



[12] 发明专利申请公开说明书

[11] CN 86 1 08366 A

[43] 公开日 1987年8月19日

(21) 申请号 86 1 08366

(22) 申请日 86.12.6

(30) 优先权

(32)85.12.6 (33)US (31)806.037

(32)86.6.30 (33)US (31)879.902

(71) 申请人 阿格拉塞特斯

地址 美国威斯康星 53562.米德尔顿大学草地 8520 号

(72) 发明人 旦尼斯·E·麦克卡布

布瑞思 J·马丁内尔

阿兰波欧罗瑞 L·加拉汉-威斯

(74) 专利代理机构 上海专利事务所

代理人 夏晓 张琦霞

(54) 发明名称 田野作物的微生物接种剂的生产

(57) 摘要

本发明是一种生产农用微生物接种剂的方法。它涉及制备一种由磨细蛭石、营养物和水所组成的培养基。而且也揭示了小麦粉是真菌培养物较佳的营养素。具体方法是将培养基放在容器内,然后进行消毒和用微生物培养物接种,并使后者在容器内繁殖。所得产品既能以湿态使用,也可使之在空气中干燥,以便于使用和贮存。若产品是在潮湿状态下使用,则可采用塑料袋作为容器,以使发酵配方和包装均可一步完成。

权 利 要 求 书

1.一种农田作物微生物接种剂的生产方法，它包括下列步骤：

将含有磨细的颗粒载体、一定量营养物 and 水的培养基放入培养物容器内：

使容器内的培养基接种含有微生物接种剂培养物；

将容器贮存在适合微生物生长的条件下，以使微生物培养物在容器内的培养基上繁殖和成熟。

2.如权利要求1所述的方法，其中营养物是面粉。

3.如权利要求2所述的方法，其中面粉是原色的白小麦粉。

4.如权利要求2所述的方法，其中面粉与颗粒载体的干重比为1.3%至9%。

5.如权利要求4所述的方法，其中面粉与颗粒载体的干重比约为1.3%。

6.如权利要求4所述的方法，其中水与颗粒载体的重量比约为60%。

7.如权利要求1所述的方法，其中颗粒载体是蛭石。

8.如权利要求7所述的方法，其中蛭石系磨细成粒径大致在40目以下的物料。

9.如权利要求1所述的方法，它还包括在接种前对盛有培养基的培养物容器进行灭菌。

10.如权利要求8所述的方法，其中灭菌处理系在高压消毒蒸锅中进行。

11.如权利要求1所述的方法，它还包括在贮存前打开容器，使培养物在室温下进行空气干燥。

12. 如权利要求11所述的方法，其中贮存时间至少为30天。
13. 由权利要求11所述的方法产生的一种农业用干燥微生物接种剂。
14. 如权利要求1所述的方法，其中微生物接种剂是真菌。
15. 如权利要求1所述的方法，其中微生物接种剂是细菌。
16. 如权利要求15所述的方法，其中所说细菌是根瘤菌属的一种菌株。
17. 如权利要求1所述的方法，其中培养物容器是塑料袋。
18. 由权利要求1所述的方法生产的一种农用微生物接种剂。
19. 一种农田作物微生物接种剂的制备方法，它包括下列步骤：
将一定量磨细的蛭石放入塑料袋中；
再将含有水和微生物营养物的培养基加到袋内蛭石中，
使袋内所装的物料接种微生物培养物；
将塑料袋严加密封，
将塑料袋保存在室温条件下，以使微生物培养物在袋内培养基中繁殖。
20. 如权利要求19所述的方法，其中蛭石系磨成小于40目的粒子。
21. 如权利要求19所述的方法，它还包括在加入培养基前，对装有蛭石的塑料袋进行消毒灭菌。
22. 如权利要求19所述的方法，其中添加培养基和接种袋内物料的步骤是通过将一些微生物培养物用营养液调稀，然后将微生物培养物和营养液一起装入袋内而实现。
23. 如权利要求19所述的方法，它还包括提供用作接种剂的袋装微生物培养物。
24. 如权利要求19所述的方法，其中微生物接种剂是细菌。
25. 如权利要求24所述的方法，其中所说细菌是根瘤菌属的一种

菌株。

26. 一种由权利要求19所述的方法生产的一种农用微生物接种剂。

27. 一种用于培养微生物的培养基，它包括磨细的蛭石、水和适量面粉，其中面粉的用量为蛭石的1.0%-9%(干重百分比)。

28. 如权利要求27所述的培养基，其中所说蛭石系磨成小于40目的粒子。

29. 如权利要求27所述的培养基，其中所说适量水约为蛭石用量的60%(重量百分数)。

30. 如权利要求27所述的方法，其中所说面粉是原色白小麦粉。

31. 如权利要求27所述的方法，其中所说适量面粉约为蛭石用量的1.3%(干重百分比)。

田野作物的微生物接种剂的生产

本申请为1985年12月6号申请的美国专利申请 S. N. 806,037 的继续申请部分。

本发明一般地涉及到生产大量稳定的可贮藏的存活的微生物材料的方法，特别涉及到适宜用作农业田野作物接种剂以提高作物产量的干燥的稳定的微生物制剂配方的方法。

长期以来，人们懂得并用于农业实践的是，某些生物（即微生物）的接种剂可用于某些特定的选择的作物物种以促进这些物种的作物的生长或有助于那些对特定的致病微生物有抗病性的作物的生存。此外，当前的研究资料表明，有几种根部繁殖的微生物能用于促进显花作物的生长或者用作致病有机体的拮抗剂，从而提高作物的产量。参见 Schroth 和 Hancock 著的“抑制疾病土壤及根部繁殖细胞”，《科学》（《Science》），Vol. 216, p p .1376-1381 (1982)。最早建立的微生物接种剂的运用方法最常用的是在种植时用根瘤细菌属（Rhizobium）培养物对大豆及其他豆科植物进行细菌接种，以使根瘤细菌在大豆或其它豆科植物的根部的小瘤中形成菌落，在根瘤中，这些细菌将共生固氮而对细菌及作物都有利。目前这种接种可通过几种技术来完成，但是没有一种适合于各种目的的方法。目前实践中所用的技术包括对种子进行涂层或在种植的种子或作物上撒上接种剂或者在种植的种子农田上播撒潮湿的活的接种剂。

过去人们曾作过有意义的努力以使制备的作物细菌接种剂产品最佳化，特别集中于根瘤细菌接种剂。制备这样的接种剂的典型方法通

常既需要一个发酵过程以生产出足够数量的细菌，又需要一个稳定或配方过程以获得稳定的成熟细菌，在无活性的状态下便于贮藏及装运或者以活性培养物配成细菌配方以便直接施于田间。在现有技术中，典型地说，发酵与配方过程被认为是有很大区别的，需要一种或多种处理或者加工操作以成功地将存活的细菌从发酵转到配方。此外，在现有技术中，存活的根瘤细菌培养物的载体是泥炭。由于泥炭难以灭菌而产生微生物污染，由于在灭菌过程中泥炭产生有毒的物质，所以在泥炭中直接培养至今不被认为是可行的，因而，当采用泥炭载体时通常要把发酵过程与配方过程明确分开。

农业领域有些人认为，其他非根瘤细菌微生物能够促进普通作物的生长。例如，在现有技术中已经知道许多真菌是与某些具有维管束的植物或木本植物的根部相联合的。真菌与植物的这种类型的联合尚没有很好地加以鉴定，对于这些联合真菌学家们是将它们确定为共生性还是称作为致病性更为合适还不十分清楚和取得一致意见。尽管对于这样的联合不甚了解，但真菌与植物根部产生的这种联合常常被称作菌根联合。

现在有人专门地报导说，一些特定的真菌或菌株具有成为某些其他植物病原体的拮抗剂的能力。例如，有人报导，真菌剂 *Talaromyces flavus* 在茄子的栽培过程中具有成为真菌病原体 *Verticillium dahliae* 的拮抗剂的能力。参见，Marios, 等著的“大田中的茄子 *Solanum- Melongena* 的轮枝孢菌萎蔫病的生物防治”，刊于《植物病害》(《Plant Disease》), 66:12, 1166-1168 页 (1982)。据报导另一些真菌种有相似的作用。Papivizas 著的“木霉 (*Trichoderma- Harzianum*) 在土壤和豌豆栽培品系 Perfect id-Freezer) 和菜豆栽培品系 Blue-lake 中的生存”，刊于《植物病理学》72:1 122-125 页 (1982)。美国专利第 4,259,317 号公开了一种保

护糖甜菜免受寄生性真菌引起的枯萎的制剂，其中包括采用寡雄腐霉 (*Pythium Oligandrum*) 作为接种剂用于糖甜种子以防止其他真菌对植物伤害的运用。

采用真菌作为作物接种剂的一个难点是难于繁殖和大量生产可繁殖的真菌材料。真菌培养技术尚未得到很好的改进。对于一个用作作物接种剂的真菌品系而言，它必须是能够以足够的数量进行生产，并且生产过程的终产物必须易于处理，并且需有一个足够长的贮藏时间以供商业使用。虽然合适的微生物接种剂能够维持在潮湿状态，但是，湿的培养物会造成运输和贮藏上的困难。因而如果把真菌精制成干的或者粉状显然更好，而这种状态的真菌在土壤中栽培可以成活。

已知道至少人们有过这样一个企图，想设计一个生产并制备真菌剂用作农业接种剂的方法。美国专利第4,530,834号，Soper及McCabe公开了该方法并转让给美国农业部。该方法包括，在一个合适的培养基中培养真菌剂的菌丝体，并在一个网筛上收获菌丝体以获得菌丝簇。这些菌丝簇然后用一种保护剂处理，直至菌丝簇被完全浸透，而这种保护剂最好为蔗糖溶液。然后菌丝体进行保温，再在室温下凉干。

本发明打算提供一个生产一种类似的干燥可繁殖的真菌产物的更为方便的方法。

本发明概括了生产田间作物微生物接种剂的方法，该方法包括下列步骤：

将制备含有颗粒状蛭石的一定数量的微生物营养物 and 水的培养基引入一个柔韧的便于处理的培养容器中，将微生物接种剂培养物接种到容器中的培养基中，将容器放置在适合于微生物生长的条件下，使得微生物在容器中的培养基中生长和成熟。

本发明的一个目的是提供一个可靠地生产大量的稳定的用于作物

的生物接种剂的方法。

本发明的另一个目的是，提供一个在保持生产优质产品的同时，而又方便且经济的方法，这是因为该方法将发酵和配方两个步骤结合成为一个步骤。

本发明的一个优点在于，该方法对于微生物培养物尽可能作最少的处理。

本发明的另一个优点在于，它有可能使微生物培养物进行有效的发酵和配方，而先前没有可靠的资料可供借鉴。

下面的说明将使本发明的其他目的、优点及特征变得更为明显。

与主要采用液体培养基的大多数的现有微生物发酵技术不同，本发明的这一方法采用包括用带有营养物液体（即水）浸湿的颗粒载体的培养基。该方法采用载体在发酵过程开始时可最大程度分布微生物产物，而不是在一种培养基上培养微生物。然后通过在前阶段引进载体把它们转移到载体上。本发明的方法减少了对培养物的处理、测定及运输的步骤，从而使一步发酵及配方过程简单、经济并且有效。

因而，对本发明的生产方法的实施首先是制备含有载体的用于微生物生长及发酵的培养基。该培养基包括精选的研磨过的颗粒载体，最好为蛭虫，为微生物选择的营养物和水。培养基置于容器之中，在容器内灭菌。容器最好是柔韧的、可任意处理的器皿，诸如，单一聚乙烯或者聚丙烯制成的杯子、桶、盘子或者袋。然后，将微生物接种到容器内的培养基中，使微生物培养物生长。经过一段生长时期后，培养物便可用作作物接种剂或者在空气中凉干，或者在潮湿状态下贮藏较长时间。容器内的培养微生物可以在这些原来的容器内贮藏然后交付使用。该产物是稳定的，使用方便并且很适合用于种子的均匀涂层。

本发明方法的实施的开始步骤是制备培养基。大部分培养基是由

可用作微生物载体的精选磨粉颗粒或其他颗粒物质构成。人们发现，蛭石是作为载体的最好材料，因为蛭石具有价格低、容易得到、无毒性、均匀性好及易于加工等优点。正如将从描述的方法中看到的那样，蛭石不仅可用作培养基，而且也可用作接种剂的载体、蛭石适合于两方面的用途，因为它自然地富含气体，并且具有天然的缓冲容量。特别是片状剥落蛭石，它具有较大表面积有益于微生物的生长。当然蛭石也是无机物，易于灭菌。已发现研磨至小于40目的颗粒度，一般为40—200目的蛭石特别适合于实施本发明。蛭石的最佳粒度为45—80目。

在蛭石提供了可使微生物培养物生长的基质的同时，微生物接种剂的生长也需要营养物。对于每种生产的微生物菌株应该选择合适的营养物。对于大多数rhizobial培养物，已发现酵母提取物和甘露糖醇的营养成份可以产生模范的结果。对于其他的细菌培养物，可以成功地采用的营养肉汤。对于许多真菌培养物及一些细菌培养物，人们十分惊奇地发现，一般地说在采用小麦及麸糠粉时，特别是采用通常的白色的未经漂白的小麦粉用作为营养物时，有其优点。对于此方法所产生的许多菌株的微生物产物的稳定性，小麦粉看来特别有利，但其原因还不十分清楚。在采用其他的多糖时，所得到的产物特别是真菌的产物，当使用面粉时，产物最为稳定。一般，面粉的量只占基质材料中较小百分比，按干重计为平均1.0%—9%。对于适于面粉营养物的真菌的培养物或其他培养物，已发现未漂白小麦粉或麸糠粉的剂量是按干重占蛭石重量的1.3%的比例最为适宜。对于rhizobial培养物及其它细菌培养物，最佳的干燥营养物的比例分别为1.8%和1.2%。

这种混合物也必须浸湿以提高合适的水分供培养物生长。加入到颗粒状的基质中的水的量也可以根据选择而变化。已发现，一般说来，水的量按重量计相当于颗粒基质的60%，最适于培养物的生长。这一比

例也可表达为每克蛭石采用1.5 毫升水。如果采用的是在溶液中的营养剂，如酵母提取物及甘露醇溶液，那么这样的营养物溶液可以直接按照1.5 毫升/ 每克的比例加到蛭石中以获得合适水分的培养物，因为加入的营养物是把合适的水加入培养物。

在实施本发明的描述中可以想象，将为微生物生长而配制的基质引入培养容器内，最好引入微生物培养物之前进行灭菌。这样做是为了方便和易于外理。如果需要的话，完全可以大量地配制好培养基，灭菌然后转入预先消毒过的在其中微生物培养物被培养的容器中。然而，当培养物的容器为单纯的柔韧的塑料树脂容器，诸如，普通的聚丙烯薄膜袋时，这种方法进展得特别迅速。将合适数量的混合物引入容器，其中含有培养基的培养容器是通过高压消毒而使培养基和容器在同一步骤中灭菌的。灭菌后，培养基及容器冷却待用。

其中含有合适的培养基混合物的灭菌过的容器再用有待培养的培养物进行接种。对于细菌而言，接种应该用细菌培养物。对于真菌而言，接种应该用孢子或其他可繁殖的材料。用微生物培养物接种后，容器应该密闭。聚丙烯袋子能够轻易地用热封口使袋变形而封口，也可容易地通过扣件或其他类似的装置，用机械方法密封。然后将容器放在适合于微生物培养物生长的条件下贮藏。通常容器可以简单地在室温下放置足够长的时间，以使培养物在容器中的培养基上长出。已发现对于真菌而言超过三十天，最好不少于四十五天，这些日子是对室温下生长的培养物的最佳的生长和稳定性所必需的。对于细菌而言，超过七天，最好至少三十天的日子是令人满意的。

一旦微生物培养物是在容器中被培养，这种材料或者直接从容器中取出而用作农业接种剂，或者从容器中取出后凉干而被作为干燥接种剂或用于种子涂层。如果这种材料是从容器中取出后在湿态使用，那么容器本身，最好为塑料袋，是可用作贮藏及运输的容器。微生物

特别是细菌，在容器内会达到一个极限的集群密度，然后处于休眠。蛭石上携带的湿的微生物混合物可以直接从袋中取出使用，也可以分别引入农田或者在种栽时与种子混合。对于许多培养物而言，然而尤其是对于真菌培养物，干性的材料提供了处理方便和其稳定性好的诱人的益处。

如果真菌培养物是准备干燥的，那么容器内的培养时期必须进行选择。一般地说，当培养时间远远少于三十天，干性接种剂在贮藏时间及稳定性方面将会受到不良影响。如果在干燥之前培养物成熟时间超过三十天，那么干性产物甚至在经历了一个长的贮藏时期之后，将日益稳定并且显示出增加的存活力。已经发现培养生长四十五天之后，干性培养物的稳定性并不显著地增加，因而对于干性接种剂的最有效的生产过程，四十五天的培养物生长时间为最佳。培养物在容器内经历了必需的生长阶段之后，直接打开容器并在室温下空气干燥培养物。培养物取出，在适于人类居住的一般的室温下敞置于空气中，经过足够的时间直到培养物中的湿度与当地室内的相对湿度达到平衡为止。

已发现用这种方法生产的干性真菌微生物培养物是稳定的，并且易于处理。这样的培养物是颗粒状的，并且易于农业上的运用，要么插撒到田野中，要么涂在种子表面层。这样生产的干状培养物可以存活两个月以上，在此时期内，真菌的生存能力即使有退化也是很少的。此外，本生产方法对于操作上的运用和其经济性是可行的。这是因为同样的容器用于灭菌和微生物繁殖，过程中的各种组分处理及微生物培养物本身的处理减到了最少的程度。因为该方法不需要专门的容器或器皿，实施本方法的必需材料从经济上看是很有吸引力的，并且是容易得到的。因而，本方法提供了一个有效的、经济的而同时又可得到高稳定性、均一性并且获得最大生存能力的产品的生产方法。

将20克40目的粒状蛭石基质与0.26克小麦粉和13毫升水混合于容器内，然后置于4盎司聚丙烯试样杯中。

将试样杯密封，然后用高压消毒蒸锅灭菌，尔后使其冷却。俟杯子冷却后，重新将其启封，并用小皮伞属奥里脱(*Oreates*)繁殖体(真菌物种)接种。然后再将其严加密封，并在实验室的室温下放置45天。

45天后，打开杯子，并使培养物在敞开的浅盘内置于空气中干燥二天。

对由此产生的干燥培养物的稳定性和生活力的测定表明，每克干燥培养物至少包含 10^6 活的小皮伞属奥里脱繁殖体。在架子上存放6周后，重复进行生活力测试，结果表明上述干燥培养物的可测生活力并未发生显著退化。

例2

将下面表1所列的每个真菌培养物接种到经高压消毒蒸锅灭菌的各只半加仑塑料瓶中，而瓶内事先已盛有按上述例1的比例配制而成的500克蛭石、面粉和水的菌种生长培养基。然后在每只瓶内加入0.5克左右的真菌培养接种剂，并使培养基充分混合。接种后2至4周，测定培养基中真菌的活性水平(仍以每克繁殖体计)而塑料瓶始终保存在室温条件下。接种后6个月再进行活性测定。

在研究者所知的最大可能范围内，对表中各真菌培养物进行识别。

表 1

真菌培养物	初始活性 水平 (计算值)	成熟活性 水平 (2-4周)	贮存活性 水平 (6个月)
144 小皮伞属 奥里脱	9×10^3	9×10^6	2×10^6
189 木霉属	1×10^4	1×10^7	3×10^7
191 被孢菌属	8×10^2	8×10^5	6×10^5
231 毛霉属)	1×10^2	1×10^5	4×10^6
238 毛霉属	2×10^3	2×10^6	4×10^6
257 木霉属	2×10^4	2×10^7	3×10^7
258 木霉属	2×10^5	2×10^8	3×10^8
274 木霉属	2×10^5	2×10^8	2×10^8
284 子囊菌纲	3×10^3	3×10^6	8×10^5
285 茎点霉属)	1×10^3	1×10^6	2×10^6
301 毛霉属)	1×10^3	1×10^6	4×10^6
303 木霉属	6×10^3	6×10^6	3×10^7
331 交链孢属	8×10^2	8×10^5	6×10^5
332 木霉属	1×10^4	1×10^7	2×10^7
490 子囊菌纲	4×10^3	4×10^6	5×10^7
491 子囊菌纲	3×10^3	3×10^6	1×10^7
545 根霉属	1×10^2	1×10^5	3×10^5
546 被孢菌属	8×10^2	8×10^5	9×10^5
744 柱盘孢菌属 破坏菌 (destructans)	8×10^4	8×10^7	6×10^6

例3

再按同样方法制备上述例2中所列各真菌培养物，并使之在空气中干燥。干燥后随即用标准稀释技术测定活性水平。干燥的培养物在室温下贮存6周后，再对其生活力进行测定，并将结果综合归纳成表2。

表 2

真菌培养物	制备时活性水平	6周后活性水平
144 小皮伞属奥里脱	3×10^5	2×10^3
189 木霉属	3×10^6	2×10^6
191 被孢菌属	2×10^5	7×10^4
231 毛霉属	2×10^5	1×10^5
238 毛霉属	1×10^6	2×10^6
(目)		
257 木霉属	2×10^6	2×10^6
258 木霉属	1×10^8	1×10^8
274 木霉属	8×10^7	1×10^8
284 子囊菌纲	2×10^5	9×10^4
(纲)		
285 茎点霉属	4×10^5	2×10^5
301 毛霉属	2×10^5	1×10^6
303 木霉属	3×10^6	1×10^7
331 交链孢属	6×10^5	5×10^5
332 木霉属	3×10^7	2×10^7
474 交链孢属	5×10^5	6×10^4
475 分支孢子菌属	2×10^7	9×10^6
490 子囊菌纲	1×10^7	3×10^6
(纲)		
491 子囊菌纲	6×10^6	2×10^6
(纲)		
545 根霉属	2×10^4	6×10^4
546 被孢菌属	2×10^5	6×10^4
744 柱盘孢菌属 破坏菌	2×10^6	3×10^6

例4

将上述例3 所制备的各个培养物的一部分干燥组分分开，以供冷藏生活力试验。每个干燥培养物的试样均在4 °C下冷藏5 个月。在贮存3 个月和5 个月后，分别二次测定各培养物的活性水平，结果如下面表3 所示。

表 3

真菌培养物	制备时活性 水平	3 个月后活性 水平	5 个月后活性 水平
144 小皮伞属奥里脱	3×10^5	3×10^5	1×10^5
189 木霉属	3×10^6	1×10^7	9×10^6
191 被孢菌属	2×10^5	5×10^4	4×10^5
231 毛霉属	2×10^5	3×10^5	9×10^5
238 毛霉属	1×10^6	2×10^6	8×10^6
257 木霉属	2×10^6	5×10^6	2×10^7
258 木霉属	1×10^8	2×10^8	7×10^7
274 木霉属	8×10^7	5×10^7	5×10^7
284 子囊菌纲	2×10^5	4×10^5	3×10^5
285 茎点霉属	4×10^5	5×10^5	2×10^6
301 毛霉属	2×10^5	2×10^6	7×10^6
303 木霉属	3×10^6	2×10^7	2×10^7
331 交链孢属	6×10^5	1×10^6	2×10^6
332 木霉属	3×10^7	4×10^7	4×10^7
474 交链孢属	5×10^5	6×10^5	1×10^6
475 分支孢子菌属	2×10^7	1×10^7	9×10^6
490 子囊菌纲	1×10^7	1×10^7	1×10^7
491 子囊菌纲	6×10^6	1×10^7	1×10^7
545 根霉属	2×10^4	8×10^4	2×10^6
546 被孢菌属	2×10^5	3×10^5	6×10^5
744 柱盘孢菌属-破坏菌	2×10^6	9×10^6	5×10^6

例5

市场上可买到的标准蛭石是经过威莱(wiley)磨机加工磨细的标称40目物料。磨细的蛭石过筛后,将所得的45-80目级分装在使用作培养物容器的软聚丙烯袋内。然后使袋中蛭石在高压消毒蒸锅中灭菌45分钟。

使从衣阿华大豆田中分离出来的根瘤菌属吉泡涅克(japonicum)培养物在酵母抽提物-甘露醇液体培养基中生长达到平稳期,而上述菌母培养物的平稳期条件是由光密度的测量所确定,达到平稳期后,光密度保持恒定。在菌母培养物中取出一个试样,并用新鲜酵母抽提物-甘露醇液体培养基稀释至细菌-培养液中的细菌密度略低于 10^8 细菌/毫升(液体)。然后将细菌-培养液以每克蛭石1.5毫升溶液的比例加到袋中蛭石内,并使之充分混合后,将聚丙烯袋密封。此袋保存在室温条件下,以待细菌生长。下表归纳了试样培养物的生长概况。

表 4

试样编号	细菌密度 (细菌/克)		
	开始(时间为零)	7天	30天
1	1.4×10^4	1.7×10^8	1.3×10^9
2	1.4×10^4	3.1×10^8	1.3×10^9
3	1.4×10^4	3.2×10^8	1.6×10^9
4	1.4×10^4	3.2×10^8	1.0×10^9

从表中可以看出,30天内细菌繁殖了100,000倍。所产生的稠密繁殖的细菌培养物呈颗粒状,其浓度适合农田直接应用。通常在工业上是以 10^8 细菌/克的密度用接种剂涂复种子,以使每个种子带有 10^5 个细菌,而这一密度即使在生活力呈一个对数损失的情况下,仍可达到足以满足应用的细菌密度。因此,鉴于装入袋内的根瘤菌属培养物已含有合适的载体和稠密的活的培养物,它无需进一步处理,即可适合

农田运用。

例6

为验证本法对其他根瘤菌属菌株的实用性，对根瘤菌属吉泡涅克的其他四种菌株重复上述例5中的处理方法，其中野生型细菌的三种突变体系从路易斯安那州的大豆作物中分离得到，而另一个培养物取自明尼苏达州的大豆作物中分离所得。培养方法相同，所得的对数生长曲线与上述例5的模式相似，并归纳于下表。

表 5

分离菌编号	细菌密度 (细菌/克)	
	开始	7 天后
突变体 1	3.6×10^5	8.0×10^8
突变体 2	3.9×10^5	1.5×10^9
突变体 3	1.9×10^6	6.0×10^8
明尼苏达州菌株	5.1×10^4	6.9×10^8

这些结果证实，所述培养方法与菌株无关。

例7

为进一步证实所述方法适用于各种各样的非根瘤菌属细菌，对六种土壤细菌试样重复进行例5的处理方法，这六种试样培养物均系与大豆根有关的培养物，它们不会使大豆根部结节，而且在生长速率和细菌及菌落形态方面均与根瘤菌属不同。在分类学上还未对这些培养物进行分类。除使用市场上可买到的普通液体培养基代替酵母抽提物-甘露醇液体培养基外，均按与根瘤菌属类似的方法处理培养物，结果综合归纳如下：

表 6

分离菌编号	细菌密度 (细菌/克)	
	开始	12天后
No. 1	8.0×10^4	3.0×10^8
No. 2	8.0×10^4	5.1×10^9
No. 3	8.0×10^4	2.7×10^9
No. 4	8.0×10^4	2.5×10^9
No. 5	8.0×10^4	1.1×10^{10}
No. 6	8.0×10^4	9.6×10^8

这些结果证明，所述方法对农业上可能关心的各种寓居于土壤中或与根有关的细菌均为适用。虽然对数生长曲线可能因物种而异，但在这些培养物中得到显著的高生长速率。由于本法提供的效益，使之在已知的或未知的与土壤相关的微生物中的应用成为可能。