



RRPD89090387 (S.P)

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

水產甲殼廢棄物製備之幾丁質類物質在水處理、食品、農業、化工、醫藥上之應用-幾丁質酶及蛋白質酶產生菌配合蝦殼粉的使用對田間生態系變化及農作物生長的影響(3/3)

Effect of chitinase and protease-producing bacteria and use of shrimp shell powder on the changes of ecosystem and growth of crops in the field

NSC89-2313-B-019-C72-A24

執行單位：國立台灣海洋大學食品科學系

中華民國 90 年 05 月 30 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫編號：NSC 89-2313 -B-019-072-A24

執行期限：89年08月01日至90年07月31日

主持人：陳幸臣

執行機構及單位名稱：國立台灣海洋大學食品科學系

一、中文摘要

本研究以幾丁質酶產生菌 (*Cellulomonas flavigena*) NTOU 1 株作為拮抗菌，配合蝦殼粉的使用，探討其對植物土媒病原黴菌 *Rhizoctonia solani* CCRC31252 之抑制情形與防治綠豆由該菌所引起之病害。*C. flavigena* 在含有膠狀幾丁質之培養基中對 *R. solani* 有明顯的抑制作用；以掃描式電子顯微鏡觀察，發現 *C. flavigena* 能引起 *R. solani* 菌絲變形及凹陷，甚至造成菌絲溶解的現象。在基礎培養基 (pH6.0) 含不同碳源培養 *C. flavigena*，發現 *R. solani* 乾燥菌絲(0.02%) 能誘導 *C. flavigena* 產生 *N*-乙酰葡萄糖胺酶及些微幾丁二糖酶活性；且蝦殼粉添加能誘導較高的 *N*-乙酰葡萄糖胺酶活性及 *N*-乙酰幾丁二糖酶活性。接種 *C. flavigena* 於未滅菌土壤中會隨時間而顯著降低活菌數；但在含有蝦殼粉的土壤中降低甚微。

而在接種 *C. flavigena* (1.7×10^7 CFU/g soil) 於未滅菌土壤 7 天後進行 21 天綠豆栽培試驗中，含有 0.1% 蝦殼粉之試驗組能顯著抑制 *R. solani* 引起綠豆之病害。分析未滅菌土壤於綠豆栽培期間之微生物活性，在總生菌數方面添加 0.1% 蝦殼粉能提高總生菌數；卻不影響總真菌數。除 *R. solani* 外，*C. flavigena* 也能抑制土壤分離株 *Penicillium* spp. 與 *Fusarium* sp. 的生長。進一步針對其他植物病原真菌進行拮抗試驗，發現 *C. flavigena* NTOU 1 也能抑制 *Colletotrichum gloeosporioides*、*Alternaria brassicae* 及 *Fusarium oxysporium* 病原真菌

之生長，其中又以對 *C. gloeosporioides* 抑制強度最大。

關鍵詞：*Cellulomonas flavigena*、幾丁質酶、蝦殼粉、*Rhizoctonia solani*、生物防治

Abstract

This research was conducted to evaluate the practicability of *Cellulomonas flavigena* NTOU 1 to be the biofungicide to inhibit the growth of plant pathogen *Rhizoctonia solani*. In the test of complex media containing colloidal chitin, *C. flavigena* could significantly ($p < 0.05$) inhibit the growth of *R. solani*, resulting hyphal hydrolyzation under the observation of SEM. In basal medium containing dried mycelia (0.02% w/v), *C. flavigena* could be activated to induce the production of *N*-acetylglucosaminidase (GlcNAcase) and small amount of *N*-diacetylchitobiase (chitobiase). Addition of shrimp shell powder (SSP) in the media could enhance the activities of GlcNAcase and chitobiase. Among them, addition of 0.2% SSP exhibited the highest GlcNAcase activity at day 2, while at day 6, the addition of 0.5% SSP revealed the highest chitobiase activity. Both activities decreased along with the reduction of viable counts of *C. flavigena*. However, the addition of SSP in soil could reduce the mortality of *C. flavigena*. In mung bean culture test inside incubation chamber,

addition of SSP (0.1% w/w) in native soil without sterilization, the inoculation of *C. flavigena* (1.7×10^7 CFU/g soil) could significantly inhibit *R. solani* causing plant disease ($p < 0.05$). *C. flavigena* could also inhibit the growth of *Penicillium* and *Fusarium* isolated from soil.

Keywords: *Cellulomonas flavigena* NTOU 1, *Rhizoctonia solani*, shrimp shell powder, biofungicide

二、前言

有關以生物農藥防治植物病害之研究，為近一、二十年來此領域的重要課題。因幾丁質為許多植物病原真菌、線蟲的害蟲體成份組成之一，故以幾丁質酶產生菌水解幾丁質作為生物農藥之用深受矚目。幾丁質酶可以水解病原真菌細胞壁，此作用被認為是生物防治中一個重要的機制。並且已有不少幾丁質酶或幾丁質酶產生菌應用於植物病害防治上。

Rhizoctonia solani 為一全球性分布之重要植物土媒病原真菌，能引起包括 66 科 (class)，300 種 (species) 以上之寄主植物幼苗倒伏 (damping-off)、莖腐 (stem rot) 及根腐 (root rot) 等病癥。本省各主要農作地區，常可見 *R. solani* 病害。由於 *R. solani* 可以菌核 (sclerotium) 及菌絲存活於土壤與介質中，故不易為殺菌劑所控制，且由於其病原性分化低，因此尋求抗病基因難，抗病育種也不易。在田間栽培上，過去多仰賴化學殺菌劑的施用，有鑑於生物防治用菌的需求，篩選拮抗菌進行與土壤添加物的研究為近年來防治研究之重點，其中更有以拮抗菌配合土壤添加物進行之防治試驗。在溫室試驗中，以 *Bacillus sp.* 作為拮抗菌配合添加幾丁質、纖維素、稻草或蝦殼等有機添加物於土壤中，發現可抑制 *R.*

solani 引起之綠豆腰折病，其中又以幾丁質為最佳的有機添加物。

Cellulomonas flavigena NTOU 1 為本研究室自土壤中分離，為一株本土性能產生幾丁質酶之菌株，能以外切模式水解蝦殼幾丁質。本實驗室曾以 *Candida parapsilosis* CCRC 20515 發酵蝦殼後之廢液培養 *C. flavigena* NTOU 1，發現其粗酵素液可抑制 *R. solani* CCRC 31252 的生長。因此本研究之目的在於了解 *C. flavigena* NTOU 1 對 *R. solani* CCRC 31252 之拮抗作用；並藉由 *C. flavigena* NTOU 1 配合蝦殼粉使用對 *R. solani* 引起之綠豆病害防治功效以評估其做為生物防治劑之可行性。

三、結果與討論

C. flavigena NTOU 1 與 *R. solani* 培養基進行之拮抗試驗，發現 *C. flavigena* NTOU 1 在含有膠狀幾丁質的培養基中，對 *R. solani* 菌落生長有明顯的抑制情形，其中以 WAcc agar 抑制情形最明顯 ($p < 0.05$)。將兩菌在 YMcc agar 對峙培養 4 天後，切取兩菌交接處洋菜塊，以掃描式電子顯微鏡觀察 *R. solani* 之菌絲形態。在對照組尚未被 *C. flavigena* NTOU 1 作用之菌絲結構完整；而被 *C. flavigena* NTOU 1 作用之菌絲有明顯斷裂、縊縮與溶解的情形，顯示 *C. flavigena* NTOU 1 對 *R. solani* 具有菌絲溶解的作用。

C. flavigena NTOU 1 利用不同受質作為碳源所誘導之幾丁酶的活性，以基礎培養基含不同碳源 [0.02% (w/v), pH6.0] 培養 *C. flavigena* NTOU 1，發現 *R. solani* 乾燥菌絲能誘導 *C. flavigena* NTOU 1 產生 *N*-乙酰幾丁葡萄糖胺酶 (GlcNAcase) (max: 43.6U/mL) 及些微幾丁二糖酶 (Chitobiase) 活性 (max: 25.2U/mL)；而蝦殼粉能誘導產生較高之 GlcNAcase (max: 76.0U/mL) 及

Chitinase (max: 252.2U/mL)活性，且其所誘導之 Chitinase 活性顯著高於 GlcNAcase 活性。幾丁質水解菌的抗真菌活性，最常表現的就是菌絲的水解⁽¹⁾；且在以 *R. solani* 菌絲作為碳源，培養 *C. flavigena* NTOU 1 也可誘導出 *N*-乙酰葡萄糖胺酶及些微幾丁二糖酶，因此推測 *C. flavigena* NTOU 1 對 *R. solani* 之抑制作用，與其幾丁質酶水解 *R. solani* 菌絲有關。

當培養基缺乏碳源時，能誘導微生物分泌醣類水解酵素，例如在不含碳源培養基中 *Streptomyces elegans* 有顯著的 chitinases 與 β -1,4-glucanases 活性，其生長遲緩，可能因營養貧瘠而分泌大量的細胞壁水解酵素；細菌與真菌醣類水解酵素的分泌會受到過多的葡萄糖或代謝快速的醣類所抑制，而醣類水解酵素會在生長速率減緩如營養貧瘠時被誘導產生⁽²⁾。學者發現在土壤中若 *Streptomyces* sp. 的生長能量來源不足時，就會攻擊 *Aspergillus niger* 的菌絲以得到其所需之生長能量⁽³⁾。

微生物具有水解其他有機質的能力是自然界常見的一種現象，在土壤微生物生態平衡上扮演重要角色，藉此水解其他有機質的能力可做為有效的防治工具。Chet 等人(1988)⁽⁴⁾探討幾丁質酶在防治 *S. rolfii* 所扮演的角色時，以 *S. rolfii* 菌絲與其細胞壁作為碳源培養 *Serratia marcescens*，也同樣可檢測到幾丁質酶活性。由於 *R. solani* 乾燥菌絲亦能誘導 *C. flavigena* NTOU 1 產生 GlcNAcase 與些微 chitinase 活性，因此也證實 *C. flavigena* NTOU 1 拮抗 *R. solani* 的能力與其幾丁質酶有關。蝦殼粉能誘導較高之 GlcNAcase 及 chitinase 活性。*C. flavigena* NTOU 1 對蝦殼粉與 *R. solani* 乾燥菌絲所誘導之主要幾丁質酶屬於不同水解模式。

Lorito 等人⁽⁵⁾將純化自 *T. harzianum* 之不同水解模式的幾丁質酶混合時，可減少數十倍甚至數百倍幾丁質酶的用量，即可

達到相同的抑菌效果。此外，不同來源的幾丁質酶可能會增強影響膜結構物質 (Membrane-affecting compounds, MACs) 對真菌之抑制作用。這些 MACs 包括植物的 PR proteins、抗生物質(如 trichothiazine、gliotoxin)及化學殺菌劑等，能抑制真菌細胞壁主要組成的合成作用，並使其細胞壁對幾丁質酶的作用更敏感⁽⁶⁾。因此 *C. flavigena* NTOU 1 與其他防治劑混和使用可能表現較佳的防治效果，宜進一步進行討論。

接種 *C. flavigena* NTOU 1 (1.7×10^7 CFU /g soil) 於未滅菌土壤中並配合添加 0.1% (w/w) 蝦殼粉混和後放置 7 天，再種植綠豆 21 天進行栽培試驗，分析防治功效，發現在含有蝦殼粉之實驗組能顯著降低 *R. solani* 引起綠豆之死亡率。單獨接種 *C. flavigena* NTOU 1 也具有部分抑制病害的效果。

由於幾丁質酶對植物初期之萌發及生長時之抑菌效果遠較已成熟植物之抑菌效果來得有效，且植物在未木質化前容易受感染，在此時添加拮抗菌能較容易達到保護植物的效果。以蝦殼粉作為土壤添加劑能促進土壤中能分解幾丁質之微生物密度⁽⁷⁾。而蝦殼粉配合幾丁質酶產生菌的施用，產生大量幾丁質酶破壞真菌細胞壁，亦可降低病害⁽⁸⁾。於未滅菌土中添加蝦殼粉後，土壤中之總生菌數與 *C. flavigena* NTOU 1 菌數都有顯著提高；而 *C. flavigena* NTOU 1 添加至土壤後其菌數會因需與土壤中原有微生物競爭空間與養分隨時間逐漸下降，但在含有蝦殼粉的降低的幅度較微。顯示 *C. flavigena* NTOU 1 在含有蝦殼粉的土壤中能維持較佳之菌數穩定性。另外，在栽培試驗中也以 1.7×10^7 CFU /g soil 之 *C. flavigena* NTOU 1 配合 1% (w/w) 蝦殼粉對 *R. solani* 有最好防治效果。

在接種 *C. flavigena* NTOU 1 (1.7×10^7 CFU /g soil) 於未滅菌土壤後，土壤中的

總生菌數，不因接種 *C. flavigena* NTOU 1 與否影響總活菌數的變化；而添加 0.1% (w/w) 蝦殼粉於土壤，則會顯著提高土壤中之總活菌數 ($p < 0.05$)。在接種 *C. flavigena* NTOU 1 於未滅菌土壤後，土壤中的總活真菌數，不因 *C. flavigena* NTOU 1 的接種或 0.1% (w/w) 蝦殼粉的添加而變化。

就真菌菌相的改變而言，使用 *C. flavigena* NTOU 1 為植物作為生物防治劑，除 *R. solani* 外，也會抑制土壤分離株 *Penicillium* spp. 與 *Fusarium* sp. 的生長。除了 *R. solani* CCRC31252 以外，*C. flavigena* NTOU 1 也能抑制 *Colletotrichum gloesporioides* CCRC35003、*Alternaria brassicae* CCRC35006 及 *Fusarium oxysporium* f. sp. *momordicae* CCRC35046 植物病原真菌之生長，若比較其相對抑制率，則以對 *C. gloesporioides* 抑制強度最大。

四、計畫成果自評

我們發現本實驗自土壤分離的 *C. flavigena* NTOU 1 除了可供蝦醬油的生產及用於水解幾丁質為 *N*-乙醯幾丁寡糖外，尚可利用於土壤中植物病原菌如 *R. solani* 等之抑制。由於在基隆不易租得田地，無法進行更詳細的田間試驗，覺得不足。

五、參考文獻

1. Inbar, J. and Chet, I. 1991. Evidence that chitinase produced by *Aeromonas caviae* is involved in the biological control of soil-borne plant pathogens by this bacterium. *Soil. Biol. Biochem.* 23: 973-978.
2. Tweddell, R. J., JabaJi -hare, S. H. and Charest, P. M. 1994. Production of chitinase and β -1,3-glucanase by *Stachybotrys elegans*, a Mycoparasite of *Rhizoctonia solani*. *Am. Society for Microbiology.* 60:489-495.
3. Mahadevan, B. and Crawford, D. L. 1997. Properties of the chitinase of the antifungal biocontrol agent *Streptomyces lydicus* WYEC108. *Enzyme and Microbial Technology* 20: 489-493.
4. Ordentlich, A., Elad, Y. and Chet, I. 1988. The role of chitinase of *Serratia marcescens* in biocontrol of *Sclerotium rolfii*. *Phytopathol.* 78: 84-87.
5. Lorito, M., Hayes, C. K., Zoina, A., Scala F., Sorbo, G. D., Woo, S. L. and Harman, G. E. 1994b. Potential of genes and gene products from *Trichoderma* sp. and *Gliocladium* sp. for the Development of Biological Pesticides. 1994. *Molecular Biotechnology.* 2: 209-217.
6. Lorito, M., Woo, S. L., Donzelli, B. and Scala, F. 1996. Synergistic, antifungal interactions of chitinolytic enzymes from fungi, bacteria and plants. *Chitin Enzymology.* 2: 157-164.
7. Spiegel, Y., Chet, I., and Cohn, E. 1987. Use of chitin for controlling plant-parasitic nematodes. II. Mode of action. *Plant and Soil*, 98:337-345.
8. Sabry, S. A. 1992. Microbial degradation of shrimp-shell waste. *J. Basic Microbiol.* 32(2): 107-111.