

5406 抗菌菌肥料作用机制的研究

II. 产生抗菌物质的分析研究

尹莘耘 荀培琪 林声远 邱桂英 張均康

(中国农业科学院土壤肥料研究所, 北京)

在温室、田间试验中, 5406 抗菌菌肥料对农作物除表现明显的刺激作用外^[1,2,3,5,6], 尚具有防病的效能^[1,2,5], 特别在防止棉花、大豆、豌豆等作物的烂种上, 效果尤为明显, 且较稳定^[4,5]; 但对小麦锈病^[3]、棉花立枯病^[5]、黄萎病等^[5], 则有时效果良好, 有时较差。因此有必要分析其所产生的抗菌物质, 以稳定和提高防病的效果。

材 料 和 方 法

将 5406 菌种繁殖在固体培养基^[2] (肥土: 豆饼粉 = 10:1) 和液体培养基 (黄豆饼粉 2.0%, 葡萄糖 2.0%, NaCl 0.3%, CaCO₃ 0.4%) 中, 待充分发酵后, 以固体发酵物 (抗菌菌肥料) 的浸出液和液体发酵的菌体及滤液为材料, 进行抗菌物质的提取方法、稳定性能及生物测定等的研究^[7-11]。

实 验 结 果

(一) 发 酵 条 件

1. 培养基选择 试用了 6 种不同的发酵培养基, 结果表明, 以红霉素培养基^[7] (成分如前述) 所得到的效价最高 (见表 1)。

表 1 各种培养基对 5406 拮抗性能的影响*

培 养 基	拮抗性 (抑菌圈直径, 毫米)	
	枯草杆菌	红 酵 母
链霉素培养基	25.5	21.0
马铃薯-葡萄糖培养基	0.0	10.0
马铃薯-蔗糖培养基	15.0	21.0
红霉素培养基	26.5	23.5
新霉素培养基	0.0	20.0
拂霉素培养基	0.0	18.0

* 发酵时间为 48 小时。

2. 抗菌物质的检定 根据表 1 的结果, 选用红霉素培养基进行液体发酵, 同时制作固体发酵物, 以枯草杆菌 8 号和红酵母 112 号进行拮抗性测定, 结果如表 2。

表 2 5406 抗菌物质的检定

培 养 物		拮抗性能(抑菌圈直径,毫米)	
		枯草杆菌	红 酵 母
液体发酵物**	培养液	17	14
	菌体乙醇浸出液	0	17
	滤液	18	0
固体发酵物**	水浸液	—*	0
	乙醇浸液	—*	14

* 测定对红酵母的抑制作用时,加金霉素抑制细菌的生长;在测定固体培养物对枯草杆菌的作用时,由于不能加金霉素,易遭其他杂菌污染,故未测出结果,有待进一步试验。
** 液体发酵时间为 48 小时,固体发酵时间为 120 小时。

由表 2 结果得知,在 5406 的代谢产物中,抗真菌部分和抗细菌部分是两种不同的物质。

3. 发酵时间的决定 将 5406 菌种在液体和固体培养基中进行发酵,每隔一定时间取样测定其拮抗性,结果如表 3。

表 3 发酵时间对 5406 抗菌性能的影响

发 酵 物	发酵时间 (小时)	拮抗性能(抑菌圈直径,毫米)	
		枯草杆菌	红 酵 母
液体发酵物	24	20	21
	36	22	23
	48	24	24
	60	25	26
	72	23	22
	84	23	22
	96	14	16
	108	0	0
固体发酵物	48	—	0
	96	—	0
	144	—	26
	168	—	30
	192	—	22
	216	—	16
	240	—	0

由表 3 看出,5406 抗菌物质在液体培养时,经 60 小时左右达最高峰,108 小时以后则抗菌能力完全消失。在固体发酵时,抗细菌部分由于容易污染,未测效价;而抗真菌部分则在发酵培养 168 小时达最高峰,到 240 小时抗菌性能完全消失。

(二) 抗菌物质的性质

1. 溶解性 将 5406 发酵滤液和菌体浸出液分别点在滤纸条上,在各种不同溶媒系统中进行层析,层析完毕,将纸条贴在试验菌的洋菜平板上进行培养显层。计算其 R_f 值。

如表 4 所示。

表 4 5406 抗菌物质的溶解性

溶 媒 系 统	R _f 值	
	抗真菌物质	抗细菌物质
水	0.00	0.97
95%乙醇	0.97	0.80
80%丙酮	0.94	0.87
水饱和乙酸丁酯	0.00	0.74
乙酸丁酯:乙酸:水(2:1:1)	0.98	0.97
乙醚	0.00	0.00
水饱和丁醇	0.95	0.73
甲苯:乙醇(1:4)	0.95	0.87
氯仿	0.20	0.00

由表 4 得知, 5406 抗真菌物质和抗细菌物质均易溶于乙醇、丙酮、丁醇、甲苯:乙醇和丁醇:乙酸:水等溶媒中; 不溶于乙醚和氯仿。抗细菌部分可溶于水和乙酸丁酯中, 而抗真菌部分则不溶于水和乙酸丁酯中。

2. 在不同 pH 中的稳定性 将 5406 发酵滤液和菌体浸出液分装于试管中, 调 pH 分别为 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10, 放置 2 小时后分别中和至中性, 测定效价, 结果如图 1。

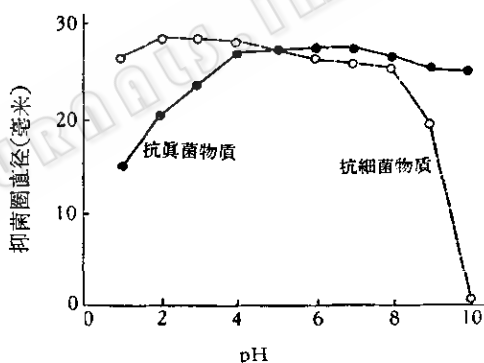


图 1 5406 抗菌物质在不同 pH 中的稳定性。

图 1 结果指出, 5406 抗真菌物质在碱性条件下比较稳定; 而抗细菌物质则在酸性条件下比较稳定。

3. 在不同温度下的稳定性 5406 抗真菌物质对热是比较稳定的, 在 80℃ 以下的各级温度中放置 2 小时, 活性基本上没有损失。在 40—80℃ 经 8 小时, 活性略有降低, 往往在 50℃ 烘箱中烘干 2—4 天, 仍有活性存在。5406 抗细菌物质对热特别敏感, 其发酵液 (pH7.8) 30℃ 经 8 小时, 40℃ 经 6 小时, 50℃ 经 4 小时, 即完全破坏。但在酸性情况下, 受热破坏的程度即可减轻。

(三) 提 要

根据 5406 抗菌物质的溶解性能及对 pH 和温热的稳定性能, 采取的提取方法如图 2 所示。

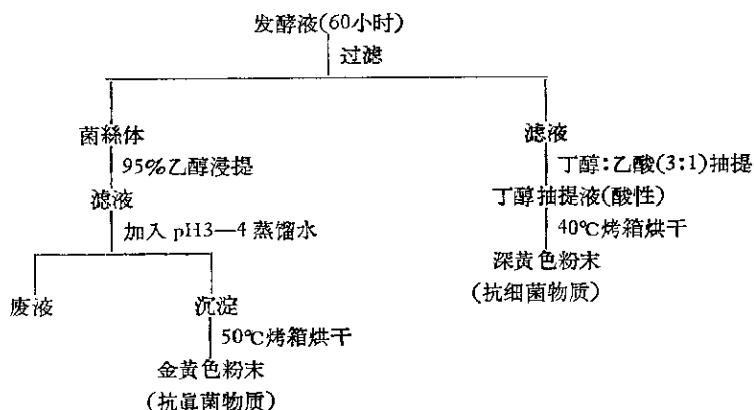


图2 5406 抗菌物质的分离提取。

根据图2方法所得抗菌物质,浓度在0.1—0.05%对试验菌有效。

讨 论

根据以上的实验结果,证实了在5406的代谢产物中有两种抗菌物质存在。由于该物质的产生,所以在施用5406菌肥时,有时能显示出明显的防病效果。但因该抗菌物质在菌肥中只有10天的时效,菌肥制成后,如不及时使用或施用于不适宜其继续繁殖和产生抗菌素的土壤中时,效果就显得差。所以在利用菌肥防治小麦锈病、棉花立枯病、棉花黄萎病时,其效果常有不同的表现,不如刺激作用稳定。因此,根据抗菌物质的特性作为菌肥来施用,如只要求刺激生长时,则于菌肥制成后,可以堆放较长的时间,刺激物质不致失去;而要求防病时,则必须在发酵完毕后三天以内施于田间,或者以棉子饼粉、肥土(1:10—30),或棉籽饼粉、猪粪、肥土(1:30:70),各混拌入菌肥母剂1—3份,施于田间,任其在发酵过程中产生抗菌物质以杀菌防病。如进行拌种为防止烂种增加出苗时,在土壤有机质丰富(黑土、棕壤土而pH在7—8.4之间者)的情况下,则所用的菌粉,只要干燥保存在室温下,使抗生素不失去活力,亦可在播种后继续繁殖而不断地产生有效物质。这样所要求的菌剂就不受时间的限制。

由于5406抗菌物质对温热特别敏感,在30℃以上即受破坏,故必需注意菌肥的贮存条件和及时应用等问题。一般而论,5406菌肥在早春或晚秋进行拌种防止烂种时施用,受温热的影响不大。但最好也要及时施用,并在施入土壤时,配合棉子饼、猪厩肥等营养物质,使延长其效果。

摘 要

5406 抗生素(放线菌)能在固体培养基(饼土)或液体培养基中形成抑制真菌和细菌生长的两种不同代谢产物。抗真菌部分存在于菌丝体中,可用95%乙醇提取。该物质在碱性情况下较为稳定。抗菌部分存在于发酵液中,可用丁醇:乙酸(3:1)混合溶媒提取。该物质在酸性情况下较稳定,在碱性情况下易被破坏,对温热也特别敏感。在发酵液中(pH7—8)30℃经8小时,40℃经6小时或50℃经4小时,全部破坏;但在酸性情况下,受热破坏的程度即可减轻。

参 考 文 献

- [1] 尹莘耘、杨开宇、陈鹏、诸德辉、罗静玉、陈应南：北京农业大学学报，3 (1)：55—65，1957。
[2] 尹莘耘：抗生素肥料的应用及其制造法，120 页，高教出版社出版，1958。
[3] 尹莘耘、刘闲秋、荀培琪、曾广然、曹功懋：抗菌素研究—IV，57—62 页，上海科学技术出版社，1961。
[4] 尹莘耘、张均康、荀培琪、林声远、邱桂英：中国植物保护学会学术会议年刊，1963。
[5] 尹莘耘：抗生素肥料及其应用，160 页，农业出版社，1965。
[6] 尹莘耘、荀培琪、邱桂英、林声远、张均康：微生物学报，11(2)：259—269，1965。
[7] 马誉滋：抗菌素，489 页，人民卫生出版社，1959。
[8] Brimley, R. C. & Barrett, F. C.: *Practical Chromatography*, Cambridge, 1954.
[9] Malek, I. *et al.*: *J. Hygiene, Epidemiol., Microbiol., & Immunol.*, 1:397—412, 1957.
[10] Waksman, S. A. *et al.*: *Science*, 109, 305, 1949.
[11] 佐木渝介：抗生物物质(上下册)，1147 页，日本，东京大学出版，1960。

STUDIES ON THE MECHANISMS OF ANTAGONISTIC FERTILIZER "5406"

II. ANALYSIS OF THE ANTIBIOTIC SUBSTANCES

YIN S. Y., XUN P. C., LIN S. Y.,
CHIU K. Y. AND CHANG J. K.

(*Institute of Soils and Fertilizers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Peking*)

Two antibiotic substances were isolated from *Streptomyces* "5406" grown either on solid or in liquid medium.

One was recovered from mycelium by extraction with 95% ethanol and found to have antifungal properties. It is stable in alkaline and under heat conditions, but sensitive to acid.

The other which had antibacterial properties, was extracted by butanol-acetic acid (3:1) from the culture filtrate. It is stable to acid, but decomposed completely at 30°C after 8 hours, 40°C after 6 hours and 50°C after 4 hours under alkaline condition.

The production, transportation and application of this fertilizer is discussed in the light of these findings.