

细菌肥料丛书

固氮菌和矽细菌肥料

方景依 編著

上海科学技术出版社

內 容 提 要

本書介紹固氮菌和磷細菌的形态、生理、細菌分离、培养及其菌剂的制备和施用方法。書中專节介紹增产效果，說明細菌肥料的增产关键，在于能否提高制品质量和改进施用方法。

本書可供各地公社、农場技术干部和农校师生等参考。

固氮菌和磷細菌肥料

方景依 編著

*

上海科学技术出版社出版

(上海瑞金二路450号)

上海市书刊出版业营业許可証出033号

新华书店上海发行所发行 各地新华书店經售

上海新华印刷厂印刷

*

开本 787×1092 1/32 印張 1 26/32 字数 39,000

1960年6月第1版 1960年6月第1次印刷

印数 1--15,000

統一書号：16119·419

定 价：(九) 0.18 元

第一部分 固氮菌肥料

第一节	固氮菌剂的作用	1
第二节	固氮菌的形态和生理	2
第三节	分离菌种方法	7
一、	接种、繁育和分离	8
二、	计算菌数和质量鉴定	9
三、	<i>Pseudomonas radiobacter</i> 的去除	10
四、	优良菌种的选择和固氮能力的测定	11
第四节	菌剂培制方法	12
一、	大量繁殖固氮菌用的培养基配方	12
二、	草炭处理	13
三、	利用黄泥代替草炭	14
四、	固氮菌液的制备	15
五、	固氮菌肥(成品)的制备	15
六、	质量规格	15
七、	固氮菌固体培养工艺流程	15
八、	固氮菌液体培养工艺流程	16
九、	固氮菌薯糖培养法	17
十、	适于公社和农场自制的泥面简易培养法	18
第五节	固氮菌肥料浓缩粉制造方法	19
第六节	固氮菌剂的增产效果	21
第七节	施用方法和用量	27

一、棉花	27
二、蔬菜、烟草、水稻等作物	28
三、甘薯或馬鈴薯等作物	28
四、用作追肥基肥	28
五、注意事項	29

第二部分 磷細菌肥料

第一节 磷細菌剂的作用	30
第二节 磷細菌的形态和生理	31
第三节 有机磷細菌的分离和培养	37
一、P.A.明基娜培养基	37
二、卵磷脂的制备	37
三、核酸的精制	38
四、維諾格拉多夫斯基硅胶平板制法(修改)	38
五、菌种矿化力的鉴定	39
第四节 无机磷細菌的分离和培养	39
第五节 有机和无机磷細菌剂的制备	41
第六节 有机和无机磷細菌剂的增产效果	44
一、苏联有机磷細菌剂的增产效果	44
二、我国轉化有机磷細菌 283 等的肥效	44
三、我国有机磷細菌 Ba ₁ 等增产效果	48
四、苏联无机磷細菌的增产效果	48
五、我国无机磷細菌的肥效試驗效果	53
第七节 施用方法	53
一、一般施用法	53
二、适应条件	54

第一部分 固氮菌肥料

第一节 固氮菌剂的作用

氮是植物正常生长和发育所不可缺少的养料，因为没有氮素，植物便不能合成生活细胞原形质构成上所需要的蛋白质。植物对氮素的需要量是很大的，为使作物达到高额的产量，通常每公顷土壤约须含 150~200 公斤可给态氮素。但是土壤中所贮藏的可给态氮素却是非常有限的。因此，除了在土壤中施用氮素肥料以外，如何利用大气中无尽的气态氮素来丰富土壤中的氮素含量，是非常有意义的问题。

空气中有 75% 以上是氮气，于每公顷土壤上空的大气中含有分子态氮约 80,000 吨；可是大部分植物不能直接同化它，只有某些土壤中的微生物能将它同化而转变成为氮素化合物，这些氮素化合物就可以为植物所利用。

这些土壤微生物中，对于丰富土壤氮素有着极重要作用的是根瘤菌、好气性固氮菌、丁酸菌以及其他一些微生物。其中好气性固氮菌是荷兰学者 M. W. 别依耶林克 (Beijerinck) 在 1901 年首先从土壤中分离出来的。以后五十多年中，世界各国的微生物学家，对好气性固氮菌进行了一系列的研究，其中也包括中国的学者。值得指出的是，苏联的科学家们在阐明好气性固氮菌的各种特性，特别在实际应用上的研究曾作出了卓越的贡献。

根据苏联学者的研究，证明了好气性固氮菌在良好的条件下，每年在其所定居的每公顷土壤中可以同化 20~100 公

斤的大气氮素。这样一个数字，就足以说明它在农业生产上的意义。好气性固氮菌在农业生产中的应用，早在1926年C. П. 科斯蒂切夫 (Костычев) 院士发表了克里米亚南岸速作烟草的土壤的氮素平衡理论以后，就开始被苏联的农业研究工作者和实践者所重视。基于这一理论，确信了好气性固氮菌的生命活动，对于土壤中氮的贮藏量不仅可以保持，而且还可以增加，所以苏联从1936年开始，就大量地制造和应用好气性固氮菌，并通过试验，证明好气性固氮菌剂对各种作物有增产的效果。

我国从1952年起，中国科学院林业土壤研究所首先在东北开始了好气性固氮菌的研究和试验，后来，华北、华中、华南、华东、西南、西北等农业科学研究机关结合中国实际的自然地理条件和作物种类等，陆续在当地进行广泛试验推广应用，选择当地有效菌株，设厂制造好气性固氮菌剂。大跃进以来，更是遍地开花，各市县、专区、公社等纷纷设厂制造，同时推广土法扩大培养方法；自制自用，大大降低了成本及运输费用。

第二节 固氮菌的形态和生理

固氮菌剂（或称自生好气性固氮菌细菌肥料），是以固氮菌 *Azotobacter*① *chroococcum* Beijerinck（圆褐固氮菌）为主的细菌制剂。到目前止，固氮菌的变种，已经知道很多，一般主张归纳为四种：*Az. chroococcum*（图I-1）、*Az. agile*（图I-2）、*Az. vinelandii*（图I-3,4）和 *Az. indicum*。这一属的共同特征是：细菌内没有内生孢子，菌体成较大杆状或甚至球

① 固氮菌属。

状,有时几成酵母状外形;具有鞭毛,格兰氏染色阴性,专性好气,常在培养液表面形成一层薄膜。当供应糖类或其他能源时,可固定大气中的氮。在无氮培养基上可生长良好。寄居处所为土壤和水。

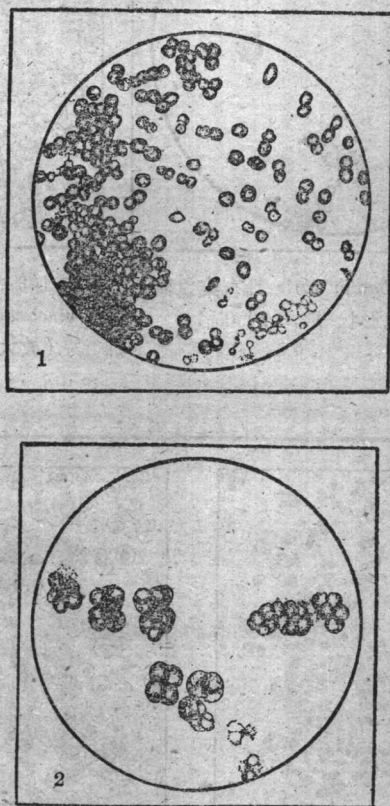


图 I-1 *Azotobacter chroococcum*:
(1) 单独和成对形状; (2) 复合形状
(放大 1500 倍)

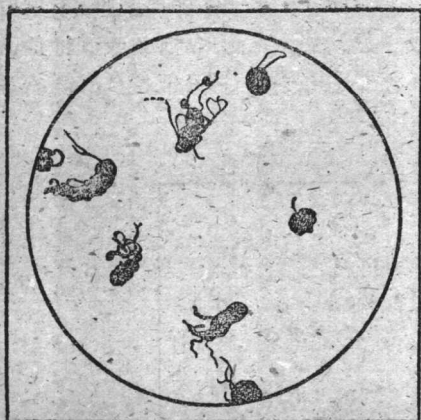


图 I-2 *Azotobacter agile* 具有染色鞭毛的细胞形状(放大 1000 倍)



图 I-3 *Azotobacter vinelandii* 杆状细胞(放大 1000 倍)

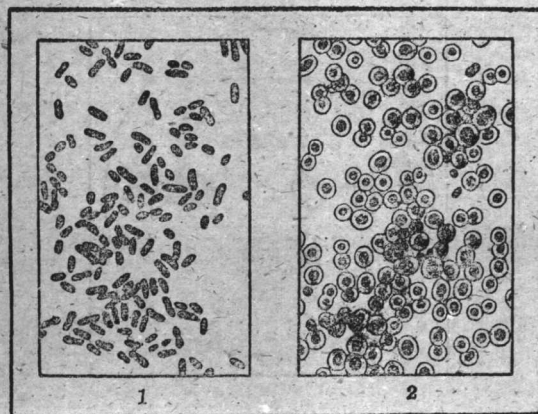


图 I-4 *Azotobacter vinelandii* (1) 营养细胞, 杆状; (2) 球形休眠状细胞(放大 1000 倍)

Azotobacter chroococcum Beijerinck (1901) 的形态和生理

1. 形态：杆状，大小 $2.0 \sim 3.0 \times 3.0 \sim 6.0$ 微米，往往成对排列。细菌外具有包囊，偶亦有链状。细胞中有3个或4个折射性颗粒，染色后更清晰可见。细胞外的一层厚度不定的粘性荚膜，用一品红与稀释的染色墨汁混合染色，可很明显看到（图1-5）。这荚膜后期变成棕色。这种色素可溶于水、乙醇、乙醚、哥罗仿等。它借周身鞭毛运动（有说只具一根鞭毛）。格兰氏染色阴性，未发现内有孢子，幼小时呈粗杆状，继续发育成椭圆形，后再变成球状；及老出现褐色色素，粘性荚膜逐渐紧缩成一层厚壁，包在菌体之外，可以长期保持生活力，遇到环境适宜时以出芽法产生新的具有颗粒的球形细胞。



图1-5 *Azotobacter chroococcum* 用一品红与染色墨汁混合染色（放大1000倍）

在动物胶上的聚落是很小，圆形，黄色，颗粒状，后期变成棕黄色。在动物胶斜面培养，生长不良，不液化。甘露醇琼脂①斜面培养，呈灰色，可变成棕色。

2. 生理：培养在牛肉汁中不生长，即在肉内添加了葡萄糖也不生长。利用消化蛋白困难。对石蕊牛乳，在10~14天内变成更为澄明。在马铃薯上，产生有光泽不易分清的粘液状皱褶，其色泽可变成黄色、黄棕色或栗棕色。

这种固氮菌可利用葡萄糖和蔗糖，从大气中固定氮素，放出二氧化碳。其他可利用的碳源有果糖、麦芽糖、甘露醇、糊

① 琼脂，一般亦称洋菜。

精、分解乳糖、阿拉伯糖、淀粉、甘油、乙醇、醋酸盐、丁酸盐、檸檬酸盐、乳酸盐、苹果酸盐、丙酸盐和琥珀酸盐。对硝酸盐，濃度低于 0.1% 可促进生长，过高则抑制生长。

其化学成分，在甘露醇琼脂培养 4 天的菌体，干燥后分析，含半纖維 0.5%、粗蛋白低于 20%、灰分低于 5%、木质素类物质超过 30%。

好气性。最适温度为 $25\sim 28^{\circ}\text{C}$ 。区别特征为不能生长于消化蛋白培养基，即添加了葡萄糖也不能生长。常产生棕黑色或黑色色素。这菌可从土壤中分离，它的寄居場所，主要是中性或微硷性田土。

Azotobacter agile Beijerinck(1901)的形态和生理

杆状，4~6 微米长，几成圓形。具有許多鞭毛，运动性很强。有报导若干变种不运动。格兰氏染色阴性。可生长于缺乏有机氮的培养基。对动物胶不液化。甘露醇琼脂上的聚落为圓形，灰白色，半透明，中心白色，能引成培养基上藍綠色螢光現象，很少形成包囊。在馬鈴薯培养基上呈黃白色，具有粘液，逐渐变成黃棕色。若有有机酸存在，可形成綠色或紅色色素。可固定大气中氮素，放出二氧化碳。好气性。适温 $25\sim 28^{\circ}\text{C}$ 。与上述細菌主要区别，为不产生棕褐色素，有螢光現象，可在含葡萄糖的消化蛋白牛肉汁內生长。寄居于水和土壤。

Azotobacter vinelandii Lipman(1903)的形态和生理 与 *Az. agile* 十分相象。

Azotobacter indicum Starkey & De (1939) 的形态和生理

橢圓形， $0.5\sim 1.2\times 1.7\sim 2.7$ 微米。其主要特征：(1)耐酸程度可在 pH 值 3~9 的范围；(2) 菌体两端各具一个大而

圓的折光體(即脂肪體);(3)產生大量粘液。一般寄居在土中。

非共生好氣性固氮菌是多形態性的,在高溫(42°C)時,缺氧,遇鹼或鈣、鉀、磷不足時,可引成很大的桿菌。它們的變種很多,特別是 *Azotobacter vinelandii*, 發現有不同的發育階段:先在幼年期,細胞呈圓形,內有顆粒而後細胞慢慢伸長,形成圓頭多孔桿菌;繼續繁殖又重新變為短桿狀,以後再變為球狀。所有這些變化可在 15~20 小時完成。但在正常條件下,這種情況不發生;在低溫時,它長期保持具有顆粒形態的細胞。

固氮菌都是極度好氧,需要良好通氣,方能良好生長。雖在 $10\sim42^{\circ}\text{C}$ 範圍內也可以生長,但以 $25\sim30^{\circ}\text{C}$ 最為適宜;在 50°C 上,30 分鐘可將它殺死。一般喜歡 pH 7~8, pH 6 以下,活動極差(*Az. indicum* 例外)。它們對磷、鈣、鉀的需要很嚴格,因此可利用它們來測定土壤中磷和鈣的需要情況。它們可以固氮,每消耗 1 克糖類可固定幾毫克至 20 毫克氮。若與其他非共生厭氣桿菌、纖維分解菌等混合培養,可大為提高固氮能力。

第三節 分離菌種方法

分離細菌的目的為:(1)在獲得當地品系,使產品更適應當地使用;(2)所引進的菌種污染時作分離培養,進一步純化;(3)制成菌劑實施到田間,又在顯著增產地點,將固氮菌重新分離回來,菌種經過實際考驗,作用能力將逐步增強;(4)作為鑑定產品質量計算菌數之用。

一般分離固氮菌菌種用的培養液配合成分如下:

甘露醇(或蔗糖等轉化糖)	10~20 克
磷酸氫二鉀(K_2HPO_4)	0.3 克

磷酸氫鈣(CaHPO_4)	0.2 克
硫酸鉀(K_2SO_4)	0.2 克
硫酸鎂($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.3 克
氯化鈉(NaCl)	0.5 克
氯化鐵或硫酸亞鐵(FeCl_3 或 FeSO_4)	微量
	(百萬分之 5 克)
碳酸鈣(CaCO_3)	5~10 克
水	1000 毫升

在 1000 毫升水內加入微量元素液 1 毫升。

微量元素液的配合如下：硼酸 (H_3BO_3) 5 克、鉬酸鉍 $[(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4]$ 5 克、碘化鉀 (KI) 0.5 克、溴化鈉 (NaBr) 0.5 克、硫酸鋅 ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.2 克、硫酸鋁 $[\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}]$ 0.3 克，將這些化學品溶解在 1000 毫升蒸餾水里，用時吸出 1 毫升。

甘露醇售價很高，可用蔗糖、葡萄糖或其他糖類代替，一般都用蔗糖；甘油、糊精和各種有機酸鹽，也可代替甘露醇。如果不是精密研究試驗工作，一般可不必用化學純粹藥品，用合乎工業用規格藥品即可。其中磷酸氫二鉀，可用過磷酸鈣和氯化鉀代替。糖量用 1% 已足夠，或用蔗糖 0.5% 加甘油 0.5%；尤其在大量製造固氮菌劑時，原料用量和原料品種，必須精打細算。

分離固氮菌的步驟如下：

一、接種、鑲育和分離 先將上述培養液配好，分離用的培養液可用 2% 糖量，然後將這培養液倒入 300~500 毫升平底燒瓶，每個燒瓶保持最大液面，即 150~250 毫升。這培養液一般不須殺菌，即可將土壤接種，土壤用肥沃菜園土或熟田土壤。接種土 1~3 克已足夠。培養在 25~28°C 恆溫箱內。培

培养液很快发生气泡,大部为丁酸菌等发育,经过7~10天,培养液表面产生了一层菌膜,菌膜先为灰白色,而后成为褐色。丁酸菌等先沉在碳酸鈣底下。将长成的菌膜放在显微镜下观察,就能看到如前描述的固氮菌的菌膜,将这菌膜用白金耳或白金針接引,向前述培养液再添加琼脂2%。所做成的固体培养基(经过灭菌)的平板上,作划綫分离或涂面分离。培养在25~28°C恒温箱内;经过2~3天,典型固氮菌聚落可在平板上发育。在固氮菌单独聚落上,将固氮菌用白金針接入事先灭过菌的固体培养基斜面上。分离以前将固氮菌先繁育一下,使分离工作更不易失败。丁酸菌等厌气性菌,在这种条件下是分离不出的。

二、計算菌数和質量鉴定 直接从水或土壤或制成的固氮菌剂,分离固氮菌都同样可以的。所取水样、土样或制品样,須有代表性。一般可用混合取样法。例如采取土样,先在田的近四角和中間,以梅花式采取,混和起来,然后从中取出。准确称取样品1克,投入玻塞300毫升容量三角瓶内,内装无菌水100毫升(水样用无菌水99毫升),充分振荡,可先装入几顆玻璃珠或碎玻片,将土样或制品上的菌体擦下。从水样分离固氮菌可不必添加玻璃珠或碎玻片。振荡应往复30次,实际上对土样或制剂的分析是不够的,应延长至5~10分鐘。接着,用干热灭菌过(170~175°C半小时或165~170°C1小时)的小吸管吸取1毫升(吸管吸口处預先用針塞入少許脱脂棉),吹入另一玻塞三角瓶所装99毫升的无菌水内,充分振荡。这样就稀釋了10,000倍。按照估計和需要,可稀釋成 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-7} 倍或更大倍数。再換1支小无菌吸管,在已知

- 琼脂%是指每100毫升液体所含琼脂的百分比重量;2%即1000毫升用20克琼脂。

稀釋倍数的液体吸出 1 毫升，先放入干热灭菌过的扁平培养皿內，即倒进灭菌过的固体培养基 10 毫升，輕輕均匀混合。固体培养基先用沸水隔水加热，取出来至对皮肤可忍受程度——約 45°C，而仍保持流动，太热倒入培养皿內，易将固氮菌烫死；太凉不易倒出，都影响分析结果。培养皿一般用直径为 9~11 厘米的，培养基用 10 毫升已足够，太多不适宜。俟培养基凝固后，将培养皿倒置，边上贴上日期、样品、名称等的标签，培养在恒温箱內。大約 3、4 天，固氮菌聚落即可完全长齐，每一聚落由一个細胞发育而成。按照稀釋倍数，就可推算所分析水样、土样、制品样內所含固氮菌数。这样做虽然要化几天时间，但十分可靠，比直接計数法①可靠，因为直接計数法不論样品內死的、活的、是的、否的，往往都計算在內，差异很大。計数的分离培养，必須有两个以上的重复，平均計算。

为更适于分离和辨别固氮菌聚落，可先将培养基的酸度用 1% 氫氧化鈉調节至 pH 7~8，并用一品紅或中性紅指示剂添加在培养基內。若作 *Az. indicum* 的分离，应将培养基的 pH 調节至 3~6 或 pH 9，也可采用在这 pH 範圍內的指示剂。

三、*Pseudomonas radiobacter*② 的去除 这一种菌，在分离和純化固氮菌过程中，往往与固氮菌伴生在一起，使工作发生困难。这种菌产生酸，使培养基的酸度增加，影响固氮菌的生长，不設法去除，固氮菌几次移植后，将混杂不堪。用一般平面斜面培养分离很难去除。可采用一再划綫分离方法去

① 直接計数法指湯麦斯 (Thomas) 血球計，以菌液稀釋后，取一滴在計数板上用显微鏡观察，再把它推算，此法一般菌肥厂还在应用，但很不可靠，故不詳述。

② 假单胞菌屬或叶頂毛杆菌屬，見圖 II-4。

除,由于白金針在固体培养基上划綫,机械地摩擦分开,經過 2~3 次划綫,可将 *Pseudomonas radiobacter* 摔开。仔細鏡檢聚落,可得到十分純粹的固氮菌。

四、优良菌种的选择和固氮能力的測定 将已分离出的菌株,进行固氮能力的測定,以选择优良的菌株。对于引进的菌株,也应该时常測定固氮能力,防止退化。固氮能力的測定方法:取一白金耳純菌移入盛有 10 毫升的无氮 Ashby^① 液体培养基中,在 28~30°C 恒温箱培养 3 天后取出,将此菌液全部倒入已灭菌盛有 90 毫升 Ashby 液体培养基的 300 毫升三角瓶內;或直接用白金針向 100 毫升培养液接种,不經過 10 毫升繁育阶段亦可。接种后在恒温箱(28~30°C)培养 15~30 天(以所培养菌的发育速度而定)。每种固氮菌至少接种 2~3 瓶。培养基所用糖类以葡萄糖或蔗糖較宜,不宜用甘露醇,因最后不易測定剩余碳源。糖分及无机盐要化学純粹或分析用規格,用分析天平准确称衡。蒸餾水最好用重蒸餾水^②,未接种前应空白校正过。試驗完毕时在每只三角瓶用別尔特兰(Bertland)法或碘量法(参考 Я. М. 皮列里曼等著的成藥分析 148~149 頁)測定遺留下来的葡萄糖含量;并用凱氏(Kjedahl)法或改良凱氏法測定总含氮量、固氮作用的

① Ashby 培养基:

蒸餾水	1000 毫升	NaCl	0.2 克
甘露醇	10 克	CaSO ₄ ·2H ₂ O	0.1 克
KH ₂ PO ₄	0.2 克	CaCO ₃	5 克
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 克		

如做成固体培养基,加琼脂 15~20 克(琼脂有好坏,故用量有范围;冬季琼脂要少用些)。

② 重蒸餾水即将普通蒸餾水再蒸一次的蒸餾水,因一般蒸餾水往往不純,含有杂质。

活跃性或固氮能力。以利用每 1 克葡萄糖(或轉化糖)或利用每 1 克分子的葡萄糖所固定下来的氮量来表示。一般配在培养液里的糖量,每 1000 毫升水用 10 克已足够,不必用 20 克。

第四节 菌剂培制方法

一、大量繁殖固氮菌用的培养基配方

蔗糖	10 克
磷酸氢二钾	0.2 克
氯化钠	0.2 克
硫酸镁	0.2 克
碳酸钙	5 克
琼脂(劣质琼脂或在夏季, 宜增加用量为 20 克)	15 克
水	1000 毫升
微量元素液	1 毫升

调整酸硷度为 pH 7.4~7.8。微量元素液的配合見前节。

其中磷酸氢二钾可用磷酸二氢钾 (KH_2PO_4) 或磷酸钾 (K_3PO_4) 代替。亦可用过磷酸钙代替。茲修改这一配方如下:

蔗糖 10 克、过磷酸钙 0.06%、25°Be' 盐滷 0.1%①、碳酸钙 5 克,下同。省去氯化钠、硫酸镁,因盐滷内有丰富的氯化钠、氯化镁、氯化钾等存在。

每个 850 毫升克氏瓶或路氏瓶装入培养基 100 毫升。灭菌条件为高压灭菌 20 磅 30 分鐘,一般环境条件較差或在夏季,須延长至 1 小时。在大型双扉高压灭菌器内进行。放冷后,在接种室接种;接种后在 28~30°C 培养室内保温 3~4

① 这百分率是指 1000 毫升水中所含各物質的百分比。

天。

固体培养基琼脂供应困难时,可采用以下措施:

1. 回收: 以用过的培养基,充分水洗,加热溶化至沸,俟冷却凝固后,切去沉淀物等杂质,将凝固物切成小块,在水中冲洗一天,使原在琼脂上的细菌新陈代谢物尽量除去,即可加入营养料,再度使用。经过处理约可回收 85~90%; 反复回收,约可用 10 次。

2. 以石花菜与琼脂混合使用: 石花菜与琼脂比为 4:1。石花菜宜先漂白去杂^①。

3. 全部采用石花菜: 石花菜质地不硬,可先除杂精制,加入相当于石花菜重量 5~10% 氯化钙,以提高它的凝固力。

4. 其他: 萝卜头切成片,涂浸培养液; 硅胶平板: 用水玻璃(硅酸钠)加盐酸,充分水洗; 木芋(西南产)、鬼草(一种海藻)、淀粉凝块等,都可适当代用。

二、草炭处理 草炭即泥炭,是用作吸附材料。原来水分很高,须先阳光晒干或大面积场所晾干。一般要求产泥炭的乡社自行处理,干燥到含水量 1~2%,最好能达到 0.5%。干燥工作也可通过烘焙解决,目的在于灭菌和容易吸收水分。烘焙可用烟道气——将大块草炭用棒敲碎或钹刀钹碎(都是粗碎),铺在大耐火方砖上。大耐火方砖用小耐火砖为支脚,联铺成约 1 平方丈面积,长方形,底部砌好炉膛,生火。烟道气再由炉身返回,经过草炭表面,将草炭的水分随烟道气从炉前烟囱带走。炉前有一铁皮门,可装卸草炭,操作时定时开启翻动。

① 石花菜漂白去杂的方法,是将石花菜先用冷水洗净,加热水煮化,取下静置,俟杂质沉底,用纱布过滤去杂质或只取上层清液,熬浓,然后按照原来的用量添加钙离子,使石花菜更易凝固。钙离子一般用氯化钙,用量为 0.5%。此法系中国科学院微生物研究所介绍。