

放線菌應用於紅龍果廢棄枝條與羽毛轉化生成微生物肥料之研究¹

曾宥紘²、賴文龍³、郭雅紋²、陳鴻堂²

摘 要

本研究篩選具分解羽毛及溶磷能力之節桿菌放線菌菌株K10 (*Arthrobacter* sp. K10) 及有效分解紅龍果枝條之鏈黴菌放線菌菌株CP3 (*Streptomyces* sp. CP3)，以應用於紅龍果廢棄枝條及羽毛再利用。研究顯示菌株K10可以羽毛做為生長所需之碳氮源，培養於礦物鹽羽毛培養基中(BHF)至第4天，羽毛分解率為63.7%，將其培養於10% (w/v)紅龍果枝條塊及1% (w/v)羽毛培養基(PIF)，仍可有效分解羽毛，轉化生成銨離子及胺基酸，且分解液之電導度明顯增加，紅龍果枝條可做為菌株K10分解羽毛所需之養分，取代礦物鹽之功能。菌株K10具有溶解磷酸三鈣及磷礦石粉之功能，經培養於PIF培養基至第4天及第6天，其分解液菌數可達 10^8 cfu/ml以上，且具有溶磷活性。紅龍果枝條分解菌CP3具有分解纖維及果膠能力，可有效分解紅龍果枝條，經由混合接種菌株K10，可增加分解紅龍果枝條及羽毛之效能，其分解液含有多種胺基酸，並以含硫胺基酸含量最多，具有相對易分解高氮養分特性，可使用於補充作物所需氮肥，並經由溶磷能力之菌株K10來提高土壤有效性磷含量，達成廢棄資材加值再利用。

關鍵字：放線菌、紅龍果枝條、羽毛分解、溶磷菌

前 言

紅龍果(*Hylocereus* spp.)因栽培繁殖容易且可多批次產果，產量高，因而促使農民廣泛種植，其栽培面積的增加，將於冬季枝條修剪時期，產生大量廢棄枝條，此廢棄枝條若棄置於田間則易產生耕作困擾及環境問題，因此若能加值利用紅龍果廢棄枝條資源化，則有助於廢棄枝條再利用。此外仙人掌植物枝條中鉀及鈣含量豐，而鈉含量低⁽²¹⁾，具有作為有機高鉀資材應用潛力。

氮為作物生長所需，有機栽培常以海鳥糞或豆粕做為氮肥補充，然而因價格高昂，羽毛可做為替代氮源，提供作物所需氮素⁽¹³⁾，然而因羽毛角蛋白質含量豐且其雙硫鍵多結構緊密，因此不易分解，無法快速釋放氮素供作物利用，另應用於飼料添加之研究指出，以高溫

¹ 行政院農業委員會臺中區農業改良場研究報告第 0862 號。

² 行政院農業委員會臺中區農業改良場助理研究員。

³ 行政院農業委員會臺中區農業改良場副研究員。

高壓處理羽毛以作為飼料添加，常因胺基酸結構破壞，如methionine、lysine及tryptophan易受破壞，而導致其作為飼料添加之營養價值減損⁽³²⁾。微生物轉換羽毛廢棄物將可避免胺基酸遭破壞，可提高飼料添加之價值或作為相對速效之氮質肥料施用^(5,8,11,13,18,22)。

磷為作物生長所需之必要元素，然因磷肥施用至土壤後易導致磷酸鈣、磷酸鋁及磷酸鐵沉澱而降低磷之植物有效性^(2,31)，若因磷之植物有效性低而大量施用磷肥，則會導致施肥成本增加且造成環境汙染⁽²⁷⁾。溶磷菌可經由產酸、鉗合及氧化還原等作用而溶解難溶性磷^(9,10)。近來由於肥料價格高漲及其他產業對磷礦的需求增加，如食物防腐添加、殺真菌劑應用、製陶業、冶金業等，使得高品質磷礦分配至農業應用的機會降低，因此以溶磷菌進行土壤磷之溶出以提高作物利用率，有利於達農業之永續發展⁽¹²⁾。

本研究將篩選具溶磷能力之羽毛分解菌及紅龍果枝條分解菌，並利用紅龍果廢棄枝條及羽毛之養分放大培養菌株，以達到農業廢棄物再利用及其做為溶磷微生物肥料開發之研究，以達到土壤氮源補充、增加磷肥有效性及加值利用紅龍果廢棄枝條及羽毛三大優點。

材料與方法

具溶磷能力之羽毛分解菌株及紅龍果廢棄枝條分解菌株之篩選

本研究自本場採取玉米肥料試驗田區之土壤，添加10 g於95 mL含有1%雞羽毛(取自興中台股份有限公司)、10%紅龍果廢棄枝條(取自本場紅龍果試驗田區)及0.5%磷酸三鈣(Calcium phosphate tribasic, KATAYAMA)之去離子水中，經室溫培養5天後以十倍連續稀釋塗抹於BHF(1%羽毛, w/v)固態培養基中，BHF培養基為參考BH基本礦物鹽培養基⁽⁷⁾，並經修改其配方為每1L去離子水含有1 g磷酸氫二鉀、1 g磷酸二氫鉀、0.2 g硫酸鎂(含7個結晶水)及0.02 g氯化鈣並添加1% (w/v)之羽毛。本研究之羽毛先經由刀片切割機切割約20秒後備用。經培養3~5天後，進行純化培養並挑選單一菌落接種至液態磷酸三鈣或磷礦石粉(Rock-P, CCM FERTILIZER Sdn Bhd)培養基，經培養4天後以鉬藍法⁽³⁴⁾進行水溶性磷含量分析，以篩選溶磷菌株並分析其溶磷量。磷酸三鈣培養基及磷礦石粉培養基之配方參照肥料檢驗方法(方法編號AFS3183-1)並修改為添加5 g/L磷酸三鈣或磷礦石粉。接種篩選之溶磷菌株單一菌落至BHF液態培養基中，於室溫培養4天後觀察羽毛分解狀況，以篩選出具溶磷能力之羽毛分解菌。

上述經振盪培養5天之土壤懸浮液，取1 mL添加於50 mL之10% (w/v)紅龍果廢棄枝條液態培養基中，經室溫110 rpm振盪培養3天後，以十倍連續稀釋塗抹於紅龍果廢棄枝條固態培養基中，室溫培養3天後，經純化並挑選單一菌落接種至含10% (w/v)紅龍果廢棄枝條之液態培養基中，於室溫培養3天後，觀察枝條分解狀況，以篩選紅龍果枝條分解菌。紅龍果廢棄枝條先切成長寬約0.5~1 cm後備用。紅龍果廢棄枝條培養基，其配製為添加已切成長寬約0.5~1 cm之紅龍果廢棄枝條塊(10% w/v)於50 mL去離子水中。上述培養基以高溫高壓滅菌20分鐘後備用。固態培養基配製則添加17 g/L洋菜膠。

篩選之菌株16S rDNA基因序列分析

篩選菌株接種於5 mL NB (nutrient broth, Difco)培養基中，於室溫培養24小時後，以MO BIO公司之商業套組(UltraClean™ Microbial Genomic DNA isolation Kit, MO BIO Laboratories, INC., USA)進行細菌DNA萃取。抽取之DNA以引子1F (5' GAG TTT GAT CAT GGC TCA G 3')及9R (5' AAG GAG GTG ATC CAA CCG CA 3')^(14,29)進行PCR以放大16S rDNA。委外進行定序分析，取得序列後於GenBank (NCBI)進行序列比對，以初步確認篩選菌株之菌屬。

菌株分解纖維素及果膠能力測試

本研究參照前人研究研究方法，配製纖維素分解⁽²⁰⁾及果膠分解⁽¹⁾測試平板培養基，菌株具有纖維素分解能力，經剛果紅染色後於培養基中呈現透明圈環。果膠分解測試培養基因剛果紅於配製培養基時已添加，因此菌株具有果膠分解能力，可於培養基中直接觀察到透明圈環。

紅龍果廢棄枝條分解率及分解液之pH、EC、元素養分及菌落數分析

本研究接種篩選菌株之單一菌落於50 ml紅龍果廢棄枝條(10% w/v)培養基中，於室溫(約30°C)及110 rpm震盪培養3天後，以10倍連續稀釋法，取樣100 µl塗抹於NB固態培養基中，培養3天後計算菌落數。另其培養液經預先以70°C烘乾至恆重之Whatman No. 1濾紙過濾後，其濾液以電極分析pH及EC，銨態氮及全氮以微量擴散法測定⁽¹⁶⁾，鉀以火焰光度計測定(Sherwood flam photometer 410)，磷以鉬藍法測定⁽³⁴⁾而鈣及鎂則用原子吸收光譜儀(Hitachi Polarized Zeeman Atomic absorption spectrophotometer Z-5000)分析。濾紙上殘留紅龍果枝條經70°C烘乾至恆重後秤重，經與對照處理(未接菌之紅龍果廢棄枝條培養基)之殘留重量比較後，計算紅龍果枝條分解率。以上處理皆以3重複進行試驗。統計分析以Least Significance difference (LSD)法進行比較，表三中相同字母表示彼此間無顯著差異(p=0.05)。

紅龍果廢棄枝條及羽毛分解液之pH、EC、元素養分及菌落數分析

本研究配製紅龍果廢棄枝條羽毛培養基，為添加1% (w/v)羽毛於10% (w/v)紅龍果廢棄枝條培養基中經滅菌後，接種單一菌落於此50 ml培養基中，於室溫(約30°C)及110 rpm震盪培養4天後及6天後，分析分解液之菌落數、pH、EC、銨離子、全氮、磷、鉀、鈣及鎂含量，其分析方法如前所述。以上處理皆以3重複進行試驗。統計分析以Least Significance difference (LSD)法進行比較，表四中相同字母表示彼此間無顯著差異(p=0.05)。

紅龍果廢棄枝條分解液及紅龍果廢棄枝條與羽毛分解菌液之溶磷量分析

本研究接種單一菌落於紅龍果廢棄枝條培養基中，經培養3天後，以分解液進行溶磷活性分析。另接種單一菌落於紅龍果廢棄枝條及羽毛培養基中，經培養4天後，以分解液進行溶磷活性分析。溶磷活性分析為取100 µl分解液至50 ml磷酸三鈣或磷礦石粉培養基中，對照組添加100 µl未接菌之培養基，經培養4天後，以鉬藍法分析可溶性磷含量。培養基配製參照肥料檢驗方法(方法編號AFS3183-1)為添加5 g/L磷酸三鈣或磷礦石粉。以上處理皆以3重複進行

試驗。統計分析以Least Significance difference (LSD)法進行比較，表中相同字母表示彼此間無顯著差異($p=0.05$)。

紅龍果廢棄枝條及羽毛分解液之游離胺基酸分析

本研究接種單一菌落於紅龍果廢棄枝條羽毛培養基經培養4天後，進行游離胺基酸分析，以瞭解篩選菌株之羽毛分解特性及其做為其他應用之參考，本研究委由嘉義大學檢驗分析及技術推廣服務中心進行分析。

結果與討論

具溶磷能力之羽毛分解菌株及紅龍果枝條分解菌株之篩選及16S rDNA基因序列分析

本研究篩選具溶磷能力之羽毛分解菌株K10，經接種並培養於含有磷酸三鈣或磷礦石粉培養基中至第4天，可溶性磷含量分別為 64.46 ± 6.95 mg/L及 4.4 ± 0.9 mg/L，具有溶磷能力。另將其培養於以羽毛為單一碳及氮源之礦物鹽培養基中(BHF)第4天，其羽毛轉化為水溶性且其分解率與菌數明顯增加(表一)，且羽毛分解液之pH、EC、銨離子，全氮及磷含量明顯增加，而鉀、鈣及鎂含量則些微減少(表一)，顯示羽毛可作為菌株K10生長所需之碳氮源，經分解後釋出養分離子而使EC值明顯增加，其中以銨離子含量的增加最為顯著，推測為角蛋白酶(keratinase)及脫銨酶(deaminase)的作用所致。本研究篩選紅龍果枝條分解菌株CP3，以應用於紅龍果廢棄枝條再利用，篩選依據為菌株之單一菌落經接種於10% (w/v)液態紅龍果廢棄枝條培養基中，經培養3天後，紅龍果枝條塊已呈現分解，其型態由原本枝條塊轉換為小顆粒之型態。

表一、節桿菌菌株 K10 培養於 BHF 培養基第 4 天之元素養分含量、菌數及羽毛分解率

Table 1. The nutrient nutrient component bacterial number and feather degradation rate (%) after incubating with *Arthrobacter* strain K10 in BHF medium at the fourth day

Isolates	pH	EC (mS/cm)	NH ₄ ⁺ (mg/L)	Tot-N (%)	P (mg/L)	K (mg/L)	Ca (mg/L)	Mg (mg/L)	cfu×10 ⁸ /ml	Feather degradation rate (%)
K10	8.71 ±0.13(SD)	3.64 ±0.28	472.5 ±98.5	0.539 ±0.02	615.51 ±66.5	744.5 ±79.9	0.9 ±0.15	10.0 ±4.32	6.4 ±0.50	63.7 ±2.08
Blank	6.81 ±0.01	1.27 ±0.06	12 ±0.15	0.015 ±0.0006	419 ±1.88	747 ±1.00	1.6 ±0.0058	17.3 ±0.61	-	-

本研究篩選2菌株經16S rDNA定序，其中菌株K10序列長度為1,395 bp，而CP3序列長度為1,359 bp，經序列比對其結果顯示菌株K10為放線菌節桿菌屬，其與*Arthrobacter nicotinovorans* DSM420 type strain (NCBI accession number: NR_026194)相似度98%，與*Arthrobacter ureafaciens* strain NC (NCBI accession number: NR_029281)相似度98%。菌株CP3為鏈黴菌屬與*Streptomyces diastaticus* subsp. *ardesiacus* strain NRRL B-1773 (NCBI accession number: NR_043486)相似度為99%。初步確認篩選菌株為放線菌。

紅龍果廢棄枝條再利用

紅龍果廢棄枝條經烘乾磨粉後分析元素養分含量，其氮、磷、鉀、鈣、鎂含量分別為1.2、0.37、4.47、1.55及0.61%，而微量元素銅、錳、鋅、鐵含量則分別為10、90、51及30 mg/kg，顯示其枝條鉀含量最高其次為鈣及氮。

本研究為有效再利用紅龍果廢棄枝條，篩選紅龍果枝條分解菌株CP3，分別接種具溶磷能力之羽毛分解菌株K10及CP3於10% (w/v)紅龍果廢棄枝條培養基中，培養至第3天，接種菌株CP3之培養基中，可觀察到枝條分解跡象(圖一)，枝條分解率、菌數及溶磷能力如表二所示。紅龍果枝條分解液pH值明顯增加而EC值些微增加，菌株CP3之分解液中銨離子及全氮含量無顯著增加，而磷含量顯著降低，然而其鈣含量些微增加(表三)，推測為菌株以顆粒狀型態生長，過濾時菌體易殘留於濾紙上，因此過濾液中養分濃度較低，而其鈣離子含量的增加，推測為菌株CP3分解紅龍果枝條，並將果膠分解後，釋出鈣離子所致(表三)。前人研究分析仙人掌枝條養分含量，其中以水分及纖維含量較高，而脂肪及蛋白質含量低，其含量分別為水分90.1 g/100 g、脂肪0.3 g/100 g、碳水化合物5.6 g/100 g、蛋白質1.7 g/100 g而纖維為3.5 g/100 g，其中水溶性纖維果膠及黏液含量豐富⁽²¹⁾。紅龍果為仙人掌科植物，推測其枝條具有高纖維及高果膠含量，另本研究發現菌株CP3具有分解纖維素及果膠之能力(圖二)，而菌株K10則無纖維素分解能力，且果膠分解能力較菌株CP3差，其透明圈環較小且較不透明，此與菌株CP3紅龍果枝條分解率較菌株K10佳(表二)，並導致分解液鈣含量較高似有相關(表三)。菌株K10之分解液中銨離子及全氮含量顯著增加，顯示枝條有機氮分解並做為其生長所需，由於菌株K10具有分解羽毛能力，其所具有之蛋白質水解酶，將有助於氮的礦化，因此其分解液中銨離子含量較菌株CP3為高。而磷含量以接種菌株K10有明顯增加。接種菌株K10之分解液中鈣含量較對照組為低，且顯著低於菌株CP3，推測為此菌株分解紅龍果枝條能力較差所致。紅龍果枝條分解液，經由分析其菌落數及溶磷量(表二)，顯示菌株K10符合微生物肥料之菌數及溶磷活性要求，然而紅龍果枝條分解液之養分含量低，作為液肥施用較果有限，因此若額外添加營養源以提高肥分，則其分解液將具有更廣泛應用性。



圖一、鏈黴菌菌株 CP3 有效分解紅龍果枝條(10%) (圖左)，右圖為對照組
Fig. 1. Degradation of pitaya cladode by *streptomyces* sp. CP3 (left) and control (right)

表二、節桿菌菌株 K10 及鏈黴菌菌株 CP3 培養於 10%紅龍果枝條培養基至第 3 天，菌數、枝條分解率及磷酸三鈣與磷礦石粉溶解量

Table 2. The bacterial number, pitaya cladode degradation rate (%) and phosphorous released amounts from Ca-P and rock-P of pitaya cladode hydrolysates by incubating *Arthrobacter* sp. strain K10 and *Streptomyces* sp. CP3 in 10% pitaya cladode medium at the third day

Isolates	Bacterial number (cfu×10 ⁸ /ml)	Pitaya cladode degradation rate (%)	Ca-P ¹ solubilization (mg/L)	Rock-P ¹ solubilization (mg/L)
K10	6.4±1.9(SD)	12.1±4.0	29.7±7.84	3.04±0.092
CP3	0.135±0.025	20.9±5.4	-	-

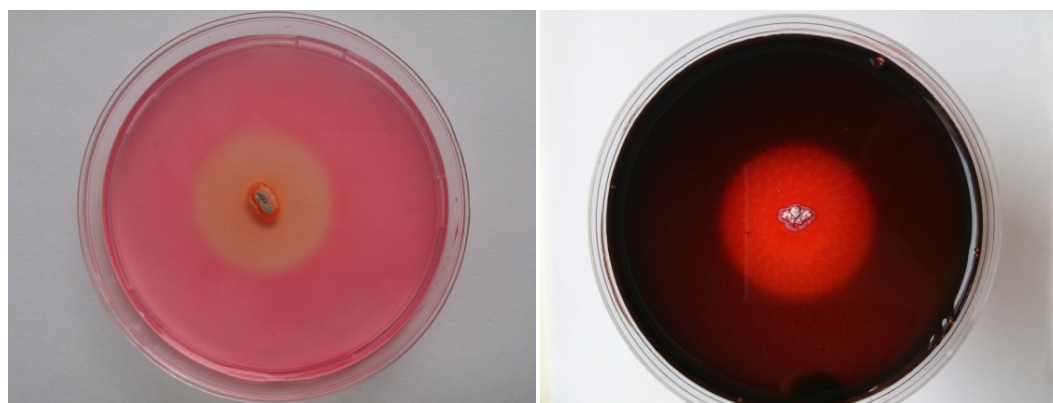
¹ Determination of phosphate solubilization by adding 100 µL pitaya cladode lysates to 50 mL phosphate medium and incubation four days.

表三、節桿菌菌株 K10 及鏈黴菌菌株 CP3 培養於 10%紅龍果枝條培養基至第 3 天，pH、EC 及元素養分含量分析

Table 3. The pH, EC and nutrient component of pitaya cladode hydrolysates by incubating *Arthrobacter* sp. strain K10 and *Streptomyces* sp. CP3 in 10% pitaya cladode medium at the third day

Isolates	pH	EC (mS/cm)	NH ₄ ⁺ (mg/L)	Tot-N (%)	P (mg/L)	K (mg/L)	Ca (mg/L)	Mg (mg/L)
K10	8.07a ¹	1.24a	32.5a	0.036a	73.4a	389.2a	6.53b	29.6a
CP3	7.88b	1.25a	5.8b	0.015b	5.6b	364.0a	21.83a	33.3a
Blank	5.52c	1.08b	10.0b	0.016b	75.3a	339.6a	18.60a	42.6a

¹ Significant in comparison with control at P = 0.05 (LSD test).



圖二、平板測試鏈黴菌菌株 CP3 分解纖維(圖左)及果膠(圖右)能力(透明圈)

Fig. 2. Cellulose and pectin degradation (clean zone) by *Streptomyces* sp. CP3 in the plate test

微生物分解紅龍果廢棄枝條及羽毛之特性分析

本研究為有效利用紅龍果廢棄枝條之養分，額外添加氮源應可補足枝條氮含量低，微生物生長較緩慢之缺點，又為資源有效利用，因此選用家禽業廢棄物羽毛作為添加之營養源，使兩種廢棄物作為微生物生長能源，藉以評估作為微生物肥料開發及廢棄物再利用之效益。

本研究添加1%羽毛於10%紅龍果廢棄枝條培養基中，經培養具溶磷能力之羽毛分解菌K10及混合培養菌株K10+CP3培養4及6天，其分解液之銨離子及全氮含量相較對照組皆明顯增加(表四)，顯示紅龍果廢棄枝條中的養分可作為微生物初期分解羽毛所需，可取代微生物分解羽毛時所需額外添加之礦物鹽。經比較接種菌株K10之紅龍果枝條分解液(10% Pi)、礦物鹽羽毛分解液(BHF)及紅龍果枝條羽毛分解液(10% Pi+F)中銨離子含量(表一、表三及表四)，顯示於添加礦物鹽之培養基其釋放養分量較高，而紅龍果枝條之有機養分，需經微生物轉化分解等程序後，方才進行吸收利用，因此羽毛分解效能較慢，然而混合菌株K10+CP3之紅龍果枝條羽毛分解液中，銨離子含量為489 mg/L，與接種K10之礦物鹽羽毛分解液(BHF)相近，由此可知羽毛分解菌搭配有效分解紅龍果枝條之菌株，可提升羽毛分解轉化功效。經觀察混合菌株K10+CP3於紅龍果廢棄枝條羽毛培養基中的生長情形，發現菌株CP3附著於三角培養瓶管壁生長，而其分解紅龍果枝條所釋放之養分可供菌株K10利用並加速羽毛分解，其結果也顯現於混合菌株K10+CP3分解液經過濾後，殘留於濾紙上之羽毛及紅龍果枝條已呈現完全分解(圖三)，紅龍果枝條及羽毛共同分解率相較於K10單獨接種者約可增加10% (表五)。

菌株接種於紅龍果廢棄枝條羽毛培養基第4天，其分解液之銨離子及全氮含量較對照組明顯增加，磷及鎂含量較對照組為低，而鉀含量差異不大，鈣含量以K10+CP3有明顯增加，培養至第6天則其分解液之銨離子及全氮含量較第4天些微增加，磷含量相較第4天明顯下降，而鉀含量則些微下降，鈣及鎂含量些微變化(表四)，各處理中以混合菌株K10+CP3之銨離子、全氮、鈣及鎂含量最高。

表四、節桿菌菌株 K10 及鏈黴菌菌株 CP3 培養於 10%紅龍果枝條及 1%羽毛培養基至第 4 天及 6 天，分解液 pH、EC 及元素養分含量分析

Table 4. The pH, EC and nutrient component of pitaya cladode (10%) and feather (1%) hydrolysates by incubating *Arthrobacter* sp. strain K10 and *Streptomyces* sp. CP3 in PIF medium to the fourth and sixth day

Isolates	pH	EC	NH ₄ ⁺	Tot-N	P	K	Ca	Mg
incubation 4 day		(mS/cm)	(mg/L)	(%)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)
K10	8.54a ¹	2.77b	418.5b	0.44b	95.4c	403.3a	13.4b	6.6c
K10+CP3	8.54a	2.85a	489.0a	0.47a	133.5b	380.0a	24.1a	16.3b
Blank	5.91b	1.15c	32.0c	0.037c	195.0a	370.5a	16.5b	45.4a
Isolates	pH	EC	NH ₄ ⁺	Tot-N	P	K	Ca	Mg
incubation 6 day		(mS/cm)	(mg/L)	(%)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)
K10	8.68a	2.88a	515.5a	0.50b	32.3b	335.2a	15.5b	7.4b
K10+CP3	8.71a	2.98a	542.0a	0.54a	18.8c	359.0a	21.7a	10.8b
Blank	5.91b	1.15b	32b	0.037c	195.0a	370.5a	16.5b	45.4a

¹ Significant in comparison with control at P = 0.05 (LSD test).

混合菌株K10+CP3之紅龍果枝條及羽毛分解效能，顯然較單獨接種菌株K10為佳，推測菌株CP3並未與K10發生相剋作用而抑制彼此生長。本研究篩選之菌株K10及混合菌株

K10+CP3分解紅龍果枝條及羽毛之分解液，其菌數及溶磷活性皆符合溶磷菌微生物肥料之菌數及溶磷活性要求(表五)，另分解液之養分分析結果顯示，除作為微生物肥料之應用外，也可應用於生產液態有機質肥料，其中羽毛分解後之*oligopeptide*及胺基酸相較於羽毛粉，其氮肥利用率更高，而分解液之其他養分離子亦可為作物吸收利用，以補充作物對養分需求，及其作為溶磷微生物肥料施用以增加磷肥效益，而有助於農業廢棄物循環利用並兼顧其永續發展。



圖三、放線菌混合菌株 K10+CP3 培養於 PIF 培養基至第 4 天之過濾殘留物(圖左)，右圖為對照組
Fig. 3. The filtered residue of PIF medium by incubating actinobacteria strains K10 and CP3 to the fourth day (left), and the control (right)

表五、節桿菌菌株 K10 及鏈黴菌菌株 CP3 培養於 10%紅龍果枝條及 1%羽毛培養基至第 4 天及第 6 天，分解液菌數、枝條及羽毛分解率及磷酸三鈣與磷礦石粉溶解量

Table 5. The bacterial number, degradation rate (%) of pitaya cladode and feather, and phosphorous released amounts from Ca-P and rock-P of pitaya cladode and feather hydrolysates by incubating *Arthrobacter* sp. strain K10 and *Streptomyces* sp. CP3 in PIF medium to the fourth and sixth day

	Bacterial number (cfu×10 ⁹ /ml)	Pitaya cladode and feather degradation rate (%)	Ca-P ¹ solubilization (mg/L)	Rock-P ¹ solubilization (mg/L)
Isolates Incubation 4 day				
K10	1.12±0.11(SD)	24.50±6.4	73.17±1.8	7.085±0.39
K10+CP3	6.44±0.64	35.34±7.7	69.36±0.5	8.069±0.92
Isolates Incubation 6 day				
K10	2.14±0.09	31.01±3.1	70.90±10.7	5.624±0.68
K10+CP3	7.27±0.71	41.52±4.1	58.19±11.0	7.252±0.05

¹ Determination of phosphate solubilization by adding 100 µL pitaya cladode lysates to 50 mL phosphate medium and incubation four days.

紅龍果枝條及羽毛分解液之游離胺基酸分析

本研究分析紅龍果枝條及羽毛分解液之游離胺基酸(表六)，結果顯示菌株K10之分解液含有檢測之17種胺基酸，其中含量較高為cysteine及methionine，cysteine為羽毛角蛋白質雙硫鍵之組成分，羽毛分解過程中將釋出此胺基酸，因此其含量較高。菌株K10之分解液中動物必需胺基酸由高而低分別為methionine、valine、leucine、arginine、phenylalanine、isoleucine、lysine及threonine。接種混合菌株K10+CP3則其分解液之游離胺基酸除aspartic acid及cysteine含量較單獨接種K10者為低，其他15種胺基酸含量皆較高，其中必需胺基酸增加顯著，如valine增加9.84 ppm、leucine增加9.5 ppm、phenylalanine增加4.49 ppm及arginine增加3.91 ppm。結果顯示混合菌株K10+CP3可更有效分解紅龍果枝條及羽毛而轉化生成較多游離胺基酸。

表六、接種菌株 K10 及 K10+CP3 於紅龍果枝條與羽毛培養基至第 4 天其分解液之游離胺基酸含量分析

Table 6. The contents of free amino acids in the pitaya cladode and feather hydrolysates by inoculating the strain K10 and K10+CP3 (incubation 4 days)

Amino acid (AA)	AA contents (µg/g) by inoculated strain K10	AA contents (µg/g) by inoculated strain K10+CP3
Aspartic acid	1.84	1.77
Glutamic acid	3.55	8.00
Serine	1.06	10.37
Histidine	0.55	1.05
Glycine	4.41	4.94
Threonine	0.48	2.06
Arginine	3.14	7.05
Alanine	10.48	15.95
Tyrosine	0.93	4.86
Cysteine	102.45	85.33
Valine	14.05	23.89
Methionine	70.70	72.63
Phenylalanine	3.07	7.56
Isoleucine	0.98	1.14
Leucine	4.86	14.36
Lysine	0.94	2.11
Proline	1.19	1.92

前人研究提及羽毛粉做為飼料添加，由於其動物消化率低且缺乏動物必需胺基酸如methionine、lysine、histidine及tryptophan等，而降低其在飼料添加之價值⁽⁴⁾。雖可以水浴加熱法處理羽毛粉以增加動物可消化之胺基酸含量，然而處理過程會導致必需胺基酸的破壞如lysine、methionine及tryptophan等^(19,32)，若以高溫高壓法處理羽毛雖可破壞羽毛角蛋白之結構，並提高動物對其消化率，然而此過程會轉化生成alanine及lanthionine，造成胺基酸養分不

均而需額外添加必需胺基酸⁽⁵⁾。因此以生物轉化羽毛以提高其可消化胺基酸含量，並保有許多必需胺基酸，可做為高營養價值之飼料添加。而羽毛經由細菌分解後，做為飼料添加其養分效果與大豆粕相近⁽³⁵⁾，顯示羽毛經微生物分解後，可提高羽毛作為飼料添加之價值。另在飼料配方研究上提及含硫胺基酸如cysteine及methionine對幼雛動物生長而言是十分重要的營養源^(25,30,36)。而本研究發現篩選菌株之紅龍果枝條及羽毛分解液中，methionine及cysteine含量豐富，可做為未來飼料添加之效益評估及應用。

飼料配方為考量經濟效益，有研究指出使用低蛋白質飼料並添加合成胺基酸為一可行方法^(3,17,24)，且其飼料利用率較高蛋白質飼料更佳^(6,23)，如低蛋白質飼料添加lysine及methionine可增加雞蛋重量^(3,15,17,26,28)。另外於飼料中添加蛋白酶亦可增加其胺基酸之利用率⁽³³⁾，本研究之羽毛分解液，可應用於飼料添加，而菌體本身可做為蛋白質來源，菌體分泌之角蛋白酶或可提高胺基酸利用率，皆有做為飼料應用之潛力。

參考文獻

1. Akbar, S. and R. G. Prasuna. 2012. Exploitation of fruit wastes for pectinase production using *Aspergillus oryzae*. Int. J. Pharm. Bio. Sci. 3: 756-765.
2. Alam, M. M. and J. K. Ladha. 2004. Optimizing phosphorus fertilization in an intensive vegetable-rice cropping system. Biol. Fertil. Soils 40: 277-283.
3. Ayupov, F. G. 1985. Effect of supplementary lysine and asparatic acid on anabolic processes in hens under stress. Sbornik Nauchnykh Trudov 31: 106-109.
4. Baker, D. H., R. C. Blitenthal, K. P. Boebel, G. L. Czarnecki, L. L. Southern and G. M. Willis. 1981. Protein-amino acid evaluation of steam-processed feather meal. Poult. Sci. 60: 1865-1872.
5. Bertsch, A. and N. Coello. 2005. A biotechnological process for treatment and recycling poultry feathers as a feed ingredient. Bioresour. Technol. 96: 1703-1780.
6. Blair, R., J. P. Jacob, S. Ibrahim and P. A. Wang. 1999. Quantative asses of reduced-protein diets and supplements to improve nitrogen utilize. J. Applied Poult. Res. 8: 25-47.
7. Bushnell, L. D. and H. F. Haas. 1941. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. J. Bacteriol. 41: 653-73.
8. Choi, J. M. and P. V. Nelson. 1996. Developing a slow-release nitrogen fertilizer from organic sources: II. Using poultry feathers. J Am Soc Hort Sci 121: 634-638.
9. Chung, H., M. Park, M. Madhaiyan, S. Seshadri, J. Song, H. Cho and T. Sa. 2005. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea. Soil. Boil. Biochem. 37: 1970-1974.
10. Gulati, A., N. Sharma, P. Vyas, S. Sood, P. Rahi, V. Pathania and R. Prasad. 2010. Organic acid production and plant growth promotion as a function of phosphate solubilization by *Acinetobacter*

- rhizosphaerae* strain BIHB 723 isolated from the cold deserts of the trans-Himalayas. Arch. Microbiol. 192: 975-983.
11. Gupta, R. and P. Ramnani. 2006. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. Appl. Microbiol. Biotechnol. 70: 21-33.
 12. Gyaneshwar, P., G. Naresh Kumar, L. J. Parekh and P. S. Poole. 2002. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. Plant Soil 245: 83-93.
 13. Hadas, A. and L. Kautsky. 1994. Feather meal, a semi-slow-release nitrogen fertilizer for organic farming. Fertil. Res. 38: 165-70.
 14. Kämpfer, P., U. Dreyer, A. Neef, W. Dott and H. J. Busse. 2003. *Chryseobacterium defluvii* sp. nov., isolated from wastewater. Int J Syst Evol Microbiol 53: 93-97.
 15. Karunajeswa, H., S. Abu-Serewa, S. H. Thorn and P. Eason. 1987. The effect of dietary level of sunflower seeds and lysine on egg quality and laying performance of white leghorn hens. J. Sci. Food Agric. 41: 325-332.
 16. Keeney, D. R. and D. W. Nelson. 1982. Nitrogen-Inorganic Form. In: Page A. L., R. H. Miller and D. R. Keeney. (eds.). Methods of Soil Analysis, Part 2, 2nd edition. ASA, Madison, Wisconsin, pp.659-663.
 17. Keshawar, K. and M. E. Jackson. 1992. Performance of growing pullets and laying hens fed low protein, amino acid supplemented diets. Poult. Sci. 71: 905-918.
 18. Kim, J. M., Y. M. Choi and H. J. Suh. 2005. Preparation of feather digests as fertilizer with *Bacillus Pumilus* KHS-1. J. Microbiol. Biotech. 15: 472-476.
 19. Latshaw, J. D., N. Musharf and R. Retrum. 1994. Processing of feather to maximize its nutritional value for poultry. Anim. Feed Sci. Technol. 47: 179-188.
 20. Magnelli, P. E., A. Martinez and O. A. Mercuri. 1997. Simple method for determining cellulolytic activity in fungi. Rev. Argent. Microbiol. 29: 210-214.
 21. Munoz de Chavez, M., A. Chavez, V. Valles and J. A. Roldan. 1995. The nopal: a plant of manifold qualities. World Rev. Nutr. Diet. 77: 109-134.
 22. Onifade, A. A., N. A. Al-Sane, A. A. Al-Musallam and S. Al-Zarban. 1998. A review: potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. Bioresour. Technol. 66: 1-11.
 23. Parr, J. F. and J. D. Summers. 1991. The effect of minimizing amino acid excesses in broiler diets. Poult. Sci. 70: 1540-1549.

24. Pens, A. M. and L. S. Jensen. 1991. Influence of protein concentration, amino acid supplementation and daily time of access to high or low protein diets on egg weight and components in laying hens. *Poult. Sci.* 70: 2460-2466.
25. Pinto, R., A. S. Ferreira, J. L. Donzele, L. F. T. Albino, M. de Almeida e Silva, R. de Soares and C. A. Pereira. 2003. Methionine plus cystine requirement for growing japanese quails. *Rev. Bras. Zootech.* 32: 1174-1181.
26. Prochaska, J. F. and D. J. Shafer. 1996. The effect of L-lysine intake on egg component yield and composition in laying hens. *Poult. Sci.* 75: 1268-1277.
27. Reddy, M. S., S. Kumar, K. Babita and M. S. Reddy. 2002. Biosolubilization of poorly soluble rock phosphates by *Aspergillus tubingensis* and *Aspergillus niger*. *Bioresour. Technol.* 84: 187-189.
28. Revingion, W. H., E. T. Moran and G. R. McDaniel. 1991. Performance of broiler breeder males given low protein feed. *Poult. Sci.* 70: 139-145.
29. Shen, F. T., P. Kämpfer, C. C. Young, W. A. Lai, and A. B. Arun. 2005. *Chryseobacterium taichungense* sp. nov., isolated from contaminated soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 55: 1301-1304.
30. Silva Junior, R. G. C., G. R. Q. Lana, C. B. V. Rabello, S. R. V. Lana and W. A. Barboza. 2006. Requirements of methionine plus cystine for female broilers chickens from 1 to 21 and 42 days old on tropical climate region. *Rev. Bras. Zootech.* 35: 497-503.
31. Vassilev, N. and M. Vassileva. 2003. Biotechnological solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61: 435-440.
32. Wang, X. and C. M. Parsons. 1997. Effect of processing systems on protein quality of feather meals and hog hair meals. *Poultry Sci.* 76: 491-496.
33. Wang, J. J., J. D. Garlich and J. C. H. Shih. 2006. Beneficial effects of Versazyme, a keratinase feed additive, on body weight, feed conversion, and breast yield of broiler chickens. *J. Appl. Poult. Res.* 15: 544-550.
34. Watanabe, F. S. and S. R. Olsen. 1965. Test of an ascorbic acid method for determining phosphorous in water and NaHCO₃ extracts from soil. *Soil. Sci. Soc. Am. J.* 29: 677-678.
35. Williams, C. M., G. G. Lee, J. D. Garlich and J. C. H. Shih. 1991. Evaluation of a bacterial feather fermentation product, featherlysate, as a feed protein. *Poultry Sci.* 70: 85-94.
36. Zhan, X. A., J. X. Li, Z. R. Xu and R. Q. Zhao. 2005. Effects of methionine and betaine supplementation on growth performance, carcass composition and metabolism of lipids in male broilers. *Brit. Poultry Sci.* 47: 576-580.

Application of Actinobacteria on Development of Biofertilizer with Utilization of Wasted Pitaya Cladode and Feather ¹

You-Hong Zeng², Wen-Lung Lay³, Ya-Wen Kuo² and Hong-Tang Chen²

ABSTRACT

In order to recycle using wasted pitaya cladode and feather, the bacterium isolated as *Streptomyces* strain CP3 can efficiently degrade pitaya cladode and the bacterium isolated as *Arthrobacter* strain K10 had dual functions including feather degradation and phosphate solubilization. Feather used as the sole carbon and nitrogen source for strain K10, the feather degradation rate was 63.7% after incubating in medium contained mineral salts and feather (BHF medium) added to the 4th day. Feather can also be efficiently degraded by incubating strain K10 in 10% (w/v) pitaya cladode and 1% (w/v) feather medium (PIF medium), in which more ammonium ion and amino acids was producing to combine with EC value increase in the feather hydrolysates. The results showed that the nutrients in pitaya cladode substitute minerals during feather degradation. At 4th and 6th day of incubating strain K10 in PIF medium, the bacterial numbers in feather hydrolysates were more than 10⁸ cfu/ml and were able to solublize calcium phosphate and rock phosphate. Cellulose and pectin-degrading *Streptomyces* strain CP3 can be used to increase degradation efficiency of pitaya cladode and feather by co-inoculating the strain K10 in the PIF medium, among the various amino acids produced, the concentration of sulfuric amino acids were higher. The inoculation of CP3 and K10 can be applied as relatively fast-released nitrogen fertilizer and enhancement of soil phosphorous bioavailability for value-added in the wasted pitaya cladode and feather reutilization.

Keywords: Actinobacteria, pitaya cladode, feather degradation, phosphate-solubilizing bacteria

¹ Contribution No. 0862 from Taichung DARES, COA.

² Assistant soil scientist of Taichung DARES, COA.

³ Associate soil scientist of Taichung DARES, COA.