

2024 年【科學探究競賽-這樣教我就懂】

技高組 成果報告表單

題目(作品)名稱：「磷」漓盡致·溶磷菌微生物肥料開發

一、摘要

磷在土壤中多以無機難溶性型態存在，不易為植物吸收，隨著農業科技日新月異，人類同時面對外來種入侵、農藥殘留、化學肥料濫用、環境污染等問題，隨著環保意識抬頭，有益的微生物可提供農作物營養來源，溶磷菌可促進磷的溶解，增加植物根系對磷的吸收，有效的將土壤變得更好，減少化學肥料的使用，本研究是觀察在栽種不同農作物的土壤中所分離出的溶磷菌是否一樣，以了解溶磷菌對農作物是否有專一性，實驗土壤樣本使用種植玉米、番茄、櫛瓜的土壤來觀察，經連續稀釋塗抹於培養基上，於 28°C 培養 3 天~5 天觀察，挑選菌落再做四區劃線分離出溶磷菌，研究結果顯示從種植玉米、番茄、櫛瓜的土壤分離出的溶磷菌不相同，本實驗的目的是可以讓土壤維持健康進而永續循環，達到友善環境，守護地球的目標。

本實驗使用不同磷源及培養基條件下與市售 pikovskaya's agar 培養基來製作，探討是否能分離出土壤中的溶磷菌並將分離出之溶磷菌針對不同作物進行施肥，未來展望進而能應用於農作物的栽種，提升土壤磷利用效率，幫助農作物生長及維持穩定的品質。

二、探究題目(創意作品)與動機

研究動機是我們在寒假時參加中山大學創立的不廢少年永續循環的營隊，而在農村走踏的時候，才發現原來農田的病蟲害和病菌很多，若無噴灑農藥處理，可能導致種出來的農作物不良率高而沒辦法賣出去，這時我們思考有甚麼方法可以讓土壤變的更好，能讓農產品品質穩定並減少對環境的破壞，於是我們請教學校園藝科老師，老師建議我們可以使用溶磷菌以減少農藥所帶來的化學汙染和溫室氣體排放，結合我們食品所學微生物檢驗技術進行研究，溶磷菌於土壤中的主要目的在於促進磷的有效吸收，提升植物的生長及產量分解土壤中的磷酸鹽，轉化為可讓植物吸收的磷素，助於提高土壤中的磷利用效率，而減少化學肥料的使用。

三、探究(創作)目的與假設

(一)研究目的

- 1.減少對化學肥料的依賴。
- 2.增進土壤的通氣性。
- 3.降低肥料的投入，使成本降低。

(二)研究假設

- 1.探討自製培養基，不同配方的磷含量是否能讓溶磷菌成長？
- 2.取不同農作物的土壤，分離鏡檢確認是否為同種溶磷菌？
- 3.了解溶磷菌於不同農作物的土壤是否具有專一性？

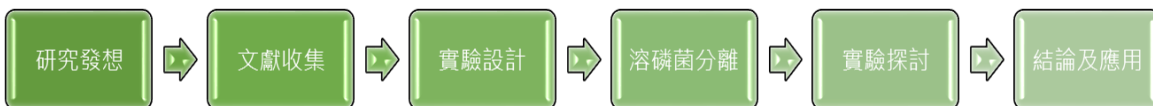
4. 探討市售溶磷菌與自製溶磷菌之比較。

四、探究方法與驗證步驟

(一) 實驗器材

三角瓶、試管和試管架、L 型玻棒、無菌水、濕熱滅菌釜、乾熱滅菌烘箱、血清瓶、無菌操作檯、培養皿、打火機、接種環、天平、秤量紙、藥勺、磁石、加熱板、500 毫升燒杯、顯微鏡、載玻片、革蘭氏染色試劑、恆溫水浴箱、培養箱、酒精燈、分注器、鋁箔紙、安全吸球、拋棄式 1 毫升刻度吸量管、玻片木夾、70% 酒精噴霧瓶、廢液杯、洗滌瓶

(二) 研究架構



(三) 實驗流程

			
<p>1. 器具準備 L 型玻棒、燒杯放入乾熱滅菌 170°C · 1 小時</p>	<p>2. 土壤採樣 (種植玉米、櫛瓜、蕃茄之土壤)</p>	<p>3. 秤取培養基配方</p>	<p>4. 培養基煮融</p>
			
<p>5. 將培養基和 9 毫升蒸餾水濕熱滅菌 121°C · 15 分鐘</p>	<p>6. 培養基放入水浴箱恆溫冷卻</p>	<p>7. 將培養基倒入培養皿中，待至凝固</p>	<p>8. 取土壤 1g 至 9mL 無菌水試管中做連續稀釋至 10⁵</p>
			

9.將玉米、蕃茄、櫛瓜土壤及市售溶磷菌粉末從 10^3 、 10^4 、 10^5 各取 0.1mL 做塗抹，二重複	10.放入 28°C 恆溫培養箱，倒皿培養 3~5 天	11.觀察菌種是否具有透明環	12.在 10^5 培養基上觀察菌種其生長狀態 左到右依序為空白、市售溶磷菌、玉米、櫛瓜及蕃茄土壤
			
13.從不同土壤樣品 10^5 培養基上取具有透明環菌種做四區劃線培養，做二重複	14.放入 28°C 恆溫培養箱，倒皿培養 3 天	15.分離出單一菌落	16.進行革蘭氏染色
			
17.鏡檢	18.鏡檢結果	19.溶磷菌擴大培養	20.植物專用溶磷菌培養液

(四)實驗探討

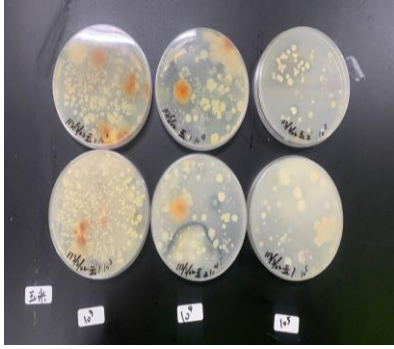
1.不同培養基其營養成分比例及實驗結果

以培養基 500mL 計算各成分百分比					
培養基	配方一	配方二	配方三	配方四	市售 pikovskaya's agar 培養基
營養成分	葡萄糖 2%	葡萄糖 1.02%	葡萄糖 1.02%	葡萄糖 1.02%	酵母抽取物 0.05%
	磷酸鈉 1%	甘胺酸 0.03%	甘胺酸 0.03%	甘胺酸 0.03%	葡萄糖 1%
	氯化鉀 0.05%	氯化鉀 0.02%	氯化鉀 0.0001%	氯化鉀 0.0001%	磷酸鈣 0.5%
	硫酸鎂 0.02%	硫酸鎂 0.0001%	碳酸鈣 0.9%	硫酸亞鐵 0.0001%	硫酸銨 0.05%

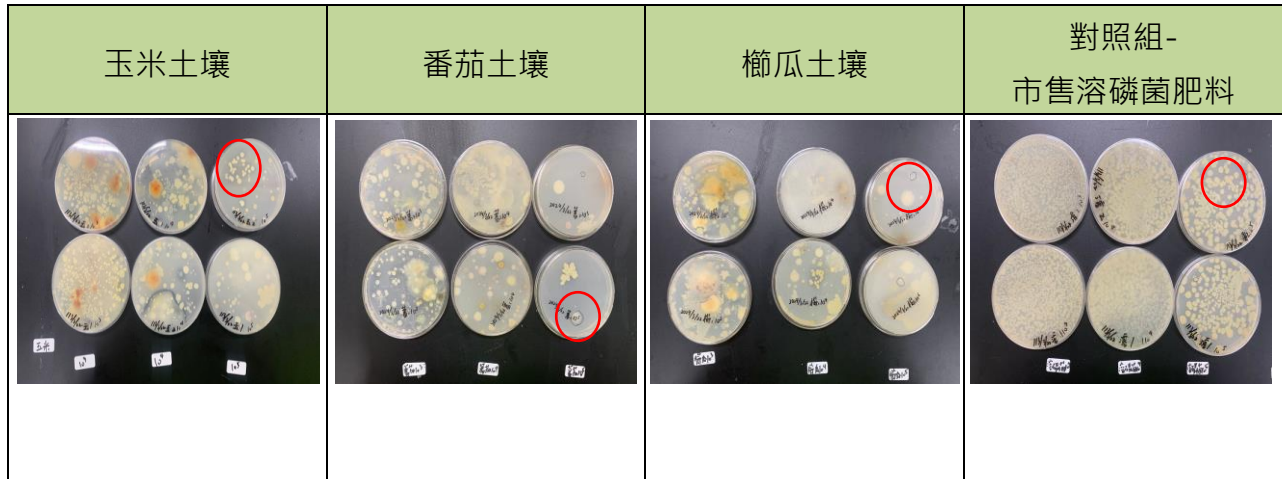
	硫酸亞鐵 0.0001%	硫酸亞鐵 0.0001%	洋菜 1.5%	碳酸鈣 0.9%	氯化鉀 0.02%
	PCA 3%	洋菜 1.5%	磷酸鈉 0.3%	洋菜 1.5%	硫酸鎂 0.01%
	NA 2%	磷酸鈉 0.3%	0.2M 稀鹽酸加 到碳酸鈣完全 溶解	偏磷酸 0.4%	硫酸錳 0.0001%
					硫酸亞鐵 0.0001%
					洋菜 1.5%
凝固狀況	凝固成功	凝固不完全	凝固不完全	凝固不完全	凝固成功
實驗結果	塗抹培養 5 天後 無透明環，無法 培養出溶磷菌	無法進行後續 實驗	無法進行後續 實驗	無法進行後續 實驗	塗抹培養 5 天

實驗顯示自製培養基，因其營養成分缺少磷酸鈣，培養 5 天後無產生透明環，無法分離出溶磷菌，因此以市售 pikovskaya's agar 培養基做後續實驗。

2. 稀釋倍數的選擇

實驗條件	實驗結果	圖示
1. 十倍連續稀釋至 $10^1 \sim 10^3$ ，分別取 0.1mL 做塗抹培養	稀釋倍數至 10^3 ，雜菌高，分離出多為黴菌、酵母菌，無法分離出溶磷菌，因此重新將所需材料及器具滅菌再做第二次實驗	
2. 十倍連續稀釋至 $10^3 \sim 10^5$ ，分別取 0.1mL 做塗抹培養	稀釋倍數至 10^4 、 10^5 ，可分離出具有透明環之溶磷菌	

3. 土壤所分離出溶磷菌之溶磷現象



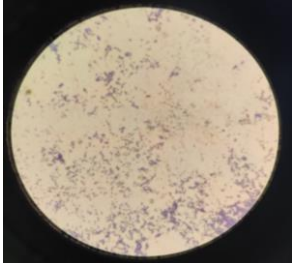
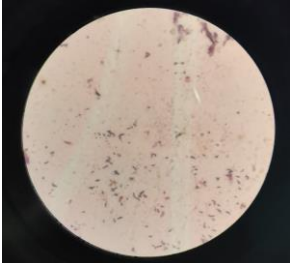
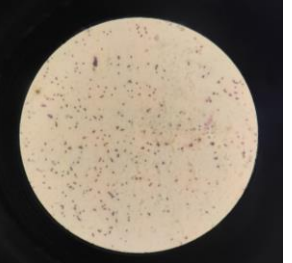
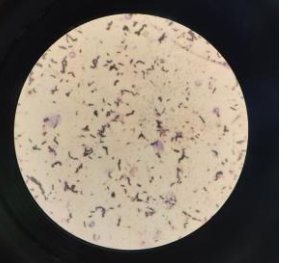
以接種環勾取溶磷現象明顯之菌落(紅色圈起處)進行四區劃線培養分離單一純菌落，再進行擴大培養得到植物專用溶磷菌培養液。

溶磷菌涵蓋真菌、放射菌及細菌，常見如細菌的 *Pseudomonas* spp.、*Mycobacterium* spp.、*Micrococcus* spp.、*Bacillus* spp. 及 *Flavobacterium* spp. 等，真菌為 *Aspergillus* spp.、*Penicillium* spp. 等，放線菌為 *Streptomyces* spp. 等(SubbaRao · 1982)。

目前發現溶磷微生物分泌有機酸的可能溶磷機制如下

- (1) 有機酸的酸化作用：溶磷微生物藉由有機酸產生使培養基 pH 值下降，造成難溶性磷酸鹽溶解。
- (2) 有機酸的鉗合作用：微生物產生之有機酸，如檸檬酸、2-酮基葡萄糖酸、草酸等能與金屬離子產生鉗合作用，與磷酸根競爭金屬離子，使磷酸根離子得以釋放。
- (3) 有機酸的競爭吸附：有機酸與磷酸根競爭吸附位置，使磷的吸附作用降低。

4. 土壤分離出菌株其革蘭氏染色鏡檢結果

玉米土壤	番茄土壤	櫛瓜土壤	對照組- 市售溶磷菌肥料
			
革蘭氏陽性菌 長桿狀	革蘭氏陽性菌 短桿狀	革蘭氏陽性菌 球狀	革蘭氏陽性菌 長桿狀

由革蘭氏染色結果及性狀分析，從玉米、番茄及櫛瓜土壤所分離出溶磷菌為不同菌株，

因此可於從土壤中分離之溶磷菌，再進行擴大培養得到種植不同植物專用溶磷菌培養液，藉以改善土壤中的磷利用效率，促進磷的溶解，增加植物根系對磷的吸收，而減少化學肥料的使用。

五、結論與生活應用

結論：土壤中的磷主要以無機態磷結合形式存在最多，對植物的有效性磷減少，因此磷肥在每期作物生產中皆需要施用，否則農作物產量及品質就受到影響，但磷肥回收利用率很低，有 8 成幾乎都被土壤所固定結合，經實驗了解微生物肥料溶磷菌在不同農作物具有專一性，可針對不同作物施予適合的溶磷菌，土壤或種子接種溶磷微生物可以改善土壤中被固定磷的溶解狀況，使得植物更容易吸收養分而提高作物的產量，使用溶磷菌，除了降低施肥所增加的成本外，也減少化學肥料使用，減少對環境的破壞，能達到友善環境、永續循環的目標。生活應用：

1. 溶磷菌適合用於在土壤中，幫助農作物生長，使農產品品質及產量穩定。
2. 降低化學性肥料的投入，使成本降低。
3. 增進土壤的通氣性。
4. 能減少對化學肥料的依賴，愛護環境，永續循環利用。

參考資料

一、書籍資料

江春梅(2020年)。食品微生物實習(上)。復文書局

二、網路文獻

1. 國立自然科學博物館(2023年05月15日)。農業生態。[農業生態-國立自然科學博物館 \(nmns.edu.tw\)](http://nmns.edu.tw)
2. 楊秋忠。微生物的肥料：溶磷菌的應用及要領。第 53 期。
https://www.mdare.gov.tw/files/mdais/web_structure/3379/1017.pdf
3. 黃文益。臺東地區重要作物溶磷菌之開發研究。<https://ssur.cc/hYK9iHH>
4. 黃裕銘博士、研究生彭勇俊(2012年)。土壤 pH、磷酸鹽及溶磷菌對土壤磷型態及玉米生長之影響。國立中興大學土壤環境科學系：碩士學位論文