市售溶磷菌肥料產品品質分析

林素禎[1,*]、林姿君[2]、簡宣裕[3]

摘要

高品質的微生物肥料才能在田間提高植物營養元素的吸收及促進植物生長，而政府的品質管控有助於微生物肥料產品在田間獲得更好和更一致的結果，而且還可以從市場上去除品質差的產品，進而提高農民的信心。本文將介紹農業試驗所於 2017 年與 2018 年購買市面上販售的溶磷菌肥料產品，進行溶磷菌有效活菌數、雜菌率、溶磷環、溶磷活性及菌種鑑定，其檢測方法參考農糧署公告的微生物肥料檢驗項目之檢驗方法。由 2017 年檢測結果可知，農業試驗所由市面上購得的 14 個溶磷菌肥料產品只有 5 個皆符合農糧署微生物肥料規定，合格率為 36%。由 2018 年檢測結果可知，16 個市售溶磷菌肥料產品只有8個皆符合農糧署微生物肥料規定，合格率為 50%。上述檢測結果為國內微生物肥料產品上市以來第一次全面性的微生物肥料產品之品質分析，該分析資料可提供農糧署在微生物肥料產品品質管控以及未來微生物肥料法規修改之參考。

關鍵詞：微生物肥料、溶磷菌、品質管控。

前言

農委會農糧署自 2008 年起推動合理化施肥至 2014 年止，經由合理施用化學肥料，每年業已減少化學肥料施用量 10.7%，平均每年約減少 12 萬公噸 (農委會農糧署農業統計年報 91-103 年, http://www.afa.gov.tw)，未來擬利用有機質肥料

* 通訊作者：linmay@tari.gov.tw
1 農委會農業試驗所農業化學組助理研究員。台灣 台中市。
2 農委會農業試驗所農業化學組計畫助理。台灣 台中市。
3 農委會農業試驗所農業化學組前研究員。台灣 台中市。

與微生物肥料之施用，期能再次降低化學肥料之施用量。

微生物肥料 (biofertilizer) 的商業化生產始於 1895 年，在美國和英國開始生產豆科植物用的根瘤固氮菌接種劑，到了 1993 年，根瘤固氮菌接種劑在世界各大洲許多國家都有生產 (Brockwell & Bottomley 1995)。化學肥料與有機質肥料可用肥料成分來標示其肥分之高低，而微生物肥料中除了固氮菌可直接提供作物氮肥外，其他種類的微生物肥料都是藉由增進土壤營養狀況或改良土壤之理化、生物性質，而增加作物產量及品質者，所以微生物肥料的必要檢驗項目與化學肥料及有機質肥料迥然不同。印度在 1996 年提出了溶磷菌與固氮菌 (*Azospirillum*) 的產品標準規範，標準規範中包括菌種名稱、出廠時之菌數、保存期限到期時之菌數、雜菌率、保存期限、pH值、水分含量、定量的活性指標、載體種類、載體大小定量指標 (Ghosh *et al*. 2001)。目前國內的微生物肥料產品登記時需提供菌種名稱、出廠時之目標菌株有效活菌數、活性、大腸桿菌群、雜菌率、保存期限等，但微生物肥料產品規格中無定量的微生物肥料活性與載體大小之規定，且無需提供微生物肥料的肥 (功) 效試驗報告。

Catroux 等人 (2001) 報導指出世界各地 90% 的豆科根瘤菌沒有實際的效果，主要是因產品的品質很差。Herrmann等人 (2013) 報導指出 65 個微生物產品中，只有 37% 的產品中是“純的”微生物菌劑，而其他 63% 被雜菌污染，且 40% 產品中沒有指標微生物。法國根瘤菌產品品管法規最嚴格，每粒種子的菌數需在 10^6 以上，且從出廠到儲架期間皆需無污染，其產品每季使用前皆需經過檢定 (Herrmann *et al*. 2013)。

微生物肥料品質好壞直接影響到施用效果，目前我國微生物肥料產品販售前需先取得農糧署許可證號才能進行販售，而要取得農糧署許可證號，微生物肥料產品必須要先經過檢驗單位檢驗合格。目前微生物肥料產品檢驗之採樣都是取剛製造完成之產品，而微生物肥料產品從出廠到儲架期間，其品質在保存期限內是否還能維持，則有待國內政府機關定期抽樣檢驗才能知道實際狀況。從 2018 年起，農糧署及各縣市政府開始進行微生物肥料產品抽樣與檢驗，希望能在微生物肥料產品品質上進行把關。農業試驗所在 2017 與 2018 兩年間，購買市售溶磷菌肥料產品進行檢驗，本文中將介紹這些溶磷菌肥料產品根據農糧署公告的微生物肥料檢驗項目之檢驗結果。

材料與方法

農業試驗所於2017年與2018年購買市面上販售的溶磷菌肥料產品，進行溶磷菌有效活菌數、雜菌率、溶磷環、溶磷活性等之檢測及菌種鑑定，其檢測方法參考農糧署公告的「肥料檢驗項目之檢驗方法」，溶磷菌有效活菌數及溶磷活性檢驗方法編號為AFS3183-1，雜菌率檢驗方法編號為AFS3802-1，溶磷菌肥料產品之菌種鑑定方法編號為AFS3001-1。另外，目前國內在微生物肥料限制事項中只有大腸桿菌群檢測，2017年農業試驗所委託弘光科技大學食品與化妝品品質檢驗與分析中心檢測市售14個溶磷菌肥料產品之大腸桿菌群、大腸桿菌與沙門氏菌，其檢驗方法參考衛福部公告食品微生物之檢驗方法 (大腸桿菌群之檢驗、大腸桿菌之檢驗及沙門氏桿菌之檢驗)。本文中溶磷菌肥料產品各項的檢測方法簡述於下。

溶磷菌有效活菌數、雜菌率及溶磷環測定

取10 g (或10 mL) 溶磷菌肥料產品放入容積250 mL已滅菌三角瓶中，加入90 mL已滅菌之冷稀釋液中，即為10倍稀釋檢液 (亦稱 10^{-1} 稀釋度檢液)。上述冷稀釋液為生理食鹽水，其配製方法如下：將 8.5 g NaCl 溶解於蒸餾水中，然後稀釋定量成 1 L 經滅菌後備用。將裝有10倍稀釋檢液之三角瓶置於迴轉振盪器上，以30℃，200 rpm 轉速振盪 20 min，使其混合均勻。振盪後，樣品若為粒劑，需於桌面靜置30 s後，再行稀釋。吸取 1 mL 之 10 倍稀釋檢液，移入 9 mL 冷稀釋液之螺旋試管中，振盪均勻，即為 10^2 倍稀釋檢液 (亦稱10^{-2}稀釋度檢液) 。依序稀釋至所需稀釋度。本操作需製作不添加溶磷菌肥料產品之空白對照組。取0.1 mL適當稀釋度之菌檢液置於培養基表面中央處 (若預估菌液之活菌數為10^9 CFU mL^{-1}，則採用10^5－10^7倍稀釋檢液；依此類推) ，立即取滅菌之玻璃塗抹棒，將菌液均勻塗抹在培養基表面。確認培養基表面無菌液流動後，將培養皿倒置於生長箱內30℃黑暗培養，分別於第3 d、第 7 d、第 14 d及第 28 d，選擇每皿菌落數在25－250之稀釋度計算菌落數，溶磷菌有效活菌數 ＝ 平均菌落數 (CFU $皿^{-1}$) × 稀釋倍率 / 稀釋菌液量 (g $皿^{-1}$或 $mL皿^{-1}$)。雜菌係指不屬於微生物肥料目標菌種(溶磷菌) 之其他微生物，依菌落特徵判定雜菌數，計算微生物肥料雜菌率，雜菌率 ＝ 雜菌數 × (雜菌數 + 溶磷菌數)$^{-1}$ × 100%。溶磷菌菌落周圍可形成透明

環，測量溶磷菌菌落形成透明環之直徑，以每一菌落最長與最短之直徑，取其平均值代表溶磷菌菌落之溶磷環直徑。上述溶磷菌培養基如表1所示，每個直徑 9 cm 培養皿有 13 mL 培養基，平板培養基厚度約 2 mm。

溶磷活性

取 1 g (或 1 mL) 溶磷菌肥料產品加入 100 mL 液體培養基中，在 30℃， 200 rpm 培養箱中振盪培養 4 d，另取1 g (或1 mL) 經滅菌處理之溶磷菌肥料產品為對照組。上述溶磷菌液體培養基之組成不含瓊脂 (agar)，其餘與表1相同。培養後，將培養液置於高速離心機中離心20 min (5℃ 配合 27000 x g 條件)，然後取澄清液，並以0.45 μm濾膜過濾。取定量濾液 (磷約100 μg–900 μg) 移至50 mL量液瓶中，加入10 mL混合試劑，以去離子水稀釋定量，混勻並靜置1 h後，以波長420 nm分光光度計測定磷濃度。磷標準曲線製作方法如下：取0 mL、5 mL、10 mL、15 mL、20 mL及 25 mL 之 50 mg L^{-1}磷標準溶液，分別加入50 mL量液瓶中，並各加入10 mL混合試劑後以去離子水稀釋定量至50 mL，混勻後即為0 mg L^{-1}、5 mg L^{-1}、10 mg L^{-1}、15 mg L^{-1}、20 mg L^{-1}及25 mg L^{-1} 之磷濃度，靜置1 h後，以分光光度計測定，並製作標準曲線。依標準曲線所得之溶磷菌肥料產品磷濃度，計算磷含量。溶磷活性是指單位重量 (體積) 溶磷菌肥料產品之溶磷菌，在單位時間內將難溶性磷分

表 1. 溶磷菌固體培養基[z]
Table 1. Culture medium for phosphate-solubilizing bacteria

Composition	Concentration (g/L)	Company name
Sucrose	10	Choneye, Taiwan
NH_4NO_3	0.27	Katayama, Japan
KCl	0.2	Katayama, Japan
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1	Katayama, Japan
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.001	Katayama, Japan
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0.001	Merck, Germany
Agar	15	Becton, Dickinson and Company，BD, USA
$Ca_3(PO_4)_2$	5	Katayama, Japan

[z] Medium pH was adjusted to 7.0 ± 0.1, and then sterilized at 121℃ for 15 minutes.

解為水溶性磷之量μg (g (mL) × h (d)) $^{-1}$，溶磷活性 ＝ (溶磷菌肥料產品之培養液所含水溶性磷量 (μg 瓶$^{-1}$) – (滅菌的溶磷菌肥料產品之培養液所含水溶性磷量 (μg 瓶$^{-1}$)) / (使用溶磷菌肥料產品量 (mL 瓶$^{-1}$ 或 g 瓶$^{-1}$) × 培養時間 (h或d))。上述混合試劑的配製方法如下：將偏釩酸銨溶液移入1000 mL量液瓶中，快速攪拌，並緩慢加入250 mL濃硝酸 (HNO_3)，冷卻至室溫後，將鉬酸銨溶液倒入量液瓶中，定量至1000 mL。上述鉬酸銨溶液為取25 g鉬酸銨 ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}\cdot 4H_2O$) 溶解於400 mL去離子水中後備用；偏釩酸銨溶液為取1.25 g偏釩酸銨 (NH_4VO_3) 溶解於300 mL 之沸騰去離子水中，冷卻至室溫供用；50 mg L^{-1} 磷標準溶液製作為以KH_2PO_4先於40℃下乾燥，正確稱取0.2197 g後，加入去離子水及25 mL 3.5 M硫酸液，再加去離子水至1000 mL，此時磷濃度即為磷50 mg L^{-1}，亦可採用市售磷標準溶液。上述3.5 M硫酸液製作為緩慢將194 mL濃硫酸，加入500 mL去離子水中，再稀釋為1000 mL，冷卻備用。

溶磷菌肥料產品之菌種鑑定

溶磷菌肥料產品目標溶磷菌菌體之基因組DNA (genomic DNA) 分離：先將低溫保存之目標溶磷菌菌體樣品進行十倍連續稀釋，取1 mL目標溶磷菌菌體樣品與9 mL滅菌水混合，製備10^{-1}–10^{-8}濃度之稀釋液，再取100 μL稀釋液，均勻塗抹於NA培養基中，於30℃下恆溫培養約3–7 d。NB培養基中外加15 g L^{-1}瓊脂後為NA培養基。挑選單一菌落後，至少進行三次劃線分離，確定挑選之菌株為純系培養者。將挑選之純系培養菌株分別接種至5 mL之NB液體培養基中，於30℃配合轉速180 rpm之恆溫振盪條件下，培養4 d。取1.5 mL之上述菌液加入一個經滅菌之2 mL微量離心管中，再將微量離心管置入可控溫高速微量離心機中，於4℃配合10,000 x g之條件下高速離心30 s，將菌體離心至微量離心管之管壁上。倒掉培養液後，再於4℃配合10,000 x g之條件下高速離心30 s，以微量吸取器小心移除殘留之上清液。接著，以萃取試藥套組 (UltraClean Microbial DNA Isolation Kit) 萃取基因組DNA。萃取試藥套組含Microbead solution，Microbead tube，Solution 1，Solution 2，Solution 3，Solution 4，Solution 5，spin filter。上述微量離心管去除上清液後，加入300 μL Microbead solution，將黏附於管壁之菌體沖起並輕微振盪，再將溶液連同菌體移至Microbead tube中。加入50 μL Solution 1 於Microbead tube中。將Microbead

tube置於水浴槽中，以70℃加熱10 min。將Microbead tube置於振盪旋轉盤上，調整轉速至最大刻度後振盪10 min。將Microbead tube置於微量離心機中，並以10,000 x g離心 30 s。以微量吸取器將上清液移至一新的2 mL微量離心管中，加入100 μL Solution 2於微量離心管中，上下搖動5 s，使其與上清液充分混合，並置於4℃條件下5 min。將微量離心管置於微量離心機中，並以10,000 x g離心1 min。以微量吸取器將上清液移至一新的2 mL微量離心管中，加入900 μL Solution 3於微量離心管中，上下搖動 5 s，使其與上清液充分混合。取700 μL上述混合液，並移至含有spin filter之微量離心管，並將微量離心管置於微量離心機中，以10,000 x g離心30 s。將微量離心管中蒐集之濾液倒掉後，再將剩餘混合液700 μL移至含有spin filter 之相同微量離心管，並將微量離心管置於微量離心機中，以10,000 x g離心30 s後，再倒掉濾液。加入300 μL Solution 4於上述之微量離心管的spin filter上，並將微量離心管置於微量離心機中，以10,000 x g離心30 s。將微量離心管中蒐集之濾液倒掉後，再將微量離心管置於微量離心機中，以10,000 x g離心1 min後，再去除殘液。將spin filter移至一新的2 mL微量離心管中，加入50 μL Solution 5於spin filter中央。將含有spin filter之微量離心管置於微量離心機後，以10,000 x g離心30 s，將spin filter取出後，此時微量離心管中的濾液即含有萃取之基因組DNA，將含有基因組DNA之離心管儲存於-20℃冰箱中，以供聚合酶鏈鎖反應 (Polymerase chain reaction，PCR) 增殖16S核醣體DNA (16S rDNA) 用。

溶磷菌菌體 16S 核醣體DNA (16S rDNA) 之 PCR 擴增方法如下：本試驗使用16S rDNA細菌通用引子對11F (5'-GTTTGATCCTGGCTCAG-3'，Kane *et al.* 1993) 及1492R (5'-TACCTTGTTACGACTT-3'，Lin & Stahl. 1995)。將引子對回溶後，以桌上型低轉速離心機離心3 s後，放置冰上備用。吸取0.5 μL 10 mM 11F引子與0.5 μL 10 mM 1492R引子，再加入0.25 μL 2μ μL-1 Taq DNA 聚合酶，2 μL 2.5mM dNTPs，2.5 μL 10X之聚合酶緩衝溶液，及測試菌株之基因組DNA約3 ng，於PCR專用塑膠管中，最後添加去離子水使總體積為25 μL，即可進行聚合酶鏈鎖反應以擴增DNA，其熱循環條件如下：最初變性95℃ 10 min，使基因組DNA完全打開，接著每個循環設定的條件為變性95℃ 50 s，黏接53℃ 60 s，延展72℃ 120 s，變性至延展需進行28個循環反應，最終延展72℃ 10 min，然後將PCR增殖後之16S rDNA 儲存於-20℃冰箱中備用。

DNA膠體電泳分析：以0.5X TAE緩衝液配製0.8%洋菜膠 (agarose)，並以微波爐加熱溶解後於室溫靜置冷卻至40℃－55℃，倒入製膠台凝固，待完成後，將洋菜膠放入電泳槽中，並倒入適量之0.5X TAE緩衝液使其完全覆蓋膠體。吸取5μL增殖後的16S rDNA，並與1μL 6X EZ-Vision DNA染劑 (DNA dye as loading dye) 混合均勻後，隨即注入膠體孔洞中，接著在 16S rDNA樣品一側注入2μL 1Kb DNA分子量標記 (DNA molecular weight marker)，用來比對16S rDNA樣品之分子量。電泳條件為100 V，經 25 min－30 min，完成後將膠體置於UV照光拍攝系統內，觀察結果並拍照記錄。

16S rDNA序列定序與分析：16S rDNA經PCR擴增並以膠體電泳確認後，委由明欣生物科技公司 (Taipei，Taiwan) 以自動核酸定序儀進行DNA定序分析，定序引子對為11F和1492R引子，定序結果以BioEdit軟體進行序列比對與組合，將上述已組合之核醣體DNA序列在EzBioCloud網站中與標準菌株之16S rDNA序列進行比對，所得之序列相似度作為微生物鑑定之判讀依據。另外，亦將廠商在申請溶磷菌肥料產品登記證時所提供的目標菌株16S rDNA序列，在EzBioCloud網站中與標準菌株之16S rDNA序列進行比對，所得之菌種名稱與上述結果比較是否為同一菌種。

結果

2017 年市售溶磷菌肥料產品品質分析

2017年農業試驗所由市面上購得14種溶磷菌肥料產品，其溶磷菌有效活菌數、雜菌率、溶磷環、溶磷酸鈣活性檢測及菌種鑑定如表2所示。依據農糧署2013年4月3日修正之肥料種類品目及規格中規定，市售溶磷菌肥料產品之有效活菌數為固態每公克1×10^7菌落形成數以上；液態每毫升1×10^8菌落形成數以上，肥料登記與市售品查驗之容許差限值為菌落形成數無上限，下限為肥料登記值之1/10，由此可知，市售溶磷菌肥料產品的溶磷菌有效活菌數除了需符合規定的菌落形成數以上，尚須符合下限為肥料登記值之1/10才算合格，目前農糧署網站中並未公告已登記的溶磷菌肥料產品之溶磷菌有效活菌數登記值。由檢驗結果 (表2) 可知，產品編號1、5、12、13與14的溶磷菌有效活菌數未達固態每公克1×10^7菌落形成數以上之規定，判定為不合格之產品，2017年由市面上購得14種溶磷菌肥料產品其溶

磷菌有效活菌數不合格率為36%。產品編號1、5與14在產品登記時溶磷菌有效活菌數所用的檢測方法為農糧署公告方法AFS3183-1，產品編號12與13在產品登記時所用的檢測方法為經濟部標準檢驗局CNS15301-3，其培養基配方中的瓊脂 (Agar) 為12 g L^{-1}，磷酸鈣 ($Ca_3(PO_4)_2$) 為0.3 g L^{-1}，而農糧署公告方法 (AFS3183-1) 培養基配方中的瓊脂為15 g L^{-1}，磷酸鈣 ($Ca_3(PO_4)_2$) 為5 g L^{-1}，其他培養基成分與用量皆相同。培養基配方中的瓊脂含量與磷酸鈣含量是否會影響溶磷菌有效活菌數需要進一步探討。

在雜菌率檢測方面，農糧署之肥料種類品目及規格中規定，溶磷菌肥料固態產品雜菌率不得超過15%，液態產品雜菌率不得超過5%，由檢驗結果 (表2) 可知，14種市售溶磷菌肥料產品中，雜菌率皆符合農糧署規定。

在溶磷環檢測方面，農糧署之肥料種類品目及規格中並無溶磷環之規定。有關定量的活性指標目前只有印度的資料，其規定為：以分光光度法檢測時，菌株應具有最小30%的溶磷能力，以溶磷環檢測時，在厚度至少為3 mm 的培養基上形成最小5 mm溶磷環。若以印度的溶磷環基準 (Ghosh *et al*. 2001) 來看，14種市售溶磷菌肥料產品之溶磷環皆不符合規定，其中，產品編號3、9、10、12與13等5個產品皆沒有產生溶磷環。

在溶磷菌活性檢測方面，農糧署之肥料種類品目及規格中溶磷菌活性無定量指標，只要有活性即可，由檢驗結果 (表2) 可知，產品編號3、7、10與11的溶磷菌活性皆為負值，依農糧署的規定判定為不合格之產品，14種溶磷菌肥料產品其溶磷菌活性不合格率為29%。產品編號3在產品登記時溶磷菌活性檢測方法為調整的磷酸鈣培養基，其培養基配方以農糧署公告方法為基礎，將碳源調整為葡萄糖，另外添加0.1g 酵母抽出物。產品編號7在產品登記時所用的檢測方法為農糧署公告方法。產品編號10與11，在產品登記時檢測方法為經濟部標準檢驗局CNS15301-3，其溶磷菌活性培養基配方中的磷酸鈣 ($Ca_3(PO_4)_2$) 為0.3 g L^{-1}，而農糧署公告方法 (AFS3183-1) 培養基配方中的磷酸鈣 ($Ca_3(PO_4)_2$) 為5 g L^{-1}，其他培養基成分與用量皆相同。培養基配方中的碳源種類、酵母抽出物添加與磷酸鈣含量是否會影響溶磷菌活性需要進一步探討。

在菌種鑑定方面，若將14種溶磷菌肥料產品之目標溶磷菌菌株已組合的16S rDNA序列，以NCBI核酸序列資料庫比對，同一個產品的菌株序列可以得到許多序

列相似度完全相同但不一樣的菌種名稱，在這些序列相似度最高的菌種名稱當中，皆可找到廠商所登記的菌種名稱，但無法判定哪一個可代表該菌株之菌種名稱。因此，再將14種溶磷菌肥料產品之目標溶磷菌菌株已組合的16S rDNA序列，與EzBioCloud網站中標準菌株的16S rDNA進行比對，取其所得序列相似度最高之微生物菌種名稱 (如表2)。另外，亦將廠商在產品上所標示的目標菌株菌種名稱，及產品在登記時所提供的16S rDNA序列與EzBioCloud網站中標準菌株的16S rDNA進行比對，取其所得序列相似度最高之微生物菌種名稱列於表2。由表2中可知，產品編號1，2，4，5，6，8與14等7個產品，在產品上所標示的目標菌株菌種名稱皆為*Bacillus safensis*，而上述7個產品登記時所提供的16S rDNA序列在EzBioCloud網站中比對後的菌種名稱亦為*Bacillus safensis*，此外，從上述7個市售產品中所分離之目標菌株菌種名稱也是*Bacillus safensis*，由此可判定上述7個市售產品目標菌株菌種名稱皆符合農糧署規定。產品編號3與10這2個產品，在產品上所標示的目標菌株菌種名稱皆為*Bacillus subtilis*，上述2個產品登記時所提供的16S rDNA序列在EzBioCloud網站中比對後的菌種名稱亦為*Bacillus subtilis*，而上述2個市售產品中所分離之目標菌株菌種名稱也是*Bacillus subtilis*，由此可判定上述2個市售產品目標菌株菌種名稱皆符合農糧署規定。產品編號7、12與13這3個產品，在產品上所標示的目標菌株菌種名稱皆為*Bacillus licheniformis*，上述3個產品登記時所提供的16S rDNA序列在EzBioCloud網站中比對後的菌種名稱亦為*Bacillus licheniformis*，而上述3個市售產品中所分離之目標菌株菌種名稱也是*Bacillus licheniformis*，由此可判定上述3個市售產品目標菌株菌種名稱皆符合農糧署規定。產品編號9在產品上所標示的目標菌株菌種名稱為*Bacillus amyloliquefaciens*，但該產品在登記時所提供的16S rDNA序列與EzBioCloud網站中標準菌株進行比對後，序列相似度最高的微生物菌種名稱為*Bacillus subtilis*與*Bacillus siamensis*，而從市售產品中所分離之目標菌株菌種名稱為*Bacillus siamensis*，因該產品在登記時所提供的16S rDNA序列與EzBioCloud網站中比對後的微生物菌種名稱有*Bacillus siamensis*，判定產品編號9菌種名稱符合農糧署規定。產品編號11在產品上所標示的目標菌株菌種名稱為*Bacillus subtilis*，但該產品在登記時所提供的16S rDNA序列與EzBioCloud網站中標準菌株進行比對後，序列相似度最高的微生物菌種名稱為*Bacillus siamensis*，而從市售產品中所分離之目標菌株菌種名稱為*Bacillus*

siamensis，因該產品在登記時所提供的16S rDNA序列與EzBioCloud網站中比對後的微生物菌種名稱為*Bacillus siamensis*，判定產品編號11菌種名稱符合農糧署規定。由上述結果可知，14種溶磷菌肥料產品其溶磷菌目標菌株之菌種鑑定合格率為100%。

目前國內在微生物肥料限制事項中只有大腸桿菌群的測定，尚無大腸桿菌與沙門氏菌之檢測，農業試驗所委託弘光科技大學食品與化妝品品質檢驗與分析中心檢測市售14個產品之大腸桿菌群、大腸桿菌與沙門氏菌，結果顯示，14個溶磷菌肥料產品之大腸桿菌群皆符合農糧署肥料規定，其大腸桿菌群皆小於1×10^3菌落形成數，而大腸桿菌與沙門氏菌檢測結果皆呈現陰性。

由2017年各項檢測結果可知，農業試驗所由市面上購得的14個溶磷菌肥料產品只有5個皆符合農糧署肥料規格，合格率為36%。

2018 年市售溶磷菌肥料產品品質分析

2018年農業試驗所由市面上購得16種溶磷菌肥料產品，其溶磷菌有效活菌數、雜菌率、溶磷環與溶磷酸鈣活性檢測及菌種鑑定如表3所示。由檢驗結果 (表3) 可知，產品編號14的溶磷菌有效活菌數未達固態每公克1×10^7菌落形成數以上之規定，判定為不合格之產品，2018年由市面上購得16種溶磷菌肥料產品其溶磷菌有效活菌數不合格率為6%。產品編號14在產品登記時所用的檢測方法為農糧署公告方法。

在雜菌率檢測方面，由檢驗結果 (表3) 可知，16種市售溶磷菌肥料產品中，產品編號2的雜菌率高達52.9%，超過固態產品雜菌率15%之規定，依農糧署的規定判定為不合格之產品，16種溶磷菌肥料產品其雜菌率不合格率為6%。產品編號2在產品登記時所用的檢測方法為農糧署公告方法。

在溶磷環檢測方面，由檢驗結果 (表3) 可知，16種市售溶磷菌肥料產品之溶磷環只有產品編號8與產品編號11超過5 mm，而產品編號3、7、9、10及12產品之溶磷環為0。

在溶磷菌活性檢測方面，由檢驗結果 (表3) 可知，產品編號9、10、11、12、16、17的溶磷菌活性皆為負值，依農糧署的規定判定為不合格之產品，16種溶磷菌肥料產品其溶磷菌活性不合格率為38%。產品編號9、10、11，在產品登記時檢

表 2. 2017 年市售溶磷菌肥料產品品質分析

Table 2. Commercial product quality analysis of phosphate-solubilizing bacteria in 2017

Sample no.	Plate count [z]	Contamination rate [y] (%)	Phosphate solubilizing halo zone (mm)	Tricalcium phosphate solubilizing activity (μg g^{-1} (mL^{-1}) day^{-1})	Species name of target strain on product label	Species name based on rDNA sequence data when product was registered [x]	Species name of products bought from market in 2017 and identified by rDNA sequence [w]
1	7.3×10^{6} CFU g^{-1}	ND [x]	4.4 ± 0.7	4,962	*Bacillus safensis*	*Bacillus safensis*	*Bacillus safensis*
2	3.3×10^{7} CFU g^{-1}	ND	3.6 ± 0.5	3,464	*Bacillus safensis*	*Bacillus safensis*	*Bacillus safensis*
3	4.9×10^{8} CFU g^{-1}	ND	0	-328	*Bacillus subtilis*	*Bacillus subtilis*	*Bacillus subtilis*
4	1.0×10^{7} CFU g^{-1}	ND	3.4 ± 0.3	131	*Bacillus safensis*	*Bacillus safensis*	*Bacillus safensis*
5	8.2×10^{6} CFU g^{-1}	2.4	3.3 ± 0.3	3,549	*Bacillus safensis*	*Bacillus safensis*	*Bacillus safensis*
6	2.0×10^{7} CFU g^{-1}	ND	3.1 ± 0.3	1,251	*Bacillus safensis*	*Bacillus safensis*	*Bacillus safensis*
7	1.0×10^{9} CFU mL^{-1}	ND	2.5 ± 0.3	-166	*Bacillus licheniformis*	*Bacillus licheniformis*	*Bacillus licheniformis*
8	1.8×10^{7} CFU g^{-1}	ND	3.5 ± 0.4	1,697	*Bacillus safensis*	*Bacillus safensis*	*Bacillus safensis*
9	2.3×10^{9} CFU mL^{-1}	ND	0	365	*Bacillus amyloliquefaciens*	*Bacillus subtilis*, *Bacillus siamensis*	*Bacillus siamensis*
10	4.9×10^{8} CFU mL^{-1}	ND	0	-563	*Bacillus subtillis*	*Bacillus subtillis*	*Bacillus subtillis*
11	7.4×10^{8} CFU mL^{-1}	0.16	4.4 ± 0.6	-459	*Bacillus subtilis*	*Bacillus siamensis*	*Bacillus siamensis*
12	5.4×10^{6} CFU g^{-1}	ND	0	950	*Bacillus licheniformis*	*Bacillus licheniformis*	*Bacillus licheniformis*
13	5.7×10^{6} CFU g^{-1}	1.8	0	1,107	*Bacillus licheniformis*	*Bacillus licheniformis*	*Bacillus licheniformis*
14	1.9×10^{6} CFU g^{-1}	ND	3.3 ± 0.4	3,162	*Bacillus safensis*	*Bacillus safensis*	*Bacillus safensis*

[z] Effective plate count of phosphate solubilizing bacteria: Plate count number for solid product more than 1×10^{7} CFU g^{-1}, and plate count number for liquid product more than 1×10^{8} CFU mL^{-1}. Acceptable deviation limit between registration record and market sampling of product: CFU without upper limit; however, the lowest acceptable limit of CFU was one tenth of the registration record as shown on Category and Specificity of Fertilizers (revised on 2013/4/3)

[y] Contamination rate shall not exceed 15% and 5% for solid and liquid products, respectively

[x] Species name based on rDNA sequence data when product was registered. The 16S rDNA sequence of target strain was identified by comparing with that of standard strain in the website of EzBioCloud. (2019/10/28)

[w] After purification, phosphate solubilizing bacteria were identified by 16S rDNA sequencing. The sequences of 16S rDNA were compared with those of standard strains in the website of EzBioCloud. (2019/10/28)

表 3. 2018 年市售溶磷菌肥料產品品質分析

Table 3. Commercial product quality analysis of phosphate-solubilizing bacteria in 2018

Sample no.	Plate count [z]	Contamination rate [y] (%)	Phosphate solubilizing halo zone (mm)	Tricalcium phosphate solubilizing activity (μg g^{-1} (mL^{-1}) day^{-1})	Species name of target strain on product label	Species name based on rDNA sequence data when product was registered [x]	Species name of products bought from market in 2018 and identified by rDNA sequence [w]
1 [z]	5.9×10^{7} CFU g^{-1}	ND [w]	4.3 ± 0.7	4739	*Bacillus safensis*	*Bacillus safensis*	*Bacillus safensis*
2	1.6×10^{7} CFU g^{-1}	52.9	3.3 ± 1.7	627	*Bacillus safensis*	*Bacillus safensis*	*Bacillus safensis*
3	1.5×10^{8} CFU g^{-1}	ND	0	422	*Bacillus subtilis*	*Bacillus subtilis*	*Bacillus subtilis*
4	4.8×10^{7} CFU g^{-1}	ND	3.0 ± 0.4	4176	*Bacillus safensis*	*Bacillus safensis*	*Bacillus safensis*
5	2.2×10^{7} CFU g^{-1}	0.9	3.4 ± 0.4	1406	*Bacillus safensis*	*Bacillus safensis*	*Bacillus safensis*
6	4.2×10^{7} CFU g^{-1}	ND	4.1 ± 0.8	287	*Bacillus safensis*	*Bacillus safensis*	*Bacillus safensis*
7	1.7×10^{9} CFU mL^{-1}	ND	0	760	*Bacillus licheniformis*	*Bacillus licheniformis*	*Bacillus licheniformis*
8	1.9×10^{7} CFU g^{-1}	0.5	5.9 ± 1.1	1774	*Bacillus safensis*	*Bacillus safensis*	*Bacillus safensis*
9	2.0×10^{9} CFU mL^{-1}	ND	0	-536	*Bacillus amyloliquefaciens*	*Bacillus subtilis*, *Bacillus siamensis*	*Bacillus velezensis*
10	1.9×10^{8} CFU mL^{-1}	ND	0	-36	*Bacillus subtillis*	*Bacillus subtillis*	*Bacillus velezensis*
11	9.8×10^{7} CFU mL^{-1}	ND	5.5 ± 0.7	-296	*Bacillus subtilis*	*Bacillus siamensis*	*Bacillus velezensis*
12	1.6×10^{7} CFU g^{-1}	ND	0	-1932	*Bacillus licheniformis*	*Bacillus licheniformis*	*Bacillus licheniformis*
14	8.4×10^{6} CFU g^{-1}	ND	3.3 ± 0.4	408	*Bacillus safensis*	*Bacillus safensis*	*Bacillus safensis*
15	8.6×10^{7} CFU g^{-1}	0.1	4.4 ± 1.3	2474	*Bacillus safensis*	*Bacillus safensis*	*Bacillus safensis*
16	2.2×10^{8} CFU g^{-1}	ND	3.0 ± 0.4	-303	*Bacillus safensis*	*Bacillus safensis*	*Bacillus safensis*
17	2.6×10^{7} CFU g^{-1}	ND	4.5 ± 1.1	-2977	*Bacillus safensis*	*Bacillus safensis*	*Bacillus safensis*

[z,y, x, w] Legends same as Table 2.

測方法為經濟部標準檢驗局CNS15301-3，其溶磷菌活性培養基配方中的磷酸鈣($Ca_3(PO_4)_2$) 為0.3 g L^{-1}，而農糧署公告方法 (AFS3183-1) 培養基配方中的磷酸鈣($Ca_3(PO_4)_2$) 為5 g L^{-1}，其他培養基成分與用量皆相同。產品編號12、16、17在產品登記時所用的檢測方法為農糧署公告方法。培養基配方中的磷酸鈣含量是否會影響溶磷菌活性需要進一步探討。

在菌種鑑定方面，將16種溶磷菌肥料產品之目標溶磷菌菌株已組合的16S rDNA序列與 EzBioCloud 網站中標準菌株的16S rDNA進行比對，取其所得序列相似度最高之微生物菌種名稱 (如表3)。另外，亦將廠商在產品上所標示的目標菌株菌種名稱，及產品在登記時所提供的16S rDNA序列與EzBioCloud網站中標準菌株的16S rDNA進行比對，取其所得序列相似度最高之微生物菌種名稱列於表3。由表3中可知，產品編號9在產品上所標示的目標菌株菌種名稱為*Bacillus amyloliquefaciens*，但該產品在登記時所提供的16S rDNA序列與EzBioCloud網站中標準菌株進行比對後，序列相似度最高的微生物菌種名稱為*Bacillus subtilis*與*Bacillus siamensis*，而從市售產品中所分離之目標菌株菌種名稱為*Bacillus velezensis*，因該產品在登記時所提供的16S rDNA序列與EzBioCloud網站中比對後的微生物菌種名稱非*Bacillus velezensis*，判定產品編號9菌種名稱不符合農糧署規定。產品編號10在產品上所標示的目標菌株菌種名稱為*Bacillus subtilis*，但該產品在登記時所提供的16S rDNA序列與EzBioCloud網站中標準菌株進行比對後，序列相似度最高的微生物菌種名稱亦為*Bacillus subtilis*，而從市售產品中所分離之目標菌株菌種名稱為*Bacillus velezensis*，因該產品在登記時所提供的16S rDNA序列與EzBioCloud網站中比對後的微生物菌種名稱非*Bacillus velezensis*，判定產品編號10菌種名稱不符合農糧署規定。產品編號11在產品上所標示的目標菌株菌種名稱為*Bacillus subtilis*，但該產品在登記時所提供的16S rDNA序列與EzBioCloud網站中標準菌株進行比對後，序列相似度最高的微生物菌種名稱為*Bacillus siamensis*，而從市售產品中所分離之目標菌株菌種名稱為*Bacillus velezensis*，因該產品在登記時所提供的16S rDNA序列與EzBioCloud網站中比對後的微生物菌種名稱非*Bacillus velezensis*，判定產品編號11菌種名稱不符合農糧署規定。由上述結果可知，16種溶磷菌肥料產品其溶磷菌目標菌株之菌種鑑定不合格率為19%。

由2018年各項檢測結果可知，農業試驗所由市面上購得的16個溶磷菌肥料產

品只有8個皆符合農糧署肥料規格，合格率為50%。

討論

由 2017 年與 2018 年檢測結果可知，農業試驗所在市面上購得的 30 個市售溶磷菌肥料產品只有13 個皆符合農糧署溶磷菌肥料規格，兩年合格率平均為43%，上述檢測結果為國內微生物肥料產品上市以來第一次全面性的微生物肥料產品之品質分析。根據 Catroux 等人 (2001) 所述，全世界商業生產的所有豆科植物接種劑中有 90% 被認為對生產力沒有任何實際影響，這主要歸因於產品品質差。Herrmann等人 (2013) 的研究指出 65 個微生物產品中，只有 37% 的產品中是純的微生物菌劑，而其他63%被雜菌污染，且40%產品中沒有指標微生物。這些結果凸顯出微生物肥料產品需要更好的品質控制系統，以確保有效的產品能夠到達最終用戶。品質保證和品質控制的實施，不僅有助於微生物肥料產品在田間獲得更好和更一致的結果，而且還可以從市場上去除品質差的產品，進而提高農民的信心。品質保證是微生物肥料製造商在生產過程中，每個階段都必須達到設定的標準，才能進入下一個生產步驟，否則，生產中止。品質控制則由獨立的實驗室在微生物肥料產品出售前，檢測其品質是否符合標準，藉以控制準備出售的微生物肥料產品 (Stephens & Rask 2000)。對於微生物肥料產品的品質控制，各國法規規定不一，目前對於根瘤菌接種劑以法國擁有最嚴格的標準：(1) 所有根瘤菌接種劑應證明對環境無害，(2) 根瘤菌接種劑應由純培養物製成和無菌載體，(3) 每粒種子在播種時其活菌數至少需 10^6 個活的細胞，(4) 從出廠到儲架期間皆需無污染，(5) 產品每季使用前皆需經過獨立的實驗室檢定合格 (Herrmann *et al*. 2013)。

從 2018 年起，農糧署及各縣市政府開始進行微生物肥料產品抽樣，並送樣至農業試驗所進行檢驗，希望能在微生物肥料產品品質上進行控管，2018 年農糧署規定的檢測項目只有微生物肥料的活菌數，檢驗結果顯示：在 10 個送樣產品中，有 3 個產品未達農糧署微生物肥料活菌數規格，不合格率為 30%。國內目前的微生物肥料產品無微生物肥料活性的定量指標之規定，且無需微生物肥料的肥(功) 效試驗報告，這些微生物肥料產品是否可提高作物對營養元素之吸收，尚待進一步測試。國內目前農民使用微生物肥料的比率不高，主要是由於微生物肥料

肥 (功) 效不穩定，而造成肥 (功) 效差的原因為微生物肥料產品菌體肥 (功) 效差或載體配方不合適。微生物肥料肥 (功) 效的提升，可藉由廠商或政府的田間(或盆栽)肥 (功) 效評估試驗來把關。

有關微生物肥料載體配方之研究，為了維持微生物肥料肥 (功) 效，載體配方應結合以下幾個特點：(1) 載體配方應為微生物提供保護環境 (例如：提供菌體養分，適宜的pH值及含水量等)，使微生物有最佳生長，並在儲存期間、運輸過程以及加入土壤後，防止其菌數減少。(2) 產品配方應該易於使用，對環境友善，並且具有成本效益，且製作材料易於取得 (Bashan 1998；Hungria *et al.* 2005)。有關微生物肥料載體配方之研究，尚待研發人員積極投入開發。

引用文獻

1. Bashan, Y. 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. Biotechnology Advances 16(4):729–770.
2. Brockwell, J. and P. J. Bottomley. 1995. Recent advances in inoculant technology and prospects for the future. Soil Biology and Biochemistry. 27(4-5):683–697.
3. Catroux, G., A. Hartmann, and C. Revellin. 2001. Trends in rhizobial inoculant production and use. Plant and Soil 230(1):21–30.
4. Ghosh T. K., R. P. Singh, Duhan Joginder, and D. S. Yadav. 2001. A review on quality control of biofertilizer in India. Fertilizer Marketing News 31:1-9.
5. Herrmann, L. and D. Lesueur. 2013 Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. Applied Microbiology and Biotechnology 97(20):8859–8873.
6. Hungria, M., M. F. Loureiro, I. C. Mendes, R. J. Campo, P. H. Graham. 2005. Inoculant preparation, production and application. P. 223–253. *in*: D. Werner and W. E. Newton (eds) Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment. 342 pp.
7. Kane, M. D., L. K. Poulsen, and D. A. Stahl. 1993. Monitoring the enrichment and isolation of sulfate-reducing bacteria by using oligonucleotide hybridization probes designed from environmentally derived 16S rRNA sequences. Applied and environmental microbiology 59(3):682–686.
8. Lin, C. and D. A. Stahl. 1995. Taxon-specific probes for the cellulolytic genus fibrobacter reveal abundant and novel equine-associated populations. Applied and Environmental Microbiology 61(4):1348–1351.
9. Stephens, J. H. G. and H. M. Rask. 2000. Inoculant production and formulation. Field Crops Research 65(2-3):249–258.

Quality Analysis of Commercial Phosphate-solubilizing Bio-fertilizer Products

Su-Chen Lin[1,*], Zi-Jun Lin [2], and Shiuan-Yuh Chien [3]

Summary

Only bio-fertilizers with good quality can assure its promotion in plant nutrients absorption and growth in the field, and the supervision of product quality from government side could play another key role not only in helping bio-fertilizers provide a better and consistent results in the field, but also in eliminating products with bad quality. Both efforts could enhance the farmers' confidence in these microbial products. In this report, all of the analysis results of commercial phosphate-solubilizing bio-fertilizers, purchased from markets from 2017 to 2018 were documented. The scope of product analysis included total plate count of viable microbes, contamination rate, phosphate-solubilizing zone, phosphate-solubilizing activity, target species identification. All of methodologies followed the publications by Agriculture and Food Agency (AFA). In 2017, only 5 among 14 commercial products (36%) met the requirements by AFA . In 2018, only 8 among 16 commercial products (50%) met the requirements by AFA. This is the first product quality report about commercial phosphate-solubilizing bio-fertilizers. This result will be submitted to AFA and referred to revise the management law of bio-fertilizers in the future.

Keywords: Bio-fertilizer, Phosphate-solubilizing bacteria, Quality supervision.

---

* Corresponding author, e-mail: linmay@tari.gov.tw

[1] Assistant Researcher, Agricultural Chemistry Division, Taiwan Agriculture Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

[2] Research Assistant, Agricultural Chemistry Division, Taiwan Agriculture Research Institute , Taichung, Taiwan, ROC.

[3] Former Researcher, Agricultural Chemistry Division, Taiwan Agriculture Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.