

## 국내 토양으로 분리된 *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* CAB133균주의 생물학적 특성

최수연 · 조민수 · 김태환 · 김진수 · 백승경 · 운영남 · 홍순성<sup>1</sup> · 유용만\*

충남대학교 농업생명과학대학 응용생물학과, <sup>1</sup>농업과학기술원 농약평가과

## Bioactive Characterization of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* CAB133 Isolated from Domestic Soil

Su-Yeon Choi, Min-Su Cho, Tae-Hwan Kim, Jin-Su Kim, Seung-Kyung Pack, Young-Nam Youn, Soon-Sung Hong<sup>1</sup> and Yong-Man Yu\*

Dept. Applied Biology, College of Agriculture and Life Sciences, Chungnam National University, Daejeon, 305-764, Korea

<sup>1</sup>National Institute of Agricultural Science and Technology, Suwon, Korea

**ABSTRACT :** To screen highly active *Bacillus thuringiensis* isolates against *Spodoptera litura* (Lepidoptera, Noctuidae), 46 *B. thuringiensis* was isolated from 115 samples obtained from several crop soils. Especially, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* CAB133 and CAB162 isolates showed 100% mortality against *S. litura*. LD<sub>50</sub> values of CAB133, CAB162 and HD-1 strains of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* were 0.089, 3.144 and 0.513 µg/ml against 2nd larva of *S. litura*, respectively. The weight of 3rd larva of *S. litura* which were fed crystal inclusion protein (1.267 µg/ml) with *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* CAB133 was about 30 times less than control group. CAB133 and CAB 162 strains of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* which were taken a highly toxicity against *S. litura* were analyzed by SDS-PAGE, and estimated the molecular weight of the Cry proteins. Their serological identification by H serotypes were showed *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (3abc) type.

**KEY WORDS :** *Bacillus thuringiensis*, *Spodoptera litura*, Bioactivity, SDS-PAGE

**초 록 :** 국내의 난방제 해충에 선택적으로 생물활성을 나타내는 균주를 선별하기 위하여 작물재배 지역의 토양으로부터 채취한 115개의 토양샘플 중 46개의 *Bacillus thuringiensis* 균주를 분리하였다. 이러한 *B. thuringiensis* 균주를 사용하여 난방제 농업해충에 생물활성을 검정한 결과 배추좀나방(*Plutella xylostella*)에 CAB119을 포함한 35균주, 파밤나방(*Spodoptera litura*)에는 CAB128, CAB141균주가, 담배거세미나방(*Spodoptera exigua*)은 CAB133과 CAB159균주가 효과를 나타냈으며 CAB162균주는 3종류의 모든 해충에 높은 활성을 보였다. 분리된 *B. thuringiensis* CAB133 균주는 H serotype에 의한 혈청학적 동정과 SDS-PAGE를 통한 독소 단백질 패턴에서 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (3abc)로 동정되었다. 담배거세미나방 2령 유충에 대한 활성검정의 결과 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (3abc) CAB133, CAB162의 두 균주에 대한 LD<sub>50</sub> 값은 각각 0.089, 3.144 µg/ml로 높은 활성을 나타냈다. 담배거세미나방의 령기에 따른 생물실험에서 CAB133 균주 1.5×10<sup>6</sup> (cfu/ml)에서 1령의 경우 3일, 2령은 5일에 100%의 사충율을 보였다. 담배거세미나방의 경우 *B. thuringiensis*를 섭식 후 먹기를 중단하여 성장이 멈추면서 5~7일 후에 사망하였다. 그러므로 *B. thuringiensis*의 결정성독소단백질(1.267 µg/ml)를 섭식하고 성장하지 못하는 담배거세미나방 유충의 무게는 대조군보다 5일후 약 30배 정도 차이로 나타나서 사망하였다.

**검색어 :** *Bacillus thuringiensis*, *Spodoptera litura*, 생물검정, SDS-PAGE

\*Corresponding author. E-mail: ymyu@cnu.ac.kr

곤충병원성세균인 *Bacillus thuringiensis*는 호기성 Gram 양성균의 간균으로, 영양세포에 내생포자를 형성하는 시기에 살충성 단백질 결정체를 동시에 형성한다. 현재까지 나비목, 파리목, 딱정벌레목 등의 곤충에 독성을 가진 단백질 결정체는 내독소( $\delta$ -endotoxin)라 불리는 폴리펩티드로 이루어져 있으며, 이 내독소 단백질의 종류에 따라 대상 해충에 대한 독성이 달라지는 기주특이성을 나타낸다(Schnepf, 1995). 내독소의 작용기작은 내독소 단백질이 분해되어 독소활성을 보이게 되면, 중장세포의 수용체에 이들 독소가 결합하여 구멍을 뚫으므로, 중장세포막의 이온교환의 불균형과 영양분의 흡수가 이루어지지 않게 되며, 이에 따라 패혈증이 유발되어 섭식이 중지되고 결국에는 곤충이 죽게 된다(Gill et al., 1992). 이러한 과정에서 단백질의 분해 활성이 살충성 단백질을 만드는데 주로 120~140 kDa에 해당하는 내독소 단백질이 곤충 중장의 높은 알칼리성 곤충 소화액에 의해서 용해되어 60~70 kDa의 저항성 독성 단백질이 형성되어 독성이 나타나는 것으로 보고되어 있다(Lecadet and Martouret, 1967; Yamamoto and Laughim, 1981).

Dulmage and Aizawai (1982)는 *B. thuringiensis*의 주요 서식처가 토양이며 많은 나라에서 새로운 *B. thuringiensis*를 분리하기 위해서 많은 노력을 하고 있다고 보고하였다. 그리고 특히 Martin and Travers (1989)는 5대륙과 그 대륙의 섬의 토양 샘플로부터의 *B. thuringiensis*의 분리와 분포를 보고하였다. 이러한 새로운 *B. thuringiensis*의 분리는 기주범위 확대, 고독성, 새로운 미생물 농약의 개발, 곤충 저항성의 해결책을 제시하므로(Tanada and Kaya, 1993) 세계 여러 나라에서 새로운 *B. thuringiensis* 균주를 찾기 위해서 *B. thuringiensis*의 선발, 분리, 분석을 수행하고 있다(Chilcott and Wigley, 1993; Smith and Couche, 1991). 한편 최근 국내에서는 Kim et al. (2006)이 산과 들에서 142곳의 토양시료를 채취하여 배추좀나방에 활성을 나타내는 11균주, 담배거세미나방에 7균주, 암청색줄무늬밤나방이 5균주, 파리목의 빨간집모기에 5균주가 독성을 나타내는 것을 분리하여 보고한 바 있다.

담배거세미나방[*Spodoptera litura* (Fabricius)]은 나비목(Lepidoptera), 밤나방과(Noctuidae) *Spodoptera* 속에 속하는 가장 대표적인 농업해충으로(Horikiri, 1964; Garad et al., 1984; Bae et al., 1997), 가해하는 기주의 종류가 100여종 이상인 광식성 및 잡식성 해충으로 알려져 있다(Minamikawa, 1937; Mochida and Okada, 1974). 또한 이들 해충의 유충은 선천적으로 약제에 대한 높은 내성과 낮은 감수성으로 어린 유충기를 제외한 중령 이상의 유충

은 약제방제가 매우 어려운 대표적인 난방제 해충으로 보고되어 있다(Choi et al., 1996; Bae et al., 2003). 그럼에도 불구하고 이 해충을 방제에는 데는 주로 살충제에 의존하고 있었으나 약제 저항성이 나타나면서(Kim and Shin, 1987) 방제가 어려운 실정이다. 더욱이 화학합성농약인 살충제 위주의 방제는 해충으로 하여금 약제저항성을 증가시킬 뿐만 아니라, 살충제 사용으로 인한 환경오염과 이에 따른 생태계 파괴 등의 문제를 일으킬 수 있다. 그러므로 생태계 보호 및 농작물 생산 증대를 위하여 종합적 해충방제 방법이 도입이 되고 살충제의 사용이 억제됨에 따라 생물학적인 방법에 의한 해충방제에 관심이 매우 높아져 있다. 이에 대표적인 것이 곤충병원성 세균인 *B. thuringiensis* 균주를 이용한 미생물 농약이다.

따라서 본 연구는 농작물의 경작 토양에서 난방제 해충인 담배거세미나방 유충을 방제를 목적으로 고도의 활성을 나타내는 새로운 *B. thuringiensis* 균주를 선발하고, 분리된 균에 대해서 생물활성 및 특성조사를 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 시료 채취

토양 시료는 주로 충청남북도의 논, 밭, 과수원을 중심으로 이전에 생물농약을 처리하지 않은 토양에서 총 115개의 시료를 채취하였다. 시료는 토양 표면에서 약 10 cm 깊이로 멸균된 수저를 이용하여 5 g씩 채취하였으며, 채취한 시료는 멸균된 플라스틱 봉지에 넣고 실험실로 가져와 4°C 냉장실에 보관하면서 사용하였다.

### *B. thuringiensis*의 분리

*B. thuringiensis* 균주의 분리는 Ohba and Aizawa (1978) 방법을 사용하였다. 채취된 토양 시료의 1 g을 시험관에 넣은 뒤, 멸균 증류수 9 ml에 넣고 3~4회 정도 강하게 교반하였다. 포자를 형성하지 못하는 세균들을 선택적으로 제거하기 위하여 65°C에서 30분 동안 열처리하였다. 열처리 후 5분 동안 정치하여 흙을 가라앉히고 상층액을 10<sup>3</sup>까지 희석하여 Nutrient agar plate에 고르게 도말하였다. 이 plate를 27°C에서 3~4일간 배양 후에 형성된 *Bacillus* 콜로니들 중에서 외형이 *B. thuringiensis*와 비슷한 콜로니들만 선발하여 위상차현미경 1,000배로 내독소 단백질과 포자를 형성하는 균주를 선발하였다. 분리된 균주 중에

담배거세미나방에 생물검정을 실시하여 효과가 좋은 *B. thuringiensis* 균주를 일본 규슈대학의 Ohba 교수에게 보내 H serotype의 동정을 수행하였다.

### 위상차현미경과 주사전자현미경

포자형성기가 지난 *B. thuringiensis* 균주의 포자와 내독소 단백질 혼합물에서 이들의 크기와 형태를 알아보기 위하여 위상차 현미경과 주사전자현미경을 이용하여 관찰하였다. 위상차현미경으로 관찰하기 위해서 순수분리한 배지에서 소량의 *B. thuringiensis* 균주를 slide glass위에 묻힌 후 1000배로 관찰 하였다. 주사전자현미경으로 관찰할 시료는 conducting silver paint (Ladd Res., USA)에서 금으로 코팅을 하여 표본을 준비하였으며 Philips XL 30 ESEM (Philips, Netherlands)을 이용하여 관찰하였다.

### 곤충사육

본 실험에서 사용된 배추좀나방(*P. xylostella*)은 야외개체군을 채취하여 배추를 먹이로 실험실에서 누대 사육하였고, 담배거세미나방(*S. litura*)과 파밤나방(*S. exigua*)은 농촌진흥청 농업기술과학원으로부터 분양받아 인공먹이로 누대 사육하였다. 모든 곤충은 온도  $25\pm 2^\circ\text{C}$ , 광조건 16L:8D, 상대습도 50~60%의 조건에서 사육하였다.

### 생물검정

선발된 *B. thuringiensis* 균주를 Nutrient agar배지에 접종하고  $27^\circ\text{C}$ 에서 4~6일 동안 배양 후 위상차 현미경으로 내독소 결정체 단백질 형성을 관찰하면서 내독소 단백질을 형성하였을 때, 배지위의 균을 모아 원심튜브와 원심분리기를 이용해 상층액을 버리고 남은 펠렛에 멸균수 2 ml을 첨가하여 약  $1.5\times 10^7$  (cfu/ml)에 해당하는 균액을 정성적 생물검정에 사용하였다.

#### 1) *P. xylostella*에 대한 독성 검정

배추좀나방에 대한 생물검정은 Tabashnik et al. (1990)의 방법에 따라 잎 디스크 침지법을 수정하여 실시하였다. 3×3 cm의 배추잎을  $10^2$ 에 해당하는 희석액 20 ml에 침지한 후 건조시킨 다음 2령 유충 10마리씩을 3반복으로 실시하여 24시간 단위로 72시간 동안 치사율을 조사하였다.

#### 2) *S. litura*와 *S. exigua*에 대한 독성 검정

담배거세미나방과 파밤나방에 대한 생물활성 검정은

$10^1$ 에 해당하는 희석액 100  $\mu\text{l}$ 을 0.5 g의 인공사료에 첨가하여 2령 말기 유충을 5마리씩 넣고 4반복으로 실시하여 24시간 단위로 120시간 동안 치사율을 조사하였다.

#### 3) 반수치사농도(LC<sub>50</sub>)

모든 실험은 5마리씩 4반복 실시하였으며, 희석농도는 담배거세미나방 유충이 모두 사망하는 농도와 생존하는 농도까지 5~7농도 범위를 하여 조사한 사충율로 Finney (1971)의 probit 계산법에 기초한 PC 프로그램(Reymond, 1985)을 이용하여 반수치사농도(LC<sub>50</sub>)를 산출하였다.

#### 4) *S. litura*에 대한 섭식저해

체중이 약 0.005-0.009 mg인 담배거세미나방 3령기 유충을 대상으로 crystal-spore 혼합액(단백질량 1.267  $\mu\text{g/ml}$ )을  $10^4$ 까지 희석하여 인공먹이 0.5 g당 각 희석액 100  $\mu\text{l}$ 을 첨가하여 98마리를 5일 동안 먹이고 체중을 측정한다.

### SDS-PAGE

각 균주를 멸균수에 현탁시킨 현탁액을 Nutrient agar 배지(Difco Detroit, MI, USA)에  $27^\circ\text{C}$ 에서 5일 동안 배양한다. 배양된 균주를 위상차현미경 하에서 autolysis가 일어나는 것을 확인한 후, lysis가 일어났으면 PBS buffer를 사용하여 원심튜브에 집균하여 15000 rpm으로  $4^\circ\text{C}$ 에서 10분간 원심을 한다. 원심을 돌린 후, 상층액은 버리고 washing buffer I (500 mM NaCl, 2% Triton X-100)은 3번, washing buffer II (500 mM NaCl)는 2번 세척한다. 세척된 parasporal inclusions는 멸균수를 첨가한 후  $-20^\circ\text{C}$ 에 실험에 사용할 때까지 저장한다. SDS-PAGE는 담배거세미나방에 100%의 사충율을 보이는 분리균에 대해서 10% separating과 4% stacking gel을 사용한 Laemmli의 방법을 이용하여 실험하였다(Laemmli, 1970). 전기영동 수행 후에, 겔을 0.1% Coomassie blue R250 (Sigma, St. Louis, MO)로 염색하였다.

#### *S. litura*의 증장추출액에 처리

담배거세미나방 100마리의 5령 유충을  $-4^\circ\text{C}$ 에 10초간 둔 후, 멸균된 해부용 칼을 이용하여 해부하여 증장만을 얼음하의 원심튜브에 넣고  $13000\times g$   $4^\circ\text{C}$  15분간 원심한다. 연한 갈색을 띠는 상층액만을 에펜도프 튜브에 넣어  $-20^\circ\text{C}$ 에 보관한다. 약 30-50  $\mu\text{g/ml}$ 의 단백질 농도의 parasporal inclusion 1  $\mu\text{l}$ 를 50 mM NaOH 수용액을 5분 처리한 후 원심하여 상층액을 버리고 담배거세미나방 증

장액 0.04 µg/ml 1 µl과 혼합하여 교반한 후, 37°C에서 15분간 반응시켜서 사용하였다(Zhong *et al.*, 2000; Zouari and Samir 1997). 10% separating gel과 4% stacking gel을 사용하여 전기영동하였다.

## 결과 및 고찰

### *B. thuringiensis*의 분리와 동정

국내 농작물에 많은 피해를 주는 담배거세미나방은 해충의 생리, 생태적 특성 때문에 화학농약에 의한 방제가 어려울 뿐만 아니라 최근 친환경 농산물을 생산하는데도 적당한 방제방법이 없어서 곤란한 실정이다. 따라서 미생물적 방제 인자인 *Bacillus thuringiensis* 균주를 분리를 시도하였으며, 또한 이 균주의 숙주가 서식하는 농작물의 경작지를 택하여 토양분리를 수행하였다. 본 연구는 국내의 나방류가 서식하는 작물을 경작하는 토양으로부터 채취한 총 115개의 토양샘플 중에서 46개의 *B. thuringiensis* 균주를 분리하였다(Table 1). 토양의 샘플로부터 분리되는 비율은 약 40%로 나타났다. *B. thuringiensis*를 분리한 Martin and Travers (1989)가 보고한 바에 의하면, 아시아에서 채취한 토양샘플에서 85%의 높은 선발율을 보이고 있는 것과는 많은 차이를 나타내고 있다. *B. thuringiensis* 균이 분리된 토양의 재배작물에 따른 분리비율을 살펴보면, 식용작물 재배토양에서는 58.6%, 공예작물 20.0%, 채소류 27.2%의 *B. thuringiensis* 균주 분리율을 보였다. 특이할 만한 사항으로는 식용작물 중에서도 콩에서 자라는 토양에서 *B. thuringiensis*의 균주가 가장 많이 분리되었다. 이러한 현상은 일반적으로 유기물이 풍부한 토양에서는 많은 미생물들이 다양하게 존재하기 때문으로 사료된다. 국내에서도 많은 균주가 분리되었는데 양잠농가에서 채취한 시료에서 27%의 높은 *B. thuringiensis*가 나왔으며, 곡물류가 존재하는 먼지에서도 40%정도의 아주

높은 비율로 *B. thuringiensis*가 분리되며 일반적으로 토양에서도 10%정도로 보고되었다(Kim *et al.*, 1995a, b, c., Kim *et al.*, 2006). 그리고 터키에서는 저곡창고, 죽은 곤충으로부터 63.5%의 높은 비율로 *B. thuringiensis*가 분리되는 것을 알 수가 있다(Apaydin *et al.*, 2005). 이러한 결과는 샘플의 채취 장소에 따라서 *B. thuringiensis*의 균주의 획득 빈도가 변할 수 있음을 보여주었다.

담배거세미나방에 대해서 100%의 높은 활성을 보이는 CAB133, CAB162 균주에 대해서 M. Obha (Institute of Biological Control, Faculty of Agriculture, Kyusu University, Fukuoka, Japan)에 H serotype을 의뢰한 결과, 두 균주 모두 혈청형이 3abc인 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*로 동정되었다.

### 분리균주의 형태적 특성

토양으로부터 분리한 총 46개의 *B. thuringiensis* 균주들을 위상차 현미경으로 관찰한 결과, 나비목 해충에 주로 활성을 나타내는 32개의 Bipyrarnidal type과 모기 등 파리목 해충에 효과를 보이는 13개의 Spherical type 그리고 대부분 무독성을 나타내는 Amorphouse type이 1개로 나타났다(Table 2).

*B. thuringiensis*의 내독소단백질 형태는 살충성을 나타내는 곤충 숙주범위와 밀접한 관계를 나타내는 정보를 주기 때문에(Maeda *et al.*, 2000), 위상차 현미경 하에서의 내독소단백질 형태 관찰은 *B. thuringiensis* 균주의 살충

**Table 2.** Morphological types of parasporal inclusions of *B. thuringiensis* isolates.

Morphological groups	No. of <i>B. thuringiensis</i> isolates
Bipyrarnidal type	34
Spherical type	11
Amorphouse type	1
Total	46

**Table 1.** Ratio of isolation of *B. thuringiensis* collected from different crop soil samples

Kinds of crops	No. of soil samples	No. of soil samples with <i>B. thuringiensis</i>	% of isolates	
Food crops	29	17	58.6	
Industrial crops	20	4	20.0	
Garden crops	Vegetable	54	15	27.2
	Fruit tree	8	0	0
Etc	4	0	0	
Total	115	46	40	

활성에 대한 중요한 정보로 제공된다. 따라서 담배거세미나방에 활성이 높은 새로 분리된 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* CAB133, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* CAB162 균주는 나비목에 활성이 있는 기준균주인 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*나 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*와 같은 전형적인 이중피라미드형의 결정성 내독소단백질과 유사한 패턴으로 보인다(Figs. 2, 3). 또한 Kim et al. (2006)이

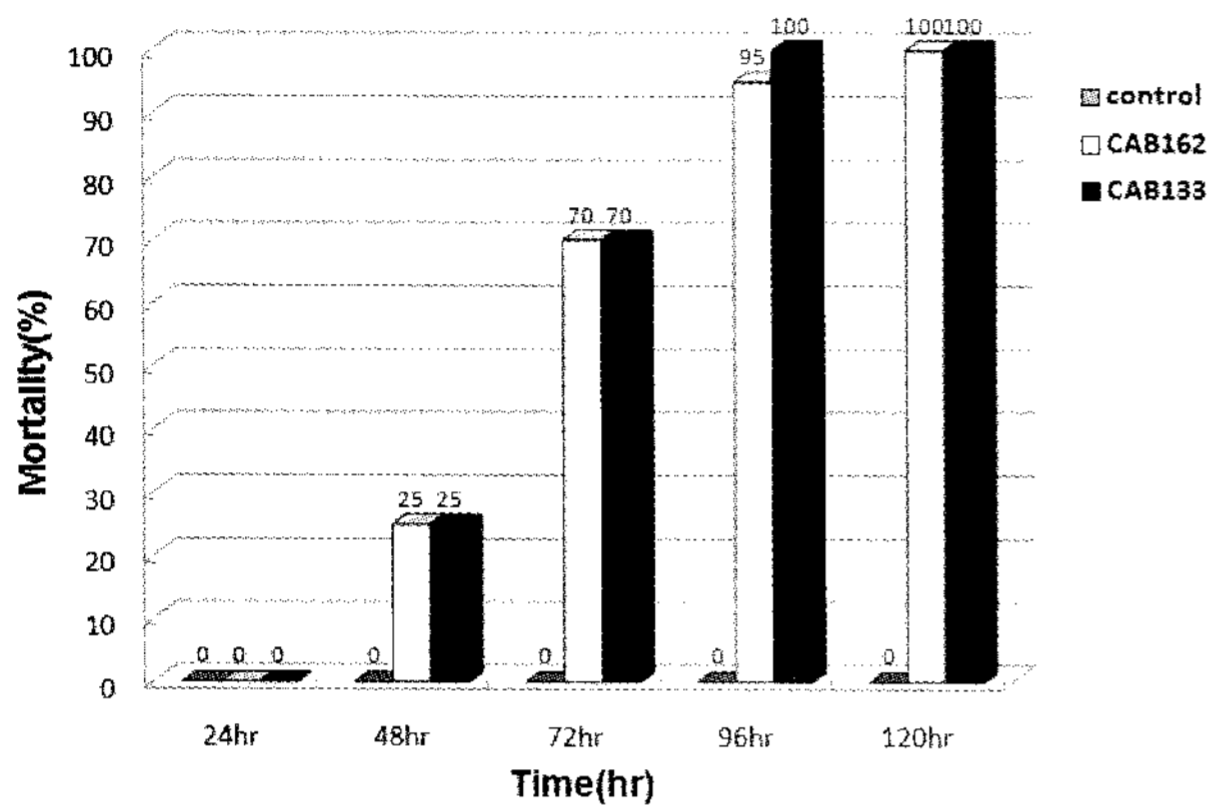


Fig. 1. Mortality ratio of *Spodoptera litura* against *B. thuringiensis* with 2 different isolates.

분리한 *B. thuringiensis*균주의 경우에도 결정성 단백질은 위상차 현미경으로 관찰하였을 때 이중피라미드형태가 13개이고 구형이 3개로 이들 가운데 담배거세미나방에 대한 살충활성이 높은 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* CAB109 균주를 분리하였다. 따라서 담배거세미나방에 살충활성을 나타내는 이 두 균주가 혈청학적으로는 분명하게 다름에도 불구하고 동일한 해충에 독성을 나타내는 결정성독소단백질을 생산하므로 동일한 유전자인지의 여부를 연구할 필요가 있다.

### 생물검정

국내 농작물 경작지에서 분리된 46개의 *B. thuringiensis* 균주의 기주범위 및 생물활성을 확인하기 위하여 실험실에서 사육중인 나비목 해충인 배추좀나방과, 파밤나방, 담배거세미나방에 대하여 독성활성을 검정하였다. 시험한 결과, 배추좀나방에 90% 이상의 사충율을 보인 균주가 36개로서 모두 이중피라미드 형태이었으나, 이중에서 CAB131 균주만이 구형의 크리스탈을 가진 균주였다. 그리고 파밤나방에 높은 독성 효과를 나타내는 균주로는 CAB133, CAB159, CAB162 등 3균주가 있었으며, 담배

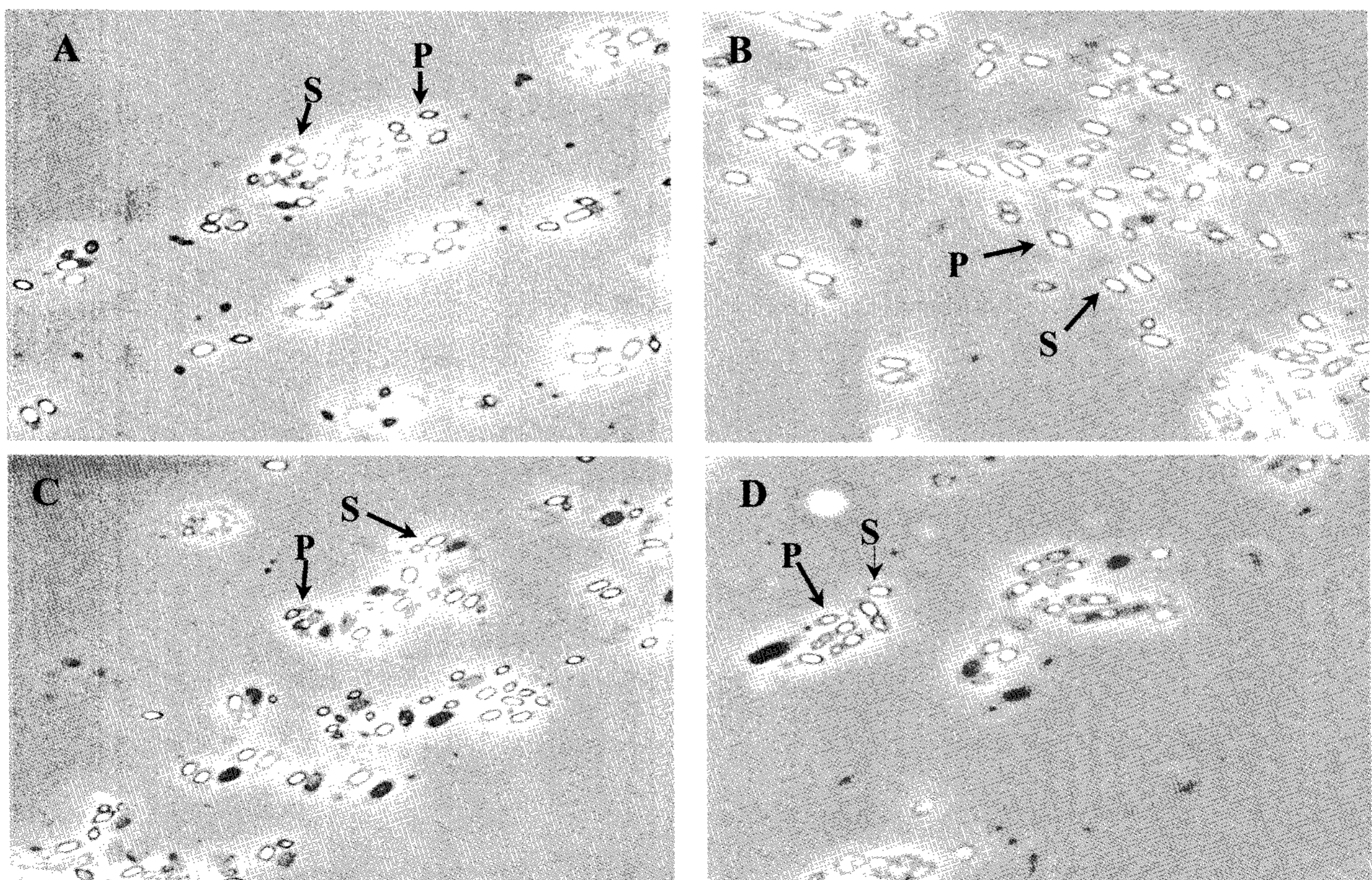


Fig. 2. Phase-contrast microscope photographs ( $\times 1000$ ) of crystal shapes of *Bacillus thuringiensis* kurstaki (A), *B. thuringiensis* aizawai (B), *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* CAB133 (C), and CAB162 (D). P: parasporal crystal; S: spore.

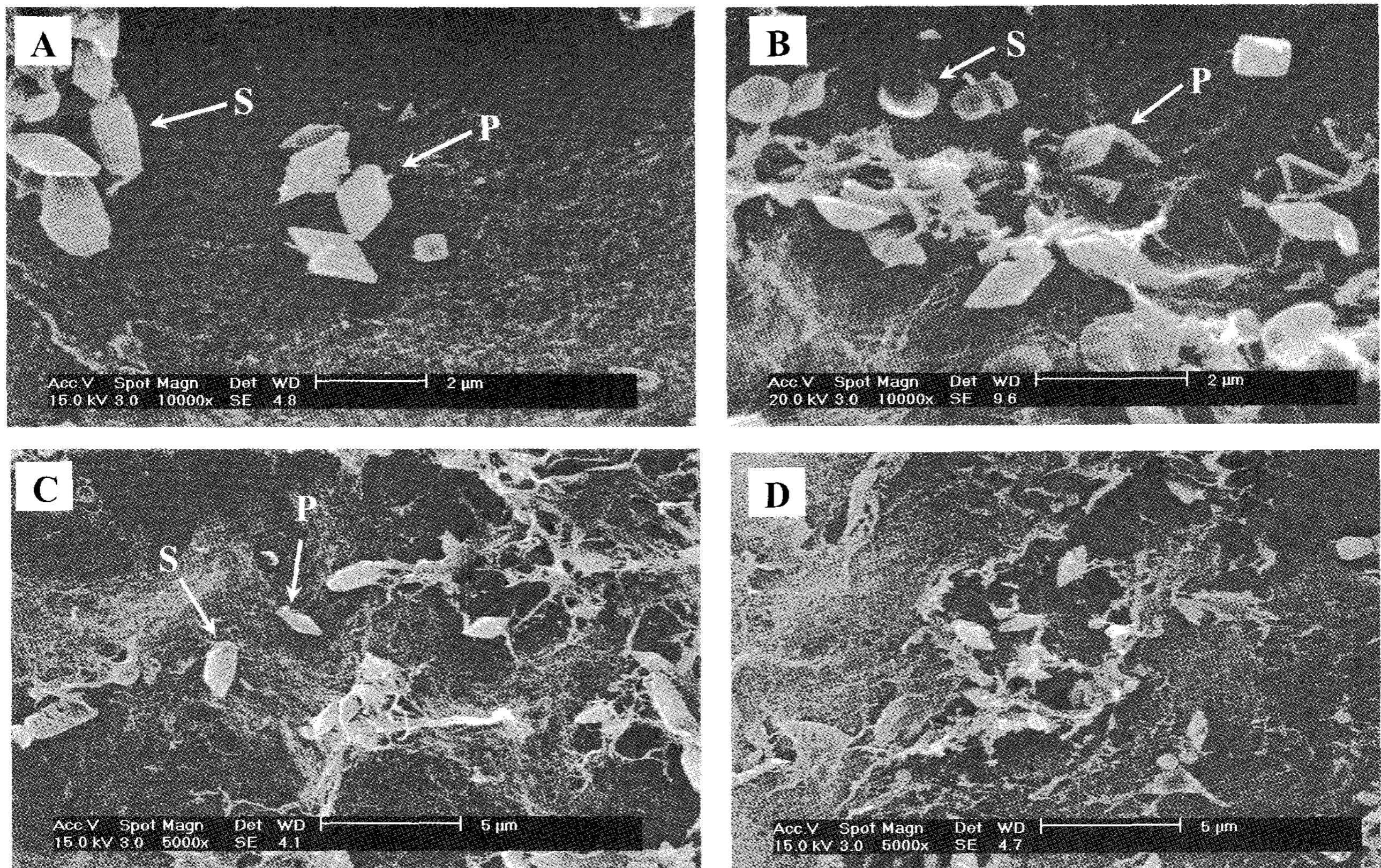


Fig. 3. Scanning electron microscope photographs (SEM) of crystal shapes of *Bacillus thuringiensis kurstaki* (A), *B. thuringiensis aizawai* (B), *B. thuringiensis subsp. kurstaki* CAB133 (C), and CAB162 (D). P: parasporal crystal; S: spore.

거세미나방에 독성을 보이는 균주로는 CAB128, CAB141, CAB162 등 3개의 균주가 높은 활성이 나타났다(Table 3). 특히, CAB133, CAB162 균주는 담배거세미나방에 100%의 사충율을 보였는데, CAB162 균주는 배추좀나방, 파밤나방, 담배거세미나방 등 3종의 곤충에 모두 높은 생물 효과 및 넓은 기주범위를 보였고, CAB133 균주의 경우에는 담배거세미나방에 대하여 CAB162 균주보다 빠른 사충효과를 가지고 있었다(Fig. 1). 또한 파밤나방과 담배거세미나방에 효과를 나타내는 모든 균주가 배추좀나방에도 동시에 생물활성을 나타내었다.

담배거세미나방에 보다 강하며 속효적인 균주를 선발하기 위한 생물검정에서 CAB133, CAB162균주 및 *B. thuringiensis subsp. kurstaki* HD-1의 반수치사 농도값은 각각 0.089  $\mu\text{g/ml}$ 과, 3.144  $\mu\text{g/ml}$ , 0.513  $\mu\text{g/ml}$ 로 CAB133 균주가 CAB162와 비교균주인 *B. thuringiensis subsp. kurstaki* HD-1에 비해서 상당히 높은 활성을 나타내는 것으로 확인되었다(Table 4). 또한 CAB133균주와 CAB162 균주에 대해서 다른 해충의 활성범위를 알아보기 위해서 배추좀나방, 지하집모기, 이집트숲모기에 대해서 LD<sub>50</sub> 값을 각각 조사하였다. 생물검정에서 CAB133균주는 배추

Table 3. Bioactivity of *B. thuringiensis* isolates against Lepidoptera larvae

Insects	<i>B. thuringiensis</i> strains (>90% mortality)
<i>Plutell xylostella</i>	CAB118, CAB119, CAB120, CAB121, CAB123, CAB124, CAB125, CAB126, CAB128, CAB129, CAB130, CAB131, CAB132, CAB133, CAB134, CAB135, CAB136, CAB137, CAB138, CAB139, CAB140, CAB141, CAB142, CAB143, CAB146, CAB148, CAB152, CAB153, CAB154, CAB155, CAB156, CAB157, CAB159, CAB160, CAB161, CAB162 (36)
<i>Spodoptera litura</i>	CAB133, CAB159, CAB162 (3)
<i>Spodoptera exigua</i>	CAB128, CAB141, CAB162 (3)
Non-toxic	CAB117, CAB122, CAB127, CAB144, CAB145, CAB147, CAB149, CAB150, CAB151, CAB158 (10)
Total	46

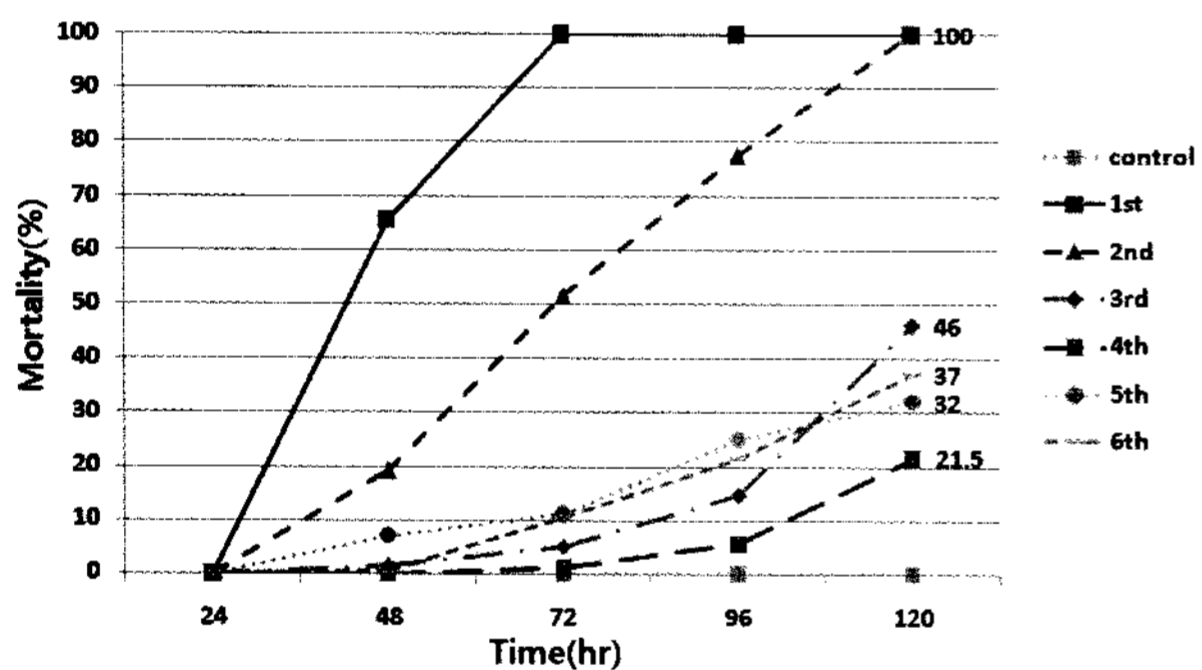
**Table 4.** Toxicity of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* CAB133 and CAB162 isolates against *Spodoptera litura*

Strains	n	Slope±SE	LD <sub>50</sub> (95%CL., µg/ml)
<i>B. thuringiensis</i> <i>kurstaki</i> HD-1	120	1.517±0.116	0.513 (0.418-0.626)
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> CAB133	120	1.265±0.107	0.089 (0.071-0.115)
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> CAB162	120	1.821±0.165	3.144 (2.678-3.771)

**Table 5.** Comparative toxicity of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* CAB133 and CAB162 isolates against *Plutella xylostella*, *Cules pipiens molestus* and *Aedes aegypti*

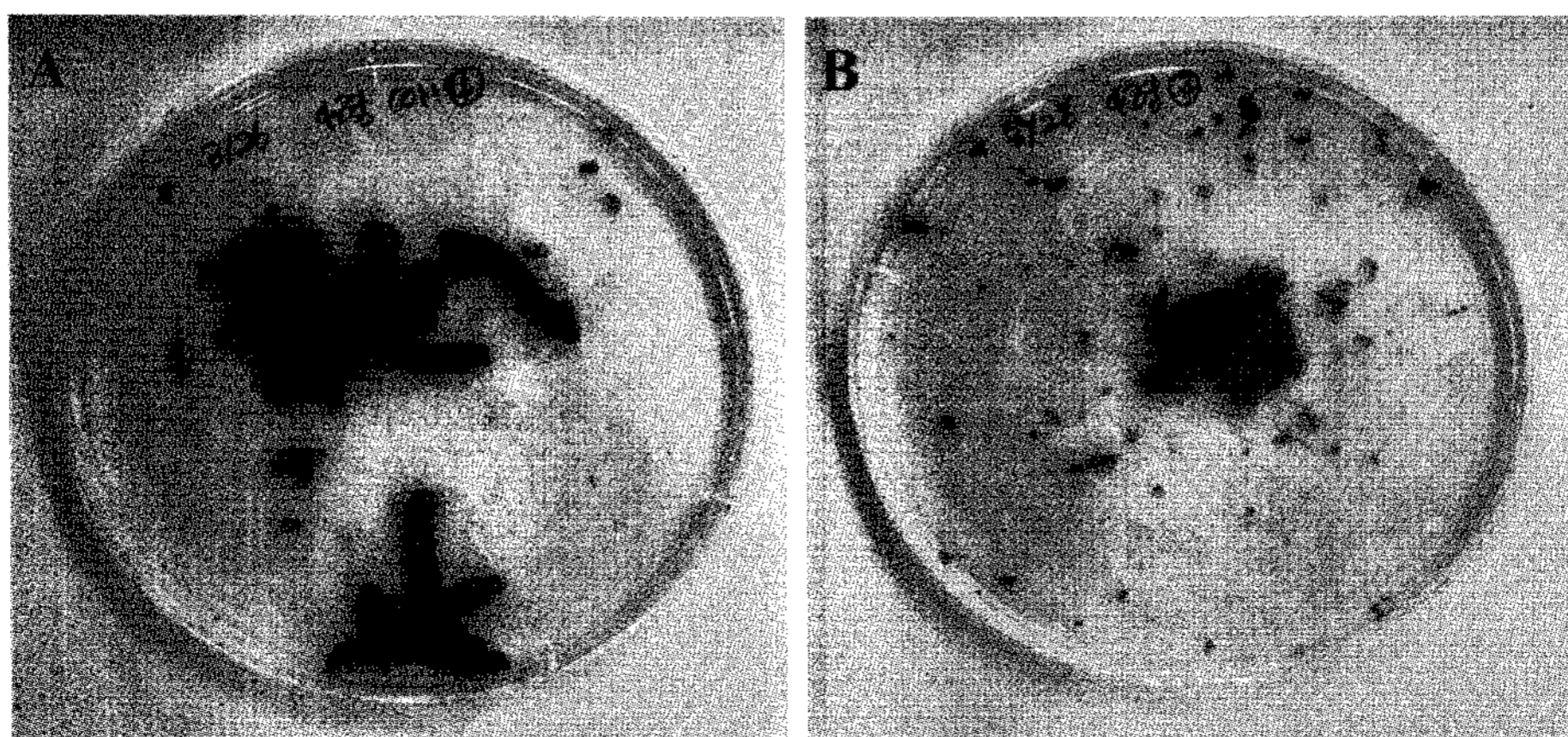
	LC <sub>50</sub> (ng/ml)		
	<i>Plutella xylostella</i>	<i>Cules pipiens molestus</i>	<i>Aedes aegypti</i>
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> CAB133	0.57	433.85	292.15
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> CAB162	1.88	2626.15	582.99

좀나방, 지하집모기 그리고 이집트 숲모기에 각각 0.57 ng/ml, 433.85 ng/ml, 292.15 ng/ml로 보였으며 CAB162 균주는 1.88 ng/ml, 2626.15 ng/ml, 582.99 ng/ml로 조사되었다. 결과적으로 CAB133균주가 모든 시험곤충에 CAB162균주 보다 높은 활성을 나타내었다(Table 4, 5).

**Fig. 4.** Mortality ratio of *S. litura* larva against *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* CAB133 according to different larval ages.

따라서 CAB133 균주가 배추좀나방에 생물활성을 보이고 특히 난방제 해충인 담배거세미나방에 분리된 다른 균주 보다 빠르며 고효성인 균주로 선발하여 실험에 사용하였다.

일반적으로 담배거세미나방은 화학 살충제에 대한 저항성이 강하여 방제가 어려운 해충으로 알려져 있다. 그렇지만, 유충의 발육과정 중 3령 이하의 어린 유충기는 약제에 대한 감수성이 비교적 높아서 방제에 큰 어려움이 없고, 3령 이상의 유충들만이 약제에 대한 감수성이 낮아 방제가 매우 어렵다고 보고하였다(Bae et al., 2003). 따라서 *B. thuringiensis* CAB133 균주에 대해서도 1령에서부터 6령까지의 살충활성을 조사하였다. 담배거세미나방의 각각의 영기별 유충에 *B. thuringiensis* CAB133 균주를 섭식시켰을 때 1~2일에 사망하는 것도 있었으나 죽지 않아도 5일 동안 섭식이 중단되고 성장하지 못한 채로 결국에는 사망하였다(Fig. 4, 5). 영기별 활성시험에서 2, 3 그리고 4령기의 LD<sub>50</sub> 값은 0.089 µg/ml, 0.271 µg/ml,

**Fig. 5.** The appearance of *S. litura* larva treated with *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* CAB133 isolate ( $1.5 \times 10^6$  cfu/ml). A: control; B: 4th larva of feeding inhibition.

0.389 µg/ml로 2령이 가장 감수성이고, 3령, 4령은 2령에 비해 약 3배, 4배의 높은 농도 값이 나타났다. 3령과 4령의 LD<sub>50</sub> 값은 크게 차이가 나타나지 않았다(Table 6).

*B. thuringiensis* CAB133 균주를 섭식하고 성장하지 못하는 특성을 조사하기 위하여 담배거세미나방 3령 유충에 LD<sub>50</sub> 값의 내독소결정성 단백질을 1.276 µg/ml에서부터 10배 간격 차이로 섭식시켰다. *B. thuringiensis* CAB133 균주를 섭식한 해충의 일부는 사망하고 나머지 살아있으나 유충의 5일 후 무게는 대조군의 116.4 µg/ml에 비하여 사망률이 84%인 경우 약 30배 적게 측정되었다(Table 7). 이러한 결과는 *B. thuringiensis*를 섭식하면 패혈증에 죽기도 하지만 섭식 중단으로 굶어 죽기도 하기 때문에 *B. thuringiensis* CAB133의 내독소단백질로 인한 섭식저해로 유충의 무게 증가율이 감소함을 알 수 있었다. Fig. 5에 나타내는 것은 어린 유충기에는 사망률이 높으나 노령으로 갈수록 사망률은 급소하게 저하되는 것을 볼 수 있었다. 1, 2령 유충은 5일 만에 100%의 높은 사충율을 보였고 3령은 약 50% 반면에 노령유충기인 4, 5, 6령 유충은 40% 이하의 낮은 사충율이 나타났다(Fig. 4). 이러한 결과들을 바탕으로 담배거세미나방의 효과적인 방제 방법은 발생 초기인 어린 령기의 유충으로 존재할 때 처리하는 것이 감수성이 매우 낮아지기 때문에 해충방제 효과가 나타날 것으로 사료된다.

**SDS-PAGE와 증장추출물의 처리**

나비목에 활성이 있는 이중피라미드형의 crystal을 구성

하는 Cry 단백질의 분자량은 약 130~140 kDa에 해당하며 나비목 증장 내의 높은 알칼리성과 단백질효소에 의해서 약 60~65 kDa의 독소단백질로 만들어져 살충효과를 나타내게 된다(Aronson, 1993). *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* CAB133과 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* CAB162 균주는 혈청학적인 분류에서는 동일한 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*로 동정되었으나, 생물활성으로 나타난 기주범위 및 효과에서 차이가 나타나므로 이들 균주의 분자생물학적인 차이를 검토하게 되었다. 따라서 담배거세미나방에 100%의 사충율을 보인 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* CAB133와 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* CAB162균주는 나비목에 활성이 있고, 기본 균주인 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* 및 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*와 비교하여 SDS-PAGE를 통하여 내독소단백질 특성을 확인하였다. 새로 분리된 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* CAB133 균주는 기본 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* 균주와, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* CAB162 균주는 기본 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* 균주와 단백질 밴드 패턴이 유사하였다. *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* CAB133 균주는 약 145 kDa, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* CAB162 균주는 약 130 kDa과 약 66 kDa의 주요 단백질 밴드를 조사할 수 있었다(Fig. 6). 이 두 균주가 생산하는 parasporal inclusion의 활성독소를 확인하기 위해서 담배거세미나방의 증장 추출액으로 처리하였다. 두 균주의 단백질이 증장추출액에 의해 분해된 결과, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* CAB133 균주는 약 70 kDa, 61 kDa, 50 kDa 등 주요한 3개의 밴드가 형성되었으며, *B. thuringiensis*

**Table 6.** Toxic activity of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* CAB133 isolate against various larval stages of *S. litura* larvae

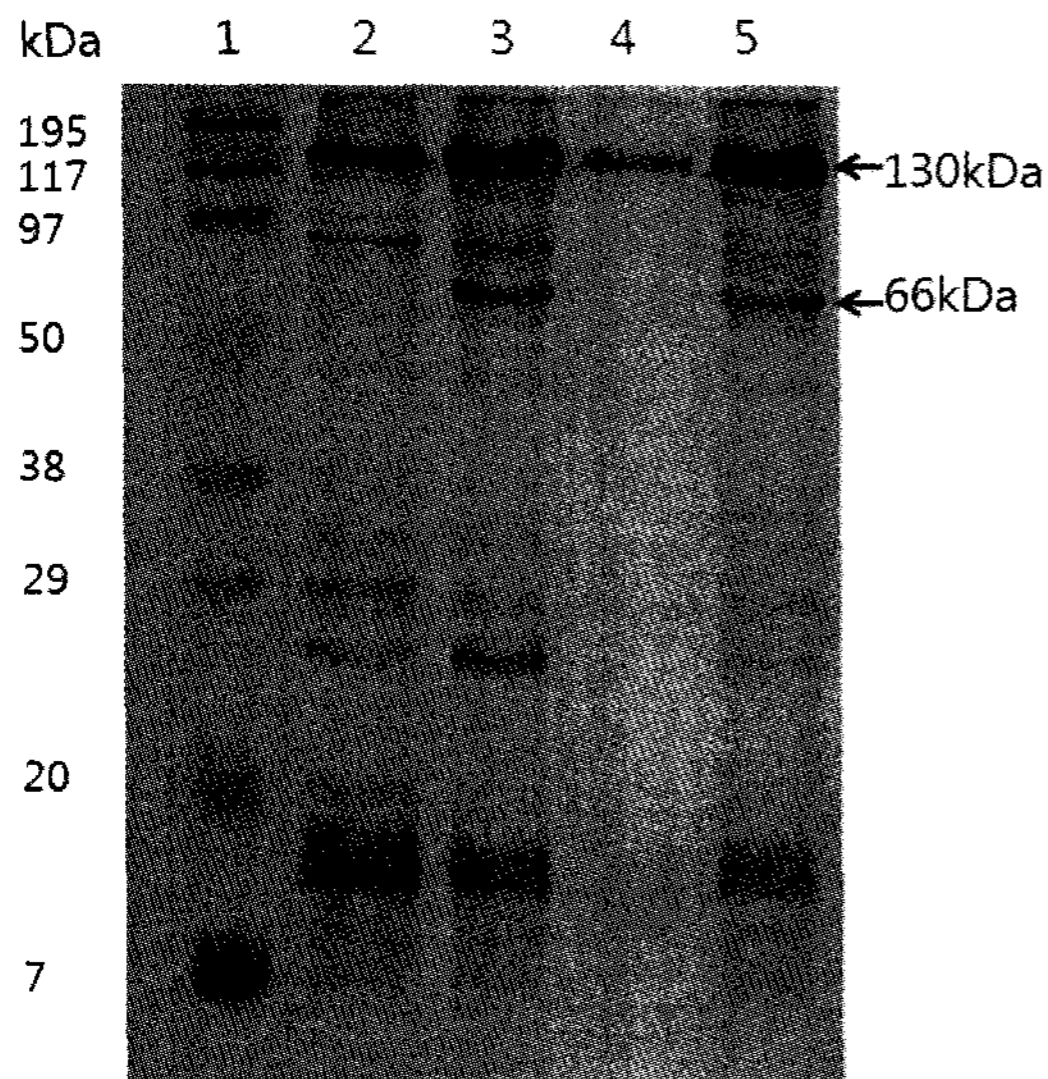
Isolate	Larval stages	n	Slope±SE	LD <sub>50</sub> (95% CL., µg/ml)
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> CAB133	2nd instar	120	1.265±0.107	0.089 (0.071-0.115)
	3rd instar	120	1.588±1.800	0.271 (0.209-0.300)
	4th instar	120	1.566±0.165	0.389 (0.478-0.681)

**Table 7.** Weight increase of *S. litura* 3rd larvae fed CAB133 strain six concentration

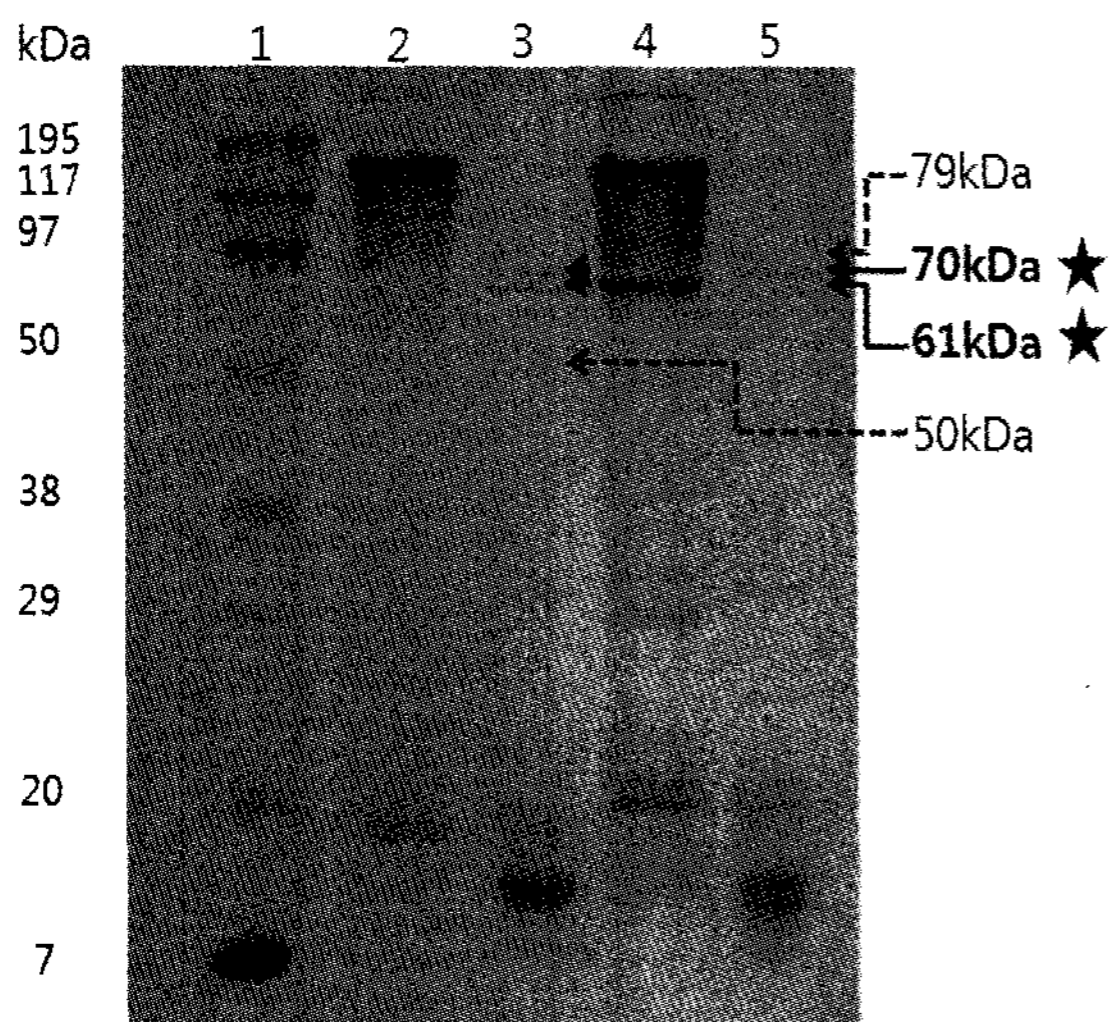
Protein concentration (µg/ml)	N <sup>a</sup>	Weight increase <sup>b</sup> (µg)	Mortality (%)
Control	98	116.4±27.9 a	0
0.0001267	98	95.9±8.8 b	0
0.001267	98	77.3±17.1 c	4
0.012670	98	46.4±9.5 d	12
0.126700	98	34.4±4.2 d	34
1.267000	98	4.0±1.2 e	84

a: Number of insects tested; b: 5 dates of after weight increase





**Fig. 6.** SDS-PAGE of crystal inclusion proteins produced by *B. thuringiensis* isolates. Lane 1: molecular marker; Lane 2: *B. thuringiensis aizawai*; Lane 3: *B. thuringiensis kurstaki*; Lane 4: *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* CAB133; Lane 5: *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* CAB162.



**Fig. 7.** SDS-PAGE analysis of undigested and *S. litura* gut extract digest of solubilized crystal proteins of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* CAB133 and CAB162. Lane 1: molecular marker; Lane 2: undigested CAB133; Lane 3: digested CAB133; Lane 4: undigested CAB162; Lane 5: digested CAB162.

subsp. *kurstaki* CAB162 균주는 약 79, 70, 61 kDa 크기의 주요한 3개의 단백질 밴드가 생성되었다. 담배거세미나방 중장액으로 처리한 두 균주로부터 약 70 kDa과 61 kDa의 동일한 두종류의 밴드가 존재하는 것으로 나타났다(Fig. 7). 따라서 혈청학적으로 동일한 균주일지라도 각각의 균주가 생산하는 결정성독소단백질의 유전자가

다르기 때문에 해충의 기주범위 및 살충성에는 차이가 나타난다. 따라서 본 연구를 통해서 국내 농작물 경작지에서 분리, 동정되어 특성이 조사된 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* CAB133 균주는 실용화에 필요한 연구를 수행하여야 할 것이다.

## 사 사

본 논문은 2008년 농촌진흥청 특화작목연구개발과제의 지원에 의해 수행한 결과입니다.

## Literature Cited

- Apaydin, O., A.F. Yenidunya, S. Harsa and H. Gunes. 2005. Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from different grain habitats in Turkey. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21: 285-292.
- Arson, A.I. 1993 The two faces of *Bacillus thuringiensis*; insecticidal proteins and post-exponential survival. *Mol. Microbiol.* 7: 489-496.
- Bae, S.D., Park K.B. and Oh Y.J. 1997. Effect of temperature and food source on the egg and larval development of tobacco cutworm, *Spodoptera litura* Fabricius. *Korean F. Appl. Entomol.* 36(1): 48-54.
- Bae, S.D., Choi B.R. Song Y.H. and Kim H.F. 2003. Insecticide susceptibility in the different larva of tobacco cutworm, *Spodoptera litura* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae) collected in the soybean fields of Milyang, Korea. *Kor. J. Appl. Entomol.* 42: 225-231.
- Chilcott C.N. and P.J. Wigley. 1993. Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from soil and insect habitats in New Zealand. *F. Invertbr. Pathol.* 61: 244-247.
- Choi, J.R., W.R. Song, S.Y. Hwang, H.S. Kim and J.O. Lee. 1996. Age-related susceptibility of *Spodoptera litura* larvae to some insecticides. *Korean J. Appl. Entomol.* 35: 249-253.
- Dulmage, H.T. and K. Aizawa. 1982. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in nature. In E. Kurstak (ed) *Microbial and viral pesticides*. Marcel Dekker, Inc., New York, pp 209-237.
- Finney, D.J. 1971. *Probit analysis, estimation of the median effective dose*. Cambridge University Press. London. 19-47.
- Garad, G.P., P.R. Shivpuje and G.G. Bilapate. 1984. Life fecundity tables of *Spodoptera litura* Fabricius on different hosts. *Proc. Indian Acad. Sci. (Anim Sci.)*. 93: 29-33.
- Gill, S.S., E.A. Cowles and P.V. Pietrantonio. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu. Rev. Entomol.* 37: 615-636.
- Horikiri, M. 1964. Bionomics and control of tobacco cutworm, *Spodoptera litura* Fabricius. *Plant Quarantine* 18: 269-274.
- Kim, C.H. and H.Y. Shin. 1987. Studies on bionomics and control tobacco cutworm, *Spodoptera litura* Fabricius in southern part of Korea. *F. Inst. Agr. Res. Util. Gyeongsang National. Univ.*

- 21: 105-122.
- Kim, D.A., J.S. Kim, M.R. Kil, Y.N. Youn, D.S. Park and Y.M. Yu. 2006. Isolation and activity of insect pathogenic *Bacillus thuringiensis* strain from soil. *Kor. J. Appl. Entomol.* 45(3): 357-362.
- Kim, H.S., D.W. Lee, H.W. Park, Y.M. Yu, J.I. Kim and S.K. Kang. 1995c. Distribution and characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from soils of sericultural farms in Korea. *Korean J. Seric. Sci.*, 37(1): 57-61.
- Kim, H.S., H.W. Park, D.W. Lee, Y.M. Yu and S.K. Kang. 1995a. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated in granary dust. *Kor. J. Appl. Entomol.*, 34(3): 243-248.
- Kim, H.S., H.W. Park, D.W. Lee, Y.M. Yu, J.I. Kim and S.K. Kang. 1995b. Distribution and characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from soil in Korea. *Kor. J. Appl. Entomol.*, 34(4): 344-349.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lecadet, M.M. and D. Martouret. 1967. The enzymatic hydrolysis of *Bacillus thuringiensis* berliner crystals, and the liberation of toxic fractions of bacterial origin by the cycle of *Pieris brassicae* (Linnaeus). *J. Invertebr. Pathol.* 7: 105-108.
- Maeda, M., C. Mizuki, Y. Nakamura, T. Hatano, and M. Ohba. 2000. Recovery of *Bacillus thuringiensis* from marine sediments of Japan. *Current Microbiol.* 40: 413-422.
- Martin P.A.W. and R.S. Travers. 1989. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 2437-2442.
- Minamikawa, H. 1937. Survey on the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* Fabricius Taiwan Central Res. Ins. Agr. Report 70: 1-66.
- Mochida, O. and T. Okada. 1974. A bibliography of *Spodoptera* spp. (Lepidoptera: Noctuidae). *Misc. Bull. Kyushu Nat. Agr. Expt. Sta.* 49: 1-110.
- Ohba M. and K. Aizawa. 1978. Physiology of spore forming bacteria associated with insects minimal nutritional requirements for growth sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 28: 124-128.
- Raymond, M. 1985. Presentation d'un programme d'analyse log-probit pour micro-ordinateur. *Cah. ORSTOM, Ser. Ent. Med. et Parasitol.* 22: 117-121.
- Schnepf, H.E. 1995. *Bacillus thuringiensis* toxins; regulation, activities and structural diversity. *Curr. Opin. Biotech.* 6: 305-312.
- Smith R.A. and G.A. Couche. 1991. The phylloplane as a source of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 311-315.
- Tabashnik, B.E., N.L. Cushing, N. Finson, M.W. Johnson. 1990. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.* 83: 1671-1676.
- Tanada, Y. and H.K. Kaya. 1993. *Insect pathology*, Academic Press, Sandiego, pp. 90-91.
- Yamamoto, T. and R.E. McLaughlin. 1981. Isolation of a protein from the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* toxic to the mosquito larva, *Aedes taeniorhynchus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 103: 414-421.
- Zhong, C., D.J. Ellar, A. Bishop, C. Johnson, S. Lin and E.R. Hart. 2000. Characterization of a *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin which is toxic to insects in three orders. *J. Invertebr. Pathol.* 76: 131-139.
- Zouari, N. and J. Samir, 1997. Purification and immunological characterization of particular delta-endotoxins from three strains of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnol. Lett.* 19(8): 825-829.

(Received for publication June 10 2008;  
revised June 18 2008; accepted June 23 2008)