

中華民國第 60 屆中小學科學展覽會
作品說明書

高級中等學校組 農業與食品學科

第三名

052204

探討不同環境的鏈黴菌對南方根瘤線蟲之影響

學校名稱：高雄市立高雄女子高級中學

作者： 高二 陳亮萱 高二 鄧皓芸 高二 杜妍禎	指導老師： 許曉菁 沈櫻芳
---	-----------------------------

關鍵詞：鏈黴菌、南方根瘤線蟲、生物防治

摘要

鏈黴菌(*Streptomyces spp.*)是防治農業害蟲南方根瘤線蟲(*Meloidogyne incognita*)上的重要角色。我們自三處不同環境土壤，嘗試篩選出同種的鏈黴菌各一株(編號 c5、d5、r3)，測試其生理特性(不同溫度、pH 值、碳源下之生長)，及對抑制南方根瘤線蟲孵化、二齡線蟲活動力能力，最後以幾丁質培養基測試其分解幾丁質能力。其中 c5 在 pH9 下不論是生長情形或是抗蟲能力皆較佳；r3 則較適合中性環境。而幾丁質酶的分解能力與抑制蟲卵孵化較為相關，線蟲活動力抑制則可能有其他物質參與。我們也發現各株菌的最佳生長條件，跟其原生環境常是不相符合的；且 d5 與 r3 為同種鏈黴菌卻也具有生理特性和抗蟲能力差異，未來希望能從其採集地生態了解影響因素，將鏈黴菌應用至農地時，可考慮菌株的適應問題。

壹、研究動機

鏈黴菌(*Streptomyces spp.*)於農業上的應用於近年來為人所知，在高中應用生物課程中於抗生素一課被提到。根據農業雜誌農傳媒的介紹，其以抗生、競爭以及超寄生等方式拮抗植物病原菌，產生 IAA 等促進植物生長效果之物質，各種胞外酵素及抗生素也能免去植物病原菌之感染與擴散，其中對南方根瘤線蟲(*Meloidogyne incognita*)之防治更是助益良多(陳雲成，2008)(王至全，2018)。

鏈黴菌以分泌幾丁質酶的方式有效抑制線蟲數量，農業上常被建議施以蝦蟹殼粉以提高其效用，而其他分子也是影響線蟲活動力的因素。(石信德，2010)。我們搜尋文獻後發現大多研究方向為篩選出具良好抗蟲能力之鏈黴菌株，並且可商業化作為生物防治使用；而本研究希望在了解不同環境之同樣鏈黴菌，在不同溫度、酸鹼值之生理特性的差異後，釐清不同酸鹼值下三株鏈黴菌抑制南方根瘤線蟲效果之差異及其原因。因此，我們計劃從不同環境之土壤中初步篩選出鏈黴菌，並觀察其於各溫度及酸鹼值下之生長情形差異，進一步測試自己篩選出之鏈黴菌株對於南方根瘤線蟲之蟲卵孵化和活動力的抑制效果，並以幾丁質培養基測試鏈黴菌對幾丁質酶的分解能力，以驗證幾丁質酶與蟲卵孵化抑制的關係。

貳、研究目的

- 一、篩選出不同環境之同種鏈黴菌菌株，並測試不同株鏈黴菌在不同環境條件的生長情形
- 二、測試不同酸鹼值下鏈黴菌對南方根瘤線蟲孵化抑制效果及二齡線蟲活動力抑制效果
- 三、探討不同株鏈黴菌抗蟲效果，與此鏈黴菌原生環境和生理特性之相關性
- 四、探討鏈黴菌抗蟲效果和幾丁質酶之相關性

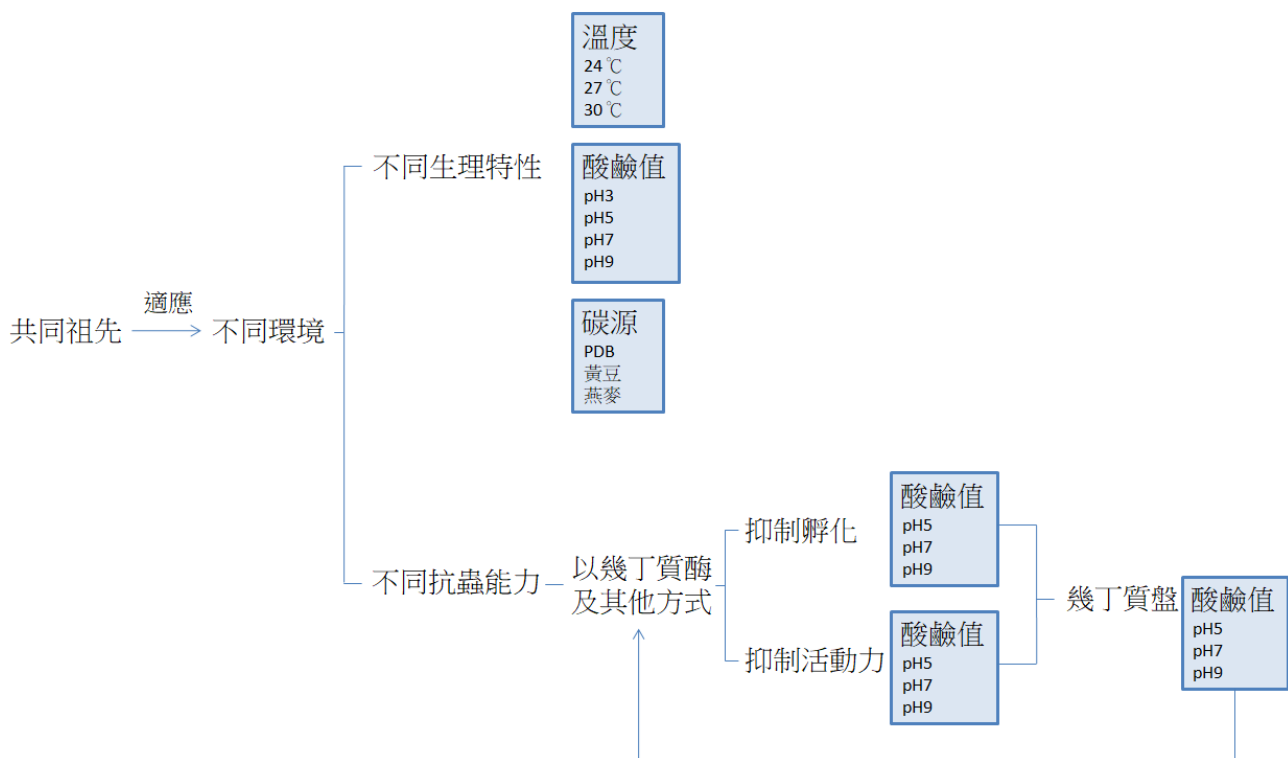



圖 1 實驗架構

參、研究器材與設備

一、鏈黴菌的篩選、培養與環境條件變化實驗

(一)篩選：土壤取樣、篩選

表一 篩選鏈黴菌用器材

操作項目	器材與設備	圖片
土壤取樣	meter、鏟子、夾鏈袋(圖 2)	
篩選、挑選	試管、微量吸管、麥克筆、接種環、酒精燈、Chitin 培養基平板	

(二)菌株培養與環境條件變化實驗

表二 菌株培養及環境變化實驗器材

操作項目	器材與設備
菌株培養	接種環、酒精燈、PDA 平板、恆溫箱
環境變化實驗	抽風機、500 mL 量筒、乳頭滴管、200mL 燒杯、恆溫箱、螺旋蓋試管、50mL 錐形瓶、接種環、酒精燈、複式顯微鏡、鏡油、拭鏡紙、PDA 平板、分光光度計、比色管

(三)培養基製作

表三 培養基製作器材

項目	器材與設備	圖片	
chitin 培養基	電子天平、秤量紙、刮勺、100 mL 燒杯、1000 mL 燒杯、100mL 量筒、乳頭滴管、培養皿、1000 mL 血清瓶、加熱攪拌器、無菌操作台	抽風機、抽濾裝置(抽濾機、橡膠管、側管、錐形瓶、布氏漏斗、橡膠環)(圖 3、4)、濾紙、廣用試紙	  <p>圖 3 抽濾機 圖 4 抽濾裝置</p>
PDA			
中性 PDB	電子天平、秤量紙、刮勺、100 mL 燒杯、1000 mL 燒杯、	抽風機、10mL 量筒	 <p>圖 5 PDB 製作工具</p>
酸鹼 PDB	100mL 量筒、乳頭滴管、1000 mL 血清瓶(圖 5)		
碳源煎汁	電子天平、秤量紙、磨豆機、500mL 燒杯、500mL 血清瓶(圖 6)		 <p>圖 6 碳源煎汁製作工具</p>

*培養基配方及製作方法

1. 篩選用 chitin 培養基：

(1) 配方： Chitin 25g、Agar 3.2g、 K_2HPO_4 0.14g、 KH_2PO_4 0.06g、 $MgSO_4$ 0.0002g、 $FeSO_4$ 0.002g、 $ZnSO_4$ 0.0002g，純水 1L

(2) 幾丁質溶解：由於幾丁質不溶於水而溶於酸，所以我們以 HCl 先將之溶解以利進行下一步驟(圖 7)

a. 準備 2L 冰蒸餾水，並秤量 5g chitin 置於 100 mL 燒杯中。

b. 於抽風機內以 100mL 量筒量取 12 M, 50 mL HCl 並加入備有 chitin 之燒杯中攪拌 1 hr。

c. 加入 1250 mL 冰蒸餾水中攪拌後靜置沉降 18 hr，後移除上層澄清液，重複步驟三次。



圖 7 製作 chitin 培養基

(3) 抽濾裝置：

a. 將圓形濾紙對摺四次(16 折)，平坦置於布氏抽濾漏斗，以蒸餾水潤濕之。

b. 打開水流抽氣機，將塑膠軟管接上抽濾瓶側管，裝置開始抽氣減壓吸緊，注意塑膠

管與抽濾瓶側管密合。

- c. 將步驟一之 Chitin 膠體溶液攪拌後快速以玻棒引導至漏斗中心，至濾紙上佈滿 Chitin 膠體，等待約 1min 使其乾燥。
- d. 拔除連結至側管之塑膠管使裝置減壓，小心取下濾紙，將濾紙上之 chitin 沉澱物刮入另一燒杯，並以廣用試紙測量抽濾瓶內溶液之 pH 值。
- e. 當 pH 值小於 4 時再重複(3)、(4)及(5)動作，若大於 4 則靜置等待置備 Chitin 培養基。

(4) 配製 Chitin 培養基液：

- a. 量取 200 mL 蒸餾水加入 500 mL 血清瓶。
- b. 秤量(6)之 Chitin 產物 25g、Agar 3.2g、 K_2HPO_4 0.14g、 KH_2PO_4 0.06g、 $MgSO_4$ 0.0002g、 $FeSO_4$ 0.002g、 $ZnSO_4$ 0.0002g，加入血清瓶。
- c. 蓋上血清瓶並搖晃至均勻，靜置等待下一步。

(5) 中和：取 10 mL 培養液，加入酚酞指示劑並以 NaOH 水溶液(0.4g NaOH，100mL) 滴定，並記錄其中和所需體積，並於剩餘培養液中加入上述體積乘以 19 之 NaOH 溶液。

(6) 滅菌：放入滅菌釜中以高溫高壓滅菌 30min，取出並冷卻至雙手可握之溫度。

(7) 倒盤：於無菌操作台中將尚未凝固之 Chitin 培養基液適量倒入培養皿中，靜置等待凝固後放入冰箱。

2. pH7 PDB：取 PDB powder 24g 置入 1L 血清瓶中加蒸餾水至 1L，充分攪拌後以滅菌釜滅菌 30min，取出冷卻至雙手可握，放入冰箱保存。
3. pH3 PDB：取 1mL 12M 的 HCl 水溶液進行序列稀釋，得 5mL 0.1M HCl 水溶液，加水到 500mL 並將其倒入血清瓶中；取 12g PDB 粉加入血清瓶中混合均勻。
4. pH5 PDB：取 1mL 12M 的 HCl 水溶液進行序列稀釋，得 5mL 0.001M HCl 水溶液，加水到 500mL 並將其倒入血清瓶中；取 12g PDB 粉加入血清瓶中混合均勻。
5. pH8 PDB：取 0.4g NaOH 加 100mL 水進行序列稀釋，得 5mL 0.001M NaOH 水溶液，加水到 500mL 並將其倒入血清瓶中；取 12g PDB 粉加入血清瓶中混合均勻。
6. pH9 PDB：取 0.4g NaOH 加 100mL 水進行序列稀釋，得 5mL 0.01M NaOH 水溶液，加水到 500mL 並將其倒入血清瓶中；取 12g PDB 粉加入血清瓶中混合均勻。
7. 1% 黃豆煎汁：以磨豆機磨碎黃豆，取 5g 黃豆粉置入 500mL 血清瓶，加蒸餾水至 500mL，充分攪拌後以滅菌釜滅菌 30min，放入冰箱保存。
8. 1% 燕麥煎汁：以磨豆機磨碎燕麥，取 5g 燕麥粉置入 500mL 血清瓶，加蒸餾水至

500mL，充分攪拌後以滅菌釜滅菌 30min，放入冰箱保存。

9. 培養用 PDA 平板：取 PDB powder 24g、Agar 16g 置入 1L 血清瓶中加蒸餾水至 1L，充分攪拌後以滅菌釜滅菌 30min，取出冷卻至雙手可握，倒盤靜置凝固，倒置放入冰箱保存。

二、測試不同酸鹼值下鏈黴菌對南方根瘤線蟲孵化抑制效果及排斥二齡線蟲反應

(一) 蟲卵：採集、孵化率實驗

表四 南方根瘤線蟲之卵、二齡線蟲之採集以及鏈黴菌抑制孵化率及活動力實驗器材



操作項目	器材與設備	圖片
採集	南方根瘤線蟲病株(台南農改場空心菜病株)、解剖顯微鏡、解剖刀、解剖針、鑷子、剪刀、培養皿、(圖 8)	
實驗	自製細滴管、計數器、離心管、微量吸管、鑷子、解剖針(圖 9)	

圖 8 採集工具

圖 9 孵化率實驗工具

(二) 線蟲：養殖、採集及活動力實驗

表五

操作項目	器材與設備	圖片
養殖	牛番茄(圖 10)、盆栽、市售培養土、線蟲(台南農改場空心菜病株)(圖 11)	 
採集	改良柏門氏漏斗法裝置(漏斗、塑膠軟管、試管、100mL 燒杯、市售衛生紙、萬用夾、支架)(圖 12)、培養皿、含線蟲之病土	
實驗	培養皿、自製細滴管、乳頭滴管、解剖顯微鏡、線蟲、計時器(圖 13)	

圖 10 牛番茄 圖 11 空心菜病株

圖 12 柏門氏漏斗法裝置

圖 13 實驗工具

三、測試鏈黴菌對幾丁質培養基之分解能力

(一) chitin 培養基配方

1. pH5 chitin 培養基

(1) 配方：Chitin 15g、Agar 24g、K₂HPO₄ 0.084g、KH₂PO₄ 0.036g、MgSO₄ 0.00012g、FeSO₄ 0.0012g、ZnSO₄ 0.00012g、NaOH 4g、HCl 12mL，純水 6.5L

(2) 重複篩選用 chitin 培養基之(2)~(7)步驟

2. pH9 chitin 培養基

(1) 配方：Chitin 15g、Agar 24g、K₂HPO₄ 0.084g、KH₂PO₄ 0.036g、MgSO₄ 0.00012g、FeSO₄ 0.0012g、ZnSO₄ 0.00012g、NaOH 4g、HCl 12mL，純水 6.5L

(2) 重複篩選用 chitin 培養基之(2)~(7)步驟

(二) 透化圈觀察實驗：chitin 培養基、酒精燈、接種環、解剖針、尺、恆溫箱。

肆、研究過程與方法

一、基本介紹文獻

(一) 鏈黴菌：放線菌目(Actinobacterales)屬於革蘭氏陽性細菌，廣泛分布在土壤中。研究顯示此類細菌具有多種病害防治機制，包含產生抗生物質、競爭養分與空間、促進植物生長、分解病原毒素。鏈黴菌亞目(Streptomycineae)佔放線菌目族群 50%以上。鏈黴菌亞目產生之抗生物質佔已知種類的 75% 以上，被視為最重要的放線菌亞目。



圖 14 遭到根瘤線蟲入侵的番茄根

(黃榮揚，2016)

(二) 鏈黴菌與根瘤線蟲：根瘤線蟲為番茄最常見的病害。根瘤線蟲會入侵番茄根部，致使根部不正常腫大呈腫瘤狀(圖 14)，影響植株養分吸收，地上部發育不良、黃化。此外，根瘤線蟲感染所造成之傷口會使番茄植株較容易遭受萎凋病菌及其他病原菌的二次感染，加劇植株死亡。(王至全，2018)

二、流程圖

鏈黴菌篩選

鏈黴菌不同條件之生長情形

鏈黴菌抑制線蟲孵化或活動力

土壤取樣

環境：潮濕陰涼、潮濕但有照光、陽光充足、乾燥
選擇地點(按順序)：香草花園、大門西側、操場、榕園



chitin 培養基初步篩選

初步篩選出能利用 chitin 之細菌或真菌



挑選
多株鏈黴菌

觀察菌落：菌落較小半透明、表面粗糙呈不規則隆起、不易挑起，邊緣向四周放射狀

革蘭氏染色法：陽性

顯微鏡下型態：含菌絲、鏈狀排列之分生孢子

生長速率慢，且有泥土味



選擇目標菌株

決定以吸光值定量，但菌絲太多難以測量



挑選菌落較少菌絲者



希望在不同環境挑選出同一種鏈黴菌



挑選型態相似者，每處一株

香草花園無，於是排除

鏈黴菌篩選

鏈黴菌不同條件之生長情形

鏈黴菌抑制線蟲孵化或活動力

溫度

24、27、30°C

生長量、30°C生長曲線

酸鹼值

30°C

pH3、5、7、8

生長量

碳源

30°C

PDB、燕麥、黃豆

生長量

鏈黴菌篩選

鏈黴菌不同條件之生長情形

鏈黴菌抑制線蟲孵化或活動力

線蟲備用

來源：台南農改場病株

培養與繁殖：自植番茄



鑑定取材

根瘤

縱切根瘤並觀察

雌蟲：半透明水滴型

卵：半透明橢圓膠囊

卵鞘：褐色球狀



菌株抑制孵化

30°C

pH5、7、9

菌株抑制線蟲活動力

30°C

pH5、7、9

鏈黴菌分解幾丁質培養基能力

酸鹼值

30°C

pH5、7、9

圖 15 流程圖

三、鏈黴菌篩選和鑑定

(一) 篩選

1. 採集：就地取學校土壤進行鏈黴菌的篩選，其中選擇長年照光的操場(c)、濕潤陰暗且佈有落葉之香草花園(x)、潮濕但偶爾照光的大門西側(d)以及乾燥陰涼的沙土質榕園(r)四處地點採集土壤，希望在接下來改變環境因素的測試中能將結果對照到菌株最初生長地之環境。連續三天測量其土壤溫度、pH 值、照光度、溼度等環境變因並記錄。取土壤裝入夾鏈袋保存。

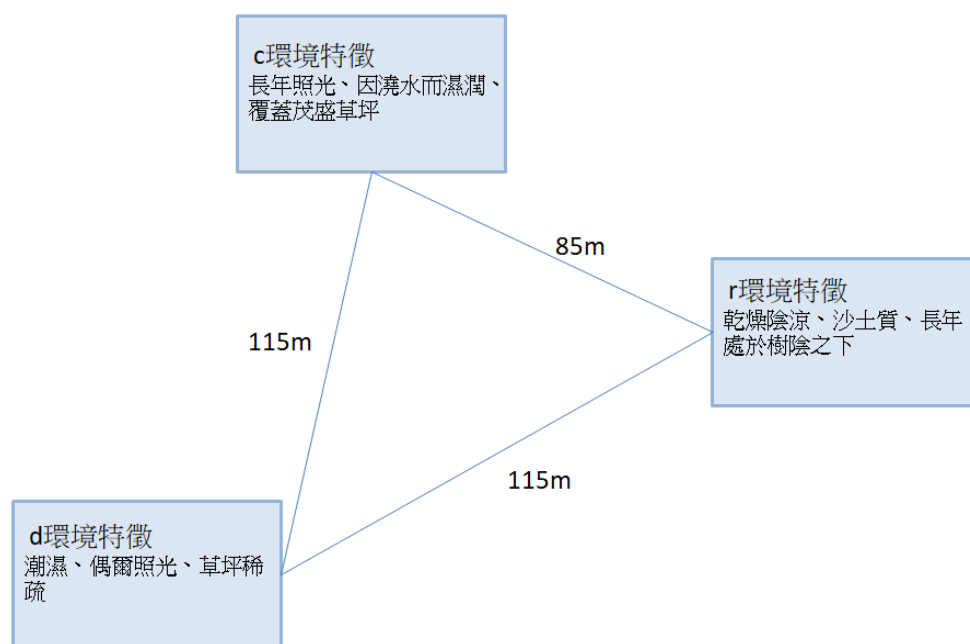


圖 16 採集地點特徵示意圖

註：x 環境並未挑選出合適菌株投入實驗，此處不畫出其環境特徵

2. 篩選：利用幾丁質培養基。在土壤中的各種微生物中，只有少許種類可以將 Chitin 作為營養來源，其中最主要的類別便是黴菌以及我們所需要篩選出的鏈黴菌。
於無菌操作台中將採集之土壤各取 2g 加入 10mL 以滅菌釜滅菌 30min 後的蒸餾水，充分攪拌並靜置。約 8min 沉澱後以 1000 μ L 微量滴管取上層澄清液 1000 μ L 進行序列稀釋 (稀釋倍數 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3})，滴於 Chitin 平板上。另取 L 型塗抹棒沾酒精並以酒精燈燃燒之使徹底滅菌，將菌液均勻塗抹於平板上，放入 30°C 恆溫箱等待其生長。

(二) 鑑定：

1. 觀察菌落型態

首先，我們觀察 Chitin 平板上生長一周後之菌落型態。根據文獻中的描述及圖片，我們先鎖定幾個目標菌落，具有以下特徵：

直徑約 1-3mm 之半透明小菌落，表面粗糙呈不規則隆起，邊緣向四周放射狀，以接種環難以刮取，容易連帶 Chitin 膠質一同勾下。

再待其生長一周(共兩周)後，再次觀察並以微焦鏡頭拍照記錄：

直徑約 1-3mm 之半透明小菌落，表面粗糙呈不規則隆起，邊緣向四周放射狀。

將多個目標鏈黴菌候選者其置於 PDA 平板上於 30°C 培養後三天，分別將其標記為來源地+挑選順序(如：c1、r4 等)，觀察其變化並記錄。在經過以下的鑑定方法後，我們最終選出 c5、d5、r3 為實驗菌株。

2. 革蘭氏染色法

再來，我們以革蘭氏染色法檢驗目標菌落，檢查其是否同鏈黴菌生理般呈陽性反應。(圖 15)以下為染色實驗步驟：

(1) 取樣及固定：於無菌操作台內操作。

- 取載玻片，於背面用麥克筆畫一個小圈以規劃菌的位置。
- 以接種環刮取 PDA 平板上之單一目目標菌落，少許即可，置於小圈內，再以微量吸管吸取適量無菌水滴於菌上，以牙籤攪拌並抹平。
- 用鑷子夾住載玻片在酒精燈上來回輕移以燒乾固定，注意使其均勻受熱避免玻片破裂造成危險。

(2) 革蘭氏染色：

- 初染：將玻片平放，以 2% Crystal Violet 染劑作用 1min，用滴管取蒸餾水沖洗之並以吸水紙吸走多餘水份並風乾。
- 媒染：加入 Gram Iodine 媒染劑作用 1min，以蒸餾水沖洗之，風乾。
- 脫色：將玻片斜置由上往下滴 95% 酒精，直到流出的酒精呈無色再以蒸餾水沖洗之，風乾。
- 加入 3.6% Safranin 作用 1min，以蒸餾水沖去多餘染料，風乾。

(3) 觀察其於顯微鏡下之顏色與型態，並拍照記錄。

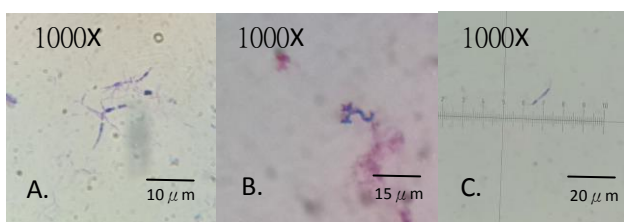


圖 17 A. c5, B. d5, C. r3 在 1000X 顯微鏡下的型態

3. 顯微鏡下型態觀察

我們以複式顯微鏡觀察染色後菌之型態，挑選出可形成菌絲、分生孢子成鏈狀排列之菌株。

4. 生長速率較慢

由於與鏈黴菌極為相似難辨的黴菌對革蘭氏染色也呈陽性反應，我們也能根據它們在生長速率上的不同作為判斷其是否為鏈黴菌的根據之一。

在低溫(7°C)下，鏈黴菌幾乎無法生長，而黴菌則只是較常溫下較慢些許而已，且黴菌會在約一周後形成粉狀孢子散落，以此可判斷菌落是鏈黴菌或是黴菌。

表六 鏈黴菌與黴菌之比較

	鏈黴菌	黴菌
培養基上的型態	放射狀	團狀
PH 值	5~8	5~9
溫度	25~27	10~30
生長水分	抗乾旱	相對溼度 70~90%才能生長
外部型態	鏈狀	球狀
三天的生長速度(cm)	0.5~0.8	1~5

5. 具泥土味:鏈黴菌可產生土臭素，是泥土味來源。在培養的過程當中有泥土味散出

(三) 選擇目標菌落：

我們將目標菌落另置於 PDA 培養基上培養，將四處所初步挑選出的菌株進行比對，希望能挑出同種之四株菌，後續實驗才能將之合理比較。且因為要以測量吸光值的方式進行定量，所以我們也挑選較少菌絲之菌株，避免菌無法較平均的散佈於液態培養基中。最後在香草花園處無目標菌株出現，故只挑出三處環境各一目標菌株：c5、d5、r3。

(四)菌種鑑定與親緣關係比較

1. 將三種菌送至基龍米克斯生物科技股份有限公司進行菌種鑑定
2. 在 NCBI 的資料庫中找尋鑑定出之菌種和其他鏈黴菌種的 16S RNA 之基因序列，並以

MEGA5 中的序列比對(Alignment)功能，將鑑定菌種和其他鏈黴菌種進行序列比對，最後利用軟體中的 Neighbor-joining 方法建構 Neighbor-joining tree，比較三者間的親緣關係

(五) 培養：

將接種環以酒精燈燒紅兩次，刮下標記之菌落並以三區畫線法將菌塗抹於 PDA 平板上(圖 18)，並倒置放入 30°C 恆溫箱中培養。

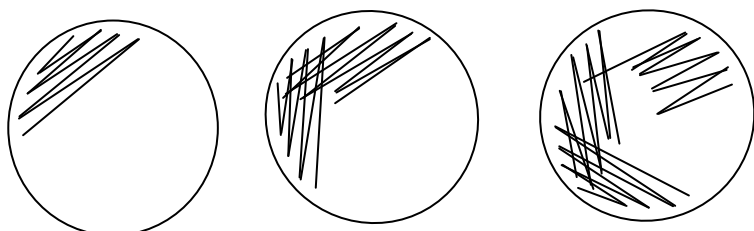


圖 18 三區畫線法示意圖

四、測試三株鏈黴菌珠在不同環境條件的生長情形

(一) 共同前置與測量

1. 分光光度計使用：

- (1) 根據實驗目的，取波長 600nm 段進行測量定量。
- (2) 以微量吸管吸取 0.5mL 蒸餾水置入塑膠管中，作為分光光度測量之空白值。
- (3) 以微量吸管吸取 0.5mL 菌液置入塑膠管中使用分光光度計進行測量。
- (4) 以微量吸管吸取 0.5mL PDB 原液測量，作為空白樣品

(二) 實驗一：測量三株鏈黴菌珠在不同溫度下的生長情形

經過資料查詢與校園實地觀測記錄，得知台灣土壤平均溫度大約 17-27°C，而最初培養鏈黴菌之溫度為 30°C，因此我們首先取 24、27、30°C 三組進行實驗並記錄鏈黴菌生長情形。

1. 實驗菌液前置培養：為了方便往後實驗之定量與操作，我們以測量菌液吸光值的方式將之定量。

- (1) 將螺旋蓋試管蓋子轉至半緊，放入滅菌釜中高溫高壓滅菌 30min。
- (2) 在無菌操作台中量取 6mL PDB 置入螺旋蓋試管。
- (3) 從培養用 PDA 平板上挑選一菌落，另取接種環以酒精燈燒紅兩

次後將菌落刮下，放入含 PDB 之螺旋蓋試管中，靜置於 24、27、30°C(各實驗)恆溫箱中培養。

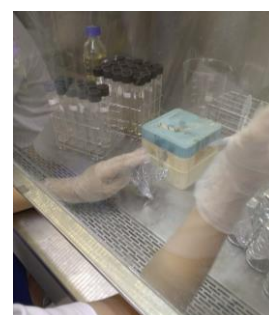


圖 19 操作過程

2. 實驗用菌液分光光度測量：於無菌操作台中以微量吸管吸取試管中菌液 500 μ L 放入比色管中，以分光光度計測量其吸光值(OD 600nm)。根據其吸光值決定該試管之菌液要取 1、2 或 4mL 進行實驗，使起始值相差所造成的誤差減少。

3. 實驗：

(1) 在無菌操作台中自試管中取 1、2 或 4 mL 菌液置入 50mL 錐形瓶，加 PDB 培養液至 30mL。(三重覆、三株菌、三個溫度，共 27 個)(圖 19)

(2) 將錐形瓶置入各溫度(24、27、30 $^{\circ}$ C)培養箱進行震盪培養(175apm)。每 24hr 進行觀測，連續七日並紀錄實驗結果、繪製生長曲線。

(三) 實驗二：測量三株鏈黴菌株在不同環境酸鹼值下的生長情形

經過資料查詢與校園實地觀測記錄，得知台灣土壤平均酸鹼值大約 5-8pH 值，因此我們取 pH 值 3、5、7、8 四個 pH 值進行實驗並記錄鏈黴菌生長情形。

1. 實驗菌液前置培養：

(1) 將螺旋蓋試管蓋子轉至半緊，放入滅菌釜中高溫高壓滅菌 30min。

a. 在無菌操作台中量取 6mL pH3、5、7 或 8(視各實驗)之 PDB 原液置入螺旋蓋試管。

b. 從培養用 PDA 平板上挑選一菌落，另取接種環以酒精燈燒紅兩次後將菌落刮下，放入含 PDB 之螺旋蓋試管中，靜置於 30 $^{\circ}$ C 恆溫箱中培養。

2. 實驗用菌液分光光度測量：於無菌操作台中以微量吸管吸取試管中菌液 500 μ L 放入塑膠管中，以分光光度計測量其吸光值。根據其吸光值決定該試管之菌液要取 1、2 或 4mL 進行實驗，使起始值差不多。

3. 實驗：

(1) 在無菌操作台中自試管中取 1、2 或 4 mL 菌液置入 50mL 錐形瓶，加 PDB 培養液至 30mL。(三重覆、三種菌、三個酸鹼值，共 27 個)

(2) 將錐形瓶置入 30 $^{\circ}$ C 培養箱進行震盪培養(175apm)。七日後進行分光光度測量，紀錄並繪製圖表。

(四) 實驗三：測量三株鏈黴菌株在不同碳源下的生長情形

經過資料查詢與討論，根據鏈黴菌生長必需養分及其他相關，我們決定以不同常見且方便取得之碳源作為主要營養物質進行鏈黴菌培養，並佐以部分改動。取 1% 黃豆煎汁 (10g 黃豆粉，1L)、1% 燕麥液煎汁 (10g 燕麥粉，1L) 及對照組 PDB。

1. 實驗：

(1) 在無菌操作台中自試管中取 1、2 或 4 mL 菌液置入 50mL 錐形瓶，加 1% 燕麥或 1%

黃豆煎汁至 30mL。(三重覆、三種菌、三個酸鹼值，共 27 個)

(2) 將錐形瓶置入 30°C 培養箱進行震盪培養(175apm)。五日後進行分光光度測量，紀錄並繪製圖表。

五、探討三株鏈黴菌，在不同酸鹼值下對南方根瘤線蟲孵化抑制效果

(一) 南方根瘤線蟲(*Meloidogyne incognita*) 的取得、鑑定、培養和純化

1. 來源：台南農改場空心菜病株。

2. 增殖與培養：

將病株種植於水桶中，觀察並挑選狀況較優的植株進行水耕扦插及土耕。病株開始枯萎時，在解剖顯微鏡下以刀片切開根瘤(圖 20)並觀察其內之根瘤線蟲雌蟲及卵塊，拍照並記錄。

解剖顯微鏡下，雌蟲附著於根瘤內部，呈乳白色或半透明水滴型(圖 21)，以解剖針取出並置於蒸餾水內靜置 5min 會脹大、變透明且能看見白色腸道。線蟲卵則會被一墨綠色或褐色球狀「卵鞘」包圍保護，以解剖針及鑷子取出後置於水中戳破便可取得蟲卵。



圖 20 剖開的根瘤

蟲卵呈橢圓膠囊狀，半透明，有時可看見孵化線蟲的形狀或呈顆粒狀。

3. 接種：根據資料查訊及討論，我們以下列三種方式進行接種

(1) 病株土壤接種：取病株根部周圍土壤混入健康植株土壤(圖 20)，使其感染根瘤線蟲。



圖 21 根瘤中的雌蟲

(2) 病株根瘤接種：取病株根瘤置於健康植株根部周圍，使其感染根瘤線蟲。

(3) 卵塊接種：切開病株根瘤，取其中之卵鞘並置於健康植株根部周圍使其感染。

4. 純化：我們以根瘤線蟲最為顯要之特性--形成根瘤--作為篩選之根據，取根瘤內的卵塊，部分取用進行孵化率實驗，另一部分置於蔗糖水中培養並等待其孵化，以改良式柏門氏漏斗法收集活動力較強的二齡線蟲。



圖 22 培養及繁殖線蟲之番茄

取鏈黴菌液置於培養皿上與卵塊作用，觀察其孵化狀況。定義「未孵化率」(未孵化卵數/全部卵數)作為鏈黴菌抑制南方根瘤線蟲卵孵化之指標。

(二)實驗：

1. 於解剖顯微鏡下以刀片小心削下根瘤一側，再以尖鑷子取下卵鞘，置於培養皿上，加一滴蒸餾水後戳破卵鞘攤開，以計數器計其數量並記錄。(圖 23)
2. 在無菌操作台中以微量吸管定量 500 μ L，取 600nm 波段吸光值為 0.7-0.9 之菌液放入 15mL 離心管中，並將卵塊以自製細滴管吸起並滴入離心管中，放入 27 $^{\circ}$ C 恆溫箱中靜置五天。
3. 取出離心管，將管內液體倒至培養皿上，在解剖顯微鏡下以計數器計孵化出之線蟲及卵數量並記錄，算出未孵化率(未孵化卵數/全部卵數)。

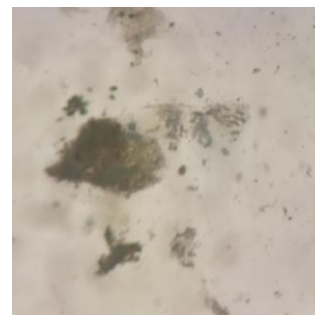


圖 23 以計數器計其卵數

六、探討三株鏈黴菌，在不同酸鹼值下對二齡線蟲活動力抑制效果

(一) 二齡線蟲採集：改良式柏門氏漏斗法(圖 24)

1. 將塑膠水管一端接上漏斗，一端接上試管。
2. 在漏斗中鋪一層衛生紙，將病土放在其上鋪平。
3. 以蒸餾水將整個裝置灌滿至淹過土面。

(二) 實驗：

根據資料蒐集結果，線蟲若呈僵直、痙攣狀(圖 25)，雖不能將之界定為死亡，但也已失去危害植物的能力，因此我們定義「活動力下降率」(活動力下降之線蟲數量/全部線蟲數量)，以作為鏈黴菌拮抗線蟲能力之指標。

1. 以自製細滴管吸取具活動力之線蟲十隻另置於乾淨培養皿上。
2. 滴 1.5mL 蒸餾水，再滴 1.5mL 菌液，計時 20min。
3. 觀察並記錄僵直、痙攣或正常活動之線蟲數量，計算線蟲活動力下降比例。



圖 24 柏門氏漏斗裝置

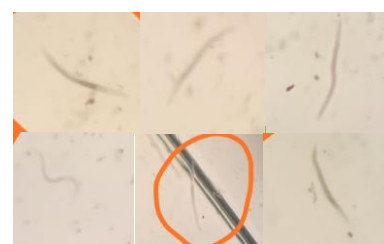


圖 25 線蟲僵直狀

七、測試三株鏈黴菌在不同酸鹼值下分解幾丁質能力

(一) 製備 pH5、7、9 chitin 培養基。

(二) 以接種環刮取少許鏈黴菌，點於 chitin 培養基上，並置於恆溫箱(30 $^{\circ}$ C)中培養五日。

(三) 觀察並記錄其透化圈半徑。(透化圈半徑 = 整圈半徑 - 菌株半徑)

*透化圈示意圖

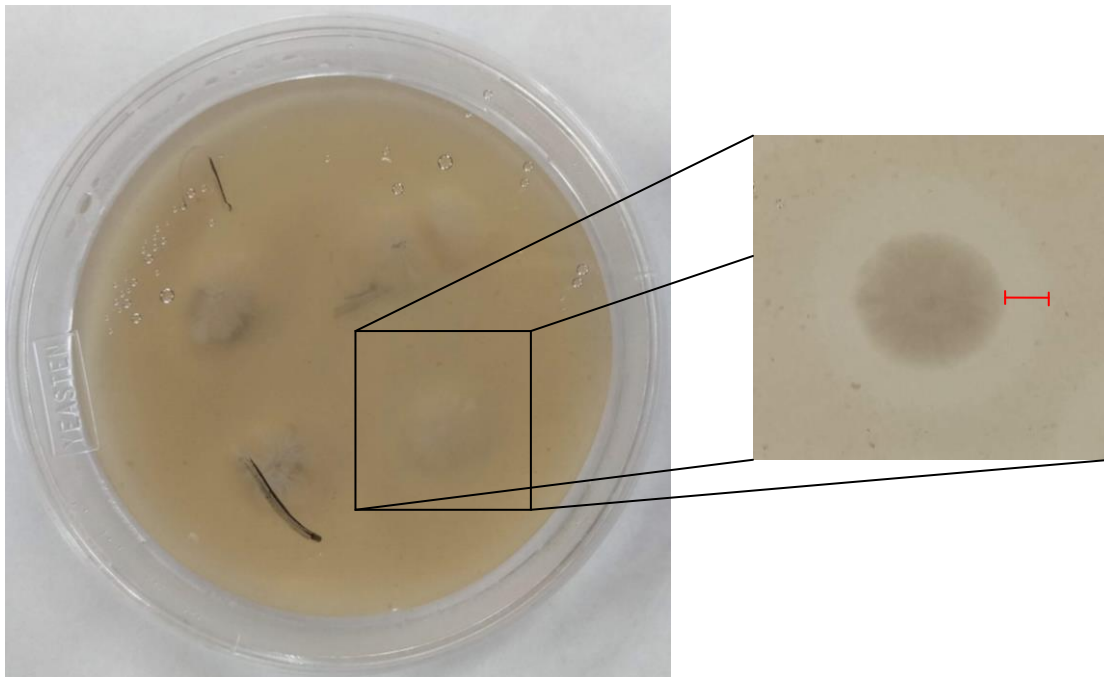


圖 26 透化圈

八、統計

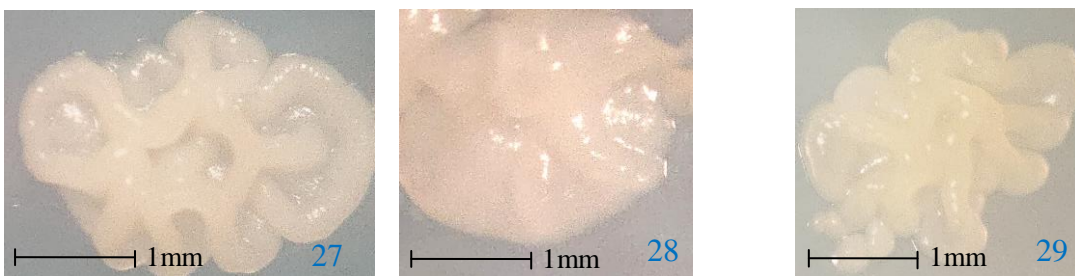
以 T test 將兩組三重複之數據分析，取其 p 值判斷其是否有顯著差異。

伍、研究結果

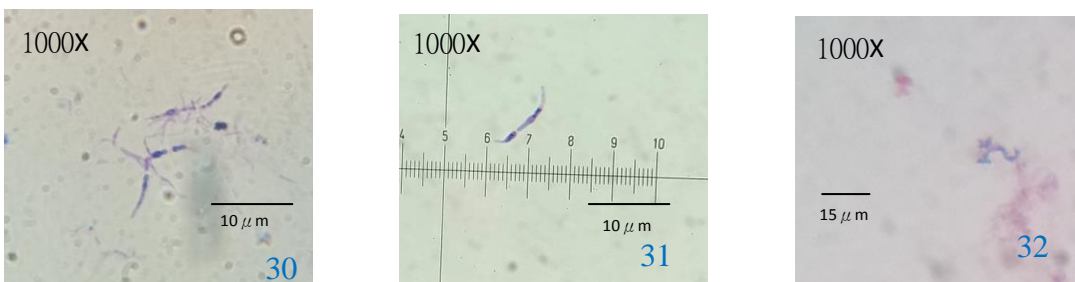
一、前置作業：篩選出不同環境之鏈黴菌，並鑑定

(一) 篩選圖片

直徑約 1-3mm 之半透明小菌落，表面粗糙呈不規則隆起，邊緣向四周放射狀，以接種環難以刮取，容易連帶 Chitin 膠質一同勾下。(圖 27 c5、28 d5、29 r3)



革蘭氏染色呈陽性反應，可形成菌絲、分生孢子成鏈狀排列 (圖 30 c5、31 d5、32 r3)



(二) 菌種鑑定和序列比對

經過菌種鑑定後，c5 為 *Streptomyces viridobrunneus*，d5 為 *Streptomyces misionensis*，r3 為 *Streptomyces misionensis*。

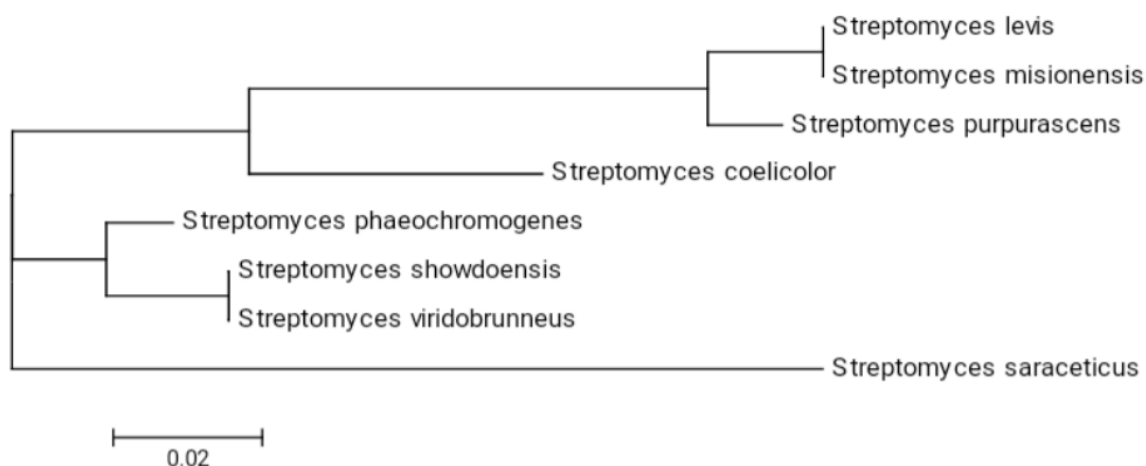
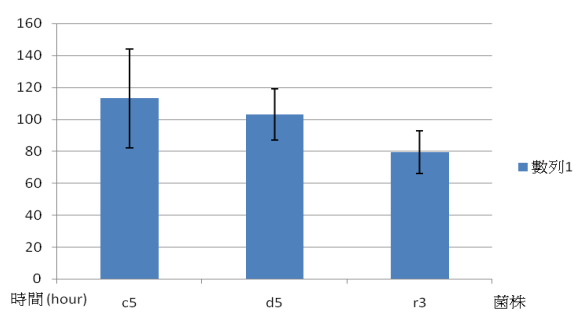


圖 33 Neighbor-joining tree:包含本實驗之兩種鏈黴菌和其他用來參考親緣關係之鏈黴菌 (*Streptomyces coelicolor* 為鏈黴菌的模式菌種，已進行全基因體定序。*Streptomyces saraceticus* 為上市之商業化菌種)

二、測試不同株鏈黴菌在不同環境條件的生長情形

(一) 測試三株鏈黴菌在 30°C 下的生長情形

1. 倍增時間



取第二至第六天進行線性迴歸分析，計算出倍增時間(doubling time)。由左圖得知 c5、d5、r3 間之倍增時間皆無顯著差異。

圖 34 30°C 倍增時間

2. 生長曲線

我們將 c5、d5、r3 菌株培養於 30°C 培養箱，培養七天，發現三株菌皆在第二天至第三天時進入對數期(log phase)，濃度上升較劇烈，其中 c5(圖 35)及 r3(圖 37)在第六天至第七天時趨緩，進入穩定期(stationary phase)，d5(圖 36)則較不穩定。

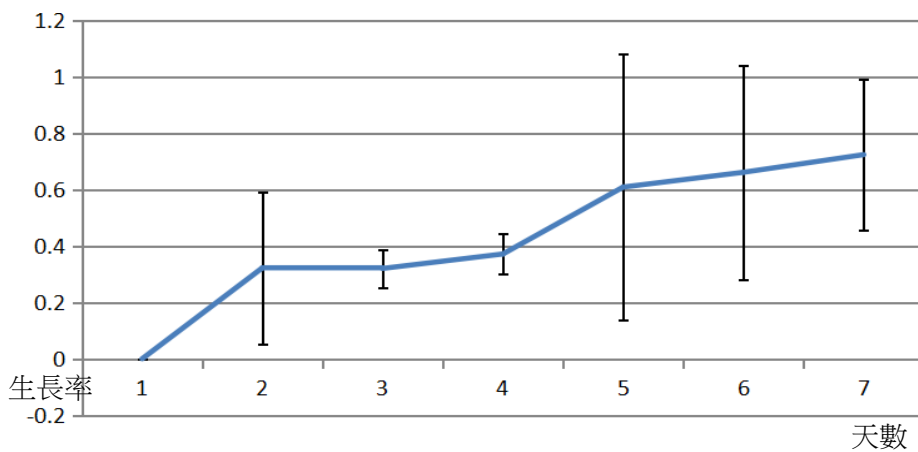


圖 35 c5 在 30°C 下之一周生長曲線

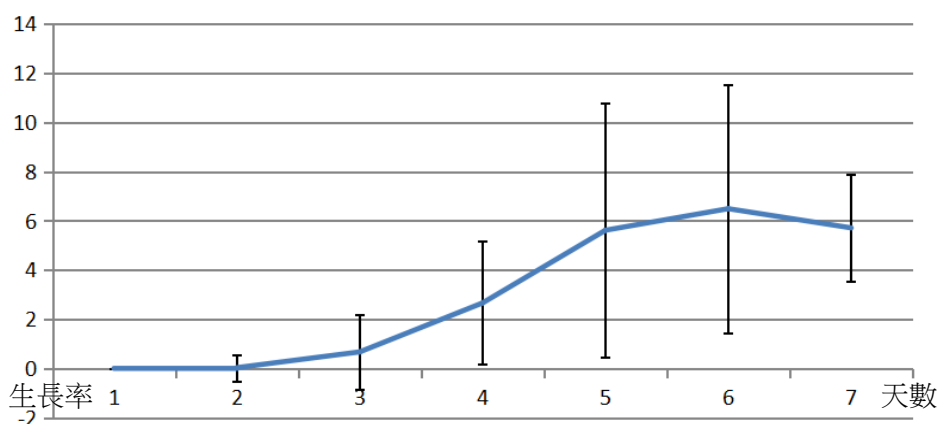


圖 36 d5 在 30°C 下之一周生長曲線

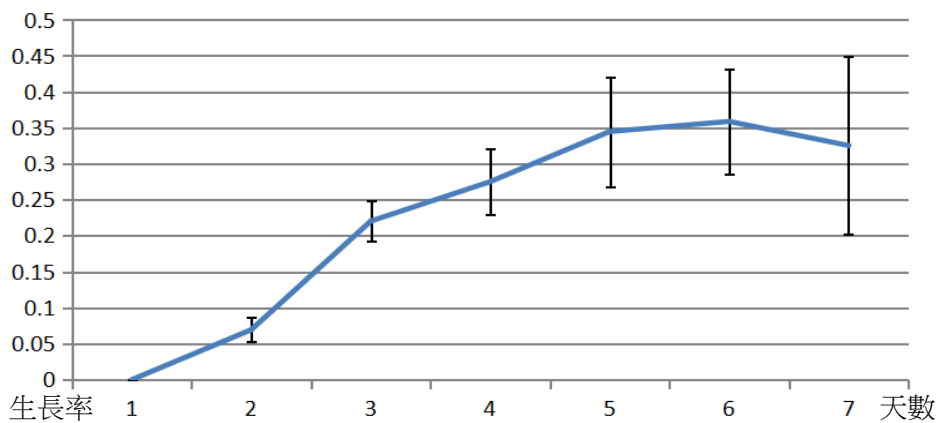


圖 37 r3 在 30°C 下之一周生長曲線

(二) 測試三株鏈黴菌在不同溫度下之生長情形

我們將 c5 d5 r3 菌株培養於 24、27、30°C 培養箱培養七天，測其吸光值並計算一周生長量。(圖 38、39、40)

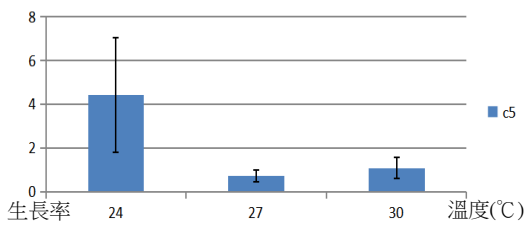


圖 38 c5 在三種溫度下之一周生長率

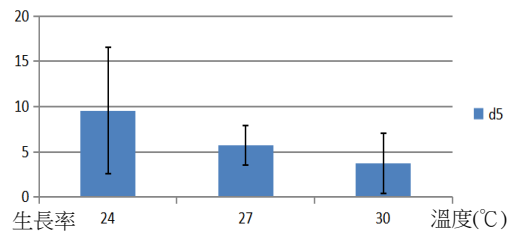


圖 39 d5 在三種溫度下之一周生長率

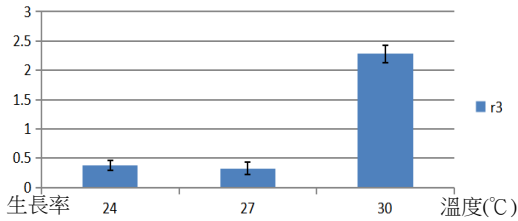


圖 40 r3 在三種溫度下之一周生長率

我們將三株菌在 24、27、30°C 之百分生長率放在同一圖表進行綜合比較。(圖 41)

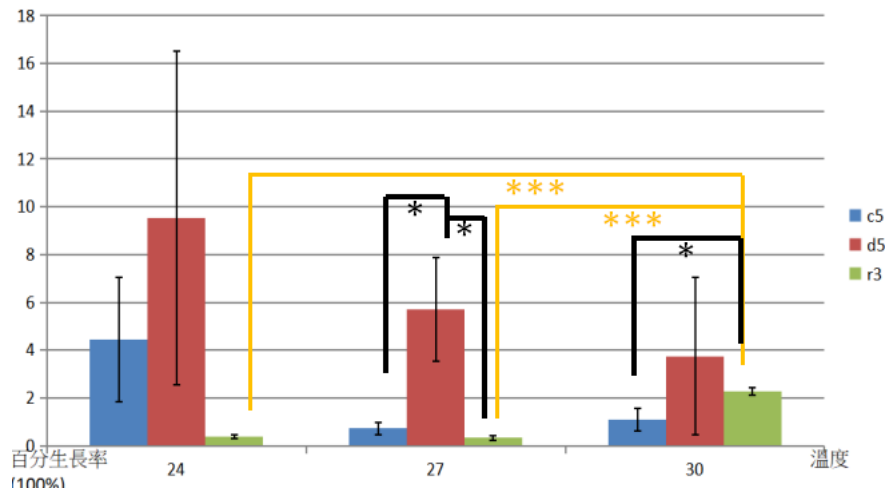


圖 41 三種菌在三個溫度下之一周生長率比較

表 7 比較各組別之 p 值

比較組別	c5/d5	d5/r3	r3/c5
24°C	0.2032	0.1025	0.0795
27°C	0.0416	0.0359	0.0710
30°C	0.1894	0.2981	0.0384
比較組別	c5	d5	r3
24/27°C	0.0917	0.2687	0.3126
27/30°C	0.1984	0.2645	0.00006
30/24°C	0.1085	0.1833	0.0002

在 24°C 下，三株菌皆無顯著差異；27°C 下，c5/d5 有顯著差異($p < 0.05$)，d5/r3 有顯

著差異($p < 0.05$)，r3/c5 無顯著差異；30°C 下，除 r3/c5 有顯著差異，其他皆無顯著差異。

從圖中可得知，c5 在三個溫度下之一周生長率，兩兩皆無顯著差異；d5 在三個溫度下皆無顯著差異；r3 在 27/30°C、30/24°C 兩組皆有明顯顯著差異($p < 0.0001$)。

(三) 測試不同酸鹼值下的生長率

在溫度實驗後，我們以 30°C 的環境進行此酸鹼值實驗，將菌放入不同酸鹼值之液態培養基中培養七日，以測量吸光值之方式定量以記錄並計算其一週生長量。(圖 42、43、44)

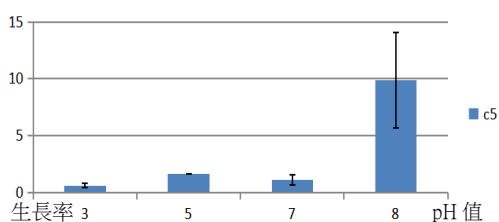


圖 42 c5 在四種酸鹼值下之一周生長率

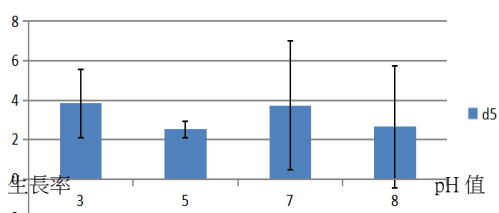


圖 43 d5 在四種酸鹼值下之一周生長率

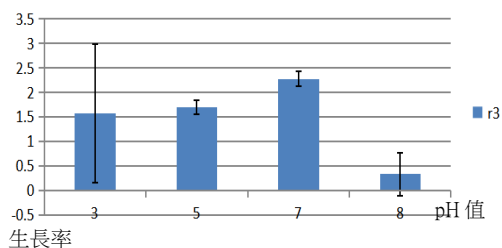


圖 44 r3 在四種酸鹼值下之一周生長率

我們將三株菌在 pH3、5、7、8 下之百分生長率放在同一圖表進行綜合比較。(圖 45)

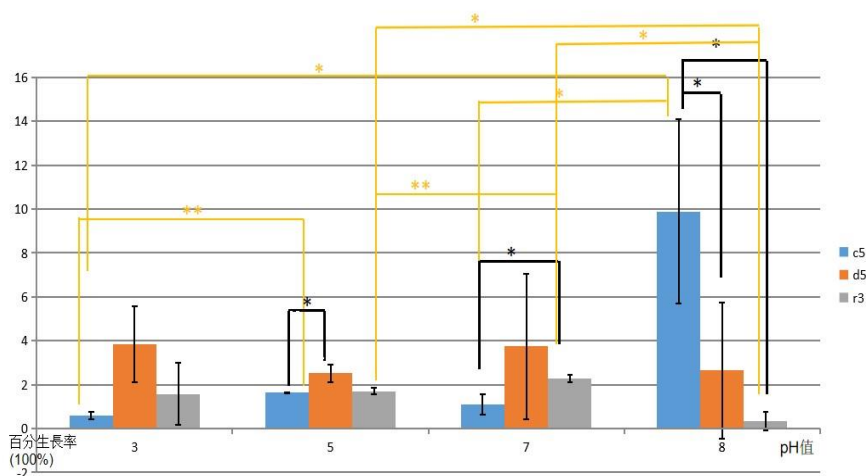


圖 45 三株菌在四種酸鹼值環境下之一周生長率比較

表 8 比較各組別之 p 值

比較組別	c5/d5	d5/r3	r3/c5
pH3	0.0599	0.1131	0.2178
pH5	0.0463	0.0595	0.2659
pH7	0.1894	0.2980	0.0384
pH8	0.0427	0.2031	0.0427
比較組別	c5	d5	r3
pH3/5	0.0063	0.2021	0.4542
pH3/7	0.1463	0.4868	0.2766
pH3/8	0.0445	0.3339	0.1787
pH5/7	0.1260	0.3267	0.0087
pH5/8	0.5805	0.4788	0.0201
pH7/8	0.0494	0.3746	0.0

從圖中以及表中可以看到，pH3 中三株菌皆無顯著差異；pH5 中皆無顯著差異；pH7 中僅 r3/c5 有顯著差異($p<0.05$)；pH8 中 c5/d5 及 r3/c5 有顯著差異($p<0.05$)，c5/d5 則無顯著差異。

c5 於 pH3/5、pH3/8、pH7/8 有顯著差異($p<0.05$)；d5 在四種 pH 值中兩兩皆無顯著差異；r3 於 pH5/7、pH5/8、pH7/8 中有顯著差異($p<0.05$)。

(四) 測試不同株鏈黴菌在不同碳源下的生長情形

在酸鹼值實驗後，我們以 30°C 的環境進行此碳源實驗，將菌放入不同碳源之液態培養基中培養五日，以測量吸光值之方式定量以記錄並計算其五日生長率。(圖 46)

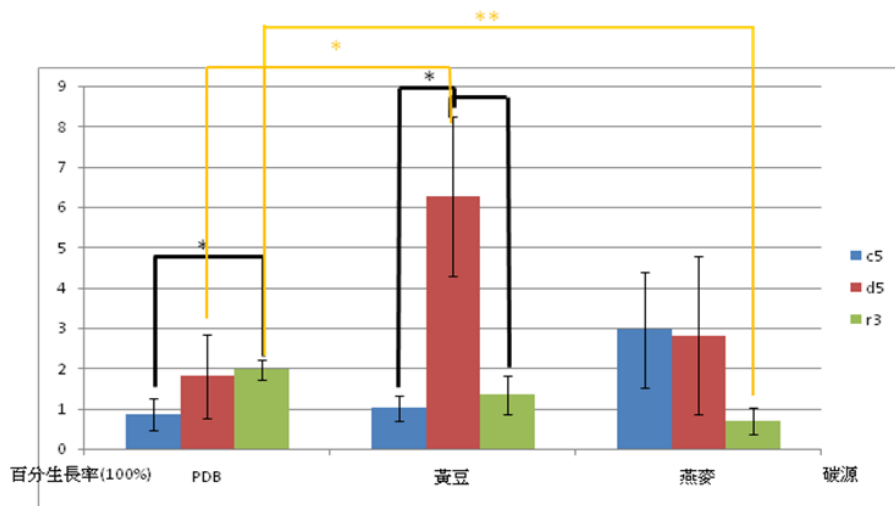


圖 46 三株菌在三種碳源環境下之一周生長率比較

表 9 比較各組別之 p 值

比較組別	c5/d5	d5/r3	r3/c5
PDB	0.1551	0.4272	0.0209
黃豆	0.0329	0.0383	0.2274
燕麥	0.4684	0.1348	0.0807
比較組別	c5	d5	r3
PDB/黃	0.3496	0.0336	0.1001
黃/燕	0.1005	0.0780	0.0909
燕/PDB	0.0924	0.2839	0.0058

碳源為 PDB 時，r3 的生長率高於 c5，有顯著差異($p < 0.05$)。碳源為黃豆時，d5 的生長率高於 c5、r3，皆有顯著差異($p < 0.05$)。碳源為燕麥時，三者生長率無顯著差異。

c5 在三種碳源的生長率無顯著差異。d5 在碳源為黃豆的生長率高於 PDB，有顯著差異($p < 0.05$)。r3 在碳源為 PDB 的生長率高於燕麥，有顯著差異($p < 0.01$)。

三、探討不同酸鹼值下鏈黴菌對南方根瘤線蟲孵化抑制效果

為了去除滲透壓等其他因素造成線蟲蟲卵無法孵化，我們將計算出的未孵化率扣除空白值(例如將 r3, pH7 組別下之卵未孵化率扣除以 pH7 PDB 浸泡之卵的孵化率)，再進行比較與討論(圖 47)。

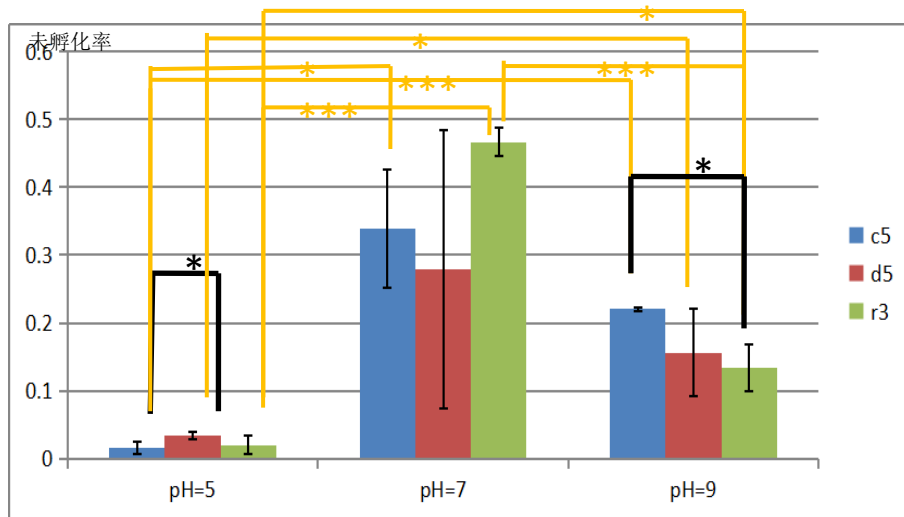


圖 47 三株菌在三種酸鹼值環境下對南方根瘤線蟲孵化抑制效果

註：扣除後未孵化比例越高，代表鏈黴菌越能對線蟲孵化造成影響。

表 10 比較各組別之 p 值

比較組別	c5/d5	d5/r3	r3/c5
pH5	0.0241	0.1700	0.1659
pH7	0.2572	0.1480	0.1483
pH9	0.2083	0.2360	0.0481
比較組別	c5	d5	r3
pH5/7	0.0129	0.1224	0.0006
pH7/9	0.0566	0.2932	0.0009
pH9/5	0.0004	0.0463	0.0402

從圖中可以得知，pH5 中僅 c5/d5 有顯著差異($p < 0.05$)；pH7 中三株菌間皆無顯著差異；pH9 中 r3/c5 有顯著差異($p < 0.05$)。

c5 在 pH5/7 有顯著差異($p < 0.05$)，在 pH9/5 中有非常顯著差異($p < 0.005$)；d5 在 pH9/5 中有顯著差異($p < 0.05$)，其餘皆無顯著差異；r3 則兩兩皆有顯著差異，其中 pH5/7、pH7/9 有非常顯著的差異。

四、探討不同酸鹼值下鏈黴菌抑制線蟲活動力效果

同未孵化率，先扣除滲透壓等其他因素造成線蟲活動力下降後將之進行比較。

(圖 48)

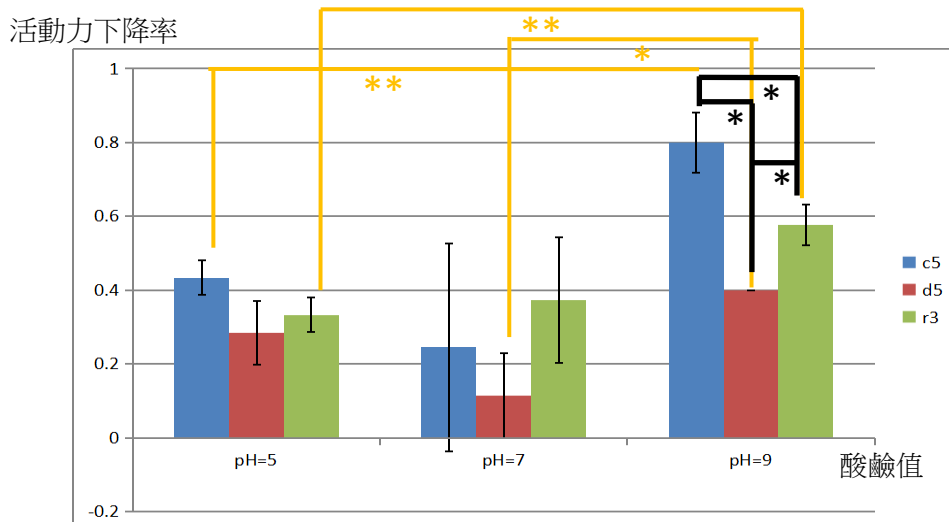


圖 48 三株菌在三種酸鹼值環境下抑制線蟲活動力效果

表 11 比較各組別之 p 值

比較組別	c5/d5	d5/r3	r3/c5
pH5	0.0608	0.2682	0.0505
pH7	0.3203	0.0798	0.2953
pH9	0.0101	0.0225	0.0241
比較組別	c5	d5	r3
pH5/7	0.2120	0.0914	0.3928
pH7/9	0.0556	0.0381	0.1239
pH9/5	0.0059	0.0993	0.0044

從上圖中得知，pH5 中三株菌之效果皆無顯著差異；pH7 中也皆無顯著差異；pH9 中則三株菌兩兩皆有顯著差異($p < 0.05$)。

c5 在 pH5/7 中皆無顯著差異；d5 在 pH7/9 中有顯著差異($p < 0.05$)，其餘皆無顯著差異；r3 在 pH9/5 中有很顯著差異($p < 0.01$)，其餘組別則無。

五、測試不同鏈黴菌(c5、r3)在不同酸鹼值下之分解幾丁質能力

根據文獻查詢(石信德，2010)，鏈黴菌以分解幾丁質的方式抑制線蟲孵化，因此我們將鏈黴菌置於幾丁質培養基上方進行培養，觀察其透化圈大小，以測量其分解幾丁質能力。

我們挑出前述實驗中實驗效果較優的 c5、r3 進行實驗。(圖 49)

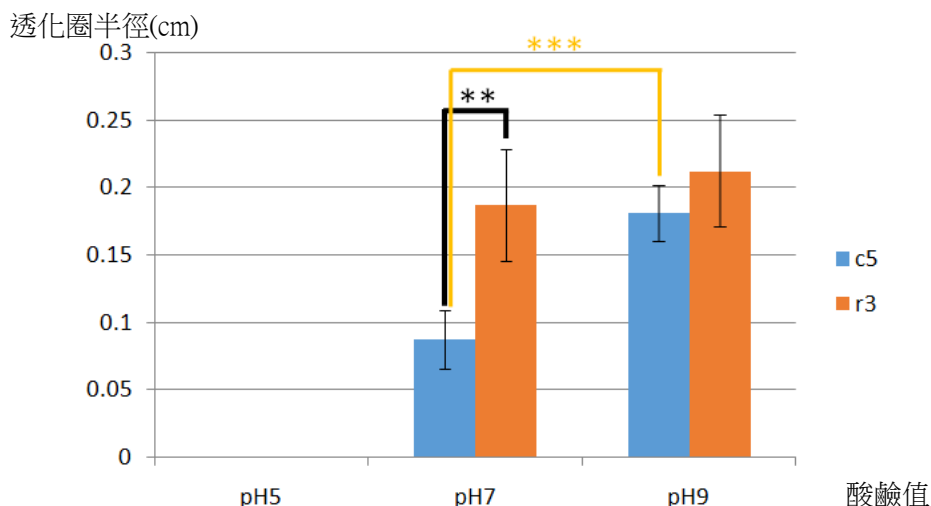


圖 49 兩株菌在不同酸鹼值下之分解幾丁質能力

表 12 比較各組別之 *p* 值

比較組別	pH7	pH9
r3/c5	0.0069	0.1539
比較組別	c5	r3
pH7/9	0.0004	0.2440

從上圖中得知，pH5 中兩株菌皆無生長；pH7 中 r3 高於 c5，有很顯著差異($p < 0.01$)；pH9 中則皆無顯著差異。

c5 在 pH7/9 中有非常顯著差異($p < 0.005$)；r3 在 pH7/9 中無顯著差異。

陸、 討論

一、 不同環境之鏈黴菌於不同溫度、酸鹼條件下之生長情形

首先測試自不同環境中篩選出之鏈黴菌的生長情形，一是得知菌株之生理特性並將其最適生長環境與原環境對照；二是對照後續節抗線蟲實驗的結果，觀察其抗蟲能力是否與生理特性或原環境有關聯。

將結果與菌株來源地之環境進行比對，整理如下表所示：

表 13 菌株來源地之土壤情形

土壤情形	操場	大門西側	榕園	香草花園
溫度	27-30°C	23-25°C	23°C	23°C

pH	9.0	6.5	6.5	5.0
光線	全日曝曬	半日曝曬	全日陰暗	全日陰暗
濕度	很濕潤(灑水)	濕潤	乾燥	很濕潤(落葉)

但根據我們的結果，大約只有 c5 有符合原生長地為最適生長地的推論，其餘組別無明顯關聯。

這與我們一開始所預期的結果不一樣。推測可能有兩種原因：一是它的適應不一定是以生長快速呈現出來，可能是其他具適應性特徵，例如他可以分泌抗生素去拮抗其他種細菌。二推測因為在篩選過程中，我們不能確定所選擇出之菌株的最適生長環境是它的原環境，只能知道它有生長在那裡。因此，我們推測若是從土壤中大規模提煉出「大量」鏈黴菌，才能將測試出之生長率與原環境進行比較，但若只有挑選出「其中一株」鏈黴菌，則不能就此推測其最適生長環境與原環境重疊。未來或許可以從土壤中分離出多一點菌株，證明我們的菌種在原生地的數量多寡，或是其他種菌種有沒有相似的適應特性。這或許可以說明：只用某些條件(溫度、酸鹼值或碳源)去測試菌株的最適生長狀況，並不代表菌株可以比較適應這些條件的環境，還要考慮環境生態系的綜合因素導致菌株的適應。

二、不同環境之鏈黴菌於三種碳源下之生長情形

將鏈黴菌應用於農業上時，添加一些碳源能讓鏈黴菌獲取更多營養，進而有效提高菌之生產力，並且也可得知碳源對於其抗蟲能力的影響。因此我們以方便取得且對土壤影響較小的黃豆以及燕麥煎汁進行測試，發現三株鏈黴菌在不論是以 PDB、黃豆及燕麥煎汁培養的生長情形都無顯著差異。

但據前人的研究報告指出，黃豆相較於其他穀物含有較多易利用之蛋白質，而當環境中含有豐富易利用之氮源時，微生物會為了生長而抑制次級代謝物的生合成，且在優渥的氮源環境中，微生物代謝產生之銨離子也會抑制次級代謝物的合成 (Lounes, et al., 1995; Sanchez and Demain, 2002; 王志全, 2018)，所以黃豆分泌之二次代謝物量應較少甚至沒有。再者，另一研究指出，在 2% 燕麥煎汁培養下，鏈黴菌能分泌較多抗生物質(何炳璋, 2001)。結合以上兩點，燕麥相較於黃豆似乎是較優的選擇，可設為未來研究方向，甚至近一步使用植株進行實際操作。

三、測試鏈黴菌(c5、d5、r3)在不同酸鹼值下，對南方根瘤線蟲抑制效果

- (一) 鏈黴菌以抑制孵化與降低二齡線蟲活動力抑制南方根瘤線蟲數量。
- (二) 百分生長率與抑制南方根瘤線蟲效果之關聯

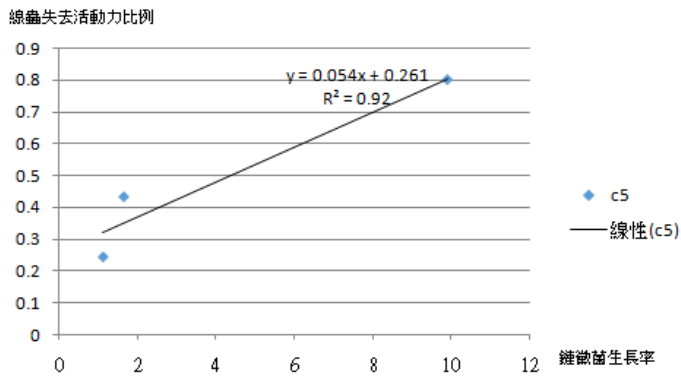


圖 50 c5 的生長率和抑制線蟲活動力散佈圖

從上圖得知，在不同酸鹼值下 c5 的生長率和其抑制線蟲活動力的比例呈正相關。

從實驗結果中可以看到，c5 在生長率和抑制二齡線蟲活動力的表現上，皆為在中性較差而鹼性較佳，雖然兩者數據為正相關，但因為仍有許多可能的影響因素，再加上其他組別並無此種表現，無法確認兩者是否有實際的關聯，不能以此推測百分生長率若越大就越能抗蟲。對此結果，我們有以下兩種推論：

1. 情況一：由於菌株適合生長於此環境(如 c5 適合生長於弱鹼性)，所以百分生長率比較高，且分泌酵素或其他次級代謝物量也比較多。但這只能稍微解釋 c5 的實驗結果，對此我們做出第二個假設。
2. 情況二：存於土壤的微生物中，整體來說鏈黴菌的生長速率偏慢，但又能佔據有自己的一席之地，是因為能分泌多種酵素、抗生素以達到競爭優勢並延續族群的目的。但資源有限，慾望無窮，同樣的經濟學理論也可用於鏈黴菌對於生長與分泌二次代謝株菌種在不同情況下可能會有不一樣的選擇，形成不同的結果。

(三) 抑制南方根瘤線蟲孵化及活動力之關聯

從結果來看，兩者不呈正相關。於下段說明。

四、 鏈黴菌抑制線蟲效果與分解幾丁質能力的關聯

(一) 鏈黴菌抑制線蟲的方式

南方根瘤線蟲之卵殼含有幾丁質，鏈黴菌分泌的幾丁質酶破壞其卵殼，抑制其孵化(石信德，2010)。而抑制線蟲活動力方面則還有其他物質參與。從前人的研究可以得知，部分鏈黴菌的次級代謝物中含有阿維菌素，阿維菌素是一種大環內酯衍生物，以觸殺或胃毒的途徑使線蟲之運動神經信息被阻斷，產生僵直的反應，無法活動及進食最後導致死亡(康乃爾大學，1994)，且對於抑制線蟲孵化沒有顯著效果，因此阿維菌素的存在可能為造成上段抑制孵化與活動力兩者不呈正相關的原因之一。

(二) 幾丁質酶與抗蟲能力

本實驗以 chitin 培養基上的透化圈大小作為比較鏈黴菌分解幾丁質能力的依據，探討抑制孵化與抑制線蟲活動力和幾丁質分解能力的關係。我們的實驗結果顯示，中性培養基上 r3 透化圈大小跟 c5 比有顯著差異，而抑制孵化效果數據 r3 高於 c5 但無顯著差異；pH9 中透化圈無顯著差異，與卵孵化實驗中 c5 能力大於 r3 不符合；至於二齡線蟲活動力實驗，則不符合此結果。未來可將培養鏈黴菌的上清液施以高溫加熱，破壞幾丁質酶留下抗生素等小分子，再將之施用於線蟲孵化抑制及活動力抑制實驗，比較其幾丁質酶對於兩者的重要性。

未來若是能取得這兩株鏈黴菌的二次代謝物並分析，則更能證明鏈黴菌以何種方式抑制線蟲。

(三) c5 與 r3 的幾丁質分解能力和原環境之關係

總體而言，c5 在鹼性(約 pH9)環境中有較好的幾丁質分解能力，抑制孵化效果也比較好；r3 則在中性下有較好的幾丁質分解能力，抑制孵化效果數據高於 c5 但無顯著差異。由於 c5 的原環境酸鹼值偏鹼性(約 pH8.5~9)，而 r3 的原環境為中性，我們推測其幾丁質分解能力可能和適應原環境有關。

五、三株鏈黴菌的親緣關係比較

我們所挑選出之菌株經過送件菌種鑑定後皆屬鏈黴菌，其中 d5 與 r3 兩者為同種菌親緣關係較接近。然而 d5 與 r3 在生長情形、抑制線蟲卵孵化率以及抑制二齡線蟲活動力能力等方面皆不同，可見同種菌不同菌株間有差異。

因此在未來可分析這兩株菌的採集地土壤環境狀態差異，包括各種生物、非生物因子，研究哪些因素造成兩株菌的差異之大。

六、未來展望

(一) c5 菌株之應用和探討

綜合來看，c5(原生地為操場)是抗蟲能力較佳之鏈黴菌株，或許這種鏈黴菌在操場這種環境的適應，比起我們研究的其他兩個環境具有較好抗蟲能力。因此使用 c5 至農田上時，先使用我們測試出其適合生長條件將其增量，接著可考慮農田生態是否類似其原生環境使其適應，或者積極方面，將土地之生態系調整至類似於操場土壤的生態系，複製其溫度、酸鹼度、濕度及微生物組成等，推測同種菌會適應環境、發展出類似於 c5 菌株的生理，進而達到 c5 除去南方根瘤線蟲的效果。

如果自己在農地培養自然界中的鏈黴菌時，是否也可考慮調整至類似於操場土壤

的生態系？c5 僅是操場土壤中的其中一株，並不能以此歸納出操場之環境容易發展出抗蟲能力較佳之鏈黴菌這種說法。因此未來研究也可從操場土壤中取更多菌種進行實驗，證明操場環境是培養抗蟲能力較佳之菌種的場地。

多數市售鏈黴菌菌株幾經篩選，雖然除蟲能力強大，但若再配合生態造成菌株變異的考量，能使長久抑制南方根瘤線蟲的能力更完善。未來研究方向可將生態系考慮至鏈黴菌抗蟲效果研究中。

(二) 實驗模組

另外，因為我們僅有進行 c5、d5 及 r3 三株菌的測試，未來也可以此研究方式作為模組，測試出某種菌於某環境中的抗蟲能力最佳；將此方法推展至商品化時，也可將最適抗蟲環境納入篩選菌種時的考量之一，選出適合不同環境之鏈黴菌種，讓農人依照農地環境挑選適用的鏈黴菌種。

(三) 鏈黴菌適應環境

由於 d5、r3 屬於同種鏈黴菌，卻在生長情形及抗蟲能力上有差異。所以關於菌株的採集地環境，我們還想了解兩株菌的原環境差異，例如是否因為 r3 的採集地土壤中的幾丁質較多，使當地的菌種分泌較多幾丁質酶。另外，分泌抗生素也是鏈黴菌抑制線蟲的方式之一，c5 及 r3 的原環境是否有生物或非生物因子使其分泌抗生素能力較強。

柒、 結論

一、 測試不同株鏈黴菌(c5、d5、r3)在不同環境條件的生長情形

(一) 三株菌百分生長率最大之條件與原生環境並無明顯重疊。可能是菌株適應不一定以生長快速呈現，或在篩選過程中不能確定所選擇出之菌株可代表此處的菌相。我們認為只用溫度、酸鹼值或碳源等條件測試菌株的最適生長條件，並不代表菌株較適應此條件，還要考慮環境生態系的綜合因素導致菌株的適應演化。

二、 測試不同株鏈黴菌(c5、d5、r3)在不同酸鹼值下，對南方根瘤線蟲拮抗效果

(一) 整體而言，c5 在鹼性(pH9)下有較好的生長情形及抗蟲能力；r3 則於中性較佳。若將這兩株應用至農地上實，可先使用我們測試出其適合生長條件將其增量，接著可考慮農田生態是否類似其原生環境使其適應並達到較好之抗蟲能力。

(二) 不同酸鹼值下，c5 的生長率與抑制線蟲活動力之能力呈正相關。鏈黴菌可能會因為適合生長於某環境而使生長速度較快，並產生較多次級代謝物；但也有可能為了生長，而抑制次級代謝物之合成，因此實驗結果中各株菌在不同環境下的生長率與抑制線蟲能力的相關有些出入，不能以此推測百分生長率若越大就越能抗蟲。

三、鏈黴菌抑制線蟲效果與分解幾丁質能力的關聯

(一) c5 在鹼性(pH9)條件下分解幾丁質的能力最好；中性下則 r3 大於 c5。推測與對原環境的適應有關。

(二) 鏈黴菌以分泌幾丁質酶的方式抑制南方根瘤線蟲蟲卵的孵化，但尚有其他因素影響鏈黴菌抑制二齡線蟲活動力的能力。

四、未來展望和應用

(一) c5 菌株之應用和探討

未來可以實際利用幾丁質培養基，測試我們三株菌株實際分解幾丁質之能力，探討 c5 能力較佳的原因，與其生理特性、甚至原生環境的相關性，可更了解他的適應演化。

而考慮到 c5 僅是操場土壤中的其中一株，並不能以此歸納出操場之環境容易發展出抗蟲能力較佳之鏈黴菌這種說法。因此未來研究也可從操場土壤中取更多菌種進行實驗，驗證操場環境是否為培養抗蟲能力較佳之鏈黴菌的環境。

(二) 實驗模組化

未來也可以同樣的實驗方式，測試出某菌種的最佳抗蟲環境，商品化此環境菌株時，賣家可研發出適合不同環境之鏈黴菌，使農人依據農地環境挑選適合的菌株。

(三) c5、d5、r3 的採集地環境差異：由於 d5、r3 屬於同種鏈黴菌，卻在生長情形及抗蟲能力上有差異，而 c5 抗蟲能力較佳。希望藉由分析三株菌之採集地環境差異，能了解使兩株菌差異的原因，例如酸鹼值差異和幾丁質含量多寡等。

(四) 抑制線蟲活動力因素

為了分析幾丁質酶於抑制線蟲中影響程度，可將鏈黴菌上清液煮至破壞幾丁質酶結構留下小分子，再施於抑制孵化實驗以及抑制二齡線蟲活動力實驗；或直接施以幾丁質酶，觀察其結果。

捌、參考資料及其他

1. 黃榮揚 (2016)。應用兩種鏈黴菌綜合防治南方根瘤線蟲病害與茄科細菌性斑點病之潛力探討。台中市：國立中興大學植物病理學系所碩士論文。2020 年 3 月 10 日。取自 <https://hdl.handle.net/11296/6h49d4>
2. 王至全 (2018)。應用鏈黴菌管理番茄萎凋病與根瘤線蟲。台中市：國立中興大學土壤環境科學系所碩士論文。2020 年 3 月 10 日。取自 <https://hdl.handle.net/11296/n9n25z>

3. 石信德、黃振文（2005）。保護植物的重要菌源—鏈黴菌。科學發展。 391: p. 22-27。
4. 陳雲成（2008）。應用鏈黴菌 *Streptomyces* spp. 防治植物真菌性病害與植物寄生性線蟲病害。台中市：國立中興大學植物病理學系所碩士論文。2020年3月10日。取自 <https://hdl.handle.net/11296/hg9d74>
5. 馬玟釧、連德昇、吳淑姿、余世宗、涂瑞澤（2007）。篩選幾丁質分解酶生產菌與其酵素之特性分析。科學與工程技術期刊，3(3)，25-34。2020年3月10日，取自 <http://journal.dyu.edu.tw/dyujournal/document/setjournal/s03-3-25-34.pdf>
6. 杜冠毅（2014）。應用鏈黴菌 *Streptomyces* spp. 促進植物生長及根系調節物質之探討。台中市：國立中興大學植物病理學系所碩士論文。2020年3月10日。取自 <https://hdl.handle.net/11296/4nna86>
7. Thimoteo, S. S., Glogauer, A., Faoro, H., de Souza, E. M., Huergo, L. F., Moerschbacher, B. M., & Pedrosa, F. O. (2017). A broad pH range and processive chitinase from a metagenome library. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 50(1).
8. Rey, T., & Dumas, B. (2017). Plenty is no plague: *Streptomyces* symbiosis with crops. *Trends in plant science*, 22(1), 30-37.
9. 楊尚書（2005）。鏈黴菌 *Streptomyces griseobrunneus* S3 幾丁質分解酵素基因之分子選殖及抗病性轉基因蕃茄與菸草之製作。台中市：國立中興大學植物病理學系所博士論文。2020年3月10日。取自 <https://hdl.handle.net/11296/3snwgt>
10. Abamectin. (1994). Extension Toxicology Network. from <http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/extoxnet/24d-captan/abamectin-ext.html>.
11. 蔡東纂（2008）。根瘤線蟲。載於行政院農業委員會動植物防疫檢疫局出品，植物保護圖鑑系列—香蕉保護（80-82頁）。臺北市：行政院農業委員會動植物防疫檢疫局。

【評語】 052204

1. 本研究分離三個菌株，利用基因定序已比對初來其品種學名，建議應就該放射菌學名搜索一下是否同一菌種已被發表相關生理、生長的參數或是防治南方根瘤線的功效研究，亦即此科展之研究結果是否是新發現，可再多著墨。
2. 實驗內容充實並能具體完成。
3. 若能更進一步分析確認鏈黴菌之幾丁質酶與二次代謝物及抗南方根瘤線蟲活性的相關性，則成果更具有應用價值。
4. 本研究內容的整理與撰寫相當詳盡，但圖、表的表達可在精進。例如：圖的 X、Y 軸座標要標示好，分別放在軸距左側、下方。
5. 表 7-12 “比較各組別之 p 值” 很難理解。是比較橫排或縱排數據間的差值？有兩種可能。而且表的標頭應該直接標明是做何試驗之比較結果。

摘要

鏈黴菌(*Streptomyces spp.*)是防治農業害蟲南方根瘤線蟲(*Meloidogyne incognita*)上的重要角色。我們自三處不同環境土壤，嘗試篩選出同種的鏈黴菌各一株(編號c5、d5、r3)，測試其生理特性(不同溫度、pH值、碳源下之生長)，及對抑制南方根瘤線蟲孵化、二齡線蟲活動力能力，最後以幾丁質培養基測試其分解幾丁質能力。其中c5在pH9下不論是生長情形或是抗蟲能力皆較佳；r3則較適合中性環境。而幾丁質酶的分解能力與抑制蟲卵孵化較為相關，線蟲活動力抑制則可能有其他物質參與。我們也發現各株菌的最佳生長條件，跟其原生環境常是不相符合的；且d5與r3為同種鏈黴菌卻也具有生理特性和抗蟲能力差異，未來希望能從其採集地生態了解影響因素，將鏈黴菌應用至農地時，可考慮菌株的適應問題。



圖1 微焦鏡頭下的鏈黴菌



圖2 解剖顯微鏡下線蟲雌蟲

研究動機

鏈黴菌(*Streptomyces spp.*)以抗生、競爭以及超寄生等方式拮抗植物病原菌，產生IAA等促進植物生長效果之物質，各種胞外酵素及抗生素也能免去植物病原菌之感染與擴散，其中對南方根瘤線蟲(*Meloidogyne incognita*)之防治更是助益良多(陳雲成，2008)(王至全，2018)。

鏈黴菌以分泌幾丁質酶的方式有效抑制線蟲數量，農業上常被建議施以蝦蟹殼粉以提高其效用，而其他分子也是影響線蟲活動力的因素。(石信德，2010)。我們搜尋文獻後發現大多研究方向為篩選出具有良好抗蟲能力之鏈黴菌株，並且可商業化作為生物防治使用；而本研究希望在了解不同環境之同樣鏈黴菌，在不同溫度、酸鹼值之生理特性的差異後，釐清不同酸鹼值下三株鏈黴菌抑制南方根瘤線蟲效果之差異及其原因。因此，我們計劃從不同環境之土壤中初步篩選出鏈黴菌，並觀察其於各溫度及酸鹼值下之生長情形差異，進一步測試自己篩選出之鏈黴菌株對於南方根瘤線蟲之蟲卵孵化和活動力的抑制效果，並以幾丁質培養基測試鏈黴菌對幾丁質酶的分解能力，以驗證幾丁質酶與蟲卵孵化抑制的關係。

研究目的

- 一、篩選出不同環境之同種鏈黴菌菌株，並測試不同株鏈黴菌在不同環境條件的生長情形
- 二、測試不同酸鹼值下鏈黴菌對南方根瘤線蟲孵化抑制效果及二齡線蟲活動力抑制效果
- 三、探討不同株鏈黴菌抗蟲效果，與此鏈黴菌原生環境和生理特性之相關性
- 四、探討鏈黴菌抗蟲效果和幾丁質酶之相關性

研究過程與方法

鏈黴菌篩選

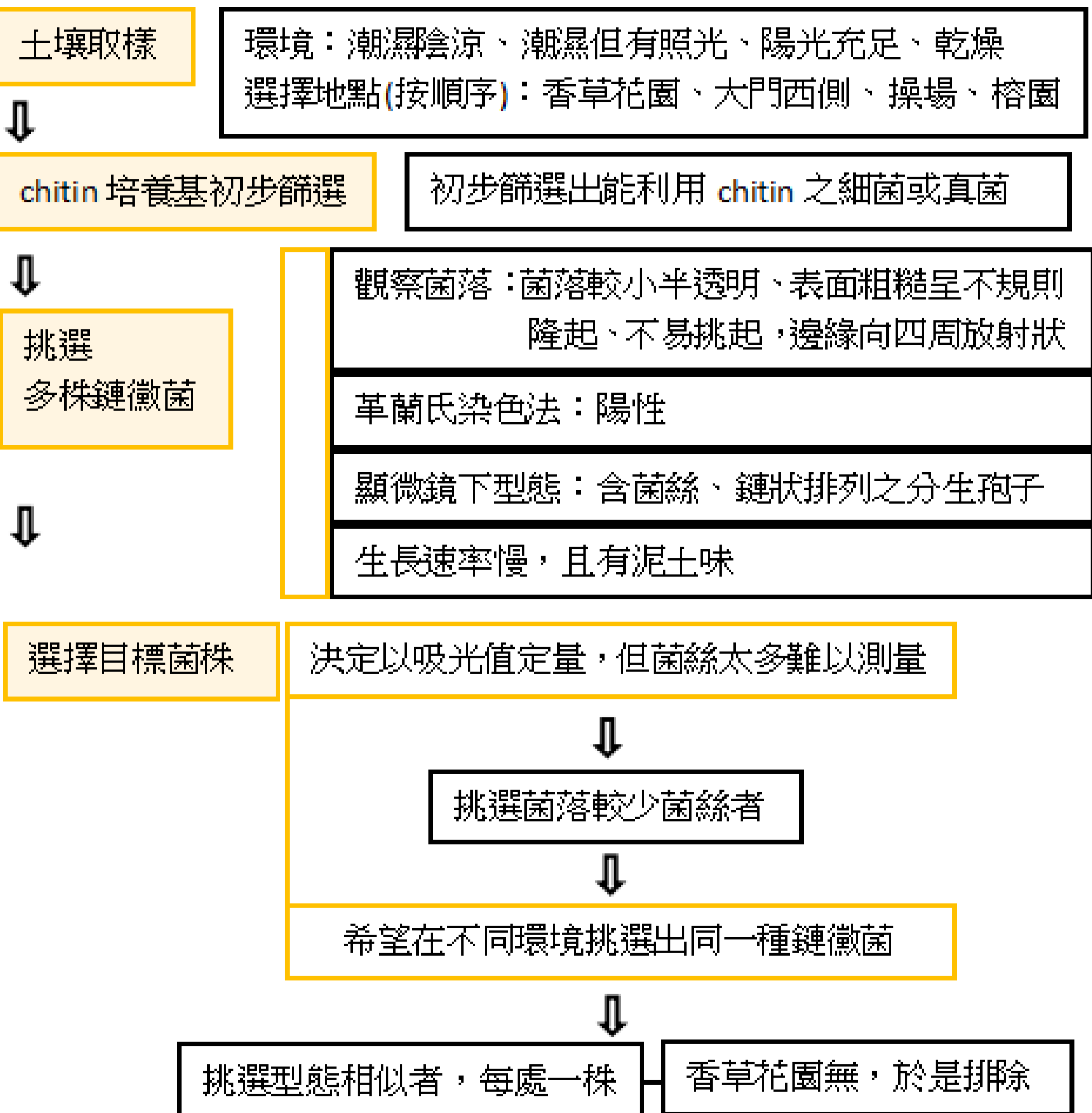
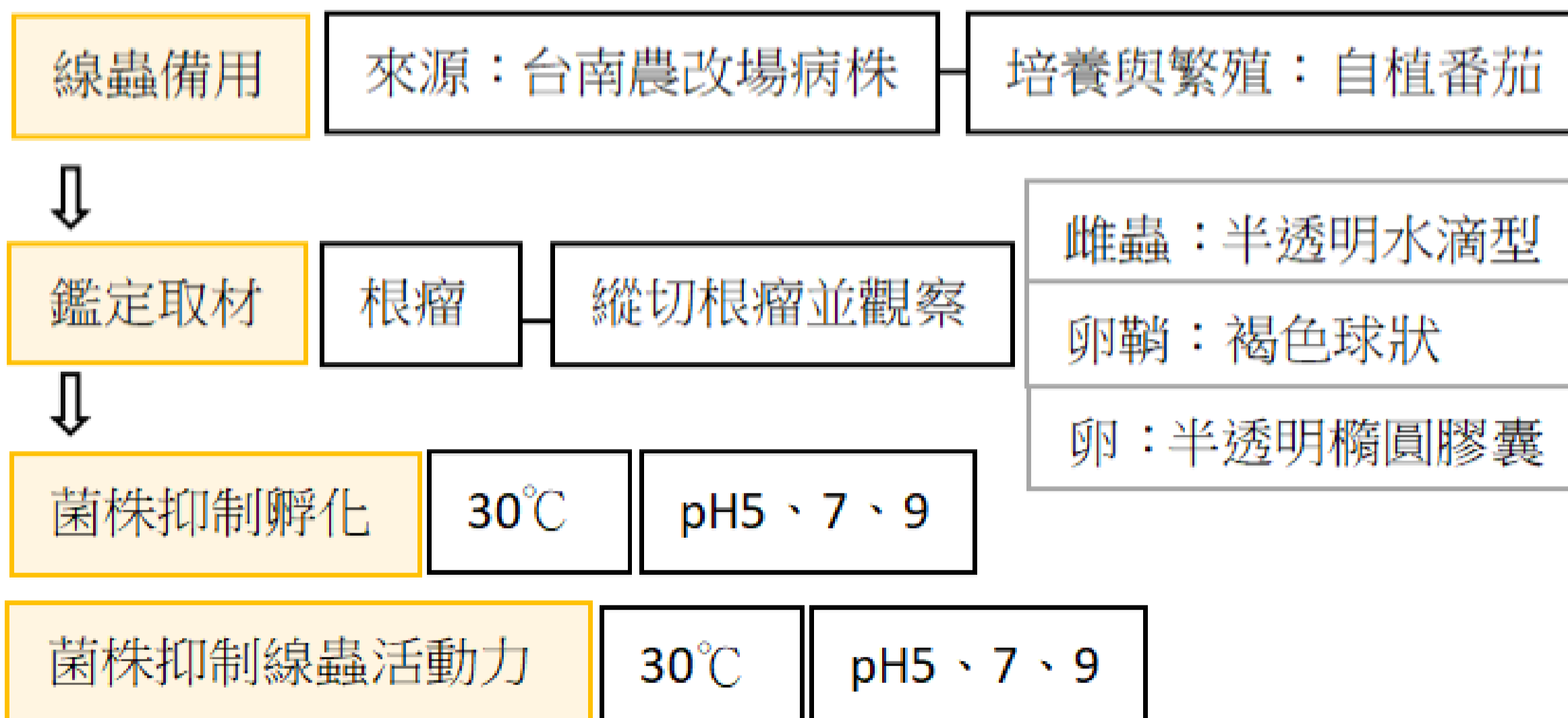


圖3 流程圖

鏈黴菌不同條件之生長情形測試

溫度	24、27、30°C	生長量、30°C生長曲線
酸鹼值	30°C pH3、5、7、8	生長量
碳源	30°C PDB、燕麥、黃豆	生長量

鏈黴菌抑制線蟲孵化或活動力



鏈黴菌分解幾丁質培養基能力

酸鹼值	30°C pH5、7、9
-----	----------------

研究結果

一、前置作業：

篩選出不同環境之鏈黴菌，並初步鑑定

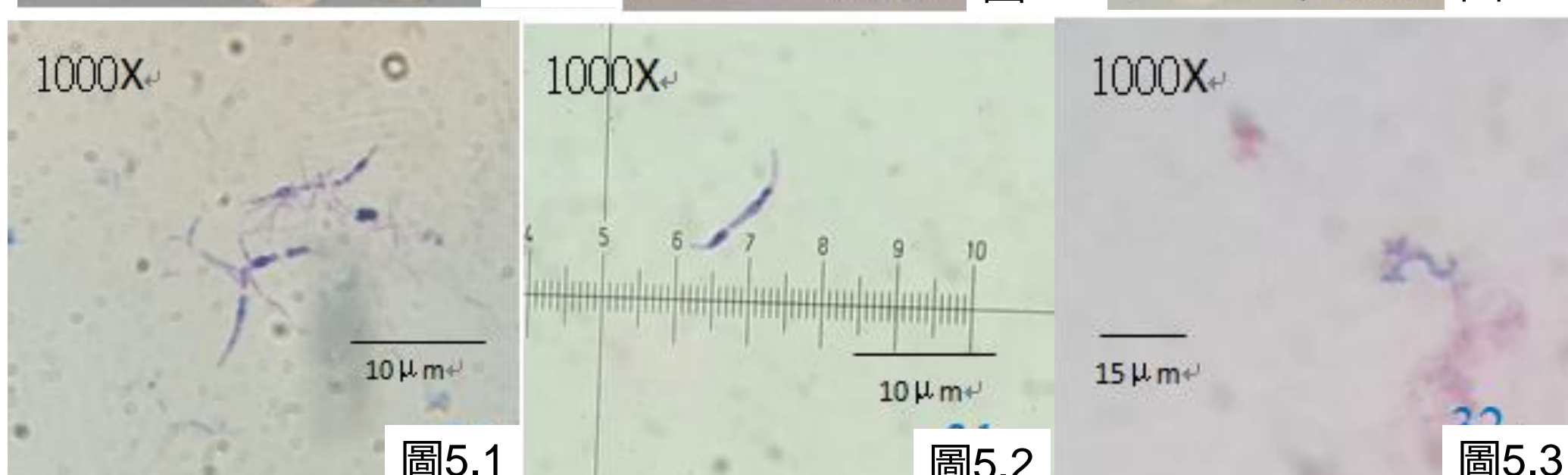
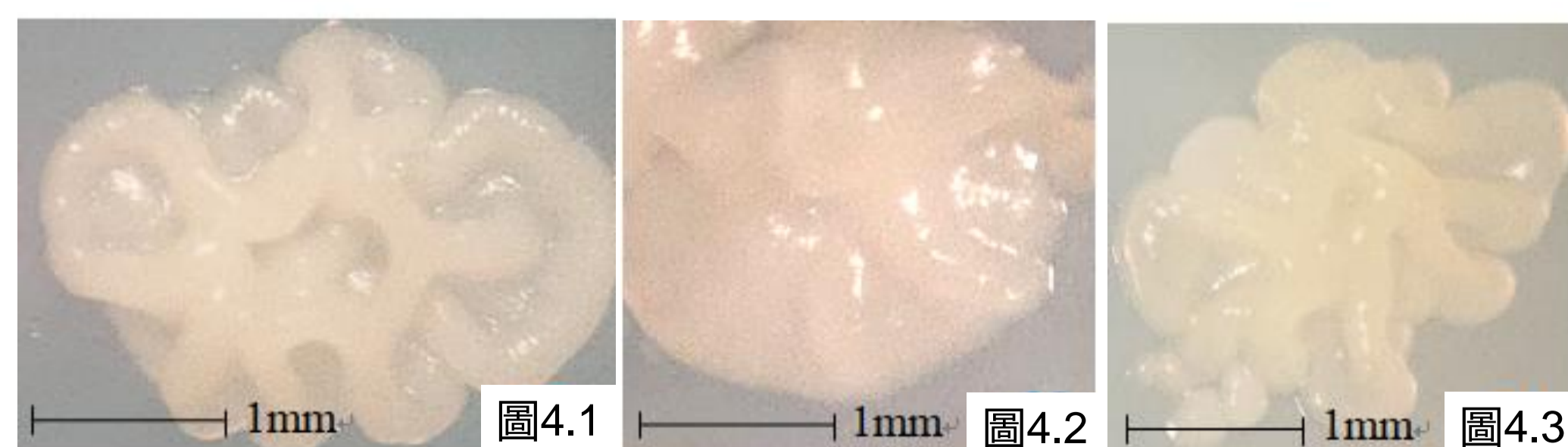
(一)篩選圖片

直徑約1-3mm半透明小菌落，表面粗糙呈不規則隆起，邊緣向四周放射狀，以接種環難以刮取，容易連帶Chitin膠質一同勾下

(圖4：1. c5、2. d5、3. r3)

革蘭氏染色呈陽性反應，可形成菌絲、分生孢子成鏈狀排列

(圖5：1. c5、2. d5、3. r3)



二、測試不同株鏈黴菌在不同環境條件的生長情形

(一)測試三株鏈黴菌在30°C下的生長曲線

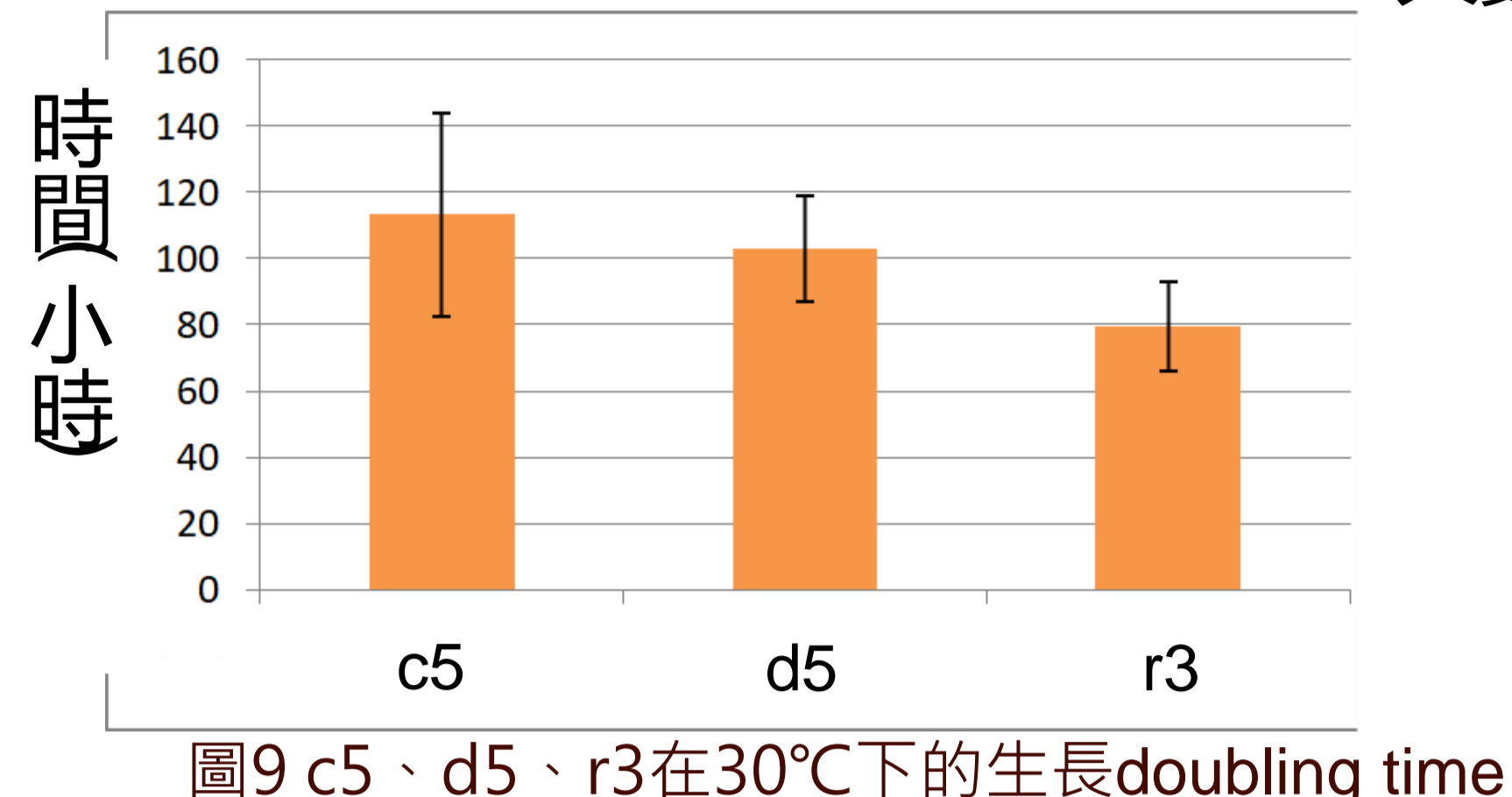
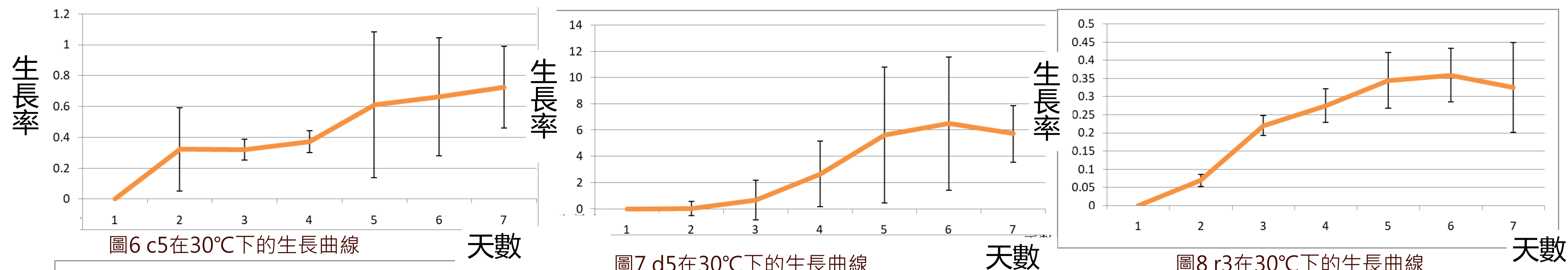
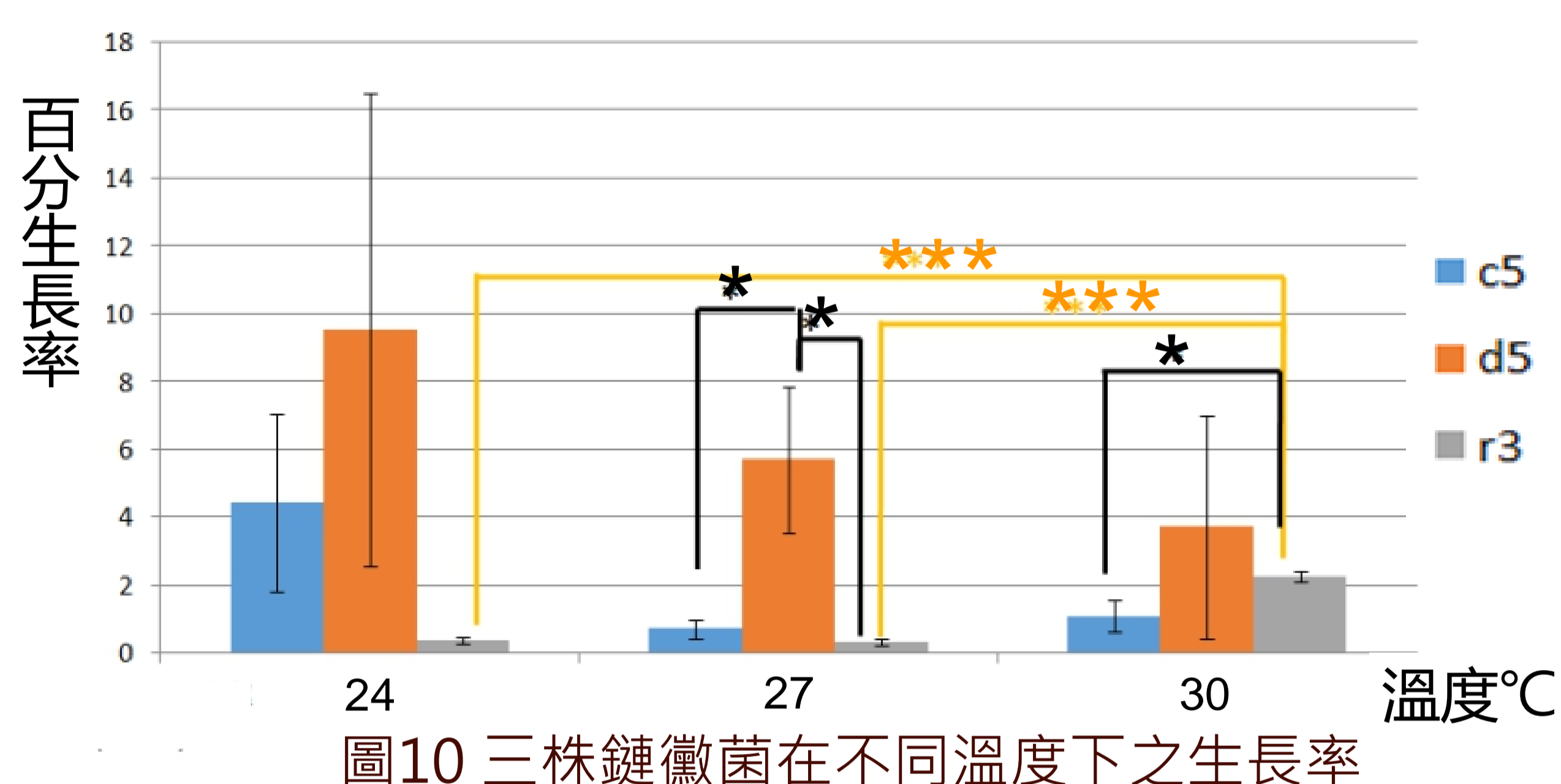


圖9：取第二至第六天進行線性迴歸分析，計算出倍增時間(doubling time)。由左圖得知c5、d5、r3間之倍增時間皆無顯著差異。

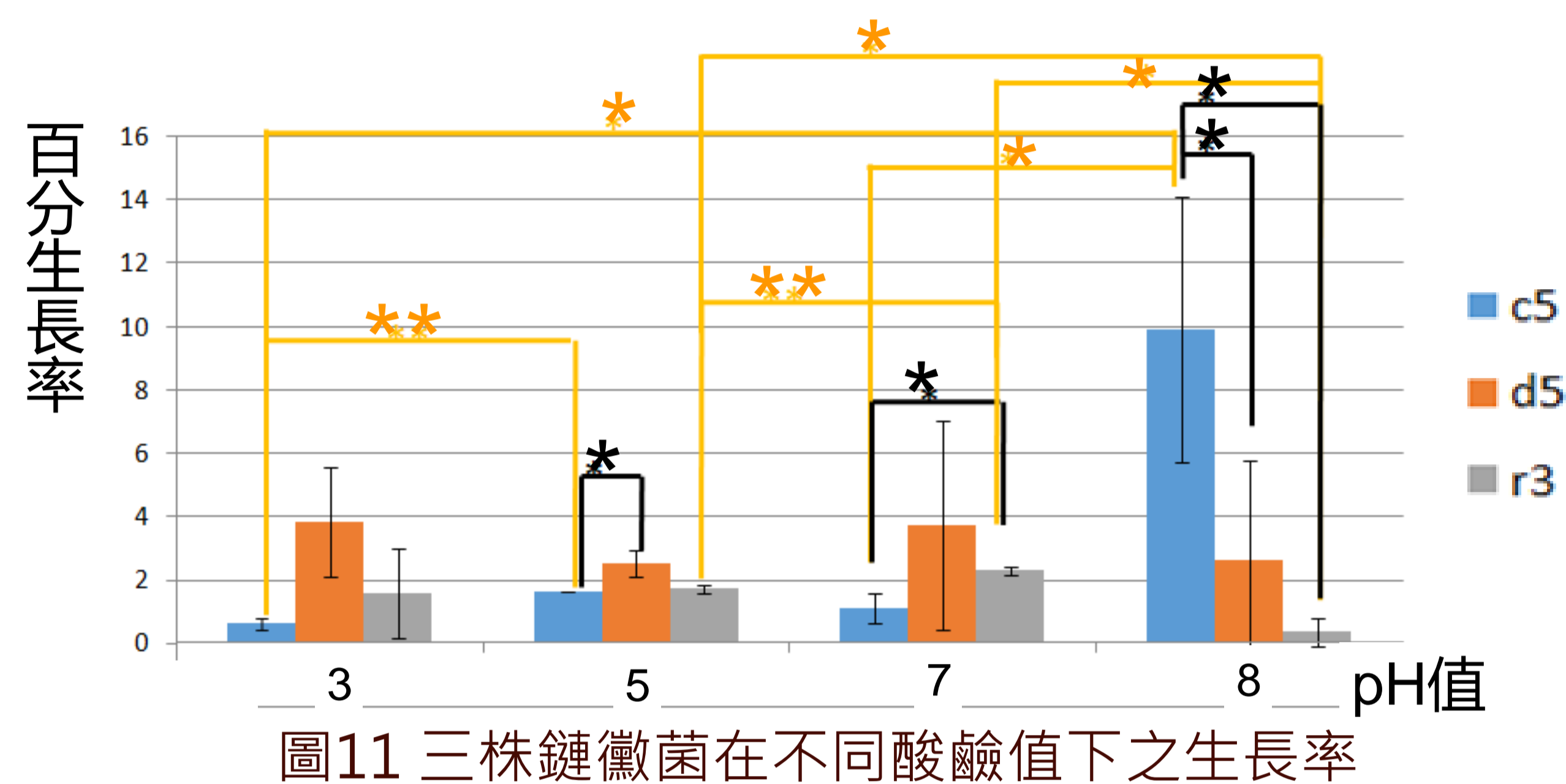
(二)測試三株鏈黴菌在不同溫度下之生長率



24°C下三株菌皆無顯著差異；
27°C下，c5/d5有顯著差異，
d5/r3有顯著差異，
r3/c5無顯著差異；
30°C下，除r3/c5有顯著差異，
其他皆無顯著差異。

c5在三個溫度下之一周生長率，
兩兩皆無顯著差異；d5在三個
溫度下皆無顯著差異；r3在
27/30°C、30/24°C兩組皆有明
顯顯著差異。

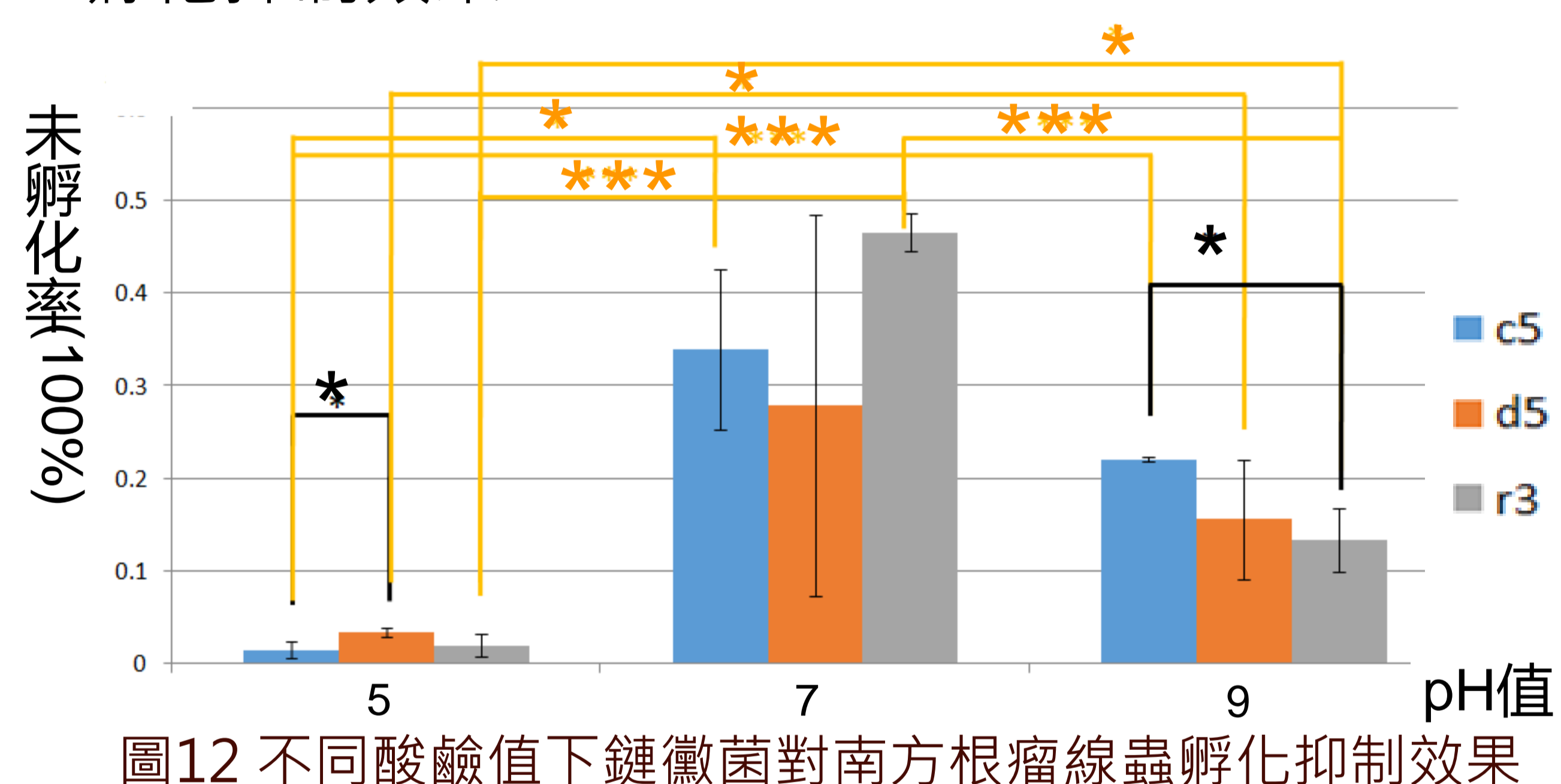
(三)測試三株鏈黴菌在不同酸鹼值下之生長率



pH3中三株菌皆無顯著差異；
pH5中皆無顯著差異；
pH7中僅r3/c5有顯著差異；
pH8中c5/d5及r3/c5有顯著差
異，c5/d5則無顯著差異。

c5於pH3/5、pH3/8、pH7/8有
顯著差異；
d5在四種pH值中皆無顯著差異；
r3於pH5/7、pH5/8、pH7/8中
有顯著差異。

三、測試不同酸鹼值下鏈黴菌對南方根瘤線蟲 孵化抑制效果

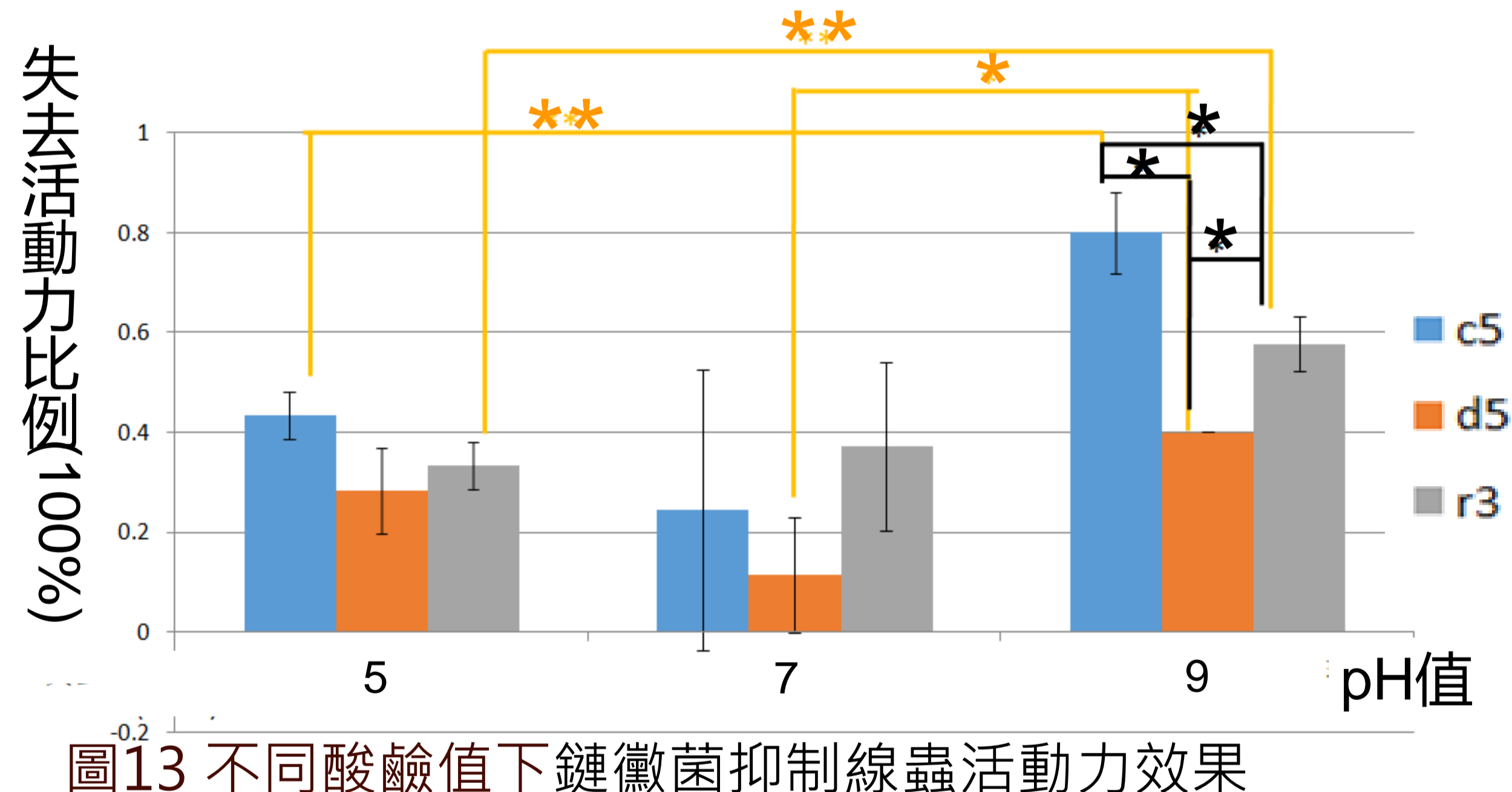


pH5中僅c5/d5有顯著差異；
pH7中三株菌間皆無顯著差異；
pH9中r3/c5有顯著差異。
c5在pH5/7有顯著差異，在
pH9/5中有非常顯著差異；

d5在pH9/5中有顯著差異，其
餘皆無顯著差異；
r3則兩兩皆有顯著差異，其中
pH5/7、pH7/9有非常顯著的差
異。

*圖12、13已扣除滲透壓所造成之基本值，圖中為三株菌之間的比較，並非絕對未孵化率及絕對失去活動比例

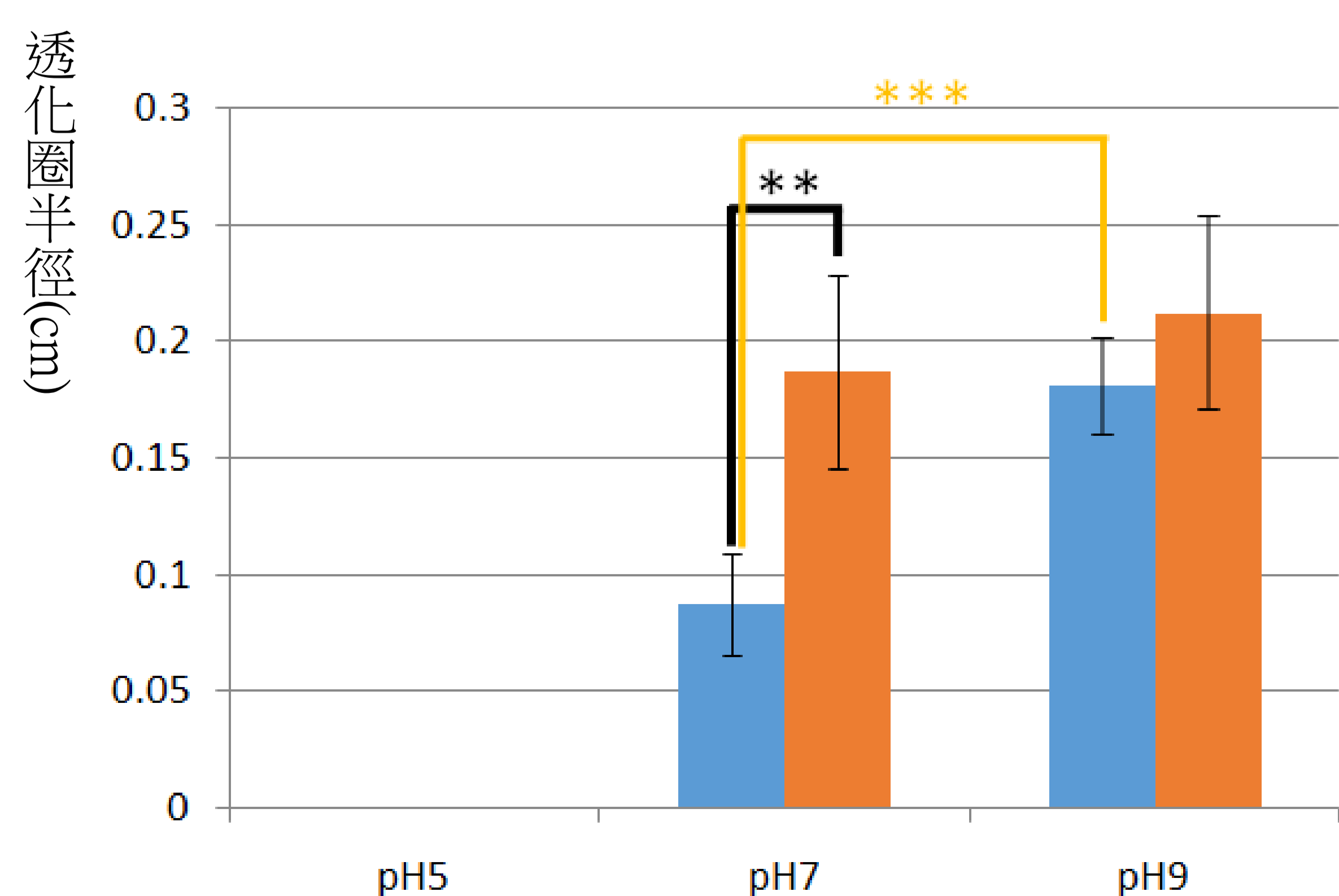
四、測試不同酸鹼值下鏈黴菌抑制線蟲活動力效果



pH5中三株菌之效果皆無顯著
差異；
pH7中也皆無顯著差異；
pH9中則三株菌兩兩皆有顯著
差異。

c5在pH5/7中皆無顯著差異；
d5在pH7/9中有顯著差異，其
餘皆無顯著差異；
r3在pH9/5中有很顯著差異，
其餘組別則無。

五、測試不同鏈黴菌(c5、r3)在不同酸鹼值下之分解幾丁質能力



pH5中兩株菌皆無生長；
pH7中r3高於c5，有很顯
著差異；
pH9中則皆無顯著差異。

c5在pH7/9中有非常顯著
差異；
r3在pH7/9中無顯著差異。

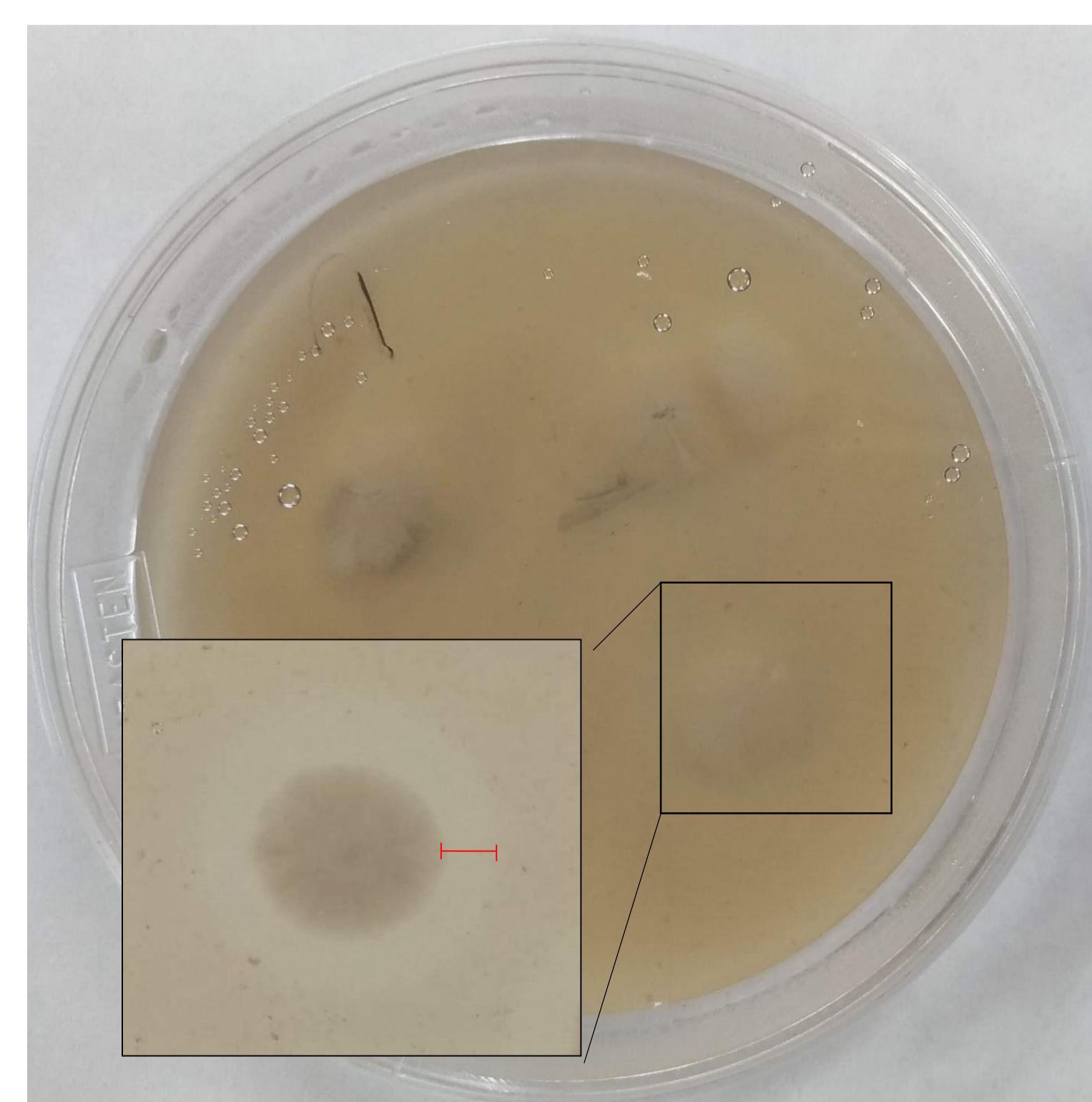
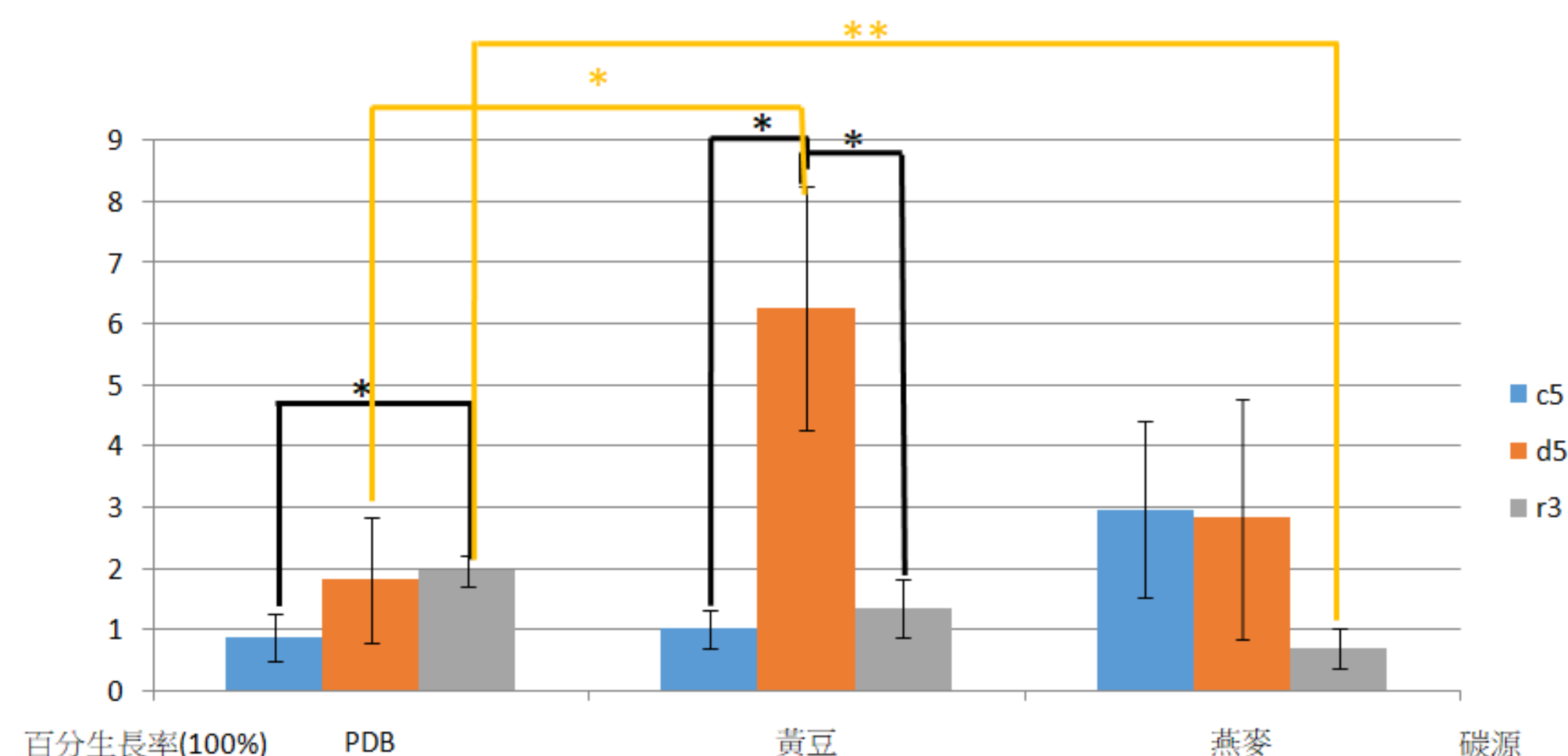


圖15 鏈黴菌在幾丁質培養基上的透化圈

圖14不同鏈黴菌(c5、r3)在不同酸鹼值下之分解幾丁質能力

六、測試不同株鏈黴菌在不同碳源下的生長情形



碳源為PDB時，r3的生長率高於c5，有顯著差異。
碳源為黃豆時，d5的生長率高於c5、r3，皆有顯著差異。
碳源為燕麥時，三者生長率無顯著差異。

c5在三種碳源的生長率無顯著差異。
d5在碳源為黃豆的生長率高於PDB，有顯著差異。
r3在碳源為PDB的生長率高於燕麥，有顯著差異。

圖16 三株鏈黴菌在不同碳源下之生長率

討論與結論

來自三個不同地方的菌(c5、d5、r3)有共同祖先

適應不同環境的過程中演化出不同的生理特性

一、測試不同株鏈黴菌在不同環境條件的生長情形

根據我們的結果，大約只有c5符合原生長地為最適生長地的推論，其餘組別無明顯關聯。推測可能有兩種原因：一是它的適應不一定是以生長快速呈現出來，二是在篩選過程中不能確定所選擇出之菌株可代表此處的菌相。

二、測試不同株鏈黴菌在不同酸鹼值下，對南方根瘤線蟲抑制效果

百分生長率與抑制南方根瘤線蟲效果之關係

c5 在生長率和抑制二齡線蟲活動力的表現上，皆為在中性較差而鹼性較佳，但因為仍有許多可能的影響因素，再加上其他組別並無此種表現，無法確認兩者是否有實際的關聯。對此結果，我們有以下兩種推論：
情況一：由於菌株適合生長於此環境(如c5適合生長於弱鹼性)，所以百分生長率比較高，且分泌酵素或其他次級代謝物量也比較多或效果較好。
情況二：因為資源有限，鏈黴菌對於生長與分泌二次代謝株菌種在不同情況下可能會有不一樣的選擇。

幾丁質酶與抗蟲能力之關係

鏈黴菌以幾丁質酶分解南方根瘤線蟲的卵殼以抑制其孵化，而溫度與酸鹼值影響幾丁質酶的活性，因此我們以幾丁質培養基測試鏈黴菌分解幾丁質的能力，比較抑制孵化實驗。而結果比較也顯示，幾丁質分解能力較強的菌株，抑制孵化效果較佳，在抑制活動力方面則沒有。為了比較其幾丁質酶對於兩者的重要性，未來也可將培養鏈黴菌的上清液施以高溫加熱，破壞幾丁質酶留下抗生素等小分子，再將之施用於兩種抗蟲實驗。

c5與r3的幾丁質分解能力和原環境之關係

c5在鹼性(約pH9)環境中有較好的幾丁質分解能力，且其抑制孵化效果比r3好；r3則在中性下有較c5好的幾丁質分解能力，抑制孵化效果數據高於c5但無顯著差異。由於c5的原環境酸鹼值偏鹼性(約pH8.5~9)，而r3的原環境為中性，我們推測其幾丁質分解能力可能和適應原環境有關。

三、三株鏈黴菌的親緣關係比較

鑑定得知c5為*Streptomyces viridobrunneus*，d5、r3為*Streptomyces misionensis*，其中d5與r3親緣關係較接近。然而d5與r3在生長情形等方面皆不同，可見同種菌不同菌株間有差異。

四、未來展望和應用

- 未來可以從抗蟲能力較佳菌株的原生地中取更多菌種進行實驗，驗證此環境是否為比較適合的培養環境。
- 把菌株應用至農地上時，考慮將土地之生態系調整至適合此菌株的生態系。

3. 可將鏈黴菌與環境的互動考慮至抗蟲效果研究中，未來也可以此研究方式作為模組，測試出某種菌在適應何種環境後抗蟲能力較佳。
4. 商品化時，可將最適抗蟲環境納入篩選菌種時的考量之一。

參考資料

- 黃榮揚 (2016)。應用兩種鏈黴菌綜合防治南方根瘤線蟲病害與茄科細菌性斑點病之潛力探討。台中市：國立中興大學植物病理學系所碩士論文。2020年3月10日。取自 <https://hdl.handle.net/11296/6h49d4>
- 王至全 (2018)。應用鏈黴菌管理番茄萎凋病與根瘤線蟲。台中市：國立中興大學土壤環境科學系所碩士論文。2020年3月10日。取自 <https://hdl.handle.net/11296/n9n25z>
- 石信德、黃振文 (2005)。保護植物的重要菌源-鏈黴菌。科學發展。391: p. 22-27。
- 陳雲成 (2008)。應用鏈黴菌 *Streptomyces* spp. 防治植物真菌性病害與植物寄生性線蟲病害。台中市：國立中興大學植物病理學系所碩士論文。2020年3月10日。取自 <https://hdl.handle.net/11296/hg9d74>
- 馬玟釗、連德昇、吳淑姿、余世宗、涂瑞澤 (2007)。篩選幾丁質分解酶生產菌與其酵素之特性分析。科學與工程技術期刊。3(3)。25-34。2020年3月10日。取自 <http://journal.dyu.edu.tw/dyujournal/document/setjournal/s03-3-25-34.pdf>
- 杜冠毅 (2014)。應用鏈黴菌 *Streptomyces* spp. 促進植物生長及根系調節物質之探討。台中市：國立中興大學植物病理學系所碩士論文。2020年3月10日。取自 <https://hdl.handle.net/11296/4nna86>
- Thimoteo, S. S., Glogauer, A., Faoro, H., de Souza, E. M., Huergo, L. F., Moerschbacher, B. M., & Pedrosa, F. O. (2017). A broad pH range and processive chitinase from a metagenome Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 50(1).
- Rey, T., & Dumas, B. (2017). Plenty is no plague: *Streptomyces* symbiosis with crops. Trends in plant science, 22(1), 30-37.
- 楊尚書 (2005)。鏈黴菌 *Streptomyces griseobrunneus* S3 幾丁質分解酵素基因之分子選殖及抗病性轉基因蕃茄與菸草之製作。台中市：國立中興大學植物病理學系所博士論文。2020年3月10日。取自 <https://hdl.handle.net/11296/3snwtg>
- Abamectin. (1994). Extension Toxicology Network. from <http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/extoxnet/24d-captan/abamectin-ext.html>.
- 蔡東纂 (2008)。根瘤線蟲。載於行政院農業委員會動植物防疫檢疫局出品。植物保護圖鑑系列-香蕉保護 (80-82 頁)。臺北市：行政院農業委員會動植物防疫檢疫局。

表1 原生環境(校園中三處)土壤情形

土壤情形	操場(c)	大門西側(d)	榕園(r)
溫度	27-30°C	23-25°C	23°C
pH	9.0	6.5	6.5
光線	全日曝曬	半日曝曬	全日陰暗
濕度	很濕潤(灑水)	濕潤	乾燥



圖17 解剖顯微鏡下之線蟲(40X)



圖18 自製柏門氏漏斗