

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11)特許番号

特許第3184967号
(P3184967)

(45)発行日 平成13年7月9日(2001.7.9)

(24)登録日 平成13年5月11日(2001.5.11)

(51)Int.Cl.⁷

A 0 1 N 63/00

識別記号

F I

A 0 1 N 63/00

F

請求項の数4(全14頁)

(21)出願番号 特願平11-95435
(22)出願日 平成11年4月1日(1999.4.1)
(65)公開番号 特開2000-290117(P2000-290117A)
(43)公開日 平成12年10月17日(2000.10.17)
審査請求日 平成11年4月1日(1999.4.1)
前置審査

(73)特許権者 391030284
農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所長
茨城県つくば市大わし1-2
(72)発明者 佐藤 守
茨城県牛久市栄町1-56-68
(72)発明者 渡部 賢司
茨城県つくば市並木2-10-1-203-302
(72)発明者 塚田 益裕
茨城県つくば市松代4-25-401-403
(74)代理人 100091096
弁理士 平木 祐輔 (外1名)
審査官 原 健司

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 微生物除草剤及び除草方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】 シュードモナス・シリングに属し、セイトカアワダチソウに対して病原性を示す微生物を有効成分として含有することを特徴とする除草剤。

【請求項2】 請求項1記載の除草剤と1又は2種以上の化学除草剤とを含有することを特徴とする除草剤。

【請求項3】 請求項1又は2に記載の除草剤を用いたセイトカアワダチソウの防除方法。

【請求項4】 前記除草剤を塗布、付着及び噴霧からなる群より選ばれる1以上の方法によってセイトカアワダチソウに無傷接種又は有傷接種することを特徴とする、請求項3記載の防除方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術の分野】本発明は、セイトカアワダ

チソウに対して病原性を示す微生物を利用した微生物除草剤、及び氷核活性を有する微生物を利用した微生物除草剤に関する。また、本発明は、これらの微生物除草剤と化学除草剤とを含有する除草剤にも関する。

【0002】

【従来の技術】我が国に於ける雑草の被害は甚大であり、仮に除草を行わないとすると、各種作物の収量は大幅に減少し、農業生産性の減収に直結することになる。無除草による減収率は、例えば、水稻では36%、大麦では68%、小麦では14%、陸稲では19%、落花生では37%、小豆では12%と推定されている。また、ゴルフ場の芝や、鉄道線路、公園、堤防、駐車場のり面等の非農耕地に対する雑草の被害も甚大である。そのため、特に第二次世界大戦後、農耕地やゴルフ場等で多量の化学除草剤が使用されてきた。従って、作物の生産性の増大や

景観保全のために化学除草剤が果たした役割は少くない。

【0003】しかし、化学除草剤の普及により新たな問題が浮上してきた。すなわち、化学除草剤を含む農薬の環境への蓄積が、ヒトの健康やヒト以外の生物種の生存に悪影響を及ぼすことが、近年、強く懸念されてきている。それゆえ、なるべく環境に穏やかな作用をもつ農薬、特に生物農薬の開発が強く望まれている。これは除草剤の分野においても同様であり、微生物を利用した除草方法の開発が世界的に進められている。

【0004】微生物を利用した除草方法は、微生物そのものを利用する方法と、微生物の代謝産物を利用する方法の二つに分けることができる。前者は微生物除草剤と呼ばれ、植物に対して病原性を示す糸状菌、細菌又はウイルス等が使用される。一方、後者は微生物源除草剤と呼ばれ、病原性微生物の代謝産物である毒素、植物ホルモン、酵素等が使用される。

【0005】現在、微生物除草剤として実用化しているものは5種類程度に過ぎず、実用化に近いものをすべて含めても20種類程度に過ぎない。このように商品化した微生物除草剤が極めて少ない理由としては、微生物除草剤による除草効果が特に大規模な試験において必ずしも十分に発揮されないこと、除草効果が安定して発揮されないこと等が挙げられる。

【0006】微生物除草剤として利用される微生物の大部分は、植物に対して病原性を示す糸状菌であり、細菌由来のものは1種類に過ぎない。その一つが、芝地の強害雑草であるスズメノカタビラ用の微生物除草剤キャンペリコ（農薬登録、農林水産省第19657号）である（今泉誠子、スズメノカタビラ用微生物除草剤の開発、第9回関東雑草研究会シンポジウム（1997））。これは、スズメノカタビラに病原性を示すキサントモナス属細菌を製剤化したもので、スズメノカタビラを選択的に除草できるという点に特徴がある。しかし、キサントモナス属細菌は植物の道管内で生育するため、その主要な感染経路は傷感染である。そのため、この微生物除草剤は芝等の刈込み後に散布しなければ有効な除草効果が得られないという利用技術上の制約があった。

【0007】微生物除草剤は、特定の雑草を標的にするのが一般的であり、他の種類の雑草には利用できない。従って、それぞれの雑草に対する微生物除草剤の開発が必要となる。北米由来の帰化雑草であるセイタカアワダチソウは、我が国の荒れ地、道端等に繁茂する最も一般的な雑草である。その防除には、刈込み等の物理的除草方法や化学除草剤の施用が行われてきたが、依然として繁茂し続けている。しかし、セイタカアワダチソウに対する微生物除草剤の研究は、これまで全く行われておらず、セイタカアワダチソウを防除し得る微生物除草剤の開発が望まれていた。

【0008】一方、上記のように化学除草剤も微生物除

草剤もそれぞれの問題点があるため、それを補う除草方法の開発も望まれていた。例えば、微生物除草剤を主体として、それに化学除草剤を添加することにより有効な除草が可能となれば、化学除草剤の散布回数や使用量の低減化を実現することができると考えられる。このような状況の下、セイタカアワダチソウを防除し得る新規微生物除草剤、及び雑草に対して優れた除草効果を発揮するとともに化学除草剤との併用も可能であるような新規微生物除草剤の開発が望まれていた。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、セイタカアワダチソウを防除し得る新規微生物除草剤、及び雑草に対して優れた除草効果を発揮するとともに化学除草剤との併用も可能であるような新規微生物除草剤を提供することを目的とする。

【0010】

【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、シュードモナス属に属する微生物を用いることによりセイタカアワダチソウを防除し得ることを見出した。また、本発明者らは、氷核活性を有する微生物を用いることにより自然降霜を利用して雑草を防除し得ることを見出した。さらに、本発明者らは、上記微生物と化学除草剤とを併用することにより効率よく雑草を防除し得ることを見出した。

【0011】これらの知見に基づいて、本発明は完成するに至った。すなわち、本発明は、シュードモナス属に属し、セイタカアワダチソウに対して病原性を示す微生物を有効成分として含有することを特徴とする除草剤である。また、本発明は、氷核活性を有する微生物を有効成分として含有することを特徴とする除草剤である。さらに、本発明は、上記除草剤と1又は2種以上の化学除草剤とを含有することを特徴とする除草剤である。

【0012】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。本発明の第一（以下、「第一発明」という）は、シュードモナス属に属し、セイタカアワダチソウに対して病原性を示す微生物を有効成分として含有することを特徴とする除草剤である。

【0013】第一発明の除草剤の有効成分である微生物は、シュードモナス属に属し、セイタカアワダチソウに対して病原性を示す微生物である限り、いかなる微生物であってもよいが、好ましくはシュードモナス・シリング（*Pseudomonas syringae*）に属する微生物であり、最も好ましくはシュードモナス・シリング SEI-1株である。なお、シュードモナス・シリング SEI-1株は、工業技術院生命工学工業技術研究所への受託が拒否されたため、分譲は本願出願人が保証する。シュードモナス・シリングについては、基本的な菌学的性質の他、5つの主要性質で同定するLOPAT法（Lelliottら、J. Appl. Bact., 29巻、470-489頁、1966年）により同定することが可能

である。

【0014】シュードモナス・シリング SEI-1株は、葉身に細菌病と推定される黒褐色の病斑を有するセイタカアワダチソウから分離した菌株である。本菌株は次のような菌学的性質を有している。①グラム陰性菌であり、極べん毛をもつ桿菌で運動性がある。②キングB培地（栄研化学製）で黄緑色蛍光色素を産生する。③植物病原細菌の簡易同定LOPAT法では、レバン産生（-）、オキシダーゼ活性（-）、ジャガイモ塊茎腐敗（-）、アルギニン加水分解（-）、タバコ過敏反応（+）を示し、LOPAT;Ib群に属する。これらの菌学的性質から、本菌株はシュードモナス・シリングに属する微生物と同定された。本菌株は、セイタカアワダチソウに対して選択的に病原性を示し、他の植物（例えば、クワ、コウゾ、カジノキ、ウメ等の樹木、アスター、サルビア、マリーゴールド等の草花、クワワサ、クズ、ハコベ等の雑草）に対しては病原性を示さない。セイタカアワダチソウに選択的に病原性を示すシュードモナス・シリングはこれまで全く知られていなかったため、本菌株は新しい病原型の菌株であることが判明した。菌学的性質のうち、特徴的な性質は、本菌株がLOPAT法に対する極めて特異的の反応を示す点である。なお、シュードモナス・シリングには、約50の亜種に相当する病原型（pathovar）が存在する。これらの病原型は、菌学的性質によっては区別できず、特定の植物に対する病原性の有無によってのみ区別できる。例えば、クワに病原性を示すものはpv.mor、タバコに病原性を示すものはpv.tabaciと区別される。このうち、特定の病原型（例えば、pv.mori）が氷核活性を有することが知られている。

【0015】シュードモナス・シリング SEI-1株の培養には、特別な方法を使用する必要はなく、シュードモナス属の公知の菌株と同様の培養方法を使用することができる。培地としては、資化可能な炭素源、窒素源、無機物及び必要な生育促進物質を適当に含有する培地であれば、合成培地及び天然培地のいずれを使用してもよい。具体的には、例えば、キングB培地（ペプトン 20g、K₂HP0₄ 1.5g、MgSO₄·7H₂O 1.5g、グリセリン 10g、寒天 15g、蒸留水1L）、シュークローズ添加LB培地（ペプトン 10g、酵母エキス 5g、食塩 10g、寒天 15g、シュークローズ 50g、蒸留水1L）等を使用することができる。培養に際しては、培養温度を15~30℃、好ましくは25~28℃、pHを5~9、好ましくは6~8とすることができる。

【0016】第一発明の除草剤としては、シュードモナス属に属し、セイタカアワダチソウに対して病原性を示す微生物（生菌）をそのまま使用してもよいし、適当な液体担体に溶解若しくは分散させるか、又は適当な粉末担体と混合させるか若しくはこれに吸着させて使用してもよい。この際、必要に応じて乳化剤、分散剤、懸濁剤、展着剤、浸透剤、湿潤剤、安定剤等を添加し、液剤、乳剤、油剤、水和剤、粉剤等に製剤化して使用する

こともできる。製剤化に使用する液体担体としては、例えば、水、スキムミルク水溶液、ソルビトール水溶液、グルタミン酸ナトリウム水溶液等を例示することができる。これらの1種又は2種以上を組み合わせ使用することができる。また、製剤化に使用する粉末担体としては、例えば、ゼラチン、絹フィブロイン粉末、ゼオライト、スキムミルク等を例示することができる。これらの1種又は2種以上を組み合わせ使用することができる。製剤化方法は、微生物のセイタカアワダチソウに対する病原性を失わせない限り特に限定されない。例えば、シュードモナス属に属し、セイタカアワダチソウに病原性を示す微生物をキングB培地等の細菌増殖用培地で20~30℃で2日間培養した後、それを殺菌蒸留水で懸濁し第一発明の除草剤として使用することができる。この際、懸濁液に界面活性剤（例えばツイ-ン20）を5000倍程度に希釈して混合すると、微生物と葉面との接着が良好となるため好ましい。

【0017】第一発明の除草剤の有効成分である微生物の濃度は、使用目的に応じて適宜設定することができる。例えば、上記のように微生物の懸濁液を使用する場合には、微生物濃度を10⁸~10⁹cells/mlの範囲とするのが好ましく、さらに高濃度であれば除草効果をより安定して発揮させることができる。第一発明の除草剤を使用する際、その散布量は対象植物の繁茂の度合いに応じて適宜設定することができる。散布方法は特に限定されず、例えば、塗布、付着、噴霧等の方法を用いた無傷接種又は有傷接種を例示することができる。散布の際には、噴霧器等によって対象植物の葉面に微生物が十分に付着させるのが好ましい。有傷接種は、対象植物を機械的に傷付けた後に行うと効果的である。実施例においては、束針法で機械的に傷を付けたが、第一発明の除草剤を大規模に使用する場合には、機械的除草によって対象植物を傷付けた後に有傷接種すればよい。

【0018】第一発明の除草剤の対象植物は特に限定されないが、セイタカアワダチソウに対して特に有効である。また、防除対象とする植物の生育時期についても特に限定されず、発芽後まもない植物から成長した植物まで広く防除対象とすることができる。但し、対象植物をセイタカアワダチソウとする場合、その生育段階や接種時期により除草効果に差がある。セイタカアワダチソウの生育段階は、なるべく若い生育段階であるのが好ましい。すなわち、生育期（5~6月）のセイタカアワダチソウ（例えば、背丈が5~15cmのもの）を対象とするのが好ましく、年間を通して使用する場合には、機械的除草又は化学的除草の後、新たに生育してきた若い生育段階のセイタカアワダチソウ（例えば、背丈が5~15cmのもの）を対象とするのが好ましい。また、セイタカアワダチソウへの接種時期は、微生物の増殖が旺盛な時期（例えば、4~9月）が好ましい。気温が低く、セイタカアワダチソウの生育が停止し、微生物の増殖も抑制さ

れる時期（例えば、10～12月）では、微生物を接種してもセイタカアワダチソウへの感染が起こらず、有効な除草効果が得られない。これに対して、接種時期が6月頃であれば、セイタカアワダチソウに容易に感染させ発病させることができる。この場合には、接種後1週間程度で初期病斑が現われ、壞疽斑点に進行し、それが拡大する。さらには、周囲のセイタカアワダチソウにまで感染し、有効な除草効果が得られる。

【0019】第一発明の除草剤の有効成分としてシュードモナス・シリング SEI-1株を使用する場合には、セイタカアワダチソウを選択的に防除することができる。すなわち、シュードモナス・シリング SEI-1株は、セイタカアワダチソウに対して特異的に病原性を示し、他の植物（例えば、クワ、コウゾ、カジノキ、ウメ等の樹木、アスター、サルビア、マリーゴールド等の草花、クワワサ、クズ、ハコベ等）に対しては病原性を示さない。従って、シュードモナス・シリング SEI-1株の使用に当たっては、周囲の植物等への影響を考慮することはない。この宿主選択性の高さは優れた除草剤の条件であり、使用場所が限定されることはなく、例えば、非農耕地（鉄道線路、公園、堤防、駐車場、のり面）や畑地での使用が可能である。しかしながら、本菌株は以下で詳述するように氷核活性を有するため、気温が低下し自然降霜が起こる時期に畑地で使用する場合には注意を要する。

【0020】本発明の第二（以下、「第二発明」という）は、氷核活性を有する微生物を有効成分として含有することを特徴とする除草剤である。第二発明の有効成分である微生物は、氷核活性を有する微生物である限り、いかなる微生物であってもよい。ここで、「氷核活性を有する微生物」とは、氷晶核となり水を凍結又は氷結させる能力を有する微生物を意味する。このような微生物としては、例えば、-6～0の温度範囲で氷核活性を有することが可能な微生物を例示することができる。ここで、「可能な」とは、-6～0の温度範囲に限定されず、-6より低い温度においても氷核活性を有し得ることを意味する。従って、氷核活性を有する微生物が水を凍結又は氷結させる温度は特に限定されるものではない。

【0021】氷核活性を有する微生物としては、例えば、シュードモナス属、エルウィニア属又はザントモナス属に属する微生物を例示することができる。シュードモナス属に属する氷核活性細菌としては、例えば、シュードモナス・フルオレッセンス（*Pseudomonas fluorescens*）、シュードモナス・シリング（*Pseudomonas syringae*）、シュードモナス・ピリジフラバ（*Pseudomonas viridiflava*）等を例示することができ、エルウィニア属に属する氷核活性細菌としては、例えば、エルウィニア・アナナス（*Erwinia ananas*）、エルウィニア・ヘルビコーラ（*Erwinia herbicola*）、エルウィニア・ステワルティ（*Erwinia stewartii*）等を例示することができ、

ザントモナス属に属する氷核活性細菌としては、例えば、ザントモナス・カンペストリス（*Xanthomonas campestris*）等を例示することができる（Lindow, S. Annual Review of Plant Pathology, 21巻 363-384, 1982, 佐藤守, 遺伝42巻, 30-34, 1988）。より具体的には、シュードモナス属に属する氷核活性細菌として、シュードモナス・シリング SEI-1株、シュードモナス・シリング Ni23株、シュードモナス・シリング Mei40株を例示することができ、エルウィニア属に属する氷核活性細菌として、エルウィニア・アナナス TM2株、エルウィニア・アナナス Mei7株を例示することができる。なお、これらの菌株は、工業技術院生命工学工業技術研究所への受託が拒否されたため、分譲は本願出願人が保証する。

【0022】シュードモナス・シリング SEI-1株の菌学的性質は、上記の通りである。本菌株の過冷却点（SCP（Super cooling point）、氷核形成温度）は-1.8であり、氷核形成最小濃度は 10^4 cell/mlである。一般に、過冷却点が高いほど、また氷核形成最小濃度が低いほど、氷核活性が高いと判定でき、本菌株は従来の氷核活性細菌の中にあつて氷核活性が最も優れていることが判明した。このような優れた氷核活性は、特定の培養条件（培地、培養温度等）下で培養することにより特異的に増強できる。すなわち、最適な培養条件で培養した氷核活性細菌の氷核活性は、通常の培地で培養したときの10倍以上も増強できる。氷核活性細菌の活性を増強するのに好都合な培地としては、キングB培地（ペプトン 20g、 K_2HPO_4 1.5g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.5g、グリセリン 10g、寒天15g、蒸留水1L）、シュークロース添加LB培地（ペプトン 10g、酵母エキス 5g、食塩 10g、寒天 15g、シュークロース 50g、蒸留水1L）等を例示することができる。氷核活性を増強するには培養温度も重要であり、培養温度は好ましくは18～22である。培養温度がこの温度範囲より低いと目的とする細菌量を得るのに長時間を要するという問題点があり、また高すぎると細菌表面の氷核活性蛋白が変性し氷核能力が低下するという問題点がある。なお、このような氷核活性を増強するための条件は、氷核活性を有する微生物のいずれにも適用可能である。

【0023】シュードモナス・シリング Ni23株は、クワ葉面から分離された氷核活性細菌である。本菌株の菌学的性質は次の通りである。①グラム陰性細菌で、極鞭毛を有する桿菌で運動性がある。②キングB培地で黄緑色蛍光色素を産生する。③レバン産生（-）、オキシダーゼ活性（-）、ジャガイモ塊茎腐敗（-）、アルギニン加水分解（-）、タバコ過敏反応（+）の特性を有する。これらの菌学的性質から、本菌株はシュードモナス・シリングに属する微生物と同定された。本菌株の過冷却点は-3.0であり、氷核形成最小濃度は $10^4 \sim 10^6$ cells/mlである。

【0024】シュードモナス・シリング Mei40株は、ク

ワノメイガ体内から分離された氷核活性細菌である。本菌株の菌学的性質は次の通りである。①グラム陰性細菌で、極鞭毛を有する桿菌で運動性がある。②キングB培地で黄緑色蛍光色素を産生する。③レバン産生(-)、オキシダーゼ活性(-)、ジャガイモ塊茎腐敗(-)、アルギニン加水分解(-)、タバコ過敏反応(+)の特性を有する。これらの菌学的性質から、本菌株はシュードモナス・シリングに属する微生物と同定された。本菌株の過冷却点は-3.0 であり、氷核形成最小濃度は $10^4 \sim 10^6$ cells/mlである。

【0025】エルウィニア・アナナス TM2株は、クワ葉面から分離された氷核活性細菌である。本菌株の菌学的性質は次の通りである。①グラム陰性細菌で、周毛を有する桿菌で運動性がある。②多くの増殖用培地で黄色の集落を形成する。③内生孢子、気中菌糸を形成しない。④硝酸塩を還元しない。⑤イノシトール、ラフィノース、セルビオース、メリビオース、グリセロールを利用する。これらの菌学的性質から、本菌株はエルウィニア・アナナスに属する微生物と同定された。本菌株の過冷却点は-2.7 であり、氷核形成最小濃度は $10^4 \sim 10^6$ cells/mlである。

【0026】エルウィニア・アナナス Mei7株は、クワノメイガ体内から分離された氷核活性細菌である。本菌株の菌学的性質は次の通りである。①グラム陰性細菌で、周毛を有する桿菌で運動性がある。②多くの増殖用培地で黄色の集落を形成する。③キングB培地で黄緑色蛍光色素を産生しない。④好氣的、嫌氣的生育をする。⑤内生孢子、気中菌糸を形成しない。⑥硝酸塩を還元しない。⑦イノシトール、ラフィノース、セルビオース、メリビオース、グリセロールを利用する。これらの菌学的性質から、本菌株はエルウィニア・アナナスに属する微生物と同定された。本菌株の過冷却点は-2.7 であり、氷核形成最小濃度は 10^6 cells/mlである。

【0027】なお、エルウィニア・アナナスについては、腸内細菌同定キットAPI20E (BioMerieux社製) および主要糖類分解能検定 (Dye, D.W. (1983): *Erwinia: The "Amylovora" and "Herbicola" groups*. Plant Bacterial Diseases (Fahy, P.C. and Persley, G. J. Ed.) Academic Press, 67-86頁) 等により同定が可能である。

【0028】氷核活性を有する微生物の培養には、特別な方法を用いる必要はなく、氷核活性を有する公知の微生物と同様の培養方法を用いることができる。培地としては、資化可能な炭素源、窒素源、無機物及び必要な生育促進物質を適当に含有する培地であれば、合成培地及び天然培地のいずれを用いてもよい。具体的には、例えば、キングB培地、シュークロース添加LB培地等を用いることができる。培養に際しては、培養温度を15~25、好ましくは18~22、pHを5~9、好ましくは6~7とすることができる。

【0029】第二発明の有効成分としては、氷核活性を

有するとともに植物に対して病原性を示す微生物を使用するのが好ましい。このような微生物を使用すれば、氷核活性によって微生物を植物開口部から感染させることができ、これによって微生物を傷感染させなくても、該微生物の病原性を発揮させることができる。氷核活性を有するとともに植物に対して病原性を示す微生物としては、例えば、シュードモナス・シリングに属する微生物を例示することができ、より具体的には、シュードモナス・シリング SEI-1株を例示することができる。

【0030】第二発明の有効成分である氷核活性を有する微生物は生菌であってもよいが、氷核活性を有する菌体処理物であってもよい。菌体処理物には、氷核活性を有する処理物である限り、菌体にいかなる処理を施したのものも含まれる。このような菌体処理物としては、例えば、菌体表面の氷核タンパク質を破壊しない滅菌処理 (例えば、紫外線照射処理、線照射処理等) により得られる死菌を例示することができる。氷核活性を有する限り、生菌であっても菌体処理物であっても除草剤の有効成分として使用できることは、氷核活性を有する微生物に由来する氷核活性タンパク質を化学除草剤に混入することによって有望な生物除草剤が得られることを意味する。

【0031】第二発明の除草剤は、氷核活性を有する微生物又はその菌体処理物をそのまま使用してもよいし、適当な液体担体に溶解若しくは分散させるか、又は適当な粉末担体と混合させるか若しくはこれに吸着させることにより製剤化して使用してもよい。この際、製剤化に使用する液体担体としては、例えば、水、スキムミルク水溶液、グルタミン酸ナトリウム水溶液、ソルビトール水溶液等を例示することができ、これらの1種又は2種以上を組み合わせ使用することができる。また、製剤化に使用する粉末担体としては、例えば、ゼラチン、絹フィブロイン、ゼオライト、スキムミルク等を例示することができ、これらの1種又は2種以上を組み合わせ使用することができる。さらに、必要に応じて乳化剤、分散剤、懸濁剤、展着剤、浸透剤、湿潤剤、安定剤等を添加し、液剤、乳剤、油剤、水和剤、粉剤等に製剤化して使用することもできる。例えば、氷核活性を有する微生物をキングB培地等の細菌増殖用培地で22 で2日間培養した後、殺菌蒸留水に懸濁し第二発明の除草剤として使用することができる。この際、懸濁液に界面活性剤 (例えば、ツイ-ン20 (シグマ社製)) を5000倍程度に希釈して混合すると、葉面と微生物との接着が良好となるため好ましい。

【0032】微生物除草剤を実用的に利用する際の決め手は製剤化が可能であるか否かである。すなわち、目的とする微生物の特性 (第二発明においては氷核活性) を安定かつ高レベルに維持することが非常に重要であり、微生物の特性を安定かつ高レベルに維持するための保護剤の開発が必要不可欠となる。このような保護剤として

利用する媒体は、微生物の吸着能及び保持能が高く、さらに微生物の特性を維持でき、しかも比較的安価で容易に製剤化できる必要がある。第二発明の除草剤を製剤化する際に使用し得る微生物の保護剤としては、ゼラチン、絹タンパク質、絹フィブロイン等を例示することができる。これらの保護剤を使用して製剤化すれば、氷核活性を有する微生物の特性（氷核活性）を安定かつ高レベルに維持させた状態で製剤化することができる。例えば、氷核活性を有する微生物の懸濁液に上記保護剤を添加した後、微生物を保護剤に吸着させ、乾燥させることにより微生物の氷核活性を安定かつ高レベルに維持させた状態で粉剤に製剤化することができる。この際、懸濁液の微生物濃度は、2～10%程度とするのが好ましい。また、乾燥処理の前に微生物を保護剤に十分吸着させておくことが重要であり、そのために懸濁液に保護剤を加えた後、該懸濁液を20～25 で1時間程度静置しておくのが好ましい。

【0033】第二発明の除草剤の有効成分である微生物の濃度は、剤型や使用目的等に応じて適宜設定することができる。例えば、上記のように氷核活性を有する微生物を懸濁して使用する場合には、懸濁液中の微生物濃度を $10^3 \sim 10^9$ /ml、好ましくは $10^6 \sim 10^9$ /mlの範囲とすることができる。この際、氷核活性を有する微生物としてシュードモナス・シリング SEI-1株を使用する場合、懸濁液中のシュードモナス・シリング SEI-1株の濃度が 10^3 /ml以上であれば除草効果が発揮され得る。自然の環境下では、太陽の紫外線照射環境下で滅菌されるが、細菌濃度が 10^3 /mlにまで減少しても、依然氷核活性を有しているので、散布後、シュードモナス・シリング SEI-1株の氷核活性が長期間にわたって維持される。例えば、 10^8 /mlのシュードモナス・シリング SEI-1株を植物体に十分噴霧した場合には、散布後2週間以上にわたり除草効果が維持され得る。

【0034】第二発明の除草剤を使用する際、その散布量は雑草の繁茂の度合いに応じて適宜設定することができる。散布方法は特に限定されず、例えば、塗布、付着、噴霧等の方法を用いた無傷接種又は有傷接種を例示することができる。散布の際は、噴霧器等によって対象植物の葉面に氷核活性を有する微生物が十分に付着するように行うのが好ましい。有傷接種は、例えば、機械的除草によって植物体を傷付けた後、第二発明を散布することによって行うことができる。機械的除草の後に第二発明の除草剤を散布することにより対象植物の二次発生を抑えることが可能となる。

【0035】第二発明の除草剤の対象植物は特に限定されない。第二発明の除草剤の対象植物としては、例えば、秋～冬季の雑草、より具体的には、イネ科の雑草（例えば、イヌムギ、ネズミムギ、ホソムギ、スズメノカタビラ、スズメノテッポウ、カモジグサ）、マメ科の雑草（例えば、スズメノエンドウ、カラスノエンド

ウ）、ナデシコ科の雑草（例えば、ミミナグサ、ノミノフスマ）、シソ科の雑草（ホトケノザ）、ゴマノハグサ科の雑草（例えば、オオイヌノフグリ）、アブラナ科の雑草（例えば、ナズナ）、アカネ科の雑草（例えば、ヤエムグラ）、ヒメオドリコソウ等を例示することができる。

【0036】氷核活性を有する微生物は、その表層に氷核蛋白を有しているため、氷晶核となり、周囲の水滴を凍結又は氷結させる。この性質を利用すれば、気温の低下や自然降霜によって対象植物に凍霜害を誘起することができ、これによって対象植物を凍死させて防除することができる。この際、例えば-5 程度の自然降霜が30分～2時間であれば、氷核活性を有する微生物による凍霜害を十分に誘起することができ、対象植物を効率よく防除することができる。また、-2～3 程度の自然降霜であっても、これが30分以上、好ましくはさらに長時間続けば、氷核活性を有する微生物による凍霜害を十分に誘起することができ、対象植物の防除が可能となる。

【0037】第二発明の除草剤による使用に当たっては、その使用場所を十分に考慮するのが望ましい。すなわち、氷核活性を有する微生物による除草効果は、非特異的に発揮され得るので、対象植物以外の有用植物（例えば、野菜等の農作物）に対しても氷核活性を有する微生物による凍霜害が誘起される可能性がある。そこで、第二発明の除草剤を使用するに当たっては、その使用場所を限定することを考慮するのが好ましい。例えば、有用植物が存在しない場所、非農耕地（鉄道線路、公園、堤防、駐車場、のり面）、氷核活性を有する微生物により誘起される凍霜害の影響を受けない有用植物が存在する場所等で使用するのが好ましい。また、以下の実施例で示すように高麗芝等の芝草は氷核活性を有する微生物によって誘起される凍霜害の影響を受けず、強い耐凍性を示すので、芝草の栽培畑やゴルフ場で使用するのも好ましい。

【0038】本発明の第三は、第一発明の除草剤又は第二発明の除草剤と1又は2種以上の化学除草剤とを含有することを特徴とする除草剤である。化学除草剤としては、公知のいかなる化学除草剤を使用してもよく、例えば、水田用、畑地用、非農耕地用等の市販の化学除草剤を使用することができる。より具体的には、鉄道線路、公園、堤防、駐車場、のり面等の非農耕地用の化学除草剤として使用されるグリホサ-ト系除草剤（例えば、「ラウンドアップ」（日本モンサント株式会社製）、グリホシネ-ト系除草剤（ヘキスト社製）、ピピリジリウム系除草剤（例えば、パラコート、ジクワット（ゼネカ社製））を例示でき、水田用の除草剤としては、スルホニルウレア系除草剤を例示することができる。

【0039】第一発明の除草剤又は第二発明の除草剤と化学除草剤とを混合して使用すれば、化学除草剤の散布回数又は散布量を軽減化することができる。化学除草剤

は、一般に即効的かつ強力な除草効果を有するという優れた特徴を有する反面、環境汚染という問題点を持っているため、化学除草剤の散布回数又は散布量を軽減化できることは非常に有用である。

【0040】第一発明の除草剤と化学除草剤とを併用して雑草（例えば、セイタカアワダチソウ）の除草を行う場合、その使用時期は、第一発明の有効成分である微生物の増殖が活発な時期（例えば4月～9月）が好ましく、この時期において使用すれば、化学除草剤の散布回数又は散布量を大幅に減少させることができる。また、氷核活性を有する微生物による除草効果は気温の低下や降霜によって誘起されるので、氷核活性を有する微生物と化学除草剤とを併用することにより、特に気温が低い時期（例えば、10月～3月）における化学除草剤の散布回数又は散布量を大幅に減少させることができる。

【0041】

【実施例】以下、本発明を実施例及び比較例により更に詳細に説明するが、本発明はこれらの例に限定されるものではない。

〔実施例1〕クワ及びクワノメイガからの氷核活性細菌の分離

クワ植物の葉又は昆虫クワノメイガを乳鉢に入れ、適量の殺菌水を加え十分に摩砕し、それを希釈平板法により、LB培地（ペプトン 10g、酵母エキス 5g、食塩 10g、寒天 15g、蒸留水1L）を用いて28℃で培養した。3日間培養して得られた単一のコロニーを、更に純粋培養して分離菌株とした。

【0042】これらの分離菌株の氷核活性の有無を次の方法で検定した。すなわち、分離菌株をLB平板培地法を用いて22℃で1～2日間培養した後、菌体を殺菌水に10⁸/mL程度に懸濁して供試液とした。その供試液のうちの約1mLを栄研製の試験管（滅菌Fスピッツ、10mL容）に取り、-5℃の不凍液中に30分程度浸漬して、細菌懸濁液の凍結の有無により氷核活性の有無を目視で判定した。氷核活性を示した菌株は、スキムミルク培地（スキムミルク10g、グルタミン酸ソーダ1.5g、100mL）に混ぜ、-30℃で保存した。再度使用する時は、それを溶解してLB培地で培養した。

【0043】上記の方法により氷核活性細菌が、クワ葉面から2菌株（Ni23株、TM2株）、クワノメイガ体内から2菌株（Mei40株、Mei7株）分離された。そこで、これらの菌株の菌学的性質を調べ、各菌株の同定を試みた。その結果、Ni23株は次のような菌学的性質を有していた。

- ①グラム陰性細菌
- ②極鞭毛を有する桿菌で運動性がある
- ③キングB培地で黄緑色蛍光色素を産生する
- ④レバン産生(-)、オキシダーゼ活性(-)、ジャガイモ塊茎腐敗(-)、アルギニン加水分解(-)、タバコ過敏反応(+)の特性を有する

上記菌学的性質より、Ni23株をシュードモナス・シリング (*Pseudomonas syringae*) に属する微生物と同定し、シュードモナス・シリング Ni23株と命名した。

【0044】また、TM2株は次のような菌学的性質を有していた。

- ①グラム陰性細菌
- ②周毛を有する桿菌で運動性がある
- ③多くの増殖用培地で黄色の集落を形成する
- ④内生孢子、気中菌糸を形成しない
- ⑤硝酸塩を還元しない
- ⑥イノシトール、ラフィノース、セルビオース、メリピオース、グリセロールを利用する

上記菌学的性質より、TM2株をエルウィニア・アナナス (*Erwinia ananas*) に属する微生物と同定し、エルウィニア・アナナス TM2株と命名した。

【0045】また、Mei40株は次のような菌学的性質を有していた。

- ①グラム陰性細菌
- ②極鞭毛を有する桿菌で運動性がある
- ③キングB培地で黄緑色蛍光色素を産生する
- ④レバン産生(-)、オキシダーゼ活性(-)、ジャガイモ塊茎腐敗(-)、アルギニン加水分解(-)、タバコ過敏反応(+)の特性を有する

上記菌学的性質より、Mei40株をシュードモナス・シリング (*Pseudomonas syringae*) に属する微生物と同定し、シュードモナス・シリング Mei40株と命名した。

【0046】また、Mei7株は次のような菌学的性質を有していた。

- ①グラム陰性細菌
- ②周毛を有する桿菌で運動性がある
- ③多くの増殖用培地で黄色の集落を形成する
- ④キングB培地で黄緑色蛍光色素を産生しない
- ⑤好氣的、嫌氣的生育をする
- ⑥内生孢子、気中菌糸を形成しない
- ⑦硝酸塩を還元しない
- ⑧イノシトール、ラフィノース、セルビオース、メリピオース、グリセロールを利用する

【0047】上記菌学的性質より、Mei7株をエルウィニア・アナナス (*Erwinia ananas*) に属する微生物と同定し、エルウィニア・アナナス Mei7株と命名した。なお、シュードモナス・シリング Ni23株、エルウィニア・アナナス TM2株、シュードモナス・シリング Mei40株及びエルウィニア・アナナス Mei7株は、工業技術院生命工学工業技術研究所への受託が拒否されたため、各菌株の分譲は本願出願人が保証する。

【0048】〔実施例2〕セイダカアワダチソウからの氷核活性細菌の分離

セイダカアワダチソウから氷核活性細菌を次の方法で分離した。1998年5月、茨城県つくば市の農道に繁茂するセイダカアワダチソウの葉身に細菌病と判定できる黒褐色

の病斑を見付けた。セイタカアワダチソウの細菌病に関しては全く知られておらず、新菌種の可能性があるため、細菌を分離することにした。その結果、分離細菌は、健全なセイタカアワダチソウに有傷、無傷接種法のいずれでも、明瞭な病原性を示し新病原細菌であることが確定した。

【0049】分離細菌は、グラム陰性であり、極べん毛を持つ桿菌で運動性を示した。また、キングB培地（栄研化学製）で黄緑色蛍光色素が産生したので、シュードモナス属に属することが確認できた。更に、植物病原細菌の簡易同定LOPAT法では、レバン産生（-）、オキシダーゼ活性（-）、ジャガイモ塊茎腐敗（-）、アルギニン加水分解（-）、タバコ過敏反応（+）を示し、LOPAT; Ib群に属するものと断定できたため、本菌株をシュードモナス・シリングに属する微生物と同定した。本菌株は、以下で述べるようにセイタカアワダチソウに病原性を有するが、同植物に病原性を示すシュードモナス・シリングに属する微生物は全く知られていないため、新病原型すなわち新菌株であると同定し、シュードモナス・シリング SEI-1株と命名した。なお、この菌株は、工業技術院生命工学工業技術研究所への受託が拒否されたため、分譲は本願出願人が保証する。

【0050】〔実施例3〕新規氷核活性細菌の氷核活性実施例1及び2で分離したシュードモナス・シリング S EI-1株、Ni23株及びMei40株、並びにエルウィニア・アナナス TM2株及びMei7株と、公知の非氷核活性細菌との

氷核活性を比較した。氷核活性の比較は、 10^8 /mL程度の細菌懸濁液における過冷却温度（氷核活性開始温度）及び-5 ~ -6における氷核形成最小濃度の2つの要因について評価することにより行った。この評価によって、過冷却温度が高いほど、また、氷核形成最小濃度が低いほど、氷核能力が高いと判定できる。過冷却温度は、試作装置としてデザインした過冷却温度測定器により測定した。その際、サンプル量は20 μ Lとし、冷却速度は1 /分とした。

【0051】また、氷核形成最小濃度の測定は、測定しようとする細菌懸濁液を通常10倍段階希釈することにより、段階的な細菌濃度検定液を1 mLの量で試験管内に作製し、これを上述の温度により30分程度空冷又は不凍液中に保ち、どの濃度の懸濁液まで氷結したかを調査することにより行った。ここで、空冷による方法とは、一定の温度（-6 ~ 0）の恒温室内に氷核活性細菌の入った試験管を置いて30分後に試料の氷核形成状態を調べる方法を意味する。また、不凍液中での方法とは、エチレングリコールを冷媒として一定温度に保冷した冷媒中に氷核活性細菌の入った試験管を入れて経時変化を調べる方法を意味する。同時に、各希釈液中の細菌数（生菌数）を調べ、細菌濃度を1mLあたりの生菌数で表示した。各種氷核活性細菌の氷核形成温度（過冷却点）及び氷核形成最小濃度（CFU/mL）を表1に示す。

【0052】

【表1】

菌株名 ¹⁾	分離源	氷核形成温度 (°C)	最小濃度 (細胞数/mL)
<i>Pseudomonas syringae</i>			
SEI-1	セイタカアワダチソウ	-1.8	10^4
Ni23	クワ	-3.0	$10^4 \sim 10^6$
Mei 40	クワノメイガ	-3.0	$10^4 \sim 10^6$
<i>Erwinia ananas</i>			
TM2	クワ	-2.7	$10^4 \sim 10^6$
Mei 7	クワノメイガ	-2.7	10^5
[非氷核活性細菌]			
<i>Escherichia coli</i> JA221	--	-20.0	--
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC3953	--	-21.5	--

1) LB培地、22°Cで培養した。

【0053】表1から明らかのように、シュードモナス・シリング SEI-1株、Ni23株及びMei40株、並びにエルウィニア・アナナス TM2株及びMei7株の5菌株は、いずれも高い氷核活性を示した。とりわけ、シュードモナス・シリング SEI-1株は、氷核形成温度 -1.8、氷核形成最小濃度 10^4 /mLと最も優れた氷核能力を示し、かつ安定していた。一方、シュードモナス・シリング Ni23

株及びMei40株、並びにエルウィニア・アナナス TM2株及びMei7株は、氷核形成最小濃度が $10^4 \sim 10^6$ /mLであり、シュードモナス・シリング SEI-1株より氷核活性が幾分低かった。

【0054】〔実施例4〕セイタカアワダチソウに対するSEI-1株の病原性
生育ステージの異なるセイタカアワダチソウ（若苗、成

熟苗)にSEI-1株の懸濁液(濃度 10^9 /ml)を接種し、SEI-1株の病原機能を活かしたセイタカアワダチソウの除草効果を評価した。その際、散布時期の適否を検討するため接種時期を6月12日、6月5日、11月1日の3区とし、それぞれ野外の自然環境下で行った。また、接種には無傷接種と有傷接種の2区を対象にした。無傷接種の中には噴霧と塗抹を含めることがある。噴霧接種とは、 10^9 /mLの細菌液(ツイ-ン20、5000倍希釈液)を噴霧器により、葉の裏表に十分にかかるように噴霧する方法を意味する。有傷接種は10本程度の縫針を一つに束ねたもの

の先端を、 10^9 /mLの細菌液を付着させ、葉の表面に一葉身につき約10箇所軽度の傷が付く程度に刺し、温室(20~25)におき、2週間程度観察する方法を意味する。さらに、接種時期が6月の若苗及び成熟苗としては、背丈がそれぞれ10cm、60cm程度のセイタカアワダチソウを、接種時期が11月の若苗としては、背丈は10cm程度のセイタカアワダチソウを用いた。得られた結果を表2に示す。

【0055】
【表2】

植物	個体 No.	接種時期	噴霧接種	有傷接種
若苗	-1	6/12	+++	+++
	-2		+++	+++
	-3-10		NT	+++
成熟苗	-1	6/5	+	++
	-2		+	++
若苗	-1-6	11/1	-	-

注：植物病斑の進展程度の評価基準は次の通りである

+++ 極めて著しい、++ 著しい、+ 普通、- 全く認められない
NT 未試験

【0056】表2から明らかのように、背丈10cm程度のセイダカアワダチソウの若苗にSEI-1株の懸濁液を噴霧接種すると、接種後1週間程度で初期病斑が現れ、それが壊疽斑点となり拡大し、セイタカアワダチソウを容易に発病させることができた。そして、さらに周囲の若苗に感染し病気が広がった。有傷接種の場合も同様であったが、病斑の進展が早かった。また、噴霧接種及び有傷接種に関して、植物体の病原性発現に及ぼす影響を比較すると、有傷接種の方がより広範な適用範囲を示した。例えば、表2に示すように、成熟苗でも中程度の病斑の進行を示した。

【0057】但し、気温の低下する11月では、噴霧接種及び有傷接種の両方とも、ほとんど感染せず病徴もみられなかった。そのため、SEI-1株でセイタカアワダチソウを除草するには、4~9月の気温の高い時期に、なる

べく若い植物を対象に散布することが特に好ましいことが判明した。また、SEI-1株は傷口から容易に植物体に侵入するため、例えば、機械除草の後に散布することにより、二次発生を抑えることが可能であるが判明した。

【0058】〔実施例5〕SEI-1株の各種雑草及び有用植物に対する病原性

各種雑草及び有用植物にSEI-1株の懸濁液(濃度 10^9 /ml)を噴霧接種又は有傷接種し、各種雑草及び有用植物に対するSEI-1株の病原性を検討した。接種時期及び実験時期は6月上旬とした。接種後は、20-25の温室に置き、2週間程度観察した。得られた結果を表3に示す。

【0059】
【表3】

噴霧接種	有傷接種	植 物 名
+	+	セイタカアワダチソウ
+	-	なし
-	-	(樹木)クワ, コウゾ, カジノキ, ウメ, (草花)アスター, サルビア, マリーゴールド, ブルーオーシャン, テルモプシモンタナ, 三色スミレ, イチゴ, (雑草)クワクサ, クズ, ハコベエノキグサ, イヌホウズキ, イヌタデ, ハルタデ(早), ハルタデ(晩), スベルヒユ, カヤツリグサ, メヒシバ, コゴメカヤツリグサ, エノコログサ, ヒメイヌビエ, カキドウシ, ツユクサ
-	+A	ツルマメ, キク, キンギョソウ, ヒメムカシヨモギ, ヤブカラシ, アジサイ
-	+B	イチビ, タカサブロー, シロザ, アカザ, ホナガイヌビユ, ホソアゲイトー, イヌビユ, オヒシバ, ヒメムカシヨモギ

注：表中、+A：接種部が壞疽を起こす、+B：接種部が壞疽を起こすのではなく、白化する（植物の抵抗反応と推測されるので真の病原性とはいえない）ことであり、具体的には、有傷接種部位のみが、壞疽の黒色ではなく白色になり、それ以上には拡大しない現象をいう。

【0060】表3から明らかなように、噴霧接種の場合、SEI-1株はセイタカアワダチソウにのみに病原性を有し、それ以外の各種雑草及び有用植物には全く病原性を示さないという、極めて高い寄主選択性を示した。有傷接種の場合には、一部の植物体に壞疽斑を形成したが、噴霧接種では全く病徴を示さなかった。このように、SEI-1株は対象雑草であるセイタカアワダチソウ以外の植物に害を与えないという点において微生物除草剤として優れた利点を有することが判明した。

【0061】〔実施例6〕SEI-1株の氷核活性機能によるイヌムギの霜害誘導（低温処理時間との関係）
氷核活性細菌SEI-1株を用いてイヌムギに霜害を起こさせる実験を行った。実施時期は、98年10月とし、野外に繁茂しているイヌムギの若苗をポットに移植した。それに10⁸/mL濃度の細菌液を噴霧し、-5 で一定時間接触させた後、温室に戻し、1-2週間程度観察した。対照とし

て氷核活性を有しないP.syringae SM-2株を用いた。イヌムギを-5 で低温処理する時間を変化させ、各処理時間における霜害被害率を評価した。なお、これ以降の表中で用いる「Cont(DW)」とは、蒸留水散布を行った対照区を意味する。また、「m」は分を表し、「h」は時間を表す。

【0062】実験例6以降における対象植物の霜害被害率は下記の評価基準により霜害を起こした有用植物葉の比率から評価した。

- : 0 - 10%
+ : 11 - 50%
++ : 51 - 80%
+++ : 81 - 100%

得られた結果を表4に示す。

【0063】

【表4】

菌株名	低温処理時間(分, 時間)								
	0m	5m	10m	30m	1h	2h	3h	5h	20h
SEI-1(INA+)	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
SM-2(INA-)	-	-	-	-	++	++	+++	+++	+++
Cont(DW)	-	-	-	-	+	+	+++	+++	+++

注：表中、INA+：氷核活性陽性、INA-：氷核活性陰性

【0064】表4から明らかなように、対照区では-5の2時間以内の接触では全く被害が起らないか軽度の被害であった。一方、氷核活性細菌SEI-1株(10⁸/ml)を散布した区では10分以上の接触で大きな被害(霜害)を起こし、大部分が枯死した。これによって、-5で30分程度(又は、対照区で被害が軽い-5で2時間程度)の自然降霜があれば、冬雑草の氷核活性細菌による防除が可能であることが判明した。

【0065】〔実施例7〕SEI-1株の氷核活性機能によ

るイヌムギの霜害誘導(SEI株の生菌及び死菌による氷核活性機能の相違)

SEI-1株の生菌及び死菌による氷核活性機能の相違、並びに細菌濃度とイヌムギに表れる霜害の被害率との関係を調べた。死菌は細菌液濃度を紫外線ランプで30cm直下で15分程度照射し、得られたものである。これを実施例6の生菌の場合と同様に希釈し、供試した。対照として蒸留水のみを噴霧を行った。これらに-5で30分間の低温処理を施し、霜害被害率を評価した。得られた結果を

表5に示す。

【0066】

菌株名	細菌数 (対数表示)									
	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0
SEI-1 (LC)										
SEI-1 (UV)	+++	+++	+++	++	++	++	+	+	-	-
Cont (DW)	+++	+++	++	++	++	+	NT	NT	NT	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注: LC:生菌, UV:紫外線照射による死菌, NT:未試験

【0067】表5から明らかのように、イヌムギに氷核活性細菌を接種するための最適細菌濃度は $10^9 \sim 10^8$ /mlであり、-5 で30分間～2時間の降霜時に特に有効であることが判明した。また、イヌムギを除草する際、生菌濃度は 10^7 /ml以上が好ましいが、低濃度(例えば 10^2 /ml)でも軽微な除草効果が認められた。一方、紫外線照射したSEI-1株の死菌でも十分な氷核活性機能が認められた。この結果は、葉面上の細菌数が紫外線等の外部要因で減少しても除草効果が顕著に減少するものでないことを示しており、このことから、氷核活性細菌の散布後に、比較的長期間、氷核活性機能が維持されることが判明した(下記の実施例8で実験的にこの類推を確認している)。また、紫外線死菌でも氷核活性機能を有することから、微生物除草剤の製剤化に当たり、必ずしも生菌

を使用する必要がなく、製剤化方法の適用範囲を広げることができることが判明した。

【0068】〔実施例8〕SEI-1株の氷核活性機能によるイヌムギの霜害誘導効果の持続性

SEI-1株によりイヌムギの霜害の被害防止の効果がどの程度持続するかを調べた。 10^8 /mlの菌株を植物に十分噴霧器で散布し、温室内に所定期間保った後、低温処理を行った。対照として蒸留水を散布し、同様な処理を行った。なお、イヌムギの霜害実験は-5 で30分間処理することで効果の持続性を調べ、霜害被害率を評価した。得られた結果を表6に示す。

【0069】

【表6】

使用細菌	散布後日数 (日)					
	0	1	2	4	8	14
SEI-1株	+++	+++	+++	+++	++	++

【0070】表6から明らかのように、SEI-1株の散布後2週間以上効力が維持された。このように生菌そのものを用いても2週間以上の持続性が確認された。さらに氷核蛋白の保護操作を加えることにより長期間の維持が期待できる。このように製剤化に有用な展望が得られた。

【0071】〔実施例9〕SEI-1株の氷核活性機能によるイヌムギの霜害誘導(除草剤併用による効果) 除草剤(ラウンドアップ(日本モンサント社製))単独、SEI-1株単独又はそれらの混合溶液を噴霧器でイヌムギ若苗に十分散布し、-5 で10分間又は30分間処理し

た後、温室(20-25)に戻し、霜害の被害の程度を観察した。この際、SEI-1株として 10^8 /ml濃度の生菌を用いた。また、除草剤と細菌懸濁液の混合比率は1:1とし、対照として蒸留水を散布した。霜害の被害は、処理直後～2日間と比較的早く見られるが、除草剤による被害の出現には、通常1-2週間かかるので3週間程度観察した。これにより、化学除草剤併用によるイヌムギの霜害被害率を評価した。得られた結果を表7に示す。

【0072】

【表7】

処理方法	-5℃での処理時間(分)	
	10	30
X 100 RA	+++	+++
X 100 RA + SEI-1	+++	+++(*)
X 500 RA	+++	+++
X 500 RA + SEI-1	+++	+++(*)
X 1000 RA	-	+
X 1000 RA + SEI-1	++	+++(*)
SEI-1	++	+++(*)
Cont(DW)	-	-

【0073】被害率は、次の4段階で評価した。

+++ 極めて著しい ++ 著しい + 普通 - 認められない

表中の(*)のついた被害率は、霜害と除草剤による被害の両方を含んでいることを意味する。また、表中、「R

A」は除草剤ラウンドアップを意味し、「X」は希釈倍数を意味し、「X 100 RA」は希釈倍率100倍のラウンドアップ除草剤を意味し、「X 100 RA + SEI-1」は希釈倍率100倍の除草剤とSEI-1株生菌とを混合比率1:1で混合したものを意味する。

【0074】表7から明らかなように、霜害は低温処理後早期に発現し、化学除草剤による被害は比較的長期間経過後に発現した。従って、早い時期にほとんどが霜害で枯死し（約80%程度）、残った健全葉がさらに化学除草剤により枯死し、ほぼ100%の被害率となった。化学除草剤のみの場合（X 100, X 500）も同様に100%が枯死した。

【0075】また、表7から明らかなように、化学除草剤の100倍及び500倍希釈液を単独で散布した場合には、いずれの希釈倍率でも顕著な除草効果を示したが、希釈倍率が1000倍の場合には除草効果は見られなかった。一方、化学除草剤に氷核活性細菌を混合した場合には、化学除草剤を単独で施用した場合と同様の被害程度を示したが、氷核活性細菌を混合したことによる除草効

菌株名	-5℃での処理時間（分）	
	10	30
Erwinia ananas Mei40	++	+++
Erwinia ananas TM2	++	+++
Pseudomonas syringae Mei40	++	+++
Pseudomonas syringae Ni23	++	+++
Cont(DW)	-	-

【0078】表8から明らかなように、いずれの氷核活性細菌もSEI-1株と同程度に効果が認められた。この結果から、いずれの菌株もSEI-1株と同様に除草用として利用可能なことが分かった。

〔実施例11〕SEI-1株の氷核活性機能による各種冬雑草の霜害誘導
イヌムギ以外の冬雑草に対するSEI-1株の霜害誘導効果

植物名	処理	-5℃での処理時間（分、時間）			
		0m	30m	1h	3h
イヌムギ	SEI-1	-	+	+++	+++
	Cont	-	-	-	-
ネズムギ	SEI-1	-	++	+++	NT
	Cont	-	-	-	NT
カラスムギ	SEI-1	-	++	+++	+++
	Cont	-	-	-	-
スズメノテッポウ	SEI-1	-	+	+++	+++
	Cont	-	-	-	-
スズメノカタビラ	SEI-1	-	+++	+++	+++
	Cont	-	-	-	+
カラスノエンドウ	SEI-1	-	++	+++	+++
	Cont	-	-	-	+
ホトケノザ	SEI-1	-	+	+++	+++
	Cont	-	-	+	+++
オオイヌノフグリ	SEI-1	-	+++	+++	NT
	Cont	-	+	+++	NT

【0080】表9から明らかなように、SEI-1株の噴霧接種により大部分の冬雑草に置いて効果が見られた。すなわち、無処理では、3時間の低温接触（-5℃）でもほとんど影響を受けないが、SEI-1株の接種により30分程度の接触時間でも甚大な被害（霜害）が誘導された。一部の雑草では、もともと低温に敏感なものも見受けられた。

果の増進は確認できなかった。また、化学除草剤の混合によって氷核活性細菌による霜害誘導効果は減少しなかった。

【0076】〔実施例10〕各種氷核活性細菌によるイヌムギの霜害誘導

SEI-1株以外の氷核活性細菌（*Pseudomonas syringae* Mei40株及びNi23株、*Erwinia ananas* Mei40株及びTM2株）においても同様の効果が認められるかどうかを確かめるために、各種氷核活性細菌の生菌（濃度 10^8 /mL）を噴霧器でイヌムギに散布し、-5℃で10分間又は30分間接触させた後、温室に移し、霜害被害率を観察した。得られた結果を表8に示す。

【0077】

【表8】

を知るため、細菌液（ 10^8 /mL）を各種植物に噴霧し、-5℃に所定時間接触させ、その後、戸外（自然温度）に置き、霜害被害率を評価した。なお、対照として蒸留水を噴霧したものを用いた。得られた結果を表9に示す。

【0079】

【表9】

〔実施例12〕SEI-1株の氷核活性機能による有用植物の霜害誘導

SEI-1株を散布した場合の有用植物への被害程度を知るため芝及び代表的な冬作物であるコマツナに対する霜害被害率を評価した。得られた結果を表10に示す。

【0081】

【表10】

植物名	処理	-5℃での処理時間(分、時間)					
		0m	10m	30m	1h	2h	3h
芝(高麗芝)	SEI-1	-	-	-	-	-	-
	Cont(DW)	-	-	-	-	-	-
コマツナ	SEI-1	-	-	+	+	+	+
	Cont(DW)	-	-	-	+	+	+

【0082】表10から明らかなように、芝(高麗芝)は極めて低温に耐性であり、SEI-1株の影響もほとんど現れなかった。一方、コマツナも冬雑草等に比べて、強い耐性を持ち、軽微な被害であった。このように有用作物の種類によっては影響の小さいものが見出された。

〔実施例13〕氷核活性細菌(SEI-1株)の製剤化を目的とした各種吸着保護剤の評価検定

氷核活性細菌(SEI-1株)の懸濁液(3.3×10^8 /ml)に下記の各種吸着保護剤を6~10%加えてよく攪拌した。約1時間静置することにより氷核活性細菌を吸着保護剤に吸着させた後、遠心処理(5000rpm、15min)して上清を除いた。次いで、22℃の恒温器に1週間保ち、試料水溶液を徐々に自然乾燥で蒸発させ、1日程度自然乾燥させることによって乾燥固化状態とした。

【0083】なお、吸着保護剤として用いたゼラチンはDIFCO社製、シリカゲルはMERCK製商品名Kieselgel 60(70-230 mesh ASTM)、スキムミルクはDIFCO社製のものである。フィブロイン粉末は次のように調製した。家蚕絹

糸を95%の0.2%炭酸ナトリウム水溶液で精練して絹フィブロイン繊維を得た後、これを臭化リチウム水溶液に入れ55℃で30分かけて溶解した。これをセルロース透析膜に入れ、純水と置換して絹フィブロイン水溶液を調製した後、-30℃で一旦凍結させたものを減圧乾燥することで粉末状の絹フィブロインを調製した。セリシン粉末は、家蚕繭糸を蒸留水に入れて煮沸し、繭糸表面を覆っているセリシンを除去した後、水溶液を凍結乾燥して調製した。

【0084】氷核活性細菌を吸着した保護剤の氷核活性能は次のようにして検定した。乾燥状態の試料に乾燥前と等量の殺菌蒸留水を加えてよく攪拌した。これを原液として、10倍階段希釈液を作製した。これらを-5℃で30分間接触させ、どの希釈濃度まで氷結するか否かを判別することによって氷核活性能の強弱を判定した。得られた結果を表11に示す。

【0085】

【表11】

吸着保護剤	再融解後の希釈倍数(対数表示)					
	0	1	2	3	4	5
フィブロイン粉末(6%)	+	+	+	+	+	-
ゼラチン(6%)	+	+	+	+	+	-
シリカゲル(6%)	+	+	-	-	-	-
セリシン粉末(6%)	+	+	-	-	-	-
スキムミルク(6%)	+	+	+	-	-	-
スキムミルク(10%)	+	+	-	-	-	-
S(6%)+F粉末(4%)*	+	+	+	+	+	-
蒸留水	+	+	-	-	-	-

*Sはスキムミルク、Fはフィブロインを示す。

【0086】表11から明らかなように、対照区として用いた蒸留水区では氷核活性維持最大希釈倍率が10であるのに対し、絹フィブロイン粉末及びゼラチンの氷核活性維持能力は、対照区の1000倍の能力(希釈倍率1000)を示した。一方、セリシン、シリカゲルや従来から細菌の凍結又は凍結乾燥用の媒体としてよく用いられるスキムミルクでは、ほとんど吸着効果、保持効果又は高品質の特性維持効果は認められなかった。なお、これとは別に行った凍結処理実験においては、スキムミルクは高い保護能力を示した。これらの事実から、絹フィブロイン粉末及びゼラチンは氷核活性細菌の乾燥粉末作成の吸着保護剤として優れた能力を有していることが明らかになった。

【0087】

【発明の効果】本発明により、セイタカアワダチソウを

防除し得る微生物除草剤が提供される。また、特に、シユードモナス・シリング SEI-1株を用いる場合には、セイタカアワダチソウを選択的に防除し得る。また、本発明により、氷核活性を有する微生物を利用した微生物除草剤が提供される。特に、氷核活性を有するとともに植物に病原性を示す微生物を利用すれば、より効率のよい除草効果が得られる。氷核活性を有する微生物を利用した除草剤は、自然界における作用をそのまま使用するため、環境への負荷が少なく、他の生物に対し薬害を起ささない。このように氷核活性を有する微生物を利用した除草剤は、環境負荷が少なく、安全性が高いという特徴があり、かつ経済的であるという経済的なメリットがある。氷核活性を有する微生物の製剤化には、氷核活性を安定かつ高レベルに維持するための保護剤として、ゼラチンや絹フィブロインを利用できる。こうした保護剤を

使用することにより、目的とする微生物の特性（本発明の場合は氷核活性）を安定かつ高レベルに維持した状態で製剤化することが可能となる。さらに、本発明により、これらの微生物除草剤と化学除草剤とを含有する除

草剤が提供される。これによって、化学除草剤の使用回数及び使用量を軽減化することができ、環境保全に貢献できる。

フロントページの続き

(56)参考文献 特開 昭58 - 122020 (J P , A)
特開 昭59 - 98627 (J P , A)
特開 昭60 - 102186 (J P , A)
特開 平 5 - 115223 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl.7, D B名)

A01N 63/00
A01N 25/00
A01N 25/04
A01N 25/06
A01N 25/10
A01N 25/22
A01N 25/24
C12N 1/20