

缺磷土壤施磷、鈣及稻藁液肥後，

土壤中固氮菌與固磷菌的變化

國中教師組生物第一名

台北市古亭國民中學

作者：楊淑端

一、緒言：

耕土之肥沃度及作物生產量與土壤微生物實有不可分割的關係 (Sadasivan 1970) (7)，Waksman (1922) 曾經主張以土壤微生物的數量來衡量土壤的肥沃力(8)。但至目前為止，微生物在土壤之生態及生理以及與高等作物營養供需的關係均缺乏了解，所以一般概念均認為由於微生物的表面積遠大於高等植物根部的表面積，故加入土壤中之肥料瞬間即被微生物使用殆盡，造成高等植物可用之營養素 (Available nutrients) 缺乏，而忽略了微生物乃是高等植物營養之儲藏及供應的來源 (尤其固氮菌與固磷菌對於土壤中氮磷的循環與維持，佔有極重要的角色，而對於土壤肥力的保持也有舉足輕重的地位)，有其益於植物之一面也。

事實上在有機物貧瘠的土壤裏添加無機肥料，如氮、磷、鉀等要素，其增加作物生產量之效果遠不如添加有機肥料好，土壤學家解釋之為有機肥料吸水性大，陽離子交換能力強 (Cation exchangeable capacity)，且能增進團粒，並含有微量元素 (Minor elements)，致使土壤肥力增高。但據 Alexander 氏 (1961) 估計每公克肥沃的土壤裏含細菌數達 10^9 個(5)，測量許多彰化縣濁水溪沖積表土，每公克細菌數亦在 5×10^8 左右，而幾乎全部活的細菌均附在有機物內。今吾人若以此土壤含百分之二的有機物來計算，則每公克有機物裏含細菌數將可達到 10^{10} 個左右，如此密度的細菌數，其活動力對有機物的性質又有決定性的影響，又怎樣能與土壤肥力分離得開呢？

氮、磷、鉀為高等植物之三大主要營養素，亦為微生物不可缺乏營養劑，根部之細菌（Rhizosphere bacteria）其數日常約是3—5倍於根部之土壤，此等細菌活躍於高等植物根部之表面，而其壽命遠不如高等植物長，一旦死亡，其菌體內之營養仍為植物所吸收。一般細菌在酸性或嫌氣性狀態下，均的放出磷酸、核酸等滋養，此等營養均可能被高等作物利用。此事實不能說微生物與增加作物產量及保持土壤肥力沒有密切關係。

每一個土壤中固氮菌均為氮素製造之工廠，而每一個土壤固磷菌是一個磷酸貯藏所，此二種細菌密度與土壤肥力應有不可分離之關係。固氮菌數在土壤中因為添加了磷肥或其他肥料而驟增，文獻之多不勝枚舉（2, 3, 5, 9），但固磷菌受肥料加入後之影響，至今文獻缺乏，本篇論文用桃園縣南坎村的土壤為材料，此土壤極為貧瘠，吾人測此類細菌在加入無機磷、鈣及稻藁抽出液後數量之變化，俾冀望此實驗結果能供給土壤微生物學及農藝學家作一參考，有助於該地區作物之增產。

二、實驗材料及方法：

(一)土壤樣品：

以台灣桃園縣南坎山坡表面砂質壤土（fine sandy loam）為材料，採集地點未經施肥及耕作，有雜草生長。

土樣經2.0mm篩孔之篩過後，一經風乾後作為一般理化性質之測定，另一方面濕土則為分二組，一組以 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 調整pH至7.0左右，另一組維持原來土壤pH，以做菌落數及盆栽實驗。

(二)實驗方法：

⊖土壤性質的測定與稻藁液的化學分析：

(1)土壤pH用玻璃電極法（Glass electrode method）

以1 + 1（W/W'）蒸餾水加土壤混合一小時後，以玻璃薄膜電極之pH計測定。(1)

(2)化學測定：

有機物測定採用濕燃燒法（Wet combustion method）

，全氮量測定採半微量法（Kjeldahl method），磷測定

採 Troug 法，抽出液在 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 比色

法測定，鉀則以火燃測定法 (Flame photometry method) 測定。(1)

⊖盆栽實驗：

將土壤以下列六種情形處理之，然後每盆栽培五株稻子幼苗
每隔一天澆水一次 (20 ml) 。

土壤處理分爲(1)無處理組(2)加磷組(3)加磷與稻藁抽取液組(4)
加鈣組 (或調整pH組) (5)加鈣與磷組(6)加鈣、磷與稻磷抽取
液組。每公斤土壤在試驗過程中加入磷酸酸量 (K_2HPO_4 磷
酸氫二鉀) 爲5.1克，加入純直灰 $Ca(OH)_2$ 爲2.25克。

⊖土壤總菌數及固氮菌數的測定：

(1)總菌數測定：

用蒸餾水連續稀釋法 (Serial dilution method) 及用平
板接種法 (Surface inoculum) (4)，培養基採用 Holdy
(1960) 之土壤抽出營養劑加上酵母抽出粉末，其成份如
下：

土壤抽取培養基 (Soil extract medium)
酵母抽出粉末 (Yeast extract) 2.0 g
純製洋菜 (Bacto agar) 15.0 g
土壤抽出液 (Soil extract) 1000 c.c.
pH調至7.0，然後在121°C，15磅壓力下滅菌15分鐘，在
25°C 培養室裏培養四天。

(2)固氮菌數測定：

計算方法如測總菌數，培養基採用 Burk 氏無氮培養基 (Burk's N-free medium) (6)，其成份如下：

Burk 氏無氮培養基 (Burk's N-free medium)
磷酸二氫鉀 (KH_2PO_4) 0.2 g
磷酸氫二鉀 (K_2HPO_4) 0.8 g
硫酸鎂 ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 0.2 g
硫酸鈣 ($CaSO \cdot 2H_2O$) 0.1 g
甘露糖醇 (Mannitol) 10-30 g
鉬、鐵 (Mo, Fe) 1 g

無氮純製洋 (Bacto-free agar)	15 g
蒸餾水 (Dist. water)	1000 ml

(註) Mo, Fe 之貯存溶液 (Stock solution) 分別為 1 ml 中含 0.1 mg Mo, 1 mg Fe, 本實驗所用鹽類為 FeCl_3 與 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 。

此培養基使用前 pH 調至 7.0-7.2, 殺菌為 121°C 下 15 分鐘, 在室溫培養四天, 菌羣體形態 (Colony morphology) 或菌體形態 (Cellular morphology) 有類似 Actinomycetes 於不予計算。

④ 固磷菌的測定：

凡在土壤培養劑生長出來不同菌羣體形態之細菌均予以純種分離, 分別種入培養溶液中 (Culture solution)。在室溫下培養, 待細菌達到固定生長期時 (Stationary phase), 用 Albert modification method 染, 看其有無磷酸結核 (Poly-Phosphate granules) 之情形。部分之細菌磷結核有用電子顯微鏡 (Hitachi model 2) 觀察。

培養溶液 (Culture solution) 之成分為：

蛋白胨 (Peptone)	2 g
酵母抽出粉末 (Yeast extract)	1 g
葡萄糖 (Glucose)	0.5 g
氯化銨 (NH_4Cl)	0.1 g
磷酸氫二鉀 (K_2HPO_4)	0.1 g
氯化鎂 (MgCl_2)	0.1 g
蒸餾水 (Dist. water)	100 g

使用前 pH 調 7.0, 在 121°C , 15 磅壓力下滅菌 15 分鐘。

⑤ 染色方法：

染色材料參照 Allert metachromatic stain Method 而稍予修改, 作者發現以如下褪色步驟可避免部分用亞氫氧基丁酸核 (Poly- β -Hydroxybutyrate) 魚目混珠也。

Modified Poly-Phosphate Stain

(1) 甲基藍 (Methyl blue)	1.0 g
-------------------------	-------

甲苯胺藍 (Toluidin blue)	0.2 g
乙醇 (Ethanol)	10 ml
蒸餾水 (Dist water)	100 ml
染色五分鐘	
(2)醋酸 (Acetic acid)	0.5 ml/100ml
褪色15秒	

⑥植物乾重量測定：

盆栽實驗 (24天) 後，將每盆稻子取四株 (連根部在內) 洗淨，在 Oven 110°C 下烘乾一晝夜後，取出放入乾燥器中半小時，秤重。

三、結果：

(一)土壤性質測定：

如 (表一) 所示，此土壤為強酸性；且土壤之含氮及磷量極少。

表一：土壤分析

pH	有機物	全氮素 (N)	磷 (P)	鉀 (K)
	g/100g土壤		kg/ha	
4.3	2.4	0.12	6.4	66

(二)稻蘗液成分測定：

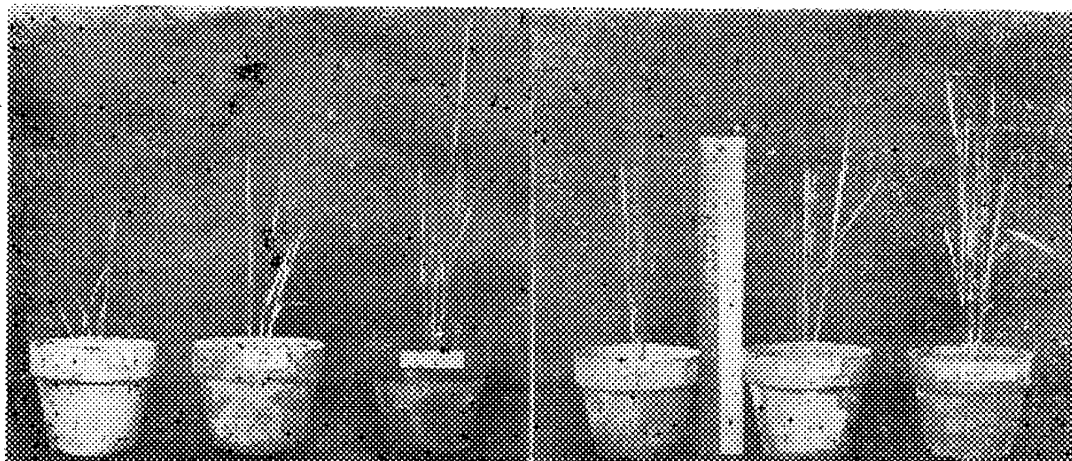
如 (表二) 所示，稻蘗液中含豐富的有機質。

表二：稻蘗液分析成分

有機物	全氮素 (N)	磷 (P)	鉀 (K)
mg/l			
2,500	82	14	500

(三) 盆栽實驗結果：

如(圖一)所示加稻藁液(C)、磷(P)及鈣(Ca)後，植物生長的情形最好，而控制組無論在高等植物及細菌均生長不好。



圖一：盆栽實驗，六種不同土壤處理，稻子生長情形的比較

(四) 表三：稻之乾重及長度：

處 理	控制組	加磷組	加 磷 、 抽 出 液 組
乾 重 (公克 / 平均 每株)	0.015	0.038	0.095
長 度 (公分 / 平均 每株)	7.8	13.9	18.7

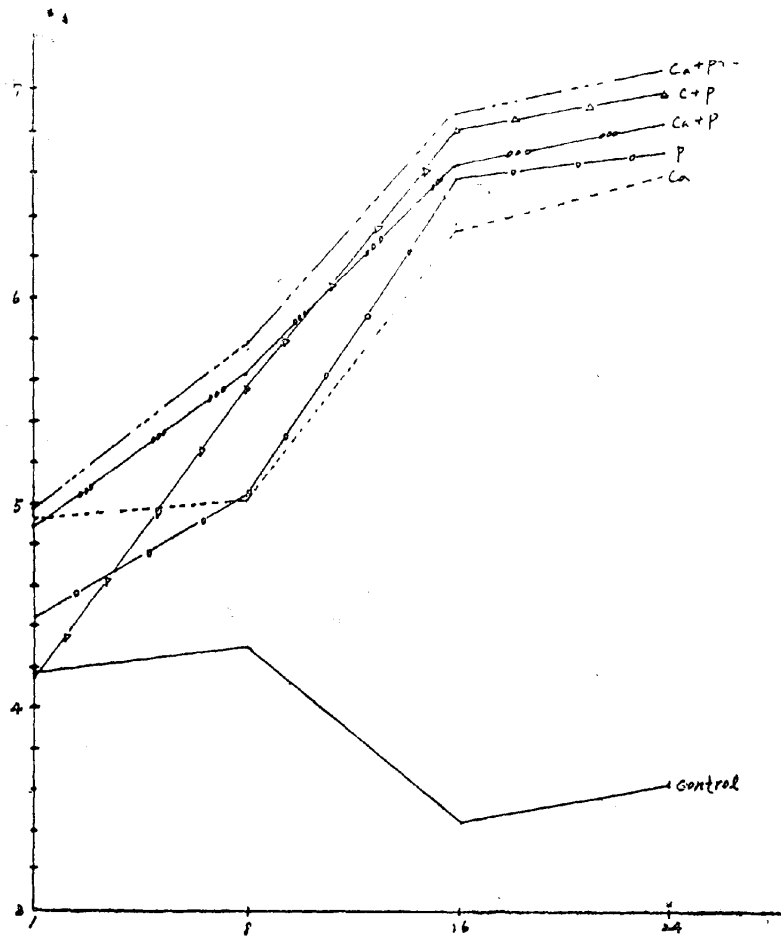
處 理	加鈣組	加 磷 、 鈣 組	加 鈣 、 稻 磷 藁 液 組
乾 重 (公克 / 平均 每株)	0.055	0.098	0.132
長 度 (公分 / 平均 每株)	16.3	20.4	23.4

(五) 固氮菌數測定：

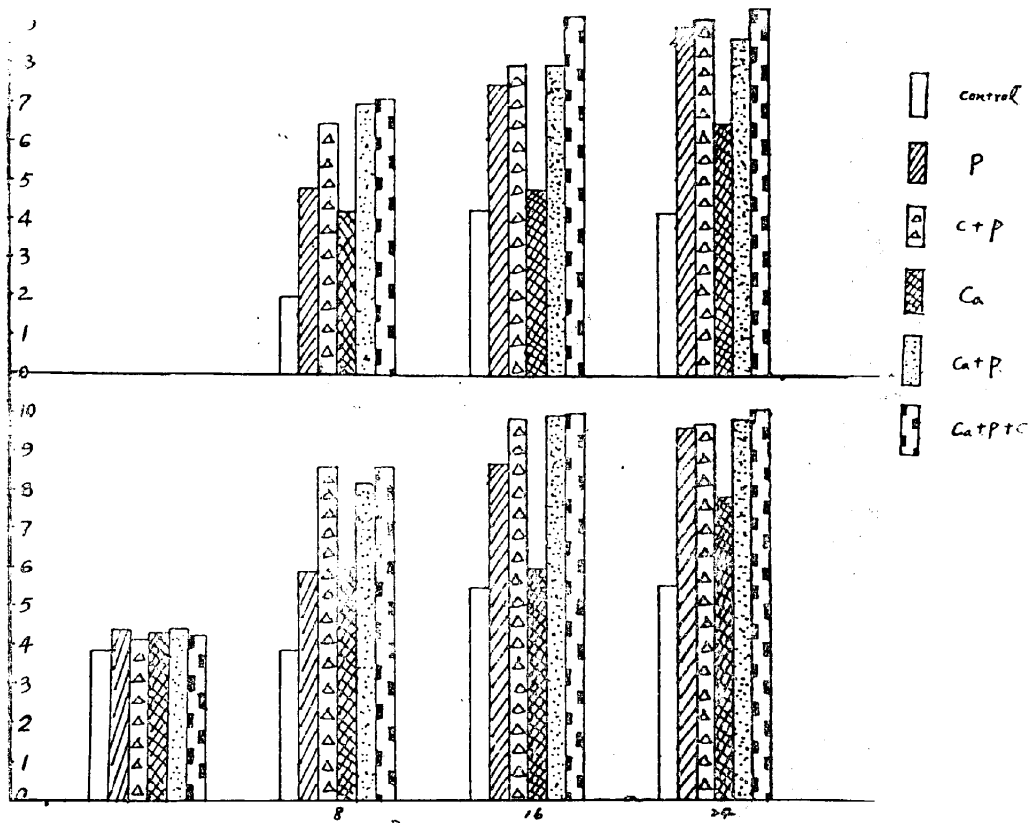
如(圖二)所示，除了控制組之固氮菌數無顯著上升且有下降情形外，其他施肥各組之固氮菌數均有顯著上升，而以加鈣、磷及稻藁液組為最。

(六) 總菌數與固磷菌的測定：

如(圖三)所示，總菌數大致有增加，而以加磷、鈣及稻藁液組為最多，其次為加鈣及磷組，加磷及稻藁液組。固磷菌在有磷的情形下比缺磷時為多。

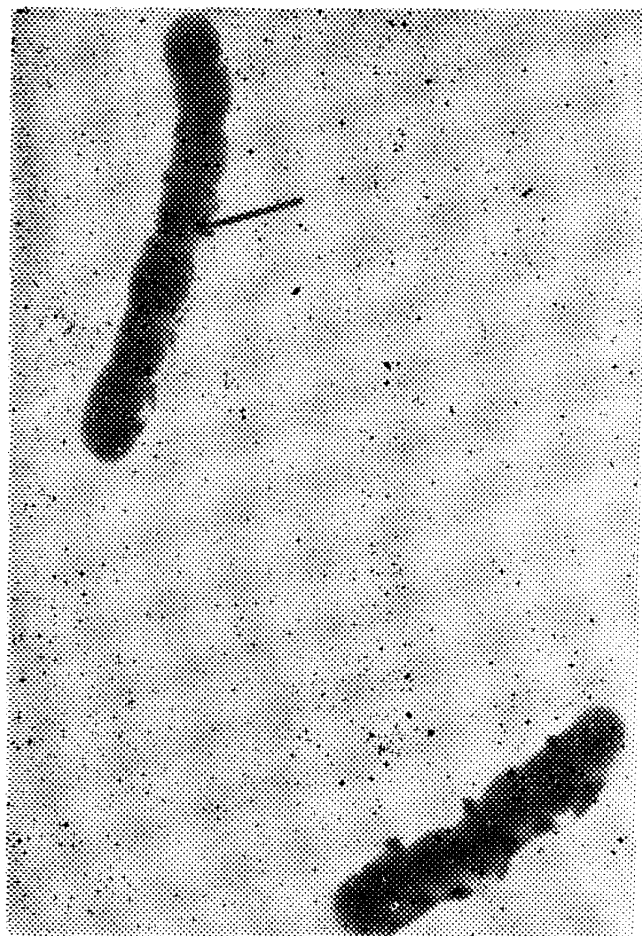


圖二：土壤在六種不同處理效應下，固氮菌數目比較



圖三：土壤在六種不同處理效應下，總菌數目與固氮菌落數目的比較

(七) 電子顯微之觀察



圖四：×20,000



圖五：×60,000

說明：圖四及五中箭頭所指之黑粒爲細菌所結成的磷酸核，圖五爲高倍率放大者。電子顯微鏡用 Hitachi Model 2，細菌均用被覆薄層技術 (Shadow casting technique) 製作，使用之金屬薄膜爲鉑與金 (Pt+Au)。

四、討論：

(一)由化學分析結果知本土壤爲強酸性，且爲極端缺乏氮與磷之土壤，故提議該地區農民多施該二種肥料，及施石灰以調整土壤之酸鹼度，使生產量增加。此亦可由圖一盆栽實驗的結果做一參考。

在添加肥料以後，加入之肥料如磷者有三個去向，少量爲高等植物所吸收；其次爲土壤鐵 (Fe)、鋁 (Al) 所吸收 (如該土壤爲酸性的話)，或爲鈣 (Ca) 所吸收 (如該土壤爲鹼性)，此等磷酸鐵、磷酸鈣均爲難溶性者；再者爲細菌所吸收。換言之，土壤在添加肥料後，可資稻子利用之肥料瞬間化爲不溶性，而稻子生長期長，吸入一日之肥，甚難維持長久生長，故推斷在細菌裏的磷或其他元素，日後在稻子缺乏該等元素時可爲稻子利用，供應稻子生長。

(二)非共生固氮菌在固氮過程中需要高量的鈣鹽參助 (3、5)，如圖二所示，大致可看出在加入鈣鹽的土壤中，其固氮菌 (Azotobater) 有顯然增加；同時加鈣鹽於土壤中所造成另一結果是提高土壤的 pH，而在酸性環境裏 (pH 低於 6.0) 固氮菌通常生長不良 (5)。本實驗控制組土壤 pH 爲 4.3，固氮菌之數量極低，如圖二所示，固氮數目在此環境裏不但在整個實驗過程中沒有增加，且有下降的趨勢，此現象顯示在土壤貧瘠與強酸性下，不利於固氮菌的生長。至於在加磷 (P) 與加磷及稻藁液 (P + C) 的土壤，於實驗開始土壤 pH 亦等於 4.3，所以在開始時固氮菌數目不太多，但是日後由於土壤中有效磷酸鹽的添加，故增加了此固氮菌的活性；同時加了稻藁液的土壤比沒有加稻藁液的土壤，其固氮菌數增加較多，因稻藁液中含有豐富的有機物可能爲其重要因素之一。林良平等氏 (1973) 亦證明碳

與磷的供應可能為固氮菌在土壤中生長與固氮力的二個控制因子。(2)

綜述之，最能使固氮菌數量驟增者是加磷、鈣及稻藁液組 (Ca + P + C)，其次為加磷與稻藁液組 (C + P)，再其次為加鈣與磷組 (Ca + P)，加磷組 (P)，加鈣組 (Ca)，最不理想者為控制組。

(三)自然界裏有能力結磷酸核的細菌，其生長所需之磷酸是否必需比普通細菌濃度稍高，至今無文獻可供參考。但本實驗除控制組外，細菌總數增加，則結多磷酸核之細菌也跟著增加，其增加之程度略有不同，增加最多者為加磷、鈣及稻藁液組 (Ca + P + C)，其次為加磷與稻藁液組 (C + P)，再次者為加磷組 (P) 及加磷與鈣組 (Ca + P)。此項結果暗示固磷菌在有磷的環境下比缺磷的環境生長得好，而稻藁液的加入亦有重要影響，鈣的因素則較為不顯著。

總之，因為加磷、加鈣與加稻藁液的處理，而固氮菌與固磷菌均直接與間接反應出此土壤極為缺乏該項元素，且土壤之活性及栽培的稻子與細菌數的增加，在施肥前與後均有極大的不同。至於儲藏在細菌裏的磷酸核與氮素是否直接地供應給植物生長之助，有待進一步的求證。

五、中文摘要：

- (一)本文以桃園縣南坎附近一缺磷、缺氮之土壤作實驗材料，(此地區多種植水稻為主)，測定該土壤在添加各種肥料(包括磷、鈣及稻藁液)後，觀察稻子之生長及細菌之生長，尤其調查固氮菌與固磷菌在土壤裏之數量。
- (二)細菌包括非共生固氮菌 (Azotobacter) 與固磷菌，對於土壤的酸鹼度與缺磷很敏感，而稻藁液中含有大量的碳源可明顯地促進稻子的生長與細菌數目的增加。
- (三)由結果顯示施肥對於高等植物與細菌均有利，通常施肥後瞬間肥料即被微生物使用殆盡，造成高等植物可用之營養素缺乏，可見土壤中細菌與稻子之間具有相互關係存在。細菌可能是高等植物營養的儲藏來源(至少對於氮與磷酸)，然而高等植物

由於具有放出氨基酸，糖與維他命的能力，故亦可利於細菌的生長。