

In vivo 및 *in vitro*로 배양된 곤충병원성 선충의 지방산 함량 및 효능

¹김 호 현 · ^{1,2} 박 선 호

¹계명대학교 공학부, ²(주)바이코시스 부설연구소
(접수 : 2002. 5. 8., 게재승인 : 2002. 6. 22.)

Fatty Acid Contents and Efficacy of *In vivo* and *In vitro* Cultured Entomopathogenic Nematodes

Hyo Hyun Kim¹ and Sun Ho Park^{1,2*}

¹Faculty of Engineering, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

²Biotechnology Research Institute, Advanced Biocontrol System Co., Ltd., Daegu 704-701, Korea

(Received : 2002. 5. 8., Accepted : 2002. 6. 22.)

Fatty Acid contents of entomopathogenic nematodes (EPNs) were examined by various types of nematodes and culture methods. Seven different types EPNs cultured by *in vivo* did not contain same fatty acid contents, but similar compositions. It was also found that *Steinernema carpocapsae* among EPNs cultured by *in vivo* and *in vitro* contained not only different fatty acid contents, but also revealed distinctive motilities in a soil. The addition of olive oil in the *in vitro* culture medium resulted in similar fatty acid contents of *S. carpocapsae* to *in vivo* and greatly improved the pathogenicity of nematodes compared to that of soy oil in the medium.

Key Words : entomopathogenic nematodes, *Steinernema carpocapsae*, fatty acid contents, olive oil

서 론

최근 유기 합성 농약의 단점을 극복하고 각종 환경 규제에 능동적으로 대처할 수 있는 새로운 천적으로 곤충병원성 선충(Entomopathogenic Nematodes)이 주목받고 있다. 곤충병원성 선충은 체내에 공생하는 박테리아인 *Xenorhabdus* spp.와 작용하여 곤충에 폐혈증을 유발시킴으로써 48시간 이내에 기주를 치사시키는 우수한 병원성을 지니고 있다. 또한 넓은 기주범위와 뛰어난 기주 탐색 능력 및 해충 사멸 능력을 가지고 있어 차세대 생물 농약으로 크게 기대되고 있다(1).

곤충병원성 선충은 체내에 에너지를 지질로 변환하여 저장하며 높은 지질의 함량으로 감염태 선충인 IJs(Infective Juveniles)를 오랜 기간 저장할 수 있다(2,3). 또한 *in vivo*에서 생산된 곤충병원성 선충은 *in vitro*에서 생산된 선충보다 병원성, 해충으로의 침투능력, 저장수명 등에 있어 우수한 것으로 보고되고 있다(4,5). 또한 곤충병원성 선충과 선충내에 존재하는 공생박테리아의 지방산 함량은 종에 따라라도 차이가 있고 선충을 생산하는 인공배지 및 배양방법에 따라라도 달라지는 것으로 알려져 있다(6-12). 예를 들면 곤충병원성 선

충의 연구 초기에 Poinar는 액체배양으로 곤충병원성 선충 *Heterorhabditis bacteriophora*를 생산하였지만 인공배지의 부적절한 선택으로 병원성과 무관한 지방산을 가진 선충을 생산함으로써 선충의 살충력이 감소하는 결과를 가져왔다(13). 최근에는 선충내 지방산 성분 가운데 일부가 기주 탐색에 필요한 에너지로 이용된다는 사실을 알아냈으며, 토양내 먹이로 하는 기주가 없을 경우 선충은 가지고 있는 지질을 분해하면서 생존해 나간다는 것이 보고 되고 있다(14-15).

본 연구에서는 *in vivo*로 배양된 곤충병원성 선충 7계통의 지방산 함량 비를 조사하였으며, *S. carpocapsae* 종에 대해 *in vivo* 및 *in vitro*로 배양된 선충의 지방산 함량비와 선충의 토양내 침투력 및 병원성의 차이를 비교하였다.

재료 및 방법

곤충병원성 선충 및 배양방법

본 연구에 사용된 곤충병원성 선충은 *Steinernema glaseri*(3종), *Steinernema carpocapsae*, *Steinernema monticolum*, *Steinernema longicaudum*, *Heterorhabditis bacteriophora*의 7계통으로 *in vivo* 배양하기 위해 3령 단계의 꿀벌부채명나방 유충을 사육하여 기주로 이용하였고 선충을 접종한 후 28°C에서 5~7일간 배양, 수확하여 사용하였다(16). 곤충병원성 선충을 *in vitro*로 배양하기 위해서는 동·식물의 기름성분, 단백질, salt, yeast 등으로 조제한 혼합배지를 만들어 250 mL 삼각 flask에

* Corresponding Author : Faculty of Engineering, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

Tel : +82-53-580-5457, Fax : +82-53-587-1034

E-mail : park@kmu.ac.kr

50 mL을 넣고 선충을 1500 마리/mL로 접종한 후(17), 28°C, 200 rpm에서 약 15일간 배양하였다.

곤충병원성 선충 *S. carpocapsae* 종에 대해 지방산 함량에 가장 영향을 미치는 soy oil 성분의 농도를 2%, 5%(w/v)로 각각 배양한 후 선충을 수확하여 지방산 함량을 측정하였다. 또한 oil 성분을 달리하여 soy oil(100), soy oil + olive oil (50:50), olive oil(100)로 각각 배양한 후 선충을 수확하여 지방산 함량, 병원성 및 침투력을 측정하였다.

곤충병원성 선충의 지방산 분석

곤충병원성 선충 7계통의 지방산 분석을 위해 *in vivo* 배양의 경우 선충을 유충 사체로부터 White trap을 설치하여 분리하였고(16), *in vitro* 배양의 경우 선충을 분리하기 위해 20 μ m mesh를 사용하였다. 이렇게 분리된 선충은 초순수 증류수로 3회 세척과정을 거친 후 현미경으로 정확한 선충의 개체수를 조사하여 사용하였다. 곤충병원성 선충은 5×10^6 마리를 사용하였으며, 선충의 수분을 제거하기 위해 5 μ m mesh로 선충을 걸렀다. 선충의 지방산 성분 및 함량비를 조사하기 위해서 먼저 시험관(13×100 mm)에 reagent 1(NaOH 45 g, CH₃OH 150 mL, 초순수 150 mL)을 1 mL 넣은 후 백금 루프를 이용하여 수분을 제거한 선충을 넣고 5~10초 동안 vortex하였다. 100°C 항온조에 5분간 담근 후 다시 vortex하고 100°C의 항온조에 25분간 방치하였다. 그리고 얼음 통에 넣어 가급적 급속히 냉각하고 reagent 2(6 N HCl 325 mL, CH₃OH 275 mL)를 2 mL 시험관에 넣고 섞어 주었다. 그리고 80°C 항온조에 10분간 담근 후 얼음에서 냉각시킨 후 reagent 3(hexane, methyl tert-butyl ether: 1/1)을 1.25 mL 시험관에 첨가하였으며, 이때 시험관에 층이 생김을 확인할 수 있었다. 또한 시험관을 orbital shaker에서 10분간 천천히 흔들어 층을 더 분리하였다. 하등액을 pasteur pipet을 이용하여 2~3회에 걸쳐 완전히 제거한 후 reagent 4(NaOH 10.8 g, 초순수 900 mL)를 3 mL 시험관에 넣고 orbital shaker를 이용하여 5분간 천천히 흔들었다. 만약 층이 확실하게 나누어지지 않을 경우에는 냉장고에 잠시 넣어두거나 또는 reagent 5(saturated NaCl/water solution)를 이용하여 분리하였으며, 최종 처리된 상등액은 pasteur pipet을 이용하여 GC 분석용 vial에 최소 150 μ L 이상을 넣었다. 지방산 분석은 GC(HP6890,

USA)를 이용하였으며, 운반 기체는 수소, oven에서의 초기 온도는 170°C, column은 HP 19091B-102(Ultra 2.5% phenyl methyl siloxane, L25 m×Ø200 μ m, 초기 유속은 0.4 mL/min)를 사용하였다. 또한 검출기로는 FID(flame ionization detector)를 사용하였고, 투입되는 시료의 양은 2 μ L를 사용하였다. 지방산 성분 및 함량의 최종 분석은 Sherlock Software를 이용하여 분석하였다.

곤충병원성 선충의 병원성 측정

*In vivo, in vitro*에서 배양된 곤충병원성 선충의 병원성을 조사하기 위해서 먼저 4°C 냉장고에서 7일 보관된 선충을 꺼내어 25°C에서 약 30분간 두어 활성을 회복시킨 다음 24-well plate에 여지를 깔고 각 well당 꿀벌부채명나방 유충을 1마리씩 전체 10마리를 넣었다. 선충농도에 따른 병원성 측정을 위하여 각각 0, 1, 5, 15, 50, 100, 200마리의 선충을 75 μ L에 현탁하여 각각의 well에 접종한 후 24, 48, 72, 96 hr 마다 관찰하여 치사율을 측정하였다(18).

곤충병원성 선충의 토양내 침투력 측정

침투력 측정을 위하여 직경이 10 cm, 높이가 5 cm인 motility column(10×5 cm)을 제작하여 꿀벌부채명나방 유충을 5, 10, 15, 20, 25, 30 cm의 깊이에 각각 5마리씩 위치하여 깊이에 따른 유충 사멸의 차이를 조사하였다(19). 수분을 함유한 column 내부의 모래(7% w/w)는 체(2.5 mm)로 걸러 사용하였고, motility column 내부에 모래를 채우고 각층의 바닥부분에 철 mesh(1 mm)를 고정하여 유충의 이동을 막았다. 선충농도는 1000 마리/mL로 현탁하여 column의 상부 표면에 주입하고 25°C incubator에서 48시간 후 토양 깊이 별로 유충의 사멸상태를 조사하였다.

결과 및 고찰

*In vivo*로 배양된 곤충병원성 선충의 지방산 함량

7계통 곤충병원성 선충의 지방산 함량을 분석한 결과를 Table 1에 나타내었다. 탄소 18개를 가지고 이중결합을 1개를 가지는 oleic acid(18:1)가 모든 선충 중에서 약 38~45%로 가장 높은 것으로 나타났다. 그 중 *S. glaseri* 종과 *S.*

Table 1. Contents of fatty acids of total lipids obtained from various entomopathogenic nematodes cultured by *in vivo* methods

Fatty acid	% Content						
	<i>Steinernema longicaudum</i>	<i>Steinernema carpocapsae</i>	<i>Steinernema monticolum</i>	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	<i>Steinernema glaseri</i> -DR	<i>Steinernema glaseri</i> -MK	<i>Steinernema glaseri</i> -NC
C15:0	0.6±0.2	1.1±0.0	0.9±0.1	2.0±0.4	0.8±0.3	1.1±0.3	0.8±0.3
C16:0	15.9±1.6	9.8±0.6	16.1±2.5	16.4±0.7	16.7±3.5	10.5±0.6	16.7±2.3
C17:0	0.7±0.1	1.3±0.1	1.0±0.0	1.1±0.2	0.7±0.1	1.2±0.1	0.6±0.1
C18:0	6.0±0.2	7.4±0.0	5.5±1.2	3.9±0.9	6.0±0.0	8.0±1.5	5.4±1.1
C18:1	44.5±1.1	38.5±0.0	38.8±0.4	40.0±6.2	44.8±1.0	44.5±0.5	44.9±1.3
C18:2	22.7±0.2	23.0±2.1	23.9±0.8	20.5±2.2	20.4±2.3	22.9±1.3	21.3±0.7
C18:3	1.0±0.1	0.8±0.0	1.5±0.2	1.3±0.2	0.9±0.1	1.1±0.6	0.9±0.2
C19:1	2.7±1.1	8.4±2.3	5.0±3.4	1.5±0.9	2.3±0.9	3.7±0.5	2.9±0.7
C20:0	0.5±0.1	1.4±0.1	0.6±0.0	0.1±0.1	0.7±0.2	1.3±0.1	0.5±0.0
C20:2	1.9±0.2	4.6±0.8	2.2±0.2	0.3±0.4	3.5±0.2	2.4±0.3	2.2±1.5
C20:4	1.7±0.0	1.3±0.1	1.7±0.4	2.4±0.1	1.2±0.5	1.5±0.1	1.5±0.1
Others	1.6±1.2	2.0±0.5	2.1±0.7	10.0±4.7	2.4±0.4	2.1±1.0	2.6±1.0

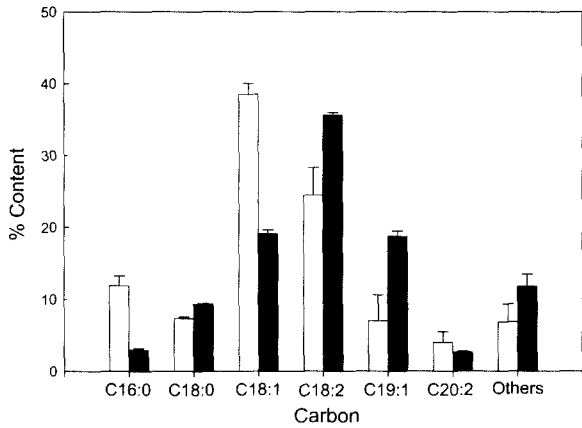


Figure 1. Contents of fatty acids of total lipids obtained from *S. carpocapsae* cultured by different culture methods. (□) *In vivo* culture, (■) *In vitro* culture.

longicaudum 종이 44.5~44.9%로 oleic acid를 비교적 많이 함유한 반면에, *S. carpocapsae* 종과 *S. monticolum* 종이 38.5~38.8%로 oleic acid를 비교적 적게 함유하는 것으로 나타났다. 7계통의 선충들이 두번째로 많이 함유하고 있는 linoleic acid(18:2)의 경우에는 약 20.4~23.9%로 비교적 큰 차이를 보이지 않았다. Palmitic acid(16:0)의 경우에는 *S. glaseri*-MK 종과 *S. carpocapsae* 종이 약 9.8~10.5%로 함유량이 비교적 적은 반면 다른 종들에 대해서는 15.9~16.7%로 거의 유사한 것으로 나타났다. Stearic acid(18:0)의 경우에는 *S. glaseri*-MK 종이 8%로 가장 많았고 *H. bacteriophora* 종이 3.9%로 가장 적은 함유량을 보였다. 탄소 19개를 가지고 이중결합을 1개를 가지는 지방산의 경우에는 1.5~8.4%로 종별로 비교적 뚜렷한 차이를 보였다. 이상의 결과로 보아 7계통의 곤충병원성 선충의 지방산 성분은 비슷하나, 각 계통의 지방산 함량은 다소 차이가 있음을 확인할 수 있었다. 최근 연구 결과에 의하면 선충 종마다 주요 지방산 성분은 비슷하나 각각의 지방산 함량비에서는 차이가 있는 것으로 밝혀지고 있으며 (3,10), 특히 선충 종이 같은 경우에도 선충이 발견된 장소와 지역적인 특성에 따라 지방산 함량비가 차이가 나는 것으로 보고 되고 있다(15). 본 연구 결과 또한 채집된 선충의 기후와 토양조건 등의 지역적 특성으로 인해 같은 선충 종이지만 지방산 함량비에 있어서는 차이를 보이는 것으로 사료된다.

배양방법에 따른 곤충병원성 선충의 지방산 함량 변화

In vivo 및 *in vitro*로 각각 배양된 곤충병원성 선충 *S. carpocapsae* 종의 지방산 함량비를 분석한 결과를 Figure 1에 나타내었다. *In vivo*로 배양된 선충의 경우 oleic acid(18:1)가 38.5±1.6%로 가장 높은 함량비를 보였으며, linoleic acid(18:2), palmitic acid(16:0), stearic acid(18:0)의 순으로 각각 24.4±3.8%, 10.2±1.3%, 7.4±0.2%로 나타났다. 반면에 *in vitro*로 배양된 곤충병원성 선충의 경우 linoleic acid(18:2)가 35.6±0.4%로 가장 높은 함량비를 보였고, 18:1, 19:1, 18:0의 순으로 각각 19.1±0.6%, 18.7±0.8%, 9.3±0.1%로 나타나 배양방법에 따라 곤충병원성 선충의 지방산의 함량비가 달라짐을 확인할 수 있었다. 이와 같이 배양방법에 따라 선충의 지방산 함량비가 달라지는 것은 *in vivo* 배양에서 사용된 유충

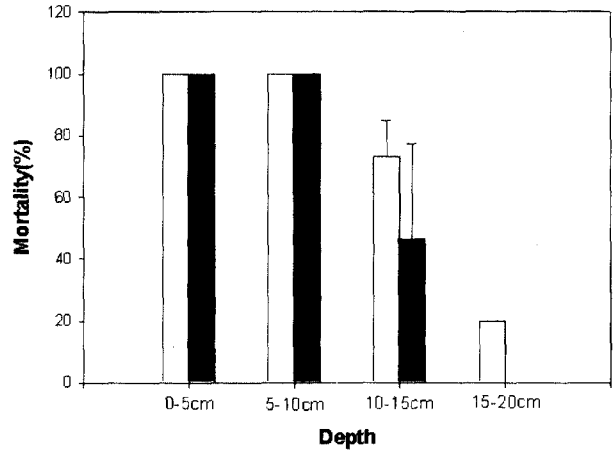


Figure 2. Motilities of *Steinernema carpocapsae* cultured by *in vivo* and *in vitro*. (□) *In vivo* culture, (■) *In vitro* culture.

의 영양분과 *in vitro* 배양에서 사용된 배지 조성의 차이 때문인 것으로 사료된다. 따라서 *in vitro*로 선충을 배양할 경우 배양배지 및 배양조건에 따라선 선충의 지방산 함량비가 달라질 수 있을 것으로 판단된다.

***In vivo* 및 *in vitro*로 배양된 곤충병원성 선충의 토양내 침투력 비교**

Figure 2에 *in vivo* 및 *in vitro*로 배양된 곤충병원성 선충 *S. carpocapsae* 종의 꿀벌부채명나방 유충에 대한 선충의 토양에서의 침투력을 측정된 결과를 나타내었다. *In vivo*로 배양된 선충의 경우 토양깊이 10 cm까지 100%의 치사율을 보였으나 10~15 cm의 깊이에서는 73.3±11.55%의 치사율을 보여 침투력이 조금 감소하였고 15~20 cm의 깊이에서 20%의 치사율을 보였다. 반면 *in vitro*로 배양된 선충의 경우는 10 cm 깊이까지 100%의 치사율을 보였으나 10~15 cm 깊이에서 46.7±30.55%를 보였고 15 cm 깊이 이상에서는 유충을 사멸시키지 못하는 것으로 나타났다. 이상의 결과에서 *in vivo*로 배양된 곤충병원성 선충이 *in vitro*로 배양된 선충보다 침투력이 우수한 것을 알 수 있었다. 곤충병원성 선충의 토양 침투력은 일반적으로 선충의 종류, 선충접종 농도 및 온도에 따라 차이가 날 수 있으며(19), 선충의 지방산 함량에 따라선 침투력 및 토양내 존속기간 등이 영향을 받는 것으로 보고되고 있다(2,4,7). 따라서 *in vivo* 및 *in vitro*로 배양된 선충의 지방산을 비교하여 특히 부족한 성분을 *in vitro* 배양 배지에 적절히 추가해 줌으로써 침투력이나 환경요인에 대한 적응력을 더 향상시킬 수 있을 것으로 사료된다.

***In vitro* 배지 중 oil 성분의 농도에 따른 곤충병원성 선충의 지방산 함량 변화**

곤충병원성 선충의 *in vitro* 배양배지 중 soy oil의 농도를 달리하여 배양된 곤충병원성 선충의 지방산 함량을 분석하여 나타낸 결과를 Figure 3에 나타내었다. soy oil의 경우 주요 지방산이 oleic acid가 약 30%, linoleic acid가 약 52% 함유되어 있어 선충의 지방산 함량에서도 oleic acid와 linoleic acid가 약간 증가되었음을 알 수 있다. 그러나 그 차이는 매우 적었으며 soy oil의 농도 증가 후에 선충의 침투력도 크게

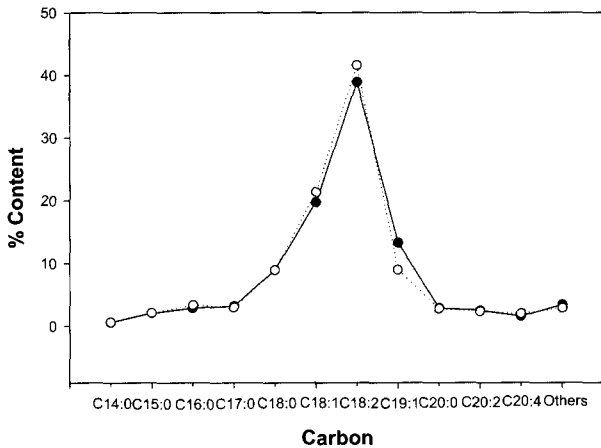


Figure 3. Contents of Fatty acids of total lipids for *S. carpocapsae* cultured at different concentrations of soy oil. (○) 5% soy oil, (●) 2% soy oil.

변화되지 않았다(data not shown). Figure 4는 곤충병원성 선충의 배양배지 중 oil의 종류를 달리하여 배양된 선충의 지방산 함량을 나타낸 것이다. soy oil만을 사용한 경우 선충의 지방산 중 oleic acid(18:1)가 약 22%, linoleic acid(18:2)가 약 42%의 함량비를 가지는데 비해 soy oil과 olive oil을 50:50으로 첨가한 경우 oleic acid(18:1)가 약 37%, linoleic acid(18:2)가 약 31%의 함량비를 보였고, olive oil만 첨가한 경우 oleic acid(18:1)가 약 39%, linoleic acid(18:2)가 약 20%의 함량비를 보여 oil의 종류에 따른 선충의 지방산 함량은 크게 변화됨을 확인할 수 있었다. 이는 olive oil의 경우 oleic acid(18:1)를 약 73%, linoleic acid(18:2)를 약 9% 함유하고 있어 olive oil을 첨가한 배지에서 배양된 선충의 지방산 함량은 soy oil을 첨가한 배지보다 oleic acid가 약 17% 정도 증가된 반면 linoleic acid는 오히려 약 22% 정도 감소되는 것으로 나타났다.

In vivo 및 in vitro로 배양된 곤충병원성 선충의 병원성 비교

곤충병원성 선충 *S. carpocapsae* 종을 in vivo 및 soy oil과 olive oil을 첨가하여 in vitro로 각각 배양한 선충의 병원성을 분석한 결과를 Table 2에 나타내었다. In vivo로 배양된 선충의 경우 유충당 선충 15마리를 접종했을 때 96 hr만에 100%, 72 hr까지 50%의 치사율을 보였다. 반면에 soy oil을 첨가하여 in vitro로 배양된 선충의 경우 유충당 선충 200마리를 접

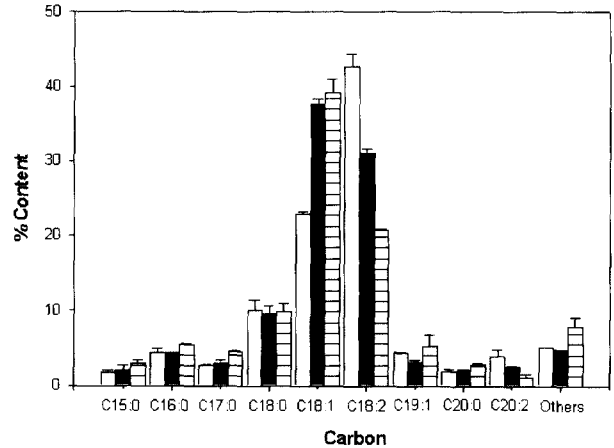


Figure 4. Contents of Fatty acids of total lipids for *S. carpocapsae* cultured at different oils. (□) soy oil, (■) soy oil+olive oil, (▨) olive oil.

종했을 때 96 hr에 83%의 치사율을 보여 병원성이 in vivo에 비해 낮은 것을 확인할 수 있었다. 하지만 olive oil을 첨가하여 in vitro로 배양된 선충의 경우 유충당 선충 15마리를 접종했을 때 72 hr만에 100%, 48 hr까지 60%의 치사율을 보였고 유충당 선충 100마리를 접종했을 때 48 hr만에 100%의 치사율을 보여 olive oil을 첨가했을 경우 선충의 병원성이 크게 향상되는 것을 확인할 수 있었다. 이상의 결과에서 곤충병원성 선충의 효능은 선충의 종, 토양 온도 등 이 밖의 다른 여러 환경 요인에 의해 영향을 받을 수 있지만 곤충병원성 선충의 지방산 성분을 인위적으로 조절함으로써 적절히 대응할 수 있으며 앞으로 이에 대한 더 많은 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

요 약

곤충병원성 선충의 종류 및 배양방법에 따른 지방산 함량비를 조사하였다. In vivo로 배양된 곤충병원성 선충 7계통의 지방산 조성은 비슷하였으나, 지방산 함량비에서 차이가 있었다. 곤충병원성 선충 *S. carpocapsae* 종을 in vivo 및 in vitro로 배양하여 분석한 결과 배양방법에 따라 지방산의 함량비가 달라질 뿐만 아니라 선충의 토양내 침투력이 달라지는 것을 확인하였다. Olive oil을 첨가하여 선충을 배양했을 경우 주요 지방산 함량비를 in vivo로 배양된 결과와 유사하

Table 2. Comparison of mortality of *S. carpocapsae* cultured by in vivo and in vitro.

Inoculation Conc.	% Mortality											
	In vivo				In vitro							
					soy oil				olive oil			
	24 hr	48 hr	72 hr	96 hr	24 hr	48 hr	72 hr	96 hr	24 hr	48 hr	72 hr	96 hr
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	8	8	0	0	0	0	0	10	20	20
5	0	0	25	25	0	0	0	8	0	40	50	50
15	0	25	50	100	0	0	0	17	0	60	100	100
50	0	17	50	100	0	0	0	8	0	90	100	100
100	0	17	58	100	0	0	17	25	0	100	100	100
200	0	17	83	100	0	0	47	83	0	100	100	100

게 조절할 수 있었으며 선충의 병원성도 soy oil을 첨가하여 배양한 선충에 비해 크게 향상되는 것을 확인할 수 있었다.

REFERENCES

1. Park, S. H. and D. W. Kim (1998) Environmentally friendly biopesticide using entomopathogenic nematodes, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **12**, 261-268.
2. Hatab, M. A. and R. Gaugler (1997) Influence of growth temperature on fatty acids and phospholipids of *Steinernema riobravisi* infective juveniles, *J. Therm. Biol.* **22**, 237-244.
3. Selvan, S., R. Gaugler and E. E. Lewis (1993) Biochemical energy reserves of entomopathogenic nematodes, *J. Parasitol.* **79**, 167-172.
4. Gaugler, R. and R. Georgis (1992) Culture methods and efficacy of entomopathogenic nematodes, *Biol. Control*, **1**, 269-274.
5. Converse, V. and R. W. Miller (1999) Development of the one-on-one quality assessment assay for entomopathogenic nematodes, *J. Invert. Pathol.* **74**, 143-148.
6. Hatab, M. A. and R. Gaugler (1997) Growth-mediated variations in fatty acids of *Xenorhabdus* sp., *J. Appl. Microbiol.* **82**, 351-358.
7. Patel, M. N., M. Stolinski and D. J. Wright (1997) Neutral lipid and the assessment of infectivity in entomopathogenic nematodes: observations on four *Steinernema* species, *J. Parasitol.* **114**, 489-496.
8. Hatab, M. A., R. Gaugler and R. Ehlers (1998) Influence of culture method on *Steinernema glaseri* lipids, *J. Parasitol.* **84**(2), 215-221.
9. Hatab, M. A. and R. Gaugler (1999) Lipids of *in vivo* and *in vitro* cultured *Heterorhabditis bacteriophora*, *Biol. Control* **15**, 113-118.
10. Patel, M. N. and D. J. Wright (1997) Fatty acid composition of neutral lipid energy reserves in infective juveniles of entomopathogenic nematodes, *Comp. Biochem. Physiol.* **118B**(2), 341-348.
11. Yoo, S. K., I. Brown and R. Gaugler (2000) Lipid media development for *Heterorhabditis bacteriophora*: lipid source and concentration, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**, 759-763.
12. Hatab, M. A. and R. Gaugler (2001) Diet composition and lipids of *in vitro*-produced *Heterorhabditis bacteriophora*, *Biol. Control* **20**, 1-7.
13. Georgis, R. and R. Gaugler (1991) Predictability in biological control using entomopathogenic nematodes, *J. Econ. Entomol.* **84**, 713-720.
14. Wright, D. J., P. S. Grewal and M. Stolinski (1997) Relative importance of neutral lipids and glycogen as energy stores in dauer larvae of two entomopathogenic nematodes, *Steinernema carpocapsae* and *Steinernema feltiae*, *Comp. Biochem. Physiol.* **118B**(2), 269-273.
15. Fitters, P. F., M. N. Patel, C. T. Griffin and D. J. Wright (1999) Fatty acid composition of *Heterorhabditis bacteriophora* sp. during storage, *Comp. Biochem. Physiol.* **124B**, 81-88.
16. Kim, D. W., H. Y. Choo and S. H. Park (1996) *In vivo* production method for *Steinernema* spp. using *Galleria mellonella* larvae, *J. NERI* **1**(1), 315-334.
17. Park, S. H., D. W. Kim and Y. S. Yu (1998) *In vitro* culture of entomopathogenic nematodes with its symbiotic bacteria for biopesticide, *Curr. Biochem. Eng.* **3**(3), 79-88.
18. Morris, O. N., V. Converse and I. Harding (1990) Virulence of entomopathogenic nematode-bacteria complexes for larvae of noctuids, a geometrid and pyralid. *Cana. Entomol.* **122**, 309-320.
19. Yu, Y. S. and S. H. Park (2000) Biological control of apple pest with entomopathogenic nematodes, *Steinernema* spp., *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **15**(1), 106-111.