

## 芽孢桿菌屬細菌防治作物病害之應用現況

郭建志

### 摘 要

作物在生產過程中，常會受到多種的病蟲害侵擾，農友為保護作物收穫，常使用化學農藥做為防治病蟲害的主要策略之一。但近年因為病蟲害抗藥性的出現、化學農藥殘留問題、對人體與環境毒性的疑慮，使得生物農藥的發展與應用漸漸受到重視。生物農藥微生物製劑中包含許多種的微生物，其中以芽孢桿菌屬 (*Bacillus spp.*) 之微生物製劑的市場佔有率最多。芽孢桿菌為革蘭氏陽性細菌，好氧性的短桿狀細菌，具有周生鞭毛，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 至 pH 10 的環境之下，具有耐高溫之特性，可產生內生孢子以適應不良環境。芽孢桿菌屬內包含多種菌種，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 (*Bacillus subtilis*)、液化澱粉芽孢桿菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)、蕈狀芽孢桿菌 (*Bacillus mycoides*)、地衣芽孢桿菌 (*Bacillus licheniformis*)、短小芽孢桿菌 (*Bacillus pumilus*) 等。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表現，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 (Antibiotic substance) 抑制病原菌的生長、產生多種代謝酵素分解病原菌、產生複合揮發性物質抑制病原菌生長、促進植物的生長及誘導植物產生抗病反應等作用。芽孢桿菌屬細菌根據學者研究至今有近 200 種抗生物質被發現，以枯草桿菌為例，研究至少有 66 種不同的抗生物質，但僅只有 11 種有確定的結構與功能，最常被研究的抗生物質包含伊枯草桿菌素 A (Iturin A)、豐原素 (Fengycin) 與表面素 (Surfactin) 等。芽孢桿菌經研究可間接或直接促進植物生長，可提供固氮、溶磷作用及活化根部的代謝表現與誘導植物產生抗病性，藉以抵抗病原菌的入侵。芽孢桿菌屬細菌為多功能性的生物防治菌，可同時減少多種病害之發生，病原菌對於其複雜的抗病機制不易產生抗性，可適用於有機農業，並可搭配化學農藥使用，融入整合性病蟲害管理 (Integrated pest management, IPM) 的策略中，不僅可降低病蟲害抗藥性的發生，化學農藥減量使用，並有助於確保農產品的安全與民眾健康。

## 前 言

近年來由於農產品安全為消費者重視的議題，尤其是連續性採收作物之病蟲害防治，如何減少化學農藥的施用，以降低農藥殘留的疑慮，因此開發生物農藥與應用在作物病害上，是目前世界上熱門的研究議題之一。生物農藥 (生物製劑) 則係指天然物質如動物、植物、微生物及其所衍生之產品，包括「天然素材農藥」、「微生物農藥」、「生化農藥」及基因工程技術產製之微生物農藥。生物農藥可被應用至作物整合性病蟲害管理 (Integrated Pest Management, IPM) 策略中，可減少化學農藥使用、降低病蟲害產生抗藥性機率，友善環境及降低化學農藥對人體的衝擊。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，至 2017 年將成長至 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<sup>(1,2)</sup>。在微生物農藥的研究方面，目前大多以芽孢桿菌屬 (*Bacillus* spp.) 的研究最多<sup>(12)</sup>，包括枯草桿菌 (*Bacillus subtilis*) 與液化澱粉芽孢桿菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 等，此兩種菌種皆可以產生多種的二次代謝產物<sup>(13)</sup>，可以抑制多種植物病原菌的生長，並誘發植物本身產生防禦反應，例如 PR-protein 的產生，可以抵抗病原菌的入侵<sup>(11)</sup>。本文將介紹目前常見之芽孢桿菌菌株種類與特性，實際田間防治作物病害之功效。

## 內 容

### 常見之芽孢桿菌種類特性介紹

#### (一) 枯草桿菌 *Bacillus subtilis*

於 1872 年由學者 Ferdinand Cohn 所命名，為一種長鏈狀需氧性、可產芽孢的桿菌，為革蘭氏陽性菌 Gram Positive，具有周生鞭毛，在逆境之環境下會形成內生孢子，普遍存在於土壤與植物體內或體表中，一般認定為安全性之有益微生物菌種。枯草桿菌在土壤中會與病原微生物競爭養分，降低病原菌的危害，同時可產生抗生物質抑制病原菌的生長，有關枯草桿菌的研究方面，對於土壤傳播性病害、葉部細菌性病害及儲藏性病害，皆證實具有防治的效果與潛力。國外利用枯草桿菌作為病害防治已應用多年，目前有多種商品化製劑上市，知名的產品像是

美國 Gustafson 公司生產的 Kodiak™ 製劑，主成分為 *B. subtilis* GB03 strain 及其內生孢子，於 1930 年在澳洲所發現與分離，可用於種子處理與苗期土壤傳播性病害。AgraQuest 公司所生產的 Rhapsody™、Serenade™ 製劑，主成分為 *B. subtilis* strain QST 713 在 1995 年於加州的蜜桃園土壤中所發現，主要防治對象為葉部病害。國內則是有百泰生物科技公司所生產的臺灣寶與臺灣水寶製劑，主要針對豌豆白粉病及胡瓜露菌病等葉部病害進行防治<sup>(6)</sup>。

## (二) 液化澱粉芽孢桿菌 *Bacillus amyloliquefaciens*

早期許多研究人員或學者會將液化澱粉芽孢桿菌歸類為枯草桿菌的一個亞種，因為菌種外觀與表現特性與 *B. subtilis* 相似，是屬於一種好氣性的桿菌，在代謝過程中會產生許多種不同的二次代謝物<sup>(7)</sup>，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。隨著後來分子生物技術在基因上研究，以及在  $\alpha$ -amylase 的表現上，最後學者 Priest 等人在 1987 年於期刊上發表將液化澱粉芽孢桿菌真正定義與區分出來與 *B. subtilis* 是不同的菌種<sup>(6)</sup>。近年的研究發現在植物病害防治上亦有不錯的效果，對於 *Rhizoctonia solani* 立枯絲核菌、Grey mould 灰黴病、*Pythium* spp. 猝倒病有不錯的防治效果。國外由丹麥 Novozymes 公司所生產的 Taegro™，主成分為 *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens* strain FZB24，主要應用在土壤傳播性病害包括鐮孢菌 (*Fusarium* spp.)、菌核病 (*Sclerotinia* spp.)、疫病菌 (*Phytophthora* spp.) 及腐黴菌 (*Pythium* spp.)<sup>(7)</sup> 等作物病害。此外，瑞士的先正達 Syngenta 公司在 2012 年獨家取得 Taegro™ 全球性代理及銷售協議。美國 Certis 公司於 2011 年上市的 Double Nickel 55™，屬於廣效性微生物製劑，2012 年核准在美國加州使用，主成分為 *Bacillus amyloliquefaciens* strain D747，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，國內行政院農業委員會藥物毒物試驗所，謝奉家博士團隊所研發的 *Bacillus amyloliquefaciens* Ba-BPD1，同時具有微生物肥料、農藥及飼料添加物之功效，於 2013 年將微生物肥料與農藥專利與技術轉移給臺灣肥料股份有限公司，飼料添加物技術轉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，另外兼具益生菌的功效，可以作為飼料添加物。篩選多功效的液化澱粉芽孢桿菌，則是作為後續篩選菌種與研究的新思維<sup>(6)</sup>。

### (三) 蕈狀芽孢桿菌 *Bacillus mycoides*

蕈狀芽孢桿菌最早於 1886 由 Flügge 氏所描述分類，而在 1946 年時被分類為 *B. cereus* var. *mycoides*，到了 1986 年又被重新分類為 *B. mycoides*。蕈狀芽孢桿菌外型呈短桿狀，在 NA 與 PDA medium 會呈現白色 羽毛狀絲形菌落，可與其他芽孢桿菌快速區別。據研究指出，*B. mycoides* 使植株生長發育良好，具有 (Plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR) 之功能，可藉由分泌抗生物質 (antibiotic)、嵌鐵物質 (siderophores)、或利用競爭生態位與養份及誘導植株產生系統性抗病等作用，避免或降低植物遭受病原菌的侵害。丁氏也指出，*B. mycoides* CHT2402 可促進番茄植株生長，且利用此菌於 5% 玉米粉或 5% 黃豆粉培養後的培養液混拌入土壤介質中，則可發現若以此介質種植番茄，可降低由番茄萎凋病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) 的發生機率<sup>(5,10)</sup>。美國 Certis 公司所研發的 *Bacillus mycoides* isolate J (BmJ) WG 製劑，於 2012 年被核准於美國蒙大拿州 Montana state，應用於馬鈴薯種薯處理，可以降低馬鈴薯 Y 病毒 (Potato Virus Y, PVY) 的感染。在國內研發部分，由中興大學植物病理系黃振文教授所研發的 *Bacillus mycoides*，已經技術轉移給聯發生物科技股份有限公司，產品名為蕈狀芽孢桿菌 (原枯草桿菌 3 號)，經試驗證實施用枯草桿菌 3 號可有效促進植物生長，提高作物對逆境與病害之耐受性，其中包含可減緩土傳性病害，如茄科真菌性萎凋病、立枯病、猝倒病及白粉病之發生。並可有效改善根圈土壤環境，增強植物養分吸收。

### 芽孢桿菌防治作物病害之實例探討

#### (一) 葉部病害

##### 1. 枯草桿菌 *B. subtilis* UMAF6639 防治瓜類白粉病

Romero 學者等人利用 *B. subtilis* UMAF6639，針對瓜類白粉病菌 Powdery Mildew 進行生物活性抗菌試驗，利用胡瓜離葉接種法，實驗共分 6 種處理，分別為對照組 1 (ddH<sub>2</sub>O)、對照組 2 (nutrient broth control)、處理 1 (*B. subtilis* UMAF6639 活孢子菌液)、處理 2 (*B. subtilis* UMAF6639 活孢子過濾液)、處理 3 (4 倍過濾液) 與處理 4 (16 倍過濾液)，經接種白粉病菌 *Podosphaera fusca* 後，第 16 天觀察病害程度，16 倍的過濾液與對照組相比，仍然可以降低 50% 的罹病率。後續學者們研究 *B. subtilis* UMAF6639 先處理胡瓜葉片後，可以激發茉莉花酸



(jasmonate acid, JA) 的大量產生，並活化誘導性系統抗性 (Induced systemic resistance, ISR)，同時產生活化氧化物 (reactive oxygen species, ROS) 並強化細胞壁作用 (cell wall reinforcement)，直接與間接抵抗白粉病的入侵，而達成抗病反應。

## 2. 液化澱粉芽孢桿菌 *B. amyloliquefaciens* B190 防治百合灰黴病

臺大吳文希教授曾從臺灣百合分離本土性之液化澱粉芽孢桿菌，從 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，對於其他 16 種植物病原菌亦具有抑制生長之效果，為促使 *B. amyloliquefaciens* B190 能更穩定且有效地於田間維持百合開花期正常生長，於是研製生物製劑配方，此配方中添加 *B. amyloliquefaciens* B190 ( $1 \times 10^5$  cfu / ml)、0.025% A、0.05% B、0.1% S1 與 0.025% S2，於四次田間試驗，均具顯著性地 ( $p = 0.05$ ) 維持百合植株正常生長與發育<sup>(8)</sup>。

## (二) 土壤傳播性病害

### 1. 具拮抗能力之液化澱粉芽孢桿菌防治甘藷青枯病

陳等人所研究之 *B. amyloliquefaciens* SPX-1 菌株，本研究亦證實來自葉用甘藷莖部組內之 *B. amyloliquefaciens* SPX1 菌株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<sup>(9)</sup>。

### 2. 枯草桿菌與芽孢桿菌防治茄子萎凋病

Altinok 等人所研究數十株芽孢桿菌菌株對茄子萎凋病 (*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 14.12% 與 16.57%，相較於對照組罹病率 91.53%，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<sup>(14)</sup>。

## (三) 倉儲性病害之防治

### 1. 液化澱粉芽孢桿菌 PPCB004 菌株防治倉儲果實病害

Arrebola 等人所分離之 *B. amyloliquefaciens* PPCB004 菌株，分別進行接種病原菌前一天將果實浸泡於 PPCB004 菌株醱酵液中與接種後一天再浸泡處理，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*) 共三種倉儲病害。經接種後結果顯示，PPCB004 菌株防治柑橘青黴病的效果最佳，前一天處理組之罹病率為 9.8%、後一天處理組之罹病率為 100%。PPCB004 菌株防治柑橘黑斑病的效果次之。PPCB004 菌株前一天處理組之罹病率為 28.3%，後一天處理組之罹病率為 50%，而對照組則為 92%。顯示 PPCB004 菌株具有開發成為商品化之潛力。

## 2. 液化澱粉芽孢桿菌 PPCB004 菌株混和 1-methylcyclopropene (1-MCP) 防治木瓜炭疽病與木瓜蒂腐病

經研究結果顯示，BA + 1-MCP 可降低果腐病菌 *Phomopsis rot* 及炭疽病菌 *Anthraco* 在木瓜上的病斑大小及罹病程度，在果腐病與炭疽病之罹病率上，對照組分別為 48% 與 39%；預先處理 PPCB004+1-MCP 之罹病率分別為 21% 與 15%，可以明顯降低兩種倉儲病害之罹病率，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。

## 參考文獻

1. 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。
2. 許嘉伊 楊玉婷 2011 全球微生物農藥研究發展趨勢分析 農業生技產業季刊 28: 1-9。
3. 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。
4. 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 有機農業產業發展研討會專輯 臺中區農業改良場特刊 96: 147-181。
5. 黃振文 2010 研製内生細菌植物保護製劑防治作物病害 農業生物技術國家型科技計畫第三期成果特刊 [植物篇] 104-105。
6. 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業藥物毒物試驗所技術專刊第 205 號 p.1-11。

7. Cawoy, H., W. Bettiol, P. Fickers and M. Ongena. 2011. *Bacillus*-Based Biological Control of Plant Diseases. Pesticides in the Modern World - Pesticides Use and Management. Chapter 13: 273-303.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. Garcí'a, A. P., 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.
12. 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.
13. Ongena, M. and P. Jacques. 2007. *Bacillus* lipopeptides : versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends Microbiol. 16(3): 115-125.
14. 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.