

# 곤충병원세균(*Xenorhabdus nematophila*, *Photorhabdus temperata* ssp. *temperata*)의 대사물질을 이용한 “비티플러스” 생물농약 개발

서삼열 · 김용균\*

안동대학교 자연과학대학 생명자원과학과

## Development of “Bt-Plus” Biopesticide Using Entomopathogenic Bacterial (*Xenorhabdus nematophila*, *Photorhabdus temperata* ssp. *temperata*) Metabolites

Samyeol Seo and Yonggyun Kim\*

Department of Bioresource Sciences, Andong National University, Andong 760-749, Korea

**ABSTRACT:** *Bacillus thuringiensis* (Bt) is a bacterial biopesticide against insect pests, mainly lepidopterans. *Spodoptera exigua* and *Plutella xylostella* exhibit significant decreases in Bt susceptibility in late larval instars. To enhance Bt pathogenicity, we used a mixture treatment of Bt and other bacterial metabolites which possessed significant immunosuppressive activities. Mixtures of Bt with culture broths of *Xenorhabdus nematophila* (Xn) or *Photorhabdus temperata* ssp. *temperata* (Ptt) significantly enhanced the Bt pathogenicity against late larval instars. Different ratios of Bt to bacterial culture broth had significant pathogenicities against last instar *P. xylostella* and *S. exigua*. Five compounds identified from the bacterial culture broth also enhanced Bt pathogenicity. After determining the optimal ratios, the mixture was applied to cabbage infested by late instar *P. xylostella* or *S. exigua* in greenhouse conditions. A mixture of Bt and Xn culture broth killed 100% of both insect pests when it was sprayed twice, while Bt alone killed less than 80% or 60% of *P. xylostella* and *S. exigua*, respectively. Other Bt mixtures, including Ptt culture broth or bacterial metabolites, also significantly increased pathogenicity in the semi-field assays. These results demonstrated that the Bt mixtures collectively names "Bt-Plus" can be developed into potent biopesticides to increase the efficacy of Bt.

**Key words:** *Bacillus thuringiensis*, *Xenorhabdus nematophila*, *Photorhabdus temperata*, subsp. *temperata*, *Plutella xylostella*, *Spodoptera exigua*, Metabolite, Biopesticide

**초 록:** *Bacillus thuringiensis* (Bt)는 나비목의 해충방제에 주로 사용되는 미생물농약이다. 그러나 파밤나방(*Spodoptera exigua*)과 배추좀나방(*Plutella xylostella*)에서 보듯 종령기에 접어들면 Bt 감수성이 현격하게 낮아져 방제효율이 낮아진다. 본 연구는 Bt의 병원력을 제고시키기는 데 목적을 두고, 이를 위해 곤충의 면역반응을 억제시키는 곤충병원세균의 대사물질을 이용하여 Bt의 혼합제를 개발하려 했다. 곤충병원세균(*Xenorhabdus nematophila* (Xn) 또는 *Photorhabdus temperata* ssp. *temperata* (Ptt))의 배양액을 다양한 농도로 Bt에 혼합하여 파밤나방과 배추좀나방 종령 유충에 처리하였을 때 Bt 병원력을 현격하게 증가시켰다. 세균 배양액으로부터 동정한 다섯 가지의 화합물을 Bt와 혼합하여 처리하면 Bt 병원력을 또한 증가시켰다. 최적의 방제 효과를 나타낼 수 있는 Bt와 세균배양액 또는 대사물질의 혼합비율과 살포량을 결정한 후 배추 포장에 발생한 배추좀나방과 파밤나방 종령 유충에 대해 처리하였다. Bt와 Xn 배양액을 2 회 이상 살포하면 배추좀나방과 파밤나방에 대해 100%의 방제효과를 나타냈으나, Bt 단독으로 처리하면 각각 약 80%와 60% 이하의 방제효과를 나타내었다. Ptt 배양액 및 세균 대사물질을 포함한 다른 Bt 혼합제들 또한 뚜렷한 병원력 증가를 간신포장실험에서 보여주었다. 이러한 Bt 혼합제를 통틀어 “비티플러스”라 명명하였으며, 이는 Bt 약효의 단점을 극복한 효과적 미생물 살충제로 개발 가능성을 보여주었다.

**검색어:** 비티, 곤충병원세균, 배추좀나방, 파밤나방, 대사화합물, 생물농약

\*Corresponding author: [hosanna@andong.ac.kr](mailto:hosanna@andong.ac.kr)

Received May 11 2011; Revised July 21 2011

Accepted August 17 2011

국내외적으로 가장 많이 사용되는 미생물농약인 *Bacillus thuringiensis* (Bt)는 그람양성 간균으로 내생포자를 형성하며, 내독소로 이루어진 살충성 단백질을 생성한다(Tanada and Kaya, 1993). Bt의 주요작용기작은 특이적 병원성 단백질에 기인하기 때문에 비표적 생명체에 대하여 비교적 안전하여 친환경 농자재로 널리 이용되고 있다. 현재까지 Bt 생물농약은 나비목, 파리목 등에 활성을 나타내며 기주 범위를 확대시키고 있다(Schnepf *et al.*, 1998). 살충성 단백질의 작용기작은 Bt가 경구를 통해 장내로 들어가면 중장의 분해효소에 의해 내독소 단백질이 활성화되어 증장세포막에 존재하는 수용체와 결합하여 증장세포에 손상을 입혀 중장 내강과 혈관을 직접 연결시켜 궁극적으로 패혈증을 일으켜 치사시키는 것으로 알려져 있다(Gill *et al.*, 1992). 그러나 이 독소 단백질의 기주 특이성은 적용 해충의 범위를 좁히고, 화학농약에 비해 약효가 비교적 느리고, 저항성의 발달로 보다 넓은 적용 확대를 어렵게 하고 있다(Tabashink *et al.*, 2009).

곤충병원세균인 *Photorhabdus temperata* ssp. *temperata* (Ptt)는 국내에서 채집된 *Heterorhabditis megidis*의 곤충병원선충에서 분리되었다(Kang *et al.*, 2004). 유사한 곤충병원선충으로 *Steinernema carpocapsae*에서 공생세균인 *Xenorhabdus nematophila* (Xn)를 분리하였다(Park *et al.*, 1999). *Heterorhabditis*와 *Steinernema*는 상이한 발생 기원을 가지지만, 이들이 보이는 기생 생활사는 유사한 패턴을 보이는 것으로 추정된다(Akhurst, 1980; Adams and Nguyen, 2002). 즉, 이들 세균은 각 선충 기주의 장내에서 서식하면서 종 특이적 공생 생활환을 보인다(Kaya and Gaugler, 1993). 일단 감염태 선충이 대상 곤충의 개구부를 지나 혈강으로 침입하면 선충의 장내에 공생하는 곤충병원세균을 배출시킨다(Herbert and Goodrich-Blair, 2007). 혈강으로 배출된 세균은 자신과 기주 선충을 보호하기 위해 대상 곤충의 면역을 억제시킨다(Park and Kim, 2000). 면역기능이 억제된 기주는 체내에서 세균증식이 이루어지면서 발생하는 독소단백질과 더불어 기주 곤충의 패혈증을 유발시켜 치사에 이르게 한다(Dunphy and Webster, 1991, 1994; French-Constant *et al.*, 2005).

특히 Xn 곤충병원세균의 배양액에서 유기용매추출법을 통하여 분리된 물질인 벤질리덴아세톤, proline-tyrosine (PY), acetylated phenylalanine-glycine-valine (Ac-FGV)은 아이코사노이드 생합성을 억제하며 곤충의 면역억제를 유도하는 것으로 알려져 있다(Ji *et al.*, 2004; Kwon and Kim, 2008; Shrestha and Kim, 2009). 아이코사노이드는 20개 탄소로 구성된 부포화 지방산 유도체로서 다양한 병원체에 대한 혈구세포의 포식작용 및 소낭형성과 같은 세포성 면역 반응과 다양한 항생펩타이드의 작용으로 비롯되는 체액성 면역반응을 매개하는 면역 중개

물질로 알려져 있다(Stanley and Miller, 2006; Shrestha and Kim, 2009). 세포성 면역반응의 대부분은 혈장의 페놀옥시테이즈 활성화에 의한 멜라닌형성 반응에 의존한다(Kanost *et al.*, 2004). 즉, 아이코사노이드 생합성 억제제는 이러한 다양한 세포성 면역반응 및 체액성 면역반응을 억제하여 대상 곤충의 면역저하를 유발하여 혼합 처리시 Bt와 같은 곤충병원세균의 살충력을 높일 수 있는 것으로 보고되었다(Seo and Kim, 2010).

배추좀나방(*Plutella xylostella*)에 대해 Xn과 Ptt는 미생물농약인 Bt의 병원력을 현격하게 증가시켰으며(Seo and Kim, 2009; Seo *et al.*, 2010), 이러한 곤충병원세균을 이용하여 새로운 미생물 농약을 개발하는 연구가 진행되었다(Seo and Kim, 2009). 또한 미생물 농약의 산업화로 진행하기 위해서는 이러한 곤충병원세균의 대량 배양에 따른 경제성을 고려하여 저가의 공업용 세균 배양액을 선발하였다(Seo *et al.*, 2010).

본 연구는 Xn과 Ptt 유래 세균 대시물질을 이용하여 Bt의 살충력을 증가시키는 새로운 미생물 복합제를 개발하는데 목표를 두었다. 이를 위해 배추좀나방과 파밤나방 종령 유충을 대상으로 두 미생물체의 최적 혼합비율을 결정하였으며, 이를 토대로 수화제 형태의 제제화를 통한 시설재배지에서 포장 효과를 결정하였다.

## 재료 및 방법

### 배추좀나방 사육

시험곤충은 안동시 송천동에 소재한 배추밭에서 채집한 유충을 약제 처리하지 않고 실내에서 누대 사육한 것을 사용하였다. 유충은 온도  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , 광주기 16:8 h (L:D), 상대습도 40~60%의 배양기에서 배추를 먹이로 사육했다. 성충은 10% 설탕물을 먹이로 제공하고 배추 잎을 이용하여 산란을 유도하였다.

### Bt 균주 선발

*B. thuringiensis* 균주는 (주)고려바이오(Hwasung, Korea)로부터 지원받았으며 *B. thuringiensis* var. *kurstaki* serotype a (Bt1), *B. thuringiensis* var. *kurstaki* serotype b (Bt2) 그리고 *B. thuringiensis* var. *aizawai* NT0423 (Bt3)을 사용하였다. 각각의 균주에 멸균수 1 mL를 혼합하여 현탁액을 만든 후 loop를 이용하여 Luria-Bertani (LB) 사면배지(1 L 제조시 bacto trypton 10 g, yeast extract 5 g, sodium chloride 10 g, Agar 15 g)에 세균을 도말하고  $28^\circ\text{C}$ 에서 48 시간 배양하였다. 평판배지에서 배양된 세균은 단일 콜로니를 얻고 이를 멸균수로 희석하여 2 mL의 LB

액체배지에서 28°C 에서 48 시간 배양하였다.

## Xn과 Ptt 세균 배양액 및 제제화

근충병원세균인 *X. nematophila* K1과 *P. temperata* ssp. *temperata* ANU101은 기주 선충에서 분리된 후(Park *et al.*, 1999; Kang *et al.*, 2004) 동결보관된 것을 이용하였다. 이들 균주는 LB 평판배지를 이용하여 28°C 에서 12 시간동안 배양하여 단일 균총을 채취하였다. 채취된 단일 균총을 2 mL의 LB 액체 배지를 이용하여 28°C 에서 12 시간 동안 200 rpm의 속도로 교반 배양한 후, 글리세롤을 30%의 농도가 되도록 첨가한 후 동결 분획시료를 만들었다. 이 동결시료가 추후 반복되는 세균 배양의 원시료로 이용되어 계대배양에 따른 세균 변이 가능성을 줄였다. 글리세롤 동결 세균시료 250 µL를 1 L의 LB 액체배지에 첨가하고 28°C 에서 200 rpm의 속도로 48 시간동안 교반 배양하였다. 배양된 세균은 분광광도계(Uvikon 930, Kontron, Ales, France)를 이용하여 590 nm에서 흡광도를 측정하여 흡광도 값이 2.4 이상이 되면 동결건조기(PVTFD 100R, Ilshin BioBase, Yangju, Korea)를 이용하여 함수량 14.7% 조건이 되게 72 시간 동결 건조하였으며, 동결 건조된 시료에 규조토(Duksan, Seoul, Korea)를 70% 첨가하여 제제화하였다.

## Bt 혼합제의 제제화

선발 Bt3을 이용하여 혼합제를 제제화했다. Bt3 균주는 tryptic soy agar (TSA, 24 g/L, Bectondickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) 배지를 이용하여 30°C 에서 24 시간 동안 배양하여 단일 균총을 채취하였다. 채취된 단일 균총을 2 mL의 TSB 액체배지를 이용하여 30°C 에서 24 시간 동안 200 rpm의 속도로 교반 배양한 후, 글리세롤을 30%의 농도가 되도록 첨가한 후 동결 분획시료를 만들었다. 이후 제제화 과정은 앞에서 기술한 Xn/Ptt 세균배양액과 동일하게 처리하였다.

## 대사 화합물의 조제

*X. nematophila* 유래 물질인 benzylideneacetone (BZA, (E)-4-phenylbut-3-en-2-one, Sigma-Aldrich Korea), proline-tyrosine (PY, 3-(4-hydroxybenzyl)-hexahydropyrrolo[1,2- $\alpha$ ]pyrazine-1,4-dione, Peptron, Daejon, Korea), acetylated phenylalanine-glycine-valine (Ac-FGV, 2-(2-(2-benzyl-3-oxobutanamido)acetamido)-3-methyl butanoic acid, Peptron) 그리고 cyclic PY (cPY, 3-(4-hydroxyphenyl)-2-(pyrrolidine-2-carboxamido)propanoi

c acid)는 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich Korea)를 이용하여 1,000 ppm의 농도로 조제되었으며 indole (2,3-benzopyrrole, Sigma-Aldrich Korea)과 oxindole (2,3-dihydro-1H-indol-2-one, Sigma-Aldrich Korea)은 증류수를 이용하여 1,000 ppm의 농도로 조제한 시료에 Bt를 혼합하였다. 세균 대사물질 혼합의 경우는 BZA을 기준으로 동일한 양으로 기타 화합물 복합체를 첨가했다. 이때 기타 화합물 복합체는 각 화합물이 동일한 양으로 혼합했다.

## Bt 혼합제의 조성비를 결정

앞에서 기술한 방법과 같이 동결 건조하여 제제화한 Bt, Xn 그리고 Ptt의 세균배양액을 Bt:Xn 그리고 Bt:Ptt를 0:1,000 - 1,000:0의 질량 비율로 혼합하여 증류수를 이용하여 각각 1,000 ppm의 현탁액으로 조제하였다. 배추 잎(3 cm<sup>2</sup>)을 조제된 Bt 혼합액에 10분간 침지시킨 후 여과지가 깔려진 용기(직경 9 cm)에서 5분간 음건하였다. 각각의 배추 잎에 배추좀나방 4령충과 파밤나방 5령충을 10 마리씩 3 반복으로 처리하였다. 대조구는 증류수로 상기와 동일하게 처리하였다. 세균 대사물질은 Bt와 1:1 또는 3:7의 질량비율로 혼합하였다. 이들 혼합물을 1,000 ppm으로 조제하여 배추좀나방 4령충과 파밤나방 5령충에 처리하였다.

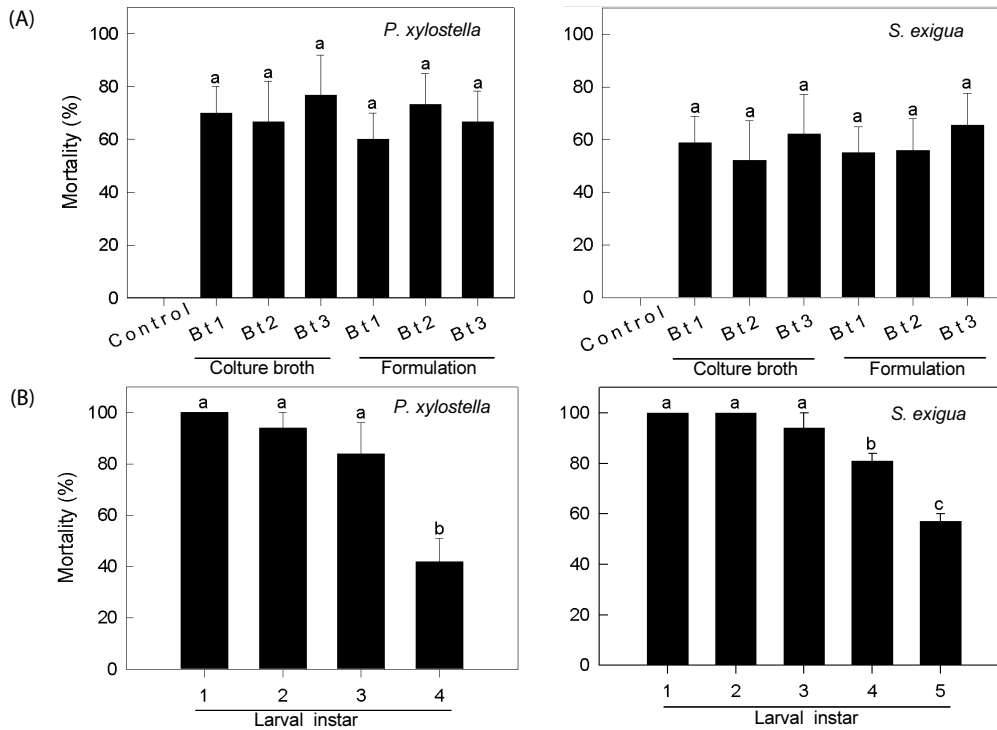
## 살포약량 측정을 위한 간이 포장실험

실험에 사용된 열갈이배추(Danong, Namyangju, Korea)는 30 일간 온도 28 ± 1°C, 광조건 16:8 h (L:D) 그리고 상대습도 40~60%의 온실에서 재배하였다. 약제 처리하기 전 발생한 배추좀나방과 파밤나방 가운데 4령 또는 5령의 개체만 계수하여 처리하기 전 밀도로 산출하였다. 이후 약제를 처리하였으며, 다중 처리는 24 시간 및 48 시간 이후에 각각 추가 처리하였다. 생존수는 최초 살포 24 시간 이후부터 계수하여 120 시간까지 실시하였다.

## 결과

### Bt 제형화와 영기별 감수성 변이

동결 건조에 따른 Bt 제형화가 파밤나방과 배추좀나방의 살충력에 미치는 효과가 검증되었다(Fig. 1A). 이를 위해 세 가지 Bt 균주를 TSB 액체배지에서 배양하여 각각 세균배양액과 동결 제형화로 나누어 각각 배추좀나방 3령충과 파밤나방 4령충에 대해 살충력을 비교하였다. 이때 3개 균주는 물론이고 동결



**Fig. 1.** Screening of an optimal *Bacillus thuringiensis* (Bt) isolate against *Plutella xylostella* and *Spodoptera exigua*. (A) Pathogenicity of two isolates (Bt1 and Bt2) from *Bt kurstaki* and one isolate (Bt3) from *Bt aizawai* were compared. Culture broths containing  $10^{11}$  cfu/ml bacterial cells or formulation forms (1,000 ppm,  $10^9$  per mg). Formulation was made by freeze-drying as described in Materials and methods. Each treatment was tested on 30 last instar larvae. Three replicates were performed. (B) Variation in pathogenicity of Bt3 formulation (1,000 ppm,  $10^9$  cfu per mg) in larval development.

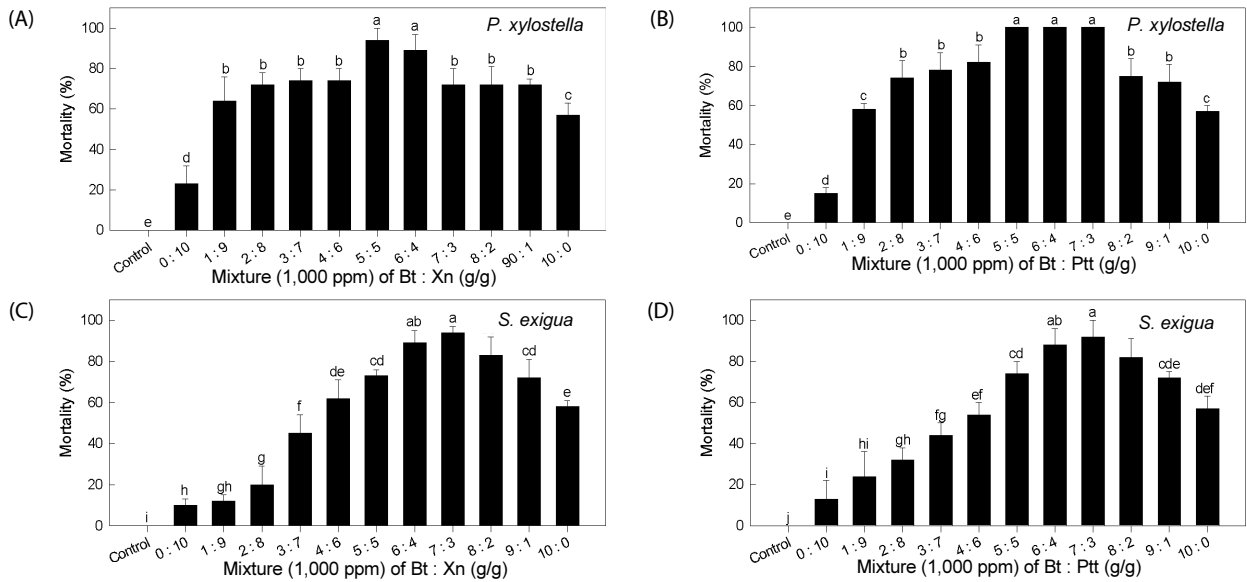
건조한 제제는 모두 뚜렷한 차이 없이 유사한 살충력을 나타냈다(배추좀나방:  $F = 0.54$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.4746$ ; 파밤나방:  $F = 0.06$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.8053$ ). 그러나 살충률이 배추좀나방에서 최대 80% 그리고 파밤나방에서 최대 약 60% 이상을 넘지 못했다. 이를 해충의 발육 단계별 Bt 살충제의 감수성을 확인하기 위해 Bt를 1,000 ppm으로 조제하여 모든 유충기에 섭식 처리하였다(Fig. 1B). 배추좀나방의 경우 1~3령충은 살충률이 100%로 나타났지만 4령충은 살충률이 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 파밤나방은 4령과 5령 모두에서 감수성이 현격하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이후의 Bt 처리는 모두 Bt3을 이용한 동결 건조 제형을 이용하였다.

### Bt 미생물 혼합제의 혼합비율 결정

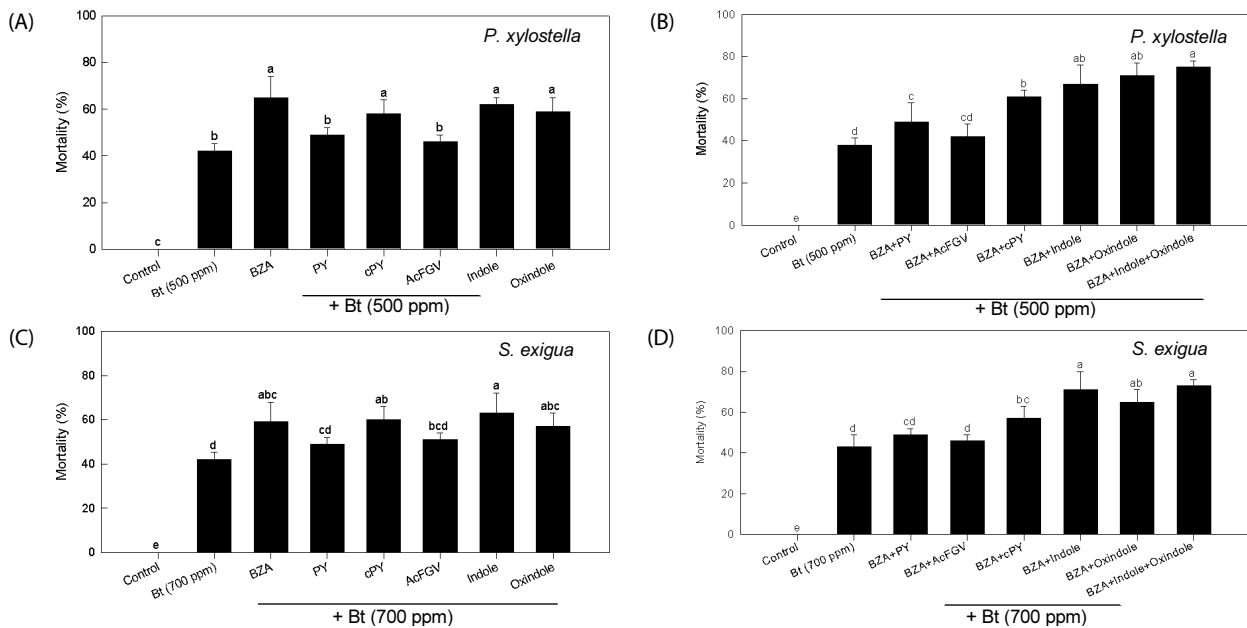
Bt의 살충력을 증가시키기 위해 면역억제 효과를 갖는 Xn과 Ptt 배양액을 혼합한 혼합제 개발을 시도하였다(Fig. 2). 선발된 Bt 제제에 동일한 동결건조 방법으로 준비된 Xn 또는 Ptt 배양액 제형을 서로 다른 질량 비율로 혼합하였다. 이 혼합제를 1,000 ppm이 되도록 증류수를 이용하여 현탁액으로 조제하여 배추좀

나방 종령 유충에 대한 살충력을 검정하였다. Bt와 Xn 혼합 처리구에서는 5:5와 6:4 비율에서 살충률이 가장 높게 나타났다(Fig. 2A). Bt와 Ptt 혼합 처리구에서는 5:5-7:3 비율에서 살충률이 100%로 나타났다(Fig. 2B). 동일한 처리방법으로 파밤나방 종령 유충에 대해 Bt와 Xn 혼합제는 6:4-7:3 비율에서 최대 살충률을 나타냈다(Fig. 2C). 동일한 처리방법으로 Bt와 Ptt 혼합제 처리는 파밤나방 종령 유충에 대해 6:4-7:3 비율에서 최대 살충률을 나타냈다(Fig. 2D). 따라서 Bt 혼합제는 대상 해충에 따라 다르게 결정되어, 배추좀나방의 경우는 5:5(Bt: 세균배양액, g/g), 그리고 파밤나방의 경우는 7:3(Bt: 세균배양액, g/g)의 비율로 혼합하는 것이 가장 이상적 비율로 결정하였다.

Xn 대사 화합물인 BZA, PY, Ac-FGV, cPY, indole 그리고 oxindole을 Bt와 1:1 또는 3:7의 질량비율로 혼합하여 모두 1,000 ppm의 농도로 배추좀나방과 파밤나방 종령 유충에 섭식 처리하였다(Fig. 3). 배추좀나방의 경우 500 ppm의 Bt는 불과 40%의 살충률을 나타내는 반면 BZA, cPY, indole 또는 oxindole을 각각 혼합하면 살충률을 현격하게 증가시켰다(Fig. 3A). 이 가운데 BZA의 효과가 가장 높은 상승효과를 주었고, 다시 BZA를 기준으로 다른 화합물의 조합을 이뤄 Bt 상승효과를 검정하였다



**Fig. 2.** Determination of optimal ratios of *Bacillus thuringiensis* (Bt) to bacterial culture broths of *Xenorhabdus nematophila* (Xn) or *Photorhabdus temperata temperata* (Ptt). Bacterial culture broths were formulated in soluble powder by freeze-drying. Each mg of bacterial formulation contained  $10^5$  cfu for Bt sample,  $10^8$  cfu for Xn sample, and  $10^{10}$  cfu for Ptt sample. Last instar *Plutella xylostella* or *Spodoptera exigua* were bio-assayed against the Bt mixtures. Each treatment was tested on 30 larvae. Three replicates were performed. Mortality was measured 5 days after treatment. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test).

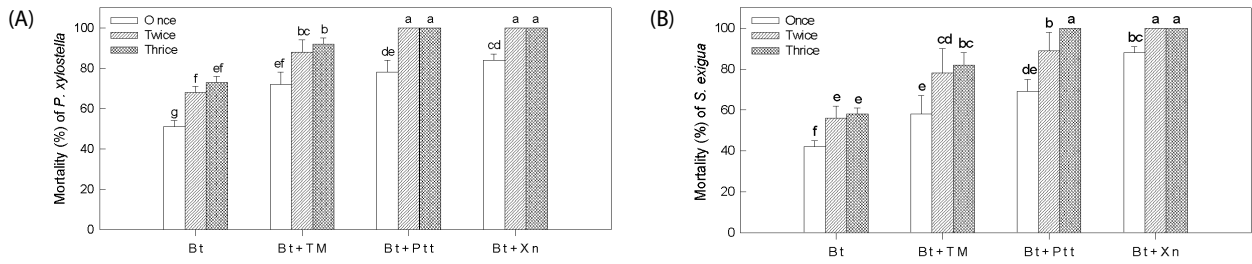


**Fig. 3.** Determination of optimal bacterial metabolite mixtures to increase pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* (Bt) against last instar *Plutella xylostella* or *Spodoptera exigua* (A, C). Single metabolite effect on the Bt pathogenicity (B, D). Mixture effect of metabolites on the Bt pathogenicity. Bt concentrations were 500 ppm for *P. xylostella* and 700 ppm for *S. exigua*. In each mixture, BZA was 50%. For 'BZA+indole+oxindole', indole and oxindole were mixed equally to be 50% in the mixture. Each treatment was tested on 30 larvae. Three replicates were performed. Mortality was measured 5 days after treatment. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test).

(Fig. 3B). 이때 가장 높은 상승효과는 BZA와 indole 및 oxindole 을 혼합한 조합에서 나타났다. 그러나 배양액에서 보듯 100%의

살충력은 조사된 모든 혼합 비율에서 나타나지 않았다.

대사물질의 Bt에 대한 협력효과가 파밤나방에서 분석되었다



**Fig. 4.** Control efficacy of three *Bacillus thuringiensis* (Bt) mixtures against *Plutella xylostella* and *Spodoptera exigua* larvae infesting oriental cabbage. TM represents a toxic metabolite mixture consisting of BZA and indole in equal amounts. Ptt represents a bacterial culture broth formulation of *Photobacterium temperata temperata*. Xn represents a culture broth formulation of *Xenorhabdus nematophila*. 'Xn+Bt' or 'Ptt+Bt' mixtures (1,000 ppm) consisted of 500 ppm Bt and 500 ppm Xn or Ptt for controlling *P. xylostella*, and 700 ppm Bt and 300 ppm Xn or Ptt for controlling *S. exigua*. 'TM+Bt' mixture (1,000 ppm) consisted of 700 ppm Bt and 300 ppm TM. The insecticide treatment was applied to cabbage up to three times every 24 h. Each treatment was tested on 30 larvae. Three replicates were performed. Mortality was measured 5 days after treatment. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test).

(Figs. 3C, D). 먼저 화합물 단독으로 Bt와 혼합하였을 때 BZA가 가장 높은 상승효과를 주었다. 다시 BZA를 기준으로 다른 화합물을 첨가한 복합 제형을 만들어 분석하였을 때 배추좀나방과 마찬가지로 BZA와 indole 및 oxindole을 혼합한 조합에서 가장 높게 상승효과가 나타났다. 따라서 세균 대사물질은 효과가 가장 높은 BZA, indole 및 oxindole을 2:1:1의 질량비로 혼합하여 포장 실험에 적용하게 했다.

### 간이 포장실험을 통한 살포약량 결정

Bt와 Xn 배양액, Ptt 배양액 그리고 세균 대사 화합물의 정해진 비율을 토대로 열갈이배추가 재배된 포장에서 발생한 배추좀나방 종령 유충을 대상으로 약제를 처리하였다(Fig. 4A). 살포량을 결정하기 위해 최초 1 회 살포 후 24 시간 주기로 최대 3 회까지 살포하였다. 배추좀나방에 1 회 살포시 Bt와 Xn 배양액을 혼합하여 처리한 시험구에서 살충률이 약 80%로 나타났으며 1 회 추가 살포한 경우 두 세균 배양액 모두 100%의 살충력을 나타냈다. 그러나 세균 대사물질의 경우는 3 회 처리하여도 100%의 방제 효과를 나타내지 못했다. 동일한 방법으로 파밤나방 종령 유충을 대상으로 실시하였다(Fig. 4B). 파밤나방에 1 회 살포시 Bt와 Xn 배양액을 혼합한 처리구에서 살충률이 약 80%로 나타났으나, 2 회 이상 살포한 경우 살충률이 100%로 나타났다. Ptt 배양액의 경우는 3회 처리에서 100% 처리 효과가 나타났다. 그러나 세균 대사물질의 경우는 3회 처리하여도 최대 80%의 살충률을 넘지 못했다.

### 고찰

본 연구 결과는 난 방제 해충인 배추좀나방과 파밤나방을 대

상으로 곤충병원세균인 *X. nematophila*와 *P. temperata* ssp. *temperata*의 배양액 또는 배양액에 존재하는 대사물질을 이용하여 포장에 적용 가능한 미생물농약을 개발하는데 목적을 두었다. 현재 사용되고 있는 Bt 미생물제는 본 연구에서 보듯 유충의 영기가 진행함에 따라 감수성이 낮아지는 현상을 볼 수 있다. 즉, 분석된 Bt *kurstaki*와 Bt *aizawai* 모두는 비록 어린 유충기에는 100% 살충률을 보일 수 있으나 최종령에 이르면 병원력이 떨어져 배추좀나방의 경우 약 40%의 최대 살충률을 나타내었고 파밤나방은 약 60%의 최대 살충력을 나타내었다. 이러한 Bt의 영기별 감수성 변화는 나비목 해충에서 보고되었다(Rausell *et al.*, 2000). 이러한 이유로서 유충의 영기가 진행함에 따라 Bt의 독소 단백질인 Cry 1δ에 대한 수용체로서 aminopeptidase N(APN)의 발현량에 따라 역비례한다고 보고하였다(Gilliland *et al.*, 2002). 따라서 본 연구에서 나타난 유충 영기별 Bt의 감수성 변이는 중장에 존재하는 Bt 내독소 수용체의 밀도 변화와 관련이 있을 것으로 추정된다.

Bt는 그람양성 간균으로 곤충의 경구로 중장에 들어가면 이들이 갖는 내독소에 의해 독성이 나타나게 된다. 즉, 중장의 알칼리 환경에서 용해된 내독소는 다시 단백질 분해에 의해 활성화되고 중장의 미세용모의 세포막소낭에 존재하는 수용체에 결합한다(Hoffman *et al.*, 1988; Zhang *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007; Jenkins and Dean, 2000). 결합된 Bt 독소 단백질은 중장 세포막에 구멍을 형성하고 중장 기능 마비(Gill *et al.*, 1992; Pigot and Ellar, 2007) 및 세포치사(Zhang *et al.*, 2008)로 이어지게 한다. 이러한 중장세포 와해를 통해 중장내의 세균이 혈장으로 침입하게 되고 패혈증을 유발하여 치사케 한다(Broderick *et al.*, 2006). 광범위한 Bt 사용은 해충들의 저항성을 유발시켰다(Tabashnik *et al.*, 2000). 이러한 Bt 저항성은 중장 상피세포막에 존재하는 Bt 내독소 단백질 수용체의 구조 변화(Gahan *et*

al., 2001; Ferre and Van Rie, 2002), 이 독소 단백질 가수분해력 저하(Oppert *et al.*, 1997) 그리고 손상된 상피 세포들의 빠른 회복능력(Forcada *et al.*, 1999)을 포함한다. 여기에 곤충의 세균에 대한 방어기작으로 Bt에 대한 감염력 저하는 곤충의 면역능력 상승에 따라 기인될 수 있어 실제로 Bt 세균 감염에 따라 혈림프의 멜라닌 형성반응과 같은 면역 반응이 야기되었다(Rahman *et al.*, 2004). Bt와 곤충 면역작용 사이의 기능적 관계성은 BZA 또는 유약호르몬과 같은 면역억제 물질이 배추좀나방에 대해 Bt 병원력을 증가시키는 사실에서도 입증되었다(Kwon and Kim, 2007, 2008). 파밤나방의 경우 아이코사노이드 생합성과 멜라닌 반응을 일으키는 페놀옥시테이즈 효소 반응과는 밀접한 관계성을 가지며, BZA의 경우 페놀옥시테이즈 활성을 억제시키는 것으로 밝혀졌다(Kwon and Kim, 2008). 이러한 페놀옥시테이즈의 활성화 초기단계에 아이코사노이드가 관여하기에 (Shrestha and Kim, 2008), Xn와 Ptt 배양액에 존재하는 아이코사노이드 생합성 억제제에 의해 Bt의 병원력을 상승시킨 것으로 설명되어 질 수 있다. 따라서 아이코사노이드 생합성억제 물질을 생성하는 Xn 또는 Ptt 배양액을 이용하여 나비목 해충의 종령에 대해서 Bt의 살충력을 높이려는 시도가 본 연구에서 실시되었다.

Xn의 배양액은 Bt와 혼합하여 파밤나방과 배추좀나방의 각각의 종령기인 5령과 4령에 처리할 경우 Bt 단독 처리에 비해 현격하게 살충력을 증가시켰다. 이러한 살충력 증가 효과는 Xn과 Bt의 상대 비율에 따라 차이가 있었고, 포장의 경우는 살포약량에 따라 차이를 보였다. Xn 또는 Ptt의 Bt 살충력 제고 효과는 이들이 생성하는 대사물질에 기인한다고 볼 수 있다. 특별히 BZA는 두 세균이 공통적으로 생산하는 물질로서(Seo *et al.*, 2010) 인지질분해효소의 일종인 phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)의 효소 활성을 억제하여 아이코사노이드 생합성을 억제할 뿐만 아니라 직접적으로 페놀옥시테이즈의 효소 활성을 기질과 경쟁적으로 억제하는 것으로 보고되었고 이러한 억제효과로 PY, cPY 및 Ac-FGV에서 나타났다(Song *et al.*, 2011). 한편 이들 세균 대사물질이 갖는 면역억제 효과 이외에 이들은 곤충의 중장에서 소화효율을 낮추어 생존율을 억제하는 효과를 갖는다고 보고하였다(Kim and Kim, 2011). 즉, 세균 대사물질은 면역억제는 물론이고 섭식에 따라 소화 효율을 낮추어 Bt의 살충력을 증가시킨 것으로 사료된다. 그러나 본 연구에서 분석한 5종의 세균 대사물질을 모두 처리하여도 세균 배양액의 첨가 효과에 미치지 못한다는 것에 의미를 가질 필요가 있다. 이는 세균 배양액에 Bt의 살충력을 증가시킬 또 다른 물질이 포함되어 있다는 것을 제시하고 있다. 이러한 물질(들)의 분리 및 화학 동정이 요구된다.

이상의 연구 결과는 Xn와 Ptt의 배양액에 면역억제 물질이 포

함되었으며, 이 물질이 배추좀나방과 파밤나방의 아이코사노이드 생합성 반응을 억제시켰고, 궁극적으로 Bt의 병원력을 제고시켜 Bt에 대해 감수성이 낮은 종령 유충을 방제할 수 있다는 것을 보였다. 또한 본 연구 결과는 이들 세균 배양액과 Bt의 효과적인 조합비율을 결정하였고, 포장 조건에서 최적의 살포량을 결정하였다. 더불어 미생물제로 산업화하기 위해서는 Xn 및 Ptt 세균 배양액의 생산 단가를 낮춰야 하며, 이를 위한 저렴한 배지 선택도 개발되었다(Seo *et al.*, 2010). 이러한 결과에 따라 Xn 배양액과 Ptt 배양액 그리고 세균 대사 화합물을 이용하여 새로운 미생물농약인 “비티플러스”가 개발될 수 있을 것으로 사료된다.

## 사 사

본 연구는 2011년도 농촌진흥청 아젠다 사업(대과제명: 화학농약 대체기술)으로부터 지원받아 수행하였다. 연구 기간 동안 서삼열은 교육과학기술부의 2단계 BK21 사업을 통해 지원받았다.

## Literature Cited

- Adams, B.J. and K.B. Nguyen. 2002. Taxonomy and systematics. pp. 1-33. *In* Entomopathogenic nematology, ed. by R. Gaugler. CABI Publishing, New York.
- Akhurst, R.J. 1980. Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. *J. Gen. Microbiol.* 121: 303-309.
- Broderick, N.A., K.F. Raffa and J. Handelsman. 2006. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 15196-15199.
- Dunphy, G.B. and J.M. Webster. 1991. Antihemocytic surface components of *Xenorhabdus nematophilus* var. *dukti* and their modification by serum of nonimmune larvae of *Galleria mellonella*. *J. Invertebr. Pathol.* 58: 40-51.
- Dunphy, G.B. and J.M. Webster. 1994. Interaction of *Xenorhabdus nematophila* subsp. *nematophilus* with the haemolymph of *Galleria mellonella*. *J. Insect Physiol.* 30: 883-889.
- Ferre J. and J. Van Rie. 2002. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 47: 501-533.
- French-Constant, R.H., N. Waterfield and P. Daborn. 2005. Insecticidal toxins from *Photobacterium* and *Xenorhabdus*. pp. 239-253, *In* Comprehensive molecular insect science, eds. by L.I. Gilbert, I. Kostas and S.S. Gill. Elsevier, New York.
- Forcada, C., E. Alcacer, M.D. Garcera, A. Tato and R. Martinez. 1999. Resistance to *Bacillus thuringiensis* CryAc toxin in three strains of *Heliothis virescens*: proteolytic and SIM study of the larval midgut. *Arch. Insect Bitchen. Physiol.* 42: 51-63.
- Gahan, L.J., F. Gould and D.G. Heckel. 2001. Identification of a gene

- associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science* 293: 857-861.
- Gill, S.S., E.A. Cowles and P.V. Pietrantonio. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu. Rev. Entomol.* 37: 615-636.
- Gilliland, A., C.E. Chambers, E.J. Bone and D.J. Ellar. 2002. Role of *Bacillus thuringiensis* Cry1 $\delta$  endotoxin binding in determining potency during lepidopteran larval development. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1509-1515.
- Herbert, E. E. and H. Goodrich-Blair. 2007. Friend and foe: the two face of *Xenorhabdus nematophila*. *Nat. Rev. Microbiol.* 5: 634-646.
- Hoffman, C., H. Vanderbruggen, H. Hofte, J. Van Rie, S. Jansens and H. Van Mellaert. 1988. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 7844-7848.
- Jenkins, J.I. and D.H. Dean. 2000. Exploring the mechanism of action of insecticidal proteins by genetic engineering methods. pp. 33-54. *In Genetic engineering: principles and methods*, vol. 22. eds. by K. Setlow. Plenum, New York.
- Ji, D., Y. Yi, G.H. Kang, Y.H. Choi, P. Kim, N.I. Baek and Y. Kim. 2004. Identification of an antibacterial compound, benzylideneacetone, from *Xenorhabdus nematophila* against major plant-pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 239: 241-248.
- Kang, S., S. Han and Y. Kim. 2004. Identification of an entomopathogenic bacterium, *Photorhabdus temperata* subsp. *temperata*, in Korea. *J. Asia Pac. Entomol.* 7: 331-337.
- Kanost, M.R., H. Jiang and X. Yu. 2004. Innate immune responses of a lepidopteran insects, *Manduca sexta*. *Immunol. Rev.* 198:97-105.
- Kaya, H.K. and R. Gaugler. 1993. Entomopathogenic nematodes. *Annu. Rev. Entomol.* 38: 181-206.
- Kim, J. and Y. Kim. 2011. Three metabolites from an entomopathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophila*, inhibit larval development of *Spodoptera exigua*(Lepidoptera: Noctuidae) by inhibiting a digestive enzyme, phospholipase A<sub>2</sub>. *Insect Sci.* DOI 10.1111/j. 1744-7917.2010.01363.x.
- Kwon, S. and Y. Kim. 2007. Immunosuppressive action of pyriproxyfen, a juvenile hormone analog, enhances pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* against diamondback moth, *Plutella xylostella*(Lepidoptera: Yponomeutidae). *Biol. Control* 42: 72-76.
- Kwon, S. and Y. Kim. 2008. Benzylideneacetone, an immunosuppressant, enhances virulence of *Bacillus thuringiensis* against beet armyworm(Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 101: 36-41.
- Oppert, B., K.J. Krammer, R.W. Beeman, D. Johnson and W.H. McGaughey. 1997. Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *J. Biol. Chem.* 272: 23473-23476.
- Park, Y., Y. Yi and Y. Kim. 1999. Identification and characterization of a symbiotic bacterium associated with *Steinernema carpocapsae* in Korea. *J. Asia Pac. Entomol.* 2: 105-111.
- Park, Y. and Y. Kim. 2000. Eicosanoids rescue *Spodoptera exigua* infected with *Xenorhabdus nematophila*, the symbiotic bacteria to the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. *J. Insect Physiol.* 46: 1469-1476.
- Piggott, C. and D.J. Ellar. 2007. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71: 255-281.
- Rahman, M.M, H.L.S. Roberts, M. Sarjan, S. Asgari and O. Schmidt. 2004. Induction and transmission of *Bacillus thuringiensis* tolerance in the flour moth, *Ephesia kuehniella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 2696-2699.
- Rausell, C., A.C. Martinez-Ramirez, I. Garcia-Robles and M.D. Real. 2000. A binding site for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is lost during larval development in two forest pests. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 153-1558.
- 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. *J. Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 775-806.
- Seo, S. and Y. Kim. 2009. Two entomopathogenic bacteria, *Xenorhabdus nematophila* K1 and *Photorhabdus temperata* subsp. *temperata* ANU101 secrete factors enhancing Bt pathogenicity against the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Kor. J. Appl. Entomol.* 38: 385-392.
- Seo, Y., H. Jang, K. Kim and Y. Kim. 2010. Comparative analysis of immunosuppressive metabolites synthesized by an entomopathogenic bacterium, *Photorhabdus temperata* ssp. *temperata*, to select economic bacterial culture media. *Kor. J. Appl. Entomol.* 49: 409-416.
- Shrestha, S. and Y. Kim. 2008. Eicosanoids mediate prophenoloxidase release from oenocytoids in the beet armyworm *Spodoptera exigua*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38: 99-112.
- Shrestha, S. and Y. Kim. 2009. Biochemical characteristics of immune-associated phospholipase A<sub>2</sub> and its inhibition by an entomopathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophila*. *J. Microbiol.* 47: 774-782.
- Song, C.J., S. Seo, S. Shrestha and Y. Kim. 2011. Bacterial metabolites of an entomopathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophila*, inhibits a catalytic activity of phenoloxidase of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 21: 317-322.
- Stanley, D.W. and J.S. Miller. 2006. Eicosanoid actions in insect cellular immune functions. *Entomol. Exp. Appl.* 119:1-13.
- Tabashnik, B.E., G.C. Unnithan., L. Masson., D.W. Crowder., X. Li and Y. Carriere. 2009. Asymmetrical cross-resistance between *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Ac and Cry2Ab in pink bollworm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 29: 11889-11894.
- Tabashnik, B.E., R.T. Roush, E.D. Earle and A.M. Shelton. 2000. Resistance to Bt toxins. *Science* 287: 42.
- Tanada, Y. and H.K. Kaya. 1993. *Insect pathology*, Academic Press, San Diego.
- Wang, P., J-Z. Zhao, A. Rodrico-Simon, W. Kain, A.F Janmaat, A.M. Shelton, J. Ferre and J.H. Myers. 2007. Mechanism of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in a greenhouse population of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 1199-1207.
- Zhang, X., M. Candas, N. B. Griko, L. Rose-Young and L. A. Bulla Jr. 2005. Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor Bt-R1 expressed in insect cells. *Cell Death Differ.* 12: 1407-1416.
- Zhang, X., N.B. Griko, S.K. Corona and L.A. Bulla, Jr. 2008. Enhanced exocytosis of the receptor BT-R(1) induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis* directly correlates to the execution of cell death. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 149: 581-588.