

# 兼具殺蟲與抗菌作用之線蟲共生細菌—光桿菌

謝奉家 林宗俊 曾瑞堂 高穗生\*

台中縣霧峰鄉 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所

(接受日期：中華民國93年5月26日)

## 摘 要

謝奉家、林宗俊、曾瑞堂、高穗生\* 2004 兼具殺蟲與抗菌作用之線蟲共生細菌—光桿菌 植保會刊 46：163-172

光桿菌 (*Photorhabdus luminescens*) 屬於腸內桿菌科 (Enterobacteriaceae)，為革蘭氏陰性，可發出螢光 (bioluminescent) 的桿狀細菌，已證實兼具殺蟲與抗菌效果<sup>(13, 14)</sup>。光桿菌與其分類地位相近之嗜線蟲桿菌 (*Xenorhabdus* spp.) 同為病原線蟲之腸道共生 (symbiotic) 細菌。光桿菌與異小桿線蟲 (*Heterorhabditis* spp.) 共生，而嗜線蟲桿菌則是與斯氏線蟲 (*Steinernema* spp.) 共生。光桿菌或嗜線蟲桿菌隨著線蟲的侵染過程而進入昆蟲寄主的血腔 (haemocoel)，並在血腔中大量繁殖後，分泌多種代謝產物，於 24 至 48 小時之內即能殺死寄主。共生細菌可以從寄主分離出來培養，1993 年光桿菌屬才正式從嗜線蟲桿菌屬中分出<sup>(2)</sup>，目前已分離到至少 3 個具有不同程度殺蟲活性的光桿菌亞種<sup>(13)</sup>。病原線蟲、光桿菌與昆蟲幼蟲之間形成微妙的三者關係 (tri-trophic system)，光桿菌在共生與致病之間的轉換 (switch) 模式值得深入探討。由於全球迄今尚未上市兼具殺蟲與抑菌效果的微生物製劑，光桿菌具有殺蟲與抗菌雙效作用，在植物病蟲害之生物防治與抗生物質之利用上，潛力無窮。

在殺蟲能力方面，1998 年美國 Wisconsin 大學的科學家從寄生在異小桿線蟲消化道內的光桿菌中找到一個高分子量蛋白複合物 (high-molecular-weight toxin complexes)，它是由 A、B、C、D 四種成份組成<sup>(3)</sup>，注射或口服這種蛋白複合物除了對鱗翅目具有殺蟲活性外，對鞘翅目和雙翅目也都有很強的毒殺活性，是一種廣譜殺蟲蛋白，引起國外研究學者重視<sup>(14, 19, 20)</sup>，這些發現提供害蟲防治的另一生物資源。可經量產純化直接噴灑這種細菌的毒素，以防治害蟲，或者是將它們的基因選殖到植物中去，這種新基因對於農作物持久性抗蟲育種具有很大的應用潛力<sup>(9)</sup>。利用基因轉殖技術進行育種，一般採取多基因策略來培育持久性抗逆的新品種。以抗蟲基因工程為例，轉基因植物在推廣應用的過程當中，害蟲容易對

\* 通訊作者。E-mail: sskao@tactri.gov.tw

單一殺蟲基因產生抗性。針對這一問題，除了採用所謂的“高劑量／避難所”(high-dose/refuge) 策略來降低害蟲抗性發生的風險之外，將具有不同殺蟲機制的基因組合在同一植物以延緩害蟲的抗性發展也是另一種有效的策略，因此，需要不斷尋找殺蟲活性更強的新基因。國際上對於各種生物資源一直予以極大重視，特別是從微生物中發現具價值的新基因。光桿菌未來的挑戰工作之一即是有用基因的選殖與應用。

至於抑菌能力方面，光桿菌與嗜線蟲桿菌都能產生多種代謝產物，例如幾丁質分解酵素 (chitinases)<sup>(8)</sup>、脂肪分解酵素 (lipases)<sup>(18)</sup>、蛋白酵素 (protease)<sup>(7, 17)</sup>、蛋白酵素抑制劑 (protease inhibitor)<sup>(21)</sup>、抗生物質 (antibiotics)<sup>(15)</sup>、脂多醣體 (lipopolysaccharides)<sup>(12)</sup>與溶血素 (hemolysins)<sup>(5)</sup>等，可以抑制其他雜菌在昆蟲寄主體內的增殖，保護線蟲繁殖的環境<sup>(1)</sup>。研究發現在病原線蟲 (entomopathogenic nematode) 的體外大量培養中，共生細菌的質量、數量與種群動態直接或間接地影響著線蟲質量和產量<sup>(16)</sup>。光桿菌或嗜線蟲桿菌代謝過程中產生的代謝產物能抑制多種細菌、酵母菌和真菌的生長，發酵液中的抑菌成分均為首次發現，突破了以前對抗生素產生菌的菌株篩選模式，這樣可降低抗生素間交互抗性的產生，為農用抗生素提供一類新的菌株來源。國外許多學者對共生細菌的抑菌譜已進行一些研究，國內尚無這方面的研究報導。

本文首先探討野生型光桿菌菌株 (*Photorhabdus luminescens* ATCC 29999, isolation: nematode, *Heterorhabditis bacteriophora*, Australia; 購自新竹食工所) 的最適培養條件，並針對台灣本土重要害蟲，例如小菜蛾 (*Plutella xylostella*)、大蠟蛾 (*Galleria mellonella*)、玉米穗蟲 (*Helicoverpa armigera*)、斜紋夜蛾 (*Spodoptera litura*)、擬尺蠖 (*Trichoplusia ni*) 與甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*) 等鱗翅目 (lepidoptera) 昆蟲進行室內殺蟲譜試驗。國外研究報告指出光桿菌分子量大於 100 kDa 的毒蛋白複合體代謝產物對於國外部份昆蟲有殺蟲效果<sup>(3)</sup>，因此本研究首先進行光桿菌代謝產物大於 100 kDa 蛋白質的製備。步驟如下：挑選光桿菌菌株的單一菌落放入 100 ml 的 PP3T 培養液【2% (w/v) proteose peptone No.3 與 0.5% (w/v) Tween 60】。以 30°C，250 rpm，培養 48 小時，變成紅磚色菌液。菌液改裝在 250 mL 的圓柱塑膠離心瓶，4°C，10,000 x g，離心 20 分鐘。取上清液，經 0.45  $\mu$  m 的細菌過濾膜過濾，再以 100 kDa 的分子篩濃縮過濾裝置 (centriplus YM-100 ultrafiltration device) 在 4°C，3,000 x g，離心 4 小時。將上層濃縮液保存於-20°C。接著用上述大於 100 kDa 蛋白質濃縮液進行供試昆蟲的生物活性試驗，步驟如下：利用飼料表面污染法進行口服毒性 (oral toxicity) 測試，選用無農藥新鮮人工飼料培養基，將 800 ppm ( $\mu$  g/ml) 蛋白質濃縮液滴加於人工飼料塊後，接入 30 隻相同齡期的幼蟲，連續餵食 48 小時後，置換新鮮無藥劑處理之人工飼料，觀察幼蟲 72 小時內的死亡情形。若發現對幼蟲有致死效果，則將檢品溶液進行系列稀釋並定量滴加於人工飼料塊，接著同上述昆蟲生物活性試驗步驟進行，紀錄 72 小時累積死亡率。經 Abbott Formula 校正後，以濃度對數-死亡率，作 Probit analysis 分析其半致死濃度 (50% lethal concentrations, LC<sub>50</sub>)。半致死濃度表示能夠殺死 50% 昆蟲幼蟲的檢品濃度；若檢品的半致死濃度愈低，表示殺蟲效果愈好。若發現對某些幼蟲沒有致死作用，

則稱取蟲體重量並與對照組的蟲體重量進行比較，觀察是否有抑制取食的效應。上述試驗均重複三次。

本研究另外利用植物病原真菌，例如玫瑰灰黴病菌 (*Botrytis cinerea*，由本所生物藥劑組提供)、檸檬炭疽病菌 (*Glomerella cingulata*，由藥毒所農藥應用組提供)、蘋果褐斑病菌 (*Alternaria mali*，由藥毒所生物藥劑組提供)、甜椒疫病 (*Phytophthora capsici*，購自新竹食工所 BCRC 32226)、香蕉炭疽病菌 (*Colletotrichum musae*，購自新竹食工所 BCRC 38047)、百合灰黴病菌 (*Botrytis elliptica*，由藥毒所生物藥劑組提供)、豌豆鎌胞菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*，購自新竹食工所 BCRC 35290)、番茄鎌胞菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*，購自新竹食工所 BCRC 32107)、水稻立枯絲核菌 (*Rhizoctonia solani*，購自新竹食工所 BCRC 35687) 與百合白絹病菌 (*Sclerotium rolfsii*，購自新竹食工所 BCRC 35714) 等進行室內抑制真菌譜試驗。步驟如下：挑選光桿菌菌株的單一菌落放入 100 ml 的 PP3T 培養液。以 30°C，250 rpm，培養 48 小時，變成紅磚色菌液。病原真菌已事先接種於馬鈴薯葡萄糖瓊脂平板 (potato dextrose agar, PDA) 25°C 培養 3 至 9 天 (依不同病原真菌而異) 使其長滿平板，欲使用前，以圓形直徑 9 mm 打孔器挖取菌絲尖端塊，並在 PDA 平板兩側放置已滅菌之直徑 9 mm 濾紙圓盤和直徑 9 mm 病原菌之菌絲塊。取 30  $\mu$ l 光桿菌菌液滴於濾紙圓盤上。25°C 培養 (依病原菌種類不同約 5~7 天)，待對照皿之菌絲長滿到濾紙圓盤邊緣時，記錄檢品的抑制距離 (圖一)。

接著測試光桿菌對於常見細菌與植物病原細菌是否也有抑菌效果，所使用的細菌菌株包括蘇力菌 (*Bacillus thuringiensis* A6-06X，由本所生物藥劑組提供)、枯草桿菌 (*Bacillus subtilis*，購自新竹食工所 BCRC 16048)、仙人掌桿菌 (*Bacillus cereus* JSR01，由本所生物藥劑組提供)、沙門氏菌 (*Salmonella typhimurium* TA 98 與 TA 100，由本所應用毒理組提供)、黑腐病原細菌 (*Xanthomonas campestris* 17，由中台醫護技術學院曾義雄博士提供)、大腸桿菌 (*Escherichia coli*，由本所生物藥劑組提供)、胡蘿蔔軟腐桿菌 (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*，購自新竹食工所 BCRC 12613)、菊花軟腐桿菌 (*Erwinia chrysanthemi*，購自新竹食工所 BCRC 13149) 等進行室內抑制細菌譜試驗。步驟如下：光桿菌菌株培養在 LB (Luria-Bertani broth)、NB (Nutrient broth)、TSB (Tryptic soy broth)、PSB (Potato sucrose broth) 與 PP3T (2% PP3 與 0.5% Tween 60) 等 5 種不同培養液，進行 30°C，150 rpm，培養 2 天與 6 天。菌液再分別經 0.45  $\mu$ m 的細菌過濾膜過濾，即得到不含菌體的代謝產物混合液。將 50 ml 滅菌溶化的 NA 培養液冷卻至 45°C~50°C 時，加入 0.75 ml 供試細菌 (1.5% v/v)，每皿倒入 15 ml 培養基，凝固後在培養基上放置一個已滅菌濾紙圓盤 (直徑 9 mm)，每個濾紙圓盤滴加 50  $\mu$ l 的代謝產物混合液，放在適當溫度 (依細菌種類不同)，培養 24 小時，測量抑菌圈半徑。

本研究利用光桿菌代謝產物分子量大於 100 kDa 的毒蛋白複合體，針對台灣本土重要害蟲，例如小菜蛾、大蠟蛾、玉米穗蟲、斜紋夜蛾、擬尺蠖與甜菜夜蛾等鱗翅目昆蟲進行室內殺蟲譜試驗。由試驗結果 (表一) 得知分子量大於 100 kDa 的毒蛋白複合體對於小菜蛾與大蠟蛾的半致死濃度分別為 56 ppm 與 200 ppm，顯示其具有顯著殺蟲效果，甚至不亞於市售蘇力菌商品。雖然濃度為 800 ppm 時

對於玉米穗蟲、斜紋夜蛾、擬尺蠖與甜菜夜蛾並沒有致死效果，但卻有抑制玉米穗蟲取食的效應，玉米穗蟲的蟲體可隨中毒程度升高而減少葉面取食，在應用上仍具有降低蟲害的部份效果。

表一、光桿菌大於 100 kDa 毒素對於常見昆蟲的殺蟲譜

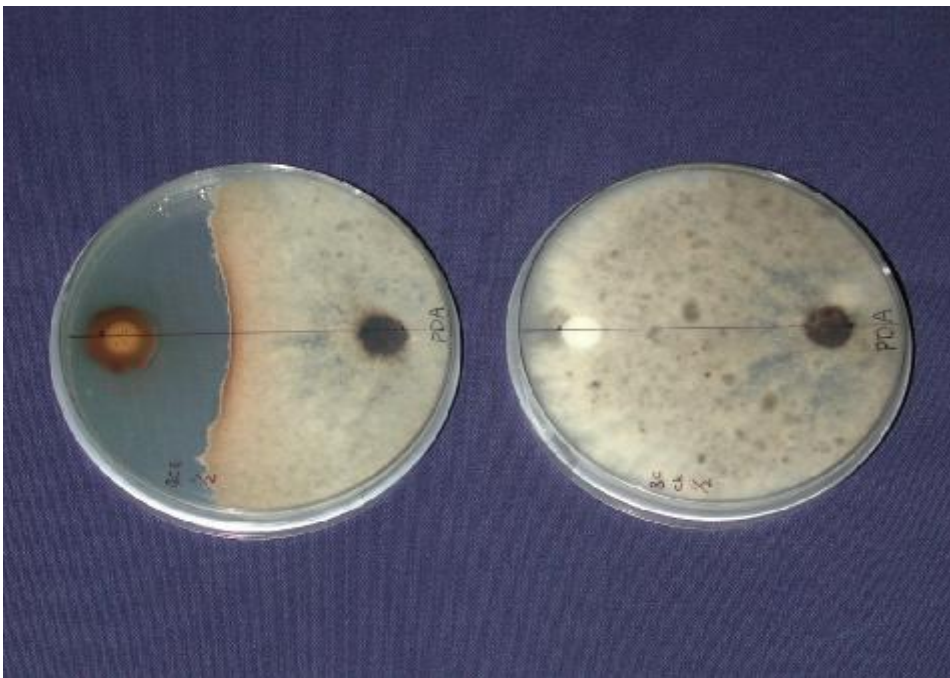
Table 1. Insects killed by *Photorhabdus luminescens* with toxins whose molecular weights were larger than 100 kDa.

Common name	Species	Oral toxicity
Diamondback moth	<i>Plutella xylostella</i>	LC <sub>50</sub> =56±3.2 ppm <sup>1)</sup>
Wax moth larva	<i>Galleria mellonella</i>	LC <sub>50</sub> =200±11.0 ppm <sup>1)</sup>
Corn earworm	<i>Helicoverpa armigera</i>	± <sup>2)</sup>
Tobacco cutworm	<i>Spodoptera litura</i>	— <sup>3)</sup>
Cabbage looper	<i>Trichoplusia ni</i>	—
Beet armyworm	<i>Spodoptera exigua</i>	—

<sup>1)</sup> Thirty larvae/replicate, 3 replicates/concentration, and 5 concentrations/trial. Mean±S.D. derived from 3 trials.

<sup>2)</sup> No mortality but with feeding inhibition.

<sup>3)</sup> No mortality or feeding inhibition.



圖一、光桿菌菌液對於植物病原真菌之抑菌情形（以玫瑰灰黴病菌為例）。

Fig. 1. *In vitro* antagonistic plate trial by the dual culture method. Growth inhibition by *Photorhabdus luminescens* on agar plates (exemplified by “*Botrytis cinerea*”).

為瞭解光桿菌菌液對植物病原真菌的抑制效果，本研究同時進行玫瑰灰黴病菌（圖一）、檬果炭疽病菌、蘋果褐斑病菌、甜椒疫病菌、香蕉炭疽病菌、百合灰黴病菌、豌豆鎌胞菌、番茄鎌胞菌、水稻立枯絲核菌與百合白絹病菌的對峙試驗。試驗結果（表二）顯示除了對百合白絹病菌沒有明顯抑制效果外，對於其他 9 種植物病原真菌都有明顯抑制效果，尤其對於玫瑰灰黴病菌（圖一）、檬果炭疽病菌、蘋果褐斑病菌與甜椒疫病菌具有相當顯著抑菌效果。其中，我們也挑選檬果炭疽病菌進行檬果生物檢定 (bioassay)，證實光桿菌菌液有很好的防治效果(數據未附於本文)。

另外，本研究進行光桿菌 ”菌體及其代謝產物混合液” 對細菌的抑制試驗，結果發現對於蘇力菌、枯草桿菌、仙人掌桿菌、沙門氏菌、黑腐病原細菌、大腸桿菌、胡蘿蔔軟腐桿菌與菊花軟腐桿菌等 8 種細菌全部都有明顯抑菌效果。但為瞭解不同培養液對於光桿菌 ”代謝產物” 的影響與相對的抑菌效果，本實驗室利用 LB、NB、TSB、PSB 與 PP3T 等 5 種不同培養液，進行 30°C，150 rpm，培養光桿菌菌液 2 天與 6 天，菌液再分別經 0.45 μm 的細菌過濾膜過濾，即得到不含菌體的代謝產物混合液。試驗結果發現 LB、NB、TSB、PSB 等 4 種培養的菌液，雖然也有部份抑菌效果，但整體試驗結果並不理想。然而 PP3T 培養的菌液經 0.45 μm 的細菌過濾膜過濾，除了菊花軟腐桿菌沒有明顯效果外，對於其他 8 種細菌，包含革蘭氏陽性菌與陰性菌，都有很好的抑菌效果（表三）。同時為了評估培養天數對於光桿菌 ”代謝產物” 的影響，發現 PP3T 培養第 6 天的抑菌效果有部份確實大於 PP3T 培養第 2 天的抑菌效果(表三)，此現象突顯光桿菌未來在量產時，發酵製程與代謝產物的最佳化仍有改進的空間。

表二、光桿菌菌液對於病原真菌的抑菌譜

Table 2. Spectrum of antimycotic activity of *Photorhabdus luminescens* as measured by the level of growth inhibition of a range of fungal species on agar plates by the dual culture method

Fungal species	Antimycotic activity <sup>1, 2)</sup>
<i>Botrytis cinerea</i>	+++
<i>Glomerella cingulata</i>	+++
<i>Alternaria mali</i>	+++
<i>Phytophthora capsici</i>	+++
<i>Colletotrichum musae</i>	++
<i>Botrytis elliptica</i>	++
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>pisi</i>	++
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	+
<i>Rhizoctonia solani</i>	+
<i>Sclerotium rolfsii</i>	-

<sup>1)</sup> Four levels of antimycotic activity as measured by inhibition of fungal growth are defined as: -, inhibition zone ≤ 1 mm; +, 1 < inhibition zone ≤ 5 mm; ++, 5 < inhibition zone ≤ 9 mm; +++, inhibition zone > 9 mm.

<sup>2)</sup> Data were derived from 3 trials with 3 replicates/trial.

表三、光桿菌用 PP3T 培養不同天數對於常見細菌的抑菌譜

Table 3. Spectrum of antibacterial activity of *Photobacterium luminescens* PP3T cultures as measured by the level of growth inhibition of a range of bacterial species on agar plates by the concomitant culture method

Bacterial species	Antibacterial activity <sup>1)</sup>	
	PP3T <sup>2, 3)</sup>	
	2 days post-treatment	6 days post-treatment
<i>Bacillus thuringiensis</i> A6-06X	++	+++
<i>Bacillus subtilis</i>	+++	+++
<i>Bacillus cereus</i> JSR01	++	+++
<i>Salmonella typhimurium</i> TA 98	++	++
<i>Salmonella typhimurium</i> TA 100	++	++
<i>Xanthomonas campestris</i> 17	++	++
<i>Escherichia coli</i>	+	++
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	+++	+++
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	-	-

<sup>1)</sup> Four levels of antibacterial activity as measured by inhibition of bacterial growth defined as: -, inhibition radius  $\leq 1$  mm; +,  $1 < \text{inhibition radius} \leq 2$  mm; ++,  $2 < \text{inhibition radius} \leq 3.5$  mm; + + +, inhibition radius  $> 3.5$  mm.

<sup>2)</sup> The PP3T medium was composed of 2% (w/v) proteose peptone no. 3 and 0.5% (w/v) Tween 60.

<sup>3)</sup> Data were derived from 3 trials with 3 replicates/trial.

Ensign 等在 1998 年公開的一項專利及隨後發表的幾篇論文中<sup>(3, 4)</sup>，光桿菌菌株 *P. luminescens* W-14 中的毒蛋白複合基因利用基因剔除 (genetic knock-out) 方式，初步發現含四個編碼 (encode) 毒蛋白複合體 (toxin complex, tc) 的基因簇 (genomic islands) 分別為 tca (13 kb)、tcb (7.5 kb)、tcc (11.5 kb) 和 tcd (12 kb)，其中 tca 和 tcd 編碼的高分子量蛋白複合體 a 和蛋白複合體 d，對煙草天蛾 (*Manduca sexta*) 等害蟲有較強的口服毒性，光桿菌毒蛋白複合體為外分泌型，分子量大於 100 kDa，害蟲的中腸為其活性作用部位。Ragni 等在 1998 年公開的另一項專利中則報導 *P. luminescens* XP01 菌株的殺蟲活性成分為非外分泌型物質，將上述殺蟲蛋白基因轉入大腸桿菌後，可用抗體檢出表現之蛋白，但不具有口服毒性，推測可能是必須採用組合 (combination) 基因而非單一基因，也可能是表現蛋白未被修飾成具活性蛋白或沒有分泌至細胞外所致。光桿菌殺蟲毒蛋白的基因簇較大，遺傳操作較難<sup>(19, 20)</sup>，雖然目前文獻發表光桿菌許多殺蟲毒蛋白的核酸和氨基酸序列，但對於殺蟲毒蛋白的種類、修飾方式、分泌類型、殺蟲機轉與結構組成等方面，仍有待進一步研究<sup>(11)</sup>。研究人員仍陸續發現其它與殺蟲有關的毒素，例如 Mcf 毒素<sup>(10)</sup> (makes caterpillars floppy toxin)。至於抑菌能力方面，光桿菌對於測試之病原細菌和真菌具有廣譜拮抗性，尤其對植物病原真菌有較強的抑制效果，但目前相關抑菌成份仍只有極少數被研究或確認<sup>(15)</sup>。幾丁質分解酵素是光桿菌菌液中的重要物質之一。幾丁質分解酵素可分解許多植物病原真菌之細胞壁，使具有幾丁質分解酵素的微生物具有抑菌的能力；或與其他抗菌物質發

揮協力作用，促進其殺菌或抑菌的效果。

光桿菌是昆蟲病原線蟲體內的共生細菌，隨著昆蟲病原線蟲種類的不斷發現，其共生細菌的種類也會不斷增加。目前為止，在澳洲、德國、荷蘭、芬蘭、瑞士、愛爾蘭、印度、西班牙、葡萄牙、阿根廷、義大利、以色列、美國、加拿大、土耳其與中國大陸<sup>(6)</sup>等地已陸續發現當地的光桿菌菌株，但在台灣尚未有文獻報告發現本土光桿菌菌株，本實驗室已進行台灣本土菌株的採集、分離與篩選工作。綜合國外研究成果，目前光桿菌尚在被探討是否具有開發為微生物製劑之潛能階段，所以本實驗室正積極研究線蟲共生細菌光桿菌對本土害蟲防治效果及對植物病原菌的抑制作用，並進行有效成份的分離，同時嘗試進行有用基因的轉殖工作。由於同一菌株產生的殺蟲與抑菌成份多為混合物，成份間可能相互影響，而且光桿菌菌株間產生的代謝成份互不相同<sup>(11)</sup>，因此有必要進行有效成份的分離，以測定其個別成份的殺蟲與抑菌效果。我們短期目標希望釐清相關作用的有效成分，建立作用譜與效用等相關資料；中期目標是篩選並開發本土光桿菌成為新的微生物製劑；長期目標則是累積一些成果並嘗試建立標準規範以為未來品質管制指標。

(關鍵詞：光桿菌、共生菌、殺蟲及抗菌作用、蟲生病原線蟲)

## 謝 辭

本研究由行政院農業委員會農業生物技術國家型科技計畫－93農科-4.2.1-藥-P2計畫經費補助。承蒙本所林秀昭小姐與李美珍小姐協助試驗，謹此一併誌謝。

## 引 用 文 獻

1. Boemare, N. E., and Akhurst, R. J. 1988. Biochemical and physiological characterization of colony form variants in *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae). J. Gen. Microbiol. 134: 751-761.
2. Boemare, N. E., Akhurst, R. J., and Mourant, R. G. 1993. DNA relatedness between *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae), symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes, and a proposal to transfer *Xenorhabdus luminescens* to a new genus, *Photorhabdus* gen. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 43: 249-255.
3. Bowen, D. J., and Ensign, J. C. 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.
4. Bowen, D., Rocheleau, T. A., Blackburn, M., Andreev, O., Golubeva, E., Bhartia, R., and French-Constant, R. H. 1998. Insecticidal toxins from the bacterium *Photorhabdus luminescens*. Science 280: 2129-2132.
5. Brillard, J., Duchaud, E., Boemare, N., Kunst, F., and Givaudan, A. 2002. The PhlA hemolysin from the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens* belongs to the two-partner secretion family of hemolysins. J. Bacteriol. 184: 3871-3878.

6. Brunel, B., Givaudan, A., Lanois, A., Akhurst, R. J., and Boemare, N. 1997. Fast and accurate identification of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* species by restriction analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 574-580.
7. Caldas, C., Cherqui, A., Pereira, A., and Simoes, N. 2002. Purification and characterization of an extracellular protease from *Xenorhabdus nematophila* involved in insect immunosuppression. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1297-1304.
8. Chen, G., Zhang, Y., Li, J., Dunphy, G.B., Punja, Z. K., and Webster, J. M. 1996. Chitinase activity of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* species, bacterial associates of entomopathogenic nematodes. *J. Invert. Pathol.* 68: 101-108.
9. Ciche, T. A., and Ensign, J. C. 2003. For the insect pathogen *Photorhabdus luminescens*, which end of a nematode is out? *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1890-1897.
10. Daborn, P. J., Waterfield, N., Silva, C. P., Au, C. P. Y., Sharma, S., and French-Constant, R. H. 2002. A single *Photorhabdus* gene, makes caterpillars floppy (mcf), allows *Escherichia coli* to persist within and kill insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 10742-10747.
11. Daborn, P. J., Waterfield, N., Blight, M. A., and French-Constant, R. H. 2001. Measuring virulence factor expression by the pathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens* in culture and during insect infection. *J. Bacteriol.* 183: 5834-5839.
12. Dunphy, G. B., and Webster, J. M. 1988. Lipopolysaccharides of *Xenorhabdus nematophilus* (Enterobacteriaceae) and their haemocyte toxicity in non-immune *Galleria mellonella* (Insecta: Lepidoptera) larvae. *J. Gen. Microbiol.* 134: 1017-1028.
13. Forst, S., Dowds, B., Boemare, N., and Stackebrandt, E. 1997. *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: bugs that kill bugs. *Annu. Rev. Microbiol.* 51: 47-72.
14. Guo, L., Fatig, R. O. III, Orr, G. L., Schafer, B. W., Strickland, J. A., Sukhapinda, K., Woodsworth, A. T., and Petell, J. K. 1999. *Photorhabdus luminescens* W-14 insecticidal activity consists of at least two similar but distinct proteins. Purification and characterization of toxin A and toxin B. *J. Biol. Chem.* 274: 9836-9842.
15. Hu, K., and Webster, J. M. 2000. Antibiotic production in relation to bacterial growth and nematode development in *Photorhabdus-Heterorhabditis* infected *Galleria mellonella* larvae. *FEMS Micro. Biol. Letts.* 189: 219-223.
16. Poinar, G. O., and Thomas, G. M. 1966. Significance of *Achromobacter nematophilus* Poinar and Thomas (Achromobacteraceae: Eubacteriales) in the development of the nematode, DD-136 (*Neoaplectana* sp., Steinernematidae). *Parasitology* 56: 385-390.
17. Schmidt, T. M., Bleakley, B., and Neilson, K. H. 1988. Characterization of an extracellular protease from the insect pathogen *Xenorhabdus luminescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:



- 2793-2797.
18. Wang, H., and Dowds, B. C. A. 1993. Phase variation in *Xenorhabdus luminescens*: cloning and sequencing of the lipase gene and analysis of its expression in primary and secondary phases of the bacterium. *J. Bacteriol.* 175: 1665-1673.
  19. Waterfield, N., Daborn, P. J., and ffrench-Constant, R. H. 2002. Genomic islands in *Photorhabdus*. *Trends in Microbiology.* 10: 541-545.
  20. Waterfield, N., Dowling, A., Sharma, S., Daborn, P. J., Potter, U., and ffrench-Constant, R. H. 2001. Oral toxicity of *Photorhabdus luminescens* W14 toxin complexes in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5017-5024.
  21. Wee, K. E., Yonan, C. R., and Chang, F. N. 2000. A new broad-spectrum protease inhibitor from the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Microbiology* 146: 3141-3147.

## ABSTRACT

**Hsieh, F. C., Lin, T. C., Tseng, J. T., and Kao, S. S.\* 2004. An entomopathogenic-nematophilic bacterium, *Photorhabdus luminescens*, with insecticidal and antimicrobial activities.** Plant Prot. Bull. 46: 163-172. (Biopesticides Division, Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture, Taichung, Taiwan 413, ROC)

*Photorhabdus luminescens*, a gram-negative bioluminescent insect-pathogenic bacterium, belonging to the family Enterobacteriaceae, lives in a symbiotic relationship with Heterorhabditid nematodes. Recently, it was reported that antibiotics from *P. luminescens* exhibited a wide spectrum of growth inhibition with several fungi of medicinal and agricultural importance. However, there has been no report of this kind on indigenous pest and plant pathogen. In this study, supernatant fluid of bacterial culture was centrifuged, filtered, and bioassayed against 6 species of insect larvae. The  $LC_{50}$  values of protein preparations against the 3rd instar larvae of the lepidopteran *Plutella xylostella* and *Galleria mellonella* were 56 and 200 ppm, respectively. Antagonistic effects of bacterial culture and protein preparations on 10 species of fungi and 9 species of bacteria were screened by means of dual or concomitant culture methods. High antimicrobial activities were observed against *Botrytis cinerea*, *Glomerella cingulata*, *Alternaria mali*, *Phytophthora capsici*, *Bacillus thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. cereus*, and *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. In conclusion, *P. luminescens* ATCC 29999 has high insecticidal and antimicrobial activities against local pests and pathogens.

(Key words: *Photorhabdus luminescens*, symbionts, insecticidal and antimicrobial activities, entomopathogenic nematode)

\*Corresponding author. E-mail: sskao@tactri.gov.tw