

春雷霉素的土法生产和应用

上海植物生理研究所农用抗菌素组 编

上海人民出版社

春雷霉素的土法生产和应用

上海植物生理研究所农用抗菌素组

上海人民出版社

春雷霉素的土法生产和应用

上海植物生理研究所

农用抗菌素组

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 上海市印刷四厂印刷

开本 787×1092 1/32 印张 1.25 字数 24,000

1972年3月第1版~1972年6月第2次印刷

书号: 16·4·220 定价: 0.09元

毛主席语录



在生产斗争和科学实验范围内，
人类总是不断发展的，自然界也总是
不断发展的，永远不会停止在一个水
平上。因此，人类总得不断地总结经
验，有所发现，有所发明，有所创造，有
所前进。

写在前面

在毛主席无产阶级革命路线指引下，我国农业战线的形势和其他各条战线一样，一派大好。广大贫下中农、革命干部和科技人员认真学习马列主义、毛泽东思想，深入批判刘少奇一类骗子的反革命修正主义路线，在阶级斗争、生产斗争和科学实验三大革命运动中不断取得新的胜利。为了贯彻执行“备战、备荒、为人民”的伟大战略方针，夺取农业新丰收，广大科技人员遵照毛主席关于“知识分子同工农群众结合”的伟大教导，深入农村，深入实际，和贫下中农在一起，广泛开展防治农业病虫害的群众性科学实验活动。春雷霉素防治稻瘟病这个新生事物就是在这大好形势下诞生的。

春雷霉素，是一种能抑制稻瘟病菌的抗菌素，同时也具有治疗绿脓杆菌感染的作用。但是，能不能把它应用到大田的稻瘟病防治中去？能不能根据农村条件进行土法生产？毛主席教导我们：“认识从实践始”。一年多来，在党的领导下，在工农兵的再教育下，我们同贫下中农和中国人民解放军生产建设兵团的战士们一起进行了大田试验。实践证明，春雷霉素对防治稻瘟病有很好的效果。春雷霉素土法生产的研究，尽管曾经多次失败，但在贫下中农的大力支持和推动下，经过实践、认识、再实践、再认识，终于获得了初步成功。事实深刻地教育我们，知识分子只有在毛主席的无产阶级革命路线指引下，与工农兵相结合，才能在三大革命斗争的实践中不断前进。

现在，为了适应在大田防治稻瘟病中推广应用春雷霉素

的需要,我们把有关春雷霉素的特性,上海郊区和兄弟省市试验应用和土法生产的部分研究资料,连同我们和上海市嘉定县南翔公社微生物组一起进行的春雷霉素土法生产试验结果汇集在一起,编成这本小册子,以供生产中使用参考。但是,由于我们对马、列著作和毛主席著作学习不够,工作中还存在许多缺点。广大工农兵和兄弟单位在实践中创造的丰富经验,我们必须很好学习。就是这里介绍的春雷霉素土法生产资料,也还与广大工农兵的要求有着很大距离。我们热诚希望广大工农兵和兄弟单位提出批评。

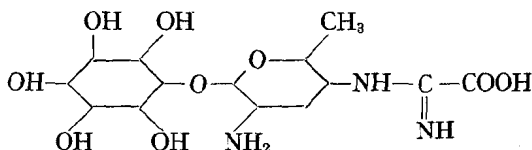
上海植物生理研究所农用抗菌素组

目 录

一、春雷霉素的物理化学性质和抗菌作用	1
二、春雷霉素的土法生产	3
(一)春雷霉素产生菌的介绍	3
(二)春雷霉素土法生产的原料	7
(三)土法生产流程	7
(四)斜面孢子(一级种子)的培养	7
(五)液体种子(二级种子)的培养	8
(六)固体发酵(三级发酵)	9
(七)发酵过程中应注意的事项	10
(八)土法产品的后处理和保藏	11
三、春雷霉素的微生物效价测定法——管碟法	13
四、春雷霉素对防治稻瘟病的应用及效果	21
(一)春雷霉素工业产品的药效	21
(二)春雷霉素土法产品的药效	23
五、附录	26
六、问题讨论	31

一、春雷霉素的物理化学性质 和抗菌作用

春雷霉素是一种由放线菌所产生的农医两用的抗菌素。它是由碳、氢、氧、氮所组成。分子式为 $C_{14}H_{25}O_9N_3H_2O \cdot HCl$ ，分子量(盐酸盐)为 433.8。熔点为 $206 \sim 210^\circ C$ 。其结构式为



春雷霉素呈弱碱性，它的盐酸盐为白色针状或片状结晶，有甜味，易溶于水，不溶于甲醇、乙醇、丙酮、苯等有机溶剂。在酸性溶液中稳定，在碱性溶液中易失活破坏。例如，在 pH5 的条件下于 $50^\circ C$ 贮存 10 周其效价没有下降，而在 pH9 则下降至 42.6%。因之在使用时不宜与碱性农药如石灰硫磺合剂、西力生石灰、波尔多液等混合使用。

春雷霉素对人、家畜、水产鱼虾都几乎无毒，使用十分安全。

春雷霉素是一个广谱抗菌素，对某些革兰氏阴性及革兰氏阳性细菌及某些真菌有拮抗作用。在医学上主要用于治疗绿脓杆菌的感染，在农业上对稻瘟病有防治作用。它用药量低，药效长，无药害，无毒性，效果显著。据有关资料报导，春雷霉素对细菌的抗菌作用主要表现在干扰了细菌的蛋白质合

成,对稻瘟病的抗菌作用是抑制菌丝的正常发育,使菌丝肥大畸形,细胞质颗粒化,停止伸长,从而达到防治作用。这种抑菌性能在酸性条件下表现较显著。

二、春雷霉素的土法生产

(一)春雷霉素产生菌的介绍

现在用于土法生产的春雷霉素菌种是中国科学院微生物研究所于一九六四年在江西土良地区分离得到的，命名为小金色放线菌(*Act. Micro-aureus*)，菌种编号为 A.S. 4730。

1. 形态特征

孢子丝呈紧密小螺旋形，1~6圈，成密集簇状。孢子丝未断裂成孢子时，螺旋较松弛，显微镜下易于观察(图1)。孢子

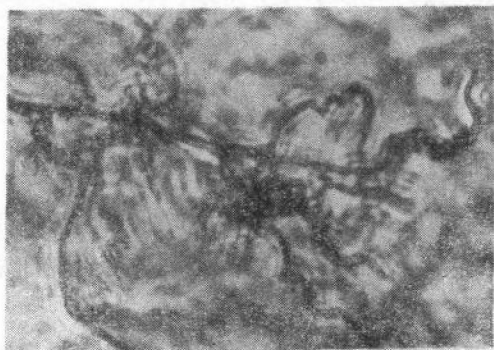


图1 “780”菌种的孢子丝形态

成熟后，孢丝螺旋紧密且聚生成团，不易观察分辨。孢子表面光滑，椭圆形($0.6\sim0.8\times1.0\sim1.2\mu$)或球形($0.6\sim0.8\mu$) (图2)。

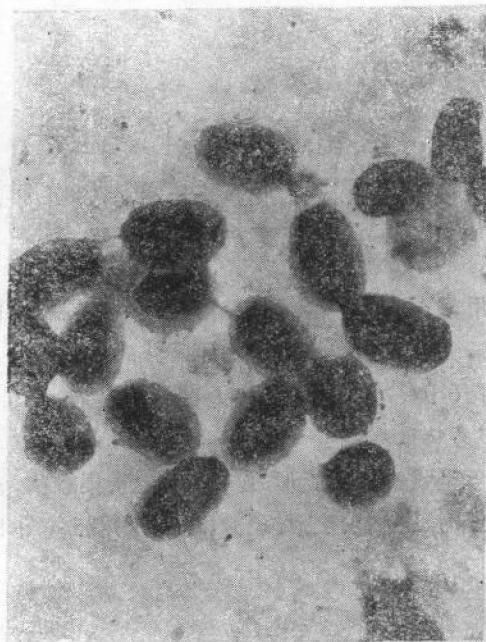


图 2 “730”菌种孢子形态
(电子显微镜 8000 倍放大)

2. 菌落类型

据华北制药厂的资料报导,“730”菌种在黄豆饼粉、葡萄糖、琼脂培养基上,于 28°C 培养 11~12 天,菌落形态可有五种不同类型:

(1) 菌落直径 7~8 毫米,放射纹路整齐,呈梅花型,中央突起,气生菌丝灰白至粉灰,菌落背面黄绿色。

(2) 菌落大小形状同(1),但气生菌丝呈深灰绿色。

(3) 菌落小,直径 4~5 毫米,放射纹路少,气生菌丝灰白色。

(4) 半光秃型, 大部分菌落不规则, 有的甚至延伸较大、扁平, 在培养 8 天以前, 大部无气生菌丝生长, 以后逐渐在部分地方有一些孢子, 有的白色, 有的粉红色, 或灰绿色。

(5) 无孢子的光秃型, 有的菌落皱纹特多, 碎细。

将前三种类型的菌落移至斜面, 互相之间看不出差异, 初步认为属正常型, 而后两种变异较大, 属变异型。

3. 生理特性

春雷霉素产生菌“730”适于在有机培养基中生长, 最适生长条件为 28°C , $\text{pH}7.0\sim7.2$, 好气。对碳源利用以甘油、油脂、肌醇、葡萄糖、果糖较好, 也能利用麦芽糖、半乳糖、甘露糖、棉子糖等。对氮源可以利用有机氮源如蛋白胨、黄豆饼粉、蚕蛹粉、鱼粉等, 也能利用无机氮源如硝酸盐。铁离子对春雷霉素的生产有一定影响。

4. 菌种的保存

为了保持菌种的优良特性, 并防止生产菌种的退化, 必须重视做好菌种的保存。正常的“730”菌种在黄豆饼粉、甘油、蛋白胨、琼脂培养基上, 于 28°C 培养 11~12 天, 其斜面外观应是菌苔厚, 孢子生长丰满, 呈灰白至粉灰色, 基内菌丝及分泌的可溶性色素为淡黄色素。若保管不善就会出现菌种的退化现象。菌种退化的原因, 主要由于菌种内部的变异性, 随着在斜面上传代次数的增加, 退化现象会突出地反映出来, 如菌苔变薄, 孢子生长不丰满, 或者只长白色气生菌丝, 而不形成孢子, 甚至变成光秃型等。为了防止菌种的退化, 必须注意控制斜面传代的次数, 并经常进行菌种的自然分离选育, 即将菌种稀释分离培养成单孢子菌落, 挑选正常类型的菌落, 保存备用。

春雷霉素菌种的保存，一般采用砂土保存法。取细黄砂及泥土分别先用水洗净，再用 3% 的 HCl 浸洗，然后用水洗至中性(即相当于水的 pH)，再用 4% 的 NaOH 浸洗，最后用水洗至中性(即相当于水的 pH)，烘干，取黄砂 2 份和泥土 1 份充分混匀备用。

经过以上处理的砂土，分装于内径 9 毫米、长约 90 毫米的玻璃试管中，每管装入砂土高度约 15 毫米，管口塞上棉塞。该砂土管经 3~5 次间歇高压灭菌后，挑取少量灭菌砂土接种在肉汤斜面培养基上，于 37℃ 培养 24 小时，以检验灭菌效果，证明无菌方可使用。

保存的菌种，培养到孢子完全成熟后，即可接入灭菌的砂土管内。其做法有两种：

(1) 干法：用接种环以无菌操作将 2 支斜面的孢子轻轻刮入 1 支砂土管中(注意不要带入培养基)，摇匀即成。

(2) 湿法：在无菌室或接种箱内，在每支孢子斜面中加入约 2 毫升的无菌水，洗下孢子，并用灭菌玻珠将孢子打散，然后经四层灭菌纱布无菌过滤以除去菌丝体，制成孢子悬浮液(若省去玻珠打散及纱布过滤两步也无大影响)，再用灭菌滴管吸取 0.1~0.2 毫升加入每支无菌砂土管中，即可将此含菌的砂土管放在干燥器中干燥，干燥器内放有五氧化二磷(P_2O_5)，或无水氯化钙($CaCl_2$)，或生石灰(CaO)等干燥剂，必要时可以调换干燥剂，直至砂土完全干燥为止。也可用真空干燥的方法，先把含菌砂土管放在装有干燥剂的干燥器内，然后用真空泵抽气约 7~8 小时后即可干燥。

制成的砂土管应抽取 2~3 支，挑取少量砂土接种于肉汤斜面培养基上，检验是否污染杂菌。证明无杂菌感染，就可将

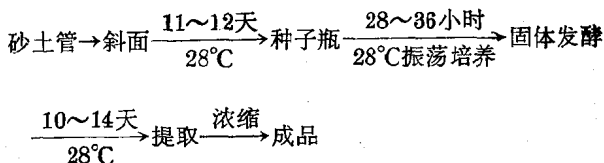
已干燥的砂土管用石蜡封口,使成密闭,即为成品。

制好的砂土管,应放在干燥器内(或放在装有生石灰的大口瓶内),置荫凉干燥处保存。

(二)春雷霉素土法生产的原料

黄豆饼粉	磷酸二氢钠(NaH_2PO_4)
蛋白胨	氢氧化钠(NaOH)
甘油	盐酸(HCl)
食盐(NaCl)	食油下脚(如米糠油,菜油,
碳酸钙(CaCO_3)	棉籽油,亚麻仁油,豆油
琼脂(洋菜)	等下脚均可)
豆油(或花生油、玉米油、	蚕蛹粉
菜油)	麸糠(稻壳)
磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	春雷霉素纯品(作标准用)
硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	pH试纸(0.5~5.0; 6.4~
牛肉膏(牛肉汁亦可)	8.0; 5.4~7.0等三种)
磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)	美蓝(亚甲基蓝或次甲基
	蓝)

(三)土法生产流程



(四)斜面孢子(一级种子)的培养

【培养基成份】

*黄豆饼粉	1 克	碳酸钙(CaCO_3)	0.2 克
蛋白胨	0.3 克	琼脂(洋菜)	2.5 克
甘油	1 克	自来水	100 毫升
蚕蛹粉	0.3 克	用氢氧化钠(NaOH)溶液	
食盐(NaCl)	0.5 克	调pH 至 7.0~7.2	

将以上成份混和加热,待琼脂熔化后分装入试管,塞上棉塞。然后经 1.2 公斤/平方厘米高压蒸气灭菌 25 分钟,取出搁置成斜面。

取春雷霉素产生菌的砂土管一支,按无菌操作,用接种环取少量砂土移置到斜面上并均匀涂布。然后将斜面置 28°C 培养 11~12 天,见到斜面上孢子生长丰满呈粉灰色,即可取出,放在荫凉干燥处(约 10°C)保存备用,保存期以不超过一个半月为宜。

(五)液体种子(二级种子)的培养

【培养基成份】

豆油(或花生油,玉米油)	1 克
黄豆饼粉	1.5 克
食盐(NaCl)	0.3 克
磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	0.1 克
硫酸镁(MgSO_4)	0.05 克
自来水	100 毫升
pH	7.0~7.2

配成后充分摇匀,每个 500 毫升的三角瓶装 100 毫升培养基,加棉塞,高压灭菌(1.2 公斤 30 分钟)。按无菌操作将斜

* 黄豆饼粉加入 10 倍量的水(例如 10 克的黄豆饼粉加入 100 毫升水)加热搅拌煮沸 10 分钟,用四层纱布过滤,取用滤液作配制培养基之用。

面孢子接种于培养基内，每瓶接入斜面孢子一小块，约1平方厘米，然后于28℃振荡培养28~36小时。振荡培养的时间与使用的摇床往复频率有关，每分钟100~110次，一般培养24~28小时即可，若80~90次，一般需36小时左右。总之，应依菌丝生长好坏而灵活掌握。

种子长得好坏是一个重要关键。在接种固体前必须经过镜检，即按无菌操作取少量的培养液置载玻片上，小火烘干后，以美蓝溶液染色约2分钟，然后用水冲去多余的美蓝染色液，干后在显微镜下检查，一般用油镜（1350~1500倍）。镜检结果要求菌丝量多，长而粗壮，未断裂或开始断裂，染色深而均匀，无杂菌，方可接种。

(六)固体发酵(三级发酵)

【培养基成份】

食油下脚(如菜油,豆油,米糠油等)	8%
黄豆饼粉	10%
蚕蛹粉	5%
麸糠	77%

每100克固体培养基加0.17%的氢氧化钠溶液130毫升，拌匀后分装入瓶，每只蘑菇瓶(容积750毫升)装料40~50克。这样配制的培养基在消毒前的pH约为8.0左右，消毒后的pH为6.2~6.4左右。塞上棉塞于1.5公斤高压灭菌1小时。冷却后接种二级种子，每100克固体培养基接种30~40毫升，摇匀后置28℃培养。4~6天后可见有白色菌体生长，10~14天后即可取出。发酵好了的固体物外观白色至灰白色的菌体很多，pH6.0~6.2，镜检菌丝量很多，并有孢子，

染色很浅。

(七)发酵过程中应注意的事项

(1) 不要用霉腐变质的原料,如霉的黄豆饼粉,变质的食油(或下脚),等等。

(2) 保证生产菌种的质量是达到稳产高产的首要条件。第一,菌种传代不要太多,以防菌种退化。第二,有条件的地方应做好菌种复壮选育工作,确保菌种的优良特性和不断选育高产菌种。

(3) 一级斜面菌种保存时间不宜太长。在 10°C 保存最多不要超过 45 天;在夏天如无条件控制温度,更不宜久存。最好算好时间保证生产用新鲜的菌种。一级斜面菌种不宜与有机溶剂如甲醇、乙醚、酒精、丁醇等等同放一处,以免有机溶剂气体伤害菌种,引起蜕变。

(4) 在整个发酵过程中都要注意防止杂菌污染。在一级斜面菌种方面,斜面制成后最好预先放在 37°C 培养 24~48 小时,无杂菌方可使用。接种后 1~2 天内要注意检查,如发现有杂菌污染的斜面,要及时淘汰。在二级种子方面,接种三级前应当仔细镜检,排除染菌的种子。另外,一个单位如果同时生产杀螟杆菌、五四〇六、九二〇等品种,为了避免不同品种之间相互干扰,用具(如接种箱,接种环等)最好能与杀螟杆菌分开,如无条件则必须于使用前严格灭菌。此外对环境卫生、灭菌、无菌操作等等都应重视。总之,要从思想上加以重视,从各个环节加以控制,只有这样才能有效地防止杂菌污染。