

固氮菌的液體培養*

陳淑筠 高俊德

(華北農業科學研究所) (北京市第二地方工業局)

自從1901年 M. W. Beijerinck 發現了固氮菌以來,累積了大量研究資料。這種細菌屬於固氮菌科,它的標準屬種是 *Azotobacter chroococcum*, 體形大,具有固定空氣中氮素、很高的呼吸強度 ($Q_{O_2} = 2,000-4,000$) 和產生維生素乙等特異的生理習性。但因增產效果不很穩定且數量較小,很多國家還未用它作為細菌肥料或推廣應用。蘇聯從1926年開始廣泛試用於農業生產上,並且從實踐中肯定了它的效果而推廣應用。我國近年來也已注意到此項工作,例如中國科學院林業土壤研究所、農業部華北農業科學研究所和其他農業試驗研究機關及農業院校都進行了固氮菌的分離、培養和接種試驗。結果證明在某些情況下,固氮菌可以促進農作物提早成熟,增加產量。1956年北京市第二地方工業局和華北農業科學研究所密切合作,試製了固氮菌劑,在華北和其他地區重點試用,得有良好結果。

固氮菌劑的生產和使用簡便,價格較低(每畝不過五分至一角錢),是增產措施之一,因而,已有幾個省分利用普通的扁平固體培養法製造固氮菌劑。為了進一步保證菌劑的質量,改進製造方法,降低成本,有必要採用工業化的液體深層培養法。這種方法主要是把無菌空氣壓入培養液中,使固氮菌得到良好的增殖,然後與烘乾磨細調正為中性的草炭混合製成菌劑。

近十餘年來,深層培養的技術有着很大的進展,利用發酵罐培養大量固氮菌的方法,在很多國家已有相當成熟的經驗,而在國內也已有不少這方面的報道。本文僅就我國應用的一些固氮菌,進行深層培養的基本試驗,結果分述於後。

(一) 固氮菌液體深層培養用菌種的選擇

1. 菌株來源及菌號

本試驗所用的菌種除 8017、8018 兩菌為蘇聯的標準菌種外,全係華北農業科學研究所農化系細菌肥料組由國內各地土壤及作物根上分離的,經過純化成為純菌株(表1)。

1957年2月20日收到。

* 本文為北京市第二地方工業局化驗室與華北農業科學研究所合作結果之一。參加本工作者有:汪海珠同志、汪大明同志、吳心如同志、張濤同志、李集義同志等。

本試驗為梁化成先生及胡濟生先生指導。

2. 培養基 1 (其成分如下)

表 1

| 成分 | 量 | 菌 號 | 菌 株 來 源 |
|---|--------|------|----------------------|
| 蔗糖 | 15 克 | 8001 | 河北農田土壤, 略加磷, 固氮菌生長極佳 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0.2 克 | 8003 | 1953 年河北武安豐產棉田土壤 |
| K ₂ HPO ₄ | 0.2 克 | 8004 | 1954 年山西洪趙豐產麥田土壤 |
| NaCl | 0.2 克 | 8005 | 1954 年山西高產棉田土壤 |
| CaCl ₂ | 0.05 克 | 8006 | 山西洪趙豐產田麥根上分離 |
| 酵母汁(2%) | 100 毫升 | 8008 | 1955 年雲南草壩農場甘薯玉米地土壤 |
| 微量元素* | 2 滴 | 8009 | 華北農業科學研究所麥田土壤 |
| 蒸餾水 | 900 毫升 | 8012 | 河南豐產麥田土壤 |
| pH | 7.2 | 8013 | 山西長治掃帚草根系土壤 |
| * 微量元素液成分: | | 8014 | 1955 年山西解縣豐產棉田土壤 |
| H ₃ BO ₃ 5 克, Na ₂ MoO ₄ 5 克, | | 8015 | 華北農業科學研究所稻田土壤 |
| 蒸餾水 1,000 毫升。 | | 8017 | 蘇聯標準菌種 53 號 |
| 3. 方法 | | 8018 | 蘇聯標準菌種 K 號 |

係用振盪培養法。於 500 毫升三

角瓶中加入 50 毫升上述培養液, 高壓滅菌 (15 磅, 20 分鐘) 後, 分別接種各號細菌於其中, 接種菌量為 2×10^6 /毫升。放於振盪機上, 於 25—30°C 溫度下振盪培養。振盪機的振幅為 7.5 厘米, 次數為 90 次/分鐘。48 小時後, 於顯微鏡下用血球計計算菌數, 結果見表 2。

表 2 中說明了在同一條件下的液體培養中以 8001、8004、

8005、8012、8013、8017、8014 增菌較快, 每毫升菌數可達 $1,000 \times 10^6$ 以上。

(二) 培養基的成分對固氮菌發育的關係

1. 不同炭源對固氮菌發育的影響

所用菌株: 8001 號

培養基 2 (其成分如下)

| | |
|--------------------------------------|----------|
| 碳源 | 10 克 |
| K ₂ HPO ₄ | 0.5 克 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0.2 克 |
| NaCl | 0.2 克 |
| CaCl ₂ | 0.2 克 |
| FeCl ₃ (10%) | 1 滴 |
| 水(自來水) | 1,000 毫升 |

表 2

| 菌 號 | 菌數 ($\times 10^6$ /毫升) |
|------|-------------------------|
| 8001 | 1300 |
| 8003 | 900 |
| 8004 | 1500 |
| 8005 | 950 |
| 8006 | 600 |
| 8008 | 800 |
| 8009 | 500 |
| 8012 | 1100 |
| 8013 | 1000 |
| 8014 | 1300 |
| 8015 | 900 |
| 8017 | 1300 |
| 8018 | 900 |

試驗方法: 於 500 毫升三角瓶中, 加入 50 毫升碳源不同的培養液, 滅菌 (15 磅 30 分鐘) 後, 接種培養好的 8001 號菌液 5 毫升, 於 25°C 中靜置培養一星期 (每日用手搖兩次), 用稀釋法測菌數, 結果如表 3。

表 3 中表現了固氮菌在蔗糖及柿霜中菌數較多。蔗糖比較便宜, 適於大量生產中應用。

2. 培養基中添加其他物質對固氮菌發育的影響

有些文獻中記載，於培養土壤微生物時，添加少許土壤浸液，對土壤微生物有良好作用。又如文獻⁽⁴⁾稱：在固氮菌發育初期，加入少量氮素物質，對固氮菌有促進作用；又如加入含有生長素(bio-

tin)類物質對固氮菌的發育有利。我們選擇了幾種添加物質，分別加入於培養基(培養基 1)中，接種 8001 號菌，於 30°C 中靜置培養 100 小時，於顯微鏡下用血球計測菌數，結果如表 4。

表 4

| 添加物質及量(%) | 接種菌數(10 ⁶ /毫升) | 培養後菌數(10 ⁶ /毫升) | 比對照增加 |
|-----------|---------------------------|----------------------------|-------|
| 土 壤 0.2 | 3.75 | 264.0 | 7 倍 |
| 麥 麩 0.2 | 3.75 | 264.0 | 7 倍 |
| 酵 母 粉 0.2 | 3.75 | 330.0 | 8.8 倍 |
| 豆 芽 汁 0.2 | 3.75 | 147.0 | 4 倍 |
| 對 照 (不加) | 3.75 | 40.0 | — |

3. 液體培養基中酵母含量對固氮菌發育的關係*

由表 4 中可以看出，於液體培養基中加入酵母浸液時，對固氮菌的發育有良好效果。爲了明確用量，作了以下的試驗。試驗方法如 1，於不同酵母浸液添量中對查固氮菌繁殖情況，結果見表 5。

表 5

| 加入 2% 酵 母 水 | | 細 菌 數 × 10 ⁶ /毫升 | |
|-------------|----|-----------------------------|--------|
| 毫升/50 毫升 | % | 8001 號 | 8004 號 |
| 1 | 2 | 162 | 130 |
| 2 | 4 | 190 | 140 |
| 3 | 6 | 266 | 220 |
| 4 | 8 | 600 | — |
| 5 | 10 | 324 | 200 |
| CK | — | 125 | 120 |

從表 5 中可以知道培養固氮菌時，於培養液中加入 5—8% 的 20% 酵母浸液，對固氮菌較爲適宜。於培養中並觀察到固氮菌運動活潑，繁殖較快。

* 本試驗進行中，曾請教陳華葵及樊慶笙教授和胡濟生先生，據談少量酵母對固氮菌的固氮能力不會受到影響。

4. 培養液中含磷酸鹽濃度對固氮菌繁殖的關係

培養固氮菌常用的阿其畢 (Ashby) 培養基中, 含磷酸鹽的濃度是 0.2 克/升, 但在試驗中常常發現稍增加磷酸鹽濃度, 固氮菌發育較佳, 故考慮增加培養液中磷酸鹽含量。應用菌株為 8001 及 8013 兩種, 所用培養基及方法如二項振盪培養法。培養液中 K_2HPO_4 量分別為每升 0.1 克、0.2 克、0.4 克、0.6 克、0.8 克和 1 克者 6 種, 結果如表 6。

表 6

| 菌 號 菌數 $\times 10^6$ / 毫升 | K_2HPO_4 濃 度 | | | | | |
|------------------------------|----------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | 0.1 克/升 | 0.2 克/升 | 0.4 克/升 | 0.6 克/升 | 0.8 克/升 | 1.0 克/升 |
| 8001 | 100 | 1100 | 2000 | — | 2600 | — |
| 8001 | 100 | 1300 | 1600 | 2100 | 2300 | 1300 |
| 8013 | 100 | 1400 | 2400 | 1500 | — | — |
| 8013 | 100 | 1350 | 2200 | 1800 | 1500 | 1600 |

由試驗結果看出, 培養液中 K_2HPO_4 濃度的提高, 依菌種不同而異。

(三) 振盪(搖瓶)培養增菌試驗

1. 搖瓶中培養液量與增菌的關係

試驗方法及條件大體與二項同, 於 500 毫升三角瓶中分別加入 50、100、150 毫升培養液, 使用菌株為 8001 及 8013, 振盪培養 36 小時後, 於顯微鏡下用血球計測菌數, 結果見表 7。

根據表 7 的結果, 搖瓶中培養液量少時, 固氮菌的菌數增加較多, 即說明溶解的空氣量增多, 固氮菌繁殖也快^[1]。

2. 振盪培養試驗

根據以上的試驗, 初步瞭解固氮菌於液體培養時的基本要求。我們選用了以下組成的培養基, 試驗振盪培養下固氮菌的增殖情況。所用菌株為 8013。

培養基 3 (成分如下)

| | | | |
|----------------------|--------|----------------|-------------------|
| 蔗糖 | 15 克 | $FeCl_3$ (10%) | 1—2 滴 |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.2 克 | 酵母浸汁 (2%) | 80 毫升 |
| K_2HPO_4 | 0.8 克 | 微量元素 | 2 滴 (成分與培養基 1 者同) |
| $CaCl_2$ | 0.05 克 | 蒸餾水 | 920 毫升 |
| $NaCl$ | 0.2 克 | pH | 7.4 |

表 7

| 菌 號 | 培養基量(毫升) | 菌數 $\times 10^6$ / 毫升 |
|------|----------|-----------------------|
| 8001 | 50 | 1100 |
| 8001 | 100 | 1000 |
| 8001 | 150 | 700 |
| 8013 | 50 | 1200 |
| 8013 | 100 | 1000 |
| 8013 | 150 | 650 |

試驗於 500 毫升三角瓶中，裝培養液 100 毫升，滅菌（15 磅 30 分鐘）後接入固氮菌（ 2×10^6 — 3×10^6 /毫升），於 30°C 振盪培養 48 小時，振盪為 90 次/分鐘，振幅為 7 厘米。培養後於顯微鏡下用血球計測菌數，結果如表 8。

由表 8 的結果中看出：如果按照以上條件，振盪培養 48 小時，每毫升菌數可達 $2,000 \times 10^6$ 以上。

（四）幾種金屬對固氮菌發育的影響

由於固氮菌大量增殖時，必須利用通氣培養。培養罐的製造用何種金屬為適宜，進行了初步瞭解，試驗方法係將銅、鐵、錫、鋁、鉛、不銹鋼等 6 種金屬小塊放於接種有固氮菌的阿其畢瓊脂培養基的表面，培養一星期後，觀察培養基中固氮菌有無抑制圈出現。

結果：錫與不銹鋼對固氮菌的發育無抑制現象，鉛的抑制作用最大，銅鋁次之，鐵又次之。根據觀察在鐵片周圍有一圈呈棕色為鐵銹，這圈上無固氮菌菌落，再向外一定距離有一圈固氮菌菌落生長甚佳。於不銹鋼片周圍的菌落也發育較快。這表示在培養基中加入微量的鐵對固氮菌有良好作用。

（五）10 升玻璃瓶中通氣培養試驗

於使用發酵罐大量繁殖固氮菌前，先於 10 升玻璃瓶中進行增菌試驗，所用裝置如下：

1. 空氣壓縮機：1 台（1 馬力）。
2. 空氣過濾裝置：空氣先通過砂棒過濾，然後通過棉濾管（砂棒預先用熱蒸氣滅菌，棉濾管用乾熱滅菌）後，再通入瓶中。
3. 空氣分散裝置：通氣管係用較粗的玻璃管，下端套以硬橡皮管，於下端約 7 厘米處鑽許多小孔，橡皮管下口塞緊，外面套小型細布口袋三層，上口束緊於橡皮管或玻璃管上。然後放於水中，壓入空氣，由布袋溢出分散很均勻的小氣泡，方可使用。（裝置如圖 1）

培養基成分同培養基 3。

原菌的準備：按上述振盪培養法先行使原菌馴化^[5]，適於振盪的環境，這樣培養 36—48 小時的年青純菌株，菌數每毫升達 2×10^9 左右，備為接種之用。

於 10 升玻璃細口瓶中，裝入培養基 6 升，並加入 5 毫升滅菌花生油作為止泡劑，

表 8

| 試驗次序 | 菌數 $\times 10^6$ /毫升 |
|------|----------------------|
| 1 | 2300 |
| 2 | 2400 |
| 3 | 2000 |
| 4 | 2100 |
| 5 | 2500 |
| 6 | 2600 |
| 7 | 2100 |

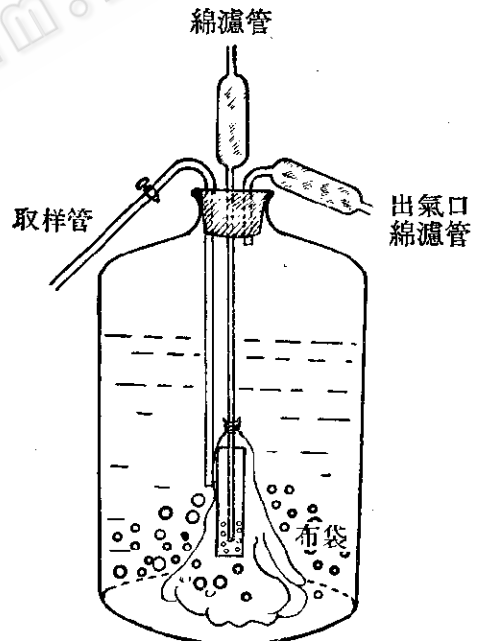


圖 1

120°C 2 小時滅菌後，接種準備好的原菌，培養溫度為 28—30°C，連續通氣，通氣量及條件見表 9。

表 9

| 菌 號 | 培 養 液 | 接 種 量 | 通 氣 量 | 菌數 × 10 ⁶ /毫升 | |
|------|-------|-------------------------|----------|--------------------------|--------|
| | | | | 24 小時 | 48 小時 |
| 8013 | 培養基 3 | 6 × 10 ⁶ /毫升 | 11 升/分鐘 | 900.0 | 1500.0 |
| 8013 | 培養基 3 | 6 × 10 ⁶ /毫升 | 6 升/分鐘 | 380.0 | 850.0 |
| 8013 | 培養基 3 | 6 × 10 ⁶ /毫升 | 2.5 升/分鐘 | 少 | 300.0 |

試驗說明了通氣量的大小和氣泡分佈的均勻與否，是左右菌數增加的主要因素，如條件適宜，通氣培養 48 小時，菌數每毫升可達 $1,500 \times 10^6$ 之多。

(六) 應用發酵罐進行通氣培養固氮菌的試驗

1. 發酵罐的製造

根據前人資料^[2]和我們自己試驗的結果，知道金屬錫對固氮菌的發育無不良影響，我們的發酵罐是銅質掛錫裏（圖 2）。

通氣裝置：通過砂棒濾過的無菌空氣，經過通氣管由近底部噴壺頭式的出氣口壓出。出口外面套一細布布袋，使壓出的空氣於培養液中形成很細小且分散均勻的小氣

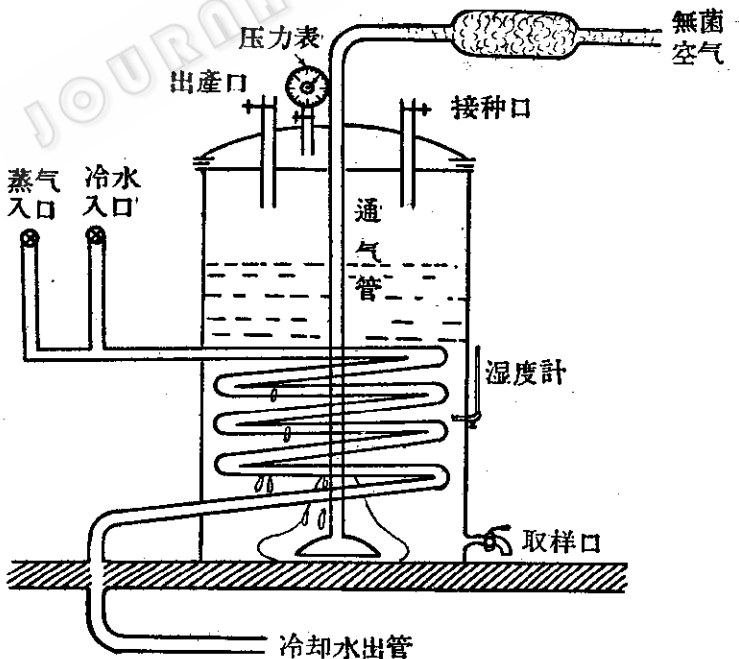


圖 2

泡，混佈於培養液中。

滅菌和保溫裝置：罐內裝有銅質表面掛錫裏的盤管，盤管一端接於冷水管和蒸氣管，使盤管可以通蒸氣也可以通入冷水，作為培養液滅菌及保溫之用。罐上並附有溫度計、壓力表、力料口、取樣口等（圖 2）。

2. 發酵罐培養的操作方法

培養基成分，為培養基 3，每次加入量為 40 升。滅菌係由盤管通入蒸氣加熱，使培養基於 110°C 2 小時滅菌，然後慢慢通入冷水冷卻達 $28-30^{\circ}\text{C}$ ，繼續保持此溫度（用盤管保溫）。

菌種係經過搖瓶培養接入大玻璃瓶中，通氣培養 36—48 小時的菌液，經顯微鏡檢查無雜菌，並經過測菌數認為可以作大罐原菌，由接種口用無菌方法壓入，接種量為使罐內每毫升達 5×10^7 。

於保溫 $28-30^{\circ}\text{C}$ 的情況下，連續通入空氣，培養 36 或 48 小時，取樣，測菌數不再顯著增加時，即可將菌液放出，備作細菌肥料用。

在大型發酵罐中培養 36—48 小時後，一般菌數可達 $10 \times 10^8-20 \times 10^8$ 。培養條件及於培養中菌數培加曲綫如圖 3：

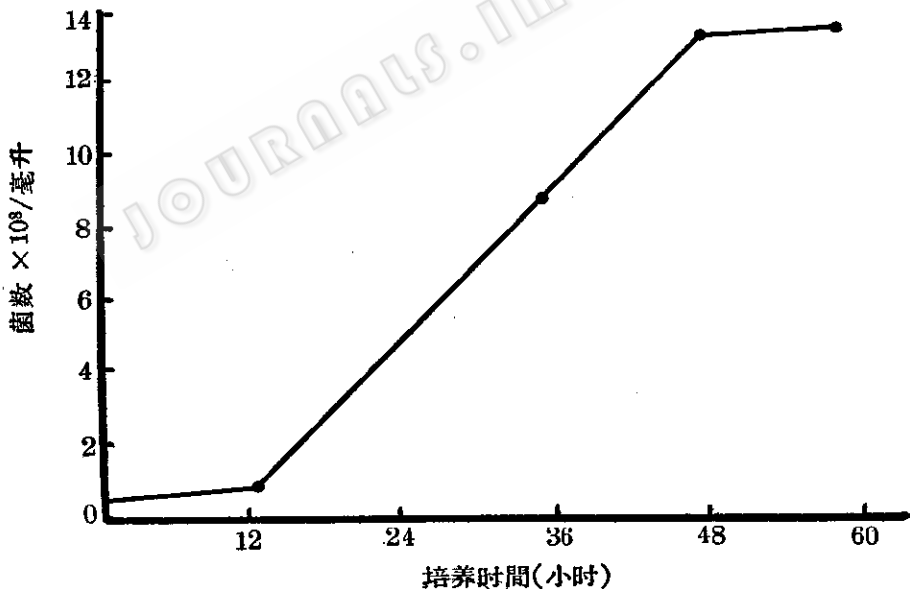


圖 3

結 論

1. 通過試驗，選出了七個固氮菌菌株較適於用液體培養，並對固氮菌液體培養的具體培養條件，有了進一步的瞭解。

2. 應用適宜的菌株，在適宜的培養條件及程序下，振盪培養時，每毫升中固氮菌數可達 20×10^8 ；於 10 升玻璃瓶中通氣培養時，每毫升中菌數可達 15×10^8 ；於大型金屬發酵罐中每毫升可達 $10-20 \times 10^8$ 。按目前固氮菌劑的質量要求，5—10 升這樣的菌液便可够一畝地用量，每罐 40 升則可作成 4,000—8,000 畝固氮菌劑。

3. 通過試驗，初步掌握了工業上製造固氮菌的培養增菌程序，為工業上大量製造細菌肥料的參考。

參 考 文 獻

- [1] Jensen. H. L.: The Azotobacteriaceae Bacteriological Review, **18**: 14 (1954).
- [2] Sylvan B. Lee & R. H. Burris: *Ind. Ing. Chem.*, **35** (3): 345 (1943).
- [3] Л. И. Рибантек: *Микробиология*, **25** (2): 231 (1956).
- [4] Fry, D. A.: The nitrogen metabolism of micro-organisms.
- [5] Alexander. M. & Wilson. P. W.: *Applied Microbiology* (1954).
- [6] Г. В. 羅帕金娜, Н. М. 拉查列娃: 全蘇農業微生物研究所著作集, 1953, 13 卷.

ON THE PRODUCTION OF SUBMERGED AZOTOBACTER CULTURE

CHEN, S. Y. and GAW, T. D.

Azotogen, a bacterial fertilizer tested for field use, during four years period in certain sections of this country has proved beneficial. In this paper, the method of submerged Azotobacter culture in larger scale was described. It involved the selection of appropriate Azotobacter strains, culture medium, rate of aeration as well as time of harvest. The following medium was found to be most suitable:

| | |
|---|-----------|
| Sucrose..... | 15 gm. |
| K ₂ HPO ₄ | 0.8 gm. |
| MgSO ₄ · 7H ₂ O | 0.2 gm. |
| NaCl | 0.2 gm. |
| CaCl | 0.05 gm. |
| MoO and B solution..... | 2 drops |
| Na ₂ MoO ₄ | 5 gm. |
| H ₂ BO ₃ | 5 gm. |
| Water (distilled) | 1,000 ml. |
| FeCl ₃ (10%)..... | 2 drops |
| Yeast extract (2%) | 80 ml. |
| Water | 920 ml. |

Agar slant culture was transferred to shake culture (at a rate of 90 cycle in a reciprocating shaker) and incubated in 30°C for 48 hours. It was acclimated for two successive transfers and inoculated to larger volume of fluid medium in ratio of 1:10. It was aerated continuously (V Fluid/V air/min. = 0.43) and then incubated at 28°C for 52 hours at which peak growth of 10—20 × 10⁸ cells/ml. was obtained. The procedures were repeated both in 10 liter glass bottle and 50 liter fermenter tank, and was considered feasible for routine production of Azotobacter in Azotogen manufacture.