

Steinernema glaseri 곤충병원선충으로부터 공생박테리아의 분리 및 배양특성

†박 선 호 · 유 연 수

계명대학교 화학·재료공학부

(접수 : 1998. 12. 30., 게재승인 : 1999. 4. 15.)

Isolation and Culture Characteristics of a Bacterial Symbiont from Entomopathogenic Nematode *Steinernema glaseri*

Sun Ho Park† and Yeon Su Yu

School of Chemical Engineering & Materials Engineering, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea

(Received · 1998. 12. 30., Accepted · 1999. 4. 15.)

A symbiotic bacterium with highly effective toxins was isolated from entomopathogenic nematode *Steinernema glaseri* which has been widely used against various soil-inhabiting pests. The symbiont of *S. glaseri* was identified as *Xenorhabdus nematophilus* sp. by using several biochemical and physiological tests. When this strain was released into the hemolymph of insect larva, it produced highly toxic substances and killed the larva within 2 days. Two colony forms that differed in some biochemical characteristics were observed when cultured *in vitro*. Phase I colonies were mucoid and difficult to be dispersed in liquid. Phase II was not mucoid and was easily dispersed in liquid. It did not adsorb neutral red or bromothymol blue. Rod-shaped cell size was highly variable between two phases, ranging 2-10 μ m. It was also found that only infective-stage nematodes can carry only primary-phase *Xenorhabdus* in their intestine.

Key Words : *Xenorhabdus*, Symbiotic bacteria, Biopesticide, Entomopathogenic nematodes, *Steinernema glaseri*.

서 론

곤충병원성 선충(entomopathogenic nematodes)은 뛰어난 기주 탐색능력과 높은 치사율, 기타 포유류 및 식물에 대한 안정성 때문에 생태친화적인 차세대 무공해 생물살충제로 크게 기대되고 있다(1-3). 특히 *Neocleptana*, *Steinernema* 그리고 *Heterorhabditis* 속 곤충병원성 선충은 측미선구강(Sececementea)의 원충목(Rhabditida)에 속하며 장내에 공생박테리아를 보유하여 생물살충제로 살포시 해충의 유충에 침입한 후 해충의 혈장(hemolymph)에 이들을 분비함으로써 해충 숙주를 24-48시간 내에 사멸시킬 뿐만 아니다. 선충 증식에 필요한 영양소 및 유충 사체 내에서의 다른 미생물의 증식을 억제하기 위해서 광역 항균 스펙트럼의 항생제를 포함한 몇 가지 물질을 분비하는 것으로 알려져 있다(4-6) 곤충병원성 선충의 공생박테리아인 *Xenorhabdus* 속은 Enterobacteriaceae류에 속하며(7), 그람음성균으로 조건적 혐기성(facultatively anaerobic)인 간균(rod-shape)이다. *Xenorhabdus*는 초기에 *X. nematophilus*(symbiotic with Steinernematidae)와 *X. luminescens*(symbiotic with Heterorhabditidae)의 2종(species)으로 구분되었으나(8), 그 후에 *X. nematophilus*는 *nematophilus*, *bovienui*, *poinarii*, 그리고 *beddi-*

*ngii*의 4종류의 subspecies로 구분되었다(9-10) 또한 *Xenorhabdus*는 *in vitro* 배양 시 phase I에서 phase II의 상태로 변화될 수 있는데 이를 등질이형화(dimorphism)현상(11)이라 부르며, 그 유전적 원인은 잘 알려지지 않고 있다. Phase I은 등질이형인 phase II에 비해서 대사가 더 활발하며, *in vitro* 배지에서 phase II의 출현은 일반적으로 감염단계 선충(infective juvenile nematodes)의 증식을 낮게 하는 것으로 알려져 있다(12). 최근 곤충 혈장에서의 *Xenorhabdus* 생존이 박테리아의 외막 표면성분에 관련되는 것으로 예상하여 외막단백질에 대한 연구도 진행되고 있다(13-14)

본 연구에서는 국내에 서식하고 있는 곤충병원성 선충인 *Steinernema glaseri* 종의 살충효과를 규명하기 위하여 선충과 공생관계에 있는 장내박테리아(Enterobacteriaceae)를 분리하였으며 해충에 미치는 독성 등 그 성장특성을 비교, 조사하였다.

재료 및 방법

재 료

곤충병원성 선충인 *Steinernema glaseri* 종의 *in vivo* 증식을 위해서 꿀벌부채명나방(*Galleria mellonella*)의 유충을 사용하였다(15). 또한 선충으로부터 공생박테리아의 분리 및 생리적 특성을 조사하기 위해서 NA, MacConkey agar, peptone form soymeal, yeast extract, phenolphthalein diphosphate, tween 85, L-phenylalanine, ferric chloride를 Merck로부터 구입하였고 bromothymol blue는 Junsei, triphenyltetrazolium chloride는

† Corresponding Author : 1000 Shindang-dong, Dalseo-gu, Taegu 704-701, Korea

Tel · 053-580-5457, Fax · 053-633-4929

e-mail : park@knucc.keimyung.ac.kr

Sigma로부터 각각 구입하였다. 또한 균주의 동정 실험을 위해서 BUGM 배지와 95개의 carbon source가 코팅된 microplate는 Biolog사로부터 구입하였다.

공생박테리아의 분리 및 동정

공생박테리아를 분리하기 위해서 사용된 곤충병원성 선충인 *Steinernema glaseri* 종은 국내에서 분리·동정된 것(16)으로 다음의 세 가지 방법을 사용하여 분리하였다. 첫째, *Steinernema glaseri*를 보관중인 냉장고(10℃)에서 꺼내 실온에서 30분간 방치하여 선충의 활성을 회복시킨 다음 0.5% NaClO 용액에 10분간 침지시켜 표면살균된 선충을 YS 배지가 첨가된 tube에 담아 vortexing하여 선충을 파괴시킨 후 28℃ shaking incubator에서 48시간 배양한 후 배양액을 nutrient agar, MacConkey agar, 그리고 NBTA에 각각 plate out하여 colony를 분리하였다. 둘째, 꿀벌부채명나방 유충의 hemolymph액을 nutrient agar에 무균적으로 몇방울 떨어트린 다음 표면살균된 선충을 그 위에 마룻 떨어트려 48시간 배양한 후 선충이 hemolymph액에 분비한 공생박테리아에 의해 생성된 colony를 분리하였다. 셋째, 선충을 꿀벌부채명나방 유충에 접종한지 48시간 후 사멸한 유충 사체 내부액을 plate out하여 colony를 분리하였다. 이때 무균적으로 유충 사체를 해부하기 위해 유충사체를 95% ethanol에 침지한 후 알코올 램프를 이용하여 순간적으로 유충 표면의 알코올을 태운 다음 멸균증류수에 침지하여 사용하였다.

Steinernema glaseri 선충으로부터 nutrient agar, MacConkey agar, 그리고 NBTA를 이용하여 순수분리한 colony를 BUGM배지에서 2회 배양하여 순수한 colony를 생성하였다. 3-4

일 경과 후 생성된 colony는 0.85% saline 용액에 풀어서 saline 용액으로 다시 현탁액의 탁도가 적정 범위 안에 오도록 희석하였다. 2-8℃에 보관된 microplate를 꺼내 28-30℃에서 현탁액의 적정량을 microplate에 접종하고 24시간동안 배양하였다. 배양을 실시한 microplate를 동정시스템에 입력하고 95개 carbon source 각각에 대한 산화능을 조사하였다. 또한 동정시스템에 내장된 566 종/속의 그람 음성균 data base software를 이용하여 동정 결과를 조사하였다.

Biolog 동정시스템

Biolog 동정시스템은 서로 다른 종류의 carbon sources들이 코팅된 microplate를 용도에 맞게 미리 선택하여 미생물의 이용 또는 산화능을 측정할 수 있으며 사용되는 microplate의 종류와 조성은 Table 1과 같다.

미생물이 성장하는데 필요한 모든 nutrient와 biochemicals은 96 well microplate에 미리 코팅되고 건조되어있다. Carbon source들의 이용을 색깔로 나타내기 위한 산화환원 염료로 tetrazolium violet을 이용하였다. 세포현탁액은 각 well당 150µL (GN, GP, ES microplates), 100µL(YT, SF-N, SF-P microplates)씩 접종하고, well에 함유된 chemical은 세포가 호흡활동을 함으로써 산화되고, tetrazolium 염료는 환원이 되면서 보리색을 띠게 된다.

공생박테리아의 배양특성

Steinernema glaseri 선충으로부터 분리된 공생박테리아 *Xenorhabdus*의 phase I과 II의 성장 및 생리특성을 확인하기 위해서 nutrient agar와 MacConkey agar에서 성장여부 및 colony

Table 1. Types and compositions of microplates used for Biolog system.

Types of microplates			
Microplates	Characteristics		
GN	Gram negative strains, Enteric bacteria, non-fermenter bacteria, fastidious strains		
GP	Gram positive strains, lactic acid producing bacteria		
AN	Anaerobic bacteria		
SF-N, SF-P	Actinomyces and Fungi		
ES	<i>E. coli</i> and <i>Salmonella</i>		
Eco	Ecology study		
Compositions of microplates			
Composition	number of wells	Composition	number of wells
polymers	5	carbohydrates and derivatives	28
methylesters	2	carboxylic acids	24
brominated chemical	1	amides	3
amino acids and derivatives	20	aromatic chemicals	4
amines	3	alcohols	2
phosphorylated chemicals	3		

색, 곤충병원성, 37°C 성장 가능성, bromothymol blue 흡수능, morphology 특성, 그리고 catalase, lecithinase, urease, phosphatase, lipolysis 등의 생화학 특성 등을 조사하였다

분리된 박테리아의 곤충병원성을 조사하기 위해서 먼저 NBTA에서 성장한 균주의 colony를 멸균된 식염수(0.9% NaCl)에 현탁한 후 희석하여 균주의 농도를 달리하였다. 다른 농도의 균주 현탁액을 5 μ L의 microsyringe를 이용하여 꿀벌부채명나방의 유충(3령) 아랫쪽 다리를 찢어서 혈강 내에 주입하였다. 또한 박테리아가 toxin을 체외로 분비하는가를 확인하기 위해 YS배지에서 균주를 48시간 배양한 후 성장한 균주와 배양액을 함께 유충에 주입한 경우와 균주배양액을 10,000rpm에서 15분간 원심분리하여 분리한 상등액을 유충에 주입한 경우의 병원성을 각각 비교하였다. 접종 균주농도는 접종 현탁액을 희석한 다음 plate out하여 확인하였으며, 접종한 꿀벌부채명나방의 유충을 25°C incubator에 보관하면서 사멸시간을 조사하였다.

분리된 박테리아의 형태적 특성을 조사하기 위해서 NBTA에서 2-3일 정도 배양한 공생박테리아의 colony를 취하여 0.9% NaCl로 세척하였다. 1cm 각으로 자른 여과지에 녹인 agar 배지를 1-2방울 떨어뜨려 스며들게 하였다. 이과지 조각을 새로운 한천 평판 배지상에 얹고 준비된 균액을 한방울 엮었다. 균액은 곧 agar배지에 스며들어가고 균만이 agar 박층 위에 얹힌 채 2일 정도 배양하였다. 여과지 그대로 2.5% glutaraldehyde에서 전고정을 1시간 실시하고 1% OsO₄로 2시간후 고정을 실시하였다. 고정이 끝난 시료는 0.2M phosphate buffer(pH 7.3)로 3회 세척을 실시하고, ethanol 농도순으로 탈수시킨 후 iso-amylacetate로 치환을 overnight 실시하였다. 초임계 건조기를 이용하여 시료를 건조한 후, 200-300Å로 금속 코팅하고 SEM(Hitachi S-4100, JAPAN)으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

Figure 1은 국내에서 분리된 곤충병원성 선충 *Steinernema glaseri*의 모습으로써 꿀벌부채명(*Galleria mellonella*)나방의 유충을 이용한 *in vivo*배양에 의해 수확된 감염대(3-IJ) 단계의 선충이다. 크기는 890 \pm 138 μ m으로 이 단계의 선충은 활성이 매우 강하며 새로운 유충을 탐색하여 치사시킬 수 있는 능력이 있다. 형태적으로는 실모양 또는 원통모양으로 전체적으로 좌우대칭이며, 방추상 형태를 보인다.

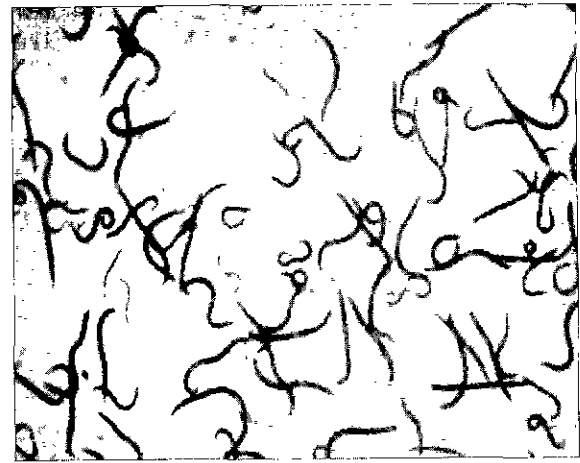


Figure 1. Third-stage juveniles(Infective Juvenile) harvested from *in vivo* culture of *Steinernema glaseri*.

Table 2는 곤충병원성 선충 *Steinernema glaseri*로부터 3가지 방법으로 분리된 5종의 균주에 대한 특성을 나타낸 것이다. 표면 살균된 선충을 vortex하여 파괴시킨 후 YS 배지에서 배양하여 분리한 방법과 꿀벌부채명나방 유충의 hemolymph액을 이용하여 분리한 방법에서는 XR-DR 균주 1종류만 분리되었으나 꿀벌부채명나방 유충에 선충을 접종하여 균주를 분리한 방법에서는 XR-DR와 함께 유충 내 4종류의 다른 균주 GM-Y, GM-H, GM-B, GM-R가 발견되었다(17). 분리된 유충 내 4종의 균주에 대한 특성을 살펴보면, nutrient agar에서 성장하는 균주 각각의 colony 색은 GM-Y와 GM-H는 yellow, GM-B는 brown, 그리고 GM-R는 red색으로 차이를 보였다. 그리고 MacConkey agar에서는 GM-Y는 bright pink, GM-B와 GM-R는 red-brown, 그리고 GM-H는 특이적으로 성장하지 못하였으며, NBTA에서는 4종의 균주 모두 red색을 보였다. 그러나 XR-DR의 경우에 NA에서는 yellow, MacConkey agar에서는 red-brwon, 그리고 NBTA에서는 특이적으로 blue 혹은 green을 보인 결과로 매우 대조적이었다. 또한 37°C에서 GM-Y와 GM-H는 성장이 불가능한 반면 GM-B, GM-R, XR-DR은 성장이 가능하였으며, 각 균주의 morphology는 GM-Y, GM-H, GM-B, XR-DR은 간균(rod), 그리고 GM-R는 구균(coccus)의 형태를 보였다. 지금까지

Table 2. Characteristics of bacteria isolated from entomopathogenic nematode *Steinernema glaseri*.

Characteristics	strain	GM-YE	GM-HE	GM-BR	GM-RE	XR-DR
	Pigment		yellow	yellow	brown	red
Insect pathogenicity		+	+	-	+	+
Colony colour on MacConkey agar		bright pink	not grow	red-brown	red-brown	red-brown
Growth on 37°C		-	-	+	+	+
Adsorption of bromothymol blue		-	-	-	-	+
Morphology		rod	rod	rod	coccus	rod

Table 3. Characteristics of bacteria isolates in distinguishing *Xenorhabdus nematophilus*

Characteristic	strain	
	XR-DR(I)	XR-DR(II)
Pigment	yellow	yellow
Bioluminescence	-	-
Insect pathogenicity	+	+
Growth on 37°C	+	+
Colony colour on MacConkey agar	red-brown	bright pink
Adsorption of bromothymol blue	+	-
Catalase	-	-
Lecithinase	+	+
Urease	-	-
Phosphatase	+	+
Lipolysis(tween85)	-	-

*Steinernema glaseri*로부터 분리된 공생박테리아 *Xenorhabdus*의 경우 MacConkey agar에서는 neutral red를 흡수하며, NBTA에서는 *Xenorhabdus nematophilus* subsp. *poinarii*를 제외한 다른 종의 경우 BTB를 흡수하여 green 혹은 blue색을 보이는 것이 특징인 것으로 알려져 있다(18). 따라서 세 가지 공생박테리아 분리방법에서 모두 동일하게 발견되며, NBTA에서 특징적으로 BTB를 흡수하여 blue색의 colony색을 나타내는 XR-DR 균주가 *Steinernema glaseri*로부터 분리된 공생박테리아임을 추측할 수 있었다.

Table 3은 순수분리된 XR-DR 균주를 YS 배양액에서 *in vitro* 배양한 결과 *Steinernema glaseri*로부터 일차적으로 분리된 균주, phase I과 다른 특징을 가지는 동질이형(dimorphism), phase II를 발견하였는데, 이 경우 XR-DR의 phase I과 II의 성장 및 특성을 나타낸 것이다. Colony색을 보면 phase I과 II 모두 NA에서는 yellow인 반면, MacConkey agar에서는 phase I은 red-brown이고 phase II는 bright pink이었다. 또한 NBTA에서는 phase I은 blue 혹은 green을 보였으나 phase II는 red를 보였다. 그러나 이들은 catalase, lecithinase, urease, phosphatase, lipolysis등의 생화학 실험과 꿀벌부채명(*Galleria mellonella*)나방의 유충에 대한 병형성과 37°C 성장가능성에서는 동일한 결과를 보였다. 이 경우 *Xenorhabdus nematophilus*종이 catalase에 대해 음성적인 특징을 보인 것은 일반적인 Enterobacteriaceae류와는 다른 결과를 보인 것이며, 또한 *Xenorhabdus* 속 내 다른종인 *Xenorhabdus luminescence* 종과도 다소 다른 특징적인 차이를 보인 것이다.

Table 4는 *Xenorhabdus* 균주의 phase I과 II에 대하여 95개 carbon source에 대한 산화능을 나타낸 것이다. 95개 carbon source를 이용한 Biolog 동정시스템은 미생물의 종류에 따라 특징의 기질에 대해서 산화하는 정도와 속도가 다르다는 특징을 이용한 것으로써 최근 서식지에 따른 미생물군(19)과 사막의 토양에서 생존하고 있는 미생물군(20)을 분리하기 위한 미생물 분류의 1단계 방법으로 매우 유용하게 사용되었다. 분리된 균주를

95개 carbon source를 이용하는 Biolog 동정시스템을 사용하여 내장된 566 종/속의 그람 음성균 data base와 비교한 결과, 분리된 4종류의 균주 GM-Y, GM-H, GM-B, GM-R는 각각 유사도 0.980, 0.637, 0.712, 0.744로 *Xanthomonas maltophilia*, CDC group DF-3, *Enterobacter agglomerans* biogroup 5, *Serratia marcescens*로 각각 동정되었다. 반면 분리된 XR-DR균주의 경우 glycogen 외 10개의 carbon source에 대한 산화능 정도에 있어서 차이를 보이지만 XR-DR의 phase I은 유사도 0.834로 *Xenorhabdus nematophilus*로 그리고 phase II는 유사도 0.822로 *Xenorhabdus nematophilus*로 거의 비슷한 유사도로 동일한 동정결과를 보였다. 본 연구에 사용된 동정 시스템의 경우 현탁액을 micorplate에 접종한 후 24시간을 배양하여 동정한 결과가 유사도 0.5 이상이고 유사도가 더 높은 다른 유사 균주가 없을 경우 동정결과로 해석되었는데, *Steinernema glaseri* 및 꿀벌부채명(*Galleria mellonella*)나방의 유충으로부터 분리된 균주 각각에 대한 동정결과 다른 유사균주는 존재하지 않았다.

Figure 2 (a)-(b)에서 보듯이 분리된 *Xenorhabdus* 균주를 MacConkey agar에 25°C 하에서 3-5일 동안 배양한 결과 phase I colony에서는 짙은 red-brown색을 띄고 이 경우 colony 주위에 clear zone이 형성하였다. 반면 phase II는 phase I과 달리 bright pink색을 나타내었다. 또한 phase I은 colony가 위로 볼록한 형태이고 직경이 작지만 phase II는 plate 바닥에 퍼지는 형태로 colony의 직경이 phase I에 비해서 크게 나타났다. Figure 2 (c)-(d)는 분리된 균주를 NBTA agar에 25°C 하에서 3-5일 동안 배양한 결과로써 phase I colony에서는 green 혹은 blue색을 띄고 이 경우에도 colony 주위에 clear zone이 형성되었다. 반면 phase II는 phase I과 달리 red색을 나타내었으며 colony 주위에 clear zone이 형성되지 않았다. 이것은 *Xenorhabdus* 균주의 phase I만이 phase II와 달리 특징적으로 NBTA agar에 녹아있는 bromothymol blue를 흡수하기 때문으로 사료된다

Figure 3는 분리된 *Xenorhabdus* 균주를 전자현미경을 이용하

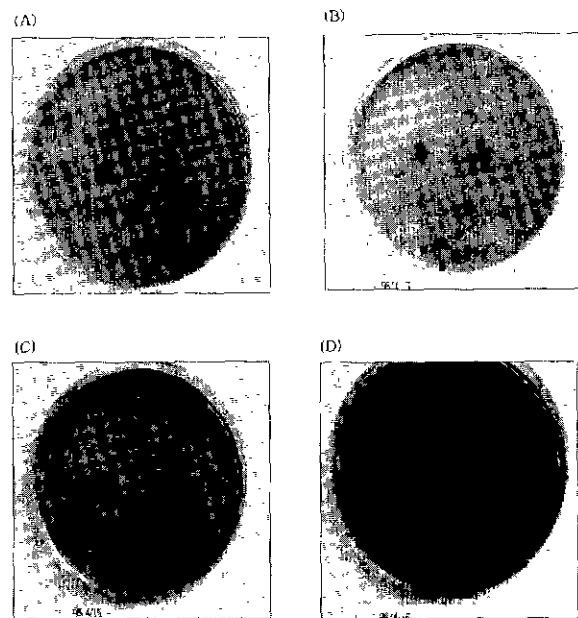


Figure 2. Physiological characteristics of bacteria isolates in distinguishing *Xenorhabdus nematophilus*.

Table 4. Assimilation of various carbon sources by bacteria isolates.

C-source	XR-DR(I)	XR-DR(II)	C-source	XR-DR(I)	XR-DR(II)	C-source	XR-DR(I)	XR-DR(II)
water	-	-	turanose	-	-	D-alanine	-	-
α -cyclodextrin	-	-	xyhtol	-	-	L-alanine	w	w
dextrin	+	+	methyl pyruvate	+	+	L-alanyl-glycine	w	+
glycogen	-	w	mono-methyl succinate	w	w	L-asparagine	+	+
tween40	+	+	acetic acid	-	w	L-aspartic acid	w	+
tween80	-	-	cis-aconitic acid	-	-	L-glutamic acid	+	+
N-acetyl-D-galactosamine	-	-	citric acid	-	-	glycyl-L- aspartic acid	+	+
N-acetyl-D-glucosamine	+	+	formic acid	-	-	glycyl-L- glutamic acid	w	w
adonitol	-	-	D-galactonic acid lactone	-	-	L-histidine	+	+
L-arabinose	w	w	D-galacturonic acid	-	-	hydroxy L-proline	-	-
D-arabitol	-	-	D-gluconic acid	w	w	L-leucine	-	-
cellobiose	-	-	D-glucosaminic acid	-	-	L-ornithine	-	-
i-erythritol	-	-	D-glucuronic acid	-	-	L-phenylalanine	-	-
D-fructose	w	w	α -hydroxybutyric acid	-	w	L-proline	-	-
L-fucose	-	-	β -hydroxybutyric acid	-	-	L-pyroglutamic acid	-	-
D-galactose	-	w	γ -hydroxybutyric acid	-	w	D-serine	-	-
gentobiose	-	-	p-hydroxyphenylacetic acid	-	-	L-serine	+	+
α -D-glucose	+	+	itaconic acid	-	-	L-threonine	-	-
m-inositol	-	-	α -keto butyric acid	-	-	D,L-camline	-	-
α -D-lactose	-	-	α -keto glutaric acid	-	-	γ -amino butyric acid	-	-
lactulose	-	-	α -keto valeric acid	-	-	urocanic acid	-	-
maltose	+	+	D,L-lactic acid	+	+	inosine	w	w
D-mannitol	-	-	malonic acid	-	-	uridine	w	w
D-mannose	+	+	propionic acid	w	+	thymidine	-	w
D-melibiose	-	-	quinic acid	-	-	phenyl ethylamine	-	-
β -methyl-D-glucoside	-	-	D-saccharic acid	-	-	putrescine	-	-
D-psicose	w	w	sebacic acid	-	-	2-amino ethanol	-	-
D-raffinose	-	-	succinic acid	w	w	2,3-butanediol	-	-
L-rhamnose	-	-	bromosuccinic acid	-	-	glycerol	-	+
D-sorbitol	-	-	succinamic acid	-	-	D,L-glycerol phosphate	+	+
sucrose	-	-	glucuronamide	-	w	glucose-1- phosphate	+	+
D-trehalose	+	+	alaninamide	-	w	glucose-6- phosphate	+	+
similarity							0.834	0.822
Result of identification							Xen. Nem ss	Xen. Nem ss
							Bovienii	Bovienii

여 활영한 모습으로 간균(rod)의 형태를 보였으며 배양조건에 따라 크기는 0.1-2µm × 2-10µm로 다양하게 변하였다. 또한 균주의 표면에는 편모(flagellar)가 있어 운동성을 가지는 것으로 확인되었다

Figure 4는 꿀벌부채명나방의 유충의 hemolymph에 phase I과 II의 균주를 각각 농도를 달리하여 접종하였을 때 유충사멸속도를 조사한 결과이다. 유충 1마리당 분리된 균주 중 phase I의 접종농도는 0, 3, 290, 20200, 200000마리였는데 1마리당 접종농도가 0, 3마리인 경우는 유충이 사멸하지 않은 반면 290마리인 경우는 35시간, 20200마리인 경우는 20시간, 그리고 200000마리인 경우는 14시간만에 유충을 사멸하였다. 또한 phase II의 접종농도는 0, 3, 300, 21100, 202000마리였는데 1마리당 접종농도가 0, 3마리인 경우는 유충이 사멸하지 않은 반면 300마리인 경우는 38시간, 21100마리인 경우는 20시간, 그리고 202000마리인 경우는 14시간만에 유충을 사멸하였다. 즉 phase variation에 관계없이 꿀벌부채명나방 유충에 대해서 비슷한 병원성을 보였으나, 균주의 접종농도가 증가함에 따라 유충의 사멸속도가 증가하는 것으로 조사되었다. 또한 박테리아가 toxin을 체외로 분비하는가를 확인하기 위해서 박테리아를 YS매지에서 48시간 배양한 후 균주배양액의 유충 1마리당 균주접종농도는 약 2x10⁵마리로 균주와 배양액을 함께 유충에 접종한 경우는 14시간만에 유충을 사

멸하였으며, 원심분리에 의해서 분리한 상등액을 접종한 경우는 27시간만에 유충을 사멸하였다 또한 박테리아를 접종하지않은 YS매지를 접종한 경우는 유충을 사멸하지 못하였다. 따라서 공생박테리아는 체외로 꿀벌부채명나방 유충을 사멸하는 toxin을 분비하는 것으로 사료된다

요 약

본 연구에서는 환경친화적인 해충 방제를 위한 생물살충제로써 그 이용가능성이 높은 곤충병원성 선충 중 *Steinernema glaseri* 종의 살충효과를 규명하기 위하여 선충과 공생관계에 있는 박테리아를 분리하였으며, 이들에 대한 곤충병원성 및 생리화학적 특성을 조사하였다.

곤충병원성 선충으로부터 분리된 균주와 꿀벌부채명나방 유충 내부에 서식하고 있는 다른 4종, *Xanthomonas maltophilia*, CDC group DF-3, *Enterobacter agglomerans* biogroup 5, *Serratia marcescens* 균주와는 nutrient agar, MacConkey agar, NBTA에서의 colony특성 및 37°C 성장가능성 등을 비교하여 각각 분리하였다. 곤충병원성 선충으로부터 분리된 균주의 경우 분리하는 과정에서 감염단계 선충의 장내에서는 균주의 phase I만이 분리되었지만 *in vitro* 배양 동안에 생화학적 특성에서 차이가 있는 동질이형, phase II로 변함을 확인하였다. Phase I은 phase II와 달리 MacConkey agar에서는 neutral red를 흡수하여 red-brown색의 colony와 clear zone을 보였으며, NBTA agar에서는 BTB를 흡수하여 blue 혹은 green색의 colony와 clear zone을 보였다. 분리된 균주는 99개 carbon source 이용특성을 이용한 Biolog 동정시스템에서 phase I은 유사도 0.834로 *Xenorhabdus nematophilus*로 그리고 phase II는 유사도 0.822로 *Xenorhabdus nematophilus*로 거의 비슷한 유사도로 동일한 동정결과를 보였다. 또한 그 외 생화학 실험을 통하여 분리된 균주가 *Xenorhabdus nematophilus* 종 균주임을 일차적으로 확인하였다. 또한 꿀벌부채명나방의 유충을 이용하여 균주의 병원성을 조사한 결과, phase I과 II 모두 비슷한 병원성을 가지며 접종농도가 증가함에 따라서 사멸속도가 증가되며 유충을 사멸하는 toxin은 균주의 체외로 분비됨을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 계명대학교 비사연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. 박선호, 김도원(1997), 곤충병원성 선충을 이용한 무공해 생물농약, *한국생물공학회지*, 12(3), 261-268.
2. 박선호, 김도원(1997), 곤충기생성 선충의 대량배양 기술 개발, *생물화학공학동향* II 2(2), 29-34.
3. Kaya, H. K. and R. Gaugler(1993), Entomopathogenic Nematodes, *Annu. Rev. Entomol*, 38, 181-206.
4. Akhurst, R. J. and M. E. Boemare(1990). Biology and taxonomy of *Xenorhabdus*. In: *Entomopathogenic nematodes in biological control*, (Gaugler, R. and H. K. Kaya, eds), pp. 75-92. CRC Press, Florida.



Figure 3. Scanning electron micrograph of bacteria isolated from *Steinernema glaseri* Dongrae.

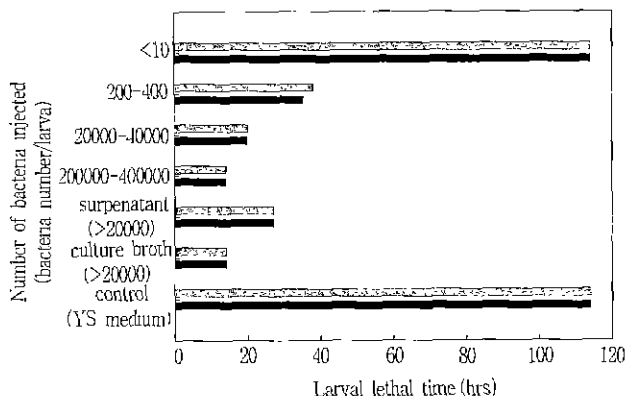


Figure 4. Pathogenicity of *Xenorhabdus nematophilus* against *Galleria mellonella* larva. (▨) Phase I, (■) Phase II

5. Bird, A. F and R. J Akhurst(1983). The nature of the intestinal vesicle in nematodes of the family *Steinernematidae*, *Int. J. Parasitol.* **13**, 599-606
6. Akhurst, R. J.(1993), Bacterial symbionts of entomopathogenic nematodes the power behind the throne, In: *Nematodes and the biological control of insect pests*, (R. A. Bedding, R. J. Akhurst, and H. K. Kaya, eds), pp. 127-136, CSIRO, Australia.
7. Boemare, N, R. J Akhurst, and R. G. Mourant(1993), DNA relatedness between *Xenorhabdus* spp. (*Enterobacteriaceae*), symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes, and a proposal to transfer *Xenorhabdus luminescens* to a new genus, *Photorhabdus* gen. nov., *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**, 249-255.
8. Thomas, G. M. and G. O. Poinar(1979), *Xenorhabdus* gen. nov., a genus of entomopathogenic nematophilic bacteria of the family *Enterobacteriaceae*, *Int. J. Syst. Bacteriol.* **29**, 352-360.
9. Akhurst, R. J.(1983), Taxonomic study of *Xenorhabdus*, a genus of bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes. *Int. J. Sys. Bacteriol.* **33**, 38-45.
- 10 Akhurst, R. J. (1986), *Xenorhabdus nematophilus* subsp. *beddingii*(*Enterobacteriaceae*) a new subspecies of bacteria mutualistically associated with entomopathogenic nematodes, *Int. J. Sys. Bacteriol.* **36**, 454-457
11. Hurlber, R E., J. Xu, and C L. Small(1994), Colonial and cellular polymorphism in *Xenorhabdus luminescens*, *Appl. Environ. Microbiol.* **55**. 1136-1143.
12. Boemare, N. and R. J. Akhurs(1988), Biochemical and physiological characterization of colony form variants in *Xenorhabdus* spp.(*Enterobacteriaceae*), *J. Gen. Microbiol.* **134**, 751-761.
13. Leisman, G. B. et al.(1995), Characterization and environmental regulation of outer membrane proteins, *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 200-204
- 14 Forst, S. and N. Tabatabai(1997), Role of the histidine kinase, *EnvZ*, in the production of outer membrane protein, *Appl. Environ. Microbiol.* **63**. 962-968
15. 박선희, 김도원(1998), *Galleria mellonella* 유충을 이용한 곤충병원성 선충의 배양조건, *한국생물공학회지*, **13**(1), 31-37.
16. Choo, H Y., J B. Kim, and D. W. Lee(1996), Entomopathogenic nematodes(*Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*) from Korea with a key to *steinernema*, *Korean J. Soil Zoology* **1**(1), 28-36
17. Park, S. H. and Y. S. Yu(1998), Isolation and identification of *Xanthomonas malophilia* from *Galleria mellonella* larvae. *Keimyung Univ., Bull. I. I. S.* **21**(1), 37-46.
18. Akhurst, R. J.(1986), Recent advances in *Xenorhabdus* research, In: *Fundamental and applied aspects of invertebrate pathology*(R. A. Samson, J. M. Vlck, and D. Peters eds), pp. 304-307, Veldhoven, Netherlands,
19. Garland, J. L. and A. L. Mills(1991), Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of communities level sole-carbon-source utilization, *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2351-2360.
- 20 Zak, J. C., M. R. Willing, D. L. Moorhead, and H. G. Wildman(1994), Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. *Soil Bio Biochem.* **26**, 1101-1108.