

Insecticidal Activity and Stability by Freeze-drying of Entomopathogenic Bacteria, *Photorhabdus temperata* M1021

Gun-Seok Park · Eun-Kyung Jang · Min-Sung Kim · Jae-Ho Shin

동결건조에 따른 살충성 세균 *Photorhabdus temperata* M1021의 안정성과 살충성 평가

박건석 · 장은경 · 김민성 · 신재호

Received: 12 January 2012 / Accepted: 30 April 2012 / Published Online: 30 June 2012
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2012

Abstract In order to develop eco-friendly biopesticide, an entomopathogenic bacterium *Photorhabdus temperata* M1021 has been lyophilized via freeze-drying along with protective agents such as skim milk, starch, sodium alginate, glucose and sodium glutamate to protect cells from lysis. Freeze-drying powder of *P. temperata* M1021 containing 7% skim milk (w/v) showed highest survival rate of 63% among all the protective agents used in trials. Furthermore, the freeze-dried microbial powder showed 75% of survival rate after stored at 4°C for 4 weeks at air contact conditions. Injection toxicity of the freeze-dried sample was tested against larvae of *Galleria mellonella*. A dose of 2.0×10^1 cells of *P. temperata* M1021 killed 100% of the *G. mellonella* larvae within 4 days after injection. Moreover, 2.0×10^0 cells caused 50% mortality within the 4 days after injection. Freeze-dried *P. temperata* M1021 strains exhibited effective insecticidal activity and could be a better candidate for being used as a biopesticide.

Keywords biopesticide · freeze-drying · *Photorhabdus* · skim milk

서론

Photorhabdus 속 세균은 *Xenorhabdus* 속 세균과 더불어 곤충에게 독성을 나타내는 곤충병원성 선충의 장내에 공생하는 공생균으로 여러 종류의 살충단백질과 독성물질을 분비하여 직접적으로 곤충의 생장을 저해하거나 사멸시키는 것으로 알려져 있다(Daborn et al., 2002; Ji and Kim, 2004; Brugirard-Ricaud et al., 2005). 현재, 이러한 선충과 공생균으로 이루어진 공생체는 부가가치가 높은 작물의 생물학적 해충방제제로 제품화되어 판매되고 있으며, 해충의 방제에 매우 효과적이다(Kaya and Gaugler, 1993; Ehlers, 2001; Kaya et al., 2006). 그러나 공생 세균을 함유한 선충의 생산 및 제품화는 선충의 저장 안정성, 감염능의 저하 및 오염 등의 문제로 품질의 저하가 우려된다(Zhao et al., 2003; Wang et al., 2007). 곤충 병원성 선충의 공생세균의 일종인 *Xenorhabdus* 속 세균은 숙주선충인 *Steinernema* 속과 같이 곤충에 침투할 경우에만 높은 병원성을 나타내며(반수치사량, $LD_{50} < 100$ cells), 공생균만으로는 병원성이 매우 낮아진다($LD_{50} > 5,000$ cells). 그러나 *Photorhabdus* 속 세균은 숙주선충인 *Heterorhabditis*가 없더라도 꿀벌 부채명나방 유충에 대한 LD_{50} 수치가 100 cells 이하로 병원성이 매우 높으며, 나비목, 개미목과 모기 등에 대한 경구독성이 있는 것으로 알려져 있다(French-Constant and Bowent 1999; Dong Woon et al., 2002; Blackburn et al., 2005).

공생세균 자체로 높은 병원성을 가지는 *Photorhabdus* 속 세균을 미생물농약 소재로 직접 개발하기 위해서는 산업화에 적합한 제형을 가지는 제제화 실험이 필수적이다. 미생물농약의 안정화를 위한 제제화 기술로는 크게 기능성 고분자 및 다당류로 캡슐화시키는 방법과 세포보호제를 첨가하여 동결건조하는 방법이 주로 이용되고 있다(Bozolu et al., 1987; Zhao and Zhang 2005; Tao et al., 2009). 동결 건조시에는 온도와 수분의

G.-S. Park · E.-K. Jang · M.-S. Kim · J.-H. Shin (✉)
School of Applied Bioscience, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Republic of Korea
E-mail: jhshin@knu.ac.kr

E.-K. Jang
Food and biological resources examination division, Korean intellectual property office, Daejeon 302-701, Republic of Korea

손실을 최소화하기 위하여 skim milk, starch, dextran, polyvinylpyrrolidone (PVP)와 같은 고분자 물질과 glucose, sucrose, lactose, sodium glutamate 등과 같은 저분자 물질 등이 이용된다(Theunissen et al., 1993; Wolfe and Bryant, 1999). 현재까지 진행된 *Photobacterium* 속 세균의 제제화실험은 sodium alginate bead 내에 *P. luminescens* 배양균체를 캡슐화시킨 제제가 담배저세미나방(*Spodoptera litura*) 유충에 대한 구강 독성활성이 있다고 보고되어 있으나(Bashan et al., 2002; Rajagopal et al., 2006; Power et al., 2011) 보존제의 종류, 보존기간에 따른 균의 생존율과 살충력 등은 보고되어 있지 않다.

본 연구에서는 동결건조에 따른 공생세균의 생존율과 동결건조 시에 첨가되는 sodium alginate, starch, skim milk, glucose, sodium glutamate와 같은 보존제의 첨가 및 농도에 따른 균의 생존율을 확인하였다. 최종적으로 동결 건조된 분말의 꿀벌 부채명나방 유충에 대한 주사독성실험을 수행함과 동시에 보관기간에 따른 균주의 안정성을 확인하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 배양조건. 본실험에 사용된 *Photobacterium temperata* M1021 (KACC 91627P)은 곤충병원성 선충에서 분리한 높은 활성의 곤충병원성 공생세균으로 *Photobacterium* 균주는 TSB agar 배지를 이용하여 28°C에서 48시간 배양하여 사용하였다.

재료 및 시약. 동결건조 시 사용된 보존제인 skim milk, starch, sodium alginate, glucose, sodium-glutamate 등은 Sigma-Aldrich Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다. *Photobacterium* 균주의 배양용 배지인 trypticsoy broth (TSB)는 Becton, Dickinson and Company (USA)에서 구입하여 사용하였고, 기타 시약은 각 제조사의 특급시약을 사용하였다.

동결건조 시료의 제조. 동결건조에 사용할 균체는 본배양에서 48시간 배양한 *P. temperata* M1021의 배양액을 4°C에서 10,000 rpm의 속도로 20분간 원심분리하여 균체를 회수한 뒤 0.85%의 멸균 생리식염수에 1회 세척한 후 동일한 식염수에 현탁하였다. 동결건조 시 균체의 생존율에 영향을 미치는 보존제의 효과를 확인하기 위하여, skim milk, starch, sodium glutamate는 각각 15% (w/v) 농도로 제조하였으며, 점성이 높아 고농도의 실험이 어려운 sodium alginate는 4% (w/v), glucose의 경우 2% (w/v) 농도로 제조하여 사용하였다. 균체 현탁액에 첨가하는 보존제의 최종농도가 starch와 sodium glutamate는 각각 1, 3, 5, 7% (w/v), skim milk는 1, 5, 7, 10% (w/v), glucose는 0.5, 1% (w/v), sodium alginate는 0.5, 1, 1.5% (w/v) 농도가 되게 각각 첨가하였다. 각각의 보존제를 첨가하여 균일하게 혼합한 다음 -70°C에서 완전히 동결한 후, 동결건조기(LABCONCO, USA)를 사용하여 3일간 동결건조 하였다. 동결건조가 완료된 시료는 시료의 무게를 측정하고 다음 균일하게 분쇄하여 4°C에서 냉장 보관하였다.

동결건조 처리 후 균의 생존율 조사. 각 보존제 종류 및 농도에 따른 균의 생존율을 알아보기 위하여 각각의 보존제가 농도별로 함유된 *P. temperate* M1021 균주의 동결건조 시료를 각각 0.1 g씩 취하여 10 mL의 0.85% 멸균 생리식염수에 완전히 현탁시킨 후, 동일한 식염수에 10^{-1} ~ 10^{-6} 으로 희석하였다. 단계별로 희석한 시료를 TSB agar plate에 100 μ L씩 도말한 다음

28°C에서 48시간 배양하여 균 수를 측정하였다.

동결건조 처리 후 균의 저장성 조사. 동결건조 처리한 미생물 시료의 저장성을 알아보기 위하여 각 보존제의 첨가 농도별로 저장기간에 따른 생존율 변화를 측정하였다. 4°C에서 2주 간격으로 8주간 동안 측정하였으며, 동결건조 시료를 각각 0.1 g씩 취하여 10 mL의 멸균 생리식염수에 완전히 현탁시킨 후, 단계별로 희석하여 TSB agar plate에 100 μ L씩 도말한 다음 28°C에서 48시간 동안 배양하여 균수를 측정하였다.

동결건조 처리 후 균의 살충력 조사. 균의 살충력 시험을 위하여 각각의 동결건조 시료를 0.1 g/mL로 제조한 다음 멸균생리식염수를 이용하여 10^{-1} ~ 10^{-4} 배로 희석하였다. 희석한 시료는 microsyringe를 이용하여 5령 이상의 꿀벌 부채명나방 유충의 혈체강(hemolymph)에 3 μ L씩 주사한 다음, 25 incubator에 보관하면서 24시간 간격으로 사멸율을 조사하였다. 각각의 실험에서 유충은 10 마리씩 사용하였으며 모든실험은 3회 이상 반복하여 수행하였다.

결과 및 고찰

동결에 따른 균의 생존율 변화. 동결건조 후의 생존율은 수차례의 반복실험에서도 동일하게 0.08–0.13%로 극히 낮았다(Fig. 1).

동결건조 시 첨가된 보존제 종류에 따른 생존율 변화. 보호제로 skim milk를 첨가한 경우 농도가 증가할수록 동결건조 시료에서의 *P. temperata* M1021 균주의 생존율도 점차 증가하여 7% (w/v) 일때 가장 높은 63%의 생존율을 나타내었으나 10% 이상에서는 생존율이 감소하였다(Fig. 1A). Starch와 sodium alginate는 미생물의 보존 및 캡슐화에 많이 사용되는 고분자 물질로 알려져 있다. 본 실험에서는 starch의 첨가농도가 5% (w/v) 일때와 sodium alginate의 첨가농도가 1.5% (w/v)일 때 각각 3.53와 3.4%의 생존율을 나타내어 보존제를 첨가하지 않은 대조군에 비하여 약 30배 이상의 보존효과를 나타내었으나 skim milk의 효과에 비해 상대적으로 크지 않았다(Fig. 1B-C). Sodium glutamate를 첨가한 경우에는 Fig. 1D에서와 같이 동결건조에 따른 세포 보호효과가 전혀 나타나지 않았다. Glucose를 보호제로 사용했을 경우 1% (w/v)의 농도에서 2.11%의 생존율을 나타내는 보호효과가 있었으나, glucose가 1.5% (w/v) 이상 첨가되었을 경우에는 동결건조 후 정상적인 분말을 형성하지 못하는 단점이 있으므로 1% (w/v)를 초과하는 농도에서는 실험을 수행하지 못하였다. Sodium alginate가 세포의 생존율에는 크게 영향을 미치지 않았으나 주로 미생물의 캡슐화에 사용된다는 점에 착안하여 sodium alginate 1.5% 및 skim milk 7%를 혼합하여 보호효과의 상승을 기대하였으나 이러한 배합으로는 오히려 생존율이 낮아지는 결과를 확인하였다(테이더 미제시). 또한 일반적으로 미생물 보존 시에 사용하는 glycerol을 25% (v/v) 첨가하여 동일한 실험을 진행하였을 경우의 생존율은 73%로 매우 좋게 나타났으나 점성이 지나치게 높아 동결건조 후 분말형태로 가공할 수 없으므로 미생물 제제로 만들수 없었다(테이더 미제시).

저장기간에 따른 동결건조 균주의 안정성. 동결건조 직후의 생균수를 100%로 할 때, skim milk가 첨가되지 않은 경우 2주 차의 시험에서 모두 사멸한 것으로 나타났다(Fig. 2). Skim milk의 농도를 5 및 10% (w/v) 첨가한 경우에는 동결건조 4주

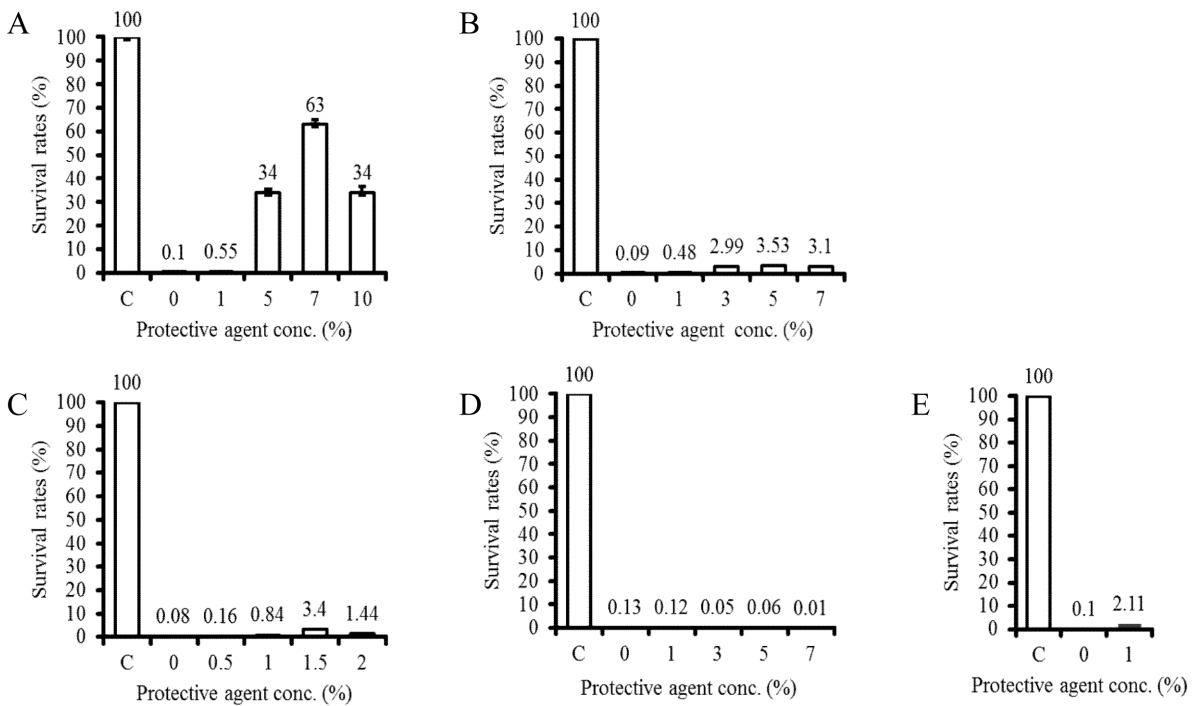


Fig. 1 Comparative effect of different protective agents on *Photorhabdus temperata* strain M1021 after freeze-drying. *P. temperate* M1021, has been lyophilized via freeze-drying along with protective agents such as skim milk, starch, sodium alginate, glucose and sodium glutamate to protect cells from lysis. Percentage of survival rates of *P. temperata* M1021 with (A), skim milk; (B), starch; (C), sodium alginate; (D), sodium glutamate; (E), glucose. Error bars represent SD.

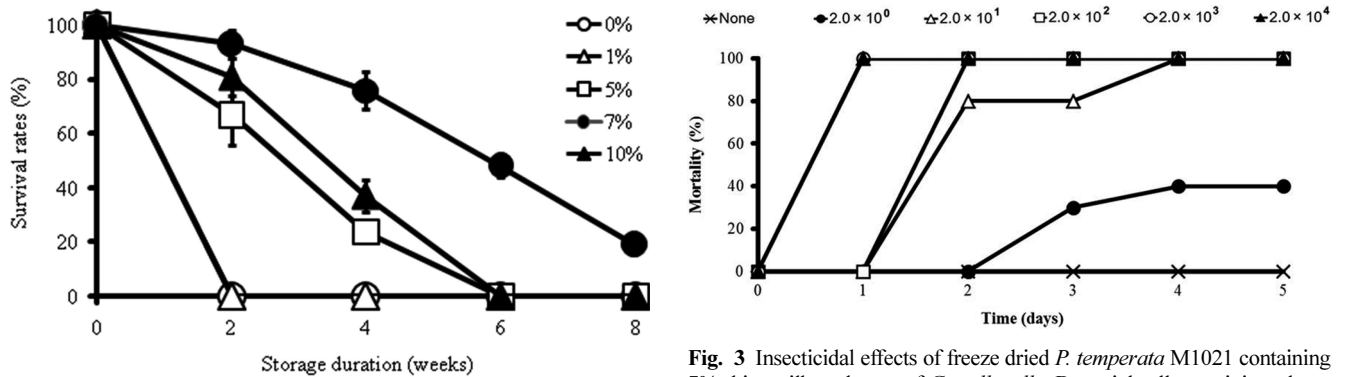


Fig. 2 Effects of skim milk (0–10%) on viability of freeze dried powder of *P. temperata* strain M1021 stored at 4°C. The skim milk was added to the concentrated cell suspension (25×), finally (○), 0%; (△), 1%; (□), 5%; (●), 7%; (▲), 10%. Error bars represent SD.

후에 각각 24.38와 36.74%의 생존율을 나타내었으나 6주 후에는 거의 모든 균이 사멸하였다(Fig. 2). Skim milk를 7% (w/v) 농도로 첨가한 시료는 *P. temperata* M1021 균주의 75% 이상이 저장 4주 까지도 유지되는 것으로 나타났으며 6주 및 8주 후에도 각각 48, 18.5%의 생존율을 보였다(Fig. 2). 동결건조 균을 산소가 없이 포장하여 밀봉하고 저온에서 보관하였을 경우에는 6개월 후에도 50% 이상의 생존율이 나타났다(데이터 미 제시).

***P. temperata* M1021 균주 동결건조 분말의 살충력 시험.** *P. temperata* M1021 균주의 주사량이 2.0×10^3 cells 이상일 때는

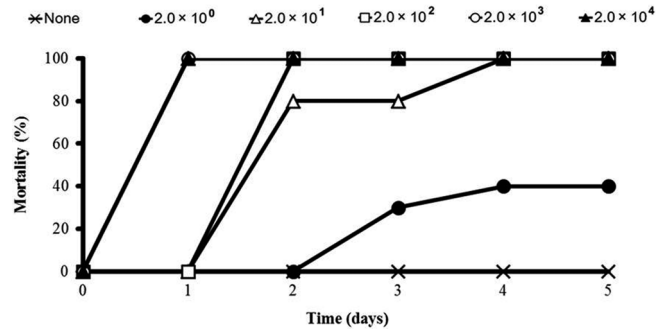


Fig. 3 Insecticidal effects of freeze dried *P. temperata* M1021 containing 7% skim milk on larvae of *G. mellonella*. Bacterial cell were injected at a concentration of (▲), 2.0×10^4 ; (○), 2.0×10^3 ; (□), 2.0×10^2 ; (△), 2.0×10^1 ; (●), 2.0×10^0 cells in 3 μ L of 0.85% NaCl solution per larva for *G. mellonella*. (×), controls received the same quantities of sterile NaCl solution. Ten larvae of *G. mellonella* were inoculated for treatment.

주사 후 24시간 이내에 모든 유충이 사멸 하였으며, 2.0×10^1 cells이 주사되었을 경우에도 유충의 80%가 2일 이내에 사멸하는 것으로 나타났다(Fig. 3). 또한, 2.0×10^0 cells의 아주 낮은 농도에서도 유충의 50%가 주사 후 4일만에 사멸하는것으로 보아, 동결건조된 *P. temperata* M1021 균주가 꿀벌부채명 나방유충의 혈체강 내에서 활발히 증식하여 독성을 나타내는 것으로 보인다.

오늘날 생물체제로 활발히 연구되고 있는 *Pseudomonas fluorescens* PF-5와 *P. fluorescens* CHA0의 경우 3 cells/larva의 낮은 농도에서도 꿀벌 부채명나방 유충에 대한 사멸율이



Fig. 4. Post injection morphological symptoms appeared in *G. mellonella*. (A), larvae injected with 0.85% NaCl solution; (B), larvae injected with 2.02×10^2 cells of freeze dried *P. temperata* M1021 turned to brick red color.

10~65%로 보고되고 있다(Baehler et al., 2005; Péchy-Tarr et al., 2008). 본 연구에서 사용된 *P. temperata* M1021 균주는 제제화를 위한 동결건조 후 매우 낮은 농도에서도 유충에 대한 살충효과가 뛰어난 것으로 조사되었으며 이를 이용한 실질적 생물학적 해충 방제제로의 개발가능성이 높을 것으로 기대된다. *P. temperata* M1021 균주에 의한 꿀벌 부채명나방 유충에 나타나는 사체의 전형적인 양상은 Fig. 4에서와 같이 유충이 죽은 후 몸이 붉게 변하며 팽압을 상실하는데, 이것은 *Photorhabdus* 균주가 생산하는 anthraquinone 색소에 의한 것으로, *P. luminescens*와 *P. temperata* 균주만의 특징이라 할 수 있다(Kuwata et al., 2008). 따라서 본 연구에서 사용된 동결건조 *P. temperata* M1021에 의한 주사독성의 발현은 오로지 동결건조된 살충균에 의한 효과로 확인되었다.

초 록

오늘날 환경친화적인 생물농약을 개발하기 위한 미생물로는 *Bacillus thuringiensis* 이외에 *Photorhabdus*, *Xenorhabdus* 및 *Serratia*와 같은 곤충병원성 미생물과 *Pseudomonas*와 같은 식물유용 미생물에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 본 연구에서는 곤충병원성 미생물인 *Photorhabdus temperata* M1021 균주를 동결건조법을 이용하여 제제화 하였으며, 동결건조 시 세포보호를 위하여 skim milk, starch, sodium alginate, glucose와 sodium glutamate를 농도별로 첨가하여 동결 건조 후의 세포 생존율을 확인하였다. 그 결과 7% (w/v)의 skim milk가 첨가된 시료에서 가장 높은 63%의 생존율을 나타내었다. 제제화된 동결 건조균을 공기와 접촉시키면서 저온에서 생존율을 측정한 결과 4주 후에도 75% 이상의 생존율을 나타내었다. 또한 제제를 이용한 살충력 시험에서 꿀벌 부채명나방 유충에 대한 주사독성은 2.0×10^1 cells/larva 이상을 주사할 경우 4일 이내에 전체유충이 사멸하는 것으로 나타났으며, 2.0×10^0 cells/larva의 아주 낮은 농도에서도 50% 이상의 유충사멸 효과를 확인하였다. 본 연구에서 사용된 *P. temperata* M1021 균주의 동결건조 분말의 뛰어난 살충효과는 보다 현실적인 생물학적 제제로의 개발가능성을 제시하고 있다.

Keywords biopesticide · freeze-drying · *Photorhabdus* · skim milk

감사의글 이 논문은 2010년도 정부의 재원으로 한국연구재단의 기초연구사업(과제번호 2010-0009969)과 환경부의 “차세대 예코 이노베이션 사업”으

로 지원받은 연구이며, 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

- Baehler E, Bottiglieri M, Pechy-Tarr M, Maurhofer M, and Keel C (2005) Use of green fluorescent protein-based reporters to monitor balanced production of antifungal compounds in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J Appl Microbiol* **99**, 24–38.
- Bashan Y, Hernandez J-P, Leyva L, and Bacilio M (2002) Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria. *Biol Fertil Soils* **35**, 359–68.
- Blackburn MB, Domek JM, Gelman DB, and Hu JS (2005) The broadly insecticidal *Photorhabdus luminescens* toxin complex a (Tca): Activity against the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, and sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci*. *J Insect Sci* **5**, 32.
- Bozolu TF, Özlgen M, and Bakir U (1987) Survival kinetics of lactic acid starter cultures during and after freeze drying. *Enzym Microbiol Technol* **9**, 531–7.
- Brugirard-Ricaud K, Duchaud E, Givaudan A, Girard PA, Kunst F, Boemare N et al. (2005) Site-specific antiphagocytic function of the *Photorhabdus luminescens* type III secretion system during insect colonization. *Cell Microbiol* **7**, 363–71.
- Daborn PJ, Waterfield N, Silva CP, Au CPY, Sharma S, and French-Constant RH (2002) A single *Photorhabdus* gene, makes caterpillars floppy (mcf), allows *Escherichia coli* to persist within and kill insects. *Proceed Natl Acad Sci* **99**, 10742–7.
- Dong Woon L, Ho Yul C, Ok Jin S, Jae Su Y, and Young Sub K (2002) Damage of perennial ryegrass *Liatum perenne* by Chestnut Brown Chafer, *Adoretus tenuimaculatus* (Coleoptera: Scarabaeidae) and biological control with Korean isolate of entomopathogenic nematodes. *Korean J Appl Entomol* **41**, 217–23.
- Ehlers R-U (2001) Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. *Appl Microbiol Biotechnol* **56**, 623–33.
- French-Constant R and Bowent D (1999) *Photorhabdus* toxins: Novel biological insecticides. *Curr Opin Microbiol* **2**, 284–8.
- Ji D and Kim Y (2004) An entomopathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophila*, inhibits the expression of an antibacterial peptide, cecropin, of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *J Ins Physiol* **50**, 489–96.
- Kaya HK, Aguilera MM, Alumai A, Choo HY, de la Torre M, Fodor A et al. (2006) Status of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria from selected countries or regions of the world. *Biol Control* **38**, 134–55.
- Kaya HK and Gaugler R (1993) Entomopathogenic Nematodes. *Ann Rev Entomology* **38**, 181–206.
- Kuwata R, Yoshiga T, Yoshida M, and Kondo E (2008) Mutualistic association of *Photorhabdus* asymbiotica with Japanese heterorhabditid entomopathogenic nematodes. *Microb Infect* **10**, 734–41.
- Péchy-Tarr M, Bruck DJ, Maurhofer M, Fischer E, Vogne C, Henkels MD et al. (2008) Molecular analysis of a novel gene cluster encoding an insect toxin in plant-associated strains of *Pseudomonas fluorescens*. *Environ Microbiol* **10**, 2368–86.
- Power B, Liu X, Germaine KJ, Ryan D, Brazil D, and Dowling DN (2011) Alginate beads as a storage, delivery and containment system for genetically modified PCB degrader and PCB biosensor derivatives of *Pseudomonas fluorescens* F113. *J Appl Microbiol* **110**, 1351–8.
- Rajagopal R, Mohan S, and Bhatnagar RK (2006) Direct infection of *Spodoptera litura* by *Photorhabdus luminescens* encapsulated in alginate beads. *J Invertebrate Pathol* **93**, 50–3.
- Tao XQ, Lu GN, Liu JP, Li T, and Yang LN (2009) Rapid degradation of phenanthrene by using *Sphingomonas* sp. GY2B immobilized in calcium alginate gel beads. *Int J Environ Res Public Health* **6**, 2470–80.
- Theunissen JJ, Stolz E, and Michel MF (1993) The effects of medium and rate of freezing on the survival of chlamydiae after lyophilization. *J Appl Bacteriol* **75**, 473–7.
- Wang L, Li XF, Zhang J, Zhao JZ, Wu QJ, Xu B et al. (2007) Monitoring of resistance for the diamondback moth to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac

- and Cry1Ba toxins and a Bt commercial formulation. *J Appl Entomol* **131**, 441–6.
- Wolfe J and Bryant G (1999) Freezing, drying, and/or vitrification of membrane–solute–water systems. *Cryobiology* **39**, 103–29.
- Zhao G and Zhang G (2005) Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying. *J Appl Microbiol* **99**, 333–8.
- Zhao J-Z, Cao J, Li Y, Collins HL, Roush RT, and Earle ED (2003) Transgenic plants expressing two *Bacillus thuringiensis* toxins delay insect resistance evolution. *Nat Biotechnol* **21**, 1493–7.