

방사선 처리에 의한 선충 방제 효과

이재광·유대현·이면주
한국원자력연구소 방사선이용연구부
(2005년 3월 17일 접수; 2005년 12월 16일 채택)

Experimental Study on Physical Control of Nematodes Using The Ionizing Radiation

Jae-Kwang Lee, Dae-Hyun Yoo and Myun-Joo Lee

Division of Radiation Application, Korea Atomic Energy Research Institute, Daejeon 305-353, Korea
(Manuscript received 17 March, 2005; accepted 16 December, 2005)

Gamma-ray treatment was used to exterminate nematodes, which were harmful to agriculture. When gamma-ray at the dose range of 5~75 kGy was irradiated, nematodes were reduced by 40~50%. When irradiated over 30 kGy, almost nematodes were non-mobile and fluorochromatic reactions showed that 60~80% of nematodes with non-mobility died after irradiation. The results of electron spin resonance spectroscopy suggested that radicals generated by radiolysis could damage to nematodes.

Key Words : Electron spin resonance spectroscopy, Nematode, Radiation, Radical

1. 서론

선충은 길이는 0.1~1mm 내외의 지렁이처럼 생긴 소동물이며, 분류학적으로는 동물계 선형동물문에 속한다¹⁾. 선충은 전 세계적으로 거의 모든 생물권에서 발견되며 특히 해양과 토양 내에 주로 서식하고 있다. 특히 토양은 선충의 가장 적합한 서식지이며 대부분 식물체의 뿌리부분에 주로 기생한다. 이들 선충은 토양생물의 10% 이상을 차지하며 일부 지역에서는 토양 1g 당 수천마리의 선충이 서식하는 것으로 알려져 있다²⁾.

선충은 토양 유기물이 분해되는 곳에 서식하면서 세균 포식, 세균 분산, 유기물의 분해 및 생성 또는 피 포식자로서 토양 생태계의 영양순환에 중요한 역할을 한다. 그러나, 일부 선충은 가축을 포함한 모든 동식물에 기생하며 질병을 일으키기도 하고 경제적으로 큰 피해를 주기도 하며, 특히 식물 기생선충에 의해 식물에 악영향을 준다³⁻⁵⁾. 기생선충 중에서 뿌리혹선충은 적응력이 좋아 그 분포범위가 넓은 편이며 경제적으로 매우 중요한 식물 기생선충

으로서 약 550여종의 식물이 기주식물로 기록되어 있다. 또한 이들 식물 기생선충은 온도에 대한 적응력이 높아 분포범위도 넓은 편이다⁶⁾.

우리나라에서는 중요 경제작물들이 선충에 의해 많은 피해를 받고 있으나 효과적인 구제방법이 없는 실정이다^{7,8)}. 현재 국내에서는 주로 물리적 방법⁹⁾과 화학적 방법¹⁰⁾을 사용하고 있다. 그러나 물리적 방제는 주기적으로 해야 하므로 비용이 많이 소요되고, 화학적 방제는 토양 및 수계를 오염시켜 주변 주민의 건강 및 환경오염 등의 부정적인 요인으로 작용하여¹¹⁾ 보다 안전하고 효과적인 살선충 방법이 요구된다. 따라서 본 연구에서는 방사선을 이용하여 선충을 보다 효율적으로 사멸시키기 위한 기초실험을 수행하였다.

2. 실험방법 및 재료

2.1. 방사선 조사

방사선 조사를 위해 고준위 Co-60 선원(AECL IR-79, 200,000 Ci, Canada)으로부터 방출되는 감마선을 사용하였다. 조사실 내부의 온도는 24 °C 내외의 상온이었으며 10 mL 유리병에 시료를 담아 5, 10, 30, 50, 75 kGy의 흡수선량으로 조사하여 방사선에 의한 살선충 효과를 확인하였다. 이때의 선량율은 각각 1.15×10^5 , 2.30×10^5 , 6.90×10^5 , 1.15×10^5 ,

Corresponding Author : Jae-Kwang Lee, Division of Radiation Application, Korea Atomic Energy Research Institute, Daejeon 305-353, Korea
Phone: +82-42-868-2292
E-mail: jklee1@kaeri.re.kr

1.71×10⁵ rad/hr 이었다.

2.2. 선충의 분리 및 배양

채취한 토양시료를 골고루 섞은 후 10g의 토양을 90 mL 증류수에 넣고 토양입단을 잘 현탁하여 토양 속의 선충이 상층부로 부유하도록 정치하였다. 30 mesh 체를 이용하여 입자상 물질을 분리하고 체를 통과한 현탁액의 상층액을 325 mesh 체로 2~3회 걸러내었다. 선충이 포함된 현탁액과 80%의 설탕물을 9 : 1 비율로 섞어 4,000 rpm에서 3분간 원심분리하여 선충을 분리하였다. 분리한 선충 중에서 Diplogasterida목 선충을 분리 후 배양하여 실험에 사용하였다.

2.3. 선충의 계수

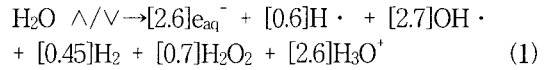
시료에 선충이 존재하지 않을 때 까지 고차단계로 희석하여 시계접시에 담아 독립현미경(DMLS, Leica)하에서 검경하여 직접계수 하였다¹²⁾. 선충 존재 유무를 확인한 후 양성으로 판정된 microplate의 well 수를 계수하여 MPN 통계표에 의거 최확치수(MPN)를 구하였다.

2.4. 형광염색을 이용한 선충의 생존력 확인

형광염색액인 6-carboxyfluorescien diacetate (C₂₅ H₁₆O₉)를 이용하여 시료와 1시간 반응시킨 후, ethidium bromide (C₂₁H₂₀N₃Br)로 이중염색하여 형광현미경 (DMLS, Leica) 하에서 선충의 생존력 여부를 현미경의 시야에서 10개의 field를 산정하여 관찰하였다.

2.5. 방사선조사에 의한 선충 사멸 기작

본 연구에서 사용된 방사선 조사방법은 고에너지의 전리방사선이 수용액에 조사될 때 발생하는 화학작용을 응용하는 방법이다^{13,14)}. 방사선은 수용액 상에 존재하는 미생물뿐만 아니라 유기오염물질도 분해할 수 있는데 이는 물이 방사선에 의해 방사화 분해될 때 생성되는 여러 가지 라디칼에 의해 미생물 및 유기오염물질이 제거되기 때문이다¹⁵⁾. 이렇듯 물은 방사선에 의해 방사화 분해되어 반응성이 큰 라디칼을 생성하는데 이는 다음과 같이 진행된다.



방사선에 의한 라디칼 효과를 측정하기 위해서 증류수에 방사선을 조사한 후 DMPO (5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide, Aldrich)를 첨가하여 ·OH 생성을 ESRs (electron spin resonance spectroscopy, Bruker EMX)를 이용하여 측정하였다.

3. 실험결과 및 토의

3.1. 선충의 운동성 변화

계수법을 이용하여 선충수를 측정할 결과 방사선 처리를 하지 않은 대조구 시료의 경우 45.5 마리로 나타났다. 한편 방사선을 5~75 kGy의 선량으로 조사할 경우 방사선을 조사하지 않은 대조구 시료에 비하여 약 50 % 정도의 선충이 완전사멸된 것으로 측정되었다 (Table 1). 방사선 처리를 하지 않은 대조구의 경우, 90% 이상의 선충에서 운동성이 관찰되었으나 5, 10 kGy의 방사선을 조사할 경우 생존한 선충의 각각 78%, 5%만이 운동성을 보였다. 그러나, 30, 50, 75 kGy로 조사할 경우 운동성이 전혀 관찰되지 않았는데, 이는 방사선을 조사 후 생존하는 선충의 대부분이 기능을 상실하였음을 보여준다.

3.2. 선충의 사멸

방사선을 조사할 경우 운동성을 지니지 않으면서 완전 사멸된 선충과 생존력을 지닌 선충을 구별하여 관찰하기 위하여 형광염색을 이용하여 선충의 사멸여부를 관찰하였다. Fig. 1~6에는 방사선 조사 선량에 변화에 따른 선충사멸에 대한 형광염색 결과를 나타내었다.

방사선을 조사하지 않은 대조구의 시료내 선충을 10시야 관찰한 결과 10시야 모두에서 녹색 형광을 띠며 강한 생존력을 나타내었다. 방사선을 5 kGy 조사할 경우 10시야를 관찰하였을 때 9시야에서 생존력을 나타내었다. 조사선량이 증가할수록 사멸된 개체수가 증가하여 75 kGy 조사할 경우 관찰된 10시야 중 4 시야에서 생존력을 나타내었다. 이는 조

Table 1. Calculation of Nematodes in accordance of Irradiation Dose (Nematodes/mL)

Mobility	Irradiation Dose (kGy)					
	0	5	10	30	50	75
N.N.	2.3	5.2	22	23.7	22	22
M.N.	43.2	18.4	1.2	0	0	0
Total	45.5	23.6	23.2	23.7	22	22
(Removed, %)	(0)	(48)	(49)	(48)	(52)	(52)

N.N : non motility nematode
M.N : motility nematode



Fig. 1. Fluorochromatic reaction of unirradiated nematodes.



Fig. 2. Fluorochromatic reaction of nematodes after irradiated at 5 kGy.



Fig. 3. Fluorochromatic reaction of nematodes after irradiated at 10 kGy.

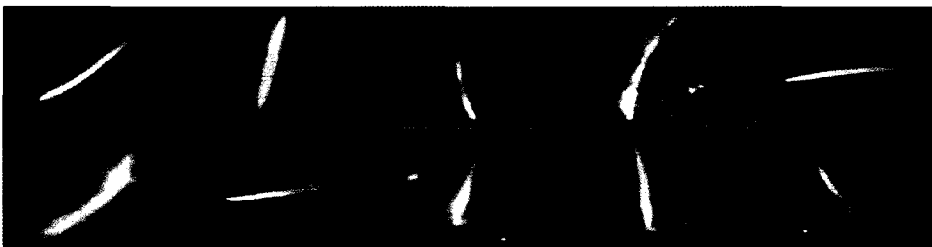


Fig. 4. Fluorochromatic reaction of nematodes after irradiated at 30 kGy.



Fig. 5. Fluorochromatic reaction of nematodes after irradiated at 50 kGy.

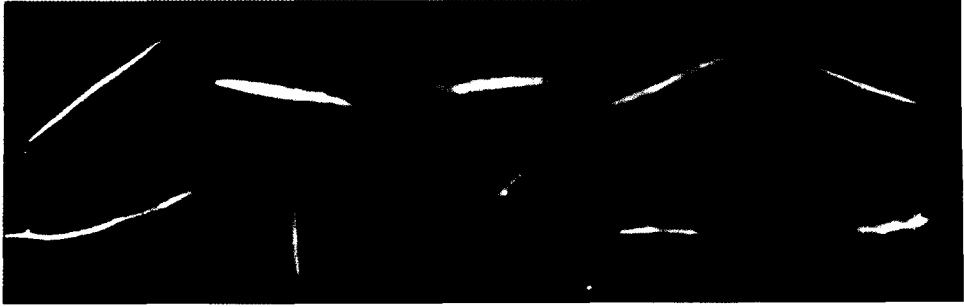


Fig. 6. Fluorochromatic reaction of nematodes after irradiated at 75 kGy.

사한 시료 전체에 있는 선충 중에서 80% 이상이 사멸된 것으로 이해할 수 있다. Figure 1~6에는 각각 조사하지 않은 대조군 시료와 5, 10, 30, 50, 75 kGy로 조사하였을 경우 형광 염색된 선충의 사진을 나타내었다.

3.4. 방사선조사에 의한 선충 사멸 기작 평가

감마선을 이용한 방사선 처리는 물의 방사분해를 통하여 수산화전자(e^-_{aq}), 수산화라디칼($\cdot OH$), 수소원자(H), 수소분자(H_2), 과산화수소(H_2O_2) 등을 생성하는데, 용존산소가 존재하는 경우 수소원자와 수산화자는 산화제인 $HO_2\cdot$ 과 $\cdot O_2^-$ 로 전환되어 결국 산화제인 $\cdot OH$ 과 함께 산화반응을 일으키게 된다¹⁶⁾. 산화성 라디칼인 $\cdot OH$ 과 함께 유기물과의 반응속도는 $10^8 \sim 10^{10} M^{-1}sec^{-1}$ 로 높은 산화환원 전위차($E_0 = 3.08 V$)를 가지며 첨가반응, 탈수소화 반응, 전자전이, 라디칼 재결합 반응 등의 경로로 용질분해 반응을 일으켜 선충을 사멸하는 것으로 생각되어진다^{17,18)}.

Fig. 8에 ESRs를 이용한 방사선 조사에 의한 $\cdot OH$ 생성 스펙트럼을 나타내었다. 방사선을 조사하지 않았을 경우 스펙트럼에 변화가 생기지 않았으나, 10 Gy의 선량으로 조사할 경우 $\cdot OH$ trap 물질인 DMPO

에 의해서 높이의 비가 1:2:2:1인 DMPO-OH 피크가 생성되었다. 방사선에 의해 생성된 $\cdot OH$ 은 선충의 세포 DNA에 손상을 주어 선충 사멸의 결과를 나타내는 것으로 판단되어진다¹⁹⁾. 최근에 *C. elegans*를 이용한 DNA 손상 및 손상복구에 관한 연구가 수행되었으며²⁰⁾, Dequen, F. 등은²¹⁾ 최대 120 Gy의 흡수 선량으로 조사하였을 때, 사멸되는 *C. elegans*는 DNA가 손상을 입어 파괴된다는 것을 입증하였으며 이는 방사선에 의해 생성된 라디칼의 강한 산화력에 의하여 선충이 사멸한다는 본 연구의 결과와도 일치한다.

4. 결론

이상의 연구결과를 통하여 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

방사선 조사에 의하여 생성된 $\cdot OH$ 은 선충의 세포 DNA에 손상을 주어 선충이 사멸되는 것으로 사료된다. 선충시료에 대하여 5~75 kGy의 선량으로 방사선 처리를 한 결과 모든 처리구 시료의 선충은 대조군에 비하여 50% 정도 감소된 것으로 나타났다. 5~10 kGy의 선량으로 방사선을 조사하였을 경우 형광염색결과 40~50% 이상 생존해 있음이 확인되었다. 한편, 방사선을 30 kGy 이상의 선량으로 조사하였을 경우 처리구에 잔존해 있는 선충의 대부분은 운동성이 거의 없었으며, 형광염색법으로 생존 여부를 확인한 결과 처리구 내 선충의 약 60~80%가 사멸된 것으로 확인되었다.

본 연구를 통하여 방사선 조사에 의한 선충 사멸과 그 기작을 확인 할 수 있었으며, 향후 추가 실험을 통하여 현장에 적용 가능한 방사선 이용 살선충 기술 개발의 기초 연구 자료로 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부의 원자력 중장기 연구개발

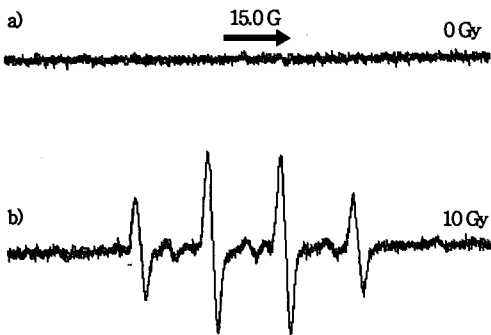


Fig. 7. EPR spectra of DMPO-OH adduct : a) before irradiation and b) after irradiation at 10 Gy.

사업의 일환으로 수행되었음.

참 고 문 헌

- 1) 박현철, 김성만, 김용철, 이충열, 최인수, 1999, 뿌리혹 선충에 대한 선충 포식성 곰팡이의 생물학적 방제효과 검토, 농업기술연구소보, 3, 31-34.
- 2) Suarez, V. H. and R. L. Lorenzo, 2000, Ecology of the free living stages of cattle nematodes during summer contamination in Argentina western pampas. Parasite, 7, 255-261.
- 3) 황경숙, 한상미, 김윤지, 남필원, 한송이, 2003, 경작지 근원 토양내 곤충병원성 선충의 검출 및 정량적 평가, 환경생물학회지, 21, 271-275.
- 4) Maggenti, A. R., 1991, Manual of agricultural nematology, Maecel Dekker, USA, 147-187.
- 5) Sasser, J. N. and C. C. C. Karter, 1985, An advanced treatise on meloidogyne, Biology and Control, 1, 166-193.
- 6) Tayer, A. L. and J. N. Sasser, 1978, Identification and control of root-knot nematodes, Biology, 1-106.
- 7) 정미정, 김희규, 1989, 뿌리혹 선충에 대한 기생 천적 균주의 분리 및 이들의 생장에 미치는 환경조건, 한국응용곤충학회지, 27, 149-158.
- 8) Kim, D. G. and R. D. Riggs, 1991, Characteristics and efficacy of a sterile hypomycete (ARF 18), A new biocontrol agent for heterodera glycines and other nematodes, J. Nematology, 23, 275-282.
- 9) Chon, H. S., H. J. Park, S. G. Yeo, S. D. Park and Y. E. Choi, 1996, Technical development for control on soil nematodes (*Meloidogyne* spp.) of oriental melone in Plastic film house, RDAJ. Agri. Sci., 38, 401-407.
- 10) Han, S. C. and Y. G. Kim, 1997, Screening resistant red pepper varieties to *Meloidogyne hapla* and their resistance mechanisms, Kor. J. Appl. Entomol., 36, 185-191.
- 11) Kim, D. G. and S. K. Choi, 2001, Effects of incorporation method of nematicides on reproduction of *Meloidogyne arenaria*., Kor. J. Appl. Entomol., 40, 89-95.
- 12) Struhan, D. and Z. Mrack, 2000, Comparison of the galleria baiting technique and a direct extraction method for recovering *Steinernema* infective-stage juveniles from soil, Folia Parasitol., 47, 315-318.
- 13) 한국원자력연구소, 1991, 원자력이론, 408-414.
- 14) Shaporo, J., 1990, Radiation protection, Harvard University Press, 21-54.
- 15) 박중현, 1995, 중수도 개발방안 연구, 첨단환경기술, 5, 10-29.
- 16) Getoff, N., 1996, Radiation-induced degradation of water pollutant-state of the art, Radiation Physics and Chemistry, 47, 581-593.
- 17) 유대현, 박상욱, 정영도, 김종배, 이면주, 강준원, 1999, γ -ray 조사를 통한 하수처리장 배출수내 미생물살균에 관한 연구, 대한환경공학회지, 21, 635-641.
- 18) 조훈제, 이선미, 김정규, 정진호, 2004, 감마선 처리에 의한 페놀과 2,4,6-트리클로로페놀의 분해제거 비교연구, 대한환경공학회지, 26, 966-969.
- 19) Cadet, J., T. Douki, D. Gasparutto and J. Ravanat, 2005, Radiation-induced damage to cellular DNA: measurement and biological role, Rad. Phy. Chem., 72, 293-299.
- 20) Stergou, L. and M. O. Hengartner, 2004, Death and more: DNA damage response pathways in the nematode *C. elegans*, Cell Death Differ., 11, 21-28.
- 21) Dequen, F., S. N. Gagnon and S. Desnoyers, 2005, Ionizing radiations in *Caenorhabditis elegans* induce poly(ADP-ribosyl)ation, a conserved DNA- damage response essential for survival, DNA repair, 4, 814-825.