

编 号: (78)025

内 部

出国参观考察报告

澳大利亚生物固氮

科学技术文献出版社

出国参观考察报告

澳大利亚生物固氮

(内部发行)

编辑者：中国科学技术情报研究所

出版者：科学技术文献出版社

印刷者：中国科学技术情报研究所印刷厂

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

开本 $787 \times 1092 \cdot \frac{1}{16}$ 0.75 印张 19千字

统一书号：13176·42 定价：0.15元

1979年4月出版 印数：8200册

目 录

一、概况	(1)
二、生物固氮研究的背景和现状	(1)
三、有关生物固氮方面的主要内容	(2)
(一) 根瘤菌的应用生态学	(2)
(二) 豆科~根瘤菌共生固氮作用中构造与功能的研究	(6)
(三) 豆科~根瘤菌共生体的碳氮代谢的研究	(8)
(四) 根瘤菌剂的生产工艺和质量检查	(8)

澳大利亚生物固氮

生物固氮考察组

一、概 况

根据中国科学院和澳大利亚科学院的协议,中国科学院派生物固氮考察组一行五人,于1978年2月11日至3月5日在澳大利亚进行专业科学考察。考察组先后访问了珀思、阿德雷德、墨尔本、堪培拉、悉尼和布里斯班六个城市,参观访问了这些地方的大学、联邦科学和工业研究组织(Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization,简称CSIRO)所属有关单位和农业部的有关单位,以及野外试验室和工厂等26个单位,如位于澳大利亚首都堪培拉的CSIRO植物工业研究所、澳大利亚国立大学生物科学研究院。位于珀思的西澳大学农学院农学系、植保系、Murdoch大学环境和生命科学系、CSIRO土地资源管理研究所、西澳州农业部。位于阿德雷德的阿德雷德大学Waite农业研究所、CSIRO土壤所。位于墨尔本的墨尔本大学Russell Grimwade生化学院。位于悉尼的悉尼大学微生物系、农业化学系、新南威尔士大学微生物学系、新南威尔士州农业部园艺研究站、Hawkesbury农学院及两个根瘤菌工厂:Root nodule PTY Limited和Agriculture Lab. PTY Limited。位于布里斯班的CSIRO热带作物和牧草研究所、CSIRO Samford牧草豆科田间试验站、CSIRO Cooper实验室、Queensland大学农学院及Queensland农学院。

在堪培拉举行了五天(2月20日至24日、每日半天)的双边学术座谈会。由植物工业研究所与考察组轮流主持。在会上共作十七篇学术报告,报告会议结束后,将报告汇集册(中澳生物固氮报告论文集)。

二、生物固氮研究的背景和现状

提高土壤肥力,其中提高植物氮素营养条件,在现代农牧业中,主要是两条措施,一条是充分发挥生物固氮的作用。一条是发展化学氮肥工业。两条都是不容忽视的。各个国家的具体情况不同,侧重点有所不同。

由于以下特点,澳大利亚十分重视发挥生物固氮的作用:

1. 地广人稀。农牧业以生产小麦、牛、羊为主,牧业比重大于农业。农牧业产品占出口额的重要部分。因此,农牧业生产都倾向于用最少的人力、物力取得最大效果的经济效益。过多的施用化学肥料,提高生产成本,不利于澳大利亚农牧业产品在国际市场上的竞争力。

2. 澳大利亚处于热带和亚热带。四季常青有利于在长期和短期牧草地上发挥豆类的共生固氮作用。澳大利亚畜牧业发展中改良牧草地的主要措施是:(1)提高土壤肥力。(2)改良牧草品种(豆类和禾本科组成混合牧草)。发挥豆类的共生固氮作用在这两项措施中都是

支柱。同时澳大利亚的小麦生产主要实行小麦与短期牧草的轮作制或小麦与豆类的轮作制。

3. 澳大利亚的豆类（不论是收获籽实的或是利用青草的）绝大多数是从外地（外洲）引进的，引进新的豆类需要同时引进适宜的根瘤菌和进行人工接种，促进了对共生固氮作用的科学研究。

因此，澳大利亚对于生物固氮的科学研究（包括应用技术和基础理论）从本世纪四十年代初起就开始受到重视。

由于澳大利亚对于生物固氮的研究有上述深刻的农业生产实践背景。研究的重点是豆类和根瘤菌的共生固氮作用。在十分重视应用技术的前提下，大力进行应用基础的研究和某些基础理论的研究。以更好地发挥共生固氮作用为出发点，进行多学科的研究。

三、有关生物固氮方面的主要内容

有关生物固氮方面的主要内容（包括在堪培拉举行的双边讨论会上的一些工作介绍）。

（一）根瘤菌的应用生态学

根瘤菌的应用生态学是根瘤菌接种剂推广应用的科学总结，也是为保证根瘤菌接种剂的实用效果而进行的科学试验的一个分支。在这方面，澳大利亚的研究工作是在世界前列的。

在澳大利亚，这方面的研究是四十年代开始的。从两篇有关这个问题的总结文章中引用的八位主要的澳大利亚的研究人员的报告的篇数，四十、五十年代共为5篇和7篇，六十年代为33篇和26篇，七十年代为2篇和17篇。在这两篇总结文章中引用的七十年代的报告篇数的悬殊，主要在于前一篇总结文章着重于根瘤菌接种剂应用技术的直接问题，后一篇总结文章着重于生态学因子的分析。这表明，在七十年代，根瘤菌应用生态学向纵深发展了。

根瘤菌接种剂的应用效果，主要受三方面因素的影响：

（1）根瘤菌接种剂的质量，包括菌种的质量，接种剂中根瘤菌的数量，和接种剂中其它成分可能产生的影响。

（2）接种以后，根瘤菌在土壤和根际的生态环境对根瘤菌的影响。

（3）豆科植物结瘤以后，植物~根瘤菌共生体系在整个生长发育过程中生态环境对共生固氮作用的影响。

本节着重介绍澳大利亚的研究者在关于第二方面的因素的研究工作。

根瘤菌在自然界的分布情况

对某一种豆科寄主来说，共生根瘤菌在自然界的分布情况可以分为三种：①土壤中缺乏这种根瘤菌；②土壤中不缺乏但菌种不良；③土壤中不缺乏优良菌种。这三种情况都不是罕见的，具体情况，具体分析。就澳大利亚而言，主要的豆科作物和牧草都是从外洲引进的，在引进以前由于没有这些作物，也没有和它们共生的根瘤菌。因此，引进一种豆科植物，同时需要引进共生根瘤菌，进行人工接种。对于共生关系的专性较高的种类，更为明显。

接种失败和结瘤失败

这是两个不完全相同的概念。接种失败可能出于：①接种剂使用不当（用量过少或方法

不对)；②用接种剂拌种时，种皮上有有毒物质；③土壤和根际微生物的对抗作用；④有毒肥料和农药的危害；⑤土壤的物理条件不宜（如过酸、土湿过高、过份干燥等等）。结种失败当然是结瘤失败的原因，但结瘤失败还可能有寄主植物的营养和田间管理的原因。

是否需要进行人工接种的诊断

田间的结瘤情况调查和土培盆栽结瘤试验仍旧是唯一可靠的诊断方法。还没有对土壤诊断的方法。

Allen 等对于需要进行人工接种的四种情况，澳大利亚的研究者认为是适合的。这四种情况是：①土地利用的最近历史上没有种过这种植物或和它同互接种族的植物；②田间调查表明结瘤情况不好；③豆种与非豆科轮栽（主要指相隔几年的轮栽制度）；④新改良平整的土壤。

四种人工接种方法的优缺点

这四种人工接种方法是：①草炭接种剂用喷粉法进行人工接种；②草炭接种剂制糊剂拌种；③制成颗粒接种剂与种子同时或分开施用；④草炭接种剂造成稀释液与种子同时或分开施用。

优缺点分别列于表 1。

糊剂拌种法仍为主要的拌种方法，方法和我国的拌种法基本相同，但一般加有粘着剂（合成胶、植物胶、明胶、糖水等等）。拌种时采用大小不同形式的搅拌机（如奶油分离器、小型水泥搅拌机等等）。

最近，适应大规模、机械化生产，澳大利亚很重视最先在以色列试用的接种剂稀释液与种子同时、分别施用的方法。施用机械见图 1。

表 1 四种人工接种法（大豆）的优缺点

方 法	优 点	缺 点
喷 粉	1. 快速，简单	1. 效果不好。
糊 剂 拌 种	1. 无需特殊设备 2. 易掌握	1. 拌种后要荫干， 2. 少量种子损坏， 3. 制备费工， 4. 必须在48小时以内播种， 5. 接种效果有时不满意， 6. 种子用药剂拌种后不适用。
固 体 菌 剂	1. 接瘤效果好， 2. 在有适宜工具时应用方便， 3. 保存质量较好， 4. 适用于药剂拌种的种子。	1. 无商品供应，如有价格较昂， 2. 在农场上制备比较复杂， 3. 播种器要配特制送料斗。
液 体 施 用	1. 接瘤效果好， 2. 应用方便，播种器只需稍加修改， 3. 适用于药剂拌种的种子， 4. 制备简便。	1. 播种器需要修改， 2. 喷器嘴有时阻塞。

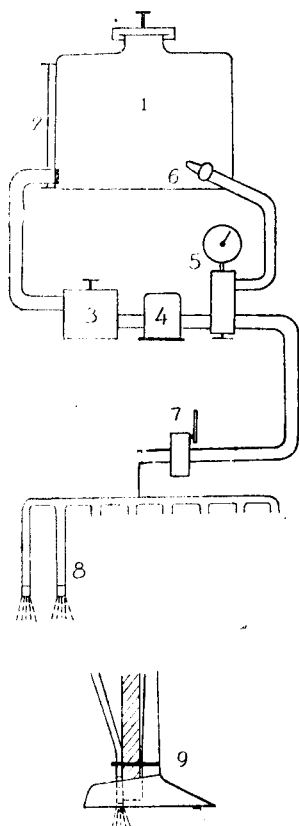


图1 液体接种器械图解

- | | |
|--------|---------|
| 1. 罐 | 2. 液面计 |
| 3. 过滤器 | 4. 泵 |
| 5. 压力阀 | 6. 分路 |
| 7. 调控 | 8、9. 喷嘴 |

种子包被化 (Seed pelleting) 接种法

这个接种法虽然不是澳大利亚首创的, 但主要的研究工作是澳大利亚进行的, 现在对很多国家有影响。方法是将接种剂混合在包被剂中, 然后包被在种子上。包被剂的主要成分为矿物质粉末 (碳酸钙、石灰岩粉、磷矿粉、石膏粉、滑石粉等等)。在澳大利亚, 这方法最先应用于酸性土壤。三叶草根瘤菌不适酸性土壤, 用碳酸钙包被种子接种的得到显著效果。澳大利亚的研究者也指出这样做可以防止种皮的有毒物质对根瘤菌的毒害。可是, 用碳酸钙包被对不耐碱的菌种是有害的。

预接种法的研究

预接种法 (Preinoculation) 指种子供应已经接种了根瘤菌的种子。预接种法有两种基本形式,
①菌侵种子;
②种子包被化。

菌侵种子 (Impregnated seeds) 是将种子浸泡在菌液内, 然后抽真空将根瘤菌吸收到种皮内部去。澳大利亚的研究者

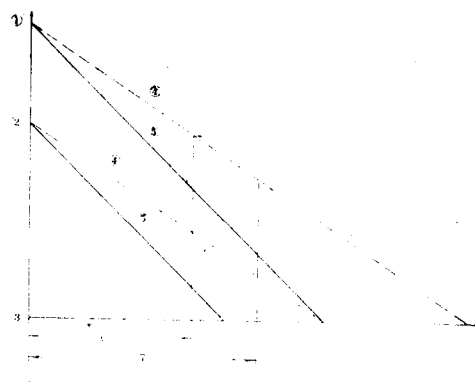


图2 改善结瘤状况的因素: (1) 降低死亡率; (2) 增加接种量; (3) 缩短出芽时间。

- ①播种时数量 (高量); ②播种时数量 (常量); ③能在根际发展的最低量; ④低死亡率; ⑤正常死亡率; ⑥催芽; ⑦正常出芽; ⑧播种时期; ⑨出芽时期。

Brockwell说他的试验结果是不满意的, 并且也没有见到满意的、有说服力的研究报告。

澳大利亚研究者十多年来着重研究的是种子包被化的预接种法。迄今为止, 仍然不能认为是成功的。澳大利亚研究者的意见是, 做为一种商品化的产品, 对预接种法应该制定相应的质量标准。

接种成败的三项因素

Brockwell指出在接种剂质量优良的前提下, 接种成败的三项因素的关系如图2。这三项因素是: ①接种菌数; ②根瘤菌在土壤中的死亡率; ③种子发芽期即从播种 (接种) 到芽苗开始结瘤并建立了适合根瘤菌繁育的根际条件之间的时期的长短。

显然, 这三次因素之间的实际关系受土壤 (不是根际) 的生态环境对于根瘤菌繁育的影响。

根瘤菌是不是稳定的土壤居住者?

这个问题主要是指在沒有寄主植物的土壤环境中根瘤菌是不是稳定的土壤居住者?

从总的情况看, 在沒有寄主植物的土壤中是沒有根瘤菌存生的。在土壤环境中, 根瘤菌

是“异乡人”。这种“异乡人”在土壤中能否定居下来？由于影响因素的复杂性，不能一概而论。它可能很快地衰亡。Nutman的试验，根瘤菌在土壤中的半衰期只有35天。可是在另一方面在澳大利亚一块至少有11年没有种过甜三叶草族的寄主植物的光板土地中，甜三叶草根瘤菌数量很多，这就指出了研究根瘤菌的土壤生态条件的复杂性。

寄主植物的根际效应

寄主植物对根瘤菌有很强的根际效应。地三叶草的试验，在种子发芽前，土壤含三叶草根瘤菌5个/克土，到衰老始期达75,000个/克土。

但是在有些“有问题”的土壤中，根际效应也可能发挥不出来。在一个“有问题”的土壤中，三叶草根际的三叶草根瘤极少；而在没有问题的土壤中，每1厘米之根根际的根瘤菌超过1000个。

非寄主豆科植物和非豆科植物对根瘤菌有没有根际影响？不同的研究结果表明有正、有负。

在土壤和根际，各种微生物对根瘤菌繁育的影响

Parker、Trinick和Chatel综述列出下列多方面的影响：

①竞争 指各种微生物在土壤中竞争养料，因而互相限制。在土壤中，微生物的养料供应一般说是处于半饥饿状态，竞争肯定起着互相限制的作用。

②对抗 主要指其它微生物产生对根瘤菌有毒害的物质（例如抗菌素类物质）。Trinick从四种土壤中分离出1500株细菌、放线菌、真菌，在合成培养基上考查它们对根瘤菌的抗生作用。总的来讲，抗生作用是比较广泛的，可是不同的根瘤菌的反应也不一样。一个在土壤中不易定居的根瘤菌株（三叶草根瘤菌TAI）和其它根瘤菌相比，受更多的真菌、放线菌、细菌种类的抗生抑制。

③猎食、寄生和溶菌作用

无疑的，根瘤菌和其它细菌一样都是土壤中一些猎食微生物的猎食对象。根瘤菌的食菌体也是广泛存在的。澳大利亚的研究者也曾分离培养出寄生细菌（*Bdellovibrio bacteriovorus*）寄生于根瘤菌的现象。但在这方面，还没有发现对根瘤菌的应用生态学有什么特殊的意义。

④促生作用和抗生作用

促生作用和抗生作用无疑是并存的。在Trinick的研究中，从土壤中分离出的1500株微生物对在土壤中存活能力强的根瘤菌株的促生作用也强，对存活能力弱的根瘤菌株的促生作用也弱。

根瘤菌株在结瘤中的竞争

主要的问题是研究接种剂中的高效根瘤菌株和土壤中原来的低效菌株在结瘤中的竞争。在这个问题上，澳大利亚的研究者们多数采用了血清学研究法——凝胶-免疫扩散法，可以用根瘤直接测定，并提出专性鉴别效应。

竞争指数（Competative Index）：竞争指数是两个同时存在的菌株的结瘤能力的表现，两菌株一起接种，接种的数量相等，结瘤能力强的菌株形成更多的根瘤。在用三叶草进行的试验中，即使结瘤能力强的菌株少一百倍，结的瘤数仍然多于结瘤能力弱的菌株（表2）。这当然和寄主植物对不同菌株的根际效应有关。另外一个值得重视的竞争关系是根瘤菌素（Rhizobiosin）的作用。根瘤菌素产生株产生根瘤菌素（一种专性溶菌蛋白质）对敏感菌株的溶菌作用。

表2 两菌株在一起按不同比例接种, 互相竞争结瘤的关系,

地三叶草试验 (Robinson 1969)

接 种 量 比 率		9 天 后 结 瘤 百 分 数	
菌株 1	菌株 2	菌株 1	菌株 2
10^8	10^8	83	17
10^6	10^8	67	33
10^4	10^8	17	83
10^2	10^8	6	94

注 菌株 1 结瘤能力强, 菌株 2 结瘤能力弱。

(二) 豆科~根瘤菌共生固氮作用中 构造与功能的研究

这方面的研究工作是以澳大利亚CSIRO植物工业研究所为核心开展的。他们把电子显微镜的形态研究和生物化学研究结合起来取得了较大的进展。

根瘤的含细菌细胞

早在1958年, Bergersen和Briggs就发现了, 在根瘤的含细菌细胞中, 类菌体是包含在质膜包之内的。大豆根瘤中一个质膜包内有3—6个类菌体(图3)。Goodchild和Bergersen (1978) 将大豆根瘤的构造和整个固氮作用的生理学结合起来, 图解如图4。



图3 含类菌体根瘤细胞横切片
电镜照片 (Goodchild和Bergersen 1978)

①在最佳条件下, 光合代谢物的供应量可达 1.2×10^{-18} 克分子己糖/分/类菌体。其中有 0.7×10^{-18} 克分子己糖进入类菌体, 消耗于固氮作用; 有 0.5×10^{-18} 克分子在根瘤细胞中, 消耗于氨合成氨基酸的作用中。

②在类菌体表面的最佳 O_2 分压为 1×10^{-8} 克分子, 而在质膜包表面的 O_2 分压则为 5×10^{-8} 克分子。这个压差是由豆血红蛋白缓冲形成的。类菌体的 O_2 消耗量为 4×10^{-18} 克分子 O_2 /分/类菌体。

③质膜包内的 N_2 的最佳量为0.5毫克分子。 $N_2 \rightarrow NH_3$ 的固定量为 1.3×10^{-18} 克分子 NH_3 /分/类菌体。

④形成天门冬酰胺的最佳量为 0.65×10^{-18} 克分子/分种/类菌体。

类菌体是活的

由于未能确证可以将类菌体分离接种到培养基中生长, 繁殖起来, 一向认为类菌体在生物化学上是活跃的, 在生长繁殖上是死的。澳大利亚国立大学生物学研究院用单生质体分离法, 将根瘤的含菌细胞分离出来, 从中取出类菌体, 类菌体中5—100%

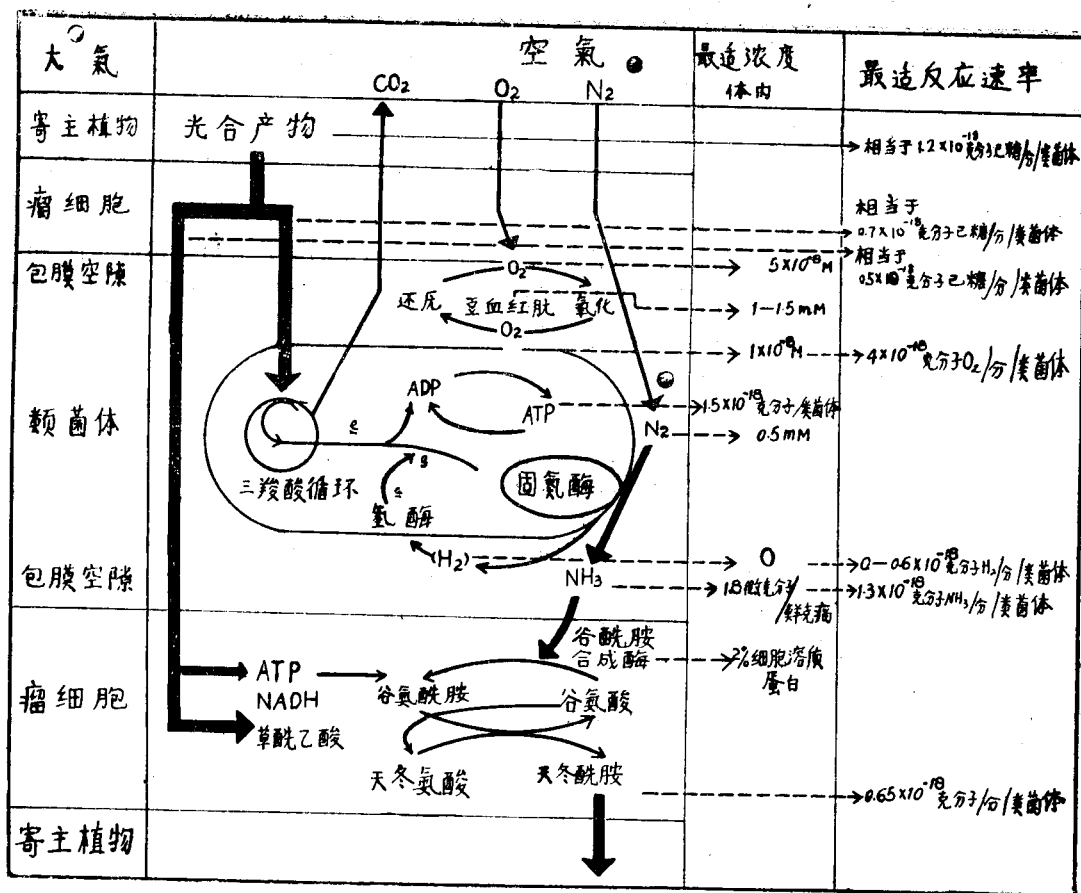


图 4

证明是活的，每个类菌体在培养基上能够繁殖成一个菌落 (Rolf et al. 1978)。

豆血红蛋白的O₂缓冲容量

固氮酶在高氧压下钝化或失活。但固氮作用是需能的，在类菌体中由好气呼吸供应能量，是需氧的。因此，两者是对立的。豆血红蛋白是根瘤中氧压的缓冲剂，它位于质膜包内。Bergersen和Goodchild (1973) 计算，在大豆根瘤中，吸氧豆血红蛋白上束縛的O₂为200微克分子，溶解的自由O₂只有20毫微克分子，豆血红蛋白对O₂的缓冲容量为10000倍。豆血红蛋白的缓冲作用既降低了自由的O₂压，保护了固氮酶的活性，又源源不断地供应氧化磷酸化需要的O₂。这在恒化器试验中得到了肯定的证据 (Bergersen & Turner 1978)。

P450细胞色素

Appleby (1969) 发现大豆根瘤类菌体中含有一种高效细胞色素 (P450)。N-Phenylimidazole对P450专性抑制，不抑制其它细胞色素。加N-Phenylimidazole (1毫克分子以内) 对类菌体的氧吸收作用影响不大，但显著降低了固氮酶活性。随着N-Phenylimidazole量的增加，固氮酶活性的下降与ATP/ADP比例的下降成直线相关 (Appleby 1975 et al)。Appleby 认为类菌体中有两套氧化酶。一套不包括P450，在高氧压下活跃，与固氮酶需要的低氧压对立。一套包括P450，在低氧压下活跃，符合固氮酶的需求，也符合在豆血红蛋白缓冲下的低氧压条件。

Appleby在中澳生物固氮座谈会上指出,想把固氮酶转移到非豆科植物上去,并发生作用,需要同时建立起一套“保护性”呼吸作用体系,好象豆科根瘤中具有①豆血红蛋白或其它氧压的缓冲因子,和②在低氧压下的高效氧化酶。

豆血红蛋白的结构和组分

在访问中,澳大利亚的研究者Appleby和Leach(墨尔本大学生物化学系教授)还口头介绍了对于豆血红蛋白的结构与组分的研究近况。豆血红蛋白的电子顺磁共振(EPR)研究和核磁共振(NMR)推测豆血红蛋白的血红素和组氨酸之间有一易变的袋状开口构造,可能和它对O₂的高度亲和力有关。他们声称已经获得了适合于X-光晶体衍射分析的豆血红蛋白晶型。

已经分析出Lba、Lbb、Lbc、Lbc₂、Lbd₁和Lbd₂六个豆血红蛋白组分,并完成了Lba和Lbc的氨基酸顺序分析。

(三) 豆科~根瘤菌共生体的碳氮代谢的研究

澳大利亚西澳大学植物学系Pate和他的同事们对于豆科~根瘤菌共生体的碳、氮代谢进行了多年研究。他们以豆科植物(Lupinus albus)为材料,应用¹⁴C和¹⁵N示踪法研究整体植株的碳代谢和生物固定的氮的整体植株中的氮代谢(图5)。

图5说明光合作用所同化的100单位碳和固氮作用所同化的100单位氮的去向。箭头向下代表经韧皮部的流动。向上表示经木质部的流动。圆圈中的数字表示生长所同化的碳氮量。从上列图式可见,光合作用每同化100单位碳就有32单位转运到根瘤中。而类菌体每固定100单位氮,只有6单位保留在根瘤中,绝大部分转送给植物的地上部分,一小部分转送给根系(Pate, 1977)。

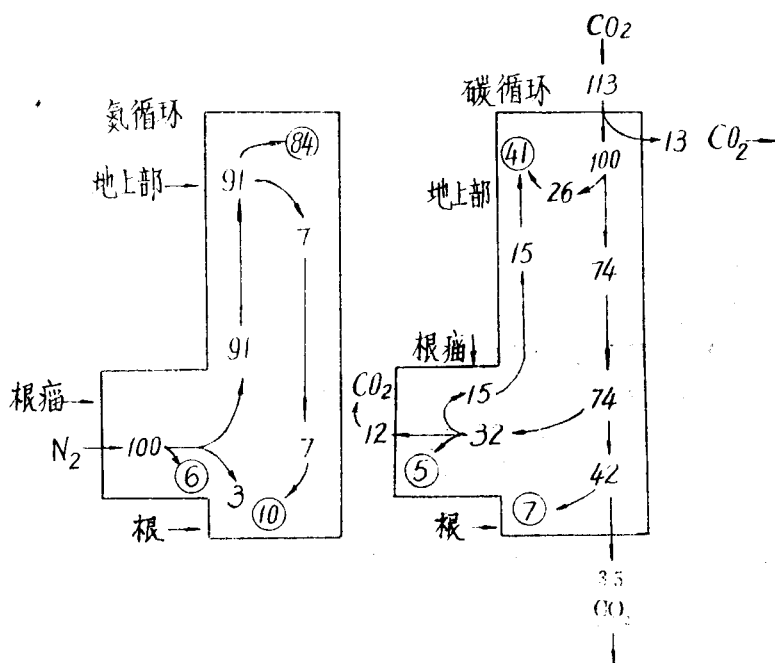


图5 豆类植物Lupinus Albus碳素同化的经济利用和固定N的分配

(四) 根瘤菌剂的生产工艺和质量检查

澳大利亚为了发展畜牧业和土壤改良,大量种植豆科作物和豆科牧草。因为这些作物及牧草品种几乎都是引进的。因此选育和接种优良菌剂的问题是澳大利亚十分重视的工作。从

三十年代后期就开始了这方面的研究。目前澳大利亚对根瘤菌剂的生产和应用建立了一套完整的生产工艺、应用技术和质量检查机构。成立了“澳大利亚接种剂研究和检查服务站”菌称A.I.R.C.S.(Australian Inoculant Research & Control Service)。这个机构的任务是：(1)为草炭根瘤菌剂生产提供优良菌种；(2)检查每一批菌剂的质量；(3)提出菌剂使用最长期限。

1. 根瘤菌剂生产工艺及其特点

(1) 生产菌种的来源：由联邦科学工业研究组织的植物工业研究所及全国有关研究单位，经过认真选育和研究提出优良菌种，由澳大利亚接种剂研究和检查服务站进行盆栽和田间小区比较实验，决定向生产推荐的菌种。目前推荐于生产应用的根瘤菌菌种有28种(表3)。

表 3

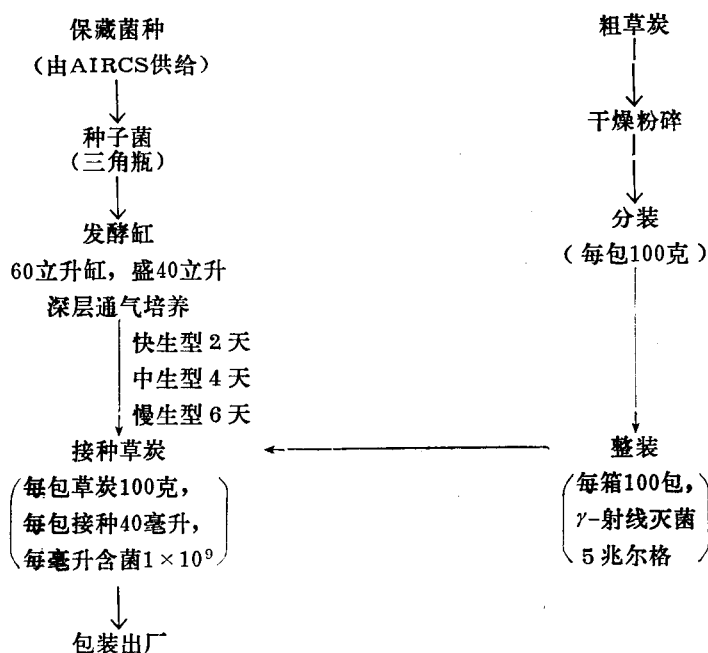
菌剂编号	寄 主 植 物	菌 种
A	Medics, Lucerne	U45
	Paragosa	W118
	Circle valley	NA2290
B	White clover	TA1
C	Subterranean clover	WU95
	T. semipilosum	CB782
D	Lotus Pedunculatus	CC829
	L. covniculatus	SU343
	L. hispidus	CC8146
E	Pea	SU351
F	Bean	CC511
G	Lupin	WU425
H	Soybean	CB1809
	C. V. Hardee	CC705
I	Cowpea	CB756
J	Lablab	CB1024
	Mug Bean	CB1015
	Centrosema	CB1923
	Desmodium	CB627
	Leucaena	CB81
	Lotononis bainesii	CB376
	Lotononis angoleusis	CB1323
	Fine-stem stylo	CB1552
	Aeschynomene	CB2312
	Salnfoin	CC1108
	Clickpea	CC1192
	Astragalus	CC1254
	Crown vetch	CC401

澳大利亚接种剂研究和检查服务站收集所有生产菌种，用冷冻干燥方法进行保藏，为了供应生产菌种，每年制种一次，并检查下列项目，保证菌种的可靠性：①进行格菌氏染色观察；②在葡萄糖-蛋白胨琼脂上检查纯度；③用血清免疫凝集法检查菌种的专一性；④用试管结瘤试验检查根瘤菌的有效性。

(2) 菌剂的生产：

澳大利亚有两个菌剂生产工厂，都位于悉尼，一个是“Root Nodule PTY. Limited”，另一个是“Agricultural Laboratories PTY. LTD.”

生产工艺：以“Agricultural Laboratories PTY. LTD.”为例，其工艺程序如下：



生产特点：(1) 为了减少泡沫，用甘油为碳源进行生产。(2) 接种采用半机械化注射法，每人每小时接种250包。(3) 草炭灭菌采用整箱（每箱100包，每包100克） γ -射线（5megarad）灭菌，节省人力和时间，减少劳动强度，改善劳动条件。

该厂全年进行生产，目前生产18种根瘤菌菌剂（表4）。

(3) 菌剂质量检查：

工厂生产菌剂经过严格检查，合乎下列标准以后，才能出售。每批菌剂由A. I. R. C. S. 抽样检查，每批抽样六包，检查其中五包。检查下列项目：

(a) 用稀释平板法检查刚果红酵母甘露醇琼脂上活菌数，要每克湿草炭达到 1000×10^6 个。百脉根菌剂 (Lotononis) 达到 300×10^6 个。

(b) 对平板上出现菌落进行形态观察及格兰氏染色检查。

(c) 进行试管琼脂结瘤实验。

(d) 用血清免疫学方法检查菌种是否是原交付生产的菌种。

(4) 建立菌剂退换制度

根瘤菌剂在工厂允许冷藏六个月，分配到使用单位，有效期六个月，为了保证菌剂质量，假若供应单位销售不完，还可以向工厂进行退换新的菌剂。

表 4

菌 剂 种 类	接 种 作 物	包 装 大 小		
		小包装 (70克) 拌种子量 (公斤)	标准包装 (250克) 拌种子量 (公斤)	经济包装 (375克) 拌种子量 (公斤)
A 组	Lucerne & all Medic except paragosa	10	50	75
Paragosa	Paragosa Medic	10	50	
B 组	Red, Strawberry, & all white clovers	5	25	37
KWC	Kenga white clover(T. Semipilosum)	5	25	
C 组	All Subterranean clovers	10	50	75
D 组	Lotus pedunculatus (L. major)	5	25	
E 组	Pea, Vetch, Tares, Broad & Tick Beans, Lentil	25	100	
F 组	French, Climbing & Navy Beans	25	100	
G 组	Lupin	25	100	
	Serradella	10	50	
H 组	Soybean	25	100	
I 组	Cowpea, Peanut	25	100	
	Velvet Bean			
	Siratro, Phasey Bean	10	50	
	Puero, Calopo			
	Glycine Stylo, Townsville Stylo	5	25	
J 组	Rongai Lablab, Highworth Lablab	25	100	
	Dolichos uniflorum (Horse Gram)	10	50	
	Archer axillaris	5	25	
MUNG组	Mung Bean	25	100	
CHICKPEA组	Chickpea	25	100	
CENTRO	Centrosema	10	50	
DESMODIUM	Desmodium	5	25	
LEUCAENA	Leucaena	25	100	
LOTNONIS	Lotononis	2	10	

主 要 参 考 文 献

1. Brockwell, J. Application of Legume Seed Inoculants 自《A Treatise on Dinitrogen Fixation》IV, pp. 277—310. Ed. R.W.F. Hardy and A. H. Gibson, Wiley, New York, U.S.A. 1977.
2. Parker, C.A., M.J. Trinick and D.L. Chatel, Rhizobia as Soil and Rhizosphere Inhabitants 同上书, pp. 311—352
3. Brockwell, J. Rhizobial Ecology and Legume Seed Inoculation 自 Chinese-Australian Symposium on Biological Nitrogen Fixation pp. 8—18. CSIRO Division of Plant Industry, Canberra.
4. Bergersen, F.J. & Briggs, M. (1958) J. Gen. Microbiol. 19, 482
5. Goodchild, D.J. & Bergersen F. J (1978) Root Nodule structure in Relation to Function 自 Chinese-Australian Symposium on Biological Nitrogen Fixation p.85

6. Rolfe, B.G., Skotnicki, M.L., Eadie, J.F. & Gresshoff, P.M. (1978) The Use of Bacteroid Viability to Examine Establishment of Nodulation in white Clover, 自 Chinese-Australian Symposium on Biological Nitrogen Fixation p.95
7. Bergersen, F.J. & Goodchild, D.J. (1973) Aust. J. Biol. Sci. 26, 741.
8. Bergersen, F.J. & Turner, G.L. (1978) Effects of Concentrations of Free O₂ upon Respiration and Nitrogenase Activity of Rhizobia, 自 Chinese-Australian Symposium on Biological Nitrogen Fixation p. 39.
9. Appleby, C.A., Turner, G.L. & Macnicol, P.K. (1975), Biochem. Biophys. Acta, 387, 461.
10. Appleby, C.A. Function of p-450 and other cytochromes in rhizobium respiration. To Appear in Proceedings of the 11th FEBS Congress. Copenhagen, 1977. In "Function of Alternative Oxidases" Symposium. Ed. H. Pagn, Dllloyd & B.C. Hill. Pergamon Press, London. (1978)
11. Date, R.A. (1969) A decade of legume Inoculant Quality Control in Australia. J. Aust. Inst. Agric. Sci. 35, 27-37.
12. Thompson, J.A., The Australian Inoculants Research and Control Service. Rhizobium Newsletter v.22, p.13, 1977.