

农业技术资料

（“一四九六”抗菌素的土法生产和使用）



1972年第4号

广东人民出版社

农业技术资料（“一四九六”抗菌素的上法生产和使用）

1972年第4号

广东人民出版社出版

广东省新华书店发行

广东新华印刷厂印刷

1972年9月第1版

1972年9月第1次印刷

书号 16111·04

定价 0.05 元

毛主席语录

备战、备荒、为人民。

鼓足干劲，力争上游，多快好省地建设社会主义。

要认真总结经验。

“一四九六”抗菌素的土法生产和使用

佛山地区微生物研究组

水稻纹枯病是为害水稻的一种主要病害，广泛分布于水稻高产地区。一般为害较重的可减产10—30%，如果因发病重而又引起倒伏、茎叶烂坏，减产则更加严重。“一四九六”抗菌素（A.S.4.896）是中国科学院微生物研究所在一九六八年从我国南部红壤中分离筛选出来的一个菌株，其产生的抗菌素对水稻纹枯病的防治效果在百分之七十左右。

在毛主席关于“备战、备荒、为人民”的伟大战略方针指引下，佛山地区于一九七一年在学习北京先进经验的基础上，开始进行土法生产和使用的科学实验，初步获得了成功。

“一四九六”用于防治纹枯病，据一九七一年早造二十三块田、共十七·三亩，晚造十一块田、共二十一亩的试验，使用20—50单位（P.P.M）时，防治效果在60—70%，高者达90%，实割产量比对照增加百分之十至二十，千粒重比对照增加百分之五左右。“一四九六”抗菌素无药害，在水稻整个生育期都可使用，对人畜无毒、使用安全，可因地制宜进行土法生产。

一、“一四九六”抗菌素的性质

“一四九六”是由一种放线菌产生的抗菌素，它对水稻纹

枯病菌有强烈的抑制作用，是目前一种新型的农用抗菌素。“一四九六”能溶于水、耐光照、对温度也比较稳定。固体产品浸提液及发酵液在60°C以下的阳光下曝晒浓缩，几乎不会降低活力。在酸碱度3以下的酸性条件下较稳定，在酸碱度7—8以上的碱性条件下，容易分解而失去活力。可与敌百虫、乐果、“二二三”等多种农药混合使用。

二、“一四九六”抗菌素产生菌的特性

“一四九六”放线菌，具有分枝而不分隔的菌丝体，无明显易见的分化核，核物质散布于细胞浆内，在斜面培养基生长时，一部分菌丝伸入培养基吸收营养，叫营养菌丝；另一部分菌丝伸出培养基表面，叫气生菌丝。利用气生菌丝体上形成的孢子或断裂菌丝而繁殖。“一四九六”抗菌素产生菌能产生色素，使周围基质染成黄褐色。菌落表面呈密致绒毛状，长孢子后成粉末状，表面呈鼠灰色，有土腥臭味。“一四九六”抗菌素的生长需要一定的营养物质、水分、适合的温度、酸碱度和足够的空气。营养物质主要是碳源、氮源、无机盐和微量元素。碳源是微生物体内部构造的组成成分及能量的来源。“一四九六”抗菌素对碳源利用的能力较强，如葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、淀粉都可被利用。至于木薯渣等农副产品也生长得很好，各种植物油及油脚^[1]也是很好的碳素营养。氮素是微生物生命的基本物质。在氮源中如豆饼粉、花生饼粉、麦麸皮、酵母膏、蚕蛹粉等都可利用，副产品中如蚕丝厂的废液（称滞头水）、豆腐坊的豆胶水，都是很好的氮素

[1] 油脚，即各种植物油之沉淀物。

养料。无机盐以磷、镁、钾为主。铁离子对“一四九六”菌体生长有抑制作用。用农副产品作培养基原料，或用天然水配制培养基时，已含有充足的微量元素，一般不需另行添加。至于有何种微量元素能促进“一四九六”抗菌素的合成，还需通过试验进一步摸索。

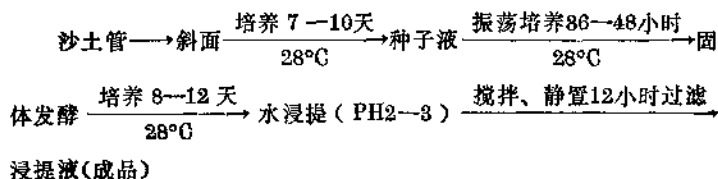
培养的适合温度是 25—28°C，酸碱度是 6.5—7 之间。培养料经消毒后酸碱度会发生变化，特别是培养料中含有大量淀粉时消毒后会偏酸性。“一四九六”抗生菌培养中、后期，酸碱度会逐渐上升至 7.5 以上。酸碱度上升过高，会影响“一四九六”抗菌素的产生。因此，在培养基中加入 0.1% 的碳酸钙或 0.3—0.4% 磷酸氢二钾作为缓冲剂，可使酸碱度比较稳定。

在培养过程中需要充足的氧气，用固体发酵进行土法生产时，必须适当控制培养基的含水量，使既满足“一四九六”菌体对水分的需要，又满足对氧气的要求。在调制固体培养基时，可加入谷壳等填充料来加以调节。

三、“一四九六”抗菌素的生产

土法生产设备简单，技术容易掌握，有利于在农村推广。为适应各地需要，我们着重介绍土法生产的方法，供大家参考。

土法生产流程：



1.沙土管的制备：在干燥、低温的条件下，微生物已失去其代谢所必需的水分，空气和适宜的温度，其新陈代谢降至极低水平，不能生长繁殖，但仍保持其生活能力，并保持其固有特性。一旦获得适宜的生长条件，又可重新生长繁殖。故在实践中常用沙土管来保存放线菌菌种，以防止传代过多而发生退化。以下介绍“一四九六”菌种的沙土管保藏法。

取黄沙及细泥用水洗净，再用3%工业盐酸泡浸二小时，然后以清水冲洗干净、烘干。再用磁铁吸除其中带磁性金属的微粒。取二份沙和一份细泥混匀，分装于1×10厘米的试管中，每管二克左右，塞上棉塞，以1公斤/厘米²灭菌半小时，间歇灭菌三次。然后挑取少量沙土接种在空白的肉汤酚红培养基_[2]上，在37°C下培养24小时，如果无杂菌生长，方可使用。将在新鲜斜面培养基上生长丰满的孢子，用接种环以无菌操作将两管孢子斜面轻轻刮入一支沙土管内（注意勿刮烂培养基），混匀后，塞上棉塞，然后放在氯化钙的干燥器内，以石蜡封口，保藏在冰箱中或放置于阴凉干燥处。

2.斜面菌种的制备

（1）培养基成分：

①麦芽糖酵母汁培养基：

（2）肉汤酚红培养基

牛肉膏	3克	蛋白胨	10克
葡萄糖	8克	氯化钠	5克
• 酚红溶液	2毫升		
酸碱度	7.3(消毒前)		

• 取酚红1克，用95%酒精溶解，加蒸馏水90毫升。大多数杂菌在生长过程中产生酸，使酚红培养基颜色由红变黄。但此培养基不是感染所有杂菌都能检查出来。所以，一般还结合平板杂菌检查法。

麦芽糖粉(或麦芽糖糊精粉) 1 %

酵母膏 0.4 %

琼脂 2 %

酸碱度 6.5—7

②马铃薯糖培养基:

马铃薯块 20 %

葡萄糖(或蔗糖) 2 %

琼脂 2 %

酸碱度 6.5—7

取洗净切碎马铃薯块 200 克, 煮沸半小时后过滤, 滤液中加入 20 克琼脂溶化后, 再加糖使溶化; 然后再补足水至一升满, 即可装试管。

(2) 斜面菌种的制作:

上述培养基经灭菌摆成斜面后, 再经 24 小时培养, 若无杂菌感染, 即可用来接种。

取“一四九六”产生菌的沙土管一支, 在无菌操作下, 以接种环挑取少许沙土涂布于斜面上, 然后放置 28°C 温箱中培养。第一、二天长出一层营养菌丝, 及一层灰白色绒毛状的气生菌丝, 三、四天培养基表面长出较厚的粉状物, 下部出现黑褐斑点, 镜检可见到粗壮的气生菌丝和大量孢子链; 五、六天后表面菌苔增厚, 培养基色素变深, 镜检见很多孢子, 七、八天后斜面长满孢子, 呈鼠灰色。一般培养 8—10 天可作接种用。

生长良好的斜面菌种应该是菌落粗壮, 菌苔厚, 长满鼠灰色孢子, 菌落底层为黄褐色, 无其他杂菌生长, 才可留作种用。

此外, 还可制成大米饭培养基供扩大接种用。其方法是

将大米煮成饭后，分装于试管中，塞上棉塞，灭菌后接种培养，可用作三级发酵（固体发酵）接种用。

3. 二级培养

（1）二级种子液培养基：

花生饼粉 2%

油 脚 3%

磷酸氢二钾 (K_2HPO_4) 0.1%

酸碱度 6.5—7

花生饼粉亦可因地制宜地用豆饼粉或鱼粉代替，也有用蚕丝厂的废液（带头水）来代替花生饼粉作二、三级液体培养基，效果也很好。

制作方法：

取上述培养基装入玻璃瓶中，每瓶装 100 毫升左右，约为瓶容量的 1/5，在 120°C 下灭菌 30 分钟，然后以无菌操作接入斜面孢子悬液，接种量为每支斜面接 100 毫升二级培养液。在 28°C 摇床振荡培养 24—36 小时。

长好的二级种子液呈粘稠状，带土腥臭味，菌丝粘挂瓶壁，种子液颜色深浅随培养基成分不同而不同，但成熟的种子液都呈浅黄色。生长良好的种子液在镜检下应是菌丝长而粗壮，菌丝量多，原生质尚未分化而使染色均匀的粗壮菌丝。若有杂菌污染，特别是杆菌污染，则不能留作种用。

（2）二级液体扩大培养：

将下列各种配方的液体培养基，分装于玻璃瓶中，经 120°C 消毒后，然后接种，放在摇床里，在 28°C 下振荡培养 5—7 天，然后收集起来作产品使用。

① 花生饼粉 3%

油脚 1%

磷酸氢二钾 0.1%

酸碱度 6.5—7

② 鱼粉 2%

淀粉 1%

糖 1%

尿素 0.2%

磷酸氢二钾 0.1%

酸碱度 6.5—7

③ 糖 1%

淀粉 1%

尿素 1%

磷酸氢二钾 0.1%

以蚕蛹水(滞头水)调制

酸碱度 6.5—7

以上①号配方效价达1000单位/毫升

②、③号配方效价达800单位/毫升

4. 三级发酵(固体发酵)

(1) 培养基成分:

① 花生饼粉30% 统糠30%

玉米粉10% 谷壳30%

② 花生饼粉80% 油脚5% 玉米粉10%

统糠30% 谷壳25%

③ 麦麸40% 油脚5% 统糠30% 谷壳25%

④ 米饭60% 油脚5% 花生饼粉15% 谷壳20%

上述①号培养基最高效价 500 单位/克

②号培养基最高效价 300—350 单位/克

③号培养基最高效价 250—300 单位/克

④号培养基最高效价200单位/克

经过试验发现培养基组合不同，效价差别很大。因此，原料的配比问题应进一步进行试验，以求得正确的结论。

（2）制作方法：

将原料加水拌匀，加水量以手紧握至指缝间有少许水珠流出为宜，酸碱度调至6—6.5左右，然后分装入瓶，塞上棉塞，于1公斤/厘米²灭菌45分钟（灭菌后趁热将培养料摇松，否则冷却后容易固结成块），然后接种二级液体种子，接种量为20—30%，拌匀后置28℃培养，约2—3天后可见培养基表面有短绒状菌丝体生长，后变灰黑孢子，约7、8天可收取。固体培养往往不见或很少出现孢子。好的固体发酵产品应是淡黄褐色，有胶粘性，与谷壳等填充料结合紧密。凡杂菌污染，不具黄褐色，结构松散，干后很易弄碎的产品，质量都不好。

（3）固体发酵的几个问题：

①原料：新鲜的培养料，对固体发酵很有利，原料陈旧往往发酵不好，效价不高。各种麸饼要求粉碎，若颗粒过大，除了影响水分渗透，蒸煮后会出现生心现象外，在发酵过程中还会影响菌丝的深入繁殖，成品浸提时仍有一粒粒麸饼，结果发酵不良，影响了效价的提高。

②蒸煮消毒：蒸煮消毒的目的在于消灭附着在原料及器物上的其他杂菌，以保证发酵时“一四九六”抗生素的正常繁殖。原料蒸煮后，一部分蛋白变成可溶性蛋白或氨基酸，淀粉则糊化变成可溶性淀粉或糖分。这些东西都是“一四九六”抗生素繁殖最适合的营养物。

高温高压蒸煮时间，不宜太长，只需达到灭菌目的及使原料充分软化即可，否则有损原料的利用率。

③发酵时间及温度:

“一四九六”抗生素生长最适宜温度为 28°C 左右,接种后,应放置在 28°C 温度下培养2—3天,以促使菌丝早生快发。在菌丝充分生长后,温度则应保持 $25-28^{\circ}\text{C}$ 左右,以利于效价的增长。总培养时间约8—10天,我们发觉延长培养时间,效价无明显增长,这可能与培养基后期碱性升高有关。固体发酵期间,不宜采用摇动培养料来降温或通气,以免妨碍菌丝生长。

(4)防止杂菌污染和开放培养:

“一四九六”抗生素由于生长较慢,在培养过程中往往易为细菌及霉菌所污染。为此,应坚持种子液的无菌检验,以保证种子液无杂菌。另方面,要搞好培养室的消毒及培养基的灭菌,接菌时操作要细致。在培养过程中控制培养条件,不使温度过高、湿度过大,改固体接种为液体接种,加大接种量,这些办法都能有效地防止杂菌污染。玻璃瓶培养一般容易获得成功,但产量受限制。如何防止杂菌污染进行开放生产,有待进一步试验。

当前“一四九六”生产主要问题是菌种效价低,如何通过选育种及改善培养条件以提高效价,是急待解决的问题。

5.“一四九六”抗菌素含量的测定

根据“一四九六”抗菌素在琼脂培养基内的渗透和对“检定菌”的抑制作用,经过培养之后,在平板上产生透明的抑菌圈,该抑菌圈的直径大小与“一四九六”抗菌素浓度成比例。

操作过程

(1)检定菌:用对“一四九六”抗菌素较敏感的丝孢酵母属的酵母菌(A.S.2.571)为检定菌。

(2)培养基:

底层培养基：琼脂1.5—2%，自然酸碱度

检定菌斜面培养基和上层培养基都可以采用以下的各种配方：

①麦芽糖1% 琼脂 1.5—2%

②黄豆芽10克加水 100 毫升，煮沸半小时后过滤，滤液中加蔗糖 5%，琼脂 1.5—2%

③一份马铃薯加五倍水煮沸半小时后过滤，取滤液加水至原来体积，加糖1%，琼脂2%

将上述底层培养基及上层培养基分别装在玻璃三角瓶中，在1公斤/厘米²灭菌30分钟，然后放置备用。

（3）检定菌的培养与菌液的制备：

把检定菌丝孢酵母接种在斜面培养基上，在37°C下培养2—3天。将15毫升灭菌水倒入丝孢酵母斜面试管内，用接种环将菌苔磨碎，作成悬浮菌液备用，也可用上述检定菌培养基作液体摇瓶培养，50毫升三角瓶装液体培养基20毫升，灭菌后接种丝孢酵母，在28°C下培养2—3天后备用。

（4）琼脂平板的制备：

可采用玻璃大盘作测定盘。将底层及上层培养基分别用水溶解化，趁热将100毫升培养基倒入作底层，水平放置凝固。然后将加热溶化的上层培养基100毫升冷至50°C左右，加入一支丝孢酵母斜面悬液，充分摇匀后立即倒在已凝固好的下层培养基上面，并迅速摇动，使之均匀平布于表面作为上层，凝固后，按图1在每个小方格内放置一个钢圈（可用单车气门圈代替）备用。

⑤	2	1	⑤	7	6
2	1	⑤	7	6	⑤
1	⑤	2	6	⑤	7
⑤	4	3	⑤	9	8
4	3	⑤	9	8	⑤
3	⑤	4	8	⑤	9

图 1

说明：每小格宽三厘米，周围用高2厘米的长玻璃条用胶布粘紧。

1、2……，表示分别滴加10单位/毫升，20单位/毫升标准液，其余以此类推。⑤表示滴加50单位/毫升标准液。

(5) 标准曲线的绘制：

标准溶液的配制：精确称取（或量取）“一四九六”标准品，放入容量瓶中，用灭菌水稀释成10、20、30、40、50、60、70、100、150单位/毫升等九种浓度。

绘制标准曲线：图中1、2、3、……9分别代表加入每毫升含“一四九六”抗菌素10单位/毫升、20单位/毫升、30单位/毫升……150单位/毫升等九种浓度的标准液。每个钢圈分别滴入标准溶液，放置38°C下培养16—20小时，出现清晰抑菌圈后，测量各抑菌圈的直径。

抑菌圈直径的校正：测定盘分四个小区，共36个小格。首先求出各浓度抑菌圈直径的平均值，再求出50单位/毫升

抑菌圈直径的总平均值与各小区 50 单位/毫升抑菌圈平均值之差，即为校正值。

例如：校正 10 单位/毫升抑菌圈直径是：

① 50 单位/毫升标准液（共12个）抑菌圈直径总平均值为20.2毫米。

②第一个小区里 50 单位/毫升标准液抑菌圈直径平均为20.0毫米。

③第一个小区10单位/毫升抑菌圈直径总平均值为 16.1 毫米。

④校正值为 $20.2 - 20.0 = 0.2$ 毫米。

⑤校正后的10单位/毫升抑菌圈直径平均为 16.1 毫米 + 0.2 毫米 = 16.3 毫米。

以此校正法求得各种不同浓度抑菌圈直径数值，校正后的抑菌圈直径为横座标，以浓度为纵座标，在半对数座标纸上点出座标点，在各点之间作一直线，即标准曲线。

（6）样品的测定：

样品的浸提及稀释：取干样品用60°C以下温水浸提，浸提液调酸碱值至 7.0，然后稀释待用。

测定及效价计算：按上述方法制备琼脂平板，以 50 单位/毫升作标准液，经16—20小时培养后，测量抑菌圈直径。

计算 50 单位/毫升抑菌圈直径的平均值与标准曲线上 50 单位/毫升抑菌圈直径之差，以此差数来校正样品抑菌圈直径的平均值，校正后的样品抑菌圈直径从标准曲线中找出浓度读数。

浓度读数 × 样品稀释倍数 = 样品效价（单位/克）

例如：一克固体发酵产品，用水浸提后稀释至 10 毫升（即10倍），校正后的样品抑菌圈直径从标准曲线中找出浓

度读数为40单位，其样品效价为 $40 \times 10 = 400$ 单位/克。

6. 产品处理

固体发酵的产品，收获时可集中放入瓷盘里，用工业废酸(硫酸、盐酸、硝酸都可以)调酸碱度至3—4左右。调酸时用木棍搅拌，使酸与固体发酵产品充分混合均匀，成浓稠糊状，放在竹筐中摊成薄层，在阳光下晒干，然后用塑料袋密封包装，贮藏待用。

液体发酵的产品，收获时的酸碱值过高时(高于7以上)，调至酸碱度6左右，应立即使用。如果要贮存一段时间，仍要用酸调酸碱度至3—4左右保存待用(因“一四九六”抗菌素在偏酸条件下较稳定)。同时，可加入0.1%苯甲酸钠作防腐剂。

调酸后的固体发酵产品及液体发酵产品，使用时要调酸碱度至6—7，然后按产品效价稀释使用。

7. 使用方法

(1) 使用浓度：“一四九六”使用的有效浓度在20—40单位/毫升，每亩用100—120斤药液喷雾。使用时，应按产品效价计算其配水量。如效价在500单位/克，如使用浓度为40单位/毫升，则每斤产品的配水量 $= \frac{500}{20} = 25$ 倍，即一斤产品可配水25斤，4斤产品配水100斤，可喷一亩水稻田。

(2) 泡浸方法：固体产品用酸碱度3—4的水泡浸12小时，用布过滤，过滤后把提取液加水至所需要的配水量，然后按每百斤药液加0.5—1市两洗衣粉作扩展剂，即可使用。

(3) 使用注意事项：

“一四九六”对水稻纹枯病虽有明显的防治效果，但使用时，必须同时加强田间管理，才能取得良好的防治效果。

“一四九六”在水稻整个生育期都可使用，但必须实行以防为主的方针，根据一九七一年试验结果，喷药一次，亦可取得良好效果。

喷药后12小时内如被雨水淋洗，对防治效果会有一定影响，必须再重喷药一次。

8. “一四九六”防治水稻纹枯病的效果：

我们遵照毛主席关于“要认真总结经验”的教导，于一九七一年早晚两造曾用“一四九六”进行大田防治水稻纹枯病的试验，现将试验结果列表于下，供参考：