

# *Bacillus thuringiensis*의 꿀벌부채명나방, *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae)에 대한 방제 효과

강아랑 · 이명렬 · 이만영 · 김혜경 · 윤미영 · 최용수\*

농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부 잠사양봉소재과 꿀벌육종연구실

## Biological Control of Wax Moth, *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) by *Bacillus thuringiensis*

Ah-Rang Kang, Myeong-Lyeol Lee, Man-Young Lee, Hye-Kyung Kim, Mi-Young Yoon and Yong-Soo Choi\*

Department of Agricultural Biology, National Institute of Agricultural Sciences, RDA, Wanju 55365, Republic of Korea

(Received 27 October 2015; Revised 31 October 2015; Accepted 3 November 2015)

### Abstract

*Bacillus thuringiensis* K1 and K2 which was isolated soils and wax showed high toxicity to wax moth, *Galleria mellonella* L.. The crystal protein profiles of *B. thuringiensis* K1 were similar to those of its reference strain, subsp. *kurstaki*. But, K2 were similar with subsp. *aizawai*. PCR analysis using cry gene primers showed that *B. thuringiensis* K1 and K2, unlike its reference strain, had *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1E*, *cry1F*, *cry2*, and *cry5* genes for K1 and *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1B*, *cry1C*, *cry1D*, *cry2*, and *cry5* genes for K2, suggesting that *B. thuringiensis* K1 and K2 was a unique strain with respect to gene type. In addition, *B. thuringiensis* K2 was showed high level of toxicity against 1 instar to 3 instar wax moth, *G. mellonella*. Furthermore, *B. thuringiensis* K1 was showed high level of toxicity against 3 instar to 5 instar wax moth, *G. mellonella*.

Key words: *Bacillus thuringiensis* K1, K2, *Galleria mellonella*, *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1E*, *cry1F*, *cry2*, and *cry5*

### 서 론

*Bacillus thuringiensis*(Bt)는 생물학적 살충제로 전 세계적으로 알려져 있는 미생물로서 곤충의 섭식 행동에 따라서 곤충의 장에서 활성을 가지면서 내독소 단백질이 곤충의 유충을 죽이는 기작으로 작용을 하는

데, 꿀벌부채명나방(*Galleria mellonella* L.)에 대한 살충력을 가지고 있는 Bt제에 대한 연구결과가 Burges와 Bailey(1968), Burges(1970)에 의하여 발표된 적이 있다. 꿀벌부채명나방(*G. mellonella* L.)은 주로 밀랍을 먹고 자라는 곤충으로써 전 세계적으로 6종이 분류되어 있으며(Amett, 1985), 국내에는 *Galleria mellonella* L.

\*Corresponding author. E-mail: beechoi@korea.kr

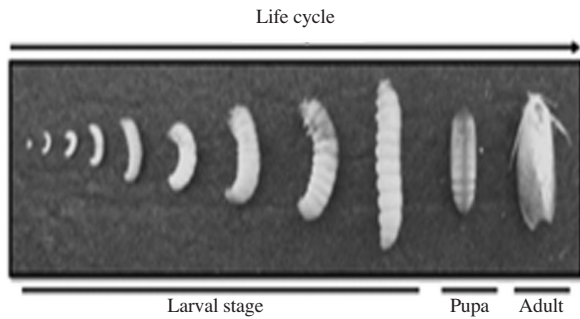


Fig. 1. Life cycle of wax moth, *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyraloidea).

와 *Achroia grisella* 2종이 양봉농가에 피해를 주는 것으로 알려져 있다(Calvert, 1982; Hachiro and Knox, 2000; 우 등, 1995). 꿀벌부채명나방(*G. mellonella* L.)에 의한 서양종꿀벌(*A. mellifera* L.) 피해로는 저장된 빈 벌집 및 먹이용 벌집을 사용하지 못할 정도의 피해를 유발한다(Caron, 1992). 또한, 꿀벌부채명나방(*G. mellonella* L.)은 벌통과 벌통사이를 이동하기 때문에 부저병과 같은 질병을 매개하여 피해를 가중하기도 한다(Charrirer and Imdorf, 1999). 이러한 꿀벌에 피해를 유발하는 꿀벌부채명나방(*G. mellonella* L.)의 방제를 위하여 많은 노력이 있어왔으며, 대표적인 방법으로 온도조절을 통한 고온 및 저온처리, 이산화탄소를 처리하는 방법이 많이 알려져 있으며, 화학적인 방법으로는 혼연제인 *P-dichlorobenzene*(PDB), 아세트산, 시안화칼슘, 다이브롬화 에틸렌, 메틸 브로마이드, 포스핀 등으로 방제하기도 한다(Hood *et al.*, 2003). 그러나 화학물질에 의한 방제는 벌꿀에의 잔류 등으로 인한 인체 유해물질의 잔류 위험성이 있어서 인체에 무해한 친환경 방제 기술의 개발을 위한 연구 결과로 Bt제의 개발에 대한 보고도 있다. 특히, *B. thuringiensis aizawai*의 경우 나비목 곤충에 살충력을 보이면서 (Tabashnik *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1998) 꿀벌부채명나방(*G. mellonella* L.)에도 효과적인 살충 효과를 가지고 있음이 보고된 바 있다(Li *et al.*, 1987). 그 외의 연구 결과로써 꿀벌부채명나방(*G. mellonella* L.)에 의한 피해를 예방하기 위하여 Bt 내독소단백질 발현유전자를 옥수수에 형질전환 시켜 꿀벌의 먹이원인 화분에 Bt 내독소 단백질이 발현되게 하여 살충력을 가지고 있

는 형질전환 옥수수 화분을 먹여서 방제하는 방법도 발표되었다(Anne *et al.*, 2003).

따라서 본 연구에서는 국내에서 분리된 *B. thuringiensis* K1과 K2의 꿀벌부채명나방(*G. mellonella* L.)에 대한 살충력을 검정하고 이의 이용을 통한 양봉농가의 꿀벌부채명나방(*G. mellonella* L.) 피해를 예방하기 위하여 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 꿀벌부채명나방(*Galleria mellonella* L.) 사육

토종벌(*Apis cerana*) 봉군 내에 기생하면서 피해를 유발하는 꿀벌부채명나방(*G. mellonella* L.)은 국내 양봉장에서 사육중인 벌통에서 채집하였으며, 이 등 (2007)의 방법에 의하여 30°C에서 24시간 암조건으로, 벌집을 절단하여 먹이로 주며 실내에서 사육하면서 Fig 1과 같은 생활사에서 각각의 령기별로 선별된 유충을 살충력 검정에 사용하였다.

### *Bacillus thuringiensis* 균주 분리

양봉장인근 표토로부터 2~5cm 깊이에서 수집된 토양과 꿀벌 벌통 내의 벌집에서 *Bacillus thuringiensis*(Bt)를 분리하기 위한 기본 배지는 nutrient agar (NA, Difco, BactoR) 배지를 이용하였다. 분리방법은 시료 1g씩을 임의로 취하여 이를 9ml의 멸균수가 들어있는 시험관에 넣고 10분간 교반한 후 기타 미생물의 생장을 억제하기 위하여 80°C에서 10분간 열처리하고 희석평판배양법으로 희석한 후 NA agar plate에 도말하였다. 그리고 30°C 항온기에서 4~5일간 배양함으로써 형성된 colony를 위상차 현미경(×1,000)으로 관찰하여 포자와 내독소 단백질을 형성하는 균주를 선발하였으며(Fig. 2), 선발된 Bt 균주는 단일 콜로니로 순수 분리하였으며 임의로 *B. thuringiensis* K2로 명명하였다.

### *Bacillus thuringiensis* 균주 살충력 검정

꿀벌부채명나방(*G. mellonella* L.) 방제를 위한 *Bacillus thuringiensis* 균주는 서울대학교에서 분양받

**Table 1.** Profile of cry gene specific primers

cry gene type	Primer	PCR product size (bp)
<i>cry1Aa</i>	5' GAGCCAAGCGACTGGAGCAGTTTACACC	782
<i>cry1Ab</i>	5' TCGAATTGAATTTGTTCC	238
<i>cry1Ac</i>	5' TCACTTCCCATCGACATCTACC	487
<i>cry1B</i>	5' GTCCAACCTTATGAGTCACCTGGGCTTC	902
<i>cry1C</i>	5' CAACCCTATTTGGTGCAGGTTC	288
<i>cry1D</i>	5' GGTACATTTAGATGTTACAGCCAC	465
<i>cry1E</i>	5' CTTAGGGATAAATGTAAGTACAG	961
<i>cry1F</i>	5' CCGGTGACCCATTAACATTCCAATC	383
<i>cry13'</i>	5' ATCACTGAGTCGCTTCGCATCTTTGACTTTCTC	
<i>cry1G5'</i>	5' ATATGGAGTGAATAGGGGG	235
<i>cry1G3'</i>	5' TGAACGGCGATTACATGC	
<i>cry25'</i>		
<i>cry23'</i>	5' CAGATACCCTTGCTGGTGTA	1073
<i>cry3AB</i>	5' ATAGGCCCGTGCTCCACCAGG	
<i>D5'</i>	5' CCGAACAATCGAAGTGAA	
<i>cry3A3'</i>	5' ATAGATGGTCCTACT	1964
<i>cry3B3'</i>	5' ATTGTTGAACGGCAACAA	1359
<i>cry3D3'</i>	5' ATTGTTGACGGCAACAA	1135
<i>cry3C5'</i>	5' CCTGAAAATTGCAGGCC	1074
<i>cry3uni3'</i>	5' AATTGATCAATAGAATC	
<i>cry4A5'</i>	5' CGAGGTGAATTTGCTCC	1032
<i>cry4A3'</i>	5' ATGGCTTGTTTCGCTACATC	
<i>cry4B5'</i>	5' GGTGCTTCCTATTCTTTGGC	2610
<i>cry4B3'</i>	5' TGACCAGGTCCCTTGATTAC	
<i>cry4B5'</i>	5' GGTGCTTCCTATTCTTTGGC	1393
<i>cry4B3'</i>	5' TGACCAGGTCCCTTGATTAC	
<i>cry4C5'</i>	5' ATGAATCCATATCAAAATAAG	2040
<i>cry4C3'</i>	5' AAGAACTTTGTTTAATTAAC	
<i>cry4D5'</i>	5' ATGGAGATAGTTCTTTAGAT	1932
<i>cry4D3'</i>	5' CTACTTTAGTAACGGATT	
<i>cry55'</i>	5' ATGAAACTAAAGAATCAA	2174
<i>cry53'</i>	5' GGTAGATTTTAATTCTAC	

은 *B. thuringiensis* K1과 벌통 양봉장 인근 토양에서 분리한 *B. thuringiensis* K2를 시험에 사용하였다. *B. thuringiensis* K1과 K2 균주는 살충력 검정을 위하여 GYS배지[(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0.2%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0.05%, CaCl<sub>2</sub>; 0.008%, MgSO<sub>4</sub>; 0.002%, MnSO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O; 0.005%, Yeast extract; 0.2%, Glucose; 0.1%]에 5일간 배양하였다. 배양되어 완전한 auto-lysis가 이루어진 배양액을 원심분리한 후 독성단백질만을 회수하여 살충력 검정에 이용하였으며 살충력 검정은 3반복으로 수행하였다. 꿀벌 부채명나방(*G. mellonella* L.)을 령기별로 유충 10마리씩 선발하여 1일간 섭식을 중단시키고 앞서 회수한 내독소단백질을 희석하여 살포한 공소비를 섭식시

키는 방법으로 살충력을 검정하였다. 살충력 검정시에 Bt 농도를 1µg/ml~100µg/ml 단계별로 설정하였으며 4×6cm의 공소비에 1ml의 내독소단백질을 살포하여 사용하였다.

### Plasmid DNA분리

*Bacillus thuringiensis* 균주의 Plasmid DNA분리를 위해 5ml LB배지에 접종하고, 30°C에서 12시간 동안 배양하였다. 배양액을 100ml SPY배지[(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0.2%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1.4%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0.6%, Sodium citrate; 0.1%, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O; 0.02%, Yeast extract; 0.1%, Glucose;

0.1%]에 다시 접종한 다음, 30°C에서 OD<sub>600</sub>=0.7 될 때까지 배양하였다. 이것을 Qiagen plasmid mini kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 분리하였다.

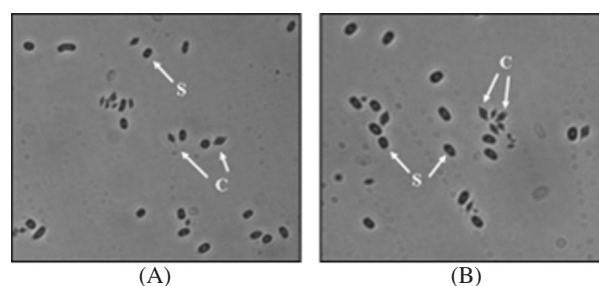
## PCR

PCR을 통해 *Bacillus thuringiensis* 균주가 가지는 내독소 단백질 유전자에 대한 유전자형을 조사하기 위해 현재까지 보고된 *cry* 유전자내의 보존영역을 특이적으로 증폭시키는 특이적인 PCR primer를 사용하였다. PCR은 Pre-Mix(Bioneer, Korea)에 *B. thuringiensis* plasmid DNA 시료와 각 primer 0.1~0.5μM을 넣은 다음 DNA Thermal Cycler(Bioneer, Korea)로 94°C에서 1분, 55°C에서 1분 그리고 72°C에서 1분씩 35회 반복조건을 설정하여 수행하였으며 그 primer의 염기서열은 Table 1(Kalman *et al.*, 1993; Chang *et al.*, 1998)과 같다.

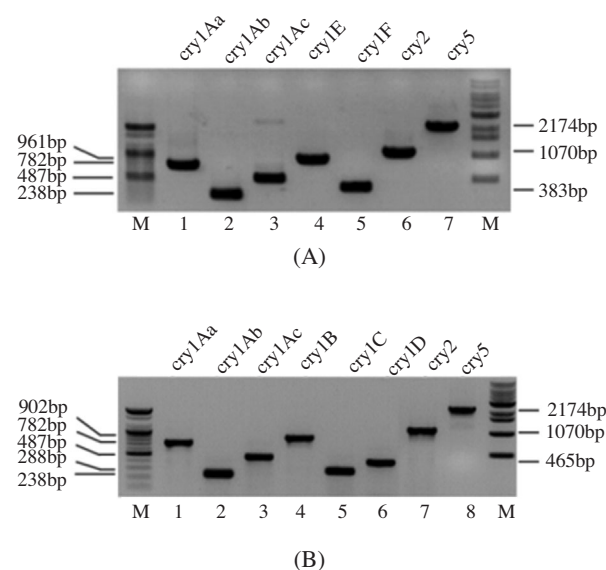
## 결과 및 고찰

### 선발 강독성 Bt K1과 K2의 생화학적 특성구명

꿀벌부채명나방(*Galleria mellonella* L.) 방제를 위한 독성과 살충 범위에서 가장 효과적인 *Bacillus thuringiensis* K1과 K2의 특성을 조사하기 위하여 *B. thuringiensis* K1과 K2의 내독소 단백질의 형태를 위상차현미경으로 관찰하였다(Fig. 2). *B. thuringiensis* K1과 K2는 각각 포자를 형성하고 crystal protein을 형성하여 기존에 알려져 있는 *B. thuringiensis* 균주의 특성인 포자형성 및 독성단백질을 발현하는 균주로 확인하였다. 또한, *B. thuringiensis* K1과 K2 균주의 분리된 plasmid DNA를 주형으로 증폭된 PCR결과로 *B. thuringiensis* K1은 일반적으로 나방류에 독성을 가지고 있는 (Herman and Whiteley, 1989) *B. thuringiensis* 균주가 보유하고 있는 *cry1*형의 단백질 유전자 영역의 발현을 확인하였으며, *B. thuringiensis* K1은 *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1E*, *cry1F*, *cry2* 그리고 *cry5*형의 단백질 유전자 영역의 발현이 확인되었다(Fig. 3A). 그리고 *B. thuringiensis* K2도 나방류에 살충력을 보이는 *cry1*형의 단백질 유전자 영역이 발현하는 것으로 확인하였는데, *B. thuringiensis* K1과는 상이하게 *cry1B*, *cry1C*와



**Fig. 2.** Micrographs of spore and crystal of *B. thuringiensis* K1 (A) and K2 (B). The spore crystal complex after autolysis of *B. thuringiensis* K1 (A) and K2 (B). The spore and crystal are represented as S and C, respectively.



**Fig. 3.** Detection of *cry* genes of *B. thuringiensis* K1 and K2 by PCR. The PCR products of *B. thuringiensis* K1 (*cry1Ab*, *cry1Aa*, *cry1Ac*, *cry1E*, *cry1F*, *cry2* and *cry5*) (A) and K2 (*cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1B*, *cry1C*, *cry1D*, *cry2* and *cry5*) (B) were analysed by 1% agarose gel electrophoresis. M indicates 100 bp (left) and 1 kb (right) DNA ladders.



*cry1D*가 발현되는 반면, *cry1E*와 *cry1F*는 발현이 되지 않는 것으로 확인되었다(Fig. 3B).

### Bt K1과 K2의 살충력

*Bacillus thuringiensis* K1과 K2의 꿀벌부채명나방 (*Galleria mellonella* L.) 유충을 50% 살충하는 농도 (LC<sub>50</sub>)를 측정된 결과 *B. thuringiensis* K1은 24.08μg/ml에서 효과를 보였으며, 반수치사시간(LT<sub>50</sub>)은 24시간이 소요되었다. 그리고 *B. thuringiensis* K2의 경우에는 반수치사농도(LC<sub>50</sub>)가 32.83μg/ml을 처리하였을 때



**Table 2.** Insecticidal activities of *B. thuringiensis* K1 and K2

Species	<i>Galleria mellonella</i>			
	LC <sub>50</sub> (µg/ml)	Live	Dead	LT <sub>50</sub> (hr)
<i>B. thuringiensis</i> K1	24.08 ≤			24
<i>B. thuringiensis</i> K2	32.83 ≤			36

효과를 보였으며, 반수치사시간(LT<sub>50</sub>)은 36시간으로 확인되었다. 특이한 점으로 *B. thuringiensis* K1의 경우에는 동일량의 내독소단백질을 처리하였으나 3일이 경과한 후에도 50%이하의 살충력을 보여서 반수치사농도(LC<sub>50</sub>)와 반수치사시간(LT<sub>50</sub>)을 측정할 수 없었으며, 5령기의 유충에 대한 살충효과가 우수하게 관찰되었으며, *B. thuringiensis* K2의 경우에는 2~5령기에서 K1과 유사하게 3일이 경과하여도 50%이하의 살충력을 보여서 반수치사농도(LC<sub>50</sub>)와 반수치사시간(LT<sub>50</sub>)을 측정할 수 없었다(Data not show). 따라서 K2의 경우에는 1령기의 유충에 특이적으로 우수한 살충력을 보였다. 이는 선발된 *B. thuringiensis* K1과 K2균주를 봉군에 적용할 경우 두 가지 균주를 혼합하여 사용한다면 폭넓은 유충령기에 대한 살충력을 보일 가능성이 있다. 따라서 본 연구에서는 국내에 보유 중이거나 분리된 *B. thuringiensis* K1과 K2 두 가지 균주를 대상으로 꿀벌부채명나방(*G. mellonella* L.) 유충에 대한 살충력을 검정한 결과, 토종벌(*A. cerana*)과 서양종 꿀벌(*A. mellifera*)에 직접적인 피해를 주는 꿀벌부채명나방(*G. mellonella* L.)을 적절히 제거할 수 있을 것으로 확인하였으며, 이러한 독성단백질을 벌통 내에서 꿀벌부채명나방(*G. mellonella* L.)이 먹을 수 있도록 소초광에 도포 및 혼합을 통한 소초광 제작 과정이 필요할 것으로 보인다. 특히 꿀벌부채명나방(*G. mellonella* L.)이 낭충봉아부패병 및 각종 질병을 매개하는 것으로 알려져 있는(Choi *et al.*, 2012) 토종벌(*A. cerana*)에 이들 균주를 적용하였을 때, 보다 효과적으로 봉군을 증식하고 질병발생 위험성을 낮출 수 있을 것으로 기대한다.

## 적 요

꿀벌부채명나방(*G. mellonella* L.)을 방제하기 위한 미생물 살충제의 개발을 위하여 Bt균주를 선발하고

각각의 균주가 가지고 있는 유전적 특성을 구명하고 독성단백질을 분리하였으며, 균주들의 유전적 특성을 구명하여 나방류 해충인 꿀벌부채명나방(*G. mellonella* L.)에 대한 살충력을 검정하였다. 그 결과 선발된 *B. thuringiensis* K1과 K2는 꿀벌부채명나방(*G. mellonella* L.) 1령기와 5령기에 우수한 살충력을 보이는 것을 확인하였다. 꿀벌부채명나방(*G. mellonella* L.) 유충의 반수치사농도(LC<sub>50</sub>)를 측정한 결과 *B. thuringiensis* K1은 24.08µg/ml, *B. thuringiensis* K2는 32.83µg/ml임을 확인하였는데, 특이한 점으로 K1은 5령기 유충, K2는 1령기 유충에 보다 우수한 살충효과를 보였다. 이러한 결과를 바탕으로, 선발된 균주는 각각 배양하여 혼합사용 하는 것이 넓은 발생단계의 꿀벌부채명나방(*G. mellonella* L.) 유충을 효과적으로 살충할 수 있을 것으로 보인다.

## 감사의 글

본 연구는 농림수산식품기술개발 연구과제(꿀벌 응애류 및 토종벌 해충 관리 기술 개발, 312027-03-1-HD010)에 의하여 수행되었음.

## 인용 문헌

- 우건석, 이종호, 조광선, 조영희. 1995. 꿀벌 해충(응애류 및 소충), 감염실태 및 방제대책에 관한 연구. 한국양봉학회지 10: 35 48.
- 이승욱, 이동운, 추호렬. 2007. 꿀벌부채명나방[*Galleria mellonella* (L.)] 사육을 위한 경제적 인공사료 개발. Korean J. Appl. Entomol. 46(3): 385 392.
- Amett, R. H. 1985. *Galleria mellonella*: In American Insects. published by van Nostrand Reinhold Company Inc. New York, USA. 570.
- Anne, V. H., Zachary, Y. H. and Walter, L. P. 2003. Effects of dietary transgenic Bt corn pollen on larvae of *Apis*

*mellifera* and *Galleria mellonella*. Journal of Apicultural Research. 42(4): 77 81.

- Burges H. D. and Bailey L. 1968. Control of the greater and lesser wax moths (*Galleria mellonella* and *Achroia grisella*) with *Bacillus thuringiensis*. J. Invertebr. Pathol. 11: 184 195.
- Burges, H. D. 1970. Stability of *Bacillus thuringiensis* in beeswax and bee comb. Proc. 4th Int. CoNoq. Iysect Pathol. Maryland. 214 218.
- Calvert, III P. 1982. Certan™, a bacterial insecticide for control of wax moth (a literature review). American Bee J. 122: 200 202.
- Caron, D. M. 1992. Wax moth. American Bee J. 132: 647 649.
- Chang, J. H., Roh, J. Y., Je, Y. H., Park, H. W., Jin, B. R., Woo, S. D. and Kang, S. K. 1998. Isolation of a strain of *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* HD 1 encoding d endotoxin CryIE. Lett Appl Microbiol. 26: 387 390.
- Charriere, J. D. and Imdorf, A. 1999. Protection of honey combs from wax moth damage. American Bee J. 139: 627 630.
- Choi, Y. S., Byeon, G. H., Ratna, Y. and Lee, M. L. 2012. Transmission of Bee Virus in *Apis cerana* Hives by *Brachymeria ornaticipes* and *Galleria mellonella*. Korean J. Apiculture. 27(2): 123 127.
- Hachiro, S. and Knox, D. 2000. Diagnosis of Honey Bee Diseases. USDA, Agricultural Handbook. 690: 61.
- Herman, H. and Whiteley, H. R. 1989. Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiological Reviews. 53(2): 242 255.
- Hood, W. M., Horton P. M. and McCreadie, J. W. 2003. Field evaluation of the red imported fire ant (Hymenoptera: Formicidae) for the control of the wax moths (Lepidoptera: Pyralidae) in stored honey bee comb. J. Agric. Urban Entomol. 20: 93 103.
- Kalman, S., Kiehne, K. L., Libs, J. L. and Yamamoto, T. 1993. Cloning of a novel cryIC type gene from a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae*. Applied and environmental microbiology. 59(4): 1131 1137.
- Liu, Y. B., Tabashnik, B. E., Moar W. J. and Smith, R. A. 1998. Synergism between *Bacillus thuringiensis* spores and toxins against resistant and susceptible Diamondback moths (*Plutella xylostella*). Appl. Environ. Microbiol. 64: 1385 1389.
- Li, R. S., Jarrett, P. and Burges, H. D. 1987. Importance of spores, crystals, and delta endotoxins in the pathogenicity of different varieties of *Bacillus thuringiensis* in *Galleria mellonella* and *Pieris brassicae*. J. Invertebrate Pathol. 50: 277 284.
- Tabashnik, B. E., Finson, N., Johnson M. W. and Heckel, D. G. 1994. Crossresistance to *Bacillus thuringiensis* toxin CryIF in the Diamondback moth (*Plutella xylostella*). Appl. Environ. Microbiol. 60: 4627 4629.