

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

研究題目：除臭微生物放線菌之菌種鑑定分析

計畫編號：CNFS93-02

執行期限：93 年 01 月 01 日至 93 年 12 月 31 日



主持人：食品科技系 陳椒華

中華民國 94 年 2 月 25 日

除臭微生物放線菌之菌種鑑定分析

計畫編號：CNFS93-02

主持人：陳椒華

摘要

本研究從堆肥土壤分離出有益微生物菌種，得到數十株類放線菌屬，除做菌種鑑定檢測，也選取除臭效果良好之菌株製作成除臭菌粉並進一步應用於廚餘臭菌試驗，得到不錯之除臭效果。將有效除臭效果之放線菌 F9 進行菌種鑑定，包括菌株培養特性分析、於 ISP 培養基培養之生長觀察、菌絲觀察、產孢情形及色素產生情形觀察，也進行細胞壁成份分析、菌株醣類利用情形及電子顯微鏡觀察等，將分析結果與 Actinobase 及 International Journal of Systematic Bacteriology 比對後，鑑定此 F9 菌株為 *Streptomyces variabilis*。

前言

自然界存在許多有用的微生物，他們已被廣泛應用於食品、醫學及工業上，達到造福人類，維護環境的功能。在眾多有用的微生物中，存在有淨菌系、發酵系及光合成系等之兼性厭氣、厭氣及好氣性之微生物，其主要為一群對土壤更改良、提高作物產值的微生物，我們稱之為有用微生物群，Effective Microorganism，簡稱 EM。

EM 菌包括嫌氣性的光合菌、乳酸菌及酵母菌、放線菌等，根據研究報告指出，EM 微生物可改良土壤，使土壤中氨基酸、有機酸、多醣類及維他命等產生，提高農作物量，而且農作物抗病力亦提高，故不需使用農藥及化學肥料；EM 菌在分解有機物中會分泌抗氧化物質，可使有機物不氧化、不發生惡臭與毒素，而將有機物質轉換成良好的有機肥料，EM 分解有機物產生的抗氧化物質亦對高級動植物的健康有幫助；EM 菌可分解動植物組成份中之蛋白質、脂肪等腐敗後所產生的惡臭氣味，所以固態有機性廢棄物如畜產廢棄物、剩餘污泥及家庭廚餘垃圾等腐敗所產生的惡臭，可採 EM 菌來處理。

放線菌為革蘭氏陽性菌，多數為好氣性生長，除少部份為致病菌外，主要為存在土壤、水及植物體中之腐生菌，因此對於土壤結構及堆肥之形成有其重要性，而放線菌所分泌之胞外酵素對自然界複雜之有機物如蛋白質、核酸、多醣類及植物組織等具有分解能力，也適用於堆肥之製備。

放線菌可應用有益微生物於除臭及堆肥化之促進效果，可提昇廚餘回收意願、減少臭味產生並促進堆肥化品質。本計畫將所分離之放線菌株進行除臭測試再進行菌種鑑定，包括傳統形態、生化分析、細胞壁成份分析及顯微境照相分析等。

實驗方法與材料

1 放線菌的分離

分離放線菌所用的培養基為 NA(Nutrient agar)培養基(Difco 0001)。分離菌種時培養基中添加 cycloheximide(50-75 μ g/ml), Nalidixic acid(20 μ g/ml)。取農場自製的堆肥，再將之懸浮於 NB(Nutrient broth)液體培養基增殖培養後，然後適當稀釋菌液，再塗抹於 NA 培養基。

2 放線菌之除臭品評分析

所分離之放線菌分別培養於 10ml Nutrient broth 及 10ml MRS broth 一星期，各取 1ml 菌體培養液，加入 10 克 新鮮煮熟之食物樣品，如虱目魚、豬肉及雞肉的密封瓶，於室溫放置七天後，品評臭味。不加菌之樣品臭味定為"9"，臭味範圍由 1 至 10，數字越小表示臭味越弱。臭味評定結果如表一。

3 放線菌之鑑定

(1) 菌株培養特性

選擇適合放線菌生長之 ISP 培養基培養放線菌，再進行生長觀察、菌絲觀察、產孢情形及色素產生情形觀察。

(2) 細胞壁成份分析

(3) 菌株醣類利用情形

(4) 電子顯微鏡觀察

結果與討論

1 放線菌之除臭效果

將所分離之放線菌添加於虱目魚、豬肉及雞肉等密封瓶中，於室溫放置七天後，品評臭味，評定結果如表一。不加菌之樣品臭味評定為"9"，臭味範圍由 1 至 10，數字越小表示臭味越弱。

表一、放線菌加入樣品七天後之除臭品評分析^a

加入所分離的放線菌	樣品		
	虱目魚	豬肉	雞肉
Control(不加菌)	9	9	9
CNCS1	5.8 \pm 2.05	5.6 \pm 2.39	6.7 \pm 2.26
CNCF1	5.6 \pm 2.50	7.8 \pm 1.80	5.2 \pm 2.09
CNCF2	4.4 \pm 1.44	5.6 \pm 2.36	5.2 \pm 1.76
CNCF5	5.2 \pm 1.82	10	5.9 \pm 1.77
CNCF9	4.2 \pm 1.72	5.2 \pm 2.2	4.6 \pm 1.36
CNCF10	5.2 \pm 1.84	4.7 \pm 1.46	5.0 \pm 1.45
CNCF11	8.8 \pm 0.80	8.0 \pm 1.61	4.5 \pm 1.99

CNCF15	5.2±1.91	5.9±2.60	5.9±1.81
CNCF16	4.2±1.46	5.5±2.03	7.2±1.74
CNCF19	4.5±1.38	5.8±2.34	5.3±2.02
CNCF24	5.3±1.80	6.7±2.14	4.0±1.96
CNCF25	5.3±1.83	5.4±1.77	7.2±1.76
CNCF27	4.8±1.77	6.0±2.50	6.7±2.02

^a註：臭味評定標準從 0~9，對照組臭味定為 9，數字越小表示越不臭

2 菌種鑑定結果

(1) 菌株培養特性

F9 菌株在 ISP 2, 3, 4 培養基均生長及產孢良好，於 ISP 5 培養基生長稍差、產孢很差 (poor)。營養菌絲為黃褐色或灰褐色，氣生菌絲為乳白色或褐灰色，不產生可溶性色素及黑色素(表二)。孢子鏈(spore chain)為螺旋狀(spiral)，孢子表面具有突起(warty)(附圖一)。

(2) 細胞壁成份分析

F9 菌株之細胞壁氨基酸及全細胞糖類成份分別為 L-DAP 及 glucose, ribose。根據 Lechevalier 等人的分類，是屬於 Chemotype IC 型，由此可以判斷其屬名為 *Streptomyces*。

(3) 菌種對各種糖類的利用如表三

(4) 電子顯微鏡照相結果如圖一。

(5) 根據結果與 Actinobase 及 International Journal of Systematic Bacteriology 比對後，鑑定此 F9 菌株為 *Streptomyces variabilis*。

Table 2 Cultural characteristics of *Streptomyces variabilis* (F9) on ISP media

	Growth	Substrate mycelia	Aerial mycelia	Sporulation	Soluble pigment
Yeast extract-malt extract agar(ISP2 medium)	well	Moderate olive brown	Light brownish gray	Well	None
Oatmeal agar(ISP3 medium)	well	Dark grayish yellow	brownish gray	Well	None
Inorganic salts starch agar(ISP 4 medium)	well	Light olive gray	Yellowish gray	Well	None
Glycerol asparagines agar(ISP 5 medium)	well	Light yellowish brown	Yellowish white	Poor	None

Table 3 Carbon source utilization of *Sreptomycetes varabilis* (F9)

Carbon source	<i>S. varabilis</i> (F9)
D-glucose	+
D-xylose	+
D-fructose	+
Sucrose	-
L-arabinose	+
Rhamnose	-
Raffinose	+
D-mannitol	+
L-inositol	-
Cellulose	-
Salicin	-





圖一、*Streptomyces variabilis* 的氣生菌絲及孢子鏈

參考文獻

Identification of the catalytic residues in the double-zinc aminopeptidase from *Streptomyces griseus* • SHORT COMMUNICATION

FEBS Letters, Volume 571, Issues 1-3, 30 July 2004, Pages 192-196

Identification and typing of *Streptomyces* strains: evaluation of interspecific, intraspecific and intraclonal differences by RAPD fingerprinting • ARTICLE

Research in Microbiology, Volume 151, Issue 10, December 2000, Pages 853-864

Reevaluation of the Final Steps in the Biosynthesis of Blasticidin S by *Streptomyces griseochromogenes* and Identification of a Novel Self-Resistance Mechanism • ARTICLE

Tetrahedron, Volume 56, Issue 5, 28 January 2000, Pages 693-701

Numerical classification and identification of *Streptomyces* species — a review • ARTICLE

Gene, Volume 115, Issues 1-2, 15 June 1992, Pages 225-233

黃瑞彰 林晉卿 林經偉 卓家榮(2002) 微生物在農業生產之應用. 台南區農業專訊第41期: 7~12 頁