

鳳梨皮經 *Azotobacter beijerinckii* A13 醱酵產出生物肥料及評估對小白菜生長效益之研究

簡宣裕^{1,2} 張明暉³ 林素禎³ 陳美蓁⁴ 林美娟⁴

摘要

鳳梨皮泥汁接種 *Azotobacter beijerinckii* A13 於 20°C 醱酵者有較高的族群數，於 35°C 醱酵者之族群數低於 10⁵ cfu/ml，於 25°C 進行醱酵時有較高的 IAA 產出濃度 (1.90µg/ml)。鳳梨皮泥汁接種 1:100 菌液處理者比接種 1:500、1:1000 及 1:5000 者有較高的固氮活性與產出較高濃度的 IAA。鳳梨皮泥汁接種 *A. beijerinckii* A13 菌液 1:100 (v:w) 進行醱酵 21 天，固氮活性有隨醱酵時間的增加而減少，但產出的 IAA 濃度則隨時間而增高。鳳梨皮泥汁以 100 °C 加熱 30 分鐘，接種 *A. beijerinckii* A13 菌液進行醱酵，醱酵物的固氮菌族群數、水溶性氮與全氮濃度及 IAA 濃度皆顯著的比鳳梨皮泥汁經高溫高壓滅菌與不滅菌接種菌液者高。鳳梨皮泥汁經 100 °C 加熱 30 分鐘，接種 *A. beijerinckii* A13 菌液，進行醱酵 21 天，醱酵物以 1:20、1:10 及 1:5 (w:w) 施用於 0.75 kg 盆栽土壤，種植小白菜，經 30 天後小白菜每棵的鮮重與乾重雖然和對照處理者 (鳳梨皮泥添汁加土壤溶液進行醱酵者) 的鮮重與乾重相較有增加的趨勢，但差異不顯著。

關鍵詞：鳳梨皮。生物肥料。固氮活性。小白菜。

前言

臺灣每年有大量有機廢棄物產生，若不妥善處理會對農業生態、環境造成負面影響，又全世界的能源愈來愈缺乏，生產過程需要耗費大量能源之化學肥料等農業栽培用資材的價格會大幅上升，故開發低耗能且兼具環保功能之綠色肥料是未來必須進行的科技研究工作。本計畫將鳳梨皮接種固氮菌株，以生物轉換產出生物性氮肥，不但可以農業資源物再利用，且可減少農業生產對化學氮肥之依賴性，對於糧食生產與環境之維護極為重要。

-
1. 通訊作者
 2. 農委會農業試驗所農化組研究員
 3. 農委會農業試驗所農化組助理研究員
 4. 農委會農業試驗所農化組研究助理

材料與方法

一、鳳梨皮成份之分析：

測定鳳梨皮以果汁機絞成泥狀然與純水依 1:1 (w:v) 比例混合後，測定 pH 與 EC 值及總還原糖含量 (DNS method)。鳳梨皮以 85 °C 烘乾後，測定全量氮、磷及鉀濃度。

二、鳳梨皮泥汁接種固氮菌 *A. beijerinckii* A13 進行醱酵對固氮族群數、固氮活性、產出 IAA 濃度及固氮量影響之探討：

8.5 g 鳳梨皮泥與 41.5 ml 水混合為鳳梨皮泥汁，調酸鹼值為 pH 7，置於 125 ml 玻璃錐形瓶內，以 100°C 加熱 30 分鐘，冷卻後進行下列試驗：

(一) 探討鳳梨皮泥汁接種 *A. beijerinckii* A13 於不同溫度進行醱酵對固氮菌族群數、固氮活性及 IAA 濃度之影響：

於無菌操作檯，將菌液以 1:100 (v:w) 接種於含鳳梨皮泥汁之 125 ml 玻璃錐形瓶內，然後置於 20°C、25°C、30°C 及 35°C 進行醱酵，經 3 天後取樣品，測定固氮菌族群數、以 GC 測定固氮活性及 HPLC 測定 IAA 濃度。

(二) 探討不同比例的 *A. beijerinckii* A13 菌液接種於鳳梨皮泥汁進行醱酵對固氮菌族群數、固氮活性及 IAA 濃度之影響：

菌液以 1:100、1:500、1:1000 及 1:5000 (v:w) 接種於含鳳梨皮泥汁之 125 ml 玻璃錐形瓶內，置於 25°C 醱酵，經 3 天後取樣品，測定固氮菌族群數、固氮活性及 IAA 濃度。

(三) 探討鳳梨皮泥汁接種 *A. beijerinckii* A13 經醱酵不同時間對固氮菌族群數、固氮活性及 IAA 濃度之影響：

於無菌操作檯，將菌液以 1:100 (v:w) 接種於含鳳梨皮泥汁之 125 ml 玻璃錐形瓶內，然後置於 25°C 溫度下醱酵，經 1、3、7、14 及 21 天後取樣品，測定固氮菌族群數、固氮活性及 IAA 濃度。

三、鳳梨皮泥汁經不同方式滅菌後接種 *A. beijerinckii* A13 進行醱酵對菌族群數、固氮活性、產出 IAA 濃度及水溶性有效氮與全氮濃度影響之探討：

8.5 g 鳳梨皮泥與 41.5 ml 水混合為鳳梨皮泥汁，調酸鹼值為 pH 7，置於 125 ml 玻璃錐形瓶內，然後分別以 1.1 atm 壓力配合 121°C 條件下滅菌 30 分鐘、100 °C 加熱 30 分鐘滅菌及不加熱 (對照處理)，於無菌操作檯冷卻後接種 1:100 (v:w) 菌液，然後置於 25°C 溫度下進行醱酵，經 21 天後，取樣品測定固氮菌族群數、固氮活性、產出 IAA 濃度及水溶性有效氮與全氮濃度。

四、鳳梨皮泥汁經 *A. beijerinckii* A13 醱酵後產物對盆栽小白菜生長之效益評估：

(一) 探討鳳梨皮泥汁接種 *A. beijerinckii* A13 菌液或土壤溶液進行醱酵對醱酵產物水溶性有效氮、全氮及 IAA 濃度之影響：

8.5 g 鳳梨皮泥與 41.5 ml 水混合為鳳梨皮泥汁，調酸鹼值為 pH 7，置於 125 ml 玻璃錐形瓶內，以 100 °C 加熱 30 分鐘，冷卻後，於無菌操作檯接種 1:100 (v:w) 菌

液或土壤溶液，進行醱酵 21 天後取樣品，測定水溶性有效氮、全氮及 IAA 濃度。

(二) 盆栽土壤施用鳳梨皮泥汁醱酵產物對小白菜鮮重與乾重的影響：

將實施方法 四(一) 製備後之鳳梨皮醱酵產物(以鳳梨皮泥汁添加土壤溶液進行醱酵之產物為對照)，以 1:20、1:10 及 1:5 (w:w) 施用於 0.75 kg 盆栽土壤，4 重複，種植小白菜，於種植 30 天後採收，測定地上部鮮重與乾重，以評估對盆栽蔬菜生長之效益。

結果與討論

一、鳳梨皮之成份含量：

鳳梨皮經分析後，得知其水分含量為 84.4%、酸鹼值與電導度值 (1:1, w:v) 為 pH4.08 與 4.69 (mS/cm)、全氮、全磷及全鉀濃度分別為 9.6 mg/g、1.85 mg/g 及 1.44 mg/g，還原糖濃度為 0.42 mg/g。

二、鳳梨皮泥汁接種固氮菌 *A. beijerinckii* A13 菌液於不同溫度進行醱酵對固氮菌族群數、固氮活性及 IAA 濃度的影響：

鳳梨皮泥汁以 100°C 加熱 30 分鐘後接種 *A. beijerinckii* A13 菌液，於不同溫度進行醱酵 3 天後，得知固氮菌族群數以於 20°C 醱酵者較多，其次為於 25°C 與 30°C 醱酵者，族群數皆高於 10⁸ cfu/ml，而於 35°C 醱酵者之固氮菌族群數低於 10⁵ cfu/ml (圖 1)，由此可以知道 20°C 至 30°C 適合固氮菌 *A. beijerinckii* A13 於鳳梨皮泥汁生長；於 25°C 醱酵有較高的固氮活性 (3,135 ηmole/hr · flask)，其次於 20°C 醱酵者，皆顯著高於 30°C 醱酵者，而於 35°C 醱酵者的固氮活性則測不出固氮活性 (圖 2)；於 25°C 進行醱酵有較高的 IAA 濃度 (1.90 μg/ml) 產出，其次為於 30°C 進行醱酵者，皆顯著比於 35°C 進行醱酵者高，而於 20°C 醱酵者的 IAA 濃度則測不出 (圖 3)。

三、鳳梨皮泥汁接種不同比例固氮菌 *A. beijerinckii* A13 菌液進行醱酵對固氮菌族群數、固氮活性及 IAA 濃度的影響：

鳳梨皮泥汁以 100°C 加熱 30 分鐘，接種不同比例 (v:w) *A. beijerinckii* A13 菌液，進行醱酵，以鳳梨皮泥汁接種 1:100、1:500 及 1:1000 菌液者皆比接種 1:5000 菌液者有較多的固氮菌族群數 (圖 4)。鳳梨皮泥汁接種 1:100 菌液者的固氮活性 (847 ηmole/hr · flask) 為較高，其次依序為接種 1:500、1:1000 及 1:5000 菌液者 (圖 5)。鳳梨皮泥汁接種 1:100 菌液，進行醱酵，所產出的 IAA 濃度 (7.43 μg/ml) 為較高，比鳳梨皮泥汁接種 1:1000 與 1:5000 菌液者顯著的高；而鳳梨皮泥汁接種 1:5000 菌液，進行醱酵，醱酵產物則測不到 IAA 的濃度 (圖 6)。

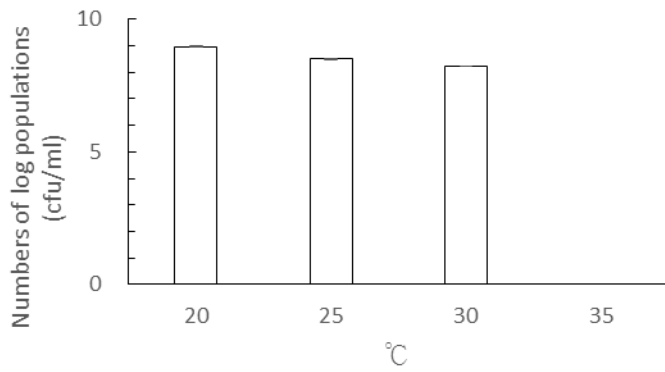


圖 1.鳳梨皮泥汁接種 *A. beijerinckii* A13 菌液於不同溫度下繁衍 3 天後之族群數。

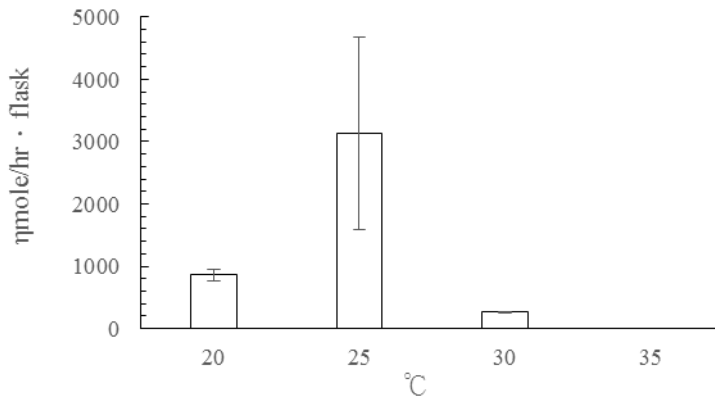


圖 2.鳳梨皮泥汁接種 *A. beijerinckii* A13 菌液於不同溫度下進行發酵 3 天後之固氮活性。

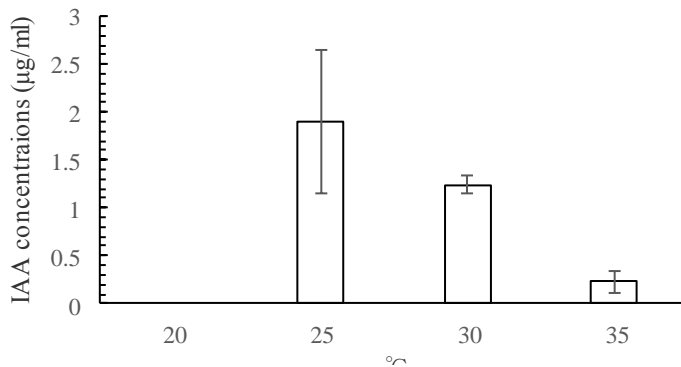


圖 3.鳳梨皮泥汁接種 *A. beijerinckii* A13 菌液於不同溫度下進行發酵 3 天後產出之 IAA 濃度。

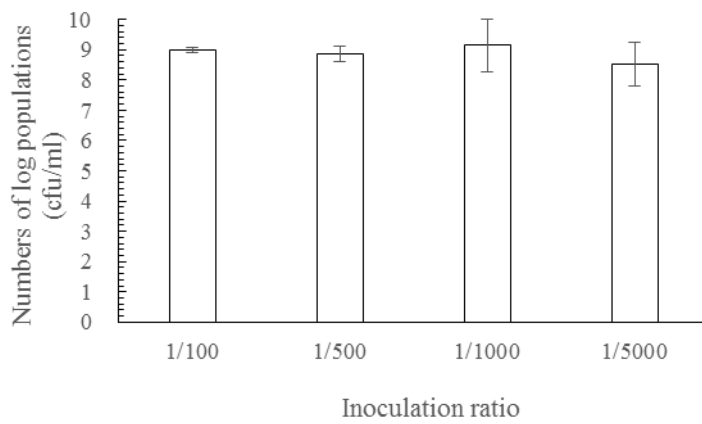


圖 4.鳳梨皮泥汁接種不同比例 *A. beijerinckii* A13 菌液經 3 天後之族群數。

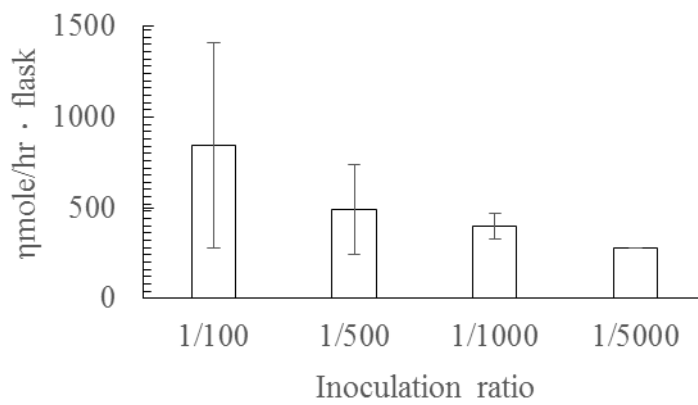


圖 5.鳳梨皮泥汁接種不同比例 *A. beijerinckii* A13 菌液經 3 天後之固氮活性。

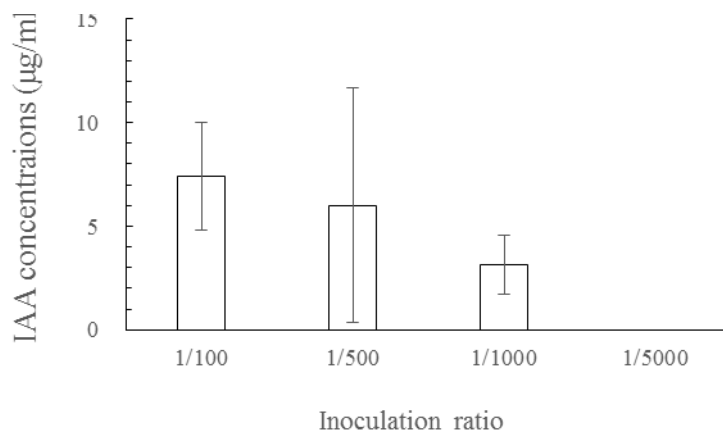


圖 6.鳳梨皮泥汁接種不同比例 *A. beijerinckii* A13 菌液經 3 天後所產出之 IAA 濃度。

四、鳳梨皮汁接種固氮菌 *A. beijerinckii* A13 菌液經醱酵不同時間對固氮菌群數、固氮活性及 IAA 濃度的影響：

鳳梨皮泥汁接種 1:100 (v:w) *A. beijerinckii* A13 菌液，經醱酵 3 天與 7 天時有較高的固氮菌群數 (10^9 cfu/ml 以上)，比醱酵 1 天、14 天及 21 天時的固氮菌群數顯著的高，醱酵至 21 天時菌族群數仍維持 $10^{8.9}$ cfu/ml (圖 7)。醱酵第 1 天時的固氮活性 (3,139 nmole/hr · flask) 顯著的比其他醱酵時間者較高，固氮活性有隨醱酵時間的增加而減少的現象，於醱酵第 14 天時固氮活性明顯的驟降 (圖 8)。鳳梨皮泥汁接種菌液，經醱酵 1 天時測不出 IAA 的濃度，但隨醱酵的時間增加，IAA 的產出濃度會顯著的增加，於進行醱酵 21 天時 IAA 的產出濃度較高為 88.4 μg/ml (圖 9)。

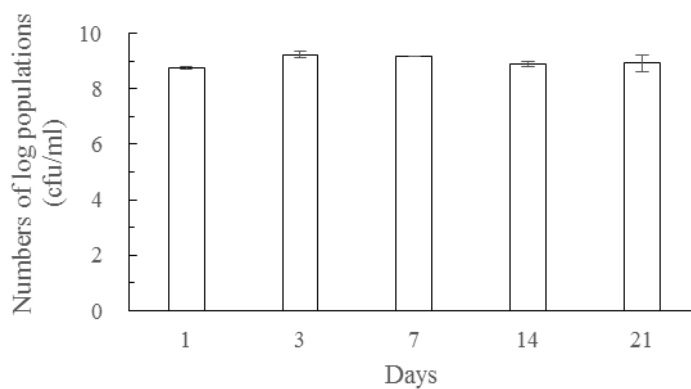


圖 7.鳳梨皮泥汁接種 *A. beijerinckii* A13 菌液經不同天數後之族群數。

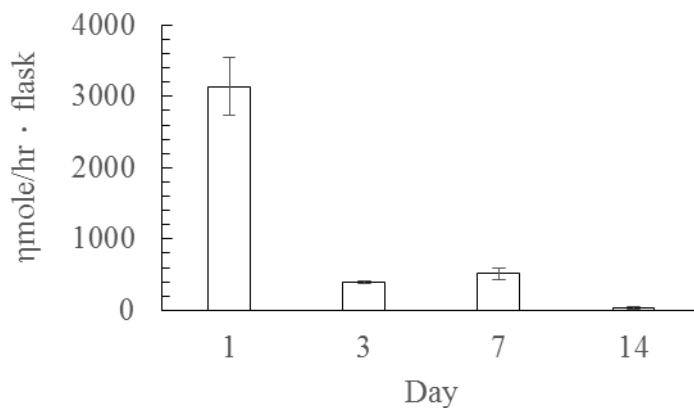


圖 8.鳳梨皮泥汁接種 *A. beijerinckii* A13 菌液經不同天數後之固氮活性。

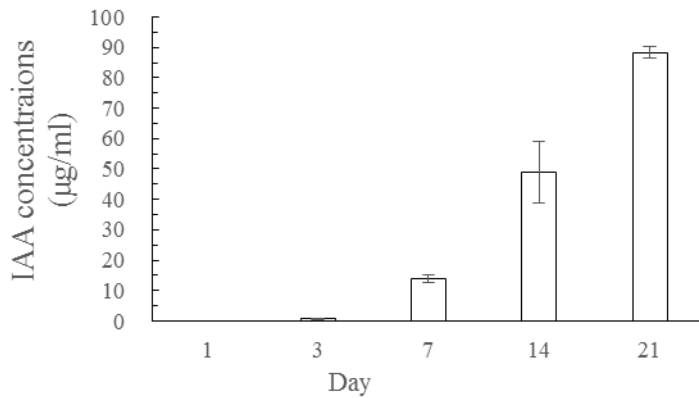


圖 9.鳳梨皮泥汁接種 *A. beijerinckii* A13 菌液經不同天數後所產出之 IAA 濃度。

五、鳳梨皮泥汁以不同方式滅菌，接種 1:100 (v:w) *A. beijerinckii* A13 菌液，經醱酵後對固氮菌族群數、IAA 產出的濃度及水溶性有效氮與全氮濃度之影響：

鳳梨皮泥汁以 100 °C 加熱 30 分鐘，接種固氮菌 *A. beijerinckii* A13 菌液，進行醱酵 21 天時固氮菌的族群數仍有 $10^{8.47}$ cfu/ml，而經高壓高溫滅菌與不滅菌的鳳梨皮泥汁接種固氮菌 *A. beijerinckii* A13 菌液，進行醱酵後的固氮菌族群數皆少於 10^5 cfu/ml (圖 10)。鳳梨皮泥汁以 100 °C 加熱 30 分鐘，接種固氮菌菌液，進行醱酵，醱酵液的水溶性氮濃度為 0.056 mg/ml，是未接種菌液者濃度的 3.1 倍；經高溫高壓滅菌與不滅菌的鳳梨皮泥汁接種菌液，而進行醱酵後所產出的水溶性有效氮濃度分別為 0.04 mg/ml 與 0.01 mg/ml，與未接種菌液者相較皆差異不顯著，可見鳳梨皮泥汁以 100 °C 加熱 30 分鐘方式滅菌配合接種固氮菌菌液，進行醱酵，較能產出水溶性有效性氮 (圖 11)。鳳梨皮泥汁以 100 °C 加熱 30 分鐘，接種固氮菌菌液進行醱酵，醱酵產物的全氮濃度為 0.4mg/ml，較未接種固氮菌菌液者增加 15.3%；鳳梨皮泥汁經高溫高壓滅菌與不滅菌，接種固氮菌菌液進行醱酵，醱酵產物的全氮濃度分別為 0.36 mg/ml 與 0.37 mg/ml，與未接種固氮菌菌液者相較皆差異不顯著，可見鳳梨皮泥汁以 100 °C 加熱 30 分鐘配合接種固氮菌菌液，進行醱酵，較能增加醱酵產物的全氮濃度 (圖 12)。鳳梨皮泥汁以 100 °C 加熱 30 分鐘，接種固氮菌菌液進行醱酵所產出的 IAA 濃度為 34.7 mg/ml，顯著的比不滅菌之鳳梨皮泥汁接種固氮菌菌液進行醱酵所產出的 IAA 濃度高；而鳳梨皮泥汁以高壓高溫滅菌後接種固氮菌菌液進行醱酵，醱酵產物的 IAA 濃度則測不定 (圖 13)。

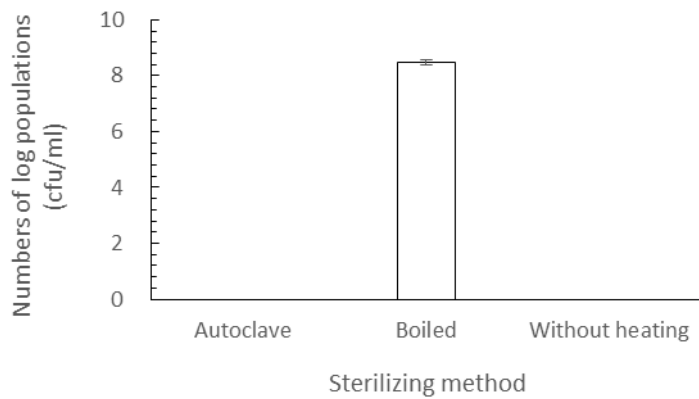


圖 10.以不同方式滅菌之鳳梨皮泥汁接種 *A. beijerinckii* A13 菌液經醱酵 21 天後之族群數。

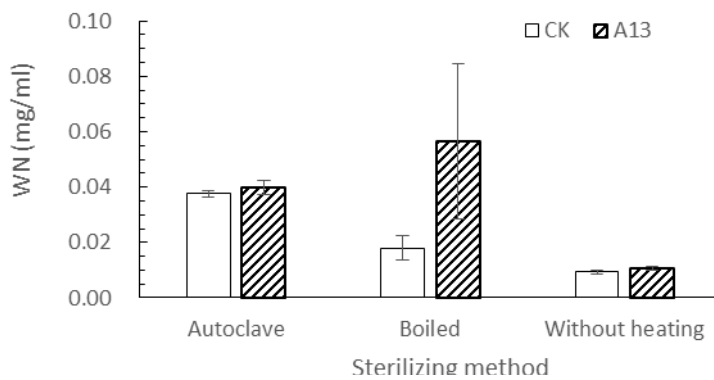


圖 11.以不同方式滅菌之鳳梨皮泥汁接種 *A. beijerinckii* A13 菌液經醱酵 21 天後之有效氮濃度。

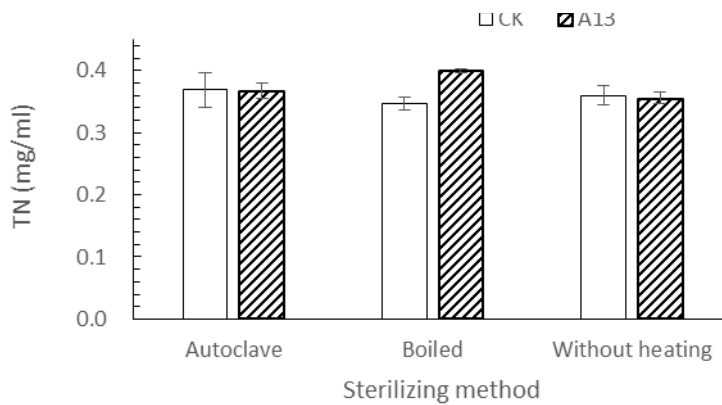


圖 12.以不同方式滅菌之鳳梨皮泥汁接種 *A. beijerinckii* A13 菌液經醱酵 21 天後之全氮濃度。

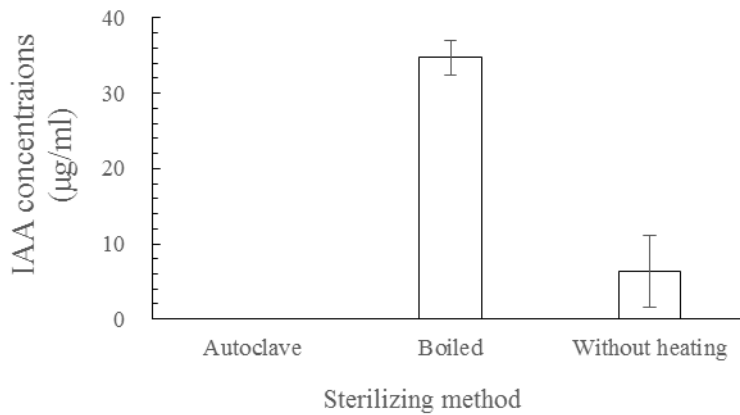


圖 13.以不同方式滅菌之鳳梨皮泥汁接種 *A. beijerinckii*

A13 菌液經醱酵 21 天後所產出之 IAA 濃度。

六、鳳梨皮泥汁接種固氮菌 *A. beijerinckii* A13 菌液或添加土壤溶液進行醱酵之產物對盆栽小白菜生長之效益：

(一)鳳梨皮泥汁接種 *A. beijerinckii* A13 菌液或添加土壤溶液進行醱酵對醱酵產物之水溶性有效氮、全氮及 IAA 濃度之影響：

鳳梨皮泥汁接種固氮菌菌液，進行醱酵後所產出的水溶性有效氮與全氮濃度為 0.033 mg/ml 與 0.429 mg/g，分別為鳳梨皮泥汁添加土壤溶液，進行醱酵後所產出者的 2.36 倍與 1.53 倍（圖 14 與圖 15）。鳳梨皮泥汁接種固氮菌菌液，進行醱酵後所產出的 IAA 濃度為 15 µg/ml，而鳳梨皮泥汁添加土壤溶液，進行醱酵後所產出的 IAA 濃度則測不到。由此可以知道鳳梨皮泥汁接種固氮菌 *A. beijerinckii* A13 菌液比添加土壤溶液，能有效增加醱酵產物中之水溶性有效氮、全氮及 IAA 濃度。

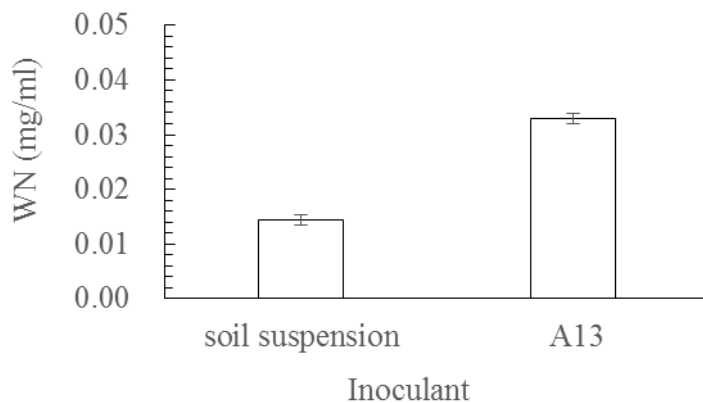


圖 14.鳳梨皮泥汁接種 *A. beijerinckii* A13 菌液或土壤溶液經醱酵 21 天後之有效氮濃度。

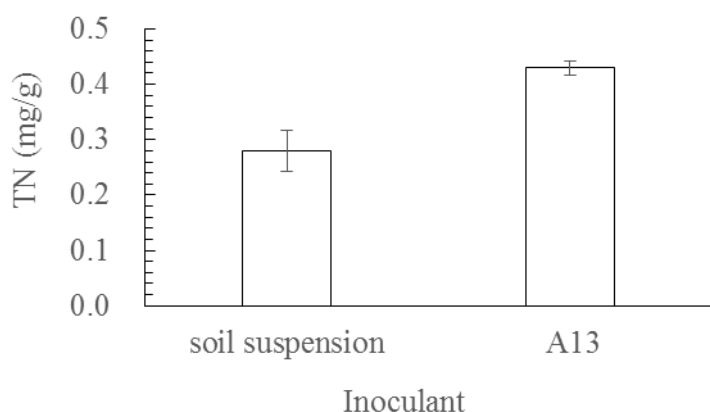


圖 15.鳳梨皮泥汁接種 *A. beijerinckii* A13 菌液或土壤溶液經醱酵 21 天後之全氮濃度。

(二)鳳梨皮泥汁經接種固氮 *A. beijerinckii* A13 菌液或添加土壤溶液進行醱酵之產物對盆栽小白菜鮮重與乾重之影響:

鳳梨皮泥汁以 100 °C 加熱 30 分鐘，接種 *A. beijerinckii* A13 菌液，進行醱酵 21 天後，將醱酵產物（以鳳梨皮添加土壤溶液進行醱酵之產物為對照）以 1:20、1:10 及 1:5 (w:w) 與盆栽土壤混合，然後種植小白菜，經 30 天後採收植株地上部，小白菜每棵的鮮重與乾重分別為 19.4 g、17.2 g 及 13.9 g 與 2.97 g、2.49 g 及 1.71 g，雖然分別和對照者的鮮重與乾重比較，差異不顯著，但是產量仍有增加的趨勢；施用於盆栽土壤的鳳梨皮泥汁醱酵物愈多，小白菜的產量反而愈少（圖 16 與圖 17），此可能與醱酵物之酸鹼值為 pH 8.2-8.4 電導度為 2.4-2.5 mS/cm，大量施用時會不利於小白菜生長有關，不過其真正原因則有待探討。

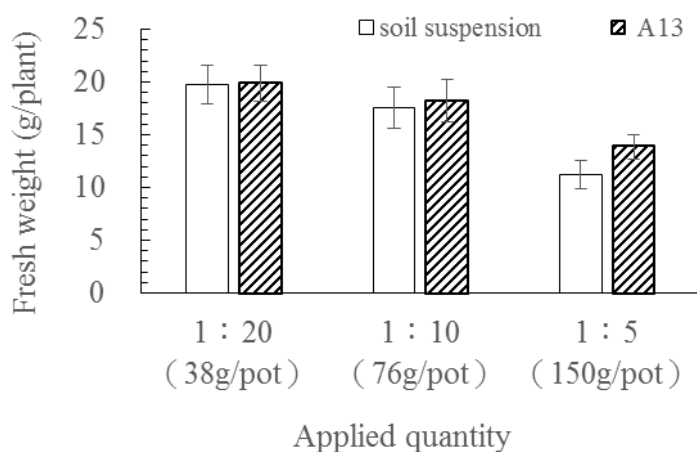


圖 16.鳳梨皮泥汁接種 *A. beijerinckii* A13 菌液或土壤溶液經醱酵 21 天後以不同量與盆栽土壤混合對小白菜鮮重的影響。

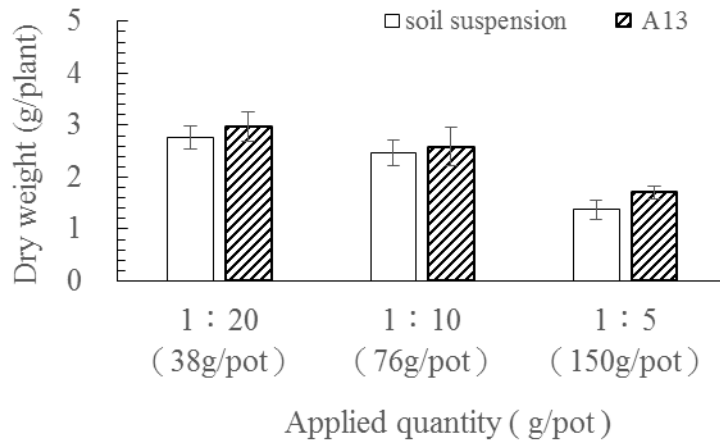


圖 17.鳳梨皮泥汁接種 *A. beijerinckii* A13 菌液或土壤溶液經醱酵 21 天後以不同量與盆栽土壤混合對小白菜乾重的影響。

結論

鳳梨皮泥汁以 100 °C 加熱 30 分鐘，接種固氮菌 *A. beijerinckii* A13 菌液進行醱酵後之產物，皆比鳳梨皮泥汁添加土壤溶液進行醱酵後之產物（對照處理）顯著增加水溶性有效氮、全氮及 IAA 濃度，醱酵後之產物以 1:20、1:10 及 1:5 (w:w) 與盆栽土壤混合，種植小白菜經 30 天後採收，小白菜每棵的鮮重量與乾重量分別比盆栽土壤混合對照處理醱酵物者重，但差異不顯著。施用於盆栽土壤之鳳梨皮泥汁醱酵物愈多，小白菜的產量反而愈少，其原因有需要進行後續之試驗加以瞭解。

參考文獻

1. Bishop, P. E., Jarlenski, D. M. & Heterington, D. R. 1982. Expression of an alternative nitrogen fixation system in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology* 150:1244-1251.
2. Bertrand, H., Plassard, C., Pinochet, X., Toraine, B., Normand, P., and Cleyet-Marel, J. C. 2000. Stimulation of the ionic transport system in *Brassica napus* by a plant growth-promoting rhizobacterium (*Achromobacter* sp.). *Canadian Journal of Microbiology* 46:229-236.
3. Deepak, and Lal, G. 2009. Integrated strategy to control wilt disease of cumin (*Cuminum cyminum* L.) caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cumini* (Schlecht) Prasad & Patel. *Journal of Spices and Aromatic Crops* 18 (1):13-18.
4. Deubel, A. and Merbach, W. 2005. Influence of microorganisms on phosphorus bioavailability in soils. In *Soil Biology v(3): Microorganisms in soils and roles in genesis and functions* pp:177-191. Ed. by F. Buscot and A. Varma. Berlin, Heidelberg.
5. Illmer, P. and Schinner, F. 1995. Solubilization of inorganic calcium phosphates - solubilization mechanisms. *Soil Biology and Biochemistry* 27:257-263.
6. Mail, G.V. and Bodhankar, M.G. 2009. Antifungal and phytohormone production potential of

- Azotobacter chroococcum* isolates from groundnut (*Arachis hypogea* L. Rhizosphere). Asian J. Exp. Sci. 23(1): 293-297.
- 7.Suneja, S., Narula, N., Anand, R. C. and Lakshminyana, K. 1996. Relationship of *Azotobacter chroococcum* siderophores with nitrogen fixation. Folia Microbiology 41:154-158.
- 8.Tindale, A. E., Mehrotra, M., Ottem, D. and Page, W. J. 2000. Dual regulation of catechol siderophore biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* by iron and oxidative stress. Microbiology 146:1617-1626.
- 9.Verma, S., kumar, V., Narula N. and Merbach, W. 2001. Studies on in vitro production of antimicrobial substances by *Azotobacter chroococcum* isolates/mutants. Journal of Plants Diseases and Protection 108:152-165.

Pineapple Peel Fermented by *Azotobacter Beijerinckii* A13 to Develop Bio-fertilizer and Assessed Its Effect on The Growth of *Brassica Chinensis* Linn

Shiuan-Yuh Chien, Ming-Huei Chang, Sue zeng Lin, Mei-Jean Chen, and Mei-Chien Lin
Agricultural Research Institute, Council of Agriculture

Abstract

Boiled pound pulpy of pineapple peel inoculated with *Azotobacter beijerinckii* A13 incubated under 25°C attained higher population and IAA concentration. Boiled pound pulpy of pineapple peel inoculated with the bacterial suspension at a ratio (v:w) of 1:100 and incubated under 25°C got higher nitrogen-fixing activity and IAA concentration than those of inoculated with the bacterial suspension at ratios of 1:500, 1:1000 and 1:5000. Pound pulpy of pineapple peel boiled and inoculated with *Azotobacter beijerinckii* A13 fermented with 21 days, the nitrogen-fixing activity was decreased and IAA concentration was increased with time. The population of *Azotobacter beijerinckii* A13, available and total nitrogen concentrations and IAA concentration of pound pulpy of pineapple peel boiled 30 minutes and inoculated with the bacterium were higher than those of pound pulpy of pineapple peel sterilized with 121°C and 1.1 atm condition and non-sterilized. The fresh and dry weights of *Brassica chinensis* Linn planted in pot soil applied with pound pulpy of pineapple peel boiled and fermented by the bacterium 21 days at ratios of 1:20, 1:10 and 1:5 were higher than those of *Brassica chinensis* Linn planted in pot soil applied with pound pulpy of pineapple peel boiled and added with soil suspension .

Key words: *Azotobacter beijerinckii*, Pineapple peel, Bio-fertilizer, Nitrogen-fixing activity, *Brassica chinensis* Linn.

-
1. Corresponding author.
 2. Researcher, Agricultural Chemistry Division, TARI, Taichung, Taiwan, ROC.
 3. Assistant Researcher, Agricultural Chemistry Division, TARI, Taichung, Taiwan, ROC.
 4. Assistant, Agricultural Chemistry Division, TARI, Taichung, Taiwan, ROC.