

拮抗細菌 Tcb43 菌株之鑑定、抗菌圖譜測定及 抗生物質分析¹

郭建志、張世杰、廖君達²

摘 要

本研究自有機田區之土壤分離的有益微生物Tcb43菌株，經由分子生物技術鑑定為液化澱粉芽孢桿菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)，檢視其菌落形態與市售其他液化澱粉芽孢桿菌具有差異，進一步經由培養基測定顯示Tcb43菌株具有澱粉、脂質、纖維素及蛋白質等4種分解酵素活性。此外，分析其對植物病原拮抗能力的結果顯示，對胡瓜炭疽病、胡瓜褐斑病、胡瓜蔓枯病、胡瓜萎凋病、辣椒炭疽病、葡萄晚腐病、洋香瓜黑點根腐病之病原菌生長有優異的抑制能力。接著利用Tcb43菌株200倍稀釋發酵液進行測試，展現出胡瓜、甜瓜及甜豌豆白粉病菌之分生孢子發芽優異的抑制能力，抑制率分別可達98.25%、85.96%及93.96%以上。分析Tcb43發酵液成分，結果顯示Tcb43發酵液成分中具有伊枯草桿菌素(Iturin A)、表面素(Surfactin)及豐原素(Fengycin)等抗生物質及多種異構物(isoforms)產生。由上述結果說明顯示，Tcb43菌株具有抑制病原菌之能力，具有研發成為微生物農藥的潛力。

關鍵詞：芽孢桿菌、抗生物質、微生物農藥

前 言

由於臺灣地處熱帶與亞熱帶區域，氣候溫暖多濕，易衍生出多種的病蟲害相，農友與栽培業者一般依賴化學藥劑進行病蟲害管理，長期施用的結果會造成許多問題，包括土壤劣化、農產品農藥殘留過量、病蟲抗藥性增加及對人體與生態環境的破壞等負面影響⁽⁴⁾，加上國內消費者對農產品的安全意識提高及重視生態環境的維護。因此，現階段開發生物農藥為國內農業試驗單位研究在面對病蟲害防治的重要課題之一。

國外在微生物農藥研究方面，以芽孢桿菌屬(*Bacillus* spp.)的研究最多，包括枯草桿菌(*B. subtilis*)、液化澱粉芽孢桿菌(*B. amyloliquefaciens*)及蕈狀芽孢桿菌(*B. mycoides*)等⁽¹⁰⁾。以往利用傳統16S核糖體RNA(16 rRNA)針對枯草桿菌群菌種進行序列增幅與比對，其基因序列相似性高達98.1~99.8%，對於醣類的代謝與生理生化反應等特徵極為相似，不易將此群中的芽

¹ 行政院農業委員會臺中區農業改良場研究報告第 0975 號。

² 行政院農業委員會臺中區農業改良場副研究員、研究助理、副研究員。

孢桿菌進行鑑定與區分^(1,29)。現階段學者常利用DNA旋轉酶(DNA gyrase)，DNA gyrase是由subunit A (GyrA)與subunit B (GyrB)蛋白所組成，分別由gyrA與gyrB gene所轉錄⁽²⁸⁾。利用gyrB基因進行定序，用以鑑別枯草桿菌群中相關菌種，其序列相似性介於75.4%~95%，可將液化澱粉芽孢桿菌、枯草桿菌、地衣芽孢桿菌(*B. licheniformis*)及短小芽孢桿菌(*B. pumilus*)等4株形態特徵相當接近的芽孢桿菌進行區分^(1,2)。

芽孢桿菌屬細菌在病害防治上的機制，是以多重作用機制的呈現，包含利用族群優勢與病原菌競爭養分與空間、可產生抗生物質(antibiotics)抑制病原菌的生長、產生多種分解酵素、產生複合揮發性物質抑制病原菌之生長、促進植物的生長及誘導植物產生抗病反應等作用^(10,18)。芽孢桿菌屬細菌於發酵培養過程中會產生許多種不同的二次代謝物，其中包含aminoglycosides、 β -lactams、polyketides和small polypeptides等，不同的代謝物質可對不同的病原菌產生抑制作用⁽¹¹⁾。芽孢桿菌所產生的脂肽類化合物(lipopeptides)中，研究最多的為伊枯草菌素(iturin)、表面素(surfactin)與豐原素(fengycin)。目前在已知的iturins group中，iturin A為最重要與研究最多之物質⁽²¹⁾。Iturin A其為一種抗真菌脂肽，此類化合物會與病原真菌細胞膜的固醇分子作用形成複合物，使得離子傳導孔隙增大，改變細胞膜的滲透性，使得鉀離子迅速流出，進而導致病原真菌菌絲分解並抑制孢子發芽，達到防治病害的效果^(5,6,19)。表面素(surfactin)為一種由芽孢桿菌屬之細菌所產生的脂肽類生物界面活性劑，具有多種異構物(isoforms)，如surfactin A、B及C，一般發現較易出現在菌體醱酵液的泡沫中，除具有一般化學界面活性劑的功能外，亦具有抗病毒、抗菌等用途^(12,13,20)。豐原素為一種由芽孢桿菌屬之細菌所產生之脂肽類真菌抗生素，結構是由脂肪酸與肽所組成，最早由Loeffler等人(1986)所發現，後續發現所培養之上清液對立枯絲核菌(*Rhizoctonia solani*)具有抑制生長效果⁽¹⁵⁾。豐原素與表面素相同，亦具有生物界面活性劑之功能⁽²²⁾。文獻報告指出某些芽孢桿菌所產生之表面素與豐原素等lipopeptides，參與了誘導系統抗病性(Induced systemic resistance, ISR)的反應，可以誘導植物產生抗性及促進植物生長之功效^(17,29,30)。這些抗生物質除可直接抑制多種植物病原菌菌絲及細胞生長外⁽¹¹⁾。部分*Bacillus spp.*菌株亦可誘發系統性後天抗病(systemic acquired resistance, SAR)，以及誘發作物組織中水楊酸及茉莉香酸合成PR-protein與茉莉香酸(jasmonic acid, JA)，藉以抵抗病原菌的入侵⁽⁷⁾。Laura等人(2013)研究*B.subtilis* UMAF6639先處理胡瓜葉片後，可以激發茉莉香酸與過氧化物質(reactive oxygen species, ROS)的大量產生，並活化誘導性系統抗病(induced systemic resistance, ISR)^(14,23,24)。以上說明芽孢桿菌屬細菌所產生之抗生物質與胞外分解酵素，對病原菌抗菌是屬於多重機制協力作用，相較於化學農藥針對單一作用點的防治，不易產生抗藥性，且對環境友善、降低病害及作物生長皆有正面效果⁽⁵⁾。

本研究進行有益拮抗微生物之篩選、鑑定、抗菌圖譜及抗生物質分析，探討Tcb43菌株對瓜類病害防治潛力，供後續應用此菌株所發展之微生物農藥於病害防治的基礎資料。

材料與方法

一、有益微生物之鑑定

本研究供試拮抗微生物菌株，係自本場有機田區土壤中篩選出之芽孢桿菌Tcb43菌株，將此菌株自20%甘油保存管中，利用移植環純化於NA培養基上，待菌落長出後，再純化1次，之後刮取單一菌落於5 mL LB broth中，置於30°C定溫箱中，無光照處理，以125 rpm轉速震盪培養24 hr後，利用「Tissue & cell Genomic DNA Purification Kit」抽取其核酸DNA。接著進行16S rRNA、*gyrB*核酸序列增幅，利用16S rRNA引子對27F/1492R與fD1/rD1⁽⁸⁾，所添加之引子濃度約5 μM，分別加入PCR各反應物，總反應體積20 μl，進行PCR反應。反應條件增幅核酸序列之條件為：94°C反應5 min，接著依序以94°C反應30 sec，57°C反應45 sec，72°C反應1min 30 sec，以上步驟共重複30個循環，最後再以72°C反應7 min，預期產物長度約1,400-1,500 bp。此外，*gyrB* gene序列參考Wang與Yamamoto等人(2007, 1995)所研發之引子對*gyrB*-41F與*gyrB*-44R^(28,29)，所添加之引子濃度約10 μM，分別加入PCR各反應物，總反應體積20 μl，進行PCR反應。反應條件為：95°C反應5 min，接著依序95°C反應60 sec、55°C反應60 sec，72°C反應1 min 30 sec，以上共重複30個循環，最後再進行72°C反應10 min，預期產物長度為1,200 bp⁽³⁰⁾。所得之專一性片段委由源資國際生物科技股份有限公司進行定序，所得序列再透過網際網路送至National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)，以BLAST 2.0之程式進行網路基因庫進行比對⁽²⁶⁾，鑑定其菌種學名。

二、分子親緣性分析

取得Tcb43菌株之16S-rRNA及*gyrB*基因之序列，分別以MEGA 7軟體將*Bacillus*屬之模式細菌序列進行排序，以近鄰結合法(Neighbour-joining method, NJ)及最大似法maximum-composite-likelihood模組進行基因庫中各*Bacillus*屬細菌16S-rRNA及*gyrB*序列進行系統親緣性分析。

三、拮抗細菌Tcb43功能性與抗菌圖譜分析

(一)微生物菌株酵素分解能力測定

本試驗配製測試澱粉酶(amylase)、脂肪分解酶(lipase)、蛋白酶(protease)及纖維素酶(cellulase)活性之培養基^(9,16,25,27)，將測試菌株以移植環沾取單一菌落，接種於上述各培養基上，對照組則無接種，置於30°C定溫箱中培養，無光照處理，依照測試條件，蛋白酶測試培

養 3-5 天,脂肪分解酶測試培養 7-10 天,可直接觀察並量測酵素分解作用圈(degradation zone)距離;澱粉分解酶培養 3-5 天後,各皿滴入 5 mL 現配 0.3%碘液染劑,靜置染液約 5-10 min 後,倒出碘液觀察並量測與記錄菌株分解作用圈距離;纖維素酶測試培養 3-5 天後,各皿滴入 5 mL 現配 0.1%剛果紅染劑,靜置染色約 5-7 min,以 1 M 的 NaCl 洗去未結合之剛果紅染劑,重複此步驟 2-3 次,最後量測與記錄菌株分解作用圈直徑(cm) 以及相對透化值(relative clearance, Rc), $Rc = (\text{菌落周圍最外圍透化之直徑} - \text{菌落直徑}) / \text{菌落直徑}$ 。

(二)微生物菌株抗菌圖譜測定

篩選具優異分解酵素特性的菌株與瓜類作物病害之病原菌,包含胡瓜炭疽病 (*Colletotrichum lagenarium*)、胡瓜褐斑病 (*Corynespora cassiicola*)、胡瓜蔓枯病 (*Stagonosporopsis cucurbitacearum*)、胡瓜萎凋病(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*)、辣椒炭疽病(*Colletotrichum acutatum*)、葡萄晚腐病(*Colletotrichum gloeosporioides*)、洋香瓜黑點根腐病(*Monosporascus cannonballus*)等 7 種病原菌進行平板拮抗測試,真菌病原測試微生物菌株對病原菌菌絲生長抑制率,抑制率(%)計算公式如:[(對照組菌落直徑-處理組菌落直徑)/對照組菌落直徑]×100。

四、拮抗細菌 Tcb43 菌株對胡瓜、甜瓜及甜豌豆白粉病菌分生孢子發芽率抑制測試

本試驗於田間採集已發病之胡瓜、甜瓜及甜豌豆白粉病之新鮮罹病葉進行試驗。孢子發芽率檢測方式參考黃等人(2009)方式,將罹病葉片上之白粉病菌孢子抖落至已塗抹溶於丙酮之 2%醋酸纖維之玻片上,分別滴入 20 μ l 之 Tcb43 菌株 200 倍稀釋發酵液、利用 0.22 μ m 之過濾膜去除 Tcb43 菌體之 200 倍稀釋發酵過濾液、200 倍稀釋之 Tcb43 發酵培養基、無菌水及未添加等 5 種處理。將完成後的玻片置於裝有潮濕濾紙之 9 cm 培養皿中,於 24°C 下黑暗培養 48 hr,於光學顯微鏡下觀察 100 顆分生孢子,記錄其發芽率,每處理 3 重複⁽³⁾。

五、拮抗細菌 Tcb43 菌株重要抗生物質及其異構物分析

本試驗利用桌上型 10L 發酵槽(Winpact FS-06)製備 7L 之 Tcb43 菌株發酵液,發酵完成後之菌量達 5x10⁸ cfu/mL。將前述發酵液取樣 1L 後,委由財團法人農業科技研究院及中興大學農產品農藥殘留檢測中心進行芽孢桿菌屬細菌之拮抗物質及其異構物分析,分析的進行係以(Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 4.6 x 150 mm 2.7 μ m)於 AB SCIEX 4000 液相層析串聯式質譜儀中完成。抗生物質萃取流程主要以液液萃取方式進行,試驗中取 500 mL 菌液,取等量乙酸乙酯以 500 mL 分液漏斗震盪萃取 10min,震盪完後靜置至少 20 min 直至清楚分層,若分層不順利則酌量添加 NaCl 使其分層清楚,收集上層有機層,並以無水硫酸鎂除水,以減壓濃縮機以連續濃縮方式濃縮至乾,濃縮完成後以 2 mL 甲醇回溶,並以 0.22 μ m 鐵氟龍過濾膜過濾後備用。後續以 API400 液相層析質譜儀進行抗生物質分析與檢測。

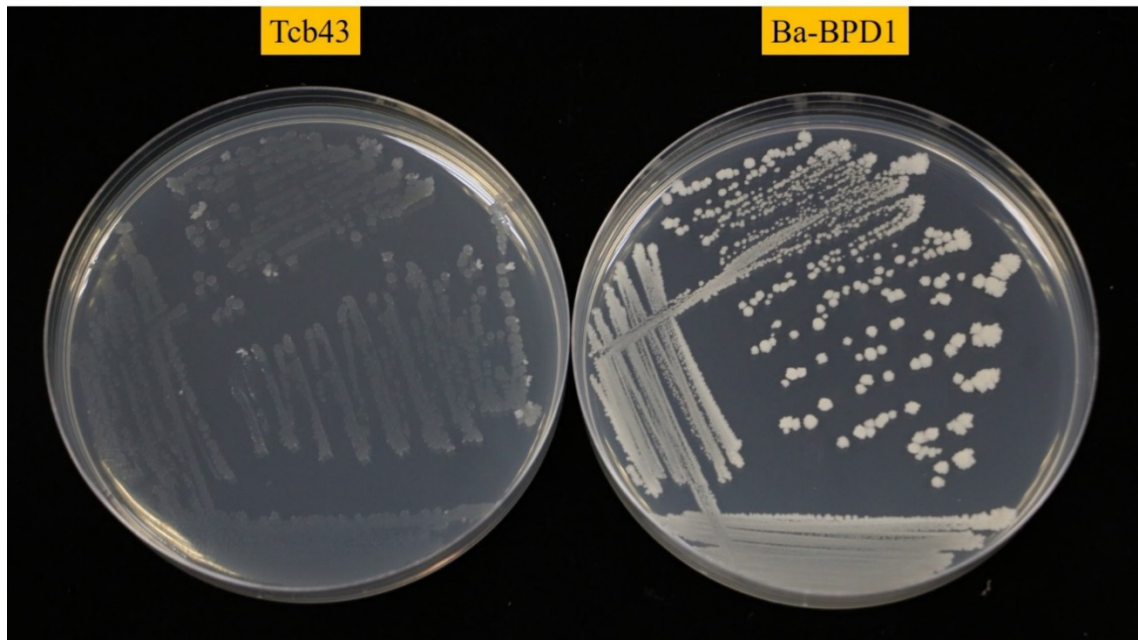
六、統計分析

實驗數據利用 SPSS12.0 軟體進行 one-way ANOVA analysis 或 Student's t-test，利用 least significant difference (LSD) tests 進行數據比較，統計上以 $P \leq 0.05$ 具顯著差異。

結 果

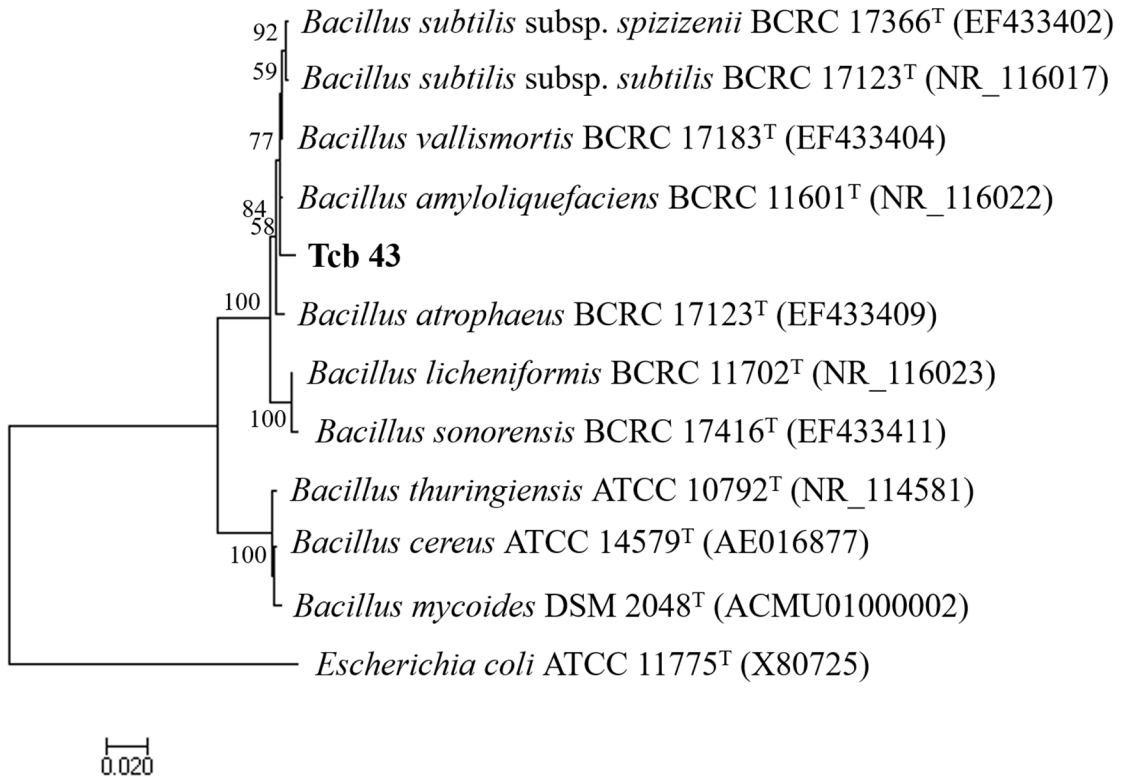
一、有益拮抗微生物之鑑定

觀察本試驗所篩選之Tcb43菌株純化於NA培養基上之菌落形態，初期菌落呈現黃白色小點，後期菌落顏色轉成透明色，形態呈現膠狀，與市售液化澱粉芽孢桿菌Ba-BPD1(活力磷寶，台灣肥料股份有限公司)菌株明顯不同圖一。應用16S rRNA及gyrB基因序列，利用其3組專一性引子對，分別為fD1/rD1、27F/1492R(16S rRNA)及gyrB-41F/gyrB-44R(gyrB)對試驗菌株Tcb43進行PCR聚合酶連鎖反應，PCR產物經膠體電泳分析確認，分別增幅出約1,400 bp與1,200 bp之專一性DNA核酸片段，將PCR產物委由源資國際生物科技股份有限公司進行核酸片段定序，所得之核酸序列與NCBI資料庫進行比對，並將所取得之16S-rRNA及gyrB gene序列，與其他*Bacillus* spp.序列進行親緣性分析。16S-rRNA區間序列親緣樹狀圖如圖二，Tcb43菌株仍無法與*B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. vallismortis*進行區分。進一步分析gyrB gene區間序列親緣樹狀圖如圖三，Tcb43與*B. amyloliquefaciens*為同一群，相似度達100%，由以上結果分析，將鑑定Tcb43菌株為液化澱粉芽孢桿菌*Bacillus amyloliquefaciens*。



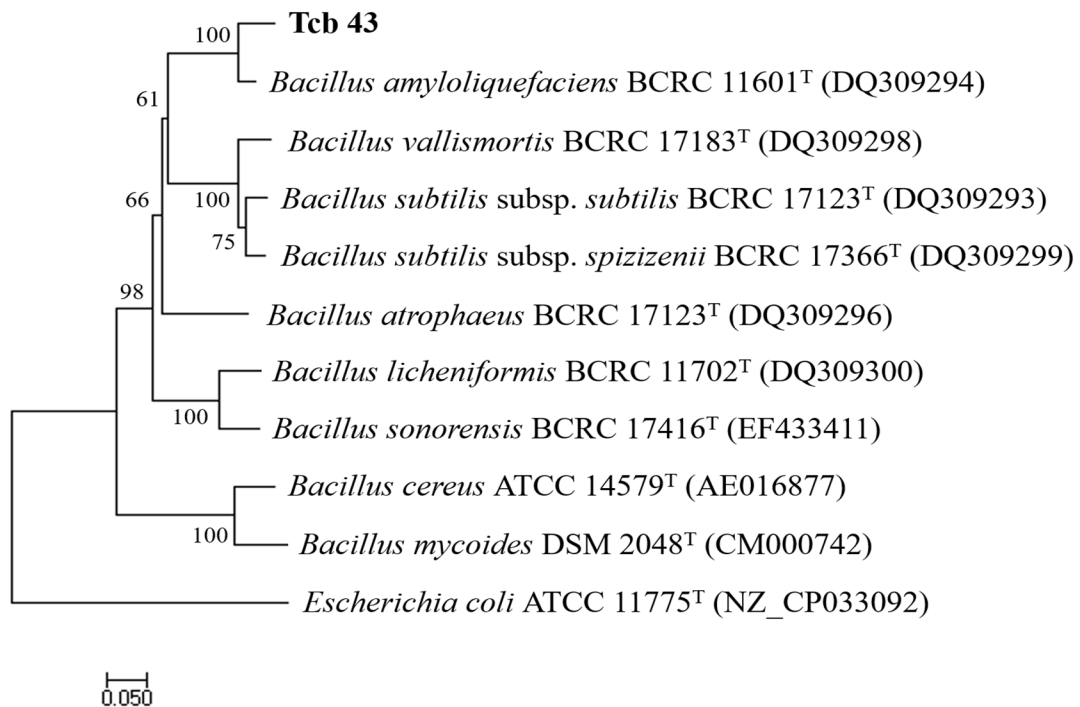
圖一、拮抗細菌 Tcb43 菌株(左)及市售液化澱粉芽孢桿菌 Ba-BPD1(右)之於 NA 培養基上菌落形態比較。

Fig. 1. Comparison of colony morphology of antagonistic bacteria Tcb43 strain (left) and commercially microbial agent *B. amyloliquefaciens* strain Ba-BPD1. (right)



圖二、以 16S rRNA 序列進行 Neighbour-joining 演化樹分析 Tcb43 與各 *Bacillus* 屬細菌間之親緣性。利用 MEGA7 軟體以 maximum-composite-likelihood 模組進行基因庫中各 *Bacillus* 屬細菌 16S rRNA 序列之親緣性比對，*Escherichia coli* ATCC 11775^T 菌株為分析使用之外群種。下方尺規(0.020)表示各菌株間每個位點之核苷酸取代數。

Fig. 2. Neighbour-joining phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequences showing the relationships between strain Tcb 43 (bold) and other *Bacillus* species. A phylogenetic tree was constructed in MEGA7 by deriving from the maximum-composite-likelihood model. Bootstrap percentages (>50 %) are shown on the nodes in 1000 replicates. The sequences of *Escherichia coli* ATCC 11775^T(X80725) was used as an outgroup. The bar (0.020) at the bottom represents the number of nucleotide substitutions per site.



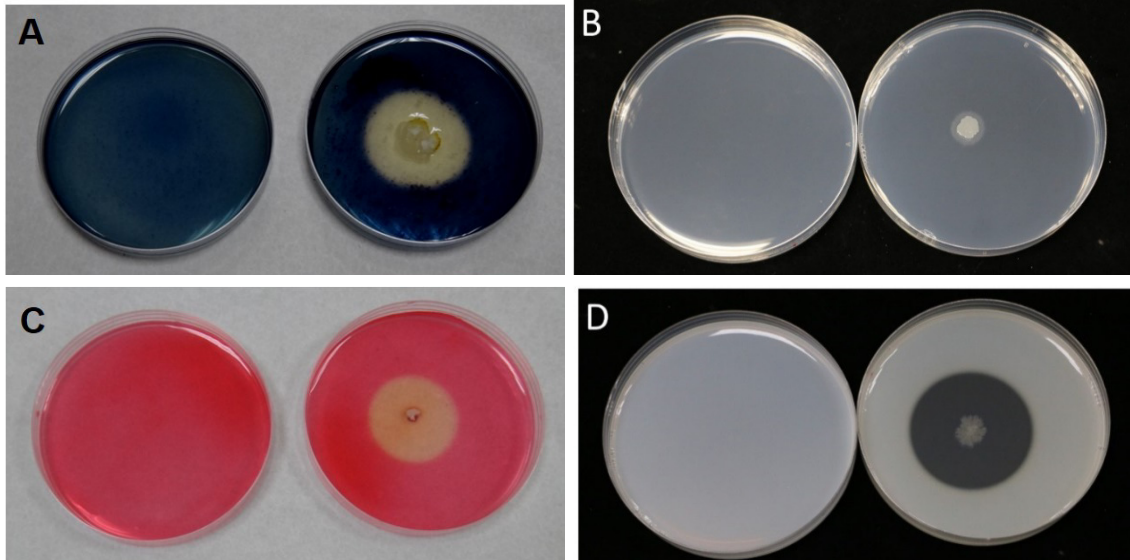
圖三、以 *gyrB* 序列進行 Neighbour-joining 演化樹分析 Tcb 43 與各 *Bacillus* 屬細菌間之親緣性。利用 MEGA7 軟體以 maximum-composite-likelihood 模組進行基因庫中各 *Bacillus* 屬細菌 *gyrB* 序列之親緣性比對，*Escherichia coli* ATCC 11775^T 菌株為分析使用之外群種。下方尺規(0.050)表示各菌株間每個位點之核苷酸取代數。

Fig. 3. Neighbour-joining phylogenetic tree of *gyrB* gene sequences showing the relationships between strain Tcb 43 (bold) and other *Bacillus* species. A phylogenetic tree was constructed in MEGA7 by deriving from the maximum-composite-likelihood model. Bootstrap percentages (>50 %) are shown on the nodes in 1000 replicates. The sequences of *Escherichia coli* ATCC 11775^T(NZ_CP033092) was used as an outgroup. The bar (0.050) at the bottom represents the number of nucleotide substitutions per site.

二、微生物菌株 Tcb43 功能特性與抗菌圖譜分析

(一)微生物菌株酵素分解能力測定

試驗菌株 Tcb43 菌株進行澱粉、脂質、纖維素與蛋白質分解能力測試，依各自試驗條件培養後，觀察菌株透化情形，如圖四A至圖四D，結果顯示 Tcb43 菌株具有分解上述四種成分之能力，並量測透化圈直徑與菌落直徑數值，分析 Tcb43 菌株分解透化值如表一，澱粉、脂質、纖維素及蛋白質之分解透化值分別為 4.79、0.94、16.15 與 5.75。



圖四、Tcb43 菌株分解酵素能力分析，培養於(A) 澱粉、(B) 脂質、(C)纖維素及(D)蛋白質鑑別培養基上之分解透化結果，Tcb43 菌落外圍空白表示分解透化圈。

Fig. 4. The evaluation of Tcb43 strain enzyme hydrolysis activity using a different selective medium, (A) amylase, (B) lipase, (C) cellulase, and (D) protease. The outer limit of the zone with Tcb43 bacterial colony indicate the hydrolysis clearance zone.

表一、Tcb43 菌株測試 4 種分解酵素能力之分解透化數值結果

Table 1. The average dimeters of 4 enzyme hydrolysis zone test of Tcb43 strains

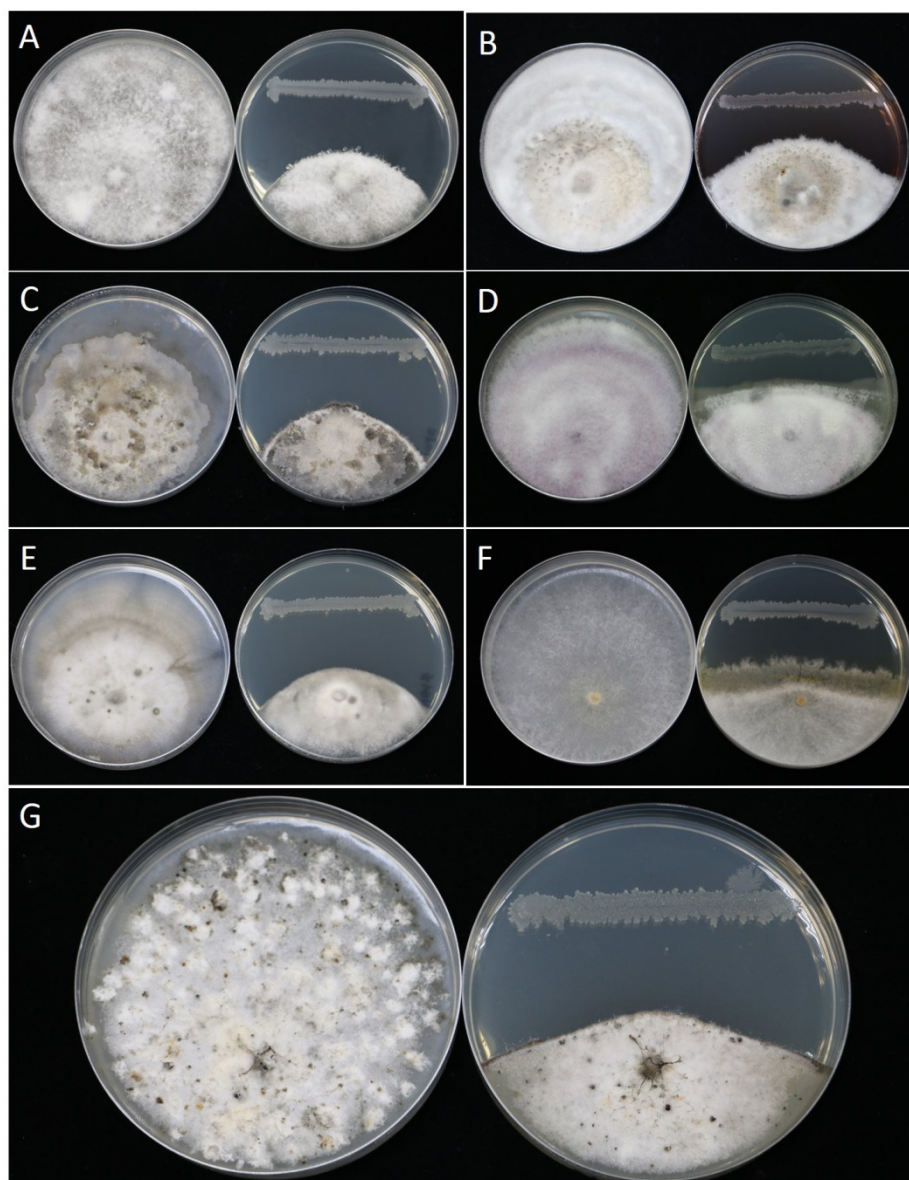
Strain	Amylase	Lipase	Cellulose	Protease
Tcb43	4.79 ¹	0.94	16.14	5.75
Control	— ²	—	—	—

¹Rc= diameter of the reaction zone-diameter of Tcb43 colony / diameter of Tcb43 colony.

² “—” indicated no hydrolysis zone production.

(二)微生物菌株抗菌圖譜測定

利用篩選之微生物Tcb43菌株，與7種植物病原菌，包括胡瓜炭疽病菌、胡瓜褐斑病菌、胡瓜蔓枯病菌、胡瓜萎凋病菌、辣椒炭疽病菌、洋香瓜黑點根腐病及葡萄晚腐病菌進行平板拮抗測試。結果顯示Tcb43菌株對測試病原菌均具抑制菌絲之能力(圖五)。病原真菌測試結果，Tcb43菌株對7種病原真菌之平均菌絲抑制率達60%以上(表二)。



圖五、Tcb43 菌株對不同植物真菌性病原之平板拮抗測試，對於(A)胡瓜炭疽病、(B)胡瓜褐斑病、(C)胡瓜蔓枯病、(D)胡瓜萎凋病、(E)辣椒炭疽病、(F)洋香瓜黑點根腐病及(G)葡萄晚腐病之菌絲生長抑制結果。

Fig. 5. Dual culture of inhibitory activity for Tcb43 strain against 6 distinct plant pathogenic fungi. (A) *Colletotrichum lagenarium*, (B) *Corynespora cassiicola*, (C) *Stagonosporopsis cucurbitacearum*, (D) *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, (E) *Colletotrichum acutatum*, (F) *Monosporascus cannonballus* and (G) *C. gloeosporioides*. The result showed Tcb43 strain could effectively inhibited the growth of pathogenic fungi mycelium.

表二、液化澱粉芽孢桿菌 Tcb43 菌株對 7 種病原真菌之菌絲抑制率結果

Table 2. Inhibitory activity of against mycelial growth by Tcb43 strain on 7 plant pathogenic fungi in dual culture assay

Pathogens	Mycelium growth inhibition (%) ¹
<i>Colletotrichum lagenarium</i>	74.90±0.59
<i>Corynespora cassiicola</i>	69.10±1.39
<i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i>	80.30±1.05
<i>Fusarium oxysporum f. sp. cucumerinum</i>	64.50±0.84
<i>Colletotrichum acutatum</i>	75.00±0.99
<i>Monosporascus cannonballus</i>	63.70±1.21
<i>C. gloeosporioides</i>	78.00±0.25

¹ Inhibition rate (%) = [(Diameter of treatment mycelial growth - diameter of control mycelial growth) / diameter of control mycelial growth] × 100%.

三、Tcb43 菌株對胡瓜、甜瓜及甜豌豆白粉病菌分生孢子發芽抑制測試

經由48 hr後，胡瓜白粉病菌分生孢子發芽率結果如表三，未添加處理為19.0%，加入無菌水與200倍稀釋之Tcb43發酵培養基後分別為22.0%與18.33%，顯示無抑制效果；而加入Tcb43菌株200倍稀釋發酵液與去除Tcb43菌體之200倍稀釋發酵過濾液，兩種處理之分生孢子發芽率均為0.33%，與其它處理相較具有顯著差異，抑制率達98.25%，可有效抑制胡瓜白粉病菌分生孢子發芽(圖六)。甜瓜白粉病菌之結果如表四，未添加處理(Blank)發芽率為14.25%，加入無菌水(water control)與200倍稀釋之Tcb43發酵培養基之孢子發芽率為20.25%與12.5%，亦無抑制效果；加入Tcb43菌株200倍稀釋發酵液與去除Tcb43菌體之200倍稀釋發酵過濾液，分生孢子發芽率分別為2.0%與4.25%，與其它處理具有顯著差異，換算抑制率分別達85.96%及70.18%。顯示含有Tcb43菌體及其發酵液可有效抑制甜瓜白粉病菌之分生孢子發芽(圖七)。此外，對於甜豌豆白粉病之分生孢子抑制結果如表五，未添加處理(Blank)發芽率為60.67%，加入無菌水(water control)之孢子發芽率為43.33%，抑制率為28.57%；Tcb43發酵培養基之孢子發芽率為28.0%，抑制率為53.85%；Tcb43菌株200倍稀釋發酵液與去除Tcb43菌體之200倍稀釋發酵過濾液，分生孢子發芽率分別為3.67%與7.33%，與其它處理具有顯著差異，換算抑制率分別達93.96%及87.91%。顯示含有Tcb43菌體及其發酵液可有效抑制甜豌豆白粉病菌之分生孢子發芽(圖八)。

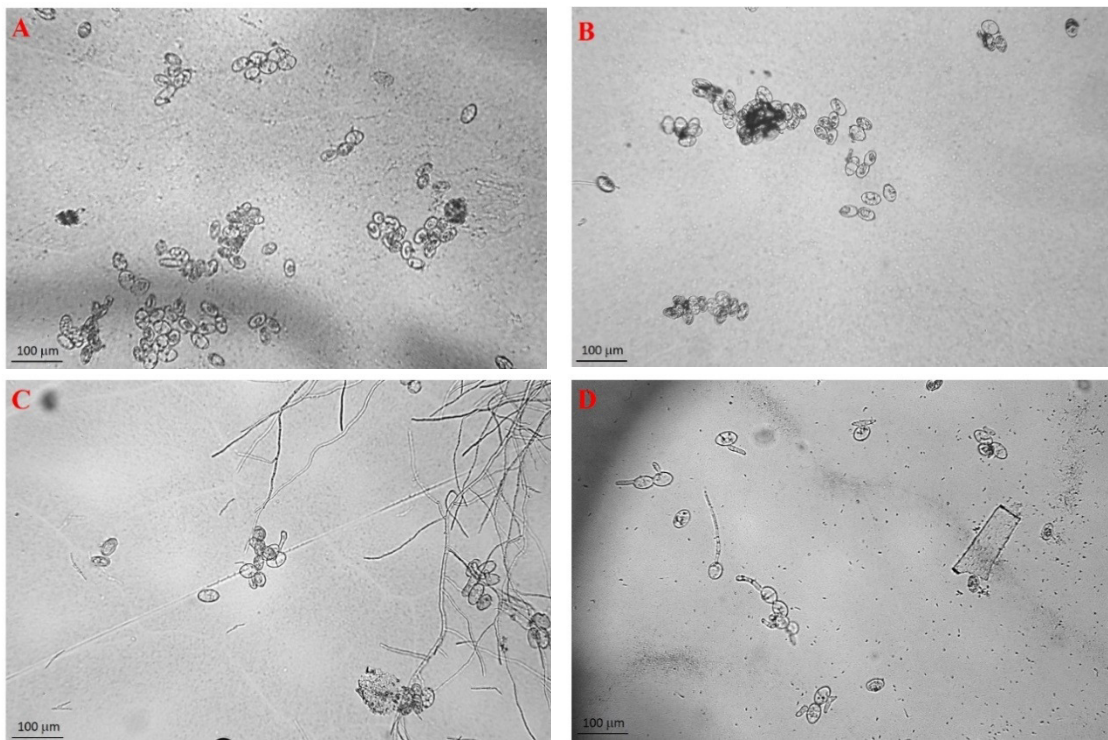
表三、評估拮抗菌 Tcb43 菌株發酵液對胡瓜白粉病菌之分生孢子發芽率測試結果

Table 3. Evaluation of antagonist Tcb43 strain treatment on the conidia germination of *Podosphaera xanthii* from cucumber

Treatment	Germination rate (%)	Inhibition rate (%) ¹
Tcb43 fermentation broth 200- folds	0.33 c ²	98.25
Filtrate of Tcb43 fermentation 200-folds	0.33 c	98.25
Medium of Tcb43 fermentation (no inoculation)	18.33 b	3.51
Control (water)	22.00 a	-15.79
Blank (without water)	19.00 ab	--

¹ Inhibition rate = [1 - (germination rate of treatment/ germination rate of CK)] x 100

² Statistical analysis by LSD ($p < 0.05$) was applied to compare the disease severity between each treatment.



圖六、測試 Tcb43 菌株 200 倍發酵液(A)、200 倍發酵液過濾液(B)、純培養液(C)及無菌水(D)對胡瓜白粉病菌分生孢子發芽率抑制試驗。

Fig. 6. Inhibitory assay on conidia germination inhibition test by using Tcb43 200 folds dilution of fermentation broth (A), filtrate of 200 folds dilution fermentation broth (B), culture broth (C) and sterile water (D) to cucumber powdery mildew.

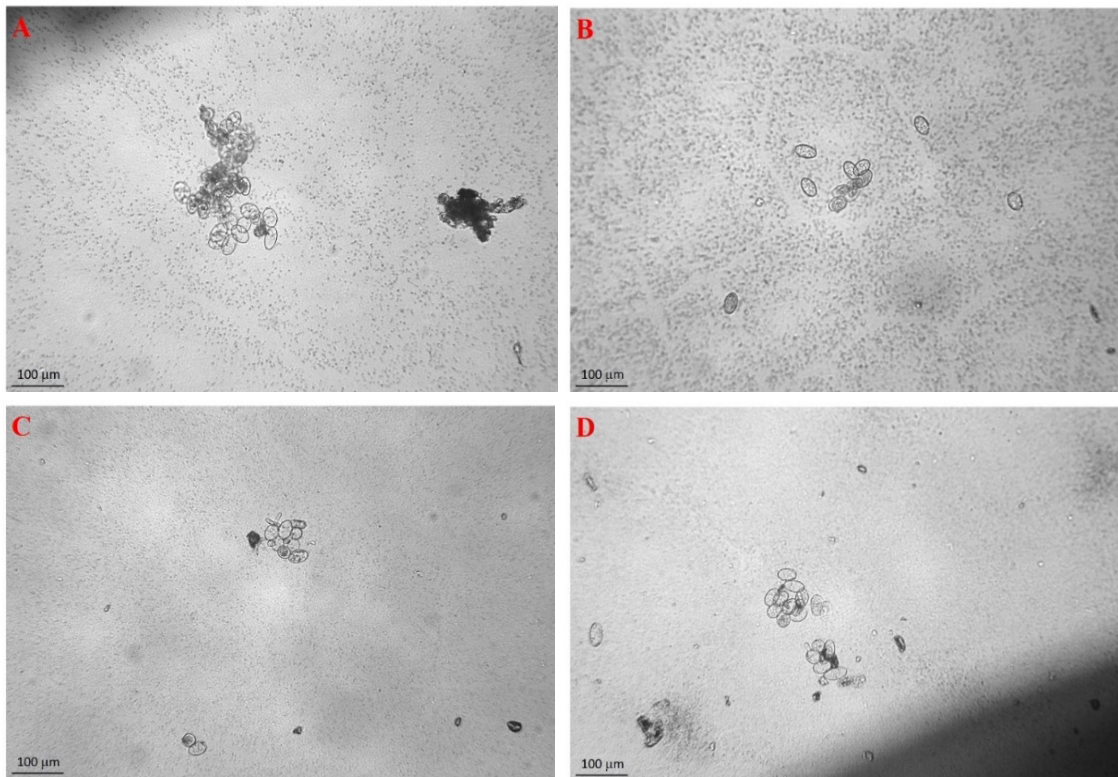
表四、評估拮抗菌 Tcb43 菌株發酵液對甜瓜白粉病菌之分生孢子發芽率測試結果

Table 4. Evaluation the antagonist Tcb43 strain treatment on the conidia germination of *Podosphaera xanthii* from melon

Treatment	Germination rate (%)	Inhibition rate (%) ¹
Tcb43 fermentation broth 200-times	2.00 c ²	85.96
Filtrate of Tcb43 fermentation 200-folds	4.25 c	70.18
Medium of Tcb43	12.50 b	12.28
Water control	20.25 a	-42.11
Blank	14.25 ab	--

¹ Inhibition rate = [1 - (germination rate of treatment/ germination rate of CK)] x 100

² Statistical analysis by LSD ($p < 0.05$) was applied to compare the disease severity between each treatment.



圖七、測試 Tcb43 菌株 200 倍發酵液(A)、200 倍發酵液過濾液(B)、純培養液(C)及無菌水(D)對甜瓜白粉病菌分生孢子發芽率抑制試驗結果。

Fig. 7. Inhibitory assay on conidia germination inhibition test by using Tcb43 200 folds dilution of fermentation broth (A), 200 times fermentation broth filtrate (B), pure culture broth (C) and sterile water (D) to melon powdery mildew.

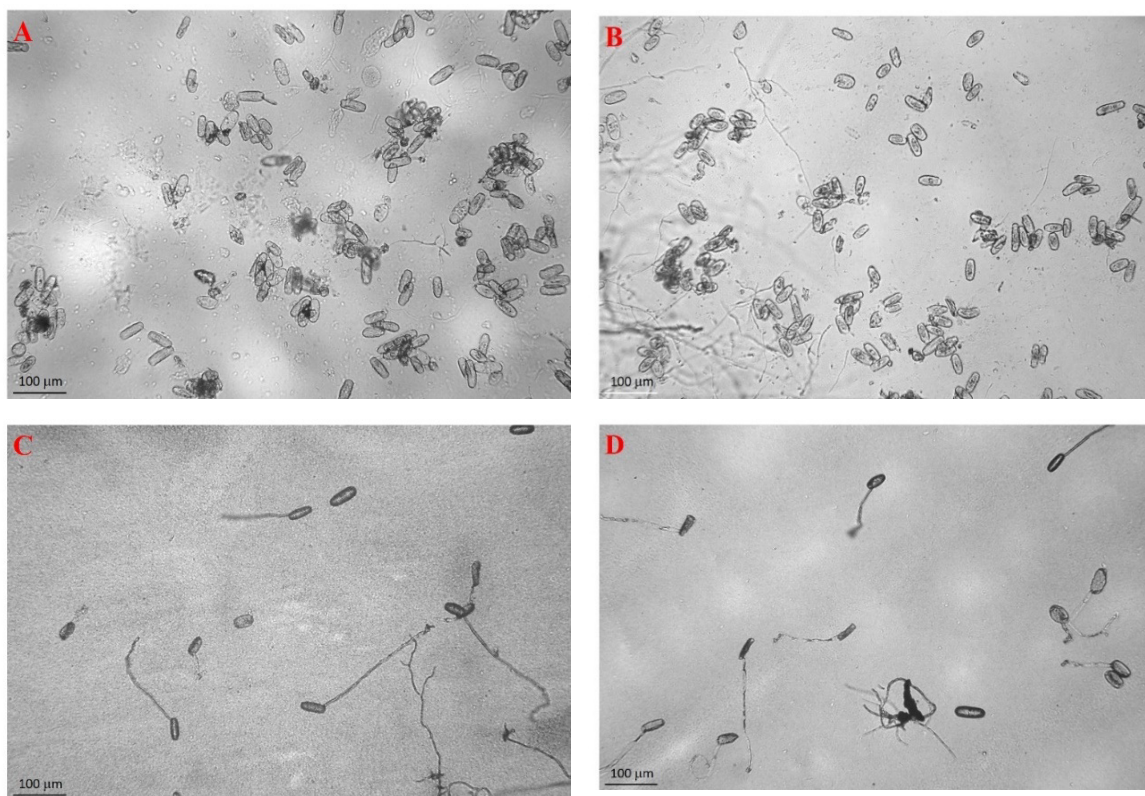
表五、評估拮抗菌 Tcb43 菌株發酵液對甜豌豆白粉病菌之分生孢子發芽率測試結果

Table 5. Evaluation the antagonist Tcb43 strain treatment on the conidia germination of *Erysiphe pisi* from sweet pea

Treatment	Germination rate (%)	Inhibition rate (%) ¹
Tcb43 fermentation broth 200-times	3.67 d ²	93.96
Filtrate of Tcb43 fermentation 200-folds	7.33 c	87.91
Medium of Tcb43	28.00 b	53.85
Water control	43.33 a	28.57
Blank	60.67 ab	--

¹ Inhibition rate = [1 - (germination rate of treatment/ germination rate of CK)] x 100

² Statistical analysis by LSD ($p < 0.05$) was applied to compare the disease severity between each treatment.

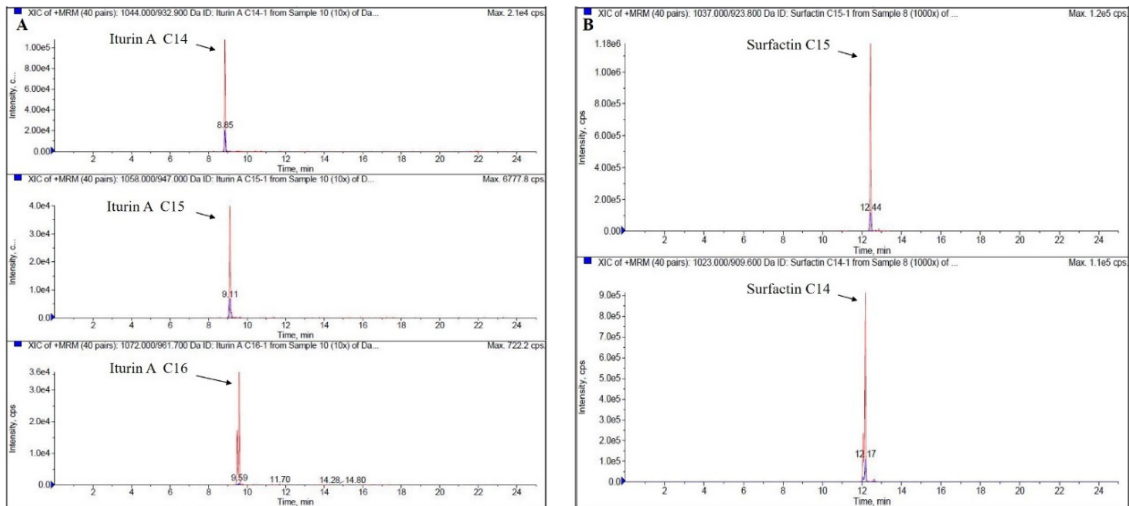


圖八、測試 Tcb43 菌株 200 倍發酵液(A)、200 倍發酵液過濾液(B)、純培養液(C)及無菌水(D)對甜豌豆白粉病分生孢子發芽率抑制試驗結果。

Fig. 8. Inhibitory assay on conidia germination inhibition test by using Tcb43 200 folds dilution of fermentation broth (A), 200 times broth filtrate (B), pure (C) culture broth and (D) sterile water to sweet pea powdery mildew.

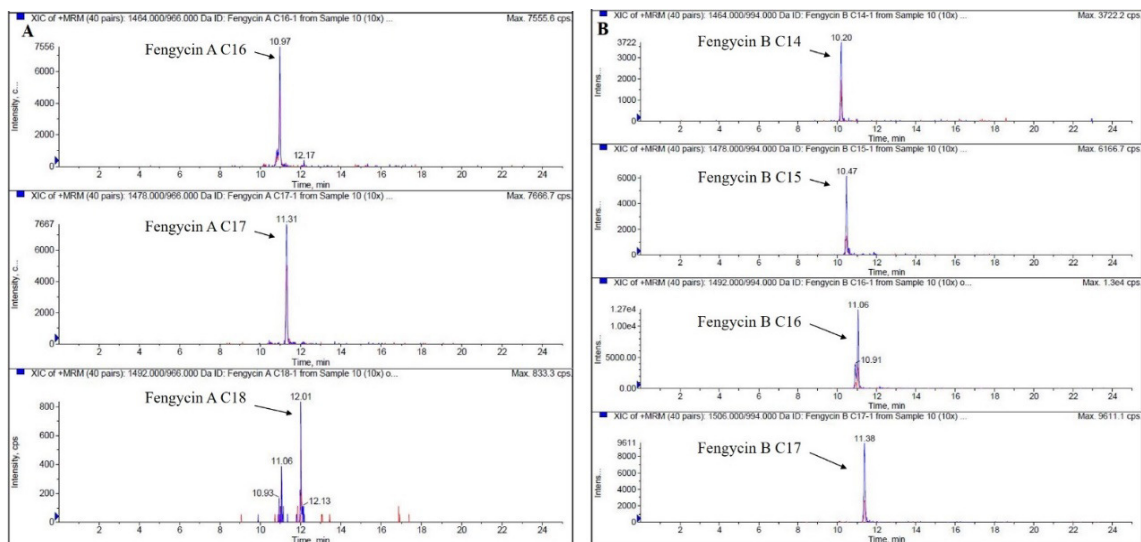
四、Tcb43 菌株重要抗生物質及其異構物分析

芽孢桿菌屬細菌可產生多種抗生物質，可抑制病原細菌或真菌生長，對於生物防治能力優劣有很大的關聯性，其中所產生的伊枯草桿菌素、表面素與豐原素屬於環脂肽類(cyclic lipopeptides)二次代謝物，為芽孢桿菌屬細菌中重要與研究最多之抗生物質。抗生物質萃取常用的溶劑種類包括醇類(甲醇、乙醇)、乙酸乙酯、乙腈等，因溶劑極性特性的不同，萃取種類及效果也不同。其中乙腈屬於毒性管制化學藥品，考量毒性與使用限制問題，因此，本試驗採用乙酸乙酯進行萃取。測試結果顯示，Tcb43發酵液中3種抗生物質均有非常好反應，由圖譜中顯示圖九A，Tcb43分別於8.85 min (C14)、9.11 min (C15)及9.59 min (C16)具有Iturin-A波峰；另外於圖九B於12.17 min (C14)及12.44 min (C15)測得Surfactin波峰。此外，分析Fengycin A可於10.97 min (C16)、11.31 min (C17)及12.01min (C18)測得C16-C18異構物圖十A、Fengycin B可於10.20 min (C14)、10.47 min (C15)及11.06 min (C16)測得C14-C17異構物圖十B，而Fengycin C及Fengycin D以目前檢測條件無法測得。



圖九、*B. amyloliquefaciens* Tcb43 抗生物質分析結果，A: Iturin A 離子分析圖譜，可測得 Iturin A C14-C16，B: Surfactin 離子分析圖譜，同時可測得 Surfactin C14-C15。

Fig. 9. Substance analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* Tcb43 produced antimicrobial compounds performed by HPLC-MASS. (A): Iturin A ion analysis spectrum, iturin AC14-C16, (B): Surfactin ion analysis spectrum, and Surfactin C14-C15 can be measured at the same time.



圖十、*B. amyloliquefaciens* Tcb43 抗生物質 Fengycin 離子分析圖譜結果，可測得 Fengycin A C16-C18 (A)、Fengycin B C14-C17 (B)，而 Fengycin C 及 Fengycin D 以目前未檢出。

Fig. 10. Substance analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* Tcb43 produced antimicrobial compounds performed by HPLC-MASS. (A): Fengycin ion analysis spectrum, Fengycin A C14-C18 ; (B): Fengycin B C14-C17, while Fengycin C and Fengycin D have not been detected so far.

討 論

生物防治是以生物做為資材防治作物病蟲害的主要策略，作物病害生物防治多以利用拮抗微生物進行病害防治，利用抗菌性、競爭空間與養分、寄生作用或誘發植物產生抗病性等機制，抑制病原菌的蔓延與繁殖，藉以達到控制與降低病害之發生⁽⁵⁾。微生物製劑係指由微生物所生產的製劑，對於環境、人體及非標的生物無負面影響，依照微生物種類可分為細菌、真菌、病毒及原生動物等，一般由自然界分離所得，經試驗研發與商品化，可作為作物病蟲害保護用之資材⁽⁵⁾。本試驗於本場有機區紅龍果田土壤中篩選與分離出1株微生物菌株 Tcb43，經分析16S rRNA與gyrB gene序列，並與線上NCBI資料庫進行比對，並進行親源分析結果，將Tcb43菌株鑑定為液化澱粉芽孢桿菌*Bacillus amyloliquefaciens*。經由培養基測試結果，Tcb43菌株具有分解澱粉、脂質、纖維素與蛋白質等4種分解能力，其中以纖維素分解能力之分解透化值RC可達16.0以上。另拮抗能力試驗結果顯示，Tcb43菌株對7種病原真菌菌絲生長皆具抑制效果，平均菌絲抑制率達60%-80%。經Tcb43菌株發酵後之發酵液，其內活孢子量可達 5×10^9 cfu/ml，且該發酵液具有抑制三種作物白粉病菌發芽之特性。於胡瓜白粉病菌試驗結果，對照組孢子發芽率為19.0%，Tcb43-200倍發酵液與200倍發酵過濾液之兩種

處理，胡瓜白粉病菌孢子發芽率均為0.33%，孢子發芽抑制率可達98.25%，其餘處理則低於4%以下，其中加入無菌水後則會增加胡瓜白粉病菌孢子發芽。於甜瓜孢子發芽試驗結果，其對照組發芽率僅14.25%，而Tcb43-200倍發酵液與200倍發酵過濾液之兩種處理，甜瓜白粉病菌孢子發芽率僅2.0%與4.25%，孢子發芽抑制率分別為85.96%與70.18%，其餘處理則低於13%以下，同樣加入無菌水處理後，也會增加甜瓜白粉病菌孢子發芽。Tcb43菌株對甜豌豆白粉病菌分生孢子發芽抑制測試結果，對照組未處理孢子發芽率為60.67%，而Tcb43-200倍發酵液與200倍發酵過濾液之兩種處理，孢子發芽率分別為3.67%與7.33%，孢子發芽抑制率可達93.96%與87.91%，單純培養基及水處理之分生孢子發芽率為28.0%與43.33%，抑制率分別為53.85%與28.57%，綜合以上兩組試驗結果，利用Tcb43發酵液200倍可大幅降低胡瓜與甜瓜白粉病菌孢子發芽率。為了解Tcb43菌株防治病原菌之機制，本次試驗委由財團法人農業科技研究院進行Tcb43菌株重要抗生物質及其異構物分析，結果可測得伊枯草桿菌素Iturins、表面素Surfactin與豐原素Fengycin等二次代謝物，其中Iturin A具有C14、C15及C16共3種異構物，Surfactin可測得C14與C15共2種異構物，Fengycin可測得Fengycin A C16-C18與Fengycin B C14-C17共7種異構物，Fengycin C與Fengycin D則未測出。國外研究亦顯示芽孢桿菌屬細菌所產生之抗生物質，包含Iturin、Surfactin及Fengycin等，對於植物病原真菌與細菌，具有抑制菌絲與細胞生長之效果^(17,31)。本研究所應用Tcb43測試7種植物病原真菌及3種作物之白粉病菌，均具有優異抑制菌絲生長與分生孢子發芽之能力。綜合以上分析結果，顯示Tcb43菌株發酵液確實具有防治植物病害之潛力。後續可強化此菌株發酵液活孢子量濃度或優化抗生物質產量，增加Tcb43菌株的抗菌標的，並進行田間小規模瓜類白粉病防治試驗，以及完備研發微生物農藥商品化之各項要件，未來可供給栽培農友於連續採收階段對於白粉病防治的新選擇。

致 謝

本研究承行政院農業委員會 108 農科-8.5.2-中-D1 計畫補助，臺中區農業改良場生物資材應用研究室許明韓先生協助試驗，俾使本研究能順利完成，特申謝忱。

參考文獻

1. 王俐婷 2011 微生物鑑定技術：基因序列分析和DNA指紋圖譜 生物資源保存及研究簡訊 24(1): 4-7。
2. 吳琰奇 2008 gryB基因於細菌分類上的應用 生物資源保存及研究簡訊 21(1): 5-8。
3. 黃晉興、陳純葳、蘇俊峰 2009 甜瓜白粉病菌之繁殖、接種及保存 台灣農業研究 58(3): 176-184。

4. 蔡孟旅、張淳淳、陳盈丞、黃秀雯、彭瑞菊、吳雅芳、林國詞、陳昇寬、鄭安秀 2017 行政院農業委員會臺南區農業改良場技術專刊168號 p.39。
5. 謝奉家 2011 臺灣芽孢桿菌生物殺菌劑的研發與應用現況 行政院農業委員會 農藥物毒物試驗所技術專刊第205號 p.1-11。
6. 顏再生 2007 本土液化澱粉芽孢桿菌含伊枯草菌素A同分異構物之鑑定 朝陽科技大學應用化學系碩士論文 p.89。
7. Besson, F. and G. Michel. 1987. Isolation and characterization of new iturins: iturin. D and iturin E. J. Antibiot. 40(4): 437-442.
8. Brosius, J., J. L. Palmer, H. P. Kennedy and H. F. Noller. 1978. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. 75: 4801-4805.
9. Cheng, C. W. and S. S. Yang. 1995. Amylase production of *Streptomyces rimosus* TM-55 and their 2-deoxyglucose resistant mutants. Zhonghua Min Guo Wei Sheng Wu Ji Mian Yi Xue Za Zhi. 28: 109-116.
10. Cawoy, H., W. Bettiol, P. Fickers and M. Ongena. 2011. *Bacillus*-based biological control of plant diseases. p. 273-303. In: Chap. 13. Pesticides in the Modern World - Pesticides Use and Management.
11. Hsieh, F. C., M. C. Li and S. S. Kao. 2003. Evaluation of the inhibition activity of *Bacillus subtilis*-based products and their related metabolites against pathogenic fungi in Taiwan. Plant Prot. Bull. 45:155-162.
12. Hsieh, F. C., M. C. Li, T. C. Lin and S. S. Kao. 2004. Rapid detection and characterization of surfactin-producing *Bacillus subtilis* and closely related species based on PCR. Curr. Microbiol. 49: 186-191.
13. Hsieh, F. C., T. C. Lin, M. Meng and S. S. Kao. 2008. Comparing methods for identifying *Bacillus* Strains capable of producing the antifungal lipopeptide iturin A. 2008. Curr Microbiol. 56: 1-5.
14. Laura, G. G., H. Zerriouh, D. Romero, J. Cubero, A. Vicente and A. P. Garcia. 2013. The antagonistic strain *Bacillus subtilis* UMAF6639 also confers protection to melon plants against cucurbit powdery mildew by activation of jasmonate and salicylic acid-dependent defence responses. Microb. Biotechnol. 6(3): 264-274.
15. Loeffler, W., S. M. Tschén, N. Vantitanakom, M. Kugler, E. Knorrp, T. F. Hsieh and T. G. Wu. 1986. Antifungal effects of bacilysin and fengycin from *Bacillus subtilis* F-29-3. J. Phytopathology 115: 204-213.
16. Magnelli, P. E., A. Martínez and O. A. Mércuri. 1997. Simple method for determining cellulolytic activity in fungi. Rev. Argent. Microbiol. 29: 210-214.

17. Ongena, M. and P. Jacques. 2007. *Bacillus* lipopeptides : versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.* 16(3): 115-125.
18. Pal, K. K. and B. M. Gardener. 2006. *Biological Control of Plant Pathogens*. The Plant Health Instructor DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.
19. Peypoux, F., F. Besson and G. Michel. 1979. Preparation and antifungal activity upon *Micrococcus luteus* of iturin A, mycosubtilin, bacillomycin L, antibiotics from *Bacillus subtilis*. *J. Antibiot.* 32(2): 136-140.
20. Peypoux, F., J. M. Bonmatin and J. Wallach. 1999. Recent trends in the biochemistry of Surfactin. *Appl. Microbiol. Biot.* 51: 553-563.
21. Phister, T. G., J. O'Sullivan and L. L. McKay. 2004. Identification of bacilysin, chlorotetaine, and iturin A produced by *Bacillus* sp. Strain CS93 isolated from Pozol, a Mexican fermented maize dough. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 631-634.
22. Pyoung I. K., J. Ryu, Y. H. Kim and Y. T. ChI. 2010. Production of Biosurfactant Lipopeptides Iturin A, Fengycin, and Surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for Control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20(1): 138-145.
23. Romero, D., A. P. García and M. E. Rivera. 2004. Isolation and evaluation of antagonistic bacteria towards the cucurbit powdery mildew fungus *Podosphaera fusca*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64:263-269.
24. Romero, D., A. Vicente, H. Zeriuoh, F. M. Cazorla, D. F. Ortuno, J. A. Tores and A. P. Garcia. 2007. Evaluation of biological control agents for managing cucurbit powdery mildew on greenhouse-grown melon. *Plant Pathol.* 56: 976-986.
25. Sacherer, P., G. Défago and D. Haas. 1994. Extracellular protease and phospholipase C are controlled by the global regulatory gene *gacA* in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *FEMS Microbiol. Lett.* 116: 155-160.
26. Schaad, N. W., J. B. Jones and W. Chun. 2001. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. 3rd edition. APS Press, St. Paul, 373.
27. Suzuki, T., T. Nakayama, T. Kurihara, T. Nishino and N. Esaki. 2001. Cold-active lipolytic activity of psychrotrophic *Acinetobacter* sp. strain no. 6. *J. Biosci. Bioeng.* 92: 144-148.
28. Wang, L. T., F. L. Lee, C. J. Tai and H. Kasai. 2007. Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57(8): 1846-1850.
29. Yamamoto, S. and H. Shigeaki. 1995. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1104-1109.

30. Yang, J. W., S. H. Yu and C. M. Ryu. 2009. Priming of defense-related genes confers root-colonizing Bacilli-elicited induced systemic resistance in pepper. *Plant Pathol. J.* 25(4): 389-399.
31. Zerriouh, H., D. Romero, L. G. Gutiérrez, F. M. Cazorla, A. Vicente and A. P. García. 2011. The Iturin-like lipopeptides are essential components in the biological control arsenal of *Bacillus subtilis* against bacterial diseases of cucurbits. *Mol. Plant-Microbe. Interact.* 24(12): 1540-1552.

The Study on Antagonistic Bacteria Tcb43: Identification, Antimicrobial Spectrum and Antibiotic Assay ¹

Chien-Chih Kuo, Shih-Chieh Chang and Chung-Ta Liao ²

ABSTRACT

In this study, we isolated and screening the beneficial microorganism Tcb43 strain from the soil of the organic field. The Tcb43 strain was identified as *Bacillus amyloliquefaciens* based on molecular analysis and its colony shape was different from other commercially *B. amyloliquefaciens* strain. Determined by culture medium, Tcb43 strain has the activity of 4 degrading enzymes such as starch, lipid, cellulose and protein. The results of antagonism analysis showed that Tcb43 strain has excellent ability against *Colletotrichum lagenarium*, *C. capsici*, *C. gloeosporioides*, *Corynespora cassiicola*, *Stagonosporopsis cucurbitacearum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, and *Monosporascus cannonballus*. In addition, use the Tcb43 200x dilutions fermentation broth can inhibit the germination of conidia of powdery mildew, including cucumber, melon and sweet pea. The inhibition rates could reach 98.25%, 85.96% and 93.96% respectively. Analysis of Tcb43 fermentation broth components, the results showed there are antibiotic producing which included iturin A, surfactin and fengycin antibiotic and other isomers. The results showed that the Tcb43 strain has the ability to inhibit pathogenic fungi and also the potential to develop into microbial agent.

Key words: *Bacillus* sp., antibiotic, biopesticide

¹ Contribution No.0975 from Taichung DARES, COA.

² Associate Researcher, Assistant, Associate Researcher of Taichung DARES, COA.