

JINGGANG MEISU

井冈霉素

上海市农药研究所农用抗菌素组编

455
30-4

上海人民出版社

井冈霉素

上海市农药研究所农用抗菌素组编

上海人民出版社

井冈霉素

上海市农药研究所农用抗菌素组编

上海人民出版社出版

(上海绍兴路5号)

新华书店上海发行所发行 上海市印刷六厂印刷

开本 787×1092 1/32 印张 5.375 字数 117,000

1977年12月第1版 1977年12月第1次印刷

统一书号: 16171·229 定价: 0.38元

前 言

伟大领袖和导师毛主席提出的农业“八字宪法”中，“保”是一个重要的环节，而农药又是贯彻“保”字的不可缺少的手段之一。近十几年来，由于涉及公害问题，研制和生产无公害农药的要求日益迫切。井冈霉素是从井冈山等地区土壤中分离得到的吸水链霉菌井冈变种所产生的抗菌素，它对水稻纹枯病等作物病害有较显著的防治效果，每亩施药 0.1 两（折合纯品），对水稻纹枯病的防治效果达 90% 左右，达到显著增产的目的。井冈霉素基本没有毒性，没有残留，在生产过程中也无“三废”问题，应用三年多以来，深受广大贫下中农的欢迎。

在英明领袖华主席为首的党中央领导下，全国农村进一步掀起农业学大寨、普及大寨县运动的新高潮。为了满足有关方面的要求，我们编写了此书。本书汇集井冈霉素工业生产和土法生产的实践经验，总结井冈霉素的应用情况，并介绍筛选研究过程，其素材来自于实践，来自于工人和贫下中农。由于我们水平有限，加上井冈霉素研制和生产的历史较短，其内容有待于今后充实提高，书中可能存在缺点和错误，欢迎读者批评指正。

本书编写过程中，得到上海第十八制药厂、上海第三制药厂、江苏太仓制药厂、浙江桐庐农药厂、江苏宜兴农药厂和上海县七一公社、川沙县张江公社、奉贤县庄行公社及广东省有关单位土作坊的大力支持，在此特表感谢。

上海市农药研究所农用抗菌素组

目 录

一、井冈霉素的筛选	1
(一) 采土分土	2
(二) 发酵初筛	4
(三) 抗菌素粗物质分离	10
(四) 井冈霉素的精制和鉴定	13
(五) 井冈霉素抗菌活性、田间试验、毒性和残留	19
二、井冈霉素产生菌的分类鉴定	23
(一) 形态特征	26
(二) 培养特征	28
(三) 生理生化特征	30
(四) 抗菌谱	34
三、井冈霉素的选种育种	37
(一) 菌种选育的目的	37
(二) 菌种选育的生物学基础	38
(三) 菌种选育的方法	39
(四) 菌种的保藏	48
四、井冈霉素发酵工艺	50
(一) 斜面孢子的制备	50
(二) 种子的扩大培养	53
(三) 发酵工艺条件	60
五、井冈霉素提炼工艺	86
(一) 薄膜浓缩法	86
(二) 滚筒干燥法	89
(三) 喷雾干燥法	90

(四) 活性炭吸附法	91
(五) 离子交换法	93
(六) 各种提炼方法的比较	98
六、井冈霉素效价测定方法	100
(一) 生物测定法(稀释法)	101
(二) 化学测定法	105
(三) 井冈霉素A气相色谱分析方法	110
七、井冈霉素的土法生产	116
(一) 斜面孢子(一级种子)的培养	116
(二) 液体种子(二级种子)的培养	118
(三) 米饭二级种子的培养	119
(四) 固体发酵(三级发酵)	120
(五) 土法产品的后处理及贮藏	124
(六) 土法产品的效价测定	125
八、井冈霉素的应用	128
(一) 井冈霉素的应用特点	128
(二) 防治水稻纹枯病	130
(三) 防治其他作物病害	142
附录	145
(一) 筛选用发酵培养基	145
(二) 化学官能团鉴定方法	146
(三) 培养特征用培养基	150
(四) 生理生化特性用培养基	152
(五) 井冈霉素工业生产常用发酵培养基	154
(六) 玉米浆、鱼粉、酵母粉的组成	155
(七) 糖的测定	156
(八) 氨基氮的测定	160
(九) 无菌试验方法	162
(十) 污染的原因及防止	164
(十一) 离子交换树脂型号	166

一、井冈霉素的筛选

水稻纹枯病是由担子菌 *Pellicularia sasakii* 引起的真菌性病害。随着我国水稻早栽、密植、增施氮肥等高产措施的推行,稻株生长茂密,水稻纹枯病日趋严重,对水稻稳产高产造成极大威胁。以往一般采用有机砷制剂进行防治,但由于水稻生长后期施用,药害严重,不能解决纹枯病对水稻的危害。

为了筛选防治水稻纹枯病的高效低毒新农药,我们遵循毛主席关于“独立自主、自力更生”的教导,发扬只争朝夕的革命精神,从1972年起开始筛选防治水稻纹枯病的农用抗菌素,于1973年在江西省井冈山、浙江省杭州植物园等地,同时

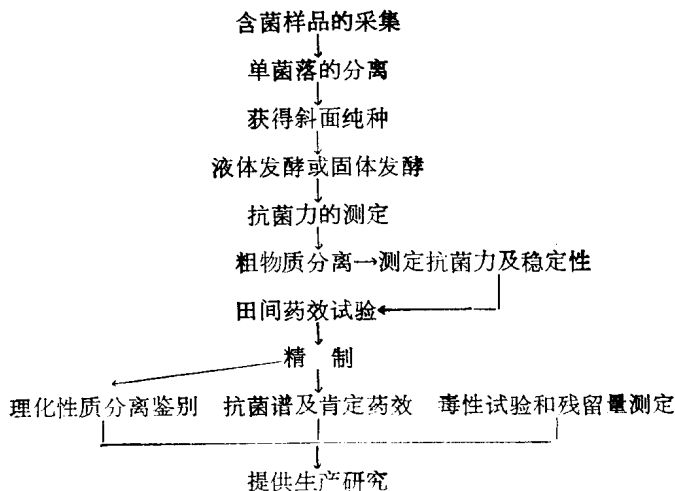


图1 井冈霉素筛选流程

找到对水稻纹枯病有很好防治效果的农用抗菌素产生菌四株,经抗菌素分离提纯鉴定,定名为“井冈霉素”。

从自然界广泛存在的千千万万种微生物中,寻找井冈霉素产生菌的过程,即称“筛选”。筛选流程如图1所示。

(一) 采 土 分 土

土壤是微生物的大本营,每一克土壤中含有几十万甚至几亿个微生物。因此筛选抗菌素产生菌往往以土壤为源。

1. 采 土

有关土壤微生物的分布和活动,已有许多报导,但对它的规律性目前认识很少。实践表明,微生物与环境有一定的相依关系,采集土样应重视采土的地点、挖土的深度及植被、气温等情况。我们采集了浙江、江苏、福建、江西、云南、四川、海南岛、安徽、广西及广东等地土样,发现江西、福建的森林酸性土壤中,放线菌极少,而丘陵向阳的砂质土和褐色土中放线菌较多。我们挖土的深度一般为5~20厘米。为了采集高温菌,多在气温35°C以上的夏季外出采土。

2. 分 土

采集的土样应及早分离。海南岛现场分土的实践表明,存放一星期后的土样与新鲜土样相比,出菌率和菌的种类显著减少。被认为重要的土样,可放在4~8°C环境中保存,以便反复分离。

(1) 分土培养基

筛选井冈霉素所用的分土培养基有以下几种:

① 天冬素—葡萄糖培养基: 葡萄糖1%,天冬素0.05%, K_2HPO_4 0.05%,琼脂1.5%。

② 高氏一号培养基: 可溶性淀粉2%, KNO_3 0.01%,

K_2HPO_4 0.005%, $MgSO_4$ 0.005%, $NaCl$ 0.005%, $FeSO_4$ 1 毫克/100 毫升, 琼脂 2%, pH7.2~7.4。

③ 淀粉琼脂培养基: 可溶性淀粉 1%, K_2HPO_4 0.3%, $CaCO_3$ 0.3%, $MgSO_4$ 0.1%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.2%, $NaCl$ 0.05%, 琼脂 2%。

④ 精氨酸培养基: 精氨酸 1 克, K_2HPO_4 1 克, $MgSO_4$ 0.5 克, 甘油 12.5 克, $NaCl$ 1 克, $CuSO_4$ 1 毫克, $ZnSO_4$ 1 毫克, $FeSO_4$ 10 毫克, $MnSO_4$ 1 毫克, 琼脂 20 克, 水 1000 毫升, pH7.0。

⑤ 黄豆饼粉浸汁琼脂培养基: 葡萄糖 1%, 黄豆饼粉 1% (先加水煮沸半小时取汁), 蛋白胨 1%, $NaCl$ 0.25%, $CaCO_3$ 0.2%, 琼脂 2%。

⑥ 蔡氏培养基: 蔗糖 3%, $NaNO_3$ 0.2%, K_2HPO_4 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, KCl 0.05%, $FeSO_4$ 0.001%, 琼脂 1.5%, pH7.2~7.4。

(2) 分土方法:

① 稀释法: 研细土样, 以水或生理盐水稀释, 28°C 分土稀释 2000~5000 倍, 40°C 分土稀释 10~20 倍。将土壤悬浮液 0.1 毫升滴入倒有分土培养基的碟子上, 玻棒推匀, 恒温培养。

② 混土法: 将研细土样 0.2 毫克, 加入已熔化的分土培养基 (约 20 毫升) 中, 摇匀后倒皿培养。

③ 弹土法: 在一张面积近培养皿口径大小的光滑纸片上, 铺上薄薄一层研细的土样, 置于倒好培养基的培养皿上, 微微震动后移去, 再置于第二、第三个培养皿上震动之。

④ 喷土法: 在一定距离外, 将土样直接喷在倒有培养基的培养皿上。

分土培养温度采用 40°C 和 28°C 二种, 以前者为主。培养 4~5 天及 8~10 天分别挑菌一次, 获得斜面纯种。菌种斜面

培养基和培养条件与分土条件基本相同。

(二) 发 酵 初 筛

筛选所用发酵培养基见附录(一)。发酵条件是菌种产生抗菌素的重要外因。给以菌种多种发酵条件,只在某些条件下才显示抗菌活性。如给予TH-82菌株10种发酵培养基,只在有玉米粉、酵母粉、蚕蛹粉、葡萄糖等营养成份时,才测到井冈霉素的存在,而在含黄豆粉、花生粉、肉膏、蛋白胨等营养成分的培养基中却呈阴性反应。因此,我们在初筛时,对每一菌株,给予多种发酵培养基。

对于初筛来说,不仅要提供合适的发酵条件,而且要有适当的筛选方法。没有好的筛选方法,即使好的菌株到了我们手边也发现不了它。因此,分土、发酵、筛选方法三者是前后相关的统一体,没有好的菌种,当然就要不断分土;但有的情况,是我们实际上已经有了好的菌种,而往往由于发酵条件不利于抗菌素的产生,或是即使已经产生而我们暂时还不认识它,这里发酵条件的改变和认识方法的改变就成了很重要的因素了。井冈霉素筛选的过程也说明了这一点,事实上,菌株TH-16,TH-29就能产生井冈霉素,但由于产生井冈霉素的发酵条件不适合和我们的“眼力”不够,一直筛选到TH-81,TH-82,通过不断地改变发酵条件和筛选方法,才有所发现。

筛选的具体方法如下:

1. 体外筛选法

(1) 结合分土进行:在琼脂平板上分离土壤微生物时,采用较大的稀释度(视土壤中微生物含量而定,一般用 10^{-7}),使菌落间距离较大(不小于1厘米),待培养4~7天菌落形成后,在空隙处接种病原菌琼脂块,再在28°C培养24小时左

右,拮抗性菌落周围就会呈现明显的抑菌圈。使用这个方法,应注意选择分离培养基,使其既适于分离菌种,又适于病原菌的生长。这个方法的缺点是,产生抗菌素的菌落可能受其邻近菌落的影响,而不产生抗菌素或不能表现出抗菌作用,结果造成漏筛。但操作简便。

(2) 纸片法:用纸片浸取待筛选菌种的发酵液,放到接种有水稻纹枯病病原菌的琼脂平板上。 28°C 培养1~2天,纸片周围出现抑菌圈,说明发酵液内含有抗纹枯病抗菌素。也可用管碟法或杯碟法进行,原理相同。

(3) 稀释法:

测定用纹枯菌:将在马铃薯蔗糖培养基上生长的水稻纹枯病菌菌核一粒,接种在含培养基(蔗糖3%, L-天冬素0.2%, 酵母膏1%, NH_4NO_3 0.3%, KH_2PO_4 0.1%, MgSO_4 0.1%, 琼脂2%, pH 7.0)的血中, 28°C 培养,42~45小时后使用。

操作步骤:吸取0.1毫升发酵滤液放入9厘米的碟子中,加入10毫升2%琼脂,摇匀冷却后,在碟子中间放直径0.5~0.6厘米的薄塑料片,上接直径0.5厘米的纹枯菌菌丝块, 28°C 培养,40~45小时后观察结果。

(4) 双层法:

纹枯菌培养液:将在马铃薯蔗糖培养基上生长45小时后的纹枯菌切成小块,接种入装有培养液(天冬素0.2%, 蔗糖3%, NH_4NO_3 0.3%, KH_2PO_4 0.1%, MgSO_4 0.1%, pH 7)的摇瓶中, 28°C 摇床上培养4天后取出,用消毒纱布滤出菌丝体,然后用生理盐水洗涤菌丝体,将洗过的菌丝体倒入高速组织捣碎器中捣碎,此菌丝悬浮液即可作为测定用。

测定培养基：下层蔗糖 0.1%，酵母膏 1.0%，蛋白胨 1.0%，琼脂 1%；上层蔗糖 0.25%，蛋白胨 0.45%，NaCl 0.1%，琼脂 1.2%。

操作步骤：将下层培养基溶化后冷却至 45℃，加入 5% 的菌丝悬浮液，摇匀后倒入用琼脂打底的木盘中，然后置于 28℃ 温室中培养 40~45 小时后取出，倒上溶化后已冷却到 50℃ 以下的上层培养液。培养液凝结后，用滤纸片蘸取发酵液进行抗菌活性的测定。

(5) 蚕豆叶片法：选取幼嫩蚕豆叶片涂上发酵液，阴干后接上在马铃薯蔗糖培养基上生长 30~40 小时的纹枯病菌，4 天后检查发病情况。亦可用花生叶片代蚕豆叶片。

在筛选井冈霉素工作的过程中，我们常采用稀释法和蚕豆叶片法。

2. 室内盆栽试验法

(1) 试验材料：

① 盆栽培育稻苗：将感病品种(例“矮南特”、“矮南早”等)先浸种催芽，然后播种在陶盆或塑料杯内(放河泥或稻田土)，置温室或室外进行育苗，稻苗长至三叶后即可使用。

② 纹枯病菌的分离、培养、保藏和复壮：

菌种的分离：选择新近感病稻株，在无菌室内剪取受害组织于新配制的 10% 漂白粉溶液中消毒 3~5 分钟，置于马铃薯蔗糖培养基上，在 26~28℃ 温箱内培养，待病原体菌丝长出后，连续纯化以得到纯菌种。

菌种的复壮：由于室内多次传代，易使菌种衰退，致病力降低。为了保持菌种的原有致病力，将纹枯病菌接种到稻上，使它感病，然后用感病组织进行分离、培养，又可得致病力高的菌株。

菌种的培养：一种用马铃薯蔗糖培养基培养，将培养基溶化，在灭菌培养皿(直径 9 厘米)中，每皿倒入 10 毫升，冷凝后，接种菌丝块或菌核，置 26~28℃温箱内培养 2 天，即可使用。另一种用稻秆培养，将经清理的稻秆剪成 2 厘米左右长，用清水浸洗，弃去水液，加入 2%糖与稻秆充分拌匀，分装于三角瓶内(占容积三分之一)，经湿热灭菌后作培养基用。培养时接入菌核 5~6 粒，或菌丝块 4~5 块，置于 26~28℃温箱内培养 2 天，充分摇动瓶内稻秆，使菌丝均匀长在稻秆上，再培养 4~5 天，供试验用。

菌种的保藏：菌种的保藏工作，也是防止菌种衰退的重要措施。一般采用斜面冰箱保藏法。将菌种接种在马铃薯蔗糖斜面上，待菌充分生长后，放在 0~9℃冰箱内保藏，每隔 4~5 个月转接到新鲜培养基上以免死亡。

(2) 药剂性能试验：

① 治疗效果试验：先在稻株上接菌，保温保湿 24~48 小时后喷布药液，继续保温保湿，一定时间后检查效果。

② 持效期试验：先喷药后接菌的持效期，以药液喷布稻株，分别经 0、1、3、5、7……天接菌，或在接菌前 0、1、3、5、7……天于稻株上喷布药液，同一天内接菌，保温保湿，一定时间后检查效果。先接菌后喷药的持效期，其方法同治疗效果试验，但检查效果在喷药后不同时间进行。

③ 根内吸传导试验：采用两种方法进行。一种以水培的稻株进行试验，在营养液中加入定量的药剂，将稻株装在这种药液中，48 小时后在离液面 10~11 厘米处接菌，保温保湿，一定时间后检查效果。另一种是于盆栽稻苗中灌进定量药液，方法同上。可用多菌灵作为对照药剂。

④ 人工降水对药剂效果的影响：先将药液喷布稻株，分

别经 0、1、3、6、12 等小时模拟中等雨量(15 毫米左右)人工喷洒自来水,然后接菌保温保湿。或者先在稻株上接菌,保温保湿 24~48 小时后喷布药液,再按不同时间和水量人工喷水,继续保温保湿,一定时间后检查效果。

(3) 测定:

① 药液的配制和施药方法:按试验需要,配制不同浓度的药液,并加入 0.03% 的乳化剂(S 型氯乳),以增加在稻株上的粘着性能。以喷雾法施药,用空压机作动力,定压定量喷布药液。

② 接菌和效果考查:在试验过程中,要观察和记载药害情况,如症状、轻重等。

1) 每株选择叶龄相同的叶片一片,在叶片中部接贴一块菌丝块(直径 4~5 毫米的边缘菌丝),接菌后放在 20~30°C 或 25°C 恒温室中,用保湿柜或上盖塑料罩的水槽保湿诱发病害(最适条件为 25~31°C,相对湿度为 90% 以上),经 2~3 天量计病斑长度,以平均每叶病斑长度计算效果。公式为:

$$\text{效果}\% = \frac{\text{空白对照平均病斑长度} - \text{药剂处理平均病斑长度}}{\text{空白对照平均病斑长度}} \times 100$$

2) 在稻分蘖期后于每株稻基部接菌丝块(0.5×1.6 厘米²)一块,用塑料薄片(厚度为 0.5 毫米左右)成圆锥形包扎稻株中下部保湿,置于 20~30°C 温室中,经 7~10 天,空白对照发病重时量计病斑长度,以平均每株病斑长度计算效果。公式同上。

3) 于每丛水稻基部接菌 1~2 块(1.0×1.6 厘米²/块)或接已培养菌丝的稻秆 2~4 根,保温保湿,经 4~5 天按株分级查效果。分级标准:

0 级:全株不发病;

1级：第一叶叶鞘或全叶发病（以第一张真叶为第一叶）；

2级：第二叶叶鞘或全叶发病；

3级：第三叶叶鞘或全叶发病。

结果计算：

$$\text{病情指数} = \frac{(\text{各级发病数} \times \text{该级代表值})\text{之和}}{\text{调查总数} \times \text{最高一级代表值}} \times 100\%$$

$$\text{效果}\% = \frac{\text{空白对照病情指数} - \text{药剂处理病情指数}}{\text{空白对照病情指数}} \times 100$$

3. 初筛中如何确定菌种的取舍

如何确定一株菌株通过初筛而被“录取”呢？抑菌圈法是经典的体外筛选法。而井冈霉素恰恰对纹枯菌不呈现抑菌圈现象，而在其他体外方法中，呈现拮抗现象。不能轻易否定体外筛选法而采用一开始就上盆栽试验。例如，四株井冈霉素产生菌，开始几次发酵液的盆栽效果并不好，由于在稀释法、双层法和叶片法中呈现拮抗现象，我们没有舍弃这些菌株，而是一再更换发酵条件，结果出现了具有较好盆栽效果的发酵液。所以在初筛时，应设计几个筛选模型，综合考察其结果，以决定取舍。

被筛选的菌种，通过我们设计的筛选模型仅仅是工作的第一步，以后的路程还更长，如果弄得不好，把有效菌种丢掉的情况是随时可能发生的，这是由于：

（1）微生物产生抗菌素有一定的条件，在筛选时由于菌株很多，我们不可能对每种菌株进行深入研究，因此对它们产生阳性反应的条件如果掌握不好，往往重复性较差。经常发生开始较好而后来不能重复的现象，因此必须注意①菌种要保持纯种，②所用菌种应新鲜，不宜在冰箱放置过久再行发酵，③种子斜面不宣传代过多，如需复筛菌种，应及时进砂土保存，④对发酵培养条件，原材料质量和配制方法，消毒方法均须严格控制。

(2) 测定方法,特别是活体测定法,由于植株对病原菌的抵抗力不同,病原菌本身的致病力不同,以及发酵条件不同,常会使结果重复性较差。

(3) 抗菌素的性能和数量有一定的关系,例如效果的好坏直接与浓度有关,药效持久的时间也直接和数量有关。因此比较抗菌素的好坏,应该在一定浓度基础上进行。但由于开始对发酵液中抗菌素性质、浓度认识很少,因此决定一个菌种的取舍不能简单地看效果或残效等性能,而应该在考虑效果的同时结合考虑某些物理因素,如热、光等自然界各种因素处理后相对活性的损失作依据。井冈霉素产生菌在初筛时,用稻苗法测定,发酵液防治效果不到50%,经初筛提取后用浓度500~1000ppm处理防治效果也只有50%左右,如果贸然筛去,就会丢掉井冈霉素产生菌。因此在农用抗菌素筛选中单以效果和粗提物的最低抑止浓度来作为取舍标准也是不足为依据的。

我们认为比较抗菌素的性能,须在纯净状态时比较各项指标才能作为取舍的依据。

(三) 抗菌素粗物质分离

野生菌种在发酵过程中产生的抗菌素含量极微,一般只有几十个单位。为了进一步考察抗菌素的性质,必须通过分离提纯,以进行抗菌素的鉴别和效力的研究。现将我们研究农用抗菌素所用的抗菌素粗物质分离方法简述如下。

抗菌素存在于滤液中,也有存在于菌丝体中的。存在于菌丝体中的抗菌素,常用的分离方法为:先将菌丝体与滤液分离,用水洗涤菌丝体数次,再用甲醇、乙醇、丙酮溶剂或含水溶剂浸泡,再用苯、醋酸乙酯等溶剂浸泡。浸泡液浓缩后即得

粗制品。滤液中的抗菌素分为脂溶性和水溶性二类。脂溶性抗菌素用醋酸乙酯、正丁醇等有机溶剂提取，在提取时应调节选择适当的 pH，再将提取液蒸去溶剂并转移至极性较差的溶剂中如氯仿、乙醚、苯等，浓缩液蒸干后即得粗品。滤液中水溶性抗菌素一般可分为极性和非极性二类。极性抗菌素用离子交换树脂提取，碱性水溶性抗菌素用阳离子交换树脂提取，酸性水溶性抗菌素用阴离子交换树脂提取，两性抗菌素二类树脂均可使用。极性弱的抗菌素在选择树脂时只能用强酸或强碱型的交换树脂。抗菌素交换在树脂上后，以 0.5~1N 盐酸或氢氧化铵洗脱，必要时混入一定量的甲醇。对酸碱不稳定的抗菌素可用氯化钠或氯化铵等盐来洗脱。非极性的水溶性抗菌素一般采用活性炭吸附法，即将发酵滤液调节成 pH 3、7、9，分别加入 2% 活性炭进行吸附，搅拌 1 小时，过滤，测活性以选择合适之 pH。然后再选择适宜之 pH 的甲醇水或丙酮水洗脱之，浓缩得粗制品。

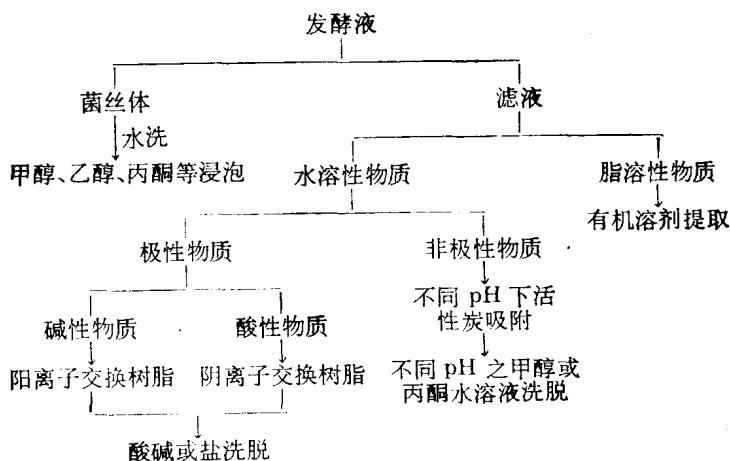


图 2 抗菌素粗物质提炼过程