

Bacillus thuringiensis 살충제 개발에 관한 연구

— *B. thuringiensis* serovar *israelensis*의 내독소 생산배지 조성—

이형환 · 이재정 · 서정희

건국대학교 생물학과 유전공학연구소

(1986년 8월 2일 수리)

Studies on the Development of the *Bacillus thuringiensis* Pesticide

— Media compositions for the endotoxin production by
B. thuringiensis var *israelensis*—

Hyung Hoan Lee, Jae Jung Lee, Jung Hee Suh

Institute for Genetic Engineering and Department of Biology,

Kon Kuk University, Seoul 133, Korea

(Received August 2 1986)

Bacillus thuringiensis serovar *israelensis* H 14 strain was cultured in 4 different fermentation M-media and then measured the rates of their growths and the productions of endotoxin crystals from the media. Out of the four M-media the production of endotoxin crystals and spores was maximal in M-4 medium (pH 9). The wet weight of the cells grown in the 150ml culture was approximately 3.901g and the number of viable spores was 1.53×10^{12} per ml and the ratio of the endotoxin over the total cell weight was 18.54%. The generation time was about 89.3 minutes in the M-1 medium, 124.1 minutes in the M-2, 97 minutes in the M-3, 130.8 minutes in the M-4. The proper pHs for the production of the endotoxin appeared to be 6.5 to 7.5.

*Bacillus thuringiensis*는 인시류등의 유충에 살충력이 있는 외독소(β -exotoxin)^(1,2,3,4)와 내독소(delta-endotoxin)^(4,5,6)을 생산하는 간균으로, 살충제로 사용되어 왔으며, 혈청형변이주에 따라서 곤충에 대한 독성효과가 약간 다른 것으로 보고되었다^(2,4,7,8). 또한 Dulmage 등은 내독소의 생산과 살충효과는 균주에 따라, 배양배지의 조성^(9,10,11,12)에 따라 다를 수 있다고 보고하였다^(13,14).

그리하여 본 연구에서는 모기의 유충에 살충력이 강한 *B. thuringiensis* serovar. *israelensis* 균의 배양조성과 pH 조건을 다르게 한 배지에서 배양했을 때의 이 균주의 성장과 내독소 생산에 미치는 영향을 비교 연구한 것을 보고한다.

실험재료 및 방법

균주

본 연구실에 보관중인 *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* (BTI) H14 K-22 균주를 실험에 사용하였다.

배지의 조성 및 제조

BTI 균주 보관용으로는 한천영양배지를 사용했고, 제 1, 2 차 배양배지인 TPB 배지와 제 3 차 배양배지인 M-1, M-2, M-3와 M-4의 조성 및 제조는 Lee 등⁽¹⁶⁾의 방법을 사용했다.

생장곡선, 균체습중량, 아포수와 pH변이 측정

BTI를 배양하면서 생장곡선, 균체습중량, 생성

Table 1. Components of the M-media for *Bacillus thuringiensis* culture.

Ingredients (gram)	M-media			
	M-1	M-2	M-3	M-4
Tryptose	10	-	-	-
Soluble starch	5	-	-	10
Casein hydrolysate	-	10	10	15
Dextrose	5	10	15	5
Yeast extract	2	2	2	-
Bacto-peptone	-	3	3	-
MgSO ₄ ·7H ₂ O	-	0.3	0.3	0.3
FeSO ₄ ·7H ₂ O	-	0.03	0.03	0.03
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	-	0.02	0.02	0.02
Distilled H ₂ O	1,000	1,000	1,000	1,000

The pH of the media was adjusted with 100 mM of K₂HPO₄ and KH₂PO₄.

된 아포수와 배양배지의 pH 변이 등을 Lee 등⁽¹⁶⁾의 방법을 사용하여 측정했다.

내독소의 분리 및 양측정

BTI 균주를 M-1, M-2, M-3와 M-4 배지에 접종하여 28°C에서 72시간 배양을 한 후에 내독소를 분리하여 생산량을 Lee 등⁽¹⁶⁾의 방법을 이용하여 조사했다.

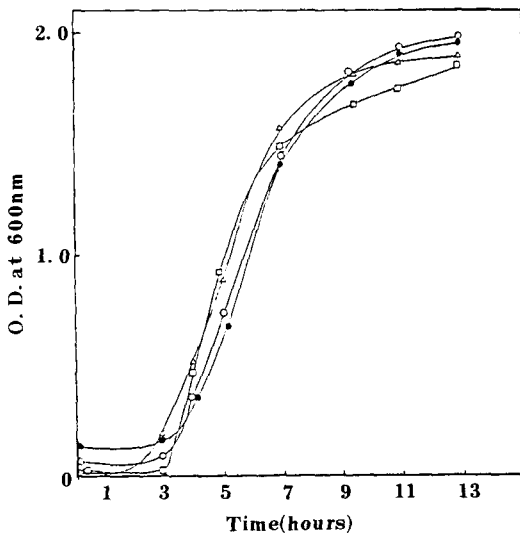


Fig. 1. Growth patterns of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in the M-1 medium having various pHs at 28°C. Growth was monitored turbidimetrically.

□ : pH 6 medium, △ : pH 7, ○ : pH 8, ● : pH 9.

Table 2. Average growth rates for *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* on the four M-media.

Media	Average hours lasting			*Average Turbidity at 10hour pi	Average doubling time
	lag phase	log phase	stationary phase		
M-1	0-3	3-9	8-	1.6	89.3
M-2	0-4	4-9	9-	2.1	124.1
M-3	0-5	5-11	11-	2.0	97.0
M-4	0-4	4-14	14-	2.0	130.8

pi: post inoculation

결 과

① *B. thuringiensis* serovar. *israelensis*의 성장

BTI 균을 제 1 차 배양배지와 제 2 차 배양배지에서 회분배양 (batch culture) 을 시킨 후에 M-1 배지 (Table 1) 을 pH 6, 7, 8 과 9 로 조정하여 12 시간 동안 회분배양한 결과는 Fig. 1 에 나타냈다. pH 6, 7, 8 과 9 로 조정된 M-1 배지에서는 성장속도가 3 시간 정도의 유도기 (lag phase) 를 지나서 8 시간 이후부터 정지기로 들어 갔으며, 성장에 의한 현탁도는 배양 10 시간 때에 600nm 에서 O. D. 가 1.6 까지 도달했다. 또한 세대 시간은 Staniner 등⁽¹⁶⁾의 방법으로 구한 결과 M-1 배지에서는 pH 9 로 적정된

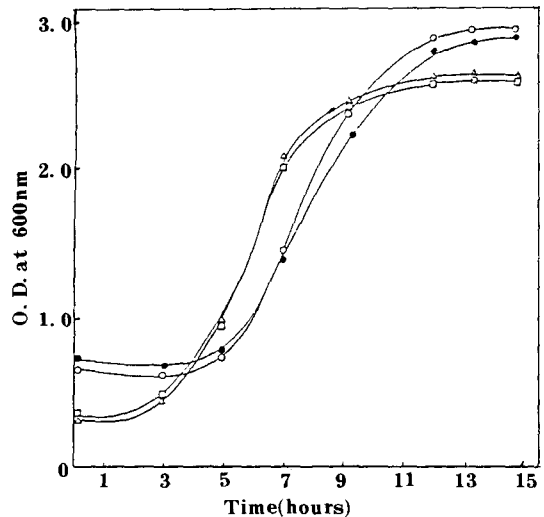


Fig. 2. Growth patterns of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in the M-2 medium having various pHs at 28°C. Growth was monitored turbidimetrically.

□ : pH 6 medium, △ : pH 7, ○ : pH 8, ● : pH 9.

배지에서 71.6분으로 가장 빨랐으며 M-1 배지에서는 평균하여 89.3분이 경과되었다 (Table 2).

제 3 차 배양배지인 M-2 배지 (Table 1) 에서 배지의 pH를 6, 7, 8 과 9 로 조정하여 28°C, 180rpm으로 BTI균을 회분배양하면서 측정된 성장곡선은 Fig. 2 에 제시되었다. M-2배지에서는 pH 8과 pH 9로 적정된 배지에서 유도기가 5시간으로 비교적 늦게 성장되었으며 5시간 정도의 대수증식기를 지나 10시간 이후 정지기로 들어감을 관찰할 수 있었다. 접종 후 10시간 배양시의 현탁도는 O. D. 600nm에서 평균 2.1 정도였으며 세대시간은 평균 M-2 배지에서는 124.1분이었다 (Table 2).

M-3 배지 (Table 1)의 pH를 6, 7, 8과 9로 조정하여 BTI를 28°C에서 회분배양하면서 조사한 성장곡선은 Fig. 3에 제시되었다. 4개의 pH M-3배지에서의 성장은 대체적으로 유도기가 5시간이나 걸리는 느린 성장을 보였다. 특히 pH 9 M-3 배지에서는 완전한 성장율을 나타냈다. pH 7과 8인 배지에서는 대수증식기의 성장율이 pH 6과 9인 배지에 비해 높았고, 10시간 배양시의 현탁도가 O. D. 600 nm에서 2.0으로 높았다 (Table 2). M-3 배지에서의 세대시간은 평균 97.05분을 나타냈다 (Table 2).

M-4 배지 (Table 1)의 pH를 6, 7, 8과 9로 조정하여 BTI를 1차, 2차 배양한 후 M-4 배지에 회분배양하면서 측정된 성장곡선이 Fig. 4이다. 여기

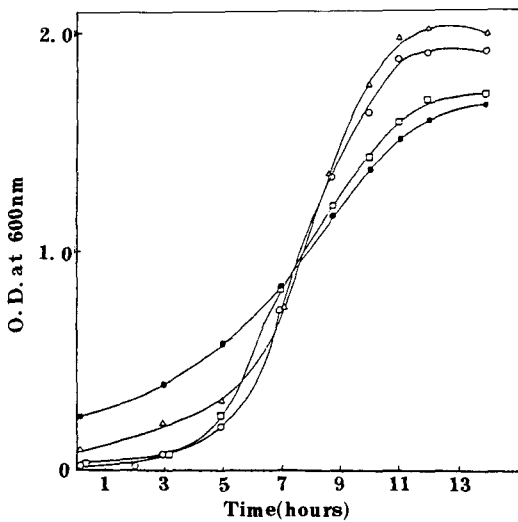


Fig. 3. Growth patterns of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in the M-3 medium having various pHs 28°C. Growth was monitored turbidimetrically.

□ : pH 6 medium, △ : pH 7, ○ : pH 8, ● : pH 9.

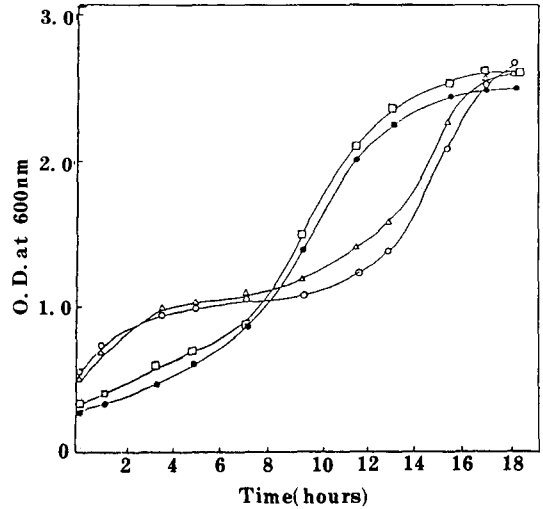


Fig. 4. Growth patterns of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in the M-4 medium having various pHs at 28°C. Growth was monitored turbidimetrically.

□ : pH 6 medium, △ : pH 7, ○ : pH 8, ● : pH 9.

에서 보면 전체적으로 유도기를 6시간 이상 거친 것이 특이하게 나타났고, pH 7과 pH 8인 배지에서 유도기의 성장속도가 다른 pH 6과 9인 배지에 비해 낮게 나타났으며 접종후 12시간 이후에서야 대수증식기로 접어들어 18시간 이후까지 지속이 되었음을 관찰할 수 있었다.

10시간 배양시의 현탁도는 O. D. 600 nm에서 pH 6과 9 M-4 배양에서는 평균 2.0이었고, pH 7과 8 M-4 배지에서는 평균 1.0을 나타냈고, 세대시간은 평균 130.8분이었다 (Table 2).

(2) BTI의 아포와 내독소 결정체 생산

BTI를 M-1, M-2, M-3과 M-4배지에서 회분배양을 한 후에 원심분리를 하여 성장한 BTI의 아포와 내독소 결정체의 습증량을 조사한 것이 Table 3에 제시되었다. 즉 M-1배지의 pH 6, 7, 8과 9로 조정된 각 배지의 배양 최초의 pH가 72시간 후에 변하는 것을 알 수 있었다. pH 6인 M-1배지는 pH 6.35로, pH 7배지는 pH 6.78로, pH 8배지는 pH 7.28로, pH 9배지는 pH 7.48로 변했음을 알 수 있었다. BTI의 150 ml 회분배양에서 pH 6인 M-1 배지에서는 1.675 g의 증식된 세균과 아포 그리고 내독소 결정체를 얻었고, pH 7 배지에서는 2.377 g, pH 8의 M-1 배지에서는 2.148 g 그리고 pH 9인 M-1 배지에서는 가장 많은 2.540 g을 얻었다. pH 6인 M-1 배지에서 생산된 생존아포수는 ml 당 6.0×10^8 개였으며 내독소 결정체 습증량은 전체 무게의

20.95%였고, pH 7인 M-1 배지에서는 생존아포수가 ml 당 6.4×10^9 개였고, 회수된 내독소의 무게는 전체 무게의 23.03%를 차지했으며, pH 8인 M-1 배지에서는 생존아포수는 ml 당 1.12×10^{10} 개였고, 내독소 결정체 무게는 19.81%였으며, pH 9인 M-1에서는 아포수는 ml 당 5.53×10^{10} 개로 제일 많았고, 결정체는 19.16%였다.

M-2 배지에서의 BTI의 아포와 내독소 결정체 생산을 비교한 것이 Table 3에 있다. M-2 배지에서도 BTI 접종시의 pH는 72시간 후에 모두 변이되었다. pH 6인 M-2 배지는 상승하여 6.31로, pH 7인 배지는 pH 6.67로, pH 8인 배지는 pH 7.17로, pH 9인 배지는 pH 7.05로 모두 변이됐다. BTI의 성장과 아포와 내독소 생산량은 pH 6인 M-2 배지에서는 $150 ml$ 에서 2.981g으로 제일 많았으며, 이중에 아포수는 ml 당 6.0×10^9 개였고, 회수된 내독소 결정체의 무게는 전체의 20.57%였다. pH 7과 pH 8인 M-2 배지에서는 BTI의 증식량이 적었으며 pH 9 배지에서는 BTI의 증식량이 2.787g이었고 이 중 아포수는 ml 당 4.4×10^9 개였고 회수된 결정체의 무게는 전체의 무게의 21.26%였다.

M-3 배지에서 BTI의 증식과 아포와 내독소 결정체의 생산을 비교한 결과가 Table 3에 제시되었다. BTI접균 초기의 M-3 배지의 pH는 모두 변했

다. pH 6인 M-3 배지는 6.01로 차이가 없었으나, pH 7인 배지는 6.47로, pH 8인 배지는 6.95로, pH 9인 배지는 pH 7.10으로 모두 변하였다. 그리고 BTI의 증식은 $150 ml$ 에서 pH 6인 M-3인 배지에서는 2.534g이었고 아포수는 ml 당 5.2×10^9 이었으며, 회수된 내독소 결정체 무게의 비는 19.23%였다. pH 7인 M-3 배지에서는 3.094g, 아포수는 ml 당 1.56×10^{10} 개였고 내독소 결정체의 무게비는 23.08%였다. pH 8인 M-3 배지에서는 BTI의 증식량이 최고로 높은 3.674g을 생산했고, 아포수는 ml 당 1.49×10^{12} 개였으며, 결정체의 무게비는 19.89%였다. pH 9인 배지에서는 BTI의 무게는 3.653g이었고 생존 아포수는 ml 당 1.36×10^{12} 개였으며, 회수된 결정체 무게비는 18.81%였다.

M-4 배지에서는 BTI의 증식과 아포 및 내독소 결정체의 생산을 비교한 결과는 Table 3에 제시되어 있다. M-4 배지에서도 BTI의 접종시의 배지의 pH가 72시간 배양후에 모두 변했다. pH 7인 M-4 배지는 72시간 뒤에는 pH 6.46으로, pH 8인 배지는 pH 6.70으로, pH 9인 배지는 6.75로 모두 변했으며, pH가 7 이하로 떨어짐을 알 수 있었다. 또한 pH 9인 M-4 배지에서는 $150 ml$ 에서 BTI의 증식량은 3.901g이었으며, 이 중 생존 아포수는 ml 당 1.53×10^{12} 개로 제일 많았으며, 회수된 결정체의

Table 3. Estimate of viable spores and endotoxin crystal produced by *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in the M-1, 2, 3 and 4 media.

Media	pH		Wet weight of the cell (g/150ml)	No. of viable spore (spore/ml)	Wet weight of Endotoxin Crystal (%) Total Cell Weight
	I	F			
M-1	6	6.35	1.675	6.0×10^8	20.95
	7	6.78	2.377	6.4×10^9	23.03
	8	7.28	2.148	1.12×10^{10}	21.60
	9	7.48	2.540	5.53×10^{10}	19.16
M-2	6	6.31	2.981	6.0×10^9	20.57
	7	6.67	2.109	5.0×10^9	24.89
	8	7.17	2.220	2.8×10^9	23.98
	9	7.05	2.787	4.4×10^9	21.26
M-3	6	6.01	2.534	5.2×10^9	19.23
	7	6.47	3.094	1.56×10^{10}	23.08
	8	6.95	3.674	1.49×10^{12}	19.89
	9	7.10	3.653	1.36×10^{12}	18.81
M-4	6	6.06	3.089	6.8×10^{11}	20.50
	7	6.46	3.012	4.0×10^{11}	23.73
	8	6.70	2.090	1.1×10^{11}	20.38
	9	6.75	3.901	1.53×10^{12}	18.54

I: initial pH, F: final pH.

비는 18.54%였다. pH 9인 M-4 배지에서는 M-1, M-2, M-3와 다른 pH M-4배지보다도 BTI 생산량과 아포수에서는 제일 높았다.

고 찰

Bacillus thuringiensis serovar. *israelensis* (B-TI) 균은 모기의 유충에 대한 치사성이 매우 높은 살충세균이며 타원형의 내독소 단백질을 생산하는 특징이 있어서 본 연구에서는 BTI의 성장, 아포생산 및 내독소 결정체의 생산에 미치는 배지의 조성 과 조건을 비교 연구하였다.

배지는 1차, 2차, 3차 배지로 나누어서 연속 증식과 아포형성을 유도하였다. 3차 배지는 M-1, M-2, M-3와 M-4배지 중에서 증식량은 M-4 배지의 pH 9인 배지에서 제일 높았는데, M-3 배지의 pH 8과 pH 9인 배지와 비교할 때 0.3g 정도의 차이를 나타냈다.

M-1 배지에서는 유도기가 다른 3 배지에 비하여 평균 3시간으로 짧았으며 세대시간은 89.3분으로 성장율이 제일 높았다. 또한 M-2배지에서도 M-1과 유사한 형이었으나 유도기가 M-1보다 길었으며 세대시간은 124.2분으로 M-1보다 성장율이 늦은 편이었다. M-3배지에서는 M-1배지와 M-2배지와 성장기 유사한 형이었으나 유도기가 평균 5시간이나 되는 배지였고 대수증식기는 6시간이나 되는 배지였다. 세대시간은 평균 97.2분으로 성장율이 비교적 높았으며, 아포의 생산수와 세포생산수도 높았다. 그러나 M-4배지에서는 대수 증식기가 다른 M-1, M-2와 M-3배지에서 보다 9시간에서 11시간으로 매우 길었으며 세대시간도 평균 130.8분으로 제일 늦은 성장율을 나타냈다. pH 9인 M-4 배지에서는 성장율이 낮았으나 아포수의 생산량과 내독소 결정체의 생산량이 비례적으로 최고로 증가 했다.

이상의 결과로 볼 때 대수증식기가 길수록 아포수의 생산이 비례적으로 많음을 관찰할 수 있었다.

배지의 pH 조건도 pH 6, 7, 8과 pH 9의 초기 조건이 72시간 뒤에는 모두 바뀌었다. pH 6인 배지에서는 72시간 배양후 pH 6.01~6.35로 상승했으며, pH 7, 8, 9인 배지는 모두 하강하여 전체적으로 pH 6.46~pH 7.48로 나타났다.

이상의 결과를 볼때 BTI의 배양배지는 pH 6.5~pH 7.5가 적합하다고 생각된다. M-4 배지에서 대수증식기가 다른 배지에서 보다도 길었던 이유는 배지 조성중 Yeast extract의 결핍과 Soluble starch를 분해하는 시간이 길었던 것으로 생각된다. 그러나 M-4 배지의 pH 9인 배지는 72시간 후에 제일 높은

성장율과 생산율을 나타내어 연구의 가치가 있다고 생각된다.

모든 배지에서 회수된 내독소 결정체의 무게비는 평균하여 20% 전후를 나타내고 있다. 개개 세포에서 내독소의 무게비는 20% 정도로 내독소 결정체가 차지하는 비율이 높은 편이었다.

결 론

Bacillus thuringiensis serovar. *israelensis* 균을 4 종류의 배지에서 배양하여 성장율, 아포와 내독소 결정체 생산과 조건, 배지조성 및 적정 pH 조건을 조사하였다.

1. 4 개의 배지중 pH 9인 M-4 배지에서 BTI의 증식량, 아포생산수와 내독소 결정체 생산이 제일 높았다. 150ml 배양에서 BTI 생산량은 3.901g이었고 생존아포수는 ml 당 1.53×10^{12} 개였고, 내독소 결정체 무게비는 18.51%이었다.

2. M-1 배지에서 BTI의 세대기간은 평균 89.3분이었고 M-2 배지에서는 평균 124.2분, M-3 배지에서는 평균 97.2분, M-4 배지에서는 평균 130.8분이었다.

3. 배지의 pH는 pH 6.5에서 pH 7.5사이가 B-TI의 증식과 내독소 생산에 적합했다.

참고문헌

1. de Barjac, H. and R. Dedoner: *Bull. Soc. Chem. Biol.*, **50**, 941-944 (1968).
2. Lecadet, M. and H. de Barjac: Pathogenesis of Invertebrate Microbial Disease, Davidson Ed., Allanheld, Osmum, N.J. Chapter 11. (1981).
3. Lee, H.H. : *Kon Kun University Academic Research Journal*, Seoul, Korea **26**, 53-59 (1982).
4. Shim, C.B., H.H. Lee and H.M. Lee: *Kor. J. Microbiol.*, **23**, 271-281 (1985).
5. Heimpel, A.M.: *Ann. Rev. Entomol.*, **12**, 287-322 (1967).
6. Oh, S.S. and H.H. Lee: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **13**, 51-57 (1985).
7. Mohd-Salleh, M.B. and L.C. Lewis: *J. Invertebr. Pathol.*, **39**, 290-297 (1982).
8. Samasanti, W., S. Pantuwatana and A. Bhumiratana: *J. Invertebr. Pathol.*, **39**, 41-48 (1982).
9. Scherrer, P., P. Luthy and B. Trumpi: *Appl. Microbiol.*, **25**, 644-646 (1973).
10. Nickerson, K.W. and L.A. Bulla, Jr.: *Appl. Microbiol.*, **28**, 124-128 (1974a).
11. Nickerson, K.W., G.S. Julian and L.A. Bulla, Jr.: *Appl.*

- Microbiol.*, **28**, 129-132 (1974b).
12. Smith, R.A.: *Can. J. Microbiol.*, **28**, 1089-1092 (1982).
 13. Dulmage, H.T.: *J. Invertebr. Pathol.*, **16**, 385-389 (1970).
 14. Dulmage, H.T.: *J. Invertebr. Pathol.*, **18**, 353-358 (1971).
 15. Stanier, R.Y., E.A. Adelberg and J. Ingraham: *The Microbial World*, 4th Ed., p276, Prentice-Hall Inc., N.J. (1976).
 16. Lee, H.H., B.Y. Hyun and C.K. Oh: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **14**, 259-264 (1986).