

한국 양잠농가에서 분리된 *Bacillus thuringiensis*의 분포와 특성조사

김호산 · 이대원 · 박현우 · 유용만* · 김정일** · 강석권
농업생명과학대학, 경농 경주연구소*, KIST 생명공학연구소**

Distribution and Characterization of *Bacillus thuringiensis* Isolated from Soils of Sericultural Farms in Korea.

Ho-San Kim, Lee Dae-Won, Park Hyun-Woo, Yu Yong-Man,*
Kim Jeong-il** and Kang Seok-Kum

College of Agriculture & Life Sciences Seoul national University, Suwon, Korea

*Kyong-ju research Institute, Kyong-nong Corporation, Kyong ju, Korea

**Korea research institute of Bioscience and Biotechnology, KIST. Taejeon, Korea

ABSTRACT

In order to isolate naturally occurring novel *B. thuringiensis* strains, we identified the distribution of *B. thuringiensis* from soils of sericultural farms (spring and autumn season, respectively) of various regions in Korea. A total of 82 strains of *B. thuringiensis* producing spore and crystal were isolated. We examined oral toxicity against lepidopterous larvae, *Bombyx mori*, dipterous larvae, *Culex pipiens* and coleopterous, *Sitophilus oryzae*. The results showed that 82 *B. thuringiensis* isolates from sericultural farms were isolated and most isolates were toxic to lepidopterous larvae. Particularly, *B. thuringiensis* strains which is lepidopterous-active, lepidopterous-and dipterous-active were widely distributed. Also, non-toxic *B. thuringiensis* isolate was common.

Key word : *B. thuringiensis*, *Bombyx mori*, *Culex pipiens*, *Sitophilus oryzae*.

서 론

곤충에 독성을 보이는 단백질을 생산하는 *B. thuringiensis*(이하 B.t로 약칭)는 환경에 무해한 미생물 살충제로 오래전부터 유용하게 쓰이고 있다(Aronson et al. 1986, Hofte & Whiteley 1989). 현재 B.t에 대한 연구는 숙주범위의 확장과 강력한 독성을 갖도록 하기 위하여 유전공학의 발달된 기법을 이용하여 서로 다른 내독소 단백질 유전자 융합, 형질전환 또는 돌연변이 유도 등의 다양한 방법으로 연구가 진행되고 있다(Adang et al. 1985, Tailor et al. 1992).

B.t의 자연계 분포는 토양(DeLucca et al. 1981 ;

Ohba & Aizawa 1986a ; Martin & Travers 1989 ; Karamanlidou et al. 1991), 양잠농가(Ohba et al. 1984), 저장작물(DeLucca et al. 1982), 식물체의 잎 표면(Smith & Couche 1991), 그리고 연못(Goldberg & Margalit 1977) 등에서 분리, 보고되었다. 그 중 토양에 대한 분포, 조사 연구는 Krieg 등(1983)에 의해 새롭고 특이한 활성을 보이는 B.t의 탐색 및 분리를 위한 연구가 수행되었고, Martin과 Travers(1989) 등에 의해 여러 토양에서 분리된 B.t의 경우 약 60% 이상이 나비목과 파리목에 독성을 나타내는 것으로 밝혀져 있다.

따라서 국내 토양에서의 B.t의 분리는 새로운 유용

Table 1. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in sericultural farms of Korea(spring season).

Locality	Number of samples examined	Number of B.t isolated
Kyonggi-do	16	12
Ch'ungch'ongbuk-do	4	1
Ch'ungch'ongnam-do	24	7
Kyongsangbuk-do	30	9
Kyongsangnam-do	4	0
Chollabuk-do	76	20
Chollanam-do	10	3
Total	164	52

B.t 균주의 탐색 및 선발을 위해 시급히 수행되어야 할 과제로 생각되어 본 연구에서는 보다 강력한 살충성과 숙주영역이 확대된 새로운 B.t를 선별하기 위해 양잠농가에서 채취한 토양에 분포하는 B.t를 분리하고 그 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 시료 채취

국내에 분포하는 B.t의 분리를 위해 봄과 가을에 전국 7개도의 양잠농가를 대상으로 잠실 주변의 토양을 채취하였다.

2. B.t의 분리

B.t의 분리는 Ohba & Aizawa(1978)의 방법에 의

거하여 채취된 시료를 50ml Conical tube에 각각 1g 씩 달아 넣은 뒤, 멸균 증류수 9ml을 첨가하여 강하게 5분 동안 교반한 후 상층액을 새로운 tube에 옮겨, 65°C에서 30분간 가열했다.

상기 현탁액을 10^{-2} 과 10^{-3} 으로 각각 희석하여 nutrient agar plate에 고르게 도말하고, 28°C에서 4-7일간 배양하여 형성된 콜로니중 B.t와 외형이 비슷한 콜로니들만 위상차현미경으로 관찰하여 내독소 단백질과 포자를 형성하는 지를 조사하였다. 이들을 형성하는 콜로니만 nutrient agar plate에 접종하고 순수배양한 다음, 독성검정에 사용하였다.

3. 분리된 B.t의 독성검정.

B.t를 sporulation이 일어나고 포자와 내독소 단백질이 세포 외부로 방출될 때까지 27°C, 5일 동안 배양하여 생성된 포자 농도를 측정한다. 다음, 10^7 spores/ml의 농도로 접종원 200ul를 2g의 인공사료에 첨가하여 각 구당 2령의 누에(*Bombyx mori*)유충 각 20 마리씩에 접종하고 25°C에서 사육하면서 2일간 치사율을 관찰하였다.

모기 유충(*Culex pipiens*)에 대한 독성검정은 10^7 spores/ml의 농도로 원액을 희석하여 20ml를 만든 후, 2령의 모기 20 마리를 넣고 치사율을 결정하기 위하여 25°C에서 사육하면서 2일간 조사하였다. 그리고 딱정벌레목인 쌀바구미(*Sitophilus oryzae*)에 대한 독성검정은 쌀 5g을 10^8 spores/ml 정도의 B.t 배양액에 2시간 동안 침지하고 음전한 후, 20 마리의

Table 2. Toxicities of *Bacillus thuringiensis* isolated from sericultural farms against Lepidoptera, Diptera and Coleoptera larvae(spring season).

Insect species	Isolate	% of toxicity with B.t isolate
Lepidopteran (<i>Plutella Xylostella</i> , <i>Bombyx mori</i>)	1-1, 1-2, 1-3, 6-1, 8-1, 19-2, 19-4, 19-5, 19-6, 27-1, 27-2, 27-3, 27-4, 32-1, 32-2, 32-3, 32-4, 49-1, 60-1, 61-1, 61-2, 61-4, 61-5, 64-1, 67-1, 67-2, 67-3, 68-1, 80-1, 82-1, 83-1, 85-1, 89-1, 104-1, 104-3 (35)	67
Dipteran (<i>Culex pipiens</i>)	84-1, 84-2, 84-3, 101-1 (4)	8
Lepidopteran/Dipteran	8-2, 8-3, 8-4, 16-1, 19-1, 36-1, 61-3, 70-1, 80-2, 104-2 (10)	19
Coleopteran (<i>Sitophilus oryzae</i>)		0
Non-toxic	30-1, 33-1, 107-1 (3)	6
Total	52	100

바구미를 넣어 25°C에서 1주일간 그 치사율을 관찰 하였다.

결과 및 고찰

1984년 Ohba 등에 의해 양잠농가에는 *B.t*가 많이 분포함이 보고되었다. 따라서 국내의 양잠농가에서도 많은 수의 *B.t*가 분포할 것으로 예상되어 전국 7개도 40개군에 존재하는 80개의 양잠농가에서 춘, 추잠기에 토양을 채취하여 *B.t*를 분리하였다.

*B.t*의 분리에 있어서 하나의 plate에 생성되는 콜로니 수는 대략 300여개 정도였으며, 이중 외형상 *B.t*로 보이는 콜로니들은 약 10% 정도였으며, 이들 *B.t*로 생각되는 콜로니를 영양세포, 포자 그리고 내독소 단백질별로 그 형태적 특성을 위상차현미경으로 조사하였다. 내독소 단백질의 형태와 크기는 관찰된 콜로니들마다 다양하게 나타났고, 포자는 거의 타원형의 일정한 형태를 보였다. 내독소 단백질의 형태는 대체로 이중피라미드형, 마름모형, 원형을 갖는 균주들이 많이 존재함을 알 수 있었다.

추잠기에 총 164개의 시료에서 52개의 *B.t*가 분리되었고(Table 1), 이렇게 분리된 *B.t* 각각을 나비목의 누에 유충, 파리목의 빨간 집모기 유충과 딱정벌레목의 쌀바구미에 대해 독성을 조사한 결과, 나비목에 독성을 갖는 균주가 67%, 파리목에 독성을 띄는 것이 8%, 나비목과 파리목에 함께 독성을 갖는 것이 19%, 내독소 단백질은 형성하지만, 독성이 없는 균주(6%)도 많이 나타났다. 한편 딱정벌레목에 독성을 띄는 균주들은 없었다(Table 2).

추잠기 양잠농가에서는 총 136개의 시료에서 30

Table 3. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in sericultural farms of Korea(fall season).

Locality	Number of samples examined	Number of <i>B.t</i> isolated
Kyonggi-do	8	2
Ch'ungchongbuk-do	4	0
Ch'ungchongnam-do	19	7
Kyongsangbuk-do	27	5
Kyongsangnam-do	5	0
Chollabuk-do	66	15
Chollanam-do	7	1
Total	136	30

개의 *B.t*가 분리되어(Table 3), 춘잠기에서 처럼 세 가지 곤충목에 대하여 독성을 검정한 결과, 특히하게도 나비목과 파리목에 독성을 띄는 균주가 67%이고 나비목과 파리목에 독성을 띄는 것은 각각 3%이며 무독성 균주도 높은 비율(27%)로 분리되어(Table 4) 춘잠기와는 다른 양상을 보였다.

봄과 가을 시기별로 나누어 행해진 양잠농가에서의 *B.t*의 분리는 봄에 더 많은 *B.t*가 분리되었고, 독성을 띄는 분포 또한 다르게 나타났다. 춘잠기에서는 나비목에 독성을 띄는 균주가 많이 분리된 반면, 추잠 시기에서는 나비목과 파리목에 동시에 독성을 띄는 균주가 많이 분리되는 특징을 보여 환경적인 요인이 *B.t*의 분포에 상당히 작용하는 것으로 보여진다.

본 실험에서 무독성 균주가 분리(봄: 6%, 가을: 27%)되는 점으로 보아 여러 *B.t* 연구자들에 의해 알려진 대로 내독소 단백질은 형성하지만, 독성이 없는 균주(Ohba & Aizawa 1986b, Ohba et al. 1988, Martin & Travers 1989)가 국내의 토양에서도 흔히

Table 4. Toxicities of *Bacillus thuringiensis* isolated from sericultural farms against *Lepidoptera*, *Diptera* and *Coleoptera* larvae(fall season).

Insect species	Isolate	% of toxicity with <i>B.t</i> isolate
Lepidoptera	1107-2 (1)	3
Diptera	1083-2 (1)	3
Lepidoptera/Diptera	1026-1, 1037-1, 1042-1, 1044-1, 1050-4, 1053-2, 1060-2, 1066-2, 1069-1, 1075-1, 1080-2, 1084-1, 1084-2, 1102-1, 1126-2, 1128-1, 1128-2, 1141-1, 1142-2, 1143-2, (20)	67
Non-toxic	1022-1, 1023-1, 1028-2, 1043-1, 1050-5, 1093-1, 1136-3, 1138-3 (8)	27
Total	30	100

Table 5. Selection of *B.t* isolates having unique properties.

Insect orders	Season	
	Spring	Autumn
	Number of selected <i>B.t</i> (Number of total <i>B.t</i>)	
Lepidoptera	6 (35)	1 (1)
Diptera	3 (4)	1 (1)
Lepidoptera/Diptera	2 (10)	8 (20)
Non-toxic	(3)	(8)

존재함을 알 수 있었다. 무독성 균주에 대한 연구 (Ohba et al. 1987, Du et al. 1994)는 현재까지 많지는 않지만, 불확실한 물리적, 화학적 요인에 의한 내독소 단백질의 degradation에 의한 것과 내독소 단백질의 불용해성의 원인에 기인한다고 보고함에 따라 이에 대한 실험이 이루어지면, *B.t*의 독성기작 연구에 많은 도움이 될 수 있을 것이다.

Table 5는 위상차현미경을 통해 관찰하여 특이한 형태를 갖고 있으면서 독성이 강한 균주들을 선발하여 분류한 것으로서 새로운 균주로서의 가능성이 매우 높은 균주들이다. 이들을 대상으로 분류, 동정의 기초적인 실험과 여러가지 분자유전학적 방법을 이용한 분석이 수행되고 있다.

위의 결과를 토대로 양잠농가의 토양에는 *B.t*가 많이 분포하고 있음을 알 수 있었고 따라서 새로운 균주의 분리가능성 또한 매우 높은 것으로 기대된다.

다양한 지역에서의 수 많은 *B.t*의 분리만큼 중요한 것은 분리된 균주의 동정과 새로운 균주의 선발을 위한 기준마련에 있다. 따라서 본 실험실에서는 34종의 H-antibody를 확보하여 이를 이용한 serotype별 분류에 의한 균주의 동정 및 새로운 균주 선발을 계획중이다.

근간에 *B.t*에 대한 저항성 해충이 출현되어 이들을 방제하기 위한 새로운 전략과 저항성 기작에 대한 연구가 많이 수행중에 있다. 여러가지 저항성 문제 해결을 위한 방안이 있지만, 특히 중요한 것은 강력한 독성을 갖는 균주의 선발, 분리에 있다. 따라서 토양을 비롯한 자연환경에서의 *B.t*의 탐색, 분리는 위 문제들의 해결에도 유익할 것이다.

적 요

토양에 존재하고 있는 새롭고, 특이한 활성을 갖는

*B.t*를 분리하기 위하여 춘잠 및 추잠기에 양잠농가의 토양을 채취하여 *B.t*의 분포를 조사하였다.

총 300개의 채취된 토양시료중에서 포자와 내독소 단백질을 생산하는 82개의 *B.t*를 분리했다.

분리된 *B.t*의 독성별 분석에서 봄에는 주로 나비목(*Bombyx mori*)에 독성을 띄는 균주(67%)가, 가을에는 나비목과 파리목(*Culex pipiens*)에 동시에 독성을 띄는 균주(67%)가 많이 분리되었다. 한편 딱정벌레목(*Sitophilus oryzae*)에 독성을 나타내는 것은 찾지 못했다. 또한, 내독소 단백질을 생산하지만, 독성을 띄지 않는 균주들도 봄에는 6%, 가을에는 27%의 비율로 분리되어 자연상태에서 흔히 존재함을 알 수 있었다.

사 사

위의 연구는 95년 서울대학교 농업생물신소재연구센터와 94년 선도기술개발사업의 연구비 지원에 의하여 수행되어졌다.

인 용 문 헌

- Adang, M.J., M.J. Staver, T.A. Rocheleau, J. Leighton, R.F. Barker, and D.V. Thompson (1985) Characterized full-length and truncated plasmid clones of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki HD-73 and their toxicity to *Manduca sexta*. *Gene* 36 : 289-300.
- Aronson, A.I., W. Beckman, and P. Dunn (1986) *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiol. Rev.* 50 : 1-24.
- DeLucca, A.J.II, Simonson, J.G., and A.D. Larson (1981) *Bacillus thuringiensis* distribution in soils of the United States. *Can. J. Microbiol.* 27 : 865-870.
- DeLucca, A.J., Palmgren, M.S., and A. Ciegler (1982) *Bacillus thuringiensis* in grain elevator dusts. *Can. J. Microbiol.* 28 : 452-456.
- Du, C, Phyllis. A.W. Martin, and Kenneth. W. Nickerson (1994) Comparison of disulfide contents and solubility at alkaline pH of insecticidal and noninsecticidal *Bacillus thuringiensis* protein crystals. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 : 3847-3953.
- Goldberg, L.J. & J. Margalit (1977) A bacterial spore demonstration rapid larvicidal activity against *Anopheles serrengotii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipens*. *Mosq. News.* 37 : 355-358.
- Hofte, H., and H.R. Whiteley (1989) Insecticidal crystal

- proteins of *Bacillus thuringiensis* 53 : 242-255.
- Karamanlidou, G., A.F., Lambropoulos., S.I, Koliais., D, Ellar., and C, Kastritsis** (1991) Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to laboratory populations of the Olive fruit fly(*Dacus oleae*). *Appl. Environ. Microbiol.* 57 : 2277-2282.
- Krieg, A., A. Huger, G. Langenbruch and W. Schnetter.** (1983) *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*: A new pathotype effective against larvae of coleoptera. *J. Appl. Entomol.* 96 : 500-508.
- Martin, P.A.W., and R.S, Travers** (1989) Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 55 : 2437-2442.
- Ohba, M. and K, Aizawa** (1978) Serological identification of *Bacillus thuringiensis* and related bacteria isolated in Japan. *J. Invertebr. pathol.* 32 : 303-309.
- 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., and 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.
- Ohba, M., Y, M. Yu, and K, Aizawa** (1987) Non-toxic isolates of *Bacillus thuringiensis* producing parasporal inclusions with unusual protein components. *Letters in Applied Microbiol.* 5 : 29-32.
- Ohba, M., Y, M. Yu, & K, Aizawa** (1988) Occurrence of non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* flagellar serotype 14 in the soil in Japan. *System. Appl. Microbiol.* 11 : 85-89.
- Ravi Tailor, Jan Tippett, Graham Gibb, Stephen Pells, Derek Pike, Linda Jordan, and Susan Ely.** (1992) Identification and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae. *Mol. Microbiol.* 6(9):1211-1217.
- Smith, R.A. & G.A. Couche** (1991) The phylloplane as a source of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 : 311-315.