

곤충병원성 진균 포자를 이용한 분상 제형의 살비 활성

구정모*, 오성**, 송화섭*, 김학웅*, 최창원**

*제노바이오

**배재대학교 생물약학과

e-mail : jungmo9@gmail.com

Acaricidal Activity of Powder Formulation Using Entomopathogenic Fungal Spore

Jung Mo Koo*, Sung Oh**, Hwa Sub Song*, Hak Eung Kim*, Chang Won Choi**

*GENOBIO Co.

**Dept. of Biology and medicinal science, Paichai Uni.

요약

본 연구에서는 닭진드기(*Dermanyssus gallinae*)에 곤충병원성 진균 포자를 유효성분으로 하는 분상 제형화 연구를 수행하였다. 곤충병원성 진균 *Beauveria bassiana* (Bb), *Paecilomyces* sp. 및 *Lecanicillium leccanii* 이상 3종의 진균을 대상으로 1.0×10^8 spore/mL의 포자 농도에서 닭진드기 살비 활성을 검토했을 때, Bb가 가장 우수했다. Bb는 sucrose와 yeast extract로 구성된 배지로 28°C, 200 rpm, 초기 pH 5.0의 조건의 액상배양에서 최대량의 포자를 생산하였다. 포자를 포함한 배양액을 동결건조하여 분말화하였고, 포도당을 증량제로 활용하여 분상 제형을 제작하였다. 각각의 제형에 대한 살비 활성을 검토하기 위해서 1/250 및 1/500 배의 희석 농도를 적용하였다. 세 가지 제형 중에서 Fd-C가 가장 우수한 살비 활성을 보였으며, 이 제형은 4°C에서 120일 동안 저장할 경우 36.1% 정도의 발아율이 감소하는 것으로 확인되었다. 이상의 결과로 Bb가 닭진드기의 개체수를 조절할 수 있는 살비제로서의 가능성을 확인할 수 있었다.

In this study, the killing efficacy of the entomopathogenic fungi against poultry red mites (*Dermanyssus gallinae*) were experimentally evaluated and the formulation studies were also performed. *Beauveria bassiana* (Bb) showed the best acaricidal activity against the red mites using the concentration(1.0×10^8 spore/mL) of three fungal species such as Bb, *Paecilomyces* sp. and *Lecanicillium leccanii*. The liquid media supplemented with sucrose and yeast extract supported maximum production of spores under the condition at 28°C, 200 rpm and initial pH 5.0. The culture containing spores was freeze-dried in three types, and a powder formulation was prepared using glucose as a carrier. The acaricidal activity of each formula was determined by using dilutions (1/250 and 1/500). Among three formulas, Fd-C was confirmed to be the best, showing that its spore germination rate was decreased to 36.1% under the storage condition of 4°C for 120 days. Results of this present study indicate that Bb may be useful as potential acaricides to control the population of red mites.

1. 서론

곤충병원성 진균은 해충에 대한 살충제로 사용되는데, 인축 독성이 없으며, 잔류 독성물질이 존재하지 않으며, 진균의 증식으로 해충을 지속적으로 방제할 수 있는 것이 장점이다. 하지만, 진균이 해충에 부착하여 증식할 수 없는 환경이 된다면 해충에 대한 방제활성은 급격히 감소하는 단점이 있다.

친환경 살충제로써 활용 가능한 곤충병원성 진균으로는 *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Lecanicillium leccanii*, *Cordyceps militaris* 등이 대표적으로 연구되었다[3]. 곤충병원성 진균을 활용하기 위해서 포자 생산이 필수적이라 할 수 있다. 진균의 포자를 생산하기 위해서

액상 또는 고상 배양을 수행하게 된다. 고상 배양의 경우에, 진균이 생산하는 포자는 소수성 형태의 포자를 생산하는데, 이 포자를 회수하는 과정에서 고상 배지의 고형성분을 분리해야 하는 번거로움이 있다. 액상 배양의 경우에, 포자는 친수성 포자를 생산하기 때문에, 실온에서 장기 저장 시 포자 발아율이 감소하는 문제점이 있다[7].

닭진드기(Red mite 혹은 Poultry mite, 학명 : *Dermanyssus gallinae*)는 거미강, 응애목의 절지동물로 크기가 1 mm 이하이다. 서식 환경은 좁고, 고온다습한 암조건을 선호하며 사육 케이지 틈사이, 사료통, 산란벨트 등에 군집한다. 또한 생활사는 유충, 제 1 약충, 제 2 약충 및 성충으로 구성되어 있는데, 약충과 성충단계에서 닭에 침입한 후 흡혈하여 문제를 유발시킨다[1].

본 연구에서는 3종의 곤충병원성 진균의 닭진드기에 대한 살비 활성을 확인하고자 하였다. 후보 곤충병원성 진균으로부터 친수성 포자를 확보하였으며, 이 포자를 분상 제형화하였고, 닭진드기에 대한 살비 활성을 연구하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 실험 균주

본 실험에 사용된 균주는 곤충병원성 진균의 일종인 *Beauveria bassiana* KACC 40224(이하 Bb), *Paecilomyces* sp. KACC 40656(이하 P sp.), *Lecanicillium leccanii* KACC 42789(이하 Ll)는 국립농업과학원에서 분양을 받았다. 균주 보관용 및 종균 배지는 PDA (Potato Dextrose Agar) 배지를 사용하였고, 25℃, 14일 동안 배양하였다. 포자는 0.05% Tween-80 용액을 agar 배지에 첨가하여 회수하였고, -80℃에 저장하였다.

2.2 후보 균주의 살비 활성 테스트

후보 진균 3종의 포자를 각각 Potato dextrose broth에서 28℃, 200rpm, 초기 pH 5.0 조건에서 7일 동안 배양하여 친수성 포자(oidia)를 확보하였다. 확보된 포자의 농도는 1.0×10^8 spore/mL가 되도록 포자 현탁액을 준비하였고, 포자 농도는 hemocytometer로 측정하였다.

실험 대상인 닭진드기(*Dermanyssus gallinae*)는 산란계 농장에서 포집하여 안정화시킨 후에 사용하였고, insect breeding dish(SPL, Korea)에 평균 100마리씩 분주한 후에 테스트를 진행하였다. 준비된 포자 현탁액을 닭진드기가 정착하고 있는 dish에 2mL/dish의 농도로 분무 살포하였다. 살포 주기는 4일 간격으로 수행하였고, 살포 전에 닭진드기 치사율을 측정하였다.

2.3 닭진드기 치사율 확인

닭진드기는 insect breeding dish에서 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 45~60%, 암조건에서 사육하면서 테스트를 진행하였다. 닭진드기 치사율 측정은 Lammer 등이 수행한 방법을 일부 수정하여 수행하였다[6]. 치사율 측정은 실체현미경(Nikon, Japan)을 사용하여 가는 칩으로 건드려서 움직임이 없는 죽은 개체를 계수하였다. 총 개체수는 닭진드기 dish를 -20℃ 냉동고에 16시간 방치하여 동사시킨 후에 실체현미경으로 총 개체수를 계수하였다.

닭진드기 치사율(%) = (치사 개체수 / 총 개체수) × 100

2.4 포자 분상 제형

최종 후보로 결정된 Bb를 sucrose 4.75%, yeast extract 8.613%의 조성의 배지에서 28℃, 200rpm, 초기 pH 5.0 조건에서 5일 배양하였고, 이 조건에서 최대치 포자

량(4.6×10^8 spores/mL)을 확보할 수 있었다. 이렇게 확보된 포자를 동결건조하기 위해서 표 1과 같은 3종류의 조성으로 동결건조를 수행하였다. 분상 제형은 포자 동결건조 분말 30%, 무수포도당 70%의 비율로 3종의 분상 제형을 제작하였고, 제형의 포자 농도는 평판 희석법으로 측정하여 1.0×10^8 cfu/g가 되도록 하였다.

[표 1] 동결건조분말 구성

Fd-C	Fd-L	Fd-M
Skim milk 10%	Skim milk 10%	Skim milk 10%
Corn starch 10%	Lactose 10%	Trehalose 10%
Glycerin 0.8%	Glycerin 0.8%	Glycerin 0.8%
Vitamin C 2.5%	Vitamin C 2.5%	Vitamin C 2.5%

2.5 포자 분상 제형의 살비 활성

포자 분상 제형의 살비 활성을 확인하기 위해서 음성대조구로는 멸균 증류수, 양성 대조구로는 Bb 포자 현탁액(1.0×10^8 cfu/mL), 3종의 Bb 포자 분상 제형(1.0×10^8 cfu/g)을 준비하였다. 살비 활성 적용 농도는 1/250 및 1/500의 희석비율을 선택하였으며, 멸균 증류수로 희석하였고, 이 희석비율은 산란계 농장에서 주로 많이 사용되는 희석 배율이다. 살비 활성 및 닭진드기 치사율 테스트는 재료 및 방법 2.2와 2.3과 동일하게 수행하였다.

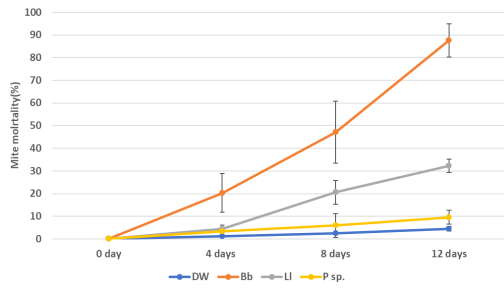
2.6 포자 분상 제형의 발아율 테스트

최종적으로 선정된 포자 분상 제형에 대한 온도에 따른 발아율을 확인하고자, 4℃ 및 25℃에서 120일 동안 보관하면서 30일 간격으로 포자 발아율을 측정하였다. 초기 시작 농도는 5.0×10^7 cfu/g에서 수행하였다. 포자 발아 측정은 평판희석법을 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 후보 균주의 살비 활성 및 치사율

Bb, P sp., 및 Ll 포자 현탁액을 산란계 농장에서 포집해 온 닭진드기에 각각 살포한 후 균주에 의한 치사율로 살비 활성을 검토하였고, 그 결과는 그림 1과 같이 확인되었다. Bb의 경우에 4일차 평균 20.3%, 8일차 평균 47.0%, 12일차 평균 87.6%의 살비활성을 보였다. 나머지 P sp., 및 Ll는 12일차에도 살비 활성이 50% 이하에도 미치지 못하는 것으로 확인되었다. 닭진드기에 대한 살비 활성은 3종의 균주 중에서 Bb가 가장 우수한 것으로 판단되어, 최종 균주를 Bb로 확정하였다.



[그림 1] 후보 진균들의 살미 활성

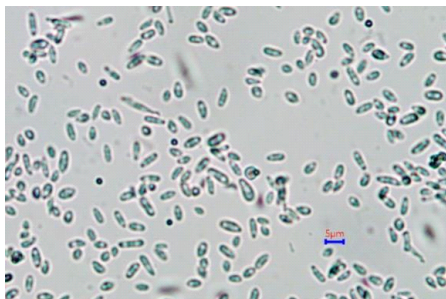
3.2 포자 분상 제형의 살미 활성 및 치사율

최종적으로 결정된 Bb를 7일 동안 배양하여 포자(oidia)가 함유된 배양액(그림 2)을 확보하였고, 표 1과 같은 조성으로 동결건조를 수행하여 3종의 분말을 제작하였다. 3종의 분말 제형 대한 살미 활성을 확인한 결과 그림 3과 4와 같은 살미 활성이 확인되었다.

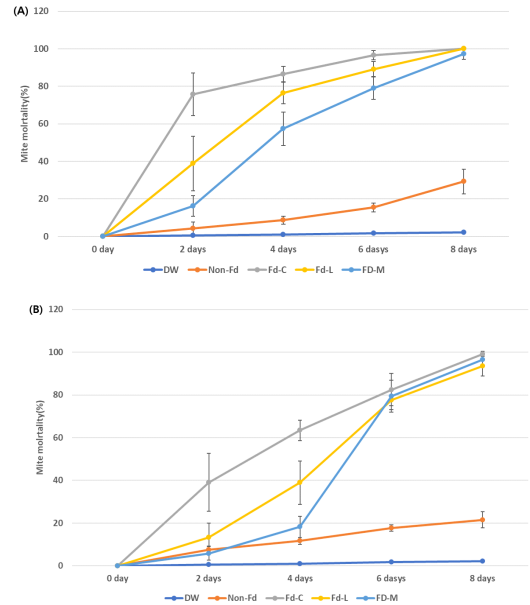
희석배율 1/250를 적용한 결과에서, Fd-C는 2일차에 평균 치사율이 75.8%로 확인되었지만, 나머지 제형은 50% 이하로 확인되었다. 모든 분말 제형에서 시간이 지남에 따라 치사율이 상승하였고, 8일차에는 100%에 가까운 치사율을 확인할 수 있었다(그림 2. A). 희석배율 1/500를 적용한 결과에서, 2일차에 모든 제형의 치사율이 50% 이하였지만, 4일차에 Fd-C는 63.4%로 확인되었고, 나머지 제형의 치사율은 50% 이하로 확인되었다. 희석배율 1/500도 시간이 지남에 따라 8일차에 90% 이상의 치사율을 확인할 수 있었다(그림 2. B). 대조구인 멸균 증류수와 포자 현탁액은 분말 제형에 비해 닭진드기 치사율이 저조하였다. 그림 4에서 보는 바와 같이 광학현미경으로 치사한 닭진드기를 관찰한 결과, 닭진드기 주위에 진균의 균사가 성장한 것이 관찰되었다.

3.3 분상 제형의 포자 발아율

Bb 포자가 함유된 Fd-C 제형의 포자 발아율로 제형의 안정성을 확인하고자 하였다. 제형을 4°C와 30°C에서 120일 동안 보관하면서 30일 간격으로 발아율을 확인한 결과는 그림 5와 같았다. 120일 후 30°C에서 보관한 제형은 발아율이 평균 99.4% 감소했으며, 4°C에서 보관한 제형은 발아율이 평균 36.1% 감소한 것으로 확인되었다.



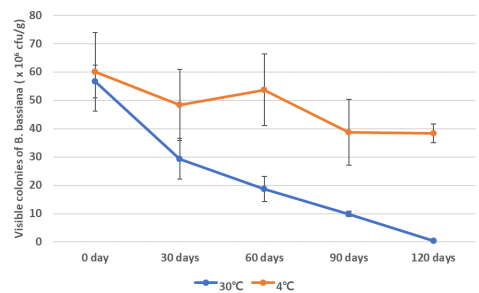
[그림 2] Bb 배양액에 함유된 포자(oidia)의 광학현미경 사진(400배, scale bar ; 5µm)



[그림 3] Bb 동결 건조 분말이 함유된 3종 분상 제형의 희석 농도에 따른 살미 효과 (A : 1/250, B : 1/500)



[그림 4] 테스트 8일차 Fd-C 제형에 의해 치사한 닭진드기(광학현미경, 40배)



[그림 5] Fd-C 제형의 저장 온도에 따른 *B. bassiana* 균주의 발아

4. 고찰

본 연구에서 최종 후보 균주로 사용된 Bb(1.0×10^8 spore/mL)의 포자는 87.6%의 살미 활성을 보였다. 닭진드기를 대상으로 한 다른 연구에서는 *B. bassiana*의 conidia 현탁액(10^9 conidia/mL)을 성충에 적용 시 12일 후에 100% 치사율을 보였고, 약충에 적용 시 14일 후에 100% 치사율을 보였다[4]. 타 연구에서는 고상 배양에서 생산된 *B. bassiana*의 포자인 conidia를 중심으로 살미활성이 검토되

었는데, 본 연구에서는 *B. bassiana*의 액상 배양에서 생산된 포자인 oidia를 사용하였다. 그러므로 *B. bassiana*의 포자인 conidia와 oidia가 닭진드기에 대한 살비 활성이 있는 것으로 확인되었으며, 치사율은 포자의 농도 및 적용 방법에 따라 유의차가 있을 것으로 예측되었다.

Bb의 균사 및 포자를 포함하는 배양액을 동결건조하여 분상화 하였고, 무수포도당을 증량제로 활용하여 분상 제형을 제작하였다. 유효성분인 진균을 분상화할 때 산업적으로 사용하기 위해서 배양액을 통상적으로 건조하는 방법을 선택하는데, AD(air-dry), S/D(spray-dry, 분무건조) 및 F/D(freeze-dry, 동결건조) 방법을 사용한다. Jackson 등은 곤충병원성 진균인 *Paecilomyces fumosoroseus*의 액상배양으로 blastospore를 확보하여 5% 규조토를 추가하여 A/D로 건조하였고, 20% lactose와 1% bovine serum album를 첨가하여 F/D로 건조하였다[5]. 닭진드기 살비 활성이 확인된 곤충병원성 진균인 *M. anisopliae* JEF-214를 고체배양으로 확보한 conidia, 증량제 및 계면활성제를 활용하여 분말 제형 및 액상 제형을 제조한 특허 문헌이 보고되었다[2].

제작된 분상 제형에 대한 살비 활성을 측정하기 위해서 제형의 살포 농도를 1/250 및 1/500로 구분하여 확인하였다. 살비 활성을 8일까지 확인하였을 때, 최종적으로 모든 분상 제형이 두 살포 농도에서 모두 90% 이상의 살비 활성을 확인할 수 있었다. 다만 Fd-C 제형이 다른 제형들에 비해 가장 빠른 시간에 강력한 살비 활성을 보인 것으로 확인되었다. *B. bassiana*를 농업용 살충제로 제형화한 연구에 따르면, conidia 및 blastospore를 A/D 건조물로 제작하여 온실가루이 유충에 살포한 결과, 살충효과에 유의차가 없는 것으로 보고되었다[8].

제품화된 분상 제형이 시장에 유통할 때 유효 성분인 진균의 발아율이 중요하다. 제품 저장 온도에 따른 Bb의 발아율을 확인하였고, 30℃ 정도의 상온보다 4℃ 정도의 저온에서 저장하는 것이 진균의 발아율을 유지하는데 도움이 되는 것으로 확인되었다. Jackson 등은 *Paecilomyces fumosoroseus*의 F/D 제형에 대한 온도 안정성 테스트를 수행하였다. 4℃ 저장 테스트에서 150일 경과 68%가 생존하였고, 22℃ 저장 테스트에서 30일 경과 1%가 생존하였다고 보고하였다[5].

본 연구를 바탕으로 곤충병원성 진균인 Bb의 액상 배양으로 생산된 포자를 활용하여 분상 제형을 산업화할 수 있는 가능성을 확인할 수 있었다. 또한 닭진드기를 방제하기 위한 살비제 뿐만 아니라 농업용 친환경 살충제로써 제품화의 가능성을 예측할 수 있었다.

사사

본 연구는 농림축산식품부의 가축질병대응기술개발(과제

번호 : 318052-2)에 의해 수행된 것이며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- [1] 이용민 (2013). 양계질병동향-닭진드기의 특성과 대처방안 (1). Korean poultry J., Vol. 45(9), pp. 135-137
- [2] 전북대학교 산학협력단. 닭진드기 방제효과를 갖는 메타리지움 아니소플리에 JFF-214 균주, 이를 이용한 닭진드기 방제용 조성물 및 닭진드기 방제방법. 대한민국 특허등록번호 10-2054577, 출원일자 2018년 2월 28일, 등록일자 2019년 12월 4일
- [3] Glare T. R., Goettel M. S., Eilenberg J. (2010). Entomopathogenic fungi and their role in regulation of insect populations. In Lawrence I. Gilbert, Sarjeet S. Gill (Ed.), Insect control(pp. 387-437). Academic Press
- [4] Immediato D., Camarda A., Iatta R., Puttill M. R., Ramos R. A., Di Paola G., et al. (2015). Laboratory evaluation of a native strain of *Beauveria bassiana* for controlling *Dermanyssus gallinae* (De Geer, 1778) (Acari : Dermanyssidae). Vet. Parasitol., Vol.212(3-4), pp. 478-482
- [5] Jackson M. A., Mcguire M. R., Lacey L. A., Wraight S. P. (1997). Liquid culture production of desiccation tolerant blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. Mycol. Res., Vol. 101(1), pp. 35-41
- [6] Lammers G. A., Bronneberg R. G. G., Vernooij J. C. M., Stegeman J. A. (2017). Experimental validation of the AVIVET trap, a tool to quantitatively monitor the dynamics of *Dermanyssus gallinae* populations in laying hens. Poult. Sci. Vol. 96(6), pp. 1563-1572
- [7] Lee J. B., Kim B. S., Joo W. H., Kwon G. S. (2016). Culture method of spore for entomopathogenic fungus using natural zeolite ceramic ball. Koren J. Environ. Agric., Vol. 35(1), pp. 72-78
- [8] Mascarin G. M., Jackson M. A., Kobori N. N., Behle R. W., Júnior Í. D. (2015). Liquid culture fermentation for rapid production of desiccation tolerant blastospore of *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea* strains. J. Invertebr. Pathol. Vol. 127. pp. 11-20