

새로운 *Bacillus thuringiensis* NT0423 균주의 제제화

김호산 · 노종열 · 이대원 · 장진희 · 제연호 · 우수동 · 김주경¹ · 유용만¹ · 강석권*
서울대학교 농업생명과학대학 응용생물화학부, ¹(주)경농 경주연구소

Formulation of a New *Bacillus thuringiensis* Strain NT0423. Kim, Ho San, Jong Yul Roh, Dae Weon Lee, Jin Hee Chang, Yeon Ho Je, Soo Dong Woo, Ju Kyong Kim¹, Yong Man Yu¹, and Seok Kwon Kang*. Division of Applied Biology and Chemistry, College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea, ¹Kyong-ju Research Institute, Kyong-nong Corporation, Kyong-ju, Korea - New microbial-control agents were prepared with *B. thuringiensis* strain NT0423 having unique properties which are different with other *B. thuringiensis* strains belonging to serotype 7 [Kor. J. Appl. Entomol. 32: 426-432.]. Three *B. thuringiensis* formulations, designated as BioBact 10%, 20% and 40%, were made with various combinations of adjuvants. These formulations showed good physical properties in wettability, suspensibility, particle size and adherence. In addition, the result of SDS-PAGE analysis indicated that δ -endotoxins remain stably in all formulations. Among the tested formulations, two wettable powder formulations, BioBact 20% and 40%, comprising 20% and 40% of *B. thuringiensis* technical powder showed the effective control against diamondback moth larvae (*Plutella xylostella*) in laboratory and field tests. Especially, when compared with commercial *B. thuringiensis* formulations (A and B commercial formulations) in field evaluation, BioBact 20% and 40% formulations showed equal activity up to 80% lethality and a good persistence effect which remain on leaves at least 7 days.

Key words: *Bacillus thuringiensis* NT0423, formulation, *Plutella xylostella*, BioBact, field evaluation

Bacillus thuringiensis(이하 Bt로 약칭)는 그람 양성기의 토양 세균으로 곤충에 독성을 보이는 내독소 단백질을 생산하며[6, 7], 이 내독소 단백질은 목적 해충외에 독성이 없기 때문에, 오래 전부터 다양한 연구 개발이 이루어져, 현재 세계의 많은 국가들이 농업해충 및 위생해충의 방제를 위한 수십종의 미생물 살충제를 개발하여 상품화하고 있다[14, 15]. Bt를 이용한 미생물 살충제는 미국에서 1961년 나비목 해충방제를 위해 잠정적으로 시판되기 시작한 이래, 파리목 및 딱정벌레목 해충에 이르기까지 다양하게 생산되었으며, 최근에는 미생물 살충제의 세계적 판매가 Bt에 집중되고 세계시장의 동향은 매년 지속적으로 증가하고 있다[9, 10, 22]. 이러한 추세를 볼 때 2,000년도에는 전체 농약시장의 상당부분을 점유하게 될 것으로 예견되어 국내에서도 생물농약의 필요성이 증대되고 있다. 현재 국내에서도 Bt 제제를 수입하여 사용하고 있으며, 환경보호의 차원에서 그 수요가 점점 확대될 것으로 예상되어 보다 더 활발한 Bt 제제의 개발이 요구되고 있다[11-13].

이에 본 연구에서는 국내 양잠농가의 잠실에서 새롭게 분리된 *Bacillus thuringiensis*(Bt) NT0423 균주를 이용하여 세 종류의 새로운 미생물 농약을 수화제형으로 제

조하고 실내와 야외 포장시험을 통하여 기존의 Bt 제제와 그 살충효과를 비교, 조사하여 미생물 살충제로의 유용성을 확인하였다.

재료 및 방법

*Bacillus thuringiensis*의 배양

Bt의 배양을 위해 영양평판배지(Beef extract 0.3%, Bacto-peptone 0.5%, pH 7.2), 대두박과 밀기울을 0:5에서 5:0까지 비율로 전체부피의 4%가 되도록 배지(SW 배지)를 만든후 전체부피가 1l가 되게 하였다. 공기균주인 Bt NT0423 균주[12]를 영양평판배지에 접종하여 30°C에서 12시간 이상 배양한 후, 생성된 단일 콜로니를 25 ml SW32 배지(대두박과 밀기울이 3:2의 비율로 포함된 배지)가 들어있는 500 ml 플라스크에 접종하였고, 30°C에서 240 rpm의 속도로 진탕배양하여 3l의 SW32 배지가 들어있는 5l 발효기(Braun Co., USA)에 접종하였고, 0.2% Antifoam 289(Sigma Co., USA), 1 vvm, 30% pO₂, 30°C, 200 rpm의 조건으로 진탕배양하여 시험용 시료로 사용하였다.

*Corresponding author
Tel. 82-331-290-2481, Fax. 82-331-296-0926
E-mail: kskipl@plaza.snu.ac.kr

Bt 살충제 제제용 부자재

Bt 배양액을 원심분리기(HIMAC CR20B2, Japan)를

Table 1. Three different formulations of wettable powders with the *B. thuringiensis* strain NT0423

Component	Formulation Types		
	I	II	III
<i>B. thuringiensis</i> NT0423	10%	10%	10%
Surface active agent (A)	7%	7%	7%
Surface active agent (B)	-	-	3%
White carbon	15%	10%	5%
Sucrose	5%	5%	5%
Kaoline	63%	68%	80%

(A) NK-NX 150: Polyoxyethylene alkyl aryl sulfate.
 (B) NK-PX: 100: Sodium naphthalene sulfonate formaldehyde condensate.

Table 2. Formulation of BioBact 20% and 40% Wettable Powders

Components	Composition (%)	
	20% W.P.*	40% W.P.
<i>B. thuringiensis</i> NT0423	20	40
Surface active agent (A)	7	8
Surface active agent (B)	2	2
Stabilizer (C)	7.5	15
Stabilizer (D)	7.5	15
Carrier	56	30
Total	100	100

(A) NK-NX250L: Polyoxyethylene alkyl aryl sulfate, Modified aromatic sulfonate.
 (B) NK-EPB100: Sodium dialkyl sulfosuccinate, sodium benzoate.
 (C) White carbon. (D) Tioxlex-25. *W.P.: Wettable powders.

이용하여 4℃, 4,000×g에서 20분간 원심분리하여 균체를 회수하였고, 각각의 첨가제를 Table 1과 2에서 제시한 양만큼 첨가하고, 공기압축기(6 kg/cm²)로 입자를 고르게 분쇄하여 실험에 이용하였다. 사용된 제제용 첨가제는 다음과 같다. 계면활성제는 polyoxyethylene alkyl aryl sulfate계, sodium alkyl sulfate, sodium naphthalene sulfonate, polyoxyethylene alkyl aryl sulfate, modified aromatic sulfonate, polyoxyethylene alkyl aryl ether, modified lignosulfonate, polyoxyethylene alkyl sulfate, sodium naphthalene sulfonate formaldehyde condensate, sodium salt of condensed naphthalene sulfonic acid, sodium dialkyl sulfosuccinate, sodium benzoate를 사용하였다. 보조첨가제는 white carbon과 tioxlex-25를, 증량제는 kaoline, 규조토, dialite와 talc을, 영양원으로는 sucrose를 사용하였다.

Bt 살충제의 제형화

Bt NT0423을 제형화하기 위한 시제품 첨가제의 첨가량별 제조처방은 Table 1과 2에서 제시하였다. 원제의 비율, 흡착제, 영양원 및 증량제를 첨가하여 세종류의 제

형으로 나누었으며, 수화성을 고려한 제형으로 Biobact 20%와 Biobact 40%으로 구분하였다(Table 1, 2).

Bt의 생균수와 내생포자수 측정

영양배지에서 자란 Bt NT0423 균주의 성장효율과 성장시기 분석을 위한 내생포자 형성도는 NT0423 균주의 배양액 일정량을 6시간에서 24시간 간격으로 수거하여 25℃에서 10,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후, 침전물을 0.1% Triton-X 100이 포함된 멸균증류수에 현탁하고 다시 20분간 원심분리한 침전물을 증류수에 재현탁하였다. 시료를 80℃에서 10분간 열처리하여 세포를 사멸시킨 다음, 포자를 10⁻¹의 농도로 연속적으로 희석하여 100 μl를 도말한 후 영양평판배지를 이용하여 30℃ 항온기에서 24시간 동안 배양한 후, 포자수를 측정하였다. 또한 전체 생균수는 수거된 배양액에 열처리를 하지 않고 영양평판배지에서 생성된 콜로니수로 계산되어졌다[1, 19].

Bt 제제의 물리성 및 부착성

Bt NT0423 균주를 이용하여 제제화한 제품의 물리성은 국립농업자재검사소 고시 공정검사방법[22]에 준하여 수화성, 현수성 및 입도를 조사하였다. 시제품의 부착성은 McGuire와 Shasha의 방법[17]을 변형하여 실시하였다. 슬라이드 유리를 증류수로 적시고, A 제품(*Bt* subsp. *kurstaki* 제제), B 제품(*Bt* subsp. *aizawai* 제제), 본 실험에서 제조한 BioBact 그리고 Bt 배양액 각 0.5 g을 처리하여 건조기에서 건조후, 슬라이드 유리를 경사지게 놓고 2분 동안 40 ml의 물을 흘린 다음, 이것을 1일간 방치하였다. 이 과정을 2회 반복실시하여 무게감소비로 부착성을 조사하였다.

저장온도 및 기간에 따른 Bt 살충제제의 농도변화

본 연구에서 제조한 Bt NT0423 원제가 포함된 비율에 따른 Biobact 10%, 20%, 40%와 대조구으로 사용된 B 제품 약 5g씩을 각 튜브에 넣고 빛이 들어가지 않게 밀봉한 다음, 4℃, 20℃, 30℃로 조절된 배양기내에 방치하면서 2, 4, 8주 후에 포자수의 변화를 조사하였다.

살충제제의 약효검정

실내시험 잎 침지방법(leaf dipping method)에 따라 Biobact 10%, 20%, 40% 수화제를 50, 100, 250, 1,000, 2,000 및 4,000배로 희석한 후 배추잎을 충분히 침지시키고 음지에서 건조한 다음, 생물검정 용기에 넣어 배추좀나방(*Plutella xylostella*) 3령 유충을 처리구당 10마리씩 접종하여 72시간 동안 죽은 곤충수를 조사하였다. 각 농도당 3반복으로 실험을 수행하였다. 대조구로는 시판 중인 A, B 제품을 동일농도로 처리하였으며, 또한 Bt NT0423 균주와 같은 농도의 배양액을 ml당 10⁶, 10⁷,

10⁸ CFU(colony forming unit)로 처리하여 약효를 비교하였다. 무처리구로는 희석액만 사용하였다.

야외 포장시험 온실에서 포트에 키운 배추를 야외로 옮겨 심은 후, 40일 정도 생육시킨 배추에 100배와 1,000배로 희석시킨 시료 각 100 ml씩을 배추 전체에 골고루 살포하였다. 1일간 방치한 후, 12개의 배추가 포함된 각 처리구에 3령의 배추좀나방 유충 10마리씩을 접종한 다음, 2일간 사충율을 조사하고 독성의 지속성 효과를 알아보기 위해 3일째와 7일째에 무작위로 각 처리구에서 잎을 채취하여 배추좀나방 유충 10마리씩을 처리한 후, 72시간 동안 사충률을 조사하였다. 대조구로는 시판중인 A, B 제품을 1,000배 희석하여 처리하였고 화학살충제는 권장사용량인 1,000배 희석하여 살포하였고 또한 Bt NT0423 균주의 배양액을 ml당 10⁷, 10⁸ CFU로 처리하여 약효를 비교하였다. 무처리구로는 희석액만 사용하였다.

살충제제의 역가검정 역가검정을 위한 공시약제는 세 종의 BioBact 10%, 20%, 40%를 사용하였고, 대조구로는 B 제품을 사용하였다. 먼저 Triton X-100을 2,000 ppm으로 희석한 용액을 준비한 후, 각각의 제제 0.1 g을 정량하여 희석액 100 ml에 넣어 희석한 다음, 다양한 농도로 희석액을 만들었다. 무처리구는 희석액만 사용하였다. 이렇게 준비된 약액을 처리하기 위하여 배추잎을 지름 9 cm 크기로 둥글게 잘라 준비된 농도별 희석액이 포함된 처리용기에 30초간 침지시킨 후, 신문지 위에서 음지에서 건조하였다. 건조된 배추잎은 새로운 생물검정 용기에 넣어준 후 배추좀나방 3령충 10마리씩을 각 농도당 5회 반복하여 처리하였다. 약제처리후, 72시간만에 죽은 곤충수를 조사하였고, probit analysis 프로그램을 사용하여[5] LC₅₀ 수치를 계산하고 공시살충제의 역가를 산출하였다[18].

결 과

제제화한 Bt 살충제와 그 특성

Bacillus thuringiensis(Bt) NT0423 원제가 10% 함유된 수화제의 개발을 위해 ml당 5×10⁹-1×10¹⁰의 포자가 포함된 Bt 배양액을 계면활성제, 흡착제, 영양원 및 증량제를 배합으로 하여 시제품을 만든 후, 다양한 물리적 성질을 조사하여 가장 효율적인 시제품 I, II, III를 선발하였다(Table 1). 시제품 I은 흡착제(white carbon)가 10%이상 들어가는 단점과 수화성 및 현수성과 같은 물성이 떨어졌고, 시제품 II는 수화성이 1분 40초나 소요되어 불량했다. 그러나 시제품 III의 경우, 흡착제의 양이 흡착에 충분했고, 수화성은 11초, 입도도 11 μm가 99%, 44 μm 이상이 1% 수준을 보여 가장 이상적인 제품으로 선발하고 BioBact 10%로 명명하였다. BioBact 10% 제제의 pH는 20℃에서 5.9로 제조하여 Bt 원제에 대한 영

Table 3. Physical properties of three formulations

Formulation	Wettability	Suspensibility	Particle size ^a
BioBact 10%	+++	+++	Pass
BioBact 20%	+++	+++	Pass
BioBact 40%	+++	+++	Pass

Symbols: (+++), Excellent; (++) , Good; and (+), Acceptable. ^aParticle size was determined by sieve test (325 mesh). Pass means the acceptability of spraying the formulation.

향을 최소화하였다. 그리고 BioBact 10% 수화제에 기초하여 Bt 원제가 보다 많이 첨가된 BioBact 20%와 40% 수화제는 계면활성제가 10%를 넘지 않게 처방하고, 안정제인 white carbon은 BioBact 40% 수화제에서는 원제의 양이 많이 첨가되었으므로 BioBact 20% 수화제보다 2배의 함량을 갖게 만들었다(Table 2). White carbon 함량의 증가에 따라 상대적으로 증량제는 BioBact 40% 수화제에서 약 1/2이 줄어 들었다.

제조된 세 종의 수화제에 대한 희석 살포시 수화성, 현수성, 입도와 같은 물리적 성질을 조사한 결과, 모두 우수한 물성을 보유하고 있었다(Table 3). 그리고 세 종의 수화제와 Bt 배양액 자체, Bt subsp. *kurstaki*가 포함된 A 회사 제품과 subsp. *aizawai*가 포함된 B 회사 제품을 대상으로 부착성을 비교하였다(Fig. 1). 그 결과, BioBact 10%, 20% 및 40%에서는 세 번의 수세에서도 35% 이상이 남아 있어 매우 우수하였고, A 제품은 22%, B 제품은 8% 이하로 부착성이 떨어졌다. 특이한 것은 Bt 배양액 자체를 처리했을 때도 35% 이상의 높은 부착성을 보였다. 또한 저장 안정성과 기간에 따른 Bt 제제의 농도 변화를 조사한 결과, 모든 제제가 4℃ 및 20℃의 저장조건에서는 안정적이었으나, 30℃ 조건에서는 8주간 저장하였을 때, Bt의 농도가 감소되는 양상을 보여 높은 온도에서는 Bt의 활성이 영향을 받음을 보여 주었고, BioBact

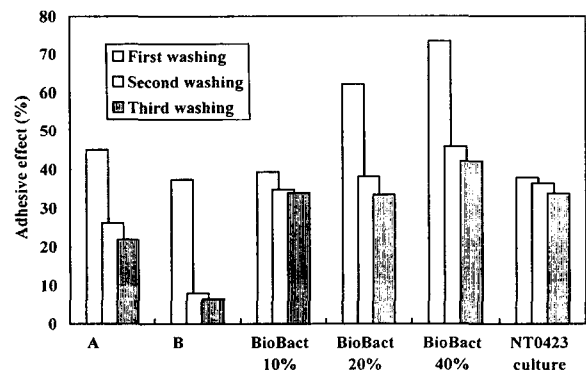


Fig. 1. Comparison in adherence to slide glass depending on formulations of *B. thuringiensis* strain NT0423 and commercial *B. thuringiensis* products. A (Bt subsp. *kurstaki* type formulation), and B(Bt subsp. *aizawai* type formulation).

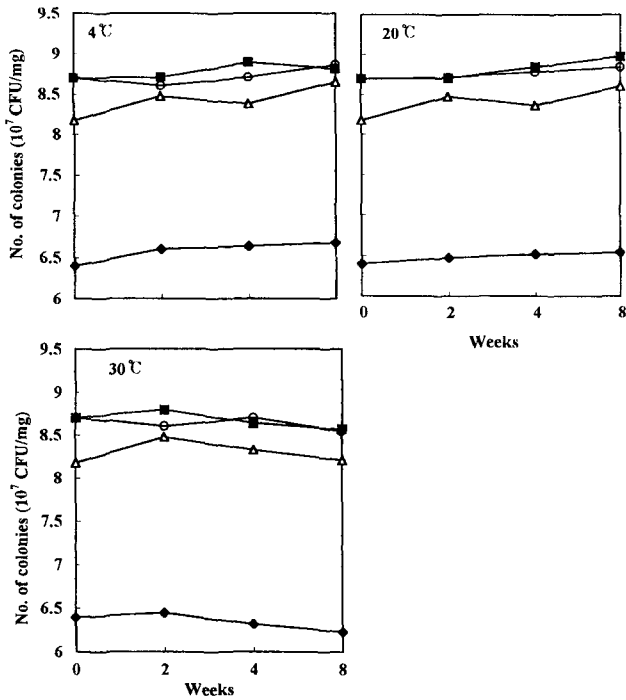


Fig. 2. Change in total number of viable cells and endospores of *B. thuringiensis* products during storage at 4°C, 20°C and 30°C.

Symbols: (○) B(Bt subsp. *aizawai* type formulation)
 (●) BioBact10%
 (△) BioBact20%
 (■) BioBact40%

10%에서는 100배 낮은 포자수를 가졌지만, 안정된 결과를 보였다(Fig. 2).

이러한 Bt 제제의 안정성을 내독소 단백질의 존재와 그 상태에 의해 조사하기 위하여 단백질 전기영동을 수행한 결과, 약 130 kDa의 분자량을 갖는 단백질이 5종의 Bt 제제에서 현저한 단백질 분해없이 모두 검출되어 안정적으로 존재하였다(Fig. 3).

BioBact 수화제의 약효검정

배추좀나방을 대상으로한 실내 독성검정에서 BioBact 20%와 40%의 수화제는 최대 4,000배 희석한 경우에서도 대조구인 A, B 제품과 같은 100%의 높은 살충성을 보였지만, BioBact 10% 수화제는 기준농도보다 4배 진하게 준비한 250배 희석액에서도 80%의 활성을 보여 매우 낮은 독성을 보였다. 반면, 제제화되지 않은 NT0423 균주 배양액 자체도 10⁷ CFU/ml에서 90%에 이르는 높은 활성을 나타내었다(Table 4).

배추좀나방에 대한 야외 독성검정 실험에서는 실내 실험결과에서 낮은 독성을 보인 BioBact 10%는 제외하였다. 배추좀나방 접종후 2일째에 독성을 조사한 결과, BioBact 20% 수화제의 100배 희석한 처리구, BioBact

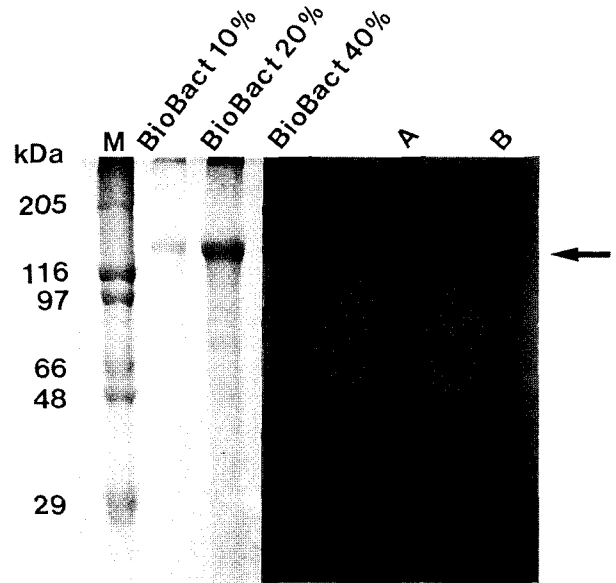


Fig. 3. SDS-PAGE analysis of 5 *B. thuringiensis* formulations. Molecular weight standards (M) were α-2-macroglobulin (205 kDa), β-galactosidase (116 kDa), phosphorylase b (97 kDa), serum albumin (66 kDa), fumarase (48.5 kDa), and carbonic anhydrase (29 kDa). The arrow indicates the position of the 130 kDa crystal protein. A (Bt subsp. *kurstaki* type formulation), and B (Bt subsp. *aizawai* type formulation).

Table 4. Insecticidal activity of several *B. thuringiensis* formulations against 3rd instar larvae of *Plutella xylostella* on cabbage in a laboratory condition

Formulation treated	Dilution Factor (× 10 ⁻³)	Mortality ^a (%)
A	1	100
	2	100
	4	100
B	1	100
	2	100
	4	100
BioBact 10%	0.05	90
	0.1	80
	0.25	80
BioBact 20%	1	100
	2	100
	4	100
BioBact 40%	1	100
	2	100
NT0423 culture	10 ⁶ CFU/ml	70
	10 ⁷ CFU/ml	90
	10 ⁸ CFU/ml	100
Untreated	-	0

^aLarvae were placed in petri-dishes containing cabbage foliage from treated plants.

A: Bt subsp. *kurstaki* type formulation.

B: Bt subsp. *aizawai* type formulation.

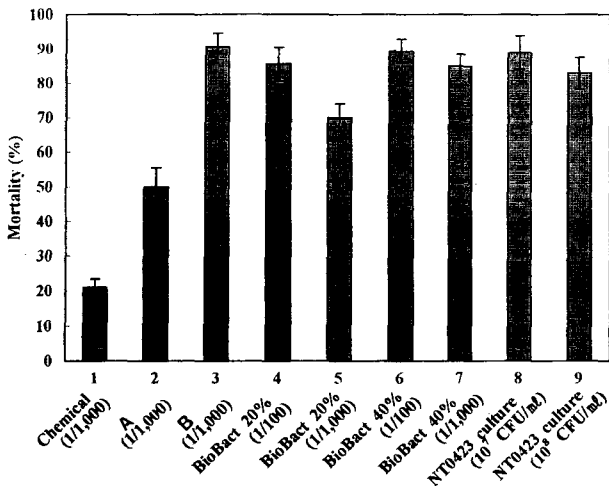


Fig. 4. Insecticidal activity of *B. thuringiensis* formulations against 3rd instar larvae of *Plutella xylostella* on cabbage in a field condition.

40%의 100배 및 1,000배 희석한 처리구에서는 모두 85% 이상의 높은 독성을 보여 대조구로 사용된 B 제품과 거의 동일한 독성을 보였고 A 제품보다는 약 1.5배 높은 독성을 나타내었다. BioBact 20% 수화제의 1,000배 희석한 처리구에서는 70%의 사충율을 보였고, 특이하게도 NT0423 균주 배양액의 경우에도 80% 이상의 상당히 높은 독성효과를 보였다(Fig. 4). 약효의 지속효과에서는 3일째 채취된 잎을 대상으로 72시간 동안 사충수를 조사해 본 결과, 화학살충제와 무처리구를 제외한 나머지 처리구에서 모두 90% 이상의 매우 높은 독성을 나타내었고, 또한 7일째 독성조사에서는 처리구당 약효 지속효과가 현저하게 차이를 보였는데, BioBact 20%와 40% 및 10⁸ CFU/ml 농도의 NT0423 균주 배양액에서는 90% 이상의 높은 독성이 지속적으로 유지되는 결과를 보여, 제제의 대규모 야외적용시 상당한 효과를 예상할 수 있다.

Table 5. Persistence effect of several formulations in field assay

Formulations Treated	Dilution Factor ($\times 10^{-3}$)	Mortality (%)	
		3rd day	7th day
Chemical*	1	60	30
A	1	100	50
B	1	100	30
BioBact 20%	0.1	100	100
	1	100	100
BioBact 40%	0.1	100	100
	1	90	90
NT0423 culture	10 ⁷ CFU/ml1	100	40
	10 ⁸ CFU/ml1	100	90
Untreated	-	0	0

*Chemical was treated with the amount recommended by manufacturer.

Table 6. Potency of three formulations against diamondback moth

Formulation	LC ₅₀	Potency (IU)
B	1.05354	35,000 DBMU/mg
BioBact 20% WP	3.35956	10,975 DBMU/mg
BioBact 40% WP	1.11115	33,185 DBMU/mg

DBMU: Diamondback moth unit. WP: Wetttable powders. B: Bt subsp. *aizawai* type.

었다. 반면, 화학살충제, A 제품, B 제품 및 NT0423 균주 배양액(10⁷ CFU/ml)에서는 50% 이하로 독성이 떨어지는 결과를 보였다(Table 5).

이상의 결과에서 BioBact 20%와 40% 수화제는 매우 우수한 살충효과를 가짐을 확인하고 제제의 표준화를 위해 국제단위에 기초하여 만들어진 제제의 살충효과를 Bt subsp. *aizawai*를 이용한 대조구인 B 제품과 비교, 분석하였다(Table 6). 3령의 배추좀나방을 대상으로 조사한 결과, BioBact 20% 수화제는 B 제품이 갖는 35,000 DBMU/mg보다 낮은 10,975 DBMU/mg를 보였고, BioBact 40% 수화제는 33,185 DBMU/mg를 보여 널리 시판되는 B 제품과 거의 유사한 수준의 살충효과를 가지고 있음을 알 수 있었다.

고찰

최근 수십년간 해충방제를 위해 급성장과 연구가 집중되어 온 생물학적 수단의 개발에 있어서 *Bacillus thuringiensis*(Bt)를 이용한 제제화는 가장 중심이 되어 왔다. Bt의 상업적 생산에서 구성성분의 활성, 안정성, 병원성, 효능 등 여러 가지 요인이 중요하지만[3], 가장 중요한 것은 보다 강력한 독성을 갖거나 숙주범위가 확장된 새로운 균주의 개발이다. 이것은 최근에 보고 [4, 16, 20]되는 저항성 해충 문제 해결에도 중요한 요인이다. 따라서 본 연구에서는 새로운 내독소 유전자를 갖고, 나비목과 파리목에 이중활성을 갖는다고 보고된[8] 새로운 Bt NT0423 균주를 이용하여 BioBact로 명명된 세 종의 현재 많이 사용되는 수화제형으로 개발하고 그 특성을 조사하였다. 제제화의 목적은 유효성분의 활성을 최대한 발휘하게 하는 동시에 사용하기에 안전하고 편리하도록 하기 위해 농약 원제, 보조제 및 부재를 혼합하고 일정한 형태를 부여하기 위한 것이다. 수화제는 원제, 증량제, 보조제를 혼합 분쇄하여 입도가 44 μ m 이하로 만든 후, 계면활성제를 첨가하여 수화성과 현수율을 측정하고 고온 및 저온 안정성 실험, 점결조사를 거쳐서 만들어진다. 생물농약에 필요한 원제 및 부재가 살충효과에 작용하는 기능은 크게 Bt 원제의 농도, 자외선 차단제, 계면활성제, 증량제로 나눌 수 있는데, 본 실험에서는 이들을 다양

하게 혼합하여 가장 적절한 제제를 선발하였다. 제제에 사용된 계면활성제는 모두 음이온성을 띄고 있고, 습윤, 분산 기능을 동시에 수행하며 가비중이 높으면 물에 가라앉기 때문에 가비중을 줄이고 원제에 영향이 없고 사람에게 무해한 종류로서 선발되어졌다. 증량제로 사용된 kaoline은 점토질의 광물질로서 가비중이 높지 않고 경제적인 특성을 갖고 있다. 또한 자외선 차단제로는 white carbon을 사용하였다.

현재까지 산업에 도입된 Bt 균주는 Bt subsp. *thuringiensis*, subsp. *kurstaki*, subsp. *dendrolimus*, subsp. *galleriae*, subsp. *israelensis*와 subsp. *aizawai*로 다양하지만[21], 나비목 해충의 방제에 있어서는 초기에 Bt subsp. *kurstaki* 균주가 많이 이용되다가 새로운 독소의 도입과 저항성 문제로 인하여 최근에는 Bt subsp. *aizawai* 균주가 주로 쓰이고 있다. 제제화에 사용된 NT 0423 균주의 경우 Bt subsp. *aizawai* 균주와 동일한 면역학적 특성을 가지는 균주로서 최근의 경향과 일치하고 매우 큰 단백질을 생산하며 새로운 유전자를 포함하고 나비목에 대한 넓은 숙주범위와 강한 독성을 보이므로 제제로 이용될 때 상당한 효력을 가질 것으로 판단되었다. 그리고 이 균주를 이용한 제제화시 배양배지로 사용된 대두박과 밀기울로 구성된 새로운 SW 배지는 경제적이고 풍부한 영양분을 함유하지만, 섬유질이 많이 포함되어 입자가 크므로 공기압축기를 이용 분쇄하였다. 이 과정에서는 열처리 및 급격한 물리적 변화가 가해되지 않기 때문에 내독소 단백질과 병원성에는 어떤 영향도 주지 않았다. 이는 Fig. 3의 결과에서 제제화 공정에서 일어날 수 있는 물리적 요인에 의한 내독소 단백질의 분해가 거의 일어나지 않고 안정적으로 존재함을 통해 알 수 있었다. 또한 제조된 BioBact 10%, 20% 그리고 40% 제제는 매우 우수한 물성을 보였는데, 특히 부착성에서 Bt 배양액의 경우 세차레의 수세에도 40% 이상의 변함 없는 일정한 부착율을 나타내어 대두박과 밀기울 성분의 점도가 작용한 것으로 보여지며, 이와 같은 천연물질에 의한 고착 증대 효과는 약효의 지속성에도 영향을 줄 것으로 기대된다.

준비된 제제로 실내 및 야외 독성검정에 있어서 공시 해충인 배추좀나방은 배추잎 전면을 가해하는 특성을 가지고 있어 제제가 배추의 잎표면에 고루 살포되어야 함으로 수화제가 유용하며, 살포시기는 Bt 제제가 속효성을 가지므로 초기 유충발생시기가 적절할 것으로 판단되었다. 독성검정 결과, BioBact 10% 수화제는 실내 조건에서 낮은 살충효능을 보였는데, 이는 적은 활성성분을 포함하기 때문으로 실제 포자수에 있어서도 적정 살충효과를 내는 10^7 - 10^8 수준보다 낮았다.

그러나, 제제화되지 않은 NT0423 균주 배양액과 비교에서는 살충력에서 큰 차이를 보이지 않았다(Table 4).

반면에, BioBact 20%와 40% 수화제는 실내조건에서는 대조구들과 같은 효능을 가졌고, 야외에서는 A 제품보다는 약 1.5배 높은 독성을 보였고 B 제품과는 거의 비슷한 독성을 나타내어 매우 우수하였다. 약효 지속성에서는 오히려 나은 결과를 보여 대량생산에 적절한 것으로 판단되었다. 이와 같은 독성검정 실험에서 특이한 점은 화학살충제의 독성이 매우 떨어져 배추좀나방이 이 약제에 대한 저항성을 이미 획득한 것으로 사료된다. 그리고 NT0423 배양액의 경우 모든 조건에서 살충력이 높게 나타나는 결과를 보여 주었고, 야외적용시 약효의 지속성도 매우 우수한 결과를 보여 대두박과 밀기울 성분이 야외환경에서 자외선 차단과 높은 점도로 인한 부착성 증대와 같은 효과를 발휘한 것으로 생각된다.

Bt 생산물의 표준화는 활성성분(active ingredient)이 포자, 배지 찌꺼기와 같은 불순물이 섞여 있기 때문에 상당히 어렵다. 현재 표준화 방법은 국제단위(International Unit)에 기초하며, 표준화의 가장 중요한 목표는 다른 fermentation batches에서도 같은 활성수준으로의 적정화에 있다[2]. BioBact 40%의 역가검정 결과는 시판중인 B 제품과 거의 대등한 살충효능을 가졌고, 이는 독성검정에서도 증명되었다. 그러나 BioBact 20%의 경우에는 야외에서는 높은 활성을 보이나 역가검정에서는 차이를 보여 효과적인 해충방제를 위해서는 Bt 원제의 농도를 20% 이상 첨가해야 함을 의미하였다.

현재 개발된 BioBact 수화제의 실제 야외에서의 적용을 위한 산업화와 농약등록을 위해 계속적인 포장 실증 실험을 수행중에 있다.

Bt 제제는 오랫동안 사용되어졌고 현재 가장 주목받고 있는 살충제이다. 상업적 농업에서의 Bt 사용은 제한되어 있지만, 생물적 방제 특히 종합적 해충 관리(IPM) 전략의 부분으로서 최근의 경향에 따라 그 필요성이 점차 증가되고 있다. 따라서 본 연구에서와 같은 새로운 Bt 균주를 이용한 미생물 제제 개발은 국내에서 절실히 요구되는 사항으로 앞으로 지속적인 연구수행이 이루어져야 할 것이다.

요 약

본 연구에서는 새로 분리된 *B. thuringiensis*(Bt) NT 0423 균주를 이용하여 효과적인 미생물 살충제를 개발하고 그 효력을 검정하였다. 농업부산물인 저가의 대두박과 밀기울을 이용한 새로운 SW32 배지로 Bt NT0423 균주를 대량배양하여 BioBact 10%, 20% 및 40%로 명명된 세 종류의 미생물 살충제를 수화제 제형으로 제조하였다. 제조된 세 종의 BioBact 제제는 수화성, 현수성, 입도 및 부착성에서 우수한 물성을 보였고 또한 SDS-PAGE 분석 결과, 약 130 kDa의 내독소 단백질도 안정

적으로 존재하였다. 세 종의 BioBact로 명명된 제제중, BioBact 10%는 독성이 낮았지만, BioBact 20%와 40%는 배추좀나방을 공시충으로하여 시판중인 Bt 제제인 subsp. *kurstaki* 균주를 사용한 A 제품, Bt subsp. *aizawai* 균주를 사용한 B 제품 및 화학살충제와 더불어 실내 및 야외 독성검정 실험을 비교 수행한 결과, 각각 100%와 80% 이상의 매우 높은 살충력을 보였다. 또한 야외에서 독성의 지속성도 다른 제제에 비해 최소 7일 이상 살충력이 유지되었다.

감사의 말

본 연구는 서울대학교 농업생명과학연구원과 농림·수산기술개발사업 과제(첨단기술)의 연구비 지원으로 수행되어졌다.

REFERENCES

1. Benoit, T. G., G. R. Wilson, and C. L. Baugh. 1990. Fermentation during growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* HD-1. *Lett. Appl. Microbiol.* **10**: 15-18.
2. Burges, H. D. 1967. The standardization of products based on *Bacillus thuringiensis*, pp. 306-312. *Proc. Int. Colloq. Insect Pathol. Microbial Control*, 1966. North-Holland Publ. Co., Amsterdam.
3. Couch, T. L. and C. M. Ignoffo. 1981. Formulation of insect pathogens, pp. 621-634. In H. D. Burges (ed.), *Microbial Control of Pests and Plant Disease 1970-1980*. Academic Press, New York.
4. Ferre, J., M. D. Real, J. Van Rie, S. Jansens, and M. Peferoen. 1991. Resistance to the *Bacillus thuringiensis* biopesticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 5119-5123.
5. Finney, D. J. 1952. *Probit Analysis*, Cambridge University press, Cambridge, UK.
6. Heimpel, A. M. 1967. A critical review of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner and other crystalliferous bacteria. *Annu. Rev. Entomol.* **12**: 287-322.
7. Höfte, H. and H. R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* **53**: 242-255.
8. Kim, H. S., H. W. Park, S. H. Kim, Y. M. Yu, S. J. Seo, and S. K. Kang. 1993. Dual-specificity of δ -endotoxin produced by newly isolated *Bacillus thuringiensis* NT 0423. *Kor. J. Appl. Entomol.* **32**: 426-432.
9. Kim, L. 1993. *Advanced Engineered Pesticides*, Marcel Dekker, INC., New York.
10. Lambert, B. and M. Peferoen. 1992. Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*. *BioScience* **42**: 112-122.
11. Lee, H. H. 1986. Studies on the development of the *Bacillus thuringiensis* pesticide: Lethality and safety tests of the endotoxin and the pesticide of *B. thuringiensis* serovar *kurstaki*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **14**(4): 325-328.
12. Lee, H. H., B. Y. Hyun, and C. K. Oh. 1986. Studies on the development of the *Bacillus thuringiensis* pesticide: Conditions of delta-endotoxin production by *B. thuringiensis* serovar *kurstaki*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **14**(3): 259-264.
13. Lee, H. H., J. J. Lee, and J. H. Suh. 1986. Studies on the development of the *Bacillus thuringiensis* pesticide: Media composition for the endotoxin production by *B. thuringiensis* serovar *israelensis*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **14**(4): 329-328.
14. Lüthy, P. 1980. Insecticidal toxins of *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **8**: 1-7.
15. Lüthy, P., J. L. Cordier, and H. M. Fischer. 1982. *Bacillus thuringiensis* as a bacterial insecticide: Basic consideration and application, pp. 35-74. In E. Kurstak (ed.), *Microbial and Viral Pesticide*, New York Marcel Dekker, Inc.
16. McGaughey, W. H. 1985. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science* **229**: 193-194.
17. McGuire, M. R. and B. S. Shasha. 1990. Sprayable self-encapsulating starch formulations for *Bacillus thuringiensis*. *J. Econom. Entomol.* **83**: 1813-1817.
18. Morris, O. N., P. Kanagaratnam, and V. Converse. 1997. Suitability of 30 agricultural products and by-products as nutrient sources for laboratory production of *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* (HD 133). *J. Invertebr. Pathol.* **70**: 113-120.
19. Nam, Y. R. 1992. Measurement of *Bacillus thuringiensis* formulations, pp. 871-877. *Inspecting Methods of Agrochemicals*, National Inspecting Office of Agricultural Materials, Kwangju, Korea.
20. Seeley, H. S., Jr., P. J. Vandemark, and J. J. Lee. 1991. Microbes in action, pp. 95-97. *A Laboratory of Manual of Microbiology*, 4th ed. W. H. Freeman and Company, New York.
21. Tabashnik, B. E., N. L. Cushing, N. Finson, and M. W. Johnson. 1990. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera Plutellidae). *J. Econom. Entomol.* **83**: 1671-1676.
22. Tanada, Y. and K. K. Harry. 1993. *Insect Pathology*, pp. 83-146. Academic Press, INC. London.

(Received January 26, 1998)