

PSEUDOMONAS FLUORESCENS B-52 所生產微生物抑制物質之研究

郭鴻達、王三郎、洪淑嫻

E-mail: 9015766@mail.dyu.edu.tw

摘要

本研究主要係以蝦蟹殼及咖啡渣廢棄物為主要碳源，經由微生物發酵後生產真菌抑制劑，並探討其真菌抑制劑性質及生物活性探討。第一部分係從蛋白質?水解幾丁質之水解液篩選出具有抑制真菌能力之菌株B-52，此菌經新竹菌種中心鑑定結果為PSEUDOMONAS FLUORESCENCE B-52(以下簡稱B-52)。第二部分係利用廢棄之蝦蟹殼及咖啡渣作為真菌抑制生產菌B-52之主要碳源，探討其較適培養條件，結果顯示以蝦蟹殼粉為碳源之真菌抑制劑以K₂HPO₄ 0.1%、MgSO₄ 7H₂O 0.05%、SCSP 0.5%、175/250ML三角錐瓶、72小時、35、PH4為較適培養條件，其抑制活性可達97%。而以咖啡渣為碳源之真菌抑制劑以K₂HPO₄ 0.1%、MgSO₄ 7H₂O 0.05%、COFFEE GROUNDS 0.5%、50/250ML三角錐瓶、72小時、25、PH3為較適培養條件，其抑制活性可達98%。第三部分係探討B-52所生產真菌抑制劑之性質及生物活性。SCSP之真菌抑制劑在PH4~11之條件下可保有其活性都在(55%~45%)，而加熱60分鐘後，在PH7、PH9之真菌抑制劑仍可維持活性為52%、56%，最小抑制濃度為6%，作用機制經顯微鏡觀察後發現，其測試菌株FUSARIUM OXYSPORUM之菌絲末端出現溶解作用的現象，與其控制組之FUSARIUM OXYSPORUM菌絲有極大差異，在儲藏50天後，其抑制活性仍維持在60%左右，在PH5~PH6之酸鹼值培養基仍保有86%之抑制率；而COFFEE GROUNDS之真菌抑制劑在PH5之條件下可保有其活性在40%，經加熱60分鐘後，仍可有很高之抑制活性(68%)，其最小抑制濃度為10%，作用機制經顯微鏡觀察後發現，其測試菌株FUSARIUM OXYSPORUM之菌絲末端出現溶解作用的現象，與其控制組之FUSARIUM OXYSPORUM菌絲有極大差異，在儲藏50天後，其抑制活性仍維持在60%左右，在PH8之酸鹼值培養基仍保有88%之抑制作用。第四部分利用BW菌之較適生產條件生產真菌抑制劑，經硫酸銨沉澱、透析後，進行DEAE-SEPHACEL離子交換層析並做抑菌測試，再經SEPHACRYL S-200膠體層析換算出其大約分子量為1.2 KDA左右。第五部分主要探討以蝦蟹殼粉、咖啡渣為碳源所發酵生產出之發酵液，對其白菜種子之生長影響，結果顯示濃度5%、10%之咖啡渣發酵液其對白菜的重量有明顯的增加，在濃度為5%時，其對白菜之長度亦有明顯的增長。

關鍵詞：PSEUDOMONAS FLUORESCENCE、蝦蟹殼粉、咖啡渣、真菌抑制劑、抑制活性、FUSARIUM OXYSPORUM、蛋白質

目錄

第一章 緒言--P1	第二章 文獻回顧 2.1前言--P3	2.1.1農、林產廢棄物之回收再利用--P4	2.1.2水產廢棄物之回收再利用--P6	2.2作物病蟲害--P7	2.3生物防治--P11	2.3.1 生物防治機制--P11	2.3.2 螢光細菌在植物病害之應用--P15	第三章 真菌抑制劑生產菌之篩選與鑑定 3.1前言--P20	3.2材料與藥品--P20	3.3篩菌--P21	3.3.1菌株之純化--P21	3.3.2發酵液之製備--P21	3.3.3抑菌分析--P22	3.4 菌種之菌學鑑定--P22	3.4.1 初步試驗 P22	3.4.2 API鑑定系統--P23	3.4.3 VITEK鑑定系統--P23	3.5結果與討論--P23	3.5.1真菌抑制劑生產菌抑菌測試--P24	3.5.2 真菌抑制劑生產菌之分離與鑑定--P25	3.5.3 菌株之試驗--P25	第四章B-52菌發酵蝦蟹殼粉、咖啡渣生產真菌抑制劑之較適培養條件探討 4.1前言 P26	4.2實驗材料與方法--P26	4.2.1微生物材料--P26	4.2.2藥品--P26	4.3 實驗方法--P27	4.3.1 樣品製備--P27	4.3.2 抑菌分析--P27	4.4 B-52菌生產真菌抑制劑較適生長條件之探--P27	4.4.1 前言--P27	4.4.2 培養液充填體積--P28	4.4.3 培養時間 --P28	4.4.4 培養基酸鹼值--P28	4.4.5 培養溫度--P28	4.4.6 主要碳源蝦蟹殼粉、咖啡渣之含量--P28	4.5 結果與討論--P29	4.5.1 培養液充填體積--P29	4.5.2 培養時間--P31	4.5.3 培養基酸鹼值--P33	4.5.4 培養溫度--P35	4.5.5 主要碳源蝦蟹殼粉、咖啡渣之含量影響--P36	4.5.5 綜合比較--P37	第五章B-52菌發酵蝦蟹殼粉、咖啡渣所生產真菌抑制劑性質及生物活性探討 5.1前言--P39	5.2實驗材料與方法--P39	5.2.1材料--P39	5.2.2 藥品--P39	5.2.3 粗真菌抑制劑之製備--P40	5.3 真菌抑制劑生物活性之探討--P40	5.3.1 B-52真菌抑制劑之最小抑制濃度探討--P40	5.3.2 B-52真菌抑制劑抑制作用之探討--P41	5.3.3儲藏時間對真菌抑制劑抑制活性之影響--P42	5.4 真菌抑制劑性質之探討--P42	5.4.1 真菌抑制劑於不同酸鹼值培養基的抑制活性之探討--P42	5.4.2 真菌抑制劑於100 之熱穩定性探討--P43	5.4.3 真菌抑制劑於不同酸鹼值緩衝液之穩定性探討--P43	5.5生物抑制劑實驗於其他菌種的抑制測試--P44	5.5.1對黴菌的抑制測試--P44	5.5.2對細菌的抑制測試--P45	5.6結果與討論--P45	5.6.1 B-52真菌抑制劑之最小抑制濃度實驗--P45	5.6.2 B-52真菌抑制劑抑制作用之探討--P48	5.6.3 B-52真菌抑制劑儲藏時間對抑制活性之影響--P53	5.6.4 真菌抑制劑於不同酸鹼值培養基得抑制活性之探討--P55	5.6.5 真菌抑制劑於100 之熱穩定性探討--P57	5.6.6真菌抑制劑於不同酸鹼值緩衝液之穩定性探討--P60	5.6.7對黴菌的抑制測試--P62	5.6.8對細菌的抑菌測試--P62	5.6.9綜合比較--P63	第六章B-52真菌抑制劑之純化與分離探討 6.1前言 --P65	6.2實驗材料與方法--P65	6.2.1化學材料--P65	6.2.2微生物材料--P66	6.3 真菌抑制劑之純化分離--P66	6.3.1 大量培養及離心--P66	6.3.2 硫酸銨沉澱--P67	6.3.3 Diethylaminoethyl(DEAE)Sephacel離子交換樹脂層析法--P67	6.3.4抑菌實驗--P67	6.3.5分子量標定
------------	--------------------	------------------------	----------------------	--------------	--------------	-------------------	-------------------------	-------------------------------	---------------	------------	-----------------	------------------	----------------	------------------	----------------	--------------------	----------------------	---------------	------------------------	---------------------------	------------------	--	-----------------	-----------------	--------------	---------------	-----------------	-----------------	-------------------------------	---------------	--------------------	------------------	-------------------	-----------------	----------------------------	----------------	--------------------	-----------------	-------------------	-----------------	------------------------------	-----------------	--	-----------------	--------------	---------------	----------------------	-----------------------	-------------------------------	-----------------------------	-----------------------------	---------------------	-----------------------------------	------------------------------	---------------------------------	---------------------------	--------------------	--------------------	---------------	-------------------------------	-----------------------------	----------------------------------	-----------------------------------	------------------------------	--------------------------------	--------------------	--------------------	----------------	----------------------------------	-----------------	----------------	-----------------	---------------------	--------------------	------------------	---	----------------	------------

與膠體(Sephacryl S-200)過濾層析法--P68 6.3.6等電點之測定--P69 6.4純化後酵素活性之測定 --P69 6.4.1懸浮態幾丁質(colloidal Chitin)之製備--P69 6.4.2 幾丁質酶(chitinase)活性測定之呈色劑--P70 6.4.3 幾丁質酶(chitinase)活性之測定--P70 6.4.4溶菌酶(lysozyme)活性測定之基質--P70 6.4.5溶菌酶(lysozyme)活性之測定 --P71 6.5胺基酸分析--P71 6.6結果與討論--P71 6.6.1 Diethylaminoethyl(DEAE)Sephacryl S-200)過濾層析法--P71 6.6.2抑菌實驗--P73 6.6.3分子量標定與膠體(Sephacryl S-200)過濾層析法--P73 6.6.4等電點--P76 6.6.5幾丁質酶(chitinase)活性之測定--P78 6.6.6溶菌酶(lysozyme)活性之測定--P78 6.6.7 胺基酸分析--P78 第七章 蝦蟹殼粉及咖啡渣發酵液之促進植物生長探討 7.1前言 --P80 7.2實驗材料--P81 7.3實驗方法--P81 7.3.1醱酵液之製備--P81 7.3.2 醱酵液之配製 --P81 7.4蔬菜之栽培--P81 7.5 結果與討論--P82

參考文獻

- 1.王三郎、李旭弘(1994) 中華生質能源會誌, 13:229.
- 2.王三郎(1996) 水產資源利用學, 高立圖書出版社.
- 3.王三郎(1997) 應用微生物學, 高立圖書出版社.
- 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.王啟浩(1999) 利用細菌醱酵農水產廢棄物生產生物製劑之研究, 私立大葉大學食品工程研究所碩士論文.
- 6.王三郎(1999) 海洋未利用生物資源之回收再利用, 生物資源 生物技術, 1(1):1-8.
- 7.王三郎(2000) 生物技術, 高立圖書出版社.
- 8.邱少華(1997) 利用綠膿桿菌K-187醱酵蝦蟹殼廢棄物生產幾丁質酶之應用及量產條件之研究, 私立大葉大學食品工程研究所碩士論文.
- 9.阮進惠、林翰良、羅淑珍(1997)幾丁聚醣水解物之連續式生產及其抑菌作用, 中國農業化會誌35(6):596-611
- 10.林景和(1986) 利用廢棄菇類栽培介質製作堆肥之研究, 文翔圖書公司.
- 11.林天枝(1993) 香菇栽培之太空包廢渣在番茄生產利用之研究, 台中區農業改良場研究彙報, 40: 37-44
- 12.林景和(1993) 利用廢棄菇類栽培介質製作堆肥之研究, 台中區農業改良場研究彙報, 39: 17-27.
- 13.林志森(1995) 環境工程會刊, 2(4):29
- 14.李汪章(1999) 生物資源生物技術, 1:9.
- 15.施英隆(1999) 生物資源、生物技術1(1):23
- 16.徐華盛(1999) 有機農場使用資材特性, 農業世界雜誌194:70--74.
- 17.陳啟禎(1993) 食用菇類發展的近況與展望, 食品工業期刊25(4):23-27.
- 18.陳昱初(1996) 談作物病蟲害之生物防治, 高雄區農業專訊, 15.
- 19.陳能敏(1996) 永續農業過去、現在、未來, 農資中心資訊科學叢書.
- 20.張明暉、向為民、簡宣裕、黃維廷(1997) 廢棄菇類木屑堆肥應用於洋香瓜育苗介質之評估, 中華 農業研究, 46(1):60-69.
- 21.陳俊位(1999) 生物農藥枯草桿菌在植物病害防治上之應用台中區農業專訊, 26:19-21.
- 22.葉美雲(1991) 玉米穗軸堆肥三種作物生長之影響, 國立台灣大學農業化學研究所碩士論文
- 23.葉志超(1996) 利用綠膿桿菌醱酵蝦蟹殼廢棄物生產真菌抑制劑之研究, 私立大葉大學食品工程研究所碩士論文.
- 24.彭金騰(1996) 杏 菇稻草栽培之研究, 中華農業研究45(4):382-387.
- 25.彭金騰(1996) 杏 菇木屑塑膠包栽培之初步研究, 中華農業研究45(4):388-392.
- 26.彭武財(1997) 廢棄木料及其纖維質類之污染堆肥化處理之介紹, 台灣農業33(4):209-229
- 27.黃秀華(1999) 生物技術在植物病害生物防治之應用, 台中區農業專訊, 26:22-25.
- 28.彭武財(2000) 木材及其纖維質廢料之有效再利用與再生, 生物資源 生物技術2(1):1-3
- 29.彭武財(2000) 木材 / 塑膠復合材料之研發其重要性, 生物資源 生物技術2(1):4-7
- 30.楊秋忠(1991) 土壤有機質的力維持, 土壤管理手冊, 60-170.
- 31.楊光盛, 水耕栽培簡介, 1~17
- 32.楊政國、王三郎(1998) 工業減廢暨永續發展研討會論文集, 353-366.
- 33.楊政國(1999) 利用枯草菌進行蝦蟹殼去蛋白之研究, 私立大葉大學食品工程研究所碩士論文.
- 34.蔡永(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.
- 35.蔡宜峰、陳清文(1994) 牛糞堆肥化處理及應用醱液之研究, 台灣農業30(4):54-62.
- 36.蔡宜峰、陳清文、蔡精強(1995) 香菇太空包廢料堆肥之研究甲、台灣農業31(1):133-141.
- 37.蔡宜峰、陳清文、蔡精強(1995) 香菇太空包廢料堆肥對梨樹生產及土壤性質之影響, 台灣農業, 31(1):142-148.
- 38.簡宣裕、莊作權(1997) 中華農業研究46(1):70-81
- 39.羅朝村(1997) 作物病害生物防治的應用與展望, 農業專論35(1):12-22
- 40.嚴式清(1989) 畜牧廢棄物在有機農業之利用, 臺中區農業改良場特刊42:229-2.
- 41.ANDREAS NATSCH, CHRISTOPH KEEL, NICOLE HEBECKER, EVE LAASIK, GENEVIEVE DEFAGO (1998) IM -PACT OF PSEUDOMONAS FLUORESCENS STRAIN CHA0 AND A DERIVATIVE WITH IMPROVED BIOCONTROL ACTIVITY ON THE CULTURABLE RESIDENT BACTERIAL COMMUNITY ON CUCUMBER, FEMS MICROBIOLOGY ECOLOGY, 27:365-380.
- 42.API 20NE INSTRUCTION MANUALS (1994). BIOM' ERIEUX VITEK INC., U.S.A.
- 43.Y. DURSUN, A. CALIK, Z. AKSU (1999) DEGRADATION OF FERROUS()CYANIDE COMPLEX IONS BY PSEUDOMONAS FLUORESCENS, PROCESS BIOCHEMISTRY, 34:901-908.
- 44.DERGHAM, Y., LELLY, J., AND ERNST, A.A. (1991) WASTE PAPE AS A SUBSTITUTE FOR PEAT IN THE MUSHROOM (AGARICUS BISPORUS) CASING SOIL PRODUCTION. MUSHROOM SCIENCE 13(1):263-267.
- 45.EMANUELE SMACCHI AND MARCO GOBBETTI (1998) PEPTIDES FROM SEVERAL ITALIAN CHEESES INHIBI -TORY TO PROTEOLYTIC ENZYME OF LACTIC ACID BACTERIA, PSEUDOMONAS FLUORESCENS ATCC 948 AND TO THE ANTIOTENSIN I-CONVERTING ENZYME, ENZYME MICROB. TECHNOL, 22:687-694-
- 46.E. P. SCHOKKER AND M. A. J. S. VAN BOEKEL (1997) PRODUCTION, PURIFICATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF THE EXTRACELLULAR PROTEINASE FROM PSEUDOMONAS FLUORESCENS 22F, ELSE -VIER SCIENCE, 7:265-271.
- 47.E. P. SCHOKER, A. C. M. VAN WAGENBERG, AND M. A. J. S. VAN BOEKEL (1998) A NOTE ON THE USE OF UREA IN STUDYING THE MECHANISM OF THERMAL INACTIVATION OF EXTRACELLULAR PROTEINA -SE FROM PSEUDOMONAS FLUORESCENS 22F, ENZYME MICROB. TECHNOL, 22:695-698
- 48.FANG, S.W. , LI, C.F., AND SHIN, D.Y.C. (1994) ANTIFUNGAL ACTIVITY OF CHITOSAN AND ITS PRESERVATIVE EFFECT ON LOW-SUGAR CANDIED KUMQUAT. J. FOOD PROT., 56:136-140.
- 49.FRAN M. SCHER. AND RALPH BAKER. (1982) EFFECT OF PSEUDOMONAS PUTIDA AND A SYNTHETIC IRO -N CHELATOR ON INDUUCION OF SOIL SUPPRESSIVENESS TO FUSARIUM WILT PAT-HOGENS. PHYTOPAT -HOLOGY. 72(12):1567-1573.
- 50.JONES, D. AND M.D. COLLINS (ED).(1993)SECTION 4:GRAM-NEGATIVE AEROBIC RODS AND COCCI'BE -RGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY',VOL. 1, PP. 140-402.THE WILLIAMS & WILHINS

CO., BALTIMORE. 51. LEEPER, S.A., WARD, T.E., AND ANDREWS, G.F. (1991) REPORT NO. EGG-2645; U.S. DEPARTMENT OF ENERGY; WASHINGTON D.C. 52. LIM, S. H., KIM, Y. S., AND KIM, S. D. (1991) PSEUDOMONAS STUTZERI YPL-1 GENETIC TRANSFORMATION AND ANTIFUNGAL MECHANISM AGAINST FUSARIUM SOLANI, AN AGENT OF PLANT ROOT ROT. APPL. ENVIR. MICROBIO. 57(2):510-516. 53. MATHUR, S.P., J.Y. DAILGLE, M. LEVESQUE, AND H. DINEL. (1986) THE FEASIBILITY OF PREPARING HIGH QUALITY COMPOSTS FROM FISH SCRAP AND PEAT WITH SEAWEEDS OR CRAB SCRAP. BIOLOGICAL AGRICULTURE AND HORTICULTURE 4:27-38. 54. MATHER, M. J. (1991) SPENT MUSHROOM COMPOST (SMC) AS A NUTRIENT SOURCE IN PEAT BASED POTTING SUBSTRATES. 13(2):645-650. 55. MCLOUGHLIN, T. J., QUINN, A. B., AND BOOKLAND, R. (1992) PSEUDOMONAS CEPACIA SUPPRESSION OF SUNFLOWER WILT FUNGUS AND ROLE OF ANTIFUNGAL COMPOUNDS IN CONTROLLING THE DISEASE. APPL. ENVIR. MICROBIO. 1760-1763. 56. MCGAN A. DICHL, JOHN S. CHAPMAN (1999) ASSOCIATION OF THE BIOCIDES 5-CHLORO-2-METHYL-ISOTHIAZOL-3-ONE WITH PSEUDOMONAS AERUGINOSA AND PSEUDOMONAS FLUORESCENS, INTERNATIONAL BIODETERIORATION & BIODEGRADATION, 44:191-199. 57. M. GOBBETTI, A. CORSETTI, E. SMACCHI, J. ROSSI (1997) PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A PROTEINACEOUS COMPOUND FROM PSEUDOMONAS FLUORESCENS ATCC 948 WITH INHIBITORY ACTIVITY AGAINST SOME GRAM-POSITIVE AND GRAM-NEGATIVE BACTERIA OF DAIRY INTEREST, LAIT 77:267-278. 58. MICHAEL CALLANAN, RAYMUND SEXTON, DAVID N. DOWLING, O'GARA (1996) REGULATION OF THE IRON UPTAKE GENES IN PSEUDOMONAS FLUORESCENS M114 BY PSEUDOBACTIN M114: THE PBRA SIGMA FACTOR GENE DOES NOT MEDIATE THE SIDEROPHORE REGULATORY RESPONSE, FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, 144:61-66. 59. M.I. VAN DYKE, J.I. PROSSER (1998) EFFECT OF CELL DENSITY AND ATTACHMENT ON RESUSCITATION IN SOIL OF STARVED PSEUDOMONAS FLUORESCENS MON 787, FEMS MICROBIOLOGY ECOLOGY, 26: 63-70. 60. NORMAN LAYH, JULIAN PARRATT, ANDREW WILLETTS (1998) CHARACTERIZATION AND PARTIAL PURIFICATION OF AN ENANTIOSELECTIVE ARYLACETONITRILASE FROM PSEUDOMONAS FLUORESCENS DSM 7155, JOURNAL OF MOLECULAR CATALYSIS, 5:467-474. 61. P. BAGNASCO, L. DE LA FUENTE, G. GUALTIERI, F. NOYA AND A. ARIAS (1998) FLUORESCENT PSEUDOMONAS SPP. AS BIOCONTROL AGENTS AGAINST FORAGE LEGUME ROOT PATHOGENIC FUNGI, SOIL-BIOL. BIOCHEM., 30(10):1317-1322. 62. PHILIPPE, L., PETER, A. H. M., WILLEM J. D. K., CLAUDE, A. AND BOB, S. (1993) ANTAGONISTIC EFFECT OF NONPATHOGENIC FUSARIUM OXYSPORUM FO47 AND PSEUDOBACTIN 358 UPON PATHOGENIC FUSARIUM OXYSPORUM F. SP. DIANTHI. APPL. ENVIR. MICROBIOL. 74-82. 63. SIMON G. EDWARDS, J. PETER W. YOUNG, ALASTAIR H. FITTER (1998) INTERACTIONS BETWEEN PSEUDOMONAS FLUORESCENS BIOCONTROL AGENTS AND GLOMUS MOSSEAE, AN ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGUS, WITHIN THE RHIZOSPHERE, FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, 166:297-303. 64. SUDARSHAN, N.R., HOOVER, D.G., AND KNORR, D. (1992) ANTIBACTERIAL ACTION OF CHITOSAN. FOOD BIOTECH., 6(3):257-272. 65. VASILKOV, P. B. (1965) ABRISSE DER GEOGRAPHISCHEN VERBREITUNG DER HUTPILZE IN DER SOWJETUNION. 66. VASU D. APPANNA, LAJOS G. GAZSO, MICHAEL ST. PIERRE (1996) MULTIPLE-METAL TOLERANCE IN PSEUDOMONAS FLUORESCENS AND ITS BIOTECHNOLOGICAL SIGNIFICANCE, JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, 52:75-80. 67. VITEK PROCEDURES MANUAL. (1995) BIOMERIEUX VITEK INC., U.S.A. 68. WANG, S. L., CHANG, W. T., AND LU, M. C. (1995) PROC. NATL. SCI. COUNCIL ROC(B), 19:105. 69. WANG, S. L., CHIO, S. H., AND CHANG, W. T. (1997) PROC. NATL. SCI. COUNCIL ROC(B), 21:71. 70. WANG, S. L., CHANG, W. T., (1997) APPL. ENVIR. MICROBIOL. 63-380. 71. WANG, S. L., CHIO, S. H., (1998) ENZYME. MICROB. TECHNOL., 22:629. 72. WANG, S. L., CHIO, S. H., (1998) ENZYME. MICROB. TECHNOL., 22:634. 73. WANG, S. L., YIEH, T. C. AND SHIH, I. L. (1999) ENZYME. MICROB. TECHNOL., 23:ACCEPTED. 74. Y. MOENNE-LOCCHOZ, J. POWELL, P. HIGGINS, J. MCCARTHY, F. O'GARA (1998) AN INVESTIGATION OF THE IMPACT OF BIOCONTROL PSEUDOMONAS FLUORESCENS F113 ON THE GROWTH OF SUGARBEET AND THE PERFORMANCE OF SUBSEQUENT CLOVER-RHIZOBIUM SYMBIOSIS, APPLIED SOIL ECOLOGY, 7:225-237. 75. ZADRAZIL, F. (1978) CULTIVATION OF PLEUROTUS. PP. 521-557.