

바퀴(*Blattella germanica* L.)의 생물학적 제어를 위한
토양세균의 분리 및 동정

李光培·蔡龍坤

大邱保健專門大學

**Isolation and indentification of soil bacteria for
biocontrol the Cockroach(*Blattella germanica* L.)**

Kwang-Bae Lee, Yong-Gon Chae

Taegu Health Junier College

Abstract

The marked spread of the cockraches of recent years has raised a great social problem in urban areas.

The cockroach have to removal because transmit a disease to human as pest insect, but particulars are not yet reported on biological control agent for the cockroach removal.

This study was tried for the first time on biological control for the cockroach removal. The obtained results were as follows :

1. The isolated were spore-forming bacillus 1098 strain in soil. The No. 109(TH 109) strain of the among spore-forming bacillus was showed the poisonous against Cockroach.
2. The biological characteristics and flagella antigenicity of the strain is similar to *Bacillus thur-ingiensis* subsp. *indiana*.
3. TH 109 strain have the delta-endotoxin of cuboid shap.
4. This delta-endotoxin of product by TH 109 strain was toxic to the cockroach(*Blattella germanica*. L).

물학적 방제제를 개발하기 위해 본 연구를 시행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 대상 곤충 및 사용균주

실험에 사용한 곤충은 전세계적으로 분포율이 가장 높고 우리나라에서도 전국적으로 가장 널리 분포되어 있는 독일바퀴(*Blattella germanica*)를 서울 국립보건의원 매개곤충과에서 분양받아서 본 실험재료로 사용하였으며, 균 동정에 사용된 비교균주인 *Bacillus thuringiensis* sudsp. *isrealensis* 는 동의 대학교 미생물학과 김광현 교수로부터 분양받아서 사용하였다.

2. 사육방법

사육조($\phi 130 \times 158$)에 바퀴를 넣고 영양이 생육에 미치는 영향을 고려하여 100g 당 비스켓 60, 분말우유 10, 설탕 10, 기타 10의 비율로 하여 곱게 가루를 만든 후 각 사육조에 조그만 접시를 놓고 2~3일마다 충분한 양을 주었고, 물을 소형관병에 물을 넣은 후 탈지면으로 막는 방법을 통하여 충분하게 공급하여 주었다. 사육도중 도망을 방지하기 위하여 사육조 윗면에 버터를 바르고 거즈와 철망으로 덮었다. 이때 온도와 습도는 각각 $25 \sim 30^\circ\text{C}$ 와 75~80%를 유지시켰다.

3. 토양으로부터 균 분리

각지에서 채취한 토양 1g을 멸균된 증류수 5ml에 현탁하고 토양 덩어리가 없도록 충분히 진탕하였다. 그 후 토양 현탁액은 포자를 형성하지 않은 균들을 제거하기 위하

여 80°C 에서 30분간 열 처리하였다. 열 처리한 토양 현탁액의 상층액 0.1ml를 TYG 한천평판배지(Tryptone 0.5%, Yeast extract 0.5%, Glucose 0.1%, K_2HPO_4 0.1%, pH 7.2)에 접종하여 30°C 에서 5일간 배양시킨 후 형성된 colony를 무작위로 분리하였다.

4. 바퀴에 대한 독성균주의 선별

토양으로부터 분리된 균주는 Bait posion method(Choi 등; 1972)와 초미량주사법(Wasti; 1978)으로 독성균주를 선별하였다. 즉 50ml 삼각 flask의 상단에 버터를 발라 바퀴가 튀어 나오지 못하게 한 다음 3령사충의 바퀴를 group 당 10마리씩 넣고 비스켓과 분말우유, 설탕을 6:1:1 비율로 배합하여 일정량(약 1g)을 먹이로 공급한 다음 배양된 colony를 멸균 증류수 0.5ml(1.0×10^8 cell/ml)에 현탁한 후, 그 회석액을 먹이에다 혼합하여 바퀴에 투여한 후 습도와 온도를 유지시키면서 1주일 동안 관찰하여 관능적으로 치사가 인정되는 균주의 group을 선별하였다. Bait posion 방법으로 선별된 균주에 대하여 다시 초미량주사법으로 독성을 최종 확인하였다. 대조균은 균 대신 PBS buffer(pH 7.2)을 투여하여 실험군과 비교하였다.

5. 선별균주의 동정

최종 선별된 균주의 형태학적 관찰은 위상차현미경을 사용하였다. 또한 생화학적인 성질의 검토는 Bergey의 manual(Sneath; 1986), Marthin 등(1985), Simbert와 Krieg(1981) 및 De Barjac과 Frachon의 방법(1990)에 의거하여 조사하였으며, 편모 항원에

의한 응집반응시험은 Pauda 등의 방법(1978)에 따라 slide glass 상에서 행하였다.

6. 내독소의 분리

Cheung 과 Hammock 의 방법(1985)에 따라 분리하였다. 즉, 설탕밀도 균배법으로 8, 500g 에서 30 분간 원심분리하여 내독소층을 조심스럽게 분리하였다. 분리된 내독소는 설탕을 제거하기 위하여 0.01% Triton X-100 용액으로 3 회 씻은후 위상차현미경으로 그 순도를 측정하였다. 그 후 분리된 내독소는 10mM EDTA 용액에 현탁시켜서 -20°C 에 보존하였다.

7. 내독소에 의한 독성시험

내독소에 대한 독성시험은 초미량주사법(Wasti ; 1978)에 의하여 시행하였다. 즉 세정량 주사기(Hamilton microliter syringes ; 10 μ l)를 이용하여 바퀴사육조에서 선별한 3령자충바퀴를 50ml 삼각 flask 에 넣은다음 ethyl ether 에다 멸균 cotton 을 가볍게 흡수시켜 약 10 초정도 마취시켰다. 마취된 바퀴의 복부에다 정제된 toxin 을 단계별로 희석하여 그 희석액 1.5 μ l 를 정확하게 injection 하였다. 복부에 toxin 이 injection 된 바퀴들은 사육조에 넣어 먹이, 온도, 습도를 적정하게 유지시키면서 시간별로 치사되는 개체를 관능적으로 계측하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 균 분리

각 지에서 채취한 토양으로부터 포자형성세균 약 1098 균주를 분리하여 바퀴에 독

성을 나타내는 균주를 Bait posion method (Choi ; 1972)을 통해서 1 차로 검색한 결과 20 개의 균주가 바퀴에 독성이 있는 균주로 추정되었다. 그후 바퀴에 독성을 나타내는 20 개의 균주를 초미량주사법(1.0×10^2 cell/ml)으로 2 차 확인한 결과 표 1 에서 보는 바와 같이 No 109 균주가 바퀴에 대해 가장 독성이 강하게 나타났으므로 이 균주를 바퀴에 대한 독성균주로 선별하였다. 선별된 균주에 대한 형태학적 특징을 위상차 현미경으로 관찰해 본 결과 포자와 내독소를 생산하는 전형적인 *Bacillus* 균주로서 TH 109 라고 명명하였다.

2. 선별균주의 동정

선별된 균주(TH 109)의 생화학적인 성질을 조사한 결과 표 2 와 같이 대조균의 *Bacillus thuringiensis* 균주들의 생화학적 성질과 유사하였으나, VP test 와 Citrite 이용성에서만 다소의 차이가 있었다. 따라서 TH 109 균주는 cuboid 모양의 내독소를 함유한 전형적인 *Bacillus thuringiensis* 의 특징을 가지고 있었다. 또한 항생물질에 대한 내성시험의 결과 표 3 에서 보는 바와 같이 penicillin 계열의 항생물질에 대해서는 모두 내성을 가지고 있었으며, 또 대조균으로 사용한 두 균주들도 penicillin 계열의 항생물질에 대한 내성이 있었다. 아울러 선별된 균주의 아종을 알아보기 위하여 일본 구주대학 생물방제 연구소에 보관하고 있는 표준균주 27 종의 편모항원에 대한 항혈청을 Ohba 교수로부터 얻어 이 표준균주로부터 slide glass 상에서 TH 109 균주의 편모항원과 반응시킨 결과 표 4 에서 보는 바와 같이 serotype

표 1. Screen of insecticide Bacilus spp. against Cockroach(*Blattella germanica*) ; Spore and crystal mixture.

Strain No	Time(hr)	Mortality(%) after injection(1.5 μ l)							total
		1	2	3	4	5	6	7	
47		0	0	0	0	0	0	0	0
56		0	0	0	0	0	0	0	0
78		0	0	0	0	0	10	0	10
83		0	0	0	0	0	0	0	0
89		0	0	0	0	0	0	0	0
93		0	10	0	0	0	0	20	30
108		0	0	0	10	0	0	0	10
109		10	10	30	10	10	0	0	70
164		0	0	0	0	0	0	0	0
175		0	0	0	0	0	10	10	20
200		0	0	0	0	0	0	0	0
362		0	0	0	0	0	0	0	0
583		0	0	0	0	0	0	0	0
671		0	10	10	0	0	0	0	20
772		10	0	0	0	0	0	0	10
884		0	0	0	0	0	0	0	0
980		0	0	0	0	10	0	0	10
1060		0	0	0	0	0	0	0	10
1075		0	0	0	0	0	0	20	20
1078		0	0	0	10	0	0	0	10
Control		0	0	0	0	0	0	0	0

Note ; Mortality(%)=No. of death of the Cockroach/Total No. of cockroach X 100. Temp. 25°C, RH 80%. Control is PBS buffer(pH 7.2).

16 인 *Bacillus thuringiensis* subsp. *indiana* 의 편모항원성에 대한 응집반응이 일어나, 토양으로부터 분리선별된 TH 109 균주는 *Bacillus thuringiensis* subsp. *indiana* 로 동정되었으나 표준 균주와의 차이점은 내독소의 형태가 표준균주는 diamond 형인데 비하여 TH 109 균주는 cuboid 형이었다.

3. 내독소에 의한 독성시험

Cheung 과 Hammock 의 방법(1985)에 따라 분리한 내독소를 멸균수로 3 번 수세하여 농도별로 희석한 후 초미량주사법으로 3 령

자충에 주사하여 시간별로 치사되는 개체를 계측하여 본 결과 표 5 에서 보는 바와 같이 3.27ng 이 injection 된 group 에서는 9 시간 이내에 100% 의 치사 효과가 나타났으며, 1.63ng 이 injection 된 group 에서는 48 시간까지 관찰했을 때 70%, 0.81ng 에서는 60%, 0.40ng 과 0.20ng 에서는 각각 50% 의 치사작용을 나타내어 본균에 의해서 생성된 내독소(delta-endotoxin)가 바퀴에 독(毒)으로 작용함을 알 수 있었다. 일반적으로 *Bacillus thuringiensis* 속의 균주는 단백질성의 내독소(delta-endotoxin 혹은 parasporal crystal)

ㄸ 2. Biochemical properties of the strain TH 109.

Strain	Bti	Bt. indiana	TH 109
Biochemical properties			
Rod-shaped	+	+	+
Endospore produced	+	+	+
Motile	+	+	+
Gram stain	positive	positive	positive
Parasporal crytals	cuboid	diamond	cuboid
Catalase	+	+	+
Lipase	+	+	+
Nitrate reduced to nitrite	+	+	+
Anaerobic growth	+	+	+
Lecithinase	+	+	+
β -galactosidase	-	-	-
Arginine dehydrogenase	+	+	+
Lysine decarboxylase	-	-	-
Ornithine decarboxylase	-	-	-
Urease	-	-	-
Tryptophan deaminase	-	-	-
H ₂ S production	-	-	-
Indol production	-	-	-
Acetion production	+	-	-
Citrate Utilization	+	+	-
Glucose fermentation	-	-	-
Oxidative Utilization			
L-Mannitol	-	-	-
Inositol	-	-	-
Sorbitol	-	-	-
Rhamnose	-	-	-
Sucrose	-	-	-
Melibiose	-	-	-
Amygdalin	-	-	-
D-Xylose	-	-	-
L-Arabinose	-	-	-
D-Glucose	+	+	+

Notes : Bti ; *Bacillus thuringiensis* subsp. *isrealensis*

Bt. indiana ; *Bacillus thuringiensis* subsp. *indiana*

+ ; positive, - ; negative.

표 3. Susceptibility on antibiotics

Strain \ Antibiotic	Bti	Bt. indiana	TH 109
Penicilline	R	R	R
Methicillin	R	R	R
Ampicilline	R	R	R
Cephalochin	R	R	R
Erythromycin	S	S	S
Chloramphenicol	S	S	S
Tetracycline	S	S	S
Clidamycin	S	S	S
Cefoperazon	S	S	S
Gentamycin	S	S	S
Kanamycin	S	S	S
Trim-prim	S	S	R

The strain were maintained on Muller-Hinton agar plate using disk(BBL Co.) which was contained each antibiotics.

Notes :

Bti ; *Bacillus thuringiensis* subsp. *isrealensis*.

Bt. indiana ; *Bacillus thuringiensis* subsp. *indiana* (type strain)

R ; resistant, S ; sensitive.

를 생성하는 특징이 있으며, 이들 내독소가 나방이 등의 곤충유충에게 특이적인 독성을 나타낸다고 알려져 있다(Aronson 등 ; 1986). 또한 *Bacillus thuringiensis* 균주가 생성한 내독소는 동물기생선충인 *Trichostrongylus co-*

표 4. H agglutination of the TH 228 isolate with antisera of *Bacillus thuringiensis* serotype.

Serotype	Subspecies	Reference	TH 109
1	<i>thuringiensis</i>	-	-
2	<i>finitimus</i>	-	-
3	<i>alesti</i>	-	-
4	<i>dendrolimus</i>	-	-
5	<i>galleriae</i>	-	-
6	<i>entomocidus</i>	-	-
7	<i>aizawai</i>	-	-
8	<i>morrisoni</i>	-	-
9	<i>tolworthi</i>	-	-
10	<i>darmstadiensis</i>	-	-
11	<i>toumanoffii</i>	-	-
12	<i>thompsoni</i>	-	-
13	<i>parkistani</i>	-	-
14	<i>isrealensis</i>	-	-
15	<i>dakoda</i>	-	-
16	<i>indiana</i>	+	+
17	<i>tohokuensis</i>	-	-
18	<i>kumamotoensis</i>	-	-
19	<i>tochigiensis</i>	-	-
20	<i>yunnanensis</i>	-	-
21	<i>colmeri</i>	-	-
22	<i>shandogensis</i>	-	-
23	<i>japonensis</i>	-	-
24	<i>neoleonensis</i>	-	-
25	<i>coreanensis</i>	-	-
26	<i>silo</i>	-	-
27	<i>mexicanensis</i>	-	-

Notes : reference ; *Bacillus thuringiensis* subsp. *indiana*(type strain).

+ ; positive, - ; negative.

표 5. Mortality of Cockroach by delta-endotoxin of the strain TH109.

Toxin Conc. /time(hr)	Mortality after injection(1.5ul)										
	5	6	8	9	12	16	24	36	40	48	total(%)
3.27	10	50	20	20	-	-	-	-	-	-	100
1.63	0	20	10	10	0	10	10	10	0	0	70
0.81	0	20	10	0	10	10	10	0	0	0	60
0.40	0	20	10	10	0	0	10	0	0	0	50
0.20	0	10	0	0	0	30	0	10	0	0	50
0.10	0	10	0	0	10	10	0	0	10	0	40
0.05	0	0	20	0	0	0	10	10	0	0	40
Control	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10

Control : PBS burrer(pH 7.2). Toxin conc. : dissolved protein with N-NaOH

Unite : ng

lubriformis 를 치사시키며, *Cooperia punctata*, *C. onosphora* 와 *Ostertagia ostertagi* 등을 치사시킨다고 보고하였다(Ciardia 와 Bizzell; 1961). 이와 같이 *Bacillus thuringiensis* 속의 균주가 해충에 대하여 비교적 넓은 생물학적 제어 능력이 입증되었으나 *B. thuringiensis* 아종인 *indiana* 에 의해서 생성된 내독소에 대하여 특이성을 나타내는 해충은 아직까지 알려져 있지 않다. 최근 본 저자의 연구를 통해서 본 TH 109 균주가 생성한 외독소(exotoxin)는 원예작물과 약용작물에 심한 피해를 주고 있는 뿌리혹선충(*Meloidogyne incognita*)의 알과 2령유충에 강한 독성을 나타내었지만 내독소(delta-endotoxin)는 알과 유충에 특이성이 없음을 보고한 바 있다(李와 金; 1993)

IV. 결 론

전 세계적으로 분포되어 있는 바퀴는 약 3,500 여종이 보고되어 있으며, 40 여종의 Bacteria, 12 종의 Helminth, 4 종의 Protozoa 및 수종의 Virus 와 fungi 등의 병원체가 자연환경속에서 바퀴에 의하여 전파되고 있음이 확인되었고, 최근 Xanthurenic acid, Kynurenic acid, 8-hydroxyguialdic acid 등 돌연변이성 및 발암성물질이 바퀴에 의하여 배설됨이 밝혀져 바퀴에 대한 구제는 국민보건상 중요한 비중을 차지하고 있다. 따라서 바퀴 구제를 위한 일환으로 천적을 이용한 생물학적 구제를 시도하기 위해, 우리나라 토양으로부터 바퀴에 독성을 나타내는 세균을 분리 동정하였다.

토양에서 분리한 1098 균주 가운데 Bait

position method 와 초미량주사법으로 바퀴에게 독작용을 나타내는 한 균주(TH 109)를 분리 선별하였다. 분리 선별된 TH 109 균주는 형태학적 및 생화학적 특징을 조사해 본 결과 포자와 내독소를 형성하는 전형적인 *Bacillus thuringiensis* 속에 속하였으며, 이 균주의 아종을 조사하기 위해 *Bacillus thuringiensis* 표준균주들의 편모항원으로부터 얻은 항혈청과 TH 109 균주의 편모항원에 대한 응집성을 조사해 본 결과 *B. thuringiensis* subsp. *indiana* 로 동정되었다.

분리선별된 TH 109 균주가 생성한 내독소(delta-endotoxin)는 cubiod 형인데 비하여 표준균주는 diamond 형이어서 내독소의 형태에 있어서 상이한 점을 발견하였다. TH 109 균주가 생성한 내독소를 Cheung 과 Hammock 의 방법(1985)에 의하여 정제한 다음, 초미량주사법으로 바퀴에 대한 독성시험을 시행한 결과 개체당 3.27ng(N-NaOH 의 용해단백질로 환산함) injection 된 group 에서는 9 시간 이내에 100%의 치사율을 보였고, 1.63ng injection group 에서는 70%, 0.20 ng injection group 에서는 50%의 치사율을 보여 TH 109 균주가 생성한 내독소가 바퀴에 독성물질로 작용함을 알 수 있었다. 표준균주인 *Bacillus thuringiensis* subsp. *indiana* 가 생성한 내독소(delta-endotoxin)는 지금까지 어떤 해충에도 특이성이 없는 것으로 알려져 왔으나, 본 연구를 통하여 생물학적으로 구제가 어려운 바퀴에 특이성이 있음을 알 수 있었다. 따라서 계속된 연구를 통해서 내독소(delta-endotoxin)의 용해조건, 내독소 단백질의 분리정제와 화학적 수식에 의한 생물학적 활성기와 관계되는 아미노산

기를 추정하고, 내독소에 대한 세포학적인 검토를 Radio-immunoassay 나 Enzyme-immunoassay 등의 방법으로 숙주세포의 receptor 연구와 병행하여 내독소 단백질에 대한 연구가 정립되면 바퀴 구제를 위한 새로운 biological agent 로 활용될 수 있으리라 사료된다.

參考文獻

1. Herms, W.B., and Nelson, Y. 1913. The croton bug(*Ectobia germanica*) as a factor in bacterial dissemination. *Am. T. pub. Health.* 3 : 929-934.
2. Longfellow, R.C. The common house roach as a carrier of disease. *Am. J. Health.* 3 : 58-61, 1914.
3. Barber, M.A. 1914. Cockroaches and ants as carriers of the vibrios of Asiatic cholera. *philippine. J.Sc., sec. B,* 9 : 1-4.
4. Galeb, Osman. 1878. Observations et experiences Sarles migrations du *Filaria rytipeurites*, parasites et des rats. *Compt rend. d. sc.,* 87 : 75-77.
5. Fibiger, Johannes. 1913. Ueber eine durch Nematoden(*Spiroptera* sp. n) hervorgerufene papillomatose und carcinomatose "Geschwulstbildung im Magen der Ratte", *Berl. Klin. Wchnsch.,* 50 : 289-298.
6. Chitwood B. 1932. A synopsis of the family Blattidae, *Ztschr. fur parasitenkunde.* 5 : 14-50.
7. Gahan, J.B., Gilbert, I.H., Peffly, R.L. and Wilson. H.G. 1948. Comparative toxicity of for chlorinated organic compounds to mosquitose, house files and cockroaches. *J. Econ. Entomol.,* 41(5) : 795-801.
8. Edwine F. Archbold, Michale. K. Rust, Donald A. Reiersen, and Katharine D. Atknsn. 1986. Characterization of Yeast infection in the Cockroach. *Environ. Entomol.* 15 : 221-222.
9. Williams., "Third Generation pesticides" in man and Ecospher, Reading from *Scientific American.* W.H. Freeman Co., San Francisco, Calif., 1971.
10. De Bach. 1964. Biological control of Insect, Pests, and Weed. Reinhold Pub. Co. New York, N.Y. 764-795.
11. Choi, Hung Chun., M.D. Yeon Hee Yoo, M.D. 1972. Anovservation on the resistance of Cockroach to various Insecticides. *고려의대잡지.* Vol 9. No. 1.
12. Wasti, S.S. and G.C. Hartmann. 1978. Microbial toxin activity on larvae of the gypsy moth and greater wax moth. Department of Bilogy, Rhode Island collage providence RI 02908. U.S.A. 192-196.
13. Sneath, P.H.A. 1986. Enspore-forming gram-positive rods and cocci. In *Bergey's manual of systametic Bacteriology*(Vol. 2). Williams & Wilkins. 1104-1135.
14. Marthin, P.A.W., E.B. Haransky, R.S. Travers and C.F. Reichelderfer. 1985.

- Rapid biochemical testing of large number of *Bacillus thuringiensis* Isolates using agar dots. *Bio. Tech.* 3 : 386-392.
15. Simbert, R.M. and N.R. Krieg. 1981. General characterization. In manual method for general bacteriology. American Society for Microbiology. 417-418.
 16. De Barjac, H. and Frachon. 1990. Classification of *Bacillus thuringiensis*. *Entomophaga*. 35 : 233-240.
 17. Pauda, L.E., M. Ohba and K. Aizawa. 1978. Serological and bacteriological studies of the three Isolates of *Bacillus thuringiensis* serotype 10. In Annual Reports of ICME. Osaka University. Japan. 169-180.
 18. Cheung, P.Y., and B.D. Hammock. 1985. Micro-lipid-droplet encapsulation of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin for control of mosquito larvae. *App. Environ Microbiol.* 50 : 984-988.
 19. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A. L. and Randall, R.J. 1951. Protein Measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193-265.
 20. Livadas, G.A. and Geogopoulos, G. 1953. Development of resistance to DDT by *Anopheles sacharovi* in greece. *Bull Wld Hlth Org.* 8, 497-511.
 21. 李韓一 · 沈載澈, 1974. 독일바퀴의 야외 구제실험 및 살충제 감수성 실험. 국립 보건연구원보 제 11 권. 101-105.
 22. 李光培 · 金光顯. 1993. *Bacillus thuringiensis*(TH 109)菌株에 의한 뿌리혹線蟲 *Meloidogyne incognita*의 防除效果, 東義大學校 生物科 博士學位論文.