

# *Xenorhabdus* 및 *Photorhabdus* 세균 배양액을 이용한 생물농약 개발에 관한 연구

서삼열 · 김용균\*

안동대학교 자연과학대학 생명자원과학과

## Study on Development of Novel Biopesticides Using Entomopathogenic Bacterial Culture Broth of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*

Samyeol Seo and Yonggyun Kim\*

Department of Bioresource Sciences, Andong National University, Andong 760-749, Korea

**ABSTRACT:** Two groups of entomopathogenic bacteria, *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*, are known to suppress insect immune responses by inhibiting eicosanoid biosynthesis. This study used these bacterial culture broths to develop novel biochemical insecticides against the diamondback moth, *Plutella xylostella*. Though the bacterial culture broths alone showed little insecticidal activity, they significantly enhanced pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* against the fourth instar larvae of *P. xylostella*. Sterilization of the bacterial culture broth by autoclaving or 0.2 μm membrane filtering did not influence the synergistic effect on the pathogenicity of *B. thuringiensis*. Three metabolites identified in the culture broth of *X. nematophila* also showed similar synergistic effects. In field test, both entomopathogenic bacterial culture broth also enhanced the control efficacy of *B. thuringiensis* against *P. xylostella*.

**Key words:** *Xenorhabdus*, *Photorhabdus*, Biochemical insecticide, *Plutella xylostella*, *Bacillus thuringiensis*, Integrated biological control

**초 록:** *Xenorhabdus* 및 *Photorhabdus* 두 곤충병원세균은 곤충의 아이코사노이드 생합성을 억제하여 면역작용을 저하시키는 인자로 알려지고 있다. 본 연구는 이들 세균의 배양액을 이용하여 배추좀나방(*Plutella xylostella*)을 방제하는 새로운 생화학농약을 개발하려 추진되었다. 두 세균 배양액의 단독 처리는 배추좀나방의 생존력에 뚜렷한 영향을 주지 않았다. 그러나 비티(*Bacillus thuringiensis*) 생물농약과 혼합하여 처리할 경우 비티 단독 처리에 비해 배추좀나방 4령충에 대해서 현격하게 높은 병원성 증가 효과를 주었다. 배양액의 세균 활성을 조사하기 위해 이 세균 배양액을 고온 멸균 및 0.2 μm 여과 멸균 처리하였다. 이렇게 처리된 멸균 배양액은 세균이 생존했던 배양액과 차이 없이 비티 생물농약의 병원력을 상승시켰다. *X. nematophila* 배양액에서 유래된 세 가지 대사물질도 세균배양액과 유사한 비티 병원력 상승효과를 보였다. 야외 배추좀나방 방제 시험에서도 세균배양액은 비티 생물농약의 방제기를 상승시키는 효과를 나타냈다.

**검색어:** 곤충병원세균, 생화학농약, 배추좀나방, 비티, 종합생물방제

생화학농약은 유용 생명체 유래 추출물질로 구성된 생물농약의 일종이다(Corpping and Menn, 2000). 살아있는 미생물을 활성 성분으로 하는 미생물농약과 구분지어, 생화학농약은 천연물 유래 추출물질로서 미생물, 식물, 조류 및 갑각류의 유래물질 등을 포함하게 된다(Corpping, 2004). 여기에 페로몬과 같은 신호 물질이 포함되기도 한다. 이를

개발하기 위해서 우선 다양한 생명체에 대한 유용성과 1차 스크리닝 단계로 후보물 도출 단계를 거쳐 추출물의 활성농도와 활성 물질의 분리 및 구조 동정을 포함하는 발전 단계를 거쳐 포장에서의 효과 검증 및 기초 독성 시험을 통한 개발 단계로 진행되게 된다(Kim, 2009).

미생물농약으로서 국내외적으로 가장 많이 사용되는 *Bacillus thuringiensis*는 Bacillaceae에 속하는 그람양성 간균이며 내세포자를 형성하면서 내독소로 이루어진 살충성 단백질을 생성한다(Tanada and Kaya, 1993). *B. thuringiensis*

\*Corresponding author: hosanna@andong.ac.kr  
Received July 8 2010; revised August 7 2010;  
accepted September 6 2010

의 주요 작용기작은 특이적 살충성 단백질에 기인하기에 비표적 생명체에 대하여 안전하여 친환경 농자재로 이용되고 있다. 현재까지 *B. thuringiensis* 생물농약은 나비목, 파리목, 딱정벌레목에 활성을 나타내며 최근에는 매미목, 메뚜기목 등 그 범위가 확대되고 있다(Schnepf *et al.*, 1998). 살충성 결정 단백질의 작용기작은 일단 *B. thuringiensis*가 경구를 통해 장내로 들어오면 중장의 분해효소들에 의해 내독소 단백질이 활성화되고, 이는 다시 중장 세포막에 존재하는 수용체와 기능적 결합을 하여 중장세포의 손상을 입혀 패혈증을 일으키는 것으로 알려져 있다(Gill *et al.*, 1992). 그러나 독소 단백질의 특이성으로 방제 대상 해충의 범위가 좁고, 화학농약에 비해 비교적 느린 살충성 및 저항성 발현으로 보다 많은 적용 확대가 어려워지고 있다(Tabashnik *et al.*, 2009).

곤충병원세균인 *Xenorhabdus*와 *Photorhabdus*에 속한 종들은 운동성이 있는 그람음성균으로 장내세균에 속한다(Akhurst, 1980). 이들 세균류는 곤충병원선충인 Steinernematidae와 Heterorhabditidae의 두 과에 각각 공생하는 생활사를 보인다(Kaya and Gaugler, 1993). 이들 선충은 상이한 발생 기원을 가지지만, 이들이 보이는 기생 생활사는 수렴성 진화 과정을 통해 유사한 패턴을 보이는 것으로 추정된다(Adams and Nguyen, 2002). 운동성이 있는 감염태 선충이 기주를 찾으면 곤충의 개구부를 통하여 체내로 들어가고 이후 표피세포층을 뚫고 곤충의 혈강으로 침투하게 된다. 혈강에 침입한 감염태 선충은 자신의 특이적 장내 공생세균(Steinernematidae는 *Xenorhabdus*와 Heterorhabditidae는 *Photorhabdus*)을 곤충 혈강으로 내보낸다(Forst *et al.*, 1997). 혈강으로 나온 세균은 자신과 선충기주를 보호하기 위해 대상 곤충의 면역을 억제시킨다(Park and Kim, 2000). 면역기능이 억제된 곤충은 체내에서 세균증식이 이뤄지면서 세균으로부터 나오는 독소단백질과 더불어 대상 곤충의 패혈증을 유발하여 치사시키게 된다(Dunphy and Webster, 1991, 1994; French-Constant *et al.*, 2005). 곤충병원세균인 *X. nematophila* 배양액에서 유기용매추출법을 통하여 분리된 물질인 benzylideneacetone (BZA), proline-tyrosine (PY), acetylated phenylalanine-glycine-valine (Ac-FGV)는 아이코사노이드 생합성을 억제하며 곤충의 면역억제를 유도하였다(Ji *et al.*, 2004; Kwon and Kim, 2008; Shrestha and Kim, 2009).

작물에 주요 해충인 배추좀나방(*Plutella xylostella*)은 나비목 집나방과(Yponomeutoidea)에 속하는 해충으로 전

세계적으로 난방제 해충의 하나이다(Talekar and Shelton, 1993). 이 해충의 경우 생활환이 16일 정도로 연간 발생세대가 많고, 살충제에 의한 노출기회가 많으며 세대가 혼재하여 저항성이 빠르게 나타나고 있는 해충이다(Kim *et al.*, 1990). 따라서 오랜 기간 동안 해충을 방제하기 위하여 살충제를 오남용하여 약제저항성을 나타내 방제에 큰 어려움을 겪고 있다(Park *et al.*, 2004).

본 연구는 난방제 해충인 배추좀나방에 대한 효과적인 생물농약 개발을 목적으로 수행되었다. *Xenorhabdus*와 *Photorhabdus*는 살충성이 높지만, 야외에서 쉽게 활성을 잃어 미생물농약으로 개발이 어렵다. 그러나 이 세균의 배양액에 포함되어 있는 면역억제 물질은 *B. thuringiensis*와 같은 타 미생물 병원체의 작용을 도와 살충효과를 제고시킬 수 있을 것으로 추정되었다(Seo and Kim, 2009). 즉, *Xenorhabdus* 또는 *Photorhabdus* 배양액을 이용한 생화학농약 성분은 *B. thuringiensis*에 가미하여 상호 미생물체가 갖는 약점을 보완하려는 새로운 생물농약 개발로 연구의 초점을 두었다. 이를 위해 본 연구는 두 곤충병원세균의 배양액에서 세균을 제거한 대사물질이 각각 *B. thuringiensis*의 살충효과를 제고시킬 수 있는 지 확인하고, 이 효과를 특히 방제가 어려운 배추좀나방 종령 유충을 대상으로 실내 및 야외 노출실험을 통해 검증하였다. 또한 본 연구는 곤충병원세균 배양액을 생물농약으로 개발하기 위해 이 배양액 유효성분들의 대상 해충에 대한 독성평가도 아울러 병행하였다.

## 재료 및 방법

### 배추좀나방 사육

시험곤충은 안동시 송천동에 소재한 배추밭에서 채집한 유충을 약제 처리하지 않고 실내에서 누대 사육한 것을 실내 약제 노출 실험에 사용하였다. 유충은 온도 25±1℃, 광주기 16:8 h (L:D), 상대습도 40~60%의 배양기에서 배추를 먹이로 사육했다. 성충은 10% 설탕물을 먹이로 배추 잎으로 산란을 유도하였다.

### 세균배양

곤충병원세균인 *X. nematophila*와 *P. temperata temperata*는 기주 선충에서 분리된 후(Park *et al.*, 1999; Kang *et al.*, 2004) 동결보관중인 것을 이용하였다. 이들 균주는 Luria-Bertani (LB) 배지를 이용하여 28℃에서 12시간동안

배양하여 단일 균총을 채취하였다. 채취된 단일 균총을 3 ml의 LB 액체배지를 이용하여 28°C에서 16시간 동안 200 rpm의 속도로 회전 배양한 후, 글리세롤을 30%의 농도가 되도록 첨가하여 동결 분획시료를 만들었다. 이 동결시료가 추후 반복되는 세균 배양의 원시료로 이용되어 계대배양에 따른 세균 번이 가능성을 줄였다. 글리세롤 동결 세균시료 250  $\mu$ l를 1 L의 LB 액체배지에 첨가하고 28°C에서 48시간 동안 200 rpm의 속도로 회전 배양하였다. 이 배양액이 생물 검정과 물질분리에 이용되었다.

**배양액 멸균처리**

배양액은 두 가지의 방법을 사용하여 멸균처리 하였다. 첫째로, 곤충병원세균인 *X. nematophila*과 *P. temperata temperata*를 LB 액체배지에서 48 시간 배양된 100 ml의 용액을 5,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후, 0.2  $\mu$ m 여과필터 (Pall Life Science, New York, Washington, USA)로 세균을 제거하였다. 둘째로, 동일한 방법으로 배양된 세균 배양액을 121°C에서 20 분 동안 고압멸균처리를 하였다.

**생물 검정**

생물농약 *B. thuringiensis*는 (주) 고려바이오(Hwasung, Korea)로부터 공급받았다. 제품 성분은 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Btk)로서 32,000 IU/mg의 활성을 보유하고 있다. LB 배지에서 배양된 곤충병원세균 용액은 각각 실내 실험 및 야외에서 500 ppm 및 1,000 ppm으로 Btk와 혼합처리 하였다. 실험약제인 Btk 및 곤충병원세균 용액은 물을 이용하여 희석하였으며 *X. nematophila* 유래 물질인 BZA (Sigma-Aldrich Korea, Seoul, Korea), PY (Peptron, Daejeon, Korea), Ac-FGV (Peptron)은 dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich Korea)를 이용하여 100,000 ppm의 고농도로 조제하였고, 이를 다시 증류수를 이용하여 희석 현탁액으로 만들었다. 이 현탁액에 배추잎(1 cm)을 10분간 침지시킨 후 여과지가 깔려진 용기(직경 9 cm)에서 5분간 건조시켰다. 각 배추 잎에 배추좀나방 4령충을 10마리씩 3반복으로 처리하였으며, 매일 24시간 주기로 5일 동안 생존수를 계수하였다. 대조구는 Btk 또는 살균수로 상기와 동일하게 처리하였다.

**통계처리**

모든 살충효과 시험 결과는 백분율 자료로서 arcsine 변환 후 SAS의 PROC GLM (SAS Institute, 1989)을 이용하여 ANOVA 분석 및 처리 평균간 비교를 실시하였다.

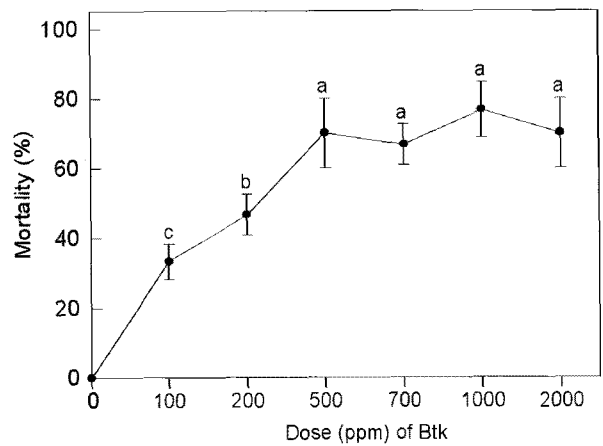


Fig. 1. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Btk) against the last instar larvae of *Plutella xylostella*. Assay used a leaf-dipping method and the resulting mortality was measured at 5 days after the treatment. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test).

**결 과**

**Btk 생물농약 단독 효과**

Btk 생물농약의 단독 효과를 알아보기 위해 이 생물농약을 농도별로 배추좀나방 종령(4령) 유충에 대해 섭식 처리 효과를 분석했다(Fig. 1). 처리된 Btk 용액은 낮은 농도에서도 살충력을 발휘하였지만 살충력이 500 ppm 이상에서는 80% 미만으로 유지되어 처리 농도를 증가시키더라도 통계적으로 차이가 없다는 것을 확인하였다. 따라서 추후 실내 실험에서는 Btk 생물농약을 500 ppm의 농도로 분석하였다.

**Btk 생물농약과 세균배양액의 혼합 상승효과**

*X. nematophila* 또는 *P. temperata temperata* 세균배양액을 혼합한 약제를 이용하여 Btk 생물농약의 살충력을 제고시킬 수 있는지 확인하였다(Fig. 2). 위에서와 같이 다시 Btk 생물농약은 단독으로 살충률이 70~80%로 나타났다. 다시 Btk에 *X. nematophila* 또는 *P. temperata temperata* 세균배양액을 희석하여 혼합하면 살충력이 원액과 1/2배로 희석한 배양액에서는 살충률이 10~20% 증가하는 것을 확인할 수 있었으며 1/5배 희석한 배양액부터는 살충률이 증가하지 않는다는 것을 확인할 수 있었다. 이것으로 *X. nematophila* 또는 *P. temperata temperata* 세균배양액을 Btk 생물농약과 혼합하였을 때 1/2배 희석된 세균배양액으로 원액과 같은 살충률을 기대할 수 있었다.

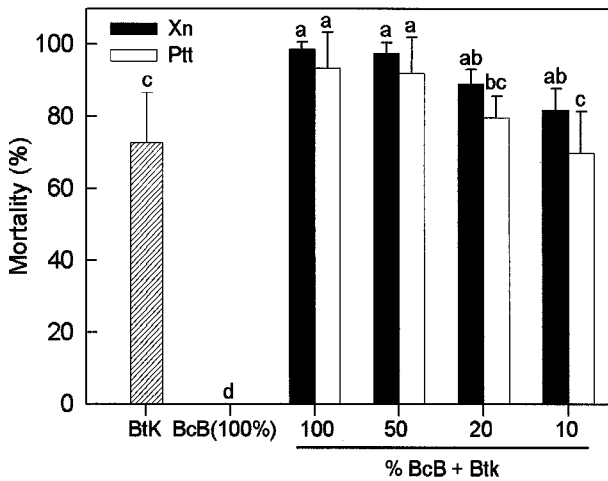


Fig. 2. Cooperative activity of the bacterial culture broth (BcB) of *Xenorhabdus nematophila* (Xn) or *Photorhabdus temperata* subsp. *temperata* (Ptt) on the toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Btk, 500 ppm) against the last instar larvae of *Plutella xylostella*. BcBs were prepared by culturing bacteria in LB broth for different concentrations of BcB were prepared by diluting it with sterilized water. Assay used a leaf-dipping method and the resulting mortality was measured at 5 days after the treatment. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test).

세균배양액 대사물질의 Btk 병원성 상승효과

*X. nematophila* 또는 *P. temperata temperata* 세균배양액에서 세균을 제거하였을 때에 Btk 생물농약의 살충력을 제고시킬 수 있는지 확인하였다(Fig. 3). 먼저 멸균과정을 통해 고온에서 *X. nematophila* 또는 *P. temperata temperata*를 각각 살균시켰고 이렇게 멸균된 배양액을 농도별로 희석하여 Btk 생물농약과 혼합하여 처리하였다(Fig. 3A). 열처리된 세균배양액과 Btk 생물농약을 혼합하면 살충률이 열처리하지 않았던 배양액과 유사하게 10~20% 증가하는 것을 확인하였다. 즉, 열처리를 하여 세균이 사멸되어도 열에 내성을 보였던 대사물질만으로도 통계적으로 차이 없이 Btk 생물농약의 살충력을 증가시킬 수 있다는 것을 확인하였다. 세균배양액을 여과기를 사용하여 세균을 제거한 배양액을 Btk 생물농약과 혼합하여 처리하였다(Fig. 3B). 세균이 제거된 배양액과 Btk 생물농약을 혼합하면 살충률이 위와 같이 10~20% 증가하는 것을 확인하였다. 이상의 결과는 세균의 생존 또는 존재 유무에 상관없이 배양된 세균배양액에는 Btk 생물농약의 효과를 제고시킬 수 있는 활성성분이 존재한다는 것을 의미했다.

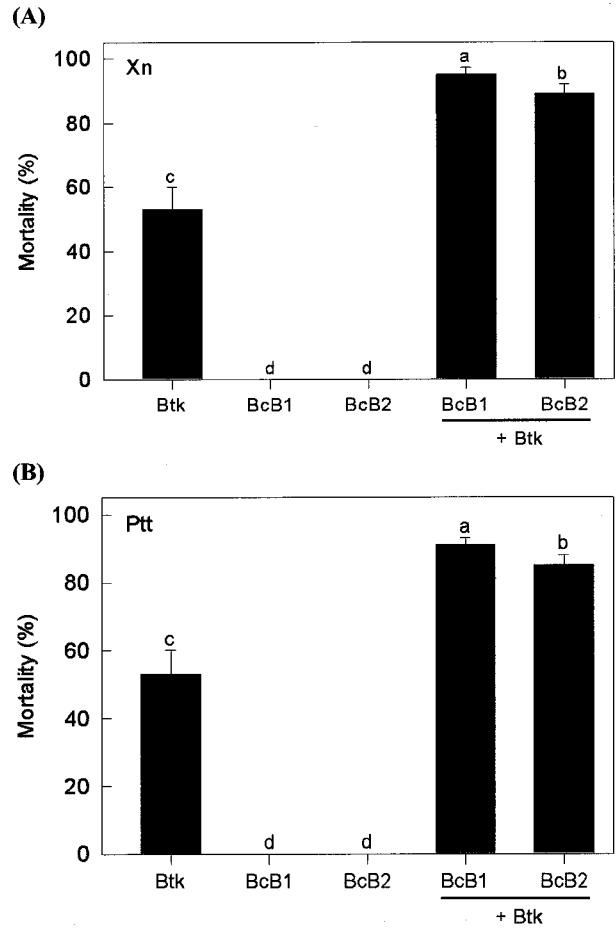


Fig. 3. Metabolite effect of the bacterial culture broth (BcB) on its cooperative activity with *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Btk, 500 ppm) against the last instar larvae of *Plutella xylostella*. BcBs were prepared by culturing bacteria of *Xenorhabdus nematophila* (Xn) or *Photorhabdus temperata* subsp. *temperata* (Ptt) in LB broth for 48 h at 28°C. BcB1 was the BcB autoclaved at 121°C for 20 min at 1.2 atmospheric pressure. BcB2 was the BcB filtered through 0.22 µm. Assay used a leaf-dipping method and the resulting mortality was measured at 5 days after the treatment. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test).

*X. nematophila* 세균배양액 유래물질의 Btk 생물농약 병원성 상승효과

*X. nematophila* 세균 배양액으로부터 유래된 세 물질인 BZA, PY, Ac-FGV의 Btk 생물농약과의 병원성 상승효과를 검정하였다(Fig. 4A). BZA, PY, Ac-FGV를 농도별로 확인하였을 때 BZA 물질이 나머지 두 물질 보다 높게 살충력을 상승시키는 것을 확인하였으며 BZA 물질의 경우 2,000 ppm 이상의 농도에서는 살충률이 위의 세균배양액과 비슷

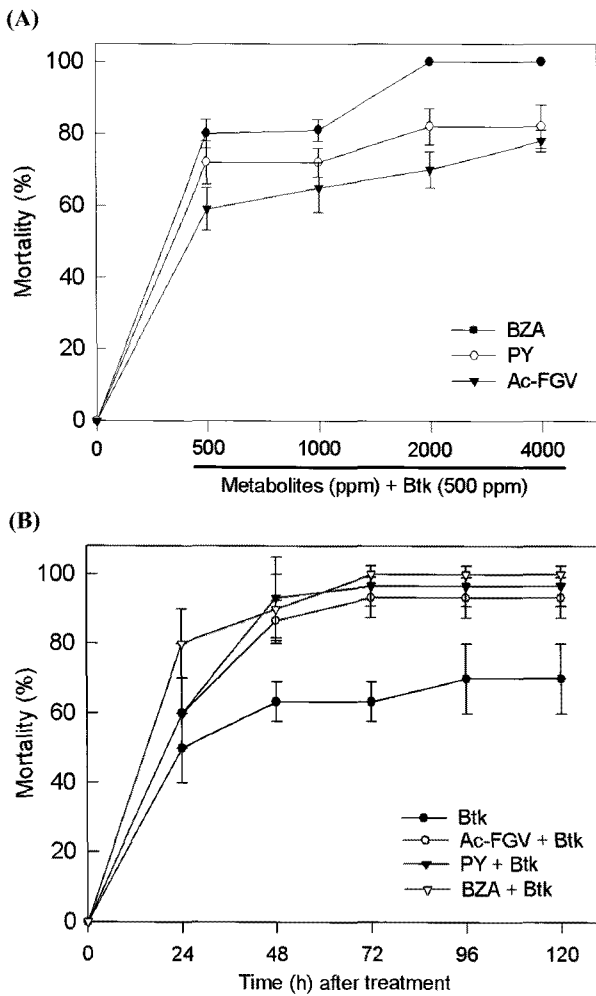


Fig. 4. Effect of three metabolites (BZA, PY and Ac-FGV) of *Xenorhabdus nematophila* on the toxic activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Btk) against the last instar larvae of *Plutella xylostella*. (A) Dose mortality response at 72 h after the treatments. (B) Time course at 2,000 ppm of each metabolite.

하게 나타난다는 것을 확인하였다. 이상의 자료를 바탕으로 처리시간의 경과에 따른 살충률을 비교하였다(Fig. 4B). 배양액은 1/2 배로 희석하여 혼합하였고 BZA는 2,000 ppm 으로 혼합하여 처리하였다. 기존의 Btk 생물농약을 처리하면 살충률이 낮고 또한 다른 세 처리구와 비교하였을 때 모든 처리 후 조사시간에서 낮은 살충률을 보였다. 반면 *X. nematophila* 또는 *P. temperata temperata* 배양액 또는 BZA를 혼합하게 될 경우 처리시간의 경과에 따른 살충력이 뚜렷하게 높아지는 것으로 나타났다.

**곤충병원세균 배양액 유래 생화학 농약의 방제효과**  
이상의 실내실험은 세균배양액을 Btk 생물농약과 혼합

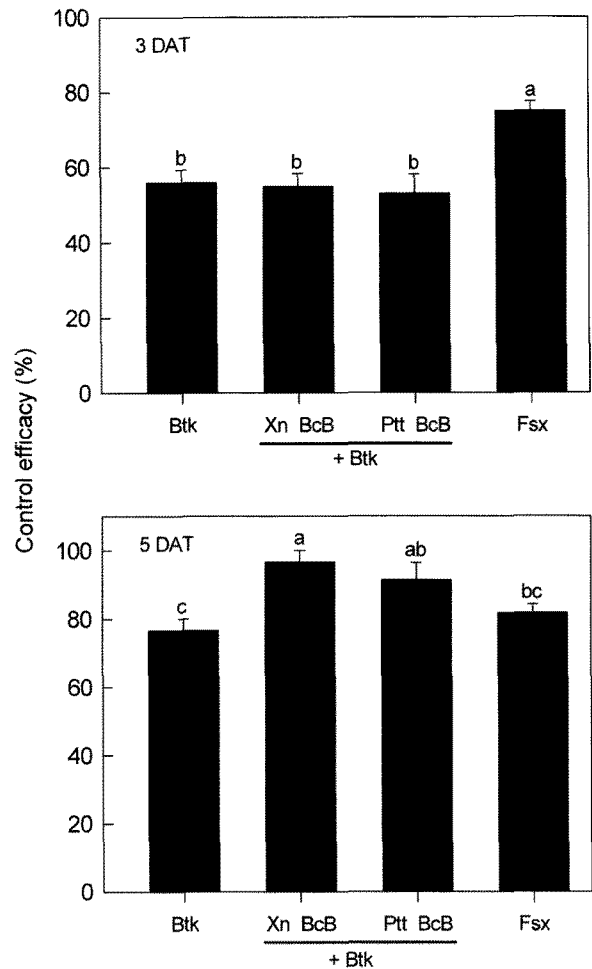


Fig. 5. Field assay. Control efficacy of bacterial culture broth (BcB) mixed with *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Btk, 1,000 ppm) against *Plutella xylostella*. BcBs were prepared by culturing bacteria of *Xenorhabdus nematophila* (Xn-BcB) or *Photorhabdus temperata* subsp. *temperata* (Ptt-BcB) in LB broth for 48 h at 28°C. Flufenoxuron (Fsx, 500 ppm) was used for control treatment for chemical insecticide. Mortality was measured at 3 or 5 days after treatment (DAT). Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test).

하게 되면 살충력을 증가시킨다는 것을 확인하였고 이것을 야외조건에서 동일하게 처리하였을 때 적용가능 여부를 판단하였다(Fig. 5). 기존의 실내실험에서는 Btk 생물농약의 농도를 500 ppm으로 사용하였지만, 야외실험에서는 회사 추천 농도인 1,000 ppm으로 설정하고, 이에 세균배양액 원액을 가미하여 처리구로 설정하였다. 대조 처리구로는 현재 화학농약으로 많이 사용되는 flufenoxuron (500 ppm, Sungbo Chem, Seoul, Korea)을 처리하였다. 예상한 대로 처리 초기에는 화학농약 처리구가 기존의 Btk 단독 처리구

보다는 살충력이 높게 나타났지만, Btk 생물농약과 세균배양액을 혼합 처리구가 5일 이후 이 화학농약 처리효과보다 우월하다는 것을 확인할 수 있었다.

## 고 찰

본 연구 결과는 난방계 해충인 배추좀나방을 대상으로 곤충병원세균인 *X. nematophila*와 *P. temperata temperata*의 대사물질을 이용하여 포장에 적용 가능한 생물농약을 개발하는데 목적을 두었다. 현재 사용되어 지는 Btk 생물농약의 경우 배추좀나방 4령 유충을 처리하게 되면 약 80% 이하의 낮은 병원력을 보였지만 세균배양액 또는 대사물질을 혼합하여 처리하면 살충률이 크게 증가하였다. 예를 들어, *X. nematophila* 또는 *P. temperata temperata* 배양액과 Btk를 혼합한 경우 약 90% 이상의 살충력 상승효과를 나타냈다. 또한 이러한 병원력 상승효과에 영향을 주었던 대사물질들은 고압의 열처리에도 효과를 잃지 않아 Btk의 병원력 제고에 안정적일 수 있다는 것을 내포하였다. 이에 따라 포장에서도 실내와 동일하게 처리하였을 때에도 병원력이 화학농약 및 Btk 단독 처리보다 높은 것을 확인하였다. 이러한 병원력 상승효과는 *X. nematophila*와 *P. temperata temperata* 배양액 내에 있는 유기물질(BZA, PY, Ac-FGV)에서 기인된 것으로 추정하였다. 따라서 *B. thuringiensis* 병원력에 미치는 영향에 대한 기존의 연구를 토대로 *X. nematophila*와 *P. temperata temperata* 배양액에 존재하는 물질이 어떻게 Btk의 병원력을 높일 수 있는 지 설명되어질 수 있다.

먼저 이들 곤충병원세균들은 종 특이적으로 기주 선충인 *S. carpocapsae*와 *H. megidis*의 소화관에 각각 공생하면서 기주 선충의 도움으로 곤충의 혈강에 도달하게 된다(Forst et al., 1997). 곤충 혈강에 침입한 곤충병원선충은 주로 구강을 통해 자신의 소화관에 있는 공생세균을 배출하게 된다(Silva et al., 2002). 한편 감염된 곤충은 병원세균과 선충을 방어하기 위해 세포성 및 체액성 면역 작용을 유도하게 한다. 곤충의 면역반응은 패턴인식단백질에 의한 외래 침입자를 인식하고, 이를 아이코사노이드를 이용하여 주변으로 인식 정보를 전달하면 체계적 면역반응이 일어나게 된다(Gillespie et al., 1997). *X. nematophila*와 *P. temperata temperata*는 모두 곤충의 면역반응을 억제시킬 수 있는데, 이는 이들 세균이 곤충의 아이코사노이드의 생합성 반응을 억제하는 데에서 기인하는 것으로 알려지고 있다(Kim et

al., 2005). 곤충면역작용이 억제된 상황에서 세균은 생존하고 번식하게 되고 결국 패혈증 때문에 치사한다. 치사된 곤충체내에서 선충은 다시 증식하고 자신의 소화관에 공생 세균을 다시 재구성한 후 타 기주체로 침입하게 된다.

세균의 대사물질이 보여주었던 Btk 상승효과는 비록 열처리 또는 여과 처리 후에도 배양액에 이러한 물질이 존재했다는 화학분석에 기초한 직접적 증거는 보여주지 못했지만, 이 추출물에 아이코사노이드 생합성 억제제가 포함되었을 것으로 추정된다. 이러한 추측은 실제로 *X. nematophila*의 경우 이전 연구에서 대사물질에 BZA, PY, Ac-FGV가 동정되어서 설득력을 갖게 하였다(Ji et al., 2004). 특별히 BZA는 아이코사노이드 활성 효과가 있어 Btk 병원력을 크게 증가시키는 것으로 알려졌다(Kwon and Kim, 2008). 그러나 본 연구에서 *X. nematophila*와 *P. temperata temperata*에 존재하는 면역억제 물질이 Btk의 병원력을 제고시켰다는 본 연구의 결과는 여러 연구에서 뒷받침하고 있다. *B. thuringiensis*는 그람양성균으로 곤충의 경구로 체내에 들어가면 이들이 갖는 내독소에 의해 독성이 나타나게 된다. 즉, 증장의 알칼리 환경에서 용해된 내독소는 다시 단백질 분해에 의해 활성화되고 증장의 미세용모의 세포막소낭에 존재하는 수용체에 결합하게 된다(Hoffman et al., 1988; Zhang et al., 2005; Wang et al., 2007; Jenkins and Dean, 2000). 이는 세포막 구멍을 형성하고 이후 증장마비(Gill et al., 1992; Pigot and Ellar, 2007) 및 세포치사(Zhang et al., 2008)로 이어지게 된다. 이러한 증장세포 와해를 통해 *B. thuringiensis* 세균이 혈강으로 침입하게 되고 패혈증을 유발하여 궁극적 곤충 치사를 초래하게 한다(Broderick et al., 2006). 광범위한 *B. thuringiensis* 사용은 해충들에게 이 약제에 대해서 저항성을 유발시켰다(Tabashnik et al., 2000). 이러한 *B. thuringiensis* 약제 둔감성은 증장 상피세포막에 존재하는 *B. thuringiensis* 내독소 단백질 수용체의 구조 변화(Gahan et al., 2001; Ferre and Van Rie, 2002), 이 독소 단백질 가수 분해력 저하(Oppert et al., 1997) 그리고 손상된 상피 세포들의 빠른 회복능력(Forcada et al., 1999)을 포함한다. 여기에 *B. thuringiensis*에 대한 감염력 저하는 곤충의 면역능력 상승에 따라 기인될 수 있어 실제로 낮은 농도의 이 세균 감염에 노출되면 혈림프의 멜라닌 형성반응과 같은 면역 반응이 증가하여 비롯될 수 있다(Rahman et al., 2004). *B. thuringiensis* 병원성과 곤충 면역작용 사이의 기능적 관계성은 BZA 또는 유약호르몬과 같은 면역억제 물질이 배추좀나방에 대해서 Btk의 감염력을 상승시키는

사실에서도 입증되었다(Kwon and Kim, 2007, 2008). 파밤 나방의 경우 아이코사노이드 생합성과 멜라닌 반응을 일으키는 페놀옥시다아제 효소 반응과는 밀접한 관계성을 가지며, BZA의 경우 페놀옥시다아제 활성을 억제시키는 것으로 밝혀졌다(Kwon and Kim, 2008). 비록 페놀옥시다아제의 활성이 면역작용과 이 효과의 지속성에서 중요하지만, 역으로 페놀옥시다아제의 증가가 *B. thuringiensis*에 대한 주요 저항성 기작으로 연결하기는 어렵다. 목화다래나방(*Pectinophora gossypiella*)의 경우 *B. thuringiensis* 약제 저항성과 감수성 사이에 페놀옥시다아제 활성 차이가 없는 것으로 나타나 이들의 관련성은 좀 더 복잡한 상위 활성화 단계에서 찾아보아야 할 것 같다(Gassmann *et al.*, 2009). 또한 면역 활성을 높게 유지하는 것은 곤충 자체에게 큰 에너지 소비이며 발육에 유리하지 않다는 보고가 나와 있다. 예를 들어, 귀뚜라미류인 *Gryllus campestris*의 경우 그람 음성균의 외막 물질인 lipopolysaccharide를 처리한 경우 생리적 대사율의 지표인 전체 단백질 함량이 낮아지는 것을 보고하였다(Jacot *et al.*, 2005). 또한 *Mycobacterium marinum*에 감염된 초파리의 경우 에너지 소비 증상을 보여 비축해두었던 지방과 글리코젠을 소비하는 현상을 나타냈다(Dionne *et al.*, 2006). 면역신호과정인 Toll과 JAK을 항시 발현하는 돌연변이체 초파리는 체내 멜라닌총량을 만들고 수명이 짧아지는 것을 보였다(Harrison *et al.*, 1995; Luo *et al.*, 1995; Qiu *et al.*, 1998). 따라서 *B. thuringiensis*에 대한 저항성을 보이는 곤충은 면역 활성화 단계에 있어서 일시에 크게 유기될 수 있다고 본다. 한 예로 척추동물의 후천성면역의 기억 작용과 유사하게 곤충에 있어서 제2차 감염에 따라 신속하게 면역작용이 일어나는 현상이 발견되었으며, 이러한 작용 원리가 미리 높은 농도의 불활성화 형태의 페놀옥시다아제를 이전 감염에서 비축해두었다가 제2차 감염 때 신속하게 많은 양으로 활성화된다고 설명하였다(Pham and Schneider, 2008). 이러한 페놀옥시다아제의 활성화 초기단계에 아이코사노이드가 관여하기에(Shrestha and Kim, 2008), *X. nematophila*와 *P. temperata* 배양액에 존재하는 아이코사노이드 생합성 억제제에 의해 *B. thuringiensis*의 병원력을 상승시킨 것으로 설명되어 질 수 있다.

이상의 연구 결과는 *X. nematophila*와 *P. temperata* 배양액에 면역억제 물질이 포함되어 있으며, 이 물질이 배추좀나방의 아이코사노이드 생합성 반응을 억제시켰고, 궁극적으로 Btk의 병원력을 제고시킬 수 있다는 것을 제시한다. 또한 본 연구 결과는 이들 세균 배양액의

*B. thuringiensis* 약제에 대한 협력제 역할을 보여 주었으며, 이러한 효과에 따라 미생물 배양액 추출물을 바탕으로 다양한 대상 해충에 대해서 새로운 생물농약으로 개발될 수 있을 것으로 사료된다.

## 사 사

본 연구는 2010년도 농촌진흥청 아젠다 사업(대과제명: 화학농약 대체기술)으로부터 지원받아 수행하였다. 본 연구 사업 기간 동안 서삼열은 교육과학기술부의 2단계 BK21사업을 통해 지원받았다.

## Literature Cited

- Adams, B.J. and K.B. Nguyen. 2002. Taxonomy and systematics. pp. 1-33. In *Entomopathogenic nematology*, ed. by R. Gaugler. CABI Publishing, New York.
- 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.
- Broderick, N.A., K.F. Raffa and J. Handelsman. 2006. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 15196-15199.
- Corpping, L.G. and J.J. Menn. 2000. Biopesticides: a review of their action, application and efficacy. *Pest Manage. Sci.* 56: 651-676.
- Corpping, L.G. 2004. The manual of biocontrol agents. BCPC, Hampshire, UK.
- Dionne, M.S., L.N. Pham, M. Shirasu-Hiza and D.S. Schneider. 2006. Akt and FOXO dysregulation contribute to infection induced wasting in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 16: 1977-1985.
- Dunphy, G.B. and J.M. Webster. 1991. Antihemocytic surface components of *Xenorhabdus nematophilus* var. *dukki* and their modification by serum of nonimmune larvae of *Galleria mellonella*. *J. Invertebr. Pathol.* 58: 40-51.
- Dunphy, G.B. and J.M. Webster. 1994. Interaction of *Xenorhabdus nematophila* subsp. *nematophilus* with the haemolymph of *Galleria mellonella*. *J. Insect Physiol.* 30: 883-889.
- Ferre J. and J. Van Rie. 2002. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 47: 501-533.
- French-Constant, R.H., N. Waterfield and P. Daborn. 2005. Insecticidal toxins from *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. pp. 239-253. In *Comprehensive molecular insect science*, eds. by L.I. Gilbert, I. Kostas and S.S. Gill. Elsevier, New York.
- Forcada, C., E. Alcacer, M.D. Garcera, A. Tato and R. Martinez. 1999. Resistance to *Bacillus thuringiensis* CryAc toxin in three strains of *Heliothis virescens* proteolytic and SIM study of the larval midgut. *Arch. Insect Physiol. Physiol.* 42: 51-63.
- Forst, S. B. Dedos, N. Boemare and E. Stackebrandt. 1997.

- Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: bugs that kill bugs. *Annu. Rev. Microbiol.* 51: 47-72.
- Gahan, L.J., F. Gould and D.G. Heckel. 2001. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science* 293: 857-861.
- Gassmann, A.J., J.A. Fabrick, M.S. Sisterson, E.R. Hannon, S.P. Stock, Y. Carriere and B.E. Tabashnik. 2009. Effects of pink bollworm resistance to *Bacillus thuringiensis* on phenoloxidase activity and susceptibility to entomopathogenic nematodes. *J. Econ. Entomol.* 102: 1224-1232.
- Gill, S.S., E.A. Cowles and P.V. Pietrantonio. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu. Rev. Entomol.* 37: 615-636.
- Gillespie, J.P., M.R. Kanost and T. Trenczek. 1997. Biological mediators of insect immunity. *Annu. Rev. Entomol.* 42: 611-643.
- Harrison, D.A., R. Binari, T.S. Nahreini, M. Gilman and N. Perrimon. 1995. Activation of a *Drosophila* Janus kinase (JAK) causes hematopoietic neoplasia and developmental defects. *EMBO J.* 14: 2857-2865.
- Hoffman, C., H. Vanderbruggen, H. Hofte, J. Van Rie, S. Jansens and H. Van Mellaert. 1988. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 7844-7848.
- Jacot, A., H. Scheuber, J. Kurtz and M.W. Brinkhof. 2005. Juvenile immune system activation induces a costly upregulation of adult immunity in field crickets, *Gryllus campestris*. *Proc. Biol. Sci.* 272: 63-69.
- Jenkins, J.I. and D.H. Dean. 2000. Exploring the mechanism of action of insecticidal proteins by genetic engineering methods. pp. 33-54. *In Genetic engineering: principles and methods*, vol. 22. eds. by K. Setlow. Plenum, New York.
- Ji, D., Y. Yi, G.H. Kang, Y.H. Choi, P. Kim, N.I. Baek and Y. Kim. 2004. Identification of an antibacterial compound, benzylideneacetone, from *Xenorhabdus nematophila* against major plant-pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 239: 241-248.
- Kang, S., S. Han and Y. Kim. 2004. Identification of an entomopathogenic bacterium, *Photorhabdus temperata* subsp. *temperata*, in Korea. *J. Asia Pac. Entomol.* 7: 331-337.
- Kaya, H.K. and R. Gaugler. 1993. Entomopathogenic nematodes. *Annu. Rev. Entomol.* 38: 181-206.
- Kim, H.H., Y.S. Seo, J.H. Lee and K.Y. Cho. 1990. Development of fenvalerate resistance in the diamondback moth, *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae) and its cross resistance. *Kor. J. Appl. Entomol.* 29: 194-200.
- Kim, J. 2009. Research trend in biopesticide development. [www.bioin.co.kr](http://www.bioin.co.kr).
- Kim, Y., D. Ji, S. Cho and Y. Park. 2005. Two groups of entomopathogenic bacteria, *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*, share an inhibitory action against Phospholipase A<sub>2</sub> to induce host immunodepression. *J. Invertebr. Pathol.* 89: 258-264.
- Kwon, S. and Y. Kim. 2007. Immunosuppressive action of pyriproxyfen, a juvenile hormone analog, enhances pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* against diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Biol. Control* 42: 72-76.
- Kwon, S. and Y. Kim. 2008. Benzylideneacetone, an immunosuppressant, enhances virulence of *Bacillus thuringiensis* against beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 101: 36-41.
- Luo, H., W.P. Hanratty and C.R. Dearolf. 1995. An amino acid substitution in the *Drosophila* hopTum-1 Jak kinase causes leukemia-like hematopoietic defects. *EMBO J.* 14: 1412-1420.
- Oppert, B., K.J. Krammer, R.W. Beeman, D. Johnson and W.H. McGaughey. 1997. Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *J. Biol. Chem.* 272: 23473-23476.
- Park, N.J., S.C. Oh, Y.H. Choi, K.R. Choi and K.Y. Cho. 2004. Inheritance and cross resistance of phenthoate-selected diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae). *J. Asia Pac. Entomol.* 7: 233-237.
- Park, Y., Y. Yi and Y. Kim. 1999. Identification and characterization of a symbiotic bacterium associated with *Steinernema carpocapsae* in Korea. *J. Asia Pac. Entomol.* 2: 105-111.
- Park, Y. and Y. Kim. 2000. Eicosanoids rescue *Spodoptera exigua* infected with *Xenorhabdus nematophila*, the symbiotic bacteria to the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. *J. Insect Physiol.* 46: 1469-1476.
- Pham, L.N. and D.S. Schneider. 2008. Evidence for specificity and memory in the insect innate immune response. pp. 97-127. *In Insect Immunology*, ed. by N.E. Beckage. 348 pp. Academic Press. New York.
- Piggott, C. and D.J. Ellar. 2007. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71: 255-281.
- Qiu, P., P. Pan and S. Govind. 1998. A role for the *Drosophila* Toll/Cactus pathway in larval hematopoiesis. *Development* 125: 1909-1920.
- Rahman, M.M., H.L.S. Roberts, M. Sarjan, S. Asgari and O. Schmidt. 2004. Induction and transmission of *Bacillus thuringiensis* tolerance in the flour moth, *Ephesia kuehniella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 2696-2699.
- SAS Institute, Inc. 1989. SAS/STAT user's guide, Release 6.03, Ed. Cary, N.C.
- Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D.R. Zeigler and D.H. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *J. Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 775-806.
- Seo, S. and Y. Kim. 2009. Two entomopathogenic bacteria, *Xenorhabdus nematophila* K1 and *Photorhabdus temperata* subsp. *temperata* ANU101 secrete factors enhancing Bt pathogenicity against the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Kor. J. Appl. Entomol.* 38: 385-392.
- Shrestha, S. and Y. Kim. 2008. Eicosanoids mediate prophenoloxidase release from oenocytoids in the beet armyworm *Spodoptera exigua*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38: 99-112.
- Shrestha, S. and Y. Kim. 2009. Biochemical characteristics of immune-associated phospholipase A<sub>2</sub> and its inhibition by an entomopathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophila*. *J. Microbiol.* 47: 774-782.



- Silva, C.P., N.R. Waterfield, P.J. Daborn, P. Dean, T. Chilver, C.P. Au, S. Sharma, U. Potter, S.E. Reynolds and R.H. French-Constant. 2002. Bacterial infection of a model insect: *Photographus luminescens* and *Manduca sexta*. *Cell. Microbiol.* 6: 329-339.
- Tabashnik, B.E., R.T. Roush, E.D. Earle and A.M. Shelton. 2000. Resistance to Bt toxins. *Science* 287: 42.
- Tabashnik, B.E., G.C. Unnithan., L. Masson., D.W. Crowder., X. Li and Y. Carriere. 2009. Asymmetrical cross-resistance between *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Ac and Cry2Ab in pink bollworm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 29: 11889-11894.
- Talekar, N.S. and A.M. Shelton. 1993. Biology, ecology, and management of the diamondback moth. *Annu. Rev. Entomol.* 38: 275-301.
- Tanada, Y. and Kaya, H.K. 1993. *Insect pathology*, Academic Press, San Diego.
- Wang, P., J-Z. Zhao, A. Rodrico-Simon, W. Kain, A.F. Janmaat, A.M. Shelton, J. Ferre and J.H. Myers. 2007. Mechanism of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in a greenhouse population of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 1199-1207.
- Zhang, X., M. Candas, N. B. Griko, L. Rose-Young and L. A. Bulla Jr. 2005. Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor Bt-R1 expressed in insect cells. *Cell Death Differ.* 12: 1407-1416.
- Zhang, X., N.B. Griko, S.K. Corona and L.A. Bulla, Jr. 2008. Enhanced exocytosis of the receptor BT-R(1) induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis* directly correlates to the execution of cell death. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 149: 581-588.