



农业微生物丛书之三

固 氮 菌

中国农业科学院土壤肥料研究所

胡济生

农 业 出 版 社

农业微生物丛书之三

固 氮 菌

中国农业科学院土壤肥料研究所

胡 济 生

*

农业出版社出版

(北京西总布胡同7号)

北京市书刊出版业营业许可證出字第106号

中华书局上海印刷厂印刷 新华书店发行

*

787×1092 耗 1/32 · 3/8 印张9,000字

1959年2月第1版

1959年2月上海第1次印刷

印数: 1—31,000 定价: (7) 0.06元

统一书号: 16144.573 59.2.京型

一、固氮菌的分离

固氮菌是广泛生存在土壤中的一种特殊细菌，作用还似根瘤菌，范围却不限于豆类作物，体形比根瘤菌大，显微镜下呈椭圆形，每每成双，能从空气中吸收氮素作为养料，并且分泌生长素物质帮助作物根系生长。由于这种细菌是在作物的体外活动（土壤中及根际），受外界的影响是很大的。固氮菌为了维持自己的生命活动，必须从土壤中的有机质和根的分泌物得到碳素养料，它要求充足的磷、钾、钙等养分和最良好的水分空气条件，在酸性环境中生长不良，这些条件也是一般的土壤微生物所需要的。固氮菌和这些微生物间，作物根际间，存在着竞争或共生的关系，因此应用固氮菌的问题比根瘤菌复杂，效果也不及根瘤菌显著。

自从1901年这种细菌被发现以来，五十余年来积累了大量研究试验资料，在农业上由于没有得到稳定的增产效果，很多国家还未作生产应用。这种细菌具有特别的生理习性，如固定空气中的氮素，很高的呼吸强度（呼吸势 $Q_{O_2} = 2,000 - 4,000$ ），产生相当量的乙种维生素等物质，它的培养和生产也比较简单，可以大量制造，有些国家把它当作研究生物固定空气中氮素机制内酶系统的材料，还有认为可以用作类似酵母的补充食料或饲料。

应用固氮菌作为肥料，在苏联已有悠久的历史，我国在应用根瘤菌肥之后也广泛的研究利用了固氮菌肥，很多资料证明，对于棉花、小麦、油菜、大白菜、马铃薯、番茄、甜菜、胡麻、烟草、玉

米、大麦、高粱等，都有相当效果。特别是 1958 年工农业生产大跃进以来，很多地区通过现场会议，肯定了固氮菌的作用，现在全国很多县社，破除了迷信和神秘观点，都能大量制造菌肥，在用量、用法以及作用范围等等都大大的推进了固氮菌的技术。

固氮菌的分离方法，通常应用下列二种：

1. 泥盘法 从高产的棉麦或其他作物田中采取表土，风干，筛除粗粒根屑，称约 50 克，加入甘露醇或白糖 1—2 克及 3% 磷酸氢二钾 (K_2HPO_4) 约 5 毫升和适量水调成泥浆，置入直径约 6 厘米的小碟中，要求将泥面抹得十分光滑，如果土壤过于砂性或粘性可适量掺入粘土胶泥或细砂调节，抹时用小刀或玻璃片沾水反复把泥面抹光。然后把小碟放在大碟中央，大碟内加入适量的水，并置一小瓦盆使水上升，维持罩内湿度经常饱和，保温 25—32°C，经 2—3 天后泥面呈现突起、全绿、小露珠状的菌苔，初为透明，渐变乳白色，最后呈黑棕色，在显微镜下检查（高倍或油镜）为典型的固氮菌，即可用灭菌的接种针挑单独的菌苔，移植到安息香酸钠无氮培养基斜面上，培养基配方如下：

安息香酸钠（苯甲酸钠）	1—2 克
磷酸氢二钾	0.2 克
硫酸镁 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2 克
食盐 $NaCl$	0.2 克
硫酸钙 $CaSO_4 \cdot 2H_2O$	0.1 克
碳酸钙 $CaCO_3$	5.0 克
水	1,000 毫升
洋菜	12—16 克

由于安息香酸钠具有一些毒性，能抑制一般杂菌的旺盛发育，可用为固氮菌的选择培养基，固氮菌在其上生长比较缓慢，最后变成黑棕色，经过数次移植即可得到纯菌，如果仍然不纯，

可將上述培养基除去洋菜作成培养液，以 20 毫升盛于 100 毫升三角瓶中，內放十几粒玻璃珠或小圓石，灭菌后接种分离的固氮菌种，这样保温 28°C，每天搖动几次，每次約一分鐘，兩星期后液体呈棕褐色。取 1 毫升稀釋成 $\frac{1}{1,000}$ 或 $\frac{1}{10,000}$ 仍用安息香酸鈉洋菜培养基作扁平培养，挑选單株菌苔鏡檢，如果仍然不純，可重复以上步驟，如果已經純化可移植以下培养基(阿其畢氏培养基)：

白糖	15—20 克
磷酸氫二鉀	0.2 克
硫酸鎂	0.2 克
食鹽	0.2 克
硫酸鈣	0.1 克
碳酸鈣	5.0 克
洋菜	15—18 克
冷开水	1,000 毫升

2. 液体法 有时用以上泥盤方法不易純化，也可采用液体方法，將以下培养液 30—50 毫升裝在 100 毫升的三角瓶中，高压灭菌后，接种 1—2 克土样，保温 25—30°C，經 5—10 天后，培养液面生成菌膜。从玻璃壁液面处，沾取少量灰白色菌苔，移植到新的液体培养基中，如此反复多次即可得到頗为純淨的固氮菌。或者用稀釋扁平固体培养法挑取單株菌苔，移植到洋菜斜面应用。

蔗糖	20 克
磷酸氫二鉀	0.2 克
碳酸鈣	5.0 克
普通水	1,000 毫升
洋菜	12—15 克

根系附着的固氮菌可用以下方法檢查分离，將根用水冲洗干淨，剪碎(0.5—1 厘米)，置灭菌水中振盪，反复几次，在無菌操作下，鑷取少許碎根，攤置在凝固的無氮洋菜培养基面上(在扁平皿中)，大約 9.5 厘米直徑的双重皿放置五、六条碎根。在 25—30°C 保温三天左右，即有粘稠菌苔圍繞根屑，初为白色，漸变棕黑，即可挑出純化。

二、固氮菌的特性

固氮菌为專性好气性細菌，体形較大，兩端鈍圓 2—3×3—6 微米，成双如“8”形，偶亦成串或成單，發育初期具有杆菌形狀，單生鞭毛，能运动。在較老时期細胞为圓形或橢圓形。幼年細胞的內含物为均一的，老年細胞內出現顆粒狀。細胞外围有粘液荚膜，用墨制剂染色，很容易呈現。沒有芽胞；格蘭氏染色反应为陽性(但有时亦为陰性)；用盧哥氏碘液染色在高倍显微鏡下(上复蓋玻片)細胞呈紅色。生長最适温度为 20—30°C。在 55—60°C 时生長微弱，数目漸減乃至死亡。10°C 及 40°C 为其生長的最低和最高界限。最适 pH 为 7.4—7.6，是喜湿性的細菌，最适宜的土壤水分是其飽含蓄水量的 2/3。

固氮菌能直接利用空气中的氮素，在無氮培养基中生長良好，能够利用多种碳素物質如糖类、高級醇、乙醇、有机酸、安息香酸、水楊酸甚至石碳酸等，但不能利用本糖。磷、鉀、鈣等是必須的礦物質养料，特別是鈣質关系菌体黑色色素的产生，可能是形成腐植酸鈣类的物質(固氮菌在缺鈣的培养基中生長不产生色素)。

固氮菌在吸收空气中氮素过程中消耗大量碳素物質和氧气以維持生命活动，每消耗一克葡萄糖約可吸收(同化) 9—20 毫

克氮素。固氮菌能够很好的利用铵态氮，但是减弱或者抑制了利用空气中氮素的作用。钼、硼或钒素可以提高其固定空气中氮素的能力。

在普通無氮的糖或甘露醇固体培养基斜面上划綫接种后，固氮菌沿綫条生長得很濃厚，白色、突起，然后从上部逐漸变成褐色、淡黃褐色、棕色或黑色，以后下移。一般5—15天全部变色。依菌系不同，菌苔邊緣有裂紋或平整，有皺紋或平滑，其他培养特性如下：

1. 肉羹蛋白胨——生長微弱，沿划綫条生長，干燥而且着色很快(早)，細胞形狀稍有改变，有大形細胞，具有不平整的外形。
2. 明膠穿刺培养——生長微弱，不液化。
3. 石蕊乳——10—14日后牛乳澄清。
4. 馬鈴薯楔——菌苔較薄，有光澤，呈皺紋，帶粘性，棕色(初为黃色)。

固氮菌固定空气中氮素的能力可任用以下兩法測定：

(1) 固体法 用無菌操作，取10毫升斐多洛夫氏洋菜培养基注入直徑約9厘米的灭菌培养皿中，凝固后接种預先培养三晝夜的固氮菌純菌种一环，涂匀，保温28°C，經24—48小时取出在60°C烘烤約2小时(除水分)。用鑷子移取到开导瓶中測定全氮，此时培养基中的糖量几已消耗殆尽，可換算每克葡萄糖吸收多少氮素，注意須作空白，因洋菜本身亦含有氮素。

(2) 液体法 于500毫升三角瓶中裝斐氏培养液100毫升，或直接裝入开导瓶中，高压灭菌后，接种純菌，保温28°C，2—4星期，每天搖动1—2次，然后測定全氮。

斐多洛夫培养基如下：

葡萄糖	20 克
磷酸鉍二鉀	0.3 克

磷酸氫鈣 CaHPO_4	0.2 克
硫酸鉀 K_2SO_4	0.2 克
硫酸鎂	0.3 克
食鹽	0.5 克
三氯化鐵	0.1 克
洋菜	20 克
蒸餾水	1,000 毫升
微量元素液*	1 毫升

*微量元素液

硼酸 H_3BO_3	5 克
鉬酸銨 $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$	5 克
碘化鉀 KI	0.5 克
溴化鈉 NaBr	0.5 克
硫酸鋅 ZnSO_4	0.2 克
硫酸鋁 $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	0.3 克
蒸餾水	1,000 毫升

三、固氮菌剂的制造

固氮菌的生产，近一、二年来进展很快，过去应用的固体培养的标准方法已被液体方法所代替。大量液体生产因为通气灭菌和搅拌等操作，易致污染杂菌，现在多采用人工振荡或混合土壤、锯末的方法培养，以便获得足量空气。

1. 固体法 將阿其畢氏洋菜培养基約 140 毫升注入大克氏瓶中，高压灭菌后接种純菌种，培养 48 小时后，测数一个标准接种环，可以沾有 25×10^6 个活固氮菌，因此推算一个大克氏瓶至少可以生長活固氮菌 2,000 亿个，按下列比例調制吸附用草炭：

干草炭粉 90 斤

过磷酸鈣	0.5 斤
糖或淀粉(薯粉或粗玉米粉)	2 兩
煤爐灰(篩細)	10 斤
熟石灰	1 斤

即与稀釋的固氮菌液 * 30—40 斤混合, 并加入微量元素液 (水 1 升加入鉬酸鈉 5 克, 硼酸 5 克) 5—10 毫升, 攪拌均匀后, 即成施肥用的固氮菌剂。

固氮菌剂調制后須淺層堆放保温数日, 每天略翻倒洒水, 保持疏松湿润以便固氮菌再大量繁殖一个时期然后包裝貯藏备用。

2. 液体法 以下方法可以代替洋菜及化学品。

糖	15 克
过磷酸鈣	0.5 克
柴草灰	1—1.5 克
粗大鹽	0.2 克
粗硫酸鎂	0.1 克
碳酸鈣或熟石灰	1—2 克
水	1,000 毫升

* 將培养好的固氮菌(在大克氏瓶中生長良好还未变黑, 檢查純淨者), 共 24 个大瓶刮泥下来, 攪水, 打成均匀悬液, 据近年試驗, 菌剂中加入鉀(矽酸鹽)細菌有良好效果, 鉀細菌可按以下任一方法培养

(1) 糖	5 克	(2) 淀粉(甘薯或馬鈴薯粉)	5—10 克
磷酸氫二鈉 Na_2HPO_4	2 克	过磷酸鈣	1.5 克
硫酸鎂	0.5 克	石灰(熟)	3 克
白陶土或玻璃粉	1 克	白陶土(白干土)	1 克
1%三氯化鐵	0.5 毫升	粗大鹽	0.2 克
水	1,000 毫升	硫酸鎂	0.1 克
		細砂	10 克
		水	1,000 毫升

鉀細菌可用液体培养, 保温 28—30°C 約三天后(不时搖动)液体变粘稠, 沉淀成粘絮狀, 即可应用, 以 500—1,000 毫升混合以上固氮菌剂中。

將以上培养液充分吸附于土壤、鋸末、煤爐灰混合物 * 中大約 2—3 (培养液):1(混合物),然后裝約 1/2 滿于广口瓶或其他小口容器中,要求混合物充分湿润,瓶底稍有积水。瓶口用双層紗布中夾棉花包扎妥當,外層再用厚紙包扎,然后高压(15 磅)灭菌 0.5—1 小时,取出,爭取在約 30—40°C 时(不燙手)迅速接种,如果不用土壤、鋸末混合物,也可用液体培养,但每天必須多次振盪,以維持固氮菌接触空气。有人把毛巾半浸在培养液中代替洋菜和土壤、鋸末混合物,固氮菌可以依附在此湿毛巾上迅速繁殖,又有人把培养液吸收在稻蘗糠和粉条中,固氮菌也能旺盛發育。

洋菜本身对于細菌营养作用不大,但能和营养液凝成固体,細菌在上面生長接触空气,發育良好同时呈現菌苔的外觀特征,易于辨認。洋菜以外的代用品,只要能够滿足細菌对于空气和水分的要求,能旺盛生長,就可应用。檢查方法是用接种环或針稍沾培养物然后移植到試管的斜面上,保温观察,如果培养的菌苔迅速呈現于划綫上而且生長良好,証明这个代用品可用。

以上培养物在 25—30°C 时保持三天上下即可与草炭混合。

如果没有草炭可用堆肥粉、炕土、塘泥等代替,但須攪入适当鋸末或有机質,使菌剂含有大量水分,保持固氮菌的生活力。

以上的成品系县市生产的母剂,要求質量如下:

1. 成品疏松湿润,沒有腐臭气味。其水分烘干測定应为 30—40%。

* 混合物成份如下:

肥土或塘泥、草炭	50%
鋸末	30—40%
煤爐灰	20—10%
熟石灰	0.1—0.5%(免去亦可) (少量)
pH	7—8

2. 酸碱度(pH)应在7—8之間。

3. 用培养皿点滴培养檢查应在100%。

四、固氮菌剂的使用

固氮菌的使用量、使用期和使用法正在發展中。过去一般是每亩用0.5—1斤拌种，或者折算一亩地約200亿个固氮菌，为了加强固氮菌在土壤中的成活，在使用时需給予相当生活条件如有机物質(碳水化合物)、磷素、草木灰、水分等等，或吸收在堆肥里，然后集中的施在种子附近以便固氮菌可以在幼苗根系占据数量上的优势而定居下来，發揮作用。

随着耕作栽培等方法的改进，固氮菌剂的每亩用量也在加大，不但用于基肥，也可用于追肥，这里介绍的“大堆制法”，适于各公社队的生产，如果温度条件合适也可在地头进行。

1. 材料的配制 先准备下列材料：肥沃土壤(过去生长的植物未遭病虫害的肥土)100斤(塘泥、河泥、溝泥均可)，柴草灰或粪灰1—2斤。厂制固氮菌剂4兩一半斤。过磷酸鈣：半斤。

碳源(供固氮菌食用)：任选以下一种或几种。

(1)粗粳粉，細糠，廢糖2—3斤(单独或混合)；

(2)切碎玉米稈，高粱稈或玉米軸約3斤，在开水中浸泡；

(3)濃米湯5—10斤；

(4)其他甜質物如甘薯水等。

將碳源用开水浸泡后，冷却到40℃以下，混合以上各材料，拌勻，要求充分湿润而不粘手的程度，温度在25—30℃之間，每天翻攪一次，并略洒温水以調温，調湿，堆約半尺至一尺厚，最好底部垫空，堆中打洞，以便空气流通，或裝筐篋，每筐約50斤，放在架上，这样保持3—5天后移陰涼处备用。

2. 成品的檢查 將磚打成半塊或 1/4 塊，在溫水中充分浸透，從以上堆中取少量（50—100 克）用溫水調成泥漿，抹在磚上約 2 分厚，要求十分平滑，再將磚塊半浸水中（泥面向上），加蓋，與大堆同時保溫 3—5 天后，如果泥面密布小水珠狀便是固氮菌苔，證明大堆培養已經成功。

如果土壤過於砂性，不易在磚上抹光，可在抹泥時摻加少量白干土或膠泥，只有在平滑的泥面上才能出現菌苔。

如果培養溫度低，時間長，泥面長白毛，便不宜用，如果泥面干裂缺水，菌苔也不出現。

3. 應用 每畝用量至少 10 斤或數十斤（多也無妨），施用作基肥或追肥，也可以混合 6% 六六六和其他糞肥，要求施在根系附近，既除蟲又肥田。

4. 注意事項 （1）每堆制成後可留下十多斤摻入下次配料中作為引子，猶如麩子。

（2）固氮菌要求水分和有機質（糞肥）條件，而且不能代替其他肥料。

（3）可以把固氮菌劑混合堆肥或圈糞一併施入土中。

（4）各顆粒肥料廠或生產泥炭的地區可以按以下配方，制成粒肥：

泥炭	50 斤
肥沃土壤或溝泥	50 斤
過磷酸鈣	1 斤
柴草灰	3—5 斤
廠制固氮菌劑	4 兩—半斤
碳源同以上配方	

培養和制法相同，成功後每百斤可以加入 6% 六六六約 3 斤，壓制成顆粒肥料，每畝用混合劑至少 30 斤。

如果化驗泥炭系酸性，必須預先加入適量熟石灰（每百斤約2—3斤）。

(5)固氮菌劑不怕凍，秋冬生產的菌劑可以貯藏久些。固氮菌特別喜濕但又要求疏松。

(6)固氮菌劑和六六六、1605、1059等農藥混用無礙，但殺菌劑有一定的抑制作用，如果用大堆的方法和糞肥攪混一起應用，即無妨礙。

(7)固氮菌劑與種子混合後，避免曬干、吹干，以免固氮菌死亡。

(8)可用醃秧根的方法用於水稻本田插秧或用於秧田育秧。蔬菜的溫框或溫室育苗用固氮菌劑效果很好。

五、固氮菌劑的效果

固氮菌劑在大田表現的效果，部分地區已經肯定，但是其中的規律性還沒有闡明，此外關於固氮菌在大田中作用的實質問題，也還未了解清楚，因此不能確定到底能固定多少氮素從而代替多少糞。根據推算，其固定的氮量似不太高，用一般的化學分析方法也不容易檢查出來。但根據固氮菌接種後在土壤中根系附近能夠成活的事實肯定了它的作用，由於接種後根系發育較好而且有刺激作物提前成熟的現象，則其作用可能不僅是固定空氣中的氮素。試驗室的檢查證明固氮菌菌種間，對於產生微生物刺激素、乙種維生素 B_{12} 、對各種土壤的適應性以及生長迅速、生長勢等等均有不同，今後應當廣泛選擇優良菌種，研究條件及作用實質，這樣便能把固氮菌的應用和理論向前進一步。

固氮菌劑的效果見下表：

施肥效果表

地 区	作物名称	氮肥	亩产量(斤)		亩产差数	增产率(%)
			对照区	固氮菌		
保定市郊区韓庄乡韓庄村	山药	氮肥	3,533	4,730	1,197	33.87
保定市楊庄乡紅星社一队	”	”	1,075	1,275	200	18.6
保定市楊庄乡紅星社一队	谷	”	338.5	475	136.5	40.2
保定富昌屯乡耳七店村	棉花	”	224	278	54	24.1
保定东关东升社	玉米	”	647	801.5	154.5	23.8
河北农学院教学試驗农場	小麦	”	101.5	151.7	50.2	49.4
滄县專區吳桥、庆云、孟村等七地	”	”	202.2	223.6	21.4	10.53

1957年張家口專區使用固氮菌剂增产效果調查表

地 区	作物	使用方法	亩产量(斤)	增产率(%)
康保县忠义乡紅光社	小麦	配成营养液	165.3	4.62
陽原县西城集体社	玉米	配成营养液	150	8.7
陽原县西城集体社	玉米	拌 种	160	16.0
怀安县有所堡社	谷子	配成营养液	128.94	28.94
怀安县有所堡社	谷子	拌 种	126.3	26.3
怀安县有所堡社	谷子	混在厩料糞里	113.1	13.1

注：一般使用菌肥的作物出苗均較对照区早半天至一天半，幼苗深綠、叶寬、莖粗。生产此种肥料，不但投資少，收效大，且使用簡便，效高价廉，不爛种、不燒苗，对农業增产問題具有極重要的意义。

