

农林科技資料

自生固氮菌肥的 生产与应用

湖北省农业科学研究所

农 业 出 版 社

一九七二年十一月

农林科技资料②

自生固氮菌肥的生产与应用

湖北省农业科学研究所

*

农业出版社出版

新华书店北京发行所发行

农业出版社印刷厂印刷装订

*

1972年11月第1版 1972年11月第1次印刷

定价：三分

自生固氮菌肥的生产与应用

湖北省农业科学研究所

氮肥是农作物增产的不可缺少的肥料。空气中有大量的游离态氮素,但是不能被植物吸收利用。自生固氮菌能够将空气中的氮素转化成有机态氮,组成自己的体躯。固氮菌在生活期中分泌到体外的含氮代谢产物以及当菌体死亡后分解的产物,就变成植物所能利用的氮素养料。固氮菌还有分泌维生素类物质及生长素类物质,促进植物生长的作用。

从土壤中分离并选育出自生固氮菌优良菌种,经过人工培养而制成的肥料,称为固氮菌肥。根据各地试验结果,固氮菌肥施用于小麦、大麦、玉米、甜菜,能显著增产,对棉花、粟谷、油菜、水稻、高粱及某些蔬菜、瓜果等作物也有较好的肥效。

一、自生固氮菌的一般特性

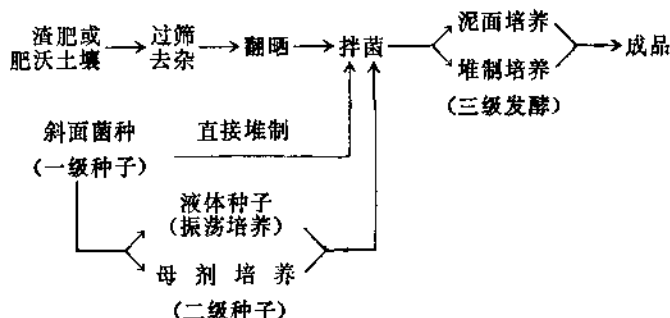
生产上一般应用的固氮菌属圆褐固氮菌。体形较大,2~3×3微米。发育初期为短杆状,有鞭毛,能运动。后期为圆或椭圆形,在显微镜下观察,通常成对,如“8”形,偶呈单个或成串。细胞外围有荚膜,不生芽胞。是一种专性好气细菌。生长适宜温度25—30℃,10℃以下停止生长,50—60℃生长微弱,

甚至死亡。最适酸碱度为中性至微碱性。喜潮湿。

二、固氮菌肥的土法生产

高质量的菌肥要求在单位重量的菌肥中含有足够数量的(每克菌肥含5亿个以上)、固氮力高、生活力强的固氮菌活跃菌体。

菌肥生产流程



(一) 斜面菌种培养

斜面培养基(阿什贝培养基)要求配制准确,灭菌彻底。

配方: 甘露蜜醇或葡萄糖 10 克(亦可用蔗糖代替), 磷酸氢二钾 0.2 克, 硫酸镁 0.2 克, 氯化钠 0.2 克, 硫酸钙 0.1 克, 碳酸钙 5 克。加水 1,000 毫升, 琼脂 1.5—2%。15 磅灭菌 30 分钟, 或用蒸笼灭菌(置蒸笼内, 从出现蒸汽时算起, 蒸两小时)。灭菌后置 25—30°C 下存放三天, 检查灭菌是否彻底, 如无杂菌生长, 即保存备用。

接种应严格掌握无菌操作, 接种好的斜面, 置 25—30°C 下

培养2—3天,移至阴凉干燥处保存备用。

生长良好的斜面上菌苔丰满、光滑、粘稠,无杂菌污染。

(二)二级种子培养

目的是要活化菌种,扩大菌数,以满足堆制培养的需要。

1.液体种子法:配方为蔗糖10克,硫酸镁0.2克,氯化钠0.2克,碳酸钙5克,过磷酸钙或钙镁磷肥8克,草木灰4克,加水1,000毫升。用10%氢氧化钠或石灰水调pH为7.0—7.5(如用钙镁磷肥可不必调pH)。500毫升三角瓶,每瓶装培养液150—200毫升(盐水瓶每瓶装培养液100毫升),15磅灭菌30分钟。

接种应严格掌握无菌操作。每200毫升接入两环菌种,置25—30℃下,摇床振荡培养48—72小时备用,如用土摇床,每小时振荡5—10分钟,培养72小时。

培养良好的液体种子应较粘稠,无酸臭味,深灰色,每毫升种子液含菌数5—10亿。

2.母剂法:母剂法是生产种子较为简便的方法。母剂培养基配方为:渣肥或菜园土100斤,过磷酸钙或钙镁磷肥1斤,米糠2斤或适量米汤、洗米水,草木灰2斤。将肥土、渣肥翻晒后,过筛去杂,按比例加入营养物质(接干料计算),充分混匀。加入适量水分,要求达到均匀、松散,以手捏成团,触之能散为度。

将培养基装入玻璃罐头瓶内(其他大口瓶或瓦罐均可),装量为瓶的1/2左右,用双层牛皮纸扎口,15磅灭菌2小时,如用蒸灶灭菌,上气计时,灭菌2小时,停火闷1小时。冷却后备用。

将培养好的斜面菌种，加适量无菌水制成菌体悬液，均匀接入培养基内，一只斜面可接 3—5 瓶母剂，放置 3—4 小时，以免粘瓶壁，再摇动瓶子，使培养基均匀松散，然后置 25—30°C 下培养 3—5 天。在培养过程中，每天摇动瓶子 2—3 次，以利通气，使菌生长均匀。

培养良好的母剂应是无酸臭味，无杂菌生长，计菌数合格。做为堆制的种子或直接当菌肥使用。

(三) 三级发酵

目的是使种子液中生长旺盛的菌种在适宜环境中充分生长、繁殖，从而获得含大量活跃菌体的菌肥。

1. 堆制法：堆制培养基的准备，与母剂培养基相同。凡含有机质较丰富的土壤，能供给面氮菌所需要的碳素营养和一定量的磷、钾的即可。将生长良好的种子液（接种量按配料中干料量计算为 5—10%）或母剂（接种量为 3—5%）均匀加入堆制培养基中，再补加水分，使之达到手捏成面，触之能散，充分拌匀。堆高 0.5—1 尺，用塑料薄膜覆盖，以利保湿保温。控制品温 25—30°C，品温过高时可适当散堆降温。培养 3—5 天，每克湿菌肥活菌数可达 20—30 亿个以上。

2. 泥面法：取肥沃的土壤，打碎过筛，去掉杂物，加入过磷酸钙或钙镁磷肥 1% 和适量米汤或洗米水，混匀备用。根据需要将干净火砖若干块浸入清水中使之充分吸水，备用；或用盆、钵器皿，内装洗净的河砂（粗细砂均可），装入量以距盆、钵口 0.5—1 厘米为度，后将清水倾入砂里与砂面相平，备用。

将已培养好的种子液（或用斜面菌种制成菌悬浮液）接入已备好的土壤培养基内，接种量 5—10%，再补加适量清水调

制成稠泥糊状，然后涂抹在已备好的砖面上，或盆、钵内的砂面上，制成泥面。泥面厚度 0.5—1 厘米为宜。将已抹泥面的火砖置于盛有清水的槽内，泥面向上，水槽内的水以浸湿砖的 $\frac{2}{3}$ 为度，水槽上面应加盖，以保湿，并防灰尘落入和阳光照射。将水槽置 25—30°C 下培养 2—3 天，泥面上长出一层露水珠状的面菌茵落后，将泥面刮下，即可直接使用，或置阴凉处风干备用。

3. 斜面菌种直接接种堆制法：此法可将菌肥生产流程由三级发酵简化为二级。具体方法是：先将斜面菌种菌苔用少量水洗下，再用掺有米汤或洗米水的清水稀释，接入准备好的堆制原料中拌匀。如水分不够就补加水分，达到手捏成团，触之能散的程度。遮荫保湿堆放。每支斜面菌种约可堆制菌肥 20—30 斤。

4. 成品质量检查：合格的成品要求杂菌少，不发霉，无酸臭味。含菌量多少也是菌肥质量的重要标志之一。含菌量愈高，质量愈好。一般要求每克湿菌肥所含活菌数不少于 5 亿。下面介绍两种检查含菌量的方法：

(1) 泥面培养计数法：该法简单易行，可用来粗略的计算活菌数。

先制备菌肥稀释液，准确称取菌肥样品 1 克，放入内装无菌水 99 毫升的 500 毫升三角瓶内，充分振荡（一般振荡 5—10 分钟）成稀释 100 倍液，接着用无菌吸管吸取 1 毫升，吹入另一个装有 9 毫升无菌水的试管中，充分振荡，成稀释 1,000 倍液，按需要可稀释十万、百万、千万、亿倍……。

然后，制备泥面。方法同泥面培养法，不同的是：泥土要用

蒸灶法或锅炒法进行灭菌，米汤或洗米水用蒸灶法或煮开灭菌。泥面要涂抹光滑，以便于计数。用无菌吸管或医用注射器在已知稀释倍数的菌液中吸取 1 毫升，喷射在泥面上。将此泥面置 25—30°C 下培养 36—48 小时，泥面上就长出露珠般的菌落来，根据每块泥面上的菌落数及菌液稀释倍数，即可计算出每克菌肥的活菌数（每个稀释度的菌液应做两个以上的泥面，求其每个稀释度的平均菌落数）。

每克菌肥含活菌数 = 泥面平均菌落数 × 稀释倍数

（2）稀释平板计数法：该法用于成品及半成品活菌数的测定，较为准确。但此法需一定设备。

同上法制备菌肥稀释液，分别用无菌吸管自百万、千万、亿倍三个稀释度中各取三个 1 毫升菌液，放入三套灭菌玻皿中，写上相应编号。取灭菌的斜面菌种培养基，加热融化，冷至 45°C 左右，倒入玻皿，大约 10 毫升左右，使能薄薄地覆盖皿底，立即轻轻充分摇匀。放平、冷却凝固后，皿底朝上，置 25—30°C 下培养 2 天。然后，取每皿菌落数在 50—150 左右的稀释度，数出菌数，求三个重复玻皿的平均数。

每克菌肥含活菌数 = 平均每皿菌数 × 稀释度

三、自生固氮菌菌种筛选、 提纯、复壮及菌种保存

选取固氮能力强，繁殖快，适应性强的优良菌种是菌肥生产及施用有效性的前提，因此，各地可开展群众性的菌种筛选工作，选取适宜本地区的优良菌株，还可利用钴射线、紫外线、硝基胍、亚硝酸、氮芥子气等物理化学人工引变方法，选育优

良菌种。

(一) 选取自生固氮菌常用的方法是土壤筛选法

在不同地理位置, 不同土壤类型, 不同作物的土壤上采集耕作层或根际周围具有代表性的土壤样品。取 2—3 克置试管中, 加无菌水 4—5 毫升, 调成泥浆, 在平板培养基上点数点, 置 25—30°C 下培养。2—3 天即长出圆形凸起粘稠乳白色菌苔。将每个培养皿内生长快、不同类型的固氮菌采取“稀释平板法”或“划线法”进行纯化培养。

经几次纯化培养后, 即获得较纯的固氮菌菌株。将该菌株进行固氮效能测定, 选取固氮效能高、生长快的优良菌株。固氮效能测定方法: 取一环纯菌种移入盛有 10 毫升灭菌的阿什贝液体培养基的小凯氏瓶或三角瓶中, 瓶口棉塞用牛皮纸包住, 以防止水分蒸发。在 25—30°C 培养 21 天, 用植物含氮测定法定氮, 计算每消耗 1 克甘露蜜醇(葡萄糖)固定氮毫克数。

(二) 菌种保存及提纯复壮

长期使用单一培养基, 及在多代移接的情况下, 受到不利于固氮菌生理要求的培养条件的影晌, 会产生生理上的老化和遗传上的变异, 致使菌种活性及繁殖力降低。为保持原有菌种的优良性状, 必须注意菌种的保藏及提纯复壮。

菌种保存常用方法:

1. 冷藏法: 将培养好的斜面菌种, 用玻璃纸或防潮纸包扎管口, 直接放在 5°C 左右的冰箱中保存, 两个月左右移接一次。深井、地窖中一般温度 10—15°C, 亦可用来短期保存菌种。或将菌种保藏在盛有 50% 的硝酸铵或尿素水溶液的冰瓶内放在地窖里。

2. 矿油保存法: 首先将液体石蜡高压间歇灭菌三次(15磅 30 分钟), 或在 $160-170^{\circ}\text{C}$ 烘箱中干热灭菌 1 小时, 经无菌检查, 证明灭菌彻底后备用。

将灭过菌的冷液体石蜡注入培养好的斜面菌种管, 覆盖全部斜面, 并高出斜面 0.5—1 厘米 (石蜡油不要沾染试管口), 塞好棉塞, 直立放在室温下, 可保存一年。若存放在冰箱中, 存放时间更久。用时, 从液体石蜡保存的斜面上挑取菌种移植到斜面培养基上进行活化, 长出菌落后, 再扩大培养使用。

菌种复壮常用的方法:

1. 更换培养基: 菌种长期在同一种培养基上培养, 会造成菌种退化, 故应经常更换培养基。介绍两种培养基如下:

(1) 葡萄糖 20 克, 磷酸氢二钾 0.3 克, 磷酸氢钙 0.2 克, 硫酸钾 0.2 克, 氯化钠 0.5 克, 硫酸镁 0.3 克, 碳酸钙 5 克, 钼酸铵、硼酸、三氯化铁微量, 加水 1,000 毫升, 琼脂 15—20 克。

(2) 用液体种子培养基滤液 1,000 毫升加琼脂 15—20 克。

2. 土壤回接法: 将菌种接入土壤中, 培养后, 再依“稀释平板法”分离培养。

菌种提纯常用稀释平板分离法:

用接种环取 2 环待纯化的菌苔, 接入内装 50 毫升无菌水的三角瓶, 充分振荡均匀, 制成菌体悬液, 再将此悬液制成一万、十万、百万倍菌体稀释液, 稀释后用无菌吸管依次从百万、十万、万倍稀释液试管中各吸取 0.1 毫升菌体悬液至相应编号的平板培养基上, 然后用玻璃刮铲涂匀, 置 $25-28^{\circ}\text{C}$ 温箱

中培养3天，再从每皿中挑取具有原菌种性状或具有优异性状的菌落进行纯化培养，经2—3次纯化培养后，测定其菌种固氮力。

菌种纯化所用培养基碳源可改用：苯甲酸钠（安息香酸钠）1—2克/1,000毫升培养基。

四、固氮菌肥肥效及有效施用条件

（一）固氮菌肥的肥效

中国科学院林业土壤研究所于1952—1954年从东北各地土壤中分离了自生固氮菌，并进行接种试验，施用于高粱、棉花、甜菜等作物，增产7.5—25.3%。据中华全国供销合作总社的统计，1956年在山西、陕西、河南、河北四省共推广了固氮菌肥近128万亩。棉花增产5.9—20.2%，小麦增产15.82—25%，玉米增产15.5%。据江苏、四川等地资料，固氮菌肥对水稻也有一定的增产作用。

1970年，湖北省农科所利用自武昌土壤中筛选出的固氮菌3号和15号制成的菌肥，在武昌县五里界公社进行试验，对小麦有显著增产效果。1971年在全省不同气候土壤地区进行多点试验，固氮菌肥对小麦、大麦、油菜等作物均有较好的肥效。小麦22个试验，施菌肥的58个处理中增产的有49个处理，占84%，一般每亩增产小麦20—50斤，增产率8—15%；因倒伏和施肥不当没有表现肥效的占16%；油菜6个试验，全部增产，每亩平均增产油菜籽17斤，增产率5—17%。举例如下表：

自生固氮菌肥肥效试验结果

试 验 单 位	作 物 种 类	每亩施 菌 肥 (斤)	作物产量(斤/亩)			
			接 菌	对 照	增 产 斤/亩	%
黄冈地区科学试验站	小 麦	8	333.2	276.8	56.4	20.4
	油 菜	沾 根	205.4	175.4	30	17.1
咸宁地区农科所	小 麦	有机肥 1,000 斤接菌	275.0	215.7	59.3	27.5
宜昌地区农科所	小 麦	40	342.7	292.3	50.4	17.2
枣阳县吴庄良种场	小 麦	4	512	463	49	10.6
沔阳县农科所	小 麦	10	168.3	158.3	10	6.3
孝感县光明大队 农 科 所	油 菜	50	245	227	18	7.9

(二)固氮菌肥有效施用条件

1. 与有机肥混合施用能提高肥效,比单施效果好。混合施用有机质肥料,不仅能供给固氮菌生活所必须的碳源及磷钾养料,还能降低某些作物根的分泌物对固氮菌的抑制作用,有机质还能改良土壤,使土壤疏松透气、保墒,为固氮菌生活创造有利的环境条件。如果有机质肥数量较少,就要增加固氮菌肥施用量。

2. 保证土壤有适量水分,是固氮菌大量繁殖所必须的条件。固氮菌是一种喜湿性微生物,土壤过干,固氮菌活动力就减弱甚至死亡。掌握在下雨前后施用固氮菌肥,效果比较好。干旱时施用,可加大菌肥湿度。施用后应立即覆土,以免阳光曝晒,降低肥效。

3. 施用石灰中和土壤酸度。固氮菌喜中性微碱性环境,因

此,在 pH 值 6 以下的土壤上施用固氮菌肥前,配合撒施些石灰,不仅能够调节土壤反应,而且还可满足固氮菌对钙离子的要求。

4. 土壤温度与菌肥施用时期的关系。固氮菌属中温性微生物,温度过低或过高,都会影响其生命活动。土温低于 10°C ,固氮菌的繁育量就很少。因此固氮菌肥施于冬播作物,宜作种肥或基肥及早期追肥,如入冬后施用,效果逐渐不显著,应在春季再行追施。夏季施用固氮菌肥应在早、晚施用,开沟施入较深土层,以利降温保温。

5. 固氮菌肥与其他肥料配合施用。施用固氮菌作基肥、种肥时,对于需肥多和生育期长的作物,如棉花、水稻、小麦等,仍需配合施用追肥以免后期脱肥。但大量氮素化肥施用会降低固氮菌固氮效能,应间隔 10 天左右,分开施用。有杀菌作用的化肥农药不能与菌肥同时施用。

五、固氮菌肥的施用方法

1. 拌种: 每亩以菌肥 10 斤左右与种子拌匀播种。
2. 沾根: 油菜、蔬菜等作物移栽时,以菌肥沾根。
3. 旱地作底肥、种肥,也可作追肥,均需开沟条施或穴施,作追肥时也可掺于清水或水粪中条施或穴施,施后随即覆土。
4. 水田浅施。秧田作基肥,带土移栽的也可作送嫁肥,大田作耙面肥或早期追肥。

5. 菌肥每亩施用量 30—50 斤,瘦田需增加用量,含有机质多的土壤或菌肥与有机肥同时施用时,可适当减少用量。