모기유충에 활성 있는 *Bacillus thuringiensis* subsp. *tohokuensis* CAB167 균주의 특성

길미라 · 김다아 · 백승경 · 김진수 · 최수연 · 김대용 · 윤영남 · 황인천¹ · Michio Ohba² · 유웅만*

충남대학교 농업생명과학대학 응용생물과, ¹(주) 경농 중앙연구소, ²규슈대학교 농과대학 생물자원 및 관리 연구실

Characterization of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tohokuensis* CAB167 Isolate against Mosquito Larva

Mi-Ra Kil, Da-A Kim, Seung-Kyoung Paek, Jin-Su Kim, Su-Yeon Choi, Da-Yong Jin, Young-Nam Youn, In-Chon Hwang¹, Michio Ohba² and Yong-Man Yu*

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

¹Central Research Institute, Kyung Nong Co., Gyeong-ju, Korea

²Bioresources and Management Laboratory, Graduate School of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan

ABSTRACT : Eight *Bacillus thuringiensis* strains activated against mosquito larva were compared their characterization. Spherical-shaped parasporal inclusion of *B. thuringiensis* subsp. *tohokuensis* CAB167 was observed by phase-contrast microscopy and scanning electron microscopy. LC₅₀ values of *B. thuringiensis* subsp. *tohokuensis* CAB167 against *Culex pipiens molestus*, *Culex pipiens pallens*, and *Aedes aegypti* were 173, 190 and 580 ng/ml, respectively. *B. thuringiensis* subsp. *tohokuensis* CAB167 had a parasporal inclusion containing 4 major protein components, for example, 135, 80, 49 and 28-kDa by SDS-PAGE. Otherwise, after trypsin digestion of parasporal inclusion, SDS-PAGE was showed new protease-resistant peptides at 72 and 63-kDa. Activated toxins of isolated CAB167 were different from other reference strains on a serological by immuno-diffusion test.

KEY WORDS : *Bacillus thuringiensis tohokuensis*, Mosquitocidal, Parasporal inclusion

초 록 : 본 연구는 모기에 활성을 나타내는 *Bacillus thuringiensis* subsp. *tohokuensis* CAB167균주에서 생산된 내독소결정단백질의 특성을 조사하였다. *B. thuringiensis* subsp. *tohokuensis* CAB167균주는 위상차 현미경과 주사전자현미경으로 관찰하여 일반적으로 모기에 활성을 나타내는 spherical type의 내독소결정성단백질을 형성하는 것으로 나타났다. 국내에서 서식하는 지하집모기(*Culex pipiens molestus*), 빨간집모기(*Culex pipiens pallens*), 이집트숲모기(*Aedes aegypti*)에 대한 이 균주의 살충활성검정은 각각 173, 190, 580 ng/ml의 LC₅₀ 값으로 각각 활성을 보였다. *B. thuringiensis* subsp. *tohokuensis* CAB167균주에서 생산된 내독소결정성단백질의 SDS-PAGE를 통해 135, 80, 49와 28-kDa의 주요한 4개의 밴드를 나타냈다. 내독소결정성단백질의 소화에 영향을 미치는 곤충중장액과 유사한 trypsin효소를 처리하여 72와 63-kDa의 단백질이 새롭게 생성하였다. 파리목 위생해충인 모기에 활성을 나타내는 다른 7개의 *B. thuringiensis* 균주들의 내독소 결정성단백질과 혈청학적인 비교실험에서 독소단백질이 차이가 있는 것을 확인하였다.

검색어 : *Bacillus thuringiensis* subsp. *tohokuensis*, Mosquitocidal, Parasporal inclusion

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

Bacillus thuringiensis(이하 *B. thuringiensis*)는 내성포자를 형성하는 세균으로 포자형성시기에 내독소결정성단백질을 생산하는 능력을 가진 그람양성균이다. *B. thuringiensis*는 누에인 silkworm, *Bombyx mori*의 병원균으로 Ishiwata에 의해서 처음 발견된 이 후, 세계의 여러 지역에서 발견되고, 다양한 곤충목에 활성을 갖고 있다(Wasano *et al.*, 1998; Dulmage, 1970). 국내에서도 토양, 양잠농가, 저곡창고 등에서 활성이 좋은 *B. thuringiensis*를 분리하여 다양한 종류의 해충에 대해서 꾸준히 이루어지고 있다(Kim *et al.*, 1995a,b,c; Kim *et al.*, 2006; Choi *et al.* 2008).

*B. thuringiensis*의 내독소결정성단백질은 일반적으로 5개의 형태적 모양으로 나뉘는데, bipyramidal, spherical-amorphous, flat squares, cubic 그리고 bar-shaped type이 있다(Benintende *et al.*, 2000; Chilcott and Wigley, 1994). Bipyramidal과 cubic type은 나비목(Federici, 1993), flat squares type은 딱정벌레목(Hernstadt *et al.*, 1986), spherical-amorphous와 bar-shaped type은 파리목에 활성을 보인다(Federici *et al.*, 1990; Ohba *et al.*, 1995). 또한 이 내독소결정성단백질을 생산해내는 유전자에 의한 분류에서 Cry와 Cyt 단백질로 구성되어 있다(Ohgushi *et al.*, 2005; Glare and O'Callaghan, 2000). 특히, Cry는 곤충에 독성이 있고 현재 Cry1-Cry22로 22개의 그룹으로 분류되어 있다(Mizuki *et al.*, 1999; Crickmore *et al.*, 1998). 곤충을 죽이는 이 단백질의 높은 특이성은 감수성 곤충 중장 세포막에 존재하는 수용체에 이 단백질이 특이적으로 결합함으로써 발생하게 된다(Cannon, 1996). 또 하나의 다른 독성 Cyt 단백질은 적혈구가 포함된 척추동물과 무척추동물의 세포용해 활성을 갖고 있으며, Cyt1과 Cyt2 두 개의 그룹으로 나뉜다(Crickmore *et al.*, 1998).

혈청학적으로 분류되어 동일 *B. thuringiensis* subspecies 인데도 두 개 또는 더 많은 곤충목에 활성을 보이는 *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* (Padua *et al.*, 1984), *B. thuringiensis* subsp. *fukuokaensis* (Ohba and Aizawa, 1990), *B. thuringiensis* subsp. *japonensis* (Ohba *et al.*, 1992)와 *B. thuringiensis* subsp. *sotto* (Ohgushi *et al.*, 2003) 등과 같은 균주들의 작용기작과 특성이 연구되었고, 1981년에 Ohba 등에 의해서 발견된 새로운 *B. thuringiensis* subsp. *tohokuensis*는 나비목과 파리목에 활성을 보이지 않았지만(Ohba *et al.*, 1981), 이후 아르헨티나에서 발견된 *B. thuringiensis* subsp. *tohokuensis* strain은 부정형의 내독소를 형성하며 나비목에 활성을 보였다(Benentende *et al.*, 2000). 또한 시베리아 서부의 토양에서는 파리목에 활성이 있는 *B. thuringiensis* subsp. *tohokuensis* strain이

발견되었다(Khodyrev *et al.*, 2006). 비록 혈청학적으로 동일한 균주라 할 지라도 발견되는 장소에 따라서 다르게 생물효과를 나타내는데 나비목에 활성을 보이는 대표적인 균주인 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*와 파리목에 활성을 보이는 대표적인 균주인 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*에 비해서는 활성이 훨씬 낮게 보고되고 있다(Benentende *et al.*, 2000.; Khodyrev *et al.*, 2006).

따라서 본 연구는 일본에서 분양받은 *B. thuringiensis* subsp. *tohokuensis* CAB167균주에 대하여 모기에 활성을 보이는 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*를 포함한 8종류의 *B. thuringiensis* 균주들과 이들이 만들어 내는 내독소결정성단백질의 생물활성, 면역학적 특성을 조사하여 파리목에 대한 독성기작 연구에 자료로 활용하려한다.

재료 및 방법

시험 균주와 배양 조건

시험에 사용된 30균주와 모기 유충에 효과를 나타내는 대조 균주들인 *B. thuringiensis* subsp. *fukuokaensis*, *B. thuringiensis* subsp. *sotto*, *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis*, *B. thuringiensis* subsp. *higo*, *B. thuringiensis* subsp. *tohokuensis*, *B. thuringiensis* subsp. *canadiensis*, *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14와 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*은 일본규슈대학(Institute of Biological Control, Kyushu University, Japan)의 Dr. M. Ohba로부터 분양받아 사용하였다. 균주의 배양조건은 한천영양배지에 27℃의 조건으로 3-4일간 배양하면서 위상차현미경으로 내성포자와 내독소결정성단백질을 관찰한 뒤 수집하였고, 4℃에 보관하면서 실험에 사용되었다.

위상차현미경 및 주사전자현미경 관찰

한천영양 배지 상에서 증식하여 포자형성기가 지난 *B. thuringiensis*의 포자와 내독소결정성단백질의 형태를 알아보기 위해 위상차현미경(Olympus BX51)과 주사전자현미경(Philips XL30E SEM)을 이용하여 관찰하였다. 위상차현미경으로 관찰하기 위해 소량의 *B. thuringiensis* 배양액을 slide glass에 떨어뜨린 후, 1000배로 내독소결정성단백질의 형태를 관찰하였다(Kim *et al.*, 1995a). 주사전자현미경으로 관찰 할 시료는 2.5% Glutaraldehyde 용액에 넣고 4℃에서 2시간동안 전고정을 하고, 전고정한

시료를 증류수로 3회 세척한 후 탈수를 한 후, 4°C에서 12시간씩 방치하였다. 50% Isoamyl acetate로 10분간 치환 하고, 100% Isoamyl acetate에서 5분간 침지 하여 임계점 건조를 하였다. 건조된 시료를 금으로 coating을 한 후 주사전자현미경(SEM)으로 관찰하였다.

생물활성검정

B. thuringiensis 균주들을 GYS배지(Nickerson and Bulla, 1974)에 접종하여 세포내 내성포자와 내독소결정성단백질이 형성되고 후에 autolysis에 의해 이들이 세포외부로 방출될 때까지 27°C에서 4-5일간 배양하였다(Kim et al., 1995a). 배양액을 집균하여 PBS 완충액으로 3회 세척한 후 냉장고에 저장하면서 사용하였다. Trypsin처리를 위하여 CAB167 균주의 내독소결정성단백질을 50 mM NaOH (pH 12.5)에 상온에서 15분 동안 용해시키고, 1 mg/ml trypsin을 10:1 (w/w)로 처리한 후, 37°C에서 30분 배양하여 생물활성 검정을 수행하였다.

실험에 사용된 모기는 서울대학교 농업생명과학대학 위생곤충실험실에서 분양받은 지하집모기(*Culex pipiens molestus*), 빨간집모기(*Culex pipiens pallens*), 이집트숲모기(*Aedes aegypti*) 등 3종을 누대 사육하면서 사용하였고, WHO (2005)의 Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides에 기록된 실험방법을 일부 수정하여 실험하였다. 누대사육하면서 2-3일 된 모기 유충 10마리를 30 ml의 물에 넣고, 적당량으로 희석한 균액의 0.3 ml를 접종하였다. 사망률은 24 hr과 48 hr 후에 사충수를 조사하였고, 3반복으로 실험하였다. 사망률(LC₅₀)은 Probit 분석프로그램을 이용하여 산출하였다.

SDS-PAGE

각 균주의 내독소결정성단백질의 SDS-PAGE는 Laemmli의 방법을 일부 수정하여 실험하였다(Laemmli, 1970). 실험에 사용한 균주들을 NA배지에 배양하여 위상차현미경으로 autolysis가 일어난 것을 확인한 후, 균을 모아 10,000 rpm에서 원심 하여 균을 씻어내어 일부 내성포자를 제거하면서 내독소결정성단백질을 수집하였다. 전기영동은 12% separating gel과 5% stacking gel을 사용하였고, 각 균주의 내독소결정성단백질을 1.5 ml씩 마이크로튜브에 넣고, 2-mercaptoethanol이 포함된 buffer를 1:2 (w/w)로 섞은 후 100°C에서 10분 동안 열처리하였다. 50 V에서 전기영동 후 gel은 Coomassie brilliant blue 250으로 40분 동안 염색하였고, 12시간 탈색하여 결과를 확인하였다.

각각의 시험 균주의 내독소결정성단백질을 50 mM NaOH (pH 12.5)에 상온에서 15분 동안 용해시키고, 1 mg/ml trypsin을 10:1 (w/w)로 처리한 후, 37°C에서 30분 배양하였다. Trypsin에 의해 용해되어진 단백질은 SDS-PAGE를 통해 결과를 확인하였다(Zhong et al., 2000; Zouari and Samir 1997).

혈청학적 실험

B. thuringiensis subsp. *tohokuensis* CAB167균주의 내독소결정성단백질 항체는 뉴질랜드 화이트 토끼에서 생성되었다. Freund's complete adjuvant와 내독소결정성단백질을 1:1의 같은 양으로 섞은 후 토끼에 7일 간격으로 4번 피하주사를 하였다. 마지막 주사 3일 후에 혈액을 채취하였고, 원심 하여 얻은 혈청을 56°C에서 30분 처리한 후, 사용할 때까지 -20°C에 보관하였다. Ouchterlony immunodiffusion의 확인 실험은 *B. thuringiensis* subsp. *tohokuensis* CAB167균주와 모기에 활성을 나타내는 7균주들의 내독소결정성단백질과의 면역학적 관계를 확인하였다. PBS buffer로 녹인 0.8% agarose gel에 구멍을 뚫고, 항원으로 사용되는 내독소결정성단백질은 항체와 동일하게 trypsin에 처리되어 용해되었다. 항원으로 각 균주들의 내독소결정성단백질을 사용했으며 *B. thuringiensis* subsp. *tohokuensis* CAB167 항체의 50 µl를 중앙 홀에 넣고, 4°C에서 3일 동안 정제하여 결과를 관찰하였다(Ohgushi et al., 2003).

결과 및 고찰

국내의 모기방제는 최근까지 주로 성충을 대상으로 화학농약을 사용하여 방제하여왔다. 그러나 최근 모기방제를 성충은 물론 유충까지도 방제할 수 있도록 곤충생장조절제를 비롯하여 환경친화적이면서 생태계에 안전한 생물적 방제인자로서 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*균주가 사용되고 있다. 곤충생장조절제 중에서는 키틴합성 저해제 중 Novaluron이 다른 작용기작을 가진 곤충생장조절제 보다 모기유충방제에 높은 활성을 보임을 확인하였다(Choi et al., 2007). 이러한 생물적 방제 인자로서 새로운 활성을 갖는 *B. thuringiensis* 균주를 선발 하기 위하여 일본 규슈대학에서 분리하여 분양받은 30개 균주의 특성을 조사하였다. 우선 이들 균주를 배양하면서 내독소결정성단백질의 형태를 위상차현미경하에서 관찰하여 일

반적으로 모기 유충에 활성을 나타내는 spherical type을 생성하는 19개 균주를 선발하여 지하집모기유충(*Culex pipiens molestus*)에 활성검정을 하였다(Table 1). 그 결과, 가장 높은 활성을 보인 CAB191은 대조균주로 사용하였던 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* 및 *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14과 동일한 살충력을 보였다. 위상차현미경하에서 형태학적으로는 모두 동일하였으나 생물활성 결과에서 차이가 나는 CAB191균주와 50% 활성을 보인 CAB167, 살충력을 전혀 보이지 않은 CAB189 균주의 혈청학적 분류를 위하여 일본 규슈대학에서 동정되었다. 결과에서 CAB191균주는 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (H14)로 CAB167균주는 *B. thuringiensis* subsp. *tohokuensis* (H17) 확인되었고, CAB189균주 혈청학적으로 동정할 수가 없었다. 따라서 본 연구에서는 혈청학적으로 동일한 균주임에도 분리되는 장소에 따라서 모기 유충에 독성을 다르게 나타내는 *B. thuringiensis* subsp. *tohokuensis* CAB167균주를 선발하여 그 작용기작과 특성을 조사하였다.

B. thuringiensis subsp. *tohokuensis* CAB167균주의 형태학적인 내독소결정성단백질과 모기유충에 활성을 보이는 다른 7개의 대조균주들 모두가 spherical type을 형성하는 것으로 확인되었다(Fig. 1). Benentende *et al.* (2000)이 분리한 *B. thuringiensis* subsp. *tohokuensis* 균주는 위상차현미경으로 관찰에서는 spherical type의 내독소결정성단백질을 생성하는 것으로 확인 되었으나 주사전자현미경의 관찰에서는 부정형을 형성하였다. 그러나 *B. thuringiensis* subsp. *tohokuensis* CAB167 균주의 내독소결정성단백질은 주사전자현미경으로 관찰에서 본 것과 같이 spherical type의 결정성독소단백질을 확인할 수 있었으며 *B. thuringiensis*

subsp. *israelensis*와 비교사진에서 볼 수 있듯이 보다 더 뚜렷한 구형을 생성하는 것을 확인하였다(Fig. 2).

파리목에 대한 기주 특이성의 차이의 조사는 3 종류의 모기 유충에 대하여 *B. thuringiensis* subsp. *tohokuensis* CAB167균주를 포함 다른 8개의 *B. thuringiensis* 균주를 사용하여 생물활성을 검토하였다(Table 2). *B. thuringiensis* subsp. *tohokuensis* CAB167 균주의 빨간집모기와 지하집모기에 대한 독성은 각각 173과 190 ng/ml로 비슷하였으나 이집트숲모기에는 580 ng/ml로 3배정도 독성이 낮은 것을 확인 할 수 있었다. 또한 *B. thuringiensis* subsp. *tohokuensis* CAB167균주는 다른 8균주와 비교하여 독성의 결과가 다양하게 나타났는데 혈청학적으로 동일한 *B. thuringiensis* subsp. *tohokuensis* type strain 보다 2~4배 낮았다. 모기유충에 가장 활성이 강한 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*나 *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14 균주와 비교하여 이집트숲모기에 대한 활성이 3,800배 이상이나 차이나는 것을 확인 할 수 있었다. 그러나 *B. thuringiensis* subsp. *fukuokaensis*는 다른 균주들에 비해 1.5~4배로 *B. thuringiensis* subsp. *tohokuensis* CAB167과 활성의 차이가 가장 적은 것으로 나타났다. 모기 유충에 대한 생물활성 시험은 *B. thuringiensis* subsp. *fukuokaensis*의 실험에서 유사한 결과를 보고하였다(Yu *et al.*, 1991).

B. thuringiensis subsp. *tohokuensis* CAB167균주의 활성범위를 확인하기 위하여 배추좀나방(*Plutella xylostella*), 파밤나방(*Spodoptera exigua*), 담배거세미나방(*Spodoptera litura*)에 대한 생물검정에서 3종 모두에 활성을 보이지 않았다(실험 데이터는 제공되지 않았음).

B. thuringiensis subsp. *tohokuensis* CAB167균주와 8개

Table 1. Activity of several *Bacillus thuringiensis* strains against *Culex pipiens molestus*.

<i>Bacillus thuringiensis</i> strains			Mortalities ^{a)}	<i>Bacillus thuringiensis</i> strains			Mortalities
1	CAB191		+++	12	CAB168		-
2	CAB170		++	13	CAB172		-
3	CAB179		++	14	CAB181		-
4	CAB183		++	15	CAB184		-
5	CAB185		++	16	CAB186		-
6	CAB188		++	17	CAB189		-
7	CAB167		+	18	CAB190		-
8	CAB171		+	19	CAB192		-
9	CAB166		+	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i>			+++
10	CAB177		+	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>morrisoni</i>			+++
11	CAB165		-				

^{a)}+++ : Highly effective(Mortality; 90%), ++: Effective(Mortality; 70%), +: Lowly effective(Mortality; 50%), -: Not effective(Mortality; 0%)

Fig. 1. Photographs of phase-contrast microscope of *B. thuringiensis* with $\times 1000$. A: *B. thuringiensis* subsp. *tohokuensis* CAB167; B: *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*; C: *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14; D: *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis*; E: *B. thuringiensis* subsp. *higo*; F: *B. thuringiensis* subsp. *canadiensis*; G: *B. thuringiensis* subsp. *fukuokaensis*; H: *B. thuringiensis* subsp. *sotto*. P: parasporal inclusion, S: spore.

Fig. 2. Scanning Electron micrographs of *Bacillus thuringiensis*. P: Parasporal inclusion. $\times 10,000$. (A) *B. thuringiensis* subsp. *tohokuensis* CAB167; (B) *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*.

Table 2. Toxicities of several *Bacillus thuringiensis* strain against larvae of *Culex pipiens molestus*, *Culex pipiens pallens* and *Aedes aegypti*.

<i>B. thuringiensis</i> serovar.	LC ₅₀ (ng/ml)		
	Mosquito species		
	<i>Culex pipiens molestus</i>	<i>Culex pipiens pallens</i>	<i>Aedes aegypti</i>
<i>tohokuensis</i> CAB 167	173	190	580
<i>tohokuensis</i>	80	50	147
<i>israelensis</i>	0.17	0.5	0.2
<i>morrisoni</i>	0.13	0.07	0.15
<i>canadensis</i>	0.2	0.19	0.63
<i>darmstadiensis</i>	16	20	62
<i>fukuokaensis</i>	104	114	146
<i>higo</i>	200	16	350
<i>sotto</i>	>10 ⁶	>10 ⁶	5.7

의 대조균주들의 내독소결정성단백질의 SDS-PAGE 패턴에서 CAB167의 내독소결정성단백질은 135, 80, 48, 28-kDa 크기의 4개의 주요 단백질을 포함하였다(Fig. 3). 시베리아 서부의 토양에서 분리된 파리목에 활성이 있는 *B. thuringiensis. tohokuensis* 균주가 생성하는 내독소결정성단백질의 135, 80, 48, 41, 30, 28-kDa과 비교했을

때, 135, 80, 48, 28-kDa의 4개의 주요한 단백질이 두 균주에서 모두 존재하는 것을 확인하였다(Khodyrev *et al.*, 2006).

B. thuringiensis subsp. *israelensis*의 경우에는 27-kDa cytolytic (cyt2) 단백질은 cyt1이 72-와 130-kDa 독성단백질과 상승작용을 일으키기 때문에 활성이 높지만, *B. thuringiensis*

Fig. 3. SDS-PAGE analysis of parasporal inclusions. M: marker; Lane 1: CAB167; Lane 2: *B.t. darmstadiensis*; Lane 3: *B.t. morrisoni* PG-14; Lane 4: *B.t. israelensis*; Lane 5: *B.t. higo*; Lane 6: *B.t. sotto*; Lane 7: *B.t. canadensis*; Lane 8: *B.t. fukuokaensis*.

subsp. *fukuokaensis*의 *cytolytic* (cyt2) 단백질은 이러한 관계에 있어서 교차-활성이 없기 때문에 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* 보다 낮은 활성을 가진 이유라고 보고 하였다(Yu et al. 1987; Yu et al., 1991). *B. thuringiensis* subsp. *tohokuensis* CAB167에서 생산된 내독소결정성 단백질은 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*에 비해 낮은 활성을 보이는 것으로 보아 *B. thuringiensis* subsp. *fukuokaensis*의 cyt2에 속하는 단백질로 추측된다.

B. thuringiensis subsp. *tohokuensis* CAB167 균주의 내독소결정성 단백질의 활성 독소를 확인하기 위해 소화효소인 trypsin을 처리한 결과로 135-kDa의 단백질이 trypsin에 의해 용해되어 72와 63-kDa 크기의 새로운 활성 단백질 밴드가 생성된 것을 확인하였다(Fig. 4). 나비목에 활성

Fig. 4. Electrophoretic analysis of trypsin digest of solubilized. M: marker, Lane 1: intact parasporal inclusion of CAB167; Lane 2: solubilized parasporal inclusion of CAB167.

을 보인 Benentende et al. (2000)가 분리한 *B. thuringiensis* subsp. *tohokuensis* 균주의 130-kDa의 내독소결정성단백질이 trypsin에 의해 분해되어 생성된 90-kDa 크기의 활성 독소와 차이를 보였다. 또한 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*는 48, 38, 30-kDa 크기의 활성 독소를 생성해 *B. thuringiensis* subsp. *tohokuensis* CAB167와 차이를 보였다 (De Barros Moreira Beltrao and Silva-filha, 2007).

Klowden et al.(1983)은 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*의 내독소결정성단백질이 trypsin을 처리하여 생성된 활성 독소 보다 이집트숲모기 유충에 70배나 적은 활성을 보인다고 보고하였다. *B. thuringiensis* subsp. *tohokuensis* CAB167의 내독소결정성단백질에 trypsin을 처리하여 생성된 72와 63-kDa의 단백질이 활성을 시험하였다(Table 3). *B. thuringiensis* subsp. *tohokuensis* CAB167의 내독소결정성단백질에 trypsin을 무처리와 처리 한 것을 지하집모기, 빨간집모기, 이집트숲모기의 유충에 생물검정을 수행하였다. 그 결과 trypsin을 처리하지 않은 *B. thuringiensis* subsp. *tohokuensis* CAB167의 내독소결정성단백질보다 지하집모기는 10배, 빨간집모기는 3배, 이집트숲모기는 2배정도로 활성이 증가한 것을 확인하였다. 이 결과로 72와 63-kDa이 활성 독소인 것을 암시한다.

모기유충에 활성을 나타내는 *B. thuringiensis* subsp. *tohokuensis* CAB167과 7개의 *B. thuringiensis* 균주들과 활성 독소단백질 사이의 관계를 확인하기 위해 Ouchterlony immunodiffusion tests를 하였다. 토끼에 생성된 *B. thuringiensis* subsp. *tohokuensis* CAB167의 항체와 CAB167를 비롯한 대조균주들을 trypsin에 용해시켜 활성독소를 시험한 결과, *B. thuringiensis* subsp. *tohokuensis* CAB167에 대해서만 항체에 응집반응이 일어나서 하얀 밴드를 형성하였다. 이를 토대로, *B. thuringiensis* subsp. *tohokuensis* CAB167의 활성 독소는 모기에 활성을 보이는 7개의 대조 균주들과 다른 특성을 갖는 단백질을 생성하는 것으로 확인되었다(Fig. 5). 토양으로부터 새롭게 분리된 *B. thuringiensis* subsp. *tohokuensis* CAB167균주의 모기 유충에 대한 활성은 극히 미약하였다. 지금까지 모기유충에 대하여 활성

Table 3. Toxicity of solubilized CAB167 protein by trypsin against larvae of *Culex pipiens moletus*, *Culex pipiens pallens* and *Aedes aegypti*.

Strains	LC ₅₀ (ng/ml)		
	Mosquito species		
	<i>Culex pipiens moletus</i>	<i>Culex pipiens pallens</i>	<i>Aedes aegypti</i>
Crude CAB 167	173	190	580
Solubilized CAB167	17	63	131

Fig. 5. Ouchterlony double immuno-diffusion test of solubilized parasporal inclusions of *Bacillus thuringiensis* strain. The centre wells contained rabbit antisera raised against solubilized inclusion protein of CAB167 (A). The wells around the center contained of antigen solution of CAB167 (1), *B.t. israelensis* (2), *B.t. morrisoni* PG-14 (3), *B.t. darmstadiensis* (4), *B.t. candensis* (5), *B.t. higo* (6), *B.t. fukuokaensis* (7), and *B.t. sotto* (8).

을 나타내는 *B. thuringiensis*는 Table 2에서 볼 수 있는 것같이 모두 8종류로 보고되고 있으나 이중 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*와 *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni*-14의 2종류만이 모기유충에 대하여 활성이 강하게 나타내고 있다. 이 두 종의 내독소결정성 단백질을 생산하는 유전자와 단백질은 매우 유사하다. 그러나 다른 6종류의 *B. thuringiensis*균주는 모기에 대하여 약간의 활성들을 나타내는 내독소 결정성 단백질을 생산하고 있으나 각각의 유전자와 단백질은 서로 상관관계를 나타내지 않고 있다. 이러한 모기유충에 대하여 독성을 나타내는 단백질의 성질을 구명하기 위하여 보다 많은 연구가 필요하다.

Literature Cited

- Benintende, G.B., J.E. Lopez-Meza, J.G. Cozzi, C.F. Piccinetti, and J.E. Ibarra. 2000. Characterizaion of INTA 51-3, a new atypical strain of *Bacillus thuringiensis* from Argentina. *Curr. Microbiol.* 41: 396-401.
- Cannon, R.J.C. 1996. *Bacillus thuringiensis* use in agriculture: A molecular perspective. *Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc.* 71: 561-636.
- Chilcott, C.N and P.J. Wigley. 1994. Opportunities for finding new *Bacillus thuringiensis* sratin collection. *Appl. Environ. Microbiolo.* 64: 4965-4972.
- Choi S.Y., S.C. Oh, M.S. Cho, S.K. Paek, J.S. Kim, D.A. Kim, M.R. Gill, Y.N. Youn and Y.M. Yu. 2007. Bioassay of environment -friendly insecticides for management of mosquito, *Culex pipiens molestus*. *Kor. J. Appl. Entomol.* 46(2): 261-267.
- Choi S.Y., M.S. Cho, T.H. Kim, J.S. Kim, S.K. Paek, D.A., Y.N. Youn, S.S. Hong and Y.M. Yu. 2008. Bioactive characterization of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* CAB133 isolated from domestic soil. *Kor. J. Appl. Entomol.* 47(2): 175-184.
- Crickmore, N., Zeigler, D.R and J. Feitelson. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. & Mol. Biolo. Rev.* 62: 807-813.
- De Barros Moreira Beltrao, H and M.H. Silva-filha. 2007. Interaction of *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* cry toxins with binding sites from *Aedes aegyti* (Diptera: Culicidae) larvae midgut. *FEMS. Micro. Lett.* 266(2): 163-169
- Dulmage, H.T. 1970. Insecticidal activity of HD-1, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*. *J. Inverte. Pathol.* 15: 232-239.
- Federici, B.A. 1993. Insecticidal bacterial proteins identify the midgut epithelium as a source of novel target site for insect control. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 22: 357-371.
- Federici, B.A., Luhy, P and J.E. Ibrarra. 1990. The parasporal body of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*: structure, protein composition and toxicity. In: de Barjae, H and Sutherland, S., (eds) *Bacterial control of mosquitoes and blackflies: Biochemistry, genetics and applications of Bacillus thuringiensis and Bacillus sphaericus*. New Brunssick, NJ: Rutgers University Press. 16-24.
- Glare, T.R. and M. O'Callaghan. 2000. *Bacillus thuringiensis*: Biology, ecology and safety. Chichester: Wiley. 350pp.
- Hernstadt, C., G.G. Soares, E.R. Wilcox and D.L. Edwards. 1986. A new strain of *Bacillus thuringiensis* with activity against coleoptetan insects. *Biotechnol.* 4: 305-308.
- Ishii, T and M. Ohba. 1994. The 23-kilodalton CytB protein is solely responsible for mosquito larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* serovar *kyushuensis*. *Curr. Microbiol.* 29: 91-94.
- Khodyrev, V.P., G.V. Kalmykova, L.I. Burtseva and V.V. Glupov. 2006. Characterizaion of crystal-forming bacteria *Bacillus thuringiensis* subsp. *tohokuensis* toxic to mosquito larvae. *Biolo. Bull.* 33(5): 513-516.
- Kim, H.S., H.W. Park, D.W. Lee, Y.M. Yu, J.I. Kim and S.K. Kang. 1995a. Distribution and characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from soils in Korea. *Kor. J. Appl. Entomol.* 34(4): 344-349.
- Kim H.S., D.W. Lee, H.W. Park, Y.M. Yu, J.I. Kim and S.K. Kang. 1995b. Distribution and characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from soils of sericultural farms in Korea. *Kor. J. Appl. Entomol.* 37(1): 57-61
- Kim H.S., H.W. Park, D.W. Lee, Y.M. Yu and S.K. Kang. 1995c. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated in Granary Dusts. *Kor. J. Appl. Entomol.* 34(3): 243-248
- 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.
- Klowden, M.J., G.A. Held and L.A.B. JR. 1983. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* to adult *Ades aegypti* Mosquitoes. *Appl. Environ. Microbiol.* 312-315.

- Koni, P.A and D.J. Ellar. 1993. Cloning and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* cytolytic delta-endotoxin. *J. Mol. Biol.* 229: 319-327.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- Mizuki, E., M. Ohba, T. Akao, S. Yamashita, H. Satio and Y.S. Park. 1999. Unique activity associated with non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* parasporal inclusions: in vitro cell-killing action on human cancer cell. *Appl. Microbiol.* 86: 477-486.
- Nickerson, K.W. and L.A.Jr. Bulla. 1974. Physiology of spore-forming bacteria associated with insects: minimal nutritional requirement for growth, sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 28: 124-128.
- Ohba, M and K. Aizawa. 1990. Occurrence of two pathotypes in *Bacillus thuringiensis* subsp. *fukuokaensis* (Flagella Serotype 3a: 3d: 3e). *J. Invertebr. Pathol.* 59: 99-103.
- Ohba, M., H. Iwahana. and S. Asano. 1992. Unique isolate of *Bacillus thuringiensis* serovar *japonensis* with a high larvicidal activity specified for scarabaeid beetles. *Lett. Appl. Microbiol.* 14: 54-57.
- Ohba, M., H. Saitoh, K. Miyamoto, K. Higuchi. 1995. *Bacillus thuringiensis* serovar higo (flagellar serotype 44), a new serogroup with a larvicidal activity preferential for the anopheline mosquito. *Letter in appl. Micro.* 21(5): 316
- Ohba, M., K. Aizawa and S. Shimizu. 1981. A new subspecies of *Bacillus thuringiensis* isolated in Japan: *Bacillus thuringiensis* subsp. *tohokuensis* (Serotype 17). *J. Invertebr. Pathol.* 38: 307-309.
- Ohgushi, A., H. Satioh, W. Naoya., A. Uemori and M. Ohba. 2005. Cloning and characterization of two novel genes, cry24B and slorf2, from a mosquitocidal strain of *Bacillus thuringiensis* serovar *sotto*. *Curr. Microbiol.* 51: 131-136.
- Ohgushi, A., N. Wasano and N. Shisa. 2003. Characterization of mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* serovar *sotto* strain isolated from Okinawa, Jap. *J. Appl. Microbiol.* 95: 982-989.
- Padua, L.E., M. Ohba and K. Aizawai. 1984. Isolation of a *Bacillus thuringiensis* strain (Serotype 8a:8b) highly and selectively toxic against mosquito larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 44: 12-17.
- Wasano, N., K.H. Kim, M. Ohba. 1998. Delta-endotoxin proteins associated with spherical parasporal inclusions of the four Lepidoptera-specific *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl. Micro.* 84(4): 501-508
- WHO. 2005. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. World Health Organization communicable disease control, prevention and eradication. WHO pesticide evaluation scheme.
- Yu, Y.M., M. Ohba and K. Aizawa. 1987. Synergistic effects of the 65- and 25-kilodalton proteins of *Bacillus thuringiensis* strain PG-14 (serotype 8a:8b) in mosquito larvicidal activity. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 33: 459-462.
- Yu, Y. M., M. Ohba and S. S. Gill. 1991. Characterization of mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *fukuokaensis* crystal proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(4): 1075-1081.
- Zhong, C., D.J. Ellar, A. Bishop, C. Johnson, S. Lin and E.R. Hart. 2000. Characterization of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin which is toxic to insects in three orders. *J. Invertebr. Pathol.* 76: 131-139.
- Zouari, Nabil 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 November 17 2008;
revised November 17 2008; accepted December 1 2008)