The Korean Journal of Microbiology (2010) Vol. 46, No. 4, pp. 389-396
Copyright ⓒ 2010, The Microbiological Society of Korea

Bacillus thuringiensis BT17 균주를 이용한 인시목 유충 방제용 미생물 살충제 생산

안경준[1*] · 이태근[2]
[1]서원대학교 과학교육과, [2]㈜흙살림

Production of Microbial Insecticide Using *Bacillus thuringiensis* BT17 for the Control of Lepidopteran Larvae

Kyung-Joon Ahn[1*] and Tae-Geun Lee[2]

[1]Department of Science Education, Seowon University, Cheongju 361-742, Republic of Korea
[2]Heuksalim Co., Cheongwon 363-883, Republic of Korea

(Received November 22, 2010/Accepted December 24, 2010)

Insecticidal crystalline toxin producing *Bacillus thuringiensis* BT17 strain was isolated and identified as *B. thuringiensis* serovar *colmeri* by 16S rRNA analysis. BT17 strain produced crystalline δ-endotoxin against to Lepidopteran larvae effectively on the culture broth of soybean meal and skim milk, 30°C and 36 h shaking culture of 280 rpm. The maximum colony forming unit achieved when the culture was continued for 24 h, but the number of crystals increased until 36 h in the 200 L fermentor. Liquid type of biological insecticide product was made, and after 3 months storage in 20°C the number of crystals was increased up to twice than beginning. Biocontrol effect of BT17 insecticide product was better in *Plutella xylostella* than in *Spodoptera exigua*, and the toxicity to animals was negligible.

***Keywords*:** *B. thuringiensis*, δ-endotoxin, biocontrol, Lepidoptera, microbial insecticide

작물 재배에 있어 생산성에 영향을 미치는 요소 가운데 농업해충은 농작물에 직접적인 피해를 줌으로 고품질 농산물 생산과 생산량 감소의 막대한 피해를 유발한다. 과채류나 엽채류, 과수류, 수도작 등을 친환경적으로 재배하는 농가에서 문제가 되는 해충 가운데 나비목 해충은 고추, 가지, 토마토에서 담배나방, 왕담배나방 등이 있으며, 배추, 양배추를 비롯해서 기타 쌈채류에서는 배추흰나비, 좀나방이 문제가 심한 편이다. 파밤나방과 담배거세나방은 기주 범위가 넓어 여러 작물에 해를 준다. 1950년대부터 개발된 유기합성농약은 병해충은 물론 잡초제거에 이르기까지 생산성 감소 요인에 대한 화학적 방제의 기틀을 마련하였으나, 1970년대 이후 농약의 강한 독성과 병해충의 내성 또는 저항성 유발과 농업생산물 및 환경에 농약 성분이 잔류하는 문제가 사회적으로 심각하게 받아들여지면서 생태계에 영향이 적은 안전한 농약의 개발에 대한 관심이 모여지게 되었다.

*Bacillus thuringiensis*는 1901년 Ishiwata에 의하여 병든 누에(*Bombyx mori*)에서 최초로 분리되었으며, 그 후 Berliner는 독일 Thuringen 지방에서 지중해 밀가루나방(*Anagaster kuehniella*)의 병든 유충으로부터 세균을 분리하여 *B. thuringiensis*로 부르기로 제안하며 알려지게 되었다(2).

다양한 세균들이 각종 곤충에 살충성을 나타내는 것으로 알려져 왔지만(4), 나비 등을 포함하는 인시목(Lepidoptera) 유충에 대한 살충력이 우수한 *B. thuringiensis* 균주들이 분리되면서 1930년대에 이미 유럽에서 실용화되어 판매되기 시작하였고 1980년대에는 농약등록도 가능해져서 다양한 BT 제품이 사용되고 있으며 살충효과가 우수한 균주인 *B. thuringiensis* serovar *kurstaki*를 이용한 상업적 활용이 활발히 전개되었다(9). 1977년에는 Goldberg와 Margalit(10)에 의하여 파리나 모기와 같은 쌍시목(Diptera)에 효과가 있는 *B. thuringiensis* serovar *israelensis*가 발견되면서 유용성이 증대되었으며 1983년에는 딱정벌레를 포함하는 초시목(Coleoptera)에 살충효과를 보이는 *B. thuringiensis* serovar *tenebroinis*가 발견되어 콜로라도 잎벌레를 대상으로 여러 제제가 개발되었으며, 최근에는 유전공학적으로 재조합된 균주를 활용하는 기술(2)도 시도되었고, 식물체에 독소 생산 유전자를 형질전환시킨 BT crop들도 실용화된 상태이나 안전성에 관한 문제가 대두되기도 하였다.

*B. thuringiensis*는 *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. mycoides* 등

* For correspondence. E-mail: kjahn@seowon.ac.kr; Tel: +82-43-299-8403; Fax: +82-43-299-8400

을 포함하는 *B. cereus* group의 한 종류이며(13, 18), *B. thuringiensis*의 특징은 살충성 독소를 생산하는 점이다. 살충성을 보이는 *Bacillus* 속 세균들은 *B. thuringiensis*, *B. sphaericus*, *B. popiliae, B. lentimorbus* 등이며 이들은 모두 포자를 생산하는 간균이고 균주에 따라 인시목, 쌍시목, 또는 초시목 등 다양한 해충에 대해 살충성을 보이는 균주들이 분리되었다(21). *B. thuringiensis* 일부 균주와 *B. sphaericus*는 모기에 대해 뛰어난 살충성을 갖고 있어서 그 상업적 유용성이 강조되었으며, *B. popiliae*와 *B. lentimorbus*는 잔디밭, 목장, 사탕수수의 주요 해충인 굼벵이의 병원균으로서 이른바 milky disease를 유발하여 치사시켜서 해충 방제에 유효하므로 초지가 많은 지역에서 상업화가 이루어졌다(5). 최근에는 막시목(Hymenoptera), 동시목(Homoptera), 직시목 (Orthoptera), 식모목(Mallophaga) 같은 곤충 뿐 아니라 nematoda, mite, protozoa 같은 생물에도 유효한 균주들이 분리되었다(6, 23).

B. thuringiensis 균주들은 포자 형성기간 동안 세포 안에 살충력이 있는 단백질을 결정체 형태로 만드는데, 유충에 의해 섭취된 단백질 결정체는 유충의 장내에서 용해되어 한 종류 이상의 δ-endotoxin 단백질을 생산하는데 이는 주로 Cry 독소로 구성되며(14, 21), 그 외 Diptera 목과 Coleoptera 목에 효과를 보이는 Cyt 독소도 확인되었다(12). 이 단백질들은 표적곤충에 대한 높은 선택성을 보이면서 동시에 인간이나 척추동물 그리고 식물에는 거의 해가 없고 자연계 내에서 생분해된다. 따라서 *B. thuringiensis*는 농업이나 공중보건에 중요한 질병매개체인 곤충을 효과적으로 억제하는 좋은 수단이 되고 있다.

재료 및 방법

균주, 배지 및 배양조건

B. thuringiensis 균주를 분리하기 위하여 국내 토양이나 누에나방 유충 사체를 채집하여 시료 무게의 10배에 해당하는 멸균증류수를 가하고 실온에서 30분 동안 둔 다음 부유액을 LB평판배지에 도말하여 32°C에서 1-2일간 배양하였으며, 평판배지 상에 형성된 *B. thuringiensis* 균주의 전형적인 콜로니 형태인 희고 둥근 콜로니를 순수 분리하여 균주로 선발하였다.

토양시료 등으로부터 균주를 순수분리하기 위하여 LB 배지 (trypton 1 g, yeast extract 0.5 g, NaCl 0.5 g, DW 100 ml)를 사용하였으며, 독소 결정을 생산하기 위한 배지로는 soybean meal과 skim milk가 포함된 배지를 각각1% 내지 2%로 다양하게 조정하여 사용하였다. 배지의 양은 실험실에서 소량 배양하는 경우에는 100 ml로 하였으며, 대량배양을 위한 seed culture는 1 L를 배양하였고, 이어서 200 L로 증량하여 키웠다. 배양온도는 32°C로 하였으며, 150 rev/min 속도로 교반하였고, 0.5 vvm의 air를 가하였으며, antifoam은 silicon oil을 0.5%로 배양 초기에 1회 첨가하였고, pH 변화를 보기 위하여 pH는 별도로 조절하지 않았다. 이렇게 배양한 배양액을 시제품과 효능검사를 위한 시료로 사용하였다. 분리 균주를 배양하여 최대로 결정성 살충독소가 생산되는 조건을 위상차현미경으로 알아보기 위해서는 LB 액체배지에 포자 생성을 촉진하기 위하여 $MgSO_4$와 $MnCl_2$를 각각 0.02% 첨가하였으며 배양온도는 28°C, 30°C, 32°C로 조정하였고, 진탕배양 속도는 200 rpm, 240 rpm, 280 rpm으로 하여 2일간 배양하였다.

분리균주의 동정

분리한 *B. thuringiensis* 균주 중 결정성 살충독소를 많이 생산하여 살충성이 우수한 균주를 선발하여 동정시험을 하였다. 동정시험을 위하여 API 50CHB (bioMèriux, France)를 사용하였으며, 보다 정확한 동정을 위하여 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석하였다.

순수 분리된 BT17 균주를 Nutrient broth agar (Difco) 배지에 접종하고, 28°C에서 2일간 배양하였으며, benzyl chloride법 (26)을 변형하여 DNA를 추출하였고 16S rDNA의 PCR (Polymerase Chain Reaction) 증폭을 위하여 사용된 primer는 27F (5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′)와 1492R (5′-GGTTACCTTGTTACGACTT-3′)이었으며 PCR 조건은 다음과 같다. 즉, 초기해리는 95°C에서 2분간 시행하였고, 해리(94°C, 30초), 혼성(58°C, 30초) 및 중합(72°C, 45초)의 3 과정을 30회 반복하고 추가적인 중합과정(72°C, 5분)을 수행하였다. 증폭된 16S rDNA는 PCR Product Purification kit (QIAGEN)를 사용하여 정제하였고, PCR 정제산물은 Genetic analyzer 310A (Applied Biosystems)를 사용하여 염기서열을 분석하였으며, DDBJ/NCBI/ GenBank와 Ribosomal Database Project II (RDP II)의 database에서 상동성 검색을 수행하였다.

순수 분리된 BT17 균주의 균체지방산조성 분석을 위하여 TSA (trypticase soy broth agar, Difco) 배지에 접종 후 28°C에서 3일간 배양하였으며, 균체 50 mg (wet weight)을 취하여 균체 지방산 methyl ester화 및 추출을 수행하였다(15). 획득한 자료는 Microbial Identification System (MIDI; Microbial ID, Inc., USA)을 이용하여 6890N Gas Chromatograph (Agilent Technologies)로 분석하였다.

결정성 살충독소 생산 확인

B. thuringiensis 균주들은 세포내에 내생포자와 더불어 각종 곤충에 대하여 살충성을 보이는 단백질 성분의 결정성 독소를 생산한다(14). 분리한 균주들의 독소 생산 여부와 배양 조건에 따른 독소 생산 최적조건을 찾기 위하여 위상차현미경을 이용하여 관찰하였다. Slide glass 위에 얇게 2% 한천 막을 입힌 뒤에 *B. thuringiensis* 균 배양액을 5 μl 떨구고 cover glass를 덮어 전체적으로 배양액이 펴지게 한 다음, 배양액이 한천에 스며들어 포자나 균체 등이 움직이지 않게 될 때 까지 30초간 기다린 후 immersion oil을 한 방울 떨구고 위상차현미경 (Olympus BH-2)으로 관찰하여 한 시야 당 관찰되는 결정성 독소의 개수를 세었다. 한 slide glass당 25개의 시야를 임의로 선정하여 나타난 개수를 세어서 평균값을 얻었으며 배양액 1 ml 당 독소의 수는 현미경 시야의 면적을 micrometer로 측정하여 계산한 면적과 cover glass 면적을 비교해서 결정하였으며 3회 반복 실험을 통하여 얻은 값의 평균값과 표준편차를 구하였다.

결정성 독소의 개수와 더불어서 viable cell count를 비교하기 위하여 시료를 희석해서 LB 평판에 고르게 도말하여 배양한 후 나타나는 콜로니 수를 보았으며 아울러서 배지의 pH 변화도 같이 조사하였다.

제형결정

대량배양한 배양액을 분상 또는 액상으로 제형을 결정하기 위하여 독소의 유지 여부와 경제적인 면을 고려하였다. 분상으로 제형을 완성하기 위하여 동결건조를 거친 배양액 분말에 증량제로서 kaolin 75%와 계면활성제로 CR-WP280B 7%, 분산제로 CR-SDS를 3%, 흡착제로 white carbon을 5% 가하여 제형을 완성하였으며, 액상의 제형을 위해서는 2,500×g로 20분 동안 원심분리하여 균체를 제거한 배양액에 증점제로 polyethylene glycol을 10-15% 되도록 가하였으며, 계면활성제로 CR-SC305를 5-10%, 그리고 산도조절제로 K_2HPO_4를 0.5% 첨가하였으며, 분상과 액상 제형에서의 독소 유지 정도를 비교하였다.

살충성 비교 및 field에서의 방제 효과 조사

분리 및 선발된 *B. thuringiensis* 균주들의 살충성을 비교하기 위하여 온도 25°C, 상대습도는 70%로 유지되는 항온항습실에서 배추좀나방(*Plutella xylostella*)의 3령기 유충을 10마리씩을 대상으로하여 균 배양액을 도포한 배추잎(품종: 상상이상)을 섭식시키면서 유충의 살충 여부를 조사하였으며, 시험 약제에 포함되어 있는 crystal 수를 비교하였다. 실제 field에서의 방제효과를 보기 위하여는 배추좀나방과 파밤나방(*Spodoptera exigua*)의 유충을 대상으로 하여 15-20°C의 하우스 내에서 살충여부를 조사하였다. 대상해충을 배추좀나방 3령 유충으로 하여 실시한 실험에서는 시험작물인 배추(품종: 상상이상)에 유충의 수를 60개체로 하고 200 L 배양기에서 36시간 배양하여 생산한 BT17 시제품을 125배, 250배, 500배 희석하여 처리하였다.

한편, 대상해충을 파밤나방2령 유충으로 실시한 경우에는 시험작물인 배추(품종: 신춘1호)에 유충의 수를 30마리로 하여 BT시제품을 125배, 250배, 500배 희석하여 처리하고 키우면서 유충의 치사 여부를 관찰하였다.

안정성 검사

생산된 시제품의 안정성을 확인하기 위한 *B. thuringiensis* BT17 균주 배양액을 포함한 시험약제를 급성 경구 독성시험을 위하여 ICR계 마우스에 투여하였다. 사육조건은 22°C의 실험실에서 5주령의 수컷과 암컷 각각 10마리씩을 대상으로 하여 주사기를 이용하여 5,000 mg/kg 투여군과 용매 대조군을 두어 위내에 강제로 1회 투여하였으며 투여 후 14일간 사망율, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰하였다.

BT17에 대한 급성 경피 독성시험은 SD계 랫드에 처리하였다. 사육조건은 마우스와 같은 조건에서 8주령의 수컷과 암컷 각각 10마리씩을 대상으로하여 체표면적의 10% 정도인 4 cm

Table 1. Biochemical characteristics (carbohydrates) of *Bacillus thuringiensis* BT17 and *Bacillus cereus* (Apiweb data)

Carbohydrate source	BT17	*B. cereus*	Carbohydrate source	BT17	*B. cereus*
Glycerol	+	+	Salicin	+	+/-
rythritol	-	-	Cellobiose	-	+/-
D-Arabinose	-	-	Maltose	+	+
L-Arabinose	-	-	Lactose	-	-
Ribose	-	-	Melibiose	-	-
D-Xylose	-	-	Sucrose	-	+/-
L-Xylose	+	+	Trehalose	+	+
Adonitol	+	+	Inulin	-	-
β-Methyl-D-xyloside	-	-	Melezitose	-	-
Galactose	-	-	Raffinose	-	-
Glucose	-	-	Starch	+	+/-
Fructose	-	-	Glycogen	+	+/-
Mannose	-	-	Xylitol	-	-
Sorbose	-	-	Gentiobiose	-	-
Rhamnose	-	-	D-Turanose	-	-
Dulcitol	-	-	D-Lyxose	-	-
Inositol	-	-	D-Tagatose	-	-
Mannitol	+	+	D-Fucose	-	-
Sorbitol	-	-	L-Fucose	-	-
α-Methyl-D-mannoside	+	+	D-Arabitol	-	-
α-Methyl-D-glucoside	+	+	L-Arabitol	-	-
N-Acetyl glucosamine	+	+	Gluconate	-	-
Amygdalin	-	-	2-Keto-gluconate	-	-
Arbutin	-	-	5-Keto-gluconate	-	-
Esculin	-	-			

× 5 cm 정도를 제모하고 4,000 mg/kg 투여군과 용매 대조군을 두어 1회 경피 도포한 후 24시간 동안 약제에 노출시키고 증류수로 세척한 다음 2주간 사망율, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰 조사하였다.

BT17 균주의 어독성을 보기 위하여 잉어(*Cyprinus carpio*)에 대한 영향시험을 96시간 동안 실시하여 농도 당 노출 어류 10마리에 대한 생사수, 일반중독증상을 관찰하고 체중 및 전장을 조사하였으며, 시험기준은 "농촌진흥청 고시 제 2008-13호, 별표4 환경생물독성 시험기준과 방법, II 생화학농약, 2.담수어류에 대한 영향시험"(2008. 5. 27)에 따랐고, 시험농도(nominal concentration)는 10.0 mg/L로 하여 시험을 실시하였다.

결과 및 고찰

균주 동정 및 살충성 독소 생산

국내 토양이나 곤충의 사체에서 분리한 *B. thuringiensis* 로 추정되는 균주들 중에서 BT17는 충북 청원군 오창면 토양에서 분리하였으며, BT135, BT144, BT170 균주는 경북 안동시에서, BT18과 BT154 균주는 경북 영주시에서 채취한 누에 나방 사체로 부터 얻었고, 이 균주들을 LB 평판에 접종하여 32°C에서 1일 동안 키워서 증류수에 풀고 위상차 현미경으로 관찰한 결과 BT144 균주를 제외한 각 균들은 내생포자(S)와 더불어서 마름모꼴의 결정성 독소(C)를 생산하였으며 배양시간이 지속되면 독소 결정들은 균체 외부로 빠져나오는 것을 볼 수 있었다(Fig. 1).

API kit를 이용한 동정 실험에서 BT144 균주를 제외한 결정성 독소를 생산하는 4균주 모두 동일한 탄수화물 이용 pattern을 보였으며(Table 1), 이 자료를 bioMérieux 회사(www.biomerieux.com)에서 제공하는 Apiweb을 통하여 분석한 결과 탄수화물 이용 능력이 거의 유사하여 *B. cereus*이거나 *B. thuringiensis*일 확률이 83.5%로 나타났는데 결정성 독소를 생산하는 균은 후자이므로 모두 *B. thuringiensis*로 판정하였다.

이어서 순수분리한 균주들을 100 ml LB액체배지에서 2일간 배양한 배양액을 배추잎에 도말하고 배추좀나방 유충에 처

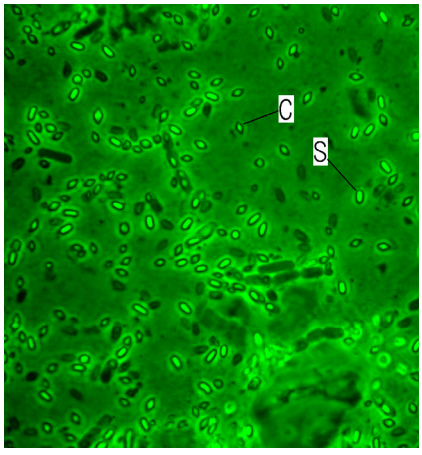

Fig. 1. Phase contrast photomicrograph of *B. thuringiensis* BT17. 'C' and 'S' mean crystal and spore, respectively.

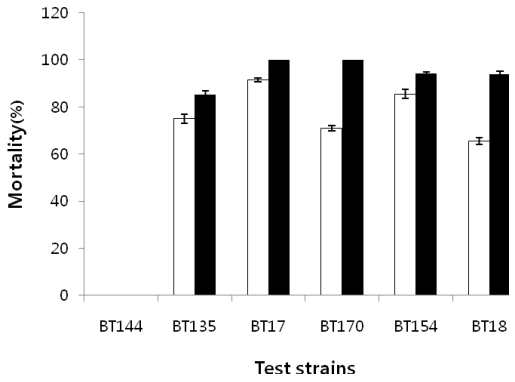

Fig. 2. Inseticidal activity to *Plutella xylostella* larva of *B. thuringiensis* strains according to feeding period (□, 24 h; ■, 48 h) of LB culture broth.

리한 결과는 Fig. 2와 같다. BT144 균주는 전혀 유충을 죽이지 못하였으며, 처리 후 24시간에 BT17 균주 처리구에서는 90% 이상의 유충이 사멸하였고, 48시간이 지나면서 나머지 균들을 처리한 실험구에서는 85% 이상의 유충이 죽었으며, 특히 BT17과 BT170 균주 처리구에서는 모든 유충이 사멸하였다.

이상과 같은 결과를 토대로 BT제제를 대량 생산하기 위하여 선정한 균주는 BT17 균주였다. BT17 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열(1,319 bp)을 해석하고 NCBI blast Program의 database에서 상동성을 검색한 결과, *B. thuringiensis* serovar *colmeri*와 100% 동일한 것으로 나타났다. 따라서 BT17 균주는 *B. thuringiensis* serovar *colmeri*로 동정 확인하였다(Fig. 3).

한편, *B. thuringiensis* serovar *colmeri* BT17의 균체 지방산 조성 분석을 실시한 결과, 주요 지방산으로는 C16:0 (19.96%), C13:0 iso (15.09%)와 C15: iso (12.53%)의 분포를 나타내었으며, C14:0 iso, C16:0 iso, C17:0 iso 그리고 C17:0 anteiso와 같은 다양한 분지형 지방산을 함유하는 특징을 나타내었다. 또한 BT17 균주는 *B. thuringiensis* ATCC 10792^T 표준균주의 주요 균체지방산 조성과도 유사한 특징을 나타내었다(Table 2).

Table. 2. Cellular fatty acid contents (%) of *B. thuringiensis* BT17 and *B. thuringiensis* ATCC 10792^T

Fatty acid	*B. thuringiensis* BT17	*B. thuringiensis* ATCC 10792^T
Saturated acids		
$C_{12:0}$	2.77	0.3
$C_{14:0}$	4.67	3.4
$C_{16:0}$	19.96	4.8
$C_{18:0}$	2.54	0.5
Branched-chain acids		
$C_{12:0\ iso}$	1.96	1.1
$C_{13:0\ iso}$	15.09	10.7
$C_{13:0\ anteiso}$	4.06	1.6
$C_{14:0\ iso}$	5.2	6.3
$C_{15:0\ iso}$	12.53	23.2
$C_{16:0\ iso}$	3.31	5.1
$C_{17:0\ iso}$	7.21	8.4
$C_{15:0\ anteiso}$	5.58	5.6

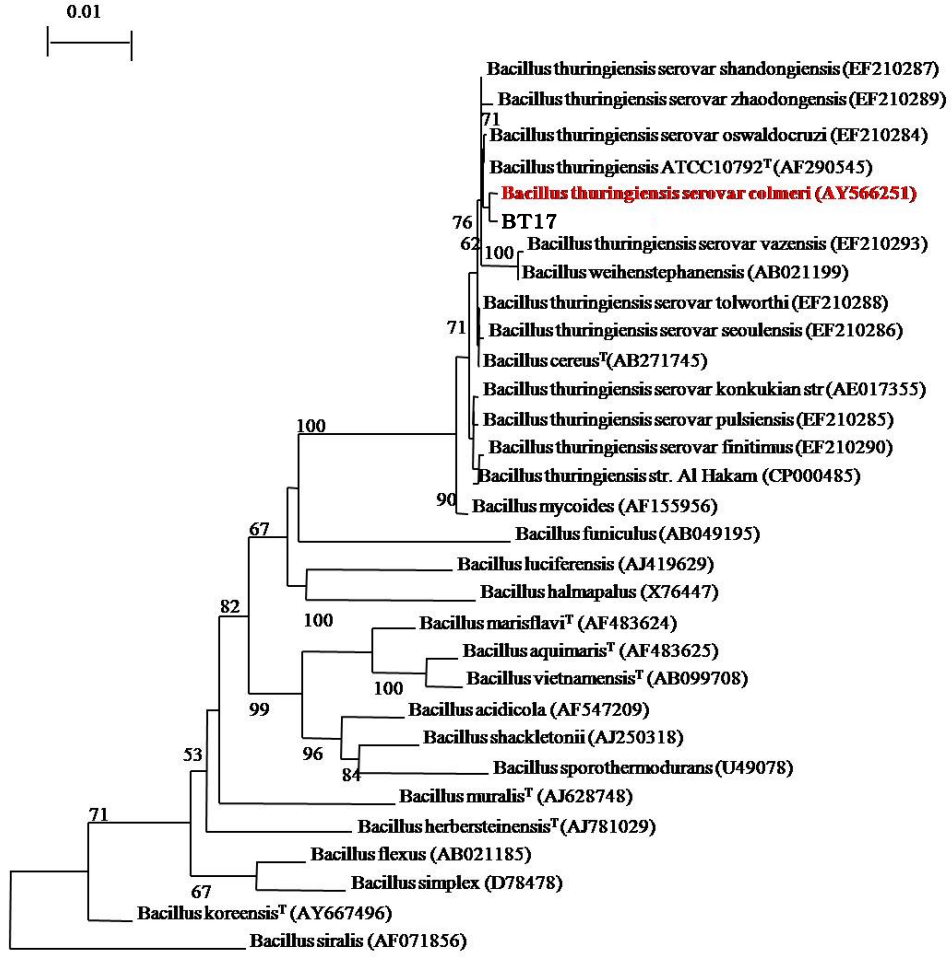

Fig. 3. Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences showing the position of strain BT17 and related bacterial taxa. Numbers at branches are bootstrap values, derived only for the nodes supported by greater than 50% (1,000 replicates). Bar, 0.01 substitutions per sit.

독소 생산을 위한 최적 배양 조건

BT17 균주가 생산하는 결정성 독소를 많이 생산하는 최적 배양 조건을 찾기 위하여 우선 LB 배지에서의 생산을 보았더니 Table 3과 같이 무기염류로 Mn^{2+}를 첨가하지 않은 경우에는 24시간 내에는 전혀 결정이 생산되지 않았으며, 48시간이 경과한 후에는 2×10^8/ml 이상의 독소 결정을 생산하였고, Mn^{2+}을 첨가한 경우에는 24시간 경과 후 부터 독소 결정이 관찰되는 것으로 보아 포자 생산(22) 뿐아니라 독소 생산에도 Mn^{2+}가 필요한 것으로 보이며, $MnSO_4$ 처리가 $MnCl_2$의 경우보다 많은 독소를 생산하였다.

Table 3. Number of crystals ($\times10^8$/ml) of BT17 strain according to the addition of mineral salts and culture time in LB broth (100 ml, 32°C, 280 rpm)

Mineral salts	24 h	48 h
control	0	2.5±0.3
0.041 mM $MgSO_4$ 0.042 mM $MnSO_4$	1.5±0.2	4.6±0.3
0.05 mM $MnCl_2$	1.2±0.1	2.1±0.5
0.042 mM $MnSO_4$	1.6±0.2	5.1±0.2

배지의 조성을 LB에서 soybean meal과 skim milk로 구성된 배지로 바꾸어 본 결과(Table 4), LB 배지에서 보다 빨리 독소 결정들이 나타났으며 soybean meal을 2%로 하였을 때 1% 첨가한 경우보다 2배 정도 우수하였고 skim milk는 오히려 2%보다 1% 첨가한 경우가 좋았다. 균의 생장이 멈춘 정지기에 이르러 독소 단백질들이 축적되기 시작하며 포자 형성이 완료된 균체의 25%에 이르는 건조중량을 차지하게 되고 세균 세포 한 개당 1-2×10^6/ml 이상의 δ-endotoxin 분자를 합성한다는 보고(1, 8)를 감안할 때 배지에 포함할 성분에서 특히 질소원의 중요성을 강조할 필요가 있다. BT17 균주의 독소 결정

Table 4. Number of crystals ($\times10^8$/ml) of BT17 strain according to the culture time and composition of medium (A) soybean meal 1%+skim milk 1%, (B) soybean meal 1%+skim milk 2%, (C) soybean meal 2%+skim milk 1%, (D) soybean meal 2%+skim milk 2%.

Medium culture time	A	B	C	D
24 h	2.5±0.3	2.8±0.5	5.0±0.4	4.9±0.1
48 h	3.2±0.4	2.6±0.2	4.8±0.2	4.1±0.1

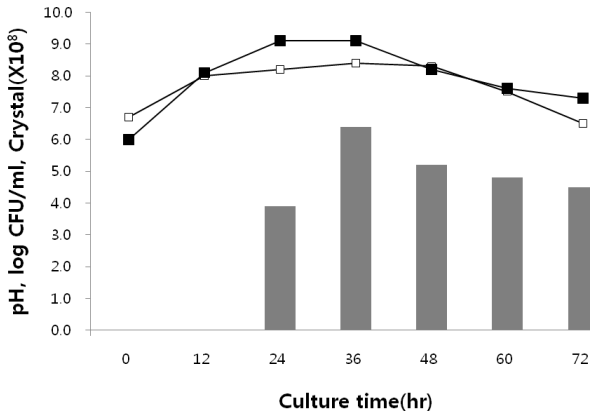

Fig. 4. Change of pH (-□-), log CFU/ml (-■-), and number of crystals ($\times 10^8$/ml, ▮) during 200 L culture time of BT17.

생산용 배지는 단백질이 풍부한 soybean meal과 skim milk를 주성분으로 제조한 배지가 좋았으며, 배양은 24시간이나 48시간에서 큰 차이가 없었다. 배지에 glucose를 첨가하면 독소 결정이 많이 생산된다는 보고들(7, 16)도 있으나 배지에 첨가한 soybean meal에 탄수화물이 상당량 포함되어 있을 것이고, Scherrer 등(20)이 *B. thuringiensis* serovar *thuringiensis* 균을 0.8% 이상의 glucose가 함유된 배지에서 키웠을 때 독소 결정의 모양이 원래 균주가 생산하는 bipyramid 형태가 아닌 무정형으로 바뀐다고 보고한 것을 토대로 별도의 glucose는 첨가하지 않았다.

Soybean meal 2%와 skim milk 1%의 배지에서 배양 온도에 따른 독소 결정 생산을 비교하여 본 결과 28°C에서 배양하였을 때는 $4.5\pm0.3\times10^8$/ml의 독소 결정이 관찰되었으며, 30°C에서는 $5.1\pm0.2\times10^8$/ml, 그리고 32°C에서는 $3.7\pm0.4\times10^8$/ml가 관찰되어서 30°C 조건이 제일 양호하였다. 또한 동일한 배지에서 30°C 조건으로 진탕 flask에서 진탕속도를 달리하여 배양하였을 때 200 rpm에서는 $2.9\pm0.3\times10^8$/ml, 240 rpm에서는 $3.7\pm0.3\times10^8$/ml, 280 rpm에서는 $6.4\pm0.5\times10^8$/ml의 독소 결정이 관찰되어서 배지에 산소를 많이 공급하여 줄수록 많은 결정이 생산되는 것으로 나타났고, 280 rpm 이상은 추가적인 실험이 필요할 것으로 생각된다. Fermentor를 이용한 대량배양 시에는 Yezza 등(25)이 지적한 바와 같이 교반장치의 회전속도를 150 rev/min으로 하고 공기를 0.5 vvm 첨가함으로서 독소 생산량을 늘릴 수 있었다.

Soybean meal 2%와 skim milk 1%의 배지에서 30°C, 280 rpm 조건으로 배양시간에 따른 독소 결정 생산을 비교한 결과(Table 5), 배양 36시간째에 가장 많은 독소 결정이 생산되었으며 24시간 배양한 경우가 48시간보다 약간 많았고, 전 배양 접종량에 따른 독소 결정 생산을 조사한 결과 2% 접종하였을 때 가장 우수하였으며 3%를 접종한 경우 오히려 독소 생산이 감소하였다.

Table 5. Number of crystals ($\times10^8$/ml) according to the culture time and inoculation (100 ml, 32°C, 280 rpm)

Culture time (h)	Inoculum size (%)		
	1	2	3
24	4.6±0.3	5.9±0.3	4.6±0.2
36	6.5±0.2	8.2±0.5	6.8±0.2
48	3.4±0.1	5.0±0.3	3.9±0.4

200 L의 soybean meal 2%와 skim milk 1% 포함 배지에서 BT17 균을 배양하면서 생균수와 독소 생산, 배지 pH의 변화를 조사한 결과는 Fig. 4와 같이 생균수는 대수기가 지나고 정지기에 도달한 배양 시작 24시간 후에 최고를 보였으며 이때부터 독소 결정이 보이기 시작하다가 36시간에 가장 많이 생산되었다. 생균수와 pH 변화는 비슷한 양상으로 나타났으며 pH 8 이상이 유지되면서 독소 결정이 많이 보였다. 배양 시작 48시간이 지나면서 독소 생산은 오히려 감소하였으며 pH도 따라서 낮아지는 경향을 볼 수 있었다. 독소의 생산과 유지에 생균수와 pH의 유지가 필요한 것으로 사료되며 보다 많은 양의 질소원을 공급하는 것이 유리할 것으로 보인다.

배추좀나방(*Plutella xylostella*)에 대한 치사율을 조사한 결과 독소의 생산이 가장 왕성한 배양시작 36시간에 치사율도 가장 높게 나왔다(Table 6). 배양 12시간까지는 독소의 생산은 관찰되지 않았으나 치사율이 22.2%가 나온 것은 독소의 수는 현미경으로 관찰되지 않을 정도로 적었으나 세포내에는 독소 성분이 나타난 것으로 보여진다. 따라서 현미경 시야에 나타나는 독소 결정이 아니더라도 세포내에는 독소 성분이 합성되고 있으며 12시간의 배양시간에 해당하는 대수기 무렵부터 이미 독소는 형성되고 있다고 할 수 있다. 그러므로 굳이 결정성 독소가 현미경 시야에 나타나지 않더라도 독소 성분 즉 독소 단백질은 세포내에 존재하고 따라서 추출도 가능할 것으로 보인다.

대량배양한 BT17 균주 배양액을 냉장, 20°C, 30°C 온도 조건에 보관하면서 시간이 경과함에 따라 독소 결정의 수가 어떻게 변하는지 관찰하였다(Fig. 5). 독소 결정의 수는 30°C에 보관한 경우에는 1개월이 지날 때 까지는 증가하다가 차차 줄어드는 모습을 보여주었으나 4°C와 20°C에 보관한 시료의 독소 결정의 수는 3개월이 지난 후에는 2배 이상 늘었는데, 이는 세균 균체 내에서 미처 결정화되지 못한 독소 단백질들이 보관 과정에서 결정 상태로 점차 구조를 갖게 된 것으로 생각된다. 단순히 밀폐하여 보관하였을 때 독소 결정의 수가 2배까지 증가한다는 사실은 특이한 결과이며 보다 장기적인 보관에 따른 독소 결정의 수 변화를 조사할 필요가 있다. 결과적으로 보면 20°C에 해당하는 실온에 보관하는 것이 별다른 냉장 조치와

Table 6. Insecticidal activity to *Plutella xylostella* and number of crystals ($\times10^8$/ml) according to the culture time in LB broth (100 ml, 32°C, 280 rpm)

Culture time (h)	No. of crystals ($\times10^8$/ml)	Mortality (%)
0	0	3.7
12	0	22.2
24	1.9±0.2	92.6
36	3.2±0.3	96.3
48	2.6±0.4	92.6

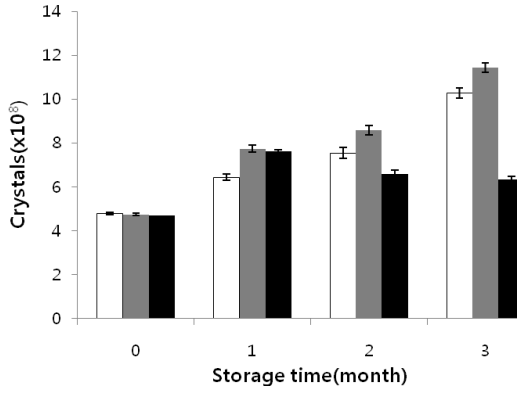

Fig. 5. Number of crystals ($\times 10^8$/ml) according to the storage temperature (□, 4°C; ▨, 20°C; ■, 30°C) and time

같은 처리 없이 양호함을 알 수 있었으며 이는 액상으로 제품화시켰을 때 유통 과정에서 유리한 실험 결과이며 다만 동결을 억제할 수 있는 처리는 필요할 것으로 보인다.

제형 선발

BT 17 균주를 soybean meal 2%와 skim milk 1% 포함배지 200 L에 배양하여 제형을 결정하기 위하여 분상과 액상의 두 가지 방법으로 BT제제를 생산하였다. 분상의 제제를 만들기 위해서 우선 동결건조를 실시하여 20배로 농축하였고, 이를 곱게 마쇄하여 첨가물로서 증량제, 분산제, 계면 활성제, 흡착제 등을 전체 중량의 90% 첨가하였다. 제조한 BT 제제를 희석하여 위상차현미경으로 관찰한 결과 독소 결정의 수는 원래 배양액의 1/10에도 못 미치는 적은 수만 관찰되었으며 덩어리가 상당히 보였는데 아마도 이러한 덩어리 속에 묻혀 있는 것으로 생각된다.

반면에 액상의 경우에는 36시간 배양한 BT 균 배양액 자체를 냉각시켜 첨가물로서 증점제, 계면활성제, 산도조절제를 첨가하여 제조하였으며 첨가물의 량은 총중량의 10% 이내가 되도록 하였다. 이렇게 제조한 액상 제제의 경우 독소 결정의 수는 원 배양액에 비하여 유사한 수준으로 유지되었다. 결과적으로 분상의 경우 보다 액상의 경우에 제조 단가도 훨씬 저렴할 뿐 아니라, 보관 중 독소 결정이 증가하는 결과를 볼 때 독소 결정의 유지 측면에도 유리하였다.

Field test를 통한 방제 효과 검정

액상으로 제조된 BT17 시험약제를 채소 재배용 하우스에서 파밤나방(*Spodoptera exigua*)과 배추좀나방(*Plutella xylostella*)의 유충에 섭식시켜 field test를 실시하였다. 액상으로 제조한 BT17시제품은 파밤나방 2령 유충에 대해서는 125배 희석하여 투여한 경우 75%에 달하는 치사효과를 보였으나, 파밤나방은 대조구에서도 유충의 연령이 낮아서인지 40% 밖에 생존하지 못하였으며 조사된 조건에서는 배추좀나방에 비하여 치사율도 떨어졌다(Table 7). 한편 배추좀나방의 3령 유충에게 동일한 농도의 BT17 시제품을 투여한 결과 Table 8과 같이 방제가가 95% 정도로 파밤나방에서보다 높게 나왔으며 이것으로 보아 BT17 제제는 배추좀나방에 대해 더 높은 치사율을 보이며 이는 *B. thuringiensis* 각 균주 마다 적용되는 대상곤충 spectrum이 다르기 때문(24)으로 사료된다. 한편 BT17시제품을 살포하는 시기는 주로 오후에 처리하였 는데 이는 일광하에서 BT 제제가 photosensitization에 의해서 분해된다는 보고(3, 5, 11, 19) 때문이었다.

안정성 검사

자연계에서 분리한 *B. thuringiensis* 균주의 83%가 곤충류에 독성을 보이는 δ-endotoxin 외에도 인체에 식중독을 유발하는 *B. cereus*형의 enterotoxin을 생산한다는 보고(17)는 대다수의 *B. thuringiensis* 균주가 인체를 비롯한 동물에 유해할 수 있다는 것이므로 BT17 균주를 생물학 제제로 사용하기 전에 안정성 검사는 필수적으로 수행되어야 한다. BT17 균주에 대한 급성 경구 독성시험을 ICR계 마우스를 사용하여 기초시험으로 5,000 mg/kg의 농도로 투여한 군과 용매 대조군을 경구 투여한 후 2주간 관찰 조사한 결과, 투여군에 있어서 암·수 모두 사망 예는 물론 시험물질 투여에 기인한 일반증상은 관찰되지 않았고, 체중변화에 있어서는 대조군과 유의성 있는 변화를 보이지 않았으며, 또한 생존동물에 대한 부검결과에 있어서도 특이한 병리학적 소견은 관찰되지 않았다. 따라서 마우스에 대한 BT17 시료의 경구 투여 시 LD50은 5,000 mg/kg 이상으로 사료된다.

BT17에 대한 급성 경피 독성시험을 SD계 랫드를 사용하여 기초시험으로 투여군과 용매 대조군을 두어 1회 경피 투여한 후 2주간 사망율, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰 조사한 결과 투여군에 있어서 암·수 모두 사망례는 물론 시험물질 투여에 기인한 일반증상은 관찰되지 않았고, 체중변화에 있어서는 대조군과 유의성 있는 변화를 보이지 않았다. 또한 생존동물에 대한 부검결과에 있어서도 특이한 병리학적 소견은 관찰되지 않았다. 따라서 랫드에 대한 BT17의 경피 투여 시

Table 7. Insecticidal activity to *Spodoptera exigua* of BT17 strain in field test

Dilution rate	Viability (%)				
	I	II	III	Mean	Mortality (%)
1/125	10	16.7	3.3	10	75.0
1/250	10	13.3	10	11	72.5
1/500	20	20	16.7	19	52.5
control	40	43.3	36.7	40	-

Table 8. Insecticidal activity to *Plutella xylostella* of BT17 strain in field test

Dilution rate	Viability (%)				
	I	II	III	Mean	Mortality (%)
1/125	3.3	6.6	5	4.9	95.1
1/250	10	18.3	10	12.7	87.3
1/500	20	20	21.6	20.5	79.5
control	100	100	100	100	-

LD50은 4,000 mg/kg 이상으로 사료된다.

BT17 균주의 잉어(*Cyprinus carpio*)에 대한 영향시험을 농도 당 노출 어류 10마리에 대하여 96시간 동안 실시한 결과, 치사가 일어나지 않는 최대 농도는 10.0 mg/L 이었으며, 대조군과 처리군에서 일반중독증상 및 특이사항은 관찰되지 않았다. 따라서 본 시료의 48시간-LC50 값은 10.0 mg/L 이상으로 어독성 III급으로 확인되었다.

적요

살충성 독소 결정을 생산하는 *Bacillus thuringiensis* BT17 균주를 분리하였으며, 16S rRNA 유전자 분석 결과 *B. thuringiensis* serovar *colmeri*로 동정하였다. BT17 균주는 인시목 유충에 대해 살충성을 보이는 결정성 독소를 soybean meal과 skim milk를 포함하는 배지에서 30°C, 280 rpm으로 36시간 진탕배양하였을 때 효율적으로 생산하였다. 200 L fermentor에서 배양하였을 때 균수는 24시간에 최대가 되었으나 독소 결정의 수는 36시간까지 증가하였다. 액상의 미생물 살충제 제품을 제조하였으며, 배양액을 20°C에서 3개월간 보관시 독소 결정의 수는 보관 초기보다 2배까지 증가하였다. BT17 균주가 포함된 살충제 제품의 효능은 파밤나방보다 배추좀나방에서 좋았으며 동물에 대한 독성은 거의 없었다.

감사의 말

본 연구는 지식경제부의 서원대학교 친환경바이오소재 및 식품 지역기술혁신센터(RIC) 사업 연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

1. Agaisse, H. and D. Lereclus. 1995. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? *J. Bacteriol.* 177, 6027-6032.
2. Baum, J.A., T.B. Johnson, and B.C. Carlton. 1999. *Bacillus thuringiensis*: natural and recombinant products, pp. 189-210. *In* F.R. Hall and J.J. Menn (eds.), Biopesticides Use and Delivery. Humana Press, Totowa, NJ, USA.
3. Berliner, E. 1915. Über die schlaffsucht der Mehlmottenraupe (*Ephestia kuhnielluszell*) und ihre Errenger *Bacillus thuringiensis* n. sp. *Z. Angew. Entomol.* 2, 29-56.
4. Bulla, L.A., Jr. 1975. Bacteria as insect pathogens. *Ann. Rev. Microbiol.* 29, 163-190.
5. Bulla, L.A., Jr., R.N. Costilow, and E.S. Sharpe. 1978. Biology of *Bacillus popilliae*. *Adv. Appl. Microbiol.* 22, 1-18.
6. Crickmore, N., D.R. Zigler, J. Freitelson, E. Schnepf, J. van Rie, D. Lereclus, J. Baum, and D.H. Dean. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Bio. Rev.* 62, 807-813.
7. Dingman, D.W. and D.P. Stahly. 1983. Medium promoting sporulation of *Bacillus larvae* and metabolism of medium components. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 860-869.
8. Du, C., P.A.W. Martin, and K.W. Nickerson. 1994. Comparison of disulfide contents and solubility at alkaline pH of insecticidal and noninsecticidal *Bacillus thuringiensis* protein crystals. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3847-3853.
9. Dulmage, H.T. 1981. Microbial control of pests and plant diseases, pp. 193-222. *In* H.D. Burgess (ed.). Academic Press, London, UK.
10. Goldberg, L.H. and J. Margalit. 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univitattus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipens*. *Mosquito News* 37, 355-358.
11. Griego, V.M. and K.D. Spence. 1978. Inactivation of *Bacillus thuringiensis* spores by ultraviolet and visible light. *Appl. Environ. Microbiol.* 35, 906-910.
12. Guerchicoff, A., A. Delecluse, and C.P. Rubinstein. 2001. The *Bacillus thuringiensis cyt* genes for hemolytic endo toxin constitute a gene family. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1090-1096.
13. Helgason, E., O.A. Økstad, D.A. Caugant, H.A. Johansen, A. Fouet, M. Mock, I. Hegna, and A.B. Klosto. 2000. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*-one species on the basis of genetic evidence. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2627-2630.
14. Höfte, H. and H.R. Whiteley. 1989. Insecticidal cyrstal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53, 242-255.
15. Miyagawa, E., R. Azuma, and T. Suto. 1979. Cellular fatty acid composition in Gram negative obligately anaerobic rods. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 25, 41-51.
16. Obeta, J.A.N. and N. Okafor. 1984. Medium for the production of primary powder of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 863-867.
17. Perani, M., A.H. Bishop, and A. Vaid. 1998. Prevalence of ß –exotoxin in natural isolates of *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 160, 55-60.
18. Priest, F.G., D.A. Kaji, Y.B. Rosato, and V.P. Canhos. 1994. Characterization of *Bacillus thuringiensis* and related bacteria by ribosomal RNA gene restriction fragment length polymorphisms. *Microbiology* 140, 15-22.
19. Pusztai, M., P. Fast, L. Gringorten, H. Kaplan, T. Lessard, and P.R. Carey. 1991. The mechanism of sunlight-mediated inactivation of *Bacillus thuringiensis* crystals. *Biochem. J.* 273, 43-47.
20. Scherrer, P., P. Lüthy, and B. Trumpi. 1973. Production of δ -endotoxin by *Bacillus thuringiensis* as a function of glucose concentrations. *Appl. Microbiol.* 25, 644-646.
21. Schnepf, E., N. Crickmore, J. van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D.R. Zeigler, and D.H. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 775-806.
22. Vasantha, N. and E. Freese. 1979. The role of manganese in growth and sporulation of *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* 112, 329-336.
23. Wei, J.Z., K. Hale, L. Carta, E. Platzer, C. Wang, S.C. Fang, and R.V. Aroian. 2003. *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 2760-2765.
24. Widner, R.W. and H.R. Whiteley. 1989. Two highly related insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* possess different host range specificities. *J. Bacteriol.* 171, 965-974.
25. Yezza, A., R.D. Tyagi, J.R. Valero, R.Y. Surampalli, and J. Smith. 2004. Scale-up of biopesticide production processes using wastewater sludge as a raw material. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 31, 545-552.
26. Zhu, H., F. Qu, and L.H. Zhu. 1993. Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride. *Nucleic Acids Res.* 21, 5279-5280.