固氮菌的應用及發展

楊秋忠
國立中興大學土壤研究所

摘　要

肥料三要素氮、磷、鉀中，唯一能來自大氣中的是氮，但此種氮氣不能直接被植物利用，需要將氮氣轉化成氨才能被植物利用，將氮氣轉化爲氨的過程謂之「固氮作用」。生物固氮是自然界的固氮微生物的作用，氮氣經由固氮細菌、放線菌或藍綠藻之固氮酵素轉化成爲氨態氮，其中農業上最多的是屬於根瘤菌。根瘤菌的應用上可以減少施用氮肥，減少環境中氮的污染及土壤酸化，可提高豆科的產量及品質，並增進土壤肥力及健康。固氮菌的應用上以篩選優良菌種爲首要工作。在台灣大豆根瘤菌之生理生化的研究已有相當之報導。

田間試驗中，接種根瘤菌，結果發現對大豆、毛豆、花生、銀合歡產量較未接種的處理均有增加。接種根瘤菌及菌根眞菌到台灣的六個試驗地，結果顯示單獨接種根瘤菌的處理明顯增加大豆根瘤生成、瘤重及固氮酵素之活性，而對大豆產量有高達134%之增產；而雙重接種根瘤菌及菌根菌，對大豆產量之影響範圍有達145%之增產。固氮菌在台灣研究發展已邁向多功效及多作物應用之菌種，除具固氮作用外，已篩選出固氮溶磷之菌種，並已初步完成非豆科與根瘤菌形成根瘤之研究發展，將使固氮菌成爲多目標用途之菌種。

關鍵字:生物固氮、共生固氮、協同固氮、非共生固氮、根瘤菌

前　言

肥料三要素氮、磷、鉀中，唯一能來自大氣中的是氮，雖然大氣存有大量的氮氣(N_2)，但此種氮氣不能直接被植物利用，需要將氮氣轉化成氨才能被植物利用，將氮氣轉化爲氨的過程謂之「固氮作用」，固氮作用主要包括「生物固氮」及「工業固氮」。生物固氮是自然界的固氮微生物的作用，氮氣經由固氮細菌、放線菌或藍綠藻之固氮酵素轉化成爲氨態氮，其中農業上應用最多的是屬於根瘤菌，根瘤菌進入豆類的根部，並形成根瘤，固定氮素供應植物氮源[11]。豆類接種適當的根瘤菌，可以固定的氮素，獲得氮肥營養。禾本科及其他非豆科作物根圈周圍生存的固氮菌，可以提供植物少量氮素，也有保護根系的功能。土壤中有大量的游離固氮菌菌種，其單位面積固定氮素雖然比共生(symbiotic)及協同(associative)固氮較小，但且在大地中默默耕耘者，至今在農業應用固氮菌上仍以根瘤菌的應用爲多[4]。

本文將以基礎瞭解生物固氮作用之種類及特性，進而瞭解台灣研究本土固氮菌的情況及本研究室在固氮作用的研究結果。

土壤中固氮菌的種類及作用

土壤中固氮菌的種類甚多，但都是屬於無細胞核的原核生物(prokaryotes)，包括有細菌(有機營細菌、光合硫化細菌、根瘤菌)、放線菌、藍綠藻等[11](表一)，其中在生態的系統上又可區分爲

游離性(free-living)、協同性(associative)及共生性(symbiotic)的固氮作用。游離性之固氮菌是分布在陸地及水體中，協同性固氮菌則分布在根圈及葉圈上，因未形成特殊構造，與共生性固氮菌有特殊構造(如瘤狀或囊狀)不同。

生物固氮的固氮酵素之作用能力甚廣，能還原氮氣(N_2)轉化成氨(NH_3)外，尚能還原乙炔(C_2H_2)成乙稀(C_2H_4)，氰(CN^-)還原成氨(NH_3)及甲烷(CH_4)等等的工作，此類物均含N≡N，N≡C，或C≡C之物質，如表二所示[12]，而對C≡O則無法作用。固氮酵素的環境中是需要無氧條件下，因此在菌體或根瘤內都需要保護之系統，如多醣、構造蛋白質或豆血紅素的隔絕保護，或將氧氣消耗等等作用，如呼吸作用的效率增加及減少該區域之光反應等。

固氮作用的重要性

根瘤菌的應用上可以減少施用氮肥，減少環境中氮的污染及土壤酸化，提高豆科的產量及品質，並增進土壤肥力及健康。減少化學氮肥施用，有助節約消耗不可再生性能源的目標。Schubert and Wolk[13]指出豆科固氮作用所消耗植物本身的能量，約等於植物吸收及利用硝態氮(NO_3^-)的能量，解開以往只對豆科固氮耗能的誤解(表三)。生物接種劑生產成本低及應用簡便，而在生產氮肥則消耗大量能源及運輸施用經費等，需要重視，但根瘤菌只限在豆科上應用，非豆科及禾本科則有待研究。

固氮菌的應用上以篩選優良菌種爲首要工作，需從分離及純化後，進行初步溫室及最後的田間篩選工作，篩出適應性及共生性佳的品系，以混合菌株的接種劑做爲應用的菌種。根瘤菌的接種劑在應用上甚爲簡便，只要與種子混合後即可播種，使用菌液量每公頃約爲2～4公升，而在台灣一般常見毛豆每公頃使用尿素約在200～400公斤，相比之下，即見使用根瘤菌省時、省錢及省力。

台灣現階段生物固氮的研究及應用

在全世界固氮應用發展上已有相當基礎[1]，台灣現階段在生物固氮的研究及應用以共生性固氮微生物爲多，協同性及游離性的微生物之研究則甚爲缺少[7]，以下分別簡要提台灣現階段的情況:

1. 共生固氮作用:

(1)豆科:

1. 農產生產:豆科作物與根瘤菌共生固氮的研究已有相當的基礎，在應用上已發展數種豆科(如毛豆、大豆、花生等)根瘤菌之接種劑，農委會及農林廳已進行毛豆接種劑之示範推廣，在根瘤菌之生理化之研究已有部份成果，由於台灣大豆快生型根瘤菌之發現及遺傳質體的分離，將有助國內根瘤菌之發展。
2. 牧草:只有埃及三葉草使用接種劑，其他豆草固氮研究甚少。
3. 林木:豆科樹種之固氮菌(銀合歡、相思樹)已有菌種之研究，其中以銀合歡根瘤菌雖已完成，但受蟲害影響，未配合用。

(2)非豆科:

研究則以林木樹種及禾本科爲主，曾有少數樹種(如赤揚)爲研究對象，而至今以菌種之分離爲多，尙未達應用階段。水田滿江紅與藍綠藻共生之應用也有甚多的報告，由於人工及殺草劑之影響，未被應用。促進禾本科形成根瘤之研究在台灣已有初步結果，但固氮能力之加強有待研究。

2. 根圈固氮:

研究以農藝作物爲主，研究上曾分離菌種及進行田間試驗階段，但只有少數作物進行試用，以玉米及牧草爲主，有增產之效果報告，但未達應用階段。

3. 游離固氮:

研究是以土壤及水田之微生物爲主，其中在國內以藍綠藻之研究較多，主要以生理生化研究爲主，應用研究尙少。

固氮研究方面尙缺乏對抗逆境之選拔，例如可抗其他病害微生物及各種環境之壓力，如乾旱、農藥、炎熱等。育成對土壤適應性廣，又能有高固氮之豆科甚爲重要，如高光合作用、低光呼吸及延長固氮期之豆科作物，並未重視。

根瘤菌之研究及應用

本研究室多年來主要在固氮菌、溶磷菌及菌根菌之研究上，其中有關固氮研究是以共生根瘤菌爲多，以下分別說明各項研究情況:

1. 優良根瘤菌之篩選:

自本省不同土壤、不同作物根部(包括:大豆、紅豆、花生、豌豆、綠豆、銀合歡、螢多籐、田菁、紫雲英及山珠豆等作物)分離根瘤菌，經含剛果紅(congo red)的酵母抽出物甘露醇洋菜培養基(yeast extract mannitol agar medium)分離菌株並經劃線純化後，供試。選拔優良的根瘤菌菌株配製粉劑(inoculant)並經推廣，達到節省施用氮肥並使作物增產之目標[14]。

2. 根瘤菌之生態研究:

瘤菌在土壤中的存活，影響豆科植物根瘤的形成及固氮作用。以人工培養基(defined medium)培養銀合歡根瘤菌Nif 94A_3，接種到非殺菌土中，在42天貯存期中，以螢光抗體法觀察，發現菌數隨時間增加而減少，約下降1000～2000倍。且每週減少的比例，亦隨時間增加而減緩。且以甘露醇(mannitol)爲碳源之人工培養基所培養之根瘤菌Nif 94A_3，在高石灰用量土壤中(pH 6.60)之存活率，高於以半乳醣(galactose)及阿拉伯醣(arabinose)爲碳源的人工培養基所培養出之同一菌株，但在低石灰量的同一土壤中(pH 5.4)，兩種培養基所培養之Nif 94A_3的存活率無差異。此結果顯示培養根瘤菌所用的培養基，若能配合土壤理化因子，將有助於根瘤菌在土壤中的存活[8, 15, 16]。

3. 根瘤菌之生理生化及共生性質:

自台灣本土中分離的大豆根瘤菌菌株中，其中SB 375及SB 682之生長世代時間分別爲1.7及2.5小時，且此二菌株在酵母抽出物甘露醇培養基中會產酸，並均可利用hexoses，pentose， sucrose， trehalose 及raffinose。其中，SB 357可以抗高濃度的kanamycin(100 μ g.mL^{-1})及penicillin (400 μ g mL^{-1}) 且可忍耐2.34%NaCl及1031.3 mosmol.kg^{-1}(約23.4bars)的鹽濃度及滲透壓[19]。

測試6株快生型大豆根瘤菌及13株慢生型大豆根瘤菌對10種抗生素的抗葯性質，結果顯示菌株中對nalidixic acid及penicillin的最大抗葯能力分別爲400 μ g mL^{-1}，200 μ g. mL^{-1}，而在大豆根部同時接種快生型及慢生型根瘤菌，結果發現快生型根瘤菌並不能完全取代慢生型根瘤菌，由根瘤中分析得知，由快生型根瘤菌誘發形成的根瘤約佔0～79%，此百分率隨接種菌數之比例不同而有變異[17]。

利用多基因座酵素電泳分析(multilocus enzyme electrophoresis)研究台灣本土根瘤菌*Rhizobium loti*及*Rhizobium leguminosarum*biovar.*viceae*之酯酵素， β-半乳糖甘酵素、葡萄糖六磷酸鹽去氫酵素、腺嘌呤酸激酵素、異檸檬酸鹽去氫酵素、六磷酸葡萄糖酸去氫酵素、β-羥丁酸鹽去氫酵素、六碳醣激酵素等8種代謝性酵素圖譜(metabolic enzyme profile)之特性，結果顯示*R. loti*及*R. leguminosarum* biovar. *viceal*可依據酵素電泳型個別歸類爲兩種不同之群集而加以區分[3]。

4. 根瘤菌之應用

田間試驗中，接種38株不同的苜蓿，三葉草、花生、大豆等根瘤菌，結果發現產量較未接種的處理增加約210%， 50%， 21%， 98%[21]。而在林地方面，台灣坡地多屬酸性，(pH4.68～6.06)，施用石灰並接種有效根瘤菌粉劑以種植銀合歡，觀察對土壤性質，銀合歡生長及成瘤作用的影響，結果施用石灰使土壤pH提高到7時，有助土壤鋁飽和度降低顯著增加銀合歡之乾物量，且在銀合歡生長初期，接種有效根瘤菌粉劑，可在銀合歡根部形成有效根瘤，並在植體乾物重、瘤數、瘤重及乙炔還原能力均比未接種處理爲高[9，15]。

雙重接種根瘤菌及菌根眞菌到台灣本土六個試驗點，測試其成瘤作用、共生固氮作用及大豆產量。結果顯示，單獨接種根瘤菌的處理明顯增加根瘤生成、瘤重及固氮酵素之活性，而對大豆之增加產量之影響可達到134%。而單獨接種菌根菌，對成瘤作用及固氮酵素活性無顯著的影響，但對大豆產量之影響，可達65%之增產，其中只有在施用氮肥的處理中，有顯著的增加。而雙重接種根瘤菌及菌根菌，對大豆產量之影響可達145%之增產，亦即顯示不論單一接種或雙重接種根瘤菌均有助於大豆產量之提升，且可取代氮肥之利用。

5. 根瘤菌的推廣成果

大豆根瘤菌每公頃每年可固定100公斤以上的氮素，且其製造成本低廉，本研究室自本省大豆產區分離的根瘤菌中，選拔出適宜本省大豆或毛豆栽培環境所使用之菌種製成生物肥料，根據本省高雄區農業改良場77及78年度的示範觀察區產量調查結果，接種根瘤菌後公頃之合格莢產量較不接種之農民慣行區增產18%以上，增加收益每期每公頃約可收益13,000餘元。77-78年度示範推廣根瘤菌面積已是1,508公頃，可使農民的收益增加二千一百餘萬元，79年度，推廣面積則達2,060公頃以上，而到82年度經由農林廳高雄農改場及屏東縣

政府農業局佔高屏地區毛豆栽培面積的60%，農民的收益可增加約六千萬元以上，此乃有形之獲益，其他諸如減少農民施用大量化學肥料，引起土壤酸化及避免殘肥滲入土壤下層造成的地下水污染等無形之利益，功不可計。若能繼續推廣根瘤菌之應用，不但可以提高毛豆產量、品質且可減少施用氮肥及土壤酸化問題，更有利於土壤及水質之環境保護(2)。83年度屏東地區之毛豆已推廣接種根瘤菌之面積達6,000公頃，有助農民收益，及減少氮肥施用，達到減少氮肥流失污染之無形功效。

參考文獻

1. 江晃榮 1991 微生物肥料之市場調查。經濟部生物技術開發中心，台北。
2. 洪阿田、鄭榮賢、吳育郎 1990 豆類作物土壤與肥培管理研討會專集。 台灣省高雄區農改場編印 p.234-241。
3. 曾振南、華傑、楊秋忠 1993 利用多基因座酵素電泳分析研究台灣本土根瘤菌之遺傳相關性。中國農化會誌 31:120-129。
4. 楊秋忠 1993 土壤與肥料(第五版)。農世股份有限公司，台中。
5. 楊秋忠、趙震慶 1982 飼料作物之固氮研究(一)優良固氮菌之選拔及引進。「飼料作物品質改進」台灣省畜產試驗所編印 p.61-66。
6. 楊秋忠、趙震慶 1988 台灣快生型大豆根瘤菌之世代時間及對大豆共生之關係 中華農學會報 143:27-37。
7. 新興科技在台灣農業運用之可能性及其影響：小組評估報告 1987 行政院農業委員會彙編， 台北 p.200-208。
8. 趙震慶、楊秋忠 1985 不同培養基對銀合歡根瘤菌在不同石灰量土壤中存活之影響。中國農化學會誌 23:236-241。
9. 趙震慶、楊秋忠、程煒兒 1985 酸性接種根瘤菌及施用石灰對銀合歡生長與成瘤作用之影響。中華農學會報 新131:35-41。
10. 趙震慶、楊秋忠 1987 *Rhizobium loti* Nif 94A_3在不同石灰用量酸土中的移動競爭對銀合歡成瘤作用之影響。中華農學會報 新137:21-33。
11. Paul， E. A. and F. E. Clark. 1989. Soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press， Inc.， New York.
12. Postgate， J. R. 1982. Fundamentals of Nitrogen Fixation. Cambridge Univ. Press， London.
13. Schubert， K. R. and C. P. Wolk. 1982. The energetics of biological nitrogen fixation. american Society of Plant Physiologists， Maryland， USA.
14. Young， C. C. 1986. Effect of sanility on growth， survival， and symbiotic characteristics *Rhizobium Japonicum* Taiwan isolates. Proceedings of the National Science Council， R.O.C. 10:275-279.

15. Young , C. C. and C. H. Chao. 1982. The selection of *Rhizobium* of *Leucaena leucocephala* in Taiwan. Leucaena Research Reports. 3:70.

16. Young , C. C. and C. C. Chao. 1984. Presistence of leucaena *Rhizobium* Nif94A in Taiwan liming soil. Leucaena Research Reports. 5:68-69.

17. Young , C. C. and C. C. Chao. 1989. Intrinsic antibiotic resistance and competition in fast-and slow-growing soybean rhizobia on a hybrid of Asian and us cultivars. Biology and Fertility of Soils (Germany) 8:66-70.

18. Young , C. C. , C. C. Chao and W. E. Cheng. 1983. Effect of liming and rhizobial inoculation on the seedling growth of *Leucaena leucocephala* in the field experiment. Leucaena Research Reports 4:73-74.

19. Young C. C. , J. Y. Chang and C. C. Chao. 1988a. Physiological and symbiotic characteristics of *Rhizobium fredii* isolated from subtropical-tropical soils. Biology and Fertility of Soils (Germany). 5:350-354.

20. Young , C. C. , T. C. Juang , and C. C. Chao. 1988b. Effects of *Rhizobium* and VA mycorrhiza inoculations on nodulation , symbiotic nitrogen fixation , and yield of soybean is subtropical-tropical fields. Biolog and Fertility of Soils (Germany) 6:165-169.

21. Young , C. C. , M. H. Wu and T. C. Juang. 1982. The selection and use of *Rhizobium* in Taiwan , Food & Fertilizer Technology Center , Technical Bulletin No. 66:1-9.

表一、生物固氮作用的種類

生態類別	菌種類別	菌種例子
一、游離性		
有機營	好氣性菌	*Azotobacter*，*Beijerinckia*，*Rhizobium*
	兼性菌	*Bacillus*，*Klebsiella*，*Azospirillum*
	厭氣性菌	*Clostridium*，*Desulfovibrio*
光合營	藻綠藻	*Nostoc*，*Anabaena*，*Gloeothece*
	紫非硫化菌	*Rhodopseudomonas*，*Rhodospirillum*
	紫綠硫化菌	*Chromatium*，*Chlorobium*
二、協生性		
有機營	根圈微生物	*Azospirillum*，*Azotobacter*，*Bacillus*
	葉圈微生物	*Klebsiella*，*Beijerinckia*
三、共生性		
有機營	豆科根瘤菌	*Rhizobium*，*Bradyrhizobium*
	豆科莖瘤菌	*Azorhizobium*
	非豆科根瘤菌	*Rhizobium*
	非豆科根瘤放線菌	*Frankia*
光合營	裸子植物、鐵樹	*Nostoc*
	地衣、地錢、苔類	*Nostoc*，*Stignonema*，*Calothrix*
	水生蕨、滿江紅	*Anabaena*

表二、生物固氮酵素的作用

反應物	構造	生成物
氮 (dinitrogen)	$N\equiv N$	NH_3+H_2
乙炔 (acetylene)	$HC\equiv CH$	$H_2C=CH_2$
氰化物 (cyanide)	$【C\equiv N】^-$	NH_3+CH_4
丙二稀 (allene)	$H_2C=C=CH_2$	$H_2CO=C-CH_3$
疊氮化物 (azide)	$N\equiv N^+-N^-$	$N_2+NH_3+N_2H_4$
氧化亞氮(nitrous oxide)	$N\equiv N^+-O^-$	$N2+NH_3$
氫離子 (H^+ion)	$【H】^+$	H_2

表三、比較生物共生固氮作用及硝態肥之利用所需要的能量

生物固氮之利用		硝態氮肥之利用	
需 要 項 目	相當ATP量	需 要 項 目	相當ATP量
1.還原氮氣	18	1.還原硝態氮	24
2.氫氣放出	6	2.銨態氮同化	7
3.銨態氮同化	7	3:運　輸	3
4.運輸	5	4.根生長及維持:	58
5.根瘤生長及維持	14.5	根系量	28.8
6.根生長及維持	43.5	生 長	4
根系量	21.6	維 持	25.2
生 長	3		
維 持	18.9		
總　共	94		92

(整理自 Schubert and Wolk， 1982)

討　論

台大農化系楊盛行教授問:

1. 每公頃之接種密度多少較佳， 因文中只提每公頃接2-4L而未提.(#1ml)。
2. 根瘤菌之接種是否需要持續性接種? 或一次即可? 在持續性接種中其接種密度又如何?

中興大學土壤系楊秋忠教授答:

1. 接種劑菌數之多寡將決定接種之效果， 一般菌數愈多愈好， 但要10^6/ml以上爲佳。
2. 爲確保根瘤菌之效應， 有必要第二次以上之接種， 因爲接種根瘤菌在土壤中的殘存能力視土壤條件而定。接種菌之密度以至少要10^6/ml以上之菌量爲佳。

畜試所許福星問:

接種豆科作物時， 如何判斷要不要接種?

中興土壤系楊秋忠教授答:

田間是否接種可依不同之資料研判， 如土壤之菌數、土壤中之含氮量等因素決定， 但爲了時效及減少化學氮肥之使用， 以「爲作物買保險」的理念、以低成本之接種， 而視其需要發揮功能， 若土壤氮素過高時， 接種也無缺點。

Aapplication and Development of Nitrogen Fixing Microorganisms

Chiu-Chung Young

Department of Soil Science， National Chung Hsing University

Abstract

In N， P， K fertilizers， only N source are obtained from the air. N_2 in the air is not utilized by plants. It need to be transformed to ammonia by nitrogen fixation. Biological nitrogen fixation is a process to fix nitrogen in bacteria， acety-nomycetes， or blue-green algae. Rhizobia is a most usefull inoculant in the agriculture. The application of rhizobia inoculant can decrease the N application， fertilizer pollutions and soil acidification， and can increase the production and quality of legumes. The selection of superior microorganisms are main work for the successful inoculation. The physiological and biological studies for Taiwan rhizobia of soybean were reported in many papers.

In field experiments， results showed that productions of soybean， vegetable soybean， peanut， and leucaena were increased by rhizobial inoculation. Treatments inoculated with rhizobia in field experiments increased nodules， and nitrogenase activity， and increased soybean production up to 134%. Treatments inoculated with both rhizobia and VA mycorrhiza increased soybean productions up to 145%. Development in N_2-fixing microorganisms was studied for multi-function and multi-crops， such as P-solubilizing ability in N_2-fixing bacteria. The nodulation of non-legumes was studied primarily for rhizobial multi-inoculation.

Key words: Biological N_2-fixation， Symbiotic N_2-fixation， Associative N_2-fixation， Non- symbiotic N_2-fixation， Rhizobia