



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105492594 A

(43) 申请公布日 2016. 04. 13

(21) 申请号 201480030676. 3

(22) 申请日 2014. 05. 30

(30) 优先权数据

61/829, 987 2013. 05. 31 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 11. 27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/040218 2014. 05. 30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/194189 EN 2014. 12. 04

(71) 申请人 新叶共生有限公司

地址 美国密苏里州

(72) 发明人 格雷格·博戈西安

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51) Int. Cl.

C12N 1/30(2006. 01)

权利要求书4页 说明书30页

(54) 发明名称

细菌发酵方法以及组合物

(57) 摘要

本发明提供了用于培养甲基杆菌(Methylobacterium)细菌的方法。具体地,所述方法提供了高效且廉价地培养这些细菌的方法。此外,本发明提供了利用这些细菌培养物以改善植物农业的方法。

1. 获得甲基杆菌(*Methylobacterium*)制备物的方法,其包括使甲基杆菌在包含连续相和分散相的乳状液中生长,从而获得甲基杆菌制备物,其中所述分散相在所述连续相中不可混溶或仅部分可混溶。

2. 如权利要求1所述的方法,其中所述甲基杆菌是甲基杆菌的单一培养物或共培养物。

3. 如权利要求1所述的方法,其中(a)所述分散相包含非水性液体且所述连续相包含水性液体,或者(b)所述分散相包含水性液体且所述连续相包含非水性液体。

4. 如权利要求3所述的方法,其中所述非水性液体在25°C下于水中的混溶性等于或低于正戊醇的混溶性。

5. 如权利要求1所述的方法,其中相对于通过使甲基杆菌在除了于非乳液中生长之外的相同条件下生长而获得的收率而言,所述分散相提供了增加的所述甲基杆菌的收率,所述非乳液包含对应于所述连续相的液体的液体。

6. 如权利要求1所述的方法,其还包括收获在所述培养基中生长的甲基杆菌。

7. 如权利要求1所述的方法,其中所述乳状液还包含足以使所述乳状液稳定的量的乳化剂。

8. 如权利要求7所述的方法,其中所述乳化剂选自增稠剂、表面活性剂以及它们的组合。

9. 如权利要求3所述的方法,其中所述非水性液体包括醇、醛、酮、脂肪酸、磷脂或者它们的任何组合。

10. 如权利要求9所述的方法,其中所述醇选自含有至少5个碳原子的脂肪醇和甾醇。

11. 如权利要求3所述的方法,其中所述非水性液体包含一种或多种动物油、微生物油、合成油或者植物油。

12. 如权利要求11所述的方法,其中所述植物油选自玉米、大豆、棉花、花生、向日葵、橄榄、亚麻、椰子、棕榈、油菜籽、芝麻籽、红花以及它们的组合。

13. 如权利要求1所述的方法,其中所述乳状液不包含光合微生物,或者其中所述乳状液还包含除甲基杆菌之外的预先确定身份的一种或多种非光合微生物。

14. 如权利要求1所述的方法,其中所述分散相包含所述乳状液的至少约0.02质量%至约20质量%。

15. 如权利要求3所述的方法,其中所述非水性液体为农业上可接受的佐剂或农业上可接受的赋形剂。

16. 如权利要求1所述的方法,其中所述生长包括下述步骤:用所述甲基杆菌接种所述乳状液,以及在足以提供所述甲基杆菌生长的条件下孵育所述接种的乳状液。

17. 如权利要求1所述的方法,其中所述甲基杆菌选自:嗜胺甲基杆菌(*M. aminovorans*)、氯甲烷甲基杆菌(*M. chloromethanicum*)、二氯甲烷甲基杆菌(*M. dichloromethanicum*)、扭脱甲基杆菌(*M. extorquens*)、藤泽氏甲基杆菌(*M. fujisawaense*)、嗜中温甲基杆菌(*M. mesophilicum*)、嗜有机甲基杆菌(*M. organophilum*)、耐辐射甲基杆菌(*M. radiotolerans*)、罗得西亚甲基杆菌(*M. rhodesianum*)、玫瑰红甲基杆菌(*M. rhodinum*)、硫氰酸盐甲基杆菌(*M. thiocyanatum*)、结瘤甲基杆菌(*M. nodulans*)、寄奴花甲基杆菌(*M. cerastii*)、*M. gossypicola*、甲基杆菌属 LMG6378 菌株、*M. phyllosphaerae*、稻甲基杆菌(*M. oryzae*)、*M. platani*、*M. populi*和扎氏甲

基杆菌(*M. zatmanii*)。

18. 如权利要求1所述的方法,其中所述乳状液基本不含污染性微生物。

19. 如权利要求6所述的方法,其中所述收获包括从所述乳状液中回收全部或部分所述甲基杆菌。

20. 如权利要求19所述的方法,所述方法还包括使所回收的所述甲基杆菌部分脱水。

21. 通过权利要求1-20中任一项所述的方法获得的甲基杆菌制备物,其中所述分散相或所述连续相包含非水性液体,所述非水性液体在25°C下于水中的混溶性等于或低于正戊醇的混溶性。

22. 用甲基杆菌处理植物或植物部分的方法,其包括下述步骤:将包含权利要求21所述的甲基杆菌制备物的组合物施用于所述植物或植物部分。

23. 如权利要求22所述的方法,其中所述组合物还包含农业上可接受的佐剂或农业上可接受的赋形剂。

24. 如权利要求23所述的方法,其中所述组合物没有固体物质。

25. 如权利要求22所述的方法,其中所述植物部分为种子,并且所述组合物具有至少约 $5 \times 10^8$ 个菌落形成单位/克所述组合物至约 $5 \times 10^{13}$ 个菌落形成单位/克所述组合物的甲基杆菌滴度。

26. 如权利要求22所述的方法,其中所述植物部分为种子、茎、根、花、子叶、胚芽鞘、果实或叶。

27. 如权利要求22所述的方法,其中所述植物或植物部分为玉米、芸苔属植物、紫花苜蓿、稻、黑麦、高粱、珍珠粟、糜子、小米、龙爪稷、向日葵、红花、大豆、烟草、马铃薯、花生、棉花、番薯、木薯、咖啡、椰子、菠萝、柑橘树、可可、茶、香蕉、鳄梨、无花果、番石榴、芒果、橄榄、番木瓜、腰果、澳洲坚果、扁桃、甜菜、甘蔗、燕麦、大麦、番茄、莴苣、青豆、利马豆、豌豆、葫芦科植物、观赏植物或针叶植物或者植物部分。

28. 通过权利要求22-27中任一项所述的方法获得的植物或植物部分,其中用所述甲基杆菌制备物至少部分地涂布所述植物或植物部分。

29. 从权利要求28所述的植物或植物部分获得的经加工的植物产品,其中所述经加工的产品包含所述乳状液。

30. 如权利要求29所述的经加工的植物产品,其中所述产品为膳食、糊状物、粉状物、片状物或饲料。

31. 如权利要求29-30中任一项所述的经加工的植物产品,其中所述经加工的产品是非可再生的。

32. 发酵产品,其包含乳状液和甲基杆菌的单一培养物或共培养物,所述乳状液包含连续相以及在所述连续相中不可混溶的或仅部分可混溶的分散相。

33. 如权利要求32所述的发酵产品,其中(a)所述分散相包含非水性液体且所述连续相包含水性液体,或者(b)所述分散相包含水性液体且所述连续相包含非水性液体

34. 如权利要求33所述的发酵产品,其中所述非水性液体在25°C下于水中的混溶性等于或低于正戊醇的混溶性

35. 如权利要求32所述的发酵产品,其中所述发酵产品基本不含污染性微生物。

36. 如权利要求32所述的发酵产品,其中所述发酵产品还包含除甲基杆菌之外的预先

确定身份的一种或多种微生物。

37. 如权利要求32所述的发酵产品,其中所述发酵产品没有固体物质。

38. 如权利要求32所述的发酵产品,其中所述产品不包含光合微生物。

39. 组合物,其包含含有连续相和分散相的乳状液以及甲基杆菌的单一培养物或共培养物,其中(a)所述分散相包含非水性液体且所述连续相包含水性液体,或者(b)所述分散相包含水性液体且所述连续相包含非水性液体,并且其中所述非水性液体在25°C下于水中的混溶性等于或低于正戊醇的混溶性。

40. 如权利要求39所述的组合物,其中所述组合物基本不含污染性微生物。

41. 如权利要求39所述的组合物,其中所述组合物还包含农业上可接受的佐剂和/或农业上可接受的赋形剂中的至少一种。

42. 如权利要求39所述的组合物,其中所述组合物没有固体物质。

43. 如权利要求39所述的组合物,其中所述第二液体包含醇、醛、酮、脂肪酸、磷脂或者它们的任何组合。

44. 如权利要求39所述的组合物,其中所述醇选自含有至少5个碳原子的脂肪醇和甾醇。

45. 如权利要求39所述的组合物,其中所述第二液体包含一种或多种动物油、微生物油、合成油或植物油。

46. 如权利要求45所述的组合物,其中所述植物油选自玉米、大豆、棉花、花生、向日葵、橄榄、亚麻、椰子、棕榈、油菜籽、芝麻籽、红花以及它们的组合。

47. 如权利要求39所述的组合物,其中所述固体物质还包含农业上可接受的佐剂或农业上可接受的赋形剂。

48. 如权利要求39所述的组合物,其中所述组合物不包含光合微生物。

49. 如权利要求39所述的组合物,其中所述组合物还包含至少一种杀虫剂和/或至少一种抑菌剂。

50. 如权利要求49所述的组合物,其中所述杀虫剂选自杀昆虫剂、杀真菌剂、杀线虫剂和杀细菌剂,其中所述杀虫剂基本不抑制所述甲基杆菌的生长。

51. 用甲基杆菌处理植物或植物部分的方法,其包括下述步骤:将权利要求32-38中任一项的发酵产品或权利要求39-50中任一项的组合物施用于所述植物或植物部分。

52. 如权利要求51所述的方法,其中所述植物部分为种子、茎、根、花、子叶、胚芽鞘、果实或叶。

53. 如权利要求51所述的方法,其中所述植物或植物部分为玉米、芸苔属植物、紫花苜蓿、稻、黑麦、高粱、珍珠粟、糜子、小米、龙爪稷、向日葵、红花、大豆、烟草、马铃薯、花生、棉花、番薯、木薯、咖啡、椰子、菠萝、柑橘树、可可、茶、香蕉、鳄梨、无花果、番石榴、芒果、橄榄、番木瓜、腰果、澳洲坚果、扁桃、甜菜、甘蔗、燕麦、大麦、番茄、莴苣、青豆、利马豆、豌豆、葫芦科植物、观赏植物或针叶植物或者植物部分。

54. 通过权利要求51所述的方法获得的植物,其中用所述组合物的发酵产品至少部分地涂布所述植物。

55. 通过权利要求51所述的方法获得的植物部分,其中用所述组合物的发酵产品至少部分地涂布所述植物。

56. 植物或植物部分,其中用乳状液至少部分地涂布所述植物或植物部分,所述乳状液包含第一水性液体、第二液体和外源甲基杆菌的单一培养物或共培养物,所述第二液体在25°C下于水中的混溶性等于或低于正戊醇的混溶性。

## 细菌发酵方法以及组合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2013年5月31日提交的美国专利申请序列号61/829,987的权益,将其全部公开内容以引用的方式并入本文。

[0003] 发明背景

[0004] 一个碳的有机化合物如甲烷和甲醇,在自然界广泛存在,并且被分类为甲烷氧化菌和甲基营养菌的细菌用作碳源。甲烷氧化细菌包括下述属中的菌种:甲基杆菌属(*Methylobacter*)、甲基单胞菌属(*Methylomonas*)、甲基微菌属(*Methylomicrobium*)、甲基球菌属(*Methylococcus*)、甲基弯曲菌属(*Methylosinus*)、甲基孢囊菌属(*Methylocystis*)、甲基球形菌属(*Methylosphaera*)、甲基暖菌属(*Methylocaldum*)以及甲基细胞菌属(*Methylocella*)(Lidstrom,2006)。甲烷氧化菌具有甲烷单加氧酶,该酶将来自O<sub>2</sub>的氧原子掺入甲烷,形成甲醇。所有甲烷氧化菌都是专性的一个碳的利用者,其不能利用含有碳-碳键的化合物。另一方面,甲基营养菌还可利用更复杂的有机化合物,如有机酸、高级醇、糖类等。因此,甲基营养细菌是兼性甲基营养菌。甲基营养细菌包括下述属中的菌种:甲基杆菌属(*Methylobacterium*)、生丝微菌属(*Hyphomicrobium*)、嗜甲基菌属(*Methylophilus*)、甲基菌属(*Methylobacillus*)、噬甲基菌属(*Methylophaga*)、氨基杆菌属(*Aminobacter*)、耗甲基杆菌属(*Methylorhabdus*)、*Methylopila*、*Methylsulfonomonas*、*Marinosulfonomonas*、副球菌属(*Paracoccus*)、黄色杆菌属(*Xanthobacter*)、屈曲杆菌属(*Ancylobacter*)(也被称为微环菌属(*Microcycclus*))、硫杆菌属(*Thiobacillus*)、红假单胞菌属(*Rhodopseudomonas*)、红杆菌属(*Rhodobacter*)、醋杆菌属(*Acetobacter*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、分枝杆菌属(*Mycobacterium*)、节杆菌属(*Arthobacter*)以及诺卡氏菌属(*Nocardia*)(Lidstrom,2006)。

[0005] 大部分甲基杆菌属的甲基营养细菌是粉红色的。它们通常指PPFM细菌,其为粉红色的兼性甲基营养菌。Green(2005,2006)在甲基杆菌属中鉴定了12个确认的菌种,具体为嗜胺甲基杆菌(*M.aminovorans*)、氯甲烷甲基杆菌(*M.chloromethanicum*)、二氯甲烷甲基杆菌(*M.dichloromethanicum*)、扭脱甲基杆菌(*M.extorquens*)、藤泽氏甲基杆菌(*M.fujisawaense*)、嗜中温甲基杆菌(*M.mesophilicum*)、嗜有机甲基杆菌(*M.organophilum*)、耐辐射甲基杆菌(*M.radiotolerans*)、罗得西亚甲基杆菌(*M.rhodesianum*)、玫瑰红甲基杆菌(*M.rhodinum*)、硫氰酸盐甲基杆菌(*M.thiocyanatum*)以及扎氏甲基杆菌(*M.zatmanii*)。然而,巢状甲基杆菌(*M.nidulans*)为非PPFM的固氮甲基杆菌(Sy et al.,2001)。甲基杆菌在自然界普遍存在,它们存在于土壤、灰尘、淡水、沉积物和叶表面中,以及存在于工业环境和临床环境中(Green,2006)。

[0006] PPFM细菌作为大部分(如果不是全部)植物(范围从藻类、藓类和苔类以及被子植物和裸子植物)物种的叶表面的定殖者的存在,表明PPFM细菌可能在植物生理中发挥重要作用(Corpe and Rheem,1989;Holland and Polacco,1994;Holland,1997;Kutschera,2007)。植物产生并分泌的甲醇可能作为生长的植物细胞壁中果胶新陈代谢的废物的事实提示这些研究者存在共生关系,其中PPFM细菌以植物产生的甲醇为食,并反过来为植物提

供积极的益处。PPFM细菌对植物生理的表明的益处包括对氮代谢、种子萌发以及通过提供PPFM产生的植物激素细胞分裂素刺激植物生长方面的积极作用。将PPFM细菌用于改善植物生长、植物产量、种子萌发、雄性可育性以及植物的营养品质已经公开于美国专利5,512,069、美国专利5,961,687、美国专利6,174,837、美国专利6,329,320、美国专利7,435,878,以及美国专利申请公开号2006/0228797中。此外,已经发现PPFM细菌能够增加栽培藻类的产量,这暗示它们在产生藻类来源的生物燃料中的应用(美国专利申请公开号2011/0269219)。

[0007] 甲基杆菌在行栽作物、蔬菜和其它栽培植物以及在基于藻类的生物燃料的产生中的广泛应用需要高效且廉价地培养大量的甲基杆菌培养物。甲基杆菌的其它工业应用也可从高效的甲基杆菌生产技术中获益。此类工业应用包括将甲基杆菌用作环境污染指示剂(因为某些甲基杆菌可生长于烟尘中)以及将其用作包装食物产业中的辐射质量控制监测剂(因为某些甲基杆菌对 $\gamma$ 射线辐射显示出高抗性)。其它工业应用包括利用甲基杆菌降解环境污染物(美国专利第US 5,418,161号、US 5,487,834号、US 6,107,067号、US 7,214,509号),以产生有用的工业化合物、聚合物前体或生物聚合物(US 5,236,930、US 5,686,276、US 6,107,067)以及重组蛋白(美国专利申请公开号20060234336)。

[0008] 然而,PPFM培养的主题范围内的多种出版物显示,为实现这些细菌的高效且廉价的大规模培养,需要克服重大障碍。Holland和Polacco(1994)报道“分离的PPFM在植物组织培养基中不能很好地生长”,所述培养基为富含营养素的培养基,并且报道“PPFM生长缓慢”。Madhaiyan等(2004)阐述了PPFM细菌,“它们生长缓慢的性质以及在整个植株中的分布表明随着植物组织扩增远离生长点,它们的数量通过稀释被简单地调节”。Abanda-Nkwatt等(2006)报道了PPFM细菌的生长:“在液体培养中,溶液在4-5天内变浑浊”,但没有具体说明达到的滴度(滴度指每毫升中细菌细胞的数量或者菌落形成单位)。

[0009] 这些生长缓慢的一致性报道被表明PPFM细菌仅可以生长至相对低的滴度的其它研究进一步证实并扩展。这些生长研究在标准液体微生物培养基中进行,所述培养基是特别制备的以使其为“水-澄清的(water-clear)”。此类培养基允许目测观察并检测期望的和非期望的(即污染的)微生物生长,显示随肉眼可见的浊度的发展。

[0010] Corpe和Basile(1982)提出了不同PPFM细菌对多种碳源的生长响应的系统研究。他们将Stanier et al.(1966)利用的标准矿物基质作为他们的基础培养基。在该出版物中,Stanier等阐述了他们的基础培养基,“它与氮川乙酸和EDTA重度螯合,并在高压灭菌时形成很多沉淀。所述沉淀随着培养基冷却再溶解,从而形成水-澄清的溶液”。

[0011] 利用该“水-澄清的”溶液作为他们的基础培养基,Corpe和Basile(1982)对多种碳源支持PPFM细菌生长的能力进行了测试。他们发现一些碳源相对优于所有其它碳源,即甘油、谷氨酸盐、甲醇、葡萄糖、天冬氨酸盐、琥珀酸盐以及苹果酸盐。然而,即使在孵育7天之后(分配给每个生长测试的时间),这些培养物中没有一个是达到大于0.7个光学单位的光密度(在660纳米处,其为测量微生物生长的标准波长),并且大部分远低于该密度。Sy等(2005)报道光密度为约0.05个光学单位的PPFM细菌的悬浮物包含约 $5 \times 10^6$ 个菌落形成单位(CFU)的PPFM细菌/毫升。因此,Corpe和Basile在用最佳碳源孵育一周后达到的最高滴度鉴定为约 $7 \times 10^7$ 个菌落形成单位/毫升。

[0012] Sy等(2005)还报道,用包含琥珀酸盐作为碳源的最低盐培养基,他们获得的扭

脱甲基杆菌的最终滴度为约 $2.5 \times 10^8$ 个菌落形成单位/毫升。

[0013] Corpe和Rheem(1989)报道PPFM细菌“在营养肉汤培养基和其它常见的异养培养基中具有比其它叶异养生物长的倍增时间”，并且推断植物产生的甲醇“可能允许PPFM与叶表面的其它细菌成功竞争”。Corpe和Reehm获得的最高滴度(在未具体说明的孵育期之后)为约 $3 \times 10^8$ 个菌落形成单位/毫升。

[0014] 因此,这些出版物表明在标准的“水-澄清的”微生物生长培养基中,PPFM细菌生长缓慢,并且通常停滞在约 $3 \times 10^8$ 个菌落形成单位/毫升的相对低的终滴度。

[0015] 为了满足对PPFM细菌在行栽作物、蔬菜和其它栽培植物以及在基于藻类的生物燃料的商业应用中的潜在需求,需要产生大量的这些细菌的制造能力。

[0016] 仅将玉米作为一个实例,在美国每年种植大约4000万公顷的玉米。对于该国内该单一农作物的每个1%的市场渗透(400,000公顷)而言,估计对PPFM细菌的需求范围可以是约每公顷30公升的滴度为约 $3 \times 10^8$ 个菌落形成单位/毫升的PPFM培养物,将其以种子处理或叶面喷洒施用。这相当于每年需要约1200万公升该滴度的PPFM培养物以处理美国1%的玉米作物。如果每批的生产时间为7天,即使是具有市场上最大体积的发酵罐设备(每批生产60,000公升)满负荷运转(每年约250天),也将需要5台或6台该类大型发酵罐(再次,仅是为供应美国玉米1%的市场渗透的需求)。此类设备可能无法建造或者以商业上可行的方式操作。

[0017] 因此,存在发展高效且廉价地大规模生产甲基杆菌的需求。

[0018] 发明概述

[0019] 本文提供用于高效生产大量的甲基杆菌的方法。这些方法可产生高滴度的甲基杆菌培养物,其中每批的生产时间显著缩短。本文提供的甲基杆菌生产方法也可利用由廉价且易得的成分组成的培养基。本文还提供包含甲基杆菌的有用的发酵液、发酵液产品、发酵产品以及组合物。本文还提供了利用包含甲基杆菌的所述发酵液、发酵液产品、发酵产品以及组合物来处理植物或植物部分的方法。本文提供的方法和组合物可被用于生产大量的甲基杆菌,所述甲基杆菌用于施用至植物或植物部分,用作生物修复中的接种物,用于生产有用的产品以及用于生产重组蛋白。通过本文提供的方法和组合物可获得的有用产品包括但不限于:聚-3-羟基丁酸、1,3-丙二醇以及噁唑吡咯喹啉(oxazopyrroloquinolines)。

[0020] 本文提供了获得甲基杆菌制备物的方法,其包括使甲基杆菌在包含连续相以及在连续相中不可混合的或仅部分可混合的分散相的乳状液中生长。在某些实施方案中,所述甲基杆菌为甲基杆菌的单一培养物或共培养物。在某些实施方案中,(a)所述分散相包含非水性液体且所述连续相包含水性液体,或者(b)所述分散相包含水性液体且所述连续相包含非水性液体。在某些实施方案中,所述非水性液体在25°C下于水中的混溶性等于或者低于正戊醇的混溶性。在某些实施方案中,相对于通过使甲基杆菌在除了于非乳状液中生长之外的相同条件下生长而获得的收率而言,所述分散相提供了增加的所述甲基杆菌的收率,所述非乳状液包含对应于连续相的液体的液体。在某些实施方案中,所述方法还包括收获生长于所述培养基中的甲基杆菌。在某些实施方案中,乳状液还包含足以使所述乳状液稳定的量的乳化剂。在某些实施方案中,所述乳化剂选自增稠剂、表面活性剂以及它们的组合。在任何前面提及的方法的某些实施方案中,所述非水性液体包含醇、醛、酮、脂肪酸、磷脂或者它们的任何组合。在某些实施方案中,所述醇选自包含至少5个碳原子的脂肪醇和甾

醇。在任何前面提及的方法的某些实施方案中,所述非水性液体包含一种或多种动物油、微生物油、合成油或植物油。在某些实施方案中,所述植物油选自玉米、大豆、棉花、花生、向日葵、橄榄、亚麻、椰子、棕榈、油菜籽、芝麻籽、红花以及它们的组合。在任何前面提及的方法的某些实施方案中,所述乳状液不包含光合微生物。在任何前面提及的方法的某些实施方案中,所述乳状液还包含除甲基杆菌之外的预先确定身份的一种或多种非光合微生物。在任何前面提及的方法的某些实施方案中,所述分散相包含所述乳状液的至少约0.02质量%至约20质量%。在任何前面提及的方法的某些实施方案中,所述非水性液体为农业上可接受的佐剂或农业上可接受的赋形剂。在任何前面提及的方法的某些实施方案中,生长包括下述步骤:将所述乳状液接种所述甲基杆菌,并在足以提供所述接种的甲基杆菌生长的条件下孵育所述接种过的乳状液。在任何前面提及的方法的某些实施方案中,所述甲基杆菌选自:嗜胺甲基杆菌、氯甲烧甲基杆菌、二氯甲烧甲基杆菌、扭脱甲基杆菌、藤泽氏甲基杆菌、嗜中温甲基杆菌、嗜有机甲基杆菌、耐辐射甲基杆菌、罗得西亚甲基杆菌、玫瑰红甲基杆菌、硫氨酸盐甲基杆菌、结瘤甲基杆菌(*M. nodulans*)、寄奴花甲基杆菌(*M. cerastii*)、*M. gossypiicola*、甲基杆菌属LMG6378菌株、*M. phyllosphaerae*、稻甲基杆菌(*M. oryzae*)、*M. platani*、*M. populi*以及扎氏甲基杆菌。在任何前面提及的方法的某些实施方案中,所述乳状液基本不含污染性微生物。在任何前面提及的方法的某些实施方案中,所述方法还包括从所述乳状液中回收全部或部分甲基杆菌。在任何前面提及的方法的某些实施方案中,所述方法还包括使所回收的甲基杆菌部分脱水。

[0021] 还提供了通过任何前面提及的方法获得的甲基杆菌制备物,其中分散相或连续相包含这样的非水性液体,其在25°C下于水中的混溶性等于或低于正戊醇的混溶性。

[0022] 还提供了用甲基杆菌处理植物或植物部分的方法,其包括下述步骤:将包含任何前面提及的甲基杆菌制备物的组合物施用于所述植物或植物部分。在某些实施方案中,所述组合物还包含农业上可接受的佐剂或农业上可接受的赋形剂。在任何前面提及的方法的某些实施方案中,所述组合物没有固体物质。在某些实施方案中,所述植物部分为种子,并且所述组合物具有至少约 $5 \times 10^8$ 个菌落形成单位/克所述组合物至约 $5 \times 10^{13}$ 个菌落形成单位/克所述组合物的甲基杆菌滴度。在某些实施方案中,所述植物部分为种子、茎、根、花、子叶、胚芽鞘、果实或叶。在某些实施方案中,所述植物或植物部分为玉米、芸苔属植物、紫花苜蓿、稻、黑麦、高粱、珍珠粟、糜子、小米、龙爪稷、向日葵、红花、大豆、烟草、马铃薯、花生、棉花、番薯、木薯、咖啡、椰子、菠萝、柑橘树、可可、茶、香蕉、鳄梨、无花果、番石榴、芒果、橄榄、番木瓜、腰果、澳洲坚果、扁桃、甜菜、甘蔗、燕麦、大麦、番茄、莴苣、青豆、利马豆、豌豆、葫芦科植物、观赏植物或针叶植物或者植物部分。在某些实施方案中,用前面提及的甲基杆菌制备物至少部分地涂布所述植物或植物部分。本文还提供了从任何前面提及的植物或植物部分获得的经加工的植物产品,其中所述经加工的产品含有乳状液。在某些实施方案中,所述经加工的植物产品为膳食、糊状物、粉状物、片状物或饲料。在某些实施方案中,所述经加工的产品是非可再生的。

[0023] 本文提供包含乳状液和甲基杆菌的单一培养物或共培养物的发酵产品,所述乳状液包含连续相以及在连续相中不可混溶的或仅部分可混溶的分散相。在某些实施方案中,(a)所述分散相包含非水性液体且所述连续相包含水性液体,或者(b)所述分散相包含水性液体且所述连续相包含非水性液体。在某些实施方案中,所述非水性液体在25°C下于水中

的混溶性等于或低于正戊醇在水中的混溶性。在某些实施方案中,所述发酵产品基本不含污染性微生物。在某些实施方案中,所述发酵产品还包含除甲基杆菌之外的预先确定身份的一种或多种微生物。在某些实施方案中,所述发酵产品不含固体物质。在某些实施方案中,所述发酵产品不含光合微生物。在某些实施方案中,所述甲基杆菌的滴度为至少约 $5 \times 10^7$ 个菌落形成单位/毫升、至少约 $5 \times 10^8$ 个菌落形成单位/毫升、至少约 $1 \times 10^9$ 个菌落形成单位/毫升、至少约 $1 \times 10^{10}$ 个菌落形成单位/毫升或者至少约 $3 \times 10^{10}$ 个菌落形成单位/毫升。在某些实施方案中,所述甲基杆菌的滴度为至少约 $5 \times 10^7$ 个菌落形成单位/毫升至至少约 $6 \times 10^{10}$ 个菌落形成单位/毫升。在某些实施方案中,至少一种甲基杆菌是粉红色的兼性甲基营养菌(PPFM)。在某些实施方案中,所述粉红色的兼性甲基营养菌(PPFM)选自嗜胺甲基杆菌、氯甲烷甲基杆菌、二氯甲烷甲基杆菌、扭脱甲基杆菌、藤泽氏甲基杆菌、嗜中温甲基杆菌、嗜有机甲基杆菌、耐辐射甲基杆菌、罗得西亚甲基杆菌、玫瑰红甲基杆菌、硫氨酸盐甲基杆菌、寄奴花甲基杆菌、*M. gossipiicola*、甲基杆菌属LMG6378菌株、*M. phyllosphaerae*、稻甲基杆菌、*M. platani*、*M. populi*以及扎氏甲基杆菌。在某些实施方案中,至少一种甲基杆菌是结瘤甲基杆菌。

[0024] 还提供了包含乳状液和甲基杆菌的单一培养物或共培养物的组合物,所述乳状液包含连续相和分散相。在某些实施方案中,(a)所述分散相包含非水性液体且所述连续相包含水性液体,或者(b)所述分散相包含水性液体且所述连续相包含非水性液体。在某些实施方案中,所述非水性液体在25°C下于水中的混溶性等于或低于正戊醇的混溶性。在某些实施方案中,所述组合物基本不含污染性微生物。在某些实施方案中,所述组合物还包含至少一种农业上可接受的佐剂和/或农业上可接受的赋形剂。在某些实施方案中,所述组合物没有固体物质。在某些实施方案中,第二液体包含醇、醛、酮、脂肪酸、磷脂或它们的任何组合。在某些实施方案中,所述醇选自含有至少5个碳原子的脂肪醇和甾醇。在某些实施方案中,所述非水性液体包含一种或多种植物油。在某些实施方案中,所述植物油选自玉米、大豆、棉花、花生、向日葵、橄榄、亚麻、椰子、棕榈、油菜籽、芝麻籽、红花以及它们的组合。在某些实施方案中,所述固体物质还包含农业上可接受的佐剂或农业上可接受的赋形剂。在某些实施方案中,所述组合物不包含光合微生物。在某些实施方案中,所述组合物还包含至少一种杀虫剂和/或至少一种抑菌剂。在某些实施方案中,所述杀虫剂选自杀昆虫剂、杀真菌剂、杀线虫剂和杀细菌剂,其中所述杀虫剂基本不抑制所述甲基杆菌的生长。

[0025] 本文还提供了用甲基杆菌处理植物或植物部分的方法,其包括下述步骤:将任何前面提及的发酵产品或组合物施用于所述植物或植物部分。在所述方法的某些实施方案中,所述植物部分为种子、茎、根、花、子叶、胚芽鞘、果实或叶。在所述方法的某些实施方案中,植物或植物部分为玉米、芸苔属植物、紫花苜蓿、稻、黑麦、高粱、珍珠粟、糜子、小米、龙爪稷、向日葵、红花、大豆、烟草、马铃薯、花生、棉花、番薯、木薯、咖啡、椰子、菠萝、柑橘树、可可、茶、香蕉、鳄梨、无花果、番石榴、芒果、橄榄、番木瓜、腰果、澳洲坚果、扁桃、甜菜、甘蔗、燕麦、大麦、番茄、莴苣、青豆、利马豆、豌豆、葫芦科植物、观赏植物或针叶植物或者植物部分。在所述方法的某些实施方案中,所述植物部分为种子,并且所述组合物具有至少约 $5 \times 10^7$ 个菌落形成单位/克所述组合物至约 $6 \times 10^{10}$ 、 $3 \times 10^{12}$ 、 $5 \times 10^{12}$ 、 $1 \times 10^{13}$ 或 $5 \times 10^{13}$ 个菌落形成单位/克所述组合物的甲基杆菌滴度。

[0026] 还提供了通过所述方法获得的植物或植物部分,其中用所述组合物的发酵产品至

少部分地涂布所述植物或植物部分。

[0027] 植物或植物部分,其中用乳状液至少部分地涂布所述植物或植物部分,所述乳状液包含第一水性液体、第二液体和外源甲基杆菌的单一培养物或共培养物,所述第二液体在水中的混溶性等于或低于正戊醇的混溶性。本文还提供了从植物或植物部分获得的经加工的植物产品,所述植物或植物部分通过任何前面提及的植物或植物部分获得,其中所述经加工的产品包含任何前面提及的乳状液、发酵产品、发酵液或组合物。在某些实施方案中,所述经加工的植物产品为膳食、糊状物、粉状物、片状物或饲料。在某些实施方案中,所述经加工的植物产品是非可再生的。

[0028] 还提供了生产工业产品的方法,其包括使甲基杆菌的单一培养物或共培养物在包含连续相以及在连续相中不可混溶的或仅部分可混溶的分散相的乳状液中生长,以及在甲基杆菌生长之后收获工业产品。在某些实施方案中,所述乳状液包含第一水性液体以及在第一水性液体中不可混溶的或仅部分可混溶的第二非水性液体。在某些实施方案中,所述乳状液基本不含来自固相、液相或者它们的组合的污染性微生物。在某些实施方案中,所述工业产品为聚合物前体、生物聚合物、药用化合物前体、药用化合物或重组蛋白。在任何前面提及的方法的某些实施方案中,所述工业产品为聚-3-羟基丁酸、1,3-丙二醇、吡咯喹啉醌或噁唑吡咯喹啉。在任何前面提及的方法的某些实施方案中,所述乳状液不包含光合微生物。

[0029] 发明描述

[0030] 定义

[0031] 如本文所使用的,短语“附于其上”和“附着的”指甲基杆菌通过在固体物质上生长或者已经在固体物质上生长而与固体物质结合。

[0032] 如本文所使用的,短语“农业上可接受的佐剂”指能增强组合物中的活性剂在处理植物和/或植物部分中的性能的物质。在某些组合物中,活性剂可包含甲基杆菌的单一培养物或共培养物。

[0033] 如本文所使用的,短语“农业上可接受的赋形剂”指可被用于处理植物的组合物中的活性剂的稀释剂和/或载体的基本为惰性的物质。在某些组合物中,活性剂可包含甲基杆菌的单一培养物或共培养物。

[0034] 如本文所使用的,术语“藻类”指任何类型的微藻类或大型藻类。

[0035] 如本文所使用的,术语“甲基杆菌”指甲基杆菌属的兼性甲基营养细菌。因此,本文所使用的术语甲基杆菌不包括为专性甲烷氧化菌的下述属中的菌种:甲基杆菌属、甲基单胞菌属、甲基微菌属、甲基球菌属、甲基弯曲菌属、甲基孢囊菌属、甲基球形菌属、甲基暖菌属以及甲基细胞菌属。

[0036] 如本文所使用的,短语“甲基杆菌的共培养物”指包含甲基杆菌的至少两种菌株或者甲基杆菌的至少两个菌种的甲基杆菌培养物。

[0037] 如本文所使用的,短语“污染性微生物”指在引入培养物、发酵液、发酵液产品或组合物之前未被鉴定出的培养物、发酵液、发酵液产品或组合物中的微生物。

[0038] 如本文所使用的,术语“乳状液”指两种不可混溶的液体的胶体混合物,其中一种液体为连续相,另一种液体为分散相。在某些实施方案中,所述连续相为水性液体,并且所述分散相为在水性液体中不可混溶的非水性液体。

[0039] 如本文所使用的,短语“基本不含污染性微生物”指这样的培养物、发酵液、发酵产品或组合物,其中按量或类型计,所述培养物、发酵液、发酵产品或组合物中存在的至少约95%的微生物是期望的甲基杆菌或预先确定身份的其它期望的微生物。

[0040] 如本文所使用的,短语“无生命的固体物质”指这样的物质:其不溶于或部分溶于水或水性溶液,并且其是无生命的或者其不是其所来源的仍然存活的有机体的一部分。

[0041] 如本文所使用的,短语“甲基杆菌的单一培养物”指由甲基杆菌的单一菌株所组成的甲基杆菌培养物。

[0042] 如本文所使用的,“杀虫剂”指杀昆虫的、杀真菌的、杀线虫的、杀细菌的试剂或者它们的任何组合。

[0043] 如本文所使用的,短语“抑菌剂”指抑制细菌的生长但不杀死细菌的试剂。

[0044] 如本文所使用的,短语“杀虫剂基本不抑制所述甲基杆菌的生长”指这样的任何杀虫剂,当在包含甲基杆菌的单一培养物或共培养物的发酵产品的组合物中提供时,将所述组合物施用于植物或植物部分时,与没有所述杀虫剂的组合物相比,其导致不多于50%的甲基杆菌生长抑制。在某些实施方案中,当将所述组合物施用于植物或植物部分时,与没有所述杀虫剂的组合物相比,所述杀虫剂导致不多于40%、20%、10%、5%、或1%的甲基杆菌生长抑制。

[0045] 如本文所使用的,术语“PPFM细菌”不限于指除结瘤甲基杆菌之外的甲基杆菌属的细菌菌种。

[0046] 如本文所使用的,短语“固体物质”指不溶于或部分溶解于水或水性溶液的物质。

[0047] 如本文所使用的,短语“可悬浮于其中的固相”指可通过搅拌分布于液体中的固体物质。

[0048] 如本文所使用的,术语“非可再生的”指不可再生为完整植物的植物部分或经加工的植物产品。

[0049] 如本文所使用的,短语“基本上所有固相都悬浮于液相中”指这样的培养基,其中至少95%、98%或99%的包含固相的固体物质通过搅拌分布于液体中。

[0050] 如本文所使用的,短语“基本上所有的固相都不悬浮于液相中”指这样的培养基,其中少于5%、2%或1%的固体通过搅拌以颗粒形式分布于培养基中。

[0051] 如本文所使用的,术语“收率”,当其用在关于发酵中获得的甲基杆菌时,指获得的甲基杆菌的数量。测定此类收率的方法包括但不限于:测定获得的每单位体积或单位质量物质的菌落形成单位(CFU)的数量,测定获得的甲基杆菌的湿重,和/或测定获得的甲基杆菌的干重。

[0052] 在任何前述定义与通过引用方式并入本文的任何专利或非专利参考文献、本文引用的任何专利或非专利参考文献或者在其它地方发现的任何专利或非专利参考文献中提供的定义不相符的程度时,应理解,本文将使用前述定义。

[0053] 培养甲基杆菌的方法、组合物以及它们的用途

[0054] 相对于仅在液体培养基中培养甲基杆菌的方法而言,发现在包含乳状液的培养基中培养甲基杆菌的方法能够显著增加甲基杆菌的所得收率。在某些实施方案中,所述方法可包括在提供甲基杆菌生长的条件下,使甲基杆菌在乳状液中生长。可通过多种方法获得包含乳状液和甲基杆菌的培养基,所述方法包括但不限于下述的任何方法:(a)用甲基杆菌

接种包含乳状液的c培养基;(b)用甲基杆菌接种水性液体,引入非水性液体,以及将它们混合以形成乳状液;(c)用甲基杆菌接种水性液体,引入非水性液体,以及将它们混合以形成乳状液;或(d)(a)、(b)或(c)的任何组合。在某些实施方案中,生长包括下述步骤:用甲基杆菌接种培养基,并在足以提供甲基杆菌生长的条件下孵育接种的培养基。在某些实施方案中,将甲基杆菌以至少约 $5 \times 10^4$ 个菌落形成单位/毫升或者至少约 $1 \times 10^5$ 个菌落形成单位/毫升的滴度接种至培养基内。在某些实施方案中,所述甲基杆菌选自:嗜胺甲基杆菌、氯甲烧甲基杆菌、二氯甲烧甲基杆菌、扭脱甲基杆菌、藤泽氏甲基杆菌、嗜中温甲基杆菌、嗜有机甲基杆菌、耐辐射甲基杆菌、罗得西亚甲基杆菌、玫瑰红甲基杆菌、硫氨酸盐甲基杆菌、结瘤甲基杆菌、寄奴花甲基杆菌、*M. gossipiicola*、甲基杆菌属LMG6378菌株、*M. phyllosphaerae*、稻甲基杆菌、*M. platani*、*M. populi*以及扎氏甲基杆菌。所述方法还可包括收获甲基杆菌的单一培养物或共培养物的步骤。收获所述甲基杆菌的方法可包括但不限于:通过过滤、离心、倾析等从液相中分离所述甲基杆菌。

[0055] 可采用的搅拌方法包括但不限于:搅动(stirring)、往复式振荡(reciprocal shaking)、旋转式振荡振荡(rotary shaking)以及它们的组合。在某些实施方案中,搅拌可包括将包含乳状液的培养基置于提供至少25、50、100、200、250、500或1000转/分钟(RPM)的旋转式摇床上。也可通过搅动、往复式振荡以及其它方法获得相当于通过设置为至少25、50、100、200、250、500或1000转/分钟(RPM)的旋转式摇床所提供的搅拌。在某些实施方案中,可通过相当于设置为至少25、50、100、200、250、500或1000转/分钟(RPM)的旋转式摇床所提供的搅拌消除或减少乳状液中水性液体和非水性液体的分离。

[0056] 包含用于本文提供的方法的乳状液的发酵液可以是基本不含污染性微生物的无菌培养物。在某些实施方案中,本文提供的培养物、发酵液、发酵产品或组合物中存在的至少约95%、98%、99%、99.5%、99.8%、99.9%或100%的微生物(按量或类型计)是期望的甲基杆菌或是预先确定身份的其它期望的微生物。期望的甲基杆菌或预先确定身份的其它期望微生物是从纯培养物中获得的微生物。为提供此类无菌培养物,在接种单一培养物或共培养物中的甲基杆菌和/或任何其它期望的微生物之前,将包含乳状液的培养基中使用的组分灭菌,或者以基本无菌的形式获得所述组分。包含乳状液的培养基的多种组分的灭菌可通过以下方法实现,所述方法包括但不限于高压灭菌、辐射、过滤除菌(对于液体而言)等。可获得基本不含污染性微生物的培养物、发酵液、发酵产品或组合物,其中在接种或提供预先确定身份的期望的微生物之前,将所述培养物、发酵液、发酵产品或组合物中的液体或液体以及任何添加的固体组分灭菌,以及采取合适的步骤以避免在期望的微生物生长过程中的培养物污染或避免组合物污染。

[0057] 可以以分批模式发酵、补料分批模式发酵或连续发酵中的任一种来实施本文提供的在包含乳状液的培养基中培养甲基杆菌的方法。本文提供的发酵液、发酵液产品以及组合物也可从分批模式发酵、补料分批模式发酵或连续发酵中的任一种获得。在某些实施方案中,可在用于本文提供的方法的分批模式发酵、补料分批模式发酵或连续发酵过程中的任一种中控制诸如pH和氧浓度的因素。

[0058] 本文提供的甲基杆菌的单一培养物或共培养物以及所得的发酵液、发酵液产品和组合物可包含一种或多种甲基杆菌,所述甲基杆菌包括但不限于:嗜胺甲基杆菌、氯甲烧甲基杆菌、二氯甲烧甲基杆菌、扭脱甲基杆菌、藤泽氏甲基杆菌、嗜中温甲基杆菌、嗜有机甲基

杆菌、耐辐射甲基杆菌、罗得西亚甲基杆菌、玫瑰红甲基杆菌、硫氨酸盐甲基杆菌、结瘤甲基杆菌、寄奴花甲基杆菌、*M.gossipiicola*、甲基杆菌属LMG6378菌株、*M.phyllosphaerae*、稻甲基杆菌、*M.platani*、*M.populi*以及扎氏甲基杆菌。在某些实施方案中,本文提供的甲基杆菌的单一培养物或共培养物以及所得的发酵液和发酵液产品可由一种或多种甲基杆菌组成。然而,本文提供的方法也可被用于其它甲基杆菌。还可通过多种公开的方法来获得甲基杆菌(Madhaiyan et al.,2007)。在某些实施方案中,可使用的此类其它甲基杆菌是这样的甲基杆菌,它们的16S RNA序列与其它已知的甲基杆菌的16S RNA序列具有至少约60%、70%、80%、90%或95%的序列同一性。通过利用16S RNA序列比较进行的甲基杆菌分类至少被Cao et al,2011所描述。在某些实施方案中,所述单一培养物或共培养物和所得产品可包含能够定殖于植物和/或植物部分的甲基杆菌。能够定殖于植物和/或植物部分的甲基杆菌包括但不限于:扭脱甲基杆菌、结瘤甲基杆菌以及嗜中温甲基杆菌。能够定殖于植物和/或植物部分的甲基杆菌还包括但不限于寄奴花甲基杆菌菌种(作为代表性菌株的DSM 23679可从莱布尼茨研究所DSMZ-德国微生物和细胞培养物保藏中心(“DSMZ”), Braunschweig,Germany获得)、*Methylobacterium gossipiicola*菌种(作为代表性菌株的NRRL B-51692可从USDA ARS,Peoria,IL.,USA获得)、甲基杆菌属LMG6378菌株(可从比利时微生物协作保藏中心/Laboratorium voor Microbiologie(“BCCLM”)Ghent,Belgium获得)、*Methylobacterium phyllosphaerae*菌种(作为代表性菌株的DSM 19779T可从DSMZ获得)、稻甲基杆菌菌种(作为代表性菌株的DSM 18207T可从DSMZ获得)、结瘤甲基杆菌菌种(作为代表性菌株的LMG 21967可从BCCLM获得)、*Methylobacterium platani*菌种(作为KCTC 12901的代表性菌株可从韩国典型菌种保藏中心,Yusong-Ku,Taejon,KR(“KCTC”)获得为)以及*Methylobacterium populi*菌种(作为ATCC BAA-705的代表性菌株可从ATCC获得)。因此提供了发酵液、发酵液产品、组合物、制备它们的方法以及利用它们的方法,其包括但不限于处理植物的方法,其中甲基杆菌为能够定殖于植物和/或植物部分的甲基杆菌,所述甲基杆菌选自扭脱甲基杆菌、结瘤甲基杆菌、嗜中温甲基杆菌、寄奴花甲基杆菌、*M.gossipiicola*、甲基杆菌属LMG6378菌株、*M.phyllosphaerae*、稻甲基杆菌、*M.platani*以及*M.populi*。在多种出版物中描述了分离能够定殖于植物和/或植物部分的其它甲基杆菌的方法,并且也可利用此类方法(参见Madhaiyan et al.,以及其中引用的参考文献)。在寻求不受理论限制的情况下,据信本文提供的在包含乳状液的培养基中培养甲基杆菌的方法可能对能够定殖于植物和/或植物部分或者分离自植物和/或植物部分的表面的甲基杆菌的生长特别有利。

[0059] 可用于本文提供的发酵液、发酵液产品、组合物以及相关方法的代表性甲基杆菌包括但不限于表1中的甲基杆菌。

[0060] 表1.代表性的甲基杆菌

[0061]

甲基杆菌	模式菌株的保藏登录号
<i>Methylobacterium adhaesivum</i>	AR27 = CCM 7305 = CECT 7069=DSM 17169T=KCTC 22099T
气生甲基杆菌( <i>Methylobacterium aerolatum</i> )	DSM 19013 = JCM 16406 = KACC 11766
嗜脲甲基杆菌( <i>Methylobacterium aminovorans</i> )	ATCC 51358 = CIP 105328 = IFO (现在的 NBRC) 15686 = JCM 8240 = VKM B-2145
水生甲基杆菌( <i>Methylobacterium aquaticum</i> )	CCM 7218 = CECT 5998 = CIP 108333 = DSM 16371
<i>Methylobacterium brachiatum</i>	DSM 19569 = NBRC 103629 = NCIMB 14379
装饰甲基杆菌( <i>Methylobacterium bullatum</i> )	DSM 21893 = LMG 24788
寄奴花甲基杆菌( <i>Methylobacterium cerastii</i> )	CCM 7788 = CCUG 60040 = DSM 23679
氯甲烷甲基杆菌( <i>Methylobacterium chloromethanicum</i> )	NCIMB 13688 = VKM B-2223
二氯甲烷甲基杆菌( <i>Methylobacterium dichloromethanicum</i> )	CIP 106787 = DSM 6343 = VKM B-2191
扭脱甲基杆菌( <i>Methylobacterium extorquens</i> )	ATCC 43645 = CCUG 2084 = DSM 1337 = IAM 12631 = IFO (现在的 NBRC)

[0062]

甲基杆菌	模式菌株的保藏登录号
	15687 = JCM 2802 = NCCB 78015 = NCIB (现在的 NCIMB) 9399 = VKM B-2064.
藤泽氏甲基杆菌( <i>Methylobacterium fujisawaense</i> )	ATCC 43884 = CIP 103775 = DSM 5686 = IFO (现在的 NBRC) 15843 = JCM 10890 = NCIB (现在的 NCIMB) 12417
<i>Methylobacterium gossipiicola</i>	CCM 7572 = NRRL B-51692
<i>Methylobacterium gregans</i>	DSM 19564 = NBRC 103626 = NCIMB 14376
西班牙甲基杆菌( <i>Methylobacterium hispanicum</i> )	GP34 = CCM 7219 = CECT 5997 = CIP 108332 = DSM 16372
懒惰甲基杆菌( <i>Methylobacterium iners</i> )	DSM 19015 = JCM 16407 = KACC 11765
伊莎贝拉甲基杆菌( <i>Methylobacterium isbiliense</i> )	CCM 7304 = CECT 7068
海鲜甲基杆菌( <i>Methylobacterium jeotgali</i> )	KCTC 12671 = LMG 23639
驹形甲基杆菌( <i>Methylobacterium komagatae</i> )	DSM 19563 = NBRC 103627 = NCIMB 14377
长甲基杆菌( <i>Methylobacterium longum</i> )	CECT 7806 = DSM 23933
葡萄牙甲基杆菌( <i>Methylobacterium lusitanum</i> )	DSM 14457 = NCIMB 13779 = VKM B-2239
地钱甲基杆菌( <i>Methylobacterium marchantiae</i> )	CCUG 56108 = DSM 21328
嗜中温甲基杆菌( <i>Methylobacterium mesophilicum</i> )	ATCC 29983 = CCUG 16482 = CIP 101129 = DSM 1708 = ICPB 4095 = IFO (现在的 NBRC) 15688 = JCM 2829 = LMG 5275 = NCIB (现在的 NCIMB) 11561 = NRRL B-14246
结瘤甲基杆菌	LMG 21967 = ORS 2060
嗜有机甲基杆菌( <i>Methylobacterium organophilum</i> )	ATCC 27886 = CIP 101049 = DSM 760 = HAMBI 2263 = IFO (现在的 NBRC) 15689 = JCM 2833 = LMG 6083 = NCCB 78041 = VKM B-2066
稻甲基杆菌( <i>Methylobacterium oryzae</i> )	DSM 18207 = JCM 16405 = KACC 11585

[0063]

甲基杆菌	模式菌株的保藏登录号
	= LMG 23582
<i>Methylobacterium persicinum</i>	DSM 19562 = NBRC 103628 = NCIMB 14378
<i>Methylobacterium phyllosphaerae</i>	DSM 19779 = JCM 16408 = KACC 11716 = LMG 24361
<i>Methylobacterium platani</i>	JCM 14648 = KCTC 12901
<i>Methylobacterium podarium</i>	ATCC BAA-547 = DSM 15083
<i>Methylobacterium populi</i>	ATCC BAA-705 = NCIMB 13946
耐辐射甲基杆菌( <i>Methylobacterium radiotolerans</i> )	ATCC 27329 = CIP 101128 = DSM 1819 = IFO (现在的 NBRC) 15690 = JCM 2831 = LMG 2269 = NCIB (现在的 NCIMB) 10815 = VKM B-2144
玫瑰红甲基杆菌( <i>Methylobacterium rhodinum</i> )	ATCC 14821 = CIP 101127 = DSM 2163 = IFO (现在的 NBRC) 15691 = JCM 2811 = LMG 2275 = NCIB (现在的 NCIMB) 9421 = VKM B-2065
<i>Methylobacterium suomiense</i>	DSM 14458 = NCIMB 13778 = VKM B-2238
<i>Methylobacterium tardum</i>	DSM 19566 = NBRC 103632 = NCIMB 14380
硫氰酸盐甲基杆菌( <i>Methylobacterium thiocyanatum</i> )	ATCC 700647 = DSM 11490 = JCM 10893 = VKM B-2197
易变甲基杆菌( <i>Methylobacterium variabile</i> )	CCM 7281 = CECT 7045 = DSM 16961
扎氏甲基杆菌( <i>Methylobacterium zatmanii</i> )	ATCC 43883 = CCUG 36916 = CIP 103774 = DSM 5688 = IFO (现在的 NBRC) 15845 = JCM 10892 = LMG 6087 = NCIB (现在的 NCIMB) 12243 = VKM B-2161

[0064] 保藏说明(Depository Key)

[0065] ATCC:美国典型菌种保藏中心,Manassas,VA,USA

[0066] CCUG:菌种保藏中心,哥德堡大学,Sweden

[0067] CIP:巴斯德研究所菌种保藏中心,Paris,FR

[0068] DSM:DSMZ-德国微生物和细胞培养物保藏中心(“DSMZ”),Braunschweig,Germany

[0069] JCM:日本微生物菌种保藏中心,Saitama,Japan

[0070] LMG:比利时微生物协作保藏中心/Laboratorium voor Microbiologie(“BCCLM”) Ghent,Belgium

[0071] NBRC:生物资源中心(NBRC),Chiba,Japan

[0072] NCIMB:英国工业、食品与海洋细菌菌种保藏中心,UK

[0073] NRRL:USDA ARS,Peoria,IL.,USA

[0074] 在某些实施方案中,单一培养物或共培养物以及所得的发酵液和发酵液产品可包含一种或多种甲基杆菌分离物或突变体,其产生升高水平的有用营养素或植物生长调节剂。美国专利第8,153,118号公开了多种甲基杆菌分离物,其产生可用于本文提供的方法和组合物的升高水平的维生素B-12和氨基酸。还提供了包含一种或多种甲基杆菌的发酵液、发酵液产品和组合物,所述甲基杆菌如过度产生维生素B-12的登录号为ATCC PTA-1561的甲基杆菌突变体B12-11,过度产生氨基酸苏氨酸的玫瑰红甲基杆菌(ATCC#43282),过度产生氨基酸L-谷氨酸的甲基杆菌属种(ATCC#21371),过度产生氨基酸L-谷氨酸的甲基杆菌属种(ATCC#21372),过度产生氨基酸L-赖氨酸的甲基杆菌属种(ATCC#21926),过度产生氨基酸L-谷氨酸的甲基杆菌属种(ATCC#21969),过度产生氨基酸L-赖氨酸、L-天冬氨酸、L-丙氨酸、L-缬氨酸、L-亮氨酸以及L-精氨酸的甲基杆菌属种(ATCC#21927),和/或产生单细胞蛋白的甲基杆菌属种(ATCC#21438)。

[0075] 在某些实施方案中,本文提供的发酵液、发酵液产品或组合物还可包含除甲基杆菌之外的预先确定身份的一种或多种引入的微生物。可添加的其它微生物包括但不限于生物杀虫性的微生物或者当施用于植物或植物部分时可提供一些其它益处的微生物。因而生物杀虫性微生物或其它有益的微生物包括但不限于:多种芽孢杆菌属种(*Bacillus* sp.)、假单胞菌属种(*Pseudomonas* sp.)、盾壳酶属种(*Coniothyrium* sp.)、泛菌属种(*Pantoea* sp.)、链霉菌属种(*Streptomyces* sp.)以及木霉属种(*Trichoderma* sp.)。微生物生物杀虫剂可以是细菌、真菌、病毒或原生动物。特别有用的生物杀虫性微生物包括多种枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)、短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilis*)、丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)、哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)、绿木霉(*Trichoderma virens*)以及利迪链霉菌(*Streptomyces lydicus*)菌株。添加的其它微生物可以是作为纯培养物获得的遗传工程化的或者天然存在的分离物。在某些实施方案中,预期细菌或真菌微生物可以以孢子的形式在发酵液、发酵液产品或组合物中提供。可添加的其它微生物包括但不限于光合微生物。此类光合生物体包括但不限于藻类。此类藻类可以包括但不限于以下藻类:原球藻属(*Protococcus*)、石莼属(*Ulva*)、松藻属(*Codium*)、浒苔属(*Enteromorpha*)、新绿藻属(*Neochloris*)和/或衣藻属(*Chlamydomonas*)。

[0076] 在某些实施方案中,用于培养基的乳状液的水性液体组分是从廉价且易得的组分制备的,所述廉价且易得的组分包括但不限于:无机盐如磷酸钾、硫酸镁等,碳源如甘油、甲醇、谷氨酸、天冬氨酸、琥珀酸等,以及氨基酸混合物如蛋白胍、胰蛋白胍等。可使用的示例性液体培养基包括但不限于:铵矿物盐(AMS)培养基(Whittenbury et al.,1970)、Vogel-Bonner(VB)基本培养基(Vogel and Bonner,1956)以及LB肉汤("Luria-Bertani Broth")。

[0077] 在某些实施方案中,乳状液包含水性液体以及在水性液体中不可混溶或仅部分可混溶的液体。在水中不可混溶的或仅部分可混溶的非水性液体包括但不限于下述中的任何液体:(1)在25°C下在水中的混溶性等于或低于正戊醇、正己醇或正庚醇的混溶性的液体;(2)包含醇、醛、酮、脂肪酸、磷脂或它们的任何组合的液体;(3)选自含有至少5、6或7个碳的脂肪醇以及甾醇的醇;(4)动物油、微生物油、合成油、植物油或者它们的组合;和/或(5)选

自以下的植物油：玉米、大豆、棉花、花生、向日葵、橄榄、亚麻、椰子、棕榈、油菜籽、芝麻籽、红花以及它们的组合。在某些实施方案中，所述不可混溶的或部分不可混溶的非水性液体可包含至少约0.02质量%至约20%质量的乳状液。在某些实施方案中，所述不可混溶的或部分不可混溶的非水性液体可包含至少约0.05%、0.1%、0.5%或1%至约3%、5%、10%或20%中任一个的乳状液(按质量计)。

[0078] 一般而言，用于提供甲基杆菌高效生长的乳状液中的非水性液体组分可以是在水中或水性溶液中不可混溶的或仅部分可混溶的任何非水性液体。当在液体培养基中提供时，此类合适的非水性液体相对于甲基杆菌而言也是非杀菌性的或是非抑菌性的。在某些实施方案中，此类合适的非水性液体还是以无菌形式容易获得的或者变得无菌的非水性液体。可通过提供除去污染性微生物的任何方法将本文使用的非水性液体灭菌，因此所述方法包括但不限于诸如高压灭菌、辐射、化学处理以及它们的任何组合的方法。

[0079] 在某些实施方案中，可将本文提供的固体物质添加至本文提供的方法、发酵产品或组合物的乳状液中。用于使甲基杆菌在包含液体和固体的双相培养基中生长的方法以及组合物公开于共同转让的美国专利申请第13/907,161号中，将其以引用的方式整体并入本文；以及公开于共同转让的国际专利申请PCT/US13/43722中，将其以引用的方式整体并入本文。这些固体物质包括动物、植物、微生物、真菌或矿物来源的天然物质，人造物质或者天然或人造物质的组合。在某些实施方案中，所述固体物质是无生命的固体物质。动物、植物、微生物或真菌来源的无生命的固体物质可从不可能生存的(即不再存活的)或已经致使其不能生存的动物、植物、微生物或真菌中获得。因此，当之前结合的硅藻海藻已经被除去或者导致不可能生存时，硅藻壳是无生命的固体物质。由于硅藻壳是无生命的固体物质，它们不被认为是光合生物体或光合微生物。在某些实施方案中，固体物质包括但不限于：沙、泥沙(silt)、土壤、粘土、灰、炭、硅藻土以及其它类似的矿物、毛玻璃或玻璃珠、地面陶瓷材料、陶瓷珠、膨润土、高岭土、滑石、珍珠岩、云母、蛭石、硅酸盐、石英粉、蒙脱石以及它们的组合。在某些实施方案中，所述固体物质可以是聚合物或是聚合物珠。可用作固体物质的聚合物包括但不限于在水中或水性溶液中不可溶或仅部分可溶的多种多糖如纤维素聚合物和几丁质聚合物、琼脂(即半乳聚糖类)以及它们的组合。在某些实施方案中，所述固体物质可以是不可溶或仅部分可溶的盐晶体。可使用的盐晶体包括但不限于不可溶或仅部分可溶的碳酸盐、铬酸盐、亚硫酸盐、磷酸盐、氢氧化物、氧化物以及硫化物。在某些实施方案中，所述固体物质可以是微生物细胞、真菌细胞、微生物孢子或真菌孢子。在某些实施方案中，所述固体物质可以是微生物细胞或微生物孢子，其中所述微生物细胞或微生物孢子不是光合微生物。在某些实施方案中，所述微生物细胞或微生物孢子不是光合微生物，其中所述光合微生物选自藻类、蓝藻、硅藻、布朗葡萄藻(*Botryococcus braunii*)、小球藻(*Chlorella*)、杜氏藻(*Dunaliella tertiolecta*)、江蓠属(*Gracilaria*)、颗石藻(*Pleurochrysis carterae*)、马尾藻属(*Sargassum*)以及石莼(*Ulva*)。在其它实施方案中，所述固体物质可以是灭活的(即不可能生存的)微生物细胞、真菌细胞、微生物孢子或真菌孢子。在其它实施方案中，所述固体物质可以是休眠的(即能存活但没有活跃分裂的)微生物细胞、真菌细胞、微生物孢子或真菌孢子。在其它实施方案中，所述固体物质可以是微生物来源的细胞碎片。在其它实施方案中，所述固体物质可以是来自于植物的任何部分的颗粒物。可用于获得所述固体物质的植物部分包括但不限于：穗轴、秕、外壳、叶、根、花、茎、树皮、种子以及它们的组

合。还可使用从经加工的植物部分获得产品,所述经加工的植物部分包括但不限于甘蔗渣、麦麸、大豆粗粉、压碎的种子饼、干草等。可将此类植物部分、经加工的植物和/或经加工的植物部分磨碎以获得可使用的颗粒形式的固体物质。在某些实施方案中,可使用包括但不限于木浆、锯屑、刨花等在内的木材或木材产品。在某些实施方案中,所述固体物质可以是来自动物的颗粒物,其包括但不限于骨粉、明胶、磨碎的或粉末状的壳、毛发、浸渍的兽皮等。

[0080] 在某些实施方案中,以颗粒形式提供添加至乳状液的固体物质,所述颗粒形式提供所述固体物质在培养基中的分布。在某些实施方案中,所述固体物质由平均长度或平均直径为约2微米至约1000微米的颗粒组成。在某些实施方案中,所述固体物质由平均长度或平均直径为约1微米至约1000微米的颗粒组成。在某些实施方案中,所述固体物质是平均长度或平均直径为约1、2、4、10、20或40微米至约100、200、500、750或1000微米中的任何微米的颗粒。用于本文提供的方法或组合物中的颗粒的理想特征包括合适的可湿性以使颗粒可通过搅拌悬浮于整个培养基中。

[0081] 在某些实施方案中,向本文提供的发酵产品、组合物和方法中的乳状液中添加的液体或固体是提供乳状液稳定的乳化剂。此类乳化剂可包括但不限于表面活性剂和增稠剂。表面活性剂可包括但不限于多种离子型或非离子型去污剂,其包括但不限于阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、两性表面活性剂、有机硅酸盐表面活性剂和/或酸化的表面活性剂。在本文提供的发酵产品、组合物和方法中用作乳化剂的水状胶质聚合物包括但不限于:琼脂、藻酸盐、阿拉伯糖基木聚糖、角叉菜胶、羧甲基纤维素、纤维素、凝胶多糖、明胶、胶凝糖、 $\beta$ -葡聚糖、瓜尔胶、阿拉伯树胶、刺槐豆胶、果胶、淀粉、黄原胶以及它们的混合物。其它乳化剂包括但不限于:多种粘土和蛋白。本文以及其它地方公开的某些农业上可接受的赋形剂和佐剂也可被用作乳化剂。

[0082] 在某些实施方案中,添加至乳状液中的固体物质作为胶体提供于培养基、发酵产品或组合物中,其中连续相是液体且非连续相是固体。可用于在用于甲基杆菌生长的液体培养基中形成胶体的合适的固体包括但不限于被称为水状胶质的多种固体。用于本文提供的培养基、方法和组合物中的此类水状胶质可以是植物、动物、微生物或合成来源的亲水性聚合物。用于所述方法中的水状胶质聚合物可包含多个羟基基团和/或可以是聚合电解质。用于本文提供的组合物和方法中的水状胶质聚合物包括但不限于:琼脂、藻酸盐、阿拉伯糖基木聚糖、角叉菜胶、羧甲基纤维素、纤维素、凝胶多糖、明胶、胶凝糖、 $\beta$ -葡聚糖、瓜尔胶、阿拉伯树胶、刺槐豆胶、果胶、淀粉、黄原胶以及它们的混合物。在某些实施方案中,用于本文提供的培养基、方法和组合物中的胶体可包含水状胶质聚合物以及一种或多种蛋白。

[0083] 在某些实施方案中,添加至乳状液的固体物质可以是提供甲基杆菌在固体物质上附着生长的固体物质。附着于固体物质上的甲基杆菌是不能通过用生长培养基简单洗涤具有附着的甲基杆菌的固体物质而被大量除去的甲基杆菌,而非附着性甲基杆菌可通过用液体生长培养基洗涤所述固体物质被大量除去。在此背景下,“大量除去”意为当用三倍体积的液体生长培养基洗涤所述固体物质时,至少约30%、40%、50%、60%、70%或80%的存在的甲基杆菌被除去。此类洗涤可通过多种方法实现,所述方法包括但不限于从洗涤的固相中倾析液体或者使液体流经过滤器上的固相,所述过滤器允许液体中的细菌流出。在某些实施方案中,所述与固体结合的附着性甲基杆菌可包括直接附着于所述固体的甲基杆菌

和/或间接附着于所述固体物质的甲基杆菌。间接附着于所述固体物质的甲基杆菌包括但不限于：附于附着于所述固体物质的另外的甲基杆菌或另外的微生物上的甲基杆菌、通过附于附着于所述固体物质的另外的物质而附着于所述固体物质的甲基杆菌等。在某些实施方案中，发酵液、发酵液产品或组合物中至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、99.5%或99.9%的甲基杆菌为附着于所述固体物质上的甲基杆菌。在某些实施方案中，附着性甲基杆菌可以以下述密度存在于发酵液、发酵液产品或组合物中的固体物质的表面：至少约1个甲基杆菌/20平方微米、至少约1个甲基杆菌/10平方微米、至少约1个甲基杆菌/10平方微米、至少约1个甲基杆菌/5平方微米、至少约1个甲基杆菌/2平方微米或者至少约1个甲基杆菌/平方微米。在某些实施方案中，附着性甲基杆菌可以以下述密度存在于发酵液、发酵液产品或组合物中的固体物质的表面：至少约1个甲基杆菌/20平方微米至约1个甲基杆菌/平方微米、至少约1个甲基杆菌/10平方微米至约1个甲基杆菌/平方微米、至少约1个甲基杆菌/10平方微米至约1个甲基杆菌/平方微米、至少约1个甲基杆菌/5平方微米至约1个甲基杆菌/平方微米或者至少约1个甲基杆菌/2平方微米至约1个甲基杆菌/平方微米。在某些实施方案中，附着性甲基杆菌可以以下述密度存在于发酵液、发酵液产品或组合物中的固体物质的表面：至少约1个甲基杆菌/20平方微米至约1个甲基杆菌/2平方微米、至少约1个甲基杆菌/10平方微米至约1个甲基杆菌/2平方微米、至少约1个甲基杆菌/10平方微米至约1个甲基杆菌/2平方微米或者至少约1个甲基杆菌/5平方微米至约1个甲基杆菌/2平方微米。本文提供的发酵产品和发酵液可包含含有非附着性甲基杆菌的液相。在某些实施方案中，液相中非附着性甲基杆菌的滴度可以低于约100,000、10,000或1,000个CFU/ml。

[0084] 提供的培养方法可收获含有下述滴度的甲基杆菌的发酵产品：大于约 $5 \times 10^7$ 个菌落形成单位/毫升、约 $5 \times 10^8$ 个菌落形成单位/毫升、大于约 $1 \times 10^9$ 个菌落形成单位/毫升、大于约 $1 \times 10^{10}$ 个菌落形成单位/毫升、至少约 $3 \times 10^{10}$ 个菌落形成单位/毫升。在某些实施方案中，本文提供的发酵液可包含下述滴度的甲基杆菌：至少约 $5 \times 10^7$ 个菌落形成单位/毫升至至少约 $3 \times 10^{10}$ 个菌落形成单位/毫升、至少约 $5 \times 10^7$ 个菌落形成单位/毫升至至少约 $4 \times 10^{10}$ 个菌落形成单位/毫升或者至少约 $5 \times 10^7$ 个菌落形成单位/毫升至至少约 $6 \times 10^{10}$ 个菌落形成单位/毫升。在某些实施方案中，本文提供的发酵液可包含下述滴度的甲基杆菌：至少约 $1 \times 10^9$ 个菌落形成单位/毫升至至少约 $3 \times 10^{10}$ 个菌落形成单位/毫升、至少约 $1 \times 10^9$ 个菌落形成单位/毫升至至少约 $4 \times 10^{10}$ 个菌落形成单位/毫升或者至少约 $1 \times 10^9$ 个菌落形成单位/毫升至至少约 $6 \times 10^{10}$ 个菌落形成单位/毫升。在某些实施方案中，本文提供的发酵液包含下述滴度的甲基杆菌：至少约 $1 \times 10^{10}$ 个菌落形成单位/毫升至至少约 $3 \times 10^{10}$ 个菌落形成单位/毫升、至少约 $1 \times 10^{10}$ 个菌落形成单位/毫升至至少约 $4 \times 10^{10}$ 个菌落形成单位/毫升或者至少约 $1 \times 10^{10}$ 个菌落形成单位/毫升至至少约 $6 \times 10^{10}$ 个菌落形成单位/毫升。在某些实施方案中，本文提供的发酵液包含下述滴度的甲基杆菌：至少约 $3 \times 10^{10}$ 个菌落形成单位/毫升至至少约 $4 \times 10^{10}$ 个菌落形成单位/毫升，或者至少约 $3 \times 10^{10}$ 个菌落形成单位/毫升至至少约 $6 \times 10^{10}$ 个菌落形成单位/毫升。

[0085] 包含含有甲基杆菌的乳状液的发酵液、发酵液产品、发酵产品或其它组合物可被用于制备可用于处理植物或植物部分的多种组合物。可选地，包含含有甲基杆菌的乳状液的发酵液、发酵液产品、发酵产品或其它组合物可被用于处理植物或植物部分。因此，提供

用所述发酵液产品或组合物至少部分地涂布的植物、植物部分,并且特别是植物种子。还提供了含有所述发酵液产品或组合物的经加工的植物产品。包含含有甲基杆菌的乳状液的发酵液、发酵液产品、发酵产品或其它组合物特别可用于处理植物种子。因而,提供用所述发酵液产品或组合物至少部分地涂布的种子。还提供了经加工的种子产品,其包括但不限于含有本文提供的发酵液产品或组合物的膳食、粉状物、饲料以及片状物。在某些实施方案中,所述经加工的植物产品是非可再生的(即不能发育为植物)。在某些实施方案中,用于所述发酵产品或组合物中的乳状液包含结合的甲基杆菌,所述发酵产品或组合物至少部分地涂布植物、植物部分或植物种子或者包含于经加工的植物、植物部分或种子产品中,所述甲基杆菌可通过将处理的与未处理的植物、植物部分、植物种子或者它们的经加工的产品进行比较而被容易地鉴别。

[0086] 包含含有甲基杆菌的乳状液的发酵液、发酵液产品、发酵产品或其它组合物可被用于生产工业产品或重组蛋白或者被用于生物修复。

[0087] 可用于处理植物或植物部分的包含含有甲基杆菌的乳状液的组合物还可包含农业上可接受的佐剂或农业上可接受的赋形剂。农业上可接受的佐剂或农业上可接受的赋形剂通常为当暴露于植物或植物部分时不引起过度的植物毒性或其它不良反应的成分。在某些实施方案中,所述乳状液自身可以是农业上可接受的佐剂或农业上可接受的赋形剂,只要它对甲基杆菌不是杀菌性的或抑菌性的。在其它实施方案中,所述组合物还包含农业上可接受的佐剂或农业上可接受的赋形剂中的至少一种。任何前面提及的组合物还可包含杀虫剂。用于所述组合物的杀虫剂包括但不限于:杀昆虫剂、杀真菌剂、杀线虫剂以及杀细菌剂。在某些实施方案中,用于所述组合物的杀虫剂是基本不抑制所述甲基杆菌生长的杀虫剂。由于甲基杆菌是革兰氏阴性细菌,因此用于所述组合物的合适的杀菌剂可包括但不限于针对革兰氏阳性细菌而非革兰氏阴性细菌显示出活性的杀菌剂。本文提供的组合物还可包含基本不抑制所述甲基杆菌生长的抑菌剂。适用于本文提供的组合物的抑菌剂包括但不限于针对革兰氏阳性细菌而非革兰氏阴性细菌显示出活性的那些抑菌剂。任何前面提及的组合物还可以是基本干燥的产品(即具有约5%或更低的含水量)、所述组合物与乳状液或悬浮液的混合物。

[0088] 用于所述组合物的农业上可接受的佐剂包括但不限于增强产品功效的组分和/或增强产品应用的易用性的产品。增强产品功效的佐剂可包括促进所述组合物对植物部分的粘附以及其在植物部分的扩散的多种湿润剂/铺展剂、促进与植物部分粘附的粘着剂、可促进活性剂与内部组织接触的渗透剂、通过抑制环境性降解而增强活性剂的半衰期的增量剂以及增加喷洒的组合物的密度或干燥时间的保湿剂。用于所述组合物的湿润剂/铺展剂可包括但不限于:非离子型表面活性剂、阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、两性表面活性剂、有机硅酸盐表面活性剂和/或酸化的表面活性剂。用于所述组合物的粘着剂可包括但不限于:基于乳胶的物质、萜烯/松脂二烯以及基于吡咯烷酮的物质。渗透剂可包括矿物油、植物油、酯化的植物油、有机硅酸盐表面活性剂以及酸化的表面活性剂。用于所述组合物的增量剂可包括但不限于硫酸铵或基于薄荷油的物质。用于所述组合物的保湿剂可包括但不限于甘油、丙二醇以及二甘醇(diethyl glycol)。改善产品应用的易用性的佐剂包括但不限于:酸化剂/缓冲剂、抗泡剂/消泡剂、相容剂、漂移减少剂(drift-reducing agents)、染料以及水调节剂(water conditioners)。用于所述组合物的抗泡剂/消泡剂可包括但不限

于二甲基聚硅氧烷(dimethopolysiloxane)。用于所述组合物的相容剂可包括但不限于硫酸铵。用于所述组合物的漂移减少剂可包括但不限于聚丙烯酰胺和多糖。用于所述组合物的水调节剂可包括但不限于硫酸铵。

[0089] 本文还提供了用发酵液、发酵液产品和组合物处理植物和/或植物部分的方法。由此获得的处理的植物以及处理的植物部分包括但不限于：玉米、芸苔属植物(例如甘蓝型油菜(*B.napus*)、白菜型油菜(*B.rapa*)、芥菜型油菜(*B.juncea*))、紫花苜蓿、稻、黑麦、高粱、粟(例如珍珠粟(*Pennisetum glaucum*)、糜子(*Panicum miliaceum*)、小米(*Setaria italica*)、龙爪稷(*Eleusine coracana*))、向日葵、红花、大豆、烟草、马铃薯、花生、棉花、番薯(*Ipomoea batatas*)、木薯、咖啡、椰子、菠萝、柑橘树、可可、茶、香蕉、鳄梨、无花果、番石榴、芒果、橄榄、番木瓜、腰果、澳洲坚果、扁桃、甜菜、甘蔗、燕麦、大麦、番茄、莴苣、青豆、利马豆、豌豆、葫芦科植物(如黄瓜、哈密瓜和甜瓜)、观赏植物以及针叶植物。被处理的植物部分包括但不限于：叶、茎、花、根、种子、果实、块茎、胚芽鞘等。可被处理的观赏植物和植物部分包括但不限于：杜鹃花、绣球花、木槿、玫瑰、郁金香、水仙花、矮牵牛、康乃馨、一品红以及菊花。可被处理的针叶植物和植物部分包括但不限于：松树如火炬松、湿地松、美国黄松、美国黑松和新西兰松；花旗松；异叶铁杉；西加云杉；红杉；冷杉如银杉和香脂冷杉；以及香柏如美国西部侧柏和阿拉斯加黄扁柏。可被处理的草坪植物和植物部分包括但不限于：一年生早熟禾、一年生黑麦草、加拿大早熟禾、牛毛草、本特草、小麦草、草地早熟禾、野茅、黑麦草、小康草、百慕大草、圣僧草以及结缕草。可用本文提供的发酵液、发酵液产品、发酵产品和/或组合物处理任何前面提及的植物的种子或其它繁殖体。

[0090] 在某些实施方案中，通过以喷雾施加发酵液、发酵液产品、发酵产品以及组合物来处理植物和/或植物部分。此类喷雾施用包括但不限于单一植物部分或植物部分的任何组合的处理。可用将发酵液、发酵液产品、发酵产品以及组合物分布至植物和/或植物部分的任何装置来实现喷洒。有用的喷雾装置包括喷管式喷雾器、手动/背负式喷雾器、作物喷粉机(即飞机喷雾)等。也可使用提供用于将所述发酵液、发酵液产品、发酵产品以及组合物施用于近轴表面和/或远轴表面中的一种或两种的喷雾装置和或方法。本文还提供了用包含含有甲基杆菌的乳状液的发酵液、发酵液产品、发酵产品或组合物中的任一种至少部分涂布的植物和/或植物部分。本文还提供了经加工的植物产品，其包含其上附有甲基杆菌的固体物质。

[0091] 在某些实施方案中，通过将种子暴露于包含本文提供的乳状液的发酵液、发酵液产品、发酵产品以及组合物来处理所述种子。可通过包括但不限于浸渍、涂布、喷雾等在内的方法用本文提供的发酵液、发酵液产品以及组合物来处理种子。种子处理可用连续和/或分批种子处理器来实现。在某些实施方案中，可通过下述方法制备涂布的种子：用含有提供的包含具有甲基杆菌的乳状液的发酵液、发酵液产品或组合物的涂布组合物使种子浆化，并且使所得产品风干。风干可在对所述种子或甲基杆菌无害的任何温度下完成，但是通常不高于30℃。包含乳状液和甲基杆菌的涂布的比例包括但不限于以下范围：种子重量的0.1%-25%，种子重量的0.5%-5%，以及种子重量的0.5%-2.5%。在某些实施方案中，还包含用于种子涂布或处理的固体物质的乳状液具有附于其上的甲基杆菌。在某些实施方案中，还包含用于种子涂布或处理的固体物质的乳状液与甲基杆菌结合，并且所述乳状液为通过本文提供的方法获得的发酵液、发酵液产品或组合物。将公开于美国专利第5,106,648

号、第5,512,069号以及第8,181,388号中的用于种子处理的各种种子处理组合物和方法通过引用的方式整体并入本文,并且可适合于与包含本文提供的发酵液、发酵液产品或组合物的活性剂一起使用。在某些实施方案中,用于处理种子的组合物可包含农业上可接受的赋形剂,所述赋形剂包括但不限于:木粉、粘土、活性炭、硅藻土、细粒无机固体、碳酸钙等。可与本文提供的发酵液、发酵液产品或组合物一起使用的粘土和无机固体包括但不限于:钙基膨润土、高岭土、瓷土、滑石、珍珠岩、云母、蛭石、硅酸盐、石英粉、蒙脱石以及它们的混合物。可使用的促进对种子的附着的农业上可接受的佐剂包括但不限于:聚乙酸乙烯酯、聚乙酸乙烯酯共聚物、水解的聚乙酸乙烯酯、聚乙烯吡咯烷酮-乙酸乙烯酯共聚物、聚乙烯醇、聚乙烯醇共聚物、聚乙烯基甲基醚、聚乙烯基甲基醚-顺丁烯二酸酐共聚物、蜡、乳胶聚合物、包括乙基纤维素和甲基纤维素的纤维素、羟甲基纤维素、羟丙基纤维素、羟甲基丙基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、藻酸盐、糊精、麦芽糊精、多糖、脂肪、油类、蛋白、刺梧桐胶、jaguar胶、黄芪胶、多糖胶、粘液、阿拉伯树胶、虫胶、偏二氯乙烯聚合物和共聚物、基于大豆的蛋白聚合物和共聚物、木质素磺酸盐、丙烯酸共聚物、淀粉、聚乙烯丙烯酸酯/盐、玉米蛋白、明胶、羧甲基纤维素、壳聚糖、聚氧化乙烯、丙烯酰亚胺聚合物和共聚物、聚羟乙基丙烯酸酯/盐、甲基丙烯酰亚胺单体、藻酸盐、乙基纤维素、聚氯丁烯以及糖浆剂或者它们的混合物。可促进涂布的其它有用的农业上可接受的佐剂包括但不限于:乙酸乙烯酯的聚合物和共聚物、聚乙烯吡咯烷酮-乙酸乙烯酯共聚物以及水溶性蜡。本文公开的以及在美国专利第8,181,388号中公开的各种表面活性剂、分散剂、抗结剂、控泡剂以及染料可适合与包含本文提供的发酵液、发酵液产品或组合物的活性剂一起使用。

## 实施例

[0092] 包括下述实施例以显示本发明的优选实施方案。本领域技术人员应理解下述实施例中公开的技术代表了申请人在本发明的实践中发现的运行良好的技术,并且因此可被认为构成了它的实践的优选模式。然而,鉴于本公开,本领域技术人员应理解,在不脱离本发明的范围的情况下可对公开的具体实施方案进行许多改变,而仍可获得相似的或类似的结果。

[0093] 实施例1.PPFM细菌在固体琼脂板培养基上的生长

[0094] 对于PPFM细菌在固体琼脂板培养基上的生长,对多种标准培养基进行测试。

[0095] 使用的一种培养基是铵矿物盐(AMS)培养基(Whittenbury et al.1970)。每升AMS培养基包含700毫克无水磷酸氢二钾、540毫克磷酸二氢钾、1克七水合硫酸镁、500毫克无水氯化铵、200毫克二水氯化钙、4毫克七水合硫酸铁、100微克七水合硫酸锌、30微克四水合氯化锰、300微克无水硼酸、200微克六水合氯化钴、10微克二水合氯化铜、20微克六水合氯化镍以及60微克二水合钼酸钠。

[0096] 从下文列出的四种储备液制备AMS培养基

[0097] 储备液I:对于以50×浓度的1升

[0098] 磷酸氢二钾,无水 35克

[0099] 磷酸二氢钾,无水 27克

[0100] 储备液II:对于以50×浓度的1升

[0101] 七水合硫酸镁 50克

[0102]	氯化铵,无水	25克
[0103]	储备液III:对于以50×浓度的1升	
[0104]	二水氯化钙	10克
[0105]	微量金属储备液:对于以1000×浓度的1升	
	七水合硫酸铁	4克
	七水合硫酸锌	100毫克
[0106]	四水合氯化锰	30毫克
	硼酸,无水	300毫克
	六水合氯化钴	200毫克
	二水合氯化铜	10毫克
[0107]	六水合氯化镍	20毫克
	二水合钼酸钠	60毫克

[0108] 将储备液I、II和III分别进行高压灭菌。由于在高压灭菌步骤中大部分盐沉淀析出,因此微量金属储备液不能进行高压灭菌,因而通过0.2微米的过滤装置将其进行过滤除菌。为确保溶液中含有所有成分的水-澄清的AMS培养基的制备,这些步骤是必需的。如最初由Whittenbury et al.(1970)所描述的,将含有磷酸盐组分的AMS培养基与其它组分分离直至培养基制备的最终完成步骤,以防止不可溶的磷酸镁和磷酸钙晶体的形成。

[0109] 为了用AMS基质制备1升固体琼脂板培养基,向940ml蒸馏水中添加15克琼脂,并将该混合物进行高压灭菌。高压灭菌之后,将储备液I、II和III中的每一种都加入20ml,并加入1ml过滤除菌的微量金属储备液。

[0110] 如果要掺入其它培养基组分如碳源,对大部分而言,在高压灭菌之前将这些加至水和琼脂的混合物中。这方面的一个例外是甲醇,其通过0.2微米的过滤装置被过滤除菌,并在基础培养基已经被高压灭菌之后加入。

[0111] 使用的第二种培养基是Vogel-Bonner(VB)基本培养基(Vogel and Bonner, 1956)。每升VB培养基含有298毫克七水合硫酸镁、14.93克无水磷酸氢二钾、5.22克四水磷酸氢铵钠以及2.73克无水柠檬酸(游离酸形式)。

[0112] 从盐和柠檬酸的25×储备液制备Vogel-Bonner基本培养基。通过下述方法制备该25×储备液:按列出的顺序将下述量的每种成分溶于1升蒸馏水中,并确保在加入下一种成分之前每种都完全溶解:7.46克七水合硫酸镁、68.23克无水柠檬酸、373.13克无水磷酸氢二钾以及130.60克四水磷酸氢铵钠。通过首先溶解硫酸镁,然后加入柠檬酸,使镁离子被柠檬酸离子螯合,以防止当添加磷酸盐时形成不可溶的磷酸镁晶体。这确保了溶液中含有所有成分的水-澄清的培养基的制备。

[0113] 为了用VB基质制备1升固体琼脂板培养基,向960ml蒸馏水中加入15克琼脂,并将该混合物进行高压灭菌。高压灭菌之后,加入40ml 25×VB盐储备液。

[0114] 如果要掺入其它组分如碳源,对大部分而言,在高压灭菌之前将这些加至水和琼脂的混合物中。这方面的一个例外是甲醇,其通过0.2微米的过滤装置被过滤除菌,并在基础培养基已经被高压灭菌之后加入。

[0115] 使用的第三种培养基是LB肉汤。每升LB肉汤含有10克胰蛋白胍、5克酵母提取物和10克氯化钠。将所有组分溶解于1升蒸馏水中,并进行高压灭菌。该培养基是水-澄清的,且溶液中含有所有成分。

[0116] 为了用LB基质制备1升固体琼脂板培养基,向1L LB肉汤中加入15克琼脂,并将该混合物进行高压灭菌。

[0117] Corpe和Basile(1982)在含有各种碳源的AMS培养基中进行了PPFM细菌各种菌株的生长的系统研究。许多测试的物质几乎不至不支持PPFM细菌的生长。Corpe和Basile报道甘油和谷氨酸盐是PPFM细菌的相对较好的碳源,并且甲醇、葡萄糖、天冬氨酸盐、琥珀酸盐以及苹果酸盐是PPFM细菌的碳源的中间体。

[0118] 申请人测量了扭脱甲基杆菌(*Methylobacterium extorquens*)在LB平板上以及在补充有各种碳源的AMS和VB平板上的生长。下文列出的碳源全部以每升10克加至AMS或VB基础盐培养基中。此外,对一些包含10克/升蛋白胍的培养基组合物进行测试。将扭脱甲基杆菌在不同琼脂平板上划线,并且将它们在30°C孵育高达两周。将生长测量为菌落变为完整尺寸(直径约2毫米)所需的孵育天数;对于即使在延长孵育之后也未形成完整尺寸的菌落的那些生长条件而言,将菌落评分为中等尺寸的(直径约1毫米)或小尺寸的(直径约0.5毫米或更小)。所有观察到的菌落都是深的、饱和的粉红色,其为PPFM细菌的特征。

[0119] 结果如下:

	VB+天冬氨酸盐	在 9 天为小尺寸
[0120]	VB+琥珀酸盐	在 10 天为小尺寸
	VB+苹果酸盐	在 10 天为小尺寸
	LB	在 9 天为完整尺寸
	AMS+葡萄糖	在 9 天为完整尺寸
	VB+葡萄糖	在 14 天为完整尺寸
	AMS+甲醇	在 6 天为完整尺寸
[0121]	VB+甲醇	在 10 天为中等尺寸
	AMS+谷氨酸盐和蛋白胍	在 5 天为完整尺寸
	AMS+甘油和蛋白胍	在 5 天为完整尺寸
	VB+甘油和蛋白胍	在 6 天为完整尺寸

[0122] PPFM细菌扭脱甲基杆菌在测试的固体琼脂板培养基上的最快且最丰富的生长是在AMS+甘油和蛋白胍或者在AMS+谷氨酸盐和蛋白胍上,紧接着是在AMS+甲醇或者VB+甘油和蛋白胍上。在其它测试的培养基上的生长显著较缓。

[0123] 实施例2.PPFM细菌在澄清的单相液体培养基中的生长

[0124] 对于实施例1中发现的支持PPFM细菌扭脱甲基杆菌最快且最丰富生长的那四种固体琼脂板培养基,制备相应的液体形式(即不加琼脂),并进行测试。如实施例1中所述制备的这四种液体培养基(唯一的例外是它们不含任何琼脂)都是溶液中含有所有成分的水-澄清的液体。

[0125] 向含有100毫升这四种液体培养基的烧瓶中添加PPFM细菌扭脱甲基杆菌的接种物以产生约 $1 \times 10^5$ 个菌落形成单位(CFU)/毫升的初始滴度。将所述烧瓶置于旋转式摇床培养箱装置中,并在30°C下以250rpm生长5天。在5天的孵育结束时,测定烧瓶中PPFM细菌的滴度。结果为:

[0126]

<u>液体培养基</u>	<u>PPFM的初始滴度</u>	<u>5天后PPFM的滴度</u>
AMS+甘油和蛋白胨	$1.4 \times 10^5$	$4.5 \times 10^5$

[0127]

AMS+谷氨酸盐和蛋白胨	$2.0 \times 10^5$	$3.8 \times 10^5$
AMS+甲醇	$1.1 \times 10^5$	$2.1 \times 10^5$
VB+甘油和蛋白胨	$1.7 \times 10^5$	$1.3 \times 10^5$

[0128] 这些结果的惊人方面是:在与PPFM细菌快速且大量生长的这些培养基的固体琼脂平板形式中(如实施例1中所述)存在的严格相同的营养素存在的情况下,PPFM细菌在所有这些水-澄清的液体培养基中的生长极差。事实上,在所有这些烧瓶中,存在极少的或无可见的浑浊(微生物生长的经典指示),并且无任何粉红色迹象。

[0129] 实施例3.PPFM细菌在含有不溶性盐晶体的双相培养基中的生长

[0130] 为了制备双相培养基,通过有意形成磷酸镁和/或磷酸钙的不溶性晶体使液体AMS+甘油和蛋白胨培养基变浑浊(即提供有固体物质)。为了在培养基中有意形成不溶性晶体,将实施例1中所述的制备方法按下述进行改变。在高压灭菌之前,将除微量金属储备液之外的所有组分一起混合。即向940ml蒸馏水中加入各自20ml的储备液I、II和III以及加入10克甘油和10克蛋白胨。高压灭菌之后,通过加入1ml过滤除菌的微量金属储备液来完成所述培养基。对在高压灭菌之前混合在一起的储备液I、II和III的组分进行高压灭菌,导致不溶性盐晶体的形成,推测所述不溶性盐晶体主要是磷酸氢镁和/或磷酸氢钙。高压灭菌之后,通过该制备方法制备的AMS+甘油和蛋白胨培养基获得了含有这些盐晶体的十分浑浊的液体培养基。这一新的液体培养基被命名为“浑浊的AMS+甘油和蛋白胨”。

[0131] 向含有100毫升浑浊的AMS+甘油和蛋白胨的烧瓶中加入PPFM细菌扭脱甲基杆菌的接种物,以产生约 $1 \times 10^5$ 个菌落形成单位(CFU)/毫升的初始滴度。将所述烧瓶置于旋转式摇床培养箱装置中,并在30°C以250rpm生长3天。仅2天之后,所述烧瓶已经形成深的、饱和的粉红色浑浊,显示PPFM细菌的快速且丰富生长。在接种后2天和3天,测定所述烧瓶中PPFM细菌的滴度。结果为:

[0132]

<u>液体培养基</u>	<u>PPFM 的初始滴度</u>	<u>2 天后 PPFM 的滴度</u>	<u>3 天后 PPFM 的滴度</u>
浑浊的 AMS+ 甘油和蛋白胨	$1.7 \times 10^5$	$1.3 \times 10^8$	$1.7 \times 10^9$

[0133] 该结果的两个惊人的方面为PPFM细菌的非常快速的生长,以及它们生长达到的滴度比在澄清的AMS+甘油和蛋白胨的液体培养基中达到的滴度(如实施例2中所示)高于接近10,000倍。

[0134] 实施例4.PPFM细菌在含有硅藻土的液体培养基中的生长。

[0135] 为了测试硅藻土在促进PPFM细菌的快速且大量生长方面是否有效,向AMS+甘油和蛋白胨的液体培养基中加入少量硅藻土。如实施例1中所述的,即通过旨在防止磷酸镁和磷酸钙的不溶性盐晶体形成的制备方法来制备该液体培养基。在高压灭菌之前向水中加入硅藻土。测试的硅藻土的量分别为每升500毫克、1克、1.5克以及2克。这些新的液体培养基被命名为“AMS+甘油和蛋白胨以及硅藻土”。

[0136] 向含有100毫升AMS+甘油和蛋白胨以及硅藻土的烧瓶中加入PPFM细菌扭脱甲基杆菌接种物,以产生约 $1 \times 10^5$ 个菌落形成单位(CFU)/毫升的初始滴度。将所述烧瓶置于旋转式摇床培养箱装置中,并在30°C以250rpm生长3天。仅在两天之后,所述烧瓶已经全部形成深的、饱和的粉红色浑浊,这显示PPFM细菌的快速且大量生长。在接种之后2天和3天,测定所述烧瓶中PPFM细菌的滴度。结果为:

[0137]

<u>液体培养基</u>	<u>PPFM 的初始滴度</u>	<u>2 天后 PPFM 的滴度</u>	<u>3 天后 PPFM 的滴度</u>
AMS+甘油和 蛋白胨以及 500 mg 硅藻土	$1.0 \times 10^5$	$1.8 \times 10^8$	$1.1 \times 10^9$
AMS+甘油和	$1.8 \times 10^5$	$3.0 \times 10^8$	$8.4 \times 10^8$

[0138]

蛋白胨以及 1 克

硅藻土

AMS+甘油和	$1.4 \times 10^5$	$4.0 \times 10^8$	$1.7 \times 10^9$
---------	-------------------	-------------------	-------------------

蛋白胨以及 1.5 克

硅藻土

AMS+甘油和	$1.7 \times 10^5$	$3.4 \times 10^8$	$2.0 \times 10^9$
---------	-------------------	-------------------	-------------------

蛋白胨以及 2 克

硅藻土

[0139] 这一结果的惊人方面为PPFM细菌的非常快速的生长,以及它们生长达到的滴度比澄清的AMS+甘油和蛋白胨的液体培养基中达到的滴度(如实施例2中所示)高于接近10,000倍。生长2天之后获得的数据还显示增加的生长量与每100ml培养物中0.5克至1.5克范围内增加的琼脂量相关。

[0140] 实施例5.不同甲基杆菌在存在或不存在多种固体的培养基中的滴度

[0141] 从DSMZ(Braunschweig,Germany)和ATCC(Manassas,VA,USA)购买了甲基杆菌属的十四种菌株。这14种菌株由12种不同种组成,因为组中有3种扭脱甲基杆菌:

- [0142] 1. DSM-6343 扭脱甲基杆菌
- [0143] 2. DSM-1819 耐辐射甲基杆菌
- [0144] 3. DSM-13060 扭脱甲基杆菌
- [0145] 4. DSM-18172 嗜有机甲基杆菌
- [0146] 5. DSM-1708 嗜中温甲基杆菌
- [0147] 6. DSM-18207 稻甲基杆菌
- [0148] 7. DSM-19779 *methylobacterium phyllosphaerae*
- [0149] 8. ATCC-14718 扭脱甲基杆菌
- [0150] 9. ATCC-14821 玫瑰红甲基杆菌
- [0151] 10. ATCC-21611 罗得西亚甲基杆菌
- [0152] 11. ATCC-35065 藤泽氏甲基杆菌
- [0153] 12. ATCC-43883 扎氏甲基杆菌
- [0154] 13. ATCC-51358 嗜胺甲基杆菌
- [0155] 14. ATCC-700647 硫氰酸盐甲基杆菌

[0156] 对于下文的测试,接种物来自生长于水-澄清的AMS-GP培养基中的培养物。这些培养物生长于200ml水-澄清的AMS-GP培养基中,测定其滴度,然后10倍浓缩。不存在固体基质的这些PPFM培养物被用于接种含有10ml水-澄清的AMS-GP培养基或添加有各种固体基质的AMS-GP培养基的试管。向每个10ml管中加入20mg各种固体基质,从而获得浓度相当于2克/升的固体基质。每个管中的目标初始滴度为约 $1 \times 10^5$ 个PPFM细胞/ml。将接种的试管置于旋

转式摇床装置中,并在30°C以250rpm生长3天。生长3天之后,测定所述培养物的滴度。

[0157] PPFM菌株在水-澄清的AMS-GP液体培养基中的生长

[0158]

		<u>初始滴度</u>	<u>3 天后的滴度(CFU/mL)</u>
DSM-6343	扭脱甲基杆菌	$3.5 \times 10^5$	$1.2 \times 10^6$
DSM-1819	耐辐射甲基杆菌	$1.8 \times 10^5$	$1.3 \times 10^6$
DSM-13060	扭脱甲基杆菌	$3.1 \times 10^5$	$3.2 \times 10^5$
DSM-18172	嗜有机甲基杆菌	$1.4 \times 10^5$	$1.8 \times 10^5$
DSM-1708	嗜中温甲基杆菌	$3.3 \times 10^5$	$1.0 \times 10^5$
DSM-18207	稻甲基杆菌	$1.1 \times 10^5$	$2.2 \times 10^6$
DSM-19779	<i>M. phyllosphaerae</i>	$2.1 \times 10^5$	$1.1 \times 10^6$
ATCC-14718	扭脱甲基杆菌	$2.0 \times 10^5$	$1.7 \times 10^5$
ATCC-14821	玫瑰红甲基杆菌	$4.4 \times 10^5$	$2.9 \times 10^5$
ATCC-21611	罗得西亚甲基杆菌	$1.8 \times 10^5$	$1.4 \times 10^5$
ATCC-35065	藤泽氏甲基杆菌	$1.3 \times 10^5$	$1.9 \times 10^6$
ATCC-43883	扎氏甲基杆菌	$5.0 \times 10^5$	$1.9 \times 10^5$
ATCC-51358	嗜胺甲基杆菌	$9.5 \times 10^4$	$1.7 \times 10^5$
ATCC-700647	硫氨酸盐甲基杆菌	$1.8 \times 10^5$	$7.6 \times 10^4$

[0159] PPFM菌株在含有不溶性盐晶体的浑浊的AMS-GP液体培养基中的生长

[0160]

		初始滴度	3 天后的滴度(CFU/mL)
DSM-6343	扭脱甲基杆菌	$2.5 \times 10^5$	$2.1 \times 10^9$
DSM-1819	耐辐射甲基杆菌	$7.6 \times 10^4$	$6.8 \times 10^8$
DSM-13060	扭脱甲基杆菌	$1.9 \times 10^5$	$4.4 \times 10^8$
DSM-18172	嗜有机甲基杆菌	$1.1 \times 10^5$	$1.9 \times 10^9$
DSM-1708	嗜中温甲基杆菌	$1.4 \times 10^5$	$9.3 \times 10^8$
DSM-18207	稻甲基杆菌	$7.3 \times 10^4$	$2.4 \times 10^8$
DSM-19779	<i>M. phyllosphaerae</i>	$1.8 \times 10^5$	$7.5 \times 10^8$
ATCC-14718	扭脱甲基杆菌	$9.3 \times 10^4$	$2.0 \times 10^9$
ATCC-14821	玫瑰红甲基杆菌	$7.1 \times 10^4$	$7.2 \times 10^8$
ATCC-21611	罗得西亚甲基杆菌	$3.9 \times 10^5$	$6.8 \times 10^8$
ATCC-35065	藤泽氏甲基杆菌	$8.2 \times 10^4$	$2.3 \times 10^8$
ATCC-43883	扎氏甲基杆菌	$1.8 \times 10^5$	$6.2 \times 10^8$
ATCC-51358	嗜胺甲基杆菌	$6.8 \times 10^4$	$1.7 \times 10^9$
ATCC-700647	硫氨酸盐甲基杆菌	$4.3 \times 10^5$	$6.5 \times 10^8$

[0161] 实施例6. 甲基杆菌在乳状液中的生长

[0162] 使10株甲基杆菌PPFM菌株生长于200ml水-澄清的AMS-GP培养基中,测定其滴度,然后10倍浓缩。不存在固体基质的这些PPFM培养物被用于接种含有10ml水-澄清的AMS-GP培养基的试管,所述AMS-GP培养基包含用水-澄清的AMS-FP培养基和油制备的乳状液。对于所述乳状液,加入的油的浓度相当于20毫升/升。每个管中的目标初始滴度为约 $1 \times 10^5$ 个PPFM菌落形成单位/ml。

[0163] 为了制备乳状液,将两个无菌的60毫升鲁尔锁注射器(luer lock syringes)连接至无菌的三通鲁尔锁旋塞阀(3-way luer lock stopcock)(目录号S7521,Sigma-Aldrich Co.,St.Louis,MO)。一个注射器是空的,另一个含有49毫升无菌的水-透明的AMS-GP液体培养基和1毫升无菌油。将液体在所述两个注射器之间有力地来回推动。通过旋塞阀的小孔口的该强有力的混合产生了两种液体的乳状液。

[0164] 将接种的试管置于旋转式摇床装置上并在30°C以250rpm生长3天。

[0165] a. PPFM菌株在被制成含有芝麻油的乳状液的AMS-GP液体培养基(以20毫升/升)中的生长

[0166]

		<u>初始滴度</u>	<u>3天后的滴度 (CFU/mL)</u>
DSM-6343	扭脱甲基杆菌	$3.2 \times 10^5$	$2.2 \times 10^8$
DSM-1819	耐辐射甲基杆菌	$8.2 \times 10^4$	$9.1 \times 10^7$
DSM-13060	扭脱甲基杆菌	$2.9 \times 10^5$	$1.5 \times 10^8$
DSM-18207	稻甲基杆菌	$1.4 \times 10^5$	$2.9 \times 10^8$
DSM-19779	<i>M. phyllosphaerae</i>	$3.5 \times 10^5$	$1.0 \times 10^8$
ATCC-14718	扭脱甲基杆菌	$8.4 \times 10^4$	$2.5 \times 10^8$
ATCC-21611	罗得西亚甲基杆菌	$2.3 \times 10^5$	$3.5 \times 10^8$
ATCC-35065	藤泽氏甲基杆菌	$6.7 \times 10^4$	$8.6 \times 10^7$
ATCC-51358	嗜胺甲基杆菌	$5.7 \times 10^4$	$2.7 \times 10^8$
ATCC-700647	硫氨酸盐甲基杆菌	$8.6 \times 10^4$	$8.6 \times 10^7$

[0167] 生长3天之后,所述乳状液的颜色为深粉色,这显示PPFM在所述乳状液中生长良好。将这些剧烈涡旋,然后测定滴度。获得的PPFM细胞的滴度高于通过使PPFM在澄清的AMS-GP液体培养基中生长所获得的那些滴度(参见实施例5的代表性结果,其中在水澄清的AMS-GP培养基中生长3天的PPFM没有超过 $10^6$ 个菌落形成单位/ml)。

[0168] b.PPFM菌株在被制成含有椰子油的乳状液的AMS-GP液体培养基中(以20毫升/升)的生长

[0169]

		<u>初始滴度</u>	<u>3天后的滴度(CFU/mL)</u>
DSM-6343	扭脱甲基杆菌	$5.7 \times 10^4$	$4.6 \times 10^8$
DSM-1819	耐辐射甲基杆菌	$9.3 \times 10^4$	$5.5 \times 10^7$
DSM-13060	扭脱甲基杆菌	$8.5 \times 10^4$	$3.7 \times 10^8$
DSM-18207	稻甲基杆菌	$2.5 \times 10^5$	$7.8 \times 10^7$
DSM-19779	<i>M. phyllosphaerae</i>	$1.4 \times 10^5$	$5.7 \times 10^8$
ATCC-14718	扭脱甲基杆菌	$3.0 \times 10^5$	$7.1 \times 10^7$
ATCC-21611	罗得西亚甲基杆菌	$6.8 \times 10^4$	$9.3 \times 10^7$
ATCC-35065	藤泽氏甲基杆菌	$8.9 \times 10^4$	$4.5 \times 10^8$
ATCC-51358	嗜胺甲基杆菌	$8.0 \times 10^4$	$9.4 \times 10^7$
ATCC-700647	硫氨酸盐甲基杆菌	$7.5 \times 10^4$	$4.7 \times 10^8$

[0171] 生长3天之后,所述乳状液的颜色为深粉色,这显示PPFM在所述乳状液中生长良好。将这些剧烈涡旋,然后测定滴度。获得的PPFM细胞的滴度高于通过使PPFM在澄清的AMS-GP液体培养基中生长所获得的那些滴度(参见实施例10的代表性结果,其中在水澄清的

AMS-GP培养基中生长3天的PPFM没有超过 $10^6$ 个菌落形成单位/ml)。

[0172] 实施例7. PPFM细菌在受控的生物反应器中的生长

[0173] 在旋转式摇床上孵育的烧瓶中的细菌的生长受生长培养基中碳源的代谢所引起的pH变化的限制。受控的生物反应器(也被称为“发酵罐”或“发酵容器”)通过受控的加入酸或碱(视情况)而将pH维持在期望的水平,从而消除了该限制。可限制细菌生长的另一因素是溶解氧的可用性。受控的生物反应器通过受控的调节进入反应容器的气流、容器的搅拌速率以及容器内的气压将溶解氧维持在适当的水平,从而消除了该限制。

[0174] 通过本文公开的或要求保护的任何方法或者如前述实施例6中所述,当在含有实施例1中所述的AMS+甘油和蛋白胨的液体培养基,进一步补充了第二不可混溶的液体以形成乳状液的受控的生物反应器中生长时,获得的PPFM细菌的最终滴度比烧瓶中所获得的PPFM细菌的最终滴度高至少约10倍或至少约30倍。

[0175] 实施例8. 包含含有甲基杆菌的乳状液的植物种子或叶处理组合物

[0176] 为了获得适于植物种子或叶处理的组合物,通过本文公开的或要求保护的任何方法或者如前述实施例6中所述,将甲基杆菌在乳状液中培养。通常,将甲基杆菌培养至高滴度(即至少约 $5 \times 10^7$ 个菌落形成单位/mL)。然后,收获乳状液中的甲基杆菌。可通过过滤、离心、倾析以及它们的组合实现收获。在某些情况下,可将收获的物质直接应用于种子或植物。在其它情况下,在施用之前,通过冷冻干燥或喷雾干燥等将收获的材料干燥。在施用于植物或种子之前,如果需要或期望,也可将干燥的材料用液体复溶。也可能向包含含有甲基杆菌的乳状液的任何发酵液中或者向收获的甲基杆菌中加入额外的农业上可接受的赋形剂和/或佐剂。添加的赋形剂可包括木粉、粘土、活性炭、硅藻土、细粒无机固体、碳酸钙等。可作为所述组合物中的赋形剂添加的粘土和无机固体包括钙基膨润土、高岭土、瓷土、滑石、珍珠岩、云母、蛭石、硅酸盐、石英粉、蒙脱石以及它们的混合物。可添加至所述组合物的促进对种子或其它植物部分的附着的农业上可接受的佐剂包括聚乙酸乙烯酯、聚乙酸乙烯酯共聚物、水解的聚乙酸乙烯酯、聚乙烯吡咯烷酮-乙酸乙烯酯共聚物、聚乙烯醇、聚乙烯醇共聚物、聚乙烯基甲基醚、聚乙烯基甲基醚-顺丁烯二酸酐共聚物、蜡、乳胶聚合物、包括乙基纤维素和甲基纤维素的纤维素、羟甲基纤维素、羟丙基纤维素、羟甲基丙基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、藻酸盐、糊精、麦芽糊精、多糖、脂肪、油类、蛋白、刺梧桐胶、jaguar胶、黄芪胶、多糖胶、粘液、阿拉伯树胶、虫胶、偏二氯乙烯聚合物和共聚物、基于大豆的蛋白聚合物和共聚物、木质素磺酸盐、丙烯酸共聚物、淀粉、聚乙烯丙烯酸酯/盐、玉米蛋白、明胶、羧甲基纤维素、壳聚糖、聚氧化乙烯、丙烯酰亚胺聚合物和共聚物、聚羟乙基丙烯酸酯/盐、甲基丙烯酰亚胺单体、藻酸盐、乙基纤维素、聚氯丁烯和糖浆剂或者它们的混合物。可促进种子或其它植物部分的涂布的其它有用的农业上可接受的佐剂包括乙酸乙烯酯聚合物和共聚物、聚乙烯吡咯烷酮-乙酸乙烯酯共聚物以及水溶性蜡。这些组合物可以被保持为干燥或半干燥形式或者如需要,可通过添加液体被配制为浆。然后可将所述组合物用于喷洒或涂布植物或种子以获得与将甲基杆菌施用于植物相关的有益效果。

[0177] 参考文献

[0178] Abanda-Nkpwatt, D., M. Musch, J. Tschiersch, M. Boettner, and W. Schwab. 2006. Molecular interaction between *Methylobacterium extorquens* and seedlings: growth promotion, methanol consumption, and localization of the

methanol emission site. *J. Exp. Bot.* 57:4025-4032.

[0179] Cao, Y-R, Wang, Q., Jin, R-X., Tang, S-K., He, W-X., Lai, H-X, Xu, L-H., and C-L Jiang. 2011. *Methylobacterium soli* sp. nov. a methanol-utilizing bacterium isolated from the forest soil. *Antonie van Leeuwenhoek* (2011) 99:629-634.

[0180] Corpe, W.A., and D.V. Basile. 1982. Methanol-utilizing bacteria associated with green plants. *Devel. Industr. Microbiol.* 23:483-493.

[0181] Corpe, W.A., and S. Rheem. 1989. Ecology of the methylotrophic bacteria on living leaf surfaces. *FEMS Microbiol. Ecol.* 62:243-250.

[0182] Green, P.N. 2005. *Methylobacterium*. In Brenner, D. J., N.R. Krieg, and J.T. Staley (eds.). "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume two, The Proteobacteria. Part C, The alpha-, beta-, delta-, and epsilonproteobacteria. "Second edition. Springer, New York. Pages 567-571.

[0183] Green, P.N. 2006. *Methylobacterium*. In Dworkin, M., S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt (eds.). "The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria. Volume 5. Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses. "Third edition. Springer, New York. Pages 257-265.

[0184] Holland, M.A. 1997. *Methylobacterium* and plants. *Recent. Res. Devel. in Plant Physiol.* 1:207-213.

[0185] Holland, M.A., and J.C. Polacco. 1994. PPFMs and other covert contaminants: Is there more to plant physiology than just plant? *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45:197-209.

[0186] Kutschera, U. 2007. Plant-associated methylotrophic bacteria as co-evolved phytosymbionts. A hypothesis. *Plant Signal Behav.* 2:74-78.

[0187] Lidstrom, M.E. 2006. Aerobic methylotrophic prokaryotes. In Dworkin, M., S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt (eds.). "The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria. Volume 2. Ecophysiology and biochemistry. "Third edition. Springer, New York. Pages 618-634.

[0188] Madhaiyan, M., S. Poonguzhali, H. S. Lee, K. Hari, S. P. Sundaram, and T. M. Sa. 2005. Pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria accelerate germination, growth and yield of sugarcane clone Co86032 (*Saccharum officinarum* L.) *Biol. Fertil. Soils* 41:350-358.

[0189] Madhaiyan, M., S. Poonguzhali, M. Senthilkumar, S. Seshadri, H. Chung, J. Yang, S. Sundaram, and T. Sa. 2004. Growth promotion and induction of systemic resistance in rice cultivar CO-47 (*Oryza sativa* L.) by *Methylobacterium* spp. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 45:315-324.

[0190] Madhaiyan, M., S. Poonguzhali, and T. Sa. 2007. Influence of plant species and environmental conditions on epiphytic and endophytic pink-pigmented facultative methylotrophic bacterial populations associated with field-grown rice cultivars. *J Microbiol Biotechnol.* 2007 Oct; 17(10):1645-54.

[0191] Stanier, R.Y., N.J. Palleroni, and M. Doudoroff. 1966. The aerobic pseudomonads: A taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* 43:159-271.

[0192] Sy, A., Giraud, E., Jourand, P., Garcia, N., Willems, A., De Lajudie, P., Prin, Y., Neyra, M., Gillis, M., Boivin-Masson, C., and Dreyfus, B. 2001. Methylo-trophic Methylobacterium Bacteria Nodulate and Fix Nitrogen in Symbiosis with Legumes. *Jour. Bacteriol.* 183(1):214-220,

[0193] Sy, A., A.C.J. Timmers, C. Knief, and J.A. Vorholt. 2005. Methylo-trophic metabolism is advantageous for Methylobacterium extorquens during colonization of Medicago truncatula under competitive conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:7245-7252.

[0194] Vogel, H.J., and D.M. Bonner. 1956. Acetylornithinase of Escherichia coli: Partial purification and some properties. *J. Biol. Chem.* 218:97-106.

[0195] Whittenbury, R., S.L. Davies, and J.F. Wilkinson. 1970. Enrichment, isolation and some properties of methane-utilizing bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 61:205-218.

[0196] 已经阐明并描述了本发明的原则,在不脱离此类原则的情况下,可对本发明的安排和细节进行修改,这对本领域技术人员应当是显而易见的。

[0197] 尽管已经以不同的实施方案和示例性实施例的方式描述了本发明的材料和方法,但是在不脱离本发明的概念、精神和范围的情况下,可对本文描述的材料和方法进行改变,这对本领域技术人员是显而易见的。对本领域技术人员而言显而易见的所有此类类似的替代和修改被认为是在通过所附的权利要求所限定的本发明的精神、范围和概念内。