紧盖子后用封口膜密封,放入冰盒内运输至实验室,备用。

[0026] 二、菌种富集、筛选、分离和纯化

[0027] 1、培养基配制

[0028] 富集培养基:称取19.45g氯化钠、5.98g氯化镁、3.24g硫酸钠、1.80g氯化钙、0.55g氯化钾、0.16g碳酸钠、0.08g溴化钾、0.034g氯化锶、0.022g硼酸、0.004g硅酸钠、0.0024g氟化钠、0.0016g硝酸钠和0.008g磷酸氢二钠,加热溶解于1000mL蒸馏水中,pH值调至7.6。取100mL富集培养基分装至250mL锥形瓶中,每瓶加入20粒直径为1mm的小玻璃珠,121℃高压灭菌20min,待用。

[0029] 无药平板培养基:配制1000mL富集培养基,加入15.0g琼脂,加热溶解后分装至

250mL锥形瓶中,121℃高压灭菌20min,倒平板,待用。

[0030] 含药平板培养基:配制1000mL富集培养基,加入100mg异丙甲草胺、100mg MEA和15.0g琼脂,加热溶解后分装至250mL锥形瓶中,121℃高压灭菌20min,倒平板,待用。

[0031] 改良的LB培养基:称取10g胰蛋白胨、5g酵母提取物和19.45g氯化钠(常规的LB培养基氯化钠浓度为 $5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\sim 10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$),溶于1000mL蒸馏水中,pH值调至7.0。取100mL改良的LB培养基分装至250mL锥形瓶中,121℃高压灭菌20min,待用。

[0032] 2、菌株的富集与驯化

[0033] 向富集培养基中同时加入异丙甲草胺和MEA并使异丙甲草胺和MEA的浓度均为 $20\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。将前面获得的载有海水样品中微生物的滤膜剪碎,加入到前述添加有异丙甲草胺和MEA的富集培养基中,于30℃、 $150\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 进行富集培养,每隔7天取培养物以5%的转接量转接到新的富集培养基中,每次转接逐步提高富集培养基中异丙甲草胺和MEA的浓度到 $40\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $60\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $80\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $100\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。每次转接完毕后,培养24h后取样,送至山东省水产品质量检验中心通过气相色谱质谱检测异丙甲草胺和MEA的残留量,判断异丙甲草胺和MEA的降解程度。

[0034] 表1 滤膜上的微生物对异丙甲草胺和MEA的降解率

		异丙甲草胺			MEA		
		初始浓度	残留量	降解率	初始浓度	残留量	降解率
		$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	%	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	%
[0035]	驯化传代1次	40	16.4	59.0	40	17.5	56.3
	驯化传代2次	60	24.7	58.8	60	24.4	59.3
	驯化传代3次	80	30.5	61.9	80	32.5	59.4
	驯化传代4次	100	40.4	59.6	100	42.7	57.3

[0036] 由表1可知:随着驯化传代次数和异丙甲草胺、MEA浓度的增加,相同时间内,培养物对异丙甲草胺和MEA的降解量逐渐增加,第5代培养物对浓度均为 $100\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的异丙甲草胺和MEA的降解率分别达到了59.6%、57.3%。

[0037] 3、菌株的分离和纯化

[0038] 滤膜上的微生物连续驯化传代4次后,取1mL第5代培养物进行梯度稀释,取100 μL 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 稀释倍数的稀释液,分别涂布于含药平板培养基上(分别记为平板1、平板2、平板3、平板4),置于30℃恒温培养箱中培养7天。

[0039] 相比于其他平板,平板2上的菌落种类较多且数量适中,从平板2上挑取形态、颜色不同的多个单菌落,分别连续划线培养3次得到纯化菌株,从中选出长势最好的菌株,记为WH-3。

[0040] 向改良的LB 培养基中同时加入异丙甲草胺和MEA并使异丙甲草胺和MEA的浓度均为 $100\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,将菌株WH-3接种于前述添加有异丙甲草胺和MEA的改良的LB 培养基中并在

150r·min⁻¹摇床上于30℃下培养24h,然后用30%甘油保种(-70℃保藏)作为备用菌株。

[0041] 三、菌株WH-3的菌落形态、菌体形状以及生理生化特征

[0042] 1、菌落形态

[0043] 在无菌条件下,采用三线法将菌株WH-3接种到无药平板培养基中,培养48h后,如图1所示,观察到在培养基上形成了乳白色、中间有凸起的圆形菌落,直径约1.5mm,表面光滑,边缘模糊。

[0044] 2、菌体形状

[0045] 用接种环取两环新鲜培养的菌株WH-3,加入到1mL无菌水中,混匀。取两个电镜专用的铜孔,吸菌悬液覆盖3min,用滤纸吸干菌液,用磷钨酸染色1.5min,用滤纸吸干磷钨酸。在Hitachi H-7650透射电镜下观察菌体形状,如图2所示,菌株WH-3呈短杆状,无鞭毛。

[0046] 3、生理生化特性

[0047] 经API 20E细菌鉴定系统鉴定,菌株WH-3可同化利用精氨酸、柠檬酸钠、丙酮酸盐,可氧化葡萄糖、鼠李糖、密二糖、阿拉伯糖,不能同化利用邻硝基苯-半乳糖苷、硫代硫酸钠、Kohn明胶、甘露醇、肌醇、山梨醇、蔗糖、苦杏仁苷,不能水解赖氨酸、鸟氨酸、色氨酸,不能产生吲哚。

[0048] 四、菌株WH-3的种属鉴定

[0049] 采用蛋白酶K裂解的方法进行基因组DNA抽提,取3μL进行电泳检测。Marker为DL9000,从上至下条带依次为9000bp、5000bp、3000bp、2000bp、1000bp、500bp,上样量为3μL,亮带为30ng·μL⁻¹,其余条带均为10ng·μL⁻¹,P1、P2、P3为抽提试剂空白对照。

[0050] 用16S全长扩增正向引物8F(核苷酸序列为:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和反向引物8R(核苷酸序列为:5'-TACGGYTACCTTGTTAYGACTT-3')扩增菌株WH-3的16S rDNA片段,扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测后,送至飞凡标准技术服务有限公司测序。

[0051] 将测序结果用BLAST检索系统和GenBank核酸数据库中所搜集的相关种属的16S rDNA序列进行同源性分析,并利用MEGA 7.0软件、采用Neighbour-joining方法构建菌株WH-3的系统发育树,构建结果如图3所示。

[0052] 经比对分析,菌株WH-3是一株假单胞杆菌,与*Pseudomonas juntendi*成簇并形成独立的内部分枝,因此,将菌株WH-3命名为*Pseudomonas juntendi* WH-3。

[0053] 五、菌株WH-3在不同温度、盐度、pH环境下的生长情况

[0054] 1、不同温度下菌株WH-3的生长量检测

[0055] 取500μL培养至指数期的WH-3菌液接种至改良的LB培养基中,在150r·min⁻¹摇床上分别于10℃、15℃、20℃、25℃、30℃、35℃、40℃、45℃下培养24h,每个实验组设3个平行,使用酶标仪测定实验初始时和第24h时培养基的OD₆₀₀,菌株生长量以第24h时培养基的OD₆₀₀与实验初始时培养基的OD₆₀₀的差值(ΔOD₆₀₀)表示。

[0056] 菌株WH-3在不同温度下的菌株生长量检测结果如图4所示。由图4可知,菌株WH-3在10℃~45℃均可生长,最适生长温度为30℃。

[0057] 2、不同盐度下菌株WH-3的生长量检测

[0058] 调整前述改良的LB培养基中氯化钠的添加量,具体的,氯化钠的添加量分别为0g、10g、20g、30g、40g、50g、60g、70g、80g、90g、100g(溶于1000mL蒸馏水中),使培养基的盐度分别为0、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%,取500μL培养至指数期的WH-3菌液接种至前述

盐度不同的培养基中,在 $150\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床上于 30°C 下培养24h,每个实验组设3个平行,使用酶标仪测定实验初始时和第24h时培养基的 OD_{600} ,菌株生长量以第24h时培养基的 OD_{600} 与实验初始时培养基的 OD_{600} 的差值(ΔOD_{600})表示。

[0059] 菌株WH-3在不同盐度下的生长量检测结果如图5所示。由图5可知,菌株WH-3生长的盐度范围为0~10%,最适盐度为3%~4%。

[0060] 3、不同pH值下菌株WH-3的生长量检测

[0061] 将前述改良的LB培养基的pH值分别调至3、4、5、6、7、8、9、10,取500 μL 培养至指数期的WH-3菌液接种至前述pH值不同的培养基中,在 $150\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床上于 30°C 下培养24h,每个实验组设3个平行,使用酶标仪测定实验初始时和第24h时培养基的 OD_{600} ,菌株生长量以第24h时培养基的 OD_{600} 与实验初始时培养基的 OD_{600} 的差值(ΔOD_{600})表示。

[0062] 菌株WH-3在不同pH值下的生长量检测结果如图6所示。由图6可知,菌株WH-3生长的pH值范围为3~10,最适生长pH值为7~8。

[0063] 综上,菌株WH-3在 $10^{\circ}\text{C} \sim 45^{\circ}\text{C}$ 、pH值3~10、氯化钠浓度(w/v)0~10%中均能生长,最适生长温度为 30°C 、最适生长pH值为7~8、最适盐度为3%~4%,具有适温范围广、耐盐和耐酸碱能力强等特点,适合在不同海域环境中使用。

[0064] 六、菌株WH-3对海洋环境中异丙甲草胺和MEA的降解效果

[0065] 根据菌株WH-3的最适盐度(3%~4%)对前述改良的LB培养基进行优化调整,具体的,将氯化钠的用量由19.45g进一步提高至30g,即:称取10g胰蛋白胨、5g酵母提取物和30g氯化钠,溶于1000mL蒸馏水中,pH值调至7.0,得到高盐LB培养基。取100mL高盐LB培养基分装至250mL锥形瓶中, 121°C 高压灭菌20min,待用。

[0066] 1、菌株WH-3在不同接种量下对异丙甲草胺和MEA的降解率

[0067] (1) 不同接种量下菌株WH-3对异丙甲草胺的降解率

[0068] 向灭菌的高盐LB培养基中加入异丙甲草胺并使异丙甲草胺的浓度为 $50\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,分别以0、0.5%、1%、3%、5%、10%、15%、20%的接种量将菌株WH-3接种至前述添加有异丙甲草胺的高盐LB培养基中,每组设3个平行,在 $150\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床上于 30°C 下培养24h,第24h取样送至山东省水产品质量检验中心通过气相色谱质谱检测异丙甲草胺的残留量,判断异丙甲草胺的降解程度。

[0069] (2) 不同接种量下菌株WH-2对MEA的降解率

[0070] 向灭菌的高盐LB培养基中加入MEA并使MEA的浓度为 $50\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,分别以0、0.5%、1%、3%、5%、10%、15%、20%的接种量将菌株WH-3接种至前述添加有MEA的高盐LB培养基中,每组设3个平行,在 $150\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床上于 30°C 下培养24h,第24h取样送至山东省水产品质量检验中心通过气相色谱质谱检测MEA的残留量,判断MEA的降解程度。

[0071] 不同接种量下菌株WH-3对异丙甲草胺和MEA的生物降解率统计结果见图7。由图7可知,随着菌株WH-3接种量的增加,异丙甲草胺和MEA降解效率均显著提高,在接种量超过5%时,降解效率趋于平衡,因此菌株WH-3的最佳接种量为5%。

[0072] 2、菌株WH-3的培养

[0073] 将菌株WH-3接种至高盐LB培养基中,在 $150\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床上于 30°C 下培养24h,得到发酵液。

[0074] 3、受污染的海水样品和海洋沉积物样品的制备

[0075] 向海水中同时添加异丙甲草胺和MEA并使异丙甲草胺和MEA的浓度均为 $50\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,得到受污染的海水样品。

[0076] 向海洋沉积物中同时添加异丙甲草胺和MEA并使异丙甲草胺和MEA的浓度均为 $50\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,得到受污染的海洋沉积物样品。

[0077] 4、用菌株WH-3处理受污染的样品

[0078] 将菌株WH-3的发酵液分别添加到受污染的海水样品和受污染的海洋沉积物样品中,接种量均为5%(v/v),于 30°C 下静置处理7天。

[0079] 在静置处理期间,每24h取样检测异丙甲草胺和MEA的浓度,计算异丙甲草胺和MEA的生物降解率和降解半衰期。

[0080] 5、结果

[0081] 受污染的海水样品中异丙甲草胺和MEA的生物降解率统计结果见图8。由图8可知,受污染的海水样品经菌株WH-3处理7天后,异丙甲草胺的生物降解率为88.1%,降解半衰期为2.67天;MEA的生物降解率为82.7%,降解半衰期为3.53天。

[0082] 受污染的海洋沉积物样品中异丙甲草胺和MEA的生物降解率统计结果见图9。由图9可知,受污染的海洋沉积物样品经菌株WH-3处理7天后,异丙甲草胺的生物降解率为82.7%,降解半衰期为3.27天;MEA的生物降解率为78.6%,降解半衰期为4.02天。

[0083] 上述结果表明:菌株WH-3对受异丙甲草胺和MEA污染的海洋环境(包括海水和海洋沉积物)具有高效的生物修复作用。

[0084] 七、菌株WH-3对海洋动物和海洋微藻的安全性

[0085] 将菌株WH-3接种至高盐LB培养基中,在 30°C 、 $150\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下振荡培养至指数期, $5000\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5min,收集菌体至无菌PBS缓冲液中,待用。

[0086] 1、菌株WH-3对海洋贝类的安全性

[0087] 四角蛤蜊(*Macrta veneriformis*)来自山东东营近岸,于自然海水(水温 $25 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$)中暂养7天,暂养期间每天投喂小新月菱形藻2次、换水2次,每次换水2/3,持续充气,及时清理粪便、挑出死亡和不健康个体,并于实验前1天停止投喂,挑取规格均匀、健康的贝作为实验对象,分为实验组和对照组,每组设3个平行,每个平行30只贝。

[0088] 实验组水体中添加菌株WH-3至终浓度为 $10^7\text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$,对照组水体中添加相同剂量的无菌PBS缓冲液,实验期间每24h投喂小新月菱形藻1次、换水1次,每次换水2/3,持续充气,及时清理粪便,连续观察7天。

[0089] 观察结果:各组贝类均健康有活力,无死亡。

[0090] 2、菌株WH-3对海洋桡足类的安全性

[0091] 中华剑水蚤(*Halicyclops sinensis* Kiefer)和太平洋纺锤水蚤(*Acartia pacifica*)均采自黄河三角洲近岸海域。自然海水经 $0.45\mu\text{m}$ 混合纤维素滤膜过滤后使用,水温 $25 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$,光暗比L:D=12h:12h。驯化培养3天后,各挑取300只健康活跃的成体进行实验,设置实验组和对照组,每组设3个平行,每个平行50只,均装于250mL锥形瓶中。

[0092] 实验组水体中添加菌株WH-3至终浓度为 $10^7\text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$,对照组水体中添加相同剂量的无菌PBS缓冲液,实验期间每24h投喂海洋红酵母1次,微量充气,连续观察3天。

[0093] 观察结果:各组水蚤均正常存活,未见死亡。

[0094] 3、菌株WH-3对海洋微藻的安全性

[0095] 小新月菱形藻(*Nitzschia closterium* f.*minutissima*)由山东省海洋资源与环境研究院藻种室提供。自然海水、f/2培养液经灭菌后用于小新月菱形藻的培养,水温 $25 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$,光照强度3000lx,光暗比为L:D =12h:12h。预培养3代,镜检细胞正常,进入对数生长期进行实验。设置实验组和对照组,每组设3个平行,每个平行取100mL对数生长期藻液装于250mL锥形瓶中。

[0096] 实验组水体中添加菌株WH-3至终浓度为 $10^7\text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$,对照组水体中添加相同剂量的无菌PBS缓冲液,连续观察3天,用血球计数板在显微镜下统计藻细胞数量。

[0097] 统计结果:各组藻细胞数量无明显差异。

[0098] 上述结果表明:菌株WH-3在 $10^7\text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 及以下浓度对海洋贝类、海洋桡足类和海洋微藻是相对安全的。

[0099] 八、菌种保藏

[0100] 假单胞杆菌WH-3,拉丁文名称为*Pseudomonas juntendi* WH-3,已送至中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC)进行保藏,保藏日期为2024年08月02日,保藏编号为CGMCC NO.31535,保藏单位地点为中国北京。

[0101] 需要说明的是,上述实施例仅仅是为清楚地说明本发明所作的举例,而并非是对本发明实施方式的限定。对于所属领域的普通技术人员来说,在上述说明的基础上还可以做出其它不同形式的变化或变动。这里无法对所有的实施方式予以穷举。凡属于本发明技术方案所引申出的显而易见的变化或变动仍处于本发明保护范围之列。



图 1

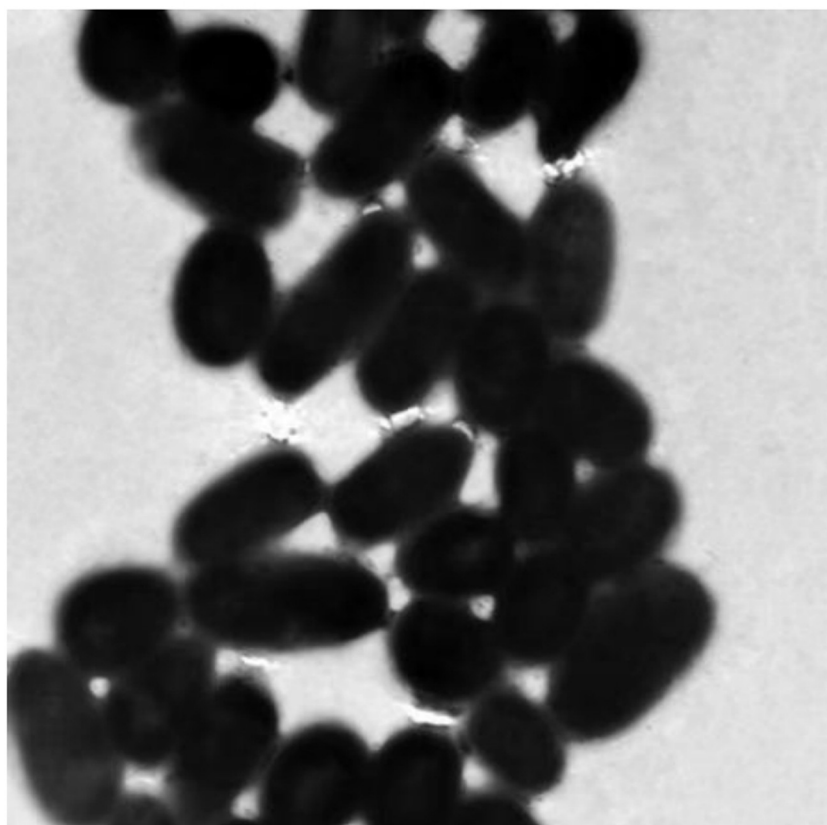


图 2

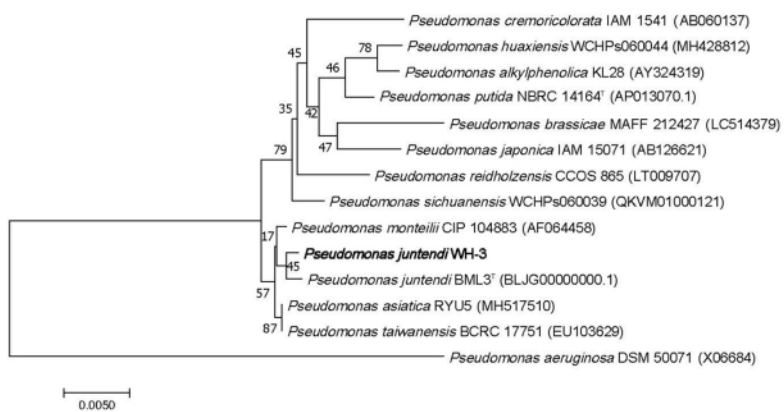


图 3

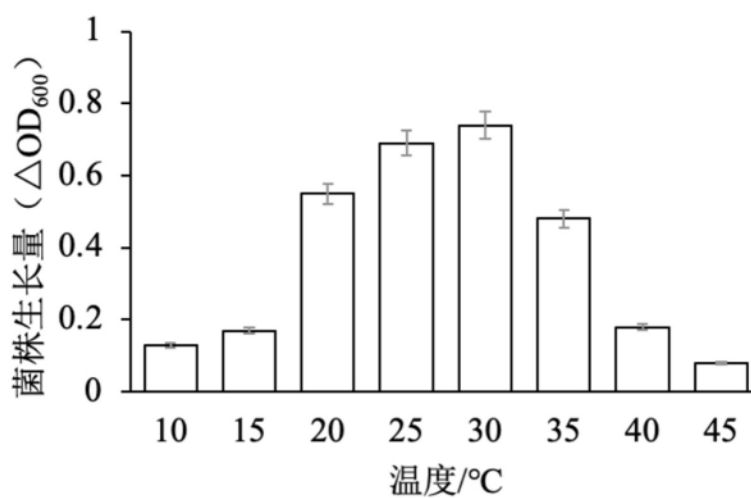


图 4

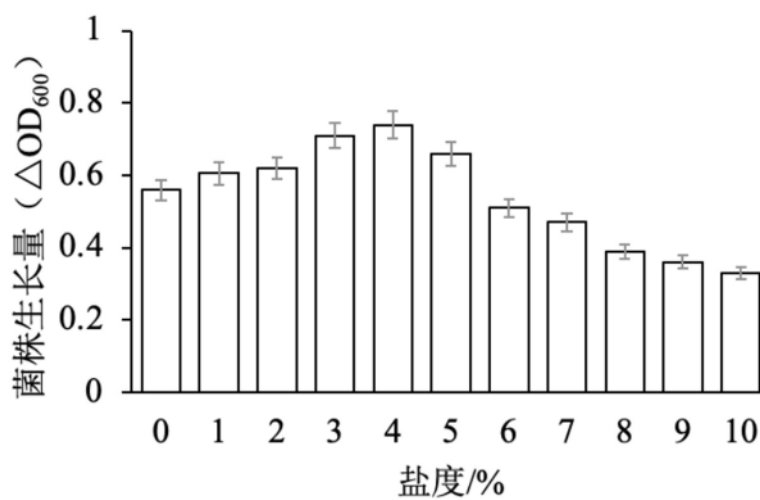


图 5

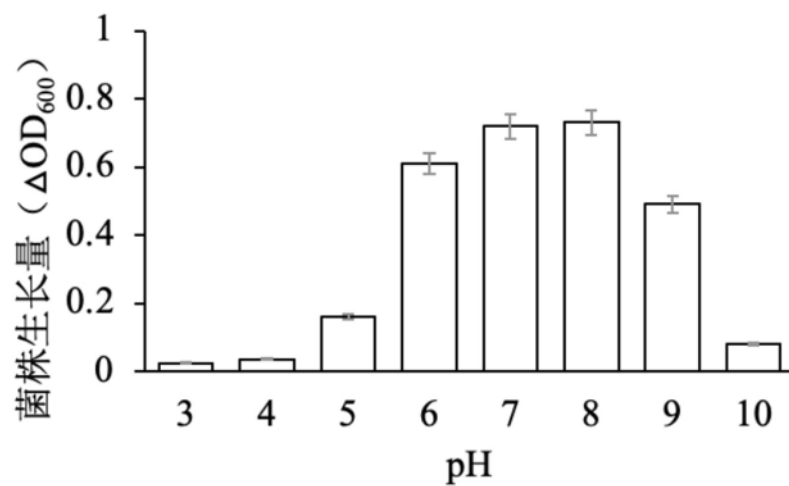


图 6

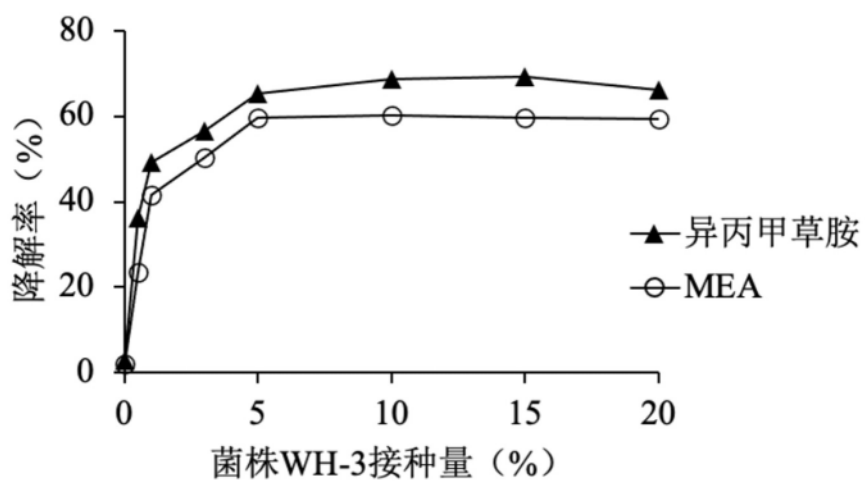


图 7

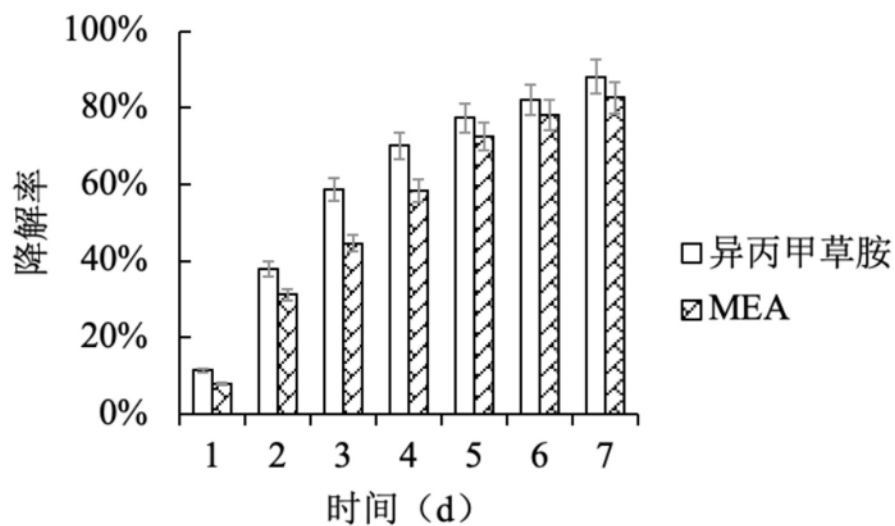


图 8

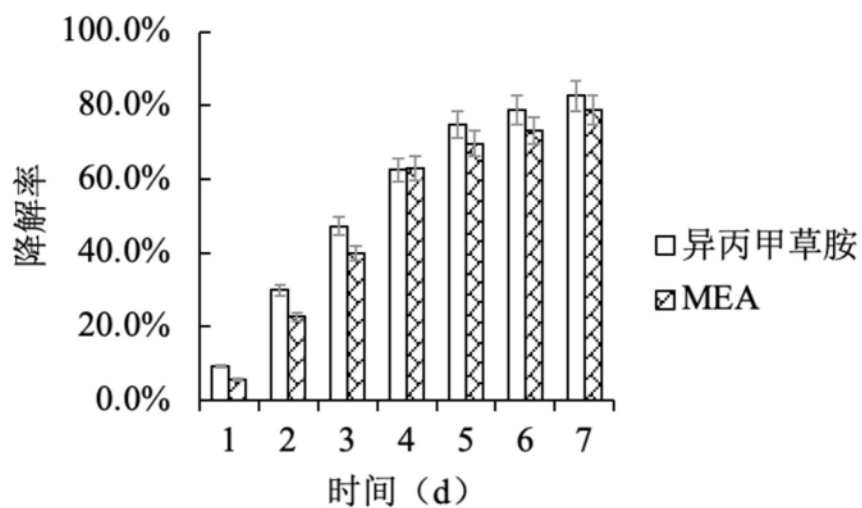


图 9