

中国科学院林业土壤研究所編輯

土壤微生物學集刊

第 1 号

科学出版社

目 录

自生固氮菌的研究.....	張宪武 周煦卿 韓靜淑 (1)
轉化有机磷細菌的研究.....	張宪武 刘期松 (11)
大豆根瘤菌的研究.....	張宪武 許光輝 (25)
根瘤菌培养条件的研究.....	張宪武 丁 鑑 (43)
大豆根瘤菌在不同土类上接种效果試驗.....	張宪武 (51)

СОДЕРЖАНИЕ

Изучение азотобактерий.....	Чжан Сянь-у, Чжоу Сюи-цин и Хань Цзин-шу (10)
Изучение бактерий, разлагающих органические соединения фосфора.....	Чжан Сянь-у и Лю Ци-сун (22)
Изучение соевых клубеньковых бактерий ...	Чжан Сянь-у и Сюй Гуан-хуй (41)
Изучение производственных условий для массовой культуры клубеньковых бактерий соевых бобов.....	Чжан Сянь-у и Тин Цзянь (49)
Изучение эффективности заражения клубеньковых бактерий сои на разных типах почв.....	Чжан Сянь-у и др. (57)

自生固氮菌的研究

張宪武 周煦卿 韓靜淑

(中国科学院林业土壤研究所)

一. 緒 言

氮是植物正常生長和發育所不可缺少的养料，因为沒有氮素植物便不能合成構成生活細胞的原形質所需要的蛋白質。^[1,2] 植物对氮素的需要量是很大的，为使作物达到高额的产量，通常每公頃土壤約需含 150—200 公斤可給态氮素。但是土壤中所貯藏的可供植物利用的氮素却是非常有限的。因此，除了往土壤中施用氮素肥料以外，如何利用大气中無盡藏的气态氮素來丰富土壤中的氮素，是非常有意义的問題。^[1]

空气中有 75% 以上是氮气，相当于每公頃土壤上空的大气柱中含有分子态氮約 80,000 吨。可是大部分植物不能同化它^[1,3]，只有某些土壤中的微生物能够同化气态氮素轉变成氮素化合物。这种氮素化合物就可為植物所利用^[1,4]。

这些土壤微生物中，对于丰富土壤氮素有極重要作用的是根瘤菌、自生固氮菌、巴氏梭菌以及一些其他的微生物。^[1] 其中自生固氮菌是荷蘭学者 M. W. 別依耶林克 (Beijerinck) 在 1901 年首先从土壤中分离出来的。以后的五十多年中，世界各国的微生物学家，对自生固氮菌进行了一系列的研究，其中也包括中国的学者。值得指出的是，苏联的科学家們在闡明自生固氮菌的各种特性，特别是在实际应用上的研究曾作出了卓越的貢獻。

根据苏联学者的研究，証明了自生固氮菌在良好的条件下，每年在其所定居的每公頃土壤中可以同化 20—100 公斤的大气氮素。这样一个数字，就足以說明它在农業生产上的意义^[1,8,9]。自生固氮菌在农業生产中的应用，早在 1926 年 C. П. 科斯蒂切夫院士發表了克里米亞南岸連作烟草的土壤的氮素平衡理論以后，就开始被苏联的农業研究工作者和实践家們所重視。基于这一理論，由于固氮菌的生命活动，不仅可以保持土壤中氮的貯藏量，而且还可以增加其貯藏量^[1,3]。

苏联从 1936 年开始，就大量地制造和应用自生固氮菌制剂^[7]，并通过試驗，証明自生固氮菌剂对各种作物有增产的效果^[1,3,5,9,10]。

为了結合中国实际的自然地理条件、作物种类等,有目的地选择与培养土壤中自生固氮菌的有效菌株,利用它們进行人工接种,在当地广泛推广应用,以提高各种农作物的产量,为祖国的农业生产服务,我們在 1952 年就开始了自生固氮菌的研究。本文仅就三年来(1952—1954年)我們在分离选择土壤中有效的自生固氮菌株以及連續兩年在东北各省县农場田間試驗所得到的初步結果报告于下。

二. 实 驗

(一) 菌种的分离与选择

1. 菌种的分离

(1) 土壤試料的采集:本研究所用的土壤試料是 1952 年 9、10 月間采集的,共采得試料 166 个。这些土壤試料均采自作物地,都是表土,即地表下 10 厘米附近的土壤。土壤試料的分布地区及数量列于表 1。

表 1 土壤試料的分布地区及数量

省 别	县 (市) 别	土壤試料数
黑 龙 江 省	克山、綏化、鉄嶺、佳木斯、温春江、宁安、牡丹江、尚志 哈尔滨	34
吉 林 省	陶賴昭、長春、九站、范家屯、公主岭、郭家店、五道溝、四平、西安、梅河口、明城、吉林、桦皮厂、龙家堡	48
辽 宁 省	蛇牛嶋、昌圖、开原、鉄嶺、新城子、沈陽、苏家屯、辽陽、聖山、湯崗子、海城、大石桥、蓋平、熊岳、瓦房店、普蘭店、金州、大連、錦州、撫順、清原	84
总 計	44	166

(2) 菌种的分离与鑒定:

甲、培养基——本研究采用 Ashby 氏甘露蜜醇培养基,其成分如下^[6,7]。

甘露蜜醇	10 克
重磷酸鉀(KH_2PO_4)	0.2 克
硫酸鎂	0.2 克
氯化鈉	0.2 克
硫酸鈣	0.1 克
碳酸鈣	5.0 克
水	1000 毫升

制法:先将重磷酸鉀溶解于少量的蒸馏水中,加入酚酞指示剂 1—2 滴,用氫氧化鈉溶液中和,然后使这溶液与其他药品混合,加蒸馏水至 1 升(如作固体培养基时,則添

加 1.5% 的瓊脂)。

乙、菌种分离的方法——取將近 1 克的土壤試料，接种于盛有 20 毫升上述灭菌培养液的容积 200 毫升的三角瓶中，放在 28—30°C 恒温箱內培养，待液面上出現一層乳白色的菌膜时用白金耳鉤取菌膜少許，置显微镜下檢查自生固氮菌生成的情况。

自生固氮菌用 Meissner 液¹⁾活体染色，在显微镜下观察呈紅棕色，为粗短形杆狀菌，兩端鈍圓，單个或成对排列。

如發現菌膜內含固氮菌，則挑起一白金耳用平面及斜面法进行反复的培养，直到获得純菌为止。

在分离过程中 *Pseudomonas radiobacter* 往往与自生固氮菌伴生在一起，使分离純化工作發生困难。反复的进行平面、斜面培养，仔細鏡檢，小心操作，可以防止混杂，而得到純粹的自生固氮菌种。

2. 自生固氮菌的分类鉴定

前人的研究指出，自生固氮菌有很多变种^[3,5,7]，分类的方法目前还有爭論。我們把由 166 个土壤中分离所得的 130 个菌种，进行了形态及培养特性的鉴定，并根据 B. E. Löhnis 和 T. Westerman 的分类方法加以分类。

3. 优良菌株的选择

將分得的 130 个菌株进行了固氮能力的測定，以选择优良的菌株。固氮力的測定方法：取一白金耳純菌移入盛有 10 毫升灭菌的 Ashby 液体培养基的試管中，在 28—30°C 培养三天后取出，將此种菌液全部傾入已灭菌的盛有 100 毫升 Ashby 固体培养基的 500 毫升容积的三角瓶中，瓶口棉塞用硫酸紙包住，以防止水分蒸發。在 28—30°C 恒温箱中培养 21 天后，用凱 (Kjeldahl) 氏法測定菌株所固定的氮素量。

三. 自生固氮菌接种效果試驗

为了进一步証实所选出的自生固氮菌优良菌株的效果，我們將选出的四个菌株，分別制成菌剂，在东北各省县農業試驗場对高粱、谷子、土豆、甜菜、亞麻、棉花等 6 种作物連續兩年进行了接种效果田间試驗。

菌粉之制备：將自生固氮菌移植于盛有 Ashby 固体培养基的克氏瓶內，28—30°C 培养 4—5 天后，用清水洗出菌苔制成悬浮液。然后按粉碎風干的草炭土量的 30% 加入其中(每坳菌数保持 1780 亿以上)，充分攪拌，即成菌粉。为調节草炭土的酸鹼度和加强固氮菌的成活率，每公斤內加入 5 克的碳酸鈣^[3,5]。

1) Meissner 液的配制：碘 7 克，碘化鉀 20 克，蒸餾水 100 毫升。

菌粉的应用是拌在种子上施入土壤里。为了适合各种作物种子大小的不同，我們进行了对各种作物菌粉用量的試驗。

四. 試驗結果

(一) 菌种的分离与选择

1. 菌种的分离

从 166 个土壤試料中分离出自生固氮菌 130 个。茲將分得菌种的土壤試料数，与全土壤試料数的百分比列于表 2。

表 2 各地区分得菌种的土壤数与所占全土壤試料的百分比

地区名称	土壤試料数	分离出菌种的土壤試料数	分得菌种的試料数占土壤試料的%
黑 龙 江 省	34	16	47.5
吉 林 省	48	41	85.4
辽 宁 省	84	73	86.8
总 計	166	130	78.3

表 3 自生固氮菌各个类型的特征

	类 別	<i>Az. Chroococcum</i>	<i>Az. Vinlandii</i>	<i>Az. Beijerinckii</i>
形态上的性質	細胞形态排列	短桿狀，兩端鈍圓 單个或成对排列	橢圓形，至紡錘形 單个或成对排列	卵圓形，細胞較大 單个或成对，有时呈两个以上的鏈狀
	大 小	1.7—2.8 × 2.8—5.6 μ	1.7—2.3 × 2.8—3.9 μ	1.7—3.1 × 3.4—5.6 μ
	运 动 性	輕微运动	运动活跃	不盖活动
Ashby 培养基上的性質	平面培养特征	初生聚落圓形，突起中心呈暗色，老的聚落产生色素，由中心向四周發生褐色或暗黑色輻射綫	新生聚落圓形，微突起，半透明，中心白色濃厚老的聚落呈紅褐色	新生聚落純白色，呈不規則的圓形，湿润，無顆粒，老的聚落呈灰黃色，由中心發生放射狀輻綫
	斜面培养特征	陈旧的斜面培养呈褐色或暗黑色	陈旧的斜面培养产生紅棕色的色素逐渐扩散于培养基內	陈旧的斜面培养呈灰黃色
	液体培养特征	生長初期，培养基內产生白色混濁，在室溫下放置一星期后則产生褐色的沉淀	液体表面产生一白色厚膜，同时亦产生淡黃色至紅褐色的色素，集中在表面附近，逐渐扩散到培养基的全部，放置后产生初为白色而后变成紅棕色的沉淀	开始生長时，表面及試管壁上产生白色圓形小点的混濁，逐渐向底部下沉

試驗結果指出，自生固氮菌在吉林和辽宁兩省的土壤試料中分布較广，黑龙江省者較少。

2. 自生固氮菌的分类鉴定

我們將分得的菌株，根据其形态和培养特征归为下列三类(表3)。

在 130 个菌株中，各类自生固氮菌的数目，如表 4 所示。

表 4 各类型菌株数与分得菌株数的百分比

类 型	菌 株 数	各类型菌株数与分得菌株数的%
<i>Az. Chroococcum</i>	109	83.9
<i>Az. Vinelandii</i>	8	6.1
<i>Az. Beijerinckii</i>	13	10.0

由表 4 中的数字可以看出，在所研究的土壤試料中 *Az. Chroococcum* 型分布最广，占分得菌株数的 83%。

3. 优良菌株的选择

经过固氮能力的测定，从 130 个菌株中选出了下列四个比较优良的菌株。

表 5 优良菌株的固氮力

菌 号	编 号	毫克 N/1 克甘露蜜醇
166	1	8.3
53	2	8.2
148	3	7.8
155	4	7.6

(二) 自生固氮菌接种效果試驗

1. 菌粉的制备

本試驗对各种作物使用的菌粉量，系按种籽大小、播种用量分别制成(表 6)。

表 6 各种作物每垧菌粉用量

作 物	每垧种籽播用量(市斤)	每垧菌粉量(市斤)	每垧拌种添加水分量(市斤)
谷	10—15	1	1
高	40	2	2
甜	60—65	4	12—15
亚	200—240	4	5
棉	200—220	6	*
土	3000	6	**

* 棉花播种前即播种，菌粉直接撒土上即可。

** 土豆接种时，与土粪或草木灰拌匀一同施用。

2. 田间试验结果

通过 1953 年的田间试验结果, 在四个菌号中, 以 1、3 号对各作物都表现得较好。因此在 1954 年的田间试验中仅采用这两个菌号。下面所整理的数据亦只列举 1、3 两号菌的增产效果。

表 7 高粱自生固氮菌接种增产效果

年 份	試驗地点	土壤类型	接 种 菌 号				对 照
			1		3		
			产 量 (市斤/亩)	增产效果%	产 量 (市斤/亩)	增产效果%	产 量 (市斤/亩)
1953	錦州省农場	褐色土	7518	10	—	—	6805
1954	承德省农場	褐色土	5801	10	5619	6	5277
	赤峰省农場	褐色土	4504	14	4071	3	3940
	錦州省农場	褐色土	7486	11	7129	6	6732
	阿城县农場	淋溶黑鈣土	4676	39	3778	13	3351

从上表结果可以看出, 1 号菌对高粱的增产效果比 3 号菌显著, 而且在褐色土的三个农场两年试验的结果, 均增产 10% 以上较为稳定。从土壤类型看来, 固氮菌在淋溶黑钙土上的增产效果比在褐色土上的高。

表 8 谷子自生固氮菌接种增产效果

年 份	試驗地点	土壤类型	接 种 菌 号				对 照
			1		3		
			产 量 (市斤/垧)	增产效果%	产 量 (市斤/垧)	增产效果%	产 量 (市斤/垧)
1953	長春县农場	淋溶黑鈣土	2483	23	2713	35	2008
1954	錦州省农場	褐色土	4240	-5	4810	9	4426
	九站省农場	生草土	5362	11	4584	-5	4834
	赤峰省农場	褐色土	71044	11	6692	6	6323

从上表可以看出, 自生固氮菌在淋溶黑钙土上的增产效果比较显著。

表 9 土豆自生固氮菌接种增产效果

年 份	試驗地点	土壤类型	接 种 菌 号				对 照
			1		3		
			产 量 (市斤/亩)	增产效果%	产 量 (市斤/亩)	增产效果%	产 量 (市斤/亩)
1953	佳木斯省农場	草甸土	22813	1	22938	2	22532

1953	長春省農場	淋溶黑鈣土	42735	11	46080	20	38339
1954	佳木斯省農場	草甸土	28001*	45	30183	56	13321
			54389**	11	49400	1	49101
	克山省農場	淋溶黑鈣土	18507	3	18596	3	18025

* 当地品种。

** 29C—20号。

从上表可以看出，自生固氮菌与作物品种之間存在着一定的关系。从1954年佳木斯省農場两个不同品种接种效果看来，自生固氮菌对本地区品种的增产效果较为显著。

表 10 甜菜自生固氮菌接种增产效果

年 份	試驗地点	土壤类型	接 种 菌 号				对 照
			1		3		
			产 量 (市斤/亩)	增产效果%	产 量 (市斤/亩)	增产效果%	产 量 (市斤/亩)
1953	呼蘭特作場	淋溶黑鈣土	19430	86	15360	47	10440
1954	德惠县农場	淋溶黑鈣土	40006	14	37166	6	35060
	五常县农場	生草灰化土	54223	31	43173	5	41270

从上表可以看出，自生固氮菌对甜菜增产比较显著，其中尤以1号菌表现得比较突出。

表 11 亞麻自生固氮菌接种增产效果

年 份	試驗地点	土壤类型	接 种 菌 号				对 照
			1		3		
			子实产量 (市斤/亩)	增产效果%	子实产量 (市斤/亩)	增产效果%	子实产量 (市斤/亩)
1953	呼蘭特作場	淋溶黑鈣土	683	16	955	62	589
1954	九站省农場	生草土	950	9	1074	23	874

从上表可以看出，3号菌对亞麻子实增产效果比较显著。

表 12 棉花自生固氮菌接种增产效果

年 份	試驗地点	土壤类型	接 种 菌 号				对 照
			1		3		
			产 量 (市斤/亩)	增产效果%	产 量 (市斤/亩)	增产效果%	产 量 (市斤/亩)
1954	錦州省农場	褐色土	2486	11	2187	-1	2216
	辽陽棉作場	褐色土	1175	15	1021	0	1026

从上表可以看出, 1号菌增产效果较为显著。

五. 討 論

1. 实验结果表明, 从东北 44 个地区 166 个土壤試料中所选出的 4 个固氮力較高的菌株, 通过兩年在东北 12 个省、县农場进行田间試驗的結果, 对高粱、谷子、土豆、甜菜、亞麻、棉花等六种作物, 在不同程度上都显示了增产效果, 其中特别是对甜菜的增产效果尤为显著。

2. 实验结果表明, 自生固氮菌菌粉对各种作物所表现的增产作用, 不很稳定。其所以产生相异的原因, 根据我們初步的分析, 認為自生固氮菌可受土壤类型的影响。例如在表 7 中, 从高粱的接种效果来看, 淋溶黑鈣土比褐色土的增产效果为高, 而且谷子也有同样的情况。此实因自生固氮菌在有机質含量高的土壤中, 生長發育較为良好。根据苏联文献記載, 当有机質肥料与固氮菌粉共同施用, 則固氮細菌表现了很高的成活率和增产效果。

其次也可以看出, 作物与菌种之間存在着一定的关系, 例如在表 10 及表 11 中, 1 号菌对甜菜的增产效果, 比 3 号菌反高, 而 3 号菌对亞麻的增产效果, 則比 1 号菌显著。

又 1954 年在佳木斯省农場, 对土豆接种試驗里, 亦可初步看出, 菌种与作物品种之間也存在着一定的关系。以当地品种来說, 1 号菌的增产效果为 45%, 3 号菌为 56%。对 292-20 品种来說, 1 号菌的增产效果为 11%, 3 号菌为 1%。当地品种的增产效果, 比較 292-20 品种为显著。

所有这些都說明了自生固氮菌与外界环境的关系是非常密切的。E. H. 米舒斯金認為施用微生物制剂效用的差异, 在頗大程度上, 由于缺乏关于施用它們的科学上論証了的原則, 通常使用它們是类似化学肥料那样来施用的, 不大考虑施入于土壤后微生物的要求^[11]。只有在知道了它們所要求的条件, 而且滿足了它們的时候, 才能保証發揮其充分的作用。

3. 針对我们兩年自生固氮菌田间試驗所發現与存在的問題, 認為今后应开展对于創造自生固氮菌在各个不同土壤中良好發育的条件^[13, 14], 选择适应于一定环境, 一定作物的微生物小种^[12, 14], 及通过作物及化学藥剂如含氮物質和微量元素的刺激等, 以提高自生固氮菌活动性能等方面的研究^[15, 16, 17]。

六. 总 結

1. 由东北 3 个省 44 个地区的 166 个土壤試驗中, 分离出自生固氮菌 130 株。經分

类鉴定,其中属于 *Az. Chroococcum* 类型的有 109 株,属于 *Az. Vinelandii* 类型的有 8 株,属于 *Az. Beijerinckii* 类型的有 13 株。

2. 由分得的 130 个自生固氮菌株中,选出了四个固氮能力较比优良的菌株。

3. 选出的 4 个菌株,对各种作物进行田间试验,其增产效果如下:

作物名称		最高增产效果 %
高	梁	39
谷	子	35
土	豆	56
甜	菜	86
苧	麻	62
棉	花	15

4. 本实验对于适应一定环境、一定作物的自生固氮菌小种的选择,和创造其发育良好条件等方面的研究,没有进行,所得的菌株表现对各作物的增产效果不甚稳定。

参 考 文 献

- [1] M. B. 斐多罗夫: 固氮细菌及其在农业上的作用(陈善堃译)。中华全国科学技术普及协会出版, 1955 年。
- [2] E. Ф. 别列佐娃: 微生物在农业上的作用(朱彦超等译)。财政经济出版社, 1954 年。
- [3] M. B. 斐多罗夫: 微生物学(张天伏等译)。中华书局出版社, 1953 年。
- [4] E. H. 米苏斯金: 微生物和土壤的肥沃性。苏联农业科学, 1955 年, 第 9 期。
- [5] Л. М. 多罗辛斯基: 细菌肥料(于祺元译)。东北农业出版社, 1952 年。
- [6] S. A. Waksman: Principles of Soil Microbiology. The Williams & Wilkins Company, 1932.
- [7] 張憲武: *Azotobacter* in the Soil of Manchuria (Report 1). 大陆科学院研究报告, 第 4 卷, 第 4 号, 1940 年。
- [8] И. А. Гомер и Е. Г. Харитон: *Азотобактер в почве травопольного севооборота микробиология том XX*, вып. 2 (1951).
- [9] Г. 别梯林科: 种子的拌菌。苏联农业科学, 1954 年, 12 期。
- [10] E. Ф. Березова, Л. М. Доросинский, Г. В. Лопатина, Р. А. Менкина, Н. М. Лазарев: Применение бактериальных удобрений. Сельхозгиз, 1955.
- [11] E. H. 米苏斯金: 微生物和土壤肥力。土壤微生物学问题讨论会论文集(婁隆后等译), 1955 年。
- [12] E. H. 米苏斯金: 植物发育和收获量问题中的微生物因素。苏联农业科学, 1953 年, 第 11 期。
- [13] П. А. 金杰里: 植物营养和微生物。土壤微生物学问题讨论会论文集(婁隆后等译), 1955 年。
- [14] M. B. 斐多罗夫: 土壤微生物学问题讨论会上发言。土壤微生物学问题讨论会论文集(婁隆后等译), 1955 年。
- [15] X. Г. Зинovieва: Влияние ризосферы некоторых сельскохозяйственных растений на азотобактер. роль микроорганизмов в питании растений, сельхозгиз, 1953.
- [16] X. Г. Зинovieва: Влияние ризосферы некоторых сельскохозяйственных растений на азотобактер. агробиология, 1954, вып. 5.
- [17] А. И. Рубчик, X. Г. Зинovieва и О. И. Бершоза: Изменчивость азотобактера изменчивость, микроорганизмов, 1955.

ИЗУЧЕНИЕ АЗОТОБАКТЕРИЙ

(Резюме)

Чжан Сянь-у, Чжоу Сюи-цин и Хань Цзин-шу

Способ повышения плодородия почвы путем использования атмосферного азота при помощи почвенных бактерий является одним из эффективных. Бактериальное удобрение из азото бактерий—одно из средств такого повышения плодородия почв.

Необходимо, при этом, получить культуры бактерий, обладающие повышенной активностью для использования их в земледелии. Начиная с сентября 1952 г. нами было собрано 166 образцов почв из С.-В. Китая, из которых были выделены культуры бактерий. Из последних отобраны 4 культуры со сравнительно высоким показателем активности. В 1953—54 гг. с ними были проделаны полевые опыты на 12 госфермах. В результате было получено повышение урожайности, причем самое большое у сахарной свекловицы. Результаты опытов сведены в следующую таблицу.

Название культур	Наибольший прирост урожая в %
гаолян	39
гуцза	35
картофель	56
сах. свекл.	88
лен	62
хлопок	15

Результаты опытов также показали, что влияние бактериального удобрения при разных внешних условиях неодинаково. Поэтому следует заняться получением культур бактерий, приспособленных к различным условиям среды, а также пробовать повышать их активность воздействуя на них микроэлементами.

轉化有机磷細菌的研究*

張宪武 刘期松

(中国科学院林業土壤研究所)

摘 要

为了提高东北地区黑土地帶含有机磷高、含有效磷低的土壤肥力使作物增产起見，我們吸取了苏联在这方面的經驗，进行了轉化有机磷細菌的研究。采用選擇性的培养基和矽酸膠板，从淋溶黑鈣土、森林灰化土、泥炭土中分离出 20 个具有对有机磷矿化力較强的菌种，矿化核磷的能力为 62—93%，矿化卵磷脂为 47—91%。从其中选出 283, 169, 103, 336 四个菌种，通过盆栽和圃場試驗，初步看出 283, 169, 103 菌种对小麦、玉米、大豆有增产效果。283 菌株使小麦增产 2—19%，玉米 15%，大豆 1%；103 菌株使小麦增产 1—17%，使大豆增产 6%；169 菌株使小麦增产 4%，使大豆和玉米增产 3% 此等菌种經鉴定均为 *Pseudomonas* sp.。

一. 引 言

土壤的發育同决定土壤肥力的各种过程中，磷的生物化学的轉化作用具有極其重大的意义^[1]。远在 1890 年俄国学者 П. А. 科斯蒂切夫(П. А. Костычев)^[2]指出，土壤中由于土壤微生物的生命活动轉化难溶的磷化物为可溶性作为植物的养料，因而也就提高了土壤肥力。

土壤中的磷以無机同有机化合物的形态存在^[7, 4]。無机磷化物包括 1-, 2-, 3-, 4-磷酸鉀、鈣、鎂、鋁、鉄，同錳的磷酸鹽类。有机磷化物主要是动植物殘体及生活与死亡微生物的磷蛋白。其較比簡單者如核酸、植酸、卵磷脂等。

土壤中很多微生物如細菌、真菌及放綫細菌全参与磷化合物的分解。其分解途徑大致可分为三方面：

- (1) 通过微生物的酵素而分解；
- (2) 为土壤微生物所产生的有机酸、CO₂ 所分解；
- (3) 为自营养的硝化細菌、硫磺細菌代謝后所形成的無机酸所分解。

因而在黑土或添加有机質的非黑土上施用磷細菌肥料，就有助于轉化土壤中不被植物所利用的有机磷为有效磷，以达到农業增产的目的。在苏联广大的黑土区域内，施

* 参加工作者：崔福来、李鳳珍、郑鴻元、王文韻。

用磷細菌已获得很大成就^[3,5,6],对提高我国东北地区广大的黑土地帶(初步調查約23万平方公里)的土壤肥力,提供了明确的研究方向。我們根据苏联蒙基娜^[2]的資料,进行了有机磷轉化細菌的研究。其目的亦在于轉化土壤中的有机磷为有效磷,借以达到农业增产之目的。本报告仅就磷細菌的分离、鉴定和矿化力測定,以及盆栽和圃場試驗的初步結果报告于后。

二. 实验部分

(一) 試样的采集 試样的采集是根据伊姆舍聶茨基、蒙基娜等人的方法并結合我国东北地区的具体情况,分别从辽宁、吉林、黑龙江省內的泥炭土、淋溶黑鈣土、森林灰化土三个土类上采集的,共采試样 114 个,如表 1 所示。

(二) 分离菌种 采用維諾格拉多夫斯基(C. H. Виноградовский)等的矽膠平板,添加 P. A. 蒙基娜的营养液的选择培养基进行分离菌种。

(1) 蒙基娜营养液的組成

(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5 克	MgSO ₄ *	0.3 克	MnSO ₄	微量
CaCO ₃	5.0 克	KCl	0.3 克	FeSO ₄ *	微量
葡萄糖	10.0 克	NaCl	0.3 克	自来水	1 升

* 係用 MgSO₄·7H₂O; FeSO₄·7H₂O

卵磷脂酒精溶液(每个平板大約 5 毫克 P₂O₅)。

(2) 經我們修改后的維諾格拉多夫斯基矽膠平板制备法

甲、稀酸液的配制:

5 毫升濃 H₂SO₄ (比重 1.18) 加蒸餾水 140 毫升 }
20 毫升濃 HCl (比重 1.19) 加蒸餾水 170 毫升 } 混合

乙、Na, K-水玻璃液的配制:

K₂SiO₃ 14.4g }
Na₂SiO₃ 51.7g } (比重 1.08—1.10) 加蒸餾水 313 毫升

以上的酸液 1 毫升足以中和 Na, K-水玻璃液 1 毫升,指示剂用 B.T.B.

丙、制备矽酸膠平板的操作:取(甲)液 6 毫升置培养皿中,再加(乙)液 6 毫升,迅速混合,加盖水平放置,数分鐘后即可得較坚实的矽膠平板。其 pH 为中性。在無菌箱中,以 80—90°C 的灭菌水浸漬兩次,每次 1 小时則可得鹽分低的矽膠板。倒置,除去多余水份。然后以無 NaCl 的蒙基娜营养液浸漬 1 小时,傾去营养液,以灭菌脫脂棉蘸

濃厚卵磷脂液¹⁾塗抹于平板上,則得均勻分布的卵磷脂矽膠板。倒置过夜,則可作為分離磷細菌之用。

(8) 分離方法:分別以矽膠平板和瓊脂平板²⁾進行分離。

(三) 菌種礦化力的鑑定 為了選出對有機磷礦化力強的菌種,就已分得的菌種進行矽培養和液體培養,測定它們對卵磷脂和核酸的礦化力。

(1) 沙培養——稱取精製砂³⁾70克,置250毫升的三角瓶中干熱滅菌,加營養液15毫升,0.5氣壓20分鐘滅菌備用。每瓶用1毫升菌液(在營養液中30°C培養48小時),接種前每瓶加1毫升卵磷脂酒精溶液,于30°C培養1月後分析。

(2) 液體培養——置35毫升營養液于250毫升三角瓶中,0.5氣壓20分鐘滅菌。鑑定礦化卵磷脂者每瓶加卵磷脂酒精溶液1毫升,鑑定礦化核酸者每瓶加精製核酸⁴⁾溶液1毫升,然後每瓶加菌液1毫升于30°C培養21日後分析。

(3) 化學分析方法——全磷和有效磷定量採用Wolf^[12]和我所微生物化學組所改善的鉬藍比色法^[12],酸度穩定範圍在 H_2SO_4 或 HCl 的0.3—0.9N之間,1—4 P.P.M.的範圍內誤差在 $\pm 5\%$ 。用煮沸2分鐘呈色,呈色完全,迅速。抽出液用0.1N HCl 。分析土壤全磷時加2%酒石酸溶液10毫升,防止矽之干擾,結果列于表2,3。

(四) 細菌鑑定 菌種根據細菌純粹培養的研究法手冊所載的方法^[13],和Bergeys細菌檢定手冊^[14]進行鑑定,結果如表5所示。

(五) 盆栽試驗 由以上分得礦化力較強的菌種中,選出八株進行盆栽試驗。

方法與處理:

甲、黑土試樣用九三農場原始荒地的淋溶黑鈣土, pH7.0 含全氮0.310%, 全磷0.147% (P_2O_5)。有效磷0.0038% (P_2O_5)。採用Mitscherlich式搪瓷盆(高20厘米×直徑20厘米), 每盆盛風干土6公斤。

乙、種籽用甘肅93號小麥,以 $1/50$ 福爾馬林(40%)滅菌。每盆播種30粒,深1.5厘米,重複3次,對照6次,最後間苗時每盆留20株。

1) 卵磷脂的製備^[15],系採取新鮮烘干(50°C)蛋黃,磨碎以酒精反復抽提數次,過濾,將酒精濾液濃縮(50°C)以丙酮沉澱。沉澱反復以丙酮洗滌至呈淡黃色為止。經分析含有效磷極少。

2) 瓊脂卵磷脂培養基是在蒙基娜營養液中加入1.5—2.0%的瓊脂,半個氣壓20分鐘滅菌。經分析培養基中含有效磷並無增加。

3) 用濃 HCl 精製。

4) 核酸之精製^[16],將含有效磷多的核酸,用10% CCl_3COOH (T.C.A.) 在4°C下(用30% KCl 的冰水保持2°C)抽出可溶性磷,攪拌兩小時澄清,傾去上部清液,再加10% T.C.A.液攪拌抽出1小時,遠心分離。將沉澱以95%酒精反復洗滌6次(至中性為止),減壓烘干(35—40°C)備用。(經分析含全磷7.77%,含有效磷0.01%,用0.1N HCl 抽出)。

丙、每盆种籽以磷細菌悬浮液 1 毫升分别接种, 同时并进行了同三个固氮菌混合接种。試驗結果見表 6, 7。

(六) 園場試驗 从分出具有矿化力較强的菌种中选用 283, 169, 103, 336 四个菌种, 进行園場試驗。种籽于播种前夕用細菌悬浮液拌种, 每垧接种量为 10,000 亿个菌。小区面积为 100—200 平方米, 結果如表 8 所示。

(七) 影响矿化力的因素 在研究中, 我們發現 CaCO_3 有增强矿化力的現象, 使我們考虑到对細菌培养的中和問題、 CO_2 的营养問題、Ca 离子对提高卵磷脂酶活动性的問題^[13, 14]。因此, 在不过分变动蒙基娜的原来营养成分的基础上进行了不添加 CaCO_3 , 添加 CaCO_3 , 加 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, CaSO_4 , 葡萄糖鈣, 及以 NaOH 中和培养液条件下进行了两个菌种的活动性試驗, 結果見表 9。

三. 試驗結果

(一) 土壤标本的采集 从表 1 中可以看到磷細菌是广泛存在于上列土壤中, 但以含有机質丰富的土壤中具矿化力高的菌种存在較多。符合于有机体与外界生存条件的統一性, 和伊姆含聶茨基院士对于自然界中發掘有实用价值的微生物所指出的生态地理分布規律的学說。給有目的地采取試料指出一定的范围。

(二) 分离菌种 由 114 个土壤标本中分离出菌种 336 株。

(三) 矿化力鑒定 在分得的菌株中, 有 20 株具有較强的矿化力。这些菌种中有 19 株是矽膠平板分出的, 1 株是由瓊脂平板分出的。

表 1 土壤有机質与磷細菌的分布情况

土壤中的有机質	采 集 地 区	土壤标本数	土 壤 pH	分离出的株 菌 数	矿 化 范 围 毫 克 (P)
丰富。分解差	玻 璃 城 子	2	7.0	0	0
	拉 法	2	6.0	2	2.05—2.65
	新 站	2	6.0	7	2.10—3.45
	滑 石 村	3	6.0	3	2.06—2.65
	郭 家 店	4	5—7	5	2.50—3.91
丰富。分解較好	秦 家 屯	6	7.5	4	2.31—4.38
	朝 陽 坡	4	7.8	4	2.06—3.35
	黑 林 子	4	6.0	5	2.23—3.58
	蛟 河	4	5.6	1	2.42
	陶 家 屯	2	7.0	0	0
	申 家 店	2	—	1	3.75

豐富、分解好	双		山	17	6—8	27	2.01—4.96
	訥		河	5	7—8	2	3.36—3.00
	哈	尔	濱	4	7.0	3	2.44—3.77
	佳	木	斯	2	7.0	3	2.89—4.28
	嘉	信	子	3	7.0	1	3.33
	林	大	溝	5	6.0	7	2.24—4.48
	長		春	7	8.0	2	2.06—3.11
較差	大	石	村	2	6.0	0	0
	宁		安	4	7.0	1	2.30
	龙		井	4	5.0	1	2.53
	尕		志	4	6—7	2	2.33—2.50
	海		林	4	7—8	3	2.91—3.82
	牡	丹	江	2	7.5	0	0
	通		化	7	7.0	1	3.11
	克		山	2	7.0	1	2.95
	齐	齐	哈	2	7.0	0	2.48—3.68
	白	城	尔	2	7.5	2	0
	呼		子	2	7.0	0	0
	双		蘭	1	—	2	3.45—3.59

表2 磷細菌對有機磷(卵磷脂)的礦化力 (砂培養30天, 溫度30°C, 0.1N HCl抽出)

株	理	添加的有機磷量(毫克*)	礦化後釋放出的磷量(毫克**)	礦化率
菌株 64		8.84	3.62	40.95
“ 66		7.75	2.24	29.00
“ 76		7.89	3.44	43.50
“ 103		7.48	2.86	36.90
“ 135		6.66	3.59	53.90
“ 139		6.66	3.58	53.40
“ 143		7.75	3.23	41.75
“ 169		7.89	3.83	48.60
“ 206		7.89	3.50	44.40
“ 274		7.75	3.33	42.95
“ 275		7.89	3.81	48.30
“ 276		7.89	3.81	48.30
“ 283		7.87	4.66	59.20
“ 284		8.99	3.60	40.10
“ 285		8.99	3.59	39.95
“ 286		8.99	3.58	39.80
“ 288		8.99	3.67	40.80
“ 299		7.75	3.20	41.30
“ 327		8.83	3.40	38.50
“ 336		7.87	4.40	55.40

* 有機磷=卵磷脂全磷—有效磷;
(P) (P) (P)

** 釋放出的磷量=加菌培養中的有效磷量—對照中的有效磷量。