

---

# 说明书

一种獭兔源枯草芽孢杆菌及其在提高獭兔生长性能中的应用

## 5 技术领域

本发明属于生物技术领域，具体地说，涉及一种獭兔源枯草芽孢杆菌及其在提高獭兔生长性能中的应用。

### 背景技术

10 近年来，我国养殖业面临着日益严峻的食品安全问题，传统的抗生素虽然在治疗动物疾病、促进动物生长方面具有巨大的优势，但由于其易产生耐药性等缺陷而饱受争议，在养殖业中受到越来越多的限制。于是大部分国家开始限制抗生素的使用，并开始寻找替代抗生素的产品，以解决养殖业面临的难题。芽孢杆菌是一种重要的益生菌，对促进动物的生长发育和维持动物  
15 体内微生态的平衡具有重要意义，芽孢杆菌能够在恶劣环境下形成抗逆性强的内生孢子，能够耐受自然界及加工过程中的极端条件，具有作为饲用益生菌开发的潜力，对动物健康养殖意义重大。目前可以作为饲用的芽孢杆菌有：枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*），地衣芽孢杆菌（*Bacillus licheniformis*），短小芽孢杆菌（*Bacillus pumilus*）和蜡样芽孢杆菌（*Bacillus cereus*）等。

20 综合目前关于枯草芽孢杆菌的文献报道，其对动物的益生功能主要体现在以下几方面：第一，枯草芽孢杆菌可通过多种途径提高动物机体的免疫功能；第二，枯草芽孢杆菌能够降低肠道有害菌的数量、增加肠道有益菌的数量，维持肠道微生态的平衡；第三，枯草芽孢杆菌能分泌多种酶类，促进动物对营养物质的消化吸收，改善肠道形态；第四，枯草芽孢杆菌通过抑制蛋  
25 白质转化为胺和氨，降低脲酶活性，减少氨氮物质分解，提高含氮物质的消

化率等方式达到生物除臭的作用；第五，枯草芽孢杆菌能够提高动物机体的抗氧化能力，保护机体免受氧化应激。

獭兔是一种皮肉兼用型兔种，在目前保护野生动物的大背景下，獭兔皮是裘皮比较成功的替代品。此外兔肉是世界卫生组织推荐的“三高四低”优质肉制品，养殖前景广阔。獭兔是一种敏感性很高的动物，饲料原料、饲料配方和饲养环境的改变、惊吓等都极易造成獭兔的应激，从而引起死亡。本试验从獭兔体内分离益生芽孢杆菌并应用于獭兔，降低了芽孢杆菌添加后可能对獭兔造成的应激，且益生菌存在种属差异，不同宿主来源的细菌很难在其他种属动物肠道内定植，甚至还可能转化为致病菌，相同宿主来源的优势菌进入宿主体内时能够在复杂的肠道菌群中排除定植抗力，快速定植到肠道中发挥其功能。在獭兔养殖中，腹泻疾病高发、频发，严重影响兔业生产，且断奶兔因自身免疫系统、消化系统发育不完善，断奶后饲料结构发生变化，极易发生腹泻，高产酶的芽孢杆菌的添加可以改善獭兔的消化吸收，促进肠道发育，减少腹泻的发生。

已有的研究表明在獭兔饲养中添加一定剂量的非獭兔源益生菌，獭兔死亡率却异常升高，但耐过存活獭兔的小肠绒毛高度、隐窝深度、粘膜层厚度、肠道质量均显著增加，免疫器官质量、细胞因子水平也显著提高，肠道菌群结构更加复杂，部分有害菌数量降低，有益菌数量增加，腹泻率降低。此外一定剂量的益生菌还可增加獭兔肌肉生长速度。由此可见，獭兔在适应外源益生菌的过程中会导致部分弱兔出现不耐受，死亡率升高的严重问题。獭兔源的益生菌来自獭兔，不会出现不耐受现象，同时又具有上述益生效果，所以獭兔源益生菌筛选与应用是目前解决獭兔养殖中断奶兔养殖问题的有效途径之一。但是相关的研究在国内外都是空白。因此，獭兔源高产酶芽孢杆菌的定向筛选与应用研究工作十分必要，为獭兔养殖中使用益生菌替代抗生素添加剂提供参考，并为生产绿色优质的兔肉提供保证。

5 目前，国内申请饲用芽孢杆菌专利，其发明内容大多是饲用具有育肥作用的芽孢杆菌，例如：专利一种利用中性蛋白酶的凝结芽孢杆菌提高北京油鸡生产性能的方法（申请号：201611014471.3，申请日：2016-11-18，公开号：CN 106520614 A，公开日：2017-03-22）报道了从传统干酪中分离出的一株  
10 凝结芽孢杆菌可以降低北京油鸡的死亡率，显著提高油鸡体重和蛋白利用率，促进肠道中有益菌的生长，抑制有害菌的生长，对提高油鸡生产性能有良好的作用；专利一株提高白羽肉鸡生长性能的凝结芽孢杆菌（申请号：201410719197.4，申请日：2014-12-03，公开号：CN 104403972 A，公开日：2015-03-11）报道了从健康家禽的消化道分离出的一株凝结芽孢杆菌可以降低白羽肉鸡盲肠大肠杆菌数和氨态氮浓度，提高盲肠微生物多样性指数，降低死淘率和料重比，提高肉鸡的日增重；专利枯草芽孢杆菌制剂及其制备方法与应用（申请号：201210139547.0，申请日：2012-05-08，公开号：CN 102660534 A，公开日：2012-09-12）报道了枯草芽孢杆菌制剂经口服途径（饮水或拌料）饲喂畜禽后，具有改善消化功能，提高饲料转化率，促进生长的  
15 作用。

目前有关芽孢杆菌在提高獭兔生长性能的方法未见专利报道。关于利用獭兔源高产纤维素酶、蛋白酶、淀粉酶的芽孢杆菌活菌制剂饲喂獭兔，提高饲料转化率和肠道酶活、降低料重比、提高獭兔生长性能的方法，也尚未见国内外相关文献报道和专利报道。

20

## 发明内容

有鉴于此，本发明针对上述的问题，提供了一种獭兔源枯草芽孢杆菌及其在提高獭兔生长性能中的应用。

为了解决上述技术问题，本发明公开了一种獭兔源枯草芽孢杆菌，该菌  
25 株已于2017年5月31日保藏于中国典型培养物保藏中心，保藏地址：湖北省武汉市武昌区八一路299号，武汉大学保藏中心，430072，保藏号CCTCC NO:

M2017290。

本发明还公开了一种上述的獭兔源枯草芽孢杆菌在提高獭兔生长性能中的应用。

5 进一步地，在獭兔的基础日粮中添加枯草芽孢杆菌制剂，枯草芽孢杆菌在每克基础日粮中的含量为  $1.0 \times 10^6 \sim 10^7$  cfu。

进一步地，所述枯草芽孢杆菌制剂为枯草芽孢杆菌菌粉。

10 进一步地，所述枯草芽孢杆菌菌粉通过以下方法制备得到：将冷冻保存的枯草芽孢杆菌 BSWJ2017003 在营养肉汤培养基中活化后接种到固体培养基中培养 72~96h，期间挑取菌落镜检，收集菌体，加入载体，65℃烘干制备得到枯草芽孢杆菌菌粉，即为枯草芽孢杆菌制剂。

进一步地，所述固体培养基配方：黄豆粉 1.3%，玉米粉 1.3%，麸皮 0.5%，蛋白胨 0.3%，葡萄糖 2%，牛肉膏 0.1%，氯化钠 0.5%，琼脂 1.2%，余量为水，以上质量百分含量为 100%，pH6.5-7.5。

进一步地，制剂中枯草芽孢杆菌活菌含量为  $2 \times 10^{10}$  cfu/g。

15 进一步地，所述枯草芽孢杆菌制剂饲料制粒时添加到獭兔的基础日粮中。

与现有技术相比，本发明可以获得包括以下技术效果：

20 本发明分离得到了一株獭兔源枯草芽孢杆菌，将上述的枯草芽孢杆菌以  $1.0 \times 10^6 \sim 10^7$  cfu/g 的剂量添加到饲料中，能够显著降低獭兔料重比、提高肠道酶活等。其中，尤以在基础日粮中添加  $1.0 \times 10^6$  cfu/g 和  $1.0 \times 10^7$  cfu/g 的枯草芽孢杆菌效果最为显著。

当然，实施本发明的任一产品并不一定需要同时达到以上所述的所有技术效果。

## 附图说明

25 此处所说明的附图用来提供对本发明的进一步理解，构成本发明的一部分，本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明，并不构成对本发明的不当限定。在附图中：

图 1 是本发明枯草芽孢杆菌 BSWJ2017003 16S rDNA PCR 产物的电泳图；

图 2 是本发明不同添加量对獭兔料重比的影响。

## 具体实施方式

以下将配合实施例来详细说明本发明的实施方式，藉此对本发明如何应用技术手段来解决技术问题并达成技术功效的实现过程能充分理解并据以实施。

### 实施例 1 菌的分离与鉴定

#### 一、菌种的分离

称取健康獭兔盲肠内容物 0.5g，加入到装有 49.5mL 无菌生理盐水的带玻璃珠的锥形瓶中，摇床震荡 20min，80℃水浴 20min，十倍梯度稀释，将每个稀释度各取 100 μL 均匀涂布于 NB 平板，置于 37℃恒温培养箱培养 12~24h 后，接种环挑取疑似芽孢杆菌的单个菌落在 NB 平板上反复划线纯化，直至镜检无杂菌，得到一株能够提高獭兔生长性能的菌种，命名为 BSWJ2017003。

#### 二、菌种鉴定

（一）按照“伯杰细菌鉴定手册”（第八版）和“常见细菌系统鉴定手册”（东秀珠，蔡妙英等编著，北京：科学出版社，2001.2）中描述的方法，对菌株 BSWJ2017003 进行形态特征、培养特性和生理生化特性鉴定，具体结果如下：

菌株的形态和生理生化特征：

在 NB 培养基，37℃培养 24h，菌落呈浅黄色，近圆形，表面干燥、无光泽，有皱褶状突起，边缘不整齐。革兰氏阳性，显微镜下呈直杆状，芽孢椭圆中生。

生理生化特征：

明胶液化：+；接触酶：+；V-P 反应：+；形成吲哚：-；柠檬酸盐利用：-；葡萄糖发酵：+；葡萄糖产气：+；木糖产酸：-；木糖产气：+；甘露醇产酸：-；甘露醇产气：+；阿拉伯糖产酸：+；马尿酸盐水解：-；

精氨酸双水解： -；酪素水解： +；酪氨酸水解： -；淀粉水解： +；硝酸盐还原： +；苯丙氨酸脱氢酶： -；2%NaCl 生长： +；5%NaCl 生长： +；7%NaCl 生长： +。

## （二）16S rDNA 试验

- 5 挑取平板上的单菌落,对其进行 16S rRNA 菌落 PCR 鉴定,纯化后的 PCR 产物送北京华大基因测序,枯草芽孢杆菌 BSWJ2017003 16S rDNA PCR 产物电泳结果图见图 1,测得的序列 SEQ ID NO.1。根据 Gen-Bank 序列同源性比较,菌株 BSWJ2017003 与 *Bacillus subtilis strain GX S-11* (GenBank 登录号 KU904283.1) 同源性 99%,判定该菌为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)。
- 10 基于以上特征,将菌株 BSWJ2017003 鉴定为 *Bacillus subtilis*,其分类命名为 *Bacillus subtilis* BSWJ2017003。该菌株已于 2017 年 5 月 31 日保藏于保藏于中国典型培养物保藏中心(湖北省武汉市武昌区八一路 299 号,武汉大学保藏中心,430072),保藏号 CCTCC NO: M2017290。

### 实施例 2 菌种产纤维素、蛋白酶和淀粉酶初选和复选

#### 15 1、菌种产纤维素、蛋白酶和淀粉酶初选

##### 1.1 产纤维素酶初选

- 将菌种活化后接种于营养肉汤培养基中,37℃培养 12h,然后用滴种法移接在 CMA-Na 平板上,培养 24-48h,采用 0.2%的刚果红染色 30min,然后依次用蒸馏水和浓度为 1mo/l 的氯化钠洗去染液,再用 5%的醋酸溶液固定颜色,用游标卡尺分别测量染色圈直径和菌落直径,计算二者的比值。
- 20

##### 1.2 产蛋白酶初选

将菌种活化后接种于营养肉汤培养基中,37℃培养 12h,然后用滴种法移接在酪素平板上,培养 24-48h,用游标卡尺分别测量酪素水解圈直径和菌落直径,计算二者的比值。

#### 25 1.3 产蛋白酶初选

将菌种活化后接种于营养肉汤培养基中，37℃培养 12h，然后用滴种法移接在淀粉平板上，培养 24-48h，采用卢戈式碘液染色，用游标卡尺分别测量透明圈直径和菌落直径，计算二者的比值。

产酶初选试验的结果表明，分离得到的 122 株菌株中，109 株具有产纤维素酶的能力，100 株具有产蛋白酶的能力，30 株具有产淀粉酶的能力。菌株 BSWJ2017003 同时具有产纤维素酶、蛋白酶和淀粉酶的能力。

2、菌种产纤维素、蛋白酶和淀粉酶复选

2.1 产纤维素酶复选

2.1.1 标准曲线的制作

取 16 支 20mL 刻度试管，灭菌干燥，按表 1 配置各种浓度的葡萄糖溶液。（每个浓度做 3 个平行）

表 1 纤维素酶标准曲线的制作

试管号	0	1	2	3	4	5
0.1%葡萄糖溶液（mL）	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
pH4.6 醋酸缓冲液（mL）	5.0	4.8	4.6	4.4	4.2	4.0

向上述不同浓度的葡萄糖溶液中分别加入 1mL 2mol/L 氢氧化钠溶液和 2mL DNS 溶液，摇匀后置沸水浴中 5min，然后流水冷却，加蒸馏水定容至 20mL。用分光光度计于波长 485nm 处，以不含葡萄糖的 0 号试管为空白对照，分别测定其吸光度值。并建立通过吸光度值求葡萄糖的回归方程。

2.1.2 粗酶液 CMC 酶活力测定

将活化的芽孢杆菌菌液接种于种子培养基 I 中，37℃培养 12h，然后以 2%的接种量接种于发酵培养基 I 中，摇床培养 160r/min，37℃培养 48h，发酵 12h 后补加 CMC-Na。发酵后离心，收集上清液即为待测粗酶液。将 0.625%CMC-Na 溶液预热至 50℃。按以下顺序操作：取 20ml 具塞刻度试管，预先灭菌干燥，编号。取粗酶液 1.00ml，置于 50℃水浴锅中预热 2min，加

入 4ml 已预热至 50℃的 0.625%CMC-Na 溶液，于 50℃水浴准确反应 5min 取出，立即加入 1ml 2mol/L 氢氧化钠溶液和 2mlDNS 显色液，摇匀后样品管与对照管都置于沸水浴准确计时 5min 取出，流水迅速冷却，加蒸馏水定容至 20ml。空白对照加底物之前置于沸水浴中 10min 使酶失活，其余操作同上。

5 定容，摇匀，用分光光度计测定 OD<sub>485</sub> 的值。在上述条件下定义为每分钟每毫升粗酶液产生 1 μmol 葡萄糖为一个酶活单位(U)。

2.1.3 粗酶液滤纸酶活力的测定

粗酶液的制备方法同 2.1.2。

10 取 50mg 新华滤纸，加入 3mL 0.2mol/L pH4.6 的醋酸缓冲液，加入粗酶液 1mL，50℃水浴准确反应 60min，加入 2mL DNS，沸水浴 5min，冷却后定容至 20mL。空白对照加底物之前置于沸水浴中 10min 使酶失活，其余操作同上。定容，摇匀，用分光光度计测定 OD<sub>485</sub> 的值。在上述条件下定义为每分钟每毫升粗酶液产生 1 μmol 葡萄糖为一个酶活单位(U)。

2.2 产蛋白酶复选

15 2.2.1 标准曲线的制作

取 16 支 20mL 刻度试管，灭菌干燥，按表 2 配置各种浓度的酪氨酸溶液。（每个浓度做 3 个平行）

表 2 蛋白酶标准曲线的制作

试管号	0	1	2	3	4	5
100 μg/mL 酪氨酸溶液( mL )	0	1	2	3	4	5
蒸馏水 ( mL )	10	9	8	7	6	5

20 取上述不同浓度的酪氨酸溶液各 1mL，分别加入 5mL 0.4mol/mL 碳酸钠溶液和 1mL 福林试剂溶液，摇匀后置于 40℃水浴中反应 20min，加蒸馏水定容至 20mL。用分光光度计于波长 660nm 处，以不含酪氨酸的 0 号试管为空白对照，分别测定其吸光度值。并建立通过吸光度值求酪氨酸的回归方程。

2.2.2 粗酶液蛋白酶活力测定



将活化的芽孢杆菌菌液接种于种子培养基Ⅱ中，37℃培养 12h，然后以 2%的接种量接种于发酵培养基Ⅱ中，摇床培养 160r/min，37℃培养 48h，发酵 24h 后补加葡萄糖。发酵后离心，收集上清液即为待测粗酶液。将 2%酪蛋白溶液放入 40℃的恒温水浴锅中预热 5min。按以下顺序操作：取 20ml 具塞刻度试管，预先灭菌干燥，编号。取粗酶液 2.50ml，置于 40℃水浴锅中预热 2min，加入 2.5ml 已预热至 40℃的 2%酪蛋白溶液，于 40℃水浴准确反应 10min 取出，加入 5ml 0.4mol/L 三氯乙酸溶液终止反应，立即摇匀，取出静置 10min，取滤液 1mL，加入 5mL 0.4mol/L 碳酸钠溶液和 1mL 福林试剂溶液，混匀后置 40℃水浴中 20min，加蒸馏水定容至 20ml。空白对照，样品中先加入三氯乙酸使酶失活，再加入酪蛋白溶液，以后操作步骤同上。用分光光度计测定  $OD_{660}$  的值。在上述条件下定义为每分钟每毫升粗酶液产生  $1\mu\text{mol}$  酪氨酸为一个酶活单位(U)。

2.3 产淀粉酶复选

2.3.1 标准曲线的制作

取 19 支 20mL 刻度试管,灭菌干燥,按表 1 配置各种浓度的麦芽糖溶液。  
(每个浓度做 3 个平行)

表 3 淀粉酶标准曲线的制作

试管号	0	1	2	3	4	5	6
0.1%麦芽糖溶液 (mL)	0	0.2	0.6	1.0	1.4	1.8	2.0
蒸馏水 (mL)	2.0	1.8	1.4	1.0	0.6	0.2	0

向上述不同浓度的麦芽糖溶液中分别加入 2mL DNS 溶液，摇匀后置沸水浴中 5min，然后流水冷却，加蒸馏水定容至 20mL。用分光光度计于波长 520nm 处，以不含麦芽糖的 0 号试管为空白对照，分别测定其吸光度值。并建立通过吸光度值求麦芽糖的回归方程。

2.3.2 粗酶液淀粉酶活力测定

将活化的芽孢杆菌菌液接种于种子培养基Ⅲ中，37℃培养 12h，然后以

5%的接种量接种于发酵培养基Ⅲ中，摇床培养 160r/min，37℃培养 48h，发酵 24h 后补加碳酸钙。发酵后离心，收集上清液即为待测粗酶液。按以下顺序操作：取 20ml 具塞刻度试管，预先灭菌干燥，编号。取粗酶液 1.00ml 加入 2% 的可溶性淀粉 1ml，蒸馏水 3ml，于 60℃ 水浴中预热 5min，加入 0.1mol/L 柠檬酸缓冲液（pH6.0）1ml。于 60℃ 水浴中保温 30min，加入 1.5ml DNS 溶液，沸水浴 5min，流水迅速冷却，加蒸馏水定容至 20ml。空白对照加底物之前置于沸水浴中 10min 使酶失活，其余步骤同上。定容，摇匀，用分光光度计测定 OD<sub>520</sub> 的值。在上述条件下定义为每分钟每毫升粗酶液产生 1 μmol 麦芽糖为一个酶活单位(U)。

- 10 根据产酶初选试验结果，产纤维素酶复选试验选取染色圈直径/菌落直径 ≥ 1.90 的 19 株菌株、产蛋白酶复选试验选取染色圈直径/菌落直径 > 1.97 的 31 株菌株、产淀粉酶复选试验选取染色圈直径/菌落直径 ≥ 1.23 的 16 株菌株进行试验。产酶复选试验的结果与产酶初选试验结果基本一致，进一步证明菌株 BSWJ2017003 具有产纤维素酶、蛋白酶和淀粉酶的能力，且该菌株具有
- 15 较高的产纤维素酶、蛋白酶和淀粉酶能力。

### 实施例 3 枯草芽孢杆菌菌粉的制备

- 将冷冻保存的枯草芽孢杆菌 BSWJ2017003 在营养肉汤培养基中活化后接种到固体培养基（黄豆粉 1.3%，玉米粉 1.3%，麸皮 0.5%，蛋白胨 0.3%，葡萄糖 2%，牛肉膏 0.1%，氯化钠 0.5%，琼脂 1.2%，余量为水，以上质量
- 20 百分含量为 100%，pH6.5-7.5）中培养 72~96h，期间挑取菌落镜检，当形成大量芽孢时，收集菌体，按 1:100 的比例加入适量载体（玉米粉等），65℃ 烘干制备得到枯草芽孢杆菌菌粉，稀释法检测菌粉活菌数。

### 实施例 4 枯草芽孢杆菌菌粉在提高獭兔生长性能中的应用

#### 1、动物试验及试验设计

- 25 120 只 35 日龄断奶獭兔（1000 ± 200g）适应性饲养一周后，随机分成 6

个处理组，每个处理组 20 只獭兔。第 1 组为空白对照组，饲喂不添加抗生素的基础日粮；第 2-6 组为枯草芽孢杆菌菌粉试验组，饲料中枯草芽孢杆菌菌粉添加量分别为  $1.0 \times 10^4$ 、 $1.0 \times 10^5$ 、 $1.0 \times 10^6$ 、 $1.0 \times 10^7$ 、 $1.0 \times 10^8$ cfu/g，试验周期为 8 周，试验时间为 2016 年 11 月-2017 年 1 月。基础日粮配方见表 4。

5 参照 Nutrition of the Rabbit（2010 第二版）兔饲养标准配制。

表 4 基础日粮配方和营养成分

日粮组成	含量%
玉米二级	15.00
次粉	8.00
麦麸	16.00
统糠 37	10.00
苜蓿草粉	32.50
豆粕	14.00
豆奶宝	1.00
磷酸氢钙	1.00
石粉	0.50
膨润土	0.80
盐 NaCl	0.40
矿添预混料	0.50
赖氨酸	0.10
蛋氨酸	0.15
中华复合维生素预混料	0.05
营养水平	
粗蛋白	16.57
粗纤维	14.82

钙	0.95
磷	0.38
赖氨酸	0.86
甲硫氨酸	0.38
半胱氨酸	0.24
消化能/ ( MJ/kg )	10.12

注: 每公斤饲料中维生素与微量元素含量: Mn90mg; Zn50mg; Fe90mg; Cu10mg; I0.4mg; Se0.2mg; Co0.4mg; VA5000IU; VD<sub>3</sub> 500IU; VE10IU; VK0.5mg; VB<sub>1</sub> 1.5mg; VB<sub>2</sub>6.0mg; 泛酸 12mg; 烟酸 35mg; VB<sub>6</sub>6.0mg;; 叶酸 0.8mg; VB<sub>12</sub> 0.01mg; 生物素 0.18mg

## 5 2、动物试验方法

采用叠层笼养, 1 只/笼。自然通风, 自由采食和饮水。

## 3、生长性能指标检测

分别在试验期第 1、8、15、22、29、36、43、50、57 天早上七点空腹称重, 统计每周采食量, 计算每周和 1-8 周的日采食量、日增重和料重比指标。

## 10 4、肠道酶活检测

试验第 57 天, 第 1 组、第 3 组、第 4 组、第 5 组每个组随机选取 6 只獭兔, 无菌分离出十二指肠、空肠、回肠、盲肠, 收集其内容物, 按上述酶活测定方法测定十二指肠、空肠和回肠内容物的蛋白酶和淀粉酶活力, 以及盲肠内容物的 CMC 酶和滤纸酶活力。一个酶活单位(U)的定义为每 g 肠道内容物在上述条件下每分钟产生 1  $\mu$  mol 底物所需的酶量。

## 5、统计方法

试验数据采用 SPSS 软件对数据进行 One-way Anova 分析, 以  $P < 0.05$  为显著水平, 试验数值以“平均值  $\pm$  标准差”表示。

## 6、结果分析

6.1、芽孢杆菌产酶初选

表 5 芽孢杆菌产纤维素酶初选

菌株	菌落直径 (mm)	染色圈直径 (mm)	染色圈直径/菌落直径
BSWJ2017003	10.93 ± 1.54	21.09 ± 1.51	1.94

结果显示 (表 5), 通过 CMC-Na 平板培养、染色, 观察, 测量, 枯草芽孢杆菌 BSWJ2017003 产生染色圈, 染色圈直径/菌落直径比值为 1.94。

5 表 6 芽孢杆菌产蛋白酶初筛

菌株	菌落直径 (mm)	染色圈直径 (mm)	染色圈直径/菌落直径
BSWJ2017003	11.11 ± 0.02	22.21 ± 0.34	2.00

结果显示 (表 6), 通过酪素平板培养, 观察, 测量, 枯草芽孢杆菌 BSWJ2017003 产生透明圈, 染色圈直径/菌落直径比值为 2.00。

表 7 芽孢杆菌产淀粉酶初筛

菌株	菌落直径 (mm)	染色圈直径 (mm)	染色圈直径/菌落直径
BSWJ2017003	21.57 ± 1.87	28.28 ± 1.11	1.32

结果显示 (表 7), 通过淀粉平板培养、染色, 观察, 测量, 枯草芽孢杆菌 BSWJ2017003 产生透明圈, 染色圈直径/菌落直径比值为 1.32。

6.2、芽孢杆菌产酶复筛

表 8 芽孢杆菌产纤维素酶、蛋白酶、淀粉酶复筛

菌株	CMC 酶活力 (U/mL)	滤纸酶活力 (U/mL)	蛋白酶活力 (U/mL)	淀粉酶酶活力 (U/mL)
BSWJ2017003	15.40 ± 0.01	2.19 ± 0.00	6.56 ± 0.00	3.54 ± 0.01

结果显示 (表 8), 枯草芽孢杆菌 BSWJ2017003 的 CMC 酶、滤纸酶、蛋白酶和淀粉酶活力分别为 15.40、2.19、6.56、3.54U/mL。

15 6.3、枯草芽孢杆菌对獭兔采食量的影响

表 9 枯草芽孢杆菌对獭兔日采食量的影响 (g/天)

组	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周	第 5 周	第 6 周	第 7 周	第 8 周	1-8 周
1	100.21	129.15	118.46	125.37	138.00	146.16	180.33	201.29	158.10
2	90.70	120.20	101.53	110.75	129.57	136.80	175.06	195.44	145.38
3	91.89	112.05	112.10	116.21	136.24	140.69	172.70	186.74	155.11
4	85.90	108.32	100.21	118.7	120.44	142.35	165.57	184.58	141.29
5	82.60	118.78	98.00	120.43	126.81	137.53	170.90	196.57	146.95
6	96.16	136.56	115.08	134.29	131.06	140.21	174.70	196.53	154.14

结果显示(表 9)，试验各组之间的采食量存在差异，第 1、3、5、6、7、8 周，1-8 周试验组獭兔日采食量低于空白对照组。

#### 6.4、枯草芽孢杆菌对獭兔日增重的影响

表 10 枯草芽孢杆菌对獭兔日增重的影响 (g/天)

组	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周	第 5 周	第 6 周	第 7 周	第 8 周	1-8 周
1	31.61	26.96	28.60	26.33	20.71	16.43	40.95	23.57	26.76
	±	±	±	±	±	±	±	±	± 1.43
	2.64 <sup>a</sup>	7.69 <sup>a</sup>	2.51 <sup>a</sup>	3.56 <sup>a</sup>	1.80 <sup>a</sup>	2.26 <sup>a</sup>	3.09 <sup>a</sup>	3.03 <sup>a</sup>	
2	34.91	35.18	29.02	30.31	21.94	25.00	51.19	31.84	25.27
	±	±	±	±	±	±	±	±	± 2.15
	2.99 <sup>b</sup>	3.76 <sup>b</sup>	3.01 <sup>a</sup>	4.95 <sup>ab</sup>	5.45 <sup>a</sup>	8.89 <sup>b</sup>	4.98 <sup>b</sup>	9.78 <sup>b</sup>	
3	34.11	36.88	28.66	33.78	25.92	22.50	38.69	39.29	27.50
	±	±	±	±	±	±	±	±	± 2.24
	3.05 <sup>ab</sup>	6.01 <sup>bc</sup>	3.87 <sup>a</sup>	3.56 <sup>b</sup>	3.59 <sup>b</sup>	3.22 <sup>ab</sup>	2.57 <sup>a</sup>	4.34 <sup>c</sup>	
4	32.23	41.96	29.70	33.47	28.78	21.07	49.64	30.51	27.51
	±	±	±	±	±	±	±	±	± 2.08
	3.14 <sup>ab</sup>	2.61 <sup>c</sup>	2.09 <sup>a</sup>	2.24 <sup>b</sup>	3.34 <sup>bc</sup>	2.25 <sup>ab</sup>	2.51 <sup>b</sup>	5.94 <sup>b</sup>	
5	31.07	35.89	27.11	30.51	22.04	23.10	52.62	30.00	27.40
	±	±	±	±	±	±	±	±	± 0.74
	2.23 <sup>a</sup>	2.53 <sup>bc</sup>	2.57 <sup>ab</sup>	4.51 <sup>ab</sup>	1.20 <sup>a</sup>	5.02 <sup>b</sup>	3.46 <sup>b</sup>	2.33 <sup>b</sup>	
6	31.34	31.88	25.00	28.57	30.82	24.64	45.36	30.41	26.63
	±	±	±	±	±	±	±	±	± 2.21
	3.81 <sup>a</sup>	9.08 <sup>ab</sup>	3.16 <sup>b</sup>	6.65 <sup>ab</sup>	3.58 <sup>c</sup>	4.88 <sup>b</sup>	4.35 <sup>c</sup>	3.78 <sup>b</sup>	

注：结果表示为平均值±标准差，同列数据附不同字母者表示差异显著（ $P<0.05$ ），以下各表同。

结果显示（表 10），各组之间的体重差异存在差异，但是与添加枯草芽孢杆菌的剂量之间很难找到明显的规律。从试验全程来看，与对照组相比，

5 各试验组的差异不显著。

6.5、枯草芽孢杆菌对獭兔料重比的影响

表 11 枯草芽孢杆菌对獭兔料重比的影响

组	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周	第 5 周	第 6 周	第 7 周	第 8 周	1-8 周
1	3.19 ± 0.27 <sup>a</sup>	5.25 ± 1.88 <sup>a</sup>	4.17 ± 0.34 <sup>a</sup>	4.84 ± 0.69 <sup>a</sup>	6.70 ± 0.55 <sup>a</sup>	9.05 ± 1.35 <sup>a</sup>	4.42 ± 0.33 <sup>a</sup>	8.68 ± 1.27 <sup>a</sup>	5.92 ± 0.32 <sup>a</sup>
2	2.62 ± 0.23 <sup>b</sup>	3.45 ± 0.35 <sup>b</sup>	3.53 ± 0.35 <sup>bc</sup>	3.74 ± 0.64 <sup>b</sup>	6.28 ± 1.79 <sup>ab</sup>	6.03 ± 1.91 <sup>b</sup>	3.45 ± 0.34 <sup>b</sup>	6.57 ± 1.64 <sup>b</sup>	5.79 ± 0.47 <sup>ab</sup>
3	2.71 ± 0.25 <sup>b</sup>	3.11 ± 0.47 <sup>b</sup>	3.98 ± 0.56 <sup>ac</sup>	3.47 ± 0.37 <sup>b</sup>	5.34 ± 0.69 <sup>b</sup>	6.35 ± 0.82 <sup>b</sup>	4.48 ± 0.30 <sup>a</sup>	4.80 ± 0.53 <sup>c</sup>	5.67 ± 0.47 <sup>ab</sup>
4	2.69 ± 0.25 <sup>b</sup>	2.59 ± 0.16 <sup>b</sup>	3.39 ± 0.23 <sup>b</sup>	3.56 ± 0.25 <sup>b</sup>	4.23 ± 0.47 <sup>c</sup>	6.82 ± 0.68 <sup>b</sup>	3.34 ± 0.17 <sup>b</sup>	6.24 ± 1.17 <sup>b</sup>	5.16 ± 0.40 <sup>c</sup>
5	2.67 ± 0.19 <sup>b</sup>	3.32 ± 0.24 <sup>b</sup>	3.64 ± 0.35 <sup>bc</sup>	4.01 ± 0.52 <sup>b</sup>	5.77 ± 0.32 <sup>ab</sup>	6.16 ± 1.13 <sup>b</sup>	3.26 ± 0.22 <sup>b</sup>	6.58 ± 0.49 <sup>b</sup>	5.37 ± 0.15 <sup>bc</sup>
6	3.11 ± 0.36 <sup>a</sup>	4.69 ± 1.64 <sup>a</sup>	4.67 ± 0.59 <sup>d</sup>	4.94 ± 1.21 <sup>a</sup>	4.30 ± 0.48 <sup>c</sup>	5.89 ± 1.24 <sup>b</sup>	3.88 ± 0.37 <sup>c</sup>	6.54 ± 0.77 <sup>b</sup>	5.82 ± 0.48 <sup>ab</sup>

结果显示（表 11 和图 2），与对照组相比，除第 3 周第 6 组、第 4 周第 6 组、第 7 周第 3 组的料重比增加外，试验期间，各试验组的料重比都有下降的趋势，且第 4 组的料重比显著降低；从试验全程来看，与对照组相比，第 4 组、第 5 组的料重比显著降低，这表明添加  $1.0 \times 10^6$  cfu/g、 $1.0 \times 10^7$  cfu/g 的枯草芽孢杆菌可提高饲料转化率，从而降低料重比。

6.6、枯草芽孢杆菌对獭兔肠道酶活的影响

表 12 枯草芽孢杆菌对獭兔肠道酶活的影响

	十二指肠		空肠		回肠		盲肠	
组	蛋白酶	淀粉酶	蛋白酶	淀粉酶	蛋白酶	淀粉酶	CMC 酶	滤纸酶
1	6.81 ± 1.15 <sup>a</sup>	12.74 ± 2.35 <sup>a</sup>	32.23 ± 5.36 <sup>a</sup>	17.61 ± 5.96 <sup>a</sup>	15.19 ± 1.20 <sup>a</sup>	9.82 ± 0.62 <sup>a</sup>	12.98 ± 1.31 <sup>a</sup>	1.13 ± 0.37 <sup>a</sup>
3	14.27 ± 3.38 <sup>b</sup>	19.09 ± 4.51 <sup>ab</sup>	33.15 ± 7.18 <sup>ab</sup>	28.77 ± 2.85 <sup>b</sup>	25.55 ± 7.60 <sup>b</sup>	16.03 ± 3.32 <sup>ab</sup>	15.83 ± 1.29 <sup>b</sup>	1.84 ± 0.22 <sup>b</sup>
4	15.47 ± 4.55 <sup>b</sup>	27.49 ± 8.95 <sup>b</sup>	46.04 ± 4.05 <sup>c</sup>	36.81 ± 5.39 <sup>bc</sup>	29.70 ± 7.01 <sup>b</sup>	19.67 ± 5.42 <sup>b</sup>	19.10 ± 0.95 <sup>c</sup>	1.83 ± 0.13 <sup>b</sup>
5	14.36 ± 1.91 <sup>b</sup>	26.03 ± 3.99 <sup>b</sup>	44.89 ± 8.14 <sup>bc</sup>	38.27 ± 3.40 <sup>c</sup>	32.46 ± 2.49 <sup>b</sup>	22.41 ± 3.55 <sup>b</sup>	16.62 ± 2.06 <sup>bc</sup>	1.87 ± 0.14 <sup>b</sup>

根据 1-8 周料重比的结果，在第 2-6 组中选取料重比较小的 3 个组（第 3 组、第 4 组、第 5 组），加上第 1 组（作为对照），共 4 个组进行后面的试验。

结果显示（表 12），与对照组相比，第 3 组除十二指肠淀粉酶、空肠蛋白酶、回肠淀粉酶外，其它肠道酶活显著升高，第 4 组、第 5 组的十二指肠、空肠、回肠的蛋白酶和淀粉酶以及盲肠的 CMC 酶和滤纸酶均显著升高。这表明添加  $1.0 \times 10^6$ cfu/g 和  $1.0 \times 10^7$ cfu/g 的枯草芽孢杆菌可显著改善肠道酶活，促进营养物质的消化吸收，进而提高獭兔的生产性能。

综上所述，动物试验结果表明，上述枯草芽孢杆菌以  $1.0 \times 10^6 \sim 10^7$ cfu/g 的剂量添加到断奶獭兔的基础日粮中，饲喂 8 周后，獭兔的日料重比显著增加，肠道酶活显著升高，促进了獭兔对营养物质的消化吸收，从而提高了獭兔的生长性能。显示本发明所述的枯草芽孢杆菌具有良好的提高獭兔生长性能的作用，对獭兔规模化养殖具有较大的意义。

上述说明示出并描述了发明的若干优选实施例，但如前所述，应当理解发明并非局限于本文所披露的形式，不应看作是对其他实施例的排除，而可用于各种其他组合、修改和环境，并能够在本文所述发明构想范围内，通过上述教导或相关领域的技术或知识进行改动。而本领域人员所进行的改动和变化不脱离发明的精神和范围，则都应在发明所附权利要求的保护范围内。





---

# 序 列 表

## 序列表

<110>	四川农业大学 四川省草原科学研究院	
<120>	一种獭兔源枯草芽孢杆菌及其在提高獭兔生长性能中的应用	
<130>	2017	
<160>	1	
<170>	PatentIn version 3.3	
<210>	1	
<211>	1073	
<212>	DNA	
<213>	獭兔源枯草芽孢杆菌	
<400>	1	
gtgatacggg	gctataatgc agtcgagcgg acagatggga gcttgctccc tgatgttagc	60
ggcggacggg	tgagtaacac gtgggtaacc tgcctgtaag actgggataa ctccgggaaa	120
ccgggggctaa	taccggatgc ttgtttgaac cgcattggtc aaacataaaa ggtggcttcg	180
gctaccactt	acagatggac ccgcggcgca ttagctagtt ggtgaggtaa tggtcacca	240
aggcaacgat	gcgtagccga cctgagaggg tgatcggcca cactgggact gagacacggc	300
ccagactcct	acgggaggca gcagtaggga atctccgca atggacgaaa gtctgacgga	360
gcaacgccgc	gtgagtgatg aaggttttcg gatcgtaaag ctctgttgtt agggaagaac	420
aagtaccgtt	cgaatagggc ggtacctga cggtaacctaa ccagaaagcc acggctaact	480
acgtgccagc	agccgcggta atacgtaggt ggcaagcgtt gtccggaatt attgggcgta	540

aagggctcgc aggcggtttc ttaagtctga tgtgaaagcc cccgggtcaa ccggggaggg	600
tcattggaaa ctggggaact tgagtcgaga agaggagagt ggaattccac gtgtagcgg	660
gaaatgcgta gagatgtgga ggaacaccag tggcgaaggc gactctctgg tctgtaactg	720
acgctgagga gcgaaagcgt ggggagcgaa caggattaga taccctggta gtccacgccg	780
taaacgatga gtgctaagtg ttacggggtt tccgcccctt agtgctgcag ctaacgcatt	840
aagcactccg cctggggagt acggtcgcaa gactgaaact caaggaattg acggggggccc	900
gcacaagcgg tggagcatgt ggtttaattc gaagcacgcg aagaacctta ccaggtctga	960
catcctctga catcctagag ataggacgtc cccttcgggg cagagtgaca gtggtgcatg	1020
atgcgtcag ctcgtgtcgt gagatgttgg gttaagtccc gcaacgagcg caa	1073