(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119242526 A
(43)申请公布日 2025.01.03

(21)申请号 202411650881.1

(22)申请日 2024.11.19

(83)生物保藏信息
CGMCC NO.30148 2024.03.26

(71)申请人 和实生物技术(山东省黄三角农高区)有限公司
地址 257100 山东省东营市山东省黄三角农高区滨海新动能产业园大健康及功能性食品产业研究院暨中试基地A座2#-101

(72)发明人 刘云哲 孙美鸽 唐爱荣 刘进国

(74)专利代理机构 北京识然知识产权代理事务所(普通合伙) 11975
专利代理师 曾庆国

(51)Int.Cl.
C12N 1/20(2006.01)
A23L 5/20(2016.01)
A23K 10/18(2016.01)
A23K 50/30(2016.01)
C12R 1/10(2006.01)

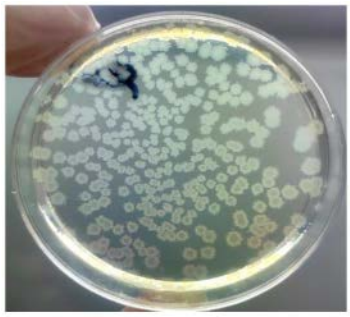
权利要求书1页 说明书13页 附图2页

(54)发明名称

一株降解黄曲霉毒素的地衣芽孢杆菌及其在育肥猪养殖中的应用

(57)摘要

本发明提供一株降解黄曲霉毒素的地衣芽孢杆菌及其在育肥猪养殖中的应用,所述的地衣芽孢杆菌的保藏编号为CGMCC NO.30148。本发明所筛选的地衣芽孢杆菌在高温水浴后活菌数依然可达到10^8CFU/mL,耐酸检测试验中活菌存活率为100%、与接种人工胃液前后活菌数保持不变,耐胆盐检测中活菌存活率为83.7%;对产气荚膜梭菌抑菌性能最强、加入抗生素和JR24B-1分组比较抑菌效果发现在24h取样时抑菌效果好,优于抗生素;对青霉素、林可霉素耐药;同时,所筛选的地衣芽孢杆菌具有强降解黄曲霉毒素和促进育肥猪生长的效果。



CN 119242526 A

1.一株地衣芽孢杆菌,其特征在于,所述的地衣芽孢杆菌的保藏编号为CGMCC NO.30148。

2.权利要求1所述的地衣芽孢杆菌在降解黄曲霉毒素中的应用。

3.权利要求1所述的地衣芽孢杆菌在制备用于降解黄曲霉毒素的制品中的应用。

4.权利要求1所述的地衣芽孢杆菌作为饲料添加剂的应用。

5.一种猪饲料,其特征在于,所述的猪饲料中添加有权利要求1所述的地衣芽孢杆菌的发酵菌粉。

6.如权利要求5所述的猪饲料,其特征在于,所述的猪饲料中发酵菌粉的添加量为0.2%。

7.如权利要求5或6所述的猪饲料,其特征在于,所述的发酵菌粉中还包含有葡萄糖,玉米淀粉和米糠粕。

一株降解黄曲霉毒素的地衣芽孢杆菌及其在育肥猪养殖中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于益生菌筛选技术领域,具体涉及一株降解黄曲霉毒素的地衣芽孢杆菌及其在育肥猪养殖中的应用。

背景技术

[0002] 黄曲霉毒素是由黄曲霉菌在通过污染玉米、小麦和杂粕等主要饲用农作物,在其种植、收货、储存和加工等环节过程中不断代谢产生的有毒代谢产物。研究表明饲料或者饲料成品受到霉菌毒素污染的范围十分广泛,全世界70%的饲料被至少一种霉菌毒素污染,其中最普遍的就是黄曲霉毒素。而猪对黄曲霉毒素最为敏感,据报道,连续12周饲喂140ppb低浓度的黄曲霉毒素可引起体重为18-64kg的猪肝损伤和胃肠道出血,严重者可在数天内死亡。连续28天给断奶仔猪食用280ppb的黄曲霉毒素会严重影响猪体重的增加。黄曲霉毒素给养殖场带来了巨大经济损失的报道层出不穷。据新《饲料卫生标准》GB13078-2017规定:仔猪黄曲霉毒素适应范围允许值小于10ppb,但2022年饲料原料及全价料中黄曲霉毒素检测报告显示,黄曲霉毒素超标率高达10%以上,其中最高值达406.95ppb,远超规定标准。因此为养殖场的实际生产找到解决黄曲霉毒素污染的方法十分迫切。

[0003] 霉菌毒素的降解方法主要有化学法、物理法及生物降解法。化学法主要有碱处理、氧化处理,化学物质降解等。这些化学方法存在效果不稳定、营养成分损失较大、难以规模化处理等缺点。物理法包括原料稀释法、研磨法、密度筛选法和吸附法等。其中,市场上比较常采用的物理方法是添加霉菌毒素物理吸附剂的办法,缺点是吸附剂可能只对部分毒素有特异性吸附作用,对其他分子量较大的毒素没有吸附性,且吸附剂在吸附毒素的同时也会吸附一些微量营养成分,可能对动物造成某种微量元素和维生素的缺乏,并且该方法去毒也不彻底,动物生长发育仍然受到很大的影响。而近年,霉菌毒素生物降解法已作为一种安全、高效且环保的霉菌毒素脱毒方法逐渐受到畜牧行业的关注,能够很好的弥补物理和化学方法去除霉菌毒素存在的缺陷。

[0004] 霉菌毒素生物降解法,其解毒机制作用明确,即借助微生物产生的功能酶将霉菌毒素的毒性基团破坏,使其转化为无毒代谢产物。相比物理吸附法,生物降解法可以彻底去除霉菌毒素的毒性,不会对动物、人体及环境产生毒副作用,效果稳定,重复性好。此外,生物降解剂在饲料中的添加量小,对维生素、微量元素等小分子有机化合物没有吸附作用,不会对饲料的营养平衡产生影响。生物降解的优势在于解毒、效率高、特异性强且本身是蛋白质不影响饲料适口性,可以循环利用;降解产物无毒无害,排出体外不会对环境造成污染;生物降解技术因其专一性、高效性和安全性代表了目前控制霉菌毒素的发展方向,具有广泛的应用发展前景。

[0005] 地衣芽孢杆菌作为一类饲用益生菌,有很强的抗逆性,并能产生较多功能酶等代谢产物。在代谢过程中产生的CotA漆酶不仅能够有效氧化黄曲霉毒素B_1,并将其分解为无毒产物黄曲霉毒素Q_1及其差向异构体$_{epi}Q_1$。研究发现地衣芽孢杆菌黄曲霉毒素B_1的降解率

高达94.7%,并且可以使黄曲霉毒素B_1的致突变作用丧失。综上,地衣芽孢杆菌具有开发成饲料添加剂用于去除饲料原料中黄曲霉毒素B_1的巨大潜力,以及饲料中添加地衣芽孢杆菌可能是在动物机体内对霉菌毒素解毒和对肠道进行生物修复的理想选择。但现有的具有降解黄曲霉毒素功效的地衣芽孢杆菌,其作为猪饲料添加剂来使用的时候,在制备饲料的过程中会因为高温导致菌株死亡,导致添加的菌株的活性丧失。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一株降解黄曲霉毒素的地衣芽孢杆菌及其在育肥猪养殖中的应用。

[0007] 本发明第一个目的是提供一株地衣芽孢杆菌(Bacillus licheniformis)JR24B-1株,已于2024年3月26日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为CGMCC NO.30148,保藏地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号。

[0008] 本发明再一个方面提供所述的地衣芽孢杆菌JR24B-1的一种用于,是在降解黄曲霉毒素,或是制备用于降解黄曲霉毒素的制品中的应用。

[0009] 本发明还提供所筛选的地衣芽孢杆菌JR24B-1株的另一种用途,是作为饲料添加剂的应用。

[0010] 本发明再一个方面还提供一种猪饲料,所述的猪饲料中添加有所述的地衣芽孢杆菌JR24B-1株的发酵菌粉。

[0011] 更进一步,所述的发酵菌粉的添加量优选为0.2%。

[0012] 更进一步的,所述的发酵菌粉中还包含有葡萄糖,玉米淀粉和米糠粕。

[0013] 本发明所筛选的地衣芽孢杆菌JR24B-1株在85℃和90℃高温水浴后活菌数依然可达到10^8CFU/mL,耐酸检测试验中活菌存活率为100%、与接种人工胃液前后活菌数保持不变,耐胆盐检测中活菌存活率为83.7%;对产气荚膜梭菌抑菌性能最强、加入抗生素和JR24B-1分组比较抑菌效果发现在24h取样时抑菌效果好,优于抗生素;对青霉素、林可霉素耐药;同时,地衣芽孢杆菌JR24B-1具有强降解黄曲霉毒素和促进育肥猪生长的效果,在育肥猪猪全价料中加0.2%地衣芽孢杆菌JR24B-1活性菌粉后,育肥猪的日增重升高24.52g/天,料比降低0.03%,饲料报酬升高53.11元/头,1-3级品质肉占比提高4.18%,经济效益综合升高了。

附图说明

[0014] 图1:地衣芽孢杆菌JR24B-1在细菌营养琼脂培养基上的菌落形态图。

[0015] 图2:地衣芽孢杆菌JR24B-1在显微镜下的菌体形态图。

[0016] 图3:地衣芽孢杆菌JR24B-1的耐药性实验结果图。

[0017] 图4:地衣芽孢杆菌JR24B-1抑菌效果实验结果图,指示菌由依次为:产气荚膜梭菌(CP)、金黄色葡萄球菌(STA)、沙门氏菌(SE)、大肠杆菌(EC)。

具体实施方式

[0018] 本发明提供一种地衣芽孢杆菌(Bacillus licheniformis)JR24B-1株,可用于降解黄曲霉毒素。

[0019] 本发明的地衣芽孢杆菌JR24B-1菌株的发酵方法如下：

[0020] 1)所述的菌种发酵液制备的制备方法,是将地衣芽孢杆菌JR24B-1菌种划线于细菌营养琼脂平板,37℃恒温培养18-24h。

[0021] 2)挑取地衣芽孢杆菌JR24B-1菌种单菌落三区划线于细菌营养琼脂平板活化一次。挑取活化后的地衣芽孢杆菌JR24B-1单菌落1个,置于加了2ml LB营养肉汤的50ml离心管中,220r/18-24h,37℃振荡培养,获得地衣芽孢杆菌JR24B-1种子液。

[0022] 3)锥形瓶中加入100ml LB营养肉汤,将摇完的2ml地衣芽孢杆菌JR24B-1种子液加到其中混匀,220r/18-24h,37℃振荡培养,获得菌种发酵液。

[0023] 4)所述的营养琼脂培养基,为牛肉膏3g、蛋白胨10g、氯化钠5g摇动容器直至溶质溶解,加热,并加入琼脂15-20g,琼脂熔化后,加入5％氢氧化钠溶液或5％稀盐酸,校正pH至7.2～7.4用蒸馏水定容至1000mL,121℃高压灭菌30min后,分装5-10ml到培养皿中,待凝固后使用。

[0024] 5)所述的LB培养基,为胰蛋白胨10g、酵母提取物5g、NaCl 10g摇动容器直至溶质溶解,加入5％氢氧化钠溶液或5％稀盐酸,调pH至7.0用蒸馏水定容至1000mL,121℃高压下蒸汽灭菌21min后,待使用。

[0025] 本发明另一个方面提供一种微生态制剂,是使用上述的地衣芽孢杆菌JR24B-1活性菌粉作为原料制备的。其具体制备的步骤如下：

[0026] 1)将上述发酵液镜检菌种形态,10000r/10min,离心后弃去发酵液上清。

[0027] 2)将离心后的沉淀菌体加入3ml无菌水吹打混匀,称取10g葡萄糖,30g玉米淀粉,10g米糠粕将吹打好的3ml沉淀产物加入其中,捏散混匀,然后置于37℃烘箱中烘干2天。粉碎机粉碎获得地衣芽孢杆菌JR24B-1活性菌粉。

[0028] 本发明所提供的地衣芽孢杆菌JR24B-1制备活性菌粉,抗逆性强:对胆盐及胃酸的耐受性良好;具有抑菌性:对大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌和产气荚膜梭菌等具有抑制作用;具有安全性:对四环素、青霉素、阿奇霉素、林可霉素耐药。具有益生效果:全程0.2％添加在猪全价料中能够提高育肥猪的生产性能和经济效益。

[0029] 黄曲霉毒素的检测方法如下:黄曲霉毒素的ELISA试剂盒检测(上海佑隆生物科技有限公司)方法如下:

[0030] 1、样品准备

[0031] 1)使用前先将试剂盒从冰箱中取出,放到室温环境下回温10min。

[0032] 2)本试剂盒所提供的酶标记物是浓缩液,使用前请先用酶稀释液进行稀释。用1.5ml酶稀释液将1瓶酵标记物溶解,配制的工作液够24孔使用。

[0033] 3)本试剂盒所提供的浓缩洗涤液用蒸馏水稀释20倍后即可使用。例如:2ml浓缩洗涤液+38ml蒸馏水,足够24孔使用。

[0034] 2、测定程序

[0035] 1)根据样品检测数插入足够数量的酶标板微孔于反应板支架上。标记好空白对照孔、标准品孔、样品孔。然后每孔加入250μL左右洗涤液,放置1min,倒掉液体后将酶标板在报纸或毛纸上用力拍干。

[0036] 2)在空白对照孔中加入50μL样品稀释液,在各个标准品孔中加入50μL黄曲霉毒素B1标准品(0ppb、0.1ppb、0.25ppb、0.5ppb、1ppb、2ppb),在样品孔中加入50μL样品液。

[0037] 3)在空白对照孔中加入50μL酶稀释液,其他孔都加入50μL稀释后的酶标记物溶液。轻轻摇匀混合,然后在37℃恒温孵育30min。

[0038] 4)孵育结束后甩掉微孔中的液体,然后每孔加入250μL左右稀释好的洗涤液,放置1min,倒掉液体,重复洗涤3次。倒掉液体后将酶标板在报纸或毛纸上用力拍干。

[0039] 5)每孔分别加入50μL显色剂和50μL反应底物,轻轻摇匀混合后,恒温孵育箱中37℃显色15min。

[0040] 6)显色反应结束后每孔加入50μL终止液。用酶标仪在450nm处进行测定。必须在加入终止液后10min内完成。

[0041] 下面结合实施例和附图对本发明进行详细描述。

[0042] 实施例1:筛选降解黄曲霉毒素的菌株

[0043] 本发明所提供的菌株的筛选检测方法如下:

[0044] 1)菌种的筛选和分离纯化

[0045] 黄曲霉毒素选择培养基:KH_2PO_4 0.25g,香豆素5g,CaCl 201g,$(NH_4)_2NO_3$401g,$FeSO_4$ 1g,$MgSO_4$ 0.25g,摇动容器直至溶质溶解,加热,并加入琼脂15-20g,琼脂熔化后,加入5%氢氧化钠溶液或5%稀盐酸,校正pH至7.2~7.4用蒸馏水定容至1000mL,121℃高压灭菌30min。

[0046] 养殖场中采集的发霉的饲料样品,取0.01g溶于1ml蒸馏水中涡旋振荡混匀,从中吸取100μL的菌液溶于900μL的蒸馏水中制成初始悬液,记此稀释梯度为10^{-1},然后用初始悬液以蒸馏水10倍逐级稀释,以此类推,稀释到10^{-10}梯度,每个梯度吸取200μL稀释后的菌悬液用涂布棒均匀涂布于初筛培养基,37℃,恒温倒置培养18-24h。

[0047] 观察并记录菌落形态,挑取长势良好的、形态不同的单菌落共9株,在黄曲霉毒素选择培养基平板上多次进行划线分离纯化得到单菌落,并分别以菌株JR24B-1~11命名。

[0048] 2)菌株的黄曲霉毒素降解率测定

[0049] 取养殖场发霉饲料样品,粉碎混匀,并用正常饲料与其混合将其黄曲霉毒素的浓度调至10ug/mg,将JR24B-1~11菌种活化,划线细菌营养琼脂平板,37℃恒温培养18-24h。挑取菌株JR24B-1~11菌种单菌落三区划线活化一次。

[0050] 挑取活化后的地衣芽孢杆菌JR24B-1~11单菌落各1个,置于加了2ml LB营养肉汤的50ml离心管中,220r/37℃,培养18-24h。

[0051] 锥形瓶中加入100ml LB液体培养基,将摇好的2ml JR24B-1~11的菌液加到其中混匀,220r/37℃恒温培养18-24h,获得菌种发酵液。

[0052] 将JR24B-1~11菌种发酵液离心,弃上清取活菌体并用无菌蒸馏水将其浓度调至10^{12}cfu/mL。

[0053] 取黄曲霉毒素浓度为10μg/mg的发霉饲料样品50g,将5ml 10^{12}cfu/mL浓度的JR24B-1~11菌液均匀喷洒在发霉饲料样品上,混合均匀,置于37℃恒温培养箱,培养72h后,测定JR24B-1~11的菌种的黄曲霉毒素降解率。结果表示JR24B-1菌种黄曲霉毒素浓度<1ppb,即JR24B-1菌种对黄曲霉毒素的降解率为100%。降解率计算方式为(霉菌毒素添加量-霉菌毒素残留量)/(霉菌毒素添加量-空白对照组残留量)×100%。因此选择JR24B-1菌种为研究对象,并用于生物降解黄曲霉毒素的进一步研究。

[0054] 表1:菌株JR24B-1~11的黄曲霉毒素降解率表

[0055]

菌种名（JR24B- ）	降解率（%）
1	100
2	16.17
3	-39.58
4	-1.75
5	-55.67
6	-115.75
7	-9.58
8	100
9	-93.92
10	100
11	100

[0056] 3)筛选具有耐高温特性的菌株

[0057] 将上述具有降解黄曲霉毒素功能的菌种进行LB液体培养,3-7天不等,镜检芽孢形成率,待菌种产芽孢50％以上后,80℃水浴10min杀死营养体,剩下芽孢评价该菌种芽孢的耐热性能,温度条件为温度85℃,15min,热处理前后涂布平板,计算存活率,直接筛选能够匹配饲料厂生产的具有耐高温性能的菌株。结果表明JR24B-1菌种在85℃加热15min后活菌数没有变化,其活菌数仍然达到98.69％。能够耐受高温对它的影响

[0058] 表2:菌株JR24B-1～11热处理15分钟后芽孢率表

[0059]

菌种名（JR24B- ）	芽孢活菌（logCFU/g）	
	未加热	85℃加热 15 分钟
1	6.10	6.02
8	3.00	0.00
10	7.39	6.21
11	5	0.00

[0060] 实施例2:菌株JR24B-1的理化性质及分类学鉴定

[0061] 1、形态学鉴定

[0062] 对处于对数生长期且菌落大小稳定的菌株进行单菌落状态描述,主要包括菌落的大小、颜色、透明度、菌落表面状态及菌落边缘状态。所得单菌落大小为8-10mm,颜色呈淡黄色或白色,圆形,不透明,菌落边缘光滑表面湿润。

[0063] 2、16SrDNA同源性序列分析

[0064] JR24B-1菌种划线培养,挑单菌落,以菌体为模板PCR,对细菌16SrDNA进行序列分析,测序所得16SrDNA结果,在NCBI数据库中进行比对,获得相关数据。数据库比对获得菌株种属,确定菌株类别为地衣芽孢杆菌(Bacillus licheniformis),并命名为地衣芽孢杆菌JR24B-1;并于2024年3月26日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为CGMCCNO.30148,保藏地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号。。

[0065] 实施例3:地衣芽孢杆菌JR24B-1的抗逆性能检测

[0066] 1、耐热性检测

[0067] LB液体培养,3-7天不等,镜检芽孢形成率,待菌种产芽孢50％以上后,80℃水浴

10min杀死营养体,剩下芽孢评价该菌种芽孢的耐热性能,温度条件为接近制粒温度的85℃2min、95℃2min,热处理前后涂布平板,计算存活率。结果显示:JR24B-1菌株在85℃处理2min后,活菌数可保持在10^8CFU/ml存活率可达100%;95℃处理2min后活菌数仍可保持在10^8CFU/ml,存活率达100%以上。JR24B-1菌株种子液分别经85℃和95℃水浴处理2min后,其活菌数依然可以培养至10^8CFU/ml,可见地衣芽孢杆菌JR24B-1菌株形成的芽孢对高温环境具有耐受性。

[0068] 2、耐酸性检测

[0069] LB液体培养,镜检芽孢形成率,待菌种产芽孢50%以上后,80℃水浴10min杀死营养体,剩下芽孢评价该菌种芽孢的耐酸性能。人工胃酸为PH 3.2的无菌蒸馏水,每100mL添加1g胃蛋白酶配制成人工胃液,9mL人工胃液加入1mL样品,40℃温浴2h,处理前后涂布平板计算存活率。

[0070] 结果显示:当80℃水浴10min后,活菌数保持在4.3×108CFU/ml。当接种人工胃液后,活菌数量4.3×108CFU/ml与接种前无差距,存活率为100%。说明该菌种对酸的耐受能力较强。结果提示JR24B-1菌株可以耐受胃酸的影响。

[0071] 3、耐胆盐检测

[0072] LB液体培养,镜检芽孢形成率,待菌种产芽孢50%以上后,80℃水浴10min杀死营养体,剩下芽孢评价该菌种芽孢的胆汁盐耐受性能力。人工肠液为100mL蒸馏水中加入0.68g磷酸二氢钾,调PH6.8后加入0.30g猪胆盐,121℃灭菌15min。9mL人工肠液加入1mL样品,40℃温浴2h,处理前后涂布平板计算存活率。

[0073] 结果显示:当80℃水浴10min后,活菌数为4.9×10^8CFU/ml。当加入胆汁盐后,活菌数量4.1×10^8CFU/ml呈现下降趋势,存活率为83.7%;说明地衣芽孢杆菌JR24B-1菌株的耐高温、耐胆盐能力较强。

[0074] 实施例4:地衣芽孢杆菌JR24B-1的安全性检测

[0075] 1、抗生素敏感性检测

[0076] 参照K-B药敏纸片法将JR24B-1芽孢杆菌分离株进行10种药物的敏感性试验,判断结果依照美国临床试验室标准协会(CLSI)推荐的2019版标准。

[0077] 1)JR24B-1复苏:JR24B-1接种于细菌营养平板(NA),置37℃恒温培养8-16h后取出。

[0078] 2)JR24B-1活化:将JR24B-1菌株置于3ml LB营养肉汤中,180r/37℃恒温培养4-8h后取出。

[0079] 3)涂布、贴片:吸取200μL菌液涂布于LB平板,涂板后直接将药敏纸片贴到平皿培养基表面,用镊子轻按几下药敏片,使其与培养基紧密相贴。将平皿置于37℃培养箱培养过夜,第二天用游标卡尺测量抑菌圈直径(mm)。

[0080] 4)记录结果:由表2可知:JR24B-1对青霉素、林可霉素耐药,对万古霉素、链霉素、氟苯尼考、诺氟沙星、头孢氨苄、阿奇霉素、甲氧苄啶/磺胺甲恶唑敏感。

[0081] 表3:JR24B-1芽孢杆菌药敏试验结果表

[0082]

药品名称	抑菌直径（mm）	敏感性
青霉素 PEN	8	R
林可霉素 MY	0	R
万古霉素 VAN	12	S
链霉素 S	17	S
氟苯尼考 FFC	24	S
诺氟沙星 NOR	28	S
头孢氨苄 CN	22	S
阿奇霉素 AZI	8	S
四环素 TET	18	I
甲氧苄啶/磺胺甲恶唑 SXT	28	S

[0083] 注:S:敏感;I:中介;R:耐药

[0084] 实施例5:地衣芽孢杆菌JR24B-1的益生性能检测

[0085] 1、抑菌能力检测

[0086] 采用滤纸片法评价JR24B-1对大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、产气荚膜梭菌的抑制能力。步骤如下:

[0087] 1)病原菌活化:4株病原菌(大肠杆菌、沙门菌、金黄色葡萄球菌、产气荚膜梭菌)三区划线于细菌营养琼脂(NA)培养基,置37℃恒温培养,18-24h后取出。

[0088] 2)复苏:将JR24B-1接种于NA培养基,置37℃恒温培养,18-24h后取出。

[0089] 3)富集:分别挑取4株病原菌单菌落,置于(5ml、10ml、20ml)LB营养肉汤中,37℃摇床(200rpm)培养4h后取出。

[0090] 4)离心:将JR24B-1离心(10000r/10min),吸取上清(此为菌液),沉淀的菌体用1ml LB液体培养基重悬混匀。

[0091] 5)涂板、贴片:分别吸取200μL病原菌菌液涂布于营养琼脂(NA)培养基,用无菌镊子夹取空白药敏纸片:分别沾取纯水(标号0)、菌体(标号1)、菌液(标号2),均匀贴于同一NA平板中,37℃倒置培养24h。

[0092] 6)观察结果:抑菌试验结果见表3和图4:JR24B-1地衣芽孢杆菌菌体对大肠杆菌、沙门氏菌和产气荚膜梭菌有显著抑菌效果,菌液对沙门氏菌和产气荚膜梭菌均有抑菌作用。JR24B-1菌体对大肠杆菌和产气荚膜梭菌的抑菌圈直径达到低度敏感范围,对产气荚膜梭菌的抑菌性能最强,其次为大肠杆菌、沙门氏菌/金黄色葡萄球菌;对革兰氏阳性菌(产气荚膜梭菌)拮抗效果较强。

[0093] 表4:JR24B-1抑菌试验结果表

[0094]

指示菌抑菌圈直径（mm）							
大肠杆菌（EC）		沙门氏菌（SE）		金黄色葡萄球菌（STA）		产气荚膜梭菌（CP）	
菌体	菌液	菌体	菌液	菌体	菌液	菌体	菌液
8	0	0	9	0	0	10	9
低度敏感			低度敏感			低度敏感	低度敏感

[0095] 实施例6:地衣芽孢杆菌JR24B-1的抑菌性能比较

[0096] 1、JR24B-1活化:三区划线,37℃,18-24h。

[0097] 2、JR24B-1和4株病原菌(大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、产气荚膜梭菌)18-24h后各取一个单菌落置于装有10mL LB的50mL离心管中,37℃,200r/min培养4h、8h、16h后分别取出2mL检测菌种量。

[0098] 3、试验组:分别吸取40μL病原菌菌液(大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、产气荚膜梭菌)加入到1mL JR24B-1菌液中(分别做4h、8h、16h取样的4组病原菌菌液),补LB液体培养基使总体积为4mL(加入2.96mL LB)。1)检测菌种量(细菌浓度):分别吸取100μL的菌液,分别溶于900μL的蒸馏水中制成初始悬液,记此稀释梯度为10^1,然后用初始悬液以蒸馏水10倍逐级稀释,以此类推,稀释到10^8梯度,将10^6、10^7、10^8梯度吸取200μL稀释后的菌悬液用玻璃珠均匀涂布于NA培养基,37℃,恒温倒置培养18-24h后进行菌量计数(表4),菌液浓度在10^7的菌液留待进行下一步实验(选择16h JR24B-1+8h病原菌的4组)。

[0099] 表5:JR24B-1试验组菌种量试验结果表

[0100]

组别	JR24B-1 取样时间	病原菌取样时间	菌量
1	16h	16h EC（大肠杆菌）	7.5×10^8
2	16h	16h SA（沙门氏菌）	9.5×10^8
3	16h	h JP（金黄色葡萄球菌）	3.0×10^8
4	16h	h CQ（产气荚膜梭菌）	7.0×10^9
5	16h	8h EC	8.5×10^7
6	16h	8h SA	2.0×10^7
7	16h	8h JP	6.0×10^7
8	16h	8h CQ	1.5×10^7
9	8h	8h EC	5.5×10^7
10	8h	8h SA	2.0×10^7
11	8h	8h JP	2.5×10^7
12	8h	8h CQ	5.0×10^6

[0101] 4、抗生素对照组:分别吸取40μL病原菌菌液(大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、产气荚膜梭菌),40μL氨苄青霉素(使用方法:25mL LB+50μL氨苄青霉素),加人LB液体培养基使总体积为4mL(加入3.92mL LB)。

[0102] 5、另设不加药正常对照组:病原菌大肠杆菌/沙门氏菌/金黄色葡萄球菌/产气荚

膜梭菌40μL+3.96mL LB。

[0103] 6、检测抗生素和不加药对照组的菌种量(细菌浓度):分别吸取100μL菌液,分别溶于900μL的蒸馏水中制成初始悬液,记此稀释梯度为10^1,然后用初始悬液以蒸馏水10倍逐级稀释,以此类推,稀释到10^8梯度,$10^{5\sim8}$梯度吸取200μL稀释后的菌悬液用玻璃珠均匀涂布于NA培养基,37℃,恒温倒置培养18-24h后进行菌量计数(表5),选择菌液浓度在107的菌液留待进行下一步实验。

[0104] 表6:JR24B-1对照组菌种量试验结果表

组别	抗生素对照组取样时间	菌量	对照组	菌量
1	5h EC（大肠杆菌）+AMP	2.5×10^7	EC+LB	1.5×10^6
2	5h SA（沙门氏菌）+AMP	3.5×10^6	SA+LB	1.0×10^7
3	5h JP（金黄色葡萄球菌）+AMP	5.0×10^6	JP+LB	5.0×10^6
4	5h CQ（产气荚膜梭菌）+AMP	5.0×10^5	CQ+LB	5.0×10^6
5	8h EC+AMP	1.5×10^6		
6	8h SA+AMP	6.5×10^6		
7	8h JP+AMP	1.0×10^6		
8	8h CQ+AMP	1.0×10^6		
9	16h EC+AMP	1.5×10^6		
10	16h SA+AMP	8.0×10^7		
11	16h JP+AMP	2.75×10^7		
12	16h CQ+AMP	2.5×10^7		

[0105]

[0106] 病原菌+JR24B-1(4株)、病原菌+AMP(4株)、病原菌+LB(4株)三组分别选择菌液浓度达到10^7的组别进行试验,均在37℃、180r/min条件下培养,分别于0、4、8、12、16、20、24和28h取样,取样后稀释,平板菌量计数。根据GB 4789.3-2010《食品安全国家标准食品微生物学检验大肠菌群计》用平板菌落计数法测定每毫升菌液中的活菌数(CFU·mL^{-1})。

[0107] 根据各组活菌浓度计算抑菌率。抑菌率＝(对照组细菌数一试验组细菌数)/对照组细菌数×100%(表6)。

[0108] 表7:JR24B-1试验组、抗生素对照组抑菌率试验结果表

[0109]

取样时间（h）	JR24B-1+病原菌	抑菌率（%）	AMP（氨苄青霉素）+病原菌	抑菌率（%）
4h	JR24B-1+JP（金黄色葡萄球菌）	85.7	AMP+JP（金黄色葡萄球菌）	0
	JR24B-1+EC（大肠杆菌）	50	AMP+EC（大肠杆菌）	75
	JR24B-1+SA（沙门氏菌）	88.1	AMP+SA（沙门氏菌）	99.8
	JR24B-1+CQ（产气荚膜梭菌）	-81.6	AMP+CQ（产气荚膜梭菌）	37.5
8h	JR24B-1+JP	91	AMP+JP	99.9
	JR24B-1+EC	96	AMP+EC	-13.4
	JR24B-1+SA	94.7	AMP+SA	99.9
	JR24B-1+CQ	15.8	AMP+CQ	31.6
12h	JR24B-1+JP	99.8	AMP+JP	99.8
	JR24B-1+EC	-12	AMP+EC	12
	JR24B-1+SA	-55	AMP+SA	99.7
	JR24B-1+CQ	23.9	AMP+CQ	39.1
16h	JR24B-1+JP	86.9	AMP+JP	99.9
	JR24B-1+EC	96.6	AMP+EC	-37.9
	JR24B-1+SA	-119.2	AMP+SA	99
	JR24B-1+CQ	-262.5	AMP+CQ	-20.8
20h	JR24B-1+JP	61.9	AMP+JP	91.4
	JR24B-1+EC	-104.5	AMP+EC	45.9
	JR24B-1+SA	-91.5	AMP+SA	99.5
	JR24B-1+CQ	-123	AMP+CQ	26.7
24h	JR24B-1+JP	63.3	AMP+JP	81.1
	JR24B-1+EC	80.1	AMP+EC	90
	JR24B-1+SA	92.5	AMP+SA	98.8
	JR24B-1+CQ	99.5	AMP+CQ	97
28h	JR24B-1+JP	96.7	AMP+JP	85
	JR24B-1+EC	75	AMP+EC	37.5
	JR24B-1+SA	97.6	AMP+SA	0
	JR24B-1+CQ	60	AMP+CQ	-28

[0110]

[0111] 随着培养时间的延长,JR24B-1加入病原菌组的抑菌率在24h和28h抑菌效果最好;氨苄西林加入病原菌后,抑菌效果在20h和24h时最好;整体抑菌率较高的取样时间在24h和28h。

[0112] JR24B-1和氨苄西林抑菌效果比较中发现:加入金黄色葡萄球菌后,JR24B-1的抑菌效果只在4h和28h时抑菌率高于加入氨苄西林的抑菌率;加入沙门氏菌后,氨苄西林组的抑菌效果仅在28h时表现出比JR24B-1组低的抑菌率。说明JR24B-1对这4株致病菌具有一定

的抑杀作用,在24h时抑菌率最好。

[0113] 实施例7:地衣芽孢杆菌JR24B-1活性菌粉对育肥猪生产性能和经济效益的影响

[0114] 1、试验目的

[0115] 探究地衣芽孢杆菌JR24B-1活性菌粉长期添加对育肥猪生产性能、健康度及综合经济效益的影响。

[0116] 2、试验养殖方式

[0117] 项目拟选取饲养日龄85天的350头体重55±2kg育肥猪开展试验。场地规模为2栋2000头的育肥场。进行试验期预期为期75天的动物饲养试验。

[0118] 3、试验分组

[0119] 试验期间:以猪场大群饲喂程序用料消耗完毕为试验结束,对对照组和试验组各栏猪只进行称重并记录。试验采用玉米豆粕型基础日粮,两组相同饲养管理,自由饮水和采食。

[0120] 试验拟分为2个组,分别为:

[0121] 1)对照组1:正常饲喂玉米豆粕型基础日粮

[0122] 2)试验组2:正常饲喂玉米豆粕型基础日粮,每日猪群额外添加0.2%地衣芽孢杆菌JR24B-1活性菌粉

[0123] 4、生产性能测定指标

[0124] 1)平均日增重:以饲喂料号结束时间和出栏时间为准,核算各组的增重

[0125] 2)平均采食量:以饲喂料号结束时间和出栏时间为准,统算各组猪群饲料消耗量

[0126] 3)平均死亡率:统计试验期间各组死亡率

[0127] 4)斤肉成本:试验后统计各组猪群的斤肉成本

[0128] 5)药费:统计试验期间各组药费

[0129] 5、试验结果分析与讨论

[0130] 1)0.2%地衣芽孢杆菌JR24B-1活性菌粉对育肥猪生产性能和健康度的分析表8:0.2%地衣芽孢杆菌JR24B-1活性菌粉对育肥猪生长性能和健康度影响数据统计表

[0131]

	照组	0.2%地衣芽孢杆菌 JR24B-1 活性菌粉组	*P* 值
初始体重（kg）	7.08	7.08	
期末体重（kg）	124.33	128.67	
全期平均日增重（kg）	702.43	726.95	

[0132]

全期料肉比	2.62	2.54	<0.01 差异极显著
1-3 级肉占比（%）	67.91	72.09	<0.01 差异极显著

[0133] 试验结果表明:与对照组相比,添加0.2%地衣芽孢杆菌JR24B-1活性菌粉后,育肥

猪的平均日增重增加24.52g/天(提高3.49%);料肉比降低了0.08(降低0.03%);提升肉品质方面:与对照组相比,添加0.2%地衣芽孢杆菌JR24B-1活性菌粉后,育肥猪1-3级品质肉占比提高4.18%。本试验结果符合实验预期,添加0.2%地衣芽孢杆菌JR24B-1活性菌粉后,育肥猪的日增重均提高,料比降低,饲料报酬升高,综合经济收益提高。

[0134] 2)0.2%地衣芽孢杆菌JR24B-1活性菌粉对育肥猪经济效益的分析

[0135] 表9:0.2%地衣芽孢杆菌JR24B-1活性菌粉对育肥猪经济效益的影响分析表

项目组	对照组	0.2%地衣芽孢杆菌 JR24B-1 活性菌粉组
试验头数（头）	175	175
死亡率（%）		
增重（kg/头）	117.25	121.59
耗料（kg/头）	326.26	326.26
养殖天数	177	177
饲料价格（元/kg）	3.63	3.70
肥猪价格（元/kg）	17.5	17.5
增重收益（元/头）	2051.88	2127.83
饲料成本（元/头）	1184.32	1207.16
效益（元/头）	867.56	920.67
效益差（元/头）	+53.11	
1-3 级占比提升肥猪价格（元/kg）	17.5	17.8
1-3 级占比提升效益（元/头）	0	36.47
1-3 级占比提升效益差（元/头）	+36.47	

[0136]

[0137]

[0138] 按照目前115-125kg标猪的当前售价(2024.9月:17.5元/kg,)计算,在177天的试验期内,饲喂0.2%地衣芽孢杆菌JR24B-1育肥猪头均效益增加到920.67元/头;0.2%地衣芽孢杆菌实验组饲料比对照组高70元/吨进行计算,与对照组相比,育肥猪使用0.2%地衣芽孢杆菌活性菌粉后头均经济效益上升53.11元/头,即在55±2kg体重的育肥猪饲喂0.2%地衣芽孢杆菌活性菌粉后育肥猪的经济效益上升了6.12%。在改善猪肉品质提升猪肉经济效益方面,饲喂0.2%地衣芽孢杆菌活性菌粉后育肥猪的1-3级肉占比相比对照组有显著提高,提高4.34%,理想预期提高议价0.3元/kg(1-3级占比提高,可提高议价1-1.6元/斤),按此计算育肥猪使用0.2%地衣芽孢杆菌活性菌粉后头均经济效益上升36.47元/头,即在55

±2kg体重的育肥猪饲喂0.2％地衣芽孢杆菌活性菌粉后育肥猪的经济效益综合上升了10.31％。

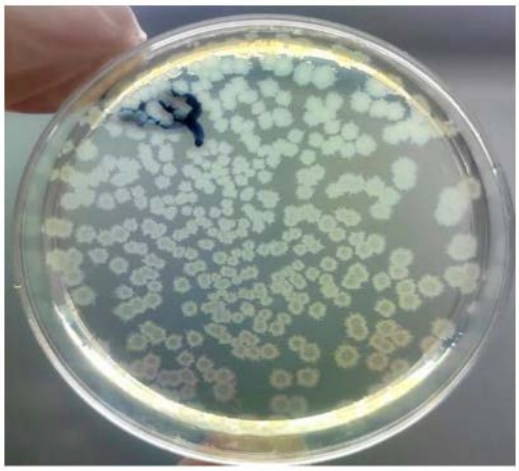


图1

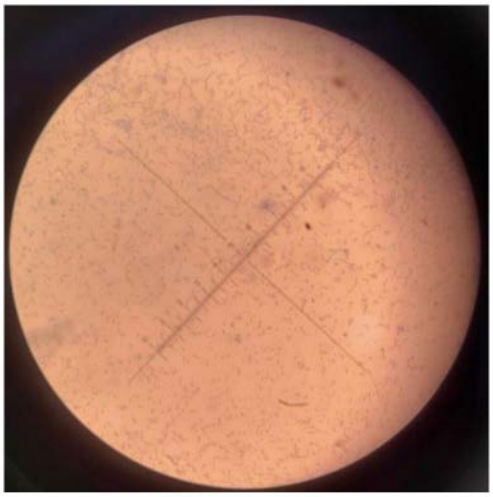


图2

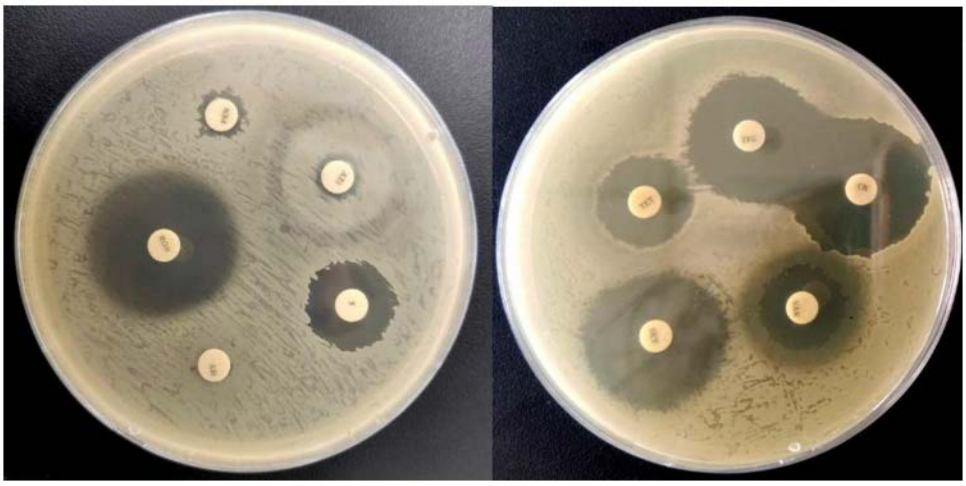


图3

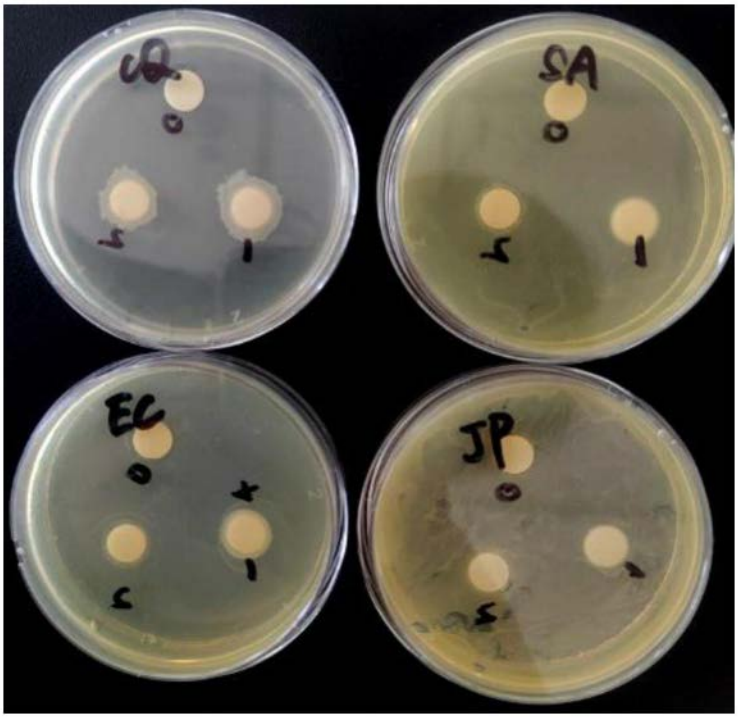


图4