

## 곤충병원성 진균의 대량 배양체계에서의 성장율

이인기 · 서종복 · 진병래 · 신상철\* · 박호용\*\* · 이범영\* · 이창근\* · 우수동 · 강석권

서울대학교 농업생명과학대학, \*산림청 임업연구원, \*\*KIST 생명공학연구소

### Growth Rate of Entomopathogenic Fungi in Mass Culture System

In Kee Lee, Jong Bok Seo, Byung Rae Jin, Sang Chul Shin\*, Ho Yong Park\*\*,  
Bum Young Lee\*, Chang Keun Lee\*, Soo Dong Woo and Seok Kwon Kang

College of Agriculture & Life Sciences, Seoul National University, Suwon, Korea

\*Forestry Research Institute, Forestry Administration, Seoul, Korea

\*\*Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology, KIST, Taejeon, Korea

#### Abstract

To develop a microbial pesticide for the control of agricultural and forestal pests in Korea, the mass culture system of entomopathogenic fungi was studied. Previously, we have developed the mass culture system which was adaptable for the culture of *Beauveria bassiana*. In this study, we determined the efficacy of this mass culture system for other entomopathogenic fungi, *B. bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *Metarhizium anisopliae*, and *Verticillium lecanii*. To determine the efficacy of mass culture system, we examined the growth rate of entomopathogenic fungi in this system which was composed of 1st liquid media for growth of blastospore and 2nd pellet media for growth of conidia. As the result, we obtained that the blastospore numbers increased  $10^3$ - $10^4$  times in liquid media at 72 hrs post inoculation and the conidia numbers increased about  $10^3$  times in pellet media at 3 weeks post inoculation. The results showed that this mass culture system for the growth of entomopathogenic fungi was effective.

Key words : Mass culture system, Entomopathogenic fungi, Growth rate

#### 서 론

현재까지 분리·보고된 진균 중 약 100여 속 700여 종의 진균이 곤충에 대해 병원성을 갖는 것으로 보고되고 있으며 (Hajek 등 1994), 이 중 약 10종 정도의 진균만이 활발히 연구되고 있다. 특히, *Beauveria bassiana*, *Hirsutella thompsonii*, *Metarhizium anisopliae*, *Verticillium lecanii*, *Aschersonia aleyrodis*, *Nomuraea rileyi* 등은 이미 해충 방제용으로 상품화되어 등록·시판되고 있는데, 이와 같은 곤충병원성 진균의 제제화에는 진균의 대량배양이 필수적이다. 따라서 이러한 진균의 대량배양에 필요한 영양소와 배양조건에 대한 연구가 활발히 이루어졌으며 (Agudelo 1983;

Thomas 1987), 특히 일본에서는 울도하늘소 (*Psacotheta hilaris*) 방제를 위하여 *Beauveria tenella*의 대량생산에 1차 액체배양과 2차 고체배지에서의 배양을 통한 2단계 배양기술을 사용하였을 때, 배양기간이 단축되고 진균의 병원성은 유지되며, 다른 미생물의 오염이 줄었다는 보고가 있었다(Kawakami와 Shimane, 1986). 국내에서는 흰곰움병균 (*Beauveria bassiana*)의 대량배양체계에 있어서, 접종원이 되는 단균사의 확보에 필수적인 1차 액체배지를 농가부산물인 밀기울과 대두박을 이용하고, 흰곰움병균 분생포자의 대량배양을 위한 고체배지로써 밀기울을 이용하여 polypropylene bag에 넣어 배양시키는 방법이 보고된 바 있다 (서 등 1995, 1996).

본 연구에서는 *B. bassiana*의 대량배양을 위해 개발된 대량배양체계에서 *B. bassiana* 이외의 다른 곤충병원성 진균들인 *Beauveria brongniartii*, *Metarhizium anisopliae*, 그리고 *Verticillium lecanii*의 성장율을 단균사와 분생포자의 성장을 조사함으로써 여러 다른 곤충병원성 진균에 대한 현 대량배양체계의 효용성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 곤충병원성 진균

실험에 사용한 곤충병원성 진균의 종류, 분리한 층체 및 토양 그리고 균주명은 표 1에 제시하였다. 각 균주는 모두 Sabouraud Dextrose Agar 배지 (SDA+Y, 4% dextrose, 1% bacto-peptone, 1.5% Agar powder, 0.2% yeast extract)로 25°C에서 2주일 정도 키운 후, Sabouraud Dextrose Broth (SDB+Y, 2% dextrose, 1% bacto-peptone, 0.2% yeast extract)에 접종하고 26°C에서 3일간 130 rpm의 조건으로 진탕배양한 다음 4°C에 보관하면서 실험에 이용하였다.

### 2. 액체배양액에서 단균사의 성장을 조사

액체배양액으로는 서 등 (1995)의 보고에 따라, 밀기울과 대두박을 3:2의 비율로 섞어 최종농도가 5% (w/v)되게 하고, 121°C, 50분 조건에서 멸균한 액체배양액 200 ml에 SDB+Y 배지에서 키운 단균사를  $10^6$  개/ml이 되도록 접종 하였다. 접종 후 12시간 간격으로 72시간 까지 배양액을 수거하여 직경 9 cm의 Petri-dish에 5 mm의 두께로 깔린 SDA+Y 배지에 접종한 후 25°C, RH 80% 이상의 조건에서 배양하면서 CFU(colony forming unit)를 조사하여 단균사의 성장을 결정하였다. 또한 혈구계측기를 이용하여 위상차현미경으로 각 시간 대에 성장한 단균사의 수를 다시 한 번 확인하였다. 위와 같은 방법으로 3반복 실험을 실시하여 단균사의 성장율을 결정하였다.

### 3. Pellet에서 분생포자의 성장을 조사

Pellet 배지에서 진균을 배양하기 위하여 통기공이 부착된 polypropylene bag안에 지름 3 mm인 S형 pellet 배지 300 g과 1차 증류수 150 ml을 넣은 후, 121°C에서 50분간 멸균하고 1차 액체 배양액에서 키운 단균사를 pellet 배지 1 g 당  $5.00 \times 10^6$  개씩 접종하여, 25°C, RH 80±5% 이상의 조건에서 3주일간 배양하였다. 1주일 간격으로 polypropylene bag에서 2-3 g의 pellet 배지를 수거하고 24시간 동안 냉동건조한

다음, 완전히 건조된 pellet 배지의 순수 무게 (g)를 측정하였다. Pellet 배지를 0.02% Tween-80 (Sigma) 용액 20 ml에 넣고 vortex하여 현탁한 다음 혈구계측기를 이용하여 ml당 포자의 수를 조사한 후, pellet 배지 1 g 당 포자형성수로 환산하였다.

## 결과 및 고찰

곤충병원성 진균의 제제화에는 진균의 대량배양이 필수적이며 우리는 이미 *Beauveria bassiana*의 대량배양체계를 보고한 바 있다 (서 등 1995, 1996). 따라서 본 실험에서는 이 배양체계가 다른 여러 가지 곤충병원성 진균의 배양에 적합한 지 조사하였다.

진균의 SDA+Y 에서의 성장상을 조사한 결과 *B. bassiana*와 *B. brongniartii*는 노란색의 colony를 형성하였고, *M. anisopliae*의 경우 짙은 초록색의 colony를 형성하였으며, *V. lecanii*는 흰색의 colony를 형성하였다 (그림 1). 또한 진균의 1차 액체배양액에서의 단균사의 형성을 위상차현미경으로 관찰한 결과, 곤충병원성 진균의 성장에 적합한 액체배지에서 관찰되는 단균사가 형성됨을 확인하였으며 모든 진균들은 거의 구형에 가까운 단균사를 형성함을 확인할 수 있었다. 그리고 Pellet 배지에서의 분생포자의 형성을

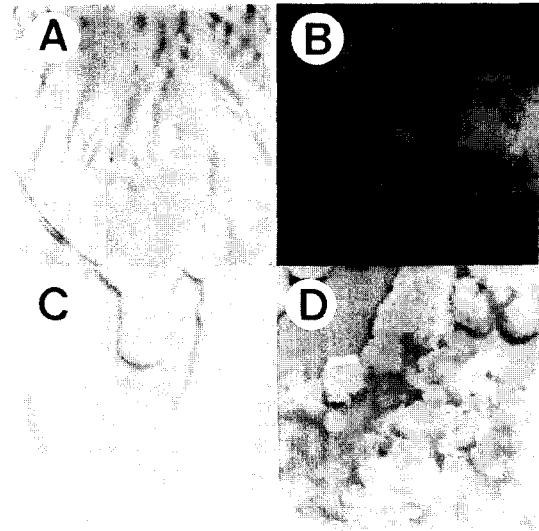


Fig. 1. The morphological characteristic of entomopathogenic fungi on SDA medium. Figures are as follows : A, *Verticillium lecanii*; B, *Metarhizium anisopliae*; C, *Beauveria bassiana*; D, *Beauveria brongniartii*.

역시 위상차현미경으로 관찰한 결과 분생포자가 양호하게 형성되는 것을 확인할 수 있었으며, *B. bassiana*와 *B. brongniartii*는 구형 또는 난형의 분생포자를 형성했고, *V. lecanii*는 난형의 분생포자를 형성한 반면 *M. anisopliae*는 독특한 원통 모양의 분생포자를 형성하였다 (표 2).

이들 균주의 액체배양액에서의 성장율은 진균에서 접종 72시간이 지난 후 액체배양액 1 ml 당 단균사의 수가 약  $10^3$ - $10^4$ 배 정도의 비율로 증가하여 대체적으로 양호한 성장을 확인 할 수 있었다 (표 3). 특히 *B. brongniartii*는  $5.25 \times 10^4$  배 이상의 가장 높은 성장율

을 보였고, 가장 낮은 성장율을 보인 *M. anisopliae*의 경우  $2.10 \times 10^3$  배의 성장율을 보였다.

Pellet 배지에서의 성장율은 접종 후 3 주 째에 모든 진균의 분생포자 수가 약  $10^3$  배 정도 증가하는 것으로 나타났다 (표 4). 그러나 액체배양액에서와는 달리 pellet 배지에서는 *B. bassiana*의 성장율이 가장 높았으며 *M. anisopliae*는 액체 배양액에서와 마찬가지로 다른 진균들 보다 약간 낮은 성장율을 보여주었다.

이러한 결과는 대량배양체계를 확립하기 위해 이용된 *B. bassiana* SFB-168-2의 성장율과 비교할 때, 액체 배양액과 pellet 배지 모두에서 비슷한 성장율을

Table 1. Fungal isolates used for this study

Isolate No.	Strain	Host	Date of Isolation
F-77	<i>Beauveria brongniartii</i>	<i>Anomala costata</i>	1971. 10. 11.
F-263	<i>Beauveria bassiana</i>	-	-
F-306	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Monochamus alternatus</i>	1981. 7. 27.
F-903	<i>Verticillium lecanii</i>	-	1991. 1. 24.

Table 2. Characteristics of entomopathogenic fungi used for this study

Isolate No.	Color on SDA medium	Shape of Conidia	Shape of Blastospore
F-77	Yellow	Rounded to Ovoid	Rounded
F-263	Yellow	Rounded to Ovoid	Rounded
F-306	Green	Cylindrical	Ovoid
F-903	White	Ovoid	Rounded

Table 3. The \*growth of blastospores of entomopathogenic fungi in liquid culture media

**Culture time(days)	1	2	3
Strain			
<i>Beauveria brongniartii</i>	$1.19 \times 10^6$	$2.94 \times 10^7$	$5.25 \times 10^8$
<i>Beauveria bassiana</i>	$3.57 \times 10^6$	$4.70 \times 10^7$	$3.31 \times 10^8$
<i>Verticillium lecanii</i>	$1.26 \times 10^7$	$1.50 \times 10^8$	$3.43 \times 10^8$
<i>Metarhizium anisopliae</i>	$4.67 \times 10^4$	$6.97 \times 10^6$	$2.10 \times 10^7$

\* The growth of fungi was estimated by 'blastospores per ml'.

\*\* The concentration of initial inoculum was ' $10^4$  per ml'.

Table 4. The \*growth of conidia of entomopathogenic fungi in pellet media

**Culture time(weeks)	1	2	3
Strain			
<i>Beauveria brongniartii</i>	$2.29 \times 10^8$	$2.70 \times 10^9$	$4.54 \times 10^9$
<i>Beauveria bassiana</i>	$5.99 \times 10^9$	$7.49 \times 10^9$	$1.64 \times 10^{10}$
<i>Verticillium lecanii</i>	$1.75 \times 10^9$	$2.37 \times 10^9$	$2.81 \times 10^9$
<i>Metarhizium anisopliae</i>	$4.55 \times 10^8$	$1.03 \times 10^9$	$1.14 \times 10^9$

\* The growth of fungi was estimated by 'conidia per g'.

\*\* The concentration of initial inoculum was ' $5.00 \times 10^6$  per g'.

보여주는 것이었다 (서 등 1995, 1996).

따라서 진균의 대량 배양을 위해 선발된 1차 액체 배양액과 2차 고체배지인 pellet은 *B. bassiana* 뿐 아니라 같은 속인 *B. brongniartii*, 그리고 다른 속인 *M. anisopliae*, *V. lecanii* 의 성장에도 효율적인 체계임을 확인할 수 있었다.

## 적 요

1차 액체배양액과 2차 pellet 배지로 이루어지는 대량배양체계의 다른 곤충병원성 곰팡이인 *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *Metarhizium anisopliae*, *Verticillium lecanii* 등에 대한 효용성을 조사하기 위하여 단균사 및 분생포자의 성장율을 비교하였다. 그 결과, 액체배양액에서 단균사의 성장율은 접종 후 72시간에 그 수가 최초 접종수에 비해  $10^3$ - $10^6$ 배 까지 증가함을 확인할 수 있었으며, pellet 배지에서 분생자의 수는 접종 후 3주 쯤에  $10^6$ 배 까지 증가됨을 확인할 수 있었다. 본 실험의 결과 진균의 대량배양을 위해 선발된 1차 액체배양액과 2차 pellet 배지는 여러 곤충병원성 진균의 성장에 효율적인 체계임을 확인할 수 있었다.

## 사 사

본 연구는 과기처 특정연구 개발과제와 서울대학교 농업생명연구소 연구센터의 연구비 지원에 의해 수행되었음.

## 인용문헌

Agudelo F. and L. A. Falcon. 1983. Mass production,

- infectivity, and field application studies with the entomopathogenic fungus *Paecilomyces farinosus*. *J. Invertebr. Pathol.* **42** : 124-132.
- Ferron P. 1978. Biological control of insect pests by entomopathogenic fungi. *Annu. Rev. Entomol.* **23** : 409-442.
- Ferron P. 1985. Fungal control. In "Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology" (G. I. Kerkut and L. I. Gilbert, Eds.), Vol. 4, pp.313-346. Pergamon, Oxford.
- Kawakami K. and T. Shimane. 1986. Microbial control of the yellow-spotted longicorn beetle, *Psacothoa hilaris* Pascoe (Coleoptera ; Cerambycidae), by and entomogenous fungus, *Beauveria tenella*. *J. Seric. Sci. Jpn.* **55** : 227-234.
- Khachatourians G. G. 1986. Production and use of biological pest control agents. *Trends Biotechnol.* **4** : 96-100.
- Hajek A. E. and R. J. St. Leger. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Ann. Rev. Entomol.* **39** : 293-322.
- 서종복, 진병래, 신상철, 박호용, 이범영, 이창근, 강석권. 1995. 흰곰음병균 (*Beauveria bassiana*) 단균사의 대량배양생산을 위한 액체배지 개발. *한국잡사학회지.* **37** : 172-175.
- 서종복, 진병래, 신상철, 박호용, 이범영, 이창근, 강석권. 1996. 흰곰음병균 (*Beauveria bassiana*) 포자의 대량배양을 위한 고체배지의 개발. *한국잡사학회지.* **38** : 31-35.
- Smith R. J. and E. A. Grula. 1981. Nutritional requirements for conidial germination and hyphal growth of *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr. Pathol.* **37** : 222-230.
- Thomas K. C., G. G. Khachatourians and W. M. Ingledew. 1987. Production and properties of *Beauveria bassiana* conidia cultivated in submerged culture. *Can. J. Microbiol.* **33** : 12-20.