

# 微生物肥料商品化保存及其複合介質應用在苗木之開發

洪美華<sup>1</sup> 賴威安<sup>2</sup> 譚鎮中<sup>1</sup> 陳鴻基<sup>1</sup> 楊秋忠<sup>3</sup>

## 摘要

本研究自本實驗室自行分離及鑑定的產孢微生物*Bacillus* sp. (6 菌株)、*Streptomyces* (1 菌株)、*Micrococcus* sp. (1 菌株)、*Meyeronyza* (1 菌株)、*Pichia* sp. (3 菌株)以及*Rhodotorula* (1 菌株), 以及非產孢微生物*Azospirillum* sp (2 菌株)、*Rhizobium* sp. (2 菌株)、*Bradyrhizobium* sp. (1 菌株)、*Sinorhizobium* sp. (1 菌株); *Lactobacillus* sp. (3 菌株); *Pseudomonas* sp. (1 菌株)。產孢微生物各菌株與BN擔體混合、非產孢微生物各菌株與M+A+B擔體混合分別製成的微生物菌劑, 利用數種栽培介質進行美濃瓜 (*Cucumis melo* L.) 穴盤苗植物生長試驗, 結果顯示未接種的植株地上部乾重以Tref及Tref+蛭石介質較佳; 施用複合菌株的處理, 產孢菌以CC-YHH053、CC-YHH069、CC-88176的菌劑的促進效果最佳, 分別可提高地上部生質量153%、161%和154%(Tref介質中)。非產孢微生物CC-RB301、CC-NO19-1、CC-NO20-1均可顯著提高植株地上部乾重(分別為53.9%、55.3%和41.1%)(在KING介質中)。選擇較具促進作物生長效果之菌株進行微生物商品化最低標準進試驗的評估。結果顯示產孢微生物CC-YHH069、CC-YHH053菌株以M1-1修正配方具較佳保存效果, 而非產孢微生物CC-RB300則以M+A+B擔體具較佳保存能力, CC-NO20-1則以B擔體的活菌保存能力較佳。其菌數均可於6個月內維持在Log CFU 7(含)以上。本研究可提高微生物肥料製劑商品化的應用價值。

**關鍵詞：**生物肥料、植物生長促進細菌(PGPB)、產孢微生物、介質、擔體複合接種劑

---

1. 國立中興大學土壤環境科學系

2. 國立中興大學生物科技發展中心

3. 國立中興大學土壤環境科學系國家講座教授, e-mail: ccyoung@mail.nchu.edu.tw

## 前言

「生物肥料」(biofertilizer)或稱為「微生物肥料」，根據中華民國政府於2013年4月3日制定的「肥料管理法」的「肥料種類品目及規格」中，對於「生物肥料」的定義為：「指其成分含有活性微生物或休眠孢子，如細菌、放線菌、真菌、藻類及其代謝產物之特定製劑，應用於作物生產具有提供植物養分或促進養分利用等功效之物品。」(行政院農委會農糧署，2013)；而楊秋忠(2014)的定義為：「係指人工培養之土壤微生物，利用活體微生物在土壤中以提供作物營養分、增進土壤營養狀況或改良土壤之物理、化學和生物性質，藉以增加作物產量及品質者。」微生物肥料的種類商品主要是液劑及固劑二大類，液體微生物肥料的保存性差，易受污染及膨罐問題，但液態商品成本較低。固態微生物肥料主要是由液態生產後乾燥或固體發酵而成，成本較高，但易運送保存。無論格蘭氏陰性或陽性的植物生長促進細菌(PGPB)的接種方法，需要將接種劑運送至土壤中並使菌體與土壤橫切面得以混合的「擔體」(carrier)(Martínez-Viveros *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2015)。本研究期以探討開發有效且保存能力高之商品化微生物肥料之產品以及技術。

## 材料與方法

### (一) 產孢及不產孢微生物肥料之菌種的分離及鑑定

所有微生物均來自於本實驗室自天然環境所分離以及鑑定之菌株，其菌屬鑑定的方式主要是利用萃取之DNA，利用聚合酶鏈反應擴增16S rRNA基因，依照Willems and Collins(1993)所述方法進行鑑定(Young *et al.*, 2005)。將16S rRNA基因核苷酸序列與美國生物資訊中心(NCBI)基因資料庫(GenBank)中的標準菌株(type strain)進行比對(Altschul *et al.*, 1997)，其所得的結果即為菌屬鑑定之依據。本研究挑選的產孢微生物種類包括：細菌 *Bacillus* sp. CC-MHH0006、CC-Jabot01、CC-MHCA、CC-MALig3、CC-YHH069 和 CC-YHH053 菌株；放線菌 *Streptomyces* sp. CC-F2-B、*Micrococcus* sp. CC-CFT082 以及酵母菌 *Merozyma* sp. CC-94009、*Pichia* sp. CC-88176、CC-94006、*Rhodotorula* sp. 88218 等13株；非產孢菌株包

括：*Azospirillum* sp. CC-CFT025、CC-RW20-51；*Rhizobium* sp. CC-RB 300、CC-RB301、CC-PN287、*Bradyrhizobium* sp. CC-PN300、*Sinorhizobium* sp. CC-SB1126；*Lactobacillus* sp. CC-NO19-1、CC-NO20-1 與 CC-CY924；*Pseudomonas* sp. CC-YMM-1 等 11 株。

### (二) 微生物複合擔體的製作：

將微生物菌液與有機質擔體(1:1體積)複合成菌劑，產孢微生物使用與經120°C 2天烘乾的碎植物材料(簡稱BN)當作擔體。非產孢微生物所使用之擔體有：稻殼 (CRH)和稻殼(重量比1:1)(簡稱FRH+RB)、穀粕(B)、礦粉M+礦粉A+穀粕 (重量比1:1:1) (簡稱M+A+B)、礦粉 (V)、礦粉 (M)、粕 (RB)、礦粉 (M) + 粕 (RB) (重量比1:1) (簡稱M+RB)(Hung *et al.*, 2014)。

### (三) 苗木生長評估：

將微生物擔體菌劑以盛裝介質的穴盤進行接種美濃瓜 (musk melon, 學名為*Cucumis melo* L.) 生長試驗。產孢微生物接種選用的栽培介質有Tref(荷藍進口)、滿地王 (KING, 德國進口) 及BVB#3: 蛭石:珍珠石(2:1:1)(簡稱BVP)；非產孢微生物接種，則選用BVB # 3、滿地王 (KING) 與Tref+蛭石(T+V)。將種子催芽後，播於裝有介質的20孔穴盤(33×28.1公分，孔5.9直徑×5.1高度公分)中，每穴一粒。以複合菌劑為處理組，以不接菌劑為控制組。每一種處理四重複，於網室設施栽培。試驗期間分別為2013年9月-10月 (產孢微生物接種) 及2014年5月份 (非產孢微生物接種)，其平均氣溫分別為30.8°C及25.8°C，平均相對濕度69%及78%，月平均日照為205.6小時及75.8小時。播種後一個月後採收，將植株地上部於70°C的烘箱乾燥至恆重，精稱其乾重(Huang *et al.*, 2013)。

### (四) 開發微生物肥料菌株的優化培養：

將促進美濃瓜效果較顯著的微生物肥料進行優化培養試驗。產孢微生物*Bacillus* sp. CC-YHH059、CC-YHH053菌株於不同NB (Himedia)、TSB(BD)+Mn，30°C 5-7天，55°C與4°C各24小時。修改的配方medium 1-1 +1 % KCl(pH8)，培養5天。修改Medium 1-1 (pH 4.7、pH

8.5、+NaCl) 進行生長及產孢條件的測試。將非產孢微生物所使用之擔體有：稻殼 (CRH)和米糠(重量比1:1)(簡稱FRH+RB)、穀粕(B)、兩種礦粉+穀粕(重量比1:1:1)(簡稱M+A+B)、礦粉V、礦粉M、粕RB、礦粉M+粕RB(重量比1:1)(簡稱M+RB)。分別將複合微生物肥料裝入容量為140 ml 的高密度聚乙烯(HDPE)樣品瓶內，於室溫下經過0-6個月的貯存時間，測定菌劑之菌數量。營養菌體的活菌數，則以標準塗抹方法測定樣品中的活菌數。孢子數量的測定方法為取適量樣品經過80°C加熱10分鐘後，或以55°C加熱3小時後再於4°C存放24小時，然後以平板塗抹法計算菌落數(CFU)。

### (五) 統計與分析

以SPSS version 13.0 軟體套組 (SPSS Inc., Chicago, USA)，以one-way analysis of variance (ANOVA) 利用Duncan's multiple range test 進行統計分析。

## 結果與討論

本研究將13種產孢微生物與BN擔體；11種非產孢細菌與M+A+B擔體，分別製成複合菌劑，以美濃瓜苗配合栽培介質(分析資料見表1)進行植物生長試驗，結果顯示未接種的植株地上部乾重以介質T及T+V較佳；施用複合菌株接種劑的處理，產孢菌以CC-YHH053、CC-YHH069、CC-88176的菌劑的促進效果最佳，可提高地上部生質量153%、161%和154%(Tref介質中)。非產孢微生物CC-RB301、CC-NO19-1、CC-NO20-1均可顯著提高植株地上部乾重(分別為53.9%、55.3%和41.1%)(在KING介質中)(見圖1)。

將促進美濃瓜穴盤苗生長功能較佳之微生物(見圖1)依照農委會最新修正公佈的《各類肥料品目及規格》規定，固態微生物肥料的有效活菌數標準為 $10^7$  CFU  $g^{-1}$ 以上，液態微生物肥料的標準為 $10^8$  CFU  $g^{-1}$ 以上；有效期限為6個月以上(行政院農委會農糧署，2013)。因此以此為最低標準進行下列試驗的評估。結果顯示產孢微生物CC-YHH069、CC-YHH053以M1-1修正配方具較佳保存效果(圖2.A、B)，而非產孢微生物CC-RB300則以M+A+B擔體具較佳保存能

力，CC-NO20-1則以B擔體的活菌保存能力較佳(見如圖2.C、D)。其菌數均可於6個月內達成Log CFU 7(含)以上。

## 結論

本研究開發產孢微生物肥料及其較佳之培養基配方(代號M1-1)以及非產孢微生物之較佳複合擔體(代號M+A+B)製成的接種菌劑可有效促進美濃瓜作物穴盤苗的生長。

## 誌謝

本研究承農業發展委員會計劃、國科會及教育部經費補助。謹致謝意。

表1.三種栽培介質性質及組成的分析結果

Table 1. Characteristics of three used plant growing media

Items:	KING	Tref	BVB#3
Moisture%(w/w, wet basis)	59	68	64
Organic matter %(w/w, dry basis)	91	90	91
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N( mg kg <sup>-1</sup> )	2.8	2.08	44.58
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N( mg kg <sup>-1</sup> )	497.9 <sup>1</sup>	402.99	5.439
P( mg kg <sup>-1</sup> )	151.4	45.74	113.92
Na( mg kg <sup>-1</sup> )	81.5	59.22	63.34
K( mg kg <sup>-1</sup> )	696.3	257.96	500.20
Ca( mg kg <sup>-1</sup> )	4752.4	4303.59	3616.86
Mg( mg kg <sup>-1</sup> )	340.0	534.14	771.31
Mn( mg kg <sup>-1</sup> )	8.5	4.69	0.82
Fe( mg kg <sup>-1</sup> )	88.2	42.38	41.32
Mn( mg kg <sup>-1</sup> )	22.3	10.91	7.63
Cu( mg kg <sup>-1</sup> )	1.5	0.57	0.49
Zn( mg kg <sup>-1</sup> )	8.3	2.94	3.98
Cd( mg kg <sup>-1</sup> )	0.07	0.03	0.04
Cr( mg kg <sup>-1</sup> )	0.04	0.01	0.01
Ni( mg kg <sup>-1</sup> )	0.11	0.01	0.03
Pb( mg kg <sup>-1</sup> )	1.20	0.41	0.99

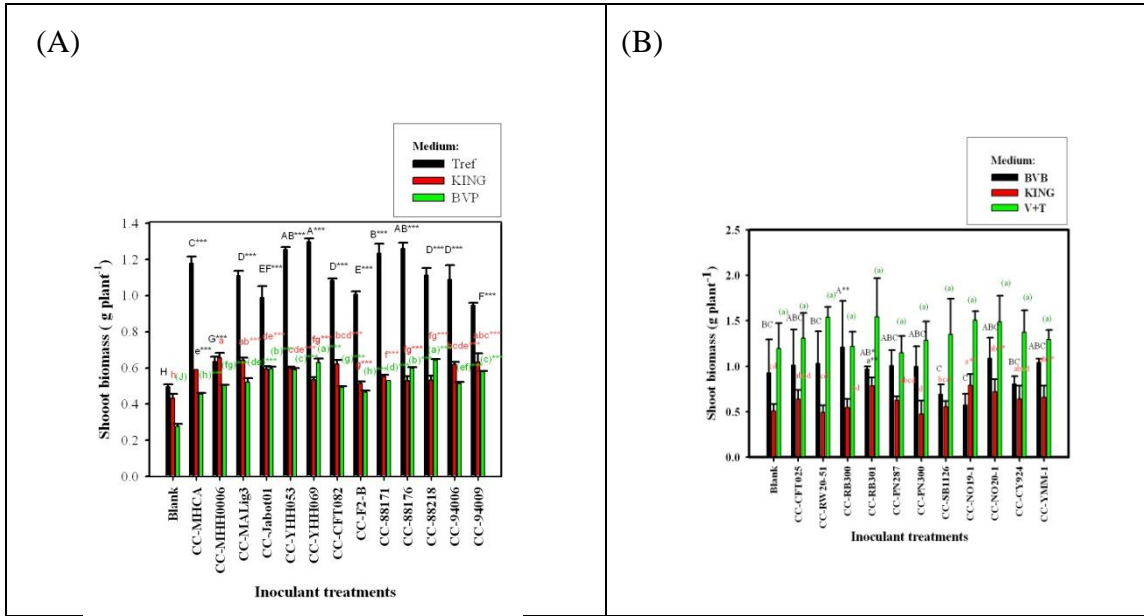
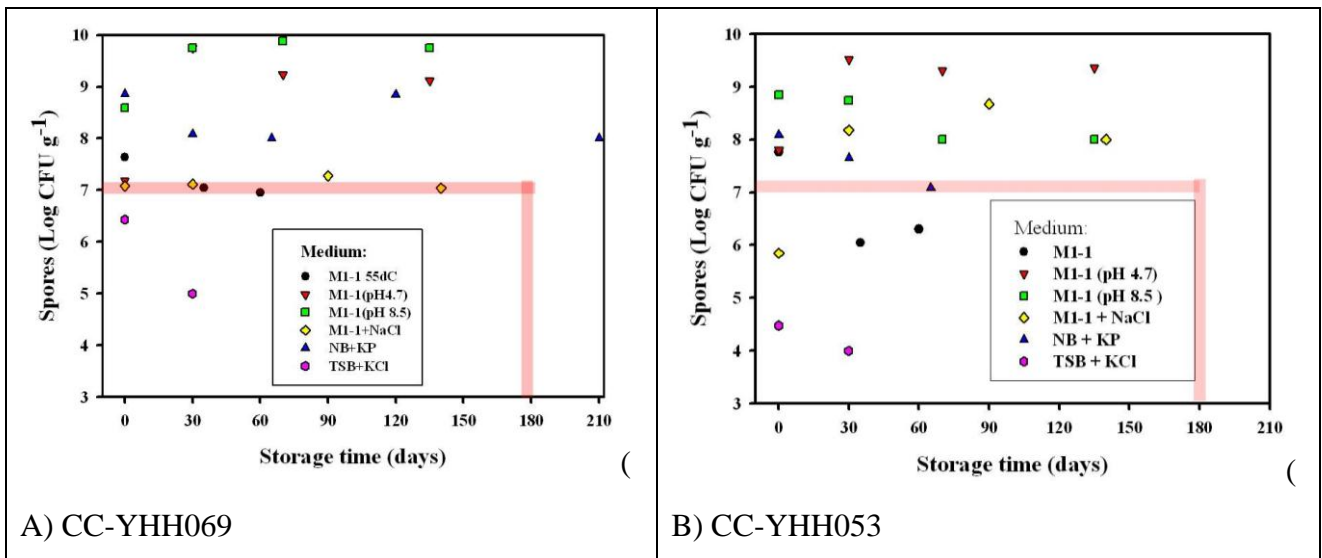


圖1.施用(A)產孢(B)不產孢菌種複合擔體菌劑於三種不同介質中美濃瓜植株重量

Fig. 1. Shoot dry weights of musk melon with carrier based inocula consisted of spore - (A), or non-spore forming (B) strains in three different plant growth media



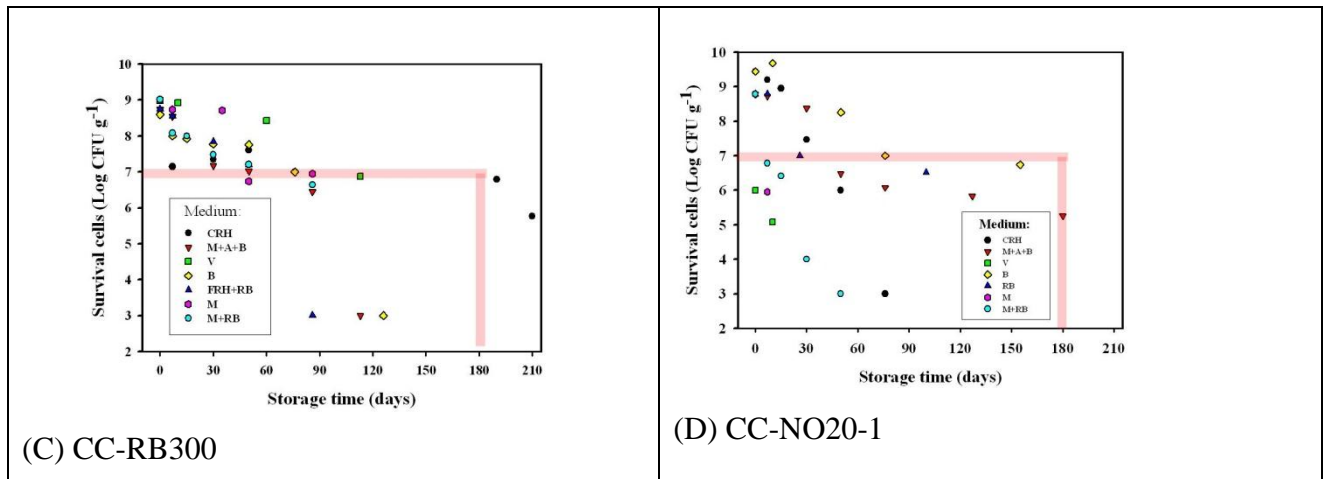


圖2.產孢(A、B)及非產孢菌(C、D)在不同培養基中的菌劑中經不同天數的存活菌數

Fig. 2. Storiability of spore (A and B) and non-spore forming strains (C and D) in various carriers

### 參考文獻

1. 行政院農委會農糧署。 2013 。肥料種類品目及規格(農糧字第 1021052625 號)。
2. Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaeffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
3. Corry, J. E. L., G. D. W. Curtis, and R. M. Baird. 1995. *Culture Media for Food Microbiology*, Vol. 34, Progress in Industrial Microbiology, Elsevier, Amsterdam.
4. Huang, J.-C., W.-A. Lai, S. Singh, A. Hameed, and C.-C. Young. 2013. Response of mycorrhizal hybrid tomato cultivars under saline stress. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 13 (2): 469-484.
5. Hung M.-H., W.-A. Lai, C.-C. Tan, H.-J. Cheng, Z.-C. Luo, and C.-C. Young. 2014. Development of biofertilizer with commercially available storability and application of carrier based inocula and solid media for cultivation of seedlings. P. 143-157. In: Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan (ed.) 2014 Proceeding of workshop on research achievement by Soil Microorganism and Ecology Task Force, agriculture and



environment sector. Held on November 27, 2014, Wufeng District, Taichung (in Chinese)

6. Hung, M.-H., A. B. Arun, F.-T. Shen, P. D. Rekha, and C.-C. Young. 2005. Indigenous rhizobia associated with native shrubby legumes in Taiwan. *Pedobiologia* 49: 577-584.
7. Lin, H.-Y., W.-A. Lai, M.-H. Hung and Chiu-Chung Young. 2015. Effect of different carriers and formulations on survival rate of rhizobia. No. A018, p.65. In Agricultural Chemical Society of Taiwan (ed.) Proceeding of 53th Conference on Agriculture Chemistry. (in Chinese)
8. Martínez-Viveros, O., M.A. Jorquera, D.E. Crowley, G. Gajardo, and M. L. Mora. 2010. Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 10 (3): 293 – 319.
9. Murray, P. R., E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (eds.). 1995. *Manual of clinical microbiology*, 6<sup>th</sup> ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
10. Vincent, J.M., 1970. *A Manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacteria*. Blackwell Scientific, Oxford.
11. Willems A., and M. D. Collins. 1993. Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S rRNA gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 43 : 305-313.
12. Young, Chiu-Chung (楊秋忠). 2014. *Soil and Fertilizer: Concepts and Practices*. Taichung: National Chung Hsing University. P. 386-387.
13. Young, C. C., P. Kämpfer, F. T. Shen, W. A. Lai, and A. B. Arun. 2005. *Chryseobacterium formosense* sp. nov., isolated from the rhizosphere of *Lactuca sativa* L. (garden lettuce). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 423-426.

## Abstract

The spore forming microorganisms *Bacillus* (n=6), *Streptomyces* (n=1), *Micrococcus* (n=1), *Meyerozyma* (n=1), *Pichia* (n=3) and *Rhodotorula* (n=1); and non-spore forming bacteria root nodulating bacteria (n=5), *Azospirillum* (n=2), *Pseudomonas* (n=1) and *Lactobacillus* (n=3), isolated from various sources, were tested for the development of carrier-based inocula for the cultivation of plug seedling of musk melon (*Cucumis melo* L.). The carriers BN and M+A+B were used as carriers for preparation of the inocula with spore forming and non-spore forming strains, respectively. The results evidenced that crop without inoculation showed dry shoot biomass was obtained in Tref and Tref+vermiculite; and CC-YHH053, CC-YHH069 and CC-88176 among spore forming strains significantly improved the shoot biomass by 153, 161 and 154%, respectively (in Tref medium). And CC-RB301, CC-NO19-1, CC-NO20-1 among non-spore forming strains also improved the shoot biomass by 53.9, 55.3 and 41.1%, respectively (in KING medium). The potential plant growth promoting strains were selected to develop biofertilizer products with commercially available storability in line with regulations and standards. During 6-month storage, the  $10^7$  CFU g<sup>-1</sup> cells were achieved by growing and sporulation of spore forming strains CC-YHH069 and CC-YHH053 in modified medium M1-1 and mixed with carrier BN; and also by mixing the cells of non-spore forming strains CC-RB300 and CC-NO20-1 with carriers M+A+B and B, respectively. This results may improve the application of innovative biofertilizer in agriculture.

**Key words :** Biofertilizer, Plant Growth Promoting Bacteria(PGPB), Spore forming microorganisms, Media, Carrier-based inocula.