中華農業研究（Jour. Agric. Res. China ）34(1)：064～070 (1985)

稻草分解促進土壤固氮活性及稻草分解菌與固氮菌共生之研究[1]

簡宣裕　林錫錦[2]

摘要：本試驗在探討固氮菌及纖維分解菌於稻草分解過程中是否有共生現象及稻草施入土中對固氮微生物固氮能力之影響。由試驗分離出3種固氮菌，9種纖維分解菌。試驗結果得知9種纖維分解菌不具固氮能力，但能產生甲烷。固氮菌中有一株於無氮培養基中之固氮活性可達 670 n mole N_2 fixed/hr/20 cc. liquid culture medium，其餘二株固氮能力微弱。固氮菌接種於纖維素中，不具固氮能力，但是接種於稻草中則有少量固氮現象，若將纖維分解菌與固氮菌同時接種於稻草及纖維素中，則固氮菌之固氮活性，纖維分解菌之甲烷生成量皆有顯著增加的趨勢，顯示纖維分解菌與固氮菌於稻草分解過程中營共生互利的現象。旱田及水田中稻草的固氮活性分別爲稻草附近土壤的10倍及 100倍以上，顯示稻草埋入土中經纖維分解菌分解後產生可供固氮微生物利用的養分擴散範圍不大，而集中於分解中稻草上。土壤水分含量20%及溫度 10°C 可視爲固氮菌繁殖之臨界條件，低於此則田間土壤固氮活性很小。

水稻爲本省主要作物，每年稻草產量接近三百萬噸，少數提供造紙及洋菇堆肥材料，多數焚燒於田中。焚燒造成環境染汚，而且道路兩旁焚燒稻草易因煙霧造成車輛肇事，若能儘量埋入田間，可由纖維分解菌分解稻草釋放出養分，一方面可供給作物生長（1），另一方面供應固氮菌活動能源進行固氮，累積氮肥於土壤中，以供作物利用。針對此目的乃進行下列試驗：1.稻草施於土中，對固氮微生物固氮能力之影響。2.稻草纖維分解菌及固氮菌之分離培養，探討稻草纖維分解菌與固氮菌是否有共生現象。

材料與方法

一、稻草掩埋於土中，對於微生物固氮能力之影響：

1.水田與旱田之固氮活性比較：

分別在本所21號水田及16號旱田（土壤性質相似）進行，將11kg之稻草條埋入 30m² 範圍內（埋入土中5cm），於不同時間後採取稻草，稻草附近2cm內之土壤及遠離稻草處之土壤樣本，各採二重複，以乙炔還原法測定固氮活性。

2.溫度及水分對固氮活性的影響：

將風乾過篩30g之水田土或旱田土及0.5g乾稻草放入50ml之三角瓶中，於不同水分含量及溫度下孵育，水分分4級：10%、20%、30%（接近飽和）、40%（浸水）。溫度亦分 4 級：10°C、20°C、30°C、40°C，共16處理，每處理採二重複。定期取樣測定固氮活性。

1.臺灣省農業試驗所　研究報告第 1200 號。

2.本所農化系助理研究員、研究員。臺灣省　臺中縣　霧峰鄉。

二、探討固氮菌與纖維分解菌是否有共生現象：

1.稻草纖維分解菌及固氮菌之分離培養：

分解中之稻草採樣在實驗室中，利用乙炔還原法先測定是否有固氮能力，將有固氮能力之稻草留下進行菌之分離純化。

（1）稻草纖維分解菌之分離純化：將分解中稻草置於 Dubo's salt 液體培養基中加强培養，經幾次繁殖後，纖維分解菌加入無菌水稀釋，於 PDA 固體培養基上劃線分離純化單一菌種。

（2）固氮菌之分離純化：將分解中具有固氮活性之稻草加入無菌水稀釋成懸浮液，然後將此懸浮液於無氮固體培養基劃線分離出純菌。

2.固氮菌與纖維分解菌共生現象之探討：

（1）固菌氮、纖維分解菌於無氮培養基中之固氮活性及甲烷生成量之測定：純化的固氮菌、纖維分解菌接種於 50ml 之三角瓶，內含 20cc. 無氮液體培養基，採二重複，經 24小時 30°C培養後用乙炔還原法測定固氮活性及利用氣體色層分析儀（Gas Chromatography）測定甲烷生成量。

（2）固氮菌、纖維分解菌於纖維素、稻草中固氮活性及甲烷生成量之測定：
將純化之固氮菌、纖維分解菌分別接種於內含 1g 纖維素、稻草之 50ml 三角瓶中，用液體基本培養基調水分至60%，經 6 星期後，測定固氮活性及甲烷生成量。

（3）固氮菌、纖維分解菌同時於纖維素、稻草中固氮活性及甲烷生成量之測定：
純化之纖維分解菌、固氮菌，一一混合後分別接種於含纖維素、稻草（1g）之 50ml 三角瓶中，經 6 星期後測定其固氮活性及甲烷生成量。

結果與討論

一、水田旱田之固氮活性：

試驗期間之田間土壤溫度，上午08：30—09：00爲 27—32°C下午04：30—05：00爲29—38°C。土壤水分含量旱田土爲15—20%，水田土爲30—35%。埋於旱田土之稻草水分含量爲30—54%，水田土中之稻草水分含量爲49—59%。試驗結果由表 1 可得知旱田土無固氮活性。稻草附近之旱田土除了在第五星期取樣時有 0.13 n mole N_2 fixed/g dried soil/hr 外，其餘時間取樣沒有固

表1. 稻草埋入土中（5cm）對土壤固氮活性之影響

（n mole N_2 fixed/g dried soil or straw/hr）

稻草埋入後之星期	旱田土	稻草附近之旱田土	旱田中之稻草	水田土	稻草附近之水田土	水田中之稻草
2	0	0	2.30	0	0	53
3	0	0	0	0	0	320
4	0	0	0	0	0	84
5	0	0.13	2.00	0.18	0.16	250
6	0	0	15	0.13	0.45	200
7	0	0	0	0.14	0.21	310
8	0	0	0	0.10	0.46	360

氮活性。水田土及稻草附近之水田土從第 2 星期至第 4 星期亦無固氮活性，從第 5 星期起其固氮活性大小分別爲0.10—0.18 n mole N_2 fixed/g dried soil/hr 及 0.16—0.46 n mole N_2 fixed/g dried soil/hr。旱田中稻草於第 2 、 5 星期及第 6 星期取樣時有 2.00—15 n mole N_2 fixed/g dried straw/hr 之固氮活性，當時稻草水分含量爲 49—54%，而其他時間稻草水分含量介於 30—50 %，水田中稻草於第 2 星期至第 8 星期取樣時有 53—360 n mole N_2 fixed/g dried straw/hr 之固氮活性，由此可知稻草之水分含量對於固氮細菌之繁殖及固氮活性影響很大。由本試驗結果可估算出田間每公頃埋入 1 噸稻草可促進土壤固定空中氮素量，每日最高量於水田可達0.24公斤旱田爲0.01公斤。又由表 1 可發現旱田中稻草及水田中稻草的固氮活性可分別爲稻草附近土壤的10倍及 100倍以上，此表示稻草埋入土中經纖維分解菌分解後產生可供微生物利用之養分（1 、 3 、 5 、 6）擴散範圍不大，而集中於分解中之稻草上，供固氮菌及其他微生物利用。由旱田中稻草及水田中稻草之固氮活性差異可顯示出分解中之稻草固氮活性受到附近土壤通氣影響甚大（5 、 6 、 7），稻草分解後之固氮活性在水田厭氣情況下高於通氣較好的旱田，厭氣性固氮菌之族羣及其固氮活性大於好氣性固氮菌者。

二、溫度與土壤水分含量對固氮活性的影響：

由表 2 、表 3 可知溫度於 30°C 最適宜固氮菌之繁衍及固氮（2 、 4），其次爲 40°C，再次爲 20°C 而 10°C時固氮活性幾乎停止，而只有在厭氣性環境（土壤接近飽和及浸水）下有微弱固氮活性，土壤水分低於20%，整個瓶內之固氮活性受到很大限制，此與田間試驗結果相似，顯示出土壤水分含量少於20%，溫度低於10°C時有抑制固氮菌繁殖及固氮活性的現象。又由表 2 表 3 發現稻草埋入水田土，在瓶內之固氮活性優於稻草埋入旱田土，此與田間試驗結果相同。

表2. 稻草埋入土中於不同溫度、水分經 2 星期後之固氮活性

(n mole N_2 fixed/flask/hr)

溫度		無稻草土壤水含分量				埋入稻草土壤水分含量			
		10%	20%	30%	40%	10%	20%	30%	40%
水田土	10°C	0	0	0	0	0	0	0.09	0.06
	20°C	0	0	0	0.11	0	0.15	0.44	1.00
	30°C	0	0	0.07	0.18	0.81	9.10	160	150
	40°C	0.16	0.19	0.24	0.35	0.16	2.20	8.00	4.80
旱田土	10°C	0	0	0	0	0	0	0	0.26
	20°C	0	0	0.08	0.07	0	0	0.40	0.63
	30°C	0	0	0.16	0.61	0	0.39	14	10
	40°C	0	0	0.37	0.56	0.32	0.49	0.49	0.53

表3. 稻草埋入土中於不同溫度、水分經4星期後之固氮活性
(n mole N_2 fixed/flask/hr)

溫度		無稻草土壤水分含量				埋入稻草土壤水分含量			
		10%	20%	30%	40%	10%	20%	30%	40%
水田土	10°C	0	0	0	0	0	0	0.10	0.07
	20°C	0	0	0	0	0	0	0	0.28
	30°C	0	0	0.74	0.75	0.65	1.70	15	23
	40°C	0	0.21	0.11	0.66	0	0	0.94	8.80
旱田土	10°C	0	0	0	0	0	0	0	0.09
	20°C	0	0	0	0.02	0	0	0	1.50
	30°C	0	0	0.18	0.76	0	1.20	4.50	4.00
	40°C	0	0	0	0.29	0	0	0.88	2.50

三、固氮菌與纖維分解菌於無氮培養基中之固氮活性及甲烷生成量：

本試驗中由分解中之稻草分離純化出3種固氮菌9種纖維分解菌，由表4得知9種纖維分解菌不具有固氮活性，3種固氮菌於液體無氮培養基中有一株固氮活性可達670 n mole N_2 fixed/flask/hr，其餘二株固氮分別只有3.1、7.2 n mole N_2 fixed/flask/hr 微弱的固氮現象。9種纖維分解菌與3種固氮菌於無氮培養基中皆不生成甲烷，此表示3種固氮菌於生長代謝過程中不產生出甲烷，9種纖維分解菌雖可由培養基取得碳源，但因本身不具固氮活性，又沒有氮源供給新陳代謝

表4. 固氮菌及纖維分解菌於無氮培養基中之固氮活性及甲烷生成量

菌種	固氮活性 n mole N_2 fixed/flask/hr	甲烷生成量 n mole CH_4 produced/flask/hr
C_1	0	0
C_2	0	0
C_3	0	0
C_4	0	0
C_5	0	0
C_6	0	0
C_7	0	0
C_8	0	0
C_9	0	0
N_1	3.1	0
N_2	670	0
N_3	7.2	0

每50ml三角瓶含20ml無氮培養基，C_1—C_9, N_1—N_3分別代表分離純化之9種纖維分解菌及3種固氮菌。

所需，故無法生長，釋放出其他氣體出來。

四、固氮菌與纖維分解菌於纖維素、稻草中之固氮活性及甲烷生成量：

由表 5 得知純化所得固氮菌於稻草中有微弱固氮活性，由0.02至0.12 n mole N_2 fixed/g dried straw/hr，而於纖維素基質中則沒有固氮現象，此表示稻草本身即含有少量能被固氮菌利用之物質，而纖維素不能直接當做碳源供給固氮菌生長利用，纖維分解菌於稻草或纖維素基質分別有 0.55 n mole CH_4 produced/g dried straw/hr及 0.30 n mole CH_4 produced/g dried cellulose/hr 之甲烷生成。

表5. 固氮菌、纖維分解菌於稻草、纖維素中之固氮活性及甲烷生成量

菌種	稻草基質					纖維素基質				
	9C	3N	N_1	N_2	N_3	9C	3N	N_1	N_2	N_3
固氮活性	0	0.10	0.03	0.12	0.02	0	0	0	0	0
甲烷生成量	0.55	0	0	0	0	0.30	0	0	0	0

9C, 3N 分別代表分離出之 9 種纖維分解菌混合及 3 種固氮菌混合。固氮活性單位：n mole N_2 fixed/g dried straw/hr。甲烷生成量單位：n mole CH_4 produced/g dried straw or cellulose/hr。

由表 5 表 6 表 7 可發現固氮菌之固氮活性及纖維分解菌之甲烷產生量，接種於稻草基質時優於纖維素中。將表 5 表 6 表 7 相互比較結果時又可發現當固氮菌與纖維分解菌單獨接種於稻草或纖維素時固氮菌之固氮活性很微弱或不存在 (0—0.12 n mole N_2 fixed/g dried straw/hr)，纖維分解菌之甲烷生成量較少 (0.30—0.55 n mole CH_4 produced/g dried straw or cellulose/hr)，當固氮菌及纖維分解菌同時接種於稻草或纖維素中，則固氮活性、甲烷生成量有增加的現象(固氮活性爲2.3—86 n mole N_2fixed/g dried straw/hr，甲烷生成量可達5.50 n mole CH_4 produced/g dried straw/hr) 此表示於稻草分解過程中固氮菌與纖維分解菌有互利共生時期存在。若將表 1 和表 6 比較，可發覺將純化之菌相互混合接種於單位乾重之稻草中，其固氮活性遠小於將單位乾重稻草埋入土壤中時，其原因可能是稻草分解過程中牽涉許多種纖維分解菌及固氮菌，土壤中含有各類微生物可以來完成此項工作，而人工純化所得之菌只有土壤中之一部份而已。

表6. 固氮菌、纖維分解菌共同接種於稻草基質之固氮活性及甲烷生成量

固氮菌 \ 纖維分解菌	固氮活性 n mole N_2 fixed/g dried straw/hr									甲烷生成量 n mole CH_4 produced/g dried straw/hr								
	C^1	C_2	C_3	C_4	C_5	C_6	C_7	C_8	C_9	C_1	C_2	C_3	C_4	C_5	C_6	C_7	C_8	C_9
N_1	6.9	4.3	3.3	7.6	4.8	7.5	3.8	7.5	5.4	470	110	145	255	180	195	125	120	130
N_2	30	15	15	15	7.6	57	15	23	86	170	140	65	50	60	20	37	0	4.5
N_3	2.3	3.4	8.5	13	3.4	5.7	13	4.5	19	160	155	185	140	165	550	290	6.5	145

表7. 固氮菌、纖維分解菌共同接種於纖維素基質之固氮活性及甲烷生成量

固氮菌 \ 纖維分解菌	固氮活性 n mole N_2 fixed/g dried cellulose/hr									甲烷生成量 n mole CH_4 produced/g dried cellulose/hr								
	C^1	C_2	C_3	C_4	C_5	C_6	C_7	C_8	C_9	C^1	C_2	C_3	C_4	C_5	C_6	C_7	C_8	C_9
N_1	3.7	0	0	3.1	0	0	4.5	0	0	0	0	0	210	0	245	205	0	215
N_2	5.0	0	8.5	9.2	0	12	0	0	0	0	0	220	155	0	0	95	0	0
N_3	2.3	3.4	8.5	13	3.4	5.7	13	4.5	19	160	155	185	140	165	550	290	6.5	145

參考文獻

1. Castellanos J. Z., P. F. Pratt. 1981. Mineralization of mannure nitrogen correlation with laboratory index. S. S. S. A. J. 45 : 354-357.
2. Ezedinma, F. C. C., N. N. Agbin and S. S. C. Dnyekwel. 1979. The contribution of symbiotic nitrogen-fixation to the nitrogen economy of natural ecosystems. Plant and Soil 51 : 503-513.
3. Giallo J., Gandin C., J. P. Belaich. 1983. Metabolism of glucose and cellobiose by cellulolytic mesophilic clostridium sp. Appl. Environ. Microbiol. 45(3) : 843-849.
4. Lee, K. K. T. Castro, and T. Yoshida. 1977. N_2-fixation throughout growth and varietal differences in N_2-fixation by the rhizosphere of rice planted in pots. Plant and Soil. 48 : 613-619.
5. Norris J. R.. D. W. Ribbons. 1970. Methods in Microbiology. Vol 3A : 93-133.
6. Smith J. H., C. L. Douglas. 1971. Wheat decomposition in the field. S. S. S. A. P. 35 : 269-272.
7. Tisdale, S. L., W. L. Nelson. 1975. Soil fertility and fertilizers. Third edition. Page : 129-131.
8. Watanabe I., K. K. Lee, B. V. Alrinagno . 1977. Biological N_2-fixation in paddy field by in situ acetylene-reduction assays. IRRI . Research Papers Seires.
9. William D. P. Stewart. 1966. Nitrogen fixation in plants. Lecturer in botany at Westfield College, University of London. Page : 1-137.
10. Yoshida, T. and R. R. Ancajas. 1971. N_2-fixation by bacteria in the root zone of rice. Soil. Sci Soc. Am. Proc. 35 : 156-157.

Study on the Symbiotic Relationship between Cellulolytic and Nitrogen-Fixing Microorganisms[1]

S. Y. Jean and C. J. Lin[2]

Summary

The purposes of these experiments were to investigate if there is any symbiotic relationship between cellulolytic and nitrogen-fixing microorganisms and the effect of rice straw buried in soil on the nitrogen-fixing activity of soil systems. Three strains of nitrogen-fixing microorganism which could not produce methane gas and nine strains of cellulose-decomposing microorganism which could not fix nitrogen, but could produce methane gas were isolated and purified from the decaying rice straw.

The results indicated that symbiotic relationship existed between the isolated cellulolytic and nitrogen-fixing microorganisms. The nitrogenase activity of soil systems and the activity of cellulolytic microorganisms were increased when rice straw buried in soils. The nitrogenase activity of decaying rice straw was 10 folds and 100 folds of the soil next to and far from the decaying rice straw, respectively. This indicated that the nitrogenase activity of soil systems were concentrated on the decaying rice straw. When the soil water content lower than 20% and soil temperature below 10°C inhibited the propagation of nitrogen-fixing microorganisms and their nitrogenase activity. The nitrogenase activity of paddy soil was greater than that of the upland soil.

1. Contribution No. 1200 from the Taiwan Agricultural Research Institute.

2. Assistant Agricultural Chemist and Senior Soil Microbiologist of the Dept. of Agri. Chem., respectively. Taiwan Agricultural Research Institute, Wu-Feng, Taichung 431, Taiwan, ROC.