

# 增益植物健康之多功能蘇力菌研究

胡斐婷<sup>1</sup> 郭雪<sup>1</sup> 蔡米皓<sup>1</sup> 曾經洲<sup>1\*</sup>

## 摘要

胡斐婷、郭雪、蔡米皓、曾經洲。2016。增益植物健康之多功能蘇力菌研究。臺灣農藥科學 1: 50-69。

選擇殺蟲效果良好之蘇力菌 (*Bacillus thuringiensis*, *Bt*)，探討其促進作物生長及抑制病原菌等附加效果。以鮎澤蘇力菌 (*Bt* subsp. *aizawai*, *Bta*) 及庫斯蘇力菌 (*Bt* subsp. *kurstaki*, *Btk*) 2 亞種之不同 5 品系菌株 (*Bta* A603、*Bta* Ab12、*Bta* ABTS1857、*Btk* E911 及 *Btk* ABTS351) 供試。利用聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 進行供試蘇力菌基因檢測，皆可檢出帶有溶磷 (phosphate solubilization)、吲哚-3-乙酸 (indole-3-acetic acid, IAA)、嵌鐵物質 (siderophore)、1-胺基環丙烷-羧酸脫胺酶 (1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase, ACCD)、幾丁質分解酶 (chitinase) 及  $\beta$ -1,3- 葡萄聚糖水解酶 ( $\beta$ -1,3-glucanase) 等基因。藉由生化分析，發現供試蘇力菌菌株，均有 IAA 生成、溶磷反應以及產生尿素分解酶、幾丁質分解酶、硝酸還原酶。與植物病原菌共同培養，會產生明顯的對峙效果。在高鹽環境下，也仍有 IAA 及尿素分解酶的生成。盆栽試驗顯示蘇力菌產品具促進作物生長、增長植物根系、協助肥料利用、耐鹽以及降低病原菌危害等效用。田間試驗也顯示使用蘇力菌產品之結球甘藍重量增加。綜合前述結果，證實蘇力菌除可殺蟲外，兼具促進作物生長、增進肥效、抑制微生物及減緩高鹽逆境等多項特性，可提升作物健康、品質及產量。

**關鍵詞：**蘇力菌、促進作物生長、抑制微生物、多功能微生物。

---

接受日期：2016 年 9 月 12 日

\* 通訊作者。Email: cctzeng@tactri.gov.tw

<sup>1</sup> 臺中市 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所

## 緒言

傳統農業生產，多使用化學農藥及肥料，易影響環境生態及造成藥劑殘留等問題，在現今農業政策以安全農業、永續經營為重點下，微生物農藥逐漸被更多農民所使用，於研發上也有顯著進展。

蘇力菌 (*Bacillus thuringiensis*) 除了帶有殺蟲結晶毒蛋白，可以開發微生物殺蟲劑外，它也是促進植物生長的根圈細菌 (plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR)<sup>(7)</sup> 成員之一。目前所知之 PGPR 有 *Aeromonas* spp.、*Azoarcus* spp.、*Azospirillum* spp.、*Azotobacter* spp.、*Bacillus* spp.、*Clostridium* spp. 及 *Pseudomonas* spp. 等屬的細菌。PGPR 能有效促進作物生長，推測為其能產生植物荷爾蒙，例如吲哚-3-乙酸 (indole-3-acetic acid, IAA) 及嵌鐵物質 (siderophore)，或降低病原菌危害機率<sup>(7, 13)</sup>。以 PGPR 細菌處理過之種子或根部，能促進發芽及生長<sup>(2, 18, 27)</sup>。前人研究發現，在芽孢桿菌屬 (*Bacillus* spp.) 藉由合成或分泌細胞分裂素等物質，影響植物生長發育<sup>(2)</sup>，或直接以溶磷、還原鐵等方法使植物獲得營養<sup>(29)</sup>；於萵苣植物上接種芽孢桿菌屬 2 星期後，植物的根部和嫩芽內的細胞分裂素皆會提高<sup>(3)</sup>；芽孢桿菌屬也可以提高玉米發芽或可以將三價鐵還原成二價<sup>(16, 38)</sup>；所產生之揮發物質，就如同化學訊號一樣連結芽孢桿菌屬和阿拉伯芥，可以刺激植物質量增加<sup>(35)</sup>；主要的拮抗物質為脂肽類，如豐原素 (fengycin)、表面素 (surfactin) 或 iturin 可抑制病原菌生長<sup>(8, 21, 23, 28, 37)</sup>；

會分泌抗生物質抑制病原菌的發生<sup>(2, 11)</sup>；也能引發系統性抗病機制 ISR (induced systemic resistance)，以降低病害發生<sup>(19)</sup>。

為了探討蘇力菌在殺蟲以外的附加表現，本研究針對供試蘇力菌菌株進行基因及相關生化分析，瞭解菌株之 1-氨基環丙烷-羧酸脫胺酶 (1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase, ACCD) 活性分析、吲哚-3-乙酸 (IAA) 含量、溶磷 (phosphate solubilizing)、嵌鐵物質、幾丁質分解酶 (chitinase)、尿素分解酶 (urease)、蛋白質分解酶 (protease)、脂質分解酶 (lipase)、硝酸還原酶 (nitrate reductase) 及氰化物 (cyanide) 生成，也探討蘇力菌之耐鹽性、於不同鹽度環境中，IAA 和尿素分解酶表現情形，以及病原菌之拮抗效果。於盆栽中，測試蘇力菌促進青梗白菜、菸草、四季豆、小黃瓜、茄子等作物的生長情形，以及抵抗軟腐、黑腐病原菌危害程度測試。於田間試驗中，評估蘇力菌促進田間結球甘藍生長情形。藉此研究殺蟲兼具促進作物生長、抑菌特性等多功能之蘇力菌，擴展產品的應用範圍。

## 材料與方法

### 一、供試蘇力菌菌株及成品

供試之蘇力菌菌株，有鮎澤蘇力菌 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*, Bta) 及庫斯蘇力菌 (*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, Btk) 不同品系之 5 種菌株，其中 Bta A603、Bta

Ab12、*Btk* E911 分別由本實驗室自行分離，*Btk* ABTS351、*Bta* ABTS1857 則分離純化自以下來源之市售蘇力菌產品。

供試之蘇力菌產品，有鮎澤蘇力菌 (*Bta*) Ab12 60% (30,000 DBMU/mg) WP (可濕性粉劑) (福壽實業先導成品)、鮎澤蘇力菌 (*Bta*) ABTS1857 48.1% (35,000 DBMU/mg) WG (水分散性粒劑) (台灣住友化學)、庫斯蘇力菌 (*Btk*) E911 60% (30,000 DBMU/mg) WP (福壽實業) 及庫斯蘇力菌 (*Btk*) ABTS351 23.7% (16,000 IU/mg) WP (台灣嘉潔) 等，供盆栽及田間試驗用。

## 二、蘇力菌之促生及抑菌基因檢測

以專一性引子對進行蘇力菌的基因分析，檢測包括植酸酶 (phytase)、酸性磷酸酶 (acid phosphatase)、嵌鐵物質 (siderophore)、吲哚 -3- 乙酸 (*ipdC*)、1- 氨基環丙烷 - 羧酸脫胺酶 (*accd*)、幾丁質分解酶 (*chitB* 和 *chit36*)、 $\beta$ -1,3- 葡萄糖聚糖水解酶 ( $\beta$ -1,3-glucanase)、醯基高絲氨酸內酯 (*aiiA*) 及雙效菌素 A (*zmaR* 和 *orf2*) 等基因<sup>(4, 22, 32, 33)</sup>。

## 三、蘇力菌之促生及抑菌活性生化測試

### (一) 1- 氨基環丙烷 - 羧酸脫胺酶 (ACCD) 活性分析

依據 Penrose 與 Glick (2003)<sup>(30)</sup> 之方法修改後進行，將供試菌株先以 Nutrient

broth (NB) (beef extract 0.3%、peptone 0.5%) 活化，再以 DF medium (含 0.5 M ACC) 偵測 1- 氨基環丙烷 - 羧酸受到 ACCD 作用後產生  $\alpha$ -ketobutyrate 之情形，來判斷是否有活性。

### (二) 吲哚 -3- 乙酸 (IAA) 產量分析

依據 Gordon 與 Weber (1951)<sup>(14)</sup> 之方法修改後進行。供試菌株以分光光度計 (OD<sub>530</sub>) 進行樣品量測。並以 98% IAA (indole-3-acetic acid, Sigma-Aldrich Inc., Stenheim, Germany) 為標準劑，利用直線迴歸求取檢量線，計算出菌株產生 IAA 的濃度。

### (三) 溶磷活性分析

依據 Pikovskaya (1948)<sup>(31)</sup> 之方法，將供試菌株培養於 30°C Pikovskaya's medium (PVK medium) 中，觀察是否有透化圈產生，以判斷菌株之溶磷能力。

### (四) 嵌鐵物質之活性測試

依據 Schwyn 與 Neilands (1997)<sup>(36)</sup> 之方法，將供試菌株培養於 Chrome azurol S (CAS) 培養基，進行嵌鐵物質活性分析，觀察培養基之呈色變化。

### (五) 幾丁質分解酶之活性分析

參考 Rojas-Avelizapa<sup>(34)</sup> 等人之方法，將供試菌株以 Colloidal chitin agar plates (NaNO<sub>3</sub> 0.3%、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.05%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1%、chitin 1%、Bacto agar 1.5%) 進行活性

分析，觀察透化圈大小，判斷幾丁質分解酶之分解效力。

#### (六) 尿素分解酶之活性分析

依據 Mora<sup>(25)</sup> 等人之方法，將供試菌株接種至 5 mL Trypticase soy broth (TSB) (5  $\mu$ M NiCl<sub>2</sub>、10 mM Urea) 中，經培養、離心，後續以 30  $\mu$ L Solution A (urea 2 g、95% ethanol 2 mL、H<sub>2</sub>O 4 mL) 重新懸浮，再加入 470  $\mu$ L Solution B (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1%、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1%、NaCl 0.5%、phenol red 0.002%) 均勻混合，反應 72 h (37°C)，觀察溶液之呈色變化，若顏色由黃色轉變為粉紅色 (顏色深淺程度，判斷依據)，則表示具有尿素分解酶。

#### (七) 蛋白質分解酶之活性分析

依據 Abdel Galil<sup>(1)</sup> 之方法，將供試菌株以 Gelatin agar plates (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2%、glucose 0.1%、peptone 0.5%、gelatin 1.5%、agar 1.5%) 進行活性分析，菌株培養 24 至 48 h (30°C)，觀察是否有透化圈產生，以判斷蛋白質分解酶之分解效力。

#### (八) 脂質分解酶之活性分析

參考 Kumar<sup>(20)</sup> 等人之方法，供試菌株以 Tween 80 agar plates (peptone 1%、NaCl 0.5%、CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.01%、agar 2%、Tween 80 1%) 進行酵素活性分析，菌株培養 24 至 48 h (30°C)，觀察是否有沉澱物產生，以判斷脂質分解酶之分解能力。

#### (九) 氰化物分析

參考 Lorck<sup>(24)</sup> 之方法，將供試菌株培養於 Trypticase soy agar (TSB 3%、glycine 0.45%、agar 1.5%)，並在培養皿上蓋中，放入含有 Cyanide solution (picric acid 1%、Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2%) 之濾紙，培養 7 d (30°C)，觀察濾紙之呈色變化，若顏色由黃色轉變為紅棕色，表示具有氰化物生成。

#### (十) 硝酸還原酵素分析

供試菌株培養於 5 mL Nitrate broth (peptone 0.5%、meat extract 0.3%、potassium nitrate 0.1%) 中，培養 24 h、取上清液，各別滴入數滴 Reagent A (0.8% sulfanilic acid in 5 N acetic acid) 及 Reagent B (0.6% N,N-Dimethyl-1-naphthylamine in 5 N acetic acid)，均勻混合並觀察其顏色，若顏色未出現紅色者則加入少量鋅粉，再次觀察其顏色變化。

### 四、蘇力菌耐鹽性測試

以 NA 培養基，分別加入不同鹽濃度 (NaCl 1%、2%、4% 及 6%) 進行測試，鹽濃度 0.05% 作為對照組，使用濾紙圓盤擴散法 (filter paper disc agar diffusion method) 進行試驗，在培養條件下，觀察蘇力菌生長之直徑大小。

接著進行不同鹽濃度環境 (2% 及 4%) 下，蘇力菌 IAA 及尿素分解酶試驗，以鹽濃度 0.05% 作為對照組，操作過程依三 (二) 及三 (六) 進行試驗。

## 五、蘇力菌與病原菌對峙試驗

使用 NA 培養基，以濾紙圓盤擴散法，進行供試菌株與五種植物病原菌之抑菌測試，供試病原細菌有國立中興大學植物病理學系曾國欽教授提供之 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (ZL3；寄主作物：彩色海芋)、*Xanthomonas campestris* (Xc17；寄主作物：十字花科)、*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc78；寄主作物：甘藍) 及本所蘇秋竹博士提供之 *Erwinia chrysanthemi* (Ech；寄主作物：唐菖蒲)，及病原真菌 *Rhizoctonia solani*。

## 六、蘇力菌對作物生長及防治病害之盆栽試驗

選用青梗白菜 (*Brassica rapa* var. *chinensis*, chinese cabbage)、小黃瓜 (*Cucumis sativus*, cucumber)、四季豆 (*Phaseolus vulgaris*, snap bean)、茄子 *Solanum melongena*, eggplant) 及菸草 (*Nicotiana tabacum*, tobacco) 作為試驗作物。以自製蘇力菌 *Bta* Ab12 成品與市售 (*Bta* ABTS1857、*Btk* E911 及 *Btk* ABTS351) 成品為試驗藥劑，試驗時各稀釋 1,000 倍後處理，以水處理為對照組。

### (一) 促進作物生長試驗

盆栽種植之 5 種作物 (青梗白菜、小黃瓜、四季豆、茄子及菸草)，分別以供試蘇力菌釋稀液，定時每週澆灌 2 次，經約 1 個

月後，測量植株葉面積及鮮重，評估蘇力菌促進植物生長之效果。

### (二) 青梗白菜幼株根部生長試驗

盆栽青梗白菜種子發芽後，開始分別澆灌供試蘇力菌釋稀液，定時每週澆灌 1 次，經 14 d 之後，測量青梗白菜幼株根部長度，評估蘇力菌對促進青梗白菜根部生長之成效。

### (三) 蘇力菌協助肥料作用試驗

盆栽青梗白菜，分別以供試蘇力菌釋稀液，定時每週施用 1 次，並個別配合葉面施肥 (1% 尿素) 或土壤施肥 (台肥有機肥 43 號) 處理。經約 1 個月之後，測量植株鮮重，評估蘇力菌與肥料影響作物生長之效益。

### (四) 蘇力菌防治植物細菌性病害之效果試驗

盆栽青梗白菜，分別以供試蘇力菌釋稀液，加入供試植物病原軟腐細菌 *E. chrysanthemi* (Ech)、*P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (ZL3)、黑腐細菌 *X. campestris* (Xc17) 或 *X. campestris* pv. *campestris* (Xcc78)，定時每週噴 1 次，後續測量植株葉片全葉及病徵部之面積，換算罹病率。罹病率 (%) = 病徵總面積 / 總葉面積 × 100。

## 七、蘇力菌促進結球甘藍生長之田間試驗

於 2014 年 12 月至 2015 年 3 月間，在

嘉義縣中埔鄉，進行蘇力菌處理結球甘藍 (*Brassica oleracea* var. *capitata*) 之田間試驗。田區規劃，每處理 2 畦，每畦 2 行，每行 12 株，共 48 株，4 重複。以自製蘇力菌 *Bta* Ab12 成品與市售 (*Bta* ABTS1857、*Btk* E911 及 *Btk* ABTS351) 成品供試，試驗時各稀釋 1,000 倍處理，以水處理對照組。甘藍苗定植後 1 wk 後，開始每週噴施用 2 次，連續處理 3 wk。試驗期間，並不再施用其他病蟲害防治藥劑。採收後稱量甘藍單球重，評估蘇力菌對甘藍產量之效益。

## 八、資料統計分析

試驗所得數據，經計算平均值與標準差後，使用 SPSS (statistical products and services solutions) 統計軟體進行變異數分析 (ANOVA)，以  $P < 0.05$  顯著標準，比較各處

理間是否顯著性差異，再以 Tukey's studentized range test (HSD) 進行事後檢定。

## 結果

### 一、蘇力菌促生及抑病基因檢測

經由 PCR 檢測，供試蘇力菌菌株均帶有促進作物生長的基因，包括植酸酶 (phytase)、酸性磷酸酶 (acid phosphatase)、嵌鐵物質 (siderophore)、吡啶 -3- 乙酸 (*ipdC*) 及 1-氨基環丙烷 - 羧酸脫胺酶 (*accD*) 等基因 (表一)。同持蘇力菌也帶有抑制病害基因，如幾丁質分解酶 (*chitB* 和 *chit36*)、 $\beta$ -1,3- 葡萄糖聚醣水解酶 ( $\beta$ -1,3-glucanase) 及醯基高絲氨酸內酯酶 (*aiiA*) 等基因。除了 *Bta* A603 外，皆具有雙效菌素 A 基因 (*zmaR* 和 *orf2*) (表二)。

表一、以 PCR 檢測鮎澤蘇力菌株 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*，*Bta* A603、*Bta* Ab12、*Bta* ABTS1857) 及庫斯蘇力菌株 (*Bt* subsp. *kurstaki*，*Btk* E911、*Btk* ABTS351) 促進植物生長之特性基因

**Table 1.** Results of PCR for the detection of plant growth promotion genes in *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) subsp. *aizawai* (*Bta* A603, *Bta* Ab12, *Bta* ABTS1857) and *Bt* subsp. *kurstaki* (*Btk* E911, *Btk* ABTS351)

<i>Bt</i> strain	Phosphate solubilisation gene		Siderophore synthesis gene	<i>ipdC</i> gene	<i>accD</i> gene
	Phytase	Acid phosphatase			
<i>Bta</i> A603	+ <sup>1)</sup>	+	+	+	+
<i>Bta</i> Ab12	+	+	+	+	+
<i>Bta</i> ABTS1857	+	+	+	+	+
<i>Btk</i> E911	+	+	+	+	+
<i>Btk</i> ABTS351	+	+	+	+	+

<sup>1)</sup> “+”: positive reaction.

## 二、蘇力菌促生特性之生化表現

以 Pikovskaya's 培養基測試 5 品系的蘇力菌菌株，供試菌株顯示皆具有溶磷效果；蘇力菌也能產生吲哚-3-乙酸 (IAA)，菌株依 *Bta* A603、*Bta* Ab12、*Bta* ABTS1857、*Btk* E911 及 *Btk* ABTS351 順序，IAA 生成濃度為  $20.67 \pm 1.54 \mu\text{g/mL}$ 、 $11.36 \pm 2.20 \mu\text{g/mL}$ 、 $13.30 \pm 2.99 \mu\text{g/mL}$ 、 $14.69 \pm 3.16 \mu\text{g/mL}$  及  $27.40 \pm 1.63 \mu\text{g/mL}$ ，其中以 *Btk* ABTS351 之 IAA 生成濃度最高、*Bta* A603 次之；供試菌株於生化分析中未檢出 1-氨基環丙烷-羧酸脫氨酶 (ACCD) 及嵌鐵物質表現 (表三)。

## 三、蘇力菌抑菌特性之生化分析

5 品系蘇力菌菌株皆有幾丁質分解酶的生成，所產生之透化圈依 *Bta* A603、

*Bta* Ab12、*Bta* ABTS1857、*Btk* E911 及 *Btk* ABTS351 順序，為  $1.17 \pm 0.08 \text{ mm}$ 、 $1.09 \pm 0.08 \text{ mm}$ 、 $0.82 \pm 0.20 \text{ mm}$ 、 $1.02 \pm 0.06 \text{ mm}$  及  $0.96 \pm 0.13 \text{ mm}$ ，其中以 *Bta* A603 最佳，*Bta* Ab12 次之；蘇力菌菌株經 72 h 尿素分解酶試驗檢測，試驗溶液皆從黃色轉變成粉紅色，表示菌株有尿素分解酶生成，其中以 *Btk* ABTS351 最佳，*Btk* E911 及 *Bta* ABTS1857 次之；蘇力菌也有具硝酸還原酶活性，能將硝酸根轉換成亞硝酸根；生化測試，供試蘇力菌菌株皆無氰化物生成及產生蛋白質分解酶、脂質分解酶 (表四)。

## 四、蘇力菌耐鹽性測試

供試菌株在耐鹽性測試中，0.05% 鹽濃度時，蘇力菌菌株生長情形約為 4 mm；1 及 2% 鹽濃度，均有 3 mm 以上；4% 鹽濃

表二、以 PCR 檢測鮎澤蘇力菌株 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*，*Bta* A603、*Bta* Ab12、*Bta* ABTS1857) 及庫斯蘇力菌株 (*Bt* subsp. *kurstaki*，*Btk* E911、*Btk* ABTS351) 之抗菌特性基因

**Table 2.** Results of PCR for the detection of antimicrobial genes in *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) subsp. *aizawai* (*Bta* A603, *Bta* Ab12, *Bta* ABTS1857) and *Bt* subsp. *kurstaki* (*Btk* E911, *Btk* ABTS351)

<i>Bt</i> strain	Antifungal genes					Antibacterial gene
	<i>chitB</i>	<i>chit36</i>	$\beta$ -1,3-glucanase	<i>orf2</i>	<i>zmaR</i>	<i>aiiA</i>
<i>Bta</i> A603	+ <sup>1)</sup>	+	+	-	-	+
<i>Bta</i> Ab12	+	+	+	+	+	+
<i>Bta</i> ABTS1857	+	+	+	+	+	+
<i>Btk</i> E911	+	+	+	+	+	+
<i>Btk</i> ABTS351	+	+	+	+	+	+

<sup>1)</sup>“+”: positive reaction; “-”: negative reaction.

表三、鮎澤蘇力菌株 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*, *Bta* A603、*Bta* Ab12、*Bta* ABTS1857) 及庫斯蘇力菌株 (*Bt* subsp. *kurstaki*, *Btk* E911、*Btk* ABTS351) 之溶磷、1- 胺基環丙烷 - 羧酸脫胺酶、吡啶 -3- 乙酸及嵌鐵物質反應

**Table 3.** Phosphate solubilisation, ACCD, IAA, and siderophore reactions in *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) subsp. *aizawai* (*Bta* A603, *Bta* Ab12, *Bta* ABTS1857) and *Bt* subsp. *kurstaki* (*Btk* E911, *Btk* ABTS351)

<i>Bt</i> strain	Phosphate solubilisation	ACCD	IAA (µg/mL)	Siderophore
<i>Bta</i> A603	+ <sup>1)</sup>	- <sup>1)</sup>	20.67 ± 1.54 <sup>2)</sup> ab <sup>3)</sup>	- <sup>1)</sup>
<i>Bta</i> Ab12	+	-	11.36 ± 2.20 b	-
<i>Bta</i> ABTS1857	+	-	13.30 ± 2.99 b	-
<i>Btk</i> E911	+	-	14.69 ± 3.16 b	-
<i>Btk</i> ABTS351	+	-	27.40 ± 1.63 a	-

<sup>1)</sup> “+”: positive reaction; “-”: negative reaction.

<sup>2)</sup> The concentration (mean ± SD) of IAA in each culture medium was determined by comparing with a standard curve.

<sup>3)</sup> Values which are followed by the same letter are not significantly different at a level of 5% according to Tukey’s studentized range test.

表四、鮎澤蘇力菌株 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*, *Bta* A603、*Bta* Ab12、*Bta* ABTS1857) 及庫斯蘇力菌株 (*Bt* subsp. *kurstaki*, *Btk* E911、*Btk* ABTS351) 之尿素分解酶、幾丁質分解酶、蛋白質分解酶、脂質分解酶及氰化物反應

**Table 4.** Urease, chitinase, protease, lipase, and cyanide reactions in *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) subsp. *aizawai* (*Bta* A603, *Bta* Ab12, *Bta* ABTS1857) and *Bt* subsp. *kurstaki* (*Btk* E911, *Btk* ABTS351)

<i>Bt</i> strain	Cyanide	Urease	Chitinase <sup>3)</sup> (mm)	Protease	Lipase
<i>Bta</i> A603	- <sup>1)</sup>	++ <sup>2)</sup>	1.17 ± 0.08	- <sup>1)</sup>	- <sup>1)</sup>
<i>Bta</i> Ab12	-	++	1.09 ± 0.08	-	-
<i>Bta</i> ABTS1857	-	+++	0.82 ± 0.20	-	-
<i>Btk</i> E911	-	+++	1.02 ± 0.06	-	-
<i>Btk</i> ABTS351	-	++++	0.96 ± 0.13	-	-

<sup>1)</sup> “-”: negative reaction.

<sup>2)</sup> Urease reaction: ++ moderate, +++ strong, ++++ very strong.

<sup>3)</sup> Concentrations of chitinase (mean ± SD) were determined using the filter paper disc agar diffusion method.

度時，生長狀況則下降到 1 mm；6% 鹽濃度時，蘇力菌完全不生。蘇力菌於後續 IAA 尿素分解酶測試中，菌株於 0.05% 鹽濃度（對照組）時，IAA 生成量皆在 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上；在 2% 鹽濃度中，IAA 的生成量為 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上；在 4% 高鹽濃度，蘇力菌之 IAA 生成明顯下降較，濃度僅有 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，但其中 *Btk* ABTS351 較不同，生成量仍有 7.75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。於同濃度處理之結果中，蘇力菌菌株間大多無顯著性差異，僅有 *Btk* ABTS351 在高濃度下與其他菌株有顯著性差異，而在同菌株不同濃度處理之結果，具顯著性差異，顯示鹽濃度會影響菌株產生 IAA 之濃度。

蘇力菌在不同鹽濃度（0.05、2 和 4%）環境下，皆可產生尿素分解酶，而鹽度越高所產生的尿素分解酶越少，當中以 *Btk*

E911 的尿素分解酶活性最佳、不同鹽濃度間之差異最少（表五）。

## 五、蘇力菌與病原菌對峙結果

蘇力菌對四種病原細菌皆具有抑制效果。5 品系蘇力菌菌株與軟腐病菌 *E. chrysanthemi* (Ech) 的對峙結果中，抑制效果最佳為 *Btk* ABTS351；與 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (ZL3) 對峙之結果中，最佳的是 *Bta* A603；與黑腐病菌 *X. campestris* (Xc17) 之對峙結果，其抑制效果最好的是 *Bta* ABTS1857；與 *X. campestris* pv. *campestris* (Xcc78) 之結果中，則是 *Btk* ABTS351 最好（表六）。但蘇力菌菌株與立枯絲核菌之對峙結果，僅有 *Btk* ABTS351 有抑制效果，*Btk* ABTS351 與真菌在生長交接處產生對峙

表五、鮎澤蘇力菌株 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*，*Bta* A603、*Bta* Ab12、*Bta* ABTS1857) 及庫斯蘇力菌株 (*Bt* subsp. *kurstaki*，*Btk* E911、*Btk* ABTS351) 於不同鹽濃度（氯化鈉 0.05、2、4%）對 IAA 及尿素分解酶之影響

**Table 5.** Effects of different salt concentrations (NaCl 0.05, 2, 4%) on IAA and urease production by *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) subsp. *aizawai* (*Bta* A603, *Bta* Ab12, *Bta* ABTS1857) and *Bt* subsp. *kurstaki* (*Btk* E911, *Btk* ABTS351)

<i>Bt</i> strain	IAA ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )			Urease		
	0.05	2	4	0.05	2	4
<i>Bta</i> A603	11.04 $\pm$ 0.21 Aa <sup>1)</sup>	7.42 $\pm$ 1.20 Ba	2.86 $\pm$ 0.47 Cb	++ <sup>2)</sup>	++	++
<i>Bta</i> Ab12	13.11 $\pm$ 0.70 Aa	6.42 $\pm$ 0.98 Ba	2.45 $\pm$ 0.41 Cb	++	+	+
<i>Bta</i> ABTS1857	10.05 $\pm$ 1.45 Aa	6.42 $\pm$ 0.43 ABa	2.45 $\pm$ 0.41 Cb	+++	+	+
<i>Btk</i> E911	10.94 $\pm$ 1.26 Aa	8.59 $\pm$ 0.81 Aa	3.23 $\pm$ 0.39 Bb	++++	+++	+++
<i>Btk</i> ABTS351	12.10 $\pm$ 1.17 Aa	10.09 $\pm$ 1.48 Aa	7.75 $\pm$ 0.96 Aa	++++	+++	+

<sup>1)</sup> Values (mean  $\pm$  SD) within a row (uppercase letters) or within a column (lowercase letters) that are followed by the same letter(s) are not significantly different at a level of 5% according to Tukey's studentized range test.

<sup>2)</sup> Urease reaction: + weak, ++ moderate, +++ strong, ++++ very strong.

表六、以濾紙圓盤擴散法測試鮎澤蘇力菌株 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*, *Bta* A603、*Bta* Ab12、*Bta* ABTS1857) 及庫斯蘇力菌株 (*Bt* subsp. *kurstaki*, *Btk* E911、*Btk* ABTS351) 拮抗植物病原菌 (Ech: *Erwinia chrysanthemi*、ZL3: *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*、Xc17: *Xanthomonas campestris*、Xcc78: *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) 之效果

**Table 6.** Using the filter paper disc agar diffusion method to examine the inhibition of plant pathogens (Ech: *Erwinia chrysanthemi*; ZL3: *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*; Xc17: *Xanthomonas campestris*; Xcc78: *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) by *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* (*Bta* A603, *Bta* Ab12, *Bta* ABTS1857) and *Bt* subsp. *kurstaki* (*Btk* E911, *Btk* ABTS351) strains

<i>Bt</i> strain	Inhibition zone (mm)			
	Ech	ZL3	Xc17	Xcc78
<i>Bta</i> A603	1.48 ± 0.21 a <sup>1)</sup>	3.55 ± 0.13 a	2.95 ± 0.57 a	3.45 ± 0.33 a
<i>Bta</i> Ab12	2.07 ± 0.13 a	3.43 ± 0.27 a	2.52 ± 0.44 a	2.88 ± 0.24 a
<i>Bta</i> ABTS1857	1.71 ± 0.14 a	3.29 ± 0.08 ab	3.20 ± 0.21 a	2.98 ± 0.26 a
<i>Btk</i> E911	2.02 ± 0.22 a	2.70 ± 0.18 b	2.67 ± 0.38 a	3.29 ± 0.44 a
<i>Btk</i> ABTS351	2.25 ± 0.20 a	3.32 ± 0.07 ab	2.93 ± 0.23 a	3.89 ± 0.14 a

<sup>1)</sup> Values in the same column that are followed by the same letter are not significantly different at a level of 5% according to Tukey's studentized range test.

界線，真菌菌絲無法往蘇力菌菌株生長處延伸，其他菌株則可。

## 六、蘇力菌對作物生長及防治病害之盆栽試驗

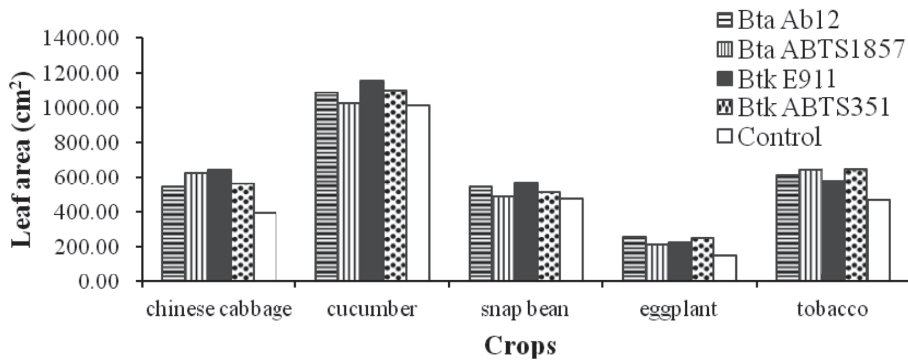
供試蘇力菌成品對青梗白菜、小黃瓜、四季豆、茄子及菸草 5 種作物，具有促進其生長之效果。蘇力菌 (*Bta* Ab12、*Bta* ABTS1857、*Btk* E911 及 *Btk* ABTS351) 處理組中，青梗白菜的地上部鮮重，以 *Btk* E911 促進效果最佳；全株葉面積則以 *Bta* ABTS1857 最佳，葉面積增加率皆有 35% 以上。蘇力菌雖也顯示對小黃瓜有促進效果，但處理組與對照組間較不明顯，在地上部鮮重結果比

較中，其增加率幅度在 11.16 ~ 0.30% 之間，而葉面積的幅度則在 13.90 ~ 0.78% 之間。在四季豆作物結果中，僅有 *Bta* Ab12 及 *Btk* E911 處理組，有較明顯之促進生長之效果，其餘 2 種處理組與對照組的生長狀況差異較小。蘇力菌能使茄子產生明顯之促進效果，其中以 *Bta* Ab12 的效果最佳、*Btk* ABTS351 次之。在菸草結果中，地上部鮮重生長狀況，依菌株 *Bta* Ab12、*Bta* ABTS1857、*Btk* E911 及 *Btk* ABTS351，其增加率為 30.13%、24.85%、16.19% 及 13.27%，全株葉面積增加率則為 31.50%、37.44%、23.14% 及 28.39% (圖一、圖二)。促進青梗白菜幼苗根部生長之結果，對照組根部平均長度為 7.3 cm，處理

組 *Bta* Ab12 為 8.6 cm、*Btk* E911 為 9.2 cm、*Btk* ABTS351 為 7.8 cm 及 *Bta* ABTS1857 為 7.5 cm，以 *Btk* E911 處理下之幼苗根部長度最長。

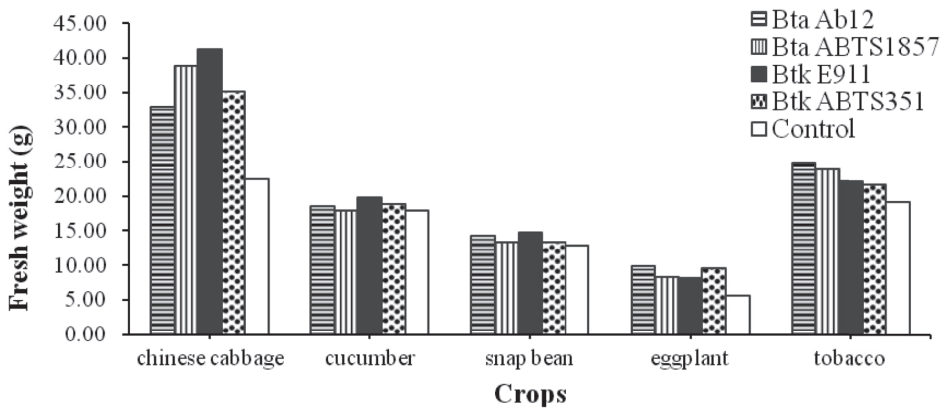
蘇力菌與有機肥 43 號共同施用後，有澆灌蘇力菌之處理組，其鮮重之測量結

果，皆比僅施用有機肥料之對照組佳，各處理組之鮮重增加率為 20.78 ~ 31.14%，以 *Bta* Ab12 處理組的鮮重 159.73 g，處理效果最佳、生長狀況最好。在青梗白菜葉面施肥 (1% 尿素) 結果，同樣地，有噴灑蘇力菌



圖一、鮎澤蘇力菌 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*，*Bta* Ab12、*Bta* ABTS1857) 及庫斯蘇力菌 (*Bt* subsp. *kurstaki*，*Btk* E911、*Btk* ABTS351) 成品對不同作物葉面積生長之影響。

Fig. 1. Effects of *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) subsp. *aizawai* (*Bta* Ab12, *Bta* ABTS1857) and *Bt* subsp. *kurstaki* (*Btk* E911, *Btk* ABTS351) on the leaf growth of different crops.



圖二、鮎澤蘇力菌 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*，*Bta* Ab12、*Bta* ABTS1857) 及庫斯蘇力菌 (*Bt* subsp. *kurstaki*，*Btk* E911、*Btk* ABTS351) 成品對作物鮮重之影響。

Fig. 2. Effects of *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) subsp. *aizawai* (*Bta* Ab12, *Bta* ABTS1857) and *Bt* subsp. *kurstaki* (*Btk* E911, *Btk* ABTS351) on the fresh weight of different crops.

之處理組，其全株鮮重測量結果皆較僅噴灑肥料之對照組佳，菌株依 *Bta* Ab12、*Bta* ABTS1857、*Btk* E911、*Btk* ABTS351 及對照組，其鮮重為 46.68 g、54.24 g、52.88 g、59.50 g 及 43.38 g，以 *Btk* ABTS351 增加效果最大，有 37.18% (表七)。

蘇力菌與病原菌的盆栽作物防治試驗結果中，軟腐病菌 *E. chrysanthemi* (Ech)、*P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (ZL3) 在青梗白菜上所造成的罹病率為 3.83 ~ 16.55%、黑腐病菌 *X. campestris* (Xc17)、*X. campestris* pv. *campestris* (Xcc78) 的情形為 10.09 ~ 35.60%，二者對青梗白菜的罹病率相差近 2 倍。而在 *E. chrysanthemi* (Ech) 的試驗結果，罹病率最大的是 *Bta* ABTS1857 有 9.47%、最小的是 *Bta* ABTS351 為 3.83%；在 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (ZL3) 的測試中，罹病率依對照組、*Bta* Ab12、*Bta* ABTS1857、*Btk* E911 及 *Btk* ABTS351 為 16.55%、12.99%、

8.54%、8.24%、10.39%。在黑腐病菌試驗結果中，有施用蘇力菌之處理組，其罹病率在 10 ~ 20%、未施用蘇力菌之處理組在 20 ~ 35% 之間，皆以 ABTS351 之防治效果最佳、*Bta* ABTS1857 次之 (圖三)。

### 七、蘇力菌結球甘藍試驗結果

田間試驗中蘇力菌皆可增加結球甘藍產量，其增加率有 14% 以上，依對照組、*Bta* Ab12、*Bta* ABTS1857、*Btk* E911 及 *Btk* ABTS351，結球甘藍單球平均重量為 1.97 kg、2.25 kg、2.34 kg、2.46 kg 及 2.31 kg，以 *Btk* E911 的促生效果最佳 (圖四)。

### 討論

蘇力菌是微生物殺蟲劑，同時也具有促進長生和抑制病原菌等特性，其主要的作分分為直接和間接兩方面，直接方面是提

表七、鮎澤蘇力菌 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*，*Bta* Ab12、*Bta* ABTS1857) 及庫斯蘇力菌 (*Bt* subsp. *kurstaki*，*Btk* E911、*Btk* ABTS351) 成品對青梗白菜 (*Brassica rapa* var. *chinensis*) 在葉面施肥、根部施肥下之鮮重調查

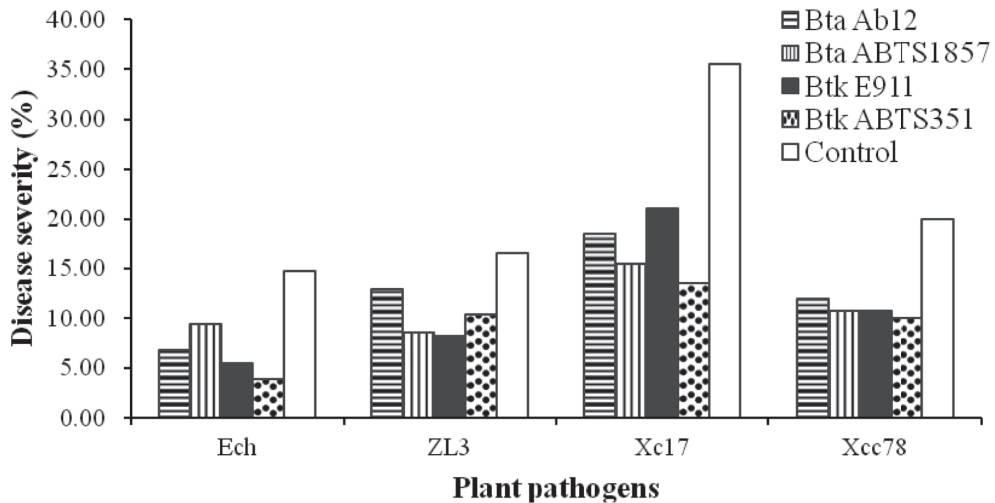
**Table 7.** Fresh weight of Chinese cabbage (*Brassica rapa* var. *chinensis*) treated with *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* (*Bta* Ab12, *Bta* ABTS1857) and *Bt* subsp. *kurstaki* (*Btk* E911, *Btk* ABTS351) products by foliar spraying and root drenching

<i>Bt</i> products	Fresh weight (g)	
	Foliar fertilization	Root drenching
<i>Bta</i> Ab12	46.68 ± 2.40	159.73 ± 9.80
<i>Bta</i> ABTS1857	54.24 ± 4.04	147.12 ± 8.90
<i>Btk</i> E911	52.88 ± 1.50	157.36 ± 18.49
<i>Btk</i> ABTS351	59.50 ± 7.53	156.25 ± 10.33
Control	43.38 ± 6.39	121.80 ± 14.48

供植物所需之物質，或將環境中物質轉變供植物體可以直接利用；間接方面是可降低病原菌對植物之影響。5 供試品系蘇力菌菌株 (*Bta* A603、*Bta* Ab12、*Bta* ABTS1857、*Btk* E911 及 *Btk* ABTS351) 具有分解酵素之基因 (幾丁質分解酶、葡萄糖聚糖水解酶)，也具有促生特性的基因 (植酸酶、酸性磷酸酶、嵌鐵物質、IAA 及 ACCD)，推測蘇力菌具有多功能的潛力。在生化測試中，蘇力菌菌株可以檢測出具有溶磷、IAA、幾丁質分解酶、尿素分解酶及硝酸還原酶等特

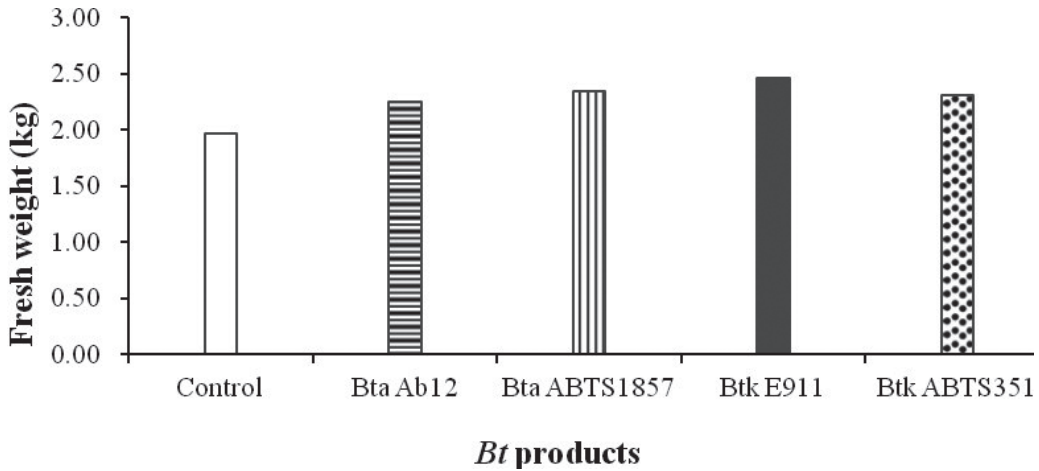
性，但無法檢測出葡萄糖聚糖水解酶、嵌鐵物質及 ACCD，可能在於這些物質所產生的量不足，無法藉由生化方法測得，但仍可以證實蘇力菌具有多功能特性潛力。

在促生和抑菌特性分析結果中，蘇力菌供試菌株能分泌 IAA 促使作物生長，而 IAA 的濃度在  $10^{-8} \sim 10^{-5}$  M 間，可以刺激植物根部生長，並且與濃度呈正相關<sup>(9)</sup>。青梗白菜幼株根部生長結果中，可以明顯看到有施用蘇力菌之處理組，其植株根部長度較長、生長狀況也較佳，處理組與對照組



圖三、鮎澤蘇力菌 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*, *Bta* Ab12、*Bta* ABTS1857) 及庫斯蘇力菌 (*Bt* subsp. *kurstaki*, *Btk* E911、*Btk* ABTS351) 成品抑制青梗白菜 (*Brassica rapa* var. *chinensis*) 細菌性病害 (Ech: *Erwinia chrysanthemi*、ZL3: *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*、Xc17: *Xanthomonas campestris*、Xcc78: *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) 發生的影響。

Fig. 3. Effects of *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) subsp. *aizawai* (*Bta* Ab12, *Bta* ABTS1857) and *Bt* subsp. *kurstaki* (*Btk* E911, *Btk* ABTS351) on the suppression of bacterial disease severity caused by Ech (*Erwinia chrysanthemi*), ZL3 (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*), Xc17 (*Xanthomonas campestris*), and Xcc78 (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) in Chinese cabbage (*Brassica rapa* var. *chinensis*).



圖四、田間試驗測試鮎澤蘇力菌 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*, *Bta* Ab12、*Bta* ABTS1857) 及庫斯蘇力菌 (*Bt* subsp. *kurstaki*, *Btk* E911、*Btk* ABTS351) 成品對結球甘藍 (*Brassica oleracea* var. *capitata*) 鮮重增加之影響。

Fig. 4. Effects of *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) subsp. *aizawai* (*Bta* Ab12, *Bta* ABTS1857) and *Bt* subsp. *kurstaki* (*Btk* E911, *Btk* ABTS351) on the fresh weight of cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) as determined through field testing.

間具有顯著性差異。而在溶磷特性中，溶磷效力可以隨著環境而改變，因此在環境壓力下，可增加菌株之溶磷能力使植物受益<sup>(26)</sup>，蘇力菌菌株在檢測上雖具有溶磷基因之訊號，但溶磷效果並不明顯，而如何增進蘇力菌的溶磷效力，則需更進一步評估及研究。在盆栽試驗中，蘇力菌皆可以促進青梗白菜、小黃瓜、四季豆、茄子及菸草等多種作物生長，尤其是在茄子作物上，處理組與對照組的比較下，植株鮮重具有顯著性差異。在田間結球甘藍試驗結果，證實蘇力菌除了能有效防治鱗翅目害蟲（例如斜紋夜蛾、小菜蛾、紋白蝶），還能因促生及抑病而增加作物重，發揮兼具防蟲及提升作物產量之效果。

在探討蘇力菌抑病特性中發現，供試 5 品系之蘇力菌菌株皆具有幾丁質分解酶，幾丁質分解酶為生物防治上的重要一環，藉由分解酶分解病原菌之細胞壁來達到防治效果。而蘇力菌與病原菌在培養基上的對峙結果中，蘇力菌對細菌性病害的抑制效果較佳，對真菌性較差，菌株雖然能分泌幾丁質分解酶，但可能在產量上，不足以有效地抑制真菌性病害，所以在抑制效用上並不顯著。在半田間試驗中，蘇力菌能有效降低細菌性病害發生，與 *X. campestris* (Xc17) 病原菌對峙的結果，處理組與對照組具有顯著性差異。從試驗結果中，蘇力菌能抑制病原菌，除了與多種分解酶的產生有關外，也可能是藉由蘇力菌菌體生長速

度較快、繁殖較佳，進而影響到病原菌的繁殖空間，以達防治上之效用。

除了幾丁質分解酶外，蘇力菌供試菌株還可以產生尿素分解酶。在農業上經常使用尿素肥作為作物栽種時的基肥，而肥料與尿素分解酶作用則會產生  $\text{NH}_3$  或  $\text{NH}_4^+$ 。 $\text{NH}_3$  於栽培過程中具有促生之特性，可以促進植物生長，而尿素分解酶也能加速尿素的分解及被利用，所以在葉面施用尿素的試驗結果中，有使用蘇力菌之處理組，其葉面積皆較未施用的佳。此外， $\text{NH}_3$  除了可以促進捲葉羽衣甘藍基部之生長外，也為一種毒性氣體，可視為抗生物質，具有抑制病害之效用<sup>(6)</sup>，也推測是蘇力菌能抑制病原細菌之原因之一。 $\text{NH}_4^+$  為主要土壤吸收養分之分子型態，因此蘇力菌除了在葉面施肥試驗中能明顯增加作物葉面積外，在施用有機肥的試驗結果中，也能有效的使作物之鮮重和葉面積皆比對照組佳。

土壤鹽分過高會不利於作物繁殖、降低生長及發育，而本文之蘇力菌菌株藉由菌體在含鹽環境下是否仍可以生長、繁殖，或是在此逆境下，檢測蘇力菌多項特性來探究其耐鹽情形。在試驗結果中，蘇力菌之最高耐鹽濃度為 4%，比海水的 3.5% 鹽度還要高，蘇力菌在此不良環境下，5 種菌株皆能分泌 IAA 及尿素分解酶。過去研究指出菌體所分泌之胞外多醣體 (exopolysaccharide, EPS) 會與陽離子 (例如  $\text{Na}^+$ ) 鍵結，可以降低植物土壤中陽離子濃度，藉此減緩鹽分過高的逆境<sup>(10)</sup>。且 PGPR 在鹽土環境中能改善番茄、胡椒、芥菜及棉花等作物生長，

減緩鹽土對作物之不良影響<sup>(12, 17)</sup>，也顯示植物因為有 PGPR 菌體的作用，使植株本身之生理、酵素分泌及生化上的產生改變，而這些變化其推測可能是減緩逆境 (鹽分、乾旱) 危害的因素之一<sup>(5, 15)</sup>。

蘇力菌供試菌株具有溶磷效果、IAA 生成、幾丁質分解酶、尿素分解酶及硝酸還原酶，而在高鹽環境下仍具有 IAA 及尿素分解酶的生成。另外，此等蘇力菌菌株也對植物病原細菌有拮抗作用，在對峙培養及作物上都有抑制效果。盆栽試驗中，蘇力菌菌株皆能促進多種作物生長，於青梗白菜試驗中也表現出具有協助肥料作用、促進根部生長之效用，田間應用上也能增加結球甘藍的單球重。故推知蘇力菌藉由促生、提高肥培作用、抑制病害等多項特性，以提升作物的品質與產量。

## 謝辭

本研究承蒙國立中興大學植物病理學系曾國欽教授及農業藥物毒物試驗所蘇秋竹博士提供試驗病原菌材料，僅致謝忱。

## 引用文獻

1. Abdel Galil, O. A. 1992. Fermentation of proteases by *Aspergillus fumigates* and *pencilium* sp. J. King Saud Univ. 4: 127-136.
2. Ahmad, F., Ahmad, I., and Khan, M. S. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. Microbiol. Res. 163:

- 173-181.
3. Arkhipova, T. N., Veselov, S. U., Melentiev, A. I., Martynenko, E. V., and Kudoyarova, G. R. 2005. Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. *Plant Soil* 272: 201-209.
  4. Arora, N., Ahmad, T., Rajagopal, R., and Bhatnagar, R. K. 2003. A constitutively expressed 36 kDa exochitinase from *Bacillus thuringiensis* HD1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 307: 620-625.
  5. Barriuso, J., Ramos, S. B., and Gutierrez Manero, F. J. 2008. Protection against pathogen and salt stress by four plant growth-promoting rhizobacteria isolated from *Pinus* sp. On *Arabidopsis thaliana*. *Phytopathology* 98: 666-672.
  6. Castro, A., Stulen, I., Posthumus, F. S., and De Kok, L. J. 2006. Changes in growth and nutrient uptake in *Brassica oleracea* exposed to atmospheric ammonia. *Ann. Bot.* 97: 121-131.
  7. Castro-Sowinski, S., Herschkovitz, Y., Okon, Y., and Jurkevitch, Y. 2007. Effects of inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria on resident rhizosphere microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 276: 1-11.
  8. Chen, X. H., Koumoutsis, A., Scholz, R., Schneider, K., Vater, J., Siissmuth, R., Piel, J., and Borriss, R. J. 2009. Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. *J. Biotechnol.* 140: 27-37.
  9. Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Broek, A. V., and Vanderleyden, J. 1999. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant Soil* 212: 155-164.
  10. Geddie, J. L., and Sutherland, I. W. 1993. Uptake of metals by bacterial polysaccharides. *J. Appl. Bacteriol.* 74: 467-472.
  11. Glick, B. R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41: 109-117.
  12. Glick, B. R., and Bashan, Y. 1997. Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytophagous. *Biotechnol. Adv.* 15: 353-378.
  13. Glick, B. R., Liu, C., Ghosh, S., and Dumbrof, E. B. 1997. Early development of canola seedlings in the presence of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Soil Biol. Biochem.* 29: 1233-1239.
  14. Gordon, S. A., and Weber, R. P. 1951. Colorimetric estimation of indoleacetic acids. *Plant Physiol.* 26: 192-195.
  15. Han, H. S., and Lee, K. D. 2005. Plant growth promoting rhizobacteria effect on antioxidant status, photosynthesis, min-

- eral uptake and growth of lettuce under soil salinity. *Res. J. Agri. Biol. Sci.* 1: 210-215.
16. Idris, E. E., Iglesias, D. J., Talon, M., and Borriss, R. 2007. Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Mol. Plant Microbe Interact.* 20: 619-626.
  17. Kang, H. L., Rae, H. K., and Song, H. G. 2008. Enhancement of growth and yield of tomato by *Rhodopseudomonas* sp. under greenhouse conditions. *J. Microbiol.* 46: 641-646.
  18. Khalid, A., Arshad, M., and Zahir, Z. A. 2004. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *J. Appl. Microbiol.* 96: 473-480.
  19. Kloepper, J. W., Ryu, C. M., and Zhang, S. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94: 1259-1266.
  20. Kumar, D., Kumar, L., Nagar, S., Raina, C., Parshad, R., and Gupta, V. K. 2012. Screening, isolation and production of lipase/esterase producing *Bacillus* sp. strain DVL2 and its potential evaluation in esterification and resolution reactions. *Arch. Appl. Sci. Res.* 4: 1763-1770.
  21. Leclère, V., Béchet, M., Adam, A., Guez, J. S., Wathelet, B., Ongena, M., Thonart, P., Gancel, F., Chollet-Imbert, M., and Jacques, P. 2005. Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. *Am. Soc. Microbiol.* 71: 4577-4584.
  22. Lee, S. J., Park, S. Y., Lee, J. J., and Yum, D. Y. 2002. Genes encoding the N-acyl homoserine lactone-degrading enzyme are widespread in many subspecies of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3919-3924.
  23. León, M., Yaryura, P. M., Montecchia, M. S., Hernández, A. I., Correa, O. S., Pucheu, N. L., Kerber, N. L., and García, A. F. 2009. Antifungal activity of selected indigenous *Pseudomonas* and *Bacillus* from the soybean rhizosphere. *Intern. J. Microbiol.* 10: 1-9.
  24. Lorck, H. 1948. Production of hydrocyanic acid by bacteria. *Physiol. Plant.* 1: 142-146.
  25. Mora, D., Fortina, M. G., Parini, C., and Ricci, G. 2002. Genetic diversity and technological properties of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from dairy products. *J. Appl. Microbiol.* 93: 278-287.
  26. Nautiyal, C. S., Bhadauria, S., Kumar, P., Lal, H., Mondal, R., and Verma, D. 2000. Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils. *FEMS Microbiol. Lett.* 182: 291-296.

27. Nezarat, S., and Gholami, A. 2009. Screening plant growth promoting rhizobacteria for improving seed germination, seedling growth and yield of maize. *Pak. J. Biol. Sci.* 12: 26-32.
28. Ongena, M., Jacques, P., Touré, Y., Destain, J., Jabrane, A., and Thonart, P. 2005. Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69: 29-38.
29. Orozco-Mosqueda, M. d. C., Velázquez-Becerra, C., Macías-Rodríguez, L. I., Santoyo, G., Flores-Cortez, I., Alfaro-Cuevas, A., and Valencia-Cantero, E. 2012. *Arthrobacter agilis* UMCV2 induces iron acquisition in *Medicago truncatula* (strategy I plant) in vitro via dimethylhexadecylamine emission. *Plant Soil* 362: 51-66.
30. Penrose, D. M., and Glick, B. R. 2003. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiol. Planta.* 118: 10-15.
31. Pikovskaya, R. I. 1948. Mobilization of phosphorous in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Microbiology* 17: 362-370.
32. Raddadi, N., Belaouis, A., Tamagnini, I., Hansen, B. M., Hendriksen, N. B., Boudabous, A., Cheril, A., and Daffonchio, D. 2009. Characterization of polyvalent and safe *Bacillus thuringiensis* strains with potential use for biocontrol. *J. Basic Microbiol.* 49: 293-303.
33. Raffel, S. J., Stabb, E. V., Milner, J. L., and Handelsman, J. 1996. Genotypic and phenotypic analysis of zwittermicin A-producing strains of *Bacillus cereus*. *Microbiology* 142: 3425-3436.
34. Rojas-Avelizapa, L. I., Cruz-Camarillo, R., Guerrero, M. I., Rodríguez-Vazquez, R., and Ibarra, J. E. 1999. Selection and characterization of a proteo-chitinolytic strain of *Bacillus thuringiensis*, able to grow in shrimp waste media. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 15: 299-308.
35. Ryu, C. M., Farag, M. A., Hu, C. H., Reddy, M. S., Wei, H. X., Paré, P. W., and Kloepper, J. W. 2003. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Pros. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 4927-4932.
36. Schwyn, B., and Neilands, J. B. 1997. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* 160: 46-56.
37. Tsuge, K., Akiyama, T., and Shoda, M. J. 2001. Cloning, sequencing and characterization of the iturin A operon. *J. Bacteriol.* 183: 6265-6273.
38. Valencia-Cantero, E., Hernandez-Calderón, E., Velázquez-Becerra, C., López-Meza, J. E., Alfaro-Cuevas, R., and Lopez-Bucio, J. 2007. Role of dissimilatory

fermentative iron-reducing bacteria in  
Fe uptake by common bean (*Phaseolus*

*vulgaris* L.) plants grown in alkaline soil.  
Plant Soil 291: 263-273.

# Characterization Assay of Multifunctional *Bacillus thuringiensis* Strains with the Ability to Enhance Plant Health

Fei-Ting Hu<sup>1</sup>, Sheueh Kuo<sup>1</sup>, Mi-Hau Tsai<sup>1</sup>, Ching-Chou Tzeng<sup>1\*</sup>

## Abstract

Hu, F. T., Kuo, S., Tsai, M. H., and Tzeng, C. C. 2016. Characterization assay of multifunctional *Bacillus thuringiensis* strains with the ability to enhance plant health. Taiwan Pestic. Sci. 1: 50-69.

In this study we investigated several properties of *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) strains with good pest killing effects, such as plant growth promotion, pathogen suppression, etc. After performing PCR on five strains of *Bt* (subsp. *aizawai* [*Bta*] A603, *Bta* Ab12, *Bta* ABTS1857, and *Bt* subsp. *kurstaki* [*Btk*] E911, and *Btk* ABTS351), we detected genes for phosphate solubilization, indole-3-acetic acid (IAA), siderophore, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase (ACCD), chitinase, and  $\beta$ -1,3-glucanase. Physiological analyses showed that (1) all strains could produce IAA, phosphorus solubilization, urease, chitinase, and nitrate reductase, and (2) IAA and urease in high salinity were secreted. The results of pot experiments further indicated that *Bt* could enhance the plant growth, improve root development, increase the efficiency of fertilizer, promote salinity tolerance, and reduce pathogen invasions. Finally, we found that *Bt* was efficient at increasing the fresh weight of cabbage in the field. In summary, this study confirmed that *Bt* can confer multiple benefits to agriculture, such as, suppressing plant pathogens, alleviating soil salinity stress, and improving the health, quality, fertility, and productivity of crops.

**Key words:** *Bacillus thuringiensis*, plant growth promotion, microorganism inhibition, multifunctional microorganism.

---

Accepted: September 12, 2016.

\* Corresponding author, Email: cctzeng@tactri.gov.tw

<sup>1</sup> Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture, Taichung.