

桿菌添加劑及不同氮源型態對霧氣耕 芭菲爾鞋蘭生長之影響

陳 敬 文¹⁾ 林 深 林²⁾

關鍵字：桿菌添加劑、氮源型態、霧氣耕、芭菲爾鞋蘭

摘要：以修改過之 1/4 Hoagland 全銨或全硝養液為氮源，於霧氣耕養液中添加枯草桿菌或蕈狀桿菌，培養 2 個月。結果顯示，施用有益桿菌添加劑於全銨為氮源的 *Paphiopedilum spicerianum* 植株，提高硝酸還原酶活性的效果較全硝處理明顯，且施用蕈狀桿菌植株根部之硝酸還原酶活性顯著高於施用枯草桿菌。根部游離胺基酸含量以對照組為最高，枯草桿菌次之，蕈狀桿菌最低；但根部可溶性蛋白質含量呈相反之趨勢。顯示施用枯草桿菌及蕈狀桿菌可促進胺基酸合成蛋白質。此外，添加有益桿菌添加劑於全銨養液，導致養液中的游離硝濃度隨著培養的時間而增加。顯示有益桿菌有強效的硝化能力，進而促進芭菲爾鞋蘭生長。

前 言

枯草桿菌(*Bacillus subtilis*)在分類上屬於原核生物門(Prokaryotae)、厚壁菌門(Firmicutes)、桿菌綱(Bacilli)、桿菌目(Bacillales)、桿菌科(Bacillaceae)、桿菌屬(*Bacillus*)。蕈狀桿菌(*Bacillus mycoides*)是一種植物內生細菌，可以進入植物組織內與植物體共存，不具有游動性，且其菌落形態呈根狀排列(rhizoidal colony)(Claus and Berkeley, 1996)。本身不會對植物造成破壞或傷害，並且有促進植物生長及抗病的作用，在植物病害防治上的應用範圍極廣，包括土壤病害、鏽孢菌萎凋病、白粉病、立枯或菌核病，且能增強植物對養分之吸收與利用，促進植物生長，對人畜無害，安全無虞(丁，2006)。桿菌屬細菌屬於革蘭陽性，好氣或兼性嫌氣性、且具週生鞭毛為其型態上主要特徵，在自然界中普遍存活於土壤之中或者植物體表，對於人、動物及環境，具有安全(generally regarded as safe, GRAS)

1) 國立中興大學園藝學系碩士班研究生。

2) 國立中興大學園藝學系講師，通訊作者。

且有益的微生物。已有紀錄之桿菌屬細菌超過 60 種，可產生耐逆境、耐儲存的內生孢子 (Priest, 1993)，更增加其在農業上之實質應用性 (Msadek, 1999)。在桿菌屬細菌對植物病害的防治機制上尚未完全了解，至今已知其防治植物病害為多重作用機制的結果，主要包括有：*Bacillus* spp. 會產生多樣的抗生素 (Ongena *et al.*, 2005)。其次，可迅速地與植物的根共生且有能力在根部繁殖 (Dijkstra *et al.*, 1987)。第三，*Bacillus* spp. 可產生短暫的有機化合物誘導植物系統性之抗病性 (Ryu *et al.*, 2004) 及產生植物荷爾蒙和胞外酵素促進植株及根部生長 (Forchetti *et al.*, 2007)。在抗生作用方面，目前已知枯草桿菌可分泌的物質，包括有抗生物質 (antibiosis)、胞外水解酵素 (extracellular hydrolyase)、氨氣 (NH₃) 與揮發性氣體 (Fiddaman and Rossal, 1993)，對病原菌之生理代謝作用具直接的影響。

霧氣耕 (fogponics culture) 是在使植物的根系暴露在含有養液的密閉容器之空氣中，養液由高壓噴頭直接噴在植物的根部，滴落的殘液可由密閉系統中回收到貯存桶中，養液不斷重新利用，且植物根系在此系統中可獲得充分的氧氣量。最早的霧氣耕研究係 Zobel 等人 (1976) 將植物根系裸露於以轉動葉輪打起之養液霧氣中生長，成功培養豆、落花生、楊梅及向日葵等植物。因霧氣耕環境通氣良好，可培養出根系發育良好的植株。Hung (1991) 取發芽 3 週之百喜草浸入含孢子之凝膠中進行接種，隨及移置霧耕培養，16 週後有 41% - 68% 的根系被菌根菌感染。菌根於通氣良好之氣霧耕環境下，感染率 (infection rate)、感染強度 (infection intensity) 與孢子密度皆不低於傳統土耕栽培的方式 (王, 1994)。吳等人 (1997) 以甕菜、百喜草及甘藷為宿主，先行在溫室內接種內生菌根菌兩週後，移植於霧氣式生長箱內進行無土栽培。證實氣霧式生長箱可培養 *Glomus aggregatum*、*G. mosseae*、*G. geosporum*、*G. microaggregatum*、*G. intraradices*、*G. pansihalos*、*G. manihotis*、*Acaulospora laevis* 及 *Entrophospora kentinensis* 等九種菌種。

因霧氣耕環境通氣性佳，有利芭菲爾鞋蘭根系生長以及有益微生物接種，而且可減少介質物理性及生物性的影響。因此，本試驗以霧氣耕培養芭菲爾鞋蘭，並施用有益微生物，觀察施用有益微生物對芭菲爾鞋蘭生長之影響。

材料與方法

一、試驗材料

芭菲爾鞋蘭 *Paph. spicerianum* 原生種實生苗 (出瓶後四年生，植株鮮重約 10 g，葉展幅約 25 cm)，種植於圓口徑 20 cm、高 30 cm 塑膠水桶中，使用經由銀灰色塑膠布包覆保麗龍板，將植株固定於中央，地上部裸露於桶面的保麗龍板上，根部則懸空於桶內的保麗龍板下，桶內裝有 1000 ml 養液。放置於國立中興大學園藝系精密溫室，遮光 50%，氣溫控制在 28±2℃。

二、試驗方法

(一) 試驗處理

試驗期間 2012 年 07 月至 2012 年 9 月，處理前，先於純水霧耕培養 1 週後，於 1/8 量 Hoagland(Hoagland and Arnon, 1950, Modified)養液中進行養液濃度培養 1 週後，開始於各元素經平衡過後且調整不同氮型態比例[Solution I (NO_3^-): 2.5mM Nitrogen; Solution II (NH_4^+): 3.75 mM Nitrogen]的 1/4 量 Hoagland 養液作為對照組，2 種不同氮源養液分別加入不同枯草桿菌 *Bacillus subtilis*(菌專家枯草桿菌一號，以下簡稱 BS1，聯發生物科技股份有限公司，台灣)或蕈狀桿菌 *Bacillus mycoides*(菌專家枯草桿菌三號，以下簡稱 BS3，聯發生物科技股份有限公司，台灣) 菌粉 1 g 於 1 L 的養液內(等於稀釋 1000 倍，菌液濃度為 10^6 CFU/ml)，共 6 處理。每處理 8 重複，每重複一株。噴霧時間從上午六點至下午六點，每隔兩小時進行一次噴霧，每次噴霧 15 秒，每週更換一次養液。

菌專家枯草桿菌濃度的測定是將菌專家枯草桿菌粉劑以無菌水稀釋 10^1 倍後，即為 10^1 倍稀釋檢液(亦稱 10^{-1} 稀釋度檢液)，利用十倍連續稀釋法(ten fold dilution series)，稀釋成 $10^{-1} \sim 10^{-10}$ 稀釋度檢液使其混合均勻，並將檢液個別做平板測數法(plate counting technique)。平板測數法是將檢液個別取 0.2 ml 置於培養基(nutrient agar, NA)表面中央處，立即取滅菌之玻璃塗抹棒，將菌液均勻塗抹在培養基表面。確認培養基表面乾燥，且無菌液流動後，將培養皿置於 35°C 生長箱培養，於培養 3 天後計算菌落數。

(二) 調查項目

1. 養液中游離大量元素與微量元素分析

(1) 全氮(Total Nitrogen) 分析

養液以 Toyo NO.1 濾紙過濾後，以凱氏氮分析(Kjeldahl method)。每次調查每處理 3 重複，每重複 1 桶。

(2) 游離銨、游離硝(Free NH_4^+ 、 NO_3^-)分析

游離硝採用水楊酸(salicylic acid)法，修改自 Cataldo 等人(1975)。養液以 Toyo NO.1 濾紙過濾後，吸取樣品液 0.1 ml，分別放入試管中，並以 0.1 ml 蒸餾水作為標準液的空白組。再分別加入 0.4 ml 5% 的水楊酸-硫酸溶液(秤取 5 g 水楊酸溶於 100 ml 濃硫酸，溶解後保存於棕色瓶中，低溫下可保存 1 週)，振盪均勻，在室溫下靜置 20 分鐘後，再加入 9.5 ml 的 8% 氫氧化鈉溶液(秤取 20 g 氫氧化鈉溶於 250 ml 的蒸餾水中)，振盪均勻冷卻至室溫。以空白組作比對，以光電比色計(Spectronic 20D+, Thermo Inc., USA)測定 410 nm 波長的吸光值。標準曲線以 $1200 \mu\text{g N. mL}^{-1}$ 硝酸鉀(KNO_3 ;potassium nitrate)配製不同濃度的標準液。全氮減去游離硝為游離銨含量。每次調查每處理 3 重複，每重複 1 桶。

2. 植物體可溶性蛋白質(Soluble protein)分析

參照 Bradford(1976)之方法，並加以修改。取 0.2 g 鮮樣，加 5 ml 0.2 M PO_4^- Buffer (pH =7)，放入均質機內低溫磨碎，過濾之後，經 1000 rpm， 4°C 高速低溫離心 10 分鐘後，取 1 ml 上清液加入稀釋 5 倍之 1 ml Coomassie blue reagent(Bio-Red)，再加入 3ml 的去離子水混合靜置 10 分鐘後，以光電比色計(Spectronic 20D+, Thermo Inc., USA)測定波長 595 nm

之 OD 值。標準曲線以小牛血清蛋白(BSA ; Bovine serum albumin) 100 µg/ml 配置。每次調查每處理 3 重複，每重複 1 株。

3. 植物體游離胺基酸(Free amino acid)分析

測定方法採 Rosen(1957)之方法，並加以修改。取 0.2 g 鮮樣，加 5ml 0.2 M PO_4^- Buffer(pH=7)，放入均質機內低溫磨碎，過濾之後，經 1000 rpm，4°C 高速低溫離心 10 分鐘後，取組織萃取液 1 ml 及 1 ml ninhydrin reagent(5 g Ninhydrin, 95 g KH_2PO_4 , 43 g Na_2HPO_3 及 3 g fructose 溶於 600 ml 蒸餾水中，再稀釋至 1 升，保存於 2°C 黑暗中)，經沸水浴加熱 10 分鐘後迅速冷卻，再加入 5 ml color diluents(2 g KIO_3 溶解於 600 ml 蒸餾水中，再以 95% 酒精稀釋至 1 升)，混合均勻後利用光電比色計(Spectronic 20D+, Thermo Inc., USA)測定在波長 570 nm 之吸收值。標準曲線以 1 mM glycine 配製。每次調查每處理 3 重複，每重複 1 株。

4. 植物體硝酸還原酶活性(Nitrate reductase activity, NRA)分析

測定方法採 Jaworski(1971)之方法，並加以修改。取單株葉片，以打孔機取下直徑 0.8 cm 的葉圓片 10 片，或根部取 0.2 g，並橫切 0.5 cm，迅速放入裝有 2.5 ml 0.2 M PO_4^- Buffer(pH 7.5) 的試管中，再加 1.25 ml 去離子水，加 0.25 ml n-propanol，及 1 ml 0.1mM KNO_3 ，blank 改加 1 ml 去離子水，放置於 25°C 水浴黑暗環境下震盪，反應 30 分鐘，加入 1% Sulfanilic acid(溶於 3 M HCl)1 ml 終止反應，再加入 1 ml 0.02% N-1-naphthyl-ethylene diamide HCl (溶於去離子水)使之呈色。組織傷口變成褐色時，再利用光電比色計(Spectronic 20D+, Thermo Inc., USA)測定在波長 540 nm 之吸收值。標準曲線以 0.1 mM KNO_2 配製。每次調查每處理 3 重複，每重複 1 株。

三、統計分析

調查後的數據，使用 Minitab 統計軟體(MINITAB Release 14.1, Minitab Inc. USA)之 ANOVA 程序，進行變方分析(analysis of variance)，各處理平均值以 Tukey's 測驗(Tukey's test)進行差異顯著性比較測試。

結 果

以霧氣耕培養芭菲爾鞋蘭，分別施用蕈狀桿菌(BM)或枯草桿菌(BS)兩種有益菌，以 1/4 Hoagland 養液為基礎，修改為全銨及全硝兩種氮源，共 6 組處理，試驗為期 2 個月。全硝為氮源者其地上部及根部 NRA 顯著高於全銨者，地上部及根部可溶性蛋白質含量亦較高；但地上部及根部游離胺基酸含量呈現相反之趨勢。在根部方面，施用 BS 及 BM 相較於相同氮源之對照組可提高植株 NRA 及可溶性蛋白質含量；但降低游離胺基酸含量。地上部也有相似的趨勢(圖 1)。

無論養液的氮源型態，施用 BM 的植株根系發育最好，BS 次之，CK 最差。此外，

以全硝為氮源其植株及根部生長較全銨為氮源處理良好(圖 2)。

以全硝為氮源培養 1-8 週之間，養液中無銨態氮產生，且硝態氮含量皆低於 5.5 ppm；培養 2 週後施用 BS 及 BM 養液中的游離硝含量高於 NO_3^- CK(表 1)。以全銨為氮源的養液第一週即出現硝態氮(0.68 ppm)，而且有逐漸升高的趨勢，培養至第 8 週硝態氮含量達 18.54 ppm。以全銨為氮源並施用 BS 及 BM 的養液，養液中的游離硝含量顯著高於 NH_4^+ CK，同樣有逐漸升高的趨勢，培養初期第一週及第二週時，施用 BM 養液中的游離硝含量顯著高施用 BS，而後兩者無顯著差異(表 2)。

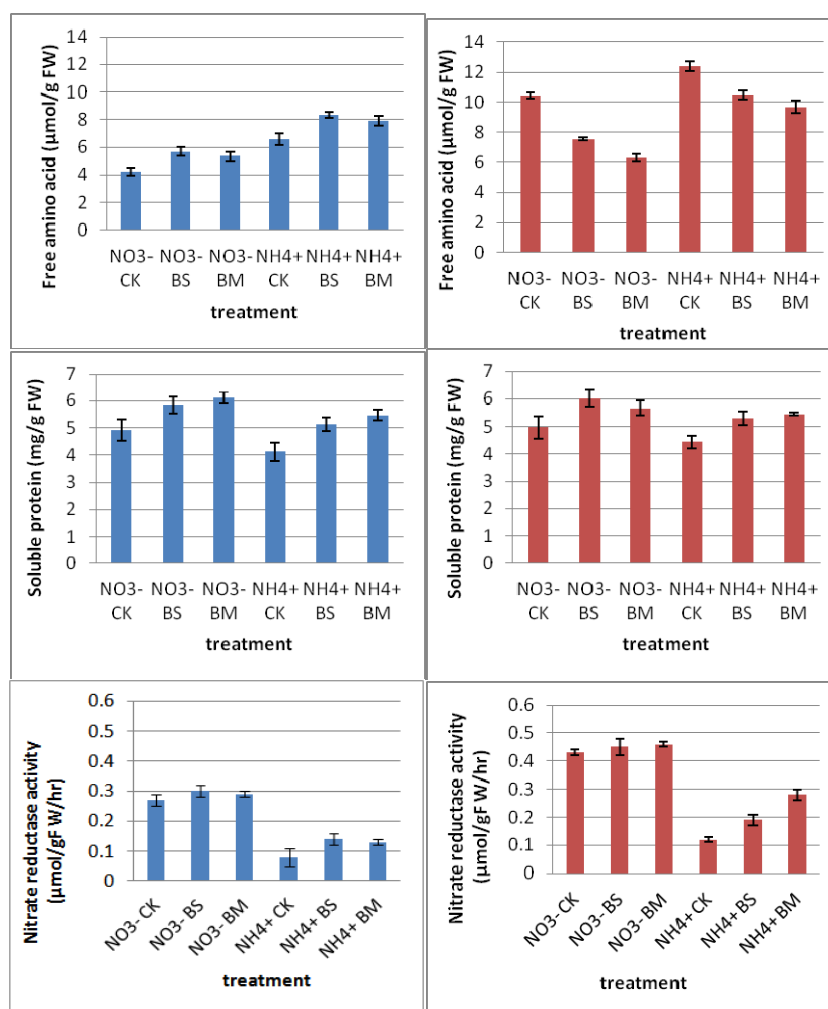


圖 1. *Paph. spicerianum* 於施用有益桿菌屬細菌及不同氮肥型態之霧氣耕系統二個月後，地上部及根部的游離胺基酸、可溶性蛋白質、硝酸還原酶活性變化。

Fig. 1. Effect of *Bacillus* spp. additives applied and different nitrogen type treatment for two months on free amino acid, nitrate reductase activity and soluble protein in shoot and root of *Paph. spicerianum*. Bars represent SE(n=3).

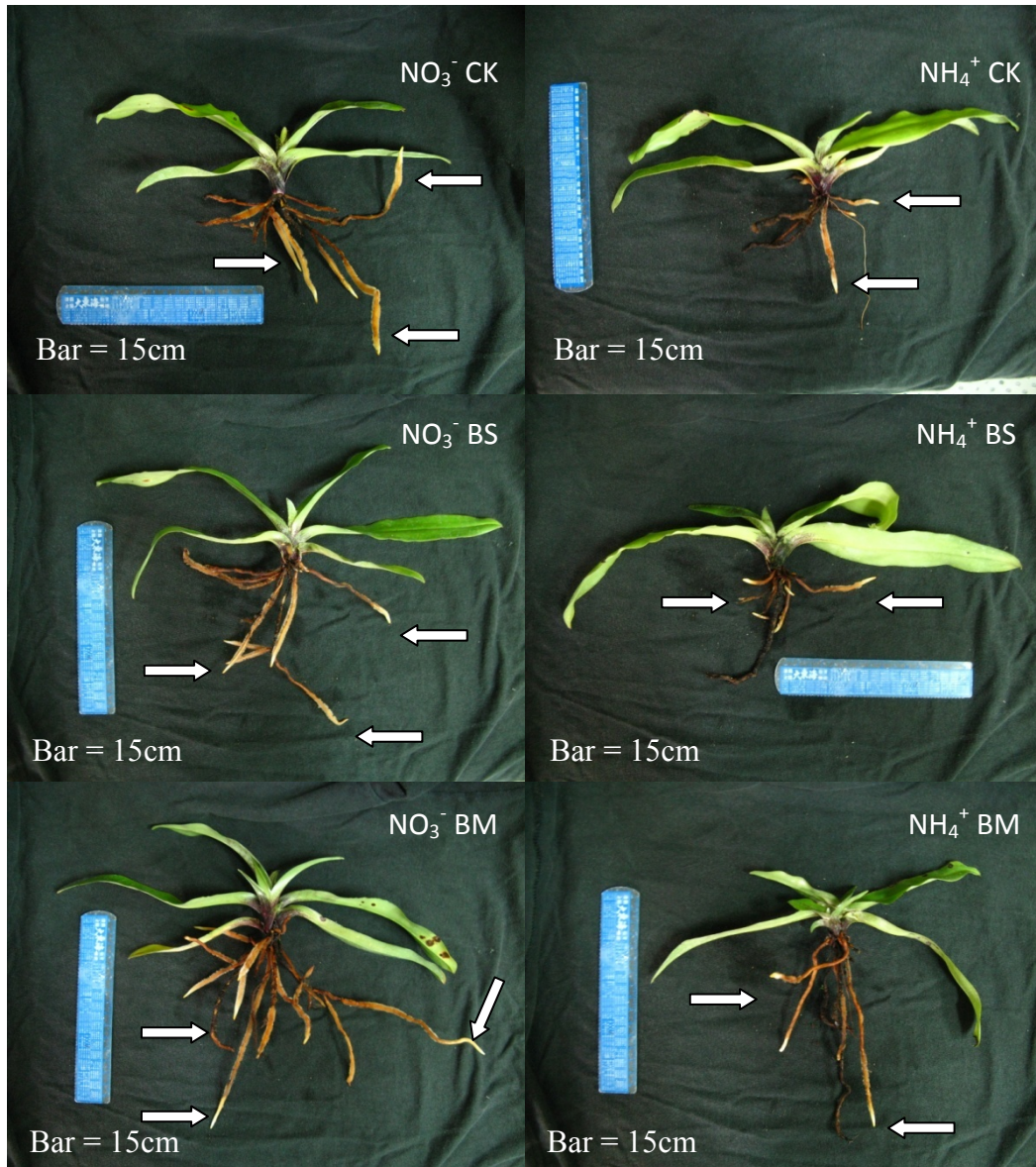


圖 2. *Paph. spicerianum* 於施用有益桿菌屬細菌及不同氮肥型態之霧氣耕系統二個月後的生長情形。

Fig. 2. Effect of *Bacillus* spp. additives applied and different nitrogen type treatment for two months on growth of *Paph. spicerianum*. Arrows indicate new growth of root tips.

表 1. 霧氣耕養液於培養 2 個月期間游離銨之變化

Table 1. Free ammonium contents in nutrient solution of fogponics culture during 2 months period.

Treat ^y	Free ammonium (ppm)							
	1st week	2 nd week	3 rd week	4 th week	5 th week	6 th week	7 th week	8 th week
NO ₃ ⁻ CK	0.00c ^z	0.00c	0.00c	0.00c	0.00c	0.00c	0.00c	0.00c
NO ₃ ⁻ BS	0.00c	0.00c	0.00c	0.00c	0.00c	0.00c	0.00c	0.00c
NO ₃ ⁻ BM	0.00c	0.00c	0.00c	0.00c	0.00c	0.00c	0.00c	0.00c
NH ₄ ⁺ CK	43.5a	42.45a	38.78a	42.21a	42.87a	38.45a	37.15a	45.35a
NH ₄ ⁺ BS	30.16b	34.65b	27.26b	31.2b	31.69b	24.01b	21.44b	31.24b
NH ₄ ⁺ BM	28.62b	28.15b	24.39b	27.14b	25.36b	20.19b	18.74b	27.12b

z: Means in a column followed by different letters are significantly different at 5% by Tukey's test .

y: Nitrogen type in culture solution.

表 2. 霧氣耕養液於培養 2 個月期間游離硝之變化

Table 2. Free nitrate contents in nutrient solution of fogponics culture during 2 months period.

Treat ^y	Free nitrate (ppm)							
	1st week	2 nd week	3 rd week	4 th week	5 th week	6 th week	7 th week	8 th week
NO ₃ ⁻ CK	5.26a ^z	3.28b	2.84c	2.94d	2.84d	2.64c	2.55d	2.74d
NO ₃ ⁻ BS	5.45a	4.88a	4.56b	3.77c	3.46c	3.57b	3.97c	3.78c
NO ₃ ⁻ BM	5.11a	4.46a	4.87b	3.89bc	3.56c	3.75b	4.21c	4.21c
NH ₄ ⁺ CK	0.68c	1.42c	5.48b	6.52b	12.42b	16.52a	14.38b	18.54b
NH ₄ ⁺ BS	3.12b	2.57b	9.47ab	15.33a	18.14a	19.47a	24.76a	28.65a
NH ₄ ⁺ BM	5.39a	4.98a	12.21a	16.25a	21.22a	24.39a	28.13a	30.23a

z: Means in a column followed by different letters are significantly different at 5% by Tukey's test .

y: Nitrogen type in culture solution.

討 論

以全硝為氮源之地上部及根部 NRA 顯著高於全銨處理，與前人研究 NO_3^- 可誘導 NR 及 NiR 酵素活性及 mRNA 高度表現(Back *et al.*, 1988)相符。胡氏(1980)指出，木瓜植體 NRA 與可溶性蛋白質含量呈現正相關。在本試驗亦呈現相似的趨勢。無論係以全硝或是全銨為氮源，施用有益菌可顯著提高地上部及根部可溶性蛋白質含量，且全硝可溶性蛋白質含量顯著高於全銨。印證芭菲爾鞋蘭為喜好硝酸態氮之作物，對硝酸態氮的吸收與運移至地上部行氮同化作用的能力高於直接吸收銨態氮(戴，2010)。一般而言，熱帶蘭花對硝酸態氮及銨態氮的吸收率相較於其他植物是偏低的，大約只有大麥的 1/3—1/7，NRA 也比大麥低很多，但足以用來吸收硝酸根離子(陳，2007)。施用有益菌於以全銨為氮源的植株，提高 NRA 的效果較全硝處理明顯，且施用 BM 植株根部之 NRA 顯著高於施用 BS。Kim 等人(2005)指出，*B. subtilis* 於器內有氧的環境下培養，可將銨態氮轉化為硝酸態氮。*B. mycooides* 施用於土壤可提高硝化作用效率，將銨轉化為硝酸鹽(Tyagny-Ryadno, 1933)。

氮源經過植物根部吸收後，藉由重要酵素 NR、NiR、GS、GOGAT 將氮素同化，形成麩胺酸與麩醯胺酸再轉成其它胺基酸或合成蛋白質(Layzell, 1990)。葉片老化時，合成的蛋白質亦可水解成游離胺基酸利用 GS/GOGAT cycle 的進行，轉換成麩胺酸與麩醯胺酸的形式運送，使植物體內氮源之再分佈(郭，1995)。如同其他植物觀察到的一樣，蘭花根部吸收硝酸根離子可利用(1)還原成銨離子並同化為胺基酸(通常為麩胺酸)後轉運至葉片。(2)儲存於葉片和根部液泡中。(3)以硝酸根離子形式轉運到葉片並還原成銨離子(Lim, 1992; Hew *et al.*, 1993)。陳(2007)提到 *Dendrobium Multico White* 器內培養之小植株其根部對於銨離子的吸收比硝酸根離子快。因此，以全銨為氮源植體胺基酸高於全硝。無論氮肥型態，CK 根部游離胺基酸含量高於 BS 及 BM；而根部可溶性蛋白質呈相反趨勢，說明施用 BS 及 BM 可促進根部蛋白質合成，加速氮同化效率。

枯草桿菌因具有硝化作用的能力(Yang *et al.*, 2011; Tyagny-Ryadno, 1933; Kim *et al.*, 2005)，導致全銨處理的養液中的銨離子部份被轉化為硝酸根離子。BM 硝化效率初期較 BS 強，之後兩者則無顯著差異。但未經施用有益桿菌之 NH_4^+ CK 養液中也有硝化作用產生的現象，且有逐漸增加的趨勢，推測是由植株根部本身所帶或是由空氣中飄入的硝化細菌於養液中滋生所致。全硝處理養液中無測到銨態氮，且硝態氮含量低，表示一大部分已經由植物根部吸收及被微生物轉變為其他形式(戴，2010)。

參 考 文 獻

- 丁佩分。2006。番茄萎凋病之生物防治菌的鑑定與防病潛力評估。國立中興大學植物病理學系碩士論文。台中。p.64。
- 王均琍。1994。本土化氣霧耕量產菌根接種源。微生物肥料之開發與利用研討會專刊。

- 165-172 pp。
- 吳繼光、林素禎、張秀月、邱春華、林淑媛。1997。氣霧式叢枝內生菌根種源生產技術之研究。中華農業研究 46(2):190-206。
- 胡啓祥。1980。木瓜氮素代謝及輪點型毒素病對其可能之影響。國立中興大學園藝學系碩士論文。台中。59 pp。
- 張則周。2008。植物營養學。五南圖書出版股份有限公司。台北 198-208 pp。
- 郭建榮。1995。根溫處理對溫室洋香瓜氮代謝之影響。國立中興大學植物學研究所碩士論文。台中。60-70 pp。
- 楊秋忠。1997。土壤與肥料。農世股份有限公司。台中。435pp。
- 陳福旗譯。Hew, C. S.和J. W. H. Yong原著。2007。熱帶蘭花生理學。睿煜出版社。屏東。119-145 pp。
- 戴裕森。2010。不同型態氮源對芭菲爾鞋蘭生長之影響。國立中興大學園藝學系碩士論文。台中。81-90 pp。
- Asaka, O. and M. Shoda. 1996. Biocontrol of *rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *bacillus subtilis* RB14. Applied and environmental microbiology 62(11): 4081–4085.
- Back, E., W. Bukhart, M. Moyer, L. Privalle, and S. Rothstein. 1988. Isolation of cDNA clones coding for spinach nitrite reductase: Complete sequence and nitrate induction. Mol. Gen. Genet. 212: 20-26.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analyt. Biochem. 72: 248–254.
- Cataldo, D. A., M. Haroon, L. E. Schrader, and V. L. Youngs. 1975. Determination of nitrate in plant tissues. Soil Sci. Plant Anal. 6(1): 71-80.
- Claus, D., and R. C. W. Berkeley. 1986. Genus *Bacillus*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology vol. 2. P. H. Sneath (ed). Williams and Wilkins, Baltimore, U.S.A. p. 1105-1139
- Dijkstra, A. F., G. H. N. Scholten, and J. A. van Veen. 1987. Colonization of wheat seedling (*Triticum aestivum*) roots by *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*. Biol. Fert. Soils 4: 41–46.
- Elsas, J. D., A. F. Dijkstra, J. M. Govaert, and J. A. Veen. 1986. Survival of *pseudomonas fluorescens* and *bacillus subtilis* introduced into two soils of different texture in field microplots. FEMS Microbiology Letters. 38(3): 151-160.
- Forchetti, G., O. Masciarelli, S. Alemano, D. Alvarez, and G. Abdala. 2007. Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L.): isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium. Appl. Microbiol. Biotechnol. 76:1145–1152.

- Fiddaman, P. J., and S. Rossall. 1993. The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. *J. Appl. Bacteriol.* 74: 119-126.
- Hew, C. S., L. Y. Lim, and C. M. Low. 1993. Nitrogen uptake by tropical orchids. *Environmental and Experimental Botany* 33: 273-281.
- Hung, L. L., D. M. O'keefe, and D. M. Sylvia. 1991. Use of hyrogel as a sticking agent for carrier of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycol. Res.* 95(4): 427-429.
- Jaworski, E. K. 1971. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 43: 1274-1279.
- Kim, J. K., K. J. Park, K. S. Cho, S. W. Nam, T. J. Park, and R. Bajpai. 2005. Aerobic nitrification–denitrification by heterotrophic *Bacillus* strains. *Bioresource Technology* 96(17): 1897-1906.
- Layzell, D. B. 1990. N₂ fixation, NO₃⁻ reduction and NH₄⁺ assimilation. In "D. T. Dennis and D. H. Turpin", eds. *Plant Physiology Biochemistry and Molecular Biology*. Longman Scientific and Technical. pp. 389-406.
- Lim, L. Y. 1992. Mineral nutrition of tropical orchids. M.Sc. Dissertation. Department of Botany. The National University of Singapore. pp. 239.
- Msadek, T. 1999. When the going gets tough: survival strategies and environmental signaling networks in *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology.* 7: 201-207.
- Ongena, M., F. Duby, E. Jourdan, T. Beaudry, V. Jadin, J. Dommès, and P. Thonart. 2005. *Bacillus subtilis* M4 decreases plant susceptibility towards fungal pathogens by increasing host resistance associated with differential gene expression. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67: 692–698.
- Priest, F. G. 1993. Systematics and ecology of *Bacillus*. In: *Bacillus subtilis* and Other Gram-positive Bacteria: Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics, American Society of Microbiology, Washington. pp. 3-16.
- Rosen, H. 1957. A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 67: 10-15.
- Ryu, C. M., M. A. Farag, C. H. Hu, M. S. Reddy, J. W. Kloepper, and P. W. Pare. 2004. Bacterial volatiles induce systemic resistance in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 134: 1017–1026.
- Tyagny-Ryadno, M. 1933. The relations of *Bacillus mycoides* with ammonification, nitrification, and soil fertility. *J. Agr. Sci.* 23(3): 335-358.
- Yang, X. P., S. M. Wang, D. W. Zhang, and L. X. Zhou. 2011. Isolation and nitrogen removal characteristics of an aerobic heterotrophic nitrifying–denitrifying bacterium, *Bacillus subtilis* A1. *Bioresource Technol.* 102(2): 854-862.
- Zobel R. W., P. D. Tredici, and J. G. Torrey. 1976. Method for growing plants aeroponically. *Plant Physiol.* 57: 344-346.

Effects of *Bacillus* spp. Additives and Different Nitrogen Type on the Growth of Fogponics *Paphiopedilum* Orchids

Jing-Wen Chen¹⁾ Shen-Lin Lin²⁾

Key words: *Bacillus* spp. additives, nitrogen type, fogponics culture, *Paphiopedilum* Orchids

Summary

Different types of nitrogen source (nitrate-N and ammonia-N) in a modified 1/4 Hoagland solution with BS or BM added to fogponics system for growing *Paph. spicerianum*. Application of BS added to ammonia-N solution, the plants had higher nitrate reductase activity than plants in nitrate-N solution. The free amino acid contents in root was highest in solution without bacteria addition, but lowest in BM treatment.

1) Graduate student, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

2) Instructor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Corresponding author.

