

固氮細菌肥料

北京师范学院 細菌肥料厂編

科学普及出版社

16.1736

5.8

总号: 1088

固氮細菌肥料

編 者: 北京师范学院細菌肥料厂

出版者: 科学普及出版社

(北京市西直門外新家園)

北京市書刊出版業營業許可証出字第091号

发 行 者: 新 华 书 店

印刷者: 北京市通州区印刷厂

开 本: 787×1092 $\frac{1}{16}$ 印张: 4

1959年 1月第 1 版 字数: 13,000

1959年 1月第1次印刷 印数: 12,050

統一書号: 16051·216

定 价: (7) 8 分

前 言

在这全民跃进的时代里，在毛主席所提出的教育方针的指导下，全国高等和中等学校都掀起勤工俭学和办工厂的高潮，从而出现了一种空前蓬勃的新气象。我院地理系和生物系为了教育结合实际、结合生产、面向工农，在多快好省的原则指导下，合建了一个细菌肥料厂，以支援当前农业上的大跃进。

建厂开始由于缺乏洋菜，我们便实验用液体培养方法。经过一段时间摸索以后，试验结果是良好的，我们便正式投入生产。为了总结这一段的生产过程和总结经验，为了和其他生产细菌肥料的单位交流生产经验，使技术不断改进，所以根据我们的生产过程和体验，写出这本小册子。

我们虽然是很认真的进行了总结，但由于我们缺乏经验，理论基础不够，错误和不当之处是在所难免的，希同志们提出指正

北京师院细菌肥料厂工人集体编写

目 次

前 言

一、什么是固氮细菌肥料.....	(1)
二、固氮细菌肥料的生产过程.....	(3)
(一)瓶子的安装、洗刷和灭菌.....	(3)
(二)培养基的配制过程.....	(4)
(三)固氮细菌的分离和接种.....	(7)
(四)液体培养的通气工作.....	(9)
(五)菌液的检验工作.....	(12)
(六)处理草炭和拌草炭工作.....	(14)
(七)包装.....	(16)
三、固氮细菌肥料的使用方法及注意事项.....	(16)

一、什么是固氮細菌肥料

我們都知道植物生长的三大主要营养元素就是氮、磷、鉀。单就氮素来講，沒有它植物就不能活。在土壤中氮素的来源，主要是靠遺留在土壤中的动植物残体的分解和施入的有机肥料的分解，以及施入的无机肥料如硫酸銨等。但事实上在很多情况下，这些氮的数量是不多的，奇怪的是在有些情况下，植物似乎是并没有象我們所想象的那样缺乏氮；这主要是由于某些土壤微生物給土壤提供了新的氮源，这些微生物在生活中能固定大气中的游离氮素，因而就增加了土壤中的氮。现在知道，能固定大气中氮素的微生物很多，其中最重要的是某些細菌。通常收这些細菌分为两大类：一类是自生固氮細菌，另一类是共生固氮細菌(就是豆料根瘤菌)。固氮細菌肥料中的細菌指的就是自生固氮細菌。

人們在很早就知道固氮細菌的作用，特别是对根瘤菌；但是对它們进行研究确是比较晚的，大約在十九世紀末才开始注意研究。由于科学的进步，以及人类利用自然、改造自然的范围逐渐扩大，所以在人們了解固氮細菌的功能以后，就利用它的生理特征，进行大量培养，制成一种肥料，施入土壤中，以增加土壤中的氮素营养，来满足植物生长的需要。近年来根据大量試驗証明，固氮細菌肥料的增产效果是肯定无疑的。

那么固氮細菌是什么样子呢？固氮細菌最常見的典型种在幼小时多成杆形；較老的菌体有时是球形，有时是橢圓形，有时它們联合成对，好象阿拉伯数字的“8”字。在菌体的外面有

一层比较厚的荚膜(是细菌由细胞内部向细胞壁上所贮积的粘性物质),由于荚膜厚,所以形成的菌落(细菌的生长不是单独存在的,常常是成群体分布着,所以一般称为菌落),一般都是粘的。菌落初期一般无色,较老或呈暗褐色(图1)。

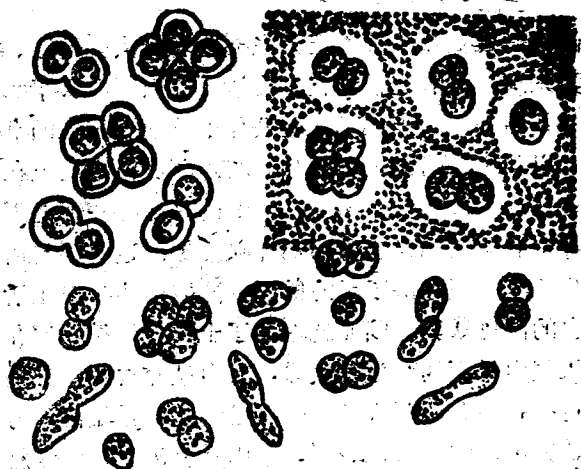


图1 菌落

由于固氮细菌肥料是一种生物肥料,所以在施用这种肥料时,必须先了解一下固氮细菌的生长条件。否则,尽管你施入多少固氮细菌肥料,如果管理不好,施到土壤中后,固氮细菌不能很好地生活,也就起不了增加土壤中植物氮素营养的作用。固氮细菌是喜欢空气和比较潮湿的中性或石灰性土壤,酸性土对它的生长不适宜。所以在施入这种肥料以后要给它创造良好的发育条件。促进它的生长。发挥它的作用。

二、固氮細菌肥料的生产过程

(一) 瓶子的安装、洗刷和灭菌

这三件工作是连接在一起的，是生产过程中的第一道工序。瓶子洗刷干净和灭菌彻底是极为重要的，它直接影响产品的质量。

1. 瓶子的安装

(1) 首先在胶皮塞上打两个孔，用它来安装通气的弯曲玻璃管，但要注意胶皮瓶塞上的孔要和玻璃管粗细相近，不要过大以免漏气。

(2) 烧弯曲玻璃管：用酒精喷灯把直玻璃管烧成 90° 左右的弯曲管作为通气管，按在胶皮塞的孔上（伸入瓶底的一端长，露出的一端短；此外再截一短直玻璃管，安另一孔上，作为排气管（图2）。

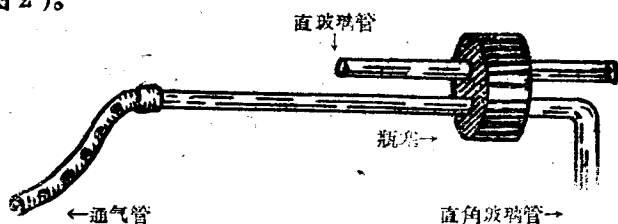


图2 瓶塞的安装

(3) 通气管的制造：取一橡皮管，扎上均匀的小孔（称通气管），最后将制好的通气管安装在弯曲管长臂的底端，并试验是否通气。

2、洗刷瓶子

这是一件细致的工作，不要粗心大意，否则打破瓶子或洗的不干净，都会造成生产上的损失。

首先用冷水(自来水)把瓶子洗刷几次，然后用去污粉洗掉瓶中所有的污物，再用冷水冲洗若干次，直至没有一点污渣为止。

3、用洗液冲洗瓶子

(1)把洗净的瓶子用洗液进行冲洗：把洗液倒入瓶子里，一般摇晃三分钟左右，这时即能去掉污垢，也能杀死杂菌。瓶口处也应冲洗。要注意倒洗液不要弄到皮肤上，用完的洗液可以收回再用。现将配制洗液方法说明如下：

重铬酸钾60克

浓硫酸 460 毫升

蒸馏水 300 毫升

将重铬酸钾溶于温蒸馏水中，候冷却后，徐徐加入浓硫酸(注意不要过热)；溶液呈红色。

(2)用洗液洗后，再用开水将洗液冲洗干净，次数一般为4—5遍，每遍时间约为3分钟左右。冲洗的目的，主要是把洗液冲刷干净。因为如果有洗液残留在瓶中，就能影响培养液的酸碱度，使其变酸，而不利於固氮细菌的生长。

(3)瓶盖的灭菌：将安装好的瓶盖用冷水冲洗干净，再用开水煮沸二次，每次要煮30分钟左右，灭菌后的瓶盖要很快地盖在灭过菌的瓶子上，并尽量使灭过菌的瓶子在空气中暴露的时间减少，力求少落入杂菌。

(二)培养基的配制过程

所谓培养基就是微生物所需要的营养物质，只有满足了它

所需要的营养物質，微生物才能很好的生长发育。那么为了使固氮細菌生长的更好，就要滿足它生长需要的营养，也就是要配制固氮細菌的培养基。在配制培养基以前，先要进行一番检查工作：

1、检查通气瓶

检查瓶子是否刷的干淨，通气管通气是否良好，瓶子是否有漏气的地方，等等。

2、配制培养基

(1) 常用的固氮細菌培养基配方：

白糖	15克
碳酸鈣(CaCO_3)	5克
食盐(NaCl)	0.2克
硫酸鎂(MgSO_4)	0.2克
磷酸氢二鉀(K_2HPO_4)	0.2克(后加)
硫酸鈣($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.1克
微量元素(硼、鉬)浓度1%的硼酸和鉬酸各	几滴。
水	1,000毫升(1升)

(2) 配制培养基时应该注意的地方：

称量之前要調整天平。(普通天平即可，在用之前先观察一下指针左右摆动是否平衡，然后再用，否則，称量不准。如无天平可用秤称量，1斤等于500克。)称量藥品一定要准确，并且要有詳細分工。称量后按着順序放入干淨的紙袋中，不要少放或重放。称完后，等到快要配制时，把所用藥品一次放入瓶內，然后检查紙袋內是否还残存有藥品，以免妨碍培养效果。

为了减少磷酸(負)离子与鈣(正)离子結合生成磷酸鈣，所以磷酸氢二鉀最后放。先把磷酸氢二鉀放入烧杯內用开水溶解，再迅速倒入培养瓶中。

3. 灭菌和灌瓶

固氮細菌肥料整个生产过程中都要严格灭菌，如果有极少数的杂菌，就会很快很多地繁殖起来，从而影响产品质量，甚至要作废。

(1) 灭菌：較好的灭菌方法是用高压灭菌鍋灭菌。但我厂因是初建，設備不够，所以暂时采用間接灭菌方法：用煮开二次的水，在 80°C 以上时迅速灌入瓶內。这样作的結果尚好。

(2) 灌瓶：灌瓶时为了防止瓶子炸裂，可先少放一些水，然后将瓶子平放并不断地轉动，使其受热均匀后，就可一直灌滿。

目前我厂用的瓶子有一万毫升和一万五千毫升的三种，可先用量筒准确量水，灌入瓶內，每灌一千毫升要在瓶上作一个标志，直到快要灌滿为止，然后按着瓶子上的标志作一尺子，以后就可以用尺子直接度量。

灌瓶同时，将磷酸氢二鉀溶液倒入瓶內。

4. 培养基酸碱度(PH值)的測定

(1) 固氮細菌培养基的酸碱度(通常用PH值表示)，要在中性至微碱性范围内(中性时PH值等于7，大于7〔7—14〕为碱性，小于7〔1—7〕为酸性)才能保証固氮細菌生长的良好。所以在配制完培养基以后，要对培养基的酸碱度进行检查及調整工作。

(2) 我厂配制的培养基的酸碱度在7.3—7.5之間。

根据設備条件可采用比色法、比較簡便的可以用混合指示剂和PH指示紙(市場上可以买到)来測定酸、碱度(其方法：取菌液約2毫升加入混合指示剂2—3滴，按发生的顏色和指示剂瓶上附有的标准色进行比較，来定其酸碱度。PH指示紙測法更为簡便，只是收PH指示紙撕下一条，半截投入菌液中，按其发生的顏色和PH指示紙瓶上附有标准色进行比較，即可确定

其酸碱性，不过，后者不够精确）。我厂采用的是比色法，其方法是在装有液体培养基的试管中，加入2—4滴指示剂，按发生的颜色和已配好的标准色进行比较来判断酸碱度的大小。

测定培养基时，其酸碱性若是大于7.5时，要加适量的1%浓度的稀硫酸来调整；若小于7.3时，则加适量的碳酸钙来调整。最终使其保持在7.3—7.5之间为止。

最后将测定结果填在细菌培养记录卡片上(如下表)。

细菌培养记录卡片 年 月 日

培养瓶号		检 查			
培 养 基	时 间	培 养 记 事	繁殖量	杂菌%	酸碱性
时 间					
数 量					
酸碱性					
摘 要					
接 种					
时 间					
菌 种		菌水供应时间		所需培养液数	
数 量		草 炭 量		成品重量	

北京师院细菌肥料厂

(三)固氮细菌的分离和接种

1、固氮细菌的分离

固氮菌种可以从土壤中分离出来，不过我厂用的是中国农业科学院的菌种，进行繁殖用来接种。繁殖时是用固体培养基，其配方与液体培养基相同，不过要在每一千毫升培养液中

加入洋菜(亦称琼脂)16克。固体培养基配好后分装至试管(用棉塞塞好)或培养皿中,进行高压灭菌。灭菌后放入无菌室中冷却,用灭过菌(酒精灯上灭菌)的接种环(图3)沾取固体菌种涂在新配好的固体培养基表面上(图4,图5)。接种环每接一次

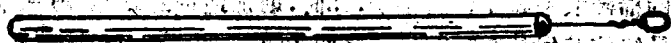


图3 接种环

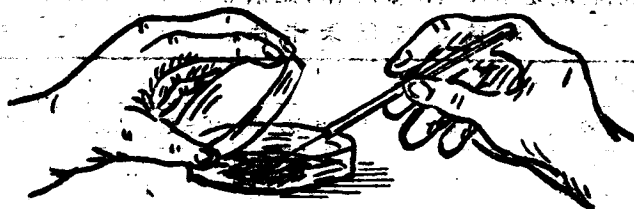


图4 往培养皿中接种

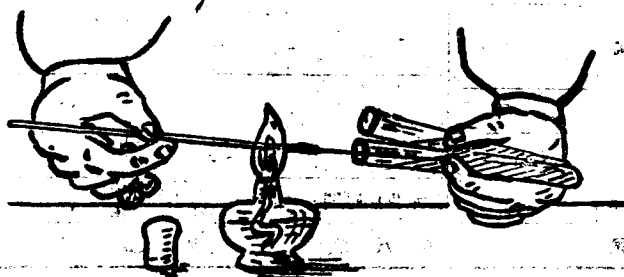


图5 从小试管移种到另一试管

后,必须在酒精灯上灭菌,再继续接种;接种后放在 $25^{\circ}-30^{\circ}\text{C}$ 的恒温箱中。经过3—5日的培养,在培养基表面上形成粘液状凸起的菌落;开始时是无色的,以后就成暗褐色的了。这菌种就做为我們第一代菌种。除用接种之外,其余的都要放在冰箱中保存,使用时拿出,再培养利用。

2、接种

将固氮菌种移植到灭过菌的培养基上的过程叫接种。接种时需要在无菌室里进行，接种用具有毛笔、接种环、酒精灯等。

(1) 驯化：将已制好并灭过菌的液体培养基放入无菌室；接种员用灭过菌的毛笔(煮1小时左右)粘上第一代菌种(固体培养基上的菌种)，然后很快的将毛笔调入盛有培养液的瓶中。作完后，就将瓶口封闭起来，以免侵入杂菌。接种后通气培养。

(2) 接种：用上述方法培养的液体菌种经过一昼夜的驯化，检查若无杂菌即可用来接种。接种方法，是将上述液体菌种在无菌室内注入被接种的大型培养瓶内即可。

液体接种的优点：目前缺少洋菜，用此法可节省洋菜，降低成本；用此法接种，只要通气一昼夜就可使用，这比固体接种繁殖快的多。

此法的缺点：如通气不好，杂菌易产生。

(3) 注意事项：

① 一切用具都要高压灭菌。

② 接种员在进入无菌室前，必须用肥皂将手洗净，并戴上厚层口罩和帽子。无菌室一般不许外人进去。无菌室接种前要用1%石碳酸溶液灭菌。

③ 接种过程中，打开培养皿或试管时，要尽量缩短在空气中暴露的时间。

④ 接种后必须将瓶盖塞紧。

⑤ 用来接种的菌种不得有杂菌。

(四) 液体培养的通气工作

接种后培养时期的通气工作，也是细菌培养的重要过程。因为稍一疏忽，通气不好就容易出现杂菌。

1. 通气的目的

固氮細菌是好气性的細菌，細菌的生长单对空气来講，有的是喜欢空气的，沒有空气它就不能生长，我們称这样細菌为好气性細菌。它的生长和繁殖，除有一定的物質营养外，还需要有良好的通气环境；只有經常連續的保持足够的空气，才能保証固氮細菌很好的生长和繁殖。

(1) 通气的設備：抽气机，气化汞溶液(浓度为0.5%)，玻璃瓶，橡皮管，橡皮塞，玻璃管，小鉄夹等。

(2) 通气装备(图6)：先把各培养瓶用橡皮管串联起来，在培养瓶的后面与一空瓶(預防氯化汞溶液倒流)和一盛有50%氯化汞溶液的瓶子相連(氯化汞溶液的作用是使空气灭菌)。在培养瓶的前面再連接两个空瓶子：第一个空瓶子是預防培养液倒流用的，第二个空瓶子是貯气用的，所以也叫貯气瓶。在貯气瓶上所連的橡皮管要各放一小鉄夹(在机器开动或休息时都要先用鉄夹夹好橡皮管，否則液体会发生倒流)。安置好后，再将整套設備接連在抽气机上，即可开始通气。

(3) 注意事項：

① 通气时室內空气要流通，而且要保持清洁；所以一般无事者最好不要随便出入。

② 室內每天应用石炭酸溶液(浓度0.5%)消毒2—3次。

③ 安装时要細心：安装好后要經過检查再通气。千万不要把各管接錯，否則就会发生倒流或不通气的现象。

④ 通气后检查是否有漏气之处，若有則需用蜡或凡士林将其封閉。

⑤ 开动机器时要注意先插好插头，再开抽气管上的小鉄夹。不开机器要把抽气管夹住，再拔插头。

⑥ 如果一时发生倒流时，則应迅速将抽气管夹好，以免繼

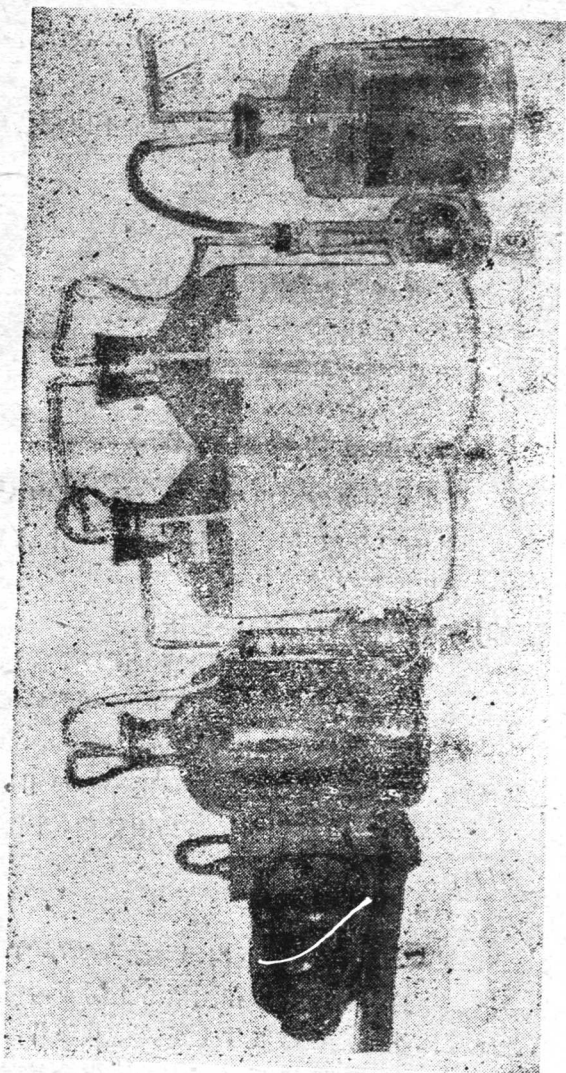


图6 通气装置

1 贮气瓶； 2 贮气瓶； 3 空瓶； 4 培养瓶； 5 空瓶； 6 氯化汞瓶

續倒流。

⑦相隔一定時間(1—2小時)將菌液震盪一次，這樣可使碳酸鈣與產生的酸及時中和，有利於細菌的繁殖。

⑧在安裝以及取液檢查時要迅速細心，盡量不使沒有經消毒的空氣進入，以免帶入雜菌。

⑨氯化汞溶液最好常換。

2、菌液在培養過程中酸鹼度的檢查

菌液在培養過程中也要檢查酸鹼度，如果不到7.3，就要加碳酸鈣與或氫氧化鈉和氫氧化鉀等來中和。我廠是用碳酸鈣來中和的。在取液檢查酸鹼度時，也要迅速細心。

(五) 菌液的檢驗工作

將通氣一晝夜的菌液用吸管取出7毫升左右，其中5毫升用來測酸鹼度(方法前面已介紹過)。另外一毫升作計算菌數用。余下的菌液作塗片進行顯微鏡檢查。

1、檢驗菌種時塗片(載物玻璃片)染色法

在菌種檢查時，為了觀察菌種更為清楚，所以要作塗片，將菌體固定，在顯微鏡下進行檢查，來了解固氮細菌的繁殖及其雜菌率。我廠一般檢驗方法是先用普通染色法制塗片，在顯微鏡下觀察菌體，如發現有可疑的細菌，即可進一步再用革蘭氏染色法制一塗片進行檢查，以斷定它是否為固氮菌，因為固氮菌革蘭氏染色為陽性。

(1) 普通染色方法：

用滅過菌的接種環沾菌液一環，均勻地塗在干淨的載物玻璃片上(簡稱載玻片)，然後將載玻片在酒精燈上烤干，並迅速通過燈火一次，此時菌體就固定在載玻片上了。待載玻片涼後，再在固定菌體上滴2—3滴龍胆紫(或番紅)，大約停半分鐘時間，將

多余龙胆紫(或番紅)輕:用水(自來水即可)沖掉,再放在酒精燈上徐徐烤干,即可開始在顯微鏡下檢查。

(2) 革蘭氏染色方法:

用滅過菌的接種環沾取菌液一環,做一涂片(方法如前),然後加龍胆紫2—3滴,待1—2分鐘後,用水沖去多餘的龍胆紫,在涂片上再加碘液2—4滴,經1—2分鐘,再用95%酒精沖洗一分鐘左右,(沖洗時要精細;作到全面沖洗,但時間不易過長,否則會影響效果。)然後用水迅速沖洗。再加復紅2—3滴,待1—2分鐘後,再用水沖洗;玻片上的水分可在酒精燈上徐徐烤干,最後鏡檢革蘭氏陽性菌是紫色,革蘭氏陰性菌是紅色,如鏡檢時出現革蘭氏陰性菌即為雜菌。

(3) 染色用染料的配制:

① 龍胆紫的配制:1克龍胆紫溶解在10毫升95%酒精中,然後再與100毫升5%的石炭酸溶液混合。

② 碘液的配制:1克碘的結晶,先溶解在濃的碘化鉀溶液中(2克碘化鉀和5毫升蒸餾水配成),再用蒸餾水稀釋至300毫升。

③ 鹼性復紅的配制:復紅1克放在10毫升95%酒精中溶解,然後用蒸餾水100毫升稀釋即成。

2. 計算菌數的方法和簡單的解释

取菌液一毫升,用無菌水稀釋10倍,然後取一滴菌液放在血球計算板上,上蓋一蓋薄片,在顯微鏡下計算菌數。計數的方法就是將薄片蓋在計數板上,使計數板上最小的正方格(其面積為 $1/400$ 平方毫米)與上面空間構成的體積為 $1/4,000$ 立方毫米。若知道一個方格內現有的菌數(假設為 n),則可推算出1毫升所含有的菌數。其公式如下:

現有菌數(n) $\times 10$ (稀釋原菌液10倍) $\times 4 \times 10^6$