

*Steinernema carpocapsae*로부터 분리된 *Xenorhabdus nematophilus*에 의한 살충물질 생산을 위한 최적 배양조건

유 연 수 · 박 선 호
계명대학교 화학·재료공학부
(접수 : 2000. 1. 28., 게재승인 : 2000. 2. 23.)

Optimal Culture Conditions for the Production of Insecticidal Toxin by *Xenorhabdus nematophilus* Isolated from *Steinernema carpocapsae*

Yeon Su Yu and Sun Ho Park*
School of Chemical Engineering & Materials Engineering,
Keimyung University, Taegu 704-701, Korea
(Received : 2000. 1. 28., Accepted : 2000. 2. 23.)

Optimal medium composition, culture conditions, characteristics of phase variation and activity of insecticidal toxin by *Xenorhabdus nematophilus* isolated and identified from Korean entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* were examined. Optimal medium composition of this strain was 50-70 g/L yeast extract, 3 g/L K_2HPO_4 , 1 g/L $NH_4H_2PO_4$, 2 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 10 g/L NaCl and, among these, yeast extract was found as a limiting nutrient for cell growth. When Monod equation was applied, maximum specific growth rate and Monod constant were estimated as 0.13 hr^{-1} and 20 g/L, respectively. The pH of culture medium increased up to 8.5-9.5 regardless of initial pH 6-7 as the cells continued to grow. The specific growth rate in a 7 L fermentor was 0.18 hr^{-1} , which was enhancement 1.4 fold compared to a flask culture. In case of phase variation, phase I fraction was maintained above 90% at the stationary phase for both flask and fermentor cultures. According to oral toxicity test of *Galleria mellonella* by *Xenorhabdus nematophilus*, the addition of cell pellets into feed inhibited normal growth of insect larvae and killed completely then after 20 days cultivation. When culture supernatant of this strain was injected into hemolymph of insect larva, the toxicity was strongest at 24 hr cultivation in the early exponential phase and gradually decreased as the culture time proceeded.

Key Words : *Steinernema carpocapsae*, entomopathogenic nematode, *Xenorhabdus nematophilus*, symbiotic bacterium, biological insecticide

서 론

지난 수십 년간 화학살충제의 지속적인 과다사용으로 인한 피해들이 지금 환경생태계 및 국민건강을 매우 심각한 수준까지 위협하고 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 세계각국은 환경친화적인 해충방제의 필요성을 인식하고 이와 관련된 신기술개발에 많은 노력을 집중하고 있다. 특히 지난 수년간 UNCED는 1999년까지 각국의 기존 화학농약 사용량의 25%를 줄이거나 대체하도록 각국에 권고하고 있으며, 우리나라

라도 국가행동계획으로 2004년까지 현재 사용되고 있는 비료와 화학농약의 사용량을 50%까지 줄이거나 대체하는 것으로 추진계획을 발표하였다. 이와 관련하여 지금까지 무공해 생물농약으로 뛰어난 살충효과가 뛰어난 미생물인 *Bacillus thuringiensis*(Bt)는 지난 30년 동안 수억 달러 규모의 생물학적 살충제 시장에서 거의 독보적인 위치를 차지해 왔으나, 최근 한정된 방제 해충의 범위와 Bt독소에 저항성을 나타내는 곤충들이 출현하기 시작하면서 새로운 생물 살충제의 개발이 절실히 요구되고 있다.

최근 넓은 기주 범위와 뛰어난 탐색능력, 높은 치사율, 장기보존 및 화학농약과의 혼용사용 등의 많은 장점을 가지는 원충목(Rhabditida)류의 곤충병원성 선충(entomopathogenic nematodes)이 차세대 무공해 생물농약으로 대두되고 있으며, 이미 세계 각국에서 성공적인 사용 예가 보고되고 있다(1-2). 그러

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

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

E-mail : park@kmu.ac.kr

나 곤충병원성 선충과 관련된 공생박테리아와 이들이 분비하는 독성물질들에 관한 연구는 매우 미흡한 실정이다. 지금까지 알려진 곤충병원성 선충의 공생박테리아중 *Entocobacteriaceae*류에 속하는 *Xenorhabdus*(3)속은 그람음성균으로 조건적 혐기성 간균으로, *in vitro* 배양 시 phase I에서 phase II의 상태로 동질이형화(dimorphism)현상을 나타낸다(4) 그 유전적 원인은 잘 알려져 있지 않지만 공생박테리아의 phase I과 phase II는 항생물질 생성(5-6), pigment(7-8), 그리고 lipase와 protease 등의 효소 분비(8-10) 등과 같은 생화학적 특성에 차이가 있는 것으로 보고되고 있다. 한편 선충에 의한 해충의 사멸은 선충의 장에 공생하고 있는 박테리아 때문으로 선충이 해충의 입, 항문, 기문 등을 통해서 해충의 혈장에 침투하면 해충 내에 분비된 공생박테리아는 독성물질을 생성하여 24-48시간 이내에 해충을 사멸시키게 되는데(11), 이때 생산하는 독성물질로는 세포 내 독소(endotoxin)와 세포 밖으로 배출되는 독소(exotoxin)가 있는 것으로 알려져 있다(12) 그러나 아직까지 곤충병원성 선충으로부터 분리된 공생박테리아가 생성하는 exotoxin에 관한 연구는 매우 초기단계로서 최근 미국의 Wisconsin대학 연구진에 의해서 *Heterorhabditidae* 선충의 공생박테리아인 *Photorhabdus luminescens*의 배양여액으로부터 분자량이 100,000 이상인 실충단백질(exotoxin)이 보고되었다(13).

본 연구에서는 국내에서 서식하고 있는 곤충병원성 선충 중 *Steinernema carpocapsae*종으로부터 분리된 공생박테리아인 *Xenorhabdus nematophilus*가 생성하는 exotoxin 및 그 최적배양 조건을 조사하였다

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용된 곤충병원성 선충인 *Steinernema carpocapsae* 종은 국내 토양에서 분리된 것(14)으로 꿀벌부체명나방(*Galleria mellonella*)의 유충을 사용하여 *in vivo*로 증식하면서 본 연구에 사용하였다(15). 또한 선충으로부터 분리한 공생박테리아의 배양에 사용된 nutrient agar(NA), MacConkey agar, peptone from soymeal, yeast extract는 Merck로부터 구입하였고 bromothymol blue는 Junsei, triphenyltetrazolium chloride는 Sigma로부터 각각 구입하였으나 또한 배지조성 중 탄소원인 glucose, fructose, lactose, saccharose, sorbitol과 무기염인 K_2HPO_4 , $NH_4H_2PO_4$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, NaCl은 Duksan으로부터 구입하였다.

곤충병원성 선충으로부터 공생박테리아의 분리·등정

본 실험에 사용된 곤충병원성 선충인 *Steinernema carpocapsae*종으로부터 공생박테리아의 분리를 위하여 다음의 세가지 방법을 사용하였다. 첫째, 표면살균된 선충을 YS 배지가 첨가된 튜브에 담아 vortex하여 선충을 파괴시킨 후 28°C shaking incubator에서 48시간 배양한 후 배양액을 nutrient agar bromothymol blue triphenyltetrazolium chloride (NBTA)에 plate out하여 콜로니를 분리하였다. 둘째, 꿀벌부체명나방 유충의 hemolymph액을 nutrient agar에 무균적으로 몇방울 떨어트린 다음 표면살균된 선충을 그 위에 미량 떨어트려 48시간 배양한 후 선충이 hemolymph액에 분리한 공생박테리아에 의해 생성된

콜로니를 분리하였다. 셋째, 선충을 꿀벌부체명나방 유충에 접종한지 48시간 후 유충 사체를 무균적으로 해부하여 사체 내부액을 plate out하여 콜로니를 분리하였다 위의 방법으로 최종적으로 분리된 박테리아는 분리에 이용한 곤충병원성 선충과 광배양 가능성을 조사하였다. 광배양 가능성은 공생박테리아를 NBTA에 plate out하여 3-5일간 증식한 colony에 곤충병원성 선충을 접종하여 정상적으로 성장하여 증식하는지를 조사함으로써 확인하였다. 또한 *S. carpocapsae* 선충으로부터 순수분리된 공생박테리아는 Biolog동정시스템을 이용하여 동정하였다(16).

공생박테리아의 성장배지 조성

분리·동정된 공생박테리아, *Xenorhabdus nematophilus*(XR-PC)를 NBTA 배지에서 3-5일간 배양한 후 colony를 250 mL flask에서 working volume 100 mL의 성장배지에 접종하여 shaking incubator에서 28°C, 200 rpm으로 배양하였으며 균체농도는 UV-VIS spectrophotometer(Smart 190DUV)를 사용하여 560 nm에서 증류수를 이용하여 50배 희석하여 O.D.(optical density)를 측정하였다.

XR-PC의 성장배지 중 yeast extract의 영향을 조사하기 위해서 0.5 g/L K_2HPO_4 , 0.5 g/L $NH_4H_2PO_4$, 0.2 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 5 g/L NaCl을 기본배지로 yeast extract의 농도를 5, 10, 30, 50, 70 g/L로 증가시켜 배지를 조제하였다. 그런 다음 XR-PC를 접종하여 시간에 따른 O.D.와 pH의 변화를 조사하였다.

XR-PC의 성장배지 중 탄소원의 영향을 조사하기 위해서 glucose, fructose, lactose, saccharose, sorbitol의 다섯가지 탄소원을 사용하였다. 탄소원은 0.5 g/L K_2HPO_4 , 0.5 g/L $NH_4H_2PO_4$, 0.2 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 5 g/L NaCl, 50 g/L yeast extract를 기본배지로 하여 각각 10, 30, 50, 100 g/L로 달리 첨가하여 배지를 조제한 후 균주를 접종하여 배양하였다.

또한 XR-PC의 성장배지 중 무기염의 영향을 조사하기 위해서 K_2HPO_4 , $NH_4H_2PO_4$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, NaCl의 네가지 무기염을 사용하였다. 0.5 g/L K_2HPO_4 , 0.5 g/L $NH_4H_2PO_4$, 0.2 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 5 g/L NaCl, 10 g/L yeast extract를 기본배지로 하여 K_2HPO_4 는 0-5 g/L 범위 내에서 농도를 달리하여 배양하였으며, $NH_4H_2PO_4$ 는 0-5 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 는 0-2 g/L, 그리고 NaCl은 0-30 g/L 범위 내에서 접종농도를 달리 첨가하여 배지를 조제한 후 균주를 접종하여 배양하였다.

공생박테리아의 oral toxicity

*S. carpocapsae*로부터 분리한 공생박테리아, XR-PC가 꿀벌부체명나방 유충에 구강독성(oral toxicity)을 가지는지를 조사하기 위해서 공기가 통하는 petri dish에 쌀겨와 밀을 주성분으로 사용하는 유충사료 20 g을 채웠다. 공생박테리아 접종농도의 영향을 조사하기 위해서 배양된 공생박테리아 pellet을 건조중량 23, 46, 230 mg으로 달리하여 각각의 petri dish에 넣고 유충사료 20 g과 섞었다 Control은 증류수 1 mL에 유충사료 20 g을 첨가한 petri dish를 사용하였다 체중이 약 63±3 mg 정도인 2령 단계의 꿀벌부체명나방 유충을 각각의 petri dish 당 10마리씩 첨가하고 25°C incubator에서 증식하면서 유충의 증식을 조사하였으며, 체중변화와 함께 유충의 변태기, 나방 단계로의 생활사 변화도 함께 조사하였다.

배양시간에 따른 공생박테리아의 상변화 및 독성물질 생성

XR-PC를 0.5 g/L K₂HPO₄, 0.5 g/L NH₄H₂PO₄, 0.2 g/L MgSO₄ · 7H₂O, 5 g/L NaCl, 50 g/L yeast extract 배지조성 하에서 flask와 fermentor에서 각각 배양했을 때의 성장과 상변화를 비교하였다. Flask배양에서는 250 mL flask에서 working volume 100 mL로 28°C, 200 rpm 하에서 약 120시간동안 진탕배양하였으며 fermentor배양에서는 7 L fermentor(KFC, Korea) 시스템에서 working volume 5 L로 온도 28±0.5°C, 1 L/min air flow rate, 600 rpm 하에서 약 60시간 동안 배양하였다. 이때, pH는 조절하지 않고 배양을 실시하였다. 균주가 flask와 fermentor에서 각각 배양할 경우 발생하는 상변화의 정도를 조사하기 위해서 배양액을 NBTA에 plate out하여 28°C에서 3-5일 배양한 후 콜로니의 색을 확인하였다. 이때 phase I은 BTB(bromothymol blue)를 흡수하여 푸른색 혹은 녹색인 반면, phase II는 붉은색을 보였다.

또한 배양시간에 따른 XR-PC의 독성물질 생산을 조사하기 위해서 0.5 g/L K₂HPO₄, 0.5 g/L NH₄H₂PO₄, 0.2 g/L MgSO₄ · 7H₂O, 5 g/L NaCl, 50 g/L yeast extract를 첨가한 배지에서 XR-PC를 배양하였다. 배양은 250 mL flask에서 working volume 100 mL로 28°C, 200 rpm 하에서 약 120시간동안 진탕 배양하면서 매일 배양액을 채취하여 독성물질의 역가를 측정하였다.

독성물질의 역가측정

배양액을 10,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 상등액을 증류수로 2, 4, 8배로 희석한다. 그리고 각각의 희석된 시료를 microsyringe를 이용하여 3령 단계의 꿀벌부채명나방 유충의 hemolymph에 3 µL씩 접종한 후, 접종된 꿀벌부채명나방 유충은 25°C incubator에서 보관하면서 사멸시간을 조사하였다.

결과 및 고찰

Steinernema carpocapsae 선충으로부터 공생박테리아를 분리하기 위한 세가지 방법에서 모두 동일한 균주가 분리되었으며, 또한 순수 분리된 균주를 YS 배양액에서 *in vitro* 배양해 본 결과 동일 균주가 두가지 상태로 빈화되는 동질이형화현상(dimorphism)이 발견되었다. 분리된 균주는 95개 탄소원을 이용하는 Biolog 동정시스템을 사용하여 내장된 566 종/속의 그람 음성균 data base와 비교한 결과, 유사도 0.543로 *Xenorhabdus nematophilus* 종의 균주로 동정결과를 보였으며, phase I과 II 모두 nutrient agar에서는 연한 노란색을, Mac Conkey agar에서는 적갈색, 그리고 NBTA에서는 phase I은 푸른색 혹은 녹색을 보였으나 phase II는 붉은색을 보였고 morphology는 간균(rod)의 형태를 보였다(16).

Figure 1은 *Steinernema carpocapsae*로부터 분리된 *Xenorhabdus nematophilus*(XR-PC)의 유기 질소원인 yeast extract의 농도 증가에 따른 성장과 pH 변화를 나타낸 것이다. 배지조성은 0.5 g/L K₂HPO₄, 0.5 g/L NH₄H₂PO₄, 0.2 g/L MgSO₄ · 7H₂O, 5 g/L NaCl의 기본배지에 yeast extract의 농도를 5 g/L에서 70 g/L까지 증가시켰다. Yeast extract의 농도가 50 g/L가 될 때까지는 XR-PC의 성장이 뚜렷이 증가하였지만 70 g/L yeast extract 농도 이상에서는 거의 포화된 최대세포농도를 보였다

(data not shown). 이때 pH는 초기 yeast extract 농도 차이에 따라 초기 pH가 6.0-7.0 정도에서 균주가 성장함에 따라 최종 pH도 8.5-9.5까지 증가하였다.

Figure 2는 yeast extract 농도에 따른 XR-PC의 최대세포농도와 비성장속도의 영향을 나타낸 것으로 yeast extract가 균주 성장에 제한인자(limiting factor)로 작용하고 있음을 잘 보여준다. Yeast extract 농도에 따른 비성장속도의 의존도를 Monod equation을 가정하여 비교해 본 결과, 최대 비성장속도는 0.13 hr⁻¹이고 Monod 상수값은 20 g/L였다. 이 결과를 *Steinernema glaseri* 선충 종으로부터 분리된 *Xenorhabdus nematophilus* (XR-DR)의 경우와 비교해 보면 최대 비성장속도는 0.13 hr⁻¹로 동일한 값을 보였으나 Monod 상수값은 25 g/L로 약간 차이를 보였다(17).

Figure 3은 XR-PC를 0.5 g/L K₂HPO₄, 0.5 g/L NH₄H₂PO₄, 0.2

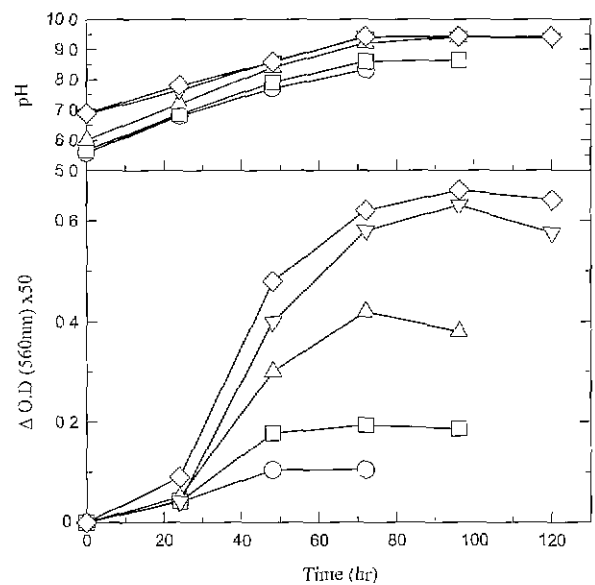


Figure 1. Profiles of pH and cell concentration of *Xenorhabdus nematophilus* isolated from *Steinernema carpocapsae* varying yeast extract concentration (○) 5 g/L, (□) 10 g/L, (△) 30 g/L, (▽) 50 g/L, (◇) 70 g/L. Fermentations were carried out at 28°C for 120hrs in 250mL flask

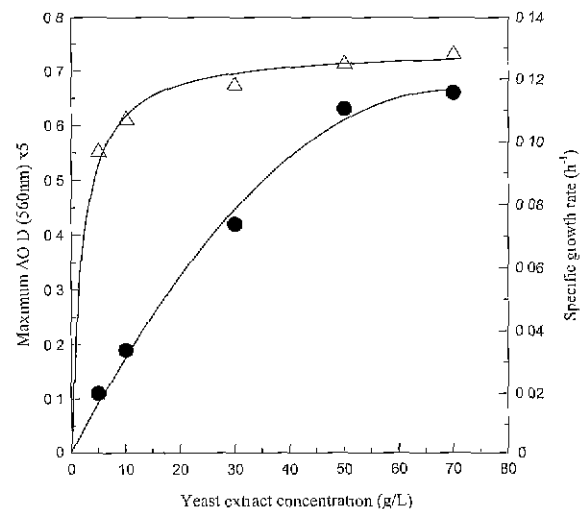


Figure 2. Effect of yeast extract concentration on maximum cell density(●) and specific growth rate(△) of *Xenorhabdus nematophilus*.

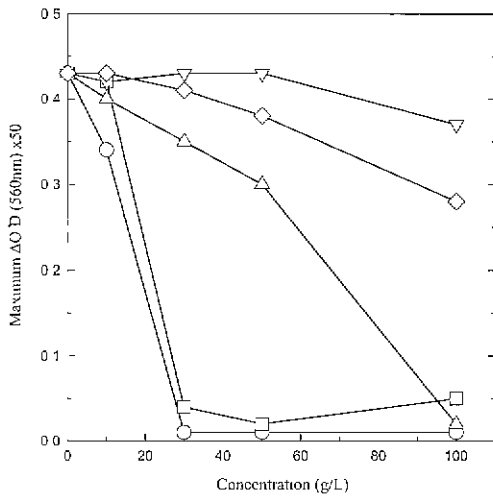


Figure 3. Effects of various carbon sources and concentrations on cell growth of *Xenorhabdus nematophilus* (○) glucose, (□) fructose, (△) lactose, (▽) saccharose, (◇) sorbitol

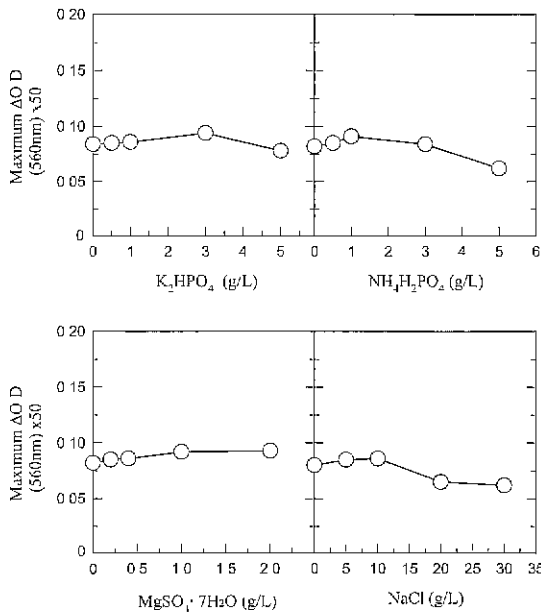


Figure 4. Effects of various inorganic salts and concentrations on cell growth of *Xenorhabdus nematophilus*.

g/L MgSO₄ · 7H₂O, 5 g/L NaCl, 50 g/L yeast extract를 첨가한 배지에 탄소원으로 glucose, fructose, lactose, saccharose, sorbitol의 다섯가지 탄소원을 각각 0, 10, 30, 50, 100 g/L로 첨가한 배지에서의 최대세포농도를 나타낸 것이다. 그러나 glucose와 fructose를 30 g/L 이상 첨가한 경우 균주가 거의 성장하지 못하였고 이때 pH가 약 5.0까지 감소되었다(data not shown). 반면 lactose, saccharose, sorbitol을 첨가한 경우에도 더 이상의 성장에 도움이 되지 않은 것으로 나타났다. XR-PC의 배지 중 별도로 탄소원 성분이 추가되지 않아도 균주 성장이 정상적으로 이루어진 것은 첨가된 yeast extract에서 XR-PC의 성장에 필요한 성분이 충분히 공급된 것으로 사료된다. 한편 glucose와 fructose의 경우 일반적으로 이용되기 쉬운 탄소원 성분이지만 이 경우 오히려 lactose, saccharose, sorbitol을 첨가한 경우보다 더 정상적인 균주 성장이 이루어지지 않았는데, 이는

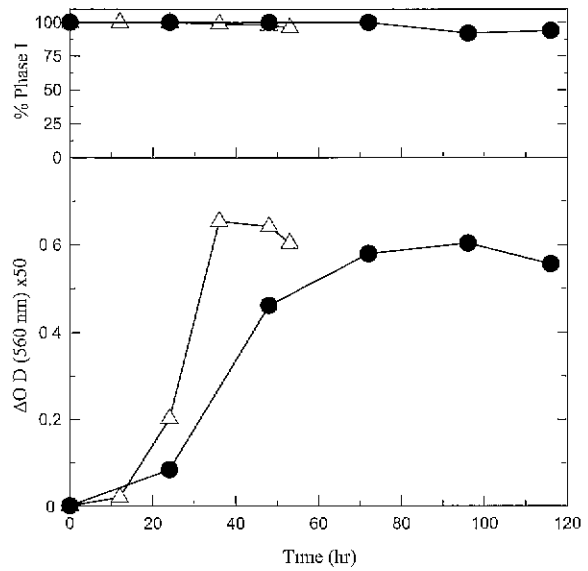


Figure 5. Comparison of cell growth and phase variation between 7L fermentor(△) and 250mL flask(●) cultures of *Xenorhabdus nematophilus*.

매우 흥미로운 결과로 pH 감소의 영향과 관련이 있을 것으로 추정된다. 그러나 정확한 원인은 앞으로 대사산물의 분석 등을 통하여 보다 구체적으로 규명되어야 할 것이다.

Figure 4는 XR-PC를 0.5 g/L K₂HPO₄, 0.5 g/L NH₄H₂PO₄, 0.2 g/L MgSO₄ · 7H₂O, 5 g/L NaCl, 10 g/L yeast extract를 첨가한 배지에 무기염 K₂HPO₄, NH₄H₂PO₄, MgSO₄ · 7H₂O, NaCl을 각각 다른 농도로 첨가하여 배양했을 때의 최대세포농도를 나타낸 것이다. K₂HPO₄와 NH₄H₂PO₄를 0-5 g/L 범위 내에서 농도를 달리하여 배양한 결과 큰 차이는 없었지만, K₂HPO₄는 3 g/L에서, NH₄H₂PO₄는 1 g/L에서 최적성장을 보였다. 또한 MgSO₄ · 7H₂O의 경우에도 성장에 큰 영향을 미치지 않은 반면 10 g/L NaCl 이상의 농도에서는 증식이 억제되었다.

Figure 5는 XR-PC를 0.5 g/L K₂HPO₄, 0.5 g/L NH₄H₂PO₄, 0.2 g/L MgSO₄ · 7H₂O, 5 g/L NaCl, 50 g/L yeast extract를 첨가한 배지에서 250 mL flask에서 working volume 100 mL로 28℃, 200 rpm에서 진탕 배양했을 때와 7 L fermentor에서 working volume 5 L로 배양했을 때의 성장과 상변화를 비교한 것이다. Fermentor배양은 28℃, 600 rpm, 1 L/min air flow rate 조건하에서 실행되었으며, 균주가 성장함에 따라 pH가 초기 6.8에서 9.0까지 증가하였다(data not shown). 균주의 최대세포농도는 fermentor(0.65)에서 배양한 경우가 flask(0.6)에서 배양한 경우보다 조금 높은 값을 보였으며, 비성장속도에 있어서도 fermentor배양에서 약 0.18 hr⁻¹로 flask배양의 0.13 hr⁻¹보다 1.4 배 가량 더 큰 값을 보였다. 이 결과는 XR-DR의 fermentor (0.62) 배양과 flask(0.58) 배양의 경우에도 최대세포농도 결과와 유사하며, 또한 비성장속도에 있어서 fermentor(약 0.17 hr⁻¹) 배양과 flask(0.12 hr⁻¹) 배양의 결과와 유사하였다. XR-PC의 경우 생화학적 test 결과 이 두 균주에 대한 95개 carbon source에 대한 산화능에 있어서 24개 carbon source 산화능에서 차이를 나타내었으며, XR-PC의 경우 37℃에서 균주 성장이 불가능한 반면, XR-DR은 성장이 가능하였으며, phosph-

atase와 tween 85를 이용한 lipase 반응에 있어서도 각각 다른

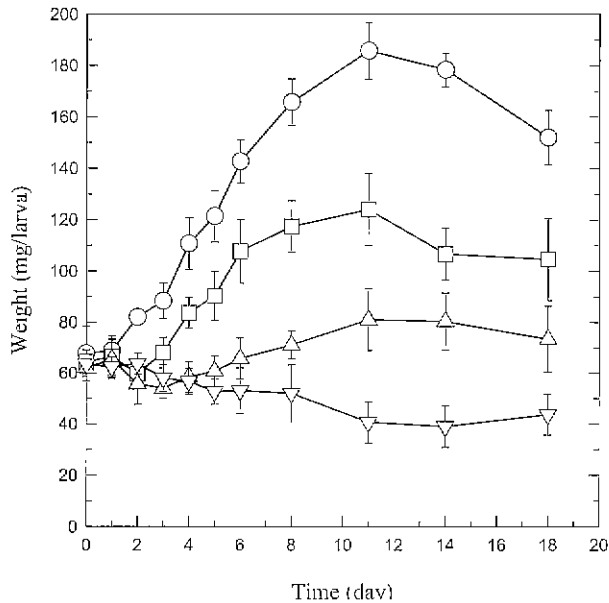


Figure 6. Growth inhibition of *Galleria mellonella* larva by *Xenorhabdus nematophilus* PC at various inoculation concentration. dose(mg/20g feed): (○) control, (□) 23, (△) 46, (▽) 230

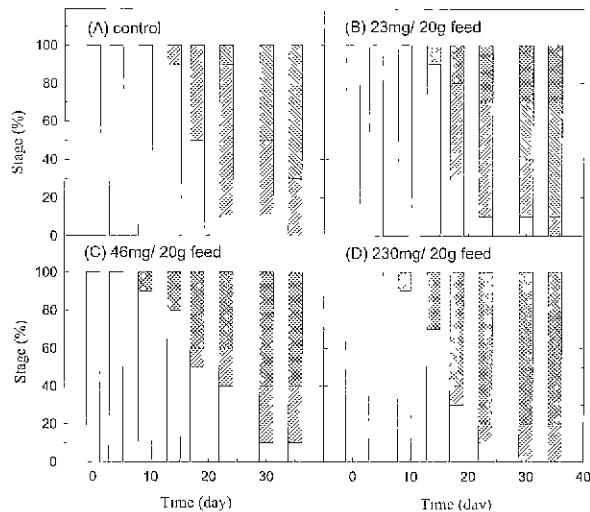


Figure 7. Life cycle inhibition of *Galleria mellonella* larva by *Xenorhabdus nematophilus* PC at various inoculation concentration (□) larva, (▨) pupa, (▩) moth, (■) dead larva

차이를 보였다[16]. 일반적으로 *in vitro*로 배양할 경우 상변화는 *Xenorhabdus nematophilus* 균주의 특징이기도 하다. XR-PC의 경우 fermentor 배양의 호기성 조건하에 균주의 성장속도가 때를수록 상변화도 빠르게 진행될 것으로 예상되었으나, 대수증식기를 지나 정지기에 접어들어도 phase I의 cell이 약 90% 이상 유지되었다 이것은 XR-DR의 경우 성장의 정지기에서 fermentor 배양과 flask 배양의 경우 모두 약 50%까지 phase II로 바뀐 것과 비교하면 *in vitro* 배양에서도 phase I 상태가 보다 안정되게 유지됨을 보여준다.

Figure 6은 체중이 약 63±3 mg 정도인 2령의 꿀벌부채명나방 유충의 사료 20 g에 각각 다른 양의 공생박테리아 pellet을 첨가해 꿀벌부채명나방 성장에 대한 oral toxicity를 비교해

본 결과이다. 공생박테리아를 첨가하지 않은 경우는 10여일

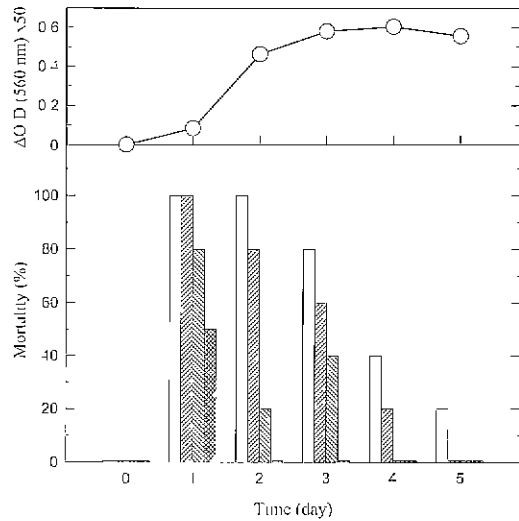


Figure 8. Comparison of mortality of *Xenorhabdus nematophilus* against *Galleria mellonella* larva at various culture times dilution factor (□) x2, (▨) x4, (▩) x8

만에 약 190 mg 정도의 3령 유충으로 정상적으로 성장하였지만, XR-PC를 유충배지 20 g당 건조중량 23, 46, 230 mg의 공생박테리아를 첨가하고 25℃에서 증식한 결과 유충의 체중이 모두 정상적으로 증가하지 못하였다. 공생박테리아 건조중량 23 mg을 첨가한 경우 최고 120 mg까지 체중이 증가한 반면, 230 mg을 첨가한 경우에는 시간이 경과함에 따라 오히려 체중이 감소되었다.

Figure 7은 2령의 꿀벌부채명나방 유충에 각각 다른 양의 공생박테리아를 첨가할 경우 유충의 생활사를 비교해본 결과이다. 공생박테리아를 첨가하지 않은 경우는 12일만에 번데기가 발생하며, 22일이 경과되면 나방이 발생하였다. 그러나 공생박테리아를 유충배지 20 g당 건조중량 23, 46, 230 mg의 공생박테리아를 첨가하고 25℃에서 증식한 결과 건조중량 23 mg을 첨가한 경우 12일 경과 후 유충사체가 발생하여 전체 유충의 30%가 사멸하였다. 또한 230 mg을 첨가한 경우는 9일만에 유충사체가 발생하여 전체 유충의 80%가 사멸하였다.

Figure 8은 XR-PC를 0.5 g/L K₂HPO₄, 0.5 g/L NH₄H₂PO₄, 0.2 g/L MgSO₄ · 7H₂O, 5 g/L NaCl, 50 g/L yeast extract를 첨가한 배지에 배양하면서 하루 간격으로 배양액을 샘플링하여 원심 분리한 상등액을 꿀벌부채명나방의 유충의 hemolymph에 주사하였을 때 유충사멸속도를 조사한 결과이다. 배양시간에 따른 상등액의 독성정도를 비교하기 위해서 상등액을 원액, 2, 4, 8 배로 희석하여 접종한 결과 배양 하루째가 가장 독성이 강하였는데, 배양시간이 경과함에 따라 오히려 독성이 조금씩 약화됨을 보여준다. 따라서 XR-PC의 경우 지수성장기 초기에 가장 강한 독성물질을 생산하는 것으로 사료되어 현재 이들 독성물질을 분리하여 그 구조를 규명하는 연구가 진행되고 있다.

요 약

국내에서 서식하고 있는 곤충병원성 선충 *Steinernema*

*carpocapsae*로부터 분리·동정된 *Xenorhabdus nematophilus*를 대상으로 최적배지조성과 배양조건, 상변화 특성 및 곤충 독성물질 역기를 조사하였다. 균주의 최적배지 조성은 50-70 g/L yeast extract, 3 g/L K_2HPO_4 , 1 g/L $NH_4H_2PO_4$, 2 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 10 g/L NaCl이였으며, yeast extract의 농도가 균주성장 제한인자로 작용하였다. Yeast extract 농도에 대한 비성장속도의 의존도를 Monod equation을 가정하여 비교해 본 결과, 최대 비성장속도는 0.13 hr^{-1} 이고 Monod 상수값은 20 g/L였다. 배양 배지의 pH는 초기 6-7에 관계없이 성장이 진행됨에 따라서 약 8.5-9.5까지 증가하였으며, 7L fermentor배양에서는 균주의 비성장속도가 약 0.18 hr^{-1} 로 flask배양보다 1.4배 더 증가하였다. 상변화의 경우 정지기에서도 fermentor배양과 flask배양 모두 약 90% 이상 phase I이 유지되었다. 한편 꿀벌부채명나방에 대한 구강독성을 시험해 본 결과, *X. nematophilus* 균주를 유충사료에 첨가하면 꿀벌부채명나방 유충의 정상적인 성장을 저해하였으며, 20여일 경과 후 완전히 유충을 사멸시키는 것을 확인하였다. 배양 상등액을 유충에 직접 주사하였을 때 배양 24 시간인 지수성장기 초기에 가장 독성이 강하였으며, 배양시간이 경과함에 따라 독성이 점차 감소하였다.

감 사

본 연구는 한국과학재단 연구비(Project No 970-4020-201-3) 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Hominick, W. M. and A. P. Reid (1990), Perspectives on entomopathogenic nematology, In *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*, R. Gaugler and H. K. Kaya, eds., p327, CRC Press, Florida.
- Hom, A. (1994), Current status of entomopathogenic nematodes, *The IPM Practitioner* **16**(3), 2.
- 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.
- Hurlber, R. E., J. Xu, and C. L. Small (1994), Colonial and cellular polymorphism in *Xenorhabdus luminescens*, *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 1136.
- Klein, M. G. (1990), Efficacy against soil-inhabiting insect Pests, In *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*, R. Gaugler and H. K. Kaya, eds., p195. CRC Press, Florida.
- McInerney, B. V., R. P. Gregson, M. J. Lacey, R. J. Akhurst, G. R. Lyons, S. H. Rhodes, and D. R. J. Smith (1991), Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp. Part 1. Dithiopyrrolone derivatives with antibiotic activity, *J. Nat. Prod (Lloydia)* **54**, 774.
- Akhurst, R. J. (1980), Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoplectana* and *Heterorhabditis*, *J. Gen. Microbiol.* **121**, 303.
- Schmidt, T. M., K. Kopecky, and K. H. Neelson (1989), Bioluminescence of the insect pathogen *Xenorhabdus luminescens*, *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 2607.
- Boemare, N., and R. J. Akhurst (1988), Biochemical and physiological characterization of colony form variants in *Xenorhabdus* spp.(Enterobacteriaceae), *J. Gen. Microbiol.* **134**, 751.
- Richardson, W. H., T. M. Schmidt, and K. H. Neelson (1988), Identification of an anthraquinone pigment and a hydroxystilbene antibiotic from *Xenorhabdus luminescens*, *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 1602.
- Dunphy, G. B. and J. M. Webster (1988), Virulence mechanisms of *Heterorhabditis heliothidi* and its bacterial associate, *Xenorhabdus luminescens*, in non-immune larvae of the dauer wax moth, *Galleria mellonella*, *Int. J. Parasitol.* **18**, 729.
- Bowen D. J., M. A. E. Barman, N. E. Beckage, and J. C. Ensign (1988), Extracellular insecticidal activity of *Xenorhabdus luminescens* strain NC-19, *Proceedings of the XVIII International Congress of Entomology*, Vancouver, pp256
- Bowen, D., T. A. Rocheleau, M. Blackburn, O. Andreev, E. Golubeva, R. Bhartiya, R. H. French-Constant (1988), Insecticidal toxins from the bacterium *Photorhabdus luminescens*, *Science* **280**(53), 2129.
- 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.
- Kim, D. W. and S. H. Park (1998), Culture condition of entomopathogenic nematodes using *Galleria mellonella* larva, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **13**(1), 31.
- Park, S. H. and Y. S. Yu (1999), Isolation and identification of a symbiotic bacterium from *Steinernema carpocapsae*, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **4**, 12.
- Park, S. H. and Y. S. Yu (1999), Isolation and culture characteristics of a bacterial symbiont from entomopathogenic nematode *Steinernema glaseri*, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **14**(2), 198.