

放線菌對彎孢菌的抑制作用

國中教師組生物科第三名

高雄市立鼎金國民中學

作 者：林榮秀

一、研究動機

在我從土壤分離真菌的幾次實驗中，常觀察到一些放線菌（分類上屬於細菌），對真菌產生拮抗現象。於是觸動我一個想法—若能發現某種放線菌，對某一種植物病原菌有強烈的控制作用，或許在植物病害防治上有實際應用的價值。

二、研究目的

針對植物病原菌——彎孢菌 (*Curvularia sp.*)

(一)選取對彎孢菌有拮抗作用的放線菌。

(二)研究拮抗菌種對彎孢菌的控制作用，包括：

1. 菌落生長形態。
2. 菌絲體生長速率。
3. 新陳代謝率。
4. 孢子萌芽率。
5. 孢子萌芽管 (germ tube) 的生長速率。

(三)抗生物質的分離和鑑定。

三、研究設備器材

- | | |
|-----------|----------|
| (一)冷凍離心機 | (二)水浴槽 |
| (三)高壓滅菌器 | (四)烘 箱 |
| (五)無菌箱 | (六)振盪培養器 |
| (七)電動天平 | (八)顯微鏡 |
| (九)顯微照相器材 | (十)光電比色計 |

(一)紫外燈

(二)色層分析展開槽

四、研究過程與方法

(一)菌種的分離和純粹培養：

放線菌和真菌均從嘉義內埔薑田的土壤中取得。分離時，因放線菌菌絲很細，黏附在土壤粒子上，不易被水沖下，故先將1克的土壤加水少許，在研鉢中用20 ml的水稀釋之，在離心機3000 rpm下離心20分鐘，取得上層液；再將15 ml的培養基(arginine-glycerol salt agar)倒在培養皿中，使之凝結。另取5 ml的arginine-glycerol salt agar在48°C水浴中保溫，加入1 ml離心取得的上層液，迅速混合，倒入凝結的培養基上，轉動培養皿，使之分佈均勻，放置室溫下培養兩星期，從中挑選放線菌及彎孢菌(*Curvularia* sp.)做純粹培養。放線菌仍培養在arginine-glycerol salt agar中，而彎孢菌培養在potato dextrose agar，PDA(Fuller, 1978)中。

(二)抗生菌種的選擇：

在培養皿中的PDA上，以直徑0.4 cm的鑽孔器打二個相距2.5 cm的小孔，其中一孔植入彎孢菌菌種，另一孔植入一種放線菌菌種，在室溫下培養，觀察是否出現控制區(inhibition zone)，結果以Thermoactinomyces dichotomica的拮抗現象最為顯著，故選取T. dichotomica做為抗生菌種。T. dichotomica是一種細菌，菌落為淡黃色皮革狀，菌絲直徑0.1 μ，生長十分緩慢。

(三)載玻片上的拮抗現象：

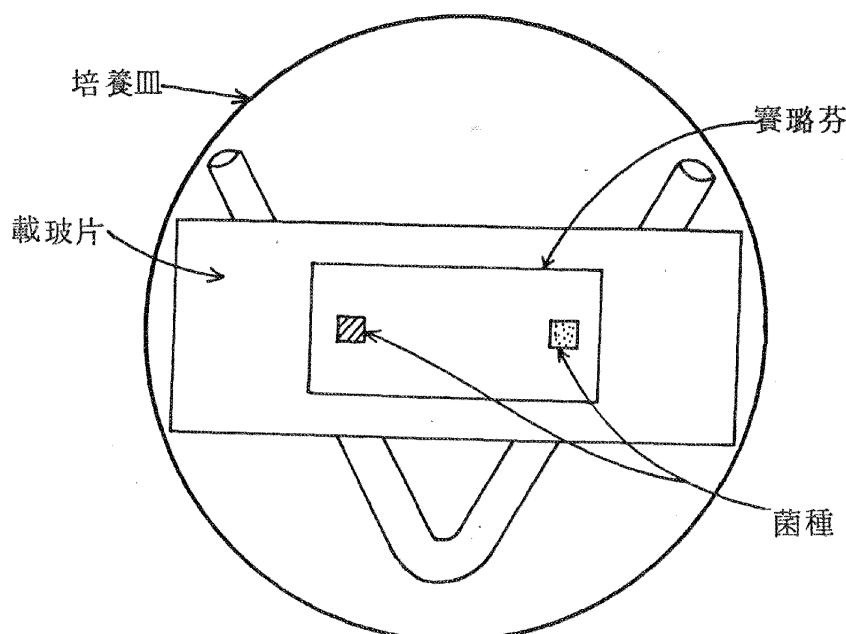
剪取2×3 cm的賽璐芬(cellophane)於蒸餾水中滅菌後，舖在無菌載玻片中央，滴一滴minimal liquid medium，在賽璐芬一端放置一小塊帶有彎孢菌的洋菜，另一端放置帶有T. dichotomica的洋菜(圖1)，對照組則以洋菜取代T. dichotomica。處理好的載玻片放在潮濕無菌的培養皿中，每天觀察菌絲生長發育的情形。

(四)放線菌培養液的抗生作用：

將T. dichotomica接種在50 ml trace salt solution中，振

過培養三星期，以濾紙過濾二次，取得濾液。

1. 對培養皿中彎孢菌菌落的影響：



圖一 賽璐芬上植入菌種，觀察拮抗現象

將 1 ml 的彎孢菌的孢子懸浮液，均勻塗佈於培養皿中的 P D A 上，再放二張直徑為 1.5 cm 的無菌濾紙，把 0.5 ml 已過濾的放線菌培養液滴在濾紙上，置室溫下培養五天，觀察濾紙周圍的抑制區。

2. 對彎孢菌菌絲體生長和新陳代謝的影響：

取 1 ml 彎孢菌的孢子懸浮液，滴入裝有 20 ml minimal liquid medium 的三角燒瓶中，培養二天，再加入 T. dichotomica 的培養液 2 ml，每間隔 24 小時取出一瓶，經濾紙過濾，（濾紙先經烘乾，稱重），在 80 °C 烘箱中烘烤 24 小時，稱取彎孢菌菌絲乾重量。

另將一瓶經 T. dichotomica 培養液處理一天的彎孢菌，以玻璃棉過濾，取得菌絲，用 pH 7.2 的磷酸緩衝液沖洗，加入 5 ml 的 TTC (2 , 3 , 5 - triphenyl tetrazolium chloride) (以磷酸

緩衝液配成 0.2%），放置 24 小時，再以玻璃棉過濾，加 3 ml 正丁醇研磨菌絲，抽取 formazan，在 490 nm 下測吸光度（ Esterhuizen , 1977 ）。

3. 對彎孢菌孢子萌芽的影響：

以無菌水沖洗彎孢菌，取得孢子懸浮液，滴在凹槽載玻片中，分別滴入放線菌培養液和 trace salt solution (做為對照組) 。四小時後，在 100 X 顯微鏡下，從五個視野中計算孢子發芽率。再將實驗組的放線菌培養液以吸水紙吸乾，用無菌水沖洗多次，滴入 trace salt solution ，每隔 1 小時計算孢子發芽率，直到第三小時為止。

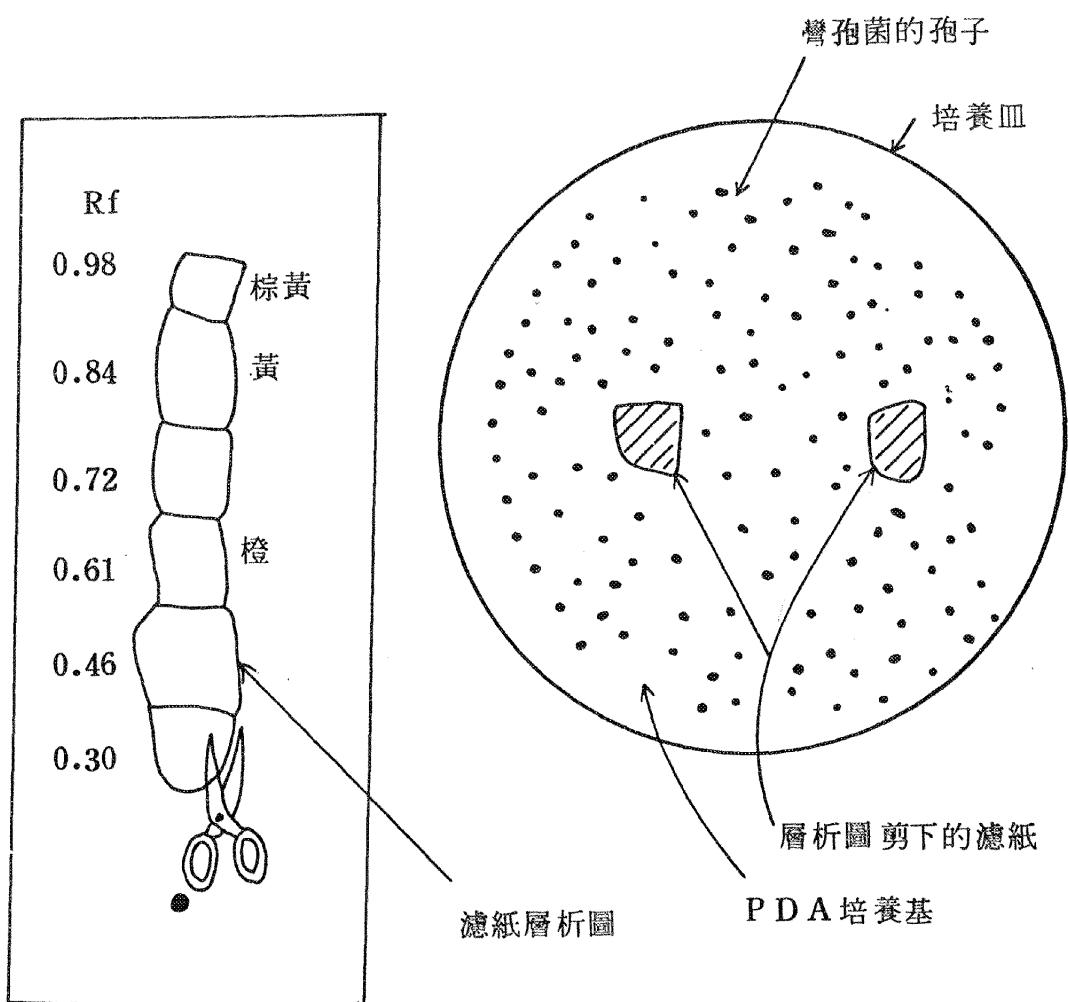
4. 對彎孢菌萌芽管生長速率的影響：

孢子懸浮液滴在凹槽玻片中， 4 小時後孢子發芽，取出一片載玻片，滴一滴 0.1% cotton blue (in lactophenol) 固定染色，量取 60 個發芽孢子的萌芽管長度。其他載玻片分兩組，實驗組加放線菌培養液，對照組放 trace salt solution ，每隔 1 小時，取出固定染色，量取萌芽管長度，直到第三小時為止。

(五) 抗生物質的分離和鑑定：

取 *T. dichotomica* 菌體放研鉢中，用 20 ml 的異丙醇磨碎，用離心機 12000 rpm 離心 20 分鐘，上層液置放 40 °C 抽氣烘箱中濃縮，然後點在 Whatman No. 1 濾紙上， chloramphenicol 當做 standard 。以 n - butanol : H₂O (64 : 36) 溶液為展開劑，展開 3 小時。取出濾紙在 254 nm 及 366 nm 紫外線下照射，用 鉛筆做下記號，記錄呈現顏色，量取 R_f 值，其中一張濾紙將各點剪下，分放塗有彎孢菌孢子的 PDA 上 (圖 2) ，四天後觀察是否有拮抗現象。第二張噴 ninhydrine solution (0.5% in ethanol) ，在 105 °C 下烘 15 分鐘，觀察顏色反應。第三張剪下有抑制作用的點，用 2 ml 的乙醇溶解出來，在光電比色計 (Spectrophotometer) 下，測最大吸收波長。

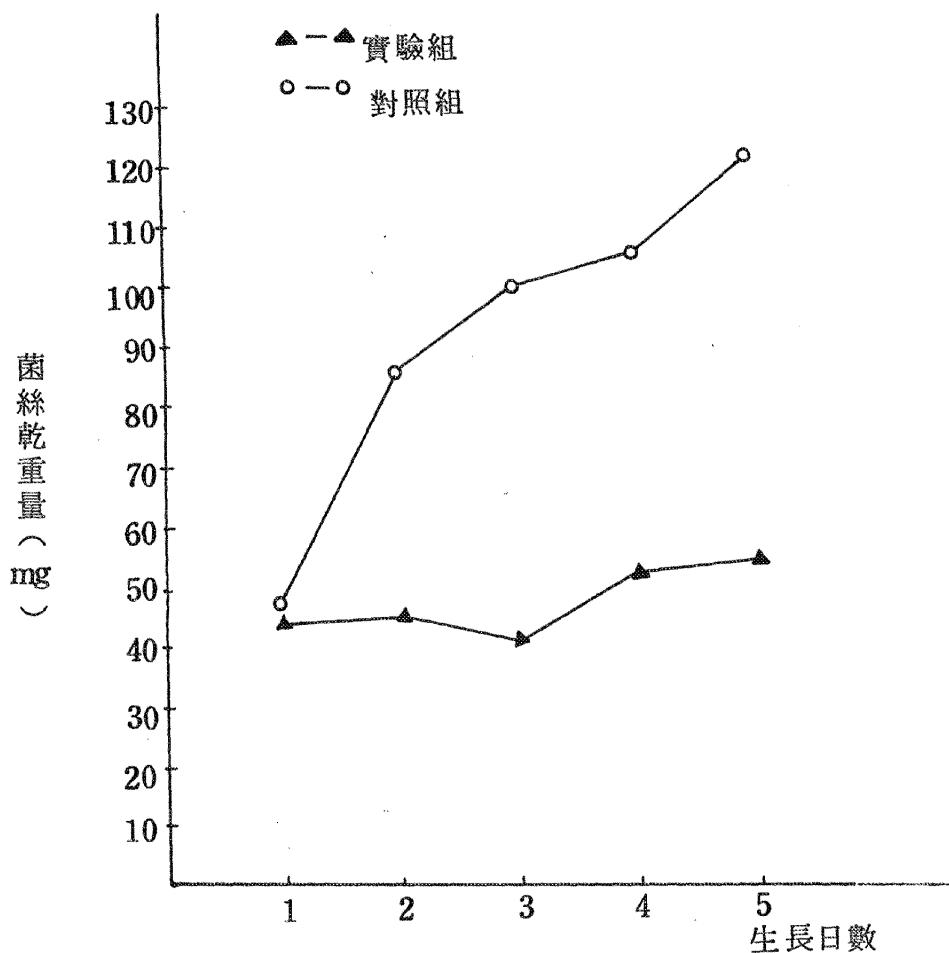
所有使用的藥品及試劑為美國 Sigma 公司出品。



圖二 以平板培養測定層析圖中的抗生物質

五、結 果

培養皿中浸有 *T. dichotomica* 培養液的濾紙和它四周皆為白色，可見彎孢菌的生長被抑制。以培養液處理 24 小時後，在 490 nm 光電比色計測量 formazan 吸光度為 1.515；而對照組為 1.757，根據乾重量換算新陳代謝率只為對照組的 70.9%，48 小時後菌絲乾重量便有顯著差異（圖 3）。

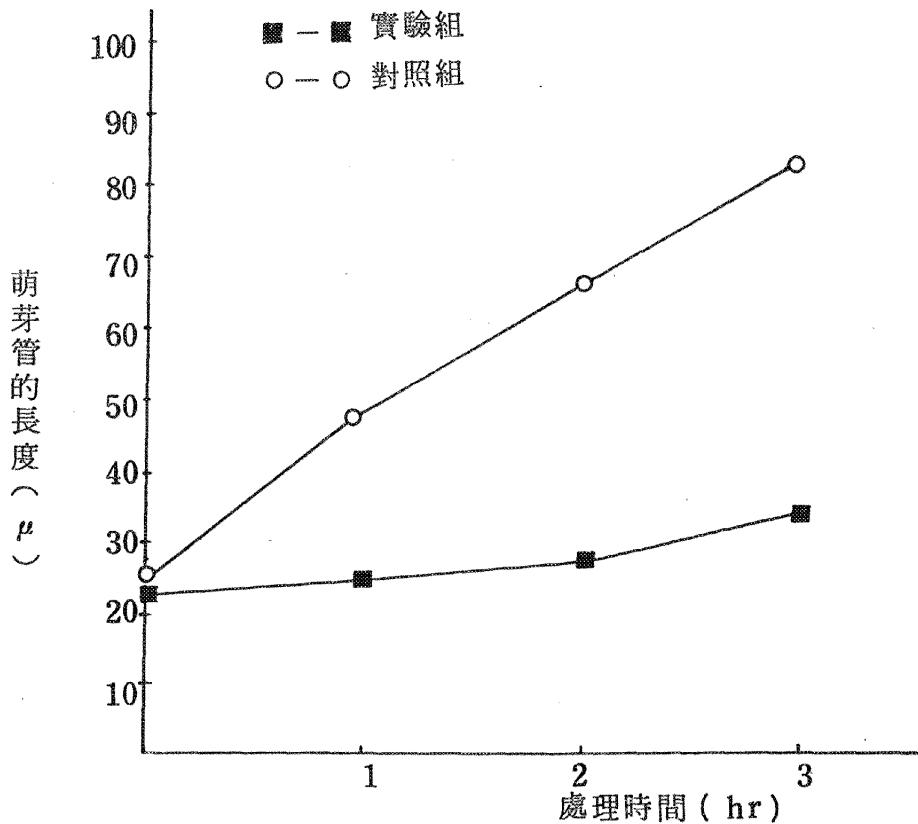


圖三 *T. dichotomica* 抑制彎孢菌菌絲生長

顯微鏡觀察賽璐芬上彎孢菌菌絲，發現 *T. dichotomica* 能抑制彎孢菌孢子形成 (sporulation)，且能抑制孢子發芽，雖用無菌水沖洗多次，發芽率仍在 1% 以下，表示孢子活力喪失，無法恢復（表一）。而已發芽的孢子，萌芽管生長亦受 *T. dichotomica* 培養液抑制（圖 4）。

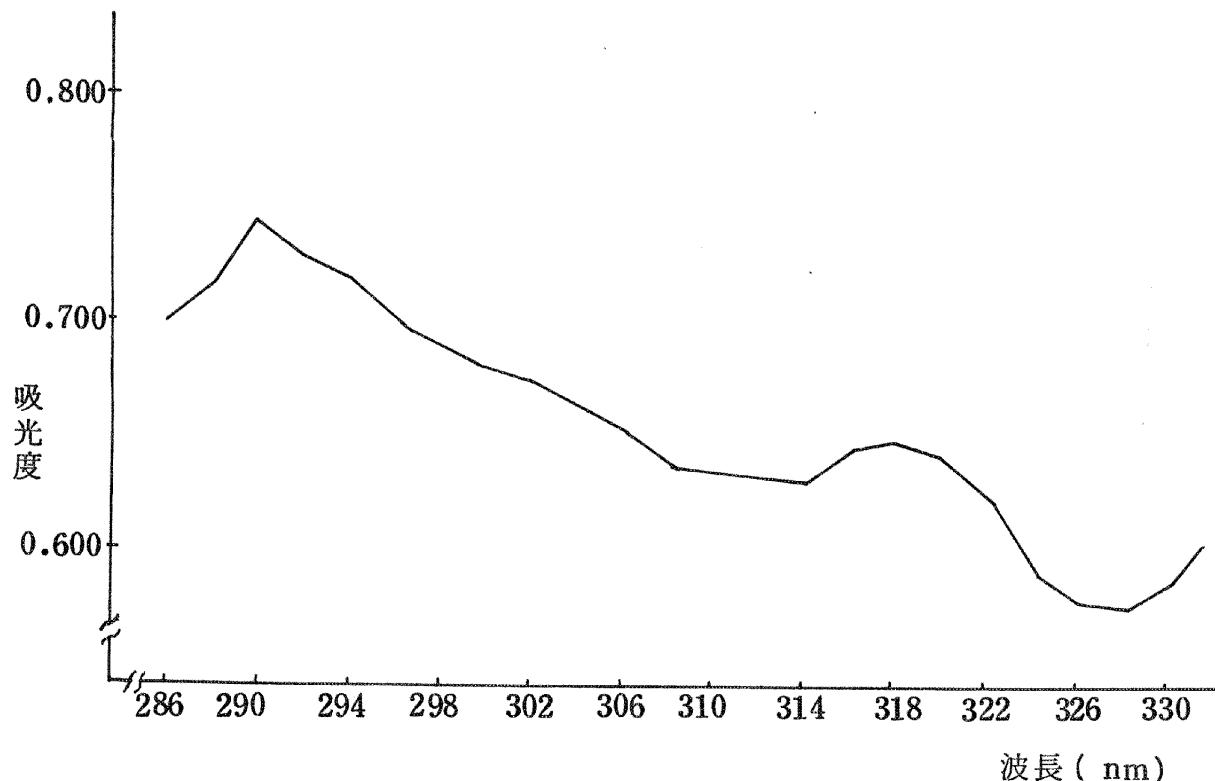
表一：放線菌培養液抑制彎孢菌的孢子發芽

時 間	孢子發芽率 %	
	實驗組	對照組
培養液處理 4 小時	0.308	80.47
去培養液後 1 小時	0.386	—
去培養液後 2 小時	0.415	—
去培養液後 3 小時	0.425	—



圖四 彎孢菌萌芽管的生長受 *T. dichotomica* 抑制

濾紙色層分析，分離出 6 個點，其中 R_f 值為 0.98 的點具有抗生素作用。此點以肉眼觀察，中間為土黃色，旁為鮮黃色，在 254 nm u.v. 照射下，中間為棕色，旁邊為鮮黃色，和菌體萃取液顏色相同，用 ninhydrine 試劑處理，顏色仍為黃棕色，故非 amino acid。而 chloramphenicol standard 的 R_f 值亦為 0.98。剪下抗生物質用乙醇浸出，以光電比色計測出最大吸收波長為 290 nm（圖 5），並有芳香氣味。



圖五 抗生物質的最大吸收波長

六、討 論

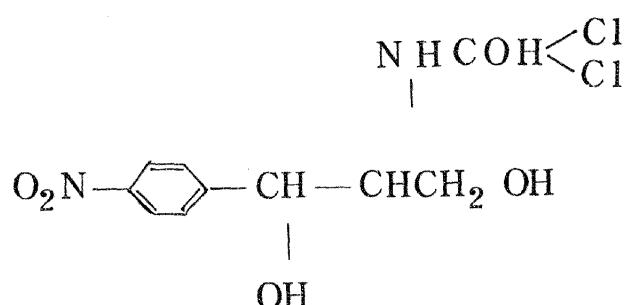
放線菌 *T. dichotomica* 可產生抗生物質，明顯地抑制彎孢菌的孢子形成，孢子發芽，菌絲生長和新陳代謝，雖除去毒質後仍無法恢復。由此觀之，應屬於殺菌作用 (fungicide) 而非止菌作用 (fungistasis) 。

微量的抗生物質在 2 cm 外對彎孢菌即有顯著的抑制，對孢子的影響顯然大於對菌絲的影響，在我的觀察中，菌絲並無扭曲或破裂，但是否有空泡 (Vacuolation) 現象，需再做進一步菌絲生長頂端的電子顯微鏡觀察。

T. dichotomica 菌體是黃色，異丙醇萃取液也是黃色，色層分析時 R_f 為 0.98，具有抗生素作用的這些物質因量很多，應是放線菌的次級代謝產物 (secondary metabolites)，且和色素有關。

用乙醇萃取的抗生物質，最大吸收波長為 290 nm，再比照 chloramphenicol 的 R_f 值和 u.v. 下的顏色反應，可知這些具有芳香氣味的物質必為酚化合物 (phenolic compounds)，且和

chloramphenicol 同樣具有一單環構造（圖六）（ Helfmann , 1964 ）。



圖六 chloramphenicol 的構造式

七、結論

在土壤中普遍存在的彎孢菌，它能引起水稻、小麥或其他作物的葉斑病、根腐病和粒腐病等植物病害（ Webster , 1980 ）。而放線菌在地表上亦分佈廣泛，不僅可抑制微生物，且有類似植物激素 auxins 和 giberellins 的作用，能促進植物生長（ Sykes & Skinner , 1973 ），我的實驗證明 *T. dichotomica* 對彎孢菌的強烈抑制，如能進一步分離，純化此抗生素，應用到植物病害的控制，甚至直接將放線菌接種於土壤中，產生生物間的相尅作用（ allelopathy ），達到生物防治的效果，在生態上更具有特殊的意義。

八、參考資料

- (一) 王月雲、陳是瑩、童武夫，1981。植物生理學實驗。國立台灣師範大學。
- (二) Esterhuizen ; B., and K.J.V.D. Merwe , 1977 , The Antifungal activity of Bacillomycin S. Mycologia 69 : 975 ~ 979 。
- (三) Fuller , M.S. 1978 , Lower fungi in the laboratory. Department of Botany. University of Georgia, 205 pp.

- (四) Heftmann , E. 1964, chromatography 。大學圖書出版社 ,
607 ~ 621 。
- (五) Sykes, G., and F.A. Skinner. 1973, Actinomycetales.
The Whitefriars press Ltd., 245 pp.
- (六) Webster, J. 1980, Introduction to fungi, 1nd ed.,
Cambridge University press , 565 pp.

評 語

1. 對生物相剋原理已有相當認識。本實驗可作為植物相剋的範例。
2. 所選材料尚稱合宜，可以顯示相剋現象。
3. 實驗方法尚稱週密，但似可再多注意其他環境因素。
4. 雖有實用價值，但應再作實驗，才能達到生物防治之效果。