

兼具殺蟲與抗菌作用的生物農藥明日之星 — 光桿菌

光桿菌的用途

以生物農藥作為植物病蟲害的防治手段，逐步取代化學合成藥劑，期能減少化學合成藥物殘毒的危害與抗藥性產生，已成為目前農業經營的趨勢與重要的研究方向。過去，化學農藥為農民耕作之必需資材，隨著國人對生態環境保護的重視，促使生物農藥的使用日漸普遍。其中以微生物本身或其代謝物為主要成份的微生物殺蟲劑或微生物殺菌劑，因相關工業化量產所需設備與操控技術較為成熟，應用性廣泛，且效果易於顯現，既有產品最多，其有關發展也最受產業界之重視。微生物殺蟲劑中的蘇力菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)產品，佔整個生物殺蟲劑市場的90%以上。許多重要的植物病害均是由土壤或根圈真菌所引起，已有研究人員利用土壤微生物間的拮抗作用，研發抑制真菌生長的微生物殺菌劑，應用於田間防治，例如：假單胞菌(*Pseudomonas* sp.)、枯草桿菌(*Bacillus subtilis*)、木黴菌(*Trichoderma* sp.)與放線菌(*Streptomyces* sp.)等。

光桿菌(*Photobacterium 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，可從寄主分離出來培養，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，重要的是已證實兼具殺蟲與抗菌效果。由於全球迄今尚未上市兼具殺蟲與抗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。

光桿菌與線蟲的共生關係

由於農藥污染與害蟲抗藥性日益嚴重，昆蟲病原線蟲(entomopathogenic nematode)為符合害蟲綜合防治(Integrated Pest Management, IPM)且具有潛力的生物防治方法之一，目前世界上仍有不少國家進行線蟲生物殺蟲劑的研究與應用。異小桿線蟲科(*Heterorhabditidae*)在分類上屬於小桿目(*Rhabditida*)，可寄生昆蟲，侵染期幼蟲腸道攜帶有共生細菌。光桿菌屬細菌(*Photobacterium* spp.)與異小桿線蟲(*Heterorhabditis* spp.)共生。異小桿線蟲的生活史分為寄生期及自由生活期。寄生時期共生細菌會隨著線蟲的侵染過程而進入寄主昆蟲的血腔(haemocoel)，並在血腔中大量繁殖後，分泌多種代



圖一 病原線蟲、光桿菌與昆蟲幼蟲之間形成微妙的三者關係，最貼切的比喻就好像是特洛伊木馬屠城：昆蟲幼蟲為城堡，病原線蟲為引進城堡內部的木馬，而光桿菌就是藏身木馬內的士兵也是真正攻擊的主力。

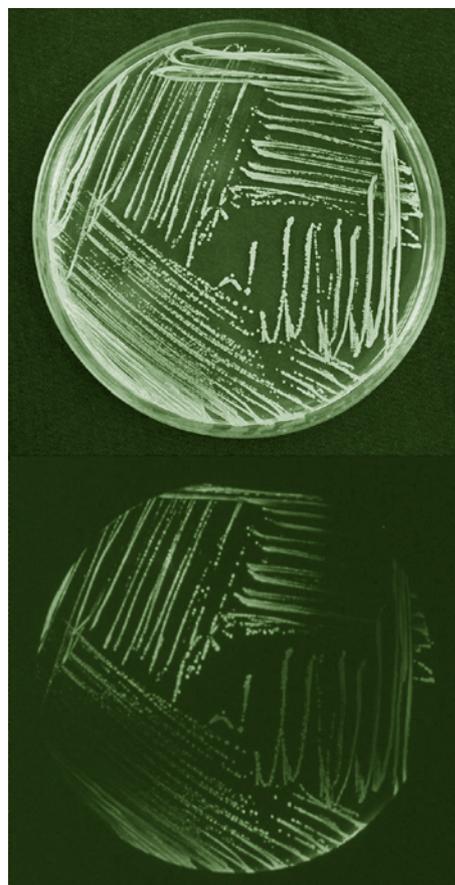
謝產物，於24至48小時之內即能殺死寄主，當營養耗盡時線蟲再離開寄主，進入自由生活期，此時的線蟲齡期為第3齡期稱為侵染期幼蟲(infective juveniles, IJ)，具高致病力，不取食，兼具寄生性、捕食性及病原微生物等3大類天敵的特性。昆蟲病原線蟲的寄主範圍廣，對哺乳動物、植物及其他非標的生物無毒性，產品在美國註冊時並不需做毒理測試。又可和許多的化學藥劑混合，可說擁有一些其他生物防治因子所缺乏的特點。

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)，最貼切的比喻就好像是特洛伊木馬屠城：昆蟲幼蟲為城堡，病原線蟲為引進城堡內部的木馬，而光桿菌就是藏身木馬內的士兵也是真正攻擊的主力。

線蟲與光桿菌的應用

由於蟲生線蟲具有以下特性，一、趨化性：線蟲具有化學感應器因而可感受到昆蟲所排出的二氧化碳與尿素，而朝釋放上述物質的生物體趨近，此行為使得線蟲具有主動性；二、蟲生線蟲及其共生菌寄生範圍極寬；三、對脊椎動物及一些無脊椎動物（如蚯蚓、蜘蛛）無毒；四、能採用動物產品，如蛋黃、雞肝、或植物如大豆粉等大量繁殖線蟲。因有上述優點，所以具有開發價值。但由於線蟲受環境的影響頗大，必須配合適宜的施用方法，才可發揮最大效果。

光桿菌在殺蟲能力方面，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，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，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。利用基因轉殖技術進行育種，一般



圖二 光桿菌菌落在自然光與暗室中的情形

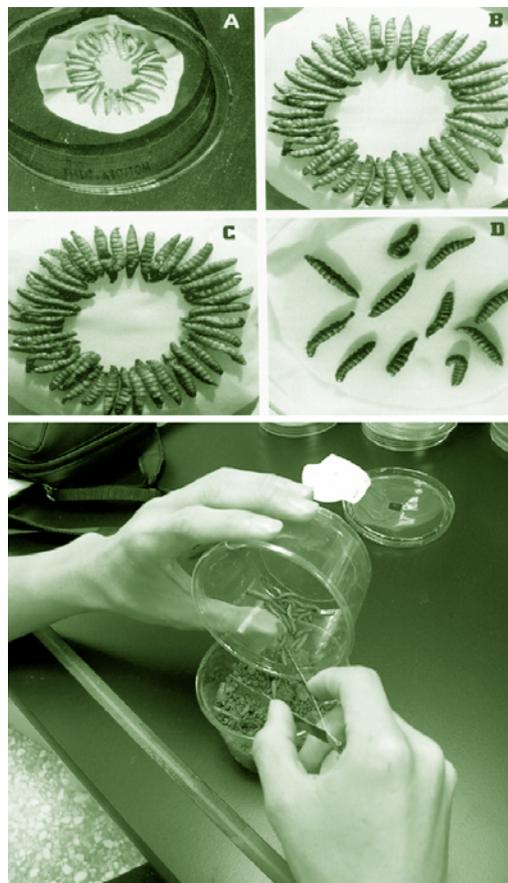
採取多基因策略來培育持久性抗逆的新品種。以抗蟲基因工程為例，轉基因植物在推廣應用的過程當中，害蟲容易對單一殺蟲基因產生抗性。針對這一問題，除了採用所謂的“高劑量／避難所”(high-dose/refuge)策略來降低害蟲抗性發生的風險之外，將具有不同殺蟲機制的基因組合在同一植物以延緩害蟲的抗性發展也是另一種有效的策略，因此，需要不斷尋找殺蟲活性更強的新基因。國際上對於各種生物資源一直予以極大重視，特別是從微生物中發現具價值的新基因。光桿菌未來的挑戰工作之一即是有用基因的選殖與應用。

至於光桿菌在抑菌能力方面，光桿菌能產生多種代謝產物，例如幾丁質分解酵素(chitinases)、脂肪分解酵素(lipases)、蛋白酵素(protease)、蛋白酵素抑制劑(protease inhibitor)、抗生物質(antibiotics)、脂多醣體(lipopolysaccharides)與溶血素(hemolysins)等，可以抑制其他雜菌在昆蟲寄主體內的增殖，保護線

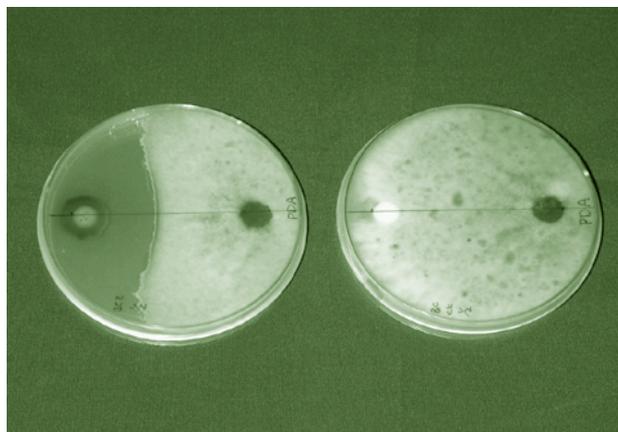
蟲繁殖的環境。研究發現在病原線蟲的體外大量培養中，共生細菌的質量、數量與種群動態直接或間接地影響著線蟲質量和產量。光桿菌代謝過程中產生的代謝產物能抑制多種細菌、酵母菌和真菌的生長，發酵液中的抑菌成分均為首次發現，突破了以前對抗生素產生菌的菌株篩選種類，這樣可降低抗生素間交互抗性的產生，為農用抗生物質提供一類新的菌株來源。尤其已有文獻報導光桿菌亦能防治森林重要害蟲—松材線蟲(*Bursaphelenchus* spp.)。國外許多學者對共生細菌的抑菌譜已進行一些研究，國內直至2004年尚無這方面的研究報導，筆者實驗室在2004年開始參與行政院農業委員會農業生物技術國家型科技計畫，正積極進行抗生物質的相關研究，相信不久可對抑菌成份有更明確的瞭解與評估。

國外研究現況

Ensign等在1998年將光桿菌菌株*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，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。研究人員仍陸續發現其它與殺蟲有關的毒素，例如 Mcf 毒素(makes caterpillars floppy toxin)。至於抑菌能力方面，光桿菌對於測試



圖三 本土短尾異小桿線蟲之分離篩選：利用大蠟蛾誘餌法 (*Galleria*-bait)



圖四 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)，左方為試驗組，右方為對照組。

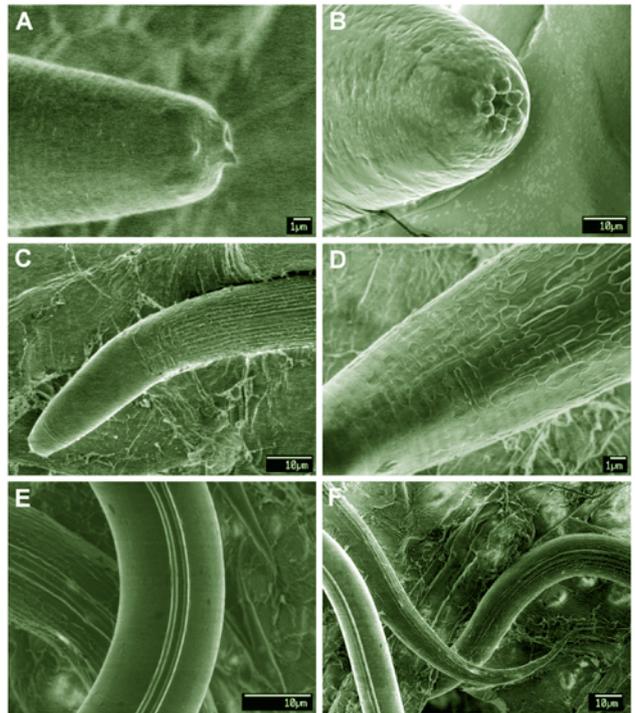
之病原細菌和真菌具有廣譜拮抗性，尤其對植物病原真菌有較強的抑制效果，但目前相關抑菌成份仍只有極少數被研究或確認。



圖五 光桿菌發酵液防治椛果炭疽病的效果，左方為試驗組，右方為對照組。

國內研究現況與成果

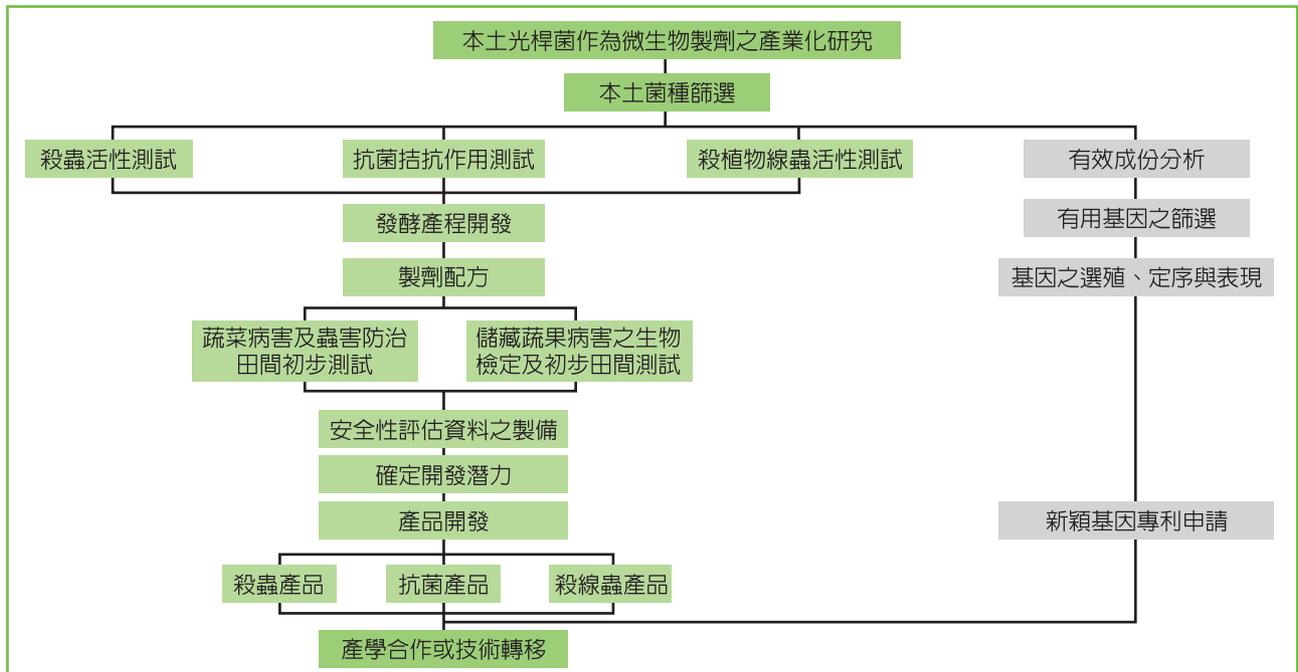
光桿菌是昆蟲病原線蟲體內的共生細菌，隨著昆蟲病原線蟲種類的不斷發現，其共生細菌的種類也會不斷增加。目前為止，在澳洲、德國、荷蘭、芬蘭、瑞士、愛爾蘭、印度、西班牙、葡萄牙、阿根廷、義大利、以色列、美國、加拿大、土耳其與中國大陸等地已陸續發現當地的光桿菌菌株，但在台灣直至 2004 年仍無文獻報告發現本土光桿菌菌株。筆者實驗室在 2004 年開始參與行政院農業委員會農業生物技術國家型科技計畫，利用大蠟蛾誘餌法(*Galleria-bait*)進行台灣本土異小桿線蟲一短尾異小桿



圖六 電子顯微鏡下短尾異小桿線蟲 *Heterorhabditis brevicaudis* TG01 之外部形態。

線蟲，並已累計篩獲 6 隻台灣本土異小桿線蟲一短尾異小桿線蟲。由於異小桿線蟲與光桿菌共生，所

表一 本土光桿菌作為微生物製劑之開發流程



以接著自線蟲體內採集、分離與篩選光桿菌菌株，已有13株共生細菌已經依細菌的形態、生化試驗與16 S rRNA 等方法，確認為本土光桿菌菌株(*Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii*)。

筆者實驗室已於2004年證實單獨使用光桿菌代謝產物分子量大於 100 kDa 的毒蛋白複合體對鱗翅目具有很強的殺蟲活性，是一種廣譜殺蟲蛋白；對於測試之病原真菌亦具有廣譜拮抗性。筆者實驗室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。為瞭解光桿菌菌液對植物病原真菌的抑制效果，進行玫瑰灰黴病菌、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、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。另外，進行光桿菌“菌體及其代謝產物混合液”對細菌的抑制試驗，結果發現對於仙人掌桿菌、沙門氏菌、大腸桿菌、黑腐病原細菌、胡蘿蔔軟腐桿菌與菊花軟腐桿菌等 6 種細菌

全部都有明顯抑菌效果。

未來願景

綜合國外研究與筆者實驗室成果，目前光桿菌確實具有開發為微生物製劑之潛力。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，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。筆者實驗室已針對台灣本土光桿菌菌株進行有效成份的分離，同時進行有用基因的轉殖工作，釐清相關作用的有效成分，建立作用譜與效用等相關資料；短期內希望提高國內廠商進行產學合作的意願並開發本土光桿菌成為新的微生物製劑。

台灣傳統化學農藥產業過去已低迷相當長的時間，如果還想在全球農藥市場上重新出發，生物農藥的推廣將是民間與政府需共同努力的方向。與傳統化學農藥比較，生物農藥的市場目前佔有率雖不高，但最近幾年隨著環保消費意識的提高，市場成長相當快速，尤其台灣加入世界貿易組織 (the World Trade Organization, WTO) 後，預期會增加微生物殺蟲劑與微生物殺菌劑商品進口種類與數量。由於全球迄今尚未上市兼具殺蟲與抗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，未來與異小桿線蟲皆值得國人進行深入探討並研發上市。

謝奉家 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所助理研究員

參考文獻

1. 謝奉家、曾巧燕、高穗生。2005。台灣首次分離的異小桿線蟲 --- 短尾異小桿線蟲。植物保護學會會刊。47：263-271。
2. 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。植物保護學會會刊。46:163-172。
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. Hsieh, F. C., Tzeng, C. Y. and Kao, S. S. 2005. An entomopathogenic-nematophilic bacterium, *Photorhabdus luminescens*, with insecticidal and antimicrobial activities. p.30. Program and Abstracts of Taiwan-Japan-Czech Republic Tri-countries Cooperation Symposium on Entomology, April 18 - 22, 2005, National Taiwan University, Taipei, Taiwan .