

곤충병원성 선충과 공생박테리아의 지방산 함량 분석

박선호^{1,2}, 김효현¹, 김지연²계명대학교 공학부¹, (주)바이코시스 부설연구소²

전화 (053)580-5457, 587-1034/5, FAX (053)587-1034

Abstract

The fatty acid compositions of entomopathogenic nematodes *Steinernema carpocapsae* strain produced *in vitro* and *in vivo* were examined. Nematodes cultured both *in vitro* and *in vivo* revealed similar fatty acids compositions with respect to 16, 18, 20 carbons. However, the contents of lipids were varied by culture methods. Furthermore, it was distinctive that nematodes cultured *in vitro* contained fatty acids with 19 carbon. In the case of symbiotic bacterium *Xenorhabdus nematophilus* isolated from *Steinernema carpocapsae*, the major lipid component was palmitic (c16:0) fatty acids.

서론

최근 유기 합성 농약의 단점을 극복하고 각종 환경 규제에 능동적으로 대처할 수 있는 새로운 천적 산업에 곤충병원성 선충(Entomopathogenic Nematodes)이 주목받고 있다. 곤충병원성 선충은 자기 몸속에 함께 공생하는 박테리아인 *Xenorhabdus* spp.와 작용하여 곤충에 폐혈증을 유발시킴으로서 48시간 이내에 기주를 치사시키는 우수한 병원성을 지니고 있다. 또한 넓은 기주범위와 뛰어난 기주 탐색 능력 및 해충 사멸 능력을 갖고 있어 차세대 생물 농약으로 크게 기대되고 있다.¹⁾ 외국의 경우 곤충병원성 선충을 대량배양 하고 있으며 또한 장기간 보관하여 제품으로 판매하고 있다. 그리고 최근에는 그 선충의 병원성, 생존력, 저장수명 등을 높이는 많은 연구가 진행되고 있으나 국내에서는 아직 이러한 연구가 기초 단계에 불과하다.

곤충병원성 선충은 체내에 에너지를 지질로 변환하여 저장하며 높은 지질의 함량으로 IJs(Infected Juveniles)를 오랜 기간 저장할 수 있다고 알려져 왔다.^{2,3)} 또한 *in vivo*에서 생산된 곤충병원성 선충은 *in vitro*에서 생산된 선충보다 병원성과 저장수명이 우수하며,⁴⁾ 곤충병원성 선충과 공생박테리아의 지방산 함량은 인공배지 및 대상 해충에 따라 달라진다고 알려져 있다.⁵⁾ 예를 들면 곤충병원성 선충 연구 초기에 Poinar는 액체배양으로 곤충병원성 선충 *Heterorhabditis bacteriophora*를 생산하였지만 인공배지의 잘못된 선택으로 선충의 병원성과 무관한 지방산을 가지는 선충을 생산함으로써 선충의 살충력이 감소하는 결과를 가져왔다.⁶⁾ 또한 곤충병원성 선충의 병원성 및 저장수명을 높이는 여러 방법 중 최근에는 선충내 지질의 성분 비율이 밝혀졌고, 그 지질 성분 가운데 일부가 다른 해충을 찾기 위한 에너지로 이용된다는 사실을 알아냈으며, 또한 토양내 먹이가 없을 경우 선충은 가지고 있는 지질을 분해하면서 생존해 나간다는 것이 보고 되고 있다.^{7,8)}

본 연구에서는 곤충병원성 선충인 *Steinernema carpocapsae*종의 병원성 및 저장수명 등을 향상시키는 방법에 대한 기초 자료를 제공하고자 선충내 지방산과 공생박테리아인 *Xenorhabdus nematophilus*종의 지방산의 함량을 분석하고, 배양 조건에 따른 각각의 지방산 성분에 대한 농도의 차이를 비교, 분석하였다.

재료 및 방법

1. 곤충병원성 선충 및 공생박테리아 배양

곤충병원성 선충을 *in vivo*로 배양하기 위해 꿀벌부채명나방(*Galleria mellonella*)의 3령 유충을 기주로 사용하였다. 본 연구에 사용된 곤충병원성 선충인 *Steiner-nema carpocapsae*종의 *in vivo*배양은 3령 단계의 꿀벌부채명나방 유충에 선충을 접종한 후 25°C에서 5~7일간 배양 후 수확하여 사용하였고, *in vitro*배양은 동·식물의 기름성분, 단백질, salt, yeast 등으로 조제한 혼합배지에 선충을 1500마리/mL로 250mL 삼각 flask에 접종하였다. 선충의 배양부피는 20mL이며 25°C에서 약 12일간 배양한 선충을 사용하였다. 또한 NBTA(Nutrient Bromothymol blue TTC Agar)배지를 이용하여 박테리아를 계대 내린 다음 28°C Incubator에서 약 5일간 증식시킨 후 그 박테리아를 현탁하여 사용하였다.

2. 지방산 분석을 위한 곤충병원성 선충의 전처리

곤충병원성 선충의 지방산 분석은 선충을 다른 배지나 성분으로부터 순수하게 분리하는 것이 중요하므로 *in vivo* 수확된 선충은 White Trap을 설치하여 분리하였고, *in vitro* 수확된 선충은 깨끗하게 세척한 후 사용하였다. 분리된 선충은 초순수 증류수로 3회 세척과정을 거친 후 현미경으로 정확한 선충의 개체수를 조사하였다. 곤충병원성 선충의 농도는 5×10^6 마리/Total를 사용하였으며, 개체수 조사가 끝나면 선충의 수분을 대부분 제거하기 위해 5 μ m mesh로 선충을 걸었다. 이렇게 분리된 선충은 각각의 지방산 성분 및 함량을 조사하기 위해서 먼저 시험관(13×100mm)에 reagent 1(NaOH 45g, CH₃OH 150mL, 초순수 150mL)을 1mL 넣은 후 백금 루프를 이용하여 수분을 제거한 선충을 모두 긁어 넣고 5-10초 동안 vortex로 현탁하였다. 100°C 항온조에 5분간 담근 후 다시 vortex에서 5-10초 동안 현탁하고 100°C의 항온조에 25분간 두었다. 그런 다음 얼음 통에 넣어 가급적 급속 냉각하고 reagent 2(6N HCl 325mL, CH₃OH 275mL)를 2mL 시험관에 넣고 vortex를 이용하여 5-10초 동안 섞어주었다. 그리고 80°C 항온조에 10분간 담근 후 얼음에서 최대한 신속히 냉각시켰다. 이 과정이 가장 중요한 처리과정으로 지방산의 추출량과 직접적으로 관련이 된다. 그런 다음 reagent 3(hexane, methyl tert-Butyl ether: 1/1)을 1.25mL 시험관에 첨가하였으며, 이때 시험관에 층이 생김을 확인할 수 있었다. 또한 시험관을 orbital shaker를 이용하여 10분간 천천히 흔들며 층을 더 분리하였다. 하등액을 pasteur pipet을 이용하여 2-3회에 걸쳐 완전히 제거한 후 reagent 4(NaOH 10.8g, 초순수 900mL)를 3mL 시험관에 넣고 시험관을 orbital shaker를 이용하여 5분간 천천히 흔들었다. 만약 층이 확실히 나누어지지 않을 경우에는 냉장고에 잠시 넣어두거나 또는 reagent 5(saturated NaCl/water solution)를 이용하여 분리하였으며, 최종 처리된 상등액은 pasteur pipet을 이용하여 GC 분석용 vial에 최소 150 μ L 이상을 넣었다.

3. 지방산 분석을 위한 공생박테리아의 전처리

분리된 공생박테리아의 지방산 성분 및 함량을 조사하기 위해서 먼저 시험관(13×100mm)에 reagent 1(NaOH 45g, CH₃OH 150mL, 초순수 150mL)을 1mL 넣은 후 백금 루프를 이용하여 TSA(Trypticase Soy Broth 30g, Bacto Agar 15g, 초순수 1L)배지에서 배양한 공생박테리아를 한 루프 정도 넣고 5-10초 동안 vortex로 현탁하였다. 이렇게 sample을 준비하였고, 다음 과정은 선충의 지방산 전처리 방법과 동일하게 시행하였다.

4. GC(Gas Chromatography)를 이용한 지방산 분석

지방산 분석은 GC(HP6890, USA)를 이용하였으며, 운반 기체는 수소, Oven에서의 초기 온도는 170°C, Column은 HP 19091B-102(Ultra 2.5% phenyl methyl

siloxane, L25m×φ200 μ m, 초기 유속은 0.4mL/min)를 사용하였다. 또한 FID (flame ionization detector)를 사용하였고, 투입되는 시료의 양은 2 μ L를 사용하였다. 지방산 성분 및 함량의 최종분석은 Sherlock Software를 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

Fig. 1은 혼합배지를 이용하여 곤충병원성 선충을 *in vitro* 증식시킨 후 그 선충을 지방산 전처리 과정을 거쳐 지방산을 분석한 결과를 나타낸 것이다. 지방산 분석 결과 *in vitro*에서 수확된 선충의 대부분은 16, 18, 19, 20개의 탄소를 가지는 지방산인 것으로 나타났다. 그 중에서도 탄소 18개를 가지는 지방산이 가장 많이 나왔고, 그 다음으로 19개, 20개, 16개의 탄소를 가지는 지방산의 순이었다. *In vivo*에서 수확한 선충도 역시 탄소 18개를 가지는 지방산이 가장 많이 나왔으나, 그 다음으로 많이 나온 지방산은 탄소 16개를 가지는 지방산이어서 *in vitro*에서 수확한 선충과 다른 결과를 보였다(all data not shown). Fig. 2는 곤충병원성 선충의 몸속에 있는 공생박테리아내 지방산 성분들을 분석한 것으로 탄소 14, 16, 18개를 가지는 지방산이 대부분인 것을 확인하였다. 공생박테리아의 지방산은 탄소 16개를 가지는 성분이 가장 많이 나왔으며, 다음으로 18개, 14개의 탄소를 가지는 지방산 순이었다. 곤충병원성 선충과 공생박테리아의 지방산 성분을 비교해 보면 16, 18개의 탄소를 가지는 지방산은 비슷하나 성분의 농도와 다른 지방산 성분과의 차이가 많이 나는 것을 확인하였다.

요약

본 연구에서는 국내에서 분리된 곤충병원성 선충인 *Steinernema carpocapsae*종과 공생박테리아인 *Xenorhabdus nematophilus*종의 지방산을 분석하여 비교하였다. *In vitro*에서 수확된 곤충병원성 선충은 탄소 18개를 함유한 지방산이 가장 많은 것을 확인할 수 있었고, *in vivo*에서 수확된 곤충병원성 선충도 탄소 18개를 함유한 지방산이 가장 많은 것을 확인할 수 있었다. 하지만 그 다음으로 많은 지방산 성분이 *in vitro*에서 수확된 선충의 경우 탄소가 19개인데 비해 *in vivo*에서는 16개의 탄소를 가진 지방산인 것으로 나타나 차이점이 있는 것으로 확인되었다. 공생박테리아인 경우는 탄소의 수가 16개인 지방산이 가장 많이 함유된 것으로 나타났다.

감사

본 연구는 2000년도 산업자원부 신기술창업보육사업(TBI)에 의해 지원되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 박선호, 김도완 "곤충병원성 선충을 이용한 무공해생물농약"(1998), *한국생물공학회*, 12(3), 261-268.
2. Abu Hatab, M. and Gaugler, R. "Influence of growth temperature on fatty acids and phospholipids of *Steinernema riobravis* infective juveniles" (1997), *J. Therm. Biol.*, 22, 237-244.
3. Selvan, S., Gaugler, R. and Lewis, E. E. "Biochemical energy reserves of entomopathogenic nematodes"(1993), *J. Parasitol.*, 79, 167-172.
4. Gaugler, R. and Georgis, R. "Culture methods and efficacy of entomopathogenic nematodes"(1992), *Biol. Contr.*, 1, 269-274.
5. Abu Hatab, M. and Gaugler, R., "Growth-mediated variations in fatty

- acids of *Xenorhabdus* sp.”(1997), *J. Appl. Microbiol.*, 82, 351-358.
6. Georgis, R. and Gaugler, R. “Predictability in biological control using entomopathogenic nematodes”(1991), *J. Econ. Entomol.*, 84, 713-720.
 7. Patel, M. N. and Wright, D. J. “Fatty acid composition of neutral lipid energy reserves in infective juveniles of entomopathogenic nematodes” (1997), *Comp. biochem. physiol.*, 118B(2), 341-348.
 8. Patel, M. N., Stolinski, M. and Wright, D. J. “Neutral lipid and the assessment of infectivity in entomopathogenic nematodes: observations on four *Steinernema* species”(1997), *J. Parasitol.*, 114, 489-496.

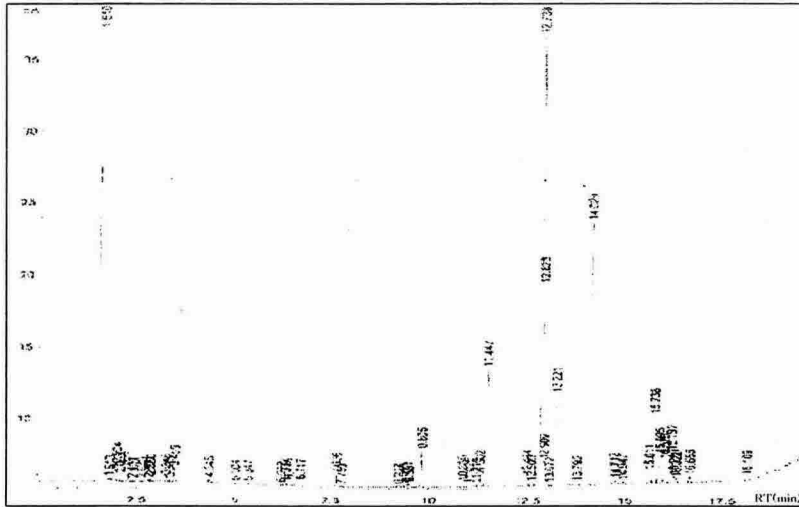


Fig. 1. Fatty acids of *S. carpocapsae* strain produced by *in vitro*

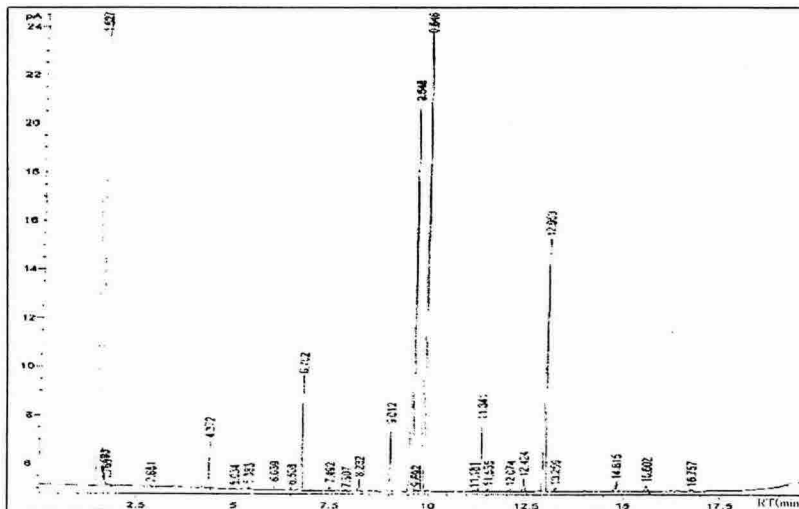


Fig. 2. Fatty acids of *Xenorhabdus nematophilus* strain