韓應昆誌 38(2): 123~128 (1999)
Korean J. Appl. Entomol.

곤충병원성 선충 *Steinernema* spp.의 산소 요구도 특성

Characteristics of the Oxygen Uptake Rate of Entomopathogenic Nematodes *Steinernema* spp.

김도완 · 박선호
Do Wan Kim and Sun Ho Park

Abstract - Recently, entomopathogenic nematodes have received a considerable attention as biological control agents. For *in vitro* cultivation, storage and transportation of nematodes, oxygen supply is extremely impotant due to its limited solubility and mass transfer problem. The oxygen uptake rates (OURs) of four different *Steinernema* species were measured in a 5L bioreactor at varying temperatures. The OURs of the *Steinernema* spp. were below 0.5×10^{-3} mmolO_2/L · min in the range of 13~17°C. The OURs (mmolO_2/L · min) of *S. glaseri* Dongrae and *S. carpocapsae* Pocheon strains were 0.4×10^{-2}, 0.75×10^{-2} at 21°C, 1.5×10^{-2}, 3.2×10^{-2} at 25°C, and 2.8×10^{-2}, 5.8×10^{-2} at 29°C, respectively. However, the OURs were not significantly altered by the agitation speed of 50~150 rpm. The specific oxygen uptake rates (q_{O_2}) of *S. glaseri* NC, *S. glaseri* Dongrae, *S. glaseri* Mungyeong and *S. carpocapsae* Pocheon strains were 0.3×10^{-8}, 0.5×10^{-9}, 0.3×10^{-9}, and 0.2×10^{-9} mmolO_2/cell · min at 25°C, respectively. As the nematode size and temperature were increased, the q_{O_2} was also increased.

Key Words - Entomopathogenic nematodes, Oxygen uptake rate, *Steinernema* spp., Storage, Mass culture

초 록 - 최근 곤충병원성 선충은 생물학적 살충제로서 크게 주목을 받고 있다. 이러한 곤충병원성 선충의 *in vitro* 배양, 저장, 수송 과정에서는 낮은 용해도와 물질전달 문제 때문에 적절한 산소 공급이 매우 중요하다. 4종의 서로 다른 *Steinernema* 곤충병원선충에 대하여 5L 생물반응기를 이용하여 온도를 변화시키면서 산소 요구도(OUR)들을 측정하였다. 13~17°C 범위에서는 모든 *Steinernema*종의 산소 요구도는 0.5×10^{-3} mmolO_2/L · min 이하였다. *S. glaseri* Dongrae와 *S. carpocapsae* Pocheon의 경우 산소요구도(mmolO_2/L · min)는 21°C에서는 각각 0.4×10^{-2}와 0.75×10^{-2}, 25°C에서는 1.5×10^{-2}와 3.2×10^{-2}, 29°C에서는 2.8×10^{-2}와 5.8×10^{-2}였다. 그러나 50~150 rpm의 교반속도에서는 산소 요구도의 변화가 그다지 크지 않았다. *S. glaseri* NC, *S. glaseri* Dongrae, *S. glaseri* Mungyeong 그리고 *S. carpocapsae* Pocheon종의 비산소 요구도(qo_2)는 25°C에서 각각 0.3×10^{-8}, 0.5×10^{-9}, 0.3×10^{-9}, 그리고 0.2×10^{-9} mmolO_2/cell · min였다. 곤충병원성 선충의 크기와 온도가 증가됨에 따라 qo_2 또한 증가하였다.

검색어 - 곤충병원성 선충, 산소 요구도, *Steinernema*종, 보관, 대량배양

곤충병원성 선충은 나비목, 딱정벌레목, 메뚜기목 등 기주 범위가 넓고 강한 병원성을 유발하여 기주에 침입 후 24~48시간내에 해충을 치사시키는 것으로 알려져 있으며, 대량 배양이 가능하고 장기간 보관할 수 있는 장점과 화학적 농약이나 병원 미생물의 침투가 곤란한 해충의 서식처에도 효과적인 침투가 가능하여 최근 생물농약으로 주목 받고 있다(Park and Kim, 1997). 이들 곤충병원성 선충중에서 생물농약으로 활

계명대학교 화학 · 재료공학부(School of Chemical Engineering & Materials Engineering, Keimyung University, 1000 Shindang-dong, Dalseo-gu, Taegu 704-701, Korea)

발히 연구되고 있는 것은 Rhabditida목의 Steinernematidae와 Heterorhabditidae과이다. 이들 선충은 공생 박테리아인 *Xenorhabdus* spp.를 체내에 가지고 해충의 입, 항문, 기문 등을 통해 해충 혈장에 침투하여 공생 박테리아 독소에 의해 해충을 치사시킨다. 선충은 공생 박테리아를 영양원으로 이용하여 성장, 산란하며 알이 부화하여 2령의 병원성 유충(Infective Juvenile, IJ)이 되고, 3령의 IJ(3-IJ)가 되면 해충 사체에서 빠져나와 새로운 기주 해충을 찾아 침범한 후 번식하는 생활사를 갖는다(Poinar, 1986).

곤충병원성 선충을 상업화된 생물농약 제품으로 대량 생산하기 위해서는 생물 반응기를 이용한 액체배양방법이 요구된다. 일반적인 호기성 미생물의 세포 배양기에서와 마찬가지로, 고농도 선충 배양을 위해서는 산소전달(oxygen transfer)속도가 산소소비(oxygen uptake)속도보다 높게 유지되는 것이 중요하다. 그러나 산소는 물에 대해 용해도가 매우 낮고(6~8 ppm), 선충 또한 shear rate에 매우 민감하기 때문에 총괄산소전달계수(overall oxygen transfer coefficient)를 높이기 위해 생물 반응기의 교반속도를 높이는데는 한계를 보이고 있다. 또한 선충의 생활사에 따라서 산소요구도도 크게 달라지는데, 유충을 배양하는 동안 산소공급은 5 mmol/hr를 유지하는데 비해 성충으로 증식하거나 암컷 성충이 알을 놓을 때는 최대 20 mmol/hr까지 산소를 공급해 주어야 한다(Friedman *et al.*, 1991). 즉 선충의 성장시기에 따라 산소요구도가 크게 달라지며, 또한 선충의 수확 후 보관 온도에 따라 활성과 병원성을 적절히 유지하기 위해서는 선충의 산소요구도를 정확히 측정하여 적정량의 산소를 공급해 주는 것도 매우 중요하다. 선충의 저장·수송에는 산소가 용존된 물(Dutky *et al.*, 1964)이나 공기가 공급되는 상태의 물(Bedding and Miller, 1981), tissue culture flask내에 0.1% formalin(Bedding, 1984)을 넣거나 수분을 함유한 polyurethane sponge(Hara *et al.*, 1981) 등이 사용되었다. 그러나 이런 방법은 저장 용기의 부피가 너무 크거나 부가적인 시설이 필요하여 실용화가 어려운 현실이다. 이상적인 곤충병원성 선충의 상업적 저장과 수송은 수분이 없는 상태로 농축하는 방법으로 이때 선충의 활성은 온도 변화에 따라 산소요구량이 달라지게 된다. 따라서 본 연구에서는 병원성과 활성이 강한 것으로 알려진 곤충병원성 선충중 4종의 *Steinernema* spp.에 대하여 생물 반응기에서 산소요구도를 각각 온도별, 교반속도별로 측정하고, 선충의 종류에 따른 산소요구도의 차이를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 곤충병원성 선충

본 연구에 사용한 곤충병원성 선충인 *Steinernema* spp. 4종 선충은 경상대학교 농생물학과 선충 연구실로부터 분양받아 꿀벌부채명나방(*Galleria mellonella*)의 노숙 유충에 접종하여 누대배양한 것을 사용하였다(Kim and Park, 1998). 본 실험에서는 선충의 3-IJ 단계를 수확하기 위해 활성이 강한 3-IJ를 꿀벌부채명나방 유충 당 약 80마리 정도로 접종한 후 25°C incubator에서 8일간 배양하였다. 서로 다른 4종의 선충을 같은 조건에서 증식시킨 후 실험에 사용하기 위해 유충에 접종된 3-IJ가 성충으로 증식한 후 유충 내부에서 새로운 3-IJ로 증식된 것을 확인 후 80마리의 유충 사체를 해부하여 실험에 사용하였다. 실험에 사용한 선충의 수는 *S. glaseri* Dongrae strain 2,100마리/mL, Mungyeong strain 5,300마리/mL, NC strain 1,000마리/mL, *S. carpocapsae* Pocheon strain 5,000마리/mL로 유충 한 마리당 수확량이 서로 다른 것은 각 선충의 크기와 증식 정도가 서로 다르기 때문이다.

2. 산소요구도의 측정 방법

곤충병원성 선충의 산소요구도의 측정은 5L-Jar Fermentor(KFC, Korea)를 사용하였으며 용존산소농도(Dissolved Oxygen; D.O.)와 교반속도, 온도는 컴퓨터를 이용하여 자동적으로 조절되며 모든 데이터는 컴퓨터에 저장되도록 하였다(Fig. 1). 배양기에 증류수 2 L를 넣고 50 rpm으로 연속 교반하면서 공기를 유입하여 용존산소를 60%로 유지하였다. 유충 사체를 해부하여 3-IJ 선충을 접종한 후 공기 공급을 중단하여 Oxygen Uptake Rate(OUR) 값을 측정하고 용존산소 값이 30%에 도달하면 다시 공기를 공급하여 60%를 유지시킨 후 반복 실험을 실시하였다. 각 선충에 대한 산소요구도 측정중 선충과 공생 박테리아의 수는 유충을 해부하여 배양기에 투입한 후 13°C에서부터 29°C까지 4°C씩 승온시켜 산소요구도를 측정한 후 일정량의 배양액을 분취하여 조사하였다. 선충의 수는 Eel Worm Counter(Advanced Equine Products, U.S.A.)를 사용하여 측정하였고, 공생 박테리아는 NA 배지(Peptone from meat 5.0 g, Meat extract 3.0 g, Agar 12.0 g, D.W. 1 L) 평판에 도말한 후 28°C incubator에서 48시간 배양 후 형성된 colony 수를 계수하였으며, 모든 실험은 3회 반복한 후 평균값을 취하였다. 또한 일정 온도에서 같은 양의 선충 현탁액을 만든 후 교반속도를 50, 100, 150 rpm으로 변화시킨 후 산소요구도를 측정하였다.

3. 온도에 따른 산소요구도 조사

각 선충의 온도 변화에 따른 산소요구도를 조사하기 위해 유충 사체 내부에서 3-IJ가 증식한 것을 확인한 후 유충 사체 80마리를 해부하여 용존산소 값을

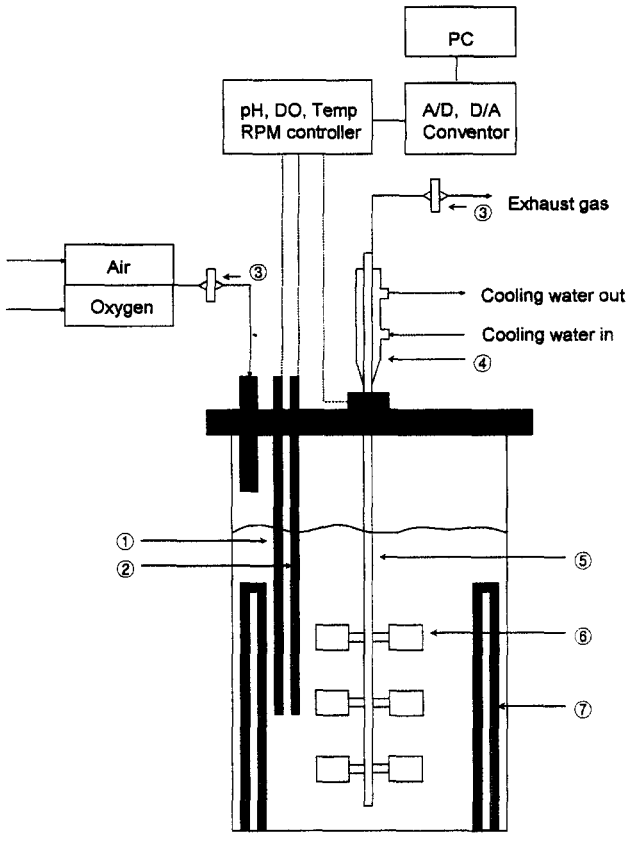

Fig. 1. A schematic diagram of the bioreactor system for measurement of oxygen uptake rate of entomopathogenic nematodes (1; pH probe, 2; dissolved oxygen probe, 3; filter, 4; condenser, 5; shaft, 6; impeller, 7; baffle).

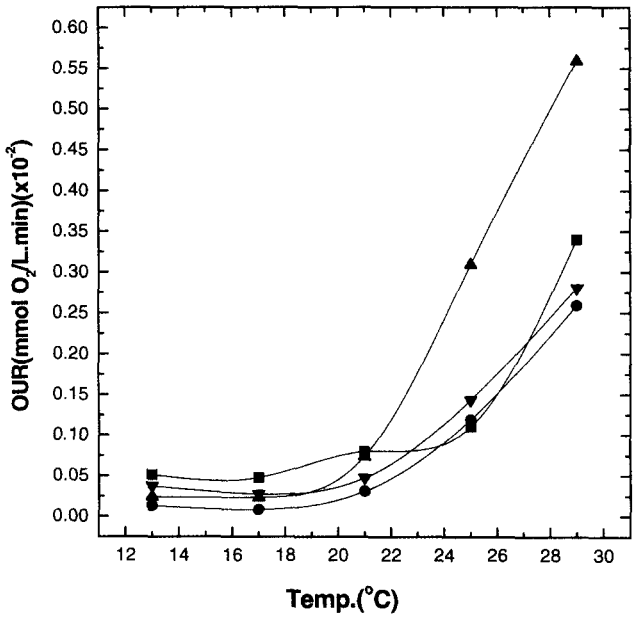

Fig. 2. Effect of temperature on oxygen uptake rate of nematodes (■; *S. carpocapsae* Pocheon strain, ●; *S. glaseri* Mungyeong strain, ▲; *S. glaseri* NC strain and ▼; *S. glaseri* Dongrae strain).

보정한 배양기에 증식한 선충을 투입하였다.

산소요구도를 측정하기 위해 먼저 곤충병원성 선충을 수확 후 보관하는 온도로 알려진 10°C보다 약간 높은 13°C부터 17°C, 21°C, 25°C, 29°C로 4°C씩 승온시켜 산소요구도를 측정하였다. 25°C는 선충 배양의 최적 온도로, 29°C는 공생 박테리아 배양의 최적 온도와 유사한 온도이다.

4. 산소요구도 계산 방법

생물 배양기에서 미생물에 의한 산소소비속도는 dynamic method (Pauline, 1995) 방법을 많이 사용한다. 배양기내의 산소에 대한 물질수지식은 다음과 같이 표시될 수 있다.

$$\frac{dC_L}{dt} = (k_La)(C_L^* - C_L) - OUR \quad (1)$$

여기서 (k_La)는 기체-액체 경계면의 총괄산소전달계수이며, $(C_L^* - C_L)$는 액중 포화산소와 실제 산소 농도차, OUR은 산소요구도를 나타낸다. 본 연구에서는 공기 공급을 차단한 후 일정 부피에서 미생물이 소비하는 산소량을 측정하였기 때문에 $(k_La)(C_L^* - C_L)$ 즉, 산소전달속도 (oxygen transfer rate; OTR)는 0이 된다.

$$OUR = -\frac{dC_L}{dt} \quad (2)$$

따라서, 식 (2)에서 시간 경과에 따른 용존산소변화를 plot하여 기울기 (%/min)로부터 $OUR(mmolO_2/L \cdot min)$ 값을 계산하였다. 각 온도에서 선충의 OUR 값을 선충농도로 나누어 주면 선충 한 마리가 소비하는 비산소소비속도 (specific oxygen uptake rate)인 q_{O_2} $(mmolO_2/cell \cdot min)$를 구할 수 있다.

$$OUR(mmolO_2/L \cdot min) = q_{O_2}(mmolO_2/cell \cdot min) \cdot X(cell/L) \quad (3)$$

식 (3)을 이용하면 단위부피당 선충농도 변화에 따른 최적 산소 공급량을 예측할 수 있으므로 곤충병원성 선충의 액체배양에 필요한 배양기의 크기와 선충농도, 대량배양된 선충의 장기간 보존 및 수송에 필요한 산소량 등을 계산할 수 있다.

결과 및 고찰

1. 온도에 따른 곤충병원성 선충의 산소요구도

실험에 사용한 선충은 *Steinernema glaseri* 종인 Dongrae, NC, Mungyeong strain과 *Steinernema carpocapsae* 종인 Pocheon strain 등의 4종이었으며 13, 17, 21, 25, 29°C 각각의 온도에서 산소요구도를 측정한 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 13~21°C에서는 OUR이 0.5×10^{-3} mmolO_2/L · min로 비교적 일정하게 나타났으나 25°C에서는 급격히 산소요구도가 증가하여 *S. glaseri* NC strain의 경우 17°C때보다 13배, *S. glaseri* strain은 9배, *S. glaseri* Dongrae strain와 *S. carpocapsae* Pocheon strain의 경우 3배와 2.4배 정도 더 많이 요구하는 것으로 나타났다. 이러한 현상은 29°C의 경우 더욱 뚜렷하게 나타나 *S. glaseri* NC strain의 OUR은 0.57×10^{-2} mmolO_2/L · min로 매우 높았고, *S. carpocapsae* Pocheon strain은 0.34×10^{-2} mmolO_2/L · min, *S. glaseri* Dongrae, Mungyeong strain은 각각 0.28×10^{-2}, 0.26×10^{-2} mmolO_2/L · min의 순서로 나타났다. 특히 곤충병원성 선충의 배양온도인 25°C 근처에서 산소요구도가 매우 급격히 변화하는 것으로 나타났는데 이는 *S. feltiae*의 경우 온도 변화에 따라 산소소비속도가 증가한 연구(Linaegren *et al.*, 1986) 결과와 일치하였다. 한편 선충 저장 온도인 10°C에서의 산소요구도는 $0.1\sim0.3\times10^{-3}$ mmolO_2/L · min

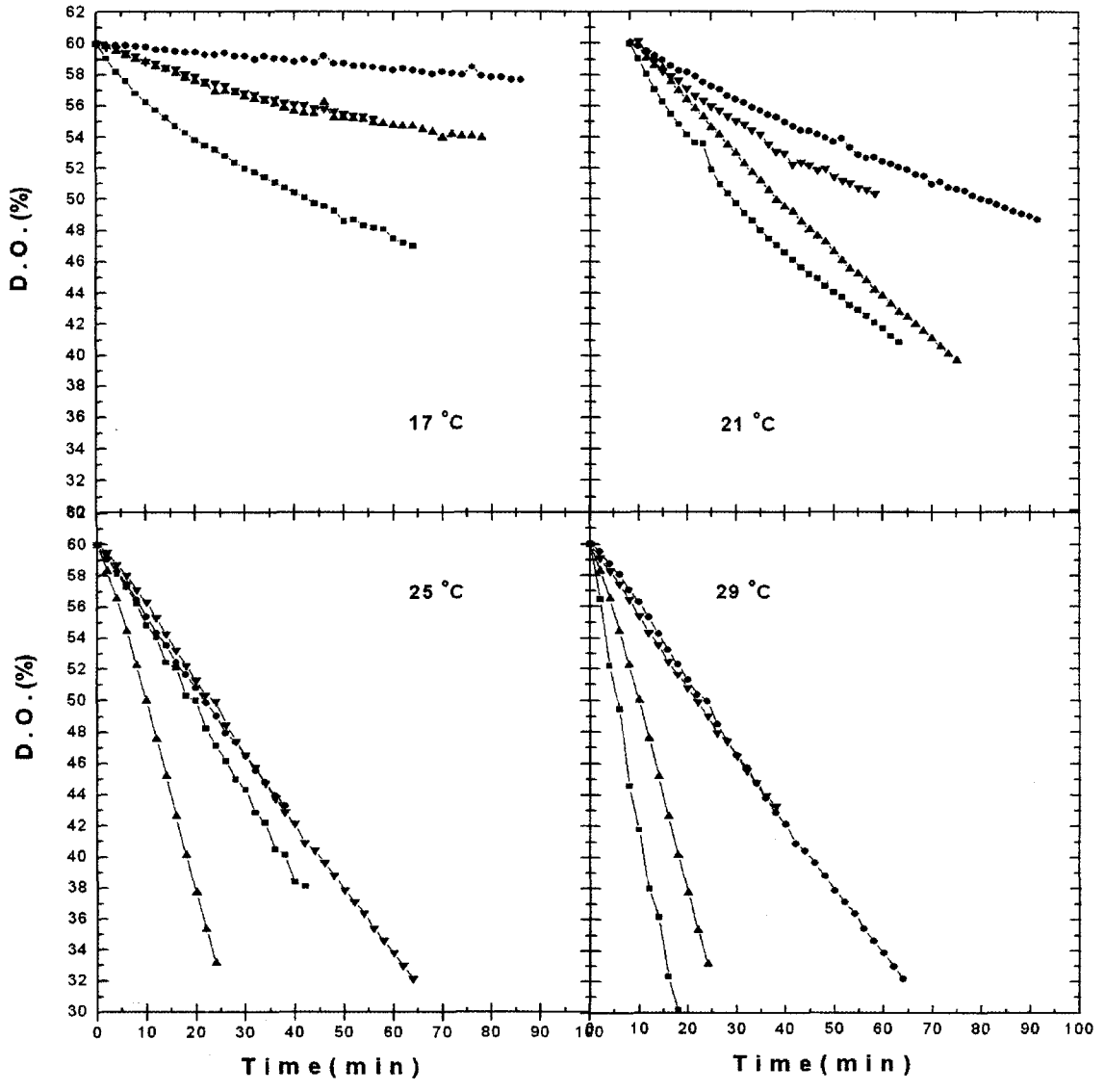

Fig. 3. Profiles of dissolved oxygen concentrations at various temperatures (■ ; *S. carpocapsae* Pocheon strain, ● ; *S. glaseri* Mungyeong strain, ▲; *S. glaseri* NC strain and ▼; *S. glaseri* Dongrae strain).

로 예측되는데 이는 Linaegren의 0.1×10^{-3} mmolO_2/L · min과 비슷한 결과를 보였다(Linaegren *et al.*, 1979).

2. 시간에 따른 용존산소의 변화

Fig. 3은 각각의 온도에서 시간 경과에 따른 용존산소농도의 변화를 나타낸 것으로 17°C 이하에서는 모든 선충 종에서 산소소비속도가 매우 느린 것으로 나타났으나 *S. carpocapsae* Pocheon strain의 경우 17°C에서 용존 산소 값이 50%에 도달하는데 40분이 소요되었으며 다른 3종의 선충은 17°C에서 산소 소비가 거의 없는 것으로 나타났다. 21°C에서는 산소소비속도가 점차 빨라져 *S. carpocapsae* Pocheon strain의 경우 용존 산소 농도 50%가 되는데 30분 소요되었는데 비해 *S. glaseri* NC와 Dongrae, Mungyeong strain의 경우 40, 60, 75분이 각각 소요되었다. 25°C의 경우 4종 모두 용존 산소 50%에 도달하는데 29분 이내로 산소소비속도가 매우 빠르게 나타났다.

S. glaseri Dongrae strain을 비이커에 1,500마리/mL로 희석하여 200 mL 현탁액을 만든 후 교반속도 변화가 용존산소소비속도에 미치는 영향을 Fig. 4에 나타내었다. 28°C에서 교반속도가 150 rpm과 50 rpm에서 용존산소 80%에 도달하는데 소요되는 시간이 23분으로 비슷하였으나 그 이후에는 50 rpm의 경우가 150 rpm보다 용존산소속도가 약간 빠르게 감소하였다. 그러나 교반속도가 50~150 rpm 사이에서는 산소요구도의 변화는 그다지 크지 않으므로 곤충병원성 선충의 shear에 의한 영향(Pace *et al.*, 1986)을 줄이기 위해 다른 선충 종에 대해서 교반속도를 50 rpm으로 고정하여 실험을 수행하였다. 선충 산소요구도 계산 방법의 식 (3)에서 선충농도 X가 높을 수록 산소공급속도도 증가해야만 한다(OTR≥OUR). 따라서, 산소공급속도에 중요한 (k_La) 값을 높이기 위해서는 일반적으로 교반속도나 액체내 단위부피당 공기 방울의 표면적과 hold-up 등을 증가시켜 주어야 한다. 그러나 선충의 shear에 대한 민감성 때문에 교반속도를 약 150 rpm 이상 높이기는 어려운 것으로 나타났고, 낮은 교반속도에서는 성충의 시기에서는 선충이 가라앉기 쉽기 때문에 보다 고농도의 선충 배양을 위해서는 새로운 선충 배양기의 설계가 필요한 것으로 사료된다.

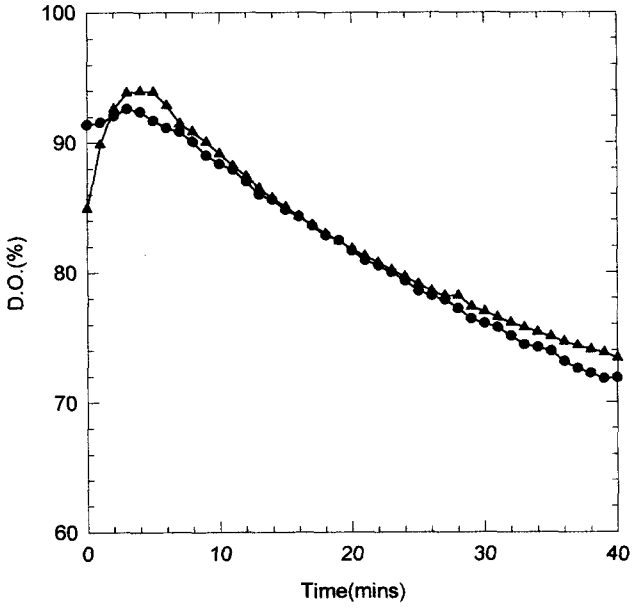

Fig. 4. Effect of agitation speed on dissolved oxygen concentration profile with 2 L working volume at 28°C of *S. glaseri* Dongrae strain (▲; 150 rpm, ●; 50 rpm).

3. 선충별 비산소소비속도의 비교

각 온도에서 곤충병원성 선충 한 마리가 요구하는 산소요구량인 q_{O_2} 값과 선충 크기를 비교해 본 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 미국산이며 크기가 제일 큰 *S. glaseri* NC strain의 경우 모든 온도 영역에서 q_{O_2} 값이 가장 높게 나타났으며 *S. glaseri* Dongrae, Mungyeong strain, *S. carpocapsae* Pocheon strain 순으로 q_{O_2} 값이 큰 것으로 나타났는데 선충의 크기가 클수록 대사 활

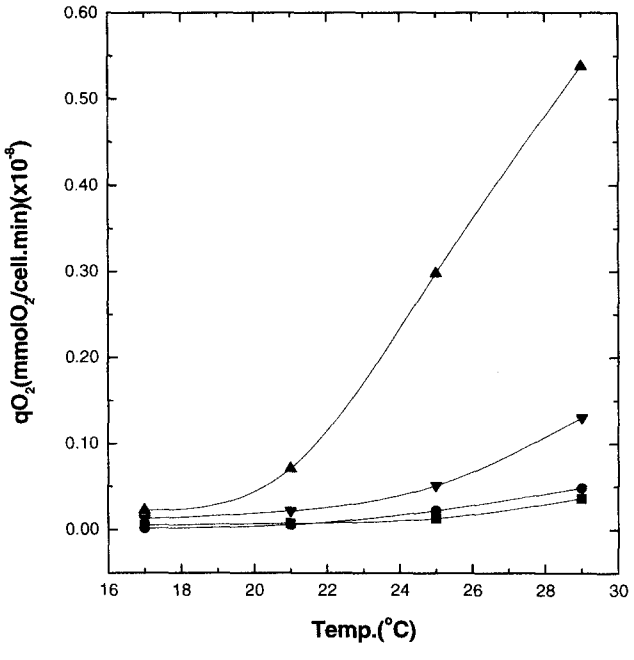

Fig. 5. Effect of temperature on specific oxygen uptake rate of nematodes (■; *S. carpocapsae* Pocheon (590±30.2 μm), ●; *S. glaseri* Mungyeong (590±30.2 μm), ▲; *S. glaseri* NC (985±123.2 μm) and ▼; *S. glaseri* Dongrae strain (890±138.2 μm)).

동에 필요한 산소요구량도 증가하기 때문인 것으로 판단된다. 특히 미국산 선충종인 *S. glaseri* NC strain은 온도에 매우 민감하여 20°C 이상에서 산소요구량이 급격히 증가하여 29°C에서 한국산 선충에 비해 무려 약 5~10배의 산소를 요구하는 것으로 나타났다. 이와 같이 한국산 선충의 산소요구도가 낮은 것은 선충을 상업화하기 위한 조건으로는 매우 유리한 점으로 작용할 수 있으며, 특히 선충의 고농도 배양과 선충의 보관 효율을 높힐 수 있을 것으로 사료된다. 그러나 산소요구도 저하에 따른 선충의 활동성 및 병원성의 변화는 더 자세히 검토되어져야 할 것이다. 한편 한국산 곤충병원성 선충의 최고 q_{O_2} 값을 약 0.1×10^{-8} $mmolO_2/cell \cdot min$으로 볼 때 박테리아보다는 10^5정도, 동물세포보다는 10^3 정도 높은 것으로 나타났으며, 27°C에서 *S. carpocapsae* Pocheon strain q_{O_2} 값 0.45×10^{-9} $mmolO_2/cell \cdot min$은 외국산 *S. feltiae*의 q_{O_2} 값 0.17×10^{-9} $mmolO_2/cell \cdot min$ (Linaegren *et al.*, 1986)와 유사한 것으로 나타났다. 29°C일 때 산소요구도 측정 후 조사한 선충 수는 *S. glaseri* Dongrae, Mungyeong, NC strain이 각각 2,000마리/mL, 5,400마리/mL, 950마리/mL였으며 *S. carpocapsae* Pocheon strain의 경우 4,700마리/mL로 처음 접종때와 비슷한 숫자를 보였고, 선충은 모두 강한 활성을 유지하였다. 곤충병원성 선충의 산소요구도 측정용 배양기내의 공생 박테리아 수는 평균적으로 10^4~10^6 cell/mL 정도임을 감안하면 공생 박테리아의 평균 산소요구도가 대략 10^{-13} $mmolO_2/cell \cdot min$이므로 선충의 산소요구도 값에는 큰 영향을 미치지 않을 것으로 생각된다.

이상의 결과에서 선충의 활성을 유지하면서 산소공급량을 줄일 수 있는 적정 온도는 13~17°C이며 이때 산소요구도는 $0.5¡¿10^{-3}$ $mmolO_2/cell \cdot min$ 이하로 매우 낮은 것을 보였다. 곤충병원성 선충인 *Steinernema* glaseri 4종의 산소요구도를 온도 변화에 따라 측정함으로써 액체배양 과정과 대량 배양된 선충을 장기간 저장하고 운송하는데 필요한 적당한 산소의 공급량을 결정할 수 있게 되었다. 배양과정중 선충의 생리적 특성과 배지 성분의 영향, 선충 밀도 등에 따른 산소요구도 변화에 관한 연구는 현재 진행 중에 있다.

사 사

본 연구는 한국과학재단 연구비 (970-4020-201-3) 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

인 용 문 헌

Bedding, R.A. and L.A. Miller. 1981. Use of a nematode, *Heterorhabditis heliathidis*, to control black vine weevil, *Otiothynchus sulcatus*, in potted plants. Annals of Applied Biology 99: 211~216.

Bedding, R.A. 1984. Large scale production, storage and transport of the insect parasitic nematodes. Ann. Biol. 104: 117~120.

Dutky, S.R., J.V. Thompson and G.E. Cantwell. 1964. A technique for the mass propagation of the DD-136 nematode. Journal of Insect Pathology 6: 417~422.

Friedman, M.J., S.E. Langston and S. Pollitt. 1991. Mass production in liquid culture of insect-killing nematodes. U.S. Patent 5, 023, 183.

Hara, A.H., J.E. Lindegren and H.K. Kaya. 1981. Monoxenic mass production of the entomogenous nematode, *Neoaplectana carpocapsae* Weiser, on dog food/agar medium. Advances in Agricultural Technology, USDA Western Series, Number 16.

Kim, D.W. and S.H. Park. 1998. Culture condition of entomopathogenic nematodes using *Galleria mellonella* larva. Korean J. Biotechnol. Bioeng. 13: 31~37.

Linaegren, J.E., D.F. Hoffmann, S.S. Collier and R.D. Eries. 1979. Propagation and storage of *Neoaplectana carpocapsae* Weiser using *Amyelois transitella* (Walker) adults. Advances in Agricutural Technology, USDA Western Series, Number 3.

Linaegren, J.E., R.E. Rij, S.R. Ross and D.C. Fouse. 1986. Respiration rate of *Steinernema feltiae* infective at several constant temparetures. Journal of Nematology 18: 221~224.

Pace, G.W., W. Grote, D.E. Pitt and M. Pitt. 1986. Liquid culture of nematodes. Int. Patent WO 86/01074.

Park, S.H. and D.W. Kim. 1997. Environmentally friendly biopesticide using entomopathogenic nematodes. Korean J. Biotechnol. Bioeng. 12: 261~268.

Pauline, M.D. 1995. Bioprocess Engineering Principles, pp. 210~213. Academic Press.

Poinar, G.O.Jr. 1986. Entomopathogenous nematodes, pp. 95~127 *In*: Biological plant and health protection, ed. by J. M. Franz. 350pp. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart.

(1998년 7월 31일 접수, 1999년 4월 7일 수리)