

枯草桿菌菌體及其代謝產物對 病原真菌之抑菌效果評估

謝奉家 李美珍 高穗生*

台中縣霧峰鄉 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所生物藥劑組

(接受日期：中華民國 92 年 6 月 5 日)

謝奉家、李美珍、高穗生* 2003 枯草桿菌菌體及其代謝產物對病原真菌之抑菌效果評估 植保會刊 45 : 155-162

許多重要的植物病害都是由土壤或根圍真菌所引起⁽²¹⁾，已有研究人員利用土壤微生物間的拮抗作用，研發抑制真菌生長之生物防治藥劑，應用於田間防治^(4, 8, 10, 16, 17, 18, 22, 23)。目前自然界雖已篩選出一些具有殺菌活性的微生物，例如，假單胞菌(*Pseudomonas* sp.)、枯草桿菌(*Bacillus subtilis*)、木黴菌(*Trichoderma* sp.) 與放線菌(*Streptomyces* sp.) 等，但真正進入市場的產品仍不多^(2, 7, 14, 16, 19)。枯草桿菌屬革蘭氏陽性，好氣性桿狀細菌，具週生鞭毛及內生孢子為其形態上主要特徵，此類細菌普遍存在於土壤及植物體表，在食品、飼料添加物、酵素、種子保護劑等生物產業發展應用甚多^(1, 2)，為一般認定屬於安全性之有益微生物種類^(1, 3)。由於可以產生內生孢子，在逆境下易於存活，且在產孢過程中，可產生對多種病原菌具有抑制作用之抗生物質(antibiotic substance)^(2, 3, 19)，因而此植物病害防治應用性之開發，多年來備受重視。枯草桿菌對病原真菌和細菌具有拮抗作用，已有文獻報告枯草桿菌可產生許多代謝產物和抗生物質，其中至少有 66 種不同的抗生物質^(2, 11, 19)，有些產品已鑑定出一種稱為“iturin A”的拮抗物質^(2, 15)，此化合物會與病原真菌細胞膜的固醇分子(sterol)作用形成複合物，因而使得離子傳導孔隙增大，改變細胞膜的滲透性，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育^(2, 12, 15)，達到防治病害的效果。

國外利用枯草桿菌在病害生物防治上之應用，已有之有年，且有商品化產品俱作為生物製劑使用。知名的 KodiakTM 製劑，即為美國 Gustafson 公司產品，其成分為枯草桿菌內生孢子，主要應用於種子處理，防治苗期病害之危害^(1, 2, 13)。俄羅斯 Novosibirsk 公司近年來所推出之枯草桿菌商品 BactophytTM，主要推薦使用於細菌性病害的防治⁽¹³⁾。民國 90 年台灣已有國內農藥公司完成登記生產枯草

* 通訊作者。E-mail: sskao@tactri.gov.tw

桿菌微生物殺菌劑，推薦用於豌豆白粉病之防治，近二年亦陸續有其他公司研發產品上市。為防止市售產品參差不齊，國內農政主管機關有責任測定枯草桿菌產品之有效生物活性 (biological activity)，為品質把關。由於生物殺菌劑產品有效成分可以是單純的菌體，或是其代謝產物，也可能是菌體加上代謝產物的作用，依不同之需求，採取不同發酵方法。過去文獻報告使用單位活孢子數 CFU (colony forming units) 或田間試驗，尚未只針對代謝產物進行生物活性測試。由於制定有效生物活性的測試方法或結果分析，會受到多重因素的影響，尤其有效成分含有代謝產物的生物殺菌劑產品，世界各國除了利用活孢子數、對峙試驗、較費時的溫室試驗或田間試驗之外，研究人員仍持續努力訂定一套理想的規格檢驗方法可以符合產品的實際評估需求。

本試驗選擇 6 種植物病原真菌為試驗材料 (表 1)：水稻立枯絲核菌 (*Rhizoctonia solani*，購自新竹食口所 BCRC 35687)、白粉白絹病菌 (*Sclerotium rolfsii* Saccardo，購自新竹食口所 BCRC 35714)、玫瑰灰黴病菌 (*Botrytis cinerea*，由本所蔡勇勝先生提供)、香蕉炭疽病菌 (*Colletotrichum musae*，購自新竹食口所 BCRC 38047)、橡果炭疽病菌 (*Glomerella cingulata*，由本所楊秀珠博士提供) 與番茄鐮胞菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*，購自新竹食口所 BCRC 32107)。同時選擇 3 種國內不同農藥公司生產製造的枯草桿菌產品：代號簡稱為

表 1、枯草桿菌 3 種產品對 6 種病原真菌的半數抑菌濃度

Table 1. The 50% inhibition concentrations (IC₅₀) of three *Bacillus subtilis*-based products against six fungal pathogens

Fungal pathogens	IC ₅₀ (ppm) ³⁾ for					
	Product A ¹⁾		Product B ¹⁾		Product C ¹⁾	
	<i>B. subtilis</i> and its related metabolites	Related metabolites	<i>B. subtilis</i> and its related metabolites	Related metabolites	<i>B. subtilis</i> and its related metabolites	Related metabolites
<i>Rhizoctonia solani</i>	13 (12-15)	202 (177-266)	4,016 (3,725-4,306)	b ²⁾	971 (863-1,078)	a ²⁾
<i>Sclerotium rolfsii</i> Saccardo	b	b	b	b	11,656 (8,953-14,360)	b
<i>Botrytis cinerea</i>	532 (452-612)	5,729 (5,074-6,384)	a	a	2,220 (1,784-2,656)	a
<i>Colletotrichum musae</i>	133 (132-135)	162 (158-166)	b	b	1,286 (1,216-1,355)	b
<i>Glomerella cingulata</i>	150 (148-153)	201 (200-203)	739 (646-832)	b	2,122 (2,026-2,217)	b
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	2,150 (2,109-2,192)	2,184 (2,099-2,270)	b	b	11,167 (11,018-11,316)	b

¹⁾ Product A, B and C are different products individually.

²⁾ "a" means the range of IC₅₀ is between 20,000 ppm and 30,000 ppm; "b" means the IC₅₀ is above 30,000 ppm.

³⁾ The numbers in parentheses are the 95% fiducial limits.

「檢品 A」(粉劑)、「檢品 B」(液劑)與「檢品 C」(粉劑)。本研究係以枯草桿菌為對象，嘗試建立並訂定殺菌劑產品之成份為代謝產物之生物活性檢測方法，並探討上述 3 種枯草桿菌產品對 6 種病原真菌的抑制情形與效力分析。傳統上，枯草桿菌與病原真菌係採用對峙生長試驗進行拮抗性篩選，用來檢測枯草桿菌整個菌液，但無法確切瞭解枯草桿菌菌體離心後之代謝產物的成份效力^(4,5)，缺點包括試驗時間長（部份長達 9 天以上），抑菌效力只能以抑制距離表示，且訂定多少才是有效距離的長短標準，見仁見智，不夠客觀。本文參考抗生素常用檢測原理⁽⁶⁾，改將待測枯草桿菌菌液或代謝產物（經離心及過濾處理）混勻於平板培養基將病原真菌菌絲塊置於平板中央，可縮短檢測時間，有些最快可於 3 天內測定代謝產物的抑菌效果，操作簡便，條件容易控制，而且數據經過換算後可以進行統計分析與比較。

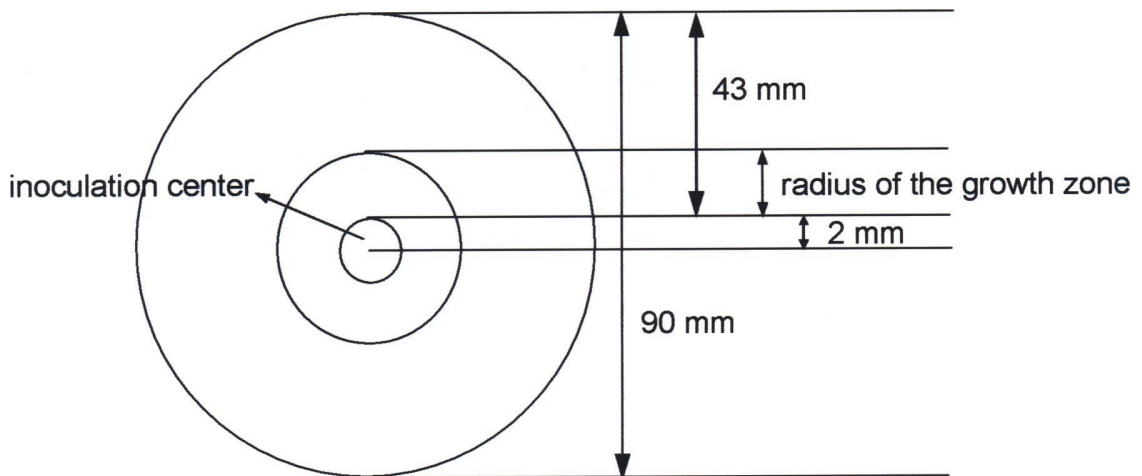
詳細試驗步驟如下，將供試之病原真菌接種於馬鈴薯葡萄糖瓊脂平板 (potato dextrose agar, PDA) 中央，置於 25°C 培養 3 至 9 天（依不同病原真菌而異）使其長滿平板，欲使用前，以直徑 4 mm 打孔器挖取菌絲尖端塊（圓形直徑 4 mm）置於 PDA 平板中央，置於 25°C 培養備用。3 g 樣品加 27 ml 無菌水至無菌三角瓶中配製成 10 倍之檢體稀釋液，接著置於往復式振盪器上，以 30°C，200 rpm 振盪 1 小時。然後將此三角瓶置入 60°C 之水浴中，水面應高於 10 倍檢體稀釋液之液面，待瓶內溫度達 60°C 後開始計時，加熱 30 分鐘。（若欲測試主要成份為代謝產物，需經離心將菌體分離。置於高速離心機 7,000 rpm 離心 20 分鐘，取上清液，經 0.45 μm 的細菌過濾膜過濾，即得到檢體代謝產物 10 倍稀釋液。）為避免稀釋濃度的抑菌活性為 0% 或 100%，宜將此 10 倍檢體稀釋液進行多次連續稀釋，找尋適當濃度範圍 (range finding)。每一供試濃度配製 100 ml PDA 並含有 100 ppm (μg/ml) 新黴素硫酸鹽 (neomycin sulfate)，以避免在檢測過程中枯草桿菌及產品加工時可能落入之環境微生物相 (microflora) 生長，干擾病原真菌之生長，並利於計算病原真菌受枯草桿菌產品中二次代謝產物之抑制情形。以不含枯草桿菌菌體及代謝產物而僅含 100 ppm 新黴素硫酸鹽之 PDA 平板為對照組。每個濃度均重複三次。以無菌吸管將 100 ml 培養液分裝成三個 9 cm 之培養皿 (20 ml/皿) 中，凝固後，接種直徑 4 mm 供測病原真菌之菌絲塊於各 PDA 平板之中央，菌絲面朝下，置於 25 °C 培養，待對照皿之菌絲長滿後，記錄各測試濃度之菌絲的生長直徑 (mm) (圖一)。為了適合農民或大眾瞭解，本文將抑菌效力予以數據化、客觀化與普遍化，分別換算出各稀釋濃度檢品之抑菌活性 (inhibition activity, IA), $IA (\%) = [1 - \text{菌絲平均生長直徑}(\text{mm}) / 43(\text{mm})] \times 100\%$ (圖二)。三種稀釋濃度中應含抑菌活性大於 50% 的 (一) 種稀釋濃度及抑菌活性小於 50% 的 (二) 種稀釋濃度。本研究進一步以濃度對數-抑菌活性，作 Probit analysis 得到對該病原菌之半數抑菌濃度 (50% inhibition concentrations, IC₅₀)。使用半數抑菌濃度來表示能夠抑制 50% 病原真菌生長的檢品濃度；若檢品的半數抑菌濃度愈高，表示抑菌效果相較之下愈低。

本研究將檢品分為「菌體及其代謝產物混合液」與「代謝產物」二部分，稀釋 40 倍至 10 萬倍進行試驗（稀釋倍數最終仍需視檢品對病原真菌之抑菌情況做適當調整）並計算抑菌活性與半數抑菌濃度。由試驗結果 (表一) 得知「檢品 A」的「

菌體及其代謝產物混合液” 或省 ”代謝產物”，除了對白合白絹病菌沒有明顯抑菌效果外，對於水稻立枯絲核菌、玫瑰灰黴病菌、香蕉炭疽病菌與橡果炭疽病菌等 4 種植物病原真菌都有很好的抑菌效果。「檢品 B」的 ”菌體及其代謝產物混合液” 除了對橡果炭疽病菌與水稻立枯絲核菌有明顯效果外，對於其他 4 種植物病原真菌都沒有發見明顯效果。「檢品 C」的 ”菌體及其代謝產物混合液” 除了對水稻立枯絲核菌有明顯效果外，對於其他 5 種植物病原真菌雖有效果但不顯著。



圖一、產品於不同濃度下對橡果炭疽病菌之抑菌情形（以產品編號 C 為例）。
 Fig. 1. Inhibition on growth of *Glomerella cingulata* on agar plates (exemplified by “product C”).



$$\text{Inhibition activity (\%)} = [1 - \text{average radius of the growth zone (mm)} / 43(\text{mm})] \times 100$$

圖二、枯草桿菌產品之抑菌活性（inhibition activity, IA）的圖示與算法。
 Fig. 2. Schema and equation to evaluate inhibition activity (IA) of *Bacillus subtilis* products.

一般而言，枯草桿菌“菌體及其代謝產物混合液”為“菌體”再加上“代謝產物”，所以對於病原真菌的抑制效果大於將菌體離心後剩下之“代謝產物”。試驗結果顯示「檢品 A」“代謝產物”即具有主要的抑制成效，“菌體及其代謝產物混合液”僅增加一些抑制效果，證實「檢品 A」“代謝產物”中即含有主要抑菌成份。然而「檢品 B」與「檢品 C」的“代謝產物”卻未能如預期含有主要抑菌成份，所以抑制效果並不理想。本實驗室進行抗生物質“iturin A”的 HPLC 分析，發現「檢品 C」“代謝產物”中的“iturin A”含量低於「檢品 A」“代謝產物”中的二十分之一。本實驗室接著進行抗生物質“iturin A”標準品（購自 Sigma）的對峙試驗，作為對照，發現單獨滴加 30 μ l 的 100 ppm 標準品，對於香蕉炭疽病菌、番茄鐮胞菌等都有顯著抑菌效果（數據未附於本文），顯示“iturin A”在抑菌效果上，雖不是唯一但卻確實扮演重要的角色。

「檢品 B」（液劑）與「檢品 C」（粉劑）的產品抑菌效果皆與「檢品 A」（粉劑）比較，在品質或產品競爭力方面皆有明顯差距，推測可能因素為產品的安定性不佳，劑型配方或代謝產物發酵製程尚未最佳化，導致部分代謝產物喪失或不足。為了評估上述推測因素，本實驗室將「檢品 C」的枯草桿菌菌種分離出來，取單一菌落（single colony）於 LB 液態培養基（Luria-Bertani Broth, Miller, DIFCO）以 30°C、200 rpm，培養 16 小時後，進行對峙試驗，出人意料發現除了對白銹病菌與水稻立枯絲核菌沒有明顯抑菌效果外，對於玫瑰灰黴病菌、香蕉炭疽病菌、橡果炭疽病菌與番茄鐮胞菌等 4 種植物病原真菌都反而出現很好的抑菌效果（數據未附於本文），相關推測獲得部分證實。此現象也突顯量產時，品質管制採用有效品管方法的重要性。

另外，檢測「檢品 A」、「檢品 B」與「檢品 C」的單位活孢子數，分別為 2.5×10^{10} CFU/g、 2.6×10^9 CFU/ml 與 2.6×10^9 CFU/g，顯示「檢品 A」的單位活孢子數高於「檢品 B」與「檢品 C」約一個級數，而「檢品 B」與「檢品 C」的單位活孢子數則相近。綜合上述實驗結果分析，產品的單位孢子數確實具某程度之抑菌效果，但代謝產物具有的抑菌效果似乎仍然大於單位孢子數的抑菌效果。

枯草桿菌製劑之植物病害防治機制尚未被全盤瞭解，有待進一步深入研究，且因其在其功能之彰顯為多重作用機制（multiple mode of action）的結果^(5, 16, 19, 21)，包括：與病原營養及空間之競爭，抗生物質之作用，促進土壤中碳分子的分解與營養之有效吸收，改善土壤性質，促進作物生長與抗病性等許多因素相互搭配，才能達到成功的拮抗作用。例如，孢子活菌施用於作物的葉面，果實的表面與土壤中，會與病原真菌進行生長競爭，由於枯草桿菌屬細菌類，較真菌生長快，能迅速將周圍可利用之營養吸收殆盡，進而獲致防治效果^(1, 2)。枯草桿菌不僅可以直接噴灑植物葉片來保護葉部真菌病害，亦可施用於土壤或做種子拌種處理以預防土壤病害^(1, 2)，其對多種作物之生長，尤其是根部之發育^(1, 3, 20, 21)，有極為明顯之促進作用，還可做為蔬果採收後防止腐敗的抗真菌劑⁽²⁾。值得注意的是其抗生物質之作用係整個菌體代謝物（metabolites）之綜合作用，而非如傳統應用上單一抗生物質之作用。由於是多重之作用機制，傳統農藥應用上常見的抗藥性（chemical resistance）問題尚不致於發生，加上其對土壤，生態環境以及植物生長，皆具有促進性之正面效果，枯草桿菌實為農業永續發展之重要關鍵產品。

目前本實驗室正積極進行枯草桿菌的聚抗生物質^(9, 15)(例如 surfactin、"iturin A"等)的相關研究,相信不久可對上述殺菌劑產品的聚活性組成有更明確的瞭解與評估。台灣傳統化學農藥產業過去已低迷相當長的時間,如果還想在全球農藥市場上重新出發,生物農藥的推廣將是民間與政府需共同努力的方向。與傳統化學農藥比較,生物農藥的市場目前佔有率雖不高,但最近幾年隨著環保消費意識的提高,市場成長相當快速,尤其台灣加入世界貿易組織(the World Trade Organization, WTO)後,預期會增加微生物殺菌劑商品進口種類與數量。本所已針對市場種類較多而且國內已有製造生產的枯草桿菌,著手訂定相關產品規格檢驗方法,協助農政主管機關進行有效管理。

(關鍵詞:枯草桿菌、殺菌劑、抑菌活性、半數抑菌濃度)

謝 辭

本研究由行政院農委會 91 農科-1.2.1-藥-P8 計畫經費補助。承蒙本所林淑霞小姐與林月琪小姐協助觀察試驗,謹此一併誌謝。

引用文獻

1. 王詩堯。2002。拮抗性桿菌屬(*Bacillus* spp.)於水稻白葉枯病防治之應用及其作用機制。國立中興大學植物病理學系碩士論文。84頁。
2. 向明。1998。台灣生物農藥研發及其產業。生物產業與製藥產業, (上冊)生物產業,第7章。田蔚城編。九州圖書文物有限公司。台北。
3. 周俊吉、陳淑芬、施怡綾、曾耀徽、曾德賜。1997。拮抗性枯草桿菌(*Bacillus subtilis*)的篩選、試量產培養與病害防治應用。植病會刊 6: 209-210。
4. 陳昇明、郭文良。1985。枯草桿菌對水稻紋枯病菌之拮抗作用及防治效應。植保會刊 27: 95-103。
5. 陳志諳、許志剛、陸凡、劉永鋒、陳毓茗。2000。枯草桿菌 B-916 分泌物對水稻紋枯病菌的拮抗活性及其抗菌

物質的研究。微生物農藥及其產業化。喻可生編。中國科學出版社。北京。294頁。

6. 陳瀾、張友清、孫松柏、夏克祥、羅成、刁信 編。1993。生物農藥檢測及其原理。中國農業出版社。北京。427頁。
7. Asaka, O., and Shoda, M. 1996. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. Appl. Environ. Microbiol. 62: 4081-4085.
8. Chou, A. L., and Wu, W. S. 2001. Isolation, identification and evaluation of bacterial antagonists against *Botrytis elliptica* on lily. J. Phytopathology. 149: 319-324.
9. Hiraoka, H., Asaka, C., Ano, T., and Shoda, M. 1992. Characteristics of *Bacillus subtilis* RB14, coproducer of peptide antibiotics iturin A and surfactin. J. Gen. Appl. Microbiol. 38: 635-640.
10. Homma, Y., and Suzui, T. 1989. Role of antibiotic production in suppression of radish damping-off by seed bacterization with *Pseudomonas cepacia*. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 55: 643-652.
11. Katz, E., and Demain, A. L. 1977. The peptide antibiotics of *Bacillus*:

- chemistry, biogenesis, and possible functions. *Bacteriol. Rev.* 41: 449-474.
12. Latoud, C., Peypoux, F., and Michel, G. 1990. Interaction of iturin A, a lipopeptide antibiotic, with *Saccharomyces cerevisiae* cells: influence of the sterol membrane composition. *Can. J. Microbiol.* 36: 384-389.
 13. Lisansky, S. G. 1995. Biopesticides-markets, technology, registration and IPR companies, pp. 10-231. *In*: R. Quinlan [ed.], *Biopesticides: Worldwide directory of research and researchers*. CPL Scientific Information Services Limited, USA.
 14. Merriman, P. R., Price, R. D., Kollmorgen, J. F., Piggott, T., and Ridge, E. H. 1974. Effect of seed inoculation with *Bacillus subtilis* and *Streptomyces griseus* on the growth of cereals and carrots. *Aust. J. Agric. Res.* 25: 219-226.
 15. Phae, C. G., and Shoda, M. 1991. Investigation of optimal conditions for foam separation of iturin, and antifungal peptide produced by *Bacillus subtilis*. *J. Ferment. Bioeng.* 71: 118-121.
 16. Phae, C. G., Shoda, M., and Kubota, H. 1990. Suppressive effect of *Bacillus subtilis* and its products on phytopathogenic microorganisms. *J. Ferment. Bioeng.* 1: 1-7.
 17. Silo-suh, L. A., Lethbridge, B. J., Raffel, S. J., He, H., Clardy, J., and Handelsman, J. 1994. Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2023-2030.
 18. Tschen, J. S.-M. 1991. Effect of antibiotic antagonists on control of basal stem rot of chrysanthemum caused by *Rhizoctonia solani*. *Plant Prot. Bull.* 33: 56-62.
 19. Tschen, J. S.-M., Loeffler, W., and Chen, L. L. 1992. Screening of antifungal substances from antagonistic *Bacillus* species. *Plant Prot. Bull.* 34: 26-32.
 20. Turner, J. T., and Backman, P. A. 1991. Factors relating to peanut yield increases after seed treatment with *Bacillus subtilis*. *Plant Dis.* 75: 547-553.
 21. Whipps, J. M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 52: 487-511.
 22. Wu, W. S., and Chou, J. K. 1995. Chemical and biological control of *Alternaria carthami* on zinnia. *Seed Sci. Technol.* 23: 193-200.
 23. Wu, W. S., and Yang, Y. H. 1992. *Alternaria* blight, a seed-transmitted disease of zinnia in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 1: 115-123.

ABSTRACT

Hsieh, F. C., Li, M. C., and Kao, S. S.* 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. (Department of Biopesticide, Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture, Taichung, Taiwan 413, ROC)

Many fungicides are being removed from the commercial market because they do not readily degrade in natural systems and/or they leave potentially hazardous residues in food and feed products. This has created a demand for safer products to prevent or delay the development of fungicide resistance or to reduce the risk of chemical pollution. In recent years, there has been considerable interest in using *Bacillus subtilis* (*Bs*), a gram-positive, spore-forming bacterium, as a biocontrol agent because of its ability to antagonize pathogens and repress plant diseases. In 2001, the first Taiwan domestic commercial biofungicide was registered for the control of pea powdery mildew. *Bacillus subtilis* has also been used to control soil-borne fungal pathogens under greenhouse conditions and in the field. However, there has been no report on comparisons of bioactivities among *Bs*-based products. We first established a bioassay method for *Bs*-based products on the basis of their inhibition activity against plant pathogens. Then, the bioactivities of 3 *Bs*-based products to 6 pathogenic fungi were individually tested. We report herein that only 1 *Bs*-based product was highly effective. These results show that the quality of these 3 *Bs*-based products is variable.

(Key words: *Bacillus subtilis*, fungicide, inhibition activity, 50% inhibition concentration)

*Corresponding author. E-mail: sskao@tactri.gov.tw