

# The Studies on the Antimicrobial Compounds of *Pseudomonas fluorescens* K-188

曾國權、王三郎

E-mail: 9125214@mail.dyu.edu.tw

## ABSTRACT

An antifungal compound-producing bacterium was isolated and identified as a strain of *Pseudomonas fluorescens* K-188. *P. fluorescens* K-188 which can coculture with *Metarhizium anisopliae* grown aerobically in a shrimp and crab shell powder medium produced antifungal compounds that in tests effectively inhibited several fungal phytopathogens including *Fusarium solani*, *Trichoderma harzianum*, and *Pythium ultimum*. Maximum inhibitory activity was obtained when *P. fluorescens* K-188 was grown aerobically in a medium consisting 1 % shrimp and crab shell powder, 0.1 %  $K_2HPO_4$  and 0.05 %  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  at a pH of 7. The crude fungicide obtained from ethanol precipitation of the culture supernatant of *P. fluorescens* K-188 retained more than 70 % of its inhibitory activities to *F. oxysporum* even after being treated at 100 °C for 10 min. At the time assayed the inhibitory activity come from two ways; One is bacterium self another is its metabolites. So we can use chitosan wrap up the bacterium and make it become the small pellets. It can easy to use and the pellets can be preserved for more than 1 month at low temperature(4 °C). It can be used for more than ten times. The metabolites can be precipitated by ethanol and found protease activity from it. This activity is stable at pH 6~9 but unstable with heat. Maximum protease activity is at pH 7~9.

Keywords : antifungal ; shrimp and crab shell powder ; protease

## Table of Contents

封面內頁 簽名頁 授權書 iii	中文摘要 iv	英文摘要 v	誌謝 vi	目錄 vii	圖目錄 xiii	表目錄 xv																				
第一章 緒言 1	第二章 文獻回顧 3	2.1前言 3	2.2水產廢棄物之回收再利用 5	2.3化學性與生物性農藥 8	2.4植物病原真菌 <i>Fusarium oxysporum</i> 9	2.4.1病徵 10	2.4.2病害發生與病害環境 11	2.5 真菌抑制劑的作用機制 12	2.5.1抑制孢子發芽與芽管延長 12	2.5.2藉由菌絲膨大的抑制作用 14	2.5.3菌絲的溶解作用 15	2.5.4營養物質的競爭作用 16	2.5.5誘發植物的生理抗性 16	2.6生物防治在植物病害之應用 17	2.6.1生物防治之微生物應用 19											
第三章 真菌抑制劑生產菌之選定 30	3.1前言 30	3.2材料與藥品 31	3.3實驗方式 31	3.4結果與討論 31	3.4.1對置培養 32	3.4.2混合培養 32	3.4.3產孢量比較 33	3.5結論 35																		
第四章 <i>Pseudomonas fluorescens</i> K-188 真菌抑制劑生產條件之探討 36	4.1前言 36	4.2實驗材料與方法 36	4.2.1材料 36	4.2.2藥品 36	4.3實驗方法 36	4.3.1樣品製備 37	4.3.2生物分析法 37	4.4 <i>Pseudomonas fluorescens</i> K-188 之真菌抑制劑生產條件探討 38	4.4.1前言 38	4.4.2碳源 38	4.4.3培養時間 39	4.4.4培養液體積 39	4.4.5培養溫度 39	4.4.6基礎培養基酸鹼值 39	4.5結果與討論 39	4.5.1不同碳源種類與不同碳源濃度 39	4.5.2不同培養液體積 40	4.5.3蝦蟹殼粉添加量 41	4.5.4不同濃度及不同處理方式的SCSP及上清液 42	4.5.5培養溫度及時間 43	4.5.6培養基酸鹼值 44	4.6結論 46				
第五章 <i>Pseudomonas fluorescens</i> K-188所生產真菌抑制劑性質、基質特異性及生物活性之探討 50	5.1前言 50	5.2藥品 50	5.3材料 51	5.4真菌抑制劑性質之探討 51	5.4.1菌株生長對抑制活性之探討 51	5.4.2真菌抑制劑於不同pH之穩定性探討 51	5.4.3真菌抑制劑於100 °C之熱穩定性探討 52	5.5真菌抑制劑針對不同基質之活性測定 52	5.5.1懸浮態幾丁質之製備 52	5.5.2幾丁質?活性測定之呈色劑 53	5.5.3幾丁質?活性之測定 53	5.5.4乙二醇幾丁質活性測定 53	5.5.5幾丁聚醣活性測定 54	5.5.6蛋白質?活性之測定 54	5.6 真菌抑制劑生物活性測定 55	5.6.1樣品製備 55	5.6.2測試菌株孢子液的製備 55	5.6.3 <i>Pseudomonas fluorescens</i> K-188 真菌抑制劑之抑制實驗 56	5.6.4 <i>Pseudomonas fluorescens</i> K-188 真菌抑制劑抑制作用之探討 56	5.7結果與討論 57	5.7.1菌株生長對抑制活性之探討 57	5.7.2真菌抑制劑於不同pH之穩定性探討 58	5.7.3真菌抑制劑於100 °C之熱穩定性探討 59	5.7.4酵素活性之測定 60	5.7.5 <i>Pseudomonas fluorescens</i> K-188 真菌抑制劑之作用機制 60	5.8結論 63
第六章 <i>Pseudomonas fluorescens</i> K-188真菌抑制劑之濃縮與性質探討 64	6.1前言 64	6.2實驗材料與方法 64	6.2.1化學材料 64	6.2.2微生物材料 64	6.3真菌抑制劑之濃縮 65	6.3.1大量培養及離心 65	6.3.2硫酸銨沉澱 65	6.3.3酒精沉澱 65	6.3.4抑菌實驗 66	6.4濃縮後酵素活性之測定 66	6.5濃縮後酵素活性對熱及酸鹼值之穩定性及其最適作用酸鹼值 67	6.6結果與討論 67	6.6.1濃縮方式 67	6.6.2濃縮後酵素活性對熱之穩定性 68	6.6.3濃縮後酵素活性對酸鹼值之穩定性 68	6.6.4濃縮後酵素最適作用酸鹼值 68	6.7結論 72									
第七章 幾丁聚醣擔體進行 <i>Pseudomonas fluorescens</i> K-188固定化之探討 73	7.1前言 73	7.2藥品 73	7.3材料 73	7.4固定化菌體之探討 74	7.4.1固定擔體成分比較 74	7.4.2保存方式比較 74	7.4.3批次重複發酵實驗 74	7.5結果與討論 74	7.5.1固定擔體成分比較 74	7.5.2保存方式比較 75	7.5.3批次重複發酵實驗 76															
第八章 結論 78	參考文獻 80	圖目 錄 圖3.1不同菌株與黑殭菌對置培養 32	圖3.2不同菌株與黑殭菌混合培養 33	圖3.3混合培養與黑殭菌單獨培養產孢量比較圖 34	圖4.1不同碳源及不同濃度下對 <i>Pseudomonas fluorescens</i> K-188生產真菌抑制劑之影響 40	圖4.2培養液體積對 <i>Pseudomonas fluorescens</i> K-188 生產真菌抑制劑之影響 41	圖4.3蝦蟹殼粉添加量對於 <i>Pseudomonas fluorescens</i> K-188生產真菌抑制劑之影響 42	圖4.4分別以不同濃度及不同處理方式的SCSP及上清液 作為碳源比較對於 <i>Pseudomonas fluorescens</i> K-188生產真菌抑制劑之影響 43	圖4.5培養溫度及																	

培養時間對*Pseudomonas fluorescens* K-188生產真菌抑制劑之影響 44 圖4.6培養基酸鹼值對*Pseudomonas fluorescens* K-188生產真菌抑制劑之影響 45 圖4.7培養前後培養基的酸鹼度 46 圖5.1 *Pseudomonas fluorescens* K-188生長情況 57 圖5.2 *Pseudomonas fluorescens* K-188生產真菌抑制劑之變化 58 圖5.3 *Pseudomonas fluorescens* K-188真菌抑制劑於不同pH之穩定性探討(25 ) 59 圖5.4 *Pseudomonas fluorescens* K-188真菌抑制劑於 100 之熱穩定性探討(pH 7) 60 圖5.5 *Pseudomonas fluorescens* K-188所生產之粗真菌抑制劑對*F. oxysporum*.在型態上的影響 62 圖6.1蛋白質?活性之100 熱穩定性(pH7) 69 圖6.2蛋白質?活性對酸鹼值之穩定性(37 ) 70 圖6.3酵素最適作用酸鹼值(37 ) 71 圖7.1擔體成分與菌圈生長之比較 75 圖7.2保存方式對抑菌活性的影響 76 圖7.3可使用次數 77 表目錄 表2.1水產廢棄物所含高附加價值物之回收 6 表2.2拮抗微生物之種類與其防治機制 20 表2.3 *Pseudomonas fluorescens*之相關文獻 25 表2.4 植物真菌性病害之特徵 27 表4.1不同微生物所產真菌抑制劑培養條件之比較 47 表6.1 *Pseudomonas fluorescens* K-188真菌抑制劑濃縮概要 67

## REFERENCES

1. 王一雄(1997) 土壤環境污染與農藥, 明文書局。
2. 王三郎 (1996) 水產資源利用學, 高立圖書出版社。
3. 王三郎 (2000) 生物技術, 高立圖書出版社。
4. 王三郎 (2002) 應用微生物學, 高立圖書出版社。
5. 王啟浩 (1999) 利用細菌發酵農水產廢棄物生產生物製劑之研究, 大葉大學食品工程研究所碩士論文。
6. 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。
7. 方繼、楊媛綸 (1995) 由*Streptococcus lactis* 所分泌類細菌素之初步純化及其抑菌機制探討, 中國農業化學會誌, 33(6):782-792。
8. 林志森(1995) 環境工程會刊, 2(4):29。
9. 邱少華(1997)利用綠膿桿菌K-187發酵蝦蟹殼廢物生產幾丁質?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。
10. 施英隆(1999) 生物資源、生物技術1(1):23。
11. 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。
12. 梁慈雯(2000)*Bacillus subtilis* V656所生產微生物抑制物質之研究, 大葉工學院食品工程研究所碩士論文。
13. 陳俊位 (2000) 生物農藥枯草桿菌在植物病害防治上之應用, 台中區農業改良場。
14. 陳昱初(1996) 談作物病蟲害之生物防治, 高雄區農業專訊。
15. 陳能敏 (1996) 永續農業過去、現在、未來, 農資中心資訊科學叢書(3):88-100,144-147。
16. 陳能敏(1996) 永續農業過去、現在、未來, 農資中心資訊科學叢書。
17. 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。
18. 黃秀華 (2000) 生物技術在植物病害生物防治之應用, 台中區農業改良場。
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. Christakopoulos P.; B. Tzalas; D. Mamma; H. Stamatis; G. N. Liadakis ; C. Tzia ; D. Kekos ; F. N. Kolisis ; B. J. Macris (1998) Production of an esterase from *Fusarium oxysporum* catalysing transesterification reaction in organic solvents. *Process Biochemistry* 33:729-733.
21. Cosio, I. G., Fisher, R. A. and Carroad, D. A. ( 1982 ) Bio-conversion of shellfish chitin waste:waste pretreatment , enzyme production, process design, and economic analysis. *J. Food Sci.*, 47:901-905.
22. Deshpande, M. V. ( 1986 ) Enzymatic degradation of chitin & its biological application. *J. Sci. & Ind. Res.* 45: 273-277.
23. Greenberg, A. E., J. J. Conners, and D. Jenkins. (1982) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Page 543-558. 15th ed., al. Pub. Health Assoc., Washington D.C.
24. Hoffman, C. and Evans, A.C. (1971) Use of spices as preservatives. *J. Ind. Eng. Chem.* 3:835-841.
25. Hoitink, H.A.J. and P.C. Fahy. (1986) Basis for the control of soil-borne plant pathogen with composts. *Ann. Rev. Phyto-pathol* 24:93-114.
26. Kato, N. and Shibasaki, I. (1975) Comparison of antimicrobial activities of fatty acids and their esters. *J. Ferment. Technol.* 53:793-785.
27. Leeper, S.A., Ward, T.E., and Andrews, G.F. (1991) Report No. EGG-2645 ; U.S. Department of Energy; Washington D.C.
28. Martin A.M. (1999) A low-energy process for the conversion of fisheries waste biomass. *Renewable Energy* 16, 1102-1105.
29. Min chu et al. (1998) Microstation System Release 3.5. (1995) Biolog, Inc. U.S.A A new potent antifungal agent from *Actinoplanes* sp.. *Tetrahedron letters* 39:7649-7652.
30. Pietro, A. Di, M. Gut-Rella., J. P. Pachlatko., and F. J. Schwinn (1992) Role of antibiotics produced by *Chaetomium globosum* in biocontrol of *Pythium ultimum*, a causal agent damping-off . *Physiol and Biotech.* 82(2):131-135.
31. Qamar, S., Chaudhary, F. M. (1991) Antifungal activity of some essential oils from local plants. *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research.* 34:30-31.
32. Reetarani S. Patil, Vandana ghormade, Mukund V. Deshpande (2000) Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme and microbial technology.* 26:473-483.
33. Ruiz, M. C.; Pietro, A. D.; G. Roncero, M. I. (1997) Purification and characterization of an acidic endo-B-1,4-xylanase from the tomato vascular pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *FEMS Microbiology Letters* 148:75-82.
34. San. L. Wang, Chio, S, H, (1998) Enzyme. *Microb. Technol.* , 22:629.
35. Sigh R. K. and Dwivedi R. S. (1987) Effects of oils on *Sclerotium rolfsii* causing foot-rot of barely. *Indian Phytopathology.* 40:531-533.
36. Stanley, W. L., Watters, G. G. , Chan, B. G. and Marcer, J. M. ( 1975 ) Lactose and other enzymes bound to chitin with glut-aldehyde. *Biotech. and Bioeng.* , 17:315-319.
37. Steven F. Vaughn and Gayland F. Spencer. (1994) Antifungal activity of natural compounds against Thiabendazole- Resistant *Fusarium sambucinum* Starin. *J. Agric. Food. Chem.* 42:200-203.
38. Thompson, D.P. (1991) Effect of butylated hydroxyanisole on conidial germination of toxigenic species of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *J. Food Protect.* 54:375-384.
39. Yang, T. and Zall, R. R. ( 1984 ) Chitosan membranes for reverse osmosis application. *J. Food Sci.*, 49:91-96.