

국내 식물시료에서 분리한 *Bacillus thuringiensis* 균주의 다양성

박승환* · 구본탁 · 신병식 · 최수근 · 정영미 · 반재구¹ · 김정일
한국과학기술연구원 생명공학연구소 응용미생물연구부, ¹생물공정연구부

Characterization of 1,925 *Bacillus thuringiensis* isolates from plants in Korea. Seung-Hwan Park*, Bon-Tag Koo, Byung-Sik Shin, Soo-Keun Choi, Young-Mee Jeong, Jae-Gu Pan and Jeong-Il Kim. Applied Microbiology Research Division, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Taejon 305-600, Korea - We collected 3,237 plant samples, mainly leaves of various trees, from many provinces in Korea and a total of 1,925 *Bacillus thuringiensis* isolates were obtained and characterized. The isolates were characterized in terms of crystal morphology, PAGE pattern of the toxin proteins, plasmids pattern, biochemical characteristics, and bioassay. The microscopic observation showed that 49.1% of the isolates have bipyramidal shape crystals, 7.1% of spherical shape crystals, 1.4% of rhomboidal shape crystals, and others have small or amorphous inclusions. The insecticidal activities of the spore-crystal mixtures of isolates were tested against *Plutella xylostella*, *Bombyx mori*, *Culex pipiens*, and *Agelastica coerulea*. Bioassay showed that 51.3% of the isolates were shown to be active; lepidopteran-specific (44.8%), dipteran-specific (4.9%) and coleopteran-specific (1.6%). The remainder (48.8%) did not show any activity against the insects we tested. Interestingly though, some of these non-active isolates were shown to have bipyramidal crystals. By serotyping 22 isolates of our collection, we found that there are various kind of subspecies such as *aizawai*, *amagiens*, *canadensis*, *darmstadiensis*, *galleriae*, *finitimus*, *kurstaki*, *morrisoni* and *neoleonensis*, and three isolates have been classified into a new serotype, H49, and one of them, the type strain, named subsp. *muju*. From this study it was found that phylloplane is a good source for the isolation of *Bacillus thuringiensis*, and *Bacillus thuringiensis* is distributed widely in Korea.

Bacillus thuringiensis(*B.t.*)는 그람 양성균의 간균으로 포자 형성시 결정형 단백질을 만드는 것이 특징이다. 이 단백질 결정체는 곤충에 대해 특이성이 높은 살충활성을 나타내며 *B.t.* 미생물 살충제 제조시 주요 활성성분이 된다. 문헌상으로는 1901년 Ishiwata가 병에 걸린 누에 유충에서 분리한 *Bacillus sotto*(현재는 *Bacillus thuringiensis* subsp. *sotto*로 분류됨)가 최초로 발견된 *B.t.* 균주로 알려져 있다(1). 이후 역사적으로 중요한 *B.t.* 균주의 발견을 살펴보면, 1911년 독일의 Berliner에 의한 *Bacillus thuringiensis* Berliner의 발견(2), 1962년 Kurstak에 의해 나비목 해충에 대해 살충성이 강한 subspecies *kurstaki*(*B.t.k.*)의 발견(3), 1970년 Dulmage에 의해 살충력이 더 우수한 subsp. *kurstaki* HD-1 strain의 발견(4), 1976년 Goldberg와 Margalit에 의해 파리, 모기 등의 파리목 해충에 살충력이 있는 subsp. *israelensis*(*B.t.i.*)의 발견(5) 및 1982년 Huger와 Krieg 등에 의해 딱정벌레목 해충에 효과가 있는 subsp. *tenebrionis*(*B.t.t.*)의 발견(6) 등을 들 수 있다. 그후 선충 등 다른 해충에 살충성이 있는 새로운

*B.t.*가 계속 발견되고 있다(7). *B.t.* 균주의 탐색연구가 활기를 띠게된 계기는 무엇보다도 1976년 Goldberg와 Margalit에 의한 *B.t.i.*의 발견(5)이며 인시목 해충 이외의 다른 해충에도 효과가 있는 다양한 *B.t.* 균주의 존재 가능성이 인식하게 됨에 따라 경쟁적인 균주탐색 연구가 수행되어 왔다. 다양한 *B.t.* 균주의 탐색을 촉진해온 다른 요인으로는 *B.t.* 살충제의 시장성 확대를 위해서 현재 *B.t.*가 화학농약에 비해 취약한 부분, 즉 살충력이 상대적으로 낮고 살충범위가 제한적이라는 점을 극복해야 한다는 것과 *B.t.* 저항성 해충의 출현에 대비하지 않으면 안된다는 점을 들 수 있다. 수년전까지만 해도 *B.t.* 제에 의해서는 해충의 저항성 유발이 거의 없는 것으로 알려져 왔었으나 근래에 와서 배추좀나방을 중심으로 *B.t.* 제에 대한 저항성 해충 출현이 보고되기 시작하였고(8-10) 이 저항성 문제가 앞으로 *B.t.* 미생물 살충제를 이용하는데 있어서 커다란 장애가 될 것이라는 우려에 따라 이를 극복하는 한 방법으로서 서로 다른 종류의 독소단백질을 생산하는 다양한 *B.t.* 균주의 탐색이 중요한 의미를 지니게 된 것이다. 이에 대한 이론적 바탕은 근래에 와서 연구되기 시작하였는데 저항성의 유발이 곤충의 중장 상피세포에 존재하는 수용체의 변화에 의한 것이며(8), 저항성을 유발한 독소단백질과 결합부위가 상이한 신규 독소단백질의 경우 기

*Corresponding author

Tel. 82-42-860-4412, Fax. 82-42-860-4594

E-mail: shpark@kribb4680.kribb.re.kr

Key words: *Bacillus thuringiensis*, Screening, Phylloplane, *Agelastica coerulea*, Insecticidal activity

존의 독소단백질에 대하여 저항성이 생긴 해충에 대해 우수한 살충 효과를 낼 수도 있다는 것이다.

그동안 *B.t.* 탐색을 위해 여러 연구자들에 의해 사용된 시료는 토양, 죽은 곤충, 식물체, 잠엽농가의 먼지, 농산물의 먼지, 웅덩이의 물, 양모, 우유 등으로 다양한 자연물에서 *B.t.*가 분리되어 왔다. 그중에서도 토양시료가 가장 널리 이용되었는데 토양으로부터 *B.t.* 분리를 효율적으로 수행하기 위해 acetate를 전처리 하는 독특한 방법이 개발되어 이용되기도 하였다(11). 그동안 세계 여러 연구팀에 의해 수행된 *B.t.* 탐색연구의 결과를 살펴볼 때 *B.t.*는 세계 전지역의 자연계에 널리 분포되어 있음을 알 수 있다(12-15). 한편 *B.t.*의 본래 서식처가 토양으로 알려져있고 실제로 많은 *B.t.* 균주들이 토양에서 분리되어 온 사실과 *B.t.*제가 식물의 잎을 가해하는 해충을 제어하기 위한 목적으로 주로 사용되고 있다는 두가지 사실은 생태학적 측면에서 설명하기가 곤란하다. 이에 대해 의문을 가지고 있던 Smith와 Couche(16)는 여러 종류의 활엽수 및 침엽수 잎을 대상으로 *B.t.* 균주 분리 연구를 수행하여 매우 높은 빈도로 다수의 균주를 분리하였으며 이 *B.t.* 균주들이 인위적인 살포 후 잔존하는 것이 아니고 식물체의 표면에 자연적으로 서식하고 있는 것이라는 주장과 함께 *B.t.*는 phylloplane epiphyte로 분류되어야 한다는 설을 제기하였다.

본 연구팀은 수년간 국내에서 채집한 토양시료로부터 *B.t.* 균주 탐색연구를 수행하여 왔으나 노력에 비하여 분리되는 숫자가 적은 편이었고 균의 종류도 그리 다양하지 못했다(data not shown). 시료를 식물체로 바꾸어 예비실험을 수행한 결과 토양시료에 비해 좋은 결과가 나오에 따라 식물체를 대상으로한 본격적인 탐색연구를 시도하였으며 국내 여러 지역에서 채집된 식물시료(주로 나뭇잎)로부터 *B.t.* 균주를 분리하고 이들의 특성을 분석함으로써, 장차 우수한 균주 및 독소단백질유전자를 확보할 수 있는 유전자원으로서의 collection을 마련코자 하였다. 그 결과 식물시료로부터 1,925주의 *B.t.* 분리주를 얻는 성과를 거두었으며 본 논문에서는 이들에 대한 몇 가지 특성조사연구의 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

시료 채취

본 연구에서는 *B.t.* 균 탐색을 위해 식물시료를 채집하였으며 식물체 중에서도 주로 나뭇잎을 채집하였다. 활엽수, 침엽수, 관목 등 다양한 수종을 대상으로 차별을 두지 않고 채집하였다. 전국 52개 지역의 3,237 sampling site에서 3,237점의 시료를 채취하였는데 가능한한 인적이 드문 잘 발달된 숲을 택하였고 sampling site간에 적어도 1 km이상의 충분한 거리를 유지토록 하였다. 나뭇

잎 채취시 가능한한 지상에서 멀리 그리고 안쪽에 있는 잎을 채취하였는데 이는 빗물, 바람 등에 의해 토양으로부터의 직접적인 오염을 줄이고자한 것이다. 모든 시료는 소형의 비닐백에 넣어 서로간에 오염되지 않도록 하였다.

B.t. 균주의 분리

약 2-3 cm² 면적의 나뭇잎을 멸균된 칼로 으려내어 1 ml의 멸균된 생리식염수와 함께 막자사발을 이용하여 분쇄하였다. 0.5 ml의 분쇄된 시료를 시험관에 옮기고 80℃ 수온조에서 3분간 진탕하면서 열처리하였다. 상온에서 30분간 방치후 0.2 ml의 시료를 취해 T3 고체배지 (tryptone 3 g, tryptose 2 g, yeast extract 2.5 g, MnCl₂ · 4H₂O 0.0075 g, agar 15 g, sodium phosphate buffer (0.05 M, pH6.8) 1.0 L)에 도말하고 30℃ 배양기에서 3일간 배양하였다. 3일후 나타난 colony들은 광학현미경을 통해 독소단백질 결정체 또는 inclusion body의 생산을 조사하였으며 이들이 관찰될 경우 *B.t.* 균주로 1차 선별하였다. 한가지 시료로부터 다수의 *B.t.* 균이 분리되는 경우가 많았는데 이러한 경우 가능한한 같은 균주가 중복 선별되지 않도록 colony 모양 및 현미경 관찰 결과에 의해 특징이 서로 다른 대표적인 균주만을 collection에 포함시켰다.

독소단백질의 PAGE 패턴

분리된 *B.t.* 균을 GYS배지(yeast extract 2 g, glucose 1 g, (NH₄)₂ · SO₄ 2 g, K₂HPO₄ 0.5 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.41 g, CaCl₂ 0.08 mg, MnSO₄ · 5H₂O 0.07 mg, 증류수 1.0 L)에 접종하여 30℃에서 3일간 진탕배양한 후 균체를 원심분리하였다. SDS-sample buffer (50 mM Tris(pH 6.8), 100 mM dithiothreitol, 2% SDS, 0.1% bromophenol blue, 10% glucose)에 균체를 현탁하고 3분간 끓인후 12.5% acrylamide gel을 사용하여 전기영동을 하였다. 전기영동이 끝난 gel은 Coomassie brilliant blue R을 사용하여 염색한 후 단백질 band 패턴을 관찰하였다.

Plasmid pattern

B.t. 균이 함유하는 매우 큰 plasmid들을 관찰하기 위하여 Eckardt 방법(17) 또는 이의 변형된 방법(18)을 많이 이용하고 있으나 낮은 농도의 agarose gel(0.4%)을 수직 방향으로 설치해야 하는 관계로 gel이 쉽게 망가지고 well의 형성이 잘 안되며 시간이 많이 걸리는 문제점이 여전히 남아있었다. 본 연구에서는 Choi(19) 등이 개발한 수평 gel 시스템을 응용하여 *B.t.* 분리주들의 plasmid 패턴을 관찰하였다.

살충성 검정

살충성 검정은 인공사료 또는 기주식물(양배추 잎을

주로 이용)의 잎에 일정량 또는 일정농도의 시료를 처리한 후 주로 3령 유충 10마리씩을 넣어 3일 또는 5일 후 치사율을 조사하였다. 대상 곤충은 나비목 해충으로는 배추좀나방(*Bombyx mori*), 흰불나방(*Hypantria cunea*), 집누에 나방(*Bombyx mori*), 과밤나방(*Spodoptera exigua*) 등의 유충을 사용하였고 파리목 해충으로는 인가 주변에서 채집한 야생모기 유충, 딱정벌레목 해충으로는 오리나무 잎벌레(*Agelastica coerulea*)를 사용하였다. 또한 모기유충에 대한 살충성 검정을 대체하는 방법으로 토끼의 혈액에 대한 Haemolysis조사(20)를 병행하였다.

생화학적 특성검사

Martin 과 Travers의 방법(14)에 따라 *B.t.*분리주 각각에 대해 4가지의 생화학적 특성을 조사하였는데 esculin 이용능은 esculin hydrolysis medium, salicin과 sucrose로부터의 산 생성능은 Hüge and Leifson O-F medium, 그리고 lecithinase 생산여부는 Egg-yolk agar(21)를 이용하여 조사하였으며 그 결과에 따라 16개의 그룹으로 분류하였다.

H-serotyping

편모항원(H antigen)에 의한 균주분류는 de Barjac의 방법(22)에 따라 행하였으며 표준균주의 편모항원에 대한 항혈청은 불란서 Pasteur연구소의 Lecadet박사 연구실에서 제조된 것을 이용하였다.

결과 및 고찰

식물시료로부터 *B.t.*균주의 분리

T3 고체배지에 도말하여 3일간 배양 후 나타난 colony들의 특징을 육안으로 관찰하고 이들중 대표적인 것들을 선정한 다음 광학현미경으로 세포, 포자 및 세포내 형성물을 관찰하여 *B.t.*균주로 여겨지는 것들을 선별하였다. 이와 같은 방법에 의해 식물시료 3,237점으로부터 총 1,925주의 *B.t.*균주를 분리하였다. 대체로 인적이 드물고 잘 발달된 숲에서, 그리고 습도가 높은 활엽수림지역에서 채취된 시료에서 많은 수의 *B.t.*가 분리되었으며 침엽수의 경우에도 상대적인 빈도는 낮지만 *B.t.*균주가 분리되었다. 설악산, 오대산, 치악산, 속리산, 계룡산, 내장산, 지리산, 덕유산, 가야산, 한라산 등 전국의 큰 산과 태안반도, 변산반도, 보성, 울진, 강릉, 제주 등의 해안지역 및 대도시 주변의 숲 등 전국 모든 지역에서 다소의 빈도차이는 있으나 *B.t.*가 분리되었고 이로써 *B.t.*균주가 국내의 자연계에 널리 분포되어 있음을 알 수 있었다(data not shown). 한편 이상의 결과로부터 국내의 경우에도 식물의 잎이 *B.t.*균주 분리를 위한 매우 유용한 분리원임을 알 수 있었고 식물잎의 표면(phyllplane)에 일반적으로 서

식하는 미생물군에 *B.t.*를 포함시켜야 한다는 Smith와 Couche(16)의 제안에 설득력이 있음을 알 수 있었다.

*B.t.*분리주가 생산하는 Crystal의 모양

일반적으로 *B.t.*균주의 독소단백질 결정체의 모양과 살충활성범위와는 밀접한 관련이 있는 것으로 알려지고 있다. 인시목 해충에 살충성이 있는 *B.t.k.*의 경우 대부분 bipyramid형의 결정체를 가지며 쌍시목 해충에 활성이 있는 *B.t.i.*의 경우 구형 또는 무정형의 결정체를 가지고 있고, 딱정벌레목 해충에 활성이 있는 *B.t.t.*의 경우 네모난 판자형(flat rectangle)의 결정체를 가진다. 따라서 *B.t.*분리주가 만드는 단백질 결정체의 모양을 조사하는 것은 *B.t.*분리주의 살충성을 예측하고 분류를 하는데 있어서 중요한 요소가 될 수 있다. 본 연구에서는 편의상 다섯 그룹으로 결정체 모양을 분류하였다. Fig. 1(A)에 나타난 바와 같이 bipyramid형의 결정체를 생산하는 분리주가 가장 많아 전체의 49.1%(945주)를 차지하였고, 무정형의 inclusion을 만드는 것이 33.1%(638주), 구형의 inclusion을 만드는 것이 7.1%(137주), 네모난 판자형의 결정체를 만드는 분리주가 1.4%(27주)였고 나머지 9.2%(178주)는 작은 inclusion을 다수 생산하는 것들이었다. 한 균주가 두가지 모양 이상의 결정체를 가진 경우도 상당수 있었는데 이를 별도로 나타내지 않고 다섯 항목에 중복 포함시켰다. 두개의 bipyramid형 결정체를 가지는 *B.t.*도 여러 지역에서 46주나 발견되었다.

*B.t.*분리주의 살충성 검정

각각의 *B.t.*분리주들을 T3 고체배지에 접종하여 3일간 배양한 다음 포자와 독소단백질 결정체를 백금이로 긁어 1 ml의 0.02% Triton X-100 용액에 현탁한 후 이를 시료로 사용하였다. 실험재료 및 방법에서 서술한 바대로 1,644주의 *B.t.*분리주들에 대해 살충성을 검정하여 Fig. 1(B)의 결과를 얻었다. 나비목 해충에 살충효과가 있는 분리주가 가장 많았는데 전체 분리주의 44.8%인 736주를 차지했고, 그 다음이 모기에 대해 살충성이 있는 분리주로 4.9%(94주)를 나타냈다. 가장 흥미로운 결과중 하나는 딱정벌레목 해충의 하나인 오리나무잎벌레(Alder leaf beetle; *Agelastica coerulea*)에 대해 살충성을 나타내는 균주가 4개 지역에서 모두 27주 분리된 것인데 국내에서 딱정벌레목에 대해 효과가 있는 *B.t.*가 분리된 것은 이번이 처음으로 매우 흥미있는 결과이다. 이 오리나무잎벌레는 아직까지 *B.t.*연구에 사용된 예가 없는 해충으로 본 연구팀이 처음 사용하였으며 적당한 딱정벌레목 공시충이 없는 국내에서는 좋은 연구대상 해충이 될 수 있을 것이다. 본 결과에서도 앞에서 서술한 바와 같이 독소단백질 결정체의 모양과 살충활성범위와 관련이 있음을 볼 수 있었는데 네모난 판자형의 결정체를 가지는

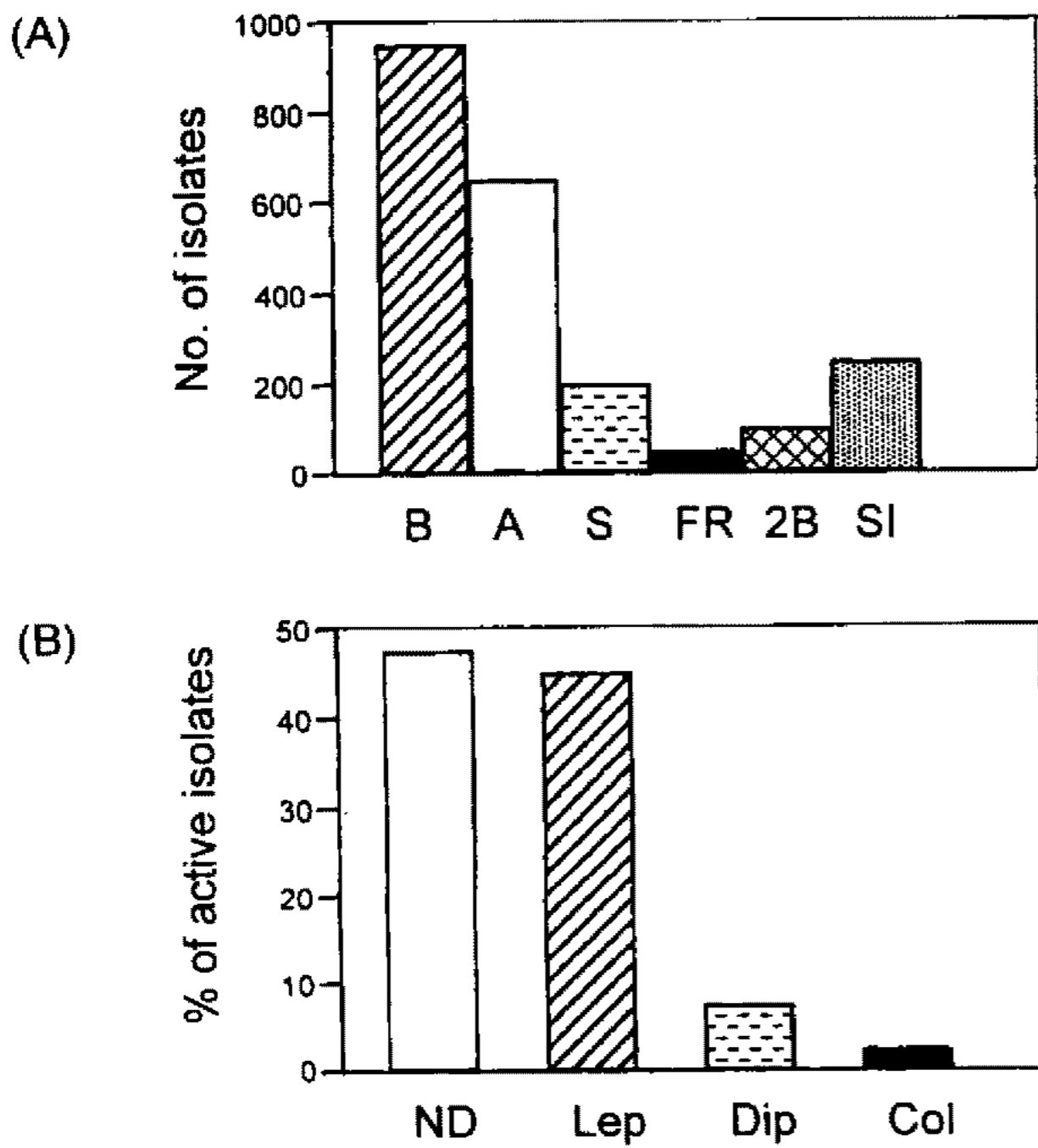


Fig. 1. Distribution of crystal shapes (A) and insecticidal activities (B) of *B.t.* isolates.

B; bipyramidal, A; amorphous, S; spherical, FR; flat rectangular, 2B; two bipyramidal, SI; small inclusions, Lep; lepidopteran insect, Dip; dipteran insect, Col; coleopteran insect, ND; not detected.

27분리주는 모두 딱정벌레목 해충에 대해 살충활성이 있었으며, bipyramid형의 결정체를 가지는 균주중 많은 수가 나비목 해충에 대해 그리고 구형의 결정체를 가지는 균주중 많은 수가 모기에 대해 살충성이 있는 것으로 나타났다. 그러나 한 개의 bipyramid형의 결정체를 가지는 균주중 일부와 두 개의 bipyramid형 결정체를 가지는 분리주의 경우 본 연구에서 사용한 공시충에 대해 활성이 없었는데 매우 흥미있는 결과로 생각된다. Martin 과 Travers(14)도 결정체를 생산하는 *B.t.*분리주 중 40%가 살충성을 나타내지 않았다고 밝힌 바 있으며 이 균주들에 대해서는 검정해보지 않은 전혀 다른 해충에 대해 살충활성을 가지고 있거나 유전적 변이가 일어나 활성을 잃어버린 경우 등의 가능성을 생각해 볼 수 있을 것이다.

SDS-PAGE에 의한 *B.t.*분리주의 독소단백질 분석

포자형성이 완료된 배양액에서 원심분리에 의해 회수한 pellet을 시료로 하여 단백질 전기영동을 수행함으로써 각 분리주가 생산하는 단백질의 band 패턴을 관찰할 수 있으며 경우에 따라서는 그 균주가 생산하는 독소단백질의 종류를 짐작할 수 있게 된다. 본 연구팀이 확보한 *B.t.*분리주의 경우 단백질 band의 패턴에 따라 10여 가지의 부류로 분류할 수 있었으며 이중에는 이미 널리 알려진 균주 *B.t.*HD-1, *B.t.*HD-2, *B.t.*HD-73 및 *B.t.i.* 등과 같은 패턴을 보이는 균주가 많은 비율을 차지하였으며 매우 독특한 패턴을 보이는 균주도 발견되었다. Fig.

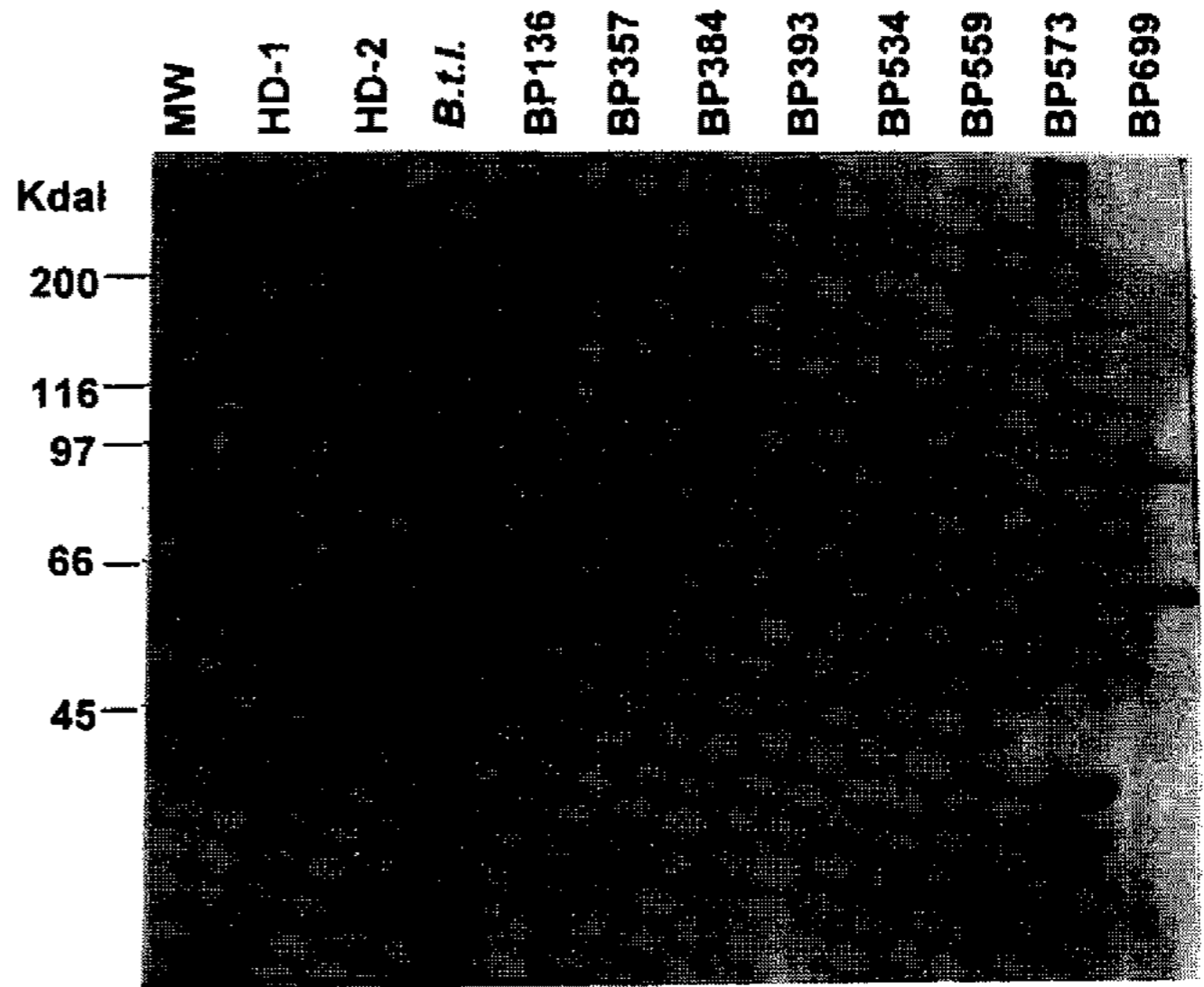


Fig. 2. SDS-PAGE analysis of three known *Bacillus thuringiensis* strains and eight unknown *B. thuringiensis* isolates.

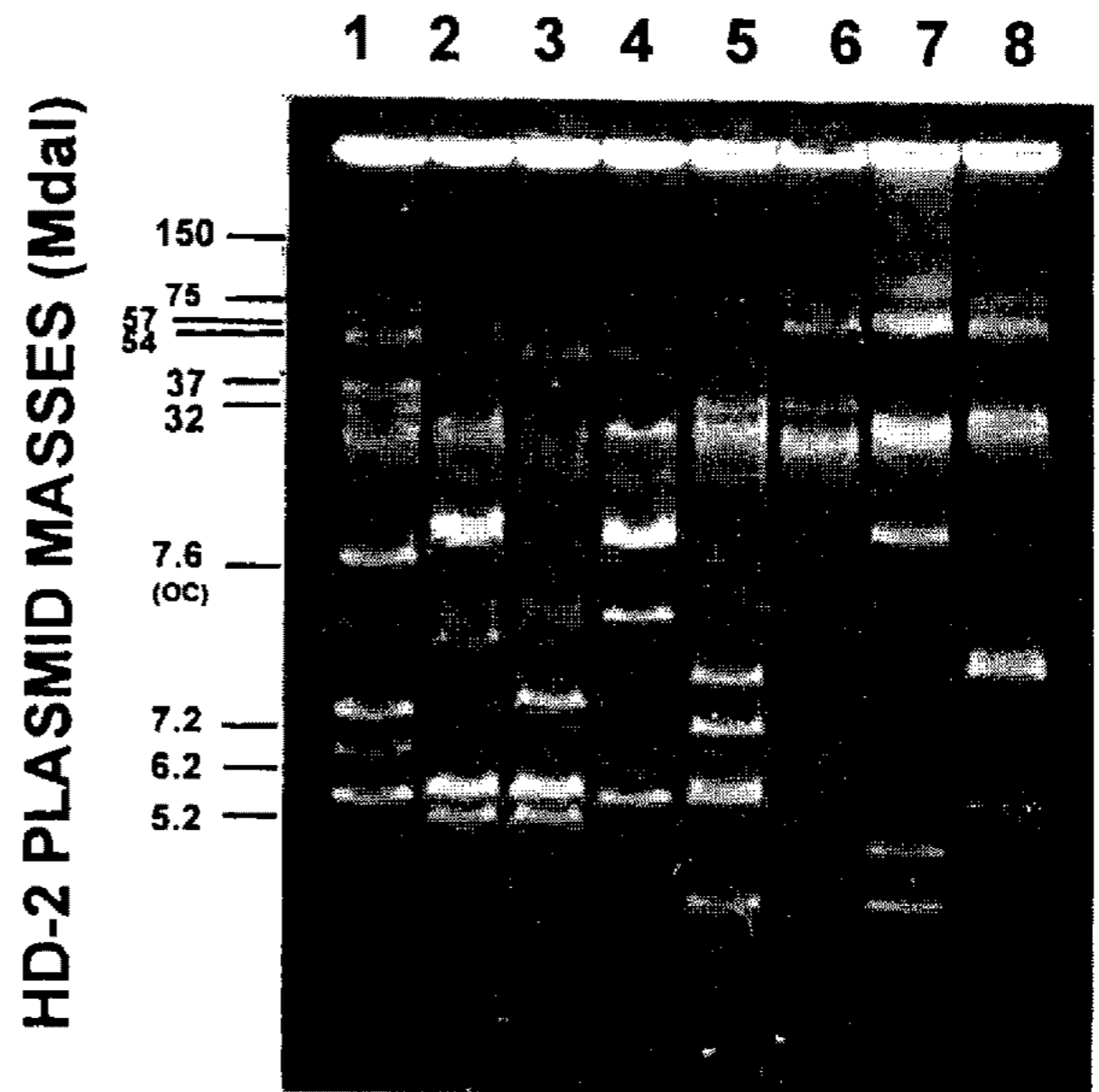


Fig. 3. Plasmid patterns of seven different *Bacillus thuringiensis* isolates.

Lane 1; *B.t.* HD-2(reference strain), lanes 2-8; unknown *B.t.* isolates in this study.

2에는 표준균주로서 *B.t.*HD-1, *B.t.*HD-2, *B.t.i.* 및 이들과 다른 패턴을 보이는 8 분리주의 단백질 전기영동 결과가 나타나 있다. 이러한 결과들은 2단계 특성조사를 위해 분리주를 선별하는 과정에서 중요한 인자로 이용되었다.

***B.t.*분리주의 Plasmids 패턴**

대부분의 독소단백질 유전자가 *B.t.*균이 가지고 있는 plasmid상에 존재한다는 것은 이미 널리 알려진 사실이다(23, 24). 따라서 분리주의 plasmid 패턴을 조사하는 일은 분리주를 분류하는데 있어서 매우 유용한 수단이

Table 1. Distribution of *B. thuringiensis* biochemical types

Biochemical type (described subspecies)	Biochemical test result ^a				Distribution
	Esculin	Salicin	Lecithinase	Sucrose	
1 (<i>thuringiensis</i>)	+	+	+	+	57
2 (<i>kurstaki</i>)	+	+	+	-	818
3 (<i>indiana</i>)	+	+	-	+	10
4 (<i>galleriae</i>)	+	+	-	-	13
5 (<i>sotto</i>)	+	-	+	+	7
6 (<i>dendrolimus</i>)	+	-	+	-	208
7 (<i>morrisoni</i>)	+	-	-	+	5
8 (<i>darmstadiensis</i>)	+	-	-	-	7
9	-	+	+	+	111
10	-	+	+	-	354
11	-	+	-	+	9
12 (<i>ostrinae</i>)	-	+	-	-	40
13	-	-	+	+	17
14 (<i>israelensis</i>)	-	-	+	-	172
15	-	-	-	+	14
16	-	-	-	-	18
Total					1,860

^aThe + sign indicates a positive reaction, i.e., utilization of esculin, acid production from salicin and sucrose, and production of lecithinase.

될 수 있다. 본 연구팀이 확보한 *B.t.*분리주를 대상으로 plasmid 패턴을 살펴본 결과 다양한 패턴을 관찰할 수 있었으며 분리주를 분류하거나 선발하는 과정에서 중요한 인자로 활용할 수 있었다. Fig. 3에 표준균주로서 plasmid 크기가 잘 밝혀진 *B.t.*HD-2(18) 및 7 분리주의 plasmid 패턴을 나타내었다.

Biochemical type에 의한 *B.t.*분리주의 분류

*B.t.*분리주를 분류하는 또하나의 방법으로 이들이 지닌 생화학적 성질을 조사하는 방법이 있다. Martin 과 Travers는 4가지의 생화학적 특성, 즉 esculin 이용능, salicin 과 sucrose 로 부터의 산 생성능 및 lecithinase 생산여부에 대한 결과를 가지고 *B.t.*균주를 16개의 그룹으로 분류할 수 있다는 연구결과를 보고하였다(14). 실험이 비교적 용이하고 효율적인 방법으로 생각되어 본 연구팀이 확보한 분리주중 1860주에 대해 이방법을 적용하여 Table 1의 결과를 얻었다. subsp. *kurstaki*가 속해있는 2번 부류가 가장 많은 수를 나타내었고 subsp. *dendrolimus*가 속해있는 6번, subsp. *israelensis*가 속해있는 14번 부류 그밖에 9번, 10번 부류가 많은 수를 차지하였다. 이러한 분류 결과는 우수균주 선정, 균주의 동정 등 다음 단계 연구를 위한 유용한 기초 자료가 될 것이다.

새로운 H-serotype의 발견

전체 *B.t.*분리주 1,925주 중에서 위에서 살펴본 여러 가지 특성을 바탕으로 22주를 선발하여 H-serotype을 조사하였다. 이 실험은 불란서 파스테르연구소의 M.-M. Lecadet의 도움으로 수행되었다. 그 결과 Table 2에 나

Table 2. H-serotypes of *Bacillus thuringiensis* isolates

BC 1	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>finitimus</i> (H2)
BC 2	<i>Bacillus thuringiensis</i> <auto-agglutinated>
BC 3	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>galleriae</i> (H5a, 5b)
BC 4	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>muju</i> (H49)
BC 5	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>amagiensis</i> (H29)
BC 6	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>neoleonensis</i> (H24a, 24b)
BC 7	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>muju</i> (H49)
BC 8	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>muju</i> (H49)
BC 9	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> (H3a, 3b, 3c)
BC 10	<i>Bacillus cereus</i>
BC 11	<i>Bacillus cereus</i>
BC 12	<i>Bacillus thuringiensis</i> <auto-agglutinated>
BC 13	<i>Bacillus thuringiensis</i> <auto-agglutinated>
BC 14	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>canadensis</i> (H5a, 5c)
BC 15	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>morrisoni</i> (H8a, 8b)
BC 16	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>darmstadiensis</i> (H10a, 10b)
BC 17	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>morrisoni</i> (H8a, 8b)
BC 18	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>morrisoni</i> (H8a, 8b)
BC 19	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>morrisoni</i> (H8a, 8b)
BC 20	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>galleriae</i> (H5a, 5b)
BC 21	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>morrisoni</i> (H8a, 8b)
BC 22	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i> (H7)

타난 바와 같이 분리주들 중에 *aizawai*(H7), *amagiensis*(H29), *canadensis*(H5a, 5c), *darmstadiensis*(H10a, 10b), *galleriae*(H5a, 5b), *finitimus*(H2), *kurstaki*(H3a, 3b, 3c), *morrisoni* (H8a, 8b) 및 *neoleonensis*(24a, 24b) 와 같은 다양한 아종이 있음을 확인하였고 3 분리주는 새로운 serotype H49로 분류되었다. 이 분리주는 분리

된 지명을 따라 *Bacillus thuringiensis* subsp. *muju*로 명명되었으며 약 145 kDal의 분자량을 갖는 결정형 단백질을 생산하는 것으로 관찰되었으나 아직 살충활성은 밝히지 못했다. 한편 Polymerase Chain Reaction 방법에 의한 분석결과 이미 알려진 독소단백질 유전자와 높은 상동성을 갖는 유전자는 없는 것으로 나타났다(data not shown). 이러한 연구결과들로 부터 국내의 자연계에도 다양한 아종의 *B.t.*균이 서식하고 있다는 사실과 나뭇잎과 같은 식물시료가 다양한 *B.t.*균 분리를 위한 좋은 대상임을 알 수 있었다.

요 약

국내 52지역 3,237 지점에서 채집한 식물시료에서 총 1,925주의 *B.t.*균을 분리하였다. 활엽수, 침엽수와 관목 등 모든 수종에서 *B.t.*균이 분리되었으며 다소의 빈도 차이는 있었으나 전국 어디에서나 *B.t.*균이 분리되었다. 토양시료에서 *B.t.*균을 분리하는 것에 비해 노력이 적게 들고 분리되는 빈도도 높아 식물시료가 *B.t.*균 분리를 위해서는 좋은 분리원임을 알 수 있었다. 분리주의 특성을 조사하여 2단계 연구를 위한 자료를 만들기 위해 독소단백질 결정체의 모양, 독소단백질의 PAGE 패턴, plasmid 패턴, 분리균주의 생화학적 성질, 살충성 검정, serotyping 등 여러 측면에서의 분석을 시도하였다. 독소단백질 결정체의 모양에서는 bipyramid형의 결정체를 생산하는 분리주가 가장 많아 전체의 49.1%(945주)를 차지하였고, 무정형의 inclusion을 만드는 것이 33.1%(638주), 구형의 inclusion을 만드는 것이 7.1%(137주), 네모난 판자형의 inclusion을 만드는 분리주가 1.4%(27주)였고 나머지 9.2%(178주)는 작은 inclusion을 다수 생산하는 것들이었다. 1,644주의 *B.t.*분리주들에 대해 살충성을 검정한 결과 나비목 해충에 살충효과가 있는 분리주가 전체 분리주의 44.8%인 736주를 차지했고, 그 다음이 모기에 대해 살충성이 있는 분리주로 4.9%(94주), 그리고 딱정벌레목 해충의 하나인 오리나무잎벌레(Alder leaf beetle; *Agelastica coerulea*)에 대해 살충성을 나타내는 균주가 27주 분리되었다. 독소단백질의 PAGE 패턴, plasmid 패턴 또는 분리균주의 생화학적 성질에 의해서도 분리주들을 분류할 수 있었으며 또한 다양한 부류의 *B.t.*균들이 분리되었음을 알 수 있었다. 한편 선발된 22주를 대상으로 H-serotyping을 시도한 결과 *aizawai* (H7), *amagiensis*(H29), *canadensis*(H5a, 5c), *darms-tadiensis*(H10a, 10b), *galleriae*(H5a, 5b), *finitimus*(H2), *kurstaki*(H3a, 3b, 3c), *morrisoni*(H8a, 8b) 및 *neoleonensis*(24a, 24b)와 같은 다양한 아종이 있음을 확인하였고 3 분리주는 새로운 serotype H49(subsp. *muju*)로 분류되었다.

감사의 말

본 연구에서 *B.t.*균주의 H-serotyping은 불란서 파스테르연구소 Lecadet박사의 도움으로 이루어졌으며 이에 대하여 깊은 감사를 드립니다.

참고문헌

1. Ishiwata, S. 1901. On a kind of severe flacherie (sotto disease). *Dainihon Sanshi Kaiho*, **114**: 1-5.
2. Berliner, E. 1911. Über die Schlafsucht der Mehlmot-tenraupe. *Z. Gesamte Getreidewesen (Berlin)*, **3**: 63-70.
3. Kurstak, E. 1962. *Entomophaga, Mem. Hors. Ser. 2*: 245-247.
4. Dulmage, H. T. 1970. Insecticidal activity of HD-1, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*. *J. Inverte. Pathol.* **15**: 232-239.
5. Goldberg, L. H. and J. Margalit. 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univattatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Mosq. News*, **37**: 355-358.
6. Krieg, A., A. M. Huger, G. A. Langenbruch, and W. Schmetter. 1983. *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*: ein neuer, gegen ber Larven von Coleopteren wirksamer Pathotyp. *Z. Ang. Entomol.* **96**: 500-508.
7. Feitelson, J. S., J. Payne, L. Kim. 1992. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. *Bio/Technol.* **10**: 271-275.
8. Ferre, J., M. D. Real, J. Van Rie, S. Jansens, and M. Peferoen. 1991. Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bio-insecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 5119-5123.
9. Tabashnik, B. E. 1994. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* **39**: 47-79.
10. Tabashnik, B. E., N. L. Cushing, N. Finson, and M. W. Johnson. 1990. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth(Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.* **83**: 1671-1676.
11. Travers, R. S., P. A. W. Martin, and C. F. Reichelderfer. 1987. Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 1263-1266.
12. DeLucca, A. J., J. G. Simonson, and A. D. Larson. 1981. *Bacillus thuringiensis* distribution in soils of the United states. *Can. J. Microbiol.* **27**: 865-870.
13. Dulmage, H. T. and K. Aizawa. 1982. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in nature, Pp 209-237. In E. Kurstak (ed.), *Microbial and viral pesticides*, Marcel Dekker, Inc., New York.
14. Martin, P. A. W. and R. S. Travers. 1989. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 2437-2442.
15. Ohba, M., and K. Aizawa. 1989. Distribution of the four

- flagellar(H) antigenic subspecies of *Bacillus thuringiensis* H serotype 3 in Japan. *J. Appl. Bacteriol.* **67**: 505-509.
16. Smith, R. A. and G. A. Couche. 1991. The phylloplane as a source of *Bacillus thuringiensis* variants. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 311-315.
 17. Eckhardt, T. 1978. A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* **1**: 584-588.
 18. Gonzalez, J. M., H. T. Dulmage, and B. C. Carlton. 1981. Correlation between specific plasmids and δ -endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid* **5**: 351-365.
 19. Choi, S. K., B. T. Koo, B. S. Shin, S. H. Park, J. I. Kim. 1995. Screening of nested deletion mutants for DNA sequencing by direct electrophoresis of bacterial cultures. *Anal. Biochem.* **230**: 182-183.
 20. Majumdar, M. K., D. P. Sikdar, A. B. Sarma, and S. K. Majumdar. 1990. A simple haemolytic method for quantitation of the delta endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* from crude samples. *J. Appl. Bacteriol.* **69**: 241-246.
 21. Gerhardt, P., R. G. Murray, R. N. Costilow, E. W. Nester, W. A. Wood, N. R. Krieg, and G. B. Phillips. 1981. *Manual of methods for microbiology*, P434. ASM, Washington.
 22. De Barjac, H. 1981. Identification of H-serotypes of *Bacillus thuringiensis*, pp 35-43. In H. D. Burges(ed.), *Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980*, Academic Press, London.
 23. Whiteley, H. R. and H. E. Schnepf. 1986. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. *Ann. Rev. Microbiol.* **40**: 549-576.
 24. Lereclus, D., O. Arantes, J. Chaufaux and M.-M. Lecadet. 1989. Transformation and expression of a cloned δ -endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **60**: 211-218.

(Received 31 December 1996)