

한국 토양에서 분리된 *Bacillus thuringiensis*의 분포와 특성조사

Distribution and Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from soils in Korea

김호산¹ · 박현우¹ · 이대원¹ · 유용만² · 김정일³ · 강석권¹

Ho San Kim¹, Hyun Woo Park¹, Dae Won Lee¹,
Yong Man Yu², Jeong Il Kim³ and Seok Kwon Kang¹

ABSTRACT To isolate naturally occurring novel *Bacillus thuringiensis* strains for useful pest control agents, the distribution and characterization of *B. thuringiensis* from soils in Korea were investigated. A total of 64 isolates of *B. thuringiensis* producing spore and crystal was obtained from 583 soil samples in Korea. Toxicity of isolates was assayed against Lepidoptera (*Bombyx mori*), Diptera (*Culex pipens*) and Coleoptera (*Sitophilus oryzae*), respectively. The results showed that *B. thuringiensis* isolates toxic Lepidoptera are 42.2%, both Lepidoptera and Diptera are 31.3% and Diptera are 20.3%, demonstrating that spectrum of insecticidal activity of *B. thuringiensis* isolates is various. But no *B. thuringiensis* isolates have toxicity against Coleoptera.

KEY WORDS *Bacillus thuringiensis*, *Bombyx mori*, *Culex pipiens*, *Sitophilus oryzae*.

초 록 해충의 방제에 효과적으로 이용할 수 있는 *Bacillus thuringiensis* 균주를 분리하기 위하여 전국의 다양한 토양을 채취하여 *B. thuringiensis*의 분포와 독성을 조사하였다. 총 548개의 토양을 전국 각지에서 채취하여 포자와 내독소 단백질을 생산하는 64개의 *B. thuringiensis*를 분리했다. 분리된 64개의 *B. thuringiensis*를 나비목의 누에 (*Bombyx mori*), 파리목의 빨간집모기 (*Culex pipens*), 딱정벌레목의 쌀바구미 (*Sitophilus oryzae*)의 세 종에 대해서 독성을 검정한 결과, 누에에 독성을 띠는 균주가 42.2%로 가장 많았으며, 누에와 빨간집모기에 동시에 독성을 띠는 균주가 31.3%, 빨간집모기에 독성을 띠는 균주는 20.3%의 비율로 분리되어 다양한 독성 분포를 보였다. 그러나 쌀바구미에 독성을 띠는 균주는 분리되지 않았고, 내독소 단백질은 형성하지만 독성이 없는 무독성 *B. thuringiensis*가 6.2%의 비율로 분리되었다.

검색어 *Bacillus thuringiensis*, 누에 (*Bombyx mori*), 빨간집모기 (*Culex pipens*), 쌀바구미 (*Sitophilus oryzae*)

포자형성(sporulation) 시기에 곤충에 강한 독성을 보이는 내독소 단백질을 생산하는 *B. thuringiensis* (이하 Bt로 약칭)는 오래전부터 그 특성의 유효성이 인정되고 많은 조사와 연구가 이루어져 농업해충 및 위생해충의 방제를 위한 미생물 제제로서 현재까지 널리 사용되어져 오고 있다(Aronson 등 1986, Ho-

fte와 Whiteley 1989, Luthy 등 1982).

Bt는 그람양성의 세균으로 토양이 주요 분포지로 알려져 있다. 따라서 토양은 Bt의 분리가능성이 매우 높은 장소임을 알 수 있다. 토양에서 Bt의 분리는 양잠농가, 저곡창고 등(Norris 1969, Burges와 Hurst 1977, Ohba 등 1984)과 더불어 계속적으로 이루어

¹ 서울대학교 농업생명과학대학 곤충병리학연구소(College of Agriculture & Life Sciences, Seoul National University, Suwon, Korea)

²경농 정주연구소(Kyong-Ju Research Institute, Kyong Nong Corporation, Kyongju, Korea)

³KIST 생명공학연구소(Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KIST, Taejeon, Korea)

어저 왔으며, 많은 연구 결과, B.t가 어떤 특정지역에만 편재하는 것이 아닌 세계의 다양한 지역의 자연토양에도 널리 분포하고 있음을 보여 주었다(De-Lucca 등 1981; Ohba와 Aizawa 1986a; Martin와 Travers 1989; Karamanlidou 등 1991). 또한 이들 지역을 대상으로 새로운 균주가 지속적으로 보고되고 있다(Tanada와 Harry 1993). 그러나 국내에서 새로운 균주 분리를 위한 국내토양에서의 B.t분포와 특성조사는 아직 보고되지 않고 있다.

이에 본 실험실에서는 국내의 양잠농가(Kim 등 1995a), 저곡창고(Kim 등 1995b)를 대상으로 토양을 채취하고 많은 수의 B.t를 분리하여 이 분리지역이 상당히 효율적임을 이미 보고한 바 있고, 여기서는 토양에 존재하는 B.t를 전국의 다양한 토양(크게 산과 들로 구분)에서 분리하여 국내에서의 그 분포와 특성을 알아 보았다. 나아가서 새롭게 대두되는 해충 및 강한 저항성을 획득한 해충을 효율적으로 방제하고 유용자원으로서 B.t를 확보하기 위하여 독성이 강하거나 숙주역이 넓어진 새로운 B.t 균주들을 분리하는 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

1. 토양시료 채취

토양은 전국 6개도에서 산과 들을 중심으로 548 곳의 토양시료를 채취하여 실험에 사용하였다. 산은 주로 소나무 같은 큰 나무밑의 토양, 과수원을 중심으로 토양을 채취하였고, 들은 원에, 과수시설단지, 각종 밭작물이 자라는 토양 등을 중심으로 채취하였다.

2. B.t의 분리

B.t는 Ohba와 Aizawa (1978)의 방법에 의거하여 분리되었다. 채취된 토양 1g을 50 ml conical tube에 넣은 뒤, 멸균증류수 9 ml을 첨가하여 강하게 5분 동안 흔들여 준다. 이 토양현탁액의 상층을 새로운 tube에 옮기고, 포자를 형성하지 못하는 세균들을 선택적으로 제거하기 위하여 80°C에서 5분간 열처리하였다. 이 현탁액을 10^{-2} 과 10^{-3} 으로 각각 희석하여 nutrient agar plate에 고르게 도말했다. 이 plate를 28°C에서 4-7일간 배양한 후에 형성된 *Baci-*

illus 콜로니들 중에서 외형이 B.t와 비슷한 콜로니들만 선별하여 위상차현미경으로 내독소 단백질과 포자를 형성하는 지를 관찰하였고, 또한 영양세포들, 포자들, 내독소 단백질들의 형태적 특징들을 검정하였다. 여기서 내독소 단백질을 형성하는 콜로니만 nutrient agar plate에 옮긴 후, 순수배양하여 4°C에 보관하면서 살충성 조사를 비롯한 기타 실험을 수행하였다 한편, 내독소 단백질을 형성하지 않는 B.t는 관찰되지 않았다.

3. 분리된 B.t의 정량적 독성검정

B.t를 G.Y.S 배지(Nickerson 등 1974)에 접종하여 세포내에 포자와 내독소 단백질이 형성되고 후에 autolysis에 의해 이들이 세포외부로 방출될 때까지 27°C에서 4-7일 동안 배양하였고, 배양중에 위상차현미경으로 계속 세포내에서의 변화를 관찰하면서 곤충에 대한 독성검정에 이용하였다

누에(*Bombyx mori*)에 대한 독성검정은 B.t 배양액의 포자농도를 측정된 다음, 10^7 개의 포자(spores/ml) 농도로 집중된 200 μ l를 2g의 인공사료에 첨가하여 각 구당 2령 유충 각 20마리씩을 넣고 25°C에서 사육하면서 48시간 동안 치사율을 조사하였다. 대조구로서 나비목에 대표적인 독성을 보이는 B.t subsp. *kurstaki*와 무처리한 것을 사용했다.

또한 이들 B.t의 모기에 대한 독성검정은 서울대학교 농업생명과학대학 위생곤충실험실에서 제공된 빨간집모기(*Culex pipiens*) 2령 유충 20마리를 20 ml의 포자와 내독소 단백질 혼합물(10^7 spores/ml)이 포함된 50 ml conical tube에 넣고 먹이를 주지 않으면서 25°C에서 48시간 동안 치사율을 조사하였다. 대조구로서 파리목에 강한 독성을 보이는 B.t subsp. *israelensis*와 무처리한 것을 사용했다. 그리고 쌀바구미(*Sitophilus oryzae*)에 대한 독성검정은 쌀 5g을 10^9 개의 포자(spores/ml)의 B.t 배양액에 2시간 동안 침지하고 음건한 후, 20마리의 바구미를 넣어 25°C에서 사육하면서 1주일간 그 치사율을 조사하였다. 각각의 독성검정은 3회 반복 실시하였다

4. 위상차현미경 및 전자현미경 관찰

포자형성기가 지난 B.t의 포자와 내독소 단백질 혼합물에서 이들의 크기와 형태를 알아보기 위하여

위상차현미경(Olympus Model VAN OX)과 주사전자현미경(Phillips SEM 515)을 이용하여 관찰하였다. 위상차현미경으로 관찰하기 위해서 소량의 B.t 배양액을 slide glass 위에 떨어 뜨린 후, 1500배로 관찰하였다. 한편, 주사전자현미경으로 관찰할 시료는 냉동건조하고 알루미늄 원반시료대 위에서 자연건조시킨 후, 탄소로 coating하고 금으로 염색하여 관찰하였다.

결 과

토양은 B.t의 주요 분포장소로 간주되고 있는 바(Martin와 Travers 1989), 국내 산림, 과수원 및 시설원에 주변의 토양을 채취하여 그 분포를 확인하고 새로운 균주의 분리가능성을 확인하였다. 전국 각지에서 채취된 총 548개의 토양시료에서 포자와 내독소 단백질을 생산하는 64개의 B.t를 분리하였다(Table 1). Ohba와 Aizawa(1978)의 방법에 의한 B.t의 분리에 있어서 고체배지상에 형성된 콜로니의 수는 대략 200여개 정도였으며, 이중 외형상 B.t로 보이는 콜로니들은 전체 콜로니에서 평균 2%에 달

했고, 콜로니가 형성되지 않은 고체배지도 다수 존재하여, 전체적으로 B.t의 분리 수가 떨어졌다. 이 콜로니들을 위상차현미경으로 관찰하여 포자와 내독소 단백질이 형성된 것들을 분리하였고, 또한 영양세포들, 포자들 그리고 parasporal inclusions의 형태적 특성을 조사하였다(Fig. 1). 특히 내독소 단백질의 크기와 형태 관찰은 후에 독성검정 결과와 더불어 가능성있는 새로운 B.t 선발의 기준이 되었다.

내독소 단백질의 형태는 대체로 이중피라미드형, 구형을 갖는 균주들이 많이 존재함을 알 수 있었는데, Fig. 2는 주사전자현미경으로 포자와 내독소 단백질 혼합물을 관찰한 것이다. 이중피라미드형태를 갖는 균주(Fig. 2-1, 2, 3)가 많이 보였고, 구형을 갖는 균주(Fig. 2-4)도 관찰할 수 있었다.

전국토양에서 분리된 B.t를 누에, 빨간집모기, 쌀바구미에 대해 독성을 검정한 결과는 Table 2와 같다. 누에에 독성을 띠는 B.t가 42.2%로 가장 많이 분리되었고, 누에와 빨간집모기에 동시에 독성을 띠는 균주가 31.3%의 비율로, 빨간집모기에 독성을 띠는 균주는 20.3%로 분리되었다. 그러나 쌀바구미에 독성을 띠는 균주는 본 실험에서 분리하지 못했다.

Table 1. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from soils in Korea

Locality	Number of soil samples examined	Number of soil samples with B.t isolate	Number of B.t isolated
Kyonggi-do	7	1	1
1>Mountain	6	1	1
2>Field	1	—	—
Chungchong-do	140	18	21
1>Mountain	—	—	—
2>Field	24	18	21
Kyongsang-do	246	19	22
1>Mountain	87	8	11
2>Field	159	11	11
Cholla-do	122	4	5
1>Mountain	65	1	1
2>Field	57	3	4
Kangwon-do	15	7	9
1>Mountain	3	—	—
2>Field	12	7	9
Cheju-do	18	5	6
1>Mountain	18	5	6
2>Field	—	—	—
Total	548	53	64

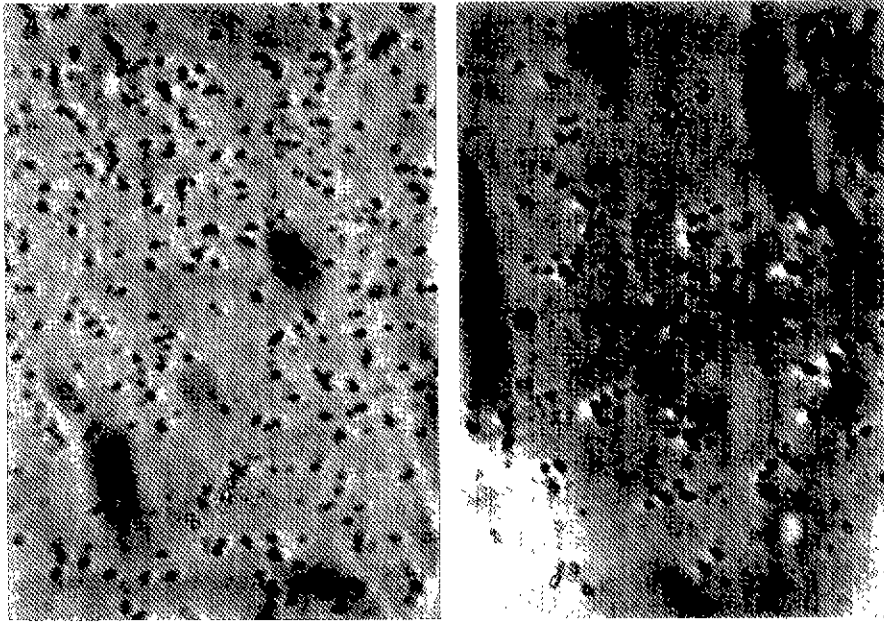


Fig. 1. Phase-contrast photographs of the sporulated cultures of *Bacillus thuringiensis* isolates. Spore and crystal represent as S and C, respectively A *Bacillus thuringiensis* isolate shows that crystals are bipyramidal in shape. B. *Bacillus thuringiensis* isolate shows that crystals are spherical in shape.

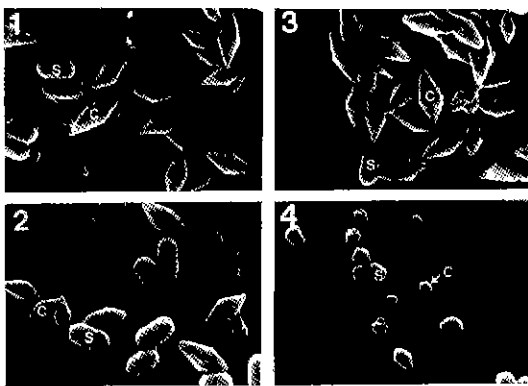


Fig. 2. Scanning Electron Microscopy of crystal-spore mixtures of *Bacillus thuringiensis* isolates. Spore and crystal represent S and C, respectively Crystals of *Bacillus thuringiensis* isolates in photopgraph number 1, 2 and 3 show typical bipyramidal in shape and those in photograph number 4 are spherical in shape

Table 2. Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis* isolated from soils in Korea

Insect tested	Bt isolates tested	% of toxicity
<i>Bombyx mori</i>	27	42.2
<i>Culex pipens</i>	13	20.3
<i>Bombyx mori</i> / <i>Culex pipens</i>	20	31.3
<i>Sitophilus oryzae</i>	—	—
Non-toxic	4	6.2
Total	64	100

보이는 균주들을 선발하였다(Table 3). 전국토양에서 분리된 64개의 Bt 중에서 누에 5개, 빨간집모기 1개, 누에와 빨간집모기에 동시에 독성을 띠는 6개 균주를 선발하여 총 12개의 새로운 균주일 가능성이 있는 B.t를 분리하였다.

고찰

토양에서의 Bt 분리는 미국내 여러지역의 토양을 대상으로 한 것(DeLucca 등 1981)과 일본내 토양

한편 이들 세 곤충의 독성검정에서 독성을 띠지 않는 무독성 균주도 6.2%로 분리되었다.

위에서 밝혀진 이상의 결과를 토대로 내독소 단백질의 형태나 크기가 특이하거나 강력한 독성을

Table 3. Selection of *Bacillus thuringiensis* isolates* having distinguishing properties

Insect	Number of B.t isolates from soils	
	Total	Selected
<i>Bombyx mori</i>	27	5
<i>Culex pipens</i>	13	1
<i>Bombyx mori</i> / <i>Culex pipens</i>	20	6

**Bacillus thuringiensis* isolates were selected by toxicity, host range and morphology of crystal protein.

에서 분리한 것(Ohba와 Aizawa, 1986a) 등 여러 연구자들에 의해 연구되어져 토양에 B.t가 많이 존재하고 그 중 나비목에 독성을 띠는 균주가 대부분을 차지한다고 알려져 있다. 본 실험에서는 Table 1과 같이 전국 6개도의 토양에서 64개의 B.t가 분리되어 분리가 이미 보고된 양잠농가와 저곡창고에 비해 효율적이지 못했으나(Kim 등 1995a, b), 새로운 B.t 분리 가능성은 채취된 토양시료가 많을 수록 증가함으로 계속적으로 다양한 자연환경 조건하의 토양 채취가 요구되어진다. 그러나 지역마다 B.t의 분리 정도가 불규칙한 양상을 보여 지역적으로 B.t의 유리한 분포지는 알 수 없었고, 또한 산과 들 중 어느 장소가 더 효율적인지 일반화할 수는 없었지만, 대개 들에서 유기물이 많은 약간 습한 토양에서 B.t가 많이 분리되는 경향을 보였다.

독성검정에서는 누에에만 독성을 띠는 균주가 대부분을 차지하지 않고, 빨간집모기, 누에/빨간집모기에 동시에 독성을 띠는 균주가 비슷한 분포를 나타내어 국내의 저곡창고와 양잠농가에서 B.t를 분리, 보고한 결과인 나비목에 독성을 띠는 균주가 대부분인 경우와는 차이를 보여(Kim 등 1995a, b), 다양한 곤충에 독성을 띠는 균주의 분리 가능성이 높을 것으로 생각되어진다. 또한 누에, 모기 유충 및 쌀 바구미에 독성이 전혀 없는 무독성 B.t 균주가 전국토양에서 6.2%가 분리되었으며, 국내의 저곡창고와 양잠농가에서도 각각 12%와 13.4%의 무독성 B.t 균주가 분리 보고된 결과로 볼 때, 무독성 B.t가 자연토양 등에서 보편적으로 존재한다는 보고(Ohba와 Aizawa 1986b, Ohba 등 1988; Martin와 Travers 1989)와 일치하는 결과를 얻었다.

분리된 균주의 내독소 단백질의 형태는 Fig. 2에서 보여지는 것처럼 대부분 이중피라미드형으로서, 대개 모기에 독성을 보이는 구형의 내독소 단백질은 적게 관찰되었고, 나비목과 파리목의 양쪽에 독성을 띠는 균주의 경우에서도 이중피라미드형이 대부분을 차지하였고 구형을 띠는 균주는 얼마되지 않았다.

Table 3은 독성과 형태면에서 특이한 새로운 균주일 가능성이 높은 균주들을 선별한 것으로서, 현재 이들을 대상으로 분류, 동정의 기초적인 실험과 여러가지 분자유전학적 방법을 이용한 분석이 수행되어지고 있다. 또한 본 실험실에서는 누에, 빨간집모기, 쌀바구미의 제한된 곤충에 대해서만 독성이 검정되었기 때문에 앞으로 독성검정을 여러가지 주요 농작물 해충에 대해 숙주를 더 넓혀서 수행하면, 특정곤충에 매우 강한 독성을 보이는 B.t 균주를 분리할 수 있을 것으로 예상되므로 이에 대한 연구도 수행 중에 있다.

사 사

위의 연구는 95년 서울대학교 농업생물신소재연구센터와 G7 과제의 연구비 지원에 의하여 수행되어졌다

인 용 문 헌

- Aronson, A. I., W Beckman & P. Dunn 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiol. Rev.* **50**: 1-24.
- Burges, H D & J. A. Hurst 1977 Ecology of *Bacillus thuringiensis* in storage moths *J. Invertebr. Pathol.* **30**: 131-139.
- DeLucca, A J., II, J G. Simonson & A D. Larson. 1981 *Bacillus thuringiensis* distribution in soils of the United States. *Can. J. Microbiol.* **27**: 865-870
- Hofte H & H. R. Whiteley. 1989 Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* **53**: 242-255.
- Karamanlidou, G., A F, Lambropoulos, S. I Koliass, D, Ellar & C, Kastritsis 1991. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to laboratory populations of the Olive fruit fly(*Dacus oleae*). *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 2277-2282
- Kim, H S, H W Park, D W Lee, Y. M. Yu, J. I Kim & S K Kang. 1995a. Distribution and Charac-

- tenzation of *Bacillus thuringiensis* isolated from soils of sericultural farms in Korea. *Korean J. Senc. Sci.* **37**(1): 57-61
- Kim, H. S., H. W. Park, D. W. Lee, Y. M. Yu, J. I. Kim & S. K. Kang. 1995b. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated in granary dusts. *Korean J. Appl. Entomol.* **34**(3): 243-248.
- Luthy, P., J. L. Cordier & H. M. Fischer. 1982. *Bacillus thuringiensis* as a bacterial insecticide: basic consideration and application. In *Microbial and Viral Pesticide* ed. kurstak, E. pp.35-74 New York Marcel Dekker.
- Martin, P. A. W. & R. S. Travers. 1989. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl Environ Microbiol.* **55**: 2437-2442.
- Nickerson, K. W. & L. A. Jr Bulla. 1974. Physiology of sporeforming bacteria associated with insects: minimal nutritional requirements for growth, sporulation, and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ Microbiol.* **28**: 124-128.
- Norris, J. R. 1969. The ecology of serotype 4B of *Bacillus thuringiensis*. *J. Appl. Bacteriol.* **32**: 261-267.
- Ohba, M., K. Aizawa & S. Sudo. 1984. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in sericultural farms of Fukuoka prefecture, Japan. *Proc. Assoc. Plant Prot. kyushu.* **30**: 152-155.
- Ohba, M. & K. Aizawa. 1978. Serological identification of *Bacillus thuringiensis* and related bacteria isolated in Japan. *J. Invertebr. Pathol.* **32**: 303-309.
- Ohba, M. & K. Aizawa. 1986a. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in soils of Japan. *J. Invertebr. Pathol.* **47**: 277-282.
- Ohba, M. & K. Aizawa. 1986b. Insect toxicity of *Bacillus thuringiensis* isolated from soils of Japan. *J. Invertebr. Pathol.* **47**: 12-20.
- Tanada, Y. & K. K. Harry. 1993. *Insect pathology*. p.90-91. Academic press, INC

(1995년 8월 26일 접수)