

한국 토양으로부터 새로운 무독성 *Bacillus thuringiensis* 균주의 분리

Isolation of Novel Non-Toxic *Bacillus thuringiensis* from Soil Samples in Korea

노종열 · 박현우 · 김호산 · 진병래 · 강석권

Jong Yul Roh, Hyun Woo Park, Ho San Kim, Byung Rae Jin and Seok Kwon Kang

ABSTRACT Four *Bacillus thuringiensis* isolates obtained from soil samples in Korea produce parasporal inclusions non-toxic to 10 insect species of three orders, Lepidoptera, Diptera and Coleoptera. These four isolates are named NTB-1, NTB-2, NTB-3 and NTB-4, respectively. The morphology of parasporal inclusions of four isolates observed by phase contrast- and scanning electron microscope was all ovoid. Characterization of four non-toxic *B. thuringiensis* isolates was determined by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and restriction endonuclease analysis. The results showed that parasporal inclusion proteins and total plasmid DNA profiles of four isolates are different from other known non-toxic *B. thuringiensis* strains, suggesting that four isolates are novel.

KEY WORDS *Bacillus thuringiensis*, non-toxic, parasporal inclusions

초 록 전국의 토양시료로부터 3가지의 곤충목인, 나비목, 파리목, 학정벌레목에 속하는 10종의 곤충에 대하여 독성을 보이지 않는 4종의 *Bacillus thuringiensis* 균주를 분리하였다. 이들 4종의 균주를 각각 NTB-1, NTB-2, NTB-3, NTB-4로 명명하였다. 위상차 현미경과 주사전자현미경을 통해 관찰된 이들 4종 균주의 내독소 단백질 형태는 모두 원형이었으며, 각 균주의 내독소 단백질과 plasmid DNA 특성을 규명하기 위해 단백질 전기영동과 제한효소 분석을 실시하였다. 그 결과 이들 균주의 내독소 단백질과 plasmid DNA pattern은 이미 알려져 있는 무독성 균주들과는 다른 양상을 보여, 기존의 무독성 균주와 다른 새로운 균주임을 알 수 있었다.

검색어 *Bacillus thuringiensis* 무독성, 내독소 단백질

*Bacillus thuringiensis*는 토양세균으로 성장조건이 악화되면 포자형성과 함께 곤충에 강한 독성을 보이는 내독소 단백질을 생성한다는 점 때문에 오랫동안 해충 방제를 위한 미생물 살충제로 사용되어져 왔다. *B. thuringiensis*의 살충 효과와 숙주범위는 이러한 내독소 단백질에 의해서 결정되는데, 지금까지 알려진 *B. thuringiensis*의 경우, 대부분 나비목 유충에 독성을 가지고 있으며, 파리목 및 딱정벌레목에 독성을 보이는 것도 보고되었다(Höfte & Whiteley 1989, Goldberg & Margalit 1977, Krieg *et al.* 1983) 그러나, 편모 항체를 이용한 *B. thuringiensis*의 분류

체계에 따라 등록된 균주들 중에서 최근에 분류된 균주들은 대부분 독성을 띠지 않을 뿐더러, 자연생태계에서 이러한 무독성 균주들이 상당수 분리된다는 보고들이 있다(de Barjac & Frachon 1990, Martin & Travers 1989, Meadows *et al.* 1992). 이들 보고들에 의하면 전체 sample중에서 독성을 갖지 않는 *B. thuringiensis*가 적게는 40%에서 많게는 55%까지 분리되었다. 또한 일반적이지 않은 내독소 단백질을 가지고 있는 2종의 무독성 *B. thuringiensis* 균주에 대한 특성을 조사한 보고도 있으며, 용해도에 있어서 다이아몬드형 내독소 단백질을 생성하는 8종의 무

서울대학교 농업생명과학대학 농생물학과(Department of Agricultural Biology, College of Agriculture & Life Sciences, Seoul National University)

독성 *B. thuringiensis* 균주와 2종의 독성 *B. thuringiensis* 균주를 비교한 보고도 있다(Ohba *et al.* 1987, Du *et al.* 1994). 이러한 보고들과 더불어 국내에서도 양잠농가와 전국 토양을 대상으로 하여 분리된 *B. thuringiensis* 균주 중에서 대략 30%의 비율로 무독성 균주가 분리되었다(Kim *et al.* 1995a, b).

본 연구에서는 이와 같이 국내에서 분리된 무독성 *B. thuringiensis* 균주들 중에서 내독소 단백질과 plasmid DNA pattern이 기존에 보고된 무독성 균주들과 다른 4종의 균주를 선발하여 그 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주

본 연구에 사용된 무독성 *B. thuringiensis* 균주는 전국의 토양시료로부터 분리된 것 중에서 선발된 4종의 균주인 *B. thuringiensis* NTB-1, NTB-2, NTB-3, NTB-4였다.

독성검정

선발된 4종의 균주를 각각 10^7 CFU/ml의 농도로 배양하여 접종원으로 사용하였다. 독성검정에 사용된 10종의 곤충들은 모두 25°C, 상대습도 60-70%의 조건에서 16시간의 광조건으로 사육하였고, 모든 독성검정은 3반복으로 실시하였다. 나비목의 경우, 누에(*Bombyx mori*), 담배나방(*Helicoverpa assulta*), 흰불나방(*Hyphantria cunea*), 파밤나방(*Spodoptera exigua*), 담배거세미나방(*Spodoptera litura*)의 5종 곤충에 대하여 접종원 200 μ 씩을 각각의 인공사료에 고르게 도말하고 자연건조시킨후, 처리구당 각각 2-3령 유충 20마리씩을 넣고 48시간동안 사육하면서 치사 여부를 관찰하였다. 파리목의 경우에는 처리구당 접종원 20 ml에 부화된지 2-3일 지난 빨간집모기(*Culex pipiens pallens*)와 작은빨간집모기(*Culex tritaeniorhynchus*) 유충을 각각 10마리씩 넣고 48시간동안 치사 여부를 관찰하였다. 딱정벌레목의 경우에는 야외에서 채집된 애풍뎅이(*Anomala rufocuprea*)와 콩풍뎅이(*Popillia mutans*), 그리고 실내사육된 쌀바구미(*Sitophilus oryzae*)에 대하여 독성 여부를 확인하였다. 야외 채집된 애풍뎅이와 콩풍뎅이는 접

종원 1 ml을 각각 채집된 장소에서 가져온 기주식물의 꽃과 고구마를, 쌀바구미의 경우는 쌀을 접종원에 침지한 후 건조시켜 96시간동안 사육하면서 독성검정을 수행하였다.

내독소단백질의 형태 관찰

4종의 *B. thuringiensis* 균주 각각을 100 ml의 G.Y. S.(Glucose-Yeast extract-Salt) 배양액에 단일 콜로니를 접종하여 30°C에서 150 rpm으로 5일간 진탕배양하여 위상차 현미경과 전자현미경 관찰을 위한 시료로 사용하였다. 준비된 시료를 slide glass에 도말하고 cover glass를 덮어 1,000배의 배율로 위상차 현미경으로 관찰하였고, 동 시료를 원반시료대 위에 도말하여 자연건조시킨 뒤 탄소로 덮고 금으로 염색하여 주사 전자현미경(Phillips SEM 515)으로 관찰하였다.

SDS-PAGE

G.Y.S. 배지에서 5일간 배양하여 lysis가 확인된 4종의 *B. thuringiensis* 균주를 4,500g에서 10분간 원심분리하여 균체를 회수하고, 5X sample buffer [0.6 ml 1 M Tris-HCl(pH 6.8), 5 ml 50% glycerol, 2 ml 10% SDS, 0.5 ml 2-mercaptoethanol, 1 ml 1% bromophenol blue, 0.9 ml H₂O]를 첨가하여 100°C 물에서 5분간 가열한 뒤 원심분리하였다. 이렇게 얻어진 상청액을 사용하여 단백질 전기영동에 사용하였다. 단백질 전기영동은 Laemmli(1970)의 방법에 따라 3% stacking gel과 10% separating gel을 사용하였으며, Coomassie brilliant blue로 염색하였다.

Plasmid DNA의 제한효소 분석

B. thuringiensis 균주를 각각 10 ml의 L.B. 배지에 접종하여 30°C에서 12시간 배양한 후, 다시 50 ml의 L.B. 배지에 100분의 1의 농도로 재접종하여 OD₆₀₀에서 0.7이 될때까지 배양하여 plasmid DNA를 분리하였다. Plasmid DNA 분리는 alkaline lysis 방법(Bimboim & Doly 1979)을 일부 수정하여 실시하였다. 분리된 plasmid DNA는 제한효소 HindIII로 절단한 후, 0.7% agarose gel에서 전기영동하고 EtBr로 염색하여 DNA 패턴을 분석하였다.

Table 1. Toxicity of *B. thuringiensis* isolates

Tested larvae	Strain			
	NTB-1	NTB-2	NTB-3	NTB-4
Lepidoptera^a				
<i>Bombyx mori</i>	— ^d	—	—	—
<i>Helicoverpa assulta</i>	—	—	—	—
<i>Hyphantria cunea</i>	—	—	—	—
<i>Spodoptera exigua</i>	—	—	—	—
<i>Spodoptera litura</i>	—	—	—	—
Diptera^b				
<i>Culex pipiens pallens</i>	—	—	—	—
<i>Culex tritaeniorhynchus</i>	—	—	—	—
Coleoptera^c				
<i>Anomala rufocuprea</i>	—	—	—	—
<i>Popillia mutans</i>	—	—	—	—
<i>Sitophilus oryzae</i>	—	—	—	—

a 2nd-3rd instar larvae b 2-3 day larvae c adult d: entirely not effective, 0% mortality

결과 및 고찰

전국 토양으로부터 선발된 4종의 *B. thuringiensis* 균주, NTB-1, NTB-2, NTB-3, NTB-4에 대한 독성 검정 결과 이들 균주들은 나비목의 경우, 누에(*B. mori*)와 우리나라의 주요 해충인 담배나방(*H. assulta*), 흰볼나방(*H. cunea*), 파밤나방(*S. exigua*), 담배 거세미나방(*S. litura*)에 대해, 파리목의 경우 빨간집모기(*C. pipiens pallens*)와 작은빨간집모기(*C. tritaeniorhynchus*)에 대해, 그리고 딱정벌레목의 경우 애퐁툭이(*A. rufocuprea*), 콩퐁툭이(*P. mutans*), 쌀바구미(*S. oryzae*)에 대해 독성을 갖지 않음을 확인하였다 (Table 1). 이러한 결과로 보아 이들 4종의 균주는 3종 곤충목에 대하여 독성이 없는 무독성 균주로 판단되었으나, 앞서 무독성 *B. thuringiensis* 균주에 관한 다른 보고들(Martin & Travers 1989, Meadow et al. 1992)에서 지적되었다시피 검정되지 않은 다른 목의 곤충들에 대하여 독성을 보일 가능성을 배제할 수는 없을 것으로 생각된다 근래에 와서는 이러한 곤충목들에 대해 독성을 보이지 않는 *B. thuringiensis*들이 다수 분리되고 있어 토양세균인 *B. thuringiensis*가 살충 목적 이외에 다른 용도로 내독소 단백질을 만들 것이라는 가능성마저 제시되고 있다(Mar-

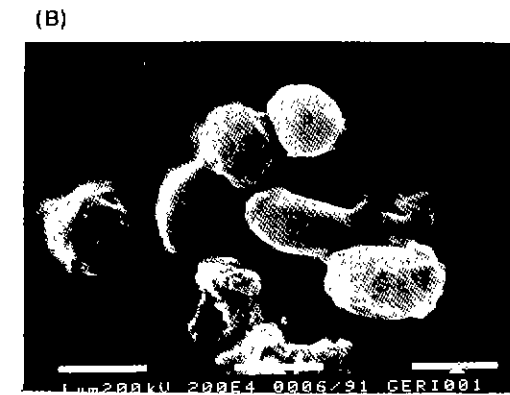
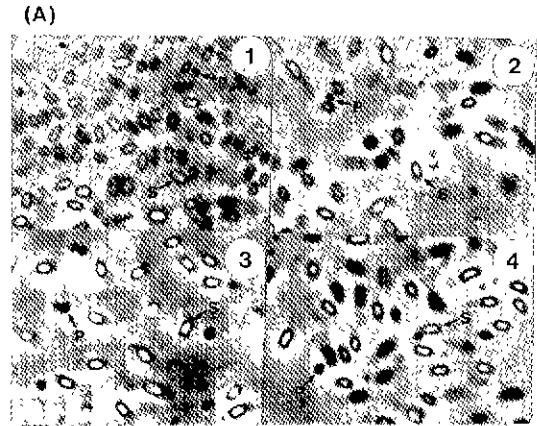


Fig. 1. Parasporal inclusions of non-toxic *B. thuringiensis* isolates observed by phase contrast- (A) and scanning electron microscope (B) 1, NTB-1; 2, NTB-2; 3, NTB-3; 4, NTB-4 Spores and parasporal inclusions are indicated as S and P, respectively

tin & Travers 1989). 또한 Ohba 등(1987)은 자연 생태계에서 독성을 갖지 않는 *B. thuringiensis*가 독성을 갖는 *B. thuringiensis*보다 폭넓게 분포하고 있으며, 결국 하나의 group으로서의 *B. thuringiensis*는 오히려 곤충에 독성을 갖지 않는다고 주장하였다 국내의 경우에 있어서도 분리된 *B. thuringiensis*의 상당수가 무독성으로 밝혀져 이들의 주장이 어느 정도의 타당성을 가지고 있음을 알 수 있다(Kim et al. 1995a, b). 그리고 이러한 결과는 자연생태계에서 앞으로도 많은 새로운 무독성 균주들이 분리될 수 있다는 가능성을 내포하고 있다

위상차 현미경과 주사 전자현미경을 통하여 무독성 균주들의 내독소 단백질 형성 여부를 관찰한 결과,

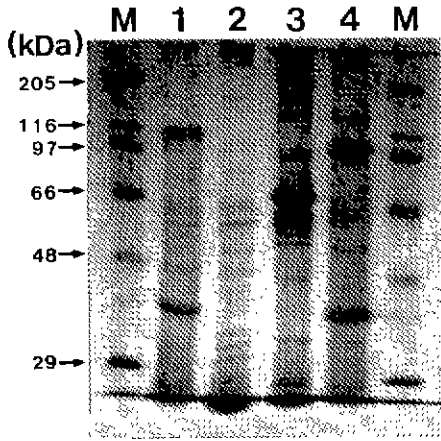


Fig. 2. SDS-PAGE analysis of non-toxic *B. thuringiensis* parasporal inclusions. Lanes: 1, NTB-1; 2, NTB-2; 3, NTB-3; 4, NTB-4; M, molecular weight size marker (Sigma)

본 연구에서 이들 균주가 생성하는 내독소 단백질의 형태는 모두 원형으로 나타났다(Fig. 1). Meadows 등(1992)은 사료참고(animal feed mill)로부터 분리된 무독성 균주의 내독소 단백질 형태를 구분하여 분류하였는데, 이 보고에서는 다이아몬드형이 가장 많았으며, 원형의 형태를 갖는 것도 상당수 분리된 것으로 보고하였다. 한편 Ohba 등(1987)이 보고한 2종의 무독성 균주는 편평한 장사방형의 내독소 단백질을 형성하며, 그외에도 부정형, 원형, 직사각형 등의 내독소 단백질을 형성하는 무독성 균주들도 보고되었다(Lee et al. 1995, Pietrantonio & Gill 1992, Burtseva et al. 1995). 이 결과로 미루어 무독성 균주가 생성하는 내독소 단백질의 형태는 매우 다양하다는 것을 알 수 있으며, 본 연구에서 선발된 4종의 균주가 모두 원형의 내독소 단백질을 형성한다는 점은 특이하다고 하겠다.

무독성 균주의 내독소 단백질에 대한 SDS-PAGE 분석 결과, 이들 균주들은 약 40-115 kDa 사이 크기의 주요 단백질을 가지고 있는 것으로 나타났다(Fig. 2). NTB-1과 NTB-4는 약 40 kDa의 유사한 분자량의 단백질을 가지면서도, NTB-1이 약 115와 110 kDa, NTB-4가 105와 100 kDa의 서로 다른 band pattern을 보임을 알 수 있었다(Fig. 2 Lane 1, 4). 한편 NTB-3의 경우에는 66 kDa의 주요 단백질이 확인된 반면, NTB-2의 경우에는 뚜렷한 주요 단백질

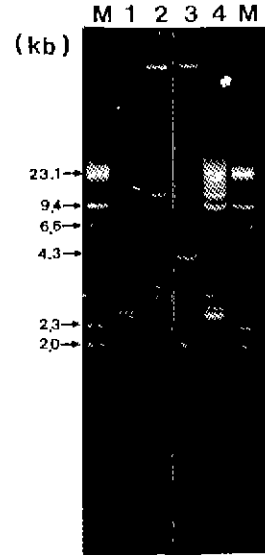


Fig. 3. Total plasmid DNA profiles of non-toxic *B. thuringiensis*. Total plasmid DNA was digested with *Hind*III and electrophoresed on a 0.7% agarose gel. Lanes: 1, NTB-1; 2, NTB-2; 3, NTB-3; 4, NTB-4; M, lambda DNA digested with *Hind*III

band가 나타나지 않고 여러개의 minor band들만이 나타났다(Fig. 2 Lane 2, 3). 앞선 보고들에 의하면 무독성 균주들의 내독소 단백질 패턴 역시 다양한데, 130에서 140 kDa 정도의 단일 band를 갖는 것, 60 kDa의 주요 band와 여러개의 minor band를 갖는 것, 3-4개의 주요 단백질을 갖는 것 등이 있다(Du et al. 1994, Pietrantonio & Gill 1992, Ohba et al. 1987, Burtseva et al. 1995).

내독소 단백질 조성이 기존의 무독성 균주들과 다른 밴드 패턴을 보이는 이들 4종의 무독성 *B. thuringiensis* 균주의 total plasmid DNA를 제한효소 *Hind*III로 절단하여 0.7% agarose gel에서 그 pattern을 비교하였다(Fig. 3). 제한효소로 절단된 plasmid DNA pattern 역시 4종 균주 모두 서로 달랐으며, 이 결과는 이미 알려진 무독성 균주들과도 상이하였다. 이러한 결과들을 종합하여 볼때 이들 4종의 *B. thuringiensis*는 새로운 무독성 균주임을 알 수 있었다.

이를 바탕으로 본 연구에서 밝혀진 4종의 새로운 무독성 *B. thuringiensis* 균주는, 내독소 단백질을 형성하면서도 독성을 나타내지 않는 무독성 *B. thuringiensis* 균주들의 무독성 mechanism을 연구하기

위한 중요한 소재로 이용되어질 수 있을 것이다.

사 사

본 연구는 서울대학교 농업생물신소재연구센터와 과기처 U. R. project의 연구비에 의해서 수행되었으며, 이에 감사드립니다

인 용 문 헌

- Bimboim, H. C. & J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA *Nucleic Acids Res* 7: 1513-1523.
- Burtseva, L. I., V. A. Burlak, G. V. Kalmikova, H. de Barjac & M.-M. Lecadet. 1995. *Bacillus thuringiensis novosibirsk* (Serovar H24a24c), a new subspecies from the west siberian plain. *J Invertebr. Pathol.* 66: 92-93
- de Barjac, H. & E. Frachon. 1990. Classification of *Bacillus thuringiensis* strains *Entomophaga*. 35: 233-240.
- Du, C., P. A. W. Martin & K. W. Nickerson 1994 Comparison of disulfide contents and solubility at alkaline pH of insecticidal and noninsecticidal *Bacillus thuringiensis* protein crystals. *Appl Environ Microbiol.* 60: 3847-3853
- Goldberg, L. J. & J. Margalit. 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles gambiae*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti*, and *Culex pipiens* *Mosq. News* 37: 355-358.
- Höfte, H. & H. R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev* 53: 242-255
- Kim, H. S., D. W. Lee, H. W. Park, Y. M. Yu, J. I. Kim & S. K. Kang. 1995a. Distribution and characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from soils of sericultural farms in Korea. *Korean J. Seric Sci.* 37: 57-61.
- Kim, H. S., H. W. Park, D. W. Lee, Y. M. Yu, J. I. Kim & S. K. Kang. 1995b. Distribution and characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from soils in Korea *Korean J. Appl. Entomol.* In press.
- Krieg, A., A. M. Huger, G. A. Langenbruch & W. Schnetter 1983 *Bacillus thuringiensis* var *tenebrionis*: ein neuer, gegen ber Larven von Coleopteren wirksamer Pathotyp. *J. Appl. Entomol* 96: 500-508.
- Laemmli, U. K. 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- Lee, H. H., J. A. Lee, K. Y. Lee, J. D. Chung, H. de Barjac, J. F. Charles, V. Cosmao Dumanoir & E. Frachon. 1994. New serovars of *Bacillus thuringiensis*: *B. thuringiensis* ser. *coreanensis* (Serotype H25), *B. thuringiensis* ser. *leesis* (Serotype H33), and *B. thuringiensis* ser. *konkukian* (Serotype H34) *J Invertebr. Pathol.* 63: 217-219
- Martin, P. A. W. & R. S. Travers 1989 Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates *Appl. Environ. Microbiol* 55: 2437-2442.
- Meadows, M. P., D. J. Ellis, J. Butt, P. Jarrett & H. D. Burges 1992 Distribution, frequency, and diversity of *Bacillus thuringiensis* in an animal feed mill. *Appl. Environ. Microbiol* 58: 1344-1350.
- Ohba, M., Y. M. Yu & K. Aizawa. 1987. Non-toxic isolates of *Bacillus thuringiensis* producing parasporal inclusions with unusual protein components. *Lett. Appl. Microbiol.* 5: 29-32
- Pietrantonio, P. V. & S. S. Gill. 1992. The parasporal inclusion of *Bacillus thuringiensis* subsp. *shandongensis*: Characterization and screening for insecticidal Activity *J. Invertebr. Pathol* 59: 295-302.

(1995년 9월 29일 접수)