



## 微生物肥料研究、生产和应用的几个问题

葛 诚

(中国农业科学院土壤肥料研究所, 北京 100081)

以微生物生命活动导致农作物得到特定的肥料效应的制品是微生物肥料, 是农业生产使用的肥料制品的一类, 但与化肥、绿肥、有机肥又有不同之处, 其作用的发挥与制品中特定的活的微生物有直接关系, 除了其为作物提供营养元素外, 它们生命活动中的代谢产物对于刺激和调控作物生长, 改善作物营养, 提高产品品质有着十分良好的作用, 有的微生物还具有防治某些作物病(虫)害的作用。因此, 世界上许多国家都把研究和开发微生物肥料及制品作为一项长远的计划。目前有 70 多个国家(包括工业发达国家、发展中国家在内)有生产应用, 种类也不断扩大。我国自 80 年代初至今, 微生物肥料处在一个新的发展时期, 但由于多种原因又存在诸多问题, 一些方面陷入了误区, 影响了微生物肥料研究、生产和应用的健康发展。本文就其中的几个问题予以说明, 供作参考。

### 1 微生物肥料的生产应用前景

微生物肥料的作用是多方面的, 综合的。因此, 从上世纪末出现以根瘤菌接种剂形式出现的微生物肥料以来已有百年应用历史, 联合国粮农组织最近在 14 个发展中国家推广多种根瘤菌接种剂的生产和应用技术, 表明微生物肥料在农业生产中确有较好的效果。国内也有近 50 年的历史, 品种增加较快, 剂型种类亦较多, 应用面积逐步扩大。据不完全统计, 现约有百家企业, 年产量在 10~40 万 t 左右。与同期化肥产量(11400 万 t)相比, 微不足道。以豆科作物来说, 我国仅大豆种植面积每年为 667 万公顷, 花生约 300 万公顷, 而实际应用微生物肥料

接种的大豆面积仅为 1% 左右, 市场容量大得很。泰国专家来华考察后指出, 仅大豆不用根瘤菌接种而用化肥, 每年浪费就达 5000 万元人民币之多。同时应指出的是, 我国化肥年产量和每公顷用量均达世界第一, 长期大量施用化肥的结果, 单位化肥量的增产量日趋下降。有人估计, 每年因盲目施用化肥造成的浪费约为 100 万 t, 5 亿元人民币之多。施用量大的地区, 地下水污染问题日益突出。因此, 有效合理的使用化肥, 提高化肥利用率已成为一个重要课题。同时, 由于化肥生产成本的提高, 价格上涨幅度过快, 已令许多地区的农民难以接受。增加有机肥、微生物肥料的使用不再是权宜之计。第三, 随着国内外积极发展绿色农业(生态农业), 生产绿色食品(安全、无公害)也是一个新的发展趋势, 为开发生产高效优质的微生物肥料提供了一个极好的发展机遇。

还应强调指出, 微生物肥料本身的发展为扩大应用奠定了基础。不仅筛选优良菌种, 改进工艺和生产设备及生产优质的微生物肥料创造了条件, 而且分子生物学技术的渗透为遗传构建、基因重组新菌株成为可能。近 20 多年兴起的植物根圈促生细菌(PGPR, Plant Growth Promoting Rhizobacteria)的研究和开发, 更使微生物肥料的应用前景大为增加。它们单独使用; 与微生物肥料某些种类联合使用; 以及基因重组有可能生产出多功能的微生物肥料产品。由此可见, 微生物肥料的广大的市场前景

1995-01-03 收稿

和应用前景是不容置疑的。

## 2 正确认识和评价微生物肥料的作用

长期以来对于微生物肥料有无作用、有多大作用一直有不同的看法,甚至反差强烈。认为微生物肥料没有什么作用的人有的是不了解微生物肥料的作用实质,有的认为土壤中已有大量的微生物,无须再施入。他们并不了解微生物肥料是将人工选育的优良菌株经发酵扩大,集中施于种子表面或其周围,形成群体优势而发挥作用的。有人则是根据自己的试验结果来否定所有的微生物肥料,却未对影响试验的条件、因素诸如产品质量、保存条件、使用的作物是否符合、方法是否正确,有无配伍禁忌等进行认真分析,即得出这样的结论;另一些人则将微生物肥料的作用无限夸大,甚至宣传施某种“微生物肥料”一次,即可不再使用化肥或其它肥料。提出这样看法的或在报刊上作如此宣传的人,一方面至今没有从植物营养的角度去证明此种“微生物肥料”施一次即可不再施化肥的证据,另一方面也没有用规范的田间试验报告来证明其取代化肥的结果。以小麦为例,一般认为100kg产量大致需要从土壤中带走2.8kg纯氮、1.0—1.3kg  $P_2O_5$ 、2.0—3.0kg  $K_2O$ 。仅以此种“微生物肥料”氮素的供给分析,如按其产品测定的固氮酶活性最高值计算,每亩地施入90kg(每公顷施1350kg)这种“微生物肥料”,其中的固氮微生物若能存活300d,每天都按此进行固氮,根据固氮酶还原乙炔为乙烯与还原氮气为氨的理论值3:1,300d固定的氮素仅为3.59kg(实际上不可能每天都处于固氮最高的峰值期,能量来源也是问题,固氮的去处即泌氨是否解决也是问题),还要保证固氮全部为作物吸收,而这是根本不可能的。小麦亩产早已不是100kg的水平。即使这种“微生物肥料”是当代最先进的“基因工程微生物”,说施入它们即可取代化肥而得到小麦的高产是完全不能令人置信的。自生和联合共生固氮微生物与根瘤菌相比,既无安全封闭的固氮场所(根瘤),固氮能量和固定的氮素去处远未解决,凭什么去侈谈“取代化肥”呢?磷、钾营养的供应就无须

再去计算了。把微生物肥料的作用一概否定是不对的,既不实事求是,不科学,也不利于微生物肥料在农业生产上发挥应有的作用。把微生物肥料神秘化,人为地罩上一层神秘的光环,无限夸大其作用也是错误的,既不利于微生物肥料的深入研究,提高应用效果,还可能败坏整个微生物肥料的声誉,造成欺骗农民,给伪劣产品、伪科学以可乘之机。

另外,值得一提的是应实事求是、科学地评价微生物肥料的应用效果,根据微生物肥料的作用实质,测定应用后减少化肥施用取得等效的增产效果、某一阶段调控生长、减少或降低病(虫)害、改善作物品质等方面的效果更实际一些,一味苛求与化肥相同的效果是不科学的。

## 3 固氮微生物肥料与固氮酶活性

当前社会上对微生物肥料作用的争论中有人认为“有固氮酶活性即等于固氮微生物有肥效”或“有无固氮酶活性是某种固氮微生物肥料有无肥效的关键”,这实际是把固氮酶活性与固氮微生物肥料的肥效两个概念混为一谈,在一定程度上造成了混乱。众所周知,固氮酶是固氮微生物中特有的一种多功能还原酶,能催化还原多种末端带有NN,NO,NC或CC三重键的小分子化合物,也是它将氮气还原为氨的基础,利用这种反应,将固氮酶还原乙炔为乙炔,换算成固定的氮,此反应就是通常所说的乙炔还原(ARA)方法或固氮酶活性测定的原理。测定是用气相色谱仪进行的,其优点是灵敏度高,便于操作,用这个方法结合 $^{15}N$ 同位素示踪,生物化学和遗传学技术,使得新发现能进行固氮作用的微生物种类大大增加,现已确定至少包括固氮菌科、芽胞杆菌科、棒状杆菌科等14个科的数百种细菌能够进行固氮作用,能测出固氮酶活性,但并非这数百种细菌都可作微生物肥料。同时,经过若干年的实践也发现,乙炔还原技术的高灵敏性带来测定过程中干扰的因素太多,测定结果仅是固氮微生物进行固氮作用的瞬间值,用乙炔还原量换算固氮量是不准确的。要全面准确计算固氮量还必须进行其它试验。因此,正确合理解释测定结果和评

价固氮的高低是个十分重要的问题,甚至应包括设置合理的对照,样品要正确处理等。过去已经出现过以固氮酶活性计算结果推算出自生或联合固氮微生物固氮的巨大数量,引起轰动效应的失误,我们再也不能重复这样的错误了。乙炔还原技术仅是生物固氮测定技术中的一种间接方法,可以定性,难于定量。对此,我们要有清醒的认识。近年一些不当的宣传恰是以这样的测定为依据,殊不知,这样的测定既未与固氮高的样品比较,有的甚至都未设土样对照,而且在测定前还加入一定量的葡萄糖,温育 4d 后测定,使样品中的微生物数量大增,乙烯峰放大,出现了假象。试想,在田间应用时是否也要往地里施入大量的葡萄糖呢?对这样的结果怎么能下一个有较高的固氮酶活性的结论,当然更不可以由此引伸出该产品是一种较好的“微生物肥料”的结论。即使用  $^{15}\text{N}$  示踪测定,如果未设合理的对照,却下了一个耸人听闻的结论,也是不科学的,不严肃的,甚至是有害的。

#### 4 规范的田间试验

我国的微生物肥料品种繁多,尤其是近年新发展的一些复合(混)微生物肥料(基质中加入各种营养元素或刺激素、稀土等),用量大,每公顷用量几百甚至一、二千公斤,与传统的微生物肥料用量相比,提高了几十倍至几百倍,田间试验的科学和规范对于说明这种复合微生物肥料是否有效、是谁的作用至关重要。近年有不少报告,试验不设基质(即不加微生物的载体)对照,而且应该是等量、等养分的基质对照,即使试验结果有效,其效果是微生物的作用还是加入营养物质的作用,抑或是二者作用的迭加,无论从哪方面都说不清楚。有人认为不论是谁的作用,只要有效就行。这种认识看似有理,实际并不科学,实践起来一方面使产品质量难以得到保证,另一方面还会给一些伪劣品或以少量化肥加入载体却以各种名目的“生物肥料”、“微生物肥料”面目出现的卖高价的制品以可乘之机。由此不难看出,即使用量少的微生物肥料,在田间试验中也应该设一个等养分、等量的基质对照。既是科学试验的需要,也是维护农

民利益的需要。

除此之外,因为微生物肥料是活的微生物制品,它的使用条件与一般意义上的化肥、有机肥等不同,有其自身的特殊要求,田间试验和应用中一定要按要求去做,否则因使用不当的无效不能归为这种微生物肥料无效。这些要求前已述及,不再赘言。

#### 5 微生物肥料的核心是活的特定微生物

微生物肥料的核心是科技工作者分离、鉴定;从众多菌株中优中选优,针对不同作物、不同土壤类型等筛选出来的特定微生物,这种微生物必须有一定的功效,而且必须对人、畜、植物无害。任何未经鉴定的,不明确分类地位的微生物不能当作生产菌种进行生产。“无害、有效”是世界上生产微生物肥料的国家通用的原则,有的国家还有“肥料法”,管理十分严格。我国过去曾发生过用病原菌作为菌种生产“微生物肥料”的教训。任何以“保密”为借口,拒不提供菌种及其分类地位的鉴定资料的借口是站不住脚的,即将开始执行的微生物肥料检验登记申报中,对菌种的管理是其中的一个重要内容。有人耽心这样保证不了知识产权,其实,这种耽心是多余的。国家有专利法,菌种可以申请专利。检验机构在受理申请时审查有关菌种资料同样可以防止假冒或盗窃菌种的事情,检验机构在检测样品时为企业保密,不分离产品中菌种作它用是其纪律。违犯者将受到纪律直至法律的制裁。发明人、研制者和企业完全可以用法律武器维护自己的合法权益。但也不能允许以知识产权为借口,不提供使用菌种确切名称、分类地位的资料。那种自己都说不清使用菌种的正确名称的产品,不能以“微生物肥料”的名义进入市场。

微生物肥料起作用的核心是肥料中特定的微生物,它们的数量和纯度直接关系到微生物肥料的应用效果,已经生产和应用根瘤菌肥料的国家几乎都有自己对数量和纯度的标准和要求,当制品中微生物的数量下降到一定程度时,也就失去微生物肥料的作用了。

企业在生产微生物肥料时,除了选择作用

强、效力高或要求技术依托单位、转让单位、研制者提供优良菌种外,在生产过程中须严格保证各级菌种的纯度,生产环节中注意改进培养基配方,提供最佳发酵条件以便得到最高的活菌数,在载体细度、载体质量、下罐时期、包装材料以及成品贮存条件上提供合理的环境和条件,以使活菌数能维持较长时间。

经销单位和用户应在维护微生物肥料中特定微生物的存活方面创造条件;如贮存条件要合理。最后,用户一定要按照说明书上的方法正确使用。

## 6 菌种的更新和复合

有些企业生产微生物肥料时其所使用的菌种数年一贯制,极少纯化、复壮或更新,这种作法实际上制约了微生物肥料作用的发挥。有的甚至购买几支菌种就开始生产微生物肥料。实际上微生物肥料作用的客体条件不断发生变化,例如农作物品种更迭速度较快,土壤的肥力条件、营养元素和有机质的含量也不断变化,长期以来对这种变化可能带给使用菌种的影响极少研究。又如根瘤菌肥料中使用的根瘤菌长期不回归寄主,作为生产菌种对其侵染结瘤能力是不利的,尤其是土壤中含有大量的野生同类根瘤菌时更是如此。

目前的“复合微生物肥料”中有些复合类群太多,如6种、8种,还有12种之多。国外引进的某些微生物肥料(制剂)甚至多达几十种。多种微生物共存于一个载体中,他们之间可以有不同的相互作用类型,例如共生、互惠、协同、加强等,作用互补或加强的,也有共存、同住等互相之间无干扰的情况。很多情况下也发生在同一载体内,由于各个微生物的世代时间长短不一,繁殖快的比繁殖慢的争夺营养和空间多,即使开始时加入的多种微生物数量一样多,在一定时间后,载体内的微生物种类早已面目皆非,这在一些不同种类微生物混合发酵吸附后检查,初始时加入的种类有的已不见踪影的现象常可见到。还有则是一些微生物种类之间有拮抗作用,被抑制的微生物则难以繁殖、存活。因此,多种微生物是否可以复合,如何复合,哪些

种类在一起复合为佳是应该认真、深入地做试验。不一定是所复合的菌种愈多效果愈好,更不能凭主观想象或随心所欲地拼合、组合。至于为了提高使用效果在基质中加入一些营养物质(或增效物质)。也是需要进行大量的研究工作的,比如是否加,加什么,加多大比例更需要深入研究,切忌主观、随意或急于推向市场。企业和研制者应该把菌种复壮、更新和有效复合当作一个较长远的研究课题深入地做下去。

除了与生产应用有关的问题以外,微生物肥料的发展趋势及我国急需发展的几个方面也是我国微生物肥料健康发展必须阐明的重要内容,简述如下。

## 7 微生物肥料的种类

传统的、发展最早、比较成熟的微生物肥料是根瘤菌肥料(接种剂)。目前已不限于此,还有不少国家开发、应用一些自生或联合共生的微生物作为接种剂使用。VA菌根真菌的纯培养虽然没有解决,但是将侵染了VA菌根的植物根段作为接种物接种名贵植物、果木、药材、花卉取得了明显的效果。根瘤菌肥料的种类也扩大到多种豆科植物。菌剂的类型有固体(粉剂、颗粒)、液体、粘胶式、自粘式,粘着剂除了阿拉伯胶、羧甲基纤维素外,还试用了一些新的粘着剂,如羟乙基纤维素、硅酸镁等。种子预接种剂在一些国家也应用多年。菌剂中使用的菌种有同一菌种的不同血清型菌株,也有不同的根瘤菌种或根瘤菌与其它细菌复合使用的微生物肥料。

## 8 产品质量和质量控制

目前,众多专家已就微生物肥料的应用效果与产品质量和质量监督密切相关取得了一致意见。凡是不重视产品质量和质量监督的国家都出现过接种效果不佳、失去农民信任、产品滞销的后果。不少国家对微生物肥料都有严格的检验登记和生产许可证制度,不合格的产品不得在市场上销售,对违犯者或处以罚款或处以监禁。FAO 1991年在意大利举办了接种剂标准和质量监督培训班,不仅请专家讲课,介绍经验,而且组织培训人员实施,学习新的检测技

术,推广新的工艺。例如微生物肥料保存温度的自动试纸记录装置,十分简单有效,超过一定温度,试纸变色,产品失效。

## 9 检测技术

一些传统的行之有效的方法继续在质检中应用,检测设备也有不少发展,如一些实验室已有自动稀释仪、红外扫描菌落计数器,甚至还有菌种鉴定的自动装置,实现了迅速、准确。目前,不仅发展了一些新的检测技术,如荧光抗体技术、免疫酶标技术、单克隆抗体、免疫印痕技术等免疫学与血清学技术,而且发展和渗透了许多分子生物学技术,如限制性酶切片段多态性分析(RFLP)、基因探针检测技术等,不仅更为准确、迅速,而且能够区分活菌、死菌或特异的生产菌株。

## 10 微生物肥料的基础性研究

多年来,许多国家的科学家致力于微生物肥料的基础性研究,如微生物肥料和寄主间的关系、品种专性和广谱性的机制,制品中微生物进入土壤后的制约因素等。如美国的 Weber、Keyser、Cregan、Divine 及 Sadowsky 等做了一系列不懈研究,他们针对美国大豆主产区土壤里野生大豆根瘤菌群体结瘤竞争能力强,影响人工选育菌株占据结瘤位置而致接种效果不明显的问题,进行了美国大豆主产区野生大豆根瘤菌群体的自然分布调查,固氮力的评价,其中吸氢酶(Hup)表型和血清组的分布是十分重要的进展。对于结瘤竞争能力强而固氮又相对较差的野生 USDA 123 血清群的特性做了深入的研究,并从一千多个品种和引种系中筛选了一部分抑制此血清群结瘤的大豆种质,并用基因探针技术对同血清群被寄主抑制结瘤的可能做了预测,准确率达 80% 以上。这些研究为改进和提高根瘤菌接种效果奠定了可靠的基础。还有菌株运动性与接种效果的关系、接种位置与接种效果的关系等也有很好的进展。

## 11 科普知识的宣传和应用培训

无论是 FAO 还是许多生产微生物肥料的国家均把宣传、普及有关知识作为一件重要工作。出版了科普书籍,发行幻灯片、电影等,同

时对应用地区的农业技术人员和农民进行培训,使他们了解有关的知识、道理和正确的应用方法。FAO 从 1982 年起在法国的 Montpellier 举办两年一届的法语地区生产微生物肥料的发展中国家的技术培训,内容为试验设计、固氮测定及接种剂生产技术等等。英语地区则在印度的国际半干旱研究所、夏威夷的 NIFTAL、叙利亚的 ICARDA 及维也纳的 FAO/IAEA 分部举行,许多国家还自己举办培训班。

## 12 我国在微生物肥料方面急需研究的问题

我国微生物肥料生产应用虽然已有数十年历史,但长期以来基础和应用基础薄弱,不但未能以理论指导实践,反而在一定程度上制约了微生物肥料的生产和应用,接种效果的提高,新剂型、新品种的开拓,在几次大的起伏中,形成了发展一下降一停顿往复循环的怪圈。除了上面叙述的生产应用中的问题以外,加强和发展微生物肥料的基础和应用基础研究乃当务之急,主管部门和企业可能的情况下予以支持应早日列为议事日程。下列课题建议优先安排:

1. 微生物肥料作用机理(营养、调节、防病作用)及影响发挥作用的条件。
2. 微生物肥料中特定微生物的生态学。它们在土壤中存活、移动,与寄主、土壤类型、肥力及土壤微生物的关系。
3. 优良生产菌株的筛选、更新、复壮,诱变和生物技术构建。
4. 微生物肥料产品质量、剂型、使用剂量、使用技术与使用效果的关系。
5. 根瘤菌肥料固氮限制因素的研究及与野生根瘤菌系结瘤竞争的影响因子及结瘤竞争的本质和提高占瘤率的途径。
6. 微生物肥料产品质量快速、准确检测技术的建立。
7. 微生物肥料新品种、新剂型的开拓。
8. 联合菌群的筛选、组合。与 PGPR 类群联合应用及其机制的研究。

(下转第 334 页)

## 参 考 文 献

- [1] 葛 诚, 江木兰. 世界农业, 1989, 11: 48—49.
- [2] 葛 诚. 土壤肥料, 1993, 6: 43—46.
- [3] 葛 诚. 世界农业, 1993, 12: 20—22.
- [4] 葛 诚. 中国科技产业, 1994, 4: 46—47.
- [5] 葛 诚, 吴 薇. 中国农学通报, 1994, 10(3): 24—28.
- [6] 吴 薇, 葛 诚. 微生物学通报, 1995, 22(2): 104—107.
- [7] FAO. Technical Handbook on Symbiotic Nitrogen Fixation, FAO, Rome, 1983.
- [8] FAO, Legume Inoculants and Their Use, FAO Rome, 1984.
- [9] FAO, The report on Expert Consultation on legume inoculant production and quality control. FAO. Rome. 1991.
- [10] Olsen P E, W A Rice. Appl Environ Microbiol, 55:520—522.
- [11] Olsen P E, W A Rice, G W Stemke, *et al.* Can J Microbiol, 1991, 37:430—432.