



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106967647 B

(45)授权公告日 2020.06.30

(21)申请号 201710302834.1

CN 101988053 A, 2011.03.23,

(22)申请日 2017.05.03

CN 102168039 A, 2011.08.31,

(65)同一申请的已公布的文献号

KR 20110135536 A, 2011.12.19,

申请公布号 CN 106967647 A

张瑾等.海洋假单胞杆菌褐藻胶裂解酶基因
在大肠杆菌中的高效表达和活性检测.《食品与
发酵工业》.2007,第33卷(第2期),第5-9页.

(43)申请公布日 2017.07.21

Tomoo Sawabe et al..Assignment of
Alteromonas elyakovii KMM 162T and five
strains isolated from spotwounded fronds
of Laminaria japonica to
Pseudoalteromonas elyakovii comb. nov.
and the extended description of the
species.《International Journal of
Systematic and Evolutionary
Microbiology》.2000, 第50卷第265-271页.

(83)生物保藏信息

CGMCC No.13265 2016.11.11

(73)专利权人 大连市现代农业生产发展服务中心

Tomoo Sawabe et al..Cloning, sequence
analysis and expression of
Pseudoalteromonas elyakovii IAM 14594
gene (alyPEEC) encoding the extracellular
alginic lyase.《Carbohydrate Research》
.2001, 第335卷第11-21页.

地址 116000 辽宁省大连市沙河口区中山路678号

审查员 关靖雯

(72)发明人 陈文博 丁勇 孙阳 石峰

(74)专利代理机构 大连格智知识产权代理有限公司 21238

代理人 刘琦

(51)Int.Cl.

C12N 1/20(2006.01)

权利要求书1页 说明书9页

C02F 3/34(2006.01)

序列表1页

C12R 1/01(2006.01)

(56)对比文件

CN 103320482 A, 2013.09.25,

波段,从而达到控制赤潮藻类泛滥生长且不影响
水生生物正常生长的目的,从而提高养殖密度,
改善了养殖环境,达到提高水生生物养殖产量的
目的。

CN 102140428 A, 2011.08.03,

(54)发明名称

一种叶氏假交替单胞菌及其应用方法

(57)摘要

本发明提供了一种叶氏假交替单胞菌,该叶氏假交替单胞菌分类命名为Pseudoalteromonas elyakovii,菌株名为BN-C-11,已于2016年11月11日于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏,保藏编号为CGMCC No.13265。本发明还提供了上述叶氏假交替单胞菌的应用方法,用于生产控制赤潮藻类的菌剂。本发明叶氏假交替单胞菌的发酵产物在池塘、水库和海区中,产生的生物酶类,可以使控制赤潮藻类泛滥,部分活性物质能够吸收藻类生长所必须的光照

1. 一种叶氏假交替单胞菌，其特征在于，该叶氏假交替单胞菌分类命名为叶氏假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas elyakovii*)，菌株名为BN-C-11，已于2016年11月11日于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称CGMCC)保藏，保藏编号为CGMCC No.13265。

2. 权利要求1所述叶氏假交替单胞菌的应用方法，其特征在于，所述叶氏假交替单胞菌BN-C-11用于生产控制赤潮藻类的菌剂。

3. 根据权利要求2所述叶氏假交替单胞菌的应用方法，其特征在于，所述控制赤潮藻类的菌剂的制备方法为：将所述叶氏假交替单胞菌BN-C-11发酵，所得叶氏假交替单胞菌BN-C-11发酵液即为控制赤潮藻类的菌剂。

4. 根据权利要求3所述叶氏假交替单胞菌的应用方法，其特征在于，制备叶氏假交替单胞菌BN-C-11发酵液的具体方法为：首先将所述叶氏假交替单胞菌BN-C-11扩繁，得到菌浓度达到 $10^9\sim 10^{11}$ cfu/ml的叶氏假交替单胞菌BN-C-11菌液；加入营养物质后进行发酵，得到叶氏假交替单胞菌BN-C-11发酵液；

所述营养物质包括葡萄糖、蔗糖、红糖或其他糖类物质中的一种或几种混合；所述营养物质的加入量为每1000ml所述叶氏假交替单胞菌BN-C-11菌液加入0.03~0.06g营养物质；

发酵条件为：温度控制在22~32℃，通气流速为2~5L/min，发酵24~36h。

5. 根据权利要求4所述叶氏假交替单胞菌的应用方法，其特征在于，所述营养物质包括葡萄糖。

6. 根据权利要求4所述叶氏假交替单胞菌的应用方法，其特征在于，发酵条件还包括光照强度1000~3000Lux。

7. 根据权利要求3所述叶氏假交替单胞菌的应用方法，其特征在于，制得的所述叶氏假交替单胞菌BN-C-11发酵液的具体使用方法为：将所述叶氏假交替单胞菌BN-C-11发酵液按照1.5~3L/亩米，投放入水生生物养殖池塘、水库或海区。

8. 根据权利要求7所述叶氏假交替单胞菌的应用方法，其特征在于，所述叶氏假交替单胞菌BN-C-11发酵液利用菌剂吸附缓释剂均匀投放到水生生物养殖池塘、水库或海区中。

9. 根据权利要求8所述叶氏假交替单胞菌的应用方法，其特征在于，所述菌剂吸附缓释剂为沸石粉、蛎壳粉或海泥。

一种叶氏假交替单胞菌及其应用方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,更具体地说,涉及一株叶氏假交替单胞菌及其应用。

背景技术

[0002] 赤潮(harmful algal bloom,HAB),又称红潮,国际上也称其为“有害藻类”或“红色幽灵”。是在特定的环境条件下,某些浮游植物、原生动物或细菌爆发性增殖或高度聚集而引起水体变色的一种有害生态现象。主要包括淡水系统中的水华,海洋中的一般赤潮,近几年新定义的褐潮,绿潮等。它是由海藻家族中的赤潮藻在特定环境条件下爆发性地增殖造成的。海藻是一个庞大的家族,很多都是非常微小的植物,有的是单细胞生物。

[0003] 赤潮是一种世界性的公害,30多个国家和地区赤潮发生都很频繁。首先,赤潮的发生,破坏了海洋的正常生态结构,因此也破坏了海洋中的正常生产过程,从而威胁海洋生物的生存。其次,有些赤潮生物会分泌出粘液,粘在鱼、虾、贝等生物的鳃上,妨碍呼吸,导致窒息死亡。含有毒素的赤潮生物被海洋生物摄食后能引起中毒死亡。人类食用含有毒素的海产品,也会造成类似的后果。再次是大量赤潮生物死亡后,在尸骸的分解过程中要大量消耗海水中的溶解氧,造成缺氧环境,引起虾、贝类的大量死亡。

[0004] 随着全国沿海养殖业的大发展,也产生了严重的自身污染问题。在养殖过程中,人工投喂大量配合饲料和鲜活饵料。由于养殖技术陈旧和不完善,往往造成投饵量偏大,残存饵料增多,严重污染了养殖水质。另一方面,由于养殖过程中需要排换水,所以每天都有大量污水排入海洋湖泊中,这些带有大量残饵、粪便的水中含有氨氮、尿素、尿酸及其它形式的含氮化合物,加快富营养化,这样为赤潮生物提供了适宜的生物环境,使其增殖加快。由此可见,养殖业的自身污染也使赤潮发生的频率增加。

[0005] 假交替单胞菌(Pseudoalteromonas)是新建立的海洋细菌属,能够产生多种活性物质,表现出多种生物活性。假交替单胞菌是从海洋中分离的运动型革兰氏阴性异养细菌根据其发酵碳水化合物能力的不同可分为两个亚群,其中发酵类群为假单胞菌属(Pseudomonas),非发酵类群最初命名为交替单胞菌属(Alteromonas),根据16S rRNA序列的基础上经系统发育学比较交替单胞菌属的细菌包括两个属:一个属仍命名为交替单胞菌属,另一个新属命名为假交替单胞菌属。

[0006] 假交替单胞菌能分泌多种胞外活性物质,包括胞外酶、胞外毒素,抗生素和胞外多糖等,这些物质表现出抗菌、溶菌、杀藻、分解半乳糖、降解纤维素和果胶以及软化琼胶等多种生物活性,有助于获取营养和竞争生存空间等具有重要的生态学作用。多数假交替单胞菌可以分泌色素,能够生存于贫营养的海洋环境中,附生于海鞘、甲壳动物、珊瑚、无脊椎动物幼虫、藻类和海绵等高等真核生物的表面,假交替单胞菌的适应机制和存活策略具有多样性和有效性,这保证它们能够广泛的生存于海洋环境中。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于开发一种可控制水生生物养殖池塘、水库或海区中赤潮藻类泛

滥的叶氏假交替单胞菌，并提供一种应用方法、采用本发明的应用方法养殖池塘、水库或海区水生生物，可使水生生物产量显著增加，其中尤为适宜海水池塘养殖生物。

[0008] 为达到上述目的，本发明提供了一种叶氏假交替单胞菌，该叶氏假交替单胞菌，分类命名为*Pseudoalteromonas elyakovii*，菌株名为BN-C-11，已于2016年11月11日于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心（简称CGMCC）保藏，保藏编号为CGMCC No.13265。

[0009] 上述叶氏假交替单胞菌BN-C-11基因序列如SEQ ID No.1所示。

[0010] 本发明还提供了上述叶氏假交替单胞菌的应用方法，所述叶氏假交替单胞菌BN-C-11用于生产控制赤潮藻类的菌剂；所述赤潮藻类为硅藻类、甲藻类或其他浮游单胞藻类。

[0011] 优选方式下，所述控制赤潮藻类的菌剂的制备方法为：将所述叶氏假交替单胞菌BN-C-11发酵，所得发酵液即为控制赤潮藻类的菌剂。

[0012] 进一步优化，所述制备发酵液的具体方法为：首先将所述叶氏假交替单胞菌BN-C-11扩繁，得到菌浓度达到 $10^9 \sim 10^{11}$ cfu/ml的叶氏假交替单胞菌BN-C-11菌液；加入营养物质后进行发酵，得到叶氏假交替单胞菌BN-C-11发酵液；

[0013] 所述营养物质包括葡萄糖、蔗糖、红糖或其他糖类物质中的一种或几种混合；优选葡萄糖；按照1000ml所述菌液加入0.03~0.06g营养物质的比例加入；

[0014] 发酵条件为：温度控制在22~32℃，通气流速为2~5L/min，发酵24~36h；

[0015] 优选方式下，发酵条件还包括光照强度1000~3000Lux。

[0016] 所述叶氏假交替单胞菌BN-C-11发酵液的具体使用方法为：将所述叶氏假交替单胞菌BN-C-11发酵液按照1.5~3L/亩米，投放入水生生物养殖池塘、水库或海区。优选方式下，所述叶氏假交替单胞菌BN-C-11发酵液利用菌剂吸附缓释剂均匀投放到水生生物养殖池塘、水库或海区中；

[0017] 所述菌剂吸附缓释剂优选沸石粉、蛎壳粉、海泥。

[0018] 本发明尤其适用于黄渤海海域的海水养殖。

[0019] 相比于现有技术，本发明的优势在于：

[0020] 1、本发明叶氏假交替单胞菌BN-C-11，属于假交替单胞菌，该细菌经过扩大培养后加入能量源（如葡萄糖、蔗糖或红糖等），使其发酵获得发酵产物，发酵产物中包含琼脂酶、β-半乳糖苷酶，α-淀粉酶和果胶裂解酶等多种胞外酶和其他等活性物质，这些物质表现出分解赤潮藻类、降解纤维素和果胶以及软化琼胶等多种生物活性。该细菌的发酵产物在池塘、水库和海区中，产生的生物酶类，可以使赤潮藻类分解消除、控制赤潮藻类泛滥，部分活性物质能够吸收藻类生长所必须的光照波段使引发赤潮的藻类死亡，从而达到控制赤潮藻类泛滥生长且不影响水生生物正常生长的目的。

[0021] 2、本发明提供的控制池塘、水库和海区赤潮藻类的菌剂可以改善水质的微生态环境，降低氨氮和亚硝酸盐，赤潮藻类生长所需要的固氮和固碳作用降低，达到抑制赤潮藻类生长的要求。

[0022] 3、本发明提供的控制池塘、水库和海区赤潮藻类的菌剂可以进一步提高养殖水生生物的产量，提高养殖生物的成活率，大规模生产抑制和去除赤潮藻类的菌剂，可以挽救养殖户损失，增加养殖户收入等方面有着举足轻重的意义。本发明尤其适用于黄渤海海域的海水养殖。

[0023] 综上,本发明提供的叶氏假交替单胞菌发酵液可以抑制赤潮泛滥,从而提高养殖密度,改善了养殖环境,达到提高水生生物养殖产量的目的。

[0024] 保藏信息

[0025] 叶氏假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas elyakovii*)BN-C-11,简称叶氏假交替单胞菌BN-C-11,已于2016年11月11日于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏(简称CGMCC;地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所;邮编100101),保藏编号为CGMCC No.13265。

具体实施方式

[0026] 以下实施例便于更好的理解本发明,但并不限于本发明,下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为自常规生化试剂商店购买得到的。

[0027] 一、菌株BN-C-11的获得

[0028] 利用富集和选择鉴别培养技术,从海参肠道分离耐受高浓度氨氮、亚硝酸盐、并能抑制赤潮藻类生长的叶氏假交替单胞菌。得到一株菌株,命名为BN-C-11。

[0029] 二、菌株BN-C-11的鉴定

[0030] 1、形态特征

[0031] 革兰氏阴性菌;

[0032] 菌体呈杆状或微弯杆菌,大小约为(0.5-1.0) μm × (1.5-3) μm;

[0033] 菌落在光照条件下呈光滑、圆润、突起;

[0034] 菌落在光照条件下为乳白色,在黑暗条件下为无色。

[0035] 2、分子特征

[0036] 16S rDNA的测序结果如序列表的序列1所示,与GENBANK ACCESSION NO.DQ537520.1的叶氏假交替单胞菌的序列相似性为99%。

[0037] 综合形态特征和分子特征,参照《伯杰氏系统细菌学手册》(第9版)和东秀珠等编著的《常见细菌系统鉴定手册》(第1版),菌株BN-C-11属于叶氏假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas elyakovii*)。

[0038] 三、菌株BN-C-11的鉴定保藏

[0039] 叶氏假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas elyakovii*)BN-C-11,简称叶氏假交替单胞菌BN-C-11,已于2016年11月11日于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏(简称CGMCC;地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所;邮编100101),保藏编号为CGMCC No.13265。

[0040] 四、叶氏假交替单胞菌BN-C-11的发酵成份及工艺条件的优化

[0041] 通过单因素及正交试验,确定如下培养基组成参数:

[0042] 葡萄糖为培养基中的最佳碳源,添加0.02-0.05%时可得到最高生物量和发酵产物。

[0043] 蛋白胨为培养基中的氮源,添加量为0.5%;

[0044] 酵母浸粉为培养基中的辅助氮源,添加量为0.1%

[0045] 磷酸高铁作用可以提高菌液的浓度。

- [0046] 采用250ml摇瓶,装液量80ml,培养温度22–32℃,pH 6.5–7.5,培养时间24–36h。
- [0047] 采用上述优化参数,叶氏假交替单胞菌BN-C-11的生物量达到 8×10^{11} 个/ml,菌体产酶量、产色素量达到最高值。
- [0048] 五、控制养殖池塘、水库或海区赤潮藻类菌剂的制备
- [0049] 将菌浓度扩繁达到 10^9 – 10^{11} cfu/ml的叶氏假交替单胞菌BN-C-11菌液,加入营养物质发酵。发酵产物即为控制养殖池塘、水库或海区赤潮藻类菌剂。
- [0050] 发酵可以选用适宜方式,发酵条件为:温度控制在22–32℃,空气通气流速为2–5L/min,光照强度1000–3000Lux,发酵24–36h。
- [0051] 此外,营养物质可以是葡萄糖、蔗糖、红糖或其他类营养物。优选方式下,按照1000ml菌液加入0.03g葡萄糖的比例加入。
- [0052] 具体实施方式如下:
- [0053] 实施例1、控制养殖池塘、水库或海区赤潮藻类菌剂的制备
- [0054] 步骤1:菌种液体培养基(pH7.0)的制备方法:5g蛋白胨、1g酵母浸粉、0.01g磷酸高铁、0.04gNaHCO₃、0.02g MgSO₄ · 7H₂O、0.02g K₂HP0₄、0.1g NH₄Cl,用陈海水定容至1000ml;实际应用中,发酵培养基采用6.5–7.5的pH均可。
- [0055] 步骤2:将菌种液体培养基在120℃下灭菌20min。
- [0056] 步骤3:采用200L发酵罐,并对发酵罐进行如下改造:(1)在发酵罐底部安装发红色的水下灯(灯光主要提供叶氏假交替单胞菌的生长必须的光源作为能源);(2)在发酵罐下部安装电热恒温控制棒;(3)在发酵罐底部设置两个外接开口,一个作为供给发酵罐的通气口,另一个作为加入培养基、营养物质和菌种的开口。
- [0057] 在发酵罐中加入160L液体培养基,然后接种叶氏假交替单胞菌BN-C-11,菌种扩增条件:温度控制在26℃,空气通气流速为3L/min,光照强度为1500Lux(1000–3000Lux均可);
- [0058] 步骤4:当发酵罐中的菌浓度达到 10^{10} cfu/ml时,加入营养物质进行发酵24h(营养物质按照1000ml菌液加入0.03g葡萄糖的比例加入),温度控制在26℃,空气通气流速为3L/min,光照强度为1000–3000Lux,此次选用1500Lux。
- [0059] 步骤5:收集发酵产物,即为控制养殖池塘、水库或海区赤潮藻类产物,4℃保藏。
- [0060] 实施例2、控制养殖池塘、水库或海区赤潮藻类菌剂的制备
- [0061] 步骤1:菌种液体培养基(pH7.0)的制备方法:5g蛋白胨、1g酵母浸粉、0.01g磷酸高铁、0.04gNaHCO₃、0.02g MgSO₄ · 7H₂O、0.02g K₂HP0₄、0.1g NH₄Cl,用陈海水定容至1000ml;实际应用中,发酵培养基采用6.5–7.5的pH均可。
- [0062] 步骤2:将菌种液体培养基在120℃下灭菌20min。
- [0063] 步骤3:采用200L发酵罐,并对发酵罐进行如下改造:(1)在发酵罐下部安装电热恒温控制棒;(2)在发酵罐底部设置两个外接开口,一个作为供给发酵罐的通气口,另一个作为加入培养基、营养物质和菌种的开口。
- [0064] 在发酵罐中加入160L液体培养基,然后接种叶氏假交替单胞菌BN-C-11,菌种扩增条件:温度控制在26℃,空气通气流速为3L/min,
- [0065] 步骤4:当发酵罐中的菌浓度达到 10^{10} cfu/ml时,加入营养物质后发酵24h(营养物质按照1000ml菌液加入0.03g葡萄糖),温度控制在26℃,空气通气流速为2L/min;
- [0066] 步骤5:收集发酵产物,即为控制养殖池塘、水库或海区赤潮藻类产物,4℃保藏。

[0067] 实施例3、控制养殖池塘、水库或海区赤潮藻类菌剂的制备

[0068] 步骤1: 菌种液体培养基(pH7.0)的制备方法:5g蛋白胨、1g酵母浸粉、0.01g磷酸高铁、0.04gNaHCO₃、0.02g MgSO₄ • 7H₂O、0.02g K₂HPO₄、0.1g NH₄Cl,用陈海水定容至1000ml; 实际应用中,发酵培养基采用6.5-7.5的pH均可。

[0069] 步骤2: 将菌种液体培养基在120℃下灭菌20min。

[0070] 步骤3: 采用200L发酵罐,并对发酵罐进行如下改造: (1) 在发酵罐底部安装发红色的水下灯(灯光主要提供叶氏假交替单胞菌的生长必须的光源作为能源); (2) 在发酵罐下部安装电热恒温控制棒; (3) 在发酵罐底部设置两个外接开口,一个作为供给发酵罐的通气口,另一个作为加入培养基、营养物质和菌种的开口。

[0071] 在发酵罐中加入160L液体培养基,然后接种叶氏假交替单胞菌BN-C-11,菌种扩增条件:温度控制在26℃,二氧化碳通气流速为4L/min,光照强度为1500Lux(1000-3000Lux均可);

[0072] 步骤4:当发酵罐中的菌浓度达到10¹⁰cfu/ml时,加入营养物质后发酵24h(营养物质按照1000ml菌液加入0.03g葡萄糖),温度控制在30℃,二氧化碳通气流速为4L/min,光照强度为1500Lux(1000-3000Lux均可);

[0073] 步骤5:收集发酵产物,即为控制养殖池塘、水库或海区赤潮藻类产物,4℃保藏。

[0074] 实施例4、控制养殖池塘、水库或海区赤潮藻类菌剂的制备

[0075] 步骤1: 菌种液体培养基(pH7.0)的制备方法:5g蛋白胨、1g酵母浸粉、0.01g磷酸高铁、0.04gNaHCO₃、0.02g MgSO₄ • 7H₂O、0.02g K₂HPO₄、0.1g NH₄Cl,用陈海水定容至1000ml; 实际应用中,发酵培养基采用6.5-7.5的pH均可。

[0076] 步骤2: 将菌种液体培养基在120℃下灭菌20min。

[0077] 步骤3: 采用200L发酵罐,并对发酵罐进行如下改造: (1) 在发酵罐下部安装电热恒温控制棒; (2) 在发酵罐底部设置两个外接开口,一个作为供给发酵罐的通气口,另一个作为加入培养基、营养物质和菌种的开口。

[0078] 在发酵罐中加入160L液体培养基,然后接种叶氏假交替单胞菌BN-C-11,菌种扩增条件:温度控制在26℃,二氧化碳通气流速为4L/min。

[0079] 步骤4:当发酵罐中的菌浓度达到10¹⁰cfu/ml时,加入营养物质后发酵24h(营养物质按照1000ml菌液加入0.03g葡萄糖),温度控制在30℃,二氧化碳通气流速为4L/min。

[0080] 步骤5:收集发酵产物,即为控制养殖池塘、水库或海区赤潮藻类产物,4℃保藏。

[0081] 实施例5、控制养殖池塘、水库或海区赤潮藻类菌剂的制备

[0082] 步骤1: 菌种液体培养基(pH7.0)的制备方法:10g蛋白胨、2g酵母浸粉、0.1g磷酸高铁、0.04gNaHCO₃、0.02g MgSO₄ • 7H₂O、0.02g K₂HPO₄、0.1g NH₄Cl,用陈海水定容至1000ml; 实际应用中,发酵培养基采用6.5-7.5的pH均可。

[0083] 步骤2: 将菌种液体培养基在120℃下灭菌20min。

[0084] 步骤3: 采用200L发酵罐,并对发酵罐进行如下改造: (1) 在发酵罐底部安装发红色的水下灯(灯光主要提供叶氏假交替单胞菌的生长必须的光源作为能源); (2) 在发酵罐下部安装电热恒温控制棒; (3) 在发酵罐底部设置两个外接开口,一个作为供给发酵罐的通气口,另一个作为加入培养基、营养物质和菌种的开口。

[0085] 在发酵罐中加入160L液体培养基,然后接种叶氏假交替单胞菌BN-C-11,菌种扩增

条件:温度控制在26℃,空气通气流速为3L/min,光照强度为1500Lux (1000–3000Lux均可) ;
[0086] 步骤4:当发酵罐中的菌浓度达到 10^9 – 10^{11} cfu/ml时,加入营养物质后发酵24h(按照1000ml菌液加入0.02g蔗糖、0.02g MgSO₄ • 7H₂O和0.02g K₂HP0₄计算),温度控制在26℃,空气通气流速为3L/min,光照强度为1500Lux (1000–3000Lux均可) ;

[0087] 步骤5:收集发酵产物,即为控制养殖池塘、水库或海区赤潮藻类产物,4℃保藏。

[0088] 实施例6、控制养殖池塘、水库或海区赤潮藻类菌剂的制备

[0089] 步骤1:菌种液体培养基(pH7.0)的制备方法:5g蛋白胨、1g酵母浸粉、0.01g磷酸高铁、用陈海水定容至1000ml;实际应用中,发酵培养基采用6.5–7.5的pH均可。

[0090] 步骤2:将菌种液体培养基在120℃下灭菌20min。

[0091] 步骤3:采用200L发酵罐,并对发酵罐进行如下改造:(1)在发酵罐下部安装电热恒温控制棒;(2)在发酵罐底部设置两个外接开口,一个作为供给发酵罐的通气口,另一个作为加入培养基、营养物质和菌种的开口。

[0092] 在发酵罐中加入160L液体培养基,然后接种叶氏假交替单胞菌BN-C-11,菌种扩增条件:温度控制在26℃,空气通气流速为3L/min,

[0093] 步骤4:当发酵罐中的菌浓度达到 10^{10} cfu/ml时,加入营养物质后发酵24h(按照1000ml菌液加入0.03g蔗糖),温度控制在26℃,空气通气流速为3L/min;

[0094] 步骤5:收集发酵产物,即为控制养殖池塘、水库或海区赤潮藻类产物,4℃保藏。

[0095] 实施例7、控制养殖池塘、水库或海区赤潮藻类菌剂的制备

[0096] 步骤1:菌种液体培养基(pH7.0)的制备方法:10g蛋白胨、2g酵母浸粉、0.1g磷酸高铁、0.04gNaHCO₃用陈海水定容至1000ml;实际应用中,发酵培养基采用6.5–7.5的pH均可。

[0097] 步骤2:将菌种液体培养基在120℃下灭菌20min。

[0098] 步骤3:采用200L发酵罐,并对发酵罐进行如下改造:(1)在发酵罐底部安装发红色的水下灯(灯光主要提供叶氏假交替单胞菌的生长必须的光源作为能源);(2)在发酵罐下部安装电热恒温控制棒;(3)在发酵罐底部设置两个外接开口,一个作为供给发酵罐的通气口,另一个作为加入培养基、营养物质和菌种的开口。

[0099] 在发酵罐中加入160L液体培养基,然后接种叶氏假交替单胞菌BN-C-11,菌种扩增条件:温度控制在26℃,二氧化碳通气流速为4L/min,光照强度为1500Lux (1000–3000Lux均可) ;

[0100] 步骤4:当发酵罐中的菌浓度达到 10^{10} cfu/ml时,加入营养物质后发酵24h(按照1000ml菌液加入0.03g蔗糖计算),温度控制在30℃,二氧化碳通气流速为4L/min,光照强度为1500Lux (1000–3000Lux均可) ;

[0101] 步骤5:收集发酵产物,即为控制养殖池塘、水库或海区赤潮藻类产物,4℃保藏。

[0102] 实施例8、控制养殖池塘、水库或海区赤潮藻类菌剂的制备

[0103] 步骤1:菌种液体培养基(pH7.0)的制备方法:10g蛋白胨、2g酵母浸粉、0.01g磷酸高铁、0.02g K₂HP0₄、0.01g NH₄C1,用水定容至1000ml;实际应用中,发酵培养基采用6.5–7.5的pH均可。

[0104] 步骤2:将菌种液体培养基在120℃下灭菌20min。

[0105] 步骤3:采用200L发酵罐,并对发酵罐进行如下改造:(1)在发酵罐下部安装电热恒温控制棒;(2)在发酵罐底部设置两个外接开口,一个作为供给发酵罐的通气口,另一个作

为加入培养基、营养物质和菌种的开口。

[0106] 在发酵罐中加入160L液体培养基,然后接种叶氏假交替单胞菌BN-C-11,菌种扩增条件:温度控制在26℃,二氧化碳通气流速为4L/min。

[0107] 步骤4:当发酵罐中的菌浓度达到 $10^9\text{--}10^{11}\text{cfu/ml}$ 时,加入营养物质后发酵24h(按照1000ml菌液加入0.03g葡萄糖和0.03g蔗糖计算),温度控制在30℃,二氧化碳通气流速为4L/min。

[0108] 步骤5:收集发酵产物,即为控制养殖池塘、水库或海区赤潮藻类产物,4℃保藏。

[0109] 实施例9、控制养殖池塘、水库或海区赤潮藻类菌剂的制备

[0110] 步骤1:发酵培养基(pH7.0)的制备方法:取0.03g葡萄糖、5g蛋白胨、1g酵母浸粉、0.04gNaHCO₃、0.02g MgSO₄ • 7H₂O、0.02g K₂HPO₄、0.1g NH₄Cl和10ml微量元素溶液,用陈海水定容至1000ml;所述微量元素溶液的制备方法如下:取0.5g H₃BO₃、400mg MnSO₄、60mg ZnSO₄ • 7H₂O、180mg NaMoO₄ • 2H₂O和Ca (NO₃)₂ • 2H₂O,用水溶解并定容至250ml。实际应用中,发酵培养基采用6.5-7.5的pH均可。

[0111] 步骤2:将发酵培养基在120℃下灭菌15-20min。

[0112] 步骤3:采用200L发酵罐,并对发酵罐进行如下改造:(1)在发酵罐底部安装发红色的水下灯(灯光主要提供叶氏假交替单胞菌生长必须的光源作为能源);(2)在发酵罐下部安装电热恒温控制棒;(3)在发酵罐底部设置两个外接开口,一个作为供给发酵罐二氧化碳的通气口,另一个作为加入发酵培养基和菌种的开口。

[0113] 在发酵罐中加入160L发酵培养基,然后接种叶氏假交替单胞菌BN-C-11,发酵条件:温度控制在30℃,二氧化碳通气流速为4L/min,光照强度为1500Lux(1000-3000Lux均可);发酵培养24-36h,收集产物,即为控制养殖池塘、水库或海区赤潮藻类产物,4℃保藏。

[0114] 应用例1、菌剂的投放,用于控制养殖池塘、水库或海区赤潮藻类以及水生生物养殖的应用。

[0115] 将上述任一实施例发酵的菌剂按照每亩米投放发酵产物1.5-3L的比例,利用菌剂吸附缓释均匀投放到水生生物养殖池塘中。优选实施例中为池塘养殖。

[0116] 注意投放2-4天内不能进行池塘换水,防止发酵产物浓度降低,失去抑制赤潮藻类效果。

[0117] 具体实施例如下:发现赤潮可能发生时,首先制备上述菌剂及获取菌剂吸附缓释剂(可购买取得)。计算池塘总面积,按照每亩米投放发酵产物1.5-3L计算。菌剂吸附缓释剂可选用沸石粉。

[0118] 计算池塘总面积,按照每亩米投放发酵产物1.5-3L计算。具体方法如下海水池塘面积按照50亩,池塘水深1米,发酵产物使用量为2L/亩米。如赤潮较重,建议加倍使用。

[0119] 依次进行以下操作:

[0120] (1)将发酵产物100L,倒入大水槽中,并添加入200L-400L的海水。

[0121] (2)将20kg-40kg沸石粉放入已经装好发酵产物的水槽中

[0122] (3)将发酵产物和沸石粉搅拌均匀,如搅拌时太粘稠,可以适量再加入200L-400L海水。

[0123] (4)连续搅动10min-15min

[0124] (5)稀释后均匀泼洒到所在池塘水面,让其自然缓释菌剂。

[0125] (6) 洒后2-4天内不能进行池塘换水,防止发酵产物浓度降低,失去抑制赤潮藻类效果。

[0126] 水温大于8℃、风速小于三级时使用,在傍晚16点到19点投放效果最佳。

[0127] 投放第12h后,能够发现赤潮的水体中,水色明显变清,赤潮爆发的情况开始减弱,水色可以由原来的酱油色、红色或深绿色,明显变浅,说明赤潮藻类已经明显得到抑制。

[0128] 投放第2-4天后,能够发现水体颜色明显变化,由开始赤潮藻类大量繁殖导致的水体颜色发红发黑,到后期的水体逐渐变为正常,说明引发赤潮的藻类已经完全得以控制。由上述实施过程尤其适用于黄渤海海域气候条件下的池塘养殖。通过上述过程,实践中,本发明一株叶氏假交替单胞菌以及应用,能够在池塘、水库和海区中控制赤潮发生。

[0129] 以投放使用实施例1菌剂BN-C-11制成微生态制剂的工厂化育苗的池子为试验组。对照组为不投放微生态制剂的池子。

[0130] 表1为第一周期对照池和试验池水质指标测定结果;表2为第二周期对照池和试验池水质指标测定结果。

[0131] 第一周期为第一次试验,试验组分别在投放微生态制剂后的第二天、第四天、第六天和第八天对水质指标进行测定,以氨氮和亚硝酸盐为例进行测定。第二周期为试验组和对照组池子同时进行换水后,按照第一周期的过程重复进行的第二次周期的实验。实验过程与第一周期完全一致。

[0132] 水质指标采用国标方法测定,氨氮测定用次溴酸盐氧化法,亚硝酸盐测定N-(1-萘基)-乙二胺光度法。

[0133] 表1

测定指标 \ 天数		第二天	第四天	第六天	第八天
对照组池	氨氮	0.063	0.091	0.134	0.196
	亚硝酸盐	0.014	0.026	0.197	0.362
试验组池	氨氮	0.062	0.083	0.093	0.11
	亚硝酸盐	0.018	0.019	0.042	0.046

[0135] 表2

测定指标 \ 天数		第二天	第四天	第六天	第八天
对照组池	氨氮	0.033	0.089	0.133	0.216
	亚硝酸盐	0.009	0.028	0.226	0.411
试验组池	氨氮	0.034	0.059	0.071	0.098
	亚硝酸盐	0.011	0.021	0.036	0.041

[0137] 本发明公开了一株叶氏假交替单胞菌以及应用,本发明提供了叶氏假交替单胞菌BN-C-11,它的保藏编号为CGMCC No.13265,属于假交替单胞菌,该细菌经过扩大培养后加入能量源(如葡萄糖、蔗糖或红糖等),使其发酵获得发酵产物,发酵产物中包含琼脂酶、β-

半乳糖苷酶,α-淀粉酶和果胶裂解酶等多种胞外酶和其他等活性物质,这些物质表现出分解赤潮藻类、降解纤维素和果胶以及软化琼胶等多种生物活性。该细菌的发酵产物在池塘、水库和海区中,产生的生物酶类,可以使引发赤潮的藻类分解消除,部分活性物质能够吸收藻类生长所必须的光照波段,从而达到控制赤潮藻类泛滥生长且不影响水生生物正常生长的目的。本发明提供的叶氏假交替单胞菌发酵液可以控制赤潮藻类,从而提高养殖密度,改善了养殖环境,达到提高水生生物养殖产量的目的。

[0138] 应用例2、本发明菌株降低氨氮和亚硝酸盐效果检测

[0139] 1、准备16个1L烧杯,加入混合完全的陈海水1L,用氨氮和亚硝酸盐标准品设定氨氮值均为0.325mg/L,亚硝酸盐均为0.125mg/L。

[0140] 2、将纯化得到的低温菌株分别扩大培养使其浓度均达到109cfu/ml。扩大培养即菌株繁殖的温度是25℃。用酶标仪对菌液的生长进行监测。2个烧杯对应加入1种菌液,每个烧杯加入菌液10μL,即10ppm,对照组2个,48h后分别测定所有烧杯中海水氨氮和亚硝酸盐值。氨氮测定用次溴酸盐氧化法,亚硝酸盐测定N-(1-萘基)-乙二胺光度法。

[0141] 检测结果如表3所示:

[0142] 表3

菌株		BN-C-11	对照
降解率 100%	氨氮 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$	39.85±1.08	5.38±1.08
	亚硝酸盐 $\text{NO}_2^- \text{-N}$	57.08±0.92	21.00±0.28

[0144] 以上所述,仅为本发明较佳的具体实施方式,但本发明的保护范围并不局限于此,任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明披露的技术范围内,根据本发明的技术方案及其发明构思加以等同替换或改变,都应涵盖在本发明的保护范围之内。

[0001] SEQUENCE LISTING
[0002] <110> 大连市水产技术推广总站
[0003] <120> 一种叶氏假交替单胞菌及其应用方法
[0004] <130>
[0005] <160> 1
[0006] <170> PatentIn version 3.3
[0007] <210> 1
[0008] <211> 1500
[0009] <212> DNA
[0010] <213> Pseudoalteromonas elyakovii
[0011] <400> 1
[0012] agagttgat cctggctcag attgaacgct ggcggcaggc ctaacacatg caagtcgagc 60
[0013] ggtaaacagaa agtagcttgc tactttgctg acgagcggcg gacgggttag taatgcttgg 120
[0014] gaacatgcct tgaggtgggg gacaacagtt ggaaacgact gctaataccg cataatgtct 180
[0015] acggaccaaa gggggcttcg gctctgcct ttagattggc ccaagtggga ttagcttagtt 240
[0016] ggtgaggtaa tggctcacca aggcgacgat ccctagctgg tttgagagga tgatcagcca 300
[0017] cactgggact gagacacggc ccagactcct acgggaggca gcagtggga atattgcaca 360
[0018] atgggcgcaa gcctgatgca gccatgccgc gtgtgtgaag aaggccttcg gttgttaag 420
[0019] cacttcagt caggagggaaa ggttagtagt taatacctgc tagctgtac gttactgaca 480
[0020] gaagaagcac cggtctaactc cgtgccagca gccgcggta tacggagggt gcgagcgtta 540
[0021] atcggattta ctggcgtaa agcgtacgca ggcggtttgt taagcgagat gtgaaagccc 600
[0022] cgggctcaac ctgggaactg catttcgaac tggcaaacta gagtgtgata gagggtggta 660
[0023] gaatttcagg tgtagcggtg aaatgcgtag agatctgaag gaataccgat ggcgaaggca 720
[0024] gccacactggg tcaacactga cgctcatgta cggaaacgctg gggagcaaac aggatttagat 780
[0025] accctggtag tccacccgt aaacgatgtc tactagaagc tcggAACCTC gttctgttt 840
[0026] ttcaaagcta acgcattaaag tagaccgcct gggagtagc ggcgcaaggt taaaactcaa 900
[0027] atgaattgac gggggccccgc acaagcggtg gagcatgtgg ttaattcga tgcaacgcga 960
[0028] agaaccttac ctacacttga catacagaga acttactaga gatagttgg tgccttcggg 1020
[0029] aactctgata caggtgtcgc atggctgtcg tcagctcggt ttgtgagatg ttgggttaag 1080
[0030] tcccgcaacg agcgcaccc ctatccttag ttgcttagcag gtaatgctga gaactctaag 1140
[0031] gagactgccg gtgataaacc ggaggaaggt ggggacgacg tcaagtcatc atggccctta 1200
[0032] cgttagggc tacacacgtg ctacaatggc gcatacagag tgctgcgaac tcgcgagagt 1260
[0033] aagcgaatca cttaaaagtgc gtcgtatgcc ggattggagt ctgcaactcg actccatgaa 1320
[0034] gtcggaatcg ctagtaatcg cgtatcagaa tgacgcggtg aatacgttcc cgggccttg 1380
[0035] acacaccgcc cgtcacacca tggaggtggg ttgctccaga agtagatagt ctaaccctcg 1440
[0036] agagttgat cctggctcag attgaacgct ggcggcaggc ctaacacatg caagtcgagc 1500