

农抗“769”工业化小试工艺的研究

曾广然 李敬轩 谢淑仪
杜长喜 杨石嶂 韩素梅

(吉林省农科院植保研究所)

近十年来,我省由于汞制剂存在残毒和公害问题,因而停止生产使用,原来一些几乎很难找到的禾谷类黑穗病和水稻恶苗病又逐年回升,成为生产上的重要病害。据不完全统计,每年约损失粮食六、七万吨。全国也有类似情况。寻找新的种子消毒剂刻不容缓。根据1970年国务院“要大力推广微生物农药”的指示精神,我所从1971年开始进行抗菌素筛选研究,从公主岭的土壤中分离到一株放线菌,经中国科学院微生物研究所鉴定,定名为不吸水链霉菌公主岭新变种(*Streptomyces ahygroscopicus gongzhulingensis* n. Var.)。用玉米查子土法培养生长很好,经辽、吉、黑、冀、晋、内蒙六省(区)1977和1978两年四百九十余万亩试验示范,用其玉米查子培养料的浸泡液处理种子,对种子传染的禾谷类黑穗病和水稻恶苗病的防治效果稳定在95%以上,和赛力散一样;对土壤传染的高粱丝黑穗病也有50%左右的防效,比赛力散还好些。初步认为可以代替赛力散作种子消毒剂〔1〕〔2〕。但土法培养受种种条件限制,成品率较低,产品数量有限,不能满足生产的需要,“769”的毒性虽未得出结论,为准备工业化生产工艺,先做小试是必要的。因此,1978年进行了发酵条件的研究。

一、种子培养基的选择

为了寻找对“769”生长较好、产孢子量多、效价较高的适合培养基,先后选配了二十二种培养基配方进行比较试验,以原用的高氏2号培养基为对照。具体试验方法是:(1)将“769”菌种移植于各种培养基的试管斜面上,置于28°C恒温箱内培养,定时观察其生长情况;(2)将“769”菌种涂抹于分别倒有各种培养基的培养皿平板上,置于28°C恒温箱内培养一周左右,再挑取同样大小的琼脂菌块,移置于撒有高粱散黑穗病菌孢子(2%琼脂培养基)的培养皿内,在25°C恒温箱里培养6小时后,取出镜检孢子发芽情况,测量其不发芽圈的大小,以确定其抑菌力;(3)挑取培养于不同培养基上的“769”菌块,倒印在玻片上,视其玻片上孢子的多少,配合肉眼观察,确定其产生孢子的多少。试验结果表明,“769”在1、2、3、5、7、9、10、11、13、14、19等11种培养基上生长较快、较好;尤以2、3、8、9、10、11、13、14、19等号更好。其中13号即高氏2号。在三次试验中,“769”在11号培养基上生长后抑菌圈半径分别为1.15、1.13和1.16厘米,均名列第一位。此外,在三次试验中观察到,“769”产生孢子较多的培养基有1、2、4、5、9、11、14、17、20等号。

综合以上试验结果，明显看出11号培养基适合于“769”的生长，表现菌丝生长发育快，产生孢子多，抑菌力较强。而高氏2号培养基虽然菌丝生长发育较好，但产生孢子较少，抑菌力也不如11号培养基。初步认为11号培养基可以用作“769”的斜面种子培养基。

11号培养基的配方如下(%)：

牛肉膏 0.5 甘油 1.0 蛋白胨 0.5 琼脂 2.0 氯化钠 0.5 PH 7.0

二、发酵培养基的选择

(一)基础培养基的选择 为了寻找对“769”深层发酵菌丝生长发育良好和发酵效价较高的适合培养基，首先选配了十种培养基配方进行摇瓶发酵比较试验。采用300毫升的三角瓶，每瓶装培养基40毫升，经灭菌接种后，在26~28°C下用往复式摇床培养72小时，然后取出用双层滤纸片法测定发酵液对高粱散黑穗病菌孢子发芽的抑制能力(方法同前)，同时进行菌丝染色，镜检菌丝发育情况。以8号培养基的抑菌力最高，抑菌圈半径达0.98厘米。镜检菌丝发育情况，也以8号培养基生长最好，菌丝明显分枝，粗壮，72小时开始产生小空泡，发育十分正常。初步认为8号培养基可做为“769”发酵的基础培养基。

8号发酵培养基的配方如下(%)：

黄豆饼粉 2.0 磷酸二氢钾 0.1 氯化钠 0.1 葡萄糖 1.0 玉米粉 1.5
碳酸钙 0.3 酵母粉 0.4 自然PH

(二)不同营养成分对“769”深层发酵的影响

1、第一、二次正交试验结果：为了进一步考察黄豆饼粉、葡萄糖、玉米粉和酵母粉四种主要成份对“769”生长发育的需要情况，1978年6月采用正交设计法进行两次摇瓶发酵试验。试验方案见表1。

表1 因素和位级表

因素	黄豆饼粉	葡萄糖	玉米粉	酵母粉	磷酸二氢钾	氯化钠	碳酸钙
位级 1	0.0%	1.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.1%	0.3%
位级 2	2.0	2.0	1.5	0.4	"	"	"
位级 3	3.0	3.0	3.0	1.0	"	"	"

注：各种配方自然PH

试验选用正交表L₉(3⁴)，并以8号发酵培养基为对照，全试验共10个处理。摇培温度28±1°C，用往复式摇床，培养95小时。抑菌圈测定方法同前。两次试验结果见表2。

由表2第一次试验结果看出，葡萄糖是主要因素，尤以3%用量表现较好，但它和2%用量之间差异不明显，应选用2%用量比较经济。其次是酵母粉，以0.4%用量较好。黄豆饼粉以3%用量较好，但与不加黄豆饼粉处理之间的差异不明显。玉米粉在三个位级中以位级1表现较好，加入玉米粉反而对“769”发酵不利。而在9个试验号中，以6

号最好，平均抑菌圈半径达0.90厘米，即 $A_3B_2C_1D_2$ 。原来8号发酵培养基（对照）的平均抑菌圈半径达0.88厘米，仅次于6号试验处理，仍然是一个较好的发酵培养基。

表2 第一、二次正交试验结果分析

因素 列号 试验号	黄豆饼粉	葡萄糖	玉米粉	酵母粉	平均抑菌圈半径(厘米)	
	A	B	C	D	第一次	第二次
1	1 (0)	1 (1.0)	3 (3.0)	2 (0.4)	0.68	0.59
2	2 (2.0)	1	1 (1.0)	1 (0)	0.62	0.49
3	3 (3.0)	1	2 (1.5)	3 (1.0)	0.71	0.67
4	1	2 (2.0)	2	1	0.82	0.60
5	2	2	3	3	0.75	0.57
6	3	2	1	2	0.90	0.70
7	1	3 (3.0)	1	3	0.85	0.63
8	2	3	2	2	0.82	0.69
9	3	3	3	1	0.86	0.60
10 (对照)	2	1	2	2	0.88	0.43
I = 位级1三次抑菌圈半径之和	2.35(1.82)	2.01(1.75)	2.37(1.82)	2.30(1.69)	总合 = 7.01 (5.72)	
II = 位级2三次抑菌圈半径之和	2.19(1.93)	2.47(2.05)	2.35(1.96)	2.40(1.98)		
III = 位级3三次抑菌圈半径之和	2.47(1.97)	2.53(1.92)	2.29(1.94)	2.31(2.05)		
极差R = 最大数减最小数	0.28(0.15)	0.52(0.30)	0.08(0.14)	0.10(0.36)		

注：表中 I、II、III 项括弧内数字为第二次试验计算结果。

由表2第二次试验结果(括弧内数字)来看，葡萄糖和酵母粉仍然是主要因素。葡萄糖以2%用量较好；酵母粉1%用量比0.4%用量好些，但差异不明显，从经济上考虑，以0.4%用量更合适些。黄豆饼粉和玉米粉各用量之间也有些差异，但都不够显著。在9个试验号中，仍以6号(即 $A_3B_2C_1D_2$)最好。这一结果和第一次正交试验完全一致。由此说明葡萄糖和酵母粉是“769”的必需营养，其经济用量分别是2%和0.4%。

2、第三次正交试验结果：1978年6月中旬，为了进一步考察各种营养成分对“769”深层发酵生长发育的影响，选择11种成份进行正交试验。试验方案见表3。

表3 因素和位级表

因素 位级	葡萄糖	玉米粉	黄豆饼粉	酵母粉	氯化钠
位级1	0.0%	3.0%	0.0%	0.4%	0.1%
位级2	2.0	0	2.0	0	0.4

(接前表)

可溶性淀粉	玉米浆	硫酸铵	硫酸镁	磷酸二氢钾	碳酸钙
0.0% 1.0	2.0% 0	1.0% 0.4	0.03% 0	0.02% 0.1	0.5% 1.0

注：各种配方自然PH

试验选用正交表 $L_{12}(2^{11})$ ，全试验共12个处理。试验条件与调查方法和上次试验相同。试验结果见表4。

表4 第三次正交试验结果分析

因素 列号 试验号	葡萄糖	玉米粉	黄豆饼粉	酵母粉	氯化钠	可溶性淀粉	玉米浆	硫酸铵	硫酸镁	硫酸二氢钾	碳酸钙	平均抑菌圈半径 (厘米)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
1	1 (0)	1 (3.0)	1 (0)	2 (0)	2 (0.4)	1 (0)	2 (0)	1 (0)	2 (0)	2 (0.1)	1 (0.5)	0.56
2	2 (2.0)	1	2 (2.0)	1 (0.4)	2	1	1 (2.0)	2 (0.4)	2	2	2 (1.0)	0.53
3	1	2 (0)	2	2	2	2 (1.0)	1	2	2	1 (0.02)	1	0.67
4	2	2	1	1	2	2	2	2	1 (0.03)	2	1	0.49
5	1	1	2	1	1 (0.1)	2	2	2	1	2	2	0.66
6	2	1	2	2	1	2	2	1	2	1	1	0.54
7	1	2	1	1	1	1	2	2	2	1	2	0.27
8	2	2	1	2	1	2	1	1	2	2	2	0.94
9	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	2	0.55
10	2	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	0.55
11	1	2	2	1	1	1	1	1	1	2	1	0.60
12	2	2	2	2	2	1	2	1	1	1	2	0.44
I = 位级 I 六次抑 菌圈半 径之和	3.31	3.39	3.36	3.10	3.56	2.95	3.84	3.63	3.29	3.02	3.41	总和 = 6.80
II = 位级 II 六次抑 菌圈半 径之和	3.49	3.41	3.44	3.70	3.24	3.85	2.96	3.17	3.51	3.78	3.39	
极差 R = 最大数减 最小数	0.18	0.02	0.08	0.60	0.32	0.90	0.78	0.46	0.22	0.76	0.02	

由表4结果明显看出,可溶性淀粉、玉米浆、磷酸二氢钾三种成份是主要因素。加用1%可溶性淀粉和2%玉米浆比不加的处理显著为好;磷酸二氢钾0.1%用量比0.02%用量显著为好。酵母粉在这次试验中表现不加的反而比0.4%用量好,和前两次试验相反,有待进一步验证。

其次,硫酸铵、氯化钠、硫酸镁、葡萄糖四种成份在两个位级间也有较明显的差别。硫酸铵以不加区最好;氯化钠0.1%用量比0.4%用量好;加用0.03%硫酸镁比不加的要好些;加入2%葡萄糖比不加的好。

第三,玉米粉、黄豆饼粉和碳酸钙三种成份不是主要因素。玉米粉和黄豆饼粉加与不加差异不大;碳酸钙两种用量差异不大,应该用低量0.5(或以下)。

综合以上三次正交试验结果来看,可以初步组成一个新的合成培养基(%):

可溶性淀粉 1.0 葡萄糖 2.0 玉米浆 2.0 酵母粉 0.4 氯化钠 0.1
磷酸二氢钾 0.1 硫酸镁 0.03 碳酸钙 0.5%(或0.3) 自然PH

这个新的合成培养基对“769”深层发酵菌丝生长发育的稳定程度和经济效益,有待进一步验证。

三、“769”的发酵条件

(一) 种子菌龄、PH和发酵时间的关系:这次试验采用摇瓶培养。菌龄分24、36、48小时三个处理,发酵时间分48、72、96、120、144小时五个处理。种子和发酵培养基均用8号基础培养基。种子接种量一律为5%。全部试验方法同前。试验结果见表5和图1、图2。

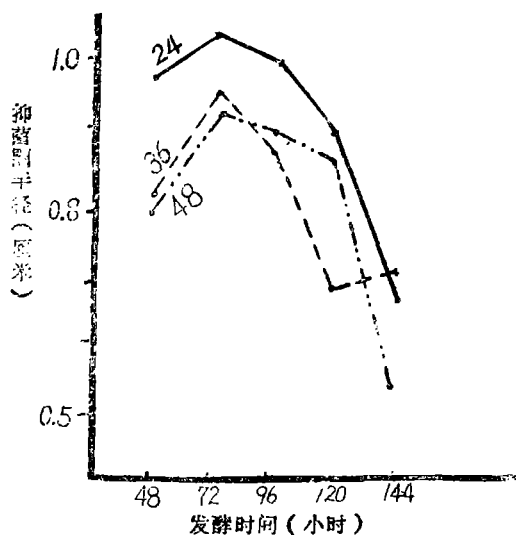
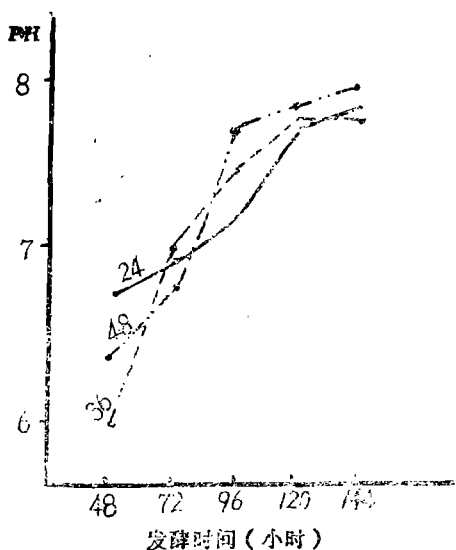


图1 三个菌龄不同发酵时间的PH变化

图2 三个菌龄不同发酵时间的抑菌力变化

由表5结果和图2曲线来看,在三个菌龄中,以菌龄24小时的抑菌圈半径最大,次为36小时,而48小时最小。从菌丝镜检中也看出,仍以菌龄24小时最好,表现菌丝粗壮分枝,发育很正常。而菌龄48小时的菌丝出现早衰、断裂、自溶现象。可见“769”发酵种子菌龄

以24小时为好，菌龄过长，对发酵不利。

表5 不同菌龄和不同发酵时间对PH和抑菌力的影响

处理号	处理内容	平均PH值	平均抑菌圈半径 (厘米)
1	菌龄24小时、发酵时间48小时	6.6	0.99
2	" " 72 "	6.8	1.07
3	" " 96 "	7.1	1.05
4	" " 120 "	7.6	0.89
5	" " 144 "	7.9	0.68
6	菌龄36小时、发酵时间48小时	6.0	0.82
7	" " 72 "	6.9	0.97
8	" " 96 "	7.4	0.88
9	" " 120 "	7.6	0.70
10	" " 144 "	7.8	0.71
11	菌龄48小时、发酵时间48小时	6.3	0.80
12	" " 72 "	6.7	0.94
13	" " 96 "	7.6	0.93
14	" " 120 "	7.7	0.87
15	" " 144 "	7.9	0.55

从发酵时间来看，“769”发酵48小时，即表现出较高的抑菌力；发酵72小时达到最高峰；次为96小时。而超过96小时后，抑菌力则直线下降。菌丝发育情况也完全一致。48小时生长良好，尤以72小时生长最好；次为96小时。当超过96小时，菌丝生长细弱，断裂自溶。因此，在摇瓶培养条件下，“769”发酵的最适时间为72小时，最长不宜超过96小时。

由表5和图1明显看出，随着发酵时间的延长，PH直线上升。在三个菌龄中，24小时区PH上升比较缓慢，96小时PH才达到7.1；而菌龄36小时和48小时区PH上升更快。另一方面三个菌龄一致表现出发酵时间72小时以内，PH均在7.0以下。当发酵时间超过96小时后，PH则急剧上升，菌丝生长发育受到严重不良影响，抑菌力显著下降。看来“769”发酵时间72小时不用另调PH，这对今后工业生产十分有利。

(二) 增加培养基营养对“769”发酵的影响：国内外常常采用丰富培养基来提高抗菌素的产量。“769”增加营养是否能延长发酵周期，提高发酵效价，也是一个重要问题。试验以8号基础培养基为对照(B组基)，在8号培养基的基础上增加营养比例，组成一个新的A组培养基(玉米粉4%，葡萄糖3%，酵母粉1%，其它成份与8号相同)，进行对比试验。用往复式摇床，摇瓶种子用8号培养基，菌龄24小时，接种量为5%，摇培时间分48、72、96和120小时四个处理，到时分别测定PH、菌丝发育和抑菌力。试验结果见表6和图3。

表 6

增加营养对“769”发酵的影响

处理号	处 理 内 容	PH	平均抑菌圈半径(厘米)	菌 丝 发 育 情 况
1	A组培养基, 摇培48小时	5.5	1.06	菌丝粗壮成网, 染色均一
2	B组 " "	5.5	0.88	" 染色较浅
3	A组 " 72小时	6.7	0.93	" 染色不均
4	B组 " "	6.4	0.93	" 染色均匀
5	A组 " 96小时	6.0	1.01	" 发育旺盛
6	B组 " "	6.5	0.78	粗状, 少分枝, 染色变浅
7	A组 " 120小时	6.7	0.95	菌 丝 开 始 自 溶
8	B组 " "	7.1	0.85	"

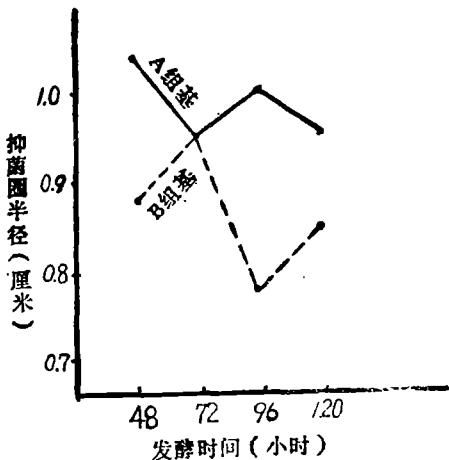


图 3 增加营养对“769”发酵的影响

30°C接入发酵罐, 接种量 5%。罐内温度 $28 \pm 1^\circ\text{C}$, 搅拌速度 200 转/分, 通气量 1:0.5 立升/分, 自动记录 PH、溶解氧、温度(见表 7)。抑菌力测定方法同前。

表 7 “769”不同发酵时间溶解氧、pH和抑菌力变化情况

发酵时间(小时)	1 2	4 8	6 0	6 8
溶解氧	6 ppm	4 ppm	3 ppm	3 ppm
p H	6.0	6.5	7.0	7.5
抑菌圈半径(厘米)		1.0		1.92

根据自动记录数据看出, “769”在发酵罐条件下, 12小时以前 PH 有下降的趋势, 保持在 6.0~4.8 之间。随着发酵时间的延长, PH 逐渐上升, 至 60 小时达到 7.0, 68 小时达到 7.5 以上。随着发酵时间的延长, 溶解氧逐渐降低, 60 小时后发酵液粘度增加, 溶解氧降低到

较低水平 3 PPM, 甚至降到 2 PPM 以下。可能由于发酵液的粘稠度过大, 菌丝浓度极高, 增加搅拌速度到 250 转/分, 溶解氧也不上升。看来过大的通气量并不必要, 1:0.5 的通气量适合于“769”的发酵。

分期测定发酵液的抑菌圈结果, 63 小时已达到高峰, 抑菌圈半径达 1.92 厘米, 结合菌丝发育情况, 初步认为到 72 小时即应放罐。这一结果和上述摇瓶试验一致。

在发酵罐的条件下, “769”的发育表现出四个明显不同的阶段 [3]。24 小时菌丝处于迟滞期; 48 小时进入对数期, 菌丝大量繁殖, 并有小空胞产生, 原生质开始凝聚; 60 小时菌丝出现大空胞, 原生质高度凝聚, 进入稳定期, 这是大量合成抗菌素的阶段; 达 70 小时, 菌丝染色变浅, 进入自溶期, 可作为放罐的菌丝生理指标。

(四) “769”深层发酵条件下的糖、氮代谢情况: 测定糖、氮代谢情况是抗菌素生产的重要步骤。试验采用往复式摇床, 500 毫升三角瓶装量 50 毫升, 种子和发酵培养基均用 8 号培养基。种龄 24 小时, 接种量 5%。不同时间取样测定糖(还原糖)、氮(氨基氮)。糖的测定用碘量法, 氨基氮用甲醛法 [3]。其它试验方法同前。试验结果看出。葡萄糖易于利用, 而且消耗很快, 中期补加葡萄糖, 可大大提高效价(本试验提高一倍), 进一步说明葡萄糖是“769”的必需碳源。另一方面, 当发酵时间超过 80 小时后, 菌体自溶, PH 和氨基氮直线上升, 还原糖和生物活性(抑菌圈半径)则明显下降, 和上述摇瓶结果一致, 说明“769”在 8 号培养基营养条件下的最适发酵时间不宜超过 80 小时。如果采用丰富培养基, 其最适发酵时间还需另行试验确定。

在试验中, 看到在营养液中加入铁屑对“769”生长发育有一定不良影响, 如加入过量, 则完全不能生长。这是今后生产中应该注意的问题。

(五) “769”发酵液的后处理条件: 在抗菌素生产中, 后处理条件直接影响到抗菌素的回收率和生产成本, 这是工厂关心的问题。因此我们也探讨了“769”发酵液的后处理条件。将“769”发酵液调至 PH 2、4、8、11 四个处理, 在 75°C 下真空浓缩 30 分钟, 使发酵液浓缩成原体积的十分之一。试验结果见表 8 和图 4。

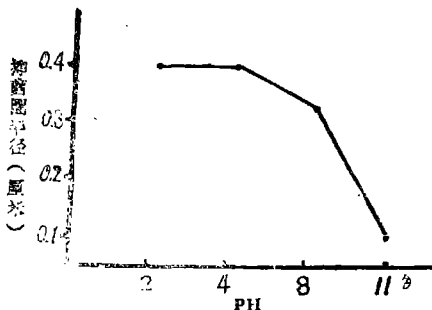


图 4 发酵液的生物测定与 PH 的关系

表 8 PH 对“769”发酵液抑菌力的影响

PH	抑菌圈半径 (厘米)		回收率 (%)
	浓缩前	浓缩后稀释 10 倍	
2	0.4	0.4	100.0
4	0.4	0.4	100.0
8	0.4	0.3	75.0
11	0.4	0.0	0.0

由表 8 和图 4 曲线来看, “769”发酵液在酸性和中性条件下较为稳定, 在强碱条件下全部被破坏。因此发酵液必须在酸化后进行真空浓缩。初步认为采用 PH 4.0、75°C 进行真空浓缩, 生产浓缩液是可行的。关于滚筒干燥制成粉剂的适合条件, 有待进一步考察。

四、讨论与总结

“769”是新选出的一个农用抗菌素, 经大面积防治试验, 对种子传染的禾谷类黑穗

病和水稻恶苗病都有很好的防治效果。目前大多数省(市、区)都在开展“769”的生产方法和防治研究,防治对象还在不断扩大,一致认为是一个有希望的农抗品种。

目前农业生产上采用土法生产,大搞群众运动,解决一部分实际问题。但土法生产的数量有限,成品率较低,满足不了生产的需要。根据国内外的实践经验,采用现代化的大工业生产,产品多,质量高,成本低,还可以发挥工业支援农业的积极性,是今后的发展方向。特别是随着我国四个现代化建设的发展,农药生产将有一个更快的发展速度。因此,开展“769”工业化生产工艺的研究,很有必要。

试验证明,11号固体培养基对“769”菌丝生长发育良好,产生孢子量多,抑菌力也较强,可以用作斜面种子培养基。原用高氏2号培养基繁殖“769”斜面种子,虽然菌丝生长还好,但长孢子量较少,抑菌力也不如11号培养基。经过摇瓶和发酵罐发酵试验,选出8号培养基对“769”深层发酵菌丝生长发育粗壮,发酵液的抑菌力略高于土法生产的玉米查子培养料,可以作为目前“769”发酵的基础培养基。通过正交试验证明,葡萄糖、酵母粉、可溶性淀粉,玉米浆是主要因素,特别是中期补加葡萄糖,可以大大提高效价。采用丰富培养基,也能延长“769”的发酵周期,提高效价。在试验中还组成了一个新的合成培养基,它的经济效益有待进一步验证。8号培养基也有待进一步完善。考虑到生产成本往往决定农抗的命运,选择价廉易得的原料,还是今后的重要任务。

试验证明,“769”发酵种子菌龄以24小时最好,表现起步效价和全程效价都显著为高。发酵时间以72小时较为合适,最长不宜超过80小时。在发酵72小时内,PH缓慢上升,一般不超过7.2,可以不另调PH,这对工业生产是很有利的。发酵时间超过80小时后,菌体自溶,氨基氮和pH直线上升,还原糖和生物活性明显下降。机械搅拌200转/分,通气量1:0.5比较合适。在发酵过程中,“769”表现出四个明显的发育阶段,自溶期可作为放罐的菌体生理指标。采用PH4.0、75°C条件下真空浓缩制备浓缩液,生物活性不受影响;而在强碱条件下,抗菌素受到严重破坏,应当注意。

由于受到试验条件的限制,每次试验的生物活性有高低,但总的趋势是一致的。这一小试工艺,可提供为以后中间试验的依据。

一般说来,一个新农抗是否有生产价值,还取决于生产效价的高低。目前“769”还是一个“野生”菌株,经过几次自然分离,生物活性有所提高,但还是比较低的。因此,菌种诱变工作急待开展,以便选育出高效价的新菌株,为工业化生产创造有利条件。

参 考 文 献

- [1] 吉林省农业科学院植物保护研究所 1977 代汞拌种剂农抗“769”研究选编
- [2] 吉林省农业科学院植物保护研究所 1978 代汞拌种剂农抗“769”《农业科技通讯》1978年2月 P. 32
- [3] 吉林大学化学系生化教研室 1975 《微生物及其应用》