



## (12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 105517557 B

(45) 授权公告日 2021.11.30

(21) 申请号 201480031784.2

(22) 申请日 2014.04.22

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 105517557 A

(43) 申请公布日 2016.04.20

(30) 优先权数据  
61/815,038 2013.04.23 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2015.12.03

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/AU2014/050019 2014.04.22

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02014/172758 EN 2014.10.30

(73) 专利权人 特雷根控股有限公司  
地址 澳大利亚墨尔本维多利亚州3000

(72) 发明人 韦恩·芬利森 凯伦·朱里

(74) 专利代理机构 上海麦其知识产权代理事务  
所(普通合伙) 31257

代理人 董红曼

(51) Int.Cl.  
A61K 35/747 (2015.01)  
A61K 36/064 (2006.01)  
A61P 31/04 (2006.01)  
A61P 31/10 (2006.01)  
A61P 15/14 (2006.01)  
A01N 63/20 (2020.01)  
A01N 63/32 (2020.01)  
A01N 63/30 (2020.01)  
A01P 3/00 (2006.01)  
A01P 1/00 (2006.01)

(56) 对比文件  
W0 1997/029644 A1, 1997.08.21  
W0 2006/136420 A2, 2006.12.28  
CN 102851232 A, 2013.01.02

审查员 翟羽佳

权利要求书2页 说明书35页 附图1页

### (54) 发明名称

具有抗微生物活性的细菌菌株以及包含所述菌株的生物控制组合物

### (57) 摘要

在此提供了用于治疗 and 预防由微生物病原体造成的感染的方法、用于治疗或预防由一种微生物病原体造成的、或与该微生物病原体相关联的病害的方法、以及用于抑制微生物生长的方法,这些方法包括给予或施用组合物,这些组合物包含帕氏乳酸杆菌、布赫纳氏乳酸杆菌、瑞氏乳酸杆菌、玉米乳酸杆菌、干酪乳酸杆菌、类干酪乳酸杆菌、NMI检索号V12/022850指定的细菌菌株以及NMI检索号V12/022849指定的细菌菌株中的一种或多种菌株。

1. 保藏检索号为V11/022945的帕氏乳酸杆菌Lp18、或保藏检索号为V11/022948的玉米乳酸杆菌Lz26在制备一种用于治疗受试者中微生物病原体感染或由微生物病原体引起的病害的组合物中的用途,其中微生物病原体为选自尖孢镰孢菌、马卡假尾孢、立枯丝核菌、灰葡萄孢菌、番茄早疫病菌、马铃薯炭疽病菌、十字花科小球腔菌、核盘菌、疮痂病链霉菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、乳房链球菌、和萨氏假单胞菌的真菌或细菌。

2. 保藏检索号为V11/022946的布赫纳氏乳酸杆菌Lb23在制备一种用于治疗受试者中微生物病原体感染或由微生物病原体引起的病害的组合物中的用途,其中微生物病原体为选自尖孢镰孢菌、马卡假尾孢、立枯丝核菌、灰葡萄孢菌、番茄早疫病菌、马铃薯炭疽病菌、十字花科小球腔菌、核盘菌、疮痂病链霉菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、和乳房链球菌的真菌或细菌。

3. 保藏检索号为V11/022947的瑞氏乳酸杆菌Lr24在制备一种用于治疗受试者中微生物病原体感染或由微生物病原体引起的病害的组合物中的用途,其中微生物病原体为选自尖孢镰孢菌、马卡假尾孢、立枯丝核菌、灰葡萄孢菌、番茄早疫病菌、十字花科小球腔菌、核盘菌、疮痂病链霉菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、乳房链球菌、和萨氏假单胞菌的真菌或细菌。

4. 培养有保藏检索号为V11/022945的帕氏乳酸杆菌Lp18、或保藏检索号为V11/022948的玉米乳酸杆菌Lz26的培养基的培养上清液或无细胞滤液在制备一种用于治疗受试者中微生物病原体感染或由微生物病原体引起的病害的组合物中的用途,其中微生物病原体为选自大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、和乳房链球菌的真菌或细菌。

5. 培养有保藏检索号为V11/022946的布赫纳氏乳酸杆菌Lb23的培养基的培养上清液或无细胞滤液在制备一种用于治疗受试者中微生物病原体感染或由微生物病原体引起的病害的组合物中的用途,其中微生物病原体为选自大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的真菌或细菌。

6. 培养有保藏检索号为V11/022947的瑞氏乳酸杆菌Lr24的培养基的培养上清液或无细胞滤液在制备一种用于治疗受试者中微生物病原体感染或由微生物病原体引起的病害的组合物中的用途,其中微生物病原体为选自大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和乳房链球菌的真菌或细菌。

7. 如权利要求1-3中任一项所述的用途,其中该组合物中的菌株经胶囊化处理。

8. 如权利要求1-6中任一项所述的用途,其中该受试者是植物。

9. 如权利要求8所述的用途,其中该植物是作物物种。

10. 如权利要求1-6中任一项所述的用途,其中该受试者是动物。

11. 如权利要求10所述的用途,其中该动物是农畜。

12. 如权利要求1-6中任一项所述的用途,其中该受试者是植物,并且该植物生长的土壤用该组合物处理。

13. 如权利要求12所述的用途,其中该土壤在该植物幼苗或植物种子的种植之前、种植时或种植之后处理。

14. 如权利要求1所述的用途,其中该组合物包含保藏检索号为V11/022943的法伯尔醋酸菌Af15、帕氏乳酸杆菌Lp18、保藏检索号为V11/022946的布赫纳氏乳酸杆菌Lb23、保藏检索号为V11/022947的瑞氏乳酸杆菌Lr24、玉米乳酸杆菌Lz26、以及保藏检索号为V11/

022944的嗜酒假丝酵母Ce31,其中微生物病原体为尖孢镰孢菌。

15.如权利要求14所述的用途,其中该组合物包含的菌株的终浓度为,每种乳酸杆菌菌株为 $2.5 \times 10^5$  cfu/ml,嗜酒假丝酵母Ce31为 $1.0 \times 10^5$  cfu/ml,且法伯尔醋酸菌Af15为 $1.0 \times 10^6$  cfu/ml。

16.如权利要求1所述的用途,其中该组合物包含玉米乳酸杆菌Lz26、保藏检索号为V12/022850的细菌菌株以及保藏检索号为V12/022849的细菌菌株,其中微生物病原体选自尖孢镰孢菌、和十字花科小球腔菌。

17.如权利要求1所述的用途,其中该组合物包含玉米乳酸杆菌Lz26、保藏检索号为V11/022946的布赫纳氏乳酸杆菌Lb23、帕氏乳酸杆菌Lp18、保藏检索号为V11/022944的嗜酒假丝酵母Ce31、以及保藏检索号为V11/022943的法伯尔醋酸菌Af15,其中微生物病原体选自番茄早疫病菌、和核盘菌。

18.如权利要求1所述的用途,其中该组合物包含玉米乳酸杆菌Lz26、帕氏乳酸杆菌Lp18、保藏检索号为V11/022946的布赫纳氏乳酸杆菌Lb23、保藏检索号为V11/022947的瑞氏乳酸杆菌Lr24、以及保藏检索号为V11/022943的法伯尔醋酸菌Af15,其中微生物病原体选自大肠杆菌、和金黄色葡萄球菌。

19.如权利要求1所述的用途,其中该组合物包含玉米乳酸杆菌Lz26、帕氏乳酸杆菌Lp18、保藏检索号为V11/022946的布赫纳氏乳酸杆菌Lb23以及保藏检索号为V11/022947的瑞氏乳酸杆菌Lr24,其中微生物病原体选自大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、和乳房链球菌。

20.一种用于治疗受试者中微生物病原体感染或由微生物病原体引起的病害的生物控制组合物,该组合物包含培养有保藏检索号为V11/022945的帕氏乳酸杆菌、保藏检索号为V11/022946的布赫纳氏乳酸杆菌、保藏检索号为V11/022947的瑞氏乳酸杆菌、或保藏检索号为V11/022948的玉米乳酸杆菌的培养基的培养上清液或无细胞滤液。

## 具有抗微生物活性的细菌菌株以及包含所述菌株的生物控制组合物

### 技术领域

[0001] 本披露整体涉及具有抗微生物活性的细菌菌株及其作为生物控制剂的用途。还提供了包含所述细菌菌株的生物控制组合物，具体地用于抑制微生物植物病原体。

### 背景技术

[0002] 所有植物易受微生物如细菌和真菌的侵袭。就果实、蔬菜以及农业和园艺作物而言，微生物病原体以及由它们造成的病害能够导致显著的作物损害、产量损失以及收获前后的经济损失。由微生物病原体造成的病害还能够导致农产品的存放期的减少，并且导致消费者的消费成本更高。

[0003] 许多真菌是已知的引起许多危害或破坏世界范围作物的病害的植物病原体。大多数植物病原真菌是子囊菌 (ascomycetes) (包括镰孢属物种 (*Fusarium* spp.)、根串珠霉属物种 (*Thielaviopsis* spp.)、葡萄孢属物种 (*Botrytis* spp.)、轮枝孢属物种 (*Verticillium* spp.) 以及稻瘟病菌属物种 (*Magnaporthe* spp.)) 和担子菌 (basidiomycetes) (包括丝核菌属物种 (*Rhizoctonia* spp.)、柄锈菌属物种 (*Puccinia* spp.) 以及蜜环菌属物种 (*Armillaria* spp.))。特别关注的是镰孢属的真菌，广泛分布在土壤中的丝状真菌。例如，数种镰孢菌物种如尖孢镰孢菌使植物包括番茄、甜瓜、姜、香蕉以及豆类感染萎蔫病 (镰孢菌萎蔫病)，从而导致如维管萎蔫病、黑斑症、叶片过早掉落以及生长迟缓的症状。若干镰孢属物种造成马铃薯的镰孢菌干腐病 (*Fusarium* dry rot)。镰孢菌干腐病在马铃薯中无论是在大田中还是在贮藏中都是一个经济上的重要问题，并且是收获后马铃薯损失的主要原因之一。在香蕉中，镰孢菌是具有高度破坏性的巴拿马病的致病原。种植园一旦被感染，就不能治愈。尖孢镰孢菌是一种不完全型无性真菌 (imperfect asexual fungus)，其借助以下三种类型的孢子传播：小分生孢子、大分生孢子、以及厚垣孢子类。因为厚垣孢子类能够保持休眠并且感染土壤多年，所以一旦尖孢镰孢菌定植在土壤中，就知道极难根除。由于杀真菌剂的无效性，目前仅可使用的应对是土壤消毒，这不是成本有效的。

[0004] 植物病原性细菌也对植物造成许多损害性的和经济上显著的病害。例子包括以下各项的物种：欧文氏菌属 (*Erwinia*)、果胶杆菌属 (*Pectobacterium*)、泛菌属 (*Pantoea*)、农杆菌属 (*Agrobacterium*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、罗尔斯通氏菌属 (*Ralstonia*)、伯克霍尔德氏菌属 (*Burkholderia*)、食酸菌属 (*Acidovorax*)、黄单胞菌属 (*Xanthomonas*)、棒形杆菌属 (*Clavibacter*)、链霉菌属 (*Streptomyces*)、木杆菌属 (*Xylella*)、螺原体属 (*Spiroplasma*) 以及植原体属 (*Phytoplasma*)。植物病原性细菌造成一系列症状，包括菌瘿和过度生长、萎蔫病、叶斑病、斑枯病、软腐病以及疮痂病和溃疡病。

[0005] 马铃薯疮痂病是感染马铃薯块茎以及其他根作物如小红萝卜、甜菜、胡萝卜以及欧洲防风草的一种病害。它在块茎表面造成难看的枯斑损伤，从而导致巨大的经济损失。主要的致病病原体是发现于世界范围的马铃薯生长区的土壤中的疮痂病链霉菌

(*Streptomyces scabies*), 一种在大多数固体介质上产生灰色菌丝的革兰氏阳性、需氧的丝状细菌。这些营养丝状体断开以便形成孢子, 这些孢子使得细菌能够存活很长一段时间并且通过水、风和土壤传播。它能够依靠腐烂的植物材料存活以及通过动物消化道存活而在土壤中存活很长一段时间、甚至数年。已经使用各种方法来降低病害严重性, 然而, 目前不可获得对马铃薯疮痂病的有效控制。

[0006] 施用于植物以抵抗病原微生物并治疗或预防由此类病原体造成的病害的杀真菌剂和其他杀虫剂典型地本质上是化学性的(通常是合成的和非天然存在的)。这些杀真菌剂和杀虫剂可能制造昂贵, 并且带来不希望的副作用, 包括对动物的毒性和环境问题。对开发替代方法有明确且持续的需要。生物控制剂和组合物是一种具有吸引力的替代物, 它更安全、更加能够生物降解, 并且开发成本更低。

[0007] 本披露的概述

[0008] 本披露的一个第一方面提供一种用于治疗或预防一种微生物病原体对一种受试者的感染的方法, 该方法包括向该受试者给予、或以其他方式将该受试者暴露于一个有效量的一种组合物, 该组合物包含选自帕氏乳酸杆菌(*Lactobacillus parafarraginis*)、布赫纳氏乳酸杆菌(*Lactobacillus buchneri*)、瑞氏乳酸杆菌(*Lactobacillus rapi*)以及玉米乳酸杆菌(*Lactobacillus zeae*)的乳酸杆菌的至少一种菌株, 或源自其中已培养所述菌株的培养基的培养上清液或无细胞滤液。

[0009] 一个第二方面提供一种用于在一种受试者中治疗或预防由一种微生物病原体造成、或与该微生物病原体相关联的一种病害的方法, 该方法包括向该受试者给予、或以其他方式将该受试者暴露于一个有效量的一种组合物, 该组合物包含选自帕氏乳酸杆菌、布赫纳氏乳酸杆菌、瑞氏乳酸杆菌以及玉米乳酸杆菌的乳酸杆菌的至少一种菌株, 或源自其中已培养所述菌株的培养基的培养上清液或无细胞滤液。

[0010] 根据以上方面, 将受试者暴露于组合物可包括直接或间接地将受试者暴露于组合物。作为举例, 在受试者为一种植物的情况下, 可通过将该组合物施用于该植物的一部分、或该植物生长或待种植的土壤中来将该植物暴露于该组合物。另外作为举例, 在受试者为一种动物的情况下, 可通过将该组合物施用于在其上饲养该动物的牧场或其他草地(或牧场或其他草地在其上生长的土壤)来将该动物暴露于该组合物。

[0011] 该方法可进一步包括向该受试者给予、或以其他方式将该受试者暴露于有效量的一种或多种抗微生物剂。

[0012] 一个第三方面提供一种用于抑制一种微生物的生长的方法, 该方法包括将该微生物、或被该微生物定居的或能够被该微生物定居的一种环境暴露于一个有效量的一种组合物, 该组合物包含选自帕氏乳酸杆菌、布赫纳氏乳酸杆菌、瑞氏乳酸杆菌以及玉米乳酸杆菌的乳酸杆菌的至少一种菌株, 或源自其中已培养所述菌株的培养基的培养上清液或无细胞滤液。

[0013] 在示例性实施例中, 该受试者是一种植物。在另外的示例性实施例中, 该受试者是一种植物, 并且该环境是土壤、植物根和/或植物叶。可在该植物的种植之前、种植时或种植之后使用该组合物处理土壤。类似地, 可在该植物的种植之前、种植时或种植之后使用该组合物处理植物根。

[0014] 该方法可包括使用该组合物对该环境或该受试者进行一次处理或多次处理。

[0015] 该方法可进一步包括将该微生物暴露于一个有效量的一种或多种抗微生物剂。

[0016] 一个第四方面提供一种用于治疗或预防一种微生物病原体对一种受试者的感染的生物控制组合物,该组合物包含选自帕氏乳酸杆菌、布赫纳氏乳酸杆菌、瑞氏乳酸杆菌以及玉米乳酸杆菌的乳酸杆菌的至少一种菌株,或源自其中已培养所述菌株的培养基的培养上清液或无细胞滤液。

[0017] 一个第五方面提供一种用于在一种受试者中治疗或预防由一种微生物病原体对该受试者的感染造成的、或与该感染相关联的一种病害的生物控制组合物,该组合物包含选自帕氏乳酸杆菌、布赫纳氏乳酸杆菌、瑞氏乳酸杆菌以及玉米乳酸杆菌的乳酸杆菌的至少一种菌株,或源自其中已培养所述菌株的培养基的培养上清液或无细胞滤液。

[0018] 一个第六方面提供一种用于抑制一种微生物的生长的组合物,该组合物包含选自帕氏乳酸杆菌、布赫纳氏乳酸杆菌、瑞氏乳酸杆菌以及玉米乳酸杆菌的乳酸杆菌的至少一种菌株,或源自其中已培养所述菌株的培养基的培养上清液或无细胞滤液。

[0019] 可替代地,或除了在以上方面中所描述的组合物的组分之外,在此披露的组合物可包含于2012年12月14日以检索号V12/022847保藏在澳大利亚国家计量研究院(National Measurement Institute,Australia)的迪氏乳酸杆菌(*Lactobacillus diolivorans*) (N3)、于2012年12月14日以检索号V12/022848保藏在澳大利亚国家计量研究院的帕氏乳酸杆菌(N11)、于2012年12月14日以检索号V12/022851保藏在澳大利亚国家计量研究院的短乳酸杆菌(*Lactobacillus brevis*) (TD)、类干酪乳酸杆菌(*Lactobacillus paracasei*)、于2012年12月14日以检索号V12/022849保藏在澳大利亚国家计量研究院的命名为‘T9’的菌株、干酪乳酸杆菌(*Lactobacillus casei*)以及于2012年12月14日以检索号V12/022850保藏在澳大利亚国家计量研究院的在此命名为‘TB’的菌株的一种或多种菌株;或源自其中已经培养这些菌株中的一种或多种的培养基的培养上清液或无细胞滤液。

[0020] 在此还提供乳酸杆菌的一种或多种菌株用于制造一种用于治疗或预防一种微生物病原体对一种受试者的感染的组合物的用途,其中这些乳酸杆菌选自帕氏乳酸杆菌、布赫纳氏乳酸杆菌、瑞氏乳酸杆菌以及玉米乳酸杆菌。

[0021] 在此还提供乳酸杆菌的一种或多种菌株用于制造一种用于在一种受试者中治疗或预防由一种微生物病原体对该受试者的感染造成的、或与该感染相关联的一种病害的组合物的用途,其中这些乳酸杆菌选自帕氏乳酸杆菌、布赫纳氏乳酸杆菌、瑞氏乳酸杆菌以及玉米乳酸杆菌。

[0022] 在此还提供乳酸杆菌的一种或多种菌株用于制造一种用于抑制一种微生物的生长的组合物的用途,其中这些乳酸杆菌选自帕氏乳酸杆菌、布赫纳氏乳酸杆菌、瑞氏乳酸杆菌以及玉米乳酸杆菌。

[0023] 在此还提供乳酸杆菌的一种或多种菌株用于制造一种用于治疗或预防一种微生物病原体对一种受试者的感染的组合物的用途,其中这些乳酸杆菌选自帕氏乳酸杆菌、布赫纳氏乳酸杆菌、瑞氏乳酸杆菌、玉米乳酸杆菌、类干酪乳酸杆菌、于2012年12月14日以检索号V12/022849保藏在澳大利亚国家计量研究院的在此命名为‘T9’的菌株、干酪乳酸杆菌以及于2012年12月14日以检索号V12/022850保藏在澳大利亚家计量研究院的在此命名为‘TB’的菌株。

[0024] 在此还提供乳酸杆菌的一种或多种菌株用于制造一种用于在一种受试者中治疗

或预防由一种微生物病原体对该受试者的感染造成的、或与该感染相关联的一种病害的组合物的用途,其中这些乳酸杆菌选自帕氏乳酸杆菌、布赫纳氏乳酸杆菌、瑞氏乳酸杆菌、玉米乳酸杆菌、类干酪乳酸杆菌、于2012年12月14日以检索号V12/022849保藏在澳大利亚国家计量研究院的在此命名为‘T9’的菌株、干酪乳酸杆菌以及于2012年12月14日以检索号V12/022850保藏在澳大利亚国家计量研究院的在此命名为‘TB’的菌株。

[0025] 在此还提供乳酸杆菌的一种或多种菌株用于制造一种用于抑制一种微生物的生长的组合物的用途,其中这些乳酸杆菌选自帕氏乳酸杆菌、布赫纳氏乳酸杆菌、瑞氏乳酸杆菌、玉米乳酸杆菌、类干酪乳酸杆菌、于2012年12月14日以检索号V12/022849保藏在澳大利亚国家计量研究院的在此命名为‘T9’的菌株、干酪乳酸杆菌、以及于2012年12月14日以检索号V12/022850保藏在澳大利亚国家计量研究院的在此命名为‘TB’的菌株。

[0026] 在此还提供以下菌株中的一种或多种用于制造一种用于治疗或预防一种微生物病原体对一种受试者的感染、用于在一种受试者中治疗或预防由一种微生物病原体对该受试者的感染造成的、或与该感染相关联的一种病害、或用于抑制一种微生物的生长的组合物的用途:于2012年12月14日以检索号V12/022847保藏在澳大利亚国家计量研究院的迪氏乳酸杆菌(N3)、于2012年12月14日以检索号V12/022848保藏在澳大利亚国家计量研究院的帕氏乳酸杆菌(N11)、于2012年12月14日以检索号V12/022851保藏在澳大利亚国家计量研究院的短乳酸杆菌(TD)、类干酪乳酸杆菌、于2012年12月14日以检索号V12/022849保藏在澳大利亚国家计量研究院的在此命名为‘T9’的菌株、干酪乳酸杆菌、以及于2012年12月14日以检索号V12/022850保藏在澳大利亚国家计量研究院的在此命名为‘TB’的菌株。

[0027] 以下披露涉及所有的以上这些方面和实施例。

[0028] 帕氏乳酸杆菌菌株可以是帕氏乳酸杆菌Lp18。在一个具体的实施例中,该帕氏乳酸杆菌菌株是于2011年10月27日以检索号V11/022945保藏在澳大利亚国家计量研究院的帕氏乳酸杆菌Lp18。

[0029] 布赫纳氏乳酸杆菌菌株可以是布赫纳氏乳酸杆菌Lb23。在一个具体的实施例中,该布赫纳氏乳酸杆菌菌株是于2011年10月27日以检索号V11/022946保藏在澳大利亚国家计量研究院的布赫纳氏乳酸杆菌Lb23。

[0030] 瑞氏乳酸杆菌菌株可以是瑞氏乳酸杆菌Lr24。在一个具体的实施例中,该瑞氏乳酸杆菌菌株是于2011年10月27日以检索号V11/022947保藏在澳大利亚国家计量研究院的瑞氏乳酸杆菌Lr24。

[0031] 玉米乳酸杆菌菌株可以是玉米乳酸杆菌Lz26。在一个具体的实施例中,该玉米乳酸杆菌菌株是于2011年10月27日以检索号V11/022948保藏在澳大利亚国家计量研究院的玉米乳酸杆菌Lz26。

[0032] 该组合物可进一步包含法伯尔醋酸菌(*Acetobacter fabarum*)的一种菌株。该法伯尔醋酸菌菌株可以是法伯尔醋酸菌Af15。在一个具体的实施例中,该法伯尔醋酸菌菌株是于2011年10月27日以检索号V11/022943保藏在澳大利亚国家计量研究院的法伯尔醋酸菌Af15。

[0033] 该组合物可进一步包含一种酵母。该酵母可以是嗜酒假丝酵母的一种菌株。该嗜酒假丝酵母菌株可以是嗜酒假丝酵母Ce31。在一个具体的实施例中,该嗜酒假丝酵母菌株是于2011年10月27日以检索号V11/022944保藏在澳大利亚国家计量研究院的嗜酒假丝酵

母Ce31。

[0034] 该组合物可包含两种或更多种所述乳酸杆菌物种、三种所述乳酸杆菌物种或所有的所述乳酸杆菌物种。该组合物可表示两种或更多种或三种或更多种所述乳酸杆菌物种的一个共生组合。

[0035] 该组合物中的菌株中的一种或多种可以是胶囊化的。在多种菌株被胶囊化的情况下,这些菌株可以是各自胶囊化的或组合在一个单一胶囊中。

[0036] 组合物可进一步包含一种或多种抗微生物剂。

[0037] 该受试者可以是一种植物或一种动物。在具体的示例性实施例中,该受试者是一种植物。例如,该植物可以是一种农作物物种、一种园艺作物物种或一种用于燃料或制药生产的作物物种。在另一个示例性实施例中,该受试者是一种非人动物,如一种产乳哺乳动物(例如一种母牛或山羊)。

[0038] 该微生物病原体可以是一种植物病害或动物病害的致病物。在示例性实施例中,该病害可选自腐烂症、萎蔫病、锈病、斑病、枯萎病、溃疡病、白粉病、霉病、菌瘿、疮痂病或乳腺炎。

[0039] 微生物病原体可以是一种真菌或细菌。

[0040] 在一个示例性实施例中,真菌可以选自一种镰孢属(*Fusarium* sp.)、一种假尾孢菌属(*Pseudocercospora* sp.)、一种单胞瓶霉属(*Phialemonium* sp.)、一种葡萄孢属或一种丝核菌属(*Rhizoctonia* sp.)。该镰孢属可以是尖孢镰孢菌,如姜专化型尖孢镰孢菌(*Fusarium oxysporum* f.sp.*zingiberi*)、西瓜专化型尖孢镰孢菌(*Fusarium oxysporum* f.sp.*niveum*)或古巴专化型尖孢镰孢菌(*Fusarium oxysporum* f.sp.*cubense*)。假尾孢菌属可以是马卡假尾孢(*Pseudocercospora macadamiae*)。单胞瓶霉属可以是两型孢瓶霉属真菌(*Phialemonium dimorphosporum*)。葡萄孢属可以是灰葡萄孢菌。丝核菌属可以是立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)。有经验的受理人员将了解这列表是无穷尽的。另外的适合的真菌物种被披露在下文。

[0041] 细菌可以是革兰氏阳性或革兰氏阴性的。在一个示例性实施例中,细菌可以是一种链霉菌属、一种葡萄球菌属(*Staphylococcus* sp.)、一种埃希氏菌属(*Escherichia* sp.)、一种假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)、一种泛菌属(*Pantoea* sp.)或一种链球菌属(*Streptococcus* sp.)。该链霉菌属可以是疮痂病链霉菌。该葡萄球菌属可以是金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)。该链球菌属可以是乳房链球菌(*S.uberis*)。该埃希氏菌属可以是大肠杆菌(*Escherichia coli*)。该假单胞菌属可以是油橄榄假单胞菌(*Pseudomonas savastani*)。该泛菌属可以是成团泛菌(*Pmantoea agglomerans*)。有经验的受理人员将了解这列表是无穷尽的。另外的适合的细菌物种被披露在下文。

[0042] 附图简要说明

[0043] 参考以下附图,在此仅通过非限制性举例的方式描述了本披露的方面和实施例。

[0044] 图1.在如实例3中所描述处理三周后,西瓜植株的根高度、植株高度以及植株重量。对每个参数,多个条从左到右代表来自实验A、B、C以及D的西瓜幼苗。

[0045] 详细说明

[0046] 除非另外定义,否则在此所使用的所有技术和科学术语具有与本披露所属领域的那些普通技术人员通常所理解相同的含义。虽然类似或等效于在此所描述的那些方法和材

料的任何方法和材料可以用于本披露的实践或测试,但描述了典型的方法和材料。

[0047] 在此使用的冠词“一个”和“一种”指的是一个/种或多于一个/种(即,至少一个/种)该冠词的语法宾语。通过举例,“一个元件”意指一个元件或多于一个元件。

[0048] 在本说明书的背景下,术语“约”应理解为指的是一系列数目,本领域的技术人员认为该一系列数目相当于在实现相同功能或结果的情况下引用的值。

[0049] 贯穿本说明书及其后的权利要求书,除非上下文另有要求,否则词语“包括(comprise)”以及变型如“包括(comprises)”或“包括(comprising)”应当被理解成是指包含一个提及的整体或步骤或者多个整体或步骤的组,但不排除任何其他整体或步骤或者多个整体或步骤的组。

[0050] 如在此所使用,术语“抗微生物剂”指的是单独或与另一种试剂组合能够杀死一种或多种微生物物种或抑制该一种或多种微生物物种的生长的任何试剂。抗微生物剂包括但不限于抗生素、去污剂、表面活性剂、诱导氧化应激反应的试剂、细菌素和抗微生物酶(例如,脂肪酶、链霉蛋白酶以及裂解酶)和各种其他蛋白水解酶和核酸酶、肽以及噬菌体。提及抗微生物剂包括提及天然和合成抗微生物剂两者。

[0051] 如在此所使用,术语“暴露”意指大体使与…相接触。如在此所描述的将一种受试者暴露于一种组合物或试剂包括向该受试者给予该组合物或试剂,或以其他方式使该组合物或试剂与该受试者接触,不论是直接还是间接接触。例如,将一种受试者暴露于一种组合物或试剂可包括将该组合物或试剂施用到或给予到该受试者居住的一种环境、或一种饲料,即该受试者被给予的液体或其他营养组合物。在本披露中,术语“暴露”、“给予”和“接触”以及它们的变型在一些情况下可互换使用。

[0052] 如在此所使用的与微生物生长相关的术语“抑制(inhibiting)”及其变型如“抑制(inhibition)”和“抑制(inhibits)”指的是一种组合物或试剂的任何杀微生物或微生物抑制活性。这类抑制可以是在量值上的和/或在本质上是时间上的或空间上的。一种组合物或试剂对细菌或真菌的生长的抑制可以通过测量在存在和不存在该组合物或试剂时的微生物生长来评价。与未暴露于该组合物或试剂的相同微生物的生长相比较,微生物生长可被该组合物或试剂抑制至少或约10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多。

[0053] 如在此所使用的术语“受试者”指的是被一种微生物病原体感染的或疑似被感染的、或易受该微生物病原体感染的任何植物或动物。植物类包括但不限于生产果实、蔬菜、谷物、块茎、豆类、花以及叶的植物,或任何其他经济上或环境上重要的植物。因此,植物可以是一种作物物种。如在此所使用的术语“作物”指的是生长以供收获或用于任何经济目的的任何植物,这些目的包括例如人类食物、牲畜饲料、燃料或制药生产(例如,罂粟)。动物类包括例如哺乳动物、鸟类、鱼、爬行动物、两栖动物以及任何其他脊椎动物或无脊椎动物,如具有经济、环境和/或其他显著重要性的那些。哺乳动物包括但不限于牲畜和其他农畜(如牛、山羊、绵羊、马、猪以及鸡)、表演动物(如比赛用马)、伴侣动物类(如猫和狗)、实验室试验用动物以及人。

[0054] 如在此所使用的,术语“有效量”指的是施用到一个给定的土壤区域或植物营养生长部分上,足以实现一种或多种有益或期望结果(例如就植物生长速率、作物产量或土壤中的养料可获得性而言)的微生物接种物或肥料的量。可以在一个或多个施用中提供一个“有

效量”。所需的精确量将取决于多个因素而变化,这些因素如所用单一菌株的身份和数量、所处理的植物物种、待处理土壤的性质和状况、待施用的微生物接种物或肥料组合物的确切性质、其中该接种物或肥料被施用的形式及其施用手段、以及该施用发生过程中植物生长长期的阶段。因此,不可能指定一个精确的“有效量”。然而,对于任何给定的情况,一个适当的“有效量”可以由本领域普通技术人员仅仅使用常规实验来确定。

[0055] 如在此所使用,术语“治疗(treating)”、“治疗(treatment)”等指的是改善或以其他方式阻碍、延迟或逆转一种感染或病害、或一种感染或病害的至少一种症状的进展(包括减小一种感染或病害的严重程度)的任何和所有施用。因此,治疗未必是指治疗一种受试者直到感染完全消除或从一种病害恢复为止。类似地,术语“预防(preventing)”、“预防(preventing)”等指的是防止一种感染或病害的建立、或以其他方式延迟该感染或病害发作的任何和所有施用。

[0056] 在此使用的术语“任选地”意指随后描述的特征可以存在或可以不存在,或者随后描述的事件或情况可以发生或可以不发生。因此,本说明书将理解成包括并涵盖其中存在该特征的实施例和其中不存在该特征的实施例,以及其中发生该事件或情况的实施例以及其中不发生该事件或情况的实施例。

[0057] 在此提供了用于治疗或预防一种微生物病原体对一种受试者的感染的方法,该方法包括向该受试者给予、或以其他方式将该受试者暴露于一个有效量的一种组合物,该组合物包含选自帕氏乳酸杆菌、布赫纳氏乳酸杆菌、瑞氏乳酸杆菌以及玉米乳酸杆菌的乳酸杆菌的至少一种菌株。

[0058] 在此还提供了用于在一种受试者中治疗或预防由一种微生物病原体造成的、或与该微生物病原体相关联的一种病害的方法,该方法包括向该受试者给予、或以其他方式将该受试者暴露于一个有效量的一种组合物,该组合物包含选自帕氏乳酸杆菌、布赫纳氏乳酸杆菌、瑞氏乳酸杆菌以及玉米乳酸杆菌的乳酸杆菌的至少一种菌株。

[0059] 在此进一步提供用于抑制一种微生物的生长方法,该方法包括将该微生物、或被该微生物定居的或能够被该微生物定居的一种环境暴露于一个有效量的一种组合物,该组合物包含选自帕氏乳酸杆菌、布赫纳氏乳酸杆菌、瑞氏乳酸杆菌以及玉米乳酸杆菌的乳酸杆菌的至少一种菌株。

[0060] 在此还提供用于治疗或预防一种微生物病原体对一种受试者的感染的方法,该方法包括向该受试者给予、或以其他方式将该受试者暴露于一个有效量的一种组合物,该组合物包含选自帕氏乳酸杆菌、布赫纳氏乳酸杆菌、瑞氏乳酸杆菌、玉米乳酸杆菌、干酪乳酸杆菌、类干酪乳酸杆菌、于2012年12月14日以检索号V12/022849保藏在澳大利亚国家计量研究院的在此命名为‘T9’的菌株、以及于2012年12月14日以检索号V12/022850保藏在澳大利亚国家计量研究院的在此命名为‘TB’的菌株的乳酸杆菌的至少一种菌株。

[0061] 还提供用于在一种受试者中治疗或预防由一种微生物病原体造成的、或与该微生物病原体相关联的一种病害的方法,该方法包括向该受试者给予、或以其他方式将该受试者暴露于一个有效量的一种组合物,该组合物包含选自帕氏乳酸杆菌、布赫纳氏乳酸杆菌、瑞氏乳酸杆菌、玉米乳酸杆菌、干酪乳酸杆菌、类干酪乳酸杆菌、于2012年12月14日以检索号V12/022849保藏在澳大利亚国家计量研究院的在此命名为‘T9’的菌株、以及于2012年12月14日以检索号V12/022850保藏在澳大利亚国家计量研究院的在此命名为‘TB’的菌株的乳

酸杆菌的至少一种菌株。

[0062] 在此进一步提供用于抑制一种微生物的生长方法,该方法包括将该微生物、或被该微生物定居的或能够被该微生物定居的一种环境暴露于一个有效量的一种组合物,该组合物包含选自帕氏乳酸杆菌、布赫纳氏乳酸杆菌、瑞氏乳酸杆菌、玉米乳酸杆菌、干酪乳酸杆菌、类干酪乳酸杆菌、于2012年12月14日以检索号V12/022849保藏在澳大利亚国家计量研究院的在此命名为‘T9’的菌株、以及于2012年12月14日以检索号V12/022850保藏在澳大利亚国家计量研究院的在此命名为‘TB’的菌株的乳酸杆菌的至少一种菌株。

[0063] 还提供了新颖的生物控制组合物,其用于治疗 and 预防由微生物病原体造成的感染、以及由此类感染造成的或与此类感染相关联的病害,并且用于抑制微生物的生长。

[0064] 根据本披露,该微生物病原体或微生物可以是能够在任何植物或动物物种中感染和/或造成病害的一种真菌性或细菌性病原体。因此,本披露的方法和组合物可用于治疗和预防植物和动物的真菌性病害,如腐烂症、萎蔫病、锈病、斑病、枯萎病、溃疡病、白粉病以及霉病。本披露的方法和组合物还可用于治疗 and 预防植物和动物的细菌性病害,包括菌瘿、疮痂病以及如乳腺炎的其他病害。

[0065] 在示例性实施例中,在此披露的方法和组合物可用于治疗和预防选自以下各项的真菌性病害:镰孢菌干腐病、镰孢菌萎蔫病、黑点病、晚疫病、黑痣病、立枯病、红粉病、靶斑病、巴拿马病、条锈病(黄锈病)、软腐病、茎锈病(黑锈病)、灰霉病、疫霉心腐病、黑穗病、疫腐病(*Phytophthora rot*)、花生锈病、丝核菌茎腐病、腐败病、真菌性壳斑病(*fungal husk spot*)、枝干溃疡病、白纹羽病、黄萎病以及姜黄化病,并且可用于治疗和预防由这些病害的致病物造成的感染。在受试者为一种植物的情况下,受病害影响的植物可以是例如一种食用作物(用于人或其他动物),如任何产生果实、蔬菜、坚果、种子或谷物的植物。示例性作物植物包括但不限于块茎和其他地面下蔬菜(如马铃薯、甜菜根、小红萝卜、胡萝卜、洋葱等)、地面生长或藤本蔬菜(如南瓜和南瓜家族的其他成员、黄豆、豌豆、芦笋等)、叶菜类(如莴苣、甜菜、菠菜、苜蓿等)、其他蔬菜(如西红柿、甘蓝(包括西兰花)、鳄梨等)、果实类(如浆果类、橄榄、包括油桃和蜜桃的核果类、包括芒果和香蕉的热带水果、苹果、梨、西瓜、柑橘、橘子、柑橘、猕猴桃、椰子等)、谷类(如大米、玉米、小麦、大麦、小米、燕麦、黑麦等)、坚果类(如澳洲坚果、花生、巴西坚果、欧榛、核桃、杏仁等)、以及其他经济上有价值的作物和植物(如大蒜、姜、甘蔗、大豆、向日葵、油菜、高粱、牧草、草坪草等)。

[0066] 在受试者为一种动物的情况下,在具体的示例性实施例中,可以通过将组合物施用到在其上饲养该动物的牧草、草或其他植物上来将该动物间接暴露于在此披露的一种组合物。在此类实施例中,示例性动物是奶牛。

[0067] 在示例性实施例中,在此披露的方法和组合物可用于治疗和预防选自以下各项的细菌性病害:疮痂病、细菌性斑病、细菌性斑点病、马铃薯疮痂病、细菌性软腐病、冠瘿病和乳腺炎,并且可用于治疗和预防由这些病害的致病物造成的感染。

[0068] 在此披露的方法和组合物针对其应用的真菌性病原体包括但不限于:镰孢属物种,如尖孢镰孢菌及其专化形式,包括姜专化型尖孢镰孢菌、西瓜专化型尖孢镰孢菌以及古巴专化型尖孢镰孢菌;马铃薯炭疽病菌(*Collectotrichum coccodes*);疫霉属物种(*Phytophthora spp.*),如致病疫霉(*Phytophthora infestans*)、红腐疫霉(*Phytophthora erythroseptica*)、樟疫霉(*Phytophthora cinnamomi*);立枯丝核菌(*Rhizoctonia*

*solani*);多主棒孢菌(*Corynespora cassiicola*);柄锈菌属物种,如落花生柄锈菌(*Puccinia arachidis*)、条锈菌(*Puccinia striiformis*)、小麦专化型禾柄锈菌(*Puccinia graminis f.sp.tritici*);灰葡萄孢菌;丝核菌;群结腐霉(*Pythium myriotylum*);马卡假尾孢(*Psuedocercospora macadamiae*);白纹羽病菌(*Rosellinia necatrix*);轮枝菌属物种(*Verticillium spp.*),如*Verticillium deliliae*;两型孢瓶霉属真菌;根串珠霉属物种;稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*)。

[0069] 在此披露的方法和组合物针对其应用的细菌性病原体包括但不限于:疮痂病链霉菌;黄单胞菌属物种(*Xanthomonas spp.*),如野油菜黄单胞菌辣椒斑点病致病变种(*Xanthomonas campestris pv.Vesicatoria*);假单胞菌属物种(*Pseudomonas spp.*),如萨氏假单胞菌(*P.savastanoi*)、丁香假单胞菌(*P.syringae*)、铜绿假单胞菌(*P.aeruginosa*)、以及荧光假单胞菌(*P.fluorescens*);大肠杆菌;单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*);葡萄球菌属物种,如金黄色葡萄球菌;链球菌属物种,如乳房链球菌;根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*);洋葱伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia cepacia*);胡萝卜软腐欧文氏菌(*Erwinia carotovora*);菊欧文氏菌(*Erwinia chrysanthemi*);成团泛菌;青枯雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*);斯氏泛菌(*Pantoea stewartii*);嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*);弧菌属物种(*Vibrio spp.*),如鳃弧菌(*V.anguillarum*)、哈维氏弧菌(*V.harveyi*)、霍乱弧菌(*V.cholera*)、以及副溶血弧菌(*V.parahaemolyticus*);胸膜肺炎放线杆菌(*Actinobacillus pleuropneumoniae*);紫色色杆菌(*Chromobacter violaceum*);贝纳氏立克次体(*Coxiella burnetti*);土拉弗朗西斯菌(*Francisella tularensis*);流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenza*);多杀巴斯德菌(*Pasteurella multocida*);弗氏志贺菌(*Shigella flexneri*);伤寒沙门菌(*Salmonella typhi*);鼠伤寒沙门菌(*Salmonella typhimurium*);鼠疫耶尔森菌(*Yersinia pestis*);以及假结核耶尔森菌(*Yersinia pseudotuberculosis*)。

[0070] 本领域的技术人员将认识到在此披露的真菌性病原体和病害,以及细菌性病原体和病害仅仅是示例性的,并且本披露的范围不受这些限制。许多其他真菌性病原体和病害,以及细菌性病原体和病害应是本领域技术人员所公知的,并且本披露的方法和组合物也被用于对抗这些。

[0071] 在此披露的具体实施例中,在此披露的组合物包含选自帕氏乳酸杆菌、布赫纳氏乳酸杆菌、瑞氏乳酸杆菌、玉米乳酸杆菌、短乳酸杆菌以及迪氏乳酸杆菌的一种或多种细菌物种的菌株。在替代性实施例中,组合物可包含源自其中已培养以上提及的菌株的培养基的培养上清液或无细胞滤液。在替代性实施例中,在此披露的组合物包含选自帕氏乳酸杆菌、布赫纳氏乳酸杆菌、瑞氏乳酸杆菌、玉米乳酸杆菌、干酪乳酸杆菌、类干酪乳酸杆菌、于2012年12月14日以检索号V12/022849保藏在澳大利亚国家计量研究院的在此命名为‘T9’的菌株、以及于2012年12月14日以检索号V12/022850保藏在澳大利亚国家计量研究院的在此命名为‘TB’的菌株的一种或多种细菌物种的菌株。

[0072] 帕氏乳酸杆菌菌株可以是帕氏乳酸杆菌Lp18。在一个具体的实施例中,该帕氏乳酸杆菌菌株是于2011年10月27日以检索号V11/022945保藏在澳大利亚国家计量研究院的帕氏乳酸杆菌Lp18。布赫纳氏乳酸杆菌菌株可以是布赫纳氏乳酸杆菌Lb23。在一个具体的实施例中,该布赫纳氏乳酸杆菌菌株是于2011年10月27日以检索号V11/022946保藏在澳大利

利亚国家计量研究院的布赫纳氏乳酸杆菌Lb23。瑞氏乳酸杆菌菌株可以是瑞氏乳酸杆菌Lr24。在一个具体的实施例中,该瑞氏乳酸杆菌菌株是于2011年10月27日以检索号V11/022947保藏在澳大利亚国家计量研究院的瑞氏乳酸杆菌Lr24。玉米乳酸杆菌菌株可以是玉米乳酸杆菌Lz26。在一个具体的实施例中,该玉米乳酸杆菌菌株是于2011年10月27日以检索号V11/022948保藏在澳大利亚国家计量研究院的玉米乳酸杆菌Lz26。

[0073] 在另外的实施例中,在此披露的组合物可包含选自于2012年12月14日以检索号V12/022847保藏在澳大利亚国家计量研究院的迪氏乳酸杆菌(N3)、于2012年12月14日以检索号V12/022848保藏在澳大利亚国家计量研究院的帕氏乳酸杆菌(N11)、于2012年12月14日以检索号V12/022851保藏在澳大利亚国家计量研究院的短乳酸杆菌(TD)、类干酪乳酸杆菌、于2012年12月14日以检索号V12/022849保藏在澳大利亚国家计量研究院的在此命名为‘T9’的菌株、干酪乳酸杆菌、以及于2012年12月14日以检索号V12/022850保藏在澳大利亚国家计量研究院的在此命名为‘TB’的菌株的一种或多种菌株;或源自其中已培养一种或多种这些菌株中的培养基的培养上清液或无细胞滤液。

[0074] 本披露的组合物可进一步包含法伯尔醋酸菌的一种菌株,或源自其中已培养法伯尔醋酸菌的一种菌株的培养基的培养上清液或无细胞滤液。该法伯尔醋酸菌菌株可以是法伯尔醋酸菌Af15。在一个具体的实施例中,该法伯尔醋酸菌菌株是于2011年10月27日以检索号V11/022943保藏在澳大利亚国家计量研究院的法伯尔醋酸菌Af15。组合物可进一步包含一种酵母,或源自其中已培养一种酵母的培养基的培养上清液或无细胞滤液。该酵母可以是嗜酒假丝酵母的一种菌株。该嗜酒假丝酵母菌株可以是嗜酒假丝酵母Ce31。在一个具体的实施例中,该嗜酒假丝酵母菌株是于2011年10月27日以检索号V11/022944保藏在澳大利亚国家计量研究院的嗜酒假丝酵母Ce31。

[0075] 待加入到在此披露的组合物中的各个微生物菌株的浓度将取决于多种因素,包括所用各个菌株的身份和数量、待处理的微生物病原体、感染或病害、其中组合物被施用的形式以及施用该组合物的手段。对于任何给定的情况,适当的浓度可以通过本领域的普通技术人员仅仅使用常规实验来确定。仅以举例的方式,组合物中存在的每种菌株的浓度可以是约 $1 \times 10^2$ cfu/ml至约 $1 \times 10^{10}$ cfu/ml,并且可以是约 $1 \times 10^3$ cfu/ml、约 $2.5 \times 10^3$ cfu/ml、约 $5 \times 10^3$ cfu/ml、 $1 \times 10^4$ cfu/ml、约 $2.5 \times 10^4$ cfu/ml、约 $5 \times 10^4$ cfu/ml、 $1 \times 10^5$ cfu/ml、约 $2.5 \times 10^5$ cfu/ml、约 $5 \times 10^5$ cfu/ml、 $1 \times 10^6$ cfu/ml、约 $2.5 \times 10^6$ cfu/ml、约 $5 \times 10^6$ cfu/ml、 $1 \times 10^7$ cfu/ml、约 $2.5 \times 10^7$ cfu/ml、约 $5 \times 10^7$ cfu/ml、 $1 \times 10^8$ cfu/ml、约 $2.5 \times 10^8$ cfu/ml、约 $5 \times 10^8$ cfu/ml、 $1 \times 10^9$ cfu/ml、约 $2.5 \times 10^9$ cfu/ml、或约 $5 \times 10^9$ cfu/ml。在具体的示例性实施例中,乳酸杆菌菌株的终浓度是约 $2.5 \times 10^5$ cfu/ml,法伯尔醋酸菌的终浓度可以是约 $1 \times 10^6$ cfu/ml并且嗜酒假丝酵母的终浓度可以是约 $1 \times 10^5$ cfu/ml。

[0076] 本披露还涵盖的是在此所描述的微生物菌株的变体。如在此所使用,术语“变体”指的是在此披露并示例的微生物菌株的天然存在的和特定研发的变体或突变体。变体可以具有或不具有在此示例的特定菌株的相同鉴定生物特征,只要就治疗或预防由微生物病原体造成的感染、或者治疗或预防由微生物病原体造成的或与微生物病原体相关联的病害而言,它们享有类似的有利特性即可。用于制备在此示例的微生物菌株的变体的适合方法的说明性例子包括但不限于:基因整合技术,如由插入元件或转座子或通过同源重组介导的那些、用于修饰、插入、去除、激活基因或使基因沉默的其他DNA重组技术、种内原生质

体融合、通过用紫外线或X射线辐射、或通过用一种化学诱变剂如亚硝基胍、甲基磺酸甲酯、氮芥等处理而引起的突变、以及噬菌体介导的转导。适合且可适用的方法是本领域中熟知的,并且被描述在例如尤其是J.H.米勒(J.H.Miller),分子遗传学实验(Experiments in Molecular Genetics),冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press),冷泉港,纽约,(1972);J.H.米勒,细菌遗传学简明教程(A Short Course in Bacterial Genetics),冷泉港实验室出版社,冷泉港,纽约(1992);以及J.萨姆布鲁克(J.Sambrook)、D.拉塞尔(D.Russell),分子克隆:实验手册(Molecular Cloning:A Laboratory Manual),第三版,冷泉港实验室出版社,冷泉港,纽约(2001)中。

[0077] 如在此所使用的术语“变体”还涵盖与在此披露的菌株在系统发生学上密切相关的微生物菌株,以及在一个或多个系统发生学上的信息标记如rRNA基因、延长和起始因子基因、RNA聚合酶亚基基因、DNA回旋酶基因、热激蛋白基因以及recA基因处与在此披露的菌株具有基本序列一致性的菌株。例如,如在此所涵盖的一种“变体”菌株的16S rRNA基因可与在此披露的一种菌株享有约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序列一致性。

[0078] 本披露的方法可进一步包括向一种需要处理的受试者给予,或以其他方式将该受试者暴露于一种或多种抗微生物剂。可在同一时间或在不同时间即同时或依序地给予或暴露于在此披露的一种组合物以及一种抗微生物剂。抗微生物剂可与这些方法中使用的微生物菌株共同配制。因此在此披露的组合物可包含一种或多种抗微生物剂。在其中微生物菌株和抗微生物剂被配制在不同的组合物中的情况下,它们可通过相同或不同路径或手段来给予或递送。

[0079] 适合于在此描述的方法的示例性抗微生物剂包括但不限于抗生素、去污剂、表面活性剂、诱导氧化应激反应的试剂、细菌素和抗微生物酶(例如,脂肪酶、链霉蛋白酶以及裂解酶)和各种其他蛋白水解酶和核酸酶、肽以及噬菌体。抗微生物剂可以是天然的或合成的。可根据具体情况,针对本发明的具体应用选择使用的抗微生物剂,并且本领域技术人员应了解本发明的范围不受具体抗微生物剂的性质或身份的限制。抗微生物剂的非限制性例子包括氟喹诺酮、氨基糖苷、糖肽、林可酰胺、头孢菌素及相关 $\beta$ -内酰胺、大环内酯、硝基咪唑、青霉素、多粘菌素、四环素、以及它们的任何组合。例如,本发明的方法可使用醋氨苯砒(acedapsone);磺胺苯砒钠(acetosulfone sodium);阿来霉素(alamecin);阿来西定(alexidine);阿姆地诺西林(amdinocillin);阿姆地诺西林双酯(amdinocillin pivoxil);阿米环素(amicycline);氨氟沙星(amifloxacin);甲磺酸氨氟沙星(amifloxacin mesylate);阿米卡星(amikacin);硫酸阿米卡星(amikacin sulfate);氨基水杨酸(aminosalicylic acid);氨基水杨酸钠(aminosalicylate sodium);阿莫西林(amoxicillin);安福霉素(amphomycin);氨苄西林(ampicillin);氨苄西林钠(ampicillin sodium);阿帕西林钠(apalcillin sodium);安普霉素(apramycin);天冬菌素(aspartocin);硫酸阿司米星(astromicin sulfate);阿维霉素(avilamycin);阿伏霉素(avoparcin);阿奇霉素(azithromycin);阿洛西林(azlocillin);阿洛西林钠(azlocillin sodium);盐酸巴氨西林(bacampicillin hydrochloride);杆菌肽(bacitracin);亚甲基双水杨酸杆菌肽(bacitracin methylene disalicylate);杆菌肽锌(bacitracin zinc);班贝霉素(bambermycins);苯沙酸钙(benzoylpas calcium);红霉素(erythromycin);硫酸

庆大霉素 (betamycin sulfate); 比阿培南 (biapenem); 比尼霉素 (biniramycin); 盐酸苯柳胺酯 (biphenamine hydrochloride); 硫酸镁双硫氧吡啶 (bispyrithione magsulfex); 布替卡星 (butikacin); 硫酸丁酰苄菌素 (butirosin sulfate); 硫酸卷曲霉素 (capreomycin sulfate); 卡巴多司 (carbadox); 羧苄西林二钠 (carbenicillin disodium); 卡茛西林钠 (carbenicillin indanyl sodium); 卡非西林钠 (carbenicillin phenyl sodium); 羧苄青霉素钾 (carbenicillin potassium); 卡芦莫南钠 (carumonam sodium); 头孢克洛 (cefaclor); 头孢羟氨苄 (cefadroxil); 头孢孟多 (cefamandole); 头孢孟多酯钠 (cefamandole nafate); 头孢孟多钠 (cefamandole sodium); 头孢帕罗 (cefaparole); 头孢曲嗪 (cefatrizine); 头孢氟唑钠 (cefazaflur sodium); 头孢唑啉 (cefazolin); 头孢唑林钠 (cefazolin sodium); 头孢拉宗 (cefbuperazone); 头孢地尼 (cefdinir); 头孢吡肟 (cefepime); 盐酸头孢吡肟 (cefepime hydrochloride); 头孢替考 (cefetecol); 头孢克肟 (cefixime); 盐酸头孢甲肟 (cefmenoxime hydrochloride); 头孢美唑 (cefmetazole); 头孢美唑钠 (cefmetazole sodium); 头孢尼西单钠 (cefonicid monosodium); 头孢尼西钠 (cefonicid sodium); 头孢哌酮钠 (cefoperazone sodium); 头孢雷特 (ceforanide); 头孢噻肟钠 (cefotaxime sodium); 头孢替坦 (cefotetan); 头孢替坦二钠 (cefotetan disodium); 盐酸头孢替安 (cefotiam hydrochloride); 头孢西丁 (cefoxitin); 头孢西丁钠 (cefoxitinsodium); 头孢咪唑 (cefpimizole); 头孢咪唑钠 (cefpimizole sodium); 头孢匹胺 (cefpiramide); 头孢匹胺钠 (cefpiramide sodium); 硫酸头孢匹罗 (cefpirome sulfate); 头孢泊肟酯 (cefpodoxime proxetil); 头孢丙烯 (cefprozil); 头孢沙定 (cefroxadine); 头孢磺啉钠 (cefsulodin sodium); 头孢他啶 (ceftazidime); 头孢布烯 (ceftibuten); 头孢唑肟钠 (ceftizoxime sodium); 头孢曲松钠 (ceftriaxone sodium); 头孢呋辛 (cefuroxime); 头孢呋辛酯 (cefuroxime axetil); 头孢呋辛匹赛酯 (cefuroxime pivoxetil); 头孢呋辛钠 (cefuroxime sodium); 头孢乙腈钠 (cephacetrile sodium); 头孢氨苄 (cephalexin); 盐酸头孢氨苄 (cephalexin hydrochloride); 头孢来星 (cephaloglycin); 头孢噻啉 (cephaloridine); 头孢噻吩钠 (cephalothin sodium); 头孢匹林钠 (cephapirin sodium); 头孢拉啶 (cephradine); 盐酸西托环素 (cetocycline hydrochloride); 乙酰氯霉素 (cetophenicol); 氯霉素 (chloramphenicol); 氯霉素棕榈酸酯 (chloramphenicol palmitate); 氯霉素泛酸酯复合物 (chloramphenicol pantothenate complex); 琥珀酸钠氯霉素 (chloramphenicol sodium succinate); 氨基苯磷酸氯己定 (chlorhexidine phosphanilate); 氯二甲酚 (chloroxylenol); 金霉素硫酸氢盐 (chlortetracycline bisulfate); 盐酸金霉素 (chlortetracycline hydrochloride); 西诺沙星 (cinoxacin); 环丙沙星 (ciprofloxacin); 盐酸环丙沙星 (ciprofloxacin hydrochloride); 西罗霉素 (cirolemycin); 克拉霉素 (clarithromycin); 盐酸克林沙星 (clinafloxacin hydrochloride); 克林霉素 (clindamycin); 盐酸克林霉素 (clindamycin hydrochloride); 盐酸克林霉素棕榈酸酯 (clindamycin palmitate hydrochloride); 克林霉素磷酸酯 (clindamycin phosphate); 氯法齐明 (clofazimine); 苄星氯唑西林 (cloxacillin benzathine); 氯唑西林钠 (cloxacillin sodium); 氯己定 (chlorhexidine); 氯羟喹啉 (cloxyquin); 多粘菌素 E 甲磺酸钠 (colistimethate sodium); 硫酸粘杆菌素 (colistin sulfate); 香豆霉素 (coumermycin); 香豆霉素钠 (coumermycin

sodium);环己西林(cyclacillin);环丝氨酸(cycloserine);达福普汀(dalfopristin);氨苯砒(dapsone);达托霉素(daptomycin);地美环素(demeclocycline);盐酸地美环素(demeclocycline hydrochloride);去甲环素(demecycline);地奴真菌素(denofungin);二氢藜芦啉(diaveridine);双氯西林(dicloxacillin);双氯西林钠(dicloxacillin sodium);硫酸双氢链霉素(dihydrostreptomycin sulfate);双硫氧吡啉(dipyrithione);地红霉素(dirithromycin);多西环素(doxycycline);多西环素钙(doxycycline calcium);多西环素磷酸复合物(doxycycline fosfatex);盐酸多西环素(doxycycline hyclate);屈克沙星钠(droxacin sodium);依诺沙星(enoxacin);依匹西林(epicillin);盐酸差向四环素(epitetracycline hydrochloride);红霉素(erythromycin);醋硬脂红霉素(erythromycin acistrate);依托红霉素(erythromycin estolate);琥乙红霉素(erythromycin ethylsuccinate);葡庚糖酸红霉素(erythromycin gluceptate);乳糖酸红霉素(erythromycin lactobionate);红霉素丙酸酯(erythromycin propionate);硬脂酸红霉素(erythromycin stearate);盐酸乙胺丁醇(ethambutol hydrochloride);乙硫异烟胺(ethionamide);氟罗沙星(fleroxacin);氟氯西林(floxacillin);氟氟丙氨酸(fludalanine);氟甲喹(flumequine);磷霉素(fosfomycin);复美欣氨基丁三醇(fosfomycin tromethamine);呋莫西林(fumoxicillin);呋唑氯铵(furazolium chloride);酒石酸呋噻咪唑(furazolium tartrate);夫西地酸钠(fusidate sodium);夫西地酸(fusidic acid);更昔洛韦(ganciclovir)和更昔洛韦钠(ganciclovir sodium);硫酸庆大霉素(gentamicin sulfate);格洛莫南(gloximonam);短杆菌肽(gramicidin);卤普罗近(haloprogin);海他西林(hetacillin);海他西林钾(hetacillin potassium);海克西定(hexedine);依巴沙星(ibafloxacin);亚胺培南(imipenem);异康唑(isoconazole);异帕米星(isepamicin);异烟肼(isoniazid);交沙霉素(josamycin);硫酸卡那霉素(kanamycin sulfate);北里霉素(kitasamycin);左呋喃他酮(levofuraltadone);左普匹西林钾(levopropylcillin potassium);来红霉素(lexithromycin);林可霉素(lincomycin);盐酸林可霉素(lincomycin hydrochloride);洛美沙星(lomefloxacin);盐酸洛美沙星(lomefloxacin hydrochloride);甲磺酸洛美沙星(lomefloxacin mesylate);氯碳头孢(loracarbef);磺胺米隆(mafenide);甲氯环素(meclocycline);磺基水杨酸甲氯环素(meclocycline sulfosalicylate);巨霉素磷酸二氢钾(megalomicin potassium phosphate);美喹多司(mequidox);美罗培南(meropenem);甲烯土霉素(methacycline);盐酸甲烯土霉素(methacycline hydrochloride);乌洛托品(methenamine);马尿酸乌洛托品(methenamine hippurate);扁桃酸乌洛托品(methenamine mandelate);甲氧西林钠(methicillin sodium);美替普林(metioprim);盐酸甲硝唑(metronidazole hydrochloride);磷酸甲硝唑(metronidazole phosphate);美洛西林(mezlocillin);美洛西林钠(mezlocillin sodium);米诺环素(minocycline);盐酸米诺环素(minocycline hydrochloride);盐酸米林霉素(mirincamycin hydrochloride);莫能霉素(monensin);莫能霉素钠(monensin sodium);萘夫西林钠(nafcillin sodium);萘啶酸钠(nalidixate sodium);萘啶酸(nalidixic acid);纳他霉素(natamycin);暗霉素(nebramycin);棕榈酸新霉素(neomycin palmitate);硫酸新霉素(neomycin sulfate);十一烯酸新霉素(neomycin Undecylenate);硫酸奈替米星(netilmicin sulfate);中性霉素

(neutramycin); 硝呋唑烯(nifuradene); 硝呋地腈(nifuraldezone); 硝呋太尔(nifuratel); 硝呋隆(nifuratrone); 硝呋达奇(nifurdazil); 硝呋米特(nifurimide); 硝呋吡醇(nifurpirinol); 硝呋奎唑(nifurquinazol); 硝呋噻唑(nifurthiazole); 硝环素(nitrocycline); 硝呋妥因(nitrofurantoin); 硝米特(nitromide); 诺氟沙星(norfloxacin); 新生霉素钠(novobiocin sodium); 氧氟沙星(ofloxacin); 昂托普利(ormetoprim); 苯唑西林(oxacillin) 和苯唑西林钠(oxacillin sodium); 肟莫南(oximonam); 肟莫南钠(oximonam sodium); 恶喹酸(oxolinic acid); 土霉素(oxytetracycline); 土霉素钙(oxytetracycline calcium); 盐酸土霉素(oxytetracycline hydrochloride); 帕地霉素(palidimycin); 对氯酚(parachlorophenol); 保洛霉素(paulomycin); 培氟沙星(pefloxacin); 甲磺酸培氟沙星(pefloxacin mesylate); 培那西林(penamecillin); 青霉素(penicillins), 如苄星青霉素G(penicillin G benzathine)、青霉素G钾(penicillin G potassium)、普鲁卡因青霉素G(penicillin G procaine)、青霉素G钠(penicillin G sodium)、青霉素V(penicillin V)、苄星青霉素V(penicillin V benzathine)、海巴青霉素V(penicillin V hydrabamine)、以及青霉素V钾(penicillin V potassium); 戊胺唑酮钠(pentizidone sodium); 对氨基水杨酸苯酯(phenyl aminosalicylate); 哌拉西林钠(piperacillin sodium); 吡苄西林钠(pirbenicillin sodium); 吡地西林钠(piridicillin sodium); 盐酸吡利霉素(pirlimycin hydrochloride); 盐酸匹氨青霉素(pivampicillin hydrochloride); 双羟萘酸匹氨青霉素(pivampicillin pamoate); 磺胺匹青霉素(pivampicillin probenatate); 硫酸多粘菌素b(polymyxin b sulfate); 甲基丝裂霉素(porfiromycin); 普匹卡星(propikacin); 吡嗪酰胺(pyrazinamide); 吡硫翁锌(pyritihione zinc); 醋酸喹地卡明(quindecamine acetate); 奎奴普丁(quinupristin); 消旋甲砒霉素(racephenicol); 雷莫拉宁(ramoplanin); 雷尼霉素(ranimycin); 瑞洛霉素(relomycin); 瑞普米星(repromicin); 利福布汀(rifabutin); 利福美坦(rifametane); 利福克昔(rifamexil); 利福米特(rifamide); 利福平(rifampin); 利福喷汀(rifapentine); 利福昔明(rifaximin); 罗利环素(rolitetracycline); 硝酸罗利环素(rolitetracycline nitrate); 罗沙米星(rosaramicin); 丁酸罗沙米星(rosaramicin butyrate); 丙酸罗沙米星(rosaramicin propionate); 磷酸罗沙米星钠(rosaramicin sodium phosphate); 硬脂酸罗沙米星(rosaramicin stearate); 罗索沙星(rosoxacin); 洛克沙砷(roxarsone); 罗红霉素(roxithromycin); 山环素(sancycline); 山费培南钠(sanfetrinem sodium); 沙莫西林(sarmoxicillin); 沙匹西林(sarpicillin); 司可芬净(scopafungin); 西索米星(sisomicin); 硫酸西索米星(sisomicin sulfate); 司帕沙星(sparfloxacin); 盐酸大观霉素(spectinomycin hydrochloride); 螺旋霉素(spiramycin); 盐酸司他霉素(stallimycin hydrochloride); 司替霉素(steffimycin); 硫酸链霉素(streptomycin sulfate); 链异烟肼(streptonicozid); 磺胺苯(sulfabenz); 磺胺苯酰(sulfabenzamide); 磺胺乙酰(sulfacetamide); 磺胺乙酰钠(sulfacetamide sodium); 磺胺西汀(sulfacytine); 磺胺嘧啶(sulfadiazine); 磺胺嘧啶钠(sulfadiazine sodium); 磺胺多辛(sulfadoxine); 磺胺林(sulfalene); 磺胺甲基嘧啶(sulfamerazine); 磺胺对甲氧嘧啶(sulfameter); 磺胺二甲嘧啶(sulfamethazine); 磺胺甲二唑(sulfamethizole); 磺胺甲噁

唑(sulfamethoxazole);磺胺间甲氧嘧啶(sulfamonomethoxine);磺胺噻唑(sulfamoxole);氨基苯磺酸锌(sulfanilate zinc);磺胺硝苯(sulfanitran);柳氮磺吡啶(sulfasalazine);磺胺异噻唑(sulfasomizole);磺胺噻唑(sulfathiazole);磺胺吡唑(sulfazamet);磺胺异噻唑(sulfisoxazole);磺胺乙酰异噻唑(sulfisoxazole acetyl);磺胺异噻唑二乙醇胺(sulfisoxazole diolamine);横粘菌素(sulfomyxin);硫培南(sulopenem);舒他西林(sultamicillin);森西林钠(suncillin sodium);盐酸酞氨西林(talampicillin hydrochloride);替考拉宁(teicoplanin);盐酸替马沙星(temafloxacin hydrochloride);替莫西林(temocillin);四环素(tetracycline);盐酸四环素(tetracycline hydrochloride);四环素磷酸复盐(tetracycline phosphate complex);四氧普林(tetroxoprim);甲砒霉素(thiamphenicol);苯硫甲氢霉素钾(thiphencillin potassium);羧噻吩青霉素甲苯酯钠(ticarcillin cresyl sodium);替卡西林二钠(ticarcillin disodium);替卡西林一钠(ticarcillin monosodium);替克拉酮(ticlatone);氯化乔多(tiodonium chloride);妥布霉素(tobramycin);硫酸妥布霉素(tobramycin sulfate);妥舒沙星(tosufloxacin);甲氧苄啶(trimethoprim);硫酸甲氧苄啶(trimethoprim sulfate);三磺嘧啶(trisulfapyrimidines);醋竹桃霉素(troleandomycin);硫酸丙大观霉素(trospectomycin sulfate);短杆菌素(tyrothricin);万古霉素(vancomycin);盐酸万古霉素(vancomycin hydrochloride);维及霉素(virginiamycin);佐博霉素(zorbamycin);以及它们的组合。

[0080] 在此披露的组合物可任选地进一步包含一种或多种另外的微生物生物体,例如,农艺学上有益的微生物。此类农艺学上有益的微生物可与本披露的生物体协同或协调,或以其他方式与其配合。农艺学上有益的微生物的例子包括芽胞杆菌属(*Bacillus* sp.)、假单胞菌属、根瘤菌属(*Rhizobium* sp.)、固氮螺菌属(*Azospirillum* sp.)、固氮菌属(*Azotobacter* sp.)、光能利用细菌和纤维素降解细菌、梭菌属(*Clostridium* sp.)、木霉属(*Trichoderma* sp.)等。本领域技术人员应了解,此列表仅仅是示例性的,并且不通过参照此处提供的具体例子而受限。

[0081] 在土壤环境中,可发现接种细菌难以在天然存在的竞争者和捕食者生物体之间存活。为了帮助本披露的组合物中存在的微生物在施用于环境中之后的存活,可将这些菌株中的一种或多种胶囊化于例如一种适合的聚合物基体之中。在一个例子中,胶囊可包括藻酸盐珠粒,如由杨(Young)等人,2006,植物生长-促进细菌于富含腐殖酸的藻酸盐珠粒中的封装(Encapsulation of plant growth-promoting bacteria in alginate beads enriched with humic acid),生物技术和生物工程(Biotechnology and Bioengineering),95:76-83所描述,其披露内容通过引用以其全文结合在此。本领域的技术人员应了解,可使用任何适合的胶囊化材料或基体。可使用本领域的技术人员已知的方法和技术来实现胶囊化。除了这些微生物,胶囊化的微生物可包括营养物质或组合物的其他组分。

[0082] 可将在此披露的组合物直接或间接地施用或给予至需要处理的任何植物或动物。在向植物施用的情况下,可将组合物施用到植物部分(如叶)或种子上,或可替代地,可施用到其中这些植物生长或将要生长、或其中已经播撒或将要播撒种子的土壤中。可以通过任何适合的手段进行施用并且可以任何适合的规模施用。例如,施用可包括倾倒、喷涂或喷

雾,包括大规模或批量喷涂或喷雾、在种植之前浸泡种子、和/或在种植之后浸润种子或幼苗。本领域的技术人员应了解,多种施用手段可组合使用(例如在种植之前浸泡种子,然后浸润已种植的种子和/或施用到幼苗或成熟植株上)。种子、幼苗或成熟植株可以根据需要处理多次。所需的施用数量可以由本领域的技术人员根据以下各项容易地确定:例如,所讨论的植物、待治疗的病原体或病害、治疗开始时植物的发育阶段、植物的健康状态、生长、植物生长的环境和/或气候条件、以及生长植物的目的。

[0083] 因此,根据本披露,在此披露的组合物可制备为任何适合的形式,取决于将组合物施用到土壤或植物种子或植物营养生长部分上所借助的那些手段。适合的形式可包括例如浆液、液体、以及固体形式。固体形式包括粉剂、颗粒体、较大的微粒形式以及球粒。固体形式可被胶囊化在水溶性包衣中(例如染色或未染色的明胶球体或胶囊)、延长释放包衣中,或者使用例如明胶、聚乙烯醇、乙基纤维素、邻苯二甲酸乙酸纤维素、或苯乙烯马来酸酐中的一种或多种通过微胶囊被胶囊化为一种自由流动的粉末。液体可包括水性溶液和水性悬浮液、以及乳油。

[0084] 为了实现在此披露的组合物的有效分散、粘附和/或在环境中的保存或稳定性,将这些组合物与适合的有助于分散、粘附以及保存/稳定性的载体组分一起配制可以是有利的。适合的载体应是本领域的技术人员已知的并且包括例如壳聚糖、蛭石、堆肥、滑石粉、乳粉、凝胶等。

[0085] 可以将另外的组分掺入本披露的组合物中,如腐殖物质、痕量元素、有机材料、渗透剂、宏量营养素、微量营养素以及其他土壤和/或植物添加剂。

[0086] 可以掺入的腐殖质或腐殖物质可包括但不限于源自例如氧化褐煤或风化褐煤的腐殖酸、富里酸以及腐殖酸盐如腐殖酸钾。

[0087] 所添加的有机材料可包括但不限于生物固体、动物粪肥、堆肥或堆肥有机副产物、活性污泥或经过加工的动物或植物副产品(包括血粉、羽毛粉、棉籽粉、海洋海带粉、海藻提取物、鱼精以及鱼粉)。

[0088] 渗透剂包括但不限于非离子润湿剂、基于去污剂的表面活性剂、硅酮和/或有机硅酮。适合的渗透剂应是本领域的技术人员已知的,非限制性例子包括聚合的聚氧化烯、阿洛醇(allinol)、壬苯醇醚、辛苯聚醇、氧基嘉实多(oxycastrol)、曲通(TRITON)、吐温(TWEEN)、硅酮树脂(Sylgard) 309、喜威(Silwet) L-77、以及和博克斯(Herbex)(硅酮/表面活性剂共混物)。

[0089] 包含在组合物中的示例性痕量元素在实例3中提供。然而,本领域的技术人员应认识到,适合的痕量元素不限于此,并且可以使用任何痕量元素(天然的或合成的)。

[0090] 可以添加到本披露的组合物的任选的另外的土壤和/或植物添加剂包括,例如,水捕获剂如沸石、酶、植物生长激素如赤霉素、以及有害生物控制剂如杀螨剂、杀昆虫剂、杀真菌剂以及杀线虫剂。

[0091] 可以冷冻干燥本披露的组合物,包括包含胶囊化菌株的组合物,以延长存放期和/或有助于农业应用如田间分散。

[0092] 在本说明书对任何现有出版物(或来源于其的信息)或任何已知素材的引用都不会且不应被视为承认或认可或以任何形式暗示该现有出版物(或来源于其的信息)或已知素材构成本说明书涉及的所努力领域内的一般常识的一部分。

[0093] 现在将参照以下具体实例描述本披露,所述实例不应当解释为以任何方式限制本发明的范围。

[0094] 实例

[0095] 以下实例示意本发明并且不应当解释为以任何方式限制贯穿本说明书而描述的披露内容的一般性质。

[0096] 实例1-微生物菌株和菌株组合

[0097] 以下微生物菌株和菌株组合用于在此描述的实验。

[0098] 帕氏乳酸杆菌Lp18分离自环境来源。部分16S rRNA测序表明其与具有危害等级1 (TRBA) 的帕氏乳酸杆菌AB 262735具有100%相似性。当在34℃下在MRS培养基上无氧培养3天时,Lp18产生奶油状、圆形、具轻微光泽、凸面的菌落,直径为1-2mm(兼性厌氧菌)。其微观形态是革兰氏阳性、不动的、短柱状矩形、大部分为二倍体。帕氏乳酸杆菌Lp18是于2011年10月27日以检索号V11/022945保藏在澳大利亚国家计量研究院。

[0099] 布赫纳氏乳酸杆菌Lb23分离自环境来源。部分16S rRNA测序表明其与具有危害等级1 (TRBA) 的布赫纳氏乳酸杆菌AB 429368具有99%相似性。当在34℃下在MRS培养基上无氧培养4天时,Lb23产生奶油状、有光泽的、凸面的菌落,直径为1-2mm(兼性厌氧菌)。其微观形态是革兰氏阳性、不动的、链柱状。布赫纳氏乳酸杆菌Lb23是于2011年10月27日以检索号V11/022946保藏在澳大利亚国家计量研究院。

[0100] 瑞氏乳酸杆菌Lr24分离自环境来源。部分16S rRNA测序表明其与具有危害等级1 (DSMZ) 的瑞氏乳酸杆菌AB 366389具有99%相似性。当在34℃下在MRS培养基上无氧培养4天时,Lr24产生奶油状、圆形、有光泽的的菌落,直径为0.5mm(兼性厌氧菌)。其微观形态是革兰氏阳性、不动的、短柱状的单或二倍体。瑞氏乳酸杆菌Lr24是于2011年10月27日以检索号V11/022947保藏在澳大利亚国家计量研究院。

[0101] API® 50CH条(生物梅里埃(Biomérieux))的发酵结果显示Lr24仅使L-阿拉伯糖、D-核糖、D-木糖、D-果糖以及七叶灵柠檬酸铁发酵。

[0102] 玉米乳酸杆菌Lz26分离自环境来源。部分16S rRNA测序表明其与具有危害等级1 (TRBA) 的玉米乳酸杆菌AB 008213.1具有99%相似性。当在34℃下在MRS培养基上无氧培养48小时时,Lz26产生白色、圆形、有光泽的、凸面的菌落,直径为1mm(兼性厌氧菌)。其微观形态是革兰氏阳性、不动的、短柱状,几乎全为球菌状二倍体以及一些链状。玉米乳酸杆菌Lz26是于2011年10月27日以检索号V11/022948保藏在澳大利亚国家计量研究院。

[0103] API® 50CH条(生物梅里埃)的发酵结果显示Lz26使D-阿拉伯糖、D-核糖、D-侧金盏花醇、D-半乳糖、D-葡萄糖、D-果糖、D-甘露糖、L-鼠李糖、卫矛醇、肌醇、D-甘露醇、D-山梨醇、N-乙酰葡萄糖胺、苦杏仁苷、熊果苷、七叶灵柠檬酸铁、水杨苷、D-纤维二糖、D-乳糖、D-海藻糖、D-松三糖、龙胆二糖、D-松二糖、D-塔格糖、L-岩藻糖、L-阿拉伯糖醇、葡萄糖酸钾以及2-酮葡萄糖酸钾。

[0104] 法伯尔醋酸菌Af15分离自环境来源。部分16S rRNA测序表明其与具有危害等级1 (DSMZ) 的法伯尔醋酸菌AM 905849具有100%相似性。当在34℃下在麦芽提取物培养基上培养3天时,AF15产生不透明物状、圆形、有光泽的、凸面的菌落,直径为1 mm(需氧的)。其微观形态是革兰氏阴性、柱状单或二倍体。法伯尔醋酸菌Af15是于2011年10月27日以检索号

V11/022943保藏在澳大利亚国家计量研究院。

[0105] 嗜酒假丝酵母Ce31分离自环境来源。部分16S rRNA测序表明其与嗜酒假丝酵母AB534618具有89%相似性。当在34℃下在麦芽提取物培养基上培养2天时,Ce31产生奶油状、扁平的、暗淡的、略圆的菌落,直径为2-3mm(需氧的)。其微观形态是出芽、卵形酵母。嗜酒假丝酵母Ce31是于2011年10月27日以检索号V11/022944保藏在澳大利亚国家计量研究院。

[0106] 在此描述的实验中使用的其他菌株为:于2012年12月14日以检索号V12/022847保藏在澳大利亚国家计量研究院的迪氏乳酸杆菌(N3);于2012年12月14日以检索号V12/022848保藏在澳大利亚国家计量研究院的帕氏乳酸杆菌(N11);于2012年12月14日以检索号V12/022851保藏在澳大利亚国家计量研究院的短乳酸杆菌(TD);于2012年12月14日以检索号V12/022849保藏在澳大利亚国家计量研究院的在此命名为‘T9’的菌株;以及于2012年12月14日以检索号V12/022850保藏在澳大利亚家计量研究院的在此命名为‘TB’的菌株。

[0107] 于2012年12月14日以检索号V12/022850保藏在澳大利亚家计量研究院的在此命名为‘TB’的菌株与干酪乳酸杆菌具有31.5%的全基因组整体相似性,如通过小16S核糖体RNA(rRNA)序列的SILVA BLAST比对搜索所确定的(夸斯特(Quast)等人,2013,SILVA核糖体RNA基因数据库计划:改进的数据处理和基于网络的工具(The SILVA ribosomal RNA gene database project:improved data processing and web-based tools),核酸研究(Nucl. Acid Res.),41(D1):D590-596)。API<sup>®</sup> 50CH条(生物梅里埃)的发酵结果显示TB使D-半乳糖、D-葡萄糖、D-果糖、D-甘露糖、甲基- $\alpha$ D-吡喃甘露糖苷、甲基- $\alpha$ D-吡喃葡萄糖苷、N-乙酰葡萄糖胺、苦杏仁苷、熊果苷、七叶灵柠檬酸铁、水杨苷、D-纤维二糖、D-麦芽糖、D-乳糖、蔗糖、D-松三糖、D-棉子糖、龙胆二糖、D-塔格糖以及葡萄糖酸钾。

[0108] 于2012年12月14日以检索号V12/022849保藏在澳大利亚家计量研究院的在此命名为‘T9’的菌株与类干酪乳酸杆菌具有95.3%的全基因组整体相似性,如通过SILVA BLAST比对搜索所确定的。API<sup>®</sup> 50CH条(生物梅里埃)的发酵结果显示T9使D-核糖、D-半乳糖、D-葡萄糖、D-果糖、D-甘露糖、D-甘露醇、D-山梨醇、甲基- $\alpha$ D-吡喃葡萄糖苷、N-乙酰葡萄糖胺、苦杏仁苷、熊果苷、七叶灵柠檬酸铁、水杨苷、D-纤维二糖、D-麦芽糖、蔗糖、D-海藻糖、菊糖、龙胆二糖、D-松二糖、D-塔格糖、L-阿拉伯糖醇、葡萄糖酸钾以及2-酮葡萄糖酸钾。

[0109] 以上描述的微生物菌株的以下组合用于下文描述的实验。

[0110] 在下文被称为‘GL组合物’的组合物包含六种以上所述的微生物菌株(即法伯尔醋酸菌Af15、帕氏乳酸杆菌Lp18、布赫纳氏乳酸杆菌Lb23、瑞氏乳酸杆菌Lr24、玉米乳酸杆菌Lz26、以及嗜酒假丝酵母Ce31),每种乳酸杆菌菌株的终浓度为 $2.5 \times 10^5$ cfu/ml、嗜酒假丝酵母Ce31的终浓度为 $1.0 \times 10^5$ cfu/ml、并且法伯尔醋酸菌Af15的终浓度为 $1.0 \times 10^6$ cfu/ml。

[0111] 在下文被称为‘混合液G’的组合物包含三种以上所述的微生物菌株,具体地是玉米乳酸杆菌Lz26、菌株TB(NMI检索号V12/022850)以及T9(NMI检索号V12/022849)。将新鲜的细菌培养株添加到2%痕量元素、0.3%腐殖质、4%糖蜜以及水的混合液中,对应的终浓度为 $1 \times 10^7$ cfu/ml的玉米乳酸杆菌Lz26、 $1 \times 10^7$ cfu/ml的TB、以及 $1 \times 10^7$ cfu/ml的T9。用磷酸将组合物调节到pH 3.8-4.2。

[0112] 在下文被称为‘混合液I’的组合物包含五种以上所述的微生物菌株,具体地是玉

米乳酸杆菌Lz26、布赫纳氏乳酸杆菌Lb23、帕氏乳酸杆菌Lp18、嗜酒假丝酵母Ce31、以及法伯尔醋酸菌Af15。将新鲜的细菌培养株添加到2%痕量元素、0.3%腐殖质、4%糖蜜以及水的混合液中,对应的终浓度为 $1 \times 10^7$ cfu/ml的玉米乳酸杆菌Lz26、 $1 \times 10^7$ cfu/ml的布赫纳氏乳酸杆菌Lb23、 $1 \times 10^7$ cfu/ml的帕氏乳酸杆菌Lp18、 $1 \times 10^5$ cfu/ml的嗜酒假丝酵母Ce31、以及 $1 \times 10^6$ cfu/ml的法伯尔醋酸菌Af15。用磷酸将组合物调节到pH 3.8-4.2。

[0113] 在下文被称为‘混合液2’的组合物包含五种以上所述的微生物菌株,具体地是玉米乳酸杆菌Lz26、帕氏乳酸杆菌Lp18、布赫纳氏乳酸杆菌Lb23、瑞氏乳酸杆菌Lr24、以及法伯尔醋酸菌Af15。将新鲜的细菌培养株添加到2%痕量元素、3%糖蜜以及反渗透(R0)水的无菌混合液中,对应的终浓度为 $1 \times 10^7$ cfu/ml的玉米乳酸杆菌Lz26、 $1 \times 10^6$ cfu/ml的帕氏乳酸杆菌Lp18、 $1 \times 10^6$ cfu/ml的布赫纳氏乳酸杆菌Lb23、 $1 \times 10^6$ cfu/ml的瑞氏乳酸杆菌Lr24、以及 $1 \times 10^6$ cfu/ml的法伯尔醋酸菌Af15。

[0114] 在下文被称为‘混合液3’的组合物包含四种以上所述的微生物菌株,具体地是玉米乳酸杆菌Lz26、帕氏乳酸杆菌Lp18、布赫纳氏乳酸杆菌Lb23、以及瑞氏乳酸杆菌Lr24。将乳酸杆菌属的新鲜培养株添加到3%糖蜜和反渗透水的无菌混合液中,对应的终浓度为 $1 \times 10^7$ cfu/ml的玉米乳酸杆菌Lz26、 $1 \times 10^6$ cfu/ml的帕氏乳酸杆菌Lp18、 $1 \times 10^6$ cfu/ml的布赫纳氏乳酸杆菌Lb23、以及 $1 \times 10^6$ cfu/ml的瑞氏乳酸杆菌Lr24。

[0115] 培养株的维持

[0116] 由每种分离株制备30%甘油原种并且维持在-80℃下用于长期培养储存。在4℃下,这些培养株的短期储存维持在琼脂斜面上(储存3个月)并且在琼脂平板上每月进行一次继代培养。为了维持分离株的原始性状,三次平板继代培养后,从-80℃原种制备新鲜平板。

[0117] 接种物和生长培养基

[0118] 使乳酸杆菌菌株在MRS液体培养基(Difco)中或在MRS琼脂平板上(取决于应用)、在具有或不具有空气的情况下(瑞氏乳酸杆菌优选厌氧)生长。这些培养株常规地在30℃-34℃的中温下生长2天。使醋酸杆菌属和Ethanolicola菌株在麦芽提取物液体培养基(Oxoid)中或在麦芽提取物琼脂平板上(取决于应用)有氧生长。这些培养株常规地在30℃-34℃的中温下生长2天。

[0119] 发酵罐‘种子’制备

[0120] 对于菌株个体,使用无菌的镍铬合金线,将单一菌落从新鲜培养板中移除,并转移到含有15mL无菌培养基的通用瓶中。将该瓶牢固地置于设置为30℃的振荡培养箱中,在140rpm下持续48小时(不对瑞氏乳酸杆菌进行振荡)。孵育之后,将可见浑浊的(cloudy)细菌生长。将‘种子’接种瓶储存在4℃下直到需要(最多1周)。

[0121] 典型地需要5%细菌接种以用于发酵操作。将储存的15ml培养株种子添加到肖特(Schott)瓶中,该瓶中含有总发酵罐工作量的5%的量的无菌培养基。孵育培养株并以与15ml种子相同的方式振荡。使用大型自控发酵罐来使每种分离株的纯培养株生长。存在碱、止泡剂以及葡萄糖的自动进料。典型地,该温度维持在30℃-34℃,pH 5.5,但是氧气与搅拌取决于微生物而不同。

[0122] 样品分析

[0123] 分离株的各自大规模培养之后,无菌吸取样品,并且在层流洁净工作台使用10

倍连续稀释液进行存活力计数。还制备了一个湿载玻片,并且使用相差显微镜观察净度以双重检查可能存在但是不能在该培养基上生长的污染物。48小时后,针对纯培养株(相同菌落形态)对存活力板进行检查并且对菌落计数以产生菌落形成单位每ml (cfu/ml) 值。还进行了革兰氏染色以用于显微镜观察。

[0124] 实例2-抗姜专化型尖孢镰孢菌的活性

[0125] 1955年在昆士兰 (Queensland) 首次报道了姜黄化病。它是由姜专化型尖孢镰孢菌造成的,姜专化型尖孢镰孢菌导致叶子黄变和萎蔫以及姜的根茎腐烂。此病害已对澳大利亚的姜产业造成了严重的经济损失。

[0126] 发明人进行了一项实验室实验,其中用实例1中所述的个体细菌菌株(在下文称为“GL”菌株)攻击植物病原体姜专化型尖孢镰孢菌,以确定它们是否对镰孢菌姜病原体表现出拮抗作用。

[0127] 姜专化型尖孢镰孢菌(在下文称为“foz”)的纯分离株购自植物标本馆 (BRIP) 昆士兰DPI培养物保藏中心 (Herbarium (BRIP) Queensland DPI culture collection)。常规地使Foz在室温下在PDA固体培养基上有氧生长。数天后看见粉红色的生长并且大约5天之后长成白色气生菌丝体。它也在麦芽提取物 (ME) 和MRS固体培养基上生长良好。常规地使帕氏乳酸杆菌Lp18、布赫纳氏乳酸杆菌Lb23、瑞氏乳酸杆菌Lr24、以及玉米乳酸杆菌Lz26在34℃下在MRS培养基上无氧生长。常规地使法伯尔醋酸菌Af15和嗜酒假丝酵母Ce31在34℃下在ME琼脂上有氧生长。使用四种不同的方法(孔板法、交叉划线板法、双板筛选法以及点滴培养法)根据以下实验方案测定GL细菌菌株的抗真菌活性。

[0128] 孔板法

[0129] • 针对每种病原体生长需要制备两个琼脂板。

[0130] • 使用一个1ml无菌尖端的大的端部,在一个板中切割出六个9mm孔,在第二个板中切割出七个9mm孔。

[0131] • 将2.5ml的无菌0.85%盐水添加到一个无菌螺帽小玻瓶(bijou bottle)中。使用一个已火焰灭菌的环将2-3个菌落(或真菌菌丝生长的2个环)从一个刚培养过病原体的板中移出、冲洗到盐水中并充分涡旋,这样使得溶液看起来类似于0.5麦氏标准(MacFarlands standard)。

[0132] • 将一个无菌拭子浸在盐水/菌落混合液中,并且使用轻微的压力,使拭子在板上Z字形前进,小心操作以便不破坏孔。此步骤重复三次,每次轻微地转动板。

[0133] • 将待测试的特异性GL菌株的刚培养过的培养液(1-3天)过滤通过一个无菌的0.45μm的过滤器,以便除去微生物。将滤液收集到一个无菌螺帽小玻瓶中。

[0134] • 用待测试的每种GL菌株标记板上的每个孔。将80μl的滤液添加到每个孔中。

[0135] • 将这些板静置、最上部封盖并且在室温下孵育。

[0136] • 24小时后,针对病原体生长对这些板进行检查。测量并记录任何透明的抑菌圈的直径(包括9mm的孔直径)。如果看到的是没有生长或微弱的生长,那么将这些板静置以孵育更长时间,直到看到良好生长为止。

[0137] 交叉划线板法

[0138] 使用此方法来研究正在生长的GL菌株自身而不是上清液滤液对病原体的作用。

[0139] • 使用一个已火焰灭菌的环沿着琼脂板的中心(相对于细菌生长需要)划出新鲜

GL培养物的若干个竖直划线(~1cm宽)。

[0140] • 将这些板在恰当的生长温度下孵育过夜,以实现GL菌株分离株的良好生长。

[0141] • 使用病原体的新鲜板培养物,从左到右穿过板水平划出一条单线。再孵育该板。

[0142] • 孵育24小时后,针对在真菌性病原体与GL菌株接种线之间的任何生长抑制区域对板的左手侧进行观察(右手侧是病原体和GL菌株的混合液)。如果需要,将这些板静置孵育更长时间,直到看到病原体的良好生长。

[0143] 双板筛选法

[0144] 为了克服与GL菌株和病原体的不同生长需要相关联的困难,开发了此方法。在一个两部分培养皿中进行筛选,每部分使用两种不同的生长培养基。

[0145] • 使用具有两个部分的无菌培养皿,将GL细菌培养琼脂倒入两个部分中。

[0146] • 一旦干燥并凝固,就在无菌条件下切掉每个部分的一半。用病原体生长培养基填充移取的四分之一部分。

[0147] • 将1-3新鲜的GL菌株菌落添加到2.5ml无菌的0.85%盐水中,以达到与0.5麦氏标准类似的密度。

[0148] • 使用一个无菌拭子,在每四分之一部分上进行三次涂布。将这些板在34℃下有氧(或无氧)(取决于微生物)孵育24-48小时。

[0149] • 从一个新鲜板中切出foz的3个无菌环大小的块,冲洗到5ml的无菌milli Q水中并充分涡旋混合。

[0150] • 使用一个无菌拭子,在病原体琼脂上进行一次涂布,小心靠近但不接触GL菌株。

[0151] • 双重包裹这些板,并且在适当的病原体生长温度(通常27℃)下孵育1-10天,取决于病原体生长速率。

[0152] • 测量并记录在病原体生长与GL菌株边缘之间的距离。

[0153] 点滴培养法

[0154] 此法是为了考察GL菌株的有活力的培养物对病原体的直接效应。如以上所述制备foz的涂抹的涂布板。将10 $\mu$ l的GL菌株的刚生长过夜的培养物在foz涂布板的顶部滴在标记斑点中。将这些板在室温下静置过夜,并且在24小时和48小时生长后进行观察。记录透明的抑菌圈直径。

[0155] 来自实验室实验的结果示于表1中。活跃生长的帕氏乳酸杆菌Lp18、布赫纳氏乳酸杆菌Lb23、瑞氏乳酸杆菌Lr24、以及玉米乳酸杆菌Lz26表现出foz的最佳生长抑制。源自这些生物体的生长培养物的无细胞滤液不抑制foz生长的这一事实表明在细菌与镰孢菌病原体之间的相互作用。法伯尔醋酸菌Af15和嗜酒假丝酵母Ce31显示出抑制foz生长的能力较弱。

[0156] 还积极抗foz的是活跃生长的菌株迪氏乳酸杆菌(N3)、短乳酸杆菌(TD)、以及菌株TB和T9,连同从N3、TB、T9、TD以及帕氏乳酸杆菌(N11)的培养物中抽取的无细胞滤液。

[0157] 表1. 在添加GL菌株之后,在27℃下24小时的姜专业化型尖孢镰孢菌的生长抑菌圈(mm)

	GL菌株 <sup>1</sup>	姜专化型尖孢镰孢菌生长			
		培养物滤液 孔	双板法 间隙	交叉划线法 间隙	点滴培养法 圈
[0158]	15	没有圈 (0)	0	0	生长阻滞
	18	0	21	27	32
	23	0	22	30	22
	24	0	8	8	17
	26	0	28	25	27
	31	0	0	0	生长阻滞
	N3	14	19	-	-
	N11	15	-	-	-
	TB	12	22	-	17
	TD	12	-	-	17
	T9	12	28	-	16

[0159] 由重复实验计算出的平均值

[0160] 1 15,法伯尔醋酸菌Af15;18,帕氏乳酸杆菌Lp18;23,布赫纳氏乳酸杆菌Lb23;24,瑞氏乳酸杆菌Lr24;26,玉米乳酸杆菌Lz26;31,嗜酒假丝酵母Ce31;N3,迪氏乳酸杆菌(V12/022847);N11,帕氏乳酸杆菌(V12/022848);TB(V12/022850);TD,短乳酸杆菌(V12/022851);T9(V12/022849)。

[0161] 实例3-西瓜幼苗中镰孢菌的控制

[0162] 感染的幼苗

[0163] 接着发明人研究了包含实例1中所述的细菌菌株的组合物对亨斯迈(Huntsman)西瓜幼苗中的植物病原体尖孢镰孢菌的作用。尖孢镰孢菌具有许多专化形式(专化型)。感染西瓜产生镰孢菌萎蔫病的形式是西瓜专化型尖孢镰孢菌。在此研究中使用的幼苗感染了尖孢镰孢菌并且获自土壤中具有显著的镰孢菌问题的西瓜田(由杰森·克洛茨(Jason Klotz)提供)。

[0164] 该组合物(以下被称为‘GL组合物’)包含六种实例1中列出的微生物菌株(即法伯尔醋酸菌Af15、帕氏乳酸杆菌Lp18、布赫纳氏乳酸杆菌Lb23、瑞氏乳酸杆菌Lr24、玉米乳酸杆菌Lz26、以及嗜酒假丝酵母Ce31),每种乳酸杆菌菌株的终浓度为 $2.5 \times 10^5$  cfu/ml、嗜酒假丝酵母的终浓度为 $1.0 \times 10^5$  cfu/ml,并且法伯尔醋酸菌的终浓度为 $1.0 \times 10^6$  cfu/ml。如实例1中所述使菌株生长并且将这些菌株与2%痕量元素、0.3%腐殖酸盐(可溶腐殖酸盐,莱维公司(LawrieCo))、3%糖蜜、以及0.1%-0.2%磷酸混合。添加磷酸至pH在3.8至4.0范围内的程度。痕量元素组分典型地包括以下各项(每1,000 L):

[0165] 表2.GL组合物的痕量元素组分

[0166]	材料	量(kg)
	水	200kg
	硫酸钾	15.25kg
	铜复合物 <sup>1</sup>	25.6kg

柠檬酸镁 <sup>2</sup>	175.0kg
柠檬酸铬 <sup>3</sup>	10.0kg
Sokolate钙 <sup>4</sup>	52.0kg
柠檬酸	11.15kg
硫酸亚铁	4.0kg
硫酸钴	750g
硫酸镍	250g
硫酸锰	4.0kg
脲	31.0kg
硫酸锌	4.0kg
硼砂	4.5kg
MAP	13.25kg
钼酸钠	2.5kg
乙酸	10.8kg
糖	50.0kg

[0167] 实验方案示于表3中。每个实验重复4次。

[0168] 表3

实验	GL根浸渍	GL浸润
A	根在1:10 GL中浸渍30分钟	无
B	无	浸润 (6 mL GL 1:10, 在根处)
C	在种植之前用GL处理土壤 <sup>1</sup>	无
D	对照 (H <sub>2</sub> O)	
	盆的总数量	20

[0170] 1对于实验A,称取2000g土壤并且在种植之前在拉链袋中用40L/Ha的GL组合物处理48小时,并充分混合。然后将内含物均等地分配在4个盆之中。

[0171] 将已知被尖孢镰孢菌感染的亨斯迈甜瓜幼苗栽在盆中,并且放置在~28℃-30℃的水培灯下。在到达时幼苗看起来没有活力并发黄。如表3中所述对盆栽幼苗浇水和处理。使用喷雾壶一天对所有盆浇水两次。随着植株生长,每棵植株的水量增加。

[0172] 在种植后一周初期观察后,用40L/Ha的1:10GL处理除了对照实验(D)中的那些植株之外的所有植株。植株每周接受一次处理,持续大约三周。

[0173] 对于实验A、B以及C,在初始处理后7天,观察到这些植株是萎蔫且干燥的。在第二次处理后48小时,实验A和B中的植株(以及实验C中的一盆)显得健康。实验C中的3盆中的植株和对照依然保持干燥并且死亡。结果在下文和图1中汇总。

[0174] 实验A:4棵植株中有4棵从尖孢镰孢菌感染中存活下来。与其他处理相比,这些植株具有更大且更充满生气的叶子。这些植株具有更强壮的主干。在所有重复中根系明显紧凑和密集。植株的平均重量是最高的并且是总体植株生长的一个良好的指示物。

[0175] 实验B:4棵植株中有3棵从尖孢镰孢菌感染中存活下来。一颗植株在第一周后被病原体感染。叶片大小是一般水平,并且植株健康状况良好。根系没有A中的密集。总体植株健

康状况是令人满意的。这些植株的主干是强壮的。

[0176] 实验C: 4棵植株中有1棵从尖孢镰孢菌感染中存活下来。总体植株生长和健康状况非常差。

[0177] 实验D: 所有重复被尖孢镰孢菌感染并且在一周内死亡。

[0178] 概括地说, 结果表明, 与其他处理和H<sub>2</sub>O对照相比, 在种植之前将感染幼苗的根在1:10GL溶液中浸泡30分钟是最成功的。显然, 将存在于GL溶液中的细菌引入到根的根际增加了植株对抗植物病原体尖孢镰孢菌而存活的可能性。

[0179] 感染土壤中幼苗的保护

[0180] 接着发明人研究了在此所述的微生物菌株组合物是否能够保护西瓜幼苗免受镰孢菌感染的土壤的影响。

[0181] 实验1

[0182] 含有24个穴盘(cell trays)的小的繁殖温室用于实验。用已知感染了侵袭西瓜的镰孢菌物种的充分混合的田间土壤填充这些盘。将‘糖果红’西瓜种的三粒种子种植在每个穴中。每个实验(formulation)/对照具有三个穴。将每个三元组在下面装入袋中, 以防止排水流出而造成实验之间的交叉污染。一个穴组含有一个水对照、一个高压灭菌的土壤对照(以2天间隔进行3次高压灭菌)以及该微生物组合物混合液G(参见实例1)。比较两个穴组; 浸泡的种子和未浸泡的种子。将种子在无菌水或混合液G中(按1:10稀释)浸泡1小时。将每粒种子种植至类似的深度并且在种植后立即向每个穴给药6ml无菌水或1ml的混合液G(1:10)加5ml无菌水。将繁殖室密封并且避免阳光直射置于环境温度下12天。

[0183] 实验2

[0184] 以基本上与实验1相同的方式设置实验2, 有两个不同之处。将种子浸泡30分钟, 并且将初始微生物组合物剂量减少三分之一(将300μl的1:10稀释的混合液G添加到3ml的无菌水中), 但是在一周后重复。将3ml无菌水添加到水对照中。

[0185] 实验1和实验2的结果在表4中示出。用混合液G(具有7天的后续第二剂量)浸泡的种子成功保护了西瓜幼苗在12天的生长期免受过镰孢菌感染。种子浸泡时间影响发芽率。与相当的未浸泡的幼苗相比, 实验2中较短的浸泡时间增加了所有幼苗的幼苗高度。有趣的是, 在两个实验中, 缺乏所有生物活性的高压灭菌土壤阻滞幼苗生长。

[0186] 表4. 西瓜幼苗的保护

[0187]

	4天		8天		12天	
	%发芽		平均高度 (mm)		%仍直立的	
	浸泡	未浸泡	浸泡	未浸泡	浸泡	未浸泡
实验1						
水	33	89	35	106	33	0
混合液G	33	89	108	131	100	13
高压灭菌的土壤	-	86	-	86	-	100
实验2						
水	78	100	67	56	43	67(微弱的)
混合液G	100	100	83	58	100	100
高压灭菌的土壤	100	67	47	33	100	100

[0188] 实例4-抗检索号24322的古巴专化型尖孢镰孢菌(营养体亲和群0120)的活性

[0189] 古巴专化型尖孢镰孢菌(生理小种1-4)是香蕉中的破坏性巴拿马病的致病病原体。由于严格的检疫控制,致病病原体不能直接在实验室中测试,然而,毒性较弱的菌株(foc检索号24322)是允许的。进行双板测定,该测定针对GL组合物(参见实例3)和实例1中描述的个体GL菌株激发病原体的生长。该试验一式两份进行并且重复。结果在表5中示出。结果表明,GL组合物完全抑制镰孢菌生长,并且还表现来自GL菌株玉米乳酸杆菌Lz26、短乳酸杆菌(TD)、TB以及T9的强的抗微生物作用。

[0190] 表5.在添加GL菌株之后,古巴专化型尖孢镰孢菌VCG 0120在不同的孵育时间下的双板生长抑菌圈(mm)

[0191]

古巴专化型尖孢镰孢菌VCG 0120				
GL组合物或 GL菌株 <sup>1</sup>	第一次筛选		第二次筛选	
	27°C	27°C/室温	27°C	27°C
	24小时 间隙	9天 间隙	48小时 间隙	7天 间隙
GL组合物	不生长	不生长	不生长	不生长
15	生长 (0)	生长 (0)	生长 (0)	生长 (0)
18	25	生长减少	27	15
23	25	生长减少	28	18
24	18	生长减少	20	7
26	37	19	不生长	不生长
31	生长 (0)	生长 (0)	生长 (0)	生长 (0)
N3	18	0	29	10
N11	16	0	3	0
TB	不生长	不生长	不生长	不生长
TD	不生长	20	30	20
T9	不生长	31	不生长	不生长

[0192] 由重复实验计算出的平均值

[0193] 1 15, 法伯尔醋酸菌Af15; 18, 帕氏乳酸杆菌Lp18; 23, 布赫纳氏乳酸杆菌Lb23; 24, 瑞氏乳酸杆菌Lr24; 26, 玉米乳酸杆菌Lz26; 31, 嗜酒假丝酵母Ce31; N3, 迪氏乳酸杆菌 (V12/022847); N11, 帕氏乳酸杆菌 (V12/022848); TB (V12/022850); TD, 短乳酸杆菌 (V12/022851); T9 (V12/022849)。

[0194] 实例5-抗其他真菌物种的活性

[0195] 马卡假尾孢是澳洲坚果的壳斑病的致病病原体。它使得坚果过早地从树上落下, 从而对澳洲坚果产业造成巨大的经济损失。一些品种的澳洲坚果树如A16比其他品种更易受影响。马卡假尾孢的纯分离株获自第一产业培养物保藏中心的昆士兰部门 (Queensland Department of Primary Industries culture collection)。如实例2中所述来测试实例1中所述的GL菌株抑制此真菌性病原体的生长的能力。下面将结果示于表6中。使用活跃生长的培养物和生长培养基 (滤液) 两者, 帕氏乳酸杆菌Lp18、布赫纳氏乳酸杆菌Lb23、瑞氏乳酸杆菌Lr24、玉米乳酸杆菌Lz26、迪氏乳酸杆菌 (N3)、TB以及T9都能够抑制该病原体的生长。

[0196] 表6. 在27°C下5天后马卡假尾孢的生长抑菌圈 (mm)

GL 菌株 <sup>1</sup>	马卡假尾孢		
	培养物滤液 孔圈 (mm)	交叉划线法 间隙 (mm)	双板法 间隙
[0197]	15	0	生长减少
	18	0	不生长
	23	0	不生长
	24	0	不生长
	26	0	不生长
	31	0	生长减少
	N3	0	不生长
	N11	0	-
	TB	0	不生长
	TD	0	不生长
	T9	0	不生长

[0198] 由重复实验计算出的平均值

[0199] 1 1 15, 法伯尔醋酸菌 Af15; 18, 帕氏乳酸杆菌 Lp18; 23, 布赫纳氏乳酸杆菌 Lb23; 24, 瑞氏乳酸杆菌 Lr24; 26, 玉米乳酸杆菌 Lz26; 31, 嗜酒假丝酵母 Ce31; N3, 迪氏乳酸杆菌 (V12/022847); N11, 帕氏乳酸杆菌 (V12/022848); TB (V12/022850); TD, 短乳酸杆菌 (V12/022851); T9 (V12/022849)。

[0200] 进行类似实验以测定实例1中所述的GL菌株抑制真菌性病原体立枯丝核菌(一系列植物物种中的根腐病、茎腐病、猝倒病(damping off)以及纤茎病(wire stem)的致病物)和灰葡萄孢菌(感染广泛多种作物(包括葡萄、番茄、以及草莓)的死体营养型真菌)生长的能力。使用如实例2中所述的双板筛选法,不同的是,将一小片真菌丛(fungal mat)直接放置在板的顶部,而不是被涂抹在板上。结果在表7中示出。

[0201] 表7. 立枯丝核菌和灰葡萄孢菌的生长抑制

GL 菌株 <sup>1</sup>	立枯丝核菌	灰葡萄孢菌
	双板法	双板法
[0202]		

[0203]

15	不生长	-
18	生长减少	不生长
23	不生长	不生长
24	生长减少	不生长
26	不生长	不生长
31	不生长	-
N3	生长减少	不生长
N11	生长减少	不生长
TB	不生长	不生长
TD	不生长	不生长
T9	不生长	不生长

[0204] 1 15, 法伯尔醋酸菌 Af15; 18, 帕氏乳酸杆菌 Lp18; 23, 布赫纳氏乳酸杆菌 Lb23; 24, 瑞氏乳酸杆菌 Lr24; 26, 玉米乳酸杆菌 Lz26; 31, 嗜酒假丝酵母 Ce31; N3, 迪氏乳酸杆菌 (V12/022847); N11, 帕氏乳酸杆菌 (V12/022848); TB (V12/022850); TD, 短乳酸杆菌 (V12/022851); T9 (V12/022849)。

[0205] 使用双板筛选法进行类似实验, 以确定实例1中所述的GL菌株和混合液抑制真菌性病原体番茄早疫病菌 (*Alternaria solani*)、马铃薯炭疽病菌 (*Colletotrichum coccodes*)、十字花科小球腔菌 (*Leptosphaeria maculans*) 以及核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 生长的能力。结果示于表8和表9中。

[0206] 表8. 番茄早疫病菌和马铃薯炭疽病菌的生长抑制

[0207]

GL菌株	番茄早疫病菌	马铃薯炭疽病菌
	(DAR34057)	(DAR37980)
	双板法 (4天, 28℃)	双板法 (4天, 28℃)
	间隙 (mm)	间隙 (mm)
Lp18	不生长	33
Lb23	不生长	不生长
Lr24	16、18	0
Lz26	不生长	不生长
TB	不生长	不生长
混合液G	0	0
混合液I	不生长	0

[0208] 表9. 十字花科小球腔菌和核盘菌的生长抑制

[0209]

GL菌株	十字花科小球腔菌	核盘菌
	(DAR73522)	(DAR76625)
	双板法 (4天, 28℃)	双板法 (4天, 25℃)

[0210]

	间隙 (mm)	间隙 (mm)
Lp18	不生长	不生长

Lb23	不生长	不生长
Lr24	生长阻滞	33
Lz26	不生长	不生长
TB	不生长	不生长
混合液G	生长阻滞	0
混合液I	-	生长阻滞

[0211] 实例6-抗马铃薯疮痂病菌的活性

[0212] 发明人进行了一项实验室实验,以确定实例1中所述的GL菌株抑制革兰氏阳性细菌疮痂病链霉菌(马铃薯疮痂病的致病物)生长的能力。

[0213] 疮痂病链霉菌的纯分离株获自塔斯马尼亚州新城的塔斯马尼亚农业研究所蔬菜中心(The Vegetable Centre,Tasmanian Institute of Agriculture,New Town,Tasmania)的安娜贝尔·威尔逊(Anabel Wilson)。常规地使疮痂病链霉菌在室温下于PDA固体培养基上有氧生长。数天后看见白色的生长并且大约5天之后长成灰色气生菌丝体。常规地使帕氏乳酸杆菌Lp18、布赫纳氏乳酸杆菌Lb23、瑞氏乳酸杆菌Lr24、以及玉米乳酸杆菌Lz26在34℃下在MRS培养基上无氧生长。常规地使法伯尔醋酸菌Af15和嗜酒假丝酵母Ce31在34℃下在ME琼脂上有氧生长。使用三种不同的方法(如实例2中描述的孔板法、交叉划线板法以及双板法)来确定细菌菌株的抗菌活性。

[0214] 下面将结果示于表10中。活跃生长的帕氏乳酸杆菌Lp18、布赫纳氏乳酸杆菌Lb23和玉米乳酸杆菌Lz26以及菌株TB表现出最佳的疮痂病链霉菌生长抑制。源自这些生物体的培养物的无细胞上清液不抑制疮痂病链霉菌生长的这一事实表明在GL菌株与病原体之间的相互作用。

[0215] 表10.在添加GL菌株后24小时疮痂病链霉菌的生长抑菌圈(mm)

GL菌株 <sup>1</sup>	疮痂病链霉菌生长		
	培养物滤液孔圈 (mm)	双板法间隙 (mm)	交叉划线法间隙 (mm)
18	0	不生长	不生长
23	0	26	不生长
24	0	19	15
26	0	不生长	不生长
N3		15	
N11		-	
TB	0	26	不生长
TD		-	
T9	0	26	不生长

[0217] 1 18,帕氏乳酸杆菌Lp18;23,布赫纳氏乳酸杆菌Lb23;24,瑞氏乳酸杆菌Lr24;26,玉米乳酸杆菌Lz26;31,嗜酒假丝酵母Ce31;N3,迪氏乳酸杆菌(V12/022847);N11,帕氏乳酸杆菌(V12/022848);TB(V12/022850);TD,短乳酸杆菌(V12/022851);T9(V12/022849)。

[0218] 实例7-抗乳腺炎的致病物的活性

[0219] 临床乳腺炎是乳品工业的严重问题。乳腺炎可由若干种不同的细菌物种造成,主要致病物种是革兰氏阳性物种金黄色葡萄球菌和乳房链球菌以及革兰氏阴性物种大肠杆菌。发明人研究了实例1中所述的GL菌株(单独和组合)抑制大肠杆菌的环境样品(分离株)、大肠杆菌的实验室菌株(ATCC25922)以及金黄色葡萄球菌和乳房链球菌的实验室菌株的生长能力。

[0220] 细菌培养物滤液的MIC的测定

[0221] 培养单一乳酸杆菌GL菌株的新鲜的过夜培养物。将3ml的过夜培养物在4,000rpm下旋转10分钟。倾析上清液并将上清液过滤通过一个0.45μl的注射过滤器(syringe filter)单元,进入一个无菌螺帽小玻瓶中。使用无菌0.85%盐水对来自各细菌培养物的无菌滤液以及一个MRS生长培养基对照进行1:1、1:3、1:5、1:10稀释。使用一个1ml无菌尖端的宽的端部,在一个新鲜营养琼脂板中切割出彼此间隔六个孔的洞。用三种乳腺炎病原体(稀释至0.5麦氏标准)中的一种涂抹板三次。将80μl的各稀释滤液(以及未稀释的和MRS)添加到六个孔中的每一个中。对于每种病原体以及每种细菌滤液重复此步骤。将这些板在34℃下孵育过夜。测量并记录被抑制生长的透明圈的直径。

[0222] 结果在表11、12以及13中示出。来自玉米乳酸杆菌Lz26、TB以及T9的生长培养物滤液表现出对所有三种乳腺炎病原体的抗微生物活性。滤液保持有效,直至1:3稀释度。所有三种病原体在不存在GL菌株时生长良好。

[0223] 表11. 大肠杆菌的生长抑制

GL 菌株 <sup>1</sup>	大肠杆菌 (ATCC25922)				
	圈直径 (mm)				
	浓度	1:1	1:3	1:5	1:10
Lz26	19	17	15	12	0
TB	16	12	10	0	-
T9	13	13	11	0	-
培养基	0	-	-	-	-
GL 菌株 <sup>1</sup>	大肠杆菌 (环境分离株)				
	圈 (mm)				
	浓度		1:2	1:5	1:10
Lz26	19	-	15	13	0

[0225] 表12. 金黄色葡萄球菌的生长抑制

GL 菌株 <sup>1</sup>	金黄色葡萄球菌 (ATCC25923)				
	圈 (mm) <sup>1</sup>				
	浓度	1:1	1:3	1:5	1:10
Lz26	19	16	13	6	0
TB	17	15	15	11	0
T9	18	15	15	0	-
培养基	0	-	-	-	-

[0227] 1圈是生长减少的(并不完全透明)。

[0228] 表13.乳房链球菌的生长抑制

[0229]	GL 菌株 <sup>1</sup>	乳房链球菌				
		圈 (mm)				
		浓度	1:1	1:3	1:5	1:10
	Lz26	40	24	20	14	0
	TB	>40	28	18	0	-
	T9	40	24	18	16	0
	培养基	0	-	-	-	-

[0230] 抑制病原体所需的最小CFU的测定

[0231] 在实验开始时,对六种乳酸杆菌GL菌株以及两种组合物(混合液2和混合液3;参见实例1)中的每一种的存活力进行测定。记录每种培养物的每ml菌落形成单位(cfu/ml)的数量(表14)。

[0232] 表14

[0233]	GL菌株/混合液	cfu/ml
	Lp18	$2.7 \times 10^8$
	Lb23	$1.9 \times 10^8$
	Lr24	$2.0 \times 10^8$
	Lz26	$9.0 \times 10^8$
	TB	$3.8 \times 10^7$
	T9	$1.3 \times 10^7$
	混合液2	$8.0 \times 10^5$
	混合液3	$2.4 \times 10^7$

[0234] 将每种菌株(或混合液)在无菌MRS培养基中1:100、1:1,000以及1:10,000稀释。倒营养琼脂/MRS双板(以上所述)。将100 $\mu$ l的稀释培养物涂布在双板(双份)的每个MRS四分之一上。使用小玻璃“曲棍球棒”将100 $\mu$ l涂布在培养基上。将这些板在34℃下厌氧孵育48小时。将三种病原体稀释到0.5麦氏标准,并且使用一个无菌拭子将每种病原体涂抹在双板的两种营养琼脂四分之一上。将这些板在34℃下再孵育2天。测量并记录生长的任何透明圈。零表示没有圈(不抑制)并且不生长表示病原体没有生长(完全抑制)。在对照营养琼脂板上划出每种病原体的一个涂抹线以证实它们在不存在GL菌株或组合物时的存活力。

[0235] 结果在表15、16以及17中示出。T9和混合液3的有活力的培养物是最有效的,需要少于100个菌落以便对所有三种导致乳腺炎的细菌物种产生抑制作用。将使用乳酸杆菌Lz26、Lb23以及T9来配制一种第三抗乳腺炎混合液。所有的三种病原体在不存在GL菌株/组合物时生长良好。

[0236] 表15

[0237]

GL 菌株/ 混合液	大肠杆菌 (ATCC25922)			
	圈 (mm)			
	浓度	1:100	1:1,000	1:10,000
Lp18	16	11	10	8
Lb23	不生长	30	17	11
Lr24	17	10	0	-
Lz26	不生长	不生长	不生长	不生长
TB	不生长	16	17	8
T9	不生长	不生长	不生长	不生长
混合液2	17	17	0	-
混合液3	不生长	不生长	不生长	21

[0238] 表16

[0239]

GL 菌株/混合液	金黄色葡萄球菌 (ATCC25923)			
	圈 (mm)			
	浓度	1:100	1:1,000	1:10,000
Lp18	22	24	19	18
Lb23	不生长	29	23	0
Lr24	22	18	6	0
Lz26	不生长	不生长	不生长	不生长
TB	?	不生长	21	18
T9	不生长	不生长	不生长	不生长
混合液2	?	23	30	20
混合液3	不生长	不生长	不生长	19

[0240] 表17

[0241]

GL 菌株/ 混合液	乳房链球菌			
	圈 (mm)			
	浓度	1:100	1:1,000	1:10,000
Lp18	16	15	14	11

[0242]

Lb23	不生长	不生长	不生长	不生长
Lr24	0	0	-	-
Lz26	不生长	没有圈, 微弱的背景菌苔 (faint background lawn)		
TB	不生长	10	10	0
T9	没有圈, 微弱的背景菌苔			
混合液2	没有圈, 微弱的背景菌苔			
混合液3	不生长	不生长	不生长	不生长

[0243] 还测定了在添加GL菌株后24小时细菌分离株的生长抑菌圈 (mm) (如以上实例中所描述的)。结果在表18、19以及20中示出。

[0244] 表18

[0245]

GL菌株 <sup>1</sup>	大肠杆菌 (环境分离株)			
	孔板法	点滴培养法	交叉划线法	双板法
	(透明圈包括孔直径)	(自生长边缘的圈)	(透明圈间隙)	(透明圈间隙)
18	12 mm, 模糊的	2 mm	30 mm	不生长
23	12 mm, 模糊的	5 mm	28mm	不生长
24	12 mm, 模糊的	26 mm	10 mm	不生长
26	14 mm	28 mm	33 mm	不生长
TB	15 mm	-	-	不生长
TD	14 mm	-	-	不生长
T9	15 mm	-	-	不生长
N3	-	-	-	不生长
N11	-	-	-	不生长

[0246] 1 18, 帕氏乳酸杆菌Lp18; 23, 布赫纳氏乳酸杆菌Lb23; 24, 瑞氏乳酸杆菌Lr24; 26, 玉米乳酸杆菌Lz26; TB (V12/022850); TD, 短乳酸杆菌 (V12/022851); T9 (V12/022849); N3, 迪氏乳酸杆菌 (V12/022847); N11, 帕氏乳酸杆菌 (V12/022848)。

[0247] 表19

[0248]

GL菌株 <sup>1</sup>	金黄色葡萄球菌 (ATCC25923)			
	孔板法	点滴培养法	交叉划线法	双板法
	(透明圈包括孔直径)	(自生长边缘的圈)	(透明圈间隙)	(透明圈间隙)
18	25 mm	28 mm	33 mm	不生长
23	23 mm	20 mm	30 mm	不生长
24	21 mm	18 mm	15 mm	不生长
26	28 mm	28 mm	30 mm	不生长
TB	30 mm	-	-	不生长

[0249]

TD	30 mm	-	-	不生长
T9	30 mm	-	-	不生长
N3	-	-	-	不生长
N11	-	-	-	不生长

[0250] 1 18, 帕氏乳酸杆菌Lp18;23, 布赫纳氏乳酸杆菌Lb23;24, 瑞氏乳酸杆菌Lr24;26, 玉米乳酸杆菌Lz26;TB (V12/022850);TD, 短乳酸杆菌 (V12/022851);T9 (V12/022849);N3, 迪氏乳酸杆菌 (V12/022847);N11, 帕氏乳酸杆菌 (V12/022848)。

[0251] 表20

[0252]

GL菌株 <sup>1</sup>	乳房链球菌	
	孔板法	双板法
	(透明圈包括孔直径)	(透明圈间隙)
18	15 mm, 模糊的	不生长
23	0	不生长
24	15 mm, 模糊的	不生长
26	15 mm	不生长
TB	16 mm	不生长
TD	16 mm	不生长
T9	18 mm	不生长
N3	-	不生长
N11	-	不生长

[0253] 1 18, 帕氏乳酸杆菌Lp18;23, 布赫纳氏乳酸杆菌Lb23;24, 瑞氏乳酸杆菌Lr24;26, 玉米乳酸杆菌Lz26;TB (V12/022850);TD, 短乳酸杆菌 (V12/022851);T9 (V12/022849);N3, 迪氏乳酸杆菌 (V12/022847);N11, 帕氏乳酸杆菌 (V12/022848)。

[0254] 实例8-抗萨氏假单胞菌的活性

[0255] 发明人还使用如实例2中所述的双板筛选法研究了实例1中所述的GL菌株抑制萨氏假单胞菌 (尤其是橄榄菌瘿病的致病物) 的生长的能力。结果在表21中示出。

[0256] 表21. 萨氏假单胞菌的生长抑制

[0257]

GL菌株 <sup>1</sup>	萨氏假单胞菌 (DAR 76118)
	双板法 (间隙, mm)
15	-
18	不生长
23	-
24	33
26	不生长
31	-
N3	各处微弱生长

[0258]

N11	不生长
TB	不生长
TD	不生长
T9	不生长

[0259] 1 15,法伯尔醋酸菌Af15;18,帕氏乳酸杆菌Lp18;23,布赫纳氏乳酸杆菌Lb23;24,瑞氏乳酸杆菌Lr24;26,玉米乳酸杆菌Lz26;31,嗜酒假丝酵母Ce31;N3,迪氏乳酸杆菌(V12/022847);N11,帕氏乳酸杆菌(V12/022848);TB(V12/022850);TD,短乳酸杆菌(V12/022851);T9(V12/022849)。

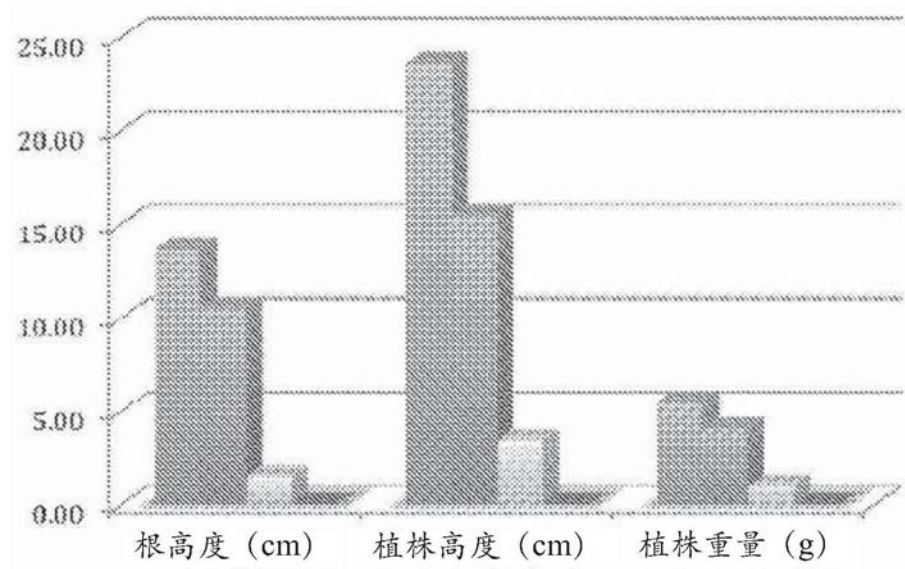


图1