

5000-1396

1658

00167

固氮細菌及其在農業上的作用

(苏联) M. B. 斐多羅夫 著

北京市農林水利局
試驗農場

北京市农业科学研究所



中華全國科學技術普及協會出版

本書提要

氮素肥料是植物（農作物）不可缺少的資料。但是，我們知道土壤中所貯藏的可供植物利用的氮素却是很有限的。因此，除了往土壤中施用氮素肥料以外，如何為植物尋找氮素養料的其他來源，就成為農業科學上的一項重要任務。

這本小冊子指出了通過某些土壤微生物的生命活動，可以把空氣中的無窮無盡的氣態氮素固定起來，供給植物利用。並全面地介紹了同化空氣中氣態氮素的微生物的特性、微生物同化氣態氮素的有利條件和過程、以及利用根瘤菌和需氧固氮菌作為細菌肥料的方法。可幫助讀者掌握固氮細菌的基本知識，以便正確地運用大豆根瘤菌、花生根瘤菌等細菌肥料來提高農業生產。

目次

同化空氣中氣態氮素的微生物的特性	3
微生物同化大氣氮素的有利條件	10
細菌同化氣態氮素的過程	12
利用根瘤菌作為細菌肥料——根瘤菌劑	13
利用需氧固氮菌作為細菌肥料——固氮菌劑	19

在我國農業的面前，擺着一個非常重大的任務：要在最近期間，將主要農作物的產量提高 50—70%。爲了完成這樣一個巨大的任務，必須採取一切措施，其中也包括擴大利用各種可以促進農作物良好生長的土壤微生物在內。

這種肉眼看不見的生物，在土壤裏是非常之多的（1克重的土壤中約有 10 億個）。並且對植物的發育，有着很大的影響。它們分解土壤中的有機物質，將其中所含的碳素，以碳酸氣的形態，重新歸還給大氣。植物便利用這種碳酸氣來構成其軀體有機物質。由於土壤微生物生命活動的結果，植物在生長期間，每公頃土壤約可放出 750 萬公升的二氧化碳氣體。這麼多的二氧化碳，差不多可以充分保證植物的碳素營養。

在保證植物的氮素營養上，土壤微生物也有很重要的作用。植物如果缺少氮素，正常的發育，是完全不可能的。因為沒有氮素，便不能合成蛋白質，而沒有蛋白質，便不可能構成生活細胞的原生質。植物對於氮素的需要量是非常大的：爲使植物達到高產的產量，每公頃土壤約需含 150—200 公斤可給態氮素。

由此，必然會產生這樣的問題：「在土壤中有這麼多氮素嗎？」根據化學分析測定，每公頃土壤的耕作層中，含有6000公斤（生草灰土）到1500—2000公斤（厚黑鈣土）的氮素。土壤中的氮素貯藏量至少够植物利用50年——100年之久。即使在單純利用的情況下，但實際上如果我們不往灰化土中施用氮素肥料，連一次高額產量也不可能獲得。這只能解釋為，土壤中所有的氮素化合物決不是都能被植物吸收來作為氮素養料的。

土壤中腐殖質類的有機氮素化合物，完全不適宜供作植物的營養，而却佔了土壤中氮素總貯藏量的90%左右。雖然加強土壤微生物的生命活動，可以提高土壤中所貯藏的氮素化合物的利用率，但是如果經常廣泛的利用它們，便會破壞土壤在農業上有價值的特性，並減低其肥力。因此，更重要的是，除了提高土壤中所含氮素利用率以外，還必須找尋供給植物氮素養料的其他來源。貯藏着無窮無盡的氣態氮素的大氣，便是這種來源之一。

在每公頃土地面上的空氣柱中大約含有8,000公斤的氣態氮素。這個數量，超過灰化土中氮素貯藏量的13,000倍或黑鈣土中氮素貯藏量的4,000倍。可是這種無窮無盡的氮的來源，對於高等植物來說，是完全不能被利用的。由於植物在許多世紀來的發展，地面上出現了幾十萬種植物。可是，在這些植物中，沒有一種植物能夠獨立地同化空氣中的氣態氮素。只有在土壤微生物中有一些「種」，能夠同化這種為其他生物所不能利用的氣態氮素以構成自己軀體的蛋白質。由於它們的生命活動，氣態氮素轉變成化合物狀態的氮素，而成為植物能夠利用的了。

这种微生物給農業帶來很大的利益。因此，應該廣泛地加以利用，以提高土壤的肥力。这种微生物不僅在現在對於丰富土壤中的氮素有着重要的作用，而且在過去對於累積土壤中的化合態氮素，也起過極大的作用。關於這一點，可以根據下面的事實來推知。我們知道，在母岩中是沒有氮素的，因此它們風化後，不能供給我們化合態氮素的貯藏物（如同在現代土壤中所看到的）。因此，这种化合氮態的貯藏物，只能是由於同化空氣中氣態氮素的土壤微生物的生命活動的結果所生成。

在這些微生物中，對於丰富土壤氮素有着最重要作用的是根瘤菌、需氧固氮菌、巴斯德梭菌以及一些其他的微生物。根瘤菌與豆科植物共生時，同化大氣氮素。在栽培豆科植物的每公頃土地上，在豆科植物的生長期間，可以同化100—400公斤的分子態氮。自由生活的固氮細菌（需氧固氮菌，巴斯德梭菌等）活躍性較小，在生長期間，在其所定居的每公頃土壤中，只能同化20—50公斤的大氣氮素。但是因為它們在土壤中分佈得非常廣泛，所以同化的氣態氮素的數量是很大的。

所以這些資料表明，加緊地培育上述土壤細菌就可以使我們從取之不盡的大氣中，免費獲得大量氮素，用於作物栽培上。但因為這是與土壤微生物的生命活動有聯系的，所以，需要對這些土壤微生物良好的發育條件，有正確的了解。

同化空氣中氣態氮素的微生物的特性

早在1866年，著名的俄國學者沃羅寧就在豆科植物的根瘤中發現了根瘤菌。然而一直到1888年才將根瘤菌提純進行培養。在同年中也証實了，这种細菌在豆科植物的根瘤中能同

化空氣中的氣態氮素。進一步的研究指出，根瘤菌是極小而呈桿狀的形態。這種桿菌的寬度，約為千分之一毫米（1微米），其長度很少超過千分之四到五毫米。

這種細菌棲居於根瘤的期間，它們的外部形態有着顯著的變化，並經歷着特殊的發育史。開始時是很小的桿菌，長度約為千分之一毫米，寬度為二萬分之一毫米。在這個發育階段中，即使把它們放在3000—4000倍的顯微鏡下，也難以觀察到。在進一步發育的過程中，它們變得稍為大一些，後來又變為「分枝」的形態。這種「分枝」形態稱為假菌體（圖一）。在顯微鏡下觀察用各種豆科植物的根瘤做成的切片，多半能看見它們。假菌體再進一步發育，就逐漸變為小球狀，而後又變為短桿狀。



圖一 根瘤菌的各種假菌體（約放大2000倍）。

所有這些階段，都很容易在夏季期間的根瘤中觀察到。對於同化空氣中氣態氮素最重要的階段，一般認為是這種細菌的「分枝」形態時期。它出現在豆科植物花期開始前或正當花期的根瘤中，強烈地同化着空氣中的氣態氮素。

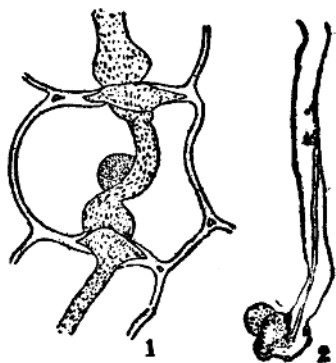
根據根瘤菌棲居的豆科植物的種可以將所

有的根瘤菌類羣歸列爲幾個種。目前至少可區分出下列12個根瘤菌的種。

1. 三葉草;
2. 豌豆、箭筈豌豆、洋扁豆、馬蠶豆、山豆;
3. 苜蓿、草木樨、葫蘆巴;
4. 扁豆、烏足豆;
5. 大豆;
6. 菜豆;
7. 落花生、豇豆(牛豌豆);
8. 綠豆;
9. 西施豆;
10. 驢豆;
11. 洋槐;
12. 黃槐錦雞兒。

這裏所列出的任何一組的細菌，都能在本組所有植物的根部上形成根瘤。但是箭筈豌豆的細菌，还是在箭筈豌豆上形成的根瘤最好，而豌豆細菌則爲豌豆等等。

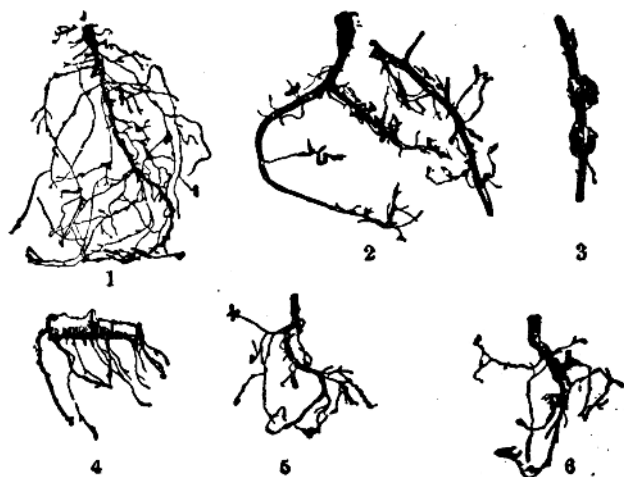
根瘤菌經根毛進入豆科植物的根部，再由一個細胞至另一個細胞而進入根的內部(圖二)。在根部細菌定居的地方，由於根部細胞的



圖二

1—細胞及侵入縫；2—根瘤菌侵入豆科植物根部中的狀況。

異常分裂及強烈生長，而形成畸形的小瘤。這種畸形的小瘤就叫做根瘤（圖三）。在細菌與豆科植物之間，建有特殊的共棲關係，這種共棲關係雖然也是複雜的，但主要是具有共生的特性。豆科植物以不含氮的物質（主要是可溶性的醣類）及礦物鹽類供給根瘤菌。根瘤菌便利用這種有機物質作為碳素養料來強烈地生長和同化大氣中的氣態氮素以構成自己的軀體。而大部分同化了的氮素則被它們排出體外供作豆科植物的氮素養料。在細菌生命活動最活躍的時期中，它們在一、兩個星期內所同化的大氣氮素，就多到這樣的程度，以至其重量超過它們所寄居的根瘤的重量。在栽培豆科植物的每公頃土地上，根瘤菌在其生長期間中，能同化數百公斤（100—400公斤）的大氣氮素。



圖三 在根瘤菌的作用下，在豆科植物的根部所形成的根瘤的外部形態：

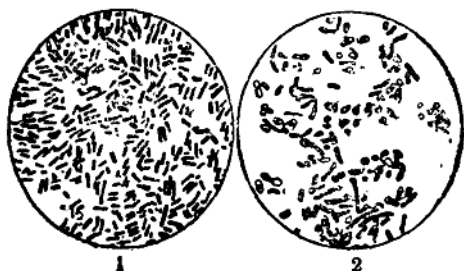
1—三葉草；2—豌豆；3—羽扇豆；4—蠶豆；5—苜蓿；6—豌豆。

然而只有当它們在一定的條件下發育時，才能有這麼大的同化氣態氮素的能力。其中最重要的條件有下列幾個：1.除要有足夠量的可給態氮素外，還必須有充分的豆科植物所需的營養物質；2.豆科植物須有良好的光照條件；3.必須有對於豆科植物的生長、及根瘤菌的生命活動、有着良好作用的土壤溶液；4.根瘤中應該有適應於與這種豆科植物行共生關係的活躍類型的根瘤菌。當所有這些條件都具備時，根瘤菌便能積極地同化空氣中氣態氮素，並充分地保證豆科植物的氮素養料。

由於上述任何一個因素，都很容易在土壤中藉助於採用適當的農業技術措施來調節。所以，在農業實踐中，完全有可能掌握根瘤菌的活躍性，使它們能同化更多的空氣中的氣態氮素。如果當我們栽培豆科植物而不能廣泛地利用大氣氮素時，那末這僅僅是由於沒有採取適當的農業技術措施的緣故。

在土壤裏自由生活着的、能够以空氣中氣態氮素為營養的細菌，是著名的俄國微生物學家 C.H. 維諾格拉斯基於 1893 年發現的。從這類重要的土壤細菌羣中，分離出來的第一種細菌，是巴斯德梭菌 (*Clstr. dinmpasteuria num*)。為了將這種細菌提純進行培養，C.H. 維諾格拉斯基制定了一種專門的方法。這個方法後來被稱為選擇培養法。為了在一定的條件下，分離出能够同化氣態氮素的土壤細菌，他採用了這樣的一種培養基，其中除不含氮素外，含有全部所需的營養物質。在這種培養基中，當然只有具有同化大氣氮素能力的土壤細菌能够發育。這個方法，不僅預先決定了对這種細菌研究的成功，也決定了对於其他同化氣態氮素細菌研究的成功。

C.H. 維諾格拉斯基所分離出來的細菌，是不大能在無氧



圖四 在土壤中自由生活的同化氣態氮素的
細菌—巴斯德梭菌：

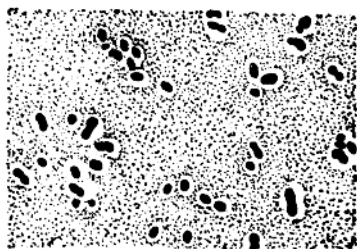
1—早期的培養；2—有孢子的培養菌(約放大1000倍)。

培養基中發育的桿菌(圖四)，它屬於丁酸細菌羣，廣泛地分佈於土壤內。無論應用任何地區的土壤作分析，總是很容易發現它們。對於這種細菌發育最良好的碳素養料的來源，是可溶性醣類。它利用這種可溶性醣類來同化大氣氮素，每克被發酵的糖，可同化2-3毫克的大氣氮素。然而這種細菌祇有當土壤溶液中沒有很多可給態氮化合物的情況下，才能同化氣態氮素。如果在有可給態氮化合物存在的情況下，即使是很少的數量，梭菌就停止同化大氣中氮素的作用，而以現成的氮素化合物為營養，因而失去其氮素積累者的寶貴特性。

荷蘭學者彼依也林克，於1901年，自土壤微生物羣中分離出第二種能夠同化空氣中氣態氮素的自由生活的細菌。這種細菌叫做需氧固氮菌。以後証明了，需氧固氮菌廣泛地分佈於自然界中，同時也發現它有若干變種。這些變種是以具有不同特徵相互區分的。在土壤中最常見的需氧固氮菌的類型，是能形成褐色色素而被稱為圓褐需氧固氮菌(*Azotobacter chroococcum*)的類型。這種細菌在各個不同的發育階段中，外部形態有很大

的變化。最常見的是相聯的雙球形。在球形的周圍常有黏性的莢膜，而球形細胞也能變化。如在早期生長時，它們是巨大的、兩端圓的粗桿狀。當它們進一步發育時，才變為橢圓形，後來又變成圓形（圖五）

在水中，有時在土壤中也發現需氧固氮菌的其他類型叫做游動需氧固氮菌（*Azotobacter agile*）。它的細胞較大，而且有較大的運動性。除了以上所說的以外，發現於各種土壤中的其他類型的需氧固氮菌也被分離出來了。



圖五 在土壤中自由生活的同化氣態氮素的細菌——圓褐需氧固氮菌（約放大1000倍）。

在需氧固氮菌在土壤中發育所必需的全部條件中，具有特別重要作用的是良好的通氣、適宜的溫度、中性反應的土壤溶液，以及具備除可給態的氮化合物以外的其他全部必需的营养物質。

各種有機物大抵都可以作為需氧固氮菌的碳素養料的來源。但其中最重要的是各種的醣類、醇類，特別是在纖維素分解時所形成的有機酸。由於需氧固氮菌對碳素養料的需要量很小，而使它成為可能以大氣氮素豐富土壤的重要的參與者了。

從土壤發展過程的觀點來看，需氧固氮菌在醋酸、丁酸以及由土壤中特殊的纖維素分解菌經常分解纖維素而產生的含氧酸等有機酸上有良好生長的可能性，有着特殊的意義。當所有有利條件都存在時，需氧固氮菌利用1克無氮物質能夠同化15

—20毫克的大氣氮素。這個數量，看來似乎並不算大，如把它折合為利用一噸被分解的有機物質時，則可從空氣中攝取約20公斤的氮素。

除了需氧固氮菌及梭菌外，還有某些土壤細菌，以及一些土壤真菌及藍綠藻也能同化氣態氮素。在這些細菌中，有一種外部形態及其他特徵都很近似於需氧固氮菌的，固氮單胞菌（*Azomonas*）。它們每利用1克有機物質，可以同化約10毫克的大氣氮素。真菌中能同化大氣氮素的是菌根菌的一些代表者。這些真菌不僅能在許多植物根的表面上發育，而且能部分地穿入根的內部。其中的某一些種，能夠同化大量的大氣中的氮素。例如，與石楠科植物共棲的真菌，便具有這種能力。它們被稱為 *Phoma bctae*（真菌基點屬的一個種——譯者註）。關於這種真菌能在提純進行培養的條件下，同化大氣中氮素的證據已得到了。因此，我們可以根據它與石楠科植物營共生作用的能力，說明石楠科植物，通常在含有很少量可被吸收的氮素的砂土上能良好發育的原因。

最後，近來還發現了一些藍綠藻的代表者，也能以大氣中的氣態氮素為營養。一種被稱為念珠藻的藻類及若干其他藍綠藻，已被證明都具有這種能力。雖然它們所同化的大氣中氮素的數量很少，但是由於它們能夠利用空氣中氣態氮素，所以對於豐富土壤中的氮素來說，還是具有重大意義的。

微生物同化大氣氮素的有利條件

上述的土壤細菌、真菌及藻類都能同化大氣中的氮素，把大氣中的氮素吸引到經濟的循環中來。當然它們祇有在良好的條

件下發育，才能完成这种作用。如果我們能在土壤中，創造出对其愈為有利的條件，則它們也將由大氣中同化更多的氮素以肥沃土壤。現在將那些對於同化氣態氮素的微生物的發育（例如對於需氧固氮菌的發育）最有利的條件，分述如下：

第一，祇有当土壤中保證了这种細菌全部所需要的營養來源的情況下（除了可給態氮素養料外），这些細菌才能良好的發育。特別重要的是碳素及磷素養料。例如当磷素缺乏時，需氧固氮菌甚至成了植物磷素營養的競爭者。由於它們要利用磷素以構成自己的軀體，因而就奪去了植物一部分的磷素養料。在這種情況下，植物的產量，當然要比如果在其根部附近的需氧固氮菌不發育時可能得到的產量要低了。

其次，土壤條件也具有很重要的作用，特別是土壤溶液的反應。中性反應對於需養固氮菌的發育、分佈及成活率最為有利。最不適宜的是酸性反應。如果將需氧固氮菌的活躍性的族施用於酸性土壤時，經過一個較短的時間，它便減弱到這樣的程度，以至放在它們所習慣的培養基上，也會停止生長。這種變弱了的需氧固氮菌的培養，其同化氣態氮素的能力大大地減低了，祇能生活於有氮化合物的土壤中。因此，它失去了氮素積累者本身最寶貴的特性。

除了土壤酸度外，其他的土壤條件也有很大的作用。在未開墾的黑鈣土上，例如在苏姆斯基試驗站，雖然这种土壤的反應完全有利於这种微生物的發育，但是需氧固氮菌仍然是缺乏的。雖然在耕作地中有着非常丰盛的需氧固氮菌，而在未開墾地中却不能發現它。由於它在这个試驗站的施肥与不施肥的土壤上，都能一致的生長，顯然可知它在未開墾地上缺乏的原因，

与土壤反应或者这种土壤中营养物质的不足無關。在这个情况下，决定因素應該是土壤的物理性質，特別是土壤的緊密度及其对氧氣供应的不足。在諾苏夫斯基試驗站的無結構土壤上也观察到同樣的情况。即使施用多量的腐肥及礦物質肥料，而由於通氣不良的緣故，需氧固氮菌还是不能在这种土壤中出现。因此，土壤的物理性質對於需氧固氮菌及其他同化氣態氮素的微生物的發育，也有着很大的影响。

細菌同化氣態氮素的过程

大家知道，能够同化大氣氮素的微生物的種類是不多的。同化大氣氮素的过程是怎样進行的呢？這個問題，在剛發現这种農業上重要的土壤細菌羣時，就引起了學者們的興趣。近五十年來，在这方面曾經有过許多不同的推測，然而所有的推測都很少具有充分的理由。雖然也曾發表过氣態氮素与水的活化氮的相互作用的可能性的見解，但却沒有得到充分的有理由的証據觀點。祇在最近期間，主要是由於我們研究的結果，才肯定了需氧固氮菌對於大氣氮素的同化，是藉助於与这种微生物的身体構造有緊密联系的、特殊酶的系統來完成的。

爲了不將这种酶自需氧固氮菌細胞中分離出來而測定这种酶可能具有的化學性質，我們製定並应用了一种特殊的研究方法，藉助於这种方法，已經肯定了这种作用是由於以下重要的化學过程。这种与大氣氮素化合的酶，起初是由局部的氧化而使氮素与它联結起來，然後開始逐漸地还原，而利用这种氮素以構成需氧固氮菌身体的蛋白質。这种过程是由一個反应接着一個反应組成的，十分複雜地進行着。因此，在這裏我們不

能詳細地來敘述它。但是必須指出，解釋這個過程的功勞，是屬於在這個科學領域中獲得巨大成就的蘇維埃學者。

因為由大氣中所同化的氮素是組成氨基酸的成分，而氨基酸又形成需氧固氮菌身體的蛋白質，因此，這種微生物細胞數目的增長，與氣態氮素的同化之間，有着直接的相依關係。同樣地，在被同化的空氣氮素數量與需氧固氮菌所利用的有機物質的化學能量的儲量之間也有着這種相依關係，（每克的化學能量含量，大約可以同化2毫克大氣氮素）順便說明一下，後者的相依關係，表明了需氧固氮菌的呼吸作用與大氣氮素同化之間的相互聯繫。關於氣態氮素同化作用的新理論，解釋了與這種過程有關的全部特性，也包括那些一直到目前尚無圓滿解釋的特性在內。

利用根瘤菌作為細菌肥料——根瘤菌劑

由於根瘤菌具有各種的族和在土壤中分佈的局限性，而可能有這樣的情況，即當豆科植物第一次播種於某一片土壤中時，找不到自己特有的根瘤菌。這時如果不施用這種細菌，那末它們便會表現得和其他的綠色植物一樣，以土壤中的氮素物質為營養。

許多試驗都証明了，當土壤中施入根瘤菌時，便能提高產量。因此，在農業實踐上已經開始製造並應用特殊的細菌肥料——根瘤菌劑。在1912年我們初次製出了根瘤菌劑。最初它們祇是用於試驗栽培方面。其後在農業轉向社會主義發展道路的時代，便開始廣泛地應用這種製劑。在1930年，栽培豆科植物的土地上接種根瘤菌的祇有200,000公頃，1937年則為

780,000 公頃，1940 年是 2,337,000 公頃，現在根瘤菌劑已是更大規模地在應用着。

製造根瘤菌劑的技術並不十分複雜。先將根瘤菌培養於加入 1% 糖的豆煎汁培養基中，然後用所獲得的培養物，感染消毒過的土壤（每公頃半公斤土壤）。在每個裝有土壤的瓶中加入 20—30 毫升的細菌培養物，將瓶子放在 25—30°C 的特殊的房間（定溫箱）中維持 5—8 天。在這期間，根瘤菌便在消毒土壤中發育。當其細胞數目達到每克一億個時，根瘤菌劑便真製成了。

根瘤菌劑使用的方法甚為簡單。主要手續如下：在播種的當天或播種的前一天，將瓶中的根瘤菌劑和以清水，按照每 10 公斤小型種子（三葉草、苜蓿）或 20 公斤大型種子（豌豆、菜豆、箭舌豌豆、羽扇豆等）加水 200 毫升計算。將上法製成的渾濁液與種子均勻地混和，使每個種子都稍稍濕潤。待種子徐徐乾後，便準備播種。所有操作的手續，都必須避開陽光的照射。

根瘤菌劑對於豆科植物的產量的提高，是依土壤條件為轉移的。土壤的酸性反應不僅降低根瘤菌劑在新開墾地區的效力，而且在原先栽種過豆科植物的地區也要求補行接種。因為在酸性土壤中，根瘤菌不到五年就要死，因此在這種地區有必要補行接種。在中性土壤中，它們能較好的保存着，在這種土壤中施用根瘤菌劑很容易引起反應（特別是接種較活躍的根瘤菌的族）。由於在土壤中接種根瘤菌，產量可以大為提高，平均約為 25—35%，大量試驗的結果已經証明了這一點。茲列於表一。

表一

根瘤菌劑的效力（根據大量試驗的材料）

作物名稱	被計算的產物	由於施用根瘤菌劑而提高產量(%)	試驗數目
豌豆	綠色物質	14.0	36
豌豆	籽粒	18.4	240
箭筈豌豆	籽粒	20.5	99
箭筈豌豆	乾草	25.8	20
羽扇豆	籽粒	50.0	50
羽扇豆	綠色物質	56.9	92
三葉草	乾草	38.0	7
苜蓿	乾草	32.6	29
洋扁豆	籽粒	16.1	67
大豆	籽粒	14.8	82
大豆	綠色物質	19.4	56
苜蓿	綠色物質	33.0	29

这种製品，其作用的可靠性也是很高的。如果其中所含的根瘤菌是活躍的培養物，而土壤氣候條件又利於豆科植物的生長，那末根瘤菌劑作用的可靠性可接近於100%。

因為根瘤菌有極大的專化性，祇能感染一定的豆科植物的根系，因此便須製造出各種類型的根瘤菌劑。它祇適宜感染預定的那種豆科植物的種子。在瓶子的商標上必須註明這種根瘤菌劑是供給那一種豆科植物用的。這種說明應該很詳細。

正確地運用農業技術時，根瘤菌劑不僅能提高植物的總產量，而且也能大大提高植物體中及根系殘餘物中的氮含量。因此，在栽種過接種了根瘤菌劑的豆科植物之後，栽種的農作物也常能獲得較高的產量，在重新開墾的地區，由於早先沒有栽種過這種豆科植物，產量增加得特別高，常能增加到一倍，而在氮素缺乏的土壤中，甚至增加兩倍。