

The studies on microbial reclamation of agricultural and marine wastes for production of bio-agents

王啟浩、王三郎；林良平

E-mail: 8809529@mail.dyu.edu.tw

ABSTRACT

In this study, the utilization of agricultural and marine wastes by microbes to produce various bio-agents, such as fungicide, bio-surfactant, bio-fertilizer and antioxidant were described. In the first part, we described the isolation and identification of two strains of fungicide-producing microorganisms. These two strains were numbered as W113 and W118, both identified as strains of *Bacillus subtilis*. In the second part, the optimum cultural media and conditions were studied. The optimum condition for W113 was found to be the cultured at 25 °C for 3 days in 50ml medium (pH 7.0) containing 0.1% K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄ 7H₂O, 1.75% chitin, and 0.15% Chinese herb residue (CHR). The optimum condition for W118 was found to be cultured was shaken at 30 °C for 2 days in 100ml medium (pH 7.0) containing 0.1% K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄ 7H₂O, 0.75% chitin, and 0.05% *Gandoderma zucidum* residue (GZR). Under such conditions, W113 and W118 exhibited the maximum antifungal activities on pathogenic *F. oxysporum*. The inhibitory activities are 94% and 91%, respectively. In the third part, the properties of fungicides produced by W113 and W118 were studied. The fungicide produced by W113 displayed the maximum inhibitory activity (86%) on pathogenic *F. oxysporum* at pH 7.0. It was remarkably thermostable and retained 52% of its activity even after being heated at 100 °C for 40 min. The fungicide produced by W118 displayed the maximum inhibitory activity (73%) at pH 7.0-8.0. It retained 51% of its activity after being heated at 100 °C for 30min. The minimum inhibitory activities for W113 and W118 were 25% and 23%, respectively. Both fungicides showed no chitinase activity but caused abnormal hyphal swelling on the tip of *F. oxysporum*. In the fourth part, the production of bio-surfactant by *Bacillus subtilis* W113 and *Bacillus subtilis* W118 by two-stage fermentation technique was discussed. The surface tension of culture broth was below 40 dyne/cm after the W113 and W118 were cultivated for 18 and 8 hr, respectively. The surface tension was below 50 dyne/cm after two-stage fermentation for 16 hr. In the fifth part, the properties of composts made by in-oculating crab and shell wastes with *Pseudomonas aeruginosa* K-187, *Bacillus cereus* B1, *Streptomyces actuosus* A-151, and *Bacillus subtilis* B1 were studied. The effects of the composts on the growth of Chinese cabbage were observed. The results showed the compost prepared by inoculating with *Bacillus cereus* B1 gave the best result. The length and fresh weight of the whole plant were grown enormously, they are 148 % and 607 % in comparison with the control. In the sixth part, the production of antioxidant by fermentation of crab and shell wastes or Chinese herb residue with microbes were discussed. Several strains of microorganisms, including *Pseudomonas aeruginosa* K-187, *Bacillus cereus* w112, and *Streptomyces actuosus* A-151, were used for this experiment. The results showed that the re-paration by fermenting the *P. aeruginosa* K-187 with chinese herb residue showed the highest anti-oxidative activity; however, none of the preparation displayed higher anti-oxidative activity than that of BHA.

Keywords : Fungicide ; crab and shell powder ; Compost ; chitin ; *Gandoderma zucidum* residue ; Chinese herb residue ; Bio-surfactant ; Two-stage fermentation technique ; Antioxidant

Table of Contents

封面內頁 簽名頁 授權書 . iii	中文摘要 v	英文摘要 viii	誌謝 xi	目錄 xii	圖目錄 xx	表目錄 xv
第一章 緒言 1	第二章 文獻回顧 4	2.1 農業廢棄物之回收再利用 4	2.2 水產廢棄物之回收再利用 7	2.3 幾丁質之發現及分佈 9	2.4 幾丁質之構造 12	2.5 幾丁質之物理和化學性質 14
2.5.1 物理性質 14	2.5.2 化學性質 15	2.5.3 幾丁質之製備 15	2.6 幾丁質之應用 16	2.6.1 食品方面 16	2.6.2 廢水處理 17	2.6.3 生化方面 17
2.6.4 醫學方面 20	2.6.5 農業方面 20	2.6.6 其它方面 20	2.7 植物病原真菌 <i>Fusarium oxysporum</i> 21	2.7.1 病徵 22	2.7.2 病害發生與病害環境 22	2.8 真菌抑制劑的分類 23
2.8.1 化學合成真菌抑制劑 23	2.8.2 植物來源的真菌抑制劑 24	2.8.3 微生物來源的真菌抑制劑 26	2.9 真菌抑制劑的作用機制 28	2.9.1 抑制孢子發芽與芽管延長 29	2.9.2 藉由菌絲膨大的抑制作用 30	2.9.3 菌絲的溶解作用 31
2.9.4 營養物質的競爭作用 31	2.9.5 誘發植物的生理抗性 32	2.10 生物界面活性劑 44	2.11 植物生長促劑--生物技術於有機肥料的應用 53	2.11.1 有機肥料的配製 54	2.11.2 有機廢棄物直接施用之弊端 56	2.12 抗氧化劑 57
第三章 真菌抑制劑生產菌之篩選與鑑定 60	3.1 篩菌 60	3.2 菌株之純化 60	3.3 發酵液之製備 61	3.4 生物分析法 61	3.5 菌種鑑定 62	3.6 結果與討論 62
3.6.1 真菌抑制劑生產菌之分離與鑑定 62	3.6.2 初步試驗 63	3.6.3 分離株 W113、W118 之探討 63	第四章 <i>Bacillus subtilis</i> W113 及 <i>Bacillus subtilis</i> W118 真菌抑制劑生產條件之探討 65	4.1 實驗材料與方法 65	4.1.1 幾丁質 65	4.1.2 藥品 65
4.2 實驗方法 66	4.2.1 樣品製備 66	4.2.2 生物分析法 67	4.3 <i>Bacillus subtilis</i> W113 及 <i>Bacillus subtilis</i> W118 之真菌抑制劑生產條件探討 68	4.3.1 前言 68	4.3.2 幾丁質 68	4.3.3 培養液體積 69
4.3.4 培養時間 69	4.3.5 培養溫度 69	4.3.6 碳源				

69 4.3.7 基礎培養基酸鹼值 69 4.4結果與討論 70 4.4.1 幾丁質濃度的影響 70 4.4.2 培養液體積的影響 74 4.4.3 培養時間的影響 74 4.4.4 培養溫度的影響 75 4.4.5 碳源的影響 78 4.4.6 培養基酸鹼值的影響 82 4.5 Bacillus subtilis W113 及 Bacillus subtilis W118 真菌抑制劑之較適生產條件 84 第五章 Bacillus subtilis W113 及 Bacillus subtilis W118 所生產真菌抑制劑性質及生物活性探討 89 5.1 藥品 89 5.2 材料 90 5.3 真菌抑制劑性質之探討 90 5.3.1 真菌抑制劑於不同 pH 之穩定性探討 90 5.3.2 真菌抑制劑於 100 之熱穩定性探討 91 5.3.3 懸浮態幾丁質之製備 91 5.3.4 幾丁質? 活性測定之呈色劑 91 5.3.5 幾丁質? 活性之測定 92 5.4 真菌抑制劑生物活性測定 92 5.4.1 樣品製備 92 5.4.2 測試菌株孢子液的製備 92 5.4.3 Bacillus subtilis W113 及 Bacillus subtilis W118 真菌抑制劑之抑制實驗 93 5.4.4 Bacillus subtilis W113 及 Bacillus subtilis W118 真菌抑制劑之最小抑制濃度實驗 93 5.4.5 Bacillus subtilis W113 及 Bacillus subtilis W118 真菌抑制劑抑制作用之探討 94 5.4.6 Bacillus subtilis W113 及 Bacillus subtilis W118 真菌抑制劑儲藏溫度與時間之影響 95 5.5 結果與討論 96 5.5.1 真菌抑制劑於不同 pH 之穩定性探討 96 5.5.2 真菌抑制劑於 100 之熱穩定性探討 98 5.5.3 幾丁質分解? (chitinase) 活性之測定 100 5.5.4 Bacillus subtilis W113 及 Bacillus subtilis W118 真菌抑制劑之最小抑制濃度試驗 100 5.5.5 Bacillus subtilis W113 及 Bacillus subtilis W118 真菌抑制劑之作用機制 102 5.5.6 Bacillus subtilis W113 及 Bacillus subtilis W118 真菌抑制劑儲藏溫度與時間之影響 106 5.5.7 綜合討論 109 第六章 二階式培養技術應用於 Bacillus subtilis W113 及 Bacillus subtilis W118 生產脂胜? 型生物 界面活性劑 112 6.1 前言 112 6.2 材料與方法 114 6.2.1 標準品 114 6.2.2 菌種 114 6.2.3 培善基 115 6.2.4 種培養 115 6.2.5 初級培養 115 6.2.6 二階培養 115 6.2.7 菌體生長測定 117 6.2.8 表面張力值之測定 117 6.3 結果與討論 118 6.3.1 Bacillus subtilis W113 及 Bacillus subtilis W118 之生長曲線與培養液表面張力 118 6.3.2 枯草桿菌 Bacillus subtilis W113 及 Bacillus subtilis W118 之二階培養 123 第七章 蝦蟹殼廢棄物之堆肥製造與應用 130 7.1 前言 130 7.2 材料與方法 131 7.2.1 材料 131 7.2.2 藥品 131 7.2.3 菌株 131 7.3 方法 132 7.3.1 材料處理 132 7.3.2 發酵液之配製 132 7.3.3 碳氮比調整 132 7.3.4 堆積 133 7.3.5 發酵微生物 133 7.3.6 加水與翻堆 133 7.3.7 水分及肥料成分之分析 134 7.3.8 堆肥之應用-小白菜栽培實驗 136 7.4 結果與討論 137 7.4.1 不同微生物堆肥之成分與性質分析 137 7.4.2 堆肥之應用-小白菜栽培實驗 140 7.5 結論 147 第八章 以細菌發酵蝦蟹殼廢棄物及中藥殘渣生產抗氧化劑 148 8.1 前言 148 8.2 材料 148 8.3 藥品 149 8.4 菌種 149 8.5 樣品製備 150 8.6 分析藥品之配製 150 8.7 方法步驟 151 8.7.1 《方法一》 151 8.7.2 《方法二》 152 8.8 結果與討論 153 8.8.1 不同濃度下 BHA 的抗氧化性 153 8.8.2 不同濃度 BHA 無恆溫條件對抗氧化性之影響 153 8.8.3 不同濃度 BHA 經恆溫條件後對抗氧化性之影響 153 8.8.4 以細菌發酵中藥殘渣及蝦蟹殼廢棄物之抗氧化性 156 8.8.5 以細菌發酵中藥殘渣及蝦蟹殼廢棄物經恆溫處理後之抗氧化性 156 第九章 結論 159 參考文獻 162 附錄一 186

REFERENCES

1. 王三郎 (1996) 水產資源利用學, 高立圖書出版社.
2. 王三郎 (1998) 應用微生物學, 高立圖書出版社.
3. 方云、夏詠梅 (1992) 生物表面活性劑. 中國輕工業出版社, 北京 中國大陸. pp:4-5.
4. 王啟浩、王三郎 (1998) 林產資源有用成分回收再利用. 工業 減廢暨永續發展研討會, 379.
5. 呂明洲 (1994) Pseudomonas aeruginosa K-181 所產幾丁質分解酵素之探討. 大葉工學院食品工程研究所碩士論文.
6. 邱少華 (1995) 利用綠膿桿菌 K-187 發酵蝦蟹殼廢棄物生產幾丁質之應用及量產條件之研究. 大葉工學院食品工程研究所碩士論文.
7. 張文智 (1995) 蝦蟹殼加工之廢棄物回收與再利用. 大葉工學院 食品工程研究所碩士論文.
8. 李汪章 (1999) 生物資源生物技術, 1:9.
9. 許為群 (1991) 蝦殼的微生物轉化和菌種的篩選. 水產學報, (3):193~196.
10. 吳思敏、顏國欽 (1998) 桑葉甲醇萃取物抗養化機制之探討. 食品科學, 25(2):128-137.
11. 徐泰浩、曾耀銘 (1994a) 生物界面活性劑發酵產程與分離純化. 生物產業, 5(1、2):55-65.
12. 徐泰浩、曾耀銘 (1994b) 生物界面活性劑生產技術之開發與應用. 41(6):42~56.
13. 翁瑞光 (1996) 苜蓿芽、豌豆芽及油菜芽抗氧化性之研究. 宜蘭 農工學報, 14:34-38.
14. 翁瑞光 (1997) 蘿蔔嬰萃取物於模式系統之抗氧化性. 宜蘭農工學 報, 18:29-35.
15. 陳天、張皓冰、葉秀蓮 (1991) 殼聚糖常溫保鮮獼猴桃的研究. 食品科學, 10:34-41.
16. 陳勁初 (1995) 抗真菌之食品添加物. 食品工業, 28(9):24-30.
17. 張圓笙、周正俊 (1981) 荖藤對於 Aspergillus parasiticus, Aspergillus niger、Mucor mucedo 孢子發芽之影響. 中國農 業化學會誌, 19(1/2):99-107.
18. 黃文瑛 (1994) Geotrichum candidum 菌株生物乳化劑之回收與 特性之探討. 中國農業化學會誌, 32(4):439-448.
19. 葉志超 (1996) 利用綠膿桿菌發酵蝦蟹殼廢棄物生產真菌抑制劑之研究. 大葉工學院食品工程研究所碩士論文.
20. 楊政國、王三郎 (1998) 工業減廢暨永續發展研討會論文集. 353-366
21. 孫守恭 (1995) 鐮胞菌之變異行為與其在經濟作物抗病育種之運用. 行政院國家科學委員會.
22. 高銘木、謝得上 (1998) 真菌代謝物純化鑑定其毒害甘蔗之機轉. 台灣糖業公司糖業研究所.
23. 楊秋忠 (1991) 土壤有機質的地力維持. 土壤管理手冊, 60~170.
24. 蔡永纂 (1994) 有機質添加物在防治作物線蟲病害之永續作為. 農 藥世界, 126(2):56~65.
25. 蔡永皞 (1996) 農水產廢棄物堆肥化之開發及應用() 瓜類育苗 介質之研製及其理化性質. 高雄場研究彙報, 8(1):43~54.
26. 蔡永皞 (1997) 農水產廢棄物堆肥化之開發及應用() 送風式堆 肥槽之建立及快速堆肥製造. 高雄場研究彙報, 9(1):44~59.
27. 蔡永皞 (1993) 施用雞糞堆肥對轉作田間土壤及作物氮素動態之影響. 高雄區農業改良場研究彙報, 5(1):49~61.
28. 蔡宜峰、莊作權、黃裕銘 (1993) 一般有機質在土壤礦化潛能及 礦化速率之估算. 永續農業研討會專集, 69~77.
29. 錢明賚 (1998) 蔬果中之抗氧化物質. 食品工業, 30(8):24-34.
30. 謝順堂 (1994) Pseudomonas aeruginosa M-1001 所產溶菌酵素抑制劑之研究. 大葉工學院食品工程研究所碩士論文.
31. 張榮倫 (1995) 二階式培養結合休止細胞固定化技術應用於 Bacillus subtilis 生物界面活性劑之生成. 大葉工學院食品工 程研究所碩士論文.