

液化澱粉芽孢桿菌 Tcb45 菌株 應用於微生物肥料之開發

郭建志、林煜恒、張世杰、羅佩昕、廖君達

行政院農業委員會臺中區農業改良場

摘要

微生物肥料的開發對於臺灣永續農業的發展扮演重要的角色，同時也是國內農業研究重要的發展項目之一。國內農友長期依賴化學肥料進行農作物栽培管理，容易造成土壤劣化、產量降低或出現連作障礙，甚至病害產生等問題，更對環境造成負面影響。因此，本研究自土壤中篩選出多株有益微生物菌株，其中 1 株 Tcb45 菌株經由分子技術鑑定為液化澱粉芽孢桿菌 *Bacillus amyloliquefaciens*。經由檢測分析，Tcb45 菌株具有溶磷 (phosphate solubilization) 與嵌鐵物質 (siderophore) 活性，並可產生澱粉、蛋白質與纖維素分解酶，且具有耐鹽能力，培養於 7% 氯化鈉之培養條件下，菌量仍可達 10^8 CFU/mL 以上，顯示可與化學肥料混合使用之潛力。將此菌株產製成發酵液後施用於多種蔬菜作物如甘藍、白菜及萵苣等，於蔬菜苗期進行根部澆灌及生長期進行葉面噴施 4~6 次，便可有助於蔬菜根系之發育與生長，顯著提升產量 10 - 20 % 之功效。在田間結球白菜化學肥料減量試驗結果，使用 70 % 化學肥料量搭配 Tcb45 菌株施用，與慣行全量施用的處理相比，其產量並無減少情形。Tcb45 微生物菌株及其量產技術，目前已技術移轉給業者及商品化，可應用於慣行栽培管理，後續進一步可應用於友善及有機栽培模式中，期能成為有助於農業的永續發展及友善環境耕作的利器。

關鍵詞：微生物肥料、液化澱粉芽孢桿菌、溶磷作用

前言

臺灣地處於熱帶與亞熱帶區域，為高溫多雨及溫暖潮濕的氣候型態，國內農作物種植種類繁多，加上多屬於小面積栽培，在長期集約耕作模式下，部分農友及栽培業者為了維持高產，進行田間耕作管理之時，會偏施化學肥料進行田間肥培管理，並追求單位面積產量提升以及複種次數。長期使用化學肥料，對於肥料使用種類及用量若無控管的情形下，容易造成許多負面影響，包括土壤酸化或鹽化、土壤養分分布不均勻、土壤有益微生物族群失衡、有機質含量減少、土壤劣化引發連作障礙、甚至土壤傳播性病害產生等問題，進而影響農作物產量與品質(楊，2006)。

為避免農友偏施過多化學肥料及施用方式不當，國內農試改良場所長期輔導農友進行合理化施肥，降低化學肥料的用量、添加有機質肥料促進地力改善及施用微生物肥料，增加作物根圈有益微生物族群，強化植物根部對於養分的吸收及促進作物生長。近年來國內推行友善環境耕作及有機農業之農業政策，對於微生物肥料、有機質肥料及農田地力改良肥料資材及生物防治資材的購買均有補助政策。針對國產有機質肥料每公頃補助上限 12,000 元、微生物肥料與生物防治資材亦可獲得購買憑證金額二分之一，每公頃最高補助 5,000 元；而農田地力改良資材可補助購買金額三分之一，每公頃最高補助 3,000 元，顯示未來微生物肥料產業規模相當具有前景(林等，2018；張，2018)。

土壤中具有豐富的微生物資源，有益微生物的菌種多元，其中在作物生長促進的根圈微生物族群(Plant growth promoting rhizobacteria, PGPR)中，具有溶磷能力(phosphate solubilization)的微生物總稱「溶磷菌」，可將土壤中的無效性磷轉變為有效性磷，且具有多種功能特性，可以分為促進作物生長，增加作物對於土壤肥分的有效利用，協助改善土壤劣化問題，此類微生物菌種可開發成為微生物肥料(楊，2011)。微生物肥料係指含有活性微生物或休眠孢子，例如細菌、放線菌、真菌及藻類等及其他代謝產物的特性製劑，應用於作物生產具有提供植物養分、促進植物吸收養分之利用率及促進作物生長(楊，2006)。若其功能特性具有可以抑制病原菌生長，降低作物病害發生，保護作物根圈及改善連作障礙的微生物菌種可開發成為微生物農藥，甚至有些微生物兼具微生物肥料及微生物農藥之特性(Compant *et al.*, 2005; Timmusk *et al.*, 2018)。依據市場研究公司 Grand View Research 指出在 2019 年全球生物肥料市場規模約 10.0 億美元，並預期全球生物肥料市場自 2020-2027 的年複合成長率可達 12.8 %。

國內近年開始推動友善耕作的農業形式，主要定義包括：(1) 維護水土資源、(2) 保持生態環境及生物多樣性、(3) 促進農業友善環境及資源永續利用及 (4) 農業生產過程中不使用合成化學物質、基因改造生物及其產品。友善耕作就是友善自然環境的一種農作物管理方式，同時也是不使用除草劑、化學農藥及化學肥料的耕作模式，透過友善耕作不僅能增加生態系的穩定性，也能提高生態系中的生物多樣性，有助於自然環境的保護作用。此外，除了推動友善耕作外，國內有機農業促進法已於 107 年 5 月 30 日公布，並於公布後 1 年開始施行，為促進有機農業永續發展，增進有機農產品品質，以維護國民健康與兼顧生產者及消費者權益，並達到環境有機生態、農民有機生產及消費者有機生活之目標 (黃，2018)。

此外，近年來，植物生物刺激素 (Plant biostimulants) 受到世界各國的關注及快速發展，目前對於植物生物刺激素產品依照主要成分共分為七大類，其中微生物類亦包括在內。目前歐盟、美國及大陸對於植物生物刺激素的定義略有不同，其中歐盟則是把植物生物刺激素納入肥料的管理範圍。普遍的定義為：是一種包含活性物質或微生物成分，應用於植物上，可以提高作物的生長與發育，施用於植物或根圈附近，可以刺激植物的生理代謝反應、間接增強和提升營養物質的吸收、提高植物營養的利用率、提升植物抵抗非生物逆境的能力及提高產量與品質 (Kumar and Verma, 2018; Woo and Pepe, 2018; Yang *et al.*, 2009)。國內各農試改良場所亦開始研發微生物應用於作物耐非生物逆境 (高溫熱障礙、低溫寒害、強降雨淹水、乾旱及鹽分等) 之研究，國內相關法規對此類產品界定仍不完全，但此產品對於作物栽培具有正向的影響成效，可作為國內後續研發的方向之一，並配合日後國內對於植物生物刺激素的法規完善，可以提供給農友在栽培管理上的新選擇。

內容

一、微生物肥料功能特性

土壤中可促進植物生長之根圈微生物 (PGPR)，具有多功能特性，可做為微生物肥料 (biofertilizers)、植物生長調節劑 (phytostimulators)、根圈修復 (rhizoremediators) 及微生物農藥 (biopesticides)。而部分 PGPR 可研發成為微生物肥料，對於作物促進生長的機

制可分為直接影響及間接影響 (楊, 2014; Ahemad and Kibretb, 2014; Kundan *et al.*, 2015; Stamenković *et al.*, 2018)。有益微生物族群透過直接以及間接機制促進作物生長及降低病害, 直接影響作物生長的機制包括以下幾點:

1. 固氮作用 (Nitrogen Fixation): 主要是由固氮菌進行, 主要將氮氣固定為氨氣, 再轉化成胺基化合物提供給作物利用。固氮菌可分為游離固氮菌、協生性固氮菌及共生性固氮菌三類, 其中寄主專一性最高的為共生性固氮菌 (楊, 2014)。目前具有固氮作用的微生物菌種, 常見的有 *Azospirillum*、*Alcaligenes*、*Arthrobacter*、*Bacillus*、*Burkholderia*、*Enterobacter*、*Pseudomonas*、*Rhizobium* 及 *Serratia* 等 (Kundan *et al.*, 2015)。
2. 溶磷作用 (Phosphate solubilization): 具有溶磷作用的微生物可分為共生性溶磷菌及非共生溶磷菌。共生性溶磷菌主要為菌根真菌, 對於作物具有促進生長、增加苗期存活率、提高產量以及幫助作物抵抗逆境之能力 (林與吳, 2005)。此外, 非共生溶磷菌主要由細菌、真菌以及放線菌為大宗, 其中研究溶磷細菌中以芽孢桿菌屬 (*Bacillus* spp.)、根瘤菌屬 (*Rhizobium* spp.) 以及螢光假單孢菌屬 (*Pseudomonas* spp.) 最多 (Kundan *et al.*, 2015), 目前國內微生物肥料的產品多以芽孢桿菌為主。
3. 產生植物激素: 根圈微生物中具有合成轉化生成植物激素, 例如生長素 Indole-3-acetic acid (indole acetic acid, IAA)、激勃素 (Gibberellic acid, GA) 及細胞分裂素 cytokinin, 可促進根系發育以及養分的吸收利用 (楊, 2014; Kundan *et al.*, 2015)。
4. 產生 ACC 脫氨酶: 某些微生物菌株可以生產 ACC 脫氨酶 (1 aminocyclopropane 1 carboxylatedeaminase), 藉此降低乙烯 (ethylene) 之生成, 以促進根系生長, 協助作物抵抗逆境之能力 (楊, 2014; Ahemad and Kibretb. 2014; Kundan *et al.*, 2015)。

微生物除了可直接影響並促進作物生長外, 另可以間接影響作物生長, 其作用包含產生嵌鐵物質 (siderophores production) 及多種分解酵素 (lytic enzymes) 競爭營養空間, 產生抗生物質 (antibiotic) 及氰化氫 (HCN production) 抑制病原菌的生長以及誘發植物產生抗病性 (Induced systemic response, ISR), 降低病害的發生, 有助於作物生長及產量的維持 (楊, 2014; Ahemad and Kibretb. 2014; Kundan *et al.*, 2015)。

二、國內微生物肥料登記現況

近年來，由於國內推動永續農業、有機農業及友善耕作，並鼓勵農友施用有機質肥料及微生物肥料，減少化學肥料的施用量，因此微生物肥料為目前重要的農業發展方向之一。現階段大專院校及各農試改良場所均有研發團隊進行土壤有益微生物菌種菌株篩選、功能特性分析、溫室與田間功效驗證、試量產發酵以及商品化之研究。目前國內將微生物肥料依照功能特性進行產品區隔，分為六大類，分別為一、豆科根瘤菌肥料 (品目編號 8-01)；二、游離固氮菌肥料 (品目編號 8-02)；三、溶磷菌肥料 (品目編號 8-03)；四、溶鉀菌肥料 (品目編號 8-04)；五、複合微生物肥料 (品目編號 8-05) 及六、叢枝菌根菌肥料 (品目編號 8-06) (李，2014)。為簡化肥料業者申辦微生物肥料登記證程序，農委會評估審查微生物肥料菌種安全性，於 100 年 6 月 3 日公告「已被鑑定為安全之微生物肥料菌種」，可免做生物毒性 (動物毒理試驗)，包括細菌 8 個、真菌 4 個及酵母菌 4 個，計 16 個微生物肥料菌種。目前國內正研議擴增微生物肥料的安全菌種名單，期能增加微生物肥料的研發量能。目前國內微生物肥料共取得 64 張登記證，登記情形如 (表一)，以溶磷菌肥料登記數量最多，共有 59 項產品，19 家業者；溶鉀菌肥料共有 3 項產品，2 家業者；叢枝菌根菌肥料共有 2 項產品，2 家業者。菌種分析如 (表二)，溶磷菌肥料大多以芽孢桿菌屬為主，分別為 *Bacillus amyloliquefaciens* (液化澱粉芽孢桿菌)、*B. licheniformis* (地衣芽孢桿菌)、*B. mycoides* (蕈狀芽孢桿菌)、*B. safensis* (沙福芽孢桿菌)、*B. subtilis* (枯草桿菌) 與 *B. velezensis* (貝萊斯芽孢桿菌)，共 6 個菌種及 1 個酵母菌 *Candida guilliermondii* (季也蒙假絲酵母菌)。溶鉀菌肥料目前以 *B. amyloliquefaciens* 及 *B. mycoides* 為主。叢枝菌根菌肥料主要菌種為 *Glomus mosseae*。目前國內微生物肥料以固氮菌為主之肥料品目尚未商品化，而國外已有多種產品，後續可作為研發的方向之一。

表一、現階段臺灣微生物肥料登記品目現況

	微生物登記品目		
	8-03 溶磷菌肥料	8-04 溶鉀菌肥料	8-06 叢枝菌根菌肥料
產品數量	59	3	2
業者數量	19	2	2

(資料來源 - 肥料管理整合資訊系統，統計至 109 年 8 月 10 日)

表二、臺灣微生物肥料產品之菌種分析

肥料品目	菌種名稱	產品數量
溶磷菌肥料	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (液化澱粉芽孢桿菌)	13
	<i>Bacillus licheniformis</i> (地衣芽孢桿菌)	7
	<i>Bacillus mycodies</i> (蕈狀芽孢桿菌)	1
	<i>Bacillus safensis</i> (沙福芽孢桿菌)	21
	<i>Bacillus subtilis</i> (枯草桿菌)	14
	<i>Bacillus velezensis</i> (貝萊斯芽孢桿菌)	2
	<i>Candida guilliermondii</i> (季也蒙假絲酵母菌)	1
溶鉀菌肥料	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (液化澱粉芽孢桿菌)	1
	<i>Bacillus mycodies</i> (蕈狀芽孢桿菌)	2
叢枝菌根菌肥料	<i>Glomus mosseae</i>	2
總數		64

(統計至 109 年 8 月 10 日)

三、微生物肥料 - 液化澱粉芽孢桿菌 Tcb45 之研發及應用

(一) 微生物肥料 Tcb45 菌株篩選及鑑定

本研究自本場有機區土壤取樣，利用土壤系列稀釋法篩選有益微生物菌株，其中 1 株 Tcb45 菌株初步鑑定為革蘭陽性菌。將此菌株利用移植環純化於 NA 培養基上，待菌落長出後，再純化 1 次，之後刮取單一菌落於 5 mL LB broth 中，置於 30°C 定溫箱中，無光照處理，以 125 rpm 轉速震盪培養 24 小時後，利用「Tissue & cell Genomic DNA Purification Kit」抽取其核酸 DNA。接著進行 16S rRNA 及 *gyrB* 核酸序列增幅，利用 16S rRNA 引子對 27F/1492R (Brosius *et al.*, 1978) 及 *gyrB* gene 之引子對 *gyrB*-41F 與 *gyrB*-44R (Wang *et al.*, 2007; Yamamoto and Shigeaki, 1995) 進行 PCR 反應。所得之專一性片段委由源資國際生物科技股份有限公司進行定序，所得序列透過網際網路送至 National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)，以 BLAST 2.0 之程式進行網路基因庫進行比對 (Schaad *et al.*, 2001)。後續將 Tcb45 菌株之 16S-rRNA 及 *gyrB* 基因之序列，與 NCBI 基因庫中各 *Bacillus* 屬細菌 16S-rRNA 及 *gyrB* 序

列進行系統親緣性分析，最後比對結果，將 Tcb45 菌株鑑定為液化澱粉芽孢桿菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)，菌落形態如圖一。

(二) 液化澱粉芽孢桿菌 Tcb45 菌株功能特性分析

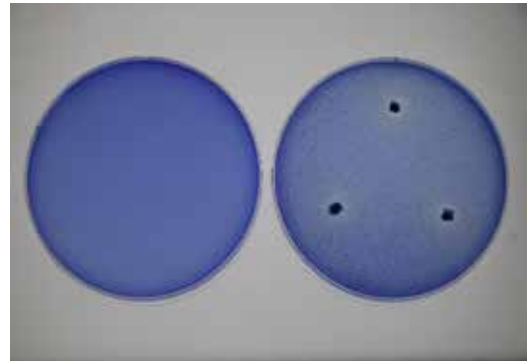
1. 微生物肥料溶磷活性能力分析

將所篩選之微生物 Tcb45 菌株進行純化培養，並挑選單一菌落接種至 5ml 的 LB Broth 培養 1 天後，自 LB Broth 中取出 500 μ l (OD₆₂₀=0.3) 至液態磷酸三鈣、磷酸鐵及磷礦石粉 (Rock-P, CCM FERTILIZER Sdn Bhd) 培養基中，經培養 4 天後以鉬藍法 (Watanabe and Olsen, 1965) 進行水溶性磷含量分析，分析其可溶性磷含量 (μ g/ml/day)。磷酸三鈣、磷酸鐵及磷礦石粉培養基之配方參照肥料檢驗方法 (方法編號 AFS3183-1)。溶磷分析結果，Tcb45 菌株培養 4 天後，檢測磷酸三鈣、磷酸鐵及磷礦石粉之可溶性磷為 872.0 μ g/ml/day、588.83 μ g/ml/day 及 17.18 μ g/ml/day。此外，配製含有溴酚藍 (bromophenol blue) 的溶磷平板 (Dissolve Phosphorus Agar, DPA)，將 Tcb45 菌株挑選單一菌落接種於平板上，經過 48 小時後觀察菌落周圍可產生黃暈及透化圈 (圖二)。



圖一、液化澱粉芽孢桿菌 Tcb45 於 NA 培養基上菌落形態

Fig. 1. *Bacillus amyloliquefaciens* Tcb45 strain colony morphology on the NA medium.

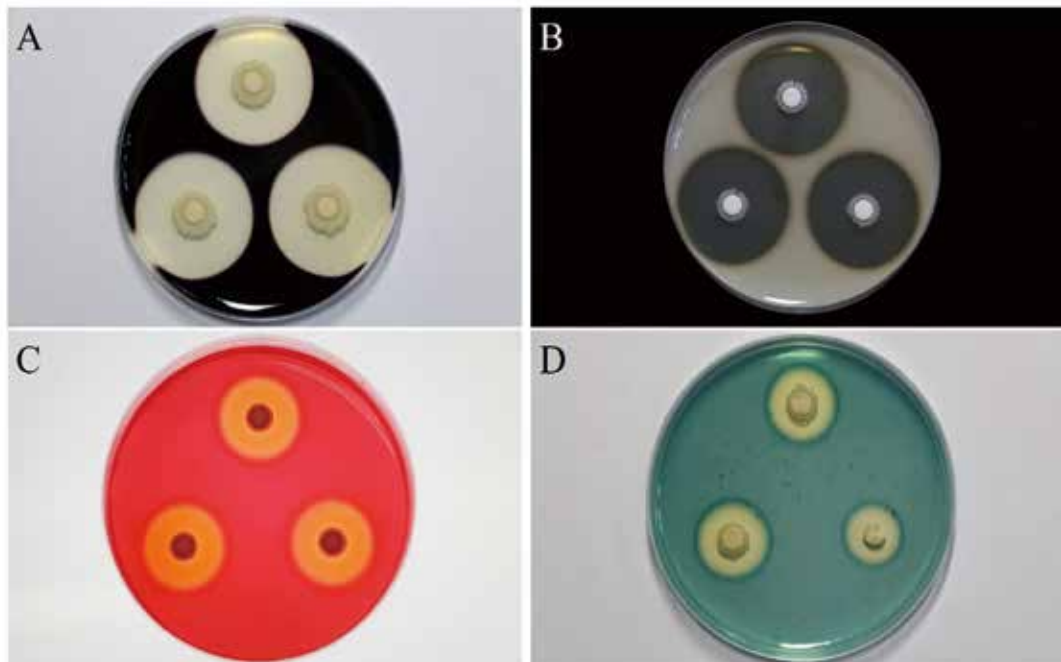


圖二、Tcb45 菌株於溶磷平板上之透化情形

Fig. 2. Tcb45 colonies forming a clear halo zone around each colony on the dissolve phosphorus agar.

2. 分解酵素活性及嵌鐵物質分析

本試驗測試 Tcb45 菌株是否具有澱粉分解酵素 (amylase)、脂肪分解酵素 (lipase)、蛋白分解酵素 (protease)、纖維素分解酵素 (cellulase) 及嵌鐵物質 (siderophore production) 之活性。培養基配置參考前人研究 (Cheng and Yang, 1995 ; Suzuki *et al.*, 2001 ; Sacherer *et al.*, 1994 ; Magnelli *et al.*, 1997 ; Husen, 2003), 將測試菌株以移植環沾取單一菌落, 接種於 5 ml 之 NB 液態培養基, 利用震盪培養 (28°C, 125rpm) 24 小時後, 取原液 20 μ l (調整 OD₆₂₀=0.3) 滴入含有濾紙片之上述各培養基上, 置於 30°C 定溫箱中培養, 無光照處理, 依照各測試培養天數及染色條件。Tcb45 菌株具有澱粉酶、蛋白酶、纖維素酶及嵌鐵物質之活性 (圖三)。



圖三、Tcb45 菌株分解酵素能力測定, 於 (A) 澱粉、(B) 蛋白質、(C) 纖維素及 (D) 嵌鐵培養基上之分解透化結果, Tcb45 菌落外圍空白表示分解透化圈

Fig. 3. The evaluation of Tcb45 strain enzyme hydrolysis activity using a different selective medium, (A) amylase, (B) protease, (C) cellulase, and (D) siderophore production. The outer limit of the zone with Tcb45 bacterial colony indicate the hydrolysis clearance zone.

3. Tcb45 菌株耐鹽能力分析

此外，本研究亦測試 Tcb45 菌株對於不同鹽分濃度之耐鹽性分析，配製含有 0%、3%、5%、7% 及 10% 氯化鈉 NaCl 之 Nutrient Broth (NB) 培養基，將 Tcb45 菌株以移植環刮取單一菌落，接種於上述配製之不同氯化鈉濃度 NB 培養基，每個濃度 3 重複，放置於 28°C 之震盪培養箱中，以 125 rpm 震盪培養 24 小時後，分別測定培養基之酸鹼值 (pH)、鹽度 (EC) 及培養基中 Tcb45 孢子濃度，結果如下表。添加 Tcb45 可以提高 NB 培養液之 pH，0~10% NaCl 均有相同的趨勢，推測可能 Tcb45 具有分解蛋白質或產氨能力的關係 (曾等，2016；Dastager *et al.*, 2014)。EC 值的部分，隨著添加 Tcb45 後，分析 NaCl 之 EC 值，其值與對照組 (未加菌) 的趨勢相同。檢測 Tcb45 菌量的部分，未添加 (0%) 之菌量為 2.63×10^9 CFU/mL，3%、5% 及 7% NaCl 濃度下，Tcb45 菌量仍可達 10^8 CFU/mL 以上，而添加至 10% NaCl 之處理則無法檢測出 Tcb45。綜合以上結果，Tcb45 菌株仍顯示具耐鹽特性，後續應可與化學肥料進行混合施用於作物之潛力。

表三、液化澱粉芽孢桿菌 Tcb45 菌株培養於不同濃度之氯化鈉 NB 培養基 24 小時後之 pH、EC 及菌量分析

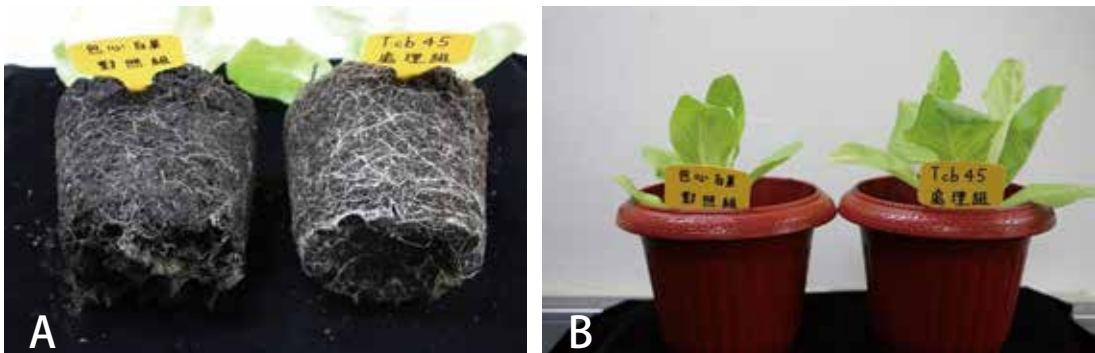
Table 3. The analysis of pH, EC and bacterial spores number of NB with different concentration of NaCl at 24 hours after inoculated with Tcb45 strain

Conc. of NaCl (%)	pH		EC (mS/ cm)		Tcb45 cell number (x 10 ⁸ CFU/ ml)
	Control	Tcb45	Control	Tcb45	
0	7.32±0.03	8.25±0.11	1.28±0.20	2.13±0.11	26.33±5.86
3	6.29±0.12	7.62±0.32	39.30±1.14	45.10±2.00	9.33±0.58
5	6.28±0.04	7.05±0.34	64.20±2.11	65.73±2.06	1.67±0.38
7	6.31±0.08	7.28±0.30	80.20±1.59	83.80±1.65	1.33±0.15
10	6.29±0.21	6.94±0.29	103.80±2.81	109.00±2.17	--*

*not detected

(三) Tcb45 菌株促進作物生長及田間試驗

本研究利用 Tcb45 菌株進行蔬菜苗期試驗，可促結球白菜根系發育及生長勢相較於未處理具有促進生長效果(圖四)。此外，於本場有機試驗田區進行小規模微生物肥效試驗，於苗期定植前澆灌 1 次 Tcb45 菌株之 200 倍稀釋液，定植後連續澆灌 3-4 次，其結果與對照組相比，在半結球萵苣、不結球白菜、甘藍的測試結果，具有促進生長及提升產量的效果(圖五至圖七)。



圖四、利用液化澱粉芽孢桿菌 Tcb45 菌株於結球白菜苗期處理，可促進根系發育(圖四 A)及生長情形(圖四 B)

Fig. 4. *B. amyloliquefaciens* Tcb45 could promoting root development (Fig. 4A) and plant growth (Fig. 4B) by application on chinese cabbage seedling



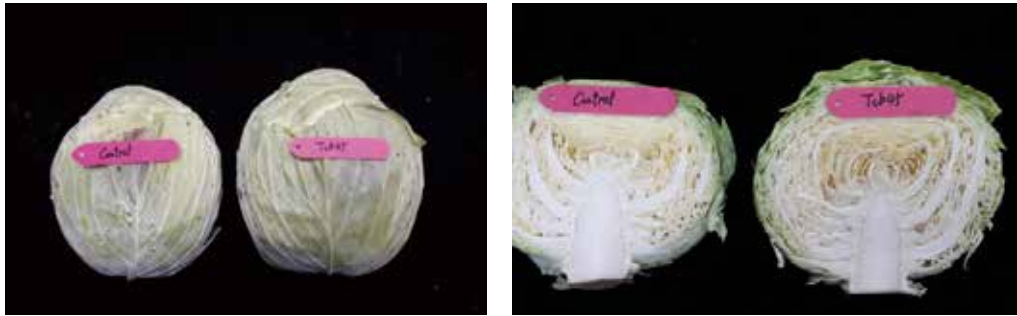
圖五、應用 Tcb45 菌株於半結球萵苣之促進生長試驗結果，對照組(圖左)，處理組(圖右)

Fig. 5. The results of growth promotion test by Tcb45 applied on lettuce, control (left) and treatment (right)



圖六、應用 Tcb45 菌株於不結球白菜之促進生長試驗結果，對照組(圖左)，處理組(圖右)

Fig. 6. The results of growth promotion test by Tcb45 applied on non-heading cabbage, control (left) and treatment (right)



圖七、應用 Tcb45 菌株於甘藍之促進生長試驗結果，對照組（圖左），處理組（圖右）
Fig. 7. The results of growth promotion test by Tcb45 applied on on cabbage, control (left) and treatment (right)

經由田間小規模測試結果，證實 Tcb45 菌株確實具有促進作物生長之功效，進一步試驗對於化學肥料減量的田間測試。於彰化縣溪州鄉進行結球白菜田間肥效試驗，分為處理組施用 70% 化學肥料並搭配 Tcb45 發酵液澆灌與葉噴及對照組施用 100% 化學肥料。處理組以 Tcb45 發酵液 500 倍稀釋液，於定植 7 天開始進行根部澆灌，連續澆灌 2 次，後續改由葉噴處理 2 次。待採收後分析其結果，其全株總重、單球重及球高結果如表四，在化學肥料量的施用降低 30% 的情形，Tcb45 處理組結果與對照組相比雖有增加，但無顯著差異（圖八），顯示應用微生物肥料搭配減量化學肥料的條件，仍可維持原有的產量，有助於減少化學肥料的使用及友善環境的目的。

表四、應用液化澱粉芽孢桿菌 Tcb45 菌株發酵液之 500 倍稀釋液，施用於結球白菜，與對照組相比之全株總重、單球重及球高結果

Table 4. The result of chinese cabbage total plant weight, single ball weight and ball height after applying *B. amyloliquefaciens* Tcb45 fermentation broth 500-fold dilution compared with the control

No.	total plant weight (kg)	single ball weight (kg)	single ball height (cm)	Chemical fertilizer application amounts (%)
Control	1.42a*	0.814a	30.50a	100
Tcb45	1.45a	0.876a	34.33a	70

* Means with different letter are significantly from each other at $P \leq 0.05$ by LSD test.



圖八、應用 Tcb45 菌株 500 倍發酵液於結球白菜之肥效試驗結果，對照組 (圖左)，Tcb45 處理組 (圖右)

Fig. 8. The result of fertilizer test by application Tcb45 500-fold dilution of fermentation broth in chinese cabbage results, control group (left), Tcb45 treatment (right)

結語

國內微生物肥料的研究已發展多年，對於促進作物生長之機制明確，可以協助農友栽培時，減少化學肥料的使用、促進作物對於土壤中養分的有效利用、緩解土壤酸化及劣化、增加土壤中微生物族群多樣性、甚至可幫助作物抵抗逆境之能力，其產品對於環境友善。從 2014 年至 2020 年間，微生物肥料登記產品從 13 種增加至 64 種，從原本溶磷作用為主，至目前已經有溶鉀菌產品，菌根菌產品以及酵母菌產品，顯示微生物肥料產業正快速成長。本場近年著重於微生物資材的開發，對於菌株的篩選研發多管齊下，亦開發許多有助於農作物栽培管理時可用的微生物資材，包括微生物堆肥、微生物液肥、羽毛分解菌、微生物肥料及微生物農藥等產品，可以提供農友及栽培業者導入期栽培管理模式中，減少化學肥料與農藥的使用量，調適土壤劣化及酸化情形，本研究研發之液化澱粉芽孢桿菌 Tcb45 菌株具有溶磷能力，並可產生多種分解酵素、嵌鐵物質，並具有耐鹽能力，經由試驗證實用於多種蔬菜作物可促進生長，提高產量。可與化學肥料共同施用並降低化學肥料的施用量，Tcb45 菌株及量產技術已經技術移轉，並商品化，產品為溶磷微生物肥料「活力美」，可導入慣行栽培管理中，未來進一步提供給有機栽

培及友善耕作使用。微生物肥料產業的發展有助於國內農業的永續經營，達到友善環境及穩定作物優質生產的目標。

參考文獻

1. 李英明 2014 微生物肥料管理現況與展望 農業生物資材產業發展研討會論文集 行政院農業委員會臺中區農業改良場 特刊 121:13-21。
2. 林素禎、吳繼光 2005 微生物肥料在合理化施肥之應用 合理化施肥專刊 行政院農業委員會農業試驗所特刊 121:289-304。
3. 林秀芬、周涵穎、邱安隆、李英明 2018 臺灣微生物農藥與微生物肥料產業發展現況 行政院農業委員會 農政與農情 317。
4. 黃俊欽 2018 推動有機新農業 有機及友善耕作研討會論文集 行政院農業委員會臺中區農業改良場 特刊 135:1-8。
5. 曾宥紘、郭雅紋、陳鴻堂 2016 放線菌 *Arthrobacter enclensis* TCC-2 之多功能羽毛分解特性及促進有機栽培萵苣生長之研究 臺中區農業改良場研究彙報 131:57-68。
6. 張忠賀 2014 國內微生物肥料產業的發展現況與展望 農業生物資材產業發展研討會論文集 行政院農業委員會臺中區農業改良場 特刊 121:163-175。
7. 張耀聰 2018 友善環境農業資材應用介紹 高雄區農業專訊 108: 5-7。
8. 楊秋忠 2006 微生物肥料在綠色農業之研究與發展 生物技術與綠色農業研討會專刊 行政院農業委員會農業試驗所特刊 127: 11-17。
9. 楊秋忠 2011 微生物肥料：溶磷菌的應用及要領 苗栗區農業專訊 53。
10. 楊秋忠 2014 微生物肥料在作物生長的作用機制 農業生物資材產業發展研討會論文集 行政院農業委員會臺中區農業改良場 特刊 121:59-68。
11. Ahemad, M. and M. Kibretb. 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. J. King Saud Univ.Sci. 26:1-20.
12. Brosius, J., J. L. Palmer, H. P. Kennedy and H. F. Noller. 1978. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. 75:4801-4805.
13. Compant, S., B. Duffy, J. Nowak, C. Cle'ment and E. A. Barka. 2005. Use of plant growth-

- promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(9):4951-4959.
14. Cheng, C, W. and S. S. Yang. 1995. Amylase production of *Streptomyces rimosus* TM-55 and their 2-deoxyglucose resistant mutants. *Zhonghua Min Guo Wei Sheng Wu Ji Mian Yi Xue Za Zhi.* 28: 109-116.
 15. Dastager, S.G., Q. Liu, S. K. Tang, S. Krishnamurthi, J. C. Lee and W. J. Li. 2014. *Arthrobacter enclensis* sp. nov., isolated from sediment sample. *Arch. Microbiol.* 196(11): 775-82.
 16. Husen, E. 2003. Screening of soil bacterial for plant growth promotion activities *in vitro*. *Indonesian J. Agric. Sci. Technol.* 4(1):27-31.
 17. Kumar, A. and J. P. Verma. 2018. Does plant-Microbe interaction confer stress tolerance in plants: A review? *Microbiol. Res.* 207:41-52.
 18. Kundan, R., G. Pant, N. Jadon and P. K. Agrawal. 2015. Plant growth promoting rhizobacteria: mechanism and current prospective. *J. Fertil. Pestic.* 6(2): 1-9.
 19. Magnelli, P. E., A. Martinez and O. A. Mercuri. 1997. Simple method for determining cellulolytic activity in fungi. *Rev. Argent. Microbiol.* 29:210-214.
 20. Sacherer, P., G. Defago and D. Haas. 1994. Extracellular protease and phospholipase C are controlled by the global regulatory gene *gacA* in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *FEMS Microbiol. Lett.* 116:155-160.
 21. Schaad, N. W., J. B. Jones and W. Chun. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3rd edition. APS Press, St. Paul, 373.
 22. Stamenković, S., V. Beškoski, I. Karabegović, M. Lazić and N. Nikolić. 2018. Microbial fertilizers: A comprehensive review of current findings and future perspectives. *Span. j. agric. res.* 16 (1):1-16.
 23. Suzuki, T., T. Nakayama, T. Kurihara, T. Nishino and N. Esaki. 2001. Cold-active lipolytic activity of psychrotrophic *Acinetobacter* sp. strain no. 6. *J. Biosci. Bioeng.* 92:144-148.
 24. Timmusk, S., L. Behers, J. Muthoni, A. Muraya. and A. C. Aronsson. 2017. Perspectives and challenges of microbial application for crop improvement. *Front. Plant Sci.* 8:49.

25. Wang, L. T., F. L. Lee, C. J. Tai and H. Kasai. 2007. Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57(8):1846-1850.
26. Watanabe, F. S., and S. R. Olsen. 1965. Test of an ascorbic acid method for determining phosphorus in water and NaHCO₃ extracts from soil. *Soil. Sci. Soc. Am. J.* 29:677-678.
27. Woo, S. L. and O. Pepe. 2018. Microbial Consortia: Promising Probiotics as Plant Biostimulants for Sustainable Agriculture. *Front. Plant Sci.* 9: 1801.
28. Yamamoto, S. and H. Shigeaki. 1995. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1104-1109.
29. Yang, J., J. W. Kloepper and C. M. Ryu. 2009. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends Plant Sci.* 14(1):1-4.

The Research and Development of *Bacillus amyloliquefaciens* Tcb45 as Microbial Fertilizer

Chien-Chih Kuo, Yu-Heng Lin, Shih-Chieh Chang, Pei-Hsin Lo and Chung-Ta Liao
Taichung District Agricultural Research and Extension Station, COA

Abstract

The development of microbial fertilizers plays an important role in the development of sustainable agriculture and research in Taiwan. Farmers relied on chemical fertilizers for crop cultivation and management for a long time, which could cause problems such as soil degradation, reduced yields, continuous cropping obstacles, soil diseases and had a negative impact on the environment. Therefore, in this study, we isolated and screened a number of beneficial microbial from the organic soil, one of Tcb45 strain was identified as *Bacillus amyloliquefaciens* by molecular technology. Tcb45 strain had phosphate solubilization and siderophore activities, and could produce starch, protein and cellulolytic enzymes through the detection and analysis. Tcb45 strain had salt tolerance ability, the bacteria number count can still reach more than 10^8 CFU/mL under 7% sodium chloride culture conditions after 24 hours. It showed Tcb45 strain have the potential of being mixed with chemical fertilizers. We made Tcb45 strain fermentation broth and applied to a variety of vegetable crops, such as cabbage and lettuce. During the vegetable seedling stage by root irrigation and foliar spraying 4-6 times during the growth period, it could promote growth of vegetable roots and significantly increase the yield by 10-20%. In the field study of Chinese cabbage, the yield for plants that were given 70% of the chemical fertilizer plus Tcb45 strain was equivalent to the yield for the plants that were given full amount of chemical fertilizer. The Tcb45 microbial strain and its mass production technology have been technology transferred to the biotechnology company and commercialized, and can be applied to conventional farming, furthermore it could application to friendly and organic cultivation in the future. It is expected to promotion of sustainable agriculture and friendly environment farming.

Key Words: Microbial fertilizer, *Bacillus amyloliquefaciens*, Phosphate solubilization