

## 거세미나방속 해충에 독성을 가지는 *Bacillus thuringiensis* 균주의 분리 및 특성

장진희 · 노종열 · 제연호 · 이대원 · 우수동 · 설광열\* · 강석권  
서울대학교 농업생명과학대학, \*농촌진흥청 잠사곤충연구소

### Isolation and Characterization of *Bacillus thuringiensis* Toxic to *Spodoptera* Species in Korea

Jin Hee Chang, Jong Yul Roh, Yeon Ho Je, Dae Weon Lee,  
Soo Dong Woo, Kwang Youl Seol\* and Seok Kwon Kang

Department of Agricultural Biology, College of Agriculture and Life  
Sciences, Seoul National University, Suwon, Korea

\*National Sericulture and Entomology Research Institute, RDA, Suwon, Korea

#### ABSTRACT

To isolate *Bacillus thuringiensis* toxic to *Spodoptera* species, we collected soil samples in Korea. In these samples, we characterized 7 *B. thuringiensis* isolates toxic to *Spodoptera exigua* or *S. litura* from soil, granary and sericultural farm samples. The 7 isolates were named *B. thuringiensis* STB-1, STB-2, STB-3, STB-4, STB-5, STB-6 and STB-7, respectively. The bioassay of these isolates against *S. exigua* and *S. litura* showed highly insecticidal activity. The serotypes of them were determined by agglutination tests using 33 antisera; STB-1 and STB-2 are identical to *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, and STB-3, STB-4 and STB-5 are identical to subsp. *kenyae*. STB-6 and STB-7 did not react with 33 antisera. STB-1 and STB-3 which have different gene types from *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* and subsp. *kenyae* are identified new isolates. STB-6 and STB-7 which show no agglutination in serological tests have *cryIA(a)*, *cryIA(b)*, *cryIC*, and *cryII* genes are also identified new isolates. Molecular weights of parasporal inclusions of all isolates were determined approximately 130 kDa by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

Key words : *Bacillus thuringiensis*, *Spodoptera exigua*, *Spodoptera litura*, *cryI*, *cryII*

#### 서 론

*Bacillus thuringiensis*는 그람양성 토양 세균으로 포자를 형성하는 동안 곤충에 특이적인 독성을 보이는 내독소 단백질을 형성한다. 이러한 내독소 단백질은 인축에는 무해하며 균주에 따라 각각 나비목, 파리목 및 딱정벌레목의 곤충에 대해서 강한 독성을 지니고 있기 때문에 미생물 살충제로 널리 이용되고 있다 (Aronson *et al.* 1986, Höfte and Whiteley,

1989).

*B. thuringiensis*의 미생물살충제로의 이용은 자연계에 존재하는 균주를 그대로 제제화하는 방법과 분자생물학적 방법에 의해 기주범위가 보다 넓고 독성이 강화된 균주를 제작하여 제제화하는 방법이 시도되고 있으나, 현재 이용되고 있는 모든 *B. thuringiensis* 제제는 자연계에서 분리된 균주로 나비목과 딱정벌레목 해충의 방제에 주로 이용되고 있다.

특히 나비목 해충으로 보고된 곤충에서 밤나방과 (Noctuidae) 거세미나방속 해충은 전세계적으로 중요한 농업 해충으로 화학살충제 뿐 아니라 현재까지 개발된 *B. thuringiensis* 제제로도 방제가 어려운 해충이다. 국내에서도 거세미나방속 해충인 파밤나방 (*Spodoptera exigua*), 담배거세미나방 (*Spodoptera litura*) 등이 담배, 고추 등에 큰 피해를 주는 것으로 알려져 있으며 지금까지 거세미나방속 해충에 높은 독성을 보이는 *B. thuringiensis*는 거의 보고되지 않고 있다.

따라서 본 연구는 거세미나방속 해충의 방제를 위한 *B. thuringiensis* 제제의 개발을 위하여, 여기에 독성을 보이는 새로운 *B. thuringiensis* 균주를 전국 토양, 양잠 농가 및 저곡창고 등에서 채취한 토양과 먼지 등에서 분리하고 그 특성을 규명하였다.

## 재료 및 방법

### 1. *Bacillus thuringiensis*의 분리

전국의 양잠 농가, 저곡창고, 시설 원예 단지, 과수원, 산, 들 등지에서 채집한 토양과 먼지로부터 Ohba와 Aizawa (1978)의 방법에 따라 *B. thuringiensis* 균주를 분리하였다. 시료 1g에 멸균증류수 9ml을 첨가하여 강하게 5분 동안 흔들어 준 다음, 현탁액의 상층을 50 ml 튜브로 옮겨 포자를 형성하지 못하는 세균들을 선택적으로 제거하기 위하여 80°C에서 5분간 열처리하였다. 그 후 현탁액을 10<sup>2</sup>과 10<sup>3</sup>으로 각각 희석하여 nutrient agar 평판 배지에 고르게 도말하고, 28°C에서 4-5일동안 배양하였다. 포자 형성 콜로니들 중에서 성장 상태가 *B. thuringiensis*와 유사한 콜로니를 선발하여 위상차현미경으로 내독소 단백질과 포자의 형성 여부를 관찰하였다.

### 2. 단백질 전기 영동

선발한 균주들의 내독소 단백질 특성을 조사하기 위해 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 Laemmli (1970)의 방법에 따라 3% stacking gel, 12% separating gel을 이용하여 수행하였다. Nutrient agar 평판 배지에서 배양된 균주를 멸균된 증류수로 pipetting에 의해 수거한 20 µl 배양 용액에 5× sample buffer를 첨가하고 100°C에서 5분간 열처리한 후 원심 분리하여 상층액을 전기영동하였다. 전기 영동이 끝난 polyacrylamide gel은 Coomassie brilliant blue로 염색한 후, 단백질의 영동상을 확인하였다.

### 3. 편모항원성 검정

선발한 분리균주들의 일차적 분류를 위해 33개의 *B. thuringiensis* 편모 항체를 사용하여 편모항원성을 검정하였다. 각 *B.t.*의 편모 항체는 Ohba & Aizawa (1978)의 방법에 따라 만들었으며, 30°C, 100 rpm으로 LB 배지에서 배양한 분리균주를 1/100농도로 희석한 편모 항체와 동량으로 섞어 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 응집 반응 여부를 조사하였다.

### 4. Polymerase Chain Reaction (PCR)을 이용한 유전자형 분석

각 분리균주의 유전자형을 분석하기 위해 *Spodoptera* 속에 독성을 보이는 내독소 단백질을 발현하는 유전자로 알려진 *cryIA(a)* (Bai et al. 1993), *cryIA(b)* (Moar et al. 1990), *cryIA(c)* (Moar et al. 1990), *cryIC* (Visser et al. 1988), *cryIE* (Bai et al. 1993), *cryII* (Moar et al. 1994)들에 대해 米村眞之 등(1995)이 보고한 특이 primers를 합성하여 사용하였다.

### 5. 생물 검정

분리한 균주를 G.Y.S. 배지에서 30°C, 150 rpm에서 4-7일 배양하여 내독소 단백질이 생성됨을 현미경으로 확인하고 생물 검정을 실시하였다. 1차 생물 검정은 농촌진흥청잠사곤충연구소로부터 분양받은 누에와 서울대학교 위생곤충학연구소로부터 분양받은 빨간집모기, 본 연구실에서 계대한 배추좀나방과 쌀바구미를 실험곤충으로하여 수행하였다. 1차 생물 검정 결과에 따라 나비목에 독성을 보이거나 나비목, 파리목에 양독성을 보이는 균주를 파밤나방, 담배거세미나방을 대상으로 2차 생물 검정을 수행하였다. 생물 검정 시료는 nutrient agar 평판 배지에서 4-7일간 28°C에서 배양하고 배양 용액을 10<sup>7</sup> cells/ml의 농도로 100 µl씩 약간 보완한 고 등 (1990)의 인공 사료 (2.5×2.5×0.5 cm<sup>3</sup>)에 도말하고 건조시킨 후 3령 실험 곤충으로 3반복 생물 검정하였다.

## 결과 및 고찰

전국의 양잠 농가, 저곡창고, 시설 원예 단지, 과수원, 산, 들 등지에서 채집한 토양과 먼지에서 분리한 *B. thuringiensis* 균주들을 배추좀나방, 누에, 빨간집모기에 대해 1차 생물 검정과 파밤나방, 담배거세미나방에 대해 2차 생물 검정을 수행하여 독성이 확인된 7개의 균주들을 선발하였고 이들 균주들을 STB-1,

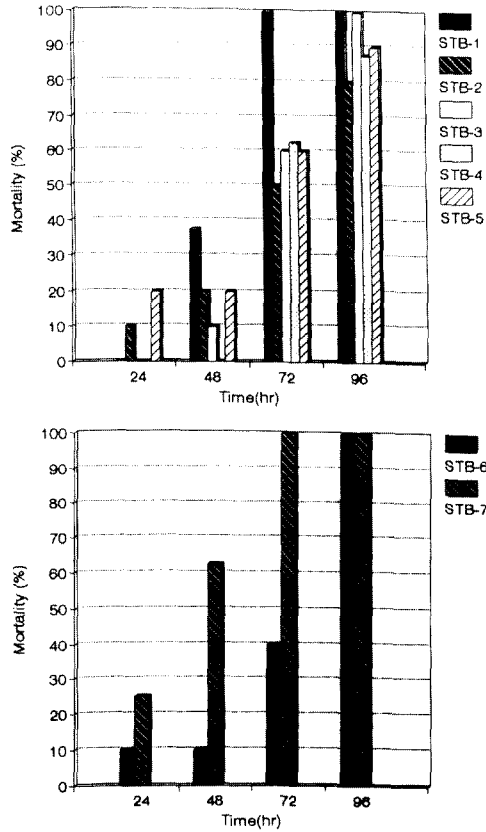


Fig. 1. Toxicity of *B. thuringiensis* isolates against 3rd instar larvae of *Spodoptera exigua*

STB-2, STB-3, STB-4, STB-5, STB-6, STB-7로 각각 명명하였다.

파밤나방에 대한 생물 검정 결과, 처리후 24시간 이내에 STB-2, STB-5, STB-6, STB-7은 10-25%의 독성을 보였으며, 특히 STB-7 균주는 48시간 이내에 63%의 높은 독성을 보였으나, 이외의 균주들은 50% 이하의 낮은 치사율을 나타내었다. 처리후 72시간 이상에서는 STB-6를 제외한 모든 균주가 50%이상의 치사율을 보였으며, 처리후 96시간 경과시는 모든 균주가 80-100%의 치사율을 보였다 (그림 1). 이러한 결과는 *B. thuringiensis* 균주들에 대한 다른 나비목 곤충들의 감수성과 비교할 때 거세미나방속 해충이 *B. thuringiensis* 내독소 단백질에 대한 감수성이 낮다는 보고와 일치하는 것이며 (Bai et al. 1993 ; Sasaki et al. 1996 ; Whitlock et al. 1991), 기보고된 거세미나방속에 독성을 보이는 *B. thuringiensis*에 비해서 독성 발현 시간은 지연되

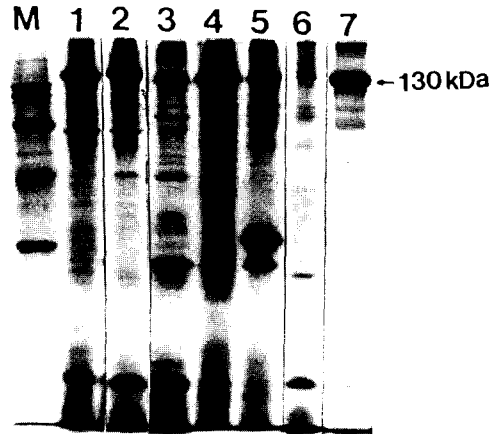


Fig. 2. Parasporal inclusion proteins of *Spodoptera*-specific *B. thuringiensis* isolates determined by SDS-PAGE. Lanes are as follows: 1, STB-1; 2, STB-2; 3, STB-3; 4, STB-4; 5, STB-5; 6, STB-6; 7, STB-7. M indicates molecular mass standards (29, 48, 66, 97, 116 and 205 kDa).

었으나, 전반적으로 높은 독성을 가지는 것으로 보아 거세미나방속 해충 방제에 이용 가능성을 보여 주었다.

분리한 균주들의 내독소 단백질 분자량을 SDS-PAGE에 의해 조사한 결과, 모든 균주에서 약 130 kDa 크기의 내독소 단백질을 확인하였다 (그림 2). 이러한 분자량은 나비목 곤충에 독성을 보이는 균주들이 형성하는 전형적인 CryI 단백질에 속하는 내독소 단백질의 분자량과 일치하는 것이었다.

분리균주들에 대한 1차 분류를 위해 33개 균주의 편모항체를 이용하여 편모항원성을 조사하였다. 그 결과 STB-1과 STB-2는 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*와 동일한 H3a3b와, STB-3, STB-4, STB-5는 subsp. *kenyae*와 동일한 H4a4c의 편모 항체와 반응하였으나, STB-6과 STB-7은 33종류의 편모 항체와 응집반응을 보이지 않았다(표 1). 거세미나방속 해충에 독성을 보이는 *B. thuringiensis* 균주로는 Visser 등 (1988, 1990)과 Sasaki 등 (1996)에 의해 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*와 subsp. *kenyae*가 보고되었으며 본 연구에서는 STB-1부터 STB-5가 이들과 같은 편모항원성을 보임으로써 일치하는 결과였다.

또한 분리균주들이 기존의 거세미나방속에 독성을 띠는 *B. thuringiensis*와 다른 새로운 균주인지 조사하기 위하여 PCR을 이용하여 유전자형을 확인

**Table 1.** *H agglutination test of B. thuringiensis* STB isolates toxic to *Spodoptera* species

H serotype	Serovar	Isolate						
		STB-1	STB-2	STB-3	STB-4	STB-5	STB-6	STB-7
1	<i>thuringiensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
2	<i>finitimus</i>	-	-	-	-	-	-	-
3a	<i>alesti</i>	-	-	-	-	-	-	-
3a3b	<i>kurstaki</i>	+	+	+	-	-	-	-
4a4b	<i>sotto</i>	-	-	-	-	-	-	-
4a4c	<i>kenyae</i>	-	-	-	+	+	-	-
5a5b	<i>galleriae</i>	-	-	-	-	-	-	-
6	<i>entomocidus</i>	-	-	-	-	-	-	-
7	<i>aizawai</i>	-	-	-	-	-	-	-
8a8b	<i>morrisoni</i>	-	-	-	-	-	-	-
8a8c	<i>ostrinae</i>	-	-	-	-	-	-	-
8b8d	<i>nigeriensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
9	<i>tobworthi</i>	-	-	-	-	-	-	-
10	<i>darmstadiensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
11a11b	<i>toumanoffi</i>	-	-	-	-	-	-	-
11a11c	<i>kyushuensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
12	<i>thompsoni</i>	-	-	-	-	-	-	-
13	<i>pakistani</i>	-	-	-	-	-	-	-
14	<i>israelensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
15	<i>dakota</i>	-	-	-	-	-	-	-
16	<i>indiana</i>	-	-	-	-	-	-	-
17	<i>tohokuensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
18	<i>kumamotoensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
19	<i>tochigiensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
20a20b	<i>yunnanensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
20a20c	<i>pondicheriensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
21	<i>colmeri</i>	-	-	-	-	-	-	-
22	<i>shandongiensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
23	<i>japonensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
24	<i>neoleonensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
25	<i>coreanensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
26	<i>silo</i>	-	-	-	-	-	-	-
27	<i>mexicanensis</i>	-	-	-	-	-	-	-

+ : agglutination detected  
 - : agglutination not detected

하고 기존의 균주와 비교하였다. PCR 반응의 예상 증폭 절편의 크기는 *cryIA(a)*에서 733 bp, *cryIA(b)*에서 237 bp, *cryIA(c)*에서 486 bp, *cryIC*에서 288 bp, *cryIE*에서 882 bp, *cryII*에서 1,069 bp이며, PCR을 통해 증폭된 절편의 크기와 제한 효소를 이용한 PCR 절편 분석을 수행하였다. 분리균주에 대한 PCR 결과, 편모항원성이 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*와 동일한 균주인 STB-1은 *cryIA(a)*, *cryIA(b)*, *cryIA(c)*, *cryIE*, *cryII*의 유전자형을 가지고 있었으나, subsp. *kurstaki*에 존재하지 않는 *cryIE* 유전

자형이 존재하였다. 편모항원성이 *B. thuringiensis* subsp. *kenyae*와 동일한 균주인 STB-3는 *cryIE*, STB-4는 *cryIA(b)*, *cryII*, STB-5는 *cryIA(a)*, *cryIA(b)*, *cryIA(c)*, *cryII*의 유전자형이 존재하였으며, STB-5는 subsp. *kenyae*에서는 존재하지 않는 유전자인 *cryIA(a)*와 *cryII*를 가지고 있으나, subsp. *kenyae*에 있는 *cryIE* 유전자가 존재하지 않았다. 또한 STB-6와 STB-7은 *cryIA(a)*, *cryIA(b)*, *cryIC*, *cryII*를 가지고 있으나 33종의 편모 항원을 이용한 편모항원성 검정 결과, 기존의 균주와 편모항원성을 보이지 않

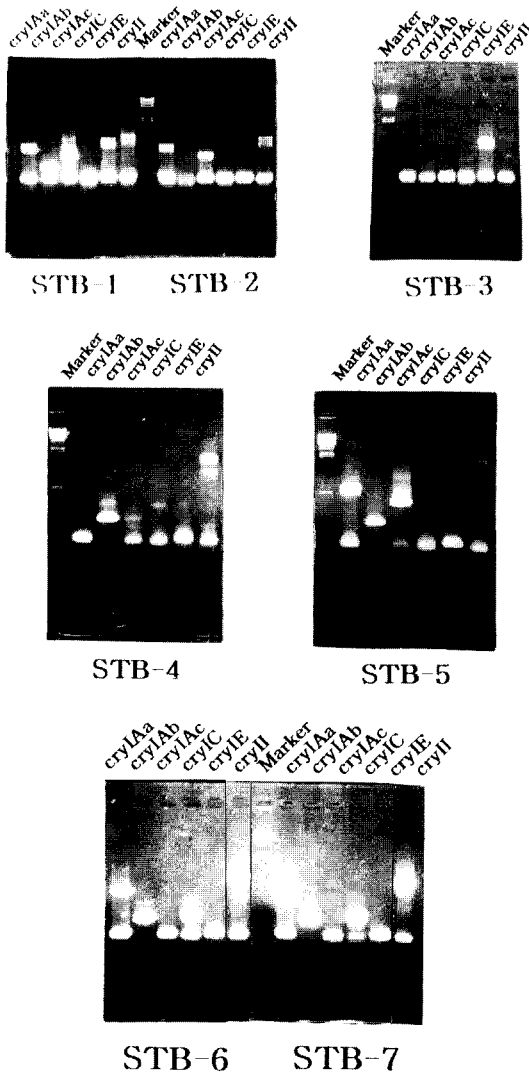


Fig. 3. PCR product profiles of *B. thuringiensis* STB isolates toxic to *Spodoptera* species by *cryI*- and *cryII*-type gene specific primers

았다(그림 3, 표 1, 2).

이상의 결과로 볼 때 분리균주인 STB-1, STB-5, STB-6 그리고 STB-7은 거세미나방속에 독성을 보이는 기존의 균주와 다른, 독성을 가지는 균주로 추정되며, 특히 담배거세미나방에 높은 독성을 보인 STB-7은 이후 내독소 단백질 유전자의 구조 결정을 비롯한 제제화에 대한 일련의 연구가 이루어지면 거세미나방속 해충 방제를 위한 미생물살충제로써의 활용이 기대된다.

Table 2. Gene types of *B. thuringiensis* STB strains as determined by specific PCR primers

<i>B. thuringiensis</i> strains	Gene type					
	<i>cryIA(a)</i>	<i>cryIA(b)</i>	<i>cryIA(c)</i>	<i>cryIC</i>	<i>cryIE</i>	<i>cryII</i>
Kurstaki HD-1	+	+	+	-	-	+
Kurstaki HD-73	-	+	+	-	-	-
<i>aizawai</i>	+	+	-	-	-	-
<i>kenyae</i>	-	+	+	-	+	-
STB-1	+	+	+	-	+	+
STB-2	+	-	+	-	-	+
STB-3	-	-	-	-	+	-
STB-4	-	+	-	-	-	+
STB-5	+	+	+	-	-	+
STB-6	+	+	-	+	-	+
STB-7	+	+	-	+	-	+

+ : PCR product observed  
 - : PCR product not observed

### 적 요

전국 토양, 양잠 농가, 저곡 창고, 시설 원예 단지, 과수원, 산, 밭 등에서 분리한 토양과 먼지 등의 시료로부터 거세미나방속 해충에 강한 독성을 보이는 7개 균주를 분리하였다. 이들을 각각 STB-1에서 STB-7까지 명명하였으며 모두 약 130 kDa의 내독소 단백질을 형성하였다. 편모항원성 검정 결과 STB-1, STB-2는 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*와 STB-3, STB-4, STB-5는 subsp. *kenyae*와 반응하였으며 STB-6, STB-7은 기존의 편모항체와 반응하지 않았다. PCR로 유전자형을 분석한 결과 STB-1은 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*에서는 보고되지 않은 *cryIE* 유전자를 가지고 있으며 STB-5는 subsp. *kenyae*와는 다른 유전자형을 보였다. 기존의 편모항체와 반응을 보이지 않은 STB-6와 STB-7은 *cryIA(a)*, *cryIA(b)*, *cryIC*, *cryII*를 가지고 있었다.

### 사 사

본 연구는 서울대학교 농업생물 신소재 연구센터와 95' 농림수산 특정연구과제(첨단 농림수산물기술개발과제) 연구비 지원에 의하여 수행되었음.

### 인용문헌

Aronson 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
- Bai C., D. Degheele, S. Jansens, and B. Lambert (1993) Activity of insecticidal proteins and strains of *Bacillus thuringiensis* against *Spodoptera exempta* (Walker). *J. Invertebr. Pathol.* **62** : 211-215
- Höfte H. and H. R. Whiteley (1989) Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* **53** : 242-255.
- 고현관, 이상계, 이비파, 최귀문, 김정화 (1990) 인공 사료에 의한 과밤나방의 대량사육법. *한응곤지*. **29** : 180-184
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** : 680-685
- Moar W. J., L. Masson, R. Brousseau and J. T. Trumbles (1990) Toxicity to *Spodoptera exigua* and *Trichoplusia ni* of individual p1 protoxins and sporulated cultures of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 and NRD-12. *Appl. Environ. Microbiol.* **56** : 2480-2483
- Moar W. J., J. T. Trumble, R. H. Hice and P. A. Backman (1994) Insecticidal activity of the CryII protein from the NRD-12 isolates of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* expressed in *Escherichia coli* and *Bacillus thuringiensis* and in a leaf-colonizing strain of *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60** : 896-902
- 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 and S. Sudo (1984) Distribution of *Bacillus thuringiensis* in sericultural farms of Fukuoka prefecture. Japan. *Proc. Assoc. Plant Prot. Kyushu.* **30** : 152-155
- Sasaki J., S. Asno, T. Lizuka, H. Bando, B. W. Lay, S. Hastowo, G. K. Powell and T. Yamamoto (1996) Insecticidal activity of the protein encoded by the cryV gene of *Bacillus thuringiensis kurstaki* INA-02. *Curr. Microbiol.* **32** : 195-200.
- Visser B., E. Munsterman, A. Stoker and W. G. Dirkse (1990) A novel *Bacillus thuringiensis* gene encoding a *Spodoptera exigua*-specific crystal protein. *J. Bacteriol.* **172** : 6783-6788.
- Visser B., T. van der Salm, W. van den Brink and G. Folkers (1988) Genes from *Bacillus thuringiensis entomocidus* 60.5 coding for insect-specific toxins. *Mol. Gen. Genet.* **212** : 219-224.
- Whitlock H. V., M. C. Lo, M. H. Kuo and T. S. Soong (1991) Two new isolates of *Bacillus thuringiensis* pathogenic to *Spodoptera litura*. *J. Invertebr. Pat hol.* **58** : 33-39
- 米村眞之, 早坂昭二, 古田要二 (1995) 新規微生物農薬(BT菌)の検索と開発. 蠶絲昆蟲機能試験研究成績計劃概要集. 4101-4102.