

## 누에를 이용한 곤충병원성 선충의 검색 및 배양

한상미\* · 이광길 · 여주홍 · 권해용 · 우순옥 · 이용우 · 백하주<sup>1)</sup> · 한명세<sup>2)</sup>  
농업과학기술원 잠사곤충부, <sup>1)</sup>경상북도보건환경연구원, <sup>2)</sup>경북대학교 농업생명과학대학

### The Detection and Multiplicity of Entomopathogenic Nematodes Using Silkworms (*Bombyx mori*)

SangMi Han\*, Kwang Gill Lee, Joo-Hong Yeo, HaeYong Kweon, Soon-Ok Woo, Yong-Woo Lee, HaJu Baek<sup>1)</sup>, and MyungSae Han<sup>2)</sup>

Dept. of Sericulture and Entomology, NIAST, RDA, Suwon 441-100, Korea

<sup>1)</sup>Dept. of Wastewater Analysis, KyongsangBuk-Do Government Public Institute of Health & Environment, Daegu 702-702, Korea

<sup>2)</sup>Insect Pathology of Laboratory, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

#### ABSTRACT

Entomopathogenic nematodes were isolated through the investigation in soils collected from cultivated and non-cultivated fields using silkworms (*Bombyx mori*) and *Galleria mellonella* trap. The detectable rate of entomopathogenic nematodes of silkworms trap was higher than the *G. mellonella* trap. This study indicates the detection of entomopathogenic nematodes from soils that silkworms are sensitive superior to the *G. mellonella* to entomopathogenic nematodes. The steinernema, rhabditidae, and diplogatroidae strains successfully cultured on the silkworm host as well as on artificial media. Reproductivity in the living silkworm larva and pupa was 1.5 to 3.5×10<sup>5</sup> nematodes per host. However, *G. mellonella* could be multiplied less than 5×10<sup>5</sup> nematodes. The dried pupa of the silkworm following moisturize was cultured 0.5 to 2×10<sup>5</sup> nematodes per host. The culture methods of the steinernema, rhabditidae, and diplogatroidae strains, using silkworm powder, extracted chicken intestine, and food waste fertilizer could be applicative, but rate of reproduction was low.

**Key words :** silkworm, entomopathogenic nematodes, *Galleria mellonella*

#### 서 론

선충은 미소동물로써 전 세계적으로 거의 모든 서식지에 서 발견되며 특히 해양과 토양내에 주로 서식하고 있다. 그중 많은 종이 사람과 가축을 포함한 척추동물과 무척추동물에 기생하며 질병을 일으키기도 하고 식물에 기생하여 경제적인 큰 피해를 주기도 한다(Maggenti, 1991).

토양은 선충의 가장 적합한 서식지로서, 토양 입자 주변의 얇은 수막에 존재하기도 하지만 대부분의 선충은 식물체의 뿌리 부분에 가장 많이 서식하는 것으로 알려져 있다(Ingham, 1984). 이들 선충은 토양생물의 10% 이상을 차지하고 일부 지역에서는 토양 1g당 수천마리의 선충이 서식하는 것으로 알려져 있다(Suarez & Lorenzo, 2000). 토양 중에는 식물기생성 선충뿐만 아니라 유기물의 분해자로서 자유생활을 하는 선충과 곤충에 절대적 또는 임

의적 내부기생자로서 토양생태계에 중요한 역할을 담당하는 유익 선충류도 있어 이들 곤충기생성 선충은 농작물 해충방제를 위한 화학적 농약을 대신할 생물농약으로 주목 받고 있다(Bedding & Miller, 1981; Bird *et al.*, 1998; Mirto *et al.*, 2002; Sanyal, 2000).

1980년 중반까지 동정된 토양내 선충은 2,200속 15,000 종이 밝혀졌으며 대표적인 선충은 *Rhabditida*, *Tylenchida*, *Aphelenchida* 및 *Dorylaimida*의 4개목으로 주로 식물기생성 선충을 대상으로 분류되었다. 자유생활 선충이나 곤충기생성 선충에 대한 정량적 평가 및 분류학적 연구는 매우 미흡한 실정이다(Adamson, 1987; Griffin, 2000). 토양생태계의 중요한 생물적 인자라 볼 수 있는 선충군집에 관한 연구가 절실히 필요한 실정이다(Jorgenson, 1984). 이는 곤충기생성 선충의 인공배양이 확립되지 않은데서 기인한다.

\*Corresponding author. E-mail: sangmih@rda.go.kr

본 연구는 토양으로부터 곤충병원성 선충을 효율적 검색하고 배양하는데 실험실내에서 인공사료를 통해 대량 사육이 가능한 집누에의 이용 가능성을 알아보았다.

## 재료 및 방법

### 1. 토양시료

충청남도 금산군의 10년 이상 유기농법을 실시해온 배추 재배지(OB), 무 재배지(OR)의 근권토양 및 화학비료를 주로 사용하는 관행농법을 실시해온 동일 작물재배지 근권토양(CB, CR)을 대상으로 재배 작물당 3개 지점의 근권에서 토양시료를 채취하였다. 대조구 토양으로는 공장 주변의 비경작지 토양(NC-1, NC-2)을 선정하여 시료를 채취하였다.

### 2. 누에 및 꿀벌부채명나방 사육

누에(*Bombyx mori*)는 실험실에서 계대 보존중인 백옥잠을 표준사육법에 준하여 항온항습 잠실에서 사육하였다. 꿀벌부채명나방(*Galleria mellonella*) 유충은 Woodring & Kaya(1988)의 방법을 응용하여 실험실에서 누대 사육하였다.

### 3. 토양으로부터 곤충병원성 선충 분리

채취한 토양 200 g을 20×10×8 cm(가로×세로×높이)의 반투명 플라스틱상자에 넣고 증류수를 분무하고 잘 섞은 다음 표면을 평탄하게 다듬고, 그 위에 물에 젖은 여지 한 장을 덮었다. 각기 5령 1일째 누에 유충, 상족후 10일 경과한 누에 번데기 그리고 꿀벌부채명나방 5령 1일째 유충 10마리를 투입하고 25±1°C에서 24시간 간격으로 치사한 개체를 옮기고 White trap(White, 1929)을 설치하여 곤충병원성 선충을 분리하였다.

토양내 선충 분리에 적합한 숙주의 탐색을 위해 200 g의 멸균 토양내에 실험실에서 계대 배양중인 *steinernema*, *rhabditidae* 그리고 *diplogatroidae* 계통의 선충을 10 ml의 증류수에 선충 수를 달리하여 투입한 후 5령 1일째 누에 유충, 상족후 10일 경과한 누에 번데기 그리고 꿀벌부채명나방 5령 1일째 유충을 10마리씩 투입한 후 치사한 곤충을 조사하고 선충의 감염여부를 조사하였다.

### 4. 곤충 생체를 이용한 선충 배양

선충은 실험실에서 계대 배양중인 *Steinernema*, *Rhabditidae* 그리고 *Diplogatroidae* 과 선충을 사용하였다. 6 well plate에 여지를 깔고 감염기 유충단계의 선충 10마리를 0.5 ml의 증류수와 함께 주입하고, 5령 3일째 누에 유충, 상족후 10일 경과한 누에 번데기 그리고 5령 1일째 꿀벌부채명나방 유충을 각기 1마리씩 투입하였다. 각기 곤충 기주

가 치사하면 White trap을 설치하여 증식된 선충 수를 조사하였다.

### 5. 유기물을 이용한 선충 배양

건조된 누에 번데기는 선충을 접종하기 전에 멸균수로 충분히 포화시킨다. 6 well plate에 여지를 깔고 감염기 유충단계의 선충 20마리를 0.5 ml의 증류수와 함께 주입하고 준비한 누에 번데기 1마리를 투입하고 3일간 노출시킨다. 번데기의 표면은 멸균수로 2~3회 씻은 다음 새로운 petri dish에 옮겨서 접종시와 같은 조건으로 2주일간 배양한 후, White trap을 설치하여 증식된 선충 수를 조사하였다.

환경문제를 야기하는 유기성 폐기물을 이용한 선충 배양을 위하여 음식 쓰레기 발효 퇴비, 축산 폐기물인 닭내장 그리고 제조 후 2년이 경과한 누에 분말을 이용하였다. 닭내장 배지 제조는 Bedding & Miller(1981)의 방법에 준하였다. 10 g의 누에 가루와 음식물 발효 퇴비는 10 cm petri dish에 고르게 퍼 넣은 다음 5 ml의 증류수와 함께 50마리의 선충을 주입하고 2주간 배양 후 선충수를 조사하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 토양내 곤충병원성 선충 검출

6개 지역 토양으로부터 수집된 선충은 원심분리법을 통해 모두 분리되었다(Whang *et al.*, 2003). 곤충병원성 선충은 이들 토양으로부터 곤충 trap을 사용하여 분리하였다. 분리된 선충의 생리 생태적 특성이 통성 기생성이거나 부생성인 경우라도, 누에와 꿀벌부채명나방의 감염치사가 확인되었으므로 곤충의 원사인으로 인정할 수 있었다(Gaugler & Kaya, 1990). 토양내 곤충병원성 선충의 검출률은 토양 시료의 토성과 채취방법 및 trap용 곤충의 감수성 등이 복합된 결과로 간주 할 수 있다(Feckman & Baldwin, 1990). 동일 조건의 토양으로부터 누에 유충과 번데기, 꿀벌부채명나방 유충을 trap으로 사용하여 곤충병원성 선충을 분리하였다. 누에 유충을 사용했을 때는 NC-2 지역에서, 꿀벌부채명나방 유충의 경우는 CR과 NC-2의 두지역에서 곤충병원성 선충이 검출되지 않았다. 그러나 이들 지역 모두 누에 번데기를 사용했을 경우에는 검출되었다(표 1). 이를 검증하기 위해 멸균 토양에 *Steinernema*과 계통의 감염단계 선충을 10, 100, 1000마리의 비율로 주입한 후 누에 유충, 번데기와 꿀벌부채명나방 유충을 투입하였다. 1000마리의 선충을 함유한 토양에서는 48시간에서 72시간 내에 모두 선충 감염으로 인한 곤충 치사가 관찰되었고, 10 마리의 선충이 함유된 토양에서는 투입한 숙주 곤충간

**Table 1.** The collection time of the isolation of entomopathogenic nematode by various insects from soils (days)

Soil name	host			nematodes
	Silkworm larva	Silkworm pupa	<i>G. mellonella</i> larva	
OB	3	4	2	+
OR	5	7	6	+
CB	9(P)	8	7	+
CR	7(P)	8	-	+
NC-1	12(P)	11	13	+
NC-2	-	15	-	+

P; pupation, -; not detection, +; detection

**Table 2.** Lethal time of silkworm larva, pupa and *G. mellonella* larva following exposure to the different amount of nematodes in soil samples (days)

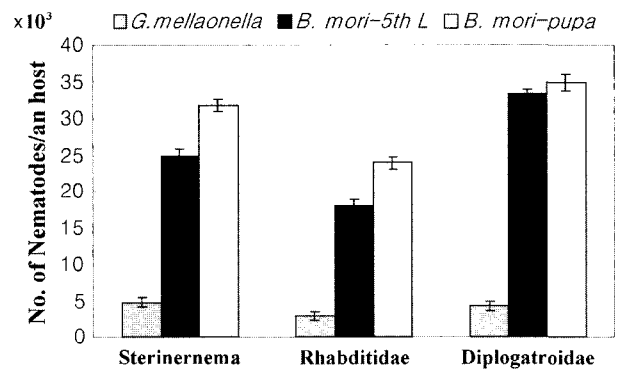
Nematodes/200 g soil	days (mean ± SE) for host death by nematodes		
	Silkworm larva	Silkworm pupa	<i>G. mellonella</i> Larva
10	6 ± 0.6	7 ± 0.4	11 ± 0.6
100	5 ± 0.6	7 ± 0.6	5 ± 0.9
1,000	2 ± 0	3 ± 0.9	2 ± 0.6

에 검출 시간이 많이 소요되었다(표 2). 특히 누에 번데기의 경우에는 토양내 선충 밀도에 크게 관계되지 않으나 꿀벌부채명나방은 선충 밀도가 높을 경우엔 검출이 용이하나 낮으면 검출 시간이 매우 느려지거나 검출되지 않는 경향을 보였다. 따라서 곤충병원성 선충의 검출을 위한 trap용 곤충은 종래에 사용되어온 꿀벌부채명나방보다 누에가 우수한 것으로 사료된다(Bird *et al.*, 1998). 누에는 장구한 세월동안 실내에서만 사육되어 선충과의 접촉 없이 진화된 결과, 저항성 계통이 선발될 기회가 부여되지 않았기 때문에 야생 곤충 종 보다 선충에 감수성이 높은 것이 선충 분리에 유리하게 작용하였을 것이다.

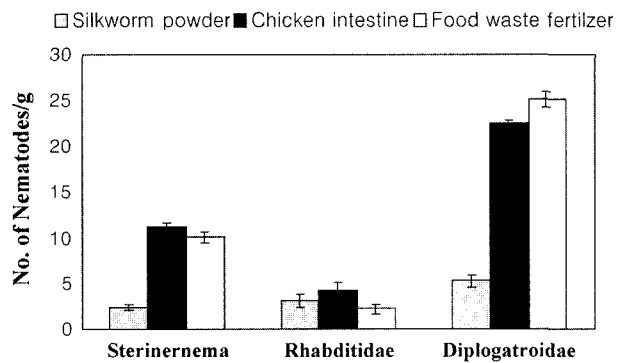
**2. 곤충병원성 선충 배양**

생물학적 방제제로서 숙주영역이 넓은 곤충병원성 선충은 꿀벌부채명나방 또는 담배거세미나방을 이용하여 증식할 경우, 숙주 1두당 15-20만 마리의 선충을 생산한다고 하였다(Bedding & Miller, 1981). 선충 종류에 따라서는 다소 차이를 보였으나, 누에 유충에서는 20-35만 마리의 선충이 증식되었으며, 번데기에서는 25-40만 마리의 선충이 증식되었다(그림 1). 반면 꿀벌부채명나방은 5만 마리 내외의 선충이 증식되었고, 누에로부터 증식된 선충수는 누에 번데기가 유충보다 많았으나 단위 배양기간을 고려할 경우 생산성은 유충이 더 높았다. 누에는 선충의 증식뿐 아니라 대량 사육에도 꿀벌부채명나방 또는 담배거세미나방에 비하여 월등하게 우수하였으므로 증식용 숙주로서 매우 유리한 것으로 판단되었다.

양잠 부산물 건조 번데기를 습윤 처리하여 선충용 배지로 이용한 경우, *Sterinernema*, *Rhabditidae*, *Diplogastroidae*



**Fig. 1.** Multiplicity of *sterinernema*, *rhabditidae*, and *diplogastroidae* nematode strain in the insect host prepared by *G. mellonella* larva, silkworm larva, and pupa.



**Fig. 2.** Multiplicity of *sterinernema*, *rhabditidae*, and *diplogastroidae* nematode strains in the culture media prepared by organic wastes of silkworm powder, chicken intestine, and food waste fertilizer.

과 선충계통에서 대체적으로 증식이 가능하였으나(그림 2), 살아있는 누에 유충이나, 번데기에 접종하였을 경우 보다

**Table 3.** Number of nematodes produced by incubation at 25°C in the dried pupae of silkworms after dampness preparation and inoculation of 100 nematodes per host

Nematode strains	No. Nematodes Isolated per host (mean ± SE)			Total
	1~20 days	21~40 days	41~60 days	
Steinernema	1,815 ± 92.2	2,336 ± 27.2	1,666 ± 88.3	5,817 ± 109.7
Rhabditidae	3,487 ± 124.6	5,063 ± 43.7	1,550 ± 46.9	10,100 ± 131.9
Diplogastroidae	14,493 ± 88.8	5,573 ± 84.5	-	20,067 ± 20.3

--; not detection.

증식률이 매우 낮았다.

대체물질을 이용한 인공배양 기술 개발의 가능성을 시험하기 위하여 유기성 폐기물을 활용한 닭내장 배지(Beedding, 1981), 누에가루 폐엽톱, 음식물 발효퇴비 등을 첨가한 배지에 접종한 결과 *Steinernema*, *Rhabditidae*, *Diplogastroidae*의 선충계통은 모두 증식이 확인되었다(표 3). 그러나 *Diplogastroidae*의 선충을 제외하고는 매우 낮은 증식률을 보였다. *Diplogastroidae* 계통은 닭내장 배지와 음식물 발효퇴비에서도 누에 유충과 번데기 생체를 이용한 것과 비슷한 우수한 증식률을 보였다(Beedding, 1981).

상업적 용도로 필요한 대량의 선충을 확보하기 위해 *in vitro* 배양기술의 개발이 중시되고 있으며 다목적 고기능성 생물 살충제 개발이 필요하므로 대량 사육이 가능하고 사육기간이 짧은 누에를 이용한다면, 다량 증식은 물론 감염력이 우수한 선충을 얻을수 있으리라 사료된다.

## 적 요

본 연구는 해충에 대한 생물적 방제제로서 유용한 곤충병원성 선충의 효율적 검색과 *in vitro*에서의 대량 증식 가능성을 조사하였으며 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 토양으로부터 곤충병원성 선충의 검색을 위한 trap용 곤충으로는 꿀벌부채명나방보다 누에가 감수성이 높았다.

2. *Steinernema*, *Rhabditidae*, *Diplogastroidae*과 계통의 선충은 꿀벌부채명나방 유충에서의 증식은 5만 마리 이하였으나, 누에 유충에서는 15만에서 35만 마리의 선충 증식이 일어났으며, 누에 번데기에서는 25만 마리 이상의 선충이 증식되었다. 누에 증식에 있어 누에 번데기를 사용했을때가 가장 우수하였다.

3. *Steinernema*, *Rhabditidae*, *Diplogastroidae*과 계통의 선충에 대한 증식률은 열풍건조 번데기의 흡수처리 후 배양 및 기타 천연물 인공배지에서 증식은 가능하였으나 살아있는 누에 유충 보다는 증식률이 낮았다.

4. 이상의 결과로 토양으로부터 곤충병원성 선충을 분리하는데 누에를 이용한 trap이 매우 우수하였으며, 선충의 증식에 있어 누에 유충 및 번데기가 효과적인 것으로 판단된다.

## 인용문헌

- Adamson M. L. (1987) Phylogenetic analysis of the higher classification of the Nematoda, Canadian Journal of Zoology, 65: 1478~1482.
- Bedding, R. A. and L. A. Miller (1981) Use of a nematode, *Heterorhabditis heliathidis*, to control black vine weevil, *Otiathynchus sulcatus*, in potted plants, Annals of Applied Biology, 99: 211~216.
- Bird J., M. Larsen, P. Nansen, H. O. Kraglund, J. Gronvold, S. A. Jenriksen, and J. Wolstrup (1998) Dung-derived biological agents associated with reduced numbers of infective larvae of equine strongyles in faecal culatures, *J. Helminthol.*, 72: 21~26.
- Feckman, D. W. and J. G. Baldwin (1990) Nematoda. In "Soil biology guide", John Wiley & Sons, New York, pp. 155~168.
- Gaugler, R. and H. L. Kaya (1990) Biology and taxonomy. in "Entomopathogenic Nematodes in Biological Control", CRC Press, pp. 23~90.
- Griffin C. T., R. Chaerani, D. Fallon, A. P. Reid, and M. J. Downes (2000) Occurrence and distribution of the entomopathogenic nematodes *Steinernema* spp. and *Heterorhabditis indica* in indonesia, *J. Helminthol.*, 74: 143~150.
- Ingham R.E. and J. K. Detling (1984) Plant-herbivore interactions in a north american mixedgrass prairie. III. Soil nematode populations and root biomass on *Cynomys ludovicianus* colonies and adjacent uncolonized areas, *Oecologia.*, 63: 307~313.
- Jorgenson E. C. (1984) Nematicides and nonconventional soil amendantents in the management of root-knot nematode on cotton, *J. Nematol.*, 16: 154~158.
- Maggenti A. R. (1991) Nemata: Higher classification, In Manual of agricultural nematology, Maecel Dekker, pp. 147~158.
- Mirto S., R T. La, C. Gambi, R. C. Danovaro, and A. Mazzola (2002) Nematode community response to fish-farm impact in the western mediterranean, *Environ Pollut.*, 116: 203~214.
- Sanyal P. K. (2000) Screening for indian isolates of predacious fungi for use in biological control aganinst nematode parasites of ruminants, *Vet Res Commun.*, 24: 55~62.
- 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.
- Whang, K. S., S. M. Han, Y. J. Kim, P. W. Nam, and S. Y. Han, (2003) The Detection and a Quantitative Evaluation of Entomopathogenic Nematodes in Cultivated Rhizosphere Soil,

*Korean J. Environ. biol.*, 21: 271~275.

White G. E. (1929) A method for obtaining infective nematode larvae from culture, *Science*, 66: 302.

Woodring, J. L. and H. K. Kaya (1988) Steinerematid and Heterorhabditid nematodes; A handbook of biology and techniques, Arkansa Agricultural Experiment Station,

Fayetteville Aekansas, pp. 1~30.

Woodring, J. L. and H. K. Kaya (1988) Steinernematidae and heterorhabditid nematodes: A handbook of techniques, Southern Coop. Ser. Bull. Alkansas Agri. Exp. Stn. Fayetteville, pp. 187.