GOVP1199900170

BSNB0210-98021-4

최종보고서

솔잎혹파리 방제를 위한 유효병원미생물의 탐색, 대량배양 및 제제화에 관한 연구

Isolation, Mass culture, and Insecticide Formulation of Insect-pathogenic Microorganisms for the Control of Pine Needle Gall Midge, *Thecodiplosis japonensis*

주관연구기관

한국과학기술연구원

생명공학연구소

과 학 기 술 부

제 출 문

과학기술부장관 귀하

본 보고서를 "솔잎혹파리 방제를 위한 유효병원미생물의 탐색, 대량배양 및 제제화에 관한 연구" 의 최종보고서로 제출합니다.

1998. 7

연 구 기 관 : KIST 생명공학연구소
연 구 책 임 자 : 박호용 (생명공학연구소 책임연구원)
연 구 원 : 손광희 (〃 선임연구원)
박순식 (〃 선임연구원)
신상운 (〃 연 구 원)
박두상 (〃 연 구 원)
권용국 (〃 선임 기사)
한창훈 (〃 책임 기사)
김춘미 (〃 연구 조원)
박규택 (강원대학교 농과대학 교수)
유용만 ((주)경농 중앙연구소 수석연구원)

여 백

Summary

1. Title of the Research

Isolation, mass culture, and insecticide formulation of insect-pathogenic microorganisms for the control of pine needle gall midge, *Thecodiplosis japonensis*

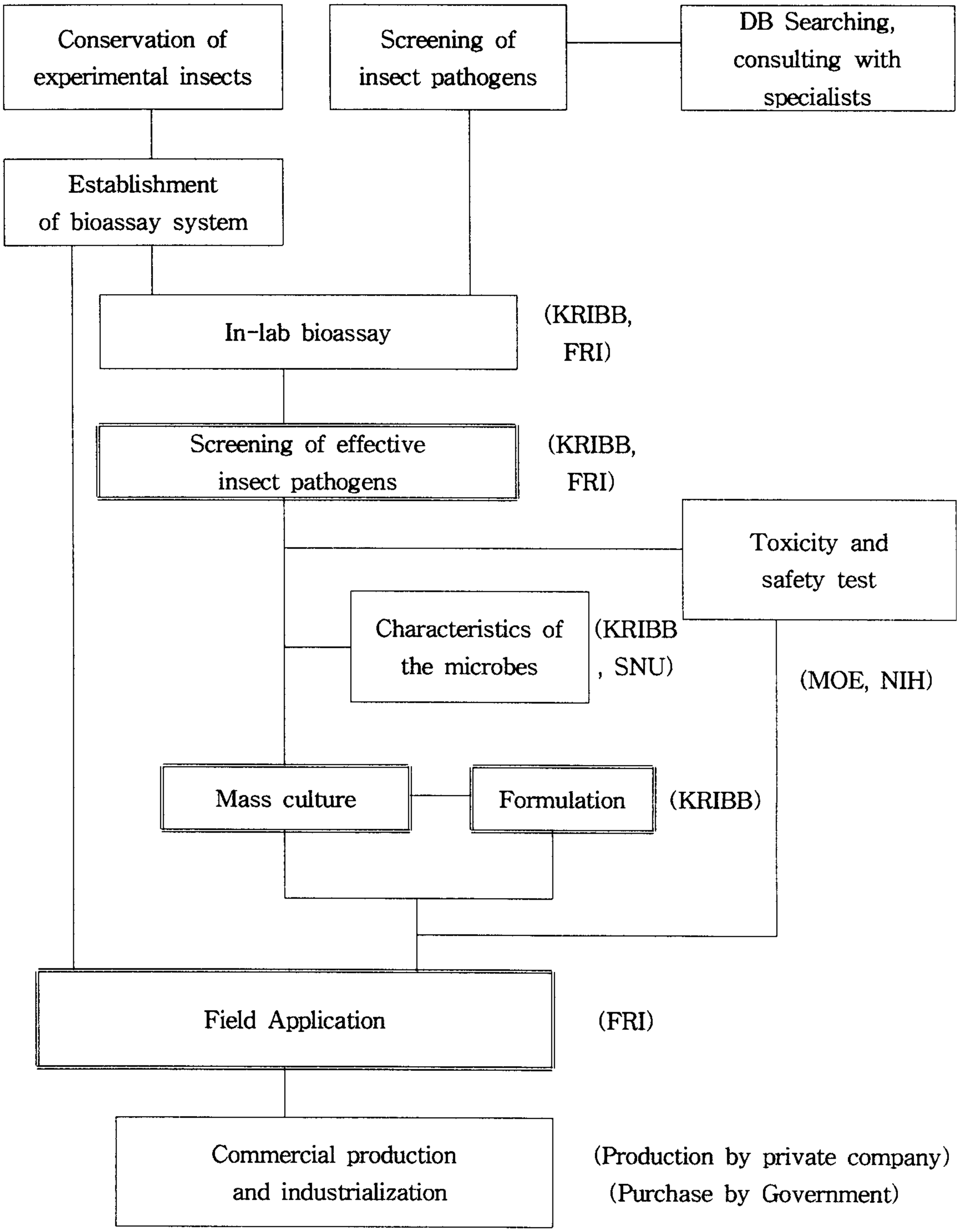
2. Background of the Research

- The pine needle gall midge, *Thecodiplosis japonensis* is the most serious insect pest in the forest of Korea since several decades ago.
- The insect infests *Pinus densifroa* and *Pinus thunbergii*, the most dominant species of pine tree in Korea.
- Althoguth various kinds of measures have been tried to control the insect pest, the infested areas and damages are still spreading and serous all over the country.
- So, it is urgently required to develope the integrated pest management system to control the insect pest on the point of view of effectiveness and environmental pollution.
- In this study, we will develope the microbial insecticide for the control of the pine needle gall midge, *Thecodiplosis japonensis*, with consideration of the unique life cycle of the insect pest.

3. Purpose and Contents of the Research

	Objectives	Scope and content of the research
1st year ('94)	Screening of the effective insect pathogens	1. Screening of insect-pathogenic microorganisms from the insects and forest soil. 2. Conservation of the experimental insects for bioassay 3. Establishment of in-and out-lab bioassay system against the pine needle gall midge.
2nd year ('95)	Selection, culture and formulation of effective pathogens	1. Screening of the effective pathogens. 2. Analysis of characteristics of the pathogens. 3. Establishement of culture system of the effective insect pathogens 4. Formulation and small scale field application of the microbial insecticide
3th year ('96)	Mass production, formulation and field application	1. Mass production of effective insect pathogens 2.. Formulation for field application 3. Field application of microbial insecticide against the pine needle gall midge

4. Strategy and Approach System of the Research



5. Results of the Research

1) The larva of the pine needle gall midge, *Thecodiplosis japonensis* were collected from the infested pine needle in the field, and conserved in growth chamber at 4℃.

2) Insect-pathogenic microorgamisms were isolated from the soil and diseased insects in the field. Among 300 samples from 50 sites, 420 strains were isolated by preliminary screening and finally 14 fungal strains were selected including *Beauveria, Metarhizium, Paecilomyces, Penicillium* and *Verticillium* spp.

3) About 9×10^9 spores/g culture were produced by the plate culture of *Beauveria bassiana* HY-1.

4) The insect pathogenic fungi, *B. bassiana* HY-1 were cultured with large scale on wheat bran etc. Optimal moisture content is 41.3%(w/w). The production efficiency is 1.36×10^9 cfu/g in the flask culture, and 2.05×10^8 cfu/g in polypropylene-bag for mass production under the culture condition of 27℃, for 11 days.

5) Biodegradable natural formulating materials were selected by consideration of economy and easy to get, nutritional balance,

protective effect for spores, and texture. The formulation efficiency was tested by the amount of capsulated spores and pathogenicity to the insects.

6) In the first year, *B. bassiana* HY-1 were immobilized to gelatinized starch as carrier We tried to improve the stability and durability by various factors, UV, dry condition, and swept etc. In the second year, in addition, we introduced more cheaper materials and simple methods with economical point of view. The main composition of formulation is the mixture of clay and detergent for trapping viable spores of *B. bassiana* HY-1. In the last year, we have developed the formulation with easy care type as microbial insecticide.

7) Various types of formulations were prepared for the process efficiency checking and comparable tests. The test microbial insecticide was massively produced for the field appication to control the pine needle gall midge, *Thecodiplosis japonensis.*

8) In this study, we have isolated effective insect-pathogenic microorganisms, produced it and developed the microbial insecticide for the control of the pine needle gall midge, *Thecodiplosis japonensis.*

여 백

요 약 문

1. 연구개발과제명

솔잎혹파리 방제를 위한 유효병원미생물의 탐색, 대량배양 및 제제화에 관한 연구

2. 연구개발의 배경 및 필요성

- 솔잎혹파리(*Thecodiplosis japonensis*)는 외래해충(Introduced Insect Pests)으로서 오래전부터 현재까지 우리나라 산림해충의 압도적 수위를 차지하고 있슴.
- 또한 특히 세계적으로 우리나라 대부분 지역에서 자생하고 있는 토착수종인 소나무(赤松: *Pinus densifora*)와 곰솔(海松, 黑松 *Pinus thunbergii*)을 선호해서 가해하고 있슴.
- 1929년 서울과 목포에서 처음 발견된 이래 부산등지에서도 그 피해발생이 확인됨.
- 그동안 갖가지 방법을 동원하여 이 해충의 확산을 저지하기 위해 애써 왔지만, 지금은 일부 지역을 제외한 전 국토의 소나무들이 이 해충에 시달리고 있으며, 최근에는 남한과 인접한 북한지역등 한반도 전역으로까지 확산되고 있슴.
- 지난 70년대초까지도 삼림지역에 화학농약으로 대량 항공방제를 했으나, 유용곤충의 피해가 더욱 커서 이를 중지하기도 했슴.
- 현재는 주로 천적곤충인 먹좀벌 살포와 수간주사법을 이용하고 있는데, 주간주사의 경우 1ha 당 120명의 인력이 필요한데다 솔잎혹파리의 방제시기가 6월 한달간으로 짧아 많은 어려움이 있슴. 천적인 먹좀벌의 대량방출도 인공사육기술의 한계 및 방제시기의 제약, 기생율등의 문제로 말미암아

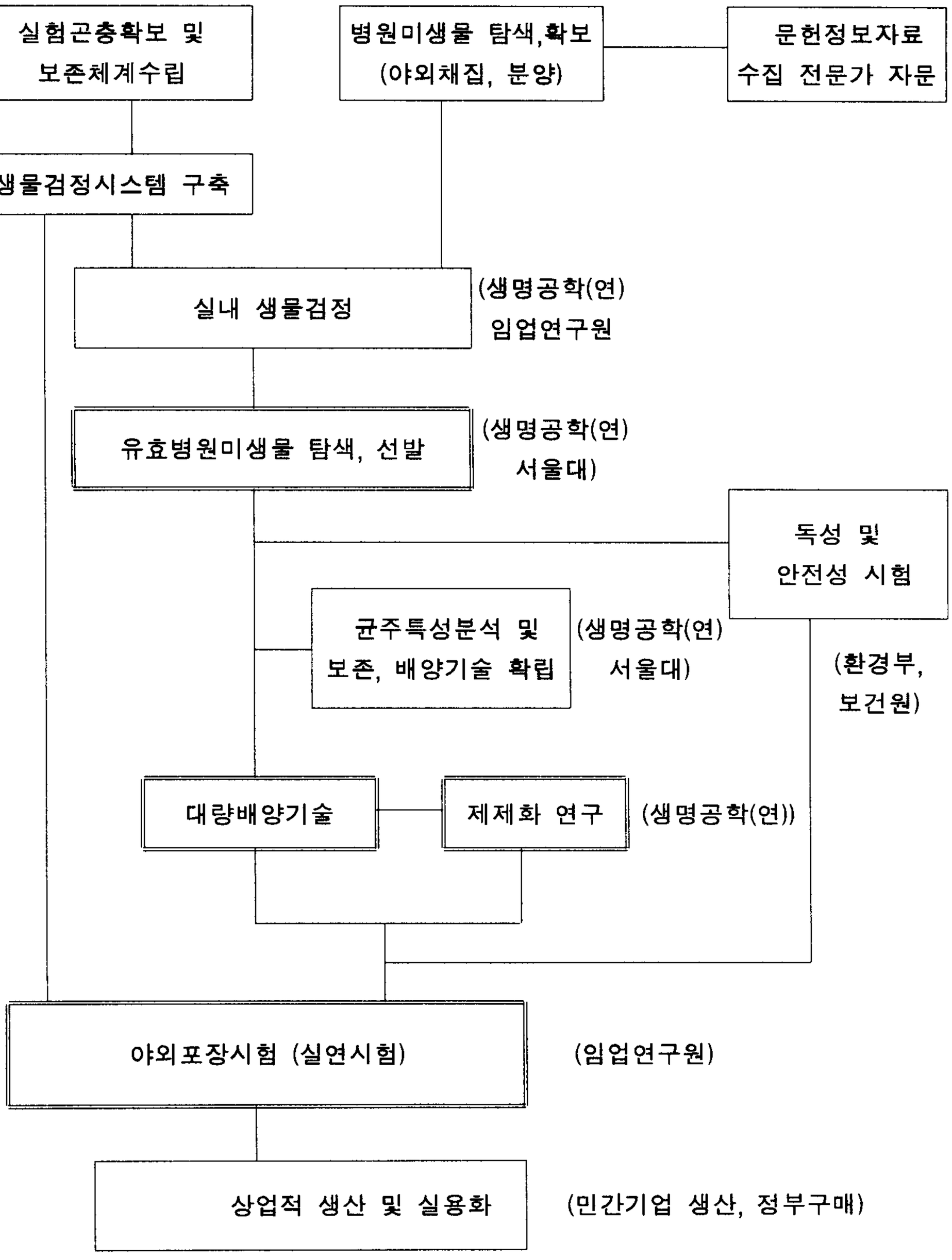
효과적인 방제에 한계가 있슴.

- 1997년 현재 발생면적은 전국적으로 28만ha이며, 강원도(67,129ha)에 이어 경북(39,000ha), 충북(15,000ha) 지역등이 피해가 특히 심하며, 솔잎혹파리 방제소요예산은 강원도의 경우 152억원등 연간 380억원임.
- 따라서 솔잎혹파리 곤충의 생태적 특성으로 인하여 곤충병원미생물 이용을 중심으로 한 종합적 방제체계(Integrated Pest Management System)를 활용하는 대책마련이 시급함. 그렇지 않을 경우에는 전국토 산림자원 및 생태계의 심각한 파괴가 예상됨.
- 또한, 솔잎혹파리방제를 위한 기술은 세계적으로 개발된 것이 없어 기술도입이 불가능하여 자체개발 할 수 밖에 없슴.

3. 연구개발의 목표 및 내용

구 분	연구개발목표	연구개발내용 및 범위
1차년도 ('94)	유효곤충병원 미생물 탐색 및 실험곤충 확보	**1. 유효곤충병원미생물 탐색** (전국의 산림토양 및 솔잎혹파리 피해 극심지역으로 부터 곤충병원곰팡이, 세균, 바이러스등의 탐색, 분리) **2. 실험곤충의 확보** (솔잎혹파리 유충의 야외채집후 실내사육) **3. 생물검정시스템 구축준비**
2차년도 ('95)	유효병원미생물 확보, 특성분석, 배양체계 구축 및 제제화	**1. 유효곤충병원미생물 탐색, 확보** (실내 생물검정을 통한 살충력 평가, 선발) **2. 유효곤충병원미생물의 특성분석** (미생물 특성, 병원력 및 솔잎혹파리에 대한 살충기작 연구) **3. 유효 곤충병원미생물의 배양체계 구축 및 제제화** (미생물 대량배양 및 병원력의 효율화, 극대화) **4. 실내 및 소규모 야외포장 시험** (실험실내 및 피해 극심 지역 20ha 이내 규모)
3차년도 ('96)	유효미생물 대량생산, 제제화 및 해충방제 야외산포 시험	**1. 유효곤충병원미생물의 대량생산** - 곤충병원미생물의 특성을 고려한 대량생산 시스템 구축 (특히, 병원력 유지 측면) - 야외 산포시험 면적, 횟수 등을 고려한 미생물 살충제 생산 - 야외산포용 200kg/ha 기준 약 20ha 정도의 시험규모 소요량 생산 - 곤충병원미생물 생산의 상업적 최적화 조건 구현 **2. 실용화를 위한 제제화** - 솔잎혹파리에 대한 살충력 극대화를 위한 제형설계 - 공중살포시 지상도달능력, 토양내 타 미생물과의 생존경쟁능력, 솔잎혹파리에 접촉시까지 유효 병원력 보유능력등을 고려한 제제화 - 상업생산을 고려한 경제적인 제제구성조건 구현 **3. 솔잎혹파리 방제 제제의 예비 야외산포시험** - 방제지역, 규모, 기후, 피해정도 등을 고려한 시험설계 - 솔잎혹파리 방제용 미생물 살충제의 효능 평가 분석 및 효율적 방제가능성 도출 - 솔잎혹파리 방제용 미생물 제제의 등록시험 및 상업적 생산가능성 모색

4. 연구개발 추진체계


실험곤충확보 및
보존체계수립
병원미생물 탐색,확보
(야외채집, 분양)
문헌정보자료
수집 전문가 자문
생물검정시스템 구축
실내 생물검정
(생명공학(연)
임업연구원
유효병원미생물 탐색, 선발
(생명공학(연)
서울대)
독성 및
안전성 시험
균주특성분석 및
보존, 배양기술 확립
(생명공학(연)
서울대)
(환경부,
보건원)
대량배양기술
제제화 연구
(생명공학(연))
야외포장시험 (실연시험)
(임업연구원)
상업적 생산 및 실용화
(민간기업 생산, 정부구매)

5. 연구개발 결과

1. 유효곤충병원미생물 탐색을 위한 실내 생물검정 시스템 구축의 일환으로 솔잎혹파리 유충이 들어있는 충영을 야외에서 확보하고, 저온저장고의 톱밥층속에 솔잎혹파리 유충을 보존하면서 연구에 사용하였다.

2. 야외에서 병원미생물에 감염되어 죽은 곤충이나 솔잎혹파리 서식토양으로부터 유효곤충미생물을 분리하였다. 전국의 50개 지역의 300개 토양샘플로부터 420균주를 분리하고, 3차 생물검정을 통해 최종적으로 *Beauveria, Metarhizium, Paecilomyces, Penicillium* 및 *Verticillium* 속에 속하는 14가지 곰팡이 균주를 선발하였다.

3. 선발된 유효곤충병원미생물 중 *Beauveria bassiana*를 이용한 평판배양을 실시한 결과, 균체 g 당 약 9×10^{10}개의 포자를 생산할 수 있었다.

4. 밀기울을 주요성분으로 하는 고체배지에서 솔잎혹파리 병원미생물인 *Beauveria bassiana* HY-1을 배양하였다. 최적의 수분함량은 41.3% (w/w)였다. 생산 수율은 소규모 삼각플라스크에서 1.36 x 10^9cfu/g, 대량생산을 위한 polypropylene-bag에서 2.05 x 10^8cfu/g 였다. 배양조건은 27°C에서 11일간 성장 및 숙성을 유도하였다. 이러한 기본적인 배양조건을 마련하기 위해 초기배양단계에서 통계적 방법론을 적용하였다.

5. 제제화를 위한 생분해성 천연담체 재료선발은 구입용이성, 영양균형, 포자 피막보호효과 및 물성을 고려하여 제제화 효율을 비교 시험하였다. 단일재료를 사용하여 각각의 갭슐화 포자량을 조사하고, 이를 각각의 병원력을 검정하였다.

6. 제 1차년도에는 호화된 전분 (gelatinized starch)을 담체(carrier)로 하여 솔잎혹파리 병원성 미생물 *B. bassiana* HY-1을 고정화 시켰다. 외부 환경으로부터의 여러 가지 유해인자들 즉, 자외선, 건조조건 및 유실의 문제를 개선하여 약제의 안정성과 지속성을 높이고자 하였다. 2차년도에는 여기에 경제성을 감안하여 보다 싼 재료 및 간단한 방법론을 도입하였다. 즉, 포자를 안전하게 잡아두는(trapping) 데에 주안점을 두어 clay 및 계면활성제의 혼합물을담체로 하였다. 또한 3차년도에는 이 혼합담체를 다루기 편한 모양으로 제형화하여 조립식 최종 제형을 완성하여 연구를 진행하였다.

7. 제제화의 공정확인 및 비교시료의 제조를 위해 여러가지 조성의 담체를 이용한 시제품을 제조, 효력을 비교하였으며, 야외 산포시험을 위한 대량 시제품의 생산도 실시하였다.

8. 이상의 결과, 솔잎혹파리 방제를 위한 유효미생물의 탐색, 실용적 생산을 고려한 대량생산 및 제제화를 달성할 수 있었다.

9. 따라서, 향후 실용화 연구에서는 더욱 효과적인 병원성 균주의 선발, 경제적인 미생물 살충제 공정개선 병원력 유지, 토양속에서의 생존력 증진, 타 미생물과의 경쟁우위, 자외선등에 의한 불활화 방지, 적절한 중력제등을 이용한 서식토양까지의 도달효율 향상 등을 고려한 지속적인 제형 개선과 함께 효과적인 야외산포기술 개발 및 개선도 수행할 계획이다.

여 백

목 차

Page

요약문 3

제 1 장 서론 19

제 2 장 재료 및 방법 21

2-1. 실험곤충의 확보 및 생물검정 시스템 구축 21

1) 실험곤충 (솔잎혹파리) 의 확보 21

2) 충령으로부터 실험곤충의 회수를 위한 야외포장 설치 21

3) 실내 대형저장고 설치 21

2-2. 곤충 병원 미생물의 탐색 22

1) 솔잎혹파리 피해 지역의 토양시료 채취 22

2) 곰팡이 균주 확보 23

3) 병원력 검정 23

2-3. 병원미생물의 대량생산 및 제제화 24

1) 시약 및 실험재료 24

2) 사용균주 및 종균배양 25

3) 포자배양 및 회수 25

4) 액체배양 26

5) 발효수율의 조사 26

6) 소규모 고체배양 27

7) 대량 고체배양 27

8) 제제화 28

제 3 장 결과 및 고찰 31

3-1. 실험곤충의 확보 및 생물검정 시스템구축 31

1) 실험곤충 (솔잎혹파리) 의 확보 31

2) 생물검정 시스템 구축 31

3-2. 솔잎혹파리 방제용 유효병원미생물 탐색 36

3-3. 솔잎혹파리 방제용 곤충병원 미생물의 대량생산 39

1) 포자의 생산 39

2) 소규모 고체배양 39

3) 통계적 최적화 41

4) 대량배양 최적화 42

5) 유효곤충병원미생물의 대량생산 43

3-4. 솔잎혹파리 방제용 미생물살충제의 제제화 46

1) 천연담체를 이용한 제형 46

2) *B. bassiana* HY-1의 제제화 50

3) 혼합담체의 제제화 51

4) 조립식 시험제형의 최적화 52

5) 솔잎혹파리 방제용 미생물제제의 제형화 개선방향 53

6) 시험제제의 소규모 역가조사 54

7) 시험용 제형의 살포농도별 원제미생물 동태 55

인용문헌 61

제 1 장 서 론

솔잎혹파리(*Thecodiplosis japonensis*)는 외래해충(Introduced Insect Pests)으로서 오래전부터 현재까지 우리나라 산림해충의 압도적 수위를 차지하고 있으며, 특히 세계적으로 우리나라 대부분 지역에서 자생하고 있는 토착수종인 소나무(赤松: *Pinus densifora*)와 곰솔(海松, 黑松 *Pinus thunbergii*)을 선호해서 가해하고 있다. 솔잎혹파리는 5월경 소나무의 어린 잎에 산란을 하고 부화된 유충은 바로 솔잎의 기부로 이동하여 충영을 형성한 뒤 수액을 흡즙하여 소나무의 생육을 저해시킨다. 따라서, 소나무의 성장은 현저히 둔화되고, 심한 경우 2-3년 이내에 피해수목이 말라죽는 경우가 발생한다. 유충은 솔잎기부의 충영내에서 3령까지 성장을 하고 10-11월 하순경에는 충령을 탈출하여 피해 소나무 주변의 토양으로 들어가서 5cm이내 깊이에서 월동을 한다. 이듬해 4-5월에 번데기 과정을 거쳐 우화하며 1-2일 정도의 성충기간 동안 교미, 산란을 하는 1년에 1회 발생의 생활사를 가진다. 1929년 서울과 목포에서 처음 발견된 이래 부산등지에서도 그 피해발생이 확인되었고, 우리나라에 침입하기전 일본 남부지방에 발생해 큰 피해를 주었으며, 일본에서도 그동안 이 해충의 방제에 수 많은 노력을 기울였으나 큰 효과를 보지 못한 상태이다. 그동안 갖가지 방법을 동원하여 이 해충의 확산을 저지하기 위해 애써 왔지만, 지금은 일부 지역을 제외한 전 국토의 소나무들이 이 해충에 시달리고 있으며, 최근에는 남한과 인접한 북한지역등 한반도 전역으로까지 확산되고 있다. 지난 70년대초까지도 삼림지역에 화학농약으로 대량 항공방제를 했으나, 유용곤충의 피해가 더욱 커서 이를 중지하기도 했다. 현재는 주로 천적곤충인 먹좀벌 살포와 수간주사법을 이용하고 있는데, 수간주사의 경우 1ha 당 120명의 인력이 필요한데다 솔잎혹파리의 방제시기가 6월 한달간으로 짧아 많은 어려움이 있으며, 천적인 먹좀벌의 대량방출도 인공사육기술의 한계 및 방제시기의 제약, 낮은 기생율등의 문제로 말미암아 효과적인 방제에 한계가 있다.

1997년 현재 발생면적은 전국적으로 약 28만ha이며, 강원도(67,129ha)에

이어 경북(39,000ha), 충북(15,000ha) 지역등이 피해가 특히 심한 것으로 보고되고 있으며, 강원도의 경우 약 157억원등 전국적으로 연간 380억원 이상의 솔잎혹파리 방제예산을 사용하고 있다. 주요 피해사례로는 제주도를 포함한 전국의 산림 대부분이며, 천연기념물인 정이품송의 경우가 일반에게 잘 알려져 있다. 따라서, 솔잎혹파리 피해 및 화학살충제 사용으로 인한 전국토 산림자원 및 환경 생태계의 심각한 파괴를 막기 위해서는 솔잎혹파리의 생태적 특성으로 인하여 곤충병원미생물 이용을 중심으로 한 종합적 방제 체계(Integrated Pest Management System)를 활용하는 대책마련이 시급히 요청된다. 특히, 우리나라 산림에서 토종 소나무가 차지하고 있는 압도적 구성비율을 고려해 볼 때, 단순한 임목자원으로서의 경제적 가치 뿐만 아니라, 생물다양성 보전, 이산화탄소 고정, 수자원 보호 및 휴양림등의 유형, 무형의 엄청난 중요성을 지니고 있는 실정이다. 따라서, 현재 솔잎혹파리 방제를 위해 투입되고 있는 막대한 예산뿐만 아니라, 산림에 화학 살충제를 산포함으로써 발생되는 심각한 환경오염 및 인축에의 독성 문제를 최소화 해야 하는 과제도 당장 현안으로 대두되고 있으며, 이런 관점에서 선진국에서 이미 성공적으로 시도되고 있는 미생물적 방제 기술의 중요성이 절실히 요구된다. 즉, 환경친화적이고, 항공기등을 이용한 대면적 방제가 가능하며, 경제적이고 효율적인 솔잎혹파리 방제기술로써 곤충병원미생물을 이용한 방제기술을 주력 수단으로 한 방제체계를 마련해야 할 것이다(韓 등, 1995). 더구나 세계적으로도 솔잎혹파리 방제를 위해 개발된 미생물살충제는 전혀 없기 때문에 해외로부터의 기술도입도 불가능하다. 우리나라에서도 일부 연구자들에 의한 기초연구 및 방제노력이 시도된바 있지만, 지속적이고, 체계적인 연구지원, 노력의 부족으로 성공적인 결과를 얻지는 못했었다 (姜 등, 1982 ; 趙 등, 1975, 1977, 1978 ; 高, 1975 ; 趙등, 1995). 이러한 관점에서 본 연구에서는 솔잎혹파리 피해지역을 중심으로한 우리나라 전국의 산림 및 토양으로부터 유효곤충병원 미생물을 탐색, 분리하고, 경제적인 대량배양시스템을 개발하여 효율적이고, 안정적인 상업적 제제화 기술을 개발하였다.

제 2 장 재료 및 방법

1. 실험곤충의 확보 및 생물검정 시스템 구축

1) 실험곤충 (솔잎혹파리) 의 확보

솔잎혹파리 방제에 효과적인 곤충 병원미생물을 탐색하기 위해서는 실험곤충의 안정적 확보 문제가 선결되어야 한다 따라서 본 연구팀은 솔잎혹파리의 피해가 극심한 지역으로써 충령형성율이 약 60%로 매우 높은 충남 태안군 소원면 파도리 일원의 적송림 지역을 솔잎혹파리 충령 확보 지역으로 선정하였다.

2) 충령으로부터 실험곤충의 회수를 위한 야외포장 설치

배수가 잘되는 야외지역을 선정하여 방수합판으로 틀 (5×20×0.6m)을 제작 설치한뒤 오염되지 않은 깨끗한 모래를 4cm두께로 고르게 깔고 그 위에 적송톱밥을 5cm두께로 깔았다. 그리고 충령으로부터 나오는 실험곤충 (솔잎혹파리 유충)을 야생조류및 태양광으로부터 보호하기 위하여 방조철망과 검은색 이중 그늘망으로 덮었다.

3) 실내 대형저장고 설치

충령으로부터 빠져나온 솔잎혹파리 유충을 계속적으로 필요시기에 실험곤충으로 활용하기 위하여 실험실 내에 대형 저온 저장고 (3.3×2.4×2.4m)를 주문 제작하여 설치하였다. 필요시기까지 실험곤충을 안전하게 유지관리하기 위하여 플라스틱 상자 (60×40×10cm)를 주문제작하여 야외 포장에서 얻어진 솔잎혹파리가 든 톱밥층을 이 상자에 담아 실내 저온 저장고(연중 4℃유지)에 옮겨졌다.

2. 곤충 병원 미생물의 탐색

1) 솔잎혹파리 피해 지역의 토양시료 채취

솔잎혹파리의 피해극심지역과 피해최성기를 넘긴 지역의 적송림의 부엽토, 표토층과 2~5cm 사이의 토양을 약 10~20g 정도씩 채취하였다. 채취된 시료들은 채취 지역의 장소, 일시, 채취지역의 주변환경의 특성, 토양의 특성 등의 정보를 기록하였다. 이들 시료들은 솔잎혹파리 방제에 이용가능한 유효곤충병원미생물의 분리를 위한 시료로 활용하였다. 토양시료 채취지역은 그림 1 에 나타낸 것과 같다.

그림 1. 솔잎혹파리에 대한 유효곤충병원미생물 탐색을 위한 토양시료 채취 장소

2) 곰팡이 균주 확보

토양시료로부터 곰팡이 균주를 분리하기 위하여 채취된 토양시료 (0.1g)를 멸균수 (5ml)에 현탁시켰다. 현탁액중 0.1ml을 취하여 DTM배지 (표 1)에 도말하였다. 이를 30℃에서 5일간 배양시킨뒤, 선별 분리하여 새 DTM 배지에 접종하여 동일조건에서 배양하였다. 이들 순수분리된 균주들을 저온실(4℃)에 보관하거나 병원력검정에 이용하였다.

표 1. Dermatophyte 검정배지 (DTM)

Ingredient	Quantity (%)
Glucose	2
Soytone	1
Penol Red	0.02
Cycloheximide	0.05
Chloramphenicol	0.01
Gentamycin	0.01
Agar	1.5
Acetone(w/w)	2

3) 병원력 검정

확보된 각각의 균주들의 솔잎혹파리에 대한 병원력을 검정하기 위하여 5g의 고체배지 (표 2)가 들어 있는 시험관 (20x 2 cm)에 접종한 후 28℃에서 6일간 배양하였다. 증류수로 적신 filter paper를 깐 petridish (87mm)에 솔잎혹파리 유충 20마리씩을 넣은 뒤, 수분유지를 위해 증류수에 적신 탈지면을 넣어주었다. 병원력 검정을 위하여 균주 현탁액 (500㎕)을 솔잎 혹파리 유충이 있는 petridish에 분무하여 26℃에서 배양하였다.

표 2. 고체배양 배지

Ingredient	Quantity
Wheat Bran	500 g
Potato Dextrose Broth	3 g
Brain Heart Infusion	5 g
$MgSO_4.7H_2O$	1 g
DW	500 ml

3. 병원 미생물의 제제화

1) 시약 및 실험재료

Soytone (Difco), Potato dextrose agar (Difco), Czapek-Dox broth (Difco), Yeast extract (Difco), Fermtech-agar (Merck), Bacto-agar (Difco), 4 Gelrite (Kelko Co., Inc., Rahway, NJ, USA), Kaolin (Shimakyu, 제일산업), Potato starch (Sigma, 중앙식품), Na-lignosulfonate (Sigma), Ca-lignosulfonate (중국산), 제오라이트 (한두교역), 및 각종 salt류 (Sigma, 동양화학, 덕산화학) 등을 사용하였다.

캡슐화 재료로는 soybean, rice, barley, wheat, mungbean, rye 등을 국내산으로 구입하여 분말화 하여 사용하였으며, soil은 논, 밭, 정원, 임야 등에서 흙을 채취하여 건조시켜 100mesh 및 200mesh의 체로 걸러서 사용하였다.

호화에 필요한 물은 1차 증류수를 사용하였다.

2) 사용균주 및 종균배양

우리나라 산림토양으로부터 탐색, 확보된 곤충 병원성 균주인 *Beauveria bassiana* HY-1 KCTC 0155BP를 솔잎혹파리에 대한 방제 효과 검정을 위한 제제화 연구에 이용하였다. 최소배지에서 배양된 액체배양물과 평판배양을 통해 회수된 포자분말을 비교하였다. 그 결과 배양속도, 운영중 오염균 발생여부, 본배양 만료후 포자 숙성도를 기준으로 볼 때 액체배지에서의 종균 생산이 유리하였다. 이때 사용된 배지는 Yeast extract가 첨가된 Czapek broth와 Potato-dextrose broth였다. Agar-plate를 이용한 평판 배양은 종균 자체의 포자의 숙성도와 포자농도가 높게 유지되었으나 종균 제조까지 1달의 배양기간이 소요되었고, 대량 생산을 유지할 만큼의 생산성을 유지하지 못했다. 한편, 밀기울을 이용한 고체 배양물 의 계대 배양은 오염 및 병원성 상실을 유발할 수 있어서 제외시켰다. 종균은 배양 직후 사용하거나 냉장조건에서 1주일 이내 보관하면서 사용하였다. 냉동 보관된 종균은 고체배양 속도 저하를 가져왔다.

3) 포자배양 및 회수

Czapek-Dox agar (표 3)에서 종균용 균주를 배양하여 0.1 - 0.05g의 포자 및 균사체를 각각 같은 조성의 14cm 직경의 평판배지에 건조상태로 spreading 하였다. 암실상태의 26℃ 항온실과 포자화 촉진을 위해 밝은 상태의 실온조건으로 15일간 배양하였다. 해부현미경 하에서 기균사 끝에 포자 성숙이 관찰되고 외견상 균체색상이 짙어진 후 포자를 scraper로 긁어서 회수하였다. 회수된 포자는 건조한 상태로 캡슐화 되기까지 2일 이내 실온 보관하였다.

표 3. 곰팡이 포자생산을 위한 배지 조성

Ingredient	Quantity (g)
Czapek-Dox broth	
Bacto saccharose	30
Sodium nitrate	3
Diphotassium phosphate	1
Magnesium sulfate	0.5
Potassium chloride	0.5
Ferrous sulfate	0.01
DW	1,000
Yeast extract	5
Agar*	20

* Gelrite 5g으로 대처할 수 있음.

4) 액체배양

Yeast Extract 0.5%가 포함된 Czapek Box broth (Facto-Saccharate 30g, Sodium Nitrate 3g, Dipotassium Phosphate 1g, Magnesium Sulfate 0.5g, Potassium chloride 0.5g, Ferrous Sulfate 0.01g, per liter)에서 진탕 배양하였다. 최소 배지에 가까운 조성으로 균사 생산 수율은 낮았지만 배양 시간이 단축되고 본 배양 고체배지에 접종 후 성장 속도가 현저히 향상되었다. 1ℓ (Bellco flask, 4 baffled) 또는 5ℓ(one baffled) 용량의 배양용기에 20%의 배양액을 채워 150rpm, 27℃ 조건에서 blastospore가 형성되기 시작할 때까지 2-3일간 배양하여 종균을 준비하였다. 배양액의 색을 육안으로 관찰하고 현미경 하에서 counting chamber로 확인하여 배양 시간을 결정하였다.

5) 발효 수율의 조사

살충력을 보이는 유효성분인 포자 및 균체의 생균수를 측정하였다. Rose-bengal 및 항생제 nalidixic acid 50ppm이 첨가된 Czapek agar에서 시료

를 도말하여 발생하는 *B. bassiana* HY-1의 균총을 조사하였다. 또한 hemacytometer(100㎛ depth)에서 포자수를 확인하여 회수율 및 spore titer를 조사하였다. 고체발효 인자의 분석 : Plackett-Burman design을 이용한 통계학적인 방법을 사용하였다. (Monaghan R.L. et al, in Novel microbial products for medicine and agriculture, 1989).

6) 삼각플라스크를 이용한 *Beauveria bassiana* HY-1의 고체배양

① 고체배지: 밀기울로 제조된 고체배지 (2mm x 2mm, pellet type, 수분함량 12%) 80g을 500ml 분량의 삼각플라스크에 담았다. 이 고체배지에 증류수 30ml, 40ml, 50ml을 섞어서 최종 수분함량 36.0%, 41.3%, 45.8%(w/w)으로 조정하고, 알루미늄 foil 또는 cotton plug을 마개로 하여 121°C에서 15분간 살균하였다.

② 종균배양: 0.5%의 yeast extract와 3%의 malt extract가 첨가된 Czapek-Box broth 200ml에 냉동보관된 종균액 1ml을 접종하여 포자농도 1.5 x 10^6cfu/ml이 될 때까지 2~3일간 27°C, 150rpm에서 진탕 배양하였다.

③ 고체배양: 준비된 고체배지에 종균 배양액 3.2ml을 접종하여 27°C에서 정치 배양하였다.

7) 대량 고체배양

① 고체 pellet 500gram에 250ml의 증류수를 첨가하고 (wet wt. 770g) 종균 20ml을 접종하였다. 배양조건은 27°C, 40W x 2 x 1.5m의 광량, 상대습도 20~90%로 유지되었다.

② 배양용기 : 통기성 증진을 위한 filter membrane (7 x 7 cm^2, 유효면적 직경 3.5cm)이 2장 부착된 Polypropylene bag (50 x 22 x 10 cm^3)을 밀봉/살균하여 사용하였다

③ 고체배양배지 : Pellet 형태로 성형된 밀기울을 고체배지로 사용 (초기

수분함량 10-15%, w/w)하였다. 고체배양 배지의 최종 수분함량을 37-40%가 되도록 증류수를 첨가하고, 배양용기를 밀봉한 후 120℃에서 30분간 1회 살균하여 준비하였다. 살균 직후 수분함량은 1.2%정도 감소하였다. 모든 과정에서 dead space를 줄이기 위해 충분한 혼합과 교반과정을 병행하였다.

8) 제제화

① 캡슐화 제형

캡슐화 재료 (표 4) 를 잘 섞어, 정해진 양의 증류수에 완전히 현탁시켜 121℃에서 15 - 30분간 살균 및 호화 시킨 후, 식기 전에 다시 완전히 섞어 찬물에서 냉각시켰다. 교반기에서 (Flat blade, d=5cm, 200 rpm 이상) 10분 이상 완전히 섞어준 후, 교반이 계속되는 상태에서 첨가제와 건조포자를 넣고 완전히 섞어 점성변화가 관찰될 때까지 계속했다. 실온조건에서 PE film에 얇게 펴서 하룻밤동안 건조시켜 수분함량 15% 이내가 되면 회수하였다. 100g 이내의 소량 작업 시에는 7% 수분함량을 기준으로 회수하였다.

표 4. 캡슐화 담체 기본 조성

Biomatrix composition	Quantuty
Hyb matrix	(2 kg)
콩가루	667 g
녹 두	333 g
쌀가루	250 g
보리가루	250 g
감자전분	250 g
호밀가루	250 g
Soil (황토흙)	200 g
DW	6 liter
호화 (121℃, 20min)	

캡슐화가 끝나고 회수된 건조물을 Food mixer (한일, 2-blades type)에서 5 - 10초 간 반복적으로 분쇄하였다. 분말화가 진행되어 덩어리가 보이지 않을 때까지 계속하였다. 대량 작업의 경우 Pin crusher (Daega pulverizing mach. Co., Korea) 로 분말화 하였다. 혼합 분말은 Sieve separator에서 250㎛ (60 mesh) 이하의 분말을 회수하였다.

② 경제적 제형

제 1차년도에는 호화된 전분 (gelatinized starch)을 담체(carrier)로 하여 솔잎혹파리 병원성 미생물 *B. bassiana*을 고정화 시켰다. 외부 환경으로부터의 여러 가지 유해인자들 즉, 자외선, 건조조건 및 유실의 문제를 개선하여 약제의 안정성과 지속성을 높이고자 하였다. 2차년도에는 여기에 경제성을 감안하여 보다 싼 재료 및 간단한 방법론을 도입하였다. 즉, 포자를 안전하게 잡아두는(trapping) 데에 주안점을 두어 clay 및 계면활성제의 혼합물을 담체로 하였다. 또한 3차년도에는 이 혼합담체를 다루기 편한 모양으로 제형화하여 조립식 최종 제형을 완성하기 위한 연구를 수행하였다.

제제화에 사용된 원제는 액체 배양된 발효액을 사용하거나, Pellet type의 밀기울 고체배지에 배양하여 건조시킨 포자 혼합물을 사용하였다.

실험실에서 적용된 제제방법은 두 가지였다. 첫째는 건식처리로 조제와 혼합하여 포자를 안정화시켜 분제, 수화제 및 pellet형의 입제로 만들었다. Mortar, Food mixer 및 Pin-crusher를 사용하여 원제인 포자 고체배양물을 분쇄하고 보조재료와 혼합하였다. 둘째는 호화전분법으로 건식처리에 비해 공정이 어렵지만 포자의 보호효과 및 지속효과가 좋을 것으로 기대하고 시험제제 수준으로 제작하였다. 포자를 호화전분에 고정화 시켜 건조, 분쇄하여 분제 및 수화제 구성하였으며 Food mixer 및 sieve separator 공정에 사용하여 고정화된 호화전분을 처리하여 250㎛ 및 595㎛ 직경의 입자로 조정하였다(60, 30 mesh)

포자 안정화를 위해 사용한 보조재료의 종류는 기본조제로 Lignin, Lignosulfonate 및 Diatomaceus earth, 계면활성제로는 Polyoxyethylene nonylphenyl ether(HLB=13.3), Triton X-100(HLB=13.5), Tween 80(HLB=15.0), Brij56(HLB=12.9)를 사용하였다. 재료의 분쇄 및 혼합 방법은 Mortar, Dry mixer 및 Pin-crusher를 사용하는 공정이 100g 내외의 소규모에서 100kg 수준의 대규모까지 시험되었다. 포자의 함량의 조사는 Counting chamber에 의해 spore를 세는 방법과 nalidixic acid를 이용한 곰팡이 선별배지에서의 Viable count를 병행하였다.

제 3 장. 결과 및 고찰

1. 실험곤충의 확보 및 생물검정 시스템 구축

1) 실험곤충 (솔잎혹파리) 의 확보

솔잎혹파리는 산란된 직후 솔잎의 기부로 내려가 혹을 형성한 뒤 월동을 위해 땅으로 내려오기까지 줄 곧 혹 속에서 생활하면서 소나무의 즙액을 빨아 먹음으로써 소나무의 성장에 치명적인 영향을 주는 특성을 지니고 있다. 이러한 생활 습성때문에 실험곤충으로 이용하기 위한 솔잎혹파리의 확보는 솔잎혹파리에 의해 형성된 충영 (그림 2)을 채취한 뒤 이들 속에 들어있는 유충을 이용하여야 한다.

따라서 본 연구팀은 솔잎혹파리의 피해가 극심한 지역으로써 충영형성율이 약 60%로 매우 높은 충남 태안군 소원면 파도리 일원의 적송림 지역을 솔잎혹파리 충영 확보 지역으로 선정하였다. 이 지역으로부터 충영이 형성된 솔잎을 약 1,000 kg 정도 확보하였다. 충영이 형성된 솔잎 1,000 Kg 당 약 12 x 10^6개 정도의 충영을 얻을 수 있으며 15 x 10^6 마리 정도의 건강한 유충을 얻을 수 있을 것으로 추정되었다.

2) 생물검정 시스템 구축

확보된 충령으로부터 실험곤충인 솔잎혹파리 유충만을 회수하기 위한 솔잎혹파리 회수용 야외포장을 제작설치하였다. 야외포장에 채집해 온 충령 (1,000 kg)을 고르게 깔아두고 야생조류로부터 보호하기 위하여 방조철망을 씌우고 직사광선을 차단하기 위하여 검은색 이중 그늘망으로 덮었다. 이렇게 한 뒤 야외에 약 2개월 정도 방치시킴으로써 솔잎혹파리 유충이 충령으로부터 빠져나오도록 유도하였다 (그림 3).

혹으로부터 빠져나온 유충이 들어있는 적송톱밥층을 플라스틱 상자에 담

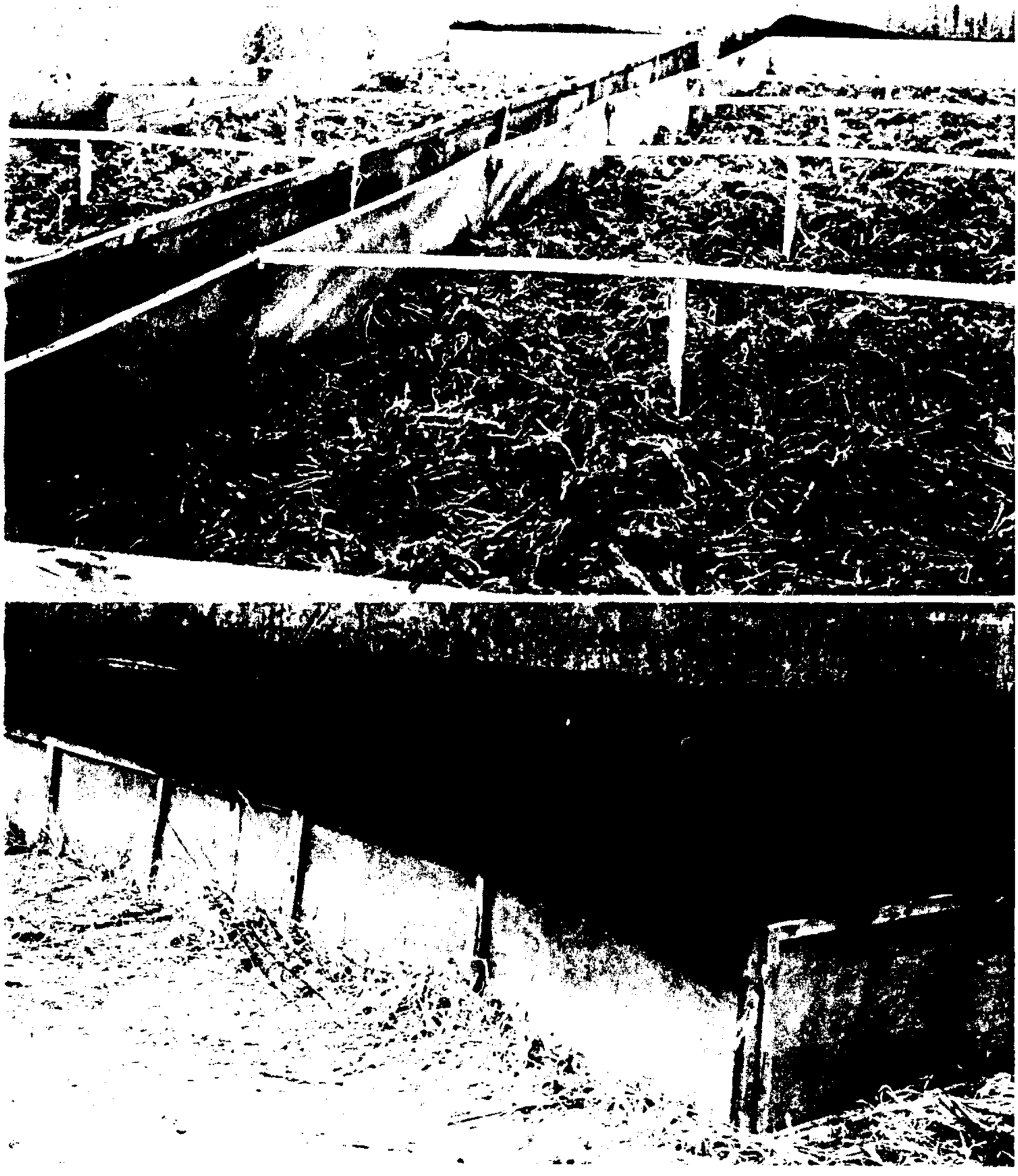
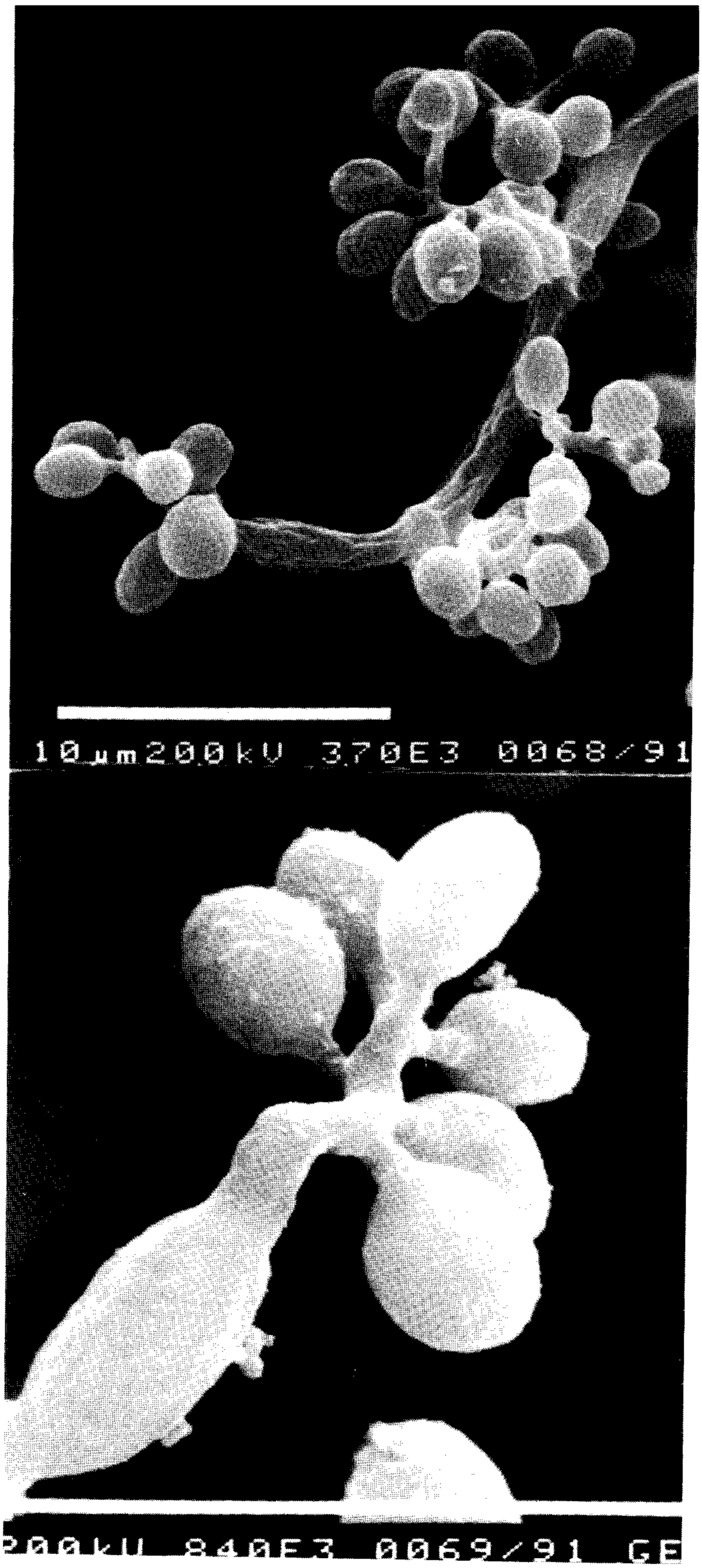


그림 3. 솔잎혹파리에 감염된 솔가지로부터 곤충확보를 위한 야외포장


10µm20.0kV 3.70E3 0068/91
20.0kV 8.40E3 0069/91 GE

아 이들 상자채로 실내 저온저장고에 옮겨 보관하면서 계속적으로 곤충 병원미생물의 탐색 및 병원력 검정 등에 필요불가결한 실험곤충으로 이용할 수 있도록 하였다.

2. 솔잎혹파리 방제용 유효 병원미생물 탐색

솔잎혹파리에 유효한 병원미생물을 분리하기 위한 방법으로 야외에서 병원미생물에 의해 감염되어 죽은 곤충들을 채집하여 유효병원미생물을 분리하는 방법과 솔잎혹파리 서식 토양 시료로부터 분리하는 방법을 병행하였다. 유효곤충병원미생물을 분리하기 위한 토양시료는 솔잎혹파리에 의한 피해가 극심한 지역과 피해 최성기를 넘긴 지역 등에서 채취하였다. 전국의 50 지역으로부터 141가지 토양시료를 수집하였으며, DTM 배지를 이용하여 957 가지의 곰팡이 균주를 분리하였으며, 이들중 콜로니의 성장특성 및 외형적인 특성을 중심으로하여 258 가지로 구분하였다 (표 5). 이들 각각을 병원력 검정용 고체배지 (표 2)에서 배양하여 솔잎혹파리를 넣은 petridish에 처리한 뒤 27℃ 에서 한달동안 유지시키면서 치사효과를 조사하였다. 각각의 petridish는 마르지 않게 수시로 증류수를 분무하여 주었으며, 균주를 처리하지 않은 것들에서는 대부분의 솔잎혹파리 유충들이 생존해 있었다. 20% 이상의 치사효과를 보이는 96가지 균주들을 선택하여 반복실험하여 최종적으로 14가지 후보균주를 선발하였다(표 5). 이들은 *Beauveria* 속, *Metarhizium* 속, *Paecilomyces* 속, *Penicillium* 속, 및 *Verticillium* 속으로 분류되었다 (그림 4, 5).

표 5. 솔잎혹파리에 유효한 곤충병원성 곰팡이의 분리 예

Region	Sampling area	No. of soil samples	No. of Isolates	No. of different Isolates	No. of Candidates after 1st screening	No. of Candidates after 2nd screening	No. of Candidates after 3rd screening
Taejon	National Cemetery	14	40	40	9	1	0
Chungnam	Cheongyang	6	32	26	5	0	0
	Hongsung	3	21	15	6	0	0
	Taean	12	55	32	16	3	2
	Seosan	2	32	4	4	0	0
Chungbuk	Chungju	3	38	9	4	2	2
	Jecheon	5	30	3	1	0	0
Kangwon	Wonju	9	43	27	12	0	0
	Hoengsung	5	37	16	5	0	0
	Hongcheon	2	25	6	2	0	0
	Samcheok	5	47	5	4	1	1
	Donghae	6	39	7	1	1	0
	Jeongsun	2	32	2	1	0	0
	Pyeongchang	2	39	2	0	0	0
	Myeongju	3	40	4	2	0	0
Jeonnam	Haenam	9	28	2	1	0	0
	Jangheung	5	21	2	0	0	0
Jeonbuk	Buan	4	28	4	2	1	0
	Byeonsan	8	36	13	5	0	0
	Gochang	3	25	3	2	-	-

- : not yet

(continued)

표 5. (continued)

Region	Sampling area	No. of soil samples	No. of Isolates	No. of different Isolates	No. of Candidates after 1st screening	No. of Candidates after 2nd screening	No. of Candidates after 3rd screening
Kyeongbuk	Kunwi	3	28	2	1	-	-
	Sangju	5	30	9	5	-	-
	Jeomchon	2	24	2	1	-	-
	Yechun	3	35	4	2	-	-
	Yeongju	2	26	2	0	-	-
	Bongwha	4	31	2	0	-	-
	Uljin	10	28	10	4	-	-
	Pyeonghae	2	32	1	1	-	-
	Yeongduck	2	35	4	0	-	-
Total	29	141	957	258	96	9	3

- : not yet

3. 솔잎혹파리 방제용 병원 미생물의 대량생산

1) 포자의 생산

포자 숙성도가 낮고, *Bacillus*류의 오염균이 관찰되는 고체배양물을 대체하기 위해, 평판배양(d=8cm)을 통해 균체 및 포자를 회수하였다 (표 6). CY agar plate당 약 0.5g의 균체가 생산되었고, 균체 g당 9.1 x10^{10}개의 포자가 관찰되었다.

표 6. CY agar 배지에서의 포자생산

Yield	Quantity
Recovery	c.a. 0.5g-spore mix / plates,
No. of Spores by counting chamber	9.1 x 10^{10}spores / g-spore mix

2) 삼각플라스크를 이용한 *Beauveria bassiana* HY-1의 고체배양 결과 41.3%의 수분함량을 가진 배지에서 배양시간 6일에 2.09 x 10^9cfu/g, 20일에 1.34 x 10^9cfu/g의 농도로 균체가 성장하였다 (그림 5). 배양은 접종후 2주에 거의 정지하고 포자의 숙성이 이루어졌으며 전체 고체 배양물의 무게가 배양의 지속에 따라 일정하게 감소하여 균체 성장에 따른 영양원의 분해 및 수분의 증발을 알 수 있었다.

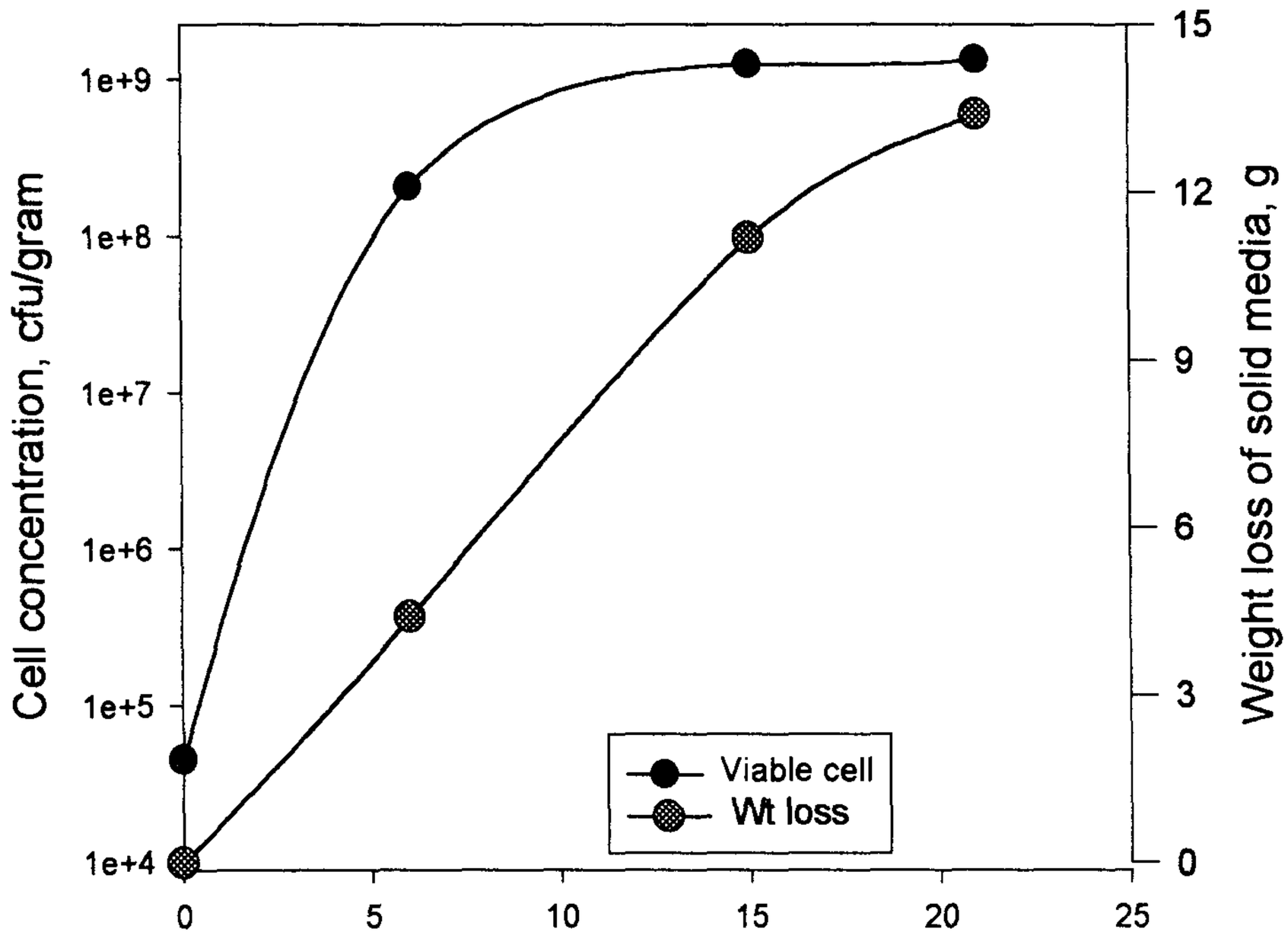


그림 6. 삼각플라스크를 이용한 *Beauveria bassiana* HY-1의 고체배양.

삼각플라스크를 이용한 *Beauveria bassiana* HY-1의 고체배양 :

80g의 배지를 500ml 플라스크에 넣어 cotton plug하여 26°C에서 배양하였다. 종균은 PD-broth에서 3일간 전배양된 액체 배양물을 플라스크당 3ml 씩 사용하였다.

삼각플라스크를 이용한 실험에서 고체배지의 수분함량과 균체 생산량의 관계 :

두 번의 실험에서 수분함량 41.3, 45.8%의 배지는 유사한 결과를 보이지만 36.0% 배지에서는 성장이 둔화되었다 (그림 7). 배양초기의 수분함량이 낮은 경우 배양이 지속되면서 배양층 표면의 건조 현상이 두드러져서 정상적인 균사의 확산이 이루어지기 어려운데서 전체적인 성장 둔화가 생기는 것으로 보인다.

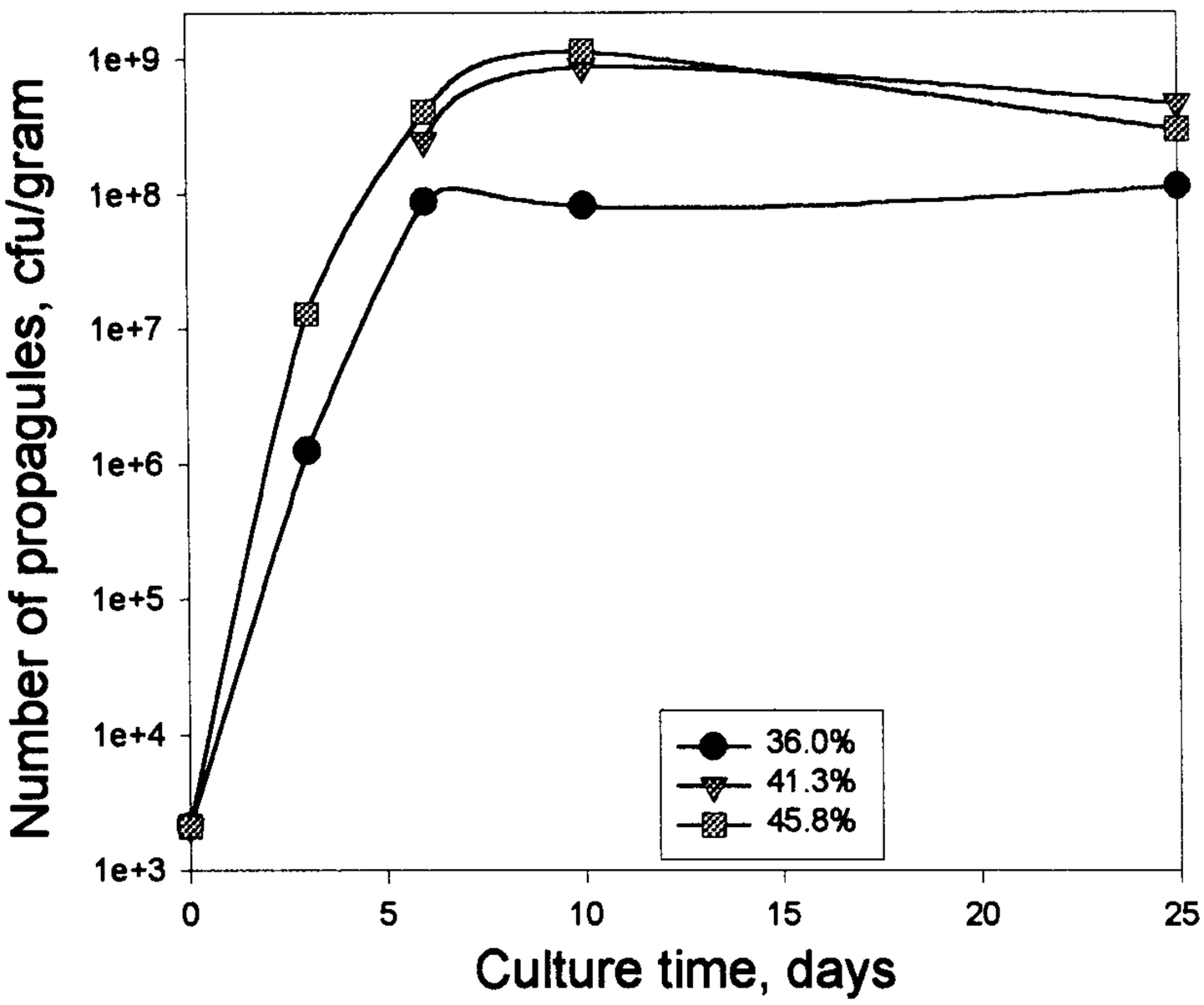


그림 7. 삼각플라스크를 이용한 *B. bassiana* HY-1의 고체배양에서 수분의 영향.

3) 통계적 최적화

대량 생산을 위한 전단계로 대량배양에 사용할 배양용기와 조건에서의 발효인자의 영향을 분석하였다. 사용된 변수는 사용된 고체배지의 양, 수분함량, 포자화에 대한 광촉진효과, 종균의 보관 상태, 첨가제로서 포도당의 영향을

Placket-Burmnan design에 의해서 분석하였다. 이때 측정한 수치는 균총을 형성하는 생균수와 배지의 소모량이었다. 표 7에서 보듯이 기존의 삼각 플라스크에서의 배양조건이 polypropylene bag에서도 잘 적용됨을 알 수 있었고 수분함량도 50% 보다는 37%가 약간의 유효성을 더 보여주고 있어서 기존의 플라스크에서와 마찬가지로 40% 부근을 계속 사용하기로 하였다.

표 7. *B. bassiana* HY-1의 고체배양에 대한 각 인자의 영향 분석

Culture condition			Response, t-value*	
Factors	Higher	Lower	Viable counts, cfu/gram	Consumption of Media
Amount of media (grams per bag)	500	250	0.75	-1.31
Water contents (%)	50	37	0.84	-2.63 (>70%)
Light	ON	OFF	-1.10	-1.03
Seed inoculum	Unfrozen	Frozen	-1.19	-1.25
Glucose (%)	1.0	0	-1.93	1.34

* Response was detected after 21 days of culture in solid-state media.

4) *Beauveria bassiana* HY-1의 대량배양 최적화

① 종균 접종량 결정 : 1%, 2%, 4% (v/w)의 농도를 사용하여 비교 실험 후 lag time을 최소화하고 종균 소비량을 최적화 한 2%를 대량 생산에 적용하였다.

② 배양용기 : Polypropylene bag 배양용기 하나에 채워진 고체배지의 양은 건조중량 1kg, 0.5kg, 0.2kg에 대해서 수분함량 25 - 50% (w/w)의 조건으로 조사하였다. 통상 오염 및 배지 건조를 방지하기 위해서 배양기는 세워서 filter가 배지에 직접 닿지 않는 상태를 유지하였다. 2차이상의 반복 멸균에 의한 용기의 재료피로를 줄이기 위해 살균을 위한 autoclave 는 1회로 한정하였다.

③ Polypropylene bag 배양용기에서의 고체배양 (그림 8). : 배양 1주일에 균사 성장이 모든 배지에 확산되었고, 이후 포자화의 진행에 따라 10일 이후에는 포자농도가 $2x10^8$cfu/g에 이르렀다

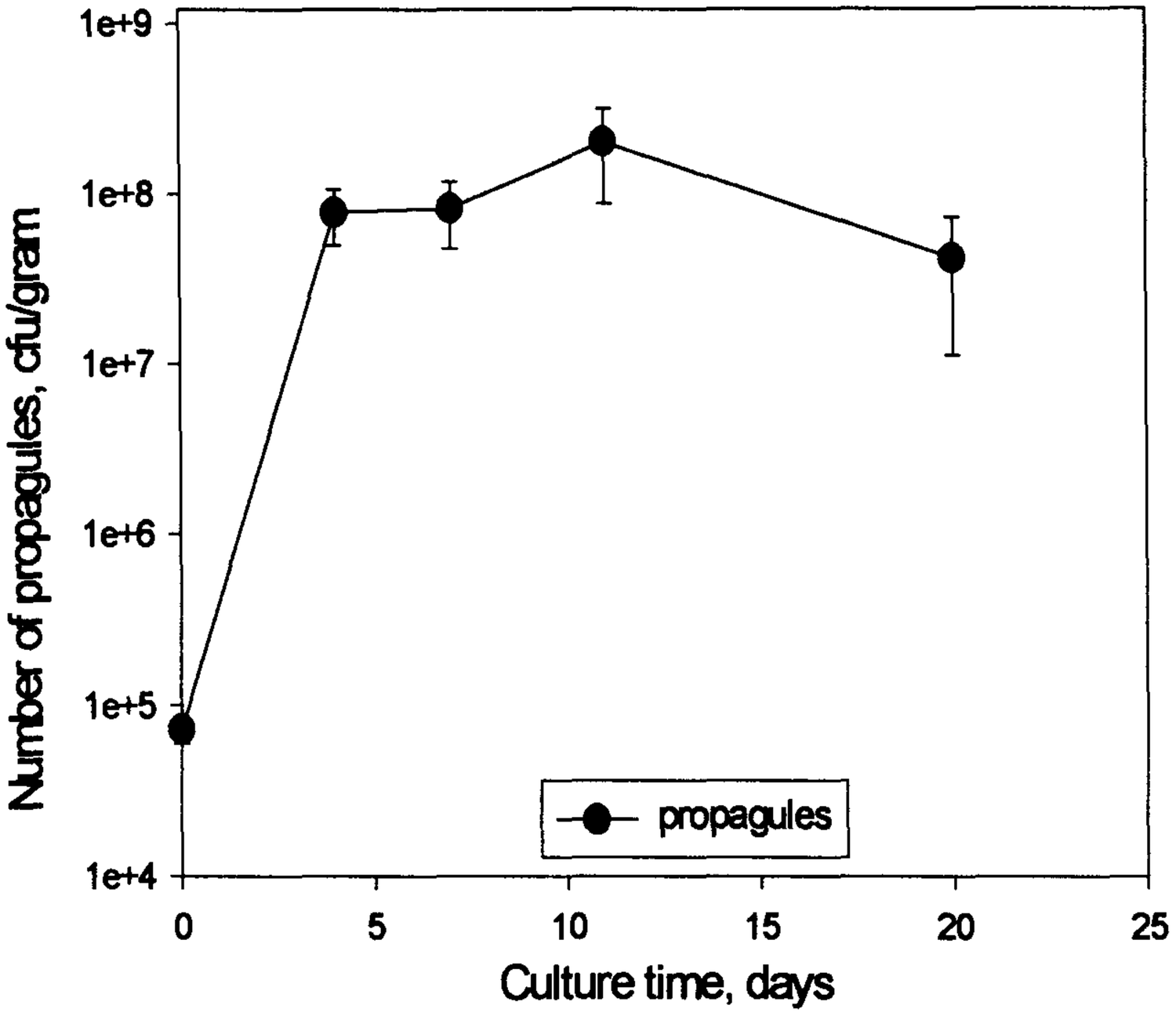


그림 8 Polypropylene bag 배양용기에서의 고체배양

5) *Beauveria bassiana* HY-1의 대량생산

배양 온도는 26℃였고 배양실의 상대 습도는 20-60% 였다. 포자 숙성에 필요한 빛은 40W 형광등을 천장과 벽면에 설치하여 평균 조사거리 1.5m의 조건으로 24시간 공급하였다. 배양용기는 높이 40cm의 선반에 세워서 3일간의 발아, 1주일간의 성장, 1주일간의 숙성기간을 거쳐 고체배지상에서 포자를 생산하였다. 주 배양실은 전실을 포함한 2중의 문으로 격리하였다. 최적화가 완료된 고체배양실은 1일 처리량 기준으로 500g x 120bags = 60kg의 생산 수

율을 보이며, 월 20일 가동 기준으로 월간 1.2톤의 고체배지 처리능력을 보였다. (표8, 그림 7) 대량생산을 위한 공정을 단순화하여 제제 1g당 포자수 10^9 개 이상의 제제를 생산하였다.

표 8. 솔잎혹파리 방제용 미생물 HY-1의 대량고체배양

항목	기준	최적화 결과
종균 접종량	Lag time과 종균 소비량	2% (v/v)
배양용기	통기성 증진	Polypropylene bag with vent
고체배양배지	고체배지의 양	0.5kg
	수분함량	37~40% (w/w)
	살균	120℃ x 30분
대량배양실 운용	배양온도/습도	25℃/상대 습도 20-60%
	포자화촉진	40W x 1.5m
	생산량	1.2톤/20일

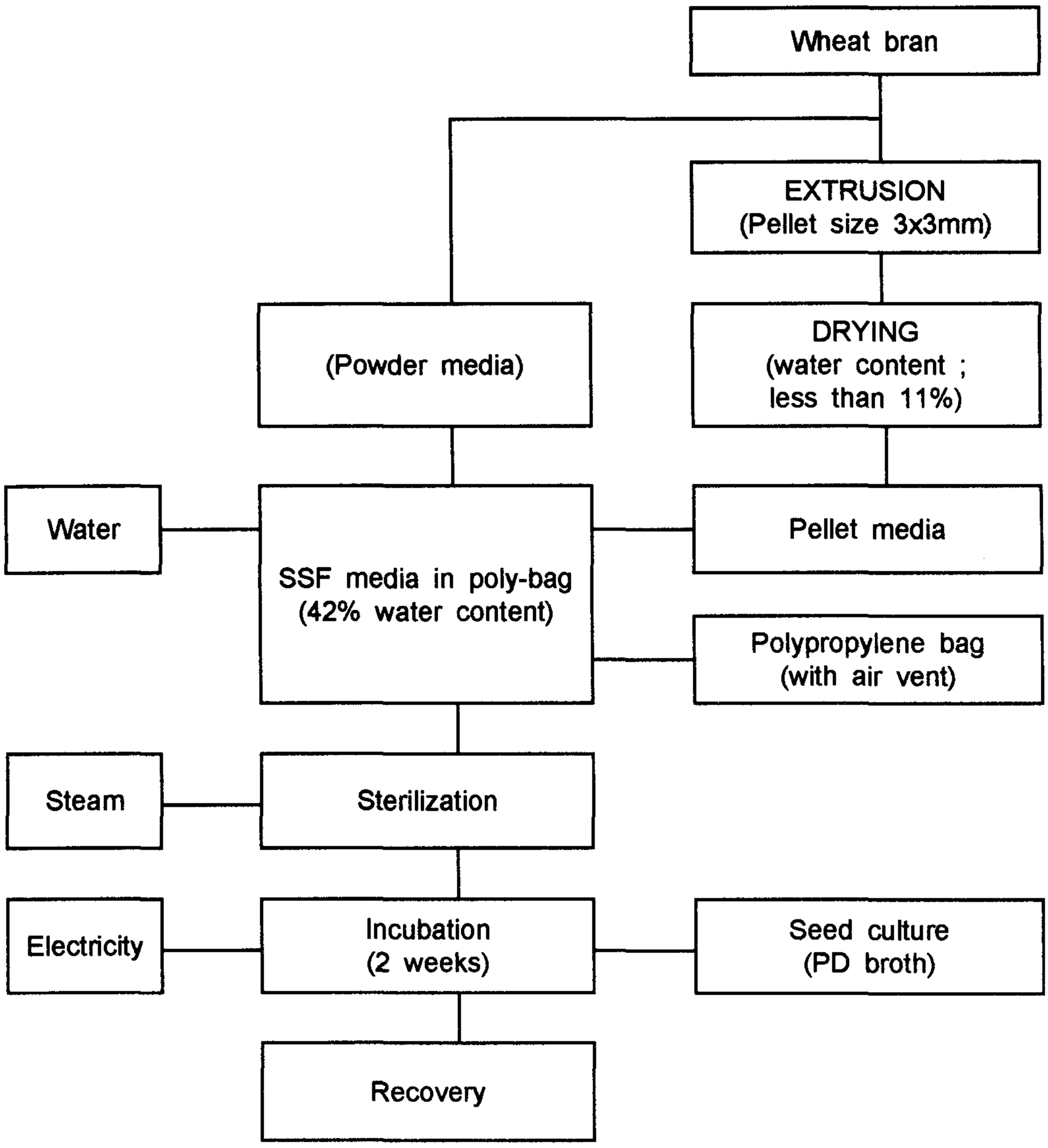


그림 9. *B. bassiana* HY-1의 고체배양에 의한 대량생산

4. 제제화

제 1차년도에는 호화된 전분 (gelatinized starch)을 담체(carrier)로 하여 솔잎혹파리 병원성 미생물 *B. bassiana*을 고정화 시켰다. 외부 환경으로부터의 여러 가지 유해인자들 즉, 자외선, 건조조건 및 유실의 문제를 개선하여 약제의 안정성과 지속성을 높이고자 하였다. 2차년도에는 여기에 경제성을 감안하여 보다 싼 재료 및 간단한 방법론을 도입하였다. 즉, 포자를 안전하게 잡아두는(trapping) 데에 주안점을 두어 clay 및 계면활성제의 혼합물을 담체로 하였다. 또한 이 혼합담체를 다루기 편한 모양으로 제형화하여 조립식 최종 제형을 완성하여 3차년도 실험을 진행하였다.

1) 천연담체를 이용한 캡슐화 제형

생분해성 천연 담체 재료를 선발하기 위해, 구입 용이성, 질소원/탄소원의 영양균형, 포자를 안전하게 피막화 할 수 있는 보호효과 및 물성을 고려하여 제제화 효율을 비교 실험하였다. 단일 재료를 사용하여 각각의 캡슐화 포자량을 조사하고 (표 9), 이들 각각의 병원력을 검정하였다. 각각의 담체 재료를 건조중량 기준 50g 을 제조하여, 0.5g씩의 포자 혼합물을 캡슐화 하였다. 캡슐화 후 증류수로 적절히 희석하여 PDA에서 colony forming unit을 각 제제별로 조사하고 회수율을 조사한 결과 감자전분, 쌀가루 그리고 카오린의 회수율이 상대적으로 높았고, soil의 경우는 100%보다 높았으나, bioassay 결과와 비교할 때 의미가 없었다. 혼합, 살균, 건조의 단위과정 및 실제 사용조건에서 적정한 물성을 유지하기 위해 구입이 쉬운 질소원, 탄소원 및 무기 첨가제로 콩, 밀, 쌀 및 soil을 기본적으로 선발하였다. 이 경우 캡슐화 전의 시료는 hemacytometer로 조사한데 반해, 캡슐화 후에는 고분자 담체 성분에 의한 간섭으로 hemacytometer 대신 활성포자수를 조사하였고, 소량을 처리하여 회수율이 상대적으로 높았다.

표 9. 단일담체별 제제화 효율

Matrix components	Bioencapsulated spore titer (cfu/g)	Recovery (%)	Bioactivity after 1 month
Soybean powder	5.2×10^8	57	++
Potato starch	2.6×10^9	>100	+
Rice powder	3.7×10^9	>100	+
Barley powder	4.3×10^8	47	+
Soil	1.6×10^{10}	>100	-
Kaolinite	3.4×10^9	>100	+
Wheat	2.2×10^9	>100	++

* Spore input : 0.5g dry wt-spore / 50g-matrix

① 1차 시제품 생산 (Lot. IR-1, IR-2)

공정 확인 및 비교시료의 제조를 위해 표 9와 같은 조성으로 2kg의 담체 재료를 준비하여, 담체 건조중량 1kg당 5g의 spore를 캡슐화 하였다. 입자 직경 250㎛ 이하의 IR-1과 250㎛ 이상의 IR-2를 제조하여 총 균체 수와 내열 포자 수를 측정하였다 (Table 10). 포자 회수율은 9.3 - 13.7% 였다. 2kg 해당량을 실온에서 처리하였는데 이때 제제의 수분함량이 높고 회수율이 저하되는 것으로 보아 대량화에 따라 건조과정이 길어지는 것은 제제에 불리함을 알 수 있었다.

표 10. 시제품 IR-1과 IR-2

Formulation	Particle size	Amount (g)	Apparent spore titer (cfu/g)	Recovery (%)	Heat stable spore (65 °C, 30min, cfu/g)	Water content (%, w/w)
IR1	< 250 μm	860	6.0×10^6 5.1×10^7	13.7	1.0×10^5	14.8
IR2	> 250 μm	1,400	3.5×10^6 4.0×10^7	9.3	1.0×10^6 7.0×10^5	

② 포자 혼입 방법 개선

담체 선발과정을 고려하여 조성이 보다 간단한 2차 시제품 (IR-3, IR-4)을 제조하였다 (표 11). 다량의 포자를 섞어주기 위해, La-lignosulfonate 및 Tween80 용액을 이용해 현탁을 시도했지만 포자의 표면 hydrophobicity가 높아 효율이 낮았다. 따라서 소량의 호화 된 담체 재료에 포자를 섞어 균일한 농축 포자액(1:1, v/v)을 만들어 본 담체에 캡슐화를 시도하였다.

표 11. 시제품 IR-3 (2 x 2kg)

Biomatrix composition	Amount
Matrix : 콩가루 쌀가루	2,000 g 2,000 g
Soil (황토흙)	400 g
DW	11 liter
호화 (121°C, 30min)	
Spore mix 30g / 60 plates of spores	

③ 임야 실험을 위한 대량 시제품의 생산 (IR-4, IR-5)

포자의 혼입성을 증가 시키기 위해 호화에 필요한 수분량을 10liter로 하고, matrix의 점도를 증진시키기 위해 밀가루를 보강하였다 (표 12). 또한 spore titer를 높이기 위해 같은 양의 matrix에 IR-4 보다 5배의 포자를 캡슐화 하였다. Spore mix는 1liter의 matrix에 lignosulfonate와 Tween 80로 현탁시켜, 포자 및 균사 덩어리가 잘 풀어진 후 본 matrix와 섞었다.

표 12. IR-4의 조성 및 제제 (4kg)

Biomatrix composition	Amount
Matrix : 콩가루	2,000 g
쌀가루	1,000 g
밀가루	1,000 g
Soil (황토흙)	400 g
Lignosulfonate	1 g
Tween80	1 ml
DW	10 liter
호화 (121°C, 30min)	
Spore mix 133g / 300 plates of spores	
Spore titer : 5.2 x 10^8 cfu/g, Water content : 11.6 % (w/w)	
Recovery yield : 19.0%	

④ 최종제제 준비 (100kg)

IR-4를 재현한 여러 Lot의 시료를 준비하여, Kaoline (pHsurface = 6.4 - 7.5, 325 mesh for wettable powder formulation, 250mesh for dust formulation)과 lignosulfonate를 증량제로한 최종제제 20kg을 구성했다.

⑤ 제형별 효능평가

기확보된 곤충 병원미생물의 야외 산포시험을 위한 적절한 제제를 개발하기 위한 것으로 몇가지 제제형태에 따른 솔잎혹파리에 대한 병원력을 검정하였다. 먼저 입자 직경이 250 μm 이하인 것 (IR-1), 250 μm 이상의 것으로 구분하여 솔잎혹파리에 대한 병원력을 검정한 결과 큰 차이가 IR-1이 더 안정된 제제로 보여졌다. 따라서 입자직경이 250 μm 이하인 것을 이용하여 제제조성이 보다 간단하면서 포자 혼입방법을 개선시킨 2차 시제품 (IR-3, IR-4)을 제조하여 병원력을 검정하였다. IR-4의 경우 IR-3에 비하여 포자함량이 더 많이 들어갔지만 치사효과는 비슷하게 나타났다 (표 13).

표 13. 솔잎혹파리에 대한 제형별 살충효과

Formulation type / Concentration (%)		No. of insects tested	No. of dead insects	Mortality (%)
IR 1	5	60	19	31.6
	20	60	21	35.0
IR 2	5	60	8	13.3
	20	60	25	41.6
IR 3	5	60	4	6.6
	20	60	10	16.6
IR 4	5	60	4	6.6
	20	60	8	13.3
Control (DW)		60	0	0

* Each type of fomulated insect pathogen was dispersed in distilled water and assayed for its lethal effect.

2) *Beauveria bassiana* HY-1의 제제화

① 제제화에 사용된 원제는 액체 배양된 발효액을 사용하거나, Pellet type의 밀기울 고체배지에 배양하여 건조시킨 포자 혼합물을 사용하였다. 고체 배양물의 포자함량은 lot951113 경우 2.2 x 10^{10}cfu/gram 이었고, 수분함량은 적외선 분석기에 의하면 약 17.8%(w/w)이었다.

② 실험실에서 적용된 제제방법은 두 가지였다. 첫째는 건식처리로 조제와 혼합하여 포자를 안정화시켜 분제, 수화제 및 pellet형의 입제로 만들었다. Mortar, Food mixer 및 Pin-crusher를 사용하여 원제인 포자 고체배양물을 분쇄하고 보조재료와 혼합하였다. 둘째는 호화전분법으로 건식처리에 비해 공정이 어렵지만 포자의 보호효과 및 지속효과가 좋을 것으로 기대하고 시험제제 수준으로 제작하였다. 포자를 호화전분에 고정화 시켜 건조, 분쇄하여 분제 및 수화제 구성하였으며 Food mixer 및 sieve separator 공정에 사용하여

고정화된 호화전분을 처리하여 250㎛ 및 595㎛ 직경의 입자로 조정하였다(60, 30 mesh)

③ 포자 안정화를 위해 사용한 보조재료의 종류는 기본조제로 Lignin, Lignosulfonate 및 Diatomaceus earth, 계면활성제로는 Polyoxyethylene nonylphenyl ether(HLB=13.3), Triton X-100(HLB=13.5), Tween 80(HLB=15.0), Brij56(HLB=12.9)를 사용하였다. 재료의 분쇄 및 혼합 방법은 Mortar, Dry mixer 및 Pin-crusher를 사용하는 공정이 100g 내외의 소규모에서 100kg 수준의 대규모까지 시험되었다. 포자의 함량의 조사는 Counting chamber에 의해 spore를 세는 방법과 nalidixic acid를 이용한 곰팡이 선별배지에서의 활성포자수 조사를 병행하였다.

3) 혼합담체를 이용한 제제화

고체 배양물에 이 혼합담체를 섞어 함께 분쇄하면서 충분히 숙성된 포자를 clay 표면에 흡착시켰다. 이때 공정에 따른 포자의 회수율은 표-4과 같았다. 고체배양물에 잔존하는 섬유질을 비롯한 불순물이 분쇄에 영향을 주었지만 2차 분쇄이후의 제제에서는 미생물의 유효농도가 낮아서 1차분쇄로 제제를 위한 혼합은 충분했다. 따라서 혼합담체의 경우 포자의 포집 능력이 높아서 고체배양물로부터 포자를 회수해 안정화 시키는데 적절한 것으로 여겨졌다. 단지 사용자의 편의 및 제형의 다양화를 위한 입상화 등의 방안이 요구되었다.

표 14. Clay 혼합담체를 이용한 시험제제의 *B. bassiana* HY-1의 포자농도

시제품 종류	수율 (%)	제제내의 생존 포자농도 (cfu/g)
1차 분쇄후 제제	70	1.08×10^{8} - 1.90×10^{8}
2차 분쇄후 제제	20	2.34×10^{7} - 2.52×10^{7}
2차 분쇄 나머지	10	1×10^{5} 이하

4) 조립식 시험제형의 최적화

① 약제의 보존성, 사용편의성을 개선하기위해서 규조토 제제를 바탕으로 입상의 신규 조립식 제제를 구성하였고 이의 포자함량과 안정성을 조사하였다. 조립형 제제인 II, III, IV은 gram당 1.3 x 10^6 내지 1.5 x 10^7의 포자함량을 보였다. 공정상 - 70℃에서 1시간의 건조에 의해서 1/1000의 수율 감소가 있었고, 3% 이내의 metanol을 포함한 시료를 풍건하여 새로이 구성된 IV-1의 안정성이 가장 좋았다. 사용된 보조 재료는 KCl 보다는 talc가 포자 안정성 높인다. 또한 계면활성제는 TG74와 FSE3가 포자 안정성에 유리한 붕괴 확전제로 확인되었다. (표 15).

표 15. 제형별 열안정성

Formulation Code name	Viable count (*Beauveria* cfu/gram)	Thermadeactivation rate (10^{-3}cfam/hour)	Average dead insects (Mortality,%)	
			30 days after	45 days after
II-1	2.4 x 106	-41.4	11.3±1.2 (57)	16.0±1.0 (80)
II-2	4.3 x 106	-41.7	12.3±2.5 (62)	14.3±2.5 (72)
III-1	1.3 x 106	-49.5	12.3±2.5 (62)	17.6±0.6 (88)
III-2	2.3 x 106	-61.8	13.3±1.2 (67)	17.0±3.0 (85)
IV-1	1.5 x 107	-26.6	-	-

* Deactivation kinetics at 45℃

Deactivation rate는 그 절대값이 작을수록 온도에따른 안정성이 높게 평가될 수 있는 간접적인 수치이다. 따라서 제제번호 IV-1이 가장 우수한 결과를 보였다.(제제구성은 미공개)

② 시험용 시료의 생산 : 표 15에서의 결과를 바탕으로 처방과 제조방법을 바꾸어 최적의 제조방법을 조사하였다 (표 16). 제조 방법에 따른 생물활성을 포자농도를 기준으로 조사하여 #5, #6의 방법을 선택하여 표 17에서의 처방 1로 산지실험용 시료 제조에 사용하였다.

표 16. 솔잎혹파리 방제용 미생물농약의 제조방법

시료 번호	성분	혼합/분쇄 방법	미생물농도, cfu/g
1	미건조 고체배양물 + BSW + Talc	믹서로 분쇄	9.57×10^6
2	미건조 고체배양물 + BSW + Talc	믹서로 분쇄/Extruding	1.07×10^8
3	미건조 고체배양물 + BSW + Talc	Jet-mill로 분쇄	7.61×10^7
4	미건조 고체배양물 + BSW + Talc	Jet-mill로 분쇄/Extruding	2.32×10^7
5	건조한 고체배양물 + BSW + Talc	믹서로 분쇄	2.41×10^8
6	건조한 고체배양물 + BSW + Talc	믹서로 분쇄/Extruding	2.40×10^8
7	건조한 고체배양물 + BSW + Talc	Jet-mill로 분쇄	2.18×10^8
8	건조한 고체배양물 + BSW + Talc	Jet-mill로 분쇄/Extruding	1.66×10^8
9	건조한 고체배양물 + BSW + Talc	Jet-mill로 분쇄/Extruding	1.37×10^8
10	미건조 고체배양물	-	8.63×10^8
11	건조한 고체배양물	-	6.50×10^8

5) 솔잎혹파리 방제용 미생물제제의 제형화 개선방향

1차년도에 시작된 제제화의 실험은 고체배양 기술의 대량화에따라 안정성, 경제성, 사용용이성을 기준으로 조립식 입제로 개선되었다. (표 17)

표 17. 솔잎혹파리 방제용 미생물살충제 제형요약

제형화 기초재료 선발	- 천연담체조성 결정하여 소규모 시료생산 : 액체배양 포자의 고정용 담체 (콩가루, 쌀, 밀, 황토) - 소수성이 강한 포자의 포집 : 규조토 및 계면활성제 종류 및 함량 결정
소량 기초제형 (규조토)	- 기본 조제 : Lignin, Lignosulfonate, Diatomaceus earth - 계면활성제 : Polyoxyethylene nonylphenyl ether, Triton X100, Tween 80, Brij56 - 분쇄 및 혼합 방법 : Mortar, Dry mixer, Pin-crusher - 활성 조사 : Counting chamber, Viable count
대량 제형 (조립식입제)	- 조성 : Bentonite, talc, starch, WG5, STP - 시제품 제작 : II-1, I-2, III-1, III-2, IV-1

6) 제제화된 솔잎혹파리 방제용 미생물제제의 소규모 역가조사 (Simulation pot)

① 톱밥을 주성분으로 구성된 솔잎혹파리 월동상을 마련하고 유충을 넣어주어 simulation pot을 만들었다. 월동상의 전체 크기는 245cm x 490cm 였다. 분제형태 *Beauveria* 시험약제의 살포농도는 1 m^2당 94.9g, 21.5g이었고 pellet형 입제는 10.6g이었고 대조구로서 무처리구를 만들었다. 약제처리 후 133일후까지 월동상 내의 유효미생물 밀도를 조사하였다.

② 초기 미생물농도는 *Beauveria bassiana*기준으로 최고 1.39 × 10^7cfu/g-soil 이 확인되었고, 133일 후에는 6.78 x 10^3cfu/g-soil 이하로 분석되었다. 따라서 94.9g 농도의 1회 약제처리로 약 133일까지 유효농도가 유지되었다. 약제 처리 후 1주일동안 약 1%정도의 미생물만 유지되었고, 이 농도가 계속 유지되며 서서히 감소하는 경향을 보임으로써 처리초기에 미생물의 밀도 유지를 위한 방법이 필요함을 알 수 있다. 또한 처리 후 89일까지는 월동상 중의 유효 미생물농도가 초기 처리농도에 잘 비례하였다 (그림-5).

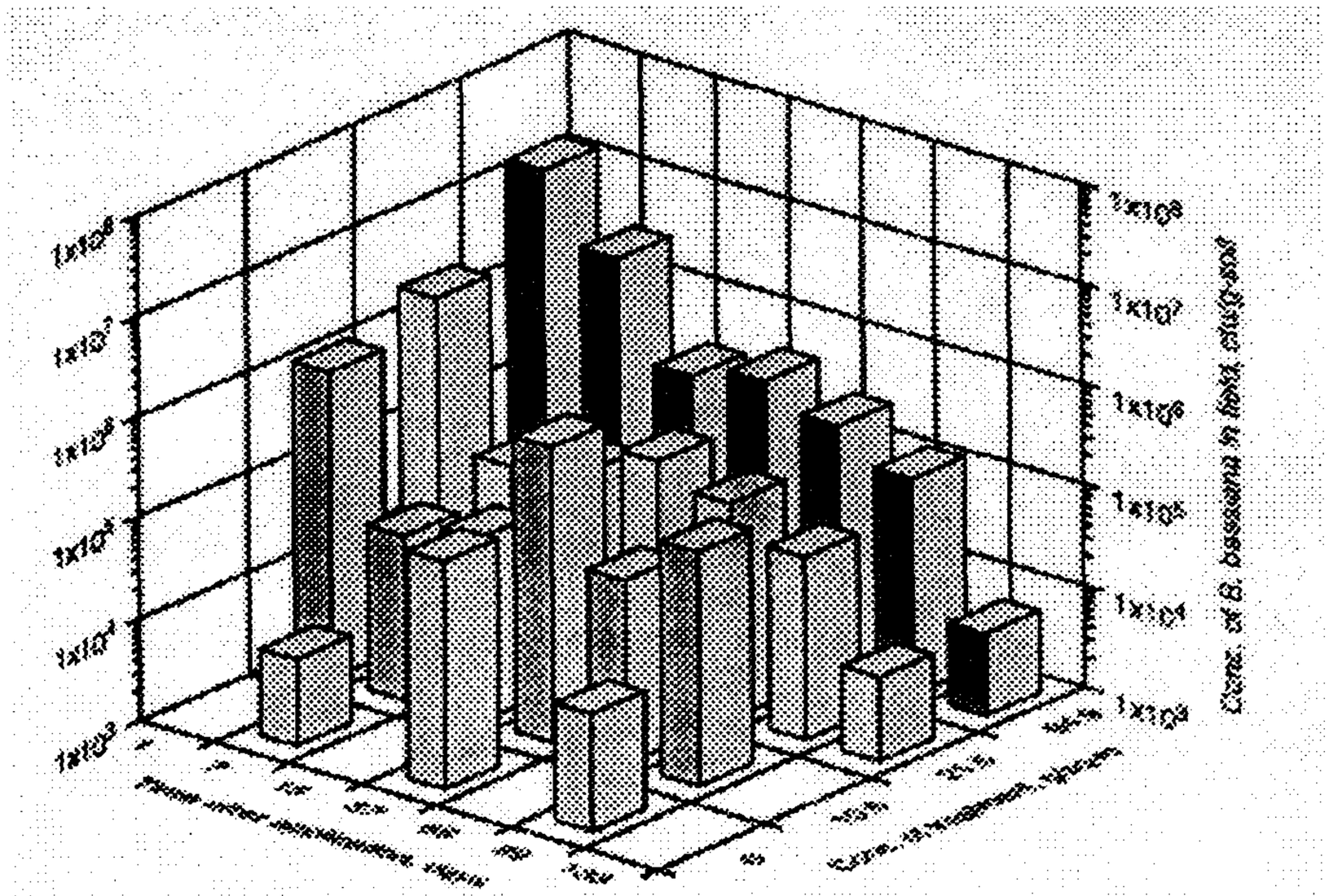


그림 10. 솔잎혹파리 방제용 미생물살충제의 소규모 포장내 유효미생물농도

7) 시험용 제형의 살포농도별 원제 미생물 통태

① 시험용제제를 강원도 평창읍 대하리 일원의 송림지역에 농도별로 처리하고 토양중의 유효미생물의 농도를 조사하였다. 한차례 강우가 지나간 1997년 4월 4일에 시험제제를 정해진 농도대로 살립기 및 인력에 의해서 정해진 구간별로 지면에 살포하였다. 시험제제의 살포는 당일 한 번에 한정하고 이후의 추가약제 처리는 없었다. 구역별 처리농도는 (표 18)과 같다.

표 18. 솔잎혹파리 방제용 미생물살충제의 야외살포시험 처리농도

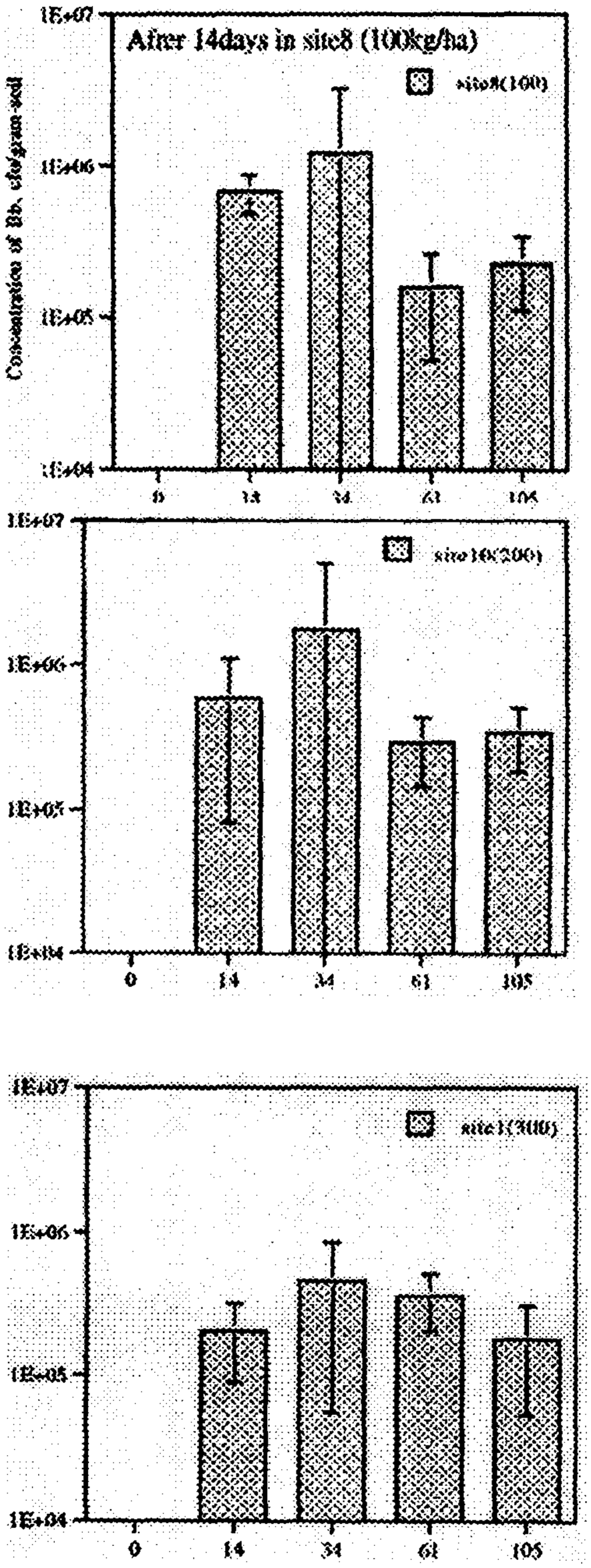
산포구역 번호	면적, ha	살포량, kg	살포농도, kg/ha
8	1	100	100
7	1	150	150
10	2	400	200
2	1	250	250
1	1	300	300

② 원제 미생물 *Beauveria bassiana* HY-1의 토중 농도를 조사하기 위해서 시료 살포 직전 및 살포 후 정해진 시일에 시험구간내의 토양을 채취하였다. 산포 구간 당 5개이상의 시료를 낙엽층 아래의 토양 표층에서 약20g 씩 채취하였다. 시료는 증류수로 희석하여 Czapek agar에서 살아있는 원제 미생물의 수를 조사하였다.

③ 1회 약제처리 후 유효미생물 밀도변화: 시험약제 처리 전 토양중의 미생물군락은 $2.8x10^5$ 내지 $5.4x10^5$cfu/g-soil의 잡균이 존재하며 *Beauveria* 종류의 미생물은 관찰되지 않았다. 시험약제의 처리 2주일 후 빗물, 이슬 등에 의해서 시료가 산포 구간 토양전반에 확산되었을 시점에서부터 토양중의 유효미생물농도를 조사하였다. 처리 후 2주에 10^6cfu/g-soil이하로 유지되던 유효미생물농도가 처리 후 34일째는 10^6이상으로 증가하여 계속적으로 약제가 확산되어 토양중으로 침투하고 생태계에 정착해 감을 알 수 있었다 (그림-6). 그러

나 약제처리 후 2달이 되는 6월 4일에는 미생물농도가 10^5 내지 10^6cfu/g-soil 사이로 감소되었고 이후 105일까지 10^5cfu/g-soil 이상의 농도가 유지되었다.

④ 처리농도에 따른 유효미생물 동태: 100, 150, 200, 250, 300kg/ha의 처리농도내에서는 처리농도간의 균일한 유의성을 발견할 수 없었다 (각 시험구간의 경사도, 소나무상태, 토양상태, 약제처리자의 숙련도 등 변수가 이의 원인으로 여겨짐). 단지 200kg이상의 농도구간은 처리 후 61일까지 비교적 안정적으로 미생물 밀도가 유지되었다. 처리 후 105일에는 초기 살포량과 관계없이 10^5cfu/g-soil 이상의 미생물밀도가 유지되었다.



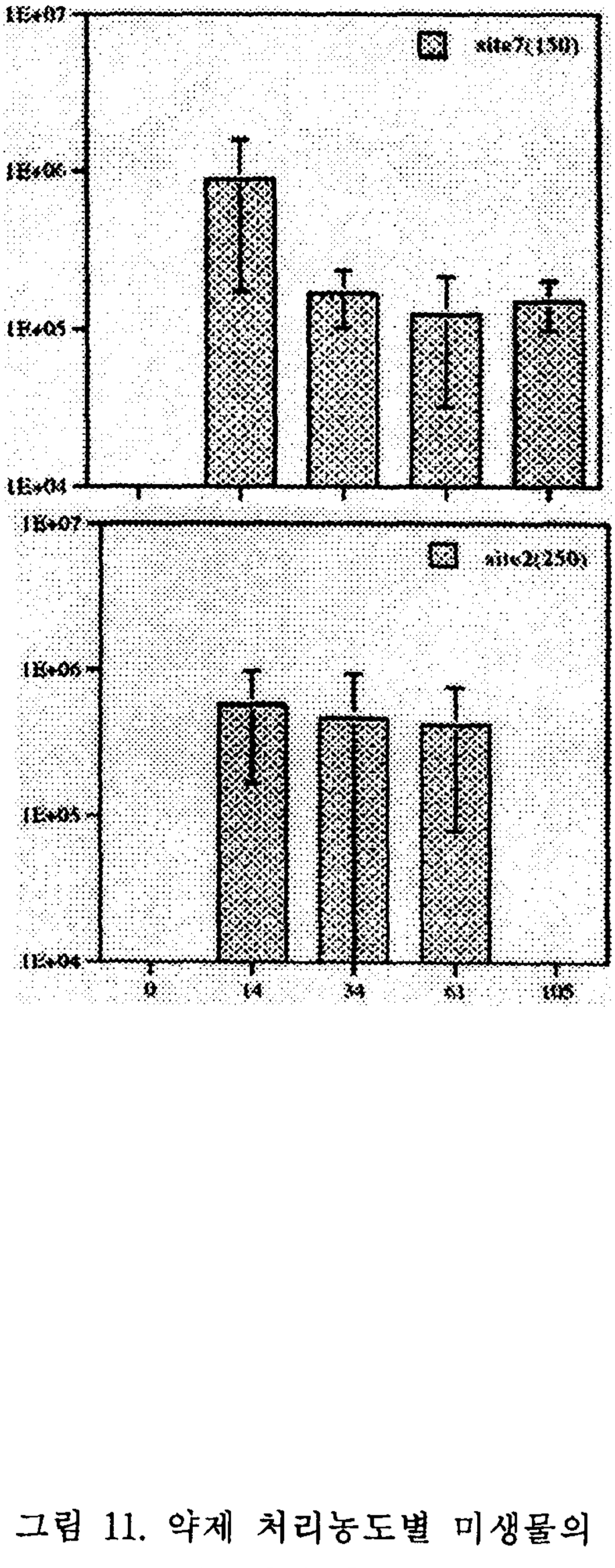
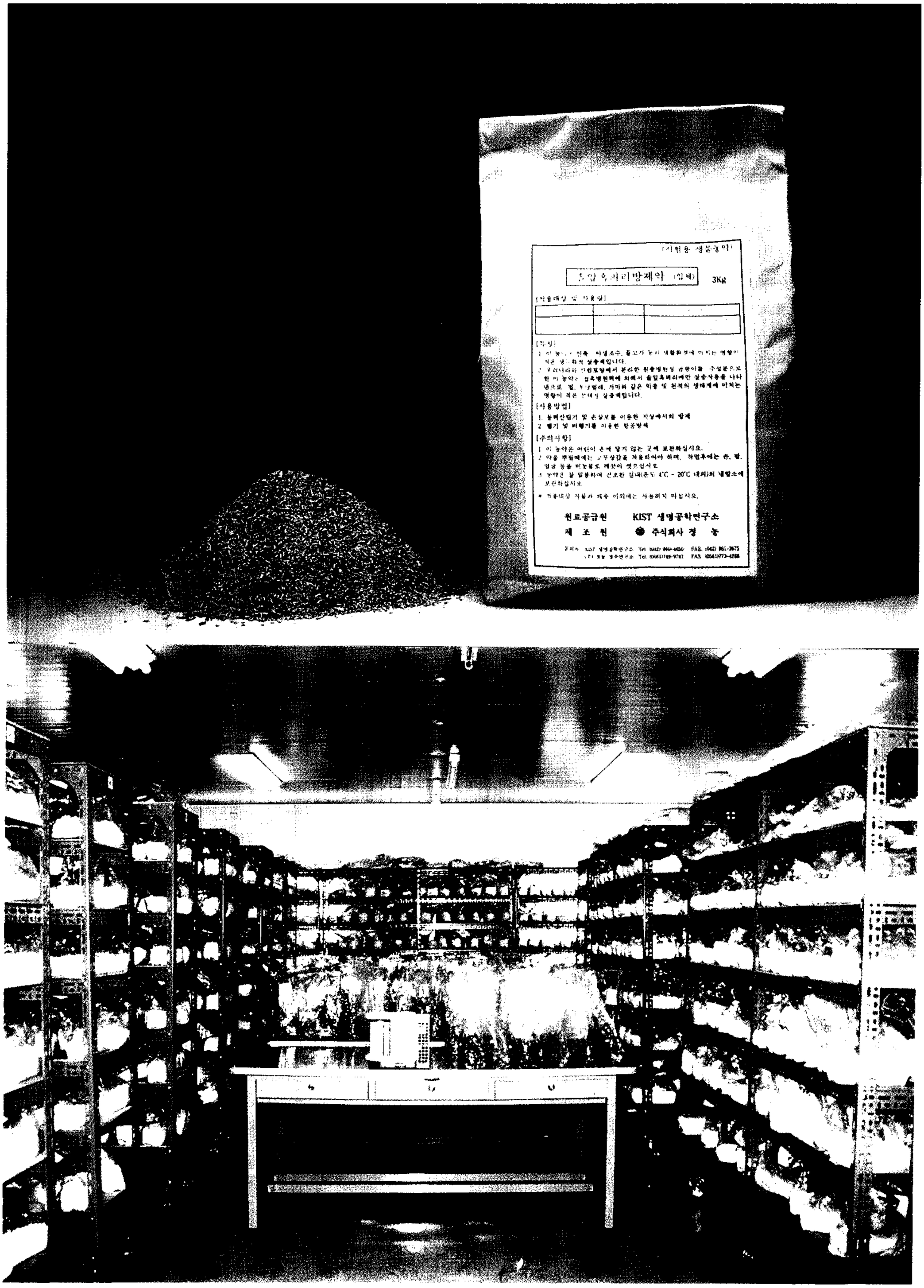


그림 11. 약제 처리농도별 미생물의 밀도변화 추이


[시험용 생물농약]
토양 유래 미생물제 (입제) 3Kg
[이용대상 및 사용량]
[주의]
1 이 농약은 인축, 어성초수, 물고기 등의 생활환경에 미치는 영향이 적은 생물학적 살충제입니다.
2 우리나라의 산림토양에서 분리한 뿌리병원성 균을 주성분으로 한 이 농약은 감독병원체에 의해서 솔잎혹파리에만 살충작용을 나타냄으로 벌, 누에, 거미와 같은 익충 및 천적의 생태계에 미치는 영향이 적은 선택성 살충제입니다.
[사용방법]
1. 동력산림기 및 손살포를 이용한 직상에서의 방제
2 헬기 및 비행기를 이용한 항공방제
[주의사항]
1 이 농약은 어린이 손에 닿지 않는 곳에 보관하십시요.
2 약을 뿌릴때에는 고무장갑을 착용하여야 하며, 작업후에는 손, 발, 입을 물을 비누물로 씻어 내십시오.
3 농약은 잘 밀봉하여 건조한 실내(온도 4℃ - 20℃ 내외)의 냉암소에 보관하십시오.
* 사용대상 작물과 해충 이외에는 사용하지 마십시오.
원료공급원 KIST 생명공학연구소
제 조 원 주식회사 경 농

본 연구를 통하여 현재 우리나라 산림의 가장 심각한 해충인 솔잎혹파리를 방제하기 위해 유효병원미생물의 탐색, 상업적 생산을 고려한 대량생산 및 제제화를 위한 연구의 실용화 준비단계는 이루어졌다고 판단된다(그림 12). 따라서, 앞으로 진전될 연구에서는 더욱 효과적인 병원성 균주 선발과 함께, 경제적인 미생물 살충제 생산, 그리고, 병원력 유지, 토양속에서의 생존력, 타 미생물과의 경쟁우위, 자외선 등에 의한 불활성화 방지, 적절한 중력제 등을 이용한 서식 토양까지의 도달 효율등이 필수적으로 고려된 지속적인 제형화 개선에 더욱 중점적인 연구노력을 집중시킬 예정이다. 본 연구의 최종 목표가 계획대로 달성되는 경우, 환경친화적이고, 대면적 방제가 가능하며, 경제적이고, 효과적인 솔잎혹파리 방제기술의 개발, 실용화를 통해 이 아름다운 금수강산을 우리 자신은 물론 후손들에게 부끄럽지 않게 훌륭히 물려줄 수 있을 것으로 기대한다.

여 백

인 용 문 헌

1. 姜錫權, 趙鏞涉, 朴鎬用, 高星澈 (1982) 솔잎혹파리의 병원미생물에 관한 조사연구 I. 특히 가잠 경화병과 관련하여. 한국잠사학회지 24(1), 32-38.
2. 高濟鎬 (1975) 솔잎혹파리의 피해와 방제대책. 한국임학회지 26, 68-72.
3. 高濟鎬 (1982) 솔잎혹파리 피해와 방제현황. 한국식물보호학회지 21, 159-162.
4. 李範英 (1992) 솔잎혹파리의 생태 특성과 관리 전략. 강원대 '92 국제 학술 심포지움, 118-132.
5. 岡田齊夫 (1994) 微生物的 防除の現狀と展望. 植物防役 48(11), 449-454.
6. 조용섭, 정후섭, 황계성 (1975) 솔잎혹파리의 병원체 및 그 활용에 관한 연구. 1975년도 林試연구보고.
7. 조용섭, 정후섭, 유인현 (1977) 솔잎혹파리의 병원체 조사 및 그 활용에 관한 연구. 1977년도 임업시험장 연구보고.
8. 조용섭, 황계성 (1978) 주요산림해충의 병원미생물 개발에 관한 연구. 1978년도 林試연구보고.
9. 조재명, 이범영, 정영진 (1995) 솔잎혹파리 논문집 I. 생태, 피해, 방제전략. 임업연구원 연구자료 제103호, 298pp.
10. 조재명, 이범영, 정영진 (1995) 솔잎혹파리 논문집 II. 생물적, 화학적, 임업적 방제. 임업연구원 연구자료 제103호, 458pp.
11. 조재명, 이범영, 정영진 (1995) 솔잎혹파리 논문집 III. 일본, 유럽, 미국. 임업연구원 연구자료 제103호, 283pp.
12. 韓文熙 등 (1995) 솔잎혹파리의 생물적방제 국가 대책 수립을 위한 조사연구. 과기처보고서 BSN81700-710-1, 249pp.
13. Bailey L.A. and A.C. rath (1994) Production of *Metarhizium anisopliae* spores using nutrient-impregnated membranes and its economic analysis. Biocon. Sci. Technol. 4: 297-307.

14. Desgranges C., C. Vergoignan, A. Lereec, G. Riba and A. Durand (1993) Use of solid state fermentation to produce *Beauveria bassiana* for the biological control of european corn borer. Biotech. Adv. 11: 577-587.

15. Feng M.G., T.J. Poprawski and Khachatourians G.G. (1994) Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: Current status. Biocontrol Science and Technology 4: 3-34.

16. Hegedus D.D., M.J. Bidochka and G.G. Khachatourians (1990) *Beauveria bassiana* submerged conidia production in a defined medium containing chitin, two hexosamines or glucose. Appl. Microbiol. Biotechnol. 33: 641-647.

17. Jackson M.J. and R.J. Bothast (1990) Carbon concentration and carbon-to-nitrogen ratio influence submerged-culture conidiation by the potential bioherbicide *Colletotrichum truncatum* NRRL13737. Appl. Environ. Microbiol. 56: 3435-3438.

18. Leathers T.D., S.C. Gupta S.C. and N.J. Alexander (1993) Mycopesticides: status, challenges and potential. J. Ind. Microbiol. 12:69-75.

19. Reithinger R., C.R. Davies, H. Cadena and B. Alexander (1997) Evaluation of the fungus *Beauveria bassiana* as a potential biological control agent against Phlebotomine sand flies in Colombian coffee plantations. J. Invert. Pathol. 70: 131-135.

20. Samson, R.A., H. Evans, and J-P. Latge (1988) Atlas of Entomopathogenic Fungi. Springer-Verlag, Berlin, 187pp.

21. Sandhu S.S., R.C. Rajak and G.P. Agarwal (1993) Studies on prolonged

storage of *Beauveria bassiana* conidia: Effects of temperature and relative humidity on conidial viability and virulence against Chickpea borer, *Helicoverpa armigera*. Biocon. Sci. Technol. 3: 47-53.

22. Tanada Y. and H. Kaya (1993) Insect Pathology. Academic Press, Inc., Sand iego, 666pp.
23. Thomas K.C. Khachatourians G.G. and W,M. Ingledew (1986) Production and properties of *Beauveria bassiana* conidia cultivated in submerged culture. Can. J. Microbiol. 33: 12-20
24. Yu X., S.G. Hallett, J. Sheppard and A.K. Watson (1997) Application of the Plackett-Burman experimental design to evaluate nutritional requirements for the production of *Colletotrichum coccodes* spores. Appl Microbiol. Biotechnol. 47: 301-305