

说明书摘要

【总体说明及优点】

本发明涉及一种吩嗪-1-甲酰肼生物杀菌剂的制备方法，将绿针假单胞菌（*Pseudomonas chlororaphis*）经过微生物培养、发酵、提取而获得的一种对多种真菌性植物病害具有良好的抑制效果的新型生物农药。与现有技术相比，本发明制备得到的杀菌剂对黄瓜霜霉病和白粉病、水稻纹枯病、西瓜枯萎病、辣椒疫病、油菜菌黑、番茄灰霉病等多种瓜果蔬菜和粮食作物病原真菌均有较强的抑制作用，且制备方法简单。

权 利 要 求 书

【制备方法的总体描述】

1. 一种吩嗪-1-甲酰肼生物杀菌剂的制备方法，其特征在于，该方法包括以下步骤：

(1) 将绿针假单胞菌 (*Pseudomonas chlororaphis*) 接种到经过高温灭菌的液体培养基中并置于全自动控温摇床上，控制转速为 180-240rpm，在 25-30℃ 下培养 1-3 天得到含有绿针假单胞菌的液体种子；

(2) 将液体种子液移入到经过高温灭菌的装在发酵罐中的培养基中，控制发酵罐转速为 180-240rpm，在 25-30℃ 下培养 2-5 天，即得到含有吩嗪-1-甲酰肼的发酵液；

(3) 将含有吩嗪-1-甲酰肼的发酵液在搅拌下用酸调节 pH 至 2-4，然后进行过滤，得到的滤液用溶剂进行萃取、分离、浓缩、结晶及干燥，即制备得到吩嗪-1-甲酰肼生物杀菌剂。

【生物保藏信息，以及对制备方法各步骤及工艺参数的进一步说明】

2. 根据权利要求 1 所述的一种吩嗪-1-甲酰肼生物杀菌剂的制备方法，其特征在于，所述的绿针假单胞菌 (*Pseudomonas chlororaphis*)，其微生物保藏登记号为：CGMCC NO.6773。

3. 根据权利要求 1 所述的一种吩嗪-1-甲酰肼生物杀菌剂的制备方法，其特征在于，步骤 (1) 中所述的液体培养基的配方采用以下组分及重量百分比含量：玉米粉 1-5%、豆饼粉 2-8%、蛋白胨 1-3%、 K_2HPO_4 0.01-0.03%、 KH_2PO_4 0.01-0.03%、无水硫酸镁 0.03-0.08%、甘油 0.1-0.3%，余量为水，液体培养基的 pH 为 6.5-7.5。

4. 根据权利要求 1 所述的一种吩嗪-1-甲酰肼生物杀菌剂的制备方法，其特征在于，步骤 (1) 中所述的液体培养基的配方优选以下组分及重量百分比含量：玉米粉 2-3%、豆饼粉 4-6%、蛋白胨 1-2%、 K_2HPO_4 0.02%、 KH_2PO_4 0.02%、无水硫酸镁 0.04-0.06%、甘油 0.2%，余量为水，液体培养基的 pH 为 7.0。

5. 根据权利要求 1 所述的一种吩嗪-1-甲酰肼生物杀菌剂的制备方法，其特征在于，步骤 (2) 中所述的培养基的配方采用以下组分及重量百分比含量：玉米粉 1-5%、豆饼粉 2-8%、蛋白胨 1-3%、 K_2HPO_4 0.01-0.03%、 KH_2PO_4

0.01-0.03%、无水硫酸镁 0.03-0.08%、甘油 0.1-0.3%，余量为水，培养基的 pH 为 6.5-7.5。

6. 根据权利要求 1 所述的一种吩嗪-1-甲酰肼生物杀菌剂的制备方法，其特征在于，步骤（2）中所述的培养基的配方优选以下组分及重量百分比含量：玉米粉 2-4%、豆饼粉 3-6%、蛋白胨 2%、 K_2HPO_4 0.02%、 KH_2PO_4 0.02%、无水硫酸镁 0.04-0.06%、甘油 0.2%，余量为水，培养基的 pH 为 7.0。

7. 根据权利要求 1 所述的一种吩嗪-1-甲酰肼生物杀菌剂的制备方法，其特征在于，步骤（3）中所述的酸选用盐酸、硫酸或草酸。

8. 根据权利要求 1 所述的一种吩嗪-1-甲酰肼生物杀菌剂的制备方法，其特征在于，步骤（3）中所述的酸优选硫酸。

9. 根据权利要求 1 所述的一种吩嗪-1-甲酰肼生物杀菌剂的制备方法，其特征在于，步骤（3）采用膜过滤、板框过滤或离心机过滤处理含有吩嗪-1-甲酰肼的发酵液。

10. 根据权利要求 1 所述的一种吩嗪-1-甲酰肼生物杀菌剂的制备方法，其特征在于，步骤（3）中所述的溶剂为乙酸乙酯、氯仿或乙酸丁酯。

说明书

一种吩嗪-1-甲酰肼生物杀菌剂的制备方法

技术领域

本发明涉及一种生物杀菌剂的制备方法，尤其是涉及一种吩嗪-1-甲酰肼生物杀菌剂的制备方法。

背景技术

【要求介绍与本主题相关现有技术的发展情况，客观地指出其存在的缺点。】

植物根际中存在着一些有益的细菌，它们可以通过直接或间接的方式促进植物生长并对由病原菌引起的植物病害起到防治作用，这些能够促进植物生长、防治病害并增加作物产量的微生物统称为植物根际促生菌（plant growth promoting rhizobacteria, PGPR）。此类根际微生物种类丰富多样，选择适当的根际促生细菌对植物进行处理（如浸种或喷雾），可以改善根际微生态环境、促进植物生长、抑制或减轻植物病害、减少化肥和农药投入、减轻环境污染等作用。本发明提供的细菌是从植物根部分离获得，属于根际促生细菌。

发明内容

【详细说明本发明技术方案：

- （1）制备方法的总体描述；**
- （2）生物保藏信息，以及对制备方法各步骤及工艺参数的进一步说明；**
- （3）结合方法工艺说明改进之处及其相应带来的有益效果】**

本发明的目的就是为了克服上述现有技术存在的缺陷而提供将绿针假单胞菌经过微生物培养、发酵而获得新型生物杀菌剂吩嗪-1-甲酰肼的制备方法。

本发明的目的可以通过以下技术方案来实现：

（1）制备方法的总体描述；

一种吩嗪-1-甲酰肼生物杀菌剂的制备方法，包括以下步骤：

- （1）将绿针假单胞菌接种到经过高温灭菌的液体培养基中并置于全自动**

控温摇床上，控制转速为 180-240rpm，在 25-30℃下培养 1-3 天得到含有绿针假单胞菌的液体种子；

(2) 将液体种子液移入到经过高温灭菌的装在发酵罐中的培养基中，控制发酵罐转速为 180-240rpm，在 25-30℃下培养 2-5 天，即得到含有吩嗪-1-甲酰肼的发酵液；

(3) 将含有吩嗪-1-甲酰肼的发酵液在搅拌下用酸调节 pH 至 2-4，然后进行过滤，得到的滤液用溶剂进行萃取、分离、浓缩、结晶及干燥，即制备得到吩嗪-1-甲酰肼生物杀菌剂。

(2) 生物保藏信息，以及对制备方法各步骤及工艺参数的进一步说明

所述的绿针假单胞菌 (*Pseudomonas chlororaphis*) 是上海农乐生物制品股份有限公司通过筛选获得的一种重要的植物根际促生细菌，其保藏编号为 CGMCC NO.6773；保藏时间：2012 年 11 月 2 日；保藏单位：保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 China General Microbiological Culture Collection Center (CGMCC)；保藏地址：北京市朝阳区北辰西路 1 号院，中国科学院微生物研究所。

步骤 (1) 中所述的液体培养基的配方采用以下组分及重量百分比含量：玉米粉 1-5%、豆饼粉 2-8%、蛋白胨 1-3%、 K_2HPO_4 0.01-0.03%、 KH_2PO_4 0.01-0.03%、无水硫酸镁 0.03-0.08%、甘油 0.1-0.3%，余量为水，液体培养基的 pH 为 6.5-7.5。

步骤 (2) 中所述的培养基的配方采用以下组分及重量百分比含量：玉米粉 1-5%、豆饼粉 2-8%、蛋白胨 1-3%、 K_2HPO_4 0.01-0.03%、 KH_2PO_4 0.01-0.03%、无水硫酸镁 0.03-0.08%、甘油 0.1-0.3%，余量为水，培养基的 pH 为 6.5-7.5。

步骤 (3) 中所述的酸选用盐酸、硫酸或草酸。

步骤 (3) 采用膜过滤、板框过滤或离心机过滤处理含有吩嗪-1-甲酰肼的发酵液。

步骤 (3) 中所述的溶剂为乙酸乙酯、氯仿或乙酸丁酯。

(3) 结合方法工艺说明改进之处及其相应带来的有益效果 (即优点，有益效果通常由产率、效率的提高，能耗、原材料的节省，以及操作、使用的简便等方面反映出来，在后面的具体实施案例中可以用具体数据举例说明。)

与现有技术相比，本发明采用从植物根围分离到的绿针假单胞菌大部分都具有防病增产作用，可用于植物病害的生物防治。该类菌株对黄瓜霜霉病和白粉病菌、水稻纹枯病菌、西瓜枯萎病菌、辣椒疫病菌、油菜菌黑病菌、番茄灰霉病菌等多种瓜果蔬菜和粮食作物病原真菌均有较强的抑制作用，并且能够在多种作物根际进行定殖，显示了在生物防治中应用的潜力。

绿针假单胞菌对黄瓜白粉病、辣椒疫病、甜瓜蔓枯病等农作物真菌病原菌有很强的抑制作用。绿针假单胞菌的作用机理一是产生活性物质或改善矿质营养直接促进植物生长；二是菌体产生代谢物质或通过竞争作用抑制或阻碍根围病原微生物的发展，间接促进植物的生长。其生防作用机理涉及有效的根部定殖、抗生作用、根际营养竞争(特别是对 Fe 的竞争)、诱导植物抗性和分泌降解微生物的酶等。

这种制备方法所使用的生产装置与化工装置相比，具有较大的安全优势。主要生产工艺参数温度、压力处于常态，可控，保险系数高的状态。所用原料以农产品、农产品加工品及生物制品为主，安全性高，无易燃、易爆、高毒等原料及产品风险。最终获得的产品属于低毒，对环境无不良影响，对储存环境要求低，在运输过程中安全。并且，加工成制剂产品后，具有更低的毒性和对环境更友好的特征，使产品从生产到使用整个过程中的安全得到可靠的保证。

具体实施方式

下面结合具体实施例对本发明进行详细说明。

【对照技术方案做详细说明，实施例中将技术方案中的数值范围改成具体的数值点，并且注意需要支持到数值范围两端的端值，并且结合实验数据进一步说明有益效果】

绿针假单胞菌 (*Pseudomonas chlororaphis*) 是上海农乐生物制品股份有限公司通过筛选获得的一种重要的植物根际促生细菌，其保藏编号为 CGMCC NO.6773；保藏时间：2012 年 11 月 2 日；保藏单位：保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 China General Microbiological Culture Collection Center (CGMCC)；保藏地址：北京市朝阳区北辰西路 1 号院，中国科学院微生物研究所，本发明将绿针假单胞菌 (*Pseudomonas chlororaphis*)

经过微生物培养、发酵、提取而获得的一种对多种真菌性植物病害具有良好的抑制效果的新型生物农药。

实施例 1

吩嗪-1-甲酰肼生物杀菌剂的制备方法，包括以下步骤：

1、将生长良好的绿针假单胞菌 nlsy001 菌种接种到装有经过高温灭菌的液体培养基中，置于全自动控温摇床上，转速调节为 180rpm，在 27℃ 下培养 24 小时，得到含有绿针假单胞菌 nlsy001 液体种子。所述液体培养基配方为：玉米粉 1%、豆饼粉 3.5%、蛋白胨 2%、 K_2HPO_4 0.01%、 KH_2PO_4 0.01%、无水硫酸镁 0.04%、甘油 0.1%，PH7.0，余量为水。

2、将上述制好的 nlsy003 液体种子液移入到经过高温灭菌的装在发酵罐中的培养基中，发酵罐转速调节为 180rpm，在 27℃ 下培养 2 天，即得到含有 1.2 克/升吩嗪-1-甲酰肼的发酵液。所述液体培养基配方为：玉米粉 1%、豆饼粉 3.5%、蛋白胨 2%、 K_2HPO_4 0.01%、 KH_2PO_4 0.01%、无水硫酸镁 0.04%、甘油 0.1%，PH7.0，余量为水。

3、将上述制好的含有吩嗪-1-甲酰肼的发酵液在搅拌下用酸（盐酸、硫酸、草酸）调节 PH2.5，然后进行过滤（膜过滤、板框过滤、离心机过滤），将滤液再用溶剂（乙酸乙酯、氯仿、乙酸丁酯）进行萃取、分离、浓缩、结晶及干燥，即得到吩嗪-1-甲酰肼产品。

实施例 2

吩嗪-1-甲酰肼生物杀菌剂的制备方法，包括以下步骤：

1、将生长良好的绿针假单胞菌 nlsy001 菌种接种到装有经过高温灭菌的液体培养基中，置于全自动控温摇床上，转速调节为 200rpm，在 28℃ 下培养 36 小时，得到含有绿针假单胞菌 nlsy001 液体种子。所述液体培养基配方为：玉米粉 2%、豆饼粉 4%、蛋白胨 2.5%、 K_2HPO_4 0.015%、 KH_2PO_4 0.015%、无水硫酸镁 0.04%、甘油 0.1%，PH7.2，余量为水。

2、将上述制好的 nlsy003 液体种子液移入到经过高温灭菌的装在发酵罐中的培养基中，发酵罐转速调节为 200rpm，在 28℃ 下培养 60 小时，即得到含有 3.0 克/升吩嗪-1-甲酰肼的发酵液。所述液体培养基配方为：玉米粉 2%、豆饼粉 4%、蛋白胨 2.5%、 K_2HPO_4 0.015%、 KH_2PO_4 0.015%、无水硫酸镁 0.04%、

甘油 0.1%，PH7.2，余量为水。

3、将上述制好的含有吩嗪-1-甲酰肼的发酵液在搅拌下用酸（盐酸、硫酸、草酸）调节 PH3.0，然后进行过滤（膜过滤、板框过滤、离心机过滤），将滤液再用溶剂（乙酸乙酯、氯仿、乙酸丁酯）进行萃取、分离、浓缩、结晶及干燥，即得到吩嗪-1-甲酰肼产品。

实施例 3

吩嗪-1-甲酰肼生物杀菌剂的制备方法，包括以下步骤：

1、将生长良好的绿针假单胞菌 nlsy001 菌种接种到装有经过高温灭菌的液体培养基中，置于全自动控温摇床上，转速调节为 220rpm，在 30℃下培养 48 小时，得到含有绿针假单胞菌 nlsy001 液体种子。所述液体培养基配方为：玉米粉 4.5%、豆饼粉 4%、蛋白胨 3%、K₂HPO₄ 0.025%、KH₂PO₄ 0.025%、无水硫酸镁 0.05%、甘油 0.3%，PH7.5，余量为水。

2、将上述制好的 nlsy001 液体种子液移入到经过高温灭菌的装在发酵罐中的培养基中，发酵罐转速调节为 220rpm，在 30℃下培养 72 小时，即得到含有 2.2 克/升吩嗪-1-甲酰肼的发酵液。所述液体培养基配方为：玉米粉 4.5%、豆饼粉 4%、蛋白胨 3%、K₂HPO₄ 0.025%、KH₂PO₄ 0.025%、无水硫酸镁 0.05%、甘油 0.3%，PH7.5，余量为水。

3、将上述制好的含有吩嗪-1-甲酰肼的发酵液在搅拌下用酸（盐酸、硫酸、草酸）调节 PH3.5，然后进行过滤（膜过滤、板框过滤、离心机过滤），将滤液再用溶剂（乙酸乙酯、氯仿、乙酸丁酯）进行萃取、分离、浓缩、结晶及干燥，即得到吩嗪-1-甲酰肼产品。

实施例 4

吩嗪-1-甲酰肼对植物病原菌的抑菌作用：将吩嗪-1-甲酰肼制成 1% 的悬浮剂，分别测试对黄瓜霜霉病（S）和白粉病菌（H）、水稻纹枯病菌（W）、西瓜枯萎病菌（G）、辣椒疫病菌（Q）、油菜菌黑病菌（J）、番茄灰霉病菌（F）的抑菌作用，结果如表 1 所示：

表 1

病原菌	S	H	W	G	Q	J	F
EC ₅₀ (mg/L)	0.56	0.85	0.28	1.88	1.20	1.17	1.52

EC₅₀ 为半致死浓度，浓度越低，表示抑菌作用越强。

试验表明：吩嗪-1-甲酰肼是一种广谱生物杀菌剂，对多种植物真菌病害具有显著的抑菌效果。

实施例 5

吩嗪-1-甲酰肼对黄瓜白粉病的药效试验：将吩嗪-1-甲酰肼制成 1% 的悬浮剂进行药效试验，将 1% 吩嗪-1-甲酰肼悬浮剂稀释 500 倍、1000 倍和 1500 倍，采用常规的叶面喷雾法进行防治试验。对黄瓜白粉病的试验结果如下表所示，试验中，吩嗪-1-甲酰肼生物杀菌剂对黄瓜的叶片、花及果实无任何药害，也没有观察到对其它生物的影响，因此，吩嗪-1-甲酰肼生物杀菌剂可以作为无公害的瓜类白粉病防治药物加以使用。

表 2 吩嗪-1-甲酰肼生物杀菌剂对黄瓜白粉病的药效试验

试验处理	用药量（稀释倍数）	防治效果（%）
1% 吩嗪-1-甲酰肼悬浮剂	500	85.70
	1000	78.26
	1500	71.59

实施例 6

吩嗪-1-甲酰肼对黄瓜霜霉病的药效试验：将吩嗪-1-甲酰肼制成 1% 的悬浮剂进行药效试验，将 1% 吩嗪-1-甲酰肼悬浮剂稀释 500 倍、1000 倍和 1500 倍，采用常规的叶面喷雾法进行防治试验。对黄瓜霜霉病的试验结果如下表所示，试验中，吩嗪-1-甲酰肼生物杀菌剂对黄瓜的叶片、花及果实无任何药害，也没有观察到对其它生物的影响，因此，吩嗪-1-甲酰肼生物杀菌剂可以作为无公害的瓜类霜霉病防治药物加以使用。

表 3 吩嗪-1-甲酰肼生物杀菌剂对黄瓜霜霉病的药效试验

试验处理	用药量（稀释倍数）	防治效果（%）
1% 吩嗪-1-甲酰肼悬浮剂	500	84.95
	1000	75.46
	1500	72.13

实施例 7

吩嗪-1-甲酰肼对水稻纹枯病的药效试验：将吩嗪-1-甲酰肼制成 1% 的悬浮

剂进行药效试验，将 1% 吩嗪-1-甲酰肼悬浮剂稀释 500 倍、1000 倍和 1500 倍，采用常规的叶面喷雾，在水稻纹枯病的发病初期施药。施药时把药液喷到水稻茎秆上，喷雾重点部位是水稻中下部。试验结果如下表明，吩嗪-1-甲酰肼生物杀菌剂对水稻无任何不良影响，无药害产生。试验药剂 1% 吩嗪-1-甲酰肼悬浮剂对水稻纹枯病有较好的防效，在发病初期连施两次药基本能控制水稻纹枯病的为害。

表 4 吩嗪-1-甲酰肼生物杀菌剂对水稻纹枯病的药效试验（药后 14 天）

试验处理	用药量（稀释倍数）	平均防效（%）
1% 吩嗪-1-甲酰肼悬浮剂	500	87.58
	1000	77.26
	1500	70.04