

枯草桿菌 *Bacillus subtilis* BS-99-H 之 iturin A 抗菌物質對蓮霧果腐病原菌 *Pestalotiopsis eugeniae* 之生物活性

林秀芬¹ 陳滄海² 劉顯達^{3,4}

¹ 屏東科技大學 生物資源研究所

² 屏東科技大學 植物醫學系

³ 美和科技大學 健康與生技產業研究所

⁴ 聯絡作者，電子郵件：x0007@meiho.edu.tw；傳真：+886-8-7789-837

摘要

林秀芬、陳滄海、劉顯達. 2010. 枯草桿菌 *Bacillus subtilis* BS-99-H 之 iturin A 抗菌物質對蓮霧果腐病原菌 *Pestalotiopsis eugeniae* 之生物活性. 植病會刊19: 225-233.

從玻璃紙抗生法的研究顯示，令枯草桿菌 (*Bacillus subtilis*) BS-99-H 之瓊脂塊放在玻璃紙上，再置於培養基平板上培養 1-4 天，去除含有枯草桿菌玻璃紙之培養基經 90°C 加熱 10 分鐘及未經加熱處理，皆對蓮霧果腐病原菌 (*Pestalotiopsis eugeniae*) 的菌絲生長有相同的抑制效果，至培養第 5 天之後，對 *P. eugeniae* 菌絲生長的抑制率達 100%。由上述具有拮抗作用之培養基中萃取可能的抗菌物質，經 HPLC 及串聯式質譜儀 (MS/MS) 分析得知其為 iturin A 抗生物質。另將部分純化 iturin A 與 *P. eugeniae* 菌絲混合處理後，發現菌體細胞導電度於 8 小時後顯著增加 3.4 倍，至 28 小時達到高峰，為 5.3 倍；以顯微鏡觀察 *P. eugeniae* 菌絲呈現異常膨脹與扭曲。BS-99-H 所產生的 iturin A 抑制 *P. eugeniae* 孢子發芽之 IC₅₀ 為 0.51 mg/ml，當 iturin A 濃度為 ≥ 0.84 mg/ml 則完全抑制 *P. eugeniae* 孢子發芽與菌絲生長。從本研究結果顯示出 BS-99-H 產生的 iturin A 是抑制 *P. eugeniae* 很重要的因子，在發展對 *P. eugeniae* 之生物防治上將可扮演重要的角色，因此本研究所得的枯草桿菌 BS-99-H 未來具有潛力開發作為蓮霧果腐病害之生物性殺菌劑。

關鍵詞：枯草桿菌 BS-99-H、蓮霧果腐病原菌、iturin A

緒言

蓮霧 (*Syzygium samarangense* Merrill et Perry) 為國內重要熱帶果樹之一，以屏東縣為最大產地。蓮霧果實在套袋栽培制度下，果實也常發生炭疽病、果腐病、黑腐病及疫病之危害，造成農民的損失⁽¹³⁾。生物防治為病害綜合防治體系之一種方法，由於施用化學殺菌劑易使病菌容易產生抗藥性，對人類也有不利的影響，因此病害防治若能以生物防治方法來替代化學農藥，將可減少化學農藥的使用而利於環境的保護⁽¹⁸⁾。有益細菌類中如假單胞菌屬 (*Pseudomonas* spp.) 與桿菌屬 (*Bacillus* spp.) 可產生許多種抗真菌性及抗細

菌性的物質，而抗生物質的產生在病害生物防治上扮演著重要的角色。實際上，桿菌屬不同種類的細菌會分泌胜肽 (peptides) 和脂胜肽 (lipopeptides) 之抗真菌性的物質，例如 fungicine、iturin、bacillomicine 等到培養基中來抑制許多的真菌，如 *Aspergillus*、*Penicillium* 和 *Fusarium* 種類的生長或是抑制一些酵母菌的生長^(5, 8, 11)。

已有許多的研究是利用細菌來作為生物防治製劑^(12, 22)，尤其是革蘭氏陽性細菌可產生抗熱性及抗乾燥能力之內生孢子結構，以此所做成的製劑產品比較穩定^(9, 18)，例如枯草桿菌 (*B. subtilis*) 菌株已被來研究作為植物病害之生物防治製劑⁽²⁵⁾。本實驗室所篩選到之拮

抗性枯草桿菌，菌株代號為 BS-99-H，對許多種病原性真菌具有抑制效果，因此具有開發成生物性農藥之潛力。枯草桿菌 BS-99-H 對蓮霧果腐病原菌 (*Pestalotiopsis eugeniae*) 的抑制效果為最佳，本研究的目的是測試枯草桿菌 BS-99-H 菌株對多種真菌之抑制作用，純化其所產生之抗生物質 iturin A，探討枯草桿菌培養的天數與抑制 *P. eugeniae* 生長之效率及產生的 iturin A 含量之關係，及研究 iturin A 對蓮霧果腐病原菌所造成之影響。

材料與方法

菌株鑑定

本研究從屏東地區土壤所分離之拮抗細菌菌株，代號為 BS-99-H，依 16S rDNA 序列分析來鑑定之。BS-99-H 菌株以 nutrient broth (簡稱 NB) 培養 20 小時後以 NucleoSpin® plant purification Kits 萃取 DNA。將萃取之 DNA 與 Cho⁽⁶⁾ 等人報告之專一性引子對 16S-F-(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 及 16S-R-(5'-GGCTACCTTGTACGGCTT-3') 進行 PCR 反應，其引子對所擴增之 16S rDNA 序列產物約為 1.5 kb。PCR 反應開始為 94°C 5 分鐘；隨之於下列條件重複 35 個循環：94°C 變性 1 分鐘，50-65°C 鏈合 1 分鐘，72°C 延展 1 分鐘 40 秒；最後以 72°C 反應 5 分鐘。PCR 結束後，取 15 µl 之反應溶液加入含 0.3 µg/ml EtBr 之 1% 洋菜膠內，以 0.5X TAE buffer、100 伏特電壓進行電泳 30 分鐘。最後自膠體回收並純化單一 DNA 條帶，並送至明欣生物科技公司定序。

平板對峙培養之拮抗測試

以內徑為 8 mm 的打孔器鑽取事先已培養於 3~7 天、28°C 馬鈴薯培養基 (potato dextrose agar, 簡稱 PDA) 之多種病原真菌菌絲塊備用，另外配製 PDA 與固體營養培養基 (nutrient agar, 簡稱 NA) 以 1:1 比例製成平板培養基供對峙培養檢測用。以移植環沾取 BS-99-H 菌株畫線於 9 公分培養皿內含對峙培養平板中間，再將每種病原真菌之菌絲塊放置於培養基平板兩側靠近邊緣處，每個培養皿左右兩側各放 1 塊同一種病原真菌，供測之病原真菌共有 11 屬 26 種；另以沾取無菌水畫線做為對照組。每種病原真菌以 5 個培養皿為 1 重覆，做 3 重覆，試驗重覆做 2 次，於 28°C 定溫培養箱觀察，經培養不同天數後，以對照組之培養皿為基準，待對照組之病原真菌菌絲長至中間畫線時，則計算枯草桿菌至病原真菌菌絲間之生長抑制距離⁽²²⁾。

玻璃紙抗生法

事先取枯草桿菌濃度為 10⁶ cfu/ml 的菌液 0.1 ml，以 L 型玻璃棒塗佈於 NA 培養基平板，於 28°C 培養 2 天後之平板作為枯草桿菌菌塊的來源；以及將蓮霧果腐病原菌 (*P. eugeniae*) 培養於 PDA 培養基平板上，於 28°C 培養 5 天後，再以內徑為 8 mm 的鑽孔器鑽取其平板之邊緣部位的菌絲塊為備用。另外將 PDA 與 NA 以 1:1 比例配製及滅菌後，倒入 6 公分培養皿製成平板培養基，且舖上一層滅菌玻璃紙 (cellophane paper)，作為本研究檢測抗生物質用之平板培養基⁽¹⁷⁾。將枯草桿菌菌塊放入檢測用之平板培養基作為處理組，處理組分成培養 1、2、3、4、5、6、7 及 10 天，以未接枯草桿菌菌塊做為對照組。以配製 120 ml 之檢測培養基供每處理用，每種處理以 4 個培養皿為 1 重覆，做 3 重覆，試驗重覆做 2 次。每培養皿中倒入 10 ml 培養基，於每培養皿中放置一塊 8 mm 大小的枯草桿菌菌塊至檢測用培養基中間，依培養不同天數後，再連同菌塊與玻璃紙撕去，並去除菌塊生長直徑外側之培養基後，再將蓮霧果腐病原菌之菌塊置於前述培養皿中培養。另外同前述處理組方法，將撕去菌塊與玻璃紙的培養皿，切下與收集含有枯草桿菌生長面積之培養基，以 90°C 加熱 10 分鐘使其溶解後，再將其倒至平板中，待其凝固後接入蓮霧果腐病原菌之菌塊培養，最後計算其菌絲生長抑制率⁽²¹⁾。菌絲生長抑制率 (%) = (對照組平均半徑 - 處理組平均半徑) / 對照組平均半徑 × 100%。

抗生物質萃取

為了鑑定抗生素種類及濃度，以固體培養基玻璃紙法⁽¹⁷⁾ 來萃取抗生素，因可集中收集細菌生長面積之培養基，故可較易得到高濃度之抗生素，所以本研究採用固體培養基來萃取枯草桿菌 BS-99-H 之抗生物質。將上述撕去枯草桿菌菌塊與玻璃紙之未加熱及加熱的 NA 培養基，以無菌刀切取及收集枯草桿菌生長面積之培養基，以甲醇 2:1 (v/v) 萃取 2 天後，將萃取液先以濾紙 (Whatman No. 1) 過濾後，再將過濾液利用真空減壓濃縮機於 40°C 濃縮至乾，最後再以 1 ml 甲醇將抗生物質溶出，經 0.22 µm 濾膜過濾，即得抗生物質之抽出液⁽³⁾。

枯草桿菌發酵上澄清液加酸後對蓮霧果腐病原菌 (*P. eugeniae*) 菌絲體細胞膜之影響

事先取 20 個大小為 8 mm 之蓮霧果腐病原菌 (*P. eugeniae*) 菌絲塊於 200 ml 之 potato dextrose broth (PDB) 液體培養基中，以 120 rpm、28°C 培養 5 天後，再以抽氣過濾 (Whatman No. 1) 得到 *P. eugeniae* 菌絲體備

用。參考 Lin 等人⁽¹⁴⁾ 方法加以修改之，將枯草桿菌培養於 28°C、10 天之 200 ml nutrient broth (NB) 發酵液，經 10,000 rpm 離心 15 分鐘，取其上澄清液以 1 N 鹽酸調整至 pH 2.0 後，取其 100 ml 加入 5 克的 *P. eugeniae* 菌絲體，於 28°C、120 rpm 懸浮處理 8 小時後，再以無菌去離子水漂洗三次後，加入 50 ml 無菌去離子水於 28°C、120 rpm 震盪，並按時取樣，以 Suntex SC-2300 導電度計檢測液體導電度之變化；另外將未培養細菌之 NB 培養液以 1 N 鹽酸調整至 pH 2.0 後，依上述同樣的方法處理 *P. eugeniae* 菌絲體做為對照組。

高效能液相層析儀 (High Pressure Liquid Chromatography; HPLC) 及串聯式質譜儀 (Tandem Mass Spectrometer; MS/MS) 分析 iturin A

購自 Sigma 之純度 98% iturin A 為標準品，以甲醇稀釋配製成濃度 250 mg/L、500 mg/L、1000 mg/L、2000 mg/L 之標準溶液，以 HPLC (HITACHI, D-2000) 分析並建立 iturin A 標準曲線。參考 Araujo 等人^(3, 10) 之方法，將 iturin A 標準溶液及抗生物質之抽出液各取 10 µl 注入 HPLC 內分析，以逆相 C18 管柱，配製 Acetonitrile : 10mM Ammonium acetate (2:3,v/v) 為移動相，流速 1 ml/min 於波長 280 nm 測定 iturin A 含量，最後將波峰所得的面積總和帶入標準曲線所求得的公式計算，即可算出 iturin A 的濃度。另外參考 Phister 等人⁽¹⁹⁾ 方法加以修改之，將抗生物質之抽出液與 iturin A 標準溶液以串聯式質譜儀 (MS/MS; API 4000 Q-Trap) 進行質譜掃描，以正離子測定質量 m/z 900 至 m/z 1200 之範圍，以 0.1 µl/min 進行質譜掃描比對分析。

發芽率測試

參考 Chitarra 等人⁽⁵⁾ 之方法加以修改，先以 0.1 % Tween 20 將 *P. eugeniae* 孢子洗下配製成 10⁵ spore/ml 之孢子懸浮液備用。將萃取所得到的 iturin A 抗生物質先以 1 ml 的二甲基亞砜 (Dimethyl sulfoxide; 簡稱 DMSO) 充分溶解，再將其作一系列的稀釋後，取其溶液與孢子懸浮液以 1 : 1 (v/v) 比例混合，滴於含有 PDA 之載玻片，並保持其濕度於 28°C 培養，經 12 小時之後，以顯微鏡 400 倍率觀察 *P. eugeniae* 孢子發芽情況；另以 DMSO 處理作為對照組。以計算每視野中發芽及未發芽之分生孢子數量，累計 100 個發芽及未發芽之孢子數量為一重複，每個載玻片計算三重複；計算時，當發芽管長度至少超過孢子直徑之 1.5 倍長，即視為發芽。

結果

菌株鑑定

本研究之供試菌株 BS-99-H 經 16S rDNA 之專一性引子對進行 PCR 擴增反應與電泳分析，並將電泳分析所得約 1.5-kb DNA 片段進行純化及定序。將所得序列與 GenBank 資料庫 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) 比對後得知 BS-99-H 與枯草桿菌 (*Bacillus subtilis*) 16S rDNA 相似度為 99.67 %。根據 16S rDNA 序列相似度，我們將本研究之供試菌株 BS-99-H 鑑定為枯草桿菌 (*B. subtilis*)。

拮抗菌對植物病原真菌的抑制能力

平板對峙培養結果得知，枯草桿菌 BS-99-H 菌株對 11 屬 26 種的供試病原真菌皆有抑制其菌絲生長的作用，其中對蓮霧果腐病原 (*P. eugeniae*) 的抑制效果為最好，其生長抑制帶之半徑為 17.5 mm；其次為對甘藍黑斑病原菌 (*Alternaria* sp.)，其生長抑制帶之半徑為 14.50 mm；對青椒疫病 (*Phytophthora capsici*) 之生長抑制帶半徑為 11.82 mm；對草莓灰黴病原 (*Botrytis cinerea*) 之生長抑制帶半徑為 11.67 mm；但以對番茄白絹病 (*Sclerotium rolfsii*) 的抑制效果為最差，其生長抑制帶之半徑為 3.58 mm；各種病原菌之對照組的生長抑制帶半徑皆為 0 mm，完全無抑制效果 (表一)，由此得知 BS-99-H 對蓮霧果腐病原菌之抑制效果為最佳，故選用 *P. eugeniae* 作為後續實驗的供試病原真菌對象。

玻璃紙抗生法及 iturin A 含量分析

以平板玻璃紙方式培養枯草桿菌，分別收集培養 1、2、3、4、5、6、7 及 10 天的培養基，分成加熱及未加熱兩種處理，再將其針對蓮霧果腐病菌菌絲做拮抗效果測試。結果顯示，在培養基未加熱的處理中，培養枯草桿菌 1 天所得到的培養基，對蓮霧果腐病菌菌絲的生長抑制率為 65.1%，隨著培養枯草桿菌的天數增加，其抑制效率呈現提高的趨勢，且測到的枯草桿菌產生之抗生物質 iturin A 含量也呈現增加的趨勢；在培養枯草桿菌第 4 天時，對蓮霧果腐病菌的菌絲生長抑制率為 81.2%，所測到的抗生物質 iturin A 含量為 0.25 mg/ml，但在培養枯草桿菌第 5 天後，對蓮霧果腐病菌的菌絲生長抑制率均為 100%，測到的 iturin A 含量均超過 1.59 mg/ml。而培養基經加熱處理者與未經熱處理者所得的結果相同 (表二)。

表一、以對峙培養法測試枯草桿菌 BS-99-H 菌株對植物真菌性病原菌菌絲生長抑制能力

Table 1. Mycelia growth inhibition of plant fungal pathogens by *Bacillus subtilis* BS-99-H using the dual culture technique.

Disease name	Pathogen	Inhibition of mycelia growth (mm) ¹
Alternaria leaf spot	<i>Alternaria</i> sp.	14.50 ± 0.58 ^{L*}
Collar rot of bamboo	<i>Botryodiplodia</i> sp.	10.17 ± 0.52 ^{hij}
Black rot of wax apple	<i>B. theobromae</i>	10.00 ± 0.40 ^{ghij}
Graymold rot	<i>Botrytis cinerea</i>	11.67 ± 0.94 ^k
Anthrachnose of bamboo	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	8.58 ± 0.33 ^{fg}
Anthrachnose of mango	<i>C. gloeosporioides</i>	10.58 ± 0.26 ^{ijk}
Anthrachnose of wax apple	<i>C. gloeosporioides</i>	9.83 ± 0.13 ^{ghij}
Anthrachnose of coffee	<i>C. gloeosporioides</i>	7.50 ± 0.69 ^{de}
Anthrachnose of banana	<i>C. musae</i>	8.23 ± 0.22 ^{def}
Anthrachnose of peacock leaf spot	<i>Colletotrichum</i> sp.	8.00 ± 0.46 ^{def}
Anthrachnose of pepper	<i>Colletotrichum</i> sp.	9.33 ± 0.42 ^{fghi}
Cylindrocladium fruit rot of wax apple	<i>Cylindrocladium</i> sp.	4.20 ± 0.46 ^{ab}
Stem canker of Indian jujube	<i>Fusarium decemcellulare</i>	7.17 ± 0.21 ^d
Fusarium wilt of lettuce	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lactucum</i>	4.00 ± 0.23 ^{ab}
Fusarium yellow droft of onion	<i>Fusarium</i> sp.	8.83 ± 0.25 ^{efg}
Brown root rot of Cymbidium	<i>F. ventricosum</i>	7.50 ± 0.58 ^{de}
Fusarium wilt of watermelon	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	10.83 ± 0.13 ^{jk}
Panama disease of banana	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	11.00 ± 0.20 ^{jk}
Pestalotiopsis fruit rot of wax apple	<i>Pestalotiopsis eugeniae</i>	17.50 ± 0.87 ^m
Rice blast	<i>Pyricularia oryzae</i>	9.00 ± 0.52 ^{fgh}
Phytophthora blight of pepper	<i>Phytophthora capsici</i>	11.82 ± 0.13 ^k
Rice sheath blight	<i>Rhizoctonia solani</i>	11.00 ± 0.58 ^{jk}
Southern sclerotium blight of tomato	<i>Sclerotium rolfsii</i>	3.58 ± 0.36 ^a
Southern sclerotium blight of rice	<i>S. rolfsii</i>	5.83 ± 0.36 ^c

¹ Means ± S. D. Numbers with the same upper case letter are not significantly different by Tukey's test ($p < 0.05$).

枯草桿菌發酵上澄清液加酸後對蓮霧果腐病原菌 (*P. eugeniae*) 菌絲體細胞膜之影響

經以培養 10 天的 BS-99-H 發酵上澄清液加酸後，對 *P. eugeniae* 菌絲團處理 8 小時，按時檢測其導電度變化結果如圖一所示，供試處理組菌絲體懸浮液之導電度從初始 18.2 $\mu\text{S}/\text{cm}$ ，經 8 小時增加為 62.4 $\mu\text{S}/\text{cm}$ ，其後一直到 28 小時內，均呈現上升趨勢，於第 28 小時達 96.0 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 為最高峰，但在第 30 小時測時，其導電度上升幅度較小，為 96.4 $\mu\text{S}/\text{cm}$ ；而以酸性培養基為對照組之導電度則無上升的現象，導電度仍維持在初始的 5.0 ± 0.1 。由此結果得知，*P. eugeniae* 菌絲經處理 30 小時後，供試 BS-99-H 處理組的導電度約為對照組的 19.7 倍。

Iturin A 對蓮霧果腐病原菌孢子發芽之影響

爲了瞭解抗生物質 iturin A 對蓮霧果腐病原菌之孢子發芽的抑制能力爲何，故以測定其 IC_{50} (抑制 50% 孢子發芽的濃度)，來做爲評估其抑菌能力。BS-99-H 所產生之抗生物質 iturin A 抑制 *P. eugeniae* 孢子發芽之 IC_{50} 爲 0.51 mg/ml，且 iturin A 含量高於 0.84 mg/ml 時，皆可完全抑制其菌絲生長及孢子的發芽 (表三)；當 iturin A 含量低於 0.84 mg/ml 雖對孢子發芽無完全抑制，但經 12 小時，孢子發芽長出的菌絲呈現異常膨脹與扭曲，如圖二所示，尤其是隨著 iturin A 含量增加時，*P. eugeniae* 的菌絲出現膨脹與扭曲情況會更嚴重，至 30 小時 *P. eugeniae* 菌絲則停止生長；在對照中則沒有觀察到這種現象。

表二、以玻璃紙抗生法測試枯草桿菌 (*Bacillus subtilis*) BS-99-H 之培養天數對蓮霧果腐病原菌 (*Pestalotiopsis eugeniae*) 菌絲生長之抑制效果及其產生抗生物質 iturin A 含量之變化

Table 2. Incubation time of *Bacillus subtilis* BS-99-H on the activity against *Pestalotiopsis eugeniae* hyphal growth and the amount of antibiotic iturin A produced using cellophane paper antibiosis test and HPLC analysis

Day of incubation ¹	Inhibition rate of hyphal growth (%) ²		Iturin A(mg/ml)	
	Non-heated ³	Heated ⁴	Non-heated ⁵	Heated ⁶
1	65.1 ± 1.21 ^a	62.9 ± 0.37 ^a	0.08 ± 0.00 ^a	0.07 ± 0.00 ^a
2	73.7 ± 0.69 ^b	71.3 ± 0.75 ^b	0.15 ± 0.03 ^{ab}	0.17 ± 0.00 ^a
3	79.3 ± 0.72 ^c	76.8 ± 0.81 ^c	0.23 ± 0.02 ^b	0.29 ± 0.00 ^{ab}
4	81.2 ± 2.08 ^d	80.4 ± 0.64 ^d	0.25 ± 0.03 ^b	0.49 ± 0.00 ^b
5	100.0 ± 0.00 ^e	100.0 ± 0.00 ^e	1.59 ± 0.02 ^c	1.24 ± 0.00 ^c
6	100.0 ± 0.00 ^e	100.0 ± 0.00 ^e	1.82 ± 0.05 ^d	1.74 ± 0.00 ^d
7	100.0 ± 0.00 ^e	100.0 ± 0.00 ^e	2.28 ± 0.04 ^e	2.33 ± 0.00 ^e
10	100.0 ± 0.00 ^e	100.0 ± 0.00 ^e	2.72 ± 0.08 ^f	2.67 ± 0.00 ^f

¹ Days of BS-99-H incubated on a cellophane paper which was overlaid on a medium. After incubation, the cellophane paper was removed, and the medium, either non-heated or heated at 90°C for 10 min, was used to test the activity against mycelia growth of *P. eugeniae*, and also used for the HPLC analysis.

² The inhibition rate = (Radius of CK colony - Radius of treatment colony) / Radius of CK colony × 100%

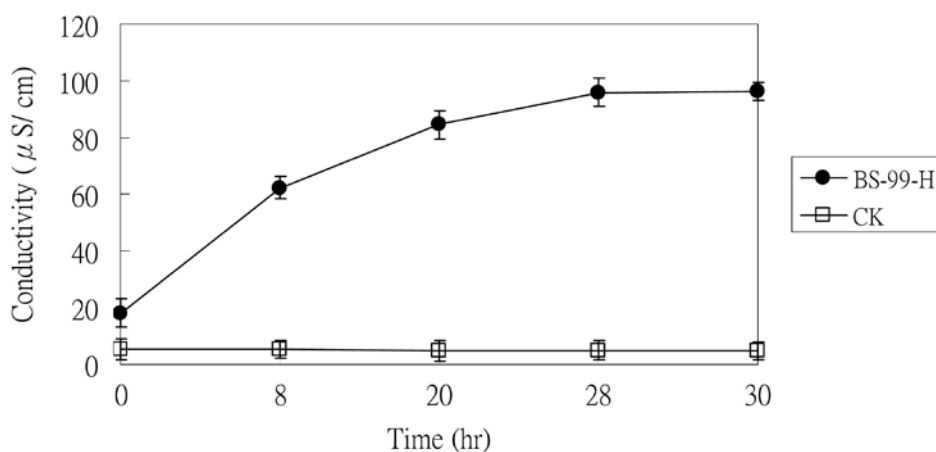
^{3,4,5,6} Means ± S. D. Numbers on each column with the same upper case letter are not significantly different by Tukey's test ($p < .05$).

表三、從枯草桿菌 BS-99-H 萃取部份純化所得之 iturin A 對蓮霧果腐病原菌的發芽率影響

Table 3. Effect of partially purified iturin A extracted from *Bacillus subtilis* BS-99-H on the spore germination rate of *Pestalotiopsis eugeniae*

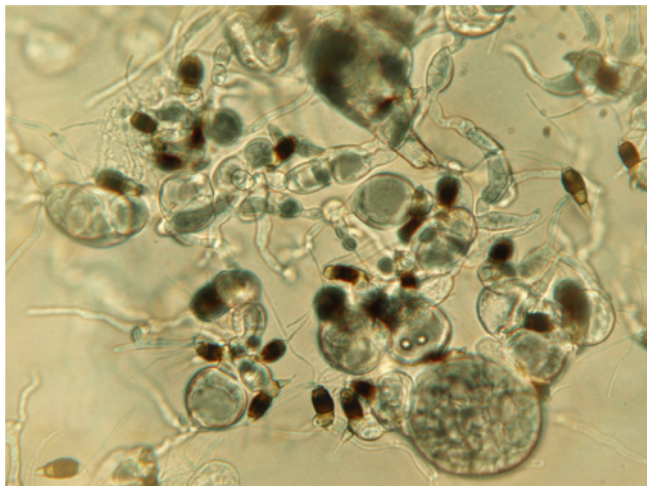
Iturin A (mg/ml)	Spore germination rate ¹ (%)
0.12	100.0 ± 0.00 ^a
0.25	93.6 ± 0.00 ^b
0.49	53.4 ± 0.00 ^c
0.84	0 ± 0.00 ^e
1.24	0 ± 0.00 ^e

¹ Means ± S. D. numbers with the same upper case letter are not significantly different by Tukey's test ($p < .05$).



圖一、枯草桿菌BS-99-H所得半純化 iturin A 粗製品處理蓮霧果腐病原菌之菌絲體 8 小時所造成的細胞膜滲漏作用。以未培養細菌之酸性 NB 培養液為對照組。

Fig. 1. The electrolyte leakage from mycelia of *Pestalotiopsis eugeniae* after an 8-hour treatment by partially purified iturin A compound from *Bacillus subtilis* BS-99-H or by acidic nutrient broth (pH 2.0) (CK).



圖二、蓮霧果腐病原菌 (*Pestalotiopsis eugeniae*) 發芽後之菌絲受到枯草桿菌 (*Bacillus subtilis*) BS-99-H 之 iturin A 作用 12 小時後呈現異常膨大及扭曲。

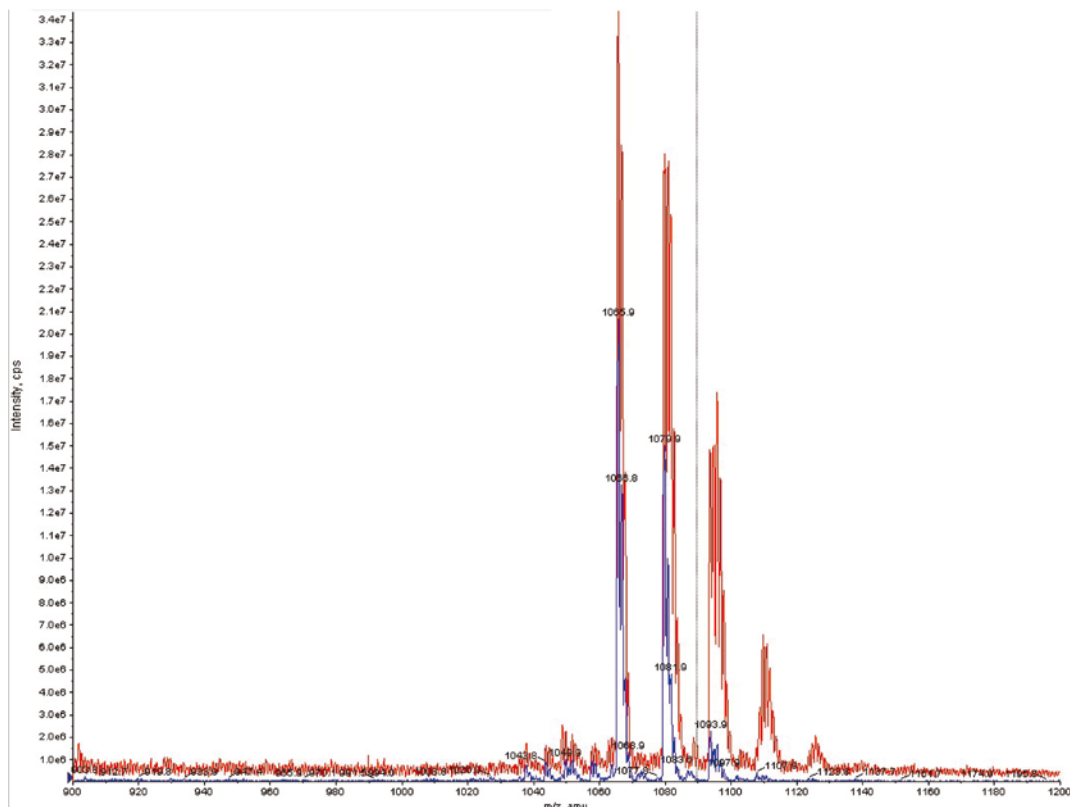
Fig. 2. The swollen and deformed hyphal growth from germinated spore of *Pestalotiopsis eugeniae* 12 hrs after treatment with iturin A extracted from culture supernatants of *Bacillus subtilis* BS-99-H.

iturin A 鑑定

已知 iturin A (I1774, Sigma) 為一種混合物標準品，含有 6 個同分異構物 (isoforms)，因此從 HPLC 分析結果得知，本研究之抗生物質抽出液與 iturin A 標準品之 HPLC 圖譜皆呈現 6 個相同滯留時間的波峰 (peaks)，且從 MS/MS 質譜儀掃描得到的圖譜結果得知，iturin A 標準溶液與抽出液的圖譜於 m/z 1065、 m/z 1079 及 m/z 1093 皆出現高波峰，且抗生物質之抽出液與 iturin A 標準溶液的圖譜有多處重疊，如圖三所示，故抽出液與 iturin A 標準溶液的圖譜比對非常吻合，證實本研究抗生物質抽出液為 iturin A。

討 論

已知桿菌屬 (*Bacillus* spp.) 細菌可產生大量的胜肽抗生物質，其可有效的抑制細菌、真菌或是酵母菌之生長，加上胜肽抗生物質是由罕見的胺基酸例如鳥氨酸 (ornithine) 或是 D-型胺基酸 (D-amino acid) 所組成，為一種小型或是環狀的脂胜肽結構，使其具有高穩定性的特性⁽¹⁶⁾。Chitarra 等人⁽⁵⁾ 的報告指出 *B. subtilis* 產



圖三、以串聯式質譜儀測定 iturin A 標準品 (藍色曲線) 與枯草桿菌 BS-99-H 萃取之抗生物質 iturin A (紅色曲線) 之質譜圖。

Fig. 3. Mass spectra detection of iturin A standard (blue curve) and antibiotic iturin A extracted from *Bacillus subtilis* BS-99-H (red curve) by using tandem mass spectrometry.

生的抗真菌的活性物質能抗高溫、有廣泛的 pH 範圍，並具有許多水解酵素的作用，而這一類抗真菌的化合物是屬於 iturin 家族的抗生物質。本研究將玻璃紙培養枯草桿菌之含有抑菌物質的培養基經 90°C 加熱後，從回融凝固的培養基仍可得到對 *P. eugeniae* 有抑制的作用，表示培養基內含有耐高溫之抑菌物質，進一步從其培養基中萃取並經 HPLC 分析得知為 iturin A 物質，此結果與 Chitarra 等人⁽⁵⁾ 的報告中所提到的相吻合。枯草桿菌可產生 iturin A 及 surfactin 來有效的防治 *Rhizoctonia solani* 所引起的番茄立枯病⁽⁴⁾。Souto 等人⁽²²⁾ 的報告指出從 *Bacillus* sp. BNM 122 之不含菌體的過濾液中可萃取得到具有抗真菌活性的脂肽抗菌物質，而本研究從移除 BS-99-H 菌體之培養基中也可萃取得到 iturin A 之脂肽抗菌物質，表示這些 *Bacillus* 細菌可分泌此抗生物質至培養基中。

另外從玻璃紙抗生法之培養基未加熱與加熱的抑菌試驗中得知，加熱處理後的培養基對 *P. eugeniae* 仍有抑菌效果。已知溫度、pH、及某些化學藥品會影響酶的活性^(2, 23)，*Bacillus* 屬細菌會產生許多大量的細胞外酵素，而酵素活性則是隨著溫度的上升而會下降，當溫度增加到 70°C 以上時，酵素如 chitinase、protease、 α -amylases、 β -amylase 等則會變性而失去活性^(1, 2, 20)，故推測本研究枯草桿菌 BS-99-H 對 *P. eugeniae* 的抑菌作用上，酵素並沒有扮演抑菌之角色。再加上以 iturin A 處理 *P. eugeniae* 後，其菌絲懸浮液電解質滲漏有明顯快速增加的現象，此與 Lin 等人⁽¹⁴⁾ 之報告結果相同。已有研究報告指出 iturins 類包括 bacillomycin F、bacillomycin L、mycosubtilin、iturin A 等，其作用機制為影響細胞膜表面張力，導致膜表面小孔的形成，進而使胞內鉀離子和其他重要的離子滲漏^(7, 15)。故本研究推測 *P. eugeniae* 菌絲的細胞膜因受到 BS-99-H 產生之 iturin A 抗生物質作用，改變其通透性而導致離子滲漏現象。

另外從光學顯微鏡觀察發現，受到 iturin A 處理之 *P. eugeniae* 之菌絲生長會呈現異常的膨脹與扭曲，與文獻報告之 *F. oxysporum* 菌絲受到 *B. subtilis* 之抗菌物質處理後，所觀察到的現象相似⁽²³⁾。Chitarra 等人⁽⁵⁾ 報告亦指出 *B. subtilis* YM 10-20 所產生的抗真菌化合物，經 HPLC 分析顯示出其為 iturin A 化合物，將藍酪黴菌 (*Penicillium roqueforti*) 的分生孢子經 iturin A 處理後，以碘化丙啶 (Propidium Iodide) 之染色方法和掃描式電子顯微鏡觀察得知，iturin A 可有效地滲透進入此真菌分生孢子的細胞膜，而且會破壞或抑制分生孢子的發芽。在本研究中，當 BS-99-H 所產生之 iturin A 濃度 ≥ 0.84 mg/ml 時，*P. eugeniae* 之孢子發芽則完全被抑制，此結果與 Chitarra 等人⁽⁵⁾ 的報告結果相同。由此可知，

本研究篩選得到之枯草桿菌 BS-99-H 主要影響或抑制 *P. eugeniae* 生長的作用因子應為 iturin A 抗生物質。綜合本研究結果得知，枯草桿菌 BS-99-H 菌株對多種真菌性病原菌之生長皆有抑制作用，在植物病害防治上的應用範圍可包括土壤病害及葉表病害，其生物防治效果則有待未來進一步研究並作田間防治試驗；此枯草桿菌菌株具有作生物防治之潛力，未來可將其開發應用於蓮霧果腐病害防治之微生物農藥。

謝 辭

本研究承農委會動植物防疫檢疫局之經費補助，大仁科技大學何婉清教授及屏東科技大學梁文進教授提供實驗病原真菌的材料，謹致謝忱。

引用文獻 (LITERATURE CITED)

1. Aderibigbe, E.Y. 1998. Characterization of extracellular proteinases from strains of *Bacillus subtilis* group. *Afr. J. Sci.* 2: 100-107.
2. Ajayi, A.O., and Fagade, O. E. 2007. Heat activation and stability of amylases from *Bacillus* species. *Afr. J. Biotechnol.* 6: 1181-1184.
3. Araujo, F. F., Henning, A. A., and Hungria, M. 2005. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21: 1639-1645.
4. Asaka, O., and Shoda, M. 1996. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4081-4085.
5. Chitarra, G. S., Breeuwer, P., Nout, M. J., van Aelst, A. C., Rombouts, F. M., and Abee, T. 2003. An antifungal compound produced by *Bacillus subtilis* YM 10-20 inhibits germination of *Penicillium roqueforti* conidiospores. *J. Appl. Microbiol.* 94: 159-166.
6. Cho, S. J., Lee, S. K., Cha, B. J., Kim, Y. H., Shin, K. S. 2003. Detection and characterization of the *Gloeosporium gloeosporioides* growth inhibitory compound iturin A from *Bacillus subtilis* strain KS03. *FEMS Microbiol. Lett.* 223: 47-51.
7. De Lucca, A. J., and Walsh, T. J. 1999. Antifungal Peptides: Novel Therapeutic Compounds against Emerging Pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 1-11.
8. Eshita, S. M., Roberto, N. H., Beale, J. M., Mamiya, B. M. and Workman, R.F. 1995. Bacillomycin Lc, a new antibiotic of iturin group: isolation, structures and antifungal activities of the congeners. *J. Antibiot.* 48: 1240-1247.
9. Handelsman, J., and Stabb, E. V. 1996. Biocontrol of

- soilborne plant pathogens. *Plant Cell* 8: 1855-1869.
10. Hsieh, F. C., Lin, T. C., Meng, M. H., and Kao, S. S. 2008. Comparing methods for identifying *Bacillus* strains capable of producing the antifungal lipopeptide iturin A. *Curr. Microbiol.* 56: 1-5.
 11. Kajimura, Y., Sugiyama, M., and Kaneda, M. 1995. Bacillopeptins, new cyclic lipopeptide antibiotics from *Bacillus subtilis* FR-2. *J. Antibiot.* 48: 1095-1103.
 12. Kim, D., Cook, R. J., and Weller, D. 1997. *Bacillus* sp. L324-92 for biological control of three root diseases of wheat grown with reduced tillage. *Phytopathology* 87: 551-558.
 13. Lin, C. C., and Tsai, S. F. 2001. Survey of *Pestalotiopsis* disease of waxapple at Kaohsiung area in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 10: 123-128.
 14. Lin, H. C., Huang, W. D., Yang, S. S., and Tzeng, D. S. 2008. Growth promotion and reduced *Sclerotium rolfsii* seedling blight of rice by *Bacillus subtilis* WG6-14. *Plant Pathol. Bull.* 17: 53-64.
 15. Maget-Dana, R., Peypoux, F. 1994. Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: biological and physicochemical properties. *Toxicology* 87: 151-174.
 16. Munimbazi, C., and Bullerman, L. B. 1998. Isolation and partial characterization of antifungal metabolites of *Bacillus pumilus*. *J. Appl. Microbiol.* 84: 959-968.
 17. Ni, H. F., Hsu, S. L., Chen, R. S., and Yang, H. R. 2010. Screening of *Trichoderma* spp. from soils in Taiwan for antagonism on fungal plant pathogens. *J. Taiwan. Agric. Res.* 59: 29-41.
 18. Ongena, M., and Jacques, P. 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.* 16: 115-125.
 19. Phister, T. G., O'Sullivan, D. J., and McKay, L. L. 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.
 20. Shahanara, B., Iftikhar, A., Faisal, A., Samsuzzaman, Parvez, H., Nurul, A., Jalaluddin, A. H. 2007. Characterization of an intracellular protease from *Pseudomonas Aeruginosa*. *Pak. J. Med. Sci.* 23: 227-232.
 21. Song, R. Q., and Ji, H. F. 2006. Inhibitory effects of 8 toxic mushroom strains on growth and germination of *Alternaria alternata*. *J. Agric. Technol.* 2: 39-48.
 22. Souto, G. I., Correa, O. S., Montecchia, M. S., Kerber, N. L., Pucheu, N. L., Bachur, M., and García, A. F. 2004. Genetic and functional characterization of a *Bacillus* sp. strain excreting surfactin and antifungal metabolites partially identified as iturin-like compounds. *J. Appl. Microbiol.* 97: 1247-1256.
 23. Swain, M. R., and Ray, R. C. 2007. Alpha amylase production by *B. subtilis* CM3 in solid state fermentation using cassava fibrous residue. *J. Basic Microbiol.* 47: 417-425.
 24. Wang, S. L., Shih, I. L., Wang, C. H. Tseng, K. C., Chang, W. T., Twu, Y. K., Ro, J. J., and Wang, C. L. 2002. Production of antifungal compounds from chitin by *Bacillus subtilis*. *Enzyme Microb. Technol.* 31: 321-328.
 25. Yu, G. Y., Sinclair, J. B., Hartman, G. L., and Bertagnolli, B. L. 2002. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biol. Biochem.* 34: 955-963.

Abstract

Bioactivity of antifungal substance iturin A produced by *Bacillus subtilis* strain BS-99-H against *Pestalotiopsis eugeniae*, a causal pathogen of wax apple fruit rot

Using the cellophane paper antibiosis method, an agar disc containing *Bacillus subtilis* BS-99-H was placed on a cellophane paper which was overlaid on the surface of an agar medium plate. After incubation, the cellophane paper was removed, and the medium that was heated at 90°C for 10 min or non-heated was assayed for the inhibitory activity against mycelial growth of *Pestalotiopsis eugeniae*. Inhibition of mycelial growth of *P. eugeniae* was observed on both heated and non-heated media one day after incubation, and a complete inhibition can be observed at 5 days post incubation. The extracts from the heated and non-heated media were analyzed by the HPLC and tandem mass spectrometry (MS/MS) methods, and iturin A was detected from both media. The partially purified iturin A was found to cause electrolyte leakage of *P. eugeniae* mycelia. The leakage was increased 3.4 folds at 8 hours post treatment and reached maximum increase of 5.3 folds at 28 hours post treatment. Treatment with the BS-99-H iturin A also caused swelling and malformed shape of the hyphae of *P. eugeniae*. The IC_{50} value of iturin A from BS-99-H for inhibition of *P. eugeniae* conidial germination was 0.51 mg/ml. The conidial germination and mycelia growth were both completely inhibited by iturin A at ≥ 0.84 mg/ml. The above results indicate that antibiotic iturin A produced by BS-99-H played an important role in antagonism against *P. eugeniae*. Therefore, *B. subtilis* BS-99-H could be a useful organism for development of a biofungicide agent for biocontrol of wax apple fruit rot.

Key words: *Bacillus subtilis* BS-99-H, *Pestalotiopsis eugeniae*, iturin A