

## 곤충병원성 선충으로부터 분리된 공생박테리아의 종별 특성

<sup>1</sup>김지연·\*박선호

<sup>1</sup>(주)바이코시스 부설연구소, 계명대학교 공학부  
(접수 : 2002. 5. 8., 게재승인 : 2002. 6. 22.)

## Characterization of Symbiotic Bacteria from Entomopathogenic Nematode

Ji Yeon Kim<sup>1</sup> and Sun Ho Park<sup>†</sup>

<sup>1</sup>Biotechnology Research Institute, Bicosys, Co., Ltd., 1000 Shindang-dong, Daegu 704-701  
Faculty of Engineering, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea  
(Received : 2002. 5. 8., Accepted : 2002. 6. 22.)

Symbiotic bacteria with highly effective insecticidal activities were isolated and compared with their physiological characteristics from seven species of entomopathogenic nematodes belong to *Steinernematidae* and *Heterorhabditidae* sp., and three of them were identified as *Xenorhabdus nematophilus*. Culture characteristics, insecticidal activities, protease activities and fatty acid contents of various symbiotic bacterial isolates were also examined. In the case of cell growth and insecticidal activity, XR-PC and XR-MK were superior to other species when cultured in vitro. The insecticidal activity were highest at the early exponential growth phase, and gradually decreased with time. The protease activity of XR-DR was remarkable compared to other species. In the case of HE-HY, however the protease activity increased in parallel with cell growth. Interestingly, the fatty acid patterns of *Xenorhabdus nematophilus* isolated from different entomopathogenic nematode, showed remarkable differences in their contents of 12:0, 14:0, 16:1 cis 5 and 17:0 cyclo and hydroxy and branch fatty acids were varied from 2% to 15% among total fatty acid contents.

**Key Words** : *Xenorhabdus nematophilus*, insecticidal activity, protease, fatty acids

### 서론

현재 환경오염 및 생태계 파괴 등 많은 문제점을 지닌 화학살충제의 사용을 대체할 수 있는 무공해 생물살충제에 대한 관심이 집중되고 있다. 특히 화학농약과 혼용 사용할 수 있는 생물살충제인 *Steinernematidae* 및 *Heterorhabditidae*속의 곤충병원성 선충은 인체에 부작용이 없고 대상 해충의 범위가 넓으며 해충이 내성을 일으키지 않고 또한 해충 탐색능력이 뛰어난 장점이 있다(1). 곤충병원성 선충에 의한 해충의 파괴는 선충 내에 공생하는 박테리아에 의한 것으로 알려져 있다. 공생박테리아는 감염태(infective juvenile)단계 곤충병원성 선충의 장(gut) 내에 주로 존재하며 장기간의 *in vitro* 배양시 phase I에서 phase II의 상태로 변화될 수 있는데, 이를 동질이형화(dimorphism)현상이라 부른다(2). 그 유전적 원인은 잘 알려져 있지 않지만 공생박테리아의 phase I과 phase II는 항생물질 생성(3,4), pigment(5,6), 그리고 lipase와 prote-

ase 등의 효소분비(6-8) 등과 같은 생화학적 특성에 차이가 있는 것으로 보고되고 있다. Phase I은 동질이형인 phase II에 비해서 대사가 더 활발하며 사멸한 해충 사체 내에서 다른 미생물의 성장을 억제하는 광역 항균스펙트럼을 가진 다양한 2차 대사산물을 분비한다(9).

선충에 의한 해충의 사멸은 선충이 해충의 입, 기문 등을 통해 해충의 혈장에 침투하면 해충 내로 분비된 공생박테리아가 독성물질을 생성하여 24-48시간 이내에 해충을 사멸시킨다(10). 해충을 사멸시키는 직접적인 원인인 공생박테리아가 생산하는 독성물질의 종류로는 단백질 분해 효소 및 효소가 아닌 단백질인 것으로 밝혀지고 있다(11,12). 특히 *Steinernematidae*속의 공생박테리아인 *Xenorhabdus nematophilus*는 곤충 유충의 사멸과 소화에 중요한 역할을 하는 생성물을 형성하는데 이는 단백질 분해효소를 포함하는 것으로 알려져 있다(11). 공생박테리아는 endotoxin과 exotoxin을 분비하며 해충을 사멸시키는 직접적인 원인은 exotoxin으로 알려져 있다(13).

최근 곤충병원성 선충을 인공증식할 경우 해충을 이용해 *in vivo* 증식한 선충과 비교해서 지방산 함량과 성분에서 차이를 나타내고 있으며, 이것이 선충의 증식력, 보관력, 그리고 살충성에 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되고 있다(14). 또한 선충 배양시 공생박테리아 역시 인공증식 배지의 조성

<sup>†</sup> Corresponding Author : Faculty of Engineering, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea  
Tel : +82-53-580-5457, Fax : +82-53-587-1034  
E-mail : nark@kmu.ac.kr

이나 온도에 의해서 포화지방산 및 불포화지방산 함량에 차이를 나타내고 있다(15).

본 연구에서는 곤충병원성 선충 *Steinernematidae*속 6종과 *Heterohabditidae*속 1종으로부터 각각 공생하는 박테리아를 분리하여 종별 공생박테리아의 특성, 단백질 분해 효소의 생성정도, 꿀벌부채명나방 유충에 대한 살충성 및 지방산 함량 등을 비교하였다.

## 재료 및 방법

### 공생박테리아의 분리 및 탄소원에 대한 산화능

사용된 곤충병원성 선충은 *Steinernematidae* 6종(*Steinernema glaseri* DR, *S. glaseri* NC, *S. glaseri* MK, *S. carpocapsae* PC, *S. moticola*, *S. Longicaudum*)과 *Heterorhabditidae* 1종(*Heterorhabditis bacteriophora*)으로 경상대학교 선충연구실로부터 분양 받았다. *In vivo*로 증식된 곤충병원성선충을 꿀벌부채명나방 유충에 접종하여 사멸시킨 후 95% ethanol에 담귀 표면 살균한 후 3-4회 무균 증류수를 이용하여 세척한 후 무균적으로 유충을 해부하고 hemolymph를 NBTA배지에 plate out한 후 28°C incubator에서 배양하였다.

NBTA에서 3-5일 동안 배양하여 나타난 colony를 BUGM 배지에 옮겨 2회 계대배양을 실시한 후 순수한 colony를 생성하였다. 생성된 colony는 0.9% saline 용액에 현탁하여 현탁액의 탁도가 적정 범위 안에 오도록 탁도계를 이용하여 희석하였다. 4°C에 보관된 microplate에 현탁액의 적정량을 접종하고 28°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양된 microplate를 Biolog 시스템에 입력하고 95개 carbon source 각각에 대해 산화능을 조사하였다. 또한 그 결과를 Biolog 시스템에 내장된 566종/속의 그람 음성균 database software를 이용하여 결과를 비교하였다(16).

### 공생박테리아의 배양

NBTA배지에서 3-5일 정도 성장한 colony를 취해서 250 mL flask, 100 mL 0.5% NaCl, 0.05% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.05% NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.02% MgSO 7H<sub>2</sub>O, 5% yeast extract 배지에 접종하여 28°C, 200 rpm incubator에서 7일간 배양하였으며 24시간 간격으로 sampling 하였다. 공생박테리아의 배양액을 1:50 희석하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그리고 배양액을 10,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 박테리아를 제거한 상등액으로 단백질 분해 효소 및 꿀벌부채명나방 유충에 대한 살충성 test를 위한 시료로 사용하였다.

### 단백질 분해효소 활성 및 꿀벌부채명나방 유충에 대한 살충성 측정

단백질 분해효소의 활성은 0.1 mL의 배양 원심분리 상등액, 3 mg HPA 그리고 1.4 mL buffer(1 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris-HCl pH 8.0)를 혼합하여 2시간 동안 30°C에서 200 rpm으로 shaking해 반응시킨 후 원심분리하여 반응하지 않고 남은 HPA를 제거한 반응여액의 흡광도를 596 nm에서 측정하였다.

살충성 test는 꿀벌부채명나방 유충을 사용하여 실행하였다. 각 시료에 대해 4마리의 유충을 사용하였으며, 3 µL의 배양

원심분리 상등액을 유충의 혈강에 microsyringe를 사용하여 주사한 후, 25°C incubator에 보관하면서 시간에 따른 사멸정도를 조사하였다.

### 공생박테리아의 지방산 측정

분리된 공생박테리아의 지방산 성분 및 함량을 조사하기 위해서 먼저 시험관 (13×100 mm)에 reagent 1(NaOH 45 g, CH<sub>3</sub>OH 150 mL, 초순수 150 mL)을 1 mL 넣은 후 TSA (Trypticase Soy Broth 30 g, Bacto Agar 15 g, 초순수 1 L) 배지에서 배양한 공생박테리아를 한 루프 정도 넣고 vortex하였다. 100°C에 5분간 담근 후 다시 vortex하고 100°C의 항온조에 25분간 두었다. 그런 다음 급속히 냉각하고 reagent 2(6 N HCl 325 mL, CH<sub>3</sub>OH 275 mL)를 2 mL 넣고 섞어주었다. 그리고 80°C 항온조에 10분간 담근 후 최대한 신속히 냉각시켰다. 그런 다음 reagent 3(hexane: methyl tert-Butyl ether=1:1)을 1.25 mL 첨가하였으며, 이때 층이 생성되면 orbital shaker를 이용하여 10분간 천천히 흔들어 층을 더 분리하였다. 하등액을 pasteur pipet을 이용하여 2-3회에 걸쳐 완전히 제거한 후 reagent 4(NaOH 10.8 g, 초순수 900 mL)를 3mL 시험관에 넣고 orbital shaker에서 5분간 다시 천천히 흔들어 준 후 냉장고에 잠시 넣어두거나 또는 reagent 5 (saturated NaCl/water solution)를 이용하여 분리하였으며, 최종 처리된 상등액은 pasteur pipet을 이용하여 GC 분석용 vial에 최소 150 µL 이상을 넣었다.

지방산 측정은 HP6890 gas chromatograph를 사용하였으며, Ultra2 capillary column을 사용하여 carrier gas로 H<sub>2</sub>를 0.4 mL/min의 유속으로 흘려주었고 column의 초기온도는 170°C로 260°C까지 5°C/min의 속도를 온도를 상승시켰으며 detector는 FID를 사용하였다. 그리고 지방산 성분 및 함량의 최종분석은 MIS Sherlock software를 이용하여 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 분리된 공생박테리아의 탄소원에 대한 산화능

Table 1은 *Steinernemas glaseri* 곤충병원성 선충으로부터 분리된 공생박테리아인 XR-DR과 XR-MK에 대한 95개 탄소원에 대한 산화능을 나타낸 것이다. 공생박테리아 XR-DR을 95개 탄소원을 이용한 Biolog 동정시스템을 사용하여 내장된 566종/속의 그람 음성균의 database와 비교한 결과, XR-DR은 유사도 0.834로 *Xenorhabdus nematophilus*로 그리고 XR-MK 또한 유사도 0.728로 *X. nematophilus*로 거의 동일한 군주에 속하는 것으로 나타났다. 그러나 탄소원별 산화능은  $\gamma$ -hydroxybutyric acid와 glycyl-L-aspartic acid에 대해 뚜렷한 차이를 보였으며 glycogen, tween80, m-inositol, D-psicose, D-glucuronic acid 등의 12종 이상의 carbon source에 대해 서로 다른 산화능을 보이는 것으로 보아 *X. nematophilus*의 subspecies는 서로 다른 것으로 추정된다.

Table 2는 *Steinernema carpocapsae*와 *S. monticola*의 곤충병원성 선충으로부터 분리된 공생박테리아 XR-PC와 XR-MO에 대한 Biolog 동정시스템의 95개 탄소원에 대한 산화능을 나타낸 것이다. 이 경우에 XR-PC는 유사도 0.534로 *X. nematophilus*로 나타난 반면, XR-MO의 경우 유사도 0.5 이상

Table 1. Assimilation of various carbon sources by symbiotic bacteria XR-DR and XR-MK

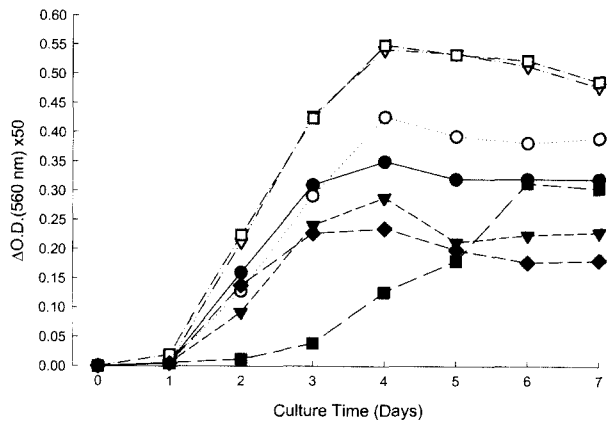
C-source	XR-DR	XR-MK	C-source	XR-DR	XR-MK	C-source	XR-DR	XR-MK
water	-	-	turanose	-	-	D-alanine	-	-
-cyclodextrin	-	-	xylitol	-	-	L-alanine	w	+
dextrin	+	+	methyl pyruvate	+	+	L-alanyl-glycine	w	w
glycogen	-	w	mono-methyl succinate	w	+	L-asparagine	+	+
tween40	+	w	acetic acid	-	w	L-aspartic acid	w	w
tween80	-	w	cis-acconitic acid	-	-	L-glutamic acid	+	+
N-acetyl-D-galactosamine	-	-	citric acid	-	-	glycyl-L-aspartic acid	+	-
N-acetyl-D-glucosamine	+	+	formic acid	-	w	glycyl-L-glutamic acid	w	+
adonitol	-	-	D-galactonic acid latone	-	-	L-histidine	+	w
L-arabinose	w	w	D-galacturonic acid	-	-	hydroxy L-proline	-	-
D-arabitol	-	-	D-gluconic acid	w	-	L-leucine	-	-
cellobiose	-	-	D-glucosaminic acid	-	-	L-omithine	-	-
i-erythritol	-	-	D-glucuronic acid	-	-	L-phenylal nine	-	-
D-fructose	w	+	-hydroxybutyric acid	-	-	L-proline	-	w
L-fucose	-	-	-hydroxybutyric acid	-	-	L-pyroglytamic acid	-	-
D-galactose	-	-	-hydroxybutyric acid	-	+	D-serine	-	w
gentiobiose	-	-	p-hydroxyphenylacetic acid	-	w	L-serine	+	+
-D-glucose	+	+	itaconic acid	-	-	L-threonine	-	-
m-inositol	-	w	-keto butyric acid	-	-	D,L-camitine	-	-
-D-lactose	-	-	-keto glutaric acid	-	-	-amino butyric acid	-	-
lactulose	-	-	-keto valeric acid	-	-	urocanic acid	-	-
maltose	+	+	D,L-lactic acid	+	w	inosine	w	+
D-mannitol	-	-	malonic acid	-	-	uridine	w	+
D-mannose	+	+	propionic acid	w	w	thymidine	-	w
D-melibiose	-	-	quinic acid	-	-	phenyl ethylamine	-	w
-methyl-D-glucoside	-	-	D-saccharic acid	-	-	putrescine	-	w
D-psicose	w	-	sebacid acid	-	-	2-amino ethanol	-	-
D-raffinose	-	-	succinic acid	w	w	2,3-butanediol	-	-
L-rhamnose	-	-	bromosuccinic acid	-	-	glycerol	+	w
D-sorbitol	-	-	succinamic acid	-	-	D,L-glycerol phosphate	+	+
sucrose	-	-	glucuronamide	-	-	glucose-1-phosphate	+	+
D-trehalose	+	+	alaninamide	-	w	glucose-6-phosphate	+	+
						Similarity	0.834	0.728
						Result of identification	Xen.	Nem.

+, positive response; -, negative response; W, weak response

Table 2. Assimilation of various carbon sources by symbiotic bacteria XR-MO and XR-PC

C-source	XR-PC	XR-MO	C-source	XR-PC	XR-MO	C-source	XR-PC	XR-MO
water	-	-	turanose	-	-	D-alanine	w	-
-cyclodextrin	-	-	xylitol	-	-	L-alanine	+	-
dextrin	+	-	methyl pyruvate	+	-	L-alanyl-glycine	w	w
glycogen	-	-	mono-methyl succinate	-	+	L-asparagine	+	+
tween40	-	+	acetic acid	-	-	L-aspartic acid	+	+
tween80	w	+	cis-acconitic acid	-	-	L-glutamic acid	+	+
N-acetyl-D-galactosamine	-	-	citric acid	-	w	glycyl-L-aspartic acid	-	+
N-acetyl-D-glucosamine	+	+	formic acid	w	-	glycyl-L-glutamic acid	+	+
adonitol	-	-	D-galactonic acid latone	-	-	L-histidine	w	-
L-arabinose	w	w	D-galacturonic acid	-	-	hydroxy L-proline	-	-
D-arabitol	-	-	D-gluconic acid	-	-	L-leucine	-	-
cellobiose	-	-	D-glucosaminic acid	-	-	L-omithine	-	-
i-erythritol	-	-	D-glucuronic acid	-	+	L-phenylal nine	-	-
D-fructose	+	+	-hydroxybutyric acid	-	-	L-proline	+	w
L-fucose	-	+	-hydroxybutyric acid	-	-	L-pyroglytamic acid	-	-
D-galactose	-	w	-hydroxybutyric acid	-	-	D-serine	w	-
gentiobiose	-	+	p-hydroxyphenylacetic acid	+	-	L-serine	+	w
-D-glucose	+	+	itaconic acid	-	-	L-threonine	-	+
m-inositol	w	-	-keto butyric acid	-	-	D,L-camitine	-	-
-D-lactose	-	-	-keto glutaric acid	-	-	-amino butyric acid	-	-
lactulose	-	-	-keto valeric acid	-	-	urocanic acid	-	-
maltose	+	-	D,L-lactic acid	w	-	inosine	+	-
D-mannitol	-	+	malonic acid	-	-	uridine	+	-
D-mannose	+	+	propionic acid	w	w	thymidine	w	-
D-melibiose	-	-	quinic acid	-	-	phenyl ethylamine	w	-
-methyl-D-glucoside	-	-	D-saccharic acid	-	-	putrescine	w	-
D-psicose	-	w	sebacid acid	-	-	2-amino ethanol	-	-
D-raffinose	-	-	succinic acid	w	-	2,3-butanediol	-	-
L-rhamnose	-	-	bromosuccinic acid	-	-	glycerol	+	-
D-sorbitol	-	-	succinamic acid	-	-	D,L-glycerol phosphate	+	-
sucrose	-	-	glucuronamide	w	w	glucose-1-phosphate	+	+
D-trehalose	+	+	alaninamide	w	-	glucose-6-phosphate	+	-
						Similarity	0.534	0.240
						Result of identification	Xen.	N/A

+, positive response; -, negative response; W, weak response



**Figure 1.** Profiles of cell growth by various symbiotic bacteria. □: XR-MK ▽: XR-PC ○: XR-NC ■: HE-HY ▾: XR-MO ●: XR-LC ◆: XR-DR

의 내장된 database 균주가 없는 것으로 나타났다. 한편 그 외 다른 3종류의 곤충병원성 선충으로부터 분리된 공생박테리아에 대해서도 Biolog 동정시스템에 의해 균주확인이 어려웠으며 기타의 방법으로 동정 실험이 진행중에 있다.

**공생박테리아 배양시간에 따른 살충성 변화**

분리된 공생박테리아의 종별 성장곡선을 비교하기 위하여

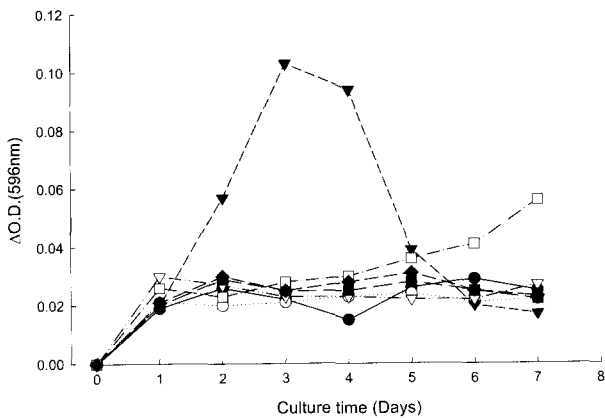
시간별로 배양액을 채취한 후 1:50 희석하여 560 nm에서 흡광도를 측정하여 Figure 1에 나타내었다. 대부분의 종이 배양 4일째에 최대 균체 성장을 나타내었으며 이후는 정지기로 접어들었으나 5% YS 배지에서 XR-PC 및 XR-MK가 비교적 가장 빨리 성장하는 것으로 나타났다. 대수증식기에서 specific growth rate는 XR-MK와 XR-PC가 각각 0.202d<sup>-1</sup>, 0.199d<sup>-1</sup>였으며, HE-HY는 0.086d<sup>-1</sup>로 다른 종에 비해 2.2배-1.4배 정도 작았다. HE-HY의 경우는 다른 종들에 비하여 지연기가 매우 길었으며 6일째에 최대 균체 성장을 나타내었다. *Heterorabditidae*로부터 분리한 공생박테리아인 HE-HY는 5% YS배지에서는 잘 증식되지 않는 것으로 보아 별도의 성장배지 성분이 필요한 것으로 사료된다. 공생박테리아의 성장과 관련하여 종별 살충성을 비교하기 위하여 꿀벌부채명 나방에 대한 살충성 test를 실시한 결과를 Table 3에 나타내었다. Table 3에서 보는 바와 같이 공생박테리아의 배양 상등액만 접종하여도 XR-MO와 XR-LC를 제외하고는 모두 72 시간 이내에 유충을 사멸시키는 것으로 보아 살충물질이 박테리아의 체외로 분비되는 것으로 사료된다. 또한 종별로 균체 성장 시간에 따라 그 살충성을 비교해 보면, XR-PC 및 XR-MK가 살충성이 가장 우수하였고 대부분의 종이 배양 1-2일째 대수증식기 초기에 살충 활성이 가장 높게 나타났으며 그 이후에는 점차 살충성이 감소되었다. 물론 분리된 공생박테리아 7종에 대해 유충 당 수십에서 수백 마리 정도의

**Table 3.** Insect pathogenicity of symbiotic bacteria cell-free culture broth against *Galleria mellonella* larva

(Lethal number/larva number)

		24 h	41 h	48 h	72 h	96 h							
Control		0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	24 h	41 h	48 h	72 h	96 h		
XR-MK	1day	0/4	4/4	4/4	4/4	4/4	XR-DR	1day	0/4	1/4	1/4	1/4	1/4
	2day	0/4	1/4	3/4	3/4	3/4		2day	0/4	3/4	3/4	4/4	4/4
	3day	0/4	0/4	1/4	1/4	1/4		3day	0/4	0/4	0/4	1/4	2/4
	4day	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4		4day	0/4	0/4	0/4	1/4	2/4
	5day	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4		5day	0/4	2/4	2/4	3/4	3/4
	6day	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4		6day	0/4	0/4	0/4	0/4	1/4
	7day	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4		7day	0/4	0/4	0/4	0/4	1/4
XR-PC	1day	0/4	3/4	3/4	3/4	3/4	XR-MO	1day	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	2day	0/4	2/4	3/4	4/4	4/4		2day	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	3day	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4		3day	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	4day	0/4	2/4	2/4	2/4	2/4		4day	0/4	0/4	0/4	1/4	2/4
	5day	0/4	0/4	1/4	1/4	1/4		5day	0/4	0/4	0/4	0/4	1/4
	6day	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4		6day	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	7day	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4		7day	0/4	0/4	0/4	0/4	2/4
HE-HY	1day	0/4	0/4	0/4	1/4	1/4	XR-LC	1day	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	2day	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4		2day	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	3day	0/4	0/4	2/4	2/4	2/4		3day	0/4	0/4	0/4	0/4	1/4
	4day	0/4	1/4	1/4	4/4	4/4		4day	0/4	0/4	0/4	0/4	1/4
	5day	0/4	0/4	0/4	4/4	4/4		5day	0/4	0/4	0/4	0/4	3/4
	6day	0/4	0/4	0/4	0/4	4/4		6day	0/4	0/4	0/4	0/4	1/4
	7day	0/4	0/4	0/4	0/4	4/4		7day	0/4	0/4	0/4	0/4	2/4
XR-NC	1day	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4							
	2day	0/4	1/4	2/4	4/4	4/4							
	3day	0/4	1/4	2/4	2/4	3/4							
	4day	0/4	0/4	0/4	0/4	1/4							
	5day	0/4	0/4	0/4	0/4	4/4							
	6day	0/4	0/4	0/4	0/4	2/4							
	7day	0/4	0/4	1/4	2/4	4/4							

3 μL of cell-free cultrue broth was injected into hemolymph of each larva; n=4 larvae for each sample group.



**Figure 2.** Profiles of extracellular protease production by various symbiotic bacteria. □: HE-HY -▽: XR-MK ○: XR-MO ■: XR-NC -▼: XR-DR ●: XR-PC ◆: XR-LC

공생박테리아를 접종하였을 때에도 48시간 이내에 유충을 사멸시키는 것을 확인하였다(data not shown). HE-HY종의 경우는 배양 3일 이후에 살충 활성이 나타났으나 이 경우에도 공생박테리아의 대수증식기 초기단계에서 살충물질을 분비하는 것으로 보인다.

공생박테리아에 의한 해충의 사멸정도는 대상 해충 및 해충의 면역적, 생리적 특성 그리고 공생박테리아의 종류에 따라 크게 다르게 나타날 수 있다(17). 꿀벌부채명나방의 유충의 경우에는 일반적인 병원성 박테리아에 대해서도 감수성이 높기 때문에 비교적 낮은 공생박테리아의 농도에서도 (LD<sub>50</sub>은 유충당 약 10<sup>2</sup> 정도) 병원성을 나타내었지만 저항성이 높은 tobacco horn worm, *Manduca sexta*에 대해서 병원성을 조사한 경우 *Serratia marcescens*, *Esherichia coli* D31 혹은 *Pseudomonas aeruginosa* 등에 대해 유충당 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> 정도를 접종하여도 사멸되지 않은 반면 공생박테리아 *X. nematophilus*를 접종할 경우 90% 이상의 높은 치사율을 나타내었다(18). 또한 이 경우에도 *M. sexta*의 혈장에서 공생박테리아의 대량 증식이 되기 전에 유충이 사멸하는 것으로 보아 패혈증(septicemia)에 의한 것이라기 보다는 살충물질의 분비에 의한 것으로 보고되고 있다(13). 그러나 아직까지 공생박테리아가 분비하는 살충물질에 대한 정확한 작용기작은 밝혀지지 않고 있다.

**공생박테리아의 배양시간에 따른 protease 활성 변화**

Figure 2는 곤충병원성 선충으로부터 각각 분리된 공생박테리아 배양상등액의 단백질 분해효소의 활성을 비교한 것이다. XR-DR와 HE-HY를 제외한 5종류의 공생박테리아는 모두 배양 1일째부터 7일째까지 거의 일정하게 protease 활성이 나타났다. XR-DR은 특이적으로 균체의 성장에 비례하여 protease 활성도 증가하여 배양 3일째에 다른 종에 비해 약 4.5배의 protease 활성을 보인후 배양 4일 이후부터 다시 급격히 감소하였다. 또한 HE-HY의 경우에는 배양 말기에 protease 활성이 다소 증가되는 경향을 보였다.

*Xenorhabdus*속 공생박테리아가 생성하는 효소로는 lipases, phospholipases, protease, 그리고 DNases 등이 알려져 있다(7).

지수성장기 말기와 정지기 초기 사이에 높게 나타나지만, 공생박테리아의 경우에는 특이적으로 성장기간 초기부터 말기에 이르기까지 거의 일정하게 생성되는 것으로 알려져 있다(11). 또한 혈장 내부의 거대분자는 공생박테리아에 의해서 분비되는 다양한 종류의 효소에 의해서 분해되며, 이들은 선충 증식에 영양원으로써 이용된다. 한편 Ryu(19) 등에 의해서 XR-NC에 대한 단백질 분해효소의 활성은 배지성분중 tryptone과 fructose를 첨가할 경우 가장 높은 것으로 확인되었다. XR-HY 및 XR-DR을 제외한 5종의 공생박테리아의 경우 protease 활성이 배양시간에 따라 거의 일정하게 나타났는데 이를 배양시간에 따른 exotoxin의 살충력과 비교해 보면 protease가 해충의 사멸에 직접적인 원인이 아님을 시사해 주며, 또한 exotoxin과의 직접적인 관련이 없는 것으로 사료된다. 따라서 현재 공생박테리아가 분비하는 살충물질을 규명하기 위한 분리 및 정제에 관한 연구가 수행 중에 있다.

**공생박테리아 종별 지방산 함량**

공생박테리아의 지방산 함량은 선충의 증식력, 보관력 및 살충성에 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되고 있으며(14), 또한 박테리아 종의 동정에도 이용된다(20). 공생박테리아의 지방산 함량에 관한 결과(Table 4)를 살펴보면 7종류의 공생박테리아 중 특히 XR-PC는 10:0, 12:0, 16:1 cis 5, 18:1 cis 7, 17:0 cyclo, 19:0 cyclo cis 8의 함량비에서 다른 종류의 공생박테리아와 차이를 나타내었으며, 또한 HE-HY의 경우에는 12:0, 14:0, 18:0, 13:0 iso, 15:0 iso, 17:0 iso, 16:1 cis 5, 17:1 cis 7 iso, 17:0 cyclo의 함량비에서 다른 종류의 공생박테리아와 차이를 나타내었다. 또한 XR-MO 및 XR-MK의 경우에서도 15:0의 함량비에서 다른 종류의 공생박테리아와 구별되었다. 그리고 같은 계통의 *Stenernema glaseri*에서 분리된 공생박테리아인 XR-DR, XR-MK 및 XR-NC의 경우에서도 약간 다른 차이를 나타내었다. 이들 세종의 공생박테리아의 지방산 함량을 분석한 결과 XR-MK가 12:0, 15:0, 15:0 iso 15:0 iso 3OH의 지방산에서 다른 2종에 비해 큰 차이를 보였으며 같은 계통의 선충에서 분리한 공생박테리아 간에도 지방산 함량에 차이를 나타내었다.

기존의 알려진 *Xenorhabdus*속의 지방산 성분 및 함량(21)과 비교해 볼 때 전체적인 지방산 성분과 함량비는 유사하였으나 그중 *X. nematophilus*의 17:0 cyclo의 함량비에 있어서 본 연구에 사용된 공생박테리아는 약 4-15%인 반면 기존에 알려진 *X. nematophilus*는 27.7% 정도로 본 실험에 사용된 공생박테리아가 적은 함량비를 나타내는 것으로 확인되었다. 일반적으로 Enterobacteriaceae는 hydroxy와 branch 지방산을 함유하지 않는 특성(22)이 있는 반면 공생박테리아 *Xenorhabdus*속은 그렇지 않은 특징이 있다. 본 연구에서 분리된 공생박테리아의 경우에서도 hydroxy와 branch 지방산을 전체 지방산의 약 2-15% 정도까지 함유하는 것으로 확인되었다. 특히 HE-HY의 경우 branch 지방산을, XR-LC의 경우 hydroxy 지방산을 비교적 많이 함유하는 것으로 나타났다.

최근 곤충병원성 선충을 인공증식할 경우 해충을 이용해 *in vivo* 증식한 선충과 비교해서 지방산 함량과 성분에서 차이를 나타내고 있으며, 이들이 선충의 증식력, 보관력, 그리고 사충세균 억제력 과려이 있는 것으로 보고되고 있다(14).

Table 4. Composition of fatty acids for various symbiotic bacteria isolates

fatty acid	Composition(%)						
	XR-PC	HE-HY	XR-NC	XR-LC	XR-DR	XR-MO	XR-MK
<b>Saturated</b>							
10:0	t	-	-	-	-	-	-
12:0	2.99	2.83	0.74	0.46	0.77	0.72	1.02
14:0	7.65	8.05	13.15	8.75	14.02	12.81	10.27
15:0	0.83	0.52	0.43	0.68	0.70	1.97	3.56
16:0	31.26	28.49	32.54	30.47	32.37	29.10	27.67
17:0	0.27	0.14	-	-	-	0.32	t
18:0	0.28	0.97	0.30	0.20	0.23	0.32	t
<b>Branched</b>							
13:0 iso	0.12	1.04	t	0.46	t	0.12	0.40
14:0 iso	-	t	-	-	-	-	-
15:0 iso	t	6.80	1.26	3.55	1.27	2.17	3.51
15:0 anteiso	-	0.38	-	-	-	-	-
16:0 iso	-	0.26	-	-	-	-	-
17:0 iso	-	5.16	0.47	1.28	0.25	0.52	0.68
17:0 anteiso	-	0.39	-	-	-	-	-
19:0 iso	-	-	-	-	-	0.20	-
19:0 10methyl	0.49	-	-	-	-	-	0.41
<b>Hydroxy</b>							
12:0 3OH	0.39	0.37	1.16	1.43	0.67	1.39	0.78
13:0 iso 3OH	-	-	-	0.15	-	-	-
15:0 iso 3OH	-	0.63	0.38	1.07	0.20	1.16	1.58
16:0 3OH	0.97	-	-	0.80	0.25	0.33	-
<b>Unsaturated</b>							
13:1 at 12-13	0.27	-	-	-	-	-	0.15
15:1 iso F	-	0.39	-	-	-	-	0.13
16:1 cis 9	-	0.14	-	-	-	-	-
16:1 cis 5	0.20	0.55	t	-	-	t	-
17:1 iso cis 9	-	2.74	-	0.41	-	0.19	0.30
17:1 cis 8	t	-	-	-	-	-	-
18:1 cis 9	-	0.10	0.44	-	0.15	0.16	-
18:1 cis 7	17.30	12.67	10.45	8.25	10.79	9.56	9.53
18:1 cis 5	-	0.10	-	-	-	-	-
<b>Cyclo</b>							
17:0 cyclo	4.44	4.86	11.23	14.51	10.55	12.32	10.55
19:0 cyclo cis 8	0.49	-	-	-	-	-	0.41

∴ not detected, t: trace

또한 선충 배양시 공생박테리아 역시 인공증식 배지의 조성이나 온도에 의해서 포화지방산과 불포화지방산 등의 함량에 차이를 나타내고 있으며, 또한 이로 인해 선충의 살충성, 증식력 및 보관에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(15). 그러나 곤충병원성 선충과 공생박테리아의 상호 작용기작 및 지방산 성분과의 관계에 대한 자료는 미흡한 실정이며, 추후 이에 대한 연구가 더 수행되어야 할 것으로 사료된다.

## 요 약

*Steinernematidae*와 *Heterorhabditidae*속에 속하는 7종의 곤충병원성 선충으로부터 매우 강한 살충성을 갖는 공생박테리아를 분리하여 그 종별 특성을 비교하였다. 분리된 공생박테리아의 종별 배양특성, 살충특성, 단백질 분해 효소의 활성 및 지방산 함량 등이 조사되었다. XR-PC 및 XR-MK의 성장 및 살충성이 가장 우수한 것으로 나타났으며 대수증식기 초기에 살충성이 가장 높은 반면에, 시간이 지남에 따라 살충

성도 점차 감소되었다. 이 살충성은 protease 역가와 직접 관련이 없었으나 XR-DR의 경우 다른 종에 비해 배양 3일째 약 4.5배의 최대 활성을 보였다. 그러나 HE-HY의 경우 균체의 성장에 비례하여 protease 역가도 계속 증가하였다. 지방산 함량의 경우 특히 공생박테리아의 종별로 12:0, 14:0, 16:1 cis 5, 17:0 cyclo에서 지방산 함량의 차이를 크게 나타내었으며 hydroxy와 branch 지방산이 전체 지방산의 약 2-15%까지 변화하는 것으로 나타났다.

## REFERENCES

- Hominick, W. M. (1990), Entomopathogenic Rhabditid nematodes and pest control, *Parasitology Today*, **6**, 148-152.
- Hurlber, R. E., Xu, J. and C. L. Small (1994), Colonial and cellular polymorphism in *Xenorhabdus luminescens*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 1136-1143.
- Klein, M. G. (1990), Efficacy against Soil Inhabiting

- Insect Pests, In *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*, R. Gaugler and H. K. Kaya, Eds., CRC Press, Florida.
4. McInerney, B. V., Gregson, R. O., Lacey, M., Akhurst, R. J., Lyons, G. R., Rhodes, S. H., Smith, D. R., Lutz, J. M. E. and A. H. White (1991), Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp., I. Dithiopyrrolone derivatives with antibiotic activity, *J. Natural Products*, **54**, 774-784.
  5. Akhurst, R. J. (1980), Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp. bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*, *J. Gen. Microbiol.* **121**, 303-309.
  6. Schmidt, T. M., Kopecky, K. and K. H. Neelson (1989), Bioluminescence of the insect pathogen *Xenorhabdus luminescens*, *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 2607-2612.
  7. Boemare, N. and R. J. Akhurst (1988), Biochemical and physiological characterization of colony form variants in *Xenorhabdus* spp.(Enterobacteriaceae), *J. Gen. Microbiol.* **134**, 751-761.
  8. Richardson, W. H., Schmidt, T. M. and K. H. Neelson (1988), Identification of an anthraquinone pigment and a hydroxystilbene antibiotic from *Xenorhabdus luminescens*, *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 1602-1605.
  9. Boemare, N., Laumond, C. and J. Luciani (1982), Occurrence of toxicogenesis by the entomogenous germ free nematode *Neoaplectana carpocapsae* Weiser in the germ free insect *Galleria mellonella* L, *Comptes Rendus Academy Science Series III: Life Sciences*, **295**, 543-546.
  10. Bedding, R. A. and A. S. Molyneux (1982), Penetration of insect cuticle by infective juveniles of *Heterorhabditis* spp.(Heterorhabditidae: Nematoda), *Nematologica*, **28**, 354-359.
  11. Schmidt, T. M., Bleakley, B. and K. H. Neelson (1988), Characterization of an extracellular protease from the insect pathogen *Xenorhabdus luminescens*, *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 2793-2797.
  12. Ensign, J. C., Bowen, D. J. and S. B. Bintrim (1990), Crystalline inclusion proteins and an insecticidal toxin of *Xenorhabdus luminescens* strain NC-19, *Proceedings and Abstracts, 5th International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control*, Adelaide, 218-221.
  13. Dunphy, G. B. and J. M. Webster (1998), Virulence mechanism of *Heterorhabditis heliothidi* and its bacterial associate, *Xenorhabdus luminescens*, in non-immune larvae of the dauer wax moth, *Galleria mellonella*, *Int. J. Parasitol.* **18**, 729-737.
  14. Hatab, M. A., Gaugler, R. and R. Ehlers (1998), Influence of culture method on *Steinernema glaseri* lipids, *J. Parasitology*, **84**, 215-221.
  15. Hatab, M. A. and R. Gaugler (1997), Growth-mediated variations in fatty acids of *Xenorhabdus* spp., *J. Appl. Microbiol.* **82**, 351-358.
  16. Yu, Y. S. (2001), Isolation and Characterization of a Bacterial Symbiont from Entomopathogenic Nematodes, Ph.D. Dissertation, Dept. of Chemical Engineering, Keimyung University.
  17. Akhurst, R. J. and G. Dunphy (1993), Tripartite interactions between symbiotically associated entomopathogenic bacteria nematodes, and their insect hosts, *In parasites and pathogens of insects*, N. Beckage, S. Thompson, and B. Federich, Eds., Academic Press, New York.
  18. Dunn, P. E. and D. R. Drake (1983), Fate of bacteria injected into nature and immunized larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, *J. Invest. Pathol.* **41**, 77-85.
  19. Ryu, K. G., Bae, J. S. and S. H. Park (1999), Extracellular protease production from *Xenorhabdus nematophilus*, a symbiotic bacterium of entomopathogenic nematodes, *Biotechnol. Bioproc. Eng.* **4**, 147-150.
  20. Osterhout, G. J., Shull, V. H. and J. D. Dick (1991), Identification of clinical isolates of gram-negative nonfermentative bacteria by an automated cellular fatty acid identification system, *J. Clin. Microbiol.* **29**, 1822-1830.
  21. Janse, J. D. and P. H. Smits (1990), Whole cell fatty acid patterns of *Xenorhabdus* species, *Lett. Appl. Microbiol.* **10**, 131-135 (1990).
  22. Boe, B. and J. Gjerde (1980), Fatty acid patterns in the classification of some representatives of the families Enterobacteriaceae and Vibrionaceae, *J. Gen. Microbiol.* **116**, 41-49.