

Galleria mellonella 유충을 이용한 곤충병원성 선충의 배양 조건

김도완·†박선호

계명대학교 화학재료공학부

(접수 : 1997. 8. 20, 게재승인 : 1997. 11. 11)

Culture Condition of Entomopathogenic Nematodes Using *Galleria mellonella* Larva

Do Wan Kim and Sun Ho Park†

School of Chemical Engineering & Materials Engineering, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea

(Received : 1997. 8. 20, Accepted : 1997. 11. 11)

A simple method for the *in vivo* production of third-stage infective juveniles(IJs) of *Steinernema glaseri* was developed. Using *Galleria mellonella* larvae, only IJs can be rapidly generated in adequate quantities for field application. The nematode inoculation concentration and incubation temperature were critically important. The most effective temperature for infectivity of *Steinernema glaseri* IJs to *Galleria mellonella* larvae was 33°C. However, the total number of nematodes harvested at 25°C about 66,000 IJs per larva was significantly greater than those at other temperatures. The optimal inoculation number of nematodes was 60 to 80 nematodes per host larva. The higher nematode inoculation concentration of 100 IJs per larva caused a rapid decrease in the total number of IJs harvested. As the inoculation medium pH increased, the number of IJs harvested increased and reached about 110,000 IJs per larva at pH 9.0. The pathogenicity of IJs was decreased by increasing the salt concentration in the medium.

Key Words : biological control, entomopathogenic nematodes, *Steinernema* spp., *Galleria mellonella*, *in vivo* production

서론

유기합성 농약 일변도의 해충방제는 농작물의 농약 성분의 잔류, 농약 저항성 해충의 출현 등으로 심각한 부작용을 낳고 있으며, 유기합성 농약의 단점을 개선할 수 있는 생물살충제에 대한 관심이 집중되고 있다.

최근 생물살충제로서 활발히 연구되고 있는 곤충병원성(entomopathogenic) 선충은 해충 사멸 능력이 뛰어나 뿐 아니라 대량 배양이 용이하며 장기간 보존이 가능하고 토양 속이나 물 속 등과 같이 화학적 농약이나 병원 미생물의 침투가 곤란한 환경에서도 효과를 잘 발휘하는 것으로 알려져 있다(1). 곤충병원성 선충 중 특히 Rhabditida 목의 Steinernematidae와 Heterorhabditidae 과의 선충은 공생 박테리아인 *Xenorhabdus* spp.와 함께 해충의 입, 항문, 기문 등을 통해 숙주의 혈장에 침투하여 공생 박테리아에 의해 24~48시간내에 해충을 치사시키며 또한 선충 증식에 필요한 영양소도 제공하게 된다(2).

Kaya 등(3)은 *Steinernema*와 *Heterorhabditis* 종의 곤충병

원성 선충의 life-cycle, *Steinernema* spp. 선충의 증식과 수확, 저장 방법(4), *Steinernema* spp.의 생육 환경에 대한 연구(5)를 보고하였다. 그런데, Baskaran 등(6)에 의하면 곤충병원성 선충은 대상 해충이나 환경에 따라 병원성 발현에 큰 차이를 보이는 것으로 나타났다. 특히 *S. carpocapsae*는 높은 온도(35°C) 보다 낮은 온도(5~25°C)에서 생육과 병원성 발현이 좋은 것으로 나타났고, *S. glaseri*는 15~35°C에서 활성 유지가 가장 좋은 반면 토양 수분이 감소하면 활성이 약해지는 것으로 보고되었다(7). 여러 곤충병원성 선충종에 따른 해충 방제에 대한 연구결과, 특히 감자 바구미 제거를 위해 *Steinernema*보다 *Heterorhabditis*가 병원성이 강한 것으로 나타났다(8). 감자와 대나무에 피해를 주는 바나나 나방(*Opogona sachari*) 구제를 위해서도 곤충병원성 선충 살포로 58~100%의 치사율을 보였으며(9), 아파트에 서식하는 독일바퀴 구제를 위해 *S. carpocapsae*를 접종하여 pot 내의 모든 바퀴벌레를 완전히 제거하였다(10).

한편, 국내의 *Steinernema*와 *Heterorhabditis* 종의 채집 결과(11-13), 499 개의 sample중 23 곳에서 검출되었는데 그 중 19 곳이 *Steinernema*, 4 곳이 *Heterorhabditis* 속으로 나타났다. 한편 선충의 환경적 분포는 산림 토양이 3.6%, 공원과 골프장 및 잔디밭이 3.7%, 농경지가 12.5%, 강가 12.5%, 해안지역 11.8% 등으로 우리나라 토양에 비교적 널리 분포하는 것으로 나타났다. 또한 국내에서 분리된 곤충병원성 선충을 농림해충에

† Corresponding Author : 1000 Shindang-dong, Dalseo-gu, Taegu 704-701, Korea

Tel : 053-580-5457, Fax : 053-580-5165

E-mail : PARK@KMUCC.KEIMYUNG.AC.KR

대해 병원성을 조사해 본 결과(14), 배추좀나방과 이화명나방에 *Steinernema* spp.와 *Heterorhabditis* spp를 각각 살포하여 높은 치사율을 보였다. 이들은 또한 오리나무 잎벌레와 골프장 굼벵이의 제거에도 그 효과가 인정되었다(15). 국내의 곤충병원성 선충들의 경우에도 온도에 민감하여 *Steinernema* GJ-1은 15~25°C에서 높은 병원성을 나타내었으나 30°C에서는 병원성이 전혀 없었으며 25°C에서 최고 유충당 약 1.9×10^4 마리가 증식되었다. 그러나, *Steinernema* CD-1의 경우에는 15°C에서 병원성이 전혀 없었고 30°C에서 가장 많이 증식되었다(16). 이상 살펴본 바와 같이 국내에서도 곤충병원성 선충을 이용한 해충 방제에 대한 기초 연구가 진행되고 있으나, 아직 생물살충제로 산업화하기 위한 대량 생산 기술에 관한 연구는 매우 미흡한 상태이다.

따라서 본 연구에서는 곤충병원성 선충을 이용한 무공해 생물 농약의 개발을 위하여 국내에 서식하고 있는 선충종 살충효과가 우수하고 증식 및 수확이 용이한 것으로 알려진 *Steinernema glaseri*를 예로하여 대량 배양방법을 확립하고, 생활사, 생육에 필요한 최적온도와 선충의 병원성 발현에 영향을 미치는 염 농도 및 pH 등의 영향을 조사하였으며 수확을 최대로 얻을 수 있는 선충의 집종량과 선충이 숙주곤충에 접종된 후 숙주곤충 내부에서의 증식과정을 조사하였다.

재료 및 방법

꿀벌부채명나방의 유충 및 배지조성

본 연구에서는 곤충병원성 선충을 *in vivo*로 배양하기 위해 꿀벌부채명나방(*Galleria mellonella*)의 3령 유충을 기주로 사용하였으며 꿀벌부채명나방 사료는 쌀겨와 밀을 각각 500g씩 혼합하고 Glycerin과 꿀을 200mL씩 넣은 후 Vitamin(제텐-씨, 한미약품공업) 0.8g, Yeast(드라이 이스트, 조흥화학공업) 분말 3.0g에 증류수 100mL를 첨가하였다. 꿀벌부채명나방의 알을 채집하여 조제 사료에 넣고 25°C incubator에서 약 25일간 배양하면 3령 유충으로 증식하게 된다.

선충 및 배양방법

본 연구에 사용된 선충은 *Steinernema glaseri* Dongrae strain으로 감염단계인 3령 선충(Infective Juvenile; IJ)을 경상대학교 농생물학과 선충 연구실로부터 분양 받았다. 꿀벌부채명나방의 유충을 이용한 선충의 *in vivo* 배양은 petri dish(15x90mm)에 여과지(φ90mm, Whatman No.1) 1장을 깔고 활성이 강한 IJ를 현탁 희석(200마리/mL)한 후 1mL씩 고르게 뿌려 여과지 전체를 적신 후 생체중량 180 ± 3 mg인 꿀벌부채명나방의 3령 유충 10마리를 넣어 꿀벌부채명나방 유충에 선충을 접종하였다(Fig.

1A). 그 후 petri dish의 수분을 유지한 상태로 25°C에서 5~7일간 배양하였다(18). IJ의 수확을 위해 petri dish(25x150mm)속에 시계침(φ70mm)를 놓고 여과지 1장을 증류수와 접촉할 수 있게 접은 후 그 위에 치사 유충 20마리를 올려 놓아 선충 수확용 white trap을 만들었다(Fig. 1B). trap 설치 3~4일경부터 약 10일 동안 수확 하였다. 순수한 선충 현탁액을 만들기 위해 수 차례 세정한 선충은 tissue culture flask(75cm², 250mL, Falcon)에 선충 현탁액의 깊이가 1cm가 넘지 않게 넣고 10°C 냉장고에 넣어 보관하였다. 실험에 사용하기 30분전에 실온에 꺼

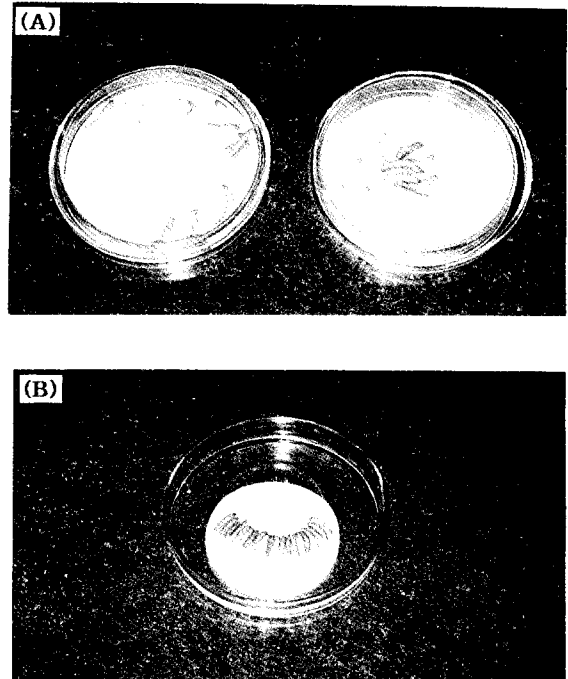


Figure 1. *In vivo* culture of *Steinernema glaseri*.

(A) Inoculation step

(B) White water trap for harvest

내 선충 활성을 회복시키고 eel worm counter(Advanced Equine Products, U.S.A.)로 현미경(x40) 하에서 선충수를 측정하였다.

온도의 영향

온도에 따른 곤충병원성 선충의 유충 치사 능력을 조사하기 위하여 petri dish(15x90mm)에 여과지(Whatman No.1)를 1장씩 깔고 꿀벌부채명나방 유충 10마리씩 넣은 다음, 17, 21, 25, 29, 33, 37°C에서 각 시험구에 대해 수확후 1주일 이내의 활성이 강한 IJ를 숙주유충당 0, 10, 30, 50, 100마리 농도로 각각 접종 하였다. 시간 경과에 따른 유충 치사율을 조사하기 위해 일정 농도에서 LT₅₀(median lethal time) 값과 집종 농도별 치사된 유충수를 조사하여 LD₅₀ (median lethal dose) 값을 구하였다.

또한, 유충 내부에서의 선충 증식 과정에 미치는 온도의 영향을 조사하기 위해 800마리 IJ/mL를 꿀벌부채명나방 유충 10마리에 접종 후 20, 25, 29, 33°C에 각각 보관하면서 시간이 경과함에 따른 선충의 증식 과정을 관찰하였다. 각 실험은 3회 반복하여 조사하고 통계처리는 Duncan's 방법을 사용하였다.

염 농도의 영향

염 농도가 선충의 활성과 병원성 발현 및 IJs의 수확량에 미치는 영향을 조사하기 위해 NaCl과 NaNO₃를 사용하였다. NaCl 농도를 1, 2, 5, 10% 변화시킨 후 활성이 강한 선충을 500마리/mL로 접종한 후 28°C, 150rpm으로 교반하면서 시간 경과에 따른 선충의 활성도를 조사하였다. 또한 선충이 생육 가능한 염(NaNO₃) 농도 범위인 0, 0.5, 1.0, 2.0%에 각각 선충 1,000마리/mL를 현탁시킨 후 3령의 유충 한 마리당 IJ 100마리를 접종하고 보습조건 하에서 유충 사멸 속도가 제일 빠른 33°C

incubator에 보관하였다. 12시간 이후 3시간 간격으로 유충 사멸을 관찰하여 LT_{50} 값을 조사하였고 유충이 모두 사멸된 후 $NaNO_3$ 농도를 변화시킨 각각의 white trap을 설치한 후 25°C incubator에서 시간 경과에 따라 유충 사체 10마리에서 수확되는 선충수를 비교하였다. 실험에 사용된 염 농도의 삼투압 측정 은 automatic Osmometer(Precision System, Inc., U.S.A.)를 사용하였다.

pH의 영향

pH가 선충에 미치는 영향을 조사하기 위해 활성이 강한 IJ를 pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0에서 각각 1,000마리/mL 정도의 현탁액을 만든 후 유충이 10마리씩 들어있는 petri dish에 접종하여 33°C에 보관하고 LT_{50} 값을 조사하였다. 유충이 모두 사멸된 후 pH를 변화시킨 각각의 white trap을 설치한 후 25°C incubator에서 시간 경과에 따라 숙주유충 10마리에서 나오는 선충 수확량을 비교하였으며 3회 반복으로 실험하였다.

선충 접종 농도와 접종 유충 시기의 영향

곤충병원성 선충의 최대 수확량을 얻기위한 IJ의 접종 농도를 찾기 위해 꿀벌부채명나방 3령 유충 1마리당 접종하는 선충의 농도를 10, 30, 40, 60, 80, 100마리가 되게 희석하여 접종하였고, petri dish당 숙주유충 10마리씩 공시하였다. 수분을 유지한 상태로 petri dish에서 25°C에서 배양하였고, 숙주유충 사멸후 white trap을 설치하고 최초 수확시점부터 유출되는 IJ 수를 조사하였다.

또한 일정한 선충 접종 농도에서 꿀벌부채명나방 유충의 접종시기 변화에 따른 선충 증식과 수확량을 조사하기 위해 생체중량 $180 \pm 3mg$ 인 3령 유충과 $250 \pm 3mg$ 인 4령 유충에 IJ 80마리씩 접종한 후 20°C incubator에 보관하고 유충 치사후 48시간 간격으로 유충 사체를 해부하여 선충 증식 과정을 조사하였다. 시험구 별로 3마리의 숙주유충을 해부하여 조사한 평균값을 구하였다.

결과 및 고찰

꿀벌부채명나방의 유충을 이용한 선충의 배양과 생활사

꿀벌부채명나방의 알을 채집한 trap에 유충 배지를 넣고 25°C incubator에서 약 25일간 배양한 결과 IJ를 접종하기에 적당한

20mm 정도 크기와 약 200mg의 3령 유충으로 증식하였다. 나방 1마리가 낳는 알의 수는 대체로 200개 정도이나 적절한 습도 유지를 해주지 않으면 말라 죽는 경우가 많으며 일단 알에서 깨어난 유충은 활성이 매우 강하고, 약 10일 경과되면 2령충이 된다. 2령충 이상의 유충이 되면 배지 소모량이 매우 많아지고 유충의 색깔은 배지 색에 의해 결정되어지는 것을 볼 수 있었다.

숙주유충은 치사된 후 3~4일이 경과되면 황갈색을 띠게된다. 시간 경과에 따라 유충 내부에서는 IJ가 증식하여 성충이 된 후 새로운 IJ의 수가 늘어남에 따라 유충 사체는 점차 연화되고 영양분이 부족해짐에 따라 IJ는 새로운 유충을 찾기위해 유충 사체에서 빠져나온 *S. glaseri*는 여과지 위에서 1번 탈피한 후 3-IJ로 증식하여 white trap의 증류수에 수확되었다.

*Steinernema glaseri*의 3-IJ가 꿀벌부채명나방 유충의 기문이나 항문으로 침입한 후, 숙주유충을 치사시키면 그 후 약 4일이 경과하면서 유충 내부에서는 둥근 모양의 선충 알이 보이기 시작하는데 일부 깨어나 1-IJ가 된 모습도 보여주고 있다(Fig. 2A). 10 μ m 정도의 1-IJ는 2-IJ로 증식한 후 1회 탈피하여 활성이 매우 강하고 새로운 유충을 탐색하여 치사시킬 수 있는 150 μ m 정도의 3-IJ 단계가 되고(Fig. 2B), 다시 한 번 탈피 후 암·수로 분화한 성충이 되었다(Fig. 2C). 이때 *Heterorhabditis*의 경우 자웅동체이므로 암·수 구분 없이 단 1마리라도 유충에 침입하면 번식이 가능하며, 때로 *S. glaseri* 종의 경우 암 성충 내부에서 알이 깨어나 2-IJ까지 증식한 후 성충 밖으로 빠져나오는 것이 관찰되는 경우도 있었다.

유충 내부에서의 선충의 증식 과정

Fig. 3는 온도에 따른 유충 내부에서의 선충 증식과정을 나타낸 것으로 IJ가 유충 내부에 침입한 후 유충을 치사시키고 선충이 교미 후 성충으로 증식하는데 약 3일 정도 소요되었다. 그 후 배란이 시작되어 25, 29°C에서 3일 이후부터 새로운 IJ가 보이기 시작하였으며, 20°C에서는 선충의 성충이 관찰된 후 4일 경과 시점에서 3-IJ가 출현하였고, 수확 기간도 29°C에 비해 72시간 정도 더 걸렸다. 33°C를 제외한 실험구의 전체 수확량을 비교해 보면 20, 25, 29°C에서 각각 4.1×10^5 , 4.5×10^5 , 3.1×10^5 IJ/larva로 나타났으며 온도가 높을수록 초기에 많은 수의 선충이 수확되는 반면 수확 종료 시간은 빠른 것으로 나타났다. 숙주유충 1마리당 최대 선충의 성충 수는 16마리 정도였으며 성충 1마리가



Figure 2. Life cycle during *in vivo* culture of *Steinernema glaseri*.

- (A) The eggs and secondt-stage juveniles(J2).(x1,000)
- (B) The third-stage juveniles(J3), which is often called the "Infective Juvenile(IJ)".(x100)
- (C) The adult stage : The progeny of the next generation form the new IJs.(x1,000)

생산하는 IJ 수는 25°C일 때 약 7,000마리 정도였으며, 20, 29°C에서 각각 5,000마리, 4,000마리 정도로 나타났다. 이상의 결과에서 일정농도의 선충을 숙주유충에 접종시킨 결과 IJ 수확량이 제일 많은 선충 증식의 최적 온도는 25°C였으며 33°C에서는 알에서 깨어난 후 IJ로 증식하지 못한 것으로 보아 30°C 이상에서 *S. glaseri*가 잘자라지 않는다는 연구결과와 일치하는 것으로

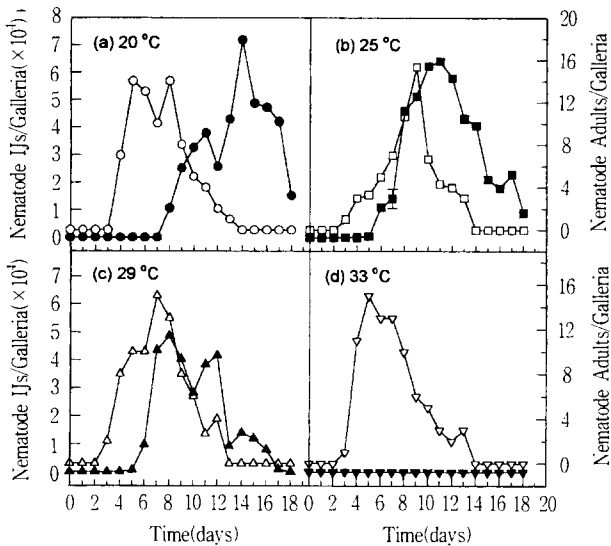


Figure 3. Effect of temperature on nematode growth at *in vivo* culture. (●- 20°C IJs, ■- 25°C IJs, ▲- 29°C IJs, ▼- 33°C IJs, ○- 20°C adults, □- 25°C adults, △- 29°C adults, ▽- 33°C adults, 180±3mg *G. mellonella* larva, inoculation concentration of 80 IJs per larva)

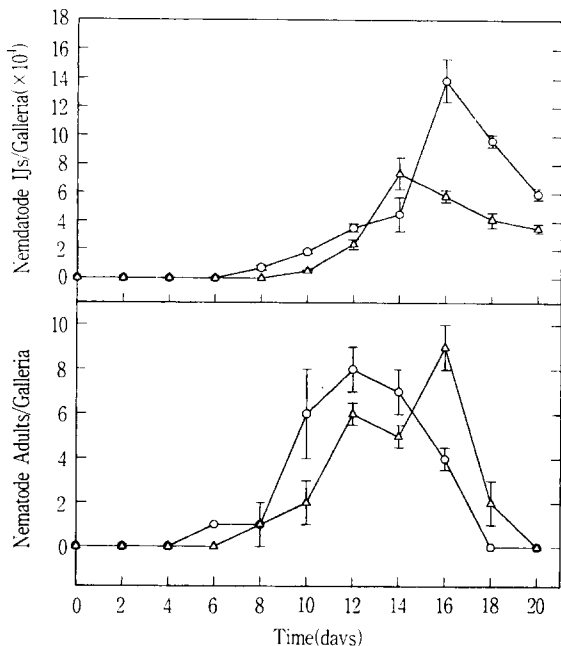


Figure 4. Effect of larval age on nematode growth. (○- 3-stage(180±3mg) *G. mellonella* larva, △- 4-stage(250±3mg) *G. mellonella* larva, 20°C, inoculation concentration of 80 IJs per larva)

밝혀졌다(16).

Fig. 4는 일정한 선충 접종 농도에서 꿀벌부채명나방 유충의 접종시기 변화에 따른 유충 내부에서의 선충 증식 곡선을 나타낸 것이다. 생체중량 180±3mg인 3령 유충의 경우 3-IJ 접종후 6일 경과 시점에서 처음으로 성충 1마리가 발견되었으며 8일 경과 후에서 IJ가 다수 발견되었으나 생체중량 250±3mg인 4령 유충에서는 4일 늦은 12일 경과 후부터 IJs가 처음 발견되었다. 유충 1마리당 최대 성충수는 9마리로 비슷하였으나 최대 성충수에 도달하는데 소요되는 시간은 4령 유충이 4일 정도 늦었으며, 수확된 전체 선충수를 비교해 보면 3령 유충의 실험구에서 4x10³마리 정도로 4령 유충에 비해 수확량이 많은 것으로 나타났다. 성충 한 마리가 생산하는 IJ의 수를 비교해 보면 4령 유충이 약 9x10³마리였는데 비해 3령 유충에서는 약 1.5x10⁴마리로 나타났다. 이 결과는 선충이 꿀벌부채명나방 3령 유충에는 비교적 효과적으로 작용하여 병원성을 발현하고 증식하여 수확량이 많았지만 탈피를 준비하는 4령에서는 선충에 대한 저항성이 강해지고 유충의 표피가 딱딱해져서 사멸시간이 지연되고 선충의 활성화 감소하며 증식속도 또한 늦어져 수확량이 줄어드는 것으로 사료된다.

선충의 병원성 및 증식에 미치는 영향

각각의 온도에서 접종하는 선충 농도를 변화시킨 후 시간 경과에 따른 꿀벌부채명나방 유충에 대한 선충의 LT₅₀, LD₅₀ 값을 Table 1에 나타내었다. 17°C와 37°C에서는 모든 접종 농도에서 병원성을 나타내지 않았으며, 33°C에서 평균 LT₅₀ 값이 약 20시간으로 가장 빠른 치사속도를 보였는데 그 이유는 고온의 영향으로 숙주유충의 생리 활성 저하와 공생박테리아의 확산속도 증가 때문인 것으로 판단되며, 같은 온도에서 IJ의 접종 농도를 변화시킨 결과 유충당 선충을 100마리로 접종했을 때가 10마리 접종 농도 구에 비해 LT₅₀ 값이 최대 5시간 이상 단축된 것으로 보아 유충당 선충 접종 농도가 높을수록 치사속도는 빨랐으나 IJ의 수확 측면을 고려하여 100마리 이상 증가시켜 실험하

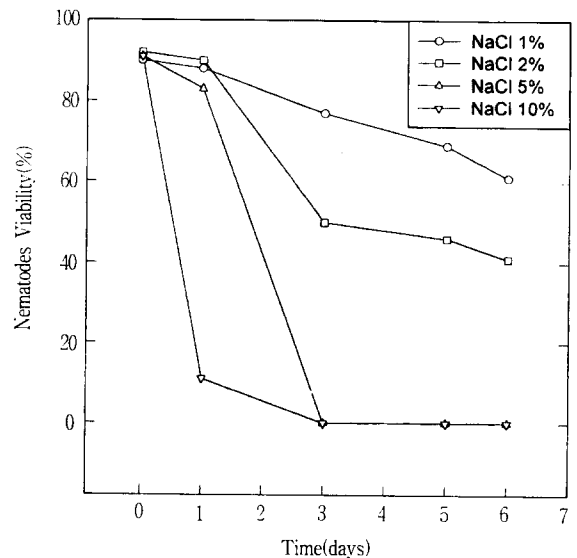


Figure 5. Viability of nematodes at various NaCl concentrations.

Table 1. Infectivity of *Steinernema glaseri* infective juveniles to *Galleria mellonella* larvae.

Temperature	21°C				25°C			
Nematodes/larva	10	30	50	100	10	30	50	100
LT ₅₀ ¹⁾ (hr)	47.5±1.4 ³⁾	43.9±0.9	40.2±2.5	34.6±3.1	37.6±1.9	32.0±1.6	27.0±3.2	25.5±1.0
LD ₅₀ ²⁾ (Nematodes)	42.0±3.8				36.0±6.5			
Temperature	29°C				33°C			
Nematodes/larva	10	30	50	100	10	30	50	100
LT ₅₀ (hr)	25.0±1.8	23.3±1.3	21.3±2.6	20.5±5.5	23.4±1.6	20.1±2.6	18.7±1.3	17.3±5.4
LD ₅₀ (Nematodes)	22.0±7.0				26.0±7.0			

1) LT₅₀ : median lethal time, 2) LD₅₀ : median lethal dose, 3) : mean±SE

Table 2. Effect of salt concentration on the *G. mellonella* mortality and the total number of *S. glaseri* infective juveniles harvested. (Nematodes / 10 larvae)

Salt Conc.	LT ₅₀ (hr) ±SE	Number of IJs Harvested(x10 ⁴)±SE					Total Number of IJs Harvested±SE*
		2day	4day	6day	8day	10day	
0 %	13.8±1.0	117±22	687±98	157±8	33±2	10±2	1,004±372a
0.5 %	14.8±1.0	134±18	400±14	100±11	65±7	46±0.1	745±25b
1.0 %	16.5±0.7	90±8	425±19	115±13	81±4	50±5	760±17b
2.0 %	17.9±1.7	28±9	24±6	141±16	471±141	80±4	744±39b

* : Number of IJs followed by the same letters are not significantly different(P<0.05) according to Duncan's multiple range test.

지는 않았다. 그러나, 실제 포장에서의 해충방제 실험에서는 각종 요인에 의해 영향을 받기 때문에 더 높은 농도의 연구가 필요할 것으로 사료된다.

염의 농도가 선충의 활동 정도 즉, IJ가 유충에 침투할 수 있는 능력인 활성에 미치는 영향을 Fig. 5에 나타내었는데, 7일 경과 때까지 NaCl 농도 1%(삼투압 301mOsm/kg · H₂O)에서는 55% 이상의 강한 활성을 유지하였으나 2%(삼투압 668mOsm/kg · H₂O)에서는 45%의 생존율을 보였으며, 활성은 매우 저하되었다. 또한 5%(삼투압 1537mOsm/kg · H₂O)와 10%의 NaCl 농도에서는 선충을 투입하는 즉시 사멸되었다. 또한 Table 2는 선충이 생육 가능한 염 농도 범위에서 농도 변화에 따른 선충의 병원성 발현과 수확량을 비교한 결과이다. 2% NaNO₃일 때 LT₅₀ 값이 약 18시간으로 염이 전혀없는 증류수에 비해 4시간 정도 오래 걸렸으며 선충에 의해 감염된 유충 사체를 각각의 염 농도에서 white trap을 설치한 후 시간 경과에 따른 선충의 수확량을 비교한 결과 0.5% 이하의 농도에서는 trap 설치후 4일 이내인 수확 초기에 전체 수확량의 70% 이상이 수확된데 비해 2% 농도에서는 trap 설치후 8일 경과 시점에서 가장 많은 IJ가 수확되었다. 수확된 전체 선충수는 증류수에서 약 1x10⁶마리였

으나 염이 포함된 실험구에서는 약 7.5x10⁵마리 정도로 수확량이 줄어든 것으로 보아 삼투압의 증가가 선충의 활성이나 병원성에 매우 중요하며 또한 증식 속도를 지연시킨 것으로 사료된다. 이러한 결과는 액체배지중의 삼투압 측정 실험에서 선충이 삼투압 400mOsm/kg · H₂O 이상일 때 활성이 급격히 감소하는 결과와 일치하였다.(data not shown)

pH 변화가 선충 생육에 미치는 영향을 Table 3에 나타내었다. pH 4.0에서 9.0까지의 모든 영역에서 LT₅₀ 값은 약 17시간으로 비슷하게 나타났으며 선충에 감염된 유충 사체 10마리에서 수확된 선충수를 비교해 본 결과 모든 pH 범위에서 비슷한 수의 IJ가 수확되었으나 약 알칼리성인 pH 8.0과 9.0에서 수확량이 약 2x10⁴마리 정도 증가한 것으로 보아 선충의 병원성은 pH의 영향을 별로 받지 않으나 선충 증식의 최적 pH는 약알칼리성으로 나타났다. 이 결과는 선충 증식에 필수 영양소를 제공하는 공생 박테리아가 약알칼리성에서 최적 성장조건을 보이는 것과 관련이 있으며 선충의 인공 액체배양 연구(17)에서 알려진 조건과 일치하는 것으로 밝혀졌다.

선충 접종 농도가 유충 내부에서의 선충 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 꿀벌부채명나방의 유충 10마리당 수확되는

Table 3. Effect of pH on the *Galleria mellonella* mortality and the total number of *Steinernema glaseri* infective juveniles harvested. (Nematodes / 10 larvae)

pH	LT ₅₀ (hr) ±SE	Number of IJs Harvested(x10 ³)±SE					Total Number of IJs Harvested±SE*
		2day	4day	6day	8day	10day	
4.0	18±3.4	0	494±26	100±21	50±2	7±0.1	651±15d
5.0	18±2.5	0	381±28	173±12	53±2	7±0.2	614±24e
6.0	18±0.6	0	640±14	100±14	10±2	5±1	754±25c
7.0	17±2.0	5±0.3	433±21	126±12	100±2	67±16	730±102bc
8.0	17±4.5	79±8	368±23	274±19	200±43	75±6	997±200b
9.0	17±3.0	87±15	520±96	309±71	150±16	40±9	1,106±246a

* : Number of IJs followed by the same letters are not significantly different(P<0.05) according to Duncan's multiple range test.

Table 4. Effect of nematode inoculation concentration on the total number of *Steinernema glaseri* infective juveniles harvested at 25°C using 10 larvae of *Galleria mellonella*.

Inoculation Conc. (Number of IJs per larva)	Number of IJs Harvested(x10 ³)±SE							Total Number of IJs Harvested ±SE*
	1~5 day	6 day	7 day	8 day	9~10 day	11~13 day	14~15 day	
10	8±0.3	26±3	0	0	130±22	0	0	164±13
30	29±2	150±29	76±3	0	0	0	0	255±11
40	56±4	255±11	66±5	24±3	0	990±78	0	401±16
60	204±28	6±1	22±3	95±4	63±5	46±9	4±1	439±23
80	36±6	230±14	66±3	318±13	11±3	0	0	661±109
100	2±0.2	59±3	0	0	1±0.4	0	0	63±2

* : Number of IJs followed by the same letters are not significantly different(P<0.05) according to Duncan's multiple range test.

선충수를 조사하여 Table 4에 나타내었다. 대체로 유충 1마리당 접종된 선충 수가 증가할 수록 수확되는 선충수도 증가하였다. 유충 1마리당 접종하는 선충 농도가 80마리인 경우는 6.6x10³마리 10마리를 접종한 경우에 비해 4배 이상 더 많이 수확되었으며 모든 실험구에서 수확 개시 6일 이내에 전체 수확량의 50% 이상이 수확되었으나 100마리를 접종한 경우 오히려 수확된 선충수가 급격히 줄어들었는데 그 이유는 선충 접종 농도가 너무 높으면 선충끼리의 경쟁 관계 형성과 영양성분의 부족 때문인 것으로 사료된다.

요 약

유기합성 농약의 단점을 극복하고 각종 환경 규제에 능동적으로 대처할 수 있는 새로운 무공해 생물 농약의 개발로 곤충병원성 선충이 최근 주목 받고 있다. 곤충병원성 선충은 넓은 기주 범위와 뛰어난 기주 탐색 능력이 있어 해충을 빠른 속도로 치사시키고 대량 배양이 용이하고 장기간 보관할 수 있는 장점이 있다. 국내에 서식하고 있는 *Steinernema glaseri* 선충을 꿀벌부채명나방 유충에 접종하여 *in vivo* 대량 배양 기술을 위한 최적 조건을 찾는 실험 결과 33°C, 100마리/유충 접종구에서 최적 치사율을 보였으나 17°C와 37°C에서는 병원성 발현이 전혀 없었

다. 꿀벌부채명나방 유충 1마리당 최대 수확 선충량은 25°C 선충 접종 농도 80마리일 때 6.6x10³마리였으며, 유충 내부에서의 선충 증식 속도도 접종 농도가 40~80마리 범위에서 증가한 반면 유충에 대한 접종시기는 3령 유충이 4령 유충에 비해 선충에 효과적으로 작용하여 수확 선충수가 1.8배 정도 증가하였다. pH 변화는 선충의 유충 사멸 능력에는 영향을 미치지 못했으나 pH 9.0에서 가장 좋은 증식을 보였다. 염은 선충 생육에 약 영향을 미쳐 증류수에 비해 40% 정도 수확이 감소하였다.

감 사

본 연구는 1996년도 교육부 학술연구조성비(생물화학공학)에 의해 수행된 결과이며, 이에 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

1. 박선호, 김도완 (1997), 곤충병원성 선충을 이용한 무공해 생물 농약(총설), *한국생물공학회지*, 12(3), 261-268.
2. Poinar, G. O. Jr. (1986), *Entomophagous Nematodes*, in : *Biological Plant and Health Protection*, pp.95-127, G. Fischer, New York.

3. Kaya, H. K. and L. W. Jennifer (1988), Steinernematid and Heterorhabditid Nematodes : A Handbook of Techniques, Southern Cooperative Series Bulletin 331 a Publication of the Nematode Subcommittee of the Southern Regional Project S-135 Entomopathogens for Use IMP Systems, pp.7-12.
4. Lindegren, 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**(2), 193-197.
5. Kung, S. P. and R. Gaugler (1991), Effects of Soil Temperature, Moisture, and Relative Humidity on Entomopathogenic Nematode Persistence, *J. Invertebrate Pathology*, **57**, 242-249.
6. Baskaran, R. K. M., C. V. Sivakumar, and M. S. Venugopal (1994), Biocontrol Potential of Native Entomopathogenic Nematodes in Controlling Red Hairy Caterpillar (*Amasacta albistriga*)(Lepidoptera : Arctiidae) of Groundnut(*Arachis hypogaea*), *Indian Journal of Agricultural Sciences*, **64**(9), 655-657.
7. Mracek, Z. and J. M. Webster (1993), Survey of Heterorhabditidae and Steinernematidae (Rhabditida, Nematoda) in Western Canada, *J. Nematol.*, **25**(4), 710-717.
8. Catharine, M. M. and R. K. Jansson (1992), Comparison of Ten Entomopathogenic Nematodes for Control of Sweetpotato Weevil (Coleoptera : Apionidae), *J. Economic Entomology*, **85**(5), 1642-1650.
9. Pena, J. E., W. J. Schroeder, and L. S. Osborne (1990), Use of Entomopathogenic Nematodes of the Families Heterorhabditidae and Steinernematidae to Control Banna Moth (*Opogona sachari*), *Nematropica*, **20**(1), 51-55.
10. Appel, A. G., E. P. Benson, J. M. Ellenberger, and S. A. Manweiler (1993), Laboratory and Field Evaluation of an Entomogenous Nematode (Nematoda : Steinernematidae) for German Cockroach (Dictyoptera : Blattellidae) Control, *J. Economic Entomology*, **86**(3), 777-784.
11. 추호렬, 김준범, 이동운 (1996), 한국산 곤충병원성 선충과 *Steinernema* 속의 검색표, *한국토양농물학회지*, **1**(1), 28-36.
12. 김준범, 박지두, 김철수 (1995), 한국산 곤충기생성 선충의 분포 및 병원성, *산림과학논문집*, **51**, 74-79.
13. 이상명, 이동운, 추호렬 (1996), 남부지방에서 곤충병원성 선충과 곤충병원성 곰팡이의 분리, *산림과학논문집*, **53**, 110-116.
14. 추호렬, 이상명, 정부근, 박영도, 김형환 (1995), 한국산 곤충병원성 선충(Steinernematidae와 Heterorhabditidae)의 지역 농림 해충에 대한 병원성, *한국응용곤충학회지*, **34**(4), 314-320.
15. 허진 (1996), "곤충병원성 선충 Steinernematid와 Heterorhabditid 및 곤충병원성 곰팡이 *Beauveria brongniartii*를 이용한 고프장 굼벵이의 생물적 방제", 석사학위논문, 경상대학교.
16. 이상명, 이동운, 추호렬 (1996), 남부지방 산림 토양에서 분리된 곤충병원성 선충 *Steinernema* spp.의 증식과 병원성, *산림과학논문집*, **53**, 117-123.
17. Kaya, H. K. and R. Gaugler (1993), Entomopathogenic Nematodes. *Annu. Rev. Entomol.*, **39**, 181-206.