

## 곤충병원성 선충 유래 공생박테리아의 종별 특성 비교

박선호<sup>1,2</sup>, 김지연<sup>2</sup>계명대학교 공학부<sup>1</sup>, (주) 바이코시스 부설연구소<sup>2</sup>

전화 (053)580-5457, (053)580-1034/5, FAX (053)587-1034

## Abstract

In order to investigate fatty acid contents and effects of cell growth on the production of an extracellular protease and toxicity of exotoxin, several symbiotic bacteria with highly effective toxins were isolated from seven species of entomopathogenic nematodes belong in *Steinernematidae*(*Steinernema glaseri* XR-DR, *S. glaseri* XR-NC, *S. glaseri* XR-MK, *S. carpocapsae* XR-PC, *S. moticola* XR-MO, *S. Longicaudum* XR-I.C) and *Heterorhabditidae* sp.(*Heterorhabditis bacteriophora* XR-HY). In the cell growth and exotoxin toxicity, XR-PC and XR-MK were superior to other species when cultured *in vitro*. The protease activity of XR-DR was remarkable compared to other species. In the case of XR-HY, the protease activity increased in parallel with cell growth. Interestingly the fatty acid contents of XR-PC and XR-HY were significantly different from those of other species 12:0, 14:0, 13:0 iso, 16:1 cis 5 and 17:0 cyclo.

## 서론

현재 환경오염 및 생태계 파괴 등 많은 문제점을 지닌 화학살충제의 사용을 대체할 수 있는 무공해 생물살충제에 대한 관심이 집중되고 있다. 특히 화학농약과 혼용 사용할 수 있는 생물살충제인 *Steinernematidae* 및 *Heterorhabditidae*속의 곤충병원성 선충은 인축에 부작용이 없고 대상 해충의 범위가 넓으며 해충이 내성을 일으키지 않고 또한 해충 탐색능력이 뛰어난 장점이 있다<sup>1)</sup>. 곤충병원성 선충에 의한 해충의 파괴는 선충 내에 공생하는 박테리아에 의한 것으로 알려지고 있다. 즉 선충이 해충의 입, 기문 등을 통해 해충의 혈장에 침투하면 해충 내로 분비된 공생박테리아가 독성물질을 생성하여 24-48시간 이내에 해충을 사멸시킨다고 한다<sup>2)</sup>. 해충을 사멸시키는 직접적인 원인인 공생박테리아가 생산하는 독성물질의 종류로는 단백질 분해 효소 및 효소가 아닌 단백질인 것으로 밝혀지고 있다. 특히 *Steinernematidae*속의 공생박테리아인 *Xenorhabdus nematophilus*는 곤충 유충의 사멸과 소화에 중요한 역할을 하는 생성물을 형성하는데 이는 단백질 분해효소에 의한 것으로 알려지고 있다. 공생박테리아는 endotoxin과 exotoxin을 분비하며 해충을 사멸시키는 직접적인 원인은 exotoxin으로 알려져 있다.

최근 곤충병원성 선충을 인공증식할 경우 해충을 이용해 *in vivo* 증식한 선충과 비교해서 지방산 함량과 성분에서 차이를 나타내고 있으며, 이것이 선충의 증식력, 보관력, 그리고 살충성에 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되고 있다. 또한 선충 배양시 공생박테리아 역시 인공증식 배지의 조성이나 온도에 의해서 포화지방산 및 불포화지방산 함량에 차이를 나타내고 있다.

이에 본 연구에서는 *Steinernematidae*속 6종과 *Heterorhabditidae*속 1종의 곤충병원성 선충으로부터 각각 공생박테리아를 분리하여 flask 상에서 7일간 배양하여 공생박테리아의

성장정도, 단백질 분해 효소의 생성, 배양상등액의 꿀벌부채명나방 유충에 대한 살충성 및 지방산 함량에 관한 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 공생박테리아의 분리

근충병원성 선충 Steinernematidae 6종(*Steinernema glaseri* XR-DR, *S. glaseri* XR-NC, *S. glaseri* XR-MK, *S. carpocapsae* XR-PC, *S. moticola* XR-MO, *S. Longicaudum* XR-LC)과 Heterorhabditidae 1종(*Heterorhabditis bacteriophora* XR-HY)을 꿀벌부채명나방 유충에 접종하여 사멸시킨 후 95% ethanol에 담귀 표면 살균한 후 3-4회 무균증류수를 이용하여 세척하여 무균적으로 유충을 해부하고 혈강을 NBTA배지에 plate out한 후 28°C incubator에서 배양하였다.

### 2. 공생박테리아의 배양 및 성장 측정

NBTA배지에서 3-5일 정도 성장한 colony를 취해서 250mL flask, 100mL 5% yeast extract배지에 접종하여 28°C, 200rpm incubator에서 7일간 배양하였으며 24시간 간격으로 sampling 하였다. 공생박테리아의 성장은 배양액을 1:50 희석하여 560nm에서 흡광도를 측정하였다. 그리고 배양액을 10,000rpm에서 15분간 원심분리하여 박테리아를 제거한 상등액으로 단백질 분해 효소 및 꿀벌부채명나방 유충에 대한 살충성 test에 시료로 사용하였다.

### 3. 단백질 분해 활성 측정 및 꿀벌부채명나방 유충에 대한 살충성 test

단백질 분해 효소의 활성은 Schmidt 등의 방법을 수정하여 측정하였다. 0.1mL의 배양 원심분리 상등액, 3mg HPA 그리고 1.4mL buffer(1mM CaCl<sub>2</sub>, 50mM Tris-HCl pH 8.0)를 혼합하여 2시간 동안 30°C에서 200rpm으로 shaking해 반응시킨 후 원심분리하여 반응하지 않고 남은 HPA를 제거한 반응여액의 흡광도를 596nm에서 측정하였다.

살충성 test는 꿀벌부채명나방 유충의 이용해 Park과 Yu의 방법에 준하여 실행하였다. 3μL의 배양 원심분리 상등액을 유충의 혈강에 microsyringe를 사용해 주사하였으며 각 시료에 대해 4마리의 유충을 이용했고 이는 25°C incubator에 보관하면서 시간에 따른 사멸정도를 조사하였다.

### 4. 공생박테리아의 지방산 측정

공생박테리아를 saponification→methylation→extraction 순으로 전처리한 후 유기분획을 취하여 지방산 측정 시료로 사용하였다. 지방산 측정은 HP 6890 gas chromatograph를, column은 Ultra2 capillary column을 사용하였으며 carrier gas는 H<sub>2</sub>를 분당 0.4mL로 흘려 주었고 column의 초기온도는 170°C로 260°C까지 5°C/min의 속도를 온도를 상승시켰으며 detector는 FID를 사용하였다. 그리고 지방산 성분 및 함량의 최종분석은 MIS Sherlock software를 이용하여 분석하였다.

## 결과 및 고찰

공생박테리아의 성장은 XR-PC 및 XR-MK가 가장 우수한 것으로 나타났다. Figure 1을 보면 대부분의 종이 배양 4일째에 최대 성장을 나타내었으며 이후는 사멸기로 접어들었고 그러나 XR-HY의 경우는 다른 종들에 비하여 성장속도가 느렸고 6일째에 최대 성장을 나타내었다. 공생박테리아의 성장과 관련하여 꿀벌부채명 나방에 대한 살충성 test를 실시한 결과 XR-PC 및 XR-MK가 살충성이 우수하였고 XR-HY를 제외한 대부분의 종이 배양 1-2일째에 살충 활성이 뛰어났으며 XR-HY종의 경우는 배양 3일 이후에 살충 활성이 나타났다. 이러한 결과는 공생박테리아의 성장 초기단계에서 살충 활성이 뛰어남을 시사해 준다.

공생박테리아의 protease 활성의 경우 XR-DR이 배양 4일째에 최대 활성을 나타내었으며 XR-HY는 배양 초기부터 배양 7일째까지 서서히 증가하는 경향을 보였으며 이들을 제외한 나머지 종은 배양 초기부터 말기까지 거의 일정하게 유지되었다.

공생박테리아의 지방산 함량은 선충의 증식력, 보관력 및 살충성에 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되고 있다. 공생박테리아의 지방산 함량에 관한 결과(Table 1)를 살펴보면 XR-PC 및 XR-HY가 다른 종의 지방산 함량에 비해 12:0, 14:0, 13:0 iso, 16:1 cis 5, 17:0 cyclo에서 함량의 차이를 나타내었으며 이는 선충 종에 따른 공생박테리아의 지방산 함량에 차이가 나타남을 시사해 준다. 기존에 알려진 *Xenorhabdus*속의 지방산 성분 및 함량과 비교해 볼 때 전체적인 지방산 성분과 함량비가 유사하였으나 그중 *X. nematophilus*의 17:0 cyclo의 함량비에 있어서 본 연구에 사용된 공생박테리아는 약 4-15%로 기존의 *X. nematophilus*에 비해 적은 함량비를 나타내는 것으로 확인되었다.

## 요약

관충병원성 선충으로부터 각각 공생박테리아를 분리하여 flask 상에서 7일간 배양하여 공생박테리아의 성장정도, 단백질 분해 효소의 생성, 배양상등액의 꿀벌부채명나방 유충에 대한 살충성 및 지방산 함량에 관한 연구를 수행한 결과 XR-PC 및 XR-MK의 성장 및 살충성이 가장 우수한 것으로 나타났으며 protease 활성은 XR-DR이 배양 4일째 최대 활성을 보였으며, 지방산 함량의 경우 XR-PC 및 XR-HY가 다른 종의 지방산 함량에 비해 12:0, 14:0, 13:0 iso, 16:1 cis 5, 17:0 cyclo에서 함량의 차이를 나타내었다.

## 감사

본 연구는 2000년도 산업자원부 신기술창업보육사업(TBI)에 의해 지원되었으며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Hominick, W.M., "Entomopathogenic rhabditid nematodes and pest control"(1990), Parasitology Today, 6, 148-152.
2. Bedding, R.A. and Molyneux, A.S., "Penetration of insect cuticle by infective juveniles of *Heterorhabditis* spp.(Heterorhabditidae: Nematoda)"(1982), Nematologica, 28, 354 -359.

Table 1. Composition of fatty acid for various symbiotic bacteria isolates

Fatty acid	Composition(%)						
	XR-DR	XR-NC	XR-MK	XR-PC	XR-MO	XR-LC	HE-HY
<b>Saturated</b>							
10:0	-	-	-	0.1±0.1	-	-	-
12:0	0.7±0.2	0.7±0.6	1.5±1.3	2.9±0.3	0.7±0.1	0.6±0.3	2.8±0.7
14:0	14.0±0.8	13.1±1.6	10.2±3.2	7.6±0.5	12.8±1.1	13.1±1.9	5.4±4.4
15:0	0.7±0.0	-	0.7±0.2	0.8±0.0	1.9±0.1	0.6±0.1	0.5±0.1
16:0	32.4±0.2	32.5±2.1	29.3±0.2	31.1±0.3	29.1±4.1	30.4±1.5	28.4±2.6
17:0	-	-	0.3±0.1	0.2±0.0	-	-	-
18:0	0.3±0.0	-	0.2±0.1	0.2±0.0	-	0.4±0.1	0.9±1.0
<b>Branched</b>							
13:0 iso	-	-	0.6±0.2	0.1±0.0	2.1±0.1	0.4±0.2	1.0±0.2
14:0 iso	-	-	-	-	-	-	-
15:0 iso	1.2±0.4	1.2±0.6	3.8±4.8	-	-	3.5±3.1	6.8±2.0
16:0 iso	-	-	-	-	-	-	-
17:0 iso	0.4±0.0	0.4±0.1	-	-	-	1.2±1.1	5.1±1.0
19:0	-	-	-	-	-	-	-
<b>Hydroxy</b>							
11:0 iso 3 OH	-	-	-	-	-	-	-
12:0 3 OH	2.9±3.4	1.1±0.9	0.7±0.1	0.3±0.0	1.3±1.1	1.4±0.8	0.3±0.1
14:0 3 OH	4.6±3.5	5.3±4.6	5.7±1.4	4.7±0.5	7.5±4.4	6.4±2.8	4.9±2.7
15:0 iso 3 OH	0.3±0.0	0.4±0.3	1.1±1.3	-	1.7±0.9	1.0±0.7	0.6±0.3
16:0 3 OH	-	-	2.0±2.1	0.9±0.1	-	0.8±0.4	-
<b>Unsaturated</b>							
16:1 cis 5	-	-	-	0.2±0.0	-	-	0.5±0.1
16:1 cis 7	18.5±0.8	16.8±0.7	16.9±6.9	26.4±0.2	14.8±2.6	12.7±1.4	16.6±1.0
17:1 cis 7 iso	-	-	-	-	-	-	2.7±1.0
18:1 cis 7	10.8±0.5	10.4±2.4	10.4±4.4	17.3±0.6	9.5±1.9	8.2±0.4	12.6±0.8
<b>Cyclic</b>							
17:0 cyclo	10.5±0.4	11.2±0.5	11.0±6.5	4.4±0.5	12.3±2.7	14.5±0.9	4.9±0.5
19:0 cyclo cis 8	1.7±0.3	1.9±0.4	1.8±0.8	0.6±0.0	2.9±1.2	2.6±0.1	-

-: not detected

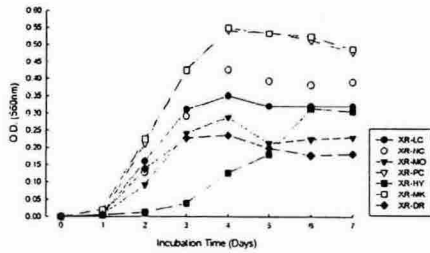


Figure 1. Comparison of cell growth by various symbiotic bacteria.

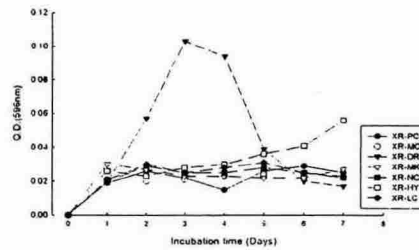


Figure 2. Comparison of extracellular protease production by various symbiotic bacteria.