

항선충성 *Bacillus thuringiensis* 108균주의 분리와 특성

이재훈 · 류은주¹ · 김광현*

동의대학교 생명응용학과, ¹한서대학교 미용학과

Isolation and Characterization of a Nematicidal *Bacillus thuringiensis* strain 108. Lee, Jae-Hun, Eun-Ju Ryu, and Kwang-Hyeon Kim*. Department of Life Science and Biotechnology, Dong-eui university, Pusan, 614-714, Korea, Department of Cosmetology, Han-Seo University, Seosan-si, Chungcheongnam-do 356-706, Korea – *Bacillus thuringiensis* strain 108 was isolated from soil and had nematicidal activity against second stage juvenile of plant root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. The strain 108, a rod shape, spore forming and Gram positive bacterium, produced lecithinase, catalase, and δ -endotoxin. The strain 108 belongs to H serotype 3, *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. A nematicidal substance of the strain 108 was partially purified on Sephadex G-25 gel filtration, activated carbon adsorption, silica gel adsorption, and Sephadex G-10 gel filtration. LC₉₀ of the partially purified substance against *M. incognita* was 1.2 μ g/ml. The nematicidal substance was stable by heat treatment at 100°C for 1hr, but was perfectly lost nematicidal activity after autoclave (110°C, 30 min).

Key words: Nematicidal toxin, *Bacillus thuringiensis*, *Meloidogyne incognita*, plant root-knot nematode

서 론

토양 내에 서식하는 선충류는 식물의 연작장애의 중요한 요인으로 인식되고 있다. 여러 선충류 중에서도 뿌리에 기생하여 혹을 형성하는 뿌리혹 선충류는 우리나라 시설재배 단지의 중요한 해충으로 각종 채소 및 화훼류에서 피해가 많이 나타나고 있다. 오늘날 선충을 방제하기 위한 방법으로 화학적 살선충제를 뿌리거나[7, 15], 물리적인 방법, 즉 비닐을 피복하여 태양열을 이용한 토양온도를 높여서 토양 내의 선충 밀도를 낮추는 방법[16]을 사용하거나, 연작을 통하여 선충 감염 피해가 적은 식물의 재배로 선충 밀도를 낮추는 후

에 다시 경작을 하는 방법[3]도 택하고 있다. 화학약제에 의한 뿌리혹 선충의 방제는 환경오염뿐만 아니라 무분별한 살균작용에 따른 토양 내의 유용 미생물의 피해도 가중되어 토양을 척박하게 하는 원인이 된다. 또한 물리적인 방법은 선충 구제에 많은 시간을 요하기 때문에 새로운 방법으로 생물학적 선충방제가 1900년대 초부터 연구되고 있다. 최근까지 뿌리혹 선충에 대한 생물학적 방제로 시도된 미생물로서는 *Tricoderma harzianum*, *Verticillium lecanii*, *Pochonia chlamydosporia*, *Hirsutella rhossiliensis* 및 *Paecilomyces lilacinus* 등이 알려져 있다[8-10, 13, 17].

최근 연구에 의하면 *Bacillus thuringiensis* 균들은 모기나 나방류에 독성을 나타내어 미생물 농약으로 이미 시판되고 있으나, 이외에도 Hymenoptera, Homoptera, Orthoptera 및

Mallophaga 등의 여러 곤충 종에 대해서도 독성을 가지며 [4], 또한 nematodes, mites 및 protozoa 등과 같이 비곤충에도 독성을 나타낸다는 보고가 있다[5]. 특히, 이 등[11]은 토마토 뿌리혹 선충 *Meloidogyne incognita*에 치사력이 있는 *B. thuringiensis* BtTH109 균주를 분리하여 선충방제의 가능성을 확인하였다. 따라서 본인은 *B. thuringiensis*균이 생산하는 다양한 독성물질과 숙주에 대한 다양성으로 볼 때 뿌리혹 선충에 독성을 나타내는 *B. thuringiensis*이 존재할 가능성이 있다고 생각되어 항선충성 *B. thuringiensis* 균주를 분리 선별코자 하였다.

재료 및 방법

대상 식물과 뿌리혹 선충

뿌리혹 선충은 *Meloidogyne incognita*를 사용하였으며, 부산 원예시험장의 박동근 박사로부터 얻었다. 뿌리혹 선충의 숙주로는 토마토(*Lycopersicon pimpinellifolium*, 김해종묘)를 시중에서 구입하여 사용하였다.

균 분리 및 배양

B. thuringiensis 균주의 분리는 부산 근교의 토양을 채취하여 사용하였다. 먼저 토양 0.2 g이 들어있는 Eppendorf tube에 멸균수 1 ml을 넣은 다음 포자 형성균이 아닌 대부분의 영양세균을 죽이기 위하여 80°C에서 10분 동안 열처리를 행하고 즉시 냉각시켰다. 냉각된 토양 부유액 100 μ l은 PYG 한천배지(Glucose 1.0%, Peptone 0.5%, Yeast extract 0.5%, K₂HPO₄ 0.1%, Agar 1.5%)에 10³배까지 10배씩 단계적으로 희석하여 도말하고, 28°C에서 2-3일 동안 배양하

*Corresponding author

Tel: 82-51-890-1533, Fax: 82-51-890-1532

E-mail: kimkh@deu.ac.kr

였다. 그 후 형성된 colony는 위상차 현미경으로 관찰하여 포자와 결정성 내독소를 함유한 균주들을 *B. thuringiensis* 균주로 분리하였다.

시료조제 및 항선충성 *B. thuringiensis*의 선별

분리된 *B. thuringiensis* 들은 20 ml의 PYG배지가 함유된 100 ml 삼각 플라스크에 1백금이 접종하여 28에서 3-5일 동안 액체배양하였다. 각 균주의 배양액은 3 ml씩 취하여 13,000rpm에서 5분 동안 원심분리 하여 침전물을 모았다. 그 후 침전물은 멸균수로 3회 세척 하고 50mM Na₂CO₃(pH 10.8)에 현탁하여 37°C에서 1시간 동안 용해를 시켰다. 알카리로 용해된 용액은 다시 13,000rpm에서 5분 동안 원심분리를 행하여 침전물은 제거하고, 그 상등액 0.3 ml를 24-well culture plate의 각 well에 주입하고 0.1M phosphate buffer (pH 7.0) 0.6 ml을 가하여 pH를 8.0으로 조정 한 후 28°C에서 부화시킨 뿌리혹 선충의 2령 유충을 투여하여 항온기(24hr 28°C)에 방치한 후 입체현미경으로 관찰하여 뿌리혹 선충에 대해 치사력이 있는 균주를 선별하였다. 이때 대조군으로 *B. thuringiensis* var *kurstaki* HD-1의 알카리 용해액이 사용되었다.

뿌리혹 선충에 대한 독성 실험

뿌리혹 선충의 난낭을 감염된 토마토 뿌리에서 채취하여 24well culture plate에 0.8% saline 1 ml/well을 넣고 28°C 항온기에서 24시간 동안 방치하여 난(egg)을 부화시켜서 2령 유충의 수가 60-80마리/100 μ l가 되도록 준비하였다. 미리 준비된 시료(항선충성 물질)는 24-well culture plate의 각 well에 100-200 μ l씩 넣고 운동성이 강한 유충용액 100 μ l (60-80마리)를 첨가시킨 후 증류수로 전체량이 1가 되도록 조절하였다. 그 후 24-well culture plate내에 들어 있는 유충은 28 항온기에서 24시간 방치시킨 후 운동성이 있는 선충과 운동성이 완전히 소실된 선충의 수를 현미경 하에서 측정하였다.

항선충성 물질의 정제

선별균주에서 생산되는 항선충성 물질을 정제하기 위해 먼저 선별된 *B. thuringiensis* 108 (Bt 108)균주의 배양액을 원심분리(8,000rpm, 20min) 하였다. 침전된 pellet은 멸균수로 3회 세척한 다음 50mM Na₂CO₃(pH 10.8)에 현탁하여 용해(37°C, 1시간)시켰다. 그 후 다시 원심분리 하여 알카리로 용해된 상층액을 취하고 50°C에서 배양액의 1/100이 될 때까지 진공 농축을 하였다. 농축된 시료는 미리 Sephadex G-25(Sigma Chem. Co.)로 충전된 column(Φ 1.5 \times 35 cm, Pharmacia)에 3 ml를 주입하고 3 ml/tube로 분획(flow rate 0.6 ml/min)하였다. 각 분획시료는 뿌리혹 선충의 2령 유충에 대한 치사력을 측정하여, 항선충성 활성을 가진 분획들을 모아 진공 농축하였다. 이 농축액은 미리 활성탄으로 충

진된 column(Φ 1.5 \times 50 cm)에 흡착시키고 아세톤으로 용출시켰다. 활성탄 컬럼에서 아세톤으로 용출된 물질은 뿌리혹 선충에 대한 치사력을 측정하여, 항선충 활성을 가지는 분획을 모아 진공 농축시켰다. 이 농축액은 다시 silica gel(Sigma Chem. Co.)로 충전된 컬럼(Φ 1.5 \times 12 cm)에 0.1 ml을 주입하고 용매(H₂O : Acetonitrile : Methanol : Isopropanol = 140 : 30 : 10 : 20)로 1 ml씩 분획하여 각 분획된 용액은 완전히 진공 농축하여 유기용매를 제거시킨 후 뿌리혹 선충에 대한 치사력을 측정하고, 항선충 활성을 가지는 분획을 모아 진공 농축시켰다. 이 농축액은 미리 Sephadex G-10(Sigma Chem. Co.)로 충전된 컬럼(Φ 1.5 \times 85 cm, Pharmacia)에 주입(0.5 ml)하고 3 ml/tube씩 분획(flow rate 0.6ml/min)한 후 각 분획시료에 대해 뿌리혹 선충의 유충에 대한 치사력을 측정하였다.

결과 및 고찰

항선충성 *B. thuringiensis* 균주의 선별 및 특성

항선충 활성을 가지는 *B. thuringiensis* 균주를 분리하기 위하여 부산 근교의 다양한 토양 (200시료) 으로부터 1984 균주들을 분리하였다. 이들 중에서 선충에 대해 치사율이 높은 균주 108번을 선별하였다(Table 1).

선별된 항선충성 108 균주를 위상차 현미경으로 관찰한 결과 *Bacillus*형이며, 내생포자를 형성하고 또한 전형적인 bipyrmaid형의 내독소를 함유하고 있었다. 또한 선별된 108 균주의 생화학적 특성을 조사해본 결과 Gram양성이며, 포자를 형성하고, 운동성이 활발하며, lecithinase 및 catalase활성을 나타내었다. 따라서 분리균주 108은 내독소를 생성하는 전형적인 *B. thuringiensis*에 속하며, 편모항원성으로 분류한 결과 H serotype 3으로서 표준균주인 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*의 편모항원성과 일치하였다(Table 2).

일반적으로 *B. thuringiensis*의 독소 중에서도 β -exotoxin이 선충에 대한 치사력을 가지고 있다고 알려져 있으나[12], β -exotoxin생성은 몇 종의 *B. thuringiensis* serovar에 국한되어 있으며[6] 특히, *kurstaki*에서는 β -exotoxin이 생성된다는 보고가 없다. 또한, 실험방법에서 기술한 바와 같이 *B. thuringiensis* 108 균주의 배양 상층액은 제거하고 남은 침전

Table 1. Nematicidal activity of *B. thuringiensis* strain 108 in vitro

Incubation time (hr)	Number of nematode			
	Sample		Control	
	Alive	Dead	Alive	Dead
0	60 \pm 8	7 \pm 4	58 \pm 6	5 \pm 2
24	15 \pm 5	48 \pm 7	55 \pm 5	8 \pm 3
Mortality (%)	76 \pm 8		13 \pm 4	

As control, extract of *B. thuringiensis* strain HD-1 with 50mM Na₂CO₃ was used.

Table 2. Biochemical characteristics of *B. thuringiensis* strain 108

characteristics	strains	Bt 108	Bt HD-1
Morphology		Rod	Rod
Gram stain		+	+
Spore production		+	+
Motility		+	+
δ -endotoxin shape		Bipyramidal	Bipyramidal
Catalase production		+	+
Lecithinase production		+	+
H serotype		3	3
Nematicidal activity		+	-

Symbols: +; positive, Bt 108; *B. thuringiensis* strain 108, Bt HD-1; *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1.

물을 알카리로 가수분해하여서 얻은 산물임으로 β -exotoxin 이 아닌 알카리 분해물질이 선충의 유충에 대한 독성을 나타내었다는 점이 특이하였다. 한편, Bt 108균주의 산(HCl)이나 유기용매(MeOH, Acetone, EtOAc, CH_2Cl_2)를 사용하여 추출된 용액에서 선충에 대한 독성실험을 행하였으나 전혀 활성이 나타나지 않았다.

뿌리혹 선충에 대한 독성물질의 정제

선별된 *B. thuringiensis* 108 균주를 배양하여 원심분리하여 모든 침전물에서 알카리 용해액을 조제하여 Sephadex G-25 gel filtration을 하였다. 그 결과 2개의 main peak를 얻었으며, 이 중 peak 2 (fraction no.21-31)에서 선충에 대한 치사력을 나타내었고, 약 70 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 항선충성 물질에서 90% 이상의 유충이 치사되었으며, 이때 표준물질로서 AMP (sigma)를 기준으로 산출하였다. Sephadex G-25에서 선충에 대해 치사활성을 나타내는 분획을 다시 활성탄에 흡착시킨 결과 항선충성 물질은 활성탄에 흡착이 되었으며, 아세톤으로 용출된 부분에서 항선충 활성이 나타났으며, 26 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 90%이상의 치사활성을 나타내었다. 활성탄에 흡착된 분획은 다시 모아서 silica gel에 흡착시켰으며, 그 결과 3개의 main peak를 얻을 수가 있었으며, 이 중 2번째 peak (fraction no. 13-21)에서 유충에 대한 강한 치사력이 나타났

Table 4. Heat stability of the nematicidal substance

Incubation time(hr)	Number of nematode							
	Sample treated with heat						Control	
	None treatment		100°C (1hr)		110°C (30 min)		Alive	Dead
	Alive	Dead	Alive	Dead	Alive	Dead	Alive	Dead
0	83 \pm 12	5 \pm 3	90 \pm 17	4 \pm 2	85 \pm 12	2 \pm 1	94 \pm 15	2 \pm 1
24	3 \pm 2	80 \pm 10	8 \pm 5	86 \pm 13	81 \pm 11	4 \pm 2	87 \pm 12	8 \pm 4
Mortality(%)	96 \pm 12		91 \pm 10		5 \pm 3		8 \pm 5	

As control, extract of *B. thuringiensis* strain HD-1 with 50 mM Na_2CO_3 was used.

Table 3. LC₉₀ against the 2nd juvenile during purification of the nematicidal substance

Fraction	Nematicidal activity LC ₉₀ ($\mu\text{g/ml}$)
Cells lysated	78 \pm 12
Sephadex G-25	70 \pm 10
Activated carbon	26 \pm 7
Silica gel adsorption	6,2 \pm 1.2
Sephadex G-10	1.2 \pm 0.3

으며, 6.2 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 90% 이상의 치사력을 나타내었다. Silica gel 흡착 fraction 중 선충에 치사력을 가진 peak 2 부분을 농축하여 Sephadex G-10 gel filtration를 행하였다. 그 결과 2개의 peak가 나타났으며 이 중 peak 1 (fraction no. 26-34)에서 선충에 강한 치사력을 나타내었으며, 이 때 90% 이상의 치사력을 가지는 농도는 1.2 $\mu\text{g/ml}$ 였다(Table 3).

항선충성 물질의 열안정성

항선충성 물질의 열에 대한 안정성을 조사하기 위해 100°C에서 1시간 동안 열처리하였다. 그 결과 Table 4에서 보는 바와 같이 열처리(100°C, 1 hr)된 항선충성 물질은 유충에 대한 치사활성을 잘 유지하였다. 그러나, 항선충성 물질을 고압멸균(110°C, 15min)한 결과는 유충에 대한 치사력이 완전히 소실되었다. 이는 *B. thuringiensis* 108균주가 생산하는 항선충성 물질은 UV spectrum에서 256nm에서 최대 흡광도를 나타내었으며, 적어도 β -exotoxin과는 다소 차이가 있다는 것을 강하게 시사하고 있다. Mozgovaya 등[14]은 토양에서 *B. thuringiensis*의 항선충성 효과가 내열성인 β -exotoxin이외에도 thermo-labile factor에 의해서도 나타난다고 제안하였으나, 이 thermo-labile factor는 spore나 내독소(δ -endotoxin)의 단백질이나 peptide라고 추측하고 있으나 그에 대한 구조나 특성에 대해서는 전혀 알려져 있지 않으며, Borgonie 등[1]도 유사한 제안을 하였다.

*B. thuringiensis*가 생산하는 독소에는 α -exotoxin, β -exotoxin, δ -endotoxin 외에 여러 종류의 protease[2]와 chitinase[18] 등이 존재한다. 항선충성 *B. thuringiensis* 108 균주의 선충에 대한 독성물질은 β -exotoxin과 비교해 볼 때

1) β -exotoxin은 배양용액에 존재하지만 이 독성물질은 배양액에는 존재하지 않으며 균체를 파쇄하여 분획하였다는 점(실험방법)과 2) β -exotoxin은 열에 강하여 autoclave (110 °C, 30 min)후에도 선충에 대한 독성이 유지되지만 본 균주의 독성물질은 autoclave 후에는 완전히 독성을 소실한다는 점(Table 4) 및 3) 분리된 108균주는 kurstaki와 동일한 serotype 3로 분류되었으며 이 serotype 3에서는 지금까지 β -exotoxin을 생성한다는 보고가 없다는 점[6]에서 차이가 있다.

결론적으로 *B. thuringiensis* 108균주가 생산하는 항선충성 물질은 β -exotoxin과는 차이가 있는 비교적 열에 안정한 물질이라고 사료된다.

요 약

식물 뿌리혹 선충인 *Meloidogyne incognita*에 살충성이 있는 *Bacillus thuringiensis* 108 균주를 분리 선별하였다. 이 균주는 Gram양성이며, 포자를 형성하고, 운동성이 활발하며, lecithinase 및 catalase활성을 나타내었다. 이 균주가 생산하는 결정형 내독소(d-endotoxin)는 bipyrmid형이었고, 편모항원성에 따른 균주의 동정 결과 serotype 3으로 표준 균주인 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*의 편모항원성과 일치하였다.

B. thuringiensis 108 균주의 항선충성 물질은 Sephadex G-25 gel filtration, 활성탄 흡착 chromatography, Silica gel 흡착 chromatography 및 Sephadex G-10 gel filtration을 이용하여 정제를 하였다. 최종 정제단계인 Sephadex G-10 gel filtration 후에 항선충 물질의 LC₉₀는 1.2 µg/ml이었다.

B. thuringiensis 108 균주가 생산하는 항선충성 물질은 100°C 열처리에서 안정하였으나 autoclave(110°C 30 min)를 했을 때는 그 독성이 완전히 소실되었다.

감사의 말

본 연구는 2006년도 동의대학교 학술연구비 지원에 의한 논문임.

REFERENCES

- Borgonie, G., Claeys, M., Leyns, F., Arnaut, G., Dewaele, and D., Coomans, A. 1996. Effect of nematicidal *Bacillus thuringiensis* strains on free-living nematodes. 1. Light-microscopic observations, species and biological stage specificity and identification of resistant mutants of *Caenorhabditis elegans*. *Fundamental and Applied Nematology*. **19**: 391-398.
- Brar, A. K., M. Verma, R. D. Tyagi, R. Y. Surampalli, S. Barnabe, and J. R. Valero. 2007. *Bacillus thuringiensis* protease: production and role in growth, sporulation and synergism. *Process Biochemistry*. **42**: 773-790.
- Buena, A. P., A. Garcia-Alvarez, M. A. Diez-Rojo, C. Ros, P. Fernandez, A. Lacasa, and A. Bello. 2007. Use of pepper crop residues for the control of root-knot nematodes. *Bioresource Technology*. **98**: 2846-2851.
- Feitelson, J. S. 1993. The *Bacillus thuringiensis* family tree, pp. 63-71. In L. Kim (ed.), *Advanced engineered pesticide*. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.
- Feitelson, J. S., J. Payne, and L. Kim. 1992. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. *Bio/Technology* **10**: 271-275.
- Hernandez, C. S., C. Martinez, M. Porcar, P. Caballero, and J. Ferre. 2003. Correlation between serovars of *Bacillus thuringiensis* and type I beta-exotoxin production. *J. Invertebr. Pathol.* **82**: 57-62.
- Hutchinson, C. M., M. E. McGiffen, H. D. Ohr, J. J. Sims, and J. O. Becker, 1999. Efficacy of methyl iodide soil fumigation for control of *Meloidogyne incognita*, *Tylenchulus semipenetrans* and *Heterodera schachtii*. *Nematology* **1**: 407-414.
- Jaffee, B. A. 2000. Augmentation of soil with the nematophagous fungi *Hirsutella rhossiliensis* and *Arthrobotyla*. *Phytopathology*. **90**: 498-504.
- Kerry, B., and L. Hidalgo-Diaz. 2004. Application of *Pochonia chlamydosporia* in the integrated control of root-knot nematodes on organically grown vegetable crops in Cuba, pp. 123-126. In R. A. Sikora, S. Gowen, R. Hauschild, S. Kiewnick (eds.), *Multitrophic interactions in soil*. vol. **27**, IOBC/wprs Bull.
- Lara, J., N. Acosta, C. Betancourt, N. Vincente, and R. Rodriguez. 1996. Biological control of *Meloidogyne incognita* in tomato in Puerto Rico. *Nematropica*. **26**: 143-152.
- Lee, K. B., K. H. Kim and Y. H. Kim 1994. Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strain BtTH109 which is toxic against root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 227-232.
- Levinson, B. L., K. J. Kasyan, S. S. Chiu, T. C. Currier and J. M. Jr. Gonzalez. 1990. Identification of β -exotoxin Production, Plasmids Encoding β -exotoxin, and a New Exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by Using High-Performance Liquid Chromatography. *J. Bacteriol.* **172**: 3172-3179.
- Meyer, S. L. F. 1999. Efficacy of the fungus *Verticillium lecanii* for suppressing root-knot nematode egg numbers on Cantaloupe roots. *HortTechnology*. **9**: 443-447.
- Mozgovaya, I. N., B. A. Byzov, N. F. Ryabchenko, N. D. Romanenko, and D. G. Zvyagintsev. Nematicidal effects of the entomopathogenic bacteria *Bacillus thuringiensis* in soil. *Pedobiologia* **46**: 558-572.
- Nico, A. I., R. M. Jimenez-Diaz, and P. Castillo. 2004. Control of root-knot nematodes by composted agro-industrial wastes in potting mixtures. *Crop Prot.* **23**: 581-587.

16. Oka, Y., N. Shapira, and P. Fine. 2007. Control of root-knot nematodes in organic farming systems by organic amendments and soil solarization. *Crop Prot.* in press.
17. Sharon, E., M. Bar-Eyal, I. Chet, A. Herrera-Estrella, O. Kleifeld, and Y. Spiegel. 2001. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Tricoderma harzianum*. *Phytopathology*. **91**: 687-693.
18. Wiwat, C., S. Thaitanun, S. Pantuwatana, and A. Bhumiratana. 2000. Toxicity of chitinase-producing *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* HD-1 (G) toward *Plutella xylostella*. *J. Invertebr. Pathol.* **76**: 270-277.

(Received July 4, 2007/Accepted Aug. 28, 2007)