

根瘤菌剂的培养与应用

黄 隆 广

(江苏省农业科学院)

根瘤菌和豆科植物共生固氮,在农业实践中一直当作用地养地和提高产量的一项措施。据估计,它们每年可以固氮达 90×10^6 吨^[1]。据苏联 1978 年报告,在应用根瘤菌作为种子接种剂方面,大豆根瘤菌的应用占全苏大豆总面积 37%,豌豆占 24%,苕子占 9%^[2]。澳大利亚和新西兰的应用面积亦很大,并把根瘤菌作为常规措施应用,每年都有不少研究报告,澳大利亚 1978—1979 年就超过 105 篇^[3],美国还有几家根瘤菌剂公司。可见,根瘤菌的应用是很普遍的。但是效果常受到菌剂质量的影响。我国曾经大面积进行使用,声势浩大,但是在一定程度上菌剂质量不稳定,缺少系统检查,以致在持续发展上受到障碍^[4]。因此菌剂生产是重要一环,本文介绍国外对这方面研究的进展情况。

一、根瘤菌剂的培养

根瘤菌生产不像其它微生物那样,只是要它的生命代谢产物,或蛋白质,生产根瘤菌不仅要求有大量含菌数,而且必须对豆科植物接种能使植物结瘤,并进行固氮。因此,在生产过程中绝不能使其原有性能遭到改变。

培养基 根瘤菌虽是异养性微生物,通常要求营养不是太高,植物浸提液亦可作为营养成分。现在,工厂生产都用酵母浸提液培养基,大多数根瘤菌容易利用单糖和双糖作碳源,而某些慢生型根瘤菌,像羽扇豆大豆根瘤菌,比较喜欢五碳糖(阿拉伯糖),蔗糖或甘露醇,甘油。碳源的有效利用决定着通气、灭菌方法,以及碳源的特性,例如,半乳糖或阿拉伯糖的过滤灭菌和加热灭菌就有差别。

培养基加入放线菌酮(Actidione) 0.002% 可以抑制真菌的污染,加入刚果红 0.025 克/立升就很容易区别绝大多数污染的微生物。浓度加到 0.1 克/立升,可以选择抗革兰氏阳性的细菌;加入溴百里酚兰(5 ml 0.5% 酒精溶液),可以区别产酸和不产酸的根瘤菌;加入青霉素 100 单位/毫升,可以减少污染,并不影响其有效性^[6]。

缩短培养时间可以减少污染,应加速根瘤菌的生长繁殖。适当增加一些酵母浸提液是有好处的,但浓度过量亦会抑制生长。

通气 根瘤菌是好气性微生物,培养条件必须通气,发酵罐生产必须有通入灭菌空气和搅拌装置,这样才能达到迅速生长繁殖。氧分压在 0.15 atm 时对根瘤菌呼吸是适宜的,0.1 atm 时,亦生长良好。国外的经验,20 升培养基每分钟要通入 1 升空气。从

文献看,空气流量是 0.5—120 升/升培养基·时,这个范围都可以。亦有 用 5 升空气/升·时是较适合的。如生产三叶草根瘤菌 TA1,根瘤菌数从 0.1×10^9 繁殖到 3.5×10^9 /升,1 升培养基 1 小时要通入空气 1—5 升^{[11][6]}。

pH 问题 根瘤菌适宜的 pH 是 7.0—7.2。当利用甘露醇后,快生型根瘤菌会产酸,在 48 小时 100 毫升培养基酸度可以达到 0.1N 2—3 毫升,在微弱缓冲液的培养中,苜蓿、三叶草、豌豆和菜豆的根瘤菌 96 小时培养,并不引起 pH 多大变化,144 小时苜蓿根瘤菌 pH 才从 6.8 降低到 6.4,其它根瘤菌并不降低 pH。通常产酸表明遭受杂菌的污染。

温度 根瘤菌培养在 26°—28℃ 是适合的。Burton 培养苜蓿根瘤菌是用 30—32℃,因为它们较喜欢稍高的温度。

减少杂菌污染加速根瘤菌生长,接种量应加大,一般是 1%,使每毫升开始培养的菌数达到 10^6 — 10^7 个细胞。快生型 36—72 小时繁殖量可以达到最大,慢生型则要 108—192 小时,前者繁殖一代是 4 小时,后者是 6—12 小时。Skinner 等在生产三叶草根瘤菌 TA1 的观察:生长 24 小时后总数达到 5.2×10^9 /ml,有 65% 细胞能存活,在 48 小时总数增加到 140×10^9 /ml,仅 3% 存活。即 3.4×10^9 对 4.2×10^9 /ml 酵母浸出液的来源和浓度明显影响到总数与存活的比率。

接种剂类型 培养好的菌液欧洲直接进行拌种(我国常用琼脂菌剂加水稀释使用),但必须立即使用,不然死亡率很高,2 天仅有 2% 能在种子表面存活^[9]。优点是简单方便,缺点是不耐储藏,运输困难,如一时不能及时应用,菌龄衰老,不仅数量减少,而大大影响接种效果。冷冻干燥菌粉在一些国家亦有应用,但拌种后死亡率相当高(Vincent 1965)。通常认为采用吸附剂是一较好的方法,7 天仍有 30—70% 存活^[7],吸附剂种类很多,有用木炭、褐煤粉、蔗糖、膨润土、纤维粉、甘蔗渣、椰皮纤维粉、稻壳、藁秆粉加木炭、土壤堆肥混合物、麦秆粉、滑石粉、泥炭等等。但是,泥炭和含有机质量高的土壤是用得比较广泛的。

总之,吸附剂的材料应具备以下条件:(1)对根瘤菌无毒,(2)具有强的吸附性能,(3)易于粉碎和灭菌,(4)对种子具有良好的粘着力,(5)价廉。

一个好的吸附剂经根瘤菌吸附拌合后,如果在 3—5 星期中根瘤菌数量增加 10 倍左右,即根瘤菌可以在吸附剂上生长繁殖。

这里介绍一些例子,如荷兰的生产用 42% 重壤土,33% 泥炭,20% 苜蓿粉,5% CaCO_3 ,根瘤菌可以生长繁殖到 10^{10} 个细胞/克。

Corby (1975)^[8]用玉米芯 1000 公斤,石灰石 27 公斤,过磷酸钙 9 公斤,硝酸铵 12 公斤,同样可以得到好的结果。

澳大利亚、美国都采用泥炭。泥炭在烘干的过程中应注意温度不宜超过 100℃,否则泥炭降解时对根瘤菌会产生毒性物质,但 Burton 的方法通过 650℃ 热风干燥,快速冷却,则不会形成毒素。

泥炭太酸应用 CaCO_3 中和至 pH6.5—7.0,用 NH_4OH 、 Na_2CO_3 、 K_2CO_3 对根瘤菌有害。

泥炭粉碎不宜太粗太大,一般应在 10—40 微米左右,亦有通过 200 筛孔的,印度是通过 60 筛孔^[7]。

泥炭应消毒灭菌,不然会影响根瘤菌的进一步生长繁殖。

国外常用热风干燥灭菌、蒸汽灭菌、 γ 射线和化学灭菌。美国用热风干燥 650℃ 灭菌,泥炭含水量很快从 60% 降到 8—9%,趁热锤研粉碎装袋备用,可以达到满意效果。蒸汽灭菌在 121℃ 4 小时,泥炭装瓶 2/3 可以进行 3 小时。荷兰、捷克斯洛伐克都是采用瓶装的灭菌方法。化学上的灭菌用氧化乙烯 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ 气体消毒,第一要穿透彻底。第二处理后将氧化乙烯排尽,但效果上往往出现差异,很难达到预期要求。不是在泥炭中穿透不彻底就是排毒未尽,因此有许多困难,处理后杂菌量有的达到 10^9 个细胞/1 克泥炭。在澳大利亚常用 γ 射线灭菌,将泥炭装在 0.05mm 规格的低密度聚乙烯袋内, γ 照射量是 5×10^6 拉德(测量电离辐射吸收量单位)灭菌亦很不彻底,甚至 10×10^6 拉德也不能达到要求,杂菌污染可达到 10^7 /克泥炭。他们认为杂菌量虽然存在,但不会造成严重影响。 γ 射线应用方便,是一个可选择的方法,但成本较高。

灭菌好的泥炭用培养的菌液(每毫升含菌量不低于 1×10^9 个细胞)进行接种,混合均匀,使湿度保持在 40—60%。即 pH 在 4.15—2.69,置 26℃ 下进一步培养,在阴凉干燥地方保存,如果包装良好,菌剂水份没有什么损失,26 个星期菌量并不减少。

二、菌剂质量检查和标准

菌剂质量是决定使用效果的关键。从外形看一般不易区分质量的好坏(除非霉变产生恶臭变酸,或失水严重干裂),只有通过分析测定的检查手段才能确定。许多国家对此都没有专门单位进行检查把关,如乌拉圭、捷克斯洛伐克、苏联、荷兰、罗德西亚、澳大利亚……等。如澳大利亚有一中心机构,全称 Australian Inoculant Research and Control Service,简称 AIRCS,由政府财政支持,对菌剂检查建立一定法制。主要负责选育菌种和试验菌种的有效性,供应菌种,检查在拌入泥炭前的含菌量,各地产品含菌量的测定。要求含菌量每克不应低于一亿个细胞。拌种后每粒种子至少要有 1000 个根瘤菌。这种检查工作至 1977 年止已进行 19 年。美国是各工厂有自己的检测系统,标出自己的产品规格。其常规检查是在播种前 2—3 星期进行预接种,接着在无根瘤菌的土壤中种植,观察接种效果,从结瘤状况反映质量的好坏。捷克斯洛伐克的标准是 1 克土壤泥炭混合的菌剂应含有 3 亿个根瘤菌。荷兰是 $4000—25000 \times 10^6$ /1 克壤土-泥炭-苜蓿混合物吸附剂,新西兰是 100×10^6 /克吸附剂,苏联是 $50—100 \times 10^6$ /克吸附剂,美国接近 300×10^6 /克吸附剂。

三、根瘤菌的应用技术

根瘤菌的应用虽然可以直接施于土壤,在条播机和种子同时一起下田,而习惯上是拌种。不管是拌种或直接下田,它们在干燥条件下都会迅速死亡,所以,在某些情况还

要采用特殊的接种措施。例如地三叶、白三叶和一些苜蓿种子的外衣含有某些抗菌物质，对根瘤菌的存活造成不良影响。还有拌有杀菌剂的种子都是同样有害，土壤的酸度、盐碱度、以及温度、湿度等等都影响接种效果。下面是一些特殊的接种技术。

(1) **石灰包衣**：当豆科植物种子拌有酸性肥料，以及土壤pH较低时，石灰包衣主要对根瘤菌起到保护作用。包衣是在滚筒内制造，先用纤维素胶和植物树脂或阿拉伯胶(50公斤种子用5升胶)使种子弄湿，接着拌上泥炭菌剂，最后裹上石灰即成。

值得注意的是，羽扇豆、三叶草和某些热带豆科植物不能耐石灰的高pH。用磷灰石粉或其它一些中性粉是较适合的。其次，这些阿拉伯胶都大大增加成本，国内常用的是面粉糊，效果亦很好。

(2) **接种剂包衣**：当土壤呈中性或微酸性，并存着较多的无效的土著根瘤菌时，要战胜这些土著根瘤菌可采用接种剂包衣的办法。首先在种子用阿拉伯胶(1升/15公斤个种子)，然后用根瘤菌接种剂拌合。此种方法对土著根瘤菌具有高的竞争能力，同时在播种后对土壤干旱和高温可耐达2—3星期。

(3) **其它包衣**：近来有各种包衣种子出售，如采用粘土、炭粉、石膏、 CaCO_3 、微量元素、杀虫剂等，其中包含有泥炭根瘤菌接种剂，牌号名目繁多，如Prillcote、Calpril、Rhizo—kote、Nu—kote、Goldcoat等。这些都是为了创造更好的有利条件，使植物更好生长，能结成更多的根瘤。目前，尚缺少材料证明，这些包衣根瘤菌存活时间比石灰包衣长多少，好处有多大。

此外，还用液体菌液浇灌和制成固体颗粒菌剂，施入种子附近，利用靠近种子的有利位置便于侵染结瘤^[6]。

应该提出，根瘤菌接种实际上是细菌生态学的一种具体应用。根瘤菌占土壤中微生物总数是极少极少的。土壤中就以细菌而言，我们对溧阳板浆白土测定，每克干土计2,247,000个，而根瘤菌(以苕子根瘤菌计算)每克干土650个；根际上、以扬州长江冲积土豌豆为例，一克根际上含菌10,719,000个，豌豆根瘤菌730个，同样是有限的。通过接种可以提高它们的数量，增强其竞争性，特别是拌种，每粒种子保证1000个，相对集中在种子附近，给侵染结瘤创造了有利条件，与土著根瘤菌竞争是一等的战略位置。

根瘤菌接种在土壤中的死亡率与植株幼苗发芽时间快慢对结瘤有关。可以减少接种剂的死亡率，或增加接种量，以及提高种子发芽速度。即缩短发芽时间，就可以在植物根际增加根瘤菌数。

由上可见，保证土壤中有较高的根瘤菌，菌剂质量无疑是重要的，生产过程实确是一个关键环节。

参 考 文 献

1. Burton, J.C.: Rhizobium species. Microbial Technology, p29-55. Academic press, Inc 1979.
2. Dorosinskii, L.M.: Izvestiya Akademii Nauk. SSSR. p607-612, 1978.
3. Annotated Bibliography of Australian work on Rhizobium. published during 1978-1979.
4. 黄隆广: 论我国细菌肥料现状及提高有效性的途径, 土壤通报 1960.6.
5. Date, R.A.: Preparation of legume seed inoculants. A treatise on dinitrogen fixation section ID. p243-276.
6. Brockwell, J.: Application of legume seed inoculants. A treatise on dinitrogen fixation section. IV. p277-309.
7. Strijdom, B.W.et al.: Carriers of rhizobia and the effects of prior threatment on the survival of rhizobia. Symbiotic nitrogen fixation in plants. International Biological Programme 7. p151-168.
8. Corby, H.D.L.: A method of making a pure-culture, peat-type, legume inoculant, using a substitute for peat. 同上 p169-173.
9. Burton, J.C.: Methods of inoculating seeds and their effect on survival of rhizobia. 同上 p175-189.

中美大豆科学讨论会第二次会议概况

中美大豆科学讨论会第二次会议, 于1983年7月28日至8月2日在吉林省长春市长白山宾馆举行(第一次在美国伊利诺斯州俄尔班那市的伊利诺斯州立大学内举行)。我国参加会议的代表, 包括黑龙江、吉林、辽宁、山东、江苏、山西、安徽、湖北、湖南等9个省(市)59人, 连同工作人员共约多100多人。向大会交付论文为60篇。其中在大会上宣读的为43篇。美国参加人数为27人, 宣读论文17篇。经中美双方商定, 会议日程为: 开头两天举行全体会议, 包括开幕式和大会宣读论文; 一天去公主岭参加吉林省农科院大豆研究所落成典礼, 并参观该所试验设备和试验田; 后两天半划分小组(即分遗传育种、栽培生理、病虫害害和加工利用四个组), 进行小组宣读论文和学术交流, 分专业深入讨论交流中美双方共同关心的科学技术问题。

这次会议开得较好, 开得很成功, 中美双方科学家一致表示满意。中美大豆科学讨论会第二次会议之前, 中方曾两次专门召开了筹备会议。吉林省政府和吉林省农科学院领导, 对这次会议非常重视, 省政府副秘书长为大会秘书长, 开亲自主持大会开幕式; 而保证会议自始至终顺利进行。

(常耀中)