

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101569311 B

(45) 授权公告日 2012.04.18

(21) 申请号 200910086959.0

(22) 申请日 2009.06.11

(73) 专利权人 北京市农林科学院

地址 100097 北京市海淀区曙光花园中路9号

(72) 发明人 卢向阳 刘伟成 刘建华 卢彩鸽
刘霆 田兆丰 杨剑芳 张涛涛
董丹

(74) 专利代理机构 北京众合诚成知识产权代理有限公司 11246

代理人 史二元

(51) Int. Cl.

A01N 43/90 (2006.01)

A01N 25/22 (2006.01)

A01N 25/04 (2006.01)

A01P 3/00 (2006.01)

A01G 13/00 (2006.01)

(56) 对比文件

WO 2007039572 A1, 2007.04.12,

CN 101161083 A, 2008.04.16,

CN 101182485 A, 2008.05.21,

审查员 高丽娜

权利要求书 1 页 说明书 10 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种抗光解杀菌悬乳剂及制备和使用方法

(57) 摘要

本发明公开了一种属于生物农药加工与应用领域的抗光解杀菌悬乳剂及制备方法,该悬乳剂的活性成分为纳他霉素,采用利迪链霉菌 A01 抗菌活性产物的浓缩液添加紫外光吸收剂的方法,制成农药悬乳剂。本发明也公开了该悬乳剂的使用方法。该悬乳剂不但能够有效防治植物土传真菌病害,而且也能够有效防治植物地上部组织真菌病害,具有杀菌谱广、杀菌效果好、成本低的特点,具有良好的开发应用前景。

1. 一种抗光解杀菌悬乳剂,其特征在于,所述抗光解杀菌悬乳剂的活性成分为纳他霉素,其组分的质量百分比为:纳他霉素 0.01%~6%;紫外光吸收剂 UV-234 或 UV-5313%~30%;甲苯或二甲苯 3%~30%;乳化剂 3%~15%;抗沉淀剂 0.5%~15%;余量为水。

2. 根据权利要求 1 所述的抗光解杀菌悬乳剂,其特征在于,所述悬乳剂还包括常规使用剂量的如下组分中的一种或多种,抗冻剂、消泡剂和 pH 调整剂。

3. 根据权利要求 1 所述的抗光解杀菌悬乳剂,其特征在于,所述悬乳剂的各组分及其质量百分比为:纳他霉素 0.05%~5%;紫外光吸收剂 5%~20%;甲苯或二甲苯 5%~20%;乳化剂 3%~10%;抗沉淀剂 1%~10%;余量为水。

4. 根据权利要求 1 所述的抗光解杀菌悬乳剂,其特征在于,所述纳他霉素的来源为利迪链霉菌 A01、褐黄孢链霉菌、纳塔尔链霉菌或恰塔努加链霉菌所产生的抗菌浓缩液。

5. 根据权利要求 1 所述的抗光解杀菌悬乳剂,其特征在于,所述乳化剂为农乳 600[#]、农乳 601[#]、农乳 602[#] 和农乳 500[#] 中的一种或多种。

6. 根据权利要求 1 所述的抗光解杀菌悬乳剂,其特征在于,所述抗沉淀剂为羧甲基纤维素钠、膨润土、黄原酸胶和硅酸铝镁中的一种或多种。

7. 根据权利要求 1-6 任一所述的抗光解杀菌悬乳剂,其特征在于,所述抗光解杀菌悬乳剂的防治对象为真菌病害。

8. 权利要求 1 所述的抗光解杀菌悬乳剂的制备方法,其特征在于,按上述比例配制悬乳剂,先称取紫外光吸收剂,将其溶于甲苯或二甲苯中,加热溶解后加入乳化剂,搅拌均匀,得到溶液 1,并将其加入到纳他霉素中,边加边搅拌,直至混合均匀,然后加入抗沉淀剂和水再搅拌均匀,放入研磨机研磨至 95%颗粒细度小于 5 μ m 为止。

9. 权利要求 1 所述的抗光解杀菌悬乳剂的使用方法,其特征在于,在植物发病之前或发病初期,按活性成分纳他霉素的使用浓度 10~100ppm,将悬乳剂兑水配制成稀释液,采用喷雾法或灌根法将其喷洒于植物表面或施于植物根部。

一种抗光解杀菌悬乳剂及制备和使用方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物农药加工与应用领域,具体涉及一种抗光解杀菌悬乳剂及制备和使用方法。

背景技术

[0002] 纳他霉素 (Natamycin), 又称纳塔霉素或那他霉素, 分子结构式见图 1, 它能够专性抑制酵母菌和霉菌, 其作用机制是它作用于菌体细胞膜, 与质膜中含有的麦角甾醇作用, 损伤细胞质膜, 造成细胞内物质的泄漏, 从而起到杀菌作用 (田中信男, 北京科学出版社, 1977)。目前, 已知恰塔努加链霉菌 (*Streptomyces chattanovgensis*)、纳塔尔链霉菌 (*S. natalensis*)、褐黄孢链霉菌 (*S. gilvosporeus*) (芦国营, 饲料工业, 2005, 26(11): 28-31) 代谢所产生的抗菌活性产物是纳他霉素。最近, 北京市农林科学院植环所成功地利用放线菌利迪链霉菌 A01 (*Streptomyces l ydicus*) 获得了抗菌活性产物纳他霉素的浓缩液 (中国专利《一株产纳他霉素的利迪链霉菌及其应用》, 申请号: 200710187435. 1), 并证明其抗菌活性物质是纳他霉素 (见附图 4)。

[0003] 纳他霉素作为抗菌剂有如下优点, 具有低剂量 (10^{-6} 数量级)、高效率, 抗菌作用时间长的特点, 是一种高效、安全的天然生物性抗菌剂, 抑菌作用比山梨酸强 50 倍左右, 且连续数年使用也不易引起靶标真菌形成抗性。FAO/WHO 食品添加剂专家委员会分别于 1968 年、1976 年和 2001 年 3 次审阅了纳他霉素的安全性, 确定其可接受的每日摄入量 (ADI) 为: 0. 3mg/kg 体重 / 天。因为纳他霉素主要用于表面处理, 即使大量食用被处理的产品也不会达到平均日摄入量 (王贵芳, 赵少华, 中国食品添加剂, 2006 :2 :144-151)。因此, 纳他霉素对人畜很安全, 目前已在饮料、饲料、食品及医药上广泛应用, 但在农业生产上仅限于应用于防治棉花和豆类的种菌病害 (曾广然, 吉林农业科学, 1989, (2) :28-36)。

[0004] 纳他霉素未在农业上广泛应用的原因有两个: 一是用于防治植物地上部病害时易受紫外线影响而分解。这是由于纳他霉素分子是一种多烯结构, 这使得纳他霉素对紫外线比较敏感; 二是目前纳他霉素主要的商品剂型是 50% 的晶体, 它是通过微生物的代谢产物经过浓缩、提纯而来的, 成本较高, 不适宜农用。

[0005] 目前, 在国内外农药剂型加工中, 农药悬乳剂 (SE) 多用于 2 种或 2 种以上的除草剂加工, 是将固体农药与原油状农药混合加工成混剂的良好剂型。由于紫外光吸收剂多为不能直接加工成悬浮剂的固体, 但却是易溶于有机溶剂, 而微生物的抗菌活性产物又多为水不溶性固体, 因此将它们加工成悬乳剂是一种良好的选择。但该剂型应用于生物农药的加工尚未见报道。

发明内容

[0006] 本发明克服了上述缺点, 提供了一种抗光解杀菌悬乳剂, 该悬乳剂可直接利用链霉菌抗菌活性产物的浓缩物, 添加紫外光吸收剂, 制成农药悬乳剂, 该药剂既能有效防治植物土传病害, 也能有效防治植物地上部组织病害。

[0007] 本发明还提供了上述抗光解杀菌悬乳剂的制备方法。

[0008] 本发明也提供了上述抗光解杀菌悬乳剂的使用方法。

[0009] 一种抗光解杀菌悬乳剂,活性成分为纳他霉素,各组分及其质量百分比为:纳他霉素 0.01%~6%;紫外光吸收剂 3%~30%;甲苯或二甲苯 3%~30%;乳化剂 3%~15%;抗沉淀剂 0.5%~15%;余量为水。悬乳剂的组分不局限于上述组分,还包括如下组分中的一种或多种,抗冻剂、消泡剂和 pH 调整剂,其使用剂量为本领域常规剂量。其中,抗冻剂,如乙二醇、丙二醇、甘油、尿素等;消泡剂,如聚醚类、有机硅铜类、 $C_{8\sim 10}$ 的脂肪醇、 $C_{10\sim 20}$ 饱和脂肪族羧酸及其酯类、酯-醚型化合物等;pH 调整剂,如醋酸、盐酸、氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、铵盐、三乙醇铵等。

[0010] 所述悬乳剂优选下列组分及其质量百分比:纳他霉素 0.05%~5%;紫外光吸收剂 5%~20%;甲苯或二甲苯 5%~20%;乳化剂 3%~10%;抗沉淀剂 1%~10%;余量为水。

[0011] 所述纳他霉素的来源为利迪链霉菌 A01、褐黄孢链霉菌、纳塔尔链霉菌或恰塔努加链霉菌所产生的抗菌浓缩液。

[0012] 所述抗菌浓缩液是指来自于利迪链霉菌 A01、恰塔努加链霉菌、纳塔尔链霉菌、褐黄孢链霉菌之一的抗菌活性产物,产物经 0.45 μ m 微孔滤膜过滤并浓缩而获得抗菌浓缩液,其中含有活性组分纳他霉素。

[0013] 上述利迪链霉菌 A01 抗菌活性产物的制备方法参照专利《一株产纳他霉素的利迪链霉菌及其应用》,申请号为 200710187435.1。

[0014] 上述褐黄孢链霉菌的抗菌活性产物的制备方法参照专利《Natamycinrecovery》(Raghoenath,Dilipkoemar,Webbers,et al.USP:6150143,2000-11~21);《Fermentation process for producing Natamycin with additional carbon andnitrogen》(Eilsenschink M A,Mils J R,MichaelA.USP:5686273,1997);《纳他霉素的种菌制备和繁殖方法》(M A 艾森申克.CNP:1071460A,1993);《通过控制发酵培养基的 pH 以提高纳他霉素的生产速率》(M A 艾森申克.CNP:1072959A,1993);《连续发酵法生产纳他霉素》(P T 奥尔森.CNP:1070688A,1993)。

[0015] 上述纳塔尔链霉菌的抗菌活性产物的制备方法除了参照褐黄孢链霉菌的抗菌活性产物的制备方法以外,还可参照文献(Enshasy H A, Farid M A. J., Basic Microbiol., 2000, 40(5-6), 333-342);(Enshasy H A, Faird M A. J., Basic Microbiol., 2000, 40(3), 157-166)。

[0016] 上述恰塔努加链霉菌的抗菌活性产物的制备方法除了参照上述方法以外,可参照文献(郑风娥等,食品工业科技,2008(29),8:159-160,172)。

[0017] 所述紫外光吸收剂为 UV-234 和 UV-531,其分子结构分别见附图 2 和 3,UV-234 为 2-(2'-羟基-3',5' 双(a,a-二甲基苄基)苯基)苯并三唑,UV-531 为 2-羟基-4-正辛氧基二苯甲酮。

[0018] 所述乳化剂为农乳 600[#]、农乳 601[#]、农乳 602[#] 和农乳 500[#] 中的一种或多种。

[0019] 所述抗沉淀剂(又称增稠剂或悬浮稳定剂)为羧甲基纤维素钠、膨润土、黄原酸胶和硅酸铝镁中的一种或多种。

[0020] 所述悬乳剂的防治对象为真菌病害,所述病害为番茄灰霉病(Botrytis cinerea)、

辣椒灰霉病 (*Botrytis cinerea*)、茄子灰霉病 (*Botrytis cinerea*)、葡萄灰霉病 (*Botrytis cinerea*)、玉米大斑病 (*Exserohilum turcicum*)、瓜果腐霉病 (*Pythium aphanidermatum*)、茄子早疫病 (*Alternaria solani*)、小麦纹枯病 (*Rhizoctonia cerealis*)、小麦赤霉病 (*Fusarium graminearum*)、稻瘟病 (*Pyriculariaoryzae*)、豌豆根腐病 (*Fusarium solani* f. sp. *pisii*)、番茄叶霉病 (*Cladosporiumfulvum*)、西瓜枯萎病 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*)、黄瓜枯萎病 (*Fusariumoxysporum* f. sp. *cucumerinum*)、百合根腐病 (*Rhizoctonia solani*)、李子褐腐病 (*Monilinia fructicola*)、桃褐腐病 (*Monilinia fructicola*)、桃枯萎病 (*Fusariumoxysporum* f. sp. *persica*)、芹菜斑枯病 (*Septoria apii*)、辣椒炭疽病 (*Colletotrichumcapsici*)、甘蓝枯萎病 (*Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *conglutinans*)、苹果轮斑病 (*Alternaria mali*)、棉花黄萎病 (*Verticillium dahliae*)、棉花枯萎病 (*Fusariumoxysporum* f. sp. *vasinfectum*) 等,但不局限于上述真菌病害。

[0021] 一种抗光解杀菌悬乳剂的制备方法,具体操作步骤如下:按上述比例配制悬乳剂,先称取紫外光吸收剂,将其溶于甲苯或二甲苯中,加热溶解后加入乳化剂,搅拌均匀,得到溶液 1,将其加入到纳他霉素中,边加边搅拌,直至混合均匀,然后加入抗沉淀剂和水再搅拌均匀,放入研磨机研磨至 95%颗粒细度小于 5 μ m 为止。其中,溶液 1 加入到纳他霉素时的温度优选 50 ~ 70 $^{\circ}$ C。

[0022] 一种抗光解杀菌悬乳剂的制备方法,还包括上述方法中加入抗沉淀剂后再分别加入抗冻剂、消泡剂或 pH 调整剂和水搅拌均匀。

[0023] 一种抗光解杀菌悬乳剂的使用方法,具体操作步骤如下:在植物发病之前或发病初期,按活性成分纳他霉素的使用浓度 10 ~ 100ppm,将悬乳剂兑水配制成稀释液,采用喷雾法或灌根法将其喷洒于植物表面或施于植物根部。其中,喷洒时的光照强度优选小于 7543LX,即傍晚或阴天。

[0024] 上述的植物表面是指植物的叶、茎和果实的表面等地上部组织。

[0025] 本发明具有以下优点:

[0026] (1) 与不添加紫外光吸收剂的药剂相比,带有紫外光吸收剂的悬乳剂活性成分的稳定性有大幅度提高,从而使得药剂在弱光下可以有效防治植物地上组织病害。

[0027] (2) 本发明使得微生物抗菌活性产物的浓缩液可以直接加工成农药制剂,而无须经过提纯工序,由此节约了生产成本,为药剂在农业生产上广泛应用奠定了基础。

[0028] (3) 为作物生产,尤其是蔬菜生产,提供了安全的生物农药品种,保障了人民的身体健康。

附图说明

[0029] 图 1 为纳他霉素的化学结构;

[0030] 图 2 为紫外线吸收剂 UV-234 化学结构;

[0031] 图 3 为紫外线吸收剂 UV-531 化学结构;

[0032] 图 4 为利迪链霉菌 A01 活性物质 (A) 与纳他霉素 (B) 的紫外吸收光谱图。

具体实施方式

[0033] 以下是实施例中所涉及的原料、试剂和菌种:

[0034] 1 供试菌株

[0035] 利迪链霉菌 A01 (*Streptomyces lydicus*) (CGMCC No.1653), 以下实施例中简称菌株 A01, 由北京市农林科学院植环所从北京郊区菜园土壤中分离获得, 保藏于该研究所的植物病害生物防治研究室和中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (CGMCC)。将菌株 A01 转接于高氏一号斜面培养基上 28℃ 培养 10 ~ 14 天, 培养好的斜面可在 4℃ 短期存放备用, 同时将其成熟新鲜孢子放于 20% 甘油中 -20℃ 可长期保存备用 (见中国发明专利《一株产纳他霉素的利迪链霉菌及其应用》(申请号:200710187435.1))。

[0036] 植物病原真菌: 棉花黄萎病菌 (*Verticillium dahliae*)、棉花枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*)、番茄灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*)、辣椒灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*)、茄子灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*)、葡萄灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*)、玉米大斑病菌 (*Exserohilum turcicum*)、瓜果腐霉菌 (*Pythiumaphanidermatum*)、茄子早疫病菌 (*Alternaria solani*)、小麦纹枯病菌 (*Rhizoctonia cerealis*)、小麦赤霉病菌 (*Fusarium graminearum*)、稻瘟病菌 (*Pyricularia oryzae*)、豌豆根腐病菌 (*Fusarium solani* f. sp. *pisii*)、番茄叶霉病菌 (*Cladosporium fulvum*)、西瓜枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*)、黄瓜枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*)、百合根腐病菌 (*Rhizoctonia solani*)、李子褐腐病菌 (*Monilinia fructicola*)、桃褐腐病菌 (*Monilinia fructicola*)、桃枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *persica*)、芹菜斑枯病菌 (*Septoria apii*)、辣椒炭疽病菌 (*Colletotrichum capsici*)、甘蓝枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *conglutinans*)、苹果轮斑病菌 (*Alternaria mali*)。

[0037] 酵母菌: 啤酒酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*)。

[0038] 以上植物病原真菌是由中国农业大学植物病理学系和北京市农林科学院植环所提供, 啤酒酵母菌购自中国农业微生物菌种保藏管理中心 (ACCC)。

[0039] 2 供试培养基及溶液

[0040] 菌株 A01 基础发酵培养基: 葡萄糖 20g, 黄豆粉 20g, 淀粉 10g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.5g, 蛋白胨 5g, 玉米浆 2.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25g, K_2HPO_4 0.02g, NaCl 4g, CaCO_3 6g, 自来水 1000ml, pH 7.2, 121℃ 灭菌 30min。

[0041] PDA 培养基: 马铃薯 200g, 洗净切成 1cm³ 小块煮沸约 30min 后用四层纱布过滤, 滤液用蒸馏水补足至 1000ml, 加葡萄糖 20g, 琼脂 15g, pH 自然, 121℃ 灭菌 30min。

[0042] 高氏一号培养基: 可溶性淀粉 20g, NaCl 0.5g, KNO_3 1g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g, K_2HPO_4 0.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, 琼脂 20g, 蒸馏水 1000ml, pH 7.2 ~ 7.4, 121℃ 灭菌 30min。

[0043] 牛肉膏蛋白胨培养基: 牛肉膏 3g, 蛋白胨 10g, NaCl 5g, 琼脂 15g, 蒸馏水 1000ml, pH 7.4 ~ 7.6, 121℃ 灭菌 30min。

[0044] 生理盐水: NaCl 8.5g, 蒸馏水 1000ml, 121℃ 灭菌 30min。

[0045] 3 菌株 A01 浓缩液

[0046] 制备方法参照专利《一株产纳他霉素的利迪链霉菌及其应用》, 申请号为 200710187435.1

[0047] 4 其它试剂和设备

[0048] 紫外线吸收剂 UV-234 和 UV-531, 购自北京中优恒力精细化学有限公司; 乳化剂

系列:农乳 600[#]、农乳 601[#]、农乳 602[#]、农乳 500[#];溶剂:二甲苯、甲苯;抗沉淀剂:羧甲基纤维素钠(CMC)、膨润土和硅酸铝镁;抗冻剂:尿素;消泡剂:泡敌(消泡剂 GPE,聚醚类);pH 调整剂:36%醋酸;1%多抗霉素水剂,购自陕西绿盾生物制品有限责任公司;QZM-1 型锥形磨;显微镜(具校准的接目测微尺);喷雾器:(Matabi 121010Style 1.5);照度计:(型号:TES-1339,泰仕电子工业股份有限公司);番茄品种:盆栽红(北京农林科学院蔬菜所提供)。

[0049] 实施例 1 本发明的抗光解杀菌悬乳剂的制备

[0050] 按表 1~2 的组分和质量配比称取各组分配制本发明悬乳剂,先称取紫外光吸收剂,将其溶于甲苯或二甲苯中,加热溶解后加入乳化剂,搅拌均匀,得到溶液 1,将其加入到菌株 A01 浓缩液中,边加边搅拌,直至混合均匀,然后依次加入抗沉淀剂、抗冻剂、消泡剂、pH 调整剂和水再搅拌均匀,放入研磨机研磨至 95%颗粒细度小于 5 μ m 为止(用显微镜测量)。

[0051] 表 1 抗光解杀菌悬乳剂各组分质量配比(一)

[0052]

组分名称	配比(%)			
	①0.1g/L 纳他霉素悬乳剂	②0.5g/L 纳他霉素悬乳剂	③1g/L 纳他霉素悬乳剂	④1g/L 纳他霉素悬乳剂
菌株 A01 浓缩液(有效含量 1.408g/L)	6.7	33.5	67	67
UV-234	30	3	5	-
UV-531	-	-	-	5
二甲苯或甲苯	30	3	5	5
农乳 601 [#]	10	6.4	2	3
农乳 500 [#]	5	4	1	1
CMC	-	-	2	6
硅酸铝镁或膨润土	15	10	-	-
尿素	2	2	2	2
醋酸	1	2	2	2
泡敌	0.1	0.1	-	-
水	0.2	36	14	9

[0053] 表 2 抗光解杀菌悬乳剂各组分质量配比(二)

[0054]

组分名称	配比(%)			
	⑤25g/L 纳他霉 素悬乳剂	⑥37.5 g/L 纳他 霉素悬乳剂	⑦50g/L 纳他霉 素悬乳剂	⑧60g/L 纳他霉 素悬乳剂
菌株 A01 浓缩液(有 效含量 70.4g/L)	33.5	50.3	67	85
UV-234	20	10	-	5
UV-531	-	-	10	-
二甲苯或甲苯	20	10	12	6
农乳 602 [#]	10	3	6	2.5
农乳 500 [#]	5	2	4	1
硅酸铝镁或膨润土	10	4.7	1	0.5
水	1.5	20	-	-

[0055] - :表示悬乳剂中不含有该组分

[0056] 实施例 2 菌株 A01 活性代谢产物的抑菌谱测定

[0057] (1) 活菌体平板抑菌作用

[0058] 采用平板对峙培养法(鲁素芸,北京农业大学出版,1993)。菌株 A01 在高氏一号培养基上 28℃恒温培养 14 天,植物病原真菌在 PDA 平板上 28℃恒温培养 4 天,自菌落边缘用直径 0.7cm 无菌不锈钢打孔器打制带菌琼脂片;用无菌接种针挑取病原菌菌片,菌丝面朝下接种于 PDA 平板上,菌片距离培养皿边缘 2cm,同时以同样方法挑取菌株 A01 的带菌琼脂片,置于距病原真菌菌片 4.00cm 处,以未接菌株 A01 仅接病原菌的平板为对照,每个处理三次重复,25℃恒温培养 4 天,测量病原菌边缘与菌株 A01 菌落边缘之间的抑菌带宽度。

[0059] (2) 发酵液中活性物质的抑菌作用

[0060] 采用琼脂平板扩散法。供试植物病原真菌在 PDA 斜面上 28℃恒温培养 7 天后,刮取其分生孢子和菌丝体置盛有无菌玻璃珠(直径 2.5mm)和无菌水的三角瓶中用力充分振荡,配成 10^6 CFU/ml 的菌悬液;取 200 μ l 菌悬液均匀涂布在 PDA 平板(直径 9cm)上,用直径 0.7cm 的无菌不锈钢打孔器等距离打制三个孔,然后向每孔内注入经 0.45 μ m 微孔滤膜过滤灭菌的菌株 A01 的发酵滤液 100 μ l,25℃恒温培养 48h,十字交叉法测量抑菌圈的直径;供试植物病原细菌和啤酒酵母菌分别在牛肉膏蛋白胨培养基和 PDA 上培养 2 天后,用无菌生理盐水配成 10^4 CFU/ml 浓度的菌悬液,取 5ml 菌悬液与 100ml 冷却至 45℃左右的 PDA 培养基混匀后倒制平板,每个培养皿(直径 9cm)倒入 30ml 混合液,待凝固后,用直径 0.7cm 无菌不锈钢打孔器等距离打制三个孔,向每孔内注入经 0.45 μ m 微孔滤膜过滤除菌的 A01 发酵滤液 100 μ l,28℃恒温培养 48h,十字交叉法测量抑菌圈的直径。每个处理三次重复。

[0061] 从表 3 中可以看出,菌株 A01 对供试的 10 多种植物病原真菌和啤酒酵母菌(*S. cerevisiae*)具有很强的抑菌活性,其中菌株 A01 对供试的植物病原真菌的抑菌带宽均在 1.50cm 以上,最高的是对辣椒炭疽病菌(*C. capsici*),抑菌带宽达 2.57cm,其发酵液除了对啤酒酵母菌的抑菌圈直径在 3.00cm 以下外,对其他病原真菌的抑菌圈直径均达到了 3.00cm 以上,最强的抑菌效果是对小麦纹枯病菌(*R. cerealis*)和李子褐腐病菌(*M. fructicola*),直径达 4.77cm。由此说明菌株 A01 产生的活性物质具有广谱的抗真菌活

性。

[0062] 表 3 菌株 A01 抑菌测定结果

[0063]

编号	供试菌株	抑菌带宽 (cm)	抑菌圈直径 (cm)
1	棉花黄萎病菌 <i>V. dahliae</i>	2.07	3.77
2	棉花枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	1.70	4.30
3	黄瓜枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	1.60	3.50
4	西瓜枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	1.80	4.07
5	甘蓝枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i> Schl. f. sp. <i>conglutinans</i>	2.07	4.47
6	桃枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>persica</i>	1.90	4.27
7	葡萄灰霉病菌 <i>B. cinerea</i> (on grape)	1.67	4.30
8	辣椒灰霉病菌 <i>B. cinerea</i> (on pepper)	1.77	4.00
9	茄子灰霉病菌 <i>B. cinerea</i> (on eggplant)	1.73	4.50
10	番茄灰霉病菌 <i>B. cinerea</i> (on tomato)	2.20	4.03
11	番茄叶霉病菌 <i>C. fulvum</i>	1.87	4.40
12	豌豆根腐病菌 <i>F. solani</i> f. sp. <i>pisi</i>	1.90	3.53
13	稻瘟病菌 <i>P. oryzae</i>	1.97	4.00
14	小麦赤霉病菌 <i>F. graminearum</i>	1.67	4.00
15	小麦纹枯病菌 <i>R. cerealis</i>	1.90	4.77
16	玉米大斑病菌 <i>E. turcicum</i>	2.00	4.63
17	茄子早疫病菌 <i>A. solani</i>	1.80	4.50
18	瓜果腐霉菌 <i>P. aphanidermatum</i>	1.90	4.40
20	桃褐腐病菌 <i>M. fructicola</i>	1.53	3.37
21	李子褐腐病菌 <i>M. fructicola</i>	2.07	4.77
22	百合根腐病菌 <i>R. solani</i>	1.93	3.23
23	芹菜斑枯病菌 <i>S. apii</i>	1.67	4.10
24	苹果轮斑病菌 <i>A. mali</i>	1.83	4.07
25	辣椒炭疽病菌 <i>C. capsici</i>	2.57	4.10
26	啤酒酵母菌 <i>S. cerevisiae</i>	—	2.97

[0064] 注：“—”表示未测该项内容；表中数据为 3 次重复数值的平均值。

[0065] 实施例 3 实施例 1 中悬乳剂③和悬乳剂④防治大棚番茄灰霉病的防治效果

[0066] 将实施例 1 中悬乳剂③设为代号 NUV234SE, 悬乳剂④设为代号 NUV531SE。在大棚内将番茄苗育成 8 ~ 10cm 高的壮苗, 然后移入高 15cm, 直径 13cm 的塑料花盆内 (每盆 1 株), 培养至番茄初花期施药。将各药剂配制成有效含量为 20ppm 的药液, 其试验处理共 5 种, 见表 5 所示。施药采用喷雾器, 每株苗喷雾容量为 33. 3mL, 重复 3 次, 随机区组排列。喷药后置于大棚内 1. 5h, 使各处理药剂接受阳光照射, 起始时间为下午 1 时, 结束时间为下午

2:30。起始时测定 1 次光照强度,结束时测定 1 次光照强度,重复 5 次。起始时平均光照强度为 23892LX,结束时平均光照强度为 13586LX,先后两次的平均值为 18740LX。阳光照射后再接种,接种也采用喷雾器,菌种为番茄灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*),悬浮液的孢子浓度为 $10^7 \sim 10^8$ CFU,每盆番茄苗喷雾容量为 20mL。接种后立即置于温度为 20℃,相对湿度为 70 ~ 100%的培养箱内保湿培养 48h,然后置于塑料大棚中培养。施药后 1 ~ 14 天每隔 1 天观察药害情况;施药后 7 天和 14 天考察病情指数、发病率和防治效果,其计算方法如下:

[0067] 发病率 (%) = 发病叶数 / 调查总叶数 × 100

[0068] 病情指数 (%) = $\Sigma [(病级叶数 \times 代表数值)] / (调查的总叶数 \times 发病最重级的代表数值) \times 100$

[0069] 防治效果 (%) = (对照病情指数 - 处理病情指数) / 对照病情指数 × 100

[0070] 施药后 1 ~ 14 天观察各处理对番茄无任何药害症状。从表 4 可见,药后 14 天考察,添加紫外线吸收剂的 NUV234SE 和 NUV531SE 处理的防治效果为 49.6% ~ 50.9%,而菌株 A01 浓缩液和多抗霉素的防效分别为 9.8% 和 4.6%,NUV234SE 和 NUV531SE 防治效果明显优于 A01 浓缩液和多抗霉素,并存在显著差异。它们之间的效果存在显著差异。

[0071] 表 4 不同药剂的 20ppm 纳他霉素药液防治大棚番茄灰霉病的效果

[0072]

药剂来源	病情指数		发病率%		防治效果%	
	7d	14d	7d	14d	7d	14d
A01 浓缩液	10.2	10.5	15.0	13.0	11.5 b	9.8 b
NUV234SE	6.1	7.1	10.3	9.4	47.0 a	50.9 a
NUV531SE	5.9	5.3	8.1	6.3	44.1 a	49.6 a
多抗霉素水剂	9.0	11.5	14.9	14.4	15.6 b	4.6 b

[0073]

CK (不施药)	10.4	10.5	15.1	15.2	—	—
----------	------	------	------	------	---	---

[0074] 注:表中数据为 3 次重复的平均值;平均数后的不同字母表示经 Duncan's 新复极差测验在 $p = 0.05$ 水平上差异显著。

[0075] 实施例 4 不同施药时间 NUV234SE 和 NUV531SE 防治大棚番茄灰霉病的效果

[0076] 将各药剂配制成有效含量为 20ppm 的药液,其试验处理共 8 种,见表 6 所示。第一批处理施药时间为下午 1 时 (pm. 1),放置于大棚内受光照时间为 3h,起始时平均光照强度为 25240LX,结束时平均光照强度为 7543LX,先后两次的平均值为 16392LX。第二批处理施药时间为下午 4 时 (pm. 4),起始时平均光照强度为 7543LX。其它试验方法同实施例 3。

[0077] 从表 5 可见,施药后 7 天和 14 天考察,下午 1 时喷施 A01 浓缩液 (不添加紫外吸收剂) 的防效分别为 26.3% 和 30.4%,下午 4 时喷药的防效分别为 62.5% 和 67.4%,两者之间存在显著差异,下午 4 时喷药的效果优于下午 1 时喷药的效果;在下午 1 时喷施 NUV234SE 的防效分别为 84.1% 和 83.2%,在下午 4 时喷药的防效分别为 93.4% 和 95.3%,两者之间也存在显著差异,下午 4 时喷药的效果优于下午 1 时喷药的效果;添加 UV-531 的效果类似于 UV-234。结果表明,防效好差的顺序为 NUV234SE = NUV531SE > 多抗霉素 > A01 浓缩液;添加紫外光吸收剂的 A01 浓缩液防治效果优于单一使用 A01 浓缩液 (不添加紫外光吸收

剂);NUV234SE 和 NUV531SE 在阳光较弱的条件下(即施药后平均光照强度能够保持在小于 7543LX 数个小时,如傍晚或阴天)的使用效果优于在阳光较强的条件下(中午)的使用效果。

[0078] 表 5 施药时间对 NUV234SE 和 NUV531SE 防治大棚番茄灰霉病的效果

[0079]

处理	施药时间	发病率 (%)		病情指数		防治效果 (%)	
		7d	14d	7d	14d	7d	14d
A01 浓缩液	pm.1	6.6	5.6	4.3	4.6	26.3 d	30.4 d
	pm.4	3.3	3.8	1.8	2.5	62.5 c	67.4 c
NUV234SE	pm.1	15.7	11.3	11.7	9.5	84.1 b	83.2 b

[0080]

NUV531SE	pm.4	2.5	2.0	1.0	0.8	93.4 a	95.3 a
	pm.1	17.7	13.3	12.7	9.5	83.6 b	82.1 b
	pm.4	2.7	2.1	1.3	1.0	92.2 a	94.1 a
多抗霉素水剂	pm.1	8.6	5.9	4.9	4.6	57.2 c	61.1 c
CK (不施药)	—	16.8	16.3	12.4	14.1	—	—

[0081] 注:表中数据为 3 次重复的平均值;平均数后的不同字母表示经 Duncan' s 新复极差测验在 $p = 0.05$ 水平上差异显著。

[0082] 实施例 5NUV234SE 和 NUV531SE 防治西瓜枯萎病试验

[0083] 在北京大兴县选往年西瓜枯萎病严重的地块一块,西瓜密度为 500 株/亩,品种京欣一号,土壤质地为沙壤土。供试药剂分别为 NUV234SE、NUV531SE、A01 浓缩液和 1%多抗霉素水剂,将各药剂配制成 30ppm 的药液,并设一不施药的处理 CK,共 5 种处理。小区面积为 30 平方米,重复 3 次。采用药剂灌根的方法防治枯萎病,灌根在西瓜移栽后 7 天后开始,每隔 7 天灌根 1 次,共灌根 3 次,每株瓜苗灌液量为 200 克。稀释的药剂直接浇灌于西瓜根部。灌根施药后 80 天考察各个小区所有西瓜的发病株率,然后计算出防治效果。

[0084] 从表 6 可见,NUV234SE 和 NUV531SE 防治西瓜枯萎病的效果分别为 80.9%和 80.2%,两者之间差异不显著;而 A01 浓缩液和多抗霉素防治西瓜枯萎病的效果分别为 60.5%和 65.6%,两者之间也差异不显著;NUV234SE 和 NUV531SE 的防效明显优于对照药剂 A01 浓缩液和多抗霉素,并且存在差异显著。这一结果表明,添加紫外光吸收剂的 NUV234SE 和 NUV531SE 明显提高了 A01 浓缩液(不添加紫外光吸收剂)防治西瓜枯萎病的效果。

[0085] 表 6NUV234SE 和 NUV531SE 防治西瓜枯萎病试验结果

[0086]

处理	NUV234SE	NUV531SE	A01 浓缩液	多抗霉素水剂
防治效果%	80.9a	80.2a	60.5b	65.6b

[0087] 注:表中数据为 3 次重复的平均值;平均数后的不同字母表示经 Duncan' s 新复

极差测验在 $p = 0.05$ 水平上差异显著。

[0088] 参考文献

[0089] 1、田中信男,《抗菌素的作用机制》翻译组译,抗菌素的作用机制,北京科学出版社,1977

[0090] 2、芦国营,新型防腐剂纳他霉素的研究进展,饲料工业,2005,26(11):28-31

[0091] 3、王贵芳,赵少华. 纳他霉素的特性及其在食品中的应用,中国食品添加剂,2006:2:144-151

[0092] 4、曾广然,农用抗生素的应用和发展,吉林农业科学,1989,(2):28-36

[0093] 5、Enshasy H A, Farid M A. J. Influence of inoculum type and cultivation conditions on Natamycin production by *Streptomyces natalensis*, Basic Microbiol., 2000, 40(5-6), 333-342

[0094] 6、Enshasy H A, Faird M A. J., Optimization of the cultivation medium for natamycin production by *Streptomyces natalensis*, Basic Microbiol., 2000, 40(3), 157-166

[0095] 7、郑凤娥等,纳他霉素产生菌的诱变育种研究,食品工业科技,2008(29),8:159-160,172

[0096] 8、鲁素芸,植物病害生物防治学 [M],北京农业大学出版,1993

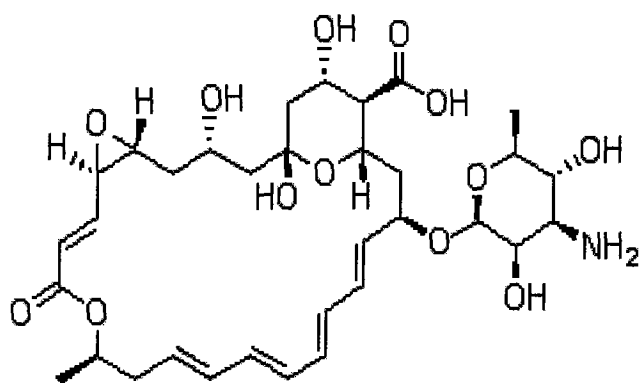


图 1

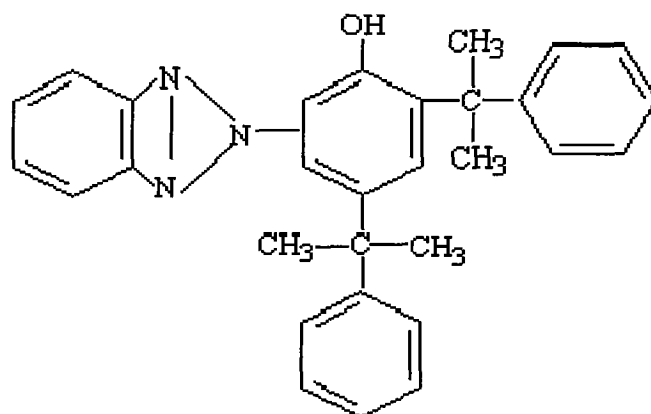


图 2

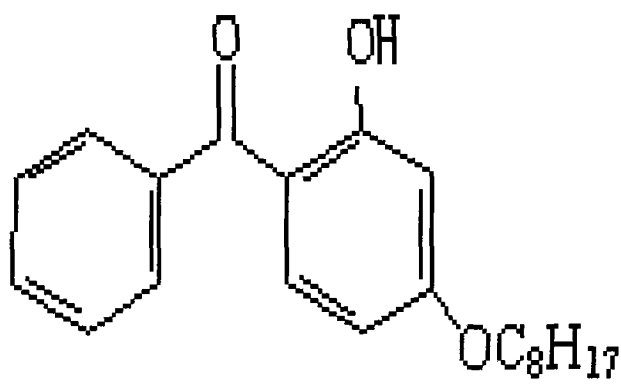


图 3

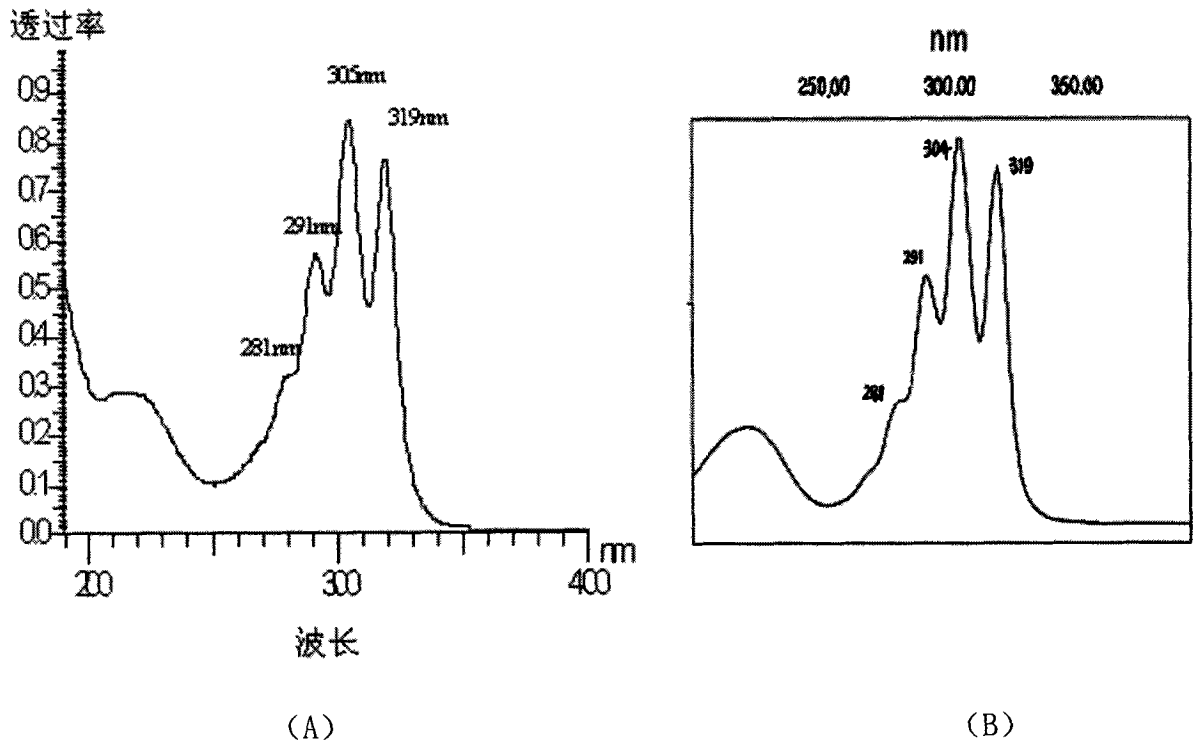


图 4