

## 완결과제 최종보고서

일반과제(○), 보안과제( )

(과제번호 : PJ010029)

곤충병원 세균을 이용한 나방류 방제기술 개발

(Control Techniques of Lepidopteran Insect Pests Using Insect Pathogenic Bacteria)

충남대학교 산학협력단

### 연구수행기간

2014. 02. ~ 2016. 12.

농촌진흥청

## 제 출 문

농촌진흥청장 귀하

본 보고서를 “곤충병원 세균을 이용한 나방류 방제기술 개발에 관한 연구”(개발기간 : 2014. 02. 01. ~ 2016. 12. 31.) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

제1세부연구과제 : 곤충병원세균을 이용한 나방류 방제

제1협동연구과제 : 대량 배양기술 확립

제2협동연구과제 : 곤충병원세균의 특성 구명 및 나방류 방제기술 개발

2017. 02.

제1세부연구기관장명 : 충남대학교 산학협력단

제1세부연구책임자 : 윤영남

참여연구원 : 윤영남, 유용만, 진나영, 권혜리, 이유경, 류태희, 고나연, 정유빈,  
전준학, 이보람, 강찬영, 조민규, 장현주, 변일현, 김희지, 김정희  
제1협동연구기관장명 : 우진비엔지

제1협동연구책임자 : 김태완

참여연구원 : 김태완, 김태환, 황영민

제2협동연구기관장명 : 국립농업과학원

제2협동연구책임자 : 한지희

참여연구원 : 한지희, 김정준, 이상엽

주관연구책임자 : 윤영남

주관연구기관장 : 충남대학교 산학협력단장



농촌진흥청 농업과학기술 연구개발사업 운영규정 제51조에 따라 보고서  
열람에 동의합니다.

## 보고서 요약서

과제번호	PJ010029		연구기간	2014. 02. 01~ 2016. 12. 31
연구사업명	단위사업명	현장 실용화 농업기술		
	세부사업명	친환경 안전농산물 생산기술		
	내역사업명	친환경 미생물 농자재의 현장적용 기술개발		
연구과제명	주관과제명	곤충병원 세균을 이용한 나방류 방제기술 개발		
	세부(협동) 과제명	(1세부) 곤충병원 세균을 이용한 나방류 방제 (1협동) 대량 배양기술 확립 (2협동) 곤충병원 세균의 특성 구명 및 나방류 방제기술 개발		
연구책임자	구분	연구기관	소속	성명
	1세부	충남대학교	충남대학교	윤영남
	1협동	우진비엔지	우진비엔지	김태완
	2협동	국립농업과학원	국립농업과학원	한지희
총 연구기간 참여 연구원 수	총: 22 명 내부: 22 명 외부: 0 명	총 연구개발비	정부: 420,000 천원 민간: 45,000 천원 계: 645,000 천원	
위탁연구기관명 및 연구책임자	김태완	참여기업명	우진비엔지	
국제공동연구	상대국명:	상대국	연구기관명:	
1. 국내에서 새로 분리한 <i>B. thuringiensis</i> 균주의 특허연구 2. 시설작물이나 채소류에 발생하는 청벌레류의 해충을 친환경적인 방제자료 제공 3. 새로운 천연식물보호제(미생물실충제)를 유기농자재로 등록하여 상품화 4. 미생물을 농약의 제품, 사용방법, 사용 시기의 문제점을 개선함으로 사용자의 요구를 충족시킴 5. 화학 농약의 사용을 줄이고 미생물을 농약의 사용 확대로 친환경 농산물을 안심하고 생산할 수 있게 함	보고서 면수 142			

## 〈 국 문 요 약 문 〉

연구의 목적 및 내용	곤충병원 세균을 이용한 나방류 방제기술 개발				
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 나비목해충에 새로운 효과를 나타내는 <i>B. thuringiensis</i> 균주 선발 및 특성 구명</li> <li>- 국내에서 새로 분리한 <i>B. thuringiensis</i> 균주의 특허연구</li> <li>- 과채류인 토마토, 파프리카(해충발생상황에 따라 다른 작물로 변경)작물에 발생하는 나비목 해충과 재배 방법에 따른 적용 방제방법 연구 개발</li> <li>- 신규 병원성세균 균주의 저비용 대량생산시스템 개발</li> <li>- 개발된 제형화 기술을 이용한 제품의 상품화 및 유기농자재 인증</li> <li>- 선발 균주의 파밤나방, 배추좀나방, 담배거세미나방 유충의 살충활성 증진효과 포트검정</li> <li>- 첨가제 혼합 균주의 밤나방과 해충에 대한 포장 방제효과 구명</li> </ul>				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 유기농자재의 개발로 유기농식품의 작물에 발생하는 나비목해충 방제자료 제공</li> <li>- 시설작물이나 채소류에 발생하는 청벌레류의 해충을 친환경적인 방제자료 제공</li> <li>- 새로운 천연식물보호제(미생물살충제)를 유기농자재로 등록하여 상품화</li> <li>- 미생물 농약의 제품, 사용방법, 사용 시기의 문제점을 개선함으로 사용자의 요구를 충족시킴</li> <li>- 화학 농약사용을 줄이고 미생물 농약의 사용 확대로 친환경 농산물을 안심하고 생산할 수 있게 함</li> </ul>				
중심어 (5개 이내)	<i>Bacillus thuringiensis</i>	친환경농자재	미생물살충제	나비목해충	

## 〈 Summary 〉

Purpose& Contents	Control Techniques of Lepidopteran Insect Pests Using Insect Pathogenic Bacteria				
Results	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Selection and characterization of <i>B. thuringiensis</i> strains showing new effects on Lepidoptera insect pests</li> <li>- Study on the patent of a new isolated <i>B. thuringiensis</i> strain in domestically</li> <li>- Research and development of application control methods for lepidopteran pests and cultivation methods in fruit and vegetable, crops(Changed to other crops on the occurrence of pests)</li> <li>- Development of low cost mass production system of new pathogenic bacterial strains</li> <li>- Product commercialization and organic agricultural materials certification using the developed formulation technology</li> <li>- The pot assay of the insecticidal activity enhancing effect on the larvae of the selected strain</li> <li>- Effect of field control on Noctuinae pest of additive-mixed strain</li> </ul>				
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> <li>- The development of organic agricultural materials to provide resources for control of lepidoptera insect pests in organic food crops</li> <li>- Provide eco-friendly control data on the insect pests of greenhouse crop and vegetables</li> <li>- A new microbial insecticide is registered as an organic agricultural materials and commercialized.</li> <li>- Meets users' needs by improving problem the using methods and timing of microbiological pesticide products</li> <li>- Reduce the use of chemical pesticides and increase the use of microbial pesticides to produce eco-friendly agricultural products safely</li> </ul>				
Keywords	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Environment-friendly agricultural material	Microbial pesticides	Lepidoptera insect pests	

## 〈 목 차 〉

제 1 장 연구개발과제의개요 .....	1
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	4
제 3 장 연구수행 내용 및 결과 .....	7
제 4 장 목표달성을 및 관련분야에의 기여도 .....	115
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 .....	123
제 6 장 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	124
제 7 장 연구개발성과의 보안등급 .....	124
제 8 장 국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비현황 ... .....	124
제 9 장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 .... .....	125
제 10장 연구개발과제의 대표적 연구실적 .....	128
제 11장 기타사항 .....	130
제 12장 참고문헌 .....	131

## 제 1 장 연구 개발 과제의 개요

### 제1절 연구 개발 목적

- 각각의 나비목 해충에 살충 효과가 있고 저항성 문제를 해결하는 새로운 균주의 선발
- 각 작물과 각각의 해충에 적합한 적용방법 개발
- 선발 곤충병원성 세균의 제품화하여 친환경 목록공시제 등록
- 주관과제 선발 나방류 고병원성 세균의 생물학적 특성 구명
- 선발 균주의 밤나방과 해충에 대한 방제 활성 증진 연구
- 첨가제 처리에 따른 선발균주의 포장 방제효과 검정

### 제2절 연구 개발의 필요성

- 국내 유기 및 친환경농산물의 주요생산 시설재배지에 최근 나비목 해충류(특히 농민들 사이에서 ‘청벌레’라 통칭해서 불리는 해충)의 발생이 매년 증가하여 왔으며, 이는 농산물의 품질저하 및 수확량 감소 등을 유발하는 난방제 문제해충으로 나타남
- 시설재배지의 오이, 딸기, 토마토, 파프리카 등의 과채류와 배추, 상추, 잎들깨와 같은 엽채류 등에 파밤나방, 거세미나방류, 배추좀나방, 밤나방 등의 나비목 해충이 한해 4~5회 발생하여 상당한 피해를 주고 있으나 특별한 친환경방제제가 없음
- 특히 한 농작물에 몇 종류의 나방류 해충이 동시다발적으로 발생하고, 생리, 생태 또한 복잡하며 해충들의 세대가 중복되어 발생하므로 경종적, 물리적, 생물적인 종합적방제 방법이 필요함
- 유기농산물이나 친환경 농산물을 생산하기 위하여서는 다양한 작물에 발생하는 각각의 병해충의 방제에 적절한 농자제의 개발이 필수적이며 특히 각양각색인 농작물의 재배 방식과 발생 시기에 따른 방제방법의 개발이 시급함
- 세계적으로 유기농산물에 발생하는 나방류의 해충방제에는 neem제나 제충국제를 사용하고 있으나 *Bacillus thuringiensis*(BT)제가 주류를 이루고 있으며 일본의 경우에는 BT제품이 그리고 미국에는 Bt를 이용한 GMO 콩, 옥수수, 면화 등의 작물에 이용되고 있음
- 국내에서 등록된 천연식물보호제(살균; 25종, 살충; 13종, 제초; 1종)가 총 39종이며 13종의 살충제중 곰팡이류가 3종, 세균이 9종, neem이 1개로 되어 있음
- 천연식물보호제에서 미생물살충제인 BT제는 각각의 해충에 대한 균주특이성이 강하고 분리된 해충에서 보다 더 강한 독성을 나타내기 때문에 사용국가에서 분리하여 상품화 하는 것이 유리함

- 현재 국내에서는 합성농약이 96.5%, 생물농약이 0.5% 그리고 친환경농자재가 3.0%씩 작물보호제로 이용되고 있는 실정임. 그러나 합성농약의 경우에는 많은 문제점들이 이미 알려졌으며, 친환경농자재의 경우에도 성분 및 약효 발현 정도를 전혀 알 수 없는 것들이 많아 농민의 피해가 갈수록 많아지고 있음
- 합성농약과 친환경농자재의 문제점을 해결하기 위해서는 사용자인 농민의 경제적 측면 (고부가가치 농산물 생산을 통한 소득 증가)에서나 수요자인 소비자의 안전성 보호(잔류독성이 없는 안전한 농산물 섭취)를 최우선 할 수 있는 생물농약의 사용이 가장 합당함
- 국내에서 경쟁력이 있는 천연식물보호제 제품을 개발하지 못할 경우 선진국으로부터 생물농약을 수입할 수밖에 없으며, 이는 국내 천연식물보호제 개발 기업들의 퇴보를 가지고 올 뿐만 아니라 국내 천연식물보호제산업이 선진국에 종속되는 결과를 초래함. 이에 따라 국내에서 경쟁력이 높은 천연식물보호제를 개발하는 것이 시급히 요구됨
- 천연식물보호제의 상품화에는 미생물의 분리/동정 기술, 미생물 발효기술, 천연물 분리 /동정 기술, 제형화 그리고 특히 사용방법의 기술 등의 다양한 분야의 전문기술이 필요할 뿐만 아니라 안전성 평가 및 포장시험 등을 통한 등록에 많은 비용이 들기 때문에 영세한 벤처 기업만으로는 우수한 천연식물보호제 제품 개발이 불가능함
- 국내에 상품화되어 판매되고 있는 미생물 살충제라 하더라도 이 제품의 장점을 부각 하여 적절한 사용방법 등을 제시하지 않고 판매에만 집중하므로 잘못 사용하는 등 친환경 안전 농산물에 이 약제의 사용이 증가하지 못하고 있는 실정임
- 전체 해충의 40%를 차지하는 나방류는 특히 작물, 과수, 수목 전반에 걸쳐서 큰 피해를 발생시킴
- 밤나방류는 나방류 중에 종류와 숫자가 가장 많은 그룹으로 국내 분포하는 밤나방과 종은 총 986종이며 주목할 만한 해충으로 도둑나방, 거세미나방, 담배나방, 담배거세미나방 등이 이에 속함. 특히 밤나방은 개체수가 많고 1년에 여러 차례 출현하여 피해가 큼(담배나방 1년에 3회 발생, 120~400개 알을 낳으며 1마리당 4~11개의 고추를 가해)
- 밤나방은 오이, 고추, 토마토 등 약 100여 종의 농작물을 가해함. 특히 파의 경우 파밤나방, 고추와 담배는 왕담배나방, 담배나방, 오이와 콩은 오이금무늬밤나방, 콩금무늬밤나방 등이 주요 해충으로 알려져 있으며 검거세미나방, 거세미나방, 숯검은밤나방 등도 농작물에 큰 피해를 주는 것으로 알려짐
- 시설재배지의 과채류와 잎채류 등에 나비목 해충이 한해 4~5회 발생하여 상당한 피해를 주고 있으나 특별한 친환경방제제가 없음. 특히 한 농작물에 여러 종류의 나방류 해충이 동시다발적으로 발생하고, 해충들의 세대 또한 중복되어 발생하므로 경종적, 물리적, 생물적인 종합적 방제 방법이 필요함
- 국내 등록된 미생물살충제는 나방류를 방제하는 *Bacillus thuringiensis* 9종, 선충을 방제하는 *Monacrosporium thaumasiun* 1종, 총채벌레나 온실 가루이를 방제하는 *Beauveria bassiana*

2종, *Paecilomyces fumosoroseus* 1종(총 13종)으로 친환경 안전 농산물 생산 확대를 위한 미생물 농약, 살충제의 개발이 절실한 실정임

- 밤나방과 해충 방제를 위해 개발된 미생물 살충제인 *B. thuringiensis* 의 경우 방제 효과가 낮게 나타나며 저항성 개체의 출현이 문제가 되므로 새로운 곤충병원성 미생물의 분리 및 분리 균주의 살충 활성을 증진시킬 수 있는 연구가 필요함

### 제3절 연구 개발 범위

#### ○ 곤충병원성 세균의 배양 조건 확립

- 곤충병원성 세균이 잘 생육하는 산업배지 조성을 선정하기 위해, 생균수 및 내독소단백질 생성능을 지표로 배양 최적 조건을 조사하였다. 탄소원, 질소원, C/N율, 온도, 교반속도, air flow 등을 달리하여 배양 최적 조건 및 산업배양배지를 확립

#### ○ 제제화 및 제형화

- 산업화를 위하여 제형화 연구를 위하여 액체, 액상수화제, 수화제의 형태로 제형화한 후, 생균수 및 내독소단백질의 지속성 여부를 확인한다. 또한 저장성과 안전성 향상을 위하여 계면활성제, 자외선차단제, 안정제, 결합제 등 다양한 첨가물을 이용하여 안정성 및 내독소단백질의 지속성 등을 조사

#### ○ 대량배양공정 시스템 확립

- 경쟁력있는 제품개발을 위해 생산 process를 확립 한 후, 종균, seed 배양, Jar-fermentor 배양, 농축, SD의 과정의 각 공정별 포자수 및 내독소단백질량을 조사하여 변화를 관찰, 최적의 대량배양공정 시스템을 개발

#### ○ 에코파워의 약해 및 안전성 검정

- 본 과제를 통해 개발된 에코파워 수화제의 약해 및 안정성 검정을 수행하였다. 농촌진흥청 시험인증기관인 강원대학교 친환경농산물안전성센터에 의뢰하여 6작물에 대한 약해시험, 5종의 병원성미생물에 대한 안정성 검정을 조사한다.

#### ○ 에코파워의 유기농업자재 목록공시 등록

- 상술한 일련의 연구과정을 통해 개발된 에코파워의 유기농업자재 목록공시 등록을 위해 농촌진흥청 공인 시험기관에 각 시험을 의뢰, 목록공시 인증기관인 강원대학교 친환경농산물안전성센터에서 공시 등록을 진행

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제1절 국내 기술 수준 및 시장 현황

- 현재 국내의 경우에는 미생물농약, 천적 및 친환경농자재를 포함한 국내 천연식물 보호제 시장은 약 2,000억 정도로 추정되고 있으며, 2020년에는 전체 농약 시장의 20% 규모인 3,000억 원 정도에 이를 것으로 추정됨
- 천연식물보호제이 개발되면 농약 수입대체 효과도 크리라 기대됨. 국내에서 판매되고 있는 농약의 대부분은 수입되고 있는 실정인데, 2002년도 현재 수입은 3억4천만 불(원제 2억7천만 불, 합성원료 3천만불)로서 수입의존도는 78.3%에 이른
- 국내에서는 소수의 전문 연구자로 인한 신소재의 개발능력 부족으로 국내에 등록된 (2012년 10월 31일) 천연식물보호제은 살균제 25종, 살충제 13종, 제초제 1종으로 총 39종에 불과하다. 그것도 살균제의 경우 *Bacillus* 농약이 10종 (71.4%), 살충제의 경우 BT제가 8종(75.0%)으로 *Bacillus*가 주종을 이루고 있으며 현재 등록을 위해 시험 중인 천연식물보호제도 사정은 비슷함
- 천연식물보호제의 경우 살아있는 생물을 사용하여 살아있는 해충을 죽여야 되므로 균의 선발, 배양, 유통 그리고 살포 방법 등에서 상당한 주의를 요하나 국내의 경우 대부분 농약과 동일시하여 실패하는 경우가 많아 국내농업에 효과적인 BT제의 사용에는 새로운 균주의 탐색과 이의 현장에 농민들이 효과가 나타나도록 활용할 수 있는 연구개발이 절대적으로 필요함
- 국내에서 분리된 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* 균주를 이용하여 파밤나방과 담배거세미 나방에 대한 생물학적 방제 효능을 보고함(김태환 등, 2009)
- 파밤나방에 대한 곤충병원 선충으로부터 분리한 곤충병원세균(*Xenorhabdus nematophila*, *X. sp.* 그리고 *Photorhabdus temperata* subsp. *temperata*) 배양액의 곤충면역억제활성 및 *B. thuringiensis* 생물농약과 혼합효과를 보고함(김지민 등, 2008)
- 배추좀나방을 효과적으로 방제하기 위해 내부기생성 천적인 프루텔고치벌(*Cotesia plutellae*)과 미생물농약인 *B. thuringiensis*의 혼합처리 기술을 개발하기 위한 연구가 수행됨(김규순 등, 2013)
- 배추에 기생하는 배추좀나방의 효과적인 방제를 위한 *B. thuringiensis*의 처리 간격에 대한 연구가 수행됨

## 제2절 국외 기술 수준 및 시장 현황

- 세계적으로 볼 때 생물농약의 시장은 도입단계를 지나 성장초기단계로서 전 세계적으로 친환경정책 및 안전농산물에 대한 관심이 증가함에 따라 폭발적으로 시장이 신장하리라 기대됨. Santander Investment(1998)에 의하면 매년 약 20%씩 시장이 신장할 것으로 추정됨
- 세계 생물농약은 2010년 현재 세계 농약 시장의 약 3%인 8억불로 추정되고 있으나, OECD국가를 중심으로 한 친환경농업정책으로 인하여 그 시장규모가 2013년에는 세계 농약시장의 약 15%인 45억불에 달할 것으로 추정되고 있음
- 생물농약의 경우에는 대기업보다는 주로 벤처기업이나 중소기업들이 주도적으로 시장을 선도하고 있음. 이를 중에서 년간 500억 원 이상 매출의 비교적 큰 규모의 회사로는 Valent BioSciences사, Certis USA사, Koppert사 등이 있으며, 작지만 성공적인 회사로 평가받고 있는 회사로는 AgraQuest사, BioWorks사 및 E-nema사 등이 있음. 그리고 혁신적인 기술로서 이제 막 시작하는 회사로는 Pasteuria BioScicenes사, Exosect사 등이 있음
- 2010년 현재 미국 EPA에는 76개의 미생물농약과 113개의 생화학 농약 (Biochemical pesticides)이 등록되어 있음. 유럽의 경우에는 미국과 그 정의가 조금 다르지만 BCPC(British Crop Protection Council)에서 출판한 "The Manual of Biocontrol Agents, 3rd edition"에 따르면 미생물농약이 112개가 등록되어 시판되고 있으며, 천연물농약은 58개가 등록되어 있고, Semiochemicals, 즉 반합성화합물 농약이 56개가 등록되어 있음.
- 유럽에 등록되어 있는 미생물 종류로는 *Bacteria*가 *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, *B. sphaericus*, *B. t.* subsp. *aizawai*, *B. t.* subsp. *tenebrionis* 등이고, *Fungi*가 *Beauveria bassiana*, *B. brongniartii*, *Paecilomyces fumosoroseus*, *Metarrhizium flavoviride*, *Verticillium lecanii* 등임
- 미국에서는 2012년도에 *B. thuringiensis* subsp. *galleriae* strain SDS-502를 딱정벌레목 구리풀뎅이(*Anomala cuprea*)에 높은 살충효과를 보이는 것으로 등록 하였으며 Bt유전자로 GMO 작물도 최근 4종 등록하였음
- 노지 작물의 해충인 담배나방, 파밤나방 등 밤나방을 방제하기 위해 친환경살충제인 avidin과 BT독소의 살충효율증진에 관련된 연구가 진행됨(Zhu 등, 2005)
- 배추좀나방의 효과적인 방제를 위해 BT에 첨가되는 화학적 첨가제를 선발함(Zhang 등, 2013)
- BT 9균주의 δ-endotoxin의 혼합에 의한 담배거세미나방의 살충효율 증대 효과를 연구함(Asano 등, 1995)
- 모기의 효과적인 방제를 위한 *B. sphaericus*와 *B. thuringiensis* serovar. *Israeleensis*의 저가 배지를 개발함(Poopathi 등, 2002)
- *B. thuringiensis* *kurstaki* 와 *Photobacterius luminescens* 의 혼합처리에 의한 담배거세미나방 방제효율 증진에 대한 연구가 진행됨(Benfarhat-Touzri 등, 2013)

### 제3절 국내외 연구현황 비교 및 필요 연구 분야

- 국내의 미생물 농약으로서 처음 개발되어 등록된 것은 2005년도 *B. t. aizawai* NT 0423균주를 국내 토양에서 처음 분리하여 배추좀나방에 등록하여 상품화 하였으며 현재는 파밤나방 등 몇 개의 해충에 친환경 유기농자재로 공시
- 국내의 생물농약에 대한 본격적인 연구는 1990년대 후반부터 이루어졌음. 한국화학 연구원과 생명공학연구원의 정부출연연구소, 경상대학교, 충남대학교, 충북대학교, 서울대학교 등의 대학교, 그리고 (주)경농, (주)동부한농화학, (주)그린바이오텍, (주)비아이지 등의 기업체에서 연구를 진행해 왔음
- 현재 미국이나 일본에서는 곤충병원성 세균인 *B. thuringiensis*를 새로운 해충에 대하여 살충효과 있는 것을 선별 등록하고 있으며 시장에서도 일정한 비율을 차지하며 사용되고 있는 실정임. 이는 유기농산물의 생산을 위하여 발생되는 나비목해충의 방제에 사용되고 있으며 화학농약의 줄임으로 환경을 보호
- 국내에서도 새로운 BT를 선발하여 등록하고 상품화하는 데에 충분한 기술력을 보유하고 있으나 연구개발이 지속적이지 못하여 새로운 균주를 탐색하는 것으로 완료되는 경우가 많고, 현장연구가 없어 사용상의 문제점이 많은 것으로 알려져 있음
- 국내의 농가에서 작물보호 분야의 문화는 농약과 같이 신속하고 무차별로 해충을 모두 죽이는 약제를 선호하기 때문에 친환경적인 BT제의 시장성은 감소된 상태이기 때문에 이 약제의 특성에 맞게 사용토록 할 연구가 필요
- BT제는 절대적으로 안전하며 살충력이 뛰어나므로 오이와 같이 연속 수확작물에 나비목 해충이 발생하거나, 콩과같이 잎을 잡아먹어도 콩에는 무해한 작물, 토양해충 등 특이성이 요구되는 작물해충 연구가 필요

## 제 3 장 연구 수행 내용 및 결과

### 제1절 1 세부과제명: 곤충병원 세균을 이용한 나방류 방제

#### 1. 연구 수행 내용

가. 나비목 해충에 새로운 효과를 나타내는 *Bacillus thuringiensis* 균주 선발 및 특성 규명

##### (1) 토양시료 채집

- 토양 시료는 충청북도 영동, 옥천의 산과 들 26곳에서 채취 하였다. 시료는 토양 표면에서 약 10cm 깊이로 판 후 멸균된 시약스푼을 이용하여 채취 하였고 실험에 사용하였다. 산은 주로 나무 밑의 토양에서, 들의 경우 생물농약의 살포가 되지 않는 토양을 중심으로 채취 하였고, 토양 샘플은 멸균된 용기에 밀봉하여 4°C에 보관하였다.

##### (2) *Bacillus thuringiensis* 균주의 분리 및 동정

- *B. thuringiensis* 균주의 분리는 Ohba & Aizawa(1978) 방법을 사용하였다. 채취된 토양 시료의 1g을 시험판에 넣은 뒤 멸균수 9ml을 넣고 3~4회 정도 강하게 교반하였다. 포자를 형성하지 못하는 세균들을 선택적으로 제거하기 위하여 65°C 항온수조에서 30분 동안 열처리하였다. 열처리 후 5분 동안 정치하여 흙을 가라앉히고 상층액을 10<sup>3</sup>까지 희석하여 Nutrient agar plate에 고르게 도말하였다. 이 plate를 27°C 배양기에서 3~4일간 배양한 후 형성된 *Bacillus* colony들은 중에서 외형이 *B. thuringiensis* 균주와 유사한 colony를 선별하였다. 선별된 colony들은 위상차현미경 1,000배로 관찰하여 내독소 단백질을 형성하는 균주를 선별하였다. 선별된 균주는 멸균수에 희석하여 위와 같은 방법으로 배양한 후, autolysis가 일어난 것을 확인하고 15,000 rpm으로 15분간 원심분리기(Avanti J-E, Beckman)로 원심 분리하여 침군하였다. 분리된 8개의 *B. thuringiensis* 균주 중 2개의 균주를 목원대학교 미생물생태자원연구소에 보내 flagellin C 유전자에 의해 동정을 수행하였다.

##### (3) 위상차현미경과 주사전자현미경

- Nutrient agar plate 상에서 증식하여 포자형성기가 지난 *B. thuringiensis* 균주의 포자와 내독소결정성단백질의 형태를 알아보기 위해 위상차현미경(Olympus BX51)과 주사전자현미경(Quanta FEG MK2)을 이용하여 관찰하였다. 위상차현미경으로 관찰하기 위해 소량의 균주를 slide glass에 떨어뜨린 후 1,000배로 내독소결정성단백질의 형태를 관찰하였다(Kim et al., 1995). 주사전자현미경으로 관찰하기 위해 균주를 한국생명공학연구원에 보내 관찰하였다.

#### (4) 공시곤충

- 본 실험에 사용된 나비목 해충인 담배거세미나방(*S. litura*), 파밤나방(*S. exigua*)은 인공사료(Gho et al., 1991)를 먹이로 이용하였고, 배추좀나방(*P. xylostella*)은 열무를 기주로 사용하였다. 성충의 먹이로는 10% 설탕물을 공급하였다. 파리목인 이집트金陵모기(*A. aegypti*)는 야외 채집한 개체군을 충남대학교 곤충생리 실험실에서 치어사료에 yeast extract를 첨가한 먹이로 계대사육하여 사용하였다. 모든 곤충은 충남대학교 생물학 해충제어 실험실에서, 온도  $25\pm2^{\circ}\text{C}$ , 광조건 16L:8D, 상대습도 50~60% 조건(Kim et al., 2008)에서 누대 사육하였다.

#### (5) 생물활성 검정 및 반수치사농도

- 선발된 2종의 *B. thuringiensis* 균주를 Nutrient Agar배지에 접종하고  $27^{\circ}\text{C}$ 에서 5일 동안 배양 후 위상차현미경으로 내독소 결정체 단백질 형성을 관찰하면서 내독소 단백질을 형성하였을 때, 균을 모아 원심분리 하였다. 상층액은 버리고 남은 펠렛에 멸균수 20mℓ를 첨가하여 CAB565는  $1.0\times10^7(\text{cfu}/\text{ml})$ , CAB566은  $1.7\times10^7(\text{cfu}/\text{ml})$ 에 해당하는 배양액을 생물검정에 사용하였다. 살충활성을 비교하기 위해 실험실에 보유하고 있는 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* KB098균주와 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KB099균주를 비교 균주로 사용하였고, 혈청형이 *aizawai*이면서 생물농약으로 시판중인 TB-WP 제품과 비교 검정 하였다.

##### 1) 담배거세미나방과 파밤나방에 대한 독성 검정

- 담배거세미나방과 파밤나방에 대한 생물활성 검정은  $150\mu\text{l}$ 의 배양액을 1g의 인공사료에 첨가하여 유충을 5마리씩 petri dish에 넣고 6반복 실시하여 120시간 동안 치사율을 조사하였다.

##### 2) 배추좀나방에 대한 독성 검정

- 배추좀나방에 대한 생물활성 검정은 3령에서 5령 유충을 대상으로 배춧잎을 이용한 잎침지법(Tabashnik et al., 1990, Shelton et al., 1993)을 수행하였다. 잎 disk(직경 5cm)를 40ml의 배양액에 침지하였고, 실온에서 1시간동안 음전하였다. 대조구는 잎 disk를 중류수에 동일한 조건으로 처리하였다. 처리된 잎 disk는 filter paper를 깔아놓은 petri dish에 옮긴 후 유충 10마리씩 넣고 3반복 실시하여 72시간동안 치사율을 조사하였다.

##### 3) 이집트金陵모기에 대한 독성 검정

- 이집트金陵모기에 대한 생물활성 검정은 WHO(2005)의 실험방법을 일부 수정하여 실험하였다. 2령 유충 10마리씩 30ml의 물이 담긴 90ml 플라스틱 컵에 넣고, 희석한 균액의 0.3ml을 접종하였다. 72시간동안 치사율을 조사하였고, 3반복 실험하였다.

##### 4) 반수치사농도(LC<sub>50</sub>)

- 모든 실험은 5마리씩 6반복 실시하였으며, 희석농도는 유충이 모두 사망하는 농도와 생존하는

농도까지 5~7개의 농도범위를 정하여 조사한 사충률로 Finney(1971)의 probit 계산법에 기초한 PC 프로그램(Reymond *et al.*, 1985)을 이용하여 반수치사농도(LC<sub>50</sub>)를 산출하였다.

#### (6) SDS-PAGE

- 실험에 사용된 각각의 균주를 Nutrient Agar배지에 접종하고 27°C에서 5일 동안 배양하여 위상차현미경으로 autolysis가 일어나는 것을 확인한 후, PBS buffer를 사용하여 원심튜브에 15,000rpm으로 4°C에서 10분간 원심을 한다. 원심 후 상층액은 버리고 washing buffer I(500mM NaCl, 2% Triton X-100)은 3번, washing buffer II(500mM NaCl)는 2번 세척한다. 세척된 parasporal inclusion은 멸균수를 침가한 후 -20°C에 보관한다. SDS-PAGE는 Laemmli(1970)의 방법을 일부 수정하여 12% separating gel과 5% stacking gel을 사용했다. 전기영동이 끝난 gel은 0.5% Coomassie brilliant blue로 염색하였다.
- 담배거세미나방과 파밤나방의 중장 추출액은 각각의 5령 유충을 -4°C에 10초간 둔 후, 멸균한 해부용 칼을 이용하여 중장만 열음하의 원심튜브에 넣고 13,000rpm, 4°C, 15분 원심 분리하여 깨끗한 상층액만 에펜돌프 튜브에 넣어 -20°C에 보관 한다. 중장액 처리는 살충성 결정체 독소 단백질과 50mM NaOH 수용액을 상온에서 5분간 반응시킨 후 원심 분리하여 상층액을 버리고 중장액과 혼합하여 37°C에서 15분간 반응시킨 후 확인하였다(Zhong *et al.*, 2000; Zouari and Samit, 1997).

#### (7) PCR analysis

- 선발된 2종의 *B. thuringiensis* 균주의 내독소 유전자의 Cry형 유전자를 동정하기 위하여 gene-specific primer set를 사용하였다. PCR의 증폭은 Thermal Cycle C1000™(BIO-RAD)을 사용하였다. 반응액은 완충액 성분과 dNTP등이 함유된 premix(Bioneer)에 주형 DNA 1.0μl, primer set 각각 1.0μl, 중류수 17μl를 혼합하여 최종볼륨을 20μl로 하여 수행하였다. PCR condition은 94°C에서 5분 총 30 cycle로 94°C에서 1분, annealing 57°C에서 1분, 72°C에서 1분, 72°C에서 5분으로 진행하여 PCR product DNA를 생산하였으며 1.5% agarose gel에서 전기영동하였다(Yang *et al.*, 2011, Abdullah *et al.*, 2009, Ye *et al.*, 2009).

cry gene	primer sequences	size of product (bp)
cry1Aa	5'GAGCCAAGCGACTGGAGCAGTTACACC3'	782
cry1Ab	5'TCGAATTGAATTGTTCC3'	238
cry1Ac	5'GTCCAACCTTATGAGTCACCTGGGCTTC3'	550
cry1B	5'GTCCAACCTTATGAGTCACCTGGGCTTC3'	902
cry1C	5'CAAC CCT ATTGGTGCAGGTT C3'	288
cry1D	5'GGTACATTTAGATGTTCACAGCCAC3'	465
cry1E	5'CTTAGGGATAAAATGTAAGTACAG3'	961
cry1F	5'CCGGTGACCCATTAACATTCCAATC3'	383
cry13'	5'ATCACTGAGTCGCTTCGCATCTTGACTTTCTC3'	-
cry1G5'	5'ATATGGAGTGAAATAGGGGG3'	235
cry1G3'	5'TGAACGGCGATTACATGC3'	-
cry1H5'	5'GCTGTCTACCATGATTGCTTG3'	1584
cry1I3'	5'CAGTGCAGTAACCTTCTCTTGC3'	-

#### (8) Plasmid DNA 추출

- 선발된 2종의 *B. thuringiensis* 균주로부터 plasmid DNA를 추출하기 위하여 Qiagen midi kit의 protocol을 일부 수정하여 사용하였다. 균주를 LB배지 5ml에 접종하여 27°C 180rpm으로 8시간 배양한다. 배양액을 LB배지 50ml에 넣고 동일한 조건으로 16시간 배양한다. 배양된 균은 6,000g, 15분, 4°C의 조건으로 원심 분리한다. 상층액을 버리고 P1 buffer(50mM Tris-HCl, pH 8.0, 10mM EDTA, 50μg/ml of RNase A) 4ml을 넣고 vortexing 하여 펠렛을 풀어준다. P2 buffer (0.2M NaOH, 1% SDS) 4ml을 넣고 투브를 4~6번 뒤집어 주어 혼합하고 15~25°C 배양기에서 5분간 배양한다. 냉각한 P3 buffer(4M guanidine hydrochloride, 0.5M potassium acetate, pH 4.2) 4ml을 넣고 4~6번 뒤집어 주어 혼합하고 얼음에서 15분간 배양한다. 30분간 15,000rpm, 4°C로 원심 분리한 후, 상층액을 새 투브로 옮긴다. 15분간 15,000rpm, 4°C로 원심 분리한 후, Qiagen-tip 100을 수평으로 놓고 QBT buffer(50mM NaCl, 50mM MOPS, pH 7.0, 15% isopropanol, 0.15% Triton X-100) 4ml을 넣어 통과시킨 컬럼에 원심 분리한 상층액을 넣는다. 상층액이 컬럼을 완전히 통과하면 QC buffer 10ml로 두 번 Qiagen-tip 100을 washing한다. QF buffer 5ml로 DNA를 녹여서 분리한다. 상온의 isopropanol 3.5ml을 첨가하여 DNA를 침전시키고 30분간 15,000rpm, 4°C로 원심 분리한다. 상층액을 버리고 70% 에탄올 2ml을 첨가하여 DNA 펠렛을 washing한 후 10분간 15,000rpm, 4°C로 원심 분리한다. 상층액을 버리고 5~10분간 공기건조 시키고 3차 증류수 200μl를 넣어 plasmid DNA를 다시 녹인다. plasmid DNA를 3차 증류수와 혼합시킨 후 멸균한 Eppendorf tube에 넣고 실험에 사용하기 전까지 -20°C에서 보관하였다. 전기영동은 agarose gel을 1×TAE buffer에 1% 비율로 혼합하여 열을 가해 녹인 후 gel tray에 놓고 20분간 굳힌 agarose gel을 사용하였다. 전기영동장치에 gel과 동일한 1×TAE buffer를 gel 위로 3~5mm정도 올라오게 놓고 loading dye와 loading star를 5:1의

비율로 섞은 혼합액과 plasmid DNA sample을 1:5의 비율로 혼합하여 각각의 well에 넣고 50V에서 60분간 전기영동한 후 UV를 쬐어 band pattern을 확인하였다.

#### 나. 신규 *Bacillus thuringiensis* 균주의 대량배양액을 이용한 친환경농자재 예비 실험

##### (1) 우진 B&G 배양액 현황

- 우진 B&G에서 1차, 2차, 3차 배양액을 받았으며 제형은 아래 표와 같다.

배양차수	균주No.	cfu/ml	제형
1차	1차WJ565	5.1X108	배양액
	1차WJ566	4.8X108	배양액
	2차WJ565-0	7.0×108	배양액
	2차WJ565-1	6.6×108	corn starch 5%
	2차WJ565-2	3.9×108	sucrose 5%, corn starch 1%, lactic acid 0.1%
	2차WJ565-3	1.3×109	Tween80 10%
	2차WJ566-0	7.2×108	배양액
	2차WJ566-1	3.8×108	corn starch 5%
	2차WJ566-2	1.1×108	sucrose 5%, corn starch 1%, lactic acid 0.1%
3차	2차WJ566-3	3.7×109	Tween80 10%
	3차WJ565	2.9X109	배양액
	3차WJ566	5.5X108	배양액

##### (2) 배양액 생물활성 검정

- 배양액을  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ (cfu/ml)의 농도로 회석하여 생물검정에 사용하였다. 담배거세미나방과 파밤나방에 대한 생물활성 검정은  $150\mu\ell$ 의 회석액을 1g의 인공사료에 첨가하여 유충을 5마리씩 petri dish에 넣고 6반복 실시하여 120시간 동안 치사율을 조사하였다.
- 배추좀나방에 대한 생물활성 검정은 유충을 대상으로 배춧잎을 이용한 잎침지법 (Tabashnik et al., 1990, Shelton et al., 1993)을 수행하였다. 잎 disk(직경 5cm)를 40ml의 배양액에 침지하였고, 실온에서 1시간동안 음건하였다. 대조구는 잎 disk를 증류수에 동일한 조건으로 처리하였다. 처리된 잎 disk는 filter paper를 깔아놓은 petri dish에 옮긴 후 유충 10마리씩 넣고 3반복 실시하여 72시간동안 치사율을 조사하였다.

다. 농촌진흥청 농업미생물자원센터(KACC)에서 분양받은 세균에 대한 나방류 해충(담배거세미나방, 과밤나방, 배추좀나방)에 대한 살충활성검정

### (1) 생물활성 검정

- 농업미생물자원센터(KACC)에서 분양받은 100균주(60균주는 현재 분양 중)를 각각의 균주에 등록된 배지에 접종하여 배양한 후 균을 모아 원심분리 하였다. 상층액은 버리고 남은 웰렛에 멸균수를 적정량 첨가하여 원액에 대한 살충활성검정을 실시하였다. 담배거세미나방과 과밤나방에 대한 생물활성 검정은 150 $\mu\text{l}$ 의 원액을 1g의 인공사료에 첨가하여 유충을 5마리씩 petri dish에 넣고 6반복 실시하여 120시간 동안 치사율을 조사하였다. 배추좀나방에 대한 생물활성 검정은 유충을 대상으로 배춧잎을 이용한 잎침지법(Tabashnik *et al.*, 1990, Shelton *et al.*, 1993)을 수행하였다. 잎 disk(직경 5cm)를 40ml의 배양액에 침지하였고, 실온에서 1시간동안 음건하였다. 대조구는 잎 disk를 종류수에 동일한 조건으로 처리하였다. 처리된 잎 disk는 filter paper를 깔아놓은 petri dish에 옮긴 후 유충 10마리씩 넣고 3반복 실시하여 72시간동안 치사율을 조사하였다.

## 라. 국내에서 신규 미생물살충제 선발 검토

### (1) 토양스크리닝을 통해 분리한 균을 이용한 살선충효과 검증

#### 1) 토양 스크리닝

- 시험관에 토양 1g과 멸균수 9ml을 멸균한 시험관에 넣고 토양과 멸균수가 섞이도록 강하게 Vortexing한다. 5분동안 정치시킨 후 작은 시험관에 2.7ml의 멸균수를 준비한 후 토양이 가라앉은 상청액 300 $\mu\text{l}$ 를 넣어 10배 흐석시킨다. NA배지에 날짜, 흐석배수, 반복수, 토양 등을 적는다. 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup> 흐석배수를 200 $\mu\text{l}$ 씩 3반복 도말한다. 실링 후 27°C 배양기에 2~3일간 배양한 후 세균을 선택한 후 계대 배양을 했다.

#### 2) 균주 준비

- 토양 스크리닝후 나온 세균을 가지고 Nutrient agar배지에 접종하고 27°C에서 5일간 배양한 후 집균하여 4°C에 보관하여 생물검정에 사용하였다.

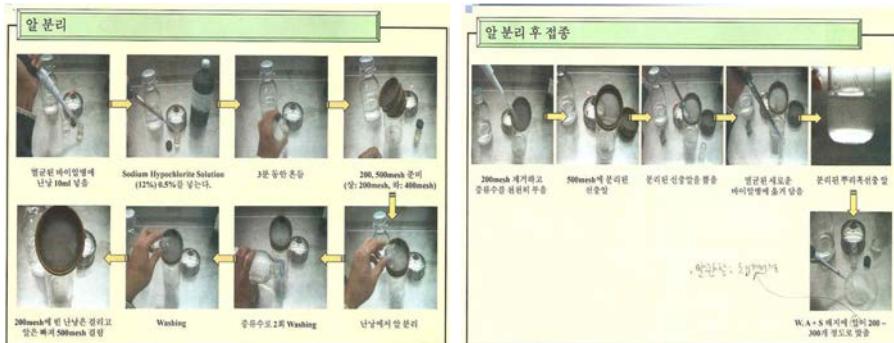
#### 3) 뿌리혹선충 증식

- 직경 20-30cm의 고무통에 상토와 모래를 섞어 채운 후 본엽이 2-4개인 토마토 묘를 이식하여 이식 1주일 후 뿌리 주위에 뿌리혹선충 접종원을 3-5균데 접종했다. 6-7주 후 뿌리혹선충이 감염된 뿌리를 수확한다.

#### 4) 뿌리혹선충 알 분리

- 감염된 기주 뿌리를 채집한 후 Phloxin B 염색시약을 0.0015%로 희석한 물에 뿌리를 담궈 15~20분 염색을 했다. 염색한 후 흐르는 물에 행군 후 증류수에 10분 정도 담궈 난낭만 염색약이 남게 했다. 난낭을 모으기 위해 해부현미경으로 관찰하며 핀셋으로 난낭을 때어서 증류수에 담긴 비커에 모았다. 모든 난낭은 Sodium Hypochlorite Solution으로 소독한다. 소독한 난낭에서 알을 분리하여 200, 500 mesh에 걸려서 분리된 알만 뽑는다.





## 5) 뿌리혹선충 유충 분리

- 앞에서 분리한 알은 25°C에서 부화시킨 후 베르만 깔대기법을 이용하여 유충만 분리했다.

※ 베르만깔대기법

- (1) 깔때기를 설치하고 깔대기 밑부분에는 고무호스를 달아준다.
- (2) 고무호스에 집게를 달아주어 중력에 의하여 물이 새는 것을 막아준다.
- (3) 집게를 달아준 깔대기에 물을 부어준 후 체보다 더 고운 KIMWIPES 티슈를 채에 잘 붙인 후 앞서 설치해 놓은 깔대기에 옮겨놓는데 이때 물의 양은 채를 넘지 않도록 물을 넣어준다.
- (4) 분리한 알을 천천히 부어준다.
- (5) 이대로 24시간 정도 놔두면 중력에 의하여 뿌리혹선충 유충이 아래로 향하게 되어 고무호스 아래 부분으로 모이게 된다.
- (6) 이것을 취하여 생물검정에 사용하였다.

## 6) 생물검정

- 부화한 유충을 falcon tube에 모아 1ml씩 24 well plate에 처리한 후 현미경으로 well마다 유충의 마리수를 계수한다. 시험약제마다 양을 다르게 접종하여 24h, 48h 동안 유충의 운동성을 검정한다. 대조구는 우진비엔비의 선충제로를 사용하였다.

### (2) 풍뎅이과 7종에서 분리한 장내세균의 병해충 방제 가능성 검토

#### 1) 실험곤충

- 실험 곤충의 채집은 6~8월에 대전 인근에서 야간 라이트 트랩을 이용하여 주동무늬차색풍뎅이 (*Adoretus tenuimaculatus*), 쇠털차색풍뎅이(*Adoretus hirsutus*), 등얼룩풍뎅이(*Blitopertha orientalis*), 빨간색우단풍뎅이(*Maladera verticalis*), 긴다색풍뎅이(*Heptophylla picea*), 별줄풍뎅이(*Mimela testaceipes*), 뭉고청동풍뎅이(*Anomala mongolica*)의 성충을 각각 3개체 이상씩 채집하여 insect dish에 넣어 실험실로 옮겨 실험에 사용하였다.

## 2) 소화기관 분리 및 장내세균 분리 동정

- 채집한 풍뎅이의 성충을 -20°C에 10분간 넣어 기절시킨 후 1% NaClO<sub>3</sub> 용액에 1분, 70%알코올에 1분간 소독한 후 멸균수에 1분간 씻은 후 멸균된 해부도구로 멸균된 파라핀 위에서장을 분리한 후 멸균된 saline solution(9.32g NaCl, 0.77g KCl, 0.5g CaCl, 0.18g NaHCO<sub>3</sub>, 0.01g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> / 1Liter pH7.4) 200ul가 담긴 1.5ml eppendorf tube(Axygen, Central Avenue Union City. USA)에 넣어 마쇄한 후 멸균수로 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup>으로 희석한 중장액을 NA배지(DifcoTM Nutrient Agar)에 평판도말하여 25°C에서 3일간 배양시킨 군을 육안으로 서로 다른 콜로니를 식별하여 각각 순수분리 하였다. 순수분리한 단일 콜로니들을 MACROGEN에 맡겨서 16S rDNA를 PCR 증폭 하였으며, 여기에는 사용된 primer는 518F(5' -CCAGCAGCCGCGGTAAATACG-3') primer와 800R(5' -TACCAGGGTATCTAAATCC-3') primer를 사용하였다. 결정된 염기서열을 SeqMan program을 이용하여 Alignment하여 정리하였다. 정리된 16S rDNA 염기서열의 similarity는 NCBI/GeneBank database의 BLAST program을 이용하여 비교하였다.

## 3) 풍뎅이에서 분리한 14균주의 살충활성 검정

- 동정된 14종의 군주를 멸균된 LB배지(DifcoTM LB Broth) 100ml가 담긴 플라스크에 멸균된 텁으로 단일 콜로니를 접종시켜 Shaking incubater에서 28°C, 120rpm으로 3일간 배양한 후 인공사육중인 파밤나방(*Spodoptera exigua*) 2령 유충 5마리당 식독은 인공사료 1g에 배양액 200ul, 접촉독은 약 300ul를 분무하여 접종하였다. 24시간마다 파밤나방을 확인하였으며 자극을 가해도 움직이지 않는 개체를 죽은 것으로 판단하였다. 각 배양 군주마다 6반복 실험하여 각각 30개체를 대상으로 실험하였다.

마. 배추, 무에 발생하는 담배거세미나방, 배추좀나방, 파밤나방의 방제방법 연구 개발(야외, 시설 하우스실험)

### (1) 배추 포장에서의 담배거세미나방 살충효과검정(야외 실험)

- 앞서 선발된 2개의 군주(CAB565, CAB566)를 이용하여 우진비엔지에서 제공한 대량배양액을 이용하여 담배거세미나방에 대한 친환경농자재 야외 살충효과를 확인하고자 하였다. 대전광역시 유성구 노은동에 위치한 충남대학교 실험포장에 정식한 배추에 담배거세미나방 2령 유충을 10,000마리 방사 후, 약 1주일 뒤 배추 1포기당 3령 유충을 3마리씩 각각 접종하였다. 실험구는 무처리구, 대조구, CAB565, 3차 WJ565배양액, 3차 WJ566배양액으로 총 5개 구간을 실험에 이용하였다. 대조구 약제로는 토박이(동부한농)를 이용하였다. 약제는 반자동분무기를 이용하여 살포하였으며, CAB565와 3차 WJ566배양액은 100배 희석하였으며, 3차 WJ565배양액은 10배 희석하여 살포하였다. 배추는 10포기를 1반복으로, 구역당 총 3반복

실시하였다. 피해조사는 약제 살포 후 3, 5, 7일차에 육안관찰을 통하여 식흔으로 인해 피해염수를 조사하였다.

#### (2) 배추 포장에서의 담배거세미나방 살충효과검정(시설 하우스 실험)

- 앞서 선발된 2개의 균주(CAB565, CAB566)를 이용하여 우진비엔지에서 제공한 대량배양액을 이용하여 담배거세미나방에 대한 친환경농자재 시설 하우스 살충효과를 확인하고자 하였다. 실험포는 대전광역시 유성구 궁동 충남대학교 내 시설 하우스에서 실시하였다. 정식한 배추에 담배거세미나방 1령 유충을 약 10,000마리 방사 후 철대를 세운 다음 비닐을 씌워 유충의 온도조건으로 최대 맞추어 준 후 실험하였다. 실험구는 무처리구, 대조구, CAB565, 3차 WJ565배양액, 3차 WJ566배양액으로 총 5개 구간을 실험에 이용하였으며, 대조구 약제로는 토박이(동부한농)을 사용하였다. 반자동 분무기를 이용하여 약제 살포하였으며, CAB565와 3차 WJ566배양액은 100배 희석하여 사용하였고, 3차 WJ565배양액은 10배 희석하여 살포하였다. 배추는 1 두둑 당 45포기를 정식하였으며, 15포기를 1반복으로 하여 총 3반복하였다. 따라서 총 사용한 두둑은 5개 두둑이다. 피해조사는 약제 살포 전 그리고 약제 살포 후 3, 5, 7일차에 생충수와 사충수를 육안조사하였다.

#### (3) 배추 포장에서의 파밤나방 살충효과검정(시설 하우스 실험)

- 앞서 선발된 2개의 균주(CAB565, CAB566)를 이용하여 우진비엔지에서 제공한 대량배양액을 이용하여 파밤나방에 대한 친환경농자재 시설 하우스 살충효과를 확인하고자 하였다. 실험포는 대전광역시 유성구 궁동 충남대학교 내 시설 하우스에서 실시하였다. 정식한 배추에 파밤나방 2령 유충을 약 10,000마리 방사 후 철대를 세운 다음 비닐을 씌워 유충의 온도조건으로 최대 맞추어 준 후 실험하였다. 실험구는 무처리구, 대조구, CAB565, 3차 WJ565배양액, 3차 WJ566배양액으로 총 5개 구간을 실험에 이용하였으며, 대조구 약제로는 토박이(동부한농)을 사용하였다. 반자동 분무기를 이용하여 약제 살포하였으며, CAB565와 3차 WJ566배양액은 100배 희석하여 사용하였고, 3차 WJ565배양액은 10배 희석하여 살포하였다. 배추는 1 두둑 당 45포기를 정식하였으며, 15포기를 1반복으로 하여 총 3반복하였다. 따라서 총 사용한 두둑은 5개 두둑이다. 피해조사는 약제 살포 전 그리고 약제 살포 후 3, 5, 7일차에 생충수와 사충수를 육안조사하였다.

#### (4) 무 포장에서의 배추좀나방 살충효과검정(시설 하우스 실험)

- 앞서 선발된 2개의 균주(CAB565, CAB566)를 이용하여 우진비엔지에서 제공한 대량배양액을 이용하여 배추좀나방에 대한 친환경농자재 시설 하우스 살충효과를 확인하고자 하였다. 실험포는 대전광역시 유성구 궁동 충남대학교 내 시설 하우스에서 실시하였다. 정식한 배추에 파밤나방 2령 유충을 약 700마리 방사 후 철대를 세운 다음 비닐을 씌워 유충의 온도조건으로 최대 맞추어 준 후 실험하였다. 실험구는 무처리구, 대조구, 3차 WJ565배양액, 3차

WJ566배양액으로 총 4개 구간을 실험에 이용하였으며, 대조구 약제로는 토박이(동부한농)을 사용하였다. 반자동 분무기를 이용하여 약제 살포하였으며, 3차 WJ566배양액은 100배 희석하여 사용하였고, 3차 WJ565배양액은 10배 희석하여 살포하였다. 무는 두둑에 홀뿌리기를 하여 파종하였으며, 1두둑 내에서 3개의 구역으로 나누어 3반복 실험하였다. 20개 기주를 임의 선정하여 피해조사를 실시하였으며, 약제 살포 전 그리고 약제 살포 후 3, 5, 7일차에 생충수와 사충수를 육안조사하였다.

## 바. 지속적으로 나비목해충에 새로운 효과를 나타내는 *B. thuringiensis* 균주 선발 및 특성 구명

### (1) PCR 분석

- 선발된 2종의 *B. thuringiensis* 균주의 cry1 유전자 외에 다른 cry 유전자 증폭을 동정하기 위하여 gene-specific primer set를 사용하였다. PCR의 증폭은 Thermal Cycle C1000<sup>TM</sup>(BIO-RAD)을 사용하였다. 반응액은 완충액 성분과 dNTP등이 함유된 premix(Bioneer)에 주형 DNA 1.0 $\mu$ l, primer set 각각 1.0 $\mu$ l, 중류수 17 $\mu$ l를 혼합하여 최종볼륨을 20 $\mu$ l로 하여 수행하였다. PCR condition은 94°C에서 5분 총 30 cycle로 94°C에서 1분, annealing 57°C에서 1분, 72°C에서 1분, 72°C에서 5분으로 진행하여 PCR product DNA를 생산하였으며 1.5% agarose gel에서 전기영동을 실시하였다(Yang et al., 2011, Abdullah et al., 2009, Ye et al., 2009).

Primers	Primer sequence (5'-3')	PCR products (bp)	Primer	Primer sequence (5'-3')	PCR products (bp)
cry25'	CAGATACCCTTG CTGGTGTAA	1073	cry4C5'	ATGAATCCATATCA AAATAAG	2040
cry23'	ATAGGCCCGTGC TCCACCAGG	-	cry4C3'	AAGAACTTGTTT TAATTAAAC	
cry35'	CGTTATCGCAGA GAGATGACATTA AC	589	cry4D5'	ATGGAAGATAGTT CTTTAGAT	1932
cry33'	CATCTGTTGTTT CTGGAGGCAAT	-	cry4D3'	CTACTTTAGTAACG GATT	
cry3A3'	ATAGATGGTCCT ACTT	1964	cry55'	ATGGAAGATAGTT CTTTAGAT	2174
cry3B3'	GAATCCTGTGCA CCTAA	1359	cry53'	GGTAGATTAAAT TCTAC	-
cry3D3'	ATTGTTGCCGTC AACAA	1135	cry9A5'	ATCATGCCATGGAT CAAAATAAACACGG AATTATTGG	571

cry3ABD 5'	CCGAACAATCGA AGTGAA	-	cry9A3'	CCGCTTCCAATAAC ATCTTT	-
cry3C5'	CCTGAAAATTAC AGGCC	1074	cry9B5'	TCATTGGTATAAG AGTTGGTCTATAG AC	402
cry3C3'	AATTGATCAATA GAATC	-	cry9C5'	CTGCTCCCTTCAA TCC	306
cry4A5'	CGAGGGTGAATT TGCTCC	1032	cry9D5'	CCGAGCTCTATGAA TCGAAATAATCAA AATGAAT	1917
cry4A3'	ATGGCTTGTTTC GCTACATC	-	cry9BCD 3'	CCTCCTAGACACAG GGATGATTTCAAT TC	-
cry4B5'	GGTGCTTCCTAT TCTTTGGC	2610			
cry4B3'	ATGGCTTGTTTC GCTACATC	-			

## (2) Real time PCR 분석

- 선발된 2종의 *B. thuringiensis* 균주 DNA의 cry 유전자의 발현량을 비교하기 위하여 SYBR Green I real time PCR(BIO-RAD)을 수행하였다. 모든 real time PCR 반응액은 BIO-RAD사의 iQTM SYBR Green I Supermix를 첨가하고 template DNA 2 $\mu$ l와 각각 가지고 있는 primer를 1 $\mu$ l를 혼합하여 최종 볼륨 20 $\mu$ l로 하여 수행하였고, 모든 균주는 동일한 농도(2.5ng/ $\mu$ l)로 실험을 진행하였다. Real-time PCR은 95°C에서 5분 총 40cycle로 95°C에서 1분, annealing 60°C에서 30초, 72°C에서 30초로 진행하여 PCR product DNA를 생산하였으며 1.5% agarose gel에서 전기영동 하였다.

## (3) Gelextraction

- Crystal-coding plasmid DNA를 agarose gel에서 재추출하기 위해 Qiaquick gel extraction kit를 사용하여 gel extraction하였고 Qiaex II gel extraction kit는 Qiaquick gel extraction kit를 이용한 결과가 정확한지를 확인하기 위해 사용하였다. Qiaquick gel extraction kit는 Qiagen의 protocol방법대로 사용하였다. 선발된 2종의 plasmid DNA를 전기영동한 agarose gel로부터 crystal-coding plasmid DNA band를 날카로운 메스로 절단하였다. QG buffer를 gel 무게의 3배 volume으로 넣고 50°C에서 2분간격으로 vortexing하며 10분간 녹인다. Isopropanol을 gel 무게만큼 첨가한 후 collection tube와 결합시킨 컬럼에 넣고 13,000rpm으로 1분간 원심분리하여 컬럼을 통과시킨다. Collection tube를 비우고 QG buffer 500 $\mu$ l를 컬럼에 넣고 13,000rpm으로 1분간 원심한다. Collection tube를 비우고 PE buffer 750 $\mu$ l를 컬럼에 넣고 13,000rpm으로 1분간 원심분리하여 washing 하고 collection tube를 비운 후, 다시 13,000rpm으로 1분간 원심분리하여

남은 ethanol을 제거한다. Collection tube를 버리고 1.5ml eppendorf tube 설치한 후 EB buffer를 20 $\mu$ l 컬럼에 넣은 후 1분간 반응시키고 13,000rpm으로 1분간 원심분리하여 DNA를 용출시킨 후 실험에 사용하기 전까지 -20°C에서 보관하였다. Gel extraction sample의 확인은 0.8% agarose gel에서 50V로 60분간 전기영동하여 band를 확인하였고, crystal-coding plasmid DNA band의 cry gene 확인은 PCR을 수행한 후 1.5% agarose gel에서 50V로 35분간 전기영동하여 확인하였다. Qiaex II gel extraction kit는 Qiagen의 protocol방법대로 사용하였다. KB098균주의 plasmid DNA를 전기영동한 agarose gel로부터 crystal-coding plasmid DNA band를 날카로운 메스로 절단하였다. QX1 buffer 600 $\mu$ l, 3차증류수 400 $\mu$ l 첨가한다. Qiaex II 30 $\mu$ l 첨가 후 30초 vortexing하여 혼탁시킨다. 50°C에서 10분간 incubate하여 gel을 녹인다. 30초간 원심분리하고 상청액을 피펫으로 조심스럽게 제거한다. 500 $\mu$ l QX1 buffer를 넣고 vortexing하여 펠렛을 세척한다. 30초간 원심분리하고 상청액을 제거한다. 500 $\mu$ l PE buffer를 넣고 vortexing한 후 30초간 원심분리 과정을 두 번하여 펠렛을 세척한다. 펠렛을 30분 공기건조한다. 3차증류수 20 $\mu$ l 넣고 펠렛을 재현탁한다. 30초간 원심분리한 후 상청액을 새튜브로 옮긴다.

#### 사. 신규 *Bacillus thuringiensis* 균주의 제형화에 대한 살충활성 시험

##### (1) 제형화 된 균주의 실내 생물활성 검정

- 세로운 제형 565-1, 566-1, 565-2, 566-3, 565-4, 566-4를 실내 생물검정을 통해 담배거세미나방, 과밤나방, 배추 좀나방, 회양목명나방에 대한 살충활성 확인을 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup>, 10<sup>8</sup>(cfu/ml)의 농도와 10<sup>7</sup>(cfu/ml)을 기준으로 5배, 10배, 50배의 농도로 희석하여 생물검정에 사용하였다. 담배거세미나방과 과밤나방에 대한 생물활성 검정은 150 $\mu$ l의 희석액을 1g의 인공사료에 첨가하여 유충을 5마리씩 petri dish에 넣고 6반복 실시하여 120시간 동안 치사율을 조사하였다. 회양목명나방에 대한 생물활성 검정은 유충을 대상으로 회양목잎을 이용한 잎침지법(Tabashnik *et al.*, 1990, Shelton *et al.*, 1993)을 수행하였다. 잎 disk(직경 5cm)를 40ml의 배양액에 침지하였고, 실온에서 1시간동안 음전하였다. 대조구는 잎 disk를 증류수에 동일한 조건으로 처리하였다. 처리된 잎 disk는 filter paper를 깔아놓은 petri dish에 옮긴 후 유충 각 10마리씩 넣고 3반복 실시하여 72시간동안 치사율을 조사하였다.

#### 아. 선발된 2개 균주의 대량배양 및 상품화 제형으로 포장 실증시험(배추 좀나방, 담배거세미나방, 과밤나방 등 청벌례 위주 선발)

##### (1) 열무 시설하우스에서의 담배거세미나방 살충효과검정 (야외살충실험)

- 선발된 다음의 약제에 대하여 야외에서 살충효과를 검정하였다. 약제는 (제형2)565, (제형3)565,

(제형4)565, (제형4)566을  $10^6$ ,  $10^7$ (cfu/ml)의 농도로 대조구, 무처리와 비교하여 실험 하였다. 실험장소는 대전광역시 유성구에 위치한 충남대 하우스 포장에서 열무 정식 후 담배거세미나방을 방사하여 실험하였다. 실험은 각 약제당 3반복 하였으며, 처리 전 담배거세미나방의 유충을 조사한 후 반자동분무기를 이용하여 골고루 살포하였다, 이 후 3일차 5일차에 생충수를 확인하였다.

#### (2) 고추 시설하우스에서의 담배나방 살충효과 검정

- 선발된 다음의 약제에 대하여 야외에서 살충효과를 검정하였다. 약제는 (제형2)565, (제형3)565, (제형4)565, (제형4)566을  $10^6$ ,  $10^7$ (cfu/ml)의 농도로 대조구, 무처리와 비교하여 실험 하였다. 실험장소는 충북 청주시 상당구 남일면에 위치한 고추 시설하우스포장에서 발생한 담배나방에 대하여 실험하였다. 5개의 고추기주의 열매를 모두 조사한 후, 담배나방의 섭식흔이 있는 열매를 조사하여 백분율로 나타냈다. 약제 처리는 처리구 당 각각 3반복하였으며, 반자동분무기를 이용하여 살포한 뒤 5일차, 10일차에 섭식흔을 확인하였다.

#### (3) 열무 시설하우스에서 배추순나방 살충효과 검정

- 선발된 다음의 약제에 대하여 야외에서 살충효과를 검정하였다. 약제는 (제형4)565, (제형4)566을  $10^6$ ,  $10^7$ (cfu/ml)의 농도로 대조구, 무처리와 비교하여 실험 하였다. 실험 장소는 대전광역시 유성구에 위치한 충남대 하우스 포장에서 열무 정식 후 자연 발생한 배추순나방에 대하여 실험하였다. 실험을 각 약제당 3반복하였으며, 처리전 배추순나방의 유충 또는 잎이 말려있는 상태의 유충을 조사하였다. 그 다음 반자동분무기로 각 처리구에 골고루 살포하여, 이후 3일차, 7일차에 생충수를 조사하였다.

#### (4) 배추 노지포장에서의 파밤나방 살충효과 검정

- 선발된 다음의 약제에 대하여 야외에서 살충효과를 검정하였다. 약제는 (제형4)565, (제형4)566을  $10^6$ ,  $10^7$ (cfu/ml)의 농도로 대조구, 무처리와 비교하여 실험 하였다. 실험장소는 대전 광역시 유성구 장대동에 위치한 충남대 부속농장에서 배추를 정식 후 자연 발생한 파밤나방에 대하여 실험하였다. 실험은 각 약제당 3반복 하였으며, 처리 전 파밤나방의 유충을 조사한 뒤 반자동분무기를 이용하여 처리구에 골고루 살포하였다. 이 후 3일차 5일차에 생충수를 확인하였다.

자. 국내에서 기주범위가 다른 새로운 *B. thuringiensis* 균주의 선발(2균주)

#### (1) 중국 연변대학 농학원 심립과학학부로부터 백두산 부근에서 채집하여 분리한 BT 18균주의 생태학적 특성 조사

## 1) *Bacillus thuringiensis* 균주의 분리

- 백두산 인근 토양을 채취하여 분리한 16개의 *B. thuringiensis*균주를 중국 연변대학 농학원 삼림과학부로부터 분양받았다. *B. thuringiensis*의 포자와 내독소단백질결정체의 형태를 관찰하기 위해 Nutrient agar medium(Difco Detroit, MI, USA)에 도말한 후 27°C에서 4~5일 배양하였다. 배지 상에서 증식하여 autolysis가 일어난 *B. thuringiensis* 균주를 위상차현미경(Olympus BX51)으로 관찰하였다(Kim et al., 1995a).
- 생물활성 검정 후 파밤나방에 활성이 높은 4개의 *B. thuringiensis* 균주를 목원대학교 미생물생태자원연구소에 등정을 의뢰하여 16S rRNA 유전자 염기서열 분석 및 flagellin gene을 이용한 결과를 확인하였다.

## 2) 실험곤충

- 본 실험에 사용된 파밤나방(*Spodoptera exigua*)과 담배거세미나방 (*Spodoptera litura*)은 농촌진흥청 농업과학기술원으로부터 분양받아 인공사료(Goh et al., 1990)를 이용하여 누대 사육한 개체를 사용하였다. 배추좀나방(*Plutella xylostella*)은 야외개체군을 채집하여 배추를 먹이로 공급하여 누대 사육하였고, 성충의 먹이로는 10% 설탕물을 산란상자(직경: 20cm, 높이: 15cm의 플라스틱)에 공급하였다. 이집트숲모기(*Aedes aegypti*)는 충남대학교 곤충생리학 실험실에서 분양받아 누대 사육한 개체를 사용하였다. 모든 곤충은 온도 25±1°C, 광조건 16L:8D, 상대습도 50~60%의 조건에서 사육하였다. 왕담배나방(*Helicoverpa armigera*)은 충남 예산의 고추밭에서 채집한 개체를 직접 실험에 사용하였다.

## 3) 생물활성검정

- *B. thuringiensis* 균주를 nutrient agar medium에 접종하고 27°C에서 5일 동안 배양하여 위상차현미경으로 autolysis가 일어나는 것을 확인한 후 집균하였다. 원심분리 후 상청액을 버리고 남은 펜렛에 멸균수 2ml을 첨가하여 약  $1.0 \times 10^8$  농도에 해당하는 균액을 생물검정에 사용하였다.
- 파밤나방과 담배거세미나방에 대한 생물활성검정은 약  $1.0 \times 10^8$ (cfu/ml)에 해당하는 희석액  $200\mu\ell$ 을 1g의 인공사료에 살포한 후 3령 유충을 5마리씩 접종하였다. 왕담배나방은  $2 \times 2$ cm의 고추를  $1.0 \times 10^8$ (cfu/ml)에 해당하는 희석액에 침지한 뒤 음전하여 3~5령이 혼재한 유충을 5마리씩 접종하여 관찰했다. 총 3반복 수행하였으며 24시간 단위로 120시간 동안 사충률을 조사하였다. 배추좀나방에 대한 생물검정은 Tabashnik et al. (1990)의 방법에서 일 디스크 침지법을 일부 수정하여 실시하였다.  $3 \times 3$ cm의 배추잎을 약  $1.0 \times 10^8$ (cfu/ml)에 해당하는 희석액에 침지한 후 음전하여 3령 유충 10마리씩을 접종했다. 총 3반복 수행하였으며 24시간 단위로 72시간 동안 사충률을 조사하였다. 이집트숲모기에 대한 생물활성검정은 WHO(2005)의 실험 방법을 일부 수정하여 실험하였다. 부화한지 3~5일 경과한 유충을 10마리씩 30ml의 물이 담긴 90ml 용량의 플라스틱 용기에 넣고,  $1.0 \times 10^6$  (cfu/ ml)에 해당하는 균액  $300\mu\ell$ 을 접종하였다.

72시간동안 치사율을 조사하였고, 3반복 실험하였다.

- 살충활성을 비교하기 위하여 국내 시장에서 판매되고 있는 *B. thuringiensis* 균주를 이용한 방제제 중 이번 연구에서 선발한 균주와 혈청형이 같거나 표기되지 않은 6종류의 제품을 선정하여 파밤나방에 대한 생물활성검정을 실시하였다. 포트실험은 72×72×200cm의 용기에 6개 제품과 *B. thuringiensis* 균주의 균일 희석액을 상추에 처리하고 파밤나방 3령 유충을 접종하여 관찰하였다.
- 반수치사농도( $LC_{50}$ ) 및  $LC_{95}$ 값은 유충이 전부 사망하는 농도와 생존하는 농도까지 5~7구간의 사충률을 바탕으로 SPSS(IBM SPSS statistics 22)프로그램을 이용하여 probit 분석을 통해 산출하였다.

#### 4) SDS-PAGE 분석

- 대상 시료를 준비하기 위해 *B. thuringiensis* 균주를 Nutrient agar medium에 접종하고 27°C에서 5일 동안 배양하여 위상차현미경으로 autolysis가 일어나는 것을 확인한 후, PBS buffer를 사용하여 원심튜브에 15,000rpm으로 4°C에서 10분간 원심분리 하였다. 원심 후, 상청액은 버리고 washing buffer I (500mM NaCl, 2% Triton X-100)은 3번, washing buffer II (500mM NaCl)는 2번 세척하였다. 세척된 parasporal inclusions는 멸균수를 첨가한 후 실험에 사용될 때 까지 -20°C에 보관하였다(Lee et al., 2015).
- 소화반응에 사용할 중장액은 파밤나방 30마리의 5령 유충을 -4°C에 10초간 둔 후, 멸균된 해부용 칼을 이용하여 분리한 중장을 2ml 튜브에 넣고 13,000rpm, 15분간 원심분리 하였다(Jin et al., 2015). 연한 갈색을 띠는 상청액만 에펜돌프튜브에 넣어 실험에 사용될 때 까지 -20°C에 보관하였다(Zhong et al., 2000).
- SDS-PAGE는 Laemmli(1970)의 방법을 일부 수정하여 실험하였다. 본 실험에서 선발한 *B. thuringiensis* 균주의 단백질 패턴 분석을 위해 에펜돌프튜브에 parasporal inclusions 5 $\mu$ l를 접종한 후 50mM NaOH 수용액 700 $\mu$ l를 첨가하여 5분 동안 상온 반응하였다. 13,000rpm, 4°C에서 5분간 원심분리한 후 상청액은 버리고 sample buffer를 20 $\mu$ l 첨가한 후 균이 풀어 질 때까지 vortexing 하였다. vortexing 후, 단백질의 변성을 막기 위해 즉시 100°C에서 10분 동안 열처리 하고 얼음에 1분 동안 담가두었다. 에펜돌프튜브를 얼음에서 끼내 13,000rpm으로 상온에서 1분 동안 원심분리 후 12% separating gel과 5% stacking gel에 접종하였다(Garcia-carreno et al., 1993). 전기영동이 끝난 gel은 30% ethanol, 10% acetic acid, 0.5% coomassie brilliant blue G-250으로 염색하였고, 30% ethanol, 10% acetic acid로 탈색하였다. 파밤나방 중장액의 소화에 의한 반응 실험은 parasporal inclusions 5 $\mu$ l와 중장액 1 $\mu$ l를 혼합하여 교반한 후, 37°C에서 15분간 반응시켜 사용하였다(Jin et al., 2009).

#### 5) Plasmid DNA 추출

- 선발된 *B. thuringiensis* 균주를 Luria-Bertani medium(Difco, USA) 10ml에 접종하여 30°C,

220rpm의 조건하에 16시간동안 배양하였다. 배양액 1ml을 SPY medium(0.2%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1.4%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.6%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.1% sodium citrate, 0.02%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.2 yeast extract, 0.1% glucose) 100ml에 접종하여 OD<sub>600</sub> 측정값이 0.6~0.8이 될 때까지 4시간 정도 배양 하였다. 배양된 균을 plasmid mini prep kit ver2.0(Biofact)를 사용하여 추출하고, 1.0% agarose gel에서 50V로 60분 동안 전기영동하여 결과를 확인하였다.

## 6) PCR 분석

- *B. thuringiensis*의 내독소 유전자의 Cry형 유전자를 확인하기 위해 gene-specific primer set를 사용하였다. PCR의 증폭은 Thermal Cycle C1000TM(BIO-RAD)을 사용하였다. 샘플은 완충액 성분과 dNTP등이 함유된 premix (Bioneer)에 주형 DNA 1.0 $\mu\text{l}$ , primer set 각각 1.0 $\mu\text{l}$ , 중류수 17 $\mu\text{l}$ 를 혼합하여 최종 volume을 20 $\mu\text{l}$ 로 수행하였다. PCR condition은 95°C 5분, 30cycles, 94°C 1분, 57°C 1분, 72°C 1분, 72°C 5분으로 수행하였으며 1.2% agarose gel에 100V, 30min 조건으로 전기영동하여 확인하였다(Yang *et al.*, 2011, Abdullah *et al.*, 2009, Ye *et al.*, 2009).

Cry genes	forward primer	Reverse primer	Size of product (bp)
cry1Aa	GAGCCAAGCGACTGGAGCAGTTTA CACC	cry13' ATCACTGAGTCGCTTCGCATCTTGAC TTTCTC	782
cry1Ab	TCGAATTGAATTGTTCC	cry13'	238
cry1Ac	GTCCAACCTTATGAGTCACCTGGG CTTC	cry13'	550
cry1B	GTCCAACCTTATGAGTCACCTGGG CTTC	cry13'	902
cry1C	CAACCCTATTGGTGCAGGTTC	cry13'	288
cry1D	GGTACATTAGATGTTCACAGCCA C	cry13'	465
cry1E	CTTAGGGATAAAATGTAAGTACAG	cry13'	961
cry1F	CCGGTGACCATTAACATTCCAAT C	cry13'	383
cry1G	ATATGGAGTGAATAGGGGG	TGAACGGCGATTACATGC	235
cry1I	GCTGTCTACCATGATTGGCTTG	CAGTGCAGTAACCTTCTCTTG	1584
cry2A	CAGATACCCCTGCTGGTGTAA	ATAGGCCCGTGCTCCACCAGG	1073
cry3	CGTTATCGCAGAGAGATGACATTA AC	CATCTGTTGTTCTGGAGGCAAT	589
cry3A	CCGAACAATCGAAGTGAA	ATAGATGGTCCACTT	1964
cry3B	CCGAACAATCGAAGTGAA	GAATCCTGTGCACCTAA	1359

cry3C	CCTGAAAATTACAGGCC	AATTGATCAATAGAAC	1135
cry3D	CCGAACAATCGAAGTGAA	ATTGTTGCCGTCAACAA	1074
cry4A	CGAGGTGAAATTGCTCC	ATGGCTTGTTCGCTACATC	1032
cry4B	GGTGCTTCCTATTCTTGGC	ATGGCTTGTTCGCTACATC	2610
cry4C	ATGAATCCATATCAAATAAG	AAGAACTTGTTTAATTAAC	2040
cry5	ATGGAAGATAGTTCTTAGAT	GGTAGATTTAATTCTAC	2174
cry9A	ATCATGCCATGGATCAAATAAACAA CGGAATTATTGG	CCGCTTCCAATAACATCTTT	571
cry9B	TCATTGGTATAAGAGTTGGTCTAT AGAC	CCTCCTAGACACAGGGATGATTTC AATT	402
cry9C	CTGCTCCCTTCAATCC	CCTCCTAGACACAGGGATGATTTC AATT	306
cry9D	CCGAGCTCTATGAATCGAAATAAT CAAATGAAT	CCTCCTAGACACAGGGATGATTTC AATT	1917

## (2) 제주도 8곳에서 채취한 토양으로부터 모기에 살충효과를 가지는 균주 선발

### 1) 토양시료 채집

- 토양 시료는 제주특별자치도 13곳에서 104개의 토양 샘플을 채취하였다. 시료는 토양 표면에서 약 10cm 깊이로 판 후 멸균된 시약스푼을 이용하여 채취하였으며 채취한 시료는 멸균된 플라스틱 봉지에 넣고 실험실로 가져와 4°C 냉장실에 보관하면서 실험에 사용하였다.

### 2) *Bacillus thuringiensis* 균주의 분리 및 동정

- *B. thuringiensis* 균주의 분리는 Ohba and Aizawa(1978) 방법을 사용하였다. 채취된 토양 시료의 1g을 시험관에 넣은 뒤 멸균수 9㎖을 넣고 3~4회 정도 강하게 교반하였다. 포자를 형성하지 못하는 세균들을 선택적으로 제거하기 위하여 65°C 항온수조에서 20분 동안 열처리하였다. 열처리 후 5분 동안 정치하여 흙을 가라앉히고 상층액을 10~3까지 희석하여 Nutrient agar plate에 고르게 도말하였다. 이 plate를 27°C 배양기에서 3~4일간 배양한 후 형성된 *Bacillus* colony를 중에서 외형이 *B. thuringiensis* 균주와 유사한 colony를 선별하였다. 선별된 colony들은 위상차현미경 1,000배로 관찰하여 내독소 단백질을 형성하는 균주를 선별하였다. 선별된 균주는 멸균수에 희석하여 위와 같은 방법으로 배양한 후, autolysis가 일어난 것을 확인하고 15,000rpm으로 15분간 원심분리기(Avanti J-E, Beckman)로 원심 분리하여 짐균하였다.

### 3) 위상차현미경과 주사전자현미경

- Nutrient agar plate상에서 증식하여 포자형성기가 지난 *B. thuringiensis* 균주의 포자와 내독소결정성단백질의 형태를 알아보기 위해 위상차현미경(Olympus BX51)을 이용하여

관찰하였다. 위상차현미경으로 관찰하기 위해 소량의 균주를 slide glass에 떨어뜨린 후 1,000배로 내독소결정성단백질의 형태를 관찰하였다(Kim et al., 1995).

#### 4) 공시곤충

- 본 실험에 사용된 나비목 해충인 담배거세미나방(*S. litura*), 과밤나방(*S. exigua*)은 인공사료(Gho et al., 1991)를 먹이로 이용하였고, 배추좀나방(*P. xylostella*)은 열무를 기주로 사용하였다. 성충의 먹이로는 10% 설탕물을 공급하였다. 파리목인 이집트金陵모기(*A.aegypti*)는 치어사료에 yeast extract를 첨가한 먹이로 사육하여 사용하였다. 모든 곤충은 충남대학교 생물적해충제어 실험실에서 온도 25±2°C, 광조건 16L:8D, 상대습도 50~60% 조건(Kim et al., 2008)에서 누대 사육하였다.

#### 5) 생물활성 검정 및 반수치사농도

- 선발된 7개의 *B. thuringiensis* 균주를 Nutrient Agar배지에 접종하고 27°C에서 5일 동안 배양 후 위상차현미경으로 내독소결정체단백질 형성을 관찰하면서 내독소 단백질을 형성하였을 때, 균을 모아 원심분리하였다. 상층액은 버리고 남은 펠렛에 멸균수를 첨가하여 10<sup>7</sup> 해당하는 배양액을 생물검정에 사용하였다. 살충활성을 비교하기 위해 실험실에서 보유하고 있는 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* 균주와 *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* 균주를 비교 균주로 사용하였다.
- 담배거세미나방과 과밤나방에 대한 생물활성 검정은 200μl의 배양액을 1g의 인공사료에 첨가하여 3령 유충을 5마리씩 petri dish에 넣고 6반복 실시하여 120시간 동안 치사율을 조사하였다.
- 이집트金陵모기에 대한 독성 검정은 알에서 부화한지 3-4일된 이집트金陵모기 유충 10마리씩 30mℓ의 물이 담긴 90mℓ플라스틱 컵에 넣고, 희석한 균액의 0.3mℓ를 접종하였다. 72시간 동안 치사율을 조사하고, 3반복 실험하였다.

#### 6) SDS-PAGE

- 각각의 균주를 Nutrient Agar배지에 접종하고 27°C에서 5일 동안 배양하여 위상차현미경으로 autolysis가 일어난 것을 확인한 후, 균을 모아 원심튜브에 15,000rpm으로 4°C에서 10분간 원심하였다. 원심 후 상청액은 버리고 균을 쟁어내어 일부 내성포자를 제거하면서 내독소결정성단백질을 수집하기 위해 washing buffer I (500mM NaCl, 2% Triton X-100)으로 2번, washing buffer II(500mM NaCl)으로 3번 세척하였다. 세척된 parasporal inclusion은 멸균수를 첨가한 후 1.5mℓ 마이크로튜브에 1mℓ씩 넣고 -20°C에 보관하였다. SDS-PAGE는 Laemmli(1970)의 방법을 일부 수정하여 12% separating gel과 5% stacking gel을 사용하였다. 전기영동이 끝난 gel은 0.5% Coomassie brilliant blue로 염색하였고, 12시간 털색하여 결과를 확인하였다.

차. 선발된 2개 균주의 대량배양 및 상품화 제형으로 포장 실증시험(배추즙나방, 담배거세미나방, 파밤나방 등 청벌례 위주 선발)

#### (1) 배추 노지포장에서의 담배거세미나방 살충효과 검정

- 선발된 균주의 상품화 제형과 원료의 실외 생물검정을 통해 담배거세미나방에 대한 살충활성을 확인하였다. 시제품의 처리농도에 따른 살충활성 정도를 알아보기 위해 에코파워 ×200, ×500, ×1,000, ×1,500와 원료 ×200, ×500, ×1,000, ×1,500을 대조구(토박이-동부한농), 무처리와 비교하여 실험하였다. 실험장소는 충북 진천군 이월면 중산리의 배추 농가로 2령 유충을 방사하여 실험하였다. 실험은 각 약제 당 3반복하였으며, 처리 전 담배거세미나방의 유충을 조사한 후 반자동분무기를 이용하여 골고루 살포하였다. 이후 3일차, 7일차에 생충수를 확인하였다.

#### (2) 배추 노지포장에서의 파밤나방 살충효과 검정

- 선발된 균주의 상품화 제형과 원료의 실외 생물검정을 통해 파밤나방에 대한 살충활성을 확인하였다. 시제품의 처리농도에 따른 살충활성 정도를 알아보기 위해 에코파워 ×200, ×500, ×1,000, ×1,500와 원료 ×200, ×500, ×1,000, ×1,500을 대조구(토박이-동부한농), 무처리와 비교하여 실험하였다. 실험장소는 대전광역시 유성구 장대동에 위치한 충남대 부속농장에 배추를 정식하여 2령 유충을 방사 후 실험하였다. 실험은 각 약제 당 3반복하였으며, 처리 전 파밤나방의 유충을 조사한 후 반자동분무기를 이용하여 골고루 살포하였다. 이후 3일차, 7일차에 생충수를 확인하였다.

#### (3) 들깨 노지포장과 열무 시설하우스에서의 담배거세미나방 살충효과 검정

- 선발된 균주의 상품화 제형과 시중에 판매중인 제품과의 비교실험을 통해 담배거세미나방에 대한 살충활성을 확인하였다. 약제는 선발된 균주의 상품화 제형인 에코파워 ×500, ×2,500와 시중에 판매중인 제품인 비티원-고려바이오, 솔빛채-그린바이오텍, 어그리-아리스타라이프사이언스, 에코사이드-대유, 토박이-동부한농, 무처리 총 8구역으로 실험하였다. 실험장소는 대전광역시 유성구 궁동 충남대학교 내 시설하우스에 열무를 파종한 곳과 장대동 충남대 부속농장에 들깨를 정식한 곳으로 담배거세미나방 2령 유충을 방사 후 실험을 실시하였다. 실험은 각 약제 당 3반복하였으며, 처리 전 담배거세미나방의 유충을 조사한 후 반자동분무기를 이용하여 골고루 살포하였다. 이후 3일차, 7일차에 생충수를 확인하였다.

#### (4) 열무 시설하우스에서의 배추흰나비 살충효과 검정

- 선발된 균주의 상품화 제형과 시중에 판매중인 제품과의 비교실험을 통해 배추흰나비에 대한 살충활성을 확인하였다. 약제는 선발된 균주의 상품화 제형인 에코파워 ×500, ×2,500와 시중에 판매중인 제품인 비티원-고려바이오, 솔빛채-그린바이오텍, 어그리-아리스타라이프사이언스,

에코사이드-대유, 토박이-동부한농, 무처리 총 8구역으로 실험하였다. 실험장소는 대전광역시 유성구 궁동 충남대학교 내 시설하우스에 열무를 과종한 후 자연벌생한 배추흰나비에 대하여 실험하였다. 실험은 각 약제 당 3번복하였으며, 처리 전 배추흰나비의 유충을 조사한 후 반자동분무기를 이용하여 골고루 살포하였다. 이후 3일차, 7일차에 생충수를 확인하였다.

#### (5) 양배추 노지포장에서의 파밤나방 살충효과 검정

- 선발된 균주의 상품화 제형과 시중에 판매중인 제품과의 비교실험을 통해 배추흰나비에 대한 살충활성을 확인하였다. 약제는 선발된 균주의 상품화 제형인 에코파워 ×500, ×2,500와 시중에 판매중인 제품인 비티원-고려바이오, 솔빛체-그린바이오텍, 어그리-아리스타라이프사이언스, 에코사이드-대유, 토박이-동부한농, 무처리 총 8구역으로 실험하였다. 실험장소는 대전광역시 유성구 장대동에 위치한 충남대 부속농장에 양배추를 정식한 곳으로 파밤나방 2령 유충을 방사한 후 실험을 실시하였다. 실험은 각 약제 당 3번복하였으며, 처리 전 배추흰나비의 유충을 조사한 후 반자동분무기를 이용하여 골고루 살포하였다. 이후 3일차, 7일차에 생충수를 확인하였다.

## 2. 연구 수행 결과

### 가. 나비목 해충에 새로운 효과를 나타내는 *Bacillus thuringiensis* 균주의 선발 및 특성 규명

#### (1) *B. thuringiensis* 균주 분리

- 충청북도 영동, 옥천의 산과 들 26곳에서 토양을 채취하여 새로운 *B. thuringiensis* 균주 분리의 가능성을 확인하였다. 26개의 토양시료 중 6개의 토양에서 *B. thuringiensis* 균주가 분리되어 23%의 높은 비율로 나타났다(Table 1). 토양을 채취하여 스크리닝 한 후 분리 선발된 8개의 *B. thuringiensis* 균주의 기주 범위 및 살충활성을 검정하기 위하여 나비목 해충인 담배거세미나방, 배추좀나방, 파밤나방과 파리목 해충인 이집트衾모기 등 4종류의 해충에 살충활성을 검정하였다(Table 2). 시험한 결과, 8개 균주들의 활성범위 중 배추좀나방에서 6개의 균주로 가장 많은 수가 분리되었다. 이 중 CAB565, CAB566, CAB567 균주가 이 해충에 대해서 90% 이상의 높은 살충활성을 나타냈다. 또한 담배거세미나방에 CAB565, CAB566, CAB567 균주, 파밤나방에 CAB565, CAB566 균주가 90% 이상의 높은 살충활성을 나타내었다. 그리고 이집트衾모기에는 CAB565, CAB566 균주가 나비목보다 낮은 70% 이상의 살충활성을 나타내었다. CAB565, CAB566 균주는 담배거세미나방, 배추좀나방, 파밤나방, 이집트衾모기 등 4종의 곤충에 모두 높은 살충활성을 가지는 것으로 나타내어 최종 신규균주로 선발하였다. 선발한 두 균주의 crystal형태를 관찰하기 위해 위상차현미경으로 확인한 결과 CAB565, CAB566 균주는 일반적인 bipyramidal 형태의 crystal임을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

Locality	Number of soil sample examined	Number of soil sample with <i>Bt</i> isolated	Leptoptera					Diptera	
			Tsetse larvae	Spodoptera litura	Spodoptera exigua	Pitella cyathella	Aedes vexans	Diptera	
Young-dong			CAB559	-	-	-	-	-	
1> Mountain	5	3	CAB560	-	-	-	-	-	
2> Field	9	2	CAB561	+	+	++	+		
Ok-cheon			CAB562	+	+	++	-		
1> Mountain	4	2	CAB563	-	-	+	-		
2> Field	8	1	CAB565	---	---	---	--		
Total	26	8	CAB566	---	---	---	--		
			CAB567	---	++	---	+		

**<Table 1>** 26개 토양샘플에서 분리한 *B. thuringiensis* 균주

**<Table 2>** 나비목 3종(담배거세미나방, 과밤나방, 배추좀나방) 및 모기 1종에 대한 살충활성검정

## (2) 생물활성검정

- 신규균주로 선발한 CAB565, CAB566균주와 실험실에 보유하고 있는 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* KB098 균주와 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KB099 균주를 비교 균주로 사용하였고, 혈청형이 *aizawai*이면서 생물농약으로 시판중인 TB-WP 제품과 비교 검정 하였다. 담배거세미나방 2령 유충에 대한 LC<sub>95</sub>값이 CAB565 균주에서  $0.8 \times 10^5$ (cfu/ml)으로 비교균주인 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KB099 균주와 TB-WP 제품에 비해서 상당히 높은 살충활성을 나타내는 것으로 확인되었다. 3령에 대한 LC<sub>95</sub>값은 CAB566 균주가  $0.7 \times 10^7$ (cfu/ml)으로 가장 높은 살충활성을 보였고, 4령 역시  $0.9 \times 10^7$ (cfu/ml)으로 비교균주인 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* KB098 균주와 TB-WP 제품에 비해서 상당히 높은 살충활성을 나타내는 것으로 확인하였다(Table 3). 과밤나방 유충에 대한 결과는 CAB566 균주에서 2령부터 5령 유충에 대한 LC<sub>95</sub>값이 각각  $2.9 \times 10^5$ (cfu/ml),  $2.0 \times 10^6$ (cfu/ml),  $3.9 \times 10^6$ (cfu/ml),  $0.8 \times 10^8$ (cfu/ml)으로 비교균주에 비해서 상당히 높은 살충활성을 나타내는 것으로 확인되었다(Table 4). 담배거세미나방과 과밤나방에 대한 CAB565, CAB566 균주와 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* KB098, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KB099균주, TB-WP 제품의 정확한 생물검정과 속효성을 비교하기 위해 동일한 농도로 2령 유충에 처리한 후 확인해 본 결과 담배거세미나방의 경우 CAB565 균주, 과밤나방의 경우 CAB566 균주가 다른 균주와 제품에 비해 가장 고독성을 나타내었으며, 더 빠른 살충효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2, 3). 배추좀나방에 대한 CAB565, CAB566 균주와 비교균주와의 정확한 생물검정과 속효성을 비교하기 위해 동일한 농도로 3령부터 5령 유충에 처리한 후 확인해 본 결과 CAB565, CAB566 균주가 다른 균주와 제품에 비해 가장 고독성을 나타내었으며, 더 빠른 살충효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

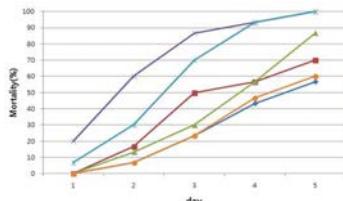
**<Fig. 1>** 신규 균주의 내독 소단백질형태의 관찰

Strain	Developmental stages		
	2 <sup>nd</sup> (cfu/ml)	3 <sup>rd</sup> (cfu/ml)	4 <sup>th</sup> (cfu/ml)
KB098	$3.4 \times 10^7$	$> 10^9$	$> 10^9$
KB099	$4.6 \times 10^6$	$0.6 \times 10^8$	$1.1 \times 10^8$
CAB530	$2.8 \times 10^6$	$1.0 \times 10^6$	$> 10^9$
CAB565	$0.8 \times 10^5$	$0.8 \times 10^6$	$> 10^9$
CAB566	$0.9 \times 10^5$	$0.7 \times 10^7$	$0.9 \times 10^7$
TB-WP	$2.3 \times 10^4$	$> 10^9$	$> 10^9$

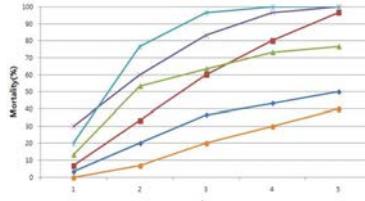
<Table 3> 담배거세미나방에 대한 신규균주와 기존균주의 LC<sub>95</sub>값 비교

Strain	Developmental stages			
	2 <sup>nd</sup> (cfu/ml)	3 <sup>rd</sup> (cfu/ml)	4 <sup>th</sup> (cfu/ml)	5 <sup>th</sup> (cfu/ml)
KB098	$4.0 \times 10^7$	$0.8 \times 10^8$	$0.9 \times 10^8$	$4.7 \times 10^8$
KB099	$4.7 \times 10^6$	$1.0 \times 10^7$	$0.8 \times 10^8$	$2.7 \times 10^8$
CAB530	$2.0 \times 10^6$	$1.5 \times 10^7$	$0.8 \times 10^8$	$0.9 \times 10^8$
CAB565	$4.0 \times 10^5$	$2.7 \times 10^6$	$0.5 \times 10^7$	$4.6 \times 10^7$
CAB566	$2.9 \times 10^5$	$2.0 \times 10^6$	$3.9 \times 10^6$	$0.8 \times 10^8$
TB-WP	$1.7 \times 10^8$	$0.6 \times 10^9$	$> 10^9$	$> 10^9$

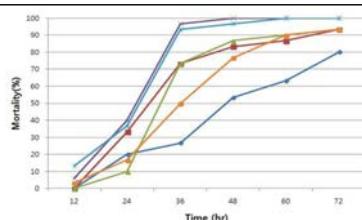
<Table 4> 과밤나방에 대한 신규균주와 기존균주의 LC<sub>95</sub>값 비교



<Fig. 2> 신규균주와 기존균주의 담배거세미나방 2령 유충의 시간별 생물활성검정



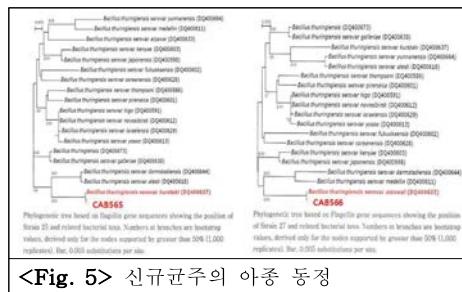
<Fig. 3> 신규균주와 기존균주의 과밤나방 2령 유충의 시간별 생물활성검정



<Fig. 4> 신규균주와 기존균주의 배추좀나방 시간별 생물활성검정

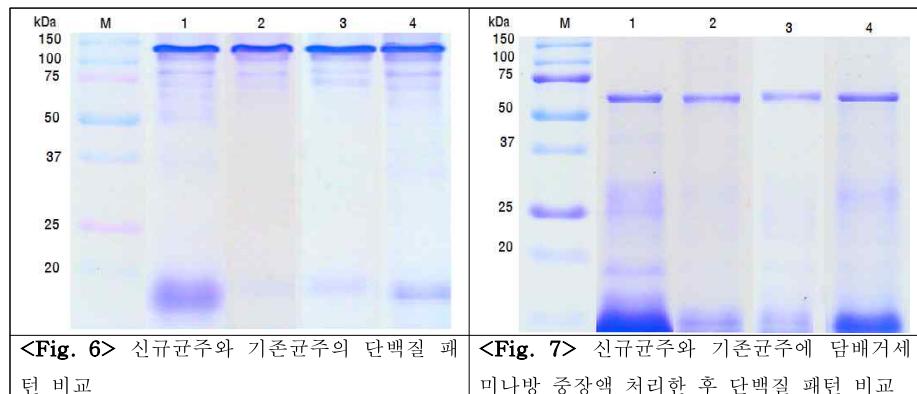
### (3) *B. thuringiensis* 균주 동정

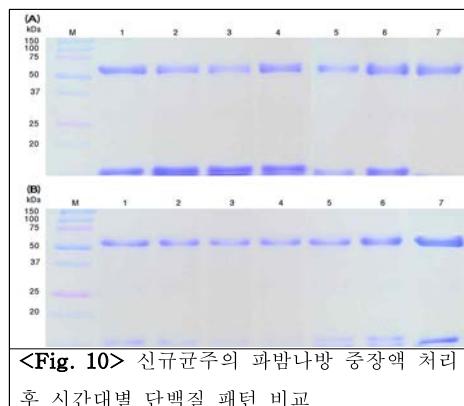
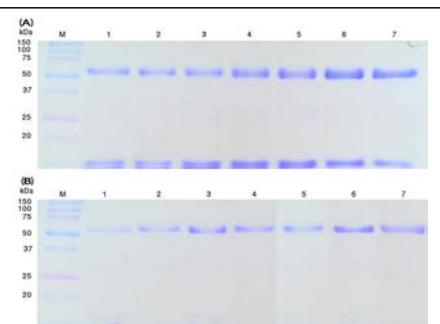
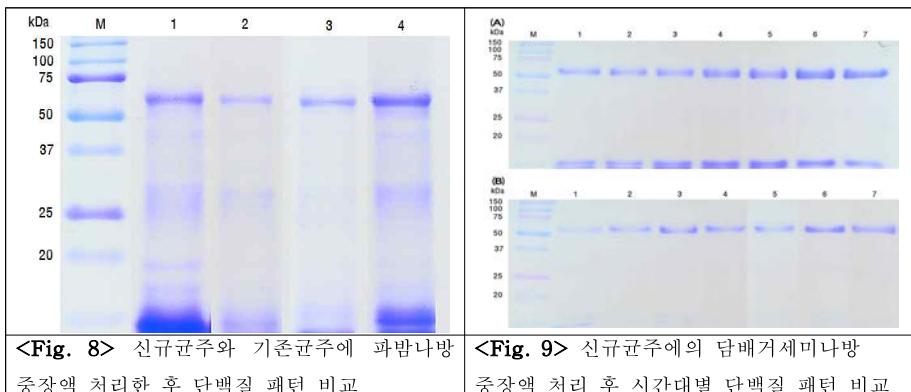
- 분리된 8개의 *B. thuringiensis* 균주 중 2개의 균주를 목원대학교 미생물생태자원연구소에서 flagellin C 유전자에 의해 동정을 수행한 결과, CAB565 균주는 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*로 분류되었고, CAB566 균주는 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*로 분류되었다(Fig. 5).



#### (4) *B. thuringiensis* 균주의 단백질 분석( SDS-PAGE)

- 신규균주를 SDS-PAGE하여 단백질 패턴을 조사하였다. CAB565 균주는 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KB099 균주와 같은 130kDa의 벤드가 확인 되었으며, 매우 유사한 패턴을 나타내 *kurstaki* strain으로 추정할 수 있었다. CAB566 균주는 *B. thuringiensis* subsp. *atazawai* KB098 균주와 같은 130kDa이 확인되었으며, 같은 크기의 유사한 벤드 2개를 확인할 수 있었다(Fig. 6). 두 균주의 parasporal inclusion의 활성 독소 양상을 확인하기 위해 담배거세미나방과 파밤나방의 중장액을 추출하여 각 균주와 37°C에서 반응시켜 보았다. 담배거세미나방의 중장액을 처리하였을 때 CAB565 균주와 CAB566 균주의 130kDa의 전독소가 중장액에 의해 분해되어 약 65kDa의 독소단백질 벤드를 확인할 수 있었다(Fig. 7). 파밤나방의 중장액을 처리하였을 때도 마찬가지로 CAB565 균주와 CAB566 균주의 130kDa의 전독소가 중장액에 의해 분해되어 약 65kDa의 독소단백질 벤드를 확인할 수 있었다(Fig. 8). CAB565, CAB566 균주에 중장액처리시 65kDa의 활성 독소 단백질이 시간에 따라 유지되는지 확인하였다. CAB565, CAB566 균주에 담배거세미나방과 파밤나방의 중장액을 처리 한 후 1분, 5분, 10분, 15분, 6시간, 12시간, 22시간까지 반응시켜 단백질 패턴을 분석하였다. 그 결과 두 균주 모두 22시간까지 65kDa의 활성독소가 유지됨을 확인하였다(Fig. 9, Fig. 10).





### (5) *B. thuringiensis* 균주의 분자유전학적 특성

- *B. thuringiensis*가 가지고 있는 crystal proteins을 확인하기 위해 PCR 분석을 이용하였다. 이전 실험실에서 파밤나방에 활성을 보인 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* KB098 균주는 *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1C*, *cry1D* 유전자를 가지고 있었고, 담배거세미나방에 활성을 보인 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KB099 균주는 *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1C*, *cry1D*, *cryII* 유전자를 가지고 있었다(Table 5). 본 실험에서 분리동정된 CAB565 균주는 *cry1Aa*, *cry1Ac*, *cryII* 유전자를 가지고 있음이 확인되었으며, 이는 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KB099 균주가 가지고 있는 크리스탈 유전자와 유사한 경향을 나타냈다(Fig. 11A). 또한 CAB566 균주는 *cry1Aa*, *cry1C*, *cry1D*, *cryII* 유전자를 가지고 있음이 확인되었으며, 이는 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* KB098 균주와 일치성을 나타냈다(Fig. 11B).

Strain	cry genes
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kustaki</i> CAB565	<i>cryIAa</i> , <i>cryIAc</i> , <i>cryII</i>
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kustaki</i> KB099	<i>cryIAa</i> , <i>cryIAb</i> , <i>cryIC</i> , <i>cryID</i> , <i>cryII</i>
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i> CAB566	<i>cryIAa</i> , <i>cryIC</i> , <i>cryID</i> , <i>cryII</i>
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i> KB098	<i>cryIAa</i> , <i>cryIAb</i> , <i>cryIC</i> , <i>cryID</i> ,

**A**

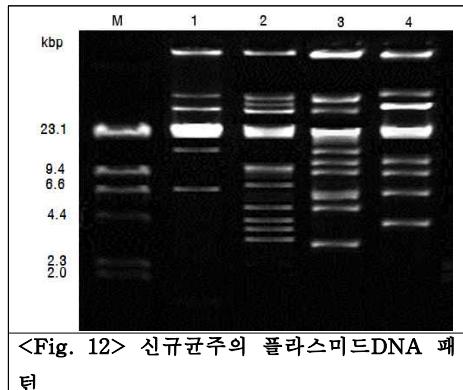
**B**

<Table 5> 신규균주의 cry 유전자 확인

<Fig. 11> 신규균주의 cry 유전자 확인

#### (6) Plasmid DNA 분석

- CAB565 균주와 대조균주로서 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KB099 균주를 사용하였고, CAB566 균주와 대조균주로서 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* KB098 균주를 사용하여 plasmid DNA 패턴을 확인하였다(Fig. 12). CAB565 균주의 전체 plasmid DNA를 분석한 결과, 같은 혈청형임에도 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KB099 균주와 다른 패턴의 plasmid DNA를 가지고 있었다. CAB565 균주는 10개, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KB099 균주는 5개의 plasmid DNA를 포함하고 있는 것으로 조사되었다. 또한, CAB565 균주에서는 23.1kb보다 큰 plasmid DNA 밴드가 3개, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KB099는 2개를 가지고 있는 것을 확인할 수 있었으며, CAB565 균주는 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KB099에 존재하지 않는 9.4kb와 4.4kb 이하의 밴드를 확인할 수 있었다. 앞의 결과와 마찬가지로 CAB566 균주의 전체 plasmid DNA를 분석한 결과, 같은 혈청형임에도 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* KB098 균주와 다른 패턴의 plasmid DNA를 가지고 있었다. CAB566 균주는 7개, *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* KB098 균주는 9개의 plasmid DNA를 포함하고 있는 것으로 조사되었다. CAB566 균주와 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* KB098 균주에서 23.1kb보다 큰 plasmid DNA 밴드 2개가 확인되었고, 6.6kb 밴드를 확인할 수 있었다. CAB566 균주는 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* KB098에 존재하지 않는 9.6kb와 4.4kb 밴드를 확인 할 수 있었으며, 4.4kb 이하의 밴드를 보이지 않음으로서 차이를 확인할 수 있었다.



#### 나. 신규 *Bacillus thuringiensis* 균주의 대량배양액을 이용한 친환경농자재 예비 실험

- 우진에서 배양한 1차, 2차, 3차 배양액을 생물검정하였다(Table 6). 1차 배양액 중 1차WJ565 배양액은  $10^7$ (cfu/ml)농도에서 담배거세미나방 2령유충에 대해 100% 사충율을 나타냈으며  $10^8$ (cfu/ml) 농도에서는 3령 유충을 100% 사충율을 나타냈다(Table 7, 8). 과밤나방에 2령, 3령 유충에서  $10^7$ (cfu/ml),  $10^8$ (cfu/ml)농도에서 높은 사충효과를 나타냈다. 1차WJ566 배양액은 담배거세미나방, 과밤나방 2, 3, 4령에  $10^7$ (cfu/ml),  $10^8$ (cfu/ml)에서 높은 사충율을 나타냈다(Table 9, 10). 2차 배양액은 2차WJ566-2, 2차WJ566-3 배양액이 담배거세미나방 3령 유충에 90% 이상의 사충율을 나타냈고(Table 13, 14), 과밤나방 3령유충에는 2차WJ565-2, 2차WJ566-2 배양액이 90% 이상의 사충율을 나타냈다(Table 15, 16). 3차 배양액은 90% 이상의 사충율을 나타내지 않았다(Table 17-20).

##### (1) 1차 배양액 colony counting 및 각 나방류(담배거세미나방, 과밤나방) 생물검정

균주No.	cfu/ml
1차WJ565	$5.1 \times 10^8$
1차WJ566	$4.8 \times 10^8$

**<Table 6> 1차 배양액-colony counting**

cfu/ml	2nd	3rd	4th
$10^8$	-	100	26.7
$10^7$	100	26.7	13.3
$10^6$	13.3	3	13.3
$10^5$	0	0	-

<Table 7> 1차 WJ565 생물검정-담배거세미 나방 생물검정 사총률(%)

cfu/ml	2nd	3rd	4th
$10^8$	100	100	43.3
$10^7$	100	13.3	10
$10^6$	50	23.3	13.3
$10^5$	10	3	-

<Table 8> 1차 WJ565 생물검정-파밤나방 생물검정 사총률(%)

cfu/ml	2nd	3rd	4th
$10^8$	-	100	100
$10^7$	100	100	30
$10^6$	96.7	26.7	3
$10^5$	3	0	-

<Table 9> 1차 WJ566 생물검정-담배거세미 생물검정 사총률(%)

cfu/ml	2nd	3rd	4th
$10^8$	100	100	100
$10^7$	100	93.3	90
$10^6$	50	3	13.3
$10^5$	10	13.3	-

<Table 10> 1차 WJ566 생물검정-파밤나방 생물검정 사총률(%)

## (2) 2차 배양액 colony counting 및 각 나방류(담배거세미나방, 파밤나방) 3령 유충 생물검정

군주 No.	cfu/ml	제형
2차WJ565-0	$7.0 \times 10^8$	배양액 제형
2차WJ565-1	$6.6 \times 10^8$	corn starch 5%
2차WJ565-2	$3.9 \times 10^8$	sucrose 5%, corn starch 1%, lactic acid 0.1%
2차WJ565-3	$1.3 \times 10^9$	Tween80 10%

<Table 11> 2차 WJ565 배양액 colony counting

군주 No.	cfu/ml	제형
2차WJ566-0	$7.2 \times 10^8$	배양액 제형
2차WJ566-1	$3.8 \times 10^8$	corn starch 5%
2차WJ566-2	$1.1 \times 10^8$	sucrose 5%, corn starch 1%, lactic acid 0.1%
2차WJ566-3	$3.7 \times 10^9$	Tween80 10%

<Table 12> 2차 WJ566 배양액 colony counting

cfu/ml	2차WJ56 5-0	2차WJ56 5-1	2차WJ56 5-2	2차WJ56 5-3
109	-	-	-	26.7
108	-	-	73.3	3.3
107	13.3	3.3	3.3	10
106	3.3	3.3	-	-

<Table 13> 2차 WJ565 생물검정-담배거제 미나방 3령유충 사충률(%)

cfu/ml	2차WJ5 66-0	2차WJ5 66-1	2차WJ5 66-2	2차WJ5 66-3
109	-	-	-	93.3
108	-	-	97.7	30
107	60	80	33.3	10
106	6.7	13.3	-	-

<Table 14> 2차 WJ566 생물검정-담배거제 미나방 3령유충 사충률(%)

cfu/ml	2차WJ56 5-0	2차WJ56 5-1	2차WJ56 5-2	2차WJ56 5-3
109	-	-	-	63.3
108	-	-	96.7	10
107	23.3	26.7	40	3.3
106	10	6.7	10	-

<Table 15> 2차 WJ565 생물검정-파밤나방 3령유충 생물검정 사충률(%)

cfu/ml	2차WJ5 66-0	2차WJ5 66-1	2차WJ5 66-2	2차WJ5 66-3
$10^9$	-	-	-	86.7
$10^8$	-	-	93.3	56.7
$10^7$	50	73.3	40	10
$10^6$	0	6.7	20	-

<Table 16> 2차 WJ566 생물검정-파밤나방 3령유충 생물검정 사충률(%)

(3) 3차 배양액 colony counting 및 각 나방류(배추좀나방, 파밤나방, 담배거제미나방) 3령 유충 생물검정

spread법	cfu/ml
3차WJ565	$2.9 \times 10^9$
3차WJ566	$5.5 \times 10^8$

<Table 17> 3차 배양액-colony counting

cfu/ml	3차WJ565	3차WJ566
$10^6$	86.7	53.3
$10^5$	63.3	30
$10^4$	20	43.3

<Table 18> 3차 배양액-배추좀나방 3령 유충 생물검정 사충률(%)

cfu/ml	3차WJ565	3차WJ566
$10^8$	43.3	43.3
$10^7$	23.3	30
$10^6$	36.7	20
$10^5$	13.3	30

<Table 19> 3차 배양액-파밤나방 3령 유충 생물검정 사총률(%)

cfu/ml	3차WJ565	3차WJ566
$10^7$	3.3	6.7
$10^6$	3.3	0
$10^5$	0	0

<Table 20> 3차 배양액-담배거세미나방 3령 유충 생물검정 사총률(%)

#### 다. 농촌진흥청 농업미생물자원센터(KACC)에서 분양받은 세균에 대한 나방류 해충(담배거세미나방, 파밤나방, 배추좀나방)에 대한 살충활성검정

- 현재 분양받은 40균주 중 나비목 해충(담배거세미나방, 파밤나방, 배추좀나방)에 대한 살충활성 검정 결과 *Bacillus thuringiensis* (14615) 균주만 3종의 나비목 해충에 높은 독성을 나타냈으며 *Bacillus thuringiensis* (10172) 균주는 배추좀나방에 높은 독성을 나타냈다(Table 21). 20균주는 생물활성검정 중에 있으며 60균주는 농촌진흥청 농업미생물자원센터의 익산 신청사로의 이전 관계로 분양이 늦어져서 현재 분양을 요청중에 있다.

Number	resources number	Scientific Name	Lepidoptera		
			Plutella xylostella	Spodoptera litura	Spodoptera exigua
1	10372	<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-
2	14615		+++	+++	+++
3	13068	<i>Bacillus thuringiensis</i>	-	-	-
4	10168		-	-	-
5	10172		+++	-	+
6	17914	<i>Burkholderia pyrrocinia</i>	-	-	-
7	11218	<i>Burkholderia</i> sp.	-	-	-
8	10157		-	-	-
9	10232	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-
10	14021		-	-	-
11	10545		-	-	-
12	10238	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	-	-
13	10245		-	-	-
14	10318		-	-	-
15	10155		-	-	-
16	11753		-	-	-
17	13301	<i>Serratia</i> sp.	-	-	-
18	13763		-	-	-
19	11743		-	-	-
20	11744		-	-	-

21	10169
22	10170
23	10171
24	10173
25	10174
26	10175
27	10176
28	10177
28	10178
29	10179
30	10180
	<i>Bacillus thuringiensis</i>
31	10181
32	10182
33	10183
34	10184
35	12061
36	12072
37	12073
38	12074
39	12075
40	13073

Number	resources number	Scientific Name	Number	resources number	Scientific Name
41	13082		71	44103	
42	13753		72	44242	<i>Beauveria bassiana</i>
43	15000		73	17047	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i>
44	15634		74	14394	
45	10128		75	14741	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>izizenii</i>
46	10159	<i>Bacillus</i> sp.	76	17796	
47	10160		77	17797	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>
48	10233		78	17803	
49	10579		79	10111	
50	18088		80	10113	
51	13944		81	10793	
52	10223	<i>Burkholderia gladioli</i>	82	10806	
53	10340		83	10939	
54	11786		84	16750	<i>Bacillus subtilis</i>
55	11787		85	16869	
56	11787		86	17026	
57	11792		87	17117	
58	12774	<i>Burkholderia</i> sp.	88	17121	
59	12815		89	10156	
60	14108		90	11225	
61	15008		91	11750	<i>Serratia</i> sp.
62	15009		92	11760	
63	40039		93	11892	
64	40218		94	14611	
65	40224		95	14674	
66	40377		96	14686	
67	43302	<i>Beauveria bassiana</i>	97	14694	<i>Streptomyces</i> sp.
68	43303		98	14711	
69	43304		99	14842	
70	44102		100	20109	

<Table 21> 농업미생물자원센터(KACC) 분양균주의 3종 나비목 유충에 대한 살충 활성검정

#### 라. 토양스크리닝을 통해 분리한 균을 이용한 살선충 효과 검증

- 토양스크리닝을 통하여 총 15개의 세균을 분리하였고, 균 15개를 100배로 희석하여 살선충 효과를 확인하였다. 15개 균 중 4번, 15번 균주가 살선충 효과가 있는 것으로 확인되었고, 원액으로 생물검정하려하였으나, 현미경관찰이 어려운 점을 고려하여 100배로 희석하여 생물검정을 검정하였다(Table 22). 효과있는 균주로 선발한 4번, 15번 균주는  $10^7$ 농도로 생물검정 한 결과, 두 균주 모두  $10^7$ 농도에서 높은 살선충효과가 있는 것으로 나타났다(Table 23).

	약제 처리전	24h	48h
무처리	15	13	12
대조구	10	0	0
1	30	32	25
2	14	14	11
3	14	22	13
4	12	0	4
5	19	26	22
6	13	12	14
7	21	8	10
8	10	4	20
9	17	14	8
10	17	13	22
11	16	10	10
12	13	7	13
13	8	9	7
14	14	12	8
15	13	0	3

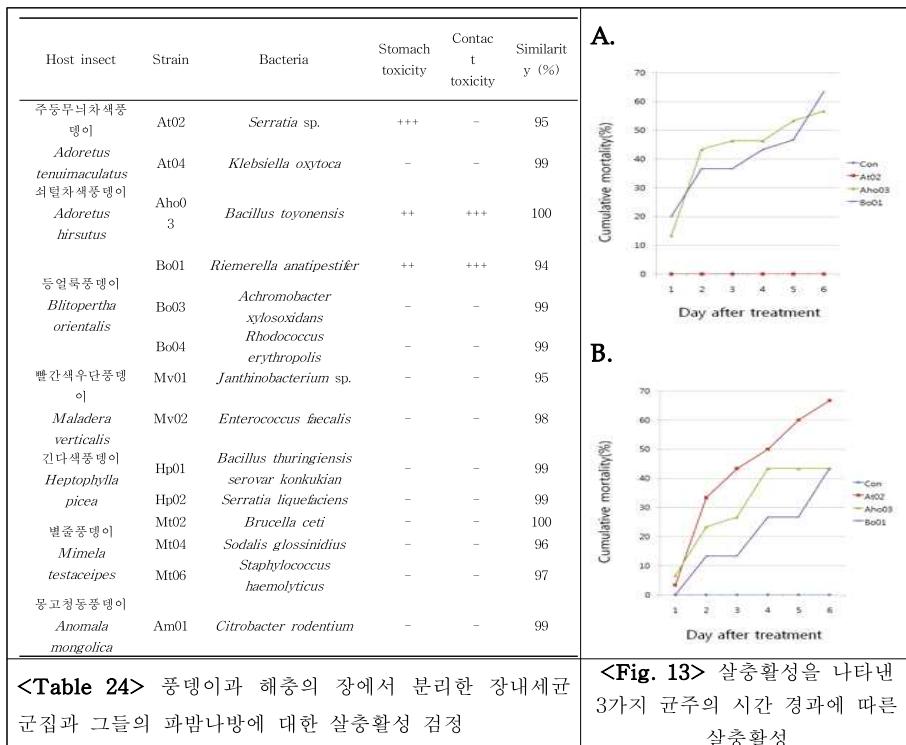
<Table 22> 토양스크리닝을 통해 분리한 군 15개의 살충총 효과

	처리전	24h	48h
A(No. 4)			
무처리	60	57	56
대조구	57	12	0
300 $\mu\ell$	39.95	0	2.6
400 $\mu\ell$	18.5	0	0
B(No. 15)			
무처리	24	24	18
대조구	51	3	6
300 $\mu\ell$	80.25	0.4	0.4
400 $\mu\ell$	56.05	0	0

<Table 23> 선발한 2균주의 10<sup>7</sup> 농도로 생물검정

#### 마. 풍뎅이과 7종에서 분리한 장내세균의 병해충 방제 가능성 검토

- Table 24에서 7종의 풍뎅이에서 분리되어 동정된 장내세균, 살충활성 능력은 다음과 같이 0~5-, 5~10+, 11~15++, 15~30++++로 표기하였다. 처리한 콜로니의 수는 At02 *Serratia sp.*: 2.15X10<sup>7</sup>, Aho03 *B. toyonensis*: 2.325X10<sup>7</sup>, Bo01 *R. anatipestifer*: 8.375X10<sup>6</sup> 다음과 같이 처리하였다. Table 24는 모든 실험에서 무처리구는 0%의 활성을 나타냈고 At02 *Serratia sp.*균주는 접촉에서만 6일차에 66.66%, Aho03 *B. toyonensis*균주는 식독에서 6일차에 56.66%와 접촉에서 43.33%를 나타냈고 Bo01 *R. anatipestifer*균주는 식독에서 6일차에 63.33%와 접촉에서 43.33%를 나타냈음을 보여준다(Fig. 13). *R. anatipestifer*균주는 오리의 폐혈증을 일으키는 균으로 알려져 사용하는데 주의 할 필요가 있고 *Serratia sp.*균주는 접촉에서만 살충활성을 보인 것으로 보아 작용기작을 알아보기 위해서는 추가 실험이 필요하다.



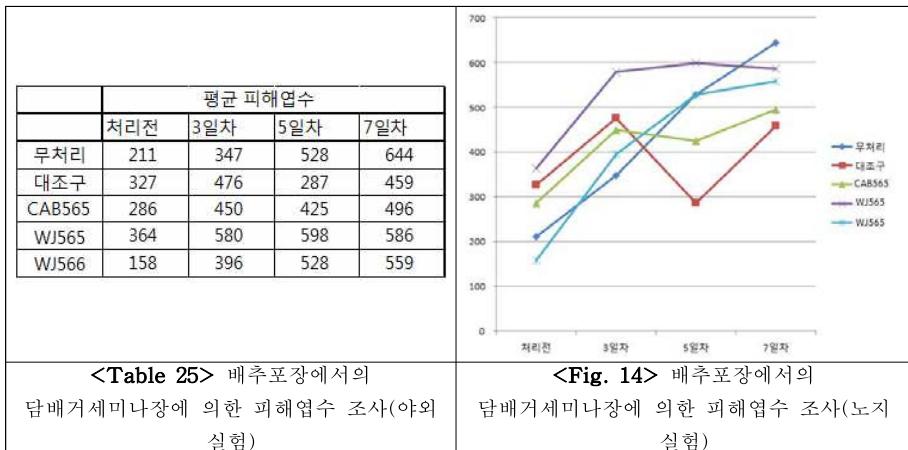
**<Table 24>** 풍뎅이과 해충의 장에서 분리한 장내세균 군집과 그들의 파밤나방에 대한 살충활성 검정

바. 배추, 무에 발생하는 담배거세미나방, 배추좀나방, 파밤나방의 방제방법 연구 개발(야외, 시설 하우스실험)

#### (1) 배추 포장에서의 담배거세미나방 살충효과검정(야외 실험)

- Table 25, Fig. 14은 약제 처리 전, 약제처리 후 3, 5, 7일 후 담배거세미나방에 의한 피해엽수를 조사한 결과이다. 무처리구는 피해가 꾸준히 증가하는 경향이며 이는 거세미의 유충이 성장하면서 섭식량이 증가하는 것을 나타낸다. 대조구(토박이)는 5일차에 피해가 급격히 줄어들어드는 것을 보인다. CAB565 처리구에서는 대조구와 비교 시 피해엽수는 많고, 수치 간 폭은 적지만 대조구와 비슷한 경향을 보이며, 무처리에 비해 일정한 수치를 유지하므로 담배거세미유충에 대한 살충효과를 보인다고 볼 수 있다. 3차 WJ565배양액은 약제 처리 후 수치가 증가하다가 일정수준 부터는 일정한 수치를 보인다. 무처리에 비해서 일정한 수치를 유지하지만 5일차 배추가 자라는 시기를 볼 때 피해엽수가 유지되는 것으로 보아 담배거세미유충에 대한 살충력을 보이지만, 효과가 미비하다. 3차 WJ566배양액 처리구에서는

피해식흔이 꾸준히 증가하며 무처리 그레프와 비슷한 경향을 보이는 것으로 보아 담배거세미유충에 대한 살충효과가 미비하다. 따라서 CAB565 대해서 살충효과가 높으며, 대량배양액 제조 시 효과가 떨어지는 것으로 보여진다(Fig. 15-20).





&lt;Fig. 17&gt; 대조구 배추포장(7일차)

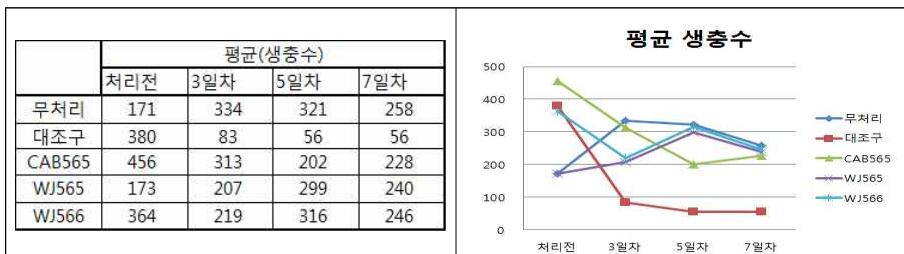


&lt;Fig. 18&gt; CAB565처리구 배추포장(7일차)

<Fig. 19> 3차 WJ565배양액 처리구  
배추포장(7일차)<Fig. 20> 3차 WJ566배양액 처리구  
배추포장(7일차)

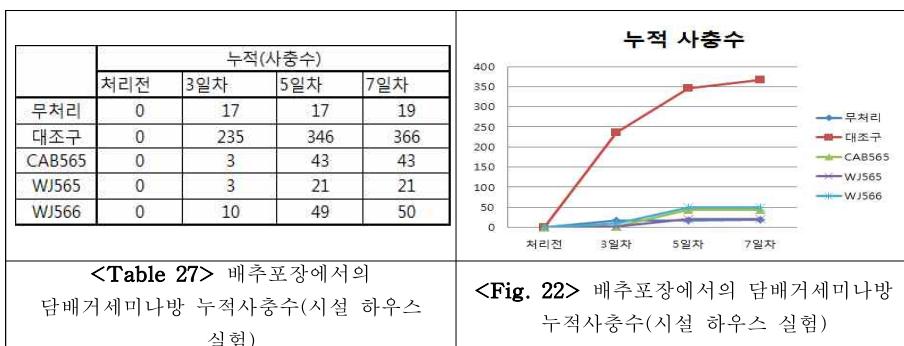
## (2) 배추 포장에서의 담배거세미나방 살충효과검정(시설 하우스 실험)

- Table 26, Fig. 21은 담배거세미나방에 대한 평균 생충수를 나타내는 결과이다. 무처리구의 경우 3일차에 나타난 사충수에서 크게 변화가 없었는데 반하여, 대조구(토박이) 처리구에서는 사충수가 크게 증가하였다(Table 27, Fig. 22). CAB565, 3차 WJ565배양액, 3차 WJ566배양액 모두 처리 후 누적 사충수가 증가하긴 하였으나, 그 효과는 크게 나타나지는 않았다. 사충수 조사는 배추 내에서 죽어있는 경우만 조사했기 때문에 땅에 떨어진 경우는 조사할 수 없기 때문에 생충수와 함께 비교해야한다. CAB 565는 대조구의 경우와 동일하게 감소하는 추세를 보였으며, 또한 CAB 565와 비교하였을 때 3차 WJ565배양액은 누적 사충율은 비슷하나 생충수는 증가하는 것으로 보아 살충효과는 떨어진다고 볼 수 있다. 따라서 3개의 배양액에 대하여 담배거세미나방 유충의 살충효과는 CAB 565가 가장 좋았으며, 대량 배양과정을 거친 배양액의 경우에는 효과가 감소하는 경향을 나타낸다(Fig. 23-28).



<Table 26> 배추포장에서의  
담배거세미나방  
평균 생충수(시설 하우스 실험)

<Fig. 21> 배추포장에서의 담배거세미나방  
평균 생충수(시설 하우스 실험)



<Table 27> 배추포장에서의  
담배거세미나방 누적사총수(시설 하우스  
실험)

<Fig. 22> 배추포장에서의 담배거세미나방  
누적사총수(시설 하우스 실험)





&lt;Fig. 25&gt; 대조구 배추포장(7일차)



&lt;Fig. 26&gt; CAB565처리구 배추포장(7일차)



&lt;Fig. 27&gt; 3차 WJ565배양액 처리구 배추포장(7일차)



&lt;Fig. 28&gt; 3차 WJ566배양액 처리구 배추포장(7일차)

### (3) 배추 포장에서의 파밤나방 살충효과검정(시설 하우스 실험)

- 선발된 2개의 균주의 대량배양액을 이용하여 파밤나방에 대한 친환경 농자재 시설 하우스실험을 실시하였다. 무처리에서의 생충수가 점차 감소하는 것은, 이는 비닐을 덮었지만 기온이 내려감에 따라 파밤나방 유충 중 적응하지 못하는 개체들이 죽어가는 것을 나타낸다(Table 28, Fig. 29). 대조구 또한 비닐을 덮었지만 추위의 영향으로 비교적 생충수의 변화폭이 크지 않다. 3차 WJ566 배양액은 생충수의 변화폭이 적은 경향을 나타낸다. 누적사충수에서는 3차 WJ565 배양액보다 높고, 대조구와 비슷한 경향을 보였다(Table 29, Fig. 30). 따라서 평균 생충수와 누적사충수를 비교하였을 때 파밤나방에 대한 살충효과는 CAB 565가 가장 높으며, 다음으로 3차 배양액 들은 모두 비슷한 수준이다(Fig. 31-36).

	평균(생충수)			
	처리전	3일차	5일차	7일차
무처리	86	70	59	38
대조구	51	38	22	33
CAB565	65	34	48	32
WJ565	39	22	42	37
WJ566	51	33	34	36

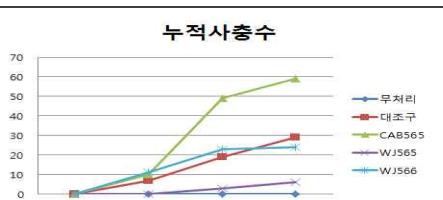
<Table 28> 배추포장에서의 파밤나방 평균 생충수(시설 하우스 실험)



<Fig. 29> 배추포장에서의 파밤나방 평균 생충수(시설 하우스 실험)

	누적(사충수)			
	처리전	3일차	5일차	7일차
무처리	0	0	0	0
대조구	0	7	19	29
CAB565	0	10	49	59
WJ565	0	0	3	6
WJ566	0	11	23	24

<Table 29> 배추포장에서의 파밤나방 누적사충수(시설 하우스 실험)



<Fig. 30> 배추포장에서의 파밤나방 누적사충수(시설 하우스 실험)



<Fig. 31> 무처리 배추포장(약제처리 전)



<Fig. 32> 무처리 배추포장(7일차)



<Fig. 33> 대조구 배추포장(7일차)



<Fig. 34> CAB565처리구 배추포장(7일차)



<Fig. 35> 3차 WJ565배양액 처리구  
배추포장(7일차)



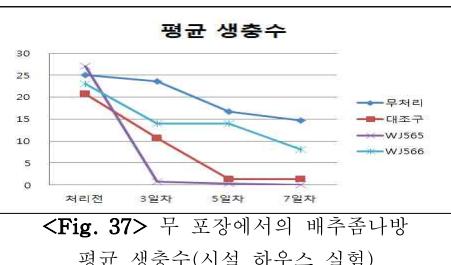
<Fig. 36> 3차 WJ566배양액 처리구  
배추포장(7일차)

#### (4) 무 포장에서의 배추좀나방 살충효과검정(시설 하우스 실험)

- 선발된 2개의 균주의 대량 배양액으로 배추좀나방에 대한 친환경농자재 시설 하우스실험을 실시하였다. 무처리에 비하여 대조구에서 생충수와 사충수 모두에서 비교적 큰 변화폭을 보이며, 3차 WJ565배양액은 생충수가 급격하게 줄어드는 경향을 보인다(Table 30, Fig. 37). 3차 WJ565배양액은 생충수와 사충수에서 급격한 변화폭을 보이는 것으로 보아 배추좀나방에 대한 살충효과가 높은 것으로 볼 수 있다(Table 31, Fig. 38). 따라서 배추좀나방에 대한 3차 WJ565배양액은 무처리와 대조구의 생충수, 사충수 그래프와 비교해보았을 때 살충효과가 높은 것을 나타내며, 3차 WJ566배양액 처리구는 대조구의 생충수, 사충수와 비교했을 때 사충효과가 낮은 것으로 사료된다(Fig. 39~43).

	평균(생충수)			
	처리전	3일차	5일차	7일차
무처리	25	24	17	15
대조구	21	11	1	1
WJ565	27	1	0	0
WJ566	23	14	14	8

<Table 30> 무 포장에서의 배추좀나방  
평균 생충수(시설 하우스 실험)



<Fig. 37> 무 포장에서의 배추좀나방  
평균 생충수(시설 하우스 실험)

	누적(사총수)			
	처리전	3일차	5일차	7일차
무처리	3	4	4	4
대조구	2	9	22	27
WJ565	1	28	54	60
WJ566	0	5	5	5

<Table 31> 무 포장에서의 파밤나방 누적 사총수(시설 하우스 실험)

### 누적사총수



<Fig. 38> 배추포장에서의 배추좀나방 누적 사총수(시설 하우스 실험)



<Fig. 39> 무처리 무 포장(약제처리 전)



<Fig. 40> 무처리 무 포장(7일차)



<Fig. 41> 대조구 무 포장(7일차)



<Fig. 42> 3차 WJ565배양액 처리구 무 포장(7일차)

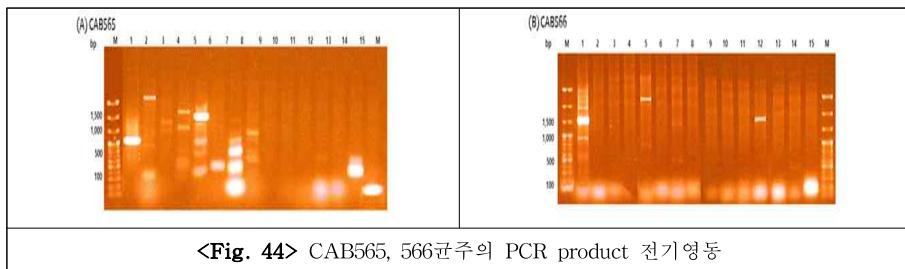


<Fig. 43> 3차 WJ566배양액 처리구 무 포장(7일차)

사. 지속적으로 나비목해충에 새로운 효과를 나타내는 *B. thuringiensis* 균주 선발 및 특성구명

### (1) PCR analysis

- *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* CAB565균주와 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* CAB566균주의 crystal protein에 관여하는 plasmid DNA를 탐색하였다. *B. thuringiensis*에서 대상해충에 살충활성을 나타내는 crystal protein을 형성하는데 관여하는 cry gene은 주로 plasmid DNA상에 존재한다. plasmid DNA는 균주마다 보유하고 있는 개수가 다양하고, cry gene은 모든 균주가 서로 다른 크기, 다른 위치의 plasmid DNA에 존재한다. *cry1* 유전자 외에 다른 cry 유전자 증폭을 보기위해 같은 혈청형인 균주와 *cry2*, *cry9* 유전자를 증폭하여 비교한 결과, CAB565, CAB566균주는 다른 유전자를 가지지 않았다(Fig. 44).



### (2) Real-time PCR

- DNA가 얼마나 존재하는지 비교하기 위해 Real-time PCR한 결과, CAB565균주는 KB099균주보다 *cry1Aa*, *cry1Ac*, *cry1I* 유전자가 많이 존재하였으며(Table 32), 전기영동을 통해 많이 가지는 cry 유전자가 강하게 증폭되었다(Fig. 45). CAB566균주는 KB098균주보다 *cry1Aa*, *cry1C*, *cry1D* 유전자가 많이 존재하였으며(Table 33), 전기영동을 통해 많이 가지는 cry 유전자가 강하게 증폭되었다(Fig. 46).

Primer	Ct(threshold cycle)		Melt Temp	
	CAB565	KB099	CAB565	KB099
<i>cry1Aa</i>	12.02	13.31	81.00	81.00
<i>cry1Ab</i>	-	38.22	-	-
<i>cry1Ac</i>	11.44	32.21	81.50	81.50
<i>cry1C</i>	30.28	14.28	80.50	80.50
<i>cry1D</i>	30.92	14.46	82.00	81.50
<i>cry2I</i>	18.49	38.80	81.50	-

**<Table 32>**  
*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* 균주의 Real-time PCR 분석

**(A) CAB565**

**(B) KB099**

**<Fig. 45> CAB565균주와 기존균주의 Real-timePCR 전기영동**

Primer	Ct(threshold cycle)		Melt Temp		
	CAB566	KB098	CAB566	KB098	
<i>cry1Aa</i>	13.60	14.50	81.00	81.00	
<i>cry1Ab</i>	37.94	37.56	-	-	
<i>cry1C</i>	15.28	16.33	80.50	80.50	
<i>cry1D</i>	14.68	16.12	81.50	81.50	
<i>cry2I</i>	36.32	22.53	81.50	-	

**<Table 33>**  
*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* 균주의  
Real-time PCR 분석

(A) CAB566

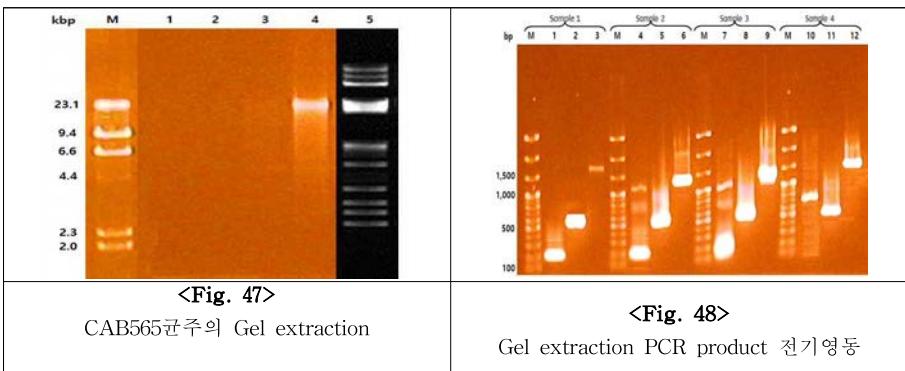
(B) KB098

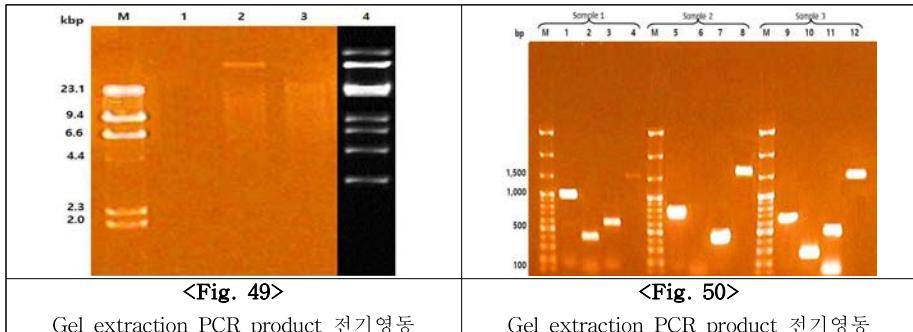
**<Fig. 46>**

CAB566균주와 기존균주의 Real-timePCR  
전기영동

### (3) Gelextraction

- 두 균주의 23.1kbp 크기의 밴드와 그 이상 크기의 밴드를 절단하여 gel extraction기법을 사용하여 plasmid DNA를 절단한 후에 gel extraction하였다.
- CAB565균주는 총 4개의 밴드를 절단하여 전기영동을 하였고 그 결과 4번째 sample에서 밴드를 형성하였다(Fig. 47). 절단한 밴드안에 존재하는 cry 유전자를 CAB565균주가 가지는 3종류의 primer를 사용하여 PCR 했을 때, 4번째 sample에서 *cry1Aa*, *cry1Ac*, *cry1I* 유전자를 가지는 것으로 나타났다(Fig. 48).
- CAB566균주는 총 3개의 밴드를 절단하여 전기영동을 하였고 그 결과 2번째 sample에서 밴드를 형성하였다(Fig. 49). 절단한 밴드안에 존재하는 cry 유전자를 CAB566균주가 기존에 가지는 4종류의 primer를 사용하여 PCR 했을 때, 2번째 sample에서 *cry1Aa*, *cry1D* 유전자를 가지고 있었고, 3번째 sample에서는 *cry1C*, *cry1I* 유전자를 가지는 것으로 나타났다(Fig. 50).





#### 아. 신규 *Bacillus thuringiensis* 균주의 제형화에 대한 살충활성 시험

- 우진비엔지에서 개발한 (제형4)565, (제형2)566, (제형3)566, (제형4)566(Fig. 51)을 실내 생물검정을 통해 담배거세미나방과 파밤나방, 회양목나방에 대한 살충활성을 확인(Table 34)하였다. (제형2)566, (제형3)566 배양액은  $10^7$ (cfu/ml)의 5배 농도에서 회양목나방에서 80% 이상의 사충률이 나타났으며, (제형4)565, (제형4)566은 파밤나방 3령에서  $10^8$ ,  $10^7$ (cfu/ml)에서 100%의 높은 사충률을 나타내었다. (제형4)565, (제형4)566은  $10^8$ (cfu/ml)에서 100%의 높은 사충률을 나타내었고,  $10^7$ (cfu/ml)에서 60% 이상의 높은 사충률을 나타내었다.

 <b>&lt;Fig. 51&gt;</b> 제형화된 CAB565, CAB566 균주의 현미경 관찰	<b>Table 34</b> 나비목 해충에 대한 살충활성 검정	<b>Table 35</b> 나비목 해충에 대한 살충활성 검정																																																																																														
	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th colspan="2">565-25 제형 (<math>10^7</math>cfu/ml)</th> <th colspan="2">담배거세미나방 (<i>Spodoptera litura</i>)</th> <th colspan="2">파밤나방 (<i>Spodoptera exigua</i>)</th> <th colspan="2">회양목나방 (<i>Heliothis virescens</i>)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>5배</td> <td>63.3</td> <td>50</td> <td>96.7</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>10배</td> <td>50</td> <td>46.7</td> <td>-</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>50배</td> <td>33</td> <td>16.7</td> <td>-</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th colspan="2">566-4 제형 (<math>10^7</math>cfu/ml)</th> <th colspan="2">담배거세미나방 (<i>Spodoptera litura</i>)</th> <th colspan="2">파밤나방 (<i>Spodoptera exigua</i>)</th> <th colspan="2">회양목나방 (<i>Heliothis virescens</i>)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>5배</td> <td>50</td> <td>56.7</td> <td>86.7</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>10배</td> <td>13.3</td> <td>53.3</td> <td>-</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>50배</td> <td>6.7</td> <td>36.7</td> <td>-</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	565-25 제형 ( $10^7$ cfu/ml)		담배거세미나방 ( <i>Spodoptera litura</i> )		파밤나방 ( <i>Spodoptera exigua</i> )		회양목나방 ( <i>Heliothis virescens</i> )		5배	63.3	50	96.7					10배	50	46.7	-					50배	33	16.7	-					566-4 제형 ( $10^7$ cfu/ml)		담배거세미나방 ( <i>Spodoptera litura</i> )		파밤나방 ( <i>Spodoptera exigua</i> )		회양목나방 ( <i>Heliothis virescens</i> )		5배	50	56.7	86.7					10배	13.3	53.3	-					50배	6.7	36.7	-					<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th colspan="2">566-4 제형 (<math>10^7</math>cfu/ml)</th> <th colspan="2">담배거세미나방 (<i>Spodoptera litura</i>)</th> <th colspan="2">파밤나방 (<i>Spodoptera exigua</i>)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>10배cfu/ml</td> <td>100</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>10<sup>1</sup>cfu/ml</td> <td>66.7</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>10<sup>2</sup>cfu/ml</td> <td>3.3</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>10<sup>3</sup>cfu/ml</td> <td>6.7</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	566-4 제형 ( $10^7$ cfu/ml)		담배거세미나방 ( <i>Spodoptera litura</i> )		파밤나방 ( <i>Spodoptera exigua</i> )		10배cfu/ml	100					10 <sup>1</sup> cfu/ml	66.7					10 <sup>2</sup> cfu/ml	3.3					10 <sup>3</sup> cfu/ml	6.7				
565-25 제형 ( $10^7$ cfu/ml)		담배거세미나방 ( <i>Spodoptera litura</i> )		파밤나방 ( <i>Spodoptera exigua</i> )		회양목나방 ( <i>Heliothis virescens</i> )																																																																																										
5배	63.3	50	96.7																																																																																													
10배	50	46.7	-																																																																																													
50배	33	16.7	-																																																																																													
566-4 제형 ( $10^7$ cfu/ml)		담배거세미나방 ( <i>Spodoptera litura</i> )		파밤나방 ( <i>Spodoptera exigua</i> )		회양목나방 ( <i>Heliothis virescens</i> )																																																																																										
5배	50	56.7	86.7																																																																																													
10배	13.3	53.3	-																																																																																													
50배	6.7	36.7	-																																																																																													
566-4 제형 ( $10^7$ cfu/ml)		담배거세미나방 ( <i>Spodoptera litura</i> )		파밤나방 ( <i>Spodoptera exigua</i> )																																																																																												
10배cfu/ml	100																																																																																															
10 <sup>1</sup> cfu/ml	66.7																																																																																															
10 <sup>2</sup> cfu/ml	3.3																																																																																															
10 <sup>3</sup> cfu/ml	6.7																																																																																															

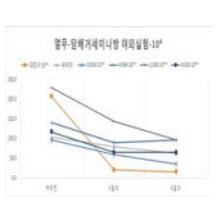
#### 자. 선발된 2개 균주의 대량배양 및 상품화 제형으로 포장 실증시험(배추좀나방, 담배거세미나방, 파밤나방 등 청벌레 위주 선발)

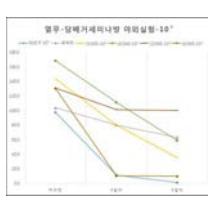
##### (1) 열무 시설하우스에서의 담배거세미나방 살충효과검정 (야외살충실험)

- 우진비엔지에서 개발한 새로운 제형을 야외 살충검정을 통해 담배거세미나방 대한 살충활성을

확인(Fig. 52-64)하였다.

- 무처리는 생충수가 조금 줄어들지만, 피해는 꾸준히 증가하는 경향이며, 이는 담배거세미나방이 성장하면서 섭식량이 증가하는 것을 나타낸다.
- 대조구는 희석배수 모두 생충수가 현저히 줄어들며, 이와 비슷한 양상을 보이는 처리구는 (제형4) $565 \cdot 10^7$ 이며 이러한 결과는 가장 살충효과가 높다는 것을 나타낸다.
- 전체적으로 처리구의 생충수가 줄어들지만, 뚜렷한 효과는 희석배수가  $10^7$ 에서 생충수가 낮아지는 것을 볼 수 있으며, 생충수가 가장 낮아진 처리구는 (제형4) $565 \cdot 10^7$ 이며 다음으로 낮아진 처리구는 (제형4) $566 \cdot 10^7$ 이다.  $10^6$ 의 처리구 중에서 생충수가 가장 낮은 것은 (제형4) $565 \cdot 10^6$ 과 (제형4) $566 \cdot 10^6$ 이었다.
- 따라서 (제형4) $565$ 와 (제형4) $566$ 에서 가장 살충효과가 높았으며,  $10^7$ 으로 희석한 처리구에서 가장 높은 살충효과를 나타내었다.

			
<b>&lt;Fig. 52&gt;</b> $10^6$ 희석배수 처리구에서 담배거세미나방에 대한 야외살충활성 결과	<b>&lt;Fig. 53&gt;</b> 담배거세미나방에 대한 야외살충실험 대조구 $10^6$ 처리전과 5일차	<b>&lt;Fig. 54&gt;</b> 담배거세미나방에 대한 야외살충실험 (제형2) $565 \cdot 10^6$ 처리전과 5일차	<b>&lt;Fig. 55&gt;</b> 담배거세미나방에 대한 야외살충실험 (제형3) $565 \cdot 10^6$ 처리전과 5일차

			
<b>&lt;Fig. 56&gt;</b> 담배거세미나방에 대한 야외살충실험 (제형4) $565 \cdot 10^6$ 처리전과 5일차	<b>&lt;Fig. 57&gt;</b> 담배거세미나방에 대한 야외살충실험 (제형4) $566 \cdot 10^6$ 처리전과 5일차	<b>&lt;Fig. 58&gt;</b> 담배거세미나방에 대한 야외살충실험 무처리 구 처리전과 5일차	<b>&lt;Fig. 59&gt;</b> $10^7$ 희석배수 처리구에서 담배거세미나방에 대한 야외살충활성 결과



&lt;Fig. 60&gt;

담배거세미나방에  
대한 야외 살충실험  
대조구 $10^7$  처리전과  
5일차

&lt;Fig. 61&gt;

담배거세미나방에  
대한 야외 살충실험  
(제형2)565- $10^7$   
처리전과 5일차

&lt;Fig. 62&gt;

담배거세미나방에  
대한 야외 살충실험  
(제형3)565- $10^7$   
처리전과 5일차

&lt;Fig. 63&gt;

담배거세미나방에  
대한 야외 살충실험  
(제형4)565- $10^7$   
처리전과 5일차



&lt;Fig. 64&gt;

담배거세미나방에  
대한 야외 살충실험  
(제형4)566- $10^7$   
처리전과 5일차

## (2) 고추 시설하우스에서의 담배나방 살충효과 검정

- 우진비엔지에서 개발한 새로운 제형을 실내 생물검정을 통해 담배나방에 대한 살충활성을 확인(Fig. 65-77)하였다.
- 실험은 과실의 피해율이 5% 이상부터 시작되는데, 약제처리 이후 피해율의 변화를 보였다.
- 무처리의 경우 담배나방의 피해가 늘어나는 것을 확인할 수 있는데 이와 비교하여 (제형4)565와 (제형4)566에서 피해율이 줄어들었으며, 대조구에서 크게 줄었다. 대조구의 경우 처리전 피해율이 높기 때문에 뚜렷이 확인할 수 있었고, 이러한 환경을 바탕으로 비슷한 효과를 보이는 처리구는 (제형4)565로 나타났다. 오히려 무처리처럼 과실 피해율이 높아진 약제도 있었는데, 이러한 결과는 환경에 대한 제형에 따라 부작하는 곳이 다르며, 환경에 따라 다르기 때문에 나타나는 것으로 보여진다.

<p><b>&lt;Fig. 65&gt;</b> 담배나방에 대한 야외 살충실험 결과 - 희석 배수 <math>10^6</math></p>	<p><b>&lt;Fig. 66&gt;</b> 담배나방에 대한 야외 살충실험 결과 대조군-<math>10^6</math>에서 처리전과 10일차</p>	<p><b>&lt;Fig. 67&gt;</b> 담배나방에 대한 야외 살충실험 결과 (제형2)565-<math>10^6</math>에서 처리전과 10일차</p>	<p><b>&lt;Fig. 68&gt;</b> 담배나방에 대한 야외 살충실험 결과 (제형3)565-<math>10^6</math>에서 처리전과 10일차</p>
<p><b>&lt;Fig. 69&gt;</b> 담배나방에 대한 야외 살충실험 결과 (제형4)565-<math>10^6</math>에서 처리전과 10일차</p>	<p><b>&lt;Fig. 70&gt;</b> 담배나방에 대한 야외 살충실험 결과 (제형4)566-<math>10^6</math>에서 처리전과 10일차</p>	<p><b>&lt;Fig. 71&gt;</b> 담배나방에 대한 야외 살충실험 결과 무처리 처리전과 10일차</p>	<p><b>&lt;Fig. 72&gt;</b> 담배나방에 대한 야외 살충실험 결과 - 희석 배수 <math>10^7</math></p>
<p><b>&lt;Fig. 73&gt;</b> 담배나방에 대한 야외 살충실험 결과 대조군-<math>10^7</math>에서 처리전과 10일차</p>	<p><b>&lt;Fig. 74&gt;</b> 담배나방에 대한 야외 살충실험 결과 (제형2)565-<math>10^7</math>에서 처리전과 10일차</p>	<p><b>&lt;Fig. 75&gt;</b> 담배나방에 대한 야외 살충실험 결과 (제형3)565-<math>10^7</math>에서 처리전과 10일차</p>	<p><b>&lt;Fig. 76&gt;</b> 담배나방에 대한 야외 살충실험 결과 (제형4)565-<math>10^7</math>에서 처리전과 10일차</p>

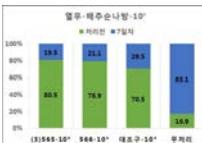
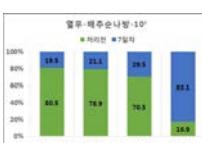


&lt;Fig. 77&gt;

담배나방에 대한  
야외 살충실험 결과  
(제형4)566- $10^6$ 에서  
처리전과 10일차

### (3) 열무 시설하우스에서 배추순나방 살충효과 검정

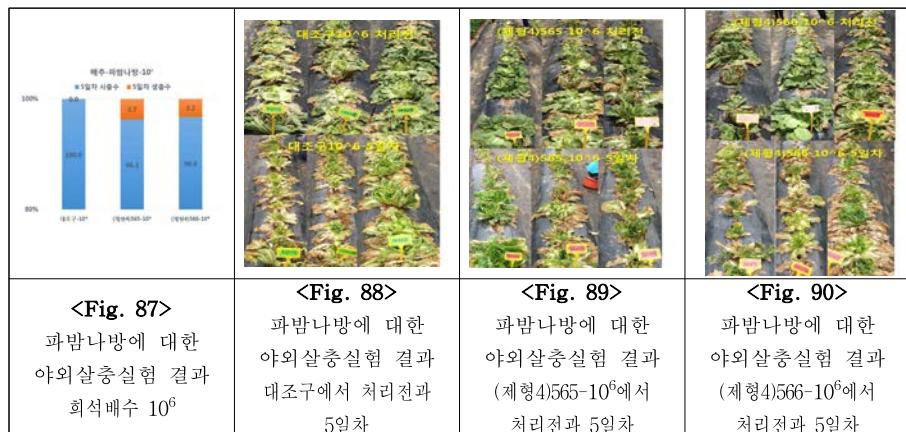
- 우진비엔지에서 개발한 새로운 제형을 실내 생물검정을 통해 담배나방에 대한 살충활성을 확인(Fig. 78-86)하였다. 결과는 처리전의 생충수를 100%로 환산하여 7일후의 생충수를 처리전에 대한 %로 환산하여 변화한 값을 표현하였다. 처리전 값이 100으로 무처리의 경우 생충수는 조금 줄어들었지만, 이러한 이유는 무처리구의 기주를 대부분 섭식 후 우화하거나 이동한 것으로 사료된다. (제형4)566- $10^7$ 와 대조구- $10^7$ 의 경우 더 높은 농도임에도 불구하고 살충효과가 낮았는데, 이러한 이유는 배추순나방의 경우 잎을 말거나 줄기 속을 파고 들어가 있기 때문에 이러한 오차 값이 나오는 것으로 사료된다. (제형4)565와 (제형4)566에서 대조구와 비교하였을 때 대조구보다 높은 살충효과를 나타내며, 특히 (제형4)566- $10^7$ 의 경우 처리전보다 92%의 살충효과는 나타내었다.

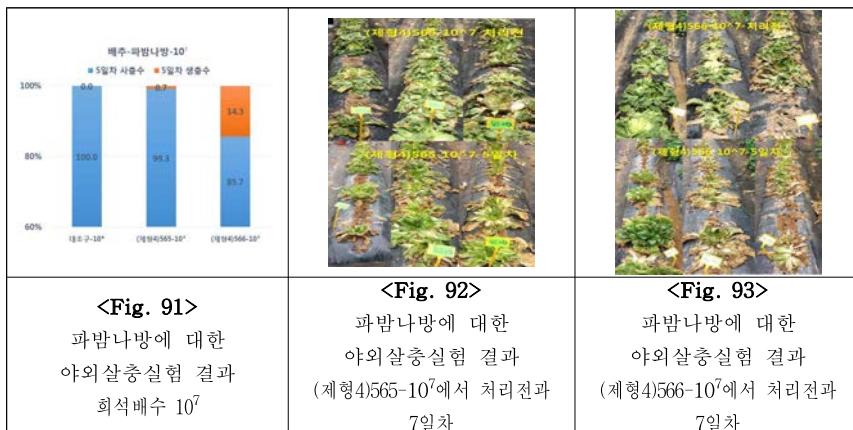
 <p>열두 - 배추순나방 - 10<sup>6</sup> * 처리전 #7일차 (대조구 10<sup>6</sup>) 81.1 (대조구 10<sup>6</sup>) 81.1 (대조구 10<sup>6</sup>) 78.9 (대조구 10<sup>6</sup>) 81.1 무처리</p>	 <p>대조구 10<sup>6</sup>-7일차 대조구 10<sup>6</sup> 처리전</p>	 <p>(제형4) 565-10<sup>6</sup>-7일차 (제형4) 565-10<sup>6</sup> 처리전</p>	 <p>(제형4) 566-10<sup>6</sup>-7일차 (제형4) 566-10<sup>6</sup> 처리전</p>
<p><b>&lt;Fig. 78&gt;</b> 배추순나방에 대한 야외살충실험 결과 회석배수 10<sup>6</sup></p>	<p><b>&lt;Fig. 79&gt;</b> 배추순나방에 대한 야외살충실험 결과 대조구-10<sup>6</sup>에서 처리전과 7일차</p>	<p><b>&lt;Fig. 80&gt;</b> 배추순나방에 대한 야외살충실험 결과 (제형4)565-10<sup>6</sup>에서 처리전과 7일차</p>	<p><b>&lt;Fig. 81&gt;</b> 배추순나방에 대한 야외살충실험 결과 (제형4)566-10<sup>6</sup>에서 처리전과 7일차</p>
 <p>무처리 처리전 무처리 7일차</p>	 <p>열두 - 배추순나방 - 10<sup>7</sup> * 처리전 #7일차 (대조구 10<sup>7</sup>) 81.1 (대조구 10<sup>7</sup>) 81.1 (대조구 10<sup>7</sup>) 78.9 (대조구 10<sup>7</sup>) 81.1 무처리</p>	 <p>대조구 10<sup>7</sup>-7일차 대조구 10<sup>7</sup> 처리전</p>	 <p>(제형4) 565-10<sup>7</sup>-7일차 (제형4) 565-10<sup>7</sup> 처리전</p>
<p><b>&lt;Fig. 82&gt;</b> 배추순나방에 대한 야외살충실험 결과 무처리 처리전과 7일차</p>	<p><b>&lt;Fig. 83&gt;</b> 배추순나방에 대한 야외살충실험 결과 회석배수 10<sup>7</sup></p>	<p><b>&lt;Fig. 84&gt;</b> 배추순나방에 대한 야외살충실험 결과 대조구-10<sup>7</sup>에서 처리전과 7일차</p>	<p><b>&lt;Fig. 85&gt;</b> 배추순나방에 대한 야외살충실험 결과 (제형4)565-10<sup>7</sup>에서 처리전과 7일차</p>



#### (4) 배추 노지포장에서의 파밤나방 살충효과 검정

- 우진비엔지에서 개발한 새로운 제형을 실내 생물검정을 통해 담배나방에 대한 살충활성을 확인하였다(Fig. 87~93). 결과는 처리전의 생충수를 100%로 환산하여 7일후의 생충수를 처리전에 대한 %로 환산하여 변화한 값을 표현하였다. (제형4)565와 (제형4)566 균주의 살충활성을 높으며, 대조구와 비교 시에도 비슷한 살충활성을 보였다. 또한 5일차 생충율은 5%이하로 나타났으며, 노지포장의 경우 시설보다 환경에 대하여 더 많은 영향을 받음으로 인한 오차일 수 있다.



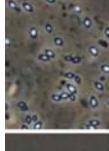
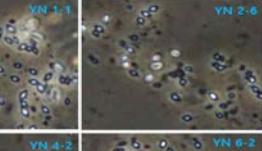


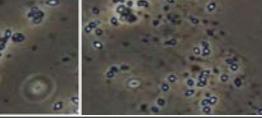
자. 국내에서 기주 범위가 다른 새로운 *B. thuringiensis* 균주의 선발(2균주)

#### (1) 중국 연변대학 농학원 삼립과학학부로부터 백두산 부근에서 채집하여 분리한 BT 18균주의 생태학적 특성 조사

- 중국 연변대학 농학원 삼립과학학부 실험실로부터 백두산 부근 토양을 채집 후 분리한 균주를 분양받았고(Table 36), 18균주 중 17균주에서 *Bacillus thuringiensis*의 특성인 결정성 단백질이 확인하였다(Fig. 94).
- 담배거세미나방, 파밤나방, 배추 좀나방 3령 유충에 대해 살충활성을 검정하였고(Table 37), 담배거세미나방 유충에서 5개, 파밤나방 유충서 4개의 각각 살충 효과를 나타내는 균주를 5개, 4개 선발하여 3령 유충에 대한 LC<sub>50</sub>, LC<sub>95</sub>값을 산출하였다(Table 38, 39).
- 파밤나방 유충 중장액과 반응시켜 SDS-PAGE를 진행한 결과, 선발된 4균주에서 약 65kDa의 독소단백질 밴드를 확인하였다(Fig. 95).
- YN1-1, 2-6, 4-2 등의 3균주에서 cry1Aa, cry1Ab, cry1C, cry1D, cry1I 등 5개의 유전자를 확인하였고 YN6-2 균주에서 cry1Aa, cry1Ab, cry1C, cry1D 4개 유전자의 증폭을 확인하였다(Fig. 96).
- 살충활성이 가장 높은 YN1-1 균주와 국내 시장에서 판매되고 있는 6종류의 제품을 1.0×10<sup>7</sup>(cfu/ml)에 해당하는 희석액으로 파밤나방 3령 유충에 대하여 생물활성 검정을 실시한 결과는 YN1-1 균주와 상품의 A제품이 90% 이상의 높은 살충효과를 나타냄을 확인하였다(Table 40, Fig. 97).

Number of soil sample	Locality	
YN 1-1		
YN 1-2	화룡시 서성진(Helong Xichengzhen)	
YN 1-3		
YN 2-1		
YN 2-2	화룡시 용성진(Helong Longchengzhen)	
YN 2-3		
YN 2-4		
YN 2-5		
YN 2-6		
YN 3-1	화룡시 서성진 세백밀촌(Helong Xichengzhen)	
YN 4-1		
YN 4-2	화룡시 서성진 선봉리장(Helong Xichengzhen)	
YN 4-3		
YN 4-4		
YN5-4	안도현 삼도령 신촌촌(Antu xian)	
YN 6-1		
YN 6-2	용정시 동불사진(Longjing Tongfoshizhen)	
YN 6-3		



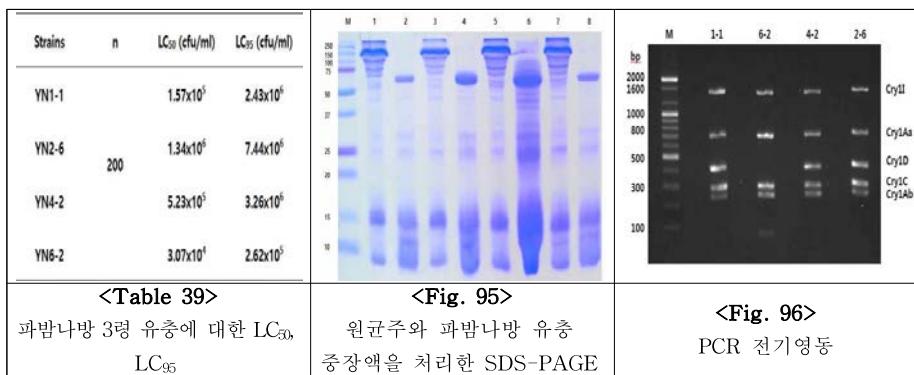
<Table 36>  
백두산 부근에서 분리된 18개 균주

<Fig. 94>  
분리된 균주의 현미경 관찰

Tested larvae	Lepidopteran			Strains	n	LC <sub>50</sub> (cfu/ml)	LC <sub>95</sub> (cfu/ml)
	<i>P. xylostella</i>	<i>S. littura</i>	<i>S. exigua</i>				
YN 1-1	+++	++	++	YN1-1			
YN 1-2	++	++	++				
YN 1-3	++	++	++				
YN 2-1	+++	++	++	YN2-1			
YN 2-2	++	++	++				
YN 2-3	++	++	++				
YN 2-4	++	++	++				
YN 2-5	+	++	++				
YN 2-6	+++	++	+++	YN4-1	200	6.25x10 <sup>5</sup>	1.79x10 <sup>6</sup>
YN 3-1	+	++	++				
YN 4-1	+++	++	++	YN4-4			
YN 4-2	++	+++	+++				
YN 4-3	+	+	+				
YN 4-4	+++	++	++				
YN 6-1	+++	++	++	YN4-4			
YN 6-2	++	+++	+++				
YN 6-3	+	+	+				

<Table 37>  
담배거세미나방, 과밤나방, 배추좀나방 3령  
유충에 대한 살충활성 검정

<Table 38>  
담배거세미나방 3령 유충에 대한 LC<sub>50</sub>, LC<sub>95</sub>



Products	<i>B. thuringiensis</i> strains	Concentration-of <i>B. thuringiensis</i> strains	Mortality(%)	
A	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>azawai</i> (GB413)		91±5	
B	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>azawai</i> NT0427		73.5±6.9	
C	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>azawai</i> + <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>		45.6±1.7	
D	<i>B. thuringiensis</i>	1.0 x 10 <sup>6</sup> [cfu/ml]	15.6±3.4	
E	<i>B. thuringiensis</i>		74.4±3.4	
F	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>azawai</i>		66.7±3.9	
YN1-1	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>azawai</i>		88.9±1.7	
Control	-		5.6±2.3	

**<Table 40>**

파밤나방 3령 유충에 대한 시제품과 YN1-1  
균주의 생물활성 비교

**<Fig. 97>**

파밤나방 3령유충에 대한 시제품과 YN1-1 균주의  
실내포트 검정

## (2) 제주도 8곳에서 채취한 토양으로부터 모기에 살충효과를 가지는 균주 선발

- 제주도 13개 장소에서 104개의 토양샘플을 채취하였고, 104개의 토양샘플 중에서 crystal을 형성하는 7개의 균주를 분리하였다(Table 41, Fig. 98).
- 이집트金陵모기와 파밤나방에 대해 6가지 균주의 살충활성 실험을 진행하였으며(Table 6), 이집트金陵모기에서 9번, 102번, 131번 균주는  $10^6$ cfu/ml에서 80%이상의 살충활성을 나타내었고(Table 42), 파밤나방에는 9번, 102번, 114번, 131번, 145번, 186번 균주에서 80%이상의 살충활성을 나타내었다(Table 43).

Livinity	Number of soil sample examined	Number of soil sample with crystalized			Tested larvae	Diptera	Lepidoptero
제주도제주시도, 제주시 고금읍 비단로	8	1			9	+++	+++
제주도제주시도, 제주시 새길동 남동리 322 번지 1층동호장 4호	8	0			102	+++	+++
제주도제주시도, 제주시 새길동 남동리 322 번지 1층동호장 4호	13	0			114	+++	+++
제주도제주시도, 제주시 새길동 남동리 322 번지 1층동호장 4호	16	2			strain	131	+++
제주도제주시도, 제주시 새길동 남동리 322 번지 1층동호장 4호	5	1			145	+++	+++
제주도제주시도, 제주시 새길동 남동리 322 번지 1층동호장 4호	3	1			186	++	+++
제주도제주시도, 제주시 새길동 남동리 322 번지 1층동호장 4호	19	0			Control	-	-
제주도제주시도, 제주시 새길동 남동리 322 번지 1층동호장 4호	7	1					
제주도제주시도, 제주시 새길동 남동리 322 번지 1층동호장 4호	2	1					
제주도제주시도, 제주시 새길동 남동리 322 번지 1층동호장 4호	2	0					
제주도제주시도, 제주시 새길동 남동리 322 번지 1층동호장 4호	2	0					
제주도제주시도, 제주시 새길동 남동리 322 번지 1층동호장 4호	5	0					
제주도제주시도, 제주시 새길동 남동리 322 번지 1층동호장 4호	1	0					
Total	104	7					

**<Table 41>**

제주도 104개의 토양샘플  
중에서 분리된 7개의 균주

**<Fig. 98>**

분리된 균주의 현미경 관찰

**<Table 42>**

이집트金陵모기와 파밤나방에  
대한 살충활성 검정

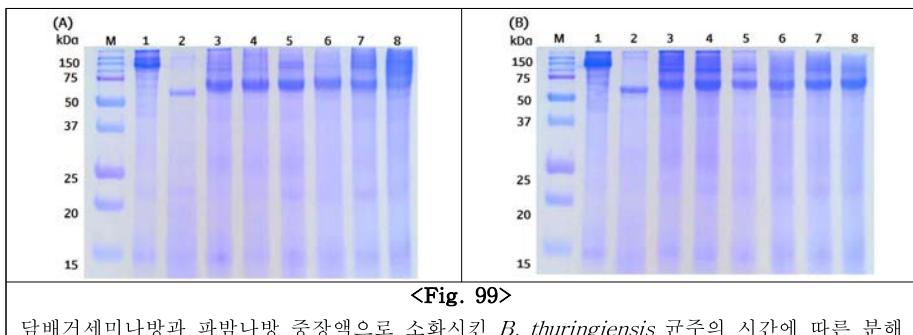
Tested larvae	Serial dilution		Tested larvae	Serial dilution	
	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>		10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>
strain	9	95	100	9	100
	102	100	80	102	100
	114	90	65	114	96
	131	100	85	strain	131
	145	95	65	145	100
	186	70	55	186	100
	Control	0	0	Control	0

<Table 43>
<Table 44>

10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup>cfu/ml에서 이집트金陵모기에 대한 살충활성 검정
10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup>cfu/ml에서 파밤나방에 대한 살충활성 검정

### 차. 1, 2년차 연구에서 새로 분리된 *B. thuringiensis* 균주 작용기작

- 중장액 protease의 종류에 따라 최적 pH를 가지며, *B. thuringiensis*의 활성화는 pH에 따라 영향을 준다. *B. thuringiensis*는 알칼리성 조건에서 중장액에 의해 쉽게 분해되었으며, 분해과정에 관여하는 효소의 활성은 알칼리성 pH에서 최적의 활성을 나타내었다.
- *B. thuringiensis*는 알칼리성 조건에서 중장액에 의해 쉽게 분해되었으며, 분해과정에 관여하는 효소의 활성은 담배거세미나방의 경우 pH 7.5-10에서 최적의 활성을 나타내었고, 파밤나방의 경우 pH 9-12에서 알칼리성 pH에서 최적의 활성을 나타내었으며 두 해충의 중장액의 차이를 확인하였다(Fig. 99).



카. 선발된 2개 균주의 대량배양 및 상품화 제형으로 포장 실증시험(배추좀나방, 담배거세미나방, 파밤나방 등 청벌레 위주 선발)

### (1) 배추 노지포장에서의 담배거세미나방 살충효과 검정

- 우진비엔지에서 개발한 새로운 균주의 상품화 제형을 야외 생물검정을 통해 담배거세미나방에 대한 시제품의 처리농도에 따른 살충활성을 확인하였다(Fig. 100~110). 결과는 처리전, 3일차, 7일차의 생충수를 막대바로 표시하고 처리전 생충수에 대한 3일차, 7일차의 생충률을 꺾은선으로 표시하였다. 무처리는 다른 처리구에 비하여 생충수가 크게 줄어들지 않았으며, 유충이 성장하면서 섭식량이 증가하여 피해가 크게 증가하는 경향을 나타낸다. 이에 비해 대조구(토박이-동부한농)는 생충수가 현저히 줄어들었는데, 에코파워, 원료 모두  $\times 1,500$ 을 제외한 처리구들이 대조구와 비슷한 양상을 보였다. 특히 에코파워  $\times 200$ ,  $\times 500$ , 원료  $\times 200$ ,  $\times 500$ 은 대조구보다 더 높은 효과를 보였다. 또한 모든 처리구의 생충수가 줄어들지만, 에코파워와 원료의 희석배수가 낮아질수록 효과가 감소하는 것을 보였다. 에코파워, 원료  $\times 1,500$ 은 무처리와 생충수가 크게 다르지 않아 효과가 아주 미비한 것으로 보인다. 그리고 에코파워와 원료 처리 시 비슷한 양상을 보였지만 원료 처리 시에 비교적 생충률이 더 낮았다. 결과적으로 에코파워, 원료  $\times 200$ ,  $\times 500$  처리 시에 가장 높은 살충효과를 나타내었다.

			
<b>&lt;Fig. 100&gt; 선발된 균주의 상품화 제형과 원료 처리구에서 담배거세미나방에 대한 야외살충활성 검정</b>	<b>&lt;Fig. 101&gt; 배추-담배거세미나방 에 대한 야외살충실험 무처리 처리전, 3일차, 7일차</b>	<b>&lt;Fig. 102&gt; 배추-담배거세미나방 에 대한 야외살충실험 대조구(토박이) 3일차, 7일차</b>	<b>&lt;Fig. 103&gt; 배추-담배거세미나방 에 대한 야외살충실험 에코파워 200배 3일차, 7일차</b>



**<Fig. 104>**  
배추-담배거세미나방  
에 대한  
야외 살충실험  
에코파워 500배  
3일차, 7일차

**<Fig. 105>**  
배추-담배거세미나방  
에 대한  
야외 살충실험  
에코파워 1,000배  
3일차, 7일차

**<Fig. 106>**  
배추-담배거세미나방  
에 대한  
야외 살충실험  
에코파워 1,500배  
3일차, 7일차

**<Fig. 107>**  
배추-담배거세미나방  
에 대한  
야외 살충실험  
원료 200배  
3일차, 7일차



**<Fig. 108>**  
배추-담배거세미나방  
에 대한  
야외 살충실험  
원료 500배  
3일차, 7일차

**<Fig. 109>**  
배추-담배거세미나방  
에 대한  
야외 살충실험  
원료 1,000배  
3일차, 7일차

**<Fig. 110>**  
배추-담배거세미나방  
에 대한  
야외 살충실험  
원료 1,500배  
3일차, 7일차

## (2) 배추 노지포장에서의 파밤나방 살충효과 검정

- 우진비엔지에서 개발한 새로운 균주의 상품화 제형을 야외 생물검정을 통해 파밤나방에 대한 시제품의 처리농도에 따른 살충활성을 확인하였다(Fig. 111-121). 결과는 처리전, 3일차, 7일차의 생충수를 막대바로 표시하고 처리전 생충수에 대한 3일차, 7일차의 생충률을 꺾은선으로 표시하였다. 무처리의 경우 시간이 경과함에 따라 생충수가 줄어들었으나 그 정도가 심하지 않았다. 반면에 대조구는 생충수가 처리전에 비하여 크게 줄어들었다. 파밤나방의 경우 원료  $\times 200$ 이 대조구보다 더 높은 효과를 보였으며, 에코파워  $\times 200$ ,  $\times 500$ ,  $\times 1,000$ , 원료  $\times 500$ ,  $\times 1,000$ 이 대조구와 비슷하게 감소하는 추세를 보였다. 에코파워와 원료의 효과를 비교했을 시에는 원료의 효과가 더 좋았다. 결과로 보아 에코파워 원료  $\times 200$ ,  $\times 500$ ,  $\times 1,000$  처리 시에 파밤나방에 대한 높은 살충효과를 기대할 수 있다.

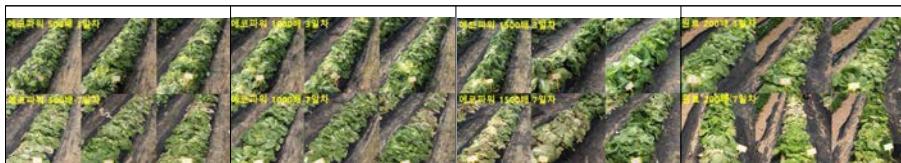


## <Fig. 111> 선발된 균주의 상품화 제형과 원료 처리구에서 파밤나방에 대한 야외살충활성 검정

<Fig. 112>  
배추-파밥나방에  
대한 야외 살충실험  
무처리  
처리전, 3일차, 7일차

**<Fig. 113>**  
배추-파밤나방에  
대한 야외 살충실험  
대조구(토박이)  
3일차, 7일차

<Fig. 114>  
배추-파밤나방에  
대한 야외 살충 실험  
에코파워 200배  
3일차, 7일차



**<Fig. 115>**  
배추-파밤나방에  
대한 야외 살충설 험  
에코파워 500배  
3억차 7억차

<Fig. 116>  
비추-파밤나방에  
한 야외 살충실험  
코파워 1,000배  
3억차 7억차

**<Fig. 117>**  
배추-파밤나방에  
대한 야외 살충실험  
에코파워 1,500배  
3억차 7억차

<Fig. 118>  
배추-파밤나방에  
대한 야외 살충 실험  
원료 200배  
3일차 7일차



<Fig. 119>  
배추-파밤나방에  
대한 야외 살충 실험  
원료 500배  
3일 차 7일 차

<Fig. 120>  
배추-파밥나방에  
대한 야외 살충실험  
원료 1,000배  
3일차 7일차

**<Fig. 121>**  
배추-파밥나방에  
대한 야외 살충 실험  
원료 1,500배  
3일차 7일차

### (3) 들깨 노지포장에서의 담배거세미나방 살충 효과 검정

- 우진비엔지에서 개발한 새로운 균주의 상품화 제형을 아와 생물검정을 통해 시중에 판매중인 제품과 담배거세미나방에 대한 살충활성을 비교하였다(Fig. 122-130). 전체적으로 처리구의 생충수가 줄어드는데, 무처리는 생충수가 다른 처리구에 비해 조금 줄어들어 식흔이 크게 형성되어 피해가 컸다. 가장 뚜렷한 효과는 에코파워 ×500, 토박이로 7일차 생충률이 처리전과

비교해 들깨에서 20% 초반대로 나타났다. 들깨에서는 비티원, 에코사이드도 이와 비슷하게 높은 효과를 보였다. 그 뒤로는 어그리, 솔빛채, 에코파워 ×2,500이 담배거세미나방 유충에 대해 살충효과를 나타냈는데 에코파워 ×2,500은 무처리와 비슷하여 그다지 효과가 있는 것으로 보이지 않는다. 결과적으로 들깨에서 실험하였을 때, 실험구에서 에코파워 ×500, 토박이가 가장 살충효과가 높았으며 나머지 결과도 비슷한 양상을 띠기 때문에 같은 해충에 대한 기주에 따른 차이는 크게 없는 것으로 보인다.

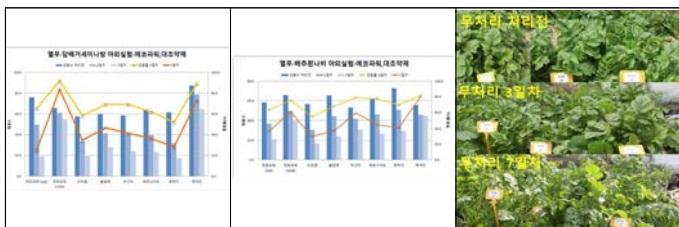
<p><b>&lt;Fig. 122&gt;</b> 들깨에서의 선발된 군주의 상품화 제형과 시중에 판매중인 제품 치리구에서 담배거세미나방에 대한 야외 살충활성 검정</p>	<p><b>&lt;Fig. 123&gt;</b> 들깨-담배거세미나방 에 대한 야외살충실험 무처리 처리전, 3일차, 7일차</p>	<p><b>&lt;Fig. 124&gt;</b> 들깨-담배거세미나방 에 대한 야외살충실험 에코파워 500배 3일차, 7일차</p>	<p><b>&lt;Fig. 125&gt;</b> 들깨-담배거세미나방 에 대한 야외살충실험 에코파워 2,500배 3일차, 7일차</p>
<p><b>&lt;Fig. 126&gt;</b> 들깨-담배거세미나방 에 대한 야외살충실험 비티원 3일차, 7일차</p>	<p><b>&lt;Fig. 127&gt;</b> 들깨-담배거세미나방 에 대한 야외살충실험 솔빛채 3일차, 7일차</p>	<p><b>&lt;Fig. 128&gt;</b> 들깨-담배거세미나방 에 대한 야외살충실험 어그리 3일차, 7일차</p>	<p><b>&lt;Fig. 129&gt;</b> 들깨-담배거세미나방 에 대한 야외살충실험 에코사이드 3일차, 7일차</p>



<Fig. 130>  
들깨-담배거세미나방  
에 대한  
야외 살충실험  
토박이 3일차, 7일차

#### (4) 열무 시설하우스에서의 담배거세미나방과 배추흰나비 살충효과 검정

- 우진비엔지에서 개발한 새로운 균주의 상품화 제형을 야외 생물검정을 통해 시중에 판매중인 제품과 담배거세미나방과 배추흰나비에 대한 살충활성을 비교하였다(Fig. 131-140). 무처리의 경우 처리전에 비해 생충수는 조금 줄어들었지만, 이는 무처리구의 기주를 섭식한 후 우화하거나 이동한 것으로 생각된다. 배추흰나비에 대해 가장 큰 살충효과를 보인 약제는 비티원, 에코파워 ×500, 솔빛체로 7일차 생충률이 40% 이하로 나타났다. 그리고 토박이, 에코사이드는 7일차 생충률이 40%대로 약간 효과가 떨어지는 것을 볼 수 있었다. 뒤로는 어그리, 에코파워 ×2,500이 7일차에 60% 가량 생충률을 보여 배추흰나비에 대해 미비한 효과를 보였다. 가장 뚜렷한 효과는 에코파워 ×500, 토박이로 7일차 생충률이 처리전과 비교해 열무에서 20% 초반대로 나타났다. 열무에서 7일차 생충률이 30% 중반대로 어느정도 높은 효과를 보였다. 그 뒤로는 어그리, 솔빛채, 에코파워 ×2,500이 담배거세미나방 유충에 대해 살충효과를 나타냈는데 에코파워 ×2,500은 무처리와 비슷하여 그다지 효과가 있는 것으로 보이지 않는다. 결과적으로 열무에서 에코파워 ×500, 토박이가 가장 살충효과가 높았으며 나머지 결과도 비슷한 양상을 띠기 때문에 같은 해충에 대한 기주에 따른 차이는 크게 없는 것으로 보인다.



**<Fig. 131>**  
열무에서의 선발된  
균주의 상품화  
재형과 시중에  
판매중인  
제품 처리구에서  
담배거세미나방에  
대한 야외 살충활성  
검정

**<Fig. 132>**  
열무에서의 선발된  
균주의 상품화  
재형과 시중에  
판매중인  
제품 처리구에서  
배추흰나비에 대한  
야외 살충활성 검정

**<Fig. 133>**  
열무-담배거세미나방,  
배추흰나비에 대한  
야외 살충실험  
무처리  
처리전, 3일차, 7일차



**<Fig. 134>**  
열무-담배거세미나방,  
배추흰나비에 대한  
야외 살충실험  
에코파워 500배  
3일차, 7일차

**<Fig. 135>**  
열무-담배거세미나방,  
배추흰나비에 대한  
야외 살충실험  
에코파워 2,500배  
3일차, 7일차

**<Fig. 136>**  
열무-담배거세미나방,  
배추흰나비에 대한  
야외 살충실험  
비티원 3일차, 7일차

**<Fig. 137>**  
열무-담배거세미나방,  
배추흰나비에 대한  
야외 살충실험  
솔빛채 3일차, 7일차

	<b>&lt;Fig. 138&gt;</b> 열무-담배거세미나방, 배추흰나비에 대한 야외살충실험 어그리 3일차, 7일차	<b>&lt;Fig. 139&gt;</b> 열무-담배거세미나방, 배추흰나비에 대한 야외살충실험 에코사이드 3일차, 7일차	<b>&lt;Fig. 140&gt;</b> 열무-담배거세미나방, 배추흰나비에 대한 야외살충실험 토박이 3일차, 7일차
---	---	--	---

#### (5) 양배추, 열무 노지포장에서의 파밤나방 살충효과 검정

- 우진비엔지에서 개발한 새로운 균주의 상품화 제형을 야외 생물검정을 통해 시중에 판매중인 제품과 파밤나방에 대한 살충활성을 비교하였다(Fig. 141-149). 무처리의 7일차 생충률이 65%로 다른 해충에 비해 다소 낮은 경향을 보였는데, 이는 노지포장 조건하에 기상상태로 인한 영향을 받은 것으로 사료된다. 에코파워 ×500, 솔빛채는 파밤나방 유충의 7일차 생충률이 20%대로 가장 살충효과가 높은 것으로 나타났다. 그리고 토팔이, 어그리는 7일차 생충률의 30% 중반대로 나타났으며 비티원, 에코파워 ×2,500, 에코사이드는 40% 후반대로 효과가 다소 떨어지는 것으로 나타났다.

 <b>&lt;Fig. 141&gt;</b> 양배추에서의 선발된 균주의 상품화 제형과 시중에 판매중인 제품 처리구에서 파밤나방에 대한 야외 살충활성 검정	 <b>&lt;Fig. 142&gt;</b> 열무-파밤나방에 대한 야외살충실험 무처리 처리전, 3일차, 7일차	 <b>&lt;Fig. 143&gt;</b> 열무-담배거세미나방, 배추흰나비에 대한 야외살충실험 에코파워 500배 3일차, 7일차	 <b>&lt;Fig. 144&gt;</b> 열무-담배거세미나방, 배추흰나비에 대한 야외살충실험 에코파워 2,500배 3일차, 7일차
---	--	--	--

			
<p><b>&lt;Fig. 145&gt;</b> 열무-파밤나방에 대한 야외 살충실험 비티원 3일차, 7일차</p>	<p><b>&lt;Fig. 146&gt;</b> 열무-파밤나방에 대한 야외 살충실험 솔빛채 3일차, 7일차</p>	<p><b>&lt;Fig. 147&gt;</b> 열무-파밤나방에 대한 야외 살충실험 어그리 3일차, 7일차</p>	<p><b>&lt;Fig. 148&gt;</b> 열무-파밤나방에 대한 야외 살충실험 에코사이드 3일차, 7일차</p>


<p><b>&lt;Fig. 149&gt;</b> 열무-파밤나방에 대한 야외 살충실험 토박이 3일차, 7일차</p>

## 제2절 1 협동과제명: 대량배양기술 확립

### 1. 연구 수행 내용

#### 가. 균주의 배양적 특성 조사

##### (1) 미생물의 배양 및 보존

- 본 과제에 사용된 곤충병원성 균주 *Bacillus thuringiensis*(이하 *B.t.*) CAB565, CAB566균주는 대량배양을 통한 산업화 가능성을 확인하기 위해 충남대학교로부터 나비목해충에 효과적인 균주로 선발되었다. 균주 보관용 배지는 Nutrient agar(NA) 평판고체배지를 사용한다. 평판고체배지에 균을 접종하여 항온 배양기에서 35°C에 24시간 배양한 후 냉장보관하여 사용하며, 2주마다 NA 평판고체배지에 계대배양하여 사용한다. 종균용 균주는 500ml 삼각플라스크에 Nutrient broth(NB) 액체배지 100ml를 멸균하여 35°C, 120rpm, 6시간의 조건으로 진탕배양하여 사용한다. 또한 균주의 장기보관을 위해 NB 배지에 24시간 배양된 배양액을 동결보존제인 멸균된 스킨밀크과 1:1로 혼합하여 -80°C에서 보관하여 사용한다.

##### (2) 신규 병원성 세균의 배양조건 확립

- 곤충살충성 단백질을 생산하는 신규병원성세균의 배양 조건을 확인하기 위해 *B.t.* 균주의 일반 상업배지인 NB배지에 접종하여 배양온도, 초기pH, 교반속도 등의 배지 이외의 배양조건을 조사하였다.

##### (3) 신규 병원성세균의 산업배지 조건 확립

- 병원성세균의 배양 최적화를 위해 균주의 성장에 미치는 주요 성분인 탄소원, 질소원에 대한 조사를 진행하였다. 일반적으로 사용되는 *Bacillus*의 기본배지 조성에 탄소원과 질소원에 변화를 주어 최적의 배지 조성을 선정하였으며, 선발된 탄소원과 질소원과 무기염류의 조성비의 최적 조합을 확인하기 위해 마이크로플레이트를 이용하여 각 조건별로 배양 후 최적의 조성을 확립하였다.

##### (4) 배양 결과 분석

- 분광광도계를 통한 흡광도 측정은 산업배지 조성 선발을 위해 사용하였다. 다양한 탄소원과 질소원의 조합 및 조성비에 따른 선발을 위해 시간적으로 빠르며, 비교하기 편리한 흡광도를 측정하여 각각의 탄소원과 질소원 선발을 위해 사용되었다. 선발된 산업배지의 생균수 측정은 평판주입법을 사용하였다. 최종 배양액을 십진희석하여,  $10^{-7}$ ~ $10^{-9}$ 의 희석액을 페트리디ッシュ에 1ml씩 넣고 멸균된 NA배지를 부어 24시간 후 생균수를 측정하였다. 곤충의 살충성을 보이는데 중요한 역할을 하는 내독소단백질량을 정량적으로 측정하기 위해 Bradford method 법을 사용하였다. 시료의 전처리는 기존에 알려진 방법을 참고 하였다. 내독소단백질량을 측정하기 위해

Bovine serum albumin을 최종농도가 0 - 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 샘플을 제조하여 단백질량 측정을 위한 Standard curve를 측정하였으며, 이 결과를 바탕으로 *B.t.* CAB565, CAB566균주 배양액의 내독소단백질량을 측정하였다.

## 나. 대량배양 공정

### (1) Scale-up

- 2KL의 멸균배양기로의 생산을 위해 종균 단계부터  $\rightarrow$  50ml  $\rightarrow$  10L  $\rightarrow$  2ton의 단계에 이르는 공정을 확립하였다. 각 공정마다 균주를 0.5%씩 접종하여 순차적으로 scale-up을 진행하였다.

## (2) 대량배양 확인

- 30L 멸균배양기기의 조건을 바탕으로 2KL의 공정을 수립한다. 배양 중 2시간 간격으로 Sample 을 취하여 pH 및 용존산소량을 측정하여 최적의 배양조건 및 배양시간을 설정한다. 최종배양액 을 샘플링하여 생균수와 내독소단백질량을 측정하였으며 대조구로 시중에 판매중인 에코존을 사용하였다.

## 다. 곤충병원성세균 균주의 제형화

- 곤충병원성 세균의 제제화를 위해 대량배양된 *B.t.* CAB566배양액을 다양한 부형제와 계면 활성제 등을 이용하여 액제, 액상수화제, 수화제의 형태로 제제화 하였다. 제제의 특성을 파악하기 위해 관능검사, 주성분 안정성 등 각종 실험을 통해 가장 안정적인 제형을 조사하였다.

### (1) 곤충병원성세균을 이용한 제제 탐색

- *B.t.* CAB566균주 배양액에 계면활성제, 다당류, PEG, 자외선차단제, 안정제, 결합제 등을 첨가하고 다양한 제조 공정을 통해 액제, 액상수화제, 수화제의 3가지 형태로 제제화 하였다.

### (2) 최적의 제제 선발

- 제조된 액제, 액상수화제, 수화제 세가지 제형의 수율 및 내독소단백질 함유량, 관능검사, 포장 및 보관시 유의점 등을 확인하여 최적의 제제 형태를 선발한다.

**라. 신규 곤충병원성세균 살충단백질 및 균주 제형화를 위한 재료 탐색****(1) 수화제 재료 탐색**

- *B.t.* CAB566 배양액을 이용한 수화제의 효능 및 내독소단백질의 안정성을 향상시키기 위해, Tween 80, 계면활성제, 자외선차단제, 안정제, 결합제 등을 첨가하여 제제의 안정성을 조사한다.

**(2) 내독소단백질 및 곤충병원성세균의 변화 조사**

- 부형제 첨가에 따른 효과를 검정하기 위해 수화제에 포함하는 내독소단백질과 곤충병원성세균의 함량을 Bradford method와 주입평판법을 통해 조사한다. Bradford method는 BSA를 이용하여 standard curve를 그린 후, 수화제를 희석하여 내독소단백질의 양을 정량하였다. 볼플라스크와 test tube를 이용하여 십진희석법을 통해 수화제를 균일하게 희석한 후 주입평판법을 이용하여 수화제의 곤충병원성세균의 수율을 조사한다.

**마. 대량배양 공정체계 확립**

- 곤충병원성세균 *B.t.* CAB566을 제품화 하기 위해 우진비엔지 주식회사의 보유 장비를 이용하여 대량배양 공정체계를 확립한다.

**(1) 미생물 배양**

- 산업배지를 이용하여 Seed 배양, 1차 배양, Main 배양의 단계를 통해 15ton 멸균배양기에 서 배양 볼륨 10ton의 *B.t.* CAB566 균주 배양액을 생산한다.

**(2) 수화제 제제화**

- 미생물 배양액을 수화제 형태로 만들기 위해 Spray dry를 이용하였다. Spray dry의 주입온도 115 ~ 120°C, 배출온도 90 ~ 95°C, 압력 5.6kg/cm<sup>2</sup>, 300L/hr의 조건으로 배양액을 분말로 제조하였다.

**(3) 공정별 수율 확인**

- 공정 시스템 단계에 따른 수율 확인을 하였다. 배양, 농축, 균체회수, 분무건조, 혼합등의 공정 단계에 따른 생균수와 내독소단백질의 변화를 측정하였다. 각 공정별로 손실분을 확인하여 효율적인 대량배양공정시스템을 확립하였다.

## 바. 유기농업자재 공시 등록 의뢰

### (1) 등록 시험의뢰

- 유기농업자재 등록을 위해 농촌진흥청에서 지정된 공인시험기관에 등록 시험을 의뢰 하였다.  
다. 강원대학교 친환경농산물안전성센터에서 미생물 시험, 약해 시험을 진행한다. 한국생물 안전성연구소에서 6종의 독성시험을 진행한다.

### (2) 공시등록

- 신규 곤충병원성세균 *B.t.* CAB566의 유기농업자재 등록을 위해 농촌진흥청 지정 공시등록 기관인 강원대학교 친환경농산물안전성센터에 공시등록을 진행하였다.

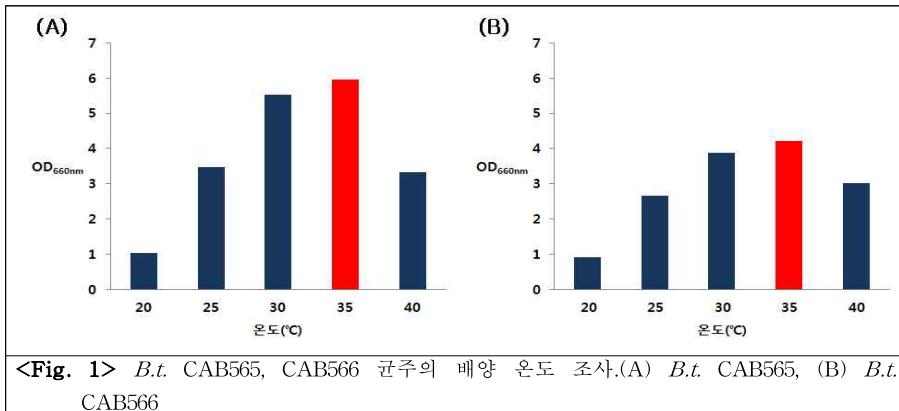
## 사. 에코파워의 유해 미생물 및 약해 확인

- 에코파워의 유해 중금속 및 약해 평가를 수행하였다. 농촌진흥청 공인 시험기관인 강원대학교 친환경농산물안전성센터에 시험을 의뢰하여 유해미생물(5종) 및 약해가 발생하기 쉬운 작물(6종)에 시험을 진행하였다.

## 2. 연구 수행 결과

### 가. 배양 적정 온도 확인

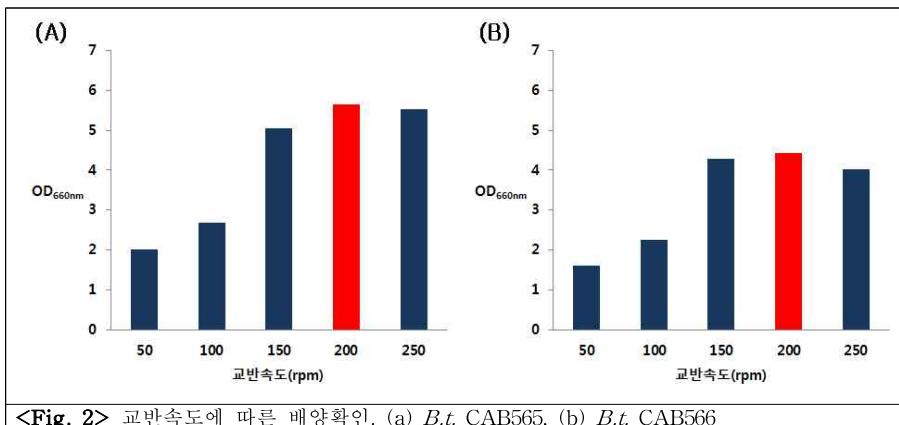
- 신규 병원성세균에 대한 배양온도 확인을 위해 일반혼합배지인 NB배지를 이용하여 온도범위 20 ~ 40°C 범위에서 5°C 간격으로 24시간 동안 진탕배양하여 흡광도를 측정하였다. 흡광도 측정결과 *B.t.* CAB565, CAB566 균주 모두 30°C와 35°C에서 높은 O.D.값을 나타내는 것을 확인하였으며 그 차이는 크지 않다.



<Fig. 1> *B.t.* CAB565, CAB566 균주의 배양 온도 조사.(A) *B.t.* CAB565, (B) *B.t.* CAB566

#### 나. 교반속도 확인

- 교반속도는 배지에 전달되는 산소전달력에 차이를 준다. 이는 결국 균체의 성장량의 차이를 나타낸다. NB배지를 이용하여 35°C에서 교반속도를 50 ~ 250rpm까지 50의 간격으로 24시간동안 진탕배양하여 흡광도를 측정하였다. 흡광도 측정결과 *B.t.* CAB565, CAB566균주 모두 200rpm에서 높은 O.D. 값을 나타내는 것을 확인하였다.

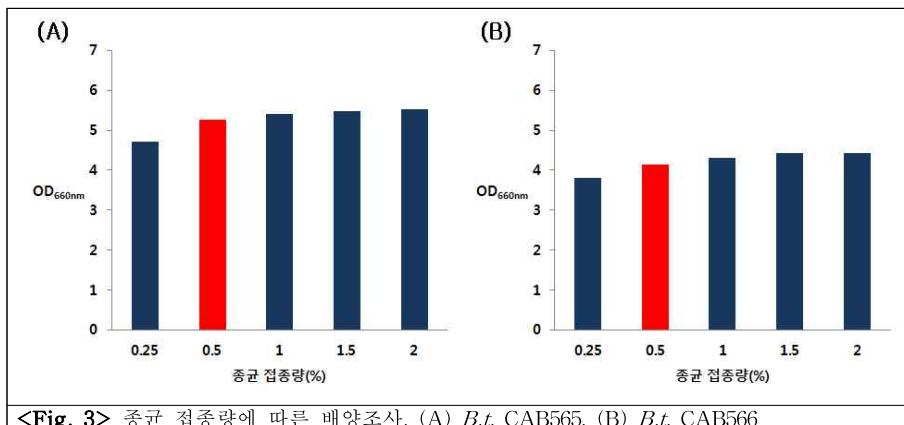


<Fig. 2> 교반속도에 따른 배양확인. (a) *B.t.* CAB565, (b) *B.t.* CAB566

#### 다. 접종량에 따른 배양확인

- 접종량에 따른 배양차이를 확인하였다. 온도 35°C, 200prm의 조건에서 접종량을 0.25 ~

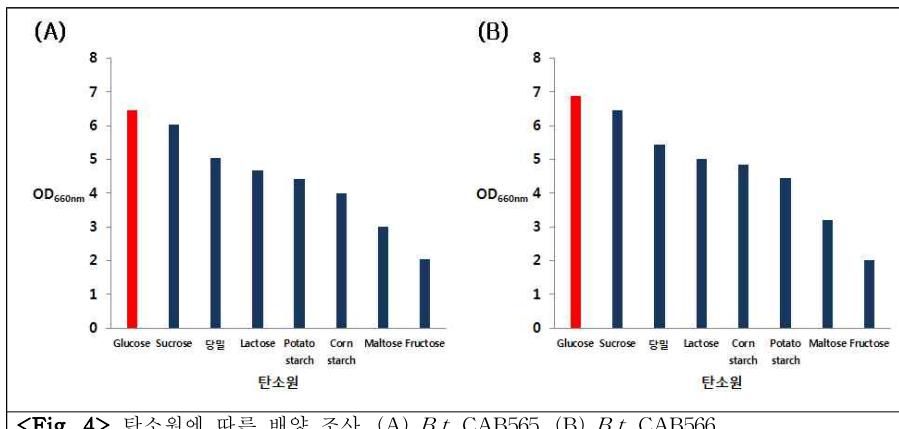
2.0%까지 각각 접종하여 24시간 배양 후 O.D.값 측정을 통해 배양정도를 확인하였다. 0.5%에서 2.0%까지 큰 차이를 보이지 않는 것을 확인하였으며, 대량배양공정시 종균의 양을 고려하여 0.5%를 적정 접종량으로 선정하였다.



<Fig. 3> 종균 접종량에 따른 배양조사. (A) *B.t. CAB565*, (B) *B.t. CAB566*

#### 라. 신규 병원성세균의 탄소원 선정

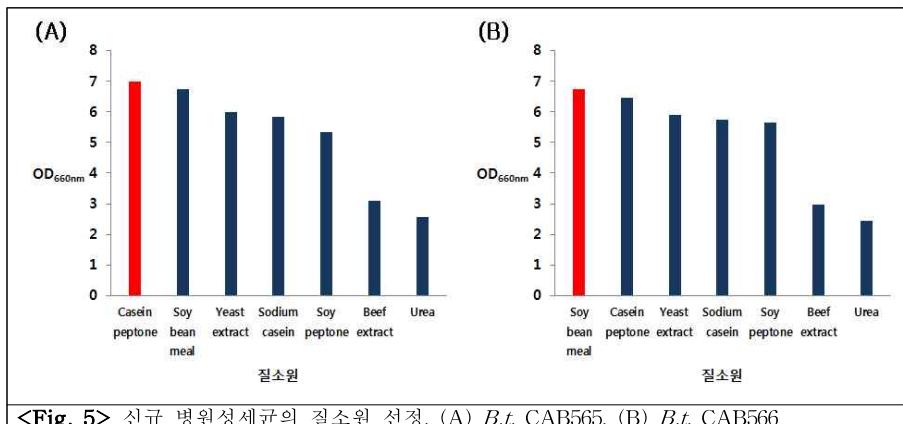
- 신규 병원성세균의 생육에 적합한 탄소원을 선발하기 위해 *Bacillus*의 생육에 적합한 기본 배지(Glucose 0.5%, Yeast extract 0.5%, CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O 0.1%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5%, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.3%, MnSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O 0.1%)에 탄소원인 Glucose를 빼고 Sucrose, Fructose, Corn starch, Potato starch, 당밀, Malotose, Lactose를 0.5%씩 넣어 앞서 조사된 배양조건인 온도 35°C, 200rpm, 종균 접종량 0.5%에서 24시간 배양하여 O.D.값을 측정하였다. *B.t. CAB565*, *CAB566*균주 모두 Glucose를 탄소원으로 사용하였을 때 각각 6.88, 6.44로 가장 높은 O.D. 값을 나타내는 것으로 조사되었다. 이를 통해 Glucose를 탄소원으로 선정하였다.



<Fig. 4> 탄소원에 따른 배양 조사. (A) *B.t.* CAB565, (B) *B.t.* CAB566

#### 마. 신규 병원성 세균의 질소원 선정

- 신규 병원성 세균의 생육에 적합한 질소원을 선별하기 위해 기본배지에 질소원인 Yeast extract 대신 Sodium casein, Casein peptone, Soy peptone, Soy bean meal, Beef extract, Urea를 1.0%씩 넣어 동일한 조건에서 24시간 배양 후 흡광도를 측정하였다. *B.t.* CAB565 군주는 Casein peptone을 사용하였을 때 가장 높은 O.D.값을 나타내었으며( $OD_{660\text{nm}}$  6.98), *B.t.* CAB566 군주의 경우 Soy bean meal을 사용하였을 때 가장 높은 O.D.값을 보였다( $OD_{660\text{nm}}$  6.74). 두 군주 모두 Casein peptone과 Soy bean meal의 차이가 크지 않았지만 혼미경상으로 관찰하였을 때, 내독소단백질의 형성이 Casein peptone이 더 효과적이었기 때문에 질소원으로 선정하였다.



<Fig. 5> 신규 병원성 세균의 질소원 선정. (A) *B.t.* CAB565, (B) *B.t.* CAB566

#### 바. 산업배지의 조성비 결정

- 기본배지를 중심으로 탄소원, 질소원으로 결정된 Glucose와 Casein peptone의 함량에 따른 영향을 조사하였다. 무기염류는 기본배지에서 사용한 농도로 사용하였다. 96-well 마이크로 플레이트에 미리 제조한 배지 200ul를 넣은 후 종균 0.5%를 접종하여 35°C 배양기에서 24시간 배양 후 O.D.값을 측정하였다. *B.t.* CAB565, CAB566균주 모두 B7에서 가장 높은 O.D.값을 나타낸 것을 확인 할 수 있었다. 이를 토대로 Jar-fermentor 배양을 통한 대량배양공정시 탄소원, 질소원, 무기염류의 조성비를 2:3:1를 기준으로 설정하였다.

	Ratio(C:N:M)	O.D. <sub>660nm</sub>		Ratio(C:N:M)	O.D. <sub>660nm</sub>		Ratio(C:N:M)	O.D. <sub>660nm</sub>
A1	1:1:1	4.86	B1	2:1:1	5.83	C1	3:1:1	5.68
A2	1:1:2	4.75	B2	2:1:2	5.23	C2	3:1:2	6.52
A3	1:1:3	4.35	B3	2:1:3	6.32	C3	3:1:3	5.11
A4	1:2:1	6.56	B4	2:2:1	7.01	C4	3:2:1	6.03
A5	1:2:2	6.12	B5	2:2:2	6.78	C5	3:2:2	6.43
A6	1:2:3	6.04	B6	2:2:3	6.32	C6	3:2:3	6.36
A7	1:3:1	6.32	B7	2:3:1	8.54	C7	3:3:1	7.89
A8	1:3:2	6.44	B8	2:3:2	8.01	C8	3:3:2	7.65
A9	1:3:3	6.56	B9	2:3:3	7.89	C9	3:3:3	7.54

<Table 1> *B.t.* CAB565 균주의 배지조성 실험

	Ratio(C:N:M)	O.D. <sub>660nm</sub>		Ratio(C:N:M)	O.D. <sub>660nm</sub>		Ratio(C:N:M)	O.D. <sub>660nm</sub>
A1	1:1:1	4.46	B1	2:1:1:	5.39	C1	3:1:1	5.68
A2	1:1:2	4.45	B2	2:1:21	5.01	C2	3:1:2	6.12
A3	1:1:3	4.65	B3	2:1:3	6.00	C3	3:1:3	4.81
A4	1:2:1	6.26	B4	2:2:1	6.61	C4	3:2:1	5.51
A5	1:2:2	5.81	B5	2:2:2	6.28	C5	3:2:2	6.12
A6	1:2:3	5.91	B6	2:2:3	6.12	C6	3:2:3	6.03
A7	1:3:1	6.00	B7	2:3:1	8.21	C7	3:3:1	7.41
A8	1:3:2	6.14	B8	2:3:2	7.71	C8	3:3:2	7.23
A9	1:3:3	6.22	B9	2:3:3	7.46	C9	3:3:3	7.43

<Table 2> *B.t.* CAB566균주의 배지조성 실험

배지조성	조성비(%)
Glucose	2.0%
Casein peptone	3.0%
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.1%
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5%
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.3%
MnSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.1%

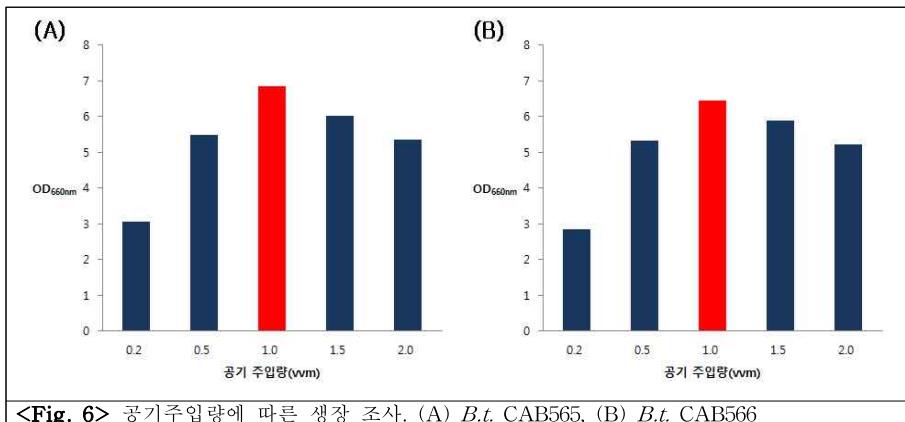
<Table 3> 병원성세균 *B.t.*의 최적 산업 배지 조성

## 사. 대량배양 공정

### (1) 공기 주입량에 따른 성장을 비교

- 삼각플라스크에서는 지속적인 공기 주입이 불가능하기 때문에 대량배양공정체계를 확립하기 위해서는 Jar-fermentor에서의 산소소비량을 측정하여야 한다. 배양시 최적 공기 주입량을 알아보기 위하여 30L Jar-fermentor에서 산업배지 10L를 멀균한 후, *B.t.* CAB565,

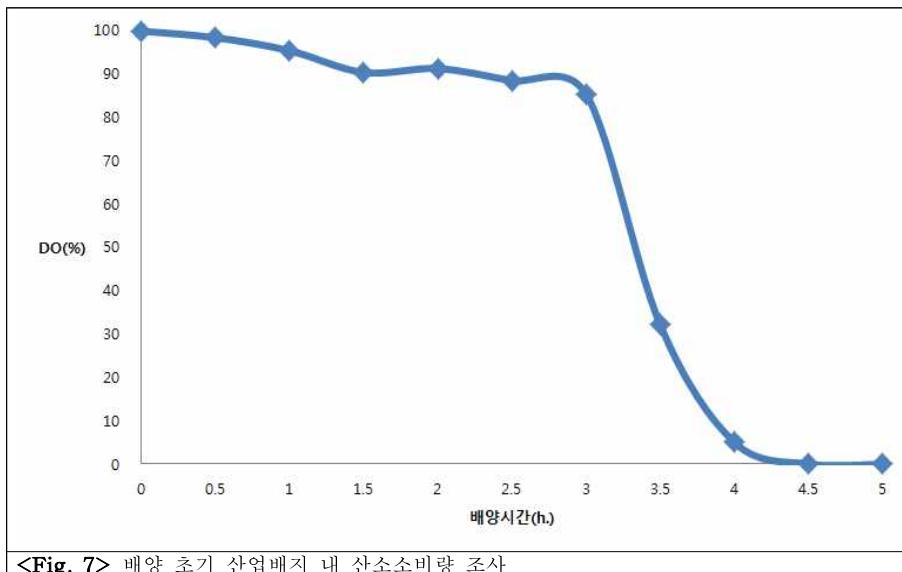
CAB566균주를 접종하여 35°C, 200rpm의 조건하에서 2일간 배양한 후 O.D.값을 측정하였다. 배양 중 공기 주입량을 0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0vvm으로 달리하여 배양한 결과 1.5vvm이상의 공기 주입량에서는 *B.t.*의 성장이 줄어드는 현상을 보였다. 일정량 이상의 과도한 산소는 균주의 성장에 방해가 되는 것으로 조사되었으며 공기주입량은 1.0vvm이 효과적인 것으로 조사되었다.



<Fig. 6> 공기주입량에 따른 생장 조사. (A) *B.t.* CAB565, (B) *B.t.* CAB566

## (2) Jar fermentor에서 산소 소비량 확인

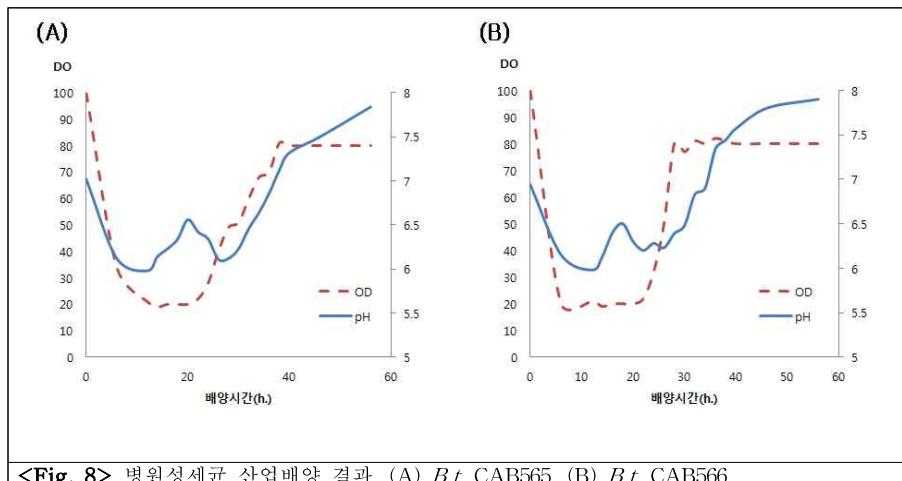
- 배양 중 배지 내 용존산소량을 0으로 떨어뜨리지 않기 위해 초기 산소 소비량을 조사하였다. 산업배지조성을 30L Jar-fermentor에 총 볼륨 10L를 멀균하였으며, air량은 1vvm(10L/m), 내압 0.5로 배양하였다. 접종 0 ~ 3시간까지는 산소소비량이 크게 차이가 없었다. 하지만 3시간 이후부터 급격히 배지내 용존산소량이 줄어드는 것으로 확인되었다. 보통 효소나內독소단백질과 같은 2차 대사산물을 생성하는 균의 경우 배지 내 용존산소량을 20%이상으로 유지시켜준다. 산소의 양이 적으면 대사산물을 생성하는 영향을 미쳐 그 생산량이 줄어들기 때문이다. 배양 3 ~ 4시간사이에 소비되는 산소량을 계산 하였을 때 분당 0.13L씩 더 사용하는 것으로 조사되었다. 신규 병원성세균의 배양시 배지 내의 용존산소량의 양을 20%이상으로 유지 시키기위해 배양 3시간 후부터 배양기에 공급하는 air의 양을 조금씩 높여 최소 용존산소량의 농도를 20%이상으로 유지시키는 배양 조건을 설정하도록 한다.



<Fig. 7> 배양 초기 산업배지 내 산소소비량 조사

### (3) Jar fermentor에서 배양 조사

- 산소소비량을 고려하여 신규 병원성세균 *B.t* CAB565, CAB566균주를 30L Jar-fermentor에서 배양하였다. 배양 3시간 후부터 급격히 떨어지는 용존산소량을 10분당 0.2vvm씩 높여 배지내 산소의 양을 20%로 유지시켰으며, 대수 증식기 이후 산소의 소비량이 줄어드는 20시간 이후 air의 양을 다시 1vvm으로 줄여 배지 내 용존산소량이 일정하게 유지되도록 설정하였다. 총배양시간은 *B.t* CAB565균주의 경우 48시간, CAB566균주는 56시간이었다.



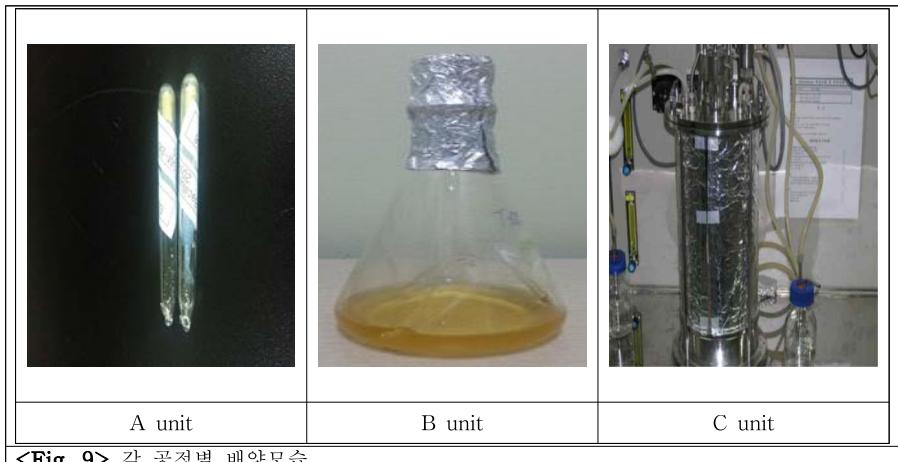
<Fig. 8> 병원성세균 산업배양 결과. (A) *B.t.* CAB565, (B) *B.t.* CAB566

#### (4) 대량배양 공정체계

- 최적 배양조건을 바탕으로 병원성세균 *B.t.* CAB565, CAB566의 pilot plant 생산 process를 설정하였다. Scale-up 단계는 *B.t.* 앰플  $\rightarrow$  50ml  $\rightarrow$  10L  $\rightarrow$  2kL의 단계로 진행되며, 단계 별로 seed량은 0.5% ~ 1.0%로 설정하였다. 종균 *B.t.*는 스킨밀크를 이용하여 동결건조하여 보관한 앰풀을 사용하였다. 50ml의 배양은 NB배지를 사용하였으며, 10L, 2kL은 산업배지를 사용하였다. 각 단계별 배양조건 및 배양시간은 다음과 같다.

Process	배양 volume	배양조건	접종량	배양시간(hr.)
A unit	앰플	-80°C	-	-
B unit	50 ml	35°C, 200rpm	앰플 1개	6
C unit	10 L	35°C, 200rpm	50ml	8
Main	2 kL	35°C, 80rpm	10L	50

<Table 4> 각 공정별 배양 조건



&lt;Fig. 9&gt; 각 공정별 배양모습

### (5) Pilot plant 생산

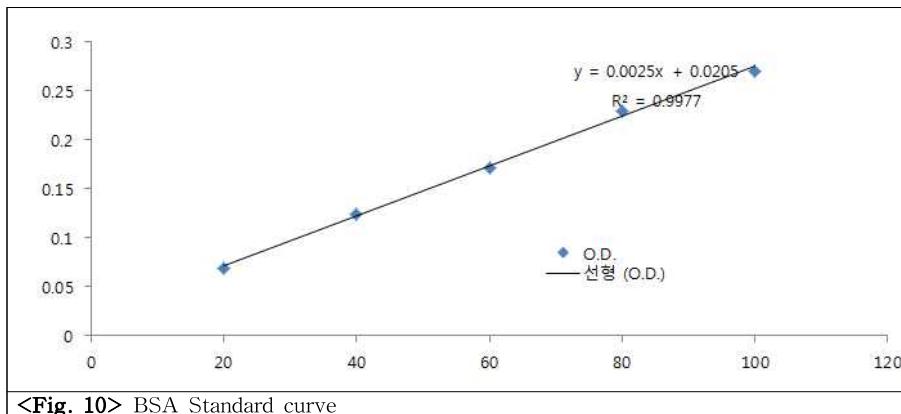
- 생산 process를 확립한 후 이를 바탕으로 pilot plant 생산 배양을 진행하였다. B unit은 250ml 삼각플라스크에 NB배지 50ml를 멸균한 후, 앰플 1개를 접종하여 전통배양기에서 배양을 진행하였다. C unit은 30L Jar-fermentor에 산업배지 10L를 멸균하여 B unit 50ml를 접종하였다. Main 배양은 4 ton Jar-fermentor에 2kL의 산업배지를 멸균하여 C unit이 배양 8시간이 되었을 때 접종하였다. B unit에서 C unit으로 접종은 압력에 견딜 수 있는 이송도구를 제작하여 B.t. 균 이외의 균이 오염되지 않도록 하였다. Main 배양은 50시간 배양을 기준으로 배양 중 6시간 단위로 샘플링하여 오염여부를 확인 하였으며, 포자와 내독소단백질 생성을 관찰 후 배양종료 시점을 설정하였다. 모든 배지는 121°C에서 30분간 멸균을 진행하였으며, 접종은 무균실에서 진행되었고, 발효기로의 접종은 이송도구 멸균을 따로 진행하여 무균상태에서 작업이 이루어지게 하였다. 배양 주 pH, D.O.는 컴퓨터에 의해 5초간격으로 자동으로 측정하여 저장되었으며, 최종 배양액은 샘플링하여 QC를 진행하였다.

Main 배양	Temp. : 35°C
	RPM : 80rpm(4 ton 배양기 기준 -> 터빈 type)
	Air : 1.0vvm(2kL/m)
	pH : 멸균전 8.51, 멸균후 7.05, 배양종료 7.8 ~ 8.2
	Working volume : 50 ~ 70%
	배양시간 : 50시간(내독소 단백질 생성 후 lysis)
	특징 : 배양초기 성장은 느리나, 6시간 이후 성장이 빨라지며, 8~12시간 form 발생이 잦게 나타남. 이후 다시 form이 줄어들어 배양 완료 시까지 form이 발생하지 않음.

&lt;Table 5&gt; Main 배양 특징

#### (6) 신규 병원성센균의 수율 및 살충단백질 확인

- 최종 배양액의 생균수 측정 및 살충성단백질의 양을 조사하였다. 대조구로는 시중에 판매중인 *B.t.* 제품인 에코존을 설정하였다. 배양결과 *B.t.* CAB565균주의 경우 생균수  $1.7 \times 10^9$ cfu/ml로 측정되었으며 살충성 단백질의 양은 22,230 $\mu$ g/ml로 27번 균주는  $1.3 \times 10^9$ cfu/ml, 18,380 $\mu$ g/ml로 측정되었다. 생균수 및 살충성단백질 모두 대조구보다는 높은 함량을 보였다. 내독소단백질량의 실제 살충력과 연관이 있는지 여부는 실험실 및 야외실험을 통해 검증할 필요가 있다.



&lt;Fig. 10&gt; BSA Standard curve

	생균수(cfu/ml)	내독소단백질량(ug/ml)
예 코존(대조구)	$1.2 \times 10^9$	7,410
B.t. CAB565	$1.7 \times 10^9$	22,230
B.t. CAB566	$1.3 \times 10^9$	18,380

&lt;Table 6&gt; 배양완료액의 생균수 및 내독소단백질량 측정

#### 아. 곤충병원성 세균의 제제화

- 사용목적에 따라 *B.t.* CAB566을 다양한 형태의 제형으로 만들었다. 제조 및 사용하기 편리한 액체, 보관 및 희석시 내독소단백질의 분산이 용이한 액상수화제, 보관 및 제품의 안정성이 뛰어난 수화제의 형태로 제조하였다.
- 액상제제는 제조 및 사용이 편리한 이점이 있지만 장기 보관시 용기의 팽창현상이 관찰되며, 미생물 특유의 발효취로 인해 선호도가 떨어졌으며, 액상수화제는 분산력이 뛰어나지만 제조 공정상의 어려움, 다른 제형에 비해 수율이 떨어지는 단점이 있다. 수화제는 제조공정상 시간이 오래 걸리며, 제조 비용도 많이 들지만, 사용 및 보관이 용이하며 장기간 보관에도 내독소단백질 및 곤충병원성 세균의 유지에 장점이 있어 최종 제제화 형태를 수화제로 선정하였다.



&lt;Fig. 11&gt; 곤충병원성 세균을 이용한 다양한 형태의 제제

#### (1) 액제

- *B.t.* CAB566배양액을 이용하여 액상제제를 제조하였다. 액상 상태에서의 내독소단백질과 곤충병원성세균의 보존을 위해 PEG 8000과 다당류를 사용하였다. 다당류를 이용하여 내독소단백질과 곤충병원성세균을 감싸 외부 자극으로부터 보호하는 역할을 하며, PEG 8000을 이용하여 미생물 및 내독소단백질을 부착하여 미생물 고정에 영향을 준다.



<Fig. 12> 액상 제제의 현미경사진

## (2) 액상수화제

- 배양액을 Sodium alginate, Methylcellulose, Sodium metabisulfite 등을 이용하여 캡슐화 및 보존성을 높이고 활성탄을 사용하여 미생물을 고정화 하였다. 미생물 및 내독소단백질을 감싸 수축된 상태로 유지되어 있는 제형을 물에 희석하면 분산되어 골고루 퍼지도록 제형을 제조하여 엽면살포하였을 경우 엽에 골고루 묻어 섭식활동을 하는 청벌레를 효과적으로 방제할 수 있는 형태로 제조하였다.



<Fig. 13> 액상수화제의 현미경사진

### (3) 수화제

- B.t CAB566배양액을 분무건조기를 이용하여 분말 형태로 제조하였다. 이 분말에 효과 상승 및 분산제, 전착제 등을 첨가하여 수화제를 제조하였다. 각 부형제는 목적에 맞게 사용하였으며, 부형제와 B.t. 분말의 혼합 및 용해도를 확인하여 제제화 하였다.

부형제의 종류	특징
전착제	회식 후 약제를 살포할 때 작물의 잎면에 내독소단백질과 곤충병원성 세균이 균일하게 퍼지고, 미끄러운 잎면에 작 불어 풍우에도 유실하지 않는 성질을 증가시킨다.
계면활성제	분자 중에 친수성기 및 친유성기를 모두 포함하는 양친매성 물질로, 세정력, 분산력, 가용화력, 상균력, 기포력 및 침투력을 향상시킨다.
자외선차단제	제조가 완성된 조성물의 운반, 저장 및 조성물의 살포 등에서 광선에 포함된 자외선을 차단하여 농약 조성물 내의 활성성분인 미생물 균주 및 내독소단백질의 안정성을 유지한다.
안정제	조성물의 안정성을 향상시킨다.
결합제	조성물을 구성하는 각 성분들을 긴밀하게 결합 또는 수용하도록 한다.

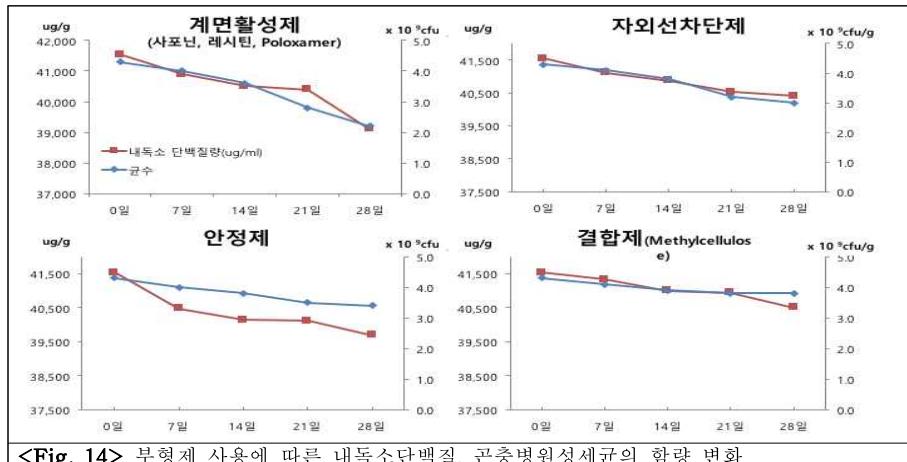
<Table 7> 수화제에 사용된 부형제의 특징

	액제	액상수화제	수화제
냄새	발효취	발효취	무취
저장성	장기 보관시 용기팽창	실온 보관	실온 보관
주성분 안정성	시간 경과에 따라 생균수 저하 및 내독소단백질 함량 저하	주성분 함량변화 적음	주성분 함량변화 없음
내독소 단백질 함량	약 4,000 ug/ml	약 6,000 ug/ml	약 40,000 ug/g
제조 공정 시간	72hr.	96hr.	120hr.

<Table 8> 제제의 선발

### 자. 수화제의 특성 조사

- 최종 제형으로 선발된 수화제의 내독소단백질과 곤충병원성세균의 함량 유지 및 살충력 향상을 위해 다양한 형태의 부형제를 혼합하여 안정성 변화를 관찰하였다. 단기간에 함량 변화를 관찰하기 위해 45°C의 가혹조건에서의 함량 변화를 관찰하였다.
- 최종 제제의 함량으로 설정한  $1.0 \times 10^9$  cfu/g을 모두 충족하는 결과를 나타냈으며, 계면활성제, 자외선차단제, 안정제, 결합제를 사용한 시험구 모두 초기 내독소단백질량에 비해 5% 내외로 분해된 결과를 확인할 수 있었다. 부형제의 조성비율을 조절하여 장기간 보관에도 더욱 효과적인 곤충병원성제제를 제조할 수 있을 것으로 기대된다.



<Fig. 14> 부형제 사용에 따른 내독소단백질, 곤충 병원성세균의 함량 변화

### 차. 대량배양 공정 확립

- 곤충병원성세균을 이용한 시제품 생산을 위한 대량배양공정체계를 확립하였다. 대량배양공정체계는 크게 2가지로 나뉘는데 *B.t.* CAB566의 미생물배양액을 생산하기 위한 미생물배양공정, 이 배양액을 이용하여 수화제 형태로 생산하기 위한 제제화 공정으로 나뉜다.
- 미생물 종균 앰플 또는 colony로부터 seed배양을 거쳐 2차 배양, 매인배양(10ton)에 이르기 까지 총 4 ~ 5단계를 거친다. 이렇게 생산된 미생물을 배양액은  $5.0 \times 10^9$  cfu/ml의 생균수, 약 4,000ug/ml의 내독소 단백질 수율을 보인다.
- 미생물 배양액을 분상으로 만들기 위해 분무건조한다. 분무건조과정 중 미생물을 부착하기 위해 Starch계열의 부형제를 혼합하여 분무건조하며, 분무건조의 조건은 주입온도 115 ~ 120°C, 배출온도 90 ~ 95°C, 압력 5.6kg/cm<sup>2</sup>, 300L/hr의 조건이다. 이렇게 생산된 분말은 4.0 ~  $6.0 \times 10^{10}$  cfu/g의 생균수, 약 40,000 ~ 45,000 ug/g의 내독소단백질 수율을 나타낸다. *B.t.* CAB566분말에 수화제의 효능 및 안정성을 높이기 위한 부형제와 혼합하여 시제품을 생산하는 공정체계를 확립한다.



&lt;Fig. 15&gt; 대량배양공정 모식도

	생산 볼륨	공정시간	수율	단계
Seed 배양	5L	16hr.	$2.0 \times 10^8$ cfu/ml	2차배양 종균 배양
2차 배양	100L	12hr.	$6.0 \times 10^8$ cfu/ml	메인 종균 배양
메인 배양	10,000L	50hr.	$5.0 \times 10^9$ cfu/ml 4,000 ug/ml	미생물 배양완료
분무건조	1,000kg	33hr.	$4.0 \sim 6.0 \times 10^{10}$ cfu/g 40,000 ~ 45,000 ug/g	수화제 원료
혼합	10,000kg	10hr.	$4.0 \sim 6.0 \times 10^9$ cfu/g 4,000 ~ 4,500 ug/g	제품 생산

&lt;Table 9&gt; 각 공정별 수율 변화

### 카. 유기농업자체 공시등록

- 대량배양 process를 확립하고 *B.t. CAB566* 수화제를 상품화 단계를 진행한다. *Bacillus thuringiensis*는 대표적인 미생물 곤충병원성세균으로서 친환경 및 유기농업에 사용하기 위해 친환경농어업 육성 및 유기식품의 관리지원에 관한 법률에 따라 유기농업자체로 공시등록을 진행한다. 제품명 『에코파워』는 *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* CAB566을 보증성분으로하여  $1.0 \times 10^9$  cfu/g을 함량으로 수화제 형태로 제품등록을 진행였으며, 공시등록에 필요한 외부시험성적서는 강원대학교 친환경농산물안전성센터와 한국생물안전성연구소에서 발급받았다. 또한 위 시험성적서를 바탕으로 공시등록기관인 강원대학교 친환경농산물안전성센터에서 공시등록을 진행하였으며, 2016년 4월 6일 공시 번호 -2-5-125로 “에코파워”를 공시등록할 수 있었다. 또한 친환경『친환경농어업 육성 및 유기식품 등의 관리 지원에 관한 법률』에 따라 3년 후, 품질인증 등록을 준비하고 진행하고자 한다.

 <small>■ 농림축산식품부 소관 친환경농어업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률 시행규칙 [별지 제2호서식]</small> <small>(일반)</small>	
<small>공시번호 : 제 공시-2-5-125호</small>	
<b>유기농업자재 [○] 공시서 [ ] 품질인증서</b>	
1. 업체명 : 우진비엔지㈜      2. 대표자 성명 : 강 재 구 3. 주소(사업장) : 경기도 화성시 양감면 정문송산로 230 4. 자재의 명칭 : 미생물 5. 자재의 구분 : 충해관리용 6. 상표명 : 에코파워 7. 주성분(원료)의 종류 및 함량(%) : - 주성분명 : <i>Bacillus thuringiensis</i> - 원료의 함량 : 미생물( <i>Bacillus thuringiensis</i> ) 10% 8. 유효기간 : 2016. 4. 6 ~ 2019. 4. 5 9. 제조장 주소 또는 수입원산지(국가, 제조사) : 경기도 화성시 양감면 정문송산로 230 10. 최초 공고일 : 2016. 4. 6 11. 최초 공시등기관 : 강원대학교 산학협력단  <small>「친환경농어업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률」 제38조제2항 및 「농림축산식품부 소관 친환경농어업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률 시행규칙」 제49조제2항에 따라 위와 같이 유기농업자재 공시(품질인증)임을 증명합니다.</small>	
<small>2016년 11월 22일</small>	
<small>강원대학교 산학협력단장</small>	
 <small>2016.11.22 09:00:11 (2016.11.22 09:00:11)</small>	

<Fig. 16> 에코파워 유기농업자재 목록공시 등록증



<Fig. 17> 유기농업자재 에코파워

#### **타. 에코파워의 약해 및 유해미생물 조사**

- 에코파워의 주성분인 *B.t.* CAB566의 배양과정에서 배지의 멸균공정은 고압과 고온을 이용하기 때문에 여러 가지 배지성분들이 들어갔을 때 성분의 변화가 발생할 수 있으며, 경쟁력있는 단가 산정을 위해 bulk type의 원료를 사용한다. 따라서 원료를 제조하는 공정 체계에서 시약만큼 안전하지 않을 수 있다. *B.t.* CAB566은 유기농업 및 친환경농업시 나방류 해충방제를 특징으로 하고 있다. 이와 같은 목적에 의해 유기농업 및 친환경농업의 안전한 사용을 위해 강원대학교 친환경농산물안전성센터에 약해시험 및 유해미생물 함유여부를 의뢰하여 확인하였다. 고추, 배추, 상추, 오이, 토마토, 벼에 대해 약해조사한 결과 상기 작물에서 안전하게 사용할 수 있음을 확인하였다. 또한 제제에서 병원성대장균, 병원성살모넬라, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*의 유해미생물에 대해 확인한 결과, 에코파워에서는 상기 유해미생물이 함유되지 않아 안전하게 사용할 수 있음을 확인하였다.

작물명	무처리	기준량	배량
고추	15-F-356 무처리	15-F-356 기준량	15-F-356 배량
배추	15-F-356 무처리	15-F-356 기준량	15-F-356 배량
상추	15-F-356 무처리	15-F-356 기준량	15-F-356 배량
오이	15-F-356 무처리	15-F-356 기준량	15-F-356 배량
토마토	15-F-356 무처리	15-F-356 기준량	15-F-356 배량
벼	15-F-438 무처리	15-F-438 기준량	15-F-438 배량

&lt;Fig. 18&gt; 애코파워의 약해 시험

제 C-C-2015-54-2호

### 병원성미생물 검사성적서

위 탁 자	① 성명 (법인명)	우진비엔지	② 주민등록번호 (법인등록번호)	*****-*****
	③ 주소	경기도 화성시 양감면 정문송산로 230		
공 시 품	④ 성상	고상		
	⑤ 상표명	에코파워		
	⑥ 제조회사	우진비엔지		
	⑦ 검사방법	o 병원성미생물 선택배지를 이용한 검정		
	⑧ 용도	유기농업자재 목록공시 등록용		
⑨ 검 사 항 목	병원성 미생물			검사결과
	병원성 대장균( <i>Escherichia coli</i> O157:H7)			불검출
	병원성 살모넬라( <i>Salmonella</i> spp.)			불검출
	황색포도상구균( <i>Staphylococcus aureus</i> )			불검출
	리스테리아 모노사이토제네스( <i>Listeria monocytogenes</i> )			불검출
	바실러스 세레우스( <i>Bacillus cereus</i> )			불검출
1) 본 성적서는 시료를 3번복 분석한 후의 결과 값임. 2) 본 성적서는 고객이 제공한 시료를 시행한 결과로서 전체제품에 대한 품질을 보증하지는 않음. 3) 본 성적서의 결과는 쟁고, 전단, 흙보 및 소송 등의 수단으로 사용하실 수 없음.				

2015년 10월 29일

강원대학교 친환경농산물안전성센터장 (인)



&lt;Fig. 19&gt; 에코파워의 병원성미생물 검사 결과

#### 파. 에코파워의 안정성 확인

- 에코파워의 유통을 위해 보관온도에 따른 *B.t.* CAB566의 포자수와 내독소단백질 함량 변화를 조사하였다. 실온에서는 오랜기간 동안 안정성 여부를 판단하여야 하기 때문에 식약청의 안정성 시험에 따라 45°C의 가혹조건에서 포자수와 내독소단백질의 변화를 한달 동안 1주 간격으로 측정하였다. 45°C의 가혹조건하에서 에코파워 수화제는 포자수는 보증성분인  $1.0 \times 10^9$  cfu/g이상을 유지하였고 내독소 단백질은 초기 함량의 95% 이상을 포함하여 여름철 고온하에서도 보관에 큰 문제가 없을 것으로 판단되며 내독소단백질의 함량변화가 거의 없기 때문에 나방류에 대한 살충력 또한 유지될 것으로 판단된다.

경과시간	포자수(cfu/g)	내독소단백질량(ug/g)	내독소 단백질 함량 변화
0주	$4.2 \times 10^9$	4,300	-
1주	$4.2 \times 10^9$	4,300	100.0%
2주	$4.0 \times 10^9$	4,240	98.6%
3주	$3.6 \times 10^9$	4,210	97.9%
4주	$3.3 \times 10^9$	4,140	96.2%

<Table 10> 에코파워의 안정성 변화

#### 하. 에코파워의 홍보

- 본 과제를 통해 개발된 에코파워의 홍보를 위해 자사 Agro-care 사업부에서 자사 홍보자료를 제작하여 에코파워를 품목에 첨가하였다. 본 홍보자료는 자사와 거래 중인 전국의 대리점에 전달하여 제품군에 추가하였다. 또한 경기도농업기술원과 협력을 통해 2016년 국제농기계자재박람회에 참석하여 자사의 유기농업자재와 에코파워를 농민 및 바이어에게 홍보하는 자리를 마련하였다.

 <p><b>Agro_Care 제품안내</b></p> <p>Best &amp; Green Technology Best Quality &amp; Green Performance Best Service &amp; Good Partner</p> <p>진짜 품질의 힘 당위의 힘 나방개방, 친환경 생물학적 방제 불화암산화제</p> <p>우진 B&amp;G (주)</p>	<p><b>에코파워</b></p> <p>공시-2-5-125</p> <div style="display: flex; align-items: center;">  <p>나방류 유충방제 미생물을 발효 저항성, 내성 없음</p> </div> <p>200 g</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>&gt; 비티(BTA)제</li> <li>&gt; 내독소 단백질 생성, 강한 살충활성</li> <li>&gt; 나비목 해충 유충 방제</li> <li>&gt; 저항성 및 약해가 없다.</li> <li>● 적용 : 2,500배 희석(25일)</li> <li>● 작물별, 지역별 유충발생 예상시기에 앞서서 예방, 살포하면 효과적이다.</li> <li>&gt; 작물충해관리용자재</li> </ul>
---	--

<Fig. 20> 유기농업자재 에코파워 홍보자료 제작

**경기도농업기술원**  
GARES

**경기도농업기술원**  
GARES

**생명공학, 생명산업의 리더,  
첨단산업을 이끄는 글로벌 기업**

**우진 B&G (주)**

우진B&G(주)는 1977년 바이오 기술 개발의 주도적 역할을 위하여 설립되어 첨단, 경쟁 / 핵심 및 생명공학기술을 바탕으로 동물용, 식물용, 미생물 분야에 기여해온 바이오 기술력을 기반으로 시장 경쟁력 있는 제품을 개발해온 기업입니다.

우진B&G(주)는 바이오 기술과 생물 공정 및 노하우를 바탕으로 동물용, 식물용, 미생물 분야에 기여해온 바이오 기술력을 기반으로 시장 경쟁력 있는 제품을 개발해온 기업입니다.

우진B&G(주)  
(주) 우진B&G  
The FARMER MADE FOOD  
Organic Farming Material Supplier

포기농업제품 공시 세율  
(금액)-3~5~10%

- 품목
- 원료
- 제조방법
- 유통방법
- 유통기한 및 유통상태
- 유통기한 및 유통상태

포기농업제품 공시 세율  
(금액)-2~4~12%

- 품목
- 원료
- 제조방법
- 유통방법
- 유통기한 및 유통상태
- 유통기한 및 유통상태

포기농업제품 공시 세율  
(금액)-1~2~10%

- 품목
- 원료
- 제조방법
- 유통방법
- 유통기한 및 유통상태
- 유통기한 및 유통상태

우진B&G(주)  
Tel. 031-352-0100  
Fax 031-352-1400  
Homepage [www.woengeneing.com](http://www.woengeneing.com)

**Biotechnology, Life Industry,  
Leader, global company**

**우진 B&G (주)**

Woogene B&G Co., Ltd. was established in 1977 to play a leading role in the development of biotechnology. Based on the Fermentation, purification research / synthesis and biotechnology, we are working to develop market competitive products.

Based on world class technology, experience and know-how for 30 years, we offer animal medicine, active pharmaceutical ingredient (API) for humans, food additives, organic fertilizers, organic pesticides, etc. We are aiming to become a global leader by developing excellent agricultural biotechnology products.

Organic Farming Material Registered Index-2~3~10%

- 품목
- 원료
- 제조방법
- 유통방법
- 유통기한 및 유통상태
- 유통기한 및 유통상태

Organic Farming Material Registered Index-2~3~12%

- 품목
- 원료
- 제조방법
- 유통방법
- 유통기한 및 유통상태
- 유통기한 및 유통상태

Organic Farming Material Registered Index-2~3~10%

- 품목
- 원료
- 제조방법
- 유통방법
- 유통기한 및 유통상태
- 유통기한 및 유통상태

WOEGENE B&G CO., LTD.  
Add. Add. 251, Seongnam-dong, Yangju-si, Gyeonggi-do, Korea  
Tel. 031-352-0100 Fax 031-352-1400 Homepage [www.woengeneing.com](http://www.woengeneing.com)

**<Fig. 21> 2016년 국제 농기계자재 박람회 참석**

## 제3절 2 협동과제명 : 곤충병원 세균의 특성 구명 및 나방류 방제 기술 개발

### 1. 연구 수행 내용

#### 가. 시판 비티제의 살충활성 분석

본 실험에 사용된 파밤나방 유충은 국립농업과학원 농업미생물과 실험실에서 누대 사육한 개체를 사용하였다. 파밤나방 유충은 Petri dish(90×15 mm)에서 인공사료(Bioserve, mixing direction #F9219B)를 공급하여 누대 사육하였다. 번데기는 다른 상자(지름 120×높이 80 mm)로 옮겨서 성충으로 우화하도록 하였고, 우화한 성충은 10% 설탕물을 먹이로 주고 산란을 유도하였다. 곤충의 사육 조건은 25±2°C, 광조건 16L:8D, 상태습도 70±5%로 유지하였다.

시판 비티제 4종, A(*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*,  $1\times10^7$ cfu/ml, 권장농도  $2.5\times10^4$ cfu/ml), B(*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*,  $1\times10^8$ cfu/ml, 권장농도  $2\times10^5$ cfu/ml), C(*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*,  $3\times10^7$ cfu/ml, 권장농도  $3\times10^4$ cfu/ml), D(*Bacillus thuringiensis* subsp.  $1\times10^7$ cfu/ml, 권장농도  $1\times10^5$ cfu/ml)을 권장농도로 희석하여 배추 leaf disc를 침지 처리하였다. 처리한 leaf disc를 실온에서 건조 한 후 파밤나방 3령 유충을 10마리씩 투입하고 25±1°C를 유지하며 매일 6일간 사충수를 관찰하였다. 대조구로 증류수에 침지 처리한 배추 leaf disc를 이용하였다. 인공사료를 이용한 BT균주의 생물검정을 위하여 인공사료 1g에 권장농도의 BT 균주를 100ul씩 접종하고 상온에서 30~40분간 건조시켰다. 파밤나방 3령 유충이 투입된 생물검정용 dish에 침가물을 접종한 인공사료를 투입하고 25°C를 유지하며 6일간 매일 사충수를 관찰하였다. 1g의 인공사료를 모두 섭취한 후에는 무처리 인공사료를 공급하였다. 대조구로 증류수를 접종한 인공사료를 공급하였다.

#### 나. 주관과제로부터 분양받은 *Bacillus thuringiensis* CAB104, CAB110, CAB116, CAB376, CAB424균주의 처리농도별 파밤나방 유충의 살충을 검정

충남대학교에서 분양받은 *Bacillus thuringiensis* CAB104, CAB110, CAB116, CAB376, CAB424를 냉동조건으로 보관하면서 필요시 배양하여 생물검정에 이용하였다. 생물검정용 BT 균주는 TSA 배지에 접종하여 28°C에서 4~7일 동안 배양한 후 접균하여  $1\times10^4\sim10^9$  cfu/ml의 농도로 준비하였다. 배추 leaf disc를 준비된 균 혼탁액( $1\times10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ cfu/ml)에 침지 처리한 후 실온에서 건조시켰다. 처리한 배추 leaf disc에 파밤나방 3령 유충을 10마리씩 투입하고 25±1°C를 유지하며 매일 6일간 사충수를 관찰하였다. 처리 6일 후에는 파밤나방 충체의 무게 및 섭식량을 조사하였다. 대조구로 증류수에 침지 처리한 배추 leaf disc를 이용하였다.

#### 다. CAB104, CAB110, CAB116, CAB376, CAB424균주의 배양 배지별 균주생장 검정

*Bacillus thuringiensis* CAB104, CAB110, CAB116, CAB376, CAB424를 UG media와 NA media에 접종하여 28°C에서 6일간 배양한 후 UG 와 NA media plate에 도말하여 균주의 농도(cfu)를 측정하였다.

과제의 중간평가에서 주관과제와 균주를 통일할 것을 권고 받아 주관과제로부터 CAB565,

CAB566균주를 분양받아 균주의 처리 농도별 파밤나방의 살충율을 검정하였다. 생물검정은 위와 같은 방법으로 처리하였다.

#### **라. 선발 균주의 처리 작물에 따른 방제효과 검정**

*Bacillus thuringiensis* CAB565, CAB566균주를 NA배지에서 28°C, 5일간 배양한 후 접균하여  $1 \times 10^4 \sim 10^9$  cfu/ml의 농도로 준비하였다. 가지와 배추의 leaf disc를 균 혼탁액에 침지 처리한 후 실온 건조하였다. 처리한 가지, 배추 leaf disc에 파밤나방 3령 유충 5마리씩 투입하고 25±1°C를 유지하며 매일 6일간 사충수를 관찰하였다.

#### **마. 배양배지별 선발균주의 독성단백질 생산량 검정**

NA, LB, TSA배지에 *Bacillus thuringiensis* CAB565, CAB566균주를 접종 한 후 28±1°C (RH 90%)에서 6일간 배양한 후 접균하였다. 접균한 균체는 Washing buffer 1(500mM Nacl, 2% Triton X-100)으로 1-2차례 washing한 후 Washing buffer 2(500mM Nacl)로 다시 1-2차례 washing하여 BT의 내독소단백질을 준비하였다. 내독소 단백질의 생산량은 SDS PAGE를 통하여 확인하였다.

#### **바. 선발균주의 살충활성 증진을 위한 첨가제 선발 및 농도별 살충율 검정**

파밤나방 인공사료 1g에 chemical 18종(Potassium carbonate, Zinc sulphate, Sodium carbonate, Calcium sulphate, Calcium choride, Sodium acetate, Magnesium chloride, Calcium carbonate, Peptone, Tryptone, Ammonium nitrate, Sodium nitrate, Mercapto ethanol, Urea, EDTA, Citric acid, Oxalic acid, Vatamin C : 2, 1, 0.5, 0.3, 0.2, 0.1%), 식물정유 13종(Citronella java, Pepper Mint, Cinnamon-leaf, Thyme, Anise, Camphor, Tea tree, Lemon grass, Pine, Fennel, Clove leaf, Lavender, Geranium : 0.1%), 친환경 농자재 5종(Matrine, Derris, Neem, Pyrethrin, Nicotine : 0.1, 0.05, 0.025%)을 100ul씩 접종하고 상온에서 30-40분간 건조시킨다. 파밤나방 3령 유충이 투입된 생물검정용 dish에 첨가물을 접종한 인공사료를 투입하고 25°C를 유지하며 6일간 유지하며 매일 사충수를 관찰하였다. 1g의 인공사료를 모두 섭취한 후에는 무처리 인공사료를 공급하였다. 대조구로 증류수를 접종한 인공사료를 공급하였다.

#### **사. 선발 균주에 의한 배추좀나방, 담배거세미나방의 살충율 검정**

NA배지에서 28°C, 5일간 배양한 후 접균하여 준비한 선발 균주 CAB565, CAB566( $1 \times 10^6 \sim 10^7$  cfu/ml)를 인공사료에 100ul씩 처리한 후 30-40분간 상온에서 건조시킨다. 배추좀나방, 담배거세미나방 3령 유충이 투입된 생물검정용 dish에 균주를 처리한 인공사료를 투입하고 25°C를 유지하며 6일간 유지하며 매일 사충수를 관찰하였다. 1g의 인공사료를 모두 섭취한 후에는 무처리 인공사료를 공급하였다. 대조구로 증류수를 접종한 인공사료를 공급하였다.

#### **아. 선발 균주와 살충활성 증진을 위한 첨가제에 의한 파밤나방 방제효과 검정**

기존에 해충방제 효과가 있는 것으로 알려진 유기농자재 중에서 님(azadirachtin 0.75%), 고삼(matrine 1%), 제충국제(pyrethrine 5%), 테리스(rotenone 0.05%), 담배잎추출물(nicotine 2.2%)을 시중에서 원재를 구입하여 실험에 사용하였다. 각 유기농자재의 처리 농도는 님은 200~2000배(0.5~0.025%, v/v), 고삼은 200~10000배(0.5~0.01%, v/v), 제충국, 테리스, 담배잎추출

물은 500~2000배(0.5~0.025%, v/v) 희석하여 준비하였다. *Bacillus thuringiensis* CAB566균주는 NA배지에 접종하여 27°C에서 4~7일 동안 배양 후 접균하여  $1\times10^5\sim10^7$ cfu/ml의 농도로 준비하였다. 식물추출물과 BT배양액은 인공사료에 접종하기 직전에 1:1로 혼합하여 접종하였다.

실내 생물활성 검정을 위해 3령 파밤나방 유충 5마리씩을 Petri dish(90x15mm)에 투입하고 1g의 인공사료에 친환경자재 또는 BT 혼합액 100 $\mu$ l(혼합제의 농도는 최종 농도로 표시)를 접종하고 실온에서 1시간동안 건조한 후 먹이로 공급하였다. 1g의 인공사료를 모두 섭취한 후에는 무처리 인공사료를 공급하였다. 대조구로 중류수를 접종한 인공사료를 공급하였다. 25±2°C에서 6일간 유지하며 매일 사충수를 관찰하였으며 처리 6일 후에는 살아있는 유충의 무게를 측정하였다. 생물검정은 3회 수행되었으며 매 실험마다 3개의 Petri dish를 반복으로 실험하였다.

선발 균주의 살충활성 증진효과의 포트검정을 위해 고삼추출물은 멸균수로 3000배(0.033%, v/v) 희석하여 생물검정에 사용하였다. *Bacillus thuringiensis* CAB566균주는 TSA 배지에 접종하여 27°C에서 4~7일 동안 배양 후 접균하여  $1\times10^5\sim10^7$ cfu/ml의 농도로 준비하였다. 고삼추출물과 BT 배양액은 배추에 접종하기 직전에 1:1로 혼합하여 살포하였다.

생물 검정을 위해 포트에서 한 달간 재배한 배추에 파밤나방 3령 유충을 주당 10마리씩 접종하였다. BT 또는 고삼+BT 혼합물을 살포한 뒤 실온에서 건조한 후 아크릴박스에 넣어 25±2°C 유지하며 매일 사충수를 관찰하였다. 대조구로 중류수를 살포하였다. BT 또는 고삼+BT 혼합물 처리에 의한 섭식 저해 효과 검정을 위해 처리 6일 후에는 살아있는 유충의 무게를 측정하였다. 생물검정은 3회 수행되었으며 매 실험마다 포트에 심겨진 배추 3주를 이용하였다.

아외 포장에서 BT 또는 혼합물에 의한 파밤나방 방제효과 검정은 2016년 5월 24일에서 6월 10일 사이에 전북 완주군 이서면 국립농업과학원 시험포장의 비닐하우스에서 실시하였다.

고삼추출물은 멸균수로 3000배(0.033%, v/v), 담오일은 멸균수로 500배(0.1%, v/v) 희석하여 생물검정에 사용하였다. 실내 실험과 같은 방법으로 처리한 배추를 곤충사육용 텐트에 옮겨 8일간 이틀마다 사충수를 조사하고, 섭식 저해 효과 검정을 위해 실험 종료 후 살아있는 유충의 무게를 측정하였다.

각 처리간의 차이를 비교하기 위하여 PROC GLM (SAS Institute, version 9.2)을 이용하여 분석하였다. 분석은 각 반복을 종합하여 분석하였으며, 처리간의 차이는 Duncan의 다중비교를 이용하여 분석하였다. 반수치사시간(median lethal time: LT50)은 probit법(SAS Institute, version 9.2)을 이용하여 산출되었다.

## 2. 연구 수행 결과

### 가. 시판 비티제의 살충활성 분석

시판 BT제 4종을 배추 leaf disc에 처리하여 파밤나방에 대한 살충효과를 조사한 결과 A제품이 73.3±8.0% 살충율을 나타내어 파밤나방에 대한 방제효과가 가장 우수하였다. B, C, D제품의 파밤나방에 대한 살충율은 13.3±6.1~48.3±6.5%로 방제효과가 낮게 나타났다. 같은 시판 BT제를 배추가 아닌 인공사료에 처리한 결과는 배추에 처리하였을 때 보다 낮은 살충율을 나타냈다(Fig 1).

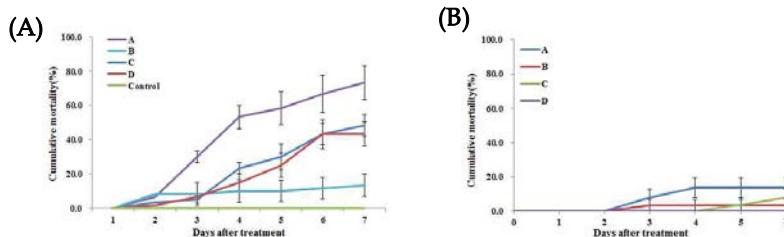


Fig. 1. Insecticidal effects of commercial BT against 3rd instar larvae of *Spodoptera exigua* 6 days after treatment at leaf disc of Chinese cabbage (A) and artificial diet (B).

#### 나. 선발 균주의 파밤나방 유충에 대한 최적 처리 농도 검정

주관과제에서 선발한 균주 CAB104, CAB110, CAB116, CAB376, CAB424의 최적 처리 농도를 구명하기 위하여 선발균주를 배추의 leaf disc에 농도별( $1\times10^4\sim1\times10^8$ )로 분사처리하고 파밤나방 2령 유충을 투입, 6일간 살충율을 검정한 결과 CAB116균주와 CAB376균주가  $1\times10^8$ cfu/ml의 농도에서 살충율100%의 우수한 살충효과를 나타냈다. 하지만  $1\times10^4\times10^7$ cfu/ml 농도에서는 낮은 살충효과를 나타냈다(Table 1).

Table 1. Insecticidal effect of selected BT isolates against 3rd instar larvae of *Spodoptera exigua* 6 days after treatment with different concentrations

	Cumulative mortality (%)				
	CAB104	CAB110	CAB116	CAB376	CAB424
$1\times10^4$	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
$1\times10^5$	3.3	0.0	5.0	0.0	0.0
$1\times10^6$	0.0	0.0	0.0	0.0	13.3
$1\times10^7$	0.0	0.0	23.3	0.0	33.3
$1\times10^8$	46.7	66.7	100.0	100.0	76.7

#### 다. 선발균주의 배양 배지별 생장

선발균주 CAB104, CAB110, CAB116, CAB376, CAB424의 최적 배양 배지를 선발하기 위해 BT 배양을 위해 적합한 것으로 알려진 UG media와 NA media에 선발균주를 접종한 뒤 균주의 성장을 조사하였다. 균주에 따라 적합한 배지가 다르게 나타났는데 CAB104, CAB116 균주는 UG media가 적합하였고 CAB110, CAB376, CAB424균주는 NA media가 배양에 적합한 것으로 나타났다(Fig 2).

중간평가과정에서 주관과제와 실험균주가 달라 통일하도록 권고 받고 새로이 CAB565, CAB566균주를 분양받아 설계하였다.

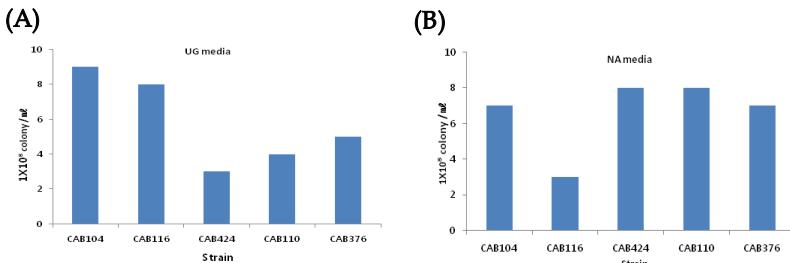


Fig. 2. Growth of selected BT isolates for 5days at UG media (A) and NA media (B).

#### 라. 선발CAB565, CAB566균주의 처리농도별 살충효과

CAB565, CAB566 균주를 과밤나방 유충에 농도별로 처리하였을 때  $1 \times 10^8$ cfu/ml 처리구에서 약  $46.9 \pm 14.6\%$ 의 살충율(Fig 3)을 나타냈으며 두 균주 모두 처리 농도가 높을수록 과밤나방 유충의 무게와 섭식량이 낮은 것으로 났다(Fig 4). 이러한 결과로 BT처리가 과밤나방 유충에 섭식장애를 일으키는 것을 확인할 수 있었다.

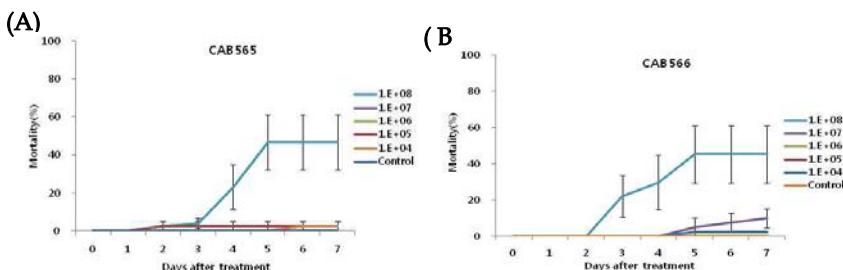


Fig. 3. Insecticidal effect of CAB565 (A) and CAB566 (B) against 3rd instar larvae of *Spodoptera exigua* 7 days after treatment with different concentrations.

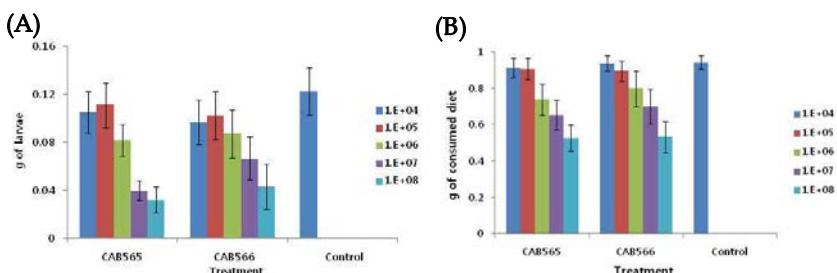


Fig. 4. Weight of alive larvae (A) and feeding amount (B) of *Spodoptera exigua* fed with artificial diet treated with CAB565 and CAB566 against 6 days after treatment.

### 마. 선발 균주의 처리 작물에 따른 살충율을 검정

BT를 이용한 해충의 방제효과는 해충이 BT균주가 생산하는 살충단백질을 섭식함으로 인해서 발생됨으로 BT를 처리할 기주 식물에 대한 해충의 섭식 기호성이 방제효과와 관계있을 것으로 판단되어 기주식물에 따른 선발균주의 살충효과를 검정하였다. 선발균주 CAB565, CAB566을 가지와 배추의 leaf disc에 처리한 후 파밤나방 2령 유충을 투입하여 살충율을 검정하였다.

CAB566균주는 가지에서  $90.0 \pm 5.8\%$ , 배추에서는  $100.0 \pm 0.0\%$ 로 두 작물 모두에서 높은 살충율을 나타냈다. CAB565균주의 경우는 가지에서는  $100.0 \pm 3.3\%$ 의 높은 살충율을 나타내는 반면에 배추에서는  $53.3 \pm 14.5\%$ 의 다소 낮은 살충율을 나타냈다. 이러한 CAB565균주의 기주작물별 살충율의 차이는 작물표면의 성상과 해충의 작물에 대한 기호도의 차이로 인한 것으로 추정된다 (Fig. 5).

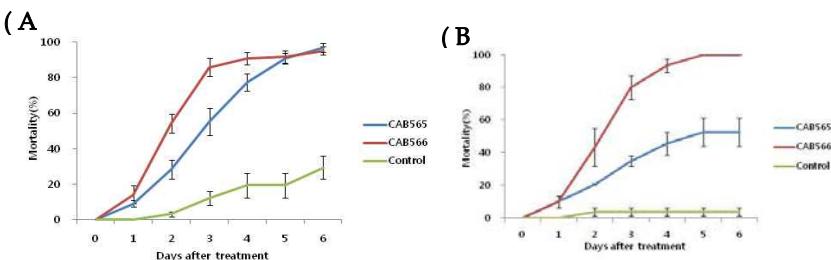


Fig. 5. Insecticidal effect of CAB565 and CAB566 against 3rd instar larvae of *Spodoptera exigua* 6 days after treatment at eggplant (A) and Chinese cabbage (B).

### 마. 배양배지별 선발균주의 독성단백질 생산량 검정

선발균주 CAB565, CAB566의 최적의 살충효과를 나타낼 수 있는 배양배지의 선발을 위하여 TSA, NA, LA배지에 선발 균주를 접종하여 5일의 배양기간 중의 살충단백질의 생산량을 비교해 보았다. CAB565균주는 LA배지, CAB566균주는 TSA배지에서 살충단백질의 생산량이 많이 생산되는 것을 확인할 수 있었다(Fig 6).

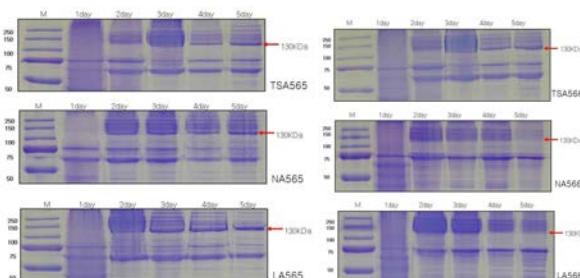


Fig. 6. Insecticidal crystal protein production of CAB565 and CAB566 at different culture media.

### 사. 선발균주의 살충활성 증진을 위한 첨가제 선발 및 농도별 살충율 검정

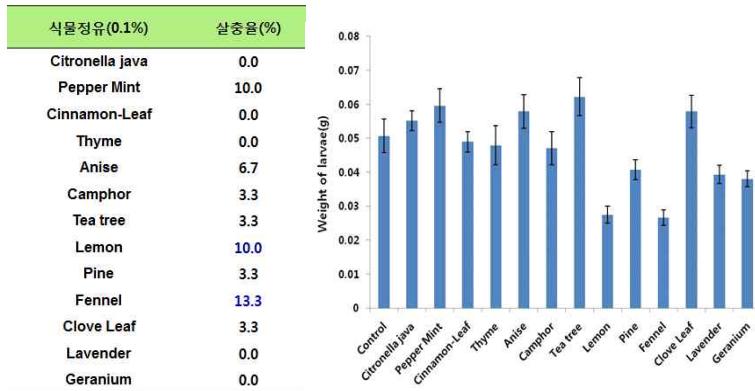
선발 곤충병원세균의 활성 증진을 위한 첨가제 선발을 위하여 문현을 통하여 조사된 18종의 화학첨가제에 대한 파밤나방의 살충효과를 조사하였다. Potassium carbonate와 Zinc sulphate의 경우 0.5% 처리에 의해 56.7%의 살충율을 나타냈으며 Sodium carbonate와 Calcium sulphate도 0.5% 농도에서 63.3%, 60%의 살충효과를 나타냈다. 살충효과를 나타낸 4종의 화학첨가제는 미량의 첨가만으로도 파밤나방을 방제할 수 있었다(Table 2).

Table 2. Insecticidal effect of Chemical against 3rd instar larvae of *Spodoptera exigua* 6 days after treatment with different concentrations

화학첨가제	실험농도(%)					
	2	1	0.5	0.3	0.2	0.1
Potassium carbonate	43.3	56.7	56.7	20	0	0
Zinc sulphate	43.3	43.3	56.7	0	0	0
Sodium carbonare	66.7	30	63.3	6.7	0	0
Calcium sulphate	56.7	53.3	60	0	0	0
Calcium chorde				3.3	0	0
Sodium acetate				10	0	0
Magnesium chorde				6.7	0	0
Calcium carbonare				13.3	0	0
<b>Nitrogenous compounds</b>						
Peptone			0	0	0	0
Tryptone			0	0	0	0
Ammonium nitrate			0	0	0	0
Sodium nitrate			0	0	0	0
<b>Protein soluble agent</b>						
Mercaptoethanol			0	0	0	0
Urea			0	0	0	0
EDTA			0	0	0	0
<b>Organic acids</b>						
Citric acid			0	0	0	0
Oxalic acid			0	0	0	0
Vitamin C			0	0	0	0

천연식물추출물인 식물정유 13종에 대한 파밤나방의 살충효과를 조사한 결과 Lemon과 Fennel 오일에서 10.0, 13.3%의 살충율을 나타냈다. 파밤나방 유충의 섭식장애 현상은 Lemon과 Fine, Fennel, Lavender, Geranium에서 나타났다(Table 3).

Table 3. Insecticidal effect and anti-feedant effect of essential oil against 3rd instar larvae of *Spodoptera exigua* 6 days after treatment



식물精油 외에도 기존에 살충효과가 있는 것으로 알려진 유기농자재 5종의 파밤나방에 대한 살충효과를 조사하였다. *Sophora*(고삼)의 경우 0.0005% 처리구에서도 100%의 높은 살충율을 나타냈다(Fig 7(A)). 유기농자재에 의한 파밤나방 유충의 섭식장애 작용은 *Sophora*(고삼)의 경우 살충충이 실험기간 중에 모두 사멸되어 조사하기 어려웠고 *Neem*의 경우 농도에 따른 섭식장애 작용이 뚜렷이 관찰되었다(Fig 7(B))).

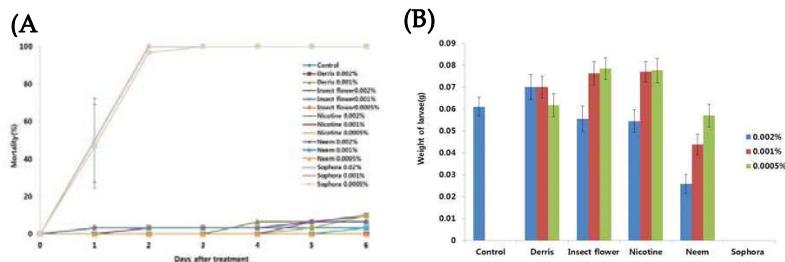


Fig. 7. Insecticidal effect and Anti-feedant effect of essential oil against 3rd instar larvae of *Spodoptera exigua* 6 days after treatment.

파밤나방 유충에 대한 유기농자재 Matrine, Neem, Pyrethrin, Nicotine, Derris 단독 또는 BT 혼합제의 처리 농도별 살충효과를 시험한 결과, Matrine 처리구의 경우 0.025% 이상의 단독 처리만으로  $98.7 \pm 1.3 \sim 100.0 \pm 0.0\%$ 의 우수한 살충율을 나타냈으며 모든 농도의 BT혼합 처리구에서 100% 살충율을 나타내었다(Table 4).

Derris와 Pyrethrin, Nicotine 처리구는 단독, BT혼합제 모두 10.0~3.3%의 낮은 살충율을 나타냈다. Neem 처리구의 경우 0.1~0.025%의 농도로 단독 처리하였을 때의 살충율은 6.7~4.2%~0.0~0.0%로 낮았으나 BT( $5 \times 10^4 \sim 10^6$ cfu/ml)혼합 처리구의 경우 살충율이  $36.7 \pm 9.5\%$ ,

46.7±8.4, 50.0±6.8%로 살충효과가 증대되는 것을 확인할 수 있었다.

Table 4. Mortality of 3rd instar larvae of *Spodoptera exigua* 6 days after treatment of different concentrations of organic material and *Bacillus thuringiensis*

Concentration of BT	Mortality (%)			
	Treatment(w/v, %) of organic material			
	0.025	0.05	0.1	
Matrine	0	98.7±1.3 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a
	5.E+04	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a
	5.E+05	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a
	5.E+06	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a
Derris	0	6.7±4.2 de	3.3±3.3 e	6.7±6.7 de
	5.E+04	3.3±3.3 e	0.0±0.0 e	3.3±3.3 e
	5.E+05	0.0±0.0 e	6.7±6.7 de	0.0±0.0 e
	5.E+06	3.3±3.3 e	3.3±3.3 e	0.0±0.0 e
Neem	0	0.0±0.0 e	3.3±3.3 e	6.7±4.2 de
	5.E+04	13.3±8.4 de	13.3±8.4 de	36.7±9.5 c
	5.E+05	13.3±9.9 de	10.0±4.5 de	46.7±8.4 bc
	5.E+06	13.3±4.2 de	20.0±10.3 d	50.0±6.8 b
Pyrethrin	0	10.0±4.5 de	0.0±0.0 e	10.0±4.5 de
	5.E+04	0.0±0.0 e	0.0±0.0 e	3.3±3.3 e
	5.E+05	6.7±4.2 de	3.3±3.3 e	6.7±6.7 de
	5.E+06	0.0±0.0 e	0.0±0.0 e	0.0±0.0 e
Nicotine	0	10.0±6.8 de	0.0±0.0 e	3.3±3.3 e
	5.E+04	6.7±4.2 de	0.0±0.0 e	0.0±0.0 e
	5.E+05	6.7±4.2 de	0.0±0.0 e	3.3±3.3 e
	5.E+06	13.3±4.2 de	6.7±4.2 de	6.7±4.2 de

Means within the same column followed by the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test ( $P > 0.05$ ).

또한 Neem처리에 의한 섭식저해 효과도 확인할 수 있었는데 처리농도가 증가함에 따라 섭식저해 효과도 우수하였다(Fig. 8).

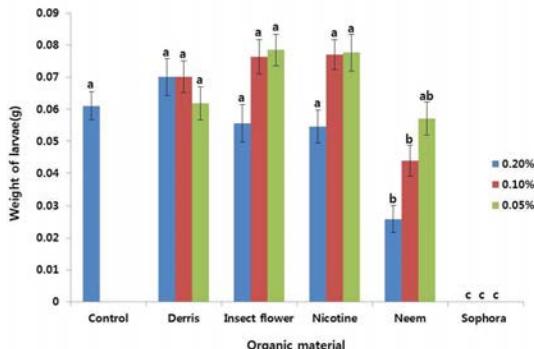
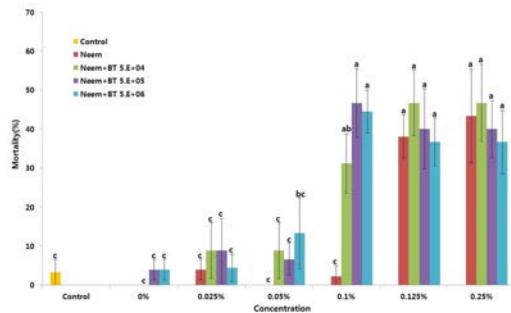


Fig. 8. Antifeedant effect of organic materials against larvae of *Spodoptera exigua*. Weight of alive larvae were measured at 6 days after treatment. Means above the column followed by the same letter are not significantly different using Duncan's multiple range test ( $P > 0.05$ ).

Neem+ BT혼합제의 살충효과 증대를 위한 적절 농도를 설정하고자 다양한 농도의 Neem+BT 혼합제에 대한 파밤나방의 방제효과를 조사하였다(Fig 9). 0.1%이상의 Neem농도 처리구의 경우 단독처리보다 BT혼합 처리구에서 높은 살충율을 나타났으나 두 처리간의 통계적으로 유의한 차이는 0.1% 혼합 처리구에서만 나타났다( $F = 8.74$ ,  $df = 32, 221$ ,  $P < 0.0001$ ). Neem농도가 높아질수록 살충율이 더욱 높아질 것으로 예상하였으나 0.1~0.25% 농도에서는 통계적으로 유의한 살충율의 변화가 없었다. Neem+BT혼합제의 섭식저해 효과 또한 단독처리보다 혼합처리에서 우수하게 나타났으나( $F=24.12$ ,  $df=27, 743$ ,  $P<0.0001$ ) Neem의 농도가 높아질수록 두 처리 모두 비슷한 저해효과를 나타냈다(Fig 9).

멸구슬나무의 주요 성분으로 limonoid 계열에 속하는 triterpenoid화합물인 azadirachtin은 님오일의 주요 살충성분으로 해충과 선충에 대해 식욕감퇴, 성장억제, 탈피저해, 형태형성 저해, 산란관파괴, 알의 부화억제, 호르몬의 균형 파괴 등의 작용으로 해충의 번식을 억제시키는데 이러한 살충효과는 400여종 이상의 곤충에 영향을 준다고 알려져 있다(Ascher, 1993; Koul and Wahab, 2004). Greenberg(2005)의 연구에서 Neem살충제를 목화 잎에 처리하였을 때 파밤나방의 산란율은 무처리와 2.5~9.3배 차이가 났으며, 1, 3, 5령 유충의 섭식량도 무처리 대비 현저하게 줄어들었다. 또한 파밤나방 알에 대한 살충율도 72~78%로 높게 나타났다. Neem은 파밤나방 뿐 아니라 배추좀나방에 대해서도 섭식저해 효과를 나타내는데 Neem살충제가 처리된 양배추가 배추좀나방에게 공급되면 섭식을 빠르게 멈추고 처리엽으로 부터 떨어져나가 피해를 최소화 할 수 있는 것으로 나타났다(Liang et. al., 2003). Azadirachtin은 곤충의 중장상피세포의 돌기를 손상시키고 세포를 부풀어 오르게 하여 입방형모양으로 만드는데 이러한 세포의 부종과 공포형성으로 미세옹모의 밀도가 낮아지게 된다. 또한 중장의 세포재생에 관여하는 Nidi를 천천히 괴사시켜 세포재생을 감소시키며 독소에 대한 감수성을 결정하는 위식막에 영향을 줘 다른 독소에 대한 감수성을 증가시키게 된다. 또한 trypsin과 elastin과 같은 장내 효소활성에도 영향을 미친다. 이러한 Azadirachtin의 작용이 BT 독소단백질의 해충 장내 수용체로의 접근, 결합에 관여하여 살충활성을 증가시키게 한다(Singh et. al., 2007).

## (A) Mortality



## (B) Weight of larvae

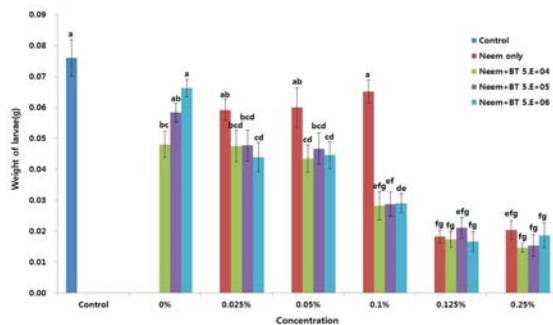


Fig 9. Mortality of 3rd instar larvae of *Spodoptera exigua* and antifeedant effect 6 days after treatment of different concentrations of Neem and *Bacillus thuringiensis*. Control was treated with distilled water. Means above the column followed by the same letter are not significantly different using Duncan's multiple range test ( $P > 0.05$ ).

과밤나방의 효과적인 방제를 위한 Matrine 또는 BT혼합제의 적정 농도를 조사하였다(Table 5). 0.025% Matrine을 단독처리 하였을 때 과밤나방 유충의 살충율은 100%이며 반수치사시간은 2.42일이었다. 0.016% Matrine+BT혼합처리의 살충율은  $86.7 \pm 5.0\%$   $97.3 \pm 1.8\%$ , 반수치사시간 3.63~2.43일으로 0.02% Matrine 단독 처리구(살충율  $89.3 \pm 5.8\%$ , 반수치사시간 3.12일)보다 살충 효과가 우수한 것을 알 수 있었다. 고삼의 주요성분인 Matrine은 quinolizidine 유래 heterocyclic 화합물( $C_{15}H_{24}N_2O$ )로 다른 식물추출물이나 화학 살충제와 혼용하여 야채, 과실, 화훼의 흰개미, 진딧물, 멸구, 유충, 곰팡이와 세균병, 선충을 방제하는데 이용되고 있다(Zanardi, 2015). Matrine은 흰개미와 점박이응애의 섭식저해 효과를 증대시킨다고 보고되고 있으며(Mao and Henderson, 2007; Bakr et al., 2012), Hwang의 연구에서 Neem과 혼용하였을 때 벼멸구에 대해서는 약제처리 5일 후 95%이상, 목화진딧물을 처리 3일째 95%이상, 오이총채벌레에 대해

서는 68.1%의 살충효과를 나타냈으며 배추좀나방에 대해서도 95%의 높은 살충율을 나타냈다 (Hwang et al., 2009). 또한 Matrine살충제에 의한 도둑나방 유충의 빌달지해 효과가 보고되기도 하였다(Zanardi, 2015). 본 연구에서도 Matrine은 0.025%이상의 농도로 단독처리하거나 0.016% matrine+BT혼합처리 할 경우  $97.3\pm1.8\%$ 이상의 우수한 살충율을 나타냈다.

BT의 저항성을 피하기 위한 전략으로 기작이 서로 다른 두 가지 물질을 혼합하여 처리하는 방법이 알려져 있다. 실험에서와 같이 친환경살충제로 알려진 고삼추출물과 선발균주의 혼합처리는 BT의 반복사용으로 인한 저항성을 회피하기 위한 수단으로 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

Table 5. Mortality and median lethal time ( $LT_{50}$ ) of larvae of *Spodoptera exigua* 6 days after treatments of different concentrations of Matrine and *Bacillus thuringiensis*

Treatment (w/v)	Mortality (%)	$LT_{50}$ (days)
Matrine only	Control	0.0±0.0 g
	0.020%	89.3±5.8 ab
	0.025%	98.7±1.3 a
	0.03%	100.0±0.0 a
	0.05%	100.0±0.0 a
	0.1%	100.0±0.0 a
	0.2%	100.0±0.0 a
	0.01%+BT 5.E+04	69.3±7.8 de
A mixture of Matrine and BT	0.01%+BT 5.E+05	69.3±8.4 de
	0.01%+BT 5.E+06	69.3±8.5 e
	0.0125%+BT 5.E+04	80.0±5.2 abcd
	0.0125%+BT 5.E+05	88.0±3.8 abc
	0.0125%+BT 5.E+06	72.0±6.7 bcde
	0.016%+BT 5.E+04	93.3±3.7 a
	0.016%+BT 5.E+05	97.3±1.8 a
	0.016%+BT 5.E+06	86.7±5.0 abc
Matrine and BT	0.025%+BT 5.E+04	100.0±0.0 a
	0.025%+BT 5.E+05	100.0±0.0 a
	0.025%+BT 5.E+06	100.0±0.0 a

Means within the same column followed by the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test ( $P > 0.05$ ).

#### 아. 선발 균주에 의한 배추좀나방, 담배거세미나방의 살충율 검정

배추좀나방 2, 3령 유충에 대한 살충율은 두 균주 모두  $1\times10^6$  cfu/ml의 농도에서도 100%의 살충율을 나타내어 방제효과가 우수하였으나 담배거세미나방의 유충에 대해서는 20%이하의 낮은 살충율을 나타내어 방제효과가 미비하였다(Fig 10).

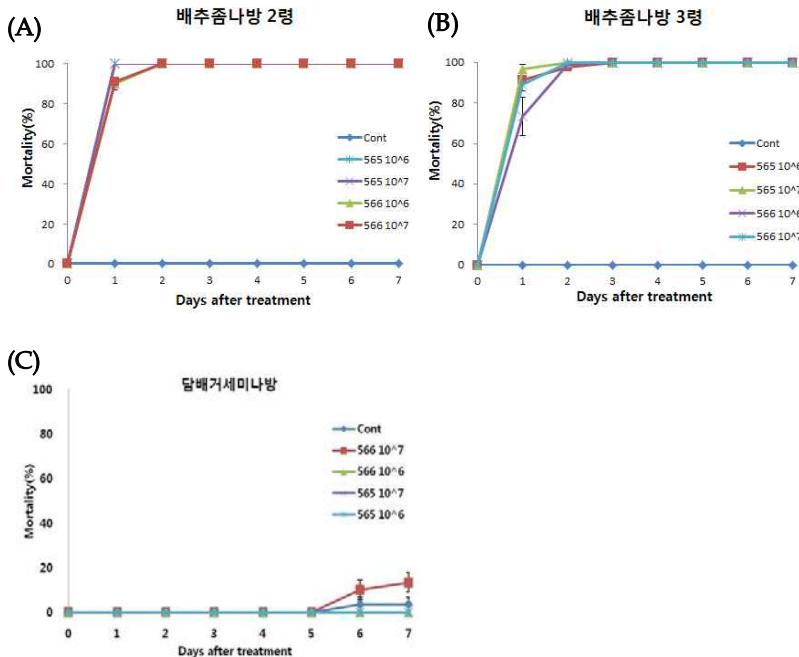


Fig 10. Mortality of 2<sup>nd</sup> (A) and 3<sup>rd</sup> (B) instar larvae of *Plutella xylostella* and 2<sup>nd</sup> instar larvae of *Spodoptera litura* (C) 7 days after treatment of *Bacillus thuringiensis*. Control was treated with distilled water.

#### 자. 선발 균주와 살충활성 증진을 위한 첨가제에 의한 파밤나방 방제효과 포트 및 포장 검정

BT 단독 또는 BT+고삼추출물 혼합제를 파밤나방이 접종된 실내 포트에 살포한 결과, BT 를 농도별( $10^5\sim 10^7$  cfu/ml)으로 단독처리 할 경우 처리 6일 후 살충율은  $27.5\pm 2.5\%$ ,  $51.3\pm 6.3\%$ ,  $92.5\pm 2.5\%$ 이었으며, BT+고삼추출물 혼합제( $10^5\sim 10^7$  cfu/ml+0.033%)를 처리했을 경우 살충율은  $98.8\pm 1.3\%$ ,  $88.8\pm 7.3\%$ ,  $91.3\pm 3.6\%$ 로 BT 단독처리보다 혼합제의 살충효과가 우수하게 나타났다 ( $F=88.85$ ,  $df=6, 16$ ,  $P<0.0001$ )(Fig 11). BT 단독처리에서는 BT의 농도가 높을수록 살충효과가 우수한 반면 BT+고삼추출물 혼합제의 경우 혼합된 BT의 농도가 낮을수록 살충율이 높게 나타났다. 이러한 결과는 leaf disc 실험결과와 유사하였는데 BT+고삼추출물 혼합제(최종농도 0.016% matrine+BT  $5\times 10^4\sim 10^6$  cfu/ml)를 배추의 leaf disc에 처리하였을 때의 살충율은 93.3%~86.7%로 BT 농도가 낮을수록 살충효과가 우수하였다(Han et al., 2015).

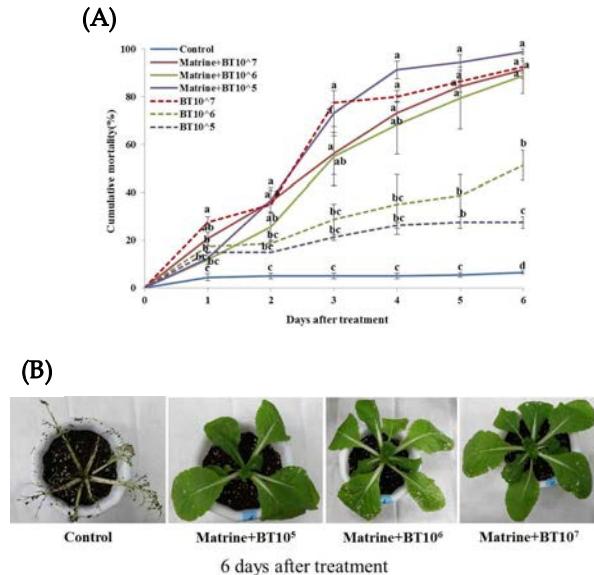


Fig. 11. Insecticidal effects (A) of a mixture of CAB566 and sophera extract (matrine) against 3rd instar larvae of *Spodoptera exigua* and leaf damage (B) 6 days after treatment at potted Chinese cabbage in laboratory. Means above the line followed by the same letter are not significantly different using Duncan's multiple range test ( $P>0.05$ ).

BT 처리에 의한 파밤나방 유충의 체중변화를 측정한 결과 BT+고삼추출물 혼합제 처리 유충의 체중은 43.2 mg, 23.9 mg, 14.7 mg으로 혼합제에 포함된 BT의 농도가 높을수록 유충의 체중이 낮은 것으로 조사되었다( $F=18.41$ ,  $df=6, 91$ ,  $P<0.0001$ )(Fig 12). 이러한 경향은 BT+고삼추출물 혼합제 처리구뿐 아니라 BT단독처리에서도 유사하게 나타났는데 BT 농도별 단독 처리구의 처리 6일 후 파밤나방 유충의 체중은 35.8 mg, 26.0 mg, 9.3 mg이었다. 결과적으로 파밤나방 유충의 체중변화는 BT 처리에 의한 것임을 확인할 수 있었다.

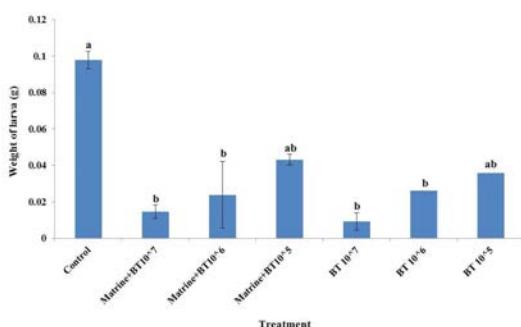


Fig. 12. Antifeedant effect of a mixture of BT and matrine against 3rd instar larvae of *Spodoptera exigua* 6 days after treatment at potted Chinese cabbage in laboratory. Weight of alive larvae were measured at 6 days after treatment. Means above the column followed by the same letter are not significantly different using Duncan's multiple range test ( $P>0.05$ ).

BT+고삼추출물 혼합제 또는 BT 단독처리의 포장에서의 파밤나방 방제효과는 BT를 농도별 ( $10^5\sim 10^7$  cfu/ml)로 단독 처리할 경우 처리 8일 후 살충율은  $14.4\pm 4.4\%$ ,  $26.7\pm 3.3\%$ ,  $66.7\pm 10.2\%$  이었으며 BT+고삼추출물 혼합제( $10^5\sim 10^7$  cfu/ml+0.033%)를 처리했을 경우 살충율은  $72.2\pm 19.7\%$ ,  $67.8\pm 18.9\%$ ,  $61.1\pm 14.2\%$ 로 BT단독처리보다 혼합제의 살충효과가 우수하게 나타났으며( $F=5.20$ ,  $df= 6, 14$ ,  $P<0.0052$ )(Fig 13) 실내실험과 마찬가지로 혼합제에 포함된 BT 농도가 낮을수록 방제효과가 우수하였다.

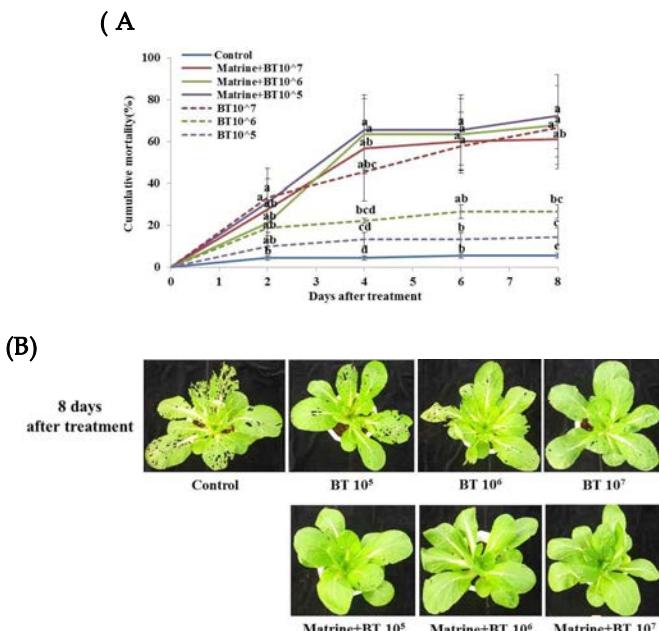


Fig. 13. Insecticidal effects (A) of a mixture of CAB566 and sophera extract (matrine) against 3rd instar larvae of *Spodoptera exigua* and leaf damage (B) 6 days after treatment at potted Chinese cabbage in plastic greenhouse. Means above the line followed by the same letter are not significantly different using Duncan's multiple range test ( $P>0.05$ ).

포장에서의 파밤나방 유충의 체중 역시 실내 포트실험과 유사한 경향을 보였다. BT+고삼추출물 혼합제를 처리하였을 때 유충의 체중은  $105.6\pm 11.9$  mg,  $57.0\pm 7.9$  mg,  $30.9\pm 4.9$  mg이었고 BT 농도별 단독처리구의 경우  $101\pm 7.5$  mg,  $65.6\pm 6.9$  mg,  $25.6\pm 3.6$  mg 이었다(Fig 14).

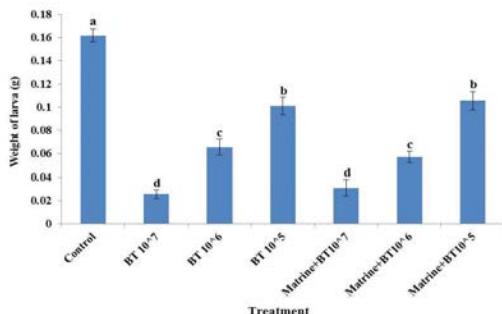
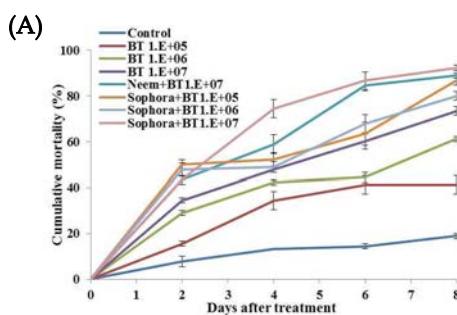


Fig. 14. Antifeedant effect of mixture of CAB566 and matrine against 3rd instar larvae of *Spodoptera exigua* 8 days after treatment at field. Weight of alive larvae were measured at 8 days after treatment. Means above the column followed by the same letter are not significantly different using Duncan's multiple range test ( $P>0.05$ ).

선발균주를 청경체에 처리하였을 때도 선발균주 단독의 살충효과 ( $BT 10^5$ : 27.4%,  $BT 10^6$ : 52.1%,  $BT 10^7$ : 67.1%)보다 첨가제와 같이 처리하였을 때 ( $BT 10^7$ +님오일: 86.3%,  $BT 10^5$ +고삼: 83.6,  $BT 10^6$ +고삼: 75.3%,  $BT 10^7$ +고삼: 90.4%) 살충효과가 우수하였으며 배추에서 보다 청경체에 처리하였을 때 우수한 살충효과를 나타내었다(Fig 15).



(B)

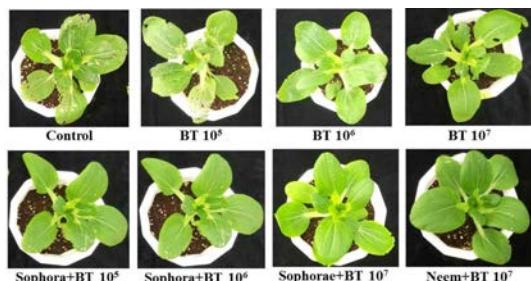
8 days  
after treatment

Fig. 15. Insecticidal effects (A) of a mixture of CAB566 and sophera extract (matrine) against 3rd instar larvae of *Spodoptera exigua* and leaf damage (B) 6 days after treatment at potted Pak choi in plastic greenhouse.

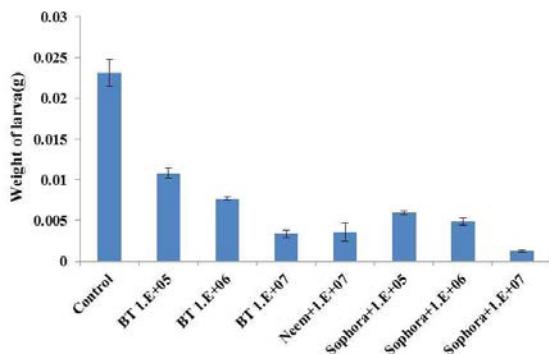


Fig. 16. Antifeedant effect of mixture of CAB566 and matrine against 3rd instar larvae of *Spodoptera exigua* 8 days after treatment at field. Weight of alive larvae were measured at 8 days after treatment.

선발 균주를 케일에 처리하였을 때의 살충효과 (BT 10<sup>5</sup>: 33.3%, BT 10<sup>6</sup>: 50.0%, BT 10<sup>7</sup>: 81.5%, BT10<sup>7</sup>+님오일: 83.3%, BT10<sup>5</sup>+고삼: 55.6%, BT10<sup>6</sup>+고삼: 63.0%, BT 10<sup>7</sup>+고삼: 90.7%)도 배추와 청경채와 같이 처리 환경에 영향을 받는 BT균주의 단독처리보다 침가제와 같이 처리하였을 때 살충효과가 우수하였다(Fig 17).

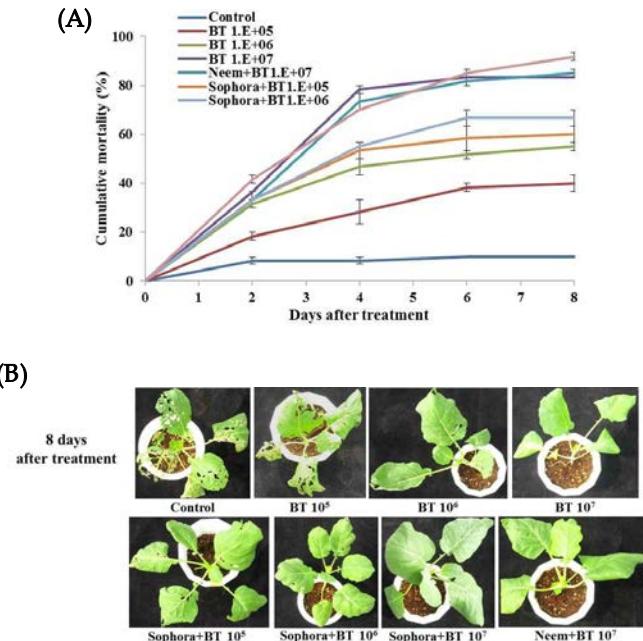


Fig. 17. Insecticidal effects (A) of a mixture of CAB566 and sophera extract (matrine) against 3rd instar larvae of *Spodoptera exigua* and leaf damage (B) 6 days after treatment at potted kale in plastic greenhouse.

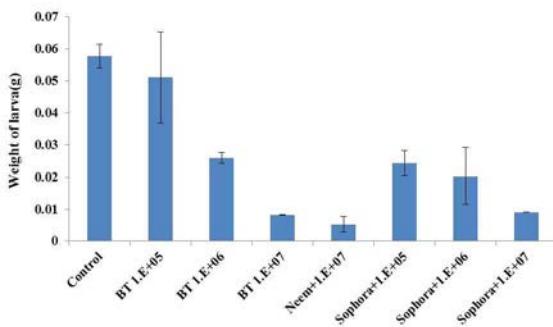


Fig. 18. Antifeedant effect of mixture of CAB566 and matrine against 3rd instar larvae of *Spodoptera exigua* 8 days after treatment at field. Weight of alive larvae were measured at 8 days after treatment.

다양한 작물에 피해를 입히는 파밤나방은 유기합성 살충제에도 저항성을 가져 방제가 힘들다.

또한 친환경 방제를 위해 이용할 수 있는 국내 등록된 미생물농약인 BT의 경우 파밤나방 노령 유충에는 방제효과가 떨어져 다양한 생육단계의 유충, 번데기 성충이 동시에 혼재하고 있는 농가에서 파밤나방을 방제하기가 더욱 힘든 실정이다.

파밤나방을 효과적으로 방제하기 위한 친환경적 방제 수단으로 BT와 선충을 혼용(살충율 : 33.3%~100%)하거나 핵다각체바이러스(SeNPV, 살충율 : 70% 이상)를 이용하였을 때 BT(살충율 : 10% 이하) 단독처리보다 방제 효과가 우수한 것을 확인할 수 있었다(Park et al., 2015). 또한 BT의 살충활성을 강화시켜주고 기주범위를 증가시킬 수 있는 방법으로 protease inhibitor인 tannic acid (40 mM)를 혼용(살충율 : 83.9%, 89.4%, 66.8%)하였을 때 파밤나방에 대한 방제효과가 BT 단독처리(살충율 : 61.8%, 80.4%, 47.3%)보다 증대되는 것으로 조사되었다(Jin et al., 2009). 농가 포장에서 온도, 자외선 등 처리환경에 영향을 많이 받는 BT와 같은 미생물의 안정적 작용과 살충활성 증대를 위해서 기작이 다른 첨가제를 혼용하는 방법이 고려될 수 있다. 본 연구 결과에서도 배추를 이용한 실내 포트 검정뿐 아니라 포장 검정에서 식물추출물인 고삼을 BT와 혼용함(살충율 : 72.2±19.7%, 67.8±18.9%, 61.1 ±14.2%)으로 BT를 단독 처리했을 때(살충율 : 14.4±4.4%, 26.7±3.3%, 66.7±10.2%)보다 파밤나방을 효과적으로 방제할 수 있었다.

고삼의 주된 활성 성분인 matrine을 oxymatrine과 식물병원균에 처리하였을 때 곰팡이의 포자발아와 균사 생장이 억제되었으며 살균제인 다코닐과 혼용하여 처리하면 항곰팡이 효과가 더욱 증가되는 것으로 조사되었다(Yang et al., 2006). 또한 진딧물 방제를 위해 0.1%의 matrine을 오이와 토마토에 처리하였을 때 98%의 방제효과와 96% 이상의 밀도감소 효과를 나타냈다(Marcic et al., 2012). Matrine은 감귤옹예(*Panonychus citri*)에 대해서도 높은 살비효과를 나타내어 90%의 밀도감소를 나타냈다(Zanardi et al., 2015). 이러한 Matrine의 살충활성 외에도 해충에 대한 식이저해효과(Mao and Henderson, 2007)를 강하게 나타내는 것으로 알려져 있으나, 본 연구의 결과에서는 파밤나방에서의 식이저해효과는 matrine에 의한 효과보다 BT에 의한 효과가 강하게 나타났다. BT 단독, BT+고삼추출물 혼합제 처리구의 포장에서의 살충율 (72.2±19.7%, 67.8±18.9%, 61.1±14.2%)이 선행연구에서 파밤나방의 인공사료에 처리했을 때(살충율 : 93.3±3.7%, 97.3± 1.8%, 86.7±5.0%)와 실내 포트 실험(살충율 : 98.8±1.3%, 88.8±7.3%, 91.3±3.6%)에서 보다 낮아서 작물의 피해가 심할 것으로 예상되었지만 BT에 의한 식이저해효과 때문에 파밤나방의 효과적인 방제를 위해서는 BT단독 처리보다는 BT와 고삼 혼합처리하여 살충효율을 높임과 동시에 BT에 의한 섭식저해 작용으로 살아남은 유충의 섭식을 줄임으로써 작물에 대한 피해를 줄일 수 있었다. 포장에서의 효과적인 해충방제를 위하여 미생물과 식물추출물을 혼용함으로서 환경에 영향을 많이 받는 미생물의 단점을 극복하고 안정적인 방제효과를 나타낼 수 있을 것으로 기대된다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야 기여도

### 제1절 : 목표대비 달성도

당초 목표	가중치(%)	개발 내용	달성도(%)
1) 새로운 균주로서 분리된 <i>B. thuringiensis</i> 균주를 지속적으로 연구가 가능하도록 함(2종 선발)	10	1) 각각의 나비목 해충에 살충 효과가 있고 저항성 문제를 해결하는 새로운 균주의 선발 2) 각 작물과 각각의 해충에 적합한 적용방법 개발 3) 새로운 <i>B. thuringiensis</i> 균주 3년차 지속적인 선발 및 특성 구명 4) 청벌레류에 대한 기주적용시험	100
2) 특허출원이 되고 기술이전을 실시하며 상품화 결정된 균에 대한 법적 조치를 함	20	1) 국내외에서 새로 분리한 <i>B. thuringiensis</i> 균주의 특허출원 연구	100
3) 선발된 <i>B. thuringiensis</i> 균주에 적합하게 연구된 작물에 대하여 처리 방법, 처리시기 등을 정리하여 상품화 자료 및 미생물 농약 교육자료로 활용(1건)	15	1) 선발된 해충의 기주범위 확대시험 2) 시제품으로 처리방법, 처리시기, 희석배수, 5작물 약해시험 3) 선발된 1개 균주의 대량배양 및 상품화 제형으로 포장 실증시험 과채류인 수박, 오이(해충발생상황에 따라 다른 작물로 변경)작물에 발생하는 나비목 해충과 재배방법에 따른 방제방법 검토	100
4) 새로운 균주로서 분리된 <i>B. thuringiensis</i> 균주를 지속적으로 연구가 가능하도록 함	15	1) 신규 병원성세균 균주의 활성 단백질 및 균주의 대량배양 생산 조건 확립 2) 신규 병원성세균 균주의 살충성 단백질 및 균주의 안정적인 대량 배양 기술 3) 신규 병원성세균 균주의 제형화 4) 신규 병원성세균 균주 살충 활성 균주의 대량 생산 및 상품화	100
5) 유기농자재 공시등록에 필요한 연구개발 및 서류등을 보완하	10	1) 유기농 자재 품질인증 시험 - 산업재지 조성 확인	100

여 등록		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Jar fermentor에서 환경에 따른 배양 조건 조절</li> <li>- 대량배양 공정 조건 확립</li> <li>- 부형제 사용에 따른 제제의 내독소단백질과 포자수 변화 조사</li> <li>- 수화제의 내독소 단백질과 세균의 안정성 및 효력상승 물질 탐색</li> </ul>	
6) 균주의 기술이전을 실시하여 상품화 결정된 균에 대한 법적 조치를 함	10	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) 예코파워 제품 개발</li> <li>2) 목록공시 접수 서류 작성</li> <li>3) 농촌진흥청 시험인증기관에 시험 의뢰</li> <li>4) 목록공시 등록</li> </ol>	100
7) 선발된 <i>B. thuringiensis</i> 균주에 적합하게 연구된 작물에 대하여 처리방법, 처리시기 등을 정리하여 상품화 자료 및 미생물 농약 교육자료로 활용	10	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) 몇 개의 작물에 발생하는 청벌레류 (담배거세미나방, 파밤나방, 담배나방, 왕담배나방, 도둑나방, 배추좀나방, 배추흰나비, 배추순나방, 목화바둑명나방)에 대한 기주범위 적용확대 생물효과 시험</li> </ol>	100
8) 새로운 균주로서 분리된 <i>B. thuringiensis</i> 균주의 방제 효과증진	10	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) 주관과제 선발 나방류 고병원성 세균의 생물학적 특성 구명 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 선발 균주의 농도별, 배양적 특성구명</li> </ul> </li> <li>2) 선발 균주의 밤나방과 해충에 대한 방제 활성 증진 연구 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 살충활성 증진을 위한 첨가제 선발 및 처리농도 검정</li> </ul> </li> <li>3) 첨가제 혼합 균주의 밤나방과 해충에 대한 포장 방제효과 구명 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 선발균주와 첨가제에 의한 포장에서의 파밤나방 방제효과 구명</li> </ul> </li> </ol>	100

## 제2절 : 정량적 성과

성과지표명	연도	당초 목표 (전체)	실적	달성을 (%)	가중치 (%)
논문 게재	SCI	5	4(1)	80(100)	10
	비SCI	2	3	150	10
산업 재산권	출원	2	3	150	20
	등록	-	-	-	-
학술발표	국제	5	6	120	10
	국내	5	25	500	10
기술이전		1	1	100	20
영농기술·정보 기관제출		1	2	200	10
기능성 물질·소재 선별		0	1	-	0
농자재 심사/등록		1	1	100	5
홍보성과		1	1	100	5
대외협력 지수		0	2	-	0
계		23	50	213(217)	100

세부과제명	세부 과제 책임자	성과물 유형	성과물명	성과물 주담당자	성과적 용년월	성과물 승인여부
곤충병원세균을 이용한 나방류 방제	윤영남	논문 게재(SCI)	Mass production of Entomopathogenic Nematode, Heterohabditis megidis by using Micropsparger of Gandong strain	김태완	2014년 9월	승인
곤충병원세균을 이용한 나방류 방제	윤영남	논문 게재 (비SCI)	배양 조건이 <i>Bacillus thuringiensis</i> 독소단백질의 생산에 미치는 영향	김태완	2014년 12월	승인
곤충병원세균을 이용한 나방류 방제	윤영남	논문 게재 (비SCI)	새로운 곤충병원성 <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i> 균주의 유전학적 특성	서미자	2014년 12월	승인
곤충병원세균을 이용한 나방류 방제	윤영남	산업 재산권 출원	살충 활성이 있는 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 CAB565균주 및 이의 용도	유용만	2014년 11월	승인
곤충병원세균을 이용한 나방류 방제	윤영남	산업 재산권 출	살충 활성이 있는 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와	유용만	2014년 11월	승인

		원	이 CAB566 균주 및 이의 용도			
곤충병원세균을 이용한 나방류 방제	윤영남	학술발표(국제)	Isolation and characterization of <i>Bacillus thuringiensis</i> strains with insecticidal activity to lepidopteran pests	이유경	2014년 11월	승인
곤충병원세균을 이용한 나방류 방제	윤영남	학술발표(국내)	나비목 단방제 해충에 살충 활성이 있는 새로운 <i>Bacillus thuringiensis</i> 균주의 분리 및 특성조사	이유경	2014년 04월	승인
곤충병원세균을 이용한 나방류 방제	윤영남	학술발표(국내)	파밤나방에 활성 있는 <i>Bacillus thuringiensis</i> 균주와 tannic acid와의 혼합처리에 따른 소화효소활성 및 특성조사	진나영	2014년 04월	승인
곤충병원세균을 이용한 나방류 방제	윤영남	학술발표(국내)	흰점박이꽃무지의 장과 먹이 및 배설물에 서식하는 세균의 유희성과 물질 분해능력 비교	전준학	2014년 04월	승인
곤충병원세균을 이용한 나방류 방제	윤영남	학술발표(국내)	<i>Bacillus thuringiensis</i> CAB565, CAB566 균주의 유전학적 특성조사	이유경	2014년 10월	승인
곤충병원세균을 이용한 나방류 방제	윤영남	학술발표(국내)	퐁뎅이과 7종에서 분리한 장내세균의 병해충 방제 가능성	전준학	2014년 10월	승인
곤충병원세균을 이용한 나방류 방제	윤영남	학술발표(국내)	<i>Bacillus thuringiensis</i> 와 tannic acid와의 혼합 처리 시 파밤나방 중장 단백질분해효소의 활성 억제 효과	진나영	2014년 10월	승인
곤충병원세균을 이용한 나방류 방제	윤영남	학술발표(국내)	<i>Bacillus thuringiensis</i> 균주와 Protease inhibitor의 혼합처리에 의한 파밤나방의 살충활성 상승효과	이보람	2014년 10월	승인
대량 배양기술 확립	김태완	학술발표(국내)	Development of commercial medium to purpose mass production of a novel strain <i>bacillus thuringiensis</i>	김태완	2014년 10월	승인
곤충병원 세균의 특성 구명 및 나방류 방제기술 개발	한지희	학술발표(국내)	Selection of Substrates and Additives for Conidia Production	한지희	2014년 05월	승인

곤충병원 세균의 특성 구명 및 나방류 방제기술 개발	한지희	영농활용 기관제출	파밤나방 친환경 방제용 녹강균의 간편 대량 배양법	한지희	2014년 11월	승인
곤충병원 세균의 특성 구명 및 나방류 방제기술 개발	한지희	기능성물질 · 소재 선발 전수	파밤나방 방제용 미생물 선발	한지희	2014년 11월	승인
곤충병원세균을 이용한 나방류 방제	윤영남	논문게재(SCI)	Isolation and characterization of New <i>bacillus thuringiensis</i> strains with insecticidal activity to difficult to control Lepidopteran pests	이유경	2015년 02월	승인
곤충병원세균을 이용한 나방류 방제	윤영남	논문게재(SCI)	Tannic acid enhancing insecticidal activity of protoxin produced in <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> KB100 strain	진나영	2015년 02월	승인
곤충병원세균을 이용한 나방류 방제	윤영남	기술이전(유상, 기술료)	살충 활성이 있는 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 CAB566 균주 및 이의 용도	유용만	2015년 04월	승인
곤충병원세균을 이용한 나방류 방제	윤영남	산업재산권 출원	바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 KB100균주의 유효량에 타닌산을 첨가하여 제조된 해충 방제용 조성물 및 이의 용도	유용만	2015년 04월	승인
곤충병원세균을 이용한 나방류 방제	윤영남	학술발표(국제)	Plasmid DNA Associated with Crystal Protein Coding in <i>Bacillus thuringiensis</i> CAB565 and CAB566	이유경	2015년 11월	승인
곤충병원세균을 이용한 나방류 방제	윤영남	학술발표(국내)	참외밭 토양에서 분리한 <i>Bacillus</i> 속 세균의 살전충 효과 검정	이보람	2015년 04월	승인
곤충병원세균을 이용한 나방류 방제	윤영남	학술발표(국내)	<i>Bacillus thuringiensis</i> CAB565와 CAB566균주의 crystal protein에 관여하는 plasmid DNA 탐색	이유경	2015년 04월	승인
곤충병원세균을 이	윤영남	학술발	곤충에서 분리한 세균의 미	전준학	2015년	승인

용한 나방류 방제		표(국내)	생물활용 가능성 검토		04월	
곤충병원세균을 이용한 나방류 방제	윤영남	학술발표(국내)	<i>Bacillus thuringiensis</i> 결정체독소단백질의 분해효소인 trypsin의 활성을 억제하는 Tannic acid	진나영	2015년 04월	승인
곤충병원세균을 이용한 나방류 방제	윤영남	학술발표(국내)	<i>Bacillus thuringiensis</i> CAB565와 CAB566 균주의 crystal protein에 대한 아미노산 분석	이유경	2015년 10월	승인
곤충병원 세균의 특성 구명 및 나방류 방제기술 개발	한지희	논문제재 (비 SCI)	유기농자재와 <i>Bacillus thuringiensis</i> 의 혼합처리에 의한 과반나방의 방제효과	한지희	2015년 12월	승인
곤충병원 세균의 특성 구명 및 나방류 방제기술 개발	한지희	학술발표(국제)	Combination effects of Organic Materials and <i>Bacillus thuringiensis</i> on <i>Spodoptera exigua</i>	한지희	2015년 05월	승인
곤충병원 세균의 특성 구명 및 나방류 방제기술 개발	한지희	대외협력지수	곤충병원세균을 이용한 나방류 방제기술 개발 공동연구과제 협의회 개최 (2015.03.06)	한지희	2015년 03월	승인
곤충병원 세균의 특성 구명 및 나방류 방제기술 개발	한지희	대외협력지수	곤충병원세균을 이용한 나방류 방제기술개발 공동연구과제 협의회 개최 (2015.05.28)	한지희	2015년 05월	승인
곤충병원세균을 이용한 나방류 방제	윤영남	논문제재(SCI)	Finding the Relationships between a Strain of <i>Bacillus thuringiensis</i> , Tannic Acid, and the Mid-gut Proteases of <i>Spodoptera exigua</i>	진나영	2016년 9월	승인
곤충병원세균을 이용한 나방류 방제	윤영남	학술발표(국제)	Analysis of Amino Acids with Crystal Proteins of <i>Bacillus thuringiensis</i> CAB565 and CAB566 Strains	이유경	2016년 9월	승인
곤충병원세균을 이용한 나방류 방제	윤영남	학술발표(국제)	Relationship among Strain of <i>Bacillus thuringiensis</i> , Tannic acid and Mid-gut Protease with <i>Spodoptera exigua</i>	진나영	2016년 9월	승인

곤충병원세균을 이용한 나방류 방제	윤영남	학술발표(국내)	<i>Bacillus thuringiensis</i> CAB566균주의 crystal protein과 내독소 binding 수용체의 분자학적 특성	이유경	2016년 4월	승인
곤충병원세균을 이용한 나방류 방제	윤영남	학술발표(국내)	<i>Bacillus thuringiensis</i> 균주와 Tannic acid 및 중장 Proteases의 상호작용	진나영	2016년 4월	승인
곤충병원세균을 이용한 나방류 방제	윤영남	학술발표(국내)	나비목 해충에 살충활성이 있는 새로운 <i>Bacillus thuringiensis</i> 균주의 생태학적 특성 조사	김유섭	2016년 4월	승인
곤충병원세균을 이용한 나방류 방제	윤영남	학술발표(국내)	이집트金陵모기 ( <i>Aedes aegypti</i> )에 생물활성이 있는 새로운 <i>Bacillus thuringiensis</i> 균주의 탐색	김희지	2016년 4월	승인
곤충병원세균을 이용한 나방류 방제	윤영남	학술발표(국내)	작은뿌리파리 ( <i>Bradysia agrestis</i> )에 살충활성을 나타내는 <i>Bacillus thuringiensis</i> 균주 탐색	장현주	2016년 4월	승인
곤충병원세균을 이용한 나방류 방제	윤영남	학술발표(국내)	백두산 인근 토양에서 분리한 새로운 <i>Bacillus thuringiensis</i> 균주의 특성 및 생물활성 검정	김유섭	2016년 10월	승인
곤충병원세균을 이용한 나방류 방제	윤영남	학술발표(국내)	담배거세미나방과 과밤나방 중장액에 대한 <i>Bacillus thuringiensis</i> CAB566균주의 활성화와 효소도 분석	이유경	2016년 10월	승인
곤충병원세균을 이용한 나방류 방제	윤영남	학술발표(국내)	작은뿌리파리 ( <i>Bradysia agrestis</i> )에 생물활성이 있는 새로운 <i>Bacillus thuringiensis</i> 균주의 탐색	김희지	2016년 10월	승인
곤충병원세균을 이용한 나방류 방제	윤영남	학술발표(국내)	제주도 토양에서 분리한 새로운 <i>Bacillus thuringiensis</i> 균주의 살충활성 및 특성	허영아	2016년 10월	승인
대량 배양기술 확립	김태완	학술발표(국제)	<i>Bacillus thuringeensis</i> serovar <i>aizawai</i> spray-dried formulations of the effect of strain CAB566	김태완	2016년 9월	승인
대량 배양기술 확립	김태완	농자재 심사/등	유기농업자재 목록공시	김태완	2016년 11월	승인

		록					
대량 배양기술 확립	김태완	홍보성과	2016년 국제농기계자재박람회	김태완	2016년 11월	승인	
곤충병원 세균의 특성 구명 및 나방류 방제기술 개발	한지희	학술발표(국내)	곤충병원성 곰팡이를 이용한 해충방제	한지희	2016년 10월	승인	
곤충병원 세균의 특성 구명 및 나방류 방제기술 개발	한지희	학술발표(국내)	<i>Bacillus thuringiensis</i> 와 고 삼추출물 혼합 처리에 의한 파밤나방 방제효과	한지희	2016년 10월	승인	
곤충병원 세균의 특성 구명 및 나방류 방제기술 개발	한지희	영농기술 · 정보 기관제출	곤충병원세균과 친환경농자재를 혼합한 혼합제를 이용한 파밤나방 방제	한지희	2016년 10월	승인	

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

- 인축 및 환경에 문제가 없는 안전한 제품으로 인한 친환경 방제를 기대
- 화학농약의 대체 방법으로써 유기농업에 도움이 되며, 고부가가치 농산물 생산을 통한 소득 증대
- *B. thuringiensis* CAB566 산업배지를 통한 대량배양 공정체계 확립
- 미생물 특성에 맞는 부형제 선택에 따른 약효 및 주성분의 안정성 향상
- 유기농업자재 공시 등록을 통한 친환경 및 유기농업 매출 향상 기대
- MYCOBIOLOGY 저널에 SCI논문(Mass Production of Aerial Conidia of *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces fumosoroseus* by Solid-State Fermentation to Develop a Mycoinsecticide) 두고 중에 있음

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 해당사항 없음

## 제 7 장 연구 개발 결과의 보안 등급

- 해당사항 없음

## 제 8 장 국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구장비 현황

- 해당사항 없음

## 제 9 장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

< 제 1세부 충남대 >

### ○ 기술적 위험요소 분석

#### 1. 연구실험실 안전점검

- 1) 목적 : 연구실험실(실험·설습실)에서 발생할 수 있는 재해 예방을 위해 잠재적 위험성 발견과 그 개선 대책을 수립하고, 연구활동종사자의 안전의식을 고취하여 쾌적한 연구실험실 안전환경 조성을 위함.
- 2) 연구실 일상점검 실시
  - 실시 : 매일 실시
  - 대상 : 학내 모든 과학기술분야 연구실험실
- 3) 연구실 정기점검(C, D형) 및 정밀안전진단(A, B형) 실시
  - 실시 : 매년 안전점검 전문기술 보유업체 선정, 실시
  - 대상 : 학내 과학기술분야 연구실험실(연구실안전관리통합시스템 등록 실험실)  
※ 실험실 유형별 분류
- 4) 연구실 수시점검 및 특별점검
  - 실시 : 필요시 또는 수시
- 5) 2015년도 정밀안전진단 및 정기점검 결과
  - 점검대상 : 과학기술분야 연구실험실 996개실
  - 점검결과
    - 1등급(936실) : 문제가 없고 안전성이 유지된 상태

#### 2. 연구실 안전 교육 · 훈련

- 1) 교육대상 : 교수, 대학원생, 실험조교, 전문직원, 소속연구원, 실험참여 학부생 등
- 2) 교육구분
  - 정기교육 : 교내 상시연구활동종사자 대상으로 연 1~2회 집합교육 실시
  - 온라인교육 : 연구실안전관리 통합시스템을 통한 사이버교육 수강
  - 자체교육 : 실험실 책임자가 실험 전 안전교육 실시
- 3) 교육내용
  - 연구실험실내 가스사고 예방대책, 소방, 응급처치, 실험실 안전점검 등

#### 3. 연구실 안전공제(보험)가입

- 1) 근거 : 연구실 안전환경 조성에 관한 법률에 의한 의무적 가입

- 가입기관 : 교육시설재난공제회
- 가입대상 : 학부생(9,850명), 대학원생(2,960명), 수료연구생(911명), 연구원(94명) 총13,815명
- 가입기간 : 2016. 4. 1. ~ 2017. 3. 31. (1년)
- 가입금액 : 사망 1억, 후유장해 1억, 부상 1,000만원

#### 4. 연구활동종사자 건강검진 실시

- 1) 대상 : 유해물질 등에 노출될 위험성 있는 연구활동종사자
- 2) 2015년 건강검진 실시
  - 검진기관 : 한국의학연구소
  - 검진인원 : 545명(상시 연구활동종사자 대상)
  - 검진유형 : 일반 및 특수 건강검진

#### ○ 안전관리대책

- 연구실사고 발생 시 당해 연구실의 소속기관장은 당해 기관의 관계자로 구성된 사고대책반을 구성하여 신속히 사고처리를 하고, 그 결과를 즉시 센터에 보고하여야 함
- 연구실 소속기관의 장 및 연구실 책임자는 종사자 또는 공중의 안전을 위하여 긴급한 조치가 필요하다고 판단되는 경우에는 연구실 사용 제한 등 안전상의 조치를 하여야 함
- 중대 연구실사고 발생 시 위원회의 장은 당해 연구실 소속기관장, 위원회의 위원 및 안전관련 전문가 등으로 사고대책위원회를 구성하고, 원인을 조사, 분석하여 대책을 수립하여야 함
- 이 규정의 시행에 필요한 세부사항은 위원회의 심의를 거쳐 총장이 따로 정함

#### < 제 1협동 우진비엔지 >

##### ○ 기술적 위험요소 분석

- 미생물을 배양하기 위해 사용하는 Jar-Fermentor는 종균을 접종하기 전, 배지를 멸균하여야 함
- 이 과정에서 고온(121℃), 고압(1.2kgf/cm<sup>2</sup>) 이상을 25분간 유지시켜야 함
- Jar-fermentor를 작동하기 위해 보일러를 이용한 steam을 사용하기 때문에 fermentor 및 line이 고온을 유지하게 됨

#### ○ 안전관리대책

- Jar-fermenter 관리를 위해 압력용기 테스트 자료를 구비 및 검토
- Steam이 통과하는 line을 보온제로 감싸 작업자가 화상을 입지 않도록 보완
- 월 1회 안전관리 교육을 통해 작업시 주의할 점을 숙지
- 장비 이용시 체크리스트를 작성하여 기존과 변경된 부분을 확인하여, 수리 및 보완여부를 판단

## &lt; 제 2협동 국립농업과학원 &gt;

## ○ 연구실 일일안전점검

- 실시대상 : 과학기술분야 해당 연구실험실 / 실시주기 : 매일 점검(연구활동시작 전)
- 실시자 : 해당 연구실책임자, 해당 연구실 연구활동종사자
- 점검양식 : 연구실안전관리센터에서 배부한 일상점검 체크리스트

## ○ 연구실 정기안전진단 및 정밀안전점검 실시

- 진단주기 : 매달 1회 전체 연구실에 대하여 정기안전점검 및 정밀안전진단 실시
- 진단대상 : 연구실험실
- 진단방법 : 진단기기를 통하여 화공, 가스, 전기, 위생, 기계 등 종합점검  
※ 전문 안전점검기관을 통하여 진단 시행

- 추후조치 : 진단결과 미비점에 대하여 개선조치가 될 수 있도록 시정요청 후 피드백

## ○ 교육훈련 체계

- 집합 안전교육

- 가. 교육대상 : 전체 연구활동종사자
- 나. 교육주기 : 반기 6시간 이상, 신규채용자 : 8시간 이상 시행
- 다. 교육방법 : 전문강사 초빙하여 교육

- 신규 연구활동종사자 교육

- 가. 교육대상 : 신규 연구활동종사자
- 나. 교육주기 : 신규채용자(계약직포함) 8시간 이상 시행
- 다. 교육방법 : 집합교육
- 라. 교육내용 : 연구실 특성에 맞는 안전교육실시

- 연구수행에 맞는 자체 안전교육 계획수립 및 이행

## ○ 연구활동종사자 건강검진 실시 : 매년 1회 실시

- 검진대상 : 산업안전보건법에 따른 유해물질 및 유해인자를 취급하는 연구활동종사자/연구원 등 건강보험 가입자

- 검진기관 : 계약된 기관에서 출장검진 또는 원내검진 시행

## 제 10 장 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문 게재지/ 특허등록국가	Impact Factor	논문 게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/ 인용횟수 등)
1	논문	배양 조건이 <i>Bacillus thuringiensis</i> 독소단백질의 생산에 미치는 영향	충남대 학교	책임	농약과학회 지	0.3952	2014년 12월	단독	
2	논문	새로운 곤충병원성 <i>Bacillus</i> <i>thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i> 균주의 유전학적 특성	충남대 학교	책임	농업과학연 구		2014년 12월	단독	
3	논문	Mass production of Entomopathogenic Nematode, Heterorhabditits megidis by using Micorosparger of Gandong strain	충남대 학교	책임	Journal of The Faculty of Agriculture Kyushu University	0.218	2014년 09월	단독	SCI
4	논문	유기농자재와 <i>Bacillus</i> <i>thuringiensis</i> 의 혼합처리에 의한 과밤나방의 방제효과	농촌진 흥청 국립농 업과학 원	1저자	농약과학회 지	0.4655	2015년 12월	단독	
5	논문	Isolation and characterization of New <i>bacillus</i> <i>thuringiensis</i> strains with insecticidal activity to difficult to control Lepidopteran pests	충남대 학교	책임	Journal of The Faculty of Agriculture Kyushu University	0.255	2015년 02월	단독	SCI
6	논문	Tannic acid enhancing insecticidal activity of protoxin produced in <i>Bacillus</i> <i>thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> KB100 strain	충남대 학교	책임	Journal of The Faculty of Agriculture Kyushu University	0.255	2015년 02월	단독	SCI

7	논문	Finding the Relationships between a Strain of <i>Bacillus thuringiensis</i> , Tannic Acid, and the Mid-gut Proteases of <i>Spodoptera exigua</i>	충남 대학교	책임	Journal of The Faculty of Agriculture Kyushu University	0.255	2016년 09월	단독	SCI
8	논문	유기농자재와 <i>Bacillus thuringiensis</i> 의 혼합처리에 의한 과밤나방의 방제효과	농촌진흥청 국립농업과학원	1저자	한국유기농업학회지		2016년 11월	단독	
9	영농활용기관제출	곤충병원세균과 친환경농자재를 혼합한 혼합제를 이용한 과밤나방 방제	농촌진흥청 국립농업과학원				2016년 11월		

## 제 11 장 기타사항

- 해당사항 없음

## 제 12 장 참고문헌

- Abdullah, M.A.F., S. Moussa, M.D. Taylor, and M.J. Adang. 2009. *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae) cadherin fragments function as synergists for Cry1A and Cry1C *Bacillus thuringiensis* toxins against noctuid moths *Helicoverpa zea*, *Agrotis ipsilon* and *Spodoptera exigua*. Pest Manag. Sci. 65: 1097–1103.
- Asano, S., & Suzuki, N. 1995. Bioassays of *Bacillus thuringiensis* formulation using diet incorporation method with common cutworm, *Spodoptera litura*(Lepidoptera: Noctuidae). Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology (Japan).
- Ascher, K. R. S. 1993. Nonconventional insecticidal effects of pesticides available from the neem tree, *Azadirachta indica*. Arch. Insect Biochem. Physiol. 22: 433–449.
- Bae, S. D., H. J. Kim, G. H. Lee, and S. T. Park. 2007. Seasonal occurrence of tobacco cutworm, *Spodoptera litura* Fabricius and beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner) using sex pheromone traps at different locations and regions in Yeongnam district. Korean J. Appl. Entomo. 46(1): 27–35.
- Bakr E. M., Soliman Z. R., Hassan M. F. and Tawadrous S. S. D. 2012. Biological activity of the organic pesticide Baicao No.1 against the red spider mite *Tetranychus urticae*. Koch. Acarines 6: 35–39.
- BenFarhat-Touzri, D., Saadaoui, M., Abdelkefi-Mesrati, L., Saadaoui, I., Azzouz, H., & Tounsi, S. 2013. Histopathological effects and determination of the putative receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry1Da toxin in *Spodoptera littoralis* midgut. Journal of invertebrate pathology, 112(2): 142–145.
- Cho, M. S., S. Y. Choi, T. W. Kim, C. Park, D. A. Kim, Y. R. Kim, S. M. Oh, S. W. Kim, Y. N. Youn, and Y. M. Yu. 2009. Insecticidal activity of diamondback moth, *Plutella xylostella* against *Bacillus thuringiensis* and neem oil. Korean J. Pestic. Sci. 13(4): 315–324.
- Choi, J. Y., H. S. Kim, B. R. Jin, K. Y. Seol, H. Y. Park, and S. K. Kang. 1996. Pathogenicity and production of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus. Korean J. Appl. Entomol. 35(3): 228–231.
- Finney, D.J. 1971. Probit analysis, estimation of the median effective dose. Cambridge University Press. London. pp19–47.
- Garcia-carreno, F. L., Dimes, L. E. and Haard, N. F. 1993. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. Anal. Biochem. 214: 65–69.

- Goh, H., Park, J., Choi, Y., Choi, K. and Park, I. 1991. The host plants of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner), (Lepidoptera: Noctuidae) and its occurrence. Korean J. Appl. Entomol. 30: 111-116.
- Greenberg S. M., Showler A. T. and Liu T. X. 2005. Effects of neem-based insecticides on beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). Insect Sci. 12: 17-23.
- Han, J. H., S. S. Yoon, S. J. Son, J. J. Kim, and S. Y. Lee. 2015. Combination effects of organic materials and *Bacillus thuringiensis* on *Spodoptera exigua*. Korean J. Pestic. Sci. 19(4): 411-417.
- Hwang I. C., Kim J., Kim H. M., Kim D. I., Kim S. G., Kim S. S. and Jang C. 2009. Evaluation of toxicity of plant extract made by neem and matrine against main pests and natural enemies. Korean J. Appl. Entomol. 48(1): 87-94.
- Isman M. B. 1999. Neem and related natural products. In: Hall, F.R., Menn, J.J. (eds.) Method in Biotechnology, vol.5. Biopesticides: Use and Delivery. Humana Press Inc. Totowa, NJ, pp.139-636.
- Jin, N. Y., Jung, S. Y., Park, C., Paek, S. K., Seo, M. J., Youn, Y. N. and Yu, Y. M. 2009. The synergy effects of mixed treatment with tannic acid and *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* KB100 against *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). Korean J. Appl. Entomol. 48: 519-526.
- Kim, D. A., J.S. Kim, M.R. Kil., S.K. Paek, S.Y. Choi, D.Y. Jin, Y.N. Yoon, I.C. Hwang and Y.M. Yu. 2008. Characterization of New *Bacillus thuringiensis* Isolated with Bioactivities to Tobacco Cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae), Kor. J. Appl. Entomol. 47(1): 87-93.
- Kim D. I., Kim S. G., Kim S. G., Ko S. J., Kang B. R., Choi D. S. and Hwang I. C. 2010. Characteristics and toxicity of Chrysanthemum sp. line by extract part and methods against *Tetranychus urticae*, *Nilaparvata lugens* and *Aphis gossypii*. Korean J Organic Agri. 18(4): 573-586.
- Kim, H. S., D.W. Lee, H.W. Park, Y.M. Yu, J.I. Kim and S.K. Kang. 1995. Distribution and characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated form soils of sericultural farms in Korea. Korean J. Seric. Sci., 37(1): 57-61.
- Kim, J. M., Nalini, M., & Kim, Y. G. 2008. Immunosuppressive Activity of Cultured Broth of Entomopathogenic Bacteria on the Beet Armyworm, *Spodoptera exigua*, and Their Mixture Effects with Bt Biopesticide on Insecticidal Pathogenicity. The Korean Journal of Pesticide Science, 12(2): 184-191.
- Kim, K., Kim, H., Park, Y. U., Kim, G. H., & Kim, Y. 2013. An integrated biological control using an endoparasitoid wasp (*Cotesia plutellae*) and a microbial insecticide

- (*Bacillus thuringiensis*) against the diamondback moth, *Plutella xylostella*. Korean journal of applied entomology, 52(1): 35–43.
- Kim, K. C., J. D. Park, and D. S. Choi. 1995. Seasonal occurrence of *Spodoptera exigua* in Chonnam province and a possibility of their control in vinyl house with pheromone traps. Korean J. Appl. Entomol. 34(2): 106–111.
  - Kim, M. J., C. K. Shim, Y. K. Kim, H. J. Jee, J. C. Yun, S. J. Hong, J. H. Park, and E. J. Han. 2013. Insecticidal effect of organic materials of BT, neem and matrine alone and its mixture against major insect pests of organic chinese cabbage. Korean J. Pestic. Sci. 17(3): 213–219.
  - Kim, T.H., D.A. Kim, K.S. Kim, M.J. Seo, Y.N. Youn and Y.M. Yu. 2009. Characterization of *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* CAB109 isolate with bioactivities to *Spodoptera litura* and *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). Kor. J. Appl. Entomol. 48: 509–517.
  - Koul O. and Wahab S. 2004. Neem: today and in the new millenium. 276pp. Netherlands, Kluwer Academic Publishers.
  - Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680–685.
  - Lawernce L. 2010. Insect Control : biological and synthetic agents 247.
  - Lee, Y. K., Jin, N. Y., Lee, B. R., Seo, M. J., Youn, Y. N., Aoki, C. Y. and Yu, Y. M. 2015. Isolation and characterization of new *Bacillus thuringiensis* strains with insecticidal activity to difficult to control lepidopteran pests. J. Fac. Agr. Kyushu Univ. 60 (1): 103–112.
  - Liang G. M., Chen W. and Liu T. X. 2003. Effects of three neem-based insecticides on diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). Crop Prot. 22: 333–340.
  - Mao L. and Henderson G. 2007. Antifeedant activity and acute and residual toxicity of alkaloids from *Sophora flavescens* (Leguminosae) against Formosan subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae). J. Econ. Entomol. 100: 866–870.
  - Marcic, D. M. Prijovic, T. Drobnjakovic, I. Medo, P. Peric and S. Milenkovic. 2012. Greenhouse and field evaluation of two biopesticides against *Tetranychus urticae* and *Panonychus ulmi*. Pestic. Phytomed. (Belgrade) 27(4): 313–320.
  - Ohba, M. and Aizawa, K. 1978. Serological identification of *Bacillus thuringiensis* and related bacteria isolated in Japan. J. Invertebr. Pathol. 32: 303–309.
  - Olson S. 2015. An analysis of the biopesticide market now and where it is going. Outlooks on Pest Management. 203–206.
  - Park, J. H., S. J. Hong, E. J. Han, C. K. Shim, M. J. Kim, and Y. K. Kim. 2015.

- Control efficacy of entomopathogenic microagent against *Spodoptera exigua* on organic Chinese cabbage. Korean J. of Organic Agric. 23(4): 797-811.
- Poopathi, S., Kumar, K. A., Kabilan, L., & Sekar, V. 2002. Development of low-cost media for the culture of mosquito larvicides, *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 18(3): 209-216.
  - Raymond, M. 1985. Presentation d'un programme d'analyse log-probit pour microordinateur. Cahiers Orston S'r. Ent M'd. Parasitol, 23.
  - Schmutterer H. 1990. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree. Annu. Rev. Entomol. 34:271-298.
  - Shelton, A.M., J.L. Robertson, H.D. Tang, C.J. Perez, S.D. Eigenbrode, H.K. Preisler, W.T. Wilsey, R.J. Cooley. 1993. Resistance of diamondback moth (Lepidoptera, Plutellidae) to *Bacillus thuringiensis* subspecies in the field. J. Econ. Entomol. 86: 697-705.
  - Singh G., Rup P. J. and Koul O. 2007. Acute, sublethal and combination effects of azadirachtin and *Bacillus thuringiensis* toxins on *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera; Noctuidae) larvae. B. Entomol. Res. 97: 351-357.
  - Tabashnik, B. E., Cushing, N. L., Finson, N. and Johnson, M. W. 1990. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). J. Econ. Entomol. 83: 1671-1676.
  - Yang, X. Y. and B. G. Zhao. 2006. Antifungal activities of matrine and oxymatrine and their synergistic effects with chlorthalonil. J. For. Res. 17(4): 323-325.
  - Yang, Z., Chen, H., Tang, W., Hua, H. and Lin, Y. 2011. Development and characterisation of transgenic rice expressing two *Bacillus thuringiensis* genes. Pest Manag. Sci. 67: 414-422.
  - Ye, R., Huang, H., Yang, Z., Chen, T., Liu, L., Li, X. and Lin, Y. 2009. Development of insect resistant transgenic rice with Cry1C\* free endosperm. Pest Manag. Sci. 65(9): 1015-1020.
  - Zanardi O. Z., Ribeiro L. D. P., Ansante T. F., Santos M. S. Bordini G. P., Yamamoto P. T. and Vendramim J. D. 2015. Bioactivity of a matrine-base biopesticide against four pest species of agricultural importance. Crop Prot. 68: 160-167.
  - Zhang, L., Qiu, S., Huang, T., Huang, Z., Xu, L., Wu, C., ... & Guan, X. 2013. Effect of chemical additives on *Bacillus thuringiensis* (Bacillales: Bacillaceae) against *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Pyralidae). Journal of economic entomology, 106(3): 1075-1080.

- Zhong, C., Ellar, D. J., Bishop, A., Johnson, C., Lin, S. and Hart, E. R. 2000. Characterization of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin which is toxic to insects in three orders. *J. Invertebr. Pathol.* 76(2): 131–139.
- Zhu, Y. C., Adamczyk Jr, J. J., & West, S. 2005. Avidin, a potential biopesticide and synergist to *Bacillus thuringiensis* toxins against field crop insects. *Journal of economic entomology*, 98(5): 1566–1571.
- Zouari, N. and J. Samit, 1997. Purification and immunological characterization of particular delta-endotoxins from three strains of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechol. Lett.* 19(8): 825–829.

## 주         의

1. 이 보고서는 농촌진흥청에서 시행한 「친환경 안전 농산물 생산기술사업」의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서의 내용을 인용·발표할 때는 반드시 농촌진흥청에서 시행한 「친환경 안전 농산물 생산기술사업」의 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.