

# 미생물살충제 “비티플러스” 액상 제형화 및 품질 분석 기술에 관한 연구

엄성현 · 박현지 · 김규순 · 홍유경 · 박지영 · 최봉기 · 김준성 · 김건우 · 강문수<sup>1</sup> · 양경형<sup>1</sup> · 김용균\*

안동대학교 자연과학대학 생명자원과학과, <sup>1</sup>(주) YA 코리아

## Study on Soluble Concentrate Formulation and Quality Control Techniques of a Microbial Insecticide “Bt-Plus”

Seonghyeon Eom, Hyeonji Park, Kyusoon Kim, Youkyeong Hong, Jiyeong Park, Bongki Choi, Joonsung Kim, Kunwoo Kim, Moonsoo Kang<sup>1</sup>, Kyunghyung Yang<sup>1</sup> and Yonggyun Kim\*

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

<sup>1</sup>YA Korea, Inc., Suweon 441-744, Korea

**ABSTRACT:** A microbial insecticide “Bt-Plus” has been developed to enhance an insecticidal efficacy of an entomopathogenic bacterium, *Bacillus thuringiensis* (Bt). However, its wettable powder formulation is not preferred by farmers and industry producers due to relatively high cost. This study aimed to develop a soluble concentrate formulation of Bt-Plus. To this end, an optimal mixture ratio of two bacterial culture broths was determined to be 5:4 (v/v) of Bt and *Xenorhabdus nematophila* (Xn) along with 10% ethanol preservative. In addition, Bt broth was concentrated by 10 times to apply the mixture at 1,000 times fold dilution. The resulting liquid formulation was sprayed on cabbage crop field infested by late instar larvae of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. The field assay showed about 77% control efficacy at 7 days after treatment, which was comparable to those of current commercial biopesticides targeting *P. xylostella*. For storage test in both low and room temperatures, the liquid formation showed a relatively stable control efficacy at least for a month. To develop a quality control technique to exhibit a stable control efficacy of Bt-Plus, Bt spore density ( $5 \times 10^{11}$  spores/mL) and eight active component concentrations of Xn bacterial metabolites in the formulation products have been proposed in this study.

**Key words:** Bt-Plus, microbial pesticide, *Bacillus thuringiensis*, *Xenorhabdus nematophila*, *Plutella xylostella*

**조 록:** 곤충병원세균(*Bacillus thuringiensis*: 비티)의 살충효과를 증가시킨 미생물살충제 “비티플러스”가 개발되었다. 그러나 수화제 형태의 비티플러스는 농가나 산업체에서 높은 단가로 선호하지 않고 있는 실정이다. 이에 본 연구는 액상 제형의 비티플러스를 개발하는 연구 목적을 두었다. 이러한 목적에 따라 먼저 비티플러스 제조에 포함되는 두 세균 배양액의 최적 혼합 비율을 결정하였다. 이 최적 혼합액은 10%의 에탄올을 보존제로 사용되었으며, 비티와 또 다른 곤충병원세균인 *Xenorhabdus nematophila* (Xn)의 배양액 비율이 5:4 (v/v)로 제조하게 했다. 또한 이 액상 제형이 1,000 회석배수에서 효과를 보이기 위해 비티 배양액을 10 배 농축하여 최적 비율로 혼합하였다. 이렇게 해서 얻어진 액상 제형을 발육 후기 유충의 배추좀나방(*Plutella xylostella*)이 가해를 하는 배추밭에 처리하여 7일 후 약 77%의 방제 효과를 보였는데, 이 처리 효과는 현재 상용화되는 배추좀나방 적용 생물농약들과 비등한 효과를 나타내는 것으로 판명되었다. 저온 및 상온의 저장 분석에서 본 액상 제형은 최소한 한 달 동안 안정된 방제효과를 나타내는 것으로 분석되었다. 이 액상 제형의 안정된 방제 효과를 보장하여 주는 품질관리 기술을 개발하기 위해 제형 내 비티 포자 밀도와 Xn 유래 유용물질의 농도를 판별하였다. 본 연구 분석은 최적의 방제 효과를 나타내기 위해서는 비티플러스 액상 제형에 비티 포자 밀도가 최소  $5 \times 10^{11}$  spores/mL 이고, Xn 세균 대사물질들 가운데 8 종 유용물질의 농도가 품질관리 판별 기준으로 제시되었다.

**검색어:** 배추좀나방, 미생물농약, 비티, 제노라투스 네마토틀라, 배추좀나방

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

Received December 26 2012; Revised April 4 2013

Accepted April 5 2013

비티 살충제는 토양에 서식하는 그람양성균인 *Bacillus thuringiensis*에서 유래된 미생물 농약이다. 이 세균은 포자를 형성할 수 있어 다양한 환경 조건에서 내성을 띌 수 있으며, 포자 형성 시기에 결정체 형태의 내독소 단백질을 생성한다(Tanada and Kaya, 1993). 이 내독소는 곤충 중장 막에 존재하는 세포막 단백질에 특이적으로 결합하여 중장 세포막을 손상시키는 작용을 가져 궁극적으로 중장세포를 파괴시키는 결과를 초래한다(Gill et al., 1992). 다양한 독소단백질의 구조에 따라 적용 대상 곤충도 상이하여 비티는 나비목뿐만 아니라 딱정벌레목 및 파리목 해충에 이르기까지 넓은 기주 범위를 갖게 되었다(Schnepf et al., 1998).

비티 살충제의 작용 특성은 섭식에 의해 이루어지며 화학농약에 비해 비교적 살충 속도가 느리다. 또한 최근 다양한 해충이 비티 살충제에 대해서 살충제 저항성을 발현하고 있다. 대표적 해충이 십자화과 작물을 기주로 하는 배추좀나방(*Plutella xylostella*)이다(Tabashnik et al., 1997). 비티 살충제에 대한 저항성 기작은 내독소 단백질의 단백질 분해 효소의 변형으로 중장 내에서 내독소 단백질의 활성화를 억제하게 하는 기작이며, 또 다른 주요 저항성 기작으로 중장 세포막 단백질인 캐드헤린(cadherin)의 변형에 따른 것으로 내독소 단백질의 결합을 낮추는 것으로 이해되고 있다(Herbert and Goodrich-Blair, 2007). 따라서 비티 살충제의 배추좀나방에 대한 효과적 방제가 어려워 농업 현장에서 선호도가 낮아지고 있다.

비티 살충제의 약점을 보완하기 위해 개발된 약제가 “비티플러스” (“Bt-Plus”)이다(Seo and Kim, 2011). 이는 곤충 면역 억제가 비티의 살충력을 높일 수 있다는 보고에 개발 원리를 두었다(Rahman et al., 2004). 실제로 면역 억제 화합물을 비티 살충제와 혼합하여 처리하면 비티의 살충력을 현저히 증가시켰다(Broderick et al., 2010). 한편, 곤충병원세균인 *Xenorhabdus nematophila* (Xn)는 대상 곤충의 면역을 억제하는 물질을 생성한다고 보고하였다(Park and Kim, 2000). 이 세균 배양액에는 최소 8종의 아이코사노이드 생합성 억제물질들(PY, oxindole, indole, HPA, cPY, BZA, PHPP 및 Ac-FGV)을 포함하고, 이들은 대상 곤충의 면역을 현격하게 억제시켰다(Seo et al., 2012). 아이코사노이드가 곤충의 면역을 증개하기 때문에 (Stanley, 2006), 이 세균 배양액과 비티 살충제의 혼합 약제인 비티플러스는 배추좀나방과 파밤나방(*Spodoptera exigua*)의 살충력을 현저히 높였다(Seo and Kim, 2011). 그러나 개발된 비티플러스의 제형이 수화제 형태로서, 사용 농민은 물론이고 산업체 생산자가 높은 단가로 산업화에 어려움을 주고 있다. 이를 개선하기 위해 본 연구는 비티플러스의 액상 제형을 개발하는 데 목표를 두었다. 이를 위해 먼저 두 세균 배양액의 배합비율을 결정했다. 또

한 살포액 희석배수를 1,000 배로 설정하기 위해 유효성분 함량도 조정하였다. 이 액상 제형의 실온 보관 기술 및 품질 관리 기술을 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 배추좀나방 사육

시험곤충은 안동시 송천동에 소재한 배추밭에서 유충을 채집하여 약제 처리하지 않고 실내에서 누대 사육한 것을 실내 약제 노출 실험에 사용하였다. 유충은 온도 25±1 °C, 광주기 16:8 h (L:D), 상대습도 40~60%의 배양기에서 사육했다. 유충은 배추를 먹이로 주었으며 성충은 10% 설탕물을 먹이로 배추 잎으로 산란을 유도하였다.

### 곤충병원세균 균주 배양

곤충병원세균(*X. nematophila*)은 기주 선충에서 분리된 후 동결보관중인 것을 이용하였다(Jung and Kim, 2006). 이들 균주는 tryptic soy broth (TSB, MCell, Seoul, Korea) 배지를 이용하여 28 °C 에서 12 시간 동안 배양하여 단일 균총을 채취하였다. 채취된 단일 균총을 TSB 액체배지를 이용하여 28 °C 에서 16 시간 동안 배양한 후, 글리세롤이 30%가 되도록 첨가하여 보관용 세균 균주를 만들었다. 이 보관 균주는 반복되는 세균 배양의 원시료로 이용되어 계대배양에 따른 세균 변이 가능성을 줄였다.

비티 균주는 각각의 균주에 멸균수 1 mL를 혼합하여 현탁액을 만든 후 루프를 이용하여 TSB 평면 배지에 세균을 도말하고 30 °C 에서 24 시간 배양하였다. 평판배지에서 배양된 세균에서 단일 콜로니를 얻고 이를 멸균수로 희석하여 TSB 액체배지를 이용하여 28 °C 에서 48 시간 동안 200 rpm에서 교반배양 후, 다시 48 시간 동안 4 °C 저온고에 보관하여 세균의 포자 형성율을 증가시켰다. 포자 형성은 위상차 광학현미경(BX-PHD, Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 1,000 배 배율에서 확인하였다.

### 생물검정

생물검정은 옆침지법으로 실시하였다. 처리 용액은 포자형성된 비티용액과 48 시간 Xn 배양액의 혼합액에 10% 에탄올을 첨가하였다. 이 처리용액을 다양한 희석 농도로 조제한 후 배추잎(3×3 cm)을 1 분간 침지시켰다. 이후 처리된 배추잎을 여과지가 깔린 용기에 놓아 10 분간 건조시켰다. 이때 1 시간 동안 절식시킨 배추좀나방 4령충을 처리구당 10 마리씩 3 반복으로 처리

하였다. 처리 약제는 24시간 섭식처리하고, 이후 정상 배추잎을 제공하였다. 생존수 확인은 24 시간 주기로 7 일차 까지 매일 하루 중 같은 시간(오전 10 시)에 조사하였다.

### 비티와 Xn 배양액의 최적 혼합비율 결정

비티와 Xn 배양액을 서로 다른 비율(0:9 - 9:0, v/v)로 혼합하여 각각 100 배 희석액으로 준비하였다. 상기에 기술된 생물검정법으로 서로 다른 혼합 비율별 살충력을 비교하였다. 각각의 혼합 비율은 배추좀나방 4령충 10 마리씩 3 반복으로 처리하였다. 대조구는 증류수로 생물검정법에서 기술한 방법과 동일하게 처리하였다. 살충력 판별은 처리 후 7 일차 사망률로 비교하였다.

### 저장기간에 따른 비티플러스 약효 변화 분석

최적의 효과를 갖는 비티플러스를 결정한 후 이 제조액을 4°C 와 25°C 에 각각 보관하였다. 이후 일주일 간격으로 시료를 수거하여 생물검정에 이용하였다. 생물검정은 배추좀나방 4령충을 대상으로 상기에 기술한 생물검정 방법대로 실시하였다. 저장 시료는 3회 독립적으로 채취하여 3반복으로 실시하였다.

### 액상 제형 비티플러스 야외 포장 약효 분석

경북 안동시에 소재한 배추 포장에 재배된 얼갈이배추를 가해하는 배추좀나방을 대상으로 실시되었다. 약제처리 전 발생한 배추좀나방 4령의 개체수를 계수하여 처리 전 밀도(시험구 당 30 마리)로 산출하였다. 이후 500 배, 1,000 배, 2,000 배의 농도로 약제처리를 하였으며 생존수는 약제처리 24 시간 이후부터 계수하여 3 일차, 5 일차, 7 일차 까지 확인하였다. 대조약제로서 슈리사이드(Bayer, Seoul, Korea)와 응삼이(Korea Bio, Hwasung, Korea)의 약효가 비교되었다.

### 액상 제형 비티플러스의 약해 분석

비티플러스 처리 기준 농도인 1,000 배 희석을 바탕으로 배양인 500배와 더불어 성숙기 배추에 대한 작물 피해를 조사하였다. 조사 항목은 배추 잎의 변색 및 외형 변화로서 달관조사로 0-5의 약해 정도 수치를 부여하여 분석하였다. 여기서 0은 약해가 없는 것이고, 1은 소수 반점, 2는 다수의 반점, 3은 잎 외형 변이, 4는 탈색, 5는 외형과 잎 색이 모두 변하는 것으로 달관조사의 기준으로 정하였다.

### 세균 대사물질 분석법

세균 배양액을 1 L 씩 총 3 회 수집한 후 2 L의 separate funnel 을 이용하여 1 L의 시료를 넣고 330 mL의 핵산을 넣고 마개로 막은 다음 30회 가랑 흔들어서 주었다. 이러한 진탕 반응 동안 매 5 회 진탕 시 코르크를 열어 가스를 배출했다. 이후 거치대에 separate funnel을 2 시간 동안 방치한 후 핵산 추출 상층액을 회수하고, 다시 330 mL의 핵산을 첨가하고 동일한 방법으로 추출했다. 다시 330 mL의 핵산을 첨가하고 동일한 방법으로 추출했다. 이렇게 해서 얻은 1 L의 핵산 추출물을 4°C 에 보관했다. 남은 여액에 핵산 추출법과 동일한 방법으로 1 L 에틸아세테이트 추출을 실시했다. 수집된 핵산층과 에틸아세테이트 층은 각각 2 L의 삼각플라스크에 붓고 무수황산나트륨을 500 g 넣은 후 탈수시켰다. 이후 2 L의 삼각플라스크 입구에 여과지를 설치하고 탈수시킨 유기용매 추출물들을 부어 무수황산나트륨을 제거시켰다. 이 추출물을 감압농축기를 이용하여 감압농축(40°C, 1 시간)하여 용매층을 제거했다. 유기용매가 사라진 플라스크 벽면에 용출된 대사물질을 5 mL의 메탄올을 첨가하여 용해시켜 회수하였다. 이 5 mL 시료를 투과 직경이 0.20 µm의 PTFE syringe filter로 여과한 후 10 µL의 초자주사기를 이용하여서 HPLC (Waters 996\_660, Milford, MA, USA)에 5 µL 주입하였다. HPLC 조건은 이동상은 물과 메탄올이 60:40 (v/v)의 비율이며, 흐름속도는 분당 0.5 mL이었다. 검출기(Waters 2487)는 254 nm에서 물질을 정량하였다.

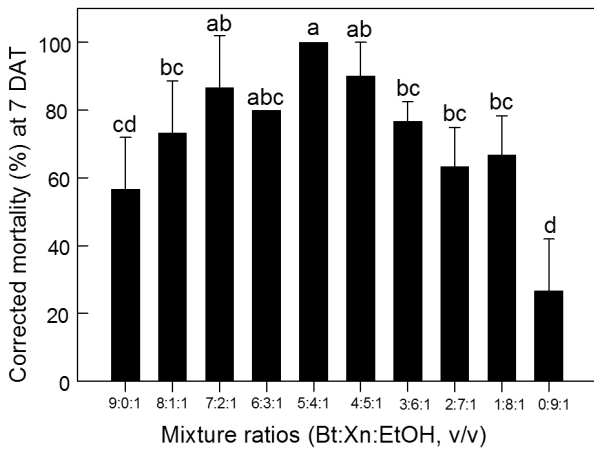
### 통계처리

모든 살충효과 시험 결과는 백분율 자료로서 arcsine 변환 후 SAS의 PROC GLM (SAS Institute, 1989)을 이용하여 ANOVA 분석 및 처리 평균간 비교를 실시하였다.

### 결과

#### 비티와 Xn 배양액 최적 혼합비율 결정

비티플러스의 액상제형을 개발하기 위해 우선 최대 약효를 줄수 있는 비티와 Xn 배양액의 혼합 비율을 결정하였다(Fig. 1). 서로 다른 혼합 비율에 따라 배추좀나방 4령충에 미치는 방제효과는 상이하였다. 비티 단독 효과는 60% 방제가를 나타내지 못하였으나, Xn 배양액이 40% 첨가되면 살충력은 100% 가까이 도달하였다. 따라서 액상제형의 비티플러스 최적 혼합 비율은 비티 배양액과 Xn 배양액이 5:4 (v/v)로 결정하였다.



**Fig. 1.** Determination of an optimal mixture of bacterial culture broths of *Bacillus thuringiensis* (Bt) and *Xenorhabdus nematophila* (Xn) along with 10% ethanol (EtOH). Different ratio mixtures were applied on cabbage leaves by dipping method and were fed by fourth instar larvae of *Plutella xylostella* for 24 h. Mortality was assessed at 7 days after treatment (DAT) and corrected by Abbott's formulation. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test).

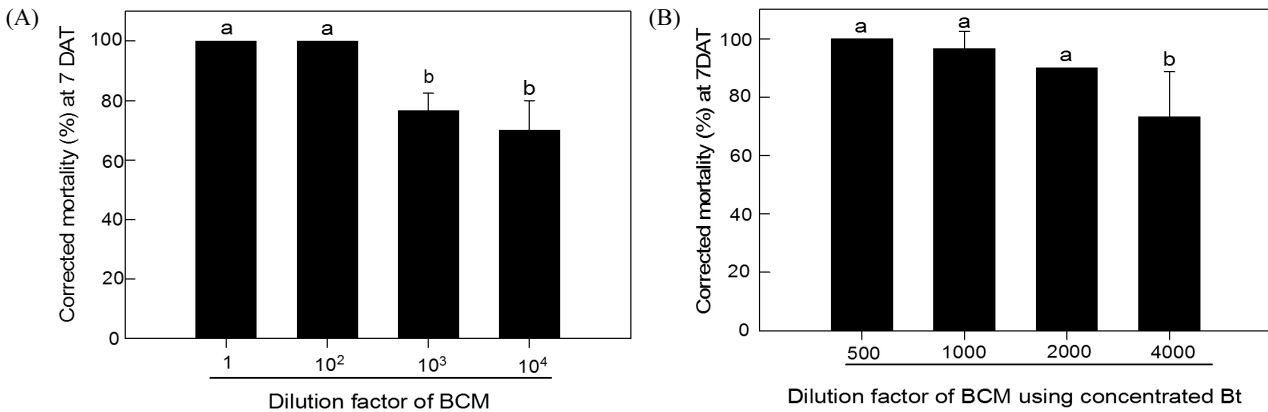
### 액상 제형 개발을 위한 비티플러스의 배양액 희석배수 결정

위에서 결정된 최적 혼합 비율에서 희석배수별 배추좀나방에 대한 방제 효율을 비교하였다(Fig. 2). 100 배까지의 희석배수에서 100%의 방제 효과를 나타냈으나, 기준 농도인 1,000 배

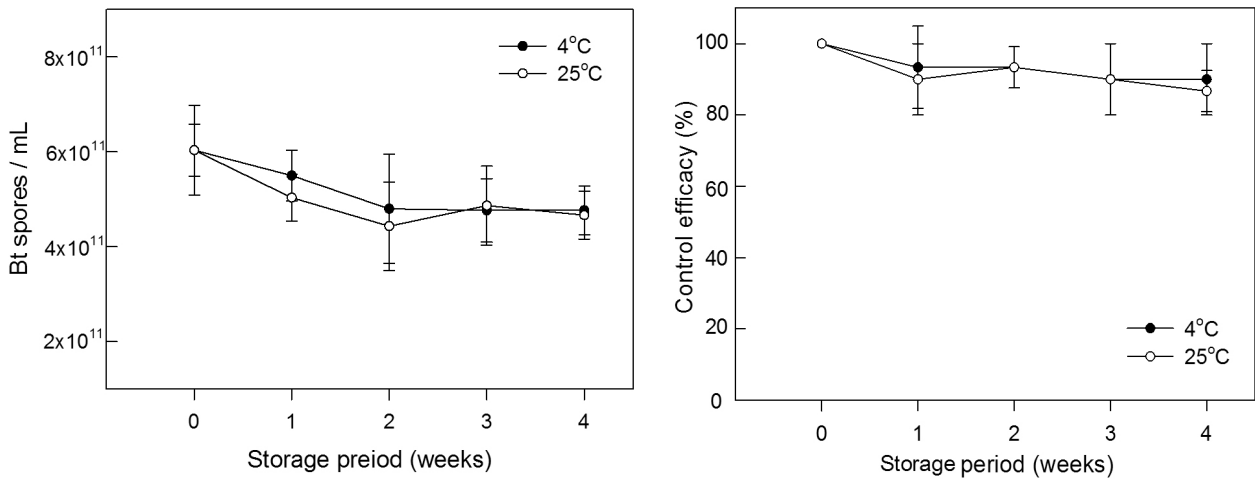
희석 배수에서는 80%의 방제 효과에 미치지 못하였다(Fig. 2A). 이 방제 효과를 증가시키기 위해 비티 배양액을 10배 농축하여 동일한 혼합 비율로 제조하였다(Fig. 2B). 이때 방제 효과는 2,000 배까지의 희석배수에서 100%에 가까운 방제 효과를 나타냈다. 이러한 결과는 1,000 배의 희석 배수에서 100% 방제 효과를 보장할 수 있음을 나타냈다.

### 저장 기간에 따른 액상 제형 비티플러스의 안전성

액상 제형의 비티플러스의 저장 기간 중 안전성을 분석하기 위해 상온과 저온에서 각각 한 달 동안 보관 실험을 실시하였다(Fig. 3). 먼저 액상 제형에 존재하는 비티 포자수의 변화를 추적하였다(Fig. 3A). 초기 포자 밀도가 약  $5 \times 10^{11}$ /mL를 기록하였고, 한 달 경과 후 저장 온도에 관계없이 큰 차이 없는 밀도를 유지하였다(4°C 보관:  $F = 2.18$ ;  $df = 4, 10$ ;  $P = 0.1451$ , 25°C 보관:  $F = 2.84$ ;  $df = 4, 10$ ;  $P = 0.0825$ , 두 온도의 상관관계:  $F = 0.20$ ;  $df = 4, 10$ ;  $P = 0.9353$ ). 저장 기간 동안 액상 비티플러스의 배추좀나방 4령충에 대한 살충력 변화를 추적하였다(Fig. 3B). 초기의 100% 방제효과는 저장 기간이 증가함에 따라 다소 감소하는 경향을 보였으나, 통계적으로 큰 차이 없는 것으로 보여 액상 제형의 비티플러스는 최소 한 달간의 저장 동안 약효에 있어서도 차이를 보이지 않는 안정성을 나타냈다(4°C 보관:  $F = 3.75$ ;  $df = 4, 10$ ;  $P = 0.0410$ , 25°C 보관:  $F = 1.44$ ;  $df = 4, 10$ ;  $P = 0.2915$ , 두 온도의 상관관계:  $F = 0.15$ ;  $df = 4, 20$ ;  $P = 0.9608$ ).



**Fig. 2.** Determination of dilution factor of soluble concentrate "Bt-Plus". The test mixture was prepared by 5:4 (v/v) bacterial culture broth mixture (BCM) of *Bacillus thuringiensis* (Bt) and *Xenorhabdus nematophila* (Xn) along with 10% ethanol (EtOH). (A) Control efficacy of "Bt-Plus" in different dilutions, were applied on cabbage leaves by dipping method and were fed by fourth instar larvae of *Plutella xylostella* for 24 h. Mortality was assessed at 7 days after treatment (DAT) and corrected by Abbott's formulation. (B) Dilution effects of "Bt-Plus" prepared with 10x concentrated Bt broth. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test).



**Fig. 3.** Stability of control efficacy of soluble formulated "Bt-Plus" under low (4°C) and room (25°C) temperatures for one month storage. The test "Bt-Plus" was prepared by 5:4 (v/v) bacterial culture broth mixture (BCM) of *Bacillus thuringiensis* (Bt) and *Xenorhabdus nematophila* (Xn) along with 10% ethanol (EtOH), in which Bt culture broth was concentrated by 10 fold. Test samples were applied on cabbage leaves by dipping method and were fed by fourth instar larvae of *Plutella xylostella* for 24 h. Mortality was assessed at 7 days after treatment (DAT) and corrected by Abbott's formulation. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test).

**Table 1.** Control efficacy of Bt-Plus (soluble concentrate) against *Plutella xylostella* larvae infesting cabbage leaves in field

Treatment <sup>1</sup> (Dilution factor)	N	Survival (%)				Mean±SD	DMRT <sup>2</sup>	Corrected mortality
		1	2	3	Mean±SD			
3 DAT <sup>3</sup>								
Control	30.0	100	93.3	93.3	95.5±3.8	a	-	
Bt-Plus (500x)	30.0	43.3	70.0	53.3	55.5±13.5	c	41.9	
Bt-Plus (1,000x)	30.0	60.0	73.3	80.0	71.1±10.2	b	25.6	
Bt-Plus (2,000x)	30.0	86.7	90.0	66.7	81.1±12.6	a	15.1	
BT	30.0	76.7	70.0	90.0	78.9±10.2	b	17.4	
BP	30.0	60.0	23.3	60.0	47.8±21.2	c	50.0	
5 DAT								
Control	30.0	100	90.0	80.0	90.0±10.0	a	-	
Bt-Plus (500x)	30.0	36.7	46.7	43.3	42.2±5.1	c	53.1	
Bt-Plus (1,000x)	30.0	53.3	63.3	63.3	60.0±5.8	b	33.4	
Bt-Plus (2,000x)	30.0	80.0	70.0	63.3	71.1±8.4	b	21.0	
BT	30.0	53.3	63.3	60.0	58.9±5.1	b	34.6	
BP	30.0	50.0	20.0	43.3	37.8±15.7	c	58.0	
7 DAT								
Control	30.0	93.3	90.0	76.7	86.7±8.8	a	-	
Bt-Plus (500x)	30.0	13.3	16.6	13.3	14.4±1.9	c	83.4	
Bt-Plus (1,000x)	30.0	26.6	13.3	20.0	20.0±6.7	c	77.0	
Bt-Plus (2,000x)	30.0	50.0	60.0	53.3	54.4±5.1	b	37.1	
BT	30.0	13.3	26.6	13.3	17.7±7.7	c	79.5	
BP	30.0	33.3	10.0	16.6	20.0±12.0	c	77.0	

<sup>1</sup> 'BT' represents a commercial Bt (Thuricide<sup>®</sup>). 'BP' represents a commercial biopesticide (Eungsami<sup>®</sup>)

<sup>2</sup> 'DMRT' represents Duncan's multiple range test at Type I error = 0.05.

<sup>3</sup> 'DAT' represents days after treatment.

## 야외 포장 실험

최적 혼합 비율을 바탕으로 제조된 액상 제형 비티플러스의

야외 조건에서 방제 효과를 검증하였다(Table 1). 처리 3일차에서는 비티플러스의 약효가 상용화된 비티 약제보다 높았지만, 친환경방제제인 응삼이 보다는 낮았다. 이러한 방제 효과는 시

간이 경과하면서 증가했으며, 최종 7 일차에는 1,000 배 희석의 액상 비티플러스가 다른 상용화된 두 생물농약과 비등한 방제 효과를 나타냈다. 이와 더불어 조사된 배추에 대한 약해조사에서 비티플러스는 기준량(1,000 배 희석)과 배량(500 배 희석)에서 모두 약해를 나타내지 않았다.

### 액상 제형 비티플러스의 Xn 유래 유효물질 분석

Xn 유래 유효물질의 농도는 HPLC를 이용하여 분석하였다(Fig. 4). 초기 1 L 기준의 제품용액을 헥산과 에틸아세테이트로 연속하여 추출하고, 추출물을 역상 HPLC를 통해 8 종의 각 유효물질 함량을 분석하여 두 추출물에서 나온 각 물질의 함량을 합하여 제품의 유효물질 농도로 기록하였다(Fig. 5). 이때 물질의 극성에 따라 보다 비극성 물질(PY, oxindole, indole, HPA, cPY, BZA)은 헥산 추출물에 보다 많이 포함했고, 덜 비극성 물질(PHPP, Ac-FGV)은 에틸아세테이트 추출물에 존재한 것을 확인할 수 있었다.

### 고찰

통합생물방제(integrated biological control: IBC)의 개념은 상이한 작용기작을 가진 생물방제인자를 조합하여 대상 해충을 방제하는 전략을 세우고 있다(Jung and Kim, 2006). 본 연구에서 분석한 비티플러스는 비티 생물제제의 곤충 증장 막을 붕괴하는 살충기작과 *X. nematophila*의 곤충 면역억제 기작을 통합

하여 상승적 살충력을 꾀하는 IBC 전략 하에 개발된 약제이다(Seo and Kim, 2011). 이들의 상승 살충효과는 각각의 생물제제가 갖는 특성을 고려하여 볼 때 추정되고, 이를 여러 사례를 통해 입증하였다. 비티는 그람양성균으로 곤충의 경구로 체내에 들어가면 비티의 내독소에 의해 독성이 나타나게 된다. 즉, 증장의 알칼리 환경에서 용해된 내독소는 단백질 분해에 의해 활성화되고 증장의 미세용모의 세포막에 존재하는 수용체에 결합하게 된다(Hoffman et al., 1988; Jenkins and Dean, 2000). 그로인해 세포막에 구멍을 형성하고 이후 증장마비(Gill et al., 1992) 및 세포치사(Zhang et al., 2008)로 이어지게 된다. 이러한 증장세포의 치사로 인해 비티와 증장 내 존재하는 세균이 곤충의 혈장으로 침입하게 되고 패혈증을 유발하여 결국 대상 곤충을 치사시키게 된다(Broderick et al., 2006). 반면에 *X. nematophila*는 곤충 면역과정 가운데 아이코사노이드 생합성 억제물질을 생산하여 대상 곤충의 면역작용을 억제한다(Park and Kim, 2000; Kim et al., 2005). 아이코사노이드는 탄소수 20 개의 불포화지방산으로 곤충에서는 프로스타글란딘류와 류코트리엔류가 포함된다(Stanley, 2006). 이들 물질은 곤충의 생식, 배설 및 면역 생리에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 인지질 분해효소인 phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)의 활성 조절에 의해 이들 물질의 합성이 조절되는 것으로 알려지고 있다(Stanley and Kim, 2011). 외래 미생물 침입에 따라 곤충은 외래인자를 인식하고 PLA<sub>2</sub>의 활성을 증가시켜 아이코사노이드의 생합성을 증가시키게 된다(Shrestha and Kim, 2009). 증가된 아이코사노이드는 감염 곤충의 세포성 및 체액성 면역 반응을 야기시켜 병원균에 대처하게

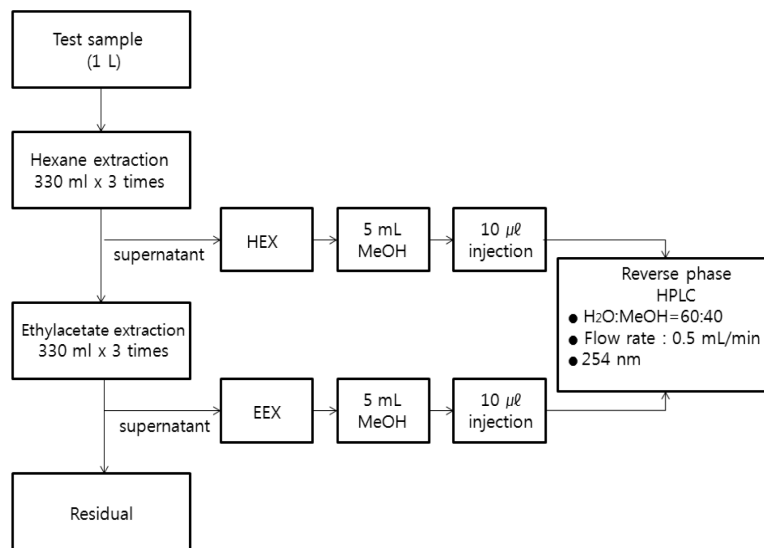
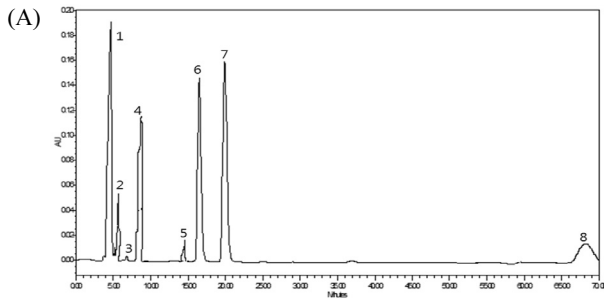


Fig. 4. A diagram describing a procedure for a HPLC analysis of bacterial metabolites of *Xenorhabdus nematophila* (Xn), in which hexane extract (HEX) and ethylacetate extract (EEX) are finally dissolved in methanol (MeOH).



Chemicals	Retention time (min)	Extracts	Xn culture (ppm)	Bt-Plus (ppm)
PHPP	4.3	HEX	0	0
		EEX	307.8±42.2	42.7±12.3
		<b>Σ</b>	<b>307.8±42.2</b>	<b>42.7±12.3</b>
PY	5.9	HEX	463.5±13.0	60.1±28.4
		EEX	0	0
		<b>Σ</b>	<b>463.5±13.0</b>	<b>60.1±28.4</b>
Ac-FGV	7.1	HEX	400.7±238.9	56.9±42.2
		EEX	7.3±2.0	115.9±6.8
		<b>Σ</b>	<b>407.9±238.4</b>	<b>172.8±47.4</b>
Cis-cPY	8.9	HEX	49.5±5.6	24.0±4.7
		EEX	0	0
		<b>Σ</b>	<b>49.5±5.6</b>	<b>24.0±4.7</b>
Oxindole	14.6	HEX	307.3±83.3	72.2±35.8
		EEX	0	0
		<b>Σ</b>	<b>307.3±83.3</b>	<b>72.2±35.8</b>
HPA	17.3	HEX	30.8±8.3	9.6±1.0
		EEX	0	0
		<b>Σ</b>	<b>30.8±8.3</b>	<b>9.6±1.0</b>
Indole	19.2	HEX	31.2±24.5	13.27±3.5
		EEX	0	0
		<b>Σ</b>	<b>31.2±24.5</b>	<b>13.27±3.5</b>
BZA	66.2	HEX	49.3±2.1	28.0±5.5
		EEX	0	0
		<b>Σ</b>	<b>49.3±2.1</b>	<b>28.0±5.5</b>

**Fig. 5.** Concentrations of bacterial metabolites in *Xenorhabdus nematophila* (Xn) culture broth and 'Bt-Plus'. (A) An example chromatogram of eight standard chemicals. (1) 'PHPP' for p-hydroxyphenyl propionic acid, (2) 'PY' for PY dipeptide, (3) 'Ac-FGV' for acetylated-FGV tripeptide, (4) 'cis-cPY' for cis-cyclo PY, (5) 'oxindole' for 2-indolinone, (6) 'HPA' for p-hydroxyphenyl acetic acid, (7) 'indole' for 1H-benzo[b]pyrrole, and (8) 'BZA' for benzylideneacetone. (B) Chemical analysis of eight metabolites in Xn broth and 'Bt-Plus'. 'HEX' and 'EEX' represent hexane extract and ethylacetate extract, respectively. Each measurement of chemical concentrations was independently replicated three times.

한다. 따라서 아이코사노이드 생합성을 억제시키는 곤충의 면역억제와 곤충병원세균의 병원력과 정의 상관관계를 갖기 때문

에 면역억제물질과 혼합하여 처리된 비티의 경우 뚜렷한 병원력 증가를 보이게 된다(Jung and Kim, 2006).

본 연구는 비티플러스의 제형을 액제로 개발하려는 목적으로 두었다. 이는 사용자 농민의 액상 제형 선호성과 기존의 수화제 형태에서 액상 제형으로 전환하면서 고체화하는 생산 공정을 줄여 생산 단가를 낮추려는 의도로 시도되었다. 액상 제형을 개발하기 위해 두 미생물제의 최적 배합 비율을 결정하고, 여기에 보존제를 첨가하는 전략을 세웠다. 본 연구에서 결정된 최적 비율은 비티, *X. nematophila* 배양액 및 보존제 에탄올의 비율이 5:4:1 (v/v)로 결정되었다. 비티를 증가키는 경우는 *X. nematophila*의 양이 줄어들어 면역 억제제들의 농도가 줄어들어 살충력이 낮아진 것으로 해석되고, 비티를 줄이는 경우도 유사하게 낮아져 이들의 상대비율 및 일정 한계 함량을 지녀야 한다는 결론을 얻을 수 있었다. 유사한 연구로서 Seo and Kim (2011)은 배추좀나방의 경우 5:5 및 파밤나방의 경우 6:4의 최적 비율을 결정하였다. 따라서 본 연구의 5:4:1의 비율에서 보존제를 제외하면 비율이 배추좀나방과 파밤나방의 최적 조건의 비율의 중간 정도의 비율을 나타낸 것으로 산출된다. 그러나 이렇게 제조된 비티플러스 액상제형은 1,000 배 희석에서 높은 살충력을 보이지 않았다. 이를 해결하기 위해 비티 농도를 10배로 농축하여 동일한 비율로 *X. nematophila*의 배양액과 혼합하였을 때, 1,000 배 희석배수에서 거의 100%에 가까운 방제 효과를 얻을 수 있었다. 이러한 결과는 비티플러스의 살충력을 결정하는데 기본적으로 가져야 할 비티의 최소농도가 존재한다는 것을 의미했다. 배양된 세균이 약  $10^{10}$  cfu/mL이기에 이를 10 배 농축하고 다시 1,000 배 희석하여 살포하였다는 이야기는 최종 살포액에 비티가  $10^8$  cfu/mL의 최소약효농도를 가져야 한다는 결론을 얻을 수 있다. 이러한 비티의 농도는 일반 상용 비티 수화제 제형에 포함된 비티 밀도와 비등하였다. 그러나 기존의 연구(Seo and Kim, 2011)는 비티플러스는 기존의 상용화된 비티에 비해 높은 약효를 보여 *X. nematophila* 배양액 물질이 이러한 살충력 상승을 유도한 것으로 해석된다. 본 연구에서도 조제된 비티플러스 액제 제형을 1,000 배 희석하여 야외에 처리한 결과 현재 배추좀나방을 대상으로 시판되는 비티제제와 친환경농자재에 비해 우수한 방제효과를 나타낸 것으로 확인되었다. 또한 어린 배추 잎을 대상으로 기준량(1,000 배 희석)과 배량(500 배 희석)의 약제 처리에서 약효를 나타내지 않았고, 등록과정에서 실시된 포유동물 및 어류에 대한 독성시험에서 낮은 독성치를 보였다(목록공시: 공시 2-2-2).

액상제형으로 개발하기 위한 다음 단계로서 저장 기간 중 안정성 분석을 실시하였다. 이를 위해 액상 제형을 상온과 저온에서 각각 저장하고 시기별로 시료를 추출하여 약효를 분석하였

다. 총 5 주까지 분석된 연구에서 저온의 경우 비티의 포자수의 증감에서 차이를 보이지 않았고, 약효에서도 뚜렷한 차이를 보이지 않았다. 그러나 상온에 저장한 액상제형은 통계학적으로는 차이가 없으나 3 주 이후 약효의 감소 추세를 보였으며, 5 주가 경과하면서 약 10%의 약효 감소를 나타냈다. 본 연구 개발에서는 액상 보존제로서 10%의 에탄올을 이용하였으나, 본 연구 최적의 상온 저장을 위해 새로운 보존제를 개발하여야 한다는 결론을 얻었다.

비티플러스의 약효 확인 및 보증을 위해서는 제품 내 유효성분의 기준한계를 설정해야 한다. 이러한 약효 유효성분으로 비티 포자수와 *X. nematophila*에서 유래되는 세균대사물질이 분석 대상이 된다. 비티 농도는 앞에서 기술한 대로  $5 \times 10^{11}$  cfu/mL의 제품 농도를 기준으로 비티플러스의 품질분석에 기준으로 삼을 수 있다. 반면에 세균대사물질은 현재까지 8종의 화합물 구조가 동정되었다(Seo et al., 2012). 본 연구는 이 8종 물질의 HPLC 분석을 위한 시료 추출 및 분석 조건을 결정하였다. 여기서 물질 추출은 두 유기용매를 이용하였으며, 일반적으로 에틸아세테이트 추출액에서 보다는 헥산 추출액에서 보다 많은 비극성물질들이 추출되었으나, 추출 반복에 따라 서로 차이를 보였다. 이후 차례로 추출되는 에틸아세테이트 추출액에 포함된 동일한 물질의 양을 산출하여 이들을 합한 함량은 추출 반복별로 차이를 적게 보여 정확한 물질 함량 분석을 위해서는 이들 두 추출액의 HPLC 분석이 이뤄져야 하며, 이들에서 산출된 세균대사물질의 함량을 산출하는 것이 바람직하다. 그러나 편의상 이들 8종의 물질을 모두 분석하기 보다는 대표적 물질이 되는 cPY 또는 BZA의 함량을 산출하는 것이 제시된다. 이는 cPY 또는 BZA가 높은 면역억제 능력을 통한 비티 상승효과가 이미 보고되었기 때문이다(Seo et al., 2012; Lee et al., 2012).

결론적으로 본 연구를 통해 비티플러스 액상제형의 개발이 가능하게 되었으며, 야외 조건에서 이 제형의 약효가 인정되었으며, 또한 이 제형의 품질 분석 기술이 개발되었다. 그러나 상온 조건에서 보다 지속적으로 약효를 유지시킬 수 있는 보존제 개발이 요구되고 있다.

## 사 사

본 연구는 2012년 안동대학교 학부선진화사업(ACE)의 지원으로 수행되었다. 또한 본 연구의 재료비는 2012년도 농촌진흥청 아젠다사업(대과제명: 화학농약 대체기술)으로부터 지원받았다.

## Literature Cited

- Broderick, N.A., Raffa, K.F., Handelsman, J., 2006. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 15196-15199.
- Broderick, N.A., Raffa, K.F., Handelsman, J., 2010. Chemical modulators of the innate immune response alter gypsy moth larval susceptibility to *Bacillus thuringiensis*. BMC Microbiol. 10, 129.
- Gill, S.S., Cowles, E.A., Pietrantonio, P.V., 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. Annu. Rev. Entomol. 37, 615-636.
- Herbert, E. E., Goodrich-Blair, H., 2007. Friend and foe: the two face of *Xenorhabdus nematophila*. Nat Rev. Microbiol. 5: 634-646.
- Hoffman, C., Vanderbruggen, H., Hofte, H., Van Rie, J., Jansens, S., Van Mellaert, H., 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., Dean, D.H., 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.
- Jung, S., Kim, Y., 2006. Synergistic effect of entomopathogenic bacteria (*Xenorhabdus* sp. and *Photorhabdus temperata* ssp. *temperata*) on the pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* ssp. *aizawai* against *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). Environ. Entomol. 35, 1584-1589.
- Kim, Y., Ji, D., Cho, S., Park, Y., 2005. Two groups of entomopathogenic bacteria, *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*, share an inhibitory action against phospholipase  $A_2$  to induce host immunodepression. J. Invertebr. Pathol. 89, 258-264.
- Lee, S., Hong, Y.P., Seo, S., Kim, Y., Choi, J., 2012. Identification, synthesis, and biological activities of cyclic L-prolyl-L-tyrosine. J. Korean Chem. Soc. 56, 661-664.
- Park, Y., Kim, Y., 2000. Eicosanoids rescue *Spodoptera exigua* infected with *Xenorhabdus nematophila*, the symbiotic bacteria to the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. J. Insect Physiol. 46, 1469-1476.
- Rahman, M.M., Roberts, H.L.S., Sarjan, M., Asgari, S., Schmidt, O., 2004. Induction and transmission of *Bacillus thuringiensis* tolerance in the flour moth *Ephesia kuehniella*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 2696-2699.
- SAS Institute, Inc. 1989. SAS/STAT user's guide, release 6.03, Ed. Cary, N.C.
- 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., Kim, Y., 2011. Development of “Bt-Plus” biopesticide using entomopathogenic bacterial (*Xenorhabdus nematophila*, *Photorhabdus temperata* ssp. *temperata*) metabolites. Korean J. Appl. Entomol. 50, 171-178.
- Seo, S., Lee, S., Hong, Y.P., Kim, Y., 2012. Chemical identification and biological characterization of phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors synthesized by entomopathogenic bacteria, *Xenorhabdus nematophila* and *Photorhabdus temperata* subsp. *temperata*. Appl. Environ. Microbiol. 78, 3816-3823.
- Shrestha, S., Kim, Y., 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.
- Stanley, D., 2006. Prostaglandins and other eicosanoids in insects: biological significance. Annu. Rev. Entomol. 51, 25-44.
- Stanley, D., Kim, Y., 2011. Prostaglandins and their receptors in insect biology. Front. Endocrinol. 2:105. doi: 10.3389/fendo.2011.00105.
- Tabashnik, B.E., Liu, Y.B., Malvar, T., Heckel, D.G., Masson, L., Ballester, V., Granero, F., Mensua, J.L., Ferre, J., 1997. Global variation in the genetic and biochemical basis of diamondback moth resistance to *Bacillus thuringiensis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 12780-12785.
- Tanada, Y., Kaya, H.K. 1993. Insect pathology, Academic Press, San Diego.
- Zhang, X., Griko, N.B., Corona, S.K., Bulla, Jr., L.A., 2008. Enhanced exocytosis of the receptor BT-R<sub>1</sub> induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis* directly correlates to the execution of cell death. Comp. Biochem. Physiol. B 149, 581-588.