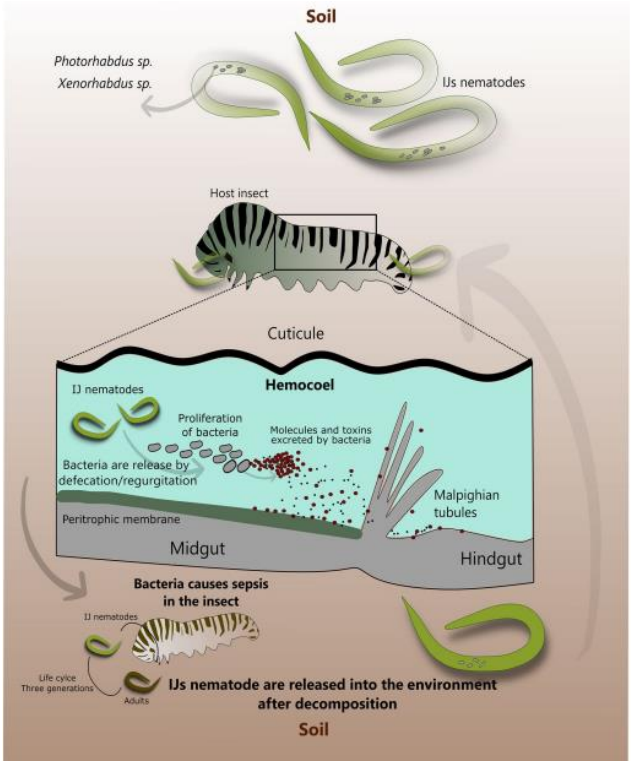
สารทุติยภูมิที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus*

ดร. อัญชลี ฐานวิสัย

แบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* เป็นแบคทีเรียแกรมลบจัดอยู่ในวงศ์ Morganellaceae (Machado et al., 2021) อาศัยอยู่อย่างจำเพาะร่วมกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง (Entomopathoginic nematode) สกุล *Steinernema* และ *Heterorhabditds* ตามลำดับ วงจรชีวิตของแบคทีเรียทั้งสกุลคล้ายกันคือ เมื่อไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่อาศัยอยู่ในดินไชเข้าตัวอ่อนของแมลง *Galleria mellonella* โดยผ่านปาก ผิวหนังและรูเปิดทางธรรมชาติ ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจะเคลื่อนที่ยัง haemolymph ของหนอนแมลง จากนั้นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจะถูกปล่อยออกมา แบคทีเรียจะมีการเพิ่มจำนวน และผลิต toxin หรือสารเคมีต่างๆ ที่ทำให้ตัวอ่อนแมลงตายด้วยภาวะโลหิตเป็นพิษภายใน 48 ชั่วโมง (รูปที่ 1) (da Silva et al., 2020) นอกจากนี้ยังผลิตสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่ยับยั้งจุลชีพชนิดอื่น ๆ ที่อยู่ในหนอนแมลงอีกด้วย



รูปที่ 1 วงจรชีวิตของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* (da Silva et al., 2020)

ปัจจุบันมีรายงานจากทั่วโลกรพบแบคทีเรีย *Xenorhabdus* จำนวน 26 ชนิด และ *Photorhabdus* จำนวน 21 ชนิด (Machado et al., 2018; Machado et al., 2019, Machado et al., 2021b; Machado et al., 2021; Sajnaga et a., 2020) มีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในจีโนมของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* หลายชนิด พบว่าแบคทีเรียทั้งสองชนิดมีความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการใกล้ชิดกัน (Tobias et al., 2017) นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาจีโนมของ *P. luminescens* subsp. *laumondii* strain TT01 และ *P. asymbiotica* แบคทีเรียทั้งสองเหล่านี้มียีนจำนวนมากที่ผลิตสารทุติยภูมิที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพที่ก่อโรค และฆ่าแมลงศัตรูพืช (Bode, 2009) นอกจากนี้ได้มีการศึกษาจีโนมของ *Xenorhabdus* 25 ชนิด และ *Photorhabdus* 5 ชนิด เพื่อทำนายกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารทุติยภูมิ พบว่ามียีนทีเกี่ยวข้อง non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) or polyketide synthase (PKS) เช่น anthraquinones, dialkylresorcinols/ cyclohexanedions, GameXPeptides/ xenotetrapeptide, glidobactins, PAX peptides, photopyrones, phurealipids, pyrrolizidine alkaloids, rhabdopeptides, rhabduscins, tilivalline, xefoampeptides, xenematides/ xeneprotides/xenobactins/fatflabets, xenoamicins, (pre-)xeno-/amicoumacins, xenocyloins, xenorhabdins, xenortides, lumizinones/pyrazinones, phenylethylamides, szentiamides, taxlllaids, tryptamide/ nematophins, xenofuranones, xentrivalpeptides (Tobias et al., 2017) นอกจากนี้มีการศึกษาเกี่นวกับกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทางชีวภาพ (biosynthetic gene clusters) จากแบคทีเรีย *Xenorhabuds* และ *Photorhabdus* รวม 45 ไอโซเลต พบว่าสามารถจำแนก biosynthetic gene clusters (BGCs) ได้ 1,000 BGCs จัดอยู่ใน 176 families และพบว่าสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นปัจจัยรุนแรง (virulence factors) ในการฆ่าแมลง และสารที่กดภูมิคุ้มกันในแมลง (insect immunosuppressants) (Shi et al., 2021)

สารทุติยภูมิ (Secondary metabolite) ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Xenorhabdus และPhotorhabdus*

แบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* สามารถสังเคราะห์สารทุติยภูมิได้หลายชนิด (ตาราง 1 และ 2) เช่น Benzylideneacetone ที่แยกได้จาก *X. nematophila* และ *X. bovienii* เป็นสารโมเลกุลขนาดเล็ก ทนความร้อน มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อโรคในพืช (Gram-negative plant-pathogen bacteria) รวมถึงได้ถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องสำอาง (Ji et al., 2004) Phospholipase A2 inhibitor ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับ Immunosuppression ในตัวอ่อนแมลง พร้อมทั้งเพิ่มความสามารถในการก่อโรคของแบคทีเรียและไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง xenocoumacins 1 และ 2 ที่แยกได้จากแบคทีเรีย *X. nematophila* มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ นอกจากนั้น Xenocoumacins 1 ยังมีคุณสมบัติเป็นสารต้านเชื้อรา (Antifungal) (McInerney et al., 1991) และสาร Chaiyaphumines ที่แยกได้จากแบคทีเรีย *Xenorhabdus* sp. 61.4 ซึ่งแยกได้จากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Sterinernema* จากจังหวัดชัยภูมิ มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อปรสิต (Antiparasitics) โดยสามารถฆ่า *Plasmodium falciparum* ซึ่งเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรคมาลาเรีย (Grundmann et al., 2014) สำหรับแบคทีเรีย *Photorhabdus* สามารถสร้างสาร secondary metabolize เช่น Carbapenems, Photobactin, 2-isopropyl-5-[(*E*)-2-phenylethenyl] benzene-1,3-diol

(IPS) และ 2-ethyl-5-[(*E*)-2-phenylethenyl] benzene-1,3-diol (ES) ซึ่งอยู่ในกลุ่มของ Stilbenes มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียหลายชนิด รวมถึงแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ที่เป็นสายพันธุ์ดื้อยา (Hu et al., 2006) นอกจากนี้ 3,5-dihydroxy-4-isopropylstibene ที่แยกได้จาก *P. luminescens* ยังสามารถต้านการเจริญของเชื้อรา และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Phenol oxidase ที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันของแมลงได้อีกด้วย (Eleftherianos et al., 2007) ต่อมาในปี ค.ศ. 2013 Ahn และคณะสามารถแยก 1,3-dimethoxy-8-hydroxy-9,10-anthreaquinone และ 3-methoxychry-sazine ซึ่งเป็นสารประกอบในกลุ่ม Anthraquinones ได้จาก *P. temperata* ซึ่งมีประสิทธิภาพในการฆ่าตัวอ่อนของยุงรำคาญ (*Culex pipiens pallens*)

ในปี ค.ศ. 1982 Akhurst ได้ทดสอบฤทธิ์ของสารต้านจุลชีพที่แยกได้จาก *X. luminescens, X. nematophila* A24 และ *Xenorhabdus* sp. Q1 พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* และแกรมลบ เช่น *Escherichia coli* และ *Shigella sonei* ในปี ค.ศ. 1996 Genhui Chen ได้ทดสอบฤทธิ์ของสารต้านจุลชีพที่แยกได้จาก *X. nematophila*, *X. bovienii* และ *P. luminescens* พบว่าสารต้านจุลชีพที่ผลิตได้ในรูปของ Primary form สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ 32 ชนิด นอกจากนั้นยังพบว่า Cell free supernatants ของแบคทีเรีย *X. nematophila* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* ได้ดีที่สุด

ในปี ค.ศ. 2008 Furgani และคณะ พบว่าสารปฏิชีวนะที่สร้างจาก *X. nematophila*, X. *budapestensis* และ *X. szentirmaii* สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *S. aureus, E. coli* และ *K. pneumonia*e โดยพบว่าเชื้อก่อโรคทั้ง 3 ชนิด มีความไวต่อสารปฏิชีวนะที่สร้างจากแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ตามลำดับ ในปี ค.ศ. 2012 Inman & Holmes พบว่า *X. nomatophila* สามารถสร้างสารต้านจุลชีพที่ทนต่อความร้อน และไม่ทนต่อความร้อนได้ เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี Disk diffusion สารต้านจุลชีพที่ทนความร้อนมีประสิทธิภาพในการต้านจุลชีพได้ดีกว่าซึ่งสารต้านจุลชีพทั้ง 2 ชนิด สามารถต้านได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ ต่อมาในปี 2014 Fang และคณะ พบว่าสารสกัดจากแบคทีเรีย *X. nematophila* ให้ผลดีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phytophthora capsici* และ *Botrytis cinerea* และในปี ค.ศ. 2018 Sa-uth และคณะ ได้ปรับปรุงอาหาร trypton soy broth โดยเติมแหล่งพลังงานอย่างคาร์บอน และไนโตรเจน พบว่าอาหารที่มีการปรับปรุงแหล่งพลังงาน สามารถทำให้ *X. stockiae* ผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราเพิ่มขึ้น โดยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phytophthora* sp., *Pythium* sp., *Rhizoctonia solani* และ *Fusarium oxysporum*

ตาราง 1 สารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Xenorhabdus*

Secondary metabolites	Biological activity	Target organisms
Benzylideneacetone	Antibacterial	*A. vitis, P. carotovorum* subsp. *atrosepticum, P. carotovorum* subs*p. carotovorum, P. syringae pv. Tabaci* และ *R. solanacearum*
Chaiyaphumine	Antiparasitics	*Plasmodium falciparum*
GameXpeptide	No data	No data
Nematophin	Antifungal Antibacterial	*B. cinerea* *B. subtilis* และ *S. aureus*
Xenocoumacins	Antifungal Antibacterial	*C. neoformam* *S. aureus* และ *S. pyogenes*
Xenocoumacins	Antibacterial	*S. aureus* และ *S. pyogenes*
Xenorhabdins	Antibacterial Antifungal Insecticidal	No data
Phenethylamines	Antibacterial Insecticidal	No data

ตาราง 2 สารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Photorhabdus*

Secondary metabolites	Biological activity	Target organisms
Anthraquinone	Insecticidal	*C. pipiens*
Benzaldehyde	Antimicrobial Insecticidal	*B. anthracis, B. aryabhattai, E. cowanii, P. capsici, R. solani* และ *C. cassiicola* *G. mellonella*
Carbapenem	Antibacterial	*E. coli, K. pneumonia* และ *E. cloacae*
GameXpeptide	No data	No data
Probactin	Siderophore	No data
Stilbene (derivatives)	Antifungal Antibacterial Cytotoxic	*A. flavus, A.fumigatus, B.cinerea, C.tropicales* และ *C. neoformans* *P. aphanidermatum,* *R. solani, E. turcicum* *F. oxysporum* *B. subtilis, E. coli, S. pyogenes* และ *S. aureus* Human cancer cell lines
trans-cinnamic acid	Antifungal	*F. effusum*

เอกสารอ้างอิง

1. Ahn JY, Lee JY, Yang EJ, Lee YJ, Koo KB, … Lee KY. Mosquitocidal activity of anthraquinones isolated from symbiotic bacteria *Photorhabdus* of entomopathogenic nematode. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 2012; 6(3), 317-320
2. Akhurst RJ. Antibiotic activity of *Xenorhabdus* spp. bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes of the families Heterorhabditidae and Steinernematidae. *Journal of General Microbiology.* 1998 128*(*12), 3061-3065.
3. Bode HB. Entomopathogenic bacteria as a source of secondary metabolites. *Curr Opin Chem Biol.* 2009; 13: 224-230
4. Bock CH, Shapiro-Ilan, DI, Wedge DE, Charles & Cantrell L. Identification of the antifungal compound, trans-cinnamic acid, produced by *Photorhabdus luminescens*, a potential biopesticide against pecan scab. *Journal of Pest Science*. 2014; **87**, 155–162**.**
5. da Silva WJ, Pilz-Júnior HL, Heermann R, da Silva OS. The great potential of entomopathogenic bacteria *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* for mosquito control: a review. *Parasit Vectors*. 2020 Jul 29;13(1):376. doi: 10.1186/s13071-020-04236-6. PMID: 32727530; PMCID: PMC7391577.
6. Eleftherianos, I., Boundy, S., Joyce, S. A., Aslam, S., Marshall, J. W., … Reynolds, S. E. An antibiotic produced by an insect-pathogenic bacterium suppresses host defenses through phenoloxidase inhibition. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2007; 104: 2419–2424.
7. Fang XL, Li XL, Wang YH, Zhang X. In vitro and in vivo antimicrobial activity of *Xenorhabdus bovienii* YL002 against *Phytophthora capsici* and *Botrytis cinerea*. *J Appl Microbiol.* 2011; 111: 145-154.
8. Furgani, G, Boszormenyi, E, Fodor, A, Mathe-Fodor, A, Forst, S, … Wolf, SL. *Xenorhabdus* antibiotics: a comparative analysis and potential utility for controlling mastitis caused by bacteria. *Journal of Applied Microbiology.* 2008; 104, 745–758.
9. Grundmann F, Kaiser M, Kurz M, Schiell M, Batzer A, Bode HB. Structure determination of the bioactive depsipeptide xenobactin from *Xenorhabdus* sp. PB30.3. *RSC Adv.* 2013; 3: 22072-22077.
10. Hu K J., Li J, X, Li B., Webster J M, & Chen GH. A novel antimicrobial epoxide isolated from larval *Galleria mellonella* infected by the nematode symbiont, *Photorhabdus luminescens* (Enterobacteriaceae). *Bioorganic and Medicinal Chemistry.* 2006; 14, 4677- 4481.
11. Inman, FL, & Holmes L. Effect of heat sterilization on the bioactivity of antibacterial metabolites secreted by *Xenorhabdus nematophila*. *Pakistan Journal of Biological Science.* 2012; 15(20), 997-1000. Retrieved November 7, 2018, from http://doi.org/10.3923/ pjbs.2012.997.1000
12. Ji D., Yi Y, Kang GH, Choi YH., Kim, P, Baek, NI., & Kim, Y. Identification of an antibacterial compound, benzylideneacetone, from *Xenorhabdus nematophila* against major plant-pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Letters.* 2004; *239*(2), 241-248. Retrieved November 11, 2018, from http://doi.org/ 10.1016/j.femsle.2004.08.041
13. Kwon B, & Kim Y. Benzylideneacetone, an immunosuppressant, enhances virulence of *Bacillus thuringiensis* against beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology.* 2008; *101*(1), 36-4.

14. Machado RAR, Muller A, Ghazal SM, Thanwisai A, Pagès S, Bode HB, et al. *Photorhabdus heterorhabditis* subsp. *aluminescens* subsp. nov., *Photorhabdus heterorhabditis* subsp. *heterorhabditis* subsp. nov., *Photorhabdus australis* subsp. *thailandensis* subsp. nov., *Photorhabdus australis* subsp. *australis* subsp. nov., and *Photorhabdus aegyptia* sp. nov. isolated from *Heterorhabditis* entomopathogenic nematodes*. Int J Syst Evol Microbiol.* 2021;71(1).
15. Machado RAR, Wüthrich D, Kuhnert P, Arce CCM, Thönen L, Ruiz C, et al. Whole-genome-based revisit of *Photorhabdus* phylogeny: proposal for the elevation of most *Photorhabdus* subspecies to the species level and description of one novel species *Photorhabdus bodei* sp. nov., and one novel subspecies *Photorhabdus laumondii* subsp. *clarkei* subsp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2018;68: 2664-2681.
16. Machado RAR, Bruno P, Arce CCM, Liechti N, Köhler A, Bernal J, et al. *Photorhabdus khanii* subsp. *guanajuatensis* subsp. nov., isolated from *Heterorhabditis atacamensis*, and *Photorhabdus luminescens* subsp. *mexicana* subsp. nov., isolated from *Heterorhabditis mexicana* entomopathogenic nematodes. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2019;69: 652-661.
17. Machado RAR, Somvanshi VS, Muller A, Kushwah J, Bhat CG. *Photorhabdus hindustanensis* sp. nov., *Photorhabdus akhurstii* subsp. *akhurstii* subsp. nov., and *Photorhabdus akhurstii* subsp. *bharatensis* subsp. nov., isolated from *Heterorhabditis* entomopathogenic nematodes. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2021b; 71:4998.
18. McInerney BV, Taylor WC, Lacey MJ, Akhurst RJ, Gregson RP. Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp., Part 2. Benzopyran-1-one derivatives with gastroprotective activity. *J Nat Prod*. 1991;54: 785-795.
19. Sajnaga E, Kazimierczak W. Evolution and taxonomy of nematode-associated entomopathogenic bacteria of the genera *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: an overview. *Symbiosis.* 2020;80(1): 1-13.
20. Sa-uth C, Rattanasena P, Chandrapatya A & Bussaman, P. Modification of medium composition for Eenhancing the production of antifungal activity from *Xenorhabdus stockiae* PB09 by using response surface methodology. *International Journal of Microbiology.* 2018; 1-10.
21. Shi YM, Hirschmann M, Shi YN, Ahmed S, Abebew D, Tobias NJ, Grün P, Crames JJ, Pöschel L, Kuttenlochner W, Richter C, Herrmann J, Müller R, Thanwisai A, Pidot SJ, Stinear TP, Groll M, Kim Y, Bode HB. Global analysis of biosynthetic gene clusters reveals conserved and unique natural products in entomopathogenic nematode-symbiotic bacteria. *Nat Chem.* 2022 Jun;14(6):701-712. doi: 10.1038/s41557-022-00923-2. Epub 2022 Apr 25. PMID: 35469007; PMCID: PMC9177418.
22. Tobias NJ, Wolff H, Djahanschiri B, Grundmann F, Kronenwerth M, Shi YM, Simonyi S, Grün P, Shapiro-Ilan D, Pidot SJ, Stinear TP, Ebersberger I, Bode HB. Natural product diversity associated with the nematode symbionts *Photorhabdus* and *Xenorhabdus. Nat Microbiol.* 2017 Dec;2(12):1676-1685. doi: 10.1038/s41564-017-0039-9. Epub 2017 Oct 9. PMID: 28993611.