	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0067717 (43) 공개일자 2012년06월26일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 5/07 (2010.01) C12N 1/20 (2006.01) C12N 5/02 (2006.01) (21) 출원번호 10-2010-0129269 (22) 출원일자 2010년12월16일 심사청구일자 2010년12월16일		(71) 출원인 연세대학교 산학협력단 서울특별시 서대문구 연세로 50, 연세대학교 (신촌동) (72) 발명자 신철수 서울특별시 은평구 갈현로33길 24, 현대아파트 101-106 (갈현동) 박해웅 경기도 고양시 일산서구 일산로725번길 10 (대화동) 윤성훈 서울특별시 강남구 역삼로92길 12, 코오롱 R & F 빌라 B동 2호 (대치동) (74) 대리인 특허법인다나

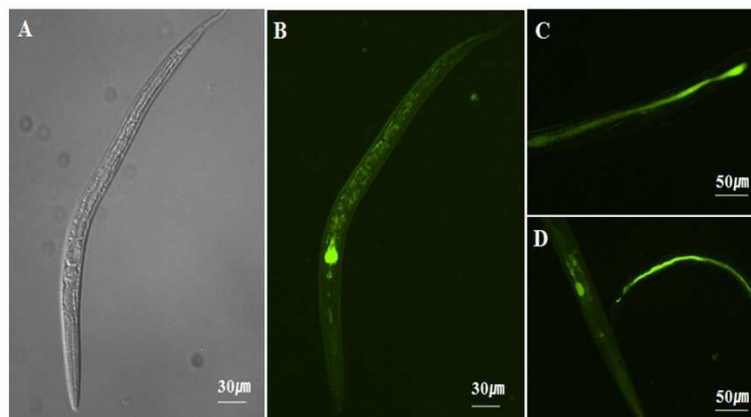
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 곤충병원성 선충 랍디티스 블루미의 배양 방법

(57) 요약

본 발명은 곤충병원성 선충 랍디티스 블루미(*Rhabdtis blumi*)의 배양 방법을 제공한다. 본 발명을 통해 곤충병원성 선충 랍디티스 블루미의 공생세균 및 증식 조건이 밝혀졌으며, 이를 통해 인시류 및 풍뎅이류를 포함한 해충들에 대한 폭넓은 방제 스펙트럼을 갖고 있는 랍디티스 블루미의 대량증식이 가능해졌다.

대표도 - 도2



특허청구의 범위

청구항 1

프로비덴시아 버미콜라(*Providencia vermicola*), 플라보박테리움(*Flavobacterium* sp.) 및 알칼리제네스 패칼리스(*Alcaligenes faecalis*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 공생세균을 포함하는 배지 중에서 곤충병원성 선충 랩디티스 블루미(*Rhabditis blumi*)를 배양하는 것을 포함하는 곤충병원성 선충 랩디티스 블루미의 생산 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 배지는 프로비덴시아 버미콜라 및 알칼리제네스 패칼리스를 포함하는 것인 곤충병원성 선충 랩디티스 블루미의 생산 방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 프로비덴시아 버미콜라 및 알칼리제네스 패칼리스는 10 내지 20: 1 내지 5의 비율로 포함되는 것인 곤충병원성 선충 랩디티스 블루미의 생산 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 배지는 프로비덴시아 버미콜라, 플라보박테리움 및 알칼리제네스 패칼리스를 포함하는 것인 곤충병원성 선충 랩디티스 블루미의 생산 방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

프로비덴시아 버미콜라, 플라보박테리움 및 알칼리제네스 패칼리스는 10 내지 20 : 0.1 내지 1 : 1 내지 5의 비율로 포함되는 것인 곤충병원성 선충 랩디티스 블루미의 생산 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 배지 중의 프로비덴시아 버미콜라의 농도가 1×10^9 cfu/ml 내지 1×10^{11} cfu/ml인 곤충병원성 선충 랩디티스 블루미의 생산 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

곤충병원성 선충 랩디티스 블루미는 공생세균의 배양 후 배지에 도입되는 것인 곤충병원성 선충 랩디티스 블루미의 생산 방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

곤충병원성 선충 랍디티스 블루미는 공생세균의 배양 24시간 이후에 배지에 도입되는 것인 곤충병원성 선충 랍디티스 블루미의 생산 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

곤충병원성 선충 랍디티스 블루미는 공생세균의 배양 30시간 이후에 배지에 도입되는 것인 곤충병원성 선충 랍디티스 블루미의 생산 방법.

청구항 10

제1항에 있어서,

배양시 통기량은 2 내지 8vvm인 곤충병원성 선충 랍디티스 블루미의 생산 방법.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 배지는 효모 추출물, 콜레스테롤, 식물성 오일, 콩 가수분해물 및 소듐클로라이드로 구성되는 성분으로부터 선택되는 하나 이상의 성분을 포함하는 것인 곤충병원성 선충 랍디티스 블루미의 생산 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 곤충병원성 선충 랍디티스 블루미의 배양 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 경제성장에 따른 국민생활의 질적 향상과 식품의 안전성에 대한 사회적 관심의 증대로 친환경 농산물의 시장은 폭발적으로 증가하여 1990년 후반 이후 지난 5년 동안 친환경 농산물 생산은 매년 70% 이상의 급속한 성장세를 나타내고 있다.

[0003] 친환경 농산물의 생산을 위해 현재 사용되고 있는 화학적 살충제를 대신할 해충 방제 방법으로서 곤충병원성 선충 (entomopathogenic nematode)을 이용한 천적개념의 생물학적 방제가 효과적인 방법으로 주목받고 있다.

[0004] 현재 알려져 있는 곤충병원성 선충으로는 *Steinernema* spp. (Steinernematidae)과 *Heterorhabditis* spp. (Heterorhabditidae)가 있으며, 이들은 각각 공생세균인 *Xenorhabdus* spp.와 *Photorhabdus* spp.와 특이적으로 결합하여 곤충의 입, 항문, 또는 표피의 기공 등을 통해 기주에 침입한 후 공생세균을 분비하며, 방출된 공생세균은 패혈증을 일으켜 기주를 48시간 이내에 치사시키는 살충기작을 지니고 있다 (Marcek et al., 1988; Clarke and Dowds, 1995; Gerritsen et al., 1998; Grewal and Georgis, 1999). 이러한 곤충병원성 선충은 포장에서의 오랜 지속성과 넓은 기주범위, 유용동물에 대한 안전성, 살포의 용이함, 감염된 기주해충을 통한 이차적인 증식을 통하여 재생산되어 토양서식 해충 방제에 유용한 천적개념의 생물방제제로 평가받고 있다 (Kaya and Gaugler, 1993).

[0005] 곤충병원성 선충은 기술적으로 활용가능성이 높은 여러 가지 특성을 나타내지만, 기주해충 내에서 선충의 병원성발현에 주요한 영향을 미치는 공생세균과의 단단한 공생관계로 인하여 기존 선충의 살충성 개량에 어려움

이 존재한다. 따라서, 한국의 환경에 생태학적으로 안전하고 고살충성을 나타내는 새로운 곤충병원성 선충을 개발하고, 이를 대량으로 증식할 수 있는 배양 방법에 대해 연구할 필요가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 곤충병원성 선충 랩디티스 블루미(*Rhabditis blumi*)를 대량으로 증식시킬 수 있는 생산 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 지금까지 랩디티스 블루미가 곤충병원성을 갖는다는 사실은 밝혀진 적이 없으며, 랩디티스 블루미가 세균 프로비덴시아 버미콜라(*Providencia vermicola*), 플라보박테리움(*Flavobacterium* sp.) 및 알칼리제네스 패칼리스(*Alcaligenes faecalis*)와 공생한다는 사실 또한 밝혀진 적이 없다. 본 발명은 랩디티스 블루미가 프로비덴시아 버미콜라, 플라보박테리움 및 알칼리제네스 패칼리스와 공생하며, 기주해충에 선충이 침입하여 이들 공생세균을 분비함으로써 기주해충을 죽인다는 사실, 그리고 랩디티스 블루미가 이들 공생세균을 영양원으로 사용하여 성장 및 증식한다는 사실에 대해 처음으로 밝혔다.

[0008] 따라서, 본 발명은 프로비덴시아 버미콜라, 플라보박테리움 및 알칼리제네스 패칼리스로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 공생세균을 포함하는 배지 중에서 곤충병원성 선충 랩디티스 블루미를 배양하는 것을 포함하는 곤충병원성 선충 랩디티스 블루미의 배양 방법을 제공한다. 하기 실시예에서 확인할 수 있는 바와 같이, 프로비덴시아 버미콜라, 플라보박테리움 및 알칼리제네스 패칼리스로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 공생세균을 포함하는 배지에서 랩디티스 블루미를 배양함으로써 선충의 증식을 유도할 수 있다. 위 세 가지 공생세균 중 프로비덴시아 버미콜라가 곤충병원성 선충 랩디티스 블루미의 성장과 증식, 그리고 병원성 발현에 가장 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다. 또한, 알칼리제네스 패칼리스는 프로비덴시아 버미콜라를 이상 증식시키는데 역할을 하는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 곤충병원성 선충 랩디티스 블루미의 대량 생산을 위해서는 배지는 프로비덴시아 버미콜라 및 알칼리제네스 패칼리스를 포함할 수 있다. 한 구체예에서, 상기 배지는 프로비덴시아 버미콜라 및 알칼리제네스 패칼리스를 10 내지 20: 1 내지 5의 비율로 포함할 수 있다. 프로비덴시아 버미콜라플라보박테리움알칼리제네스 패칼리스 알칼리제네스 패칼리스는 프로비덴시아 버미콜라의 이상 증식에 기여하는 세균이므로 그 양은 프로비덴시아 버미콜라에 비해 적게 사용될 수 있다.

[0009] 다른 구체예에서, 상기 배지는 프로비덴시아 버미콜라, 플라보박테리움 및 알칼리제네스 패칼리스를 포함하는 것일 수 있다. 일반적인 곤충병원성 선충 랩디티스 블루미의 감염태 선충은 이 세 가지 공생세균을 모두 가지고 있다. 다만, 프로비덴시아 버미콜라가 곤충병원성 선충 *Rhabditis blumi*의 성장, 증식, 또는 병원성에 결정적인 세균임을 감안할 때, 알칼리제네스 패칼리스처럼 프로비덴시아 버미콜라의 증식에 직접적인 관여를 하지 않는 플라보박테리움의 경우 배지 내 상대적으로 적은 양이 포함될 수 있다. 예를 들어, 상기 배지에서 프로비덴시아 버미콜라, 플라보박테리움 및 알칼리제네스 패칼리스는 10 내지 20: 0.1 내지 1: 1 내지 5의 비율로 포함될 수 있다. 다만, 배양 시 인위적으로 플라보박테리움을 넣어야 할 필요성은 없다.

[0010] 앞서 설명한 바와 같이, 위 세 가지 공생세균 중에서도 랩디티스 블루미의 증식에 가장 큰 역할을 하는 것은 프로비덴시아 버미콜라로서 이의 양을 조절함으로써 랩디티스 블루미의 대량 증식을 유도할 수 있다. 바람직하게는 상기 배지 중의 프로비덴시아 버미콜라의 농도는 1×10^9 cfu/ml 내지 1×10^{11} cfu/ml일 수 있다.

[0011] 상기 배지는 공생세균의 증식 및 선충의 증식을 위한 조성을 가질 수 있다.

[0012] 한편, 곤충병원성 선충 랩디티스 블루미는 공생세균의 배양 후 배지에 도입되는 것이 바람직하다. 공생세균의 대량증식 기간 동안에는 산소의 소모량이 많으므로, 공생세균의 대량증식이 끝난 이후에 선충이 도입되는 것이 선충의 성장과 증식에 유리할 것이다. 선충의 도입시간은 공생세균의 배양 24 시간 이후, 바람직하게는 30 시간 이후, 예컨대 48시간 이후일 수 있다. 또한, 공생세균과 선충의 배양시 통기량은 2 내지 8vvm일 수 있다. 바람직하게는 통기량은 5 내지 7vvm일 수 있다.

[0013] 한 구체예에서, 상기 배지는 효모 추출물, 콜레스테롤, 식물성 오일, 콩 가수분해물 및 소듐클로라이드로 구

성되는 성분으로부터 선택되는 하나 이상의 성분을 포함하는 것일 수 있다. 효모 추출물은 공생세균의 성장을 위한 탄소원 및 질소원을 제공하는 역할을 하며, 콜레스테롤이나 식물성 오일은 선충의 증식을 위한 요소로 포함된다.

발명의 효과

[0014] 본 발명을 통해 곤충병원성 선충 랩디티스 블루미의 공생세균의 종류 및 증식 조건이 밝혀졌으며, 이를 통해 인시류 및 풍뎅이류를 포함한 해충들에 대한 폭넓은 방제 스펙트럼을 갖고 있는 랩디티스 블루미의 대량증식이 가능해졌다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1A는 곤충병원성 선충 랩디티스 블루미가 기주해충의 기문을 통해 침입함을 보여주고, 도 1B는 선충의 침입 후 기주해충은 세균감염으로 인하여 몸체가 검정색으로 변하고 치사됨을 보여준다.

도 2는 곤충병원성 선충 랩디티스 블루미의 공생세균을 염색한 후 선충과 배양하여 이를 형광현미경으로 관찰한 결과를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0017] [실시예]

[0018] 해충의 준비

[0019] 랩디티스 블루미 선충의 병원성 검정을 위하여, 공주와 수원의 유기농 농가에서 거세미나방 *Agrotis segetum* (Lepidoptera: Noctuidae), 배추흰나비 *Artogeia rapae* (Lepidoptera: Pieridae), 검은은무늬나방 *Autographa nigrisigna* (Lepidoptera: Noctuidae), 복숭아명나방 *Dichocrocis punctiferalis* (Lepidoptera: Pyralidae), 미국흰불나방 *Hyphantria cunea* (Lepidoptera: Arctiidae), 흰띠명나방 *Hymenia recurvalis* (Lepidoptera: Pyralidae), 도둑나방 *Mamestra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae), 목화바둑명나방 *Palpita indica* (Lepidoptera: Pieridae), 배추좀나방 *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae), 과밤나방 *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae), 담배거세미나방 *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae)을 포함한 11가지 인시류 해충의 3령과 4령충을 채집하였으며, 농업과학기술원 원예연구소로부터 3령과 4령의 꿀벌부채명나방 *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae)을 공급받아 총 12종의 인시류 해충을 준비하였다.

[0020] 파주 소재 서원골프클럽과 고양의 야산에서 각각 풍뎅이류 해충인 등얼룩풍뎅이 *Blitopertha orientalis* (Coleoptera: Scarabaeidae)와 밤바구미 *Curculio sikkimensis* (Coleoptera: Curculionidae)를 채집하여 총 두 종의 풍뎅이류 해충을 준비하였다.

[0021] **실시예 1: 여러 가지 해충에 대한 랩디티스 블루미의 병원성 검정 (기주범위탐색)**

[0022] 실험실 수준에서 각 해충에 대한 랩디티스 블루미의 병원성을 검정하기 위하여, 처리구당 30마리씩의 건전한 3령과 4령의 유충을 사용하여 페트리디쉬법에 의거 100 감염태선충(IJs)/larva의 농도로 감염태 선충을 접종하고, 배양기에서 25°C 로 온도를 유지한 후 24시간마다 죽은 사체에서 선충의 유무를 확인하여 5일 후와 10일 후 기주해충의 치사율을 계산하였다.

[0023] 현미경 관찰 결과, 랩디티스 블루미 선충은 기주해충의 기문이나 항문을 통하여 침입함을 알 수 있었다(도 1A). 선충의 침입 후 기주해충은 세균감염으로 인하여 몸체가 검정색으로 변하고 결국 치사되었다(도 1B).

[0024] 선충의 병원성은 해충의 종류에 따라 차이를 나타내었다 ($F=40.39$; $df=13,56$; $P<0.001$). 하기 표 1에 나타낸 바와 같이, 선충을 처리한 후 5일째, 거세미나방과 복숭아명나방을 제외한 모든 해충에서 70-90%의 치사율이 관찰되었다. 노출시간을 5일에서 10일로 연장하였을 때, 거세미나방과 복숭아명나방의 치사율은 각각 0에서 81.1%, 34.4%에서 85.6%로 증가하였으나, 다른 해충의 치사율은 증가하지 않았다. 랩디티스 블루미가 분리되었던 등알룩풍뎅이의 경우 94.4%의 가장 높은 치사율을 나타내었다.

[0025] [표 1]

목(Order)	% 보정 치사율 ^a ±SE	
과(family)	5 일	10 일
종(species)		
Coleoptera		
Curculionidae		
<i>Curculio sikkimensis</i>	72.6±4.5b	75.9±5.3b
Scarabaeidae		
<i>Blitopertha orientalis</i>	93.3±5.8a	93.3±5.8a
Lepidoptera		
Arctiidae		
<i>Hyphantria cunea</i>	73.3±5.8b	73.3±5.8b
Noctuidae		
<i>Agrotis segetum</i>	0.0±0.0d	81.7±5.1ab
<i>Autographa nigrisigna</i>	82.2±5.9ab	82.2±5.9ab
<i>Mamestra brassicae</i>	76.7±5.8ab	76.7±5.8b
<i>Spodoptera exigua</i>	75.0±5.0b	75.0±5.0b
<i>Spodoptera litura</i>	70.5±0.8b	70.5±0.8b

[0026]

Pieridae		
<i>Artogeia rapae</i>	86.3±5.5ab	86.3±5.5ab
Pyralidae		
<i>Dichocrocis punctiferalis</i>	34.8±8.3c	85.8±5.2ab
<i>Galleria mellonella</i>	86.7±5.8ab	86.7±5.8ab
<i>Hymenia recurvalis</i>	83.3±5.8ab	83.3±5.8ab
<i>Palpita indica</i>	82.5±4.3ab	82.5±4.3bc
Yponomeutidae		
<i>Plutella xylostella</i>	81.8±5.1ab	81.8±5.1ab

The different letters indicate that the values are significantly different at $P < 0.05$ (Tukey's HSD).

^aThe corrected mortality was checked daily for 10 days after nematode treatment. *Rhabditis blumi* was applied at a dose of 100 IJs per larva.

Corrected mortality = [(treatment mortality-control mortality)/(100-control mortality)] × 100

본 연구에 사용된 랩디티스 블루미는 풍뎅이류 유충에서 분리되어 등얼룩풍뎅이 유충에서 가장 높은 병원성을 나타내지만, 나방류나 파리 유충에 대해서도 비교적 높은 병원성을 보이고 있어 대상해충 모두의 방제에 대해서 적합한 방제수단이라고 판단되었다.

실시예 2: 십자화과 식물에 해를 가하는 세 가지 해충에 대한 랩디티스 블루미의 병원성 검정

십자화과 식물을 가해하는 대표적인 세 가지 해충- 배추흰나비, 도둑나방, 배추좀나방에 대한 랩디티스 블루미의 병원성을 네 가지 농도에서 검증하였다. 처리구당 90마리씩의 건전한 3령과 4령의 유충을 사용하여 페트리디쉬법에 의거 10, 20, 40, 그리고 80 IJs/larva의 농도로 선충을 접종하고, 배양기에서 25°C 로 온도를 유지하고 24시간마다 해충의 치사유무를 관찰하였다.

하기 표 2에 나타난 바와 같이, 선충의 처리농도($F=1064.4$; $df=4,60$; $P<0.001$)가 증가할수록 각 해충의 치사율을 높게 관찰되었고, 해충의령수($F=37.3$; $df=1,60$; $P<0.001$)가 증가할수록 높은 치사율이 관찰되었다. 배추흰나비의 경우 각 해충당 10에서 80마리까지 농도로 선충을 처리하였을 때, 3령과 4령에서 각각 24.5%에서 79.4%와 23.4%에서 88.2%의 치사율이 관찰되었다. 도둑나방의 경우 3령에서 72.0%, 4령에서 77.8%의 치사율을 나타내었고, 배추좀나방의 경우 3령과 4령에서 각각 87.5%, 93.5%의 치사율을 나타내었다. 세 가지 해충에서 배추좀나방 4령충에 80마리의 감염태 선충을 처리하였을 때 가장 높은 치사율이 관찰되었다.

[0033] [표 2]

투여량	% 치사율(mean ± SE) ^a		
(IJs/larva)	<i>Artogeia rapae</i>	<i>Mamestra brassicae</i>	<i>Plutella xylostella</i>
3rd instar			
0	12.9±0.4fg	10.3±4.5e	14.9±2.7f
10	24.5±2.1de	16.8±3.5de	17.5±5.0f
20	34.9±1.7d	36.8±5.5c	40.1±3.5e
40	69.4±5.8b	45.2±1.7bc	67.6±5.4c
80	79.4±2.1ab	72.0±4.3a	87.5±6.4ab
4th instar			
0	10.0±1.7g	11.0±1.7e	7.2±1.2f
10	23.4±5.2ef	24.5±1.9d	18.4±1.7f
20	46.3±2.4c	39.5±3.4c	54.8±3.1d
40	77.6±5.4ab	53.7±2.1b	79.2±3.8b
80	88.2±5.9a	77.8±7.7a	93.5±1.3a

[0034]

^a The different letters on rectangles indicate that the values are significantly different at P<0.05 (Tukey's HSD). The larval mortality rates of *Artogeia rapae*, *Mamestra brassicae*, and *Plutella xylostella* were measured 5 days after nematode treatment. A total of ninety larvae in nine dishes per each treatment were tested.

[0035]

[0036] 각 해충의 4령에서 선충에 대한 감수성이 증가하는 이유는 해충의 크기가 커질수록 선충이 침입할 수 있는 기문, 입, 항문 등의 크기가 커져 선충의 침입이 상대적으로 유리하다고 판단되었다. 다른 곤충병원성 선충인 *S. carpocapsae* 선충의 경우에서도 배추좀나방과 배추흰나비의 영수가 증가할수록 선충이 쉽게 침입하는 결과를 나타내었다 (Beair, G., Fournier, Y., Dauphinais, N. (2003) Efficacy of steinernematid nematodes against three insect pests of crucifers in Quebec. *J. Nematol.* 35, 259-265).

[0037]

표 2에서 측정된 데이터를 이용하여 반수치사농도(LD₅₀)와 반수치사시간(LT₅₀)을 측정하였다. 그 결과, 하기 표 3에 나타난 바와 같이, 해충의 영수가 커질수록 LD₅₀ 값이 작아지고 LT₅₀ 값이 커지는 경향을 나타내었다. 세 가지 해충의 LT₅₀와 LD₅₀은 각각 대략 25.7-48.2 IJs/larva와 53.2-88.0 h으로 측정되었다. 반수치사 농도를 근거로 사용하여 랍디티스 블루미의 병원성 발현은 배추좀나방, 배추흰나비, 도둑나방 순으로 측정되었다.

[0038] [표 3]

해충 종류	단계	95%		95%	
	(instar)	LD ₅₀ ^a	Confidence	LT ₅₀ ^a	Confidence
			Interval		Interval
<i>Artogeia rapae</i>	3rd	36.1c	15.6-68.9	83.6a	78.7-88.8
	4th	28.0e	4.5-62.7	72.6ab	61.5-84.2
<i>Mamestra brassicae</i>	3rd	48.2a	33.5-76.6	88.0a	73.1-107.6
	4th	40.6b	27.0-60.8	86.8a	82.0-92.1
<i>Plutella xylostella</i>	3rd	33.1d	19.9-50.5	59.7b	41.1-77.2
	4th	25.7f	2.3-60.1	53.2b	33.6-71.9

^a The different letters on rectangles indicate that the values are significantly different at P<0.05 (Tukey's HSD).

[0039] LT₅₀ measured at a dose of 80 nematodes per larva

[0040] 실시예 3: 포트 실험

[0041] 파종한 지 50일이 지난 배추모종을 플라스틱 상자 (30 x 30 x 28.5 cm)에 3모씩 넣었다. 배추모종당 유충의 종류와 영수를 구분하여 각각 10마리씩 앞에 부착시킨 후, 유충이 완전히 정착할 수 있도록 2시간 동안 방치하였다. 유충의 정착 유무를 확인한 후, 각 상자에 각각 3,000, 9,000, 그리고 12,000마리의 선충이 포함된 선충용액 30 ml을 휴대용 분무기를 사용하여 살포하였다. 무처리구는 살균수 30 ml을 살포하였다. 플라스틱 상자는 25°C, 상대습도 60±5%인 생장상에 넣은 다음, 처리 7일 후 유충의 치사유무를 관찰하였다. 실험은 3회 반복으로 수행하였다.

[0042] 그 결과, 하기 표 4에 나타낸 바와 같이, 랩디티스 블루미선충의 병원성은 해충의 종류(F=30.6; df=2,24; P<0.001)와 선충의 처리농도(F=279.42; df=3,24; P<0.001)가 증가할수록 증가하였다. 배추흰나방의 경우 36.7%에서 76.7%, 도둑나방은 26.6%에서 66.7%, 그리고 배추좀나방은 53.3%에서 93.3%의 치사율을 나타내었다.

[표 4]

투여량 (IJs/pot)	% 치사율 (mean±SE) ^a		
	<i>Artogeia rapae</i>	<i>Mamestra brassicae</i>	<i>Plutella xylostella</i>
0	0.0±0.0d	0.0±0.0d	0.0±0.0d
3,000	36.7±5.8c	26.6±5.7c	53.3±5.8c
9,000	63.3±5.8b	53.3±5.8b	76.7±5.8b
12,000	76.7±5.8a	66.7±5.8a	93.3±5.8a

^a The different letters on rectangles indicate that the values are significantly different at P<0.05 (Tukey's HSD).

실시예 4: 포장실험

시설재배지에서 배추흰나비, 도둑나방, 배추좀나방에 대한 랍디티스 블루미의 병원성을 검정하기 위하여 충남 연기군 소재 시설하우스 재배지와 경기도 수원소재 시설하우스 재배지에서 싹추와 적겨자를 대상으로 포장실험을 수행하였다. 각 식물은 30 cm 간격으로 심어져 있었으며, 3.31 m²의 면적을 한 구로 정하여 각각 1 x 10¹⁰, 2 x 10¹⁰, 그리고 3 x 10¹⁰ IJs per ha 의 농도로 10 리터의 선충용액을 살포하였다. 무처리구는 10 리터의 물을 살포하여, 처리 7일 후 아래와 같은 계산식을 사용하여 병원성을 계산하였다.

$$LR = [1 - (N_t / N_0) / (C_t / C_0)] \times 100$$

N₀: 선충처리구에서 선충살포직후 해충의 밀도, N_t: 선충처리구에서 7일 후 해충의 밀도, C₀: 무처리구에서 물 살포직후 해충의 밀도, C_t: 무처리구에서 7일후 해충의 밀도.

표 5에 나타낸 바와 같이, 시설재배지에서 채소의 종류와 해충의 종류에 따라 선충의 살포효과는 커다란 차이를 나타내었다. 채소의 경우 선충처리에 따른 해충밀도의 감소는 싹추, 적겨자, 케일의 순으로 관찰되었으며, 대상해충이 배추좀나방, 배추흰나비, 도둑나방 순으로 선충에 대한 감수성이 증가하였다. 싹추에서의 경우 선충의 처리농도가 1 x 10¹⁰에서 3 x 10¹⁰ IJs per ha 로 증가하였을 때, 해충의 종류에 따른 처리효과는 차이가 있었다 (F=134.2; df=2,54; P<0.001). 배추좀나방, 배추흰나비, 그리고 도둑나방의 밀도는 각각 59%에서 88%, 8%에서 29%, 8%에서 37%로 감소하였다. 세 가지 해충 중 배추좀나방 유충에 대한 방제효과가 가장 우수하였다. 배추좀나방의 경우 채소종류에 따른 포장효과 (F=10.8; df=2,18; P<0.001)는 차이를 나타내었고, 선충의 처리농도를 1 x 10¹⁰에서 3 x 10¹⁰ IJs per ha 로 증가하였을 때, 케일에서 47%에서 72%로 가장 낮은 방제효과가 관찰되었다.

시설재배지에서 포장효과는 포트실험에서 엽채류의 종류에 따른 선충의 지속성 결과와 높은 상관관계를 나타내었다. 채소의 엽면에 잔털은 선충용액의 보유에 유리하게 작용하여 결과적으로 포장효과를 높여준다고 판단되었다.

[0051] [표 5]

식물 종류	해충 종류 ^a	유충 감소율(%)		
		선충 투여량		
		1 10 ¹⁰	x 2 x 10 ¹⁰	3 x 10 ¹⁰
<i>Brassica lee</i> ssp. namai	Ar	7.6	15.7	28.7
	Mb	7.9	35.7	36.8
	Px	59.3	71.0	88.0
<i>Brassica junacea</i> L.	Ar	5.9	14.4	26.5
	Mb	8.7	32.5	34.6
	Px	55.6	69.0	85.9
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>acephala</i>	Ar	3.4	17.4	25.6
	Mb	7.5	30.9	33.3
	Px	46.9	64.5	72.2

[0052]

[0053] 실시예 5: 공생세균을 이용한 살충력 검정

[0054] 공생세균은 기주해충의 체혈강에 단독으로 침입할 수 없다. 따라서, 공생세균을 액체배지에서 24 시간 배양하여 혈강주입법에 의해 기주해충의 치사율을 검정하였다.

[0055] 프로비덴시아 버미콜라, 플라보박테리움 및 알칼리제네스 패칼리스 5 ul의 공생세균 용액 (2×10^5 , 2×10^6 , and 2×10^7 cells/ml in Ringer's solution)을 5 ul씩 랩디티스 블루미 의 체혈강에 직접 투여하여 꿀벌부채 명나방 유충에 대한 병원성을 검정하였다.

[0056] 표 6에서 볼 수 있는 바와 같이, 각 세균의 종류에 따라 병원성은 커다란 차이를 나타내었다 (F=283.8; df=2,36; P<0.001).

[표 6]

처리 후 시간		세균 농도(cells/larva)		
	(h)	10^3	10^4	10^5
Saline	24	0	0	0
Alc		0	0	3
Fla		0	7	13
Pro		0	7	23
Saline	48	0	0	0
Alc		3	13	27
Fla		100	100	100
Pro		100	100	100

Total 90 larvae were tested for each case.

프로비텐시아 버미콜라와 플라보박테리움을 1×10^5 처리하여 24시간 경과한 경우, 20% 내외의 병원성을 나타낸 반면, 알칼리제네스 패칼리스와 식염수를 처리한 경우 병원성을 나타내지 않았다. 48시간이 경과한 뒤, 프로비텐시아 버미콜라와 플라보박테리움은 모든 농도에서 100% 병원성을 나타냈지만, 알칼리제네스 패칼리스는 30% 미만의 병원성을 나타내었다. 따라서, 세 가지 세균 중, 프로비텐시아 버미콜라와 플라보박테리움이 선충의 병원성 발현에 결정적인 세균이라 판단되었다.

실시예 6: 무균선충의 병원성 검정

공생세균의 유무에 의한 선충의 병원성을 측정하기 위하여 무균선충과 감염태선충을 각각 멸균식염수 1 ml에 2,000 마리 농도로 준비하고 5 ul의 선충용액을 꿀벌부채명나방 유충에 직접 투여하였다. 또한 항생제에 의한 병원성의 차이를 검정하기 위해 선충용액에 항생제(500 U/ml of penicillin 와 500 ppm of streptomycin)를 처리하여 꿀벌부채명나방의 혈체강에 직접 투여하였다.

그 결과, 표 7에서 볼 수 있는 바와 같이, 선충내부에 공생세균을 없는 무균선충은 120 시간까지 꿀벌부채명나방 유충에 대하여 병원성을 나타내지 않았다.

[0064] [표 7]

시간	구분	치사율 (%)
48h	/S	0c
	/A	0c
	AJ/A	0c
	IJ/A	0c
	IJ/S	90b
120h	/S	3.3c
	/A	3.3c
	AJ/A	7.8c
	IJ/A	100a
	IJ/S	100a

Total 90 larvae were tested for each case. The different letters on rectangles indicate that the values are significantly different at $P < 0.05$ (Tukey's HSD).

/S: saline solution; /A: antibiotic solution; AJ/A: axenic J1/J2 juveniles in antibiotic solution; IJ/A: IJs in antibiotic solution; IJ/S: IJs in saline solution.

[0065]

[0066]

선충처리시 항생제의 유무에 따라 병원성 발현에 커다란 차이를 나타내었다 ($t=203.9$, $P < 0.001$). 항생제를 포함한 경우 48시간까지 병원성이 발현되지 않다가 120 시간에 100%의 병원성을 나타낸 반면, 항생제를 포함하지 않았을 경우 48시간부터 90%의 병원성을 발현하여 120시간에 100% 병원성을 나타내었다.

[0067]

일반적으로 무척추 동물에 병원성을 보이는 선충은 결합되어 있는 공생세균과의 조합에 따라 병원성의 차이를 나타내었다 (Wilson, M.J., Glen, D.M., George, S.K. and Pearce, J.D. (1995a) Selection of a bacterium for the mass production of *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Nematoda:Rhabditidae) as a biocontrol agent for slugs. *Fundam. appl. Nematol.* 18, 419-425). 선충은 공생세균의 운반자 역할을 수행하여 기주해충에 침입한 뒤, 선충의 장내에 존재하는 공생세균이 방출되어 증식함으로써 기주해충의 면역체계를 마비시켜 기주해충을 치사시키는 병원성 기작을 가지고 있다 (Marcek, Z., Hanzal, R., Kodrik, D. (1988) Sites of penetration of juvenile steinernematids and heterorhabditids (Nematoda) into the larvae of *Galleria mellonella* (Lepidoptera). *J. Invertebr. Pathol.* 52, 477-478; Clarke, D.J. and Dowds, B.C.A. (1995) Virulence mechanisms of *Potorhabdus* sp. strain K122 toward wax moth larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 66, 149-155; Gerritsen, L.J.M., Wieggers, G.L. and Smits, P.H. (1998) Pathogenicity of new combinations of *Heterorhabditis* spp. and *Photorhabdus limnescens* against *Galleria mellonella* and *Tipula oleracea*. *Biol. Control* 13, 9-15; Grewal, P.S. and Georgis, R. (1999) Entomopathogenic nematodes, In Hall, F.R. and Menn, J.J. (eds), *Methods in biotechnology, vol. 5: biopesticides: use and delivery*. Humana press Inc., Totowa, NJ. pp. 271-299). 이 때 작용하는 공생세균의 살충력은 무척추동물에 대한 병원성의 발현에 주요한 역할을 수행한다. 항생제가 존재할 때 48 시간에서 랩디티스 블루미선충의 병원성이 감소하는 이유는 기주해충내에서 선충으로부터 분비된 공생세균의 증식이 항생제에 의하여 억제되었기 때문이라 사료되며, 이는 공생세균이 선충의 병원성 발현에 중추적인 역할을 수행한다고 판단되는 유용한 근거를 제시하고 있다.

[0068]

실시예 7: 선충과 세균의 공생관계 분석

[0069]

선충과 세균의 공생관계를 확인하기 위하여 형광염색시약으로 세균을 염색시키고 선충과 배양하였다. 프로비

덴시아 버미콜라세균을 형광염색시약으로 염색하기 위하여 nutrient broth에서 24 시간 순수 배양한 후 원심 분리하여 배지성분을 제거하였다. 약 3.0×10^{10} cells/ml의 프로비덴시아 버미콜라에 10 ug Alexa Fluor 488 succinimidyl ester (Molecular Probes - Invitrogen, UK)가 녹아있는 100 ul DMSO를 첨가하여 60 분간 상온에서 반응하였다. 살균수를 이용하여 반응하지 않은 형광염색시약을 제거하고 형광으로 염색된 세균을 각각 3.0×10^9 cells/ml의 농도로 첨가하여 선충과 배양하였다. 선충이 세균을 섭식한 후 선충의 장내에서 세균의 위치확인 및 형태변화를 형광현미경으로 관찰하였다(x 200). 도 2에서 볼 수 있는 바와 같이, 선충의 몸통부분의 basal bulb, vesicle, 그리고 선충의 장이 관찰되었으며(도 2a), 같은 선충을 형광현미경으로 관찰하였을 때 basal bulb 아래쪽 vesicle에 파란색으로 염색된 프로비덴시아 버미콜라의 군집을 확인할 수 있었다(도 2b). 이는 곤충병원선충의 병원성발현과 생활방식을 위한 전제조건이다. 증식 중에 있는 선충의 장내에서 넓게 퍼진 초록색 프로비덴시아 버미콜라는 선충의 증식을 위해 장내에서 소화된 세균의 잔재라 사료된다(도 2c 및 도 2d).

[0070] 랩디티스 블루미 선충은 각기 *Xenorhabdus* spp., *Photorhabdus* spp.와 특이적으로 결합되어 있는 곤충병원선충인 *Steinernema* spp., *Heterorhabditis* spp.와 유사한 병원성 기작을 가지고 있다고 판단되었다.

[0071] 실시예 8: 공생세균 종류에 따른 선충의 증식경향 분석

[0072] 곤충병원선충 랩디티스 블루미의 세 가지 공생세균-프로비덴시아 버미콜라와 플라보박테리움 및 알칼리제네스 패칼리스를 선충으로부터 분리하고, 각 세균을 tryptic soy broth (TSB, Difco)에서 25?로 순수배양 하였다.

[0073] 랩디티스 블루미 선충 유래 세 가지 공생세균의 농도에 따른 선충의 증식경향을 분석하였다. 8,000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 배지성분을 제거하고 네 가지 다른 농도 (1.5×10^{10} cfu/ml, 3.0×10^{10} cfu/ml, 6.0×10^{10} cfu/ml, and no bacteria in Ringer's solution)에서 10,000 IJs/ml의 농도로 선충을 첨가하여 25?에서 120 시간 배양하였다. 두 가지 세균의 농도에 따른 선충의 증식경향을 관찰하였다. 그 결과, 표 8에서 볼 수 있는 바와 같이, 프로비덴시아 버미콜라에 선충이 접종되었던 경우 초기세균의 농도가 높을수록 선충의 생산성이 높게 관찰되었고, 세균의 농도가 감소하면서 선충은 비례적으로 증가하였다.

[0074] [표 8]

세균 종류	시간 (h)	세균 농도 (cells/ml, $\times 10^{10}$)			총 선충 수 (number/ml, $\times 10^3$)		
알칼리제네스 패칼리스	0	1.6	3.1	6.2	10.7	10.7	10.7
	24	1.3	2.5	4.8	13.3	14.7	16.7
	48	0.7	0.8	3.2	14.0	14.3	16.3
	72	0.4	0.1	2.2	14.0	18.3	24.0
	120	0.0	0.0	0.1	13.0	18.0	23.0
플라보박테리움	0	1.6	3.1	6.1	10.7	10.7	10.7
	24	1.2	2.7	4.9	15.7	26.1	26.1
	48	0.4	0.6	2.7	21.1	28.6	35.5
	72	0.2	0.1	1.4	20.2	29.3	43.3
	120	0.0	0.0	0.1	16.0	25.1	37.2
프로비덴시아 버미콜라	0	1.5	3.0	6.1	10.7	10.7	10.7
	24	1.0	2.4	4.2	15.3	32.7	30.7
	48	0.0	0.2	1.8	24.3	37.7	48.3
	72	0.0	0.0	0.3	22.7	35.0	54.7
	120	0.0	0.0	0.0	16.0	27.7	44.7
세균없음	0	0			10.7		
	24	0			10.7		
	48	0			12.3		
	72	0			11.3		
	120	0			7		

[0075]

[0076] 프로비덴시아 버미콜라의 초기농도가 $1.5 \pm 0.1 \times 10^{10}$ 에서 $6.0 \pm 0.2 \times 10^{10}$ cfu/ml 로 증가되었을 때, 72 시간 후 선충의 농도는 2.4×10^4 에서 5.2×10^4 IJs/ml로 비례적인 증가를 나타냈다. 프로비덴시아 버미콜라의 농도가 1×10^9 cfu/ml이상으로 유지된 경우 선충 증식이 확인되었으며, 그 이하로 유지된 경우 선충의 성장은 관찰되지 않았다. 플라보박테리움과 알칼리제네스 패칼리스의 경우 초기세균의 농도가 증가할수록 선충의 증식이 비례적으로 관찰되었지만, 프로비덴시아 버미콜라와 비교하여 낮은 생산성을 나타내었다. 세 가지 공생세균 중 프로비덴시아 버미콜라와 플라보박테리움이 선충증식에 결정적인 세균이라고 판단되었다.

[0077] **실시예 9: 무균선충 제조 및 증식경향 분석**

[0078] 공생세균의 역할 규명을 위한 일환으로써 공생세균을 전혀 가지고 있지 않은 무균선충을 개발하여 공생세균을 보유하고 있는 선충의 성장과 증식경향을 비교분석하였다. 알을 품고 있는 성충을 0.4 N NaOH에 10 분간 방치하여 사멸시키고 50% phosphate를 첨가하여 중화한 후, 선충의 알만 따로 분리하여 0.2% sodium hypochlorite 로 10 분간 표면살균을 실시하여 무균선충을 개발하였다.

[0079] 6-well plate를 사용하여 인 비트로에서 세균의 유무에 따른 선충의 증식속도와 최종수율 등을 중점적으로 관찰하였다. 하기 표 9에서 볼 수 있는 바와 같이, *in vitro* 선충배양에서 공생세균이 존재하는 경우 선충은 약 0.2 h^{-1} 의 비증식 속도로 증가하였지만, 세균이 존재하지 않는 경우 시간에 따라 선충의 생장이 느린 속도로 이루어지지만 증식은 관찰되지 않았다. 240 시간이 지난 후 일반선충의 농도는 110,000 IJs/ml로 대략 110 배 증가하였지만, 무균선충의 농도는 증가하거나 감소하는 않고 일정하게 유지되었다.

[0080] **[표 9]**

선충	시간	총 선충 수	세균 농도(cells/ml, x
	(h)	(number/ml, x 10^3)	10^8)
공생세균 선충	보유		
	0	1.0	0.1
	72	6.0	47.9
	168	33.0	29.0
무균선충	0	1.0	0.0
	72	1.0	0.0
	168	1.0	0.0
	240	1.0	0.0

[0081]

[0082] 일반적으로 곤충병원선 선충의 공생세균은 선충에 병원성을 제공해 줄뿐만 아니라, 인공적인 액체배양에서 선충의 증식에 유리한 환경을 조성하여 높은 생산성을 유지시켜주는 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다. 랩디 티스 블루미 의 경우에서도 선충의 증식에 있어 공생세균이 중요한 역할을 수행하고 있음을 확인할 수 있다.

[0083] **실시예 10: 선충의 접종시기에 따른 최종수율측정**

[0084] 선충의 인공배지에 공생세균을 접종하고 24 시간 미리 배양한 후 선충의 접종시기를 다르게 조정하여 선충의 생산성을 비교하였다. 랩디티스 블루미 선충의 농도를 1,000 IJs/ml로 조절하고 배양 24, 48, 그리고 72 시간으로 달리하여 선충의 최종수율을 측정하였다. 선충의 배양은 6-well plate에서 25^oC, 216 시간 동안 실시되었다. 선충의 배양은 0.15 l 기포탑 발효기에서 25^oC, 216 시간 동안 3 vvm으로 통기량을 조절하여 실시되었다.

[0085] 하기 표 10에서 볼 수 있는 바와 같이, 공생세균을 접종한 후 24시간 배양하여 선충을 접종했던 경우 선충의 최종수율은 31,000 IJs/ml로 가장 낮은 수준이었다. 선충을 접종할 때 DOT는 3%로 측정되었고 이후 48시간까지 10% 이하로 유지하였다 (데이터 미도시). 공생세균을 48 시간 그리고 72 시간 배양한 후 선충을 접종하였을 경우 선충의 최종 농도는 각각 119,000±14,500 IJs/ml, 112,000±3,800 IJs/ml로 나타내어 24 시간 이후 접종한 실험구보다 3배 이상 증가하였다. 선충의 접종시기는 최종수율에 커다란 영향을 미친다고 판단되었다.

[0086] [표 10]

접종시간(h)	총 선충 수(number/ml, ±SE)
24	31,000±2,300
48	119,000±14,500
72	112,000±3,800

[0087]

[0088] 실시예 11: 배지성분에 따른 선충의 생산성향상 검토

[0089] 하기 표 11에 나타난 다섯 가지 배지를 사용하여 선충의 최종수율을 측정하였다. 각 배지에서 공생세균을 24 시간 배양한 뒤 감염태 선충의 농도를 1,000 IJs/ml의 조정하여 25^oC에서 216 시간동안 배양하였다.

[0090] [표 11]

1	Trypcase soy broth	1.0
	Nutrient broth	1.0
	NaCl	0.5
	Soy oil	3.0
2	Soy flour	2.5
	Yeast extract	0.5
	Lactoalbumin hydrolyzate	1.0
	Canola oil	2.5
	Cholesterol	0.02
	Liver extract	0.01
	NaCl	0.4
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.05
3	KCl	0.03
	Egg yolk	1.25
	Yeast extract	2.5
	NaCl	0.25
4	Corn oil	4.0
	Egg yolk	1.25
	Whole milk powder	3.55
	Yeast extract	0.5
	NaCl	0.23
5	Corn oil	4.0
	Yeast extract	0.5
	NaCl	0.5
	NH ₄ H ₂ PO ₄	0.05
	KH ₂ PO ₄	0.05
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.02

[0091]

[0092] 그 결과, 표 12에서 볼 수 있는 바와 같이, 6-well plate에서 216시간 동안 배양한 후 감염테 선충은 media No. 2 에서 213,000±35,000 IJs/ml로 최고 수율을 나타내었다.

[0093] [표 12]

배지번호	총 선충 수 (numbers/ml, × 10 ⁴)
1	15
2	21.3
3	18.6
4	11.2
5	3.4

[0094]

[0095] 배지성분 중 yeast extract 비율이 높을수록 선충의 최종수율은 증가하는 경향을 나타내었으며, 콜레스테롤이 첨가된 경우 선충의 증식이 빠르게 진행되었다. 식물성기름이 존재하지 않은 media No. 5의 경우 선충의 최종

수율은 $34,000 \pm 6,000$ IJs/ml로 현저히 감소하였다. 배지조성 중 탄소원이나 질소원으로 사용될 수 있는 yeast extract의 농도가 상대적으로 낮게 조성되어 선충의 증식에 사용될 수 있는 공생세균의 증식이 제한적이었기 때문이라 사료된다. 공생세균의 영양배지로서 전지분유가 높은 농도로 조성된 media No. 4에서의 선충 생산성은 비교적 낮은 수준으로 전지분유는 선충배양을 위한 배지성분으로서 적합하지 않다고 판단되었다. 배지별 식물성기름의 종류와 농도에 따라 선충의 수율을 커다란 차이를 나타내고 있으나 직접적인 비교는 불가능 하였다. 공생세균을 생장을 위한 기본적인 탄소원이나 질소원이 충분한 상태에서 콜레스테롤을 직접적으로 배지조성에 첨가하거나 (media No. 2), 또는 콜레스테롤이 함유되어있는 배지성분(계란노른자)을 첨가했던 경우 (media No. 3) 선충의 생산성은 비교적 높은 수준이었다.

[0096] Yoo et al. (Yoo, S.K., Brown, I., Gaugler, R. (2000) Liquid media development for *Heterorhabditis bacteriophora*: lipid source and concentration. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54, 759-763)은 식물성 기름의 농도가 2.5%에서 8%로 증가하였을 때, 공생세균의 농도는 증가하지 않았지만 *H. bacteriophora*의 생산성은 크게 증가한다고 보고하였다. 식물성 기름은 박테리아의 증식에 영향을 미치는 영양소는 아니지만, 선충의 콜레스테롤 생합성을 위해 주요한 영양분으로 사용되어 선충의 증식에 긍정적인 역할을 수행하였다 (Ehlers, R.U. (2001) Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 623-633). 랩디티스 블루미선충의 경우에도 식물성기름 또는 콜레스테롤의 직접적인 첨가는 선충의 생산성을 크게 증가시키는 중요한 요소라고 판단되었다.

[0097] 실시예 12: 세균의 조합비에 따른 세균 균체생산성 검증

[0098] 인공배양법에 의한 선충생산은 선충의 영양원으로 작용하는 세균의 농도를 높게 유지하는 것이 중요하다. 따라서, 세 가지 공생세균의 접종량을 인위적으로 조절함으로써 각 세균의 증식영향을 분석하였다.

[0099] 24시간 동안 tryptic soy broth (TSB)에서 배양된 각 세균을 두 가지- 알칼리제네스 패칼리스와 플라보박테리움, 알칼리제네스 패칼리스와프로비텐시아 버미콜라, 또는 플라보박테리움과프로비텐시아 버미콜라씩 10:0, 10:1, 5:5, 1:10, 0:10의 비율로 조합하여 세균의 종류와 조합비가 각 세균의 증식에 미치는 영향을 관찰하였다.

[0100] 두 종류의 세균을 공동으로 배양했을 때, 한 종의 세균은 다른 한 종의 세균의 생장에 영향을 주었다. 하기 표 13에서 볼 수 있는 바와 같이, 두 가지 세균의 균체생산량은 $6.4 - 12.6$ g/l로 하나의 세균만 순수배양한 경우($4.1-5.3$ g/l)보다 우수한 균체생산량을 나타내어, 각 세균은 다른 세균의 생장에 긍정적인 영향을 미친다고 판단하였다. 총 세균량은 알칼리제네스 패칼리스와프로비텐시아 버미콜라, 플라보박테리움과프로비텐시아 버미콜라, 그리고 알칼리제네스 패칼리스와플라보박테리움을 조합했던 순으로 높게 관찰되었고, 최고수율은 알칼리제네스 패칼리스와 프로비텐시아 버미콜라를 1:10으로 조합하였을 때 12.6 g/l를 나타내었다. 이때 프로비텐시아 버미콜라의 균체량은 10.9 g/l로 프로비텐시아 버미콜라가 선충의 생장에 가장 효과적인 역할을 수행하고 있다는 사실을 감안할 때 최적의 조건이라 판단하였다. 알칼리제네스 패칼리스의 경우, 선충의 생장과 병원성발현에 직접적인 효과를 나타내지 않지만, 프로비텐시아 버미콜라의 생장에 상승효과를 발생시켜 결과적으로 선충의 인공배양에 풍부한 영양원을 제공하는 긍정적인 역할을 수행한다고 판단되었다.

[0101] [표 13]

박테리아 비율		박테리아 수확량 (g/l)		
알칼리제네스	패칼리스:	알칼리제네스	플라보박테리움	총량
플라보박테리움		패칼리스		
10:0		4.2±0.4	0	4.2
10:1		3.9±0.9	3.1±0.6	7.0
5:5		3.3±0.4	4.3±0.6	7.6
1:10		2.0±0.5	4.4±1.0	6.4
0:10		0	4.5±0.7	4.5
알칼리제네스	패칼리스	알칼리제네스	프로비덴시아	
프로비덴시아	버미콜라	패칼리스	버미콜라	
10:0		4.1±0.6	0	4.1
10:1		3.7±0.8	3.6±0.8	7.3
5:5		3.1±0.8	5.0±0.7	8.1
1:10		1.7±0.9	10.9±1.2	12.6
0:10		0	5.2±0.7	5.2
플라보박테리움	프로비덴시아	플라보박테리움	프로비덴시아	
버미콜라			버미콜라	
10:0		4.3±0.8	0	4.3
10:1		4.0±1.1	3.0±0.5	7.0
5:5		4.0±0.5	5.4±0.4	9.4
1:10		2.2±0.3	5.3±0.6	7.5
0:10		0	5.3±0.6	5.3

[0103] 실시예 13: 기포탑 발효기에서 선충생산 최적화 수행

[0104] 작은 규모에서 규명된 발효인자를 기초로 하여 기포탑 발효기에서 통기량을 조절하여 선충을 생산하였다. 공생세균의 비율을 10:1 (프로비덴시아 버미콜라 : 플라보박테리움)로 조절하여 0.15 l 기포탑 발효기 (3 cm dia. x 22 cm, Taegyung Sci., Korea)에서 5 vvm의 통기량으로 48 시간 배양하였다. 이 후 10,000 IJs/ml의 선충을 접종하고 통기량을 2, 3, 5, 그리고 6 vvm으로 조절하고 25°C에서 216 시간 배양하여 선충의 최종수율을 측정하였다.

[0105] 하기 표 14에 나타난 바와 같이, 선충을 접종한 후 통기량을 다르게 조정하여 25°C에서 144 시간 동안 감염태 선충을 생산하였을 때 6 vvm에서 170,000±15,600 IJs/ml로 최고 수율을 나타내었다. 이 때 공생세균의 농도는 3×10^7 cfu/ml로 측정되었다. 2 vvm에서 선충을 접종한 후 72 시간 배양하였을 때 세균의 농도는 $5.4 \pm 0.89 \times 10^{10}$ cfu/ml 수준으로 증가한 반면 선충의 농도는 900±200 IJs/ml로 처음 접종한 농도보다 감소하였다. 통기량을 3 vvm으로 유지하여 72 시간 배양하였을 때, 선충의 농도는 크게 증가하지 않았지만 선충의 길이는 증가하여 생장이 진행되고 있다고 판단하였다 (data not shown). 통기량이 증가할수록 감염태 선충의 생산성은 증가하는 경향을 나타내었고, 세균의 농도는 감소하였다. 감염태 선충의 수율변화는 통기량 증가에 따른 배양액속의 용존산소가 증가하기 때문이며 이 때 선충에 의한 세균의 섭식이 활발해져 배지 내 세균농도가 감소하고 선충의 증식이 빠르게 진행되었다고 판단되었다.

[0106]

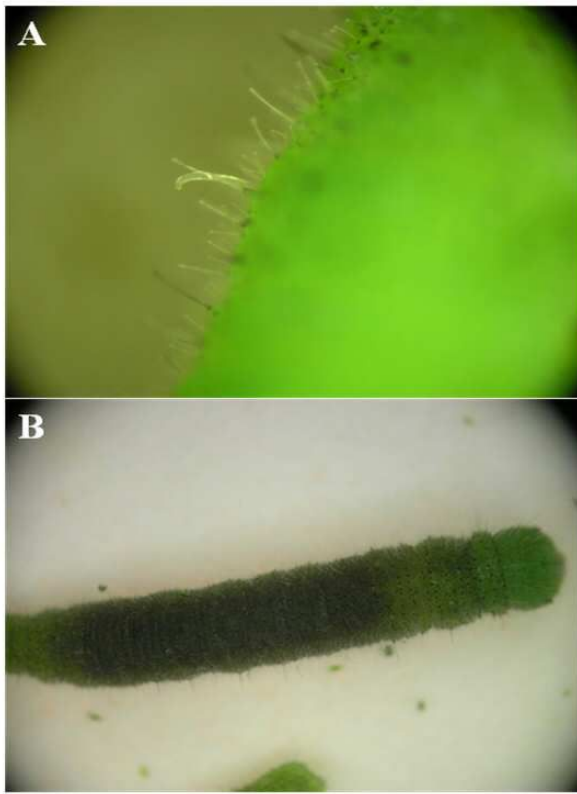
[표 14]

선충 접종 후 시간(h)	통기량 (vvm)	총 선충 수 (number/ml)	세균 농도(cfu/ml, $\times 10^{10}$)
0	2	10,000 \pm 890	4.4 \pm 0.42
	3	10,000 \pm 890	4.3 \pm 0.23
	5	10,000 \pm 890	4.3 \pm 0.29
	6	10,000 \pm 890	4.1 \pm 0.21
72	2	900 \pm 200	5.4 \pm 0.89
	3	11,500 \pm 2,200	4.0 \pm 0.22
	5	27,000 \pm 8,900	2.5 \pm 0.11
	6	52,000 \pm 12,000	2.2 \pm 0.11
144	2	1,500 \pm 100	4.7 \pm 0.24
	3	82,000 \pm 4,400	1.1 \pm 0.2
	5	138,000 \pm 22,200	0.027 \pm 0.002
	6	170,000 \pm 15,600	0.003 \pm 0.0002

[0107]

도면

도면1



도면2

