

117044-3

국내산
곤충
병원성
선충의
고살충성
증식
기술인
고체
배양법의
산업화
및
현장적용
기술개발

최
종
보
고
서

2019

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개() 발간등록번호(O)

농생명산업기술개발사업 2019년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003143-01

국내산 곤충병원성선충의 고살충성 증식기술인 고체배양법의 산업화 및 현장적용 기술개발

최종보고서

2020. 02. 14.

주관연구기관 / 대동테크
협동연구기관 / 영남대학교
경북대학교

농림축산식품부

(전문기관) 농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

‘국내산 곤충병원성 선충의 고살충성 증식기술인 고체배양법의 산업화 및 현장적용 기술개발’
(연구개발 기간 : 2017. 04. 21. ~ 2019. 12. 31.) 과제의 최종보고서 10부를 제출합니다.

2020. 02. 14.

주관연구기관명 : 대동테크

(대표자) 오현식



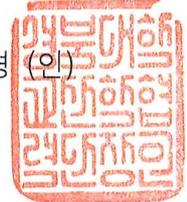
협동연구기관명 : 영남대학교 산학협력단

(대표자) 박용완



협동연구기관명 : 경북대학교 산학협력단

(대표자) 임기병 (인)



주관연구기관책임자: 유연수

협동연구기관책임자: 백광현

협동연구기관책임자: 이경열

국가연구개발사업훈령 제18조에 따라 최종보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	117044-3	해 당 단 계 연 구 기 간	3년	단 계 구 분	(최종)/ (3 단 계)
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	농생명산업기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	국내산 곤충병원성 선충의 고살충성 증식기술인 고체배양법의 산업화 및 현장적용 기술개발			
	세부 과제명	<ul style="list-style-type: none"> - 고살충성 곤충병원성 선충 고체배양 산업화 기술개발 - 고살충성 곤충병원성 선충 고체배양을 위한 최적 배양 조건확립 - 고살충성 곤충병원성 선충 고체배양제제의 현장적용 기술개발 			
연구책임자	유연수	해당단계 참여 연구원 수	총: 15명 내부: 15명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부:188,000천원 민간:63,000천원 계:251,000천원
		총 연구기간 참여 연구원 수	총: 31명 내부: 31명 외부: 명	총 연구개발비	정부:600,000천원 민간:201,000천원 계:801,000천원
연구기관명 및 소속부서명	대동테크 기술연구소			참여기업명	대동테크
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	일반과제 - 공개 가능
-------------------------	--------------

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호											

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설·장 비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약

국내산 주요 천적자원인 곤충병원성 선충의 살충성을 극대화하는 고체배양 대량 증식 기술을 개발하고 현장적용을 통해 실용성을 검증하고 제품화하여 차세대 고기능성 생물농약으로의 산업화에 기여하고자 함. 고살충성 곤충병원성 선충 고체배양 산업화 기술개발을 위해서 배지 조성별 생산 수율 및 살충력 비교, 담체 종류, 담체와 배지 혼합비, 적재 높이별 선충 생산 수율 및 살충력 비교, 고체배양 배양조 개발, 선충 세척 및 수확 시스템 개발을 수행하였음. 또한 고살충성 곤충병원성 선충 고체배양을 위한 최적 배양조건 확립을 위해서 고살충성 유도 최적 공생미생물, 곤충병원성 선충 배양조건 확립, 고살충성 유도 최적 공생미생물 배양을 위한 공생미생물의 최적 장기보관조건 확인, 그리고 최적, 최저의 고살충이 유도된 공생미생물, 곤충병원성 선충 유전자 발현 및 상응 지표물질 확인을 수행하였음. 그리고 고살충성 곤충병원성 선충 고체배양체제의 현장적용 기술개발을 위해서 꿀벌부채명나방 유충에 대한 In vivo, 액상 및 고상 배양별 농도, 시간 및 빈도에 대한 살충률 비교 분석과 시설재배지(토마토)에 관수처리 후 토양 해충의 방제율 분석, 골프장의 토양 굼벵이에 대한 제제별 방제 효과 분석, 그리고 버섯재배지의 버섯파리에 대한 제제별 방제 효과 분석을 수행하였음.

보고서 면수

133면

<요약문>

연구의 목적 및 내용	<p>국내산 주요 천적자원인 곤충병원성 선충의 살충성을 극대화하는 고체 배양 대량 증식 기술을 개발하고 현장적용을 통해 실용성을 검증하고 제품화하여 차세대 고기능성 생물농약으로의 산업화에 기여하고자 함.</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 고살충성 곤충병원성 선충 고체배양 산업화 기술개발 ○ 고살충성 곤충병원성 선충 고체배양을 위한 최적 배양조건 확립 ○ 고살충성 곤충병원성 선충 고체배양제제의 현장적용 기술개발 				
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 고살충성 곤충병원성 선충 고체배양 산업화 기술개발 <ul style="list-style-type: none"> - 배지 조성별 생산 수율 및 살충력 비교 - 담체 종류, 담체와 배지 혼합비, 적재 높이별 선충 생산 수율 및 살충력 비교 - 고체배양 배양조 개발 - 선충 세척 및 수확 시스템 개발 ○ 고살충성 곤충병원성 선충 고체배양을 위한 최적 배양조건 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 고살충성 유도 최적 공생미생물, 곤충병원성 선충 배양조건 확립 - 고살충성 유도 최적 공생미생물 배양을 위한 공생미생물의 최적 장기보관조건확인 - 최적, 최저의 고살충이 유도된 공생미생물, 곤충병원성 선충 유전자 발현 및 상응 지표물질 확인 ○ 고살충성 곤충병원성 선충 고체배양제제의 현장적용 기술개발 <ul style="list-style-type: none"> - 꿀벌부채명나방 유충에 대한 In vivo, 액상 및 고상 배양별 농도, 시간 및 빈도에 대한 살충률 비교 분석 - 시설재배지(토마토)에 관수처리 후 토양 해충의 방제율 분석 - 골프장의 토양 굼벵이에 대한 제제별 방제 효과 분석 - 버섯재배지의 버섯파리에 대한 제제별 방제 효과 분석 				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 국내외 곤충병원성 선충 관련 SCI 논문 8편, 학술발표 8건 ○ 곤충병원성 선충 고살충성 대량생산 특허 출원·등록 각 3건 ○ 기술이전 1건 ○ 연매출 100억 달성(사업종료 5년이내) - 국내 판매 70억원 + 수출 30억원 / 수익률 30%이상 달성 				
국문핵심어 (5개 이내)	곤충병원성 선충	고살충성	고체배양	현장적용	대량생산
영문핵심어 (5개 이내)	Entomopathog enic nematode	Insecticidal activity	Solid culture	Field application	Mass production

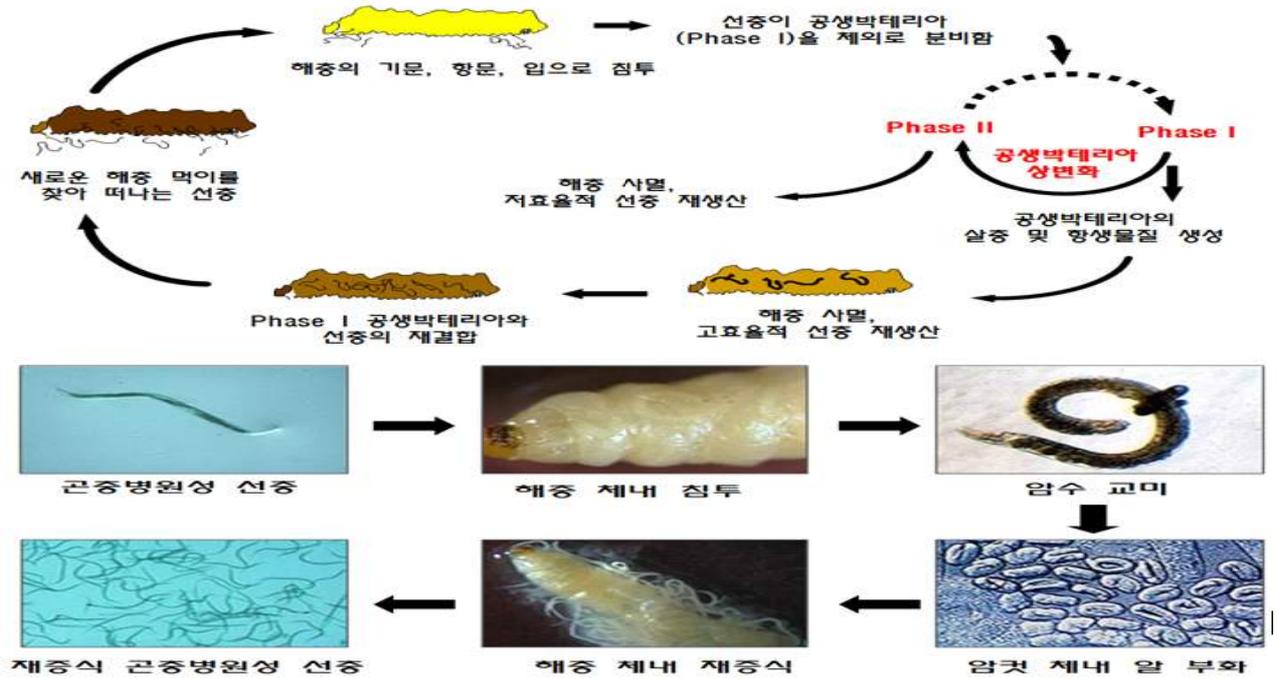
< 목 차 >

제 1장 연구개발과제의 개요	6
제 2장 연구수행 내용 및 결과	11
제 1절 고살충성 곤충병원성 선충 고체배양 산업화 기술개발	11
제 2절 고살충성 곤충병원성 선충 고체배양을 위한 공생미생물 최적 배양 조건확립	73
제 3절 고살충성 곤충병원성 선충 고체배양 제제의 현장 적용 기술개발	114
제 3장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	127
제 4장 연구결과의 활용 계획	128
제 5장 참고문헌	132

제 1장 연구개발과제의 개요

1. 연구개발 목적

- 현재 해충 방제를 위해 화학적 방제 방법이 주로 사용되고 있으나, 20세기 후반부터 깨끗하고 안전한 농산물을 선호하는 국민적 욕구가 증가하고 있고 환경에 무해하기에 국내 농업도 병해충 방제를 위해 화학합성 농자재보다도 생물이나 천연자원을 활용하는 친환경농업을 범국가적으로 실천하고 있음.
- 국내 농작물, 산림, 골프장, 식품, 산업시설에 대한 해충 피해는 지속적으로 증가하는 추세이며, 지구온난화의 영향 및 외래 도입 해충의 영향으로 인하여 해충 방제에 대한 관심 또한 계속 증가하는 추세임.
- 생물농약은 인공적으로 합성하지 않고 자연적(생물적)으로 발생하는 천연소재를 이용하여 생산되었다는 점이 합성농약과 크게 다르지만, 기능적인 면에서 그리고 화학적 및 생물학적 작용면에서 합성농약과 크게 다를 바 없음. 또한 천적을 이용한 해충 방제는 특히 시설작물의 해충방제에 많이 사용되고 있으며, 유입된 해외 해충 방제 및 최근 급속히 증가되고 있는 친환경농산물 생산 유통량과 맞물려 주목받고 있음.
- 약 30년 전부터 전 세계적으로 곤충병원성 선충(천적자원)을 이용한 친환경살충제 개발 및 제품화가 선진국 등을 중심으로 활발히 추진되었음. 곤충병원성 선충(EPN, Entomopathogenic Nematode)은 해충 탐색능력을 가지며, 살포 후 24-48시간 내에 해충 체내에 침투하여 사멸시킬 수 있는 능력을 가지고 있음. 곤충병원성 선충은 화학농약을 대신할 수 있으며, 동식물과 환경에 안전한 천적자원으로 전작물(원예, 수도, 과수 등)의 나비목, 딱정벌레목, 메뚜기목 등 300여종의 해충방제에 활용이 가능하기에 미국 환경보호청(EPA)에 등록 면제됨.



곤충병원성 선충의 해충사멸 모식도 및 공생박테리아와의 공생 생활사

- 곤충병원성 선충은 선충내부에 공생박테리아와 공생할 때 해충사멸 능력을 가지는데, 곤충병원성 선충이 해충의 체내에 침투한 후, 선충 내부에 존재하고 있는 공생박테리아를 체외로 분리하게 됨. 곤충 체내에 감염된 공생박테리아는 살충 및 항생물질을 생성하게 되어 해충사멸 작용을 하게 되며, 이때 공생박테리아는 다시금 해충 안에서 활발히 증식한 선충과 재결합을 하게 되어 사멸된 해충을 떠나 새로운 서식처로 옮겨질 준비를 하게 됨(그림 1).
- 선진국들에서는 Becker Underwood, E-nema, Koppert 등의 기업이 성공적으로 제품화에 성공하였으며, Bt미생물살충제에 이어 지속적으로 판매 시장이 성장하고 있음. 2012년에는 세계적 농자재 회사인 BASF가 Becker Underwood(미국, 1982년 설립)를 \$1.02 Billion (한화 약 1조 1700억원)에 인수함.
- 또한 곤충병원성 선충 산업은 초기 미국, 유럽, 호주 등을 중심으로 발전된 이후 최근 중국, 남아프리카공화국, 이스라엘, 멕시코, 쿠바 등 개발도상국 및 후진국에서도 자국의 곤충병원성 선충 자원을 발굴하고 자국의 해충방제에 활용하는 등 활발한 연구와 적용사례가 보고됨. 이러한 곤충병원성 선충은 비교적 쉽게 플라스크 안에서도 배양이 가능하며(그림 2), 또는 곤충 생체배양, 비닐팩 또는 스테인레스 박스를 이용한 고체배양, 현대식 최신식 액체 발효기를 이용하여 배양이 가능함(그림 3).



플라스크 조건에서의 스폰지 담체를 이용한 곤충병원성 선충 고체배양



생체(곤충) 배양



고체배양 I(비닐팩)



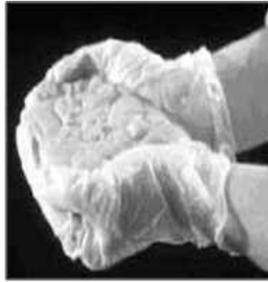
고체배양 II(박스)



액체배양(10톤)

곤충병원성 선충 생산 방법

- 전세계적으로 친환경농법의 증가 및 곤충병원성 선충의 효능의 우수함으로 인해 곤충병원성 선충의 배양, 연구, 상품화, 보급이 증가되고 있는 실정임. 그러나 국내의 경우 현재 1개 회사에서 곤충병원성 선충 *Seinernema carpocapsae* 1종만 제품화되어 활용되고 있으며, 이 또한 방제 효과 부족으로 시장규모가 급속히 감소됨.



곤충병원성선충 장내 공생박테리아 분리

대량배양기술 확립

제품화기술 확립



수도작 공동방제사업
(진환경재배지 확대)



골프장 굼벵이방제
(사멸한 유충색깔이 특이적으로 붉은색임)



기존 원예시장에서
과수시장으로 확대

국내의 곤충병원성 선충 제품화 및 적용사례

○ 이러한 국내 곤충병원성 선충 산업의 문제점은,

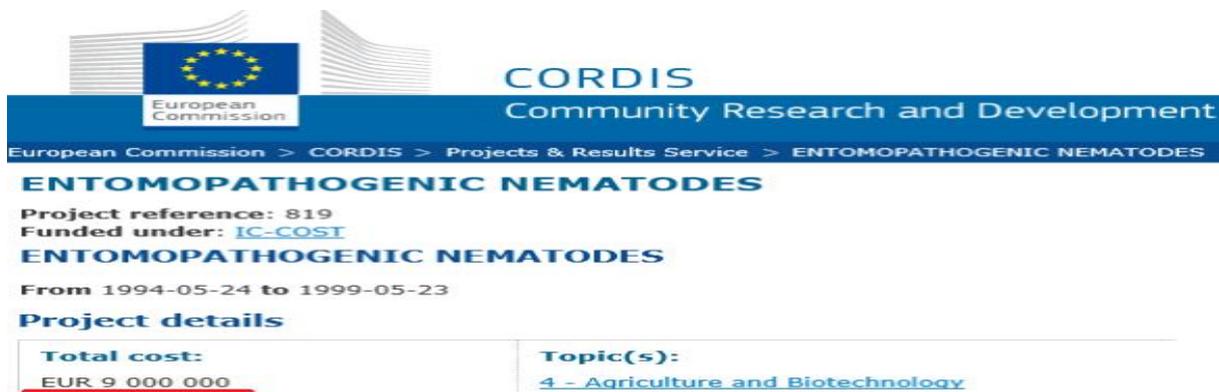
- 1) 액체배양기술로만 제품을 생산함으로 인하여 다양한 국내 곤충병원성 선충(현재까지 보고된 종이 최소 5종 이상임) 발굴 중에 대한 생산기술 미확보와 제품화 미흡으로 다양한 해충에 대한 적용 제품 개발 부족(예, 굼벵이 방제용 *Heterorhabditidae spp.*)
- 2) 품질(살충력, 저장성 등) 관리 부족으로, 고객의 제품 만족도를 지속적으로 증가시키기 위해서 반드시 개선 및 발전되어야 할 부분이고 특히 액체배양의 경우 생산공정 특성으로 살충력이 부족할 수 있음. 이를 위해서 지속적인 곤충병원성 선충 생물자원 발굴과 인공 배지 및 생산 공정개선 등 산업화에 관련된 기술 개발이 필요함.

○ 국외에서는 최근 액체배양의 문제점(높은 초기 투자비용, 대량생산 기술의 어려움 등)을 개선하고 조기에 자국의 곤충병원성 선충 자원을 현장에 활용하기 위해서 저비용, 고효율의 고체배양 기술을 개발하여 국가별 주요 해충에 효과적으로 사용되고 있음. 이 경우 국가별로 확보된 다양한 종류의 곤충병원성 선충 각각에 대한 최적화된 고체배양 대량생산 기술 개발 및 제품화가 필요함.

○ 본 연구과제를 통하여 국내에서 현재까지 발굴된 곤충병원성 선충 중 제품화 가능성이 우수한 종에 대한 고체배양 생산 및 고품질 관리시스템을 완성하고 조기에 제품화하여 국내 농작물 재배지 및 골프장 잔디 등 주요 난방제 해충 방제에 성공적으로 활용함으로써 미흡한 국내 곤충병원성 선충 산업을 활성화하고 확보된 원천 기술을 활용하여 향후 국내 곤충병원성 선충을 국제적 경쟁력을 갖춘 수출제품으로 발전시키고자 함.

2. 연구개발의 필요성

- 최근 농작물의 안전성에 대한 우려로 지속가능한 농업시스템 개발 및 새로운 친환경 방제 시스템 개발이 절실함. 안전한 먹을거리 공급에 의한 소비자 신뢰 회복이 절실함.
- 국내 천적의 90% 이상이 해외 수입 제품인 현지점에서 토착 천적의 이용을 확대하기 위한 기반 개발이 절실함. 곤충병원성 선충은 국내 토착 천적자원으로 반드시 국가적인 차원에서 지속적인 국내 친환경농업 발전을 위해서 연구가 이루어져야 할 것으로 사료됨.
- 최근 기후변화와 국제 교역량 증가 등에 의해서 외래 병해충 유입량 및 피해가 지속적으로 증가함
 - 2000년대 이전: 온실가루이(1997년), 꽃노랑총채벌레(1993년), 담배가루이(1998년) 등
 - 2000년대 이후: 콩매미(2006년), 미국선녀벌레(2009년), 갈색임개매미충(2010년) 등
- 천적의 효과를 경험한 농업인은 향후 천적의 지속적인 이용을 원하나 비싼 가격과 활용성의 어려움으로 확산이 제한됨.
- 국내 생물살충제의 대표인 BT살충제의 경우 20년 이전부터 저항성을 보이는 해충이 나타나고 있어 새로운 미생물/천적 살충제의 개발이 시급한 실정임. 이에 대한 대체로 곤충병원성 선충을 이용하는 연구가 세계적으로 활발히 이루어짐.
- 네델란드의 천적사업 활성화 사례를 소개함
 - 1991년 10년간 프랑스와 함께 천적곤충 개발에 집중 투자
 - 천적을 이용한 고도의 해충방제 기술 보유
 - 캐나다, 미국, 일본 등에 천적 곤충 수출
 - 천적 장려를 위한 “작물보호 장기계획“ 실시로 천적곤충을 활용한 농법 보급
 - 세계적인 농산물, 천적곤충 수출 강국으로 성장
- 유럽연합은 곤충병원성 선충을 미래 산업으로 지목하고 일찍이 지난 1994-1999(5년간) 90만유로(한화 112억원)를 지원하여 유럽지역 연구자 주관으로 산업화 연구를 수행함.



The image shows a banner for a CORDIS project. At the top left is the European Commission logo. The text reads: "CORDIS Community Research and Development". Below this is a navigation bar: "European Commission > CORDIS > Projects & Results Service > ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES". The main title is "ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES". Below the title, it says "Project reference: 819" and "Funded under: IC-COST". The project dates are "From 1994-05-24 to 1999-05-23". Under "Project details", there is a table with two columns: "Total cost:" with the value "EUR 9 000 000" and "Topic(s):" with the value "4 - Agriculture and Biotechnology".

- 본 과제는 기존 곤충병원성 선충의 단점인 고비용의 초기 시설투자 문제점을 새로운 배양방법인 교체배양시스템을 구축하여 실시하고 이를 통하여 안정적인 생산과 증가된 생산수율, 그리고 고살충성 친환경적인 천적 제품을 개발하는 것이 목표임.

3. 연구개발 범위

- **고살충성 곤충병원성 선충 고체배양 산업화 기술 개발**
 - 배지 조성별 생산 수율 및 살충력 비교
 - 담체 종류, 담체와 배지 혼합비, 적재 높이별 선충 생산 수율 및 살충력 비교
 - 고체배양 배양조 개발
 - 선충 감염태 유도기술 개발
 - 선충 세척 및 수확 시스템 개발

- **고살충성 곤충병원성 선충 고체배양을 위한 최적 배양 조건 확립**
 - 고살충성 유도 최적 공생미생물, 곤충병원성 선충 배양조건 확립
 - 고살충성 유도 최적 공생미생물 배양을 위한 공생미생물의 최적 장기보관조건 확인
 - 최적, 최저의 고살충이 유도된 공생미생물, 곤충병원성 선충 유전자 발현 및 상응 지표물질 확인

- **고살충성 곤충병원성 선충 고체배양 제제의 현장적용 기술 개발**
 - 꿀벌부채명나방 유충에 대한 In vivo, 액상 및 고상 배양별 농도, 시간 및 빈도에 대한 살충률 비교 분석
 - 시설재배지(토마토)에 관수처리 후 토양해충의 방제율 분석
 - 골프장의 토양 굽벙이에 대한 제제별 방제효과 분석
 - 버섯재배지의 버섯파리에 대한 제제별 방제효과 분석

제 2장 연구수행 내용 및 결과

제 1절 고살충성 곤충병원성 선충 고체배양 산업화 기술개발

가. 배지 조성별 생산 수율 및 살충력 비교

1. 목적

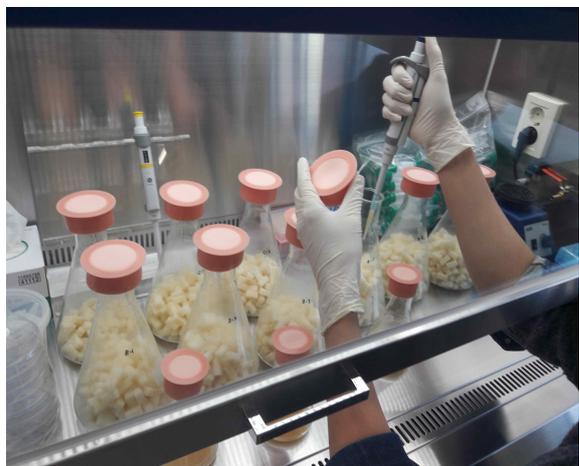
곤충병원성선충 고체배지의 주성분인 효모추출물, 대두분, 전지분유, 올리브유, 난황분 등 성분별 농도에 따른 생산수율 및 살충력을 조사 하였다. 그리고 oil의 성분(olive oil, corn oil, palm oil, fish oil, lard, soybean oil등)에 따라 생산 수율 및 살충력을 조사하였다. 곤충성분(꿀벌부채명나방, 장수풍뎅이, 밀웬 등)을 첨가한 배지로 생체증식의 영향을 조사하였다.

2. 재료 및 방법

기본 곤충병원성선충 고체배지 조성은 1,000ml 삼각플라스크에 100g[1% yeast extract, 15% soy flour, 2% whole milk powder, 2.5% olive oil, 2.5% egg yolk, 8% 배양용 담체(스폰지), 50% 멸균수]이고 15ml의 공생박테리아를 접종하여 2일간 배양하고 곤충병원성선충 접종 후 25℃에서 12일간 배양하였다. 생산수율은 곤충병원성선충 접종 후 배양 12일째에 삼각플라스크에서 수확하였다. 그리고 삼각플라스크당 수확량을 현미경을 이용하여 조사 하였다. 살충력 조사방법은 직경 90mm petri dish에 filter paper를 깔고 꿀벌부채명나방 3령 유충에 곤충병원성 선충을 접종하였다. 접종 후 48시간이 지난 뒤에 사멸율을 조사하였다.



Entomopathogenic nematode solid medium produce



Entomopathogenic nematode inoculation and nematode culture

2.1. 고체배지 조성별 농도가 곤충병원성선충 생산 수율 및 살충력에 미치는 영향

2.1.1. Yeast extract가 곤충병원성선충 생산 수율 및 살충력에 미치는 영향 조사

기본 곤충병원성선충 고체배지 조성에서 yeast extract의 농도 변화를 0, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0%로 하여 생산 수율 및 살충력을 조사하였다.

2.1.2. Soy flour가 곤충병원성선충 생산 수율 및 살충력에 미치는 영향 조사

기본 곤충병원성선충 고체배지 조성에서 soy flour의 농도 변화를 0, 5, 10, 15, 20, 25%로 하여 생산 수율 및 살충력을 조사하였다.

2.1.3. Whole milk powder가 곤충병원성선충 생산 수율 및 살충력에 미치는 영향 조사

기본 곤충병원성선충 고체배지 조성에서 whole milk powder의 농도 변화를 0, 1, 2, 3, 4, 5%로 하여 생산 수율 및 살충력을 조사하였다.

2.1.4. Olive oil이 곤충병원성선충 생산 수율 및 살충력에 미치는 영향 조사

기본 곤충병원성선충 고체배지 조성에서 olive oil 농도 변화를 0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0%로 하여 생산 수율 및 살충력을 조사하였다.

2.1.5. Egg yolk이 곤충병원성선충 생산 수율 및 살충력에 미치는 영향 조사

기본 곤충병원성선충 고체배지 조성에서 egg yolk 농도 변화를 0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0%로 하여 생산 수율 및 살충력을 조사하였다.

2.2. Oil의 성분 변화가 곤충병원성선충 생산 수율 및 살충력에 미치는 영향 조사

기본 곤충병원성선충 고체배지 조성에서 oil 성분을 5% 기준으로 6종을(olive oil, corn oil, palm oil, fish oil, lard, soybean oil) 이용하여 생산 수율 및 살충력을 조사하였다.

2.3. 곤충성분 변화가 곤충병원성선충 생산 수율 및 살충력에 미치는 영향

2.3.1. 곤충성분 변화가 곤충병원성선충(*S. carpocapsae*) 생산 수율 및 살충력에 미치는 영향 조사

기본 곤충병원성선충 고체배지 조성에서 곤충성분(노숙 유충) 5% 기준으로 3종을(꿀벌부채 명나방, 장수풍뎅이, 밀웬) 이용하여 생산 수율 및 살충력을 조사하였다. 노숙유충은 3령으로 성장한 것으로 사용하였다.

2.3.2. 곤충성분 변화가 곤충병원성선충(*H. bacteriophora*) 생산 수율 및 살충력에 미치는 영향 조사

기본 곤충병원성선충 고체배지 조성에서 곤충성분(노숙 유충) 5% 기준으로 3종을(꿀벌부채 명나방, 장수풍뎅이, 밀웬) 이용하여 생산 수율 및 살충력을 조사하였다. 노숙유충은 3령으로 성장한 것으로 사용하였다.



Insecticide effect test

3. 결과

3.1. 고체배지 조성별 농도가 곤충병원성선충 생산 수율 및 살충력에 미치는 영향

3.1.1. Yeast extract가 곤충병원성선충 생산 수율 및 살충력에 미치는 영향 조사

기본 곤충병원성선충의 고체배지에서 yeast extract의 농도를 달리하여 배양 진행시 table과 같은 결과가 나타났다. yeast extract의 최적 농도는 2% 일 때 가장 높은 생산 수율을 얻을 수 있었다. 5%에서는 2%일 때와 큰 변화를 나타내지 않았다. 생산 수율이 높을 때 살충력 또한 높게 나오는 것으로 조사 되었다. yeast extract 최적 농도는 2%가 좋을 것으로 보인다.

Yeast extract가 곤충병원성선충 생산 수율 및 살충력에 미치는 영향

Yeast extract 농도	생산수율 ($\times 10^5$ 선충수 / 배지 g당)		살충력(%)	
0	0.41	평균 0.36	56	58
	0.35		58	
	0.33		60	
0.5	1.35	1.31	80	82
	1.25		84	
	1.33		82	
1.0	2.11	2.08	90	89.3
	2.08		90	
	2.05		88	
2.0	3.62	3.68	98	99.3
	3.54		100	
	3.88		100	
5.0	3.70	3.62	96	98
	3.64		100	
	3.52		98	

3.1.2. Soy flour가 곤충병원성선충 생산 수율 및 살충력에 미치는 영향 조사

기본 곤충병원성선충의 고체배지에서 soy flour의 농도를 달리하여 배양 진행시 table과 같은 결과가 나타났다. soy flour의 최적 농도는 20% 일 때 가장 높은 생산 수율을 얻을 수 있었다. 25%에서는 20%일 때와 큰 변화를 나타내지 않았다. 생산 수율이 높을 때 살충력 또한 높게 나오는 것으로 조사 되었다. soy flour 최적 농도는 20%가 좋을 것으로 보인다.

Soy flour가 곤충병원성선충 생산 수율 및 살충력에 미치는 영향

Soy flour 농도	생산수율 ($\times 10^5$ 선충수 / 배지 g당)		살충력(%)	
0	0.51	평균 0.43	60	60
	0.45		62	
	0.34		58	
5	0.89	0.96	74	72
	1.07		70	
	0.94		72	
10	1.46	1.57	86	84
	1.62		82	
	1.64		84	
15	2.08	2.10	90	92
	2.10		94	
	2.13		92	
20	3.58	3.46	98	99.3
	3.34		100	
	3.46		100	
25	3.32	3.33	98	98.7
	3.35		100	
	3.44		98	

3.1.3. Whole milk powder가 곤충병원성선충 생산 수율 및 살충력에 미치는 영향 조사

기본 곤충병원성선충의 고체배지에서 Whole milk powder의 농도를 달리하여 배양 진행시 table과 같은 결과가 나타났다. Whole milk powder의 최적 농도는 3% 일 때 가장 높은 생산 수율을 얻을 수 있었다. 4% 이상에서는 3%일 때와 큰 변화를 나타내지 않았지만 다소 감소하는 현상으로 나타났다. 생산 수율이 높을 때 살충력 또한 높게 나오는 것으로 조사 되었다. Whole milk powder 최적 농도는 3%가 좋을 것으로 보인다.

Whole milk powder가 곤충병원성선충 생산 수율 및 살충력에 미치는 영향

Whole milk powder 농도	생산수율 ($\times 10^5$ 선충수 / 배지 g당)		살충력(%)	
0	0.43	평균 0.41	62	60
	0.40		64	
	0.41		54	
1	1.46	1.4	78	80
	1.23		82	
	1.51		80	
2	2.34	2.38	92	90.7
	2.43		86	
	2.38		94	
3	3.52	3.42	100	99.3
	3.34		100	
	3.41		98	
4	3.23	3.29	100	98.7
	3.28		98	
	3.36		98	
5	3.16	3.17	96	97.3
	3.14		98	
	3.21		98	

3.1.4. Olive oil이 곤충병원성선충 생산 수율 및 살충력에 미치는 영향 조사

기본 곤충병원성선충의 고체배지에서 olive oil의 농도를 달리하여 배양 진행시 table과 같은 결과가 나타났다. olive oil의 최적 농도는 5% 일 때 가장 높은 생산 수율을 얻을 수 있었다. 7.5% 이상에서는 5%일 때와 큰 변화를 나타내지 않았지만 다소 감소하는 현상으로 나타났다. 생산 수율이 높을 때 살충력 또한 높게 나오는 것으로 조사 되었다. olive oil 최적 농도는 5%가 좋을 것으로 보인다.

Olive oil이 곤충병원성선충 생산 수율 및 살충력에 미치는 영향

Olive oil 농도	생산수율 ($\times 10^5$ 선충수 / 배지 g당)		살충력(%)	
0	0.45	평균 0.41	58	60.7
	0.37		58	
	0.42		66	
2.5	2.21	2.08	86	88
	2.05		90	
	1.98		88	
5.0	3.54	3.56	100	99.3
	3.53		100	
	3.61		98	
7.5	3.25	3.32	98	99.3
	3.49		100	
	3.23		100	
10.0	3.12	3.10	98	98.7
	3.01		100	
	3.17		98	

3.1.5. Egg yolk이 곤충병원성선충 생산 수율 및 살충력에 미치는 영향 조사

기본 곤충병원성선충의 고체배지에서 egg yolk의 농도를 달리하여 배양 진행시 table과 같은 결과가 나타났다. egg yolk의 최적 농도는 5% 일 때 가장 높은 생산 수율을 얻을 수 있었다. 7.5% 이상에서는 5%일 때와 큰 변화를 나타내지 않았지만 다소 감소하는 현상으로 나타났다. 생산 수율이 높을 때 살충력 또한 높게 나오는 것으로 조사 되었다. Egg yolk 최적 농도는 5%가 좋을 것으로 보인다.

Egg yolk이 곤충병원성선충 생산 수율 및 살충력에 미치는 영향

Egg yolk 농도	생산수율 ($\times 10^5$ 선충수 / 배지 g당)		살충력(%)	
		평균		
0	0.37	0.37	56	55.3
	0.39		54	
	0.36		56	
2.5	2.17	2.12	80	82.7
	2.21		86	
	1.99		82	
5.0	3.52	3.48	100	100
	3.45		100	
	3.47		100	
7.5	3.32	3.37	100	100
	3.42		100	
	3.38		100	
10.0	3.12	3.09	98	98
	3.04		100	
	3.11		96	

3.2. Oil의 성분 변화가 곤충병원성선충 생산 수율 및 살충력에 미치는 영향 조사

기본 곤충병원성선충의 고체배지에서 oil의 성분을 달리 하여 배양을 진행하였다. table의 결과와 같이 oil의 성분에 따라 생산 수율 및 살충력 차이가 나타났다. 최적의 생산 수율은 olive oil이었고 corn oil과 soybean oil은 다음으로 좋은 생산 수율을 보였다. 그 외 palm oil, fish oil, lard 에서는 배양은 진행되나 생산 수율이 다른 oil에 비해 낮은 결과를 보였다. 생산 수율이 높은 oil에서 살충력 또한 높게 나오는 것으로 조사 되었다. 배양 배지로서 최적의 oil은 olive oil이 좋을 것으로 보인다.

Oil이 곤충병원성선충 생산 수율 및 살충력에 미치는 영향

Oil 성분 (5% 농도)	생산수율 ($\times 10^5$ 선충수 / 배지 g당)		살충력(%)	
		평균		
올리브유	2.27	2.23	88	86
	2.21		84	
	2.22		86	
콘오일	2.09	2.11	80	81.3
	2.13		82	
	2.11		82	
팜오일	1.12	1.07	74	75.3
	1.06		76	
	1.03		76	
피시오일	1.37	1.37	78	78.6
	1.41		78	
	1.33		80	
라드	1.03	1.07	76	75.3
	1.13		74	
	1.05		86	
대두유	2.13	2.10	82	80.78
	2.10		80	
	2.07		80	

3.3. 곤충성분 변화가 곤충병원성선충 생산 수율 및 살충력에 미치는 영향

3.3.1. 곤충성분 변화가 곤충병원성선충(*S. carpocapsae*) 생산 수율 및 살충력에 미치는 영향 조사

기본 곤충병원성선충 배지에 곤충성분을 추가하여 배양을 진행 하였다. table의 결과와 같이 곤충성분을 첨가하지 않은 것보다는 곤충성분을 첨가한 배지에서 더 높은 생산 수율과 살충력을 보였다. 그중 꿀벌부채명나방을 추가한 배양에서 높은 생산 수율과 살충력을 보였다. 장수풍뎅이와 밀웜은 생산 수율은 비슷하나 살충력에서는 조금 차이를 나타내었다.

곤충성분(노숙유충)이 곤충병원성선충 생산 수율 및 살충력에 미치는 영향

곤충 성분 (노숙유충)	생산수율 ($\times 10^5$ 선충수 / 배지 g당)		살충력(%)	
무첨가	2.11	평균 2.12	86	83.3
	2.14		82	
	2.12		82	
꿀벌부채명나방	3.51	3.56	100	100
	3.53		100	
	3.64		100	
장수풍뎅이	3.27	3.28	98	98
	3.31		100	
	3.29		96	
밀웜	3.32	3.29	96	92.7
	3.25		92	
	3.28		90	

3.3.2. 곤충성분 변화가 곤충병원성선충(*H. bacteriophora*) 생산 수율 및 살충력에 미치는 영향 조사

기본 곤충병원성선충 배지에 곤충성분을 추가하여 배양을 진행 하였다. table의 결과와 같이 곤충성분을 첨가하지 않은 것보다는 곤충성분을 첨가한 배지에서 더 높은 생산 수율과 살충력을 보였다. 그중 꿀벌부채명나방을 추가한 배양에서 높은 생산 수율과 살충력을 보였다. 장수풍뎅이와 밀웜은 생산 수율은 비슷하나 살충력에서는 조금 차이를 나타내었다.

곤충성분(노숙유충)이 곤충병원성선충 생산 수율 및 살충력에 미치는 영향

곤충 성분 (노숙유충)	생산수율 ($\times 10^5$ 선충수 / 배지 g당)		살충력(%)	
무첨가	2.11	평균 2.13	80	82
	2.12		84	
	2.16		82	
꿀벌부채명나방	3.41	3.36	100	99.3
	3.31		98	
	3.36		100	
장수풍뎅이	3.21	3.21	98	98.7
	3.25		98	
	3.18		100	
밀웜	3.23	3.21	92	92
	3.16		90	
	3.24		94	

나. 담체 함량 변화에 따른 선충 생산 수율 및 살충력 비교

1. 목적

곤충병원성선충의 고체 배양 진행시 담체 함량의 변화에 따른 생산 수율 및 살충력을 비교하였다.

2. 재료 및 방법

기본 곤충병원성선충 고체배지 조성은 1,000ml 삼각플라스크에 100g(1% yeast extract, 15% soy flour, 2% whole milk powder, 2.5% olive oil, 2.5% egg yolk, 50% 멸균수)에 배양용 담체(스펀지)의 함량 변화를 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12%로 하여 배지를 제조하였다. 이후 15ml의 공생 박테리아를 접종하여 2일간 배양하고 곤충병원성선충 접종 후 25℃에서 12일간 배양 하였다. 생산수율은 곤충병원성선충 접종 후 배양 12일째에 삼각플라스크에서 수확하였다. 그리고 삼각플라스크당 수확량을 현미경을 이용하여 조사 하였다. 살충력 조사방법은 직경 90mm petri dish에 filter paper를 깔고 꿀벌부채명나방 3령 유충에 곤충병원성선충을 접종하였다. 접종 후 48시간이 지난 뒤에 사멸율을 조사 하였다.



Entomopathogenic nematode solid medium produce

3. 결과

고체 배양에서 최적의 담체 함량을 조사하였다. 배양 진행 결과는 Table과 같이 조사 되었다. 담체 함량 0%, 2%로 배양 진행시에는 산소 공급이 이루어지지 않아 배양이 원활히 진행 되는 않는 것으로 보인다. 원활하지 않은 배양으로 인해 살충력 또한 낮게 나타나는 것으로 조사 되었다. 담체 함량 8%, 10%, 12%에서 높은 배양 수율과 살충력을 관찰 할 수 있었다. 이로 비추어 볼 때 최적의 배양 담체 함량은 8%에서 배양 하는 것이 좋을 것으로 보인다.

담체 함량 변화에 따른 선충 생산 수율 및 살충력 비교

담체 함량(%)	생산수율 ($\times 10^5$ 선충수 / 배지 g당)		살충력(%)	
0	0	평균 0	0	0
	0		0	
	0		0	
2	0.21	0.23	38	38.7
	0.23		40	
	0.25		38	
4	1.28	1.28	72	74.7
	1.24		78	
	1.32		74	
6	1.25	1.32	78	75.3
	1.34		74	
	1.37		74	
8	2.15	2.13	86	86.7
	2.14		88	
	2.11		86	
10	2.12	2.11	88	86.7
	2.09		86	
	2.12		86	
12	2.09	2.09	88	86
	2.11		84	
	2.07		86	

다. 공생박테리아 배양시간 및 선충 접종 농도별 생산 수율 및 살충력 비교

1. 목적

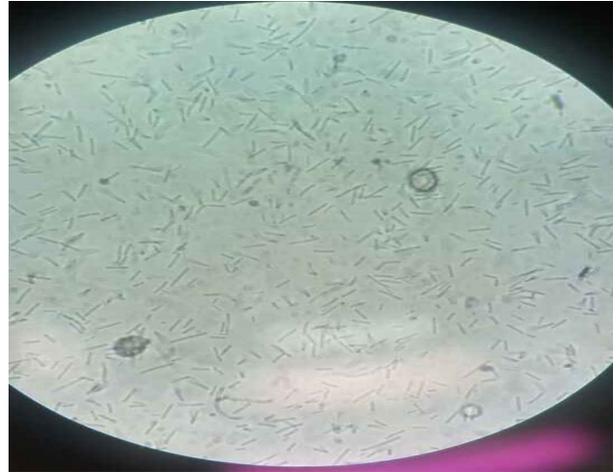
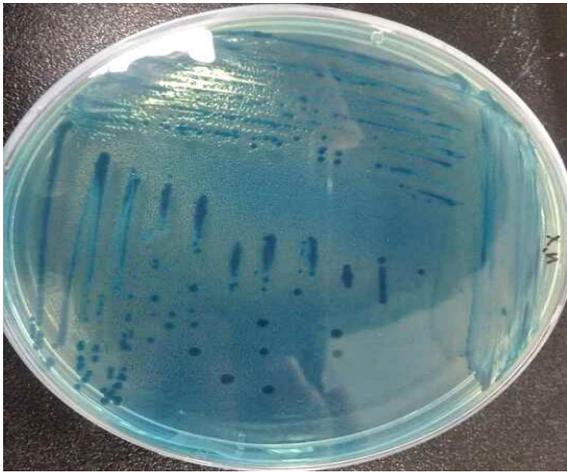
공생박테리아 배양 시간에 따른 곤충병원성선충의 생산 수율 및 살충력을 비교하였다. 그리고 곤충병원성선충의 접종 농도별로 생산수율 및 살충력을 비교하였다.

2. 재료 및 방법

기본 곤충병원성선충 고체배지 조성은 1,000ml 삼각플라스크에 100g[1% yeast extract, 15% soy flour, 2% whole milk powder, 2.5% olive oil, 2.5% egg yolk, 8% 배양용 담체(스폰지), 50% 멸균수]이고 15ml의 공생박테리아를 접종하였다. 이후 곤충병원성선충을 접종하여 25°C에서 12일간 배양 하였다.

생산수율은 곤충병원성선충 접종 후 배양 12일째에 삼각플라스크에서 수확하였다. 그리고 삼각플라스크당 수확량을 현미경을 이용하여 조사하였다.

살충력 조사방법은 직경 90mm petri dish에 filter paper를 깔고 꿀벌부채명나방 3령 유충에 곤충병원성선충을 접종하였다. 접종 후 48시간이 지난 뒤에 사멸율을 조사하였다.



Symbiotic bacteria

2.1. 공생박테리아 배양시간에 따른 곤충병원성선충의 생산 수율 및 살충력 비교

곤충병원성선충 기본 고체배지에 공생박테리아 접종 후 0, 12, 24, 48, 72시간 배양하였다. 곤충병원성선충을 접종하여 배양을 진행하였고 공생박테리아 배양시간에 따른 생산 수율 및 살충력을 비교하였다.

2.2. 곤충병원성선충 접종 농도별 생산 수율 및 살충력 비교

곤충병원성선충 기본 고체배지에 공생박테리아 배양하고 농도별(g당) 500, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000마리로 접종하였다. 배양 완료 후 접종 농도별 곤충병원성선충의 생산 수율 및 살충력을 비교하였다.

3. 결과

3.1. 공생박테리아 배양시간에 따른 곤충병원성선충의 생산 수율 및 살충력 비교

공생박테리아 배양 시간에 따른 곤충병원성선충의 생산 수율 및 살충력을 조사하였다. Table에서 보는바와 같이 공생박테리아를 48시간 이상에서 높은 배양 수율과 살충력을 나타내었다. 공생박테리아 배양 0시간, 12시간에서는 낮은 배양 수율과 살충력을 나타내었다. 공생박테리아를 48시간 배양시에 곤충병원성선충의 생산수율과 살충력이 제일 높은 것을 볼 수 있었다. 그러므로 곤충병원성선충 배양을 위한 공생박테리아의 최적의 배양시간은 48시간으로 사료된다.

공생박테리아 배양시간에 따른 곤충병원성선충의 생산 수율 및 살충력 비교

공생박테리아 배양시간(hr)	생산수율 ($\times 10^5$ 선충수 / 배지 g당)		살충력(%)	
	0	0.14	평균 0.13	30
0.13		32		
0.13		34		
12	0.24	0.24	52	53.3
	0.25		54	
	0.23		54	
24	0.75	0.73	78	76
	0.73		74	
	0.71		76	
48	2.14	2.15	86	86
	2.19		88	
	2.12		84	
72	2.05	2.08	82	82.7
	2.11		80	
	2.08		86	

3.2. 곤충병원성선충 접종 농도별 생산 수율 및 살충력 비교

곤충병원성선충 접종 농도별로 생산 수율과 살충력의 차이를 나타내었다. Table에서 보는바와 같이 1,000마리 미만에서는 매우 낮은 생산 수율과 살충력을 나타내었다. 그리고 4,000마리, 5,000마리에서 높은 생산 수율과 살충력을 나타내었다. 곤충병원성선충의 고체배양에 있어서 4,000마리에서 5,000마리가 최적의 접종 농도일 것으로 보인다.

곤충병원성선충 접종 농도별 생산 수율 및 살충력 비교

선충 접종농도 (마리수/g)	생산수율 ($\times 10^5$ 선충수 / 배지 g당)		살충력(%)	
	500	0.26	평균 0.25	42
0.22		42		
0.27		40		
1000	0.52	0.50	64	64.6
	0.45		64	
	0.54		66	
2000	1.05	0.99	72	74.7
	0.96		74	
	0.97		78	
3000	1.05	1.02	76	76.7
	1.03		78	
	0.98		76	
4000	2.08	2.09	86	84.7
	2.12		82	
	2.07		86	
5000	2.11	2.11	88	86
	2.09		84	
	2.13		86	

라. 고체배양 조건에서 곤충병원성선충의 증식 형태적 분석 및 최적 수확시점 조사

1. 목적

고체배양 조건에서 배양을 진행시 곤충병원성선충의 형태적 특징을 관찰하였다. 그리고 고체 배양 진행시 배양 시간에 따른 곤충병원성선충의 최적의 수확 시점을 조사하였다.

2. 재료 및 방법

기본 곤충병원성선충 고체배지 조성은 1,000ml 삼각플라스크에 100g[1% yeast extract, 15% soy flour, 2% whole milk powder, 2.5% olive oil, 2.5% egg yolk, 8% 배양용 담체(스폰지), 50% 멸균수]이고 15ml의 공생박테리아를 접종하여 2일간 배양하고 곤충병원성선충 접종 후 25℃에서 12일간 배양하였다.

생산수율은 곤충병원성선충 접종 후 배양 12일째에 삼각플라스크에서 수확하였다. 그리고 삼각플라스크당 수확량을 현미경을 이용하여 조사하였다.

살충력 조사방법은 직경 90mm petri dish에 filter paper를 깔고 꿀벌부채명나방 3령 유충에 곤충병원성선충을 접종하였다. 접종 후 48시간이 지난 뒤에 사멸율을 조사하였다.

2.1. 고체배양 조건에서 곤충병원성선충의 증식 형태적 분석

고체배양 조건에서 곤충병원성선충의 증식 형태를 현미경을 이용하여 관찰하였다. 성장 진행 및 교미, 알, 부화 등을 관찰하였다.

2.2. 고체배양 조건에서의 최적 수확시점 조사

고체배양 조건에서 곤충병원성선충의 배양 시간에 따른 생산 수율 및 살충력을 비교하여 곤충병원성선충의 최적 수확 시점을 조사하였다.



Nematode harvest

3. 결과

3.1. 고체배양 조건에서 곤충병원성선충의 증식 형태적 분석



Entomopathogenic nematode produced from cultured media

3.2. 고체배양 조건에서의 최적 수확시점 조사

곤충병원성선충 배양 후 수확 시점에 따른 생산 수율과 살충력을 조사하였다. Table에서 보는 바와 같이 곤충병원성선충을 접종하고 12일 후 수확하였을 때 높은 생산 수율을 나타내었다. 12일 이전과 이후에서는 점차 생산수율이 낮아지는 현상을 나타내었다. 살충력 또한 수확 일자에 비례하게 나타났다. 그러므로 최적 수확 일자는 곤충병원성선충을 접종하고 12일 후 수확하는 것이 가장 좋을 것으로 사료된다.

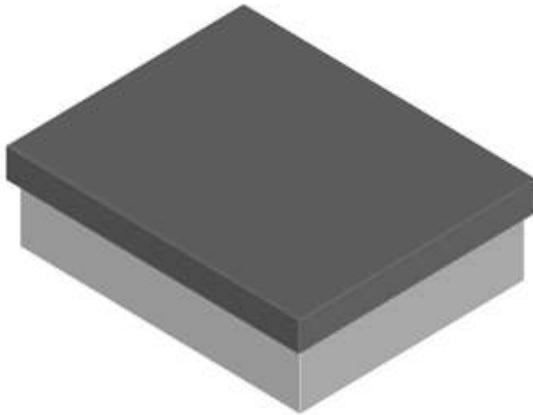
고체배양 조건에서의 최적 수확시점 조사

선충 수확일자 (일, 선충 접종 후)	생산수율 ($\times 10^5$ 선충수 / 배지 g당)		살충력(%)	
		평균		
6	1.01	1.03	70	73.3
	1.05		76	
	1.03		74	
9	1.90	1.91	78	79.3
	1.96		78	
	1.87		82	
12	2.12	2.17	86	86.7
	2.24		88	
	2.15		86	
15	2.05	2.07	86	86
	2.07		84	
	2.09		88	
18	1.95	1.91	78	79.3
	1.87		80	
	1.91		80	
21	1.85	1.85	78	78.7
	1.84		80	
	1.87		78	

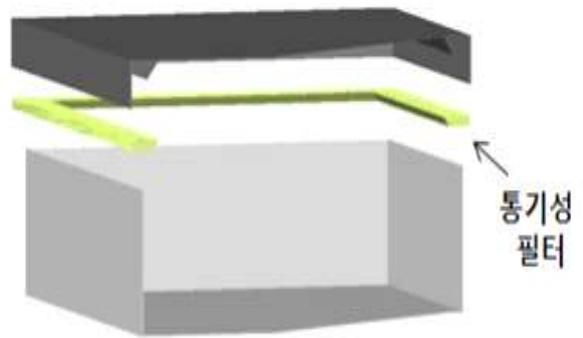
마. 고체배양 배양조 개발

곤충병원성선충을 안정적으로 배양하기 위해 배양용 cage를 제작하였다. cage의 재질은 autoclave에 의한 멸균공정이 가능하고 세척이 용이한 스테인레스를 사용하였고, 사이즈는 500×400×120mm의 직육면체로 제작하였다.

그리고 덮개 테두리 안쪽으로 멸균이 가능한 스펀지를 이용해 통기성 필터를 장착하였다. 통기성 필터로 인해 cage 내부로 배양에 필요한 공기가 무균 상태로 공급될 수 있도록 하였다. Autoclave에 의한 멸균공정 이후에 무균실에서 공생박테리아 및 선충을 접종하여 배양을 진행하도록 하였다.

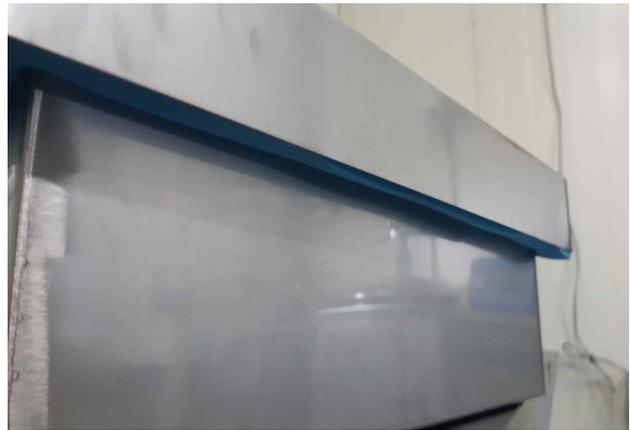
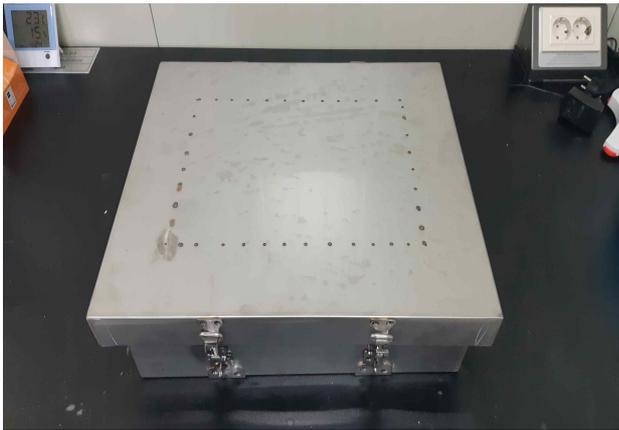


배양용 Cage : 500 x 360 x 160mm(H)



배양용 Cage 단면도

통기성 필터를 부착한 고체배양용 cage 모식도



통기성 필터를 부착한 고체배양용 cage 제작

바. 곤충병원성선충 감염태 유도기술 개발

1. 목적

곤충병원성선충은 감염태 형태(Infected Juvenile)일 때에만 해충을 사멸시킬 수 있다. 감염태 형태로 전환되지 않은 상태에서 외부에 노출되면 얼마 지나지 않아 사멸하게 되고 살충력 또한 낮게 나타난다. 감염태 형태는 곤충병원성선충의 생활사에서 매우 중요한 단계이며, 제품으로 개발 시에 품질 관리(살충력, 저장성)를 좌우한다고 할 수 있다. 그래서 수확 시점에서 더 많은 감염태 형태로 전환 되는 것이 매우 중요하다. 곤충병원성선충 배양 말기에는 배양 용기 내에서 공생박테리아와 곤충병원성선충의 증식으로 인해 배지 내부 가스의 농도가 높아지게 된다. 이에 배양 말기 이산화탄소(CO₂) 혹은 암모니아(NH₃)의 농도를 인위적으로 더 높여주어 감염태의 유도율에 영향을 주는지 조사하였다.

2. 재료 및 방법

곤충병원성선충 고체배지 조성은 500ml 삼각플라스크에 100g[2% yeast extract, 20% soy flour, 3% whole milk powder, 5% olive oil, 5% egg yolk, 8% 배양용 담체(스폰지), 57% 멸균수]이고 15ml의 공생박테리아를 접종하여 2일간 배양하고 곤충병원성선충을 5,000마리/g으로 접종 후 25℃에서 12일간 배양하였다. 가스 실험은 곤충병원성선충은 2종(*Steinernema carpocapsae*, *Heterorhabditis bacteriophora*)으로 배양하였다. 곤충병원성선충 접종 후 배양 12일째에 삼각플라스크에서 수확하여 생산수율과 감염태 비율을 비교하였다. 생산수율과 감염태 비율은 현미경을 이용하여 조사하였다.



곤충병원성선충 고체배양 배지제조



곤충병원성선충 접종 및 배양

2.1. 이산화탄소 및 암모니아의 노출 시간에 따른 곤충병원성선충 감염태 유도 영향 조사

2.1.1. 이산화탄소(CO_2)의 노출 시간에 따른 곤충병원성선충 감염태 유도에 미치는 영향 조사
곤충병원성선충 접종 이후 배양 8일째에 이산화탄소를 주입하고 0, 3, 5, 10, 15분 동안 가스에 노출하였다. 배양 종료 후 노출 시간에 따른 감염태 유도율을 조사하였다.



이산화탄소 처리방법

2.1.2. 암모니아의 노출 시간에 따른 곤충병원성선충 감염태 유도에 미치는 영향 조사
곤충병원성선충 접종 이후 배양 8일째에 암모니아(NH_3)를 주입하고 0, 1, 3, 5, 10분으로 동안 가스에 노출하였다. 배양 종료 후 노출 시간에 따른 감염태 유도율을 조사하였다.



암모니아 처리방법

2.2. 곤충병원성선충 배양 시간에 따른 이산화탄소 및 암모니아의 감염태 유도 영향 조사

2.2.1. 곤충병원성선충 배양 중에 이산화탄소 주입 시기가 감염태 유도에 미치는 영향 조사
곤충병원성선충 접종 이후 8일, 9일, 10일, 11일째에 이산화탄소를 주입하여 5분간 노출하였다. 배양 종료 후 노출 시간에 따른 감염태 유도율을 조사하였다

2.2.2. 곤충병원성선충 배양 중에 암모니아 주입 시기가 감염태 유도에 미치는 영향 조사
곤충병원성선충 접종 이후 8일, 9일, 10일, 11일째에 암모니아를 주입하여 5분간 노출하였다. 배양 종료 후 노출 시간에 따른 감염태 유도율을 조사하였다



이산화탄소 및 암모니아 처리 후 배양 모습

2.3. 가스주입 농도가 곤충병원성선충 감염태 유도에 미치는 영향

2.3.1. 이산화탄소 농도가 곤충병원성선충 감염태 유도에 미치는 영향 조사

곤충병원성선충 접종 이후 배양 8일째에 내부 공기를 제거하고 이산화탄소 농도를 0, 60~70, 70~80, 80~90, 95%이상으로 다르게 하여 주입하여 5분간 노출하였다. 배양 종료 후 노출 시간에 따른 감염태 유도율을 조사하였다. 이 경우 CO₂ 농도는 Drager X-am 7000 분석장비, 진공펌프, 그리고 가스 전용 희석장비를 사용하여 수행하였다.

2.3.2. 암모니아 농도가 곤충병원성선충 감염태 유도에 미치는 영향 조사

곤충병원성선충 접종 이후 배양 8일째에 내부 공기를 제거하고 암모니아 농도를 0, 60~70, 70~80, 80~90, 95%이상으로 주입하여 5분간 노출하였다. 배양 종료 후 노출 시간에 따른 감염태 유도율을 조사하였다. 이 경우 NH₃ 농도는 Drager X-am 7000 분석장비, 진공펌프, 그리고 가스 전용 희석장비를 사용하여 수행하였다.



가스 농도별 처리 실험 방법

3. 결과

3.1. 이산화탄소 및 암모니아의 처리 시간이 곤충병원성선충 감염태 유도에 미치는 영향

3.1.1. 이산화탄소의 노출 시간에 따른 곤충병원성선충 감염태 유도에 미치는 영향 조사

곤충병원성선충 접종 이후 8일째 배양 중에 이산화탄소를 주입하였다. 이산화탄소 주입 이후 노출 시시간별로 table과 같은 결과가 나타났다. *Steinernema carpocapsae*에서는 이산화탄소의 노출 시간이 5분일 때 가장 높은 감염태 유도 효과를 얻을 수 있었다. 이산화탄소의 노출 시간이 10분이 넘어가면 감염태 이전 단계의 곤충병원성선충에 좋지 않은 영향을 주어 전체 배양 수율에 영향을 끼쳤다. 이산화탄소의 노출 시간은 5분이 좋을 것으로 보인다. *Heterorhabditis bacteriophora*에서는 이산화탄소의 노출 시간이 5분일 때 가장 높은 감염태 유도 효과를 얻을 수 있었다. 이산화탄소의 노출 시간이 10분이 넘어가면 감염태 이전 단계의 곤충병원성선충에 좋지 않은 영향을 주어 전체 배양 수율에 영향을 끼쳤다. 이산화탄소의 노출 시간은 5분이 좋을 것으로 보인다.

이산화탄소의 처리 시간에 따른 *Steinernema carpocapsae*의 감염태 유도에 미치는 영향

CO ₂ 가스의 노출 시간(분)	횟수	배양 수율($\times 10^5$ 선충수 / 배지 g당)		감염태 비율(%)	
		회차별	평균	회차별	평균
0	1	3.56	3.60	80	81.6
	2	3.64		83	
	3	3.61		82	
3	1	3.64	3.63	83	83
	2	3.58		82	
	3	3.68		84	
5	1	3.67	3.69	84	85.3
	2	3.71		87	
	3	3.69		85	
10	1	2.35	2.31	71	70
	2	2.23		67	
	3	2.36		72	
15	1	0.87	0.91	57	58.3
	2	0.91		58	
	3	0.94		60	

이산화탄소의 처리 시간에 따른 *Heterorhabditis bacteriophora*의 감염태 유도에 미치는 영향

CO ₂ 가스의 노출 시간(분)	횟수	배양 수율($\times 10^5$ 선충수 / 배지 g당)		감염태 비율(%)	
		회차별	평균	회차별	평균
0	1	3.54	3.53	80	79.6
	2	3.50		79	
	3	3.55		80	
3	1	3.57	3.56	81	80.6
	2	3.57		81	
	3	3.54		80	
5	1	3.60	3.59	84	83.6
	2	3.60		85	
	3	3.57		82	
10	1	0.85	0.9	57	60
	2	0.94		62	
	3	0.91		61	
15	1	0.37	0.39	40	41.6
	2	0.41		43	
	3	0.39		42	

3.1.2. 암모니아의 노출 시간에 따른 곤충병원원성선충 감염태 유도에 미치는 영향 조사

곤충병원성선충 접종 이후 8일째 배양 중에 암모니아를 주입하였다. 암모니아 주입 이후 가스에 대한 노출 시간별로 table과 같은 결과가 나타났다. *Steinernema carpocapsae*에서는 암모니아의 노출 시간이 3분일 때 가장 높은 감염태 유도 효과를 얻을 수 있었다. 암모니아의 노출 시간이 5분이 넘어가면 감염태 이전 단계의 곤충병원성선충에 좋지 않은 영향을 주어 전체 배양 수율에 영향을 끼쳤다. 암모니아의 노출 시간은 5분이 좋을 것으로 보인다. *Heterorhabditis bacteriophora*에서는 암모니아의 노출 시간이 3분일 때 가장 높은 감염태 유도 효과를 얻을 수 있었다. 암모니아의 노출 시간이 5분이 넘어가면 감염태 이전 단계의 곤충병원성선충에 좋지 않은 영향을 주어 전체 배양 수율에 영향을 끼쳤다. 암모니아의 노출 시간은 5분이 좋을 것으로 보인다.

암모니아의 노출 시간에 따른 *Steinernema carpocapsae*의 감염태 유도에 미치는 영향

NH ₃ 가스의 노출 시간(분)	횟수	배양 수율($\times 10^5$ 선충수 / 배지 g당)		감염태 비율(%)	
		회차별	평균	회차별	평균
0	1	3.57	3.59	80	80.6
	2	3.58		80	
	3	3.62		82	
1	1	3.61	3.60	82	81.3
	2	3.58		80	
	3	3.61		82	
3	1	3.63	3.62	86	84.3
	2	3.61		83	
	3	3.62		84	
5	1	2.97	2.97	77	77.3
	2	2.96		76	
	3	2.98		79	
10	1	0.76	0.71	50	47.6
	2	0.68		46	
	3	0.69		47	

암모니아의 노출 시간에 따른 *Heterorhabditis bacteriophora*의 감염태 유도에 미치는 영향

NH ₃ 가스의 노출 시간(분)	횟수	배양 수율($\times 10^5$ 선충수 / 배지 g당)		감염태 비율(%)	
		회차별	평균	회차별	평균
0	1	3.50	3.52	80	80.3
	2	3.57		82	
	3	3.49		79	
1	1	3.56	3.57	81	81.6
	2	3.58		82	
	3	3.57		82	
3	1	3.58	3.60	83	83.6
	2	3.63		85	
	3	3.61		83	
5	1	2.19	2.19	72	72
	2	2.17		70	
	3	2.21		74	
10	1	0.42	0.39	46	43.6
	2	0.37		42	
	3	0.38		43	

3.2. 곤충병원성선충 배양 시간에 따른 이산화탄소 및 암모니아 처리가 감염태 유도에 미치는 영향

3.2.1. 곤충병원성선충 배양 중에 이산화탄소 처리 시기가 감염태 유도에 미치는 영향 조사

이산화탄소를 곤충병원성선충 접종 이후 0, 8, 9, 10, 11째에 주입하고 5분간 노출하였다. 이산화탄소의 주입 시기에 따라 table과 같은 감염태 유도 결과가 나타났다. *Steinernema carpocapsae*에서는 이산화탄소의 주입 시기가 9일째에 가장 높은 감염태 유도 효과를 얻을 수 있었다. 이산화탄소의 주입 시기가 10일째 이후부터는 감염태 유도 비율이 낮아지는 것으로 나타났다. 이산화탄소의 주입 시기는 곤충병원성선충 접종 10일째가 좋을 것으로 보인다. *Heterorhabditis bacteriophora*에서는 이산화탄소 주입 시기가 9일째에 가장 높은 감염태 유도 효과를 얻을 수 있었다. 이산화탄소의 주입 시기가 10일째 이후부터는 감염태 유도 비율이 낮아지는 것으로 나타났다. 이산화탄소의 주입 시기는 곤충병원성선충 접종 9일째가 좋을 것으로 보인다.

이산화탄소의 주입 시기에 따른 *Steinernema carpocapsae*의 감염태 유도에 미치는 영향

이산화탄소의 주입 시기(일)	횟수	배양 수율($\times 10^5$ 선충수 / 배지 g당)		감염태 비율(%)	
		회차별	평균	회차별	평균
미주입	1	3.56	3.55	82	81.6
	2	3.51		80	
	3	3.58		83	
8	1	3.68	3.66	87	85.3
	2	3.64		84	
	3	3.66		85	
9	1	3.70	3.72	88	90
	2	3.74		92	
	3	3.72		90	
10	1	3.70	3.69	88	87
	2	3.68		86	
	3	3.69		87	
11	1	3.57	3.59	81	82.3
	2	3.62		84	
	3	3.58		82	

이산화탄소의 주입 시기에 따른 *Heterorhabditis bacteriophora*의 감염태 유도에 미치는 영향

이산화탄소의 주입 시기(일)	횟수	배양 수율($\times 10^5$ 선충수 / 배지 g당)		감염태 비율(%)	
		회차별	평균	회차별	평균
미주입	1	3.47	3.60	79	80.6
	2	3.53		82	
	3	3.50		81	
8	1	3.57	3.56	85	83.6
	2	3.56		83	
	3	3.55		83	
9	1	3.58	3.61	85	86.3
	2	3.64		88	
	3	3.61		86	
10	1	3.50	3.52	81	82
	2	3.52		82	
	3	3.54		83	
11	1	3.49	3.50	81	81.3
	2	3.48		80	
	3	3.53		83	

3.2.2. 곤충병원성선충 배양 중에 암모니아 처리 시기가 감염태 유도에 미치는 영향 조사

암모니아를 곤충병원성선충 접종 이후 0, 8, 9, 10, 11째에 주입하고 3분간 노출하였다. 암모니아의 주입 시기에 따라 table과 같은 감염태 유도 결과가 나타났다. *Steinernema carpocapsae*에서는 암모니아의 주입 시기가 9일째에 가장 높은 감염태 유도 효과를 얻을 수 있었다. 암모니아의 주입 시기가 10일째 이후부터는 감염태 유도 비율이 낮아지는 것으로 나타났다. 암모니아의 주입 시기는 곤충병원성선충 접종 9일째가 좋을 것으로 보인다. *Heterorhabditis bacteriophora*에서는 암모니아 주입 시기가 9일째에 가장 높은 감염태 유도 효과를 얻을 수 있었다. 암모니아의 주입 시기가 10일째 이후부터는 감염태 유도 비율이 낮아지는 것으로 나타났다. 암모니아의 주입 시기는 곤충병원성선충 접종 9일째가 좋을 것으로 보인다.

암모니아의 주입 시기에 따른 *Steinernema carpocapsae*의 감염태 유도에 미치는 영향

암모니아의 주입 시기(일)	횃수	배양 수율($\times 10^5$ 선충수 / 배지 g당)		감염태 비율(%)	
		회차별	평균	회차별	평균
0	1	3.57	3.58	80	80.3
	2	3.59		81	
	3	3.58		80	
8	1	3.65	3.64	84	84
	2	3.66		85	
	3	3.61		83	
9	1	3.71	3.69	88	86
	2	3.69		85	
	3	3.67		85	
10	1	3.60	3.61	81	82
	2	3.63		83	
	3	3.60		82	
11	1	3.61	3.69	83	81.3
	2	3.60		81	
	3	3.56		80	

암모니아스의 주입 시기에 따른 *Heterorhabditis bacteriophora*의 감염태 유도에 미치는 영향

암모니아의 주입 시기(일)	횃수	배양 수율($\times 10^5$ 선충수 / 배지 g당)		감염태 비율(%)	
		회차별	평균	회차별	평균
0	1	3.51	3.54	79	80
	2	3.58		81	
	3	3.53		80	
8	1	3.64	3.61	84	82.6
	2	3.61		83	
	3	3.58		81	
9	1	3.66	3.65	85	85.3
	2	3.61		84	
	3	3.68		87	
10	1	3.63	3.62	84	83.6
	2	3.63		84	
	3	3.60		83	
11	1	3.57	3.57	81	80.6
	2	3.55		80	
	3	3.59		81	

3.3. 이산화탄소 및 암모니아 처리 농도가 곤충병원성선충 감염태 유도에 미치는 영향

3.3.1. 이산화탄소 처리 농도가 곤충병원성선충 감염태 유도에 미치는 영향 조사

이산화탄소를 곤충병원성선충 접종 이후 8일째에 0, 60~70, 70~80, 80~90, 95%이상으로 주입하여 5분간 노출하였다. 이산화탄소의 농도에 따라 table과 같은 감염태 유도 결과가 나타났다. *Steinernema carpocapsae*에서는 이산화탄소의 주입 농도가 80~90%일 때에 가장 높은 감염태 유도 효과를 얻을 수 있었다. 이산화탄소의 주입 농도가 95% 이상부터는 감염태 유도 비율이 낮아지는 것으로 나타났다. 이산화탄소의 주입 농도는 80~90%일 때가 좋을 것으로 보인다. *Heterorhabditis bacteriophora*에서는 이산화탄소 처리 농도가 80~90%일 때에 가장 높은 감염태 유도 효과를 얻을 수 있었다. 이산화탄소의 주입 농도가 95% 이상부터는 감염태 유도 비율이 낮아지는 것으로 나타났다. 이산화탄소의 주입 농도는 80~90%일 때가 좋을 것으로 보인다.

이산화탄소의 처리 농도에 따른 *Steinernema carpocapsae*의 감염태 유도에 미치는 영향

이산화탄소의 주입 농도(%)	횃수	배양 수율($\times 10^5$ 선충수 / 배지 g당)		감염태 비율(%)	
		회차별	평균	회차별	평균
0	1	3.55	3.53	82	80.6
	2	3.51		79	
	3	3.53		81	
60~70	1	3.56	3.55	82	81.3
	2	3.56		82	
	3	3.53		80	
70~80	1	3.61	3.60	83	83
	2	3.57		82	
	3	3.62		84	
80~90	1	3.67	3.67	89	89.3
	2	3.65		89	
	3	3.69		90	
95이상	1	3.66	3.64	87	85.3
	2	3.62		84	
	3	3.65		85	

이산화탄소의 처리 농도에 따른 *Heterorhabditis bacteriophora*의 감염태 유도에 미치는 영향

이산화탄소의 주입 농도(%)	횃수	배양 수율($\times 10^5$ 선충수 / 배지 g당)		감염태 비율(%)	
		회차별	평균	회차별	평균
0	1	3.48	3.51	78	80
	2	3.54		82	
	3	3.51		80	
60~70	1	3.52	3.53	80	80.6
	2	3.54		81	
	3	3.53		81	
70~80	1	3.61	3.59	84	82.6
	2	3.58		82	
	3	3.58		82	
80~90	1	3.61	3.62	87	88
	2	3.63		89	
	3	3.62		88	
95이상	1	3.57	3.60	83	84.3
	2	3.59		84	
	3	3.64		86	

3.3.2. 암모니아 처리 농도가 곤충병원원성선충 감염태 유도에 미치는 영향 조사

암모니아를 곤충병원원성선충 접종 이후 8일째에 0, 60~70, 70~80, 80~90, 95%이상으로 주입하여 5분간 노출하였다. 암모니아의 주입 농도에 따라 table과 같은 감염태 유도 결과가 나타났다. *Steinernema carpocapsae*에서는 암모니아의 주입 농도가 80~90%일 때에 가장 높은 감염태 유도 효과를 얻을 수 있었다. 암모니아의 주입 농도가 95% 이상부터는 감염태 유도 비율이 낮아지는 것으로 나타났다. NH₃ 가스의 주입 농도는 80~90%일 때가 좋을 것으로 보인다.

*Heterorhabditis bacteriophora*에서는 암모니아 처리 농도가 80~90%일 때에 가장 높은 감염태 유도 효과를 얻을 수 있었다. 암모니아의 주입 농도가 95% 이상부터는 감염태 유도 비율이 낮아지는 것으로 나타났다. 암모니아의 주입 농도는 80~90%일 때가 좋을 것으로 보인다.

암모니아의 처리 농도에 따른 *Steinernema carpocapsae*의 감염태 유도에 미치는 영향

암모니아의 처리 농도(%)	횃수	배양 수율($\times 10^5$ 선충수 / 배지 g당)		감염태 비율(%)	
		회차별	평균	회차별	평균
0	1	3.54	3.55	80	80.6
	2	3.58		82	
	3	3.53		80	
60~70	1	3.55	3.57	80	81.3
	2	3.59		83	
	3	3.57		81	
70~80	1	3.59	3.59	82	82.3
	2	3.58		82	
	3	3.60		83	
80~90	1	3.65	3.64	88	87
	2	3.62		86	
	3	3.65		87	
95이상	1	3.64	3.63	86	84.6
	2	3.65		86	
	3	3.60		82	

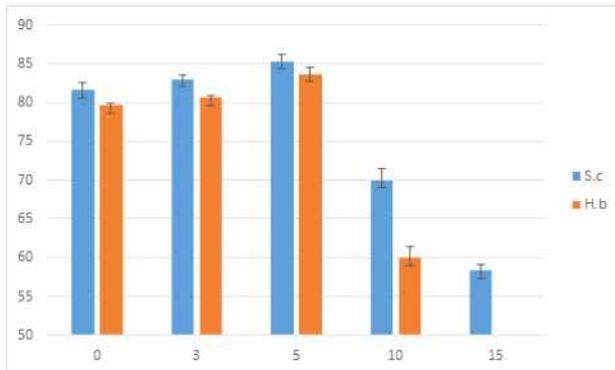
암모니아의 처리 농도에 따른 *Heterorhabditis bacteriophora*의 감염태 유도에 미치는 영향

암모니아의 처리 농도(%)	횃수	배양 수율($\times 10^5$ 선충수 / 배지 g당)		감염태 비율(%)	
		회차별	평균	회차별	평균
0	1	3.51	3.52	80	80.3
	2	3.54		81	
	3	3.51		80	
60~70	1	3.52	3.54	80	81
	2	3.54		81	
	3	3.56		82	
70~80	1	3.58	3.58	83	82.6
	2	3.57		82	
	3	3.59		83	
80~90	1	3.55	3.63	87	86
	2	3.63		86	
	3	3.61		85	
95이상	1	3.58	3.61	82	83.3
	2	3.60		83	
	3	3.65		85	

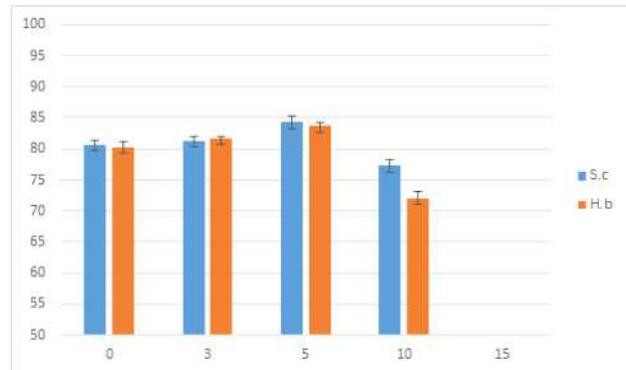
3.4 결론

곤충병원성선충 고체배양 중에 이산화탄소 및 암모니아를 공급하여 감염태 유도에 미치는 영향을 조사하였다. 아래의 그래프에서 보는 바와 같이 2가지 가스는 적정 노출 시간과 배양 일자, 가스의 농도에 따라 곤충병원성선충의 감염태 유도에 영향을 끼치는 것을 알 수 있었다. 이산화탄소에서는 5분간 노출, 배양 9일째, 80~90% 농도에서 감염유도 효과가 좋게 나타났다. 암모니아에서는 3분간 노출, 배양 9일째, 80~90% 농도에서 감염유도 효과가 좋게 나타났다.

이산화탄소 및 암모니아 노출 시간이 곤충병원성선충 감염태 유도에 미치는 영향

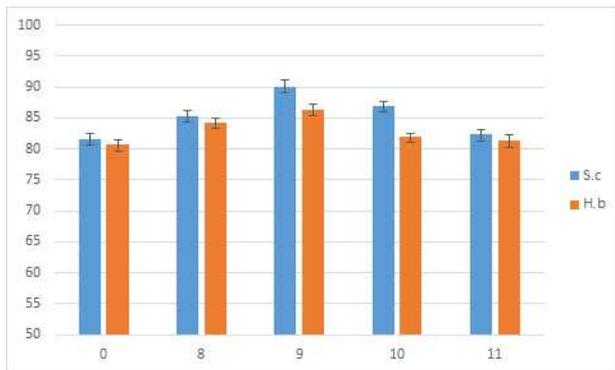


이산화탄소의 노출 시간(분)

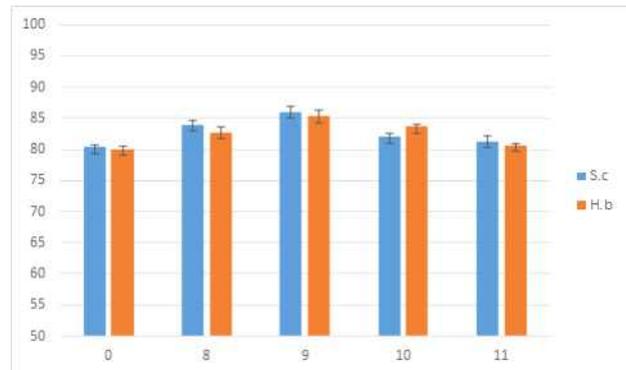


암모니아의 노출 시간(분)

곤충병원성선충 배양 시간에 따른 이산화탄소 및 암모니아 처리가 감염태 유도에 미치는 영향

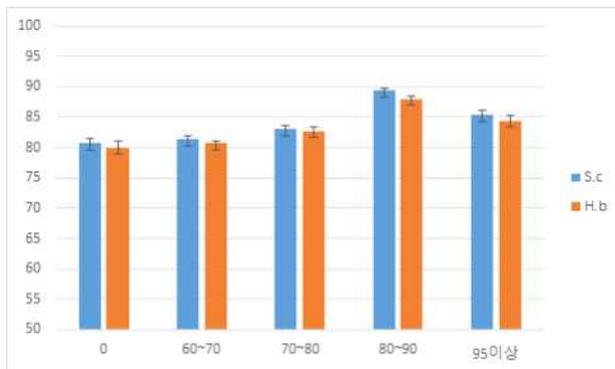


이산화탄소의 처리 시기(일)

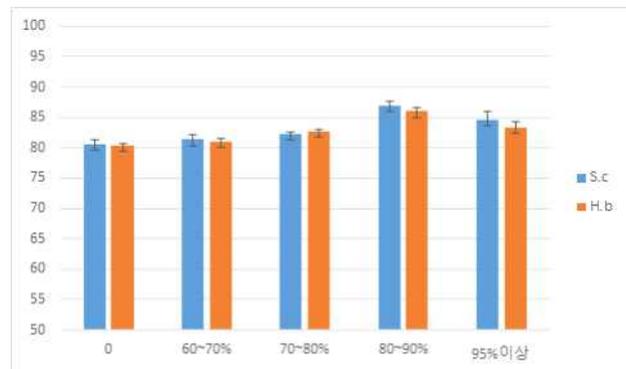


암모니아의 처리 시기(일)

이산화탄소 및 암모니아 처리 농도가 곤충병원성선충 감염태 유도에 미치는 영향



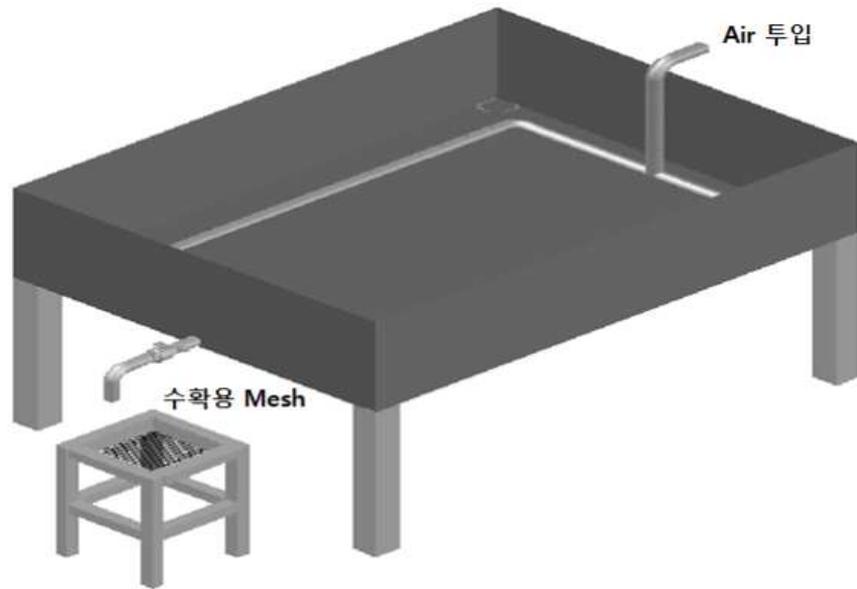
이산화탄소의 처리 농도(%)



암모니아의 처리 농도(%)

사. 선충 수확 및 세척용 폭기 시스템 개발

배양용 cage 내부에서 배양이 완료된 선충을 수확하기 위해서 수확용 폭기조를 제작하였다. 수확용 폭기조에 배양이 완료된 선충(선충+담체)을 넣고 물을 채웠다. 약 2~3시간가량 폭기를 진행하여 담체에서 선충이 분리되도록 하였다. 이후 담체를 제거하고 유화제를 처리하여 선충 표면에 남은 배지 성분을 분리하였다. 유화제 처리 후 약1~2시간 가량 폭기하여 분리가 잘 되도록 하였다.



곤충병원성선충 수확용 폭기조 모식도



곤충병원성선충 수확용 폭기조 제작

아. 선충 수확 시스템 및 제형화 최적화

1. 선충 수확 시스템

담체에서 분리가 완료된 선충액을 폭기조에서 침전하였다. 침전이 완료되면 밸브를 이용하여 상등액을 분리하였다. 상등액의 분리가 완료되면 물을 공급하여 선충 표면의 불순물을 세척하였다. 그리고 다시 침전하였다. 이와 같은 작업을 2~3회 실시하여 불순물을 제거하였다.



상등액 분리



불순물이 제거된 상태

2. 제형화 최적화

최종 침전된 선충을 현미경을 이용하여 counting 작업과 선충 활성을 확인하였다. 활성이 우수한 선충을 제품 하나당 2×10^7 마리로 맞추고 담체와 혼합하였다. 담체로는 질석을 이용하였다. 선충 혼합물을 제품 용기에 넣고 실링 처리하여 곤충병원성선충 제품을 생산하였다.



침전 회수된 곤충병원성 선충



곤충병원성선충과 담체 혼합물

자. 시제품 2종(DDK-S, DDK-H) 개발

최종 시제품의 포장지 디자인은 그림 15 및 그림 16과 같이 DDK-S와 DDK-H로 완성하였다. 또한 시제품 포장기기 및 포장상자는 그림 17과 그림 18과 같다. 약 100cc의 포장상자에 약 50g의 담체와 선충이 혼합된 제품의 형태로써 제품 상자당 약 2×10^7 마리의 곤충병원성 선충이 담겨지며, 약 4~8℃ 냉장조건에서 사용 전 6개월동안 보관할 계획이다.



DDK-S



DDK-H



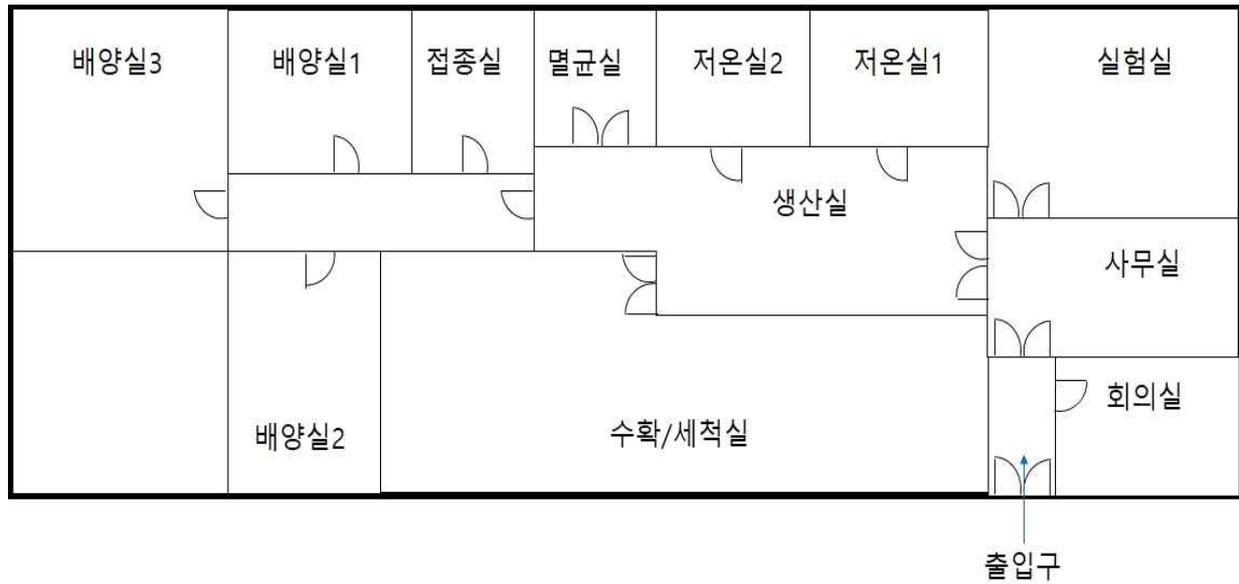
포장기기



포장된 모습

차. 양산화 생산공장 설계 및 구축

곤충병원성 선충의 양산을 위한 생산공장을 설계 및 구축하였다.



1) 배양 및 생산 공정



1. 배지 제조



2. 배지 혼합



3. 배양용기 소분



4. 배지 멸균



5. 공생박테리아 및 선충 접종



6. 배양



7. 수확



8. 담체 혼합



9. 포장

카. 고체배양 원가 검토 및 수익성 분석

고살충성을 가지는 곤충병원성 선충의 고체배양 방법을 개발하였다. 고체배양을 이용하여 곤충병원성 선충을 양산화 배양할 때의 원가 검토 및 수익성을 분석하였다.

원가 검토 및 수익성 분석은 곤충병원성 선충을 고체배양하고 수확 시에 평균 4.5×10^5 마리/g의 수율로 수확되는 것으로 계산하였고, 월평균 16일정도 수확을 진행하는 것으로 가정하여 진행하였다. 그리고 제품의 포장 단위는 2×10^7 마리/ea로 진행하였다. 월 생산량은 6,480ea로 진행하였다. 배지 조성은 대두분 20%, 올리브유 5%, 난황분 5%, 효모추출물 2%, 전지분유 3%, 증류수 57%, 스펀지 8%로 진행하였다.

1. 원가 검토

1) Seed 준비 단계

① 공생박테리아 관리

자재명	금액	월 사용량	생산 단가(제품 개당)
Petri dish(90×15)	56,000원/500ea	50ea	0.86원/ea
Nutrient Broth	133,700원/500g	250g	10.32원/ea
Agar	171,700원/500g	250g	13.25원/ea
LB Broth	86,800원/500g	500g	13.4원/ea

② 곤충병원성 선충 seed 관리

자재명	금액	월 사용량	생산 단가(제품 개당)
꿀벌부채명나방	50,000원/100마리	100마리	7.72원/ea
Petri dish(90×15)	56,000원/500ea	10ea	0.17원/ea

2) 곤충병원성 선충 생산단계

① 배양 배지

배지명	금액	단가	생산 단가(제품 개당)
대두분	32,000원/20kg	1,600원/kg	16원/ea
전지분유	227,000원/20kg	11,350/kg	17.03원/ea
효모추출물	292,600원/20kg	14,630원/kg	14.63원/ea
난황분	250,000원/20kg	12,500원/kg	31.25원/ea
올리브유	143,500원/18L	7,972원/L	19.93원/ea
스펀지	605,000원/200.000ea	2.75원/ea	181.5원/ea

② 제형 포장비

자재명	금액	단가	생산 단가(제품 개당)
질석	200,000원/20kg	10,000원/kg	600원/ea
TWEEN 60	198,000원/18kg	11,000원/kg	26.4원/ea
SPAN 60	10,000/500g	-	12원/ea
포장 용기	144,514원/5,712ea	25.3원/ea	25.3원/ea
실링필름	25,500원/롤	24원	24원/ea

③ 시설 운영비, 기타 기자재

항목	금액	단가	생산 단가(제품 개당)
전기 사용료	≒ 400,000원(월)	-	61.7원/ea
수도세	≒ 100,000원(월)	-	15.4원/ea
NaClO	14,700/20kg	735원/kg	2.27원/ea
배양용 필터	100,800원/280ea	360원/ea	48원/ea

3) 인건비

항목	인원수	총 급여	생산 단가(제품 개당)
인건비	3	7,500,000원/월	1157.4원/ea

4) 원가 총괄

DDK-S 제품 1개당 생산원가는 약 2,298.63원이다. 원가에서 이후 원료수급 사정에 따라 변동이 발생할 것으로 보인다. 그리고 원가 계산에서 판매 관련(홍보, 영업등)과 감가상각비 등의 사항은 빼고 분석을 진행하였다.

2. 수익성 분석

구분	내역	비고
재료비	-	1,013.76원/ea
시설 운영비, 기자재 비용	-	127.37원/ea
인건비	-	1157.4원/ea
소계	-	2,298.63원/ea
제품 가격	1ea	20,000원
월 생산량	6,480ea	129,600,000원
년 생산량	77,760ea	1,555,200,000원

타. 곤충병원성 선충 고체배양 생산공정도 및 메뉴얼 결정

1. *In vivo* 관리

NO.	공정명	공정내용
1	유충 준비	3~5령의 꿀벌부채명나방 유충을 준비한다. Petri dish에 pilter paper를 깔아 준다. 90mm petri dish에 유충 10마리씩 넣는다.
2	선충 준비	선충은 100마리/유충으로 계산하여 준비한다.
3	선충 접종	Pilter paper에 선충 1ml를 골고루 접종한다.
4	선충 배양	25℃의 incubator에서 배양 한다. 약 10~15일 사이에 선충의 휴면 상태를 관찰하며 수확 시기를 파악한다.
5	수확	휴면 상태를 확인하고 완료되면 수확 트랩을 설치하여 수확한다. 선충의 표면 살균 및 세척 작업 진행 후 저온보관한다.

2. 공생박테리아 분리

NO.	공정명	공정내용
1	유충 준비	3~5령의 꿀벌부채명나방 유충을 준비한다. Petri dish에 pilter paper를 깔아 준다. 90mm petri dish에 유충 10마리씩 넣는다.
2	선충 준비	선충은 100마리/유충으로 계산하여 준비한다.
3	선충 접종	Pilter paper에 선충 1ml를 골고루 접종한다.
4	선충 배양	25℃의 incubator에서 배양 한다.
5	공생균 분리	25℃에서 2~3일 후 사멸한 꿀벌부채명나방 유충을 준비한다. 클린벤치 안에서 꿀벌부채명나방 유충 사체를 알콜로 표면 살균한다. 살균된 꿀벌부채명나방 유충의 내부를 NBTA 배지에 도말 한다.
6	공생균 배양	28℃ 인큐베이터에서 5일간 배양한다.
7	순수 분리	파란색으로 형성된 콜로니를 순수분리하여 NBTA 배지에 도말 한다. 분리된 콜로니를 5일간 배양한 뒤 곤충병원성 선충 <i>in vitro</i> 배양에 사용한다.

3. 공생박테리아 seed 관리

NO.	공정명	공정내용
1	공박 준비	계대용 공생박테리아는 순수분리 후 약 2~3회 분리 계대 배양한 것으로 사용한다.
2	계대 작업	NBTA 배지에 white loop를 이용하여 공생박테리아를 계대 배양 작업 한다.
3	공박 배양	25~28℃의 인큐베이터에 넣고 배양한다.

4. 곤충병원성 선충 생산용 배양

NO.	공정명	공정내용
1	배지 제조	배지 조성에 맞게 배지를 제조한다. (대두분 20%, 올리브유 5%, 난황분 5%, 효모추출물 2%, 전지분유 3%, 증류수 57%, 스펀지 8%)
2	배지 멸균	배지를 배양 상자에 담고 121℃에서 20분간 멸균한다.
3	공생균 접종	멸균된 배양 상자를 25℃ 이하로 냉각시켜준다. 2일간 배양된 공생박테리아 seed를 접종한다.
4	공생균 배양	25℃의 배양실에 넣고 배양한다.
5	선충 접종	곤충병원성 선충 seed를 준비한다. 곤충병원성 선충을 NaClO %로 살균한다. 표면 살균된 곤충병원성 선충을 멸균수로 세척 한다. 세척인 완료된 곤충병원성 선충 seed를 배양 상자에 접종한다.
6	선충 배양	25℃의 배양실에 넣고 배양한다. 일간 배양한다.

5. 수확 공정

NO.	공정명	공정내용
1	선충 수확	배양이 완료된 배양 상자의 스펀지를 수확-침전조에 넣는다. 수확-침전조에 물을 넣고 3시간 동안 폭기 시킨다.
2	선충 세척	스펀지를 제거하고 1시간동안 침전시킨다. 상등액을 제거하고 물을 채워 1시간 동안 침전시키며 부유물을 제거한다.
3	선충 살균	마지막으로 상등액을 제거한 곤충병원성 선충액에 NaClO 1%를 처리한다. 약 20분간 살균한다.
4	선충 분리	선충 액을 Sieve를 이용하여 곤충병원성 선충을 분리한다.

6. 제품 생산공정

NO.	공정명	공정내용
1	원료 정량	수확 공정에서 분리된 곤충병원성 선충 1g을 현미경을 이용하여 카운트한다. 곤충병원성 선충의 개체수를 제품 생산량에 맞추고 액량(40ml)을 조절하여 증류수를 넣어준다. (2×10^7 마리/ea) 곤충병원성 선충액에 3%의 계면활성제를 첨가한다. (TWEEN 60 80%와 SPAN 60 20%) 질석을 제형 하고자 하는 만큼 정량(60g/ea) 한다.
2	원료 혼합	계면활성제와 혼합된 곤충병원성 선충액을 질석에 넣고 균일하게 혼합한다.
3	제품 포장	균일하게 혼합된 제형을 각 50g씩 제품 용기에 담고 필름으로 실링 한다. 곤충병원성 선충의 호흡을 위해 매우 작은 구멍을 뚫어 준다.
4	제품 보관	생산이 완료된 제품은 4~15℃에서 냉장 보관한다.

파. 유통기간 설정

1. 목적

곤충병원성선충(entomopathogenic nematode, EPN)은 측미선구강 원충목에 속하는 선충으로서 장내에 공생 세균을 가지고 있다, 선충이 대상 해충의 자연 개구부(입, 항문, 기문 등)를 통하여 혈강으로 침입했을 때, 선충의 장 속에서 공생 세균이 분리되어 나와 곤충 독소물질과 항생물질을 분비하고 대상 곤충이 패혈증을 유도함으로써 살충 효과를 발휘한다.

해외 여러 나라에서 다양한 곤충병원성 선충(EPN)을 이용한 제품들이 판매되고 있다. 대표적인 곤충병원성 선충(EPN)으로서는 스테이너네마 칼포캡시(*Steinernema carpocapsae*), 스테이너네마 글라제리(*Steinernema glaseri*), 스테이너네마 펠티에(*Steinernema feltiae*), 헤테랍디티스 박테리오포라(*Heterorhabditis bacteriophora*), 헤테랍디티스 메기디스(*Heterorhabditis megidis*) 등이 제품으로 판매되고 있다. 이중 스테이너네마 칼포캡시(*Steinernema carpocapsae*), 헤테랍디티스 박테리오포라(*Heterorhabditis bacteriophora*) 두 종이 국내에서 제품으로 판매 중이다. 스테이너네마 칼포캡시(*Steinernema carpocapsae*)는 기주 범위가 다양하며 전작물(원예, 수도, 과수 등)의 나비목, 파리목 유충의 살충에 효과적이다. 특히 나비목 중에는 목화바둑명나방, 잔디밤나방, 미국흰불나방, 과밤나방, 이화명나방, 과밤나방, 담배거세미나방 등에 살충 효과가 있고 파리류인 작은뿌리파리, 긴수염버섯파리 등에 대해서도 우수한 살충 효과가 입증된 바 있다. 헤테랍디티스 박테리오포라(*Heterorhabditis bacteriophora*)의 경우 주로 딱정벌레목 유충의 살충에 효과적이다. 특히 녹색콩풍뎅이, 주둥무늬차색풍뎅이, 등얼룩풍뎅이 등에 살충 효과가 있다.

또한, 스테이너네마 칼포캡시(*Steinernema carpocapsae*)는 24~48시간 안에 해충을 치사시키는 빠른 살충력, 뛰어난 기주 탐색능력 등을 가지고 있으며, 인·축에 무해하고, 환경이나 생태에 부작용이 없으며, 다른 약제와 일반적으로 혼용살포가 가능하므로 병해충 종합관리(IPM)를 위한 대안으로 부각 되고 있다.

곤충병원성 선충(EPN)은 살충제로 상업적으로 생산되고 있다. 하지만 제품의 보존 및 제형과 관련하여 많은 어려움이 발생 되고 있다. 기존 곤충병원성 선충(EPN)의 표면 살균 형태로는 0.05%의 차아염소산나트륨(NaClO)을 처리하고 별다른 세척 과정 없이 선충을 분리하여 제형 작업을 진행하였다. 하지만 제형의 특성상 수분 함량이 높고 저온 보관을 해야만 되기에 장기 보관이 어렵다. 그리고 수분 함량으로 인해 장기보관 중에 세균과 곰팡이가 발생하는 등의 문제점이 발생 된다. 이에 본 연구에서는 다양한 담체를 활용하여 장기보관에 효율적이고 세균과 곰팡이의 발생을 저감 시킬 수 있는 제형 방법을 개발하고자 한다.

2. 재료 및 방법

곤충병원성 선충의 기본 배양은 효모추출물 2%, 대두분 20%, 전지분유 3%, 올리브유 5%, 난황분 5%, 증류수 57%의 배지를 스펀지에 흡착하여 121℃에서 15분간 멸균 후 배양을 하였다. 공생균주를 접종한 후 2일간 배양하고 곤충병원성 선충을 접종하여 25℃에서 12일간 배양을 진행하였다(대한민국 등록특허 제10-1952542호). 제형화 이전에 곰팡이와 세균 발생을 방지하기 위해 차아염소산나트륨(NaClO) 용액을 이용하여 곤충병원성 선충(EPN)의 표면을 살균하였다. 제형화를 위해 담체는 스펀지(sponge), 질석 분말(vermiculite powder)(SM 광업), 셀룰로오스 분말(cellulose powder)(나이콘 소재, BE600/30PU), 실리카 분말(silica powder)(SAC), 맥반석 분말(barley stone powder)(SM 광업)를 이용하여 비교하였다. 스펀지(sponge)를 제외한 각 담체는 10 μ m~1,000 μ m 사이의 입자로 된 분말을 사용하였다. 스펀지(sponge)는 2×2×2.5(cm) 크기를 사용하였다. 곤충병원성선충의 장기보관을 위해서는 수분 유지가 절대적으로 필요로 한다. 따라서 최종 제형의 장기보관을 위한 수분유지를 위해 계면활성제를 첨가하였다. 계면활성제로는 SPAN계와 TWEEN계 계면활성제를 사용하였다. 각 실험은 결과의 정확성을 위해서 3반복 이상으로 진행하였고, 결과는 평균값으로 기록하였다. 곤충병원성 선충의 관찰은 실체현미경(40배율)을 이용하여 육안 관찰하였다.

2.1. 곤충병원성 선충(EPN) 제형을 위한 표면 살균

2.1.1. 곤충병원성 선충(EPN) 살균 농도

곤충병원성 선충(EPN)의 표면 살균을 위해 차아염소산나트륨(NaClO) 용액을 0.1%, 0.5%, 1%, 3%, 5%, 10%로 10분간 처리하였다. 차아염소산나트륨(NaClO) 용액을 10분 동안 처리하고 NA(Nutrient agar, 세균 증식 확인용) 배지와 PDA(Potato dextrose agar, 곰팡이 증식 확인용) 배지에 도말을 하여 오염균의 발생 여부를 관찰하였다.

2.1.2. 곤충병원성 선충(EPN) 살균 시간

곤충병원성 선충(EPN)의 표면을 차아염소산나트륨(NaClO) 1% 용액에 침전시켜 5분, 10분, 20분, 30분, 60분, 90분 후 세척 하였다. 이후 세척이 완료된 곤충병원성 선충(EPN)의 생존 여부를 관찰하였다.

2.2. 곤충병원성 선충(EPN) 제형을 위한 담체 선정

2.2.1. 담체의 종류에 따른 생존율

곤충병원성 선충(EPN)의 장기보관에 유용한 담체를 선정하기 위하여 표면 살균이 완료된 선충을 이용하여 실험을 진행하였다. 담체의 후보로는 스펀지(sponge), 질석 분말(vermiculite powder), 셀룰로오스 분말(cellulose powder), 실리카 분말(silica powder), 맥반석 분말(barley stone powder)을 이용하여 2×10⁷마리가 포함된 곤충병원성 선충(EPN)액 40ml과 담체 60g을 혼합하여 제형을 하였다. 각 담체와 혼합된 제형을 15℃에서 6개월간 보관하면서 곤충병원성 선충(EPN)의 생존율을 조사하였다.

2.2.2. 담체의 종류에 따른 제형 보관 기간별 곤충병원성 선충(EPN)의 병원성

2.2.1에서 실험한 방법에 따라 제형된 곤충병원성 선충(EPN)을 각 보관 기간별로 병원성 측정하였다. 병원성 확인을 위하여 꿀벌부채명나방 유충을 이용하였다. 살충력 검증은 petri dish(직경 90mm)에 filter paper를 1장 깔고, 선충을 100마리/ml로 희석하여 1ml를 접종하였다. 접종된 petri dish(90mm)에 꿀벌부채명나방 유충을 10마리씩 넣고 25℃에서 48시간 동안 사멸률을 조사하였다.

2.2.3. 선정된 담체의 혼합비율에 따른 생존율

위 시험에서 선정된 담체를 다양한 비율에 따라 곤충병원성 선충(EPN)과 혼합 제형을 실시하였다. 각 담체와 혼합된 제형을 15°C에서 6개월간 보관하면서 곤충병원성 선충(EPN)의 생존율을 조사하였다.

2.2.4. 선정된 담체의 혼합비율에 따른 기간별 곤충병원성 선충(EPN)의 병원성

위 시험에서 선정된 담체를 다양한 비율에 따라 곤충병원성 선충(EPN)과 혼합 제형을 실시하였다. 각 담체와 혼합된 제형을 15°C에서 6개월간 보관하면서 곤충병원성 선충(EPN)의 사멸률을 조사하였다.

2.3. 선정된 제형의 수분유지를 위한 첨가제 선정

2.3.1. 선정된 제형의 첨가제 종류에 따른 생존율

위 시험에서 선정된 최종 제형에 SPAN계 계면활성제인 SPAN 20, SPAN 60, SPAN 80과 TWEEN계 계면활성제인 TWEEN 20, TWEEN 60, TWEEN 80을 각각 1%로 첨가하였다. 각 SPAN계와 TWEEN계 계면활성제가 첨가된 제형을 15°C에서 6개월간 보관하면서 곤충병원성 선충(EPN)의 생존율을 조사하였다.

2.3.2. 선정된 제형의 첨가제 종류에 따른 기간별 곤충병원성 선충(EPN)의 병원성

위 시험에서 선정된 최종 제형에 SSPAN계 계면활성제인 SPAN 20, SPAN 60, SPAN 80과 TWEEN계 계면활성제인 TWEEN 20, TWEEN 60, TWEEN 80 첨가하였다. 각 SPAN계와 TWEEN계 계면활성제가 첨가된 제형을 15°C에서 6개월간 보관하면서 곤충병원성 선충(EPN)의 사멸률을 조사하였다.

2.3.3. 선정된 첨가제의 함량에 따른 생존율

위 시험에서 선정된 TWEEN 60 계면활성제를 최적의 첨가 비율을 찾기 위해 다양한 농도로 첨가하였다. 선정된 TWEEN계 계면활성제는 0.5%, 1%, 3%, 5%의 농도로 각각 첨가하였다. 각 비율에 따라 첨가된 제형을 15°C에서 6개월간 보관하면서 곤충병원성 선충(EPN)의 생존율을 조사하였다.

2.3.4. 선정된 첨가제의 함량에 따른 기간별 곤충병원성 선충(EPN)의 병원성

위 시험에서 선정된 TWEEN 60 계면활성제를 최적의 첨가 비율을 찾기 위해 다양한 농도로 첨가하였다. 선정된 TWEEN계 계면활성제는 0.5%, 1%, 3%, 5%의 농도로 각각 첨가하였다. 각 비율에 따라 첨가된 제형을 15°C에서 6개월간 보관하면서 곤충병원성 선충(EPN)의 사멸률을 조사하였다.

2.3.5. 첨가제의 농도별 혼합비율에 따른 생존율

위 SPAN계와 TWEEN계 계면활성제 중에서 생존율이 우수한 계면활성제 2종을 농도별 혼합 비율에 따라 첨가하였다. 각 SPAN계와 TWEEN계 계면활성제가 농도별 혼합비율에 따라 첨가된 제형을 15°C에서 6개월간 보관하면서 곤충병원성 선충(EPN)의 생존율을 조사하였다.

2.3.6. 첨가제의 농도별 혼합비율에 따른 기간별 곤충병원성 선충(EPN)의 병원성

위 SPAN계와 TWEEN계 계면활성제 중에서 생존율이 우수한 계면활성제 2종을 농도별 혼합 비율에 따라 첨가하였다. 각 SPAN계와 TWEEN계 계면활성제가 농도별 혼합비율에 따라 첨가된 제형을 15°C에서 6개월간 보관하면서 곤충병원성 선충(EPN)의 사멸률을 조사하였다.

3. 결과

3.1. 곤충병원성 선충(EPN) 제형을 위한 표면 살균

3.1.1 곤충병원성 선충(EPN) 살균 농도

곤충병원성 선충(EPN)의 표면 살균을 위해 차아염소산나트륨(NaClO) 용액을 0.1%, 0.5%, 1%, 3%, 5%, 10%로 10분간 처리하였다. 처리 농도에 따라 table과 같은 결과를 나타내었다. 살균력 검증은 NA(Nutrient agar, 세균 증식 확인용) 배지와 PDA(Potato dextrose agar, 곰팡이 증식 확인용) 배지에 오염균이 발생한 여부로 확인하였다.

차아염소산나트륨(NaClO) 농도에 따른 살균 효능

		NA(세균 증식 확인)	PDA(곰팡이 증식 확인)
<i>Steinernema carposapsae</i>	무처리	검출	검출
	0.1%	검출	검출
	0.5%	비검출	검출
	1%	비검출	비검출
	3%	비검출	비검출
	5%	비검출	비검출
	10%	비검출	비검출
	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	무처리	검출
0.1%		검출	검출
0.5%		비검출	검출
1%		비검출	비검출
3%		비검출	비검출
5%		비검출	비검출
10%		비검출	비검출

위에서 보는 것과 같이, 곤충병원성 선충(EPN)의 표면 살균은 1% 이상에서 오염균의 발생이 나타나지 않았다. 0.5%에서는 일반 세균은 살균이 되었으나 곰팡이는 완전히 살균되지 않았다. 곤충병원성 선충(EPN)의 보관 시에 세균보다는 곰팡이의 발생이 더 영향을 끼치므로 1%의 차아염소산나트륨(NaClO)으로 표면 살균 작업을 진행해야 할 것으로 보인다.

3.1.2. 곤충병원성 선충(EPN) 살균 시간

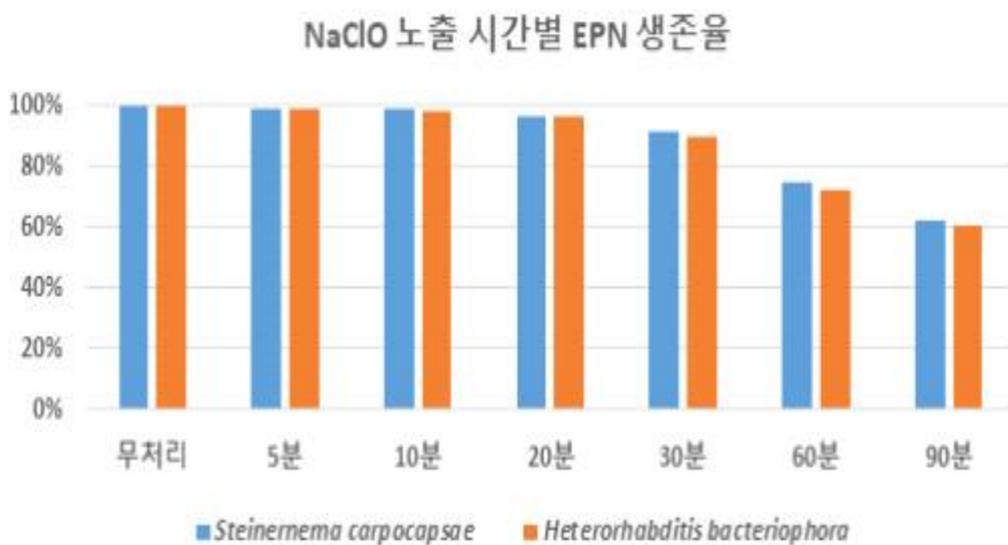
곤충병원성 선충(EPN)의 표면을 차아염소산나트륨(NaClO) 1% 용액에 침전시켜 5분, 10분, 30분, 60분, 90분 후 세척 하였다. 이후 세척이 완료된 곤충병원성 선충(EPN)의 생존 여부를 관찰하였다.

차아염소산나트륨 노출 시간에 따른 곤충병원성 선충(EPN)에 대한 영향

	생존율(%)	
	<i>Steinernema carpocapsae</i>	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>
무처리	100	100
5분	99	99
10분	99	98
20분	97	97
30분	92	90
60분	75	72
90분	62	61

위에서 보는 것과 같이, 차아염소산나트륨의 (NaClO) 1% 용액의 노출 시간에 따라 곤충병원성 선충(EPN)의 생존에 영향을 끼쳤다. 두 곤충병원성 선충(EPN)은 10분까지는 별다른 영향을 끼치지 않았고 20분 노출 시간까지는 큰 영향을 끼치지 않았다. 하지만 30분이 넘어가면서 약 10%가량의 곤충병원성 선충(EPN) 사체가 발생하는 것으로 관찰되었다. 곤충병원성 선충(EPN)을 차아염소산나트륨(NaClO) 용액에 살균 시에는 20분 내외로 살균하는 것이 바람직할 것으로 보인다.

차아염소산나트륨 용액의 노출 시간별 곤충병원성 선충(EPN)의 생존율



3.2. 곤충병원성 선충(EPN) 제형을 위한 담체 선정

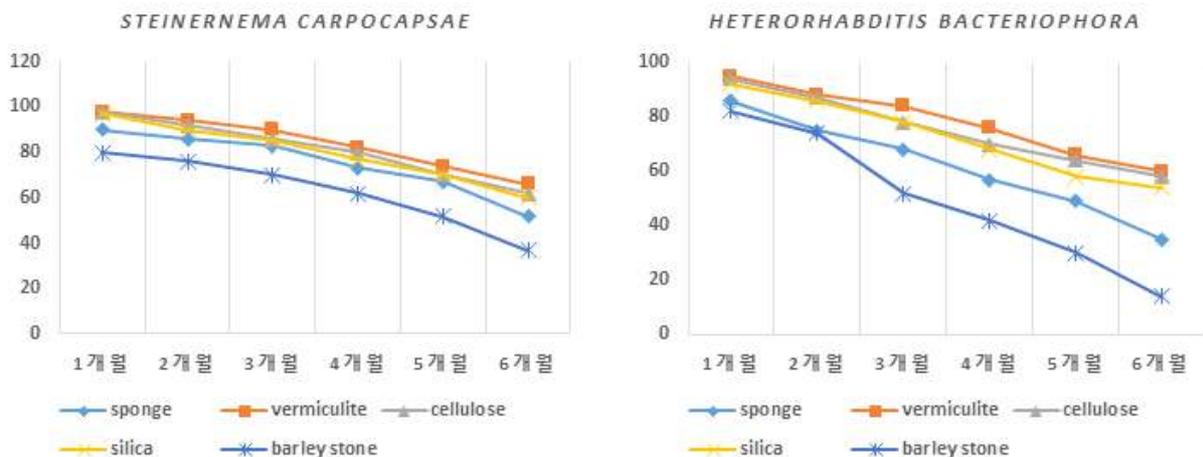
3.2.1. 담체의 종류에 따른 생존율

스펀지(sponge), 질석 분말(vermiculite powder), 셀룰로오스 분말(cellulose powder), 실리카 분말(silica powder), 맥반석 분말(barley stone powder)를 이용하여 2×10^7 마리가 포함된 곤충 병원성 선충(EPN)액 20ml과 담체 30g을 혼합하여 제형을 하여, 15°C에서 6개월간 보관하면서 곤충병원성 선충(EPN)의 생존율을 조사하였다.

담체 종류에 따른 곤충병원성 선충(EPN)의 기간별 생존율

EPN/기간	생존율(%)					
	sponge	vermiculite	cellulose	silica	barley stone	
<i>S.c</i>	1개월	90	98	98	97	80
	2개월	86	94	92	90	76
	3개월	83	90	86	85	70
	4개월	73	82	80	77	62
	5개월	67	74	70	70	52
	6개월	52	66	62	60	37
<i>H.b</i>	1개월	86	95	94	92	82
	2개월	75	88	87	86	74
	3개월	68	84	78	78	52
	4개월	57	76	70	68	42
	5개월	49	66	64	58	30
	6개월	35	60	58	54	14

위에서 보는 것과 같이, 질석 분말(vermiculite powder), 셀룰로오스 분말(cellulose powder), 실리카 분말(silica powder)에서 높은 생존율을 나타내는 것을 확인하였다. 스펀지(sponge), 맥반석 분말(barley stone powder)의 경우는 생존율이 낮아 제형을 위한 담체로서 적절하지 않다. 질석 분말(vermiculite powder)과 셀룰로오스 분말(cellulose powder), 실리카 분말(silica powder)의 경우 유사하게 사멸하는 것으로 관찰되었다. 그중 장기보관 시에는 질석 분말(vermiculite powder)의 생존율이 제일 높게 나타내어 곤충병원성 선충(EPN) 제형을 위한 최적의 담체로 활용 가능할 것으로 보인다.



담체 종류에 따른 곤충병원성 선충(EPN)의 기간별 생존율

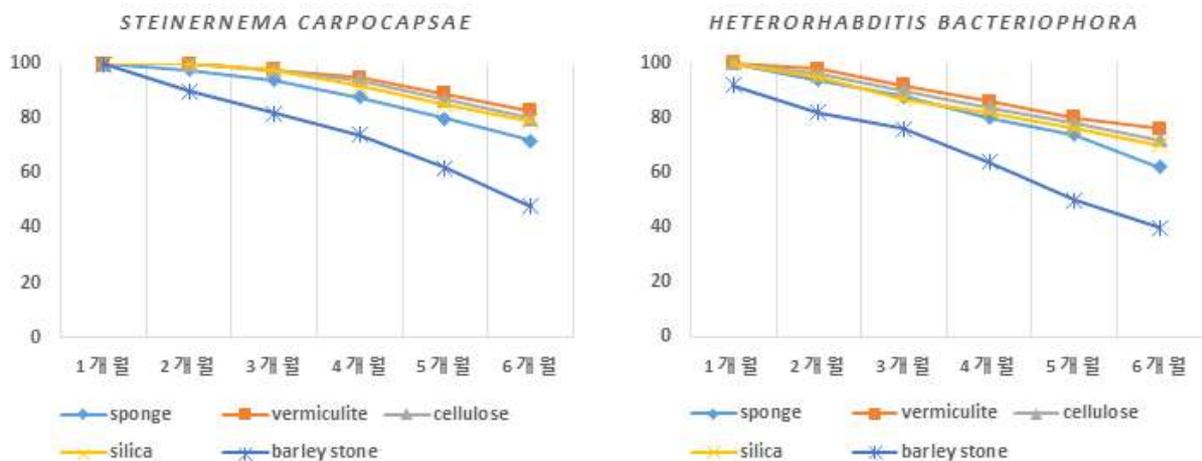
3.2.2. 담체의 종류에 따른 제형 보관 기간별 곤충병원성선충(EPN)의 병원성

각 담체의 종류에 따라 제형화를 한 다음 6개월간 보관하면서 곤충병원성 선충(EPN)의 병원성을 검증하였다.

담체 종류에 따른 제형 보관 기간별 곤충병원성 선충(EPN)의 병원성

EPN/기간	사멸률(%)					
	sponge	vermiculite	cellulose	silica	barley stone	
<i>S.c</i>	1개월	100	100	100	100	100
	2개월	98	100	100	100	90
	3개월	94	98	98	98	82
	4개월	88	95	94	92	74
	5개월	80	89	87	85	62
	6개월	72	83	80	79	48
<i>H.b</i>	1개월	100	100	100	100	92
	2개월	94	98	96	95	82
	3개월	88	92	90	87	76
	4개월	80	86	84	82	64
	5개월	74	80	78	76	50
	6개월	62	76	72	70	40

위에서 보는 것과 같이, 스테이너네마 칼포캡시(*Steinernema carpocapsae*)의 경우는 보관 3개월까지는 맥반석(barley stone powder)을 제외하고 모든 담체 제형에서 병원성이 90% 이상으로 높게 나타났다. 질석 분말(vermiculite powder)와 셀룰로오스 분말(cellulose powder), 실리카 분말(silica powder)의 경우 보관 6개월까지도 약 80%의 높은 병원성을 나타내었다. vermiculite powder의 경우 6개월이 지나도 스테이너네마 칼포캡시(*Steinernema carpocapsae*)의 병원성이 제일 높게 나타내었다. 헤테랍디티스 박테리오포라(*Heterorhabditis bacteriophora*)의 경우 보관 3개월 이후부터 모든 담체에서 병원성이 점차 낮아지는 경향을 볼 수 있었다. 헤테랍디티스 박테리오포라(*Heterorhabditis bacteriophora*)의 최적 보관 기간은 3개월이고, 질석 분말(vermiculite powder)에 혼합하여 보관할 경우 6개월까지 높은 병원성을 나타내었다.



담체 종류에 따른 제형 보관 기간별 곤충병원성 선충(EPN)의 병원성

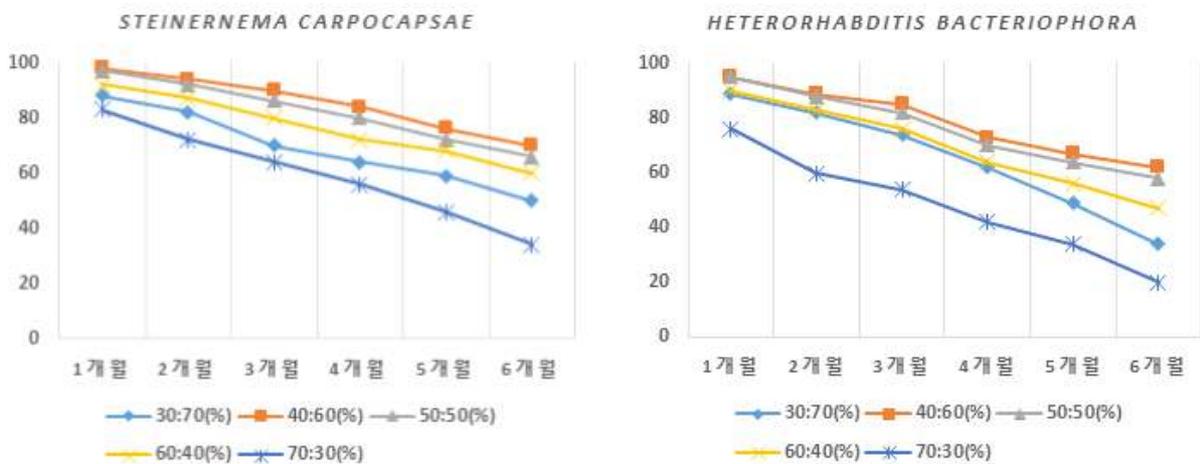
3.2.3. 선정된 담체의 혼합비율에 따른 생존율

위 시험에서 질석 분말(vermiculite powder)가 보관기관과 병원성 등에서 우수한 결과를 나타내었다. 그래서 질석 분말(vermiculite powder)을 이용하여 곤충병원성 선충(EPN)과 다양한 혼합비율로 최적의 생존율을 검사 하였다.

담체의 혼합비율에 따른 기간별 생존율

EPN/기간	생존율(EPN : Vermiculite powder%)					
	30:70	40:60	50:50	60:40	70:30	
<i>S.c</i>	1개월	88	98	97	92	83
	2개월	82	94	92	87	72
	3개월	70	90	86	80	64
	4개월	64	84	80	72	56
	5개월	59	76	72	68	46
	6개월	50	70	66	60	34
<i>H.b</i>	1개월	89	95	95	90	76
	2개월	82	89	88	83	60
	3개월	74	85	82	76	54
	4개월	62	73	70	64	42
	5개월	49	67	64	56	34
	6개월	34	62	58	47	20

위에서 보는 것과 같이, 곤충병원성 선충(EPN)의 혼합비율에 따라 장기보관에 많은 영향을 끼쳤다. 스테이너네마 칼포캡시(*Steinernema carpocapsae*)와 질석 분말(vermiculite powder)의 40:60의 비율에서 매우 높은 생존율을 나타내었다. 헤테라디티스 박테리오포라(*Heterorhabditis bacteriophora*)와 질석 분말(vermiculite powder)의 경우는 스테이너네마 칼포캡시(*Steinernema carpocapsae*) 보다는 생존율이 낮았지만 40:60에서 높은 생존율을 나타내었다.



담체의 혼합비율에 따른 기간별 생존율

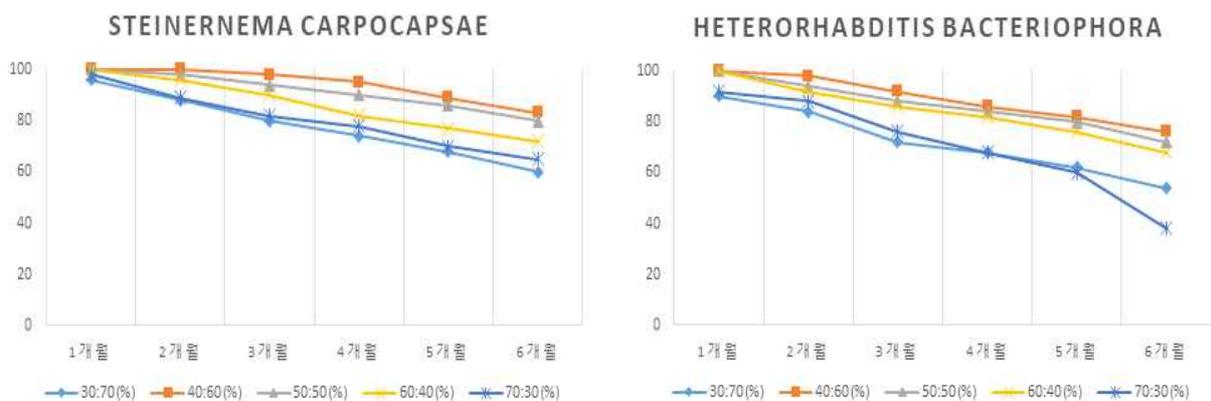
3.2.4. 선정된 담체의 혼합비율에 따른 기간별 곤충병원성선충(EPN)의 병원성

질석 분말(vermiculite powder)을 이용하여 곤충병원성 선충(EPN)과 다양한 혼합비율로 제형화하여 보관 기간별 병원성을 검사 하였다.

담체 혼합비율에 따른 기간별 병원성

EPN/기간	사멸률(EPN : Vermiculite powder%)					
	30:70	40:60	50:50	60:40	70:30	
<i>S.c</i>	1개월	96	100	100	100	98
	2개월	88	100	98	96	89
	3개월	80	98	94	90	82
	4개월	74	95	90	82	78
	5개월	68	89	86	77	70
	6개월	60	83	80	72	65
<i>H.b</i>	1개월	90	100	100	100	92
	2개월	84	98	94	92	88
	3개월	72	92	88	86	76
	4개월	68	86	84	82	68
	5개월	62	82	80	76	60
	6개월	54	76	72	68	38

위에서 보는 것과 같이, 곤충병원성 선충(EPN)과 질석 분말(vermiculite powder)의 혼합비율에 따른 제형의 보관 기간별 병원성에 많은 차이가 나타내었다. 스테이너네마 칼포캡시 (*Steinernema carpocapsae*)와 질석 분말(vermiculite powder)의 40:60과 50:50에서 보관 6개월 까지 80% 이상의 매우 높은 병원성을 나타내었다. 헤테랍디티스 박테리오포라 (*Heterorhabditis bacteriophora*)와 질석 분말(vermiculite powder)의 경우에도 40:60과 50:50에서 70% 이상의 높은 병원성을 나타내었다.



담체 혼합비율에 따른 기간별 병원성

3.3. 선정된 제형의 수분유지를 위한 첨가제 선정

3.3.1. 선정된 제형의 첨가제 종류에 따른 생존율

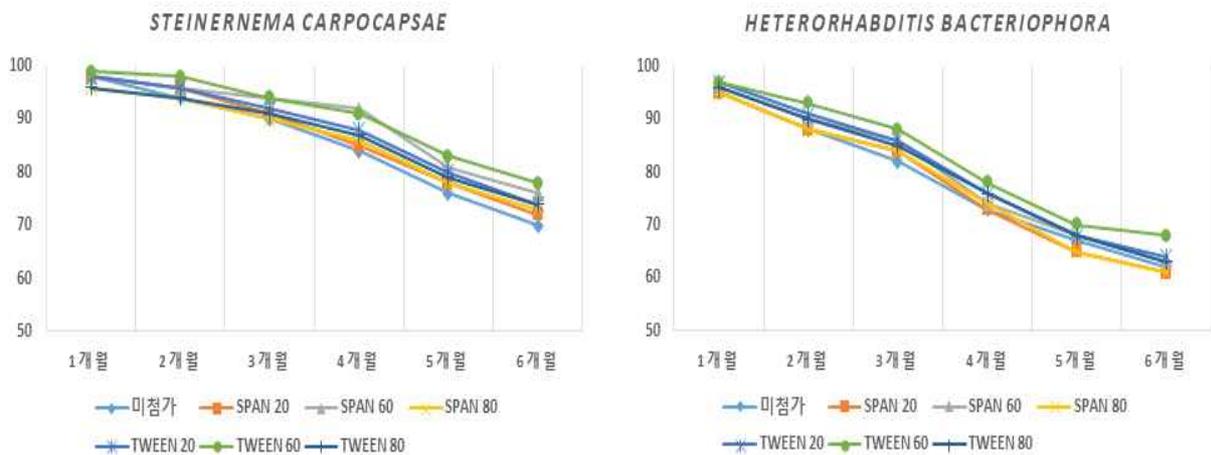
위 시험에서 선정된 최종 제형에서 수분유지를 위해 SPAN계 계면활성제와 TWEEN계 계면활성제를 1%씩 첨가하였다. SPAN계 계면활성제는 SPAN 20, SPAN 60, SPAN 80를 TWEEN계 계면활성제는 TWEEN 20, TWEEN 60, TWEEN 80를 사용하였다.

각 SPAN계와 TWEEN계 계면활성제가 첨가된 제형을 15°C에서 6개월간 보관하면서 곤충병원성 선충(EPN)의 생존율을 조사하였다.

첨가제 종류에 따른 기간별 생존율

EPN/기간	생존율(%)							
	미첨가	SPAN 20	SPAN 60	SPAN 80	TWEEN 20	TWEEN 60	TWEEN 80	
<i>S.c</i>	1개월	98	98	98	96	98	99	96
	2개월	94	96	96	94	96	98	94
	3개월	90	91	94	90	92	94	91
	4개월	84	85	92	86	88	91	87
	5개월	76	78	81	78	80	83	79
	6개월	70	72	76	73	74	78	74
<i>H.b</i>	1개월	95	95	96	95	97	97	96
	2개월	88	88	90	88	91	93	90
	3개월	82	84	86	84	86	88	85
	4개월	73	73	74	74	76	78	76
	5개월	67	65	68	65	68	70	68
	6개월	62	61	63	61	64	68	63

위에서 보는 것과 같이 최종 선정된 제형에 TWEEN계 계면활성제를 첨가하게 되면 첨가하지 않았을 때와 생존율에 차이가 나타났다. SPAN계 계면활성제의 경우 TWEEN계 계면활성제보다 생존율이 낮았다. TWEEN의 경우 생존율이 약 4~8%로 증가하는 것으로 나타내었다.



첨가제 종류에 따른 기간별 생존율

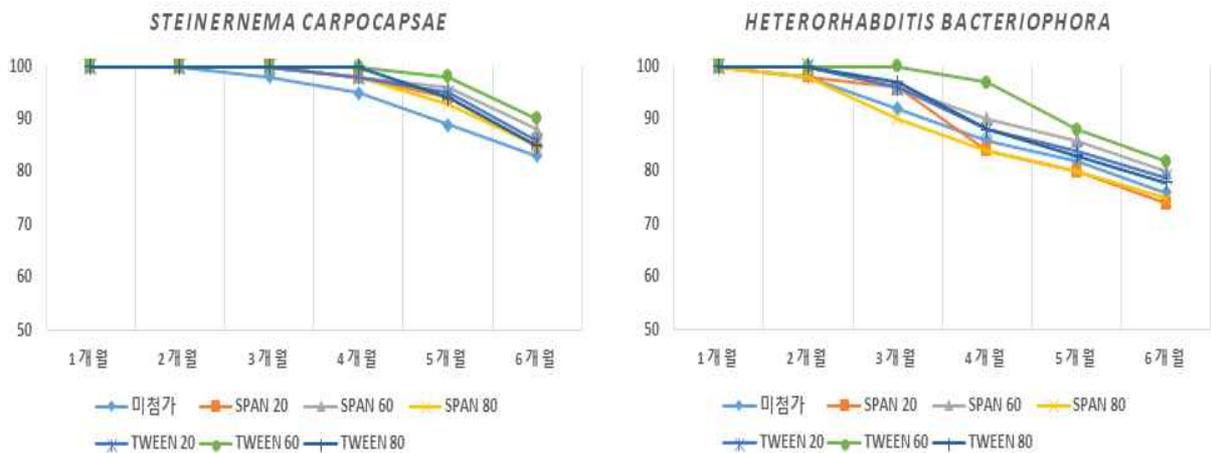
3.3.2. 선정된 제형의 첨가제 종류에 따른 기간별 곤충병원성 선충(EPN)의 병원성

위 시험에서 선정된 최종 제형에서 수분유지를 위해 SPAN계 계면활성제와 TWEEN계 계면활성제를 첨가하였다. SPAN계 계면활성제는 SPAN 20, SPAN 60, SPAN 80를 TWEEN계 계면활성제는 TWEEN 20, TWEEN 60, TWEEN 80를 사용하였다. 각 SPAN계와 TWEEN계 계면활성제가 첨가된 제형을 15°C에서 6개월간 보관하면서 곤충병원성 선충(EPN)의 사멸률을 조사하였다.

첨가제 종류에 따른 기간별 병원성

EPN/기간	사멸률(%)						
	미첨가	SPAN 20	SPAN 60	SPAN 80	TWEEN 20	TWEEN 60	TWEEN 80
<i>S.c</i>	1개월	100	100	100	100	100	100
	2개월	100	100	100	100	100	100
	3개월	98	100	100	100	100	100
	4개월	95	98	98	98	98	100
	5개월	89	94	96	93	95	98
	6개월	83	85	88	85	86	90
<i>H.b</i>	1개월	100	100	100	100	100	100
	2개월	98	98	100	98	100	100
	3개월	92	96	96	90	96	100
	4개월	86	84	90	84	88	97
	5개월	82	80	86	80	84	88
	6개월	76	74	80	75	79	82

위에서 보는 것과 같이 최종 선정된 제형에 TWEEN계 계면활성제를 첨가하게 되면 첨가하지 않았을 때와 병원성에 차이가 나타났다. SPAN계와 TWEEN계 계면활성제 모두 높은 사멸률을 나타내었다. 하지만 SPAN계 계면활성제의 경우 시간이 지남에 따라 병원성 조금 낮아지는 경향을 나타내었다.



첨가제 종류에 따른 기간별 병원성

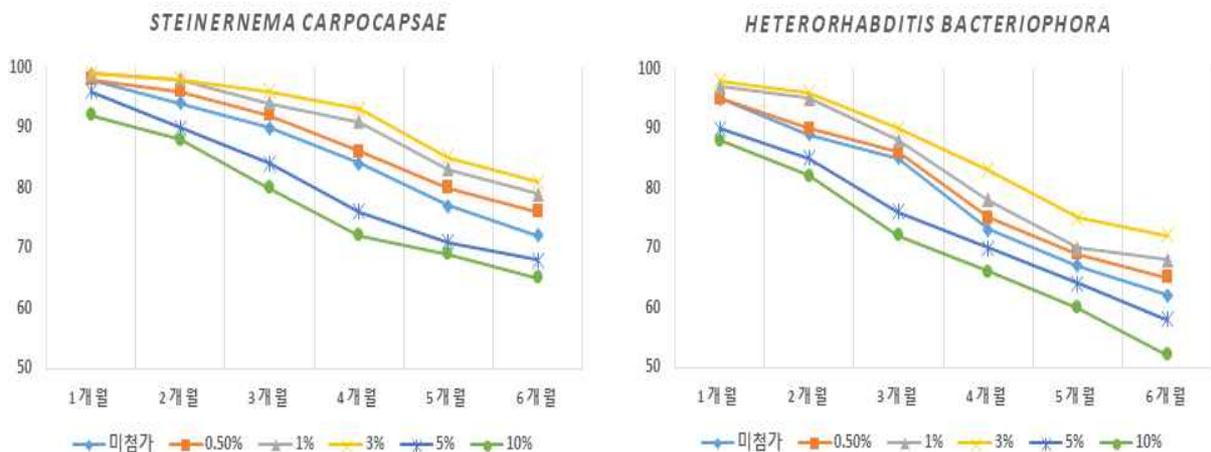
3.3.3. 선정된 첨가제의 함량에 따른 생존율

위 시험에서 선정된 TWEEN 60 계면활성제를 다양한 비율로 첨가하였다. 선정된 TWEEN 60 계면활성제는 0.5%, 1%, 3%, 5%로 달리하여 첨가하였다. 각 비율에 따라 첨가된 제형을 15°C에서 6개월간 보관하면서 곤충병원성 선충(EPN)의 생존율을 조사하였다.

TWEEN 60 함량에 따른 생존율

EPN/기간	생존율(%)						
	미첨가	0.5%	1%	3%	5%	10%	
<i>S.c</i>	1개월	98	98	99	99	96	92
	2개월	94	96	98	98	90	88
	3개월	90	92	94	96	84	80
	4개월	84	86	91	93	76	72
	5개월	77	80	83	85	71	69
	6개월	72	76	79	81	68	65
<i>H.b</i>	1개월	95	95	97	98	90	88
	2개월	89	90	95	96	85	82
	3개월	85	86	88	90	76	72
	4개월	73	75	78	83	70	66
	5개월	67	69	70	75	64	60
	6개월	62	65	68	72	58	52

위에서 보는 것과 같이 최종 선정된 제형에 TWEEN 60을 첨가하게 되면 첨가 농도에 따라 생존율에 차이가 나타났다. TWEEN 60을 첨가하게 되면 0.5, 1%, 3%까지는 생존율이 점차 증가하였지만, 5%를 넘어가면서 생존율이 낮아지는 것으로 확인되었다. TWEEN 60을 3% 첨가할 때에 스테이너네마 칼포캡시(*Steinernema carpocapsae*)는 약 9%, 헤테랍디티스 박테리오포라(*Heterorhabditis bacteriophora*)는 약 10%의 생존율이 증가하는 것으로 나타내었다.



TWEEN 60 함량에 따른 생존율

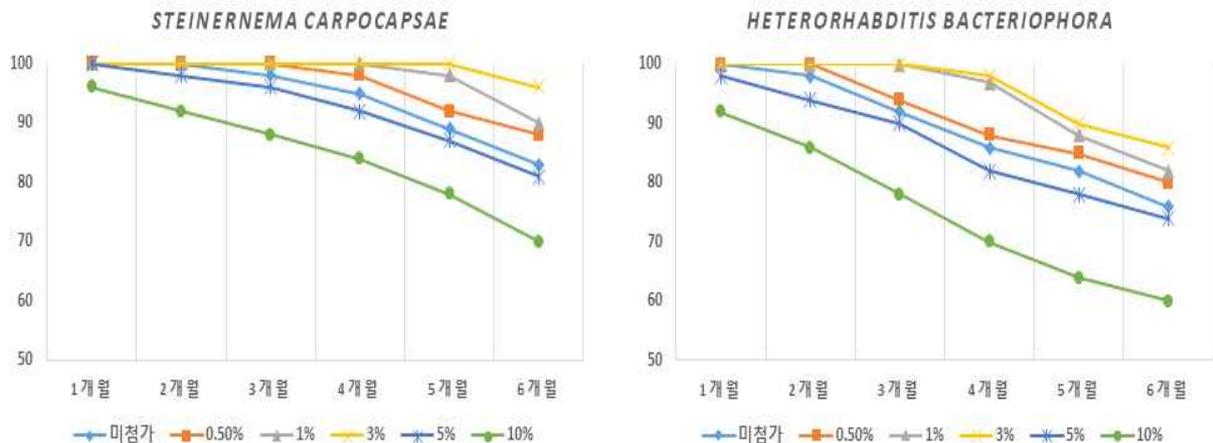
3.3.4. 선정된 첨가제의 함량에 따른 기간별 곤충병원성 선충(EPN)의 병원성

위 시험에서 선정된 TWEEN계 계면활성제를 다양한 비율로 첨가하였다. 선정된 TWEEN계 계면활성제의 각 비율에 따라 첨가된 제형을 15°C에서 6개월간 보관하면서 곤충병원성 선충(EPN)의 사멸률을 조사하였다.

TWEEN 60 함량에 따른 기간별 병원성

EPN/기간	사멸률(%)						
	미첨가	0.5%	1%	3%	5%	10%	
<i>S.c</i>	1개월	100	100	100	100	100	96
	2개월	100	100	100	100	98	92
	3개월	98	100	100	100	96	88
	4개월	95	98	100	100	92	84
	5개월	89	92	98	100	87	78
	6개월	83	88	90	96	81	70
<i>H.b</i>	1개월	100	100	100	100	98	92
	2개월	98	100	100	100	94	86
	3개월	92	94	100	100	90	78
	4개월	86	88	97	98	82	70
	5개월	82	85	88	90	78	64
	6개월	76	80	82	86	74	60

위에서 보는 것과 같이 최종 선정된 제형에 TWEEN 60을 첨가하게 되면 첨가 농도에 따라 병원성에 차이가 나타났다. 스테이너네마 칼포캡시(*Steinernema carpocapsae*)의 경우 TWEEN 60을 첨가하게 되면 0.5, 1%, 3%까지는 첨가하지 않았을 때와 같이 100%의 높은 병원성을 나타내었지만, 5%를 넘어가면서 병원성이 낮아지는 것으로 확인되었다. 헤테라딕티스 박테리오포라(*Heterorhabditis bacteriophora*)의 경우 TWEEN 60을 첨가하게 되면 0.5, 1%, 3%까지는 병원성이 점차 증가하였지만, 5%를 넘어가면서 TWEEN 60을 첨가하지 않았을 때보다 병원성이 낮아지는 것으로 나타내었다.



TWEEN 60 함량에 따른 기간별 병원성

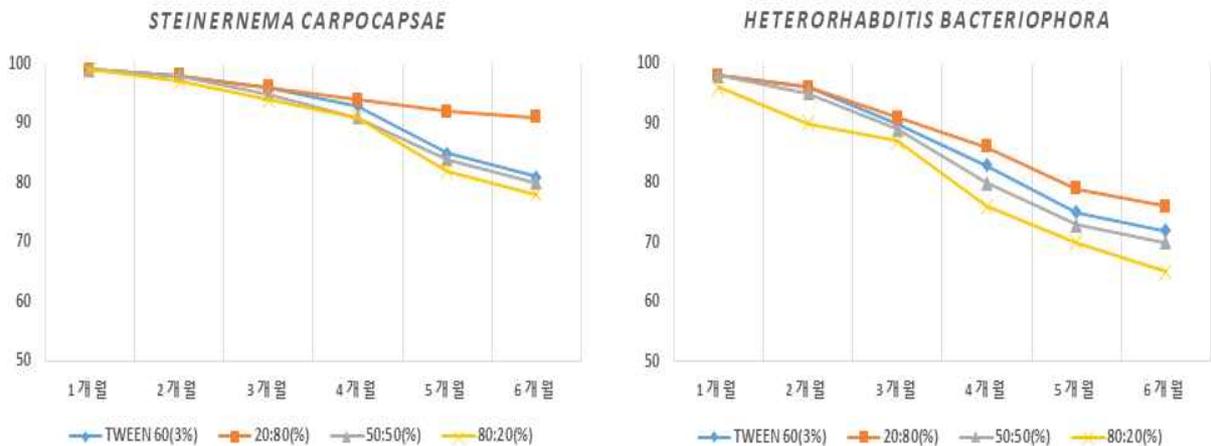
3.3.5. 첨가제의 농도별 혼합비율에 따른 생존율

위 실험에서 보는 것과 같이 PAN계 계면활성제에서는 SPAN 60, TWEEN계 계면활성제에서는 TWEEN 60이 우수한 장기보관 효과를 나타내었다. 장기보관 생존율이 우수한 계면활성제 2종을 농도별 혼합비율에 따라 첨가하였다. 이에 두 SPAN 60과 TWEEN 60 계면활성제의 농도별 혼합비율에 따라 첨가된 제형을 15°C에서 6개월간 보관하면서 곤충병원성 선충(EPN)의 생존율을 조사하였다. 계면활성제의 최종 첨가 농도는 우수한 생존율을 나타낸 TWEEN 60의 3%를 적용하여 제형에 3%의 계면활성제를 첨가하여 진행하였다.

첨가제의 농도별 혼합비율에 따른 생존율

EPN/기간	생존율(SPAN 60 : TWEEN 60%)				
	TWEEN 60(3%)	20:80	50:50	80:20	
<i>S.c</i>	1개월	99	99	99	99
	2개월	98	98	98	97
	3개월	96	96	95	94
	4개월	93	94	91	91
	5개월	85	92	84	82
	6개월	81	91	80	78
<i>H.b</i>	1개월	98	98	98	96
	2개월	96	96	95	90
	3개월	90	91	89	87
	4개월	83	86	80	76
	5개월	75	79	73	70
	6개월	72	76	70	65

위에서 보는 것과 같이 SPAN 60 + TWEEN 60(20%+80%)의 비율로 혼합하여 제형에 첨가하였을 경우 TWEEN 60의 단독 처리한 경우보다 스테이너네마 칼포캡시(*Steinernema carpocapsae*)와 헤테랍디티스 박테리오포라(*Heterorhabditis bacteriophora*)는 더 높은 생존율을 나타내었다.



첨가제의 농도별 혼합비율에 따른 생존율

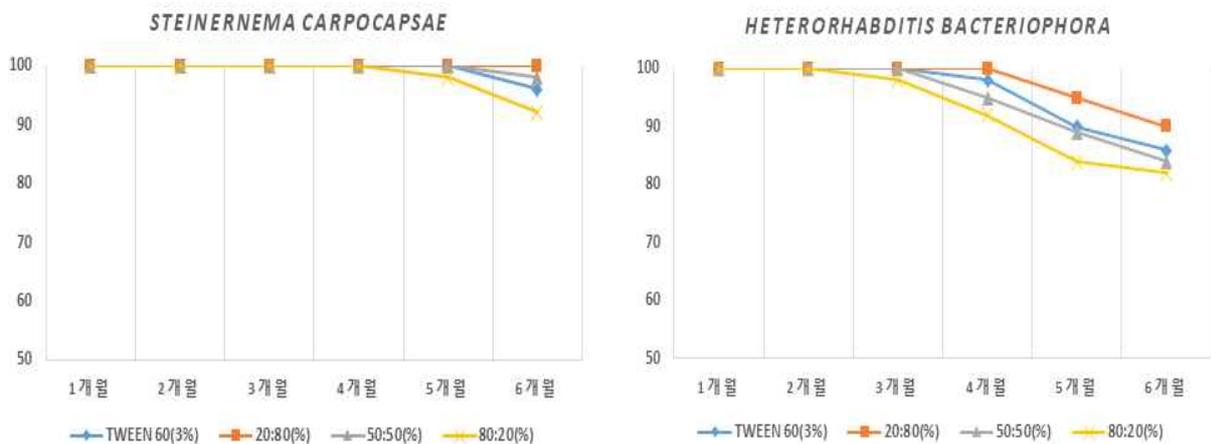
3.3.6. 첨가제의 농도별 혼합비율에 따른 기간별 곤충병원성 선충(EPN)의 병원성

위 실험에서 보는 것과 같이 PAN계 계면활성제에서는 SPAN 60, TWEEN계 계면활성제에서는 TWEEN 60이 우수한 병원성을 나타내었다. 장기보관 생존율이 우수한 계면활성제 2종을 농도별 혼합비율에 따라 첨가하였다. 이에 두 SPAN 60과 TWEEN 60 계면활성제의 농도별 혼합비율에 따라 첨가된 제형을 15°C에서 6개월간 보관하면서 곤충병원성 선충(EPN)의 사멸률을 조사하였다. 계면활성제의 최종 첨가 농도는 우수한 생존율을 나타낸 TWEEN 60의 3%를 적용하여 제형에 3%의 계면활성제를 첨가하여 진행하였다.

첨가제의 농도별 혼합비율에 따른 병원성

		사멸률(SPAN 60 : TWEEN 60%)			
		TWEEN 60(3%)	20:80	50:50	80:20
<i>S.c</i>	1개월	100	100	100	100
	2개월	100	100	100	100
	3개월	100	100	100	100
	4개월	100	100	100	100
	5개월	100	100	100	98
	6개월	96	100	98	92
<i>H.b</i>	1개월	100	100	100	100
	2개월	100	100	100	100
	3개월	100	100	100	98
	4개월	98	100	95	92
	5개월	90	95	89	84
	6개월	86	90	84	82

위에서 보는 것과 같이 SPAN 60 + TWEEN 60(20%+80%)의 비율로 혼합하여 제형에 첨가하였을 경우 스테이너네마 칼포캡시(*Steinernema carpocapsae*)에서는 보관 6개월까지 100%의 높은 병원성을 나타내었다. 헤테랍디티스 박테리오포라(*Heterorhabditis bacteriophora*)의 경우는 SPAN 60 + TWEEN 60(20%+80%)의 비율로 혼합하여 제형에 첨가하였을 경우 보관 4개월까지 100%의 병원성을 나타내었다.



첨가제의 농도별 혼합비율에 따른 병원성

4. 결론

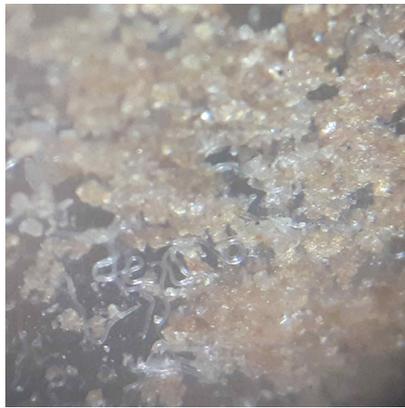
곤충병원성 선충(EPN)의 우수한 병원성과 활용적 가치에 반하여 취약한 저장성과 병원성 유지 등의 많은 제약으로 인해 사용이 쉽지 않았다. 하지만 위 실험내용에서 보았듯이 장기보관을 위해 어떠한 담체를 활용하느냐에 따라 저장성과 병원성은 많은 차이를 나타내었다. 곤충병원성 선충(EPN)의 종별로 차이가 발생하였지만, 두 개체군 모두 곤충병원성 선충(EPN)과 질석 분말(vermiculite powder)의 40:60의 비율에서 높은 저장성과 병원성을 보여주었다. 그리고 최종 선정된 제형에 TWEEN 60을 3% 첨가하게 되면 약 9~10%의 저장성이 증가하였고, 스테이너네마 칼포캡시(*Steinernema carpocapsae*)와 헤테랍디티스 박테리오포라(*Heterorhabditis bacteriophora*)에서 생존율 및 병원성이 약 10% 이상 증가하였다. 이는 TWEEN계 계면활성제가 SPAN계 계면활성제보다 습윤성이 높아 곤충병원성 선충(EPN)의 장기보관 생존율과 병원성에 더 효율적인 것으로 보이며, TWEEN계 계면활성제 중에서도 TWEEN 60이 곤충병원성 선충의 장기보관에 더 효율적인 것으로 보인다. SPAN 60 + TWEEN 60(20%+80%)의 비율로 첨가하게 되면 TWEEN 60을 3% 첨가하는 것 보다 생존율은 약 4~10%, 병원성은 약 10% 이상으로 증가하였다. 그러므로 계면활성제의 첨가 시에는 단독보다는 혼합하여 첨가하는 것이 곤충병원성 선충(EPN)의 장기보관에 매우 효율적인 것으로 보인다.

현재 국내에서 생산 판매되고 있는 스테이너네마 칼포캡시(*Steinernema carpocapsae*)와 헤테랍디티스 박테리오포라(*Heterorhabditis bacteriophora*)의 활용성이 매우 높아질 것으로 보인다.

곤충병원성 선충(EPN)의 혼합 제형



곤충병원성 선충 사진



담체 혼합 현미경 사진



담체 혼합된 사진

곤충병원성 선충(EPN)의 병원성 test



곤충병원성 선충 접종 사진



*Steinernema carpocapsae*에 의해 사멸한 꿀벌부채명나방



*Heterorhabditis bacteriophora*에 의해 사멸한 꿀벌부채명나방

하. 작물 피해 여부 조사

1. 디디케이-에스(DDK-S) 작물 피해 여부 조사

EFAF-18-0436(1)-PH-105

디디케이-에스(DDK-S)의 작물(딸기)에 대한 약해 시험

시험기간 : 2018. 08. 07. ~ 2018. 08. 21.

시험의뢰회사명 : 대동테크

시험기관명 : (주)친환경농식품안전성센터



항목명 : 디디케이-에스(DDK-S)의 작물에 대한 유기농업자재 약해 시험

- 시험기관 : (주)친환경농식품안전성센터
- 시험년도 : 2018년
- 담당자 : 구 준 학
- 시험입지조건(토성) : 원예용 상토
- 시험 개시일 : 2018년 08월 07일
- 시험 종료일 : 2018년 08월 21일
- 시험장소 : 강원대학교 친환경농업연구센터 유리온실

1. 시험목적

본 시험은 대동테크 '디디케이-에스(DDK-S)'의 작물(딸기)에 대한 약해 발생 여부를 평가하여 유기농업자재 신청을 위한 자료로 활용하고자 한다.

2. 시험방법

가. 시험기준

- ① 국립농산물품질관리원 고시 제2017-33호(2017. 06. 03.) '유기농업자재 공시 기준'
- ② 농촌진흥청 고시 제2018-4호(2018. 04. 26.) '농약 및 원제의 등록기준'

나. 시험물질: 디디케이-에스(DDK-S)(시료번호: EFAF-18-0436(1))

다. 시험작물: 딸기(설향)

라. 시험작물 적용대상: 2~3엽기 유식물

마. 시험물질 처리정보

처리구	시험물질 처리일 및 횟수	처리량
무처리	-	-
기준량	08월 07일(1회)	4,000배
배 량	08월 07일(1회)	2,000배

* 시험물질의 평량은 기준량의 경우 시험물질 4,000배 희석액(50g/200L), 배량의 경우 2,000배 희석액(100g/200L)으로 한다.

바. 시험물질 처리방법: 포트 당 유식물 1주 정식 후, 시험물질 희석액을 100평(3.3a) 기준으로 시험토양에 균일하게 토양관주 처리한다.

사. 시험구 규모(또는 주수) 및 배치법

- ① 처리구 당 3포트(1포트 1주) × 3반복(임의배치법)
- ② 포트규격: 와그너포트(지름 174.6mm, 높이 197.5mm, 1/5,000 a)



아. 재배조건: 시설재배

자. 재배관리

① 시설관리는 냉·난방기 및 자동 개폐식 차광막이 설치된 유리온실에서 1일 3회 이상 온·습도를 확인하여 작물을 재배하였다.

② 관수는 계절 및 온·습도에 따라 1일 1회에서 2회 분수호스로 관수하였다.

차. 타농자재 사용: 시험과정 중 다른 농자재는 사용하지 않는다.

카. 약해조사는 시험물질 처리일로부터 14일간(3일 후, 7일 후, 14일 후) 총 3회에 걸쳐 외관상 약해 유무를 달관조사 한다.

타. 약해의 판정기준

정도	판 정 기 준
0	육안으로 약해(藥害)가 인정되지 않음
1	아주 가벼운 약해(藥害)로서 작은 약반이 약간 인정됨
2	처리된 잎의 소부분에서 약해(藥害)가 인정됨
3	처리된 잎의 50퍼센트 정도 약해(藥害)가 인정됨
4	상당한 피해를 받고 있으나 아직 건전한 부분이 남아 있음

3. 시험결과

가. 처리 후 약해조사 결과(3, 7, 14일차)

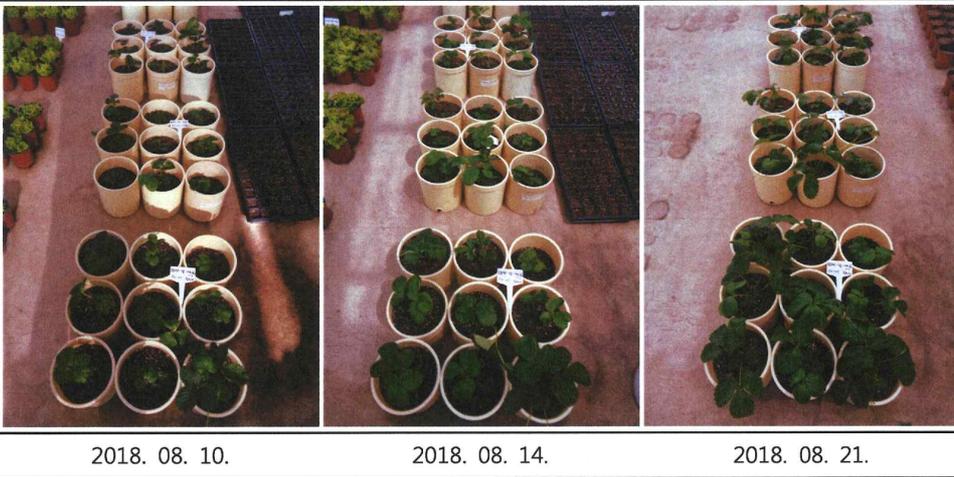
작물명	디디케이-에스 (DDK-S)	약해(0~4)			약해증상
		3일(08/10)	7일(08/14)	14일(08/21)	
딸 기	무처리	-	-	-	-
	기준량	0	0	0	없음
	배 량	0	0	0	없음



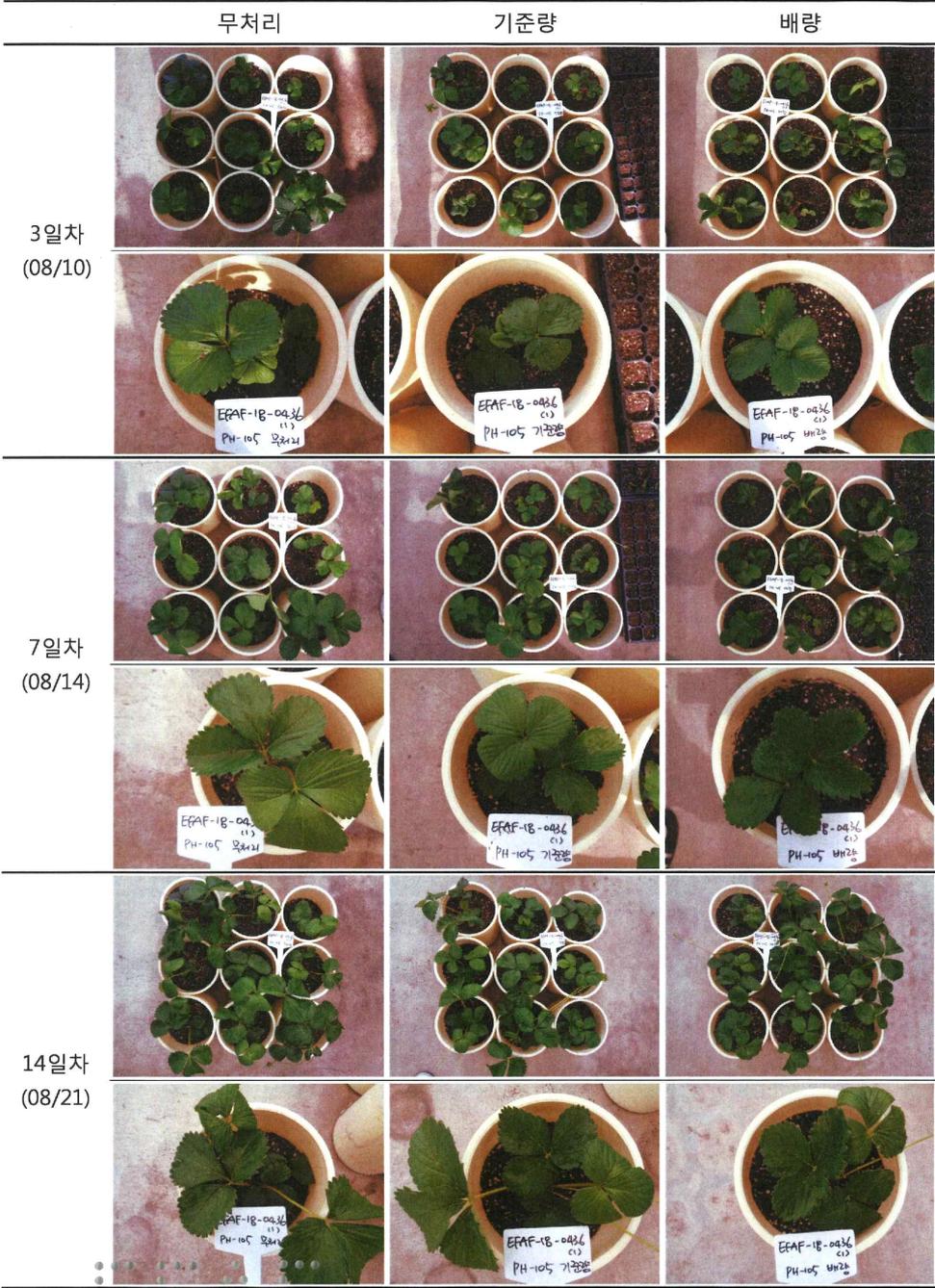
나. 토양처리 전경(2018. 08. 07.)



다. 작물시험 전경



라. 딸기의 처리 후 일자별 작물 사진



4. 결과요약

약해 시험기간 동안 “대동테크의 디디케이-에스(DDK-S)” 토양관주 처리에 의한 작물(딸기)의 피해는 발견되지 않았으며, 무처리와 기준량 및 배량을 비교하여도 약해로 판단될 만한 특이한 증상은 없었음.

5. 시험담당자 의견

시험물질 처리로 인한 기준량 및 배량에서 유식물에 대한 뚜렷한 약해증상이 없어 유기농업 자재 공시 기준에 적합하다고 판단됨.

- 1) 본 보고서에 기술된 시험과정은 시험책임자의 책임 하에 수행되었으며, 위의 기준을 준수하여 실시하였음.
- 2) 본 보고서 시험 결과는 생성된 모든 시험 기초자료를 토대로 작성되었음.
- 3) 본 보고서는 고객이 제공한 시료를 시험한 결과로써 자체보관 및 공공기관 제출용으로만 사용이 가능하며, 기타 소송 등의 수단으로 사용할 수 없음.

2018년 08월 22일

시험책임자 구 준 학



2. 디디케이-에이치(DDK-H) 작물 피해 여부 조사

EFAF-18-0436(2)-PH-106

디디케이-에이치(DDK-H)의 작물(딸기)에 대한 약해 시험

시험기간 : 2018. 08. 08. ~ 2018. 08. 22.

시험의뢰회사명 : 대동테크

시험기관명 : (주)친환경농식품안전성센터



EFAF

1/6

항목명 : 디디케이-에이치(DDK-H)의 작물에 대한 유기농업자재 약해 시험

- 시험기관 : (주)친환경농식품안전성센터
- 시험년도 : 2018년
- 담당자 : 구 준 학
- 시험입지조건(토성) : 원예용 상토
- 시험 개시일 : 2018년 08월 08일
- 시험 종료일 : 2018년 08월 22일
- 시험장소 : 강원대학교 친환경농업연구센터 유리온실

1. 시험목적

본 시험은 대동테크 '디디케이-에이치(DDK-H)'의 작물(딸기)에 대한 약해 발생 여부를 평가하여 유기농업자재 신청을 위한 자료로 활용하고자 한다.

2. 시험방법

가. 시험기준

- ① 국립농산물품질관리원 고시 제2017-33호(2017. 06. 03.) '유기농업자재 공시 기준'
- ② 농촌진흥청 고시 제2018-4호(2018. 04. 26.) '농약 및 원제의 등록기준'

나. 시험물질: 디디케이-에이치(DDK-H)(시료번호: EFAF-18-0436(2))

다. 시험작물: 딸기(설향)

라. 시험작물 적용대상: 2~3엽기 유식물

마. 시험물질 처리정보

처리구	시험물질 처리일 및 횟수	처리량
무처리	-	-
기준량	08월 08일(1회)	4,000배
배 량	08월 08일(1회)	2,000배

* 시험물질의 평량은 기준량의 경우 시험물질 4,000배 희석액(50g/200L), 배량의 경우 2,000배 희석액(100g/200L)으로 한다.

바. 시험물질 처리방법: 포트 당 유식물 1주 정식 후, 시험물질 희석액을 100평(3.3a) 기준으로 시험토양에 균일하게 토양관주 처리한다.

사. 시험구 규모(또는 주수) 및 배치법

- ① 처리구 당 3포트(1포트 1주) × 3반복(임의배치법)
- ② 포트규격: 와그너포트(지름 174.6mm, 높이 197.5mm, 1/5,000 a)



아. 재배조건: 시설재배

자. 재배관리

① 시설관리는 냉·난방기 및 자동 개폐식 차광막이 설치된 유리온실에서 1일 3회 이상 온·습도를 확인하여 작물을 재배하였다.

② 관수는 계절 및 온·습도에 따라 1일 1회에서 2회 분수호스로 관수하였다.

차. 타농자재 사용: 시험과정 중 다른 농자재는 사용하지 않는다.

카. 약해조사는 시험물질 처리일로부터 14일간(3일 후, 7일 후, 14일 후) 총 3회에 걸쳐 외관상 약해 유무를 달관조사 한다.

타. 약해의 판정기준

정도	판 정 기 준
0	육안으로 약해(藥害)가 인정되지 않음
1	아주 가벼운 약해(藥害)로서 작은 약반이 약간 인정됨
2	처리된 잎의 소부분에서 약해(藥害)가 인정됨
3	처리된 잎의 50퍼센트 정도 약해(藥害)가 인정됨
4	상당한 피해를 받고 있으나 아직 건전한 부분이 남아 있음

3. 시험결과

가. 처리 후 약해조사 결과(3, 7, 14일차)

작물명	디디케이-에스 (DDK-S)	약해(0~4)			약해증상
		3일(08/11)	7일(08/15)	14일(08/22)	
딸 기	무처리	-	-	-	-
	기준량	0	0	0	없음
	배 량	0	0	0	없음



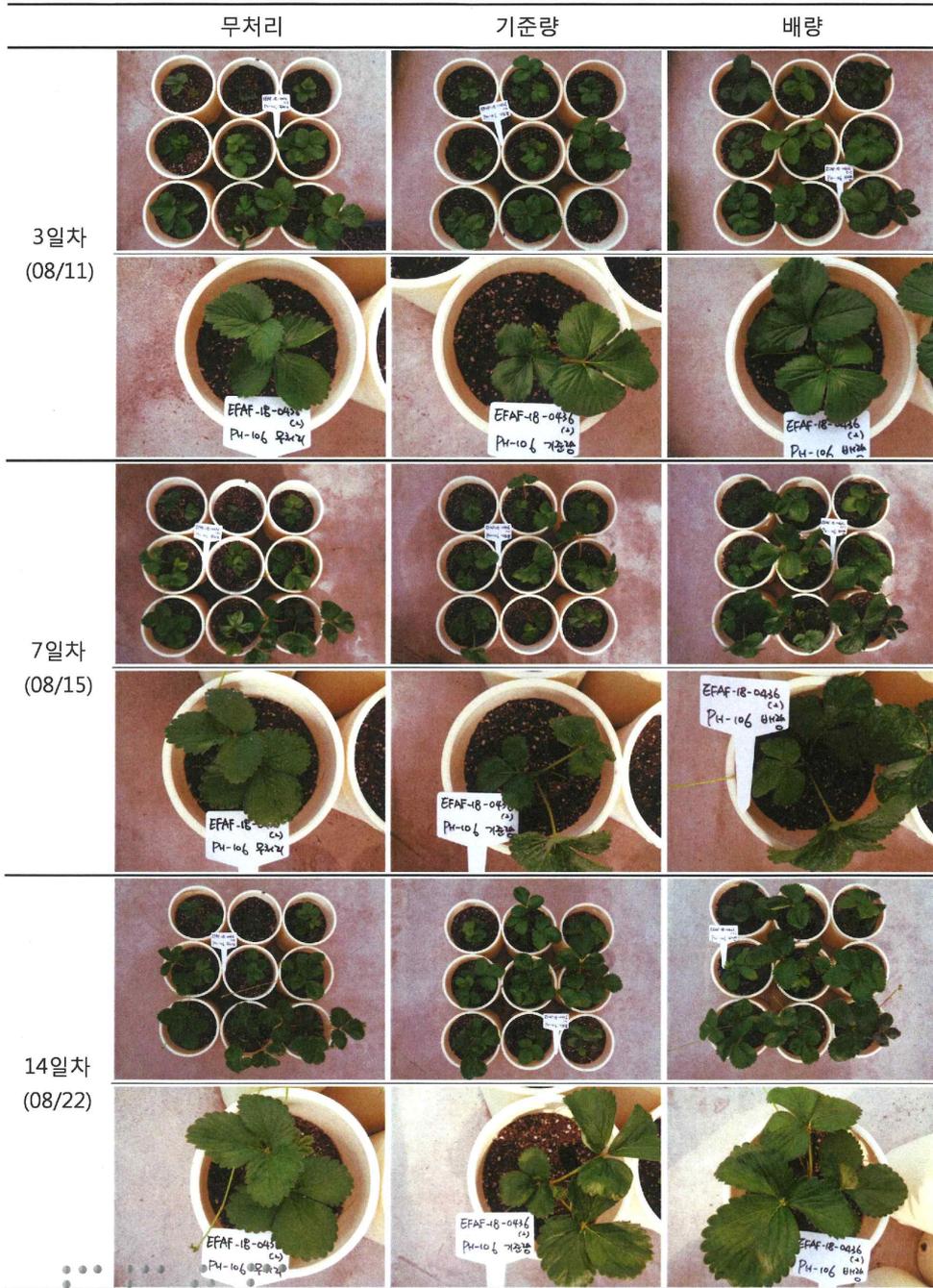
나. 토양처리 전경(2018. 08. 08.)



다. 작물시험 전경



라. 딸기의 처리 후 일자별 작물 사진



4. 결과요약

약해 시험기간 동안 “대동테크의 디디케이-에이치(DDK-H)” 토양관주 처리에 의한 작물(딸기)의 피해는 발견되지 않았으며, 무처리와 기준량 및 배량을 비교하여도 약해로 판단될 만한 특이한 증상은 없었음.

5. 시험담당자 의견

시험물질 처리로 인한 기준량 및 배량에서 유식물에 대한 뚜렷한 약해증상이 없어 유기농업 자재 공시 기준에 적합하다고 판단됨.

- 1) 본 보고서에 기술된 시험과정은 시험책임자의 책임 하에 수행되었으며, 위의 기준을 준수하여 실시하였음.
- 2) 본 보고서 시험 결과는 생성된 모든 시험 기초자료를 토대로 작성되었음.
- 3) 본 보고서는 고객이 제공한 시료를 시험한 결과로써 자체보관 및 공공기관 제출용으로만 사용이 가능하며, 기타 소송 등의 수단으로 사용할 수 없음.

2018년 08월 22일

시험책임자 구 준 학 (서명)



3. 디디케이-에스(DDK-S) 방제 효과

곤충병원성선충(대동테크 디디케이-에스, DDK-S) 천적 친환경유기농자재 시험 성적서(방제 효과, 작물 피해)

항 목 명 : 작은뿌리파리에 대한 곤충병원성선충(디디케이-에스, DDK-S) 제품의 방제 효과 시험

- 시험기관 : 충남대학교
- 시험년도 : 2019년도
- 담당자 : 유용만교수
- 시험장소 : 충남대학교 (실내)

1. 시험목적

작은뿌리파리에 대한 우수 방제 천적 곤충병원성선충(디디케이-에스, DDK-S) 제품의 방제 효과를 확인하여 친환경농자재 자료로 활용코자 함.

2. 시험방법

가. 시험작물 : 딸기

나. 대상해충 : 작은뿌리파리 (*Bradysia agrestis*)

다. 시험천적 : 곤충병원성선충(디디케이-에스, DDK-S) (*Steinernema carpocapsae*)

라. 대상해충 발생상황 : 5월 4일 포트당 20마리의 작은뿌리파리 유충을 접종시키고 5월 5일 제품을 4,000배 희석하여 포트당 10ml살포

마. 처리내용

시험 천적	제형	유효 개체수 (마리/제품)	방제효과 시험		피해시험 기준량 (해충:천적)	의뢰기관
			희석배수 및 사용량	처리시기		
곤충병원성 선충(디디케이- 에스) 무처리	병	2×10 ⁷ IJs/1 통 50g	4,000 배	포트에 해충 접종 후 10ml살포	4,000 배	대동테크

바. 경종 개요: 딸기는 직경 11cm pot에 두고 실험하였으며, 사전 약제 처리가 없었음.

사. 시험구 배치 및 소요면적 : 난괴법 3반복

구분	처리수	반복수	총구수	구당면적	소요면적	총소요면적
방제효과	2	3	6	2주	12주	18주
작물피해				1주	6주	

아. 천적 방사 전후 환경 조건

월/일	최고/최저온도℃	평균 온도℃	상대습도	광주기
5/4	25℃/22℃	24℃	65%	16L:8D
5/5	25℃/22℃	24℃	65%	16L:8D
5/6	25℃/22℃	24℃	65%	16L:8D

3. 조사방법

구분	조사 항목	조사 횟수	조사 일자	조사 방법
방제 효과	해충 생충율	2회	처리전 7일차 (5월 12일)	천적 처리 전 및 7일 후 딸기 유묘 뿌리 및 토양에서 생존한 작은뿌리파리 밀도 조사
작물 피해	외관상 피해유무	3회	3일차 (5월 8일) 5일차 (5월 10일) 7일차 (5월 12일)	천적 처리 3일, 5일, 7일 후 외관상 피해 여부 조사

4. 시험성적

가. 방제 효과 시험

○ 딸기 작은뿌리파리에 대한 곤충병원성선충 제품의 방제 효과 [천적처리 후 7일차]

시험천적	천적 처리전밀도	해충 발생 및 피해 정도(생충율)				유의차 (DMRT)	방제가 (%)
		I 반복	II 반복	III 반복	평균		
곤충병원성선충(디 디케이-에스)	50	10.0	20.0	15.0	15.0	b	84.0
무처리	50	90.0	95.0	95.0	93.3	a	-

C.V. (%) ----- 53.1

나. 약해 시험(처리 3일, 7일 후)

시험천적	시험작물	약해정도 0-5	비고
곤충병원성선충 (디디케이-에스)	딸기	0	

5. 결과 요약

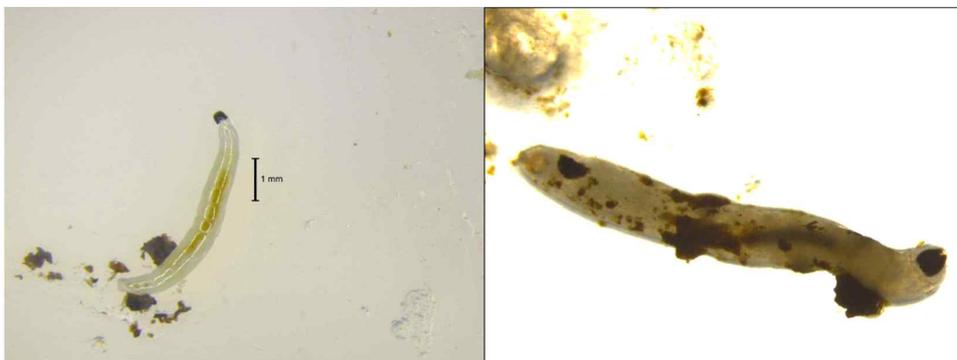
가. 방제 효과

작은뿌리파리 유충 방제 시험에서 곤충병원성선충(디디케이-에스) 제품은 최종 천적 방사 7일후부터 84.0%의 방제효과를 보임.

나. 작물 피해

딸기작물에 대한 피해 없음.

다. 작은뿌리파리 사진



정상적인 작은뿌리파리

선충에 감염된 작은뿌리파리

6. 시험담당자 의견

본 연구 시험 담당자의 소견으로 곤충병원성선충(디디케이-에스) 제품은 딸기작물에 서식하는 환경조건에 따라서 작은뿌리파리 유충을 방제 가능성이 확실히 인정됨.

충남대학교 농업생명과학대학 유용만 (인)



제 2절 고살충성 곤충병원성 선충 고체배양을 위한 공생미생물 최적 배양 조건 확립

I. 고살충성 유도 곤충병원성 선충과 공생미생물 배양조건 확립

I-1. 곤충병원성 선충에 공생하는 공생내생세균 확보

- 곤충병원성 선충에 공생하는 공생내생세균으로는 *Photorhabdus*와 *Xenorhabdus*가 있으며, *Photorhabdus*는 *Heterorhabditidae* family에 속하는 entomopathogenic 선충의 장에 서식하며, *Xenorhabdus*는 *Steinernema* 속 entomopathogenic 선충의 장에서 서식한다. *P. luminescens*와 *Xenorhabdus*는 곤충에 대한 치명적인 세균들이다.
- *P. luminescens*는 곤충병원성 선충이 곤충을 감염 시키면 *P. luminescens*가 혈류로 방출되어 고 분자량 살충 단백질 복합체 Tca와 같은 독소를 생성하여 곤충 숙주를 48 시간 이내에 빠르게 죽이게 되며, 또한 단백질 독소를 생성하기도 한다. 곤충병원성 선충과 공생하는 *P. luminescens* 감염된 곤충의 몸을 분해하고 선충과 박테리아가 사용할 수있는 영양소로 생물 전환시키는 효소를 분비하기에, 이 두 공생관계의 생명체는 번식하기에 충분한 영양소를 얻고, 또한 먹이의 영양분을 다 먹어치우기 전에 선충 자손으로 들어가 이동하게 된다.
- 곤충병원성 선충에 고살충성을 유도하기 위하여, 국내 KCCM (Korean Culture Center of Microorganisms)과 KACC (Korean Agricultural Culture Collection)로부터 공생내생세균들을 분양하여 계대 배양하였다 (표 1).
- 대동테크에서 산업화 중인 곤충병원성 선충에서 분리된 공생내생세균을 16S gene sequencing하여 이들 공생내생세균들이 (*Xenorhabdus nematophila*, *X. bovienii*, *X. hominickii*, *Photorhabdus temperata*)라는 것을 동정하였다 (그림 1).
- 이들 공생내생세균들을 다양한 배지에 계대배양하고 초저온냉동고에 분주하여 보관중이며, 이들 보관된 균주들을 이용하여 모든 연차에 진행된 실험을 진행하였다 (그림 2).

<표 1. 곤충병원성 선충에서 분리되었거나 분양을 통해 확보된 공생내생세균들>

Sample no.	내생공생세균 분리 기주 선충	공생내생세균	분양 또는 분리기관	Stock no.
1	-	<i>Xenorhabdus beddingii</i>	KCCM	40877
2	-	<i>Xenorhabdus nematophila</i>	KACC	12145
3	-	<i>Photorhabdus luminescens</i>	KACC	12123
4	-	<i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>luminescens</i>	KACC	12254
5	-	<i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>kayaii</i>	KACC	11928
6	-	<i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>laumondii</i>	KACC	12283
7	<i>Steinernema carpocapsae</i>	<i>Xenorhabdus nematophila</i>	대동테크	-
8	<i>Steinernema glaseri</i>	<i>Xenorhabdus bovienii</i>	대동테크	-
9	<i>Steinernema monticolum</i>	<i>Xenorhabdus hominickii</i>	대동테크	-
10	<i>Heterorhabditis megidis</i>	<i>Photorhabdus temperata</i>	대동테크	-

- KCCM: Korean Culture Center of Microorganisms
- KACC: Korean Agricultural Culture Collection

Sequences producing significant alignments:		Score	E	Sequences producing significant alignments:		Score	E
		(bits)	Value			(bits)	Value
ref NR_102822.1	Xenorhabdus nematophila strain ATCC 19061...	2337	0.0	ref NR_042820.1	Xenorhabdus bovienii strain DSM 4756 16S r...	2336	0.0
ref NR_119150.1	Xenorhabdus nematophila strain DSM 3370 16...	2269	0.0	ref NR_119151.1	Xenorhabdus bovienii strain DSM 4756 16S r...	2334	0.0
ref NR_042821.1	Xenorhabdus nematophila strain DSM 3370 16...	2265	0.0	ref NR_115574.1	Xenorhabdus bovienii strain ATCC 35271 16S...	2315	0.0
ref NR_115575.1	Xenorhabdus nematophila strain ATCC 19061...	2262	0.0	ref NR_074332.1	Xenorhabdus bovienii SS-2004 strain SS-200...	2307	0.0
ref NR_042823.1	Xenorhabdus szentirmai strain DSM 16338 16...	2256	0.0	ref NR_043545.1	Xenorhabdus maulenii strain VCO1 16S ribo...	2310	0.0
ref NR_105326.1	Xenorhabdus magdalenensis strain IM1 39777...	2309	0.0	ref NR_043537.1	Xenorhabdus koppenhoferi strain USNJ01 16...	2305	0.0
ref NR_043545.1	Xenorhabdus maulenii strain VCO1 16S ribo...	2327	0.0	ref NR_023012.1	Photobacterium temperata subsp. thracensis s...	2357	0.0
ref NR_119153.1	Xenorhabdus beddingii strain DSM 4764 16S...	2312	0.0	ref NR_023011.1	Photobacterium luminescens subsp. kavalii str...	2342	0.0
ref NR_043544.1	Xenorhabdus miraniensis strain GI 16S ribo...	2306	0.0	ref NR_119154.1	Pectobacterium wasabiae strain CF89 3304 1...	2334	0.0
ref NR_042822.1	Xenorhabdus beddingii strain DSM 4764 16S...	2302	0.0	ref NR_023339.1	Photobacterium luminescens subsp. akhurstii...	2294	0.0
ref NR_043542.1	Xenorhabdus doucetiae strain FRM16 16S rib...	2498	0.0	ref NR_023570.1	Photobacterium luminescens subsp. laumondii...	2284	0.0
ref NR_042945.1	Xenorhabdus cabanillasii strain USTX62 16S...	2472	0.0	ref NR_074331.1	Rahnella aquatilis HK2 strain HK2 16S ribo...	2363	0.0
ref NR_119152.1	Xenorhabdus poinarrii strain DSM 4768 16S r...	2452	0.0	ref NR_112705.1	Photobacterium luminescens subsp. laumondii...	2274	0.0
ref NR_115573.1	Xenorhabdus beddingii strain DSM 4764 16S...	2453	0.0	ref NR_115191.1	Photobacterium luminescens subsp. laumondii...	2274	0.0
ref NR_074332.1	Xenorhabdus bovienii SS-2004 strain SS-200...	2452	0.0	ref NR_115239.1	Pectobacterium wasabiae strain CF89 3304 1...	2270	0.0
ref NR_043534.1	Xenorhabdus stockiae strain TH01 16S ribos...	2440	0.0	ref NR_104305.1	Ewingella americana strain CIP 81.94 16S r...	2270	0.0
ref NR_114385.1	Xenorhabdus indica strain 28 16S ribosome...	2420	0.0	ref NR_044412.1	Photobacterium temperata subsp. cinerea str...	2258	0.0
ref NR_043547.1	Xenorhabdus romanii strain PR06-A 16S ribo...	2415	0.0	ref NR_025341.1	Serratia proteamaculans strain DSM 4543 16...	2252	0.0
ref NR_027194.1	Xenorhabdus japonica strain 3K-1T 16S ribo...	2407	0.0	ref NR_116398.1	Hafnia paralvei strain ATCC 29827 16S ribo...	2260	0.0
ref NR_025375.1	Xenorhabdus poinarrii strain GI 16S ribosom...	2392	0.0	ref NR_116513.1	Photobacterium luminescens subsp. caribbean...	2252	0.0

Sequences producing significant alignments:		Score	E	Sequences producing significant alignments:		Score	E
		(bits)	Value			(bits)	Value
ref NR_043548.1	Xenorhabdus hominickii strain KE01 16S rib...	2355	0.0	ref NR_023877.1	Photobacterium temperata strain XINach 16S r...	2273	0.0
ref NR_117381.1	Xenorhabdus khoisanse strain SF87 16S ribo...	2353	0.0	ref NR_115192.1	Photobacterium temperata subsp. kharii strai...	2263	0.0
ref NR_043547.1	Xenorhabdus koppenhoferi strain USNJ01 16...	2317	0.0	ref NR_074318.1	Photobacterium asymbiotica 16S ribosomal RNA...	2236	0.0
ref NR_115713.1	Xenorhabdus vietnamensis strain VN01 16S r...	2291	0.0	ref NR_023012.1	Photobacterium temperata subsp. thracensis s...	2236	0.0
ref NR_043536.1	Xenorhabdus inxeki strain DSM 16336 16S rib...	2291	0.0	ref NR_050774.1	Photobacterium luminescens strain Hb 16S rib...	2200	0.0
ref NR_043534.1	Xenorhabdus stockiae strain TH01 16S ribos...	2255	0.0	ref NR_115190.1	Photobacterium luminescens strain Hb 16S rib...	2204	0.0
ref NR_042827.1	Xenorhabdus ehlersii strain DSM 16337 16S...	2259	0.0	ref NR_115332.1	Photobacterium luminescens strain ATCC 25693...	2215	0.0
ref NR_043544.1	Xenorhabdus miraniensis strain GI 16S ribo...	2257	0.0	ref NR_023571.1	Photobacterium asymbiotica strain 3B5-8 16S...	2244	0.0
ref NR_042826.1	Xenorhabdus budapestensis strain DSM 16342...	2251	0.0	ref NR_044411.1	Photobacterium temperata subsp. cinerea str...	2215	0.0
ref NR_114385.1	Xenorhabdus indica strain 28 16S ribosome...	2204	0.0	ref NR_115572.1	Photobacterium luminescens strain ATCC 25699...	2215	0.0
ref NR_104767.1	Protus hauseri strain DSM 14437 16S ribos...	2496	0.0	ref NR_116000.1	Photobacterium temperata subsp. stackebrandt...	2201	0.0
ref NR_119150.1	Xenorhabdus nematophila strain DSM 3370 16...	2496	0.0	ref NR_023870.1	Photobacterium luminescens subsp. laumondii...	2207	0.0
ref NR_117215.1	Xenorhabdus ishikashii strain GD07 16S rib...	2484	0.0	ref NR_112705.1	Photobacterium luminescens subsp. laumondii...	2209	0.0
ref NR_043546.1	Xenorhabdus kozodoli strain Sav 16S ribos...	2475	0.0	ref NR_115191.1	Photobacterium luminescens subsp. akhurstii...	2207	0.0
ref NR_027194.1	Xenorhabdus doucetiae strain FRM16 16S rib...	2444	0.0	ref NR_023011.1	Photobacterium luminescens subsp. kavalii str...	2205	0.0
ref NR_043542.1	Xenorhabdus miraniensis strain GI 16S ribo...	2440	0.0	ref NR_023333.1	Photobacterium asymbiotica strain 3B0232 16...	2201	0.0
ref NR_114419.1	Protus mirabilis strain ATCC 29936 16S rib...	2439	0.0	ref NR_118470.1	Photobacterium luminescens subsp. kharii str...	2207	0.0
ref NR_074599.1	Protus mirabilis HI4320 strain HI4320 16S...	2439	0.0	ref NR_116399.1	Photobacterium temperata subsp. tasmanensis...	2205	0.0
ref NR_113544.1	Protus mirabilis strain JCM 1659 16S ribo...	2420	0.0	ref NR_109602.1	Photobacterium luminescens subsp. neonieput...	2249	0.0
ref NR_043533.1	Coscinusa myxofaciens strain NCIM 13273 1...	2413	0.0				

그림 1. 대동테크에서 분리된 공생내생세균의 16S gene sequencing을 통한 세균종 동정

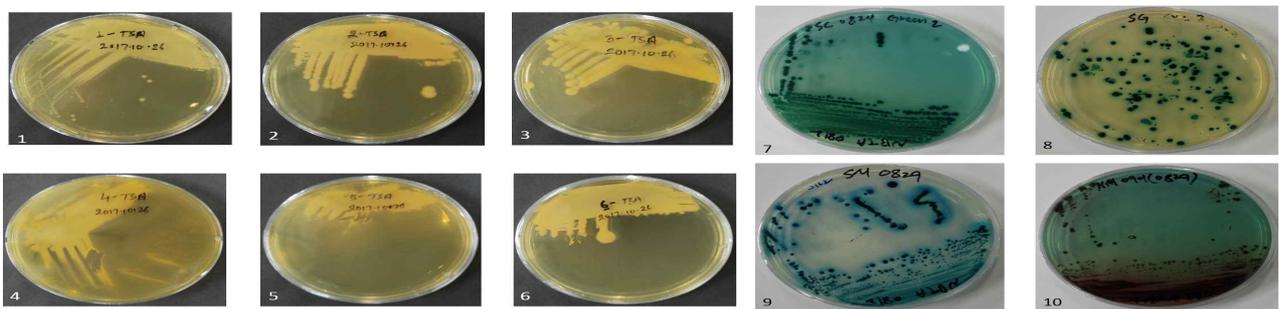


그림 2. 분양, 분리된 내생세균 TSA media(1~6번 균주) 또는 NBTA71 media (7~10번 균주) 성장 모습

- 대동테크에서 산업화 중인 곤충병원성 선충에서 분리된 공생내생세균을 16S rRNA sequencing 연구를 실행하여 이들 공생내생세균들이 *X. nematophila*, *X. bovienii*, *X. hominickii*, *Photobacterium temperata*라는 것을 확인하였다. 16S rRNA sequencing은 Xenorhabdus와 Photobacterium를 동정하는데 이용이 되어 왔으며 (Park et al., 1999; Hazir et al., 2004; Lengyel et al. 2005; Somvanshi et al., 2006), 기존 공생내생세균의 16S rRNA sequence가 잘 알려져 있기 때문에 16S rRNA sequencing을 이용하여 확인이 가능하며, 신종을 분류 및 동정하기 위해서는 16S rRNA sequencing과 형태적 특성을 고려한 동정이 필요하다.
- 대동테크에서 산업화 중인 곤충병원성 선충과 공생중인 내생세균은 16S rRNA sequencing 결과, 100% *X. nematophila*, *X. bovienii*, *X. hominickii*, *Photobacterium temperata*의 16S rRNA 유전자와 matching 하는 것으로 판별되었다. 대동테크에서 산업화 중인 *Steinernema carpocapsae*에서 분리된 공생세균의 16S rRNA sequencing 결과 및 기존에 *S. carpocapsae*에서 분리되는 공생세균의 경우 대다수의 경우 *X. nematophila* 라는 결과에 착안하여, 이 공생세균은 *X. nematophila*로 최종 판별하였다. 또한 *Steinernema glaseri*, *Steinernema monticolum*, *Heterorhabditis megidis*에서 분리된 공생세균은 16S rRNA sequencing 결과가 100% 또는 99% *X. bovienii*, *X. hominickii*, *Photobacterium temperata*의 16S rRNA 서열과 일치하였으며, 이러한 세균들이 곤충병원성 선충의 다양한 종에서 존재하는 것을 국외(비공개) 곤충병원성 연구팀과의 협업을 통하여 최종 확인하였다.

I-2. 공생내생세균 최적 배지 확립

- 곤충병원성 선충의 공생내생세균의 최적 성장 조건을 확립하기 위하여, *Steinernema glaseri*에서 분리된 *Xenorhabdus bovienii*를 이용하여 기존에 알려진 공생내생세균 및 세균 배지 6종(표 2)을 조성한 후 *X. bovienii*를 배양하여 이들의 성장을 관찰하였다.

<표 2. 공생내생세균을 배양하기 위해 조성된 배지 및 성분>

Media	Chemicals	Percentage
LB	Tryptone	1
	NaCl	0.5 (low LB, LLB)
		1 (high LB, HLB)
	Yeast extract	0.5
NB	Beef extract	0.3
	Peptone	0.5
YNB	Yeast extract	0.5
	Beef extract	0.3
	Peptone	0.5
TSB	Pancreatic digest of Casein	1.7
	Papaic digest of soybean	0.3
	Dextrose	0.25
	NaCl	0.5
	K ₂ HPO ₄	0.25
5YS	Yeast extract	5
	NaCl	0.5
	K ₂ HPO ₄	0.05
	NH ₄ H ₂ PO ₄	0.05
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.02

- 총 48시간의 배양기간 동안, LLB, HLB, TSB, 5YS 배지에서 에서 공생내생세균의 생장이 빠른 것으로 나타났다. (그림 3).

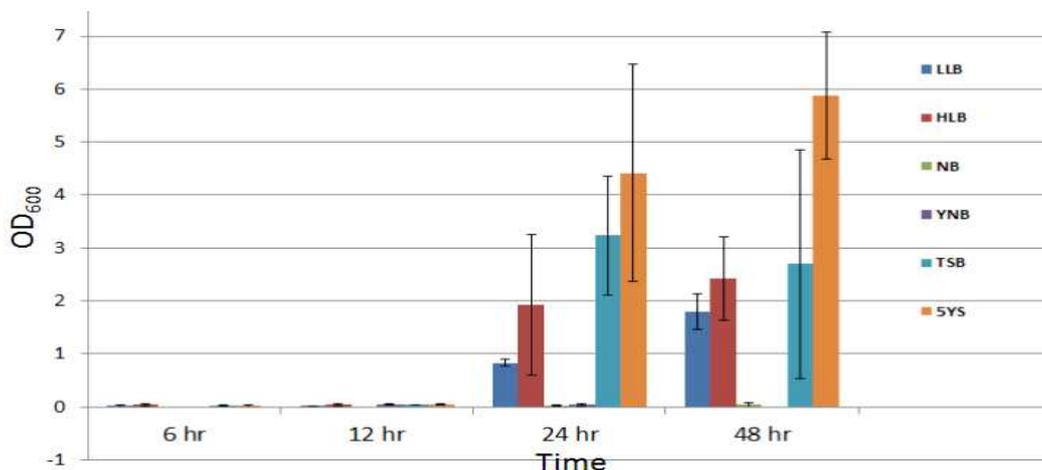


그림 3. 총 48시간의 배양 기간동안 6가지 다른 배지에서 *Xenorhabdus bovienii* 자라는 성장 속도

○ *Xenorhabdus bovienii*가 가장 잘 자라는 배지인 TSB, 5YS 배지를 이용하여, 표 1에 기술되어 있는 공생내생세균을 배양했을 때, 5YS 배지에서는 *Xenorhabdus nematophila*, *X. hominickii*가 잘 자라지 못하였으나, TSB 배지에서는 모든 공생내생세균들이 잘 자라는 것을 관찰하였다 (그림 4). 성장속도에서는 5YS가 최적의 배지이나, TSB배지에서는 모든 공생내생세균들을 배양 가능한 것을 확인하였다.

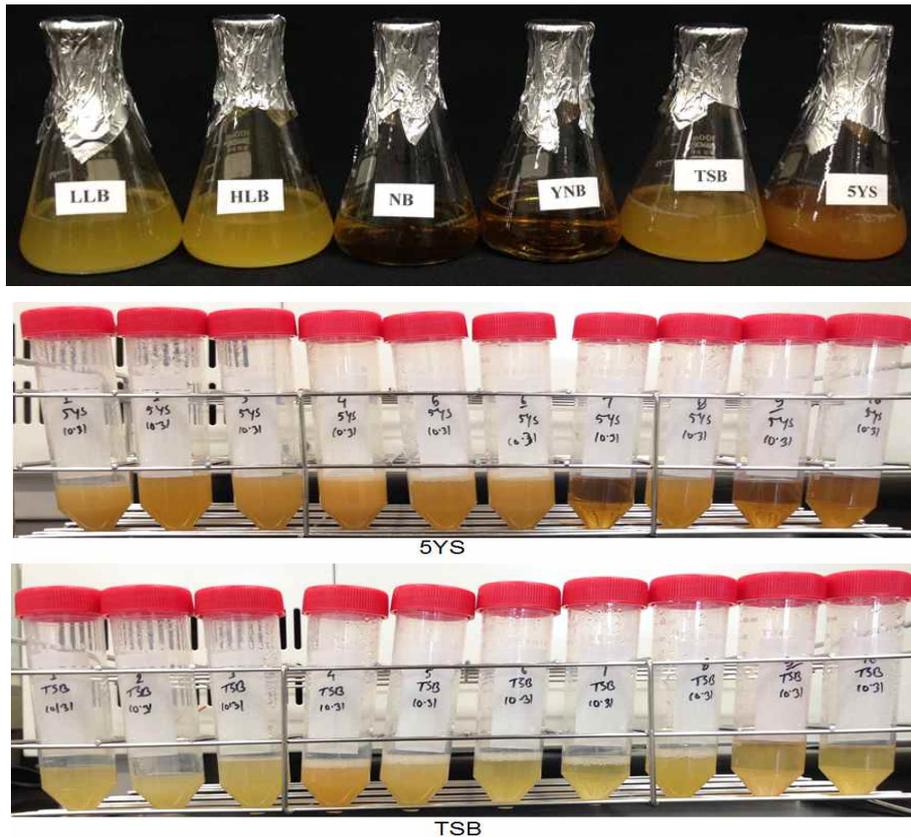


그림 4. 총 48시간의 배양기간 동안 6가지 다른 배지에서 *Xenorhabdus bovienii* 배양 (위). 분양된 10종의 공생내생세균이 5YS 배지 (중간) 또는 TSB 배지 (아래)에서 배양 속도를 확인

I-3. 공생내생세균 성장에서 염 (NaCl)의 효능 및 TSB 배지 혼용을 변화

○ NB 및 YNB 배지에서는 공생내생세균의 생장이 잘 되지 않았으나, 다른 배지인 LLB, HLB, TSB, 5YS에서 생장이 잘 되는 것은, NB, YNB 배지에서 a. 염 (Salt)의 함유가 없음, 또는 b. Beef extract가 함유되어 있기 때문에 이들 배지에서 생장이 잘 안될 수 있는 것으로 추정되어졌다. 그러기에 NB에 다른 농도의 salt를 포함한 배지를 만들어 공생내생세균의 성장을 확인하였으며, 이 때 만들어진 배지의 조성은 다음과 같다.

- NB0: Original NB media (no NaCl)
- NB1: NB media with 0.5% NaCl
- NB2: NB media with 1% NaCl
- TSB0: Original TSB media (1.7% tryptone, pancreatic digest of casein)
- TSB1: TSB media with 3.4% tryptone
- TSB2: TSB media with 5.1% tryptone

○ 공생내생세균은 비교를 위하여, 다음과 같이 4종의 공생내생세균들을 이용하였다. *Xenorhabdus beddingii* (SB1), *Xenorhabdus nematophila* (SB2), *Photorhabdus luminescens* (SB3), *Photorhabdus luminescens* subsp. *luminescens* (SB4).

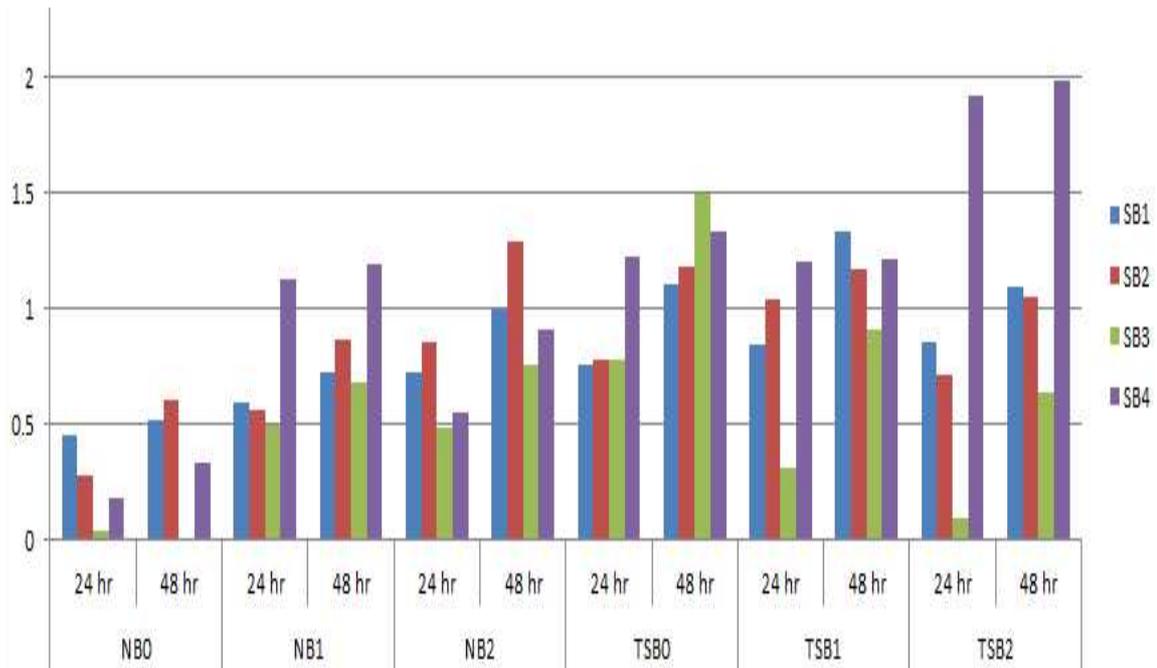


그림 5. 총 48시간의 배양기간 동안 NaCl 함유량이 다른 NB media 또는 tryptone 함유량이 다른 TSB media에서 4종의 공생내생세균의 성장 속도

- 공생내생세균들은 배지에 포함된 염과 성장 비교 실험에서, NB2 (1% NaCl가 첨가됨) 배지에서 상대적으로 높은 성장을 보였는데, 이러한 결과는 NB 배지에서 Beef extract 첨가가 공생내생세균 성장을 억제하는 것이 아니라, NaCl이 함유된 배지에서 공생내생세균들의 성장이 높은 것으로 확인되었다.
- 공생내생세균들이 TSB에 포함된 tryptone 함량에 따른 성장을 비교하기 위한 실험에서, 공생내생세균 대부분은 1.7% tryptone이 함유된 배지에서 성장이 가장 왕성하기에, TSB 배지를 사용하는 것이 적당하며, *Photorhabdus luminescens* subsp. *luminescens* (SB4)를 배양할 때는 5.1% tryptone이 함유된 배지가 성장에 가장 적당한 것을 확인하였다.
- 이러한 실험들의 결과로, 공생내생세균들을 배양할 경우, NaCl의 함량을 높게 유지 (약 1%)하는 배지가 공생내생세균 배양에 유리한 것이 확인되었다.

I-4. 공생내생세균 장기 저장 조건 확립

- 공생내생세균이 가장 잘 자라는 조건인 TSB, 5YS배지를 이용하여, 세균보존에 가장 많이 이용되는 glycerol과 DMSO를 다른 농도로 첨가하여, 2주 또는 4주간 초저온냉동고에서 보관한 후에, 생존률을 조사하였다.
- 사용한 공생내생세균은 *Xenorhabdus bovienii* 을 이용하여, glycerol 최종농도 10, 20, 30, 36 % 및 DMSO 최종농도 5, 10, 20, 30%를 이용하여 공생내생세균을 초저온냉동고에 2주간 보관하였고 이들의 성장속도를 그림 6에 나타내었다. 그림 7의 경우 초저온냉동고에 4주간 보관한 후, 성장속도를 나타내었다.

Bacteria growth after second week of stock

Bacterial growth in 5YS media

Sample no	Glycerol (%)	24 hr	48 hr	72 hr
1	10	0.51	2.32	5.81
2	20	0.67	2.71	5.61
3	30	0.60	2.61	6.01
4	36	0.57	3.22	4.57
	DMSO (%)			
9	5	0.44	2.42	4.57
10	10	0.49	1.73	4.91
11	20	0.45	2.54	5.37
12	30	0.60	2.90	5.53

Bacterial growth in TSB media				
Sample no	Glycerol (%)	24 hr	48 hr	72 hr
5	10	0.50	0.04	0.06
6	20	0.22	0.08	1.16
7	30	0.28	0.05	0.15
8	36	0.33	0.16	3.07
	DMSO (%)			
13	5	0.39	0.05	0.05
14	10	0.61	0.06	0.12
15	20	0.33	0.07	0.62
16	30	0.39	0.08	0.08

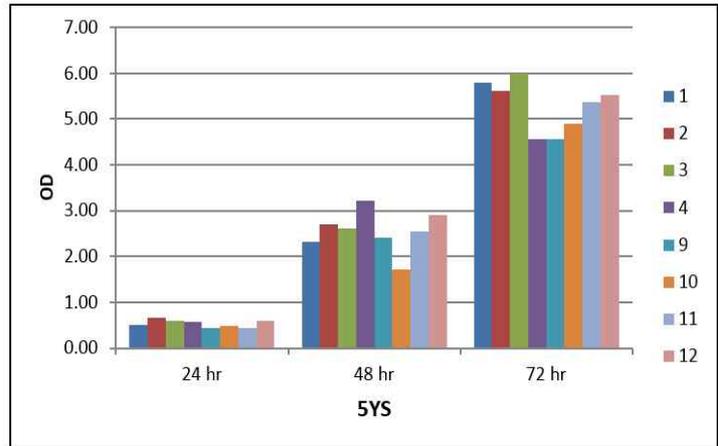


Fig. 1 Bacterial growth in 5YS media

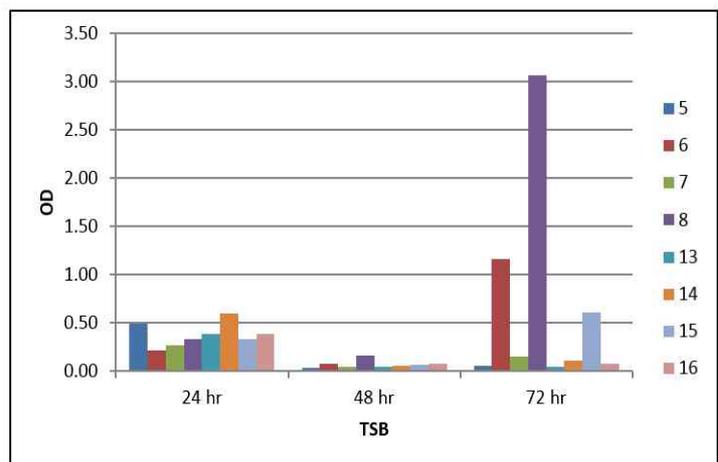


Fig. 2 Bacterial growth in TSB media

그림 6. 5YS 배지 또는 TSB 배지에서 길러진 공생내생세균을 glycerol 또는 DMSO의 다양한 농도로 혼합한 후 초저온냉동고에 2주 보관후의 성장 속도

- 2주간 deep freezer에 보관 후, 5YS 배지에 보관한 공생내생세균 *Xenorhabdus bovienii*은 glycerol 및 DMSO의 다양한 농도에서도 다시 성장을 왕성하게 하는 것으로 나타났다 (Fig. 1. Bacterial growth in 5YS media). 그러나 TSB 배지에서는 glycerol 36%로 섞어서 보관했을 경우, 초저온냉동고에 2주간 보관 후 활발한 성장을 보이는 것으로 확인되었다.

Bacteria growth after fourth week of stock

Bacteria growth in 5YS media				
Sample no	Glycerol (%)	24 hr	48 hr	72 hr
1	10	0.055	0.025	2.71
2	20	0.025	0.03	1.25
3	30	0.005	0.075	1.16
4	36	0.0258	0.025	0.035
	DMSO (%)			
9	5	0.035	0.035	0.05
10	10	0.02	0.02	0.085
11	20	0.045	0.045	0.055
12	30	0.005	0.05	0.055
Bacterial growth in TSB media				
Sample no	Glycerol (%)	24 hr	48 hr	72 hr
5	10	0.145	2.105	2.445
6	20	0.055	0.025	2.09
7	30	0.065	0.035	0
8	36	0.05	0.02	0.005
	DMSO (%)			
13	5	0.075	2.07	2.61
14	10	0.055	0.115	1.155
15	20	0.065	0.005	0.005
16	30	0.06	0.02	1.115

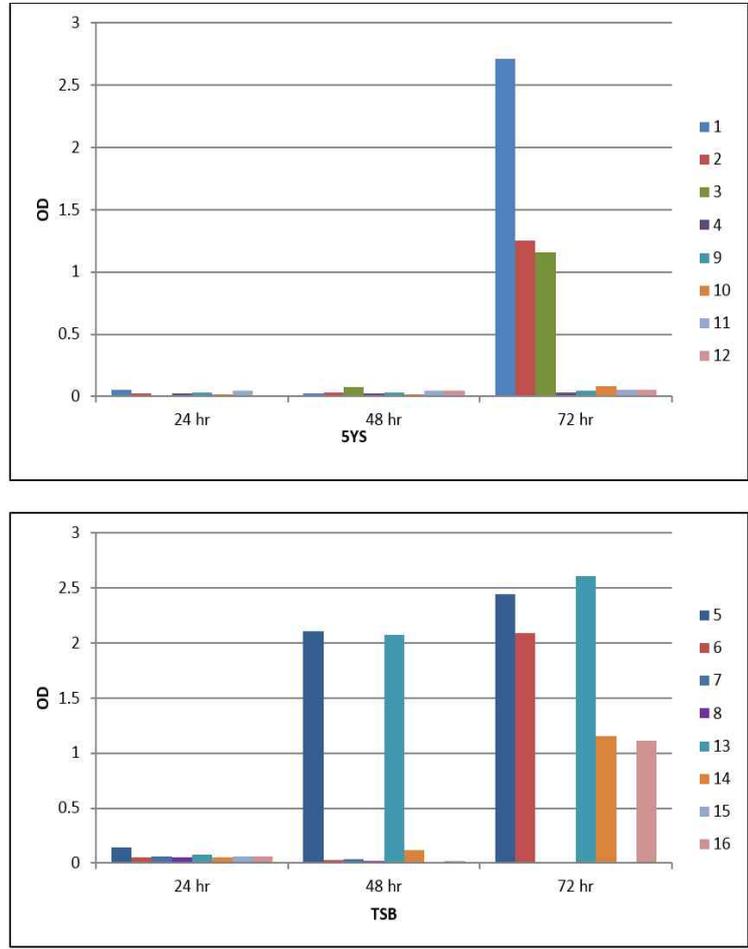


그림 7. 5YS 배지 또는 TSB 배지에서 길러진 공생내생세균 *Xenorhabdus bovienii*을 glycerol 또는 DMSO의 다양한 농도로 혼합한 후 4주후 성장 속도 확인

- 4주간 deep freezer에 보관후, 5YS 배지에 보관한 공생내생세균 *Xenorhabdus bovienii*은 glycerol 보관에서는 상대적으로 높은 회복 및 성장을 보이나, DMSO를 혼합하여 보관할 경우 회복 및 생장이 매우 낮은 것으로 확인되었다 (그림 7).
- TSB 배지에 배양을 한 경우에, 4주간 deep freezer에 보관 후에는 glycerol 10%, 20%에서 높은 회복 및 성장을 보이며, 또한 DMSO 5%를 혼합하여 보관할 경우에 회복 및 생장이 높았다 (그림 7).
- 2주 및 4주 결과를 분석하면, deep freezer에 장기 보관할 경우, 5YS 배지가 TSB 배지보다 공생내생세균의 회복 및 성장에 유리하며, 특히 상대적으로 낮은 농도 (10%)의 glycerol 보관이 가장 유리한 것으로 나타났다.
- 본 실험에 있어 2주, 4주간 결과들이 결과가 편차가 있기 때문에, 최소 3개월 이상의 장기보관 후 회복 및 성장을 분석하는 것이 필요할 것으로 사료된다. 특히 곤충병원성 선충에는 기주에 따른 다양한 종의 공생내생세균들이 있으며 이들이 선호하는 배지 및 배양 조건이 달라지기에, 산업화에 가장 적합한 공생내생세균들을 이용하여 이들 세균들의 장기보관 조건을 탐색하는 것이 필요하다.

II. 고살충성 유도 곤충병원성 선충내 공생미생물 배양조건 확립

II-1. 연구의 배경

- 2010년에 출간된 Crawford et al. (2010) Regulating alternative lifestyles in entomopathogenic bacteria. Curr Biol. 20: 69 에 의하면, 곤충병원성 선충에 공생하는 세균인 *Xenorhabdus*와 *Photorhabdus* 들은 고살충성을 유도하기 위해서는 높은 농도의 L-proline이 요구된다고 기술하였다. 이러한 고농도의 L-proline은 곤충 유충의 hemolymph에서도 발견된다.



그림 1. 곤충병원성선충과 공생세균과의 상호작용에서 M-form (mutualism form) 세균이 선충에서 상호작용이 있으며, P-form (pathogenicity-form) 세균은 감염 곤충 유충에서 나타난다.

- *Photorhabdus*와 *Xenorhabdus*에 속하는 박테리아는 곤충병원성 선충류가 곤충 유충을 기생할 수 있게 하는 삼자 공생에 참여한다. 이들 공생세균의 곤충병원성 선충류의 소화관에 평화롭게 머무는 공생 상태 (M-form)에서, 살충 독소를 생산하는 경로, 소비를 위해 곤충을 분해하는 효소를 분해하는 경로, 박테리아와 곰팡이 경쟁자를 피할 수 있는 항생제가 활성화되는 P-form 라이프 스타일로 전환하게 된다. 특히 1) 공생세균에서 항생제 생산을 유발하는 분자 신호는 무엇인가? 2) 신호에 의해 규제되는 작은 분자는 무엇입니까? 3) 박테리아가 신호를 어떻게 인식합니까?에 대한 질문에서 *Photorhabdus luminescens* TT01과 *Xenorhabdus nematophila*의 대사체 프로파일링을 통하여, 곤충의 체액에서 L-proline이 세균의 대사체 변화를 일으키는 것으로 나타났다. 특히 병독성 및 항생제에 중요한 것으로 알려진 작은 활성 물질들은 L- 프롤린에 의해 극적으로 상향 조절되어 숙주 환경에 대한 인식을 박테리아 대사 조절에 연결시키게 된다. L-프롤린에 의해 유도 된 신호 전달 경로를 확인하기 위해 *P. luminescens* TT01에서 프롤린 운반체 putP와 proU를 삭제하여, 프롤린의 역할에 대해 연구한 결과, 세균에서 L- 프롤린의 획득이 대사 변화를 조절하고 독성 및 항생제 생산에 영향을 미치는 하류 세균 경로를 궁극적으로 조절하는 박테리아 양성자 동력 (PMF)을 유지하게 하는 것을 밝혀내었다.
- 형태적 성장 효과를 알아보기 위하여, *P. luminescens*와 *X. nematophila* 단일 콜로니를 선택하여 LB에서 30°C에서 2 일 동안 성장시키고, 30 uL의 현탁액을 bromotymol blue와 TTC를 함유한 한천 평판에 다양한 농도의 염들을 이용하여 실험하였다. 소금 효능 실험 (2g 트립톤, 5g 효모 추출물 및 1L 당 0, 10 또는 35g NaCl) 및 소르비톨 실험 (1 L에 2 g 트립톤 및 5 g 효모 추출물과 750 mM sorbitol)을 위해 다양한 조성을 배지를 만들고 30°C에서 3-5 일 동안 성장시켰을 때, *P. luminescens* and *X. nematophila*가 자라게 되는 곤충의 hemolymph를 조사해보니 높은 농도로 L-proline이 존재하는 것을 확인할 수 있었다.
- 또한 공생세균의 대사체에서 곤충 헤모림프에서 분리한 유도 인자를 첨가했을 때 생성되는 대사체와 L-Proline을 첨가했을때의 NMR spectra가 거의 동일하게 나타나는 것을 확인하였다.

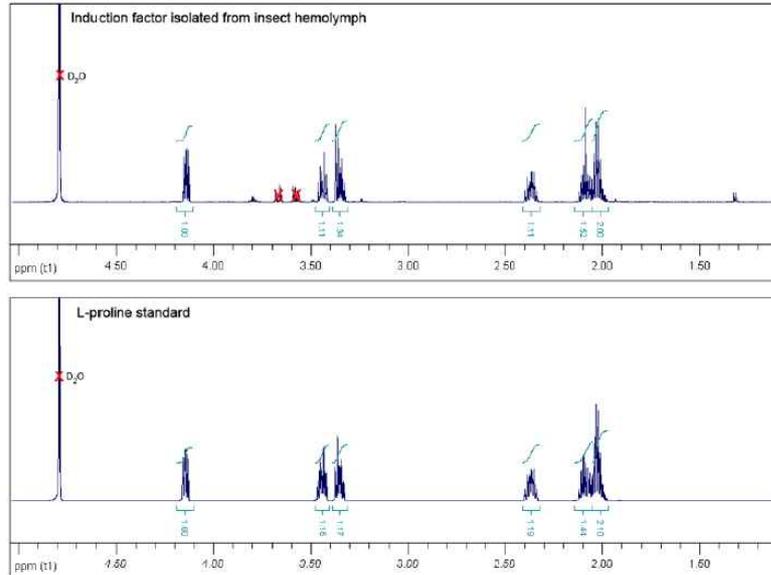


그림 2. 곤충의 hemolymph에서 분리된 공생세균의 대사체 유도 물질이 L-Proline과 일치함을 나타내는 ^1H NMR 분석결과

<표 1. 곤충 hemolymph와 배지 control에서의 free amino acid의 mM 농도>

<i>Galleria mellonella</i>						<i>Zophobus morio</i>						<i>Tenebrio molitor</i>					
	1	2	3	Avg.	Std.dev.		1	2	3	Avg.	Std.dev.		1	2	3	Avg.	Std.dev.
Ala	27.0	29.8	32.4	29.8	2.7	Ala	4.71	5.68	7.32	5.90	1.3	Ala	6.27	4.85	3.90	5.01	1.2
Arg	5.15	6.97	6.60	6.24	1.0	Arg	3.79	3.27	3.78	3.60	0.3	Arg	2.89	2.44	1.89	2.41	0.5
Asn	4.95	5.20	6.99	5.71	1.1	Asn	0.00	2.96	0.55	1.17	1.6	Asn	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0
Asp	0.47	0.53	0.51	0.50	0.0	Asp	0.00	0.74	1.02	0.59	0.5	Asp	2.96	1.91	1.77	2.21	0.7
Cys	0.41	0.42	0.40	0.41	0.0	Cys	0.42	0.38	0.44	0.41	0.0	Cys	0.61	0.54	0.55	0.57	0.0
Glu	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	Glu	0.20	1.92	2.91	1.67	1.4	Glu	11.6	9.25	8.50	9.78	1.6
Gln	94.8	98.6	106.0	99.8	5.7	Gln	31.6	18.5	38.4	29.5	10.1	Gln	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0
Gly	16.8	20.8	26.1	21.2	4.6	Gly	2.46	2.16	2.57	2.39	0.2	Gly	6.21	4.78	4.72	5.23	0.8
His	9.00	8.96	0.00	5.98	5.2	His	9.14	9.76	9.54	9.48	0.3	His	7.19	6.19	6.39	6.59	0.5
Ile	3.39	3.61	4.17	3.72	0.4	Ile	3.07	2.08	2.58	2.58	0.5	Ile	5.00	4.01	3.70	4.24	0.7
Leu	4.57	4.89	5.92	5.13	0.7	Leu	1.65	2.20	3.14	2.33	0.8	Leu	7.21	5.40	5.09	5.90	1.1
Lys	6.79	7.04	6.18	6.67	0.4	Lys	12.2	12.8	10.8	11.9	1.1	Lys	10.7	9.03	9.13	9.63	1.0
Met	0.85	0.71	1.11	0.89	0.2	Met	0.60	0.19	0.23	0.40	0.3	Met	1.40	1.14	0.99	1.17	0.2
Phe	1.39	1.67	1.86	1.64	0.2	Phe	0.69	1.47	1.70	1.29	0.5	Phe	2.17	1.68	1.65	1.83	0.3
Pro	64.2	79.0	74.7	72.6	7.6	Pro	63.0	54.6	59.4	59.0	4.2	Pro	34.8	28.7	28.9	30.8	3.5
Ser	6.79	7.27	10.2	8.07	1.8	Ser	3.09	3.19	4.60	3.62	0.8	Ser	4.86	4.27	4.30	4.47	0.3
Thr	4.69	4.52	4.94	4.72	0.2	Thr	0.75	1.40	1.69	1.28	0.5	Thr	3.50	2.79	2.66	2.98	0.5
Trp	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	Trp	0.00	1.21	2.87	1.36	1.4	Trp	0.00	0.00	0.00	0.30	0.5
Tyr	1.06	1.06	0.00	0.71	0.6	Tyr	1.64	2.29	2.40	2.11	0.4	Tyr	2.32	1.52	1.38	1.74	0.5
Val	6.44	6.92	8.64	7.33	1.2	Val	4.40	4.37	5.80	4.85	0.8	Val	9.43	6.99	6.67	7.70	1.5

<i>Manduca sexta</i>						Media control					
	1	2	3	Avg.	Std.dev.		1	2	3	Avg.	Std.dev.
Ala	2.37	1.82	2.42	2.20	0.3	Ala	2.34	3.03	3.38	2.92	0.53
Arg	7.02	5.26	7.63	6.63	1.2	Arg	0.61	0.79	0.91	0.77	0.15
Asn	1.60	2.62	3.27	2.50	0.8	Asn	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Asp	0.13	0.00	0.14	0.09	0.1	Asp	0.71	0.91	1.01	0.88	0.15
Cys	0.44	0.45	0.44	0.44	0.0	Cys	0.40	0.47	0.39	0.42	0.04
Glu	0.68	0.00	0.85	0.51	0.4	Glu	2.31	3.01	3.43	2.92	0.57
Gln	10.1	13.6	13.1	12.3	1.9	Gln	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Gly	22.5	26.2	16.8	21.8	4.8	Gly	0.73	0.92	1.00	0.88	0.14
His	11.3	11.8	10.5	11.2	0.6	His	0.00	0.00	0.20	0.07	0.11
Ile	1.53	1.35	1.77	1.55	0.2	Ile	0.94	2.02	1.30	1.42	0.55
Leu	1.31	1.23	1.89	1.48	0.4	Leu	1.75	2.61	2.56	2.30	0.48
Lys	4.59	5.03	5.12	4.91	0.3	Lys	0.89	1.07	1.32	1.09	0.22
Met	1.21	0.86	0.96	1.01	0.2	Met	0.75	1.58	0.78	1.04	0.47
Phe	0.36	0.27	0.72	0.45	0.2	Phe	0.73	0.93	1.12	0.92	0.20
Pro	3.43	2.48	4.48	3.46	1.0	Pro	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Ser	9.28	9.65	7.23	8.71	1.3	Ser	0.97	1.22	1.37	1.18	0.20
Thr	3.12	2.60	2.96	2.89	0.3	Thr	0.78	0.99	1.11	0.96	0.17
Trp	0.00	0.43	0.00	0.14	0.2	Trp	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Tyr	0.00	0.00	1.63	0.54	0.9	Tyr	0.00	0.20	0.24	0.15	0.13
Val	1.56	1.43	2.74	1.91	0.7	Val	1.10	1.46	1.67	1.41	0.29



- 표1에서 *Galleria mellonella*, *Zophobus morio*, *Tenebrio molitor*의 hemolymph에서 proline 함량이 다른 free 아미노산보다 현저히 높은 30- 72 mM 인 것을 확인할 수 있음 (단 *Manduca sexta*에서는 상대적으로 높지 않음).

○ 또한 *P. luminescens* and *X. nematophila*에 L- 또는 D-proline을 첨가했을 때, L-proline에 서만 이들 내생세균들의 성장이 증대되는 것을 발견하였음 (그림 3).

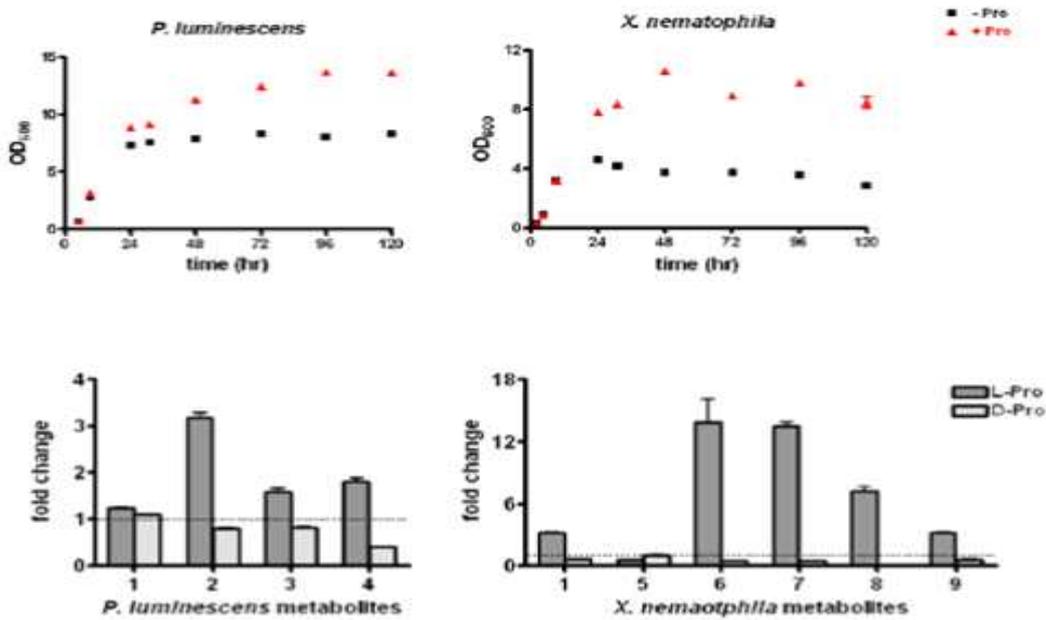


그림 3. *P. luminescens* and *X. nematophila*에 L- 또는 D-proline을 첨가했을 때의 성장곡선

○ *P. luminescens* and *X. nematophila*에서 대표적으로 생산되는 물질들은 아래 그림에서와 같이 다양한 물질들이며, 이러한 물질들은 곤충의 hemolymph 또는 L- proline을 *P. luminescens*와 *X. nematophila*에 첨가했을 때 현격하게 높은 양이 생산되는 것이 관찰됨 (그림 4).

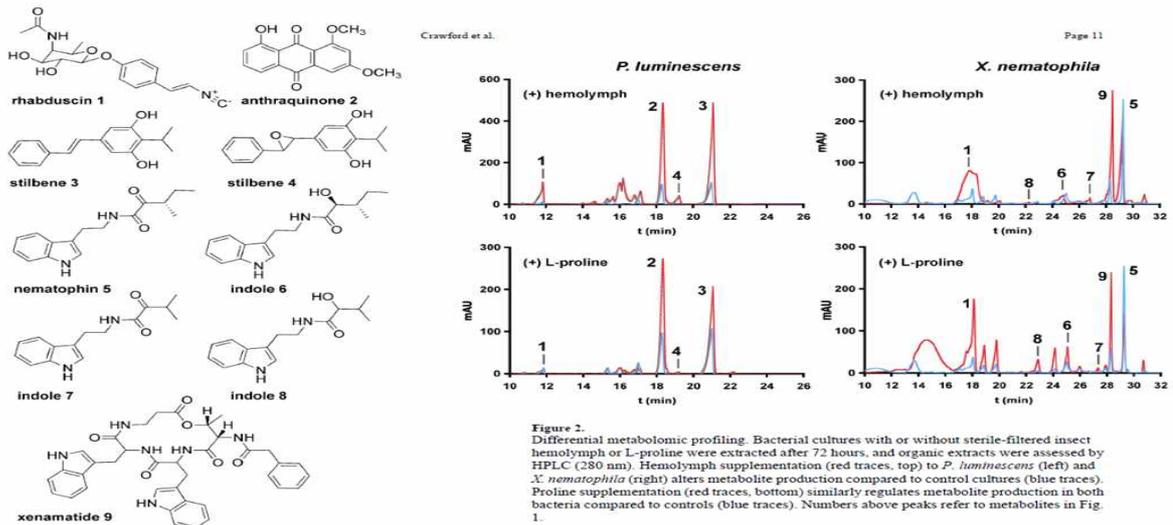


Figure 1. Selected *P. luminescens* (1-4) and *X. nematophila* (1, 5-9) metabolites.

그림 4. *P. luminescens* and *X. nematophila*에 L- 또는 D-proline을 첨가했을 때의 생성되는 물질들

- L-Proline 생합성 대사경로: L-Proline 생성에 있어서, 특히 중요한 전구 물질은 L-glutamic acid이며. 상용화된 화합물이 흔히 우리가 알고 있는 미원 (MSG, monosodium glutamate, sodium salt of glutamic acid임) 이다.

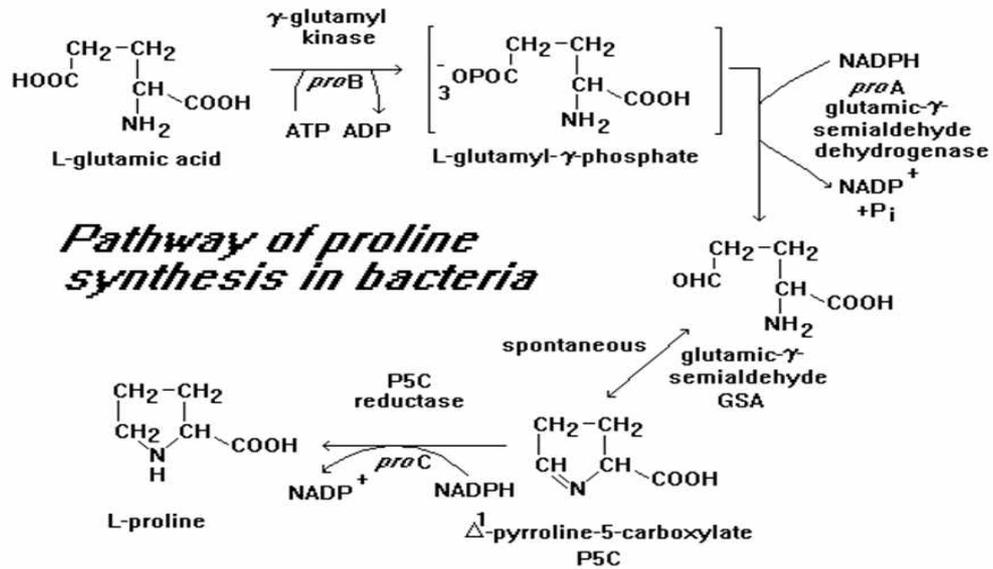


그림 5. Proline 의 생합성 과정. L-glutamic acid이 전구물질로 다양한 효소 반응을 통하여 L-proline이 생성됨

- 또한 L-Proline이 생체 내에서 osmoprotectant 역할을 맡고 있으며, proline betaine, ectoine, glycine betaine 등이 역시 osmoprotectant로 알려져 있다 (그림 6).

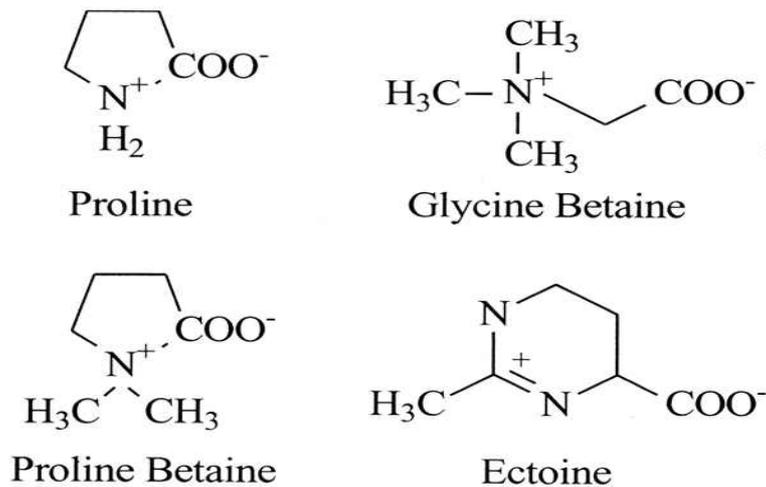


그림 6. Proline 및 생체에서 다양한 osmoprotectant 구조들

II-2. 배지조성에 따른 곤충병원성 선충내 공생세균 배양조건 확립

1. 연구의 목적

곤충병원성선충 공생세균인 *X. nematophila*와 *P. luminescens*를 기존 보고에서 알려져 있는 L-proline에 대한 생장이 증진되는지, 또한 L-proline의 전구체인 미원 (대상그룹 미원, L-glutamic acid 대체)을 첨가하였을 때의 생장을 관찰하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. L-proline 50 mM, MSG 50 mM가 내생세균 생장에 미치는 영향

KCCM 40877 *X. beddingii* (strain 1), KACC 12145 *X. nematophila* (strain 2), KACC12123 *P. luminescens* (strain 3), KACC12254 *P. luminescens* subsp. *luminescens* (strain 4) 를 이용하여, NB 배지에 L-proline 50 mM, MSG 50 mM 로 최종 농도를 보정한 후 공생세균 4종의 25°C 에서 성장 속도를 측정하였다.

2.2. L-proline 50 mM, MSG 50 mM 및 다양한 아미노산류가 내생세균 생장에 미치는 영향

Strain 1 (KCCM *X. beddingii*)과 Strain 4 (KACC *P. luminescens* subsp. *luminescens*)를 이용하여, NB 배지에 아미노산 무첨가 (control), L-proline 50 mM, MSG 50 mM, glycine betaine 50 mM로 최종 농도를 보정한 후, 이들 공생세균들의 25°C에서 성장 속도를 측정하였다.

2.3. NB, LB 배지에 L-proline 50 mM, MSG 50 mM 및 아미노산류가 내생세균 생장에 미치는 영향

Strain 2 (KCCM *X. nematophila*)를 NB 배지와 LB 배지에 아미노산 무첨가 (control), L-proline 50 mM, MSG 50 mM, glycine betaine 50 mM로 최종 농도를 보정한 후, 이들 공생세균들의 25°C에서 성장 속도를 측정하였다. 이때 4일 배양된 배양액 및 공생세균을 ethyl acetate로 추출하여, 그 추출물을 methanol에 25 mg/ml로 녹여서, 식물병원균인 *Xanthomonas citri* cv. *citri*와 다양한 항생제 저항성 변이형에 처리하여 항균 활성을 검정하였다.

표 2. 항균 활성에 이용된 *Xanthomonas citri* cv. *citri* 야생형 및 항생제 저항성 변이형

Species/strain	genotype	abbreviation
<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>		
19-18	wt	<i>XccW1</i>
10-5	wt	<i>XccW2</i>
8-4	Sm ^R <i>rpsL41</i> (K42R in S12)	<i>XccM4</i>
57-2	Sm ^R <i>strB</i> located in Tn5393	<i>XccM6</i>
27-13	Sm ^R double mutant with <i>rpsL41</i> (K42R in S12) and <i>strB</i> located in Tn5393	<i>XccM8</i>

2.4. LB 배지에 L-proline, MSG 농도에 따른 내생세균 성장에 미치는 영향

Strain 2 (*X. nematophila*)에 다양한 농도의 프롤린과 MSG를 첨가 후, 25°C에서 150 rpm의 성장 속도를 측정하였다.

2.5. 대동테크에서 분양받은 Xenorhabdus와 Photorhabdus를 다양한 농도의 L-proline, MSG를 함유한 LB 배지에서 배양 후, 배양액의 살충능 확인

대동테크에서 제품 생산을 위해 배양하고 있는 공생세균 *Xenorhabdus*와 *Photorhabdus*를 10 mM, 50 mM, 200 mM 프롤린, MSG가 함유된 LB 배지에서 25°C에서 150 rpm로 3일 동안 배양하였다. Petri dish에 거름종이를 깔은 다음, (주)에스웍에서 구입한 꿀벌부채명 나방 유충 3마리씩을 넣고 이 유충에 배양액 1 mL씩을 뿌려주고 치사율을 관찰하였다.

2.6. 대동테크에서 분양받은 Xenorhabdus와 Photorhabdus, Strain 2, 4를 다양한 농도의 L-proline, MSG를 함유한 LB 배지에서 배양 후, 배양액의 살충능 확인

대동테크에서 제품 생산을 위해 배양하고 있는 공생세균 *Xenohabdus* 및 *Photohabdus*, Strain 2, Strain 4를 10 mM, 50 mM, 200 mM 프롤린, MSG가 함유된 LB 배지에서 25°C에서 150 rpm로 4일 동안 배양하였다. 펠콘 튜브 50 mL에 배양액 5 mL씩을 넣어준 다음에, (주)에스웍에서 구입한 꿀벌부채명 나방 유충 1마리씩을 넣은 후 바로 꺼내어, 미리 준비된 축축한 거름 종이를 깔은 Petri dish에 3마리씩 놓여진 후 살충력을 조사하였다.

표 3. 살충성 실험에 이용하기 위해 준비된 배양액 번호에 따른 균주와 배지 조성표

	1	2	3	4	5	6	
Strain 2 <i>X. nematophila</i>	LB only	LB+ L-proline (10 mM)	LB+ Miwon (10 mM)	LB+ L-proline (50 mM)	LB+ Miwon (50 mM)	LB+ Miwon (200 mM)	
							7
대동테크 분양 Xenorhabdus 7번							LB+ L-proline (50 mM)

	11	12	13	14	15	16	
Strain 4 <i>P. luminescens subsp. luminescens</i>	LB only	LB+ L-proline (10 mM)	LB+ Miwon (10 mM)	LB+ L-proline (50 mM)	LB+ Miwon (50 mM)	LB+ Miwon (200 mM)	

							17
대동테크 분양 Photorhabdus							LB+ L-proline (50 mM)

2.7. Xenorhabdus Strain 2와 Photorhabdus Strain 4를 50 mM L-Proline, 10 mM MSG 함유 LB 배지에서 배양 후 ethyl acetate 추출물 시료 분석

공생세균 *Xenorhabdus* Strain 2와 *Photorhabdus* Strain 4에 50 mM 프롤린 또는 10 mM MSG를 넣어준 후, 25°C에서 150 rpm로 4일 동안 배양하였다. 배양액을 동량의 ethyl acetate 첨가한 후에, 추출물을 얻어서 HPLC로 분석하였다.

3. 결과

3.1. L-proline 50 mM, MSG 50 mM가 내생세균 성장에 미치는 영향

Xenorhabdus와 Photorhabdus를 NB 배지에 길렀을 때, L-proline 50 mM, MSG 50 mM를 첨가했을 때, 아래 그림 1과 같이 48 시간이 지난 후 빠른 속도로 생장이 있는 것을 확인하였다. 실험 대상인 총 4종의 모든 공생세균에 대하여 L-proline 50 mM과 MSG 50 mM 로 최종 농도를 보정한 NB 배지에서 빠르게 증식하는 것을 관찰할 수 있었다.

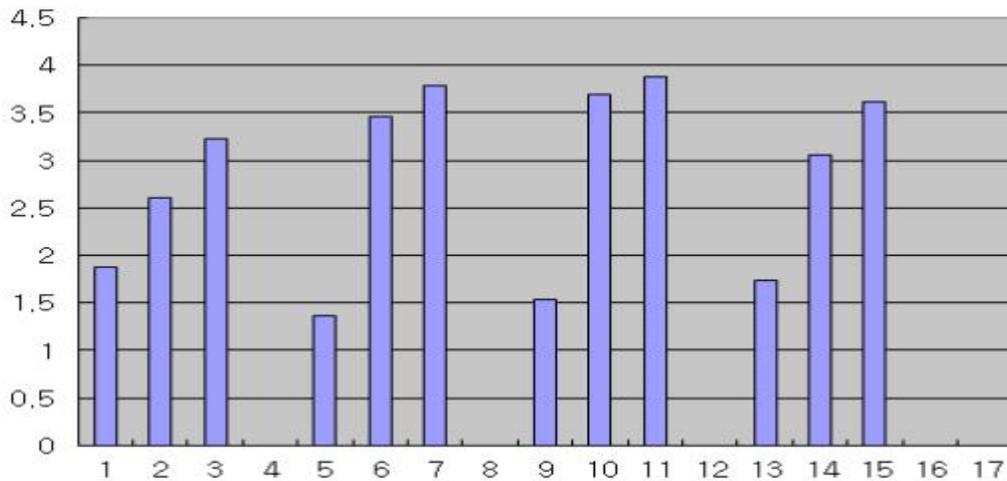


그림 7. Xenorhabdus와 Photorhabdus를 NB 배지에 48시간 배양했을 때 L-proline (50 mM) 과 MSG (50 mM)의 첨가에 따른 성장 영향 평가

1-3: KCCM 40877 *X. beddingii* (strain 1), Control, L-proline 50 mM, MSG 50 mM

5-7: KACC 12145 *X. nematophila* (strain 2), Control, L-proline 50 mM, MSG 50 mM

9-11: KACC 12123 *P. luminescens* (strain 3), Control, L-proline 50 mM, MSG 50 mM

13-15: KACC 12254 *P. luminescens* subsp. *luminescens* (strain 4), Control, L-proline 50 mM, MSG 50 mM

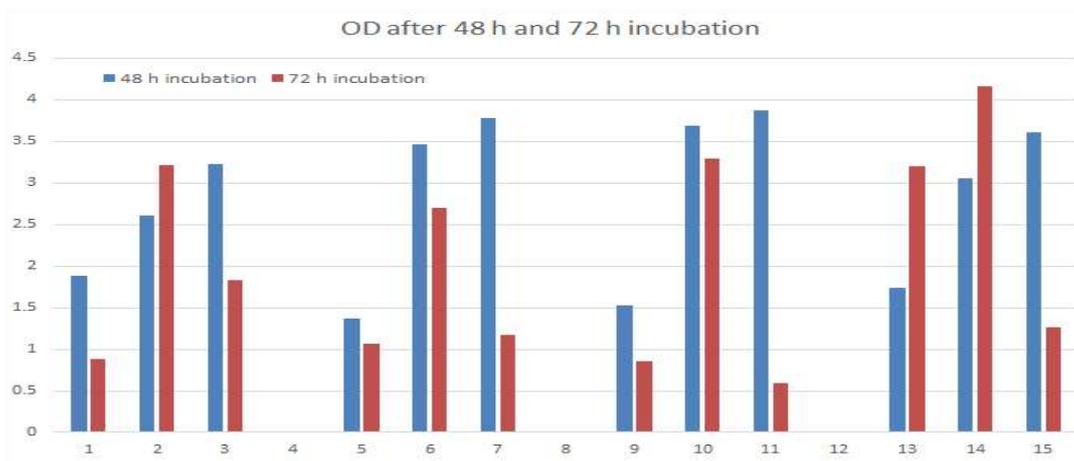
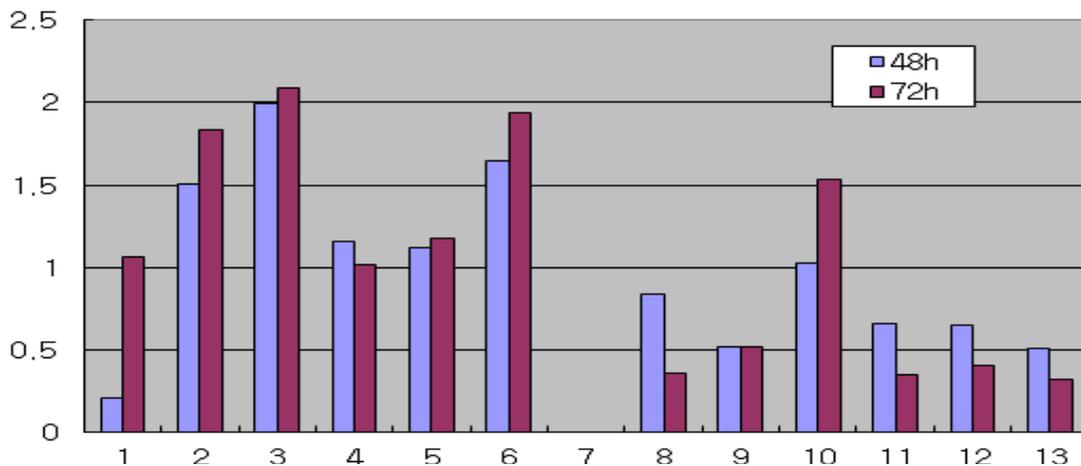


그림 8. Xenorhabdus와 Photorhabdus를 NB 배지에 25°C에서 48시간 및 72시간 배양했을 때 L-proline (50 mM) 과 MSG (50 mM)의 첨가에 따른 성장 변화

Xenorhabdus와 Photorhabdus는 빠르게 증식을 하는 반면에, NB 배지에서는 일정한 성장량 이후에는 자가 소멸 (autolysis)를 하는 경향도 있는 것으로 나타났다. Xenorhabdus를 72시간 배양했을 경우에 Control (1, 5라인)과 MSG 50 mM를 첨가한 배지 (3,7)에서는 48시간 배양했을 때보다 OD 값이 감소하는 것이 관찰되었다 (그림 8). Photorhabdus에서도 MSG 50 mM를 첨가한 배지 (11, 15)에서 72시간을 배양했을 때, OD 값이 48시간 배양했을 때보다 급격하게 감소하는 것이 관찰되었다.

3.2. L-proline 50 mM, MSG 50 mM 및 아미노산류가 내생세균 성장에 미치는 영향

Strain 1 (KCCM X. beddingii)을 NB 배지에 아미노산 무첨가 (control) 또는 프롤린, 미원을 첨가했을 때, 프롤린, 미원, glycine betaine, glycine에서 모두 아미노산을 첨가하지 않았을 때보다 빠른 성장을 가졌다 (그림 3). Strain 4 (KACC P. luminescens subsp. luminescens)는 성장이 다른 양상을 보였는데, 미원을 첨가한 NB 배지에서 48시간동안 배양되었을 때 빠른 성장을 보였으며, 72시간이 지났을 때 미원을 첨가한 배지에서만 strain 4가 성장하는 양상을 보여주었다 (그림 9). 이러한 결과는 아미노산 첨가가 Xenorhabdus에서는 성장을 증진시키지만, Photorhabdus에서는 미원 (glutamic acid)을 첨가하면 이들이 주도적으로 성장을 증진시키는 것으로 해석된다.



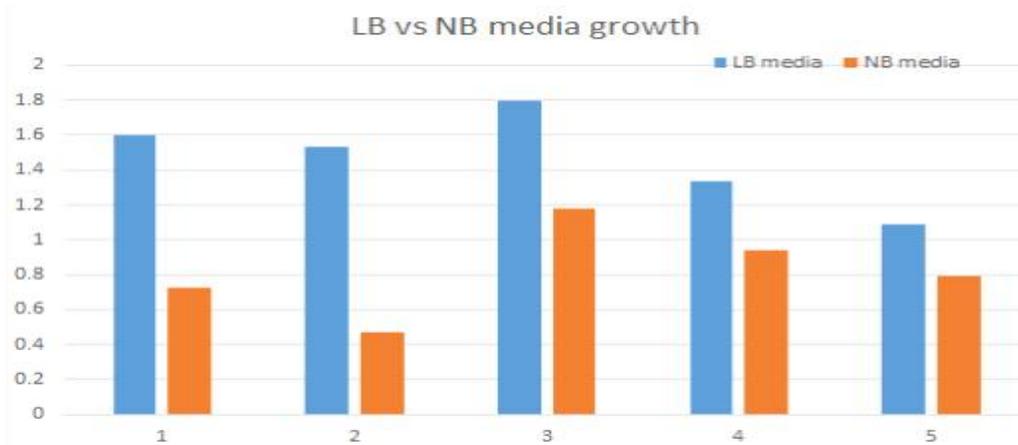
	1	2	3	4	5	6
Strain 1	NB only	NB+L-proline (50 mM)	NB+Miwon (50 mM)	NB+Glycine betaine (50 mM)	NB + Glycine (50 mM)	NB+L-proline (50 mM)

	8	9	10	11	12	13
Strain 4	NB only	NB+L-proline (50 mM)	NB+Miwon (50 mM)	NB+Glycine betaine (50 mM)	NB + Glycine (50 mM)	NB+L-proline (50 mM)

그림 9. Xenorhabdus와 Photorhabdus를 NB 배지에 25°C에서 48시간 및 72시간 배양했을 때 L-proline (50 mM), MSG (50 mM), glycine betaine, glycine의 첨가에 따른 성장 변화

3.3. NB, LB 배지에 L-proline 50 mM, MSG 50 mM 및 아미노산류가 내생세균 성장에 미치는 영향

Strain 2 (KACC12145 *X. nematophila*)를 이용하여, NB 배지와 LB 배지에 아미노산 무첨가 (control), L-proline 50 mM, MSG 50 mM, glycine betaine 50 mM로 최종 농도를 보정한 후, 이들 내생세균들의 성장 속도를 측정하였다.

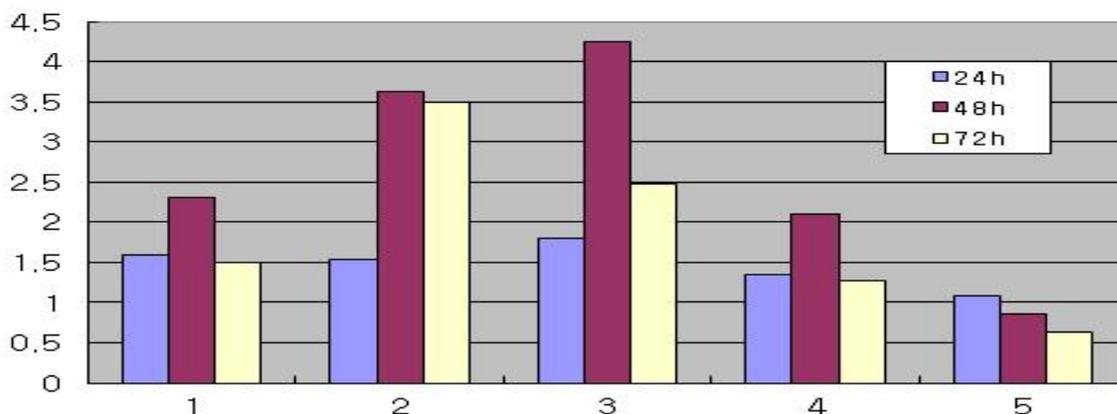


	1a	2a	3a	4a	5a
Strain 2	LB only	LB+L-proline (50 mM)	LB+Miwon (50 mM)	LB+Glycine betaine (50 mM)	LB + Glycine (50 mM)

	1b	2b	3b	4b	5b
Strain 2	NB only	NB+L-proline (50 mM)	NB+Miwon (50 mM)	NB+Glycine betaine (50 mM)	NB + Glycine (50 mM)

그림 10. *Xenorhabdus nematophila*를 LB, NB 배지에 25°C에서 24시간 배양했을 때 L-proline (50 mM), MSG (50 mM), glycine betaine, glycine의 첨가에 따른 성장 변화

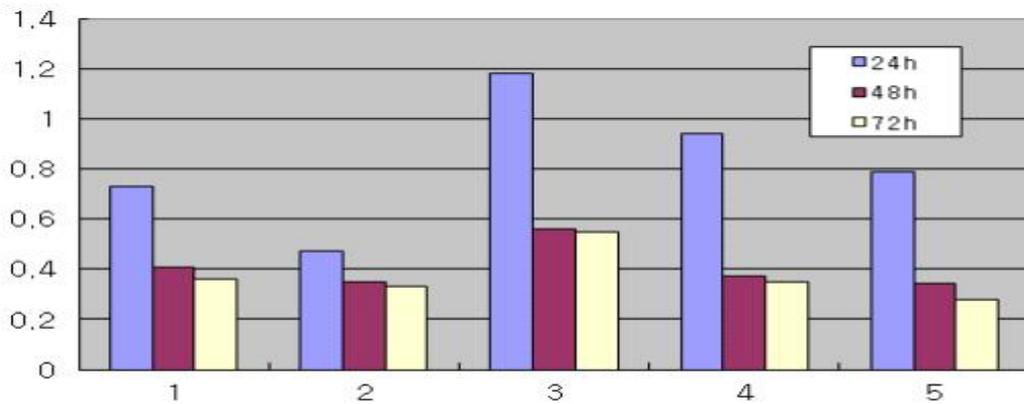
*X. nematophila*는 NB 배지보다는 LB 배지에서 24 시간동안 더 빠르게 성장하였으며, 특히 MSG에 반응하여 생장이 촉진하는 경향을 보였다 (그림 10).



	1	2	3	4	5
Strain 2	LB only	LB+L-proline (50 mM)	LB+Miwon (50 mM)	LB+Glycine betaine (50 mM)	LB + Glycine (50 mM)

그림 11. *Xenorhabdus nematophila*를 LB 배지에 25°C에서 24, 48, 72시간 배양했을 때 L-proline (50 mM), MSG (50 mM), glycine betaine, glycine의 첨가에 따른 성장 변화

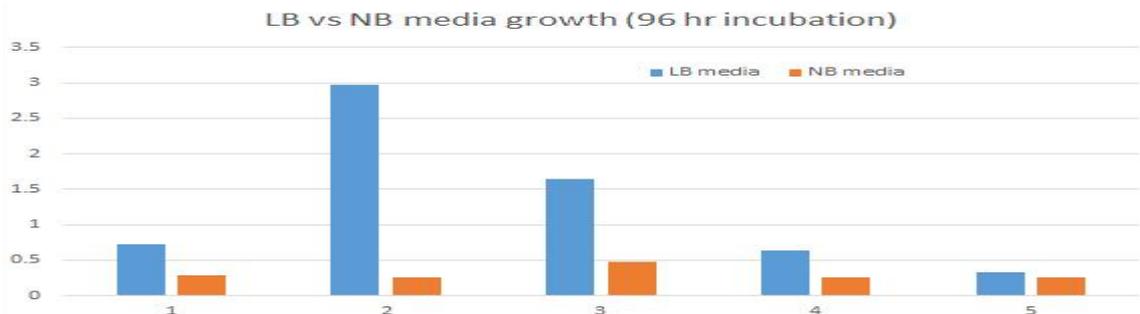
*X. nematophila*는 LB 배지에서 배양했을 때, 프롤린과 미원 (MSG)을 첨가했을 때 생장이 빠른 것을 관찰할 수 있었으며 (그림 11), 특히 프롤린을 처리했을 때 생장이 빠르게 진행된 공생세균이 자가 용균작용 없이 높은 세포 농도를 유지하는 것이 관찰되었다.



	1	2	3	4	5
Strain 2	NB only	NB+L-proline (50 mM)	NB+Miwon (50 mM)	NB+Glycine betaine (50 mM)	NB + Glycine (50 mM)

그림 11. *Xenorhabdus nematophila*를 NB 배지에 25°C에서 24, 48, 72시간 배양했을 때 L-proline (50 mM), MSG (50 mM), glycine betaine, glycine의 첨가에 따른 성장 변화

*X. nematophila*는 NB 배지에서 배양했을 때, LB 배지에 비하여 전반적인 생육 농도가 매우 낮았으며 (그림 11, 12 비교), 미원 (MSG)을 첨가했을 때 생장이 증가되지만, 24시간 배양시간이 지난 후 이렇게 높아진 세포농도에서 자가 용균 작용 등으로 빠르게 OD600 농도가 감소하는 것으로 관찰되었다.



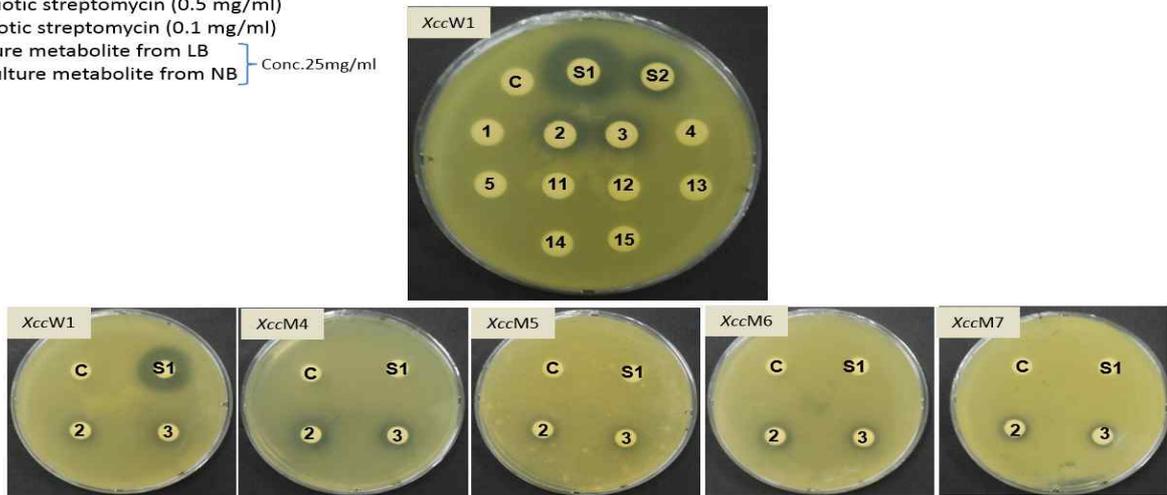
	1a	2a	3a	4a	5a
Strain 2	LB only	LB+L-proline (50 mM)	LB+Miwon (50 mM)	LB+Glycine betaine (50 mM)	LB + Glycine (50 mM)

	1b	2b	3b	4b	5b
Strain 2	NB only	NB+L-proline (50 mM)	NB+Miwon (50 mM)	NB+Glycine betaine (50 mM)	NB + Glycine (50 mM)

그림 13. *Xenorhabdus nematophila*를 LB, NB 배지에 25°C에서 96시간 배양했을 때 L-proline (50 mM), MSG (50 mM), glycine betaine, glycine의 첨가에 따른 생장 변화

*X. nematophila*는 96시간동안 배양을 하였을 때, 프롤린을 첨가한 배지에서 오랫동안 생존하였으며, NB 배지에서는 MSG를 함유한 배지에서 생존력이 높았다 (그림 13).

C: Methanol (30µl)
 S1: Antibiotic streptomycin (0.5 mg/ml)
 S2: Antibiotic streptomycin (0.1 mg/ml)
 1-5: Culture metabolite from LB
 11-15: Culture metabolite from NB } Conc. 25mg/ml



	1	2	3	4	5
Strain 2	LB only	LB+L-proline (50 mM)	LB+Miwon (50 mM)	LB+Glycine betaine (50 mM)	LB + Glycine (50 mM)

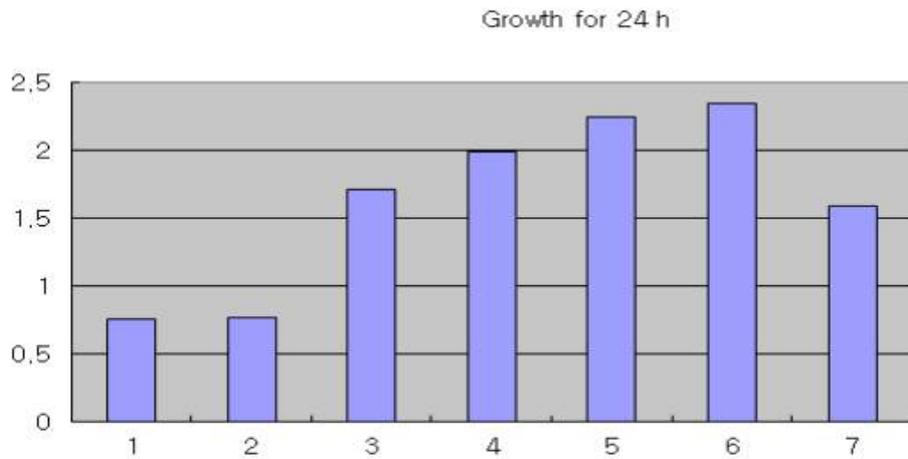
	11	12	13	14	15
Strain 2	NB only	NB+L-proline (50 mM)	NB+Miwon (50 mM)	NB+Glycine betaine (50 mM)	NB + Glycine (50 mM)

그림 14. *Xenorhabdus nematophila*를 LB, NB 배지에 25°C에서 96시간 배양했을 때 L-proline (50 mM), MSG (50 mM), glycine betaine, glycine의 첨가에 따른 미생물 항균력 비교

*X. nematophila*는 96시간동안 배양을 하였을 때, 프롤린과 미원을 첨가한 배양액 추출물에서만 을 첨가한 배지에서 오랫동안 생존하였으며, NB 배지에서는 MSG를 함유한 배지에서 생존력이 높았다 이때 4일 배양된 배양액 및 공생세균을 ethyl acetate로 추출하여, 그 추출물을 methanol에 25 mg/ml로 녹여서, 식물병원균인 *Xanthomonas campestris* cv. citri와 다양한 항생제 저항성 변이형에 처리하여 항균 활성을 검정하였다. (그림 14).

3.4. LB 배지에 L-proline, MSG 농도에 따른 내생세균 성장에 미치는 영향

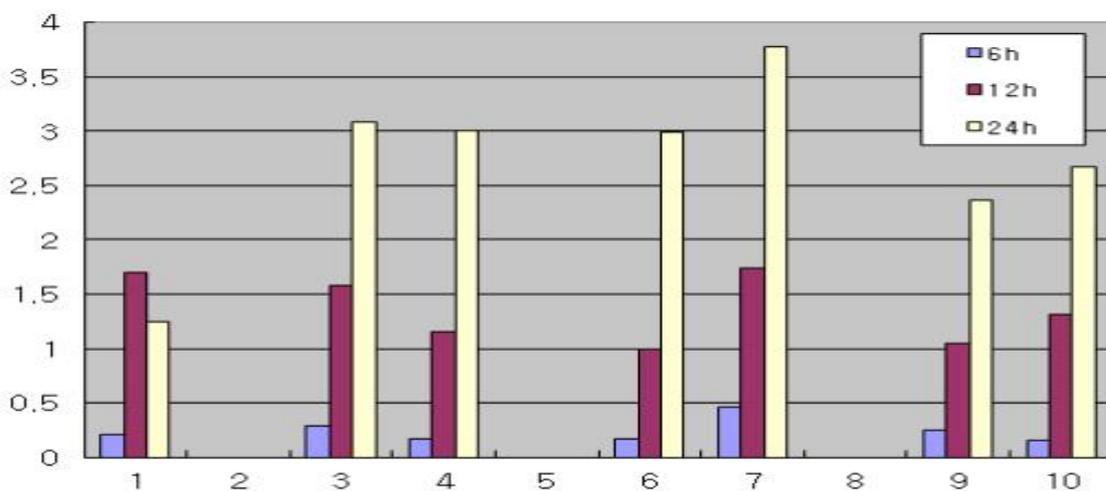
Strain 2 (*X. nematophila*)에 다양한 농도의 프롤린과 MSG를 첨가 후, 25°C에서 성장 속도를 측정하였을 때, 150 rpm의 성장 속도를 측정하였다.



	1	2	3	4	5	6	7
Strain 2	LB only	LB+ L-proline (10 mM)	LB+ Miwon (10 mM)	LB+ L-proline (50 mM)	LB+ Miwon (50 mM)	LB+ L-proline (200 mM)	LB+ Miwon (200 mM)

그림 15. *Xenorhabdus nematophila*를 LB 배지에서 다양한 농도의 프롤린과 MSG를 첨가하여 25°C에서 24시간 배양했을 때 성장 변화 (1차실험)

*X. nematophila*는 24시간동안 배양을 하였을 때, 프롤린과 MSG를 높게 첨가할수록 빠르게 성장하는 경향을 보였다. 특히 50 mM 프롤린과 MSG에서 200 mM 프롤린이나 MSG에 상응하는 성장 속도를 나타내었다 (그림 15).



	1	3	4	6	7	9	10
Strain 2	LB only	LB+ L-proline (10 mM)	LB+ Miwon (10 mM)	LB+ L-proline (50 mM)	LB+ Miwon (50 mM)	LB+ L-proline (200 mM)	LB+ Miwon (200 mM)

그림 16. *Xenorhabdus nematophila*를 LB 배지에서 다양한 농도의 프롤린과 MSG를 첨가하여 25°C에서 24시간 배양했을 때 성장 변화 (2차실험)

*X. nematophila*는 24시간동안 배양을 하면서 성장을 관찰하였을 때, 2차실험에서는 프롤린과 MSG를 첨가하면 모든 농도에서 LB 배지보다 빠르게 성장하는 것을 관찰하였다 (그림 16).

3.5. 대동테크에서 분양받은 *Xenorhabdus*와 *Photorhabdus*를 다양한 농도의 L-proline, MSG를

함유한 LB 배지에서 배양 후, 배양액의 살충능 확인

대동테크에서 제품 생산을 위해 배양하고 있는 공생세균 *Xenorhabdus*와 *Photorhabdus*를 10 mM, 50 mM, 200 mM 프롤린, MSG가 함유된 LB 배지에서 25°C에서 150 rpm로 3일 동안 배양하였다. Petri dish에 거름종이를 깔은 다음, (주)에스웜에서 구입한 꿀벌부채명나방 유충 3마리씩을 넣고 이 유충에 배양액 1 mL씩을 뿌려주고 치사율을 총 6일에 걸쳐서 관찰하였다.

	1	2	3	4	5	6
<i>Xenorhabdus</i>	LB only	LB+L-proline (10 mM)	LB+Miwon (10 mM)	LB+L-proline (50 mM)	LB+Miwon (50 mM)	LB+Miwon (200 mM)

	11	12	13	14	15	16
<i>Photorhabdus</i>	LB only	LB+L-proline (10 mM)	LB+Miwon (10 mM)	LB+L-proline (50 mM)	LB+Miwon (50 mM)	LB+Miwon (200 mM)



그림 17. 대동테크에서 상용화하고 있는 *Xenorhabdus*를 MSG 50 mM 함유된 배양액에서 길러서 꿀벌부채명나방 유충에 처리했을 때, 6일후 3마리중 2마리의 유충을 죽임



그림 18. 대동테크에서 상용화하고 있는 *Photorhabdus*를 Proline 50 mM 함유된 배양액에서 길러서 꿀벌부채명나방 유충에 처리했을 때, 5일후 3마리중 3마리의 유충을 죽임 (10번이라 써진 Petri dish:14번 처리구)

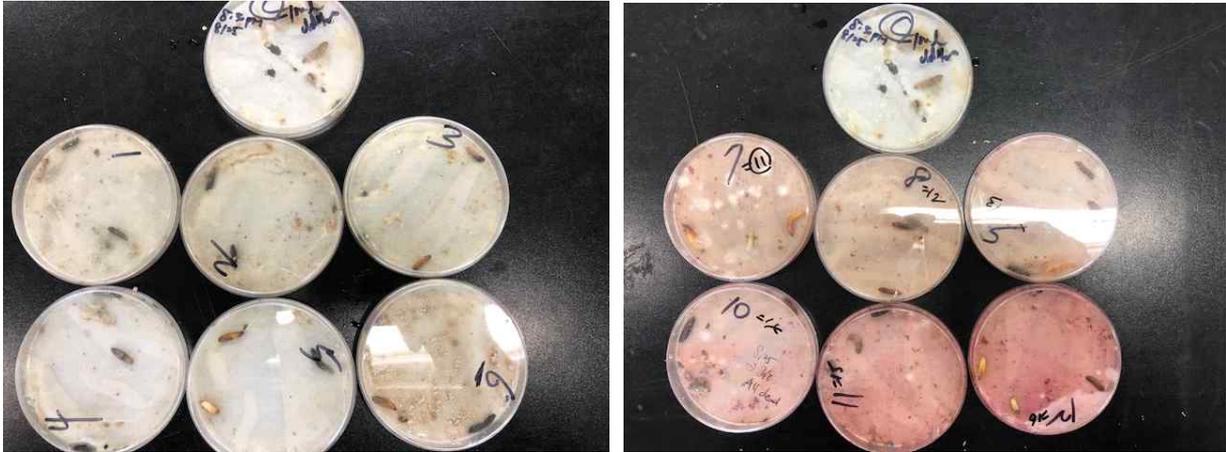


그림 19. Control 및 배양액을 떨어뜨린 꿀벌부채명나방 유충의 12일후 사진

3.6. Xenorhabdus와 Photorhabdus Strain 2, 4 및 대동테크에서 분양받은 Xenorhabdus와 Photorhabdus Strain를 다양한 농도의 L-proline, MSG를 함유한 LB 배지에서 배양하여, 배양액의 살충능 확인

Control 및 균주, 프롤린, MSG 함유에 따른 배양액의 번호는 다음 표1 과 같으며, 이에 따른 살충력을 %로 표시하였다.

표 4. 살충성 실험에 이용하기 위해 준비된 배양액 번호에 따른 꿀벌부채나방 유충 살충능 (%).

처리 후 1일후 관찰

		X. nematophila strain 2						대동테크 분양 Xenorhabdus
C1 (water)	1	2	3	4	5	6	7	
33	67	100	33	100 (펠콘 튜브에 넣자마자 죽음)	100	100	100	
		P. luminescens subsp. luminescens strain 4						대동테크 분양 Photorhabdus
C1 (LB)	11	12	13	14	15	16	17	
0	100	67	100 (최고 살충력)	0	67	33	33	



그림 14. 꿀벌부채명나방 유충을 처리한 후 찍은 사진 (C0, 1 - 7)



그림 20. 4번 배양액에 담구자마자 측정한 꿀벌부채명나방 유충 사진

4번 배양액 (50 mM 프롤린)에 담구자마자 유충은 삼투압을 잃고 바로 쪼그라들며 아무 움직임을 보이지 않았음



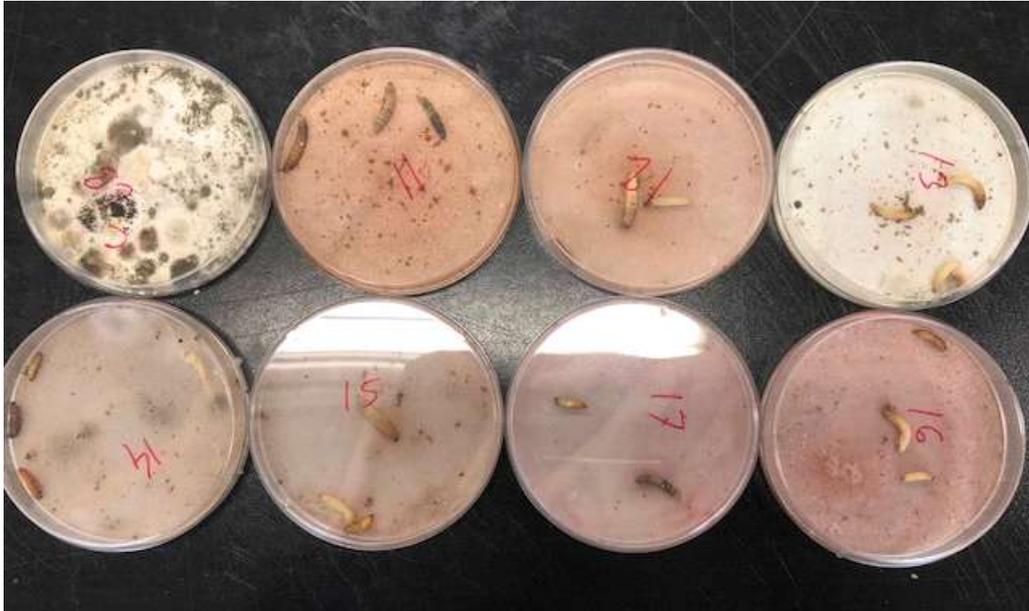


그림 21. Control 및 배양액에 담근 후 꺼내어 7일후 관찰한 꿀벌부채명나방 유충 사진

3.7. *Xenorhabdus* Strain 2의 50 mM L-Proline 함유 LB 배지에서 배양 후 ethyl acetate 추출물 시료 분석

공생세균 *Xenorhabdus* Strain 2를 LB 배지에서 또는 LB+50 mM 프롤린 배지에서 배양을 4일간 한 후에, 이들 대사체 변화를 HPLC로 분석하였다. HPLC로 분석하였을 때, 몇몇 새로운 피크가 50 mM 프롤린을 함유한 배지에서 나타나 이들 물질들을 분석하였다 (그림 22).

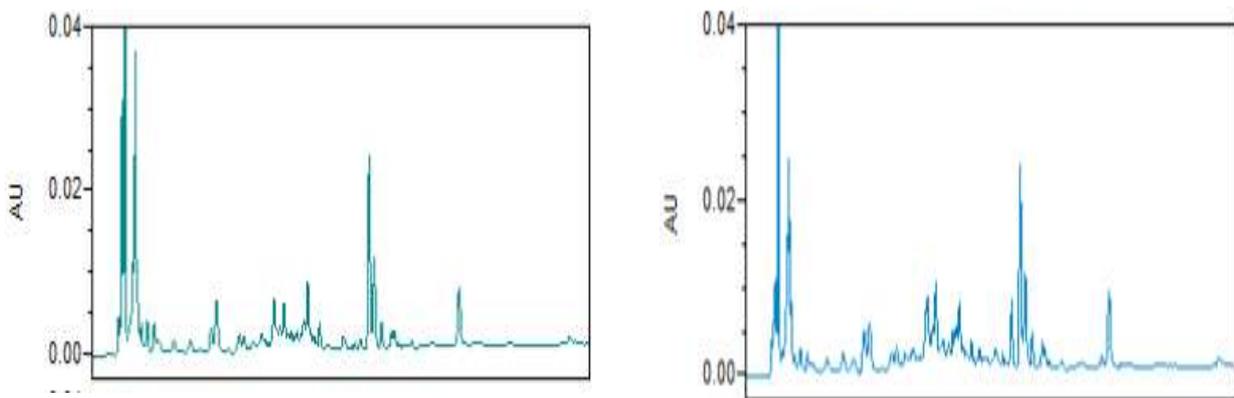


그림 22. *Xenorhabdus* Strain 2를 LB 배지 또는 50 mM L-Proline 함유 LB 배지에서 배양 후 이 배양액을 ethyl acetate로 추출했을 때 나타나는 chromatogram

II-3. 배지조성에 따른 곤충병원성 선충내 공생세균 배양조건 확립 종합 고찰

- 기존 보고들에서 공생 세균인 *Xenorhabdus*와 *Photorhabdus*는 곤충 유충의 hemolymph에서 고농도로 존재하는 L-proline에 의하여 고살충성이 유도된다고 보고됨. 프롤린 생합성 과정을 분석하여, 이러한 생합성 과정의 전구 물질이 L-glutamic acid이며 이 아미노산은 현재 식품에 MSG 형태로 매우 값싸고 광범위하게 이용되고 있는 것을 발견함.
- 공생세균인 *X. nematophila*를 L-proline, MSG 등을 다양한 농도로 처리할 때 이들 아미노산에서 배양 배지만 있는 것보다 매우 빠르게 증식하는 것을 발견하였음. *X. nematophila*는 L-proline을 처리하였을 때 항생력이 증가하였으며, 50 mM L-Proline을 LB 배지에 넣고 4일간 배양할 경우 높은 활성의 살충 활성이 유도되는 것을 확인하였음.
- 공생세균인 *P. luminescens* subsp. *luminescens*를 LB 배지에서 L-proline, MSG, glycine betaine, glycine을 다양한 농도로 첨가 후 증식 속도를 확인하였을 때, MSG 10 mM을 첨가한 LB 배양액에서 고살충 활성이 유도되는 것을 확인하였음.
- 현재 고살충이 유도된 *X. nematophila*, *P. luminescens* subsp. *luminescens* 배양체에서 물질 변화 확인 및 관련 유전자 발현 확인중이며, 이러한 물질 또는 발현량이 변화된 유전자들은 향후 고살충 유도 공생세균의 명확한 지표 물질 또는 유전자로 작용될 것이 기대됨.
- 최종적으로 공생세균에서 L-proline 첨가에 따라 유도되는 물질 및 관련 유전자를 확인하여, 방제용 공정 매뉴얼을 확립하려고 함.

III. 고체배양 곤충병원성 선충 공생세균에서 지표물질 고정화

III-1. NB 배지에 1% NaCl을 첨가했을 때 *X. nematophils* 성장 증진 기작 탐색

- 2017년도에 시도된 실험에서, 배지에 포함된 염과 성장 비교 실험에서, *X. nematophils*는 1% NaCl가 첨가된 NB 배지에서 높은 성장률을 보였음. 이번 실험에서는 NB 배지에 salt를 첨가하지 않은 배지 (control)과 최종 1% 배지를 첨가한 배지를 이용하여 RNA 발현 양상을 밝혀내어, 이러한 성장차이를 분석하기 위하여 실험을 진행하였다.
- KACC 12145 *X. nematophils*를 이용하여, 정상 NB배지와 1% NaCl가 첨가된 NB 배지에서 2일을 기른 후에, 테라젠회사에 RNA sequencing을 요청하여 실험을 실시하였다.
- 총 4,219개의 유전자들을 reference species인 *Xenorhabdus nematophila*를 이용하여 발현양상을 밝혀내었다.

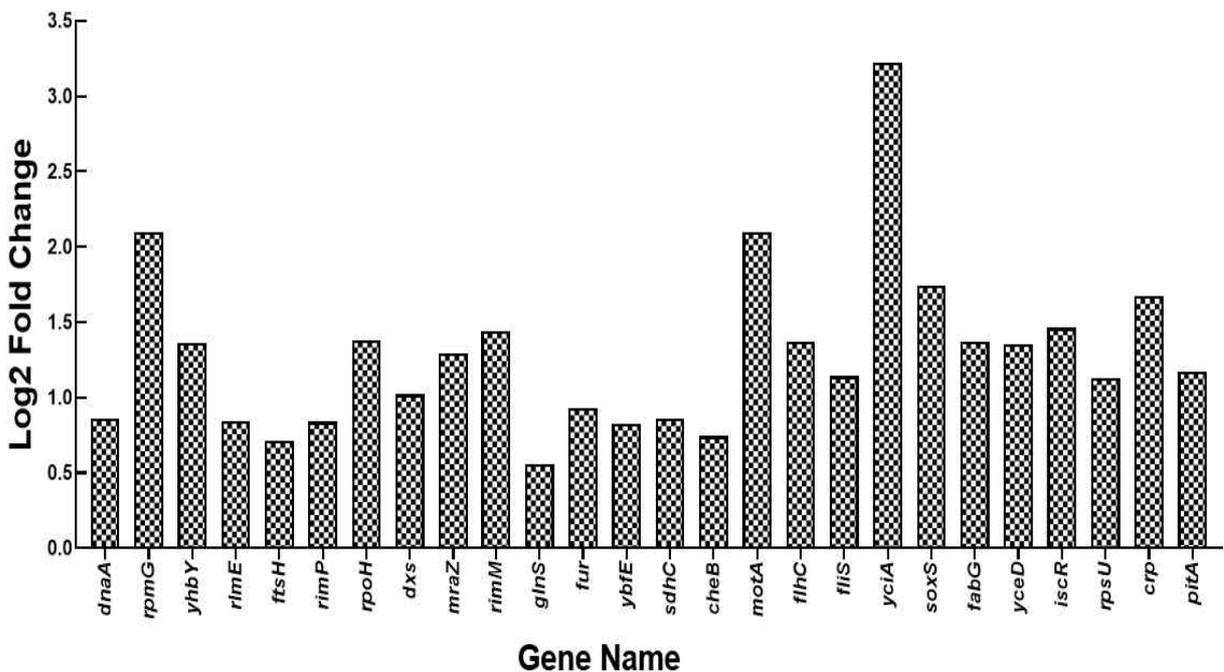


그림 1. *X. nematophils*를 NB 배지 (with 1% NaCl vs. without NaCl)에 길렀을 때 유전자 발현 패턴 변화 (up-regulated genes)

- | | | |
|----|------|---|
| 1 | dnaA | Chromosomal replication initiator protein DnaA |
| 2 | rpmG | 50S ribosomal protein L33 |
| 3 | yhbY | RNA-binding protein YhbY |
| 4 | rlmE | Ribosomal RNA large subunit methyltransferase E |
| 5 | ftsH | ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH |
| 6 | rimP | Ribosome maturation factor RimP |
| 7 | rpoH | RNA polymerase sigma factor RpoH |
| 8 | dxs | 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase |
| 9 | mraZ | Protein MraZ |
| 10 | rimM | Ribosome maturation factor RimM |
| 11 | glnS | Glutamine--tRNA ligase |
| 12 | fur | Ferric uptake regulation protein |

13	ybfE	Uncharacterized protein YbfE
14	sdhC	Succinate dehydrogenase cytochrome b556 subunit
15	cheB	Chemotaxis response regulator protein-glutamate methyltransferase
16	motA	Motility protein A
17	flhC	Flagellar transcriptional regulator FlhC
18	fliS	Flagellar protein FliS
19	yciA	Acyl-CoA thioester hydrolase YciA
20	soxS	Regulatory protein SoxS
21	fabG	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase FabG
22	yceD	Uncharacterized protein YceD
23	iscR	HTH-type transcriptional regulator IscR
24	rpsU	30S ribosomal protein S21
25	crp	cAMP-activated global transcriptional regulator CRP
26	pitA	Low-affinity inorganic phosphate transporter 1

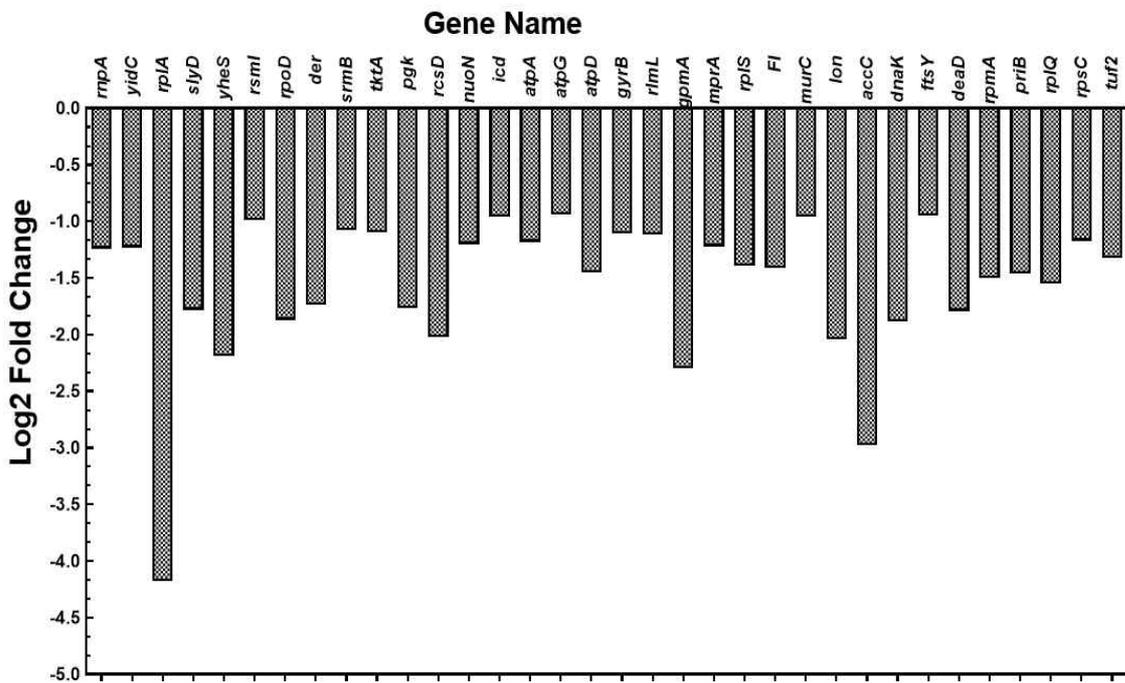


그림 2. *X. nematophilus*를 NB 배지 (with 1% NaCl vs. without NaCl)에 길렀을 때 유전자 발현 패턴 변화 (down-regulated genes) Abbreviations: FC (Fold change);

1	rnpA	Ribonuclease P protein component
2	yidC	Membrane protein insertase YidC
3	rplA	50S ribosomal protein L1
4	slyD	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase SlyD
5	yheS	Uncharacterized ABC transporter ATP-binding protein YheS
6	rsmI	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase I
7	rpoD	RNA polymerase sigma factor RpoD
8	der	GTPase Der
9	srnB	ATP-dependent RNA helicase SrnB
10	tkkA	Transketolase 1
11	pgk	Phosphoglycerate kinase

12	rcsD	Sensor-like histidine kinase RcsD
13	nuoN	NADH-quinone oxidoreductase subunit N
14	icd	Isocitrate dehydrogenase [NADP]
15	atpA	ATP synthase subunit alpha
16	atpG	ATP synthase gamma chain
17	atpD	ATP synthase subunit beta
18	gyrB	DNA gyrase subunit B
19	rlnL	Ribosomal RNA large subunit methyltransferase K/L
20	gpmA	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase
21	mprA	Transcriptional repressor MprA
22	rplS	50S ribosomal protein L19
23	Fl	Major tail sheath protein
24	murC	UDP-N-acetylmuramate--L-alanine ligase
25	lon	Lon protease
26	accC	Biotin carboxylase
27	dnaK	Chaperone protein DnaK
28	ftsY	Signal recognition particle receptor FtsY
29	deaD	ATP-dependent RNA helicase DeaD
30	rpmA	50S ribosomal protein L27
31	priB	Primosomal replication protein n]
32	rplQ	50S ribosomal protein L17
33	rpsC	30S ribosomal protein S3
34	tuf2	Elongation factor Tu 2

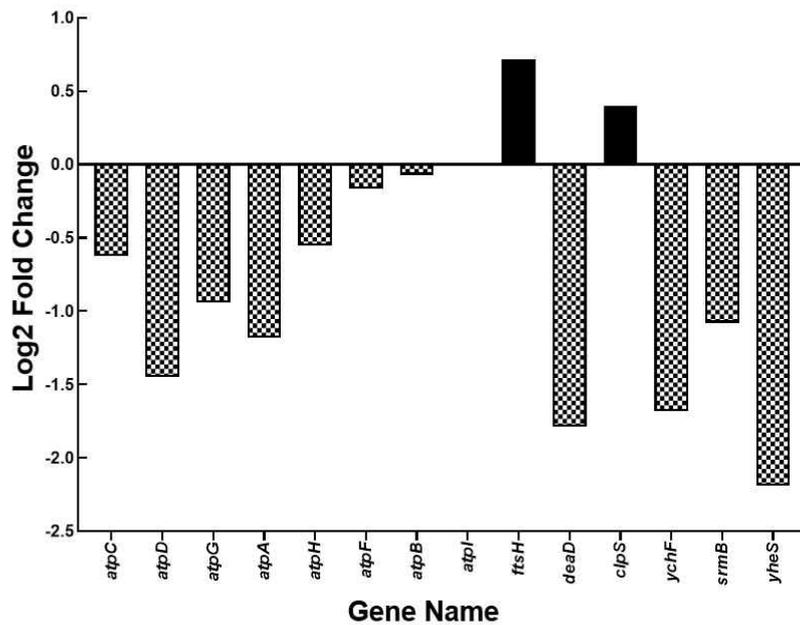


그림 3. *X. nematophilus*를 NB 배지 (with 1% NaCl vs. without NaCl)에 길렀을 때 ATP 합성과 관련한 유전자 발현 패턴 변화

1	atpC	ATP synthase epsilon chain
2	atpD	ATP synthase subunit beta
3	atpG	ATP synthase gamma chain
4	atpA	ATP synthase subunit alpha
5	atpH	ATP synthase subunit delta
6	atpF	ATP synthase subunit b
7	atpB	ATP synthase subunit a
8	atpI	ATP synthase protein I
9	ftsH	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH
10	deaD	ATP-dependent RNA helicase DeaD
11	clpS	ATP-dependent Clp protease adapter protein ClpS
12	yehF	Ribosome-binding ATPase YehF
13	srmB	ATP-dependent RNA helicase SrmB
14	yehS	Uncharacterized ABC transporter ATP-binding protein YehS

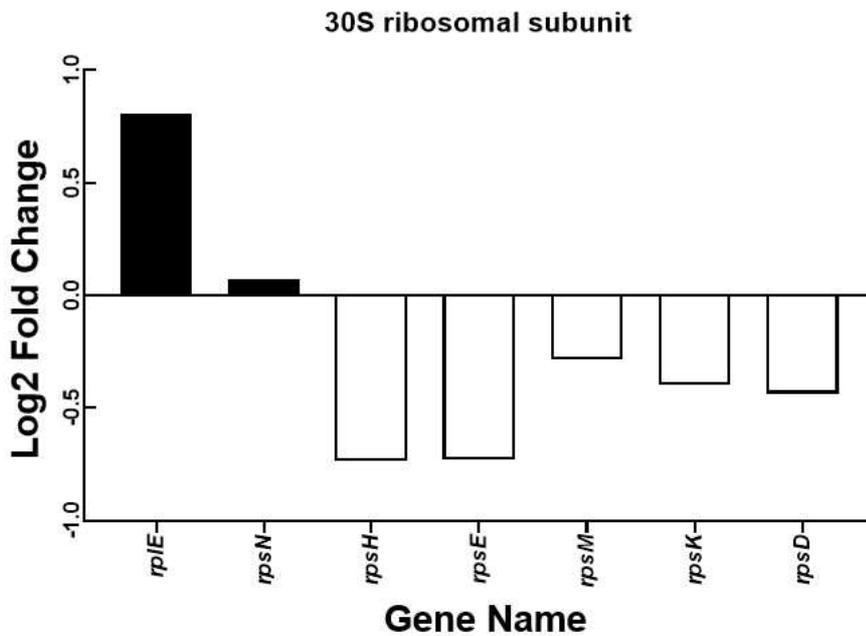


그림 4. *X. nematophilus*를 NB 배지 (with 1% NaCl vs. without NaCl)에 길렀을 때 30S ribosomal subunit와 관련한 유전자 발현 패턴 변화

1	rplE	50S ribosomal protein L5
2	rpsN	30S ribosomal protein S14
3	rpsH	30S ribosomal protein S8
4	rpsE	30S ribosomal protein S5
5	rpsM	30S ribosomal protein S13
6	rpsK	30S ribosomal protein S11
7	rpsD	30S ribosomal protein S4

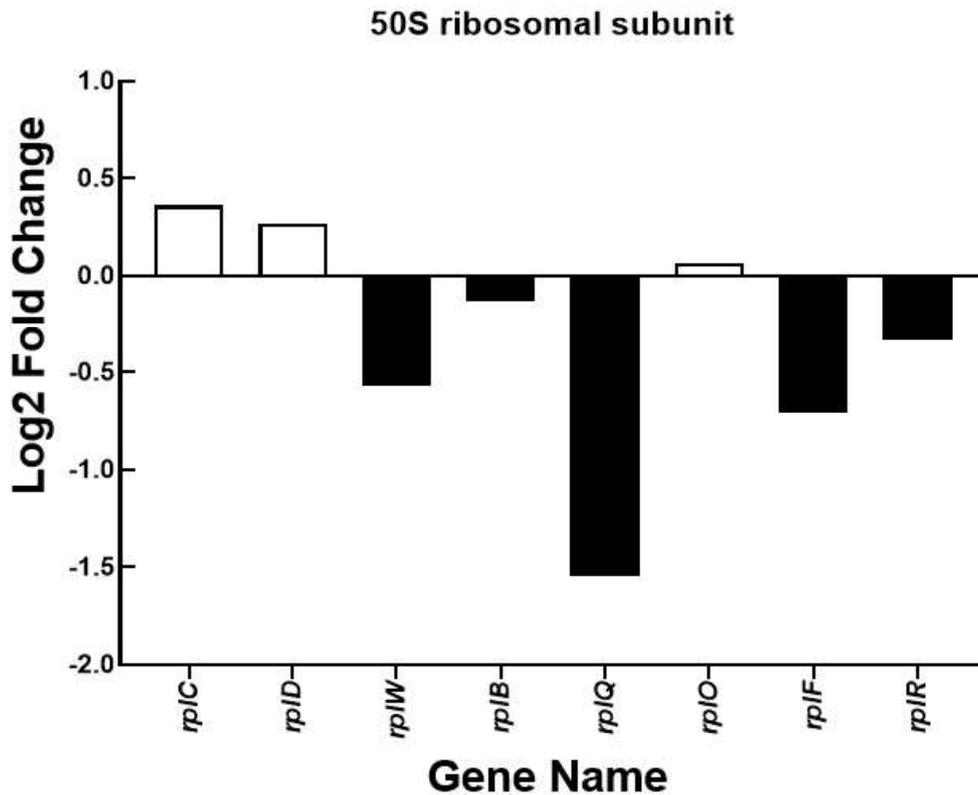


그림 5. *X. nematophils*를 NB 배지 (with 1% NaCl vs. without NaCl)에 길렀을 때 50S ribosomal subunit와 관련한 유전자 발현 패턴 변화

- | | | |
|---|------|---------------------------|
| 1 | rplC | 50S ribosomal protein L3 |
| 2 | rplD | 50S ribosomal protein L4 |
| 3 | rplW | 50S ribosomal protein L23 |
| 4 | rplB | 50S ribosomal protein L2 |
| 5 | rplQ | 50S ribosomal protein L17 |
| 6 | rplO | 50S ribosomal protein L15 |
| 7 | rplF | 50S ribosomal protein L6 |
| 8 | rplR | 50S ribosomal protein L18 |

- KACC 12145 *X. nematophils*에 1% NaCl를 첨가하여 NB 배지에서 배양을 할 경우, Ferric uptake regulation protein, Chemotaxis response regulator protein-glutamate methylesterase, Motility protein A, Flagellar transcriptional regulator FlhC, Flagellar protein FliS 등 ferric ion 섭취 및 양분에 관여하는 유전자들의 발현이 증가되는 것으로 나타났다.
- *X. nematophils*가 NaCl을 첨가함으로써 빠른 증식을 보였지만 ATP 합성에 관여하는 유전자들, 30S Ribosome과 관련한 유전자들, 50S Ribosome과 관련한 단백질들을 만드는 유전자들의 발현은 감소하였다.

III-2. LB배지에 Proline 또는 미원 (L-glutamate)를 첨가했을 때 공생세균에서 생성되는 활성 물질 탐색

1. 연구의 목적

- Xenorhabdus / Photorhabdus 종들은 다양한 이차 대사 산물을 생산할 수 있으며, 특히 비리보솜 펩타이드 합성 효소 (NRPS) 또는 폴리 케타이드 합성 효소 (PKS)에서 유래 한 특화된 대사 산물을 생산할 수 있다 (Tobias et al. 2017).

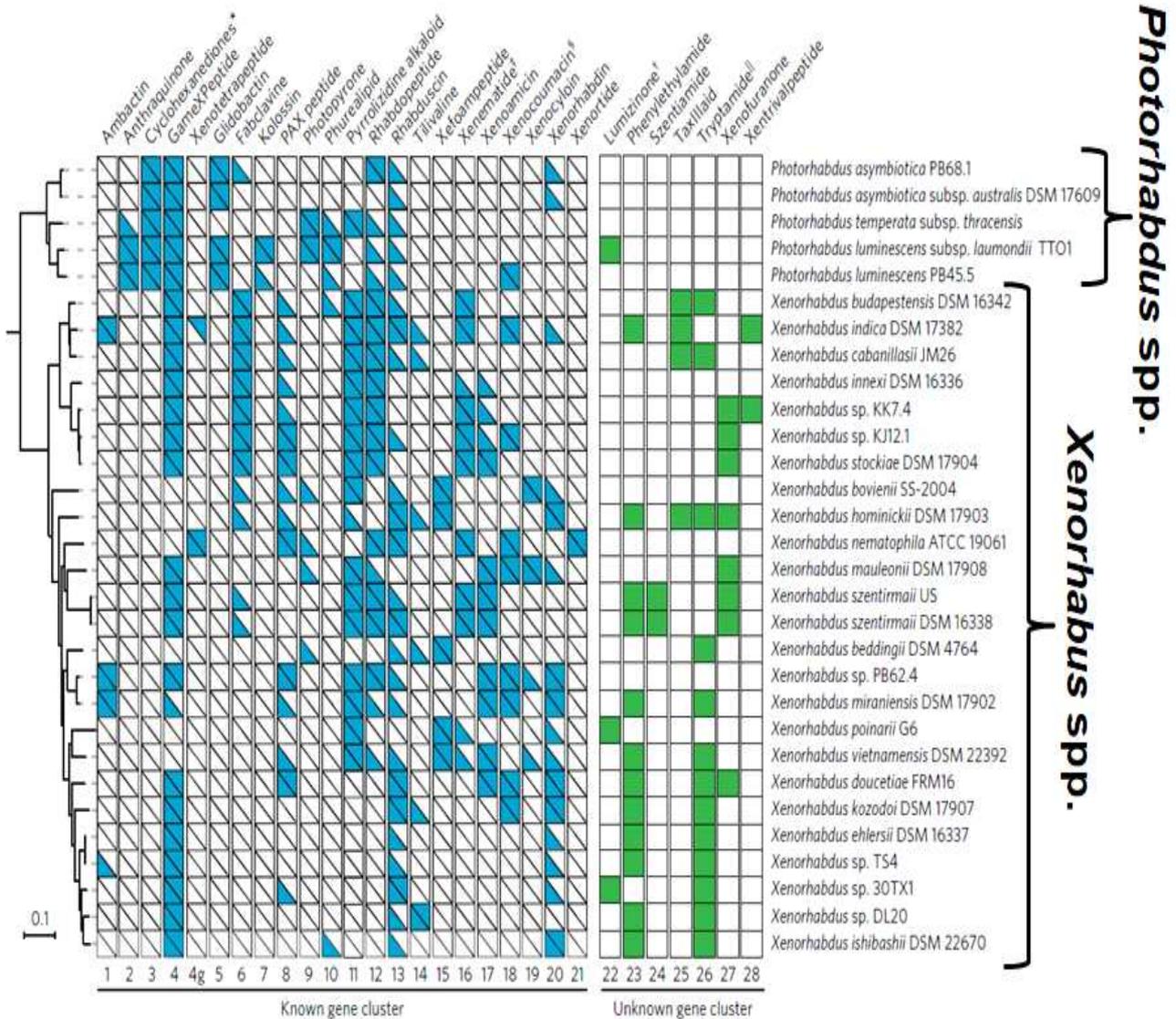


그림 6. Xenorhabdus / Photorhabdus 종들에서 다양한 활성 물질들을 생합성하는 유전자 클러스트들의 계통 분포도 (Tobias et al. 2017)

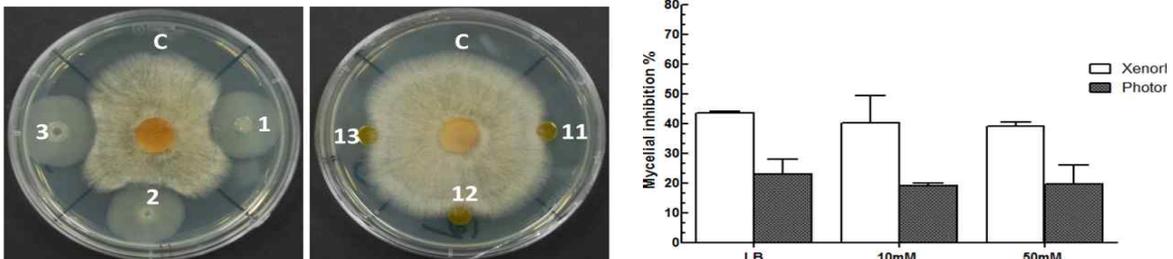
- 본 실험을 통하여 *Xenorhabdus nematophila*/*P. luminescens* subsp. *luminescens*가 항균/항생 효과가 있는 지를 검증하고 이들에 L-proline을 첨가했을 때 생성되는 물질들에 대하여 탐색하였다.

2. 실험 방법

- *Xenorhabdus nematophils*/*P. luminescens* subsp. *luminescens*를 L-프롤린과 미원이 함유된 LB 배지에서 배양하면서, 24시간 마다 (첫날은 12시간, 24시간) OD600을 측정하여 이들 두 종 세균의 성장을 확인하였다.
- 항균 활성 검정을 위하여 인삼 재배시 고년생 결주의 원인으로 작용하는 인삼 잘록병균 *Rhizoctonia solani* 및 인삼 점무늬병 원인균 (*Alternaria panax*)을 배양하였으며, 이들에게 *X. nematophils*/*P. luminescens* subsp. *luminescens*를 생균 또는 추출물을 얻어서 이들의 항진균 활성을 검정하였다.
- 항생 효능을 검정하기 위해, 감귤레양병원균인 *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 에 *X. nematophils*/*P. luminescens* subsp. *luminescens*의 생균 또는 추출물을 처리하여 이들 세균들의 항생 활성을 검정하였다.
- *X. nematophils*/*P. luminescens* subsp. *luminescens*의 항균/항생 물질을 검증하기 위하여 HPLC-MS 분석을 시도하였다.

3. 실험 결과

- 인삼 잘록병균 *Rhizoctonia solani*를 PDA 배지에 접종한 후 5일후에 L-프롤린과 미원이 함유된 LB 배지에서 배양한 *X. nematophils*/*P. luminescens* subsp. *luminescens*를 처리하여 균사 성장 방해력을 확인하였을 때 그림 7에서 나타나는 것처럼 균사 성장을 억제하는 결과를 얻었다.

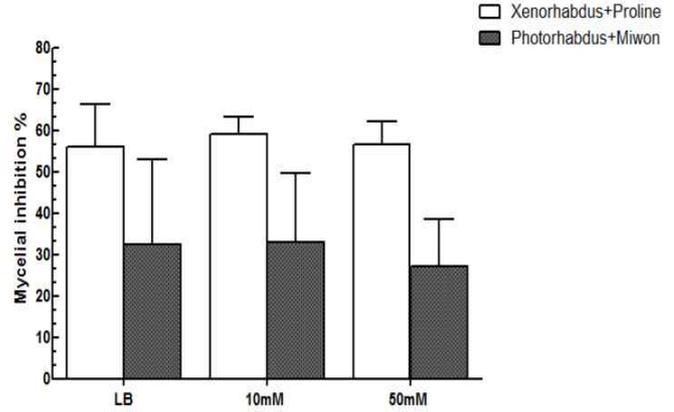
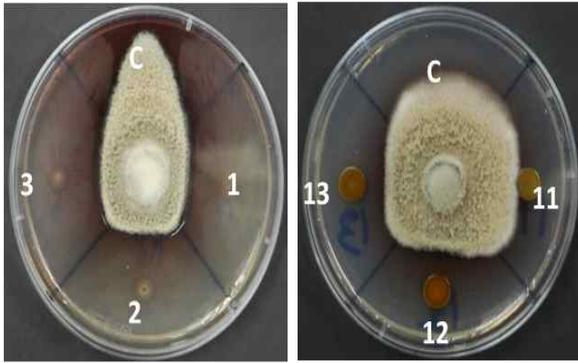


- 1: Culture of *Xenorhabdus* in LB
- 2: Culture of *Xenorhabdus*+ 10mM proline
- 3: Culture of *Xenorhabdus*+ 50mM proline

- 11: Culture of *Photorhabdus* in LB
- 12: Culture of *Photorhabdus*+ 10mM Miwon
- 13: Culture of *Photorhabdus*+ 50mM Miwon

그림 7. *X. nematophils*/*P. luminescens* subsp. *luminescens* 세균이 인삼잘록병 *Rhizoctonia solani*를 억제하는 효능 평가

- 인삼 점무늬병 원인균 (*Alternaria panax*)을 PDA 배지에 접종한 후 5일후에 L- 프롤린과 미원이 함유된 LB 배지에서 배양한 *X. nematophils*/*P. luminescens* subsp. *luminescens*를 처리하여 균사의 성장 방해력을 확인하였을 때 그림 8에서 나타나는 것처럼 균사 성장을 억제하는 결과를 얻었다.

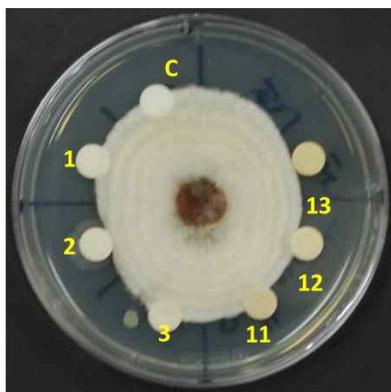


- 1: Culture of Xenorhabdus in LB
- 2: Culture of Xenorhabdus+ 10mM proline
- 3: Culture of Xenorhabdus+ 50mM proline

- 11: Culture of Photorhabdus in LB
- 12: Culture of Photorhabdus+ 10mM Miwon
- 13: Culture of Photorhabdus+ 50mM Miwon

그림 8. *X. nematophils/P. luminescens* subsp. *luminescens* 공생 세균이 인삼 점무늬병 원인균을 억제하는 항균 효능 평가

○ 인삼 잘록병균 *Rhizoctonia solani*를 PDA 배지에 접종한 후 5일 후에 L-프롤린과 미원이 함유된 LB 배지에서 배양한 *X. nematophils/P. luminescens* subsp. *luminescens*의 ethyl acetate 추출물을 처리하여 균사의 성장 방해력을 확인하였을 때 그림 9에서 나타나는 것처럼 균사 성장을 억제하는 것을 확인하였다.



Rhizoctonia solani

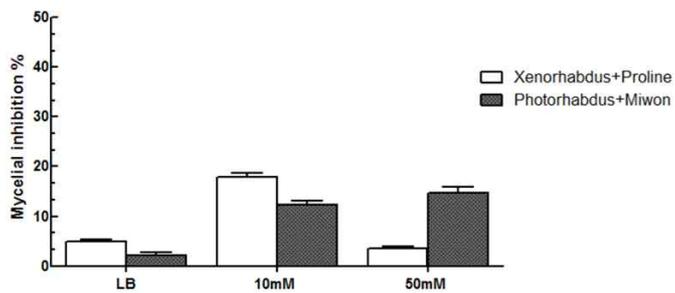
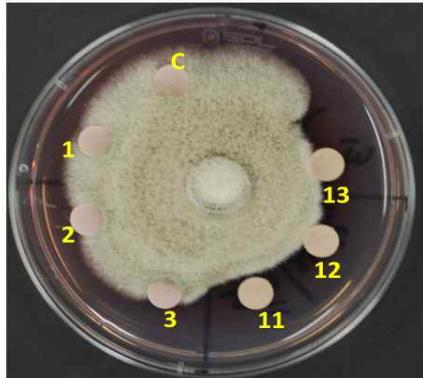


그림 9. *X. nematophils/P. luminescens* subsp. *luminescens* 배양체의 ethyl acetate 추출물이 인삼잘록병 *Rhizoctonia solani*를 억제하는 효능 평가

○ 인삼 점무늬병 원인균 *Alternaria panax*을 PDA 배지에 접종한 후 5일 후에 L-프롤린과 미원이 함유된 LB 배지에서 배양한 *X. nematophils*/*P. luminescens* subsp. *luminescens*의 ethyl acetate 추출물을 처리하여 균사의 성장 방해력을 확인하였을 때 그림 10에서 나타나는 것처럼 균사 성장을 억제하는 결과를 얻었다.



Alternaria panax

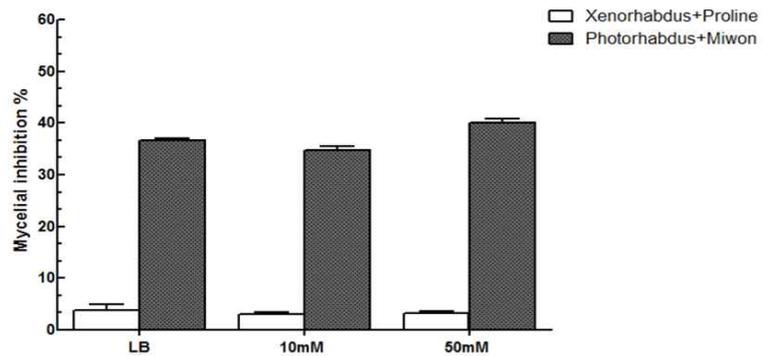


그림 10. *X. nematophils*/*P. luminescens* subsp. *luminescens* 배양체의 ethyl acetate 추출물이 인삼 점무늬병 원인균을 억제하는 항균 효능 평가

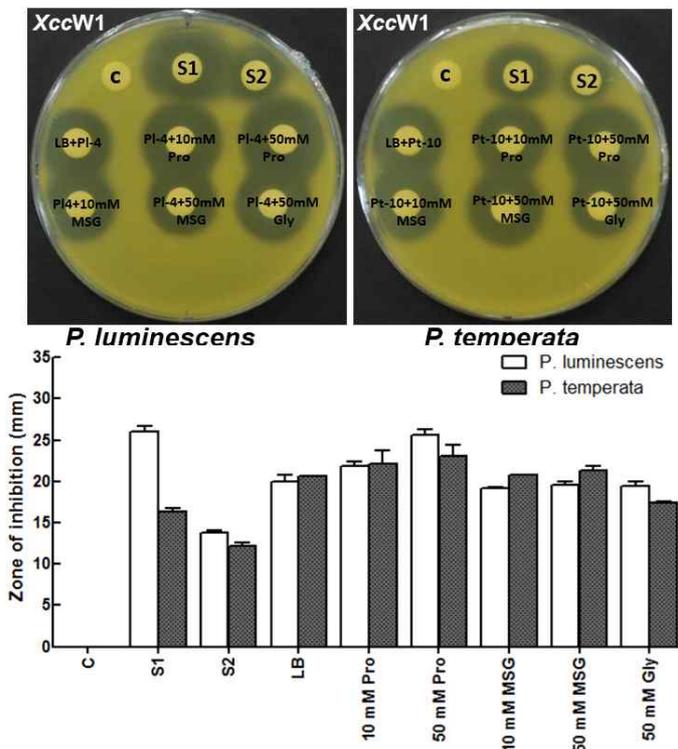
○ 항생 효능을 검정하기 위해, 감귤궤양병원균인 *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 에 *X. nematophils*/*P. luminescens* subsp. *luminescens*의 배양체에 대한 ethyl acetate 추출물을 처리하여 이들 세균들 배양체의 항생 활성을 검정한 결과를 그림 11로 표시하였다.



1. Metabolite working solution: 25mg/ml of methanol
2. 1-3: Xenorhabdus metabolite;
11-13: Photorhabdus metabolite
3. S1 and S2 contains 0.5mg/μl and 0.1mg/μl of streptomycin respectively (using 30μl)
3. C=30μl HPLC grade methanol

그림 11. *X. nematophils*/*P. luminescens* subsp. *luminescens* 배양체의 ethyl acetate 추출물이 감귤궤양병을 억제하는 항생 효능 평가 1 차 실험

○ 항생 효능을 검정하기 위해, 감귤궤양병원균인 *Xanthomonas citri* subsp. *citri*의 wild-type (항생제 저항성이 없는 균주)에 *P. luminescens* subsp. *luminescens*와 *P. temperata*의 배양체에 대한 ethyl acetate 추출물을 처리하여 이들 세균들 배양체의 항생 활성을 검정한 결과를 그림 12로 표시하였다.



C: MeOH; S1 and S2: 0.5 mg/ml and 0.1 mg/ml Streptomycin, respectively (using 30 μ l)

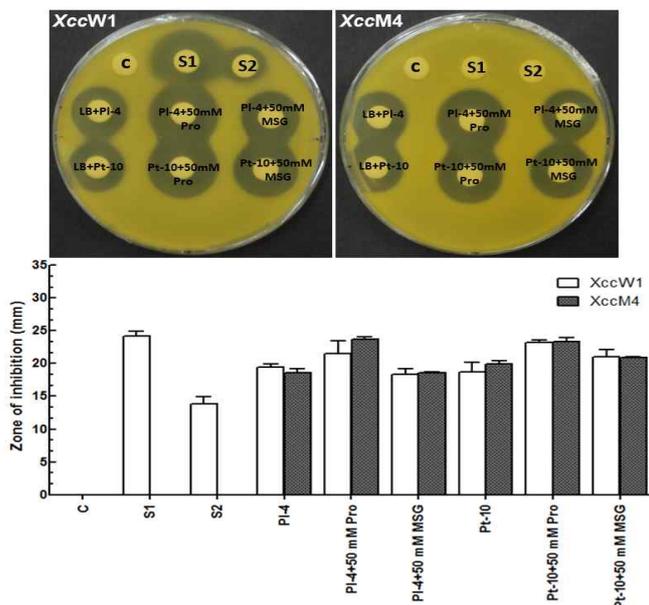
- 1, 11: LB;
- 2,12: 10 mM Proline;
- 3, 13: 50 mM Proline;
- 4,14: 10 mM MSG;
- 5,15: 50 mM MSG;
- 6, 16: 50 mM MSG

Metabolite conc: 10 mg/ ml

C=30 μ l HPLC grade methanol

그림 12. *P. luminescens* subsp. *luminescens*와 *P. temperata* 의 배양체에 대한 ethyl acetate 추출물이 감귤궤양병 wild-type을 억제하는 항생 효능 평가

○ 항생 효능을 검정하기 위해, 감귤궤양병원균인 *Xanthomonas citri* subsp. *citri*의 wild-type 균주와 항생제 저항성 균주에 *P. luminescens* subsp. *luminescens* 의 배양체에 대한 ethyl acetate 추출물을 처리하여 이들 세균들 배양체의 항생 활성을 검정한 결과를 그림 13로 표시하였다.



C: MeOH; S1 and S2: 0.5 mg/ml and 0.1 mg/ml Streptomycin, respectively (using 30 μ l)

- 1, 11: LB;
- 2,12: 10 mM Proline;
- 3, 13: 50 mM Proline;
- 4,14: 10 mM MSG;
- 5,15: 50 mM MSG;
- 6, 16: 50 mM MSG

Metabolite conc: 10 mg/ ml

C=30 μ l HPLC grade methanol

그림 13. *P. luminescens* subsp. *luminescens*의 배양체에 대한 ethyl acetate 추출물이 감귤 궤양병 wild-type 과 항생제 저항성 균주를 억제하는 항생 효능 평가

○ *X. nematophils/P. luminescens* subsp. *luminescens* 배양체의 향균/항생 물질을 검증하기 위하여 배양체의 ethyl acetate 추출물에 대하여 HPLC-MS 분석을 시도하였다. LB 배지, 또는 LB 배지에 10 mM MSG 혹은 50 mM MSG를 첨가하였고, 이들 배지에 *X. nematophils/P. luminescens*를 5일간 기른 후 배양체를 ethyl acetate로 추출하여 이들의 254, 380 nm에서 흡광도를 측정된 결과 및 peak 차이점을 그림 14, 15, 16에 나타내었다.

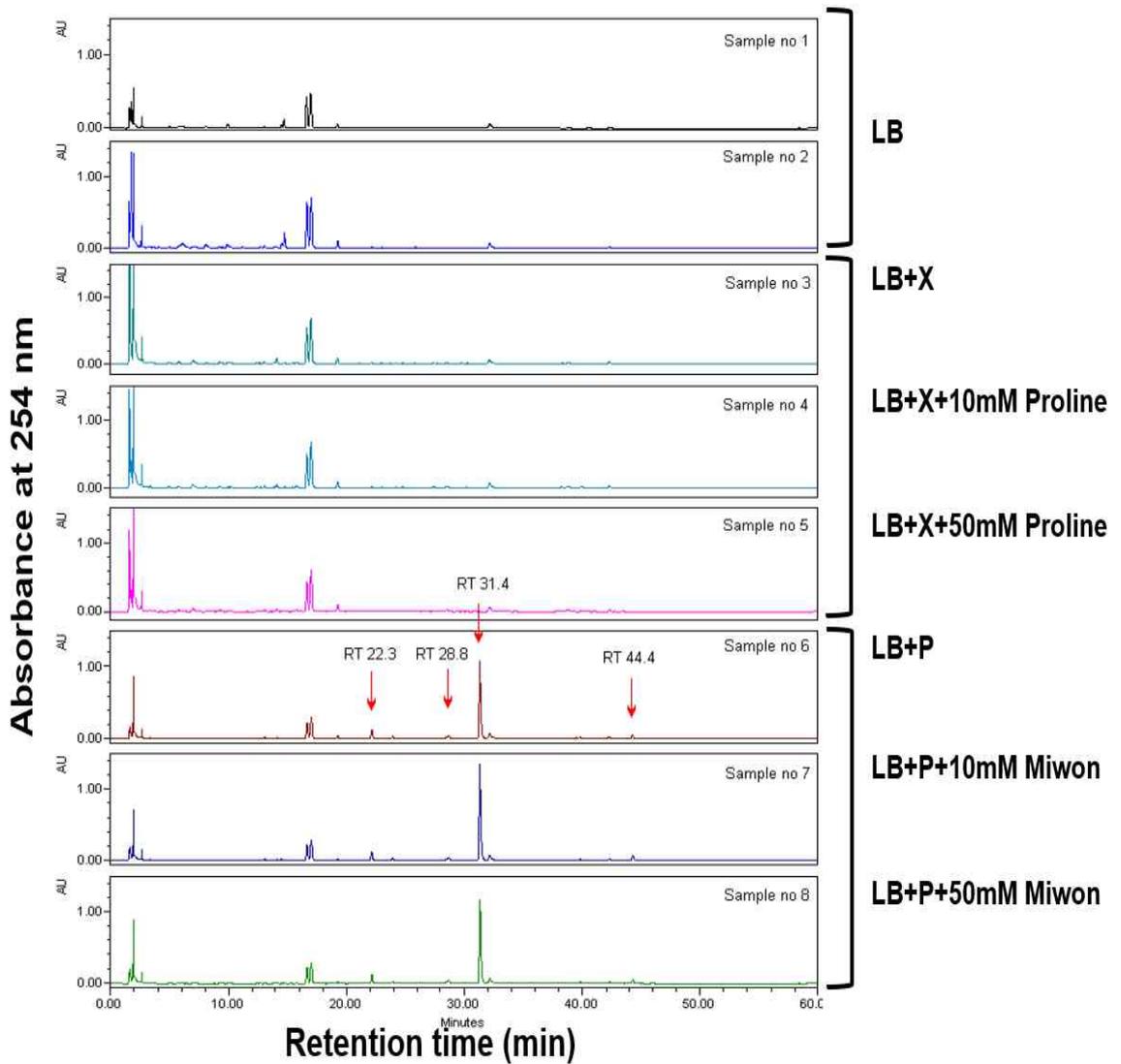


그림 14. *X. nematophils/P. luminescens* subsp. *luminescens* 배양체의 ethyl acetate 추출물에 대한 254 nm 흡광도

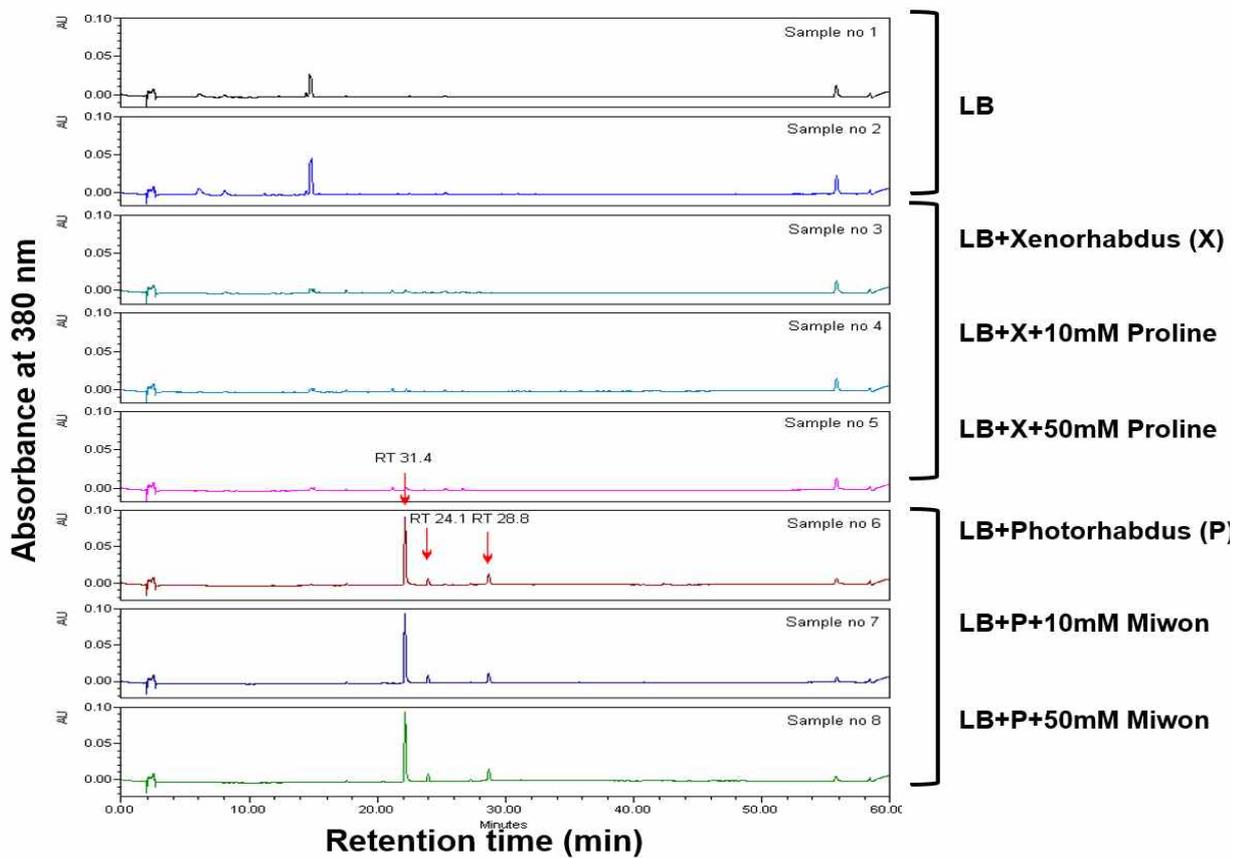
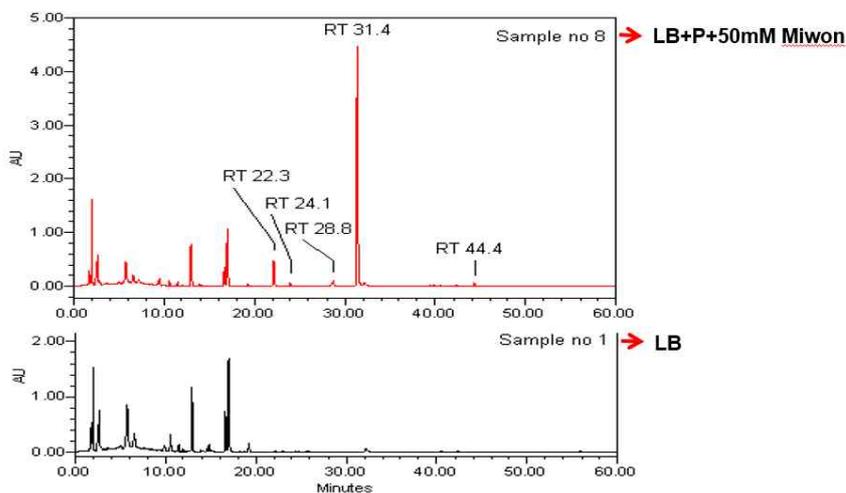


그림 15. *X. nematophils*/*P. luminescens* subsp. *luminescens* 배양체의 ethyl acetate 추출물에 대한 380 nm 흡광도

Sample no 1과 8의 210-400nm 흡광 chromatogram (PDA max plot)



* Sample no 8의 특이적 peak; RT = 22.3, 24.2, 28.8, 31.4, 44.4

그림 16. 미원 (MSG, monosodium glutamate) 50 mM 농도인 배지에서 자란 *P. luminescens* subsp. *luminescens* 배양체에서의 특이적 peak 확인

○ 미원 (MSG, monosodium glutamate) 50 mM 농도의 LB 배지에서 자란 *P. luminescens* subsp. *luminescens* 배양체의 ethyl acetate 추출물에서 HPLC-MS 분석을 시도하였을 때, Positive와 negative mode 분석 결과 일치하는 물질들은 분자량 (MW) = 286, 270, 411, 254, 538 인 것을 그림 17에 나타내었다.

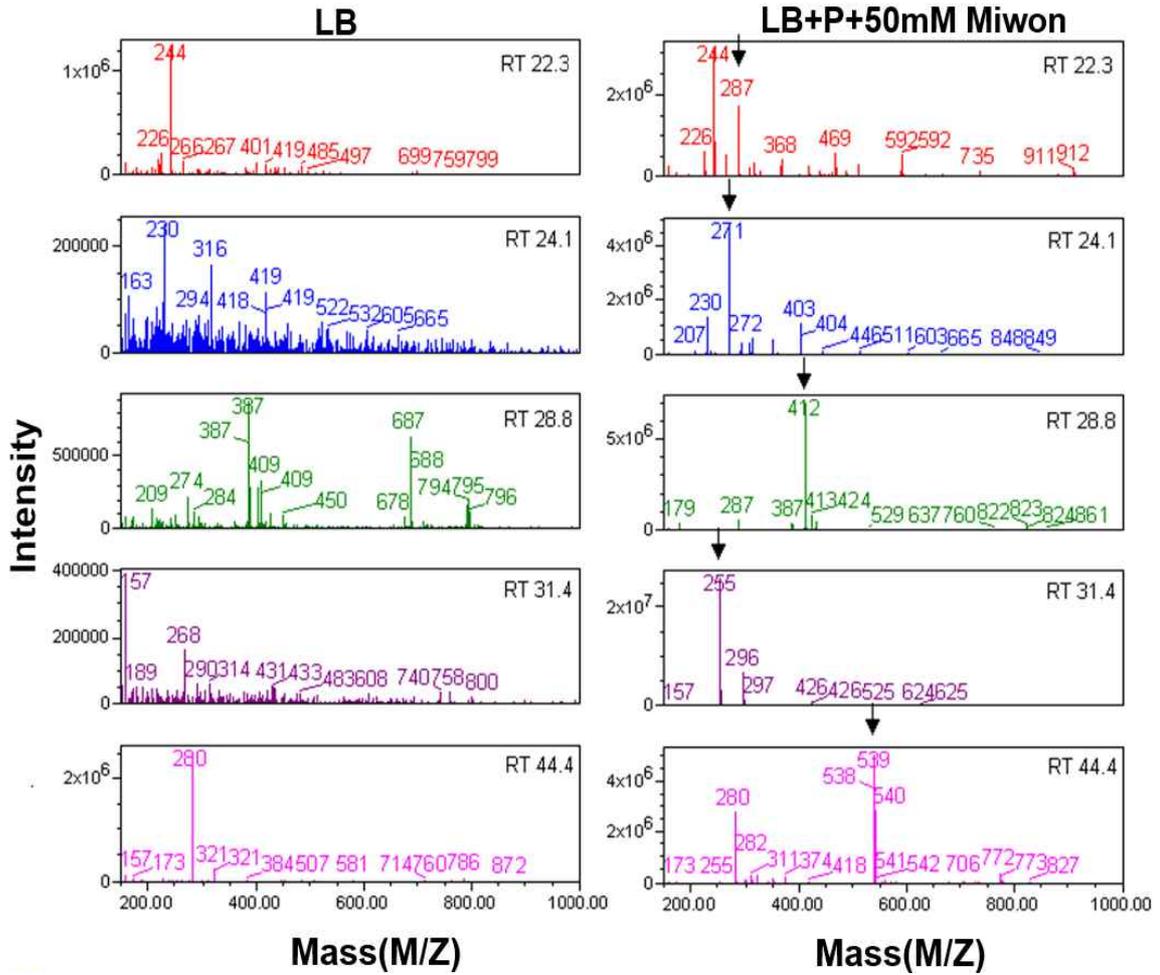


그림 17. 미원 (MSG, monosodium glutamate) 50 mM 농도 LB 배지에서 자란 *P. luminescens* subsp. *luminescens* 배양체에서 분석된 MS 피크

○ *P. luminescens* subsp. *l. imnescens*의 향균/향생 물질을 검증하기 위하여 배양체의 ethyl acetate 추출물에 대하여 HPLC-MS 분석을 시도하였다. LB 배지, 또는 LB 배지에 최종 농도 10 mM 혹은 50 mM L-Proline를 첨가하였고, 이들 배지에 *P. luminescens*를 5일간 기른 후 배양체를 ethyl acetate로 추출하여 이들의 254 nm에서 흡광도를 측정 한 결과를 그림 18로 나타내었다.

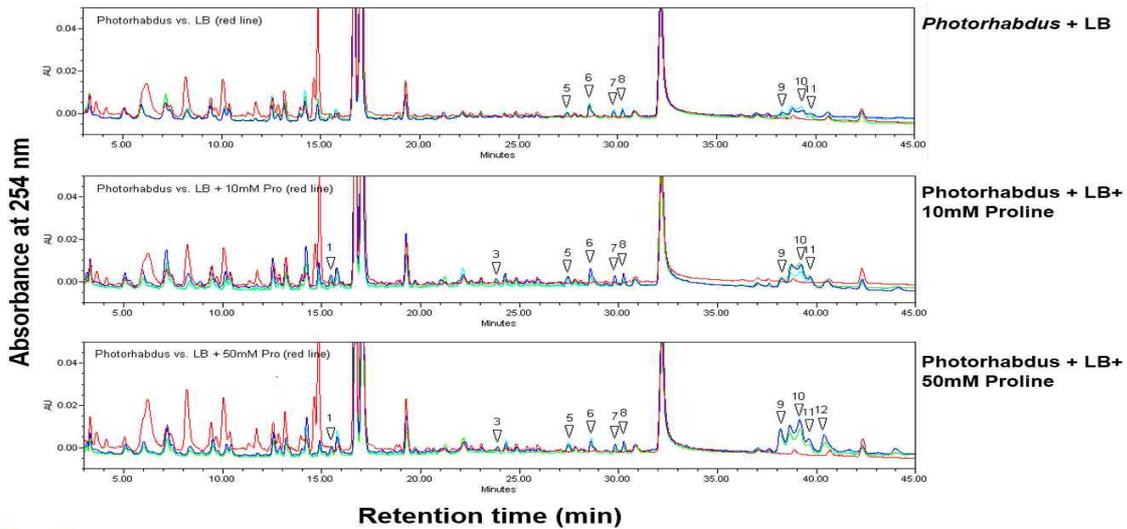


그림 18. *P. luminescens* subsp. *l. imnescens*의 배양체의 ethyl acetate 추출물에 대한 254 nm 흡광도를 통한 에서의 물질 변화 확인

○ LB 배지, 또는 LB 배지에 최종농도 10 mM 또는 50 mM L-Proline로 첨가하여, 이들 배지에 *P. luminescens*를 5일간 기른 후 배양체를 ethyl acetate로 추출하여 HPLC에서 차이가 나는 물질을 Mass spectroscopy 방법을 이용하여 분석한 결과를 그림 19에 표시하였다.

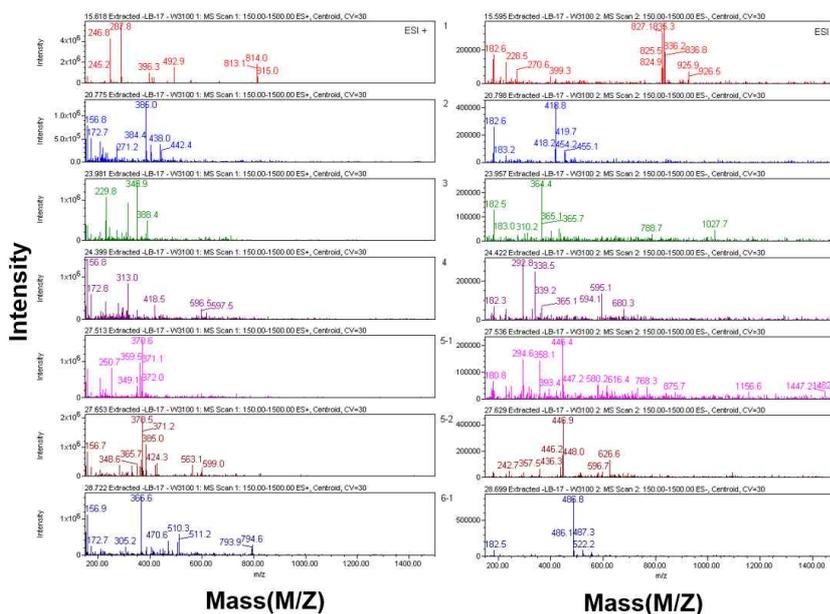


그림 19. LB 배지, 또는 LB 배지에 최종농도 10 mM 또는 50 mM L-Proline로 첨가하여 배양한 *P. luminescens* subsp. *l. imnescens*의 배양체의 ethyl acetate추출물 Mass spectra결과

○ X. nematophils의 향균/항생 물질을 검증하기 위하여 배양체의 ethyl acetate 추출물에 대하여 HPLC-MS 분석을 시도하였다. LB 배지, 또는 LB 배지에 최종농도 10 mM 혹은 50 mM MSG를 첨가하였고, 이들 배지에 X. nematophils를 5일간 기른 후 배양체를 ethyl acetate로 추출하여 이들의 254 nm에서 흡광도를 측정 한 결과는 그림 20에 나타내었다.

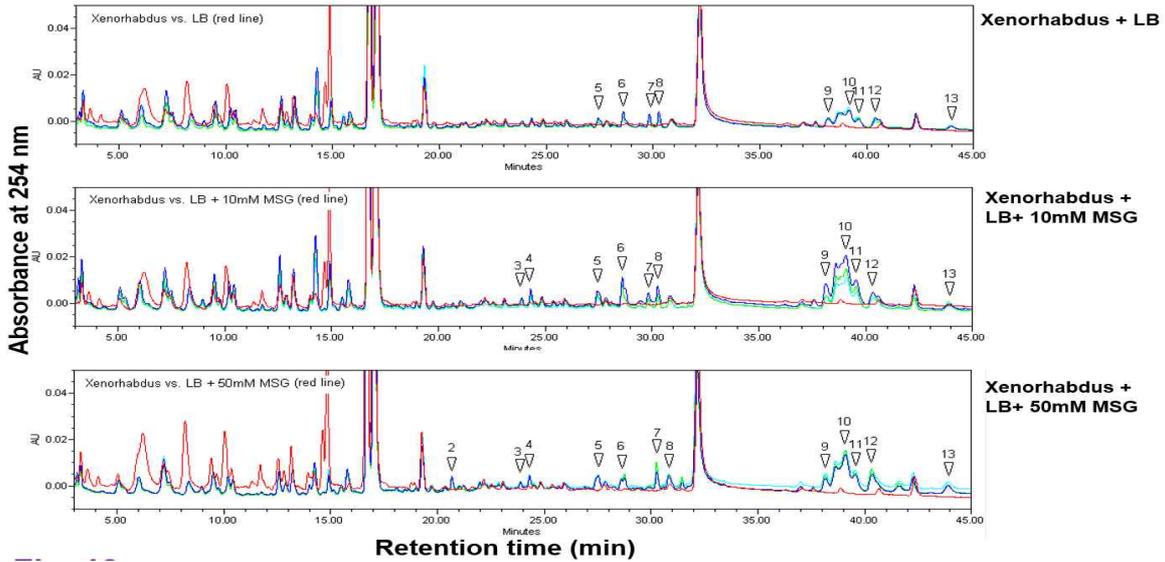


그림 20 X. nematophils의 배양체의 ethyl acetate 추출물에 대한 254 nm 흡광도 분석

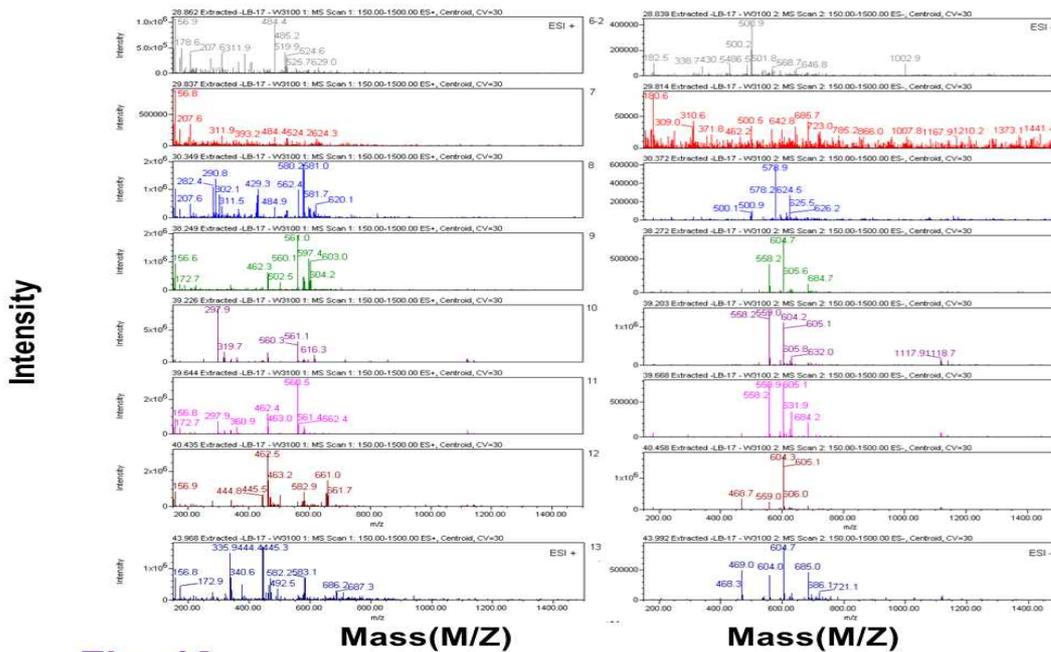


그림 21. X. nematophils의 배양체의 ethyl acetate 추출물 Mass spectra 결과

○ LB 배지, 또는 LB 배지에 10 mM MSG 혹은 50 mM MSG를 첨가하였고, 이들 배지에 X. nematophils를 5일간 기른 후 배양체를 ethyl acetate로 추출하여 HPLC에서 차이가 나는 물질을 Mass spectroscopy 방법을 이용하여 분석한 결과를 그림 21에 표시하였다.

○ *P. luminescens* 50 mM MSG를 첨가하여 길렀을 때 (8번 샘플), Positive와 negative mode 분석 결과 일치하는 물질들은 분자량 (MW) 는 286, 270, 411, 254, 538 이었다. *P. luminescens* subsp. *luminescens*을 최종 농도 10 mM 또는 50 mM L-proline에 배양한 배양체 및 *X. nematophils*을 최종 농도 10 mM 또는 50 mM MSG에 배양한 배양체의 ethyl acetate 추출물에 대하여 HPLC-MS 분석을 시도하였을 때 생성되는 물질들의 분자량은 836,420,365,448,502,580,560,606,605 인 것으로 나타났으며 이들과 관련한 물질들을 표 1로 나타내었다.

표1. *X. nematophils/P. luminescens*에 MSG 또는 Proline을 첨가하여 배양시 HPLC-MS 분석을 통해 나타난 활성 타겟 물질들

First time HPLC-MS analysis				
Sl no.	Trivial name	Molecular formula	Ion mass [M+H] ⁺	Reported in <i>Xenorhabdus/Photorhabdus</i> spp.
1.	Photopyrone A	C ₁₅ H ₂₄ O ₃	253.170	<i>P. luminescens</i> , <i>P. temperate</i>
2.	Anthraquinone 270a/b	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	271.060	<i>P. luminescens</i>
3.	Anthraquinone 284a/b	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	285.075	<i>P. luminescens</i>
4.	Xenorhabdin	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O ₂ S ₂	285.073	Mostly found in <i>Xenorhabdus</i> spp. but also detected in <i>P. asymbiotica</i>
5.	Xenotetrapeptide	C ₂₁ H ₃₈ N ₄ O ₄	411.297	<i>X. nematophila</i>
6.	Glidobactin P3	C ₂₇ H ₄₆ N ₄ O ₇	539.343	<i>P. luminescens</i>
Second time HPLC-MS analysis				
Sl no.	Trivial name	Molecular formula	Ion mass [M+H] ⁺	Reported in <i>Xenorhabdus/Photorhabdus</i> spp.
1.	Xenortide B	C ₂₇ H ₃₆ N ₄ O ₂	449.292	<i>X. nematophila</i>
2.	GameXPepptide A	C ₃₂ H ₅₃ O ₆ N ₅	604.406	<i>P. asymbiotica</i> , <i>P. temperate</i> and <i>Xenorhabdus</i> spp.

4. 종합고찰

- 인삼 잘록병균 *Rhizoctonia solani*과 인삼 점무늬병 원인균 (*Alternaria panax*)에 대해, L-프롤린 또는 미원이 함유된 LB 배지에서 배양한 *X. nematophils*/*P. luminescens* subsp. *luminescens*를 처리하면 이들은 균사의 성장을 방해하였다. 특히 *X. nematophils*의 배양체 추출물은 인삼잘록병 균사 성장을 억제하였으며, *P. luminescens* subsp. *luminescens* 배양체의 ethyl acetate 추출물은 인삼 점무늬병 원인균을 억제하는 항균 효능이 높았다. *X. nematophils* L-프롤린을 첨가했을 때 항균 활성이, *P. luminescens* subsp. *luminescens*에 미원을 처리했을 때 추출물의 항균 활성이 높아졌다.
- 항생 효능을 검정에서 감귤궤양병원균인 *Xanthomonas citri* subsp. *citri*의 wild-type 균주와 항생제 저항성 균주에 대해 *P. luminescens* subsp. *luminescens*의 배양체에 대한 ethyl acetate 추출물이 항생 효능이 높았다.
- *X. nematophils*/*P. luminescens* subsp. *luminescens* 항균/항생 물질을 검증하기 위하여 배양체의 ethyl acetate 추출물에 대하여 HPLC-MS 분석을 시도하였을 때, MSG 또는 L-Proline을 첨가하여 배양하면 표 1에 나오는 물질들이 증대되거나 생성되는 것으로 확인되었다.

제 3절 고살충성 곤충병원성 선충 고체배양 제제의 현장적용 기술개발

1. 곤충병원성선충 2종의 액상 및 고체형 제제의 살충활성 비교

1) 꿀벌부채명나방(*Galleria mellonella*) 유충(larva)에 대한 액체 및 고체배양 곤충병원성 선충의 증식을 비교

- 곤충병원성선충(*Steinernema carpocapsae*)의 액체 및 고체배양 제제를 활용하여 꿀벌부채명나방의 5령 유충에 대한 체내 증식을 비교함
- 선충 배양방법은 white trap petri dish (90 mm 직경)에 유충 10마리를 넣고 선충을 접종함
- 선충은 4,500 J2/ml 넣고 25℃에서 10일간 배양함
- 증식된 선충을 수확하여 현미경하에서 그 밀도를 측정함
- 위 시험을 3반복함

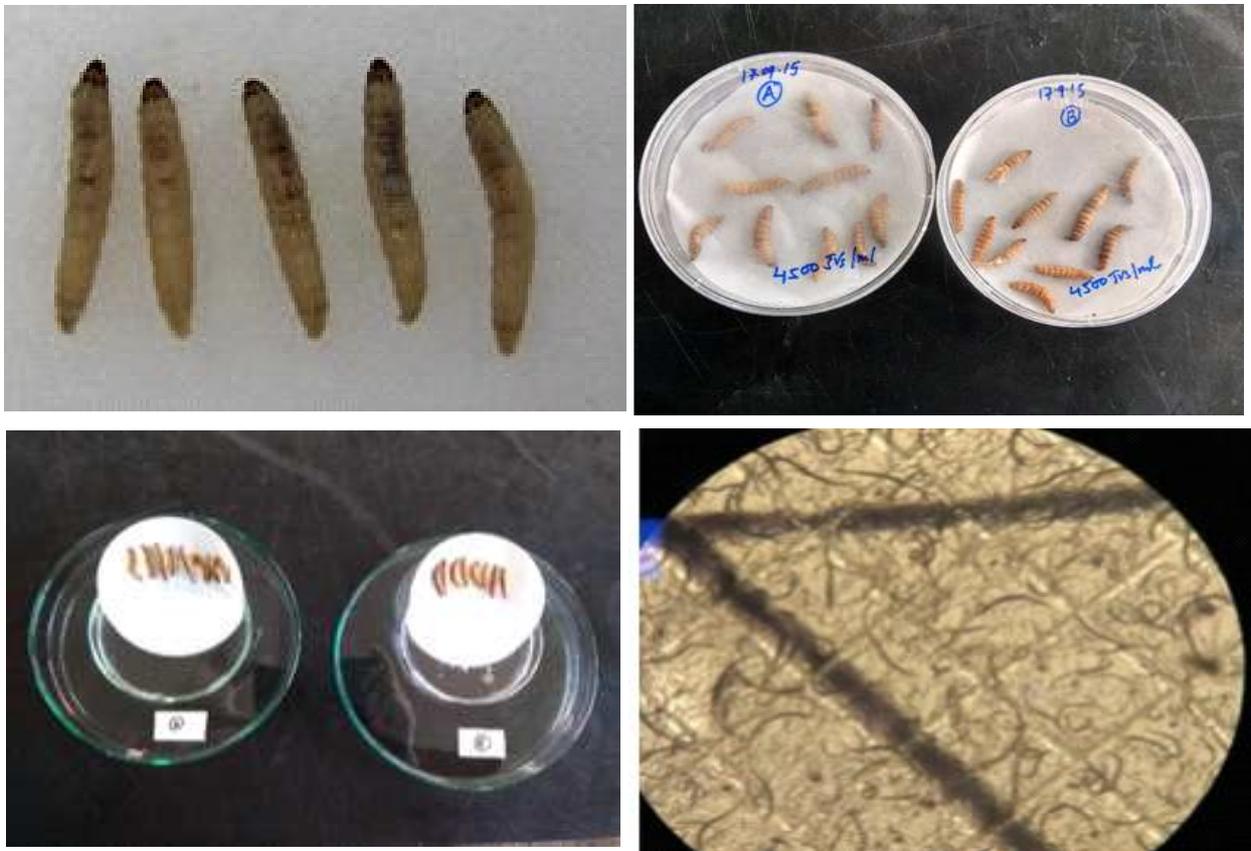


그림 1. 꿀벌부채명나방의 5령 유충을 이용하여 white trap harvesting method 으로 곤충병원성 선충을 감염시켜 증식함

새롭게 증식된 선충(J2) 수/ Galleria larva	
Liquid-culture	Solid-culture
17,172±3,906	25,285±999

- 증식된 선충의 밀도를 측정해 본 결과 Galleria 유충 한 마리당 액체배양한 선충은 17,000여마리로 증식되었는데 고체배양한 선충은 25,000여마리로 증식되었다. 즉, 고체배양한 선충이 Galleria 유충의 체내에서 액체배양 선충보다 약 1.5배 더 증식되었음

2) 꿀벌부채명나방 번데기(pupa)에 대한 액체배양 및 고체배양 곤충병원성 선충의 해충 체내에서 증식율 비교

- 곤충병원성 선충(*Steinernema carpocapsae*)의 액체배양 및 고체배양 시료를 활용하여 꿀벌부채명나방 번데기에 대한 살충율을 비교함
- 선충 배양은 white trap petri dish (90 mm 직경)에 번데기 5마리를 넣고 선충을 접종함
- 선충은 450 J2/ml 주입시키고 25°C에서 14일간 배양함
- 증식된 선충을 수확하여 현미경하에서 그 밀도를 측정함
- 위 시험을 3반복함

새롭게 증식된 선충(J2) 수/ Galleria pupa	
Liquid-culture	Solid-culture
576±132	2,304±847

- Galleria 번데기 한 마리당 증식된 선충의 밀도를 측정해 본 결과 액체배양한 선충은 576마리인데 고체배양한 선충은 2,304여마리로 증식되었다. 즉, 고체배양한 선충이 Galleria 번데기의 체내에서 액체배양 선충보다 약 4배 더 증식되었음

3) 화랑곡나방(*Plodia interpunctella*) 유충에 대한 액체배양 및 고체배양 곤충병원성 선충의 해충 체내에서 증식율 비교

- 곤충병원성선충(*Steinernema carpocapsae*)의 액체배양 및 고체배양 시료를 활용하여 화랑곡나방의 유충에 대한 살충율을 비교함
- 선충 배양방법은 white trap petri dish (90 mm 직경)에 유충 10마리를 넣고 선충을 접종함
- 선충은 4,500 J2/ml 넣고 25°C에서 10일간 배양함
- 증식된 선충을 수확하여 현미경하에서 그 밀도를 측정함

새롭게 증식된 선충(J2) 수/ Plodia larva	
Liquid-culture	Solid-culture
1,020±28.3	1,251.3±41.9

- 화랑곡나방 5령 유충 한 마리당 증식된 선충의 밀도를 측정해 본 결과 액체배양한 선충은 1,020마리인데 고체배양한 선충은 1,251마리로 증식되었다. 즉, 고체배양 선충이 액체배양 선충보다 약 1.2배 더 증식됨

4) 작은뿌리파리 유충에 대한 액체배양 및 고체배양 곤충병원성 선충의 해충 체내에서 증식을 비교

- 부추를 재배하여 작은뿌리파리(*Bradysia agrestis*) 증식시킴
- 곤충병원성선충(*Steinernema carpocapsae*)의 액체배양 및 고체배양 시료를 활용하여 작은 뿌리파리 유충에 대한 살충율을 비교함
- 선충 배양방법은 white trap petri dish (90 mm 직경)에 유충 10마리를 넣고 선충을 접종함
- 선충은 1,000 J2/ ml 넣고 25°C에서 10일간 배양함
- 증식된 선충을 수확하여 현미경하에서 그 밀도를 측정함

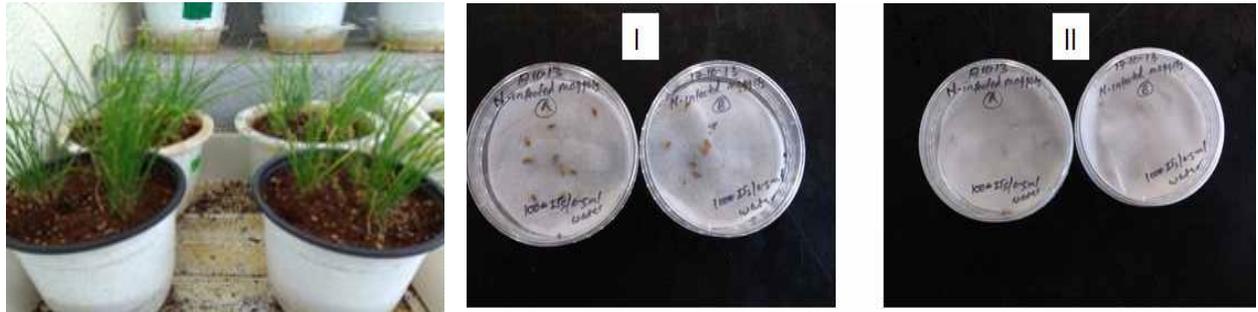


그림 2. 부추에 키운 작은뿌리파리에 대한 액체배양 및 고체배양 제제의 살충활성 비교

새롭게 증식된 선충(J2) 수/ <i>Bradysia larva</i>	
Liquid-culture	Solid-culture
112±35.2	253±172.8

- *Bradysia* 유충 한 마리당 증식된 선충의 밀도를 측정해 본 결과 액체배양한 선충은 112마리 인데 고체배양한 선충은 253마리로 증식되었다. 즉, 고체배양한 선충이 *Bradysia* 유충의 체 내에서 액체배양 선충보다 약 2.3배 더 증식됨

2. 곤충병원성선충 2종으로 다양한 해충에 대한 선충제제의 활성 비교

1) 작은뿌리파리 유충에 대한 곤충병원성 선충 2종의 살충효과 비교분석

가) 작은뿌리파리의 증식

- 온실에서 채집한 작은뿌리파리(*Bradysia impatiens*)의 염기서열을 확인하여 종을 진단하고 부추 화분에서 증식시킴
- 2 종의 곤충병원성선충(*Steinernema carpocapsae*, *Heterorhabditis indica*)을 꿀벌부채명나방 유충을 활용하여 증식시킴
- 대상해충인 작은뿌리파리 유충(n=25)에 대한 선충 (350 IJs/maggot/2 ml water)을 처리하고 25°C에서 7일간 살충율을 비교함
- 선충 배양방법은 white trap petri dish (90 mm 직경)에 유충 10마리를 넣고 선충을 접종함
- 감염된 작은뿌리파리 유충의 증상을 현미경으로 관찰함



그림 3. 작은뿌리파리를 부추에서 증식함. 작은뿌리파리 유충에 DDK-S 처리후 살충율 분석함

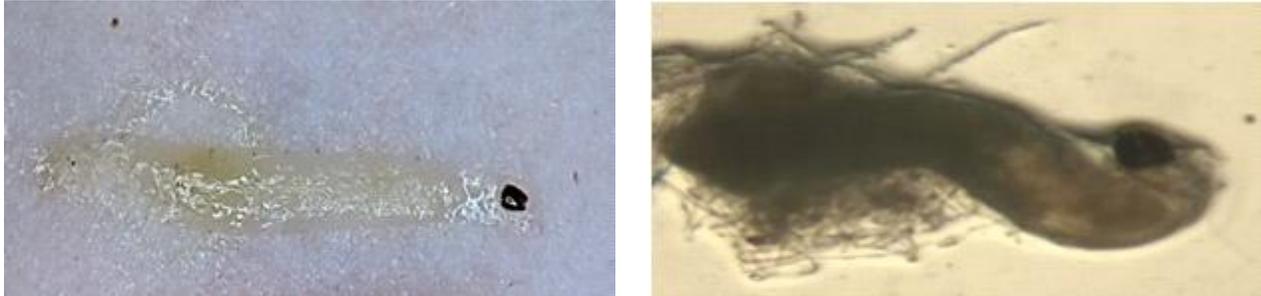


그림 4. *Steinernema carpocapsae*에 감염된 작은뿌리파리 유충의 초기(좌) 및 후기(우) 상태



그림 5. *Heterorhabditis indica*에 감염된 작은뿌리파리 유충의 초기(좌) 및 후기(우) 상태

나) 곤충병원성선충 2종을 활용한 작은뿌리파리의 살충효과

- 곤충병원성 선충을 처리에 의하여 작은뿌리파리 유충의 살충율이 7일간 서서히 증가했으며 *S. carpocapsae* 처리시 78%, *H. indica* 처리시 94%로 나타남 (그림 6)
- 작은뿌리파리의 살충율에 대한 LT50 값은 *S. carpocapsae* 처리시 104.28시간(4.35일), *H. indica* 처리시 48.47시간(2.02일) 나타남
- 곤충병원성 선충의 증식율은 작은뿌리파리 한 개체당 *S. carpocapsae* 554±19마리, *H. indica* 672±22마리 증식했음 (그림 6)
- 즉, 작은뿌리파리의 경우 *S. carpocapsae* 보다 *H. indica*의 효과가 높았는데 살충시간도 2.2배 빠르고 증식율도 1.2배 높게 나타남

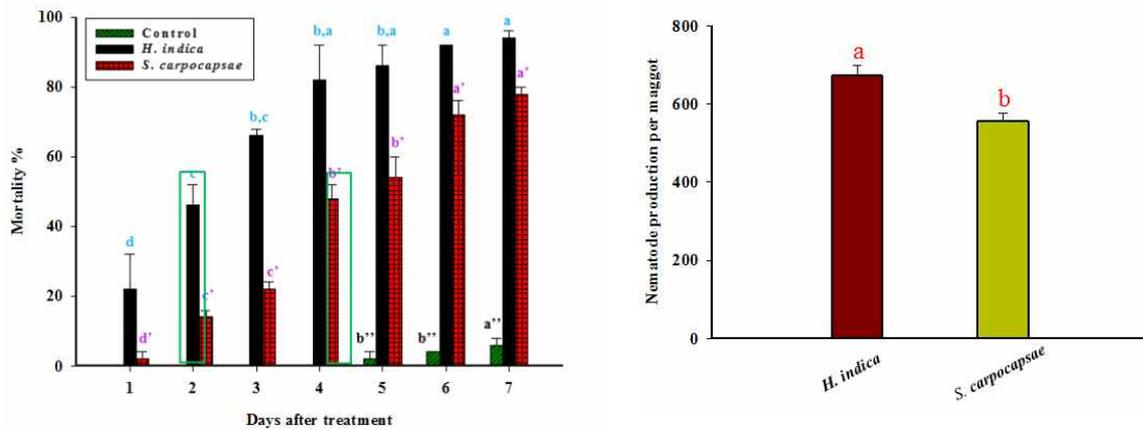


그림 6. 작은뿌리파리에 대한 곤충병원성 선충 2종의 살충율 및 증식을 비교

표 1. 2종의 곤충병원성 선충 처리에 대한 작은뿌리파리 살충율 LT50 값 비교

Nematode species	Time (h)	
	LT50	95% fiducial limit
<i>S. carpocapsae</i>	104.28 h (4.35 d)	94.37-115.81
<i>H. indica</i>	48.47 h (2.02 d)	40.78-55.60

다) 화분을 활용한 곤충병원성선충 2종의 작은뿌리파리 살충효과

- 멸균소독한 상토를 화분(8.5×9.5 cm²)에 넣고 약 50마리의 작은뿌리파리 유충을 추가한 후에 곤충병원성 선충(6000 IJs/3ml/pot)을 처리함
- 작은뿌리파리의 살충율은 *S. carpocapsae* 처리시 32%, *H. indica* 처리시 68%로 나타남

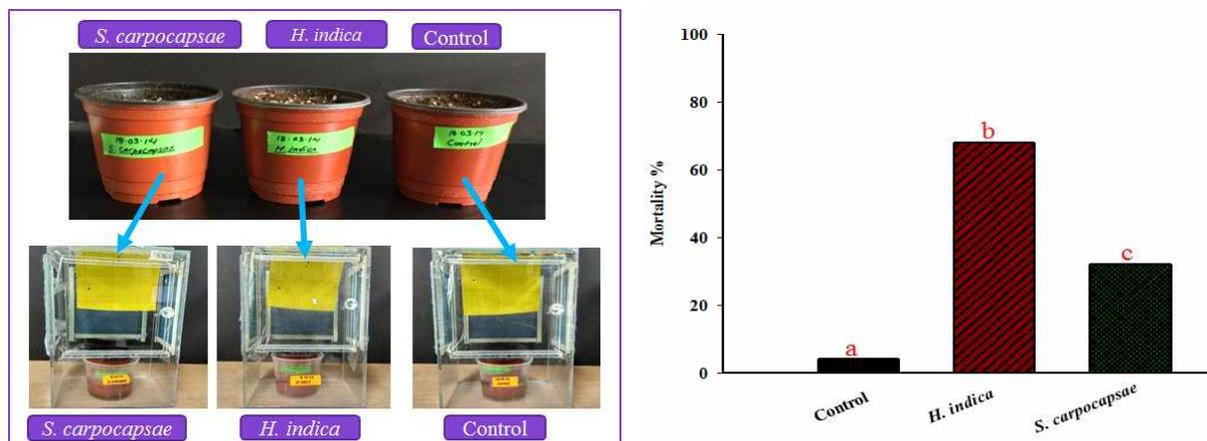


그림 7. 2종의 곤충병원성 선충을 활용한 작은뿌리파리 살충율 비교를 위한 pot시험

2) 잔디해충으로서 담배거세미나방(*Spodoptera litura*) 유충에 대한 4종의 곤충병원성 선충 처리효과 비교분석

- 담배거세미나방은 작물뿐만 아니라 잔디 등 다양한 식물의 토양에서 뿌리와 줄기 인접부 및 잎을 가해하는 해충으로서 본 연구에서 활용한 4종(*H. bacteriophora*, *H. indica*, *S. carpocapsae*, *S. longicaudum*)의 곤충병원성 선충에 대한 살충효과가 유의성 있게 나타남
- 담배거세미나방 유충의 다양한 발달단계(1령-6령)(n=10)에 대하여 2종의 곤충병원성 선충 (75IJs/ml/larva)를 처리하고 24시간 및 48시간 살충율을 관찰함

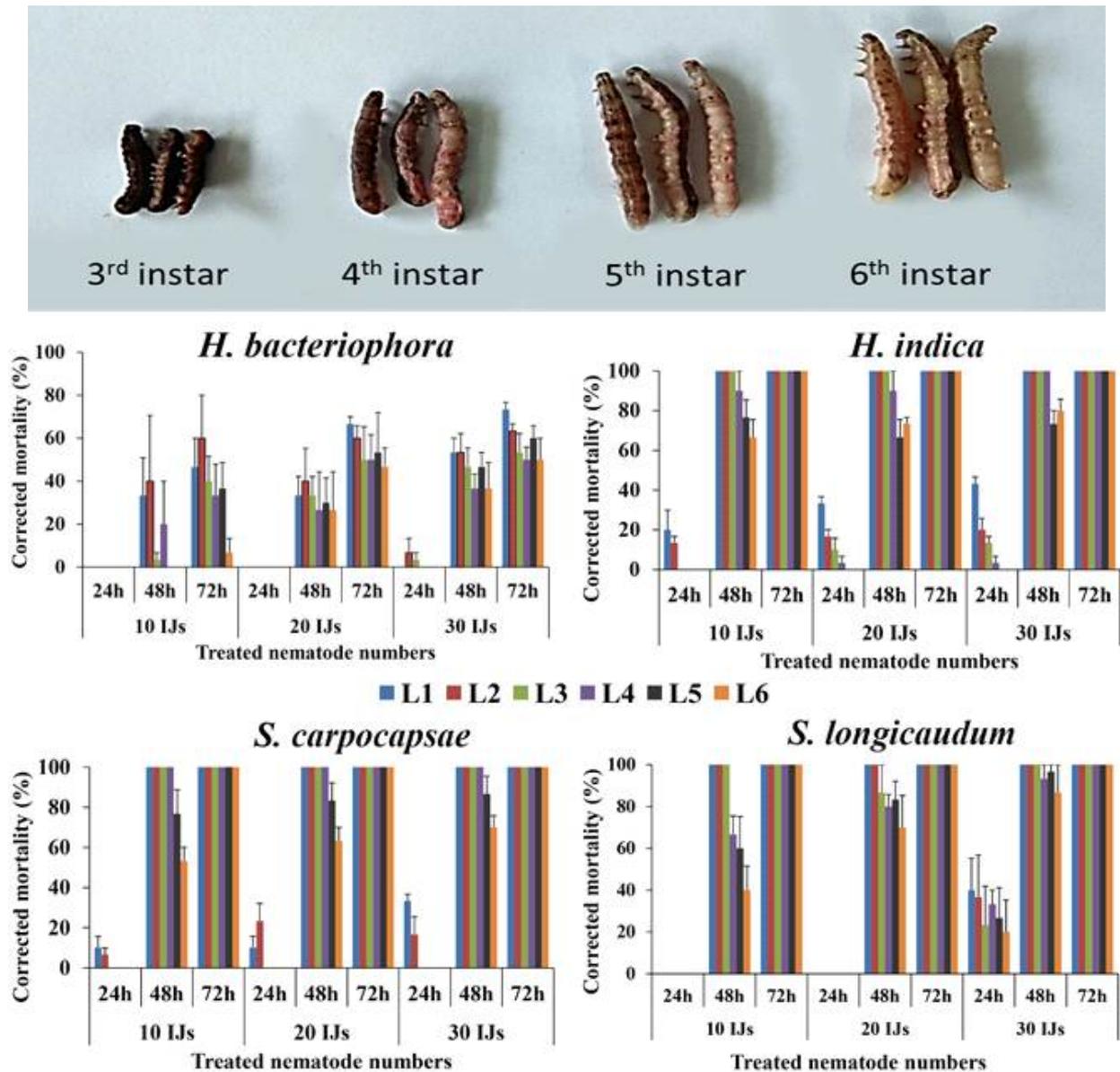


그림 8. 담배거세미나방의 다양한 유충 발달단계에 대한 4종의 곤충벼우연성 선충의 살충 효과

- 살충율은 곤충벼우연성 선충의 처리밀도에 비례했으며 어린 유충이 노숙유충보다 높게 나타남
- 담배거세미나방의 살충율은 *H. bacteriophora* 보다 *H. indica*, *S. carpocapsae*, *S. longicaudum*에서 높게 나타났음

3. 곤충병원성 선충 제제의 현장적용에 대한 방제효과 분석

1) 오이 시설재배지의 토양해충 방제를 위한 곤충병원성 선충 현장적용 시험

- 경북 군위군 효령면 오이재배농가에서 씨고자리파리(*Delia platura*) 발생이 많으며 그 피해인 뿌리와 줄기사이의 피해 흔적과 구더기 다량 발견함 (2018.5)
- 씨고자리 피해는 유포시기에 전체의 약 7% 개체가 피해를 입어 고사함
- 끈끈이트랩에서 씨고자리 성충은 수는 230여마리/트랩 이었으며 피해 개체에서 씨고자리 유충이 1-15마리/개체로 관찰됨
- 곤충병원성 선충 *Steinernema carpocapsae* 배양액을 오이재배지에 처리하여 씨고자리 발생억제효과를 조사함
- 선충배양액을 7일 간격으로 2회 관주 처리함
- 곤충병원성 선충 배양액을 2회 처리후 1달 경과시에 씨고자리 성충의 발생이 10여마리/트랩으로 현저히 줄어들었고 피해 입은 오이 개체수가 거의 나타나지 않았음



그림 9. 오이재배지의 씨고자리 발생 및 곤충병원성 선충 처리

2) 곤충병원성 선충을 이용한 잔디해충인 굽벥이의 방제 실험

가) 재료 및 방법

굽벥이의 경우 식용곤충으로 사육 중인 농가에서 분양을 받아 실험에 이용하였다. 굽벥이 2령과 3령의 사이즈로 분양을 받아서 각각 실험에 이용하였다.



그림 10. 흰점박이꽃무지 굽벥이 2령 및 3령 유충

(1) 2령의 흰점박이꽃무지 굽벥이의 방제 실험

50ml tube에 2령의 굽벥이 1마리씩 넣었다. 굽벥이 1마리당 곤충병원성 선충 50마리, 100마리, 500마리, 1,000마리를 접종하였다. 대조군으로는 멸균수만 접종하였다. 25℃에서 보관하며 굽벥이의 상태를 확인하였다. 실험은 3반복으로 진행하였다.

(2) 3령의 흰점박이꽃무지 굽벥이의 방제 실험

50ml tube에 3령의 굽벥이 1마리씩 넣었다. 굽벥이 1마리당 곤충병원성 선충 50마리, 100마리, 500마리, 1,000마리를 접종하였다. 대조군으로는 멸균수만 접종하였다. 25℃에서 보관하며 굽벥이의 상태를 확인하였다. 실험은 3반복으로 진행하였다.

나) 결과

(1) 2령의 흰점박이꽃무지 굽벥이의 방제 실험

곤충병원성선충을 이용하여 흰점박이꽃무지 굽벥이에 대해 방제 효과를 실험하였다. *Steinernema carpocapsae*의 경우 굽벥이 1마리당 1,000마리를 접종하여도 낮은 방제율을 나타내었다. 이는 *Steinernema carpocapsae*는 나방류와 파리류에 높은 침투율을 나타내고 공생박테리아가 분비하는 독성물질이 또한 나방류와 파리류에 더 높은 독성을 나타내는 것으로 사료된다. *Heterorhabditis bacteriophora*의 경우는 굽벥이 1마리당 1,000마리 접종하였을 때에 21일 이후 70%의 방제 효과를 나타내었다. 이는 *Heterorhabditis bacteriophora*가 *Steinernema carpocapsae*보다 굽벥이에 침투율이 높고, 공생박테리아가 분비하는 독성물질이 굽벥이에 대해 더 높은 병원성을 나타내는 것으로 사료된다.

표 1. 2령의 흰점박이꽃무지 굽벥이에 대한 방제율(%)

	무처리	<i>Steinernema carpocapsae</i>				<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>			
		50	1000	500	1,000	50	100	500	1,000
3일	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7일	0	0	0	0	0	0	0	0	20
15일	0	0	0	0	20	0	20	30	60
21일	0	0	0	10	30	10	40	60	80

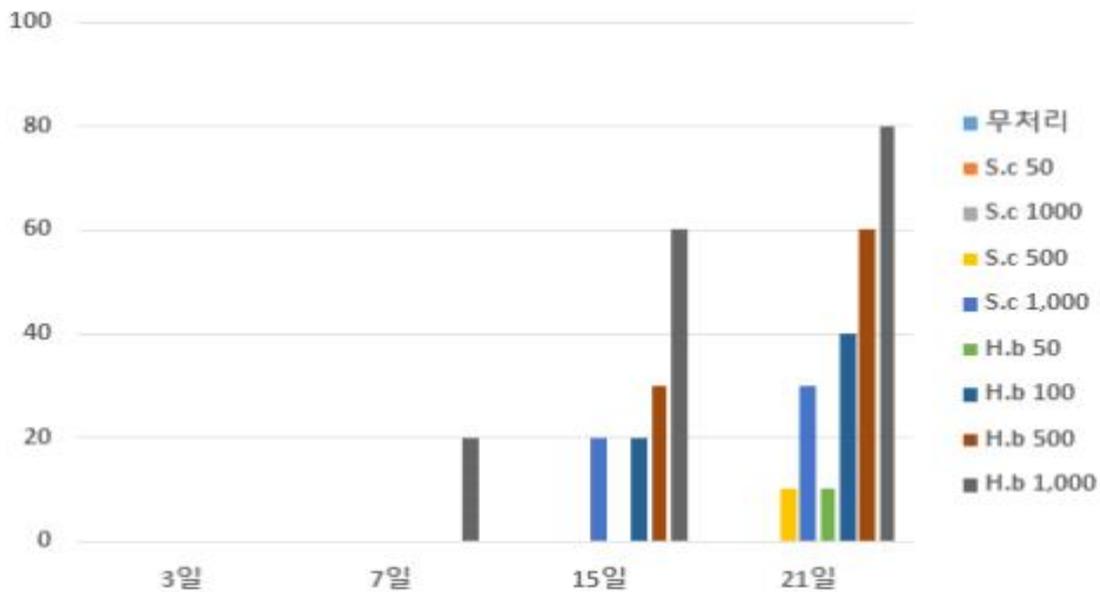


그림 11. 2령의 흰점박이꽃무지 굽벥이에 대한 방제율(%)

(2) 3령의 흰점박이꽃무지 굽벥이의 방제 실험

곤충병원성선충을 이용하여 흰점박이꽃무지 굽벥이에 대해 방제 효과를 실험하였다. *Steinernema carpocapsae*의 경우 굽벥이 1마리당 1,000마리를 접종하여도 굽벥이에 대해 병원성을 나타내지 못하였다. 이는 *Steinernema carpocapsae*는 나방류와 파리류에 높은 침투율을 나타내고 공생박테리아가 분비하는 독성물질이 또한 나방류와 파리류에 더 높은 독성을 나타내는 것으로 사료 된다. *Heterorhabditis bacteriophora*의 경우는 굽벥이 1마리당 1,000마리 접종하였을 때에 21일 이후 60%의 방제 효과를 나타내었다. 이는 *Heterorhabditis bacteriophora*가 *Steinernema carpocapsae*보다 굽벥이에 침투율이 높고, 공생박테리아가 분비하는 독성물질이 굽벥이에 대해 더 높은 병원성을 나타내는 것으로 사료 된다.

	무처리	<i>Steinernema carpocapsae</i>				<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>			
		50	1000	500	1,000	50	100	500	1,000
3일	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7일	0	0	0	0	0	0	0	0	10
15일	0	0	0	0	0	0	0	20	40
21일	0	0	0	0	0	0	20	50	70

표 2. 2령의 흰점박이꽃무지 굼벵이에 대한 방제율(%)

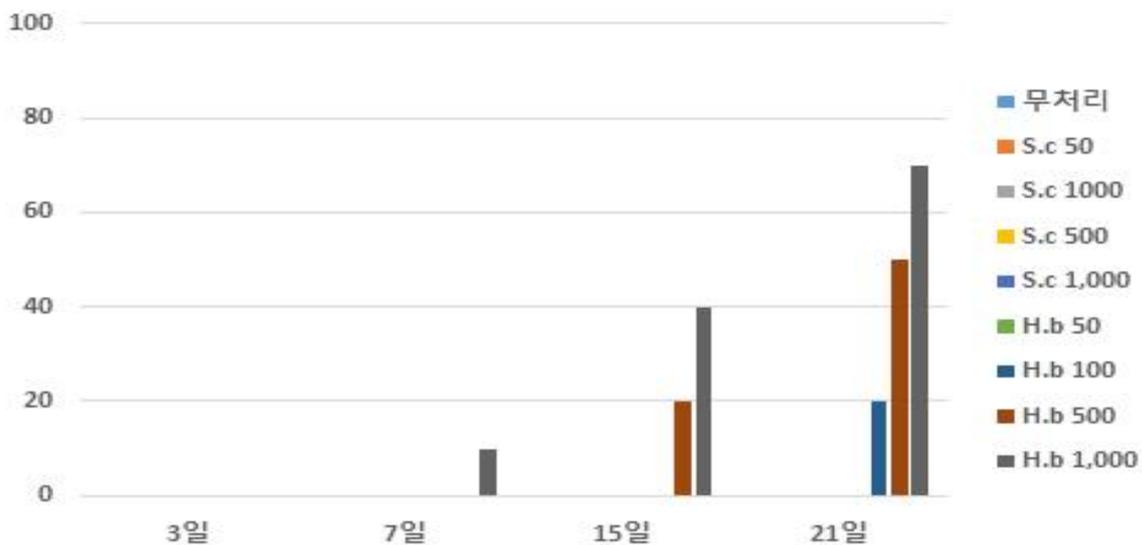


그림 12. 3령의 흰점박이꽃무지 굼벵이에 대한 방제율(%)

3) 버섯재배지의 곤충병원성 선충 현장적용 시험

가) 재료 및 방법

- 2018년 10월 느타리버섯 재배농가(군위군 소보면)에 다양한 파리류 해충의 발생이 심해 곤충병원성 선충을 활용한 방제 시험을 실시함
- 버섯 및 배지에 발생한 주요 파리 해충의 종 진단을 해 본 결과 버섯혹파리가 대부분이었고 그 외 긴수염버섯파리, 버섯벼룩파리 등이 일부 채집됨
- 고체배양 곤충병원성선충 제품 DDK-S(*S. carpocapsae* 2천만마리/50g박스)를 물 1L에 희석(2×10^7 마리/L)하여 7일 간격으로 3회 버섯배지위에 분사처리하고 처리후 3주간 버섯파리의 밀도를 측정함

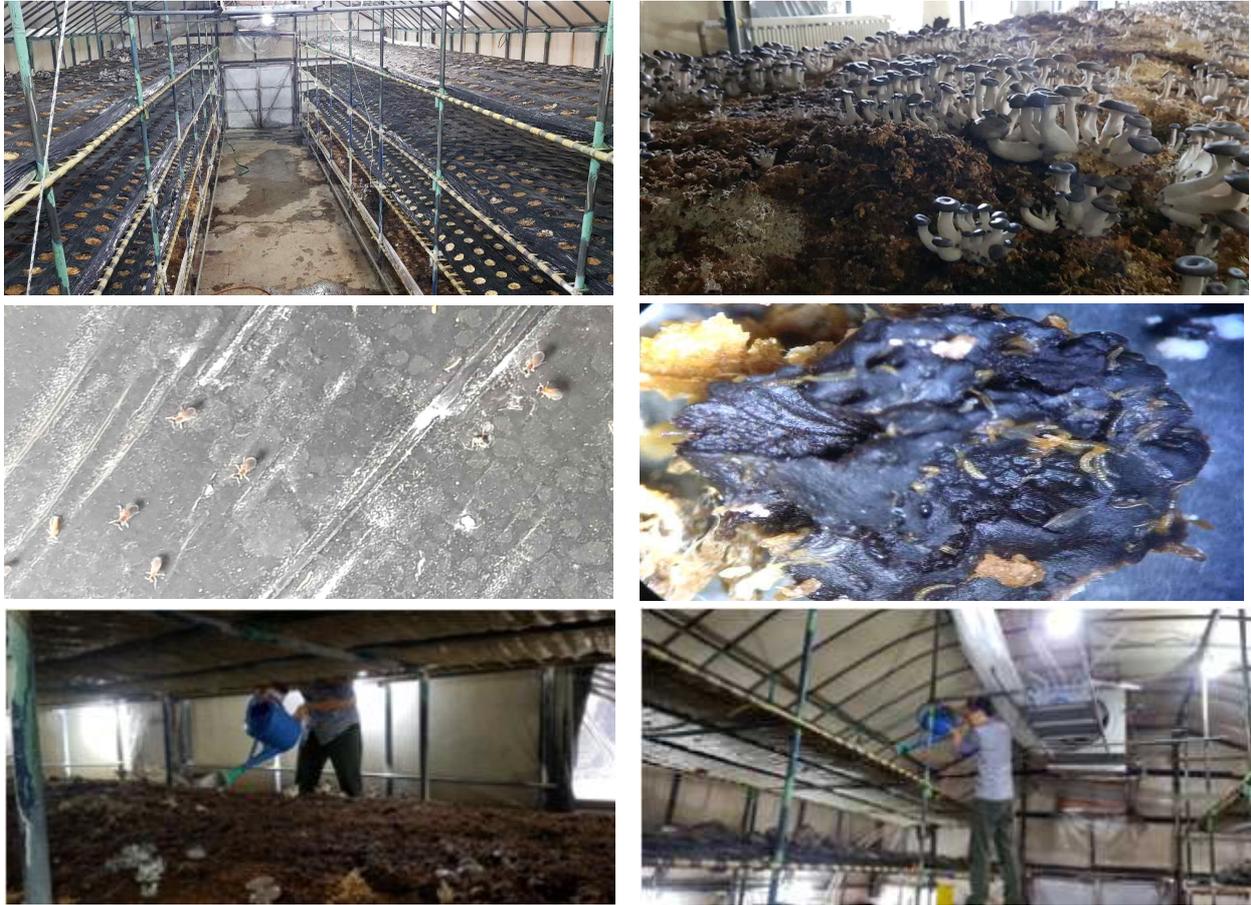


그림 13. 버섯재배농가(군위군 소보면)의 버섯파리 발생 및 곤충병원성 선충 현장적용 시험

나) 결과

- 곤충병원성 선충 처리전 버섯파리의 밀도는 버섯 1g당 218 ± 73.1 마리이었으나 3회 처리후 4주차에 채집한 버섯의 버섯파리 밀도는 27 ± 8.4 로 87.6%감소하였다.
- 고체배양 곤충병원성 선충 제제는 버섯재배지의 버섯파리 방제에 효과적인 것으로 판단된다.

4) 열대거세미나방(*Spodoptera frugiperda*)에 대한 곤충병원성선충의 방제 시험

- 열대거세미나방은 최근에 아프리카 및 아시아지역의 다양한 국가로 급속히 확산된 가장 대표적인 침입외래해충이다.
- 열대거세미나방은 남아메리카 원산인데 1980년대부터 다양한 작물에 피해를 끼치다가 2016년 아프리카로 유입되어 1년 이내에 아프리카 전역에 확산되어서 옥수수 재배에 엄청난 피해를 끼쳤으며 2018년에는 인도 및 동남아시아, 중국 남부에 확산되었고 2019년 6월에 우리나라 제주도에서 처음으로 발견되었으며 2019년 8월에는 우리나라 내륙의 여러 지역에서 동시다발적으로 발견이 되었었다.
- 이 해충은 1980년대부터 작물해충으로서 피해를 끼쳤는데 그동안 다양한 살충제를 처리하여 방제를 해 왔기 때문에 살충제에 대한 내성이 증가하여 아프리카 및 아시아 지역에서도 방제가 어려운 실정임. 그래서, 이 해충을 효과적으로 방제하기 위해서 화학적 방제 이외에 다양한 방제기술의 개발이 절실히 요구되는 상황이다.

- 2019년 8월에 경북 경산시 옥수수재배지에 발생한 열대거세미나방의 피해상황을 조사하고 이 해충의 방제를 위하여 곤충병원성 선충을 처리하여 조사함
- 경산시 옥수수재배지는 20-30츠의 어린 유묘가 자라고 있었으며 이에 열대거세미나방 2-3령 유충이 주로 서식하였는데 약 90% 이상의 옥수수가 어린 잎이 식해된 상태의 피해를 입은 상태이다.
- 이에 곤충병원성 선충 제제인 DDK-S (*Steinernema carpocapsae*)를 2000배 희석하여 분무 처리하고 1주일 후에 밀도를 다시 조사해 본 결과 생존한 나방 유충의 밀도가 현저히 줄어든 것(<5%)을 관찰할 수 있었다.
- 본 연구는 1회로 이루어졌으나 열대거세미나방 방제를 위하여 곤충병원성 선충의 활용에 대한 긍정적인 가능성을 확인한 사례라고 판단된다.



그림 14. 옥수수 재배지에 발생한 열대거세미나방 및 곤충병원성 선충 제제를 처리하는 모습

- 열대거세미나방을 인공사육하면서 곤충병원성 선충의 살충 및 증식효과를 살펴본 결과 체내에 다수의 선충이 자라고 있는 모습을 관찰할 수 있었다.
- 또한, 곤충병원성 선충 3종(*H. indica*, *S. carpocapsae*, *S. longicaudum*)을 비교해 본 결과 *H. indica*의 효과가 *S. carpocapsae*와 *S. longicaudum* 보다 빨랐으나 처리후 3일째에는 모두 100% 살충효과를 나타냈다.

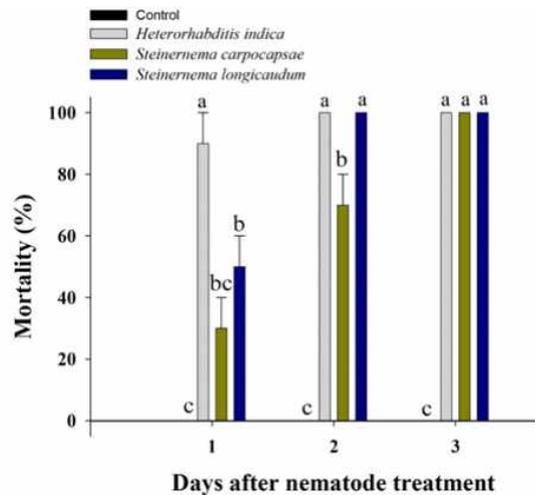


그림 15. 곤충병원성 선충에 감염된 열대거세미나방 유충의 모습 및 곤충병원성 선충 3종의 살충을 비교

4. 고찰

- 본 연구에서 개발된 곤충병원성 선충(*Steinernema carpocapsae*)의 고체 배양 체제를 액체배양된 것과 비교해 본 결과 고체배양된 선충 제제의 증식율이 꿀벌부채명나방의 유충 및 번데기, 활앙곡나방 유충 그리고 작은뿌리파리 유충에 대하여 좀 더 높게 나타났다.
- 일반적인 선충 증식에 사용하는 꿀벌부채명나방 유충에 대하여 고체배양된 선충이 액체배양된 것 보다 약 1.5배 더 증식이 되었고 이 종의 번데기에 증식시켜 본 결과 약 4배까지 증식율이 증가했다. 그러나, 화랑곡나방 유충에 대한 증식율을 비교해 본 결과 1.2배로서 큰 차이가 없었으나 작은뿌리파리 유충에 대해서는 고체배양한 것이 2.3배 더 많이 증식되었다.
- 즉, 전반적으로 고체배양한 선충의 증식율이 다소 높게 나타남으로서 선충 대량생산량을 증가시킬 수 있을 것으로 판단된다. 또한, 고체배양한 것이 액체배양한 것 보다 선충의 생물학적인 활성이 높았기 때문인 것으로 판단된다.
- 고체배양된 *Steinernema carpocapsae*의 다른 곤충병원성 선충인 *Heterorhabditis indica* 및 *Steinernema longicaudum*와 살충효능에 대한 비교시험 본 결과 각 해충 종별로 그 살충효능이 다르게 나타났다.
- 곤충병원성 선충 2종의 살충효능을 꿀벌부채명나방, 잔디해충인 담배거세미나방, 시설재배지의 작은뿌리파리, 버섯재배지의 버섯혹파리, 옥수수 해충인 열대거세미나방 등에 대하여 비교 시험해 본 결과 *Heterorhabditis indica*가 살충효능이 높고, 살충시간이 빠르며, 증식개체수도 많은 등 더 효과적인 것으로 나타났다.
- 즉, 이러한 해충의 효율적인 방제를 위하여 살충효율이 좋은 *Heterorhabditis indica*를 고체배양법으로 대량생산하여 현장에 적용하는 것이 바람직할 것으로 판단된다.
- 그러나, 다양한 해충에 대한 각 선충 종의 방제효율이 다르게 나타나기 때문에 각 해충에 대한 가장 적합한 선충을 적용할 수 있도록 살충효능을 비교하는 것이 중요하다고 판단된다.
- 또한 해충 피해 발생 전 가능한 해충의 약충 단계에서 예방적으로 곤충병원성 선충을 활용할 경우 방제효과를 더 높힐 것으로 판단된다.

제 3장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표 달성도

기존 곤충병원성 선충의 단점인 고비용의 초기 시설투자 문제점을 새로운 배양방법인 고체 배양시스템을 구축하여 실시하고, 이를 통하여 안정적인 생산과 증가 된 생산수율, 그리고 고 살충성 친환경적인 천적 제품을 개발하는 것이 목표임. 국내에서 처음으로 곤충병원성 선충을 고체배양하는 기술을 개발하였음. 이는 기존의 액체배양법 보다 저비용으로 고살충성, 우수한 생산수율을 가지는 배양방법으로써, 생산성과 품질에서 우수한 배양방법이라고 판단됨.

3-2. 관련 분야 기여도

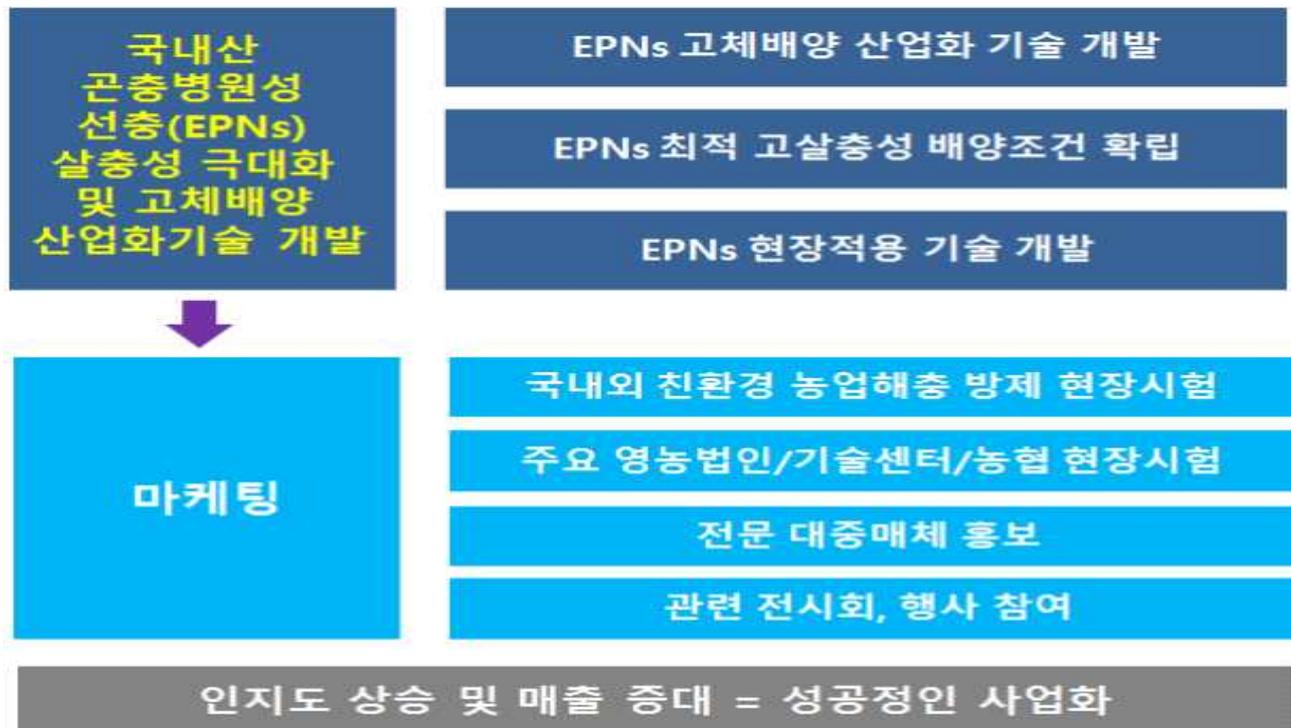
본 과제에서 생산된 곤충병원성 선충은 국내 농업현장에서 방제가 어려운 해충에게도 우수한 방제 효과를 나타내는 것을 확인하였으며, 이는 농가의 소득향상에도 높게 기여할 수 있을 것으로 사료됨. 또한 국내 천적자원 활용 친환경농자재 산업 발전에 크게 기여할 것으로 기대됨.

제 4장. 연구결과의 활용 계획

■ 사업화 제품의 목표고객 및 시장



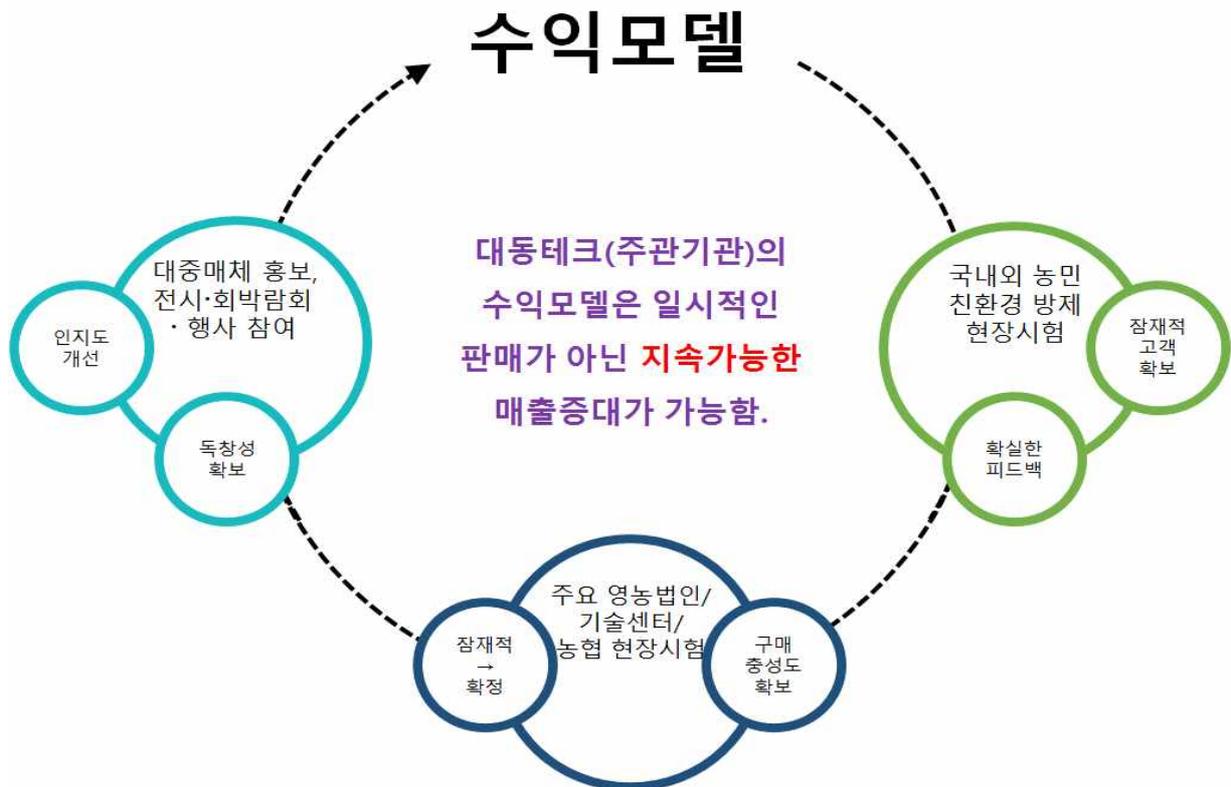
■ 사업화 추진 전략



■ 판매계획



■ 사업화를 위한 비즈니스 모델



■ 사업화 목표 및 핵심경쟁요인

(1) 사업화 목표

○ 곤충병원성 선충 판매를 통한 한국 대표 농업기업으로 성장

- 세부목표: 수익률 30%이상 달성

연매출 100억 달성(5년후) - 국내 판매 70억원 + 수출 30억원

(2) 핵심경쟁요인

○ 곤충병원성 선충 : 저비용, 고효능의 국내산 천적자원 활용 친환경유기농자재 개발

■ 목표 시장 구조

(1) 경쟁기업 현황

(가) 경쟁기업 현황

- 국외 "Becker Underwood"사와 "E-Nema"사, 그리고 "Koppert"사는 1990년대부터 인공배양을 통한 곤충병원성 선충 제품을 상용화를 시작하여 현재 북미 및 유럽시장을 선점하고 있음. 그러나 아직 대량 생산에 대한 많은 어려움과 문제점을 가지고 있으며, 이를 해결하기 위한 다양한 노력을 진행 중인 것으로 알려짐. 또한 중국, 남아공, 태국 등에서도 고체배양 등 새로운 배양방법을 활용한 제품화를 진행중에 있음.
- 국내의 경우 2000년대 세실, 바이코시스 업체에서 제품이 공급되었으나 현재는 부도로 업체가 없어진 상태이며, 수년전부터 에코원에서 *S. carpocapsae* 1종을 국내에 판매하고 있음. 그러나 아직 제품의 살충성이 많이 부족하며, 또한 *H. bacteriophora*의 경우 공급이 중단된 상태임.

■ 수익 확보 전략

(1) 주요 고객군

소비자층	거래처 확보 계획		
	종료 1차년 (BtoC강화)	종료 2차년 (병행)	종료 3차년 (BtoB강화)
1. 농업경영인(최종 소비자)	2,000	3,800	6,000
2. 총판(골프장 전담)	2	5	10
3. 대리점(농업 전담/시군별)	20	50	100
4. 수출거래처	5	10	20
매출목표(억원)	20	38	60

※ 농가 1명당 연평균 구매금액 : 약 100만원(연 2회 처리비용)

제품 1통당 평균 330m² 처리 / 농가당 평균 경작면적 8,250m² 기준(2,500평)

-> 25통*2만원 = 50만원 / 50만원 * 연 2회 처리 = 100만원

(2) 사업화 수익창출 방안

- 농업분야 : 화학농약 대체 및 효과 검증된 농자재에 대한 수요 급증 및 대책 마련 시급
- 골프장 및 잔디 사업 : 굼벵이 수요 급증
- 국내 정부 농업연구기관 및 대학, 농업인도 굼벵이 방제 등에 곤충병원성 선충 (*Heterorhabditis* spp.)가 효과적임이 이미 검증되었으나 현재 원활한 제품 공급이 안됨

■ 곤충병원성 선충 천적 작물보호제

- 인구 증가와 유가 상승 등 전 세계적인 경제위기 극복과 이산화탄소 증가에 따른 온난화 등 지구 환경 보존의 중요성이 크게 증가되면서 안전한 먹거리 생산과 환경오염을 최소화하는 지속적인 생산체제를 갖추기 위하여 LOHAS(lifestyle of Health and Sustainability) 트렌드가 최근 농업의 화두가 되고 있음(최정섭, LOHAS 생화학 작물보호제 2011).
- LOHAS 트렌드를 만족하기 위하여 OECD를 중심으로 선진 국가들은 기존 작물보호제의 사용을 5년 이내에 현재 사용량의 50% 이하로 감소시키고자 하고 있음. 특히 지속적 재배와 국민건강 보호를 위한 LOHAS 농작물의 생산이 매년 50~100억불로 성장함.
- 향후 LOHAS 트렌드는 2017년까지 그 성장세가 지속될 것으로 예상되고 미생물/생화학/천적자원 중심의 바이오작물보호제의 개발은 유력한 수단이 될 것으로 인식됨.
- 기존 작물보호제의 연용으로 인하여 변이잡초, 해충, 병원균의 발생이 더욱 심화되고 전 세계적으로 환경문제에 대한 관심의 증가로 과거에 개발된 고독성 작물보호제의 재등락이 어렵게 되면서 이를 해결할 수 있는 새로운 형태의 천적 및 바이오작물보호제의 수요가 꾸준히 증가함. 국내 유기농을 포함한 친환경 농산물 생산 농가수와 재배 면적은 지속적으로 증가하고 있으며, 이와 비례하여 천적(친환경유기농자재) 및 바이오작물보호제의 시장도 급속히 증가함.
- 세계 유기농산물은 2013년 기준 170개국, 4,310만 ha의 면적에서 생산되고 있고 지속적으로 증가 추세를 보이고 있음. 또한 세계적으로 농산물의 안전성과 건강을 추구하는 웰빙 트렌드의 확산으로 유기농산물 시장규모는 미국 유럽 등 선진국을 중심으로 2000년 이후 지속적으로 성장세를 보이고 있음(한국농촌경제연구원, 국내외 친환경농산물 생산실태 및 시장전망 2015).
- 2017년 이후 2024년까지의 친환경농산물 시장규모는 정부의 친환경 농업추진 정책의지에 따라서 생산량이 증가하며, 점차적으로 가속화 될 것이라는 가정 하에 2024년에는 4조 371억원으로 증가할 것으로 전망됨. 또한 (한국농촌경제연구원, 국내외 친환경농산물 생산실태 및 시장전망 2015).
- 한국농촌경제연구원 조사결과 소비자들의 친환경농식품에 대한 소비의향을 조사한 결과 구입경험자와 비 경험자 모두 향후 소비를 증가시킬 것이라 응답함(한국농촌경제연구원, 친환경농식품의 생산소비실태와 시장전망 2012).

제 5장 . 참고문헌

1. A. Hirao, R.-U. Ehlers. 2009. Effect of temperature on the development of *Steinernema carpocapsae* and *Steinernema feltiae* (Nematoda: Rhabditida) in liquid culture. Appl Microbiol Biotechnol 84:1061 - 1067
2. Bertoloni Meli, Sofia, Bashey, Farrah. 2018. Trade off between reproductive and anti competitor abilities in an insect - parasitic nematode - bacteria symbiosis. Ecology and evolution v.8 no.22,. 10847- 10856
3. DAVID I. SHAPIRO-ILAN, RICHOU HAN, CLAUDIA DOLINKSI, 2012. Entomopathogenic Nematode Production and Application Technology. Journal of Nematology 44(2):206 - 217
4. Devindrappa, Jagadeesh Patil, Manjunatha T Gowda, R Vijayakumar, Abraham Verghese. 2018. Fluctuating temperature: A cause for survival and development of entomopathogenic nematodes, *Heterorhabditis indica* and *Steinernema carpocapsae*. Indian journal of Experimental biology, v56 327-333
5. D. W .Kim, S. H. Park. 1998. Culture Condition of Entomopathogenic Nematodes Using *Galleria mellonella* Larva . Korean J. Biotechnol, Bioeng. v13 no1, 31-37
6. Ernesto San-Blas, Deynireth Pirela, Dana Garcia, Edgar Portillo. 2014. Experimental Parasitology 144
7. Floyd L. Inman III, Sunita Singh, Leonard D. Holmes. 2012. Mass Production of the Beneficial Nematode *Heterorhabditis bacteriophora* and Its Bacterial Symbiont *Photobacterium luminescens*. Indian J Microbiol 52(3):316 - 324
8. G.H. Gil, H.Y. Choo, R. Gaugler. 2002. Enhancement of entomopathogenic nematode production in in-vitro liquid culture of *Heterorhabditis bacteriophora* by fed-batch culture with glucose supplementation. Appl Microbiol Biotechnol 58:751 - 755
9. Guo, W.,Yan, X.,Han, R. 2017. Adapted formulations for entomopathogenic nematodes, *Steinernema* and *Heterorhabditis* spp. Nematology : international journal of fundamental and applied nematological research.v.19 no.5, 587-596
10. Jaime Ruiz-Vega, Carlos I. Cortés-Martínez, Cipriano García-Gutiérrez. 2018. Survival and Infectivity of Entomopathogenic Nematodes Formulated in Sodium Alginate Beads. Journal of Nematology. Volume 50,Issue 3, 273-280
11. Kumari, Babita,Kumar, Vinod,Kumar, Anil,Ram, Sewak. 2017. Bioefficacy of EPNs (*Steinernema* and *Heterorhabditis*, Haryana Isolates) against *Spodoptera litura*. Annals of biology v.33 no.2. 276-278
12. Liao, C, Gao, A, Li, B, Wang, M, Shan, L. 2017. Two symbiotic bacteria of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis* spp. against *Galleria mellonella*. Toxicon v.127, 85-89

13. McGraw, Benjamin A.(Corresponding author.),Schlossberg, Maxim J. 2017. Fine-scale spatial analysis of soil moisture and entomopathogenic nematode distribution following release in wetting agent-treated turf. *Applied soil ecology : a section of Agriculture, Ecosystems & Environment*v.114. 52-61
14. Priyantini Widiyaningrum , Laily Fauziyah, Dyah Rini Indriyanti. 2018. Biological Activity of Local Entomopathogenic Nematodes from Two Different Origins Based on Various Temperatures. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, Volume 21 Issue 2, 95-100
15. Ralf-Udo Ehlers. 2001. Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. *Appl Microbiol Biotechnol* 56:623 - 633
16. Ruiu, Luca. 2018. Microbial Biopesticides in Agroecosystems. *Agronomy*v.8 no.11, 235
17. y. s. Yu, S. H. Park.. 1999. In Vitro Culture of Entomopathogenic Nematode with Its Symbiont for Biopesticide. *Korean J. Biotechnol, Bioeng.* v14 no3 303-308
18. y. s. Yu, S. H. Park., 2000. Optimal culture condition for the production of insecticidal toxin by *Xenorhabdus nematophilus* isolated from *Steinernema carpocapsae*. *Korean J. Biotechnol, Bioeng.*
19. Valentina Alonso, Shyon Nasrolahi, and Adler R. Dillman. 2018. Host-Specific Activation of Entomopathogenic Nematode Infective Juveniles. *Insects.* Jun; 9(2): 59.
20. W. M. Wouts. 1981. Mass Production of the Entomogenous Nematode *Heterorhabditis heliothidis* (Nematoda- Heterorhabditidae) on Artificial Media. *Jurnal of Nematology*, v13, no4. 467-469

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술 개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.