

# 市售溶磷菌肥料產品品質分析

林素禎<sup>1,\*</sup> 林姿君<sup>2</sup> 簡宣裕<sup>3</sup>

## 摘要

林素禎、林姿君、簡宣裕。2020。市售溶磷菌肥料產品品質分析。台灣農業研究 69(1):90-100。

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及更一致的結果，而且還可以從市場上去除品質差的產品，進而提高農民使用的信心。本文闡述行政院農業委員會農業試驗所於2017年及2018年購買市面上販售溶磷菌肥料產品的檢測結果，包括溶磷菌有效活菌數、雜菌率、溶磷環、溶磷活性及菌種鑑定，其檢測方法參考行政院農業委員會農糧署公告的「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，僅有5個皆符合農糧署微生物肥料規定，合格率为36%。由2018年檢測結果可知，16個市售溶磷菌肥料產品只有8個皆符合規定，合格率为50%。上述檢測結果，乃國內微生物肥料產品上市以來第一次全面性的品質分析，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

行政院農業委員會農糧署自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（農糧署農業統計年報2002-2014年，<http://www.afa.gov.tw>）。未來擬再藉由施用有機質肥料與微生物肥料，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。至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養分之高低，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

增進土壤養分有效性或改良土壤之理化、生物性質，進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、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未有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 *et al.* (2001) 報導指出世界各地90%的豆科根瘤菌產品沒有實際的效果，主

投稿日期：2019年6月4日；接受日期：2019年11月17日。

\* 通訊作者：linmay@tari.gov.tw

<sup>1</sup> 農委會農業試驗所農業化學組助理研究員。台灣 台中市。

<sup>2</sup> 農委會農業試驗所農業化學組計畫助理。台灣 台中市。

<sup>3</sup> 農委會農業試驗所農業化學組前研究員。台灣 台中市。

要是因產品的品質不佳。Herrmann & Lesueur (2013) 報導指出 65 個微生物產品中，只有 37% 的產品是“純的”微生物菌劑，而其他 63% 的產品被雜菌污染，且 40% 的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  $10^6$  CFU 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 & Lesueur 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。微生物肥料產品檢驗之採樣現行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。行政院農業委員會農業試驗所在 2017 與 2018 兩年間，購買市售溶磷菌肥料產品進行檢測，本文中將根據農糧署公告的微生物肥料檢驗項目，評估這些溶磷菌肥料產品之品質。

## 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。(https://www.afa.gov.tw/cht/index.php?code=list&flag=detail&ids=740&article\_id=5725)。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、大腸桿菌及沙門氏菌，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  $10\times$  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  $10\times$  稀釋檢液之三角瓶置於迴轉振盪器上，以  $30^{\circ}\text{C}$ 、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  $10\times$  稀釋檢液，移入 9 mL 冷稀釋液之螺旋試管中，振盪均勻，即為  $10^2\times$  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  $\text{mL}^{-1}$ ，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  $30^{\circ}\text{C}$  黑暗培養，分別於第 3 天、第 7 天、第 14 天及第 28 天，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 (CFU  $\text{g}^{-1}$  或 CFU  $\text{mL}^{-1}$ ) = 平均菌落數 (CFU 皿 $^{-1}$ )  $\times$  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  $\times$  (雜菌數 + 溶磷菌數) $^{-1}$   $\times$  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  $30^{\circ}\text{C}$ 、200 rpm 培養箱

表 1. 溶磷菌固體培養基<sup>z</sup>。**Table 1.** Culture medium for phosphate-solubilizing bacteria<sup>z</sup>.

Composition	Concentration (g L <sup>-1</sup> )	Company name
Sucrose	10.000	Choneye, Taiwan
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.270	Katayama, Japan
KCl	0.200	Katayama, Japan
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.100	Katayama, Japan
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.001	Katayama, Japan
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.001	Merck, Germany
Agar	15.000	Becton, Dickinson and Company, BD, USA
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	5.000	Katayama, Japan
Distilled water	Added to 1,000 mL	

<sup>z</sup> Medium pH was adjusted to 7.0 ± 0.1, and then sterilized at 121°C for 15 min.

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°C 配合 27,000× g 條件)，取澄清液，並以 0.45 μm 濾膜過濾。取定量濾液 (磷約 100–900 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、5、10、15、20 及 25 mL 之 50 mg L<sup>-1</sup> 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、5、10、15、20 及 25 mg L<sup>-1</sup> 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解為水溶性磷之量 μg [g (mL) × h (d)]<sup>-1</sup>，溶磷活性 = 溶磷菌肥料產品之培養液所含水溶性磷量 (μg 瓶<sup>-1</sup>) - [滅菌的溶磷菌肥料產品之培養液所含水溶性磷量 (μg 瓶<sup>-1</sup>)] / [使用溶磷菌肥料產品量 (mL 瓶<sup>-1</sup> 或 g 瓶<sup>-1</sup>) × 培養時間 (h 或 d)]。上述混合試劑的配製方法如下：將偏鈳酸鉍溶液移入 1,000 mL 量液瓶中，快速攪拌，並

緩慢加入 250 mL 濃硝酸 (HNO<sub>3</sub>)。冷卻至室溫後，將鉍酸鉍溶液倒入量液瓶中，定量至 1,000 mL。上述鉍酸鉍溶液為取 25 g 鉍酸鉍 [(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> · 4H<sub>2</sub>O] 溶解於 400 mL 去離子水中後備用；偏鈳酸鉍溶液為取 1.25 g 偏鈳酸鉍 (NH<sub>4</sub>VO<sub>3</sub>) 溶解於 300 mL 之沸騰去離子水中，冷卻至室溫供用；50 mg L<sup>-1</sup> 磷標準溶液製作為以 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 先於 40°C 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 1,000 mL，此時磷濃度即為磷 50 mg L<sup>-1</sup>，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 1,000 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 10× 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<sup>-1</sup>–10<sup>-8</sup> 濃度之稀釋液。再取 100 μL 稀釋液，均勻塗抹於 nutrient agar (NA) 培養基中，於 30°C 下恆溫培養約 3–7 d。nutrient broth (NB) 培養基中外加 17 g L<sup>-1</sup> 瓊脂後為 NA 培養基。挑選單一菌落後，至少進行 3 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°C 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°C 配合 10,000× 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°C 配合 10,000× 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 及 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 mi-

microbead tube 中。加入 50  $\mu\text{L}$  Solution 1 於 microbead tube 中。將 microbead tube 置於水浴槽中，以 70°C 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 $\times g$  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  $\mu\text{L}$  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°C 條件下 5 min。將微量離心管置於微量離心機中，並以 10,000 $\times g$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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 $\times g$  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  $\mu\text{L}$  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 $\times g$  離心 30 s 後，再倒掉濾液。加入 300  $\mu\text{L}$  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 $\times g$  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 $\times g$  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  $\mu\text{L}$  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 $\times g$  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°C 冰箱中，以供聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction; PCR) 增殖 16S 核糖體 DNA (16S rDNA) 用。

### 溶磷菌菌體 16S 核糖體 DNA (16S rDNA) 之 PCR 擴增方法

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  $\mu\text{L}$  10 mM 11F 引子與 0.5  $\mu\text{L}$  10 mM 1492R 引子，再加入 0.25  $\mu\text{L}$   $\mu\text{L}^{-1}$  Taq DNA 聚合酶，2  $\mu\text{L}$  2.5 mM dNTPs，2.5  $\mu\text{L}$  10 $\times$  之聚合酶緩衝溶液，以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  $\mu\text{L}$ ，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°C 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°C 50 s，黏接 53°C 60 s，延展 72°C 120 s，變性至延展需進行 28 個循環反應，最終延展 72°C 10 min。然後，將 PCR 增殖後之 16S rDNA，儲存於 -20°C 冰箱中備用。

### DNA 膠體電泳分析

以 0.5 $\times$  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°C，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 0.5 $\times$  TAE 緩衝液使其完全覆蓋膠體。吸取 5  $\mu\text{L}$  增殖後的 16S rDNA，並與 1  $\mu\text{L}$  6 $\times$  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 2  $\mu\text{L}$  1 Kb 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 25–30 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 (台灣台北市) 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。將上述已組合之核糖體 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 個溶磷菌肥料產品，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結果，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  $1 \times 10^7$  菌落形成數以上；液態每毫升  $1 \times 10^8$  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  $1 \times 10^7$  菌落形成數以上之規定，判定為不合格之產品，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，所用檢測方法為經濟部標準檢驗局 CNS15301-3，其培養基配方中瓊脂 (agar) 為  $12 \text{ g L}^{-1}$ ，磷酸鈣  $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$  為  $0.3 \text{ g L}^{-1}$ 。農糧署公告方法 (AFS3183-1) 培養基配方中瓊脂為  $15 \text{ g L}^{-1}$ ，磷酸鈣  $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$  為  $5 \text{ g L}^{-1}$ ，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 個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 個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 個溶磷菌肥料產品不合格率為 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  $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$  為  $0.3 \text{ g L}^{-1}$ ，而農糧署公告方法 (AFS3183-1) 培養基配方中的磷酸鈣  $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$  為  $5 \text{ g L}^{-1}$ ，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 個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 個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 及 14 等 7 個產品，在產品上所標示的目標

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 <sup>z</sup>	Contamination rate <sup>x</sup> (%)	Phosphate solubilizing halo zone (mm)	Tricalcium phosphate solubilizing activity [ $\mu\text{g g}^{-1} (\text{mL}^{-1}) \text{day}^{-1}$ ]	Species name of target strain on product label	Species name based on rDNA sequence data when product was registered <sup>y</sup>	Species name of products bought from market in 2017 and identified by rDNA sequence <sup>w</sup>
1	$7.3 \times 10^6$ CFU $\text{g}^{-1}$	ND <sup>x</sup>	$4.4 \pm 0.7$	4,962	<i>Bacillus safensis</i>	<i>B. safensis</i>	<i>B. safensis</i>
2	$3.3 \times 10^7$ CFU $\text{g}^{-1}$	ND	$3.6 \pm 0.5$	3,464	<i>B. safensis</i>	<i>B. safensis</i>	<i>B. safensis</i>
3	$4.9 \times 10^8$ CFU $\text{g}^{-1}$	ND	0	-328	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>
4	$1.0 \times 10^7$ CFU $\text{g}^{-1}$	ND	$3.4 \pm 0.3$	131	<i>B. safensis</i>	<i>B. safensis</i>	<i>B. safensis</i>
5	$8.2 \times 10^6$ CFU $\text{g}^{-1}$	2.40	$3.3 \pm 0.3$	3,549	<i>B. safensis</i>	<i>B. safensis</i>	<i>B. safensis</i>
6	$2.0 \times 10^7$ CFU $\text{g}^{-1}$	ND	$3.1 \pm 0.3$	1,251	<i>B. safensis</i>	<i>B. safensis</i>	<i>B. safensis</i>
7	$1.0 \times 10^9$ CFU $\text{mL}^{-1}$	ND	$2.5 \pm 0.3$	-166	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. licheniformis</i>
8	$1.8 \times 10^7$ CFU $\text{g}^{-1}$	ND	$3.5 \pm 0.4$	1,697	<i>B. safensis</i>	<i>B. safensis</i>	<i>B. safensis</i>
9	$2.3 \times 10^9$ CFU $\text{mL}^{-1}$	ND	0	365	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>B. subtilis</i> 、 <i>Bacillus siamensis</i>	<i>B. siamensis</i>
10	$4.9 \times 10^8$ CFU $\text{mL}^{-1}$	ND	0	-563	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>
11	$7.4 \times 10^8$ CFU $\text{mL}^{-1}$	0.16	$4.4 \pm 0.6$	-459	<i>B. subtilis</i>	<i>B. siamensis</i>	<i>B. siamensis</i>
12	$5.4 \times 10^6$ CFU $\text{g}^{-1}$	ND	0	950	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. licheniformis</i>
13	$5.7 \times 10^6$ CFU $\text{g}^{-1}$	1.80	0	1,107	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. licheniformis</i>
14	$1.9 \times 10^6$ CFU $\text{g}^{-1}$	ND	$3.3 \pm 0.4$	3,162	<i>B. safensis</i>	<i>B. safensis</i>	<i>B. safensis</i>

<sup>z</sup> Effective plate count of phosphate solubilizing bacteria: plate count number for solid product more than  $1 \times 10^7$  CFU  $\text{g}^{-1}$ , and plate count number for liquid product more than  $1 \times 10^8$  CFU  $\text{mL}^{-1}$ . 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)

<sup>y</sup> Contamination rate shall not exceed 15% and 5% for solid and liquid products, respectively.

<sup>x</sup> 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 web-site of EzBioCloud. (2019/10/28)

<sup>w</sup> 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)

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 *B. safensis*。另外，從上述 7 個市售產品中所分離之目標菌株菌種名稱也是 *B. 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*，而上述 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 *B. subtilis*。另外，從上述 2 個市售產品中所分離之目標菌株菌種名稱也是 *B. 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*，而上述 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 *B. licheniformis*。另外，從上述 3 個市售產品中所分離之目標菌株菌種名稱，也是 *B. 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 *B. subtilis* 與 *Bacillus siamensis*。而從市售產品中所分離之目標菌株菌種名稱為 *B. 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 *B. 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 *B. 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 *B. siamensis*。而從市售產品中所分離之目標菌株菌種名稱為 *B. 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 *B. 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 個溶磷菌肥料產品其溶磷菌目標菌株之菌種鑑定合格率为 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  $1 \times 10^3$  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，合格率为 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 個溶磷菌肥料產品，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結果，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  $1 \times 10^7$  菌落形成數以上之規定，判定為不合格之產品，不合格率为 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 個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，不合格率为 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 個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，不合格率为 38%。產品編號 9、10、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 [ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ] 為  $0.3 \text{ g L}^{-1}$ ，而農糧署公告方法 (AFS3183-1) 培養基配方中

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 <sup>z</sup>	Contamination rate <sup>y</sup> (%)	Phosphate solubilizing halo zone (mm)	Tricalcium phosphate solubilizing activity [ $\mu\text{g g}^{-1} (\text{mL}^{-1}) \text{day}^{-1}$ ]	Species name of target strain on product label	Species name based on rDNA sequence data when product was registered <sup>x</sup>	Species name of products bought from market in 2018 and identified by rDNA sequence <sup>w</sup>
1 <sup>z</sup>	$5.9 \times 10^7 \text{CFU g}^{-1}$	ND <sup>w</sup>	$4.3 \pm 0.7$	4,739	<i>Bacillus safensis</i>	<i>B. safensis</i>	<i>B. safensis</i>
2	$1.6 \times 10^7 \text{CFU g}^{-1}$	52.9	$3.3 \pm 1.7$	627	<i>B. safensis</i>	<i>B. safensis</i>	<i>B. safensis</i>
3	$1.5 \times 10^8 \text{CFU g}^{-1}$	ND	0	422	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>
4	$4.8 \times 10^7 \text{CFU g}^{-1}$	ND	$3.0 \pm 0.4$	4,176	<i>B. safensis</i>	<i>B. safensis</i>	<i>B. safensis</i>
5	$2.2 \times 10^7 \text{CFU g}^{-1}$	0.9	$3.4 \pm 0.4$	1,406	<i>B. safensis</i>	<i>B. safensis</i>	<i>B. safensis</i>
6	$4.2 \times 10^7 \text{CFU g}^{-1}$	ND	$4.1 \pm 0.8$	287	<i>B. safensis</i>	<i>B. safensis</i>	<i>B. safensis</i>
7	$1.7 \times 10^8 \text{CFU mL}^{-1}$	ND	0	760	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. licheniformis</i>
8	$1.9 \times 10^7 \text{CFU g}^{-1}$	0.5	$5.9 \pm 1.1$	1,774	<i>B. safensis</i>	<i>B. safensis</i>	<i>B. safensis</i>
9	$2.0 \times 10^9 \text{CFU mL}^{-1}$	ND	0	-536	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus subtilis</i> 、 <i>Bacillus stamensis</i>	<i>Bacillus velezensis</i>
10	$1.9 \times 10^8 \text{CFU mL}^{-1}$	ND	0	-36	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. velezensis</i>
11	$9.8 \times 10^7 \text{CFU mL}^{-1}$	ND	$5.5 \pm 0.7$	-296	<i>B. subtilis</i>	<i>B. stamensis</i>	<i>B. velezensis</i>
12	$1.6 \times 10^7 \text{CFU g}^{-1}$	ND	0	-1,932	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. licheniformis</i>
14	$8.4 \times 10^6 \text{CFU g}^{-1}$	ND	$3.3 \pm 0.4$	408	<i>B. safensis</i>	<i>B. safensis</i>	<i>B. safensis</i>
15	$8.6 \times 10^7 \text{CFU g}^{-1}$	0.1	$4.4 \pm 1.3$	2,474	<i>B. safensis</i>	<i>B. safensis</i>	<i>B. safensis</i>
16	$2.2 \times 10^8 \text{CFU g}^{-1}$	ND	$3.0 \pm 0.4$	-303	<i>B. safensis</i>	<i>B. safensis</i>	<i>B. safensis</i>
17	$2.6 \times 10^7 \text{CFU g}^{-1}$	ND	$4.5 \pm 1.1$	-2,977	<i>B. safensis</i>	<i>B. safensis</i>	<i>B. safensis</i>

<sup>xyzw</sup> Legends same as Table 2.

的磷酸鈣  $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$  為  $5 \text{ g L}^{-1}$ ，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 個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 *B. 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 *B. subtilis* 與 *B. 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 *B. 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 *B. 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 *B. subtilis*，而從市售產品中所分離之目標菌株菌種名稱為 *B. 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 *B. 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 *B. 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 *B. siamensis*，而從市售產品中所分離之目標菌株菌種名稱為 *B. 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 *B. 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，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 *et al.* (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 & Lesueur (2013) 的研究指出，65 個微生物產品中，只有 37% 的產品是純的微生物菌劑，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，以及 (5) 產品每季使用前皆需經過獨立的實驗室檢定合格 (Herrmann & Lesueur 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年農糧署抽樣的樣品檢測項目，只有微生物肥料的活菌數，檢驗結果顯示：在10個抽樣產品中，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，且無需進行微生物肥料的肥(功)效試驗，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。目前國內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

- Bashan, Y. 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnol. Adv.* 16:729–770.
- Brockwell, J. and P. J. Bottomley. 1995. Recent advances in inoculant technology and prospects for the future. *Soil Biol. Biochem.* 27:683–697.
- Catroux, G., A. Hartmann, and C. Revellin. 2001. Trends in rhizobial inoculant production and use. *Plant Soil* 230:21–30.
- Ghosh, T. K., R. P. Singh, J. S. Duhan, and D. S. Yadav. 2001. A review on quality control of biofertilizer in India. *Fert. Mark. News* 32:1–9.
- Herrmann, L. and D. Lesueur. 2013. Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97:8859–8873.
- Hungria, M., M. F. Loureiro, I. C. Mendes, R. J. Campo, and P. H. Graham. 2005. Inoculant preparation, production and application. p.223–253. *in: Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and the Environment.* (Werner, D. and W. E. Newton, eds.) Springer. Dordrecht, Netherlands. 350 pp.
- 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:682–686.
- Lin, C. and D. A. Stahl. 1995. Taxon-specific probes for the cellulolytic genus *Fibrobacter* reveal abundant and novel equine-associated populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1348–1351.
- Stephens, J. H. G. and H. M. Rask. 2000. Inoculant production and formulation. *Field Crops Res.* 65:249–258.

# Quality Analysis of Commercial Phosphate-Solubilizing Bio-Fertilizer Products

Su-Chen Lin<sup>1,\*</sup>, Zi-Jun Lin<sup>2</sup>, and Shiuan-Yuh Chien<sup>3</sup>

## Abstract

Lin, S. C., Z. J. Lin, and S. Y. Chien. 2020. Quality analysis of commercial phosphate-solubilizing bio-fertilizer products. *J. Taiwan Agric. Res.* 69(1):90–100.

Only bio-fertilizers with good quality can assure their promotion in plant nutrients absorption and growth in the field, and the supervision of product quality from government side could play a key role not only in helping bio-fertilizers providing 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 halo zone, phosphate-solubilizing activity, and target species identification. All of methodologies followed the publications by Agriculture and Food Agency (AFA). In 2017, only 5 out of 14 commercial products (36%) met the requirements by AFA. In 2018, only 8 out of 16 commercial products (50%) met the requirements by AFA. This is the first product quality report about commercial phosphate-solubilizing bio-fertilizers in Taiwan. This results will be submitted to AFA and be contributed to the revision of the management regulations of bio-fertilizers in the future.

**Key words:** Bio-fertilizer, Phosphate-solubilizing bacteria, Quality supervision.

---

Received: June 4, 2019; Accepted: November 17, 2019.

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

<sup>1</sup> Assistant Research Fellow, Agricultural Chemistry Division, Taiwan Agriculture Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

<sup>2</sup> Project Assistant, Agricultural Chemistry Division, Taiwan Agriculture Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

<sup>3</sup> Former Research Fellow, Agricultural Chemistry Division, Taiwan Agriculture Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.