

최 종
연구보고서

기내배양기술을 통한 곤충병원선충의
대량증식과 바이오캡슐을 통한 제품화 기술 개발

Development of In Vitro Mass Rearing
and Bioformulation Techniques of
Entomopathogenic Nematodes

안 동 대 학 교

농 립 부



제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “기내배양기술을 통한 곤충기생선충의 대량증식과 바이오캡슐을 통한 제품화 기술 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2000. 10. 30.

주관연구기관명 : 안동대학교

총괄연구책임자 : 김 용 균

세부과제책임자 : 한 상 찬

세부과제책임자 : 이 영 근

연 구 원 : 황 기 섭

연 구 원 : 최 용 철

연 구 원 : 강 성 영

연 구 원 : 박 영 진

연 구 원 : 이 성 섭

연 구 원 : 이 승 화

연 구 원 : 김 동 기

연 구 원 : 김 미 경

요 약 문

I. 제 목

기내배양기술을 통한 곤충병원선충의 대량증식과 바이오캡슐을 통한 제품화
기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

곤충병원선충이 해충방제에 있어서 바람직한 생물적 방제인자로서 여겨져 왔다. 이
들중 특히 본 연구에서 응용적 가치를 높이려는 곤충병원선충인 *Steinernema*
*carpocapsae*는 나비목 해충에 매우 높은 살충력을 보유하는 것을 알려지고 있다. 이
들의 감염태 선충이 기주 곤충의 혈강내로 침입하게 되면 혈림프의 패혈증을 유발시
키고 기주를 24시간이내에 사망하게 한다. 이러한 살충기작의 주 요인은 이 선충의
공생세균인 *Xenorhabdus nematophilus*의 작용에 기인한다고 알려지고 있다.

이러한 유용한 해충방제 인자로서 곤충병원선충을 야외에 방제인자로서 적용하기
위해서는 이들 선충의 대량사육법과 포장조건에서 적합한 제품화 기술이 선행되어야
한다. 특히 포장에서 유효한 효과를 보이기 위해서는 막대한 숫자의 감염태 선충을
요구하게 되는 데, 비록 기주곤충에서 이들 선충이 잘 자라지만 더욱 효율이 높은 기
내배양기술을 요구하게 된다. 또 설령 많은 숫자의 감염태 선충이 포장에 살포되더
라도 이들 선충이 자외선이나 건조에 약함으로 그 효과가 크게 반감될 수 있는 데 이
를 방지하기 위해서는 이들을 보호하는 생물적 제품화 기술의 개발이 요구된다.

이 연구과제는 이러한 두 문제를 해결하기 위해 곤충병원선충의 대량증식기술과
제품화 기술에 목표를 두었다. 또 이들 선충의 포장 살충력 제고를 위해 이들 선충

의 살충기작을 면밀히 분석하여 이를 병원력 제고에 이용하게 하였다. 본 연구 과정 중에 이들 선충 뿐 만 아니라 공생미생물인 *X. nematophilus* 단독의 살충 효과를 얻게 되었으며 이에 대한 포장조사를 병행하였다. 이 세균은 해충에 대한 새로운 생물적 방제 인자로서 발견하게 되었고 현재 이 기술이 특허출원중에 있다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구과제는 크게 곤충병원선충의 대량증식기술 개발, 생물제제화 및 포장 살포 기술 개발, 살충기작 분석 및 환경안전성 평가의 세 세부과제로 나누어져 수행되었다.

곤충병원선충의 대량증식기술 개발 세부과제는 1) 곤충병원선충의 증식 최적 조건 결정 2) 대량증식용 기주 탐색 3) 기내배양기술 개발 4) 공생세균 (*X. nematophilus*)의 동정과 증식 최적 기술 개발 5) 증식된 선충의 효율적 수거방법 등을 포함한다.

곤충병원선충의 생물제제화 및 포장 살포기술 개발 세부과제는 1) 곤충병원선충의 감염태에 대한 다양한 보관방법 개발로서 용도에 따라 액상보관법, 장기간 냉동보관법, 알지닌젤 캡슐화 및 수화형 고집적 선충제제 등의 개발 2) 포장 살포용 바이오캡슐 개발로서 지상부 해충용 알지닌젤캡슐과 지하부 해충용 수화형캡슐 개발 3) 내건제 선발 및 포장 방제 효과 검정 4) 바이오캡슐의 포장 방제효과 검정 5) 공생세균의 포장 방제 효과 등을 포함한다.

곤충병원선충의 살충기작 분석 및 환경안전성 평가 세부과제는 1) 곤충병원선충의 살충력 분석 2) 공생세균의 살충력 분석 3) 작은혹 형성과정이나 phenoloxidase 활성 조사와 같은 면역 관련 반응을 조사함으로써 공생세균의 기주 곤충에 대한 면역저하 효과 검정 4) 면역저하 효과를 작용점 관점에서 분석하기 위해 면역 중개 역할을 하는 eicosanoid 생합성 과정에 대한 공생 세균의 효과 검정 5) 유용곤충에 대한 곤충병원선충과 공생세균의 안전성 평가 6) 포유동물 독성에 대한 곤충병원선충과 공생세균의 안전성 평가 등을 포함하게 된다.

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

이 연구과제를 통하여 해충방제의 생물적 방제에 관해 실제로 적용할 수 있는 새로운 많은 방제기술을 개발하였다.

1. 새로운 증식용 곤충기주가 선발되었다. 기존의 파밤나방 (*Spodoptera exigua*)이나 꿀벌부채명나방 (*Galleria mellonella*)은 한 기주당 불과 100,000마리의 감염태 선충을 생산하는 것이 최대 수확량이나 담배거세미나방 (*Spodoptera litura*)을 이용할 경우 기주 한 마리당 최대 500,000마리의 감염태 선충을 확보할 수 있게 되었다.

2. 국내에서 채집된 곤충병원선충 (*St. carpocapsae*)에 대한 공생세균을 *Xenorhabdus nematophilus*로 최초로 동정하였다. 또 이 세균에 선택적인 증식 배지를 개발하였다. 이 세균이 곤충의 살충기작에 있어서 주된 인자이며 선충은 단지 이 세균의 운반체로서 작용할 수 있음을 나타냈다. 이 세균은 바로 선충의 증식에 있어서 필수불가결하며 기내배양 기술에 이러한 사항이 접목되었다. 우리의 결과는 또한 이 세균 단독으로 해충의 치사력을 보유한다는 사실을 찾아내었고 현재 이에 대한 기술들이 특허출원중에 있다.

3. 곤충병원선충의 야외 포장 살포용 제제화로서 두 종류의 바이오캡슐이 개발되었다. 알지닌젤이 지상부 엽면 가해 해충방제용으로 개발되었다. 이 캡슐은 특히 대상 해충의 섭식유인제를 포함하여 대상해충의 섭식독을 유발하게 하였다. 수화형 입자 바이오캡슐이 개발되었다. 이 제제형은 주로 지하부 해충방제용으로 개발되었다. 우선 높은 밀도의 선충을 제한된 캡슐내로 포함시킬 수 있었으며 이 제제를 통해 장기간의 보관도 가능하였다. 또 이 제제는 수화형으로 야외 살포직전에 물에 수화시킨 후 분무기로 일반 농약과 같이 살포하게 제작되었다.

4. 곤충병원선충의 야외 살포시 제약점이 되어왔던 건조에 대한 내성을 높이기 위해 최적의 내건제가 상용 제품중에서 선발되었다. 선발된 Keltrol-F를 이용하여 일정 농도의 감염태 선충 (5,000IJs/ml)을 살포할 경우 포장 조건에서 약 90%의 해충방제 효과를 보였다.

5. 감염태 곤충병원선충의 다양한 보관기술이 개발되었다. 액상보관을 위해 최적의 무기 환경 조건 (pH, 염농도 및 온도)이 결정되었다. 장기보관을 위해 동결보관법이 -170℃의 액체질소를 이용하여 개발되었다. 두 가지 바이오캡슐 (알지닌 캡슐, 수화형 입자 캡슐)도 이러한 장기보관 및 포장살포용 감염태 선충 저장용으로 개발되었다.

6. 기주체나 기내배양체로 부터 배양된 선충집단들에서 효과적으로 감염태 선충의 수거하기 위한 방법이 개발되었다. 기존의 white trap법은 시간이 오래 걸리고 효율이 낮은 반면, 본 연구에서 Baermann funnel법을 개량하여 개발된 방법으로는 단 하루만에 모든 감염태 선충을 걸러내고 수거 효율면에서도 월등하였다.

7. 곤충병원선충의 살충기작이 분석되었다. 공생세균 (*X. nematophilus*)는 기주 곤충의 면역반응을 억제시켰다. 이는 면역중개자인 eicosanoid 생합성반응을 억제함으로써 실제 면역반응의 활성화를 중지시키는 데서 살충기작이 유래된다고 판명되었다. 이러한 억제는 기주체의 면역저하와 혈림프 패혈증을 유발시켜 궁극적으로 기주 곤충을 치사시키는 것으로 판명되었다.

8. 공생세균으로부터 생산되는 독소물질이 살균 및 살충활성 두 가지 면에서 분석되었다. 세균배양액은 살진균, 살세균 및 살충 효과를 보유하여 이 세균의 독소 물질이 생산후 배양액으로 분비된다고 밝혔다. 또 이 독소물질은 유기용매 (에틸에테르)에 분리되어진다고 밝혀졌다.

9. 곤충병원선충과 공생세균의 환경안전성 검사가 포유동물 독성과 유용곤충에 미치는 영향면에서 이뤄졌다. 두 방제인자 모두는 쥐를 이용한 포유동물 독성검사에서 아무런 해를 주지 못하였다. 그러나 유용곤충인 누에와 개미에 대해서는 곤충병원선충과 공생세균 모두가 살충효과를 보여 이 생물인자를 야외에 살포하는 경우에 제한성을 두어야 한다고 본 연구 결과는 보여 준다. 특히 공생세균은 개미에 대해 높은 독성을 보였는데 이는 이 개미류들이 자신들의 먹이 소화액에 있어서 공생 미생물에 의존도가 높고 본 연구과제의 공생세균은 막대한 항생물질의 생산할 수 있다는 점에서 해석되어질 수 있다.

이상의 본 연구결과들은 대부분 실제 생물적 방제 인자를 대상으로 분석되어 졌으며 이러한 결과들은 직접 생물농약 개발이나 포장에 적용될 수 있으리라 여겨진다. 또한 본 연구의 모든 결과는 국내 또는 국제 전문 학술 잡지에 출판 또는 투고되고 있으며 일부는 현재 특허출원중에 있다.

SUMMARY

I. Title

Development of In Vitro Mass Rearing and Bioformulation Techniques of Entomopathogenic Nematodes

II. Research Aims and Significance

Entomopathogenic nematodes have been regarded as a promising biological control agent against insect pests. *Steinernema carpocapsae*, an entomopathogenic nematode species, is highly virulent to most lepidopteran insect pests. After entering host hemocoel, the nematodes cause hemolymph septicemia and lead to host death within 24h. Entomopathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophilus*, inhabits within the nematode intestine and has been regarded as the major insecticidal lethal agent of the nematodes.

Mass rearing of the nematodes and formulation techniques are required for their field application. Although the nematodes are easy to be reared within insect hosts, *in vitro* mass rearing techniques are needed to cope with the tremendous amounts of infective juveniles required for effective field application. Another problem is the relatively labile nature of the nematodes under natural conditions such as desiccation, UV, cold temperatures, and pesticides. To overcome these adversities, biocapsulation of the stress-resistant strains are needed to prevent direct exposure to the adverse environmental conditions.

This project was focused on development of mass rearing and biocapsulation techniques of the entomopathogenic nematodes. To increase the field control efficacy of the nematodes, we also analyzed the insecticidal mechanisms of the nematodes, which then were used for optimizing control techniques. We also developed a control technique using only the entomopathogenic bacteria, *X. nematophilus*, which is now under patent process as a new insect pest control agent.

III. Research Progress and Contents

The project is subdivided by three sections: mass rearing section, biocapsulation/field application section, and insecticidal mechanism/environmental safety section.

Research progresses of mass rearing section consist of 1) determining favorable rearing conditions 2) selecting optimal insect host for mass-rearing of the nematodes 3) developing *in vitro* mass rearing techniques 4) identification and development of culturing method of *X. nematophilus* 5) development of improved collecting method of the mass-reared infective juveniles.

Research progresses of biocapsulation/field application section consist of 1) developing storage methods such as liquid storage, long-term cryopreservation, alginate storage, and high density-granular formulating storage 2) developing biocapsules using alginate granules for aerial application of the nematodes or coarse wheat granules for underground application of the nematodes 3) selecting optimal antidesiccant (Keltrol-F) and its field application 4) testing field control

efficacy of alginate formulation 5) testing control efficacy of *X. nematophilus*.

Research progresses of insecticidal mechanism/environmental safety section consist of 1) dose-mortality of *S. carpocapsae* 2) dose-mortality of *X. nematophilus* 3) immunodepressive effect of the bacteria on the insect host by showing hemocyte lethal effect and decrease of nodule formation and phenoloxidase activity 4) the blocking effect of the bacteria on eicosanoid pathway of the host insect immunity 5) environmental safety tests of both *S. carpocapsae* and *X. nematophilus* against beneficial insects such as ants and silkworm 6) mammalian toxicity tests of both *S. carpocapsae* and *X. nematophilus* against rats by oral application.

IV. Research Results and Application

This project gave a lot of significantly practical research outputs to be used for the biological control against insect pest.

1. A new mass rearing insect host was found. Tobacco cutworm, *Spodoptera litura*, could produce about 500,000 infective juveniles per 5th instar larva, which were compared with at most 100,000 infective juveniles from the current insect hosts, *Spodoptera exigua* and *Galleria mellonella*.

2. *Xenorhabdus nematophilus*, a symbiotic bacterium of the entomopathogenic nematodes, was identified first in Korea and could be mass-cultured. This bacterium was turned out to be the major insecticidal agent of the nematodes,

while the nematodes were responsible to deliver the bacteria into the insect hemocoel. The bacteria are very indispensable and used for mass-rearing the nematodes. Our results also indicated that only the bacteria could be used as insect control agent without any help of the nematodes. This application technique is now in patent process.

3. Two types of nematode biocapsule formulations were developed for field application. Alginate capsule was developed for controlling leaf-infesting insect pests. The capsules included a specific feeding attractant so that they could attract the target insect pests and gave significant oral toxicity. Granular formulation was developed for carrying high density nematodes in a capsule and being easily dissolved in water. Granular formula will be used for easy delivery of the large number of nematodes and applied for controlling underground insect pests after being released from the capsules in water.

4. Optimal antidesiccant was selected from several commercial antidesiccants for field application of the nematodes. The nematodes (5,000IJs/ml) with the selected antidesiccant, Keltrol-F, gave about 90% control efficacy on the beet armyworm in field condition.

5. Several storage methods of the infective juveniles were developed. For liquid storage, optimal storage conditions were determined in pH, salt concentration, and temperature. For long-term storage, cryopreservation technique was developed using -170°C liquid nitrogen. Two bioformulations, alginate gel and granular formulation, could be used for nematode storage and field spray.

6. A new collecting method was developed for easy and fast retrieval of the infective juveniles from the cultured nematodes. Previous method used white trap which took several days and low retrieval efficiency. New method using Baermann funnel collected only infective juveniles within a day.

7. Insecticidal modes of action of the nematodes were elucidated. The symbiotic bacteria, *X. nematophilus*, could depress the host insect immunity reactions. This inhibitory action was focused on blocking eicosanoid pathway in insect immunity-mediating process. The inhibition caused immunodepressiveness and hemolymph septicemia.

8. Toxins secreted from the bacteria were analyzed into antimicrobial and insecticidal activities. The cultured media had antibacterial, antifungal, and insecticidal activities. The toxins were separated into organic solvent (ethyl ether) layer.

9. Environmental safety tests of the nematodes and the symbiotic bacteria were performed in the toxicities on rat and beneficial insects. Both nematodes and the bacteria did not give any harmful effect on the mammalian toxicity. But the silkworm and the ant were affected by the nematodes and the bacteria. Especially the ant was relatively resistant to the nematodes, but very susceptible to the symbiotic bacteria. We hypothesized that the symbiotic bacteria produced antibacterial toxins in the digestive tract in the ants, and that the toxins changed the microbial flora in the ant gut which were indispensable for normal digestion activity.

Most of the developed results could be used for practical bioinsecticide development and could be directly applied on the agricultural field. All the results have been published in Korean or international scientific journals or are under patent process.

CONTENTS

Chapter 1. General introduction	19
Chapter 2. In vitro culturing of entomopathogenic nematodes	23
Section 1. Introduction	23
Section 2. Determining optimal rearing condition of the entomopathogenic nematodes	26
Section 3. Selecting optimal insect host for mass rearing of the entomopathogenic nematodes	32
Section 4. Identification of symbiotic bacteria and development of their culturing method	37
Section 5. In vitro culturing methods using solid or semi-solid media	45
Section 6. Improved collecting method of the cultured infective juveniles	48

Chapter 3. Development of long-term storage techniques and field application methods of the entomopathogenic nematodes	54
Section 1. Introduction	54
Section 2. Long-term storage of the entomopathogenic nematodes	56
1. Liquid storage method	56
2. Cryopreservation technique	68
3. Biocapsulation for storage	70
Section 3. Field application techniques of the entomopathogenic nematodes	79
1. Field application using selected antidesiccant	79
2. Field application using biocapsulation	84
3. Field application of symbiotic bacteria	91
Chapter 4. Improvement of pathogenicity of the entomopathogenic nematodes and environmental toxicity assessment	93
Section 1. Introduction	93
Section 2. Insecticidal mechanisms of the entomopathogenic	

nematodes	96
Section 3. Isolation and characterization of antibiotic toxins from the symbiotic bacteria	116
Section 4. Selection of the environmental resistant entomopathogenic nematodes	122
Section 5. Environmental toxicity assessment of the entomopathogenic nematodes	125
Section 6. Environmental toxicity assessment of the symbiotic bacteria	131
Chapter 5. References	140

목 차

제 1 장 서 론	19
제 2 장 곤충기생선충의 기내배양기술 개발분야	23
제1절 서 설	23
제2절 기생선충의 증식 최적화 조건 결정	26
제3절 대량증식용 자연기주 선발	32
제4절 공생미생물의 동정 및 증식최적화 기술 개발	37
제5절 고체 및 반고체 배지를 통한 기내배양 기술 개발	45
제6절 증식 감염태 선충 회수법 개량	48
제 3 장 곤충기생선충의 장기보관법 및 살포법 개발분야	54
제1절 서 설	54

제2절	곤충병원선충의 장기보관법	56
	1. 액체저장 최적화 기술 개발	56
	2. 장기보관을 위한 동결저장법 개발	68
	3. 바이오캡슐을 이용한 병원선충의 저장법 개발	70
제3절	곤충기생선충의 포장 살포법 개발	79
	1. 선발 내건제를 이용한 포장 살포법 개발	79
	2. 바이오캡슐을 이용한 포장 살포법 개발	84
	3. 공생미생물을 이용한 포장 살포법 개발	91
제 4 장	곤충기생선충의 감염력 제고 기술 개발 및 환경안전성 평가분야	93
제1절	서 설	93
제2절	곤충병원선충의 살충기작 분석	96
제3절	공생미생물의 유용물질 분리 및 특성 조사	116
제4절	환경저항성 곤충기생선충 선발	122
제5절	곤충기생선충의 환경안전성 평가	125

제6절 공생미생물의 환경안전성 평가	131
제 5 장 참 고 문 헌	140

여 백

제 1 장 서 론

IMF의 경제난국을 극복하면서 전 사회분야에서 그러하듯이 기술분야에 있어서도 저비용 고효율의 기술 개발을 더욱 요구하고 있다. 지구의 온난화와 엘니뇨 현상 등 지구촌 곳곳에서 일어나고 있는 기상이변도 환경재해에서 오는 것으로 대부분의 과학자들은 추정하고 있다. 환경호르몬의 문제가 사회 전반에 걸쳐 막대한 영향을 주고 있다. 특히, 우리의 생활주변에 환경호르몬에 노출되어 있어 인류의 생존에 큰 위협적 존재로 등장하고 있다.

기존의 화학농약은 이들 보고된 환경호르몬의 50%이상을 차지하고 있다. 이로 인한 화학농약의 규제가 날로 심각해지는 경향속에 있다. 현 상황에서 우리 농업의 활로는 이러한 경제적 문제와 환경문제를 함께 해결하는 방향으로 기술 개발이 이루어져야 한다.

많은 생물적 방제인자가 기존의 화학방제인자를 대체하려고 시도되고 있다. 이들 중 곤충병원선충이 매우 효과면에서 그리고 포장조건외 적용면에서 긍정적으로 평가되었고 이에 대한 실용화 연구가 국내외로 진행되어 왔다. 일부 선충들이 많은 종류의 곤충에 절대적 또는 통성적 내부기생자로서 작용하고 있다. 곤충기생선충은 17세기에 최초로 보고된 이래 3,000 종류 이상의 선충-곤충 관계가 보고되었다 (Kaya, 1985).

이들 곤충기생성 선충중에서 새로운 생물적 방제인자로서 곤충병원선충 (entomopathogenic nematodes)의 활용성에 관해 관심이 높아졌다. 이 부류에 속하는 선충들은 대부분 Steinernematidae와 Heterorhabdidae의 두 과에 포함되어 있다. 이들 선충은 다양한 곤충 기주에 침입하여 48시간이내에 치사를 유발할 수 있으며 인축

이나 환경에 안전하다 (Gaugler, 1981; Akhurst, 1990).

곤충에 대한 병원선충의 살충력은 이 선충의 장내 포자에 서식하는 공생세균에 기인된다 (Bird and Akhurst, 1983). 물론 선충의 도움없이 이 세균의 증식장소인 곤충 혈강내로 침입할 수 없으므로 선충도 살충력에 영향을 준다고 할 수 있다. 입, 항문 또는 기문 등을 통하여 체내로 침입한 선충은 체내의 소화관이나 기관벽을 뚫고 곤충의 혈강속으로 침입한다. 침입된 선충은 장내의 공생세균을 혈강속에 배출하게 된다. 외부인자에 대해 곤충의 세포성 및 체액성 면역반응이 시작됨으로 먼저 공생세균은 곤충의 면역반응을 무력화시키는 독소를 배출한다. 이 독소에 의해 감염곤충은 패혈증이 유발되어 궁극적으로 치사에 이르게 된다.

최근 미국에서는 일부 이들 병원선충 종은 토양해충을 구제할 목적으로 생물농약으로 등록되어 시판되고 있으며 *Steinernema carpocapsae*를 이용한 생물농약 제제화에 힘쓰고 있다 (Counick et al. 1994). 일본에서는 DD-136 (*Steinernema feltiae*)를 이용한 각종 채소 해충 (배추흰나비, 도둑나방, 담배거세미나방)과 토양해충 (*Popillia japonica*, *Anomala cuprea*, *A.rufocuprea* 등) 방제방법을 검토하고 있으며 (Inoue & Mitshashi 1989) 감귤해충 (호랑나비) 방제를 위한 지상부 살포 방법을 연구중에 있다 (Kashio et al. 1990).

국내에서도 *Steinernema*와 *Heterorhabditidae*과에 속하는 곤충기생선충을 이용하여 벼에서 (추, 1994) 산림에서 (김, 1995) 이러한 선충을 이용한 해충방제를 제시하였다.

이상의 모든 병원선충을 이용한 해충방제 방제 가능성에도 불구하고 실제 해충방제에 광범위하게 적용하지 못하는 실정은 병원선충의 대량생산 및 장기보관의 문제점

과 약의 적용시 현격히 떨어지는 약의 적응력에 따른 감염력 저하가 주된 요인이라 하겠다.

다음의 사항은 본 연구의 개발 필요성과 개발후 농업에 미치게 될 사항을 요약한 것이다.

1) 본 연구의 최종목표는 생물농약 개발이다. 현재 이 분야에 대한 관심도는 매우 높아지고 있다. 많은 부분에서 새로운 생물농약을 개발하려고 있다. 그러나 곤충병원선충을 이용한 해충방제 만큼 실현가능성이 높은 분야가 많지 않다. 실제로 미국과 일본에서는 일부 제한적으로 시판되고 있고 적용범위가 더욱 확대될 전망이다. 문제는 바로 약의 적용기술에 있다.

2) 이러한 약의 적용 기술에서 가장 큰 문제는 바로 자외선과 건조로부터 곤충병원 선충의 활력을 유지시키는 것이다. 이를 위해 본 연구에서는 바이오캡슐을 개발하게 되었다. 이 바이오캡슐의 특징은 선충의 생존에 이상적으로 적합하면서 약의 살포시 이로 인한 환경문제가 없어야한다. 본 연구과제는 2차년도에서 알지니산을 이용한 바이오 캡슐과 생체를 이용한 바이오캡슐을 개발했다. 이 두 제제형태 모두 상기의 바이오캡슐의 목적에 부응한 것으로 최종연도에서 약의 포장 시험결과를 거쳐 완전한 제품으로 판정되었으며 현재 특허화 진행중에 있다. 또 수화형 분말제도 개발하여 다목적으로 곤충병원선충을 적용시키려한다.

3) 기내배양기술은 곤충병원선충의 대량증식 뿐만 아니라 음식폐기물을 유용자원으로 전용한다는 점에서 환경보전에 매우 중요한 기술이다. 현재 동물부산물로 버려지는 닭내장을 이용하여 곤충병원선충을 증식하는 기내배양기술이 개발되었으나 다른 부산물을 충분히 이용할 수 있음을 본 연구자들은 동의하고 있다.

이상의 본 연구의 간략한 소개였으며 최종연도를 거치면서 얻게될 연구 결과는 이상의 기술한 내용보다도 더욱 많은 유용기술을 얻게 될 전망이다. 결국 다음의 사항들로 본 연구 결과들에 대한 응용적 기대 효과를 정리할 수 있다.

첫째, 곤충병원선충의 바이오캡슐 효능

둘째, 곤충병원선충의 야외 해충방제력

셋째, 곤충병원선충 및 공생세균의 환경 안전성

제 2 장 곤충기생선충의 기내배양기술 개발분야

제1절 서 설

대상 유용 생명체 증식기술은 가장 중요한 개발사항이면서 이를 이룩하기 위해서는 그 만큼 대상 생명체에 대한 다양한 기본 생물학적 정보를 요구하게 된다. 일반적으로 곤충기생선충의 생활사는 알, 유충 (주로 4령까지) 및 자웅이체의 성충으로 구성된다. Steinernema에 속한 선충들은 이러한 단순한 생활환을 가지고 있다. 감염태의 3령충이 2령충의 껍질속에 감혀있다 ("ensheath"). 이 시기를 "dauer"시기라고 부른다. Dauer는 물리적 및 화학적 신호에 따라 기주를 탐색하게 된다 (Grewal et al., 1993). 기주 곤충의 자연 개구부 (입, 항문 또는 기문)를 통하여 침입한 후 2령충 껍질을 벗고 곤충의 혈강속으로 침입한다. 혈강내에서 공생세균을 방출한 후 이 세균의 도움으로 패혈증을 유발시켜 기주를 침입 후 48시간이내에 죽게 한다. 증식된 세균에 의해 기주 분해물과 증식된 세균을 먹고 선충은 자라게 되고 임계밀도까지 증식되면 다시 dauer상태로 기주 밖으로 나와 새로운 기주를 탐색하게 된다.

이들의 기내배양을 위해서 무엇보다도 요구되는 것이 들의 공생세균의 동정 및 이들의 배양조건을 확립하는 것이다. 병원선충의 장내에 서식하는 공생세균은 5종이 알려져 있으며 장내세균과 (Entorobacteriaceae)에 속한다. 이들 세균의 특징을 보면 발광을 보이는 Photorhabdus 속의 세균은 Heterorhabditis 선충에, 발광을 보이지 않는 Xenorhabdus 속의 세균은 Steinernema 선충에 공생한다 (Akhurst and Boemare, 1986). 이들 공생관계를 분석하여 (Kaya and Gaugler, 1993) 보면 각 종의 선충은 한 종의 공생세균을 가지나 공생세균은 한 종이상의 선충에 공생할 수 있음을 나타낸다. 공생세균은 기주를 치사시키고, 항생물질을 분비하여 이차 미생물감염을 없애 주고 기주조직을 분해시켜 선충으로 하여금 알맞은 성장조건을 제공하게 된다. 선충은

세균을 외부 환경으로부터 보호하여 주고 곤충의 혈강내로 운반하여 주고 또는 기주의 면역단백질을 억제시킴으로 공생세균의 증식에 유리한 조건을 형성하여 주게 된다.

이들 세균은 배양조건에 따라 phase I과 II로 상이한 콜로니 형태를 갖는다 (Boemare and Akhurst, 1988). 병원선충의 장내에서는 오직 phase I만 발견되며 기내 계대배양 과정을 통해 phase II의 변이형이 나타난다. *Xenorhabdus*의 phase I과 II에 감염된 곤충에서 수집되는 감염선충은 오직 phase I 형태의 세균만을 가진다 (Akhurst, 1980). *Xenorhabdus*속의 세균은 다시 phase II가 I로 재변환이 이루어질 수 있다. 이러한 phase 변환은 일반적으로 세균의 유전적 불안정성에서 기인되며 (Brunham et al., 1993; Robertson and Meyer, 1994) 이러한 변이형의 유발 원인에 대해서는 정확하게 알려지지 않았으나 최소한 plasmid의 관여성은 배제되었다 (Leclerc and Boemare, 1991). 이들 변이형은 병원력에서는 차이가 없지만 기내배양조건에서 phase I이 II에 비해 선충의 증식에 우수성을 보인다 (Bedding, 1981, 1984). 이외에 phase I은 II에 비해 특정 염색물질을 흡수, 항생물질의 합성 및 거대 세포내 내용물 등의 형질을 보유하고 있다. Givaudan 등 (1995)은 phase II의 세균은 phase I이 보유하고 있는 섬모 (flagella)를 가지고 있지 않는데 이는 섬모를 구성하는 flagellin단백질을 합성하지 않는 데 기인된다고 밝혔다.

대량생산을 위한 다양한 방법이 개발되었다. 기주 곤충을 이용한 증식법 (Lindgren et al., 1993; 이 등, 1998), 고체배지 (Bedding, 1981; Wouts, 1981)나 액체배지 (Friedman, 1990)와 같은 기내배양법이 개발되었다. 또 장기보관을 위해 액체보관 (박 등, 1998) 및 냉동보관 (Popiel and Vasquez, 1991) 조건들이 결정되었다. 특히 이들 선충이 야외에 살포되었을 때 건조 (Kamionek et al., 1974)나 자외선 (Gaugler and Boush, 1978)에 영향으로 쉽게 생존력을 잃음으로 이를 방지하기 위해 내건제 (Glazer et al., 1992)나 특수한 생물제형 (Navon et al., 1998)이 시도되었다.

본 연구개발은 특히 지상부 해충을 대상으로 나비목에 탁월한 방제 효과를 보여

주고 있는 곤충병원선충 (*Steinernema carpocapsae*)의 대량 생산을 위한 기본적 생물학적 정보, 공생세균의 분리 동정 및 대량 증식법 개발에 목표를 두고 수행하였다.

제2절 기생선충의 증식 최적화 조건 결정

1. 온도별 기주내 증식 속도

병원선충 증식이 온도에 의한 영향을 분석하고자 15, 20, 25℃의 세 온도를 이용하여 분석되었다. 기주 파밤나방 한 마리 당 최대 증식선충수는 약 100,000마리이었다 (Table 1).

Table 1. Developmental pattern of *Steinernema carpocapsae* with incubation temperatures in the host, *Spodoptera exigua*

Temp (℃)	Time (Days)	N	# of nematodes		
			3 rd	4 th	adult
15	6	6	0.3±0.8	5.7±7.5	4.5±9.1
	8	5	0.0±0.0	2.2±2.6	5.8±6.9
	10	12	8.3±19.2	1.4±1.3	2.8±2.4
	12	8	41151.3±45496.7	1501.6±3347.9	4.9±7.2
	15	6	10900.5±16197.7	2261.2±5505.9	2.0±2.7
	20	2	0.0±0.0	0.0±0.0	2.5±0.7
	25	1	17000.0±0.0	1000.0±0.0	3.0±0.0
20	3	9	6.1±13.7	7.6±11.0	2.0±3.3
	6	11	33417.3±52028.8	5.5±12.6	5.3±6.5
	9	5	6406.8±9443.6	1011.8±2229.6	0.6±0.6
	12	3	137666.7±178808.1	1341.7±2302.2	1.3±1.2
	15	10	95850.0±48189.5	2008.1±2018.9	0.1±.3
	17	5	55062.4±74360.1	1910.4±3968.8	0.0±0.0
	20	2	65250.0±87327.7	0.0±0.0	0.0±0.0
25	2	8	9.5±8.3	29.5±30.6	0.0±0.0
	4	14	9401.4±19588.0	2.7±3.0	3.8±7.7
	6	10	106450.0±37643.4	3642.0±3709.4	14.5±14.5
	8	14	86870.9±68542.7	6267.3±10366.1	3.6±6.9
	10	6	66583.3±58194.0	4084.7±3041.6	1.5±3.7
	12	1	127000.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0

이러한 최대 증식숫자를 발육시키는 데까지 선충의 발육소요시간은 온도에 따라 달랐으며 온도가 증가함에 따라 빨라졌다. 20℃에서는 접종후 12일이 소요된 반면 25℃에서는 불과 6일만에 최대 증식선충을 나타냈다.

2. 침입선충의 밀도 및 기주에 따른 병원선충의 증식

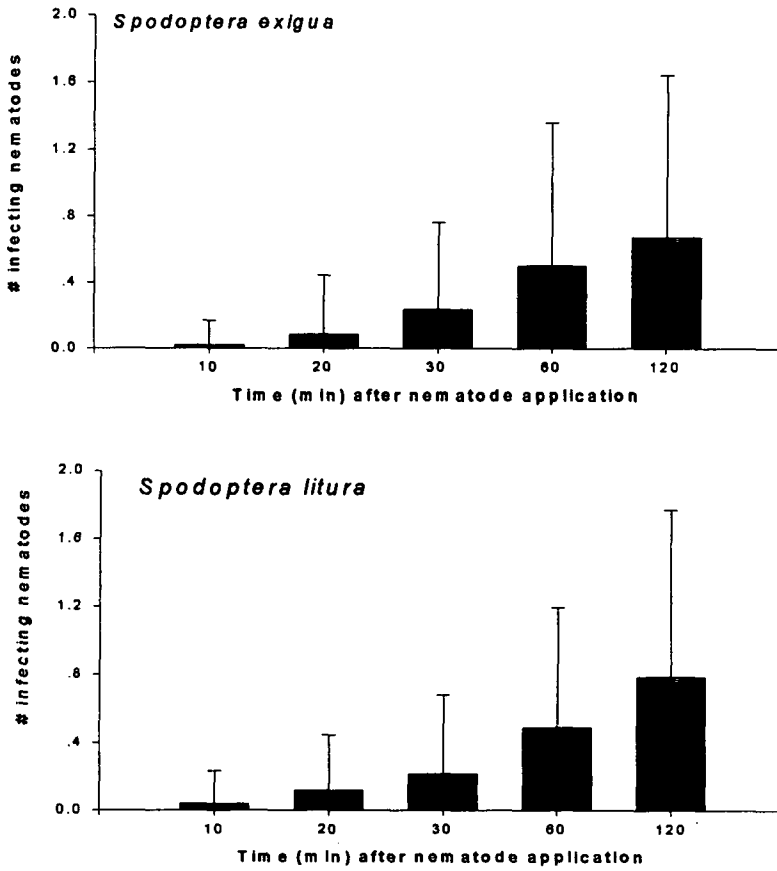


Fig. 1. Temporal infecting nematode numbers after topical application on the fifth instar larvae of *Spodoptera exigua* and *S. litura*

병원선충의 밀도와 기주 곤충의 치사와의 관계를 분석하여 최적 기주내 병원선충의 증식요건을 결정하기 위해 파밤나방과 담배거세미나방을 이용하여 조사되었다.

두 곤충에 대한 병원선충의 침입속도가 결정되었다 (Fig. 1). 병원 선충 (약 200마리)을 기주 곤충에 처리후 2시간까지 시간별로 조사되었을 때 침입된 선충의 수는 불과 2마리이하로서 매우 느리게 기주에 침입함을 알 수 있다. 유사한 결과가 Shannag 등 (1994)에 의해 보고되었으며 최대 기주사망율을 보이기 위해서는 적어도 24시간 이상의 선충침입시간을 허용해야 함을 보고했다. 이 부분에 대해서도 현재 노출시간을 연장하면서 침입선충숫자와 기주사망율과의 관계를 대조하는 실험이 진행중에 있다.

처리 병원선충의 밀도가 증가함에 따라 곤충 체내에 침입되는 선충의 수가 증가했다 (Tables 2, 3, 4). 이러한 침입숫자를 살펴보면 파밤나방 5령의 경우 처리된 선충 중 약 5%가 침입하였고 담배거세미나방은 3령에서 약 10%인 반면 5령의 경우 약 15%까지 보여 선충의 침입수는 기주에 따라 다르고 동일 기주내에서도 영기가 진행함에 따라 증가하는 경향을 보였다.

기주내에서 증식되는 병원선충의 수는 침입숫자보다는 기주의 크기에 비례하였다 (Tables 2, 3, 4). 조사된 기주중에서 가장 작은 담배거세미나방 3령충은 단일 기주내 최대증식 숫자가 약 50,000마리였고, 파밤나방 5령충의 경우 100,000마리를 보여 기존의 꿀벌부채명나방의 수준을 보였다. 그러나 담배거세미나방 5령의 경우 약 500,000마리가 수거되어 담배거세미나방 5령충을 기주로 이용한 병원선충의 자연기주 대량증식법이 현존하는 방법중에서 최적이라 결론지어진다.

Table 2. Developmental pattern of *Steinernema carpocapsae* 6 days after topical application of different numbers on the fifth instar larvae of *Spodoptera exigua*

Nematodes (IJs)	# of initial IJs		# of nematodes 6 days after application			
	n	3rd	n	3rd	4th	adults
100	8	3.1±2.5	2	43000.0±42154.5	5666.7±8962.9	2.3±3.2
200	8	2.4±1.5	12	81125.0±69358.8	3166.8±3950.4	11.8±21.9
400	22	18.0±27.5	24	73666.7±46340.4	3407.0±4468.3	10.4±15.8
800	13	56.2±68.8	8	126212.5±130564.9	773.6±2112.0	15.6±18.6
1600	18	41.4±90.8	16	58281.3±50551.9	916.8±1689.4	2.8±3.8

Table 3. Developmental pattern of *Steinernema carpocapsae* 6 days after topical application of different numbers on the third instar larvae of *Spodoptera litura*

Nematodes (IJs)	# of initial IJs		# of nematodes 6 days after application			
	n	3rd	n	3rd	4th	adults
100	19	6.37±4.91	11	35227.3±27560.3	3.8±4.1	2.1±3.5
200	20	24.50±25.24	11	46363.6±24163.1	2.6±2.9	0.6±1.4
400	20	46.25±47.69	27	53595.2±55454.4	3.7±10.8	0.4±1.2
800	21	68.19±80.91	18	42388.9±34478.7	1.0±2.43	0.2±0.7
1600	21	144.10±193.01	20	42975.0±35682.3	0.2±0.4	0.1±0.2

Table 4. Developmental pattern of *Steinernema carpocapsae* 6 days after topical application of different numbers on the fifth instar larvae of *Spodoptera litura*

Nematodes (IJs)	# of initial IJs		# of nematodes 6 days after application			
	n	3rd	n	3rd	4th	adults
100	12	13.3±12.5	9	418111.1±265051.6	8222.2±6851.6	9.1±11.6
200	12	28.4±32.4	9	486333.3±209910.1	9336.8±9323.5	22.3±22.1
400	12	80.3±74.8	9	312000.0±152952.6	3455.6±3961.4	26.3±31.9
800	12	163.5±165.8	12	266500.0±190992.4	3417.8±6036.4	18.3±31.4
1600	12	395.6±356.0	12	494166.7±275285.9	0.7±1.2	1.0±1.5

증식된 병원 선충의 기주곤충에 대한 살충력이기주 및 기주의 발육시기별로 나뉘어 조사되었다 (Tables 5, 6, 7). 곤충 기주와 발육시기에 상관없이 약 50마리의 농도에서 반수치사선충수를 기록했다. 이를 기존의 10% 기주침입율로 환산하면 약 5마리정도가 기주내로 침입하면 이 병원선충을 이용하여 해충방제가 가능함을 시사한다.

Table 5. Mortality test of *Steinernema carpocapsae* on the third instar larvae of *Spodoptera exigua*

# nematodes	n	# dead
0	29	0
33	27	11
66	26	14
133	21	16
266	25	22
533	22	21

LC₅₀ : 50.63 (27.12~77.12), slope = 1.62±0.34

Table 6. Mortality test of *Steinernema carpocapsae* on
the fifth instar larvae of *Spodoptera exigua*

# nematodes	n	# dead
0	30	0
33	27	10
66	29	13
133	29	17
266	29	24
533	30	29

LC₅₀ : 74.01 (44.65~97.87), slope = 1.64±0.30

Table 7. Mortality test of *Steinernema carpocapsae* on
the fifth instar larvae of *Spodoptera litura*

# nematodes	n	# dead
0	30	0
33	30	14
66	30	16
133	30	20
266	30	26
533	26	24

LC₅₀ : 47.98 (21.69~73.46), slope = 1.30±0.29

제3절 대량증식용 자연기주 선발

기내배양에 투입될 1차 대량생산용 기주배양체를 선발하였다. 비교적 실내에서 대량으로 사육이 가능한 파밤나방과 담배거세미나방이 비교되었다.

1. 곤충병원선충의 침입력

두 기주곤충에 대한 병원선충의 침입속도가 비교되었다 (Fig. 2). 여과지처리에 비해 국부처리가 초기침입밀도가 높았으며 기주 치사속도가 빨랐다. 두 처리방법 모두에서 파밤나방이 담배거세미나방에 비해 치사율이 높았다. 그러나 침입숫자를 비교하면 담배거세미나방이 파밤나방에 비해 높았다. 본 연구에서 이용된 병원선충의 처리밀도 (400마리)에서는 병원선충이 처리방법과 기주에 관계없이 100%의 살충력을 발휘하려면 12시간이상 침입기회를 가져야 함을 나타냈다.

병원선충을 기주 곤충에 처리후 2시간까지 시간별로 조사되었을 때 두 기주 모두에서 침입선충의 수는 불과 2마리 이하로 매우 느리게 기주에 침입했으나 충분한 침입시간을 허용했을 때 (24시간) 두 기주 모두에서 처리 병원선충 밀도가 증가함에 따라 곤충 체내의 침입되는 선충의 수가 증가했으나 침입된 병원선충수는 기주간 상이했다 (Figs. 2 and 3). 파밤나방 5령충의 경우 처리된 선충중 약 10%가 침입하였고 담배거세미나방은 3령충에서 약 10%, 5령충의 경우 약 30%까지 보여 선충의 침입은 파밤나방보다는 담배거세미나방에서 용이하였으며 동일 기주 종에서도 영기가 진행함에 따라 증가하는 경향을 보였다.

2. 병원선충의 병원력

곤충병원선충의 두 종의 기주곤충에 대한 살충력을 여과지검정법으로 비교하였다

(Table 8). 기주와 발육시기에 상관없이 약 20마리의 농도에서 반수치사농도 (LC₅₀)를 나타냈다.

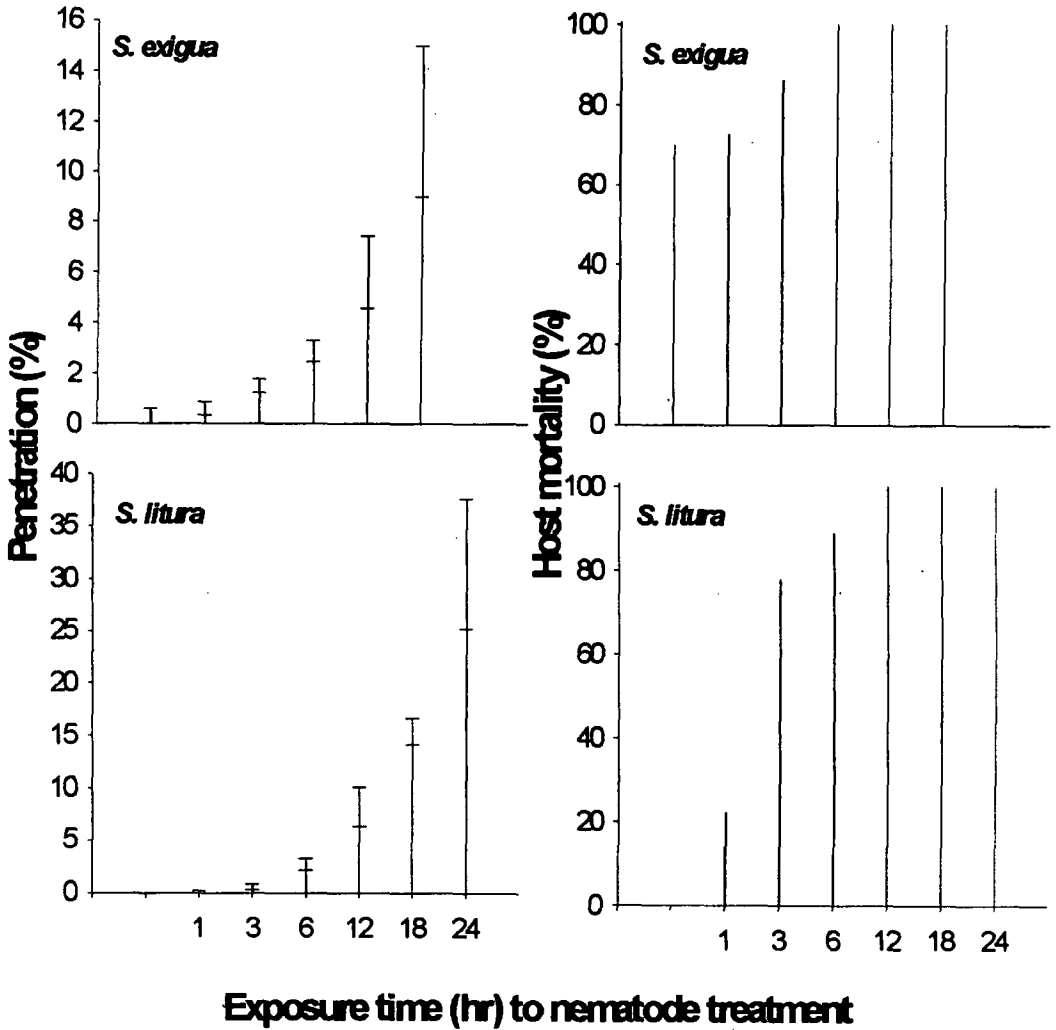


Fig. 2. Infectivity of *Steinernema carpocapsae* (400 infective juveniles/insect) to the fifth instar larvae of *Spodoptera exigua* and *Sp. litura* at 25°C. White () and black () bars represent the filter paper and topical

applications, respectively. Vertical error bars represent standard deviations of the mean.

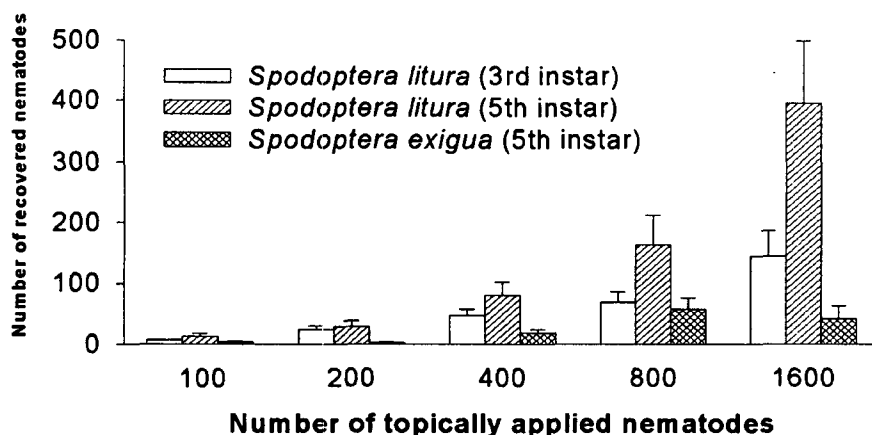


Fig. 3. Penetration of *Steinernema carpocapsae* to different insect hosts after 24h treatment at 25°C. Vertical error bars represent standard deviations of the mean.

Table 8. Pathogenicity of *Steinernema carpocapsae* on different insect hosts and developmental stages

Hosts	Instar	N	LC ₅₀ ¹ (95% C.I.)	Slope ± SD
<i>Spodoptera exigua</i>	5th	30	24.67 (14.88~32.62)	1.64 ± 0.30
<i>Spodoptera litura</i>	3rd	30	16.88 (9.04~25.71)	1.62 ± 0.34
<i>Spodoptera litura</i>	5th	29	15.99 (7.23~24.49)	1.30 ± 0.29

¹ LC₅₀ represents the lethal concentration of the infective nematodes applied to the filter paper method to kill 50% of the host insect population.

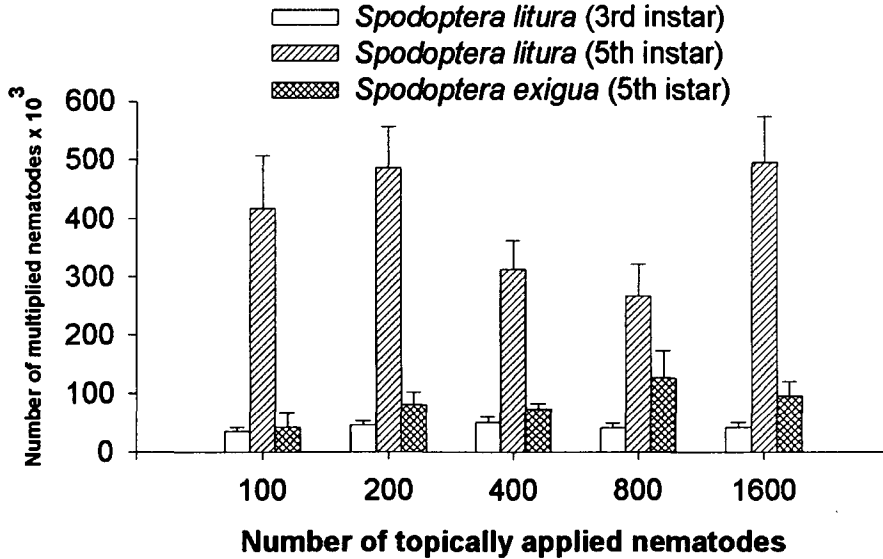


Fig. 4. Number of *Steinernema carpocapsae* produced in different insect hosts at 25°C. Vertical error bars represent standard deviations of the mean.

3. 병원선충의 증식력

병원선충의 처리농도에 따른 기주내 병원선충의 증식율을 두 종의 기주와 발육시기에 따라 조사했다 (Fig. 4). 조사된 모든 기주에서 증식된 병원선충 밀도는 접종농도에 관계없이 각 기주의 발육시기에 따라 달랐다. 과밤나방 5령충 개체에서 증식된 병원선충수는 약 100,000마리, 담배거세미나방 3령충에서 약 50,000마리, 담배거세미나방 5령충에서 처리밀도에 따라 변동은 있지만 통계적으로 차이가 없었으며 ($F = 2.13$, $df = 4, 46$, $P = 0.0919$) 최대 약 500,000마리를 나타냈다.

조사된 두 가지 발육온도가 병원선충 증식에 미치는 영향을 분석하였다 (Fig. 5).

두 온도중 병원선충의 증식은 높은 온도에서 빨랐다. 두 종의 기주 모두가 최대증식에 도달하는 기간이 20°C에서는 접종 후 12일이 소요된 반면 25°C에서는 불과 6일만으로 단축되었다.

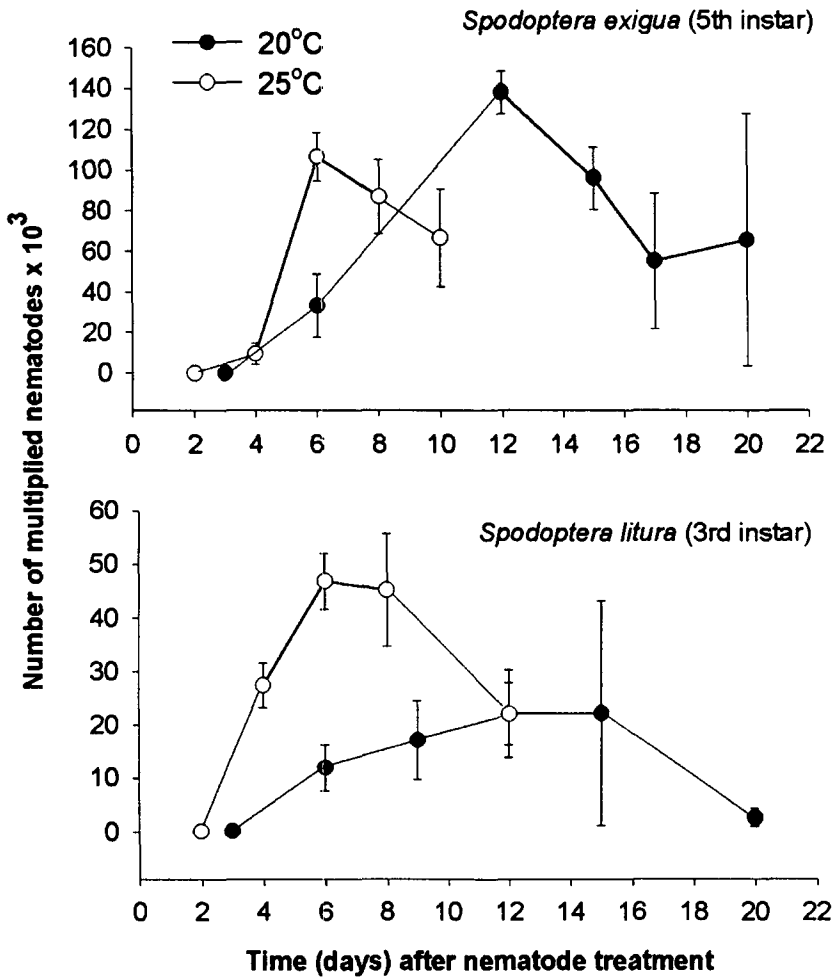


Fig. 5. Yield of infective juveniles, *Steinernema carpocapsae*, in different insect hosts with rearing temperatures. Vertical error bars represent standard deviations of the mean.

제4절 공생미생물의 동정 및 증식최적화 기술 개발

1. 공생세균의 colony 형태 변이

1) 크기관찰

공생세균을 25℃에서 48시간 동안 Tryptic soy agar (TSA)배지에서 계대배양하여 1세대(F1), 10세대(F10), 20세대(F20), 30세대(F30)의 계대배양균을 얻었다. Penicillin 250ppm이 첨가된 TSA배지에서 각각 계대배양된 공생세균을 삼각 초자봉으로 도말하여 48시간동안 25℃ 항온기에서 배양하였다. 배양된 세균 colony의 크기를 3단계로 나눴다.

일반적으로 *in vitro*상태에서는 primary form의 세균들이 안정하지만 *in vivo*상태에서는 primary form이 secondary form으로 phase variation이 일어난다. 본 실험에서 primary form에서 secondary form으로의 변화를 알아보기 위하여 30세대의 계대배양에 걸쳐서 얻어진 배양균주에 대하여 colony 크기별로 phase variation을 관찰하였으나 colony크기에서는 이런 변화를 관찰하기 어려웠다 (Table 9).

Table 9. Size variation in the successive colonies of *Xenorhabdus nematophilus* on Tryptic soy agar (TSA)

Colony size ¹	Proportion (%) of colony size with succeeding cultures			
	F1 ²	F10	F20	F30
small form ^b	100	95.74	95.38	96.43
mid form	0	4.26	4.62	3.57
large form	0	0	0	0

¹ Small colony: < 3mm, mid colony: 3mm - 4mm, large colony: > 5mm

² Number of succeeding culture

2) 공생세균의 전자현미경 분석

각각 계대배양된 균주들을 TSA배지에서 48시간 동안 25℃에서 배양하였으며 grid를 각 균주들에 dipping한 후 2% phosphotungstic acid (PTA, pH 7.0)로 5분간 염색하였다. 이를 전자현미경 (Zeiss E.M. 109, Germany)으로 세균의 형태를 관찰하였다.

본 연구대상인 공생세균의 phase variation은 flagella의 유무에 따라 primary 및 secondary로 각각 일어난다. 그러나 본 연구 결과는 계대배양 1세대, 15세대 그리고 30세대에 대하여 전자현미경 검경을 하였을 때 30세대에서도 대부분의 세균 colony가 flagella를 보유하고 있었다 (Fig. 6). 따라서 30세대에 걸친 계대배양에 의하여 세균의 primary에서 secondary form으로의 phase variation이 일어나지 않았다.

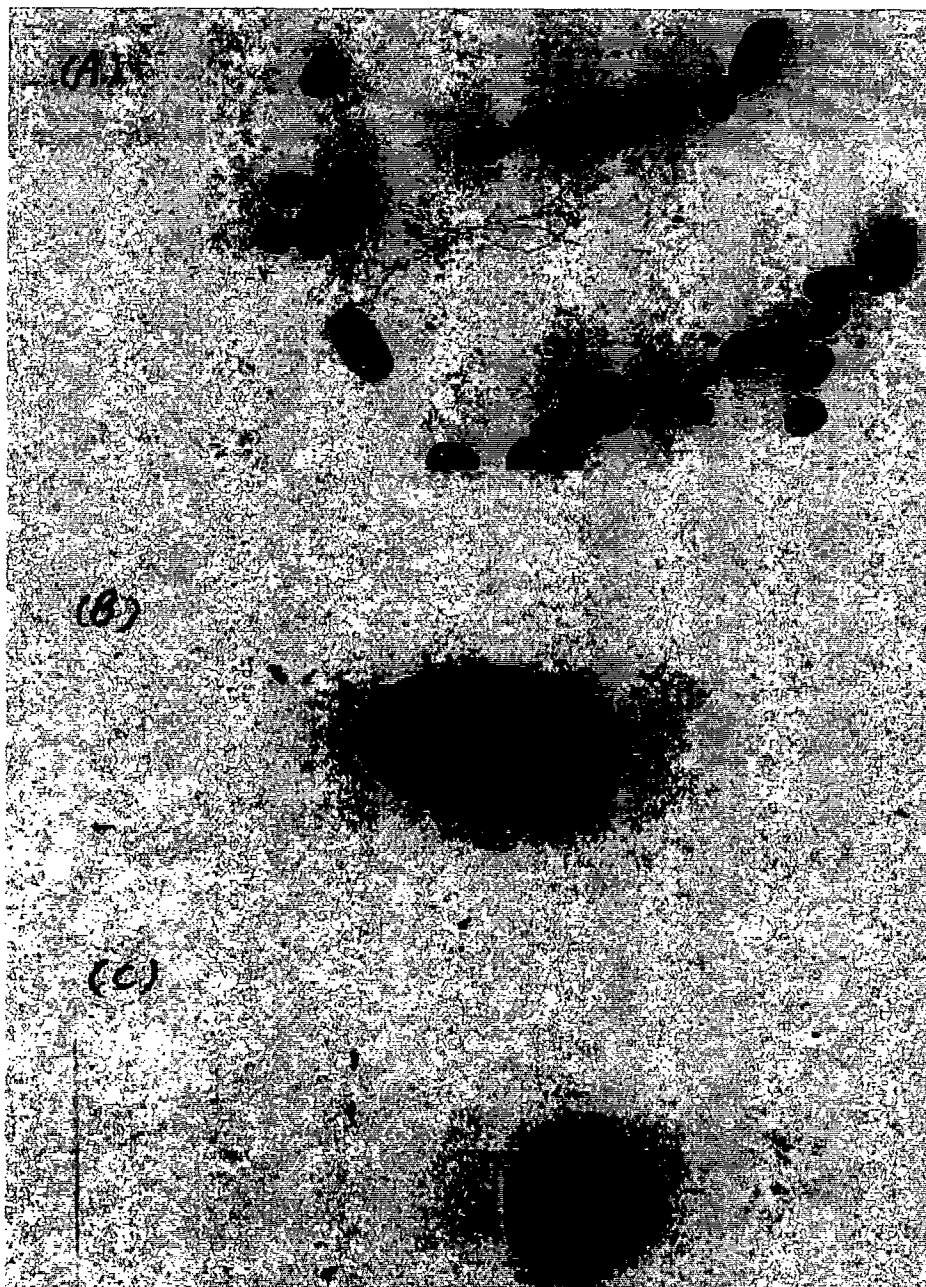


Fig. 6. Electron micrographs of *Xenorhabdus nematophilus* (A and B) and *Streptococcus faecalis* (C), bacterial pathogens to *Spodoptera exigua*. A: 7,000X, B: 20,000X, and C: 20,000X magnification, respectively.

2. 공생세균의 운동성 비교

각각 세대별로 TSA배지에서 48시간 동안 배양된 균주를 0.7% soft agar에 살균된 이수시계를 이용하여 접종한 후 48시간 25℃ 배양기에서 배양한 후 세균의 운동성을 관찰하였다.

F1, F10, F20 그리고 F30세대의 균주 모두 운동성을 가지고 있었다. 처음 접종한 곳에서 약 1cm 정도의 운동성을 나타내었다 (Table 10). 이것은 전자현미경 검정에서 관찰된 flagella에 의해서 운동성을 나타낸 것으로 확인되었다.

Table 10. Motility change in the successive colonies of *Xenorrhhabdus nematophilus* on Tryptic soy agar (TSA)

Character	F1 ¹	F10	F20	F30
Motility	+	+	+	+
Diameter (cm)	1.07±0.9	1.00±0.3	1.00±0.6	0.93±0.1

¹ Number of succeeding culture

3. 공생세균의 병원력 비교

공생세균의 병원력은 살충력과 직결되는 것으로서 실내기내배양을 통해 병원력을 상실한다면 이러한 응용 방향에 있어서 문제점을 주게 된다. 이러한 우려를 알아보기 위해 기존 배양 조건에서 세균을 계대 배양시킨 후 각 세대의 병원력을 살충력으로 알아보았다.

세대별로 계대배양된 세균을 액체 (Nutrient broth) 배지에 접종하여 25℃ 배양기에서 48시간동안 보관한 뒤 Eppendorf tube에 1ml를 옮겨서 7,000rpm에서 2분간 원심

분리하여 배지성분을 제거하였다. 그리고 0.7% saline solution (NaCl) 1ml을 처리하여 40Hz의 Voltex-mix로 2분간 세균과 섞은 다음 7,000rpm에서 2분간 재원심분리한 후 Hamilton microsyringe를 이용하여 5령의 파밤나방 뒷가슴의 왼쪽 마지막 다리를 통해 세균현탁액 2 μ l (C, 10⁶cell/ml)를 접종하여 25 $^{\circ}$ C 배양기에서 24시간 동안 보관한 후 병원성을 조사하였다.

세대별 배양에 따른 병원력 검사에서 F30까지 병원력이 소실 되지 않는 것으로 실험결과 나타났다 (Table 11).

Table 11. Pathogenicity variation in the successive cultures of *Xenorhabdus nematophilus* on Tryptic soy agar (TSA) against *Spodoptera exigua* 5th instar larvae

	F1	F10	F20	F30
Pathogenicity	+	+	+	+

4. 공생세균의 생물적 특징

1) 항생물질 분비 능력

공생세균을 25 $^{\circ}$ C에서 48시간 동안 Tryptic soy agar (TSA)배지에서 배양한 후 직경 6mm의 aluminum rod를 이용하여 새로운 TSA배지에 spotting한다. 또한 시험균주를 25 $^{\circ}$ C에서 48시간 동안 배양하고, spotting된 균을 25 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 배양하여 chloroform 3ml를 샤페 안에 처리하여 2시간 동안 휘발시킨 후 50 $^{\circ}$ C 정도의 0.7% soft agar를 시험 균주현탁액과 같이 섞어서 샤페 위에 고르게 도말한다. 다시 25 $^{\circ}$ C에서 24시간 정도 배양한 후 inhibition zone의 형성 유무를 관찰한다.

Table 12. Antibiotic activity of the symbiotic bacteria, *Xenorhabdus nematophilus*

Bacteria	Inhibition
<i>Escherichia coli</i>	+
<i>Pseudomonas putida</i>	-
<i>P. fluorescens</i>	-
<i>P. aeruginosa</i>	+
<i>Erwinia carotovora</i>	+
<i>E. rhapontici</i>	+
<i>Ralstonia solanacearum</i>	+

공생세균과 같은 장내세균과에 속하는 *Escherichia coli*, *Erwinia carotovora*, *E. rhapontici* 등을 억제시키고 담배에 세균성 썩마름 병을 유발하는 *Ralstonia solanacearum* 대해서도 항생효과를 나타내었다. 그러나 많은 종류의 식물에 대하여 점무늬병, 마름병, 물관시들음병 그리고 궤양병 등을 일으키는 *Pseudomonas* 에 대한 실험에서는 *P. aeruginosa*를 제외하고는 본 실험에서 공생세균에 의해서 억제되지 않았다 (Table 12).

2) 항생물질 (streptomycin 과 penicillin)에 대한 내성

공생세균의 선택적 배지를 만드는 일은 이 세균을 빠르게 찾아내고 동정하는 데 있어서 매우 중요한 단계이다. 그람음성균의 특징을 가지고 있는 이 세균의 항생제로서 일반적으로 그람균에 선택적으로 억제시키는 streptomycin 과 penicillin의 두 항생제를 이용하여 억제한계를 결정함으로써 타 세균의 발육을 최대한으로 억제하는 쪽으로 개발 방향을 두게 되었다.

Streptomycin을 농도별 (0.1, 1, 100, 1,000ppm)로, penicillin을 농도별 (62.5, 125, 250, 500, 1,000, 2,000ppm)로 TSA배지에 처리했다. 배지가 굳으면 삼각초자봉을 이용하여 100 μ l의 세균현탁액을 도말한 후 25 $^{\circ}$ C의 배양기에서 48시간 동안 배양한 후 세균수를 조사하였다.

항생물질에 대하여 여러 가지 세균들이 반응을 나타내었다. 본 실험에서는 분리한 공생세균이 streptomycin에 대하여 감수성인 것으로 나타났다 (Fig. 7). 그람 양성균이 16,000ppm에서도 억제되지 않는 반면 공생세균은 4,000ppm에서 감소하는 경향을 보였다. 그리고 공생세균은 penicillin에 대하여 125ppm에서 250ppm농도에서는 영향을 받지 않았으나 그람 양성균의 경우 반대로 125ppm에서 세균의 수가 감소하기 시작하여 250ppm에서는 완전히 억제되었다.

따라서 분리한 공생세균에 대한 배지에서 penicillin을 250ppm을 처리하면 그람 양성균을 다수 억제할 수 있고, streptomycin의 경우 3,000ppm을 처리하면 공생세균에 영향을 주지 않아서 좋은 준 선택성 배지가 될 수 있다고 판단된다.

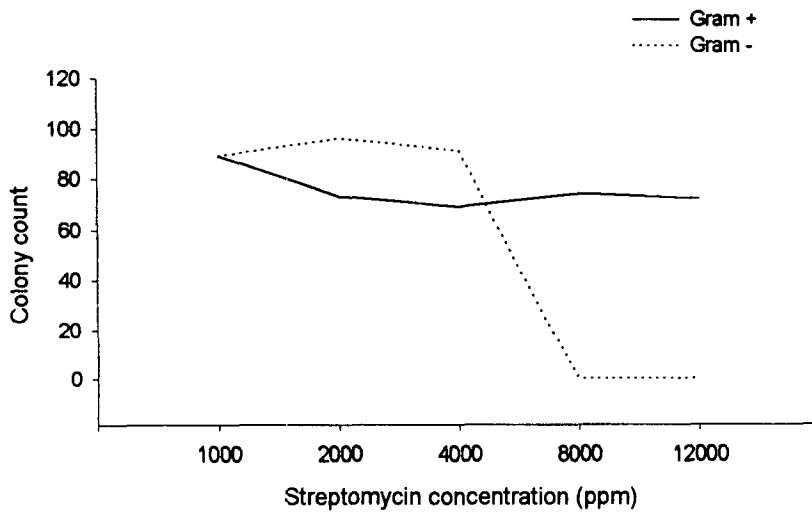
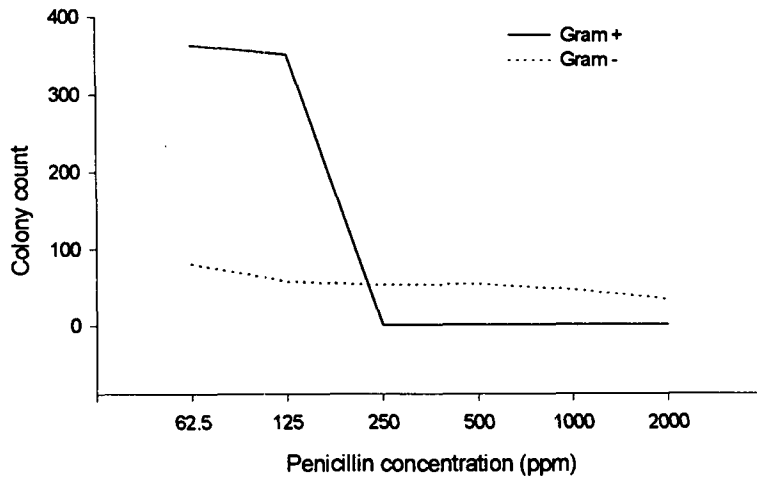


Fig 7. Susceptibility of *Xenorhabdus nematophilus* to two antibiotics. The Gram positive bacteria was obtained from *Spodoptera exigua* hemolymph.

제5절 고체 및 반고체 배지를 통한 기내배양 기술 개발

기내배양 기술은 기존의 고체 및 반고체 배지를 이용하여 개발이 진행되었다. 근본적으로 가장 중요한 공생미생물의 동정과 기내배양기술이 개발되었다 (제4절 참조). 이러한 공생세균은 선충의 기내배양에 매우 중요한 단계로서 다양한 기내배양에 이용되게 된다.

고체배지의 개발 방향은 우선 증식용 선충태를 얻는 데서부터 진행되었다. 왜냐하면 대부분의 우리가 보는 선충은 감염태로서 이는 일종의 성장면에서 휴면태의 성격을 지니기 때문에 기내증식을 위해서는 이들이 성장형 모드로 전환이 요구된다. 이를 위해 우선 다음의 axenic culture가 요구된다.

Axenic cultures

1) Surface-sterilization (modified from Nicolas (1962))

곤충병원선충의 암컷성충으로부터 채집된 알을 1% NaOCl에 15분간 표면살균한 후 Ringer's 용액으로 2회 세척한다. 이것을 nutrient agar배지에 옮기고 25°C 인큐베이터에서 배양하였다. 조사는 1일부터 4일까지 조사하였다.

2) Alkaline lysis (modified from Patel & McFadden (1978))

곤충병원선충의 암컷성충을 0.4M NaOH에 15분간 처리하여 알을 분리하고 1% NaOCl에서 표면살균하였다. 이것을 NA배지에 옮기고 25°C 인큐베이터에서 배양하였다. 조사는 1일부터 4일까지 조사하였다.

증식형 모드로 전환된 증식형 선충은 다음의 공생세균을 접종을 포함한 다양한 monoxenic 기내배양기술을 이용하여 증식하게 된다.

Monoxenic cultures

1) Honda method에 의한 선충 증식 방법

첨가물사용: Lard, Beef fat, Corn Oil, 고추씨기름, Linseed Oil

선충의 농도별 증식: 25-800IJ, 1000-6000IJ

배지 용기의 변화: 시험관, 삼각플라스크, 조직배양용기

세균의 농도별 증식: 세균을 농도별로 처리한 뒤 선충을 접종

2) Han method에 의한 선충 증식 방법

첨가물사용: Lard, Beef fat, Corn Oil, 고추씨기름, Linseed Oil

선충의 농도별 증식: 25-800IJ, 1000-6000IJ

배지 용기의 변화: 시험관, 삼각플라스크, 조직배양용기

세균의 농도별 증식: 세균을 농도별로 처리한 뒤 선충을 접종

3) Wout's method에 의한 선충 증식 방법

용매의 변화: 증류수를 이용한 것과, Sorensen phosphate buffer를
이용한 방법

용기의 변화: 삼각플라스크, petri-dish

인큐베이터의 교환: 고정상과 비고정상 인큐베이터를 이용.

4) Bedding method에 의한 선충 증식방법

배지의 수분함량 변화: 20%, 30%, 40%

용액의 변화와 pH: 증류수와 인산완충용액을 이용하였으며, 인산완충액을
이용하여 pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5로 조절하여
배지를 조성하였다.

선충의 표면살균: 1% NaOCl에 5, 10, 20, 30분간 표면살균 한 후 접종.

Honda method에 따른 35g의 시험관 배지에서만 대략 750,000IJ의 선충을 1회 수 집할 수 있었고, 그 뒤 모든 방법에서 성공하지 못했다. 그 외 배지에서 선충증식은 되지 않았지만, 수분함량이 높은 배지와, pH 6.5-7.5 배지에 접종한 선충의 생존이 길 어졌다.

제6절 증식 감염태 선충 회수법 개량

본 연구는 기주체내에 가장 감염태 선충의 밀도가 높을 때 기주를 해부하여 혈강을 노출시켜 감염태 선충의 탈출을 도와줌으로 수거시간을 단축시키겠다는 가설하에 새로운 수거방법을 모색하게 됐다. 특히 기주체내에서 인위적으로 선충의 탈출을 유도함으로써 과생되는 발육태의 혼재를 어느 정도 막기 위해 'White trap'보다는 'Baermann' 깔대기법을 수거방법으로 선택하였다. 이렇게 해서 고안된 새로운 수거방법은 기존의 방법과의 효율면에서 비교하기 위해 수거방법간 감염태 선충의 회수율과 병원력, 침입력의 차이를 분석하였다.

우선 본 연구에 수행하게 된 시험 방법을 소개한다.

시험동물증식

곤충병원선충 (*Steinernema carpocapsae*)을 곤충기주에 국부접종 후 25℃ 항온기에서 6일간 증식시켰으며 (Han *et al.* 1998) 이를 증식된 기주체로 수거방법에 따른 선충회수효과 분석실험에 사용하였다. 분리된 감염태 유충은 병원력 검정을 위해 사용될 때까지 15℃에 보관하였다 (Park *et al.* 1998). 기주곤충인 파밤나방 (*Spodoptera exigua* (Hübner))은 인공사료 (Gho *et al.* 1993)를 이용하여 실내에서 누대 사육하였다. 곤충의 사육조건은 온도 25±1℃, 광주기 16:8h (L:D)이었다.

감염태 선충분리

본 연구에서 비교된 두 가지 수거방법은 증식기주의 처리방법에 따라 분류된다. 일반적으로 증식된 기주를 해부하지 않고 스스로 기주체를 빠져나오게 하는 기존의 방법과 증식된 감염태 유충의 탈출을 용이하게 하기 위해 기주체의 혈강을 해부를 통해 노출시켜주는 방법으로 구분된다. 감염태 선충의 수거는 무처리 기주체의 경우

감염태 유충이 스스로 빠져나오는 데는 수일이 소요됨으로 일반적으로 많이 이용되고 있는 'White-trap'법 (Bedding and Akhurst 1975)으로, 해부기주체로부터 감염태 유충 수거는 일시에 수거가 간편한 'Baermann' 깔대기법 (Kaya and Stock 1997)을 이용하였다. 두 방법 모두 25℃ 상온에서 증식된 기주 사체로부터 빠져나오는 유충을 여과시키는 원리를 이용한다. 차이점은 기존의 'White-trap'법에서는 증식된 기주 사체를 아무런 처리 없이 여과지 (직경 90mm: Advantec #2, Toyo, Japan)가 깔려있는 기주접시 (50x10mm: 직경x높이) 위에 올려놓았다. 다시 이 기주접시는 주위에 살균수로 채워진 수거용 용기 (150x20mm: 직경x높이)에 넣어졌다. 이 상태에서 사체로부터 빠져나오는 감염태 유충을 주위의 살균수로 모아졌고 이 살균수를 수거처리후 10일동안 매일 1회씩 교체해주었다.

개량된 'Baermann' 깔대기법에서는 증식된 기주 사체를 여과지 (107x210mm: 가로x세로, Kimwipes® S-150, Yuhan-Kimberly, Korea)에 올려놓고 기주의 혈강이 노출되도록 표피를 해부하였다. 이렇게 처리된 여과지는 철투과망 (직경 50mm, 30 mesh) 위에 고정되었다. 이 복합체를 살균수로 채워진 유리깔대기 (60x60x8mm: 입구직경x길이x출구직경, Duran, Germany)에 올려 놓고 깔대기의 출구는 고무튜브와 집게로 조절하게 했다. 여과지를 통과하여 깔대기 출구쪽으로 모아지는 선충은 0.5-1시간 간격으로 비이커에 모이지고 깔대기는 새로운 살균수로 채워졌다. 이러한 수거는 2일동안 진행되었다. 밤기간중에는 깔대기내의 살균수를 제거하고 기주체주위를 습실처리하여 선충의 생존을 유지시키면서 수거를 일시 중단하였고 다음날 살균수를 깔대기에 채우면서 수거과정이 계속 진행되었다.

병원선충의 살충력검정

병원선충의 살충력을 분석하기 위해 페트리디쉬 생물검정법 (Han *et al.* 1996)을 이용하였다. 이러한 생물검정은 여과지 (90mm, Advantec #2, Toyo, Japan)가 깔려진 페트리디쉬 (90×15mm: 지름×높이)에 25마리 (0.5ml 증류수)의 감염태 유충을 처리한

후 3마리의 파밤나방 5령충과 인공사료 (약 1g)를 놓았다. 같은 처리는 10반복되었으며 처리된 사육용기들은 항온기 (온도 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, 광주기 16:8h (L:D))에서 48시간 경과한 후 사망률을 조사하였다.

개발된 'Baermann' 깔대기법 및 기존의 'White trap' 방법인 두 가지 선충수거방법에 따라 수거된 선충은 형태적으로 감염태 유충을 확인하였다. 특히, 감염태 유충은 4령충과 구분하기 위해 입술부위에 작은 돌기가 없으며, 크기가 $400\mu\text{m}$ 이하인 것으로 판별하였다 (Kaya and Stock 1997). 이렇게 해서 얻어진 유충이 기능적으로 감염태 능력을 소유하고 있는 지를 분석하기 위해 이들 유충들의 기주 살충력을 분석하였다.

분석된 감염태 선충농도는 일반적으로 약 25%의 치사율을 보이는 것으로 (Han *et al.* 1999) 비교적 낮은 치사농도에서 두 방법으로 분리된 선충의 치사율의 차이를 극대화시키기 위함이다. 이렇게 처리한 후 48시간 뒤에 선충에 의한 기주치사율을 조사하였다 (Fig. 8). 두 방법으로 수거된 감염태 선충은 기주치사율에 있어 차이를 보이지 않았다 ($X^2 = 0.001$; $df = 1$; $P = 0.98$).

다시 수거방법에 따른 이들 감염태 유충의 기주 침입력의 차이를 알아보았다. 페트리디쉬 검정법과 유사한 방법으로 감염태 유충 500마리를 0.5ml의 증류수와 함께 여과지에 시간별로 파밤나방 5령충 (평균 체중: 136.8 ± 16.2 mg)을 3반복으로 처리하였다 (Fig. 9). 두 방법 모두에서 처리시간이 증가할수록 침입된 선충의 수는 증가했으며 이들 상호간에 차이가 없었다 ($F = 0.04$; $df = 1, 48$; $P = 0.85$).

수거 방법에 따른 수거량의 차이가 있는지를 알아보기 위하여, 페트리디쉬 검정법과 유사하게 400마리의 감염선충을 파밤나방 5령충에 처리한 후 온도 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 에 6일

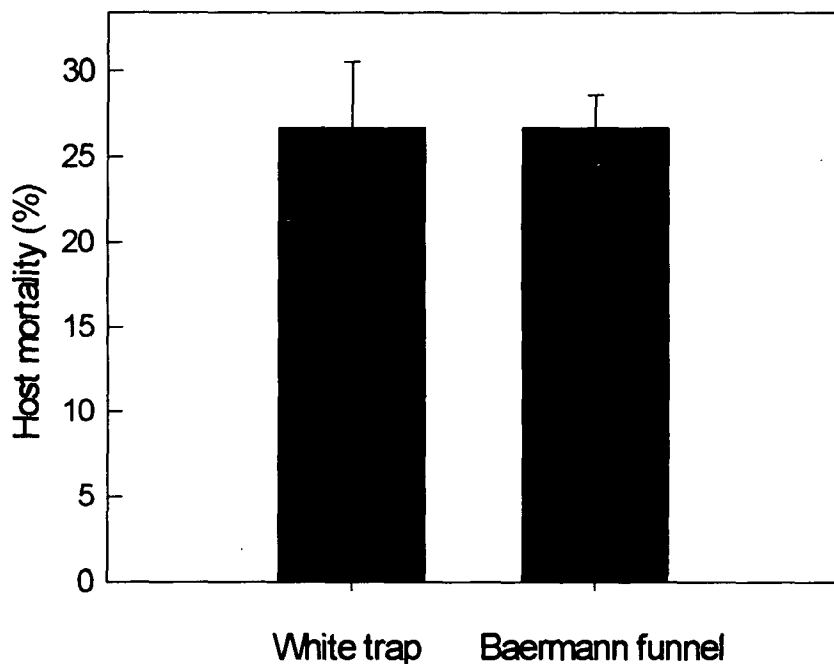


Fig. 8. Comparison of the infective juveniles collected by either classical 'White trap' or improved 'Baermann funnel' methods in their pathogenicities to the fifth instar larvae of *Spodoptera exigua* by petri-dish (90 x 15 mm: diameter x height) assay. Each treatment consisted of 10 petri-dish, each of which had 3 insect larvae on filter paper (90mm diameter, #2 Avantec, Toyo, Japan) with 25 nematodes. Mortality was assayed at 48h after the treatment. The vertical bars represent the standard deviations.

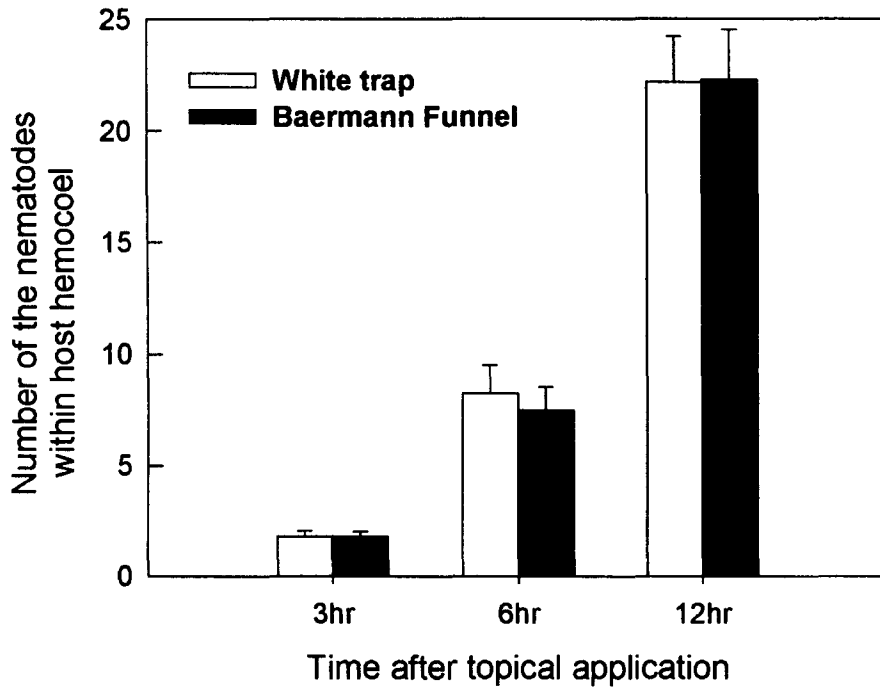


Fig. 9. Comparison of the infective juveniles collected by either classical 'White-trap' or improved 'Baermann funnel' methods in their penetrating activities into the fifth instar larvae of *Spodoptera exigua*. The penetrating activity was measured by the number of the nematodes found in the hemocoel of the larvae treated for the specific times on the filter paper (90mm diameter, #2 Avantec, Toyo, Japan) with 500 infective juveniles.

간 배양하였다. 이때 두 가지 수거방법으로 모든 선충을 수거한 후 선충의 발육시기 별로 구분하였으며 3반복으로 수행하였다. 두 방법 모두 95%이상이 감염태 유충인 3령충으로 수거되었다 (Table 13). 그 이외에 4령충이 일부 수거되었고 다른 발육태는

수거되지 않았다. 그러나 두 가지 수거방법은 감염태 수거밀도와 수거소요기간에 있어 현격한 차이를 나타냈다. 기주의 혈강을 노출시키고 감염태 선충을 수거했던 개량된 'Baermann' 깔대기법은 단지 2일의 수거기간을 통해 기주체 마리당 약 50,000마리가 수거되었다. 반면에 아무런 처리없이 감염태 선충이 기주체를 탈출하도록 고안된 기존의 'White-trap' 방법은 10일의 수거일을 통해 불과 약 20,000마리의 수거를 보였다.

Table 13. Age distribution of the nematodes collected from the fifth instar larvae of *Spodoptera exigua* which were infected with *Steinernema carpocapsae* and incubated for 6 days at 25°C. Nematode collection was conducted by either classical 'White trap' or improved 'Baermann funnel' method.

Developmental ages of nematodes	Number of nematodes/host according to collecting methods	
	'White trap'	'Baermann funnel'
Larva 2nd	0	0
3rd	21,028 ± 5,765.0	54,522.3 ± 4,315.4
4th	101.7 ± 49.2	309.3 ± 50.0
Adult	0	0

이상의 결과로 보아 수거 방법에 따른 형태적 감염태 유충은 병원력과 기주 침입력에는 차이가 없는 것으로 판명되었다. 그러나 새로이 변형된 'Baermann' 깔대기법이 기존의 'White-trap' 방법에 비해 수거시간이 단축되고 감염태 유충의 수거밀도가 높아 기주 곤충으로부터 곤충병원선충을 대량 증식시킬 경우 개량된 'Baermann' 깔대기법이 더욱 효율적인 수거방법이라고 본 연구결과는 제시한다.

제 3 장 곤충기생선충의 장기보관법 및 살포법 개발분야

제1절 서 설

해충방제에 있어서 새로운 생물적 방제 인자로서 곤충병원선충은 야외 살포에 있어서 크게 두 가지 중요한 제약점이 있다. 우선 대량 사육된 곤충병원선충의 감염태를 효과적으로 보관하는 기술이다. 즉, 일반 농약보관과 같이 적어도 상온의 조건에서 한 달이상의 보존력을 보유해야 한다는 점이다. 여기서 보관이란 생존력과 감염력 모두를 포함시킨다.

두 번째 제약점은 야외 포장에 살포하였을 경우이다. 일반적으로 곤충병원선충은 토양내 서식조건을 갖음으로 굽벙이와 같은 지하부 해충을 방제하기 위해서는 크게 문제될 수 없다. 실제로 곤충병원선충을 이용하여 해충방제도 이러한 점 때문에 지하부 해충에 국한되어 실용화하고 있다. 여기에 이 선충을 지상부 해충의 방제에 이용하려면 건조와 자외선 등의 환경 조건을 견디게 할 수 있는 캡슐화가 진행되어야 한다는 점이다.

이상의 두 가지 사항을 한꺼번에 해결하기 위해서 우리는 일반적인 보관법 개량과 새로운 바이오캡슐의 개발에 주력하게 되었다. 일반적 보관법은 기존의 액체보관을 최적화시킬 수 있는 기술을 일컫는다. 또, 기존의 선충자체의 살포에 내건성을 높혀 주기 위해 내건제의 개발이 필요하게 되었다.

바이오캡슐은 두 가지 방향으로 연구 개발되었다. 즉, 기존의 수화형 캡슐을 더욱 많은 감염태 선충을 포함시킬 수 있는 고집적 선충제제 형태로 개발하였다. 이는 일반 조건에서 보관에 최적 상태를 보였으며 한꺼번에 많은 숫자의 선충을 운반하는 데 장점을 지니게 된다. 두 번째로 알지닌산을 이용한 지상부 해충방제용 살포제형 개발이다. 기존의 알지닌 제제는 보습 및 자외선 차단 등 많은 장점에도 불구하고 선

충자체의 탈출이 매우 큰 문제이었다. 여기서는 이 제제를 변형시켜 섭식유인제를 포함한 제제를 개발함으로 섭식독을 유발시키는 제제로 개발하였다.

제2절 곤충병원선충의 장기보관법

1. 액체저장 최적화 기술 개발

병원선충의 대량증식후 최적 보관조건에서 저장하였다가 필요할 때마다 야외에 살포하여 생물학적 방제 수단으로서 병원선충을 이용하겠다는 응용적 전략하에 현재 자연기주에서 증식되고 있는 병원선충을 보관하는 것이 매우 중요하다.

이러한 증식된 병원선충의 저장연구는 중기보관 (약 30일 이내)과 장기보관 (1달 이상)으로 나뉘어 연구가 설계되었다. 당해연도에는 중기보관조건을 결정하는 데 목표를 두었으며 이는 현재 자연기주에서 증식되고 있는 병원선충을 여러 연구에서 필요할 때마다 안정적으로 공급하겠다는 연구 지원면에서도 중요하지만 실제적으로 병원 선충을 상품화시킬 때 보관용액의 조성이라는 면에서 실질적 중요성을 갖는다.

곤충병원선충 (*S. carpocapsae*)의 보관을 위한 온도, 수소이온농도 및 염농도 등의 비생물적 환경요인들이 감염태의 선충 생존력에 변동을 주었다. 다음은 본 연구를 수행하는 데 관련된 연구방법을 먼저 소개한다.

선충증식. 곤충병원선충 (*S. carpocapsae*)은 안동대학교 농생물학과에서 사육하고 있는 과밤나방 5령충에 100마리의 감염선충 (Infective Juveniles: IJs)을 국부처리 방법으로 접종하여 25℃ 배양기에서 6일간 배양시킨 후 기주를 해부하여 Baermann깔대기체법으로 시험선충을 수거했다. 분리된 약 200,000IJs를 50ml의 살균수가 담긴 보관플라스크 (75cm², Corning, USA)에 옮기고 10℃의 항온기에 보관하였다. 보관된 선충은 Baermann깔대기체법으로 살아있는 감염선충을 다시 분리하여 실험에 이용하였다.

온도조사. 각 시험플라스크 (25cm², Corning, USA)에 1,000마리의 감염선충이 포

함된 15ml의 살균수를 넣었다. 감염선충을 포함한 15개의 시험플라스크를 5종류의 보관온도 (0℃, 5℃, 10℃, 15℃ 및 25℃)에 3반복씩 처리하였다. 생존수 조사는 5일 간격으로 한달 동안 실시됐다.

pH조사. 각 pH완충용액은 Henderson-Hasselbalch공식에 따라 0.01M NaH_2PO_4 와 0.01M Na_2HPO_4 의 상대 비율에 의해 조성되었다. 감염선충 (1,000IJs)과 8종류의 서로 다른 pH 완충용액 (8.5, 8.2, 7.9, 7.7, 7.5, 6.8, 6.3 및 6.1) 15ml를 각 시험플라스크에 3반복으로 할당한 후 15℃의 항온기에 보관하였다. 생존수는 5일 간격으로 한달 동안 조사하였다.

염농도조사. NaCl을 멸균된 이차증류수에 용해하여 4종류의 서로 다른 NaCl농도 (0.5%, 1.0%, 2.5% 및 5.0%)로 조성하였다. 감염선충 (1,000IJs)이 포함된 15ml의 NaCl용액을 각 시험플라스크에 3반복으로 처리한 후 15℃의 항온기에 보관하였다. 생존수는 5일 간격으로 한달동안 조사하였다.

내한성조사. 내한성조사는 1ml 살균수에 상온에서 분리된 100마리의 감염선충을 넣고 -10℃와 -20℃에 2시간 및 4시간 동안 각각 3반복 처리한 후 실온에서 1시간 방치 후 살아있는 선충수를 현미경하에서 관찰함으로써 실시되었다. 저온순화처리는 5℃에서 2시간 선 처리한 후 내한성조사를 실시하였다. 내동결 물질로서 글리세롤이 선충의 내한성 증가에 미치는 영향을 조사하기 위해 각 농도 (1.0%, 5.0%, 10% 및 20%)의 글리세롤 1ml에 2시간동안 내한성조사를 실시하였다.

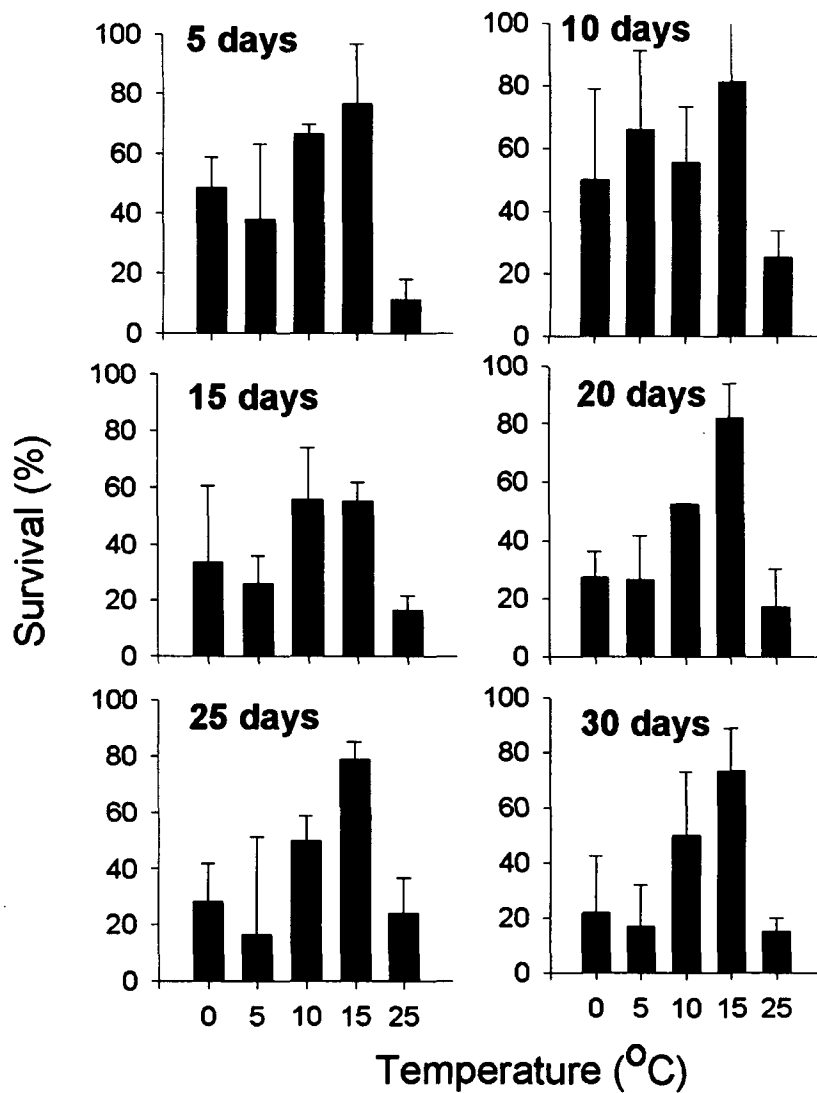


Fig. 10. Effect of temperature on preservation of infective juveniles of *S. carpocapsae*. The vertical bars above solid mean bars represent standard deviations.

Table 14. ANOVA on environmental factors for preservation of *S. carpocapsae*

Source	df	SS	MS	F	P
Temperature					
Temp ¹	4	13543522.22	3385880.56	35.70	0.0001
Time ²	5	1529245.56	305849.11	3.23	0.0121
Temp*Time	20	2650904.44	132545.22	1.40	0.1597
Error	60	5689933.33	94832.22		
Total	89	23413605.56			
pH					
pH ³	7	80185.86	11455.12	65.87	0.0001
Time	5	102934.75	20586.95	118.38	0.0001
pH*Time	35	11525.81	329.31	1.89	0.0121
Error	96	16695.33	173.91		
Total	161	211341.75			
Salt					
Salt ⁴	4	7730566.73	1932641.68	397.55	0.0001
Time	5	671510.23	134302.05	27.63	0.0001
Salt*Time	20	236523.27	11826.16	2.43	0.0042
Error	60	291680.67	4861.34		
Total	89	8930280.90			

¹ Temp represents the treated temperatures of 0, 5, 10, 15, 20, and 25°C.

² Time represents the storage periods of 5, 10, 15, 20, 25, and 30 days.

³ pH represents the hydrogen ion concentrations (pH 6.1, 6.3, 6.8, 7.5, 7.7, 7.9, 8.2, and 8.5) in 0.01M phosphate buffer.

⁴ Salt represents the NaCl concentrations (0, 0.5, 1, 2.5, 5%) in the distilled water.

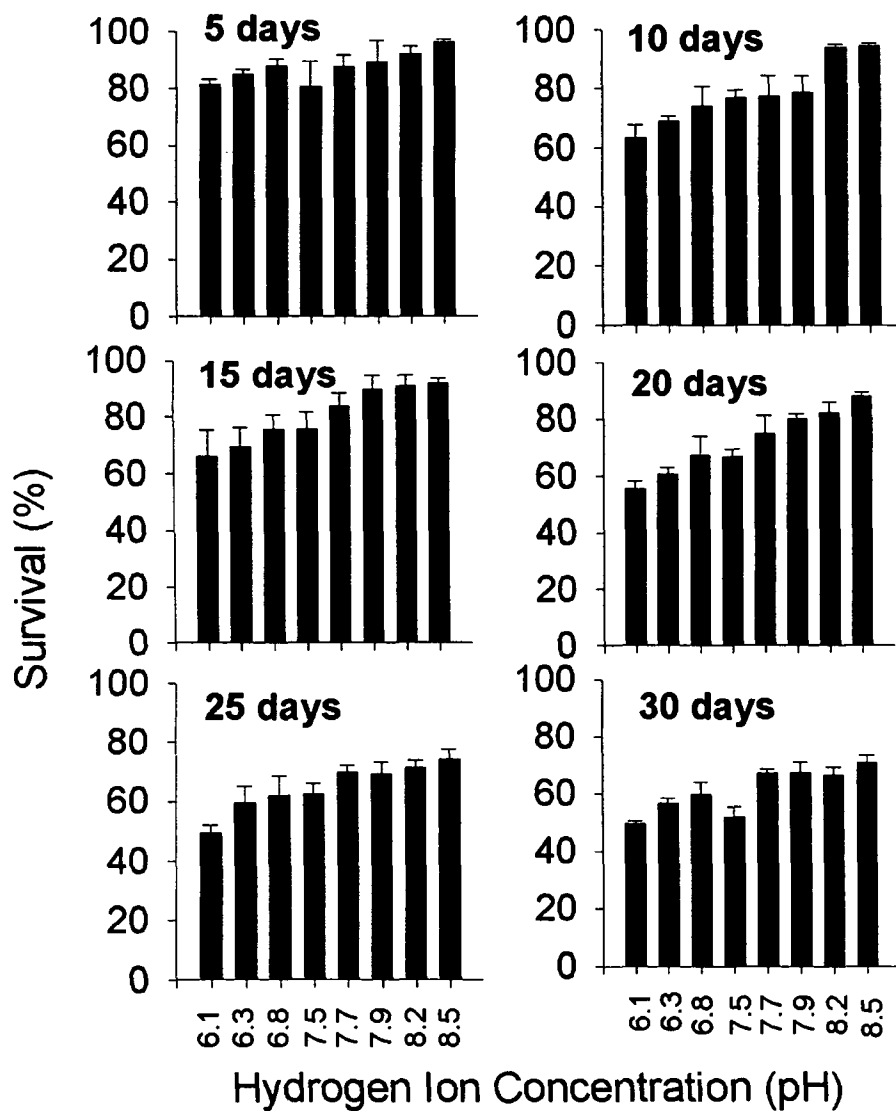


Fig. 11. Effect of hydrogen ion concentration (pH) on preservation of infective juveniles of *S. carpocapsae*. The vertical bars above solid mean bars represent standard deviations.

보관기간에 따른 온도가 감염태 곤충병원선충 (*S. carpocapsae*)의 생존력에 미치는 영향을 분석하였다. 대부분의 온도에서 보관기간에 따라 생존율이 감소하였다 (Fig. 10 and Table 14). 그러나 처리된 0°C에서 25°C까지의 5종류의 온도 가운데 15°C에서, 조사한 한달동안 가장 높은 생존율이 유지되었다 ($F = 1.65$, $df = 5, 17$, $P = 0.2200$). 그 다음으로 10°C에서 높은 생존율을 보였다. 0°C와 5°C는 10°C와 비교하여 상대적으로 낮은 생존율을 나타내었으며, 25°C에서 생존율이 가장 저조하였다.

즉, 온도는 15°C에서 조사기간중 생존율의 변동이 적어 최적의 보관온도로 밝혀졌다. 특히 25°C의 고온에서 선충의 생존율이 저온인 0°C와 5°C에 비하여 낮은 것으로 조사되어 온도가 올라감에 따라 상대적으로 대사속도의 증가로 체내 저장 에너지의 빠른 소모가 생존율 감소의 원인으로 추정된다. 이러한 가정은 곤충병원선충류의 보관기간이 진행됨에 따라 체내 지질의 함량이 감소하면서 생존율과 감염력이 낮아진다는 보고 (Robinson *et al.* 1987, Fitters *et al.* 1997)에서 연유된다. 즉 고온에 따라 생존율의 감소는 체내 에너지 축적원인 지질함량의 감소와 연결을 지을 수 있으며 이를 증명하기 위한 연구가 병원선충의 작용기작면에서 (제4장 2절 참조) 연구되었다.

보관용액속에 (0.01M 인산완충용액) 포함된 수소이온농도에 따라 병원선충의 생존력변이를 조사하였다. 수소이온농도 범위는 pH 6.1 ~ 8.5로 일반적인 생체내 pH범위를 대상으로 하였다. 수소이온농도에 따라 선충의 보관중 생존력의 변이가 현저하였다 (Fig. 11 and Table 14). 생존율이 pH 8.5에서 가장 높았고 산성으로 갈수록 생존율이 낮아지는 것으로 나타났다.

일반적으로 곤충의 혈장 수소이온농도 (pH)가 6.2~7.8이고 특별히 나비목 곤충류의 경우 약간 산성 (약 6.6)인 점을 (Blum 1985) 고려하여 이 농도를 기준으로 병원선충의 최적 보관 pH를 조사한 결과 오히려 알칼리일수록 높은 생존력을 보여 조사된 범위의 최대 pH에서 가장 최적 보관조건을 가리켰다. 추후 이후의 pH 범위에 대한 이 병원선충의 생존력반응도 조사하여야 할 것으로 사료된다. 이러한 기주조건과 최적보관조건의 차이점은 병원선충이 발육시기에 따라 서로 다른 환경조건에서 생존

을 유지시킨다는 점에서 기주 생체내 조건이 곧 병원선충의 보관조건이라는 등식은 성립되지 않는다고 여겨진다. 즉, 어린 유충과 성충은 기주 생체내에 유지되거나 감염성의 3령 유충기는 토양속에서 보내면서 기주를 탐색하고 있다 (Kaya and Gaugler 1993).

염농도에 대한 선충의 생존율 조사에서는 NaCl 염을 이용하여 곤충의 생리식염수의 농도를 기준으로 처리염농도를 구성했다. 보관용액내 염농도에 따라 이 병원선충의 생존력은 달랐다 (Fig. 12 and Table 14). 무처리에 비해 염농도가 0.5%와 1.0%의 보관용액에서 이 병원선충의 생존력이 높았으며 이 이상의 염농도는 유해하였다.

염농도도 선충의 보관중 생존력에 영향을 주었다. 조사한 염농도 중 0.5-1.0%의 범위에서 최적의 병원선충 생존력이 기록되었다. 이는 Kim과 Kim (1997)이 조사한 기주인 파밤나방 혈장이 약 200mOsm/Kg이고 이를 NaCl의 %농도로 환산하면 (1% = 171mOsm/Kg) 1.17%가 된다. 즉 염농도는 기주의 생체내 염농도와 거의 유사한 조건이 최적임을 의미한다.

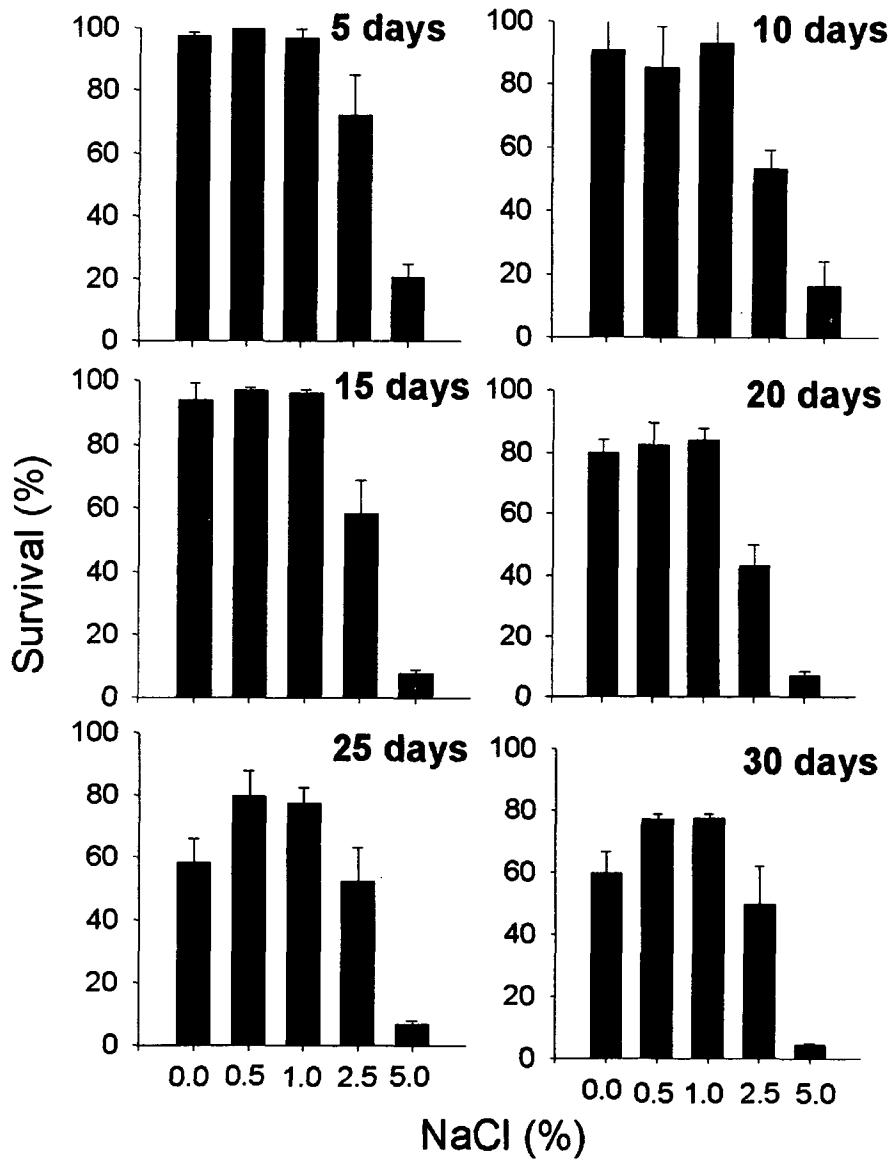


Fig. 12. Effect of salt concentration on preservation of infective juveniles of *S. carpocapsae*. The vertical bars above solid mean bars represent standard deviations.

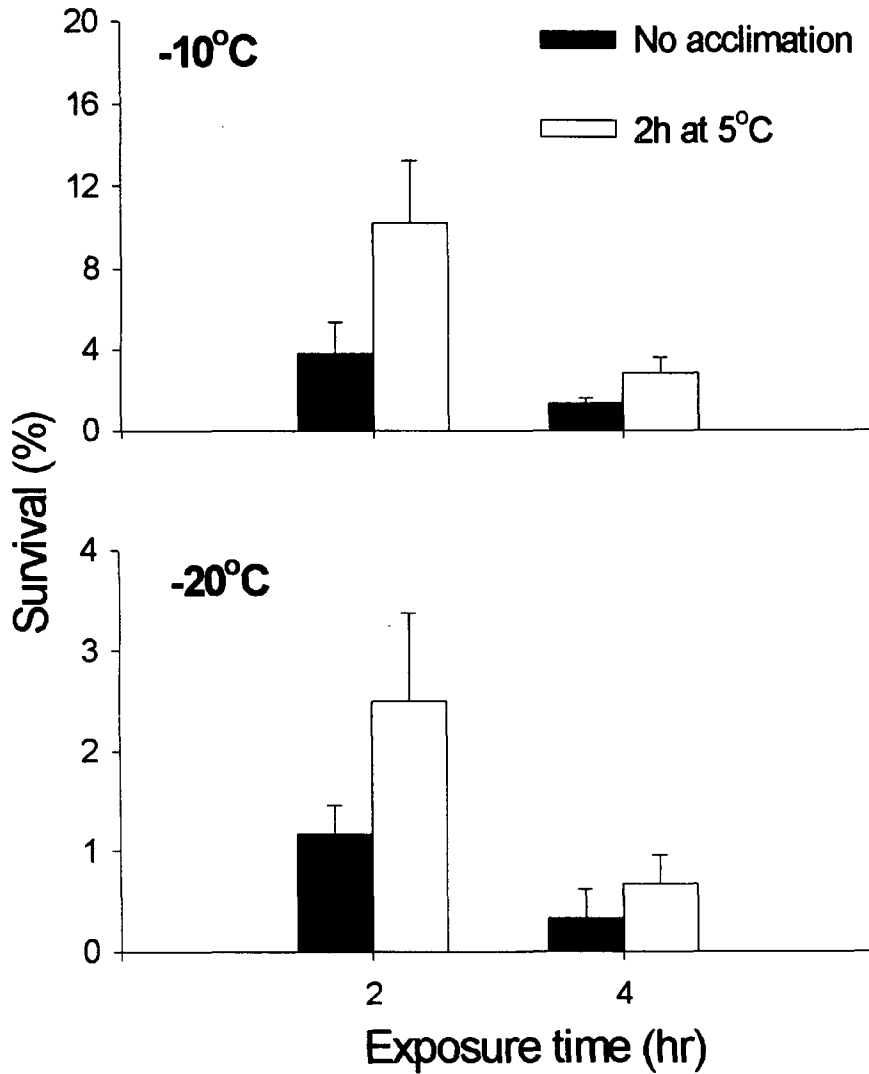


Fig. 13. Cold tolerance and low temperature acclimation of infective juveniles of *S. carpocapsae*. The vertical bars above solid mean bars represent standard deviations.

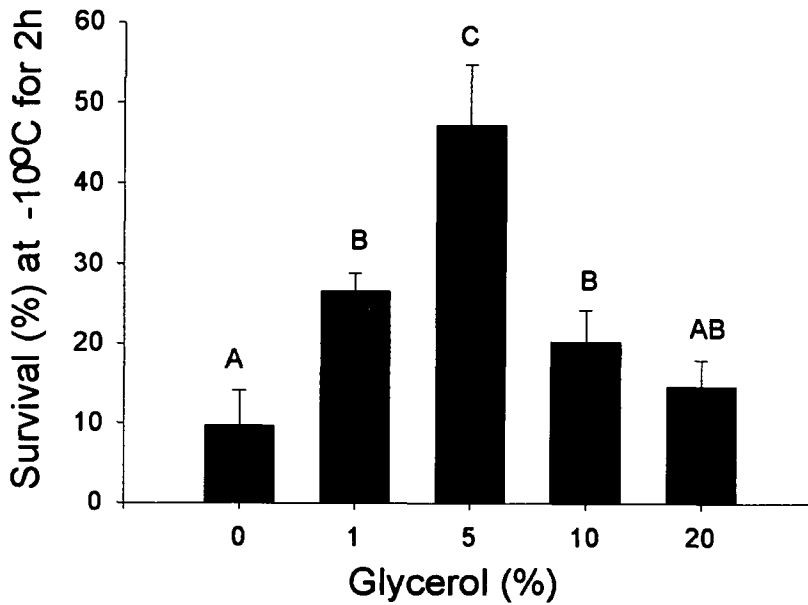


Fig. 14. Effect of glycerol on cold hardness of infective juveniles of *S. carpocapsae*. The vertical bars above solid mean bars represent standard deviations. Different letters above the error bars were different at $\alpha = 0.05$ (LSD test).

병원선충이 저온에 견디는 내한성이 조사되었다. 상온 (25°C)에서 직접 빙점 이하의 온도인 -10°C와 -20°C로 처리하였을 때 5% 이하의 생존력을 보였다 (Fig. 13). 온도가 낮을수록 노출시간이 증가함에 따라 생존력은 더욱 감소하였다. 그러나 빙점 이하의 온도로 처리하기 전에 5°C에서 2시간의 순화과정을 거친 경우 순화과정이 없었던 선충보다 높은 생존율을 나타내었다 (Table 15).

또한 글리세롤을 처리한 내한성실험에서는 5%농도를 처리한 선충집단이 무처리집단보다 -10°C에서 5배이상의 높은 생존율을 나타내었다 (Fig. 14). 그러나 10%이상의

글리세롤은 오히려 생존력이 낮아져 지나친 글리세롤의 농도는 선충에게 유해했다.

병원선충은 -10°C 이하의 빙점 온도에서 노출시간에 따라 생존율이 감소됐다. 이러한 동결치사는 저온 순화와 내동결성 물질인 글리세롤에 의해 약화되어 이 곤충병원 선충이 저온순화를 보유한 내한성을 나타냈다. 이러한 저온 순화와 글리세롤의 내한성 증진 효과는 차후 이 선충의 냉동 장기 보관을 위한 중요한 요인으로 이용될 수 있을 것이다.

즉, 조사된 모든 환경인자가 이 병원선충의 보관중 생존율에 영향을 미쳤다. 이들 환경인자들을 기준으로 이 병원선충의 최적 액체 보관조건은 온도 15°C , pH 8.5 및 염농도 0.5-1%로 판명되었다. 이 병원선충은 저온순화반응을 보였으며 내동결 물질인 글리세롤은 내한성을 증진시켰다. 그러나 10%이상의 글리세롤 농도는 오히려 유해하였다.

Table 15. ANOVA of the cold acclimation effects on *S. carpocapsae* at 5°C

Source	DF	SS	MS	F	P
TEMP ¹	1	273.38	273.38	41.79	0.0001
TIME ²	1	234.38	234.38	35.83	0.0001
ACCL ³	1	70.04	70.04	10.71	0.0048
TEMP*ACCL	1	117.04	117.04	17.89	0.0006
TIME*TEMP	1	77.04	77.04	11.78	0.0034
TIME*ACCL	1	15.04	15.04	2.30	0.1489
TIME*TEMP*ACCL	1	63.38	63.38	9.69	0.0067
Error	16	104.67	6.54		
Total	23	954.96			

¹ TEMP represents the temperatures (-10°C and -20°C) used for cold bioassay of *S. carpocapsae*.

² Time represents the exposure periods (2h and 4h) of *S. carpocapsae* to the bioassay temperatures

³ ACCL represents the low temperature acclimation of *S. carpocapsae* at 5°C before cold bioassays

15°C에 보관 중이던 선충을 날짜 별로 뽑아서, 순화 과정을 거쳐 과밤나방 5령충 기주에 여과지 검정법 (200마리 감염충/ml)을 이용하여 선충의 병원력을 조사하였다 (Fig. 15). 조사기간 (268일까지) 동안 생존력에 있어 큰 차이를 보였으나 병원력에서는 큰 차이 없이 90%이상의 살충력을 보였다.

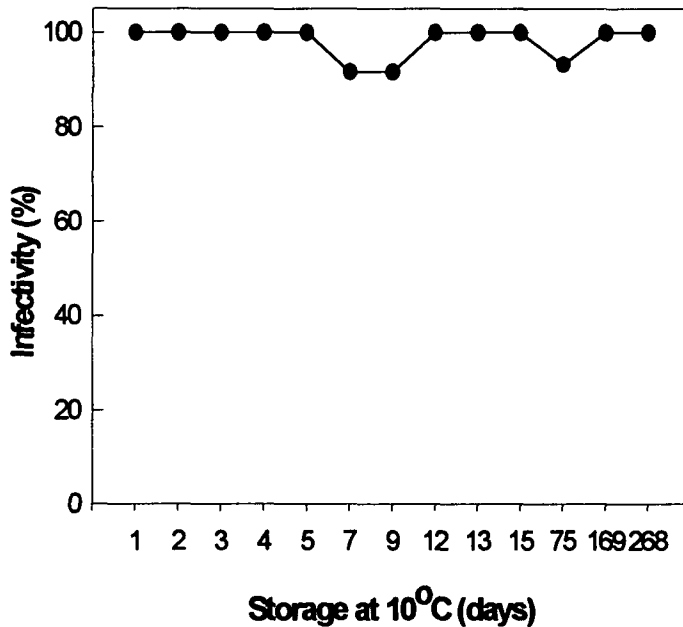


Fig. 15. Change in infectivity of *Steinerema carpocapsae* during storage in distilled water at 10°C

2. 장기보관을 위한 동결저장법 개발

선충을 2×10^5 IJ/ml로 농축하여 22% 글리세롤에 넣고 이 현탁액을 250ml 플라스크에 10ml 넣어 rotary shaker에 100rpm으로 6, 12, 24시간 배양했다. 각 글리세롤 배양시간은 선충의 생존력에 크게 영향을 주지 않았다 (Table 16).

글리세롤안에 배양된 선충을 1000rpm으로 원심분리하여 글리세롤 상층액을 제거하고, 0°C 70% methanol안에 넣고 얼음 위에서 10분간 유지하였다. 글리세롤과 methanol에 넣어 둔 샘플을 0.85% saline에 넣어 24시간 유지한 후 생존능력을 측정하였다. 글리세롤에서 배양시간이 길수록 methanol 처리에 높은 생존율을 나타냈다 (Table 16).

Table 16. Effect of glycerol preincubation for freeze storage on the survival of *Steinernema carpocapsae*

Incubation time (h) in 22% glycerol	Nematode survival (%)	
	Before methanol treatment	After methanol treatment
6	96.7 ± 1.6	46.7 ± 5.8
12	96.3 ± 0.7	86.6 ± 4.1
24	93.7 ± 2.4	91.7 ± 0.6

Methanol안에는 선충 현탁액을 1.5ml tubes에 1ml씩 넣고 liquid nitrogen안에 냉동 보관하였다. 샘플을 녹일 때는 30°C, 0.85% saline에 넣어 완전히 녹을 때까지 흔들어 주고, 선충을 가라앉혀 saline에 10회 이상 희석한다. 생존능력은 녹인 후 24시간 뒤에 조사하였다. 글리세롤 배양시간이 짧았던 처리 (6시간)를 제외하고 평균 약

70%의 높은 선충생존율을 나타냈다 (Fig. 16).

냉동저장되었던 병원선충의 기주 곤충감염율을 알아보기 위해 petri dish에 여과지를 깔고, 동결 저장하여 녹인 선충 현탁액(400IJ/0.5ml)을 여과지에 접종한 다음 파밤나방 5령충을 3마리씩 3반복하여 기주감염율을 조사하였다. 저장기간에 관계없이 90%이상의 높은 치사감염율을 기록했다 (Table 17).

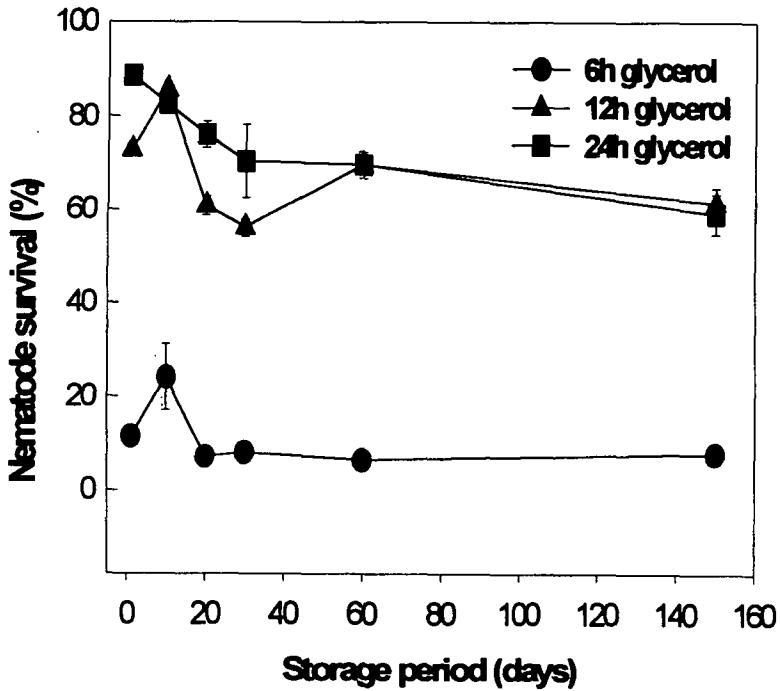


Fig. 16. Storage effect in liquid nitrogen on survival of *Steinernema carpocasae* with glycerol preincubation time

Table 17. Infectivity of *Steinernema carpocapsae* recovered after freeze storage in liquid nitrogen into the fifth instar larvae of *Spodoptera exigua*

Storage period (days)	Incubation time (h) in 22% glycerol	Infectivity to <i>S. exigua</i>	
		N	Mortality (%)
0		36	88.9
1	12	9	88.9
	24	9	100
10	12	9	100
	24	9	100
20	12	9	88.9
	24	9	88.9
30	12	9	88.9
	24	9	100
60	12	9	100
	24	9	88.9
150	12	9	100
	24	9	88.9

3. 바이오캡슐을 이용한 병원선충의 저장법 개발

일반 증류수나 식염수에 보관하였을 때 저온 저장하더라도 감염율에는 차이가 없었으나 저장기간이 길어짐에 따라 생존율이 떨어졌다. 또, 냉동보관이라 하더라도 종자선충의 보관에는 적합하겠으나 실제로 제품화했을 경우 보관에는 무리한 점이 있으므로 추후 개발될 바이오캡슐의 일환으로 alginate gel을 선발하여 이 캡슐내에서 이들 선충의 보관능력을 검증하였다. Navon et al.,(1998)의 방법을 약간 변형하여 병원

선충이 포함된 alginate gel을 만들었다. 이 alginate gel을 증류수에 담아 15℃에 보관하면서 생존율을 조사하였다.

alginate gel내에 병원선충을 장기보관 하였을 때 조사된 60일까지 80%이상의 높은 선충 생존율을 나타냈다 (Fig. 17).

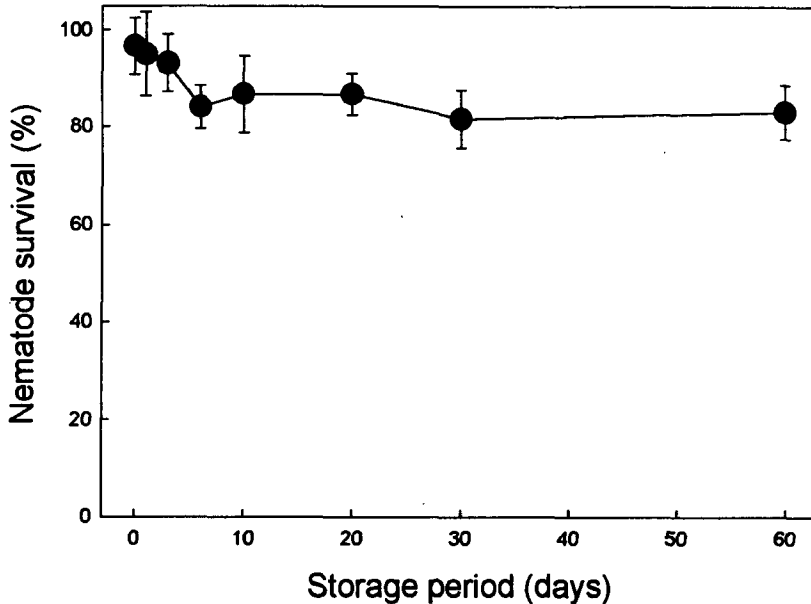
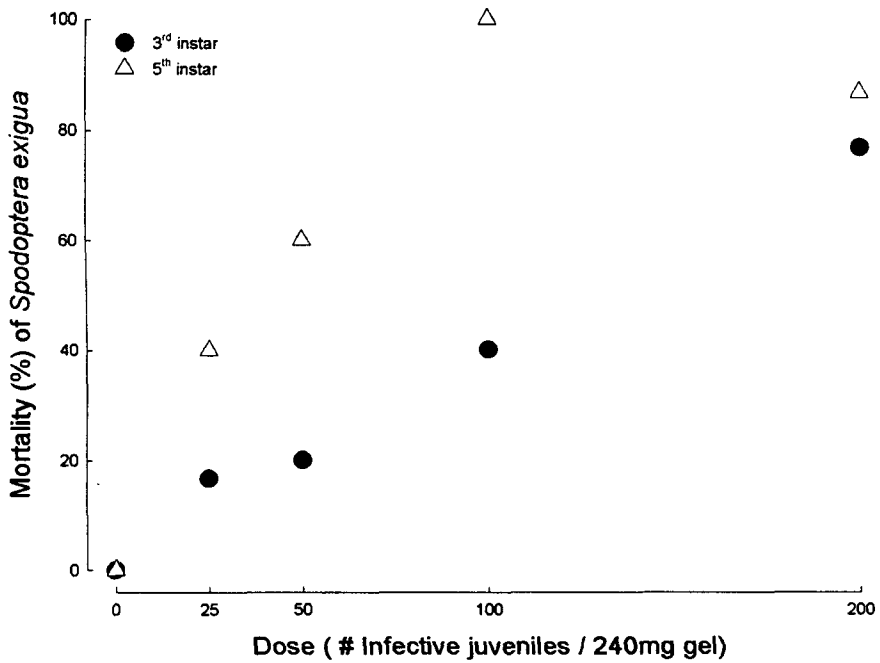


Fig. 17. Survival of *Steinerema carpocapsae* with storage in alginate gel at 15°C

개발된 alginate gel에 의한 병원선충의 살충력이 검증되었다. Alginate gel (240 mg)안에 곤충병원선충을 25, 50, 100, 200IJ로 만들었다. 파밤나방 3령충과 5령충, 담배거세미나방 5령충을 한 petri dish에 한 마리씩 넣고, alginate gel을 하나씩 넣어주었다. 24시간 뒤에 남은 alginate gel을 제거한 후 인공사료를 넣어주고 살충효과를

조사하였다.

이 바이오캡슐에 의한 기주곤충의 살충기작은 섭식에 의해 이루어졌으며 섭식 후 장내에서 탈출한 병원선충이 내장벽을 뚫고 혈강내로 침입했으리라 가정된다. 두 기주 모두에서 선충밀도가 증가함에 따라 살충력이 증가하였으며, 섭식능력이 높은 5령충이 3령충에 비해 감수성이 높았다 (Fig. 18).



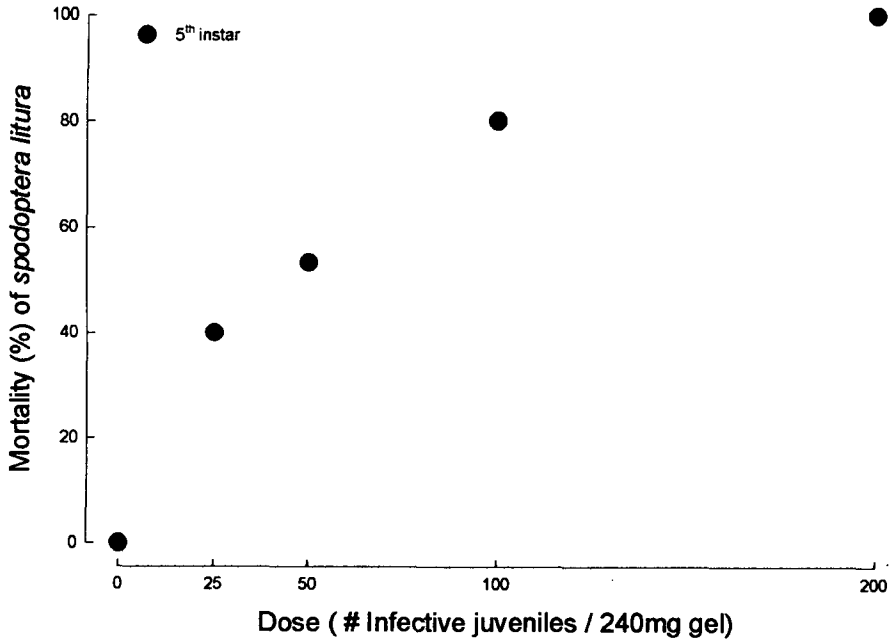


Fig. 18. Insecticidal effect of alginate gels capsuled with different concentrations of *Steinernema carpocapsae* on *Spodoptera exigua* and *Sp. litura* larvae

Alginate gel내의 수분함량과 선충 생존력과의 관계를 알아보았다. Gel내의 수분 함량이 10%이상 함유하였을 때 선충 생존력은 80%이상을 유지하였으나, 10%이하로 감소할 경우에는 선충 생존력은 급격히 감소하였다 (Fig. 19).

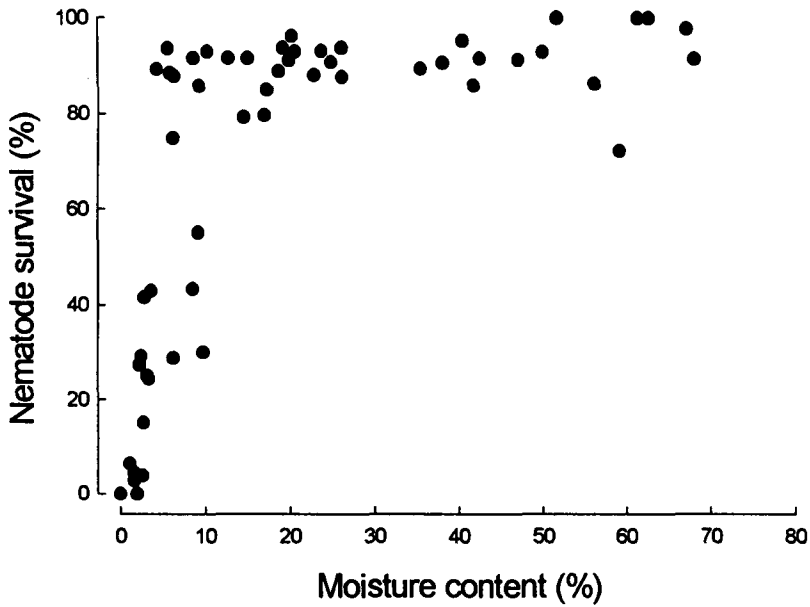


Fig. 19. Relationship between moisture content in alginate gel and survival of *Steinernema carpocapsae*

Alginate gel내의 수분함량이 선충의 생존율에 미치는 영향이 절대적이므로 이 캡슐의 수분함량에 영향을 주는 인자들을 분석하였다.

Citric acid 반응시간에 따라 수분손실에 미치는 영향

Alginate gel을 고형화시키는 데 촉매로서 citrate가 이용되어지며 이 용액에서 반응시간에 따라 gel의 형태적 변화를 야기시킴으로 반응시간과 수분감소율간에 관계를 먼저 분석하였다 (Fig. 20). Alginate 용액을 0.2M의 citric acid에 3, 10, 20분간 반응시켜 alginate gel ($26.26 \pm 1.1\text{mg}$)을 만든 후 온도 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 상대습도 40% 인큐베

이터에서 건조시켰다. 알지닌산의 젤은 citric acid의 반응시간에 관계없이 보분보존 능력을 보여주었다.

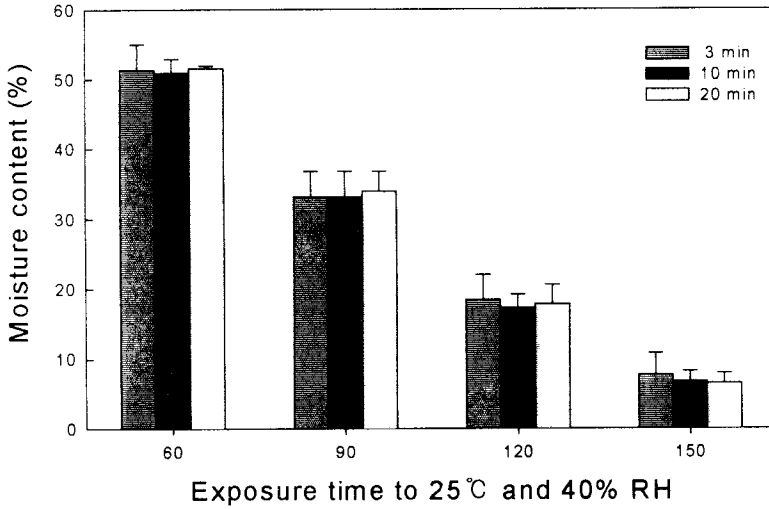


Fig. 20. Effect of citric acid reaction time on water loss of alginate gel

Alginate gel의 크기에 따라 수분손실에 미치는 영향

Alginate gel을 $6.28 \pm 2.04\text{mg}$, $36.37 \pm 2.09\text{mg}$, $250 \pm 20.44\text{mg}$, $338.57 \pm 14.59\text{mg}$ 으로 만들어 온도 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 상대습도 80%에서 건조시켰다. Gel의 크기가 증가함에 따라 보습력이 커진다는 것을 알 수 있었다 (Fig. 21).

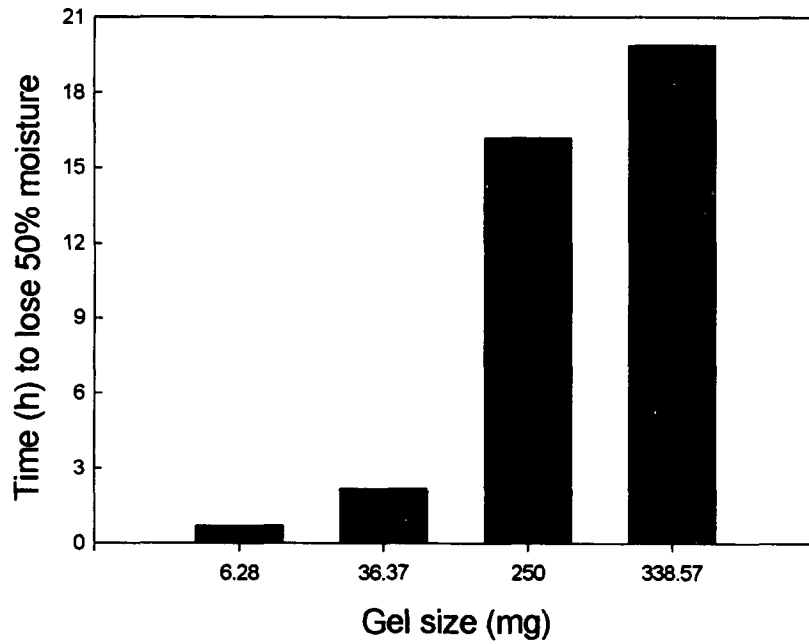


Fig. 21. Effect of alginate gel size on its water loss

외부 온도가 alginate gel의 수분손실에 미치는 영향

Alginate gel을 4개의 크기로 만들어 상대습도 35% 인큐베이터에서 온도 20, 25, 30℃에 따라 건조실험을 하였다. 온도가 올라감에 따라 수분손실량은 증가했다 (Fig 22)

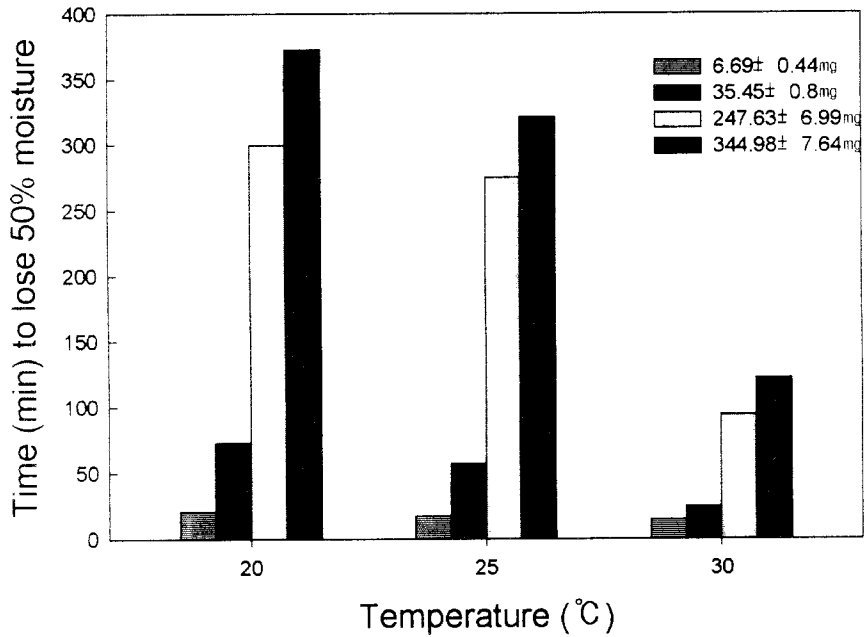


Fig. 22. Effect of air temperature on water loss of the alginate gel

습도가 alginate gel의 수분손실에 미치는 영향

Alginate gel을 4개의 크기로 만들어 온도 25°C 인큐베이터에서 습도 35, 65, 80%에 따라 건조실험을 하였다. 습도가 올라감에 따라 수분손실량은 감소했다 (Fig. 23).

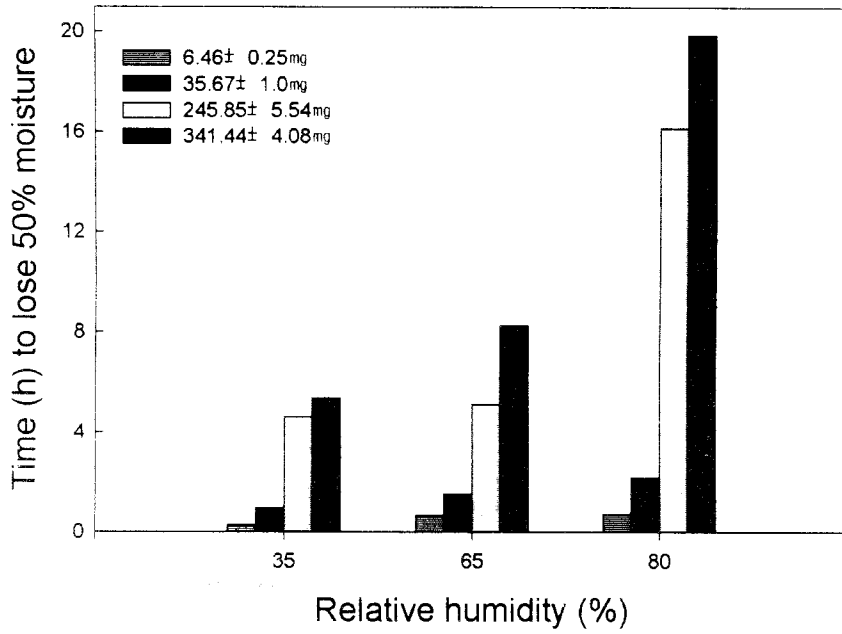


Fig. 23. Effect of relative humidity on water loss of the alginate gel

제3절 곤충기생선충의 포장 살포법 개발

1. 선발 내건제를 이용한 포장 살포법 개발

1) 내건제 선발

분석대상 내건제재료: Laponite LXG (aluminium magnesium silicate, 0.5%)

Keltrol-F (Xanthan Gum, 0.5%)

Kunipia-G (Bentonite, 0.5%)

CMC (Sodium carboxy methyl cellulose, 0.5%)

alkyl glucoside (5%)

glycerol (5%)

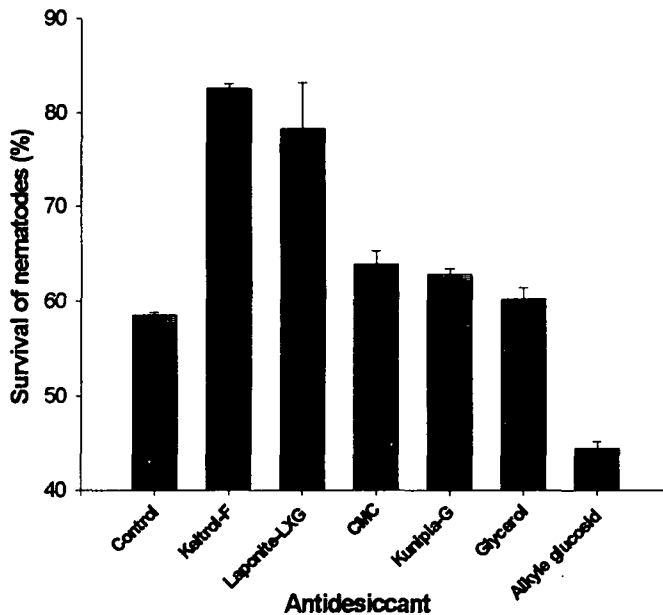


Fig. 24. Effect of various antidesiccants on the survival of *Steinernema carpocapsae* on the filter paper in the condition of 25°C and 60-70% RH for 2h

내건제 분석 방법:

- ① petri-dish (55×10mm)에 filter paper (55mm, Whatman #5)를 깎는다.
- ② Cotrol과 각각의 내건제에 1000IJ/ml로 0.5ml를 filter paper에 처리
- ③ 25±1℃에 RH 60-70%의 조건에 2h 노출시킨다.
- ④ 2h이 지나면 petri-dish에 5ml의 3차 증류수를 넣고 15±1℃에 24h 보관한 뒤 선충의 생존율을 조사한다.

노출시간이 진행됨에 따라 감염태 선충의 생존력이 떨어졌다. 이러한 건조에 대한 감수성은 내건제를 첨가함에 따라 차이를 보였다 (Fig. 24). Alkylglucoside는 오히려 선충의 생존력을 낮추는 것으로 나타나 가장 비합리적인 내건제로 판명되었다. 반면에 대조구와 내건제 처리구를 비교하였을 때 Keltrol-F와 Laponite LXG가 내건제로서의 효과가 뛰어난 것으로 판명되었다.

다음은 이들 두 내건제의 차이를 보기 위해 재시험을 해보았다 (Figs. 25 and 26).

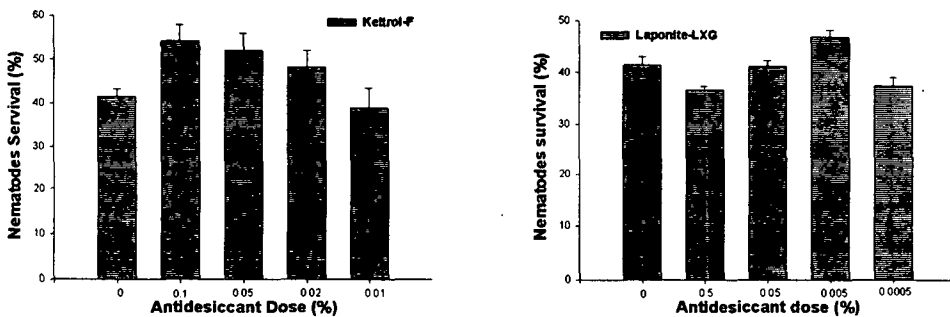


Fig. 25. Comparison of two optimal antidesiccants in their survival effect on the infective juveniles of *Steinernema carpocapsae*

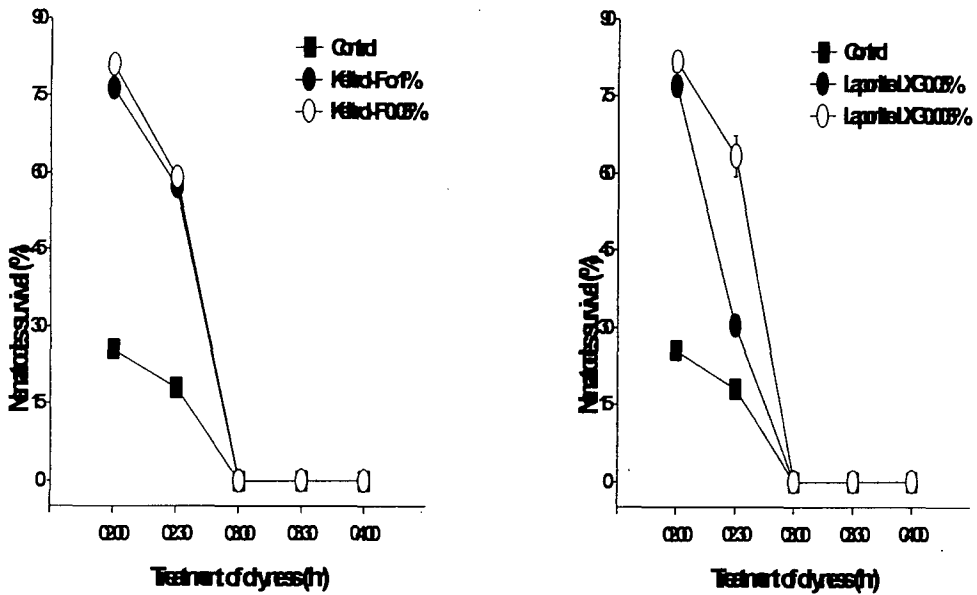


Fig. 26. Bioassay to select the optimal antidessicant for the survival of *Steinernema carpocapsae*

두 내건제 모두 유사한 선충생존율을 보였으나 (Fig. 26), 특히 같은 농도 0.05%에서 Laponite LXG 보다는 Keltrol-F가 내건제로서 적합한 것으로 판명되었다. 그러나 추후 내건제 농도는 가장 내건 효과가 높았던 0.1%로 하였다.

2) 내건제를 이용한 엽면 살포용 유효 병원선충밀도 결정

방법: ① Keltrol-F 0.1%에 각각 0, 250, 500, 1000, 5000 IJs/ml의 선충을 넣었다.

② 직경 120mm의 포트에 각각 1주의 땅콩이 심겨있고 여기에 파밤나방 3령충을 접종하였다. 접종후 24h 뒤 땅콩기주에 정착된 파밤나방의 숫자를 세

고 이를 처리전밀도로 정하였다. 각 포트는 파밤나방의 이동을 막기 위해 망사로 격리되었다

- ③ 각 포트의 땅콩에 15ml씩의 선충용액을 살포했다. 각 농도는 3반복되었다.
- ④ 처리후 48, 72h 뒤에 파밤나방의 치사율을 조사했다.

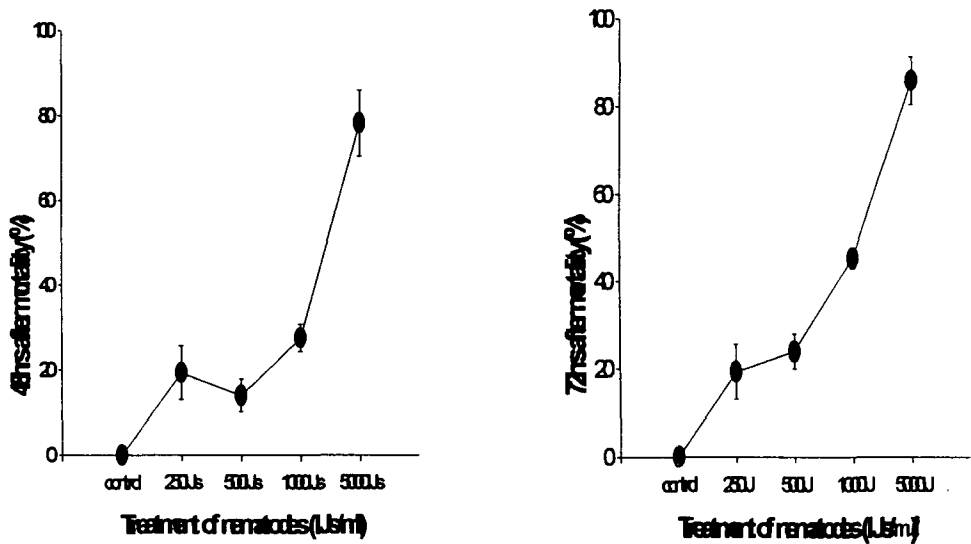


Fig. 27. Control efficacy of *Steinernema carpocapsae* supplemented with 0.1% Keltrol-F antidesiccant on the third instar larvae of *Spodoptera exigua* by leaf spray method

처리 선충의 밀도를 증가시키기에 따라 파밤나방의 사망률이 증가했다 (Fig. 27). 처리후 48시간보다는 72시간에서 사망률이 증가했다. 방제효과가 90% 이상이 되려면 5000IJs/ml 이상을 처리하여야 하는 것으로 조사되었다.

3) 병원선충에 의한 포장 방제가 결정

방법: ① 실험구는 임의배치법을 사용하였다.

② 파밤나방 3령충을 각 땅콩기주에 80마리씩 접종후 48h 이후 다시 각 땅콩에 정착된 파밤나방 숫자를 조사하여 처리전밀도를 정하였다.

③ 대조구와 처리구는 망사로 격리시켰다. 각각의 9반복으로 완전임의배치되었다.

④ 선충처리구는 0.1% Keltrol-F가 함유된 5,000마리/ml 선충용액을 15ml 살포하였고 처리구는 증류수를 살포하였다. 처리후 48, 72h 뒤에 생충률과 방제가를 조사한다.

곤충병원선충이 포장에서 내건제를 이용하여 엽면살포시 파밤나방에 대해 약 90%의 방제가를 나타냈다 (Table 18).

Table 18. Control efficacy of *Steinernema carpocapsae* on the third instar larvae of *Spodoptera exigua* by leaf spray method supplemented with 0.1% Keltrol-F antidesiccant

Treatment	Number of <i>S. exigua</i> /plant before application	Survival (%)		Control efficacy (%)	
		48h	72h	48h	72h
Control	10.1±5.5	77.9±7.1	68.2±7.8	0	0
<i>S. carpocapsae</i> (5,000IJs/ml)	7.6±2.1	13.3±4.4	8.4±6.9	82.9	87.7

2. 바이오캡슐을 이용한 포장 살포법 개발

1) 기주 생체를 이용한 병원선충의 제제화

병원선충의 제제화의 다른 방향으로 살아있는 성충에 병원선충을 감염시킴으로 제제화 및 방제노동력 절감을 동시에 이루려는 목적으로 연구되었다. 먼저 성충의 감염력 및 증식력이 검토되었다.

Triton X-100이 포함된 곤충병원선충 (400IJ/0.3ml) 용액을 우화한지 1일이 지난 파밤나방 성충에 국부처리하였다. 살충효과 및 증식여부를 조사하였다. 성충의 감염 방법을 보다 효율적으로 수행하기 위해 우화직전의 번데기에 처리하는 방법을 검토하였다. Petri dish에 흙을 담고 그 위에 파밤나방 번데기를 넣어주었다. 그 후 증류수 1ml에 곤충병원선충을 35,000IJ로 농축하여 흙 위에 뿌려주었다. 매일 우화수와 증식 여부를 조사하였다.

성충의 경우 33마리 처리하여 93.9%의 감염율을 보였고 처리후 6-7일 지난 각 성충에서 10,000 - 20,000마리의 감염선충이 증식되었다. 용의 경우 15마리 토양처리하여 12마리가 용기간중 사망하였고 3마리가 우화하였다. 이들 3마리중 다시 2마리가 선충에 감염된 상태로 우화했음이 판명났다.

2) 알지닌캡슐을 이용한 포장 살포법 개발

방법: 21 IJs의 *S. carpocapsae*와 물로 추출한 파추출물이 처리된 alginate gel을 처리별 (10, 20, 30, 및 40)로 땅콩 잎에 처리하였다. 처리한 땅콩에는 직경 0.2mm의 천으로 찌어두었다. 처리구는 3반복으로 하였으며, 각 처리당 100마리의 3령 파밤나방 유충이 땅콩 포트에 처리되었다. 무처리는 선충이 들어있지 않은 alginate gel을 처리하였다.

결과 : 21 IJs의 선충이 처리된 alginate gel 10개를 처리하였을 때 무처리구와 비교하여 96시간에 이르러 53%이상의 살충력을 확인 할 수 있었으며, 80개의 alginate gel이 처리되었을 때 약 90%에 이르는 살충력이 조사되었다 (Table 19). 또한 40개와 80개의 alginate gel이 처리되었을 때 살충력의 차이는 유의차가 없었다. 그리고 48시간에서 96시간으로 gel이 처리된 시간이 길어질수록 살충력과 방제효과가 높아지는 것을 알 수 있었다.

Table 19. Effect of alginate gel treated with *S. carpocapsae* on peanut with *S. exigua*.

Number of alginate gel ^a	Number of insects/plant		Survival (%)		Control efficacy (%)	
	Introduction	Just before spray	48h	96h	48h	96h
0	100	-	57±2	51±2 d	-	-
10	100	-	33±3.61	23.67±5.69 c	70.82	53.58
20	100	-	26.67±1.53	18±4.36 b	53.21	64.71
40	100	-	16.63±1.53	8±2 a	70.82	84.31
80	100	-	16.63±1.53	5.33±0.58 a	70.82	89.55

^a Nematode concentration was counted with 21 ± 2.65 IJs per an alginate gel.

3) 수화형 고집적선충제 개발

감염태 선충을 제한된 캡슐에 최대한으로 포장하고 이를 수화형으로 만들어 손쉽게 다시 감염태 선충을 수화 상태로 만들려하는 제제 개발이 시도되었다. 이러한 제

제는 기존의 수화형제제인 granule formulation을 응용하여 곤충병원선충을 제제화하고, 제제의 재료와 제제의 수분온도에 따른 저장력을 조사하였다.

재료 및 방법 :

밀가루(중력분), Semolina에 Kaolin을 첨가하였다. 그리고 Pear moss는 믹스기에 갈아 80-mesh체에 걸러 사용하였다 (Table 20).

선충은 40000 IJs/ml로 농축하였다. 위의 재료에 선충용액 18ml를 더하고 손으로 반죽하였다. 반죽은 1-1.5mm 두께로 펴서 20℃ 인큐베이터에서 7시간 건조시켰다. 건조한 반죽은 믹스기에서 1-2mm크기로 갈아 마개가 있는 유리병에 넣고 Parafilm으로 마개를 막았다. 이것을 5℃와 20℃에 보관하면서 선충생존율을 조사하였다.

Table 20. Component and materials of formulation

Component (%)	Formulation			H ₂ O (%)	Dried product (g)		No. active nematodes/g
	Kaolin (%)	Peat moss (%)	Nematode suspension (ml)		Gross	10-18 mesh	
	20	0	18	18	35.75	16.78	6800
Fine wheat flour (80)	10	10	18	19	37.04	16.92	21645
	10	10	18	23.3	39.01	18.18	18200
	20	0	18	17	35.9	20.32	7500
Coarse durum wheat flour (Semolina 80)	20	0	18	21	37.57	19.79	9570
	10	10	18	18.6	36.26	20.82	9996
	10	10	18	24.5	38.19	21.22	11000

결과 및 고찰: 곤충병원선충을 제제화하고, 5℃와 20℃에 저장하여 제제화의 재료에 따른 저장력과 제제화의 수분함량에 따른 선충생존율의 차이를 조사하였다. 제제화의 주재료인 밀가루의 입자크기에 따라 가는 밀가루 (Fine wheat flour)와 거친 밀가루 (Semolina)로 나누어 저장력을 조사하였을 때 밀가루의 입자크기에 따른 저장력의 차이는 보이지 않았으며, peat moss를 첨가한것과 첨가하지 않은 것에서는 peat moss를 첨가한 것의 저장력이 조금 높은 것으로 나타났다 (Fig. 28, 29, 30, 31). 제제화의 수분함량별로 나누어 저장력을 조사하였을 때 5℃에서는 수분함량이 높을수록 선충 생존율이 높게 나타났으나, 20℃에서는 너무 낮거나, 높은 수분함량이 오히려 선충 생존율을 낮추었다. 20℃에서는 제제의 수분함량이 약 19%내외가 가장 적당하였다 (Fig. 32, 33, 34, 35).

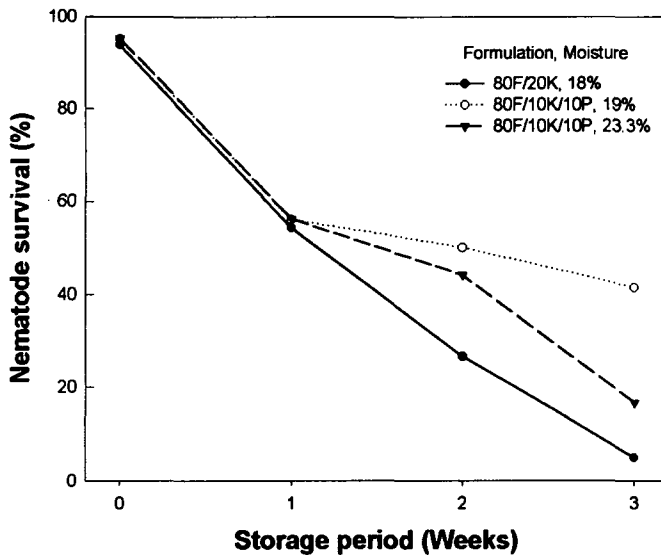


Fig. 28. Nematode survival on Fine wheat flour by peat moss at 20℃

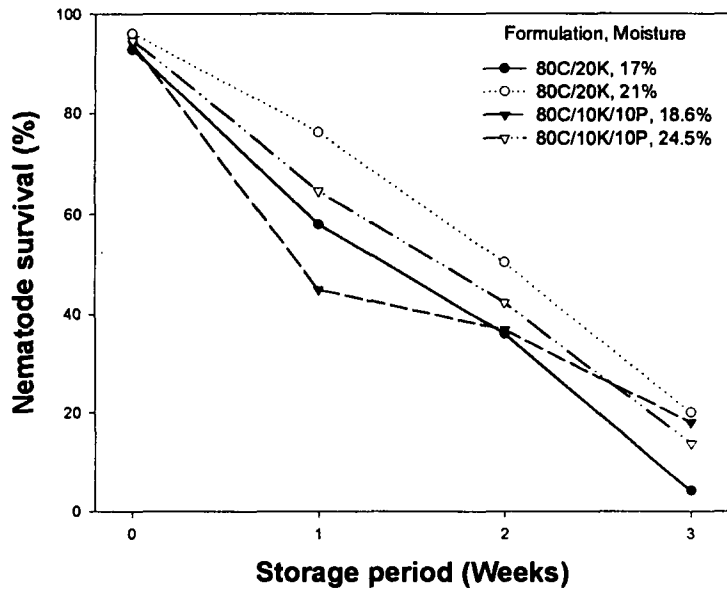


Fig. 29. Nematode survival on Coarse durum wheat flour (semolina) at 20°C

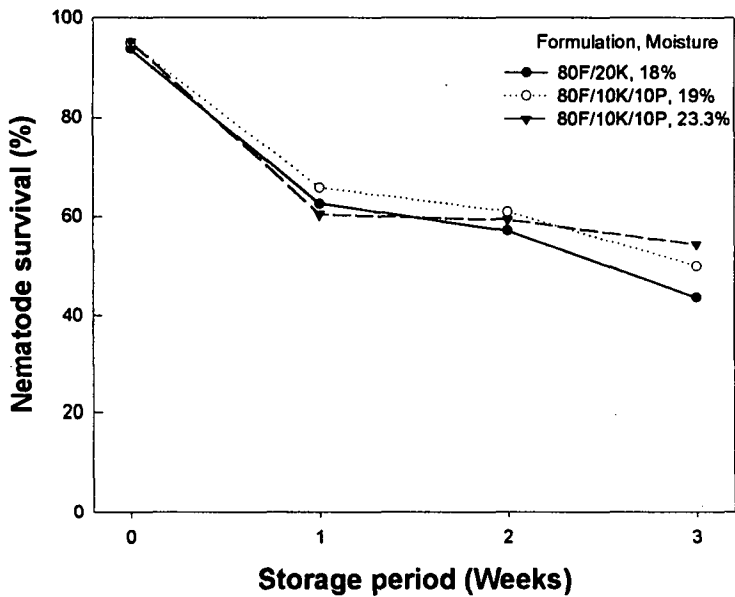


Fig. 30. Nematode survival on Fine wheat flour by peat moss at 5°C

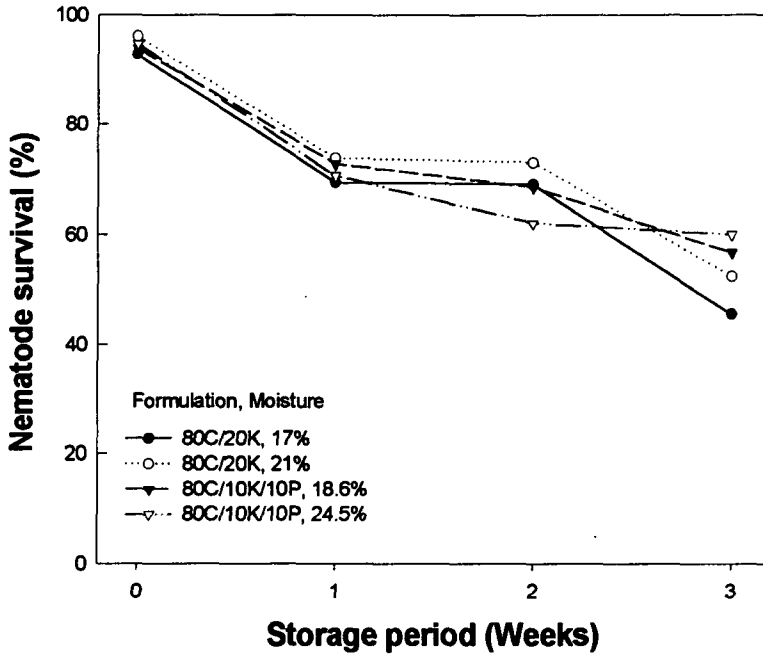


Fig. 31. Nematode survival on Coarse durum wheat flour (semolina) at 5°C

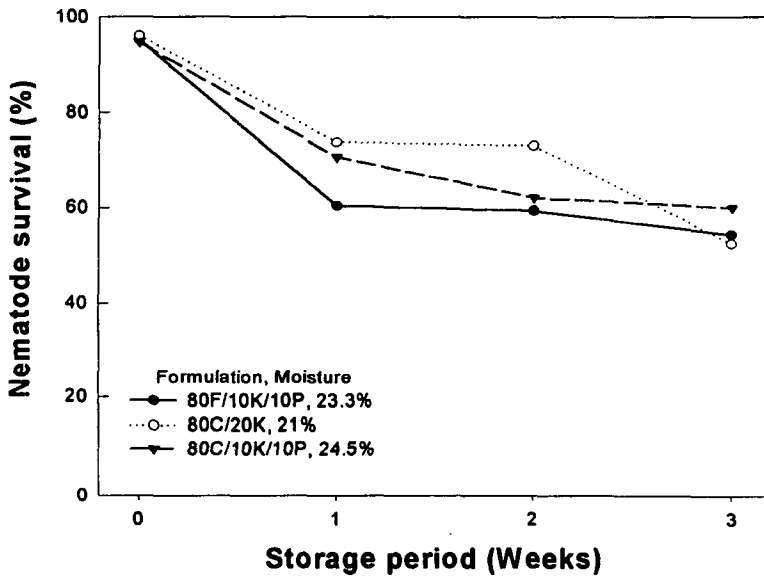


Fig. 32. Effect of nematode survival on formulation by high density of moisture at 5°C

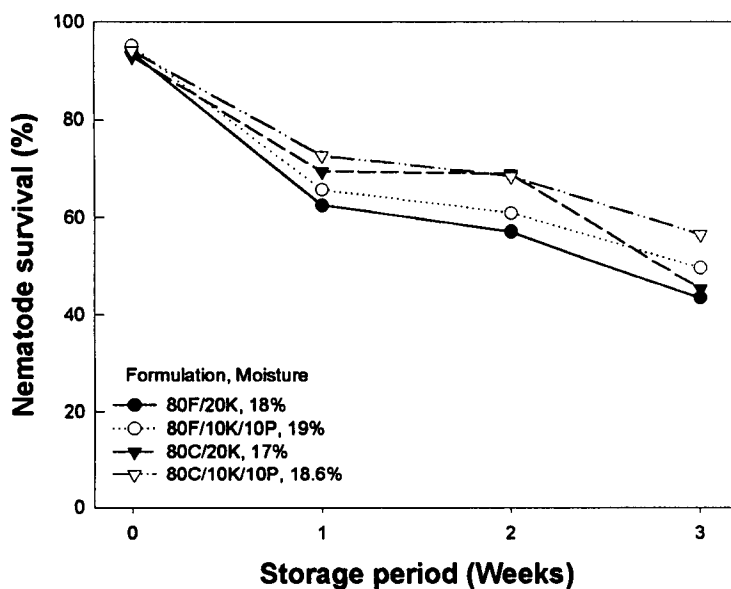


Fig. 33. Effect of nematode survival on formulation by low density of moisture at 5°C

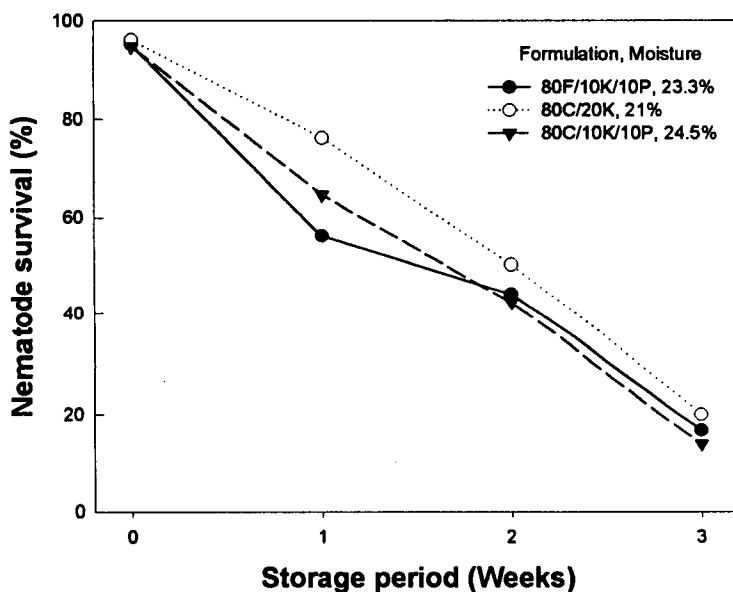


Fig. 34. Effect of nematode survival on formulation by high density of moisture at 20°C

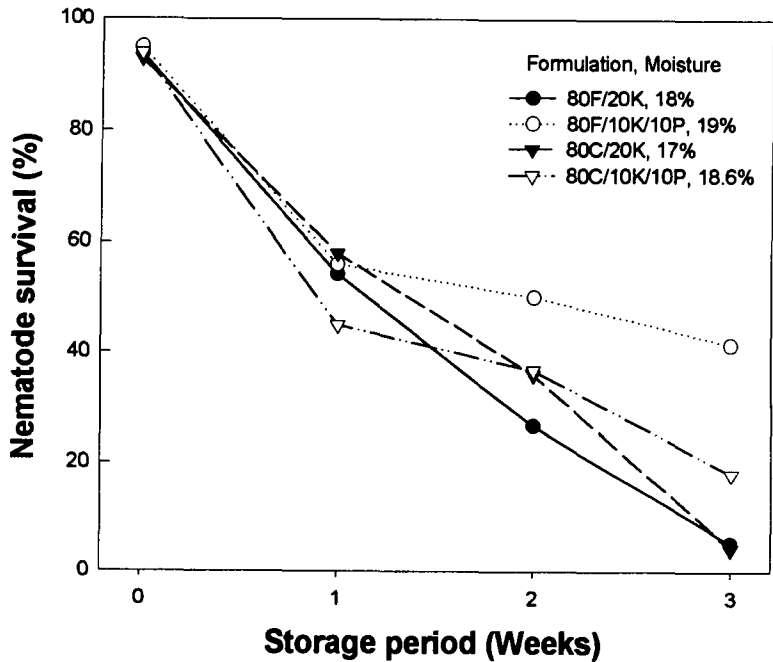


Fig. 35. Effect of nematode survival on formulation by low density of moisture at 20°C

3. 공생미생물을 이용한 포장 살포법 개발

시중에 판매되고 있는 500ppm 농도의 B.T (센타리, 전진산업) 20ml와 농도별로 (10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 및 10^9 cfu/20ml)로 조제되어 있는 *X. nematophilus*를 혼합하여 땅콩에 분무 처리하였다. 땅콩에는 3령의 파밤나방 애벌레 100마리가 처리되었다. 혼합제를 처리한 후 직경 0.2mm의 천으로 땅콩포트를 씌어두었다. 무처리인 B.T 500ppm 처리구와 20ml의 *X. nematophilus* (10^9 cfu/ml)를 처리하였다.

공생세균과 B.T만을 처리하였을 때 이들 처리간에는 통계적으로 효과가 없는 것으로 조사되었다. 또한 공생세균과 B.T를 혼합하여 처리하였을 때 공생세균의 농도가 10^8 과 10^9 에서 가장 높은 방제효과가 있었으며 이들 처리 농도간에는 방제효과의 차

이가 인정되지 않았다. 그리고 혼합제에서 공생세균의 농도가 10^8 이였을 때 96시간에서 방제효과가 75% 이상으로 가장 높게 조사되었다 (Table 21).

Table 21. Effect of B.T and *X. nematophilus* mixture on peanut with *S. exigua*

Treatments	Number of insects/plant		Survival (%)		Control efficacy (%)	
	Introduction	Just before spray	48h	96h	48h	96h
Control	100	88.00±6.08	33.00±5.20	27.00±6.00 c	-	-
Bt only	100	86.00±2.00	24.00±5.29	21.33±1.53 b	27.28	21.00
Xn only	100	90.00±5.0	23.00±5.57	20.67±1.53 b	30.30	23.44
Bt+Xn(10^9)	100	91.00±4.04	21.00±3	20.67±1.53 b	36.36	23.44
Bt+Xn(10^8)	100	90.00±2.00	14.00±4	20.00±5 b	57.58	25.93
Bt+Xn(10^7)	100	89.00±1.52	7.67±1.15	1.00±1.73 b	76.76	64.19
Bt+Xn(10^6)	100	86.00±3.46	13.00±2.00	6.67±2.00 a	60.61	75.30
Bt+Xn(10^5)	100	91.00±4.93	13.50±4.00	7.33±2.31 a	59.09	72.85

제 4 장 곤충기생선충의 감염력 제고 기술 개발 및 환경안전성 평가분야

제1절 서 설

곤충병원선충의 살충기작이 정확하게 알려져 있지 않다. 이는 곤충병원선충의 단독 역할과 공생세균과의 협조적 역할로 나뉘어서 분석되어왔다.

공생세균을 보유하는 병원선충은 살충 기작에 있어서 기주 곤충에 이들 세균을 운반하는 역할을 담당하게 된다. 대부분의 경우 공생세균 단독으로 살충기작을 발휘할 수 있으나 *Steinernema glaseri*의 경우 이 선충의 공생세균인 *Xenorhabdus poinarii* 단독으로 충분한 살충력을 발휘하지 못했다 (Akhurst, 1986). 또 *X. japonica*도 일부 곤충에 살충력을 보유하지 못하여 이들 두 공생세균이 다른 *Xenorhabdus*속의 세균에 비해 일부 살충 성분이 결여되어 있음을 암시했다 (Forst et al., 1997).

일반적으로 곤충은 침입세균에 대해 자신의 면역기작을 불러 일으켜 방어하게 된다. 그러나 공생세균에 대한 이들의 방어능력은 다른 일반 세균과 매우 구별된다. 예를 들어 *M. sexta*의 경우 이 곤충을 치사시키는 데 *Pseudomonas aeruginosa*의 LD50는 105세균/유충인 반면, *Xenorhabdus nematophilus*는 불과 20마리의 세균으로 90%의 *M. sexta*를 치사시킬 수 있다 (Dunn and Drake, 1983).

공생세균의 살충기작은 이들 세균이 곤충체내에 침입한 후 곤충의 면역반응을 극복하는 기작과 연관성을 갖는다. 일단 기주 곤충내로 선충에 의해 운반된 세균은 본격적인 살충기작을 발휘한다. 공생세균의 외막 (outer membrane)은 지질당·형태의 LPS (lipopolysaccharide) 독소를 가지고 있다. 일반세균에 있어 이 LPS는 곤충으로 하여금 세균을 인식하도록 하게 하여 곤충의 면역반응을 불러 일으키게 된다 (Xu et al., 1995). 그러나 공생세균의 LPS는 감염곤충의 면역반응에 있어 매우 중요한

prepolyphenol oxidase가 polyphenol oxidase로 활성화되는 단계를 억제시키게 되어 전반적인 면역반응을 억제하게 한다 (Dunphy and Webster, 1991). 또 외막의 당성분들은 혈구세포와 세균의 연결을 방해하여 혈구세포로부터 면역기작을 억제하게 한다.

체액성 면역반응에 대해 공생세균은 일반적으로 내성을 보이거나 이들의 발현을 억제시키게 한다 (Forst et al., 1997). 낮은 감염성을 보이는 공생세균 돌연변이체들이 보고되었으며 이들은 세포막의 성분이 변경되었음이 보고되었다 (Akhurst and Dunphy, 1993). 즉 이들 세포막 성분은 공생세균의 기주 곤충으로부터 면역기작을 무력화시키는 데 매우 중요함을 의미했다. 특히 LPS의 lipid A 성분은 혈구의 세포막을 붕괴시키는 역할을 하여 궁극적으로 기주 곤충의 패혈증을 유발시키게 된다 (Dunphy and Webster, 1988).

기주곤충의 면역기작을 무력화시킨 후 공생세균은 항세균 또는 항진균단백질을 분비와 더불어 곤충 혈강조건을 자신의 성장에 유리한 조건으로 전환시킨다. 이 조건 하에서 세균은 혈액내의 108/ml까지 증식하게 된다. 이후 증식된 세균과 분해된 조직을 선충이 섭식하며 진행되는 선충의 증식이 뒤따르게 된다.

이상의 과정은 세균이 곤충내 혈액내에서 증식단계에 이르기 전에 강력한 살충성분을 분비하여 곤충을 치사하게 한다는 점을 의미한다. Akhurst는 *X. nematophilus*로부터 살충력을 지닌 31 KDa 크기의 단백질을 발현시킬 수 있는 유전자를 분리하였다 (Forst and Neilson, 1996).

본 연구실에서는 파밤나방에 대한 *Steinernema carpocapsae*의 살충기작을 분석하고 있으며 이 선충의 공생세균인 *Xenorhabdus nematophilus*를 분리하여 이 세균만 다시 곤충에 접종하였을 때 24시간이내의 살충효과를 보였다. 다시 세균접종후 시간별 기주곤충의 혈구세포와 특이 단백질을 분석한 결과 세균 접종후 18시간이후 혈구세포는 완전히 파괴되었다. 특히 이 시간의 혈액내에는 SDS-PAGE상에서 검출될 수 있을 정도의 특이 단백질밴드가 검출되었다. 이 단백질이 세균접종에 따른 곤충 생성물인지 아니면 세균이 분비한 단백질인지에 대해서는 계속 연구중에 있다.

이상의 병원선충과 공생세균의 살충기작을 종합하여 보면, 병원선충은 일부 종을 제외하고 단지 살충기작에 있어서는 공생세균을 곤충혈강속으로 운반하는 역을 담당하게 된다. 혈강내에 들어간 공생세균은 LPS 또는 특이 독소 물질을 분비하여 기주의 면역반응을 빠르게 무기력화시키며 자신의 생장에 유리한 환경으로 전환시킨다. 이후 이들 세균의 성장에 따라 곤충은 혈액의 패혈증이 진행되어 치사에 이르게 된다. 즉, 살충기작의 본체는 공생세균의 역할을 분석이 요구된다.

제2절 곤충병원선충의 살충기작 분석

1. 곤충병원선충의 생존력과 지질 함량과의 관계

병원선충은 저장기간, 염농도, pH, 및 온도에 따라 생존력에 큰 변이를 보인다. 이를 병원선충이 지니고 있는 지질함량과 관계성을 분석하고자 각 처리마다 병원선충 내에 존재 증성지질함량과 비교하였다.

저장기간이 길어짐에 따라 생존 선충의 감소를 보이고 이에 따라 지질의 함량이 낮아졌다 (Table 22). 온도가 높아짐에 따라 급격하게 생존 선충수의 감소와 더불어 지질함량의 감소가 동반되었다 (Table 23). 수소이온 농도가 높아짐에 따라 생존선충수는 높아지고 이에 따라 지질함량도 높아졌다 (Table 24). 물리적 충격에 대한 병원선충의 생존력변화를 보기위해 shaking incubator를 이용하여 30시간까지 충격을 주었다 (Tables 25 and 26). 그러나 생존 선충수에는 크게 변함이 없었으며 따라서 지질의 함량도 변화없었다. 이상의 결과는 병원선충의 생존과 체내 지질함량과의 높은 상관성을 보여 다시 선충의 최적보관 변수 결정에 도움을 주리라 여겨진다.

Table 22. Triglyceride (TG) contents of *Steinernema carpocapsae* with storage periods

Storage (days)	1	40	57	108	118	141	181
TG (mg/0.1ml)	56.4±27.7 ^{a*}	38.2±16.4 ^{ab}	18.8±11.6 ^{bc}	22.7±10.1 ^{bc}	11.2±8.3 ^{bc}	6.8±5.8 ^c	25.6±11.3 ^{bc}
# alive (4000ij)	3934 ± 74	4000 ± 0	3664 ± 198	3679 ± 106	3989 ± 23	3723 ± 114	3283 ± 222

* Duncan's multiple range test ($\alpha=0.05$)

Table 23. Triglyceride (TG) contents of *Steinernema carpocapsae* with storage temperatures (Temp)

Temp (°C)	5	10	15	20	25
TG (mg/0.1ml)	48.7±19.1 ^{a*}	25.5±7.3 ^b	24.0±10.7 ^b	9.1±7.0 ^b	6.4±5.2 ^b
# alive (4000ij)	3441±143	3953±41	3965±61	2193±468	1111±405

* Duncan's multiple range test ($\alpha=0.05$)

Table 24. Triglyceride (TG) contents of *Steinernema carpocapsae* with storage pH

pH	5.14	6.03	7.09	7.87	8.32	8.91
TG (mg/0.1ml)	33.5±10.7 ^{ab*}	32.6±6.5 ^{ab}	27.1±10.3 ^a	31.1±7.4 ^{ab}	35.7±25.6 ^{ab}	60.7±21.3 ^b
# alive (4000ij)	3800±143	3672±65	3857±43	3774±59	3765±72	3704±59

* Duncan's multiple range test ($\alpha=0.05$)

Table 25. Triglyceride (TG) contents of *Steinernema carpocapsae* with storage temperatures (Temp)

NaCl (%)	0	0.1	0.5	1.0	2.0	4.0
TG (mg/0.1ml)	100.4±6.1 ^{a*}	76.2±13.5 ^a	102.7±14.8 ^a	118.1±12.7 ^a	144.5±7.3 ^a	525.0±371.5 ^b
# alive (4000ij)	3821±46	3871±62	3844±93	3837±57	3798±28	3105±77

* Duncan's multiple range test ($\alpha=0.05$)

Table 26. Triglyceride (TG) contents of *Steinernema carpocapsae* with shaking (200 rpm) times

Shaking (hr)	0	6	12	18	24	30
TG (mg/0.1ml)	91.3±20.6 ^{a*}	56.4±12.0 ^a	58.3±9.2 ^a	71.4±. ^a	62.7±11.9 ^a	62.0±36.5 ^a
# alive (4000ij)	3084±343	2764±466	3674±307	2985±610	3730±135	3565±259

* Duncan's multiple range test ($\alpha=0.05$)

2. 병원선충의 살충기작

병원선충 (*S. carpocapsae*)이 곤충 체내에 들어가서 기주치사 원인을 알아보기 위해서 병원선충을 파밤나방과 담배거세미나방에 접종한 후 시간별로 각 기주에서 혈림프를 추출하였다. 이 혈림프시료내에 있는 병원선충의 특이적인 단백질을 분리하기 위해 SDS-PAGE를 이용하였고 혈액내 혈구세포의 변화를 보기 위해 hemocytometer를 이용하여 총 혈구세포를 크기별로 산출했다.

두 곤충기주는 모두 병원선충에 대해 시간별로 특이적인 단백질이 나타났다 (Table 27). 이들 단백질 중 특히 두 곤충에 공통적으로 나타나는 40kDa과 24kDa 단백질이 나타난다. 이들 단백질이 선충이 분비하는 독소인지 EH는 곤충이 분비하는 면역단백질인지에 대해서는 아직 검토중에 있다. 현재 감염된 기주로부터 추출된 혈액을 농축시켜 정상 곤충에 주입한 후 살충력 검정을 실시하고 있으며 특히 이들 살충성분이 단백질인지를 확인하려고 살충성분이 들어있는 다른 농축혈액을 열처리한 후 주입시켰다. 이러한 실험 결과는 선충 침입후 일어나는 살충기작을 이해하는 데 실마리를 줄 수 있다고 여겨진다.

Table 27. Specific proteins in the hemolymph of the fifth instar larvae of *Spodoptera exigua* and *S. litura* after inoculation of *Steinernema carpocapsae* on 10% SDS-PAGE

Time for specific proteins	<i>S. exigua</i>	<i>S. litura</i>
after 24hr	-	43kDa, 31kDa
after 36hr	40kDa	-
after 48hr	24.8kDa, 24kDa, 20kDa, 19kDa	23kDa, 15kDa

시간별로 추출한 혈림프에서 총 혈구세포의 수는 12hr, 24hr, 0hr 으로 많이 나왔으며, 2.5-5.0 μ m 혈구세포는 12시간후에 추출한 혈림프에서 가장 많이 나왔으나 5.0-10.0 μ m 혈구세포에서는 24시간후에 가장 많이 보였다. 36hr이후부터 추출한 혈림프에서는 혈구세포를 관찰할 수 없었다. 이상의 결과로 선충이 침입한 이후부터 파밤나방의 혈구세포가 증가하다가 12시간 이후부터 혈수세포수가 감소하면서 파밤나방이 치사하는 것을 알 수 있다 (Table 28). 즉 병원선충의 살충기작의 주요 요인은 패혈 증임을 증명했다.

Table 28. Change of hemocytes in 1 ml of hemolymph of *Spodoptera exigua* after topical application of 200 IJs *Steinernema carpocapsae*

Hemolymph samples	# of hemocytes according to their sizes			total hemocyte
	2.5-5.0 μ m	5.0-10.0 μ m	> 10.0 μ m	
0hr	10402.5 \pm 2373	8814.2 \pm 16645.6	2213.3 \pm 822.3	21430 \pm 2921.7
12hr	19980.0 \pm 6961.4	9775.0 \pm 1840.5	875.0 \pm 301.4	32925 \pm 6793.9
24hr	13356.3 \pm 3718.7.6	10293.5 \pm 3642.1	2696.9 \pm 2448.2	26346 \pm 7552.3
36hr	0	0	0	0
48hr	0	0	0	0
60hr	0	0	0	0

3. 공생세균의 살충기작

1) 반수치사 공생세균농도

세균을 액체 (Nutrient broth)배지에 접종하여 25℃ 배양기에서 48시간동안 보관한 후 원심분리하여 배지성분을 제거하여 0.7% saline solution (NaCl) 1ml을 처리하여 세균현탁액을 제조하였다. 세균현탁액을 dilution method로 농도별 (10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9})로 희석한 후 파밤나방 5령에 $2\mu\text{l}$ (C , 10^6cell/ml)를 접종하여 25℃ 배양기에서 24시간 동안 보관한 후 병원성을 조사하였고 probit program을 이용하여 LD값을 구하였다.

현탁액을 10^{-8} 배희석한 용액을 곤충에 주사했을 때 파밤나방을 반수이상 치사시켰다. 그리고 10^{-9} 배에서는 24시간동안 파밤나방을 한 마리도 치사시키지 못하여 10^{-8} 배에서 반농도를 접종하였을 때 10^{-8} 배 보다 낮은 치사율을 나타내는 것을 관찰하여 probit program을 이용하였다. 이를 실제적인 세균의 콜로니 형성숫자 (cfu: colony forming unit)로 환산된 LD_{50} 은 32.5 (범위 = $20.3 < LD < 84.9$, 기울기 = 2.6 ± 0.8)로 분석되었다. 따라서 24시간동안 파밤나방 반수를 치사시킬 수 있는 세균수는 32 cell로 조사되었다. 이에 반하여 담배거세미나방 3령은 23cells/ larvae 그리고 5령은 84cells/ larvae로 조사되었다 (Fig. 36).

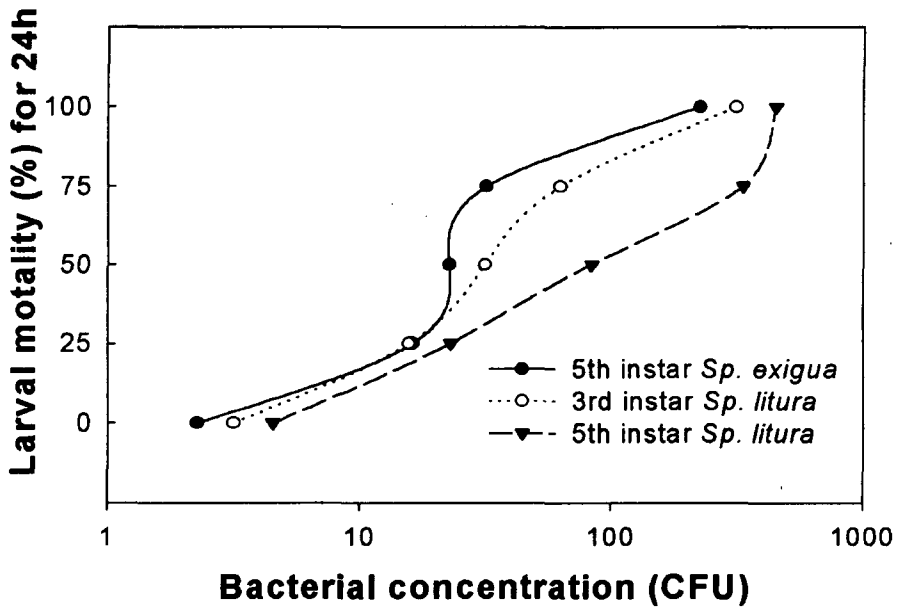


Fig. 36. Lethal dose (LD) of *X. nematophilus* on *Spodoptera* spp.

본 실험에서는 시험곤충 종간에 있어서 *X. nematophilus*의 반수치사 농도가 다르게 나타났으며 같은 곤충종에서도 곤충의 영기에 따라 반수치사 농도가 다르게 나타나는 것으로 조사되었다. 이런 차이는 각각의 곤충종이 가지고 있는 특성과 이들 곤충들의 크기에 의해서 기인되는 것으로 사료된다.

2) 면역에 반응에 작용하는 공생세균의 역할

면역반응의 중개자로서 arachidonic acid의 역할과 이에 대한 공생세균의 작용이 분석되었다. Arachidonic acid를 에탄올에 $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 로 용해시켰다. 용해된 $1.5\mu\text{l}$ 의 arachidonic acid를 Hamilton microsyringe를 이용하여 5령 파밤나방 뒷가슴의 왼쪽

마지막 다리를 통해 접종한 후 LD₈₀의 세균현탁액 1.5 μ l를 재접종하였다. 그리고 control은 에탄올 1.5 μ l를 접종한 후 세균현탁액 1.5 μ l를 재접종하였다.

Arachidonic acid를 처리후 세균이 접종된 파밤나방은 모두 생존하였으나 (Fig. 37). 또한 에탄올을 처리한 control은 LD₈₀의 치사율을 나타내었다. 따라서 파밤나방에 있어서 arachidonic acid는 곤충면역에 관여하는 prostaglandin, epoxygenase와 lipoxigenase 산물 등의 eicosanoid에 영향을 미쳐 면역작용을 보다 활성화시키는 것으로 생각된다. 공생세균은 이 호르몬중개자의 영향을 무력화시키는 것으로 추정된다.

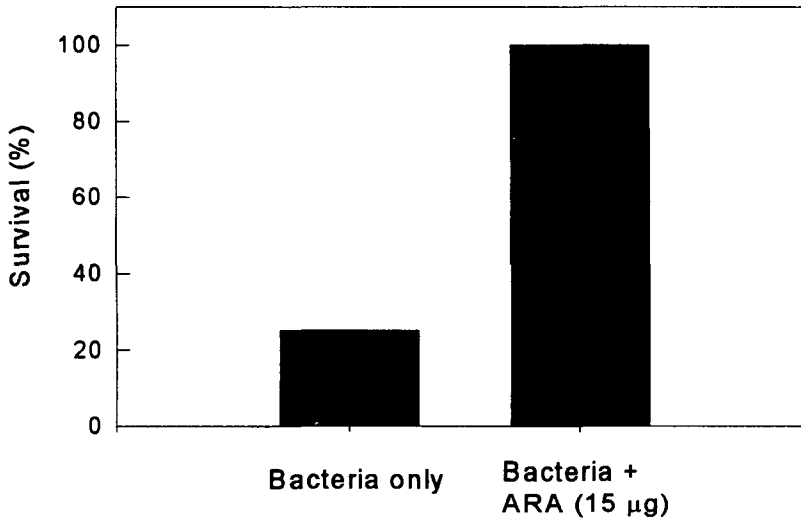


Fig. 37. Antagonistic effect of arachidonate (ARA) on the insecticidal effect of *Xenorhabdus nematophilus*

이상의 결과는 eicosanoids가 파밤나방의 면역기작에 관여하고 *X. nematophilus*는

이러한 국부호르몬의 영향을 무력화시켜 면역의 중계과정방해에 따른 패혈증의 유발로 진행됨을 보였다. 이러한 가설을 더욱 뒷받침하기 위해서는 우선 arachidonate의 농도에 따른 구제실험과 역으로 arachidonate 형성 억제자인 dexamethasone을 처리하여 확증하는 연구가 필요하게 되었다.

Hamilton microsyringe (Nevada, USA)를 이용하여 농도별로 준비된 arachidonic acid (0.01, 0.1, 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 와 dexamethasone (1, 10, 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 1 μl 를 5령의 파밤나방 복부 마지막 다리에 주사한 후, 0.7%의 saline solution에 처리된 LD80과 LD20 농도의 *X. nematophilus* 1 μl 를 microsyringe를 이용하여 같은 위치에 재접종하였다. 세균접종 24시간 뒤에 사망여부를 확인하였다.

*X. nematophilus*는 곤충체내에 toxin을 분비하여 기주곤충에 효과적인 살충효과를 나타내는 것으로 조사되었다. 그러나 LD80의 세균농도로 감염된 파밤나방 5령충은 0.1-10 μg 의 arachidonic acid를 처리하였을 때 파밤나방에 대한 세균의 살충효과를 경감시켜 생존효과를 높이는 것으로 조사되었다. 그 이상 또는 이하 농도의 arachidonic acid는 효과가 없었다 (Fig. 38). 반면에 LD20의 세균농도에서 phospholipase A₂ (PLA₂)를 억제시키는 dexamethasone를 처리하였을 때는 반대로 파밤나방의 사망률을 높이는 것으로 조사되었다 (Fig. 39). 이러한 억제효과는 처리된 dexamethasone의 최저농도인 1 μg 에서도 효과적이었다.

따라서 본 실험의 결과로 파밤나방 체내에서 *X. nematophilus*는 arachidonic acid를 생성하는 PLA₂ mechanism을 파괴시켜서 기주곤충을 치사시키게 하는 것으로 사료되는 것으로서 이 병원세균이 분비하는 살충물질은 PLA₂ 억제자와 연관성을 갖는 것으로 생각된다. 기타 eicosanoids의 영향을 분석하기 위해서는 다른 inhibitors (ibuprofen, naproxen, esculetin, phenidone 및 piroxicam)를 통한 다른 경로에 대한 세부실험이 필요하다.

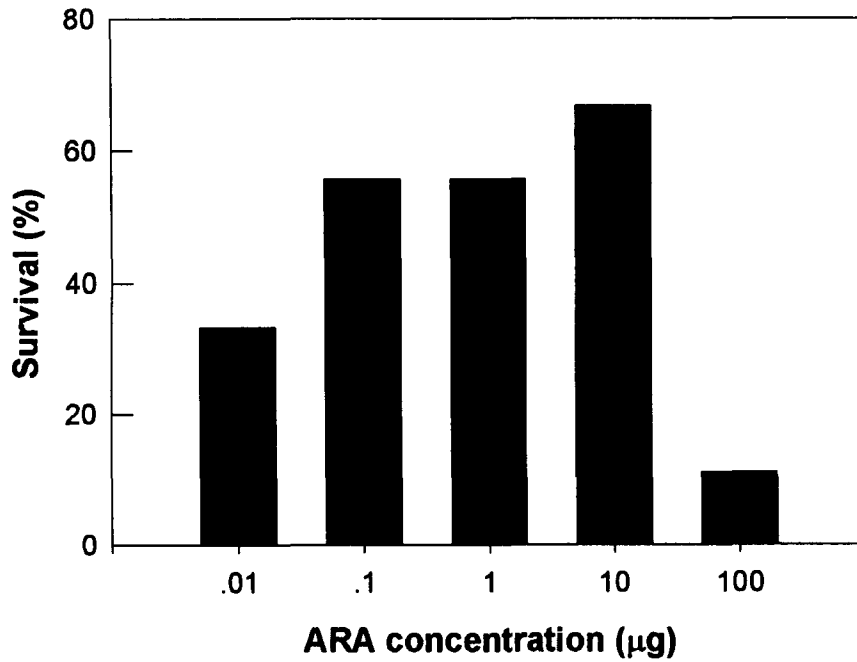


Fig 38. Dose response of arachidonic acid (ARA) in its therapeutic effect on the fifth instar larvae of *Spodoptera exigua* infected with *Xenorhabdus nematophilus*

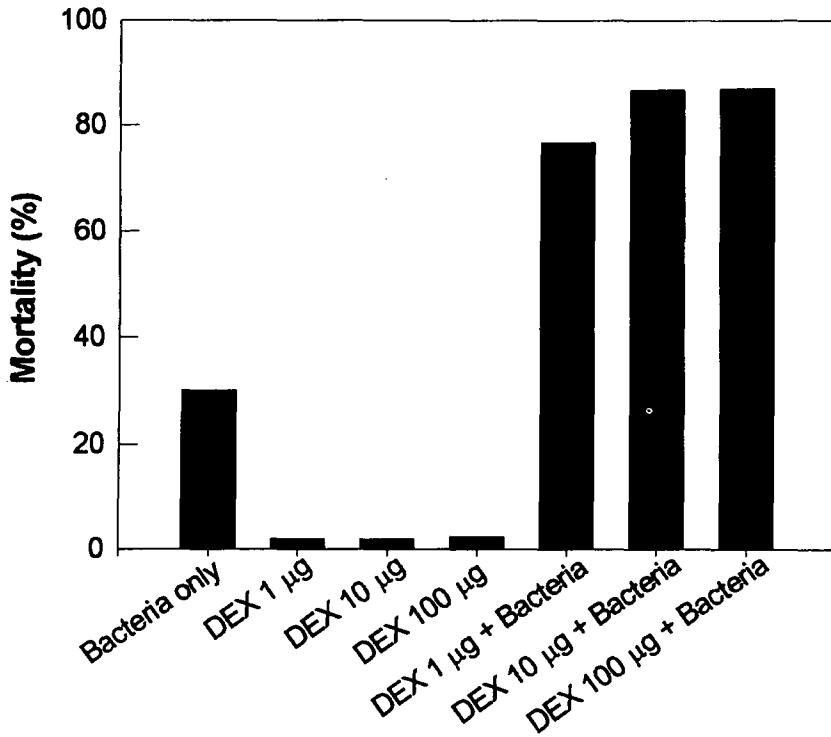


Fig. 39. Lethal effect of dexamethasone (DEX) on the fifth instar larvae of *Spodoptera exigua* infected with *Xenorhabdus nematophilus*

Arachidonate의 면역중계자 역할과 이를 저지하려는 *X. nematophilus*의 살충독소 간에 관계를 더욱 증명하기 위해 실질적인 세포성 면역기작과 연관되었다. 세포성 면역반응은 크게 식균작용, 작은혹 (nodule) 형성작용, 피막형성작용으로 나뉘는 데 이중 본 연구에서는 작은혹형성과정을 세포성면역작용의 현상으로 보고 분석하였다.

기초실험으로 0.75% saline solution, EtOH, ARA 및 DEX 2 μ l씩 파밤나방에 접종하여 16시간 후에 해부현미경상에서 해부하여 총체 내에 형성된 nodule 수를 관찰하였다. saline solution, EtOH, ARA 및 DEX에 대한 nodule 형성 효과는 모든 처리에서 1-2개의 소수가 나타났으며 처리간 차이가 없는 것으로 조사되었다 (Fig. 40). 형성된 nodule의 크기도 매우 작았다.

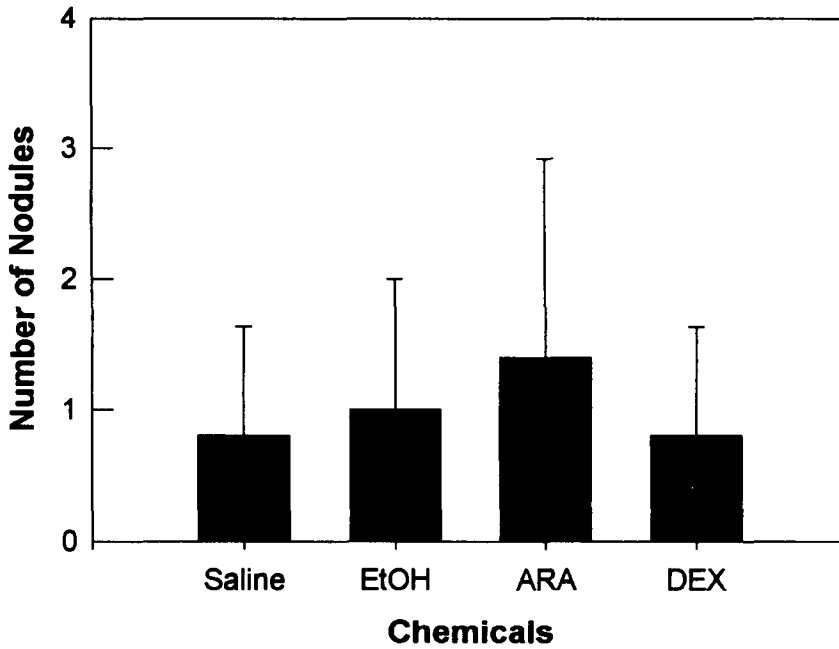


Fig. 40. Nodulation of the fifth instar larvae of *Spodoptera exigua* to the hemocoelic injection (1 μ l) of some chemicals in the absence of *Xenorhabdus nematophilus*, where EtOH, ARA, and DEX represent ethanol (100%), arachidonate (10 μ g/ μ l), and dexamethasone (10 μ g/ μ l).

0.75% saline solution에 녹여진 *X. nematophilus*를 농도별 (LD0, 20, 40, 80 및 100)로 과밤나방 5령충에 접종한 후 16시간 후에 해부현미경상에서 해부하여 충체내에 형성된 nodule 수를 관찰하였다. 세균의 부재속에서 일반적으로 1-2개의 nodule을 형성하는 과밤나방 5령충은 *X. nematophilus*가 접종되었을 때 세균의 농도증가에 따라 nodule숫자의 증가를 보였다 (Fig. 41). 최고 평균 6개의 nodule숫자는 LD80에서 나타났으며 LD100으로 세균숫자를 증가하여도 nodule숫자의 증가를 나타내지 못하였다. 이러한 결과는 우선 과밤나방이 이 세균에 대해 비자기인식 (nonself recognition)이 이뤄졌음을 의미한다. 그러나 세균을 처리하여도 비교적 적게 증가된 nodule의 숫자는 이 세균이 곤충에 대한 nodule형성 억제인자를 분비하고 있음을 내포하고 있다.

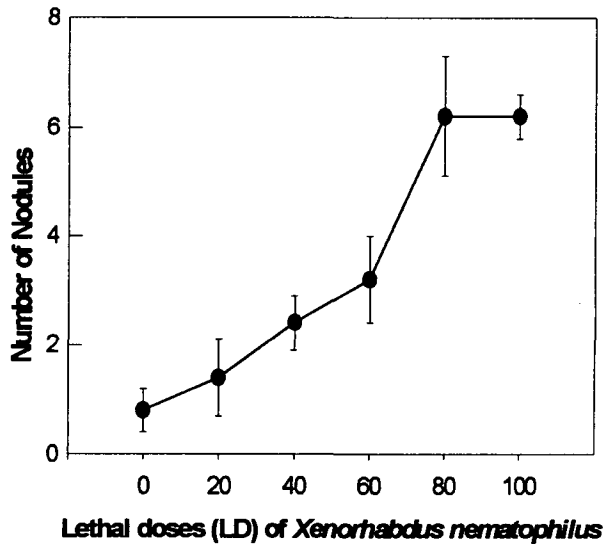


Fig. 41. Dose response of *Xenorhabdus nematophilus* on nodule formation of the fifth instar larvae of *Spodoptera exigua*, where LD represents the bacterial numbers equivalent to the lethal dose.

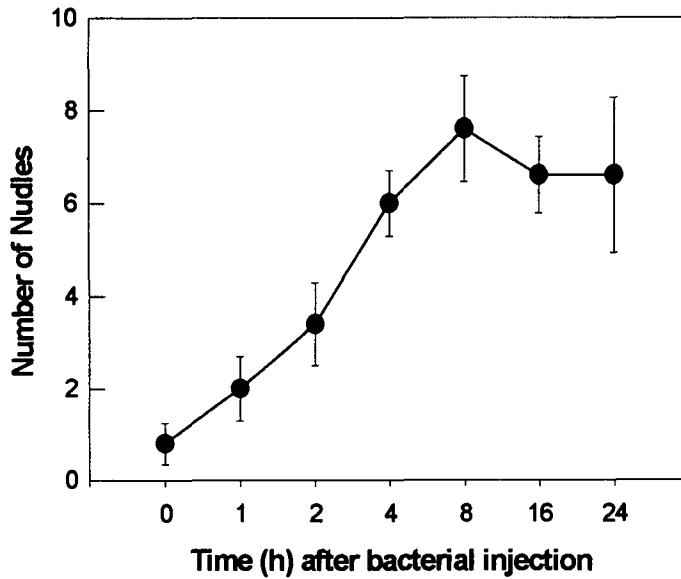


Fig. 42. Time course of nodule formation by *Xenorhabdus nematophilus* in the fifth instar larvae of *Spodoptera exigua* which were injected with the bacterial concentration equivalent to LD80.

위의 실험에서 결정된 최다 nodule형성의 세균 농도로 5령의 파밤나방에 접종하여 시간별 (0, 1, 2, 4, 8, 16 및 24h)로 형성된 nodule 수를 조사하였다 (Fig. 42). 형성된 nodule의 숫자는 접종직후부터 시간에 따라 증가하였으며 4-8시간이 지나면 최대 수치를 기록했다. 즉 세포성 면역기작중 작은혹형성과정은 불과 1-2시간만에 일어나는 빠른 면역반응으로 여겨진다.

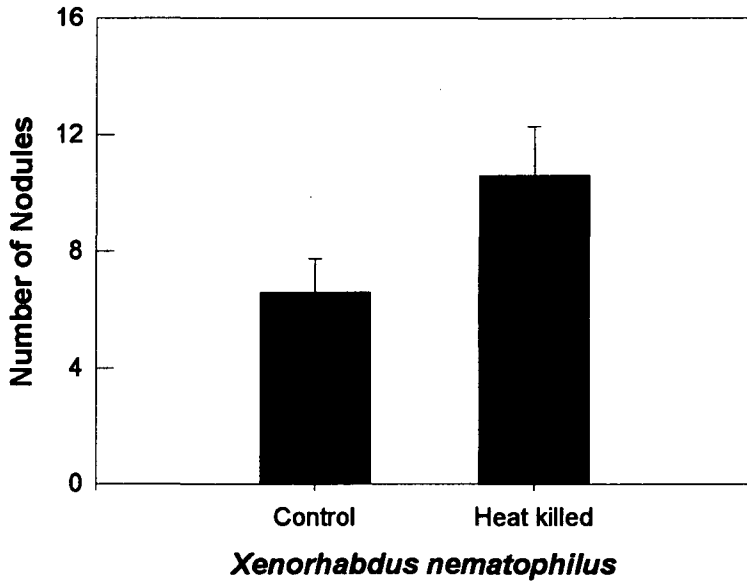


Fig. 43. Comparison between alive and heat-killed (60°C, 30min) *Xenorhabdus nematophilus* on nodule formation in the fifth instar larvae of *Spodoptera exigua*

0.75% saline solution에 용해되어있는 LD80 농도의 살아있는 *X. nematophilus*와 60°C에서 30분간 열처리된 *X. nematophilus*를 5령의 파밤나방에 접종하여 16시간 후에 형성된 nodule 수를 조사하였다. 이 조건에서 열처리된 세균은 모두 치사하였다. 즉 치사된 세균과 살아있는 세균을 같은 세균숫자로 파밤나방의 혈액내에서 대처하는 면역반응의 차이를 알아보는 실험으로 열처리된 세균에서 대조구 (6-8개)에 비해 훨씬 많은 11개의 nodule을 형성함으로써 살아있는 *X. nematophilus*는 nodule 형성을 방해하는 물질을 분비하는 것으로 (Fig. 43) 재입증되었다.

다음은 *X. nematophilus*의 살충기작중 이 세균이 유발하는 곤충 패혈증을 혈구치

사의 관점에서 알아보기 위해 이 세균을 처리한 후 시간이 경과함에 따라 살아있는 혈구와 죽은 혈구의 변이를 조사하였다.

Microsyringe를 이용하여 LD80의 *X. nematophilus* 1 μ l를 5령의 파밤나방에 접종한 후 시간별 (0, 4, 8, 12, 16, 18, 20, 22 및 24h)로 혈액을 수거하였다. 채취된 혈액은 0.04% Trypan blue와 1:1로 섞여서 Hemocytometer상에서 전체 혈구세포수와 염색되어서 죽은 혈구세포수를 각각 조사하였다.

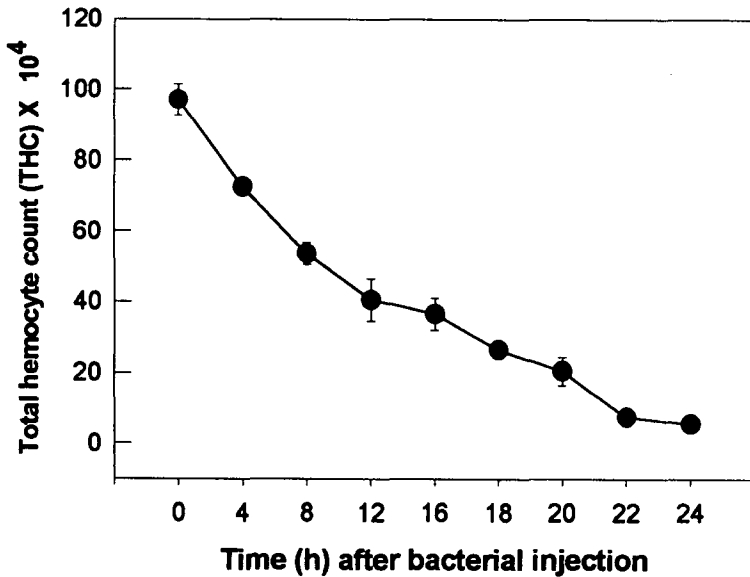


Fig 44. Temporal change of the total hemocyte count (THC) after *Xenorhabdus nematophilus* injection into the fifth instar larvae of *Spodoptera exigua*

세균 접종후 시간이 진행함에 따라 전체 혈구수의 급격한 감소가 있었다 (Fig. 44). 세균접종을 하지 않은 정상적인 파밤나방의 혈액에서는 19 x 10⁴개/ml의 혈구세포가 관찰되었으나 시간이 지날수록 혈구세포수가 감소하여 기주곤충이 치사하는 시

간인 16시간에서는 5×10^4 개/ml의 혈구세포가 관찰되었고, 24시간에서는 1×10^4 개/ml의 혈구세포가 관찰되었다. 총체의 사망은 16-18시간 사이에서 일어났다. 시간이 지날수록 0.04%의 Trypan blue에 염색된 혈구세포수는 시간이 지날수록 증가하는 것으로 조사되어 (Fig. 45) 24시간에는 완전히 염색되어 *X. nematophilus*의 cytotoxic한 효과를 알 수 있었고, 세균에 의해서 패혈증이 유발된다는 것도 증명되었다.

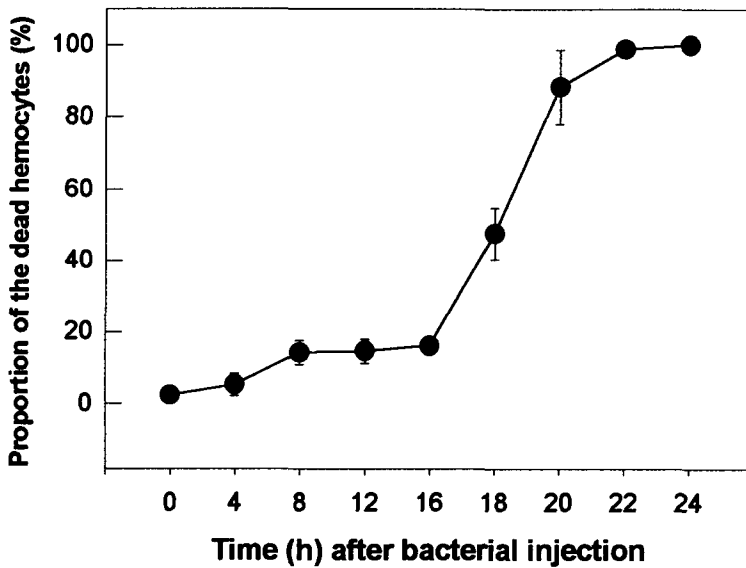


Fig. 45. Proportion of the dead hemocytes in the total hemocytes observed temporally after the injection of *Xenorhabdus nematophilus* into the fifth instar larvae of *Spodoptera exigua*

이상의 결과들은 공생세균이 기주 곤충의 면역기능을 무력화 시킨다는 것으로 결론지을 수 있다. 곤충의 혈액 면역에 있어서 중요한 효소인 phenoloxidase의 활성을 조사하여 보았다.

방법: 살아있는 세균과 열처리된 세균을 파밤나방 5령충에 Hamilton microsyringe를 이용하여 10^7 cfu/ml 농도로 주사한 후 1시간, 2시간, 및 3시간 간격으로 혈액을 추출하였다. 추출된 혈액을 5°C에서 보관을 하며 14,000rpm에서 3분간 원심분리를 하여 혈장과 혈구세포를 분리하였다. 10 μ l의 혈장에 1ml의 10^{-1} ×PBS (2mg/ml DOPA)를 처리한 후 25°C에서 20분간 배양을 한 후 495nm에서 흡수도를 조사하였다. 흡수도는 5분 간격으로 3번 측정하였다.

결과 : 각 시간별로 추출된 혈액의 혈장에서 PO의 활성을 조사하였을 때 열처리한 세균이 살아있는 세균과 비교하여 높은 효소활성을 나타내었다 (Fig. 46).

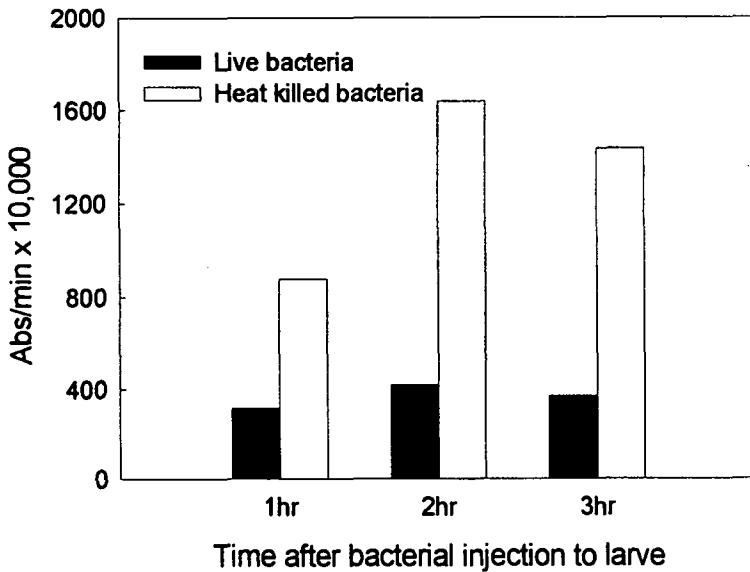


Fig. 46. Effect of *Xenorhabdus nematophilus* on phenoloxidase activity in the plasma of the fifth instar larval *Spodoptera exigua*

살아있는 공생세균은 기주 곤충의 phenoloxidase의 활성을 억제한다는 사실을 알 수 있다 (Fig. 46). 즉, 면역의 중개자인 eicosanoid pathway를 억제함으로써 궁극적인 phenoloxidase의 활성을 낮추었음을 알 수 있다.

다음은 이러한 가설을 입증하기 위해 살아있는 공생세균을 처리하고 arachidonate (ARA)를 처리하였을 때 면역이 되 살아나는 지를 증명하였다. 우선 ARA의 농도효과를 검정하였다.

방법 : *X. nematophilus*를 10^7 cfu/ml의 농도로 주사한 후 다시 농도별로 (0.25, 2.5, 25, 및 250 μ g) 조성된 arachidonic acid 2 μ l를 재 접종하였다. 30분간 처리한 후 혈액을 추출하였다. PO 측정방법은 위와 같았다. 무처리는 세균의 접종 후 70%의 Ethanol을 처리하였다.

결과 : Arachidonic acid 0.25 μ g의 농도가 처리되었을 때 가장 낮은 PO 활성을 보였으나 농도가 2.5 μ g과 25 μ g으로 증가되었을 때 PO의 활성이 증가하는 것을 알 수 있었다. 그러나 고농도의 arachidonic acid 250 μ g를 처리하였을 때에는 다시 PO의 활성이 감소하는 것을 알 수 있었다 (Fig. 47).

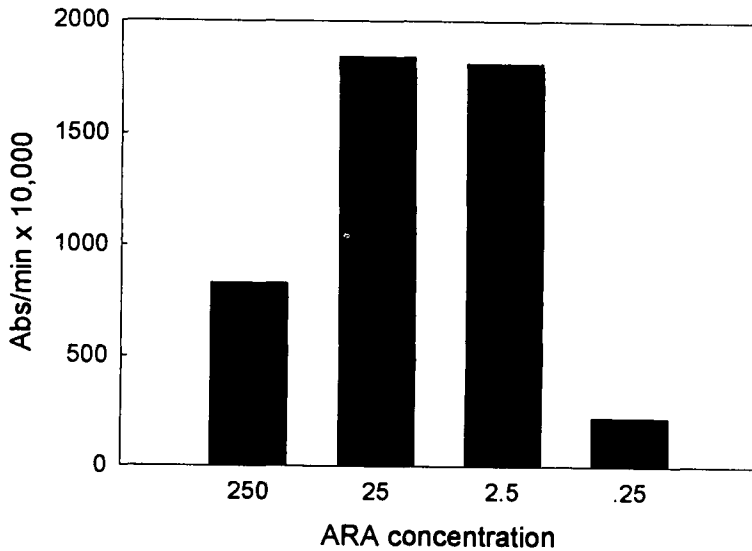


Fig. 47. Dose response of arachidonate ('ARA', μg) on the plasma phenoloxidase activity of the *Xenorhabdus nematophilus*-infected fifth instar larva of *Spodoptera exigua*

다음으로 ARA의 phenoloxidase에 대한 활성 증가 효과를 검정하였다.

방법 : 살아있는 *X. nematophilus*를 10^7cfu/ml 의 농도로 주사한 후 다시 $250\mu\text{g}$ 의 arachidonic acid $2\mu\text{l}$ 를 재 접종하였다. 30분간 처리한 후 혈액을 추출하였다. PO 측정방법은 위와 같았다. 무처리한 세균의 접종 후 70%의 Ethanol을 처리하였다.

결과 : 본 실험에서는 세균을 처리하고 Ethanol을 재 접종한 경우 PO의 활성이 거의 나타나지 않았으나, arachidonic acid를 처리하였을 때 상당히 높은 활성의 PO가 조사되어 arachidonic acid가 PO활성에 영향을 주는 것으로 조사되었다 (Fig. 48).

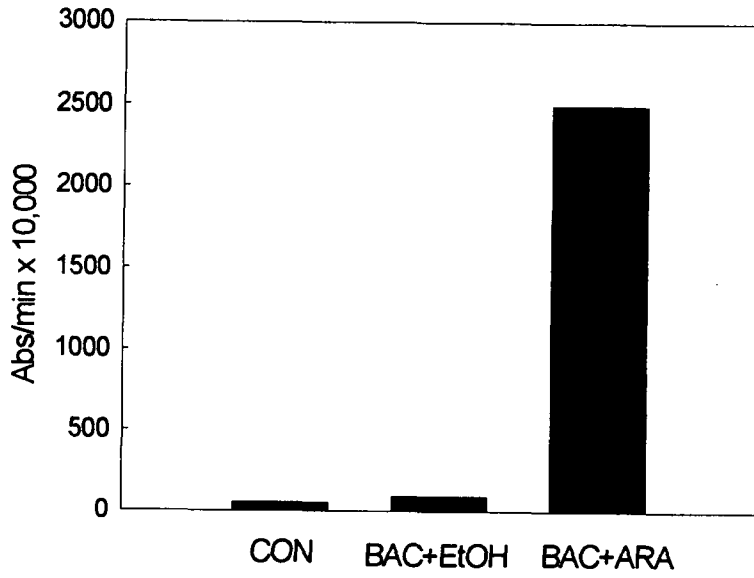


Fig. 48. Rescue effect of arachidonate ('ARA', 250 μ g) on the phenoloxidase activity of the fifth instar larval *Spodoptera exigua* infected with live *Xenorhabdus nematophilus* ('BAC', 2 x 10⁴ cells)

제3절 공생미생물의 유용물질 분리 및 특성 조사

곤충병원선충의 공생세균이 분비하는 항생물질과 toxin에 관한 특성을 연구하며 생물적 방제효과를 가지고 있는 것으로 판단되어 식물체에 피해를 주는 병원성 곰팡이를 대상으로 하여 방제효과를 조사하였다.

1. 공생세균의 곰팡이에 대한 항균효과 조사

1) 항균효과 조사

공생세균을 25℃에서 48시간 동안 Tryptic soy broth (TSB)배지에서 배양한 후 배양액 1ml (10^8 cfu/ml)를 6ml의 0.7% soft agar와 균일하게 섞은 후 직경 9cm의 PDA 평판배지에 얇게 도말하였다. 그리고 나서 chloroform 3ml를 샤페 안에 처리하여 2시간 동안 휘발시킨 후 대상 곰팡이 균주를 needle을 이용하여 가로, 세로 약 0.5mm크기로 절단한 후 PDA배지에 치상하였다. 대조구는 TSB 배양액만 PDA배지에 도말하였다. 곰팡이 균주를 치상한 후 25℃에서 일주일 동안 배양한 후 균사의 성장길이를 관찰하였다.

*X. nematophilus*에서 분리한 항생물질은 대상 곰팡이에 대해서 높은 억제효과를 나타내었다 (Table 29). 특히 *Fusarium*속의 곰팡이에 대하여 균사를 효과적으로 억제시키는 것으로 조사되었다. 이중 가장 큰 균사성장 억제는 콩이나 감자의 모잘록병을 유발하는 *F. oxysporum*에서 나타내었으며, *Cochliolous miyabeanus*의 균사가 가장 적게 억제되었다.

Table 29. Effect of antibiotic produced from *X. nematophilus* on fungi

Target fungi	Diameter of Fungi (Cm, 8days)		T	P
	<i>X. nematophilus</i>	Control		
<i>Cochliolous miyabeanus</i>	1.15 ± 0.07	2.50 ± 0.28	-6.5485	0.0225
<i>Alternaria kikuchiana</i>	0.50 ± 0.14	2.15 ± 0.07	-14.7580	0.0046
<i>Fusarium wilt</i>	0.25 ± 0.07	3.40 ± 0.14	-28.1745	0.0013
<i>F. solani</i>	0.25 ± 0.07	3.40 ± 0.00	-63.0000	0.0003
<i>F. oxisporum</i>	0.05 ± 0.07	1.60 ± 0.14	-13.8636	0.0052
<i>Collectotrichum gloesporiodes</i>	0.09 ± 0.14	2.20 ± 0.14	-9.1924	0.0116
<i>G. oingulata</i>	0.60 ± 0.14	3.90 ± 0.14	-23.3345	0.0018
<i>Colletotrichum</i> sp.	0.25 ± 0.07	3.20 ± 0.14	-26.3856	0.0014
<i>Phytophthora</i> sp.	0.90 ± 0.14	3.35 ± 0.21	-13.5902	0.0054

2) Antibiotics의 열처리시 항균효과 조사

TSB배지에서 배양된 공생세균을 45℃, 60℃, 121℃에서 30분간 water bath에서 열처리를 한 후 배양액 1ml (10⁸cfu/ml)를 6ml의 0.7% soft agar와 균일하게 섞은 후 직경 9cm의 PDA 평판배지에 얇게 도말하였고, chloroform에 2시간 동안 노출시켰다. *F. oxisporum* 균주를 치상한 후 25℃에서 일주일 동안 배양한 후 균사의 성장길이를 관찰하였다.

Antifungal effect of *X. nematophilus* treated with heat on *F. oxysporum*

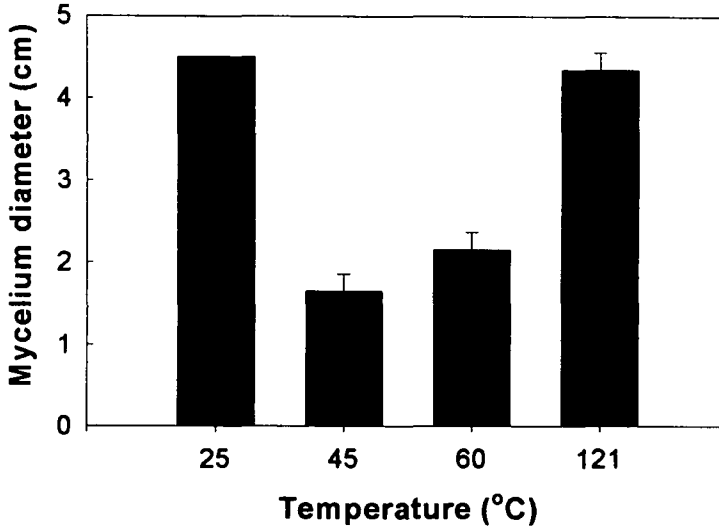


Fig. 49. Heat effect on antifungal activity of *Xenorhabdus nematophilus*

45°C와 60°C에서 30분간 열처리한 세균 배양액은 곰팡이의 균사생장에 영향을 주어 약 2.5cm 이하로 억제를 시켰지만, 121°C에서 30분간 열처리한 배양액은 대조구와 같이 균사생장에 전혀 영향을 주지 못하는 것으로 조사되었다 (Fig. 49).

3) 공생세균의 농도별 항균효과 조사

TSB배지에서 배양된 공생세균을 농도별 (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 그리고 10^8 cfu/ml)로 처리를 한 후 배양액 1ml를 6ml의 0.7% soft agar와 균일하게 섞은 후 직경 9cm의 PDA 평판배지에 얇게 도말하였고, chloroform에 2시간 동안 노출시켰다. *F. oxysporum* 균주를 치상한 후 25°C에서 일주일 동안 배양한 후 균사의 성장길이를 관찰하였다.

Effect of bacterial concentration on *F. oxisporum*

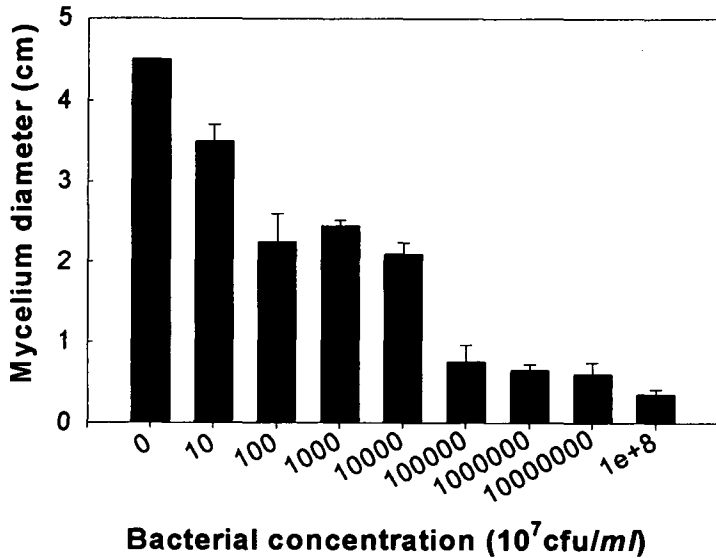


Fig. 50. Antifungal activity according to the concentration of *Xenorhabdus nematophilus*

세균 배양액의 농도가 10^5 농도부터 10^6 , 10^7 , 그리고 10^8 cfu/ml까지농도는 균사의 길이가 1cm 미만으로 가장 높은 항균효과를 나타내었지만 서로간의 항균력의 차이는 나타나지 않았다 (Fig. 50). 그리고 10^2 농도에서 10^3 , 10^4 cfu/ml까지의 농도에서는 균사의 길이가 2.5cm미만으로 가장 낮은 농도인 10^1 cfu/ml을 처리하였을 때 약 3.5cm보다 다소 높은 효과가 있는 것으로 조사되었다. 따라서 곰팡이 균주를 억제시키기에는 10^5 농도가 가장 적정인 것으로 나타났다.

2. 공생세균의 파밤나방에 대한 독소연구

1) 공생세균에서 분리한 fraction들의 병원성검정

TSB배지에서 48시간 동안 배양된 세균 배양액을 0.2 μ m의 membrane filter를 이용하여 세균을 제거하고 배양액만 여과한다. 그리고 나서 separating funnel에서 ethyl acetate와 1:1로 섞은 다음 organic fraction과 aqueous fraction으로 각각 세 번 정도 분리한다. 분리된 각각의 fraction은 rotary evaporator를 이용해 50배로 농축이 된다. 분리된 fraction들은 Hamilton micro syringe를 이용해 4 μ l씩 파밤나방 5령 유충에 접종된다. 그리고 나서 24시간동안 25 $^{\circ}$ C 배양기에 보관된 후 기주곤충의 사망률을 조사하였다.

Table 30. Effect of fractions from *X. nematophilus* of pathogenicity on *S. exigua*

Concentration	Fraction	Pathogenicity ^a
× 25	organic	-
	aqueous	-
× 50	organic	+
	aqueous	-

^a Symbols: -, non pathogenicity; +, pathogenicity. Test was observed at 24h after injection

Organic fraction은 약 18시간만에 기주 곤충에 대해서 병원성을 나타내었지만 aqueous fraction은 24시간 동안 병원성을 전혀 나타내지 못하였다 (Table 30). 따라서 공생세균의 toxin으로 생각되는 물질이 organic fraction에 존재하는 것으로 판단되었다.

2) 공생세균에서 분리한 Toxin-like compound의 LD₅₀

분리된 50배 농도의 organic fraction은 각 농도 (1, 2, 3, 그리고 4 μ l)로 처리되었다. 또한 aqueous fraction은 8 μ l와 4 μ l로 각각 5령의 파밤나방에 Hamilton micro syringe를 이용해 접종하였다. 대조구는 50% ethanol 4 μ l와 saline solution 8 μ l를 접종하였다. 그리고 나서 24시간동안 25 $^{\circ}$ C 배양기에 보관된 후, 기주곤충의 사망률을 조사하였다.

Aqueous fraction은 기주곤충에 대해서 병원성을 나타내지 못하였기 때문에 LD값을 구하기 어려웠으나 organic fraction은 4 μ l에서 처리한 기주곤충 모두 다 치사하였고 1 μ l에서는 24시간 동안 사망률을 나타내지 못하였다. 따라서 LD₅₀ = 2.32 (1.81 < LD < 2.27), Slope = 10.86 \pm 3.74 으로 조사되었다.

제4절 환경저항성 곤충기생선충 선발

1. 건조와 농약에 대한 감수성

일반적으로 선충은 야외에 살포되었을 때 건조와 자외선에 의해 생존력을 잃게 된다. 일정부피 (1ml)내에 들어 있는 선충이 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 약 50% 상대습도의 조건에서 3시간만에 50%의 치사율을 나타냈다 (Fig. 51).

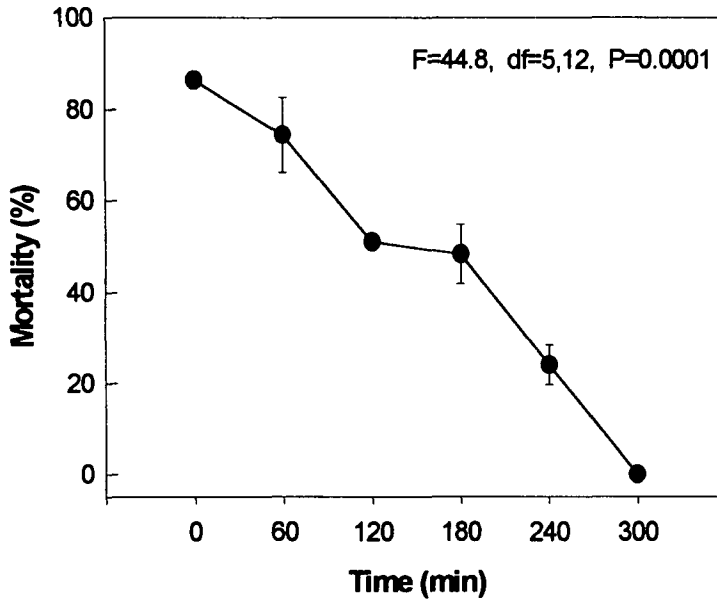


Fig. 51. Susceptibility of *Steinernema carpocapsae* to desiccation in a condition ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, 50% RH)

내한성은 '98년 연구에서 수행되었으며 -10°C 에서 50%집단이 2시간을 견디지 못했다. 농약에 대해서 병원선충의 감수성이 조사되었다 (Fig. 52). 유기인계, 피레스

로이드계, 카바메이트계, IGR 등이 조사되었으며 비교적 대부분 저항성을 보였으나 유독 methomyl 살충제에 대해 높은 감수성을 나타냈다.

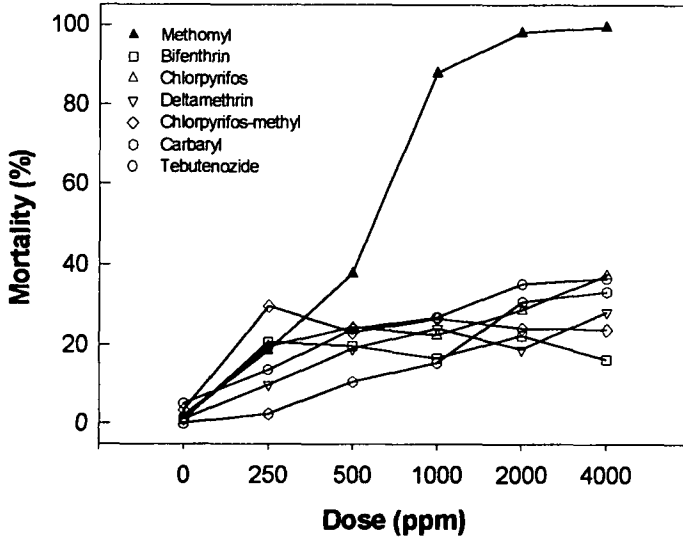


Fig. 52. Dose-mortality of *Steinernema carpocapsae* to several insecticides

2. 저항성집단 선발

내한성 선충을 선발하기 위해 -10°C 에서 2시간 처리 한 뒤 기주에 접종하여 다음 세대를 유지 반복하였다. 내건성 선충을 선발하기 위해 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 3시간 처리 한 뒤 기주에 접종하여 다음 세대를 유지 반복하였다. 카바메이트계 농약인 methomyl 에 저항성 선충을 선발하게 위해 이 약제 400ppm에 처리한 후 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 에 순화 후 15°C 에서 24시간 보관 한 뒤 기주에 접종하여 다음세대를 유지 반복하였다.

선발세대가 진행함에 따라 각 선발 조건에 저항능력의 증가를 보이지 못하였다 (Fig. 53). 이는 본래의 모집단에서 유전적 변이가 적었음에 기인된다고 여겨진다.

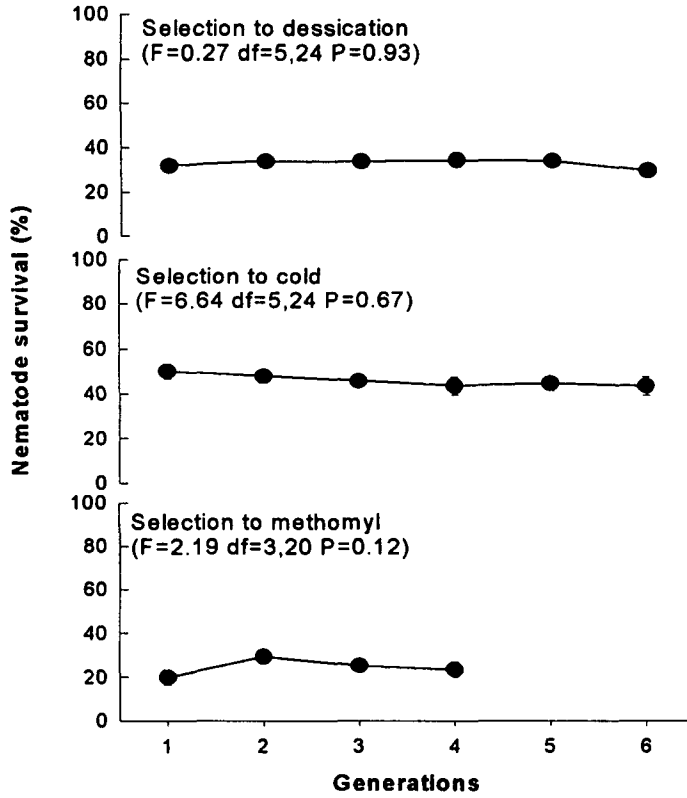


Fig. 53. Selection of *Steinernema carpocapsae* to desiccation, cold, and insecticide (methomyl)

제5절 곤충기생선충의 환경안전성 평가

1. 누에 (*Bombyx mori*)에 대한 안전성 평가

두 가지 생물검정법 (여과지검정법, 국부처리법)으로 누에에 대한 곤충기생선충의 병원력을 분석하였다.

1) 여과지검정법

방법 : 농도별 (0, 4, 8, 16, 32, 68, 136 IJs/ μ l · larva)로 조성된 곤충병원선충을 직경 9cm의 filter paper가 깔려진 petri-dish에 Micro-pipette을 이용하여 200 μ l씩 골고루 뿌려주었다. 선충이 처리된 petri-dish에 누에를 30분 후에 인공사료와 함께 처리하였다. 처리구는 농도 당 3반복으로 구성되었으며, 반복 당 6마리의 5령 3일된 누에가 처리되었다. 대조구는 살균수를 처리하였다. 곤충병원선충의 독성조사는 처리 후 24시간 간격으로 72시간까지 조사하였다.

결과 : $LC_{50} = 3$ IJs/larva, Range = $4.74 < LC < 28.58$, Slope = 4.23 ± 1.86

곤충병원선충이 누에의 몸에서 증식이 되었으며 3IJs에서 LC_{50} 을 나타내는 것으로 조사되었다. 또한 곤충병원선충이 처리된 누에는 24시간 정도에서 치사하였다. 그러나 이(1999)의 실험에서 같은 나비목 곤충인 파밤나방과 담배거세미나방을 대상으로 하였을 때 곤충병원선충의 LC_{50} 은 약 50IJs로 조사되었다. 따라서 누에는 파밤나방과 담배거세미나방보다 상대적으로 곤충병원선충에 대하여 감수성인 것으로 조사되었다.

2) 국부처리법

방법 : 농도별 (0, 4, 8, 16, 32, 68, 136 IJs/ μ l · larva)로 조성된 곤충병원선충을 직경 9cm의 filter paper가 깔려진 petri-dish에 Micro-pipette을 이용하여 200 μ l씩 골고루 누에의 몸에 뿌려주었다. 처리구는 농도 당 3반복으로 구성되었으며, 반복 당 6마리의 5령 3일된 누에가 처리되었다. 대조구는 살균수를 처리하였다. 곤충병원선충의 독성조사는 처리 후 24시간 간격으로 72시간까지 조사하였다.

결과 : LC_{50} = 120 IJs/larva, Range = 12.87 < LC < 32.74, Slope = 4.30 \pm 1.41

Filter paper method와 비슷한 120IJs로 LC_{50} 이 조사되었다.

2. 그물개미 (*Pristomyrmex pungens* Mayr)에 대한 기생선충의 병원력 검정

방법 : 농도별로 (0, 50, 500, 5,000, 50,000 IJs/ml · larva)로 조성된 곤충병원선충을 micro-pipette을 이용하여 3ml씩 골고루 500ml 비이커에 처리하였다. 먹이는 식용 비스킷을 이용하였으며, 토양은 고압살균기에서 121 $^{\circ}$ C에서 20분간 살균되었으며 처리별로 25g 씩 비이커 안에 두었다. 수분공급은 직경 1cm 크기의 솜에 증류수를 묻혀서 비이커 안에 처리하였다. 처리구는 50마리의 개미 집단으로 구성되었으며, 대조구는 살균수에 처리된 식용 비스킷을 처리하였다. 독성조사는 처리 후 24시간 간격으로 7일간 조사하였다.

Table 31. Effect of *Steinernema carpocapsae* on the survival of an ant, *Pristomyrmex pungens* Mayr

Nematode treatment (# IJs)	Number of death out of 50 ants			Mean mortality
	I	II	III	
150,000	2	3	2	4.67* ± 1.15
15,000	4	2	0	4 ± 4
1,500	0	0	0	0
150	0	0	0	0
0	0	0	0	0

The data represent the mean and standard deviations of three replicates.

The asterisk indicates significant difference between control and bacterial concentration at $P < 0.05$ (*).

결과 : 15,000과 150,000IJs의 농도로 선충이 처리된 구에서 4%와 4.67%의 사망률이 조사되었지만 선충의 증식은 없었다 (Table 31). 따라서 농도별로 처리된 곤충병원성 선충은 그물개미에 대하여 고농도의 감염태 선충에 노출되었을 때 약간의 영향을 미치는 것으로 조사되었다.

3. 곤충기생선충의 포유류에 대한 독성 검정

파밤나방을 기주로 이용하여 증식시킨 곤충병원성 선충인 *Steinernema carpocapsae*를 10^5 농도로 하여 SPF 랫드에 강제경구 투여하였다. 투여량은 1ml씩 투여하였으며 암수 각 12마리씩 실험하였다. 선충 투여 후 D1, D3, D7, D14, D21일 간격으로 변을 수거하고 체중을 측정하였다. D3, D7, D14, D21일 간격으로 해당되는 처리구들을 부검하였다. 부검한 처리구에서는 혈액을 채취하고 위, 소장, 대장을 각각 절개하여 선충의 잔존여부를 확인하였다. 선충확인용 절개한 각각의 내부장기 전체를

2ml의 살균수내에서 세척한 상태에서 선충의 유무를 확인하였다.

이 실험의 결과 곤충병원성 선충인 *Steinernema carpocapsae*를 처리한 랫드는 실험기간 중 외부의 육안적 관찰결과 어떠한 이상증상도 나타내지 않았고, 부검한 내부 장기에서도 육안적으로는 이상이 없었다. 체중 또한 대조구와 차이가 없이 정상적인 증가를 보였으며 (Table 32, Fig. 54, Table 36), 부검한 장기에서도 선충은 관찰되지 않았다 (Table 33). 이러한 결과로 보아 곤충병원성 선충인 *Steinernema carpocapsae* 는 랫드에 대해 아무런 유해영향이 없는 것으로 사려된다.

Table 32. Weight change of the rat after application of *Steinernema carpocapsae*

Number of test cage	Sex & Number	Weight (g) after treatment period					
		D0	D1	D3	D7	D14	D21
♂ I	♂ 1	219	228	231	S ₃		
	♂ 2	215	225	229	S ₃		
	♂ 3	241	259	262	S ₃		
Mean ± SD		225.0 ±14.0	237.33 ±18.8	240.7 ±18.5			
♂ II	♂ 1	224	239	253	271	S ₇	
	♂ 2	226	244	263	284	S ₇	
	♂ 3	230	251	267	288	S ₇	
Mean ± SD		226.7 ±3.1	244.7 ±6.0	261.0 ±7.2	281.0 ±8.9		
♂ III	♂ 1	220	234	252	274	281	S ₁₄
	♂ 2	234	251	268	303	291	S ₁₄
	♂ 3	227	245	272	303	298	S ₁₄
Mean ± SD		227.0 ±7.0	243.3 ±8.6	264.0 ±10.6	293.3 ±16.7	290.0 ±8.5	
♂ IV	♂ 1	242	260	276	304	335	341
	♂ 2	228	244	263	290	319	324
	♂ 3	215	232	239	263	294	295
Mean ± SD		228.3 ±13.5	245.3 ±14.1	259.3 ±18.8	285.7 ±20.9	316.0 ±20.7	320.0 ±23.6
♀ I	♀ 1	219	229	232	S ₃		
	♀ 2	212	230	228	S ₃		
	♀ 3	203	211	211	S ₃		
Mean ± SD		211.3 ±8.0	223.3 ±10.7	223.7 ±11.2			
♀ II	♀ 1	212	227	235	253	S ₇	
	♀ 2	222	23	237	254	S ₇	
	♀ 3	200	209	216	226	S ₇	
Mean ± SD		211.3 ±11.0	223.3 ±12.9	229.3 ±11.6	244.3 ±15.9		
♀ III	♀ 1	200	210	220	238	258	S ₁₄
	♀ 2	215	227	230	240	252	S ₁₄
	♀ 3	215	231	242	246	257	S ₁₄
Mean ± SD		210.0 ±8.7	222.7 ±11.2	230.7 ±11.0	241.3 ±4.2	255.7 ±3.2	
♀ IV	♀ 1	208	218	232	236	254	240
	♀ 2	217	228	238	251	250	248
	♀ 3	222	231	245	253	251	243
Mean ± SD		215.7 ±7.1	225.7 ±6.8	238.3 ±6.5	246.7 ±9.3	251.7 ±2.1	243.7 ±4.0

Table 33. Autopsy test of *Steinernema carpocapsae* in the orally treated rats

Rep.	IJs/rat	Organ ¹	Decision			
			after 3day	after 7day	after 14day	after 21day
♂ 1	10 ³	Blood	Non	Non	Non	Non
		Stomach	Non	Non	Non	Non
		SI	Non	Non	Non	Non
		LI	Non	Non	Non	Non
		Excreta	Non	Non	Non	Non
♂ 2	10 ³	Blood	Non	Non	Non	Non
		Stomach	Non	Non	Non	Non
		SI	Non	Non	Non	Non
		LI	Non	Non	Non	Non
		Excreta	Non	Non	Non	Non
♂ 3	10 ³	Blood	Non	Non	Non	Non
		Stomach	Non	Non	Non	Non
		SI	Non	Non	Non	Non
		LI	Non	Non	Non	Non
		Excreta	Non	Non	Non	Non
♀ 1	10 ³	Blood	Non	Non	Non	Non
		Stomach	Non	Non	Non	Non
		SI	Non	Non	Non	Non
		LI	Non	Non	Non	Non
		Excreta	Non	Non	Non	Non
♀ 2	10 ³	Blood	Non	Non	Non	Non
		Stomach	Non	Non	Non	Non
		SI	Non	Non	Non	Non
		LI	Non	Non	Non	Non
		Excreta	Non	Non	Non	Non
♀ 3	10 ³	Blood	Non	Non	Non	Non
		Stomach	Non	Non	Non	Non
		SI	Non	Non	Non	Non
		LI	Non	Non	Non	Non
		Excreta	Non	Non	Non	Non

¹ 'SI' and 'LI' represent the small intestine and large intestine, respectively.

제6절 공생미생물의 환경안전성 평가

1. 누에 (*Bombyx mori*)에 대한 안전성 평가

1) 경구 독성 조사

Tryptic soy broth (TSB, Difco, USA) 상에서 48시간 동안 배양된 공생세균을 4,000 rpm에서 3분간 원심분리 하여 배지성분을 제거하고 살균수로 3회 세척 후, 농도별 (10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 cfu/ml)로 조성된 세균 현탁액에 누에의 인공사료를 5분 동안 침지 시킨 후 petri-dish에 처리하였다. 처리구는 3반복으로 구성되었으며, 6마리의 5령 3일된 누에가 처리되었다. 대조구는 0.7% NaCl 식염수에 처리된 누에의 인공사료를 사용하였다. 독성조사는 처리 후 24시간 간격으로 7일간 조사하였다.

Table 34. Effect of *Xenorhabdus nematophilus* on the survival of an ant species

Bacterial dose (cfu/ml)	Number of death out of 50 ants			Mean mortality
	I	II	III	
150,000	3	2	3	44.44** ± 9.62
15,000	1	1	0	11.11* ± 9.62
1,500	0	0	0	0
150	0	0	0	0
0	0	0	0	0

The data represent the mean and standard deviations of three replicates.

The asterisk indicates significant difference between control and bacterial concentration at $P < 0.05$ (*) and $P < 0.001$ (**).

본 실험에서는 공생세균의 농도가 10^8 cfu/ml에서 약 44.44%의 누에에 대한 살충력이 조사되었다 (Table 34). 따라서 곤충병원선충에서 분리한 공생세균 (*Xenorhabdus nematophilus*)이 누에에 영향을 준다는 것이 확인되었다. 그러나 10^6 cfu/ml에서는 누에에 대해서 아무런 영향을 미치지 않는 것으로 조사되었다.

2) 혈강 내 접종 실험

농도별 (10 , 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8)로 조성된 공생세균이 들어있는 0.75% Saline solution $2\mu\text{l}$ 를 누에의 혈강 내에 Hamilton micro syringe를 이용하여 주사하였다. 대조구는 0.7% Saline solution $2\mu\text{l}$ 를 주사하였다. 처리구는 농도 당 2반복으로 구성되었으며, 반복 당 6마리의 5령 3일된 누에가 처리되었다. 공생세균의 병원성 조사는 주사 후 24시간 간격으로 3일까지 조사하였다.

$$LD_{50} = 1.4 \times 10^3, \text{ Range} = 121.63 < LD < 9,944, \text{ Slope} = 0.72 \pm 0.23$$

본 실험에서 조사된 누에에 대한 공생세균의 영향은 세균의 반수치사농도가 1,400개의 콜로니가 필요하였고, 파밤나방 ($LD_{50} = 2.6 \pm 0.8$)과 비교하여 상대적으로 영향을 덜 미치는 것으로 조사되었다. 그러나 곤충병원선충에서 분리한 공생세균에 의한 혈강주사시 누에도 감수성을 나타내는 것으로 판단된다.

2. 그물개미 (*Pristomyrmex pungens* Mayr)에 대한 공생세균의 병원력 검정

Tryptic soy broth (TSB, Difco, USA) 상에서 48시간 동안 배양된 공생세균을 4,000 rpm에서 3분간 원심분리 하여 배지성분을 제거하고 살균수로 세 번 정도 씻은 다음, 농도별 (10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 cfu/ml)로 조성된 세균 현탁액에 식용 비스킷을 5분 동안 침지시킨 후 500ml 비이커에 처리하였다. 토양은 고압살균기에서 121°C 에서 20

분간 살균되었으며 처리별로 25g 씩 두었다. 수분공급은 직경 1cm 크기의 솥에 증류수를 묻혀서 비이커 안에 처리하였다. 처리구는 농도당 3반복으로 구성되었으며, 반복당 50마리의 개미 집단으로 구성되었으며, 대조구는 살균수에 처리된 식용 비스킷을 처리하였다. 독성조사는 처리 후 24시간 간격으로 7일간 조사하였다.

처리된 공생세균의 농도가 높을수록 사망률이 증가하였다. 따라서 본 실험에서는 곤충병원선충에서 분리한 공생세균 (*Xenorhabdus nematophilus*)이 개미에게 영향을 주었다 (Table 35). 이런 이유는 개미의 장속에 공생하고 있는 공생균들이 곤충병원선충에서 분리된 공생세균이 분비하는 대사물질에 의해서 억제되어 영향을 받은 것으로 사려된다.

Table 35. Effect of *Xenorhabdus nematophilus* on the survival of an ant, *Pristomyrmex pungens* Mayr

Bacterial dose (cfu/ml)	Number of death out of 50 ants			Mean mortality
	I	II	III	
10 ⁸	50	50	50	100** ± 0.00
10 ⁷	50	50	50	100** ± 0.00
10 ⁶	46	40	50	90.67** ± 10.00
10 ⁵	40	38	36	76** ± 4.00
0	10	2	3	10 ± 8.00

The data represent the mean and standard deviations of three replicates.

The asterisk indicates significant difference between control and bacterial concentration at $P < 0.05$ (*) and $P < 0.001$ (**).

3. 곤충기생선충의 포유류에 대한 독성 검정

순수분리된 세균을 10^8 농도의 현탁액을 만들어 SPF 랫드 암수 각 12마리씩 1ml 강제경구 투여하였으며, 처리구와 대조구는 각 3개의 중간도살군과 1개의 최종부검군을 두었다. 세균을 투여하기전에 체중을 측정후 세균을 경구 투여한 후 1, 3, 7, 14, 21일 간격으로 몸무게 측정하였다. 같은 날짜 간격으로 변을 수거하고 3, 7, 14, 21일 간격으로 부검을 하였으며, 부검한 처리구에서는 혈액, 위, 소장, 대장을 채취하였다. 세균의 내부장기에 대한 잔존성 여부를 확인하기 위하여 절개한 장기의 약 3cm정도를 자른다음 2ml의 살균수에 장기를 5분간 세척하고 장기가 세척된 살균수 $200\mu\text{l}$ 를 NBTA배지에 스트릭하여 48시간 배양 후 세균의 증식여부를 확인하였다.

본 실험에서는 곤충병원성선충의 장내세균인 *Xenorhabdus nematophilus*를 강제경구 투여한 랫드의 체중의 변화를 측정후 세균이 체중에 영향을 주지 않는 것으로 나타났다 (Table 36, Fig. 54). 측정후 체중은 SAS를 이용해 통계처리 하였다 (Table 38). 실험과정에서 수거한 변과 장기의 세균유무를 확인하기 위해 배지에 배양한 결과 *X. nematophilus*는 배양되지 않았다 (Table 37). 그러나 장내세균에 속하는 많은 종류의 세균들이 배양되었으며 이 균들은 분류상 *Xenorhabdus nematophilus*와는 분류상 거리가 먼 균들로 나타났다 (Table 39). 실험에 사용한 SPF 랫드는 실험동안 육안적 관찰에서 대조구와 비교했을 때 아무런 이상이 없었으며, 해부 후 장기의 육안적 관찰에서도 대조구와 같이 아무런 영향을 받지 않는 것으로 관찰되었다. 실험 중 세균을 처리한 랫드의 암컷과 수컷이 각각 2마리씩 사망하였으나 부검결과 세균 현탁액이 횡경막 주위에서 관찰되었으며, 이는 위장내로 강제 투여되어야 할 세균 액이 흉강내로 잘못 투여되어 사망한 것으로 관찰되었고 세균에 의한 사망은 아닌 것으로 사려된다.

Table 36. Weight change of the rat after application of *X. nematophilus*

Number of test cage	Sex & Number	Weight (g) after treatment period					
		D0	D1	D3	D7	D14	D21
♂ I	♂ 1	241	265	266	S ₃		
	♂ 2	234	256	260	S ₃		
	♂ 3	229	247	256	S ₃		
Mean ± SD		234.6 ±6.0	256.0 ±9.0	260.7 ±5.0			
♂ II	♂ 1	220	235	252	282	S ₇	
	♂ 2	238	254	278	316	S ₇	
	♂ 3	229	245	258	283	S ₇	
Mean ± SD		229.0 ±9.0	244.7 ±9.5	262.7 ±13.6	293.7 ±19.4		
♂ III	♂ 1	227	DO	-	-	-	-
	♂ 2	237	255	265	302	337	S ₁₄
	♂ 3	239	256	271	301	332	S ₁₄
Mean ± SD		234.3 ±6.4	255.5 ±0.7	268.0 ±4.2	301.5 ±0.7	334.5 ±3.5	
♂ IV	♂ 1	230	DO	-	-	-	-
	♂ 2	225	238	254	282	314	323
	♂ 3	226	241	260	290	326	332
Mean ± SD		227.0 ±2.7	239.5 ±2.1	257.0 ±4.2	286.0 ±5.7	320.0 ±8.5	327.5 ±6.4
♀ I	♀ 1	217	221	229	S ₃		
	♀ 2	200	205	205	S ₃		
	♀ 3	213	226	215	S ₃		
Mean ± SD		210.0 ±8.9	217.3 ±10.9	246.3 ±42.7			
♀ II	♀ 1	209	220	224	239	S ₇	
	♀ 2	202	212	223	235	S ₇	
	♀ 3	197	204	208	222	S ₇	
Mean ± SD		202.7 ±6.0	212.0 ±8.0	218.3 ±8.9	237.0 ±2.8		
♀ III	♀ 1	200	216	224	240	232	S ₁₄
	♀ 2	206	217	227	242	244	S ₁₄
	♀ 3	218	DO	-	-	-	-
Mean ± SD		208.0 ±9.2	213.6 ±4.9	225.5 ±2.1	241.0 ±1.4	238.0 ±8.5	
♀ IV	♀ 1	214	225	231	240	251	242
	♀ 2	211	DO	-	-	-	-
	♀ 3	218	227	235	250	250	239
Mean ± SD		214.3 3.5	226.0 ±1.4	233.0 ±2.8	245.0 ±7.1	250.5 ±0.7	240.5 ±2.1

Table 37. Autopsy test of *Xenorhabdus nematophilus* in the orally reared rats

Rep	cfu/rat	Organ ¹	Decision			
			after 3day	after 7day	after 14day	after 21day
♂ 1	10 ⁸	Blood	Non	Non	Non	Non
		Stomach	Non	Non	Non	Non
		SI	Non	Non	Non	Non
		LI	Non	Non	Non	Non
		Excreta	Non	Non	Non	Non
♂ 2	10 ⁸	Blood	Non	Non	Non	Non
		Stomach	Non	Non	Non	Non
		SI	Non	Non	Non	Non
		LI	Non	Non	Non	Non
		Excreta	Non	Non	Non	Non
♂ 3	10 ⁸	Blood	Non	Non	Non	Non
		Stomach	Non	Non	Non	Non
		SI	Non	Non	Non	Non
		LI	Non	Non	Non	Non
		Excreta	Non	Non	Non	Non
♀ 1	10 ⁸	Blood	Non	Non	Non	Non
		Stomach	Non	Non	Non	Non
		SI	Non	Non	Non	Non
		LI	Non	Non	Non	Non
		Excreta	Non	Non	Non	Non
♀ 2	10 ⁸	Blood	Non	Non	Non	Non
		Stomach	Non	Non	Non	Non
		SI	Non	Non	Non	Non
		LI	Non	Non	Non	Non
		Excreta	Non	Non	Non	Non
♀ 3	10 ⁸	Blood	Non	Non	Non	Non
		Stomach	Non	Non	Non	Non
		SI	Non	Non	Non	Non
		LI	Non	Non	Non	Non
		Excreta	Non	Non	Non	Non

¹ 'SI' and 'LI' represent the small intestine and large intestine, respectively.

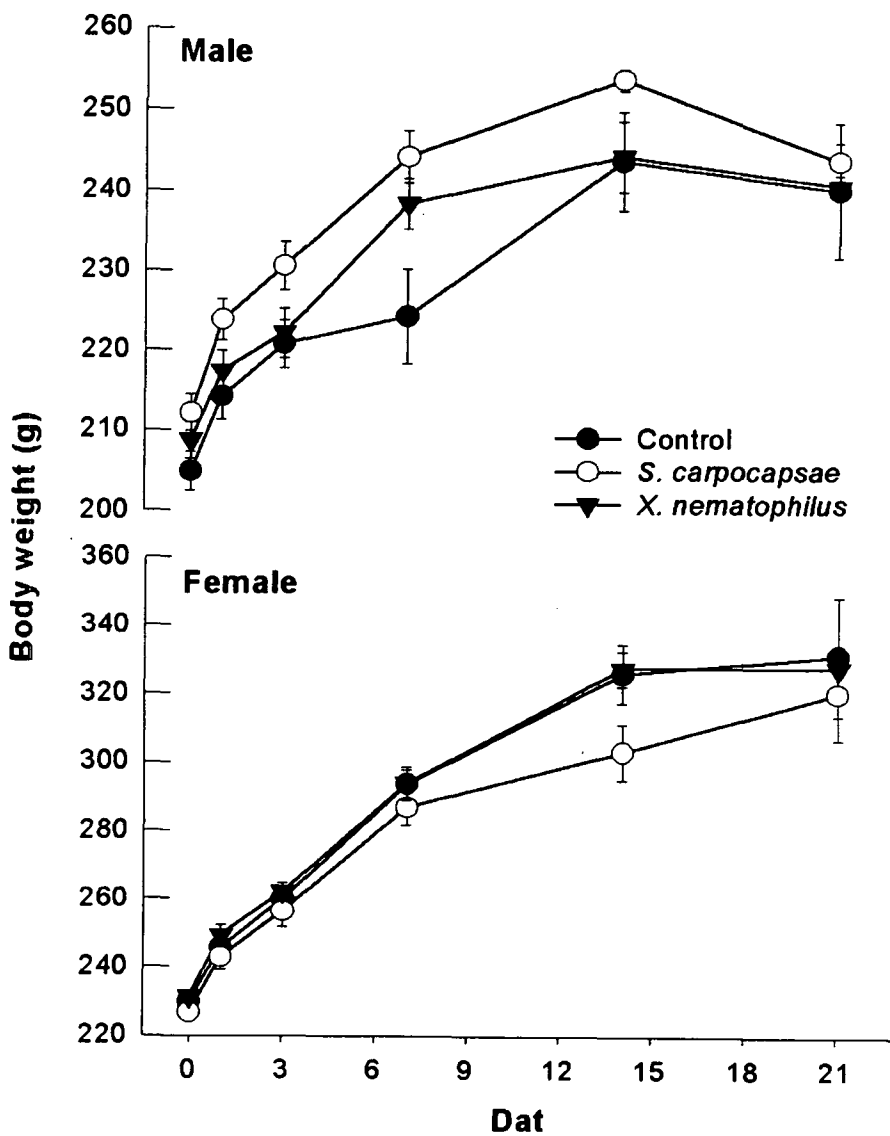


Fig. 54. Weight change in response to treatments of *X. nematophilus* and *S. carpocapsae*

Table 38. ANOVA on the body weight changes of the test rat treated orally with *S. carpocapsae* (IJs/rat) and *X. nematophilus* (cfu/rat)

Source ¹	df	SS	MS	F	P
TRT	2	270.20	135.10	1.02	0.3611
SEX	1	119023.61	119023.61	900.80	0.0001
AGE	5	146747.32	29349.46	222.12	0.0001
TRT*SEX	2	4039.33	2019.67	15.29	0.0001
TRT*DATE	10	1051.26	105.13	0.80	0.6331
SEX*DATE	5	28275.72	5655.14	42.80	0.0001
TRT*SEX*DATE	10	1503.35	150.33	1.14	0.3340
ERROR	270	35675.54	132.13	65.07	
Total	305	336586.33			

¹ 'TRT' represents three treatment including control, *S. carpocapsae* and *X. nematophilus*.

'SEX' represents male and female rats.

'AGE' represents the days after treatments.

Table 39. Other contaminated bacterial flora in different organs of the tested rats

Organ of rat	Bacteria	N	Bacteria isolate from Rat (%)	
			Control	Treatment
Stomach	<i>Proteus vulgaris</i>	3	35.67±31.34	10.07±8.99
	<i>Proteus mirabilis</i>		26.73±23.16	-
	<i>Proteus penneri</i>		21.73±18.84	-
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		30.53±26.67	11.00±10.26
	<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>		30.53±26.67	-
	<i>Klebsiella ozaenae</i>		17.67±15.87	10.07±8.80
	<i>Enterobacter amnigenus</i>		26.60±23.04	-
	<i>Enterobacter aerogenes</i>		20.10±17.42	0.13±0.15
	<i>Enterobacter agglomerans</i>		8.97±7.98	15.37±14.27
Large intestines	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	3	46.17±39.99	12.57±10.99
	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>		-	14.30±12.43
	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>		-	22.63±19.67
	<i>Acinetobacter radioresistens</i>		-	13.23±11.68
	<i>Micrococcus luteus</i>		19.87±17.22	22.20±20.67
	<i>Deinococcus erythromyxa</i>		-	22.63±19.61
Small intestines	<i>Bacillus megaterium</i>	3	-	19.53±17.30
	<i>Bacillus psychrosaccharolyticus</i>		6.83±6.01	34.97±31.97
	<i>Staphylococcus xylosum</i>		9.43±8.56	26.53±23.10
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>		-	12.10±12.92
	<i>Brevibacillus brevis</i>		-	16.87±15.47

제 5 장 참 고 문 헌

- Abrams, J. M., A. Lux and H. Steller. 1992. Macrophage in *Drosophila* embryos and L2 cells exhibit scavenger receptor-mediated endocytosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 19375-19379.
- Akhurst, R. J. 1980. Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoplectana* and *Heterorhabditis*. J. Gen. Microbiol. 121: 303-309.
- Akhurst, R. J. 1986. *Xenorhabdus nematophilus* subsp. *poinarii*: its interaction with insect pathogenic nematodes. Syst. Appl. Microbiol. 8: 142-147.
- Akhurst, R. J. 1990. Safety to nontarget invertebrates of nematodes of economically important pests. In Safety of microbial insecticides (Eds. Laird, M., L. A. Lacey, E. W. Davidson), pp. 234-238. CRC Press. Boca Raton, FL.
- Akhurst, R. J. and N. E. Boemare. 1986. A non-luminescent strain of *Xenorhabdus luminescens* (Enterobacteriaceae). J. Gen. Microbiol. 132: 1917-1922.
- Akhurst, R. J. and G. B. Dunphy. 1993. Tripartite interactions between symbiotically associated entomopathogenic bacteria, nematodes, and their insect hosts. In Parasites and pathogens of insects (Eds. Beckage, N., S. Thompson and B. Federici). 2: 1-23. Academic, New York.
- Åsling, B., M. S. Dushay and D. Hultmark. 1995. Identification of early

- genes in the *Drosophila* immune response by PCR-based differential display: the Attacin A gene and the evolution of attacin-like proteins. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25: 511-518.
- Baines, D. and R. G. H. Downer. 1992. 5-Hydroxytryptamine-sensitive adenylate cyclase affects phagocytosis in cockroach hemocytes. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 21: 303-316.
- Baines, D., T. Desantis and R. G. H. Downer. 1992. Octopamine and 5-hydroxytryptamine enhance the phagocytic and nodule formation activities of cockroach (*Periplaneta americana*) haemocytes. *J. Insect Physiol.* 38: 905-914.
- Bedding, R. A. 1981. Low costs *in vitro* mass production of *Neoplectana* and *Heterorhabditis* species (Nematoda) for field control of insect pests. *Nematologica* 27: 109-114.
- Bedding, R. A. 1984. Large scale production, storage and transport of the insect-parasitic nematodes *Neoplectana* spp. and *Heterorhabditis* spp. *Ann. Appl. Biol.* 104: 117-120.
- Bedding, R. A. and R. J. Akhurst. 1975. A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. *Nematologica* 21: 109-110.
- Bird, A. F. and R. J. Akhurst. 1983. The nature of the intestinal vesicle in nematodes of the family Steinernematidae. *Int. J. Parasitol.* 13: 599-606.
- Boemare, N. E. and R. J. Akhurst. 1988. Biochemical and physiological characterization of colony form variants in *Xenorhabdus* spp. (*Enterobacteriaceae*). *J. Gen. Microbiol.* 134: 751-761.

- Brunham, R. C., F. A. Plummer and R. S. Stephens. 1993. Bacterial antigenic variation, host immune response, and pathogen-host coevolution. *Infect. Immun.* 61: 2273-2276.
- Carlsson, A., P. Engström, E. T. Palva and H. Bennith. 1991. Attacin, an antibacterial protein from *Hyalophora cecropia* inhibits synthesis of outer membrane proteins in *Escherichia coli* by interfering with OMP gene transcription. *Infect. Immun.* 59: 3040-3045.
- Cerenius, L., Z. Liang, B. Duvic, P. Keyser and U. Hellman. 1994. Structure and biological activity of a β -1,3-D-glucan-binding protein in crustacean blood. *J. Biol. Chem.* 269: 29462-29467.
- Chadwick, J. S. and W. P. Aston. 1991. Antibacterial immunity in Lepidoptera. In *Immunity in insects and other arthropods* (Ed. Gupta, A. P.), pp. 347-370. CRC Press, Boca Raton. FL.
- Chain, B. M. and R. S. Anderson. 1983. Inflammation in insects: the release of a plasmatocyte depletion factor following interaction between bacteria and hemocytes. *J. Insect Physiol.* 29: 1-4.
- Charalambidis, N. D., S. N. Bournazos, M. Lambropoulou and V. J. Marmaras. 1994. Defense and melanization depend on the eumelanin pathway, occur independently and are controlled differentially in developing *Ceratitidis capitata*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 24: 655-662.
- Charalambidis, N. D., L. C. Foukas and V. J. Marmaras. 1996. Lipopolysaccharides (LPS) covalent association at the hemocyte surface of insects is an initial step for LPS internalization: protein tyrosine phosphorylation requirement. *Eur. J. Biochem.* 236: 200-206.
- Charalambidis, N. D., C. G. Zervas, M. Lambropoulou, G. Katsoris and V.

- J. Marmaras. 1995. Lipopolysaccharide-stimulated exocytosis of nonself recognition protein from insect hemocytes depend on protein tyrosine phosphorylation. *Eur. J. Cell Biol.* 67: 32-41.
- Cherbas, L. 1973. The induction of an injury reaction in cultured hemocytes from saturniid pupae. *J. Insect Physiol.* 19: 2011-2023.
- Davies, D. H. and M. T. Siva-Jothy. 1991. Encapsulation in insects: polydnviruses and encapsulation-promoting factors. In *Immunity of insects and other arthropods*, pp. 120-132. (Ed. Gupta, A. P.). CRC Press, Boca Raton.
- Dickinson, L. V., W. Russell and P. E. Dunn. 1988. A family of bacteria-regulated cecropin D-like peptides from *Manduca sexta*. *J. Biol. Chem.* 263: 19424-19429.
- Dimarcq, J. L., E. Keppi, B. Dunbar, J. Lambert and J-M. Reichhart. 1988. Purification and characterization of a family of novel inducible antibacterial proteins from immunized larvae of the dipteran *Phormia terranova* and complete amino acid sequence of the predominant member, diptericin A. *Eur. J. Biochem.* 171: 17-22.
- Dunn, P. E., T. Bohnert and V. W. Russell. 1994. Midgut antibacterial defenses of *Manduca sexta* following infection and during metamorphosis. In *Phylogenetic perspectives in immunity: the insect host defense* (Eds. Hoffmann, J. A., C. A. Janeway, Jr. and S. Natori), pp. 105-111. CRC Press, Boca Raton. FL.
- Dunn, P. E., W. Dai, M. R. Kanost and C. Geng. 1985. Soluble peptidoglycan fragments stimulate antibacterial synthesis by fat body from larvae of *Manduca sexta*. *Dev. Comp. Immunol.* 9: 559-568.

- Dunn, P. E. and D. R. Drake. 1983. Fate of bacteria injected into naive and immunized larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. J. Invertebr. Pathol. 41: 77-85.
- Dunphy, G. B. and R. G. H. Downer. 1994. Octopamine, a modulator of the haemocytic nodulation response of non-immune *Galleria mellonella* larvae. J. Insect Physiol. 40: 267-272.
- Dunphy, G. B. and J. M. Webster. 1988. Interaction of *Xenorhabdus nematophilus* subsp. *nematophilus* with the haemolymph of *Galleria mellonella*. J. Insect Physiol. 30: 883-889.
- Dunphy, G. B. and J. M. Webster. 1991. Antihemocytic surface components of *Xenorhabdus nematophilus* var. *dutki* and their modification by serum of nonimmune larvae of *Galleria mellonella*. J. Invertebr. Pathol. 58: 40-51.
- Ehlers, D., B. Zosel, W. Mohrig, E. Kauschke and E. Ehlers. 1992. Comparison of an *in vivo* and *in vitro* phagocytosis in *Galleria mellonella* L. Parasitol. Res. 78: 354-359.
- Fehlbaum, P., P. Bulet, L. Michaut, M. Lagueux and W. F. Broekaert. 1995. Insect immunity: septic injury to *Drosophila* induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides. J. Biol. Chem. 269: 33159-33163.
- Forst, S., B. Dowds, N. Boemare and E. Stackebrandt. 1993. *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: bugs that kill bugs. Annu. Rev. Microbiol. 51: 47-72.
- Forst, S. and K. Neilson. 1996. Molecular biology of the symbiotic-pathogenic bacteria *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp

- Microbiol. Rev. 60: 21-43.
- Friedman, M. J. 1990. Commercial production and development. In Entomopathogenic nematodes in biological control (Eds. Gaugler, R. and H. K. Kaya), pp. 153-172. CRC Press. Boca Raton, FL.
- Gateff, E. 1996. The *Drosophila melanogaster* immunoresponsive tumorous blood cell line mbn-2, a tool to study the molecular mechanisms of the immune response and to identify genes instrumental in cell-cell recognition. In Molecular mechanisms of immune responses in insects (Eds. Brey, P. and D. Hultmark). Chapman & Hall, NY.
- Gaugler, R. 1981. Biological control potential of neoaplectanid nematodes. J. Nematol. 13: 241-249.
- Gaugler, R. and G. M. Boush. 1978. Effects of ultraviolet radiation and sunlight on the entomopathogenic nematode, *Neoaplectana carpocapsae*. J. Invertebr. Pathol. 32: 291-296.
- Geng, C. and P. E. Dunn. 1989. Plasmacyte depletion in larvae of *Manduca sexta* following injection of bacteria. Dev. Comp. Immunol. 13: 17-23.
- Gho, H.G., S.G. Lee, B.P. Lee, K.M. Choi and J.H. Kim. 1990. Simple mass-rearing of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), on an artificial diet. Korean J. Appl. Entomol. 29: 180-183.
- Gillespie, J. P., M. R. Kanost and T. Trenczek. 1997. Biological mediators of insect immunity. Annu. Rev. Entomol. 42: 611-643.
- Givaudan, A., S. Baghdiguian, A. Lanois and N. Boemare. 1995. Swarming and swimming changes concomitant with phase variation in

- Xenorhabdus nematophilus*. Appl. Environ. Microbiol. 61: 1408-1413.
- Glazer, I., M. Klein, A. Navon and Y. Nakache. 1992. Comparison of efficacy of entomopathogenic nematodes combined with antidesiccants applied by canopy sprays against three cotton pests (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol. 85: 1636-1641.
- Götz, P. 1986. Encapsulation in arthropods. In Immunity in invertebrates: cell, molecules and defense reactions (Ed. Brehèlin), pp. 153-170. Spring Verlag, Berlin.
- Grewal, P. S., R. Gaugler and S. Selvan. 1993. Host recognition by entomopathogenic nematodes: behavioral response to contact with host feces. J. Chem. Ecol. 19: 1219-1231.
- Gudmundsson, C. G., D-A. Lidholm, B. Åsling, R. Gan and H. G. Boman 1991. The cecropin locus: cloning and expression of a gene cluster encoding three antibacterial peptides in *Hyalophora cecropia*. J. Biol. Chem. 266: 11510-11517.
- Han, S., Y. Kim and B. Lee. 1996. Biological control of vegetable insect pests with entomopathogenic nematodes. Korean J. Soil Zool. 1: 81-88.
- Han, S., S. Lee and Y. Kim. 1999. Pathogenicity and multiplication of entomopathogenic Nematode, *Steinernema carpocapsae* Weiser, on beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner) and tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Fabricius). Korean J. Appl. Entomol. 38: 255-260.
- Hara, S. and M. Yamakawa. 1995. A novel antibacterial peptide family isolated from the silkworm, *Bombyx mori*. Biochem. J. 310: 651-656.

- Hetru, C., P. Bulet, S. Cociancich, J. L. Dimarcq, D. Hoffmann and J. A. Hoffmann. 1994. Antibacterial peptides/polypeptides in the insect host defense: a comparison with vertebrate antibacterial peptides/polypeptides. In *Phylogenetic perspectives in immunity: The insect host defense* (Eds. Hoffmann, J. A., C. A. Janeway, Jr. and S. Natori), pp. 44-65. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Huxham, I. M. and A. M. Lackie. 1988. Behaviour *in vitro* of separated fractions of haemocytes of the locust, *Schistocerca gregaria*. *Cell Tissue Res.* 251: 677-684.
- Iijima, R., S. Kurata and S. Natori. 1993. Purification, characterization and cDNA cloning of an antifungal protein from the hemolymph of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly) larvae. *J. Biol. Chem.* 268: 12055-12061.
- Iketani, M. and I. Morishima. 1993. Induction of antibacterial protein synthesis by soluble peptidoglycan in isolated fat body from larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 23: 913-917.
- Ishikawa, M., T. Kubo and S. Natori. 1992. Purification and characterization of a dipteran homologue from *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). *Biochem. J.* 287: 573-578.
- Janeway, C. A. Jr. 1994. The role of microbial pattern recognition in self: non-self discrimination in innate and adaptive immunity. In *Phylogenetic perspectives in immunity: The insect host defense* (Eds. Hoffmann, J. A., C. A. Janeway, Jr. and S. Natori), pp. 115-122. CRC Press, Boca Raton. FL.
- Johansson, M. W. and K. Söderhäll. 1992. Cellular defence and cell

- adhesion in crustaceans. *Parasitol. Today* 1: 97-107.
- Jomori, T. and S. Natori. 1992. Function of the lipopolysaccharide-binding protein of *Periplaneta americana* as an opsonin. *FEBS Lett.* 296: 283-286.
- Jung, Y. H., B. Y. Park, D. K. Lee, Y. S. Hahn and J. Chung. 1995. Biochemical and molecular characterization of an antifungal protein from *Tenebrio molitor*. *Mol. Cell. Biol.* 5: 289-292.
- Kamioneck, M., I. Maslana and H. Sandner. 1974. The survival of invasive larvae of *Neoplectana carpocapsae* Weiser in a waterless environment under various conditions of temperature and humidity. *Zesz. Probl. Pest. Nauk Roln.* 154: 409-412.
- Kanost, M. R., W. Dai and P. E. Dunn. 1988. Peptidoglycan fragments elicit antibacterial protein synthesis in larvae of *Manduca sexta*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 8: 147-164.
- Kanost, M. R. and L. Zhao. 1996. Insect hemolymph proteins from the Ig superfamily. *Adv. Comp. Environ. Physiol.* 23: 185-197.
- Karp, R. D. 1993. The response to foreign tissue transplants in insects. In *Parasites and pathogens of insects*. Vol. 1. Parasites (Eds. Beckage, N. E., S. N. Thompson and B. A. Federici), pp. 305-316. Academic, San Diego.
- Kato, Y., Y. Motoi, K. Taniai, K. Kadono-Okuda, M. Hiramatsu and M. Yamakawa. 1994. Clearance of lipopolysaccharide in hemolymph of the silkworm *Bombyx mori*: its role in the termination of cecropin mRNA induction. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 24: 539-545.
- Kawasaki, K., T. Kubo and S. Natori. 1993. A novel role of *Periplaneta*

- lectin as an opsonin to recognize 2-keto-3-deoxyoctanate residues of bacterial lipopolysaccharides. *Comp. Biochem. Physiol.* 106B: 675-680.
- Kaya, H. K. 1985. Entomogenous nematodes for insect control in IPM systems. In *Biological control in agricultural IPM systems* (Eds. Hoy, M. A. and D. C. Herzog). Academic Press, NY.
- Kaya, H. K. and R. Gaugler. 1993. Entomopathogenic nematodes. *Annu. Rev. Entomol.* 38: 181-206.
- 김용균, 박영진. 1998. 곤충병원선충의 살충기작. *안동대 농업과학기술논문집* 5:1-22.
- Klünner, T. H. Preik-Steinhoff and T. Trenczek. 1994. Presentation and characterization of a possible binding factor for LPS in haemocyte membranes of *Galleria mellonella* and *Hyalophora cecropia*. *Verh. Dtsch. Zool. Ges.* 87: 284.
- Kylsten, P., D. A. Kimbrell, S. Daffre, C. Samakovlis and D. Hultmark. 1992. The lysozyme locus in *Drosophila melanogaster*: different genes are expressed in the midgut and salivary glands. *Mol. Gen. Genet.* 232: 335-343.
- Kylsten, P., C. Samakovlis and D. Hultmark. 1990. The cecropin locus in *Drosophila*: a compact gene cluster involved in the response to infection. *EMBO J.* 9: 217-224.
- Kyriakides, T. R., J. L. McKillip and K. D. Spence. 1993. *In vivo* distribution of immune protein scolexin in bacteria-injected *Manduca sexta* larvae. *Tissue Cell* 25: 423-434.
- Kyriakides, T. R., J. L. McKillip and K. D. Spence. 1995. Biochemical characterization, development expression, and induction of the immune

- protein scolexin from *Manduca sexta*. Arch. Insect Biochem. Physiol. 29: 269-280.
- Lackie, A. M. 1986. Transplantation; the limits of recognition. In Hemocytic and humoral immunity in arthropods (Ed. Gupta, A. P.), pp. 191-223. Wiley, New York.
- Lackie, A. M. 1988. Hemocyte behaviour. Adv. Insect Physiol. 21: 85-178.
- Ladendorff, N. E. and M. R. Kanost. 1990. Isolation and characterization of bacteria-induced protein P4 from hemolymph of *Manduca sexta*. Arch. Insect Biochem. Physiol. 15: 33-41.
- Ladendorff, N. E. and M. R. Kanost. 1991. Bacteria-induced protein P4 (hemolin) from *Manduca sexta*: a member of the immunoglobulin superfamily which can inhibit hemocyte aggregation. Arch. Insect Biochem. Physiol. 18: 285-300.
- Lanz-Mendoza, H., R. Bettencourt, M. Fabbri and I. Faye. 1996. Regulation of the immune response: the effect of hemolin on the cellular immune mechanisms. Cell. Immunol. 169: 47-54.
- Lavine, M. D. and N. E. Beckage. 1995. Polydnviruses: potent mediators of host insect immune dysfunction. Parasitol. Today 11: 368-378.
- Leclerc, M. -C. and N. E. Boemare. 1991. Plasmids and phase variation in *Xenorhabdus* spp. Appl. Environ. Microbiol. 57: 2597-2601.
- 이승화, 김용균, 한상찬. 2000. 곤충병원선충 (*Steinernema carpocapsae* Weiser)의 냉동저장법. 한용곤지 (인쇄중).
- 이성섭, 김용균, 한상찬. 2000. 감염태 곤충병원선충 (*Steinernema carpocapsae* Weiser)의 효과적 회수법. 한토동지 (인쇄중).
- Lee, S. Y., H. J. Moon, S. Kurata, S. Natori and B. K. Lee. 1995.

- Purification and cDNA cloning of an antifungal protein from the hemolymph of *Holotrichia diomphalis* larvae. Biol. Pharm. Bull. 18: 1049-1052.
- Lee, W-J. and P. T. Brey. 1995. Isolation and characterization of the lysozyme-encoding gene from the silkworm, *Bombyx mori*. Gene 161: 199-203.
- Li, J. and B. M. Christensen. 1990. Immune competence of *Aedes trivittatus* hemocytes as assessed by lectin binding. J. Parasitol. 76: 276-278.
- Lindgren, J. E., K. A. Valero and B. E. Mackey. 1993. Simple in vivo production and storage methods for *Steinernema carpocapsae* infective juveniles. J. Nematol. 25: 193-197.
- Marmaras, V. J. and N. D. Charalambidis. 1992. Certain hemocyte proteins of the medfly, *Ceratitis capitata*, are responsible for nonself recognition and immobilization of *Escherichia coli* in vitro. Arch. Insect Biochem. Physiol. 21: 281-288.
- Marmaras, V. J., N. D. Charalambidis and M. Lambropoulou. 1994. Cellular defense mechanisms in *C. capitata*: recognition and entrapment of *E. coli* by hemocytes. Arch. Insect Biochem. Physiol. 26: 1-14.
- Mc-Kenzie, A. N. J. and T. M. Preston. 1992. Functional studies on *Calliphora vomitoria* haemocytes subpopulations defined by lectin staining and density centrifugation. Dev. Comp. Immunol. 16: 19-30.
- Miller, J. S., R. W. Howard, T. Nguyen, A. Nguyen, R. M. T. Rosario and D. W. Stanley-Samuelson. 1996. Eicosanoids mediate nodulation responses to bacterial infections in larvae of the tenebrionid, *Zophobas*

- atratus*. J. Insect Physiol. 42: 3-12.
- Miller, J. S., T. Nguyen and D. W. Stanley-Samuelson. 1994. Eicosanoids mediate insect nodule responses to bacterial infections. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91: 12418-12422.
- Mohrig, W., D. Schitteck and D. Hanschke. 1979. Investigation on cellular defense reactions with *Galleria mellonella* against *Bacillus thuringiensis*. J. Invertebr. Pathol. 34: 207-212.
- Morishima, I., T. Horiba, M. Iketani, E. Nishioka and Y. Yamano. 1995. Parallel induction of cecropin and lysozyme in larvae of the silkworm *Bombyx mori*. Dev. Comp. Immunol. 19: 357-363.
- Mulnix, A. B. and P. E. Dunn. 1994. Structure and induction of a lysozyme gene from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. Insect Biochem. Mol. Biol. 24: 271-281.
- Ochiai, M., T. Niki and M. Ashida. 1992. Immunocytochemical localization of β -1,3-glucan recognition protein in the silkworm, *Bombyx mori*. Cell Tissue Res. 268: 431-437.
- Park, Y. and Y. Kim. 2000. Eicosanoids rescue *Spodoptera exigua* infected with *Xenorhabdus nematophilus*, the symbiotic bacteria to the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. J. Insect Physiol. 46: 1469-1476.
- Park, Y., Y. Kim and Y. Lee. 1999. Identification and characterization of a symbiotic bacterium associated with *Steinernema carpocapsae* in Korea. J. Asia-Pacific Entomol. 2: 105-111.
- 박영진. 김용균. 이영근. 한상찬. 1998. 곤충병원선충 (*Steinernema carpocapsae*)의 최적보관조건. 한토동지. 3: 10-16.

- Popiel, I. and E. M. Vasquez. 1991. Cryopreservation of *Steinernema carpocapsae* and *Heterorhabditis bacteriophora*. J. Nematol. 23: 432-437.
- Preik-Steinhoff, H., I. Eue and T. Trenzcek. 1992. Einsatz von FITC-markiertem LPS zur Funktionsanalyse der Hämocyten von *Galleria mellonella* und *Hyalophora cecropia*. Verh. Dtsch. Zool. Ges. 85: 213.
- Robertson, B. D. and T. F. Meyer. 1994. Genetic variation in pathogenic bacteria. Trends Genet. 8: 422-427.
- Scapagliati, G. and M. Mazzini. 1994. In vivo and in vitro phagocytosis by hemocytes of the stick insect *Bacillus rossius*. Boll. Zool. 61: 115-120.
- Stanley-Samuelson, D. W. 1994. Assessing the significance of prostaglandins and other eicosanoids in insect physiology. J. Insect Physiol. 40: 3-11.
- Strand, M. R. and L. L. Pech. 1995. Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. Annu. Rev. Entomol. 40: 31-56.
- Sun, S-C, B. Åsling and I. Faye. 1991. Organization and expression of the immunoresponsive lysozyme gene in the giant silk moth, *Hyalophora cecropia*. J. Biol. Chem. 266: 6644-6649.
- Taniai, I., K. Kadono-Okuda, Y. Kato, M. Yamamoto and M. Shimabukuro. 1995. Structure of two cecropin B-encoding genes and bacteria-inducible binding proteins which bind to the 5' upstream regulatory region in the silkworm, *Bombyx mori*. Gene 163: 215-219.
- Trenzcek, T., N. Fotiadis, T. Klänner, K. Ockroy and H. Preik-Steinhoff.

1994. The immune reaction of *Hyalophora cecropia* and *Galleria mellonella* against LPS. *Dev. Comp. Immunol.* 18S: 116 (Abstr.).
- Wago, H. 1991. Phagocytic recognition in *Bombyx mori*. In *Immunity of insects and other arthropods* (Ed. Gupta, A. P.), pp. 215-235. CRC Press, Boca Raton. FL.
- Webster, J. M., G. Chen and J. Li. 1998. Parasitic worms: An ally in the war against the superbugs. *Parasitol. Today.* 14: 161-163.
- Wiegand, C. 1995. Charakterisierung und erste Funktionsstudien eines Hämozytenproteins aus *Manduca sexta* mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers. MS thesis. Univ. Berlin.
- Wouts, W. M. 1981. Mass production of the entomogenous nematode *Heterorhabditis heliothidis* (Nematoda: Heterorhabdidae) on artificial media. *J. Nematol.* 13: 467-469.
- Xu, J., M. Nishijima, Y. Kono, K. Taniai, Y. Kato, K. Kadono-Okuda, M. Yamamoto, M. Shimabukuro, S. Chowdhury, S. K. Choi and M. Yamakawa. 1995. Identification of a hemocyte membrane protein of the silkworm, *Bombyx mori*, which specifically binds to bacterial lipopolysaccharide. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 25: 921-928.