

本土性鏈黴菌生物殺菌劑之開發

Development of Native Streptomyces as Biofungicide

曾德賜

國立中興大學 植物病理學系

摘要

有鑑於本土性鏈黴菌生物防治製劑在病害防治上之重要性，應加強相關研發工作包括篩選純化有效的強勢菌系；以及開發可以培養出有效菌數達到 10^{10} per mL以上之適宜的量化培養配方與方法等。由系列溫室與田間試驗評估，已證實對包括露菌病(downy mildews)、疫病菌 *Phytophthora* spp.、腐霉病菌 *Pythium aphanidermatum*、立枯絲核菌 *Rhizoctonia solani* AG4、镰孢病菌 *Fusarium oxysporum*、以及炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides*等具有防治效益。本研究團隊證實其應為多重作用機制(multiple mode of action)-包括生長之促進與生長勢之強化、抗生物質與水解酵素對病原真菌之協力抑制效果、對病原真菌之超寄生性、超寄生性導致細胞膜之電解質滲漏作用、及系統性抗病性誘導等所發揮之效果等。顯然本項本土性鏈黴菌生物防治製劑值得推薦給產業界推廣應用之生物科技。

前言

化學農藥的發明應用，為上一個世紀農業生產產值的大幅提昇，創造了極其輝煌的成果，也為整個人類物質文明的飛躍進步，奠定了關鍵性的安定發展之基石。然而由於農業生產上化學農藥的長期大量使用，卻也使整個地球上之生態環境遭逢前所未有的浩劫。值此全人類於新的21世紀邁步向前之際，生物合理性（Biorational）生物製劑或技術的發展，已為社會大眾所肯定取代傳統化學農藥應用性的不二之途。利用本土性的天然拮抗性有益微生物，發展生物合理性的生物防治，以減少或取代化學農藥的應用，近二、三十年來也一直是我國農政單位努力推動的重要科技發展主題。

植物土壤傳播性病害之重要性

由土棲性真菌病原所引起之作物病害，包括疫病菌(*Phytophthora* spp.)、立枯絲核菌(*Rhizoctonia solani*)、镰孢菌(*Fusarium oxysporum*)，大麗輪枝孢菌(*Verticillium dahliae*)與腐霉菌(*Pythium* spp.)等，其危害遍及全世界，由於寄主範圍廣泛、病原菌來自地下藥劑施用難以全面涵蓋，且土壤中生態環境複雜殺菌劑深入穿透不易、殺菌劑應用對土壤生態的負面影響廣受質疑，長久以來化學防治一直是殊為困難之問題，危害嚴重時常見導致業者血本無歸，相關病害的防治管理也一直是栽培業者倍感困擾之問題。針對此些病害之防治，溴化甲烷燻蒸是唯一快又有效的化學防治方法，在溴化甲烷遭禁用後，雖則甫近已有碘化甲烷與氯化苦的混合製劑Midas獲得美國環境保護署(EPA)通過一年登記，然其環境安全性還是備受質疑，替代性的技術仍亟待發展。

鏈黴菌在病害防治之發展應用

鏈黴菌(*Streptomyces* spp.)為普遍存在於各種陸地、水域棲地環境中之革蘭氏陽性細菌，於植物根圈土壤中此一寶貴生物資源含量尤為豐富，土壤特有的臭土味(揮發性)，主要抗菌性土臭素(geosmin, 二甲萘烷醇)成分即源自於鏈黴菌之代謝物。其喜好通氣性良好及偏鹼性環境，一般以絲狀菌體行營養生長，並可產生大量氣生、鏈狀、抗逆境的分生孢子，以度過惡劣的環境，為土壤生態環境中食物鏈終端分解者(decomposers)中極為重要的成員。已知的鏈黴菌種類大約在550種左右，由於其多數具有產生多種抗生物質(antibiotics)與生物巨分子分解酵素(hydrolytic enzymes)之能力，在醫藥、特化工業與農業等生命科學相關產業上的發展應用由來已久。已知救人無數的抗生素中，大多源自鏈黴菌之代謝物，其發酵量產應用亦因而為過去這數十年來一直維持興盛不衰的生技產業。在農業發展方面，自從1943年Waksman氏首度由*Streptomyces griseus* 分離出鏈黴素(streptomycin)，並成功用於細菌性病害之防治迄今，包括保米黴素(blasticidin)、嘉賜黴素(kasugamycin)、保粒黴素(polyoxin)與維利黴素(validamycin)等抗生素產品在病害防治上的開發應用，以及阿巴汀(abamectin) 與畢拉草(bialaphos)等分別在殺蟲與

殺草方面的開發應用，這些成功實例一再顯示，鏈黴菌發酵代謝物對於近代農藥發展貢獻卓著，且影響深遠。

土壤傳播性病害防治鏈黴菌生物製劑之發展應用

在諸多根圈微生物中，鏈黴菌為左右作物根系生長發育極為關鍵的因子，其為纏據根圈極具競爭性之微生物，一旦上到根系後，其不但可佔據病原菌作用部位，並可對土壤中存在之病原菌發揮競生、抗生性效果，因而可保護植物根部使免於病原之危害。此外，其於食物鏈所扮演的終端分解者角色，除了可釋出多種有機營養、有效改善土壤肥力，部分代謝產物更已經被證實對植物之抗病基因表現可有明顯的促進作用。在植物病害防治應用上，上述已知的應用性，咸以有關抗生物質之發展應用為主，在本質上其效果的發揮端賴所產出抗生性「生化學質(biochemicals)」對病原菌之抑制或致死效果。有關抗生素在農業上之應用，由於人類疾病治療上抗藥性問題的日趨嚴重，其妥適性近年來備受關切，有鑑於此，可供生物防治應用之生菌體(biomass)製劑的發展應用近年來漸受重視。唯儘管如此，或由於技術發展仍有待突破，截至目前所知，以生物農藥發展最為前進的美國為例，經EPA正式登記之鏈黴菌活體製劑仍僅有芬蘭Kemira公司所推出的Mycostop，以及美國Natural Industries正在登記中的Actinovate；前者主成分為利用分離自泥炭土拮抗性*S. griseovirides*所製作之可濕性粉劑，每克所含生菌數約在 10^8 ，主要為菌絲體與孢子組成，主要供應用於栽培介質之混拌，推廣應用於土壤傳播性病害之防治管理。後者則為含菌體之水分散性粒劑，主要防治對象同樣為土壤傳播性病害。

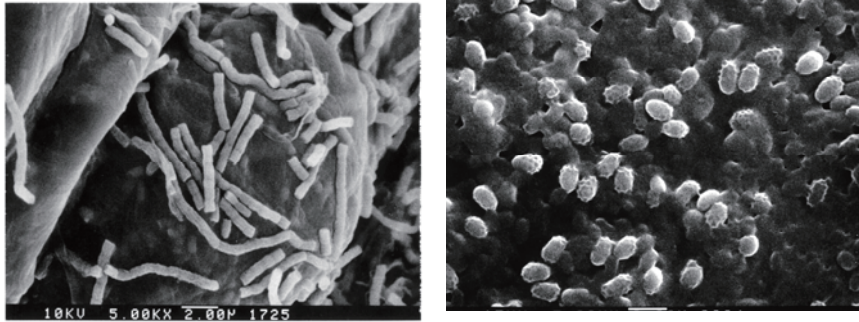
本土性鏈黴菌生物殺菌劑之開發

有鑑於鏈黴菌生物防治製劑在病害防治上之重要性，在農委會與國科會計劃補助下，本研究團隊已完成具生物殺菌劑應用潛力鏈黴菌多重快速篩選法與孢子活體製劑量產技術平臺之建立，有關智財權已由中興大學分別向中華民國及美國提出專利申請，其中中華民國發明專利部分甫近已獲審查通過(證書號碼發明第I 325891號)，同時申請之美國專利目前仍在審查中。利用已建立技術，本研究團隊已由田間採集根圈土壤樣品中選擇性分離篩選獲得近300個本土性、拮抗性優異之鏈黴菌菌株，繼而利用所建立液體發酵量產先導型工廠 5-750L 級量產設備，經由對營養需求與量產流程培養參數之不斷測試改進，產能方面已可達到每毫升 10^{10} CFU以上，內容物主要為耐儲性孢子，經於 6°C 冷藏保存八個月後，存活菌量仍達 10^8 - 10^9 cfu /ml以上(圖一)。在實際應用上，所產出樣品經以一般化學藥劑同樣噴灑、澆灌、或種子浸泡等方式施用，由系列溫室與田間試驗評估，已證實對包括疫病菌 *Phytophthora* spp.、腐霉病菌 *Pythium aphanidermatum*、立枯絲核菌 *Rhizoctonia solani* AG4、鏽孢病菌 *Fusarium oxysporum*、以及炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides* 等之感染均可有比美化學藥劑防治之效果(圖二、圖三)。

應用展望

就鏈黴菌在病害防治上的應用性而言，一般咸認為作用機制主要與其所產生抗生物質對病原的抑制或致死作用有關，近年來的相關研究，則進而指向鏈黴菌所產生包括幾丁質分解酵素(chitinases)與葡萄糖聚糖分解酵素(glucanases)等抗菌性水解酵素(antifungal hydrolytic enzymes)之重要性；在本研究團隊利用所產出活體製劑進行病害防治之實際測試中，既有結果也證實，其應為多重作用機制(multiple mode of action)-包括生長之促進與生長勢之強化、抗生物質與水解酵素對病原真菌之協力抑制效果、對病原真菌之超寄生性(圖四)、超寄生性導致細胞膜之電解質滲漏作用、及系統性抗病性誘導等所發揮之效果，此些作用機制一則與

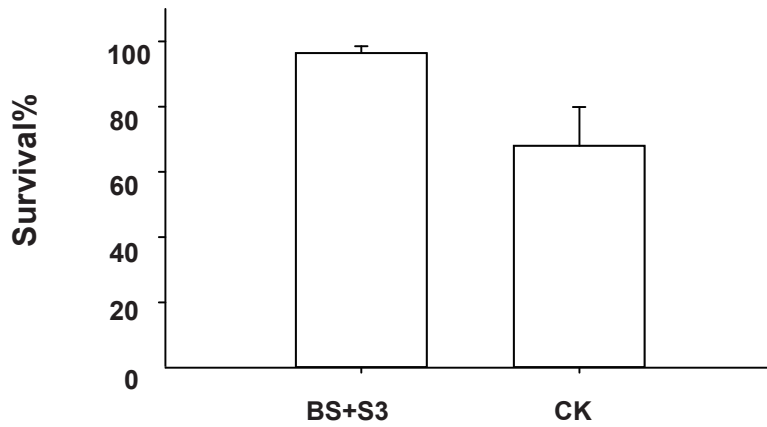
傳統化學藥劑以毒殺作用為主有別，且由於是多重機制之協力效果，其亦較不致於導致病原抗性之產生，在有機栽培應用發展上，其確為可兼顧植物保護應用效果及農業永續發展（Agricultural sustainability）考量上值得推薦給產業界推廣應用之生物科技。



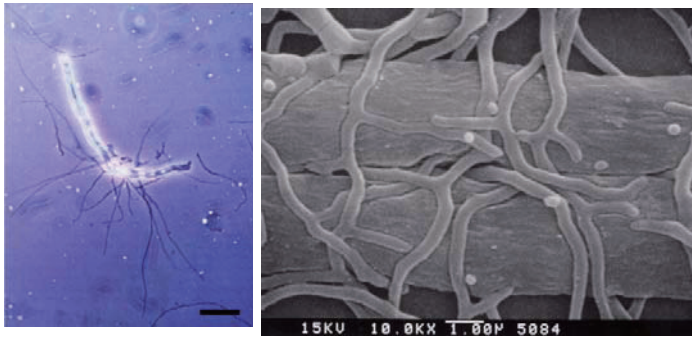
圖一、鏈黴菌*Streptomyces griseobrunneus* S3 (SGS3) 分別於固體平板培養(左圖)及750公升發酵槽液體(右圖)培養下所產出分生孢子之型態



圖二、利用Pilot Plant 發酵設備所產出SGS3 醱酵製劑於嘉義大林地區田間對柑橘裾腐病之防治效果，左圖為經澆灌處理之植株恢復生長之情形，右圖則為未處理之對照植株。



圖三、SGS3醱酵製劑於屏東萬丹地區田間對苦瓜連作障礙之防治效果，上圖示為著果後田間植株存活率調查結果處理組(BS+S)與對照組(CK)比較；下左圖為經澆灌處理之植株旺盛生長之情形，下右圖則為未處理之對照植株。



圖四、左圖為光學顯微鏡檢視鏈黴菌 *Streptomyces griseobrunneus* S3 (SGS3)對於發芽中炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides* 之超寄生作用；右圖則為於掃描式電子顯微鏡檢視下 SGS3 於立枯絲核菌 *Rhizoctonia solani* AG4 之超寄生作用。

本研究主要嘗試開發臺灣本土性鏈黴菌生物資源以供生物殺菌劑發展應用。已建立技術主要包括具有應用潛力菌株之分離篩選及其斷生孢子製劑量產所需液體發酵產程，所產出產品每毫升活體孢子濃度達 10^{10} 以上。利用既有開發完成菌株已證實其可防治包括多種露菌、腐疫病菌、腐霉病菌、立枯絲核菌、鐮刀菌以及炭疽病菌等所致之多種病害，且病害防治效果已知主要為營養與空間競爭性、抗生素性及超寄生性等多重機制之作用效果。所發展鏈黴菌生物殺菌劑於病蟲害綜合管理上之應用價值將為本講題討論重點。

Abstract

The development of Taiwan native *Streptomyces* spp. strains for biofungicide application was attempted. The established techniques include the know-hows to screen for a right competent strain and the liquid fermentation protocols for production of arthrospore formulation wherein the spore concentration exceed 10^{10} per mL. For the available strains developed, the disease control demonstrated include those caused by downy mildews, *Phytophthora* spp., *Pythium aphanidermatum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* and *Colletotrichum gloeosporioides*. The efficacy was known to due primarily to a collective effect of nutrient and space competition, antibiosis, myco-parasitism, induced resistance etc. The value of developed *Streptomyces* biofungicides as a tool for integrated pest management will be addressed.