



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108728362 B

(45) 授权公告日 2021.02.05

(21) 申请号 201810652690.7

(22) 申请日 2018.06.22

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108728362 A

(43) 申请公布日 2018.11.02

(73) 专利权人 广东海洋大学
地址 524088 广东省湛江市麻章区海大路1号

(72) 发明人 汤保贵 徐中文 张金燕 张璐
孙建华

(74) 专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569
代理人 刘奇

(51) Int.Cl.
C12N 1/04 (2006.01)
C12R 1/38 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 105543094 A, 2016.05.04

CN 103664254 A, 2014.03.26

Giulio等.Use of alginate and cryo-protective sugars to improve the viability of lactic acid bacteria after freezing and freeze-drying.《World Journal of Microbiology and Biotechnology》.2005, 第21卷第739-746页.

审查员 王婷

权利要求书1页 说明书8页

(54) 发明名称

一种沼泽红假单胞菌液体制剂的保护剂及其应用

(57) 摘要

本发明涉及光合菌保存领域,提供了一种沼泽红假单胞菌液体制剂的保护剂,包括质量分数0.59%~0.96%的海藻酸钠和pH7.5~8.0的缓冲液。利用本发明提供的保护剂能够有效提高常温下保存的沼泽红假单胞菌液体制剂的有效期,常温保存6个月后沼泽红假单胞菌液体制剂依旧存在有效活菌。

1. 沼泽红假单胞菌液体制剂的保护剂在沼泽红假单胞菌液体制剂常温和/或暗环境下保存中提高沼泽红假单胞菌菌体悬浮性,防止结块下沉,稳定溶液pH值的应用,所述保护剂占沼泽红假单胞菌液体制剂总体积的11%~32%;所述保护剂为质量分数0.75%~0.87%的海藻酸钠和pH7.5~8.0的缓冲液;所述缓冲液的摩尔浓度为0.004~0.041mol/L。

2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述缓冲液的摩尔浓度为0.013~0.025mol/L。

3. 根据权利要求1或2所述的应用,其特征在于,所述pH7.5~8.0的缓冲液选自磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液、磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液、磷酸氢二钠-磷酸二氢钾缓冲液或磷酸二氢钾-氢氧化钠缓冲液。

4. 根据权利要求3所述的应用,其特征在于,当所述缓冲液为磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液时,pH值为8.0。

一种沼泽红假单胞菌液体制剂的保护剂及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及光合细菌保存技术领域,具体涉及一种沼泽红假单胞菌液体制剂的保护剂及其应用,和一种沼泽红假单胞菌液体菌剂。

背景技术

[0002] 沼泽红假单胞菌,属于光合细菌(PSB),是地球上出现最早、自然界中普遍存在、具有原始光能合成体系的原核生物之一,能在厌氧条件下进行不产氧的光合作用。沼泽红假单胞菌广泛分布于自然界的土壤、水田、沼泽、湖泊、江海等处,主要分布于水生环境中光线能透射到的水层。

[0003] 沼泽红假单胞菌能够降解水体中的亚硝酸盐、硫化物等有毒物质,调节pH,并使氨氮、亚硝酸态氮、硝酸态氮含量降低,池底淤泥蓄积量减少,有益于藻类和微型生物数量的增加,使水体得以净化。此外,沼泽红假单胞菌还含有碳素储存物质糖原和聚 β -羟基丁酸、辅酶Q、抗病毒物质和生长促进因子,具有很高的营养价值。沼泽红假单胞菌在水产养殖业上有着非常普遍的应用。

[0004] 目前,渔用市场上沼泽红假单胞菌存在的主要问题是,在常温保藏时,夜晚或者黑暗条件下,菌体无法进行正常同化合成代谢,呼吸作用会消耗能量、产生 CO_2 ,导致液体制剂产品较长时间在常温下保存时会出现pH值下降、活力降低,菌体结块并下沉死亡的问题。

[0005] 李大列等研究显示,在渔用荚膜红单胞菌商品液中添加0.5%甘油和0.5g/L维生素C可提高保存效果(李大列,黎建斌.渔用荚膜红假单胞菌商品保存技术[J].河北渔业,2017(7):9-12.)。但是关于沼泽红假单胞菌液体制剂如何在常温下长期保存未见报道。

发明内容

[0006] 本发明为了解决现有技术中沼泽红假单胞菌液体制剂常温和/或暗环境下保存时间短的问题,提供了一种沼泽红假单胞菌液体制剂的保护剂,能够延长常温下沼泽红假单胞菌液体制剂的保存时间。

[0007] 为了解决上述问题,本发明提供了以下技术方案:

[0008] 本发明提供了一种沼泽红假单胞菌液体制剂的保护剂,包括质量分数0.59%~0.96%的海藻酸钠和pH7.5~8.0的缓冲液。

[0009] 优选的,所述保护剂中海藻酸钠的质量分数为0.75%~0.87%。

[0010] 优选的,所述缓冲液的摩尔浓度为0.004~0.041mol/L。

[0011] 优选的,所述缓冲液的摩尔浓度为0.013~0.025mol/L。

[0012] 优选的,所述pH7.5~8.0的缓冲液选自磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液、磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液、磷酸氢二钠-磷酸二氢钾缓冲液或磷酸二氢钾-氢氧化钠缓冲液。

[0013] 优选的,当所述缓冲液为磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液时,pH值为8.0。

[0014] 本发明还提供了上述技术方案所述保护剂在沼泽红假单胞菌液体制剂常温和/或暗环境下保存中的应用,所述保护剂占沼泽红假单胞菌液体菌剂总体积的11%~32%。

[0015] 本发明提供了上述技术方案所述保护剂在沼泽红假单胞菌液体制剂常温和/或暗环境下保存中的应用。

[0016] 本发明还提供了一种沼泽红假单胞菌液体菌剂,包括沼泽红假单胞菌液和前述技术方案所述的保护剂。

[0017] 优选的,所述保护剂占沼泽红假单胞菌液体菌剂总体积的11%~32%。

[0018] 优选的,所述沼泽红假单胞菌液体菌剂的活菌数为 $2.4 \times 10^9 \sim 8.0 \times 10^9$ cfu/L。

[0019] 与现有技术相比,本发明提供的技术方案具有以下优点:

[0020] 本发明提供了一种沼泽红假单胞菌液体制剂的保护剂,包括一种沼泽红假单胞菌液体制剂的保护剂,包括质量分数0.59%~0.96%的海藻酸钠和pH7.5~8.0的缓冲液。pH7.5~8.0的缓冲液能够为沼泽红假单胞菌提供适宜的pH环境,缓冲液能够有效防止液体制剂的pH显著变化,从而减少因环境pH值降低导致的沼泽红假单胞菌死亡。同时,海藻酸钠能够增强沼泽红假单胞菌的菌体悬浮性,防止结块下沉(菌体快速结块下沉会加速沼泽红假单胞菌的死亡速度)。利用本发明提供的保护剂能够有效提高常温下保存的沼泽红假单胞菌液体制剂的有效期,常温保存6个月后沼泽红假单胞菌液体菌剂依旧存在有效活菌。

[0021] 在本发明的一些具体实施例中,本发明对所述保护剂中的海藻酸钠和缓冲液的浓度进行了限定。试验表明,未添加本发明所述保护剂的沼泽红假单胞菌液体制剂常温保存3个月后活菌数降低一半以上,6个月无有效活菌数;而添加本发明所述优选技术方案保护剂的液体制剂则在常温保存3个月后活菌数为原有效活菌数的80%以上,6个月后活菌数能够达到原有的39~42%。

具体实施方式

[0022] 本发明提供了一种沼泽红假单胞菌液体制剂的保护剂,包括质量分数0.59%~0.96%的海藻酸钠和pH7.5~8.0的缓冲液。

[0023] 在本发明中,所述海藻酸钠在保护剂中的浓度优选为质量分数0.75%~0.87%,更优选为0.78%~0.82%。所述海藻酸钠在保护剂中主要起到提高沼泽红假单胞菌菌体悬浮性的作用,防止结块下沉,以延缓沼泽红假单胞菌因菌体结块导致的死亡。海藻酸钠的浓度过高或过低均无法达到显著的菌体保护作用。

[0024] 在本发明中,所述pH7.5~8.0的缓冲液浓度优选为0.004~0.041mol/L,更优选为0.013~0.025mol/L。所述pH7.5~8.0的缓冲液在保护剂中主要起到稳定溶液pH值的作用,提供pH缓冲作用,防止液体制剂的pH值发生显著变化。

[0025] 由于沼泽红假单胞菌是一种厌氧的光合细菌,其在常温、夜晚或黑暗环境下无法进行正常的同化合成代谢,随着贮存时间的延长呼吸作用会消耗大量的菌体中养分并产生二氧化碳,在封闭的制剂容器中溶液的pH值将不断降低,而沼泽红假单胞菌在较低的pH值下存活能力较差,因而导致沼泽红假单胞菌的液体制剂室温下长期贮存活菌数会显著减少。pH7.5~8.0的缓冲液针对沼泽红假单胞菌的代谢产物和常温和/或暗环境下溶液pH值迅速降低的代谢情况进行pH缓冲,以确保在较长时间内液体制剂的pH值稳定在7.0左右。

[0026] 在本发明中,所述pH7.5~8.0的缓冲液选自磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液、磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液、磷酸氢二钠-磷酸二氢钾缓冲液或磷酸二氢钾-氢氧化钠缓冲液。作为更优选的技术方案,本发明选用pH 8.0的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液。

[0027] 本发明对所述海藻酸钠、pH7.5~8.0的缓冲液的来源无特殊限定,缓冲液可以自行配置也可以采用市售商品。

[0028] 本发明对所述沼泽红假单胞菌液体制剂的保护剂制备方法无特殊限定,只要能够达到本发明限定的成分浓度即可。

[0029] 具体的,本发明所述保护剂可以按照下述方法配制:

[0030] 1) 配制pH7.5~8.0的缓冲液;

[0031] 2) 配制质量分数1%的海藻酸钠水溶液;

[0032] 3) 按照海藻酸钠溶液与pH7.5~8.0缓冲液体积比为10~25:1~7的比例混合,得到所述沼泽红假单胞菌液体制剂的保护剂。

[0033] 所述步骤1)和2)之间无时间先后顺序。

[0034] 本发明对海藻酸钠、缓冲液原料的来源无特殊限定,采用市售商品即可。

[0035] 本发明提供了上述技术方案所述保护剂在沼泽红假单胞菌液体制剂常温或暗环境下保存中的应用,所述保护剂占沼泽红假单胞菌液体菌剂总体积的11%~32%。具体的,本发明所述的保护剂能够延长沼泽红假单胞菌液体制剂在常温下和/或暗环境下的保存时间。

[0036] 本发明还提供了一种沼泽红假单胞菌液体菌剂,包括沼泽红假单胞菌液和上述技术方案所述的保护剂。该沼泽红假单胞菌液体制剂在常温和/或暗环境下有更长的保存时间长,常温保存6个月后还有沼泽红假单胞菌存活。

[0037] 在本发明更为优选的技术方案中,添加本发明所述的保护剂所得的沼泽红假单胞菌液体菌剂常温保存6个月依旧含有原菌剂39%~42%的有效活菌数。

[0038] 在本发明中,所述保护剂占沼泽红假单胞菌液体菌剂总体积的11%~32%,即所述沼泽红假单胞菌液体菌剂中海藻酸钠的质量分数在0.1%~0.25%。更优选的,所述保护剂占沼泽红假单胞菌液体菌剂总体积的18~25%,即所述沼泽红假单胞菌液体菌剂中海藻酸钠的质量分数在0.15%~0.20%。

[0039] 在本发明的一些优选技术方案中,当所述保护剂中pH7.5~8.0的缓冲液浓度为0.004mol/L~0.041mol/L时,所述沼泽红假单胞菌液体菌剂中pH7.5~8.0的缓冲液浓度为0.001mol/L~0.007mol/L。当所述pH7.5~8.0的缓冲液浓度更优选为0.013mol/L~0.025mol/L时,所述沼泽红假单胞菌液体菌剂中pH7.5~8.0的缓冲液浓度为0.003mol/L~0.005mol/L。

[0040] 在本发明中,所述沼泽红假单胞菌液体菌剂的活菌数为 $2.4 \times 10^9 \sim 8.0 \times 10^9$ cfu/L,其常温下放置6个月后的活菌数大约在 $0.9 \times 10^9 \sim 3.4 \times 10^9$ cfu/L,有效地延长了沼泽红假单胞菌液体菌剂的有效期,延长其作用时间。

[0041] 在本发明中,所述沼泽红假单胞菌液除沼泽红假单胞菌外,优选的还可以包括培养基和液体制剂辅料。本发明对所述培养基和液体制剂辅料的来源和种类无特殊限定,采用本领域常用的微生物液体制剂的辅料以及适宜沼泽红假单胞菌生长的培养基即可。

[0042] 本发明对所述沼泽红假单胞菌液的来源无特殊限定,采用市售液体菌剂即可。

[0043] 为了进一步说明本发明,下面结合实施例对本发明提供的技术方案进行详细地描述,但不能将它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0044] 实施例1沼泽红假单胞菌的保护剂

[0045] 将28.4g磷酸氢二钠和19.2g柠檬酸溶于1L水中,配制成0.1M、pH8.0的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液;将10g海藻酸钠溶于1L水中,配制成质量分数1%的海藻酸钠溶液。将海藻酸钠溶液与pH8.0的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液的体积比3:15的比例混合,得到本发明所述沼泽红假单胞菌液体制剂的保护剂。

[0046] 所述保护剂中,海藻酸钠的质量分数为0.83%,pH8.0的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液浓度为0.016mol/L。

[0047] 实施例2沼泽红假单胞菌的保护剂

[0048] 除海藻酸钠溶液与磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液的体积比为5:15外,其他均与实施例1相同。

[0049] 所述保护剂中,海藻酸钠的质量分数为0.75%,pH8.0的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液浓度为0.025mol/L。

[0050] 实施例3沼泽红假单胞菌的保护剂

[0051] 除海藻酸钠溶液与磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液的体积比为3:20外,其他均与实施例1相同。

[0052] 所述保护剂中,海藻酸钠的质量分数为0.87%,pH8.0的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液浓度为0.013mol/L。

[0053] 实施例4沼泽红假单胞菌的保护剂

[0054] 除海藻酸钠溶液与磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液的体积比为5:20外,其他均与实施例1相同。

[0055] 所述保护剂中,海藻酸钠的质量分数为0.80%,pH8.0的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液浓度为0.020mol/L。

[0056] 实施例5沼泽红假单胞菌液体菌剂

[0057] 除海藻酸钠溶液与磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液的体积比为10:1外,其他均与实施例1相同。

[0058] 将市售渔用沼泽红假单胞菌液态制剂配制成有效活菌数为 5.30×10^9 cfu/L的沼泽红假单胞菌菌液。

[0059] 取上述制备得到的保护剂,与有效活菌数为 5.30×10^9 cfu/L的沼泽红假单胞菌菌液按照体积比11:89的比例混合,得到有效活菌数为 4.27×10^9 cfu/L的沼泽红假单胞菌液体菌剂。

[0060] 实施例6沼泽红假单胞菌液体菌剂

[0061] 除海藻酸钠溶液与磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液的体积比为10:3外,其他均与实施例1相同。

[0062] 将市售渔用沼泽红假单胞菌液态制剂配制成有效活菌数为 5.42×10^9 cfu/L的沼泽红假单胞菌菌液。

[0063] 取上述制备得到的保护剂,与有效活菌数为 5.42×10^9 cfu/L的沼泽红假单胞菌菌液按照体积比13:87的比例混合,得到有效活菌数为 4.27×10^9 cfu/L的沼泽红假单胞菌液体菌剂。

[0064] 实施例7沼泽红假单胞菌液体菌剂

[0065] 除海藻酸钠溶液与磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液的体积比为10:5外,其他均与实施

例1相同。

[0066] 将市售渔用沼泽红假单胞菌液态制剂配制成有效活菌数为 5.55×10^9 cuf/L的沼泽红假单胞菌菌液。

[0067] 取上述制备得到的保护剂,与有效活菌数为 5.55×10^9 cuf/L的沼泽红假单胞菌菌液按照体积比15:85的比例混合,得到有效活菌数为 4.27×10^9 cuf/L的沼泽红假单胞菌液体菌剂。

[0068] 实施例8沼泽红假单胞菌液体菌剂

[0069] 除海藻酸钠溶液与磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液的体积比为10:7外,其他均与实施例1相同。

[0070] 将市售渔用沼泽红假单胞菌液态制剂配制成有效活菌数为 5.69×10^9 cuf/L的沼泽红假单胞菌菌液。

[0071] 取上述制备得到的保护剂,与有效活菌数为 5.69×10^9 cuf/L的沼泽红假单胞菌菌液按照体积比17:83的比例混合,得到有效活菌数为 4.27×10^9 cuf/L的沼泽红假单胞菌液体菌剂。

[0072] 实施例9沼泽红假单胞菌液体菌剂

[0073] 除海藻酸钠溶液与磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液的体积比为15:1外,其他均与实施例1相同。

[0074] 将市售渔用沼泽红假单胞菌液态制剂配制成有效活菌数为 5.62×10^9 cuf/L的沼泽红假单胞菌菌液。

[0075] 取上述制备得到的保护剂,与有效活菌数为 5.62×10^9 cuf/L的沼泽红假单胞菌菌液按照体积比16:84的比例混合,得到有效活菌数为 4.27×10^9 cuf/L的沼泽红假单胞菌液体菌剂。

[0076] 实施例10沼泽红假单胞菌液体菌剂

[0077] 将市售渔用沼泽红假单胞菌液态制剂配制成有效活菌数为 6.56×10^9 cuf/L的沼泽红假单胞菌菌液。

[0078] 取实施例1制备得到的保护剂,与有效活菌数为 6.56×10^9 cuf/L的沼泽红假单胞菌菌液按照体积比18:72的比例混合,得到有效活菌数为 4.27×10^9 cuf/L的沼泽红假单胞菌液体菌剂。

[0079] 实施例11沼泽红假单胞菌液体菌剂

[0080] 将市售渔用沼泽红假单胞菌液态制剂配制成有效活菌数为 5.90×10^9 cuf/L的沼泽红假单胞菌菌液。

[0081] 取实施例2制备得到的保护剂,与有效活菌数为 5.90×10^9 cuf/L的沼泽红假单胞菌菌液按照体积比20:80的比例混合,得到有效活菌数为 4.27×10^9 cuf/L的沼泽红假单胞菌液体菌剂。

[0082] 实施例12沼泽红假单胞菌液体菌剂

[0083] 将市售渔用沼泽红假单胞菌液态制剂配制成有效活菌数为 6.13×10^9 cuf/L的沼泽红假单胞菌菌液。

[0084] 取实施例3制备得到的保护剂,与有效活菌数为 6.13×10^9 cuf/L的沼泽红假单胞菌菌液按照体积比23:77的比例混合,得到有效活菌数为 4.27×10^9 cuf/L的沼泽红假单胞

菌液体菌剂。

[0085] 实施例13沼泽红假单胞菌液体菌剂

[0086] 将市售渔用沼泽红假单胞菌液态制剂配制成有效活菌数为 6.29×10^9 cuf/L的沼泽红假单胞菌菌液。

[0087] 取实施例4制备得到的保护剂,与有效活菌数为 6.29×10^9 cuf/L的沼泽红假单胞菌菌液按照体积比25:75的比例混合,得到有效活菌数为 4.27×10^9 cuf/L的沼泽红假单胞菌液体菌剂。

[0088] 实施例14沼泽红假单胞菌液体菌剂

[0089] 除海藻酸钠溶液与磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液的体积比为15:7外,其他均与实施例1相同。

[0090] 将市售渔用沼泽红假单胞菌液态制剂配制成有效活菌数为 6.05×10^9 cuf/L的沼泽红假单胞菌菌液。

[0091] 取上述制备得到的保护剂,与有效活菌数为 6.05×10^9 cuf/L的沼泽红假单胞菌菌液按照体积比22:78的比例混合,得到有效活菌数为 4.27×10^9 cuf/L的沼泽红假单胞菌液体菌剂。

[0092] 实施例15沼泽红假单胞菌液体菌剂

[0093] 除海藻酸钠溶液与磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液的体积比为20:1外,其他均与实施例1相同。

[0094] 将市售渔用沼泽红假单胞菌液态制剂配制成有效活菌数为 5.97×10^9 cuf/L的沼泽红假单胞菌菌液。

[0095] 取上述制备得到的保护剂,与有效活菌数为 5.97×10^9 cuf/L的沼泽红假单胞菌菌液按照体积比21:79的比例混合,得到有效活菌数为 4.27×10^9 cuf/L的沼泽红假单胞菌液体菌剂。

[0096] 实施例16沼泽红假单胞菌液体菌剂

[0097] 除海藻酸钠溶液与磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液的体积比为20:7外,其他均与实施例1相同。

[0098] 将市售渔用沼泽红假单胞菌液态制剂配制成有效活菌数为 6.46×10^9 cuf/L的沼泽红假单胞菌菌液。

[0099] 取上述制备得到的保护剂,与有效活菌数为 6.46×10^9 cuf/L的沼泽红假单胞菌菌液按照体积比27:73的比例混合,得到有效活菌数为 4.27×10^9 cuf/L的沼泽红假单胞菌液体菌剂。

[0100] 实施例17沼泽红假单胞菌液体菌剂

[0101] 除海藻酸钠溶液与磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液的体积比为25:1外,其他均与实施例1相同。

[0102] 将市售渔用沼泽红假单胞菌液态制剂配制成有效活菌数为 6.38×10^9 cuf/L的沼泽红假单胞菌菌液。

[0103] 取上述制备得到的保护剂,与有效活菌数为 6.38×10^9 cuf/L的沼泽红假单胞菌菌液按照体积比26:74的比例混合,得到有效活菌数为 4.27×10^9 cuf/L的沼泽红假单胞菌液体菌剂。

[0104] 实施例18沼泽红假单胞菌液体菌剂

[0105] 除海藻酸钠溶液与磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液的体积比为25:3外,其他均与实施例1相同。

[0106] 将市售渔用沼泽红假单胞菌液态制剂配制成有效活菌数为 6.46×10^9 cfu/L的沼泽红假单胞菌菌液。

[0107] 取上述制备得到的保护剂,与有效活菌数为 6.46×10^9 cfu/L的沼泽红假单胞菌菌液按照体积比27:73的比例混合,得到有效活菌数为 4.27×10^9 cfu/L的沼泽红假单胞菌液体菌剂。

[0108] 实施例19沼泽红假单胞菌液体菌剂

[0109] 除海藻酸钠溶液与磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液的体积比为25:5外,其他均与实施例1相同。

[0110] 将市售渔用沼泽红假单胞菌液态制剂配制成有效活菌数为 6.72×10^9 cfu/L的沼泽红假单胞菌菌液。

[0111] 取上述制备得到的保护剂,与有效活菌数为 6.72×10^9 cfu/L的沼泽红假单胞菌菌液按照体积比30:70的比例混合,得到有效活菌数为 4.27×10^9 cfu/L的沼泽红假单胞菌液体菌剂。

[0112] 实施例20沼泽红假单胞菌液体菌剂

[0113] 除海藻酸钠溶液与磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液的体积比为25:7外,其他均与实施例1相同。

[0114] 将市售渔用沼泽红假单胞菌液态制剂配制成有效活菌数为 6.94×10^9 cfu/L的沼泽红假单胞菌菌液。

[0115] 取上述制备得到的保护剂,与有效活菌数为 6.94×10^9 cfu/L的沼泽红假单胞菌菌液按照体积比32:68的比例混合,得到有效活菌数为 4.27×10^9 cfu/L的沼泽红假单胞菌液体菌剂。

[0116] 对比例

[0117] 将市售渔用沼泽红假单胞菌液态制剂配制成有效活菌数为 4.27×10^9 cfu/L的沼泽红假单胞菌液体菌剂,作为空白对照。

[0118] 实施例21

[0119] 本次试验对本发明所述保护剂对沼泽红假单胞菌液体制剂的常温保存效果进行验证:

[0120] 分别取等量的实施例4~20和对比例制备得到的沼泽红假单胞菌液体菌剂,测定其有效活菌数。其后将各组沼泽红假单胞菌液体菌剂在20~25℃下放置于同一环境下保存,分别在保存3个月、6个月后测定其有效活菌数。所述有效活菌数测定的方法为平板菌落计数法。

[0121] 试验结果如表1所示:

[0122] 表1常温下保存各组沼泽红假单胞菌液体菌剂的有效活菌数

[0123]

| 组别 | 保护剂 | | 保护剂在沼泽红假单胞菌液体菌剂中所占体积 (%) | 有效活菌数 ($\times 10^9$) | | |
|--------|-----------------------|--------------------------------------|--------------------------|-------------------------|------|------|
| | 1%海藻酸钠溶液在保护剂中所占体积 (%) | 0.1M pH8.0 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液在保护剂中所占体积 (%) | | 0 个月 | 3 个月 | 6 个月 |
| 实施例 5 | 10 | 1 | 11 | 4.27 | 2.52 | 0.93 |
| 实施例 6 | | 3 | 13 | 4.27 | 2.63 | 1.02 |
| 实施例 7 | | 5 | 15 | 4.27 | 2.67 | 1.14 |
| 实施例 8 | | 7 | 17 | 4.27 | 2.39 | 0.85 |
| 实施例 9 | 15 | 1 | 16 | 4.27 | 2.84 | 1.99 |
| 实施例 10 | | 3 | 18 | 4.27 | 3.16 | 2.59 |
| 实施例 11 | | 5 | 20 | 4.27 | 3.29 | 2.51 |
| 实施例 12 | | 7 | 22 | 4.27 | 3.21 | 2.43 |
| 实施例 13 | 20 | 1 | 21 | 4.27 | 2.9 | 1.97 |
| 实施例 14 | | 3 | 23 | 4.27 | 3.42 | 2.44 |
| 实施例 15 | | 5 | 25 | 4.27 | 3.31 | 2.6 |
| 实施例 16 | | 7 | 27 | 4.27 | 3.35 | 2.33 |
| 实施例 17 | 25 | 1 | 26 | 4.27 | 2.45 | 0.87 |
| 实施例 18 | | 3 | 28 | 4.27 | 2.59 | 0.77 |
| 实施例 19 | | 5 | 30 | 4.27 | 2.37 | 0.81 |
| 实施例 20 | | 7 | 32 | 4.27 | 2.48 | 0.69 |
| 对比例 | 0 | 0 | 0 | 4.27 | 2.06 | 0 |

[0124] 结果表明：实施例5~20的沼泽红假单胞菌液体菌剂在常温下贮存6个月后均能够保留一定的有效活菌数，而对比例未加入任何的保护剂成分，常温下贮存6个月后产品中检测不出活菌；实施例10、11、14、15的沼泽红假单胞菌液体菌剂在常温下保存3个月、6个月后保留的有效活菌数显著高于其他实施例，即表明由海藻酸钠质量分数0.75%~0.87%和浓度为0.013~0.025mol/L、pH8.0的缓冲液组成的保护剂保护效果更佳。由此可见，采用本发明提供的保护剂能够有效延缓沼泽红假单胞菌液体菌剂的保存时间，有助于其常温保存。

[0125] 以上所述仅是本发明的优选实施方式，应当指出，对于本技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明原理的前提下，还可以做出若干改进和润饰，这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。