



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106231907 B

(45)授权公告日 2019.10.18

(21)申请号 201580018793.2
(22)申请日 2015.04.07
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106231907 A
(43)申请公布日 2016.12.14
(30)优先权数据
2014-080228 2014.04.09 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2016.10.09
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2015/060816 2015.04.07
(87)PCT国际申请的公布数据
W02015/156274 JA 2015.10.15
(83)生物保藏信息
NITE BP-1095 2011.05.02
(73)专利权人 SDS生物技术株式会社
地址 日本东京
专利权人 出光兴产株式会社
(72)发明人 宫崎睦 天木雄介 田中计实
森下康行 江口贵纪
(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
72002
代理人 王灵菇 白丽

(51)Int.Cl.
A01N 63/00(2006.01)
A01P 3/00(2006.01)
C12N 1/20(2006.01)
(56)对比文件
CN 102919272 A,2013.02.13,
CN 102919272 A,2013.02.13,
US 20100272701 A1,2010.10.28,
US 20100272701 A1,2010.10.28,
CN 102459568 A,2012.05.16,
JP 2004-35421 A,2004.02.05,
CN 103703120 A,2014.04.02,
JP 8-175919 A,1996.07.09,
JP S60-180588 A,1985.09.14,
V. Yanez-Mendizabal等.Formulation
development of the biocontrol agent
Bacillus subtilis strain CPA-8 by spray-
drying.《Journal of Applied Microbiology》
.2012,第112卷第954-965页;摘要,表1.
V. Yanez-Mendizabal等.Formulation
development of the biocontrol agent
Bacillus subtilis strain CPA-8 by spray-
drying.《Journal of Applied Microbiology》
.2012,第112卷第954-965页;摘要,表1.

审查员 谢婷

权利要求书1页 说明书12页 附图1页

(54)发明名称
微生物农药组合物、其制造方法及微生物农
药的稳定化方法

(57)摘要

本发明涉及通过包含以下工序的方法获得的微生物农药组合物:将芽孢杆菌(Bacillus)属细菌的培养液的pH调节至3.0~5.0的工序(pH调节工序);混合氯化钙和/或硫酸镁的工序(混合工序);和进行冷冻干燥或喷雾干燥的工序(干燥工序)。本发明的微生物农药组合物即使在室温下长期保存有效成分也稳定,持续充分的植物病

害防治效果。

1. 一种微生物农药组合物, 其特征在于, 其通过包含将含有培养后的芽孢杆菌 (Bacillus) 属细菌的培养液的pH调节至3.0~5.0的工序即pH调节工序的方法获得, 并且含有芽孢杆菌 (Bacillus) 属细菌的菌体干燥物及1质量%以上且小于5质量%的氯化钙和/或硫酸镁。

2. 根据权利要求1所述的微生物农药组合物, 其中, 含有芽孢杆菌 (Bacillus) 属细菌的菌体干燥物和氯化钙。

3. 根据权利要求1所述的微生物农药组合物, 其中, 含有芽孢杆菌 (Bacillus) 属细菌的菌体干燥物和硫酸镁。

4. 根据权利要求1~3中任一项所述的微生物农药组合物, 其中, 芽孢杆菌 (Bacillus) 属细菌为枯草芽孢杆菌 (Bacillus subtilis)、解淀粉芽孢杆菌 (Bacillus amyloliquefaciens) 或它们的突变株。

5. 根据权利要求1~3中任一项所述的微生物农药组合物, 其中, 芽孢杆菌 (Bacillus) 属细菌是解淀粉芽孢杆菌AT-332 (Bacillus amyloliquefaciens AT-332) 株或其突变株。

6. 根据权利要求1~3中任一项所述的微生物农药组合物, 其中, 所述方法进一步包含以下工序: 混合氯化钙和/或硫酸镁的工序即混合工序; 和进行冷冻干燥或喷雾干燥的工序即干燥工序。

7. 根据权利要求6所述的微生物农药组合物, 其中, 通过实施以下工序的方法获得: 在pH调节工序之后实施混合工序, 或者同时实施pH调节工序和混合工序, 或者在混合工序之后实施pH调节工序、然后实施干燥工序。

8. 根据权利要求1~3中任一项所述的微生物农药组合物, 其中, 将农药组合物悬浮在蒸馏水中而得的悬浮水溶液的pH为3.0~5.0。

9. 一种微生物农药组合物的制造方法, 其特征在于, 包含以下工序: 将含有培养后的芽孢杆菌 (Bacillus) 属细菌的培养液的pH调节至3.0~5.0的工序即pH调节工序; 混合1质量%以上且小于5质量%的氯化钙和/或硫酸镁的工序即混合工序; 和进行冷冻干燥或喷雾干燥的工序即干燥工序。

10. 根据权利要求9所述的微生物农药组合物的制造方法, 其中, 在pH调节工序之后实施混合工序, 或者同时实施pH调节工序和混合工序, 或者在混合工序之后实施pH调节工序、然后实施干燥工序。

11. 一种微生物农药的稳定化方法, 其特征在于, 包含以下工序: 将含有培养后的芽孢杆菌 (Bacillus) 属细菌的培养液的pH调节至3.0~5.0的工序即pH调节工序; 混合1质量%以上且小于5质量%的氯化钙和/或硫酸镁的工序即混合工序; 和进行冷冻干燥或喷雾干燥的工序即干燥工序。

12. 根据权利要求11所述的微生物农药的稳定化方法, 其中, 在pH调节工序之后实施混合工序, 或者同时实施pH调节工序和混合工序, 或者在混合工序之后实施pH调节工序、然后实施干燥工序。

微生物农药组合物、其制造方法及微生物农药的稳定化方法

技术领域

[0001] 本发明涉及微生物农药的稳定化。更详细而言,涉及长期保持芽孢杆菌(*Bacillus*)属细菌的植物病害防治效果的微生物农药组合物、其制造方法及以芽孢杆菌(*Bacillus*)属细菌为有效成分的微生物农药的稳定化方法。

背景技术

[0002] 近年来,作为保护植物免受各种病害的方法,考虑到安全性和效果的持续问题,广泛使用微生物农药,该微生物农药使用了可对抗引起各种病害的病原菌的微生物。通常,微生物农药中,为了谋求防止组合物中的有效成分的效果降低和提高保存稳定性,在制剂中添加助剂。例如在形成孢子的芽孢杆菌(*Bacillus*)属细菌中,日本特开2011-184370号公报(专利文献1)中提出了添加菌体干燥物和含有硫酸钙、表面活性剂的水合性组合物。

[0003] 另外,日本特开2004-35421号公报(专利文献2)中提出了含有微生物、粘土矿物、表面活性剂及干燥剂的微生物农药。作为干燥剂,具体地示出了二氧化硅凝胶、氯化钙、III型无水石膏。

[0004] 另一方面,在使用了不形成孢子的微生物的微生物农药制剂中,为了谋求提高菌体干燥物的长期保存稳定性,进行了助剂研究。例如,日本特开2005-325077号公报(专利文献3)示出了通过在假单胞菌(*Pseudomonas*)属细菌中混合海藻糖、然后进行冷冻干燥而获得活菌回收率或保存性均良好的微生物干燥物的方法。此外,作为对该方法进行了改良的方法,日本特开2009-196920号公报(专利文献4)中公开了通过在假单胞菌(*Pseudomonas*)属细菌中混合海藻糖或蔗糖、并且混合氯化钠及氯化钾、然后进行冷冻干燥、从而包装材料的保存稳定性得以改善的方法。

[0005] 另外,日本特开2000-264807号公报(专利文献5)及日本特开2000-264808号公报(专利文献6)均示出了通过添加作为具有氨吸附能力的吸附剂的沸石、分子筛、二氧化硅凝胶等而以稳定的状态保存欧文氏菌(*Erwinia*)属细菌、假单胞菌(*Pseudomonas*)属细菌。

[0006] 此外,作为以丝状菌孢子为有效成分、保存稳定性得到改善的微生物农药制剂的例子,日本特开2010-143856号公报(专利文献7)中示出了通过使镰孢菌(*Fusarium*)属菌的活菌体中含有非晶质二氧化硅,进而添加碳酸钙和/或硫酸镁,从而改善保存稳定性的方法。

[0007] 但是,这些专利文献的发明中,不能说微生物农药制剂的稳定性得到充分地改善,还存在无法长期维持制造时的植物病害防治效果的问题。

[0008] 现有技术文献

[0009] 专利文献

[0010] 专利文献1:日本特开2011-184370号公报

[0011] 专利文献2:日本特开2004-35421号公报

[0012] 专利文献3:日本特开2005-325077号公报

[0013] 专利文献4:日本特开2009-196920号公报

- [0014] 专利文献5:日本特开2000-264807号公报
[0015] 专利文献6:日本特开2000-264808号公报
[0016] 专利文献7:日本特开2010-143856号公报

发明内容

[0017] 发明所要解决的课题

[0018] 本发明的课题在于提供即使在室温下长期保存有效成分也稳定、可持续充分的植物病害防治效果的微生物农药组合物。

[0019] 用于解决课题的方法

[0020] 本发明者们为了解决上述课题进行了深入研究,结果发现通过在作为防治植物病害的微生物的芽孢杆菌 (Bacillus) 属细菌的培养液中添加混合氯化钙和/或硫酸镁、进行冷冻干燥或喷雾干燥而获得的菌体干燥物的保存稳定性优异、长期保持了充分的植物病害防治效果,从而完成本发明。

[0021] 即,本发明涉及下述(1)~(9)的微生物农药组合物、(10)~(11)的微生物农药组合物的制造方法及(12)~(13)的微生物农药组合物的稳定化方法。

[0022] (1)一种微生物农药组合物,其特征在于,含有芽孢杆菌 (Bacillus) 属细菌的菌体干燥物及氯化钙和/或硫酸镁。

[0023] (2)根据(1)所述的微生物农药组合物,其中,含有芽孢杆菌 (Bacillus) 属细菌的菌体干燥物和氯化钙。

[0024] (3)根据(1)所述的微生物农药组合物,其中,含有芽孢杆菌 (Bacillus) 属细菌的菌体干燥物和硫酸镁。

[0025] (4)根据(1)~(3)中任一项所述的微生物农药组合物,其中,含有氯化钙和/或硫酸镁1~5质量%。

[0026] (5)根据(1)~(4)中任一项所述的微生物农药组合物,其中,芽孢杆菌 (Bacillus) 属细菌为枯草芽孢杆菌 (Bacillus subtilis)、解淀粉芽孢杆菌 (Bacillus amyloliquefaciens) 或它们的突变株。

[0027] (6)根据(1)~(5)中任一项所述的微生物农药组合物,其中,芽孢杆菌 (Bacillus) 属细菌为解淀粉芽孢杆菌AT-332 (Bacillus amyloliquefaciens AT-332) 株或它们的突变株。

[0028] (7)根据(1)~(6)中任一项所述的微生物农药组合物,其通过包含以下工序的方法获得:将芽孢杆菌 (Bacillus) 属细菌的培养液的pH调节至3.0~5.0的工序(pH调节工序);混合氯化钙和/或硫酸镁的工序(混合工序);和进行冷冻干燥或喷雾干燥的工序(干燥工序)。

[0029] (8)根据(7)所述的微生物农药组合物,其中,通过实施以下工序的方法获得:在pH调节工序之后实施混合工序,或者同时实施pH调节工序和混合工序,或者在混合工序之后实施pH调节工序、然后实施干燥工序。

[0030] (9)根据(1)~(8)中任一项所述的微生物农药组合物,其中,将农药组合物悬浮在蒸馏水中而得的悬浮水溶液的pH为3.0~5.0。

[0031] (10)一种微生物农药组合物的制造方法,其特征在于,包含以下工序:将芽孢杆菌

(Bacillus) 属细菌的培养液的pH调节至3.0~5.0的工序(pH调节工序);混合氯化钙和/或硫酸镁的工序(混合工序);和进行冷冻干燥或喷雾干燥的工序(干燥工序)。

[0032] (11) 根据(10)所述的微生物农药组合物的制造方法,其中,在pH调节工序之后实施混合工序,或者同时实施pH调节工序和混合工序,或者在混合工序之后实施pH调节工序、然后实施干燥工序。

[0033] (12) 一种微生物农药的稳定化方法,其特征在于,包含以下工序:将芽孢杆菌(Bacillus) 属细菌的培养液的pH调节至3.0~5.0的工序(pH调节工序);混合氯化钙和/或硫酸镁的工序(混合工序);和进行冷冻干燥或喷雾干燥的工序(干燥工序)。

[0034] (13) 根据(12)所述的微生物农药的稳定化方法,其中,在pH调节工序之后实施混合工序,或者同时实施pH调节工序和混合工序,或者在混合工序之后实施pH调节工序、然后实施干燥工序。

[0035] 发明效果

[0036] 根据本发明,可以稳定地保持微生物农药组合物中的有效成分(芽孢杆菌(Bacillus) 属细菌的菌体干燥物)、能够长期维持具有充分的植物病害防治效果的状态。

附图说明

[0037] 图1A~D是表示本发明微生物农药组合物(制剂)对黄瓜白粉病的防治效果试验(实施例2)结果的照片。A:对照区1(未给予制剂)、B:对照区2(未添加氯化钙的制剂区)、C:添加5%氯化钙-pH未调节区、D:添加5%氯化钙-pH为4.0区。

[0038] 图2A~D是表示本发明微生物农药组合物(制剂)对黄瓜白粉病的防治效果试验(实施例3)结果的照片。A:对照区(未添加氯化钙区)、B:添加1%氯化钙区、C:添加2.5%氯化钙区、D:添加5%氯化钙区。

具体实施方式

[0039] 本发明的微生物农药组合物的特征在于,含有有效成分的芽孢杆菌(Bacillus) 属细菌的菌体干燥物,进而含有氯化钙和/或硫酸镁。以下详细地进行说明。

[0040] [芽孢杆菌(Bacillus) 属的细菌]

[0041] 本发明的微生物农药组合物中作为菌体干燥物使用的芽孢杆菌(Bacillus) 属细菌并无特别限定,优选是对植物病害具有防治能力的芽孢杆菌(Bacillus) 属细菌。例如可举出枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)、解淀粉芽孢杆菌(Bacillus amyloliquefaciens)、短小芽孢杆菌(Bacillus pumilus)、蜡样芽孢杆菌(Bacillus cereus)、地衣形芽孢杆菌(Bacillus licheniformis)、贝莱斯芽孢杆菌(Bacillus velezensis)、芽孢杆菌属(Bacillus sp.)及它们的突变株等。其中,优选对植物病害的防治能力高的枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)、解淀粉芽孢杆菌(Bacillus amyloliquefaciens)及其突变株,更优选可举出解淀粉芽孢杆菌AT-332(Bacillus amyloliquefaciens AT-332)株及其突变株。

[0042] 将解淀粉芽孢杆菌AT-332(Bacillus amyloliquefaciens AT-332)株在2011年5月2日国际保藏于独立行政法人制品评价技术基盘机构专利微生物保藏中心(〒292-0818 日本千叶县木更津市上总镰足2-5-8),所赋予的保藏号:NITE BP-1095。

[0043] 本发明中可使用的芽孢杆菌 (*Bacillus*) 属细菌并不限于这些示例,还可以是其他的芽孢杆菌 (*Bacillus*) 属细菌。另外,还可以并用1种或2种以上的细菌。

[0044] [微生物农药制剂]

[0045] 本发明中使用的微生物农药组合物含有通过对微生物培养液进行冷冻干燥或喷雾干燥中的任一种方法获得的菌体干燥物。

[0046] 微生物培养液的干燥可以在添加氯化钙和/或硫酸镁及将pH调整至3.0~5.0之后进行。

[0047] 本发明的微生物农药组合物含有通过包含以下工序的方法制备的菌体干燥物:将pH调节至3.0~5.0的工序(pH调节工序);混合氯化钙和/或硫酸镁的工序(混合工序)、和进行冷冻干燥或喷雾干燥的工序(干燥工序)。菌体干燥物具体而言可如下获得:(1)在微生物培养液中混合氯化钙和/或硫酸镁,在将pH调整至3.0~5.0之后进行干燥,或者(2)将微生物培养液的pH调整至3.0~5.0之后,混合氯化钙和/或硫酸镁,接着进行干燥,或者(3)一边将微生物培养液的pH调整至3.0~5.0、一边混合氯化钙和/或硫酸镁、然后进行干燥。

[0048] 氯化钙和/或硫酸镁优选相对于微生物农药组合物(以下有时表述为“微生物农药制剂”)添加至1~5质量%的浓度,更优选相对于微生物农药制剂添加至2.5~5质量%的浓度。氯化钙和/或硫酸镁的添加量相对于微生物农药制剂小于1质量%时,由于添加量的不足,无法获得充分的保存稳定性改善效果。另外,相对于微生物农药制剂添加超过5质量%的量的制剂由于氯化钙和/或硫酸镁的吸湿性、制剂易于固结,无法获得本来的微生物农药制剂的效果,因此不适合。

[0049] 氯化钙及硫酸镁可以分别单独使用或者组合使用两者。

[0050] 本发明的微生物农药制剂中还可以根据所期望的剂型或效果含有其他的任意成分。

[0051] 作为剂型,例如可举出颗粒剂、粉剂、颗粒水合剂、水合剂、水溶剂、悬浮制剂、乳剂等,其中,更优选颗粒水合剂、水合剂、水溶剂、颗粒剂,更优选水合剂。

[0052] 作为任意成分,只要不损害本发明的效果则无特别限定,可举出载体、表面活性剂、分散剂、助剂、保护剂等。这些任意成分只要不对芽孢杆菌 (*Bacillus*) 属细菌的培养液的pH调节造成影响,则在制造微生物农药组合物时,可以在冷冻干燥前与氯化钙和/或硫酸镁一起添加,但通常在添加并混合到菌体干燥物中之后,加工成所期望的剂型。

[0053] 作为载体的例子,可举出滑石、膨润土、高岭土、粘土、硅藻土、白炭黑、蛭石、消石灰、硫酸铵、硅砂、尿素等多孔质的固体载体,水、异丙醇、甲基萘、二甲苯、环己酮、烷二醇等液体载体等。

[0054] 作为表面活性剂及分散剂,例如可举出二萘基甲磺酸盐、醇硫酸酯盐、木质素磺酸盐、烷基芳基磺酸盐、聚氧乙二醇醚、聚氧乙烯脱水山梨糖醇单烷化物、聚氧乙烯烷基芳基醚等。

[0055] 作为助剂,可举出羧甲基纤维素、聚乙二醇、丙二醇、阿拉伯胶、黄原胶等;作为保护剂,可举出脱脂乳、pH缓冲剂等。

[0056] [微生物农药组合物的制造]

[0057] 本发明的微生物农药组合物以菌体干燥物形式含有微生物。微生物的菌体干燥物可通过公知的装置及条件获得。

[0058] 例如,微生物为解淀粉芽孢杆菌AT-332 (Bacillus amylolique faciens A T-332) 株时如下获得:在液体标准培养基(多聚蛋白胨为0.5%、葡萄糖为0.1%、酵母提取物为0.5%、pH为7.0)中对该微生物进行振荡培养,然后混合氯化钙和/或硫酸镁且将pH调节至3.0~5.0,进行冷冻干燥或喷雾干燥,从而获得。

[0059] 冷冻干燥或喷雾干燥可以利用公知装置的条件进行,获得粉末的菌体干燥物。

[0060] 通过在所得菌体干燥物中选择混合与所期望的剂型对应的任意成分,可以制成微生物农药组合物(制剂)。

[0061] [微生物农药组合物(制剂)的使用]

[0062] 本发明的微生物农药组合物可以原样地直接施用或者用水等稀释后施用。本发明的微生物农药组合物优选悬浮于蒸馏水而得的悬浮水溶液的pH为3.0~5.0。

[0063] 微生物农药组合物的施用方法并无特别限定,例如可举出以下方法:直接散布于植物的方法、散布于土壤的方法、直接涂布于植物种子的方法、添加在添加到植物或土壤的水或肥料中的方法等。另外,制剂的施用量由于根据对象病害、对象作物、施用方法、发生倾向、受害的程度、环境条件、所使用的剂型等的不同而改变,因此优选适当地进行调整。

[0064] 本发明的微生物农药组合物对大范围种类的细菌及丝状菌发挥优异的防治力。作为可通过本发明的微生物农药组合物防治的植物的病原菌,例如可举出“水稻”的稻瘟病菌 (Pyricularia oryzae)、胡麻叶斑病 (Cochliobolus miyabeanus)、纹枯病菌 (Rhizoctonia solani)、藤仓赤霉菌 (Gibberella fujikuroi),“麦类”的白粉病菌 (Erysiphe graminis f.sp.hordei,Erysiphe graminis f.sp.tritici)、条锈病菌 (Puccinia striiformis,Puccinia graminis,Puccinia recondita f.sp.tritici,Puccinia hordei)、赤霉病菌 (Gibberella zeae)、网斑病菌 (Pyrenophorateres)、雪腐病菌 (Typhula incarnata,Typhula ishikariensis,Sclerotinia borealis,Micronectriella nivalis)、裸黑穗病菌 (Ustilago nuda)、腥黑穗病菌 (Tilletia caries,Tilletia foetida)、眼斑病菌 (Tapesia yallundea)、云纹病菌 (Phynchosporium secalis f.sp.hordei)、叶枯病菌 (Septoria tritici)、颖枯病菌 (Leptoshaeria nodorum),“柑橘”的黑点病菌 (Diaporthe citri)、痂囊腔病菌 (Elsinoe fawcettii)、褐腐疫病菌 (Phytophthora citrophthora)、绿霉病菌 (Penicillium digitatum)、绿霉病菌 (Penicillium italicum),“苹果”的花腐病菌 (Monilinia mali)、腐烂病菌 (Valsa ceratosperma)、白粉病菌 (Podosphaera leucotricha)、斑点落叶病菌 (Alternaria alternata apple pathotype apple)、黑星病菌 (Venturia inaequalis)、胶锈菌 (Gymnosporangium yamadae)、轮纹病菌 (Botriophacteria berengeriana f.sp.piricola)、蝇斑病菌 (Zygophiala jamaicensis)、煤污病菌 (Gloeodes pomigena)、黑点病菌 (Mycosphaerella pomi)、炭疽病菌 (Glomerella cingulata)、褐斑病菌 (Diplocarpon mali),“梨”的黑星病菌 (Venturia nashicola)、黑斑病菌 (Alternaria alternata Japanese pear pathotype)、轮纹病菌 (Physalospora piricola)、胶锈菌 (Gymnosporangium asiaticum)、桃的褐腐病菌 (Monilinia fructicola)、黑星病菌 (Cladosporium carpophilum)、拟茎点霉病菌 (Phomopsis sp.),“葡萄”的褐斑病菌 (Pseudocercospora vitis)、轮纹病菌 (Marssonina viticola)、黑痘病菌 (Elsinoe ampelina)、晚腐病菌 (Glomerella cingulata)、白粉病菌 (Uncinula necator)、锈病菌 (Phakopsora ampelopsidis)、拟茎点霉病菌 (Phomopsis sp.),“柿子”的

白粉病菌 (*Phyllactinia kakicola*)、炭疽病菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*)、角斑落叶病菌 (*Cercospora kaki*)、柿叶球腔病菌 (*Mycosphaerella nawae*)，“梅”的黑星病菌 (*Cladosporium carpophilum*)，“樱桃”的灰星病菌 (*Monilinia fructicola*)、“瓜类”的白粉病菌 (*Sphaerotheca fuliginea*)、蔓枯病菌 (*Didymella bryoniae*)、炭疽病菌 (*Colletotrichum lagenarium*)，“番茄”的轮纹病菌 (*Alternaria solani*)、叶锈病菌 (*Cladosporium fulvum*)，“茄子”的褐纹病菌 (*Phomopsis vexans*)、白粉病菌 (*Erysiphe cichoracearum*)，“十字花科蔬菜”的黑斑病菌 (*Alternaria japonica*, *Alternaria brassicae*, *Alternaria brassicicola*)、白斑病菌 (*Cercospora brassicae*)，“葱”的锈病菌 (*Puccinia allii*)，“生姜”的终极腐霉病菌 (*Pythium ultimum*, *Pythium zingiberis*)，“草莓”的白粉病菌 (*Sphaerotheca humuli*)、炭疽病菌 (*Glomerella cingulata*)，“大豆”的紫斑病菌 (*Cercospora kikuchii*)、黑痘病菌 (*Elsinoe glycines*)、黑点病菌 (*Diaporthe phaseolorum var. sojae*)、“小豆”的褐斑病菌 (*Cercospora canescens*)、锈病菌 (*Uromyces phaseoli var. azukicola*)，“扁豆”的炭疽病菌 (*Colletotrichum lindemuthianum*)，“花生”的黑斑病菌 (*Cercosporidium personatum*)、褐斑病菌 (*Cercospora arachidicola*)、疮痂病菌 (*Sphaceloma arachidis*)，“豌豆”的白粉病菌 (*Erysiphe pisi*)，“马铃薯”的早疫病菌 (*Alternaria solani*)，“茶”的网饼病菌 (*Exobasidium reticulatum*)、白星病菌 (*Elsinoe leucospila*)、轮斑病菌 (*Pestalotiopsis theae*, *Pestalotiopsis longiseta*)，“烟草”的胶锈菌 (*Alternaria longipes*)、白粉病菌 (*Erysiphe cichoracearum*)、炭疽病菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*)，“甜菜”的褐斑病菌 (*Cercospora beticola*)，“草”的弯孢叶斑病菌 (*Curvularia geniculata*)、角担菌属真菌 (*Ceratobasidium spp.*)，“玫瑰”的黑星病菌 (*Diplocarpon rosae*)、白粉病菌 (*Sphaerotheca pannosa*)，“菊花”的褐斑病菌 (*Septoria obesa*)、白锈病菌 (*Puccinia horiana*)，各种作物的灰霉菌 (*Botrytis cinerea*)、菌核病菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 等,但不限定于这些例子。

[0065] 实施例

[0066] 以下示出实施例具体地说明本发明,但本发明并不受以下实施例的限定。

[0067] 实施例1:

[0068] 使用芽孢杆菌 (*Bacillus*) 属细菌,在结束培养后的微生物培养液中添加各种钙化合物或镁化合物,制造微生物农药制剂,对其保存稳定性改善效果进行研究。

[0069] “微生物农药制剂的制造”

[0070] 1. 微生物培养液的制备

[0071] 在500ml容量的三角烧瓶中放入100ml的液体标准培养基(多聚蛋白胍为0.5质量%、葡萄糖为0.1质量%、酵母提取物为0.5质量%、pH为7.0),进行加热灭菌。植入芽孢杆菌 (*Bacillus*) 属的细菌(解淀粉芽孢杆菌AT-332 (*Bacillus amyloliquefaciens* AT-332) 株)的前培养物100 μ l,在30 $^{\circ}$ C下以150rpm振荡培养64小时。

[0072] 2. 培养液的干燥及制剂

[0073] 在解淀粉芽孢杆菌AT-332 (*Bacillus amyloliquefaciens* AT-332) 株的培养液中添加表1所示的钙化合物(氯化钙、醋酸钙、碳酸钙、硫酸钙、柠檬酸钙、磷酸氢钙、草酸钙及泛酸钙)或镁化合物(硫酸镁、氯化镁及硬脂酸镁),使得在制剂中终浓度达到5质量%,使用

5N的盐酸,将pH调整至5.7,使用冷冻干燥机进行干燥。作为比较例,制备未添加钙化合物或镁化合物的培养液干燥物。在该培养液的干燥物75.1质量%中混合粉碎柠檬酸三钠4质量%、柠檬酸钠2质量%、氯化钠15.9质量%、烷基硫酸酯金属盐3质量%,获得由微生物农药组合物构成的制剂。

[0074] [保存稳定性试验]

[0075] 在铝层压袋中放入上述制备的5g制剂,利用热封进行密封。将其在54℃下静置,从开始静置经过3周时,从铝层压袋中取出,比较各制剂对各种病害的防治效果。作为比较例,制备在4℃下保存了3周的制剂。

[0076] [对黄瓜白粉病的生物效果试验]

[0077] 用自来水将各制剂稀释调整至规定倍率,制备药液。使用手持喷雾器以每3盆黄瓜40ml的比例散布制备后的稀释溶液,进行风干后在温室内管理。第二天,将在黄瓜叶上传代培养的黄瓜白粉病菌的分生孢子悬浮在T ween (TWEEN;注册商标) 20的10000倍稀释溶液中,利用相同溶液调整至 5×10^3 细胞/ml。使用手持喷雾器以每盆约8ml的量喷雾接种该孢子悬浮液。接种后,在室内将其风干,在温室内进行管理直至研究。接种10~14日后调查发病面积率,计算平均发病率。通过目视判定发病面积率。另外,防治值通过下述式(数学式1)求得,表1中所示的残余活性通过下述式(数学式2)求得。残余活性是将对不在制剂中添加钙化合物或镁化合物而制备的微生物农药制剂在4℃下处理3周时的防治值作为100时的比。将生物效果试验的结果示于表1中。

[0078] [数学式1]

[0079] 防治值(抑制率)(%) = [(无处理区发病面积率(%)) - (处理区发病面积率(%))]/(无处理发病面积率(%)) × 100

[0080] [数学式2]

[0081] 残余活性(%) = 100 × 添加钙化合物或镁化合物时的防治值(%) / 对照区的防治值(%)

[0082] 表1

添加的助剂	保存条件	残余活性(%)
未添加	4℃、3周	100
未添加	54℃、3周	12
氯化钙		65
醋酸钙		12
碳酸钙		32
硫酸钙		44
柠檬酸钙		35
磷酸氢钙		12
草酸钙		49
泛酸钙		45
硫酸镁		61
氯化镁		44
硬脂酸镁		47

[0083]

[0084] 由表1可知,将未添加钙化合物或镁化合物的制剂供至54℃、3周的保存稳定性试验时,根据对黄瓜白粉病的防治值所算出的残余活性降低至12%。另外,将添加表1所示的钙化合物或镁化合物至终浓度达到5质量%的制剂供至54℃、3周的保存稳定性试验,将它们对黄瓜白粉病的防治效果进行比较。添加了作为对微生物农药制剂的保存稳定性显示效果的物质的专利文献1中记载的硫酸钙、专利文献2中作为干燥剂使用的氯化钙、专利文献7中记载的碳酸钙、硫酸镁的微生物农药制剂如表1所示,通过54℃、3周的热处理,显示残余活性为30~65%,与比较例的残余活性12%相比,显示保存稳定性改善效果。其中,显示残余活性为60%以上的氯化钙或硫酸镁通过添加在制剂中,即使在54℃、3周的热处理下,也可保持原本的微生物农药制剂的效果,获得保存稳定性改善效果和对病害的防治效果。

[0085] 另外,为了进一步提高保存稳定性,探索了当在制剂中添加实施例1中显示高效果的氯化钙和硫酸镁这2种化合物时即使是54℃、3周的热处理后生物效果试验的残余活性也显示90%以上的条件。

[0086] 实施例2:

[0087] 通过将氯化钙和硫酸镁这2种化合物添加在微生物农药制剂中并对pH进行调节,对获得了怎样的保存稳定性改善效果进行研究。

[0088] 在解淀粉芽孢杆菌AT-332 (*Bacillus amyloliquefaciens* AT-332) 株的培养液中添加氯化钙或硫酸镁至在制剂中达到5%,使用5N的盐酸或5N的氢氧化钠将培养液的pH调节至3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、9.0,进行冷冻干燥。其他操作通过与实施例1相同的手法进行制备,评价所得制剂对黄瓜白粉病的效果。将结果示于表2。

[0089] 表2

[0090]

添加的助剂	保存条件	残余活性 (%)	500 倍稀释防治值
未添加助剂-pH 调节	4℃、3 周	100	92
未添加助剂-pH 调节	54℃、3 周	5	5
5%氯化钙 (未进行 pH 调节)		59	55
5%氯化钙 (pH 为 3.0)		75	70
5%氯化钙 (pH 为 3.5)		92	86
5%氯化钙 (pH 为 4.0)		97	90
5%氯化钙 (pH 为 4.5)		92	86
5%氯化钙 (pH 为 5.0)		87	81
5%氯化钙 (pH 为 5.5)		59	55
5%氯化钙 (pH 为 6.0)		49	46
5%氯化钙 (pH 为 9.0)		41	38
5%硫酸镁 (未进行 pH 调节)		57	53
5%硫酸镁 (pH 为 3.0)		71	66
5%硫酸镁 (pH 为 3.5)		76	71
5%硫酸镁 (pH 为 4.0)		82	76
5%硫酸镁 (pH 为 4.5)		78	73
5%硫酸镁 (pH 为 5.0)		74	69
5%硫酸镁 (pH 为 5.5)		52	48
5%硫酸镁 (pH 为 6.0)		34	32
5%硫酸镁 (pH 为 9.0)		20	19

[0091] 由表2可知,将现有技术的添加有氯化钙或硫酸镁的制剂供至54℃、3周的保存稳定性试验时,残余活性分别显示为59%、57%。而将在培养结束后的培养液中添加这些盐且调节至低pH的微生物农药制剂供至54℃、3周的保存稳定性试验时,残余活性在氯化钙、pH为4.0时显示最大的97%,与仅添加了盐的制剂相比,对黄瓜白粉病的活性最大高达1.6倍左右。通过pH调节获得的保存稳定性改善效果在pH调节至5.0以下的制剂中显著可见。对于pH调节至小于3.0时的改善效果,虽未进行研究,但考虑到作为微生物农药的使用性,由于刺激性等安全上的问题,认为是不适合的。由此,在培养结束后的培养液中添加氯化钙或硫酸镁至在制剂中的终浓度达到5%且将pH调节至3.0~5.0之后,将培养液干燥、制备得到的微生物农药制剂在54℃、3周的热处理后也保持高的保存稳定性效果,对黄瓜白粉病显示高活性,更优选氯化钙,对于氯化钙,在pH为3.5~4.5的范围内显示特别优异的效果。

[0092] 图1示出了实施例2的结果中的下述试验结果的照片:将在制剂中添加氯化钙且将pH调节至4.0的制剂供至54℃、3周的保存稳定性试验,然后将对黄瓜白粉病的防治效果进行比较。A示出了无处理区;B示出了将未进行氯化钙的添加及pH调节的制剂供至54℃、3周的保存稳定性试验后进行评价的试验区;C示出了在制剂中添加氯化钙至终浓度达到5%而未进行pH调节的制剂供至54℃、3周的保存稳定性试验的试验区;D示出了将在制剂中添加氯化钙至终浓度达到5%且将pH调节至4.0的制剂供至54℃、3周的保存稳定性试验后进行评价的试验区的结果。B中,观察到与无处理区同等的病斑,而添加了氯化钙的C、添加了氯化钙且将pH调整至4.0的D的试验区中病斑数少,显示对黄瓜白粉病的防治效果得到改善。

由此可知,通过氯化钙的添加和pH至4.0的调整,防治效果得以改善。

[0093] 实施例3:

[0094] 对氯化钙充分获得保存稳定性效果和植物病害防治效果的浓度进行了研究。

[0095] 在解淀粉芽孢杆菌AT-332 (*Bacillus amyloliquefaciens* AT-332) 株的培养液中添加氯化钙或硫酸镁,至制剂中的终浓度(质量%)达到0.5%、1.0%、2.5%、5%,使用5N的盐酸将培养液的pH调节至4.0,进行冷冻干燥。其他操作通过与实施例1相同的手法进行制备,评价所得的制剂对黄瓜白粉病的效果。将结果示于表3。

[0096] 表3

添加的助剂	保存条件	残余活性 (%)
未添加助剂-pH 调节	4℃、3 周	100
未添加助剂-pH 调节	54℃、3 周	0
5%氯化钙 (未进行 pH 调节)		55
0%氯化钙 (pH 为 4.0)		42
0.5%氯化钙 (pH 为 4.0)		42
1%氯化钙 (pH 为 4.0)		57
2.5%氯化钙 (pH 为 4.0)		70
5%氯化钙 (pH 为 4.0)		88
5%硫酸镁 (未进行 pH 调节)		47
0%硫酸镁 (pH 为 4.0)		42
0.5%硫酸镁 (pH 为 4.0)		40
1%硫酸镁 (pH 为 4.0)		50
2.5%硫酸镁 (pH 为 4.0)		65
5%硫酸镁 (pH 为 4.0)		77

[0098] 该结果显示,添加在制剂中的氯化钙或硫酸镁的浓度为终浓度达到0.5质量%以下时,无法获得50%以上的残余活性。由此显示,对于保存稳定性改善效果所需要的制剂中的氯化钙或硫酸镁优选为1.0质量%以上。另外,表3中虽未显示,但当在制剂中添加终浓度多于5%的氯化钙或硫酸镁时,由于保存稳定性试验中制剂发生固结,因此并不适合。由此显示,为了获得稳定的保存稳定性效果,优选在制剂中添加氯化钙或硫酸镁至终浓度达到1~5质量%。

[0099] 图2的照片显示:在实施例3的实例中,使用在培养液中添加氯化钙至终浓度(质量%)达到1%、2.5%、5%并用5N的盐酸将pH调节至4.0、然后进行冷冻干燥而得的菌体干燥物进行制剂,将得到的微生物农药制剂供至54℃、3周的保存稳定性试验,使用试验后的制剂,比较对黄瓜白粉病的防治效果。A的照片显示使用在培养液中未进行氯化钙的添加及pH调节且在54℃下保存了3周时的制剂的结果。B显示对在培养液中添加氯化钙至终浓度达到1%且将pH调节至4.0的制剂进行评价的结果;C显示对在培养液中添加氯化钙至制剂中的终浓度达到2.5质量%且将pH调节至4.0的制剂进行评价的结果;D显示对在培养液中添加氯化钙至在制剂中的终浓度达到5质量%且将pH调节至4.0的制剂进行评价的结果。从该结果可知,A中,活性降低至与无处理区同等程度;B、C、D中,随着制剂中的氯化钙浓度增加,对黄瓜白粉病的防治效果也得到改善。由此显示,为了通过添加氯化钙获得保存稳定性的

改善效果,优选在制剂中添加至少1质量%以上的氯化钙。

[0100] 实施例4:

[0101] 对于除黄瓜白粉病以外的病害,研究了是否可以获得同样的保存稳定性效果。

[0102] 除了评价供至保存稳定性试验的制剂对黄瓜灰霉病的生物效果之外,使用与实施例1同样的方法。以下示出了对黄瓜灰霉病的生物效果试验的详细情况。

[0103] 用自来水将制剂稀释调整至规定倍率。将稀释溶液50 μ l滴加至抗生素检验用纸盘,使溶液的渗入面朝下,静置在黄瓜叶表面。接着,从在PDA琼脂培养基上生长的灰霉菌(*Botrytis cinerea*)采集分生孢子,用蒸馏水调整至 4×10^5 /ml。向该孢子悬浊液等量添加营养液(2%蔗糖、0.4%酵母提取物),最终调整至 2×10^5 /ml。将该孢子悬浊液50 μ l滴加至在黄瓜叶上排列的纸盘上,在21 $^{\circ}$ C下保温3天后,测定各病斑的直径。通过与无处理区病斑直径进行比较,利用下述式(数学式3)算出各药剂的防治值。将在制剂中未添加助剂并在4 $^{\circ}$ C下处理了3周的制剂的防治值作为100时的比,利用下述式(数学式4)算出残余活性率。将结果示于表4。

[0104] [数学式3]

[0105] 防治值(%) = [(无处理区病斑 ϕ) - (处理区病斑 ϕ)] / (无处理区病斑 ϕ) \times 100

[0106] [数学式4]

[0107] 残余活性(%) = 100 \times 添加钙化合物或镁化合物时的防治值(%) / 对照区的防治值(%)

[0108] 表4

	添加的助剂	保存条件	残余活性(%)
[0109]	未添加助剂-pH 调节	4 $^{\circ}$ C、3 周	100
	未添加助剂-pH 调节	54 $^{\circ}$ C、3 周	0
	5%氯化钙 (pH 为 4.0)		100

[0110] 其结果,将添加了氯化钙且将pH调节至4.0的培养液干燥,将所得的制剂供至54 $^{\circ}$ C、3周的保存稳定性试验,试验后的微生物农药制剂的残余活性为100%。由此可知,由本发明获得的微生物农药制剂即使在54 $^{\circ}$ C、3周的热处理后,不仅对黄瓜白粉病、还对黄瓜灰霉病具有防治效果,即并不受病害种类的限定。

[0111] 实施例5:

[0112] 研究除解淀粉芽孢杆菌AT-332(*Bacillus amyloliquefaciens* AT-332)株以外的芽孢杆菌(*Bacillus*)属细菌是否获得了相同的效果。

[0113] 在枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) QST-713株(用SDS公司制impression分离)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) MBI-600株(用出光兴产公司制botokira分离)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) HAI-0404株(用日本曹达公司制Agrocare分离)及解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) D747株(用kumiai-chem公司制ecoshot分离)的培养液中添加氯化钙至在制剂中的终浓度达到5%,使用5N的盐酸将pH调节至4.0,进行冷冻干燥。其他操作通过与实施例1同样的手法进行制备,评价所得的制剂对黄瓜白粉病的效果。将结果示于表5。

[0114] 表5

[0115]

菌株名	添加的助剂	保存条件	残余活性 (%)
枯草芽孢杆菌 QST-713	未添加助剂-pH 调节	4℃、3 周	100
	未添加助剂-pH 调节	54℃、3 周	16
	添加 5%氯化钙 (pH 为 4.0)		90
枯草芽孢杆菌 MBI-600	未添加助剂-pH 调节	4℃、3 周	100
	未添加助剂-pH 调节	54℃、3 周	22
	添加 5%氯化钙 (pH 为 4.0)		94
枯草芽孢杆菌 HAI-0404	未添加助剂-pH 调节	4℃、3 周	100
	未添加助剂-pH 调节	54℃、3 周	14
	添加 5%氯化钙 (pH 为 4.0)		89
解淀粉芽孢杆菌 D747	未添加助剂-pH 调节	4℃、3 周	100
	未添加助剂-pH 调节	54℃、3 周	26
	添加 5%氯化钙 (pH 为 4.0)		85

[0116] 其结果,即使在使用了枯草芽孢杆菌QST-713株、枯草芽孢杆菌MBI-600株、枯草芽孢杆菌HAI-0404株及解淀粉芽孢杆菌D747株的试验中,也可见与解淀粉芽孢杆菌AT-332 (*Bacillus amyloliquefaciens* AT-332) 株同样的保存稳定性改善效果。由此可知,在芽孢杆菌 (*Bacillus*) 属的细菌中,添加氯化钙或硫酸镁且将pH调节至4.0~5.0而得的微生物农药制剂即使在54℃、3后的热处理后也显示高的保存稳定性效果,也充分保持了对植物病害的防治效果。

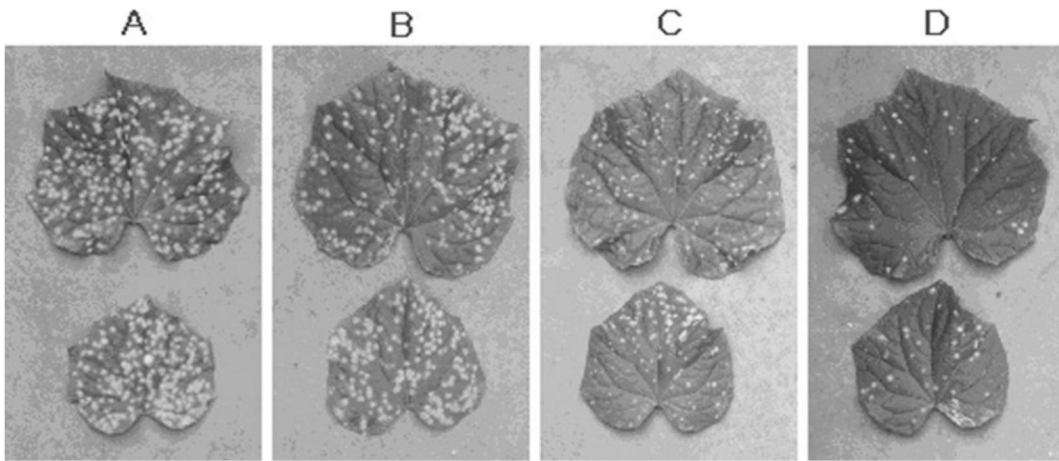


图1

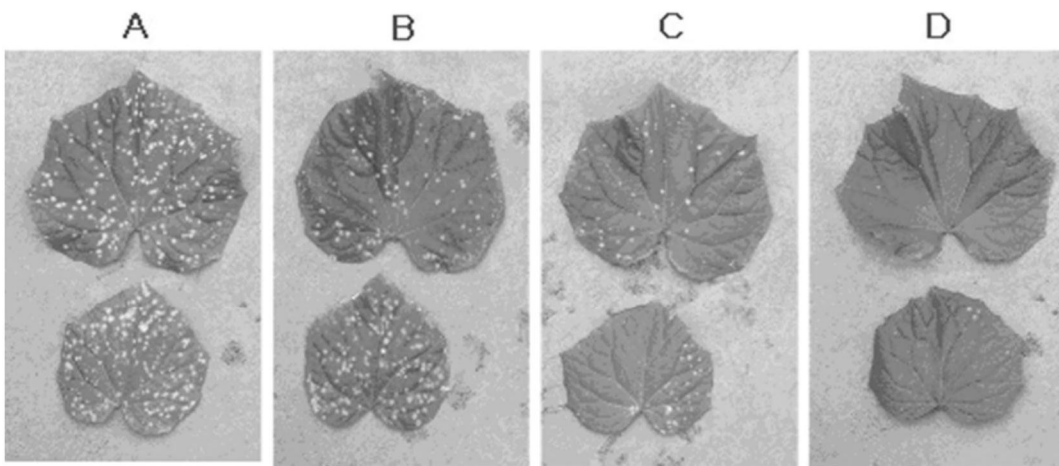


图2