洋菇堆肥中分解性微生物之研究

第一報：洋菇堆肥調製中有用之纖維素分解菌之分離及其利用

胡 蟯 賢　　胡 開 仁

一、前　　言

臺灣洋菇生產與外銷事業發展很快，在世界市場上已享有盛譽，但本省洋菇栽培歷史短暫，有關學術研究以及栽培技術等仍待積極展開，雖然栽培面積逐年增加，但是單位面積產量確年年降低，考其減產原因甚多，諸如菌種，堆肥，病蟲害以及管理問題等等。但歸納而言堆肥之調製良否實乃洋菇生產的主要因子之一，現世界各產菇國家均正積極研究此項改進工作，爲謀求增產之關鍵，若賒本而求末無異於椽木求魚，事倍而功半了。

堆肥爲農家最經濟而有效之肥料來源，本省自發展洋菇以來更顯其重要性，初製之堆肥大抵爲不可溶性，殊無肥料價值可言，及至若干時日之堆積，經分解菌類的作用而醱酵分解，以至腐爛，然後提供作物之需要。製作堆肥，方法甚簡，然其巧妙人各不同，製之得法者腐熟均勻，肥分不失，不然則生熟參半，肥力大減。通常堆鬆則孔隙多，空氣流通，好氣菌類繁殖盛，材料易於分解而生高熱，使堆中物質有易乾燥之傾向，至於堆肥緊實則空氣流通不易，嫌氣菌類繁殖盛，物質不易分解，多成腐植質，內部發熱較低。堆肥中之變化異常複雜，約言之可分三種：(1)空氣流通處材料易於乾燥，氧化作用盛，(2)空氣緊閉處材料濕潤，還原作用盛，(3)空氣與濕度適宜氧化及還原作用均不易發生，此三種變化均是使有機物分解，其分解主功則爲細菌及線狀菌，好氣細菌多生於空氣流通，溫度及濕度良好之處，而某些絲狀菌喜生於溫度濕度不高之處。微生物能分解纖維素的不多，其中某種微生物又只限在很窄的環境中促進這種作用，酸度和通氣情形爲控制纖素素分解微生物羣的主要因子，在酸性環境中分解纖維素的微生物主要的是菌類；在微酸性和中性的環境中則主要的爲細菌的作用，如通氣良好則好氣性細菌活躍，如通氣不良則以嫌氣性細菌爲主，是以調製堆肥，其錯綜複雜之關係甚多，非單一因子可成。臺灣洋菇研究工作已粗具規模，改進之處應繼續加强，若僅在表面上費工夫而不探其根本，不但成果不多，而且是一種浪費。本實驗著重於纖維分解菌類之分離及其利用，尚屬首次探討參考文獻不多且也不够完整，是以在小心求證中得到理想成果爲作者的構想。

二、實驗方法及其結果

㈠、菌株來源：

A. 本實驗是在調製堆肥時，分期採取 2 gm. 堆肥材料，經鏡檢後置於大型培養皿中，以無菌水稀釋放置半小時，用吸管吸取 1 ml，移入一盛有 9 ml 無菌水之試管中輕輕振盪，並以同法移入另一試管中，經重覆五次而分離純化所得者。

B. 由日本所引進之原菌株一種。（編號 J_1）

㈡、培養基組成如下：

培養基成分

Sodium nitrate $NaNO_3$	1.0 gm
Dipotassium phosphate K_2HPO_4	1.0 gm
Potassium chloride KCl	0.5 gm
Magneium chloride $MgCl \cdot 6H_2O$	0.5 gm
Yeast extract (10%)	10.0 ml
Cellulose dextrin	10.0 ml
pH	7.2

㈢、分離及培養方法：

A. 由各倍稀釋液中提取 1 ml，移至已殺菌之培養皿中倒入適當之洋菜培養基，順時針及反時針方向各搖振9次並重覆數次，俟培養基固定後分別置入 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C之保溫箱中，經24小時或48小時後可以觀察到許多形狀大小不同之菌落，然後將各菌落分別移入試管斜面培養基中，在同一情況下讓其生長24小時至48小時，此時菌落大體採集完成。

B. 將上列所採集之菌株在同一方法和環境下再行稀釋培養三次，讓其生長發育以便得到更爲純化之菌株，此種菌株分別放入 0°—5°C 之冰箱中保存以作下列各項試驗之用。

㈣、定性試驗和分析：

A. 初步鑑定一種與 ***Bacillus*** sp. 甚爲相近，其爲短桿狀 0.3～0.4×2 microns。Gram 染色爲陰性，外觀棕黃色而具有黏性，編號 UK_2。

B. 初步鑑定另一種與 ***Micrococcus*** sp. 甚爲相近其爲球形， 0.2～0.4 μ diameter。Gram 染色爲陰性，外觀灰白色，編號 WY_2。

C. 菌液對洋菇菌絲之活性試驗：

先製備液體培養基，將菌株分別接入其中， 45°～50°C 間讓其生長 48小時後，以兩個重覆接種洋菇菌種（543號）入內，在 25°C 下觀其有無菌絲發育情形如下。

菌株代號	UK_2	WY_2	J_1	Br_1	CK
洋菇菌種代號543之生長情形	+	+	−	−	−

D. 纖維質分解能力試驗：

製備液體培養基後，以1：10, 1：50, 1：100, 1：500, 稀釋菌液，各取 1 ml 移入於小型三角瓶中，使與 50 ml 培養液適當混合，同時塞入一長條無菌之濾紙條，使底端接觸液面，將此三角瓶放入 40°C, 45°C, 50°C 的保溫箱中 20 日後觀察其菌液浸染面積，同樣取 25 ml 在室溫下以振盪培養方式觀察之，其結果如下：

表一、第一次纖維素分解菌分解能力測定

菌株代號	液體色澤	分解能力	沉澱	漂浮物	pH 值	備註
UK_2	淺黃褐色	＋＋＋	有	無	6.6	有溶解性呈現
W-1	淡白灰色	＋＋	微有沉澱	無	6.8	濾紙呈黑灰色
Br-1	淡白灰色	＋＋	微有沉澱	無	6.8	濾紙呈黑灰色
3-1	灰白色	＋＋	有沉澱	無	6.4	呈黃褐色
AS-2	淺黃褐色	＋＋	有沉澱	無	6.2	呈黃褐色
UK-2	淺黃褐色	＋＋	有沉澱	無	6.2	呈黃褐色
W-2	灰黃色	＋＋	微有沉澱	微有漂浮物	6.6	淺黃褐色
WY_2	淺黃色	＋＋	微有沉澱	白色漂浮物	5.8	白色斑點延伸
CK	灰白色	−	微有沉澱	無	6.8	無變化

註：(a)「＋」號表分解能力强弱，以濾紙條上所變色粘染面積多少之百分比而定。
(b) 菌數量均取 1 c.c. Broth 使入 50 ml 培養液中，菌數約在 10^6/ml。
(c) 溫度以 50°C 爲準所測者。
(d) 製備之液體培養基 pH 值爲 7.0。

表二、第二次纖維素分解菌分解能力之測定

菌株代號	液體色澤	分解能力	沉澱	漂浮物	pH 值	備註
UK_2	淺黃色	++	有	無	6.6~6.8	濾紙呈淺黃色
WY_2	淺灰黃色	++	有	有白體菌體	5.8~6.4	濾紙呈白色片狀
J-1	灰黃色	++	有	無	6.2~6.8	濾紙不甚顯明
Br_1	淺黃褐色	++	微有	微有	6.2	濾紙呈黃褐色
CK	灰白色	−	微有	無	6.6~6.8	

註：(a) 表中註示同表一。(b) 漂浮物有呈薄膜或白色菌體漂浮。(c) pH 值之測定是在 2011 後所測得。(d) 菌株代號之編排無特別表示。J_1 係由日本引進之一種。 Br_1 係由竹蓀上分離者。

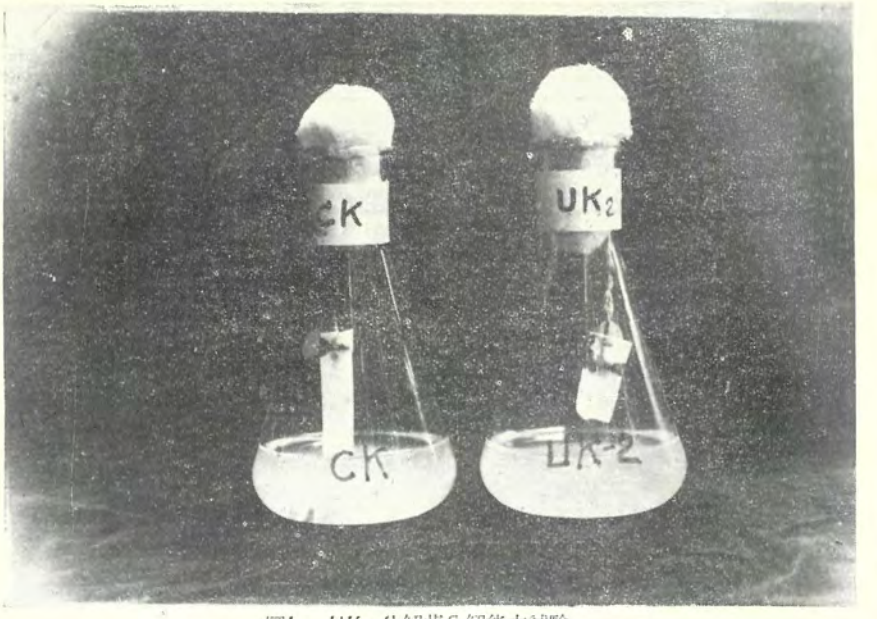


圖1. UK_2 分解菌分解能力試驗

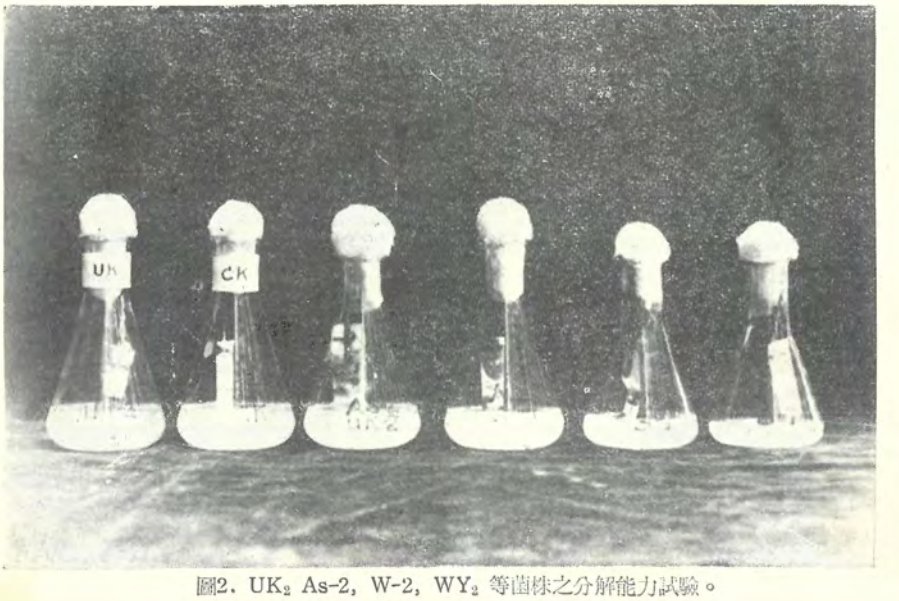


圖2. UK_2 As-2, W-2, WY_2 等菌株之分解能力試驗。

E. 固體培養基的適應性：

將各種固體培養基製備後分別接入下列兩種菌株移入保溫箱觀察其生長發育結果如下：

培養基	*Bacillus* sp. (UK_2)	*Micrococcus* sp. (WY_2)
肉汁培養基	好	好
馬鈴薯培養基	較差	較差
分離用之培養基	好	好
玉米堆肥培養基	好	好

註：以上是在 45°～48°C下培養 24 小時所觀察其生長情形，WY_2 在18 小時內即滿佈試管。

F. 菌液反接種於堆肥材料上之試驗：

(a) 材料：稻稈及一般通用之化肥。

(b) 處理方法：(a)先將稻稈切成3 cm，加入適量比例化肥及水分，經混合後置入大型試瓶中密封殺菌，然後取備妥各菌液 1 ml 注入試瓶中，在 45°C 之保溫箱中讓其生長發育5～8天，後放在25°C 左右之栽培室中，再接入洋菇菌種，觀其菌絲生長發育情形，上列兩菌株都顯示良好，洋菇菌絲滿佈瓶中，15日後覆土於其上，有果實體產生，由於面積所限未作產量上之比較，此尚待下次大面積的栽培，方能作產量統計。(b) 由菌液所製得之粉狀收集品作爲活性促進劑，以同樣方式撒佈於大型培養皿中，此時不考慮其污染程度，使稻稈醱酵分解， 7～10天後接入洋菇菌種，呈現菌絲發育，但效果未達理想，仍待改進。



圖3. 左 加入 WY_2 分解菌後再接種洋菇菌絲之生長情形。
右 未加分解菌即接種洋菇菌絲之生長情形。

G. 菌株保存問題：

菌株之分離不難，但定性利用，及保存等問題則必要周詳計劃和求證。例如菌株保存當經過移置後，由於某種內外在的因子已有退化的情形發生，尤以好熱性的菌株更甚，當第一代是在55°～60°C 分離出來，但至第三代在 55°C 下即生長不够旺盛，目前以下列方式進行試驗。

(a) 將菌株分別置 0°C及5°C 之冰箱中保存至三個月後繁殖試驗證明顯示發育有不良之情形。

(b) 在 2 mm Hg 下眞空抽氣密封置 5°C 保存 12 個月後，破管移置， 仍見其生長發育，且情況良好。

(c) 菌液以 10 ml 刻度之沉澱管在 3000r.p.m. 離心沉澱 20 分鐘，低溫抽乾移入小試管保存，此尚未作繁殖試驗，仍置於低溫下保存之。

三、結　　論

在自然界中植物體之構成，大抵爲纖維素類、澱粉類、醣類、脂肪類等等，由於微生物的活動而引起分解作用，最後生成水分及二氧化碳飛散於空氣中，在其循環作用中間，可予農業上之利用價值，堆肥卽是其中一例。纖維素的分解及對堆肥的成熟而增加其肥效度，這種工作者爲分解菌類的微生物，如細菌類，絲狀菌類等。再細分其適應性又分好氣性，嫌氣性，好熱性等。今就堆肥中好熱性菌類而進行之探討。纖維素爲微生物分解利用早在1850年卽有報告證實，該細菌類具有分解酵素(內生與外生)，其活動微妙而複雜，至今尙在探研其過程。土壤中的微生物對於落葉枯枝以及其他有機物的分解使得大自然物質循環，擔任了重要之角色，尤其對於農業上的重要性是不可忽視的，堆肥是直接供給洋菇生長上所需之營養物質，其材料之調配與製造是否適當直接影響洋菇生產。堆肥之成熟度，養分率等與分解菌類甚爲相關，通常堆肥中施以化肥，其主旨也是在促進微生物的繁殖。故堆肥中予以適當環境，讓其生存繁殖，使其在分解代謝過程中能提供有價值的養分給於洋菇菌絲是我們的目標。今考其堆肥中最先所起變化爲有機物及含氮物質之分解，在空氣及濕度適宜之處，有機質中之含氮質卽變爲 NH_3 HNO_2—HNO_3 碳質爲 HCO_3^- 若空氣及濕度不適之處則化 NH_3 爲氮氣，化碳水化合物爲一部份成碳和水，一部成腐植質。生成種種可溶性之有機物，無機物及揮發性物質，此外尙有脂肪酸醱酵作用，硫鹽化合物醱酵作用，尿素分解作用，腐敗作用，硫化氫生成作用，凡此種種均爲微生物之功。至1912年也有分解菌類之報告，1931年Waksman. S.A. 和 Stevens 又作進一步的研究報告證實。本實驗曾提出此菌液對洋菇菌絲有活性之功能（另兩種卽有抑制作用）且均能抗熱（45°～55°C)。故初步顯示證明有被利用之價值，設若在適當情形下大量繁殖，俾使堆肥材料分解不急不緩，發揮其功能而無養分損失。據國外報告，歐美已有堆肥公司之設立，利用人工培養之菌株，卽所謂活性劑，確能發揮其功效，本菌株也可抽提產物以供推廣，惟產物不多，仍待繼續研究。

四、摘　　要

由於環境所限，無法收集馬廐材料栽培洋菇，因而以人工方法調配，其主要材料來源爲稻稈，植之經年，堪可媲美馬糞材料，但仍待改進之處尙多。洋菇減產，堆肥調製未能臻善也爲主要因素之一，是以堆肥製作良否，不但影響洋菇產量而且尙能引起各種病蟲害的發生，故堆肥實爲種植洋菇最基本且重要的一項因子。實驗的目的是在尋求富於營養之洋菇栽培材料及分離優良品系之纖維素分解菌類，藉以促進堆肥材料之醱酵分解，求得適宜之代謝產物，提高堆肥養分並求節省堆製時間。本次實驗是在堆肥調製期中，分期採取含有纖維素分解菌類之堆肥，携至室內，鏡檢，分離培養，再行純化，定性，而後反接種於纖維質類上鑑定其分解能力以及對洋菇菌絲發育上的比較測定，期以對於人工調製堆肥有所助益。

實驗結論如下：

㈠ 由分離出之分解菌類分別在濾紙上行分解能力試驗，經過 4 週至 8 週觀察結果，顯示其分解能力上之差異性。

㈡ 精選較優的細菌類兩種再作分解能力試驗，經 4 週的觀察，顯示其分解能力良好。

㈢ 此兩項菌株經初步鑑定爲 *Bacillus* sp. Gram staim（革蘭氏染色）爲 negative 及 *Micrococcus* sp. 亦爲 negative 其適宜生長溫度在 45°～60°C 之間，後者更適於 55°～60°C 之間。

㈣ 菌液有促進洋菇菌絲的活性。

㈤ 另一菌類及兩眞菌類其分解能力甚好，但對洋菇菌絲生長似有阻礙。僅保留菌株尙未作進一步之研判。

㈥ 菌液接種於堆肥材料上與未接種之材料，同時進行比較，由色澤及污染面積上觀察前者較

優。

㈤ 上項接種之堆肥材料經種植洋菇菌種其菌絲發育也優，但鮮菇產量只呈現少微差異，此仍待較大面積之種植（兩坪以上）後，統計方爲正確。

㈥ 此菌液可與塡充材料混合作成粉狀及液狀成爲一種活性促進劑可予製作堆肥施用上有較多之便利。

五、參 考 文 獻

1) 土壤微生物學　板野新夫　昭和16年　日本東京興文社
2) 微生物學　日本微生物學會　昭和37年　日本東京技堂
3) 土壤微生物學　陳華癸　民國47年　正中書局印行
4) 洋菇菌種長期保存方法　胡開仁、朱細福 農業研究 Vol 14.　民國54年　臺灣省農業試驗所
5) Soc. Amer Bact. (1957) Manual of Microbiological method.
6) Bergey's Manual of determinative bacteriology 6th (1948).
7) Alexander M. (1961) Introduction to soil microbiology.
8) Mushroom science 1959-1966 Vol. I-V.
9) Hulchin H. B. and J. Clayton On the decomposition of cellulose by aerobic organism Jour. Agric. Sci. Vol. 9. 143. (1919).
10) Waksman S. A. The original and nature of the soil organic matter or soil "Humus" Soil Sci. Vol. 323, (1926).
11) Waksman (1952) The principle of soil microbiology.

MICROORGANISMS OBTAINED FROM THE SYNTHETIC MUSHROOM COMPOST

I. The Isolation, Characterization and Utilization of Cellulolytic Bacteria in the Synthetic Compost

By

J. S. Hu & K. J. Hu

SUMMARY

Proprietary composts or materials without horse manure have been available for many years. A formula for making compost from rice straw and standard fertilizers was developed by many workers. Several other synthetic composts are in fairly widespread use in some areas, these generally make use of materials not easily obtainable on Taiwan, The development of the short-composting process war carried out. It is most important to get rapid fermentation. This is done by having a stack with a loosely packed core which ensures aerobic compost. Meanwhile we put the isolated cellulolytic bacteria on the bed as an "activator". These efforts have been so successful that it is now possible to prepare a good compost within less than two weeks of composting in the stack. We could even make commercial products for short-composting. This is the aim: produce a suitable compost without losses.

Five grams or more of wet compost were sampled into a sterilized bag and brought to the Laboratory of Edible Mushroom Research, Taiwan Agricultural Research Institute. Isolations were made for free living aerobic cellulolytic bacteria on modified Fullon's medium. IO colonies of decompositers havn been isolated. Two strains among the IO colonies havr been characterized physiologically as well as morphologically. The isolated strains UK-2 and WY-2 are in agreement with the description of *Bacillus* sp. and *Micrococcus* sp. of Bergey's mauual reports.

Two strains were studied individually under aerobic conditions. These involved in cellulose degradation by using different media. A good results could be obtained by utilizing the filter paper in pure culture. It was found that they were in the cell counts at various temperature and pH-value. There is a significant increase in the number of bacteria if the nitrogen supply is adequate. The growth rate at the cultural age is between 18 and 24 hrs. through the observation seems to have a maximum growth at the temperature of more than 45°C and ca. pH 7.2 for these strains. It has been proposed that the bacteria are the main agent of cellulose degradatien in semi-arid condition and they do not inhibit the mushroom mycelium. We have modified the synthetic compost of rice straw together with

chemical fertilizers and trace elements. It is now proved to be a commercial propsition. A satisfactory solution to this problem is still awaited. It is postulated that these strains are affected by many factors such as pH, temperature and other nutrients. On the other hand, we have emphasized the effects of environment and other nutrient materials which will be coutinued for for further studies.