

Bacillus thuringiensis subsp. *israelensis* CAB199균주의 제형에 따른 모기유충방제 효과

서미자 · 길영종 · 김태환 · 김형중¹ · 윤영남 · 유용만*

충남대학교 농업생명과학대학 응용생물학과, ¹한국농어촌공사 농어촌연구원

Control Effects against Mosquitoes Larva of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* CAB199 isolate according to Different Formulations

Mi Ja Seo, Yeong Jong Gil, Tae Hwan Kim, Hyung Joong Kim¹, Young Nam Youn and Yong Man Yu*

Dept. Applied Biology, College of Agriculture and Life Sciences, Chungnam National University, Daejeon, 305-764,

¹Korea Rural Community Corporation, Rural Research Institute

ABSTRACT: Among 18 *Bacillus thuringiensis* isolates with spherical parasporal inclusion from soils, *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* CAB199 was selected. It was showing over 90% mortality against *Aedes aegypti* and *Culex pipiens molestus*. It was confirmed that this *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* CAB199 isolate also had a insecticidal activity against *Culex inatomii* that was occurred in the marsh. Because most of mosquito larva were primarily situated or shifted from under- to surface water, we need to select long floating formulations on surface water for controlling mosquito larva. It was tested the pesticidal and control effects in the laboratory and wetland with two formulation types of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, for example, wettable power (WP) and suspension concentrate type (SC). Laboratory test showed that SC formulation type was relatively faster and more effective against 3 tested mosquito species, *C. pipiens*, *Aedes aegypti*, and *C. inatomii*. Otherwise, the control efficacy of SC formulation type was more rapidly appeared against *C. inatomii* in the wetland.

Key words: *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, Mosquito larva, Formulation type, Wetland

초 록: 토양에서 분리한 구형의 내독소단백질을 가지는 18개의 균주 중, 이집트숲모기와 지하집모기에 90%이상의 살충활성을 보이는 *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* CAB199 균주를 선발하였다. 이 균주는 습지에 발생한 이나도미집모기에도 높은 살충효과를 나타내었다. 모기유충의 행동패턴은 주로 호흡을 위해 수면에서 주로 활동하고 있어, *Bti* 균주를 유효성분으로 하는 제제가 수면 위에 장시간 부유 할 수 있는 제형을 선발하고자 하였다. 수화제와 액상수화제의 두 가지 형태의 제형을 만들어 실내에서의 살충효과 및 습지에서의 방제효과를 확인한 결과, 실내에서의 경우에는 액상수화제 제형이 실험한 3종의 모기유충에 대해 속효적이며 높은 살충율을 보여주었고, 습지에서도 이나도미집모기에 대하여 가장 좋은 활성을 나타내었다.

검색어: *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, 모기유충, 살충효과, 제형, 인공습지

최근 우리나라에서는 자연생태계의 보전을 위하여 축산 폐수, 농업용수, 생활하수 등이 하천으로 유입되어 오염되는 것을 방지하는 자연정화 형태의 자연형습지나 인공습지의 형태의 수질개선 시설들이 설치되어 있다. 이러한 대단위 습지는 수질개선의 측면 뿐 아니라 생물의 서식처를 제공하

고 종 다양성을 증진시키며 자연생태계의 생물들을 관찰할 수 있는 생태공간으로 제공되어 환경의 중요성을 일깨워주고 있는데, 이러한 대단위 인공습지 및 자연습지는 모기나 파리와 같은 위생해충의 주요 집단서식처가 되어 문제가 되고 있다. 또 한편으로는 도시화와 간척사업으로 인해 이전에 문제가 되지 않았던 모기종들이 급증하여 질병을 매개하거나 귀찮고 성가신 존재로 사람들에게 접근하게 되어 모기 방제의 심각성을 일깨워주고 있다.

*Corresponding author: ymyu@cnu.ac.kr

Received May 24 2010; revised June 21 2010; accepted June 22 2010

국내의 모기방제는 최근까지 주로 성충을 대상으로 화학 농약을 이용한 화학적 방제에 의존하여 왔는데(Kil *et al.*, 2008), 모기를 치사시키는 유기인계나 피레스로이드계 살충제, 발육억제제, 모기의 접촉을 차단하는 기피제 등을 처리하는 방법으로 행해져 왔다. 성충방제는 주로 극미량연무기나 가열연무기를 이용하여 살충제인 Chlorpyrifos나 deltamethrin과 같은 약제를 서식처나 축사 천정 및 벽면에 처리하였는데, 성충의 휴식습성이나 행동습성 및 정확한 서식처를 확인하여 처리해야만 방제효과를 얻을 수 있고, 직접 접촉을 해야 방제효과를 얻을 수 있다는 점에서도 방제에 어려움이 있었다(Ree *et al.*, 1988). 하지만, 유충의 방제 없이는 모기의 개체군을 제어할 수 없었기 때문에 유충을 방제할 수 있는 곤충생장조절제를 비롯하여 환경친화적이면서 생태계에 안전한 생물적 방제인자로 *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* 균주가 이용되고 있다. 지금까지 모기유충에 대해 독성을 나타내는 8종의 *B. thuringiensis* 중 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*와 subsp. *morrisoni* 2종이 모기유충에 대해 강한 독성을 나타내는 것으로 알려져 있다(Kil *et al.*, 2008). 곤충생장조절제 중에서 키틴합성 저해기작을 가진 Novaluron과 탈피촉진기작을 보이는 Methoprene는 다른 작용기작을 가진 곤충생장조절제보다 모기유충방제에 높은 활성을 보이는 것으로 확인되었으며(Choi *et al.*, 2007), 최근 전세계적으로 모기유충을 방제하는데 이용되고 있다(Arredondo-Jimenez and Valdez-Delgado, 2006; Beckage *et al.*, 2004). 국외에서는 부리켓(briquet)제제로서 미생물 살충제인 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*를 주성분으로 한 Bactimos Briquets와 발육억제제인 methoprene을 주성분으로 한 Altosid XR Briquets 등이 모기유충방제 목적으로 쓰이고 있지만, 국내에서는 친환경적으로 대단위 인공습지에서 방제에 적용한 사례가 많지 않다(Kim *et al.*, 1995).

본 연구에서는 수질개선을 목적으로 조성된 자연정화시설에서 식물 및 미생물 등의 활동에 의해 수질이 정화되고 생태계에 안전한 방제수단으로 모기유충을 친환경적으로 방제할 수 있는지를 검토 하였다. 자연정화시설 내 모기유충의 발생양상을 조사하고, 국내 토양에서 분리한 신규 곤충병원성미생물인 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*의 살충활성이 우수한 균주를 선발하고 대량 배양하여 습지에 적용할 수 있는 최적의 제형을 만들어 현장실험을 수행하였다.

재료 및 방법

새로운 *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* CAB199 균주의 특성조사

모기유충에 높은 살충활성을 보인 새로운 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* CAB199(이하 *Bt* CAB199) 균주는 충남대학교 생물적해충제어학 실험실에서 국내토양으로부터 분리하였고 일본의 규슈대학 생물적방제시설의 M. Obhara 사에 의뢰하여 혈청형을 동정하였다. 새로운 곤충병원성미생물 균주의 특성조사를 위해 포자형성기가 지난 포자와 내독소단백질 혼합물에서 이들의 형태를 위상차현미경(Olympus BX51)과 주사전자현미경(Philips XL30E SEM)을 이용하여 관찰하였다. 위상차현미경으로 관찰하기 위해 소량의 *Bt* CAB199 배양액을 slide glass에 떨어뜨린 후 1,000배로 관찰하였다. 주사전자현미경으로 관찰할 시료는 알루미늄 원반 시료대에 위에서 자연 건조시킨 후, 탄소로 coating하고 금으로 염색하여 10,000배로 관찰되었다(Kim *et al.*, 1995).

Bt CAB199 균주의 Parasporal inclusion 단백질의 SDS-PAGE는 Laemmli의 방법을 수정하여 실험하였다(Laemmli, 1970). 균주들을 NA배지에 배양하여 위상차현미경으로 autolysis가 일어난 것을 확인 한 후, 균을 모아 NaCl이 포함된 buffer를 넣어 10,000rpm에서 원심하여 일부 포자를 제거하고 parasporal inclusion을 얻었다. 12% separating gel과 5% stacking gel을 사용하였고, 각 균주의 parasporal inclusion을 1.5 ml 튜브에 넣고, 2-mercaptoethanol이 포함된 buffer를 1:2 (w/w) 비율로 섞은 후 100°C에서 10분 동안 열처리하였다. 50V에서 전기영동 후, gel은 Coomassie brilliant blue 250으로 40분 동안 염색하였고, 12시간 탈색하여 결과를 확인하였다.

살충활성 검증

국내에 서식하는 모기의 종에 따른 살충활성의 차이를 검토하기 위해 집모기 3종, 대전광역시 유성구 궁동에서 채집하여 실내에서 누대사육중인 지하집모기(*Culex pipiens molestus*)와 빨간집모기(*Culex pipiens pallens*), 충남 당진군 석문면 자연정화시설단지에서 채집한 이나도미집모기(*Culex inatomi*)와 서울대학교 농업생명과학대학에서 분양받아 실내사육중인 숲모기 1종인 이집트숲모기(*Aedes aegypti*)에 대해 *Bt* CAB199 균주의 최종 포자농도가 10^5 cfu/ml로 처리하여 살충율을 조사하였다. 모든 실험은 500

ml 유리비이커에 습지에서 채집한 물을 300 ml정도 채워 넣고, 각각의 비이커에 모기종별로 2령 유충을 30마리씩 넣고, 1일간 적응시킨 후 배양액을 동일한 농도로 처리하고 24시간과 48시간 후의 사망률을 조사하였다. 매일 치어사료를 이용해 먹이를 공급해 주었으며, 먹이에 따른 수막이 생기는 것을 매일 제거해주었다.

수면에서 모기유충의 행동패턴

Bt CAB199의 효과적 사용하기 위하여 모기의 종과 유충의 영기에 따른 행동패턴에 나타나는 생태적 특성에 따라 효과적으로 방제할 수 있는 두 가지의 제형을 개발하였다. 행동패턴은 첫째 유충의 주요 분포하고 있는 위치를 시험하기 위하여 1 L용량의 유리비이커에 습지물을 1 L 채운 후 각각의 비이커의 습지물에 1, 2, 3, 4령 유충을 무작위로 선발하여 각각 10마리씩 방사한 후 2시간 정도 적응하게 한 다음, 시간대별로 수면층에 존재하는 모기유충의 비율과 수중에 존재하는 유충의 비율을 조사하였다. 두 번째로 수면 위로 이동하는 횟수는 유충의 주요 분포위치 조사와 동일한 방법으로 수행하되 10분 동안 유충 10마리가 수면위로 올라오는 횟수를 측정하였다. 셋째로 모기유충의 수면위에 존재하고 있는 시간 측정도 위의 두 조사항목과 동일한 방법으로 수행하였으며, 정확한 행동분석모집단을 확보하기 위해 20마리의 유충이 수면에서 호흡하는 시간을 측정하였다.

B. thuringiensis subsp. *israelensis* CAB199 균주의 제형에 따른 살충효과

물에서 서식하는 모기유충의 서식 습성에 의한 살충효과를 높이기 위하여 각각의 제형을 수면층위에서 확산과 분산성에 의하여 살충효과에 미치는 영향을 확인하였다. 알루미늄 사각용기(면적 896 cm²)에 습지에서 채집한 물 3.5 L를 채워놓고 2, 3, 4령 유충을 약 70 마리씩 방사한 후 용기 가장자리에 제형별로 각각 처리하고 24, 48시간 후의 살충율을 조사하였다. 처리농도는 용기에 담긴 물 용량을 계산하여 최종농도 10²과 10³ cfu/ml이 되도록 처리하였다. 새로운 CAB199 균주의 제형화를 위해, (주)우진 B&G에서 대량배양 하여 배양액을 만든 후 (주)경농 중앙연구소에서 수화제(wettable powder, WP)와 액상수화제(suspension concentrate, SC)로 형태로 제형화하였다(Table 5, 6).

또한 야외에서의 미생물제제의 제형에 따른 방제효과를 확인하기 위해, 당진 석문수질환경단지내 습지에서 처리 전 모기유충의 밀도를 조사하고, 처리 후 매 1주일 간격으로

습지내 물 10L를 무작위로 채집하여 물속에 서식하고 있는 모기유충의 수를 측정하여 방제효과를 비교하였다.

결과 및 고찰

곤충병원성미생물 *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* CAB199 균주의 특성

모기유충의 생물적 방제인자로서 활성을 갖는 새로운 *Bt*균주를 국내 토양으로부터 분리 하였다. 분리한 *Bt*균주에서 spherical type의 내독소 결정성단백질을 생산하는 18개의 균주를 위상차현미경 검경 후 확인 선발하여 지하집모기에 선발된 18개 균주 중 CAB199 균주가 90%이상의 살충율을 나타내며 가장 높은 살충활성을 보여주었고, 대조균주로 사용된 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*와 *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14균주와도 유사한 살충효과를 나타내었다. 또한 선발된 균주중엔 두 종 유충에 50%의 살충율을 보인 *B. thuringiensis* subsp. *tohokuensis*도 확인되었다(Kil *et al.*, 2008). CAB199 균주는 모기의 종류에 따른 기주범위의 특이성을 확인하기 위하여 이집트숲모기에 대한 생물활성 시험에서도 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* 유사한 결과를 나타내었다(Table 1).

모기에 100%의 살충활성을 보인 CAB199 균주에 대해 M. Obha 박사에게 H serotype을 의뢰한 결과, 혈청형이 H14인 *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*로 동정되었으며, CAB199 균주를 NA배지에 27°C, 3~4일 동안 배양하여 이들이 생성하는 parasporal inclusion을 위상차현미경과 주사전자현미경을 통해서 확인한 결과, spherical type의 parasporal inclusion을 형성하는 것을 확인하였다(Fig. 1). 일반적으로 위상차현미경하에서, 내독소단백질이 spherical type인 경우에 모기유충에 대해 살충활성을 보이는 것으로 확인되고 있으나(Kil *et al.*, 2008), 위상차현미경 검경결과와 살충활성결과를 통해 선발된 spherical type의 균주가 주사전자현미경 관찰에서는 부정형으로 확인되는 연구결과도 있어, 단순히 위상차현미경을 통한 내독소단백질의 형태적 관찰만으로 대상해충방제를 위한 잠재적 균주를 선발하는 것은 우수한 균주가 선발되지 않을 가능성도 있다는 것을 염두해 두어야 한다(Benintende *et al.*, 2000). 또한 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* CAB199 균주의 단백질 패턴을 분석하기 위해 기준균주인 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*와 *B. t.* subsp. *morrisoni* PG-14, 그리고 모기유충 방제를 위해 제품화된 *Bt* product의 *B.t.i* 균주를 SDS-PAGE

Table 1. Bioactivity of *B. thuringiensis* isolates against *Aedes aegypti*

<i>Bacillus thuringiensis</i> strains		<i>Mortalities</i> ^a		<i>Bacillus thuringiensis</i> strains		<i>Mortalities</i> ^a	
1	CAB165	-	11	CAB183	++		
2	CAB166	+	12	CAB184	-		
3	CAB167	+	13	CAB185	++		
4	CAB168	-	14	CAB186	-		
5	CAB170	++	15	CAB188	++		
6	CAB171	+	16	CAB189	-		
7	CAB172	-	17	CAB190	-		
8	CAB177	+	18	CAB199	+++		
9	CAB179	++		<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i>	+++		
10	CAB181	-		<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>morrisoni</i>	+++		

^a +++: Highly effective (Mortality 90-100%); ++: Effective(Mortality 70%); +: Lowly effective(Mortality 50%); -: Not effective (Mortality 0-50%)

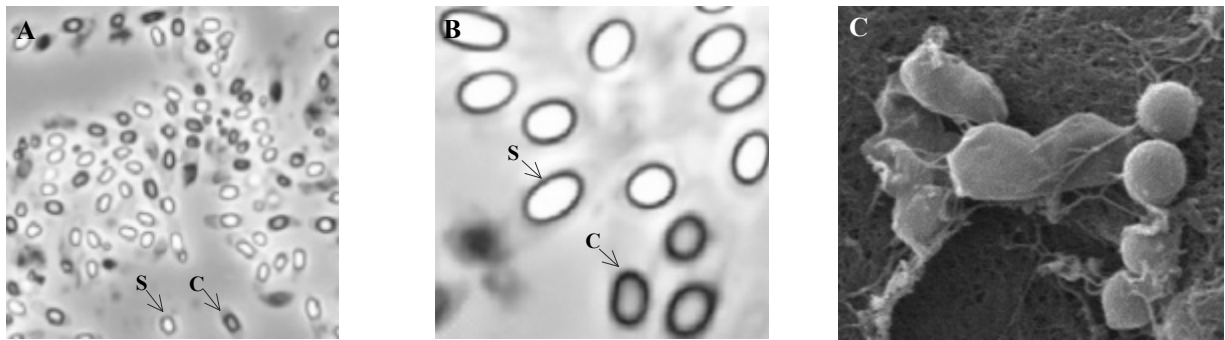


Fig. 1. Phase-contrast microscope (×1,000) (A and B) and Scanning electron microscope photographs (C) of spore (S) and crystal (C) shapes of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* CAB199.

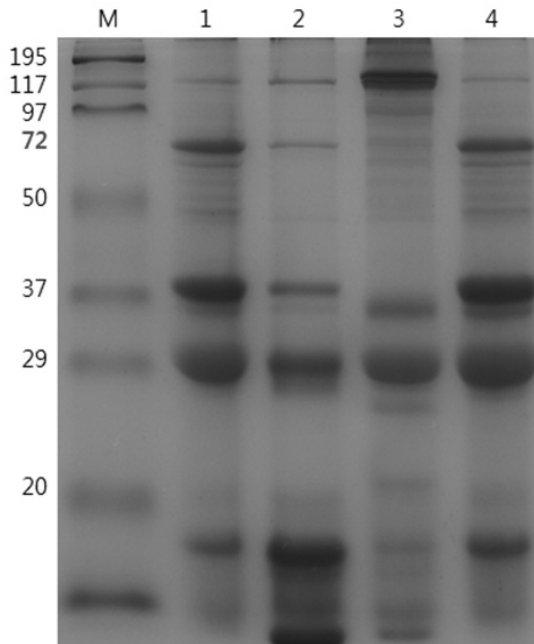


Fig. 2. SDS-PAGE analysis of parasporal inclusion of *B. thuringiensis* isolates. M: Standard Marker; Lane 1: B product; Lane 2: *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* CAB199; Lane 3: *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14; Lane 4: B.t.i.

에서 130kDa, 70kDa, 28kDa의 사이의 주요 3종류의 단백질 밴드가 확인되었으며, 기준균주와 *B.t.i.*제품에서 분리한 균주와 유사한 단백질 밴드패턴을 나타내었다(Fig. 2)

***B. thuringiensis* subsp. *israelensis* CAB199 균주의 모기 종에 따른 살충활성 검정**

국내에서 서식하는 몇 개의 모기종류에 따른 살충활성에 차이를 확인하기 위해 집모기인 지하집모기(*Culex pipiens molestus*), 빨간집모기(*Culex pipiens pallens*), 이나도미집모기(*Culex inatomii*) 등 3종류와 숲모기 1종인 이집트숲모기(*Aedes aegypti*)에 대해 최종 포자농도 10⁵ cfu/ml농도로 처리하여 살충율을 조사한 결과, 실내시험에서는 4종 모두 100%의 살충율을 나타내었다. 따라서 습지내에 발생하는 다양한 모기종류의 유충을 방제하는데 이용할 가능성이 높음을 보여주었다. 또한, 습지 내에 발생하는 모기유충을 효과적으로 방제하기 위한 적정 살포농도의 조사에서 농도 별 살충활성을 확인한 결과, 이집트숲모기, 이나도미집모기 두 종 모두 10⁴ cfu/ml 농도부터 100%의 살충율을 보였는데 (Table 2), 습지나 방제대상구역의 면적 또는 물의 양을

Table 2. Mortality of *Culex pipiens moletus*, *Culex pipiens pallens*, *Culex inatomii*, *Aedes aegypti* against CAB199 isolates (10^5 cfu/ml concentration)

Mosquitoes species	cfu/ml	N	Mortality(%)
<i>Culex pipiens moletus</i>	10^5	60	100.0
<i>Culex pipiens pallens</i>	10^5	60	100.0
	10^5	60	100.0
	10^4	60	100.0
<i>Aedes aegypti</i>	10^3	60	100.0
	10^2	60	93.3
	10^5	120	100.0
<i>Culex inatomii</i>	10^4	60	100.0
	10^3	60	95.6
	10^2	60	90.0

Table 3. Behavioral characteristics of 2nd instar larva of *Culex inatomii* and *A. aegypti*

Behavioral characteristics		<i>Culex inatomii</i>	<i>Aedes aegypti</i>	Significant level ^b
Principle distribution(%)	underwater	0.0±0.0	12.7±14.4	0.156 ^{NS}
	surface water	100.0±0.0	87.3±14.4	0.156 ^{NS}
N. of locomotion to surface water(n)		11.0±1.0	90.0±75.3	0.143 ^{NS}
Time of existence at surface water(Sec.)		300.0±α	21.0±14.3	0.000 ^{**}

^a Values represent mean±SD. t-test in SPSS version 17.0

^b ** p<0.01, and ^{NS} p>0.05

추정하여 희석하여 10^4 농도 이하로 낮아지지 않게 처리함으로써 방제효과를 높일 수 있을 것으로 보인다. Dominic Amalraj *et al.*(2000)의 연구결과에 의하면, 동일한 *Bti* 제형에 대해 방제대상 모기 종에 따른 살충율 뿐만 아니라 반수치사 농도 값도 다르게 나타난다고 하였는데, 열대집모기와 이집트숲모기에 비해 *Anopheles stephensi*모기에 대한 LC_{50} 값이 높게 나타나고 살충활성도 다소 떨어진다고 보고하고 있다. 본 연구에서도 동일한 농도에서 이나도미집모기보다는 이집트숲모기에 대한 살충활성이 높게 나타나는 것을 확인할 수 있었으며, 이에 따라 방제대상 해충에 대한 정확한 실내살충활성검정 후 적정농도를 살포하는 것이 효과적인 방제결과를 얻을 수 있을 것이다.

효과적인 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* CAB199 제형선발을 위한 모기유충의 행동패턴 조사

모기 유충은 물속에서 살지만 제 8 복절에 있는 한 쌍의 기문을 통해 호흡한다. 따라서 호흡할 때에는 물 표면으로 올라와 기공을 수면 밖으로 내 놓아야 한다. 이것은 기공주위의 특수한 구조와 물의 장력에 의해 이루어지는데, 늪모기속(*Mansonia*)의 유충은 수서식물의 뿌리나 줄기에 호흡관

을 찢어 넣어 식물로부터 산소를 얻는 것으로 보고되어 있다. 본 실험에서는 모기 종 및 영기에 따라 그들의 호흡시 수면으로 떠오르는 특이한 행동패턴에 대한 분석을 통해 물 표면층에 오래 머물 수 있는 특수한 제형화를 만들어 방제효과의 극대화가 가능한지의 여부를 확인하고자, 이집트숲모기와 이나도미집모기 유충의 주요 분포위치와 수면위로 이동하는 횟수, 수면위에 존재하는 시간을 측정하였다.

이집트숲모기 1, 2, 3, 4령 유충의 주요 분포위치와 수면위로 이동하는 횟수, 모기유충의 수면위에 존재하고 있는 시간을 측정할 결과, 1령보다는 2령, 3령 그리고 4령 유충이 수면위에 위치하는 경향을 보였으며, 노숙유충인 3, 4령 유충이 어린유충보다 호흡을 위해 수면으로 이동하는 경향이 높았다. 하지만, 수면위에 존재하고 있는 시간을 측정할 결과, 영기에 따른 차이는 없는 것으로 나타났다(Table 3).

모기종에 따른 행동패턴에 있어 차이를 확인하기 위해 이집트숲모기와 이나도미집모기 2령 유충을 이용해 위와 동일한 행동패턴실험을 수행하여 비교한 결과, 유충의 주요 분포위치는 역시 두 종 모두 수면위에 87.3과 100.0%로 주로 수면위에 위치하고 있었으며, 호흡을 위해 수면으로 이동하는 횟수에서는 이나도미집모기보다는 이집트숲모

Table 4. Behavioral characteristics of *A. aegypti* larva

Behavioral characteristics		1st Larva	2nd Larva	3rd & 4th Larva	Significant level ^a
Principle distribution (%)	underwater	38.3a	12.7b	8.0b	0.000**
	surface water	61.7a	87.3b	92.0b	0.000**
N. of locomotion to surface water (n)		34.3±7.0a	90.0±75.3a	231.7±48.6b	0.009**
Time of existence at surface water (Sec.)		22.5±22.1a	21.0±14.3a	23.2±15.9a	0.927 ^{NS}

^a Values represent mean±SD. Different letters at values in rows show significant differences(One-way ANOVA, Post hoc tests by Duncan) in SPSS version 17.0

^b ** p<0.01, and ^{NS} p>0.05.

Table 5. Culture-media condition of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* CAB199

1. Inoculation volume	0.5%
2. Air flow	0.2-1vvm
3. RPM	100rpm
4. pH	7.5
5. Culture media composition	Glucose 1%, Yeast extract 0.5%, Soybean powder 0.1%, Malt extract 0.2%, NaCl 0.2%, K ₂ HPO ₄ 0.04%, MnSO ₄ 0.0001%

기가 더 빈번하게 이동하였으나, 두 종간에 통계적으로는 차이가 없는 것으로 확인되었다. 하지만, 수면 위에 존재하고 있는 시간을 측정한 결과에서는 이나도미집모기의 경우 조사한 개체 모두가 5분(300초)이상 존재하고 있었으며 이집트숲모기의 경우는 평균 21초 정도 수면에 존재하고 있어, 이나도미집모기 유충은 거의 수면위에 존재하고 있는 것으로 확인되었다(Table 4). 위의 결과로 보아, 모기유충방제를 위해 곤충병원성미생물 제제를 살포시 수면에 좀 더 장시간동안 부유하거나 잔류하고 있는 제형의 형태로 개발하여 사용하는 것이 모기유충과 제제와의 노출시간을 늘릴 수 있으며 이에 따른 방제효과를 높일 수 있을 것으로 생각된다. 또한 노령유충으로 갈수록 수면 위에 존재하는 시간이 높았는데, 일반적으로 미생물제제에 의해 모기유충을 생물학적으로 방제할 때 주요 방제대상 영기가 2령, 3령 유충이라는 것을 고려해 볼 때, 효과적인 모기유충 방제에 있어 제제의 올바른 선택과 개발이 필수적이라 볼 수 있다.

B. thuringiensis subsp. *israelensis* 제형에 따른 방제 효과 비교

제형에 따른 살충효과 및 방제효과를 확인하기 위해 *Bt* CAB199 균주를 대량배양 할 수 있는 배양용 배지를 제공하였다. 이 균주의 배지조성은 일반적으로 Glucose 0.5~1.5%, yeast extract 0.3~0.7%, soybean powder 0.05~0.15%, malt extract 0.1~0.3%, NaCl 0.1~0.3%, K₂HPO₄ 0.02~0.06%, MnSO₄ 0.00005~0.00015%를 포함하는 균주배양용 배지를

이용하였는데, *B.t.i.* CAB199균주의 살충활성을 나타내는 내독소단백질의 생성능력을 증가시키기 위해, 표 5에 제시한 배양조건과 배지조성에 따라 배양액을 확보하였다. 대량 배양한 배양액을 이용해 두 개의 제형, 즉 유효성분 10% 수화제와 50% 액상수화제로 제형화 하였다. 액상수화제는 50%의 유효성분에 습윤제 및 분산제로 Nonylphenol, ethoxylated monoether with sulfuric acid, sodium salt, sodium bis[20 ethylhexyl]sulfocinate, polyoxyethylene nonylphenol이 사용되었으며, 수화제는 10%의 *Bti*에 흡습제로 whitecarbon를 사용하였으며, 습윤제로 sodium bis[2-ethylhexyl] sulfosuccinate를, 분산제로 Lignosulfonic acid와 sodium salt를 표 6, 7과 같은 조성으로 제형화 하였다. 표 8에서 볼 수 있는 것 같이 제형의 종류에 따른 처리에서 살충율을 확인한 결과, 처리 후 1일차에서부터 수화제 형태의 기존 B제품 10⁴cfu/ml농도는 96.3%로 새롭게 만들어진 액상수화제인 *Bt* CAB199 균주의 10³ cfu/ml, 10⁴ cfu/ml 농도처리에서 높은 사망률로 99.1%, 100.0%로 각각 나타내었다. 반면에 수화제 형태의 *Bt* CAB199 균주나 기존 B제품의 경우는 처리 후 1일차의 살충율이 동일 농도상에서 다소 낮게 나타남을 볼 수 있었다. 수화제 형태로 모기유충방역용 미생물제제로 판매되고 있는 B제품의 경우, 면적 896cm² 용기내에서 방제효과 실험을 실시한 결과, 살충율에 있어 처리 후 1일차와 3일차에 살충율이 20% 이상의 차이를 보였다. 이는 처리 후 분산이 용이하게 이루어지지 못함으로 인해 방제효과가 감소한 것으로 여겨지며, 액상수화제제형

Table 6. Composition of Suspension Concentrate (SC) formulation of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* CAB199

Bti 50% SC			
Code	Composition	%	Note
<i>Bt</i>	<i>Bti</i>	50	a.i.
MBSC	Nonylphenol, ethoxylated, monoether with sulfuric acid, sodium salt, Sodium bis[20 ethylhexyl] sulfosuccinate Polyoxyethylene nonylphenol	4	Wetting and dispersing agent
IPA	Isopropanol	30	Conformulant
Water	Water	Rest	diluent

Table 7. Composition of Wettable Powder (WP) formulation of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* CAB199

Bti 10% WP			
Code	Composition	%	Note
<i>Bt</i>	<i>Bti</i>	10	a.i.
W.C.	White carbon	1	absorbent
EPB100P	Sodium bis[2-ethylhexyl] sulfosuccinate	1	Wetting agent
SLS	Lignosulfonic acid, sodium salt	1	Dispersing agent
Kaolin	Kaolin	Rest	diluent

Table 8. Comparison of mortalities of *Culex inatomi* according to the formulation of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*

Formulation	N	1DAY after treatment		3DAY after treatment		
		Mortality(%)	Abbott M ^a	Mortality(%)	Abbott M ^a	
Wettable Powder	B product 10 ³	144	76.6±4.9b	70.9±8.0ab	94.6±4.9bc	94.1±5.3b
	B product 10 ⁴	145	96.3±3.2c	95.3±4.1c	99.1±0.8c	98.9±1.0c
	CAB199 10 ³	130	69.3±4.8b	61.8±8.5a	90.6±1.4b	88.7±2.8a
	CAB199 10 ⁴	130	82.0±4.0b	77.6±6.5b	93.4±1.2bc	92.0±2.2ab
Suspension Concentrate	CAB199 10 ³	144	99.1±0.8c	98.9±1.0c	100.0±0.0c	100.0±0.0c
	CAB199 10 ⁴	145	100.0±0.0c	100.0±0.0c	100.0±0.0c	100.0±0.0c
Control	105		18.5±6.0a		15.2±9.8a	

^a If the control mortality is between 5% and 20%, the mortalities of treated groups should be corrected according to Abbott's formula.

Mortality(%)=X-Y/X×100, X= % survival in the untreated control Y= % survival in treated sample.

의 CAB199은 처리 후 일자에 따른 차이가 거의 없는 것으로 보아, 처리 후 면적에 빠른 시간내에 고르게 분산된 것으로 보인다(Table 8). 또한 야외에서의 미생물제제의 제형에 따른 방제효과를 확인한 실험결과에서는, 액상수화제를 처리한 습지에서는 처리 후 밀도의 급격한 변화가 없이 습지내 물 1L당 10-20 마리 유충의 밀도를 보였으나, 수화제 처리구 습지에서는 두 차례의 급격한 모기유충의 밀도 증가를 보여, 방제제의 습지내 전반적인 분산정도에 있어 차이를 보여 방제효과에 차이를 나타낸 것으로 여겨진다(Fig. 3).

Das & Amalraj(1997)는 *B.t.i* 제형에 따라 야외에서의 모기유충의 방제효과에 있어 차이를 나타내는지의 여부를

조사한 결과, 실내에서는 aqueous suspension(AS) 제형이 granular 제형보다 열대집모기 방제에 있어서는 효과적이라고 보고하였으나 야외에서는 두 제형간 방제효과에 있어 큰 차이를 보이진 않았다고 제시하고 있다. 우리 실험은 작은 면적에서조차도 제형에 따른 방제효과와 차이는 나타나는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 제제의 습지 및 처리 공간 내에서의 분산이나 용해정도의 차이에 의해 살충효과에 차이를 보일 수 있음을 시사해준다. 실질적으로 이러한 문제를 해결하기 위해 일부 학자들은 *Bti*제제에 옥수수전분을 혼합하여 직경 약 2-6cm정도의 단단한 블록모양의 물에 뜨는 형태의 부리켓(Briquette)으로 제형화하여 입자가 서

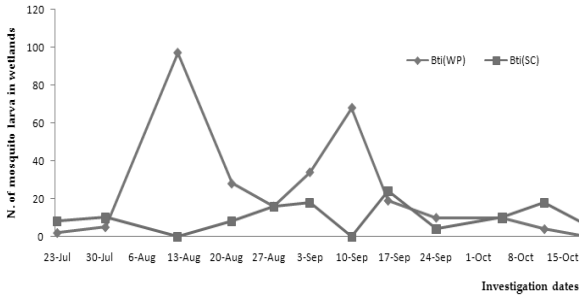


Fig. 3. Control effect of mosquito larva in constructed wetland by *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* CAB199 formulations.

서히 방출되도록 하여 잔효기간을 늘리려는 연구도 수행된 바 있다(Yu *et al.*, 1982; Khetan, 2001). 액상수화제는 물과 유기용매에 난용성인 원제를 액상의 형태로 조제한 제형으로, 수화제가 가지는 분말의 비산과 같은 단점을 보완하기 위해 개발된 제형이다. 증량제로 물을 사용하여 습식분쇄기로 입자를 평균 1-3 μ m 크기로 미분쇄 시킨 후 액상의 보조제와 혼합, 유효성분을 물에 현탁시킨 제제로, 분진이 발생하지 않아 사용할 때 안전하고 수화제처럼 평량할 필요가 없다는 장점이 있다. 습지나 인공호수, 늪 같은 장소에 살포할 경우, 평량을 할 수 없는 상황이 될 수도 있고, 사람이 직접 안으로 들어갈 수 없는 상태에서 방제대상 면적에 고루 살포하여 약제를 분산할 수 없는 문제를 해결해 줄 수 있는 제형으로 유용할 것으로 생각된다. 물론 수화제처럼 포장이나 수송, 보관에 있어 덜 편리한 점이 있지만, 입자가 미세하여 비산되기 쉬운 제형보다는 흡입이나 중독 위험이 적고, 특히나 증량제로 물을 사용하였기 때문에 독성, 환경오염 측면에서도 유리하다는 점에서, 여러 방면으로 액상수화제형태의 제형으로 곤충병원성미생물제제를 만드는 것이 효과적일 것으로 생각된다.

사 사

본 논문은 2009년 한국농어촌공사 농어촌연구원 용역연구과제인 자연정화시설의 모기 등 해충제어방안 연구 과제를 수행하는 과정에서 얻은 결과를 바탕으로 작성되었습니다.

Literature Cited

- Arredondo-jimenez, J.I. and K.M. Valdez-Delgado. 2006. Effect of Novalurion (Rimon[®] 10EC) on the mosquitoes *Anopheles albimanus*, *Anopheles pseudopunctipennis*, *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* from Chiapas, Mexico. *Med. Vector. Entomol.* 20: 377-387.
- Beckage, N.E., K.M. Marion, W.E. Walton, M.C. Wirth and F.F. Tan. 2004. The comparative larvicidal toxicities of three ecdysone agonists on the mosquitoes, *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* and *Anopheles gambiae*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 57: 111-122.
- Benintende, G.B., J.E. Lopez-Meza, J.G. Cozzi, C.F. Piccinetti and J.E. Ibarra. 2000. Characterization of INTA 51-3, a new atypical strain of *Bacillus thuringiensis* from Argentina. *Curr. Microbiol.* 41: 396-401.
- Choi, S.Y., S.C. Oh, M.S. Cho, S.K. Paek, J.S. Kim, D.A. Kim, M.R. Gill, Y.N. Youn and Y.M. Yu. 2007. Bioassay of environment-friendly insecticides for management of mosquito, *Culex pipiens molestus*. *Kor. J. Appl. Entomol.* 46(2): 261-267.
- Das, P.K. and D. Dominic Amalraj. 1997. Biological control of malaria vectors. *Indian J. Med. Res.* 106: 174-197.
- Dominic Amalraj, D., S.S. Sahu, P. Jambulingam, P.S. Boopathi Doss, M. Kalyanasundaram and P.K. Das. 2000. Efficacy of aqueous suspension and granular formulations of *Bacillus thuringiensis* (Vectobac) against mosquito vectors. *Acta Tropica* 75: 243-246.
- Khetan, S.K. 2001. *Microbial pest control*. 300bp. Marcel Dekker, Inc. N.Y.
- Kil, M.R., D.A. Kim, S.K. Paek, J.S. Kim, S.Y. Choi, D.Y. Jin, Y.N. Youn, I.C. Hwang, M. Ohba, and Y.M. Yu. 2008. Characterization of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tohokuensis* CAB167 isolate against mosquito larva. *Kor. J. Appl. Entomol.* 47(4): 457-465.
- Kim, H.S., H.W. Park, D.W. Lee, Y.M. Yu, J.I. Kim and S.K. Kang. 1995. Distribution and characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates from soil in Korea. *Kor. J. Appl. Entomol.* 34(4): 344-349.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- Ree, H.I., K.I. Im, H.J. Shin and T.U. Kim. 1988. Study on autogeneous behaviour of *Aedes togoi*, the vector of *Brugian filariasis* in Korea. *Yonsei Rep. Trop. Med.*, 19: 3-7.
- Yu, H.S., D.K. Lee, W.J. Lee and J.C. Shim, 1982. Mosquito control evaluation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in the laboratory, simulated rice paddies, and confined field trials in marsh and sewage effluent in South Korea. *J. Entomol.* 12: 69-82.