

細菌肥料資料集

云南大学生物系細菌肥料厂等編

高等教育出版社

本書收集的八篇資料，都是在1958年全國教育與生產勞動相結合展覽會上展出的技術資料。這些資料分別講述了固氮菌劑、根瘤菌劑、磷細菌肥料和抗生菌肥料的性質，生產技術和使用方法的知識。文字淺顯易懂，內容也比較精練集中，特別是能夠結合實際的介紹了某些細菌肥料的土法生產。因此對於學校、公社所辦土化肥工廠的工作者和一般從事農業工作的同志可能有很大的用處。

細菌肥料資料集

雲南大學生物系細菌肥料廠等編

高等教育出版社出版 北京宣武門內承恩寺7號

（北京市書刊出版業營業許可證出字第051號）

京華印書局印刷 新華書店發行

統一書號16010·177 開本787×1092¹/₃₂ 印張4¹/₁₆

字數86,000 印數0001—7,000 定價（8）¥0.55

1959年5月第1版 1959年5月北京第1次印刷

細菌肥料生产技术概要

云南大学生物系細菌肥料厂

一、簡要介紹常見的几种細菌肥料的菌种特性

1. 固氮菌:

这种細菌能固定空气中的氮素,以增加土壤中的氮肥。

固氮菌有两类,即嫌气性的固氮菌和好气性的固氮菌。

后一类固氮力强,常用来制成細菌肥料。

好气性固氮菌对于湿度的要求較高,在水稻土的表層發育良好。它們的最适溫度在 25—30°C 之間。

有机酸类、醇类、葡萄糖、甘露糖、蔗糖和低碳脂肪酸的盐类以及淀粉、糊精等都是固氮菌的碳源,它們利用有机碳化物作为能源进行固氮作用。在土壤或培养基中如有丰富的可給态氮化物时,固氮菌即利用氮化物而不自营固氮作用了,長此以往,并会降低甚至会丧失其固氮能力。土壤中含有适量的磷酸盐和鈣时有利于固氮菌的生長和發育,若有微量元素如硼、鋇和鈣存在,可刺激其發育与提高其固氮作用。

好气性固氮菌有下列一些菌种:

1. 圓褐固氮菌:

粗短杆状,漸变橢圓或球形,通常成对作“8”字形,細胞內含有多数大形顆粒体,后期培养中常見由多数叠合圈以厚脂膜包裹。單生鞭毛可以运动,在高溫(42°C)、缺氧、过碱或过酸、磷酸鈣供应不适当时可形成大量的長杆菌或各种各样

的弯曲状。

菌落粘韧、光滑或皱折，初期透明，随后呈灰白色，后期培养则是暗褐色或黑色，色素不渗入培养基内。

在一般石灰性土壤及中性土壤中普遍存在这种细菌。

2. 活泼固氮菌：

球状或卵圆形，为固氮菌中菌体最大的一种，通常单生或呈短链状排列，细胞内含有细小的颗粒体，不形成荚膜。周身鞭毛运动极活泼。

菌落平滑、干或湿润，不常产生色素，但在含有有机酸的培养基中产生黄褐色或绿色色素，并渗透至培养基中而现荧光。

这种细菌多分布在河水中，在土壤中少见。

3. 梵氏固氮菌：

细长杆状，后期培养呈短杆状或近似球状，无明显颗粒体及荚膜，周身鞭毛，运动活泼。

菌落平滑并有光泽，具粘性，能产生兰绿色素渗入培养基内。

分布在土壤中或水中。

4. 黑固氮菌：

短杆状，细胞内多粗大颗粒体，后期培养细菌呈球状，并由3—4个细胞联结成一小孢囊状，周身鞭毛，能运动。

菌落平滑，呈粘糊状，产生黑褐色素，因色素可渗入培养基中而使之变黑。

分布在一般土壤中，在盐渍化土壤中亦能发育。

5. 喜盐固氮菌：

初呈短杆状,后为卵圆形或球形,成对,胞内无颗粒体,后期培养中由少数细菌结成小胞囊状。周身鞭毛,能运动。

菌落粘韧,板结如粘膏,不易挑取,褐色或黑色,色素不渗入培养基中。

分布在盐渍土壤中。

6. 印度固氮菌:

卵圆形或者长椭圆形,细小,细胞两端有反光性强的颗粒,不联结成胞囊状。周身鞭毛,运动性大。

菌落凸起,粘韧,不产生色素,陈旧培养中略呈褐色。

分布在酸性水稻土中。

II. 根瘤菌:

这种细菌在豆科植物根上形成根瘤,能固定空气中的氮素,以丰富作物的氮素营养。

根瘤菌有复杂的生活史,但只有在根瘤内才能固定氮素,和植物发生共生的关系。根瘤菌在土壤中进行腐生的生活,培养时必需供给全部营养物质。碳素营养以有机碳化物为宜,氮素营养以可溶性有机氮化物较好,铵盐和硝酸盐也能利用。矿物元素中的磷、钾、硫、钙、镁等都需要。微量的铁与硼有促进根瘤菌生长的作用。生长因素对根瘤菌发育的影响很大,培养基中为含有维生素乙族,特别是生长素(Biotin)可以提高繁殖量数倍至数十倍,这类生长因素在酵母菌中含量很多,因此常用酵母菌浸液加在培养基中。

根瘤菌为好气性细菌,适宜于 25°C 左右的温度中生长,土壤中酸碱度反应在 6.5—7.5 之间时也为良好发育条件,但因菌种不同,对酸碱度的适应力也各有不同。

根瘤菌对豆科作物具有严格的选择性，例如蚕豆根瘤菌只能在蚕豆或豌豆等的根上形成根瘤，而不能与花生或大豆进行共生。根瘤菌的固氮作用也与植物的发育条件有关，当植物开花时，根瘤菌的固氮作用最强。

根瘤菌是一种多形态的细菌，在不同的环境条件下，形态的变化很大。在根瘤中生活的根瘤菌有两种主要的形态：①在幼根瘤中为极小能运动的短杆菌，②随着根瘤的发育，菌体变大，便失去鞭毛和形成分叉且具有环节状。根瘤在土壤中的形态多种多样，有环节状的，有球形的，还有带鞭毛的球菌和杆菌。在培养基上则主要是具有鞭毛的杆菌。根瘤的革兰氏染色反应为负反应。

不同种族的根瘤菌在其相应的豆科作物上所形成的根瘤，其形态也是不一致的，此外，主根上带微红色的根瘤，常常是有效性强的根菌。

不同种族的根瘤菌在形态、培养特性和其他性状上有如下的一些区别：

III. 硅酸盐细菌：

这种细菌可以分解磷灰石中的磷和正长石中的钾以供植物吸收利用，还能固定空气中的氮素，因而可以促进植物的氮磷钾营养。

硅酸盐细菌为好气性细菌，适宜生长温度是 $28-30^{\circ}\text{C}$ ，生长环境的酸碱度反应以中性或微碱性为宜。能利用淀粉作为碳源，不能在有机的含氮化合物中生长。

硅酸盐细菌在无氮培养基上能形成粘状突起而透明的菌落，菌落有明显的弹性和坚固性，由于生长迅速，很快扩延及

根瘤菌 名称	与根瘤菌 共生的豆 科植物	形 态 特 征		培 养 及 生 理 特 性	
		純培养	根瘤中的 假菌体	酵母浸汁甘露醇 琼脂上的生長	石蕊乳液 的变化
豌豆根瘤菌	豌豆屬 山豆屬 蚕豆屬 (蚕豆、君子 小巢豆菜)	杆状, 鞭 周身毛	多种形态, 形 如 α , β , γ 星形等, 具 多种液胞	生長迅速, 菌苔 扩散, 隆起發光, 半透明, 粘質或 糊状, 胶質分泌 多	碱 性, 有乳清 層
三叶草根瘤菌	三叶草屬 (紅三叶草、 白三叶草)	杆状, 鞭 周身毛	膨大, 作梨 形, 多液胞	生長迅速, 菌苔 扩散, 隆起初期 透明, 漸漸成白 色, 粘質状, 粘液 分泌甚多	碱 性, 有乳清 層
菜豆根瘤菌	菜豆屬 (四季豆)	杆状, 鞭 周身毛	根棒状, 有 分枝, 多液 胞	生長迅速, 余同 豌豆根瘤菌	碱 性, 有乳清 層
苜蓿根瘤菌	苜蓿屬 草木樨屬	杆状, 鞭 周身毛	根棒状, 有 分叉	生長迅速, 菌苔 較厚, 發光, 白堊 色, 粘質状, 胶質 分泌多, 帶有丁 酸气味	酸 性, 有乳清 層
大豆根瘤菌	大豆屬	杆状, 單 端生毛	杆状, 多液 胞	生長較慢, 菌苔 量少, 白色或白 堊色, 胶質分泌 物較少	碱 性, 无乳清 層
羽扇豆根瘤菌	羽扇豆屬 烏足豆屬	杆状, 草 端生毛	杆状, 多液 胞	生長甚慢, 菌苔 粘性較少	碱 性, 无乳清 層
紫云英根瘤菌	紫云英屬	短杆状, 單 端生毛	細棒状, 有 分叉, 少液 胞	生長較迟, 菌苔 粘糊, 白堊色	碱 性, 有乳清 層
豇豆根瘤菌	豇豆屬、花 生、胡枝子 屬、扁豆屬、 刀豆屬、綠 豆屬等	杆状, 單 端生毛	杆状 或 棒 状, 偶有液 胞, 有分叉	生長慢, 菌苔粘 性較少	碱 性, 无乳清 層

整个表面，甚至管壁。

硅酸盐細菌为两端鈍圓，体积很大的杆菌，革兰氏染色負反应。具荚膜，培养一晝夜的菌体常2—4个集于一粘性荚膜中，两三天則每个細菌均具一明显的荚膜，但在陈旧的培养中(十天)最常見到菌体消失了的空荚膜。硅酸盐細菌在淀粉培养中或30—32°C溫度条件下能大量形成芽胞，芽胞位居菌体中央(稍偏一点)，游离后呈橢圓形，在适当的条件下，芽胞又可以进行極端發芽。

IV. 磷細菌:

这种細菌是一种肥大的杆菌，菌体内含大量的顆粒状的內含物，培养初期菌体單分布，一两天后多成对联結起来，在較老的培养基中則形成鏈状，革兰氏染色正反应。能产生芽胞。

在琼脂平面上的菌落整边，顏色由灰变褐。在馬鈴薯上培养时，菌落的顏色亦由灰色变成褐色。

磷酸盐細菌对卵磷脂和核酸的分解最强。可以从核酸中分离出86%的磷。

二、菌肥生产的各个工序:

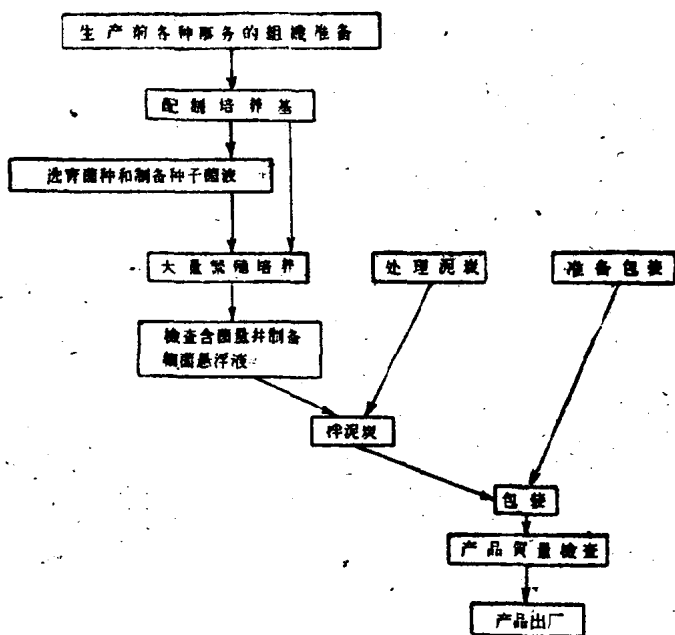
I. 細菌肥料生产程序圖示:

II. 生产前各項事务的組織准备:

根据生产上的需要和条件的最大可能来确定建厂規模，并筹划發展的步驟。生产前的准备工作主要分为如下三个方面:

1. 生产所需的物質准备:

(1) 用具: 如試管，培养皿，培养瓶(如克氏或罗氏瓶)，



培养罐，接种环等。

(2) 器材：如天秤，量器，抽气机或打气机，灭菌器等。

(3) 无菌工作条件：如无菌工作室或无菌接种箱，工作服等。

(4) 檢驗和培养用的藥品及其他原料。

(5) 泥炭及包装原料的供应和加工。

(6) 保温培养条件。

2. 組織准备：

(一) 确定工序并制定規格标准。

(二) 制定工厂管理制度。

(三)考虑成本核算。

(四)产品与原料的供销联系。

3. 清洗用具：

培养細菌的用具一般主要是玻璃用具。玻璃用具不仅要求是中性和硬質，还要求清洗得干淨。以免雜質进入培养基中影响細菌的正常生長。

某些用具，除应用前进行清洗外，尚須作灭菌的处理，才能保証良好的工作效果。

清洗常用肥皂水和洗液 (Cleaning Solution)。肥皂水以市上的肥皂粉或肥皂所制成。洗液則由重鉻酸鉀、粗硫酸和水配制而成，其比例为重鉻酸鉀 100 克、粗硫酸 100 毫升、蒸餾水 1000 毫升，先以重鉻酸鉀 100 克置研鉢中加水磨細，并攪拌使其全部溶解，然后緩緩的加入硫酸即成。洗液初配时为紅色，久用失效时則变为綠色。

用于精細分析实验的洗液，其成分的比例多为重鉻酸鉀 75 克，加入 140 毫升的水，然后再加硫酸 200 毫升配成。

新出厂的玻璃用具，一般置于溫热水的肥皂水中刷洗后，以清水淋洗数次便可应用。如为多次使用的玻璃用具，除經肥皂水刷洗之外，尚須用洗液浸泡数小时，随后再以清水冲洗和以蒸餾水冲洗 2—3 次。

盛有細菌培养物的玻璃用具，在清洗之前宜进行灭菌处理。并趁热倒去其中的剩余培养物。

III. 选择配制培养基：

培养基是人工制备的細菌生活环境，任何培养基的好坏决定于給予的条件是否适合于該細菌的要求。各种細菌培养

基的配方很多,但在生产中决擇所拟采用的培养基时,除須考虑是否适合細菌的生活要求之外,尙应考虑原料供应和成本問題,比如蚕豆根瘤菌的培养基有这样三个例子:

(甲)葡萄糖(甘油)	10 克
硫酸鎂	0.2克
碳酸鈣	3 克
磷酸氫二鉀	0.5 克
氯化鈉	0.1 克
干酵母	1—2 克
洋 菜	15—18 克 (液体培养不要洋菜)
水	1000 毫升

(乙)甘油	10 克
磷酸二氫鉀	0.2 克
磷酸氫二鉀	0.8 克
硫酸鈣	0.1 克
葡萄糖酸鈣	1.0 克
硫酸鎂	0.2 克
2% 酵母浸液	100 毫升
洋 菜	15 克 (液体培养可免去)
水	900 毫升

(丙)称取蚕豆 50 克,水一升,放在高压蒸汽灭菌器內經 10 磅蒸汽压水处理 20 分鐘(豆子并未煮熟),得到的豆汁用棉花或滤紙过滤,每升豆汁中加白糖 10 克,并調整酸碱度到中性,然后装瓶,用 15 磅的蒸汽压灭菌水处理 30 分鐘即可应用。由上述三例看来,究竟選擇那一个可以根据具体情况来

确定。有些培养基是根据不同的目的要求配制成的，选择时也应考虑到这一点。

为了使细菌适应于大生产的条件，以争取扩大生产的时间，种子菌液应与大量培养的培养基的成分一致。

培养基配制之后，还需进行酸碱度的调整和灭菌处理，各种细菌对酸碱度的要求有一定的范围，必须满足，而灭菌处理则是为了保证纯培养。

1. 培养基的配制举例：

(1) 根瘤菌：

甘油(或与白糖各半)	10 克
磷酸氢二钾	0.6 克
硫酸镁	0.2 克
碳酸钙 ^①	3 克
氯化钠	0.1 克
干酵母	1—2 克
洋菜(液体培养可免去)	15—20 克
水	1000 毫升

(2) 固氮菌：

白糖	15 克
磷酸氢二钾	0.2 克
硫酸镁	0.2 克
氯化钠	0.2 克
硫酸钙 ^①	0.1 克
碳酸钙 ^①	5.0 克

① 硫酸钙和碳酸钙可由葡萄糖酸钙代替，其用量以 0.3%。

洋菜	15—18 克
水	1000 毫升

(3) 硅酸盐菌:

白糖	10 克
磷酸氢二钠	0.2 克
白陶土 ^①	1.0 克
硫酸镁	0.5 克
三氯化铁(1%溶液)	一滴
水	1000 毫升

(4) 磷细菌:

馬鈴薯(去皮)	100—200 克
碳酸鈣	5 克
洋菜	15—18 克
水	1000 毫升

2. 培养基的处理:

(甲) 調整酸碱度

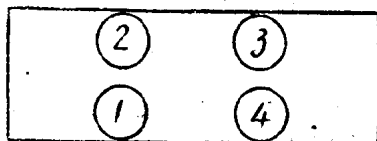
用比色的方法, 将培养基按下列操作和比例加于試管內来进行比较、測定和調整。

(1) 圖中第一管: 培养基 2 毫升, 加蒸餾水 8 毫升

第二管:

标准比色管

第三管: 內装蒸餾水



① 白陶土可用玻璃、土壤提取物代。

第四管：培养基 2 毫升，加蒸馏水 8 毫升，加指示剂(酚紅)0.25—0.5 毫升

(2) 标准比色管有标记，如需要 pH 7.6 时，即取用 7.6 的标准比色管。

(3) 比较试管的颜色，如果较标准比色管为红时，表示太碱，须加酸(HCl)矫正；如较比色管黄时，则表示太酸，须加碱(NaOH)矫正。

(4) 矫正时应用 1 毫升刻度吸管缓缓滴加酸或碱于第四管内，并混匀，直至两管颜色相等为止。

(5) 检视所用去的酸或碱的数量，并且计算培养基需加多少始符合要求的 pH 值。

设若 2 毫升的培养基内所用 $1/20$ N NaOH 的量为 0.5 升毫，则所配一升的培基中应加 $2:0.5 = 1000:x = 250$ 毫升，即加 Na-OH 250 毫升才能使 1000 毫升的培养基成 pH 7.6，如以 1 N Na-OH 代 $1/20$ N NaOH 则需加：

$$\frac{250}{20} = 12.5 \text{ 毫升的 NaOH}$$

(乙)装瓶或试管

将调整好 pH 值的培养基分装于盛器内，并加上棉塞和纸套以防灭菌后遭到沾污。

(丙)灭菌

培养基的灭菌可应用高压蒸汽、常压加热和过滤除菌等方法来进行。兹将高压蒸汽灭菌应用方法简述如下：

(1) 10 磅，半点钟；或 15 磅，20 分钟。

(2) 灭菌器的使用法:

- a. 器內加适量水,生火(煤油須經過濾),裝置灭菌物。
- b. 加蓋。
- c. 放冷空气(至出現大量蒸汽为止)。
- d. 关气伐。
- e. 保証所需压力及時間(由火及放气伐来控制)。
- f. 至所需压力及時間后,熄火,緩冷。
- g. 压力表指針回至 0 磅后,緩慢放汽。
- h. 放汽畢,隨即啓蓋。
- i. 取出灭菌物,或制成斜面。

(3) 在密閉情况下,溫度与汽压成一定的关系,但灭菌时所需的有效溫度和压力須視物品的性質、排列及包裝方式、空气流通等情况而定,宜加注意。

汽压与溫度的关系

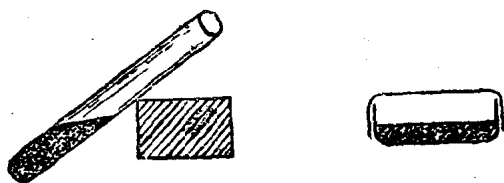
汽压磅数	溫 度(°C)	汽压磅数	溫 度(°C)
1	102.3	13	119.1
5	108.8	14	120.2
8	113.0	15	121.2
10	115.0	20	126.2
12	118.0	30	134.6

(丁)制成斜面或平板

IV. 选育菌种和制备种子菌液

(一) 选育菌种:

微生物在自然界的分布是極其广泛而又錯綜复杂的,要



对某一种微生物进行研究或应用，先决问题是如何获得其纯系培养。在菌肥的生产中，单纯获得某细菌的纯培养是不够的，还要经选育优良的菌种，即选育适应于当地土壤气候与活性很强的菌种。

微生物的纯系分离培养的方法很多，但其基本原则为从复杂类群样品中，经过稀释培养，或利用其特性进行选择培养，或以复壮的方法来得到所要求的菌种。

下面就菌肥生产中的两种菌种的分离培育法来举例说明。

1. 根瘤菌的分离和培育：

(甲) 分离：

(1) 稀释培养分离：

选瘤：从丰产健壮与正在开花或孕蕾的豆科植物的根部，选择在主根上发育良好、色微红而大型的有效根瘤。

洗瘤：以水清洗根瘤外部的泥土，并用犀利刀片切下所需根瘤，但切瘤时宜稍带根组织。

灭菌处理：将已清洗和切下的根瘤，用无菌操作手续放于 95% 的酒精中处理 2—5 分钟，以除去根上的有机质。然后在 0.2% 的升汞中浸泡 10—15 分钟，随即用灭菌水冲洗 3—4 次以除去剩余的升汞。

稀釋培养: 取灭菌的培养皿三个, 每一个培养皿内都以无菌手續加入一滴无菌水, 随后用灭菌鑷子夹取已灭菌的根瘤置于第一个培皿的水中, 并压碎攪和使成細菌悬浮液。然后用已灭菌的接种环取一环菌液到第二皿的水中, 使混合后, 再以灭菌接种环自第二皿悬液中取一环菌液至第三皿水中。最后取溶化并冷至 $45-50^{\circ}\text{C}$ 的別列索娃深層培养基三支, 分别以无菌手續一一倒入三皿中, 且充分搖匀, 使凝固后, 即将皿倒置于 25°C 的溫箱中培养。

移植与檢查: 菌長出后, 用无菌接种环鉤取不染色的單菌落移植于培养斜面基上, 进行培养, 便可得到純种。

純种可借显微镜观察和其他特性的測定来确定。

菌种培育: 菌种經分离获得之后, 应进行豆科作物的栽培試驗来选择优良品种。采用的菌种經較長时期的栽培后, 为防止菌种的馴化, 亦应讓菌种通过豆科作物来复壯。

如采集到良好的根瘤而无条件进行分离时, 可将根瘤洗淨, 阴干并詳細記載, 保存日后使用。但分离前, 須先經灭菌水泡浸半至两小时, 使其充分吸水后, 再按前述方法逐一进一步分离。

(2) **划綫分离:** 用无菌技术取已稀釋的根瘤菌悬液一环, 在別列索娃培养基平板上进行連續划綫, 經划綫再度稀釋后, 倒置 25°C 溫箱中培养, 便可获得單独菌落。

鉤取單独菌落进行移植便得純种。

2. 固氮菌的分离培养:

(1) 維諾格拉斯基氏泥盘分离法:

从高产的棉、麦或其他作物的地上取表土, 秤約 50 克, 加