

모기 살충성 세균 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*의 효과적인 분리 방법

김광현 · 이광배* · 신두만**

동의대학교 미생물학과 · 대구보건대학 보건위생과* · 대구보건대학 환경관리과**

The Effective Isolation of a Mosquitocidal Bacteria, *Bacillus thuringiensis* Subsp. *israelensis*

Kwang-Hyeon kim · Kwang-Bae Lee* · Du-Man Shin**

Department of Microbiology, Dongeui University, Pusan, 614-714

Department of Health Hygiene, Taegu Health College, Taegu 702-260, Korea*

Department of Environmental Engineering, Taegu Health College, Taegu 702-260, Korea**

Abstract

For more convenient and rapidly isolation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*(Bti), 1) heat treatment for spore forming bacteria, 2) growth in enrichment culture media for *Bacillus* sp. and 3)selection of bacteria producing a lecithinase for *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, were performed.

Spore forming bacteria were counted 4.8×10^8 cells/g soil on NAPGCY media, 9.2×10^7 cells/g soil on NA media, and 3.6×10^8 cells/g soil on NAAC media, respectively.; Bacteria producing only a lecithinase were reached at 25.2% on medium contained egg yolk, bacteria only producing a delta-endotoxin were reached at 23.2% by phase contrast microscope, and bacteria producing a lecithinase & a delta-endotoxin simultaneously were reached at 13.7%. *Bacillus thuringiensis* which producing a lecithinase and a delta-endotoxin simultaneously among bacteria producing a lecithinase, were reached at 56.5%; A half of *Bacillus thuringiensis* was produced a delta-endotoxin, but not produced a lecithinase.

Among 8 isolates of *Bacillus thuringiensis*, two strain of Bti which has a mosquito-cidal toxin, were detected by PCR using a specific primer of δ -endotoxin gene from Bti.

I. 서론

지금까지 많은 화학적 살충제가 환경오염을 유발시켰고, 숙주에 비특이적으로 작용하기 때문에 인축은 물론 생태계에 많은 영향을 끼치고 있어,

점차로 화학적 살충제의 사용이 감소되고 있으며, 반대로 생물학적 방제방법이 증가되고 있다. 이들 생물학적 방제법 중에서 *B. thuringien*-*sis*(Bt)는 세균성 해충방제제로 널리 사용되고 있으며, 이들 균주는 *in vitro*에서 쉽게 배양이 가능하고, 포자 형성 기간 동안에 결정성 내독소 단백질인 δ

-endotoxin을 생산하고¹⁾, 이 δ -endotoxin은 나방류²⁾, 모기류³⁾ 또는 딱정벌레류⁴⁾에 대해 독성을 나타내며, 최근에는 선충등 다른 해충에 살충성이 있는 새로운 Bt균주가 계속 발견되고 있어⁵⁾, 숙주에 대한 다양한 특이성을 나타내고 있다. 특히, 모기류에 강하게 독성을 나타내는 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*(Bti)가 전 세계적으로 널리 사용되고 있다.

지금까지 Bt균주를 분리하기 위해서는 내독소를 생성하는 포자형성간균을 조사하는 방법으로 위상차현미경이 많이 사용되고 있다. 그러나, 분리된 수 많은 colony를 현미경으로 보기에는 육안적으로 피로가 축적되어 δ -endotoxin을 확인하는데는 많은 불편함이 있다. 따라서 본인 등은 이같은 불편함을 제거하기 위하여 시료의 열처리, 선별배지의 이용 및 lecithinase생성 유무를 확인하여 Bti균주의 분리효율을 증가시키고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시료 채취 및 배지조성

B. thuringiensis subsp. *israelensis*(Bti)균주를 분리하기 위하여, 동의대학교 공과대학 뒷산 17곳에서 중성 토양(pH 6.8; 부식토)을 채취(100 m 간격, 지표에서 5 cm 깊이)하였다.

본 연구에 사용된 배지는 4종류로서 NA, NAAC 및 NAPGCY배지는 균주 분리용 배지로 사용하였으며, NAEY배지는 균주의 lecithinase생성을 판별하기 위한 배지로 사용되었다. 즉, nutrient agar (NA), NAAC(nutrient agar + 0.12M Na-acetate)⁶⁾, NAPGCY(nutrient agar + penicillin G + CCY salt + acid casein hydrolysate + yeast extract) 및 NAEY(nutrient + egg york)배지⁷⁾가 사용되었다.

2. 포자형성 세균의 분리 및 측정

토양 0.25 g을 10 ml의 증류수가 든 18 mm 시험관에 넣은 다음 포자형성균이 아닌 대부분의 영양세균을 죽이기 위해서 80°C에서 10분동안 열처리를 행하고 냉각시켰다⁸⁾. 냉각된 토양부유액 100 μ l는 상기에서 설명한 각각의 배지에 10³배까지

희석하여 도말하고, 28°C에서 48시간 동안 배양시킨 후 콜로니를 계측하여 토양 g당 존재하는 포자형성 세균의 수로 나타내었다.

3. Lecithinase 및 내독소 생성 확인

일반적으로 Bti균주는 lecithinase를 생산하는 균주로 알려져 있다⁹⁾. 따라서 상기에 기술한 3종의 분리용 배지에서 형성된 콜로니를 임의로 선별하여 NAEY배지에 재 접종하고, 생육된 균주 중에서 콜로니 주위에 투명한 환이 존재하는 균주를 lecithinase생성 균주라고 판명하였다. 이때 대조균으로는 egg york에 존재하는 lecithinase분해능이 있는 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*(type strain)가 사용되었다. 또한, Bt균주의 결정성 내독소(delta-endotoxin)의 존재는 위상차현미경으로 직접 관찰하여 확인하였다.

4. PCR에 의한 Bti 내독소 유전자 확인

Lecithinase 생성균주이면서 동시에 내독소를 생성하는 선별된 균주들 중에서 Carozzi¹⁰⁾ 등이 기술한 Bti균주의 내독소 유전자와 특이적으로 반응하는 primer(Dip1A : 5'CAAGCCGC-AAATCTTGTGGA3', 2551-2571Nucleotide : Dip1B : 5'ATGGCTTGTTCGCTACATC3' 3328-3348 Nucleotide)는 Bioneer사에서 조제하여 구입하였다. 또한 polymerase chain reaction(PCR)을 행하기 위해 Pharmacia co.의 Model Gene ATAQ Controller DNA Thermal Cycler가 사용되었다.

각 선별된 균주의 DNA는 Eckhardt¹¹⁾가 기술한 방법으로 추출하여 증폭용 DNA로 사용되었다. 즉, 먼저 선별된 균주는 nutrient agar상에서 배양한 단일 콜로니로부터 DNA를 추출하기 위해 단일 콜로니의 균체 한 백금을 100 μ l 멸균 증류수에 현탁시켰다. 그후 현탁액은 원심분리(15 K, 5 min)하고 상층액을 제거시키고 200 μ l 멸균 증류수에 재현탁시켰다. 재현탁된 균체는 -70°C에서 5분간 방치시킨 후 100°C에서 5분간 가열시키고(2회 반복), 원심분리 후 그 상층액은 제거하고 침전물은 40 μ l의 멸균증류수에 재현탁시켜 PCR용 template DNA로 사용(1 μ l)하였다. Bioneer사에서

조제하여 구입된 Bti균주의 primer¹⁰⁾인 Dip1A과 Dip1B(0.5 μ m/53 μ l) 0.5 μ l는 Tris-HCl완충액(pH 7.2)으로 각각 500 μ l 멸균 증류수와 혼합하고, 사용하기 직전에 1000배로 희석하여 사용하였다. 이때, Dip1A와 Dip1B의 최종농도는 각각 0.5 nM이었다.

PCR용 반응액의 조성은 nanopore D.W15.2 μ l, 2.5 mM dNTPs 1 μ l, 10x PCR bufferII 2.5 μ l, 25mM Mgcl2 2 μ l, 12.5 mM Tween 20 1 μ l, Taq polymerase 0.3 μ l로 구성되었으며, 이들의 용액에 Dip1A 1 μ l, Template DNA 1 μ l을 첨가하여 전체 양이 25 μ l되게 하였다.

Bti균주의 내독소 유전자의 증폭은 Carozzi¹⁰⁾이 기술한 방법에 따라 PCR혼합액을 원심분리(microcentrifuge, 3-4 sec)하여 잘 섞은 후 유전자 증폭기에서 35 cycle을 다음과같은 조건으로 행하였다. 즉, [(step 1. denaturation : 94 $^{\circ}$ C, 45sec ; step 2. annealing : 45 $^{\circ}$ C, 45sec ; step 3. extension : 72 $^{\circ}$ C, 1min ; step 4. extension : 72 $^{\circ}$ C, 10 min (1cycle)]을 35회 반복하였다. 그후 증폭된 내독소 유전자의 확인은 1% agarose gel electrophoresis[PCR product 10 μ l + BPB 1 μ l/well, constant voltage ; 100 v, size marker(Hind III Digested lamda DNA ; 4 μ l)]를 행하였으며, 대조군으로는 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*의 내독소 유전자가 사용되었다.

III. 결과 및 고찰

1. 토양 내에서 *B. thuringiensis*의 분리 효율

17개의 중성 토양(pH6.8; 부식토)에 존재하는 포자형성 균주를 효율적으로 분리하기 위해 3종의 배지가 사용되었다. 그 결과 Table 1.에서 보는바와 같이 배지 I에서 포자형성 세균이 토양 g당 4.8×10^8 cells로서 가장 많이 증식하였으며, 배지 II와 III에서는 각각 9.2×10^7 cells, 3.6×10^7 cells 순으로 균이 증식되었다. 이 결과로 볼 때 Bt균주도 포자형성 균이므로 토양내에 극소수의 Bt균이 존재할 경우에는 enrichment배지인 배지I을 사용하는 편이 가장 용이하게 Bt균을 분리할 가능성

Table 1. Isolation Efficacy of *Bacillus thuringiensis* from soil.

Items / medium	I	II	III
No. of spore forming bacteria (colony / g soil)	4.8×10^8	9.2×10^7	3.6×10^7
No. of bacteria producing a lecithinase	23 / 95 (25.15%)	24 / 139 (17.3%)	16 / 97 (16.5%)
No. of bacteria producing a delta-endotoxin	22 / 95 (23.2%)	18 / 139 (13.7%)	14 / 97 (17.5%)
No. of bacteria producing a lecithinase and a delta-endotoxin simultaneously	13 / 95 (13.7%)	11 / 139 (7.9%)	7 / 97 (7.2%)

Medium I was indicated nutrient agar containing penicillin G(20IU) and CCY Salt, medium II was nutrient agar containing Na-acetate, and medium III was nutrient agar only. For lecithinase activity, *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* was used as positive control.

이 있을 것이라고 사료된다.

또한 위상차 현미경으로 내독소를 생성하는 콜로니를 조사해 본 결과 배지 I에서 약14%, 배지 II와 III에서 각각 약 8%와 7%의 콜로니가 확인되었다. 이들 콜로니는 모두 내독소와 lecithinase를 동시에 생산하는 Bt균주로서 lecithinase를 생성하지 않는 Bt균의 수는 배제되었다. 일반적으로 *B. cereus*는 Bt균주와 그 생화학적 특성이 아주 유사하며, *B. cereus*는 결정성 내독소를 생산하지 않지만, lecithinase는 생산한다고 알려져 있다⁹⁾. 따라서 lecithinase만 생성하는 균주나 내독소만을 생산하는 균주들이 분리되는 빈도가 lecithinase와 내독소 모두를 동시에 생산하는 균주에 비해 약 2배 가량 많은 콜로니가 얻어졌으므로 lecithinase를 생성하는 콜로니에는 Bt균 이외에도 *B. cereus* 등과 같이 lecithinase를 생성하는 균주들이 함께 존재하고 있다고 사료된다.

Bt균의 아종 분류를 위한 생화학적인 조사에서 나타난 결과에는 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*(Bti)는 lecithinase를 생산하는 균주로 분류⁹⁾되고 있으므로 NAEY한천배지에서 lecithinase를

생산하지 않는 *B. thuringiensis* 균주에는 적어도 Bti가 포함되어 있지 않기 때문에 Bti균주의 분리에는 NAEY한천배지에서 lecithinase생성 유무를 확인하는 방법은 매우 효과적이라고 사료된다.

2. 분리 *B. thuringiensis* 균주 중 Lecithinase생성 균주의 비율

Lecithinase를 생성하는 균주 중에서 lecithinase생성과 내독소 형성을 동시에 가지는 *B. thuringiensis*의 비율은 배지I에서 가장 높은 비율인 56.5%에 달하였다(Table 2). 그러나, 배지 II와 III를 사용한 결과는 배지 I에서 보다 약 10% 정도 낮은 비율에 달하였다. 따라서, Bt균주 분리에는 배지 I을 사용한 후 분리된 균주는 NAEY배지로 옮겨서 lecithinase생성을 확인하는 방법이 Martin 등¹²⁾과 Schraft³⁾ 등이 기술한 바와 같이 *B. megaterium*과 같은 lecithinase를 생산하지 않는 *Bacillus*속 균주를 배제할 수 있다고 사료된다. 그 후 *B. cereus*나 Bti와 같은 lecithinase생성 균주를 선별하면 Bt균을 선별하는데 약 50% 이상의 확율을 가질 수 있어 모든 colony를 위상차현미경에 의존하는 방법보다 대단히 효과적이며 편리하다고 사료된다. 특히, *B. thuringiensis* 균주의 아종 중에서 특히 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*는

lecithinase를 생산하는 균주로 분류⁹⁾되고 있기 때문에 Bti분리를 위해서는 lecithinase생산을 쉽게 알수 있는 egg york배지의 사용은 Bti가 분리될 수 있는 확율이 대단히 증가되리라고 사료된다.

3. PCR에 의한 모기살충성 내독소 유전자의 확인

분리된 54균주의 *B. thuringiensis*로부터 DNA를 추출하여, *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*의 내독소 유전자에 특이적인 primer(Dip1A, Dip1B)를 사용해서¹³⁾ PCR로 내독소 유전자를 증폭시킨 결과 Fig. 1.에서 보는 바와 같이 내독소 유전자가 증폭되는 *B. thuringiensis* 균주는 2종이 존재하였다. 이때 대조균은 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*의 plasmid가 사용되었으며, *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* 내독소 유전자와 일치하는 0.5 kb의 band가 확인되었다.

최근에 *B. thuringiensis* 균주의 분리에서 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*와는 유전적으로 다르지만, 모기유충에 특이적으로 독작용을 가지는 *B. thuringiensis* 균주가 많이 알려져 있다¹⁴⁻¹⁶⁾. 본인 등이 분리한 54균주의 *B. thuringiensis* 중에서도 모기살충성 *B. thuringiensis* 균이 존재하고 있을 가능성이 있다고 사료되며, 이를 위해서는 모기유충에 의한 bioassay나 Bti와는 유전적으로 다른 내독소 유전자의 primer를 사용하면 모기살

Table 2. Ratio of No. of colony producing a delta-endotoxin and a lecithinase si multaneously against No. of colony p roducing a lecithinase only

Items/medium	I	II	III
No. of colony producing a delta-endotoxin and a lecithinase simultanously	13 / 23	11 / 24	7 / 16
/	(56.5%)	(45.8%)	(43.8%)
No. of colony producing a lecithinase only			

Medium I was indicated nutrient agar containing pencillin G(20IU) and CCY Salt, medium II was nutrient agar containing Na-acetate, and medium III was nutrient agar only. For lecithinase activity, *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* was used as positive control.



Fig. 1. Gene amplification of 8 isolates by PCR.

lane 1 ; HindIII digested lamda DNA marker, lane 2-8; isolate, lane 4 ; *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*(0.5K)

충성 내독소 유전자를 확인 할 수 있으리라고 사
료된다.

IV. 결 론

빠르게 보다 효과적으로 *B. thuringiensis* su-
bsp. *israelensis*를 분리하기 위해 1) 포자형성 균
주 선별을 위한 열처리, 2) 소수의 *Bacillus*속 균
주도 분리하기 위한 enrichment배양 및 3) *B.*
thuringiensis subsp. *israelensis*를 위한 lecithi-
nase생산 균주의 선별이 행해졌다. 그 결과

1. 포자형성 세균은 토양 1g당 NAPGCY배지에
서는 4.8×10^8 cell, NA배지에서는 9.2×10^7
cell, NAAC배지에서는 3.6×10^8 cell이 각각
존재하였다. 이들 중에 lecithinase만 생성하
는 균주는 25.5%이며, delta-endotoxin만 생
성하는 균주는 23.2%, lecithinase와 delta-
endotoxin을 모두 생산하는 균주는 13.7%에
달한다. 또한, lecithinase를 생성하는 균주
중에서 delta-endotoxin도 동시에 생성하는
균주는 56.5%에 달한다.
2. 분리된 8종의 *B. thuringiensis* 중에서 모기
에 독성이 있는 *B. thuringiensis* subsp.
israelensis 균주는 2종으로 내독소 유전자
에 대한 특이적인 primer를 사용해서 PCR을
행하여 확인하였다.

참 고 문 헌

1. Whiteley, H. R. and H. E. Schnepf: The
molecular biology of parasporal crystal
body formation in *Bacillus thuringiensis*,
Ann. Rev. Microbiol., 40, 549-576, 1986.
2. Dulmage, H. T.: Insecticidal activity of
HD-1, a new isolate of *Bacillus thurin-*
giensis var. *alesti*, J. Inverte. Pathol., 15,
232-239, 1970.
3. Goldberg, L. H. and J. Margalit: A bacte-
rial spore demonstrating rapid larvicidal
activity against *Anopheles sergentii*, *Ura-*

notaenia unguiculata, *Culex univattatus*,
Aedes aegypti and *Culex pipiens*, Mosq.
News., 37, 355-358, 1977.

4. Krieg, A., A. M. Huger, G. A. Lan-
genbruch and W. Schmetter: *Bacillus thu-*
ringiensis var. *tenebrionis*: ein neuer, ge-
gen ber Larven von Coleopteren wirk-
samer, Pathotyp. Z. Ang. Entomol., 96,
500-508, 1983.
5. Feitelson, J. S., J. Payne, L. Kim: *Bacillus*
thuringiensis: insects and beyond, Bio/Te-
chnol., 10, 271-275, 1992.
6. Massie, J., G. Robert and P. J. White:
Selective isolation of *Bacillus thuringiensis*
from soil by use of acetate as the only
major source of carbon, Appl. Environ.
Microbiol., 49, 1478-1481, 1985.
7. Johnson, C., A. H. Bishop: A technique for
the effective enrichment and isolation of
Bacillus thuringiensis, FEMS Microbiol.
Lett., 142, 173-177, 1996.
8. Stewart, G. S. A. B., K. Johnstone, E. Ha-
gelberg, and D. J. Ellar: Commitment of
bacterial spores to germinate - a measure
of the trigger reaction, Biochem. J., 198,
101-106, 1981.
9. Martin, P. A. W., and R. S. Travers:
Worldwide abundance and distribution of
Bacillus thuringiensis isolates, Appl. En-
viron. Microbiol., 55, 2437-2442, 1989.
10. Carozzi, N. B., V. C. Kramer, G. W.
Warren, S. Evola, and M. G. Koziel:
Prediction of insecticidal activity of *Ba-*
cillus thuringiensis strains by polymerase
chain reaction product profiles, Appl. En-
viron. Microbiol., 57, 3057-3061, 1991.
11. Eckhardt, T.: A rapid method for the
identification of plasmid deoxyribonucleic
acid in bacteria, Plasmid., 1, 584-588, 1978.
12. Martin, P. A. W., and E. B. Haransky:
Rapid biochemical testing of large numbers

- of *Bacillus thuringiensis* isolates using agar dots, biotechnique., 3, 386-393, 1985.
13. Schraft, H. and M. W. Griffiths : Specific oligonucleotide primers for detection of lecithinase positive *Bacillus* spp. by PCR, Appl. Environ. Microbiol., 61, 98-102, 1995.
 14. Cheung, T. Y. and K. H. Kim : Immunological characteristics of mosquitocidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* 73E10-2, Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng., 18, 301-304, 1990.
 15. Ohba, M. and K. Aizawa : A new subspecies of *Bacillus thuringiensis* possessing 11a:11c flagellar antigenic structure : *Bacillus thuringiensis* subsp. *kyushuensis*., J. Invertebr. Pathol., 32, 387-388, 1979
 16. Yu, Y. M., M. Ohba and S. S. Gill : Characterization of mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *fukuokaensis* crystal proteins., Appl. Environ. Microbiol., 57, 1075-1081, 1991.