(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4472813号
(P4472813)

(45)発行日　平成22年6月2日(2010.6.2)　(24)登録日　平成22年3月12日(2010.3.12)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 1/20	(2006.01)	C12N	1/20	A
A01N 63/00	(2006.01)	C12N	1/20	E
A01N 63/02	(2006.01)	A01N	63/00	F
C12N 3/00	(2006.01)	A01N	63/02	E
C12R 1/07	(2006.01)	C12N	3/00	

請求項の数 6　(全 12 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平11-338628
(22)出願日　平成11年11月29日(1999.11.29)
(65)公開番号　特開2001-149066(P2001-149066A)
(43)公開日　平成13年6月5日(2001.6.5)
審査請求日　平成18年9月1日(2006.9.1)

微生物の受託番号　FERM　BP-8068

(73)特許権者　591014710
千葉県
千葉県千葉市中央区市場町１番１号
(73)特許権者　000002886
ＤＩＣ株式会社
東京都板橋区坂下３丁目３５番５８号
(74)代理人　100124970
弁理士　河野　通洋
(74)代理人　100088764
弁理士　高橋　勝利
(72)発明者　木村　雅敏
千葉県市原市ちはら台３－３２－１－１－１０－５０２

最終頁に続く

(54)【発明の名称】バチルス・ポピリエの胞子嚢の製造方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
バチルス・ポピリエに属する菌を、活性炭を０．０１重量％～０．５重量％、グルコースを０．０１重量％以下で含む培地で培養することを特徴とする、胞子とパラスポラルボデイとを含むバチルス・ポピリエの胞子嚢の製造方法。
【請求項２】
胞子とパラスポラルボデイとを含む胞子嚢が、コガネムシ科の昆虫に対して殺虫性を有することを特徴とする請求項１に記載の製造方法。
【請求項３】
コガネムシ科の昆虫がドウガネブイブイである請求項１又は２に記載の製造方法。
【請求項４】
培養が、固体培養である請求項１～３の何れか１つに記載の製造方法。
【請求項５】
培地中に、寒天、ポリペプトン、酵母エキス及びリン酸塩を含むことを特徴とする請求項４に記載の製造方法。
【請求項６】
バチルス・ポピリエに属する菌が、バチルス・ポピリエ・セマダラ（ＦＥＲＭ　ＢＰ－８０６８）である請求項１～５の何れか１つに記載の製造方法。
【発明の詳細な説明】
【０００１】

【発明の属する技術分野】
本発明は、バチルス・ポピリエに属する菌の人工培地での培養による胞子とパラスポラルボディとを含むバチルス・ポピリエの胞子嚢の製造方法と、該胞子嚢を有効成分とするコガネムシ科昆虫の防除剤、及びコガネムシ科昆虫の防除方法に関する。
【０００２】
【従来の技術】
コガネムシ科昆虫の幼虫は、芝や農園芸作物や樹木等の広範囲な植物の根を食餌し、それらに多大の被害を与える。これらの幼虫は地中に棲息することから、地上から散布する化学農薬が効きにくく、且つその棲息場所が特定しにくいことから、十分な殺虫効果を得る為には、広範囲に、多量の殺虫性農薬を散布して地中に浸透させる必要があり、その結果、環境汚染を引き起こし易い為に、事実上、その防除、駆除は殆ど困難であった。
【０００３】
一方、バチルス・ポピリエに属する菌は、これらコガネムシ科昆虫の幼虫に寄生して乳化病を発病させ、最終的にコガネムシ科昆虫を死に至らしめることから、化学農薬が効きにくいコガネムシ科昆虫の駆除にバチルス・ポピリエに属する菌を利用しようとする試みが古くから行われてきた。
【０００４】
また、バチルス・ポピリエに属する菌の培養方法としては、寄生宿主であるコガネムシ科の生きた幼虫を用いて菌を増殖させ胞子嚢を製造する方法が従来から知られていた。
【０００５】
即ち、バチルス・ポピリエの胞子嚢をコガネムシ科昆虫の幼虫の存在する飼育培土に散布して、バチルス・ポピリエの胞子嚢を経口的にコガネムシ科昆虫の幼虫に摂取させるか、又は体液中に注射により注入した後、幼虫を３週間～４週間飼育し、該幼虫体内でバチルス・ポピリエを増殖させ、その後、幼虫に孔を開けるか切開して体液を採取し、得られた体液を遠心分離又は濾過することにより、幼虫体内で増やした胞子嚢を得る方法である。
【０００６】
しかしながら、この方法では、コガネムシ科昆虫の幼虫を大量に飼育する必要があり、結果的に大量の胞子嚢を多量に、短時間に、且つ経済的に得ることは困難であった。この為、コガネムシ科昆虫の幼虫を用いない人工培地を用いての培養方法に関する多くの研究が行われてきた。
【０００７】
これらのコガネムシ科昆虫の幼虫を用いない人工培地での培養方法（以下、昆虫体外培養法と呼ぶことがある）としては固体培養と液体培養がある。固体培養ではFOSTER等（J.W.Foster et al.,1950年,J.Bacteriol,59巻,463-470頁）、STEINKRAUS(Keith H.Steinkraus,1957年, J.Bacteriol,74巻,625-632頁）の研究例が、液体培養では、HAYNES等（W.C.Haynes et al.,Journal of Bacteriology,June,1966年,91巻,No6,2270-2274頁）の研究例がある。しかし、いずれの場合も、得られた胞子あるいは胞子嚢のコガネムシ科昆虫の幼虫に対する殺虫効果は明記されておらず、また商業生産にも繋がっていない。
【０００８】
米国特許（USP No.4824671）は人工培地を用いた液体培養によりバチルス・ポピリエに属する菌を培養している例である。しかし得られた胞子嚢に胞子は有るが、パラスポラルボディは存在せず、幼虫体内で形成された胞子嚢に比較してコガネムシ科昆虫の幼虫に対する殺虫効果は弱い。また福原も人工培地から得た胞子嚢では感染が起こらないと報告している（福原俊彦著　昆虫病理学　57頁）。
【０００９】
胞子嚢とは、図１に示す模式図の如く、胞子とパラスポラルボディ（又は副胞子小体）と呼ばれる小体を含む嚢であり、バチルス・ポピリエに属する菌が産生する。バチルス・ポピリエの人工培地を用いた培養方法に関する従来の文献では、胞子嚢と胞子とが明確な区別なく用いられている場合が多く、文献中の胞子との言葉が胞子のみを意味するのか、胞子は含むがパラスポラルボディは含まない胞子嚢を意味するのか、又は胞子とパラスポラ

ルボディとを含む胞子嚢であるのかが不明である場合が多い。
【００１０】
従って、従来の文献に記載されている人工培地での培養方法で得られたバチルス・ポピリエの胞子が、胞子とパラスポラルボディを含む胞子嚢であるのかは不明であり、更に該胞子もしくは胞子嚢のコガネムシ科昆虫の幼虫に対する殺虫効果も明らかにされていないが、後述する理由から、それらの多くは胞子とパラスポラルボディとを含む胞子嚢ではなく、胞子のみ又は胞子のみを含む胞子嚢であり、且つそのコガネムシ科昆虫に対する殺虫効果は弱いと推定された。
【００１１】
【発明が解決しようとする課題】
本発明が解決しようとする課題は、コガネムシ科昆虫の幼虫を用いず、人工培地を用いて胞子とパラスポラルボディとを含む多量のバチルス・ポピリエの胞子嚢を得るバチルス・ポピリエ胞子嚢の工業的な製造方法、該胞子嚢を有効成分とする、芝や農園芸作物や樹木等の根に多大な被害を与えるコガネムシ科昆虫の優れた防除剤、及び防除方法を提供することである。
【００１２】
【課題を解決するための手段】
本発明者らは上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、コガネムシ科昆虫の効果的な殺虫防除には、バチルス・ポピリエの胞子のみでなく、胞子とパラスポラルボディとを含む胞子嚢が必要であることを見出した。
更に、バチルス・ポピリエ菌をコガネムシ科昆虫の幼虫体外で増殖させ、且つ胞子とパラスポラルボディとを含む胞子嚢を形成させる為には、該菌の増殖に伴って菌体外に排出される胞子嚢形成を阻害する代謝産物を除去する必要があること、また該阻害代謝産物を除去する際に、胞子嚢の形成に必要な成分までを除去しない必要があることを見出した。
【００１３】
従来の報告例においても、バチルス・ポピリエの人工培地での培養では、菌の生育の為に培養阻害物質を除去することが必要であり、活性炭や可溶性デンプン等の吸着剤を人工培地に添加している例が見られた。しかしながら、本発明者らは、阻害物質の除去材であるこれらの活性炭の添加量を制限して培養を行わねば、胞子とパラスポラルボディとを含む胞子嚢が形成されないことを見出した。
【００１４】
即ち、本発明者らは、バチルス・ポピリエの人工培地への活性炭の添加量が０．５重量％を越えると、胞子嚢を形成するのに必要な栄養分までも除去してしまう為か、胞子とパラスポラルボディとを含む胞子嚢形成が急激に減少することを見出した。一方、従来報告されている阻害物質吸着剤の添加量は、培地に対していずれも０．６重量％以上であり、且つコガネムシ科昆虫の殺虫効果を発揮する胞子又は胞子嚢の形成程度は報告されていなかった。
【００１５】
本発明者らは、従来報告された０．６重量％以上の活性炭を含む人工培地での培養では、菌（栄養細胞）自体の生育は良好であるものの、胞子とパラスポラルボディとを含む胞子嚢の生産量は極めて少なく、コガネムシ科昆虫の殺虫効果を発揮するのに十分な胞子とパラスポラルボディとを含む胞子嚢が得られないこと、更に人工培地中にグルコースを一定量以上含有している場合には、更に胞子嚢を得にくいことも併せて見いだした。
【００１６】
従って、従来報告された活性炭を含有する人工培地でのバチルス・ポピリエの培養では、胞子とパラスポラルボディとを含む胞子嚢が十分に得られず、明確なコガネムシ科昆虫の幼虫の殺虫効果が確認できなかった為に、その殺虫効果の報告がなかったものと推定される。
【００１７】
これらから本発明者らは人工培地中の活性炭量及びグルコース量を制限することにより、

コガネムシ科に属する昆虫に対して殺虫性を有する胞子とパラスポラルボディとを含む多数の胞子嚢を有するバチルス・ポピリエの培養方法及び、該培養方法によって得られる胞子嚢を有効成分とするコガネムシ科昆虫の防除剤を完成するに至った。

【００１８】

即ち、本発明は、

（１）バチルス・ポピリエに属する菌を活性炭０．０１重量％～０．５重量％を含む培地で培養することを特徴とする、胞子とパラスポラルボデイとを含むバチルス・ポピリエの胞子嚢の製造方法と、

【００１９】

（２）式１の胞子嚢化率で示される、胞子嚢数の全菌数当たりの割合が０．１％以上であることを特徴とする（１）に記載の製造方法と、

【００２０】

【式１】

胞子嚢化率（％）＝（胞子嚢数）/（全菌数）×１００

【００２１】

（３）培地中に含まれるグルコース濃度が０．０１重量％以下であることを特徴とする（１）又は（２）に記載の製造方法と、

（４）胞子とパラスポラルボディとを含む胞子嚢がコガネムシ科の昆虫に対して殺虫性を有することを特徴とする（１）～（３）の何れか１つに記載の製造方法と、

【００２２】

（５）コガネムシ科の昆虫がドウガネブイブイである（４）に記載の製造方法と、

（６）培養が固体培養である（１）～（５）の何れか１つに記載の製造方法と、

【００２３】

（７）培地中に、寒天、ポリペプトン、酵母エキス及びリン酸塩を含むことを特徴とする（６）に記載の製造方法と、

（８）バチルス・ポピリエに属する菌がバチルス・ポピリエ・セマダラ（ＦＥＲＭ ＢＰ－８０６８）である（１）～（７）の何れか１つに記載の製造方法と、

【００２４】

（９）上記の（１）～（８）の何れか１つに記載の製造方法により製造された、胞子とパラスポラルボデイとを含むバチルス・ポピリエの胞子嚢を有効成分とするコガネムシ科昆虫の防除剤と、

【００２５】

（１０）上記の（１）～（８）の何れか１つに記載の製造方法により製造された胞子とパラスポラルボディとを含むバチルス・ポピリエの胞子嚢をコガネムシ科昆虫に作用させるコガネムシ科昆虫の防除方法とを含むものである。

【００２６】

【発明の実施の形態】

本発明で用いられるバチルス・ポピリエに属する菌とは、バチルス属ポピリエ種（Bacillus popilliae）に属する菌である。バチルス属ポピリエ種の細菌学的性質は、バージェイズ・マニュアル・オブ・デターミネイティブ・バクテリオロジー（Bargeys Manual of Determinative Baceriology）によれば、形態的性質は長さが１．３～５．２μｍ、幅が０．５～０．８μｍのグラム陰性桿菌、生育温度は２０～３５℃で胞子嚢の中にパラスポラルボディを持っている。

【００２７】

バチルス属ポピリエ種（Bacillus popilliae）に属する菌には、バチルス・ポピリエ・セマダラ株（Bacillus popilliae semadara）、バチルス・ポピリエ・デュトキ株（Bacillus popilliae dutky）（American Type Culture Collection No.１４７０６、以下ＡＴＣＣ １４７０６と称す）、バチルス・ポピリエ・メロロンサ（Bacillus popilliae melolontha）等が挙げられる。なお、バチルス・ポピリエ・セマダラ株（Bacillus popilliae semadara）は、平成１０年５月２１日に工業技術院生命工学工業技術研究所（現　独立行

政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター）に受託番号ＦＥＲＭ　Ｐ－１６８１８で寄託され、平成１４年５月２１日にブタペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号ＦＥＲＭ　ＢＰ－８０６８が付与されている。

【００２８】

以下に本発明によるバチルス・ポピリエ胞子嚢の製造方法について述べる。該微生物の培養方法としては通常の固体培養で行うことができる。固体培養の基材としては寒天・ジェランガム・カードラン・キサンタンガム等の多糖類が使用できるが、寒天を用いた培養が特に好ましい。

【００２９】

一般に微生物の良好な増殖を促すには培地中に糖類などの炭素源が加えられる。本発明に用いるバチルス・ポピリエに属する菌も、グルコース等の糖源を添加することにより菌体の増殖が促進される。しかしながら胞子とパラスポラルボデイとを含む胞子嚢を形成させるためには、グルコースの添加は好ましくなく、培地中に含まれるグルコース濃度は０．０１重量％以下にすることが好ましい。

【００３０】

培地に用いる窒素源としてはポリペプトン、乾燥酵母エキス等の有機性窒素が使用できる。これらの濃度は０．１重量％～３．０重量％、好ましくは０．２５重量％～１．５重量％の範囲である。それらの窒素源には、しばしばグルコースが含まれている場合があるが、培地中のグルコース濃度が０．０１重量％を越えないように、窒素源を選択し使用することが好ましい。

【００３１】

培地に用いるリン酸塩としては、リン酸カリウム、リン酸水素二カリウム等のリン酸塩又はそのナトリウム塩等の無機塩が使用できる。これらの濃度は０．０５重量％～１．０重量％の範囲で用いることが望ましい。

固体培地とするために加えられる寒天、ジェランガム等の多糖類の濃度は０．５重量％～５．０重量％、好ましくは１．０重量％～３．０重量％である。

【００３２】

培地中には活性炭が添加されるが、添加される活性炭の種類は粉末状、粒状、シート状等のいかなる種類の活性炭でもよく、特に制限はないが、粉末状の活性炭が好ましい。培地中の活性炭濃度は、本発明の重要な要件の一つであり、０．０１重量％～０．５重量％である必要がある。培地中の活性炭濃度が０．０１重量％以下では、胞子とパラスポラルボデイとを含む胞子嚢の形成を阻害する物質の除去効果が十分でなく、また０．５重量％を越えると、胞子とパラスポラルボデイとを含む胞子嚢の形成が急激に減少する。

【００３３】

活性炭の添加方法としては殺菌前の培地中に添加しても良いし、殺菌後の培地に添加しても良いが、活性炭が十分に殺菌され他の微生物に汚染されていないことが必要である。培養温度は２５℃～３５℃、好ましくは２７℃～３０℃である。培養時間は培養温度によって異なるが、２７℃～３０℃の場合で通常１０～１５日である。

【００３４】

培養終了後、培養物から胞子嚢を取得する方法としては、胞子嚢を含んだ菌体が固体培養基の表面にあることから、水あるいはリン酸緩衝液、Tris-HCl等の緩衝液を用いて菌体及び胞子嚢を懸濁させて洗い流し、その後、遠心分離や濾過等の一般の分離方法で菌体及び胞子嚢を取得する。

【００３５】

０．６重量％以上の活性炭を含有する従来の人工培地での培養では、胞子とパラスポラルボデイとを含むバチルス・ポピリエの胞子嚢は殆ど得られず、式１の胞子嚢化率で示される、全菌数当たりの胞子嚢数の割合は、通常０．０５重量％未満である。

【００３６】

【式１】

胞子嚢化率（％）＝（胞子嚢数）/（全菌数）×１００

【００３７】
これに対して、本発明のバチルス・ポピリエの胞子嚢の製造方法により得られる胞子嚢数は、従来の培養方法で得られる胞子嚢数よりも遥かに多い。
【００３８】
取得した菌体及び胞子嚢は、それらを懸濁した緩衝液のまま、コガネムシ科昆虫の防除剤として用いてもよく、あるいは乾燥して粉末にして用いても良い。また乾燥した後、水あるいは緩衝液の懸濁液として使用しても良い。更にこれらの胞子嚢は農薬に用いられる公知慣用の賦形剤、担体、栄養剤等の成分と混合して使用することもできる。また本発明の胞子と他の微生物製剤を混合して使用することも可能である。
【００３９】
本発明のバチルス・ポピリエの胞子嚢を有効成分とするコガネムシ科昆虫の防除剤は、芝や農作物の害虫としてよく知られているコガネムシ科昆虫のドウガネブイブイ（Anomala cuprea）、セマダラコガネ（Blitopertha orientalis）、マメコガネ（Popillia japonica）、ウスチャコガネ（phyllopertha diversa ）、チャイロコガネ（Adoretus tenuimaculatus）、ヒメコガネ（Anomala rufocuprea）等に対して、いずれも優れた殺虫性、防除効果を示し、中でも比較的大型なコガネムシであるドウガネブイブイやセマダラコガネの幼虫に対して優れた殺虫、防除効果を示す。
【００４０】
【実施例】
以下、実施例及び試験例により本発明を更に具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらに限定されるものではない。
【００４１】
（実施例１）（培地の製造）
３００ｍｌ容量の三角フラスコ２本それぞれに蒸留水１００ｍｌを入れ、トリプトン０．５重量％（ＤＩＦＣＯ社製）、イーストエクストラクト１．５重量％（オキゾイド社製）、リン酸水素二カリウム０．３重量％（和光純薬社製特級）、寒天２．０重量％（和光純薬社製特級）を添加し混合した。（以下、これら培地成分を含有する培地を培地Ａと称する。）
【００４２】
培地Ａに和光純薬社製特級粉末活性炭を、無添加、０．１重量％及び１．０重量％となるように加えた。その後１２１℃、２０分のオートクレーブ殺菌を行い寒天が固化しないうちに十分撹拌して、直径９ｃｍのプラスチックシャーレにて２０ｍｌ添加して平板培地を作成した。活性炭含有量が異なるそれら平板培地を用いて、バチルス・ポピリエ・セマダラ株及びバチルス・ポピリエ・デュトキ（ＡＴＣＣ　１４７０６）株を培養した。
【００４３】
セマダラ株（ＦＥＲＭ ＢＰ－８０６８）は、乳化病コガネムシ感染幼虫から採取した体液中の胞子嚢を用いた。胞子嚢数を胞子顕微鏡による直接検境法により計測し1×10^{4}個／ｍｌとなるように調製しエッペンチューブに０．５ｍｌ取り、ヒートブロックにて７０℃、２０分の加熱処理後、そのうちの５０μｌを上記で調製した平板培地に塗布した。
【００４４】
デュトキ株は凍結乾燥保存されていた菌体（胞子及び胞子嚢は含まず）を、ＤＩＦＣＯ社製トリプトン０．５重量％、オキゾイド社製イーストエクストラクト１．５重量％、和光純薬社製特級リン酸水素二カリウム０．３重量％、和光純薬社製特級粉末活性炭０．１重量％を添加して１２１℃で２０分の殺菌処理した液体培地を用いて、３０℃のインキュベータ内にて１２０ｒｐｍの撹拌条件により１週間培養した。その培養液の０．１ｍｌを無菌的に寒天培地に塗布した。以上の菌体を塗布した平板培地を３０℃のインキュベータ内にて１４日間培養した。
【００４５】
培養終了後、シャーレに無菌的に蒸留水２ｍｌを添加して発生したコロニーを懸濁させた後、菌体及び胞子嚢を取得した。取得した溶液中の単位容積当たりの胞子嚢数、及び全菌

数を顕微鏡による直接検鏡により計測し、式１により胞子嚢化率を算出した。表１にセマダラ株を用いた場合の試験結果を示す。活性炭添加濃度が０．１重量％の場合においてのみ胞子嚢が形成した。

【００４６】

【式１】

胞子嚢化率（％）＝（胞子嚢数）/（全菌数）×１００

【００４７】

活性炭添加濃度が０．１重量％の場合に得られたセマダラ株の胞子嚢の顕微鏡写真を図２に示す。顕微鏡写真は株式会社ニコン製の光学顕微鏡ECLIPSE E600に株式会社ソニーのカラービデオカメラモジュールXC-003を接続して撮影した（倍率：×３８００）。胞子嚢中に１つの胞子と１つのパラスポラルボデイとが含まれることが判る。

【００４８】

表２にデュトキ株を用いた場合の試験結果を示した。同様に活性炭添加濃度が０．１重量％の場合においてのみ胞子嚢が形成した。表１にセマダラ株による胞子嚢の形成を、表２にデュトキ株による胞子嚢の形成状況を示した。

【００４９】

【表１】

培地中の活性炭濃度	0%	0．1%	1．0%
胞子嚢化率	0%	4．8%	0%

【００５０】

【表２】

培地中の活性炭濃度	０％	０．１％	１．０％
胞子嚢化率	０％	３．１％	０％

【００５１】

（実施例２）

培地中の活性炭量の検討を行った。３００ｍｌ容量の三角フラスコ７本それぞれに培地Ａの成分を添加し、そこに和光純薬社製特級粉末活性炭を、無添加、０．０５重量％、０．１重量％、０．２５重量％、０．５重量％、１．０重量％、２．０重量％含むように調製した。その後１２１℃、２０分のオートクレーブ殺菌を行い実施例１と同様に平板培地を作成した。

【００５２】

セマダラ株は実施例１において活性炭添加濃度０．１重量％にて培養し取得した胞子嚢を含む菌体を使用した。取得液を無菌的に蒸留水にて希釈して1×10^{5}個／ｍｌとなるように調製した。その液をエッペンチューブに０．５ｍｌ取り、ヒートブロックにて７０℃、２０分の加熱処理後、５０μｌを取り上記で調製した活性炭添加量の異なる平板培地にそれぞれ塗布した。菌体を塗布した上記の平板培地を３０℃のインキュベータ内にて１４日間培養した。

【００５３】

培養終了後、シャーレに無菌的に蒸留水２ｍｌを添加して発生したコロニーを懸濁させた後、胞子嚢及び菌体を取得した。取得した溶液中の単位容積当たりの胞子嚢数及び全菌数

を顕微鏡による直接検鏡により計測し、式１により胞子嚢化率を算出した。図３に培地中の活性炭濃度と胞子嚢化率の関係を示す。縦軸は胞子嚢化率（％）を、横軸は培地中の活性炭濃度（重量％）を表す。活性炭濃度が０．５重量％以下で良好な胞子嚢形成が見られる。

【００５４】

（実施例３）

培地中のグルコース濃度が胞子嚢形成に与える影響を検討した。培地Ａの活性炭濃度が０．１重量％となるように調製したものと、培地Ａにグルコース濃度が０．２重量％、活性炭濃度が０．１重量％含まれるように調製した平板培地を作成した（以下、それぞれ平板培地Ｐ、平板培地Ｑと称す）。

【００５５】

また培地Ａの成分中のトリプトン及びイーストエキストラクト濃度をそれぞれ２倍にした培地に活性炭濃度が０．１重量％となるように調製し平板を作成した（以下、平板培地Ｒと称す）。

【００５６】

更に培地成分をＤＩＦＣＯ社製トリプトン１．０重量％、オキゾイド社製イーストエクストラクト０．６重量％、和光純薬社製特級リン酸水素二カリウム０．３重量％、和光純薬社製特級寒天１．５重量％、和光純薬社製特級溶性デンプン１．０重量％、和光純薬製特級グルコース０．１重量％、和光純薬製特級フラクトース０．１重量％、和光純薬製特級シュークロース０．１重量％、和光純薬製特級マルトース０．１重量％、和光純薬製特級マンノース０．１重量％、和光純薬製特級サリシン０．１重量％として和光純薬社製特級粉末活性炭を０．６重量％とした平板培地（平板培地Ｓと称す）を作成した。

【００５７】

それら培地中のグルコース濃度を比較するために培地成分Ａ中に含まれるグルコース濃度を測定した。培地Ａ成分から寒天を除いた溶液を調製し、ベーリンガー・マンハイム社のＦキットを用いて酵素法によりグルコース濃度を測定した。この結果得られたグルコース濃度は３８ｍｇ／ｌ（０．００３８重量％）であった。

【００５８】

以上により各平板培地中のグルコース濃度は、平板培地Ｐが０．００３８重量％、平板培地Ｑが０．２重量％、平板培地Ｒが０．００７６重量％、平板培地Ｓが０．１重量％である。尚、平板培地Ｒについてはトリプトン・イーストエクストラクトの濃度が２倍であることから、平板Ｐの測定値を２倍した。また平板培地ＱとＲについてはそれぞれグルコースが添加されているので、存在するグルコース濃度は添加グルコース濃度に等しい。

【００５９】

上記の４種類の平板罰にてバチルス・ポピリエ・セマダラ株を培養した。用いた培養方法は実施例１と同様である。また実施例１と同様の方法により、胞子嚢化率を算出した。表３に培地中のグルコース濃度と胞子嚢化率とを示す。グルコース濃度０．０１重量％以下の場合に胞子嚢化率が良好であることがわかる。

【００６０】

【表３】

	平板 培地Ｐ	平板 培地Ｑ	平板 培地Ｒ	平板 培地Ｓ
培地中のグルコース濃度 （重量%）	0.0038	0.1	0.0076	0.1
培地中の活性炭濃度 （重量%）	0.1	0.1	0.1	0.6
胞子嚢化率(%)	5.80	0	0.04	0

【００６１】
（実施例４）
本発明の製造方法により得られた胞子嚢によるコガネムシ科昆虫の殺虫試験を行った。直径６ｃｍのプラスチックカップ１０個に腐葉土２０ｇづつを入れた。そのうちの５個には、胞子嚢数が1×10^{8}個／カップとなるよう胞子嚢を散布した。散布した胞子嚢は実施例３に示した平板Ｐと同様の組成の平板を作成し、同じ条件にて培養して取得した胞子嚢を使用した。
【００６２】
残りの５個はコントロールとして、胞子嚢無添加で試験した。それぞれのカップにセマダラコガネ３令幼虫を１頭ずつ入れ、２５℃のインキュベータ内で４０日間飼育し、死亡個体数を調べると共に死亡体内に乳化病胞子が形成されているかを顕微鏡で調べた。
【００６３】
表４にセマダラコガネに対する昆虫体外形成胞子嚢の殺虫活性の結果を示す。３０日目までに全ての幼虫が死亡し、死亡した幼虫５頭の内、２頭が体内に乳化病の胞子嚢を形成していた。
【００６４】
【表４】

	死亡率%		
	１０日目	２０日目	３０日目
胞子嚢無添加カップ	０	０	０
胞子嚢添加カップ	４０%	８０%	１００%

【００６５】
（実施例５）
実施例４と同様にして調製したカップを３個づつ用意した。そこにドウガネブイブイ２令幼虫を１頭ずつ入れ２５℃のインキュベータ内で４０日間飼育し、死亡個体数を調べると共に死亡体内に乳化病胞子が形成されているかを顕微鏡で調べた。本発明の製造方法により製造した胞子嚢のドウガネブイブイに対する殺虫活性試験の結果を表５に示した。３０日目までに６７%の幼虫が死亡し、死亡した幼虫２頭のうち１頭が体内に乳化病の胞子嚢を形成していた。
【００６６】
【表５】

	死亡率%		
	１０日目	２０日目	３０日目
胞子嚢無添加カップ	０	０	０
胞子嚢添加カップ	０	３３％	６７％

【００６７】

【発明の効果】

本発明は、コガネムシ科昆虫の幼虫を用いることなく、人工培地を用いて胞子とパラスポラルボディとを含む多量のバチルス・ポピリエの胞子　嚢を短期間で得るバチルス・ポピリエ胞子嚢の工業的な製造方法、該胞子嚢を有効成分とする芝や農園芸作物や樹木等の根に多大な被害を与えるコガネムシ科昆虫の優れた防除剤、及び防除方法を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

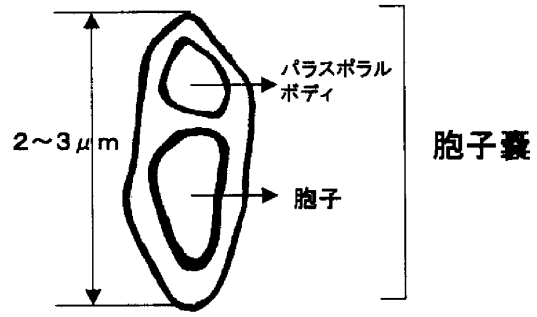
【図１】　胞子とパラスポラルボディとを含むバチルス・ポピリエの胞子嚢の模式図である。

【図２】　実施例１で、活性炭添加濃度が０．１重量％の場合に得られたセマダラ株の胞子嚢の顕微鏡写真である。

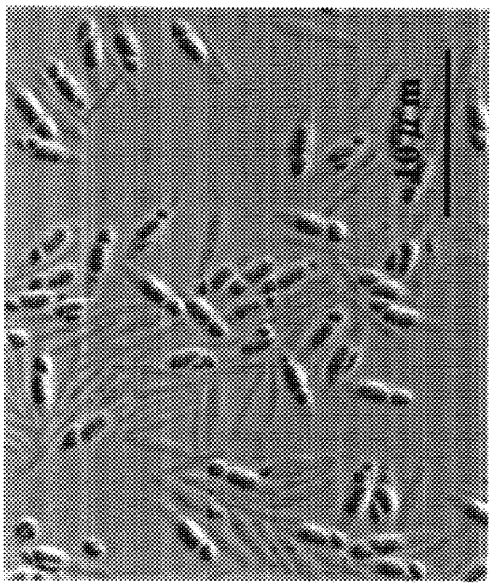
【図３】　培地中の活性炭濃度と胞子嚢化率の関係を示す図である。

縦軸は胞子嚢化率（％）、横軸は培地中の活性炭濃度（重量％）を表す。

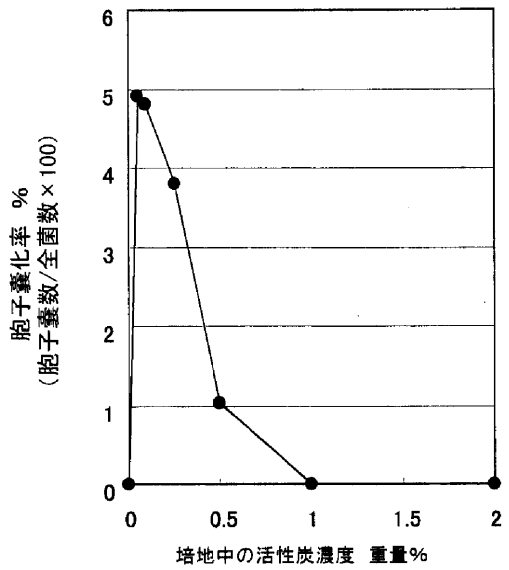
【図１】



【図２】



【図３】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C１２N 1/20 A
C１２R 1:07

(72)発明者 江原 岳
千葉県佐倉市大崎台３－４－５－３－１０４
(72)発明者 西橋 秀治
千葉県佐倉市大崎台２－２３－９
(72)発明者 藤家 梓
千葉県長生郡睦沢町上市場２５６－３
(72)発明者 長谷川 誠
千葉県千葉市緑区椎名崎町４８６－Ｅ－５０３
(72)発明者 田中 正男
千葉県千葉市美浜区高浜６－１１－１２
(72)発明者 横山 とも子
千葉県千葉市美浜区磯辺５－１６－１－５０１

審査官 六笠 紀子

(56)参考文献 特許第４３３７１９３（ＪＰ，Ｂ２）
特許第３８９８３４３（ＪＰ，Ｂ２）
特表昭６３－５０２９６１（ＪＰ，Ａ）
J.Bacteriol.,1966,Vol.91,No.6,p.2270-2274
Journal of Invertebrate Pathology,1969,Vol.13,p.161-166
Journal of Economic Entomology,1983,Vol.76,No.1,p.69-73
Canadian Journal of Microbiology,1978,Vol.24,No.12,p.1557-1561

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C12N1/00-7/08
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)