

## 곤충병원세균(*Photorhabdus temperata* ssp. *temperata*) 유래 곤충 면역 억제물질 생성 비교 연구를 통한 저렴한 세균 배지 선발

서심열 · 장호진 · 김건우 · 김용균\*  
안동대학교 자연과학대학 생명자원과학과

### Comparative Analysis of Immunosuppressive Metabolites Synthesized by an Entomopathogenic Bacterium, *Photorhabdus temperata* ssp. *temperata*, to Select Economic Bacterial Culture Media

Samyeol Seo, Hojin Jang, Kunwoo Kim and Yonggyun Kim\*

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

**ABSTRACT:** An entomopathogenic bacterium, *Photorhabdus temperata* ssp. *temperata* (Ptt), suppresses insect immune responses and facilitates its symbiotic nematode development in target insects. The immunosuppressive activity of Ptt enhances pathogenicity of various microbial pesticides including *Bacillus thuringiensis* (Bt). This study was performed to select a cheap and efficient bacterial culture medium for large scale culturing of the bacteria. Relatively cheap industrial bacterial culture media (MY and M2) were compared to two research media, Luria-Bertani (LB) and tryptic soy broth (TSB). In all tested media, a constant initial population of Ptt multiplied and reached a stationary phase at 48 h. However, more bacterial colony densities were detected in LB and TSB at the stationary phase compared to two industrial media. All bacterial culture broth gave significant synergism to Bt pathogenicity against third instars of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. Production of bacterial metabolites extracted by either hexane or ethyl acetate did not show any significant difference in total mass among four culture media. Reverse phase HPLC separated the four bacterial metabolites, which were not much different in quantities among four bacterial culture broths. This study suggests that two industrial bacterial culture media can be used to economically culture Ptt in a large scale.

**Key words:** *Photorhabdus temperata temperata*, Microbial pesticide, *Bacillus thuringiensis*, *Plutella xylostella*, Bacterial metabolite

**초 록:** 곤충병원세균인 *Photorhabdus temperata* ssp. *temperata* (Ptt)는 곤충의 면역반응을 억제시켜 피기생 곤충 체내에서 공생하는 기주 선충의 발육을 도모하게 된다. 또한 Ptt의 면역억제 활성은 *Bacillus thuringiensis* (Bt)의 병원성을 증가시킨다. 본 연구는 이러한 유용 곤충병원세균의 대량 생산을 위한 저렴한 배지를 선발하기 위해 수행되었으며, 두 연구용 배지(LB, TSB)와 저렴한 산업용 두 배지(MY, M2)를 상호 비교하였다. 모든 배양액에 동일한 밀도의 Ptt를 접종하고 배양하였을 때 48 시간 이후 정지상이 나타났다. 그러나 연구용 배양액인 LB와 TSB에서 두 가지 산업용 배양액보다 정지상에서 높은 세균 밀도를 보였다. 네 가지 배지에서 증식된 Ptt 배양액은 모두 배추좀나방(*Plutella xylostella*) 3령충에 대한 Bt 병원성을 현격하게 제고시켰고, 이들 배지 종류에 따라 차이가 없었다. 네 가지 배양액에서 세균의 증식에 의해 생산되는 대사물질의 양과 배지별 생산되는 대사물질의 동일성을 확인하기 위해 헥산과 에틸아세테이트의 유기용매로 추출했다. 시간별 배양액의 유기용매 추출물질은 세균의 증식과 비슷하게 대사물질의 생산량에서도 증가하는 것을 알 수 있었다. 역상 HPLC를 이용하여 네 가지 세균 배양액 각각에서 대사물질을 분리하였고, 정량적으로 네 가지 대사물질이 서로 다른 배지에서 통계적으로 차이 없이 검출되었다. 본 연구는 비교적 저렴한 두 가지 산업용 배지가 유용 대사물질의 생성에 변화 없이 Ptt 세균을 저렴하게 배양할 수 있다고 제시하고 있다.

**검색어:** 곤충병원세균, 미생물농약, Bt, 배추좀나방, 세균 대사물질

\*Corresponding author: hosanna@andong.ac.kr

Received November 12 2010; revised November 25 2010;  
accepted December 15 2010

곤충병원세균인 *Photorhabdus temperata* ssp. *temperata* (Ptt)는 국내에서 채집된 *Heterorhabditis megidis*의 곤충병원선충에서 분리되었다(Park *et al.*, 1999; Kang *et al.*, 2004). 이들 세균은 각 선충 기주의 장내에 서식하면서 종 특이적 공생 생활환을 보인다(Kaya and Gaugler, 1993). 유사한 곤충병원선충으로 *Steinernema*에 속한 종들이 공생세균인 *Xenorhabdus* 종류를 포함한다(Akhurst, 1980). 이 두 선충 종류는 상이한 발생 기원을 가지지만, 이들이 보이는 기생 생활사는 수렴성 진화 과정을 통해 유사한 패턴을 보이는 것으로 추정된다(Adams and Nguyen, 2002). 즉, 감염태 선충이 대상 곤충의 개구부를 지나 혈강으로 침입하면 선충의 장내에 공생하는 곤충병원세균을 배출시킨다(Herbert and Goodrich-Blair, 2007). 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).

곤충의 면역반응은 외부 인자에 대한 인식으로부터 면역 반응을 유도하기 위한 일련의 면역 신호 전달과정을 거치게 된다(Gillespie *et al.*, 1997). 다양한 면역 중개 물질이 보고되었지만, 이 가운데 아이코사노이드가 다양한 병원체에 대해 곤충의 면역반응을 증개하는 것으로 알려지고 있다(Stanley, 2006). 아이코사노이드는 탄소수 20개의 아라키도닉산으로부터 다양한 산화 반응을 통해 얻어진 물질로서 대부분 펜탄 고리를 갖는 프로스타글란딘류와 긴 사슬 형태의 류코트리엔류가 곤충에서 보고되었다(Stanley, 2000). 따라서 아이코사노이드의 생합성은 인지질로부터 아라키도닉산의 유리 과정을 촉매하는 phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)의 작용에서 기인하게 된다(Dennis, 1994, 1997). 곤충병원세균인 Ptt는 곤충의 PLA<sub>2</sub>를 억제시켜 아이코사노이드 생합성을 제한시키고, 이후 면역 신호 전달과정이 원활하게 이뤄지지 않아 대상 곤충의 면역반응을 억제시키게 된다(Kim *et al.*, 2005).

세균 유래 곤충 면역억제물질이 유사한 곤충병원세균인 *X. nematophila*에서 보고되었다(Shrestha *et al.*, 2010). 이들 물질은 모노터펜류인 benzylideneacetone (BZA)과 두 종류의 펩타이드류인 proline-tyrosine (PY), acetylated phenylalanine-glycine-valine (Ac-FGV)을 포함하게 된다. 이들은 모두

PLA<sub>2</sub>의 활성을 억제하여 곤충의 세포성면역 반응을 낮추는 것으로 판명되었다(Kwon and Kim, 2008; Shrestha *et al.*, 2010). 최근 연구는 Ptt에서 PY의 변형체인 cyclo-PY (cPY)가 구조 동정되었다(미보고 자료). 면역반응이 억제된 대상 곤충은 병원미생물에 대한 감염성이 높아지게 된다. 배추좀나방(*Plutella xylostella*)에 대해 Ptt는 미생물농약인 *Bacillus thuringiensis* (Bt)의 병원력을 현격하게 증가시켰다(Seo and Kim, 2009, 2010). 따라서 이러한 곤충병원세균을 이용하여 새로운 미생물 농약을 개발하려는 연구가 진행되었다(Seo and Kim, 2010)

미생물 농약 개발을 위한 산업화로 진행하기 위해서는 이러한 곤충병원세균의 대량 배양에 따른 경제성을 고려해야 하고, 이때 세균 배양 배지의 비용을 낮출 필요가 있다. 일반적으로 세균 배양의 규모가 작은 경우는 미생물의 생리 화학적 실험에 사용되는 Luria-Bertani (LB) 액체배지와 tryptic soy broth (TSB)가 많이 사용되나 가격이 비싸 대량으로 세균을 배양하기엔 경제성 면에서 부적합하다. 반면에, 산업용 배지는 값싼 원료를 사용하여 저렴하면서 단위 중량의 소비기질에 대해 최대 대사물질 혹은 균체수를 형성하고, 대사물질의 생성속도가 빨라 산업용으로 널리 사용되고 있다(Jeon and Gong, 1999; Park *et al.*, 1997). 또한 이러한 산업용 세균 배지의 요건은 부산물의 생성을 최소화하고 일정한 품질의 배지 재료를 향시 구입이 가능하며 배양 후 통기 교환, 추출, 정제, 폐기물 처리 등의 문제가 용이하여야 한다(Jeon and Gong, 1999). 이와 같은 관점으로부터 산업용 생산배지의 탄소원으로는 사탕수수 폐당밀, 사탕무 폐당밀, 곡물, 전분, 포도당, 설탕 등이 사용되며, 또한 질소원으로는 암모늄염, 요소, 질산염, 콩가루, 혈액 등이 사용된다(Shin, 1987).

본 연구는 실험용 배지와 재료 성분이 비슷한 산업용 배지를 선택하기 위해 실험에 사용된 LB 액체배지와 유사한 yeast extract 액체배지인 Media Yeast (MY) 액체배지와 TSB 배지와 유사한 soy 액체배지인 Media 204 (M2) 액체배지를 이용하여 곤충병원세균의 배양 및 그 대사물질을 확인하였다. 또한 이 곤충병원세균의 다양한 배양액이 배추좀나방(*Plutella xylostella*)에 대한 Bt의 감염력을 증가시키는지를 조사하였다. 끝으로 병원세균에서 분비되는 물질을 추적하기 위해 이들 배양을 분리하여, 분획구에 포함된 화학 물질 존재를 역상 HPLC를 이용하여 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 배추좀나방 사육

시험곤충은 안동시 송천동에 소재한 배추밭에서 채집한 유충을 약제 처리하지 않고 실내에서 누대 사육한 것을 사용하였다. 유충은 온도  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , 광주기 16:8 h (L:D), 상대습도 40~60%의 배양기에서 배추를 먹이로 사육했다. 성충은 10% 설탕물을 먹이로 제공하고 배추잎을 이용하여 산란을 유도하였다.

### 세균배양

곤충병원세균인 *P. temperata temperata* ANU101은 기주 선충에서 분리된 후(Park *et al.*, 1999; Kang *et al.*, 2004) 동결보관중인 것을 이용하였다. 이들 균주는 LB (1 L 제조시 bacto trypton 10 g, yeast extract 5 g, sodium chloride 10 g) 배지를 이용하여  $28^\circ\text{C}$ 에서 12 시간동안 배양하여 단일 균총을 채취하였다. 채취된 단일 균총을 다시 LB, TSB (24 g/L, Bectondickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) 배지와 산업용 LB 배지인 MY 배지(1 L 제조시 glucose 20 g, L-monosodium glutamate 12 g, yeast extract 2.5 g, monopotassium phosphate 1 g, calcium chloride 1 g, magnesium sulfate 0.3 g, copper (II) sulfate 0.03 g, manganese sulfate 0.02 g, iron (II) sulfate 0.02 g, zinc sulfate 0.02 g)와 산업용 TBS 배지인 M2 배지(1 L 제조시 glucose 20 g, soybean flour 25 g, monopotassium phosphate 2 g, calcium carbonate 1 g, magnesium sulfate 0.3 g, copper (II) sulfate 0.01 g, manganese sulfate 0.02 g, iron (II) sulfate 0.02 g, zinc sulfate 0.02 g)를 이용하여  $28^\circ\text{C}$ 에서 12 시간 동안 200 rpm의 속도로 회전 배양한 후, 글리세롤을 30%의 농도가 되도록 첨가한 후 동결 분획시료를 만들었다. 이 동결시료가 추후 반복되는 세균 배양의 원시료로 이용되어 계대배양에 따른 세균 변이 가능성을 줄였다. 글리세롤 동결 세균시료 250  $\mu\text{L}$ 를 1 L의 LB 액체배지에 첨가하고  $28^\circ\text{C}$ 에서 200 rpm의 속도로 회전 배양하였다. 배양 후 4, 8, 12, 24, 36, 48, 60 시간마다 분광광도계(Uvikon 930, Kontron, Ales, France)를 이용하여 590 nm에서 흡광도를 측정하였다. 정지상에 이른 48 시간 배양액이 생물검정과 물질분리에 이용되었다.

### 생물 검정

생물농약 Bt는 (주)고려바이오(Hwasung, Korea)로부터

지원받았다. 제품 성분은 *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki*로서 32,000 IU/mg의 활성을 보유하였다. LB, TSB, MY, M2 배지에서 배양된 곤충병원세균 배양액에 Bt가 10 ppm이 되도록 첨가하였다. 유기용매 추출액은 dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich Korea, Seoul, Korea)를 이용하여 녹였고 다시 증류수를 이용하여 희석 현탁액을 제조하였다. 이 현탁액에 배추잎(1  $\text{cm}^2$ )을 10 분간 침지시킨 후 여과지가 깔려진 용기(직경 9 cm)에서 5 분간 건조시켰다. 각 배추잎에 배추좀나방 3령충을 10 마리씩 3 반복으로 처리하였으며, 매일 24 시간 주기로 5 일 동안 생존수를 계수하였다. 대조구는 Bt 단독 또는 살균수로 상기와 동일하게 처리하였다.

### 배양액 물질 분리

LB, TSB, MY, M2 액체배지에서 4, 8, 12, 24, 36, 48, 60 시간 배양된 1 L의 용액을 5,000 rpm에서 20 분간 원심분리한 후, 상층액을 분별깔때기(2 L, Horex, Siheung, Korea)로 수집했다. 핵산 추출은 이 배양액에 330 mL씩 3회 반복하여 실시하였다. 매 반복 배양액과 핵산(Sigma-Aldrich Korea, Seoul, Korea) 용매의 혼합을 10분간 유도하였으며, 층 분리는 중력을 이용하여  $25^\circ\text{C}$ 에서 2 시간 동안 실시하였다. 추출된 핵산층(990 mL)은 서로 혼합하였으며, 남은 배양액은 다시 에틸아세테이트(Sigma-Aldrich Korea) 추출에 이용되었다. 에틸아세테이트 추출도 마찬가지로 상기의 방법으로 330 mL씩 3 회 실시되었다. 추출된 두 유기용매 층은 회전농축기(N-1000, Eyala, Tokyo, Japan)를 이용하여  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 1 시간 동안 150 rpm 속도의 조건에서 농축되었다.

### Thin layer chromatography (TLC) 분석

세균배양액으로부터 유기용매를 이용하여 준비된 핵산 분획구, 에틸아세테이트 분획구 물질들을 TLC로 분리하였다. TLC 판(Merck, Darmstadt, Germany)에 분획구 물질(200  $\mu\text{L}$ )을 각각 처리한 후 methanol : ethyl acetate (4:1, v/v)의 전개용액을 이용하여 물질 분리를 실시하였다. 전개용액이 정점에 이르면, TLC 판을 자외선 투영기(Spectroline, New York, USA)를 통하여 분리 띠를 확인한 후, sea sand (Junsei, Tokyo, Japan)와 iodine (Duksan, Ansan, Korea) 혼합물(19:1, g/g) 100 g이 담겨진 병에서 발색시켰다.

### High performance liquid chromatography (HPLC) 분석

네 가지 배지 종류별 대사물질의 분획구를 여과공 직경이

0.20  $\mu\text{m}$ 의 PTFE syringe filter (DISMIC-13HP, Advantec, Anyang, Gyeonggi, Korea)로 여과한 후, 고정상으로 C18 역상 컬럼( $\phi$  4.60 $\times$ 250 mm, Gemini C18, Phenomenex, Torrance, CA, USA)이 장착된 HPLC (Waters 600, Waters, Milford, DE, USA)를 이용하여 분석하였다. HPLC 분석 조건은 이동상으로 methanol : water (50:50, v/v)를 사용하였고, 유속을 분당 0.5 mL로 하였으며, 용출된 화합물의 피크들은 UV 254 nm 조건에서 photo diode array 검출기 (Waters 996, Waters)로 파장에 대한 흡수특성을 분석하였다.

### 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.

## 결 과

### 배지 종류별 세균 성장곡선 비교 및 생물검정

본 연구에서 비교 분석된 네 가지 배지의 전체 단가를 비교했다. 각 배지 1 L를 제조하는 데 투입되는 비용을 산정 당시(2010년 9월 29일)의 소비자 가격을 기준으로 산출하였다. 이때 연구용 TSB, LB 배지는 각각 13,264원과 4,205원이며 산업용 MY 및 M2 배지는 각각 580원과 754원

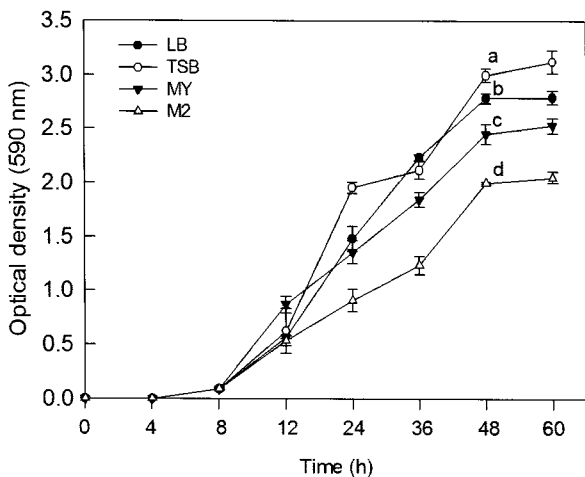


Fig. 1. Growth patterns of *Photorhabdus temperata temperata* (Ptt) in different bacterial culture media. Using two research media (LB, TSB) and two industrial media (MY, M2), Ptt was cultured at 28°C for 60 h. OD<sub>590</sub> was measured at every 4 h. Initial bacterial inoculation was  $5.0 \times 10^6$  cfu in each medium (1 L). Different letters above standard deviation at 48 h culture indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test).

으로 연구용 배지보다 산업용 배지가 7~22배 저렴했다.

비교 분석된 네 가지 배지 조건에서 세균의 성장 패턴이 분석되었다(Fig. 1). 곤충병원세균인 Ptt를 각각 LB, TSB, MY, M2 배지에  $2.5 \times 10^4$  cfu/mL 접종하고 배양 4 시간마다 분광광도계를 이용하여 OD<sub>590</sub>를 측정하여 세균밀도 변화를 추적했다. 모든 배지 조건에서 세균은 48 시간 이후에 정지상에 이르게 되었다. 이때 각각 LB, TSB, MY, M2 배지를 비교해보면 연구용 배지가 산업용 배지 보다 성장속도가 빠른 것으로 보였다. 또한 정지상에 이른 세균 밀도를 비교하여 보면 연구용 배지 중에서도 TSB 배지( $7.4 \times 10^{13}$  cfu/mL)가 LB 배지( $6.2 \times 10^{13}$  cfu/mL)보다 높은 성장 효과를 나타냈으며, 산업용 배지의 경우 MY 배지( $7.8 \times 10^{12}$  cfu/mL)가 M2 배지( $6.4 \times 10^{11}$  cfu/mL)보다 효율이 높은 것으로 나타났다.

각각의 배지에서 48 시간 동안 배양시킨 배양액의 살충력 차이를 확인하기 위해 Bt (10 ppm) 생물농약을 혼합하여 배추즙나방 3령 유충에 대해 섭식 처리 효과를 분석했다(Fig. 2). Bt 단독으로는 약 20%의 살충율을 기록했지만, Ptt 배양액과 혼합할 경우 LB, TSB, MY, M2 배지 모두에서

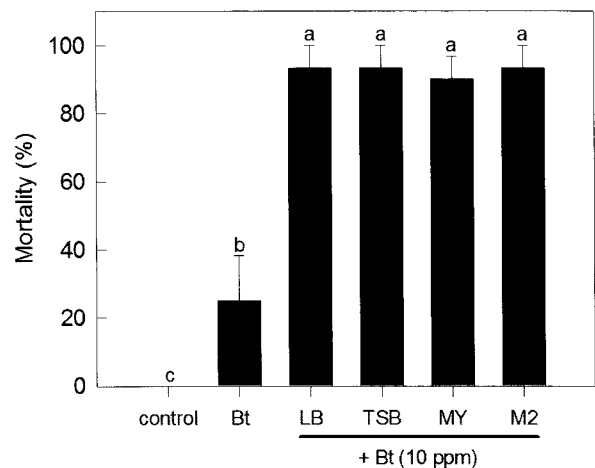


Fig. 2. Synergistic effect of *Photorhabdus temperata temperata* culture broth on *Bacillus thuringiensis* (Bt) pathogenicity against *Plutella xylostella*. The culture broth samples were obtained from 48 h culture of the bacteria in four different bacterial media (LB, TSB, MY, and M2). The resulting culture broths were used to bioassay after centrifugation at  $5,000 \times g$  to exclude bacterial cells. Third instar larvae were fed on diet cabbage leaves that were dipped into the bacterial culture broth containing Bt in a dose of 10 ppm. Control represents cabbage soaking in sterile water. Each dose treatment used 30 larvae with three replications. Mortality was estimated at 48 h after the treatment. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test).

Bt의 병원력을 현격하게 증가시키는 것으로 나타났다. 배양액에 따른 이러한 Bt 병원력 증가 효과에서는 차이가 없었다 ( $F = 0.35$ ;  $df = 3, 8$ ;  $P = 0.7925$ ).

**서로 다른 배지 조건에 따른 Ptt 이차대사산물 및 면역억제물질 생산량 차이 비교**

서로 다른 배지에서 배양 시간별로 배양액을 수거하여 핵산과 에틸아세테이트의 유기용매로 이차대사산물 생산량을 측정하였다(Figs. 3A,B). 핵산 분획구의 경우 네 가지 배양액의 교반배양 최초 측정 시간인 4 시간부터 대사물질

이 발생하기 시작하며 36 시간 이상의 배양액에서는 대사물질의 정지기인 것을 알 수 있었다. 이때 네 가지 배지의 핵산 추출물의 추출량은 차이 없이( $F = 0.29$ ;  $df = 3, 88$ ;  $P = 0.7975$ ) 평균  $6.0 \pm 0.3$  mg/mL의 생산량을 보였다. 에틸아세테이트 분획구의 네 가지 배양액 또한 핵산 분획구와 비슷한 생산 곡선을 나타내었으며 정지기( $F = 0.62$ ;  $df = 3, 88$ ;  $P = 0.6034$ )의 에틸아세테이트 추출물은  $6.0 \pm 0.5$  mg/mL라는 것을 알 수 있었다.

네 가지의 정지기의 세균배양액 핵산 분획구와 에틸아세테이트 분획구를 TLC를 이용하여 각각의 배지에서 배양된

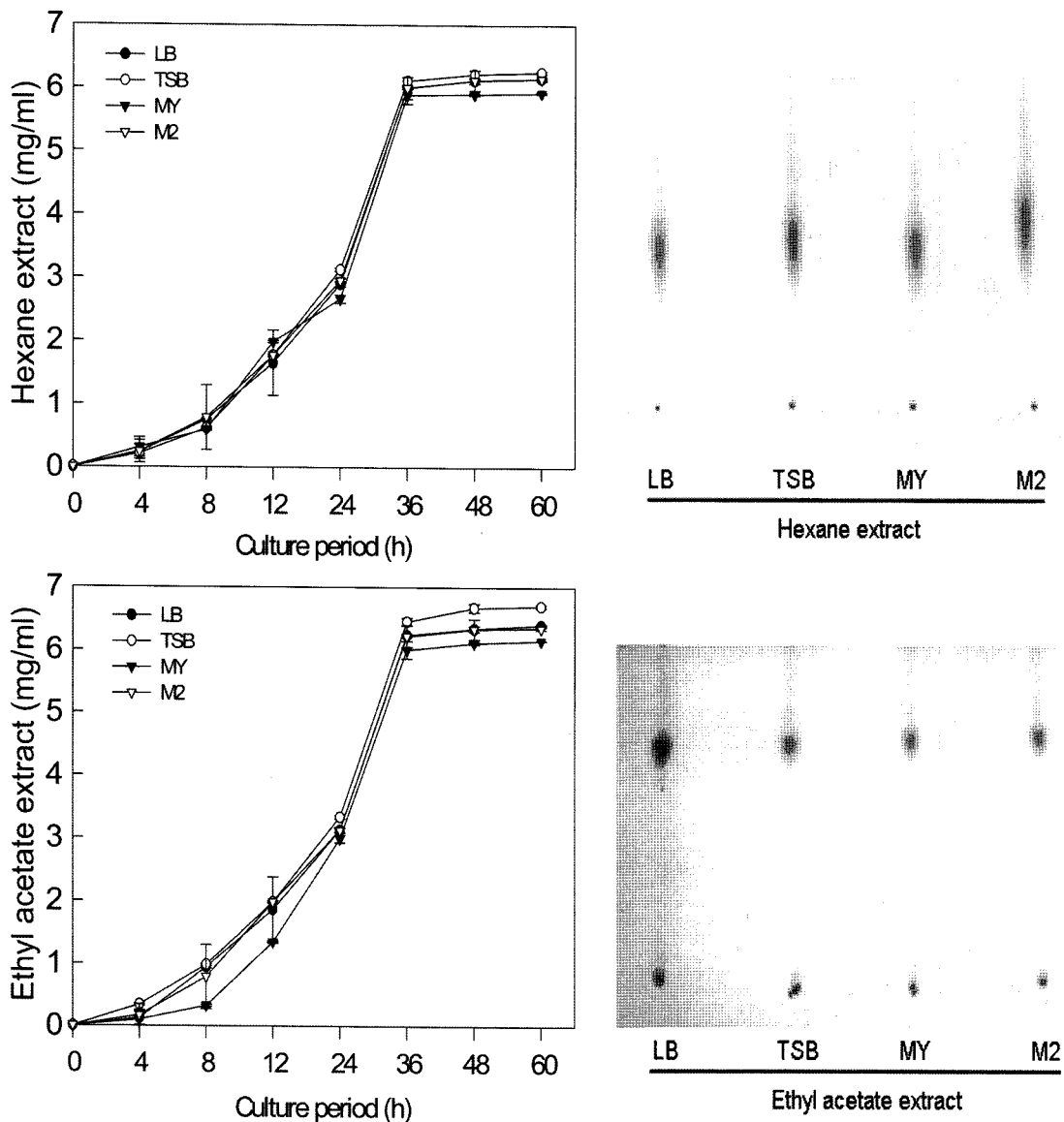


Fig. 3. Comparison of bacterial metabolites of *Photobacterium temperata temperata* cultured in different media (LB, TBS, MY, and M2). The culture broths collected from different culture periods were sequentially extracted with an equal volume of hexane (A) and subsequently ethyl acetate (B). The organic extracts were concentrated and weighed. Both organic extracts (200 mL each) were separated on a thin layer chromatography using methanol : ethyl acetate (4:1, v/v).

대사물질의 동일성의 여부를 확인하였다(Figs. 3C,D). 네 가지 세균 배양액의 핵산 분획구가 유사하게 나타났으며 에틸아세테이트 분획구 또한 유사하게 나타났다.

세균 대사물질의 HPLC 분석

이상에서 추출한 두 용매 층의 물질 조성을 알아보기 위해 역상 HPLC를 통해 물질을 분리하였다(Fig. 4). 네

가지 배지 종류별 대사물질의 분획구의 분리 피크가 유사하게 검출되었다(Figs. 4A,B). 극성이 높은 펩타이드류 (Ac-FGV, PY, cPY)는 5~7분 사이에 검출되었고, 극성이 낮은 BZA는 27~28분 사이에서 검출되는 것을 확인할 수 있었다. 핵산 추출물의 경우 주로 펩타이드류가 주요 피크로 분리되었고, 에틸아세테이트 추출물의 경우 BZA가 주요 피크로 나타났다. 이를 정량적으로 비교하여 보면 네 가지

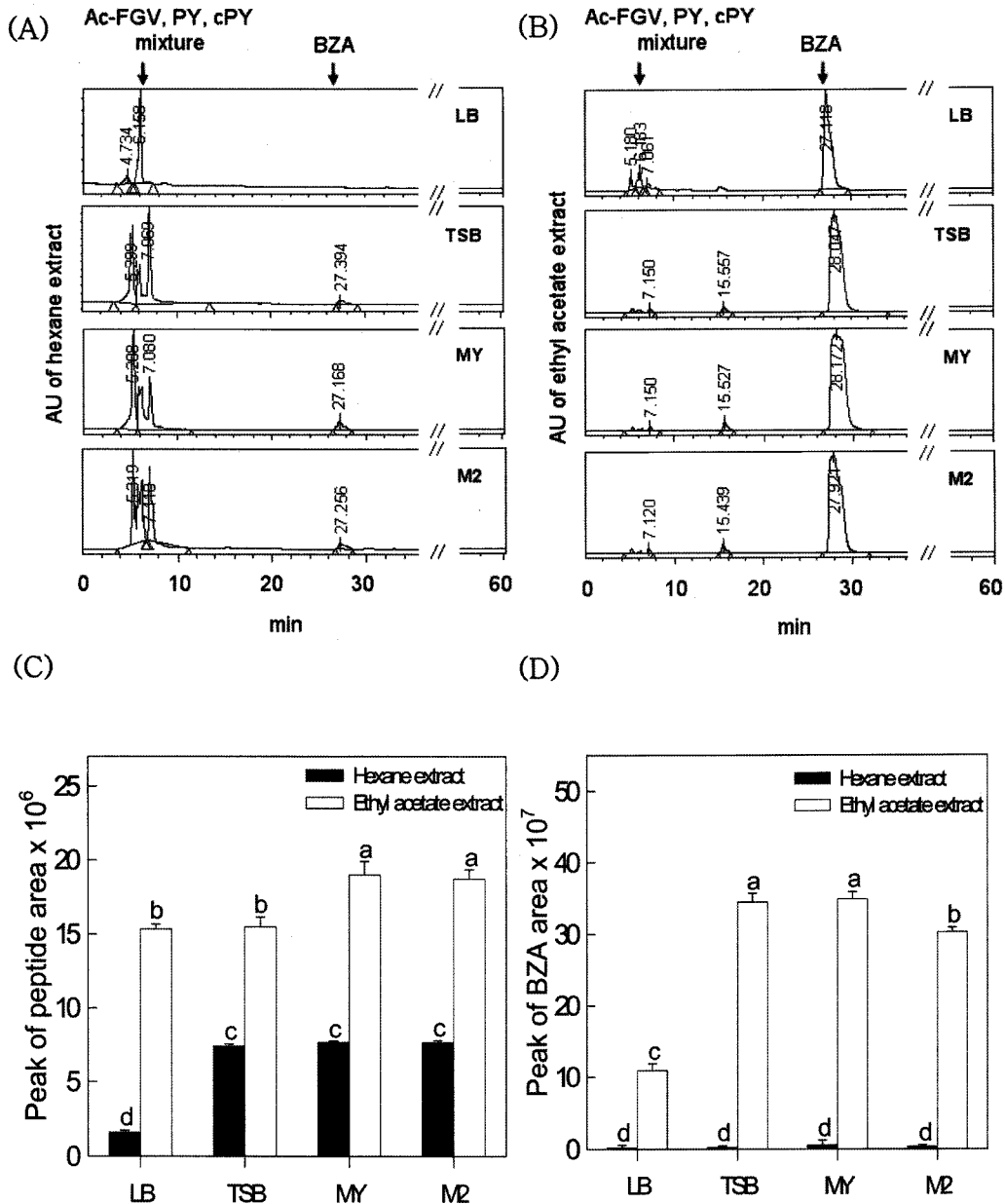


Fig. 4. Metabolite production of *Photorhabdus temperata temperata* cultured in different bacterial media (LB, TBS, MY, and M2). The 48 h culture broths were collected and sequentially extracted with hexane and ethyl acetate. HPLC analysis of both hexane (A, C) and ethyl acetate extracts (B, D) shows peaks at proline-tyrosine (PY), cyclo proline-tyrosine (cPY), acetylated phenylalanine-glycine-valine (AcFGV) mixture and benzylideneacetone (BZA). Three peptide peaks were combined in peak area estimation. Each treatment was independently replicated three times. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test).

배양액에서 유사하게 이들 면역억제물질을 생산한다는 것을 확인할 수 있지만(Figs. 4C,D), 특별히 산업용배지인 MY 배지에서는 비교적 안정적으로 높게 생산한다는 것을 확인할 수 있었다.

## 고 찰

본 연구는 비교적 가격 면에서 저렴한 산업용 배지(MY, M2)가 연구용 배지(LB, TSB)만큼 곤충병원세균의 배양 능력 및 유용 대사물질 생산을 유지하는 것을 나타냈다. 첫째로, 산업용 배지들은 모두 연구용 배지와 유사하게 성장 곡선을 나타내어 48 시간 이후에 정지상에 이르는 세균 성장 패턴을 보였다. 그러나 정지상에 도달한 세균 집단 밀도는 연구용 배지에 비해 산업용 배지에서 다소 낮은 밀도를 보였다. 그러나 이때 세균을 제외한 배양액에는 병원력에 영향을 주는 인자가 유사하게 분포했다는 것을 알 수 있다. 왜냐 하면, 이 배양액을 Bt와 혼합하여 처리하면 배추좀나방에 대한 Bt의 살충력을 증가시키는 효과가 있어서 유사하게 나타났다. 이러한 결과는 일반 산업용 배지에서도 Ptt 세균의 성장이 가능했으며, Bt 협력효과를 주는 물질의 합성도 가능했다는 것을 제시하고 있다. 여기서 Bt에 협력 효과를 주는 Ptt 배양 물질은 배추좀나방에 대해서 자체 경구 독성이라기보다는 이들이 갖는 면역 억제 효과에 따른 Bt의 병원력 증가로 해석된다(Jung and Kim, 2006). Ptt 배양액이 갖는 면역 억제 효과는 혈구세포의 활착행동을 억제하는 것으로 나타났다(Kim *et al.*, 2008). 혈구활착행동이 아이코사노이드류에 의해 매개되는 것을 박각시나방류의 일종인 *Manduca sexta*의 부정형혈구에서 보고되었다(Miller, 2005). 따라서 유사한 세균류에서 보고되었듯이 Ptt가 갖는 PLA<sub>2</sub> 억제 효과에 따라 아이코사노이드류의 생합성이 차단되어 나타나는 면역억제 현상으로 해석된다(Kim *et al.*, 2005). PLA<sub>2</sub> 촉매작용은 인지질로부터 아라키도닉산을 유지시키는 것으로 유래된 아라키도닉산을 다양한 산화과정을 통해 아이코사노이드로 전환된다(Stanley, 2006). 아이코사노이드는 곤충의 면역반응을 유발시키는데, 파밤나방(*Spodoptera exigua*)의 경우 prophenoloxidase를 함유하고 있는 편도혈구의 붕괴를 초래하며 이 효과가 혈관에서 활성화되는 것을 야기시킨다(Shrestha and Kim, 2008). 따라서 Bt가 증장세포층을 파괴시키고 혈장으로 침입할 경우 발생하는 면역 방어 작용을 Ptt 대사물질이 억제하여 줌으로 Bt의 패혈증 유발을 도와 병원력을 증가시키는

것으로 해석된다. 이러한 Bt의 패혈증 유발을 다시 장내 세균의 도움을 받아 이뤄지기 때문에(Broderick *et al.*, 2006) 혈장의 면역 저하는 이들 장내 세균들 성장을 촉진시켜 궁극적으로 Bt의 병원력을 증가시키는 결과가 나타나게 된다.

둘째로, 산업용 배지에서 성장되고 세균이 생산하는 물질은 연구용 배지와 유사하게 대사물질 총생산량에서 차이를 보이지 않았다. 세균의 이차대사산물을 본 연구에서는 유기 용매 추출물의 질량으로 분석했다. 이때 세균 배양에 따라 이들 이차대사산물의 생산량이 증가했으며, 세균의 성장 곡선에 비추어 거의 정지상에 다다른 시점에서 이차대사산물의 양도 최대치에 이르는 것을 보였다. 세균의 경우 자신들이 분비하는 물질에 따라 서로의 밀도를 감지할 수 있는 quorum sensing 기작을 갖고 이에 따라 이차대사산물의 생합성 관련 유전자의 발현을 유도할 수 있다고 알려져 있다(Demain, 1998). 특별히 Ptt와 같은 그람음성 세균의 경우 homoserine lactone류는 세균의 밀도가 높을 때 이차대사산물의 생산을 유도하는 유기자로 작용하게 된다(Huisman and Kolter, 1994). 즉, Ptt 세균의 성장과 함께 유도물질이 합성되어 방출되었고, 이를 감지한 세균들은 세포내 이차대사산물을 합성하도록 유기하여 세균 성장과 더불어 이들 물질의 증가가 나타났다고 볼 수 있다.

본 연구 결과에서 네 가지 세균 배지 배양액에서 비롯된 두 가지 유기 용매 추출물은 역상 HPLC 분석에서 다양한 검출 피크를 나타냈다. 이들 가운데 주요 피크는 기존에 *X. nematophila* 배양액에서 검출된 BZA, PY, Ac-FGV로 나타났다(Shrestha *et al.*, 2010). 최근에 Ptt 배양액에서 새롭게 검출되는 cPY가 본 연구에서도 검출되었다. 이들 모두는 PLA<sub>2</sub> 특이적 억제자인 bromophenacyl bromide와 유사한 구조를 지니며 곤충 PLA<sub>2</sub> 억제 작용을 가진 것으로 나타났다(Shrestha and Kim, 2009; Seo and Kim, 2009). 특별히 산업용 배지에서 성장한 세균이 이들 네 가지 물질을 모두 분비했다는 것은 다시 앞에서 기술된 Bt 병원력 증가 효과가 바로 이들 물질에 의해 야기되었음을 반증하는 것이다. 따라서 추후 Ptt를 이용하여 Bt의 협력제로 개발을 위해서는 가격이 저렴한 산업용 배지를 통해 대량배양이 가능하다는 것을 본 연구를 통해 제시한다.

## 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 *Neoplectana* 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.
- Demain, A.L. 1998. Induction of microbial secondary metabolism. *Intl. Microbiol.* 1: 259-264.
- Dennis, E.A. 1994. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A<sub>2</sub>. *J. Biol. Chem.* 269: 13057-13060.
- Dennis, E.A. 1997. The growing phospholipase A<sub>2</sub> superfamily of signal transduction enzymes. *Trends Biochem. Sci.* 22: 1-2.
- Dunphy, G.B. and J.M. Webster. 1991. Antihemocytic surface components of *Xenorhabdus nematophilus* var. *dutki* 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.
- 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.
- Gillespie, J.P., M.R. Kanost and T. Trenczek. 1997. Biological mediators of insect immunity. *Annu. Rev. Entomol.* 42: 611-643.
- Herbert, E. E. and H. Goodrich-Blair. 2007. Friend and foe: the two face of *Xenorhabdus nematophila*. *Nat. Rev. Microbiol.* 5: 634-646.
- Huisman, G.W., R. Kolter. 1994. Sensing starvation: a homoserine lactone-dependent signaling pathway in *Escherichia coli*. *Science* 265: 537-539.
- Jeon, C. and J. Gong. 1999. Microbial technology. Donghwa, Paju, Korea, pp. 191-208.
- Jung, S. and Y. Kim. 2006. Synergistic effect of entomopathogenic bacteria (*Xenorhabdus* sp. and *Photorhabdus temperata* ssp. *temperata*) on the pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* ssp. *aizawai* against *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environ. Entomol.* 35: 1584-1589.
- 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, J., M. Nalini and Y. Kim. 2008. Immunosuppressive activity of cultured broth of entomopathogenic bacteria on the beet armyworm, *Spodoptera exigua*, and their mixture effects with Bt biopesticide on insecticidal pathogenicity. *Kor. J. Pestic. Sci.* 12: 184-191.
- 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. Insect Physiol.* 89: 258-264.
- Kwon, B. and Y. Kim. 2008. Benzylideneacetone, an immunosuppressant, enhances virulence of *Bacillus thuringiensis* against beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 101: 36-41.
- Miller, J. 2005. Eicosanoids influence *in vitro* elongation of plasmacytes from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 59: 42-51.
- Park, S., G. Kim., M. Kim., Y. Kim., J. Kim, and H. Choi. 1997. Microbiological applications. Donghwa, Paju, Korea, pp. 61-82.
- 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.
- 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.
- SAS Institute, Inc. 1989. SAS/STAT user's guide, Release 6.03, Ed. Cary, NC.
- 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.
- Seo, S. and Y. Kim. 2010. Study on development of novel biopesticides using entomopathogenic bacterial culture broth of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*. *Kor. J. Appl. Entomol.* 49: 241-249.
- Shin, H. 1987. Biology of microorganisms. Hyungseol, Seoul, Korea, pp. 522-528.
- Shrestha, S., Y.P. Hong and Y. Kim. 2010. Two chemical derivatives of bacterial metabolites suppress cellular immune responses and enhance pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* against the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *J. Asia Pac. Entomol.* 13: 55-60.
- Shrestha, S. and Y. Kim. 2008. Eicosanoids mediate prophenoloxidase release from oenocytes 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.
- Stanley, D. 2000. Eicosanoids in invertebrate signal transduction systems. 277 pp. Princeton University Press, New Jersey.
- Stanley, D. 2006. Prostaglandins and other eicosanoids in insects: biological significance. *Annu. Rev. Entomol.* 51: 25-44.