

미생물공학의

개발현황과

전망

(2)

□ 세균 및 사상균 농약을 중심으로

서울대학교 농과대학 부교수 강 석 권

1. 세 균 농 약

곤충의 병원세균에 대한 분리는 이시와타(石渡, 1901)가 누에의 줄도균(*Bacillus thuringiensis* var. *sotto*)을 분리하면서 시작되어, 꿀벌의 부저병, 유화병균 등이 계속 분리되었고, 그후 *Bacillus thuringiensis*(이하 B.t균으로 표기)에 대한 미생물적 방제시험이 시작되면서부터 B.t균에 대한 연구가 활발하게 되어, 1960년 미국에서는 B.t균을 제제화하였고 이를 계기로 현재까지 미국, 소련등 선진국에서는 세균농약을 중점적으로 개발하여 B.t를 중심으로 *Bacillus popilliae*, *Bacillus moritai* 등 3종류의 세균에서 20종의 상품이 개발되어 있다.

1) 곤충병원세균 특징과 분류

곤충의 병원세균은 6군으로 분류할 수 있고 이들 세균은 숙주에 대한 의존정도가 병원성에 따라 곤충체내에서만 증식하는 편성병원체, 곤충체외도 증식하고 주로 소화관내에 증식하며 독소를 생성하는 통성병원체와 위의 2가지의 유형의 중간 정도의 특성을 나타내는 잠성병원체 등으로도 분류할 수도 있다. 또한 곤충병원세균 중에는 아포를 형성하는 것과 않는 것이 있는데, 전자가

〈표 1〉

세균살충제 생산 현황

세 균 명	제 품 명	제 조 회 사(국 명)
<i>Bacillus popilliae</i>	Doom, Japidemic Milky Spore Disease	Fairfax Biological Lab(미국) Reuter Lab., Inc.(미국)
<i>Bacillus thuringiensis</i> (<i>B. thuringiensis</i> δ -내독소+포자)	Dipel	Abbott Labs.(미국)
	Thuricide	Sandoz-Wander, Inc.(미국)
	Certan	Sandoz, Inc.(미국)
	Bactur	Thompson-Hayward Chem. Co. (미국)
	Bactospeine	Roger Bellon(불란서)
	Plantibac	Procida(불란서)
	Sporeine	L.I.B.E.C.(불란서)
	Biospor	Farbwerke Hoechst(서독)
	Bathurin	Chemapol-Biokrma(체코)
	Baktukal	Serum zavod Kalinovica(유고)
<i>Bacillus thuringiensis</i> (<i>B. thuringiensis</i> β -외독소)	Dendrobacillin	Glavmikrobioprom(소련)
	Entobacterin	Glavmikrobioprom(소련)
	Insektin	Glavmikrobioprom(소련)
	Biotoksybacillin	All-Union Institute of Agricultural Microbiology(소련)
<i>Bacillus moritai</i>	Eksotoksin	Glavmikrobioprom(소련)
	Toxobakterin	Glavmikrobioprom(소련)
	Lavillus M	Sumitomo Chem. Co.(일본)

특히 병원성이 강하며 현재 100여종 분리되어 있다.

2) B.t의 특성

B.t균의 가장 뚜렷한 특성은 결정 단백질의 부포자소체를 생성하는 것이다. 이 결정단백질은 나비목유충의 장내에서 소화효소에 의하여 분해되면 대단한 독성을 나타낸다.

〈표 2〉 곤충 병원세균 세균군과 속명

Bacillaceae	Streptococcaceae
<i>Bacillus</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>Clostridium</i>	
Enterobacteraceae	Rickettsiales
<i>Serratia</i>	Rickettsiaceae
<i>Proteus</i>	<i>Wolbachia</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>Rickettsialla</i>
Pseudomonadaceae	Mollicutes
<i>Pseudomonas</i>	Mycoplasmatales
	<i>Spiroplasma</i>

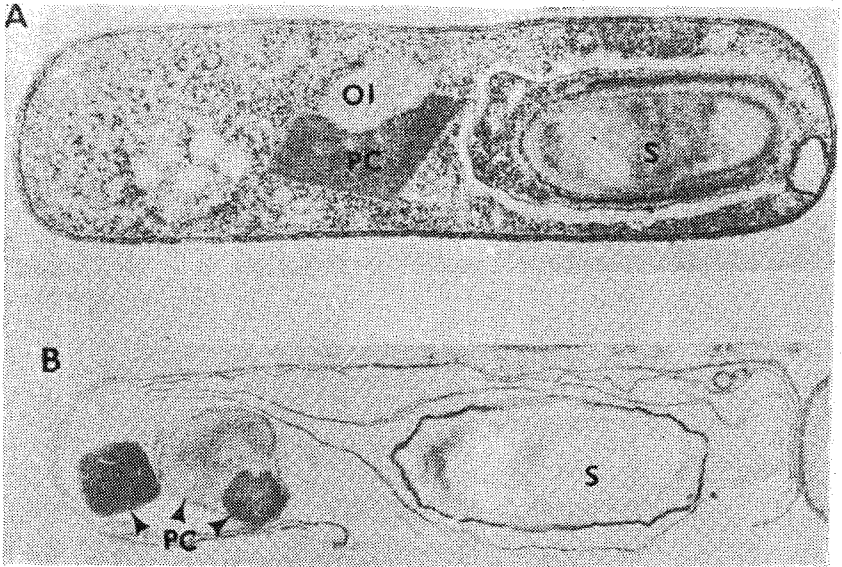
B.t에 속하는 균주는 영양세포의 편모항원성에 의하여 14종류 이상의 혈청형으로 분류된다. 따라서 이 혈청형은 분류학상의 변종으로 간주할 수 있다.

〈표 3〉 B.t의 변종과 외독소 생산

혈 청 형	변종명	외 독 소 생 성 유 무
<i>thuringiensis</i>	1	+
<i>finitimus</i>	2	-
<i>alesti</i>	3a	-
<i>Kurstaki</i>	3a3b	-
<i>sotto</i>	4a4b	+
<i>dendrolimus</i>	4a4b	-
<i>Kenyae</i>	4a4c	+
<i>galleriae</i>	5a5b	+

<i>canadensis</i>	5a5c	-
<i>entomocidus</i>	6	-
<i>subtoxicus</i>	6	-
<i>aizawai</i>	7	+
<i>morrisoni</i>	8	+
<i>tolworthi</i>	9	+
<i>darmstadiensis</i>	10	+
<i>toumanoffi</i>	11	-
<i>thompsoni</i>	12	-
<i>pakistani</i>	13	-
<i>israelensis</i>	14	-

B.t의 포자는 적당한 영양조건하에 두면 발아하여 영양세포로 되면서 증식을 시작한다. 변종에 따라서는 이 시기에 α -외독소(Phospholipase C)나 β -외독소(ATP 유사체)



〈그림 1〉 B.t의 전자 현미경 사진

A: B.t *kurstaki* 변종과

B: *israelensis* 변종

S; 포자, OI; 난형봉입체, PC; 결정단백질소체

를 배양액중에 방출하는 것도 있다. 그후 영양세포의 증식속도가 떨어지면서 포자와 결정단백질소체가 형성된다. 이것들이 성숙하면 용균에 의하여 배양액중에 방출된다. 이 단백질소체는 배양후 12시간 정도에서 형성되는데 다이아몬드형의 정 8면체로서 일반적으로 세포 1개당 1개가 형성되나, 균주에 따라서는 2개 형성되는 것도 있다. 분자량이 23만 정도이며 크기는 $5 \times 15.5 \mu\text{m}$ 이다. 물에는 녹지 않으나 알칼리성 용액이나 인시목 유충의 소화액 중에서 녹으며 18종의 아미노산을 함유하고 있고, 이 단백질의 유전정보는 B.t의 plamid가 가지고 있다.

균주와 곤충종에 따라 발병과정은 틀리지만 일반적으로 결정단백의 분해산물인 독소에 의한 중독증과 세균증식에 의한 패혈증으로 죽는다. 나비목유충이 포자와 결정단백질을 먹게 되면 독소가 장관내에서 작용하여 수분후에 섭식을 정지하고, 계속하여 중장피막조직의 손상과 함께 각종 장애가 일어나므로서 유충이 죽게 된다. 포자는 소화액 pH가 9 이상인 곤충장내에서는 거의 발아하지 않으나 장내 pH가 저하하면 발아하여 증식을 시작한다. 따라서 영양형세포는 장관파괴부위로 통하여 혈체강내로 들어가게 되는데, 이때에 변충에 따라서는 α -외독소를 생

산하여 혈체강내의 침입과 균의 증식을 조장한다. 소화액 pH가 10 이상의 누에나 작잠은 전신마비에 의하여 수신편 후에 죽는다.

결정단백의 분자량 23만 그대로는 독성을 나타내지 않는다. 결정단백이 소화관내의 단백질분해효소의 작용에 의하여 작은 분자로 분해(분자량 약 1,000~70,000)되어서 독성을 나타낸다. 이 S-내독소는 산화적인 산반응에서 탈공역제로 작용하는 것으로서 중장피막조직세포의 호흡을 촉진하여 ATP의 생성을 저해한다. ATP 생성이 저해되면 중장의 글루코스흡수가 감소하고 동시에 세포에너지 수준이 저하하여 죽게 된다. 이 δ -내독소에 감수성인 나비목 곤충은 현재 60여종 조사되어 있다.

또한 B.t의 변종 중에는 영양세포의 증식기에 열에 안정하고 물에 녹는 β -외독소를 균체외에 분비하는 것도 있는데, 독소의 화학구조는 분자량 700의 아데닌 뉴클레오타이드이다. 나비목을 중심으로 여러목의 곤충(30여종)에 대하여 감수성을 나타내는데, 주로 변태과정에서의 기형과 번데기가 되지 않는 등 독소작용을 일으킨다.

3) B.t의 역할

미생물 농약의 관점에서, B.t에 있어서 자연환경에 대한 균의 역할

을 살펴본다는 것은 중요한 의미를 가진다.

일반적으로 죽은 곤충시체내의 포자는 건조상태에서 수년간 병원성을 잃지 않는다. 그러나 습기가 많은 조건하에서는 시체중의 포자가 발아하여 내구성이 약한 영양형포자로 되기 때문에 야외에서의 유행은 적다고 볼 수 있다. 식물잎에서 B.t에 감염되어 죽은 곤충시체에 대한 역학을 생각하여 보면, 우선 분해된 시체는 감염원으로 작용하겠지만, 비교적 단시간에 병원력을 잃게 된다. 이 불활화의 주원인은 일광으로서 몇일만에 활성이 없어진다. 그러나 결정단백소체는 포자보다는 안정하다. 또한 식물잎에 붙어 있는 시체는 결국 분해하여 대부분 토양에 떨어지기 때문에 토양과 B.t의 소장과는 밀접한 관계가 있다. 토양의 pH와 유기물 함량이 주로 관계가 있는데, 유기물이 많은 토양에서는 B.t의 발아율이 높고, 중성에 가까운 토양에서는 영양세포는 증식하여 포자를 형성하지만 산성토양에서는 증식이 곤란하여 급속히 감소한다.

4) *Bacillus popilliae*의 특성

이 세균은 주로 왜콩풍뎅이(*Popilliae japonica*) 등의 풍뎅이류에서 주로 분리되고 있는 세균이다. 미생물 방제에 이용되고 있는 균주는

Popilliae var. *Popilliae*로서 풍뎅이류에 특히 강한 병원성을 나타낸다. 다른 변종은 실험실적인 병원성은 인정되나 감염율이 낮기 때문에 이용이 불가능하다. 따라서 이 세균의 숙주역은 비교적 좁다고 할 수 있다.

이 세균의 발병단계는, 유충이 포자를 먹어서 소화관에 도달하면 발아하여 영양세포로 되고, 식세포작용에 의하여 증장조직에 들어간다. 이때에 증장조직이 파괴되기 때문에 이 세균은 혈액으로 들어가서 혈구에 증식하게 되면서 많은 포자낭을 형성한다. 이렇게 되면 이 혈액내에는 다수의 포자낭이 있기 때문에 혈액이 유백색을 띠게 되어 병명을 유화병(乳化病; Milky Disease)이라 부른다. 이러한 영양세포의 급속한 증식에 의하여 숙주가 생리적 기아를 나타내면서 숙주는 죽게 되는 것이다.

풍뎅이 유충은 여름에는 지표 가까운 뿌리를 식해하고 가을이 되어 지온이 내려가면 땅속 깊이 파고 들어가 활동을 정지한다. 한편 유화병은 숙주의 체온이 16~36°C 범위내에서 병이 진전된다. 이 때문에 낮은 온도에서 포자를 먹어도 16°C 이상일 때까지 감염이 일어나지 않는 경우가 있다.

또한 죽은 곤충의 시체중에 있는 영양세포는 급속히 활성을 잃지만,

◇ 미생물 농약의 개발현황과 전망 ◇

포자상태일 때는 시체가 분해되어도 수년간 병원성을 잃지 않는다. 또 포자는 토양에 흡착하는 성질이 있어서 자연재해에서의 이동은 비교적 적고 병사체가 있는 토양에 국한하여 있게 된다. 이 균도 B.t균과 같이 포자낭중에 단백질부포자의 소체를 생성한다.

또 이 균은 보통 균의 배지보다 많은 종류의 아미노산을 함유하는 특이한 배지에만 배양되며, 배지중에 영양세포의 증식은 일어나지만 대개 하루 정도 후에는 죽게 된다. 다시 말하면 인공배지 중에는 포자형성이 일어나지 않는다. 그러나 뽕명이 유충의 체액중에는 포자형성이 활발히 일어난다. 따라서 인공배지에 배양된 세균을 유충에 경구접종하여도 감염이 일어나지 않는다. 이러한 배경 때문에 미생물 농약으로서의 양산문제가 대두되는데, 현단계에서는 일반적으로 유충에 세균을 주사하여 생산하는 소위 생체증식체제를 도입하고 있다.

2. 사상균 농약

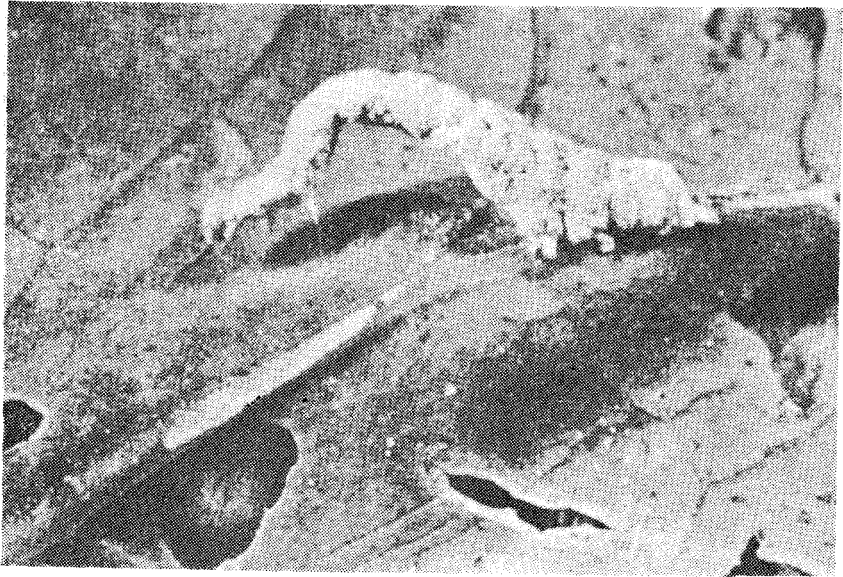
곤충의 사상균에 대한 관심은, 초기에는 누에나 꿀벌의 익충에 대하여 국한되었고, 동시에 연구도 집중되었다. 그후 사상균을 이용한 미생물학적 방제는 Forbes와 Snow(1887~1898)에 의한 시도를 크게 평가하고 있다.

곤충의 병원사상균은 최근 미국 농무성보고(The USDA Culture Collection, 1983)에 의하면 800여종이 분리되어 있다고 한다. 또한 이들 병원중에서 30여종이상이 유용한균으로 인정되어, 계속해서 개발을 집중하고 있으며 이미 개발되어 시판되고 있는 사상균 농약은 5종으로 알려져 있다.

곤충에 대한 사상균의 분류 현황은 진균류의 생활사, 자실체 및 포자의 형태 등을 기준으로 5아문으로 분류되고, 이들 중에서 불완전 균류가 병원사상균의 반이상을 차지하고 있다.

〈표 4〉 사상균 살충제 생산 현황

병 원	체	제 품 명	제조회사(국명)
<i>Aschersonia aleyrodii</i>		Aseronija	IAM(소련)
<i>A. goldiana</i>		-	
<i>Beauveria bassiana</i>		Boverin	GMB(소련)
		Biotrol FBB	NPI(미국)
<i>Verticillium lecanii</i>		-	-
<i>Metarhizium anisopliae</i>		Biotrol FMA	NPI(미국)



〈그림 2〉 Spicaria rileyi균에 감염되어 죽은 Cabbage looper의 유충
(시체 전면에 포자로 덮여 있음)

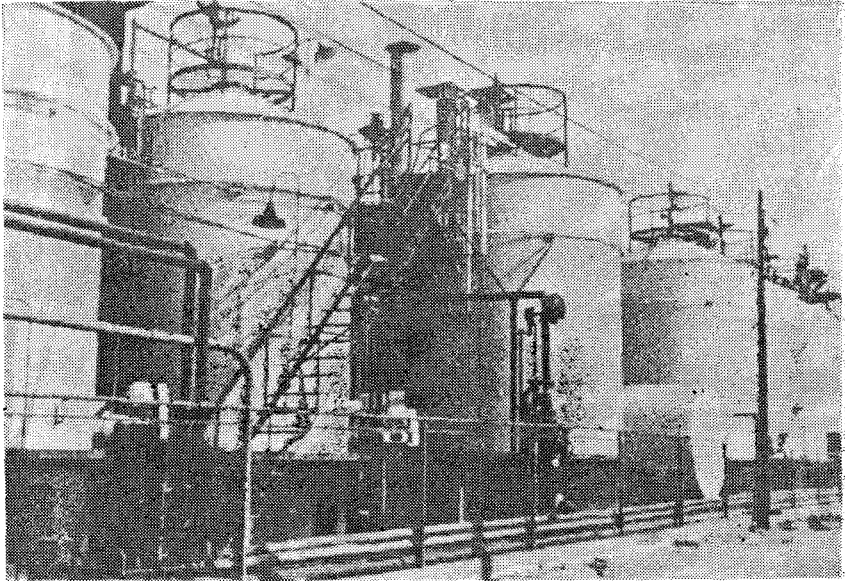
또한 최근에 생산전단계에 도달하여 곧 생산에 착수할 수 있는 균종이 편모균류에 2종, 접합균류 7종, 불완전균류에 4종 등이 보고되어 있다.

8. 양산과 역가문제

세균이나 균의 양산체제는 일반적으로 인공배지에 의한 배양법을 이용하고 있다. 비교적 장치가 간단하고 경제적인 방법으로서 받고체배양법을 들 수 있는데, 이것은 여러 담체(擔體)에 종균을 접종하여 배양하고, 배양이 끝나면 건조하여 분말로

만들어서 제제화하는 방법이다. 이 방법은 완전한 멸균상태를 유지하기가 어렵고 배양조건의 조절이 곤란하다는 점 등 문제점이 있기 때문에 최근에는 주로 액내배양법을 이용하고 있다. 이 방법은 대형의 탱크내에 완전멸균공기를 흡입시키고, 교반기에 의하여 배양액 전체의 산소를 공급하여 배양하는 것이다. 배양중의 온도는 탱크내에 설치되어 있는 파이프를 통하여 적당한 온도로 조절된 물을 순환시켜서 조절한다.

생산과정은 종균의 시험관내 배양—플라스코내 진탕배양—소형탱크



〈그림 3〉 B.t균 제조공장의 모습

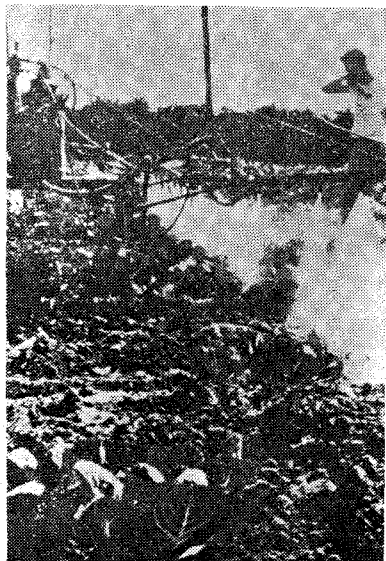
(40,000ℓ의 대형 발효탱크가 많이 설치되어 있음)

액내배양을 통하여 균을 증식시킨 후에, 최종적으로 대형탱크에 종균을 접종하여 생산한다. 배양물의 회수는 원심법과 여과과정을 이용하고 그 회수물을 마지막 제제화하는 것이다.

양산에 있어서는 생산공정에 어려움이 없고 동시에 병원력이 강한 균주를 선발해야 한다는 것은 당연하다. 미국에서의 B.t 제조에는 δ -내독소의 생산능력이 높은 HD-1 주(var. *kurstaki*)를 이용하고 있다.

미생물 살충제는 궁극적으로 목적해충에 대하여, 야외에서 그 효력이

인정되어야 하는 것이다. 실험실내에서는 효력이 있었으나 실제 야외에서 효력이 없는 미생물 약제가 간혹 있다. 단기적 방제효과를 기대할 수 있고, 또한 재현성이 있다는 것을 인정받기 위해서는 필연적으로 제제화를 규격화하는 동시에 그 역가를 명시해야 한다. 화학살충제는 화학분석치로 역가를 결정할 수 있으나, 미생물 살충제는 제조과정에서 유효성분의 불활화와 병원성에 대한 변이의 문제가 있기 때문에, 미생물 살충제의 역가는 생물검정으로서 결정하는 것이 가장 적절한 방



〈그림 4〉 B.t(Thuricide®)균을 양배추 해충을 구제하기 위하여 뿌리고 있는 모습.

범으로 생각하고 있다. 즉, 생물활성을 가진 물질의 양을 목적생물에 투여하여 그 효과를 정량하여 산출

하는 방법인데, 여기에서 기준은 단기적 방제에 기대할 수 있는 효과로서 [해충이 죽는 것을 표준으로 하고 있다.

검정에 도입되는 곤충은 감수성이 높고 효력시험에 적합하여야 하며, 동시에 균일한 곤충집단이 안정되게 공급될 수 있는 것이어야 한다. 그래서 각각 다른 농도의 병원체를 가늠한 한 야외에서의 침입경로와 유사한 방법으로 곤충에 접종하고, 얻은 용량과 반응곡선으로부터 LD₅₀치를 산출하여 역가를 측정한다.

이상 2회에 걸친 개략적인 미생물 살충제의 개발현황을 마치고, 다음호에는 미생물 살충제의 문제점, 안정성, 앞으로의 기술개발문제 및 우리나라에 있어서 개발에 대한 제언 등을 기술하고자 한다.

〈다음호에 계속〉

