



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년04월27일
(11) 등록번호 10-2105252
(24) 등록일자 2020년04월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/14 (2018.01) A01N 63/30 (2020.01)
C12R 1/645 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/14 (2013.01)
A01N 63/30 (2020.01)
(21) 출원번호 10-2018-0136512
(22) 출원일자 2018년11월08일
심사청구일자 2018년11월08일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020030035708 A*
Exp Appl Acarol, 제62권, 511-524면(2014) 1부.*
JP2005304421 A
JP2016135101 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
전북대학교산학협력단
전라북도 전주시 덕진구 백제대로 567 (덕진동1가)
(72) 발명자
김재수
전라북도 전주시 완산구 새터로 63, 204동 203호 (서신동, 동아2차아파트)
박소은
부산광역시 해운대구 재반로 23, 1603호 (재송동, 이진캐스빌)
(74) 대리인
특허법인 이룸리온
(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 7 항

심사관 : 문동현

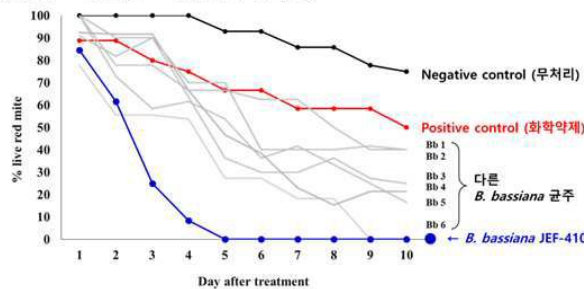
(54) 발명의 명칭 닭진드기 방제효과를 갖는 보베리아 바시아나 JEF-410 균주, 이를 이용한 닭진드기 방제용 조성물 및 닭진드기 방제방법

(57) 요약

본 발명은 닭진드기 방제효과를 가지는 보베리아 바시아나 (*Beauveria bassiana*) JEF-410 균주, 이를 이용한 닭진드기 방제용 조성물 및 이를 이용한 닭진드기 방제방법에 관한 것이다.

대표도 - 도5

(A) 닭진드기 살충효과 (단반복 실험)



(B) 처리 14일차 후 치사된 닭진드기



(52) CPC특허분류

C12R 1/645 (2013.01)

(72) 발명자

이미룡

전라북도 완주군 봉동읍 둔산1로 130, 201동 1305호(전주침단코아루2차아파트)

김중철

전라북도 익산시 서동로21길 13, 12동 405호(마동, 시영아파트)

이세진

전라북도 전주시 덕진구 사평3길 21(덕진동1가)

김시현

전라북도 전주시 완산구 당산로 43, 105동 402호(서신동, 제일비사벌새터마을아파트)

신태영

경기도 화성시 동탄중앙로 189(반송동, 동탄시범다은마을 월드메르디앙반도유보라)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711075486

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 연구재단 중견연구

연구과제명 닭진드기의 종합 관리를 위한 신규 미생물 기반 방제 모델 구축

기여율 1/1

주관기관 전북대학교

연구기간 2018.03.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

보베리아 바시아나 (*Beauveria bassiana*) JEF-410 균주 (KFCC11791P) 및 이사리아 푸모소로세아(*Isaria fumosorosea*) JEF150 (KFCC11757P), 상기 균주의 포자 또는 상기 균주의 배양액을 포함하는, 닭진드기 방제용 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 닭진드기 방제용 조성물은 액상제형, 분말제형 및 입상제형으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나로 제형화된, 닭진드기 방제용 조성물.

청구항 4

제 2항의 닭진드기 방제용 조성물에 증량제 및 계면활성제로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 추가로 포함하여 제형화한, 닭진드기 방제용 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 계면활성제는 닭진드기 방제용 조성물이 액상제형인 경우 소듐 리그노설포네이트(Sodiumlignosulfonate), 이소트리데실 알코올 에톡실레이트(isotridecyl alcohol ethoxylate) 및 아세틸렌 다이올(acetylene diol)으로 구성된 군에서 선택된 어느 하나 이상인 비이온 계면활성제인, 닭진드기 방제용 조성물.

청구항 6

제 4항에 있어서, 상기 계면활성제는 닭진드기 방제용 조성물이 분말제형 또는 입상제형인 경우 소듐 리그노설포네이트(Sodium lignosulfonate) 또는 EO/PO/EO 블록 중합체(EO/PO/EO block copolymer)인 비이온 계면활성제인, 닭진드기 방제용 조성물.

청구항 7

제 4항에 있어서, 상기 증량제는 광물성 분말인, 닭진드기 방제용 조성물.

청구항 8

제 3항의 방제용 조성물을 처리하여, 닭진드기를 방제하는 방법.

청구항 9

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 닭진드기 방제효과를 가지는 보베리아 바시아나 (*Beauveria bassiana*) JEF-410 균주, 이를 이용한 닭진드기 방제용 조성물 및 이를 이용한 닭진드기 방제방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 닭진드기(와구모, red mite)는 봄부터 가을까지 산란계 농가 생산성 하락의 주요 원인으로, 주요 질병을 전파하는 요인으로 양계업에 큰 영향을 미치고 있다. 유럽 11개국의 조사 결과, 전체 농가 중 83%가 닭진드기에 감염된 것으로 나타났으며, 이로 인한 손실액은 연간 약 1,982억 달러로 추정되고 있음. 우리나라에서도 닭진드기 감염률이 90% 이상으로 추정되며, 연간 손실액은 약 1,050억원으로 알려져 있다.

[0004] 닭진드기에 감염된 양계는 흡혈에 의한 스트레스를 받게 되며, 이로 인해 빈혈, 쇠약, 깃털 탈락 등을 유발시켜 산란율은 약 20% 감소하고, 폐사율이 최대 4%까지 증가한다고 보고되고 있다. 이러한 닭진드기는 생존력이 뛰어나 1년 내내 번식이 가능하고, 섭식 활동 없이 9개월 간 생존이 가능한 것으로 알려져 있으며, 25℃ 조건에서 6일 만에 개체수가 2배로 증가되어 방제가 매우 어려운 해충으로 알려져 있다.

[0006] 현재 우리나라에서 닭진드기 방제에 등록된 살충제 수는 13종류로 알려져 있으나, 5종류는 판매가 중단되었고, 나머지 중 4종류의 살충제는 빈 축사에서만 사용해야하는 적용상의 한계점이 있다. 현실적으로 닭이 사육되는 상태에서 사용할 수 있는 닭진드기 방제용 약품의 수는 4종류로 인식되고 있으나, 닭진드기의 약제 저항성 증가와, 잔류독성 및 환경오염 등이 근래 크게 대두되고 있음에 따라, 새로운 생물적 살충제에 대한 개발이 사회적으로 강하게 요구되고 있다.

[0008] 종래 기술에서는 닭진드기 방제와 관련하여 살충성 정유 또는 식품 첨가물을 이용한 닭진드기 살충성 조성물이 대한민국 공개특허 제 10-2013-0142588호에 의해 제시된 바 있다. 하지만 식물 추출물은 작용 특성상 식물 추출물에 직접 접촉한 닭진드기에만 방제 효과가 있고, 축사 내에 숨어있는 등 직접 접촉하지 않은 닭진드기에는 방제효과가 없는 한계점을 가지고 있다. 최근까지 살충제와 직접적으로 접촉하지 않은 닭진드기들까지도 효과적으로 방제할 수 있는 곤충병원성 진균을 이용하는 기술에 대하여는 알려진 바 없다.

[0010] 이에 본 발명자들은, 기존 합성 살충제의 저항성 문제와 환경 잔류문제를 획기적으로 극복하면서도, 닭진드기에 간접적으로 접촉하여도 방제효과가 있는 미생물 기반 신규 곤충병원성 진균의 발굴 및 효과적인 닭진드기 관리 시스템을 구축하고자 예의 노력하였다.

[0012] 그 결과, 인축에 무해하며 환경에 안전한 보베리아 바시아나 (*Beauveria bassiana*) JEF-410 균주의 뛰어난 살충력을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명은 상기와 같은 문제를 해결하기 위해 안출된 것으로, 본 발명자들은 보베리아 바시아나 (*Beauveria bassiana*) JEF-410 균주의 뛰어난 살충력을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

[0015] 본 발명의 목적은 닭진드기 방제효과를 가지는 보베리아 바시아나 (*Beauveria bassiana*) JEF-410 균주 (KFCC11791P) 를 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명의 또 다른 목적은 보베리아 바시아나 (*Beauveria bassiana*) JEF-410 균주(KFCC11791P), 상기 균주의 포자 또는 상기 균주의 배양액을 포함하는 닭진드기 방제용 조성물을 제공하는 것이다.

[0019] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 닭진드기 방제용 조성물을 처리하여 닭진드기를 방제하는 방법을 제공하는 것이다.

[0021] 본 발명의 또 다른 목적은 보베리아 바시아나 (*Beauveria bassiana*) JEF-410 균주 (KFCC11791P) 및 이사리아 푸모소로세아(*Isaira fumosorosea*) JEF150 (KFCC11757P), 상기 균주의 포자 또는 상기 균주의 배양액을 포함하는 닭진드기 방제용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0022] 상기의 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 닭진드기 방제효과를 가지는 보베리아 바시아나 (*Beauveria bassiana*) JEF-410 균주를 제공할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 닭진드기는 데르마니수스 갈리나에(*Dermanyssus gallinae*)인 것일 수 있다.
- [0026] 본 발명은 또한 보베리아 바시아나 (*Beauveria bassiana*) JEF-410 균주, 상기 균주의 포자 또는 상기 균주의 배양액을 포함하는 닭진드기 방제용 조성물을 제공할 수 있다.
- [0028] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 닭진드기 방제용 조성물은 액상제형, 분말제형 및 입상제형으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나로 제형화되는 것일 수 있다.
- [0030] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 닭진드기 방제용 조성물은 증량제 및 계면활성제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 추가로 포함하여 제형화하는 것일 수 있다.
- [0032] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 계면활성제는 닭진드기 방제용 조성물이 액상제형인 경우 소듐 리그노설포네이트(*Sodium lignosulfonate*), 이소트리데실 알코올 에톡실레이트(*isotridecyl alcohol ethoxylate*) 및 아세틸렌 다이올(*acetylene diol*)으로 구성된 군에서 선택된 어느 하나 이상인 비이온 계면활성제인 것일 수 있다.
- [0034] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 계면활성제는 닭진드기 방제용 조성물이 분말제형 또는 입상제형인 경우 소듐 리그노설포네이트(*Sodium lignosulfonate*) 또는 EO/PO/EO 블록 중합체(*EO/PO/EO block copolymer*)인 비이온 계면활성제인 것일 수 있다.
- [0036] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 증량제는 광물성 분말인 것일 수 있다.
- [0038] 본 발명은 또한 상기 서술한 닭진드기 방제용 조성물을 처리하는 단계를 포함하는 닭진기를 방제하는 방법을 제공할 수 있다.
- [0040] 본 발명은 또한 보베리아 바시아나 (*Beauveria bassiana*) JEF-410 균주 (KFCC11791P) 및 이사리아 푸모소로세아(*Isaira fumosorosea*) JEF150 (KFCC11757P), 상기 균주의 포자 또는 상기 균주의 배양액을 포함하는, 닭진드기 방제용 조성물을 제공할 수 있다.

발명의 효과

- [0041] 본 발명의 보베리아 바시아나 (*Beauveria bassiana*) JEF-410 균주를 이용한 닭진드기 방제방법을 이용하여 닭진드기에 분무처리하는 경우 기존에 보고된 살충용 조성물보다 현저히 높은 방제 효과가 있다. 본 발명의 닭진드기 방제용 조성물은 보베리아 바시아나 (*Beauveria bassiana*) JEF-410 균주를 포자형태로 포함하고 있어, 조성물에 직접적으로 접촉하지 않은 닭진드기에 대하여도 방제효과가 있다. 또한 본 발명의 보베리아 바시아나 (*Beauveria bassiana*) JEF-410 균주 및 이사리아 푸모소로세아(*Isaira fumosorosea*) JEF150 (KFCC11757P)를 이용하여 닭진드기에 처리할 경우 각각을 처리할 때보다 같이 처리 할 때 현저히 높은 방제 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0042] 도 1은 보베리아 바시아나 (*Beauveria bassiana*) JEF-410 균주를 육안으로 관찰한 것(도 1(a)) 및 실체현미경으로 관찰한 균사와 포자의 성장 형태 (도 1(b))를 나타낸 것이다.
- 도 2는 보베리아 바시아나 (*Beauveria bassiana*) JEF-410 균주의 ITS (Internal Transcribed Spacer)의 염기서열을 나타낸 것이다.
- 도 3은 기존에 보고된 균주들과 보베리아 바시아나 (*Beauveria bassiana*) JEF-410 균주의 유연관계를 비교 분석한 결과이다.
- 도 4는 Italian millet을 이용한 보베리아 바시아나 (*Beauveria bassiana*) JEF-410 균주의 포자 생산 (도 4(a)) 및 고체배양생산 과정 (도 4(b))를 나타낸 것이다.
- 도 5는 보베리아 바시아나 (*Beauveria bassiana*) JEF-410 균주의 분리처리에 의한 닭진드기의 살충률 (단반복) (도 5(a)) 및 보베리아 바시아나 (*Beauveria bassiana*) JEF-410 균주에 의해 치사된 닭진기(14일차) (도 5

(b))를 나타낸 것이다.

도 6는 보베리아 바시아나 (*Beauveria bassiana*) JEF-410 균주의 분리처리에 의한 닭진드기의 살충률 (3 반복) (도 6(a)) 및 보베리아 바시아나 (*Beauveria bassiana*) JEF-410 균주에 의해 치사된 닭진드기(14일차) (도 5(b))를 나타낸 것이다.

도 7는 보베리아 바시아나 (*Beauveria bassiana*) JEF-410 균주와 레카니실리움 아테나툼 (*Lecanicillium attenuatum*) JEF 145 또는 이사리아 푸모소로세아(*Isaira fumosorosea*) (KFCC11757P) 균주와의 혼합처리에 의한 닭진드기의 살충률 (도 7)을 나타낸 것이다.

도 8은 보베리아 바시아나 (*Beauveria bassiana*) JEF-410 균주를 이용한 수화제 제조 방법의 모식도로써, 기장에 고체 배양된 보베리아 바시아나 (*Beauveria bassiana*) JEF-410 균주(도 8 (a)), 수확된 보베리아 바시아나 (*Beauveria bassiana*) JEF-410 균주의 포자 (도 8 (b)) 및 상기 수확된 보베리아 바시아나 (*Beauveria bassiana*) JEF-410 균주의 포자 및 증량제, 계면활성제를 혼합을 통합 수화제 제조 (도 8 (c))를 나타낸 것이다.

도 9은 보베리아 바시아나 (*Beauveria bassiana*) JEF-410 균주를 이용한 액상 제형의 제조 방법의 모식도로써, 기장에 고체 배양된 보베리아 바시아나 (*Beauveria bassiana*) JEF-410 균주(도 9 (b)), 수확된 보베리아 바시아나 (*Beauveria bassiana*) JEF-410 균주의 포자(도 9 (b)), 보베리아 바시아나 (*Beauveria bassiana*) JEF-410 균주의 포자와 계면활성제의 혼합물 (도 9 (c)) 및 보베리아 바시아나 (*Beauveria bassiana*) JEF-410 균주의 액상 제형의 제조(도 9 (d))를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0043] 이하 본 발명을 보다 상세히 설명한다.
- [0044] 상술한 바와 같이, 기존 합성 살충제의 저항성 문제와 환경 잔류 문제를 획기적으로 극복할 수 있으며, 기존 식물 추출물의 기반의 살충성분이 닭진드기에 직접적으로 접촉하는 경우에만 방제효과가 나타나는 점을 개선하는 미생물 기반 신규 살충성 진균의 발굴 및 효과적인 닭진드기 관리 시스템의 개발이 요구되고 있다.
- [0046] 본 발명에 따른 보베리아 바시아나 (*Beauveria bassiana*) JEF-410 균주를 이용한 닭진드기 방제용 조성물은 인축에 무해하고, 환경에 안전하며 뛰어난 살충력을 제공하므로, 닭진드기 방제용 조성물로서 효과적이다.
- [0048] 따라서 본 발명은 닭 진드기 방제효과를 가지는 보베리아 바시아나 (*Beauveria bassiana*) JEF-410 균주를 제공한다.
- [0050] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 강원도 정선군에서 토양을 채집하였다. 채집된 토양에 갈색거저리 유충을 처리하였다. 그 결과 토양에 있는 곤충병원성 진균에 의해 치사된 갈색거저리 유충을 확보하였다. 치사된 갈색거저리 유충에서 곤충병원성진균의 단일 균총 (single colony)를 분리하였다 (1/4 Sabouraud dextrose agar, 25±2℃)
- [0052] 본 발명의 다른 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 실시예 1에서 얻은 균주를 시퀀싱하여 최종적으로 보베리아 바시아나 (*Beauveria bassiana*) JEF-410 균주로 동정하였고 (도 2), 기존에 보고된 15종의 보베리아 (*Beauveria*) 속의 균주와 ITS (internal transcribed spacer) 시퀀스의 유연관계를 비교하여 (도 3) 보베리아 바시아나 (*Beauveria bassiana*) JEF-410 균주가 기존의 균주와 유전적인 차이가 있는 신규한 isolate임을 확인하였다.
- [0054] 상기 닭진드기는 와구모 내지 Red Mite라고 불리는 데르마니수스 갈리나에(*Dermanyssus gallinae*)인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0056] 본 발명은 보베리아 바시아나 (*Beauveria bassiana*) JEF-410 균주, 상기 균주의 포자 또는 상기 균주의 배양액을 포함하는 닭진드기 방제용 조성물을 제공한다.
- [0058] 상기 닭진드기 방제용 조성물은 상기 균주의 현탁액을 곡물배지에 접종하여 고체배양을 통해 제조된 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 기장(millet), 쌀(rice), 조(Italian millet), 보리, 콩, 수수, 조, 쌀 및 현미로 이루어진 균으로부터 선택된 1종 이상의 곡물로 이루어진 배지를 사용하는 것이고, 그 중 기장(millet)배지에 접종하여 고체 배양하는 것이 가장 바람직하다(도 4).
- [0060] 본 발명의 상기 닭진드기 방제용 조성물에 있어서, 상기 고체배양은상기 균주의 현탁액을 배지에 접종한 후, 바

람직하게는 20 내지 30℃에서 5일 내지 20일 동안 배양한 후, 실온 조건에서 1 내지 30일 동안 건조할 수 있고, 더욱 바람직하게는 25℃ 조건에서 14일간 배양 후, 실온 조건에서 1일간 건조시키는 것이 바람직하다.

- [0062] 본 발명의 상기 닭진드기 방제용 조성물은 보베리아 바시아나 (*Beauveria bassiana*) JEF-410 균주의 포자를 포함하고 있으므로, 포자가 숙주곤충에 부착한 후 발아하여 진균증 등을 일으켜 살충효과가 나타나게 된다. 또한 이에 직접적으로 접촉한 닭진드기 외에 조성물에 직접적으로 접촉하지 않은 닭진드기라도 포자의 전달로 인해 방제효과가 나타날 수 있다.
- [0064] 본 발명의 상기 닭진드기 방제용 조성물은 액상, 분말 또는 입상제형인 것이 바람직하다. 상기 분말제형은 가루 형태를 의미하며, 상기 입상제형은 고체 배양체를 증량제를 이용하여 증량 대비 1~100 배로 희석한 낱알이나 알갱이 형태를 의미하나 이에 한정되지 않는다.
- [0066] 본 발명의 상기 분말 또는 입상제형은, 닭진드기 방제용 조성물과 계면활성제 및 증량제를 바람직하게는 각각 001~50%, 001~30% 및 1~70%의 증량비율로 혼합하여 제조하며, 더욱 바람직하게는 각각 5 : 5 : 90의 증량비율로 혼합하여 제조하는 것이 바람직하다(도 8, 실시예 7). 만일 계면활성제의 함량이 상기 비율보다 높아지는 경우에는 경제성이 떨어지고 닭진드기로부터 방제용 조성물이 흘러내려 방제 비용 대비 적합한 방제효과를 볼 수 없으며, 상기 비율보다 낮아지는 경우에는 닭진드기에 방제용 조성물이 충분히 부착되지 않아 방제효과가 떨어질 수 있다.
- [0068] 본 발명의 상기 액상 제형은 닭진드기 방제용 조성물과 계면활성제를 각각 0.01~80% 및 0.01~20%의 증량비율로 혼합하고, 물에 1 : 10 내지 1 : 2000의 증량비율로 희석하여 제조하며, 이때 증량제를 전체 증량대비 1 ~ 95%로, 바람직하게는 1 ~ 50%로 첨가할 수 있다. 보다 바람직하게는 닭진드기 방제용 조성물과 계면활성제를 100 : 1으로, 더욱 바람직하게는 2 : 1로 증량비율로 혼합하여 물에 1 : 10 내지 1 : 1000으로, 더욱 바람직하게는 1 : 100 내지 1 : 1000의 증량비율로 희석하여 제조하는 것이 바람직하다(도 9, 실시예 7) 만일 계면활성제의 함량이 상기 비율보다 높아지는 경우에는 경제성이 떨어지고 닭진드기로부터 방제용 조성물이 흘러내려 방제 비용 대비 적합한 방제효과를 볼 수 없으며, 상기 비율보다 낮아지는 경우에는 닭진드기에 방제용 조성물이 충분히 부착되지 않아 방제 효과가 떨어질 수 있다.
- [0070] 본 발명의 상기 계면활성제는 작물보호제에 사용가능한 모든 계면활성제를 의미하며, 그 중 비이온 계면활성제인 것이 바람직하다. 상기 비이온 계면활성제는 폴리카르복실레이트(polycarboxylate), 소듐 리그노설포네이트(Sodium lignosulfonate), 소듐 다이알킬 설포석시네이트(sodium dialkyl sulfosuccinate), 소듐 알킬 설포네이트(sodium alkyl sulfonate), 폴리옥시에틸렌 알킬 페닐 에테르, 소듐 트리폴리포스페이트(sodium tripolyphosphate), 소듐 알킬 아릴 설포네이트(sodium alkyl aryl sulfonate), 이소트리데실 알코올 에톡실레이트(isotridecyl alcohol ethoxylate), 아세틸렌 다이올(acetylene diol), 폴리옥시에틸렌 알킬 페닐 에테르(polyoxyethylene alkyl phenyl ether), 폴리옥시에틸렌 알킬 아릴 포스포릭 에스테르(polyoxyethylene aryl phosphoric ester), 폴리옥시에틸렌 알킬 아릴 에테르(polyoxyethylene alkyl aryl ether), 폴리옥시에틸렌 알킬 아릴 폴리머(polyoxyethylene alkyl aryl polymer), 폴리옥시에틸렌 알킬 아릴 폴리머 스페셜, 폴리옥시알킬은 알킬 페닐 에테르(polyoxyalkylone alkyl phenyl ether), 폴리옥시에틸렌 노닐 페닐 에테르(polyoxyethylene nonyl phenyl ether), 소듐 설포네이트나프탈렌 포름알데히드(sodium sulfonatenaphthalene formaldehyde), EO/PO/EO 블록 중합체(EO/PO/EO block copolymer), 트리톤 100 및 트윈 80 등인 것이 바람직하다.
- [0072] 더욱 바람직하게는 상기 닭진드기 방제용 조성물이 액상 제형인 경우 상기 계면활성제는 소듐 리그노설포네이트(Sodium lignosulfonate), 이소트리데실 알코올 에톡실레이트(isotridecyl alcohol ethoxylate) 및 아세틸렌 다이올(acetylene diol)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상이고, 상기 닭진드기 방제용 조성물이 분말 또는 입상제형인 경우 상기 계면활성제는 소듐 리그노설포네이트(Sodium lignosulfonate) 및 EO/PO/EO 블록 중합체(EO/PO/EO block copolymer)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0074] 본 발명의 상기 증량제는 규조토, 탈크, 석회, 인회석, 돌로마이트(dolomite), 운모(mica), 카올리나이트(kaolinite), 벤토나이트(bentonite) 또는 파이로필라이트(Pyrophyllite) 등의 광물성 분말인 것이 바람직하며, 가장 바람직하게는 파이로필라이트(Pyrophyllite)인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0076] 본 발명은 보베리아 바시아나 (*Beauveria bassiana*) JEF-410 균주는 닭진드기 성충에 진균증을 일으켜 닭진드기 방제에 탁월한 효과를 나타낸다.

- [0078] 본 발명은 또한 상기 서술한 닭진드기 방제용 조성물을 처리하는 단계를 포함하는 닭진기를 방제하는 방법을 제공할 수 있다.
- [0080] 상기 닭진드기 방제용 조성물은 현탁액으로 제조할 수 있다.
- [0082] 상기 닭진드기 방제용 조성물은 접촉 처리, 분무 처리할 수 있으며, 가장 바람직하게는 분무 처리할 수 있다.
- [0084] 본 발명의 상기 현탁액은 닭진드기 방제용 고체 배양체 내지 조성물인 배양된 균주의 포자를 수확하여 세포계산기(hemocytometer)로 계수한 후, 다양한 계면활성제를 이용하여 처리 농도에 맞춰 희석하여 제조하는 것이 바람직하다.
- [0086] 이때, 고체배양 완료 후 포자를 세포계산기(hemocytometer)로 계수하였을 때, 포자수는 1×10^7 포자(conidia)/g 내지 1×10^{10} 포자(conidia)/g 일 수 있으며, 바람직하게는 5×10^8 포자(conidia)/g 내지 5×10^9 포자(conidia)/g 인 것이 바람직하다.
- [0088] 상기 계면활성제의 바람직한 종류는 전술하였는바 그 기재로 대신한다. 현탁액의 처리 농도는 1×10^5 포자(conidia) 내지 1×10^8 포자(conidia)/ml인 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 1×10^7 포자(conidia)/ml인 것이 바람직하다.
- [0090] 본 발명의 상기 닭진드기 방제방법에 있어서, 닭진드기에 분무처리 하는 것은 닭진드기에 100마리당 0.1 내지 10 ml의 현탁액을 뿌리는 것을 의미하며, 바람직하게는 1ml의 현탁액으로 분무처리하는 것이 바람직하다. 상기 용량을 초과하여 현탁액을 처리하는 경우 처리량 대비 방제의 경제성을 확보하기 어려우며, 상기 용량보다 미만으로 현탁액을 처리하는 경우 높은 방제 활성을 보기 어렵다.
- [0092] 본 발명의 보베리아 바시아나 (*Beauveria bassiana*) JEF-410 균주 포자 현탁액을 제조하여 닭진드기 약충에 분무 처리하는 경우, 높은 살충 활성을 보이는 것을 확인하였다 (도 5).
- [0094] 본 발명은 또한 보베리아 바시아나 (*Beauveria bassiana*) JEF-410 균주 (KFCC11791P) 및 이사리아 푸모소로세아(*Isaria fumosorosea*) JEF150 (KFCC11757P), 상기 균주의 포자 또는 상기 균주의 배양액을 포함하는 닭진드기 방제용 조성물을 제공할 수 있다.
- [0096] 본 발명의 보베리아 바시아나 (*Beauveria bassiana*) JEF-410 균주 (KFCC11791P) 및 이사리아 푸모소로세아(*Isaria fumosorosea*) JEF150 (KFCC11757P) 균주를 포자현탁액으로 분무 처리한 경우, 단독으로 처리한 것 보다 닭진드기의 살충효과가 향상되는 것을 확인하였다 (도 6).
- [0098] 상기 닭진드기는 와구모 내지 Red Mite라고 불리는 데르마니수스 갈리나에(*Dermanyssus gallinae*)인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0100] 상기 닭진드기 방제용 조성물은 상기 균주의 현탁액을 곡물배지에 접종하여 고체배양을 통해 제조된 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 기장(millet), 쌀(rice), 조(Italian millet), 보리, 콩, 수수, 조, 쌀 및 현미로 이루어진 균으로부터 선택된 1종 이상의 곡물로 이루어진 배지를 사용하는 것이고, 그 중 기장(millet)배지에 접종하여 고체 배양하는 것이 가장 바람직하다 (도 6).
- [0102] 본 발명의 상기 닭진드기 방제용 조성물에 있어서, 상기 고체배양은 상기 균주의 현탁액을 배지에 접종한 후, 바람직하게는 20 내지 30°C에서 5일 내지 20일 동안 배양한 후, 실온 조건에서 1 내지 30일 동안 건조할 수 있고, 더욱 바람직하게는 25°C 조건에서 14일간 배양 후, 실온 조건에서 1일간 건조시키는 것이 바람직하다.
- [0104] 본 발명의 상기 닭진드기 방제용 조성물은 액상, 분말 또는 입상제형인 것이 바람직하다. 상기 분말제형은 가루 형태를 의미하며, 상기 입상제형은 고체 배양체를 증량제를 이용하여 중량 대비 1~100 배로 희석한 낱알이나 알갱이 형태를 의미하나 이에 한정되지 않는다.
- [0106] 본 발명은 또한 보베리아 바시아나 (*Beauveria bassiana*) JEF-410 균주 (KFCC11791P) 및 이사리아 푸모소로세아(*Isaria fumosorosea*) JEF150 (KFCC11757P)의 비율은 10:1 내지 1:10 일 수 있고, 바람직하게는 5:1 내지 1:5일 수 있으며, 가장 바람직하게는 1:1일 수 있다.
- [0108] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0110] 실시예 1. 균주의 분리 및 동정

[0111] 1-1. 균주의 분리

[0112] 본 발명자들은 다음과 같은 조건에서 토양 샘플에서 곤충병원성 진균을 분리하였다. 채집된 토양 20 g 에 1차 증류수 5 ml을 처리 후 갈색거저리 유충을 토양에 방사하였다. 그 결과 갈색거저리 유충이 치사된 후 진균의 균사가 층체에서 관찰되었다. 층체에서 균사를 분리하여 25±2℃ 조건에서 1/4 SDA(Sabouraud dextrose agar)에 배양하였다.

[0114] 1-2. 분리된 균주의 생육 및 형태

[0116] 보베리아 바시아나 (*Beauveria bassiana*) JEF-410 균주가 배양된 agar block을 Sabraud Dextrose Agar (SDA)에 옮겨 2일간 배양(25℃, dark)한 후 육안관찰 및 광학현미경 (400 배)에서 관찰하였다 (도 1). 보베리아 (*Beauveria*)속 균주의 전형적인 특징인 흰색 포자 및 포자 형성 방법이 관찰되었다.

[0117]

[0118] 실시예 2. 실시예 1의 보베리아 바시아나 (*Beauveria bassiana*) 균주의 DNA 시퀀싱

[0120] 본 발명은 실시예 1의 보베리아 바시아나 (*Beauveria bassiana*)를 동정하였다. 구체적으로 다음과 같은 조건에서 PCR을 진행하였다. 94℃에서 5분, 94℃ 60초, 62℃ 30초, 72℃ 30초를 30회 실시하였고, 최종적으로 72℃에서 3분간 후처리(post maturation) 시켰다. 서열은 하기 표 1의 β-튜블린 프라이머를 이용하여 진행되었다. PCR 산물은 0.8% agarose gel 및 Eco dye를 사용하여 140 V로 25분간 전기영동하였다. 최종적으로 얻어진 산물을 시퀀싱하여 최종적으로 *B. bassiana*로 동정되었다 (도 2). 본 발명자들은 실시예 1의 보베리아 바시아나 (*Beauveria bassiana*)를 보베리아 바시아나 (*Beauveria bassiana*) JEF-410 균주로 명명하였다. 보베리아 바시아나 (*Beauveria bassiana*) JEF-410 균주의 β-튜블린 서열은 서열번호 3번으로 기재하였다. 더불어 기존에 알려진 *Beauveria* 속 균주들과 유연관계를 확인하고자, 미국 국립생물정보센터(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에 보고되어 있는 15 종의 *Beauveria* 속 균주의 β-tublin 서열을 *Beauveria* JEF-410과의 유연관계를 비교하였다 (도3). 분석 결과, 기존에 알려진 균주들과 유전적인 차이가 있는 것으로 확인되었다.

표 1

프라이머	방향	서열	서열목록 번호
ITS (internal transcribed spacer)	정방향	5'-CCG TAG GTG AAC CTG CGG-3'	1
	역방향	5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'	2

[0124] 실시예 3. 기장 (Millet)을 이용한 고체배양조건에서의 포자 생산

[0126] 배양용 polyvinyl bag에 기장(millet) 200 g씩 넣은 후, 50% citric acid 0.16 ml을 추가로 처리하였다. Microwave를 5분간 처리하여 수분이 충분히 millet에 흡수되도록 하였다. Polyvinyl bag의 입구 부분은 원활한 산소공급을 위해 종이킵과 멸균 거즈를 이용하여 제조하였다. Millet이 담긴 polyvinyl bag은 121℃ 조건에서 15 min 간 멸균되었다. 상온에서 냉각 후, *B. bassiana* JEF-410 균주현탁액 (1x10⁷ conidia/ml)을 1 ml 씩 polyvinyl bag에 접종하였다. 25℃ 조건에서 14일간 배양 후, 실온 조건에서 1일간 건조 시킨 각 균주의 포자를 최종 생산하였다 (도 4).

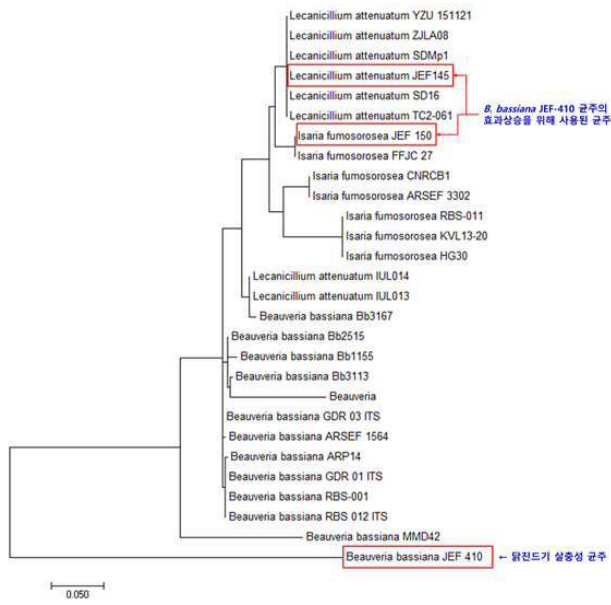
[0128] 실시예 4. 보베리아 바시아나 (*Beauveria bassiana*) JEF-410 균주의 닭진드기에 대한 방제 효과

[0130] 기장 (Millet)에 배양된 *B. bassiana* JEF-410 을 이용하여 포자 현탁액 (1x10⁷ conidia/ml) 조제한 후 닭진드기 약충에 분무 처리하였다. 25℃ 조건에서 분무 7일차에 생충수와 사충수를 조사하였다. 실험 결과 JEF-410 경우 처리 후 3일차 경과 하였을 때 0.03% silwet을 분무처리한 negative control 보다 50%이상의 빠른 살충률을 확인할 수 있었으며, 처리 5일차에 95% 이상의 살충효과를 보였으며, 이는 기존 화학약제 처리구보다 높은 살충효과를 보였다 (도 5). 따라서 본 결과를 바탕으로 *B. bassiana* JEF-410 균주가 다른 *B. bassiana* 균주에 비해 닭진드기에 높은 살충활성을 보인다고 판단되었으며, 저항성을 보이는 화학약제보다 적용가능성이 높은 것으로 추정되었다.

[0132] 실시예 5. 보베리아 바시아나 (*Beauveria bassiana*) JEF-410 균주의 닭진드기에 대한 방제 효과

- [0134] 기장 (Millet)에 배양된 *B. bassiana* JEF-410 을 이용하여 포자 현탁액 (1×10^7 conidia/ml)을 조제한 후 닭진드기 약충에 분무 처리하였다. 25°C 조건에서 분무 10일차에 생충수와 사충수를 조사하였다. 실험 결과 JEF-410 균주 처리 5일차에 0.03% silwet을 분무 처리한 negative control 보다 50%이상의 빠른 살충률을 확인할 수 있었으며, 처리 10일차에 100% 의 살충효과를 보였다. 이는 기존 화학약제 처리구보다 높은 살충효과를 보였다 (도 6). 따라서 본 결과를 바탕으로 *B. bassiana* JEF-410 균주가 다른 *B. bassiana* 균주에 비해 닭진드기에 높은 살충활성을 보인다고 판단되었으며, 저항성을 보이는 피레스로이드계 화학약제 (alpha cypermethrin)보다 적용 가능성이 높은 것으로 추정되었다.
- [0136] 실시예 6. 보베리아 바시아나 (*Beauveria bassiana*) JEF-410 균주와 레카니실리움 아테나툼 (*Lecanicillium attenuatum*) JEF 145 또는 이사리아 푸모소로세아 (*Isaria fumosorosea*) JEF150 (KFCC11757P) 균주와의 혼합처리군의 닭진드기에 대한 방제 효과(분무 처리)
- [0138] 기장 (Millet)에 배양된 *B. bassiana* JEF-410, *L.attenuatum* JEF 145, *I.fumosorosea* JEF150 을 이용하여 두 가지 조건으로 포자현탁액을 분무처리하였다. 첫 번째로 단일 균주의 처리구의 경우 포자 현탁액 (1×10^7 conidia/ml) 조제한 후 닭진드기 약충에 분무 처리하였다. 두 번째로 혼합 균주의 처리구의 경우 포자 현탁액 (2×10^7 conidia/ml)을 조제한 후 JEF-410 + JEF-145 (1:1) 또는 JEF-410 +JEF-150 (1:1) 조건으로 혼합하여 닭진드기 약충에 최종 1×10^7 conidia/ml 농도로 처리되도록 분무하였다. 25°C 조건에서 분무후 매일 생충수와 사충수를 조사하여 8일차까지 진행하였다. 실험 결과 *B. bassiana* JEF-410과 *Isaria fumosorosea* JEF-150과의 혼합처리에서 처리 2일차부터 6일차까지 살충효과의 상승을 확인하였다 (도 6). 2일차 생충율은 JEF-410은 53.2%, JEF-150은 81.4%를 보였으나, JEF-410+JEF-150 혼합처리의 경우 35.9%로 JEF-410 단일균주 처리보다 월등히 낮은 생충율을 보였다. 4일차 생충율은 JEF-410은 39.4%, JEF-150은 67.3%를 보였으나, JEF-410+JEF-150 혼합처리의 경우 22.6%로 JEF-410 단일균주 처리보다 낮은 생충율을 보였다. 마지막으로 6일차 생충율은 JEF-410은 22.5%, JEF-150은 44.1%를 보였으나, JEF-410+JEF-150 혼합처리의 경우 17.1%로 JEF-410 단일균주 처리보다 낮은 생충율을 보였다. 따라서 본 결과를 바탕으로 *B. bassiana* JEF-410 균주를 *I.fumosorosea* JEF150 균주와 혼합 처리할 경우, 살충효과가 향상되는 사실을 확인하였다. 그러나 *B. bassiana* JEF-140과 *L. attenuatum* JEF-145와 혼합처리에 의한 상승효과는 확인되지 않았다 (데이터 제시않음).
- [0140] 실시예 7. 보베리아 바시아나 (*Beauveria bassiana*) JEF-410 수화제 및 액상 제형 제조.
- [0142] 수화제 제조는 하기 과정을 통해 제조 되었다. 기장 (millet)을 이용하여 진행된 JEF-410 균주의 고체배양체에서 포자가 수확되었다 (도 8(A), (B)). 확보된 포자 분말 (원제), 증량제 (pyrophyllite) 그리고 계면활성제를 90 : 5 : 5의 중량비로 혼합하였다 (도 8(C)). 300 mesh 이하의 분말 입도를 확보하기 위해 sieve를 이용하여 filtering 과정을 진행하였다. 액상 제형 제조는 다음 과정을 통해 제조 되었다. 기장 (millet)을 이용하여 진행된 JEF-410 균주의 고체배양체에서 포자가 수확되었다 (도 9(A), (B)). 확보된 포자 분말 (원제) 와 계면활성제 (surfactant)를 약 2 : 1 중량비로 혼합하였다 (도 9(C)). 미세한 분말 입도를 확보하기 위해, sieve를 이용하여 미세 분말을 확보하였다. 확보된 미세분말을 물에 희석하여 농축된 액상 제형을 제작하였다 (도 9(d)).
- [0144] [수탁번호]
- [0146] 기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국내)
- [0147] 수탁번호 : KFCC11791P
- [0148] 수탁일자 : 20180829
- [수탁번호]
- 기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국내)
- 수탁번호 : KFCC11757P
- [0149] 수탁일자 : 20171215

도면3

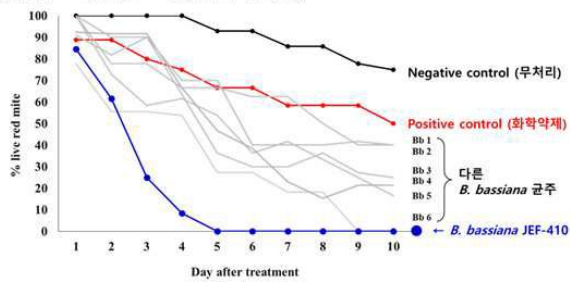


도면4



도면5

(A) 닭진드기 살충효과 (단반복 실험)

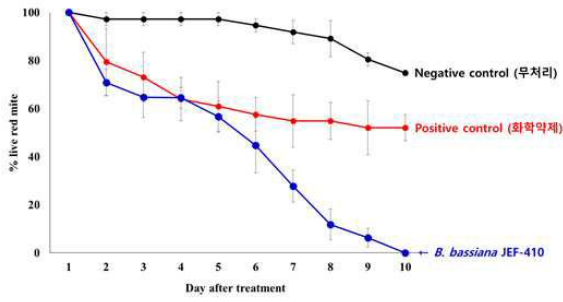


(B) 처리 14일차 후 치사된 닭진드기



도면6

(A) 닭진드기 살충효과 (3반복 실험)

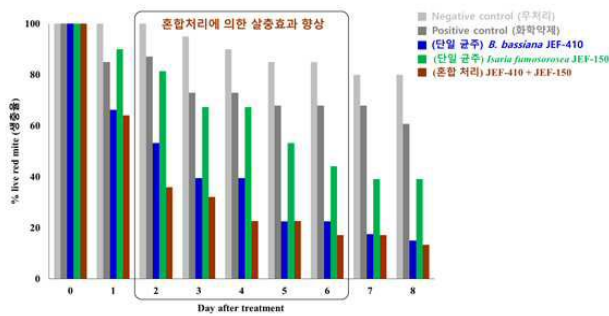


(B) 처리 14일차 후 치사된 닭진드기



도면7

2종의 균주 혼합처리에 의한 닭진드기에 대한 살충효과의 상승



처리 2-6일차 시기에 닭진드기 살충효과 상승효과 확인

- 2일차 생존율 : (단일균주) JEF-410: 53.2%, JEF-150: 81.4% → (혼합처리) JEF-410+JEF-150: 35.9% → 상승효과
- 4일차 생존율 : (단일균주) JEF-410: 39.4%, JEF-150: 67.3% → (혼합처리) JEF-410+JEF-150: 22.6% → 상승효과
- 6일차 생존율 : (단일균주) JEF-410: 22.5%, JEF-150: 44.1% → (혼합처리) JEF-410+JEF-150: 17.1% → 상승효과

도면8



도면9

