

# 液化澱粉芽孢桿菌在作物病害防治的開發與應用

郭建志\*、陳俊位、廖君達、陳葦玲、蔡宜峯

行政院農業委員會臺中區農業改良場

\*通訊作者。E-mail: kuocc@tdais.gov.tw

## 摘 要

液化澱粉芽孢桿菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 為芽孢桿菌 (*Bacillus spp.*) 的一種，屬革蘭氏陽性菌，具有周生鞭毛、好氣性、活動力強及無莢膜的細菌。大多存在於土壤、水、空氣及植物體內外。近年來，對於液化澱粉芽孢桿菌防治作物病害的研究日益增多。有關防治作物病害的機制包括可以產生多種抗生物質如 iturin A、surfactin 與 fengycin 等，可抑制病原菌的生長；菌絲可纏聚在植物根圈並誘導植物產生防禦反應，進而抵抗病原微生物的入侵，可分泌多種分解酵素如蛋白質分解酵素 (protease)、纖維分解酵素 (cellulase)、澱粉分解酵素 (amylase) 與脂肪分解酵素 (lipase)，某些菌株具有溶磷活性 (phosphate-solubilizing)，有利於作物吸收養分，促進植株生長；複合揮發性物質 (volatile organic compounds, VOC) 的產生；具有植物根圈促生細菌 (plant growth promoting rhizobacteria, PGPR) 功能，並誘導植物產生抗病反應。目前研究學者多以 gyrB 基因進行液化澱粉芽孢桿菌序列分析與比對，可有效地鑑定與區分枯草桿菌群中相似度高的芽孢桿菌菌種。本場自轄內作物之田間土壤中，分離並篩選數十株具有防治潛力之芽孢桿菌，利用培養基與多種植物病原真菌與細菌拮抗測試、耐熱活孢子數測定、生物活性等測試，篩選出 1 株對數種病原真菌 *Fusarium spp.* 與病原細菌具有優異之拮抗效果。此菌株經由細菌自動鑑定系統 (Biolog system)、16S rRNA 與 gyrB gene 序列分析後，鑑定為液化澱粉芽孢桿菌 (*Bacillus amyloliquefaciens* Tcba05)。利用 PCR 技術可自 Tcba05 菌株之核酸中，增幅出伊枯草菌素 A (iturin-A)、表面活性素 (surfactin) 之專一性 DNA 片段，顯示 Tcba-5 菌株具有產生抗生物質之能力。經由少量搖瓶量產測試後，委由中興大學進行 750 l 醱酵試量產試驗。其菌量經 4 天醱酵後可達  $10^{10}$  cfu/ml，内生孢子亦達  $10^9$  cfu/ml。經過 5 個月儲放後，其菌量仍可維持在  $10^9$  cfu/ml。後續針對豇豆萎凋病與甘藍黑腐病進行防治評估，依據溫室與先期田間試驗結果，本場所篩選之液化澱粉芽孢桿菌 *B. amyloliquefaciens* Tcba05 菌株

液態製劑及 TCB9407, 101-007 與 TC2-8 菌株, 均可有效降低萎凋病菌之罹病度達 40%、甘藍黑腐病之罹病度達 30-40%, 顯示此菌株具有病害防治之潛力, 後續將進行其他蔬菜作物病害之防治評估, 並完成商品化登記之要件, 以利加速推動生物農藥製劑商品化之時程。

**關鍵詞：**液化澱粉芽孢桿菌、生物農藥、抗生物質。

## 前 言

近年來由於農產品的安全受到消費者的重視, 尤其是短期或連續性採收作物之病蟲害問題, 因化學農藥的取得方便與施用便利, 農友長久以來依賴用於防治作物病蟲害的發生, 因此後期導致化學藥劑之殘留過量問題, 且對於自然環境或非標的生物造成會破壞, 並衝擊消費者對於農產品的信心。因此如何減少化學農藥的施用, 以降低藥劑殘留過量的疑慮, 增加消費者對於農產品安全的信心, 是目前重要的安全農業課題之一。因此開發生物農藥製劑之研究及商品融入在作物病害整合性管理策略 (integrated pest management, IPM) 中, 是近年來熱門的研究方向之一 (Jacobsen et al. 2004), 不僅有助於降低化學農藥的使用量, 同時對於無適合藥劑防治的病原菌, 具有預防病害發生或抑制病原菌生長, 專一性高, 病原菌不易產生抗藥性, 並對自然環境與生態友善, 確保農產品的安全。

根據 BCC Research 的研究指出, 全球農藥市場規模於 2012 年為 499 億美元, 預計至 2017 年將成長為 675 億美元, 年複合成長率為 6.2%。其中全球生物農藥市場規模於 2012 年為 21 億美元, 至 2017 年將成長至 37 億美元, 年複合成長率 (CAGR) 為 12%。生物農藥占農藥市場之比重將由 2012 年的 4.21%, 增加至 2017 年約 5.48%, 顯示生物農藥全球產值正逐年成長(資料來源, 臺灣經濟研究院生物科技產業研究中心 國際植物保護製劑市場趨勢簡析)。臺灣處於熱帶與亞熱帶, 雨量充足, 具有豐富的生物與微生物資源, 因此開發本土性微生物做為生物農藥之來源, 產品具有獨特性與競爭力, 對環境友善並可降低對生態環境的衝擊 (陳 et al. 2005)。在微生物農藥的研究方面, 現階段以芽孢桿菌屬 (*Bacillus* spp.) 的研究為多數, 目前應用最廣泛的微生物種類為蘇力菌 (*B. thuringiensis*), 由CPL Business Consultants 資料顯示, 2007 - 2008 年蘇力菌 產品占全球微生物農藥市場的比重約為 53% (許 2010)。其中被研究用來防治作物病害, 且有商品化製劑的菌種有枯草桿菌 (*B. subtilis*)、液化澱粉芽孢桿菌 (*B. amyloliquefaciens*)、蕈狀芽孢桿菌 (*B. mycoides*)、地衣芽孢桿菌 (*B. licheniformis*) 與短小芽孢桿菌

(*B. pumilus*) 等 (表一)。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份及空間、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 (Pal et al. 2006; Cawoy et al. 2011)。液化澱粉芽孢桿菌 (*B. amyloliquefaciens*) 是為一種好氣性的桿菌，多數菌株均可產生大量的  $\alpha$ -amylase 及 protease，因菌種外觀與表現特性與枯草桿菌 *B. subtilis* 相似，因此最早被學者認為是 *B. subtilis* 中的一個亞種。而 Welker et al. (1967) 應用 DNA hybridization 之進行研究，發現枯草桿菌和液化澱粉芽孢桿菌之基因相似度僅 14.7 - 15.4%，其中兩者之 DNA guanine-plus-cytosine 成分 (G+C%) 比率亦有所差異，因此判斷兩種芽孢桿菌為不同的菌種。在 1986 年 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 的分類中，亦將液化澱粉芽孢桿菌分類為 1 個獨立菌株。後來隨著分子層次的研究以及在  $\alpha$ -amylase 的表現差異，之後學者 Priest 等人正式在期刊上發表，將液化澱粉芽孢桿菌真正定義與枯草桿菌是不同的菌種 (Priest et al. 1987)。

液化澱粉芽孢桿菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 在分類上被歸為枯草桿菌群 (*Bacillus subtilis* group) 中，此群中包含 *B. subtilis*、*B. pumilus*、*B. atrophaeus*、*B. licheniformis*、*B. amyloliquefaciens*、*B. mojavensis*、*B. sonorensis*、*B. vallismortis* 和 *B. tequilensis* 等 (Ach et al. 1991; Huang et al. 2012; Wang et al. 2007)，目前美國食品藥物管理局 (United States, Food and Drug Administration, U.S. FDA) 將枯草桿菌群與乳酸菌認定為安全的菌種 (Generally Recognized As Safe, GRAS) (謝 2011; Huang et al. 2012)。以往利用傳統 16S rRNA 針對枯草桿菌群菌種進行 ITS 序列增幅與序列比對，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，不易將此群中的芽孢桿菌進行鑑定與區分。現階段學者常利用 DNA 旋轉酶 (DNA gyrase)，DNA gyrase 是由 GyrB 與 GyrA 蛋白所組成，分別由 *gyrB* 與 *gyrA* gene 所轉錄。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% (王 2011; 吳 2008)，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 株型態特徵相當接近的芽孢桿菌進行親源關係區分。液化澱粉芽孢桿菌在培養過程中會產生許多種不同的二次代謝物，其中包含 aminoglycosides、 $\beta$ -lactams、polyketides 和 small polypeptides 等，其中不同的代謝物質可對不同的病原菌產生抑制作用 (Hsieh et al. 2003)。其中枯草桿菌與液化澱粉芽孢桿菌所產生的

lipopeptides 中，研究最多的為伊枯草菌素 (iturins)、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 (Phister et al. 2004)。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(顏 2007; Besson & Michel 1987; Peypoux et al. 1979)。表面素 (surfactin) 為一種由芽孢桿菌屬之細菌所產生之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，除了具有一般化學界面活性劑的功能外，亦有具有抗病毒、抗菌劑等用途 (Hsieh et al. 2004; Hsieh et al. 2008; Peypoux et al. 1999)。豐原素 (fengycin) 為一種由芽孢桿菌屬之細菌所產生之脂肽類抗真菌抗生素，結構是由脂肪酸與肽所組成，最早由 Loeffler 等人所發現 (Loeffler et al. 1986)，後續發現培養上清液對於紋枯病菌 (*Rhizoctonia solani*) 具有抑制生長效果。豐原素與表面素相同，其亦具有生物界面活性劑之功能。根據文獻報告指出某些芽孢桿菌菌株所產生之 surfactin 與 fengycin 等 lipopeptides，參與了 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 (Ongena et al. 2007; Yang et al. 2009)。

目前國內外已有芽孢桿菌屬包括液化澱粉芽孢桿菌之商品化製劑 (Alejandro et al. 2011)，例如美國 Certis 公司於 2011 年上市的 Double Nickel 55<sup>TM</sup>，屬於廣效性微生物製劑 (表一)，2012 年核准在美國加州使用，主成分為 *B. amyloliquefaciens* strain D747，主要應用於作物葉部的真菌與細菌性病害，例如白粉病 (Powdery mildew)、灰黴病 (*Botrytis* spp.)、火傷病 (Fire blight)、葉斑病 (*Alternaria* spp.) 與斑點病 (*Xanthomonas* spp.) 等。此外，中國大陸國家農業部於 2013 年 5 月首次頒發給予陝西省西安經濟技術開發區的陝西加倫多作物科學有限公司所篩選與研發的液化澱粉芽孢桿菌 (解澱粉芽孢桿菌) 為活性成分的微生物殺菌劑生產許可證，此菌株主要防治對象為水稻稻熱病。國內行政院農業委員會藥物毒物試驗所，謝奉家博士團隊所篩選之 *Bacillus amyloliquefaciens* Ba-BPD1 菌株，對於數十種的病原菌具有抑制生長之效果，經研究試驗顯示 *B. amyloliquefaciens* Ba-BPD1 菌株同時具有微生物肥料、農藥及飼料添加物之功效 (謝 2011; 謝 2012)。已於 2013 年將微生物肥料與農藥專利與技術轉移給台灣肥料股份有限公司，飼料添加物技術轉移給沅美生物科技股份有限公司，顯示液化澱粉芽孢桿菌不僅可以預防作物病害的發生，更可以提昇作物的產量與品質，

同時兼具益生菌的功效，作為飼料添加物。因此篩選具有多功能的液化澱粉芽孢桿菌株，了解菌株的特性與功能，將可發揮最大之功效，有助於作物病害防治研究的新思維。

以下內文就液化澱粉芽孢桿菌的開發、應用現況與本場研究成果進行討論。

表一、國外已商品化之芽孢桿菌屬生物殺菌劑 (Alejandro et al. 2011)

Table 1. Commercial formulations of *Bacillus*-based biofungicides

Product	<i>Bacillus</i> spp.	Target Pest	Crop	Manufacturer
Avogreen	<i>B. subtilis</i>	<i>Cercospora</i> spot	Avocado	Stimuplant, South Africa
Biobest	<i>B. subtilis</i>	Sheath blight, blast, brown spot	Rice	Appliedchem, Thailand
Bactophyt	<i>B. subtilis</i>	<i>Pseudomonas</i> , <i>Xanthomonas</i>	Cereal, Vegetable and Fruit crops	Novosibirsk, Russia
Companion	<i>B. subtilis</i>	<i>Rhizoctonia</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Pythium</i> , <i>Phytophthora</i> , <i>Sclerotinia</i>	Greenhouse, nursery and ornamental crops	Growth Products, USA
HiStick <sup>a</sup>	<i>B. subtilis</i>	<i>Fusarium</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Aspergillus</i>	Soybean and peanuts	Becker Underwood, USA
Kodiak	<i>B. subtilis</i> GB03	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Aspergillus</i>	Cotton, legumes, soybean, Vegetable crops	Bayer CropScience, USA
Larminar	<i>B. subtilis</i>	<i>Alternaria</i> , <i>Botryodiplodia</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Phytophthora</i> , <i>Colletotrichum</i> , <i>Corticium</i>	Vegetables, fruit trees, ornamentals, rice, and field crops	Appliedchem, Thailand
Rhapsody	<i>B. subtilis</i> QST 713	<i>Rhizoctonia</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Pythium</i> , <i>Phytophthora</i>	Turf, ornamental, Vegetable and fruit greenhouse crop	AgraQuest, USA
Serenade	<i>B. subtilis</i> QST 713	Rust, powdery mildew, <i>Botrytis</i> , <i>Sclerotinia</i>	Vegetable, wine, nut and fruit crops	AgraQuest, USA
Subtilex	<i>B. subtilis</i> MBI600	<i>Rhizoctonia</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Aspergillus</i>	Field, ornamentals and vegetable crops	Becker Underwood, USA
Balled Plus	<i>B. pumilus</i>	Rust, powdery mildew, <i>Cercospora</i> spot, brown spot	Soybean	AgraQuest, USA

Sonata	<i>B. pumilus</i>	Rust, powdery and downy mildew	Vegetable and Fruit Crops	AgraQuest, USA
YieldShield	<i>B. pumillus</i> GB34	<i>Rhizoctonia</i> , damping off, <i>Fusarium</i>	Seed treatment, Soybean	Gustafson, USA
Votivo	<i>B. firmus</i>	Root-knot and Reniform Nematode	Cotton	Bayer CropScience, USA
EcoGuard	<i>B. licheniformis</i>	Dollar spot, anthracnose	Turf	Novozymes, Denmark
Taegro	<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>Fusarium</i> , <i>Rhizoctonia</i>	Tree seedling, ornamentals and shrubs	Novozymes, Denmark
Double Nickel55	<i>B. amyloliquefaciens</i> D747	Powdery mildew, <i>Botrytis</i> , Fire blight, <i>Alternaria</i> , <i>Xanthomonas</i> , <i>Pseudomonas</i>	Vegetable and Fruit Crops	Certis, USA

<sup>A</sup> This formulation is composed by *B. subtilis* and rhizobial cells.

## 一、液化澱粉芽孢桿菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)之研發現況

### (一) 特性介紹與篩選鑑定方式

液化澱粉芽孢桿菌分類上屬於芽孢桿菌類之微生物 (*Bacillus* spp.)，屬革蘭氏陽性菌，特性為好氧性、具有周生鞭毛、活動力強及無莢膜的細菌，大多為腐生菌，存在於土壤、水、空氣及植物體內外。可生長在 pH 2 - 10 的環境之下，具有耐高溫之特性，生長最適溫度為 30 - 40°C，遇高溫或是不良環境可以產生內生孢子。部分研究證實液化澱粉芽孢桿菌具有植物內生性功能，根據陳等人之研究報告指出，內生液化澱粉芽孢桿菌對細菌性病原甘藷青枯病菌 (*R. solanacearum*) 有良好拮抗效果 (Chen et al. 2013)。以往研究，多被用來生產  $\alpha$ -amylase 於工業用途 (Argirakos et al. 1992)，近年來的研究顯示，液化澱粉芽孢桿菌可以抑制多種的病原菌生長，真菌病原包含立枯絲核菌 (*Rhizoctonia solani*)、灰黴病菌 (*Botrytis elliptica*)、番茄萎凋病 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*)、白絹病 (*Sclerotium rolfsii*)、茄科疫病 (*Phytophthora capsici*)、蓮霧果腐菌 (*Pestalotiopsis eugeniae*) 等 (謝 & 高 2011; 謝 2012; Hsieh et al. 2003); 細菌病原包括十字花科黑腐病 (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*)、柑橘潰瘍病 (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*)、蔬菜軟腐病 (*Pectobacterium carovororum* subsp.

*carovorum*) 與青枯病 (*Ralstonia solanacearum*) (Chen et al. 2013; Chou et al. 2012; Huang et al. 2012; Wu et al. 1999)。王等人於烏山頂泥火山之泥漿中篩選出數十株細菌，經由生理型態與 PCR 技術增幅其 16S rRNA gene、16S-23S internal transcribed space region (ITS) 與專一性功能基因之 DNA 片段，將所增幅出的片段利用 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 的基因資料庫進行序列比對與鑑定，挑選具有發展潛力之菌株，鑑定為液化澱粉芽孢桿菌 *Bacillus amyloliquefaciens* A1。後續經培養基對峙、拮抗與上清液抑菌測試，A1 菌株可對多種植物病原真菌與細菌具有優異的生長抑制效果，特別對於 *Ralstonia solanacearum*、*Botryodiplodia theobromae* 與 *Alternaria brassicae* 具有最佳的抑制效果 (王 2011)。芽孢桿菌屬包含液化澱粉桿菌目前已知防治病害機制，包括競爭作用 (competition)、抗生作用 (antibiosis)、誘導抗病反應 (induced host resistance)、促進生長 (growth promotion) 與產生複合揮發性物質等作用 (陳 et al. 2009)。

## (二) 分解酵素與揮發性物質研究

液化澱粉芽孢桿菌經研究證實可產生多種胞外分解酵素，包含纖維素分解酵素 (cellulase)、蛋白質分解酵素 (protease)、脂質分解酵素 (lipase)、澱粉分解酵素 ( $\alpha$ -amylase)、甚至某些菌株具有溶磷 (phosphate-solubilizing) 等能力 (謝 & 高 2011; Welker et al. 1967; Vazquez et al. 2000)。目前研究證實 *Bacillus* spp. 屬的細菌可以分泌揮發性物質，且具有抑制病原真菌 *Rhizoctonia solani* 與 *Pythium ultimum* 生長之效果 (Fiddaman et al. 1993)。黃等人所篩選與研發的蕈狀芽孢桿菌 *Bacillus mycoides* CHT2402 發現具有產生吲哚乙酸 (indole-3-acetic acid, IAA) 與氨氣 ( $\text{NH}_3$ ) 之特性，將其細胞懸浮液施用於番茄、西瓜與萵苣三種植株上，可增加植株鮮重 (Chen et al. 2010)。

## (三) 植物根圈促生細菌研究 (plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR)

PGPR 促進植物生長的機制可分為兩種，若 PGPR 微生物分泌如吲哚乙酸、吉貝素或植物生長素等植物荷爾蒙來調節根部活化作用，稱之為直接促進效用。另一種則是 PGPR 微生物藉由產生抗生物質、嵌鐵物質、競爭養分及誘導植株產生抗病性，避免或降低植物受到病原菌的危害與入侵，此類稱之為間接促進效用 (Chen et al. 2010)。Idris 等人發現 *B. amyloliquefaciens* FZB42 的培養稀釋濾

液中含有類似吲哚乙酸的化合物 (IAA-like)，施用於玉米幼苗上經證實可以促進玉米幼苗的生長 (Idris et al. 2004)。Zehnder 等人發現 *B. amyloliquefaciens* IN937a 施用在番茄作物上，可誘發番茄產生 induced systemic resistance (ISR) 反應，可以抵抗 CMV 病毒的入侵 (Zehnder et al. 2000)。另有學者研究 *B. amyloliquefaciens* KPS46 培養過濾液中含有 indoles、lipopeptides 與 proteins，可以促進大豆根長、莖長與鮮重 (Buensanteai et al. 2008)。

#### (四) 抗生物質 antibiotics 研究

芽孢桿菌屬之細菌已知可在二次代謝過程中產生多種抗生物質，目前已知被報導過抗生物質種類多達 170 種以上，這些抗生物質對於多種植物病原細菌與真菌均具有優異之抗生效果 (Hsieh et al. 2003)。

伊枯草菌素 (iturins) 為枯草桿菌 (*B. subtilis*) 以及液化澱粉芽孢桿菌 (*B. amyloliquefaciens*) 之二次代謝物 (林 2002; 顏 2007)，亦為主要抗生物質，於培養中期即會開始進行胞外分泌，於 1957 時由 Delcambe 與 Devignat 自枯草桿菌 *B. subtilis* 443 strain 首度分離出，目前已知的 iturins group 包含 iturin A、B、C、D、E，其中 iturin A 為最重要且研究最多之種類；表面素 (surfactin)，為一種由枯草桿菌類微生物所產生之脂狀類生物界面活性劑，具有多種異構物 (isoforms)，如 surfactin A、B 及 C，一般較易集中出現在菌體發酵液的泡沫中，除具有一般化學界面活性劑的功能外，亦有具有抗病毒、抗菌劑等用途 (林 2004; Hsieh et al. 2004; Peypoux et al. 1999)，根據文獻指出某些菌株如 *B. amyloliquefaciens* KPS46 所產生之 surfactin 有誘導植物抗性以及促進植物生長之功效 (Buensanteai et al. 2008)。豐原素 (fengycin) 為 Vanittanaakom 等人發現枯草桿菌 *B. subtilis* F-29-3 菌株之培養上清液中，對立枯絲核病菌 (*Rhizoctonia solani*) 具有抑制菌絲生長功效，可造成菌絲的不正常膨大及捲曲，其結構是由脂肪酸與胛肽所組成。後來許多研究也證實液化澱粉芽孢桿菌也具有此胛肽物質，同時亦具有生物界面活性劑之功能 (Vanittanaakom et al. 1986; Wu et al. 2007)。此外 Alvarez 等人亦自 *B. amyloliquefaciens* ARP<sub>23</sub> 培養上清液中，分離出包含 iturin A、surfactin 與 fengycin 等胛肽，對於大豆菌核病 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 具有優異的抑制菌絲生長效果，噴施於大豆上可大幅降低菌核病的發生 (Alvarez et al. 2012)。上述所提及之 3 種主要胛肽物質皆為菌體透過非核糖體胛肽合成機制 (non-ribosomal peptide synthesis mechanism) 所合成 (林



2002; Blom et al. 2012; Peypoux et al. 1999; Wu et al. 2007)。

## 二、液化澱粉芽孢桿菌在病害防治之應用

### (一) 葉部病害防治之研究

國立臺灣大學吳文希教授曾自 700 多株微生物中篩選對百合灰黴病具有明顯拮抗能力之菌株，其中 B190 菌株除了對百合灰黴病可以有效抑制外，同時對於其他數十種植物病原菌亦具有抑制生長之效果，經鑑定後為本土性之液化澱粉芽孢桿菌 (Chiou & Wu 2003)。Biondi 等學者將 *B. amyloliquefaciens* D747 菌株，預先噴施於奇異果之葉片上，可以有效降低細菌性潰瘍病 (*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*) 族群的量，同時 D747 菌株噴施於葉片後，經過 21 天後，其菌量仍可達到  $10^8$  cfu/ml 以上 (Biondi et al. 2012)。

### (二) 土壤傳播性病害防治之研究

陳等人所篩選之 *B. amyloliquefaciens* SPX-1 菌株來自葉用甘藷莖部，經研究亦證實具有抑制青枯病菌生長之能力，分別利用剪莖接種法進行對甘藷青枯病防治的溫室試驗，於第 4 週時，處理 SPX1 菌株之植株的青枯病罹病度為 32.1%，比對照組降低 67.9%。證明 SPX1 菌株可降低甘藷青枯病的罹病率，同時此菌株為內生性，經接種後不影響甘藷的正常生長，具有發展成微生物製劑之潛力 (Chen et al. 2013)。Altinok 等人所研究數十株芽孢桿菌對茄子萎凋病 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae*)，在溫室接種後，*B. amyloliquefaciens* 76A-1 和 *B. subtilis* subsp. *subtilis* B379c，罹病率分別為 14.1% 與 16.6%，相較於對照組罹病率 91.5%，具有明顯降低茄子萎凋病罹病率之情形，同時此兩種菌株具有 PGPR 之功效 (Altinok et al. 2013)。近年周等人研究發現，利用 *B. amyloliquefaciens* KH412 與 PMB01 菌株在田間與 *Streptococcus thermophiles* KH446 菌株複合使用後，可明顯降低青枯病的發生，具有防治茄子青枯病的潛力 (Chou et al. 2012)。謝等人所篩選與研發的 *B. amyloliquefaciens* Ba-BPD1 對於數十種的病原菌真菌與細菌具有優異的拮抗能力，田間施用後可降低草莓灰黴病罹病度達 36%、施用於水稻，可降低紋枯病罹病度約 30 - 40%。此外在蝴蝶蘭黃葉病 *Fusarium solani* 溫室盆栽防治評估試驗，施用 10 週後可明顯降低黃葉病之罹病度達 58%，且對於蝴蝶蘭具有內生性效果 (謝 2012)。

### (三) 倉儲病害防治之研究

Arrebola 等人自水果表面所分離之 *B. amyloliquefaciens* PPCB004 菌株，發現對於 7 種不同柑橘倉儲病原真菌具有抗菌活性，經研究發現抗菌活性成分為 iturin A。分別進行接種病原菌前 1 天與後 1 天分別將柑橘果實浸泡處理於 PPCB004 菌株醱酵液中，接種之病原菌為柑橘黑斑病 (*Alternaria citri*)、酪梨炭疽病 (*Colletotrichum gloeosporioides*) 與柑橘青黴病 (*Penicillium crustosum*)。結果顯示，PPCB004 菌株防治柑橘青黴病的效果最佳，預先 1 天處理之罹病率為 9.8%、後一天處理之罹病率為 100%。PPCB004 菌株防治柑橘黑斑病的效果次之。PPCB004 菌株前 1 天處理組之罹病率為 28.3%，後 1 天處理組之罹病率為 50%，而對照組則為 92% (Arrebola et al. 2009)。顯示 PPCB004 菌株若是預先處理果實，可以顯著降低這 3 種病害的發生。Mohamed 等人亦利用 *B. amyloliquefaciens* PPCB004 菌株結合 1-甲基環丙烯 (1-Methylcyclopropene, 1-MCP)，經研究結果顯示，預先處理 1-MCP 後再處理 PPCB004 菌株，可降低蒂腐病菌 (*Phomopsis caricae-papayae*) 及炭疽病菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) 在木瓜上的病斑大小及罹病程度，在蒂腐病與炭疽病之發病率上，對照組分別為 48% 與 39%；預先處理 PPCB004 + 1-MCP 之發病率分別為 21% 與 15%，可以明顯降低兩種倉儲病害之發病率，且採收後的木瓜果實，與對照組相比皆有促進生理與品質之效果 (Mohamed et al. 2011)。顯示 *B. amyloliquefaciens* PPCB004 菌株極具有開發成為商品化之潛力。

## 三、本場液化澱粉芽孢桿菌防治作物病害之研究成果

### (一) 液化澱粉芽孢桿菌之篩選與鑑定

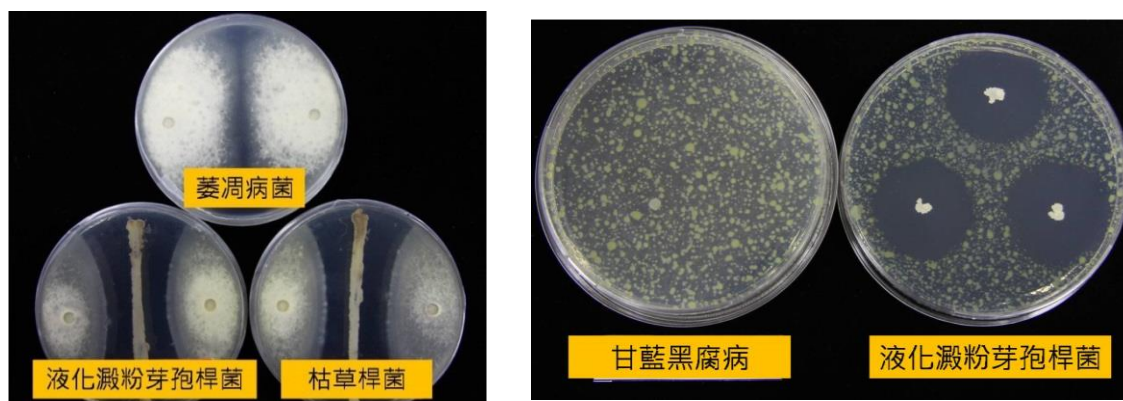
於 2010 – 2011 年間自轄內果樹柑橘園及蔬菜栽培田土壤所篩選數十株芽孢桿菌屬 (*Bacillus* spp.) 的細菌，利用培養基測試芽孢桿菌對於數十種病原菌拮抗效果，其中編號 Tcba05 菌株對數種真菌萎凋病菌 (*Fusarium oxysporum*) 與甘藍黑腐病 (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) 具優良拮抗效果 (圖一)。經各項生理生化測試、並利用細菌自動鑑定系統 (Biolog system)、16S rRNA 及 *gyrB* 基因進行序列分析，依其結果，將此菌種鑑定為液化澱粉芽孢桿菌 *Bacillus amyloliquefaciens*，並編號為 *B. amyloliquefaciens* Tcba05 以進行後續試驗研究。

## (二) 抗生物質之檢測

應用Hsien等人 (Hsieh et al. 2004; Hsieh et al. 2008) 所發表文獻，檢測 *Bacillus spp.* 的抗生物質之引子對：*ituD-f/ ituD-r* 與 *lpa-14f/ lpa-14r* (iturin gene)，*sfp-f/ sfp-r* (surfactin gene)，應用 PCR 技術可自所篩選之 Tcba05 菌株核酸中，可分別增幅出 iturin 與 surfactin gene 之專一性 DNA 片段，說明 Tcba05 菌株具有產生抗生物質之能力。

## (三) 液化澱粉芽孢桿菌 *Bacillus amyloliquefaciens* Tcba05 量產配方之建立

利用少量搖瓶測試結果，已初步建立量產配方及相關比例，並添加磷酸氫鉀可減緩醱酵液 pH 值下降幅度，於實驗室內桌上型 10 l 醱酵槽 (Majar Science Winpact 10 l) 進行小型量產試驗，經醱酵 96hr 後收槽，平均活孢子數可達  $6.5 \times 10^9$  cfu/ml，較先前 250ml 搖瓶量產之活孢子數增加約 3 倍。之後委託中興大學曾德賜教授進行 50 l 與 750 l 試量產醱酵，經由 96hr 後收槽，平均活孢子量可達  $10^{10}$  cfu/ml，內生孢子含量亦達  $10^9$  cfu/ml。



圖一、液化澱粉芽孢桿菌Tcba05與萎凋病菌 (左) 和甘藍黑腐病 (右) 對峙培養結果。

Fig.1. *Bacillus amyloliquefaciens* Tcba05 dual culture with *Fusarium oxysporum* f. sp. tracheiphilum and *Xanthomonas campestris* pv. campestris.

## (四) 豆類萎凋病與甘藍黑腐病溫室與田間先期防治評估

豆類萎凋病係由真菌镰孢菌 (*Fusarium oxysporum*) 所引起，具有不同的分化型，多種豆菜類作物皆會受到此病原真菌的為害，本研究中所研發的液化澱粉芽孢桿菌液態製劑配方，經溫室與小規模田間防治試驗，可有效降低長豇豆萎凋病的發生與罹病情形，溫室與先期田間之罹病度均可降低 40% (未發表資料)。未來仍持續進行其他豆菜類與十字花科蔬菜作物溫室與田間防治測試。甘

藍黑腐病可藉由種子傳播的方式感染甘藍苗與成株，造成產量上的損失。本場篩選出之 4 株液化澱粉芽孢桿菌TCB9407, 101-007, TC2-8 and Tcba05，與其他芽孢桿菌進行田間防治測試，罹病度僅 5 - 10%，相較對照組 40 - 50% 為低（未發表資料），可以有效抑制與降低甘藍黑腐病之危害。



圖二、噴施液化澱粉芽孢桿菌 Tcba05 液態製劑 100x，可以降低甘藍黑腐病罹病度達 40%。(左：對照組/右：處理組)

Fig. 2. Irrigated the 100x of *B. amyloliquefaciens* Tcba05 ferment broth on Cabbage in the field, after 8 weeks, disease incidence could reduced 40%.

## 結 語

液化澱粉芽孢桿菌 *Bacillus amyloliquefaciens* 分類上屬於為枯草桿菌群 *B. subtilis* group 中的革蘭氏陽性細菌，現階段許多研究證實液化澱粉芽孢桿菌具有多種功能，可以分泌多種胞外酵素、抗生物質、產生揮發性物質、具有 plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) 功能與誘導植物產生抗病反應等多重機制，來幫助作物來抵抗病原菌的入侵或感染。目前國外已有屬於液化澱粉芽孢桿菌生物農藥製劑商品 Double Nickel 55<sup>TM</sup>，屬於廣效性的生物農藥。國內在篩選拮抗微生物與醱酵量產的技術已臻完備，成功的生物農藥製劑需具備下列條件：(1) 選擇優異對多種病原具防治潛力的菌株，(2) 可大量生產菌種的配方條件，且櫥架壽命須維持1年以上的時間，(3) 生物農藥製劑在田間穩定性，降低環境因子的干擾，(4) 生物農藥製劑適當導入栽培管理與整合性病蟲害管理之中，以提升農友的使用意願。Heydari等人提及新劑型的開發、利用生物技術與奈米技術，來了解防治機制與改善防治策略，是後續研究生物農藥製劑的重點 (Heydari & Pessarakli 2010)。為提升生物農藥關鍵技術之開發能量，未來仍持續加強的重點如下列：(1) 有效整合既有微生物資源與技術平台，強化跨領域合作機制與落實產業化之應用。(2) 建

立國內本土性微生物菌種鑑定平台，避免重複篩選，並建立智財權保護機制。(3) 釐清生物農藥作用機制，建立有效成分檢測技術。(4) 建立生物農藥合理有效之田間應用模式 (陳 et al. 2005)。本場近年所篩選與研發之數十株芽孢桿菌，其中液化澱粉芽孢桿菌 Tcba05 菌株，經過溫室與小規模田間病害防治評估後，可以有效降低長豇豆萎凋病與甘藍黑腐病之罹病度，目前後續正強化該菌種在生物防治的應用價值，並完成生物農藥商品化的登記要件。未來可應用於作物整合性病蟲害管理策略 (integrated pest management, IPM) 中，或是開發成為生物與化學複合配方農藥，可達到提高病害防治效果、減少化學藥劑的施用、友善生態環境，有助於增加農產品的安全性等。

### 參考文獻

- 王惠亮、謝建元 2011 液化澱粉芽孢桿菌泥漿分離株之分離鑑定 p. 15. 海峽兩岸生物防治研討會論文專刊。
- 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。
- 林弘裕 2002 液化澱粉芽孢桿菌胜肽抗生物質之分析與回收純化物質探討 國立東華大學生物技術研究所碩士論文。
- 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 21(1): 5-8。
- 許嘉伊 2010 全球生物農藥產業概況與未來展望 農業生技產業季刊 24: 1-7。
- 陳保良、李木川、黃德昌、葉瑩 2005 生物性農藥管理與未來展望 4: 54-59。
- 陳俊位、鄧雅靜、曾德賜 2009 功能性微生物製劑在有機作物栽培病害管理上之應用 p.147-181. 有機農業產業發展研討會專輯 臺中區農業改良場特刊第 96 號 彰化。
- 謝奉家、高穗生 2011 具商品化潛力之多功能液化澱粉芽孢桿菌 p. 28-29. 海峽兩岸生物防治研討會論文專刊。
- 謝奉家 2011 臺灣芽孢桿菌生物殺菌劑的研發與應用現況 p. 1-11. 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所技術專刊第205號 臺中。
- 謝奉家 2012 具商品化潛力之多功能液化澱粉芽孢桿菌 農業生技產業季刊 32: 42-47。
- 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。89頁。
- Ash, C., J. A. E. Farrow, S. Wallbanks and M. D. Collins. 1991. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. Lett. Appl. Microbiol. 13(4): 202-206.
- Alejandro, P. G., D. Romero and A. D. Vicente. 2011. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of *Bacilli* in agriculture.

- Curr. Opin. Biotechnol. 22: 187-193.
- Argirakos, G., T. Kuganakathan and D. A. J. Wase. 1992. Effect of Immobilisation on the Production of  $\alpha$ -Amylase by an Industrial Strain of *Bacillus amyloliquefaciens*. J. Chem. Technol. Biotechnol. 35(1): 33-38.
- Arrebola, E., R. Jacobs and L. Korsten. 2009. Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens. J. Appl. Microbiol. 108: 386-395.
- Altinok, H. H., M. Dikilitas and H. N. Yildiz. 2013. Potensial of *Pseudomonas* and *Bacillus* isolates as biocontrol agents against Fusarium wilt of eggplant. Biotechnol. Eq. 27(4): 3952-3958.
- Alvarez, F., M. Castro, A. Principe, G. Borioli, S. Fischer, G. Mori and E. Jofre. 2012. The plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* strains MEP<sub>2</sub>18 and ARP<sub>2</sub>3 capable of producing the cyclic lipopeptides iturin or surfactin and fengycin are effective in biocontrol of sclerotinia stem rot diseases. J. Appl. Microbiol. 112(1):159-174.
- Besson, F. and G. Michel. 1987. Isolation and characterization of new iturins: iturin D and iturin E. J. Antibiot. 40(4): 437-442.
- Blom J., C. Rueckert, B. Niu, Q. Wang and R. Borriss. 2012. The complete genome of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* CAU B946 contains a gene cluster for nonribosomal synthesis of iturin A. J. Bacteriol. 194(7): 1845-6.
- Biondi, E., N. Kuzmanovic, A. Galeone, E. Ladurner, M. Benuzzi, P. Minardi and A. Bertaccini. 2012. Potensial of *Bacillus amyloliquefaciens* strain D747 as control agent against *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. J. Plant Pathol. 94: 58.
- Buensanteai, N., G. Y. Yuen and S. Prathangwong. 2008. The Biocontrol Bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 produces auxin, surfactin and extracellular proteins for enhanced growth of soybean plant. Thai J. Agric. Sci. 41: 101-116.
- 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.
- Chen, Y. J., H. R. Pan, Y. S. Lin and W. H. Chung. 2013. Identification of an antagonistic bacterial endophyte from vegetable sweet potato and assessment of its efficacy on controlling bacterial wilt disease. Plant Pathol. Bull. 22: 45-56.
- Chen, H. W., Y. H. Lin, J. W. Huang and, P. F. Chang. 2010. Effect of *Bacillus mycoides* on seedlings growth of lettuce. Plant Pathol. Bull. 19: 157-165.
- Chiou, A. L. and W. S. Wu. 2003. Formulation of *Bacillus amyloliquefaciens* B190 for Control of Lily Grey Mould (*Botrytis elliptica*) J. Phytopathol. 151: 13-18.
- Chou, H. P., Y. H. Lin, Y. C. Yen, Y. C. Chen and T. C. Huang. 2012. Application and evaluation of multiple microorganisms in controlling bacterial wilt of Solanaceous

- plants. p. 30. 101 annual meeting of the plant protection society of the Republic of China.
- Fiddaman, P. J. and S. Rossall. 1993. The production of antifungal volatile by *Bacillus subtilis*. J. Appl. Bacteriol. 74: 119-126.
- Heydari, A. and M. Pessarakli. 2010. A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. J. Biol. Sci. 10(4): 273-290.
- 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.
- 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.
- 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.
- Huang, T. P., D. D. S. Tzeng, A. C. L. Wong, C. H. Chen, K. M. Lu, Y. H. Lee, W. D. Hiang, B. F. Hwang and K. C. Tzeng. 2012. DNA Polymorphisms and Biocontrol of *Bacillus* Antagonistic to citrus bacterial canker with indication of the interference of phyllosphere biofilms. PLoS One 7(7): e42124.
- Idris, E. E., H. Bochow, H. Ross and R. Borriss. 2004. Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. VI. Phytohormone-like action of culture filtrates prepared from growth-promoting *Bacillus amyloliquefaciens* FZB24, FZB42, FZB45 and *Bacillus subtilis* FZB37. J. Plant Dis. Prot. 111(6): 583-597.
- Loeffler, W., S. M. Tschen, N. Vantittanakom, M. Kugler, E. Knorpp, T. F. Hsieh and T. G. Wu. 1986. Antifungal effects of bacilysin and fengycin from *Bacillus subtilis* F-29-3. J. Phytopathol. 115: 204-213.
- Mohamed, S.O., D. Sivakumar and L. Korsten. 2011. Effect of biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* and 1-methyl cyclopropene on the control of postharvest diseases and maintenance of fruit quality. Crop Prot. 30(2): 173-178.
- Ongena, M. and P. Jacques. 2007. *Bacillus* lipopeptides : versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends Microbiol. 16(3): 115-125.
- Ongena, M., E. Jourdan, A. Adam, M. Paquot, A. Brans, B. Joris, J. L. Arpigny and P. Thonart. 2007. Sufactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitor of induced systemic resistance in plants. Environ. Microbiol. 9(4): 1084-1090.
- 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.
- 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.
- Peypoux, F., J. M. Bonmatin and J. Wallach. 1999. Recent trends in the biochemistry of Surfactin. Appl. Microbiol. Biot. 51: 553-63.
- 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.
- Priest, F. G., M. Goodfellow, L. A. Shute and R. C. W. Berkeley. 1987. *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov., nom. rev. Int. J. Syst. Bacteriol. 37(1): 69-71.
- Vanittanaakom, N., W. Loeffler, U. Koch and G. Jung. 1986. Fengycin-A novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. J. Antibiot. 39: 888-901.
- Vazquez, P., G. Holguin, M. E. Puente, A. L. Cortes and Y. Bashen. 2000. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. Bio. Fertil. Soils. 30: 460-468.
- 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. Bacteriol. 57: 1846-1850.
- Welker, N. E. and L. L. ampbell. 1967. Comparison of the  $\alpha$ -amylase of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*. J. Bacteriol. 94: 1131-1135.
- Wu, C. Y., C. L. Chen, Y. H. Lee, Y. C. Cheng, Y. C. Wu, H. Y. Shu, F. Götz and S. T. Liu. 2007. Nonribosomal synthesis of fengycin on an enzyme complex formed by fengycin synthetases. J. Biol. Chem. 282(8): 5608-16.
- Wu, W. S. and T. W. Chen. 1999. Biological control of carrot black rot. J. Phytopathol. 147: 99-104.
- 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.
- Zehnder, G. W., C. Yao, J. F. Murphy, E. R. Sikora and J. W. Kloepper. 2000. Induction oh resistance in tomato against cucumber mosaic cucumovirus by plant growth-promoting rhizobacteria. BioControl 45: 127-137.
- Zhao, Y., P. Li, K. Huang, H. Hu and Y. Sun. 2013. Control of postharvest soft rot caused by *Erwinia carotovora* of vegetables by a strain of *Bacillus amyloliquefaciens* and its potential modes of action. J. Microbiol. Biotechnol. 29: 411-420.



## Development and Application of *Bacillus amyloliquefaciens* on Plant Diseases Biocontrol

Chien-Chih Kuo\*, Chien-Wei Chen, Chung-Ta Liao, Wei-Lin Chen  
and Yi-Fong Tsai

Taichung District Agricultural Research and Extension Station, COA

\*Corresponding author. E-mail: kuocc@tdais.gov.tw

### ABSTRACT

*Bacillus amyloliquefaciens* is one kind of *Bacillus* spp. It is belong to the *B. subtilis* group of aerobic, Gram-positive, peritrichous flagella, endospore-forming, no capsule and rod-shaped microorganisms. Research on the plant pathogen control by *B. amyloliquefaciens* is progressively increased. *Bacillus amyloliquefaciens* could produced various enzymes, included cellulose, protease, lipase and amylase. Some strains have phosphate-solubilizing activity. The lipopeptides produced from *B. amyloliquefaciens* can also influence the ecological fitness in terms of root colonization and also have a key role in the beneficial interaction with plants by stimulating host defence mechanisms. In this study, we isolated a dozens of microorganisms which have antimicrobial effect from soil. We select the *Bacillus* sp. Tcba05 strain which could inhibit the mycelium growth of *Fusarium oxysporum* by the antagonistic test. Used the Biolog system, 16S rRNA and gyrB gene identified Tcba05 strain as *Bacillus amyloliquefaciens*. The iturin-A and surfactin specific DNA fragment could be amplified by PCR technique. Results showed that *B. amyloliquefaciens* Tcba05 could produce the antibiotics. We commissioned National Chung-Hsien University produced 50 l and 750 l Tcba05 fermentation broths, the total colony count could reach to  $10^{10}$  cfu/ml after 4 days ferment, endospores number could reach  $10^9$  cfu/ml, the total colony count still can maintain to  $10^9$  cfu/ml after 5 months. We evaluated the bio-control effectivity of Tcba05 on fusarium blight of asparagus bean in greenhouse and infected field. The disease severity could reduce 50% and 40%, respectively. The 4 strains of *B. amyloliquefaciens* TCB9407, 101-007, TC2-8 and Tcba05 fermentation broth used in seed treatment can effectively reduce black rot infection rate. Application of different

broths on cabbage in the field, cabbage black rot disease severity could reduced 30 to 40%. The results showed that the Tcba05 fermentation broth could effective reduce the fusarium wilt and black rot disease severity, respectively. It expects to commercialize with *Bacillus amyloliquefaciens* agent as soon as possible.

**Key words:** *Bacillus amyloliquefaciens*, Biopesticide, Antibiotics.