

Bacillus thuringiensis 살충제 개발에 관한 연구

— *B. thuringiensis* serovar *kurstaki* 살충제와
내독소의 치사성과 안전성 연구 —

이 형 환

전국대학교 생물학과 유전공학연구소
(1986년 8월 2일 수리)

Studies on the Development of the *Bacillus thuringiensis*

— Lethality and safety tests of the endotoxin and the pesticide
of *B. thuringiensis* serovar *kurstaki* —

Hyung Hoan Lee

Institute for Genetic Engineering and Department of Biology,
Kon Kuk University, Seoul 133, Korea
(Received August 2, 1986)

The lethality to *Pieris rapae* larvae and the safety tests to mice of the endotoxin crystals and the pesticide of *B. thuringiensis* serovar *kurstaki* were carried out. The LD50 of the endotoxin (3.9×10^9 spores/ml) appeared to be $1 \mu\text{g}$ and that of the pesticide (2.6×10^9 spores/ml) was about $9 \mu\text{g}$. When the endotoxin solution and the pesticide were injected to the mice's intraperitoneal cavities, 10 to 20% of the mice were dead. Also in the case of intracerebral injection 20% of the mice were dead at the doses of 7.8×10^3 spores and 100% of the mice were dead at the concentration of 7.8×10^8 spores, but the mice in the oral, subcutaneous and inhalation treatment groups were safe and healthy. When the pesticide applied to the cabbage field for *raepi* larvae, 52 to 65% of the larvae in the field were killed in 4 days postapplication.

*Bacillus thuringiensis*는 곤충이외의 동물과 식물에는 전혀 해가 없는 무공해 살충제 재원이다. *B. thuringiensis*는 그람염색에 양성반응을 나타내는 간균이며, 운동성이 있고, 영양세포는 환경조건이 나쁠 때에는 아포를 형성하여 생존을 하고, 특히 아포를 형성하면서 세포 내에 곤충에 독성을 나타내는 내독소(delta-endotoxin)를 생산한다^(1,2,3,4).

B. thuringiensis serovar *kurstaki*는 이중 피라미드 형태의 내독소(약 $1.7 \mu\text{m} \times 1.0 \mu\text{m}$)를 만들며, 세포마다 한개 내지 두개씩 존재한다^(1,2,4). 이 내독소는 곤충의 인시류 및 쌍시류와 진립드류등의 유충

에 살상효과를 나타내기 때문에 생물학적 방제제로 이용이 높은 것이 보고되어 있다⁽⁵⁾.

본 연구에서는 *B. thuringiensis* var *kurstaki*를 이용하여 본 연구소에서 제조한 살충제의 살충력과 안전성등을 조사한 것을 보고한다.

재료 및 방법

균주

본 연구실에 보관중인 *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* H3a3b K-9 (BTK)을 본 실험에

사용하였다.

배지

TPB 배지와 M-3와 M-4 발효 배지를 이용하여 BTK 균을 배양하여 실험에 이용했다(Lee 등⁽⁵⁾).

살충제

BTK 균을 이용하여 제조한 낙원 1호 살충제를 사용했다.

BTK내독소의 분리

BTK를 TPB와 M-3 또는 M-4 배지에서 72시간 동안 28°C에서 배양후에 Lee 등⁽⁶⁾의 방법을 이용하여 분리했다.

내독소와 살충제의 살충력 검사

페트리 접시(9×2cm) 10개에 배추잎을 넣고 여기에 분리한 내독소 결정체 용액(3.9×10^9 아포/ml) 또는 제조된 살충제 용액을 1ml씩을 각각 고루 퍼지게 살포한 후에 3령이 된 배추흰나비 유충을 페트리 접시당 10마리씩 넣고 사육하면서 치사율을 일차로 조사했다.

정제된 내독소결정체와 BTK 살충제의 LD₅₀을 보기 위하여 다음과 같이 3령의 배추흰나비 유충을 이용하여 실시했다. 1.0g의 BTK 살충제 분말을 10ml의 탈이온수에 넣고 유리구슬(직경 6mm)과 같이 진탕을 10분간 하여 균일하게 용액을 현탁시킨 다음에 시험관(17×175mm)에 9.0ml의 탈이온수를 넣고 여기에 1ml의 현탁액을 첨가하여 진탕을 약 5초간하여 시험용 원액으로 사용했다. 페트리접시(직경 14cm×3cm)의 바닥에 생리식염수를 적신 여과지를 깔고 인공사료 먹이(Lee 등⁽⁸⁾)를 2g씩 넣어주고, 먹이에 BTK 살충제 시험용 원액을 아래와 같이 일정량씩 떨어뜨린 후에 25마리의 3령 배추흰나비유충을 사육하였다. 살충제 처리량은 2,000, 1,200, 800, 400, 200, 150, 120, 90, 60, 40, 10, 1, 0.1μl이었으며, 비처리군은 탈이온수만 1.0ml를 주었다. 내독소 결정체의 살충력 검사는 연속 10분의 1로 희석하여 실시했다.

내독소와 살충제의 안전성 검사

생쥐(mouse, ICR 혈통)를 암수구별없이 체중이 10-12g이 되는 것을 사용했고, 실험기간은 4주간이었다. 각 처리군 마다 실온에서 10마리씩을 플라스틱 사육상자(28×21×20cm)에서 사육하면서 내독소 또는 살충제인 BTK 배양액을 처리한 후에 안전성을 조사했다.

정제된 내독소와 48시간 배양된 살충제 BTK 배양액(2.6×10^4 과 2.6×10^9 아포/ml)을 멸균된 1ml 주사기를 이용하여 쥐의 복강과 피하에 0.5ml씩 주사를 하고, 뇌에는 0.05ml씩 주사를 했고, 또한 경구 섭취와 비강 점종을 0.5ml씩을 했다. 점종은

매일 한번씩 6일간 실시했고 그후 3주간 생쥐의 치사를 조사했다.

살충제의 야외살포 실험

BTK 낙원 살충제용액(아포수는 약 8×10^9 /g) 100ml를 희석용액 900ml에 현탁한 후에 전착제를 2ml 첨가하여 농축 살충제로 만들었다. 이것을 물로 희석하여 분무기를 이용하여 살포했다. 살포한 후에 배추밭에서 배추흰나비 유충(*Pieris rapae*)의 치사를 관찰했다. 10.56m²(4.8×2.2m) 크기의 밭을 3개 준비하여 조선배추(*Brassica campestris*)와 양배(*Brassica oleracea*)를 밭에 반반씩 심은 후에 두 밭은 살충제 살포밭으로 하고, 한 밭은 비살포밭으로 하여, 대조를 만들어 관찰했다. 살포한 후에 4, 8, 12일이 되었을 때, 양쪽 밭에서, 죽은 배추흰나비 유충의 수를 조사했다. 조사기간은 1985년 9월과 1986년 5월 중이었다.

배추흰나비 유충의 실험실 배양

배추흰나비 유충배지는 인공배지를 사용하였으며, 조성과 만드는 과정은 Lee 등⁽⁸⁾의 방법을 따랐다.

결과 및 고찰

내독소와 BTK 낙원살충제의 살충력

*B. thuringiensis*을 배양한후에 아포수를 측정하고, endotoxin을 분리하였으며, 분리할 때 아포의 수는 ml당 3.9×10^9 개였다. 살충력에 대한 예비 실험을 위하여 내독소를 10개의 페트리접시에 들어 있는 배추 잎에 1ml을 고르게 바른 다음에 배추흰나비 유충을 10마리씩 넣어 준 결과 24시간 내에 모두 치사(100%)시킨것을 관찰했다. 또한 살충제 *B. thuringiensis* (2.6×10^9 /ml)의 예비 살충력 실험도 동일한 방법으로 실시한 결과 24시간 내에 모두 치사(100%) 시키었다. 내독소와 BTK 살충제가 다른 인시류에 살충력을 나타내는 것은 이미 보고된 결과와 일치함을 확인한 것이다^(2,3,7). BTK 내독소와 살충제의 연속적인 희석방법을 이용하여 LD₅₀을 구한 결과 BTK 내독소의 LD₅₀은 1μg이었으며, BTK 살충제의 LD₅₀은 9μg으로 나타나(Table 1), 정제된 내독소 결정체의 치사율이 BTK 살충제보다

Table 1. Lethality of the endotoxin crystals and a microbial pesticide, *B. thuringiensis* var. *kurstaki* to *Pieris rapae* larvae.

Source of toxin	No. of spore/ml	LD ₅₀	Observed hours
endotoxin	3.9×10^9	1 μg	24
BTK pesticide	2.6×10^9	9 μg	24

Table 2. Safety tests of the purified endotoxin of *B. thuringiensis* serovar *kurstaki* to mice.

Treatments	endotoxin doses (ml/day)	Treated days	No. of mouse treated	No. of survivor
per os	0.5	6	10	9
intraperitoneal injection	0.5	6	10	8
subcutaneous injection	0.5	6	10	10
inhalation	0.5	6	10	10
intracerebral injection	0.05	6	10	8
control (dH ₂ O)	0	6	10	9

효능이 높은 것을 알 수 있었다.

내독소와 살충제의 안전성 검사

정제된 내독소와 살충제 *B. thuringiensis*의 동물에 대한 안전성 검사를 한 결과는 Table 2, 3과 4에 제시 됐다. 생쥐에 5 가지 방법으로 6 일간 내독소를 접종하고 3 주 후에 조사한 결과 구강 감염시킨 실험군에서는 한 마리가 치사되었고, 9 마리는 건강하게 생존을 했다. 복강주사군과 뇌주사군은 4 주간 후에 2 마리 씩이 치사되었고, 피하주사 실험군과 비강처리된군에서는 10마리 모두 생존했고 비처리대조군에서는 1 마리가 치사됐고, 9 마리는 건강히 생존을 하였다. 뇌주사 처리군에서 생존한 생쥐의 대부분이 정상적인 활동을 못했다 (Table 2).

살충제 *B. thuringiensis* 을 처리한 실험군의 결과

Table 3. Safety tests of a microbial pesticide, *B. thuringiensis* serovar *kurstaki*(2.6×10^4 spores/ml) to mice.

Trwtament	*Dose/mouse	Treated days	No. of mouse treated	No. of survivor
per os	7.8×10^4	6	10	10
intraperitoneal injection	7.8×10^4	6	10	10
inhalation	7.8×10^4	6	10	10
subcutaneous injection	7.8×10^4	6	10	10
intracerebral injection	7.8×10^3	6	10	8
control	0	6	10	10

*dose:number of the endotoxin crystal-spores per mouse per 6 days

Table 4. Safety tests of a mictobial pesticide, *B. thuringiensis* var. *kurstaki*(2.6×10^9 spore/ml) to mice

Treatments	*Dose/mouse	Days treated	No. of mouse treated	No. of survivor
per os	7.8×10^9	6	10	10
intraperitoneal injection	7.8×10^9	6	10	8
inhalation	7.8×10^9	6	10	10
subcutaneous injection	7.8×10^9	6	10	10
intracerebral injection	7.8×10^8	6	10	0
control	0	6	10	10

*dose:number of the endotoxin crystal-spores per mouse per 6 days.

는 Table 3 과 4 에서 제시됐다. 생쥐당 7.8×10^4 아포가 든 살충균을 구강내로 주입한 경우는 10마리 모두 건강히 생존을 했으며, 복강내 주입의 경우와 비강주입과 피하주사 실험군에서도 모두 생존을 했으며, 뇌에 주사한 실험군은 2 주되었을 때 2 마리가 치사됐다. 비처리 대조군은 모두 생존을 했다 (Table 3). 또한 살충제 *B. thuringiensis*를 고농도 (7.8×10^9 아포/ml)로 생쥐에 처리한 결과는 Table 4 에 제시됐는데, 복강주사군에서 2 마리가, 뇌하주사에서 모두가 치사됐으나, 구강감염, 비강감염, 피하주사와 비처리 대조 실험군에서는 모두 생존을 했었다.

살충제의 야외 살포 실험

배추밭 (10.56 m²)에 양배추와 조선배추를 심은 후에 40일이 되었을 때 *B. thuringiensis* var *kurstaki* 살충제를 두 밭에 아포수가 $8 \times 10^{10}/m^2$ 과 $8 \times 10^5/m^2$ 이 되게 각각 살포 했을 때의 살충율을 조사 했다. $8 \times 10^{10}/m^2$ 를 살포한 밭은 배추흰나비 유충 전체중 치사된 유충의 비율은 4 일 째에는 65%를, 8 일 째는 40%를, 12일 째는 50%를 나타냈고, $8 \times 10^5/m^2$ 을 살포한 밭에서는 살포후 4 일 째에는 52%를, 8 일 째는 29%를, 12일 째에는 30%를 나타내어 살포량이 많을수록 치사율이 높게 나타났다.

배추흰나비 유충의 실험실 배양

배추흰나비 유충을 실험실내에서 배양하기 위하여 인공 배지를 방법에서 설명한 바와 같이 제조하였다. 주요한 배지 조성은 배추잎 분말, 광물질 8 종과 비타민 9 종의 혼합으로 만든 고영양가 인공 배지이다. 이 배지는 Gel 상으로, 1 cm² 정도로 절

Table 5. Application effect of a microbial pesticide, *B. thuringiensis* serovar *kurstaki* when applied to cabbage field for *Pieris raeppi* larvae.

Pesticide *dose/ml ²	Cabbage field(m ²)	Mean % daily mortality after spray		
		4	8	12 days postapplication
8×10^{10}	10.56	65	40	50
8×10^8	10.56	52	29	30
0	10.56	0	0	0

*dose: number of the endotoxin crystal-spores per m².

단하여 페트리접시에 넣고 여기에 배추흰나비 유충을 집어 넣고 사육을 한 결과 배추잎만 넣고 사육한 유충보다 성장이 빠르고 변태기도 빠르게 나타났고, 용화하여 성체인 나비까지 나와 성장이 되었다. 배추흰나비 유충에 대한 독성이나 기타 분석실험의 이용에 유용하리라 생각이 된다.

본 연구에서는 살충력에 대한 LD₅₀을 배추흰나비 유충만을 대상으로 연구하였으며 다른 곤충의 유충에 대하여 계속적인 연구가 필요하다. 또한 BTK의 안전성에 대하여는 치사성에만 중점을 두었으나 생체내의 각기관에 미치는 영향의 연구도 앞으로 실행되어야 할 것으로 생각된다.

결 과

B. thuringiensis serovar *kurstaki* 3a3b의 내독소와 살충제에 대한 살충력과 안전성에 대하여 조사한 결과는 다음과 같다.

1. 내독소 (3.9×10^9 아포/ml)의 LD₅₀은 1 μg 이었고, 살충제 (2.6×10^9 아포/ml)는 9 μg 이었다.
2. 생쥐에 대한 내독소의 안전성검사에서는 구강주입, 비강주입과 피하주사처리군에서는 안전성

이 높았고, 복강과 뇌속에 직접주사 처리한 군에서는 20%의 치사율을 보였다.

3. 살충제인 BTK 균을 생쥐에 처리한 실험에서는 저농도 (7.8×10^4 아포/생쥐)에서는 안전성을 보였고, 고농도 (7.8×10^9 아포/생쥐) 처리에서도 비강주입, 구강주입과 피하주사처리군에서는 안전했고, 복강과 뇌속에 직접주사한 경우는 생쥐가 일부 죽었다.

4. BTK 살충제를 배추밭에 살포한 후 4 일째의 배추흰나비유충의 치사율은 52-65%였다.

감사의 말

본 연구는 산학재단 학술연구비의 지원으로 이루어진 연구의 일부이며, 연구지원에 감사를 드립니다.

참고문헌

1. Heimpel, A.M.: *Ann. Rev. Entomol.*, **12**, 287-322 (1967).
2. Bulla, L.A. Jr., D.B. Bechtel, K.J. Krammer, Y.I. Shethna, A. I. Aronson and P.C. Fritz-James: *CRC Crit. Rev. Microbiol.*, **8**, 147-203 (1980).
3. Kurstak, E.: *Microbial and Viral Pesticide*, Marcel Dekker, Inc., N.Y. (1982).
4. Lee, H.H., K.H. Yoo and S.Y. Kim: *HG. J. Gen. Eng.*, **1**, 29-35 (1984).
5. Lee, H.H., B.Y. Hyun and C.K. Oh: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **14**, 259-264 (1986).
6. Lee, H.H., T.S. Kang and K.H. Yoo: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **13**, 315-319 (1985).
7. Oh, S.S. and H.H. Lee: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **13**, 51-57 (1985).
8. Lee, H.H., K.R. Lee, E.S. Min, M.O. Yum and H.K. Chung: *Kor. J. Virol.*, **10**, 27-32 (1980).