

# 臺東地區重要作物溶磷菌之開發研究

黃文益<sup>1,2</sup>

## 摘要

微生物肥料於田間應用時，限制因素之一為土生微生物的競爭，因此篩選適合於當地土文氣候的土生微生物有其發展前景，本試驗於臺東地區各地採集果園根系土壤進行溶磷菌篩選工作，將篩選出的菌株進行溫室盆栽試驗及田間試驗，結果顯示，在溫室短期作物中，澆灌市售溶磷菌能有效提高大部分蔬菜鮮重及株高，本試驗所篩出之菌株 E69 有提升對蔬菜鮮重及乾種有提升但不顯著，在田間試驗的玉米穗重則有顯著提升，本 E69 菌株經 Biolog 鑑定為 *Burkholderia dolosa* 伯克氏菌屬。

**關鍵詞：**溶磷菌、篩選、伯克氏菌屬

## 前言

磷在土壤中多以無機難溶性型態存在，不易為植物吸收，溶磷菌可促進磷的溶解，增加植物根系對磷的吸收。然在農業上的應用，有許多因素使溶磷菌的效能及表現不如預期，其中最主要的因素為溶磷菌在作物根系的定殖能力及與土生微生物的競爭。臺東地區夏季氣候炎熱降雨集中，且為海岸山脈沖積土，在氣候、土壤及作物上均異於北部及西部，有發展本區的溶磷微生物的需求。未來的農業發展在供應作物生長的養分上，為朝向精準合理的使用肥料，其中微生物肥料的使用可降低農業生產成本，提高農民收益，逐漸為社會大眾重視(林和吳，2005)。本試驗主要為從本區土壤中分離出適合臺東地區氣候土壤的優良溶磷菌株，以應用於本區主要作物，提高其品質及產量。溶磷菌的篩選主要為使用含難溶性磷的培養基，如 Pikovskaya medium (Pikovskaya, 1948)，經序列稀釋及塗盤後挑選溶磷圈較大的菌株進行分離純化、測定菌株溶磷能力，進行盆栽試驗及菌株鑑定等(劉等，2005；黃等，2006；Hu et al., 2006；Damarjaya et al, 2005)，以期能篩選有市場潛力的菌株。

## 材料與方法

1. 採取臺東地區果樹根系土壤進行分離並記錄地上作物及植生狀態。
2. 溶磷菌分離：取植物根系土壤加入 50 ml 稀釋液中，震盪 30 分鐘，序列稀釋取  $10^{-3}$ ~ $10^{-5}$  稀

- 
1. 通訊作者
  2. 行政院農委會臺東區農業改良場助理研究員

- 釋液 0.1ml 均勻塗抹在平板培養基，於 28°C 培養 2 天。
3. 將有明顯溶磷圈之菌株以四分畫法純化後，於 28°C 培養 3 天測定溶磷圈直徑(D)及菌落直徑(d)，以(D/d)值大小初步判定菌株溶磷能力。
  4. 溶磷能力測試：取已知濃度的菌液 2ml 加入 50ml 液體培養基，另以不接種作為對照，3 重複，於 28°C (160 rpm) 恆溫震盪培養，以 4800 rpm 離心 15 分鐘，取上清液以鉬藍法測定有效性磷含量。
  5. 培養基以國家標準局 CNS 15301-3 配製：10g sucrose, 0.27g  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 0.2g KCl, 0.1g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.001g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.001g  $\text{MnSO}_4 \cdot 4-6\text{H}_2\text{O}$ , 磷酸鹽有三種：(1) 0.3 g/L 磷酸鈣( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) (2) 0.5 g/L 磷酸鋁( $\text{AlPO}_4$ ) 及 (3) 0.5 g/L 磷酸亞鐵( $\text{FePO}_4$ )，固態培養基另加 12 g/L 純化瓊脂，加水至 1000 ml。
  6. 溫室盆栽試驗：以空心菜(桃園一號)、莧菜、小白菜(三鳳二號)及綠萵苣(翠花)，進行試驗，發芽 1 週後移植於長型花盆，每處理五重複，分別為處理 1：澆灌市售溶磷菌，處理 2：澆灌篩選菌 E60 及對照 CK，於 10 月 18 日調查株高及鮮重等。
  7. 田間玉米試驗：以 CRD(完全逢機設計)設置，於生長初期及中期分次澆灌，每株 1 公升，分為處理 A. 市售溶磷菌，處理 B. 農糧署推廣用溶磷菌，處理 C. 本場篩選之溶磷菌(E60)，處理 D. 本場篩選之溶磷菌(E69) E. 對照組不施用溶磷菌，每處理 3 重複，以畦為單位，共 15 畦。
  8. 菌種鑑定：純化後的菌，以四分劃法接種至 BUG 培養基上，培養 24 小時後，接種至 GEN III 96 well microplates 上，於 33°C 下培養 24 小時，以 Biolog 鑑定判讀，軟體系統 MicroLog™ system 5.1.01。

## 結果與討論

### 一、溶磷菌篩選及鑑定

於臺東地區果園採取果樹根系土壤，序列稀釋後以選擇性培養基選擇透明溶磷圈的菌株(圖 1)，純化後篩選出數株具明顯溶磷圈的菌株(圖 2)，經以 Biolog 初步鑑定結果如表 1，主要為伯克氏菌屬(*Burkholderia*)，該菌屬為在選擇性培養基最快出現溶磷菌圈的菌種，其菌落周圍光華，顏色乳白至淡黃，菌落周圍出現明顯透明溶磷圈。

### 二、溶磷能力

經以溶磷圈對菌落的比值選擇數株進行溶磷能力測試，在對難溶性磷酸鈣的結果如表 2，因在前人研究中大部分使用的難溶性磷酸鹽含量為每公升 3~5 克，而標檢局使用量為每公升 0.3~0.5 克，因此在本試驗中使用二種調配濃度，即每公升 0.3~0.5 及 3~5 克的磷酸鹽，在調配過程中也發現即使是僅加入每公升 0.3 克的磷酸鈣亦無法完全溶解，靜置後有沉澱的現象，表 2 為試驗菌株在磷酸鈣液態培養基的溶磷能力，在第一天培養 24 小時後，以市售溶磷菌的溶磷量較高，其餘菌株相較於對照滅菌的磷酸鈣培養基亦有顯著性提高溶液中的磷含量，在第三天及第七天的數據中顯示 E60、E69 及市售溶磷菌表現均優，尤其 E69 有後來居上的趨

勢，E60 及 E69 在第一天至第 3 天之間溶磷量大量上昇，第 3 天至第 7 天之間趨緩，顯示本試驗篩選的菌株在初始時反應較市售菌株慢，但在第 3 天後則能追上溶磷表現，在添加每公升 0.3 克或 3 克磷酸鈣的差異上，可以見到溶磷量有增加，但增加的倍率與添加的倍率無正比關係，應該為該單位體積菌數所能溶解的磷酸鈣有一定量的限制；表 3 為各菌株對磷酸鐵的溶磷能力，結果顯示市售溶磷菌在每公升 0.5 克磷酸鐵的液態培養基有顯著性的提高溶磷量，尤其在第三天時最高，其餘菌株在磷酸鐵上的表現與對照無顯著差異，顯示這些菌株無法溶解磷酸鐵或對磷酸鐵的溶解能力很弱，而添加每公升 5 克磷酸鐵時溶液內的磷含量確實高於添加每公升 0.5 克磷酸鐵；表 4 為各菌株對磷酸鋁的溶磷能力，結果顯示本試驗篩選的菌株 E60、E65 及 E69 對溶解磷酸鋁的能力非常高，不僅顯著高於對照組，且顯著高於市售溶磷菌，顯示本試驗篩選株菌有使用於磷酸鋁豐富的酸性土壤中的潛力。

表 1. Biolog 初步鑑定結果

菌株	鑑定結果
E60	Burkholderia stabilis
E61	Burkholderia vietnamiensis
E62	Burkholderia contaminans
E63	Pantoea cyripedii
E64	Methylobacterium rhodinum
E65	Burkholderia ambifaria/cepacia
E66	Mycobacterium novocastrense/aichiense
E67	Burkholderia contaminans
E68	Burkholderia gladioli
E69	Burkholderia dolosa

表 2. 各菌株對磷酸鈣的溶磷能力

Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Treatment	Phosphate solubilization (mg/L)		
		Day 1	Day 3	Day 7
0.3g	E60	36.80 b	97.77 a	99.00 a
	E65	27.60 b	38.67 c	78.67 b
	E69	13.54 bc	71.20 b	108.87 a
	Commercial	75.87 a	81.87 ab	100.00 a
	CK	5.72 c	4.95 d	5.18 c
3g	E60	55.60 b	88.40 ab	135.84 a
	E65	44.76 b	66.94 b	103.80 b
	E69	33.50 bc	95.40 a	136.93 a
	Commercial	93.54 a	103.20 a	124.50 ab
	CK	25.30 c	27.50 c	26.70 c

Value are mean of three replications, mean values sharing the same letter do not differ significantly by LSD at  $p \leq 0.05$

表 3. 各菌株對磷酸鐵的溶磷能力

FePO <sub>4</sub>	Treatment	Phosphate solubilization (mg/L)		
		Day 1	Day 3	Day 7
0.5g	E60	34.13 b	35.20 b	61.33 b
	E65	26.13 b	24.40 b	25.13 b
	E69	24.53 b	27.33 b	22.93 b
	Commercial	64.67 a	121.67 a	101.60 a
	CK	35.33 b	33.73 b	29.64 b
5g	E60	169.67 a	187.87 a	195.67 a
	E65	141.20 a	188.53 a	187.13 a
	E69	142.20 a	179.87 a	192.47 a
	Commercial	152.93 a	191.20 a	208.80 a
	CK	176.67 a	193.93 a	223.93 a

Value are mean of three replications, mean values sharing the same letter do not differ significantly by LSD at  $p \leq 0.05$

表 4. 各菌株對磷酸鋁的溶磷能力

AlPO <sub>4</sub>	Treatment	Phosphate solubilization (mg/L)		
		Day 1	Day 3	Day 7
0.5g	E60	58.73 a	73.40 b	101.47 b
	E65	39.53 ab	79.20 b	145.40 ab
	E69	68.47 a	125.00 a	179.27 a
	Commercial	13.54 b	25.13 c	41.27 c
	CK	5.36 b	4.68 c	6.52 d
5g	E60	36.60 a	158.93 a	270.60 a
	E65	25.00 a	123.87 b	216.67 ab
	E69	34.50 a	135.64 ab	264.35 a
	Commercial	19.47 a	38.40 c	50.13 b
	CK	24.53 a	25.27 c	27.93 b

Value are mean of three replications, mean values sharing the same letter do not differ significantly by LSD at  $p \leq 0.05$

### 三、溫室蔬菜試驗

本試驗選用四種生長快速的蔬菜，以溶磷能力較佳的 E69 菌並已與市售溶磷菌為對照進行試驗，於種植一個月後進行調查，表 5 為各菌株對莧菜生長的影響，結果顯示市售溶磷菌對莧菜鮮重及乾重有顯著性提升，在表 6 對萵苣生長的影響方面，各溶磷菌對萵苣株高、根長、鮮重及乾重均無顯著差異，表 7 在對小白菜生長的影響以市售溶磷菌與對照的株高、鮮重及乾重有顯著差異，表 8 對空心菜的影響方面與小白菜一致，市售溶磷菌與對照的株高、鮮重及乾重有顯著差異，四種蔬菜的試驗結果顯示市售溶磷菌對蔬菜生長有促進作用，本試驗所篩選的 E69 對蔬菜生長有影響但不顯著。

表 5. 各菌株對莧菜生長的影響

Treatment	Shoot length (cm)	Root length (cm)	Biomass (g/plant)	Dry weight (g/plant)
E69	16.4 a	20.5 a	9.1 b	4.2 b
Commercial	17.1 a	19.9 a	13.4 a	6.5 a
Soil only	17.0 a	19.4 a	10.6 b	4.9 b

Value are mean of three replications, mean values sharing the same letter do not differ significantly by LSD at  $p \leq 0.05$

表 6. 各菌株對萵苣生長的影響

Treatment	Shoot length (cm)	Root length (cm)	Biomass (g/plant)	Dry weight (g/plant)
E69	11.2 a	7.2 a	8.5 a	2.2 a
Commercial	9.9 a	7.6 a	8.9 a	2.3 a
Soil only	9.8 a	7.9 a	8.4 a	2.2 a

Value are mean of three replications, mean values sharing the same letter do not differ significantly by LSD at  $p \leq 0.05$

表 7. 各菌株對小白菜生長的影響

Treatment	Shoot length (cm)	Root length (cm)	Biomass (g/plant)	Dry weight (g/plant)
E69	11.2 b	8.6 a	12.2 ab	3.1 ab
Commercial	15.0 a	8.7 a	18.3 a	4.2 a
Soil only	12.4 b	7.7 a	9.5 b	2.5 b

Value are mean of three replications, mean values sharing the same letter do not differ significantly by LSD at  $p \leq 0.05$

表 8. 各菌株對空心菜生長的影響

Treatment	Shoot length (cm)	Root length (cm)	Biomass (g/plant)	Dry weight (g/plant)
E69	37.8 ab	41.2 a	34.2 ab	17.9 b
Commercial	39.4 a	39.0 a	38.1 a	19.3 a
Soil only	34.8 b	42.8 a	29.6 b	17.5 b

Value are mean of three replications, mean values sharing the same letter do not differ significantly by LSD at  $p \leq 0.05$

#### 四、田間試驗

在田間試驗方面，本試驗選擇中長期作物食用水果玉米(彩珍)，於幼苗期及生長中期共澆灌菌液 4 次，成熟後採取玉米穗進行分析，結果如表 9，在玉米穗重方面一株僅留一穗，在 E69 及市售溶磷菌 1 號方面與對照有顯著性差異，在甜度方面，E60 反而低於對照，其餘菌種與對照無顯著性差異。

表 9. 各菌株對玉米生長的影響

Treatment	Corn ear weight	Soluble Solid
E60	151.0 b	9.4 b
E69	167.3 a	9.7 ab
Commercial 1	169.7 a	10.5 a
Commercial 2	161.0 ab	10.4 a
CK	151.5 b	10.8 a

Value are mean of three replications, mean values sharing the same letter do not differ significantly by LSD at  $p \leq 0.05$

#### 結論

本試驗篩選的 E69 菌株在溫室的試驗方面對蔬菜的生長影響雖有提昇但效果不顯著，在田間試驗的玉米穗重則有顯著提升，由於蔬菜僅澆灌一次，玉米則澆灌四次，且本菌株的效用由溶磷能力試驗得知其反應速度不及市售溶磷菌，因此或許在改變澆灌方式，如增加澆灌次數及澆灌濃度後可得顯著差異。

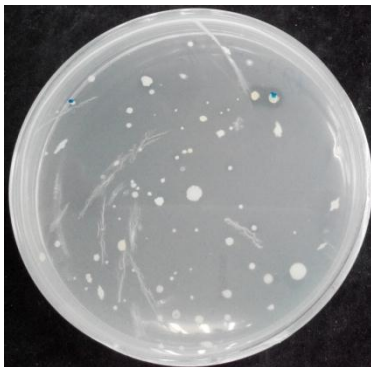


圖 1. 溶磷菌的篩選，在序列稀釋後選取具明顯透明溶磷圈的菌株。

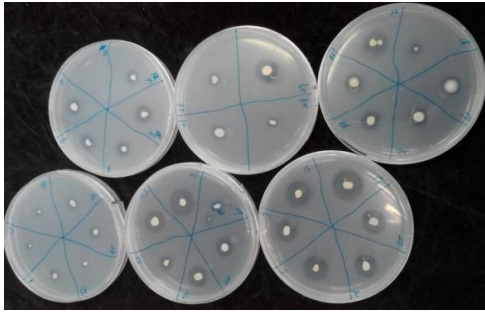


圖 2. 由溶磷圈的大小初步篩選有潛力的溶磷菌。



圖 3. E69 以營養培養基(NB)於 30°C 下在 10 公升發酵槽 24 小時即可培養出  $\geq 10^8$  CFU 的溶磷菌。

### 參考文獻

- 1.江晃榮。1993。農業生物技術。324-340。臺北：國立編譯館。
- 2.黃偉、黃欠如、胡鋒、吳洪生、李輝信。2006。紅壤溶磷菌的篩選及溶磷能力的比較。生態與農村環境學報 22(3)：37-40。
- 3.劉曉芳、任鵬、孔健、黃曉東。2003。土壤中溶磷微生物的篩選。山東商業職業技術學院學報 3：3。
- 4.Damarjaya, D. I., J. Widada, K. Senoo, M. Nishiyama, and S. Otsuka.2005. Mineral phosphate solubilizing bacteria isolated from various plant rhizosphere under different aluminum content. Indonesian Journal of Biotechnology 10(2)：814-821.
- 5.Hu X., J. Chen, and J. Guo. 2006. Two phosphate- and potassium solubilizing bacteria isolated from Tianmu Mountain, Zhejiang, China. World Journal of Microbiology & Biotechnology 22：83-990.

# Development and Application of Phosphate-solubilizing Bacteria in Taitung Area

Wen-Yi Huang<sup>1,2</sup>

## Abstract

When using microbial fertilizer in the field, one of the reasons for the remarkable efficacy is not easy to compete native microbes, so screening suitable soil microbes for the local climate and soil has its development prospects. We collected the soil around the roots and screening PSB (phosphorus solubilizing bacteria) in Taitung area orchards, and tests PSB ability in greenhouse and field. The result shows that commercially PSB can effectively improve some vegetables fresh weight and height, E69 strain have no significant in vegetable trials, but have significantly at improved corn ear weight in field trials, this E69 strain was identified as *Burkholderia dolosa* by Biolog.

**Key word:** Phosphate-solubilizing bacteria. Screening. *Burkholderia*.

---

1. Corresponding author.

2. Assistant Researcher, Taitung District Agricultural Research and Extension Station, COA.