



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101106900 B

(45) 授权公告日 2014. 04. 02

(21) 申请号 200580044343. 7

(22) 申请日 2005. 11. 14

(30) 优先权数据

11/020, 714 2004. 12. 23 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2007. 06. 22

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2005/041003 2005. 11. 14

(87) PCT国际申请的公布数据

W02006/071369 EN 2006. 07. 06

(73) 专利权人 贝克 - 安德伍德有限公司

地址 美国爱荷华州

(72) 发明人 杰里米·大卫·皮尔斯

玛丽安娜·卡彭特

(74) 专利代理机构 北京金信立方知识产权代理有限公司 11225

代理人 黄威

(51) Int. Cl.

A01C 1/06 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 86108366 A, 1987. 08. 19, 全文.

US 5695541 B, 1997. 12. 09, 说明书第 4 栏第 18 - 60 行, 第 5 栏第 9 - 18 行, 第 19 - 28 行, 第 3 栏第 49 - 67 行, 第 6 栏.

CN 1213507 A, 1999. 04. 14, 全文.

审查员 李超

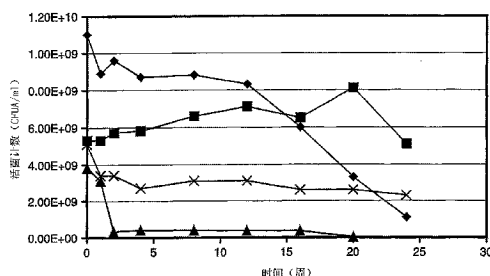
权利要求书2页 说明书7页 附图8页

(54) 发明名称

保质期延长及增强种子稳定性的液体细菌接种剂

(57) 摘要

本发明包括一种制备含有干燥剂的液体接种剂的方法。该方法能提高液体接种剂中细菌在包装容器内和施用于种子之后的存活率和稳定性。该方法包括提供细菌生长已达到近稳定期的液体接种剂, 以及将含有干燥剂的干燥处理剂加到上述液体接种剂中制得半干燥接种剂。该半干燥接种剂可进行包装和储存。它还可施用到种子上。



◆ 对照
▲ 5% 甘油
■ 20% 甘油
× 20% 甘油/5% 甘油

1. 一种制备半干燥液体接种剂的方法,该方法包括:

提供包括选自慢生根瘤菌株、根瘤菌、假单胞菌属和沙雷氏菌属中的一种或多种的细菌的液体接种剂,所述细菌生长已达到近稳定期;以及

将含有干燥剂的干燥处理剂加入足以半干燥上述液体接种剂的剂量到上述液体接种剂中制得半干燥液体接种剂,其中,所述干燥剂的重量占所述半干燥液体接种剂体积的 5-50%,其中,所述干燥剂是海藻糖、蔗糖或甘油中的一种或多种物质。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述半干燥液体接种剂的水分活度低于 0.990。

3. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述半干燥液体接种剂的水分活度低于 0.980。

4. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述液体接种剂按如下步骤制备:

将细菌接种到液体营养培养基中,获得细菌培养物;以及

对细菌培养物进行培养,让细菌生长到近稳定期后得到液体接种剂。

5. 根据权利要求 4 所述的方法,其中,所述细菌培养物的培养时间为 2-7 天。

6. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述干燥剂包括海藻糖;其中,所述海藻糖的重量占所述半干燥液体接种剂体积的 10-40%。

7. 根据权利要求 6 所述的方法,其中,所述海藻糖的重量占所述半干燥液体接种剂体积的 20-30%。

8. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述干燥剂包括海藻糖和甘油混合物。

9. 根据权利要求 8 所述的方法,其中,所述海藻糖的重量占所述半干燥液体接种剂体积的 5-40%,所述甘油的重量占所述半干燥液体接种剂体积的 1-10%。

10. 根据权利要求 9 所述的方法,其中,所述海藻糖的重量占所述半干燥液体接种剂体积的 20%,所述甘油的重量占所述半干燥液体接种剂体积的 5%。

11. 根据前述任一权利要求所述的方法,其中,该方法进一步包括包装所述半干燥液体接种剂。

12. 一种处理种子的方法,该方法包括:

提供包括选自慢生根瘤菌株、根瘤菌、假单胞菌属和沙雷氏菌属中的一种或多种的细菌的液体接种剂,所述细菌生长已达到近稳定期;

将含有干燥剂的干燥处理剂加入足以半干燥上述液体接种剂的剂量到上述液体接种剂中制得半干燥液体接种剂,其中,所述干燥剂的重量占所述半干燥液体接种剂体积的 5-50%,其中,所述干燥剂是海藻糖、蔗糖或甘油中的一种或多种物质;以及

将半干燥液体接种剂施用到种子上。

13. 根据权利要求 12 所述的方法,其中,所述种子包括豆科植物的种子。

14. 根据权利要求 12 或 13 所述的方法,其中,半干燥液体接种剂施用到种子上 10 周之后,种上细菌数大于 1×10^5 。

15. 根据权利要求 12 或 13 所述的方法,其中,该方法进一步包括在半干燥液体接种剂施用之后向种子内添加补充剂。

16. 一种制备干燥、可流动的接种剂的方法,该方法包括:

提供包括选自慢生根瘤菌株、根瘤菌、假单胞菌属和沙雷氏菌属中的一种或多种的细菌的液体接种剂,所述细菌生长已达到近稳定期;

将含有干燥剂的干燥处理剂加入足以半干燥上述液体接种剂的剂量到上述液体接种

剂中,制得半干燥液体接种剂,其中,所述干燥剂的重量占所述半干燥液体接种剂体积的5-50%,其中,所述干燥剂是海藻糖、蔗糖或甘油中的一种或多种物质;以及

将半干燥液体接种剂加到干燥载体中形成干燥、可流动的接种剂。

17. 根据权利要求 16 所述的方法,其中,该干燥载体是泥炭。

保质期延长及增强种子稳定性的液体细菌接种剂

技术领域

[0001] 本发明涉及液体接种剂,尤其涉及一种提高液体接种剂中细菌在包装容器内和施用于种子之后的存活率和稳定性的方法。背景技术

[0002] 据我们所知,对植物有益的微生物种类繁多,它们包括根瘤菌 (*Rhizobium*) (包括慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*))、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、沙雷氏菌属 (*Serratia*)、杆菌属 (*Bacillus*) (包括类芽胞杆菌属 (*Paenibacillus*))、巴斯德氏菌属 (*Pasteuria*)、固氮菌属 (*Azotobacter*)、肠杆菌属 (*Enterobacter*)、固氮螺菌属 (*Azospirillum*)、甲基杆菌属 (*Methylobacterium*)、蓝细菌 (*Cyanobacteria*) (蓝绿藻 (*blue-green algae*)) 等细菌和菌根真菌 (*mycorrhizal fungus*)。利用接种剂组合物可以将这些微生物导入植物。制备接种剂组合物的方法包括通常在营养培养基中使微生物发酵的步骤。

[0003] 可以直接将接种剂组合物施到植物种子上,也可以在播种前将其尽速施到犁沟内。往种子或土壤内接种有益微生物以提高产量的做法已风行多年。但得到的结果却往往变化不一,波动起伏,其原因可能是由于接种剂活性丧失,或者接种剂活性变化而导致剂量变化所致。

[0004] 播种时,无论将接种剂施到犁沟内还是种子内,接种剂内的微生物都来不及适应新环境。所以接种剂中的微生物的存活率可能较低。

[0005] 为提高接种剂中微生物活性,目前的通行做法是,将接种剂加到种子内或播种时,往接种剂内添加糖或聚合物等补充剂。由于这些补充剂是在接种剂装到容器之后才添加的,所以它们对装在容器内的接种剂的存活状态和稳定性并不产生效果。

[0006] 另外,往种子内加入接种剂或播种时添加补充剂不仅劳神费事,而且通常还得该接种剂的终端用户(如农民)在无法操控的环境下(如谷仓或农田)亲力亲为。所以在使用补充剂时往往会操作不当。

[0007] 为克服在接种剂制备好之后添加补充剂所引起的种种问题,还有一种做法就是,在制备液体接种剂的发酵阶段之前将补充剂加到营养培养基中。但是,在发酵前按最适宜接种剂在种上 (*onseed*) 存活的量加入补充剂时,微生物的生长却受到抑制。

[0008] 所以,需要发明一种方法来提高储存期间液体接种剂中微生物(如细菌)的存活率和稳定性,以及液体接种剂施到种子上之后微生物的种上存活率和稳定性。发明内容

[0009] 本发明的一个实施例是关于制备含干燥剂的液体接种剂产品的方法。该方法包括提供细菌生长已达到近稳定期 (*substantially stationary phase*) 的液体接种剂。将含有干燥剂的干燥处理剂加到液体接种剂中制得半干燥接种剂 (*partially desiccated inoculant*) 产品。

[0010] 本发明的另一实施例中,将半干燥接种剂包装后储存。

[0011] 本发明的再一实施例中,将半干燥接种剂施到种子上。

[0012] 附图说明

[0013] 图1是表示本发明的几个实施例中,液体肉汤中慢生大豆根瘤菌 (*Bradyrhizobium japonicum*) 的存活情况与时间、温度之间的函数关系图。

[0014] 图 2 是表示本发明的几个实施例中,液体肉汤中慢生大豆根瘤菌的存活情况与时间、温度之间的函数关系图。

[0015] 图 3 是表示本发明的几个实施例中,慢生大豆根瘤菌的种上存活情况与时间、温度之间的函数关系图。

[0016] 图 4 是表示本发明的几个实施例中,液体肉汤中慢生大豆根瘤菌的存活情况与干燥剂类型和用量之间的函数关系图。

[0017] 图 5 是表示本发明的几个实施例中,液体肉汤中慢生大豆根瘤菌的存活情况与干燥剂类型和用量之间的函数关系图。

[0018] 图 6 是表示本发明的几个实施例中,慢生大豆根瘤菌的种上存活情况与干燥剂类型和用量之间的函数关系图。

[0019] 图 7 是表示本发明的几个实施例中,液体肉汤中荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 的存活情况与干燥剂类型和用量之间的函数关系图。

[0020] 图 8 是表示本发明的几个实施例中,液体肉汤中 *Sproteomaculans* 的存活情况与干燥剂类型和用量之间的函数关系图。

[0021] 具体实施方式

[0022] 本发明提供一种制备液体接种剂的方法。该方法包括在细菌生长达到近稳定期后向液体接种剂中加入干燥剂的步骤。将干燥剂加到液体接种剂中制得半干燥接种剂。

[0023] 通过这种方法制成的半干燥接种剂无论在包装容器内,还是施到种子上之后,其细菌稳定性均得到增强。而稳定性增强使包装容器内和种子上的细菌存活率相应提高。

[0024] 将细菌接种到液体培养基中获得细菌培养物。可将各种微生物接种到液体营养培养基中,具体包括但不限于:根瘤菌(包括慢生根瘤菌属)、假单胞菌属、沙雷氏菌属、杆菌属(包括类芽胞杆菌属)、巴斯德氏菌属、固氮菌属、肠杆菌属、固氮螺菌、甲基杆菌属、蓝细菌(蓝绿藻)等细菌。其他微生物(如菌根真菌)也可以接种到液体营养培养基内获得细菌培养物。根瘤菌属和慢生根瘤菌属中,优选菌株包括慢生大豆根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*)、苜蓿根瘤菌(*Rhizobium meliloti*)、豌豆根瘤菌三叶草生物型(*Rhizobium leguminosarum biovar trifolii*)、豌豆根瘤菌蚕豆生物型(*Rhizobium leguminosarum biovar viceae*)和豌豆根瘤菌菜豆生物型(*Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli*)。这些细菌能在豆科植物根部形成根瘤。虽然以下内容主要涉及根瘤菌属接种剂组合物,但应当理解,其他微生物亦同样适用。

[0025] 细菌接种用的培养基可以是本领域技术人员已知的适合所选用细菌的任何液体营养培养基。例如,YMB 是根瘤菌属常用的培养基。YMB 组分列于下表 1。表 1 YMB 配方

酵母提取物	0.50g/l
甘露醇	10.0g/l
K ₂ HPO ₄	0.50g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2g/l
NaCl	0.1g/l
水	1l
pH	6.8

[0026] 将细菌加到液体营养培养基中,然后培养(或发酵)至细菌生长到“近稳定期”。“近稳定期”是指从“对数期”晚期到“稳定期”之间的一段培养时期。“对数生长期”是指发酵起始阶段的延迟期之后的一段时期,该时期营养供应充分,细菌一般呈指数生长。“稳定

期”是指对数生长期之后的一段时期,这个时期细菌生长基本上停止。稳定期一般在液体营养培养基中营养基本耗尽之后达到。本文将含有生长到近稳定期的细菌的物质称为“液体接种剂”。

[0027] 细菌培养期一般为 1-15 天,确切点说是 2-7 天。培养期间可以利用振荡培养箱、发酵反应器或其他类似装置使液体营养培养基和细菌通气并维持在适宜生长的温度。具体培养条件依所用的菌种和液体营养培养基种类而定。例如,慢生大豆根瘤菌接入营养培养基后,可在振荡培养箱上培养大约 1-10 天,温度约为 20-35℃。最好是培养大约 2-7 天,温度约为 28℃。

[0028] 近稳定期的细菌数依菌种而异。例如,对根瘤菌属细菌来说,液体接种剂的细菌数预计约为 1×10^9 - 1×10^{11} /ml,尤其约为 1×10^{10} /ml。这些数量只是举例说明,本发明还涵盖像这样的其他数量。

[0029] 达到近稳定期后(即细菌生长到对数增长率之后),往液体接种剂加入含有干燥剂的干燥处理剂,获得半干燥接种剂。“干燥处理剂”是指干燥剂和稀释物(一般为水)的混合物。“干燥剂”是指加到水中可降低水分活度(物体表面水蒸汽分压与饱和压的比值)的物质。水分活度降到 0.995 以下应能增加半干燥接种剂包装容器内细菌的存活率。水分活度降到 0.990 以下,最好降到约 0.980 以下,应能增加半干燥接种剂中细菌的种子存活数。

[0030] 本文中,“干燥剂”可包括干燥剂一类的任何化合物或其混合物,而不论所使用的该化合物或其混合物浓度是否真正对液体接种剂有干燥效果。适宜用的干燥剂例如包括海藻糖、蔗糖、甘油和三乙撑乙二醇(triethylene glycol)中的一种或多种。其他适合的干燥剂包括但不限于非还原糖和糖醇(例如甘露醇)。

[0031] 液体接种剂中所加入的干燥剂一般约占半干燥接种剂的 5-50%(重量/体积)。如果使用的干燥剂是海藻糖,则其使用量约占半干燥接种剂的 10-40%(重量/体积)比较理想,约 20-30%(重量/体积)则最佳。

[0032] 干燥处理剂可以包括一种以上干燥剂的混合物。事实上,该混合物可以是本文所限定的任意两种或两种以上干燥剂的组合。例如,干燥处理剂可以包括海藻糖和甘油、海藻糖和蔗糖,或者蔗糖和三乙撑乙二醇的混合物。海藻糖和甘油的混合物中,海藻糖约占半干燥接种剂的 5-40%(重量/体积),甘油约占半干燥接种剂的 1-10%(重量/体积)。海藻糖和甘油分别约占半干燥接种剂的 20%和 5%(重量/体积)是最理想的。

[0033] 可以在培养期间(例如发酵反应器或振荡培养箱)向装在培养容器内的液体接种剂中加入干燥剂,也可在液体接种剂进行包装期间加入干燥剂。

[0034] 在一个实施例中,加入足量干燥剂使半干燥接种剂中的细菌至少部分干燥,从而:(1) 提高分装和储存等后续步骤中细菌的稳定性和存活率,(2) 而且提高例如将半干燥接种剂施到种子上等后续步骤中细菌的稳定性和存活率。

[0035] 半干燥接种剂然后可以包装起来并储存。包装容器可以是工业上已知的任何标准容器,例如可以用聚乙烯囊包装半干燥接种剂。

[0036] 将半干燥接种剂包装完后予以储存。储存条件可以包括:温度在环境温度与冷藏温度之间,相对湿度在低到中等湿度之间,理想条件包括:温度约低于 35℃,相对湿度约低于 80%。

[0037] 半干燥接种剂可施用于各类种子。例如,可将半干燥接种剂施用于豆科植物的种子。豆科植物是重要经济作物中的一大家族,如大豆、紫花苜蓿(紫苜蓿)、花生、豌豆类、豆类等。半干燥接种剂中的细菌可聚集在植物根围,和/或感染植物根,例如侵入根毛,并聚集在根部,产生根瘤。依靠这种共生关系,植物通过固氮作用将气态氮转化为氮的有机化合物,并利用这些有机化合物生长。

[0038] 半干燥接种剂施用到种子上时,种上细菌数会发生改变。半干燥接种剂施用后10周,种上细菌数还在变化,但其数量应该与原始数量悬殊不大。换句话说,种上细菌数应该不会随时间而急剧减少。例如,如果半干燥接种剂施到种子上时,种上细菌数至少为 6×10^5 ,大约10周后种上细菌数至少为 1×10^5 则比较理想。

[0039] 要提高半干燥接种剂装在容器内和施于种子时其细菌的稳定性和存活量,可以考虑在向种子施用半干燥接种剂之前,将聚合物加到半干燥接种剂中,也可以在包装之前或储存之后加入该聚合物。聚合物可以包括聚乙烯基吡咯烷酮、烷基化乙烯基吡咯烷酮聚合物、乙烯基吡咯烷酮和醋酸乙烯酯共聚物、乙烯基吡咯烷酮和苯乙烯共聚物、聚乙烯醇聚合物和其他类似聚合物。聚合物约占半干燥接种剂的1-25%(重量/体积)。

[0040] 在细菌达到近稳定期之后向液体接种剂加入干燥剂得到半干燥接种剂即可提高细菌的稳定性,这样播种时则不必再添加补充剂,但这并不排除不能使用补充剂。事实上,将半干燥接种剂施用于种子之后,再往种子内添加补充剂亦属本发明的范围。补充剂可在播种时加入,也可在向种子施用半干燥接种剂之后加入。补充剂可以包括糖、胶浆,羧甲基纤维素和聚合物等任何常用的补充剂。

[0041] 半干燥接种剂可加到泥炭、粘土和/或其他类似干燥载体中形成干燥、可流动的接种剂。可借助喷雾器或其他已知装置使用该半干燥接种剂。

[0042] 下面用非限制性实施例对本发明进行说明。实施例1:海藻糖和甘油/海藻糖混合物对慢生大豆根瘤菌稳定性的影响

[0043] 将慢生大豆根瘤菌接种到装有营养培养基的摇瓶中,置于振荡培养箱内、28℃培养7天,获得为期7天的成熟发酵肉汤。制备四种处理剂分别置于250ml摇瓶内(见表2)。每种处理剂制备两份,则共有8个250ml摇瓶。取50ml上述成熟发酵肉汤加到各摇瓶内。然后将所有摇瓶置于振荡培养箱内28℃再培养7天,使摇瓶中内容物达到平衡。之后,将每种含处理剂摇瓶中的一个摇瓶转到28℃静止培养,另一个烧瓶转到35℃静止培养。表2处理剂—海藻糖和甘油对慢生大豆根瘤菌稳定性的影响

处理剂	水(g)	甘油(g)	海藻糖(g)	图中标记
对照 0%海藻糖 0%甘油	50	0	0	◆
20%海藻糖	30	0	20	■
5%甘油	45	5	0	▲
5%甘油 + 20%海藻糖	25	5	20	✕

[0044] 定期从摇瓶中取样,利用总活板计数法进行活菌计数。用平板计数时,先混合样品,然后用移液器(calibrated pipette)和无菌枪头取 1ml 样品,加到装有 9ml 反渗透(RO)水的试管内,得到 10^{-1} 稀释液。然后用 1000 μ l Rainin 移液器(校准并调到 1000 μ l)和无菌枪头从 10^{-1} 稀释试管中取出 1000 μ l 稀释液,加到装有 9ml 反渗透水的另一试管内,得到 10^{-2} 稀释液。重复上述步骤,直到获得 10^{-7} 稀释液。要注意每次转移前要将装有稀释液的试管振荡混匀。

[0045] 再用 100 μ l Rainin 移液器(校准并调到 30 μ l)和无菌枪头,从 10^{-1} 稀释试管中取出 30 μ l,在营养琼脂平板上滴 3 滴,每滴 10 μ l,用作污染检测平板。该营养琼脂为 Oxoid 培养基。按上述步骤制备其他稀释液,但 10^{-5} 、 10^{-6} 和 10^{-7} 稀释液除外。将样品加到刚果红酵母甘露醇琼脂标准平板上(“CRYMA”,见表 3)。表 3CRYMA 平板组分

成分	使用量
MgSO ₄	0.204g
NaCl	0.1g
K ₂ HPO ₄	0.5g
酵母提取物(Difco)	0.4g
甘露醇	10.0g
刚果红(0.25%溶液)	10ml
琼脂(BBL)	15g

[0046] 待平板干燥后,将平板倒置于 28℃ 培养箱内培养 5 天。之后在低倍显微镜下进行菌落计数。根据平均值 $\times$ 稀释倍数 $\times 100$,算出总菌数。

[0047] 经四种处理剂处理的慢生大豆根瘤菌在液体肉汤中 28℃ 培养后的存活结果如图 1 所示。经四种处理剂处理的慢生大豆根瘤菌在液体肉汤中 35℃ 培养后的存活结果如图 2 所示。实验期间含 5% 甘油的处理剂被污染,所以未包括在图 2 中。

[0048] 图 1 的结果表明经 20% 海藻糖和 20% 海藻糖 /5% 甘油处理的细菌在 28℃、液体肉汤中存活情况良好。对照中的细菌数从实验开始后大约 12-16 周之间某个时段开始减少。而分别经 20% 海藻糖和 20% 海藻糖 /5% 甘油处理后的细菌数在同一时段内、甚至在该时段之后仍保持在较稳定的水平。

[0049] 图 2 的结果表明经 20% 海藻糖处理的细菌在 35℃、液体肉汤中存活情况良好。经其他处理的细菌数,包括对照处理,在实验初期显著减少,而经 20% 海藻糖处理的细菌数在整个实验期间均保持相对稳定。

[0050] 10 周后,分别从对照和 20% 海藻糖处理剂取样,施到大豆种子上。将种子置于 22℃ 培育。定期取样,测定慢生大豆根瘤菌的活菌数。测定种上活菌数的方法如下。

[0051] 称取 500g 大豆种子,放到作了标记、可重新封口的干净塑料袋中。用 2ml 注射器或无菌的 2ml 移液器,取 1.38ml 处理剂均匀加到种子表面。将环境空气充到已接种的塑料袋中,然后立即将塑料袋封口,摇晃塑料袋直到处理剂将种子均匀覆盖住为止(大约 30 秒)。打开塑料袋,置于环境实验室条件(21℃)中避免阳光直射,让种子干燥(约 10 分钟)。取一支匙形刮铲,用酒精整个擦拭一遍,待干燥后从塑料袋中随机挑出 100 个完整的种子。将种子置于装有预先制备的 100ml 稀释液瓶中。将稀释液瓶封口后立即用力摇晃约 1 分钟。使用无菌技术,按如下方法将已制备的 100ml 稀释液进行系列稀释:(1) 在摇晃 100ml 稀释液瓶之后立即取 1ml 悬浮细菌和稀释液无菌转移到第一个装有 9ml 反渗透水的稀释管内,得到 10^{-1} 稀释液。(2) 将 10^{-1} 稀释液旋转混合 15 秒,(3) 旋转混合之后立即从 10^{-1} 稀释液

中取 1ml 转到另一个装有 9ml 反渗透水的稀释管内得到 10^{-2} 稀释液, (4) 然后将 10^{-2} 稀释液旋转混合; (5) 重复步骤 (3) 和 (4), 得到 10^{-3} 和 10^{-4} 稀释液。

[0052] 然后在菌落计数用琼脂平板上详细标明所使用的稀释管、处理剂和铺板日期。每份稀释液铺 2 个平板。每次从稀释管取样铺板前, 都要将稀释液旋转混匀。然后, 用标准的无菌移液技术从每份稀释液中取 100 μ l 样品, 加到各琼脂平板中央。用无菌涂布棒将样品均匀涂布在整个平板表面。然后将平板置于 28℃ 培养 7 天。之后数各平板的菌落形成单位 (CFU) 数并记录。然后用以下公式算出 各平板的 CFU: [平均菌落数 $\times$ { 标记的稀释倍数 $\times 10^{(a)} \times 100^{(b)}$ } / $100^{(c)}$], 其中 (a) 是 0.1ml 稀释液 / 板的校正值, (b) 是对原始稀释液瓶中 100ml 稀释液的校正值, (c) 是原始样品中种子数的校正值。

[0053] 10 周后慢生大豆根瘤菌的种上存活结果如图 3 所示。结果显示对照处理后的细菌数超过 1×10^5 / 种子的时长小于 1 周, 而 20% 海藻糖处理后的时长在 10 周以上。这些结果表明 20% 海藻糖处理使种上细菌存活情况良好。实施例 2: 使慢生大豆根瘤菌稳定所需的最佳海藻糖 / 蔗糖使用量

[0054] 摇瓶制备步骤同实施例 1。该实施例中的处理情况见表 4。表 4 处理剂—海藻糖和蔗糖对慢生大豆根瘤菌稳定性的影响

处理剂	水 (g)	海藻糖 (g)	蔗糖 (g)
对照	50	0	0
5% 海藻糖	45	5	0
10% 海藻糖	40	10	0
20% 海藻糖	30	20	0
30% 海藻糖	20	30	0
40% 海藻糖	10	40	0
5% 蔗糖	45	0	5
10% 蔗糖	40	0	10
20% 蔗糖	30	0	20
30% 蔗糖	20	0	30

[0055] 经处理剂处理的慢生大豆根瘤菌在 28℃、液体肉汤中培养后的存活结果如图 4 所示。经处理剂处理的慢生大豆根瘤菌在 28℃、液体肉汤中培养后的存活结果如图 5 所示。

[0056] 图 4 的结果表明, 28℃、海藻糖浓度为 10-30% (重量 / 体积) 最适宜细菌在液体肉汤中的存活。图 4 还表明经浓度为 5-10% (重量 / 体积) 的蔗糖处理也有利于细菌液体肉汤中的存活, 但达不到与海藻糖处理同样的效果。图 4 还表明细菌经 40% 海藻糖处理后仍能存活, 说明细菌在抑制微生物生长的制剂中仍具有存活能力。

[0057] 图 5 的结果表明, 35℃、海藻糖浓度为 10-30% (重量 / 体积) 最适宜细菌在液体肉汤中的存活。图 5 还表明经浓度为 5% (重量 / 体积) 的蔗糖处理也有利于液体肉汤中细菌的存活, 但达不到与海藻糖处理同样的效果。

[0058] 10 周后, 分别从表 4 所列的处理剂中取样, 施用到大豆种子上。将种子置于 22℃ 培育。分别从起始、种上 6 天后、种上 2 周后和种上 4 周后取样。测定这些样品中慢生大豆根瘤菌的活菌数。种上活菌数测定方法如实施例 1 所述, 结果如图 6 所示。

[0059] 图 6 的结果表明, 22℃、海藻糖浓度为 20-30% (重量 / 体积) 最适宜细菌在种上存活。实施例 3: 对 *Serratia Proteomaculans* 和荧光假单胞菌在液体肉汤中稳定性的评价

[0060] 在 22℃、标准微生物培养基中培养 *Serratia proteomaculans* (含量减半的胰蛋白

酶大豆肉汤—“TSB”) 24 小时, 得到细菌肉汤。准备一组摇瓶, 每个摇瓶相当于表 5 中列出的一种处理剂。将 50ml 细菌肉汤加到各摇瓶中。所有摇瓶在振荡培养箱内 22℃再培养 3 天, 使其平衡。然后将摇瓶转移到 28℃静止培养。定期取样, 制备系列稀释液, 铺到含量减半的胰蛋白酶大豆琼脂 (“TSA”) 上测定细菌数。

[0061] 重复上述步骤对荧光假单胞菌进行试验。表 5 处理剂—海藻糖、蔗糖和甘油对 *S. proteomaculans* 和荧光假单胞菌的影响

处理剂	水 (g)	海藻糖 (g)	蔗糖 (g)	甘油 (g)
对照	50	0	0	0
10%甘油	40	0	0	10
20%甘油	30	0	0	20
30%甘油	20	0	0	30
10%海藻糖	40	10	0	0
20%海藻糖	30	20	0	0
30%海藻糖	20	30	0	0
10%蔗糖	40	0	10	0
20%蔗糖	30	0	20	0
30%蔗糖	20	0	30	0

[0062] 经处理剂处理的荧光假单胞菌在 28℃、液体肉汤中培养后的存活结果如图 7 所示。结果表明在 28℃经甘油、海藻糖和蔗糖处理均能提高荧光假单胞菌的存活率。

[0063] 经处理剂处理的 *S. proteomaculans* 在 28℃、液体肉汤中培养后的存活结果如图 8 所示。结果显示到第 4 周, 分别经 30%海藻糖、10%蔗糖和 30%蔗糖处理后的细菌存活数大于对照。数据表明这些处理剂均能提高 *S. proteomaculans* 的存活率。

[0064] 本领域的技术人员应当清楚, 本发明可以根据情况以各种形式和方式予以实施。以上对实施例的详细说明只是为了理解起来更清楚, 而非对本发明的限制。

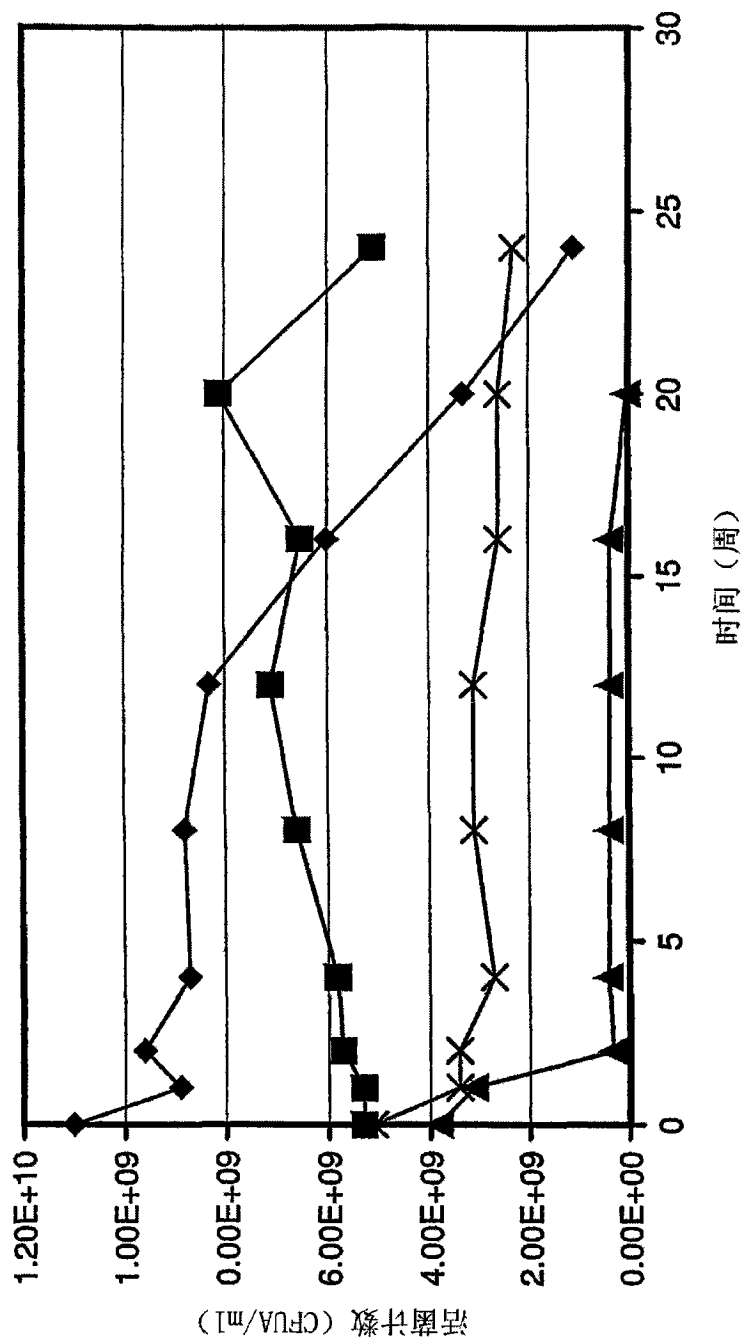


图1

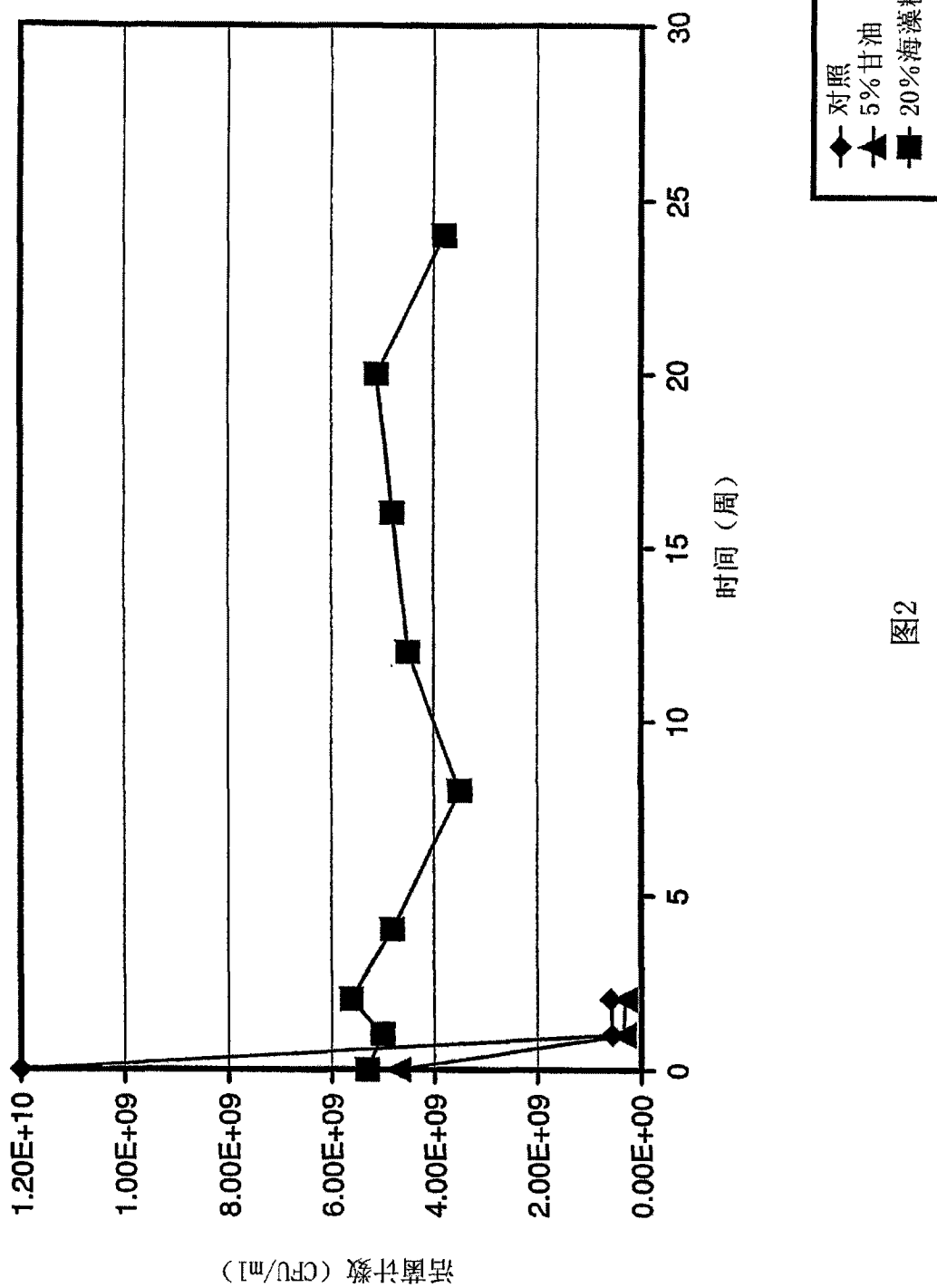


图2

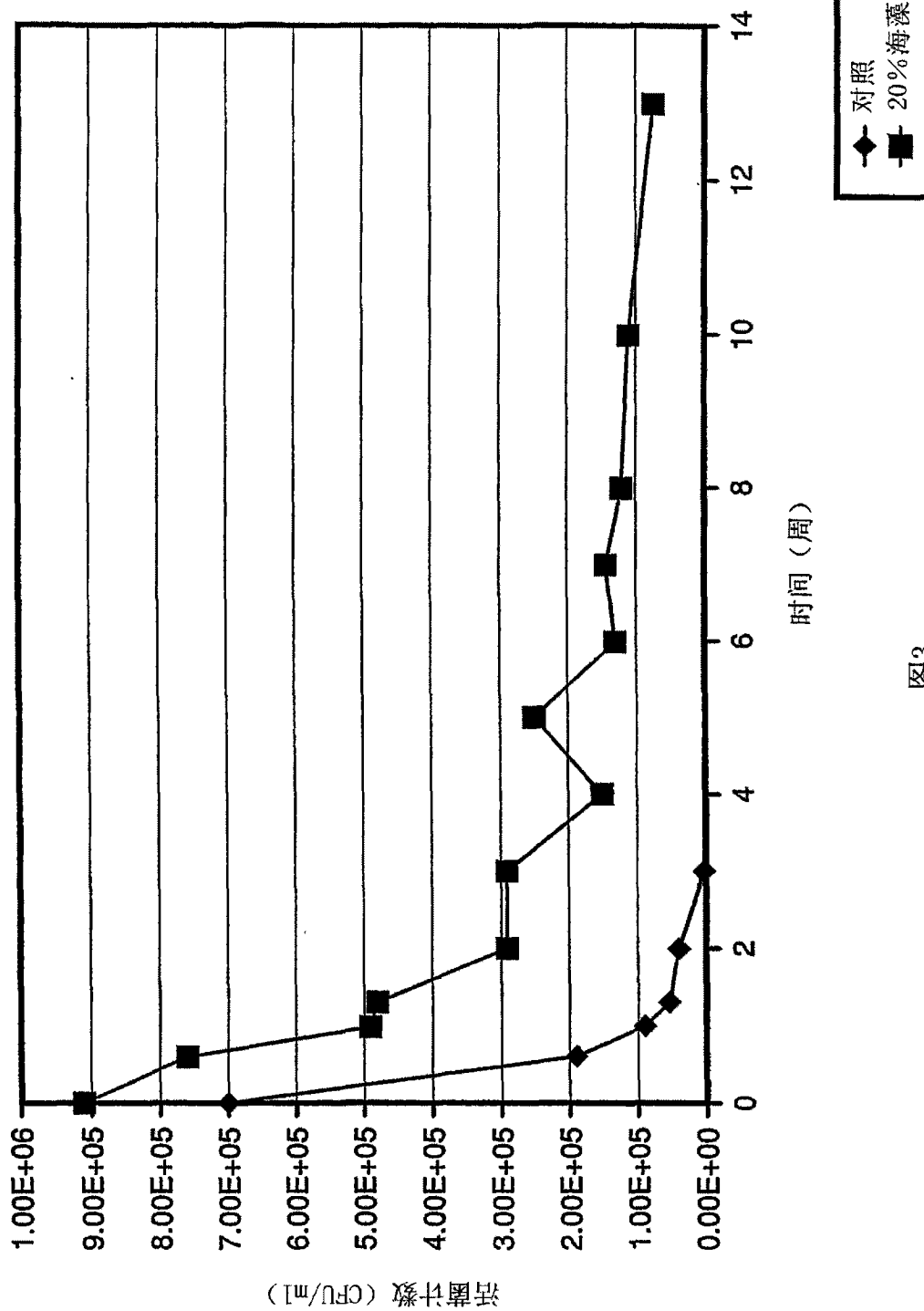


图3

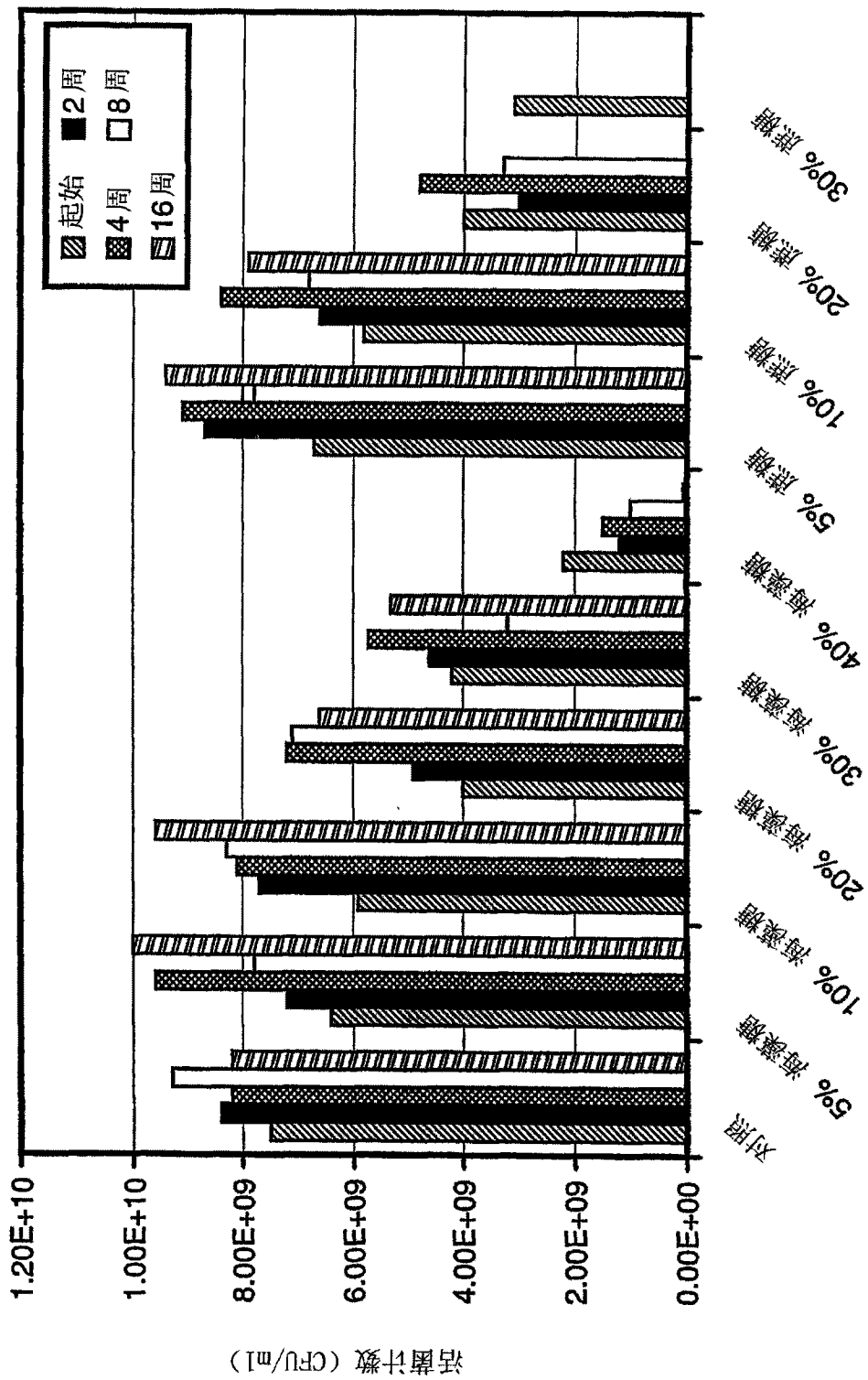
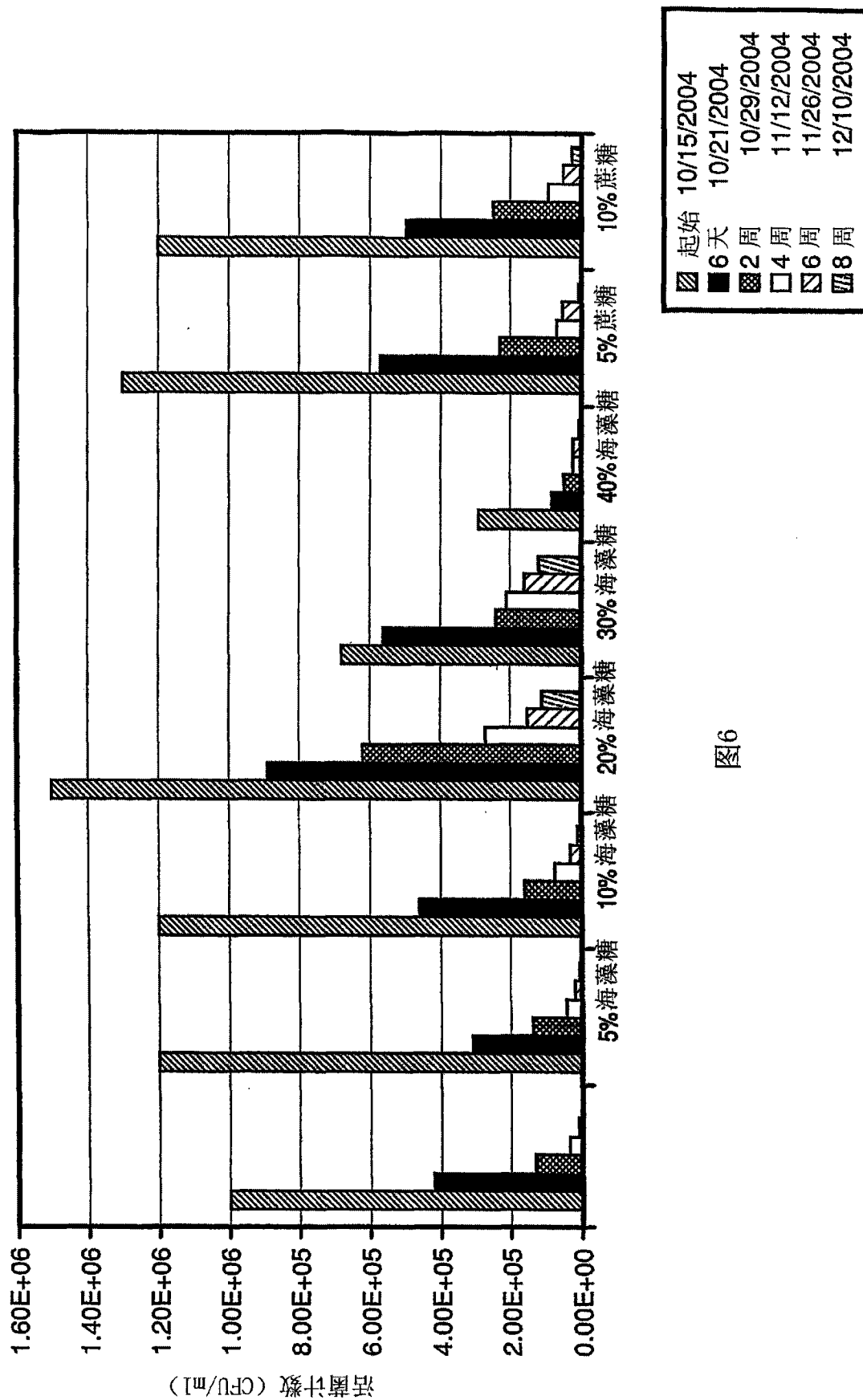


图4



图15



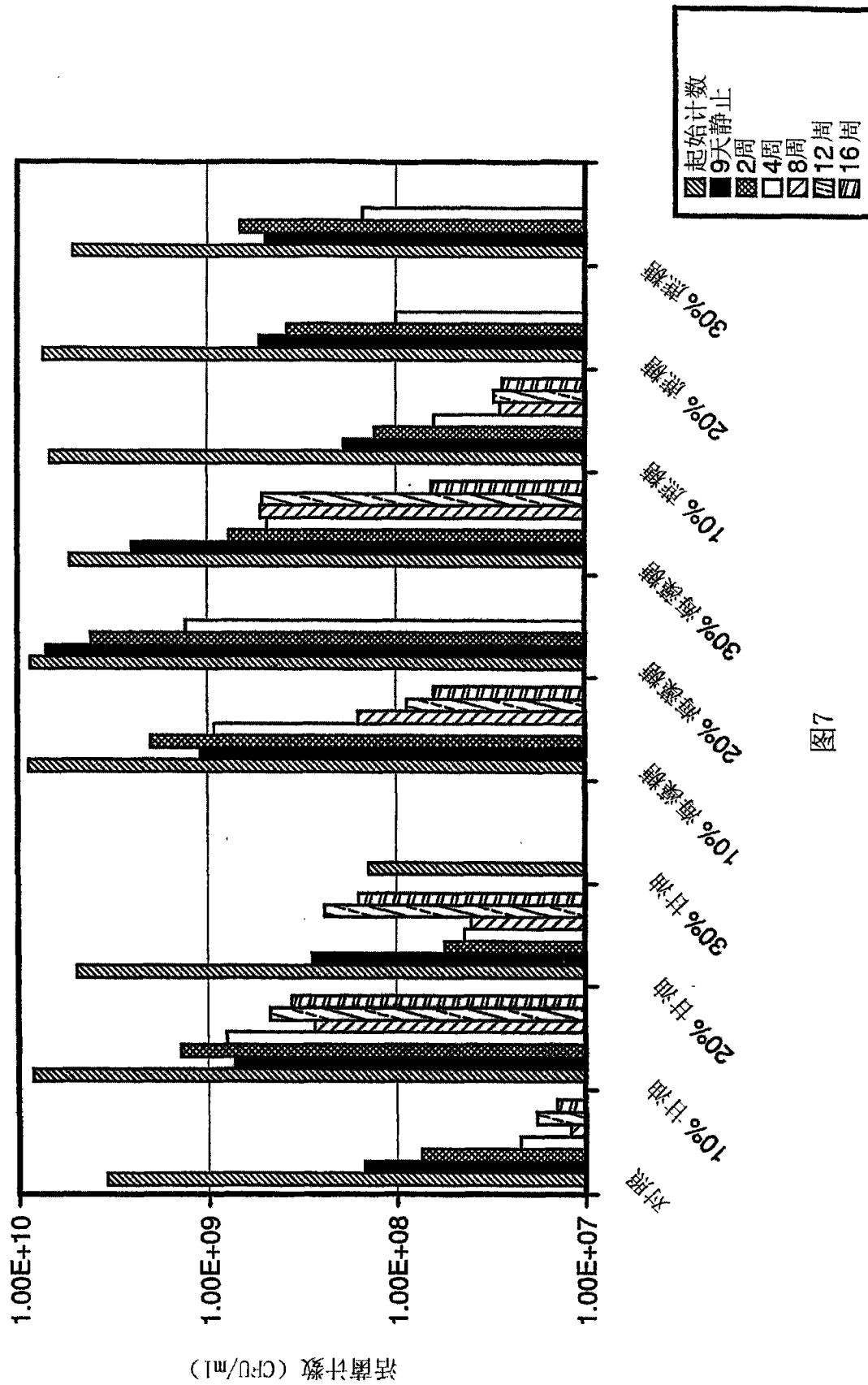


图7

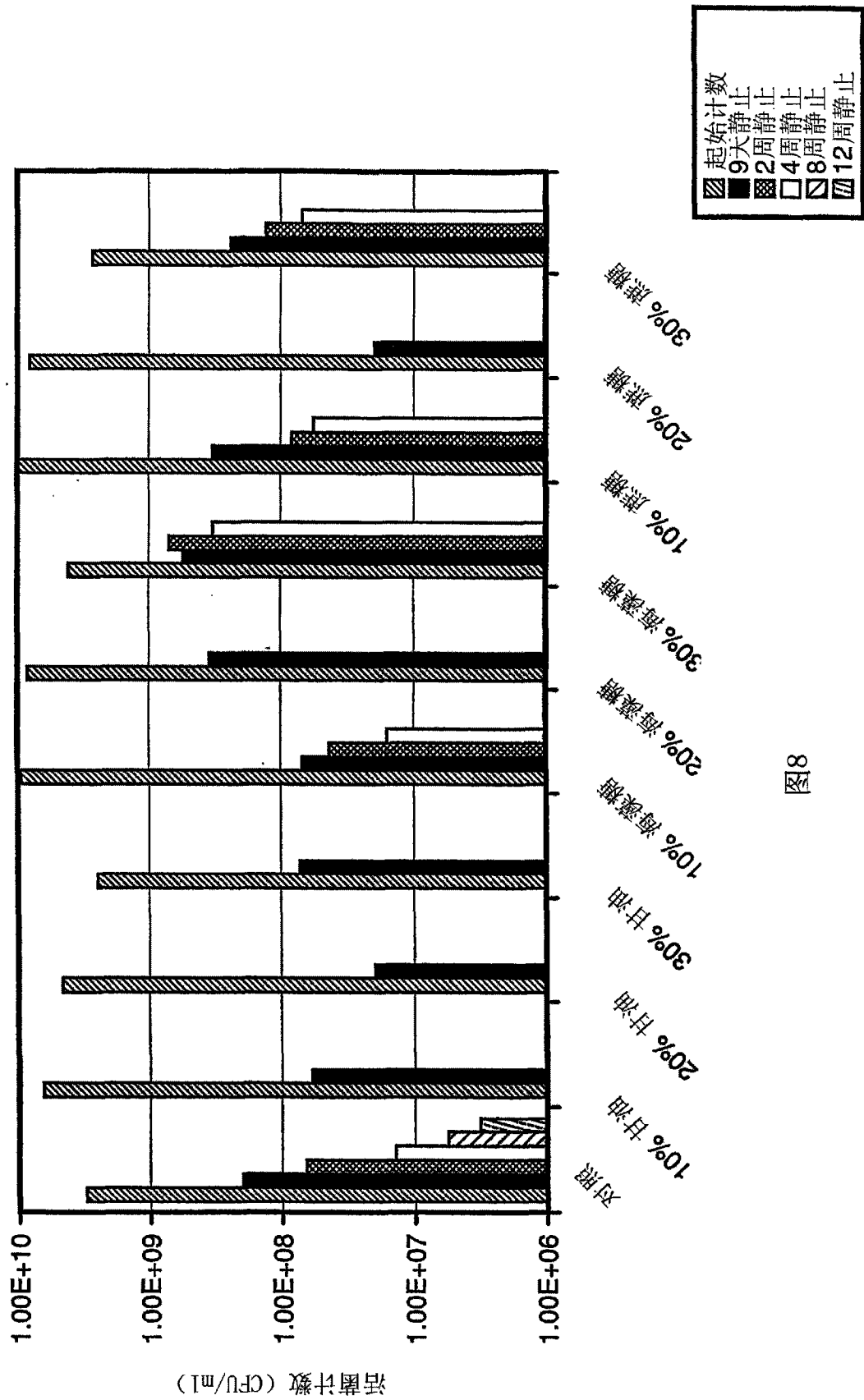


图8