

文章编号: 1674-7054(2014)03-0253-07

苏云金芽孢杆菌 A322 菌株发酵 培养基和发酵条件的优化

张路路¹ 朱朝华¹ 郭 刚²

(1. 海南大学 环境与植物保护学院 海南 海口 570228; 2. 中国热带农业科学院 海口实验站, 海南 海口 570102)

摘 要: 以菌体生长对数末期发酵液 OD_{600} 值为优化标准, 通过单因素和正交试验方法对前期室内实验筛选得到的对棉铃虫 (*Helicoverpa armigera* Hubner) 有较高活性的苏云金芽孢杆菌 BtA322 菌株进行培养基优化, 并进行发酵。结果表明, 最佳培养基配方为 0.5% 黄豆粉 + 0.5% 酵母粉 + 0.5% 葡萄糖 + 0.5% 胰蛋白胨 + 0.2% 碳酸钙 + 0.1% 磷酸二氢钾 + 0.1% 硫酸镁。最佳培养条件为培养时间 20 h, 初始 pH 值 7.5, 发酵温度 30 ℃, 摇床转速为 200 r · min⁻¹, 接种量 3%, 250 mL 三角瓶适宜装 35 mL 培养基。优化后的菌体生长量 OD_{600} 值比优化前的提高了 44.7%。

关键词: 苏云金芽孢杆菌; *Bacillus thuringiensis*; 培养基; 发酵条件

中图分类号: TQ 458

文献标志码: A

随着化学农药大面积的推广与使用, 其负作用如污染环境、残留农药危害人体健康、杀伤昆虫天敌等日益明显, 因此, 高效、低毒、低残留、与环境相容的生物农药的研究和开发成为了我国生物农药产业的主体^[1]。苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt) 属革兰氏阳性芽孢杆菌, 是目前国内外最广泛使用的生物农药^[2], 且对非目标生物安全无污染。苏云金芽孢杆菌微生物杀虫剂具有化学农药无可比拟的优点, 但生产成本高于化学农药^[3]。苏云金芽孢杆菌的发酵培养对营养物质的要求不高^[4], 但对发酵条件要求高, 且亚种、血清型或菌株不同, 其相应的发酵条件也不同, 因此, 如何降低生产成本、提高经济效益及减少污染环境已成为国内外研究 Bt 发酵培养的重点, 如杨建州^[5]等利用废味精水为主要原料对 Bt 进行发酵; Poopathi^[6]利用低成本的马铃薯、常用的糖、孟加拉豆为原料进行 Bt 发酵研究; Ghribi 等^[7]利用海水、大豆粉、淀粉为混合培养基对 Bt 进行发酵研究发现海水有利于 Bt 菌体的生长。笔者对前期筛选到的对棉铃虫有较高活性的 BtA322 菌株进行摇瓶发酵, 通过测定 BtA322 菌株生长对数末期发酵液菌体 OD_{600} 值为优化的标准, 采用单因素实验对 LB 培养基中的碳源、氮源和无机盐进行优化, 再用正交实验对培养基进行优化, 确定最佳培养基组合, 继而对初始 pH 值、温度、转速等发酵条件进行优化, 为其规模化生产及应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 菌种 本实验室前期筛选的苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis* Berliner, 简称 Bt) BtA322 菌株;

收稿日期: 2014-04-28

基金项目: 海南大学“中西部高校提升综合实力专项资金项目”; 海南大学热带作物种质资源保护与开发利用教育部重点实验室资助项目

作者简介: 张路路 (1988-), 男, 河南人, 海南大学环境与植物保护学院 2011 级硕士研究生. E-mail: zhanglu-lu1933@126.com

通信作者: 朱朝华 (1959-), 男, 副教授, 广西玉林人, 主要从事植物保护、农药学、杂草学、植物化感作用研究工作. E-mail: zch200518@21cn.com

对照菌株为笔者从市售 Bt 粉剂中分离的 Bt, 命名为 ZL-01。

1.1.2 培养基 由于前期筛选 BtA322 时, 以 LB 液体培养基的发酵液对棉铃虫进行生物测定, 因此, 实验仍用 LB 液体培养基为种子培养基和基础发酵培养基。LB 液体培养基: 胰蛋白胨 10 g, 酵母浸出物 5 g, 氯化钠 10 g, 蒸馏水补至 1 000 mL, pH 7.0。

1.1.3 主要试剂 蔗糖、葡萄糖、玉米粉、黄豆粉、酵母浸出物、胰蛋白胨、磷酸二氢钾、碳酸钙、氯化钠。

1.1.4 仪器设备 SPX-250B-Z 型生化培养箱; ZHWY-2112B 型恒温摇床; UV-1800 型紫外分光光度计; SW-CJ-1BU 型超净工作台; MLS-3780 型全自动高压灭菌锅; S20K 型 pH 计。

1.2 方法

1.2.1 BtA322 菌种活化及种子液的制备 将保存的菌种转接到斜面培养基, 30 ℃ 培养 24 h 备用。取 1 环活化的菌种, 接入含 40 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中, 28 ℃, 200 r·min⁻¹ 培养 8 h 即为种子液。

1.2.2 BtA322 在 LB 液体培养基中的生长曲线测定 以 ZL-01 菌株为对照, 在无菌条件下分别取种子液和 ZL-01 菌液按 1% 接种量接种到含有 40 mL LB 液体培养基的 250 mL 三角瓶中, 28 ℃, 200 r·min⁻¹ 下培养。在无菌条件下每隔 4 h 分别取 2 mL ZL-01 和 BtA322 的发酵液, 以不接种的 LB 液体培养基为空白对照测其 OD_{600} 值, 记录数据。

1.2.3 培养基的单因素实验

1.2.3.1 碳源优化 分别用 1% 葡萄糖、可溶性淀粉、蔗糖和葡萄糖 + 胰蛋白胨 ($w/w = 1:1$) 等量替代 LB 基础液体发酵培养基中的胰蛋白胨制成培养基, 以不加碳源的培养基为阴性对照。摇瓶发酵培养 26 h 测定发酵液的 OD_{600} 值。

1.2.3.2 氮源优化 分别用 0.5% 牛肉膏、黄豆粉、干酪素和黄豆粉 + 酵母粉 ($w/w = 1:1$) 代替培养基中的酵母浸出物制成培养基, 以不加酵母浸出物的培养基为阴性对照。摇瓶发酵培养 26 h 测定发酵液的 OD_{600} 值。

1.2.3.3 无机盐优化 分别用 1% 碳酸钙、硫酸镁、磷酸二氢钾和碳酸钙 + 硫酸镁 + 磷酸氢二钾 ($w/w = 2:1:1$) 代替 LB 液体培养基中的氯化钠制成培养基, 以不加无机盐 (氯化钠) 为阴性对照。摇瓶发酵培养 26 h 测定发酵液的 OD_{600} 值。

1.2.4 正交实验优化最佳培养基成分 通过上述单因素的研究, 确定摇瓶发酵液体培养基的最佳碳源、氮源及无机盐。采用 3 因素 3 水平 $L_9(3^3)$ 正交表进行实验, 以确定最佳培养基组合。

1.2.5 BtA322 在最优培养基中的生长曲线测定 种子液和 ZL-01 菌液, 分别按 1% 接种量接种于盛有 40 mL 最优培养基的 250 mL 三角瓶中, 28 ℃, 200 r·min⁻¹ 振荡培养 54 h。在无菌条件下, 每隔 4 h 分别取 ZL-01 和 BtA322 的发酵液 2 mL 测 OD_{600} 值。用未接种的培养基做空白对照。

1.2.6 发酵条件的优化 采用最优培养基配方, 固定摇瓶培养的其他发酵条件后, 对初始 pH、温度、转速、装液量、通气量、接种量进行逐一优化。

(1) 在最优培养基条件下, 用 3 mol·L⁻¹ NaOH 将初始 pH 值分别调至 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5。将 BtA322 按 1% 接种量接入含有 40 mL 最优培养基的 250 mL 三角瓶中, 28 ℃, 200 r·min⁻¹ 振荡 20 h。在无菌条件下, 收集发酵液测 OD_{600} 值。用未接种的培养基做空白对照, 确定最适初始 pH 值。

(2) 在最优培养基、最适初始 pH 条件下, 将 BtA322 按 1% 接种量接入含有 40 mL 最优培养基的 250 mL 三角瓶中, 分别在 25, 30, 35, 40 ℃ 下, 200 r·min⁻¹ 振荡培养 20 h。在无菌条件下收集发酵液测 OD_{600} 值。用未接种的培养基做空白对照, 确定最适温度。

(3) 在最优培养基、最适的初始 pH 值和温度下, 将 BtA322 按 1% 接种量接入含有 40 mL 最优培养基的 250 mL 三角瓶中, 摇床转速分别调至 50, 100, 150, 200, 250, 300 r·min⁻¹。振荡培养 20 h 时, 在无菌条件下收集发酵液测 OD_{600} 值。用未接种的培养基做空白对照, 确定最佳转速。

(4) 在最佳培养基、最适的初始 pH 值、温度和转速下, 在 250 mL 的三角瓶中分别装入 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 mL 最优培养基, 将 BtA322 按 1% 接种量接入含有不同含量最优培养基的 250 mL 三角瓶中, 振

荡培养 20 h, 在无菌条件下收集发酵液测 OD_{600} 值。用未接种的培养基做空白对照, 确定最佳装液量。

(5) 在最适初始 pH 值、温度和转速条件下, 将 BtA322 分别按接种量为 2%、3%、4%、5%、6% 接入装有最适装液量的最优培养基的 250 mL 的三角瓶中, 振荡培养 20 h, 在无菌条件下收集发酵液测 OD_{600} 值。用未接种的培养基做空白对照, 确定最佳接种量。

1.2.7 测定方法 将发酵菌液稀释 40 倍后, 测定 OD_{600} 值; 使用 pH 测定仪测定 pH 值。

1.2.8 数据分析 采用 Excel 和 DPS 软件进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 BtA322 菌株在 LB 液体培养基中的生长曲线

由图 1 可见, 以 ZL-01 菌株为阳性对照, BtA322 与 ZL-01 菌株的生长曲线差别不大。0~4 h 处于潜伏期, 菌体生长量少; 4 h 后进入对数生长期, 菌体数量急剧增加; 24 h 达到生长高峰; 24~36 h 进入稳定期; 36 h 后进入衰亡期即苏云金芽孢杆菌伴孢晶体产生的时期。因此, 在 LB 培养基中发酵 24 h 为苏云金芽孢杆菌对数生长末期, 这个时期内收集的菌液适合做菌种液, 能得到高活力的菌体。

2.2 不同碳源对 Bt 生长的影响 由图 2 可见, 以葡萄糖+胰蛋白胨、葡萄糖、蔗糖为碳源时苏云金芽孢杆菌的发酵液对数生长末期的 OD_{600} 值明显高于可溶性淀粉, 这表明他们均有利于苏云金芽孢杆菌的生长。阴性对照 OD_{600} 值最小, 说明缺少碳源对苏云金芽孢杆菌生长有很大影响, 其中葡萄糖+胰蛋白胨的 OD_{600} 值最大, 因此, 确定葡萄糖+胰蛋白胨最有利于苏云金芽孢杆菌的生长。

2.3 不同氮源对 Bt 生长的影响 由图 3 可知, 苏云金芽孢杆菌以 0.5% 牛肉膏、干酪素、黄豆粉和黄豆粉+酵母粉为氮源的 OD_{600} 值均比阴性对照高, 说明这些碳源均能被 BtA322 菌株利用。其中以黄豆粉+酵母粉为氮源的 OD_{600} 值最大, 因此, 确定黄豆粉+酵母粉适合做 BtA322 菌株发酵培养基的氮源。

2.4 不同无机盐对 Bt 生长的影响 由图 4 可知, 以 1% 碳酸钙、硫酸镁、磷酸二氢钾和碳酸钙+硫酸镁+磷酸二氢钾为无机盐的 OD_{600} 值均高于阴性对照, 说明他们均有利于苏云金芽孢杆菌 BtA322 的生长。其中以碳酸钙+硫酸镁+磷酸二氢钾为无机盐的 OD_{600} 值最高, 因此, 确定碳酸钙+硫酸镁+磷酸二氢钾为 BtA322 菌株发酵培养基的最佳无机盐。

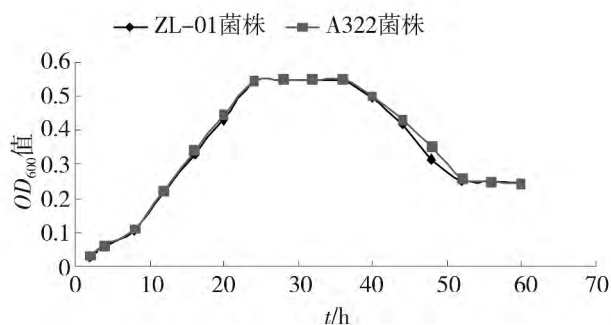


图1 BtA322 和 ZL-01 菌株 LB 液体培养基中的生长曲线
Fig. 1 The growth curve of BtA322 and ZL-01 strains in the LB liquid medium

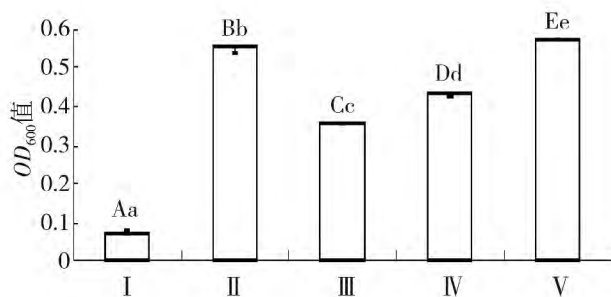


图2 不同碳源对 BtA322 发酵的影响
Fig. 2 Effects of different carbon sources on the fermentation of BtA322

1. I: CK; II: 葡萄糖; III: 可溶性淀粉; IV: 蔗糖; V: 葡萄糖+胰蛋白胨; 2. 图中不同大写字母表示差异极显著水平 ($P < 0.01$), 不同小写字母表示差异显著水平 ($P < 0.05$)。(下同)

1. I: CK; II: Glucose; III: Soluble starch; IV: Sucrose; V: Tryptone + glucose; 2. Different uppercase letters mean significant differences at the 0.01 level, and different lowercase letters mean significance differences at the 0.05 level. Similarly hereinafter

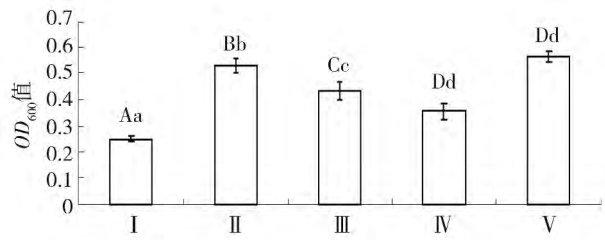


图3 不同氮源对 BtA322 发酵的影响
I: CK; II: 黄豆粉; III: 牛肉膏; IV: 干酪素; V: 黄豆粉 + 酵母粉
Fig.3 Effects of different nitrogen sources on the fermentation of BtA322
I: CK; II: Soybean meal; III: Beef extract; IV: Casein; V: Soybean meal + yeast

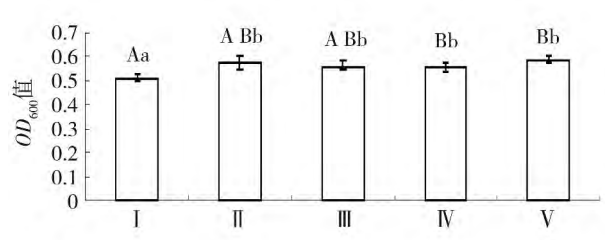


图4 不同无机盐对 BtA322 发酵的影响
I: CK; II: 碳酸钙; III: 硫酸镁; IV: 磷酸二氢钾; V: 碳酸钙 + 硫酸镁 + 磷酸二氢钾
Fig.4 Effects of different inorganic salts on the fermentation of BtA322
I: CK; II: CaCO₃; III: MgSO₄; IV: KH₂PO₄; V: CaCO₃ + MgSO₄ + KH₂PO₄

2.5 正交试验测量结果 将筛选出的最优碳源、氮源和无机盐 3 个重要因素再设计 3 个水平(见表 1), 选用 3 因素 3 水平 $L_9(3^3)$ 正交表进行实验(见表 2) 以进一步优化。由表 2 可见, 发酵培养基组分的最优组合为: $A_1B_1C_2$ 即 BtA322 菌株的最佳培养基为 0.5% 黄豆粉 + 0.5% 酵母粉 + 0.5% 葡萄糖 + 0.5% 胰蛋白胍 + 0.2% 碳酸钙 + 0.1% 磷酸二氢钾 + 0.1% 硫酸镁。极差分析表明 $R_A > R_B > R_C$ 即各因子对菌体浓度影响大小为葡萄糖 + 胰蛋白胍 > 黄豆粉 + 酵母粉 > 碳酸钙 + 磷酸二氢钾 + 硫酸镁。由表 3 可知, 葡萄糖 + 胰蛋白胍和黄豆粉 + 酵母粉差异显著; 碳酸钙 + 磷酸二氢钾 + 硫酸镁差异不显著。

表 1 正交实验因素水平
Tab.1 Factorial levels in orthogonal experiment

水平 Level	A/ 胰蛋白胍 + 葡萄糖 tryptone + glucose	B/ 黄豆粉 + 酵母粉 Soybean meal + yeast	C/ 碳酸钙 + 硫酸镁 + 磷酸二氢钾 CaCO ₃ + MgSO ₄ + KH ₂ PO ₄
1	1%	1%	0.1%
2	0.5%	0.5%	0.4%
3	2%	1.5%	0.8%

表 2 发酵培养基正交实验结果
Tab.2 The results of fermentation media in orthogonal experiment

试验号 No.	A	B	C	发酵液 OD ₆₀₀ 值 OD ₆₀₀ value of fermented liquid
1	1	1	1	0.598
2	1	2	2	0.573
3	1	3	3	0.553
4	2	1	2	0.564
5	2	2	3	0.547
6	2	3	1	0.521
7	3	1	3	0.532
8	3	2	1	0.502
9	3	3	2	0.498
K1	1.724	1.694	1.621	
K2	1.632	1.622	1.635	

续表 2 Continued to Tab. 2				
试验号 No.	A	B	C	发酵液 OD_{600} 值 OD_{600} value of fermented liquid
K3	1.532	1.572	1.632	
k1	0.575	0.565	0.54	
k2	0.544	0.541	0.545	
k3	0.511	0.524	0.544	
R	0.064	0.041	0.005	
主次顺序 Main order			A > B > C	
优水平 Optimum level	A ₁	B ₁	C ₂	
优组合 Optimum combination			A ₁ B ₁ C ₂	

表 3 正交实验方差分析 Tab. 3 The variance analysis of orthogonal experiment						
方差分析 Variance analysis	平方和 Sum of square	自由度 Freedom	均方 Mean square	F	F _α	显著水平 Significant level
胰蛋白胨 + 葡萄糖 Tryptone + Glucose	6.15×10^{-3}	2	3.075×10^{-3}	58.57		显著 Significant
黄豆粉 + 酵母粉 Soybean meal + yeast	2.5×10^{-3}	2	1.25×10^{-3}	24.81		显著 Significant
碳酸钙 + 磷酸二氢钾 + 硫酸镁 COCa + MgSO ₄ + KH ₂ PO ₄	3.3×10^{-5}	2	1.65×10^{-5}	0.314	$F_{0.05}(2, 2) = 19.0$	
误差 Error	1.05×10^{-4}	2	5.25×10^{-5}			
总和 Sum	0.0468	8				

2.6 发酵条件测定

2.6.1 BtA322 在最优培养基中的生长曲线 由图 5 可知 ,BtA322 菌株在最优培养基中发酵培养 0 ~ 4 h 处于潜伏期 ,菌体生长量少; 4 ~ 20 h 为对数生长期 ,菌体生长量急剧增加; 20 h 达到高峰期; 20 ~ 32 h 为稳定期 ,菌体生长缓慢; 32 h 后为衰退期 ,也是苏云金芽孢杆菌产生晶体的时期。因此 ,发酵培养 20 h 时适合测 OD_{600} 值。

2.6.2 初始 pH 值对发酵的影响 图 6 表明 ,不同初始 pH 值对苏云金芽孢杆菌的菌体生长影响不同。当发酵培养基初始 pH 值为 7.5 时 ,BtA322 生长较优。

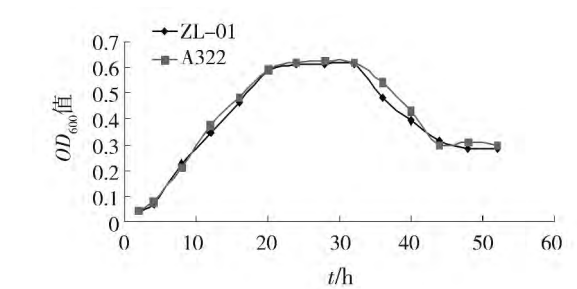


图 5 BtA322 和 ZL - 01 菌株的生长曲线
Fig. 5 The growth curve of BtA322 and ZL - 01 strains

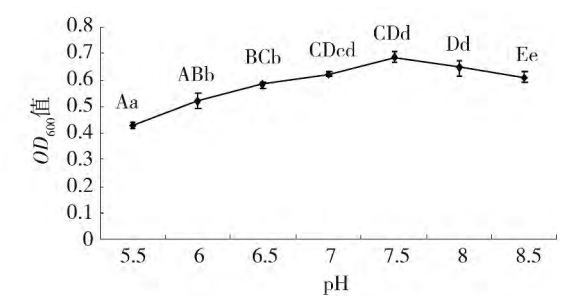


图 6 不同初始 pH 值对 BtA322 发酵的影响
Fig. 6 Effects of different initial pH values of media on the fermentation of BtA322

- 2.6.3 温度对发酵的影响 图 7 表明 ,发酵温度在 30 ℃ 时 ,BtA322 生长最好。
- 2.6.4 摇床转速对发酵的影响 图 8 表明 ,摇床转速为 200 r · min⁻¹ 时 ,BtA322 生长最好。

2.6.5 装液量对发酵的影响 图9可知 250 mL 三角瓶中培养基装液量为 35 mL 时,菌体浓度最大,生长最好。随着装液量的增加, OD_{600} 值呈下降趋势。这表明 BtA322 是需氧性发酵。

2.6.6 接种量对发酵的影响 图10表明,BtA322 菌体生长的最适接种量为 3%,随着接种量的增大,相应的 OD_{600} 值降低,不利于菌体的生长。

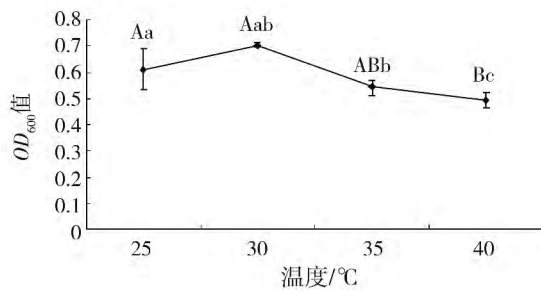


图7 不同温度对 BtA322 发酵的影响

Fig. 7 Effects of different temperatures on the fermentation of BtA322

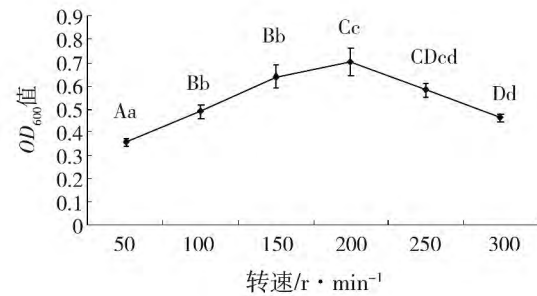


图8 不同转速对 BtA322 发酵的影响

Fig. 8 The effects of different shaking speeds on the fermentation of BtA322

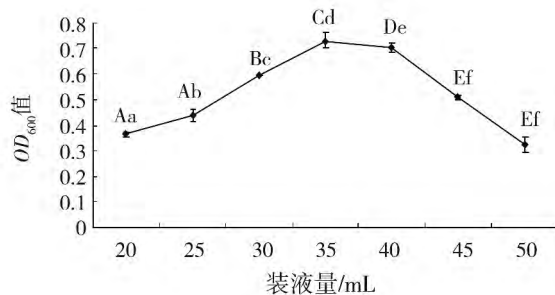


图9 不同通气量对发酵的影响 (mL)

Fig. 9 The effects of different ventilations on the fermentation of BtA322

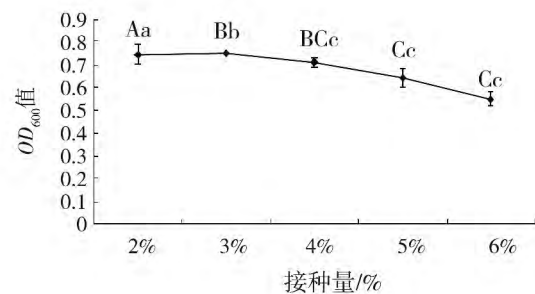


图10 不同接种量对发酵的影响

Fig. 10 The effect of different seed volumes on the fermentation of BtA322

3 结 论

根据 BtA322 菌株的生长曲线确定以对数生长末期的发酵液 OD_{600} 值为发酵优化的标准。结果表明, A322 菌株最佳培养基配方为 $A_1B_1C_2$, 即 0.5% 黄豆粉 + 0.5% 酵母提取物 + 0.5% 葡萄糖 + 0.5% 胰蛋白胍 + 0.2% 碳酸钙 + 0.1% 磷酸二氢钾 + 0.1% 硫酸镁; 最优发酵条件为培养时间 20 h, 初始 pH 值 7.5, 发酵温度 30 °C, 接种量 3%, 装液量为 250 mL 三角瓶中装培养基 35 mL。优化后菌体生长量的 OD_{600} 值比优化前提高了 44.7%。笔者对本实验室筛选到的对棉铃虫有较高活性的 BtA322 进行培养基及发酵条件的优化实验, 为该菌株的工业化生产提供了一定的理论基础。

参考文献:

- [1] 陈建峰. 我国生物农药产业主体——微生物农药和农药抗生素[J]. 中国农资 2005(7): 70.
- [2] 喻子牛. 微生物农药及其产业化[M]. 北京: 科学出版社 2000: 29-34.
- [3] 吴丽云, 关雄. Bt 发酵生产新型原料的应用进展[J]. 中国农业科技导报 2008, 10(6): 29-34.
- [4] 喻子牛. 苏云金杆菌[M]. 北京: 科学出版社, 1990: 285-423.
- [5] 杨建州, 林健, 张洪勋, 等. 味精工业高浓度有机废水培养苏云金芽胞杆菌的研究[J]. 应用与环境生物学报, 1999, 5(SI): 197-199.
- [6] POOPATHI S, KUMAR K A. Novel fermentation media for production of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* [J]. J. Eco.

Entomol, 2003, 96(4): 1039–1044.

- [7] GHRIBID, ZOUARIN, TRIGUIW, et al. Use of sea water as salts source in starch and soybean based media, for the production of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticides [J]. Process Biochem., 2007, 42(3): 374–378.

Optimization of *Bacillus thuringiensis* A322 Strain Fermentation Medium and Cultural Conditions

ZHANG Lulu¹, ZHU Chaohua¹, GUO Gang²

(1. Institute of Plant and Environmental Protection, Hainan University, Haikou 570228, China;

2. Haikou Experiment Station, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 570102, China)

Abstract: *Bacillus thuringiensis* Berliner strain A322 with higher activity against *Helicoverpa armigera* Hubner screened indoor was cultured on media through single-factor and orthogonal experiment to optimize cultural medium based on the optimization standard of OD_{600} of the fermented liquid of *B. thuringiensis* at the late logarithmic phase. The optimum medium is 0.5% soybean meal, 0.5% yeast extract, 0.5% glucose, 0.5% tryptone, 0.2% calcium carbonate, 0.1% potassium dihydrogen phosphate, and 0.1% magnesium sulfate. The major factors in laboratory shake flask liquid fermentation, such as initial pH, temperature, speed, etc were determined. The optimum cultural conditions are found to be incubation time 20 h, pH 7.5, fermentation temperatures 30 °C, speed 200 r · min⁻¹, inoculum size 3%, and medium volume 35 mL in a 250 mL flask. The OD_{600} value of the bacterial growth was increased by 21.9% after optimization of the cultural conditions.

Key words: *Bacillus thuringiensis*; medium; fermentation condition; optimization

(上接第 249 页)

Screening of Efficient Fungicides Against the Anthracnose of *Sarcandra glabra* Caused by *Colletotrichum dematium*

JIANG Ni, YE Yunfeng, HU Fengyun, LIU Lihui, LIU Wei

(Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants, Guangxi Key Laboratory of Protection and Genetic Improvement of Medicinal Resources, Nanning 530023, China)

Abstract: Antimicrobial activities of 14 fungicides were tested against *Colletotrichum dematium* by using the mycelia growth rate method, and the fungicides with an inhibition rate of 90% or more were tested in toxicity indoor and then in the field. Four fungicides, ie. Tebuconazole, flusilazole-prochloraz chloride complex, Prochloraz, Difenoconazole gave high antimicrobial effects, and their EC_{50} values were 0.799, 3.567, 55.47 and 370.34 mg · L⁻¹, respectively. The field tests showed that Tebuconazole and flusilazole-prochloraz had a control efficacy of >70% against the anthracnose of *Sarcandra glabra* when diluted at 1:3000–4000 and 1:1000–2000, respectively, indicating that these two fungicides have a better control efficacy against the anthracnose of *Sarcandra glabra* caused by *Colletotrichum dematium*, and can be released for commercial extension to control this disease.

Key words: *Sarcandra glabra*; *Colletotrichum dematium*; fungicide; screening