

모기유충에 대한 살충성 내독소와 항진균성 물질을 동시에 생산하는 *B. thuringiensis* AF6균주의 분리 및 특성

김광현 · 이광배* · 신두만**

동의대학교 미생물학과 · 대구보건대학 보건위생과* · 대구보건대학 환경관리과**

Isolation and Characterization of *Bacillus thuringiensis* strain AF6 Producing an Antifungal Substance and a Mosquitocidal Delta-endotoxin Simultaneously

Kwang-Hyeon Kim · Kwang-Bae Lee* · Du-Man Shin**

Department of Microbiology, Dongeui University, Pusan 614-714, Korea

Department of Health Hygiene, Taegu Health College, Taegu 702-260, Korea*

Department of Environmental Engineering, Taegu Health Collage 702-260, Korea**

Abstract

For a biological control on a plant pathogen, *Pyricularia oryzae*, and a mosquito, *Aedes aegypti*, *Bacillus thuringiensis* strain AF6 which produces parasporal inclusion, delta-endotoxin, was isolated. The *B. thuringiensis* strain AF6 was produced not only an antifungal substance(AFS) against *P. oryzae*, but also a mosquitocidal delta-endotoxin. The AFS of the strain AF6 is more stable at pH4.0 than pH10.0. At the mode of action, the AFS of the strain AF6 was inhibited hypha growth on potato agar plate(pH5.0), and degraded cell walls of *P. oryzae*.

I. 서론

일반적으로 식물병원균을 방제하기 위하여 사용되는 화학농약이나 항생물질계통은 그 사용범위가 상당히 넓은 반면 인체에 유해하고 저항성을 가진 병원균의 출현율을 증가시키고 있는 실정이다. 최근에는 사용숙주 범위가 좁지만 이러한 결점을 보완할 수 있는 생물학적 방제에 관한 관심이 고조되고 있다. 뿐만 아니라 식물병원균을 방제하기 위한 화학농약의 사용은 심각한 환경오염으로 인한 생태계에 문제를 유발시켜서¹⁾, 식물병

원균에 대한 방제는 인축에 대한 안전성과 더욱 경제성이 있는 방법의 선택이 요구되고 있다²⁾. 따라서 농작물에 질병을 유발시키는 식물병원성 곰팡이의 방제를 위해 1) 길항미생물의 이점을 이용하는 것과 2) 숙주에 저항성을 증가시키기 위한 미생물의 활용을 고려해야한다^{3,4)}.

길항미생물의 첨가는 토양에 존재하는 식물병원균에 대한 생물학적 방제로서 실질적이고 질병을 구제하는 화학합성 농약의 사용을 억제하는 구체적인 하나의 방법이다^{5,6)}. 길항미생물은 토양내의 여러 가지 식물병원균과 상호작용을 통해 미생

물학적 평형에 중요한 역할을 하며, 생물방제를 위한 강력한 수단으로 사용된다.

특히, 농작물에는 병원미생물에 의한 피해 만큼 해충의 피해도 크며, 이들을 방제하기 위한 유기 합성 농약의 대량 살포는 심각한 환경오염을 일으켜 직접 또는 간접적으로 국민보건에도 커다란 영향을 미친다. 따라서 본 연구는 최근에 가장 유망한 생물농약 중의 하나인 *Bacillus thuringiensis*^{1,7)}가 해충방제 만을 목적으로 사용되는 것과는 달리 *B. thuringiensis*의 한 균주가 해충과 동시에 식물병원균을 방제할 수 있는가를 검토할 목적으로 벼도열병균(*Pyricularia oryzae*)과 모기를 대상으로 그 가능성을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 사용 균주 및 배지조성

본 실험에 사용된 균주는 도열병균인 *Pyricularia oryzae* KTCC1939와 본 연구실에서 에 따라 직접 나뭇잎에서 분리한 *Bacillus thuringiensis*를 대상으로 하였다. 배지조성은 감자배지⁸⁾에 1.0% yeast extract를 첨가시키고 pH는 5.4로 조정하여 사용하였다.

2. *B. thuringiensis*균주의 동정

분리된 균주를 열처리(80°C, 10분간)를 하여 영양세포는 사멸시키고, PYG한천배지⁸⁾에서 배양(28°C, 3일)시킨 후 위상차현미경으로 포자형성 유무 및 결정성 내독소를 직접 관찰하였다. 이외의 생화학적 성상은 Krieg 등⁹⁾과 Collins 등¹⁰⁾에 의거하여 동정하였다.

3. 항진균성 *B. thuringiensis*균주의 분리 및 선별

Yeast extract가 1.0% 함유된 감자한천배지(pH 5.4)에 분리된 길항세균을 먼저 샐레의 중앙에 직선으로 접종하여 배양(28°C, 24시간)시킨다. 그 후 대상균주인 *P. oryzae*를 길항세균이 생육된 띠를 따라서 인접(1.0~2.0 cm)되게 평행선으로 접종하

여 항온기 내에서 생육(25°C, 2일간)시켰다. 생육된 *P. oryzae*의 균사가 *B. thuringiensis*의 생육저지에 의해 성장을 억제시키는 *B. thuringiensis*를 1차적으로 분리선별하였다(streak method). 1차로 선별된 *B. thuringiensis* 중에서 중층법¹¹⁾에 의해 도열병균의 생육을 억제하는 균을 다시 선별하였다. 즉, 미리 감자한천배지(pH 5.4)에 1차 선별된 *B. thuringiensis*를 샐레의 중앙에 이쑤시게로 spot하여 접종시키고 생육(28°C, 24시간)시킨 후 그 상층에 0.5% 한천이 함유된 감자배지(pH 5.4)를 중층하여, *P. oryzae*를 접종하고 배양(25°C, 36-48시간)하면서 *B. thuringiensis*의 colony 주위에 *P. oryzae*의 생육이 억제되어 투명한 환이 형성되는 균주를 2차로 선별하였다.

4. 항진균성 물질의 활성측정

활성 측정은 Disk method¹²⁾를 사용하였다. 즉, 미리 25°C에서 2~3일간 진탕 배양된 *P. oryzae*가 감자한천배지(pH 5.4)상에 도말하여 접종시켰다. 그 후 선별된 *B. thuringiensis*가 분비하는 항진균성 물질(Antifungal substance; AFS)이 함유된 용액을 paper disk(Φ0.8 cm)상에 일정량 주입시키고, 25°C에서 2~3일간 배양시켜서 disk주위에 생육 저지대인 투명대의 반지름의 크기로 항진균성 물질의 활성을 나타내었다.

5. 항진균성 물질의 조정제

감자배지(pH 5.4)에서 배양된 *B. thuringiensis* AF6의 배양액을 원심분리(10,000 rpm, 15 min)하여, 그 상층액에 황산암모늄을 포화시켰다. 그 후 4°C에서 하룻밤 동안 방치하고 형성된 침전물은 다시 원심분리하여 회수하였다. 회수된 침전물은 원래 배양액의 1/50의 용량이 되도록 생리식염수가 함유된 20 mM 인산완충액(pH 7.0)에 용해하여 투석막(MW 8,000; Dialysis membrane tube)에 넣어 투석시켜 황산암모늄을 제거하였다.

6. 단백질의 정량

조정제된 항진균성 물질의 농도를 측정하기 위해 Lowry method¹³⁾가 사용되었다.

7. 항진균성 물질의 작용양상

*P. oryzae*를 25°C에서 2-3일 동안 감자배지에서 진탕배양시킨 후 형성된 균체를 0.8% NaCl이 함유된 인산완충액에 균체를 현탁시켰다. 대조구에는 0.8% NaCl이 함유된 인산완충액 4ml와 균체 현탁액 1ml를 혼합하고 시료구에는 0.8% NaCl이 함유된 인산완충액 2ml와 균체현탁액 1ml 및 조정제된 항진균성 물질 2ml를 혼합하여 25°C에 방치하면서 경시적으로 세포벽의 파괴를 현미경으로 관찰하였다.

8. 모기에 대한 독성시험

B. thuringiensis AF6균주는 PYG한천배지⁸⁾에 배양(3일, 28°C)시킨 후 배양균체와 결정성내독소가 함유된 복합물을 증류수가 함유된 시험관에 현

탁시켰다. 그 현탁액에 모기(*Aedes aegypti*)의 유충(2령 유충) 5마리를 넣어 25°C의 항온기에서 24시간 동안 관찰하여 치사량을 조사하였다¹⁴⁾.

III. 결과 및 고찰

1. *B. thuringiensis* AF6균주의 항진균성 물질 생산

분리된 *B. thuringiensis*들의 식물 병원균 *P. oryzae*에 대한 생육 억제를 streak method로 조사해 본 결과는 Fig. 1.에서 나타난 것과 같이 항균력이 있는 길항세균인 AF6 균주가 존재하는 방향으로 *P. oryzae*균사가 전혀 생육되지 않았다. 또한, 1차 선별된 AF6균주는 다시 diffusion method를 행하여 *P. oryzae*의 생육을 관찰해 본

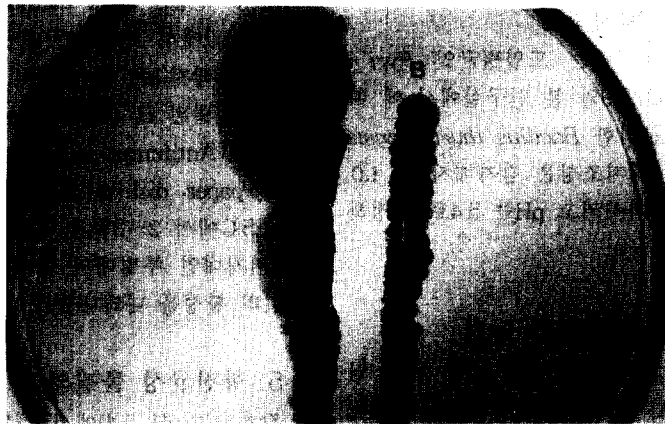


Fig. 1. Growth inhibition of *P. oryzae* by *B. thuringiensis* strain AF6 with streak method. Symbols : A : *P. oryzae*, B : *B. thuringiensis* strain AF6.

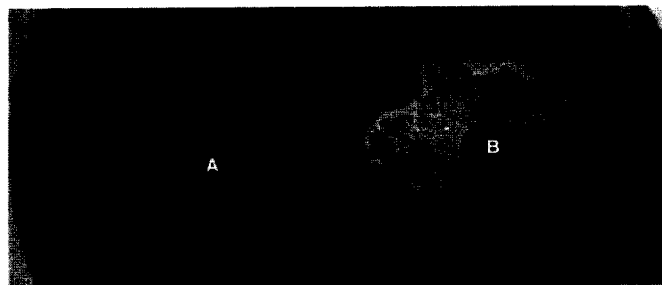


Fig. 2. Growth inhibition of *P. oryzae* by *B. thuringiensis* strain AF6 with diffusion method. Symbols : A : Distilled water B : AFS.

결과 Fig. 2.에서 보는 바와같이 AF6균주가 생육하는 colony의 주위에는 *P. oryzae* 생육이 저지되어서 뚜렷한 투명대가 형성되었다(Fig. 2). 따라서 *B. thuringiensis* AF6균주는 균체 외로 항진균성 물질을 생산하여 *P. oryzae*균사의 생육을 저해한다고 생각된다.

2. 항진균성 물질을 생산하는 *B. thuringiensis* AF6균주의 성질

항진균성 물질을 생산하는 *B. thuringiensis* AF6균주의 특성을 조사한 결과는 Table 1.과 같다. Table 1.에서 보는 바와 같이 Gram 양성의 간균, 포자를 형성하고, 운동성이 있으며 내독소를 함유한 전형적인 *B. thuringiensis* 균으로 표준균주인 *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*와는 항진균성 물질생산 능력에 만 차이가 있었다.

3. 항진균성 물질의 활성측정

항진균성 물질은 일반적으로 항생물질인 경우가 많아서 이들 항생물질은 대부분 저분자이다. 따라서 *B. thuringiensis* AF6균주가 생산하는 항진균성 물질도 저분자의 항생물질인지를 알아보기 위해 AF6균주의 배양액을 황산암모늄으로 염석시켰다. 그후 염석된 배양액은 투석막(MW6,000~8,000)을 이용하여 20 mM인산완충액(pH 7.0)에서 투석시킨 후 투석액의 항진균에 대한 활성을 측정하였다. 그 결과 Table 2.에서 보는 바와 같이 투석액의 농도가 증가됨에 따라 항진균에 대한 활성

Table 1. Physico-chemical properties of *B. thuringiensis* strain AF6

Physico-chemical properties \ Strain	Bti	Bt AF6
Gram stain	+	+
Spore formation	+	+
Shape	rod	rod
Motility	+	+
Parasporal Inclusion (Crystal)	+	+
Growth at pH 5.7(Nutrient broth)	+	+
Catalase	+	+
Nitrate reduced to nitrite	+	+
Antifungal activity	-	+
Lecithinase	+	+
Acid production from glucose	+	+
β -galactosidase	-	-
Arginine dehydrogenase	+	+
H ₂ S production	-	-
Indole production	-	-
Gelatin liquification	-	-

Symbols ; Bti : *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*(type strain), Bt AF6 : *Bacillus thuringiensis* strain AF6.

은 점차로 증가하였다. 따라서 본 균주가 생산하는 항진균성 물질은 투석막을 통과하지 않기 때문에 적어도 MW8,000 이상의 물질이라고 추정된다.

4. 항진균성 물질의 열에 대한 안정성

항진균성 물질의 열에 대한 안정성을 알아보기 위하여 항진균성 물질 0.5 ml를 각각 40℃, 60℃, 80℃에서 30분 동안 열처리를 행한 후 그 잔존 활

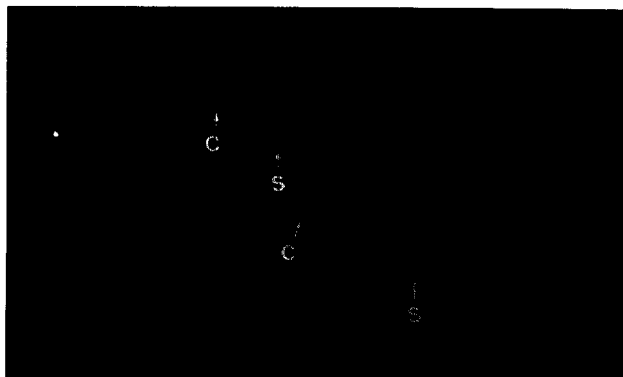


Fig. 3. Morphology of *B. thuringiensis* strain AF6 on Phase Contrast Microscope. Symbols ; C : Parasporal inclusion(Crystal), S : Spore.

Table 2. Growth inhibition of *P. oryzae* against *B. thuringiensis* strain AF6.

Volume of AFS in paper disk	0 μ l	50 μ l	80 μ l	110 μ l
Growth Inhibition(cm)	0	0.15	0.20	0.30

A paper disk was soaked with an antifungal substance(AFS) from *B. thuringiensis* strain AF6 for determination of growth inhibition of *P. oryzae*.

Table 3. Heat stability of AFS from *B. thuringiensis* strain AF6.

Temperature($^{\circ}$ C)	None treatment	40	60	80
Growth Inhibition(cm)	0.3	0.2	0.1	0.05

AFS(0.5ml) from *B. thuringiensis* strain AF6 were heated for 30 min at 40 $^{\circ}$ C, 60 $^{\circ}$ C, and 80 $^{\circ}$ C, respectively. Each AFS treated heat was rapidly kept in ice, and remaining activity of AFS was measured by disk method.

성을 조사해 본 결과는 Table 3.에서 보는바와 같다. 즉, 80 $^{\circ}$ C까지 항진균성 물질을 열처리 하였어도 그 잔존활성이 측정되었으나, 열처리를 행하지 않은 대조군에 비해 40 $^{\circ}$ C~80 $^{\circ}$ C까지 온도가 높아 질수록 활성이 줄어드는 것으로 보아 항진균성 물질은 열에 비교적 불안정하다고 사료된다.

5. 항진균성 물질의 pH에 대한 안정성

항진균성 물질이 함유된 용액 0.3 ml에 각각 10 mM 구연산완충액(pH 4.0)과 10 mM 탄산 완충액(pH 10.0)을 동량 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 동안 방치시켰다. 그 후 50 mM 인산완충액(pH 7.0)을 각각 동량 가하여 pH를 7.0으로 조정한 후 잔존하는 항진균성 물질의 활성을 측정하였다. 그 결과는 Table 4.에서 보는바와 같이 무처리 군인 pH 7.0에서 가장 안정하였고, pH 4와 pH 10에서는 불안정하였으나, 알칼리성에서 보다는 산성에서 약간의 잔존활성이 남아 있었다. 이는 일반적으로 대부분의 항생물질이 알칼리성 보다는 산성에서 더욱 안정한 현상과 유사한 결과를 얻었다.

6. 항진균성 물질의 *P. oryzae*세포벽 분해

식물 병원균인 *P. oryzae*를 25 $^{\circ}$ C에서 하룻동안

Table 4. pH stability of AFS from *B. thuringiensis* strain AF6.

pH	None treatment	4	10
Growth Inhibition(cm)	0.1	0.05	0

Mixture of 20mM phosphate buffer(0.3ml) and an antifungal substance(0.3ml) from the strain AF6, was kept at 37 $^{\circ}$ C overnight. After that, 50mM phosphate buffer(0.3ml, pH7.0) was added to the mixture, and remaining activity of an anti-fungal substance was measured by disk method.

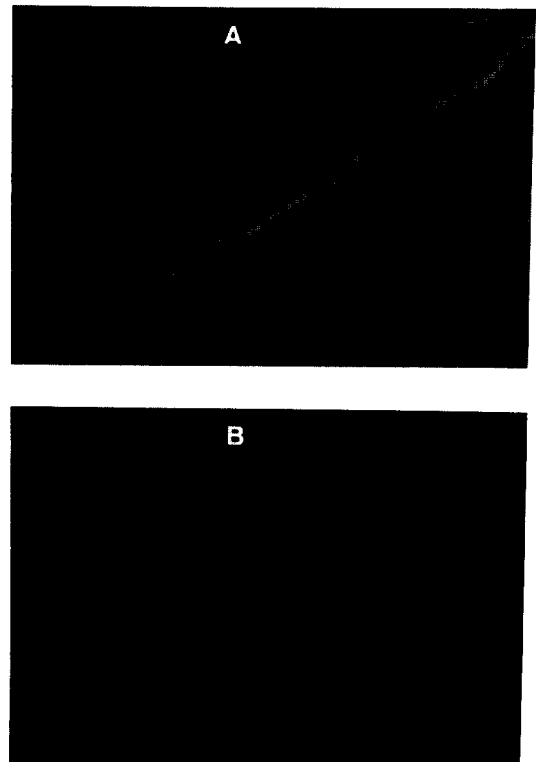


Fig. 4. Degradation of cell wall of *P. oryzae* after treatment of AFS from the strain AF6.

P. oryzae cells suspended in 3ml PBS buffer were mixed with 2ml AFS solution of the strain AF6, and the mixture was kept at 25 $^{\circ}$ C for 2 days. The AFS solution of the strain AF6 was contained 4.1mg/ml protein. Symbols: A: None treatment, B: 2 day treatment.

배양시킨 후 원심분리(13,000 rpm, 10min)하여 균

Table 5. Mosquitocidal activity of *B. thuringiensis* strain AF6

Feeding Time(hr) / Strain	Bti	Bt AF6
24	5/5	5/5
48	5/5	5/5

B. thuringiensis AF6 was cultured on PYG agar plate for 3days at 28°C, and the spore-crystal mixture was suspended into test tube containing distilled water. The 5 larvae of mosquito(*Aedes aegypti*) were introduced into the test tube, and kept at 25°C for 24hr for observation of number of dead larvae.

체를 회수하고, 대조군에는 0.8%생리식염수가 함유된 인산완충액(pH 7.0) 4ml에 균체현탁액 1ml를 혼합하였다. 또한 항진균성 물질을 처리한 처리군에는 0.8% 생리식염수가 함유된 인산완충액 2ml에 균체 현탁액 1ml와 항진균성 물질이 함유된 용액 2ml를 혼합시켜서 25°C에서 반응시키면서 경시적으로 *P. oryzae*의 균체의 변화를 현미경을 통하여 관찰하였다. 그 결과 Fig. 4에서 보는바와 같이 항진균성 물질은 48시간 후에는 *P. oryzae*균사가 절단되고 분해된 모양이 관찰되었다. 따라서 이 항진균성 물질은 *P. oryzae*의 균사를 분해함으로써 *P. oryzae*의 생육을 억제하는 것으로 사료된다.

7. 모기유충에 대한 살충성

모기유충(*A. aegypti*)에 대한 *B. thuringiensis* AF6균주의 독성시험을 행한 결과 Table 5.에서 보는 바와 같이 24시간 후에는 모두 치사되었으므로 본 *B. thuringiensis* AF6균주는 모기유충에 강한 치사력이 있는 내독소를 생산한다. 이때 대조군으로 모기유충에 강한 독성을 나타내는 *B. thuringiensis* strain *israelensis*(type strain)가 사용되었다.

IV. 결 론

해충과 동시에 식물병원균을 방제할 목적으로 해충방제를 위한 *Bacillus thuringiensis* 중 균주를 분리한 결과는 다음과 같다.

1. 모기유충에 독성을 가진 내독소를 생산하는 동시에 도열병균(*P. oryzae*)에 대한 항진균성 물질을 생산하는 *B. thuringiensis* AF6 균주를 분리하였다.
2. *B. thuringiensis* AF6의 항진균성 물질은 *P. oryzae*의 세포벽을 분해하였고, 적어도 8,000 Kda 이상의 분자량을 가진 물질로 추정되었다.
3. 항진균성 물질은 40°C에서 30분간 열처리에 의해 활성의 2/3가 소실되었으며, 중성에서 가장 안정하였다.
4. 분리된 *B. thuringiensis* AF6의 내독소는 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*와 마찬가지로 모기(*Aedes aegypti*)에 강하게 독성을 나타내었다.

참 고 문 헌

1. Carlton, B. C.: Development of improved bioinsecticides based on *Bacillus thuringiensis*, In *Pest control with enhanced environmental safety*, Edited by S. O. Duke, J. J. Menn, and J. R. Plimmer, American Chemical Society, Washington, D.C., 256-266, 1993.
2. Cook, R. J.: Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens, *Annu. Rev. Phytopathol.*, 31, 53-80, 1993.
3. Gregory, K. F., O. N. Allen, A. J. Ricker, and W. H. Peterson: Antibiotics and antagonistic microorganisms as control agents against damping-off of alfalfa, *Phytopathology.*, 42, 613-622, 1952.
4. Kerr, A.: Biological control of crown gall through prodction of agrocin 84, *Plant Dis.*, 64, 24-30, 1980.
5. Kim, K. Y., and S. D. Kim.: Biological control of *Pyricularia oryzae* blast spot with antibiotic substances produced by *Bacillus* sp. KL-3. *Kor. J. Appl. Microbiol.*

- Biotechnol. 25 : 396-402, 1997.
6. Parke, J. L., R. E. Rand, A. E. Joy, and E. B. King : Biological control of pythium damping-off and aphanomyces root rot of peas by application of *Pseudomonas cepacia* or *P. fluorescens*, Plant Dis., 75, 987-992, 1991.
 7. Feitelson, J. S., J. Payne, and L. Kim : *Bacillus thuringiensis* : insects and beyond. Bio/Technology, 10, 271-275, 1992.
 8. Kim, J. Y., and K. H. Kim : Isolation and characterization of *Bacillus* sp. PY123 producing water-soluble yellow pigment, Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 25, 454-458, 1997.
 9. Krieg, N. R. and J. C. Holt : Bergey's Manual of systematic bacteriology, Vol.2, William and Wilkins Co., Baltimore., 1105-1138, 1986.
 10. Collins, C. H. and P. A. Lyne : Microbiological method, 5th ed., Butterworth & Co., London, 356-360, 1984.
 11. Isaacson, D. M., and J. Kirschbaum : Assays of antimicrobial substance. In manual of industrial microbiology and biotechnology. Demain, A. L., and N. A. Solomon(edit). American Society for Microbiology. Washington, D.C., 410-435, 1986.
 12. Cremer, A. : Antibiotic sensitivity and assay tests. In Collins, C. H. and P. M. Lyne, Microbiological methods. Fifth ed., 167-181, 1984.
 13. Lowry, O. H., H. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall : Protein measurement with the Folin phenol reagent, J. Biol. Chem., 193, 265-275, 1951.
 14. Kim, K. W., M. Ohba, and B. W. Kim : Cloning of a hemolytic mosquitocidal delta-endotoxin gene(*Cyt*) of *Bacillus thuringiensis* 73E10-2 (serotype 10) into *Bacillus subtilis* and characterization of the *cyt* gene product, J. Microbiol. Biotech., 6, 326-330, 1996.