

〈論 文〉

## *Bacillus thuringiensis* 菌株에 따른 殺蟲力 比較

金英勳 · 金尚賢 · 姜錫權

서울大學校 農科大學

### Comparison of Pathogenicity Parasporal Crystal Protein in some *Bacillus thuringiensis* strains.

Young Hoon Kim, Sang Hyun Kim and Seok Kwon Kang

College of Agriculture, Seoul National University, Suwon, Korea

#### Abstract

The study has been carried out to acquire some basic informations about *Bacillus thuringiensis* for developing the microbial pesticide. Pathogenicity tests on three of *B. thuringiensis* var. *aizawai*, *kurstaki*, and *dendrolimus* were determined in two species of insects, *H. cunea* and *B. moris*. The pathogenicity in varieties of *B. thuringiensis* against *H. cunea* and *B. mori* was depended on instar age of tested larvae. *Bacillus thuringiensis* var. *dendrolimus*, *kurstaki*, *aizawai* are arranged in order of pathogenicity against *H. cunea* and *B. mori*. In result *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* was shown the most stable toxicity with respect to each instar of tested larvae.

#### I. 緒 言

廣範圍한 殺蟲效果를 가진 化學殺蟲劑는 2次 世界大戰 以後 有機合成農藥이 開發됨에 따라 그 效力의 우수성에 크게 인정받게 되어 農業 뿐 아니라 獸醫 및 公衆保健用 등 多方面에 그 需要가 크게 增大되고 있다고 하는 것은 周知의 사실이다. 그러나, 有機合成農藥의 劃一的인 大量散布로 인하여 심각한 여러 가지 社會問題가 대두되고 있는 것도 現實이다.

이런 問題들은 주로 殺蟲劑의 毒양내 蓄積, 食餌連鎖作用에 의하여 人間을 비롯한 포유동물에 대한 지속적인 害蟲性, 과충류, 무척추동물 및 水生生物에 대한 被害로 인한 生態界의 파괴, 抵抗性이 강한 害蟲의 出現과 아울러 無分別한 非選擇的이고, 分解가 빠른 化學製品을 開發하고, 또한 最近에는 生物學的

側面에서 天敵과 微生物을 이용하여 害蟲을 防除하는 生物的防除法(Elmerich & Aubert, 1975)에 研究의 초점을 집중시키고 있다. 微生物을 이용한 소위 生物的防除法은 自然界에서 昆蟲病을 일으키는 有效病原微生物을 이용하는 것으로 細菌, 바이러스, 絲狀菌, 原生動物 등을 들 수 있다. 그 중 昆蟲에 대하여 病原力이 강한 것은 細菌과 바이러스(Angus & Norris, 1968)로서 이들을 微生物 農藥으로 開發하기 위한 研究가 활발하여 이미 미국을 위시한 선진제국에서는 製品化되어 市販되고 있다. 특히 細菌中에서도 *Bacillus thuringiensis*는 그 殺蟲範圍나 效果가 化學殺蟲劑와 거의 對等한 認定을 받게 되어 크게 各광을 받고 있다(Angus, 1956; DeBarjac & Bonnefoi, 1962). 그러나 이러한 세계적인 연구추세에 반하여 우리나라와 같은 養蠶國家에서는 누에에 대한 被害가 우려되어 微生物農藥의 導入에 극히 소극적이며, 이에 대한 研究도 미진한 상태이다.

이러한 觀點에서 本 研究는 國內에 적합한 細菌農

1) 이 論文은 1990年度 教育部 學術研究造成費(遺傳工學)에 의하여 研究되었음.

藥開發의 基本資料를 얻기 위해, 몇 種의 有用菌株를 이용하여 農業害蟲인 배추흰나비(*Pieris rapae*)와 흰불나방(*Hyphantria cunea*)에 대한 毒性檢定과 主要益蟲인 누에(*Bombyx mori*)에 대해 毒성검정을 수행하였다.

## II. 材料 및 方法

### 1) 供試材料

本 實驗에서 사용되어진 供試蟲은 주요 山林害蟲인 흰불나방과 產業的으로 重要視되는 家蠶을 선정하였고, 이들에 대한 接種菌株는 비교적 殺蟲力이 높은 것으로 평가되고 있는 2種이 製品化된 菌株, *kurstaki*, *dendrolimus*와 그 외의 1種, *aizawai*를 供試하였다.

供試蟲으로 선택한 누에와 흰불나방은 處理時의 體重을 감안하여 3, 4齡의 누에와 4, 6齡의 흰불나방을 각각 處理對象齡으로 정하였다.

接種源으로 사용한 각 供時菌은 G. Y. S培地에서 28시간 培養, 위상차현미경으로 sporulation과 autolysis를 確認하고, 8,000g에서 10분간 遠心하여 얻은 沈澱物을 사용하였다. 外毒素과 細胞破片物을 除去하기 위해 증류수에 5回 정도 遠心洗滌하여 얻은 濃縮菌을 증류수에 稀釋하여 660 nm에서 吸光度를 測定, kavenagh 公式에 의거 乾重物로 환산하고 표준농도의 接種濃도는 ml當 1,000, 500, 250, 100, 50  $\mu$ g의 5種의 稀釋液을 각각 調製하였다.

### 2) 殺蟲力 檢定

5種의 濃度로 調製된 接種液에 직경 2.2 cm, 두께 3.0 mm로 절단된 人工飼料를 침지시킨 후 약 30분간 乾燥한 다음 各區當 30마리의 供試蟲에 대하여 3齡의 누에와 4齡의 흰불나방에는 4개, 4齡의 누에와 6齡의 흰불나방에는 6개씩 1시간 동안 침식시켰으며 침식후 남은 飼料는 除去하고 새로운 無菌飼料로 교체하여 飼育하였다.

처음 18시간 동안에는 3시간 간격으로 死蟲數를 調査하였고, 그 후 24시간, 36시간에서 死蟲數를 調査하였으며, Finney(1971)의 方法에 의거하여  $LD_{50}$  값을 산출, 殺蟲力을 比較, 檢定하였다.

또한 증류수에 침지한 같은 크기, 같은 量의 人工飼料를 침식시켜 對照區로 設定하였다.

## III. 結果 및 考察

各 供試蟲에 대한 殺蟲力 檢定 結果는 다음과 같다. 4齡의 흰불나방의 경우 각 菌株間의 毒性은 *dendrolimus*, *kurstaki*, *aizawai*順으로 各各의  $LD_{50}$ 는 15.5, 51, 97  $\mu$ g이었다(표 9).

3齡 누에의 경우에는  $LD_{50}$ 가 *dendrolimus*, *kurstaki*, *aizawai*順으로 各各 33.9, 110.5, 47.24  $\mu$ g으로 나타나 흰불나방의 경우보다는 전체적으로 낮은 毒性을 보였으나, 표 1과 표 4를 比較할 때 處理後 死亡時間은 누에가 오히려 빠르게 나타났고, 各菌株間의 毒性에

Table 1. Mortality of the fourth instar larvae of *H. cunea* in varieties of *B. thuringiensis*.

Varietal epithet	a) Approx Conc. ( $\mu$ g/ml)	No. of tested L.	No. of dead larvae with respect to each time(Hour)								Total No. of dead larvae
			3	6	9	12	15	18	24	36	
<i>aizawai</i>	1000	30	2	13	4	3	4	1	1	1	30
	500	30	-	3	10	2	1	7	1	-	24
	250	30	-	1	3	4	1	4	6	1	20
	100	30	-	2	1	1	6	1	6	-	17
	50	30	-	-	1	1	2	5	1	-	10
<i>dendrolimus</i>	1000	30	3	19	5	1	2	-	-	-	30
	500	30	-	13	5	6	4	1	1	-	30
	250	30	2	11	2	6	2	4	-	-	27
	100	30	1	2	5	12	1	1	3	-	25
	50	30	-	1	1	2	9	3	2	-	18
<i>kurstaki</i>	1000	30	1	12	10	5	1	1	-	-	30
	500	30	3	8	2	9	1	4	2	-	29
	250	30	2	7	3	2	5	8	1	-	28
	100	30	-	2	1	5	4	3	1	3	19
	50	30	-	-	1	4	8	1	2	-	16

a) Calculated from light absorbance at 660 nm by the KAVEANOGH formula.

$$W = 9929(1 - \sqrt{1 - 0.07347 \times A660})$$

**Table 2.** Toxicity of *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, *dendrolimus* and *aizawai* against fourth instar larvae of *H. cunea*.

Varial epithet	a) Con. ( $\mu\text{g/ml}$ )	No. of tested L.	No. of dead L.	Mortality (%)	Log Conc. (X)	Probit (Y)
<i>aizawai</i>	1000	30	30	100	3.000	-
	500	30	24	80	2.699	5.8416
	250	30	20	66.7	2.398	5.4316
	100	30	17	56.7	2.000	5.1687
	50	30	10	33.3	1.699	4.5684
<i>dendrolimus</i>	1000	30	30	100	3.000	-
	500	30	30	100	2.699	-
	250	30	27	90	2.398	6.2816
	100	30	25	83.3	2.000	5.9161
	50	30	18	60	1.699	5.5233
<i>kurstaki</i>	1000	30	30	100	3.000	-
	500	30	29	96.7	2.699	6.8384
	250	30	28	93.3	2.398	6.4985
	100	30	19	63.3	2.000	5.3398
	50	30	16	53.3	1.699	5.0828

**Table 3.** Mortality of the sixth instar larvae of *H. cunea* in varieties of *B. thuringiensis*.

Varial epithet	a) Approx Conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	No. of tested L.	No. of dead larvae with respect to each time(Hour)								Total No. of dead larvae
			3	6	9	12	15	18	24	36	
<i>aizawai</i>	1000	30	2	8	3	3	6	1	-	-	23
	500	30	-	1	7	5	3	2	-	-	18
	250	30	1	-	1	8	3	-	1	-	14
	100	30	-	-	-	3	1	2	-	-	6
	50	30	-	-	-	-	1	2	-	-	3
<i>dendrolimus</i>	1000	30	1	20	6	2	1	-	-	-	30
	500	30	2	11	5	6	4	-	1	-	29
	250	30	-	7	11	5	2	-	-	1	26
	100	30	-	3	1	16	-	1	-	-	21
	50	30	-	-	1	3	4	7	-	-	15
<i>kurstaki</i>	1000	30	4	17	2	6	-	1	-	-	30
	500	30	1	11	-	9	4	3	-	-	29
	250	30	2	5	7	6	3	2	2	-	27
	100	30	-	1	2	4	7	6	1	-	21
	50	30	-	3	-	8	2	1	-	-	14

서도 흰불나방과는 달리 *aizawai*가 *kurstaki*보다 높은 毒性을 나타내는 경향을 보이고 있다. 3, 4齡 幼蟲에 비해 體重이 10배가량 增加한 5, 6齡과 흰불나방 6齡의 흰불나방 6齡의 경우에는 蟲體重에 增加함에 따라 抵抗性도 增加하여 6齡 흰불나방에 대한  $LD_{50}$  *kurstaki* 54.3  $\mu\text{g}$ , *dendrolimus* 51.7  $\mu\text{g}$ , *aizawai* 289.9  $\mu\text{g}$ 이었으며 4齡의 5, 6齡에서는 위의 순서대로 184, 114, 289  $\mu\text{g}$ 의  $LD_{50}$ 를 나타내었다(표 9). 그러나 死亡時間은 抵抗性 增加와 關係없이 큰 差異가 없었는

데, 그 原因은 蟲體가 增加됨에 따라 단위시간당 섭食량도 增加하므로 치사에 필요한 절대량을 섭食했기 때문인 것으로 추정된다. 또한 흰불나방에 있어서 *dendrolimus*나 *aizawai*의 경우 齡期가 進行됨에 따라  $LD_{50}$ 가 增加하였으나, *kurstaki*는 4齡흰불나방의 경우에는 *dendrolimus*와 큰 差異가 없이 높은 毒性을 보였다. 그러나 5, 6齡의 경우에 있어서는 상대적으로 낮은 毒性을 보여 *aizawai*와 거의 같은데, 3齡5, 6齡에 있어서는 *kurstaki*가 오히려 낮게 나타났다(그림 3, 5,

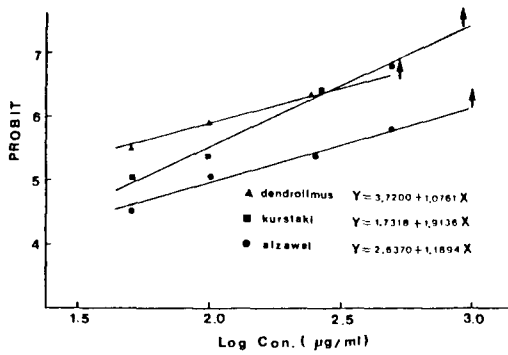


Fig. 1. Linear regression for the mortality of the fourth instar larvae of *H.cunea* in varieties of *B. thuringiensis*. Arrow indicates 100% mortality.

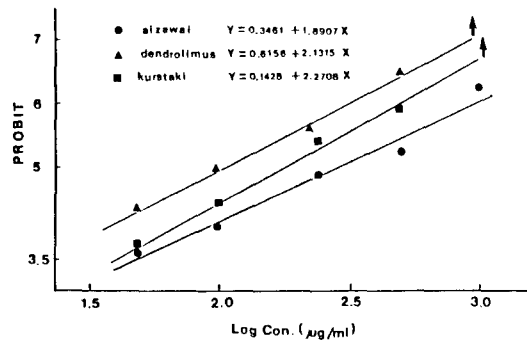


Fig. 4. Linear regression for the mortality of the fourth instar larvae of *B. mori* in varieties of *B. thuringiensis*. Arrow indicates 100% mortality.

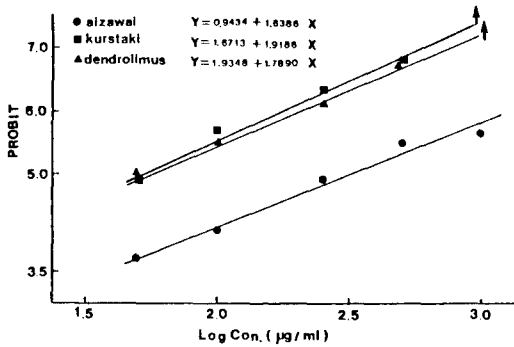


Fig. 2. Linear regression for the mortality of the sixth instar larvae of *H. cunea* in varieties of *B. thuringiensis*. Arrow indicates 100% mortality.

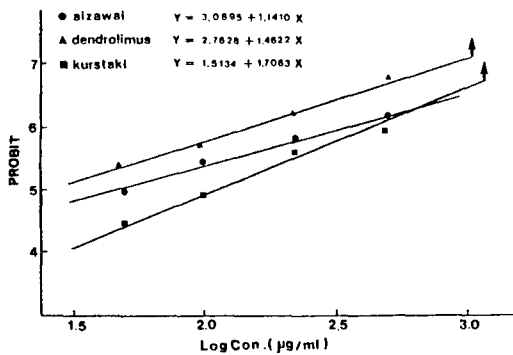


Fig. 3. Linear regression for the mortality of the third instar larvae of *B. mori* in varieties of *B. thuringiensis*. Arrow indicates 100% mortality.

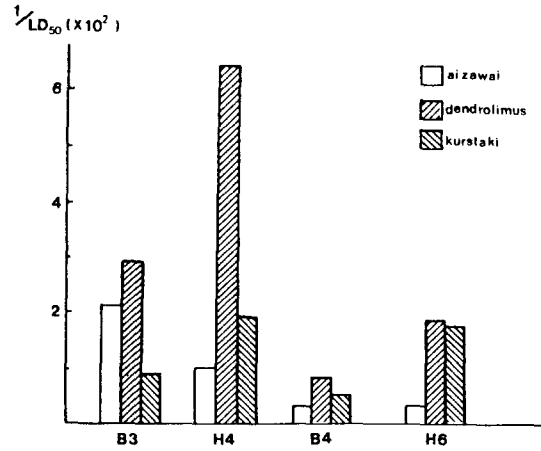


Fig. 5. Bar diagram for the comparison of toxicity in varieties of *B. thuringiensis* against host insect, B3) *B. mori* third instar larvae, B4) *B. mori* fourth instar larvae, H4) *H. cunea* fourth instar larvae, H6) *H. cunea* sixth instar larvae.

표 6, 9).

이러한 결과는 Angus & Norris(1968)의 보고와 거의 같은 경향으로 나타났으나, 實驗方法이나 供試蟲의 齡期, 菌의 培養條件에 따라 똑같은 serotype의 菌은 接種했을 때도 약 60~300배 정도의 LD<sub>50</sub> 差異를 나타내었다는 Dulmage(1971)의 報告를 고려할 때 절대적인 것으로 생각할 수는 없으며, 다만 같은 條件下에서의 各菌株間 相對比較값으로 추정될 수 있다고 믿어진다.

또한, 같은 處理區의 누에와 흰불나방의 死亡時間 差異에서 흰불나방이 누에보다 지연되는 현상은 Hei-

Table 4. Toxicity of *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, *dendrolimus* and *aizawai* against sixth instar larvae of *H. cunea*.

Varial epithet	a) Con. (µg/ml)	No. of tested L.	No. of dead L.	Mortality (%)	Log Conc. (X)	Probit (Y)
<i>aizawai</i>	1000	30	23	76.7	3.000	5.7290
	500	30	18	60	2.699	5.5233
	250	30	14	46.7	2.398	4.9172
	100	30	6	20	2.000	4.1584
	50	30	3	10	1.699	3.7184
<i>dendrolimus</i>	1000	30	30	100	3.000	-
	500	30	29	96.7	2.699	6.8384
	250	30	26	86.7	2.398	6.1123
	100	30	21	70	2.000	5.5244
	50	30	15	50	1.699	5.0000
<i>kurstaki</i>	1000	30	30	100	3.000	-
	500	30	29	96.7	2.699	6.8384
	250	30	27	90	2.398	6.2816
	100	30	21	70	2.000	5.5244
	50	30	14	46.7	1.699	4.9172

Table 5. mortality of the third instar larvae of *B. mori* in varieties of *B. thuringiensis*.

Varial epithet	a) Approx Conc. (µg/ml)	No. of tested L.	No. of dead larvae with respect to each time(Hour)								Total No. of dead larvae
			3	6	9	12	15	18	24	36	
<i>aizawai</i>	1000	30	11	7	4	2	-	1	3	2	30
	500	30	7	10	1	-	2	2	1	3	26
	250	30	-	4	6	2	3	3	1	5	24
	100	30	-	3	2	-	1	-	9	3	18
	50	30	-	-	1	1	3	-	8	1	14
<i>dendrolimus</i>	1000	30	24	4	2	-	-	-	-	-	30
	500	30	18	6	1	2	-	1	1	-	29
	250	30	13	4	3	1	4	-	1	-	26
	100	30	6	2	1	1	1	4	3	1	22
	50	30	4	2	1	6	5	1	-	-	19
<i>kurstaki</i>	1000	30	12	8	4	3	1	-	1	-	29
	500	30	8	6	3	1	1	2	3	-	24
	250	30	2	3	3	8	1	-	4	1	22
	100	30	-	2	6	2	1	-	3	-	14
	50	30	-	1	1	4	-	2	1	-	9

mpel & Angus(1963)의 報告에서와 같이 *B. thuringiensis* 內毒素 섭식후 두 昆蟲의 中腸內에서의 作用機作이 다른 데 기인한다고 설명될 수 있고 또 다른 원인으로서는 누에와 흰불나방의 섭식생리의 差異를 고려할 수 있겠다.

本 實驗에서 설정한 處理濃度는 실제 野外散布時 이용되는 濃도보다 훨씬 高濃度이기 때문에 절대적인 LD<sub>50</sub>를 測定한다는 것보다는 各菌株間의 相對的인 比較와 胞子の 增殖에 의한 死亡을 排除하기 위해서

比較적 짧은 단위시간 내에서의 LD<sub>50</sub>를 調査하였다.

실제 處理直後 ml當 100 µg 이상의 거의 모든 處理區에서 섭식이 중단되었고 일주일 정도 지난 후에는 ml當 50 µ 處理區의 一部를 제외한 모든 區에서 100%의 死亡率을 보였으며, 또한 一部 生存한 6齡 흰 불나방은 蛹化가 일어나지 않았다.

**Table 6.** Toxicity of *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, *dendrolimus* and *aizawai* against third instar larvae of *B. mori*.

Varial epithet	a) Con. (µg/ml)	No. of tested L.	No. of dead L.	Mortality (%)	Log Conc. (X)	Probit (Y)
<i>aizawai</i>	1000	30	30	100	3.000	-
	500	30	26	86.7	2.699	6.1123
	250	30	24	80	2.398	5.8416
	100	30	18	60	2.000	5.5233
	50	30	10	46.7	1.699	4.9172
<i>dendrolimus</i>	1000	30	30	100	3.000	-
	500	30	29	96.7	2.699	6.8384
	250	30	26	86.7	2.398	6.1123
	100	30	22	73.3	2.000	5.6219
	50	30	19	63.3	1.699	5.3398
<i>kurstaki</i>	1000	30	29	96.7	3.000	6.8384
	500	30	24	80	2.699	5.8416
	250	30	22	73.3	2.398	5.6219
	100	30	14	46.7	2.000	4.9172
	50	30	9	30	1.699	4.4756

**Table 7.** Mortality of the fourth instar larvae of *B. mori* in varietie of *B. thuringiensis*.

Varial epithet	a) Approx Conc. (µg/ml)	No. of tested L.	No. of dead larvae with respect to each time(Hour)								Total No. of dead larvae
			3	6	9	12	15	18	24	36	
<i>aizawai</i>	1000	30	14	7	3	-	-	2	1	-	27
	500	30	2	7	-	-	6	2	-	-	17
	250	30	-	2	1	2	-	5	2	1	13
	100	30	-	-	-	-	1	2	2	-	5
	50	30	-	-	-	-	-	3	-	-	3
<i>dendrolimus</i>	1000	30	20	2	7	1	-	-	-	-	30
	500	30	14	2	3	2	-	6	1	-	28
	250	30	11	3	2	-	3	-	1	1	21
	100	30	-	1	-	2	7	3	-	1	14
	50	30	-	-	1	-	4	-	1	1	7
<i>kurstaki</i>	1000	30	10	8	5	1	-	1	5	-	30
	500	30	5	2	1	6	3	3	5	-	25
	250	30	-	1	1	-	4	12	1	-	19
	100	30	-	-	1	1	2	4	-	-	8
	50	30	-	1	-	-	-	-	2	-	3

## 摘 要

害蟲의 微生物的 防除을 위하여 *Bacillus thuringiensis* 殺蟲劑 開發에 관한 基礎資料를 얻고자 3種의 *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, *dendrolimus*, *aizawai*와 2種의 供試蟲으로 누에와 흰불나방에 대한 毒性을 檢定하여 아래와 같은 研究結果를 얻었다.

1. *B. thuringiensis*의 누에에 대한 毒性檢定에서는 *kurstaki*를 제외하고 3齡에 비해 4齡의 경우 LD<sub>50</sub>이

5배의 증가량을 보였고, 변종간 毒性의 세기는 *dendrolimus*, *kurstaki*, *aizawai*순이었다.

2. *Bacillus thuringiensis*의 흰불나방에 대한 毒性檢定에서는 *kurstaki*를 제외하고 4齡에 비해 6齡의 경우 LD<sub>50</sub>이 3배의 증가량을 보였고, 변종간 毒性의 세기는 *dendrolimus*, *kurstaki*, *aizawai*순이었다.

3. 齡期에 관계없이 死亡時間이 큰 差異를 나타내지 않았는데 그 이유는 蟲體가 증가됨에 따라 단위시간당 섭취량도 증가하므로 치사에 필요한 절대량을 섭취한

**Table 8.** Toxicity of *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, *dendrolimus* and *aizawai* against fourth instar larvae of *B. mori*.

Varial epithet	a) Con. (µg/ml)	No. of tested L.	No. of dead L.	Mortality (%)	Log Conc. (X)	Probit (Y)
<i>aizawai</i>	1000	30	27	90	3.000	6.2816
	500	30	17	56.7	2.699	5.1687
	250	30	13	43.3	2.398	4.8313
	100	30	5	16.7	2.000	4.0329
	50	30	3	10	1.699	3.7184
<i>dendrolimus</i>	1000	30	30	100	3.000	-
	500	30	28	93.3	2.699	6.4985
	250	30	21	70	2.398	5.5244
	100	30	14	46.7	2.000	4.9172
	50	30	7	23.3	1.699	4.2710
<i>kurstaki</i>	1000	30	30	100	3.000	-
	500	30	25	83.3	2.699	5.9661
	250	30	19	63.3	2.398	5.3398
	100	30	8	26.7	2.000	4.3781
	50	30	3	10	1.699	3.7184

**Table 9.** The comparison of estimated  $LD_{50}$  in varieties of *B. thuringiensis* against host insect.

Insect Strain	3rd Instar <i>B. Mori</i>	4th Instar <i>H. cunea</i>	4th Instar <i>B. mori</i>	6th Instar <i>H. cunea</i>
<i>aizawai</i>	47.2498	96.9849	289.4009	289.9509
<i>dendrolimus</i>	33.8844	15.4703	114.0249	51.6892
<i>kurstaki</i>	110.4842	51.0387	183.9924	54.3125

것으로 추정된다.

4. *B. thuringiensis* 변종중에서 *kurstaki*는 毒性的 세기가 齡期에 관계없이 가장 안정한 것으로 나타났다.

## 引用文獻

- Angus, T. A. (1956) Association of toxicity with protein-crystalline inclusions of *Bacillus thuringiensis* Ishiwata. Can. J. Microbiol. 2 : 122-131.
- Angus, T. A. and J. R. Norris (1968) A comparison of the toxicity of some varieties of *Bacillus thuringiensis* Berliner for silkworm larvae. J. Invert. Pathol. 11 : 289-295.
- DeBarjac, H. and A. Bonnefoi (1962) Essai de classification biochimique et serologique de 24 souches de *Bacillus* du type *B. thuringiensis*. Entomophaga 7 : 5-31.
- Dulmage, H. T. (1971) Production of  $\delta$ -endotoxin by eighteen isolates of *Bacillus thuringiensis*, serotype 3, in three fermentation media. J. Invert. Pathol. 18 : 353-358.
- Elmerich, C. and J. P. Aubert (1975) In spores VI, P. Gerhardt, R. N. Costilow and H. L. Sadoff (Eds.), American Society for Microbiology, Washington, D. C., pp. 385-390.
- Finney, D. J. (1971) Probit Analysis, 3rd ED. Cambridge Univ. press, London, pp. 333.
- Heimpel, A. M. and T. A. Angus (1963) In Insect Pathology : An Advanced Treatise, Vol. 1. E. A. Steinhilber (Ed.), Academic Press, New York, pp. 21-73.