

무당벌레 소화기관으로부터 장내세균의 분리 및 계통학적 다양성

김기광¹ · 한송이¹ · 문청원² · 유용만² · 황경숙^{1,3*}

¹목원대학교 미생물나노소재학과, ²충남대학교 응용생물학과, ³목원대학교 미생물생태자원연구소

Biodiversity and Isolation of Gut Microbes from Digestive Organs of *Harmonia axyridis*

Ki-Kwang Kim¹, Song-Ih Han¹, Chung-Won Moon², Yong-Man Yu²,
and Kyung-Sook Whang^{1,3*}

¹Department of Microbial & Nanomaterials, Mokwon University, Daejeon 302-729, Republic of Korea

²Department of Applied Biology, Chungnam University, Daejeon 305-764, Republic of Korea

³Institute of Microbial Ecology & Resources, Mokwon University, Daejeon 302-729, Republic of Korea

(Received January 26, 2011 / Accepted March 23, 2011)

Bacterial density distributions of gut microbes in the digestive organs of *Harmonia axyridis* collected from three different sources (JK, CK, and CJ) were 6.0×10^4 CFU/gut under aerobic culture condition and 8.0×10^6 CFU/gut under anaerobic culture condition. Seven colony types were observed under aerobic condition and three types of similarity were detected under anaerobic condition. In total, 116 strains, including 34 strains under aerobic condition, were isolated from the digestive organs of *H. axyridis*. Based on the analysis of the 16S rRNA gene sequence, aerobic gut microbes were assigned to the *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, and *Deinococcus-Thermus*. A large number of isolates belonged to the genus *Bacillus* and *Staphylococcus* of the *Firmicutes* commonly found in *H. axyridis* from different sites. Anaerobic gut microbes were found to be similar according to colony morphological, phylogenetic analysis using ARDRA. Eighty-two anaerobic gut microbes were clustered into 17 different ARDRA types according to *HaeIII*. Representative anaerobic gut microbes in each ARDRA group were divided into five species of γ -*Proteobacteria* based on 16S rRNA gene sequence analysis; *Hafnia alvei*, *Enterobacter ludwigii*, *Enterobacter kobei*, *Pseudomonas oryzihabitans* and *Pseudomonas koreensis*. Phylogenetic analysis indicated that about 70% of the isolates belonged to γ -*Proteobacteria*, suggesting predominance of gut microbes.

Keywords: *Harmonia axyridis*, digestive organ, gut microbes

전 세계에 존재하는 곤충의 종류는 약 120만여 종이 알려져 있으며, 우리나라에는 12,000여 종이 서식하는 것으로 보고되고 있다. 이들 곤충은 먹이섭취 습성에 따라 식물성 섭취(식식성, 균식성, 미식성) 곤충과 동물성 섭취(포식성, 기생성, 육식성, 시식성) 곤충으로 크게 2부류로 나뉜다(19). 동물성 섭취 곤충 중 포식성 곤충은 살아있는 해충을 잡아먹는 “천적 곤충”으로 무당벌레, 풀잠자리, 노린재, 등애류 등이 대표적으로 꼽히고 있다(20).

우리나라는 1980년대 이후 농작물 해충 방제에 적극적으로 대처하면서 식량 증산에 큰 발전을 이루었지만, 농약 사용 증

가에 따른 인축독성, 환경오염, 잔류독성, 해충의 약제저항성 발달 등 부작용으로 폐해가 심각해지면서 친환경 농업의 필요성이 대두되기 시작했다. 해충방제 효과가 우수한 생물농약과 천적 곤충을 이용한 친환경 생명소재 산업에 관한 연구가 활발하게 진행되면서 시설작물에 심한 피해를 주고 있는 점박이 응애, 온실가루이, 진딧물, 총채벌레 등과 같은 해충의 천적곤충의 탐색과 대량 증식에 관한 기술 개발 등 친환경 생물방제 산업이 활발히 추진되고 있다. 생물적 방제에 이용되고 있는 천적 곤충으로는 무당벌레, 풀잠자리, 노린재 등 약 140여 종이 알려져 있다(9, 12).

특히 무당벌레(*Harmonia axyridis*)는 딱정벌레목(Coleoptera) 무당벌레과(Coccinellidae)에 속하는 곤충으로 국내에서는 우

* For correspondence. E-mail: kswhang@mokwon.ac.kr; Tel: +82-42-829-7593, 7597; Fax: +82-42-829-7599

리들 생활주변에서 가장 흔히 볼 수 있는 천적곤충 중의 하나이다. 무당벌레가 속해있는 무당벌레과에는 전 세계적으로 약 490속 4,200여 종이 기록되어 있으며(11), 특히 무당벌레는 진딧물을 포식하는 중요한 천적 중 하나로 우리 나라에 13속 74종이 보고되었으며, 북미대륙에는 400여 종, 유럽에는 110종이 분포하고 있는 것으로 보고되고 있다(9, 11). 무당벌레는 진딧물을 포식하는 주요 천적일 뿐만 아니라 각지벌레, 온실가루이 등을 포함한 여러 해충들을 포식하므로 해충의 생물적 방제에 활용 가능성이 매우 높은 곤충 종으로 오래 전부터 각광받고 있다(6, 13, 15, 22, 27).

최근 천적 곤충 탐색과 더불어 곤충 장내에 공생하는 미생물을 중요한 생물자원으로 인식하고 이를 생명산업의 유용한 바이오소재로 활용하고자 하는 움직임이 매우 활발해지고 있으며(28), 국내외에서 곤충 장내미생물이 생산하는 다양한 종류의 유용 효소 및 유용 유전자원을 이용한 미생물농약 후보물질, 미생물유래 항생물질, 곤충 유인성 페로몬 개발 등에 많은 연구를 진행해 왔다(1, 2, 10, 16, 24, 25, 32, 33).

곤충장내미생물은 숙주 곤충의 식이습관을 유지시켜 공통 진화(co-evolution)하는 특성 때문에 곤충의 성장에 매우 중요한 역할을 수행하고 있다. 기존 곤충에 공생하는 미생물에 관한 연구는 딱정벌레, 무당거미, 흰개미 등 매우 다양한 곤충에서 발견되고 있으며, 곤충의 장내 미생물로 *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Pseudomonas* 그리고 *Serratia* 등이 보고되었다(3, 4, 8, 18, 22, 33). 또한, 국내산 무당거미(*Nephila clavata*) 장내미생물 *Serratia proteamaculans* HY-3 균주로부터 고효율 단백질분해효소(Arazyme)를 분리하고 산업화한바 있다(1, 2, 14, 16, 26). 반면, 무당벌레의 경우, 포식성 먹이성장과 생식활동 특성에 따라 독특한 바이오매스를 이용하는 다양한 미생물 유전 자원이 분포할 것으로 판단되나, 이에 대한 연구가 아직 미흡한 실정이다. 본 연구에서는 대표적인 포식성 천적 곤충 무당벌레를 채집하여 이들 소화기관 내에 서식하는 우점 장내세균을 순수분리하고 계통학적 특성을 밝혀 미생물 유전자원 다양성 확보를 위한 기초 자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

무당벌레 채집 및 소화기관 채취

전북 김제(JK)와 충남 금산(CK) 지역에서 채집한 무당벌레(*H. axyridis*) 성충과 충남대학교 응용생물학과 곤충생리실험실(CJ)에서 누대 사육중인 무당벌레 4령의 유충을 분양 받아 본 실험에 사용하였다. 수집된 무당벌레는 온도 25°C±5°C, 광조건 16L:8D, 상대습도 50-60% 조건에서 누대 사육하였으며, 성충과 유충을 -20°C에 5분간 절식 시킨 후 70% 에탄올에 2분간 표면소독을 한 후 현미경(×40) 하에서 곤충을 해부하고 전장(foregut), 중장(midgut), 후장(hindgut)으로 연결된 소화기관을 무균적으로 분리하였다. 분리된 무당벌레 소화기관은 10% saline EDTA 용액 1 ml에 넣고 4°C에 보관하였다.

장내세균의 순수분리

채집된 3마리의 무당벌레 소화기관시료를 각각 믹서(VWR disposable pellet mixers and cordless motor V7338)를 이용하여 2분간 파쇄시킨 후 균질액을 멸균수 9 ml에 10¹-10⁶으로 순차적으로 희석하였다. 희석된 무당벌레 소화기관 시료는 NA 배지(Nutrient agar, Difco, USA)에 접종하였다. 호기배양의 경우, 28°C에서 7일간 배양하고 혐기 배양의 경우, CO₂ gas pack (GasPak EZ Anaerobe Container System, BD, USA)을 넣어 산소를 차단한 후에 28°C에서 30일간 배양 한 후 평판배지에 형성된 집락을 순수분리 하였다.

장내세균의 계통해석

16S rRNA의 PCR 증폭을 위해 *Escherichia coli* 16S rRNA 부분의 conserved sequence를 기초로 한 27F (5'-AGA GTTTGATCCTGGCTCAG-3') 프라이머와 1492R (5'-AAG GAGGTGATCCAGCCGC-3') 프라이머를 이용하였다. 추출된 DNA 1 µl (50 ng/µl)에 27 forward 프라이머, 1 µl; 1492 reverse 프라이머, 1 µl; EF-Taq polymerase (Solgent Co., Korea), 0.25 µl; dNTP, 1 µl; 10× buffer, 5 µl; band doctor, 5 µl; H₂O, 35.75 µl를 0.2 ml PCR 반응 tube에 넣고 잘 혼합한 후, 95°C에서 5분간 반응한 다음 94°C, denaturation 30초, 55°C, annealing 40초, 72°C, extension 1분을 30회 반복하고, 72°C에서 5분간 final extension의 조건으로 PCR (Gene AMP PCR System 9700, Applied Biosystems, USA) 반응을 실시하였다. PCR 증폭산물은 0.8% 아가로스 젤, 0.5× TBE buffer (0.045 M Tris-borate, 0.001 M EDTA)에서 100 V, 25 mA로 30분 전기영동한 다음, 10 mg/ml EtBr (ethidium bromide)로 15분간 염색하여 UV하에서 증폭여부를 확인하고, QIAquick® PCR Purification kit (QIAGEN Inc., Germany)를 이용하여 정제하였다. 정제된 16S rRNA 유전자 PCR 증폭 산물은 27F 프라이머를 사용하여 ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems, USA)로 cycle sequencing을 수행한 후, ABI PRISM 3700 Genetic Analyser (Applied Biosystems)로 500 bp 이상의 염기서열을 결정하였다(21). 결정된 16S rRNA 유전자 염기서열은 GenBank에 등록하여 등록번호(GenBank accession nos. HQ876709- HQ876759)를 부여받았다. 각 균주의 염기서열은 RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/>)에서 계통군을 확인하고 NCBI/RDP/ DDBJ GenBank database의 BLAST program을 이용하여 16S rRNA 유전자 염기서열 상동성을 분석하였다. 계통수 작성은 CLUSTAL X program으로 multiple sequence alignment한 후, MEGA 4.0을 사용하였으며(29), NIPALS algorithm을 기초로 한 PhyloMode 프로그램의 PCA (principal component analysis)를 이용하여 계통분류학적 유연관계를 분석하였다(23).

Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA)

무당벌레(*H. axyridis*) 소화기관으로부터 분리한 혐기성세균 DNA의 16S rRNA 유전자를 증폭하여 제한효소 *Hae*III를

처리하여 나타난 band 절단 양상을 분석하였다. PCR 산물 15 µg, 10× Buffer 2 µl, Enzyme (500 unit) 1.5 µl, DW 1.5 µl 를 반응 tube에 넣은 후 37°C에서 12시간 반응시켰다. 제한효소를 처리한 산물은 3% 아가로스 젤(1× TAE buffer; 40 mM trisacetate, 1 mM EDTA)을 사용하여 100 V, 300 mA로 1시간 30분 동안 전기영동한 후 EtBr로 20분간 염색하여 Gel documentation system (Bio-Rad, USA)의 UV 하에서 제한효소의 절단 양상을 확인하였다. 확인된 band의 pattern은 GelQuest program (version 2.3.3; Klein Raden, Germany)을 이용하여 제한효소에 의해 절단된 단편(restriction fragment; RF) 양상을 비교 분석하고 UPGMA 형태의 dendrogram을 작성하였다 (31).

결과 및 고찰

무당벌레 장내세균의 집락 특성 및 순수분리

각 지역에서 수집한 무당벌레(JK, CK, CJ)로부터 채취한 소화기관 시료를 희석평판법에 의거하여 NA 평판배지에 접종한 후 호기배양과 혐기배양을 통하여 장내세균의 밀도를 조사한 결과, 호기배양의 경우 6.0×10^4 CFU/gut을 나타내었으며, 혐기배양 결과 8.0×10^6 CFU/gut로 계수되었다. 호기적 조건에서 배양한 후 평판배지상에 형성된 집락의 형태(외형, 용기, 가장자리형태, 색깔)를 해부현미경을 사용하여 관찰한 결과 총 7가지 집락 형태로 분류되었다. Type I (circular, convex, entire, yellow), type II (circular, pulvinate, entire, yellow), type III (filamentous, flat, filamentous, white), type IV (circular, convex, entire, white), type V (circular, pulvinate, entire, pink), type VI (circular, irregular, umbonate, brown) 그리고 type VII (circular, pulvinate, entire, yellow). 또한 혐기적 조건에서 배양된 평판배지상에 형성된 세균 집락은 총 3종류: type VIII (circular, convex, entire, white), type IX (circular, pulvinate, entire, white), type X (circular, convex, entire, yellow)가 관찰되어 형태적으로 매우 유사한 특징을

나타내었다(Table 1). 본 연구에서는 호기배양을 통하여 34균주와 혐기배양을 통하여 82균주, 총 116균주의 무당벌레 장내세균을 순수분리하였다.

무당벌레 소화기관에서 분리된 호기성 세균의 계통학적 특성

무당벌레 소화기관으로부터 분리된 호기성 세균 34균주를 대상으로 16S rRNA 유전자 염기서열을 해석하고 PCA를 통하여 계통학적 특성을 확인한 결과, *α-Proteobacteria* (3균주), *γ-Proteobacteria* (2균주), *Firmicutes* (24균주), *Actinobacteria* (4균주) 그리고 *Deinococcus-Thermus* (1균주) 계통군으로 분류되었다. 무당벌레 소화기관 내 주요 계통군으로 밝혀진 *Firmicutes* 계통군 내에는 10균주가 *Bacillus thuringiensis* ATCC 10792^T와 99%-100% 상동성을 나타내었고, 13균주가 *Staphylococcus* 속에 속하는 균주로 *S. epidermidis* ATCC 14990^T, *S. xylosus* ATCC 29971^T, *S. sciuri* subsp. *sciuri* DSM 20345^T, *S. chonii* subsp. *choonii* ATCC 29974^T, *S. warneri* ATCC 27836^T 그리고 *S. hominis* subsp. *hominis* DSM 20328^T와 99%-100%의 상동성을 나타내어 무당벌레 소화기관내 우점 세균임이 밝혀졌다. 이들 *B. thuringiensis*와 *Staphylococcus* 속의 다양한 종은 JK, CK 및 CI 무당벌레 소화기관에서 모두 공통적으로 분리되었다(Fig. 1). 이상의 결과로부터 진딧물을 포식하는 무당벌레 소화기관 내에는 *Bacillus* 속과 *Staphylococcus* 속의 다양한 계통군이 공통적으로 서식하고 있는 것으로 관찰되었다.

Kwok과 Chow (17)는 *Staphylococcus* 속 주요 39종의 16S rRNA 유전자와 *hsp60* 유전자 염기서열을 기초로 2개의 그룹으로 대분류하고, group 1에 속하는 균주는 5개로 세분류하여 계통학적 특성을 밝힌바 있다. 현재 LPSN (list of prokaryotic names with standing in nomenclature, <http://www.bacterio.cict.fr/>)에 *Staphylococcus* 속의 표준균주로 43 종, 21 아종이 보고되고 있다. 본 연구에서는 *Staphylococcus* 속의 표준균주 56균주의 16S rRNA 유전자와 *Staphylococcus* 속에 속하는 분리균주 13균주의 16S rRNA 유전자를 기초로 계통수를 작

Table 1. Colony morphology of aerobic and anaerobic gut microbes isolated from digestive organs of *H. axyridis*

Colony type	Bio type	Colony morphology				No. of isolates
		Form	Elevation	Margin	Color	
I	aerobic	Cir	Con	En	Y	9
II	aerobic	Cir	Pu	En	Y	1
III	aerobic	Fil	Fl	Fil	W	9
IV	aerobic	Cir	Con	En	W	10
V	aerobic	Cir	Pu	En	P	2
VI	aerobic	Cir	Ir	Um	Br	1
VII	aerobic	Cir	Pu	En	Y	2
VIII	anaerobic	Cir	Con	En	W	40
IX	anaerobic	Cir	Pu	En	W	37
X	anaerobic	Cir	Con	En	Y	4
Total			116			

Cir, Circular; Con, Convex; En, Entire; Fil, Filamentous; Fl, Flat; Ir, Irregular; Pu, Pulvinate; Um, Umbonate; Br, Brown; P, Pink; W, White; Y, Yellow

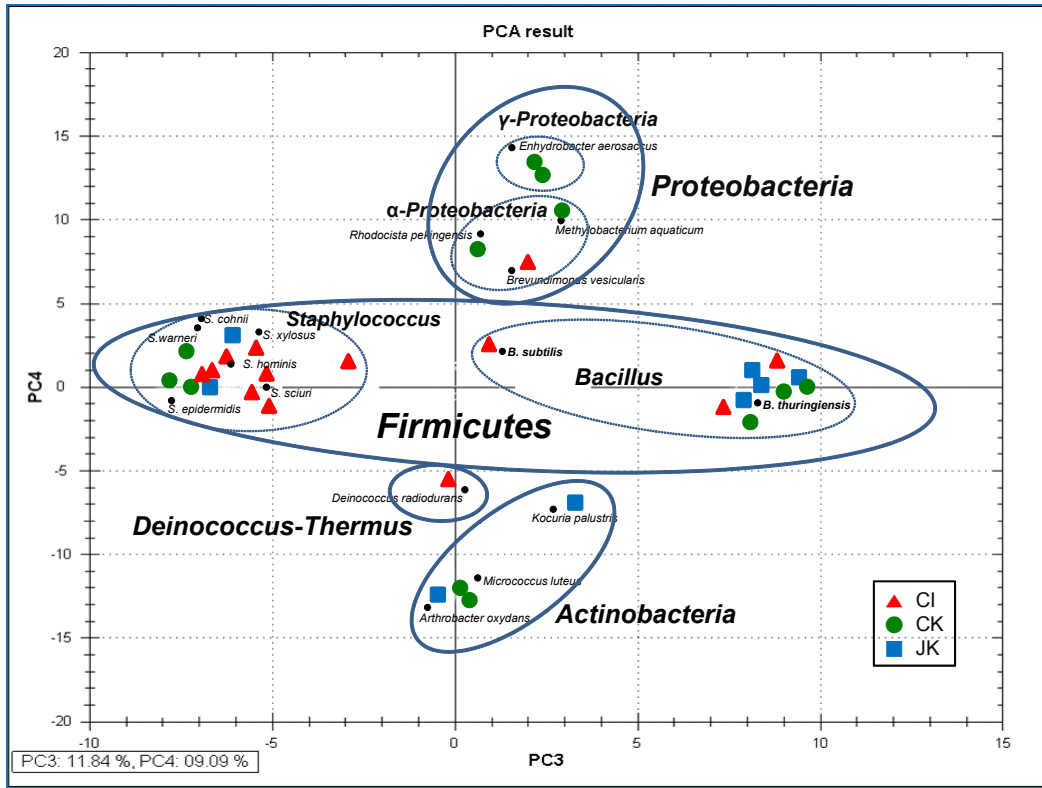


Fig. 1. PCA of 16S rRNA sequences of gut microbes isolated from digestive organs of *Harmonia axyridis*. CI, sample collected from Lab. of insect physiology, Chungnam Univ.; CK, sample collected from Gimje, Jeonbuk; JK, sample collected from Geumsan, Chungnam.

성하고 Kwok과 Chow (17)가 제안한 16S rRNA 유전자 계통군과 비교한 결과, 모든 균주는 2개의 그룹으로 대분류 되었으며 분리균주 *Staphylococcus* 속 13균주는 group I에 9균주, group II에 4균주 속하는 것으로 확인되었다. Group I에 속하는 균주는 *S. xylosum*와 *S. cohnii* subsp. *cohnii*를 포함하는 group I-a과 *S. saprophyticus* subsp. *bovis*를 포함하는 group I-b, *S. hominis* subsp. *hominis*, *S. hominis* subsp. *novobiosepticus*, *S. epidermidis*와 *S. warneri*를 포함하는 group I-c로 세분화되었다. 이상의 결과로부터 무당벌레 소화기관내에는 *Staphylococcus* 속의 다양한 종이 분포하고 있음이 확인되었다(Fig. 2).

Staphylococcus 속에 속하는 균주 중 *S. aureus*와 그 외 CNS (coagulase negative staphylococci)는 세균성 식중독 및 질병 유발 미생물로 보고되고 있다(5, 7, 30). 이들 균주들은 *Staphylococcus* 계통군 내 group I-b, group I-c, group I-d, group I-e 그리고 group II에 다양하게 분포하였으며, 본 연구에서 분리된 *Staphylococcus* 속 13균주 중 9균주가 같은 계통군에 속하는 것으로 나타났으며, 16S rRNA 유전자 상동성 98.7%-100%의 높은 상동성을 나타내었다. 추후, 이들 균주들에 대한 병원성 여부를 밝히는 연구가 매우 중요할 것으로 판단되었다.

무당벌레 소화기관에서 분리된 혐기성 세균의 계통학적 특성

무당벌레 소화기관에서 분리된 혐기세균의 콜로니 형태가 매우 유사한 특징을 나타내어 16S rRNA 유전자 염기서열 해석을 위한 대표균주를 선발하기 위하여 ARDRA (amplified ribosomal DNA restriction analysis) 패턴양상을 비교하였다. 무당벌레로부터 분리된 혐기세균 86균주 중 16S rRNA 유전자가 성공적으로 증폭된 68균주를 대상으로 제한효소(*Hae*III)를 처리한 후 각 16S rRNA의 절편양상을 GelQuest 프로그램을 이용하여 혐기성 세균간의 계통분류학적 유사도를 비교하였다. 이들 균주의 유사도 70%에서 grouping한 결과, 17개의 서로 다른 ARDRA 패턴 양상으로 분류되었다. 각 ARDRA group에 속하는 OTUs를 Table 2에 나타내었다. ARDRA 패턴 분석을 통하여 선발된 17개의 대표 혐기성세균의 16S rRNA 유전자 염기서열을 해석한 결과, 모두 γ -Proteobacteria 계통군에 속하였으며 *Enterobacteriaceae*와 *Pseudomonadacea* 두 개의 family가 존재하는 것으로 확인되었다. *Enterobacteriaceae*에 속하는 균주는 6개의 ARDRA group (group 1, group 2, group 8, group 14, group 16, group 17)의 31균주가 *Hafnia alvei* ATCC 13337^T와 99.5%-100%의 높은 상동성을 나타내었으며, 8개 ARDRA group (group 3, group 4, group 6, group 9, group 10, group 11, group 13, group 15)의 29균주가 *Enterobacter ludwigii* DSMZ 16688^T와 99.8%-

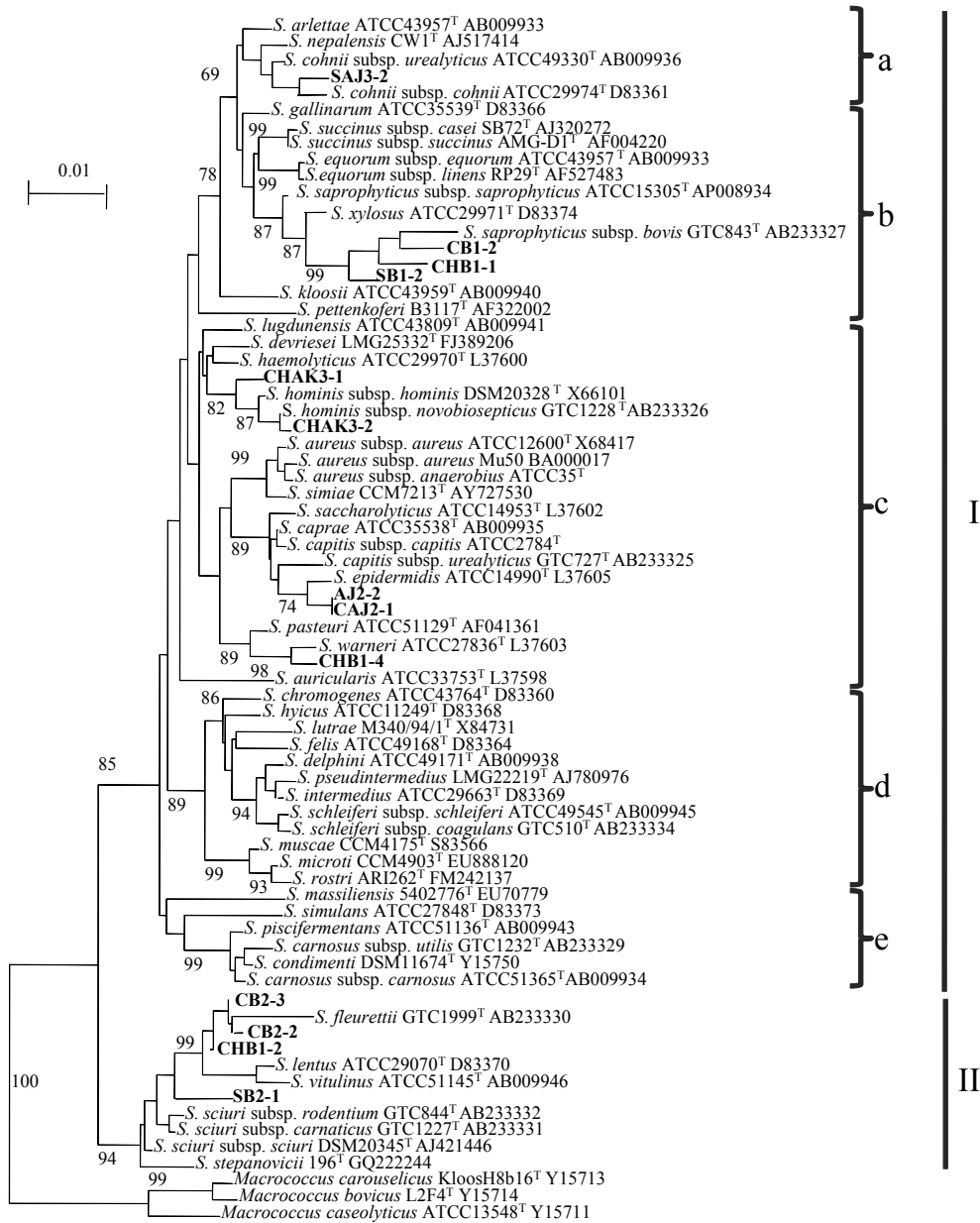


Fig. 2. Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequences of 13 gut microbes isolated from digestive organs of *Harmonia axyridis* and 56 validly described *Staphylococcus* species or subspecies.

100%의 높은 상동성을 나타내었다. Group 12에 속하는 4군주는 *Enterobacter kobei*와 99.3%의 상동성을 갖는 것으로 확인되었다. *H. alvei* ATCC 13337^T와 *E. ludwigii* DSMZ 16688^T의 경우, 서로 다른 ARDRA group들로 분류되는 것으로 확인되었다. 이와 같은 DNA fingerprinting 기법의 한계점을 극복하기 위해서는 다양한 제한효소와 DNA 다형성을 분석할 수 있는 적절한 software의 활용되어야 할 것으로 판단되었다.

*Pseudomonadacea*에 속하는 균주의 경우, Group 5의 2군주는 *P. oryzihabitans* IAM 1568^T와 99.1%, group 7의 2군주

는 *P. koreensis* Ps 9-14^T와 100%의 상동성을 나타내었다. 이상의 결과로부터 무당벌레 소화기관에서 분리된 모든 혐기성 장내세균은 γ -*Proteobacteria* 계통군에 속하였으며 *Enterobacter* 속에 속하는 균주와 *Hafnia* 속에 속하는 균주가 우점 세균군으로 확인되었다(Table 2).

무당벌레 소화기관에서 분리된 장내세균의 계통학적 다양성

무당벌레 소화기관으로부터 분리된 호기성 세균 34군주와 혐기성 세균 68군주 총 102군주의 계통학적 특성을 검토한 결과, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* 그리고

Table 2. 16S rRNA gene sequencing of representative anaerobic gut microbes of each ARDRA group

Isolates	Accession no.	Taxonomic affiliation		Closest microorganisms (Accession no.)	Similarity (%)	ARDRA group	OTUs
		Class	Family				
SB5	HQ876743	γ -Proteobacteria	Enterobacteriaceae	<i>Hafnia alvei</i> ATCC 13337 ^T (M59155)	99.51	1	6
SB12	HQ876744	γ -Proteobacteria	Enterobacteriaceae	<i>Hafnia alvei</i> ATCC 13337 ^T (M59156)	100	2	3
SB9	HQ876750	γ -Proteobacteria	Enterobacteriaceae	<i>Hafnia alvei</i> ATCC 13337 ^T (M59157)	100	8	3
SC6	HQ876756	γ -Proteobacteria	Enterobacteriaceae	<i>Hafnia alvei</i> ATCC 13337 ^T (M59158)	100	14	3
PB8	HQ876758	γ -Proteobacteria	Enterobacteriaceae	<i>Hafnia alvei</i> ATCC 13337 ^T (M59159)	100	16	7
SB8	HQ876759	γ -Proteobacteria	Enterobacteriaceae	<i>Hafnia alvei</i> ATCC 13337 ^T (M59160)	100	17	9
SAJ10	HQ876745	γ -Proteobacteria	Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter ludwigii</i> DSMZ 16688 ^T (AJ853891)	100	3	3
SC11	HQ876746	γ -Proteobacteria	Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter ludwigii</i> DSMZ 16688 ^T (AJ853892)	100	4	2
SAJ16	HQ876748	γ -Proteobacteria	Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter ludwigii</i> DSMZ 16688 ^T (AJ853893)	100	6	8
SAJ13	HQ876751	γ -Proteobacteria	Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter ludwigii</i> DSMZ 16688 ^T (AJ853894)	100	9	1
PAJ6	HQ876752	γ -Proteobacteria	Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter ludwigii</i> DSMZ 16688 ^T (AJ853895)	100	10	3
SAJ7	HQ876753	γ -Proteobacteria	Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter ludwigii</i> DSMZ 16688 ^T (AJ853896)	100	11	1
SAJ9	HQ876755	γ -Proteobacteria	Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter ludwigii</i> DSMZ 16688 ^T (AJ853897)	99.8	13	8
SC5	HQ876757	γ -Proteobacteria	Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter ludwigii</i> DSMZ 16688 ^T (AJ853898)	100	15	3
PB20	HQ876754	γ -Proteobacteria	Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter kobei</i> CIP 105566 ^T (AJ508301)	99.29	12	4
SAJ4	HQ876747	γ -Proteobacteria	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i> IAM 1568 ^T (D84004)	99.12	5	2
PB17	HQ876749	γ -Proteobacteria	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas koreensis</i> Ps 9-14 ^T (AF468452)	100	7	2

*Deinococcus-Thermus*의 4개의 계통군으로 분류되었다. 이들 장내세균의 계통수를 작성한 결과, *Rhodocista* 속과 *Methylobacterium* 속을 포함하는 α -Proteobacteria 계통군, *Enterobacteria* 속, *Pseudomonas* 속 그리고 *Hafnia* 속을 포함하는 γ -Proteobacteria 계통군, *Staphylococcus* 속과 *Bacillus* 속을 포함하는 Firmicutes 계통군, *Micrococcus* 속과 *Kocuria* 속을 포함하는 Actinobacteria 계통군 그리고 *Deinococcus-Thermus* 계통군이 확인되었다(Fig. 4). 특히, 무당벌레 소화기관으로부터 분리된 전체 장내세균의 약 70%가 γ -Proteobacteria에 속하였으며, 23%가 Firmicutes 계통군으로 무당벌레 소화기관 내 주요 계통군임이 확인되었다. γ -Proteobacteria 계통군에 속하는 세균군은 *E. ludwigii*, *E. kobei* 를 포함하는 Cluster I, *H. alvei*를 포함하는 Cluster II, *P. oryzihabitans*와 *P. koreensis* 를 포함하는 Cluster III 그리고 *Enhydrobacter aerosaccus*를 포함하는 Cluster IV로 4개의 cluster로 세분화되었다.

본 연구를 통하여 확보된 무당벌레 장내세균 중 α -Proteobacteria 계통군, Firmicutes 계통군 및 Actinobacteria 계통군에 속하는 장내세균은 모두 호기 배양을 통해 순수분리 되었다. 한편, γ -Proteobacteria 계통군에 속하는 균주 중 *Enhydrobacter aerosaccus* 2균주만 호기 배양을 통해 분리되었으며, Cluster I, Cluster II, 그리고 Cluster IV에 속하는 모든 균주가 혐기배양을 통해 분리되었다. 따라서 곤충 소화기관으로부터 다양한 미생물 유전자원을 성공적으로 분리하기 위해서는 호기적 배양 및 혐기배양을 통해 성공적으로 확보할 수 있음으로 판단되었다.

본 연구에서 분리된 다양한 무당벌레 장내 미생물은 미생물 유전자원 다양성 확보차원에서 큰 의미가 있으며, 바이오매스 처리 및 재활용을 목적으로 하는 white biotechnology 산업분야 등 곤충 장내 서식하는 공생미생물 응용 분야에 중

요한 정보를 제공할 수 있을 것으로 판단된다.

적요

각 지역에서 수집한 무당벌레(JK, CK, CJ)의 소화기관을 채취하여 장내세균의 밀도를 조사한 결과, 호기배양의 경우 6.0×10^4 CFU/gut, 혐기배양 결과 8.0×10^6 CFU/gut로 계수되었다. 호기적 조건에서 배양된 세균 집락은 총 7가지 형태로 분류되었으며, 혐기적 조건에서 배양된 집락은 총 3가지 형태로 유사한 특징을 나타내었다. 무당벌레 각 소화기관으로부터 호기성세균 34균주와 혐기성세균 82균주, 총 116균주의 장내세균을 순수분리하였다. 호기성 세균 34균주를 대상으로 16S rRNA 유전자 염기서열을 해석한 결과, α -Proteobacteria (3균주), γ -Proteobacteria (2 균주), Firmicutes (24 균주), Actinobacteria (4 균주) 그리고 *Deinococcus-Thermus* (1균주) 계통군으로 분류되었다. Firmicutes 계통군의 *Bacillus thuringiensis*와 *Staphylococcus* 속의 다양한 종은 JK, CK 및 CI 무당벌레 소화기관에서 모두 공통적으로 분리되었다. 형태적으로 유사한 혐기세균의 16S rRNA-ARDRA 패턴양상을 분석하여 유사도 70%에서 비교한 결과, 17개 ARDRA group으로 분류되었다. 각 ARDRA group에 속하는 대표 혐기성세균의 16S rRNA 유전자 염기서열을 해석한 결과, 무당벌레 소화기관에서 분리된 모든 혐기성 장내세균은 γ -Proteobacteria 계통군에 속하는 것으로 나타났으며 *Hafnia alvei*, *Enterobacter ludwigii*, *Enterobacter kobei*, *Pseudomonas oryzihabitans* 그리고 *Pseudomonas koreensis*와 높은 유연관계를 갖는 것으로 확인되었다. 무당벌레 소화기관으로부터 분리된 전체 장내세균의 약 70%가 γ -Proteobacteria 계통군에 속하였으며, 23%가 Firmicutes 계통군으로 무당벌레 소화기관 내 주요 계통군

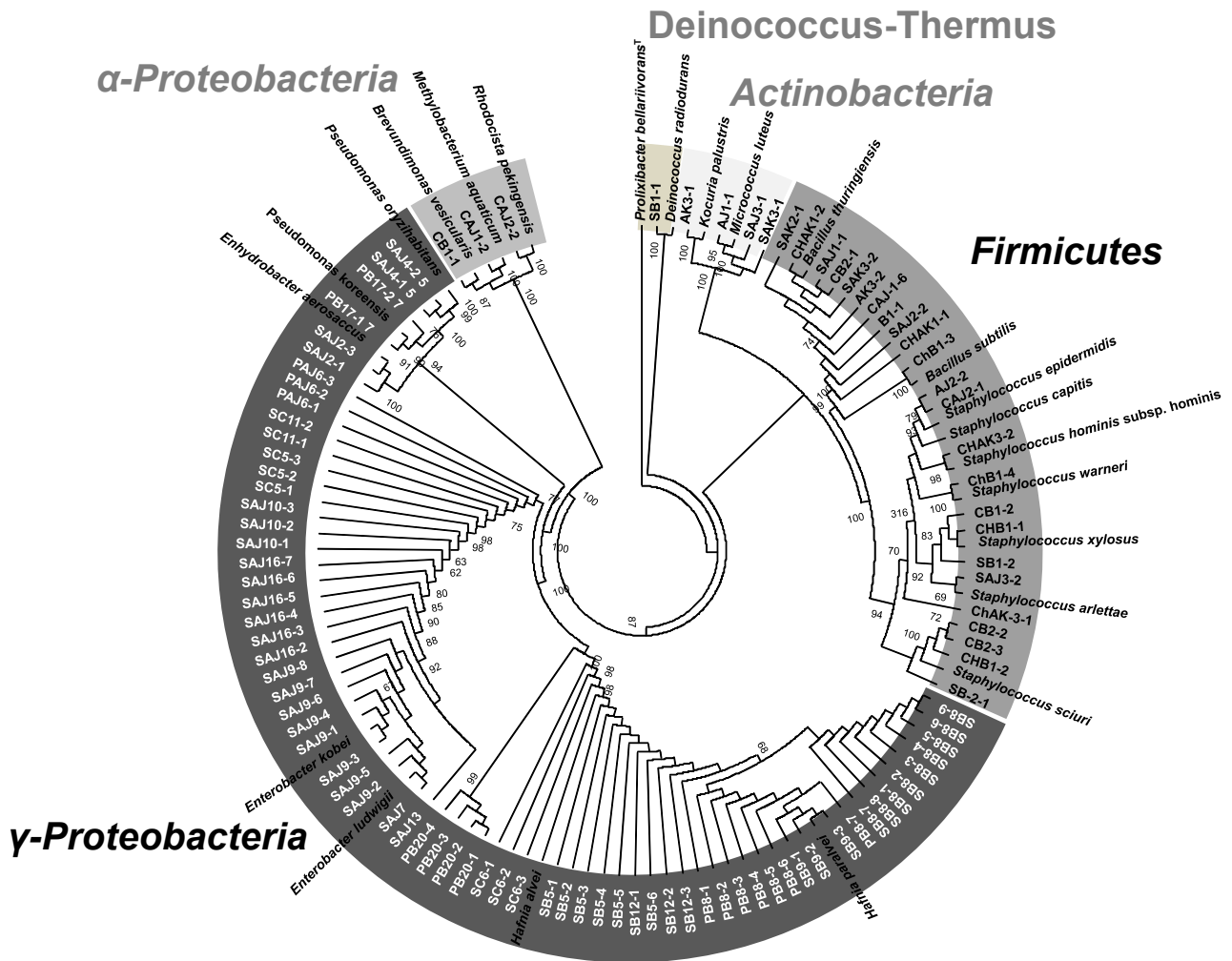


Fig. 3. Phylogenetic tree showing the affiliations of the 16S rRNA gene sequences determined for 102 isolates collected from digestive organs of *H. axyridis*.

임이 확인되었다.

감사의 말

본 연구는 교육과학기술부와 한국산업기술진흥원의 지역혁신인력양성사업(M-02-20080704171810)으로 수행된 연구결과로 이에 감사 드립니다.

참고문헌

- Bae, K.S. and H.Y. Park. 2004. Biochemical characterization of an extracellular protease in *Serratia proteamaculans* isolated from a spider. *Kor. J. Microbiol.* 40, 269-274.
- Bersanetti, P., H.Y. Park, K.S. Bae, K.H. Son, D.H. Shin, I.Y. Hirata, M.A. Juliano, A.K. Carmona, and L. Juliano. 2005. Characterization of arazyme, and exocellular metalloprotease isolated from *Serratia proteamaculans* culture medium. *Enzyme Microb. Technol.* 37, 574-581.
- Breznak, J.A. 1982. Intestinal microbiota of termites and other xylophagous insects. *Annu. Rev. Microbiol.* 36, 323-343.
- Breznak, J.A. and A. Brune. 1994. Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by termites. *Annu. Rev. Entomol.* 39, 453-487.
- Chesneau, O., A. Morvan, S. Aubert, and N. El Solh. 2000. The value of rRNA gene restriction site polymorphism analysis for delineating taxa in the genus *Staphylococcus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 689-697.
- Choi, B.R., S.W. Lee, Y.H. Song, and J.K. Yoo. 2005. Effect of sublethal doses of imidacloprid on the green peach aphid, *Myzus persicae*. *Kor. J. Pestic. Sci.* 9, 374-378.
- Gillespie, B.E., S.I. Headrick, S. Boonyayatra, and S.P. Oliver. 2009. Prevalence and persistence of coagulase-negative *Staphylococcus* species in three dairy research herds. *Vet. Microbiol.* 134, 65-72.
- Grkovic, S., T.R. Glare, T.A. Jackson, and G.E. Corbett. 1995. Genes essential for amber disease in grass grubs are located on the large plasmid found in *Serratia entomophila* and *Serratia proteamaculans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2218-2223.
- Hagen, K.S. 1962. Biology and ecology of predaceous Coccidi-

- nellidae. *Annu. Rev. Entomol.* 7, 289-326.
10. Hines, D.A., P.N. Saurugger, G.M. Ihler, and M.J. Benedik. 1988. Genetic analysis of extracellular proteins of *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 170, 4141-4146.
 11. Hodek, I. and A. Honek. 1996. Ecology of Coccinellidae, pp. 367-371. Kluwer Academic Publishers, Boston, London.
 12. Ipert, G. 1999. Biodiversity of predacious coccinellidae in relation to bioindication and economic importance. *Agricul. Ecosys. Environ.* 74, 323-342.
 13. Kim, G.H. and Y.S. Lee. 1999. Selective toxicity of aphicides to the predator *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) and *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). *Korean J. Pest. Sci.* 3, 84-89.
 14. Kim, K.D., D.S. Park, D.H. Shin, B.N. Han, H.W. Oh, Y.N. Youn, and H.Y. Park. 2006. Characterization of a ligninase producing strain, *Serratia marcescens* HY-5 isolated from *Sympetrum depressiusculum*. *Korean J. Appl. Entomol.* 45, 301-307.
 15. Koch, R.L. 2003. The multicolored asian ladybeetle, *Harmonia axyridis*: a review of its biology, uses in biological control, and non-target impacts. *J. Insect Sci.* 3, 1-16.
 16. Kwak, J., D.H. Lee, Y.D. Park, S.B. Kim, J.S. Maeng, H.W. Oh, H.Y. Park, and K.S. Bae. 2006. Polyphasic assignment of a highly proteolytic bacterium to *Serratia proteamaculans*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 16, 1537-1543.
 17. Kwok, A.Y. and A.W. Chow. 2003. Phylogenetic study of *Staphylococcus* and *Macrococcus* species based on partial *hsp60* gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 87-92.
 18. Moon, E.Y., H.W. Oh, P.J. Maeng, and K.S. Bae. 2001. Identification of enteric bacteria from *Nephila clavata*. *Kor. J. Microbiol.* 37, 1-8.
 19. Park, K.T. 2001. Insect resources, p. 101. Academybook.
 20. Park, K.T. and Y.C. Park. 1994. Survey on the aphidivorous predators for biological control agents. *RDA J. Agri. Sci.* 36, 109-118.
 21. Park, J.S., K.S. Whang, and J.S. Cheon. 2005. Procedure of microbial classification and identification, pp. 58-103. World Science Korea.
 22. Roy, H. and E. Wajnberg. 2008. From biological control to invasion: the ladybird *Harmonia axyridis* as a model species. *Biocontrol.* 53, 1-4.
 23. Rudi, K., M. Zimonja, and T. Næs. 2006. Alignment independent bi-linear multivariate modeling (AIBIMM) for global analyses of 16S rRNA phylogeny. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 1565-1575.
 24. Schafer, A., R. Konrad, T. Kuhnigk, P. Kampfer, H. Hertel, and H. König. 1996. Hemicellulose-degrading bacteria and yeasts from the termite gut. *J. Appl. Bacteriol.* 80, 471-478.
 25. Scharf, M.E. and A. Tartar. 2008. Termite digestomes as sources for novel lignocellulases. *Biofuels Bioprod. Bioref.* 2, 540-552.
 26. Schmitz, G. and V. Braun. 1985. Cell-bound and secreted proteases of *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 161, 1002-1009.
 27. Seo, M.J. and Y.N. Youn. 2000. The Asian ladybird, *Harmonia axyridis*, as biological control agent; I. predacious behavior and feeding ability. *Kor. J. Appl. Entomol.* 39, 50-71.
 28. Sweetman, H.L. 1958. The principles of biological control, p. 560. Wm. C. Brown Company, Iowa, USA.
 29. Thomson, J.D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W; improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.
 30. Trulzsch, K., B. Grabein, P. Schumann, A. Mellmann, U. Antonenka, J. Heesemann and K. Becker. 2007. *Staphylococcus pettenkoferi* sp. nov., a novel coagulase-negative staphylococcal species isolated from human clinical specimens. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 1543-1548.
 31. Vaneechoutte, M., R. Rossau, P. De Vos, M. Gillis, D. Janssens, N. Paepe, A. De Rouck, T. Fiers, G. Claeys, and K. Kersters. 1992. Rapid identification of bacteria of the Comamonadaceae with amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiol. Lett.* 93, 227-234.
 32. Ward, O.P. 1985. Proteolytic enzymes, pp. 789-818. In M.Y. Murray (ed.), *Comprehensive Biotechnology : The principles, applications and regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine*, vol. 3. Pergamon press Inc., Maxwell House, Fairview Park, Elmsford, New York, USA.
 33. Wheeler, M.M., M.R. Tarver, M.R. Coy, and M.E Scharf. 2010. Characterization of four esterase genes and esterase activity from the gut of the termite *Reticulitermes flavipes*. *Arch. Ins. Biochem. Physiol.* 73, 30-48.