



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0132129
(43) 공개일자 2011년12월07일

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01) A01N 63/02 (2006.01)

A01P 7/04 (2006.01) C12R 1/07 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0051968

(22) 출원일자 2010년06월01일

심사청구일자 2010년06월01일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전 유성구 궁동 220 충남대학교

(72) 발명자

유용만

대전광역시 서구 월평2동 무지개아파트 103동 604호

윤영남

대전광역시 유성구 관평동 대덕테크노밸리 1008동 902호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

최규환

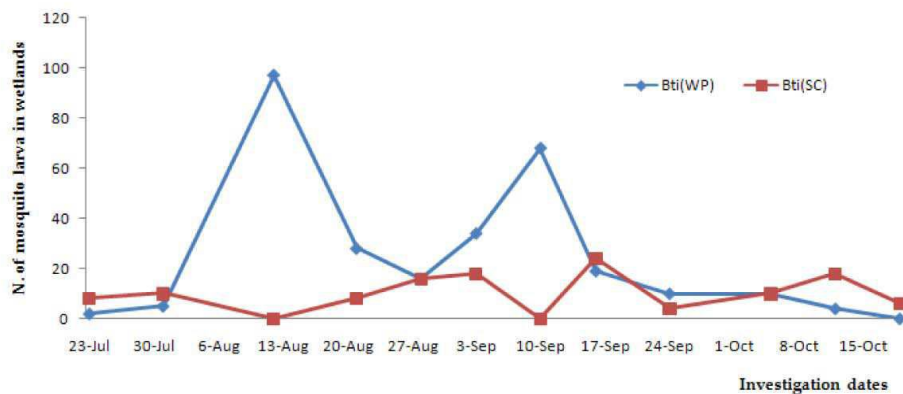
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 모기 유충에 대한 살충 효과를 갖는 바실러스 튜링지엔시스 아종 이스라엘렌시스 C A B 199 균주 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 모기 유충에 대한 살충 효과를 갖는 바실러스 튜링지엔시스 아종 이스라엘렌시스(*acillus thuringiensis* subsp. *israelensis*) CAB199 균주 및 이의 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게 본 발명은 바실러스 튜링지엔시스 아종 이스라엘렌시스 CAB199 균주, 상기 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 함유하는 모기 유충 방제용 미생물제제, 상기 균주를 배양하는 단계를 포함하는 모기 유충 방제용 미생물제제의 제조방법, 상기 균주의 유효량을 습지에 살포함으로써 모기 유충을 방제하는 방법 및 글루코스, 효모 추출물, 대두분(Soybean powder), 맥아추출물(Malt extract), NaCl, K₂HPO₄ 및 MnSO₄를 포함하는, 상기 균주 배양용 배지를 제공하는 것이다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

서미자

대전광역시 유성구 지족동 열매마을 102동 604호

길영종

대전광역시 중구 태평동 버드내마을아파트 122동
1604호

특허청구의 범위

청구항 1

바실러스 튜린지엔시스 아종 이스라엘렌시스(*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*) CAB199 균주 (KACC91528P).

청구항 2

제1항의 바실러스 튜린지엔시스 아종 이스라엘렌시스 CAB199 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 함유하는 모기 유충 방제용 미생물제제.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 모기는 지하집모기(*Culex pipiens molestus*), 빨간집모기(*Culex pipiens pallens*), 이나 도미집모기(*Culex inatomi*) 및 이집트숲모기(*Aedes aegypti*)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 모기 유충 방제용 미생물제제.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 미생물제제는 수화제(wettable powder) 또는 액상수화제(suspension concentrate)의 제형인 것을 특징으로 하는 모기 유충 방제용 미생물제제.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 수화제는 바실러스 튜린지엔시스 아종 이스라엘렌시스 CAB199 균주, 화이트카본(white carbon), 소듐 비스[2-에틸헥실]설포숙시네이트, 소듐 리그노설포네이트 및 카올린으로 이루어진 것을 특징으로 하는 모기 유충 방제용 미생물제제.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 액상수화제는 바실러스 튜린지엔시스 아종 이스라엘렌시스 CAB199 균주, MBSC(Nonylphenol, ethoxylated, monoether with sulfuric acid, sodium salt, Sodium bis[20 ethylhexyl] sulfosuccinate Polyoxyethylene nonylphenol), 이소프로판올 및 물로 이루어진 것을 특징으로 하는 모기 유충 방제용 미생물제제.

청구항 7

제1항의 바실러스 튜린지엔시스 아종 이스라엘렌시스 CAB199 균주를 배양하는 단계를 포함하는 모기 유충 방제용 미생물제제의 제조방법.

청구항 8

제1항의 바실러스 튜린지엔시스 아종 이스라엘렌시스 CAB199 균주의 유효량을 습지에 살포함으로써 모기 유충을 방제하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 모기는 지하집모기(*Culex pipiens molestus*), 빨간집모기(*Culex pipiens pallens*), 이나 도미집모기(*Culex inatomi*) 및 이집트숲모기(*Aedes aegypti*)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 모기 유충을 방제하는 방법.

청구항 10

글루코스, 효모 추출물, 대두분, 맥아추출물, NaCl, K₂HPO₄ 및 MnSO₄ 를 포함하는, 제1항의 바실러스 튜린지엔시스 아종 이스라엘렌시스 CAB199 균주 배양용 배지.

청구항 11

제10항에 있어서, 글루코스 0.5~1.5 중량%, 효모 추출물 0.3~0.7 중량%, 대두분 0.05~0.15 중량%, 맥아추출물 0.1~0.3 중량%, NaCl 0.1~0.3 중량%, K₂HPO₄ 0.02~0.06 중량% 및 MnSO₄ 0.00005~0.00015 중량%를 포함하는 것을 특징으로 하는, 제1항의 바실러스 튜린지엔시스 아종 이스라엘렌시스 CAB199 균주 배양용 배지.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 모기 유충에 대한 살충 효과를 갖는 바실러스 튜린지엔시스 아종 이스라엘렌시스 CAB199 균주 및 이의 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게 본 발명은 바실러스 튜린지엔시스 아종 이스라엘렌시스 CAB199 균주를 유효성분으로 함유하는 모기 유충 방제용 미생물제제에 관한 것으로, 대단위 인공습지에 존재하는 모기유충을 친환경적으로 방제하는데 매우 효과적인 방법을 제공할 수 있는 내용에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 최근 우리나라에서는 자연생태계의 보전을 위하여 축산폐수, 농업용수, 생활하수 등이 하천으로 유입되어 오염되는 것을 방지하는 자연정화 형태의 자연형 습지나 인공습지의 형태의 수질개선 시설들이 설치되어 있다. 이러한 대단위 습지는 수질개선의 측면 뿐만 아니라 생물의 서식처를 제공하고, 종 다양성을 증진시키며 자연생태계의 생물들을 관찰할 수 있는 생태공간으로 제공되어 환경의 중요성을 일깨워주고 있는데, 이러한 대단위 인공습지 및 자연습지는 모기나 파리와 같은 위생해충의 주요 집단서식처가 되어 문제가 되고 있다. 또 한편으로는 도시화와 간척사업으로 인해 이전에 문제가 되지 않았던 모기종들이 급증하여 질병을 매개하거나 귀찮고 성가신 존재로 사람들에게 접근하게 되어 모기방제의 심각성을 일깨워주고 있다.

[0003] 국내의 모기방제는 최근까지 주로 성충을 대상으로 화학농약을 이용한 화학적 방제에 의존하여 왔는데(Kil et al., 2008 Kor. J. Appl. Entomol. 47(4): 457-465), 모기를 치사시키는 유기인계나 피레스로이드계 살충제, 발육억제제, 모기의 접촉을 차단하는 기피제 등을 처리하는 방법으로 행해져 왔다. 성충방제는 주로 극미량연무기나 가열연무기를 이용하여 살충제인 클로르피리포스(Chlorpyrifos)나 델타메트린(deltamethrin)과 같은 약제를 서식처나 축사 천정 및 벽면에 처리하였는데, 성충의 휴식습성이나 행동습성 및 정확한 서식처를 확인하여 처리해야만 방제효과를 얻을 수 있고, 직접 접촉을 해야 방제효과를 얻을 수 있다는 점에서도 방제에 어려움이 있었다(Ree et al., 1988 Yonsei Rep. Trop. Med., 19:3-7). 하지만, 유충의 방제 없이는 모기의 개체군을 제어할 수 없었기 때문에 유충을 방제할 수 있는 곤충생장조절제를 비롯하여 환경 친화적이면서 생태계에 안전한 생물적 방제인자로 바실러스 튜린지엔시스 아종 이스라엘렌시스(*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*) 균주가 이용되고 있다. 지금까지 모기유충에 대해 독성을 나타내는 바실러스 튜린지엔시스 8종 이상 보고되고 있으나, 그 중에서도 바실러스 튜린지엔시스 아종 이스라엘렌시스와 모리소니 2종이 모기유충에 대해 강한 독성을 나타내는 것으로 알려져 있다(Kil et al., 2008 Kor. J. Appl. Entomol. 47(4): 457-465). 곤충생장조절제 중에서 키틴합성저해기작을 가진 노발루론(Novaluron)과 탈피촉진기작을 보이는 메소페노지드(Methoprene)는 다른 작용기작을 가진 곤충생장조절제보다 모기유충방제에 높은 활성을 보이는 것을 확인하였으며(Choi et al., 2007 Kor. J. Appl. Entomol. 46(2): 261-267), 최근 전 세계적으로 모기유충을 방제하는데 이용되고 있다(Beckage et al., 2004 Insect Biochem. Physiol. 57:111-122). 국외에서는 부리켓(briquet) 제제로서 미생물 살충제인 바실러스 튜린지엔시스 아종 이스라엘렌시스를 주성분으로 한 박티모스 부리켓(Bactimos Briquets)과 발육억제제인 메소프렌(methoprene)을 주성분으로 한 Altosid XR Briquets등이 모기유충 방제의 목적으로 쓰이고 있지만, 국내에서는 친환경적으로 대단위 인공습지에서 방제에 적용한 사례가 많지 않다(Kim et al., 1995 Kor. J. Appl. Entomol. 34(4): 344-349).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 안출된 것으로서, 본 발명자들은 수질개선을 목적으로 조성된 자연정화시설에서 생태계에 안전한 방제수단으로서, 모기유충을 친환경적으로 방제할 수 있는 살충활성이 우수한 바실러스 튜린지엔시스 아종 이스라엘렌시스 CAB199 균주를 선발하였고, 이 균주를 포함하는 모기 유충 방제용 미생물제제를 개발함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

- [0005] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 바실러스 튜린지엔시스 아종 이스라엘렌시스 CAB199 균주를 제공한다.
- [0006] 또한, 본 발명은 상기 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 함유하는 모기 유충 방제용 미생물제제를 제공한다.
- [0007] 또한, 본 발명은 상기 균주를 배양하는 단계를 포함하는 모기 유충 방제용 미생물제제의 제조방법을 제공한다.
- [0008] 또한, 본 발명은 상기 균주의 유효량을 습지에 살포함으로써 모기 유충을 방제하는 방법을 제공한다.
- [0009] 또한, 본 발명은 글루코스, 효모 추출물, 대두분, 맥아추출물, NaCl, K₂HPO₄ 및 MnSO₄를 포함하는, 상기 균주 배양용 배지를 제공한다.

발명의 효과

- [0010] 본 발명의 모기 유충 방제용 미생물제제는 대단위 인공습지에 존재하는 모기유충을 친환경적으로 방제하는데 매우 효과적이다.

도면의 간단한 설명

- [0011] 도 1은 바실러스 튜린지엔시스 아종 이스라엘렌시스 CAB199 균주의 결정모양을 위상차 현미경(×1,000) 및 주사전자현미경으로 관찰한 사진이다. S: 포자, C: 크리스탈 내독소
- 도 2는 바실러스 튜린지엔시스 분리주의 부포자봉 입체(parasporal inclusion)의 SDS-PAGE 분석 결과이다. M : 기준 마커, 레인 1: B 상품(Bactosec. (주)성인제약), 레인 2: 바실러스 튜린지엔시스 아종 이스라엘렌시스 CAB199, 레인 3: 바실러스 튜린지엔시스 아종 모리소니 PG-14, 레인 4: *B.t.i*
- 도 3은 바실러스 튜린지엔시스 아종 이스라엘렌시스 CAB199 제형에 의한 건설된 습지에서 모기유충의 제어효과를 나타내는 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0012] 본 발명의 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 모기 유충에 대한 살충 효과를 갖는 바실러스 튜린지엔시스(*Bacillus thuringiensis*) 균주를 제공한다. 상기 균주는 바람직하게는 모기 유충에 대한 살충 효과를 갖는 바실러스 튜린지엔시스 아종 이스라엘렌시스(*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*)이며, 더욱 바람직하게는 모기 유충에 대한 살충 효과를 갖는 바실러스 튜린지엔시스 아종 이스라엘렌시스(*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*) CAB199 균주(KACC91528P)이다.
- [0013] 또한, 본 발명은 상기 바실러스 튜린지엔시스 아종 이스라엘렌시스 CAB199 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 함유하는 모기 유충 방제용 미생물제제를 제공한다.
- [0014] 본 발명의 일 구현예에 따른 모기 유충 방제용 미생물제제에서, 상기 모기는 지하집모기(*Culex pipiens molestus*), 빨간집모기(*Culex pipiens pallens*), 이나도미집모기(*Culex inatomi*) 또는 이집트숲모기(*Aedes aegypti*) 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0015] 본 발명의 일 구현예에 따른 모기 유충 방제용 미생물제제에서, 상기 미생물제제는 수화제(wettable powder) 또는 액상수화제(suspension concentrate)의 제형일 수 있다.
- [0016] 본 발명의 액상수화제는 모기 유충을 방제하기 위해 사용된다. 본 발명의 미생물제제를 이용하여 모기 유충을 방제하기 위해서는 미생물제제를 물을 이용하여 균일하게 희석한 후 동력살포기와 같은 적절한 살포장치를 이용하여 습지에 살포할 수 있다. 본 발명의 액상수화제를 물에 희석하는 경우 액상수화제의 농도는 유효성분이 생물학적으로 유효한 범위가 될 수 있도록 10^3 내지 10^5 cfu/ml, 바람직하게는 10^4 cfu/ml 내외로 조절할 수 있다.
- [0017] 본 발명에 의한 미생물 제제는 액상 형태로 제조될 수 있으며, 이에 증량제를 첨가하여 가루분말의 형태로 이용하거나 이를 제형화하여 과립화시킬 수도 있다. 그러나 그 제형에 특별히 한정되지는 않는다. 즉 미생물제제 공급이 제한된 환경에서 이를 극복하기 위한 미생물제제로 제형화가 가능하다.
- [0018] 본 발명의 일 구현예에 따른 수화제는 유효성분(active ingredient)으로서 바실러스 튜린지엔시스 아종 이스라엘렌시스 CAB199 균주, 흡습제로서 화이트카본(white carbon), 습윤제로서 소듐 비스[2-에틸헥실]설포숙시네이

트, 분산제로서 소듐 리그노설포네이트 및 증량제로서 카올린으로 이루어질 수 있으며, 바람직하게는 10 중량% 바실러스 튜린지엔시스 아종 이스라엘렌시스 CAB199 균주, 1 중량% 화이트카본(white carbon), 1 중량% 소듐 비스[2-에틸헥실]설포숙시네이트, 1 중량% 소듐 리그노설포네이트 및 87 중량% 카올린으로 이루어질 수 있다.

[0019] 본 발명의 일 구현예에 따른 액상수화제는 유효성분(active ingredient)으로서 바실러스 튜린지엔시스 아종 이스라엘렌시스 CAB199 균주, 습윤제 및 분산제로서 MBSC(Nonylphenol, ethoxylated, monoether with sulfuric acid, sodium salt, Sodium bis[20 ethylhexyl] sulfosuccinate Polyoxyethylene nonylphenol), conformulant로서 이소프로판올 및 증량제로서 물로 이루어질 수 있다. 상기 액상수화제는 바람직하게는 50 중량% 바실러스 튜린지엔시스 아종 이스라엘렌시스 CAB199 균주, 4 중량% MBSC, 30 중량% 이소프로판올 및 16 중량% 물로 이루어질 수 있다.

[0020] 또한, 본 발명은 상기 바실러스 튜린지엔시스 아종 이스라엘렌시스 CAB199 균주를 배양하는 단계를 포함하는 모기 유충 방제용 미생물제제의 제조방법을 제공한다. 상기 균주의 배양 방법 및 미생물제제의 제조 방법은 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용할 수 있으며, 특정 방법에 특별히 제한되는 것은 아니다.

[0021] 또한, 본 발명은 상기 바실러스 튜린지엔시스 아종 이스라엘렌시스 CAB199 균주의 유효량을 습지에 살포함으로써 모기 유충을 방제하는 방법을 제공한다.

[0022] 본 발명의 일 구현예에 따른 모기 유충을 방제하는 방법에서, 상기 모기는 지하집모기(*Culex pipiens molestus*), 빨간집모기(*Culex pipiens pallens*), 이나도미집모기(*Culex inatomi*) 또는 이집트숲모기(*Aedes aegypti*) 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0023] 또한, 본 발명은 글루코스, 효모 추출물, 대두분, 맥아추출물, NaCl, K₂HPO₄ 및 MnSO₄를 포함하는, 상기 바실러스 튜린지엔시스 아종 이스라엘렌시스 CAB199 균주 배양용 배지를 제공하며, 상기 배지는 바람직하게는 글루코스 0.5~1.5 중량%, 효모 추출물 0.3~0.7 중량%, 대두분(Soybean powder) 0.05~0.15 중량%, 맥아추출물(Malt extract) 0.1~0.3 중량%, NaCl 0.1~0.3 중량%, K₂HPO₄ 0.02~0.06 중량% 및 MnSO₄ 0.00005~0.00015 중량%를 포함하며, 더욱 바람직하게는 글루코스 1 중량%, 효모 추출물 0.5 중량%, 대두분(Soybean powder) 0.1 중량%, 맥아추출물(Malt extract) 0.2 중량%, NaCl 0.2 중량%, K₂HPO₄ 0.04 중량% 및 MnSO₄ 0.0001 중량%를 포함한다.

[0024] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0025] 재료 및 방법

[0026] 1. 새로운 바실러스 튜린지엔시스 아종 이스라엘렌시스 CAB199 균주의 특성조사

[0027] 모기유충에 높은 살충활성을 보인 새로운 바실러스 튜린지엔시스 아종 이스라엘렌시스 CAB199(*B. thuringiensis* subsp. *israelensis* CAB199)(이하 *Bt*) 균주는 충남대학교 생물적해충제어학 실험실에서 국내토양으로부터 분리하였고, 일본의 규슈대학 생물적방제시설의 M. obha 박사에 의뢰하여 혈청형을 동정하였다. 새로운 곤충병원성 미생물 균주의 특성조사를 위해 포자형성기가 지난 포자와 내독소단백질 혼합물에서 이들의 형태를 위상차현미경(Olympus BX51)과 주사전자현미경(Philips XL30E SEM)을 이용하여 관찰하였다(도 1). 위상차현미경으로 관찰하기 위해 소량의 *Bt* 배양액을 슬라이드 글라스에 떨어뜨린 후 1,000배로 관찰하였다. 주사전자현미경으로 관찰할 시료는 알루미늄 원반 시료대 위에서 자연 건조시킨 후, 탄소로 코팅하고 금으로 염색하여 10,000배로 관찰하였다(Kim et al., 1995 Kor. J. Appl. Entomol. 34(4): 344-349).

[0028] CAB199 균주의 부포자봉 입체(parasporal inclusion) 단백질의 SDS-PAGE는 Laemmli의 방법을 수정하여 실험하였다(Laemmli, 1970 Nature. 227: 680-685). 균주들을 NA 배지(Difco)에 배양하여 위상차현미경으로 자가분해(Autolysis)가 일어난 것을 확인한 후, 균을 모아 NaCl이 포함된 버퍼를 넣어 10,000rpm에서 원심 분리하여 일부 포자를 제거하고, 부포자봉 입체를 얻었다. 12% separating gel과 5% stacking gel을 사용하였고, 각 균주의 부포자봉 입체를 1.5ml 튜브에 넣고, 2-머캅토에탄올이 포함된 버퍼를 1:2 (w/w)로 섞은 후 100℃에서 10분 동안 열처리하였다. 50V에서 전기영동 후, 젤은 쿠마시 브릴리언트 블루 250(Coomassie brilliant blue 250)으로 40분 동안 염색하였고, 12시간 탈색하여 결과를 확인하였다.

[0029] **2. 살충활성 검증**

[0030] 국내에 서식하는 모기의 종에 따른 살충활성의 차이를 검토하기 위해 집모기 3종, 대전광역시 유성구 궁동에서 채집하여 실내에서 누대사육중인 지하집모기(*Culex pipiens molestus*)와 빨간집모기(*Culex pipiens pallens*), 충남 당진군 석문면 자연정화시설단지에서 채집한 이나도미집모기(*Culex inatomi*)와 서울대학교 농업생명과학 대학에서 분양받아 실내사육중인 숲모기 1종인 이집트숲모기(*Aedes aegypti*)에 대해 Bt 균주의 최종 포자농도가 10^5 cfu/ml로 처리하여 살충율을 조사하였다. 모든 실험은 500ml 유리 비이커에 습지에서 채집한 물을 300ml 정도 채워 넣고, 각각의 비이커에 모기종별로 2령 유충을 30마리씩 넣고, 1일간 적응시킨 후 배양액을 동일한 농도로 처리하고 24시간과 48시간 후의 사망률을 조사하였다. 매일 치어사료를 이용해 먹이를 공급해 주었으며, 먹이에 따른 수막이 생기는 것을 매일 제거해주었다.

[0031] **3. 모기유충의 행동패턴에 따른 바실러스 튜린지엔시스 아종 이스라엘렌시스 CAB199 균주의 방제**

[0032] 미생물 살충제인 Bt를 효과적으로 사용하기 위하여, 모기의 종과 유충의 영기에 따라 나타나는 행동패턴을 관찰하여 이들의 생태적 특성에 따라 효과적으로 방제할 수 있는 제형을 개발하였다. 행동패턴은 첫째, 유충의 주요 분포 위치를 시험하기 위하여 1L 용량의 유리비이커에 습지물을 1L 채운 후 각각의 비이커의 습지물에 1, 2, 3, 4령 유충을 무작위로 선발하여 각각 10마리씩 방사한 후 2시간 정도 적응하게 한 다음, 시간대별로 수면층에 존재하는 모기유충의 비율과 수중에 존재하는 유충의 비율을 조사하였다. 두 번째, 수면 위로 이동하는 횟수는 유충의 주요 분포위치 조사와 동일한 방법으로 수행하되 10분 동안 유충 10마리가 수면위로 올라오는 횟수를 측정하였다. 셋째, 모기유충의 수면위에 존재하고 있는 시간 측정도 위의 두 조사항목과 동일한 방법으로 수행하였으며, 정확한 행동분석모집단을 확보하기 위해 20마리의 유충이 수면에서 호흡하는 시간을 측정하였다.

[0033] **4. 바실러스 튜린지엔시스 아종 이스라엘렌시스 CAB199 균주의 제형에 따른 살충효과**

[0034] 물에서 서식하는 모기유충의 서식 습성에 의한 살충효과를 높이기 위하여, 각각의 제형을 수면층위에서 확산과 분산성으로 살충효과에 미치는 영향을 확인하였다. 알루미늄 사각용기(면적 896cm^2)에 습지에서 채집한 물 3.5L를 채워놓고, 2, 3, 4령 유충을 약 70 마리씩 방사한 후 용기 가장자리에 제형별로 각각 처리하고 24, 48시간 후의 살충율을 조사하였다. 처리농도는 용기에 담긴 물 용량을 계산하여 최종농도 10^2 과 10^3 cfu/ml이 되도록 처리하였다. 새로운 CAB199의 제형화를 위해, (주)우진 B&G에서 대량배양 하여 배양액(표 1)을 만든 후 (주)경농 중앙연구소에서 수화제(Wettable powder, WP)와 액상수화제(Suspension concentrate, SC) 형태로 제형화하였다(표 2, 표 3).

[0035] 또한, 야외에서의 미생물제제의 제형에 따른 방제효과를 확인하기 위해, 당진 석문수질환경단지내 습지에서 처리 전 모기유충의 밀도를 조사하였고, 처리 후 매 1주일 간격으로 습지내 물 10L를 무작위로 채집하여 물속에 서식하고 있는 모기유충의 수를 측정하여 방제효과를 비교하였다.

표 1

바실러스 튜린지엔시스 아종 이스라엘렌시스 CAB199 균주의 배양배지 및 배양조건

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

[0036]

표 2

바실러스 튜린지엔시스 아종 이스라엘렌시스 CAB199 균주를 포함하는 액상수화제 제형의 미생물제제

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

[0037]

표 3

바실러스 튜린지엔시스 아종 이스라엘렌시스 CAB199 균주의 수화제 제형의 미생물제제

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

[0038]

[0039] 실시예 1. 바실러스 튜린지엔시스 아종 이스라엘렌시스 CAB199 균주의 특성

[0040] 모기유충의 생물적 방제인자로서 활성을 갖는 새로운 Bt 균주를 국내 토양으로부터 분리하였다. 분리한 Bt 균주

에서 구형(spherical type)의 내독소 결정성단백질을 생산하는 18개의 균주를 위상차현미경 검경 후 확인 선발하였고, 선발된 18개 균주 중 CAB199 균주가 지하집모기에 90% 이상의 살충율을 나타내어 가장 높은 살충활성을 보여주었으며, 대조균주로 사용된 바실러스 튜린지엔시스 아종 이스라엘렌시스(*B. thuringiensis* subsp. *israelensis*)와 바실러스 튜린지엔시스 아종 모리소니 PG-14(*B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14) 균주와도 유사한 살충효과를 나타내었다(표 4).

[0041] 또한, 선발된 균주 중엔 두 종 유충에 50%의 살충율을 보인 바실러스 튜린지엔시스 아종 토호쿠엔시스(*B. thuringiensis* subsp. *tohokuensis*)도 확인되었다. CAB199 균주의 모기의 종류에 따른 기주범위의 특이성을 확인하기 위한 이집트숲모기에 대한 생물활성 시험에서도 바실러스 튜린지엔시스 아종 이스라엘렌시스와 유사한 결과를 나타내었다(표 4).

표 4

이집트숲모기에 대한 바실러스 튜린지엔시스 분리 균주들의 생물활성 평가

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

[0042]

[0043] ^a +++: 효과 높음 (살충율 90-100%); ++: 효과적임 (살충율 70%); +: 효과 낮음 (살충율 50%); -: 효과없음 (살충율 0-50%)

[0044] 모기에 100%의 살충활성을 보인 CAB199 균주에 대해 M. obha에 H 혈청형 (H serotype)을 의뢰한 결과, 혈청형이 H14인 바실러스 튜린지엔시스 아종 이스라엘렌시스로 동정되었으며(표 5), CAB199 균주를 NA 배지에 27℃에서 3~4일 동안 배양하여 이들이 생성하는 부포자봉 입체를 위상차현미경과 주사전자현미경을 통해서 확인한 결과,

구형(spherical type)의 부포자봉 입체를 형성하는 것을 확인하였다(도 1). 일반적으로 위상차현미경하에서, 내독소단백질이 구형인 경우에 모기유충에 대해 살충활성을 보이는 것으로 확인되고 있으나(Kil et al., 2008 Kor. J. Appl. Entomol. 47(4): 457-465), 위상차현미경 검정결과와 살충활성결과를 통해 선발된 구형의 균주가 주사전자현미경 관찰에서는 부정형으로 확인되는 연구결과도 있어, 단순히 위상차현미경을 통한 내독소단백질의 형태적 관찰만으로 대상해충방제를 위한 잠재적 균주를 선발하는 것은 우수한 균주가 선발되지 않을 가능성도 있다는 것을 염두해 두어야 한다(Benintende 2000 Curr. Microbiol. 41: 396-401).

표 5

바실러스 튜링지엔시스 아종 이스라엘렌시스 CAB199 균주의 H 혈청형의 동정

Isolate	H-Serotype	Subspecies	Agglutinationreaction
<i>B. thuringiensis</i> CAB199	H14	<i>israelensis</i>	+

[0045]

[0046]

또한, 바실러스 튜링지엔시스 아종 이스라엘렌시스 CAB199 균주의 단백질 패턴을 분석하기 위해 기준 균주인 바실러스 튜링지엔시스 아종 이스라엘렌시스와 바실러스 튜링지엔시스 아종 모리소니 PG-14, 그리고 모기유충방제를 위해 제품화된 B product의 *B.t.i* (바실러스 튜링지엔시스 아종 이스라엘렌시스) 균주를 SDS-PAGE에서 확인한 결과, 130kDa, 70kDa, 28kDa의 사이의 주요 3종류의 단백질 밴드가 확인되었으며, 기준 균주와 *B.t.i* 제품에서 분리한 균주와 유사한 단백질 밴드패턴을 나타내었다(도 2).

[0047]

실시예 2. 바실러스 튜링지엔시스 아종 이스라엘렌시스 CAB199 균주의 모기 종에 따른 살충활성 검정

[0048]

국내에서 서식하는 몇 개의 모기종류에 따른 살충활성에 차이를 확인하기 위해 집모기 3종류로서 지하집모기(*Culex pipiens molestus*), 빨간집모기(*Culex pipiens pallens*), 이나도미집모기(*Culex inatomi*)와 숲모기 1종인 이집트숲모기(*Aedes aegypti*)에 대해 최종 포자농도 10^5 cfu/ml 농도로 처리하여 살충율을 조사한 결과, 실내시험에서 4종 모두 100%의 살충율을 나타내었다(표 6). 따라서 습지내에 발생하는 다양한 모기종류의 유충을 방제하는데 이용할 가능성이 높음을 보여주었다.

[0049]

또한, 습지 내에 발생하는 모기유충을 효과적으로 방제하기 위한 적정 살포농도의 조사에서 농도별 살충활성을 확인한 결과, 이집트숲모기, 이나도미집모기 두 종 모두 10^4 cfu/ml 농도부터 100%의 살충율을 보였는데(표 6), 습지나 방제대상구역의 면적 또는 물의 양을 추정하여 희석하여 10^4 농도 이하로 낮아지지 않게 처리함으로 방제 효과를 높일 수 있을 것으로 보인다. Dominic Amalraj et al.(2000 Acta Tropica 75: 243-246)의 연구결과에 의하면, 동일한 *Bti* 제형에 대해 방제대상 모기 종에 따른 살충율 뿐만 아니라 반수치사 농도 값도 다르게 나타난다고 하였는데, 열대집모기와 이집트숲모기에 비해 아노펠레스 스테펜시(*Anopheles stephensi*) 모기에 대한 LC_{50} 값이 높게 나타나고 살충활성도 다소 떨어진다고 보고하고 있다. 본 발명에서도 동일한 농도에서 이나도미집모기보다는 이집트숲모기에 대한 살충활성이 높게 나타나는 것을 확인할 수 있었으며, 이에 따라 방제대상 해충에 대한 정확한 실내 살충활성 검정 후 적정농도를 살포하는 것이 효과적인 방제결과를 얻을 수 있을 것이다.

표 6

CAB199 균주에 대한 지하집모기, 빨간집모기, 이집트숲모기 및 이나도미집모기의 살충률(10 cfu/ml)

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

[0050]

[0051]

실시에 3. 모기유충의 행동패턴 분석을 통한 바실러스 튜린지엔시스 아종 이스라엘렌시스 CAB199 균주의 효과적인 방제제형 모색

[0052]

모기 유충은 물속에서 살지만 제 8 복절에 있는 한 쌍의 기문을 통해 대기 중의 산소를 호흡한다. 따라서 호흡하는 물위에 떠서 기공을 수면 밖으로 내놓아야 한다. 이것은 기공주위의 특수한 구조와 물의 장력에 의해 이루어지는데, 늪모기속(*Mansonia*)의 유충은 수서식물의 뿌리나 줄기에 호흡관을 찢어 넣어 식물로부터 산소를 얻는 것으로 보고되어 있다. 본 발명에서는 모기 종 및 영기에 따라 그들의 호흡시 수면으로 떠오르는 특이한 행동패턴에 대한 분석을 통해 물 표면층에 오래 머물 수 있는 특수한 제형화를 만들어 방제효과의 극대화가 가능한지의 여부를 확인하고자, 이집트숲모기와 이나도미집모기 유충의 주요 분포위치와 수면 위로 이동하는 횟수, 수면 위에 존재하는 시간을 측정하였다(표 8).

표 7

이집트숲모기 유충의 행동패턴 분석

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

[0053]

[0054]

^a 값은 평균±표준편차를 나타낸다.

[0055] 줄에서 값의 다른 문자는 SPSS version 17.0에서 유의차(One-way ANOVA, Post hoc tests by Duncan)를 나타낸다.

[0056] ^{b **} $p < 0.01$, 및 ^{NS} $p > 0.05$

[0057] 이집트숲모기 1, 2, 3, 4령 유충의 주요 분포위치와 수면위로 이동하는 횟수, 모기유충의 수면위에 존재하고 있는 시간을 측정한 결과, 1령 보다는 2령, 3, 4령 유충이 수면 위에 위치하는 경향을 보였으며, 노숙유충인 3, 4령 유충이 어린유충보다 호흡을 위해 수면으로 이동하는 경향이 높았다. 하지만, 수면위에 존재하고 있는 시간을 측정한 결과, 영기에 따른 차이는 없는 것으로 나타났다(표 7).

[0058] 모기종에 따른 행동패턴에 있어 차이를 확인하기 위해 이집트숲모기와 이나도미집모기 2령 유충을 이용해 위와 동일한 행동패턴실험을 수행하여 비교한 결과, 유충의 주요 분포위치는 역시 두 종 모두 수면위에 87.3, 100.0%로 주로 수면위에 위치하고 있었으며, 호흡을 위해 수면으로 이동하는 횟수에서는 이나도미집모기보다는 이집트숲모기가 더 빈번하게 이동하였으나, 두 종간에 통계적으로는 차이가 없는 것으로 확인되었다. 하지만, 수면 위에 존재하고 있는 시간을 측정한 결과에서는 이나도미집모기의 경우 조사한 개체 모두가 5분(300초) 이상 존재하고 있었으며, 이집트숲모기의 경우는 평균 21초 정도 수면에 존재하고 있어, 이나도미집모기 유충은 거의 수면위에 존재하고 있는 것으로 확인되었다(표 8). 위의 결과로 보아, 모기유충방제를 위해 곤충병원성 미생물제제를 살포시 수면에 좀 더 장시간 동안 부유하거나 잔류하고 있는 제형의 형태로 개발하여 사용하는 것이 모기 유충과 제제와의 노출시간을 늘릴 수 있으며, 이에 따른 방제효과를 높일 수 있을 것으로 생각된다. 또한 노령 유충으로 갈수록 수면 위에 존재하는 시간이 높았는데, 일반적으로 미생물제제에 의해 모기유충을 생물학적으로 방제할 때 주요 방제대상 영기가 2령, 3령 유충이라는 것을 고려해 볼 때, 효과적인 모기유충 방제에 있어 제제의 올바른 선택과 개발이 필수적이라 볼 수 있다.

표 8

이나도미집모기 및 이집트숲모기의 2령 유충의 행동패턴 분석

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

[0059]

[0060] ^a 값은 평균±표준편차를 나타낸다. SPSS 버전 17.0에서 t-test

[0061] ^{b **} $p < 0.01$, 및 ^{NS} $p > 0.05$

[0062] 실시예 4. 바실러스 튜린지엔시스 아종 이스라엘렌시스 CAB199 균주의 두 가지 제형에 따른 살충효과 및 방제효과 비교

[0063] 제형에 따른 살충효과 및 방제효과를 확인하기 위해 CAB199 균주를 두 개의 제형, 즉 유효성분 10% 수화제(Wettable powder, WP)와 50% 액상수화제(Suspension concentrate, SC)로 제형화하여 처리한 후 살충율을 확인

한 결과, 처리 후 1일차에서부터 수화제 형태의 기존 B제품 10⁴농도와 액상수화제 형태의 CAB199 균주의 두 농도처리에서 높은 사망률을 나타내었으나, 수화제 형태의 CAB199 균주나 기존 B제품의 경우는 처리 후 1일차의 살충율이 동일 농도상에서 다소 낮게 나타남을 볼 수 있었다. 수화제 형태로 모기유충방역용 미생물제제로 판매되고 있는 B제품의 경우, 면적 896cm² 용기내에서 방제효과 실험을 실시한 결과, 살충율에 있어 처리 후 1일차와 3일차에 살충율이 20% 이상의 차이를 보였다. 이는 처리 후 분산이 용이하게 이루어지지 못함으로 인해 방제효과가 감소한 것으로 여겨지며, 액상수화제제형의 CAB199은 처리 후 일자에 따른 차이가 거의 없는 것으로 보아, 처리 후 면적에 빠른 시간내에 고르게 분산된 것으로 보인다(표 9).

표 9

CAB199 균주의 제형에 따른 이나도미집모기의 살충율의 비교

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

^a 대조구 살충률이 5%와 20% 사이라면, 처리구의 살충률은 Abbott's formula에 의해 수정되어야 한다.

살충률(%)=X-Y/X×100, X= 비처리 대조구에서 생존율(%), Y= 처리 샘플에서 생존율(%)

또한 야외에서의 미생물제제의 제형에 따른 방제효과를 확인한 실험결과에서는, 액상수화제를 처리한 습지에서는 처리 후 밀도의 급격한 변화가 없이 습지내 물 1L당 10~20 마리 유충의 밀도를 보였으나, 수화제 처리구 습지에서는 두 차례의 급격한 모기유충의 밀도 증가를 보여, 방제제의 습지내 전반적인 분산정도에 있어 차이를 보여 방제효과에 차이를 나타낸 것으로 여겨진다(도 3).

Das & Amalraj(1997 J. Med. Res. 106: 174-197)는 *B.t.i* 제형에 따라 야외에서의 모기유충의 방제효과에 있어 차이를 나타내는지의 여부를 조사한 결과, 실내에서는 수화제(AS) 제형이 과립 제형보다 열대집모기 방제에 있어서는 효과적이라고 보고하였으나 야외에서는 두 제형간 방제효과에 있어 큰 차이를 보이지 않았다고 제시하고 있다. 우리 실험은 작은 면적에서 조차도 제형에 따른 방제효과의 차이는 나타나는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 제제의 습지 및 처리 공간 내에서의 분산이나 용해정도의 차이에 의해 살충효과에 차이를 보일 수 있음을 시사해준다. 실질적으로 이러한 문제를 해결하기 위해 일부 학자들은 *Bti* 제제에 옥수수전분을 혼합하여 직경 약 2~6cm 정도의 단단한 블록모양의 물에 뜨는 형태의 브리켓(Briquette)으로 제형화하여 입자가 서서히 방출되도록 하여 잔효기간을 늘리려는 연구도 수행된 바 있다(Yu et al., 1982 J. of Entomology. 12:69-82). 액상수화제는 물과 유기용매에 난용성인 원제를 액상의 형태로 조제한 제형으로, 수화제가 가지는 분말의

비산과 같은 단점을 보완하기 위해 개발된 제형이다. 증량제로 물을 사용하여 습식분쇄기로 입자를 평균 1-3㎜ 크기로 미분쇄시킨 후 액상의 보조제와 혼합, 유효성분을 물에 현탁시킨 제제로, 분진이 발생하지 않아 사용할 때 안전하고 수화제처럼 평량할 필요가 없다는 장점이 있다. 습지나 인공호수, 늪 같은 장소에 살포할 경우, 평량을 할 수 없는 상황이 될 수도 있고, 사람이 직접 안으로 들어갈 수 없는 상태에서 방제대상 면적에 고루 살포하여 약제를 분산할 수 없는 문제를 해결해 줄 수 있는 제형으로 유용할 것으로 생각된다. 물론 수화제처럼 포장이나 수송, 보관에 있어 덜 편리한 점이 있지만, 입자가 미세하여 비산되기 쉬운 제형보다는 흡입이나 중독 위험이 적고, 특히나 증량제로 물을 사용하였기 때문에 독성, 환경오염 측면에서도 유리하다는 점에서, 여러 방면으로 액상수화제 형태의 제형으로 곤충병원성 미생물제제를 만드는 것이 효과적일 것으로 생각된다. 결과에 제시하지 않았지만, 실내 살충활성 검정 결과 살충효과가 높았던 CAB199 *Bti* 균주를 (주)우진 B&G에서 대량 배양한 후 배양액을 (주)경농에서 수화제(WP 10%)와 액상수화제(SC 50%)로 제형화하여 10^2 과 10^3 농도로 처리한 결과, 수화제에서는 이집트숲모기가 43.3%, 이나도미집모기가 64.5로 살충효과가 낮게 나타났다. 물론 배양액 자체가 물을 포함하고 있는 액상인 관계로 유효성분 함량 자체를 10%로 처리하여 파우더화 하였기 때문에 함량 자체의 차이로 적게 나타날 수도 있었을 것이다. 하지만 그보다 낮은 농도인 10^2 의 농도로 액상수화제를 처리하였을 때, 이나도미집모기는 80.0%, 이집트숲모기는 100.0%의 살충율을 나타내어 유효성분 자체의 함량보다는 제형에 따른 차이로 살충효과가 낮게 나타나는 문제로 생각되며 추후 좀 더 자세한 실험을 수행해야 할 것으로 생각된다.

수탁번호

[0069]

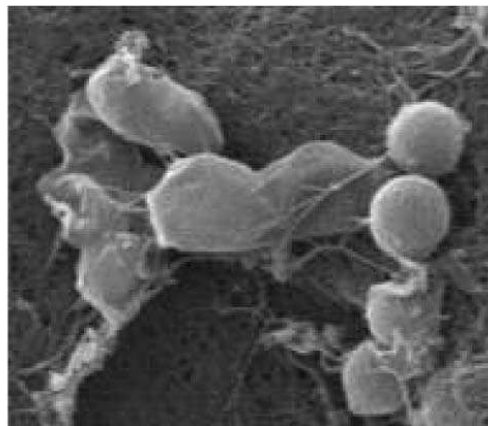
기탁기관명 : 농업생명공학연구원

수탁번호 : KACC91528

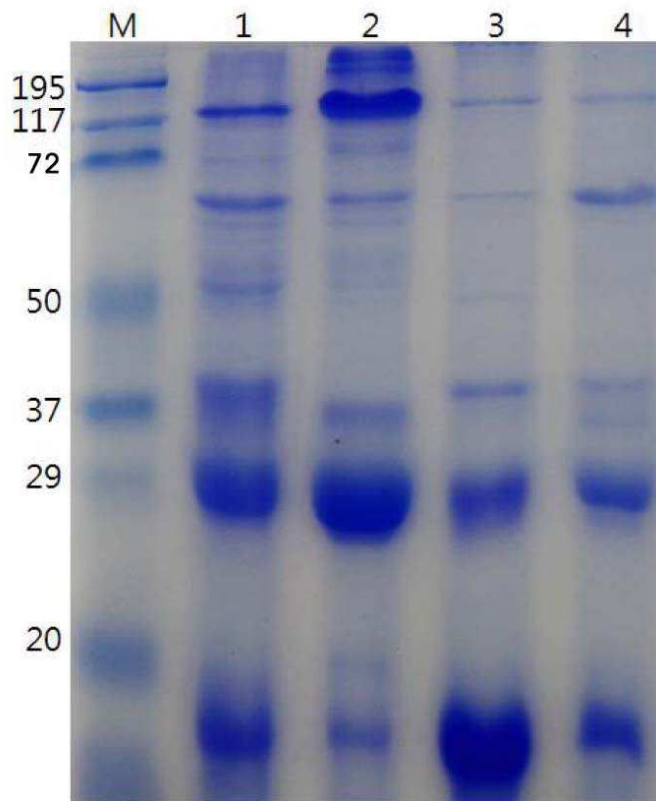
수탁일자 : 20100208

도면

도면1



도면2



도면3

