

누에에 대한 低毒性 *Bacillus thuringiensis* 菌株의 選拔

金 哲 永·金 英 勳·姜 錫 權

서울대학교 農科大學

Selection of Low Pathogenic Variety in *Bacillus thuringiensis* to Silkworm, *Bombyx mori*

Cheol Young Kim, Young Hoon Kim and Seok Kwon Kang
College of Agriculture, Seoul National University

Abstract

Among many microbial pesticides, *Bacillus thuringiensis* is one of the most hopeful pesticide and some commercial products have been appearing on the market.

Because these commercial products contain living spores and toxins of the organism, there is a danger that living spores of *B. thuringiensis* may be scattered by wind and cause a great damage in the sericulture areas.

In order to avoid these risks it is desirable to select the strain which has low pathogenicity to the silkworm, and at the sametime being highly pathogenic to the pest insects.

Thus this study has been carried out to acquire some basic informations about the procedure of desirable strain selection.

Three strains of *B.thuringiensis* var. kurstaki, var. dendrolimus and var. aizawai were used for the pathogenicity test on the silkworm, *Bombyx mori* and the fall webworm, *Hyphantria cunea*.

Those strains were investigated by the agarose gel electrophoresis patterns of plasmid DNA determine whether mutation had occurred.

Pathogenicity tests were carried out of using isolated crystal proteins and spore-crystal protein to mixtures of each strain, seperatively.

In case of using spore-crystal protein mixture, the order of pathogenicity in varieties of *B. thuringiensis* against *B.mori* and *H.cunea* were kurstaki, aizawai, dendrolimus and kurstaki, dendrolimus, aizawai, respectively.

But using isolated crystal proteins, dendrolimus had the highest toxicity to *H. cunea* and the lowest toxicity to *B. mori* among tested three strains. From the above results, dendrolimus was presumed the most desirable strain for using microbial pesticide.

緒 論

有效病原微生物을 이용하여 害蟲을 防除하는 微生物的 防除法은 化學殺蟲劑의 無分別한 사용에 따른 被害로부터 環境을 保護하기 위한 有機合成農藥의 代替 또는 保完手段으로서 最近 世界的으로 이 分野에 많은

研究가 遂行되어지고 있다.

이러한 微生物殺蟲劑에 이용되는 病原微生物은 細菌을 비롯하여 바이러스, 絲狀菌, 및 原生動物 등 여러 가지가 알려져 있으나, 그 중에서 細菌인 *Bacillus thuringiensis*(이하 B.t. 로 略함)는 化學殺蟲劑에 對等한 殺蟲力이 있는 동시에 無公害이고, 일반적인 醱酵裝置와 技術로서 大量生産이 可能하여 가장 이상적인

微生物殺蟲劑로 이용되고 있는 細菌으로서 de Barjac (1962)에 의해 血清型과 esterase型에 따라 分類되기 시작한 이래 Goldberg 등 (1977)은 israelensis를追加하여 14개의 血清型과 19개의 變種으로 分類하였다.

B.t.의 殺蟲機作은 孢子形成期間中 마름모형의 結晶型 또는 不正型의 內毒素蛋白質을 合成하는데 이들 蛋白質을 나비목이나 일부 파리목의 幼蟲이 攝食하게 되면 宿主昆蟲에 따라 差異가 있지만, 대개 알칼리성인 消化液이나 消化液中의 protease에 의해 低分子化되어 攝食後 1~2時間內 食慾을 잃고 죽게되는 強力한 殺蟲力을 나타낸다(Hannay; 1953, Fitz James; 1955, Angus; 1956).

이와같이 강한 殺蟲力이 있기 때문에 美國, 소련을 위시한 유럽의 여러 先進國家에서는 이미 많은 種類의 B.t.劑製를 開發하여 市販하고 있으며 每年 그 需要가 增加되고 있다.

이러한 B.t.劑製의 開發에 의한 害蟲防除는 化學殺蟲劑와는 달리 살아있는 生物을 材料로 하기 때문에 防除目的容蟲과 그 地域의 環境의인 要因을 考慮하여 效果의인 菌株의 育種과 選拔이 先行되어야 그 防除法이 安定的으로 確立될 수 있다고 생각된다.

現存 市販되고 있는 B.t.劑製中 Dipel도 Dulmage가 1970年 既存의 알려진 菌株보다 約 100배 정도 高毒性인 HD-1을 發見하여 이를 製品化한 것으로서 上記 사실의 重要性을 示唆하고 있다.

특히 우리나라와 같은 養蠶國家에서는 B.t.劑製가 開發되어 農藥으로서 現實化된다면 누에에 대한 被害가 크게 우려되므로 이러한 背景에서 B.t.菌의 여러變種中에서 누에에 대해서는 低毒性이고 다른 害蟲에 대해서는 猛毒性인 菌株를 選拔할 必要가 있으며 또한 반드시 先決되어야 할 重要한 課題로 생각되어진다.

따라서 本 研究에서는 結晶性 內毒素蛋白質 遺傳子가 存在하는 것으로 믿어지는 plasmid를 分離, 電氣泳動像을 比較함으로써 供試菌株를 確認하였으며, 또한 이들을 培養하여 얻은 孢子와 內毒素蛋白質의 混合物 및 純粹分離된 內毒素蛋白質의 누에와 흰불나방에 대한 毒性檢定을 각각 수행하여 B.t.劑製의 開發에 있어서 바람직한 菌株의 選拔을 위한 基礎資料를 提示하였다.

本 論文은 韓國科學財團 支援研究費로 수행되었음을 밝히는 바입니다.

試驗材料 및 方法

1. 實驗材料

本 實驗에서 사용한 供試蟲은 주요한 山林害蟲인 흰

불나방과 產業的으로 중요시 되는 누에(長春蠶)를, 이들에 대한 B.t.接種菌株는 美國 농무성의 Faust 博士로부터 分壤받은 變種中 비교적 殺蟲力이 강한 2種의 菌株 kurstaki, dendrolimus와 비교적 독성이 약한 것으로 추정되는 aizawai를 供試하였다.

2. B. thuringiensis 培養과 內毒素蛋白質의 分離

Bacto-nutrient Agar Slant培地에 subculture한 菌을 500ml Elenmeyer flask에 100ml의 GYS培地(Nickerson and Bulla, 1974)를 넣고 30°C에서 18時間 恒溫水槽內에서 培養, phage의 感染이나 acrystalliferous變異菌의 發生을 防止하기 위하여 위상차 현미경으로 孢子形成(sporulation)을 確認한 후 이를 接種源으로 사용하였다.

확인된 接種源을 5l의 N.B.S. 醱酵槽(New Brunswick Scientific G-52 gyrotary shaker)에 500ml를 넣고 250rpm, 30°C, 10d aeration 조건으로 24時間 培養後 孢子和 內毒素蛋白質의 autolysis를 誘導하기 위해 약 5時間 靜置, 위상차 현미경으로 autolysis를 確認하고 遠心分離(10,000g 20分)하여 沈澱物을 모아 0.02% Triton X-100-1N NaCl溶液을 가하여 洗滌 수거하였다.

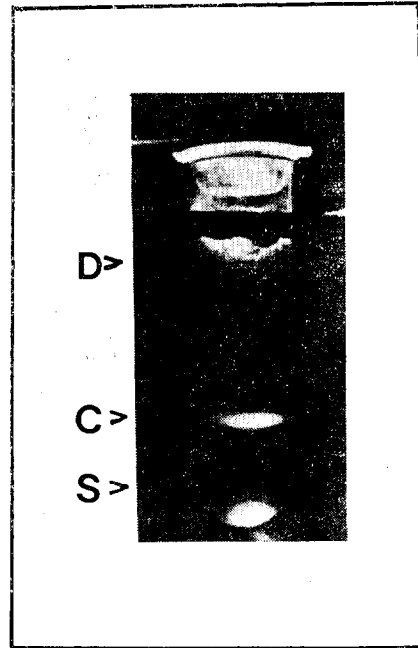


Fig. 1. The photograph of isolated parasporal crystal proteins which were formed a visible band at the interface between the 67% and 30% Renograffin layers after centrifugation(27000 g, 1hr), using fixed angle rotar. (D; cell debris, C; crystal protein, S; spore)

內毒素蛋白質의 純粹分離는 上記 遠心分離한 수거물을 10ml當 400mg 정도되게 0.02% Triton X-100 溶液으로 稀釋하고 20ml의 67% Telebrex-38 溶液위에 30%의 Telebrex-38 10ml을 重層하여 만든 이重層위에 試料 10ml를 조심히 重層, 27,000g에서 1時間 遠心分離하여 형성된 白色의 중간 band를 주사기로 추출하였다(그림 1). 분리된 內毒素蛋白質은 Schaeffer-Fulton 方法에 따라 0.5%(W/V) Malachite-Green으로 5分間 加熱染色한 후 Safranin 0 液으로 Counter staining 하고 현미경으로 觀察하여 純度を 확인하였다. 分離된 內毒素蛋白質은 증류수로 5회 이상 遠心洗滌(13,000g, 20分)하여 毒性檢定時 사용을 위해 減壓冷凍乾燥機로 乾燥 粉末化하여 -20°C에서 冷凍 保管하였다.

3. *B. thuringiensis* plasmid의 電氣泳動에 의한 性狀 比較

供試된 菌株의 變異 發生與否와 *B.t.* 菌株間 차이를 확인하기 위해 extrachromosomal DNA를 分離하고 電氣泳動을 행하여 plasmid數와 分子량을 比較하였다.

B.t. plasmid 分離는 Birnboim & Doly(1979) 方法에 따라 행하였다. *B.t.*를 G.Y.S. media에서 6時間 培養後, 培養液 0.5ml를 취하여 1.5ml Eppendorf 遠心分離管으로 13,000rpm에서 3分間 遠心하여 沈澱物을 87 mM Tris-HCl buffer로 洗滌하였다. 洗滌된 沈澱物에 100 μ l의 lysis solution(50mM glucose, 25mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 5mg/ml lysozyme, 10mg/ml RNase A, pH 8)을 넣고 37°C에서 30分間 培養後 200 μ l의 0.2N NaOH, 2% SDS를 가하고 약하게 攪拌한 다음 30分間 靜置하여 透明해지면서 粘度가 높은 상태가 되면 150 μ l의 3M sodium-acetate buffer(pH 4.8)로 中和시켜 0°C에서 약 60分間 靜置시켜 linearized된 chromosomal DNA와 SDS의 沈澱을 誘導하고 13,000g에서 5分間 遠心하여 0.4ml의 浮游液을 새로운 遠心管에 옮긴다. 새로운 遠心管에 옮긴 浮游液은 1ml의 冷 ethanol을 가하여 -20°C에서 30分靜置, 再遠心(13,000 g, 5分)하여 浮游液을 除去하고 沈澱物을 100 μ l의 0.1M sodium acetate 0.05M Tris-HCl(pH 8)로 洗滌한 後, 다시 2 volume의 冷 ethanol을 가하고 -20°C에 20分間靜置後 再遠心하였다. 遠心に 의한 沈澱物을 5 \times sample buffer(20mM borate, 25% sucrose, 0.05% BpB, 0.1% SDS) 10 μ l와 40 μ l의 증류수를 가하여 plasmid DNA 分析試料로 사용하였다.

分離된 plasmid DNA 試料는 0.6% Agarose slab gel 에 slot當 10 μ l씩 loading하여 3mA 1時間, 7mA 30分, 28mA 3時間 電氣泳動을 행하고 0.5 μ g/ml ethidium bromide溶液에 25分間 染色後 UV-illuminator 위에서

撮影하였다.

4. *B. thuringiensis* 菌株에 대한 殺蟲力 檢定

殺蟲力 檢定 對象 供試蟲은 주요한 山林害蟲인 흰불나방과 產業的으로 중요시되는 누에(長春蠶)을 選定하였고, 供試蟲의 接種齡期는 處理時의 體重을 考慮하여 누에에는 3, 4齡 흰불나방에서는 5, 6齡을 각각 處理對象齡으로 定하였다.

接種源으로 사용한 供試菌은 G.Y.S.培地에서 28時間 培養, 위상차 현미경으로 sporulation과 autolysis를 確認한 後 8,000g에서 10分間 遠心하여 細胞破片物과 外毒素을 除去하고 증류수로 稀釋하여 660nm에서 吸光度를 測定 Kavenogh公式($W=9929(1-\sqrt{1-0.07347 \times A660})$)에 依據 乾物重으로 換算하여 變異菌株別로 胞子와 內毒素蛋白質 混合物의 標準濃度の 接種濃度を 調製하였다.

이상과 같이 菌株에 따라 적정농도로 調製된 接種液에 桑葉을 浸漬시켜 30分間 陰乾한 다음 各區當 30마리를 24時間 絶食시킨 다음 1時間 동안 添食시켰으며, 添食後 남은 殘桑은 除去하였고 새로운 桑葉을 교체하여 飼育하면서 처음 24時間 동안은 매 3時間마다 그 후 48時間까지는 12時間마다 斃死蟲數를 조사하였으며, Finney(1971)의 方法에 依據하여 LD₅₀ 값을 算出하고 殺蟲力을 比較 檢定하였다. 對照區로서는 증류수에 浸漬한 桑葉을 添食시켜서 각각 조사하였다.

結果 및 考察

1. *Bacillus thuringiensis* 菌株間 plasmid DNA의 電氣泳動像

14개의 serotype와 19개의 variety로 分類되는 *B.t.*는 finitimus를 除外한 모든 菌株가 plasmid를 가지고 있고, 그 數와 分子量은 菌株에 따라 相異한 것으로 報告되어 있다(Fisher et al; 1980, Gonzalez and Carlton; 1980) 또한 같은 strain中에서도 plasmid의 數와 크기가 다른 많은 새로운 變種이 報告되고 있어 이러한 plasmid의 性狀에 基準을 두고 그 遺傳子型에 따른 分類와 同定이 이루어지는 境遇도 있다.

이상과 같은 觀點에서 本實驗에서 使用한 供試菌의 變種與否와 이후에 內毒素蛋白質의 遺傳情報가 記憶된 遺傳子 位置를 알기 위해 3種의 供試菌으로부터 plasmid를 分離하여 0.6% Agarose gel 電氣泳動을 遂行하여 分離된 gel을 ethidium bromide로 染色한 後 U.V. 下에서 確認한 結果는 그림 2 및 表 1과 같다.

plasmid의 分子量은 이미 電子顯微鏡 觀察로 open circular form plasmid의 分子量이 알려진 *thuringiensis*

Table 1. Number and Estimated Size^a of Extrachromosomal DNA Elements of *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki, var. aizawai, var. dendrolimus, and var. thuringiensis Isolated by the Agarose Gel Electrophoresis.

Strain	Serotype	Plasmid masses (Md)
HD-1 kurstaki	3a, 3b	150, 65, 45, 37, 32, 10, 7.2, 5.6, 5.2, 1.5.
dendrolimus	4a, 4b	75, 65, 45, 37.
aizawai	7	62, 37, 32, 8.5, 5.2, 4.2.
HD-2 thuringiensis	1	150, 75, 57, 54, 37, 32, 7.9, 7.2, 6.2, 5.2.

- a. The number of plasmid size were determined by the agarose gel electrophoresis using the electron microscopic sizes of plasmids of HD-2 as molecular weight markers.
 b. Flagella serotype according to de Barjac's classification (de Barjac, 1981)

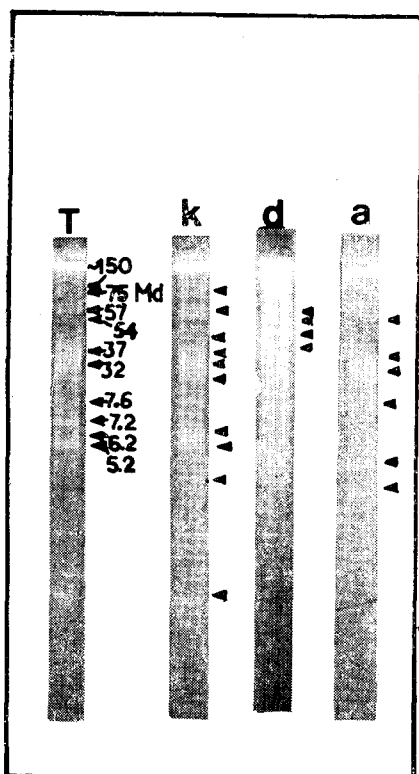


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis patterns of *B. thuringiensis* strains (lane T; thuringiensis HD-2, k; kurstaki HD-1, d; dendrolimus, a; aizawai), using the Birnboim and Doly method (1981).

In this gel, 20 μ l of the sample mixture was loaded in each slot. Electrophoresis was carried out at constant current, 3mA for 1hr, followed by electrophoresis at 7mA for 1/2hr, then at 28mA for 3hr. The gel was 0.6% agarose. The molecular weight of the HD-2 strain plasmid are listed on the light-hand margin for use as an approximate size scale.

HD-2 plasmid를 標準으로 하여 各 菌株의 分子量을 決定하였다(Gonzalez et al, 1980).

各 strain의 plasmid數와 크기는 kurstaki가 1.5~150 Md사이에 10개, dendrolimus가 75~33Md사이에 4개, aizawai가 4.2~62Md사이에 6개로서 Dedonder(1982)의 報告와 比較할때 aizawai의 低分子량의 plasmid가 1개 不足하고 kurstaki HD-1에서는 報告되지 않았던 150Md 以上の plasmid가 存在한다는 점을 除外하고는 거의 같은 結果를 나타내고 있다.

本 實驗結果에서 aizawai에서 나타나지 않은 低分子 plasmid는 細胞內에서 plasmid copy數가 적은 關係로 電氣泳動像에서 나타나지 않았을 것으로 推定되어 지고 HD-1의 150Md 以上 plasmid band는 Gonzalez 등 (1981)이나 Faust(1979)의 報告에서는 存在하는 것으로 되어있어 이들 報告書間의 相異한 結果의 原因에 대해서는 確認할 수 없었으나 本實驗에 使用된 菌株는 지금까지 알려진 kurstaki나 dendrolimus, aizawai의 變種은 아닌것으로 생각된다.

2. 殺蟲力 檢定

供試한 3개 菌株의 胞子와 結晶性 內毒素 蛋白質 混合物 및 純粹分離된 結晶性 內毒素 蛋白質을 3, 4齡 누에와, 5, 6齡 흰분나방에 대해서 殺蟲力 檢定을 實施한 結果는 다음과 같다(表 2, 3, 그림 3-6).

胞子와 內毒素 蛋白質의 混合物를 3齡 누에에 添食 處理한 경우, 各 菌株間의 毒性은 kurstaki, aizawai, dendrolimus順으로 나타났고, 各各의 LD₅₀은 1.72, 2.97, 454.67 μ g/ml로 aizawai나 kurstaki에 비해서 dendrolimus의 毒性이 약 150~250배 정도 약하게 나타났다(表 2). 그러나 이 結果는 胞子와 內毒素 蛋白質의 含量比는 培養條件과 菌株에 따라 差異를 나타낼 수 있는 關係로 3개의 菌株의 含量比가 一致하지 않는 경우를 排除할 수 없다. 따라서 上記와 같은 結果가 단지 內毒素 蛋白質의 絕對的인 毒性力의 差異에 起因

Table 2. The comparison of ^{a)} estimated LD₅₀ in varieties of *B. thuringiensis* spore and crystal protein mixture against *H. cunea* and *B. mori*

Strain	Insect	3rd instar <i>B. mori</i>	4th instar <i>B. mori</i>	5th instar <i>H. cunea</i>	6th instar <i>H. cunea</i>
aizawai		2.97	5.28	280.54	403.59
dendrolimus		454.67	627.72	26.27	18.04
kurstaki		1.72	2.15	7.78	6.21

a) Unit is $\mu\text{g per ml}$

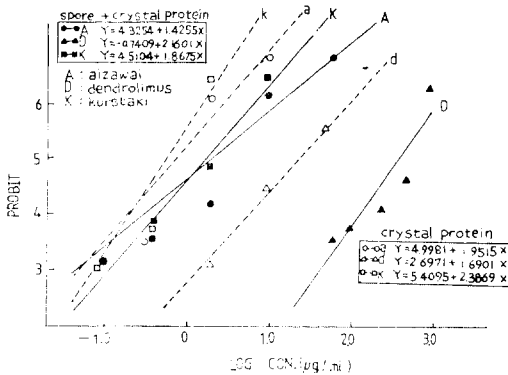


Fig. 3. Linear regression for the mortality of the third instar larvae of *B. mori* in varieties of *B. thuringiensis*.

Symbols: (A) aizawai (D) dendrolimus (K) kurstaki

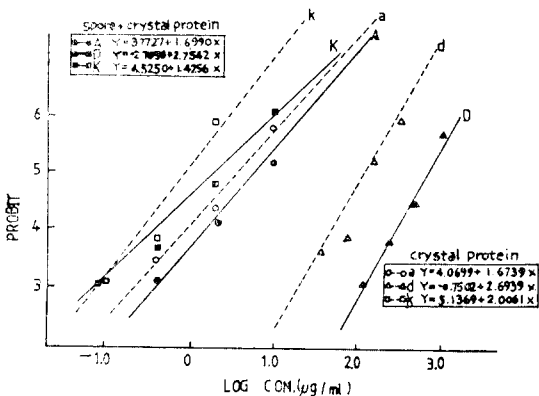


Fig. 4. Linear regression for the mortality of the fourth instar larvae of *B. mori* in varieties of *B. thuringiensis*.

Symbols: (A) aizawai (D) dendrolimus (K) kurstaki

한다고結論지을 수 없기 때문에 純粹한 內毒素 蛋白質만으로 殺蟲力을 檢定하였다(表 3).

그 結果, 누에 3齡에 添食 處理時 kurstaki, aizawai, dendrolimus 순으로 各各의 LD₅₀이 0.67, 1.0, 23.05 $\mu\text{g/ml}$ 로 나타나 胞子와 內毒素 蛋白質 混合物 處理時 보다는 적으나 strain에 따라 殺蟲力에 相當한 差異가

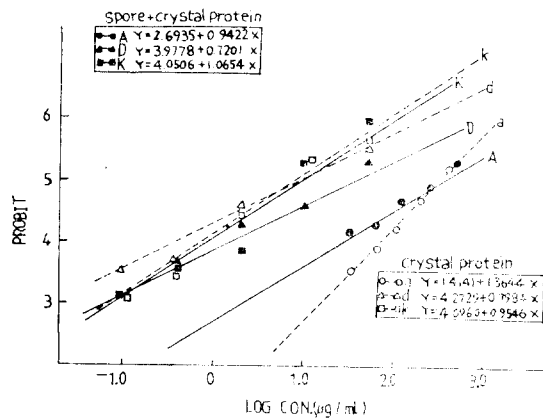


Fig. 5. Linear regression for the mortality of the fifth instar larvae of *H. cunea* in varieties of *B. thuringiensis*.

Symbols: (A) aizawai (D) dendrolimus (K) kurstaki

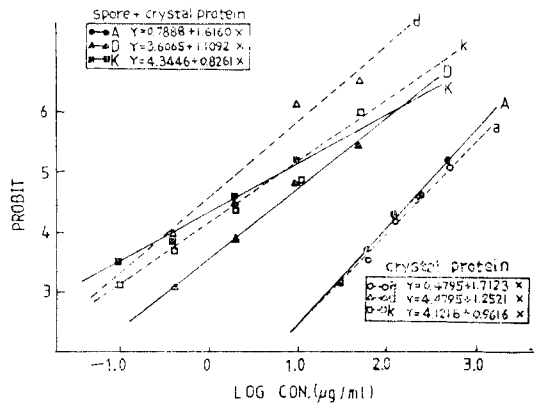


Fig. 6. linear regression for the mortality of the sixth instar larvae of *H. cunea* in varieties of *B. thuringiensis*.

Symbols: (A) aizawai (D) dendrolimus (K) kurstaki

있다는 것이 確認되었다.

이러한 結果는 4齡 누에를 處理한 경우에도 蟲體重이 增加함에 따라 抵抗性도 增加하여 LD₅₀이 3齡 處理時 보다 약간 增加했을 뿐 큰 差異가 없었다.

Table 3. The comparison of ^{a)} estimated LD₅₀ in varieties of *B. thuringiensis* crystal protein against *H. cunea* and *B. mori*

Strain	Insect	3rd instar <i>B. mori</i>	4th instar <i>B. mori</i>	5th instar <i>H. cunea</i>	6th instar <i>H. cunea</i>
aizawai		1.00	3.59	424.80	436.53
dendrolimus		23.05	136.31	8.14	2.60
kurstaik		0.67	0.85	8.85	8.19

a) Unit is μg per ml

Table 4. Mortality of the third instar larvae of *B. mori* in varieties of *B. thuringiensis* spore and crystal protein mixture.

varial epithet	Approx. Conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	No. of tested L.	No. of dead larvae with respect to each time (Hour)										Total No. of dead larvae	Mortality (%)
			3	6	9	12	15	18	21	24	36	48		
aizawai	50	30	15	1	1	7	3	1	1	—	—	—	29	96.7
	10	30	10	—	—	1	—	3	9	2	—	1	26	86.7
	2	30	4	—	—	—	—	—	—	—	—	2	6	20
	0.4	30	—	—	—	—	—	—	1	—	1	—	2	6.7
	0.08	30	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	3.3
dendrolimus	1,000	30	9	3	2	4	2	1	2	2	1	1	27	90
	500	30	2	—	1	3	1	—	1	1	2	—	11	36.7
	250	30	—	—	—	2	—	1	1	—	1	—	5	16.7
	125	30	—	—	1	1	1	—	—	—	—	—	3	10
	62.5	30	—	1	1	—	—	—	—	—	—	—	2	6.7
kurstaki	50	30	17	1	2	1	—	1	1	3	4	—	30	100
	10	30	10	—	—	—	2	1	4	6	5	—	28	93.3
	2	30	3	—	—	—	—	1	1	6	1	1	13	43.3
	0.4	30	2	—	—	—	—	—	—	—	2	—	4	13.3
	0.08	30	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	0

防除目的害蟲으로 흰불나방 5, 6齡에 대한 殺蟲力 檢定을 遂行한 結果는 胞子와 內毒素 蛋白質 混合物의 處理時 各 供試菌株間의 毒性은 누에를 供試蟲으로 한 경우와 달리 kurstaki, dendrolimus aizawai順으로 齡期에 따라 약간의 起伏이 있으나 aizawai가 dendrolimus에 비해 약 10~20배, kurstaki에 비해 약 40~70배 약한 것으로 確認되었다(表 2).

內毒素 蛋白質만을 處理한 경우에는 dendrolimus, kurstaki, aizawai順으로 나타나 dendrolimus가 kurstaki에 비해 毒性이 다소 높게 나타났다(表 3).

또한 흰불나방에 있어서 混合物과 內毒素 蛋白質 處理區 모두에서 dendrolimus와 kurstaki의 경우 齡期가 進行됨에 따라 LD₅₀가 낮아졌으며 aizawai는 오히려 LD₅₀가 다소 높아졌다(表 2, 3).

흰불나방에 대한 供試菌株들의 毒性을 比較해 볼때 胞子와 內毒素 蛋白質 混合物을 處理했을 경우에는

kurstaki가 dendrolimus에 비해 대체적으로 3~4배 정도 강한 것으로 나타났으나, 內毒素 蛋白質만을 分離하여 處理한 경우에는 dendrolimus가 kurstaki와 거의 같거나 높게 나타나 內毒素 蛋白質의 毒性은 dendrolimus가 강한 것으로 보이나 培養時 毒素蛋白質의 生産能力은 kurstaki에 비해 效率의이지 못한 것으로 생각되어진다. 이러한 結果는 表 10, 11의 時間에 따른 死蟲數를 比較한 경우와도 잘 一致되어지는 것으로서, 같은 濃度(50 μg)로 內毒素 蛋白質과 胞子混合物을 處理한 區에서 9時間內 總 斃死한 幼蟲數는 dendrolimus가 12頭, kurstaki가 25頭였으나, 內毒素 蛋白質단 處理한 경우에는 dendrolimus가 22頭 kurstaki가 12頭로서 dendrolimus가 강한것으로 나타나 있다.

以上の 生物檢定에 의한 누에와 흰불나방의 毒性 檢定 結果를 綜合 檢討하면 aizawai가 누에에 猛毒性을 나타내고 흰불나방에 가장 低毒性을 나타낸데 비해

Table 5. Mortality of the third instar larvae of *B. mori* in varieties of *B. thuringiensis* crystal protein.

varial epithet	Approx. Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	No. of tested L.	No. of dead larvae with respect to each time (Hour)											Total No. of dead larvae	Mortality (%)
			3	6	9	12	15	18	21	24	36	48			
aizawai	50	30	26	—	—	—	—	2	1	1	—	—	30	100	
	10	30	12	—	—	—	—	2	4	3	6	2	29	96.7	
	2	30	7	—	—	—	—	1	1	8	6	3	26	86.7	
	0.4	30	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	6.7	
	0.08	30	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	1	3.3	
dendrolimus	50	30	4	—	—	—	6	1	—	—	8	2	21	70	
	10	30	2	—	—	—	—	1	—	2	2	2	9	30	
	2	30	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	3.3	
	0.4	30	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	0	
	0.08	30	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	0	
kurstaki	50	30	30	—	—	—	—	—	—	—	—	—	30	100	
	10	30	26	1	1	—	1	—	—	1	—	—	30	100	
	2	30	8	—	—	1	1	2	3	6	6	1	28	93.3	
	0.4	30	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3	10	
	0.08	30	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	3.3	

Table 6. Mortality of the fourth instar larvae of *B. mori* in varieties of *B. thuringiensis* spore and crystal protein mixture.

varial epithet	Approx. Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	No. of tested L.	No. of dead larvae with respect to each time (Hour)											Total No. of dead larvae	Mortality (%)
			3	6	9	12	15	18	21	24	36	48			
aizawai	50	30	16	—	1	4	6	1	1	—	1	—	30	100	
	10	30	1	—	—	3	6	4	4	—	3	—	21	70	
	2	30	—	—	—	2	—	2	1	—	1	—	6	20	
	0.4	30	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	1	3.3	
	0.08	30	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	0	
dendrolimus	1,000	30	7	2	1	4	2	1	1	2	1	2	23	76.7	
	500	30	—	—	—	3	1	—	—	1	2	2	9	30	
	250	30	—	—	—	—	1	—	1	—	—	2	4	13.3	
	125	30	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1	3.3	
	62.5	30	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	0	
kurstaki	50	30	26	2	2	—	—	—	—	—	—	—	30	100	
	10	30	4	4	2	1	5	4	1	—	4	1	26	86.7	
	2	30	1	1	—	—	—	2	5	—	3	1	13	43.3	
	0.4	30	—	—	—	—	1	1	—	—	1	—	3	10	
	0.08	30	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1	3.3	

dendrolimus는 누에에는 가장 低毒性이고 흰불나방에 대해서는 kwrstaki와 對等한 優秀한 殺蟲力을 나타내는 것으로 밝혀졌다.

그러나 이러한 結果는 aizawai가 누에에 대하여 低毒性이라는 Aizawa(1975)의 보고와는 相反되는 結果이

고, 같은 菌株에 대해서도 供試蟲의 齡期나, 菌의 배양조건에 따라 LD₅₀치가 약 60~300배까지 현격한 차이를 나타낼 수 있다는 Rogoff(1969)와 Dulmage(1981) 등의 보고와도 비교할때 絶對적인 毒性의 세기라기보다는 같은 조건하에서 각 菌株간의 상대 비교독성으로

Table 7. Mortality of the fourth instar larvae of *B. mori* in varieties of *B. thuringiensis* crystal protein.

varial epithet	Approx. Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	No. of tested L.	No. of dead larvae with respect to each time (Hour)											Total No. of dead larvae	Mortality (%)
			3	6	9	12	15	18	21	24	36	48			
aizawai	50	30	19	—	—	2	6	3	—	—	—	—	30	100	
	10	30	10	1	—	2	—	5	3	1	2	—	24	80	
	2	30	1	—	—	—	1	2	1	—	3	—	8	26.7	
	0.4	30	—	—	—	—	—	2	—	—	—	—	2	6.7	
	0.08	30	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	0	
dendrolimus	300	30	10	—	—	7	2	—	3	1	1	1	25	83.3	
	150	30	3	1	—	2	2	2	4	2	1	1	18	60	
	75	30	—	1	—	—	2	—	—	—	—	1	4	13.3	
	37.5	30	—	1	—	—	—	—	—	—	1	1	3	10	
	18.75	30	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	0	
kurstaki	50	30	29	1	—	—	—	—	—	—	—	—	30	100	
	10	30	12	10	3	—	—	1	1	1	2	—	30	100	
	2	30	1	3	—	—	3	3	3	—	12	—	25	83.3	
	0.4	30	—	1	—	—	1	—	1	—	1	—	4	13.3	
	0.08	30	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1	3.3	

Table 8. Mortality of the fifth instar larvae of *H. cunea* in varieties of *B. thuringiensis* spore and crystal protein mixture.

varial epithet	Approx. Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	No. of tested L.	No. of dead larvae with respect to each time (Hour)											Total No. of dead larvae	Mortality (%)
			3	6	9	12	15	18	21	24	36	48			
aizawai	500	30	4	3	1	2	1	4	1	1	1	—	18	60	
	250	30	2	3	2	1	1	3	1	—	1	—	14	46.7	
	125	30	—	2	3	2	1	—	—	1	—	3	12	40	
	62.5	30	—	2	2	—	—	1	1	—	—	1	7	23.3	
	31.25	30	—	1	2	—	1	1	—	—	—	1	6	20	
dendrolimus	50	30	7	2	3	—	1	1	1	1	2	—	18	60	
	10	30	4	2	1	—	—	—	—	1	2	—	10	33.3	
	2	30	1	1	—	—	2	—	—	1	2	—	7	23.3	
	0.4	30	—	1	—	—	1	—	—	—	1	—	3	10	
	0.08	30	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	1	3.3	
kurstaki	50	30	12	3	1	2	3	2	1	1	—	—	25	83.3	
	10	30	6	2	2	—	3	3	2	1	—	—	19	63.3	
	2	30	2	—	—	—	1	—	1	—	—	—	4	13.3	
	0.4	30	1	—	—	—	1	—	—	—	—	—	2	6.7	
	0.08	30	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	1	3.3	

간주되어 진다.

한편 본 실험에서 plasmid 성장 비교 결과는 aizawai plasmid가 既存의 aizawai plasmid에 관한 보고들과 차이가 없는 것으로 볼때 본 실험의 毒性 檢定 結果가 Aizawa의 보고와는 일치하지 않았지만 공시된 aizawai

菌株가 절대 새로운 變種이 아님을 확인할 수 있었다.

공시층의 확대 및 다양한 菌株의 導入에 의한 실험과 이들 결과의 재현성여부가 요구되는 것은 사실이나 이상의 연구결과는 국내에서 사용될 B.t.劑製 菌株로는 같은 산포조건하에서 蠶絲業에 대한 被害를 極小化할

Table 9. Mortality of the fifth instar larvae of *H. cunea* in varieties of *B. thuringiensis* crystal protein.

varial epithet	Approx. Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	No. of tested L.	No. of dead larvae with respect to each time (Hour)										Total No. of dead larvae	Mortality (%)
			3	6	9	12	15	18	21	24	36	48		
aizawai	500	30	3	3	2	2	2	3	1	1	—	—	17	56.7
	250	30	2	2	1	1	1	2	—	1	1	—	11	36.7
	125	30	1	1	1	—	1	1	—	1	—	—	6	20.0
	62.5	30	—	1	1	1	—	1	—	—	—	—	4	13.3
	31.25	30	—	—	1	—	—	1	—	—	—	—	2	6.7
dendrolimus	50	30	10	3	1	—	1	—	3	1	1	1	21	70
	10	30	8	3	1	—	2	1	1	—	2	—	18	60
	2	30	3	2	—	—	1	—	2	1	1	—	10	33.3
	0.4	30	—	—	—	—	2	—	—	—	1	—	3	10
	0.08	30	—	—	1	—	—	—	—	1	—	—	2	6.7
kurstaki	50	30	13	2	—	1	3	2	1	—	—	—	22	73.3
	10	30	7	2	1	—	3	2	1	1	1	—	18	60
	2	30	3	1	2	—	1	—	—	—	1	—	8	26.7
	0.4	30	1	—	—	—	1	—	—	—	—	—	2	6.7
	0.08	30	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1	3.3

Table 10. Mortality of the sixth instar larvae of *H. cunea* in varieties of *B. thuringiensis* spore and crystal protein mixture.

varial epithet	Approx. Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	No. of tested L.	No. of dead larvae with respect to each time (Hour)										Total No. of dead larvae	Mortality (%)
			3	6	9	12	15	18	21	24	36	48		
aizawai	500	30	5	3	2	1	2	1	—	—	3	—	17	56.7
	250	30	3	2	1	1	1	—	—	—	1	1	10	33.3
	125	30	—	1	1	1	2	—	1	—	—	1	7	23.3
	62.5	30	—	1	1	—	1	—	—	—	—	—	3	10
	31.25	30	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	1	3.3
dendrolimus	50	30	11	—	1	2	2	3	—	1	—	—	20	66.7
	10	30	6	2	—	1	1	1	—	1	1	—	13	43.3
	2	30	2	—	1	—	—	1	—	—	—	—	4	13.3
	0.4	30	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	1	3.3
	0.08	30	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	0
kurstaki	50	30	17	6	2	1	—	2	1	—	1	—	30	100
	10	30	8	4	1	1	1	1	—	—	1	—	17	56.7
	2	30	5	2	—	1	—	2	—	1	—	—	11	36.7
	0.4	30	2	1	—	—	—	1	—	—	—	—	4	13.3
	0.08	30	1	—	—	—	—	—	—	1	—	—	2	6.7

수 있는 동시에 다른 害蟲에 대해서는 比較的 殺蟲力이 강한 dendrolimus가 가장 效果의인 것으로 믿어지며, 日本의 경우처럼 現在의 化學殺蟲劑에 對等한 撒布裝置만 뒤따라준다면 B.t.劑製의 撒布는 거의 問題가 되지 않을 것으로 생각된다.

摘 要

害蟲의 微生物的 防除를 위한 微生物殺蟲劑 中 特別히 注目되어지는 *Bacillus thuringiensis*殺蟲劑를 開發함에

Table 11. Mortality of the sixth instar larvae of *H. cunea* in varieties of *B. thuringiensis* crystal protein.

varial epithet	Approx. Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	No. of tested L.	No. of dead larvae with respect to each time (Hour)											Total No. of dead larvae	Mortality (%)
			3	6	9	12	15	18	21	24	36	48			
aizawai	500	30	3	2	2	2	2	1	—	2	1	1	16	53.3	
	250	30	2	2	1	1	1	—	—	1	—	2	10	23.3	
	125	30	1	1	—	1	1	—	1	—	—	1	6	20	
	62.5	30	—	—	1	—	1	—	—	—	—	—	2	6.7	
	31.25	30	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	0	
dendrolimus	50	30	5	11	6	3	1	1	—	—	1	—	28	93.3	
	10	30	4	7	3	4	3	3	1	—	1	—	26	86.7	
	2	30	1	1	—	—	1	1	1	—	4	—	9	30	
	0.4	30	—	1	—	—	1	1	—	—	2	—	5	16.7	
	0.08	30	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	1	3.3	
kurstaki	50	30	7	2	3	1	1	2	1	4	1	3	25	83.3	
	10	30	4	2	1	1	—	2	—	2	—	1	13	43.3	
	2	30	2	1	—	1	1	1	—	1	—	1	8	26.7	
	0.4	30	1	—	1	—	—	1	—	—	—	—	3	10	
	0.08	30	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1	3.3	

있어서 우리나라와 같은 養蠶國家에서는 누에에 대한 被害가 少다므로 益蟲인 누에에 대해서는 比較的 低毒性이고 目的害蟲에 대해서는 猛毒性인 菌株을 選拔하기 위한 基礎資料를 얻고자 *plasmid* 泳動像에 의해 確認된 3種의 *B.t.* 菌株 *kurstaki*, *aizawai*, *dendrolimus*를 利用하여 *Renograffin* 二重層法에 의해 分離된 內毒素 蛋白質 및 胞子와 內毒素 蛋白質 混合物 각각을 누에와 흰불나방에 대해 毒性을 檢定하여 아래와 같은 研究結果를 얻었다.

1. *plasmid*의 電氣泳動像을 分析한 結果 *kurstaki*가 150~1.5Md 사이에 10개, *dendrolimus*가 75~33Md 사이에 4개, *aizawai*가 62~4.2Md 사이에 6개 band가 나타났다.

2. 누에와 흰불나방에 대한 毒性檢定結果는 아래와 같다.

- i) *dendrolimus*가 누에에 있어서는 가장 低毒性이고 目的害蟲인 흰불나방에 대해서는 *kurstaki*와 對等한 優秀한 殺蟲力을 나타내었다.
- ii) 供試蟲에 따라 菌株間에 毒性差異가 크게 나타났다. *kurstaki*가 供試蟲에 따른 毒性差異가 가장 작고 比較的 毒性이 높은 것으로 나타났다.

參 考 文 獻

Aizawa, K., Fujiyoshi, N., and Ohba, M., Yoshikawa.

(1975) Proc. 1st Intersectional Congress of IAMS 2:597-606.

Angus, T.A. (1956) Extration, purification, and propertises of *Bacillus sotto* toxin. Can. J. Microbial. 2:122-131.

Birnboim, H.C., Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Research 7:1513-1523.

De Barjac, H., and Bonnefoi, A. (1962) Classification of *Bacillus thuringiensis*. Entomophaga 7:5-31.

Dedonder, R., Lereclus, D. (1982) Molecular relationships among plasmid of *Bacillus thuringiensis* conserved sequences through 11 crystaliferous strains. Mol. Gen. Genet. 186:391-396.

Dulmage, H. etal. (1981) In Microbial Control of Pests and Plant Diseases, 1970-1980. H.D. Burges (Ed.). Academic Press, London, pp.192-222.

Faust, R.M., Spizizen, J., Gage, V., Travers, R.S. (1979) Extrachromosomal DNA in *B. thuringiensis var. kurstaki*, *var. fnitimus*, *var. sotto* and in *Bacillus popilliae*. J. Invertebr. Pathol. 33:233-238.

Finney, D.J. (1971) Probit Analysis, 3rd Ed. pp.333, Cambridge Univ. press. London.

Fisher, H.M., and Watson, J. (1980) Experimentia 36:1452.

- Fitz James, p., and Hanney, c.l. (1955) The protein crystals of *Bacillus thuringiensis berliner*. Can. J. Microbiol. 1:694-710.
- Goldberg, L.J., and Margalit, J. (1977) A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, Mosquito News 37, 355-358.
- Gonzalez, J.M. Dulmage, H.T., and Carlton, B.C., (1981) Correlation between specific plasmid and δ -endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. Plasmid 5:351-356.
- Gonzalez, J.M., and Carlton, B.C. (1980) Patterns of plasmid DNA in crystalliferous and acrySTALLIFEROUS strains of *Bacillus thuringiensis*. Plasmid 3:92-98.
- Hanney, C.L. (1953) Nature (Lond.) 172:1004.
- Kavenage, F. (1972) In F. kavenogh(Ed.), Analytical Microbiology, pp. 43-121.
- Nickerson, K.W., and Bulla, L.A. (1974) Appl. Microbiol. 28:124-128.
- Ribier, J., and Lecadet, M.M. (1973) Etude ultrastructureale et cinetique de la sporulation de *Bacillus thuringiensis var. berliner* 1715. Ann. Microbiol. 124:311-344.