



Formosan Entomologist

Journal Homepage: entsocjournal.yabee.com.tw

Insecticidal and Antimicrobial Substances in Cultured Filtrates of the Symbiotic Bacterium, *Xenorhabdus indica*, from the Entomopathogenic Nematode, *Steinernema abbasi* 【Research report】

蟲生線蟲 (*Steinernema abbasi*) 共生菌 (*Xenorhabdus indica*) 培養液之殺蟲及抑菌物質 【研究報告】

Mi-Hau Tsai, Li-Cheng Tang*, and Roger F. Hou*
蔡米皓、唐立正*、侯豐男*

*通訊作者E-mail: rhoul@nchu.edu.tw, lctang@nchu.edu.tw

Received: 2012/02/06 Accepted: 2012/03/21 Available online: 2012/03/01

Abstract

In vitro culture of the symbiotic bacterium, *Xenorhabdus indica*, isolated from the entomopathogenic nematodes, *Steinernema abbasi* Taiwan isolate, caused ca. 95% mortality of *Galleria mellonella* mature larvae at 72 h after culturing, and remained ca. 93% at 96 h, indicating that this bacterium secreted insecticidal substances in its culture medium. After injection of mature larvae with different condensations of the bacterial cultured filtrates, the larval mortality of *G. mellonella* was ca. 85% with the 25-fold condensed filtrates and reached 100% with the 50-fold ones, whereas that of *Spodoptera litura* was ca. 75% with the 300-fold filtrates. The cultured filtrates could also inhibit some human pathogens tested, i.e., *Staphylococcus aureus* CCRC12652, *Escherichia coli* JM109, *Klebsiella pneumonia* CCRC10694, and *Vibrio parahaemolyticus* CCRC10806; a grass bacillus, *Bacillus subtilis*; and plant pathogenic fungi, i.e., *Peronophythora litchi*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani* (from cabbage), and *Collectotrichum* sp. (from strawberry). The cultured filtrates screened through 10 or 100 kDa molecular sieves could inhibit the growth of *B. subtilis* and *B. cinerea* while those through 3-kDa sieve could inhibit *B. subtilis* only. The filtrates sieved through a 10-kDa sieve caused 85.63 and 98.93% of necrotic rates, respectively, in an insect cell line, SF21, at 12 and 24 h post-treatment, whereas those through a 3 kDa sieve similarly caused 80.20 and 92.77% necrotic rates, respectively. However, only the filtrates through 10-kDa sieve resulted in 23.33, 75.00, and 96.67% mortality of *G. mellonella* larvae, respectively, at 6, 12, and 24 h after injection of *G. mellonella* larvae. It is thus indicated that both insecticidal and antimicrobial substances are present in the 10-kDa sieved filtrates. Proteins in the cultured filtrates were analyzed using SDS-PAGE electrophoresis. A protein band with 85 kDa of molecular weight was detected in the 100-kDa sieved filtrates while two bands with 22 and 25 kDa were found in the 10-kDa sieved filtrates. However, none were detected in the 3-kDa sieved one. On the basis of coloration tests, most of the separated molecules showed an amino acid structure. Furthermore, both exo- and endo-chitinases in the filtrates through 10-50 kDa sieves could be detected after reacting with different substrates, emitting fluorescence under the UV microscope. The concentration of lipopolysaccharide (LPS) isolated from *X. indica* was ca. 3×10^5 EU/mL, causing ca. 23, 43, and 93% mortality of *G. mellonella* larvae at 12, 24, and 36 h after injection, respectively. The LPS from *X. indica* resulted in ca. 7.67 mm of inhibition zone against a bacterium, *B. subtilis* and a fungus, *B. cinerea*, whereas that from *Xenorhabdus nematophila* caused ca. 8.00 and 5.33 mm of inhibition zone, respectively. In contrast, LPS from *E. coli* which is also an intestinal bacterium produced only ca. 1.33 mm of inhibition zone against *B. subtilis*. Therefore, the LPS from *X. indica* could inhibit both bacterial and fungal growth.

摘要

台灣產蟲生線蟲 (*Steinernema abbasi*) 之共生菌 (*Xenorhabdus indica*) 在體外培養72 h後，可造成大蠟蛾 (*Galleria mellonella*) 幼蟲95%的死亡率，至96 h仍可維持93.33%死亡率，顯示共生菌在此生長期可產生殺蟲物質。將培養濾液濃縮至25倍時能造成大蠟蛾幼蟲85%死亡率，而50倍能造成100%死亡率，但對斜紋夜蛾幼蟲濃縮300倍時，其死亡率僅為75%。濾液中所含之抗菌物質，對四種人體病原：金黃葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) CCRC12652品系、大腸桿菌 (*Escherichia coli*) JM109品系、克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumonia*) CCRC10694、腸炎弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) CCRC10806及枯草桿菌 (*Bacillus subtilis*) 等細菌及植物病原真菌，即 *Peronophythora litchi*、*Botrytis cinerea*、*Rhizoctonia solani* (Cabbage) 和 *Collectotrichum* sp. (Strawberry) 等菌株具抑制性。濾液經不同孔徑分子篩萃取後，對 *B. subtilis* 及 *B. cinerea* 具有抗生活性之物質，主要分佈在100及10 kDa分子篩中，但3 kDa分子篩萃取所得之物質只對 *B. subtilis* 有抑制效果；而對昆蟲SF21細胞株，主要在10及3 kDa。以孔徑10 kDa者所處理之細胞，經12及24 h分別引起85.63及98.93%之細胞壞死率；3 kDa者亦可造成80.20及92.77%細胞壞死率，但統計分析兩部份之壞死率則無顯著性。殺蟲物質之生物檢定結果，僅10 kDa者具殺蟲性，於注入血腔後6、12及24 h對大蠟蛾之幼蟲死亡率分別為23.33、75及96.67%，顯示10 kDa所篩之物質兼具抑菌及殺蟲性。濾液萃取物之蛋白質電泳分析，發現100 kDa分子篩物質在native gel上有一大分子，經SDS-PAGE分析結果，可見一濃縮物之條帶，分子量約為85 kDa；而10 kDa分子篩之萃取物，在電泳膠片上則有兩個條帶，其分子量約為22及25 kDa；但3 kDa萃取物在膠體則無條帶。經蛋白質之呈色反應結果，不同分子篩之篩出物均屬於蛋白質或肽之結構。在不同孔徑分子篩中萃取之濾液，50~10 kDa範圍中可測得exo及endo兩型幾丁質分解酵素。由共生菌所純化之脂多醣體 (LPS) 濃度約 3×10^5 EU/mL，於12、24及36 h後造成大蠟蛾幼蟲死亡率分別約為23、43及93%。經測試結果發現 *X. indica* 之LPS對 *B. subtilis* 及 *B. cinerea* 均可引起約7.67 mm之抑制圈；而 *X. nematophila* 約為8.00與5.33 mm，但同為腸內菌科之 *E. coli*，其LPS對 *B. subtilis* 之抑制圈僅約1.33 mm，顯示 *X. indica* 之LPS對細菌生長及真菌孢子發芽具有抑制作用。

Key words: *Steinernema abbasi*, *Xenorhabdus indica*, insecticidal and antimicrobial substance, protein, lipopolysaccharide

關鍵詞: 蟲生線蟲、共生菌、殺蟲與抑菌物質、蛋白質、脂多醣體。

Full Text:  [PDF\(3.24 MB\)](#)

下載其它卷期全文 Browse all articles in archive: <http://entsocjournal.yabee.com.tw>

蟲生線蟲 (*Steinernema abbasi*) 共生菌 (*Xenorhabdus indica*) 培養液之殺蟲及抑菌物質

蔡米皓、唐立正*、侯豐男*

國立中興大學昆蟲系 40227 台中市國光路 250 號

摘 要

台灣產蟲生線蟲 (*Steinernema abbasi*) 之共生菌 (*Xenorhabdus indica*) 在體外培養 72 h 後，可造成大蠟蛾 (*Galleria mellonella*) 幼蟲 95% 的死亡率，至 96 h 仍可維持 93.33% 死亡率，顯示共生菌在此生長期可產生殺蟲物質。將培養濾液濃縮至 25 倍時能造成大蠟蛾幼蟲 85% 死亡率，而 50 倍能造成 100% 死亡率，但對斜紋夜蛾幼蟲濃縮 300 倍時，其死亡率僅為 75%。濾液中所含之抗菌物質，對四種人體病原：金黃葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) CCRC12652 品系、大腸桿菌 (*Escherichia coli*) JM109 品系、克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*) CCRC10694、腸炎弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) CCRC10806 及枯草桿菌 (*Bacillus subtilis*) 等細菌及植物病原真菌，即 *Peronophythora litchi*、*Botrytis cinerea*、*Rhizoctonia solani* (Cabbage) 和 *Collectotrichum* sp. (Strawberry) 等菌株具抑制性。濾液經不同孔徑分子篩萃取後，對 *B. subtilis* 及 *B. cinerea* 具有抗生活性之物質，主要分佈在 100 及 10 kDa 分子篩中，但 3 kDa 分子篩萃取所得之物質只對 *B. subtilis* 有抑制效果；而對昆蟲 SF21 細胞株，主要在 10 及 3 kDa。以孔徑 10 kDa 者所處理之細胞，經 12 及 24 h 分別引起 85.63 及 98.93% 之細胞壞死率；3 kDa 者亦可造成 80.20 及 92.77% 細胞壞死率，但統計分析兩部份之壞死率則無顯著性。殺蟲物質之生物檢定結果，僅 10 kDa 者具殺蟲性，於注入血腔後 6、12 及 24 h 對大蠟蛾之幼蟲死亡率分別為 23.33、75 及 96.67%，顯示 10 kDa 所篩之物質兼具抑菌及殺蟲性。濾液萃取物之蛋白質電泳分析，發現 100 kDa 分子篩物質在 native gel 上有一大分子，經 SDS-PAGE 分析結果，可見一濃縮物之條帶，分子量約為 85 kDa；而 10 kDa 分子篩之萃取物，在電泳膠片上則有兩個條帶，其分子量約為 22 及 25 kDa；但 3 kDa 萃取物在膠體則無條帶。經蛋白質之呈色反應結果，不同分子篩之篩出物均屬於蛋白質或胍肽之結構。在不同孔徑分子篩中萃取之濾液，50~10 kDa 範圍中可測得 exo 及 endo 兩型幾丁質分解酵素。由共生菌所純化之脂多醣體 (LPS) 濃度約 3×10^5 EU/mL，於 12、24 及 36 h 後造成大蠟蛾幼蟲死亡率分別約為 23、43 及 93%。經測試結果發現 *X. indica* 之 LPS 對 *B. subtilis* 及 *B. cinerea* 均可引起約 7.67 mm 之抑制圈；而 *X. nematophila* 約為 8.00 與 5.33 mm，但同為腸內菌科之 *E. coli*，其 LPS 對 *B. subtilis* 之抑制圈僅約 1.33 mm，顯示 *X. indica* 之 LPS 對細菌生長及真菌孢子發芽具有抑制作用。

關鍵詞：蟲生線蟲、共生菌、殺蟲與抑菌物質、蛋白質、脂多醣體。

*論文聯繫人

Corresponding emails: rhou@nchu.edu.tw, lctang@nchu.edu.tw

蟲生線蟲共生菌之殺蟲及抑菌物質 1

前 言

蟲生線蟲 (entomopathogenic nematode) 中 *Steinernema* 屬之共生菌為 *Xenorhabdus* spp. 屬於革蘭氏陰性，腸內菌科 *Enterobacteraceae* 細菌。當線蟲由昆蟲自然開口 (如口、肛門及氣孔等) 侵入蟲體後，會將其腸道中共生菌釋放到血體腔中 (Kaya and Gaugler, 1993)。共生菌會抑制蟲體 phospholipase A2 活性，使寄主昆蟲免疫系統瓦解，有助於線蟲及共生菌在寄主蟲體中的生長 (Park and Kim, 2000; Park *et al.*, 2003)。在昆蟲啟動免疫反應的過程中，寄主昆蟲容易受到其他腐生病原菌的二次感染，為了維持單菌的 (monoxenic) 感染，共生菌 (*Xenorhabdus nematophila*) 會分泌廣譜及窄譜性抗生物質，如 bacteriocins，以抑制其他微生物的生長 (Akhurst, 1982; Boemare *et al.*, 1992)。有關共生菌在抗菌的研究，Dutky (1959) 即已推測 *Steinernema* 之共生菌具有抗微生物之能力，但直至 Paul *et al.* (1981) 才鑑定 *Xenorhabdus* spp. 會產生一些新的抗菌化合物，爾後這些物質的化學結構及生物活性陸續受到證實 (Frost and Nealon, 1996; Li *et al.*, 1998; Webster *et al.*, 1998)。

吾人已知 *Xenorhabdus* 和 *Photorhabdus* 兩屬共生菌會產生具抗菌之二次代謝產物，*Xenorhabdus* spp. 經培養後產生抗菌物質，對革蘭氏陽性細菌如 *Micrococcus*、*Staphylococcus*、*Bacillus* 等，陰性細菌如 *Escherichia*、*Shigella*、*Enterobacter*、*Serratia*、*Proteus*、*Erwinia*、*Flavobacterium*、*Pseudomonas* 等，及酵母菌，如 *Candida* 和 *Saccharomyces* 等具抑制活性 (Akhurst, 1982)。目前發現這些抗菌物質為 dithiopyrrolone 之衍生物，訂名為

xenorhabdins，其中 *xenorhabdins 2* 也具有殺蟲活性，施用 150 μg 時，可造成 *Heliothis punctigera* 幼蟲的 100% 死亡率 (McInerney *et al.*, 1991a)。至今已發現超過 30 種抗生物質，包括 hydroxystilbenes、indoles、*xenorhabdins*、*xenocoumacins*、*xenorxides*、*nematophin*、benzylacetone 等 (Paul *et al.*, 1981; McInerney *et al.*, 1991a, b; Li *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1998; Ji *et al.*, 2004)。這些代謝物除化學結構各異外，亦具有廣泛的醫藥及農業效益之生物特性，如抗生素 (antibiotic)、抗真菌素 (antimycotic)、殺蟲 (insecticidal)、殺線蟲 (nematocidal)、抗潰瘍 (antiulcer)、抗腫瘤 (antineoplastic) 及抗病毒 (antiviral) 的作用 (Webster *et al.*, 2002)。

Ensign *et al.* (1990) 在共生菌 *Photorhabdus* 培養液中突破性發現一大分子，具殺蟲活性。*Photorhabdus luminescens* W14 為目前共生菌在殺蟲蛋白研究上最詳細的菌株，此蛋白為一高分子量複合物，對菸草天蛾 (*Manduca sexta*) 幼蟲具胃毒性 (Bowen *et al.*, 1998)，但卻具熱不穩定，經 HPLC 分析出由四種蛋白質所組成的蛋白複合物，訂為 Tca、Tcb、Tcc 及 Tcd，其中 Tca 和 Tcd 對 *M. sexta* 具胃毒性，將其注入蟲體可造成幼蟲死亡，隨後在 *X. nematophila* 也發現上述物質 (Bowen *et al.*, 1998; Sergeant *et al.*, 2003)，其分子量為 39 kDa (Ryu *et al.*, 2000)。此毒蛋白複合物也存在其他細菌中，但這些細菌與昆蟲間並無關聯性。在 *X. nematophila* strain BJ 也陸續發現大分子 Xin 毒質 (Pan *et al.*, 2002)。由 *P. luminescens* strain TT01 所產生者，稱之為 PhlA hemolysin (Brillard *et al.*, 2002)。在 *X. nematophila* strain A24 也發現另一新的

殺蟲蛋白，其分子量為 42 kDa (Brown *et al.*, 2006)。

有些共生菌株會產生幾丁質分解酵素異構體 (chitinase isoforms)，其分子量約為 38.8 kDa (Chen *et al.*, 1996)。幾丁質分解酵素具有促進抗真菌活性的作用，會分解真菌細胞壁 (Chen *et al.*, 1994; Isaacson, 2000)。有些幾丁質分解酵素具有溶菌酶 (lysozyme) 的活性，會水解細菌細胞壁上的 peptidoglycans，也具有抗細菌 (antibacterial) 活性。由 *Xenorhabdus* 和 *Photorhabdus* 所產生的 endo 及 exo 幾丁質分解酵素，會抑制分生孢子 (conidia) 的發芽及菌絲的生長，但不具有溶菌酶活性，此酵素的質與量因不同的 species 和 strains 而有所差異 (Chen, 1996)。

當共生菌一旦進入昆蟲血體腔中，無論死或活的菌體，均會釋放出脂多醣體 (lipopolysaccharide, LPS)，此乃因破壞血球與 LPS 結構之脂肪酸上 lipid A 有關 (Dunphy and Webster, 1988a, b)。LPS 也會抑制體液防禦系統之原酚氧化酵素 (prophenoloxidase) 活性，儘管 LPS 對細胞及血球防禦系統均有害，但純化後之 LPS 注入大蠟蛾幼蟲體中仍無法使幼蟲死亡 (Clarke and Dowds, 1991)。

本研究室已報告台灣產蟲生線蟲 (*Steinernema abbasi*) 之共生菌為 *Xenorhabdus indica* (Liao *et al.*, 2001; Tsai *et al.*, 2008)，在培養之濾液中發現具有抗菌及能引起 SF21 細胞株壞死之物質 (Tsai *et al.*, 2011)。在過去的研究中，對共生菌 *X. indica* 之殺蟲及抗菌代謝物分析並無報告，故本文主要接續進行此共生菌所產生之抗菌及殺蟲物質的純化與其 LPS 在抗菌及殺蟲活性之測試，以供未來在微生物製劑開發之參考。

材料與方法

一、供試昆蟲及蟲生線蟲

斜紋夜蛾 (*Spodoptera litura*) 係自田間採集之卵塊，所孵化之幼蟲後以人工飼料 (OuYang and Chu, 1988) 餵飼，並置於 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 之定溫箱中 ($70 \pm 10\% \text{RH}$, 12L : 12D) 進行累代飼育。室內所飼之大蠟蛾 (*Galleria mellonella*) 蟲群於飼育箱 ($30 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\% \text{RH}$, 13L : 11D) 中，以人工飼料 (麥粉 250 g、奶粉 100 g、甘油 150 g、蜂蜜 150 mL) 進行累代飼育，以備試驗之用。

台灣產之蟲生線蟲 (*S. abbasi*) 係已在本研究室於 1998 年由花蓮縣所採集之品系 (Liao *et al.*, 2001)。以斜紋夜蛾六齡幼蟲進行活體繼代培養，當其侵染性幼期 (infective juveniles, IJs) 由幼蟲屍體內移出時，用 White trap (White, 1927) 收集，以海綿吸附保存於 20°C 全黑暗定溫箱 ($90 \pm 10\% \text{RH}$) 中備用。

二、共生菌分離與培養

將 *S. abbasi* 以接觸侵染斜紋夜蛾或大蠟蛾幼蟲，待 48 h 後蟲體死亡，取出其體液培養於 NBTA (每公升含：peptone 5.0 g、beef extract 3.0 g、agar 5.0 g、bromothymol blue 0.025 g 及 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride 0.04 g) (Akhurst, 1980) 平板上，置於全黑暗生長箱 ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) 中培養 2~3 天後，挑取單一藍綠色菌落 (single colony)，經反覆純化三次得到共生菌原生型菌株。將純化後之共生菌以 nutrient broth (NB; 每公升含：peptone 5.0 g、beef extract 3.0 g、agar 15 g, pH 7.0) 培養基於全黑暗 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 生長箱中震盪培養 (150 rpm、48 h)，以供後續試驗之用。次生

型菌落是在原生型菌培養的過程中分離所得，在 NBTA 培養基上呈現紅色菌落周圍有透明多醣體，培養方式依原生型菌培養方式培養，震盪培養時間為 24 h。

三、昆蟲細胞株之培養

將所保存的 IPLB-SF-21 AE SF21 (*Spodoptera frugiperda* SF21) 以 Grace's insect medium (Gibco BRL, NY, USA) 內含 10% fetal bovine serum (Biological Industries, Israel) 培養，待形成細胞單層 (monolayer) 進行繼代培養，供作小量殺蟲物質試驗之用。

四、共生菌脂多醣體 (LPS) 分離及定量

依據 Yi and Hackett (2000) 方法加以修改以便能快速少量萃取 LPS。依共生菌的培養方式，先將菌體培養於 NB medium 中進行震盪 (150 rpm, 25°C) 培養 48 h 後，離心 (6,000 rpm) 20 min，去除上清液，再以無菌水漂洗一次。離心後的 pellet (10 mL 菌液) 加入 1.0 mL Tri-Reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA) 再懸浮，置於室溫下 15 min，加入 200 μ L chloroform，經震盪後並置於室溫下 15 min，離心 (12,000 rpm) 10 min，取上清液，再加入無菌水回溶剩餘的脂多醣體，震盪後靜置 15~30 min，再離心，此步驟重複 2~3 次，將所萃取所得的脂多醣體上清液混合後以 3 MW 孔徑的分子篩 (Millipore Corporation, Bedford, MA, U.S.A.) 加無菌水離心去鹽，再進行冷凍乾燥，加入 200 μ L ddH₂O 進行回溶。由於在 LPS 純化過程中容易受核酸及蛋白質的污染，故以 RNase (8 mg/mL) 及 DNase (10 mg/mL) 作用 1 h，去除核酸，再以 Proteinase K (20 μ g/mL) 37°C 作用 1 h

去除 RNase、DNase 和菌體的蛋白質，在 65°C、20 min 去除 Proteinase K 活性，再以離心濃縮管 Centriplus YM-3 (Centrifugal Filter Unit, 3000 MWCO)，以 ddH₂O 漂洗濃縮去除雜質及核酸及蛋白質分解酶，完成 LPS 製備。

LPS 之定量乃依據 CoA 表 (Certificate of Analysis)，配置 50 EU/mL 濃度之 CSE (control standard endotoxin)，將 10 ng/vial CSE 加入適量無熱原水 (Lal Reagent Water, LRW)，以 parafilm 封好瓶口，震盪 30~60 min，充分混合後備用。另配置序列濃度之標準品，以五倍序列稀釋為 6.25、1.25、0.25、0.05 及 0.01 EU/mL。將製備完成之共生菌 LPS 及粗萃取之 10 kDa 共生菌代謝物，以 LRW 稀釋為 5、50、100、200 及 400 倍等不同濃度樣本。另配置 Spike 樣本，濃度為 0.25 EU/mL。配置 LAL 試劑，取 3.2 mL pyrochrome buffer 加入 pyrochrome vial 內，以 parafilm 封住瓶口，緩和混合均勻 1 min，靜置 5 min 以上。分別將 LRW、序列濃度標準品、不同濃度樣本及 Spike 樣本，各取 50 μ L 加入 96 孔盤中，每個濃度三重複。在 96 孔盤中，在 1 min 內各加入 50 μ L LAL 試劑，立即將 96 孔盤置入 ELISA reader (Versa MaxTM, Molecular Devices) 內進行判讀，每次判讀前需震盪 5~30 sec。儀器軟體 (Softmax[®] Pro) 之參數設定，為控溫在 37 \pm 1°C，設定動力學模式，判讀波長為 405 nm，時間為 80~100 min，每 10~30 sec 判讀一次，資料處理模式為 Onset OD 設為 0.03 之絕對值，而以第一次讀取之 OD 值為 baseline 做背景扣除。

五、共生菌不同培養時間之濾液對大蠶蛾幼蟲死亡率之影響

依上述共生菌培養方式進行液體培養，每 24 h 取樣一次，將培養液以 0.22 μL Millipore 濾膜過濾，再進行冷凍乾燥，並濃縮為 30 倍（體積比）之濃縮液，以微量注射器注入大蠟蛾末齡幼蟲體腔中，15 $\mu\text{L}/\text{larva}$ ，以注入 30 倍 NB medium 作為對照組，三重複，每個處理 20 隻幼蟲，24 h 後觀察記錄幼蟲死亡率。

六、共生菌培養濾液抗菌及殺蟲物質生物活性之測定

(一) 抗菌物質活性分析

抗菌活性分析主要依據 Cherif *et al.* (2003) 方法進行。利用人體及植物病原微生物計 15 種，包括金黃葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) CCRC12652 品系、大腸桿菌 (*Escherichia coli*) JM109 品系、克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*) CCRC10694、腸炎弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) CCRC10806、枯草芽孢桿菌 (*Bacillus subtilis*)、荔枝露疫病菌 (*Peronophythora litchi*)、灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*)、立枯絲核菌 (*Rhizoctonia solani* (Cabbage))、*Rhizoctonia solani* (AG-4)、炭疽病菌 (草莓) (*Collectotrichum sp.* (Strawberry))、椒炭疽病菌 (*Collectotrichum capsici*)、*Pseudocerospora sp.* (Loquat)、*Pythium aphanideratum*、*Pythium spinosum* 及 *Pythium sylvaticum* (\uparrow)。供試微生物活性分析平板之製備，係將病原細菌懸浮於無菌水，取 50 μL 分別加入 trypticase soy agar (TSA: 1.5% trypticase peptone, 0.5% phytone peptone, 0.5% NaCl, 1.5% agar) 及 nutrient agar (NA; DifcoTM) 平板上，以 L 型玻棒塗勻，而真菌則以鑽孔器鑽取直徑 1 cm 之菌絲塊，以移植環挑取培養於 potato dextrose agar (PDA; DifcoTM) 平板

上備用。將震盪培養 72 h 之共生菌培養液，離心 (8,000 rpm, 20 min)，取上清液，再以 0.22 μL Millipore 濾膜過濾。將濾液進行冷凍乾燥濃縮成 10 倍液，再以直徑 5 mm 之圓盤濾紙 (paper disc) 貼於預先備用之供試微生物平板上，取 20 μL 濃縮液滴於濾紙塊，分別置於 37 及 25°C 生長箱中，觀察並記錄抑制圈大小，每處理三重複。抗菌活性各以抑制圈大小來表示：0.1~1.0 mm，+；1.1~2.0 mm，++；2.1~3.0 mm，+++；3.1~4.0 mm，++++；4.1~5.0 mm，+++++；5.1~6.0 mm，++++++；6.1~7.0 mm，+++++++，而以 10 倍 NB medium 做為對照組。

(二) 共生菌濾液濃度對大蠟蛾及斜紋夜蛾幼蟲死亡率之影響

將培養 72 h 之共生菌培養液，以 0.22 μL Millipore 濾膜過濾後，進行冷凍乾燥，因共生菌在 *In vitro* 培養基中分泌之殺蟲物質不高，需濃縮後再進行。將無菌之濾液濃縮成 300 倍（體積比），再以 PBS buffer (Na_2HPO_4 1.44 g、 KH_2HPO_4 0.24 g、NaCl 8.0 g、KCl 0.2 g per liter、pH 7.4) 調整為 10、25、50、100、200 及 300 倍等六種濃度，以微量注射器由大蠟蛾及斜紋夜蛾幼蟲腹部末端倒數第 2~3 節之節間膜注入幼蟲體腔中 (15 $\mu\text{L}/\text{larva}$)，以注入 300 倍 NB medium 做為對照，共進行三重複，每個處理 20 隻幼蟲，48 h 後觀察並記錄死亡率。

七、共生菌培養濾液抗菌及殺蟲物質之純化與活性測定

依共生菌培養方式，將培養 72 h 之培養液，以 0.22 μL Millipore 濾膜過濾後，濾液再分別以孔徑 100、50、30、10 及 3kDa 分子篩 (Vivaspine, GE, USA) 分離，利用離心方式依分子大小進行濃縮，轉速參考

Vivaspine concentrator 提供之轉速進行，所得各大小分子之濃縮物以無菌 PBS buffer 漂洗三次，並調整濃度為 50 倍，各別置於微量離心管中備用。

(一) 抗菌活性分析

以 *B. subtilis* 及 *B. cinerea* 為共生菌常用於抗生活性分析之標準菌株。將配製分子大小不同之粗萃取物，以濾紙片之抗生測試法進行活性分析。各分子大小粗萃取之代謝物分別以 Proteinase K (20 µg/mL)、37°C 處理隔夜後，再以 65°C 加熱 10 min，以去除 Proteinase K 活性；另一處理，為各分子大小粗萃取之代謝物，以 autoclave 處理 20 min，置於冰上冷卻後備用。將細菌及孢子懸浮液，取 50 µL 各別塗於 NA 及 PDA medium 平板上，再將圓形濾紙片貼於平板上。每個濾紙片滴入 20 µL，每個處理三重複，以 50 倍之 NB medium 做為對照組，置於 25°C 定溫箱中培養，觀察並記錄抑制圈大小。

(二) 殺蟲活性分析

將配製分子大小不同之代謝物，先進行 SF21 細胞株測試，因細胞對代謝物較為敏感，需將代謝物濃度調整為 1 倍後，加入 10% 劑量於預先準備之 SF21 細胞培養皿中，置於 25°C 定溫箱中培養，觀察並記錄細胞壞死率，以 NB medium 作為對照。另將不同分子大小之粗萃取物 (50 倍) 以微量注射法，由大蠟蛾末齡幼蟲腹部之倒數 2~3 節間膜注入體腔中，15 µL/larva，共進行三重複，每處理 20 隻幼蟲，於 6、12 及 24 h 觀察並記錄幼蟲死亡率。

八、共生菌代謝物之粗萃取物蛋白質電泳分析及殺蟲物質之生物檢定

以 SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) 電泳法分析，採用 10%

separating gel 及 5% stacking gel 進行之。

(一) 電泳

洗淨樣品槽後，即可架至電泳槽內，並注入 1 倍 running buffer (14.4 g, glycine; 3 g, Tris-base; 1 g, SDS/L; pH 8.3)。取 20 µL 50 倍濃縮之粗萃取液與 1 × SDS-sample buffer (tracking dye: 1 mg, bromophenol blue, 5 mL, glycerol 溶於 5 mL 水)，混勻後於 95°C 加熱 2~5 min。冷卻後以微量吸管吸取注入樣品槽中，Marker 係採用 Pre-stained middle Marker。裝上電源蓋，先以 60 V 通電 30 min，再以 120 V 進行電泳，待追蹤染劑 (tracking dye) 藍色細線泳動到底部 (約 60 min) 即可終止電泳。置於染色盒，繼續膠片染色方法。Native-PAGE 所用之 running buffer，依上述方式製備，去除 SDS 成分以去離子水補其量即可完成。

(二) 膠片染色及乾燥

將染色液 (0.2% coomassie brilliant blue R-250 (CBR), 40% methanol, 10% acetic acid) 倒入盒中，置於搖盪器上染色 60 min。以少量脫色液 (40% ethanol, 10% acetic acid) 清洗膠片，再加入較適量脫色液脫色，直到膠片的藍色背景逐漸退去。約每 30 min 更換一次脫色液，約三次後可見蛋白質的清晰藍色彩帶出現。把玻璃紙先用水浸濕，平鋪於玻璃片上，把膠片平鋪在玻璃紙中央，去除氣泡，以塑膠條及夾子將邊緣固定，直至乾燥後保存。

(三) 殺蟲物質之生物檢定

由共生菌培養濾液中殺蟲物質的測定結果，在 10 kDa 分子篩所濃縮之代謝物具殺蟲物質，將此部分萃取物，以 10% Native-PAGE 電泳分析後，用刀片切下一條 lane，進行染色後再退染，將染色完成之膠體，與未染色比對，分別在相對位置將條帶切下，以滅菌過岩

玻磨碎，加入等量之無菌水回溶後短暫離心 (1,300 rpm, 30 sec)，取上清液，以微量注射器注入大蠟蛾末齡幼蟲體；另將此兩物質以等比例混合，進行生物檢定，15 $\mu\text{L}/\text{larva}$ ，每個處理 10 隻幼蟲。以 Native- PAGE 之空白膠體磨碎後，懸浮於無菌水中，短暫離心，取上清液作為對照，觀察並記錄幼蟲死亡率。

九、抗菌及殺蟲物質胺基酸與蛋白質之呈色反應

由孔徑 100、10 及 3 kDa 分子篩所分離具殺蟲及抗菌之粗萃取物，經 Native-PAGE 電泳分析後，用刀片切下一條 lane，進行染色及退染，與未染色之膠體比對，將相對位置之主要條帶切下，以滅菌過岩玻磨碎加入等體積之無菌水溶出蛋白，置於微量離心管中，離心 (1,300 rpm, 30 sec)，取上清液作為待測液，以 BSA 及 ddH₂O 作為對照。3 kDa 物質則以分子篩所分離之物質，以無菌水漂洗三次後進行呈色反應測定。

(一) Ninhydrin test

針對具有 α -胺基及羧基之胺基酸和蛋白質進行呈色反應。取 50 μL 待測液置於試管中，加入 10 μL ninhydrin solution (0.2% ninhydrin 溶於 95% 酒精溶液中)，以沸水浴加熱 3~4 min 後，取出冷卻後觀察並記錄結果。

(二) Biuret test

本方法用來偵測待測液中蛋白質或胜肽之存在，當待測液中含有蛋白質或胜肽，以鹼性硫酸銅稀液處理時，會形成粉紫紅色至深紫紅色 (purple violet) 之配位複合物。取 50 μL 待測液置於試管中，並準備一試管加 1 mL 的水以做對照，加入 10 μL 硫酸銅溶液，再加入 1 mL 10% NaOH 後混合均勻，觀察並記錄結果。Peptides 越長，反應所產生之顏色越深。

(三) Xanthoproteic test

針對苯環脂蛋白質或胺基酸，經濃硝酸消化後產生黃色物質 (硝基苯衍生物)，經加氨水則轉為橙色 (銨鹽)。取 50 μL 待測液置於試管中，加入等體積之濃硝酸 (變白濁狀)，在沸水浴中加熱 1~2 min (變黃色)，待冷卻後，逐滴加入濃氨水至橙色出現為止，觀察並記錄結果。

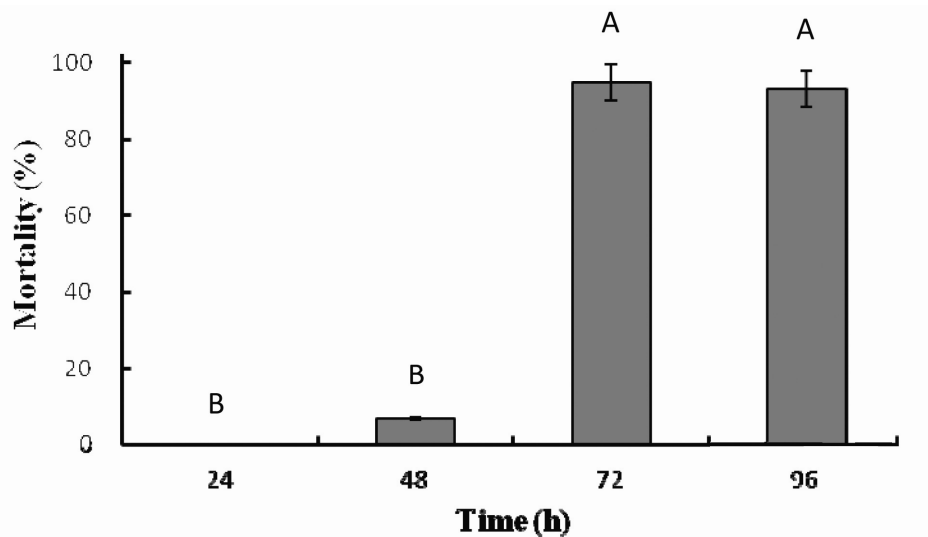
十、共生菌濾液粗萃取物基丁質分解酵素活性測定

由不同孔徑分子篩所分離共生菌濾液之粗萃取物，分別進行 exo 及 endo chitinase 測試。在 exo-chitinase 測定，分別取 5 μL 測定液於微量離心管中和 45 μL exo-chitinase 測試基質 4MU-(GlcNAc)₃ (0.1 mg/mL) 混合，置於 37 $^{\circ}\text{C}$ 定溫箱中反應 1 h: endo-chitinase 測定，方法同 exo-chitinase 測定，以 4MU-(GlcNAc)₂ (0.1 mg/mL) 溶液作為 endo-chitinase 測試基質。當基質 4MU-(GlcNAc)₃ 和 4MU-(GlcNAc)₂ 被分解後，會將螢光分子釋放出來。於紫外光下觀察螢光呈色情形，以 NB medium 做為對照組。

十一、共生菌 (*Xenorhabdus indica*) 脂多醣體 (LPS) 對大蠟蛾幼蟲及 *Bacillus subtilis* 與 *Botrytis cinerea* 活性之影響

由共生菌萃取所得之 LPS，經定量後以十倍序列稀釋成 30、300、3,000、30,000 及 300,000 EU/mL 等五個濃度，分別以微量注射器注入大蠟蛾末齡幼蟲體腔中，15 $\mu\text{L}/\text{larva}$ ，共進行三重複，每個濃度處理 10 隻幼蟲，觀察並記錄死亡率。

將 *E. coli* 及 *X. nematophila* 培養在 NB medium 中，各別培養 24 及 48 h 後之細菌數達最大時，依 LPS 萃取方法進行萃取。並依



圖一 共生菌 (*Xenorhabdus indica*) 在不同培養時間所產生之殺蟲物質對大蠟蛾幼蟲之死亡率。在 Tukey's 顯著差異分析，字母相同者則表示無顯著差異。

Fig. 1. Mortality of *Galleria mellonella* larvae treated with cultured filtrates of *Xenorhabdus indica* at different times after incubation. Means followed by the same letter are not significantly different at 5% level according to Tukey's studentized range test.

上述之抗生活性測試方式，將 *B. subtilis* 與 *B. cinerea* 平板，每個濾紙滴入 20 μ L LPS，分別置於 25°C 定溫箱中培養，觀察並記錄抑制圈大小。

十二、統計分析

利用 SPSS (Statistical Products and Services Solutions) 統計軟體計算其平均值及標準差，再利用二因子變異數分析 (ANOVA)，採 $p < 0.05$ 顯著水準比較各處理差異之顯著性，在進行 Tukey's studentized range test (HSD) 比較處理間之差異。

結 果

一、共生菌不同培養時間之濾液對大蠟蛾幼蟲致死之影響

共生菌於 NB medium 中培養，在 48 h 即開始分泌可使大蠟蛾幼蟲死亡之物質，其死亡率為 6.67%；至 72 h 時達最大量，死亡率可達 95%；至 96 h 仍可維持 93.33% 的死亡率。顯示共生菌在液體培養中，能產生殺蟲物質；在進入靜止期開始產生，培養至 72 h 達最高峰，但至 96 h，所分泌之致死物質無再增加 (圖一)，此結果可供作代謝物分析之參考。

二、共生菌培養濾液中抗菌及殺蟲物質生物活性之測定

(一) 抗菌物質活性分析

共生菌在 NB medium 中所分泌之物質，對四種人體病原，即 *S. aureus* CCRC12652、*E. coli* JM109、*K. pneumonia* CCRC10694、*V. parahaemolyticus* CCRC10806 及細菌 *B. subtilis*，和植物病原真菌，*P. litchi*、*B.*

表一 共生菌 (*Xenorhabdus indica*) 濾液之抗微生物活性

Table 1. Antimicrobial activity of *Xenorhabdus indica* cultured filtrates from *Steinernema abbasi* Taiwan strain

Strains	Antimicrobial activity ^a
<i>Staphylococcus aureus</i> CCRC12652	++++
<i>Escherichia coli</i> JM109	+++
<i>Klebsiella pneumonia</i> CCRC10694	+++
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> CCRC10806	+++++
<i>Bacillus subtilis</i>	++++
<i>Peronophythora litchi</i>	++
<i>Botrytis cinerea</i>	++++
<i>Rhizoctonia solani</i> (Cabbage)	++
<i>Rhizoctonia solani</i> (AG-4)	-
<i>Collectotrichum</i> sp. (Strawberry)	+++++++
<i>Collectotrichum capsici</i>	-
<i>Pseudocerospora</i> sp. (Loquat)	-
<i>Pythium aphanideratum</i>	-
<i>Pythium spinosum</i>	-
<i>Pythium sylvaticum</i> (♂)	-

^a Scales based on size of clear ring: “+”, 0.1-1.0 mm; “++”, 1.1-2.0 mm; “+++”, 2.1-3.0 mm; “++++”, 3.1-4.0 mm; “+++++”, 4.1-5.0 mm; “++++++”, 5.1-6.0 mm; “+++++++”, 6.1-7.0 mm. ; “-”, no inhibition zone.

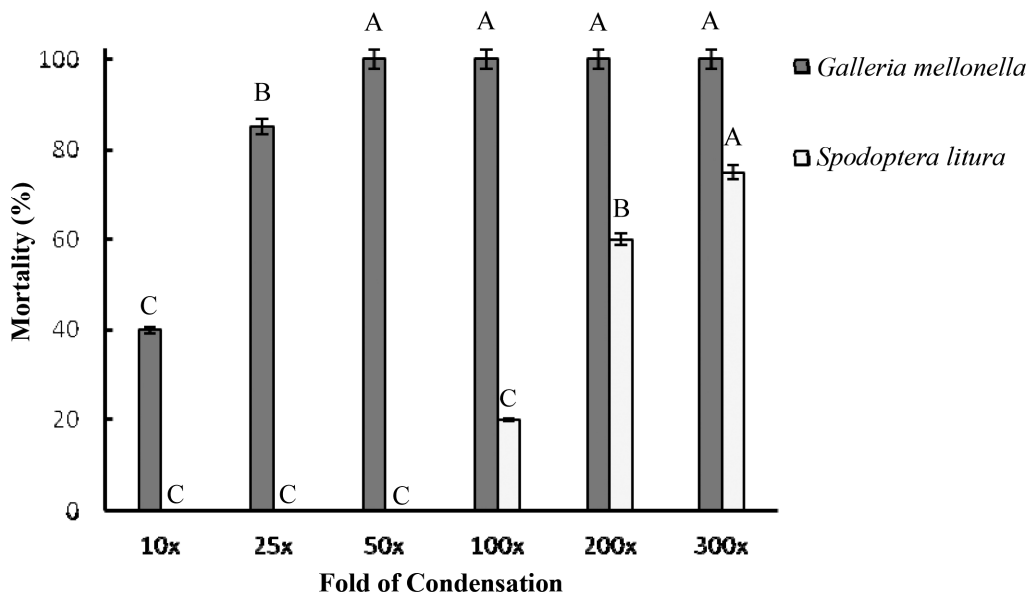
cinerea、*R. solani* (Cabbage)、*Collectotrichum* sp. (Strawberry) 等均具抑制效果，而其他受測植物病原真菌則無 (表一)。此結果顯示，共生菌培養液中可分泌對真菌及細菌之廣效性抑菌物質。

(二) 共生菌濾液濃度對大蠟蛾及斜紋夜蛾幼蟲致死之影響

共生菌培養濾液濃縮 10 倍對大蠟蛾幼蟲之死亡率為 40%，濃縮 25 倍時達 85%，至 50 倍時可達 100%。濾液濃度對斜紋夜蛾末齡幼蟲試驗結果，濃縮至 100 倍時死亡率為 20%；200 倍時為 60%；至 300 倍時死亡率亦相仿 (圖二)。顯示共生菌可於培養基中分泌殺蟲物質；但對斜紋夜蛾幼蟲需要較高濃度才能造成死亡，其比大蠟蛾幼蟲具較高的忍受性；而大蠟蛾幼蟲對共生菌所產生之殺蟲物質較敏感，故後續蟲體生物活性試驗均以大蠟蛾末齡幼蟲進行。

三、共生菌培養濾液其抑菌及殺蟲物質之純化與活性測定

以共生菌培養濾液用不同孔徑濃縮管所分離之粗萃取物測定，對 *B. subtilis* 之抗菌活性測試，經統計分析結果，原液及經 **Proteinase K** 處理者之間無顯著性 ($p = 0.069$)，而與經高溫高壓處理者具有顯著差異 ($p = 0.002$)，顯示高溫會破壞此物質對 *B. subtilis* 之活性；而活性物質之分子大小，分佈在 100、10 及 3 kDa 之範圍，以 **HSD test** 分析皆具有顯著差異 (表二)。對 *B. cinerea* 測試結果，原液及經 **Proteinase K** 處理者之間無顯著性 ($p = 0.73$)，與經高溫高壓處理者具有顯著差異 ($p = 0.017$)，且抑制效果優於前兩者；活性物質則分佈在 100 及 10 kDa 範圍中，在統計分析上並無顯著差異 (表二)。以上結果顯示活性代謝物經 **autoclave** 處理後對真菌及細菌的抑菌效果各異，對 *B. subtilis* 抑制效果降低，但對 *B. cinerea* 反而增加；而



圖二 不同濃縮倍數之共生菌 (*Xenorhabdus indica*) 培養液對大蠟蛾及斜紋夜蛾幼蟲之死亡率。在 Tukey's 顯著差異分析，字母相同者則表示無顯著差異。

Fig. 2. Mortality of *Galleria mellonella* and *Spodoptera litura* larvae caused by cultured filtrates of *Xenorhabdus indica* at different folds of condensation. Means followed by the same letter are not significantly different at 5% level according to Tukey's studentized range test.

Proteinase K 處理對代謝物之抗生效果則無影響，表示抑菌物質不被 Proteinase K 所分解；100 及 10 kDa 分子篩所濃縮之代謝物對此兩種菌株均具有抑制作用，而 3 kDa 分子篩所分離之代謝物只對 *B. subtilis* 具有活性。

共生菌培養液經分子篩濃縮後，能引起 SF21 細胞株壞死之物質，主要分佈在 10 及 3 kDa 之範圍，分子篩孔徑 10 kDa 所分離之粗萃取物對 SF21，在 12 及 24 h 分別造成 85.63 ± 4.60 及 $98.93 \pm 1.00\%$ 之細胞壞死率；在 3 kDa 所分離之代謝物亦可造成 80.20 ± 4.78 及 $92.77 \pm 2.58\%$ 之細胞壞死率；統計分析結果，此兩種孔徑分子篩所分離之代謝物，對 SF21 所造成之細胞壞死率無顯著差異（表三）。

以微量注射法將不同孔徑之分子篩所分

離濃縮之粗萃取物注入大蠟蛾幼蟲體中，僅在 10 kDa 者含殺蟲之物質，於 6、12 及 24 h 對幼蟲造成之死亡率分別為 23.33 ± 5.77 、 75.00 ± 8.66 及 $96.67 \pm 5.77\%$ ，而其他孔徑所濃縮之代謝物對幼蟲死亡率在統計分析上無顯著性（表四）。此顯示能造成大蠟蛾幼蟲死亡之物質，主要分佈在 10 kDa 孔徑分子篩之中。

四、共生菌培養液之蛋白質電泳分析

共生菌抗菌及殺蟲物質之蛋白質電泳分析，100 kDa 分子篩所濃縮之培養液，經 10% SDS-PAGE 膠體電泳分析後，有一主要條帶，此抑菌物質之分子量約為 85 kDa（圖三 A），再經 10% Native-PAGE 膠體電泳分析結果，在膠體上方有一分子量較大之物質（圖三 B）。經 10 kDa 分子篩所濃縮之粗萃取物，電

表二 共生菌 (*Xenorhabdus indica*) 培養液經不同孔徑分子篩分離之萃取物對 *Bacillus subtilis* 及 *Botrytis cinerea* 之抑制圈

Table 2. Inhibition zone of *Bacillus subtilis* and *Botrytis cinerea* caused by cultured filtrates of *Xenorhabdus indica* through various molecular weight sieves

Sieve size	Inhibition zone (mm) (Mean ± SD)*					
	<i>Bacillus subtilis</i>			<i>Botrytis cinerea</i>		
	Stock solution	Stock solution plus Proteinase K (20 µg/mL)	Stock solution (autoclaved)	Stock solution	Stock solution plus Proteinase K (20 µg/mL)	Stock solution (autoclaved)
NB medium	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 b	0.00 c	0.00 b
100 kDa	4.33 ± 0.58 b	4.33 ± 0.58 b	3.67 ± 0.58 b	6.33 ± 1.53 a	5.67 ± 2.08 a	7.33 ± 1.15 a
50 kDa	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 b	0.00 c	0.00 b
30 kDa	1.00 ± 0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 b	1.33 ± 0.58 b	0.00 b
10 kDa	5.33 ± 0.58 a	5.00 ± 0.00 a	5.00 ± 1.00 a	5.67 ± 0.58 a	5.67 ± 0.58 a	8.00 ± 1.00 a
3 kDa	3.33 ± 0.58 c	3.33 ± 0.58 c	2.33 ± 0.58 c	0.00 b	0.00 c	0.00 b

* Means followed by the same letter are not significantly different at 5% level according to Tukey's studentized range test.

表三 共生菌 (*Xenorhabdus indica*) 培養濾液經不同孔徑分子篩分離之萃取物引起 SF21 細胞株之壞死率

Table 3. Necrotic rate of SF21 cell line treated with cultured filtrates of *Xenorhabdus indica* through various molecular weight sieves

Sieve size	Necrotic rate (%) (Mean ± SD)*	
	12 h	24 h
NB medium	0.00 b	0.00 c
30 kDa	0.00 b	19.90 ± 5.20 b
10 kDa	85.63 ± 4.60 a	98.93 ± 1.00 a
3 kDa	80.20 ± 4.78 a	92.77 ± 2.58 a

* Means followed by the same letter are not significantly different at 5% level according to Tukey's studentized range test.

泳分析圖中有兩個主要條帶，其分子量分別約為 22 及 25 kDa (圖三 C)，再經 10% Native-PAGE 膠體電泳分析結果，同樣具有兩條分別屬於相同性質之條帶 (圖三 D)。但孔徑 3 kDa 分子篩之濃縮物，在兩種 PAGE 分析上並無明顯條帶產生。

孔徑 10 kDa 分子篩所濃縮之粗萃取物，經 Native-PAGE 膠體電泳分析，得到兩個不同大小之物質，各別進行大蠟蛾幼蟲之生物檢定。分子量為 22 kDa 之物質，注入大蠟蛾幼

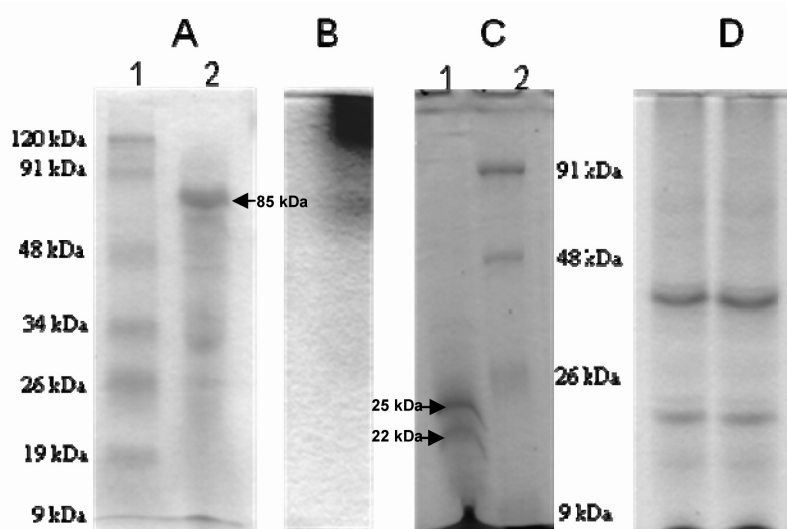
蟲體內，於 12 至 72 h 觀察對大蠟蛾幼蟲可造成 40 至 50% 死亡率；分子量 25 kDa 之物質，注入 12 至 72 h，對幼蟲僅造成 30% 死亡率。將兩種物質以等量混合，注入幼蟲體內，於 12、24、36、48、60 及 72 h 後觀察，分別可造成約 30、40、40、60、70 及 80% 死亡率 (圖四)。此結果顯示此兩種不同分子量之物質，分別均能殺死幼蟲；而其混合液所引起幼蟲死亡率大於個別注入者，表示兩種物質具協力作用。

表四 共生菌 (*Xenorhabdus indica*) 培養濾液經不同孔徑分子篩分離之萃取物對大蠟蛾 (*Galleria mellonella*) 末齡幼蟲之死亡率

Table 4. Mortality of *Galleria mellonella* treated with cultured filtrates of *Xenorhabdus indica* through various molecular weight sieves

Sieve size	Mortality (%) (Mean \pm SD)*		
	6 h	12 h	24 h
NB medium	0.00 b	0.00 b	3.33 \pm 5.77 b
30 kDa	0.00 b	0.00 b	6.67 \pm 5.77 b
10 kDa	23.33 \pm 5.77 a	75.00 \pm 8.66 a	96.67 \pm 5.77 a
3 kDa	0.00 b	0.00 b	6.67 \pm 5.77 b

* Means followed by the same letter are not significantly different at 5% level according to Tukey's studentized range test.



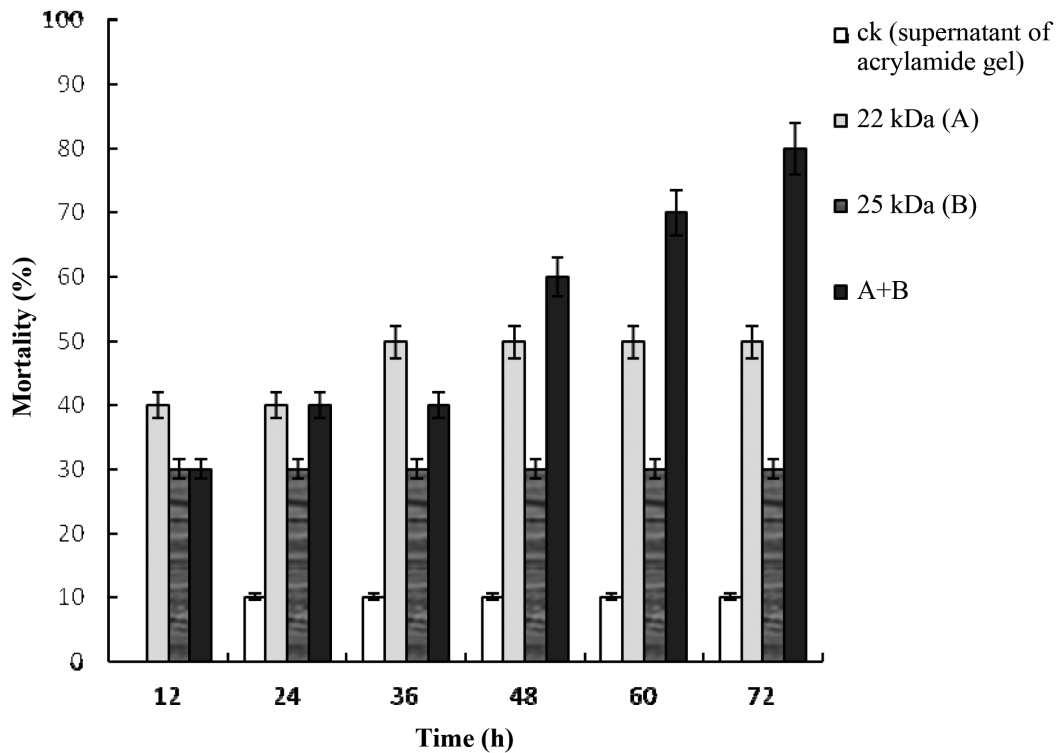
圖三 共生菌 (*Xenorhabdus indica*) 代謝物之粗萃取蛋白質電泳分析。

Fig. 3. Electrophoretic profiles of metabolites purified from *Xenorhabdus indica* filtrates. (A) Lane 1: Marker, Lane 2: extracted from 100 kDa molecular weight (MW) sieve in 10% SDS-PAGE, a band of 85 kDa. (B) extracted from 100 kDa MW sieve in 10% Native-PAGE. (C) Lane 1: extracted from 10 kDa MW sieve in 10% SDS-PAGE, two bands of 22 and 25 kDa. Lane 2: Marker. (D) extracted from 10 kDa MW sieve in 10% Native-PAGE.

五、抗菌及殺蟲物質蛋白質之呈色反應

以 Ninhydrin test 結果發現在 100 及 3 kDa 之物質與 BSA 對照組均呈紫色正反應，表示其含有 α -胺基及羧基之胺基酸或蛋白質；而 22 kDa 之物質反應結果均呈淡黃色正反應，而 25 kDa 為負反應 (表五)，可能因測

試量太低，導致呈色不明顯。Biuret test 所得的結果顯示供試四種物質與對照組均呈淡藍色正反應 (表五)，再次證明此四種物質為蛋白質。另以 Xanthoproteic test 測試四種物質與對照組均呈黃色反應正反應，表示均含有苯環 (表五)。由以上結果可知 100、10 及 3 kDa 之



圖四 共生菌 (*Xenorhabdus indica*) 所分泌兩種殺蟲物質對大蠟蛾幼蟲死亡之影響。
Fig. 4. The mortality of *Galleria mellonella* larvae caused by two substances extracted from *Xenorhabdus indica*.

表五 共生菌 (*Xenorhabdus indica*) 培養濾液中，抗菌及殺蟲物質之胺基酸或蛋白質呈色反應
Table 5. Coloration of extracts from cultured filtrates of *Xenorhabdus indica* by three tests for amino acids or proteins

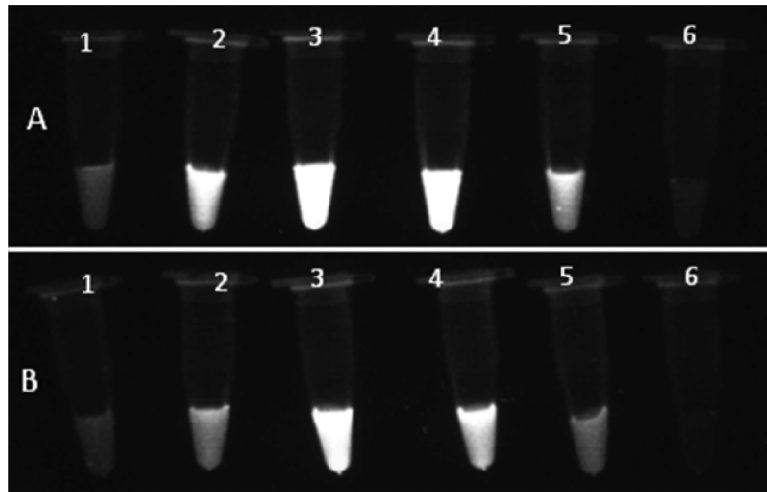
Extraction products	Coloration*		
	Ninhydrin test	Biuret test	Xanthoproteic test
85 kDa	+	+	+
22 kDa	+	+	+
25 kDa	-	+	+
3 kDa	+	+	+
CK (ddH ₂ O)	-	-	-
CK (BSA)	+	+	+

* “+”, positive reaction; “-“, negative reaction.

篩出物均屬於蛋白質或胜肽結構。

六、共生菌培養液之濃縮液內幾丁質分解酵素活性測定

共生菌 (*X. indica*) 可產生 *exo* 及 *endo* 兩種幾丁質分解酵素，主要分佈在 50~3 kDa 之濃縮液內 (圖五)，尤其在 30 及 10 kDa 的範圍有較強螢光 (圖五 A、B)，為幾丁質分解



圖五 共生菌 (*Xenorhabdus indica*) 濾液粗萃取物幾丁質分解酵素活性測定。(A) exo-chitinase 測定，受測基質為 4MU-(GlcNAc)₃。(B) endo-chitinase 測定，受測基質為 4MU-(GlcNAc)₂。Tube 1 為 100 kDa 分子篩之萃取物；Tube 2 為 50 kDa 分子篩之萃取物；Tube 3 為 30 kDa 分子篩之萃取物；Tube 4 為 10 kDa 分子篩之萃取物；Tube 5 為 3 kDa 分子篩之萃取物；Tube 6 為對照組 (NB medium)。

Fig. 5. Activity of chitinase extracted from cultured filtrates of *Xenorhabdus indica*. (A) Determination of exo-chitinase, its substrate is 4MU-(GlcNAc)₃. (B) Determination of endo-chitinase, its substrate is 4MU-(GlcNAc)₂. Tube 1, extracted from 100 kDa molecular weight (MW) sieve; Tube 2, extracted from 50 kDa MW sieve; Tube 3, extracted from 30 kDa MW sieve; Tube 4, extracted from 10 kDa MW sieve; Tube 5, extracted from 3 kDa MW sieve; Tube 6, for the NB medium (control).

表六 不同濃度之共生菌 (*Xenorhabdus indica*) 脂多醣體對大蠟蛾幼蟲之死亡率

Table 6. Mortality of *Galleria mellonella* larvae caused by lipopolysaccharide of *Xenorhabdus indica* at different concentrations

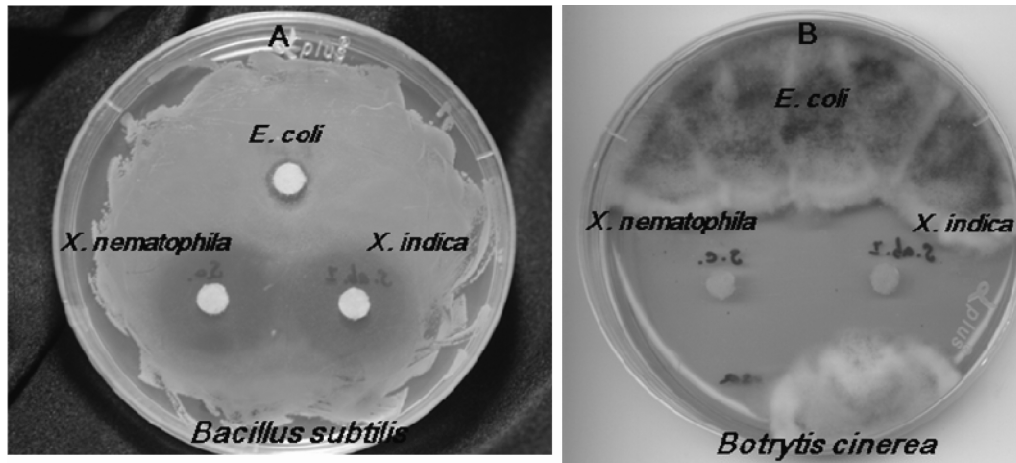
Concentration (EU/mL)	Mortality (%)*		
	12 h	24 h	36 h
3×10^5	23.33 ± 5.78 a	43.33 ± 5.78 a	93.33 ± 5.78 a
3×10^4	0.00 b	0.00 b	10.00 ± 5.78 b
3×10^3	0.00 b	3.33 ± 5.78 b	3.33 ± 5.78 c
3×10^2	0.00 b	3.33 ± 5.78 b	3.33 ± 5.78 c
30	0.00 b	0.00 b	3.33 ± 5.78 c

* Means followed by the same letter are not significantly different at 5% level according to Tukey's studentized range test.

酵素分子大小之主要範圍。

七、共生菌之脂多醣體對大蠟蛾幼蟲及 *Bacillus subtilis* 與 *Botrytis cinerea* 活性之影響

經純化所得之 LPS 濃度約為 3×10^5 EU/mL，但以 10 kDa 分子篩之濃縮濾液僅有 30 EU/mL。LPS (3×10^5 EU/mL) 經系列稀釋後注入大蠟蛾幼蟲體中，也僅有原液與其他



圖六 共生菌(*Xenorhabdus indica*) 脂多醣體 (lipopolysaccharide, LPS) 抗生活性試驗。(A) 三種細菌之 LPS 對 *Bacillus subtilis* 之抗生測試。(B) 三種細菌之 LPS 對 *Botrytis cinerea* 之抗生測試。
Fig. 6. Antibiotic activities treated with lipopolysaccharide (LPS) of *Xenorhabdus indica*. (A) LPS of three bacteria against *Bacillus subtilis*. (B) LPS from three bacteria against *Botrytis cinerea*.

表七 共生菌 (*Xenorhabdus indica*) 脂多醣體 (lipopolysaccharide, LPS) 對 *Bacillus subtilis* 及 *Botrytis cinerea* 之抑制圈
Table 7. Inhibition zone caused by *Xenorhabdus indica* lipopolysaccharide against *Bacillus subtilis* and *Botrytis cinerea*

LPS sources	Inhibition zone (mm) (Mean \pm SD)*	
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
<i>Escherichia coli</i>	1.33 \pm 0.58 c	0.00 c
<i>Xenorhabdus indica</i>	7.67 \pm 0.58 b	7.67 \pm 0.58 a
<i>Xenorhabdus nematophila</i>	8.00 \pm 1.00 a	5.33 \pm 0.58 b

* Means followed by the same letter are not significantly different at 5% level according to Tukey's studentized range test.

濃度呈顯著差異，造成幼蟲死亡率於 12、24 及 36 h 後，分別為 23.33 ± 5.78 、 43.33 ± 5.78 及 $93.33 \pm 5.78\%$ ；於 $30 \sim 3 \times 10^4$ EU/mL 之間，幼蟲死亡率並無顯著差異 (表六)。顯示共生菌 LPS 之濃度需達 3×10^5 EU/mL 才能殺死大蠟蛾幼蟲。

另外，兩種共生菌 LPS 對 *B. subtilis* 及 *B. cinerea* 均能產生抑制圈 (圖六)，其中 *X. indica* 之 LPS 對兩種菌之抑制圈分別為 7.67 ± 0.58 和 7.67 ± 0.58 mm；而 *X.*

nematophila 者為 8.00 ± 1.00 與 5.33 ± 0.58 mm。同為腸內菌科之 *E. coli*，其 LPS 對 *B. subtilis* 僅產生 1.33 ± 0.58 mm 抑制圈，對 *B. cinerea* 則無。在統計分析結果，兩種共生菌與 *E. coli* 之 LPS 對 *B. subtilis* 及 *B. cinerea* 之抑制圈均呈顯著差異 (表七)。此結果顯示共生菌之 LPS 對細菌生長及真菌孢子發芽具有抑制作用。

討 論

共生菌 (*X. indica*) 可於 NB medium 中分泌抑菌及殺蟲之物質，經 48 h 培養後開始分泌使大蠟蛾幼蟲死亡之有毒物質，培養至 72 h 後死亡率達最高，此階段為共生菌生長之靜止期。在 *X. nematophilus* 上具有相同的情形，共生菌培養至 72 h，其二次代謝產物產生達最大量；另外，由 *X. nematophilus* 所分泌之溶胞 (cytolytic) 物質，在 *in vitro* 下，可偵測到兩次，第一次在進入靜止期時產生，第二次在靜止期後期產生，且分別為不同性質之代謝物 (Brillard *et al.*, 2001; Isaacson and Webster, 2002; Jagdale *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2011)。不同共生菌之二次代謝物產生的時間亦異，例如 *P. luminescens* 與 *X. nematophilus* 液體培養至 48 h，即可產生殺蟲及抗菌之二次代謝物 (Hsieh *et al.*, 2004; Ji *et al.*, 2004)。據 Ribeiro *et al.* (2003) 報告 *X. nematophila* 抗菌蛋白的合成需要 6~8 h，繼續合成至 72 h 才會產出 flhDC-dependent cytotoxin，此為約 10,790 Da 的胜肽，稱為 á-xenorhabdolysin，累積在培養基中，此物質會破壞昆蟲血球的細胞膜。由此可知共生菌產生毒質的時機，可能與其致病機制或殺蟲活性有關。

共生菌為蟲生線蟲防止在分解昆蟲組織及本身增殖的過程中受其他微生物侵染，會分泌抗菌物質來抑制微生物對昆蟲屍體的破壞。雖然目前已知共生菌之抗菌性範圍廣泛，可抑制多種真菌、細菌、線蟲及腐生性動物等，但僅限於少數共生菌種類 (Akhurst, 1982; Boemare *et al.*, 1992; Ji *et al.*, 2004)。另有研究報告發現，某些共生菌對人體病原細菌、真菌及酵母菌等亦具抑制效果 (Akhurst, 1982; McInerney *et al.*, 1991a, b;

Li *et al.*, 1997)。本研究 *X. indica* 共生菌所產生之抗菌物質，對金黃葡萄球菌 (*S. aureus*)、腸炎弧菌 (*V. parahaemolyticus*)、大腸桿菌 (*E. coli*) 及克雷伯氏菌 (*K. pneumonia*) 等四種人體病原菌與部分植物病原真菌，即 *P. litchi*、*B. cinerea*、*R. solani* (Cabbage) 及 *Collectotrichum* sp. (Strawberry) 等具抗生活性；此結果對共生菌在醫藥及農業上的應用更具有潛力。

Boemare *et al.* (1992) 研究發現共生菌 *Xenorhabds* 與 *Photorhabdus* 產生小分子抗生物質可抑制真菌及細菌的生長，而大分子抗生物質只能抑制種內的生長。本文從共生菌濾液中可分離出大分子及小分子之抑菌物質，均對細菌 (即 *B. subtilis*) 及真菌 (即 *B. cinerea*) 有抑制作用。但對不同的炭疽病菌 (*Collectotrichum* sp.) 與立枯絲核菌 (*Rhizoctonia* sp.) 品系之抑菌性各異，顯示此有毒物質在抑菌上缺乏專一性，而大小分子之抑菌性是否有差異，仍待進一步研究。雖然 *X. indica* 可產生幾丁質分解酵素，所分離之粗萃取物，經 Proteinase K 處理後仍然有抑制能力，顯然主要抑菌物質應與幾丁質分解酵素無關。此可能共生菌產生的幾丁質分解酵素量不高，推測其僅足以分解昆蟲組織，以提供蟲生線蟲及共生菌生長之營養源。

Hussien and El-Sadawg (2008) 發現 *X. indica* 之抗菌蛋白，對 *Staphylococcus*、*Enterococcus*、*Salmonella* 及 *Pseudomonas* 等屬具有抑制活性，但對 *Escherichia* 與 *Aeromonadaceae* 則無抑制活性。台灣產的 *X. indica* 菌株對 *S. aureus* 及 *E. coli* 有抑制活性，其有毒物質具熱穩定性，顯然不同地區的品系，產生的抗菌物質及特性上有所差異。本研究分離之抗菌物質，經蛋白質呈色反應屬於蛋白類之物質，其中分子量約 85、25 及 22

kDa 者具抗菌活性，與 Hussien and El-Sadawg (2008) 發現 *X. indica* 之抗菌蛋白，分子量為 220 kDa，稱為 xenoprotec，屬於 bacteriocins 的一種，在分子量上與本研究之 *X. indica* 具有差異。雖然 bacteriocins 分子大小涵蓋的範圍廣，小分子者僅 19~37 胺基酸組成的胜肽，大的分子量有 90,000 Da，其活性範圍有只抑制與本身相近的物種，也有對很多不同菌科的物種均有活性者 (Joerger, 2003)。抗菌胜肽通常較短約 12~100 胺基酸，帶正電 (淨電荷 2~9)，具有雙極性，可由單細胞微生物、昆蟲、無脊椎動物、植物、兩棲動物、鳥類魚類及哺乳動物 (包含人類) 等均可分離而得 (Martin and Lehrer, 1995; Wang and Wang, 2004)。

由 *X. budapestensis* 所產生的抗菌物質具高穩定性，於 37°C 下維持兩週以上仍具活性，其濾液經 autoclave 處理後抑菌活性尚存；而 *X. cabanillassii* 之抗菌物質也具有相似特性，經高溫仍具抗菌活性 (Fodor *et al.*, 2010)。其高穩定性與本研究之共生菌所產生之有毒物質特性相同，是否為同一類物質仍需進一步鑑定。

在液體培養的過程中 *X. indica* 也可分泌殺蟲物質，對大蠟蛾幼蟲具高度殺蟲效力。McInerney *et al.* (1991) 由 *Xenorhabdus* spp. 代謝物中鑑定出五種 xenorhabdins 為 dithiolopyrrolone 衍生物，其中 xenorhabdins 2 在 150 $\mu\text{g cm}^{-2}$ 對 *Heliothis punctigera* 可造成 100% 幼蟲死亡率，其 LC_{50} 為 59.5 $\mu\text{g cm}^{-2}$ ，但濃度在 37.5 $\mu\text{g cm}^{-2}$ 時，只有 18.8% 死亡率。相似的化合物 thiolutin 對 *Lucilia sericata* 之殺蟲活性也具有類似的結果 (Cole and Rolinson, 1972)。此可能因共生菌本身對不同昆蟲之殺蟲機制有所差異，如 *X. nematophilus* 或 *P. luminescens* 能分泌破壞

大蠟蛾幼蟲免疫系統之毒質，進而殺死幼蟲，但後來的研究發現破壞昆蟲免疫系統並非殺死昆蟲之主因，而引起敗血症可能方為主要因素 (Dunphy, 1994, 1995; Dunphy and Hurlbert, 1995)。但並非所有共生菌都是如此，例如松象鼻蟲 (*Hylobius abietis*) 或大蚊幼蟲 (*Tipula* spp.) 對 *Xenorhabdus* 與 *Photorhabdus* 均具抗性，且共生菌與蟲生線蟲感染後造成昆蟲死亡，仍因協力作用之關係 (Dowds and Peters, 2002)。

由 *X. indica* 培養濾液中所分離到的四種物質，經呈色反應測試結果證實，均含有 α -胺基及羧基的結構及苯環脂之蛋白質或胜肽特性。Ji *et al.* (2004) 由 *X. nematophila* K1 所分泌新的一種抗菌物質，經單一化合物鑑定為 benzylideneacetone (trans-4-phenyl-3-buten-2-one)，具熱穩定性，為單萜類物質 (monoterpenoid compound)。其對革蘭氏陰性細菌有較佳的抗生活性，且其特性與 *X. indica* 所分泌之抗生物質相似。

本研究之 *X. indica* 能產生 *exo* 及 *endo* 幾丁質分解酵素，此與其他共生菌，例如 *X. nematophila*、*X. bovienii* 及 *P. luminescens* 等相仿，其中 *X. nematophila* 產生的量最多，而 *P. luminescens* 最少 (Chen, 1996)。本研究結果在 50~10 kDa 分子篩之萃取物中具有較高的螢光反應，此範圍與 *Xenorhabdus* 與 *Photorhabdus* 中所分離之幾丁質分解酵素分子量為 38.8 kDa 相近 (Chen, 1996)。幾丁質分解酵素在抑菌上扮演著重要角色，尤其可破壞真菌之細胞壁結構達到抑菌作用 (Chen *et al.*, 1994; Isaacson, 2000)。由 *X. budapestensis* 所產生的抗菌物質具高穩定性，於 37°C 下維持兩週以上仍具活性，其濾液經 autoclave 處理後仍保持抑菌活性，此特性與 *X. cabanillassii* 之抗菌物質相似 (Fodor *et al.*,

2010)。

LPS 屬於內毒素，乃是革蘭氏陰性細菌外膜組成之主要物質，將本研究純化所得 *X. indica* 之 LPS，注入大蠟蛾幼蟲體內後發現，幼蟲會產生嚴重麻痺現象，活動力劇減。本文試驗結果得知 LPS 濃度約 3×10^5 EU/mL 可導致幼蟲死亡，但以往的共生菌研究報告 LPS 注入大蠟蛾幼蟲體後並無不良影響 (Clarke and Down, 1991, 1995)，此結果與本研究不同。雖然大蠟蛾體內含有 LPS binding protein (LBP)，其會附著在 LPS 結構上的 lipid A，使 LPS 失去活性，若 LPS 超過一定臨界量時 LBP 就無作用 (Dunphy and Halwani, 1997)。這種殺蟲活性的差異亦可由本文從 10 kDa 分子篩所得到具有殺蟲活性之萃取物，含 LPS 的量僅 30 EU/mL，此濃度亦無法導致幼蟲死亡的結果加以佐證。另外，也可能因不同 species 或 strain 之共生菌所合成 LPS 成分上具有差異，本研究的 *X. indica* 所分泌之 LPS 含有對大蠟蛾幼蟲具神經毒素成分，對其他昆蟲是否也具有相同作用，仍需進一步測試。共生菌 LPS 在抗菌研究文獻記載甚少，只有在共生菌可分泌的多種抑菌代謝物，中少數有 LPS 的記載 (Dunphy and Webster, 1988a)。本研究所分離兩種共生菌，*X. indica* 與 *X. nematophila* 之 LPS 對 *B. subtilis* 與 *B. cinerea* 均具有抑菌活性，顯示共生菌除分泌二次代謝物抑制微生物的生長，以保護昆蟲屍體不被破壞外，菌體本身也具有相同的效果 (Han *et al.*, 1991; Jarose, 1996)。共生菌 *X. indica* 菌體所含之 LPS 具有抑菌及殺蟲活性，其他代謝物也同樣具有此活性。本研究所分離兼具抑菌及殺蟲之蛋白，分子量約為 22 及 25 kDa，兩者具有協力作用，此菌在未來微生物製劑開發上似具有應用潛力。

引用文獻

- Akhurst RJ. 1980. Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotic associated with the insect pathogenic nematodes *Neoplectana* and *Heterorhabditis*. *J Gen Microbiol* 121: 303-309.
- Akhurst RJ. 1982. Antibiotic activity of *Xenorhabdus* spp., bacterial symbiotically associated with insect pathogenic nematodes of the families Heterorhabditidae and Steinernematidae. *J Gen Microbiol* 128: 3061-3065.
- Boemare NE, Boyer-Giglio M, Thaler JO, Akhurst RJ, Brehelin M. 1992. Lysogeny and bacteriocinogeny in *Xenorhabdus nematophilus* and other *Xenorhabdus* spp. *Appl Environ Microbiol* 58: 3032-3037.
- Bowen DJ, Ensign JC. 1998. Purification and characterization of a high molecular weight insecticidal protein complex produced by the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Appl Environ Microbiol* 64: 3029-3035.
- Bowen D, Rocheleau TA, Blackburn M, Andreev O, Golubeva E, Bhartia R, French-Constant RH. 1998. Insecticidal toxins from the bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Science* 280: 2129-2132.
- Brillard J, Ribeiro C, Boemare N, Brehelin M, Givaudan A. 2001. Two distinct hemolytic activities in *Xenorhabdus nematophila* are active against immunocompetent insect cells. *Appl*

- Environ Microbiol 67: 2515-2525.
- Brillard J, Duchaud E, Boemare N, Kunst F, Givaudan A.** 2002. The PhIA hemolysin from the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens* belongs to the two-partner secretion family of hemolysins. J Bacteriol 184: 3871-3878.
- Brown SE, Cao AT, Dobson P, Hines ER, Akhurst RJ, East PD.** 2006. Txp40, a ubiquitous insecticidal toxin protein from *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* bacteria. Appl Environ Microbiol 72: 1653-1662.
- Chen G, Dunphy GB, Webster JM.** 1994. Antifungal activity of two *Xenorhabdus* species and *Photorhabdus luminescens*, bacteria associated with the nematodes *Steinernema* species and *Heterorhabdus megidis*. Biol Control 4: 157-162.
- Chen G.** 1996. Antimicrobial activity of the nematode symbionts, *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* (Enterobacteriaceae) and the discovery of two novel groups of antimicrobial substances, nematophin and xenorxides. PhD Dissertation, British Columbia, Canada: Simon Fraser University.
- Chen G, Maxwell P, Dunphy GB, Webster JM.** 1996. Culture conditions for *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* symbionts of entomopathogenic nematodes. Nematologica 42: 124-127.
- Cherif A, Chehimi S, Limem F, Hansen BM, Hendriksen NB, Daffonchio D, Boudabous A.** 2003. Detection and characterization of the novel bacteriocin entomocin 9 and safety evaluation of its producer, *Bacillus thuringiensis* ssp. *entomocidus* HD9. J Appl Microbiol 95: 990-1000.
- Clarke DJ, Dowds BCA.** 1991. Pathogenicity of *Xenorhabdus luminescens*. Biochem Soc Trans 20: 65S.
- Cole M, Rolinson GN.** 1972. Microbial metabolites with insecticidal properties. Appl Microbiol 24: 660-662.
- Dowds BCA, Peters A.** 2002. Virulence mechanisms. pp 79-98. In: Gaugler R, Kaya HK (eds). Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Dunphy GB.** 1994. Interaction of mutants of *Xenorhabdus nematophilus* (Enterobacteriaceae) with antibacterial systems of *Galleria mellonella* larvae (Insecta: Pyralidae). Can J Microbiol 40: 161-168.
- Dunphy GB.** 1995. Physicochemical properties and surface components of *Photorhabdus luminescens* influencing bacterial interaction with non-self response systems of nonimmune *Galleria mellonella* larvae. J Invertebr Pathol 65: 25-34.
- Dunphy GB, Halwani A.** 1997. Haemolymph proteins of larvae of *Galleria mellonella* detoxify endotoxins of the insect pathogenic bacteria *Xenorhabdus nematophilus* (Enterobacteriaceae). J Insect Physiol 43: 1023-1029.

- Dunphy GB, Hurlbert RE.** 1995. Interaction of avirulent transpositional mutants of *Xenorhabdus nematophilus* ATCC 19061 (Enterobacteriaceae) with the antibacterial systems of non-immune *Galleria mellonella* (Insecta) larvae. *J Gen Appl Microbiol* 41: 409-427.
- Dunphy GB, Webster JM.** 1988a. Lipopolysaccharides of *Xenorhabdus nematophilus* (Enterobacteriaceae) and their haemocyte toxicity in non-immune *Galleria mellonella* (Insecta: Lepidoptera) larvae. *J Gen Microbiol* 134: 1017-1028.
- Dunphy GB, Webster JM.** 1988b. Virulence mechanisms of *Heterorhabditis heliothidis* and its bacterial associate, *Xenorhabdus luminescens*, in non-immune larvae of the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *Int J Parasitol* 18: 729-737.
- Dutky SR.** 1959. Insect microbiology. *Adv Appl Microbiol* 1: 175-200.
- Ensign JC, Bowen DJ, Bintrim SB.** 1990. Crystalline inclusion proteins and an insecticidal toxin of *Xenorhabdus luminescens* strain NC-19. In: *Proceedings and Abstracts of the Vth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control*; 20-24 August 1990. Adelaide, Australia: Society for Invertebrate Pathology. pp 218.
- Fodor A, Fodor AM, Forst S, Hogan JS, Klein MG, Lengyel K, Sáringer G, Stackebrandt E, Taylor RAJ, Lehoczky Ę.** 2010. Comparative analysis of antibacterial activities of *Xenorhabdus* species on related and non-related bacteria *in vivo*. *J Microbiol Antimicrobiol* 2: 36-46.
- Frost S, Neilson K.** 1996. Molecular biology of the symbiotic-pathogenic bacteria *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp. *Microbiol Rev* 60: 21-43.
- Han RC, Wouts WM, Li L.** 1991. Development and virulence of *Heterorhabditis* spp. strains associated with different *Xenorhabdus luminescens* isolates. *J Invertebr Pathol* 58: 27-32.
- Hsieh FC, Lin TC, Tseng JT, Kao SS.** 2004. An entomopathogenic nematophilic bacterium, *Photorhabdus luminescens*, with insecticidal and antimicrobial activities. *Plant Prot Bull* 46: 163-172. (in Chinese)
- Hussien A, El-Hag A, El-Sadawy HA.** 2008. Xenoprotec: antimicrobial agent derived from *Xenorhabdus indica*. *American-Eurasian J Agric Environ Sci* 3: 568-578.
- Isaacson PJ.** 2000. Antimicrobial activity of *Xenorhabdus* sp. (Enterobacteriaceae) symbiont of the entomopathogenic nematode, *Steinernema riobrave* (Rhabditida: Steinernematidae). MSc Thesis, British Columbia, Canada: Simon Fraser University.
- Isaacson PJ, Webster JM.** 2002. Antimicrobial activity of *Xenorhabdus* sp. RIO (Enterobacteriaceae), symbiont of the entomopathogenic nematode,

- Steinernema riobrave* (Rhabditida: Steinernematidae). *J Invertebr Pathol* 79: 146-153.
- Jagdale GB, Somasekhar N, Grewal PS, Klein MG.** 2002. Suppression of plant-parasitic nematodes by application of live and dead infective juveniles of an entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae*, on boxwood (*Buxus* spp.). *Biol Control* 24: 42-49.
- Jarose J.** 1996. Do antibiotic compounds produced *in vitro* by *Xenorhabdus nematophilus* minimize the secondary invasion of insect carcasses by contaminating bacteria? *Nematologica* 42: 367-377.
- Ji D, Yi Y, Kang GH, Choi YH, Kim P, Baek NI, Kim Y.** 2004. Identification of an antibacterial compound, benzylideneacetone, from *Xenorhabdus nematophila* against major plant-pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 239: 241-248.
- Joerger RD.** 2003. Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. *Poultry Science Association* 82: 640-647.
- Kaya HK, Gaugler R.** 1993. Entomopathogenic nematodes. *Annu Rev Entomol* 38: 181-206.
- Li J, Chen G, Webster JM.** 1997. Nematophin, a novel antimicrobial substance produced by *Xenorhabdus nematophilus* (Enterobacteraceae). *Can J Microbiol* 43: 770-773.
- Li JX, Hu K, Webster JM.** 1998. Antibiotics from *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae). *Chem Heterocyclic Compds* 34: 1561-1570.
- Liao CY, Tang LC, Pai CF, Hsiao WF, Briscoe BR, Hou RH.** 2001. A new isolate of the entomopathogenic nematode, *Steinernema abbasi* (Nematoda: Steinernematidae), from Taiwan. *J Invertebr Pathol* 77: 78-80.
- Martin ETG, Lehrer RI.** 1995. Defensins and other endogenous peptide antibiotics of vertebrates. *J Leukoc Biol* 58: 128-136.
- McInerney BV, Taylor WC, Lacey MJ, Akhurst RJ, Gregson RP.** 1991a. Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp. Part 2. benzopyran-1-one derivatives with gastroprotective activity. *J Nat Prod* 54: 785-795.
- McInerney BV, Gregson RP, Lacey MJ, Akhurst RJ, Lyons GR, Rhodes SH, Smith DR J, Engelhardt LM, White AH.** 1991b. Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp. Part 1. dithiolopyrrolone derivatives with antibiotic activity. *J Nat Prod* 54: 774-784.
- Ou-Yang SC, Chu YI.** 1988. The comparison of the development of the tobacco cutworm (*Spodoptera litura* (F.)) reared with natural and artificial diets. *Chinese J Entomol* 8: 143-150. (in Chinese)
- Pan YH, Jian H, Zhang J, Chen ZY, Yang XF, Yang HW, Huang DF.** 2002. An intracellular toxic protein (Xin) isolated from *Xenorhabdus nematophilus* strain

- BJ Prog Nat Sci 12: 310-312.
- Park Y, Kim Y.** 2000. Eicosanoids rescue *Spodoptera exigua* infected with *Xenorhabdus nematophilus*, the symbiotic bacteria to the entomopathogenic nematode, *Steinernema catpocapsae*. J Insect Physiol 46: 1469-1476.
- Park Y, Kim Y, Putnam SM, Stanley DW.** 2003. The bacterium *Xenorhabdus nematophilus* depresses nodulation reactions to infection by inhibiting eicosanoid biosynthesis in tobacco hornworms, *Manduca sexta*. Arch. Insect Biochem Physiol 52: 71-80.
- Paul VJ, Frautschy S, Fenical W, Nealon KH.** 1981. Antibiotics in microbial ecology, isolation and structure assignment of several new antibacterial compounds from the insect-symbiotic bacteria *Xenorhabdus* spp. J Chem Ecol 7: 589-597.
- Ribeiro C, Vignes M, Brehelin M.** 2003. *Xenorhabdus nematophila* (enterobacteriaceae) secretes a cation-selective calcium-independent porin which causes vacuolation of the rough endoplasmic reticulum and cell lysis. J Biol Chem 278: 3030-3039.
- Ryu KG, Bae JS, Yu YS, Park SH.** 2000. Insecticidal toxin from *Xenorhabdus nematophilus*, symbiotic bacterium associated with entomopathogenic nematode *Steinernema glaseri*. Biotechnol. Bioprocess Eng 5: 141-145.
- Sergeant M, Jarrett P, Ousely M, Morgan AW.** 2003. Interactions of insecticidal toxin gene products from *Xenorhabdus nematophila* PMFI296. Appl Environ Microbiol 69: 3344-3349.
- Tsai MH, Tang LC, Hou RF.** 2008. The bacterium associated with the entomopathogenic nematode *Steinernema abbasi* (Nematoda: Steinernematidae) isolated from Taiwan. J Invertebr Pathol 99: 242-245.
- Tsai MH, Tang LC, Hou RF.** 2011. Effects of the symbiotic bacterium, *Xenorhabdus indica*, from the entomopathogenic nematode, *Steinernema abbasi*, and its metabolites on insect hemocytes and cell lines. Formosan Entomol 31: 287-308. (in Chinese)
- Wang Z, Wang G.** 2004. APD: the antimicrobial peptide database. Nucleic Acids Res 32: 590-592.
- Wang Y, Fang X, Cheng Y, Zhang X.** 2011. Manipulation of pH shift to enhance the growth and antibiotic activity of *Xenorhabdus nematophila*. J Biomed Biotechnol 2011: 1-9.
- Webster JM, Chen G, Li J.** 1998. Parasitic worms: an ally in the war against the superbugs. Parasitol Today 14: 161-163.
- Webster JM, Chen G, Hu K, Li J.** 2002. Bacterial metabolites. pp 99-114. In: Gaugler R (ed). Entomopathogenic Nematology. CABI Press, London.
- White GF.** 1927. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. Science 66: 302-303.
- Yi EC, Hackett M.** 2000. Rapid isolation

method for lipopolysaccharide and
lipid A from gram-negative bacteria.
Analyst 125: 651-656.

收件日期：2012年2月6日
接受日期：2012年3月21日

Insecticidal and Antimicrobial Substances in Cultured Filtrates of the Symbiotic Bacterium, *Xenorhabdus indica*, from the Entomopathogenic Nematode, *Steinernema abbasi*

Mi-Hau Tsai, Li-Cheng Tang*, and Roger F. Hou*

Department of Entomology, National Chung Hsing University, Taichung City 40227, Taiwan

ABSTRACT

In vitro culture of the symbiotic bacterium, *Xenorhabdus indica*, isolated from the entomopathogenic nematodes, *Steinernema abbasi* Taiwan isolate, caused ca. 95% mortality of *Galleria mellonella* mature larvae at 72 h after culturing, and remained ca. 93% at 96 h, indicating that this bacterium secreted insecticidal substances in its culture medium. After injection of mature larvae with different condensations of the bacterial cultured filtrates, the larval mortality of *G. mellonella* was ca. 85% with the 25-fold condensed filtrates and reached 100% with the 50-fold ones, whereas that of *Spodoptera litura* was ca. 75% with the 300-fold filtrates. The cultured filtrates could also inhibit some human pathogens tested, *i.e.*, *Staphylococcus aureus* CCRC12652, *Escherichia coli* JM109, *Klebsiella pneumonia* CCRC10694, and *Vibrio parahaemolyticus* CCRC10806; a grass bacillus, *Bacillus subtilis*; and plant pathogenic fungi, *i.e.*, *Peronophythora litchi*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani* (from cabbage), and *Collectotrichum* sp. (from strawberry). The cultured filtrates screened through 10 or 100 kDa molecular sieves could inhibit the growth of *B. subtilis* and *B. cinerea* while those through 3-kDa sieve could inhibit *B. subtilis* only. The filtrates sieved through a 10-kDa sieve caused 85.63 and 98.93% of necrotic rates, respectively, in an insect cell line, SF21, at 12 and 24 h post-treatment, whereas those through a 3 kDa sieve similarly caused 80.20 and 92.77% necrotic rates, respectively. However, only the filtrates through 10-kDa sieve resulted in 23.33, 75.00, and 96.67% mortality of *G. mellonella* larvae, respectively, at 6, 12, and 24 h after injection of *G. mellonella* larvae. It is thus indicated that both insecticidal and antimicrobial substances are present in the 10-kDa sieved filtrates. Proteins in the cultured filtrates were analyzed using SDS-PAGE electrophoresis. A protein band with 85 kDa of molecular weight was detected in the 100-kDa sieved filtrates while two bands with 22 and 25 kDa were found in the 10-kDa sieved filtrates. However, none were detected in the 3-kDa sieved one. On the basis of coloration tests, most of the separated molecules showed an amino acid structure. Furthermore, both exo- and endo-chitinases in the filtrates through 10-50 kDa sieves could be detected after reacting with different substrates, emitting fluorescence under the UV microscope. The concentration of lipopolysaccharide (LPS) isolated from *X. indica* was ca. 3×10^5 EU/mL, causing ca. 23, 43, and 93% mortality of *G. mellonella* larvae at 12, 24, and 36 h after injection, respectively. The LPS from *X. indica* resulted in ca. 7.67 mm of inhibition zone against a bacterium, *B. subtilis* and a fungus, *B. cinerea*, whereas that from *Xenorhabdus nematophila* caused ca. 8.00 and 5.33 mm of inhibition zone, respectively. In contrast, LPS from *E. coli* which is also an intestinal bacterium produced only ca. 1.33 mm of inhibition zone against *B. subtilis*. Therefore, the LPS from *X. indica* could inhibit both bacterial and fungal growth.

Key words: *Steinernema abbasi*, *Xenorhabdus indica*, insecticidal and antimicrobial substance, protein, lipopolysaccharide