

农用抗生素11874筛选及应用 研究资料汇编

新疆农科院微生物研究所

一九八五年三月

前 言

禾谷类作物黑穗病是自治区主要病害之一，只小麦腥黑穗病危害面积就达600多万亩，每年损失小麦达1亿多斤。高粱和玉米黑穗病也普遍发生，除造成大量粮食减产外，还降低了粮食品质及秸秆的饲用性。过去多采用赛力散等汞制剂农药防治此病，由于其毒性大，残留量高，污染环境，造成公害被淘汰。寻找高效低毒，无残毒的农药已是粮食生产之所急。

农用抗生素11874于1979年被筛选出来，经过理化性质及毒性等试验研究，证明农用抗生素11874属无公害农药之列。由自治区各地农业科研部门通力协作，先后进行了3万余亩药效试验示范。用种子重量8%的药液闷种4小时，防治小麦腥黑穗病等种传病害效果达90%以上，有显著的增产作用，1983年10月通过了科研成果鉴定。

为贯彻“科学研究要面向经济建设，经济建设要依靠科学技术”的方针，尽快把科研成果变成生产力，为自治区粮食生产多做贡献。在各协作单位共同努力下，1984年农用抗生素11874在自治区各地共示范推广12万余亩，获得了较好的经济效益及社会效益。由于粮食生产的需要，自治区各地纷纷来信索取有关农用抗生素11874的特性及应用效果资料。为了满足用户的需要，互通情报，特将1979年以来有关农用抗生素11874筛选及应用研究，1984年各地示范推广等资料汇编成册，供各地参考。

编者 1985年3月

目 录

- 1、农用抗生素11874产生菌的鉴定.....徐长伦等 (1)
- 2、抗生素11874分离与鉴别.....徐长伦等 (5)
- 3、抗生素——放线酮 (综述)徐长伦 (7)
- 4、抗生素11874生产工艺条件初步摸索.....徐长伦等 (10)
- 5、防治小麦等禾谷类作物黑穗病抗生素筛选及研制课题进展简介
.....微生物所农抗研究室 (13)
- 6、农抗11874防治小麦腥黑穗病药效试验初报.....微生物所农抗研究室 (15)
- 7、农抗11874防治小麦腥黑穗病田间药效试验初报.....
.....微生物所农抗研究室 (21)
- 8、农用抗生素11874防治高粱茎黑穗病示范试验报告.....
.....徐长伦 贾国筠等 (23)
- 9、抗生素11874防治小麦等禾谷类作物黑穗病大面积试验示范总结.....
.....徐长伦等 (25)
- 10、防治高粱茎黑穗病试验总结.....吐鲁番县农技站 (37)
- 11、农抗11874防治小麦腥黑穗病示范试验总结.....
.....奇台县农技站植保组 (40)
- 12、农抗11874防治小麦腥黑穗病小区试验小结.....侍泰山 (45)
- 13、农抗11874防治高粱散黑穗病大面积示范试验小结.....
.....玛纳斯县农技站植保组 (47)
- 14、农抗11874防治小麦腥黑穗病大面积示范总结.....
.....塔城地区协作组 (49)
- 15、11874防治玉米及高粱黑穗病试验小结.....塔城地区农科所 (54)
- 16、农抗11874防治小麦腥黑穗病试验总结.....塔城县农技站 (57)
- 17、农抗11874防治冬小麦腥黑穗病大面积示范试验小结.....
.....玛纳斯县农技站 (58)
- 18、农抗11874防治小麦腥黑穗病试验初报.....刘志裕 刘新明 (59)
- 19、农抗11874防治小麦腥黑穗病大面积试验示范报告.....
.....哈密地区植保站 (60)
- 20、农抗11874防治小麦腥黑穗病小区试验小结.....王集锦 (62)
- 21、农抗11874防治小麦腥黑穗病示范试验总结.....奇台县农技站 (64)

22、农抗11874防治禾谷类黑穗病试验示范总结.....	
.....塔城地区农抗11874推广协作组 (67)	
23、农抗11874防治小麦腥黑穗病试验示范总结.....	新源县农技站 (75)
24、农抗11874防治高粱坚黑穗病小区及大面积试验效果总结.....	
.....托克逊县农技站 (77)	
25、农抗11874防治小麦腥黑穗病试验总结.....	严文彬 (82)
26、农抗11874防治玉米瘤黑粉病试验情况汇报.....	乌什县农技站 (83)
27、11874, 769防止高粱坚黑穗病效果调查.....	贾国筠 (85)
28、农用抗生素11874防病示范推广 (1984课题总结)	
.....农科院微生物研究所 (87)	
29、农抗11874示范推广总结.....	汪振东 (90)
30、农抗11874防治小麦光腥黑穗病效果初报.....	蔡雪强 (92)
31、农抗11874对小麦腥黑穗病防治效果总结报告.....	严文彬 周立全 (98)
32、农抗11874防治小麦腥黑穗病和高粱坚黑穗病技术推广总结报告	
.....哈密地区农抗11874推广协作组 (100)	
(85) 塔城地区农抗11874推广协作组.....	01
(78) 塔城地区农抗11874推广协作组.....	11
(01) 塔城地区农抗11874推广协作组.....	31
(28) 塔城地区农抗11874推广协作组.....	61
(71) 塔城地区农抗11874推广协作组.....	81
(01) 塔城地区农抗11874推广协作组.....	81
(16) 塔城地区农抗11874推广协作组.....	81
(78) 塔城地区农抗11874推广协作组.....	81
(85) 塔城地区农抗11874推广协作组.....	81
(93) 塔城地区农抗11874推广协作组.....	81
(08) 塔城地区农抗11874推广协作组.....	81
(28) 塔城地区农抗11874推广协作组.....	81
(19) 塔城地区农抗11874推广协作组.....	81

农用抗生素“11874”产生菌的鉴定

徐长伦 王振兰 王庚元
(新疆农业科学院微生物研究所, 乌鲁木齐)

胡润茂
(四川抗菌素工业研究所, 成都)

从我国江西省井冈山地区的土壤中, 分离得到一株拮抗性放线菌11874, 它所产生的抗生素(农抗“11874”)对小麦腥黑穗病有较好的防治效果。通过形态、培养特征、生理生化特性及细胞壁组份的研究, 证明该菌株为链霉菌属中的一个新变种, 定名为不吸水链霉菌井冈山变种。

材料与方法

(一) 材料

11874菌株系从江西省井冈山地区的土壤中分离得到。

(二) 方法

采用链霉菌分类工作中一般常规方法和埋片、插片法。链霉菌鉴定通常使用的培养基和国际链霉菌计划(ISP)推荐的培养基。孢子表面形态观察系先将菌悬液制网, 然后用透射电镜进行。

结 果

(一) 形态特征

气丝生长良好, 分枝, 直径 $0.5\sim 1.2\mu\text{m}$ 。孢子丝波曲或具松紧两种螺旋形, 1~8圈, 一般4~6圈。紧螺旋形的孢子丝多于松螺旋形的, 且到后期螺旋更加密, 以致成团。孢子链含孢子10~50个或更多, 孢子呈不规则棱形, 表面有细刺, 大小为 $0.5\sim 0.8\times 0.6\sim 1.2\mu\text{m}$ 。基丝直径 $0.6\sim 1.0\mu\text{m}$, 48小时后开始分隔, 观察25天未见断裂。

(二) 培养特征

除在察氏琼脂上生长贫乏外, 在表1中另外的10种培养基上均生长丰茂, 长绒状, 白色变为苏木紫灰、中红灰、烟红灰或鼠背灰, 多有成片白色花斑和白色次生菌落。基丝淡黄至凋叶棕。可溶性色素无或淡黄至棕黄色(表1)。

(三) 生理生化特性

液化明胶, 胨化但不凝固牛奶, 水解淀粉, 在纤维素上不生长。能利用葡萄糖、L-阿拉伯糖、D-果糖、蔗糖、L-肌醇和甘露醇, 不利用D-木糖、L-鼠李糖和棉子

表 1 11874菌株的培养特征

培养基	基 丝	可溶性色素
克氏一号琼脂	生长好，绒状，白至烟红灰或鼠背灰，有成片白色次生菌落	象牙黄至淡蛋黄 蚌肉白、木瓜黄至凋叶棕
高氏一号琼脂	生长好，长绒状，白、淡红灰、鼠背灰，有成片白色次生菌落	淡蛋黄至蜜黄 鸚鵡冠黄，初熟杏黄
察氏琼脂	生长贫乏，绒状，白色	薄，无色 无
无机盐淀粉琼脂	生长好，绒状，白至淡红灰或鼠背灰，有成片白色次生菌落	淡肉色，鹿角棕 浅甘草黄，鹿角棕
甘油苹果酸钙琼脂	生长好，绒状，白、玫瑰灰、鼠背灰，有白色次生菌落	蜜黄、淡桔橙至浅凋叶棕 玫瑰粉、浅金莺黄至浅凋叶棕
甘油天门冬素琼脂	生长好，绒状，白、苏木紫灰、中红灰，有白色次生菌落	炒米黄至甘草黄 无或浅甘草黄
葡萄糖天门冬素琼脂	生长好，绒状，白至苏木紫灰或烟红灰，有白色次生菌落	乳白、淡蛋黄至沙石黄 茉莉黄，浅沙石黄
酪氨酸琼脂	生长好，绒状，乳白至鼠背灰或烟红灰，有白色次生菌落	茉莉黄至淡蛋黄 无或浅鸚鵡冠黄
葡萄糖酵母膏琼脂	生长好，绒状，白色至乳白色，日久微着灰白色	鹅掌黄、虎皮黄至风帆黄 浅风帆黄
燕麦粉琼脂	生长一般，薄，绒粉状，白至晓灰，有白色次生菌落	浅驼色至槟榔棕 淡赭
马铃薯块	生长好，厚，绒状，白至浅中红灰、烟红灰或白微染淡紫色	杏仁黄、淡蛋黄、浅沙石黄 象牙黄、桂皮淡棕至山鸡褐

* 《色谱》，科学出版社，北京，1957年。

表 2: 11874菌株与不吸水链霉菌培养特征的比较

培养基	11874菌株	不吸水链霉菌508
克氏一号琼脂	气丝白至烟红灰、鼠背灰、有白色次生菌落，呈花斑状；基丝象牙黄至淡黄；可溶性色素蚌肉白、木瓜黄、日久凋叶棕	气丝白变为百灵鸟灰；基丝浅黄至黄色；可溶性色素淡黄至黄色
高氏一号琼脂	气丝白、淡红灰、鼠背灰，有白色次生菌落，呈花斑状；基丝淡黄至蜜黄；可溶性色素鸚鵡冠黄至初熟杏黄	气丝生长丰茂，绒状，褐灰至灰褐；基丝浅黄；可溶性色素浅黄，出现迟
察氏琼脂	气丝生长贫乏，白色；基丝薄，乳白；无可溶性色素	气丝薄，微灰色，基丝薄，无色，无可溶性色素
葡萄糖天门冬素	气丝白色变为苏木紫灰，有白色次生菌落，呈花斑状；基丝乳白、淡黄、沙石黄；可溶性色素茉莉黄、浅沙石黄	气基生长丰茂，绒状，褐灰至灰褐；基丝浅黄；可溶性色素无或浅黄；
马铃薯块	气丝白变为浅中红灰、烟红灰或白微染淡紫色；基丝杏仁黄、淡黄、浅沙石黄；可溶性色素象牙黄、桂皮淡棕、山鸡褐	气基生长丰茂，厚绒状，褐灰，有白色次生菌落；基丝无色或微黄；可溶性色素无或淡黄褐，薯块略变褐色

糖。NaCl 3%可生长，7%生长可疑，10%不生长。抗酸性染色负。

(四) 细胞壁组份

含L-二氨基庚二酸、谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸、谷氨酰胺。无特异性糖，仅含有微量葡萄糖、甘露糖和核糖，细胞壁组份I型。

(五) 拮抗性

28°C培养5~7天的摇瓶发酵液对大肠杆菌、变形杆菌、白色假丝酵母有抑制作用，并对小麦腥黑穗病有较好的防治效果。

(六) 菌种鉴定

11874菌株细胞壁组份I型，基丝分隔，但不断裂，应归入链霉菌属。它与该属已知近似种——不吸水链霉菌比较，差异明显。前者在多种培养基上气丝呈苏木紫灰、中红灰、烟红灰或鼠背灰，长绒状，多有成片的白色花斑或次生菌落，而后者则呈灰、褐灰或灰褐色。前者孢子丝螺旋比后者的短，且日久更紧密，以致成团。此外，前者基丝分隔，在苹果酸钙琼脂上产生玫瑰粉色色素。利用阿拉伯糖，不凝固牛奶。11874菌株

承中国科学院微生物研究所阎逊初教授、张国伟同志指导、审定，邢桂香同志帮助，技术室摄制电镜照片，特此一并致谢。陈一峰、杨秀芳、李生芳、李玉国、金湘等同志参加部分技术工作。

抗生素11874分离与鉴别

徐长伦 王振兰

新疆农科院微生物研究所

龚炳永

中国科学院上海药物研究所

不吸水链霉菌井岗山变种在黄豆饼粉葡萄糖培养基中发酵。滤液经薄膜浓缩醋酸乙酯提取硅胶柱层析,分离到对清酒酵母和小麦光腥黑穗病菌等病原真菌具有强烈抑制活性的抗生素11874。经紫外吸收光谱、红外吸收光谱、 ^1H -核磁共振谱及质谱等理化性质的研究。鉴别为放线酮,与文献报导过的环己酰亚胺和抗菌素GF-455等为同一物质。经过多年田间大面积防病试验,抗生素11874对小麦腥黑穗病,高粱坚、散黑穗病及玉米瘤黑粉病等均有很好的防治效果。其防治禾谷类作物黑穗病等种传病害是一种很有前途的生物农药。本文报导抗生素11874的分离与鉴别。

实 验 结 果

一、发酵:

发酵培养基配方(%):黄豆饼粉3.0,淀粉3.0,葡萄糖1.0,酵母粉0.5,磷酸二氢钾0.05,氯化钠0.3,消沫油1.5,PH7.5,发酵周期80小时,用清酒酵母作生物检定试验菌。

二、分离与纯化:

抗菌活性部分主要存在于发酵液中。发酵完毕用酸调PH到4左右。板框压滤,再将滤液用碱回调到PH7.0,薄膜浓缩,用醋酸乙酯提取。减压浓缩至小体积,加入少量丙酮,转溶于水中。再用氯仿提取,减压浓缩呈棕红色糖浆状物。

糖浆状物用硅胶H柱层析,氯仿-丙酮(9:2),氯仿-正丙醇(15:1)依次洗脱,分部收集,活性部分合并,减压浓缩,得淡黄色油状物,用硅胶GF薄层层析,以多种溶剂系统展层,均呈单一斑点,证明为单一物质,在醋酸异戊酯-石油醚中,于4°C冰箱中析出无色板状至矩形棱柱状微晶。

三、理化性质:

1.薄层层析:抗生素11874以硅胶GF薄层层析,用氯仿-正丙醇(15:1)展层, $R_f=0.45$;用醋酸乙酯-苯(1:1), $R_f=0.32$ 。

2.溶解性:抗生素11874溶于甲醇、乙醇、丙酮、正丁醇、醋酸乙酯,氯仿、苯、正丙醇和水;难溶于石油醚和四氯化碳;不溶于正己烷。

3. 光谱测定：抗生素11874的乙醇溶液无紫外特征吸收峰，仅在220~232微米处有一平肩。其0.1NHCL—甲醇溶液在241微米左右，呈一吸收高峰。

红外吸收光谱显示环己酰亚胺（放线酮）的特征吸收，

¹H—核磁共振谱及质谱显示环己酰亚胺特征。

讨 论

将实验所得结果与同类抗生素作比较如下：

理化性质 项目	11874	环己酰亚胺	GF—455
溶解性	溶于一般有机溶剂及水	同 前	同 前
紫外吸收光谱	末端吸收	同 前	同 前
红外吸收光谱 (Cm^{-1})	3470, 3230	3470, 3130	3550, 3200
	2930, 1700	2900, 1695	2950, 1700
	1380, 1265	1389, 1265	1450, 1290
	1150, 870	1137, 875	1150, 840
分子量	830, 620	820	450
	281(质谱法)	254(樟脑法)	280.4(樟脑法)

从上表以及抗生素11874的紫外和红外吸收光谱的特征可以认为此抗生素是成二酰亚胺类的环己酰亚胺（放线酮）。对其质谱和¹H—核磁共振谱的分析。证实此抗生素与环己酰亚胺为同一物质。

参考文献7篇（略）

抗生素—放线酮(综述)

徐 长 伦

(新疆农科院微生物研究所)

放线酮又称环己酰亚胺,属戊二酰亚胺类抗生素。是Whiffen等于1946年发现的抗真菌抗生素,Leach于1947年首先由不吸水链霉菌中分离得到。它对多种酵母型真菌以及植物病原真菌有抑制作用,并发现它对啮齿类动物有驱避作用。迄今放线酮在国外主要用于防治蔬菜、果树真菌病害,粮食、商品及电缆防鼠咬以及作为生化试剂等。我国独创用放线酮防治茶树真菌病害取得良好效果,并在防治小麦、水稻、谷子、棉花、甘薯及苹果、梨、柑桔、黄花、蕃茄、红麻、橡胶等粮油、果蔬作物的真菌病害方面取得了很大进展。

近年来由其他放线菌也先后发现了放线酮及其异构体或其类似物。国外文献上报告者已有异放线酮、奈良霉素B.673、链菌生素A、B、C、D、钝酮素、放线菌酚、原虫霉素、链霉戊二酰亚胺、新露霉素、抗菌素E—73、杀酵母菌素、戊二霉素等。我国放线酮产生菌分布颇广。中国科学院上海药物研究所于1957年发现制霉菌素产生菌S.A—94在产生制霉菌素同时,还产生一种异放线酮。1965年又分离到产生放线酮的链霉菌GF—455。

一、放线酮的主要理化性质

1. 熔点: $116\sim 117^{\circ}\text{C}$
2. 分子式: $\text{C}_8\text{H}_8\text{NO}_2$
3. 分子量: 281
4. 结构式(略)
5. 溶解性: 溶于低级醇、丙酮、氯仿、乙酸乙酯、乙酸异戊酯、乙醚、苯等有机溶剂及水,不溶于环己烷、石油醚和四氯化碳。
6. 旋光度 $[\alpha]^{20}_D$: -3.1° (甲醇), $+8.6^{\circ}$ (水)、 -29° (氯仿)。
7. 稳定性: 干燥结晶放置八年,生物活性未减。不怕光、耐热、稳定性大。在 60°C 时放50周后活力尚保持81%。水溶液在PH4左右最稳定。加热 87°C 10小时后,活力不损失。碱性下不稳定,易失效。
8. 颜色反应: Fearon—Mitchell反应呈亮兰色,氧肟酸—三氯化铁反应呈紫红色,间苯二酚—盐酸反应呈玫瑰色,与2,4—二硝基苯肼呈正反应,ninhydrin、Fehling Molisch、Sa Koguchi、 FeCl_3 及浓硫酸呈阴性反应。

9. 紫外吸收光谱: 无特征吸收峰,只在233~287mu处有一平肩。

二、毒性: 各种动物差异较大,

急性毒性LD50 (mg/kg) :

LD50 (mg/kg)	小白鼠	豚鼠	大鼠	狗	猴子	猫	兔子
口服	133—375	65	25	80	60		
血管注射	190—190.5		2				18
皮下注射	160		2.5				
腹腔注射	122.2	60				4	

慢性毒性试验：猴子0.6mg/kg二个月无病情发现，大白鼠0.09mg/kg可忍受。

对皮肤有刺激性，如有红肿则以肥皂水冲洗可消除。

解毒剂：羟豆基可的松或甲氧基非那明有解毒作用。

三、抗菌作用：放线酮对细菌抑制活性比较低，几乎无任何抑制作用，对真菌抑制作用大，特别对许多酵母菌有较强的抑制作用。22株啤酒酵母菌在0.04~0.08r/ml有抑制作用；但在100r/ml浓度下对假白色丝酵母等无抑制作用，对菌丝型真菌抑制能力也比较弱。33属植物致病真菌中，100单位范围内可以完全抑制；Rhizctonia等于1r/ml时可以完全抑制。放线酮对酵母作用于铜离子存在下，抑制能力增加0.5~2倍。某些原虫及藻类对放线酮敏感。

四、作用原理：主要是阻止呼吸，影响营养吸收，阻止蛋白质及核酸的合成，但对酵母的作用可能不是影响能量代谢，而是抑制蛋白质合成，特别是干扰核酸蛋白的生物合成。

五、内吸作用：小麦苗喷后五周内叶部均有放线酮存在，经纸层析与原来放线酮一样。

黄瓜作叶部喷射处理，次叶中含量比较高，根次之，叶、茎抽出液中比较少。60ppm作根部上行内吸试验结果，茎叶最高达64ppm，根次之，16ppm，胚轴最少，含量只有7ppm。

白皮松基干部位喷射放线酮后，树皮中可达1.1ppm，二年后尚有微量活性，喷后可向针叶传送。

六、放线酮在农业上的应用：放线酮在农业上的应用已多年，Ford等1958年已作过系统总结，佳木谕介对日本生产的放线酮于农业上应用问题也作过讨论，其应用范围很广，现略举例如下：

1.小麦锈病：早年在墨西哥田间试验，以50ppm放线酮处理，对病斑有减少现象而引起注意。

小麦秆锈病用20~50ppm喷射可减少发病，但其它抗生素则完全无效。由于放线酮

的内吸很强,而引起大家不断注意。用放线酮缩氨脲或脲衍生物喷射后,使小麦获得对锈病的“免疫”性。早期完全可以免除其感染,其中以脲衍生物最有效。放线酮喷射后经小麦吸于体内保留期为40天,药力至少可保留30天。放线酮于植株内部并不引起其结构上的改变,内吸后从植物组织中重新分离出的有效部分与原来样品相同。

2.小麦黑粉病: 0.5~1%种子处理,全部抑制种子所带的病源菌。

3.豆类白粉病以5ppm浓度作种子处理,完全可以控制发病。

4.苹果锈病: 40ppm喷射可免除病害发展。

5.燕麦枯萎病放线酮控制发病有效。

6.樱桃叶斑病: 应用浓度1~2ppm。

7.烟草病毒: 放线酮的醋酸盐脲或缩氨脲衍生物于很低浓度下可以抑制病毒感染。

8.松苞锈病: 美国白皮松用放线酮150ppm(石油稀释)作树杆喷射,400万株规范试验,效果良好,树干病菌消灭。

9.其他: 放线酮对水稻黄化萎缩,洋葱等霜霉病、菊花锈病等均有效,同时尚可作为鼠类忌避剂。

主要文献六篇略

参考文献二

1. 放线酮二甲基脲衍生物对小麦黑粉病的防治效果

2. 放线酮二甲基脲衍生物对小麦白粉病的防治效果

3. 放线酮二甲基脲衍生物对小麦锈病的防治效果

4. 放线酮二甲基脲衍生物对小麦枯萎病的防治效果

5. 放线酮二甲基脲衍生物对小麦黄化萎缩病的防治效果

6. 放线酮二甲基脲衍生物对小麦霜霉病的防治效果

7. 放线酮二甲基脲衍生物对小麦病毒病的防治效果

8. 放线酮二甲基脲衍生物对小麦炭疽病的防治效果

9. 放线酮二甲基脲衍生物对小麦根腐病的防治效果

抗生素11874生产工艺条件初步摸索

(新疆农科院微生物研究所)

1981年以来,随着防病试验示范面积的扩大,抗生素11874从摇瓶生产转到发酵罐深层发酵生产,初步摸索出生产工艺条件如下。

一、生产用孢子制备

1.菌种名称:生产用菌种系本所筛选的不吸水链霉菌井冈山变种,用砂土管保存。

2.斜面孢子制备:将孢子斜面培养基采用天门冬素琼脂或者高氏1号琼脂,调PH7.5,分装于试管中,1公斤/厘米²灭菌25分钟,取出后摆成斜面,37℃空白培养两天,证明无菌方可使用。

3.生产用种子制备:

砂土管孢子 $\xrightarrow[28^{\circ}\text{C}]{8-10\text{天}}$ 第一代斜面孢子 $\xrightarrow[28^{\circ}\text{C}]{8-10\text{天}}$ 第二代斜面孢子(生产用)从第一代

斜面孢子移接到第二代孢子斜面上时,采用单菌落挑选接种。第二代孢子经过摇瓶发酵证明合格方能投入生产用。在4℃冰箱中可保存半月到一个月。

4.摇瓶种子制备:

(1)培养基配方(%):黄豆饼粉2,葡萄糖4,酵母粉0.5,氯化钠0.2,碳酸钙0.4,PH7.5,1公斤/厘米²高压蒸汽灭菌30分钟。

(2)摇瓶种子培养条件:接种量为1厘米²面积的斜面孢子,旋转式摇瓶机,220转/分钟;装量100~150毫升/500毫升三角瓶;培养温度:28℃±1;通气条件:采用棉塞;培养时间:22小时左右;质量要求:镜检菌丝分枝多,呈网状,美兰染色深,原生质无凝聚,无杂菌污染。

二、发酵

抗生素11874的生产采用二级发酵。

1、种子罐及发酵罐培养基配方(%);

种子罐:黄豆饼粉3,淀粉3,葡萄糖1,酵母粉0.5,磷酸二氢钾0.05,氯化钠0.1,碳酸钙0.3,消沫油1左右。

发酵罐培养基配方同种子罐。

2.配料方法:将所用各原料按量称好,直接加入罐内,用冷水配制,开动搅拌器搅匀。500立升种子罐装料量为150~200立升;2300立升发酵罐装料量为1200~1300立升。

3.种子罐和发酵罐消毒方法:进料前空消一次,进料后再实消一次,蒸汽压力1~1.5公斤/厘米²,消毒时间45分钟至1小时。

4. 种子生长和发酵条件:

种子罐: 接种量1%左右。罐温 $28^{\circ}\text{C} \pm 1$, 罐压 $0.3 \sim 0.5$ 公斤/厘米², 通气量 $1:0.5 \sim 1\text{v}/\text{v}/\text{m}$, 生长周期24小时左右; 质量要求: 镜检菌丝大量繁殖, 成网状, 美兰染色深, 无空泡产生或只有少量小空泡产生, 无杂菌污染。

发酵罐: 接种量 $10 \sim 15\%$, 罐温 28 ± 1 , 罐压 $0.3 \sim 0.5$ 公斤/厘米², 通气量 $1:0.5 \sim 1\text{v}/\text{v}/\text{m}$, 生长周期48小时左右。

三、化验

1. 生化项目: 实消后接种前取样, 化验培养基的基础氮态氮, 还原糖及PH值。接种后每隔6小时取样化验一次, 直到放罐为止, 观察变化规律。

2. 生物学项目: 取样次数同上。每次取样先用显微镜检查有否杂菌污染, 然后分别用肉汁酚红指示培养基, 牛肉膏蛋白胨琼脂检查无菌及生长情况。

四、放罐指标

1. 镜检菌丝量多, 生长停滞, 菌丝从网状逐渐分散, 有少量菌丝断裂; 原生质高度凝聚, 空泡大; 菌丝美兰染色淡。直观培养基粘稠。

2. 氮态氮由大量消耗到回升, PH由6.4回升到7.0~7.5。

3. 残糖为 $0.1 \sim 0.3\%$,

4. 抑菌活性最大, 原液抑菌圈直径达18毫米左右。

五、后处理

1. 发酵完毕加草酸调PH4, 加热 60°C 保温半小时。

2. 板框压滤机压滤。

3. 滤液加 0.3% 苯甲酸钠防腐。

4. 分装: 注明抗生素名称, 生产批号, 使用浓度及重量等。

因条件设备短缺, 目前只能批量生产发液原液。待完善设备后, 可生产浓缩液或粉剂。

六、使用浓度测定

1. 材料及方法: (1) 试验菌: 高粱坚黑穗病原菌。 (2) 培养基: 2% 水琼脂。
(3) 测定方法: 滤纸片平板法。

2. 简单操作: (1) 药液稀释: 将抗生素11874发酵原液分别用水稀释成5至20倍。

(2) 平板制作: 将水浴溶化的水琼脂倒入平皿中, 凝固即成。直径为90毫米的平皿加量为7毫升。(3) 接试验菌: 用喷头喷雾器将试验菌均匀喷散在水琼脂平板上。(4) 加药液: 用直径6毫米的普通滤纸片沾取各稀释液每皿各放一块, 至少重复3次。(5) 将平皿放置 $25 \sim 28^{\circ}\text{C}$ 下培养24小时。

3. 结果观察: 在显微镜下用标尺测量孢子没有萌发的透明圈直径(即抑菌圈大小), 无显微镜用直尺量取亦可, 结果表明抑菌圈大小与稀释倍数成反比例, 与浓度成正比例。

在没有制备出抗生素11874标准品之际,用滤纸片平板法测定其应用浓度还是可行的。但它不能说明防病有效浓度的确切单位。待以后继续工作完善之。

行的,但它不能说明防病有效浓度的确切单位。待以后继续工作完善之。

防治小麦等禾谷类作物黑穗病抗生素

筛选及研制课题进展简介

新疆农科院微生物所农抗室

一九七九年十月九日

我区近年小麦等禾谷类作物黑穗病日趋严重。每年有六百万亩小麦受到危害。轻则减产1~5%，重则减产70~80%，个别地块颗粒无收，产量损失达1亿多斤。吐鲁番地区高粱坚黑穗病和丝黑穗病也较严重，一般年份可减产30%左右。鉴于化学农药供不应求，且污染环境造成公害。因此筛选及研制高效、低毒、无残毒之生物农药是粮食生产当务之急，对保护环境及人、畜安全也具有重要意义。

一、农用抗菌素筛选流程

土壤采集→分土挑菌→摇瓶发酵→初筛→复筛→田间试验→分离提纯→物质鉴别。

二、材料及方法

(一) 土壤采集：土壤是微生物的大本营。77年夏及78年秋从本区和我国南方各省先后采集土壤样品共374个。样品取自5~20厘米的耕作层及表土，装入灭菌牛皮纸袋，室温风干备用。

(二) 分土挑菌：由资料所知，在由微生物产生的抗菌素中，由链霉菌属产生的抗菌素占90%以上，因此我们将此属菌做为挑取对象。

分土采用高氏1号和黄豆饼粉葡萄糖培养基。用土样悬液表面接种及混土法接种。将平皿置于28°C下培养5~7天，将放线菌菌落挑在高氏1号培养基斜面上。在28°C下培养7~10天后备用。

(三) 摇瓶发酵：选用黄豆饼粉葡萄糖培养基。旋转式摇瓶机每分钟转数230次。将放线菌纯培养接种后，于28°C下振荡培养4天左右。发酵完毕用60°C水浴处理30分钟，过滤后备用。

(四) 初筛：以高粱坚黑穗病菌 (*Sphacelotheca Corgi*) 孢子为微生物模型。用喉头喷粉器将其均匀喷布在水洋菜平板上，用滤纸片(直径6mm)沾取少许发酵滤液置于平板上。于20~25°C下保湿培养20小时左右。选择抑菌圈清晰，直径大于10mm以上者。

(五) 复筛：以小麦光腥黑穗病菌 (*Tilletia Foetida*) 孢子为微生物模型，将初筛入选菌株进一步过筛。操作方法同初筛，最后将平板置于10~15°C下保湿培养3天，即可观察。选择抑菌圈清晰，直径大于15mm者。

(六) 田间试验：将在实验室中筛得的拮抗菌株拿到大自然条件下加以考验，这是筛选新农抗的可靠办法。

供试材料：当地春小麦易感品种——喀什白皮和大头麦。参加试验菌株为复筛选留