

완결과제 최종보고서

일반과제(○), 보안과제()

(과제번호 : PJ009979)

국내 토착 미생물 자원을 이용한 병해충 복합방제제 개발

(Development of microbial pesticide for simultaneous control of both insect pest and disease with domestic microorganism)

국립농업과학원

연구수행기간

2014.02. ~ 2016.12.

농촌진흥청

제 출 문

농촌진흥청장 귀하

본 보고서를 “국내 토착 미생물 자원을 이용한 병해충 복합방제제 개발에 관한 연구”
(개발기간 : 2014.02.01. ~ 2016.12.31.) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

제1세부연구과제 : 유용미생물의 병해충 동시방제 효능 검정 및 기작 구명 연구

제2세부연구과제 : 병해충 동시방제 가능 미생물의 배양 및 특성 구명 연구

2017.02.28.

제1세부/협동연구기관명 : 국립농업과학원

제1세부/협동연구책임자 : 한지희

참 여 연 구 원 : 이상엽, 신태영

제2세부/협동연구기관명 : (주)한국바이오케미칼

제2세부/협동연구책임자 : 강훈석

참 여 연 구 원 : 강재곤, 박창석, 박정찬, 이영의, 정윤우

주관연구책임자 : 한지희

주관연구기관장 : 국립농업과학원장



농촌진흥청 농업과학기술 연구개발사업 운영규정 제51조에 따라 보고서
열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제번호	PJ009979		연구기간	2014.02.01. ~ 2016.12.31. (35개월)	
연구사업명	단위사업명	현장실용화농업기술			
	세부사업명	친환경안전농축산물생산기술			
	내역사업명	친환경미생물농자재현장적용기술개발			
연구과제명	주관과제명	국내 토착 미생물 자원을 이용한 병해충 복합방제제 개발			
	세부(협동) 과제명	(1세부)유용미생물의 병해충 동시방제 효능 검증 및 기작 구명 연구 (1협동)병해충 동시방제 가능 미생물의 배양 및 특성 구명 연구			
연구책임자	구분	연구기관		소속	성명
	1세부	국립농업과학원		농업생물부	한지희
	1협동	(주)한국바이오케미칼		연구소	강훈석
총 연구기간 참여 연구원 수	총: 9 명 내부: 4 명 외부: 5 명		총 연구개발비	정부: 360,000 천원 민간: 60,000 천원 계: 420,000 천원	
위탁연구기관명 및 연구책임자			참여기업명	(주)한국바이오케미칼	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
○ 진딧물 및 식물병원균에 대한 우수한 살충 및 살균 활성을 동시에 보이는 3종의 균주를 실내 스크리닝을 통해 선발함 - 진딧물 및 균핵병균 동시방제용 뷰베리아 바시아나 Bb18 - 진딧물 및 갈록병균 동시방제용 이사리아 자바니카 Pf185 - 진딧물, 갈록병균 및 고추 탄저병균 동시방제용 이사리아 푸모 소로세아 Pf212 ○ 살균활성 균주와 살충활성 균주의 배양적 특성을 구명하여 시제품 생산을 위한 정보를 취합함 ○ 살균, 살충 균주를 이용하여 액상, 유상, 분말수화제 제형을 완성하였으며 안정성이 우수한 분말수화제 제형을 이용하여 시제품을 완성함 ○ 완성된 뷰베리아 바시아나 Bb18 수화제 시제품을 이용하여 오이의 목화진딧물 및 균핵병원균에 대한 방제 효과를 실내 및 실외 실험을 통해 입증함				보고서 면수	

〈 국 문 요 약 문 〉

연구의 목적 및 내용	살충·살균활성이 우수하고 안전성 및 안정성이 확보된 병해충 동시방제 다기능성 미생물 방제제 개발 및 기작 구명				
연구개발성과	<p>○ 우수한 살충 및 살균 활성을 동시에 보이는 아래와 같은 3종의 균주를 선발함</p> <ul style="list-style-type: none"> - 진딧물 및 균핵병균 동시방제용 류베리아 바시아나 Bb18 - 진딧물 및 갈록병균 동시방제용 이사리아 자바니카 Pf185 - 진딧물, 갈록병균 및 고추 탄저병균 동시방제용 이사리아 푸모소로세아 Pf212 <p>○ 진딧물 및 균핵병원균 동시방제용 류베리아 바시아나 Bb18 수화제를 이용하여 오이의 목화진딧물 및 균핵병원균에 대한 방제 효과를 실내 및 실외 실험을 통해 입증함</p> <p>○ 류베리아 바시아나 Bb18의 내생활성에 의한 살충활성 그리고 항균활성 물질에 의한 살균활성 기작을 현미경적 그리고 분자생물학적 방법을 통해 구명함</p> <p>○ 우수한 살균활성을 가진 미생물 4종을 선발하여 기탁하였으며(KCTC18312P, KCTC18330P, KCTC18385P, KCTC18386P), 살균활성 균주와 살충활성 균주의 배양적 특성을 구명함</p> <p>○ 살균, 살충 균주를 이용하여 액상, 유상, 분말수화제 제형을 완성하였으며 안정성이 우수한 분말수화제 제형을 이용하여 시제품을 완성함</p>				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<p>○ 친환경농업자재로 공급되어 작물 생산성을 향상시켜 농가 소득 증대에 기여할 것임</p> <p>○ 새로운 미생물 원료를 확보함으로써 천연식물보호제 개발을 위한 새로운 부가가치를 창출 할 수 있을 것이다.</p>				
중심어 (5개 이내)	친환경	병해충	미생물	곤충병원균	동시방제

〈 Summary 〉

Purpose& Contents	The research aims to develop eco-friendly biocontrol control materials which can simultaneously control against both insect pest and plant pathogen. To accomplish this study we selected several isolates having both insecticidal and anti-microbial activity and selected isolate was evaluated their control effects on both insect pest and plant pathogen in laboratory and greenhouse conditions and investigated their mode of actions against both insect and pathogen.				
Results	<p>○ Three isolates having both insecticidal and anti-microbial activity are as follows:</p> <ul style="list-style-type: none"> – <i>Beauveria bassiana</i> Bb18 against aphid and <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> – <i>Isaria javanica</i> Pf185 against aphid and <i>Pythium ultimum</i> – <i>Isaria fumosorosea</i> Pf212 against aphid, <i>Pythium ultimum</i> and <i>Colletotrichum acutatum</i> <p>○ We evaluated the entomopathogenic fungal persistence and controlling effects on both cotton aphid and sclerotinia rot in laboratory and greenhouse conditions, and showed high control efficacy.</p> <p>○ <i>Beauveria bassiana</i> Bb18 showed insecticidal activity through exophytic activity on plant and could exhibit antimicrobial substances against plant pathogen.</p> <p>○ Four microbial isolates (KCTC18312P, KCTC18330P, KCTC18385P, KCTC1836P) showing strong antifungal activity were selected and deposited to KCTC and investigate the cultural characteristics.</p> <p>○ Isolates showing fungicidal and insecticidal activity successfully formulated in liquid, oil, and powder form. The prototype was developed stable powder type for commercialization.</p>				
Expected Contribution	<p>○ The developed products will be used as eco-friendly agricultural materials and are expected to enhance the agricultural productivity as well as farm income.</p> <p>○ The research results on the new microbial resources can be contributed to company which try to develop eco-friendly agriculcultural material or biopesticide based on the selected isolate.</p>				
Keywords	environmentally-friendly	pest and pathogen	micro organism	entomopathogen	dual control

〈 목 차 〉

제 1 장	연구개발과제의개요	1
제 2 장	국내외 기술개발 현황	3
제 3 장	연구수행 내용 및 결과	5
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	101
제 5 장	연구결과의 활용계획 등	103
제 6 장	연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	104
제 7 장	연구개발성과의 보안등급	105
제 8 장	국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비현황	106
제 9 장	연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	107
제 10장	연구개발과제의 대표적 연구실적	108
제 11장	기타사항	110
제 12장	참고문헌	111

제 1 장 연구 개발 과제의 개요

제1절 연구 개발 목적

20세기 산업화과정에서 농업노동력 부족, 경제성장과 인구 증가에 따른 식량부족사태 등으로 다수확을 목표로 화학비료와 유기합성농약에 의존한 농업으로 일관됨에 따라 화학비료와 유기합성농약의 폐해가 전 세계적으로 나타나기 시작하여 농업의 지속가능성이 위협받게 되고 지구환경보전의 필요성이 전면으로 대두되었고 아울러, 심각한 환경오염문제와 함께 식물의 안전성에 대한 소비자들의 요구가 팽배한 가운데 세계무역기구출범으로 농산물시장 개방에 따른 경쟁력 확보차원에서 친환경농업이 그 대안으로 자리 잡고 있다(Backman & Sikora, 2008; Chandler et al., 2008).

OECD 회원국을 중심으로 유기합성농약의 생산량을 2013년까지 현 수준의 40%로 감축하는 규제책이 진행됨에 따라 우리나라도 새로운 농약대체방제 기술개발이 시급하나 이에 대한 연구는 기대에 못 미치는 수준이다. 따라서 유기합성농약의 대체제 확보, 인축·환경독성 문제해결 및 친환경 농산물 생산을 위한 확실한 대안으로 생물농약의 개발에 많은 관심이 집중되고 있다(Erkol et al., 2011; Baker & Cook, 1974; Campbell, 1989; Morang et al., 2013; Kim et al., 2014; Lee et al., 2011; Park et al., 2012; Soh et al., 2014; Yoo et al., 2012).

국내 친환경농산물의 비중은 매년 평균 14.6% 이상 성장해갈 것으로 예상되며 이에 따라 유기재배 등 친환경농산물 재배에 필수적인 생물농약의 생산과 사용도 매년 큰 폭으로 증가하는 추세에 있다(김, 2009; 한국기술은행, 2006). 그러나, 지난 20년 동안 연령별 농가인구 중 20~49세의 비율은 지속적으로 감소하는 반면 65세 이상의 비율은 급격하게 증가하는 노령화로 인해 노동력 투입 효율을 매우 부족한 실정이며 생력화 재배 기술을 통한 생산비 절감으로 재배 효율을 증가시키기 위한 다양한 방법 개발이 시급한 과제이다. 따라서 미생물을 이용한 병해충 동시 방제제 개발은 유기합성 농약의 오·남용 폐해를 줄일 수 있으며 병해충을 동시에 방제함으로써 농작업의 생력화를 위해 반드시 필요한 연구이다(De Faria and Wraight, 2007; Ahmad and Arif, 2008; Cui et al., 2016).

그리하여 본 연구에는 친환경 안정 농산물의 생산을 위하여 목적 해충 및 병원균에 살충 및 살균 활성이 우수하고 안전성 및 안정성이 확보된 병해충 동시방제 다기능성 미생물을 선발하여 이용가능성을 파악하고자 하였다(Zimmermann, 2007a; 2007b).

최종적으로 난방제 병·해충의 종합적 관리를 위해 사용될 수 있는 친환경 미생물 농자재를 개발하고자 하였다.

제2절 연구 개발의 필요성

국내 생물농약시장은 비약적인 발전을 거듭하고 있으나 대부분의 생물농약이 항생물질에 근거한 살균제와 미생물 *Bacillus thuringensis*를 이용한 살충성 BT제가 대부분인 실정으로 2011년 국내 등록된 천연식물보호제(생물농약)는 총 35종으로 살균제가 21종, 살충제가 13

중, 제초제가 1종으로 등록되어있다(농촌진흥청, 2011).

기존 천연식물보호제(생물농약)의 경우 화학농약 대비 2~3배 비싼 가격과 화학농약에 비해 낮은 방제가 등의 문제로 인해 시장에서 외면 받고 있어 이를 해결해야할 대책이 반듯이 필요한 상황이다. 또한 일부 생물농약의 경우 유효성분의 안정성 확보를 위한 유통상의 문제점 등이 발생하는 등 이를 해결하기 위한 제제화 기술 개발이 반듯이 병행되어야 할 것이다.

특히, B.T제로 대표되고 있는 미생물 살충제의 한계에서 벗어나기 위한 새로운 살충 미생물의 탐색과 이들의 배양적 특성규명이 이루어진 개발이 절실한 실정이다.

현재, 국내 생물농약 개발 분야는 대량 발효 공정 기술 및 제형화 기술이 부족한 실정으로 신속히 해결해야 할 과제이다. 따라서, 사회적 시선과 농업노동력 문제를 해결하기 위하여 안전성과 안정성이 확보되고 다기능의 방제 능력을 가진 새로운 미생물 제제의 개발이 필요하다.

제3절 연구 개발 범위

1. 제1세부과제

본 연구에서는 오이 및 가지 등 시설 작물에 발생하는 병·해충에 동시 방제 가능한 곰팡이류를 선발하여 실내 및 실외에서 방제 효능을 검정하여 새로운 병·해충 동시 방제제를 제시하고, 목적 병·해충에 대한 방제 기작을 구명함으로써 선발 곰팡이균의 이용에 대한 기초 자료를 제공하는 것이다.

2. 제2세부과제

본 연구는 신규 활성 미생물의 발굴 및 이들 미생물과 기존 보유 미생물의 배양특성 규명하며 이들 미생물들이 농업현장에서 안전하게 사용 될 수 있도록 인축독성과 환경독성 시험을 통한 안전성 확보한다. 또한 안정성이 확보된 제형 연구를 통해 친환경 유기농업자재를 개발하는 것이다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제1절 국내 연구 현황

국내에서는 1980년대 인삼 뿌리 썩음병의 생물학적 방제연구를 시작으로 고추역병, 오이, 딸기 시들음병, 참깨 모잘목병과 잣빛곰팡이병의 생물학적 방제에 관한 연구가 지속적으로 수행되어 왔으나 생물농약등록결과를 보면 지상부 방제제에 치우쳐 있는 경향이 두드러져 있다. 미생물농약으로 개발되기 위해 특허 등록된 세균류에는 *Bacillus subtilis*, *Penibacillus polymixa*, *Bacillus amyloliquifaciens*, *Pseudomonas aureofaciens*, *Enterobacter cloacae* 및 항진균물질을 분비하는 *Streptomyces* 속등이 있으며, 곰팡이류는 *Trichoderma harziaum*, *Penicillium* sp. *Aspergillus* sp. *Monacrosporium thaumacium* 등의 균주가 이용되고 있거나 개발 중에 있다(Gal, 1992; Tweddell et al., 1994; Madi et al., 1997; Tsahouridou & Thanassouloupoulos, 2002; Chag. et al., 2006).

국내 생물농약의 개발은 한국화학연구원과 생명공학연구원, 농업과학기술원 등의 연구소와 (주)한국바이오케미칼, (주)동부한농, (주)그린바이오텍 등의 기업체에서 연구가 진행되어 왔으며 현재까지 천연식물보호제는 살균제가 21개 품목, 살충제가 13개 품목, 제초제가 1품목으로 등록되어 시판되고 있다. 이들 제품 중 21품목의 미생물살균제 중 15개 제품은 국내에서 제조되었으며, 6개의 제품은 수입되었다. 미생물 살충제의 경우에는 6개 제품이 국내에서 개발되었고, 6개 제품은 수입 제품이며 생화학농약으로 1 품목이 수입되어 등록되었다(김, 2009; Rimando & Duke, 2006).

제2절 국외 연구 현황

국외의 생물농약 개발은 대기업보다는 벤처기업이나 중소기업들이 주도적으로 시장을 선도하고 있다. 전세계적으로 110여개 회사들이 생물농약 사업을 펼치고 있으며 이중 연간 3천만불이상 매출 규모의 회사로는 Verdera OY사, Ceris USA사, AgraQuest사 등이 있다.

현재 미국 EPA에는 76개의 미생물농약과 113개의 생화학농약이 등록되어 있으며(2004, 농약연찬회). 유럽의 경우에는 미생물농약이 112개가 등록되어 시판되고 있으며, 천연물 농약은 58개가 등록되어 있다(Copping & Menn, 2000). 외국에서 개발되어진 "BINAB T", "MYCOSTOP" 등 최소한 10 종류가 이미 국내에 소개되었으며 향후 미생물농약과 생화학농약에 대한 연구, 개발은 꾸준히 증가 할 것으로 예상된다.

생물농약 개발은 대기업보다는 주로 벤처기업이나 중소기업들이 주도적으로 시장을 선도하고 있고, 전 세계적으로 약 110여개의 회사들이 생물농약을 개발, 판매하는 것으로 알려져 있다. 이들 중에서 연간 3천만 불 이상 매출의 비교적 큰 규모의 미생물농약 회사로는 Verdera OY사(미생물 농약 시장의 5%), Certis USA사 (미생물 농약 시장의 6%), AgraQuest사 (미생물 농약 시장의 6%) 등이 알려져 있다. 2010년 매출액 기준으로 *B. thuringiensis*를 기반으로 한 Bacterial 미생물 농약은 전체 시장의 80%를 차지하였다.

Faria와 Wraight (2007)는 2007년 현재 80여 개국 이상에서 171 품목의 곰팡이 이용

미생물 살충제가 개발 등록되어 있으며, 이들 품목 중 43%가 남미의 회사 또는 연구소에서 개발되었고, 그 외에 미국, 유럽 등에서 개발된 제품이 대부분이라고 보고하였다. 네덜란드와 캐나다의 연구 중 곤충병원성 곰팡이로 알려진 곰팡이 균주 중 일부가 오이 흰가루병 방제에 효과가 있다고 보고되어 있으며, 캐나다에서 분리된 곤충병원성 곰팡이 *Verticillium lecanii* 한 균주는 감자수염진딧물과 흰가루병 모두에 방제효과가 있는 것으로 보고하였다(Shah and Pell, 2003; Kim et al., 2010; Ownley et al., 2010).

제 3 장 연구 수행 내용 및 결과

제1절 유용미생물의 병해충 동시방제 효능 검정 및 기작 구명 연구

1. 재료 및 방법

가. 살충활성이 우수한 균주선발

(1) 곤충병원성 곰팡이의 접종액 준비

(가) 곰팡이 배양 및 분생포자 현탁액

진딧물 및 식물 병원성 곰팡이를 동시 방제 가능한 균주 선발을 위하여 *Beauveria bassiana* 등 11균을 Potato dextrose agar에서 25℃에서 10~15일 간 배양한 후, 포자를 생성 시킨 후 실험에 이용하였다. 포자 현탁액은 PDA에서 생성된 분생포자를 0.05% Tween-80 solution에 현탁하여 hemocytomer를 이용하여 포자를 개수하여 실험에 사용하였다.

(나) 배양액 및 배양여액

액체 배양액은 균을 Potato dextrose broth 및 AD 배지에 균을 접종한 후, 25℃, 200 rpm에서 3일 간 배양하였고, 4겹의 거즈로 여과한 시료를 배양액 그리고 그 배양액을 필터페이퍼와 시린지필터로 여과하여 포자를 제거한 시료를 배양여액이라 칭하고 이를 실험에 이용하였다.

(2) 곤충병원성 곰팡이의 생물검정

준비된 포자현탁액 또는 배양여액 1 ml을 동일 age의 성충 진딧물 20마리가 들어 있는 60 mm leaf disc에 spray tower로 살포하였고, 진딧물의 살충율을 매일 조사하여 진딧물에 대한 고병원성 균주를 선발하였다.

나. 항균활성이 우수한 균주 선발

(1) 식물병원성 균주

균핵병(*Sclerotinia sclerotiorum*), 잿빛곰팡이병(*Botrytis cinerea*), 검은무늬병(*Alternaria brassicae*), 탄저병(*Collectotrichum acutatum*), 가지 시들음병(*Fusarium oxysporum*) 등 식물병원성 곰팡이는 PDA에서 배양하면서 실험에 사용하였다.

(2) 항균활성 검정 - 대치배양

진딧물 방제와 식물병원성 곰팡이를 죽이거나 성장을 억제할 수 있는 균주 선발을 위해, 곤충병원성 곰팡이와 식물병원성 곰팡이를 PDA배지에 대치 배양하여 식물병원성 곰팡이의 균사 성장 억제능을 측정하였다.

(3) 항균활성 검정 - 경쟁활성

식물 병원성 곰팡이 현탁액 0.5 ml (10^5 spores/ml)을 PDA 배지에 살포 후 곤충병원성 곰팡이 포자 현탁액을 2일 후 살포하여 각 곰팡이 종류와 균총 형성수를 조사하여 균의 성장 억제력을 조사하였다.

다. 시제품(수화제)의 실내 검정

(1) 살충활성검정

(가) 진딧물의 접종

2엽기의 오이에 동일 성충 진딧물 20마리를 접종 한 후, 4시간 동안 진딧물이 오이 잎에 정착되도록 하였다.

(나) 수화제의 및 *Beauveria bassiana* Bb18포자현탁액의 준비

시제품 수화제(3×10^7 CFU/ml, 주성분 *Beauveria bassiana* Bb18)는 한국바이오케미칼에서 제공받아 사용 하였으며, 실험 1시간 전 물을 이용하여 100배 500배 희석하였다. 생물검정의 대조구로 사용된 Bb18 균 자체는 PDA에서 10일간 배양하면서 생성된 분생포자를 0.05% Tween-80 solution에 현탁시켜 수화제 균 밀도와 동일하게 밀도를 맞추어 실험에 사용하였다.

(다) 생물검정

20마리의 목화진딧물 성충이 접종된 오이에 주당 5 ml의 시료(수화제 희석액 및 Bb18 포자현탁액)을 살포하였고, 1시간 동안 말린 후, 25℃, 포화습도에 가까운 조건에다 둔 후, 매일 살충율 및 산자수를 조사하였다.

(2) 항균활성검정

(가) 균핵병원균의 준비 및 접종

균핵병원균(*Sclerotinia sclerotiorum*)은 PDA배지에서 20℃, 48시간 배양하여 실험에 이용하였고, 균사절편(5 mm)를 실험을 위한 접종원으로 사용하였다.

(나) 생물검정(오이 잎 이용)

아크릴 케이지(22 × 22 × 2 cm)에 2겹의 휴지를 이용하여 습실 처리하였고, 동일한 나이 및 크기의 오이 잎을 아크릴 케이지에 둔 후, 균핵병원균 균사절편을 접종하였다. 균핵병원균 접종 4시간 후, 수화제 100배, 250배, 500배 희석액 또는 Bb18 포자현탁액($1 \times 10^{4-8}$ conidia/ml)을 5 ml/잎 당 spray하였고 실온에서 1시간 동안 말렸다. 수화제 처리 4시간 후, 균핵병원균을 시료 처리된 오이 잎에 접종하고, 20℃에서 12 h: 12 h 광·암 조건으로 배양하면서 72시간 후 병반의 크기를 조사하였다.

(다) 생물검정(전체 잎 이용)

실험에 사용된 수화제 및 Bb18 포자현탁액은 위와 같이 준비하여 사용하였다. 균핵병원균 균사절편을 2엽기의 오이 잎 각각에 접종하였고, 4시간 후, 수화제를 주당 5 ml 살포하여 균핵병원균의 병반 크기를 매일 조사하였다.

라. 시제품(수화제)의 실외 검정

(1) 목화진딧물 밀도 억제율

(가) 진딧물의 접종

하우스에서 다른 해충의 유입 없이 자란 6엽기의 오이에 잎 당 3마리의 동일 성충의 목화진딧물을 접종하였고, 4시간 동안 목화진딧물이 정착되게 한 후 실험에 이용하였다.

(나) 시료의 처리 및 검정

수화제는 살포 1시간 전 물을 이용하여 100배 그리고 500배 희석하였다. 희석된 수화제는 잎당 10 ml 살포 하였으며, 한 처리구는 1회 처리 다른 처리구는 일주일 간격으로 2회 처리하였다. 진딧물의 밀도변화율은 2일 간격으로 잎 당 진딧물의 수를 조사하였다. 실험은 처리구당 3주의 오이를 사용하였다.

(2) 해충유입 억제율

(가) 작물

실험에 사용된 작물은 하우스에서 다른 해충의 유입 없이 자란 6엽기의 오이를 개방된 하우스에 둔 후, 실험에 이용하였다.

(나) 시료의 처리 및 검정

수화제는 살포 1시간 전 물을 이용하여 100배 그리고 500배 희석하였다. 희석된 수화제는 잎당 10 ml 살포 하였으며, 2일 간격으로 잎 당 붙어 있는 해충의 종류와 수를 조사하였다.

(3) 균핵병원균에 대한 예방효과 검정

(가) 작물 및 수화제 처리

검은색 포트(지름: 120 mm)에서 키운 1엽기 오이 사용하였으며, 수화제는 살포 1시간 전 물을 이용하여 100배, 250배, 500배 희석하였다. 수화제의 처리는 1엽기의 오이에 시료를 5 ml 엽면 살포하는 방법으로 접종하였다.

(나) 균핵병원균 접종 및 검정

수화제 처리 4시간 후, 균핵병원균(보비 배지에서 배양) 2개를 줄기 옆 근권부에 접종하였고, 포트 밑에 물을 채워 습도를 높여 균핵병원균의 발병율을 높였다. 2주 뒤에 균핵병원균 발생 이병주율을 조사하였다. 처리구 당 오이 20개로 사용하여 실험하였다.

(4) Bb18균의 오이잎 정착율

수화제 처리된 오이 잎의 잎 당 2개의 sample (5 mm)를 취하여 0.05% Tween-80 solution에 1분간 현탁 시켰다. 그 후, 100 ul를 dodine 및 항생제가 포함된 *Beauveria* spp. 선택배지에 도말하여 5일 후 생성되는 colony를 조사하였다.

(5) 기상조건 측정

하우스 내의 기상 조건은 HOBO device를 이용하여, 온도, 습도 그리고 빛 조사량을 조사하였다.

마. Bb18균의 기피효과

(1) Arena의 제작

목화진딧물의 *Beauveria bassiana* Bb18에 대한 기피활성검정을 위하여 5 ml의 2% agar가 포함된 60 mm dish에 오이 잎을 삽입하였다. 삽입된 오이 잎 가운데에 다시 5 mm filter paper를 삽입하여 기피활성검정을 위한 arena를 최종 완성하였다.

(2) 시료의 준비

(가) Bb18 포자 현탁액 및 수화제

Bb18균은 PDA에서 10일간 배양하여 생성된 분생포자를 0.05% Tween-80 solution을 이용하여 현탁 시킨 후 실험에 사용하였으며, 수화제는 물에 100배 희석하여 사용하였다.

(나) Bb18 배양액 및 배양여액

Bb18균을 GY 배지(2% glucose, 0.2% yeast extract, 0.02% magnesium sulfate, 0.1% dipotassium phosphate)에 접종하여 25℃, 180 rpm 조건으로 10일간 배양하였다. 10일 후 4겹의 거즈로 거른 시료를 ‘배양액’ 이라 명명하고 실험에 사용하였으며, 배양액을 원심분리 및 filter로 균을 제거시킨 시료를 ‘배양여액’ 이라 명명하여 실험에 사용하였다.

(2) 기피활성 검정

(가) 시료의 처리

Arena의 가운데에서 한 쪽 면은 2겹의 filter paper로 가리고 시료 5 ml을 분무하였다. 1시간 동안 실온에 말린 후, 다른 쪽 면 역시 2겹의 filter paper로 가리고 다른 시료를 처리하였다.

(나) 진딧물의 접종

Arena에 처리된 시료가 다 마른 후, arena 가운데 filter paper에 동일 성충 목화진딧물 10마리를 접종하였다. 접종 후 시간에 따른 목화진딧물의 거주비율 및 24시간 후 목화진딧물의 산자수비율을 조사하였다. 실험은 3반복 3회 수행하였다.

바. Bb18균의 살충활성 기작

(1) 선택배지

시제품 실외 실험 14일차 오이 잎 시료(5 mm)를 채취하여, 95% ethanol 1 분, 20% clorox solution 3분, 95% ethanol 1분 그리고 멸균수로 세척하여 *Beauveria* spp. 선택배지에 치상 하여 14일간 형성되는 colony를 조사하여 Bb18 균의 내생활성을 조사하였다.

(2) PCR

(가) 오이 잎 표면의 균 제거

오이 잎 표면에 존재하는 균들을 제거하기 위하여 0.05% tween80에 1분, dichloromethane 10분간 3회, 0.05% tween80에 1분간 3회 세척 한 후 gDNA 추출하였다. DNA 추출은 OmniPrep for Fungus Kit를 사용하여 추출하였다(St Leger and Wang, 2010).

(나) PCR 및 전기영동

수화제 처리 된 오이 잎을 앞의 dichloromethane을 이용하여 방법을 이용하여 표면의 균을 제거하였고, 그 후, 액체질소 및 막자사발을 이용하여 마쇄한 오이 잎 안의 DNA를 추출하여 실험에 이용하였다. 얻어진 DNA를 template로 이용하여 PCR하였고, PCR에 사용된 primer쌍은 ITS primers (곰팡이 동정용), P1-P3 primers (*Beauveria* 속 특이적 검출용)을 사용 하여, 94도 5분, 54도 30초, 72도 1분, 72도 10분으로 35 cycles 수행하였다. PCR 산물은 1% agarose에 전기영동하여 분석하였다(White et al., 1990).

(다) 살충활성물질 구명

진딧물에 대한 Bb18 균의 살충활성물질 구명을 위하여 배양여액을 유기용매를 이용하여 분획하였고, 이를 추출 및 농축하여 시료를 얻었다. 얻어진 시료를 진딧물에 대한 생물검정 및 TLC 분석하여 살충활성물질의 특성을 파악하였다.

(라) Bb18균의 기주에 따른 포자 부착율

목화진딧물 그리고 복숭아혹진딧물의 3일차 성충 제작하여 Bb18 포자현탁액(1×10^8)

conidia/ml) 1 ml을 spray 접종하였고, 접종 3, 6, 12, 24시간 후 진딧물 수거하여 진딧물 2배 부피의 0.01% Triton X-100 및 water에 5초간 washing하고, 다시 2배 부피 dichloromethane (DCM)를 넣고 5분간 조심스럽게 inverting하였다. 그리고 Solvent extract (DCM)에 1:1 비율의 ethyl alcohol첨가하고 원심분리 한 후(6,000 x g, 25°C, 30 min) 상층액 제거하고, 얻어진 pellet에 1 ml의 0.1% triton X-100 첨가 후, 강하게 혼합하여 hemocytometer로 포자를 개수하였다.

Bb18 접종된 목화진딧물 및 복숭아혹진딧물을 Canada balsam과 함께 프레파라트 제작하여 붙어있는 포자 및 발아된 포자의 수를 직접적으로 위상차 현미경으로 관찰하였다.

사. Bb18균의 항균활성 기작

(1) 기생활성검정

Bb18균의 기생활성검정을 위하여 슬라이드 글라스 배양 방법을 사용하였다. Bb18균과 균핵병원균을 10 mm차이를 슬라이드 글라스 위에 접종 후, 다시 슬라이드 글라스를 올려 두고 일주일간 배양하였다. 일주일 후, 두 균의 반응 영역을 위상차 현미경으로 관찰하였다.

(2) 항균활성물질검정

(가) 배양여액의 생산

Bb18의 포자현탁액 1 ml (1×10^8 conidia/ml)을 PDB, SDB 그리고 AD배지에 접종 후, 25°C, 150 rpm으로 배양 하였다. 배양 3, 5, 7일 후 원심분리 및 filter paper를 이용하여 균을 제거하였고, 균 제거된 배양여액을 실험에 이용하였다.

(나) 배양여액의 항균활성

고압멸균 된 PDA를 55°C까지 식힌 후, 준비된 배양여액이 10% 첨가되게 각각의 배지를 90 mm Petri dish에 제조하였다. 그 후, 배지 중앙에 PDA에서 자란 균핵병원균 균사절편(5 mm)를 접종 후, 25°C에서 배양하면서 생장환의 크기를 조사하였다.

(다) 세포외효소활성

배양여액의 세포외효소 활성은 Chi1, 4-Nitrophenyl N-acetyl-b-D-glucosaminide; Chi2, 4-Nitrophenyl N,N'-diacetyl-b-D-chitobioside; Chi3, 4-Nitrophenyl b-D-N,N',N''-triacetylchitotriose; Pr1, succinyl-(alanine)2-proline-phenylalanine-p-nitroanilide; Pr2, benzoyl-phenylalanine-valine-arginine-p-nitroanilide 기질을 사용하여 측정하였다.

2. 연구결과

가. 살충활성이 우수한 균주 선발

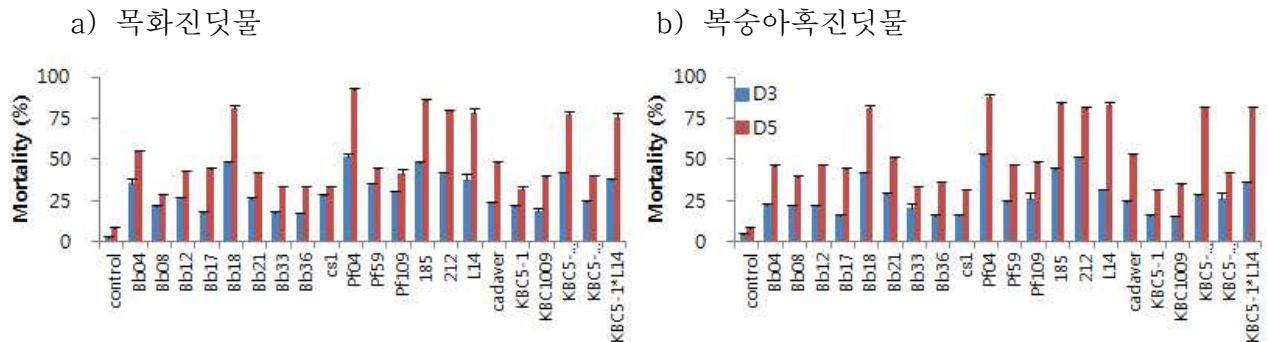


Fig. 1. 고체배양 포자현탁액에 의한 목화진딧물과 복숭아혹진딧물의 살충율

곤충병원성 곰팡이 분생포자의 진딧물에 대한 살충율을 조사한 결과, *B. bassiana* Bb 18, 04, *Paecilomyces* sp. Pf59, *Lecanicillium lecanii* L14 균이 목화진딧물과 복숭아혹진딧물에 높은 살충율을 보이는 것을 확인할 수 있었다.

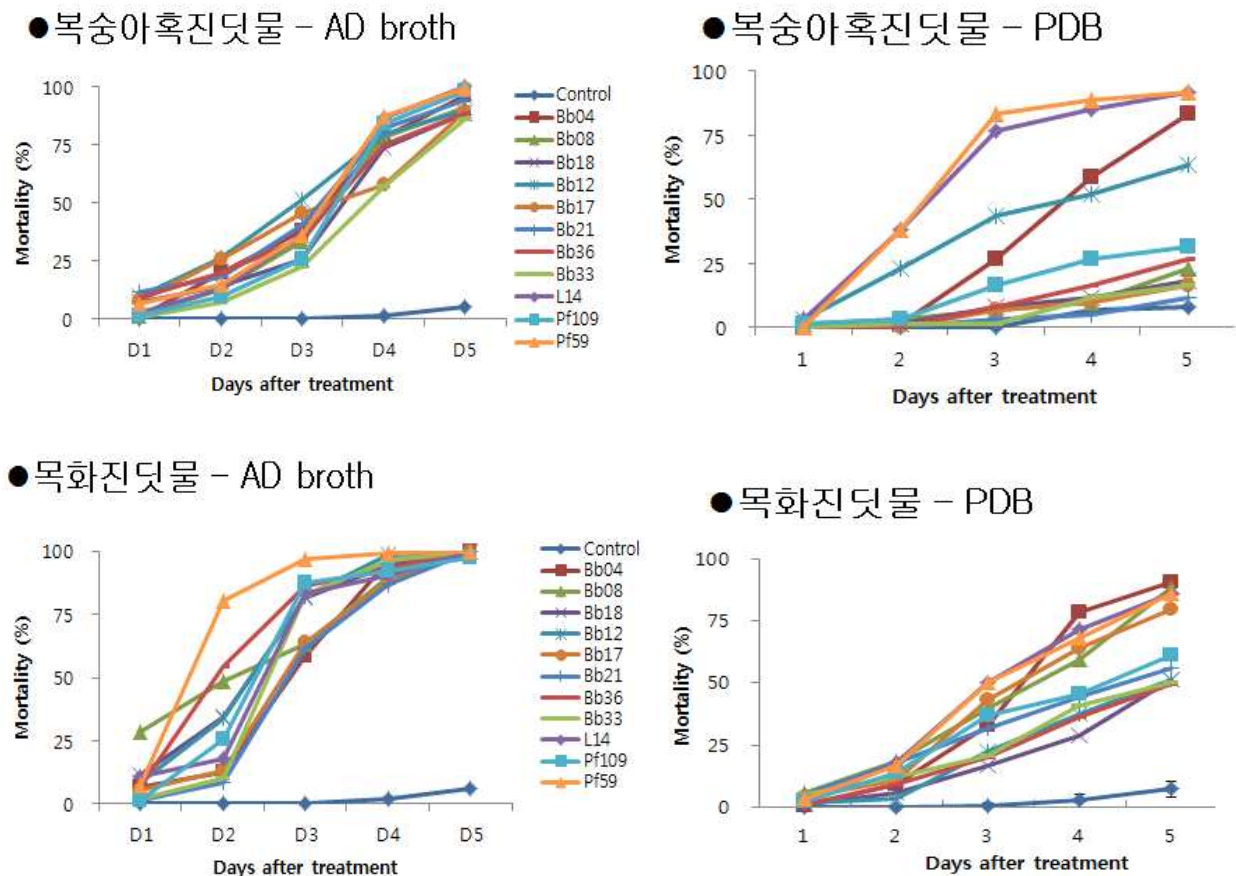
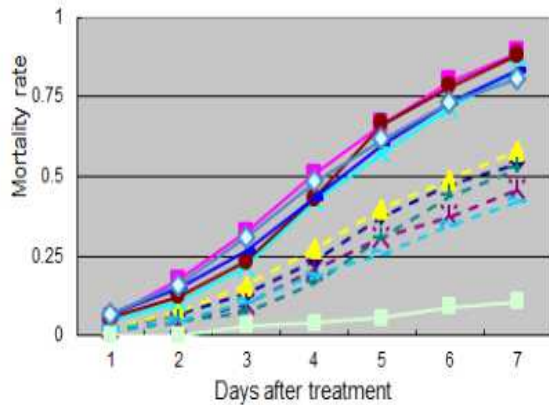


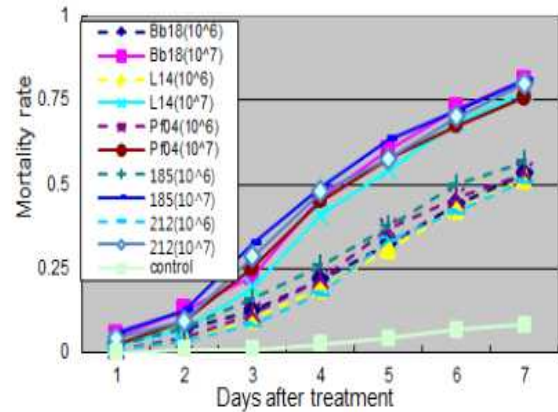
Fig. 2. 액체 배양 배지 AD 와 PDB에서 배양된 곰팡이 배양액의 복숭아혹진딧물 및 목화진딧물에 대한 살충율

곰팡이 배양여액의 살충활성을 평가한 결과, 다양한 곰팡이 배양여액에서 각 진딧물에 대한 높은 살충활성을 보이는 것을 확인할 수 있었으며, 배양여액의 살충활성은 균주에 따라서 또는 배양배지에 따라서 달라지는 것 확인할 수 있었다.

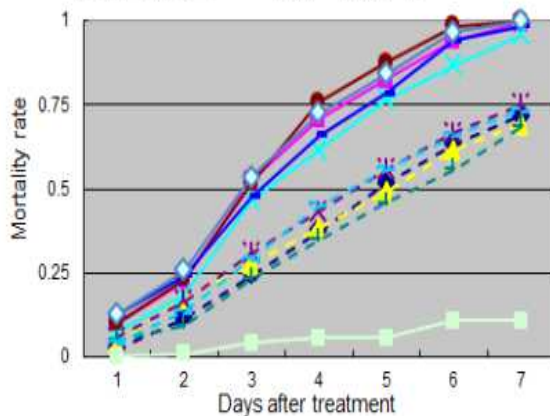
■ 목화진딧물 - 고체 배양 포자현탁액



■ 복숭아혹진딧물 - 고체 배양 포자현탁액



■ 목화진딧물 - 액체 배양액



■ 복숭아혹진딧물 - 액체 배양액

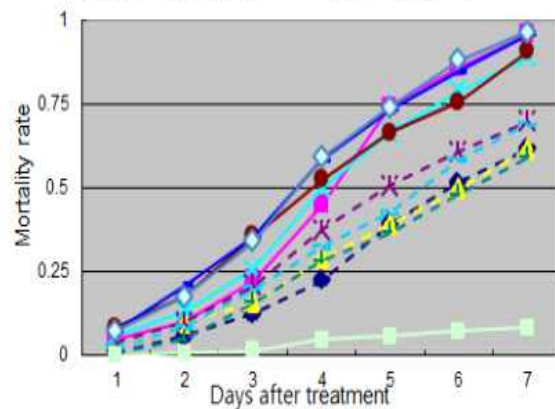


Fig. 3. 고체 및 액체 배양 곰팡이의 포자 농도별 목화진딧물 및 복숭아혹진딧물에 대한 살충율

앞의 실험 결과를 토대로 살충활성이 높은 곰팡이 균주의 포자현탁액과 배양액의 농도에 따른 살충활성을 평가한 결과, *B. bassiana* Bb 18, 04, *Paecilomyces* sp. Pf59, *Lecanicillium lecanii* L14 균이 균 밀도 1×10^7 spores/ml에서도 목화진딧물과 복숭아혹진딧물에 높은 살충율을 보이는 것으로 확인되었다.

나. 항균활성이 우수한 균주 선발

Table 1. 곤충병원성 곰팡이들의 배양 배지 종류별 균핵병균 (*Sclerotinia sclerotiorum*)에 대한 항균력

Isolate	Zone of inhibition (mm)		
	Medium		
	PDA	SDAY	AD
Bb04	1.9 ± 0.2	4.9 ± 0.7	2.4 ± 0.2
Bb08	2.4 ± 0.4	6.4 ± 0.7	3.4 ± 0.3
Bb12	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.3	0.5 ± 0.2
Bb17	1.7 ± 0.1	5.9 ± 0.8	2.2 ± 0.1
Bb18	0.9 ± 0.3	5.9 ± 0.5	5.2 ± 0.3
Bb21	0.9 ± 0.2	3.7 ± 0.7	3.7 ± 0.2
Bb33	0.0 ± 0.0	3.2 ± 0.4	0.4 ± 0.1
Bb36	1.0 ± 0.2	4.7 ± 0.5	0.4 ± 0.1
CS1	0.0 ± 0.0	1.8 ± 0.4	1.5 ± 0.1
Pf04	0.0 ± 0.0	4.1 ± 0.6	3.4 ± 0.2
Pf59	0.0 ± 0.0	1.8 ± 0.1	1.4 ± 0.3
Pf109	0.0 ± 0.0	1.9 ± 0.6	1.5 ± 0.3
185	0.7 ± 0.2	3.4 ± 0.3	3.4 ± 0.2
212	0.9 ± 0.3	3.7 ± 0.4	3.4 ± 0.1
L14	0.0 ± 0.0	2.1 ± 0.4	0.8 ± 0.1
Cadaver	1.2 ± 0.2	6.1 ± 0.9	2.6 ± 0.1
KBC5-1	3.6 ± 0.6	8.3 ± 0.6	4.7 ± 0.4
KBC1009	3.6 ± 0.4	8.2 ± 0.5	4.3 ± 0.5

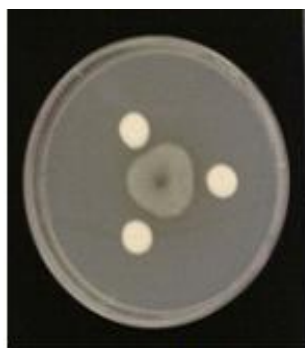


Fig. 4. AD 또는 SDAY 배지에서 배양된 곤충병원성 곰팡이의 균핵병균에 대한 항균력

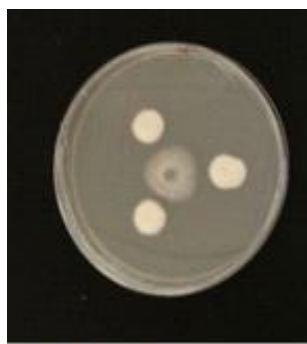
곤충병원성 곰팡이들 중에서 병·해충 동시방제에 이용될 수 있는 균주를 찾기 위해서 진딧물에 대한 병원성 검정이 완료된 균주를 가지고 균핵병균 (*Sclerotinia sclerotiorum*)에 대한 항균활성을 검정 한 결과, Bb18 균주가 항균력이 우수한 것을 확인 할 수 있었다.

Table 2. 곤충병원성 곰팡이들의 배양 배지 종류별 검은곰팡이병(*Alternaria alternata*)에 대한 항균력

Isolate	Zone of inhibition (mm)		
	Medium		
	PDA	SDAY	AD
Bb04	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	1.3 ± 0.2
Bb08	0.8 ± 0.2	0.0 ± 0.0	2.1 ± 0.3
Bb12	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Bb17	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.2
Bb18	0.6 ± 0.1	0.0 ± 0.0	4.4 ± 0.2
Bb21	0.7 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.9 ± 0.3
Bb33	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.6 ± 0.2
Bb36	0.5 ± 0.2	0.0 ± 0.0	1.3 ± 0.2
CS1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	2.8 ± 0.3
Pf04	0.7 ± 0.2	0.0 ± 0.0	3.1 ± 0.5
Pf59	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.7 ± 0.5
Pf109	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.7 ± 0.2
185	1.8 ± 0.3	0.0 ± 0.0	3.5 ± 0.3
212	2.2 ± 0.3	0.0 ± 0.0	3.1 ± 0.3
L14	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.6 ± 0.1
Cadaver	1.3 ± 0.2	0.0 ± 0.0	3.5 ± 0.1
KBC5-1	5.4 ± 0.4	3.2 ± 0.4	6.7 ± 0.3
KBC1009	5.2 ± 0.4	3.3 ± 0.3	6.2 ± 0.4



<Bb18 항균력>



<185 항균력>



<Cadaver 항균력>

Fig. 5. AD 또는 SDAY 배지에서 배양된 곤충병원성 곰팡이의 검은곰팡이병에 대한 항균력

곤충병원성 곰팡이 균주의 검은곰팡이병(*Alternaria alternata*)에 대한 항균활성을 검정한 결과, 균핵병원균에 대한 항균활성 결과와 비슷하게 Bb18 균주가 항균력이 우수한 것을 확인하였다.

Table 3. 곤충병원성 곰팡이들의 배양 배지 종류별 모잘록병균(*Pythium ultimum*)에 대한 항균력

Isolate	Zone of inhibition (mm)		
	Medium		
	PDA	SDAY	AD
Bb04	1.4 ± 0.3	0.0 ± 0.0	3.6 ± 0.2
Bb08	4.2 ± 0.3	1.7 ± 0.6	4.5 ± 0.2
Bb12	1.5 ± 0.4	0.0 ± 0.0	2.3 ± 0.4
Bb17	2.3 ± 0.3	1.4 ± 0.2	2.4 ± 0.3
Bb18	3.8 ± 0.4	2.1 ± 0.2	4.7 ± 0.4
Bb21	4.5 ± 0.5	0.8 ± 0.1	4.7 ± 0.3
Bb33	3.0 ± 0.3	0.4 ± 0.2	3.4 ± 0.4
Bb36	3.7 ± 0.3	1.5 ± 0.3	3.1 ± 0.6
CS1	3.1 ± 0.4	0.8 ± 0.4	2.8 ± 0.4
Pf04	3.7 ± 0.2	1.2 ± 0.4	5.2 ± 0.3
Pf59	2.0 ± 0.3	0.5 ± 0.2	2.5 ± 0.2
Pf109	1.7 ± 0.3	0.7 ± 0.4	2.2 ± 0.2
185	4.9 ± 0.4	0.4 ± 0.2	5.4 ± 0.3
212	4.8 ± 0.5	0.3 ± 0.2	5.5 ± 0.4
L14	1.7 ± 0.4	0.6 ± 0.4	2.8 ± 0.6
Cadaver	3.2 ± 0.7	3.2 ± 0.5	4.8 ± 0.5
KBC5-1	6.4 ± 0.4	3.7 ± 0.5	6.6 ± 0.4
KBC1009	6.2 ± 0.3	3.9 ± 0.4	6.1 ± 0.3

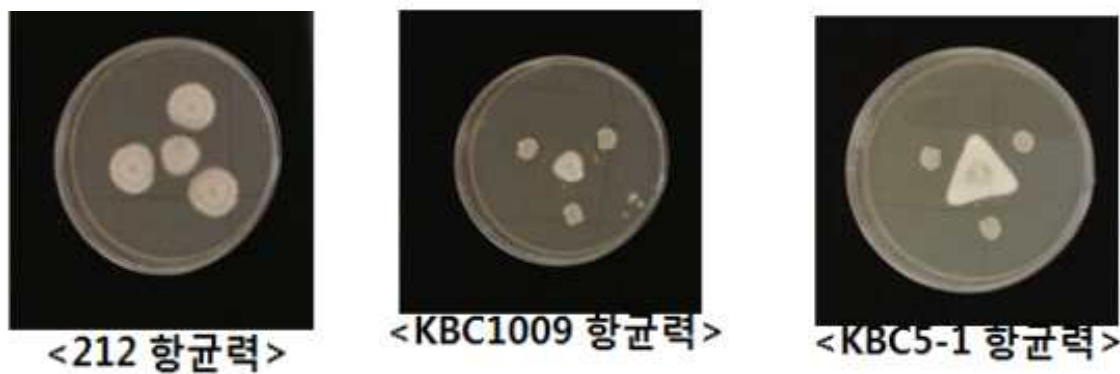


Fig. 6. AD 또는 SDAY 배지에서 배양된 곤충병원성 곰팡이의 잘록병균에 대한 항균력

곤충병원성 곰팡이 균주의 모잘록병균(*Pythium ultimum*)에 대한 항균활성을 검정 한 결과, *Paecilomyces* sp. 185, 212, Pf04 균주가 항균력이 우수한 것을 확인하였다.

Table 4. 곤충병원성 곰팡이들의 배양 배지 종류별 고추 탄저병균(*Colletotrichum acutatum*)에 대한 항균력

Isolate	Zone of inhibition (mm)		
	Medium		
	PDA	SDAY	AD
Bb04	0.5 ± 0.1	0.0 ± 0.0	1.0 ± 0.2
Bb08	1.5 ± 0.2	0.8 ± 0.4	1.1 ± 0.4
Bb12	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.2
Bb17	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Bb18	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.1	1.7 ± 0.2
Bb21	1.4 ± 0.4	0.0 ± 0.0	1.5 ± 0.1
Bb33	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Bb36	0.9 ± 0.4	0.0 ± 0.0	0.7 ± 0.2
CS1	0.2 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.1
Pf04	1.0 ± 0.4	1.1 ± 0.4	2.4 ± 0.3
Pf59	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	2.0 ± 0.3
Pf109	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
185	3.5 ± 0.4	0.0 ± 0.0	3.9 ± 0.4
212	4.8 ± 0.5	0.0 ± 0.0	5.4 ± 0.4
L14	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	1.7 ± 0.3
Cadaver	3.3 ± 0.4	1.5 ± 0.4	3.6 ± 0.3
KBC5-1	5.6 ± 0.7	2.8 ± 0.5	5.0 ± 0.4
KBC1009	5.0 ± 0.3	2.6 ± 0.5	5.2 ± 0.5



Fig. 7. AD 또는 SDAY 배지에서 배양된 곤충병원성 곰팡이의 고추 탄저병균에 대한 항균력

마지막으로 곤충병원성 곰팡이 균주의 고추 탄저병균(*Colletotrichum acutatum*)에 대한 항균활성을 검정한 결과, *Paecilomyces* sp. 185, 212, 균주가 항균력이 우수한 것을 확인하였다.

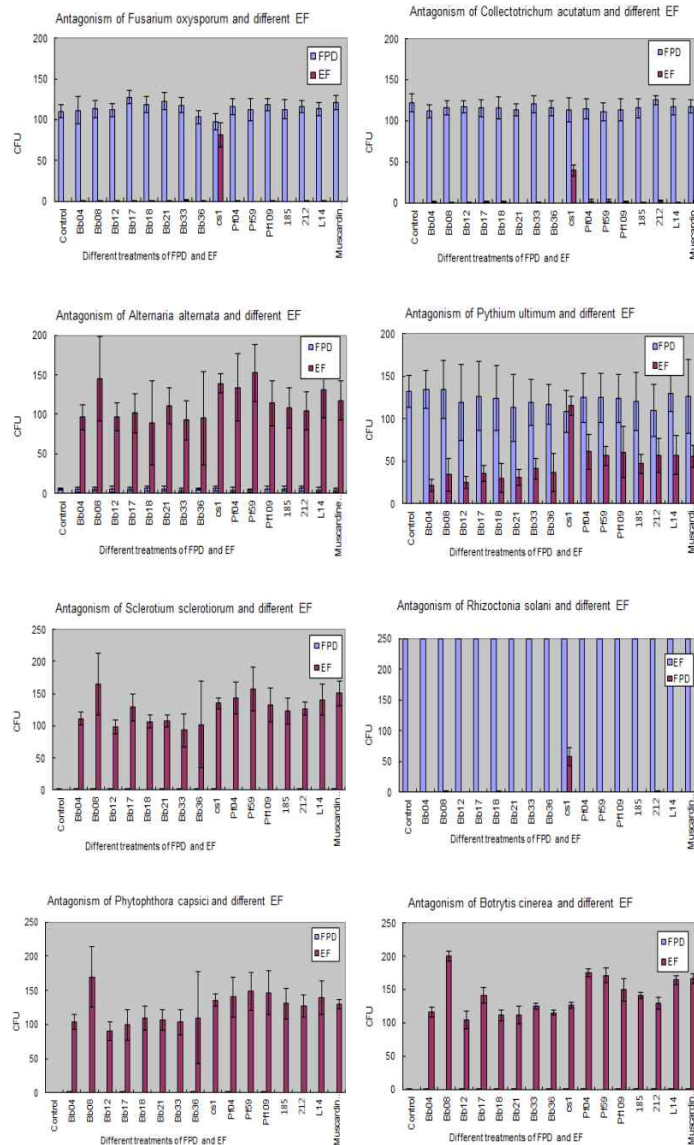


Fig. 8. 8종의 식물진균성병원균과 곤충병원균 17균주의 길항력 비교

시들음병(*Fusarium oxysporum*), 검은무늬병(*Alternaria alternata*), 고추탄저병(*Collectotrichum acutatum*), 잎집무늬마름병(*Rhizoctonia solani*), 고추역병(*Phytophthora capsici*), 모잘록병(*Pythium ultimum*), 잿빛곰팡이병(*Botrytis cinerea*), 균핵병(*Sclerotium sclerotiorum*)에 대한 곤충병원성 곰팡이 17균주의 길항력을 조사한 결과, 잎집무늬마름병, 모잘록병, 시들음병, 고추탄저병에는 백강균 CS1 균주가 길항력을 보였으나 나머지 균주들은 대부분 길항력이 없었다.

검은무늬병, 균핵병, 모잘록병, 잿빛곰팡이병 균주에 대해서는 대부분의 균주가 길항력을 보이고 있으며, 특히 Pf59, Bb08 균주가 가장 높은 길항력을 보였고, Pf04, Bb18 균주 등도 4 균주에 대한 길항력을 보였다.

이상의 결과들을 종합하여 병·해충 동시방제용 곰팡이 3종 선발하였고, 특히 출원하였다.

- 진딧물 및 균핵병균 동시방제용 류베리아 바시아나 Bb18

- 진딧물 및 잘록병균의 동시방제용 이사리아 자바니카 Pf185
 - 진딧물, 잘록병균 및 고추 탄저병균의 동시방제용 이사리아 푸모소로세아 Pf212
- 위의 특허 출원 균주 중, 진딧물 및 균핵병균 방제용 Bb18 균주를 한국바이오케미컬에 기술 이전하였고, 만들어진 시제품을 이용하여 다음 실험에 이용하였다.

다. 시제품(수화제)의 실내 검정

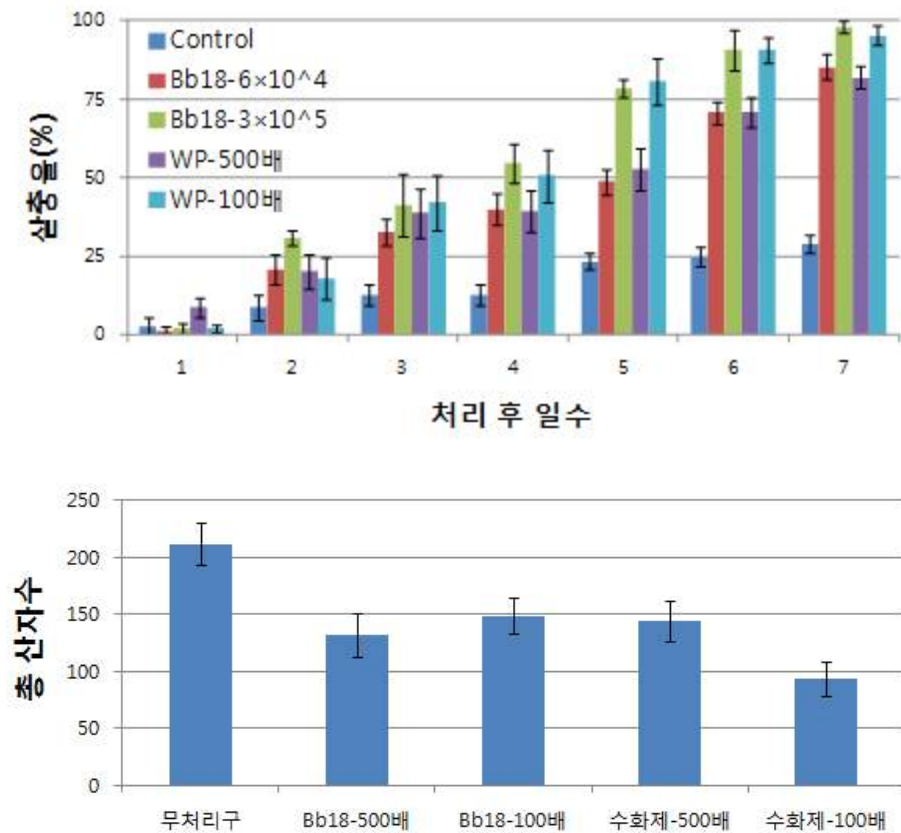


Fig. 9. Bb18이 주성분으로 제조된 수화제의 목화진딧물에 대한 실내 살충활성

수화제에 의한 목화진딧물에 대한 살충활성을 검정한 결과, 수화제 처리 7일 후, 모든 처리구에서 100% 가까운 살충율을 나타냈으며, 산자수는 무처리구 대비 66% 줄어드는 것을 확인할 수 있었다.

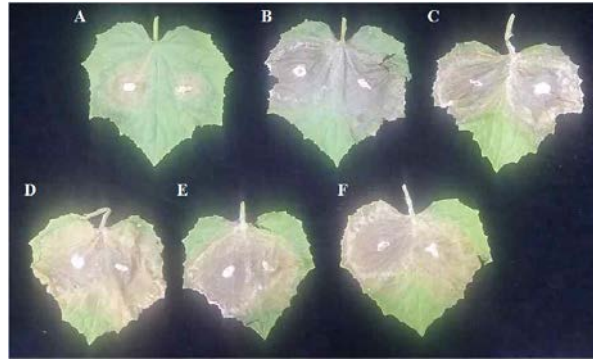


Fig. 10. Bb18 포자현탁액에 따른 오이 균핵병원균의 방제효과. (A), 1×10^8 conidia/ml 포자처리; (B), 1×10^7 conidia/ml 포자처리; (C), 1×10^6 conidia/ml 포자처리; (D), 1×10^5 conidia/ml 포자처리; (E), 1×10^4 conidia/ml 포자처리; (F), Tween-80 solution.

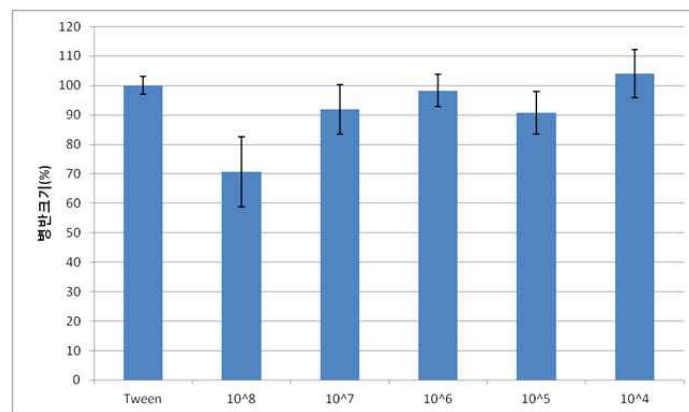


Fig. 11. Bb18 포자현탁액에 따른 오이 균핵병원균의 방제효과

Bb18 포자현탁액 처리에 따른 오이 균핵병원균의 병반크기 억제율을 조사한 결과, Bb18 포자 현탁액(1×10^8 conidia/ml) 처리 시, 대조구에 비해 병반 크기가 약 30% 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

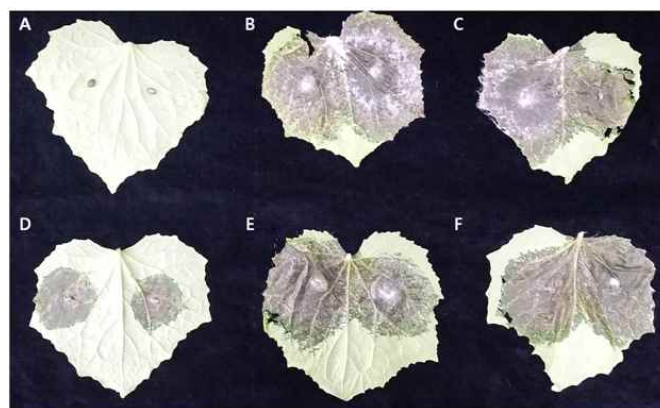


Fig. 12. Bb18 수화제 처리에 따른 오이 균핵병원균의 방제효과. (A), 균핵병원균 무처리구; (B), 증류수 처리구; (C), 수화제-대조구(WP-C)처리구; (D), 수화제 100배 희석액 처리구; (E), 수화제 250배 희석액 처리구; (F), 수화제 500배 희석액 처리구.

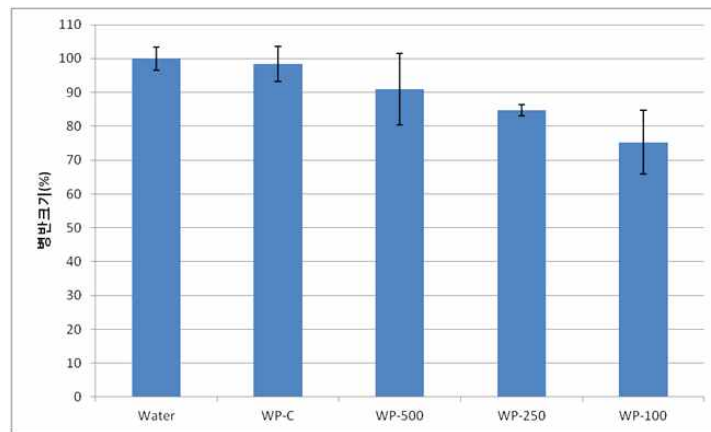


Fig. 13. Bb18 수화제 처리에 따른 오이 균핵병원균의 방제효과.

Bb18 수화제 처리에 따른 오이 균핵병원균의 병반크기 억제율을 조사한 결과, 수화제 100배 희석액 처리에 의해서, 대조구에 비해 병반 크기가 약 25% 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

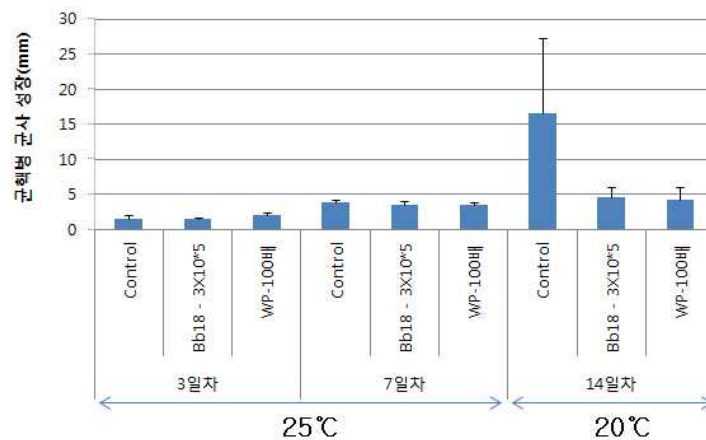


Fig. 14. 전체 오이 식물을 이용한 Bb18 수화제의 균핵병원균에 대한 항균활성 검정 결과

수화제에 의한 균핵병원균에 대한 항균활성을 실내조건에서 전체 오이 식물을 이용하여 검정한 결과, 수화제 처리에 의해 균핵병원균의 병반크기가 무처리구에 비해 약 10% 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

라. 시제품(수화제)의 실외 검정

실내에서 Bb18균이 주성분인 수화제의 목화진딧물과 균핵병원균에 대한 동시방제 활성을 검정 한 후, 이를 이용하여 실제 서로 다른 하우스 조건에서의 방제효과를 검정하였다. 또한, 동시기에 수화제 처리에 의한 해충의 유입도를 조사하여 수화제의 예방효과로의 가능성을 확인하였다.

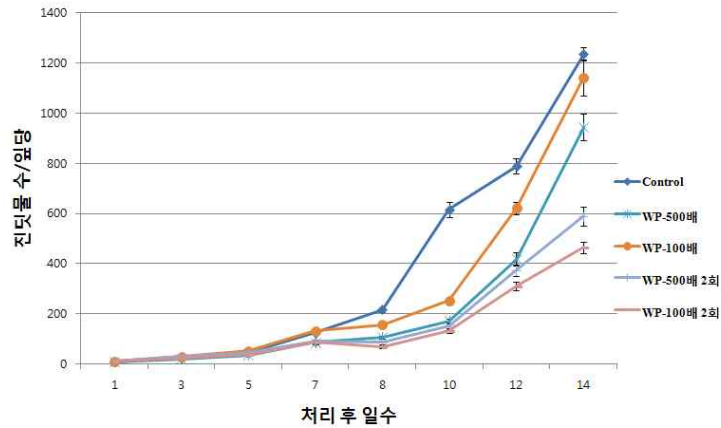


Fig. 15. 수화제의 하우스 조건(2016.06.14. ~ 2016.06.28.)에서의 목화진딧물에 대한 살충활성

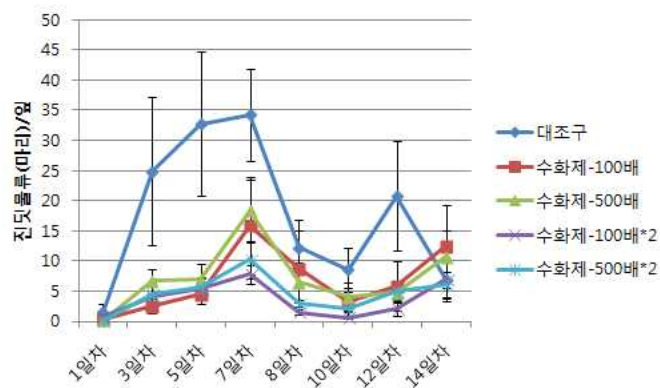


Fig. 16. 수화제 처리에 의한 하우스 조건(2016.06.14. ~ 2016.06.28.)에서의 목화진딧물 유입율

Fig. 17. 수화제 처리에 의한 하우스 조건(2016.06.14. ~ 2016.06.28.)에서의 Bb18균의 오이잎에서의 생존율

실험 14일간 평균 온도는 25 ± 6 °C, 평균습도는 $44 \pm 19.7\%$, 평균 LUX : $1198 \pm$

1458이었으며, 수화제 100배 2회 처리에 의해서 목화진딧물의 밀도가 대조구에 비해 약 62% 감소되는 것을 확인 하였다.

또한, 수화제 처리에 의해서 목화진딧물의 유입밀도가 대조구에 비해 감소되는 경향을 보였다.

수화제 처리 후, Bb18 군은 줄어드는 현상을 보였으나, 3일 차 이후, 다른 군에 의해서 군수를 관찰할 수 없었으며, 이를 해결하고자 추후 실험에서는 dodine이 첨가된 선택배지를 이용하여 Bb18 군의 실제 포장에서의 정착율과 생존율을 평가하였다.

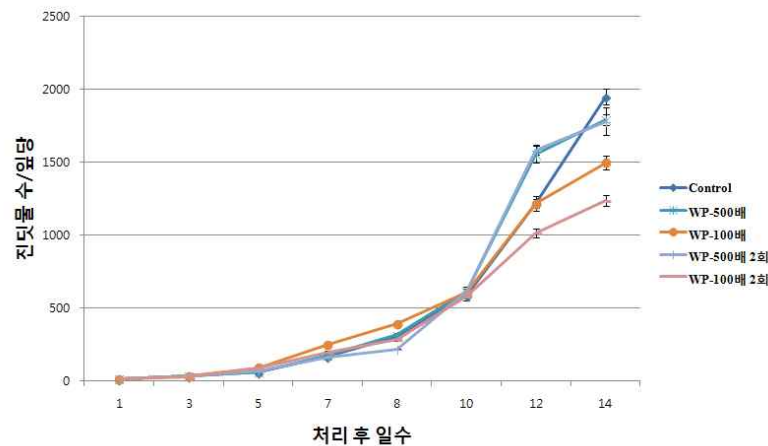


Fig. 18. 수화제의 하우스 조건(2016.07.12. ~ 2016.07.26.)에서의 목화진딧물에 대한 살충활성

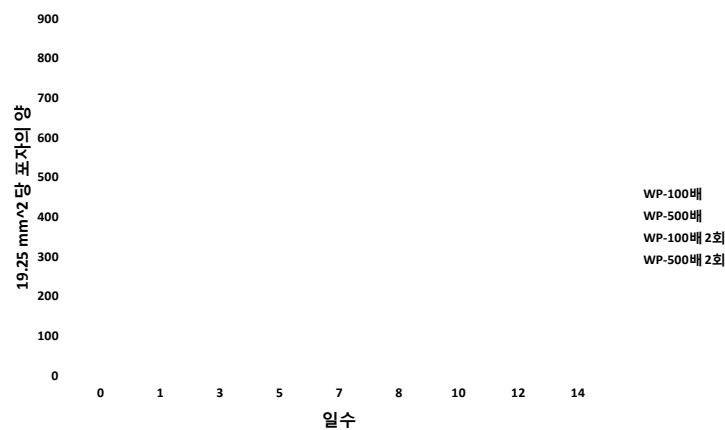


Fig. 19. 수화제 처리에 의한 하우스 조건(2016.07.12. ~ 2016.07.26.)에서의 Bb18군의 오이잎에서의 생존율

실험 14일간 평균 온도는 28 ± 6 °C, 평균습도는 $44 \pm 20\%$, 평균 LUX : 1423 ± 1724 으로 6월 달에 수행한 실험보다 평균 온도는 약 3도, 평균 빛 조사량은 200 LUX 높은 조건 이었으며, 수화제 100배 2회 처리에 의해서 목화진딧물의 밀도가 대조구에 비해 약 36% 감소되는 것을 확인 하였다.

수화제 처리에 의한 해충 유입율은 고온으로 인해 유입되는 해충 자체를 확인할 수 없어

서, 본 시기에는 Bb18의 해충 유입 억제율을 평가할 수 없었다. 마지막으로 수화제 처리 후, Bb18 균은 3일차 까지 줄어드는 현상을 보였으나, 3일 차 이후, 계속적으로 증가하여 오이 잎에 정착하는 것을 확인할 수 있었다.

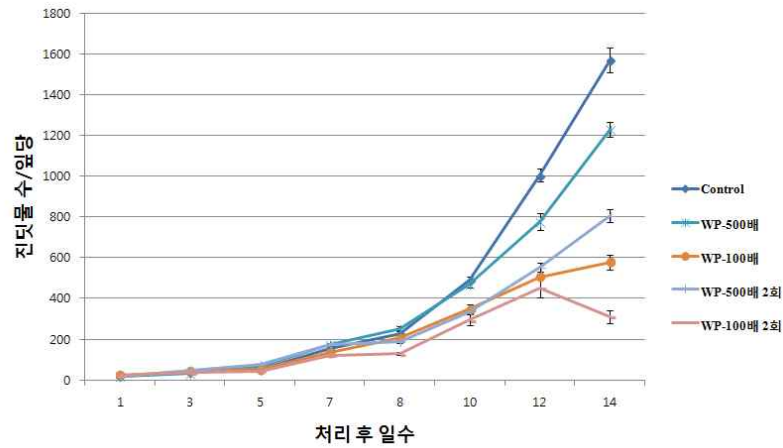


Fig. 20. 수화제의 하우스 조건(2016.09.22. ~ 2016.10.06.)에서의 목화진딧물에 대한 살충활성

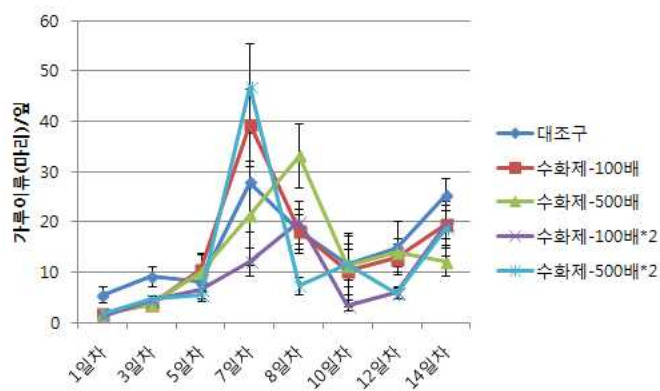


Fig. 21. 수화제 처리에 의한 하우스 조건(2016.09.22. ~ 2016.10.06.)에서의 가루이류 유입율

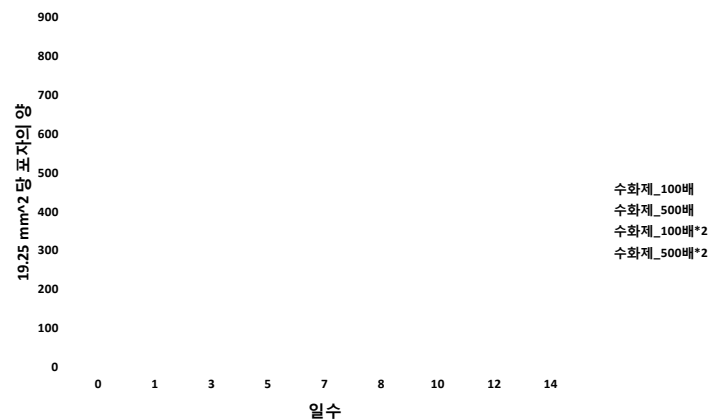


Fig. 22. 수화제 처리에 의한 하우스 조건(2016.09.22. ~ 2016.10.06.)에서의 Bb18균의
오이잎에서의 생존율

마지막 실험 14일간 평균 온도는 22 ± 5 °C, 평균습도는 $47 \pm 16\%$, 평균 LUX : 1359 \pm 2607으로 앞의 두 번의 실험과 비교하여 평균 온도가 가장 낮고 평균 습도가 가장 높은 조건 이었으며, 수화제 100배 2회 처리에 의해서 목화진딧물의 밀도가 대조구에 비해 약 80% 감소되는 것을 확인 하였다.

또한, 수화제 처리에 의해서 가루이류의 유입밀도가 대조구에 비해 감소되는 경향을 확인 할 수 있었다.

수화제 처리 후, Bb18 균은 3일차 까지 줄어드는 현상을 보였으나, 3일 차 이후, 계속적으로 증가하여 오이 잎에 정착하는 것을 확인할 수 있었다.

이상의 결과로 비록 계절에 따른 환경 조건에 따라서 Bb18 수화제의 방제 효과가 차이를 가지는 것으로 평가 되었으나, 오이 잎에 처리된 Bb18 균은 오이 잎에서 지속적으로 성장하여 정착되는 것을 확인함으로써 지속적인 방제가 가능하리라 생각 된다. 그리고 실제로 곤충병원성 곰팡이가 병원성을 보이는 환경 조건을 보일 때는 약 80% 이상의 방제 효과를 보임에 따라 본 연구목표와 부합되는 지속가능한 친환경 농산물 재배를 위한 유용한 방제방법으로 사용될 수 있을 것이라 생각 된다. 또한 더 깊이 있는 연구가 필요하지만 Bb18 수화제를 처리함으로써 진딧물 및 가루이류의 해충이 Bb18이 정착된 오이 잎을 기피함에 따라 Bb18 수화제는 해충의 예방제로서의 역할을 수행할 수 있으리라 생각 된다.

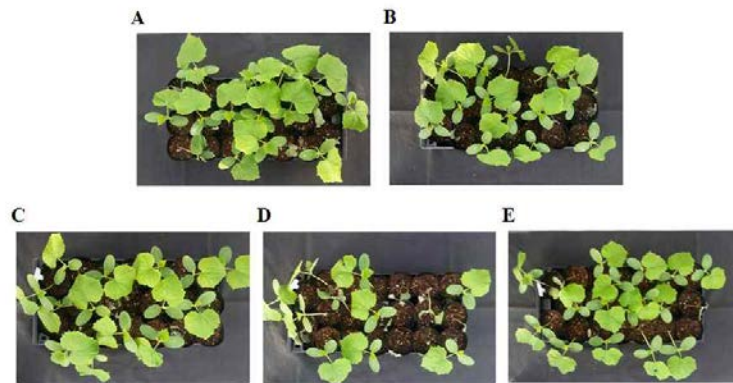


Fig. 23. 수화제 처리에 의한 하우스 조건에서의 Bb18균의 오이 균핵병 원균에 대한
예방효과. A, 대조구; B, WP-C; C, WP-500배; D, WP-250배; E, WP-100배.

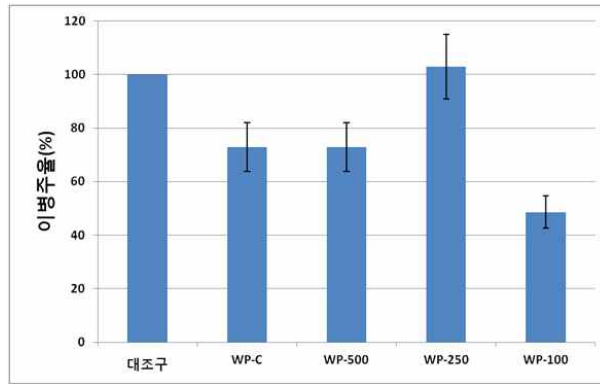


Fig. 24. 수화제 처리에 의한 하우스 조건에서의 Bb18균의 오이 균핵병원균에 대한 예방효과.

실외 조건에서 수화제 처리에 따른 오이 균핵병원균에 대한 예방효과를 검정하였다. 그 결과, 수화제 100배 처리된 오이는 대조구 처리구에 비해 균핵병원균에 대해 50% 예방효과를 가지는 것으로 확인 되었다. 이상의 결과를 종합하여, *Beauveria bassiana* Bb18이 주성분으로 이루어진 수화제는 오이의 목화진딧물 및 균핵병원균 동시방제에 사용될 수 있음을 최종확인 하였다.

마. Bb18균의 기피효과

앞의 연구에서 수화제 처리에 의해서 해충의 유입율이 감소함에 따라, 목화진딧물의 곤충병원성 곰팡이 인식 능력과 곤충병원성 곰팡이의 목화진딧물에 대한 예방적 효과를 목화진딧물의 거주비율 및 산자수를 조사를 통하여 확인하였다.

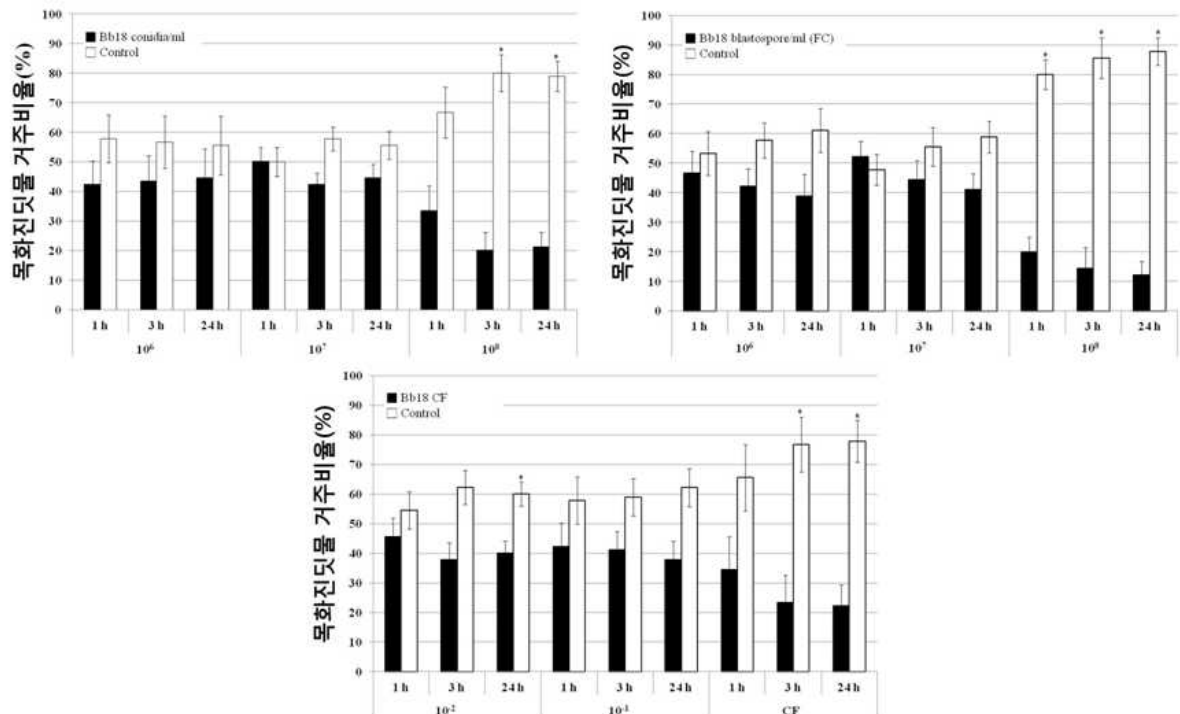


Fig. 25. Bb18 포자현탁액, 배양액(FC) 및 배양여액(CF)에 따른 목화진딧물의 시간에 따른 거주비율

그 결과, 전체 79%의 목화진딧물이 Bb18 포자현탁액(1×10^8 conidia/ml)이 처리된 오이 잎을 기피하는 행동을 보였으며, 그 이외의 낮은 농도의 포자현탁액 처리에서는 기피 행동을 보이지 않았다. 그리고 전체 88%의 목화진딧물도 Bb18 배양액(1×10^8 blastospore/ml)이 처리된 오이 잎을 기피하는 행동을 보였다. 마지막으로 Bb18 배양여액이 처리된 오이 잎 역시 전체 88%의 목화진딧물이 기피하는 행동을 보임으로써 Bb18 배양여액 안에 목화진딧물에 기피활성을 보이는 물질의 존재를 파악하였다.

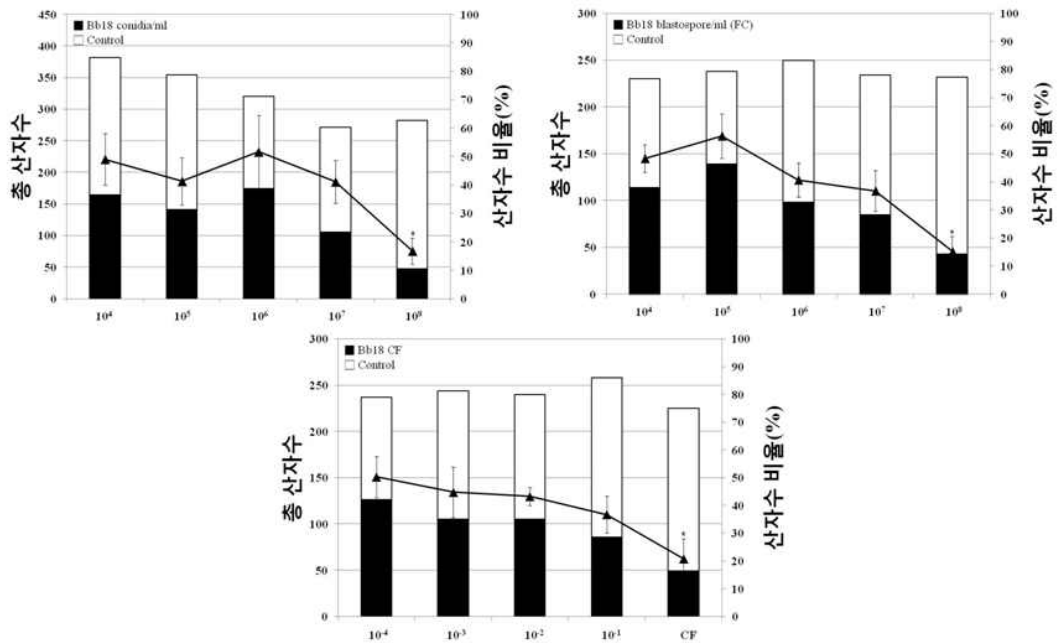


Fig. 26. Bb18 포자현탁액, 배양액(FC) 및 배양여액(CF)에 따른 목화진딧물의 산자수 비율

Bb18균의 목화진딧물에 대한 예방 효과 활성을 산자수 비율을 통해 확인 한 결과, 전체 산자수 중 85%의 산자가 Bb18 포자현탁액(1×10^8 conidia/ml)이 처리되지 않은 무처리구 오이 잎에 존재하는 것을 확인할 수 있었고, 배양액(1×10^8 blastospore/ml) 처리구 에서도 전체 85%의 산자가 무처리구 오이 잎에 존재하는 것을 확인할 수 있었다. 마지막으로 배양여액 원액 처리구에서도 전체 79%의 산자가 무처리구 오이 잎에 존재하는 것을 확인하였다.

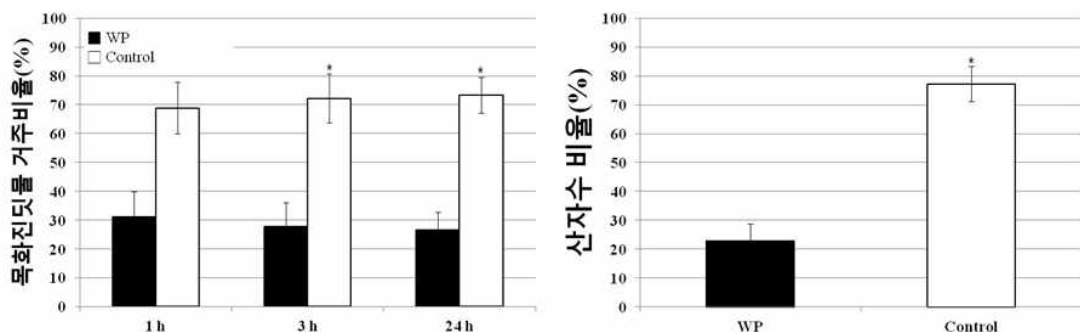


Fig. 27. 수화제 100배 처리에 따른 목화진딧물의 시간에 따른 거주비율과 산자수비율

마지막으로, Bb18균이 주 성분으로 이루어진 수화제를 이용하여 목화진딧물에 대한 기피 활성을 조사한 결과, 수화제 100배 희석액(3×10^5 CFU/ml)을 처리한 처리구에 전체 73%의 목화진딧물이 기피하는 것을 확인할 수 있었고, 산자수 또한 무처리구 오이 잎에 전체 77%의 산자구 존재하는 것을 확인할 수 있었다.

종합적으로 목화진딧물은 Bb18균(1×10^8 conidia or blastospore/ml)이 처리된 오이 잎을 기피하는 것을 확인할 수 있었고, 배양여액에서도 기피활성 물질이 있음을 확인 하였다. 또한 목화진딧물에 대한 기피활성이 있는 Bb18균이 주성분인 수화제에서도 목화진딧물에 대한 기피활성이 있는 것을 확인하였다. 이상의 결과를 종합하여 Bb18 균은 목화진딧물에 대한 직접적인 살충활성 기작 이외에 선 처리에 의한 예방적 효과를 확인하였으며, 이러한 Bb18균이 주성분으로 이루어진 수화제는 목화진딧물 예방을 위한 종합적 해충관리의 일환으로 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

바. Bb18균의 살충활성 기작

(1) 선택배지

앞 의 3번의 수화제의 실외 실험에서 얻어진 오이 잎을 이용하여 Bb18균의 살충활성 기작이 오이 잎의 외생에 의한 기작인지 내생에 의한 기작인지 알아보기 위하여, 수화제 처리된 후 2주 지난 오이 잎을 표면 소독 한 후, *Beauveria* 속 선택배지에 치상한 결과, 오이 잎 시료에서 Bb18 균의 colony는 확인할 수 없었다.

(2) PCR

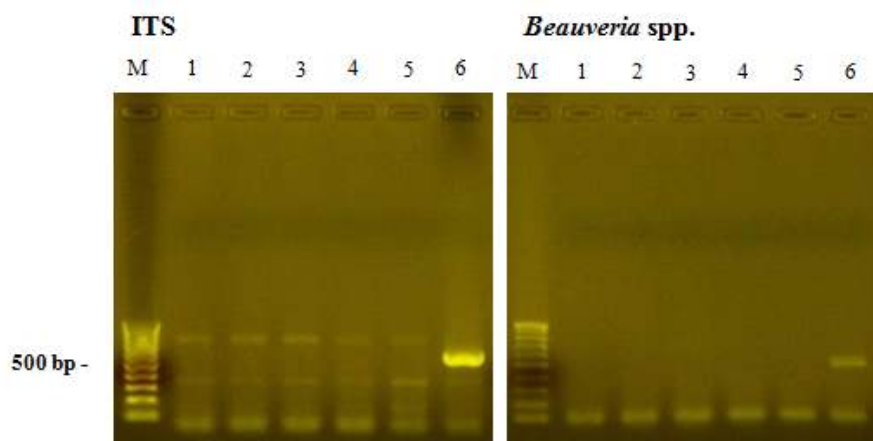


Fig. 28. 수화제 오이잎의 gDNA 추출 후, 곰팡이 특이적 ITS primers 및 *Beauveria* spp. 특이적 primers로 PCR한 후 전기영동한 사진. M, 100 bp ladder; 1, 무처리 오이잎; 2, 수화제100배 처리구 오이 잎; 3, 수화제500배 처리구 오이 잎; 4. 수화제100배 2회 처리구 오이 잎; 5. 수화제500배 2회 처리구 오이 잎; 6. PDA에서 자란 Bb18 genomic DNA

Bb18 수화제의 처리된 오이 잎 안에 내생된 전체 곰팡이 DNA 추출하였고, 이를 *Beauveria* spp. 특이적 PCR primer로 PCR하여 Bb18균의 내생 활성을 확인하였다. 그 결과를 전기영동 분석한 결과, 수화제 처리된 오이 잎 시료에서 예상되는 약 500 bp의 밴드가

관찰되지 않아 PCR 기법으로도 오이 잎에 내생한 Bb18균을 확인할 수 없어, 최종적으로 Bb18 수화제의 하우스 조건에서의 목화진딧물에 대한 살충활성은 내생활성이 아닌 외생활성에 의한 것으로 확인되었다.

(3) 살충활성물질 구명

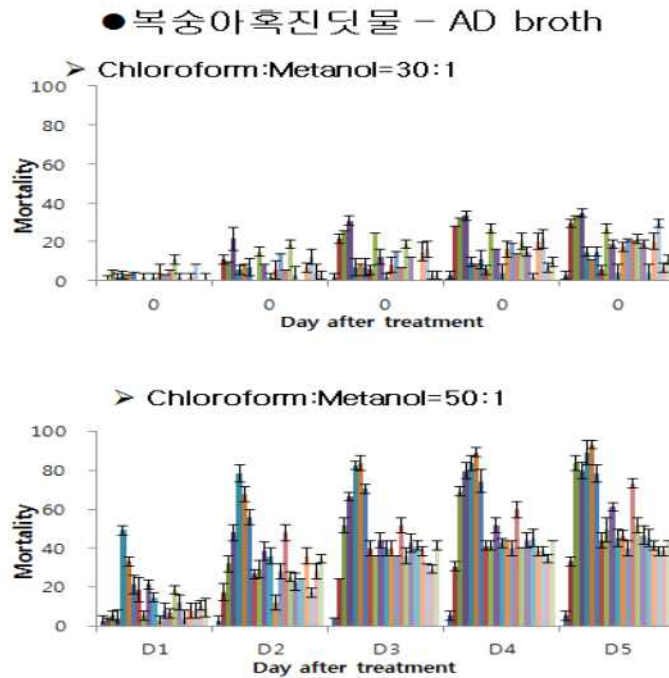


Fig. 29. AD broth 배양 곰팡이 균주의 배양여액 컬럼크로마티그래피 분획의 복숭아혹진딧물에 대한 살충율

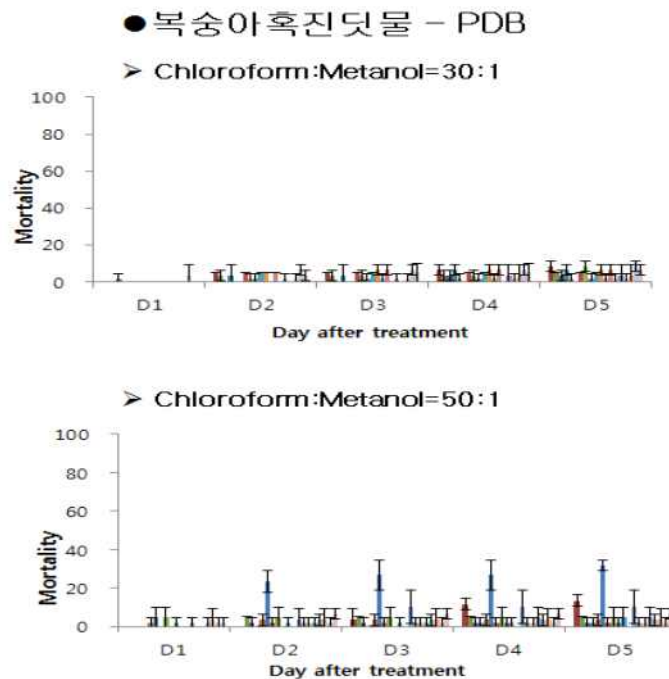


Fig. 30. PDB broth 배양 곰팡이 균주의 배양여액 컬럼크로마티그래피 분획의 복숭아혹진딧물에 대한 살충율

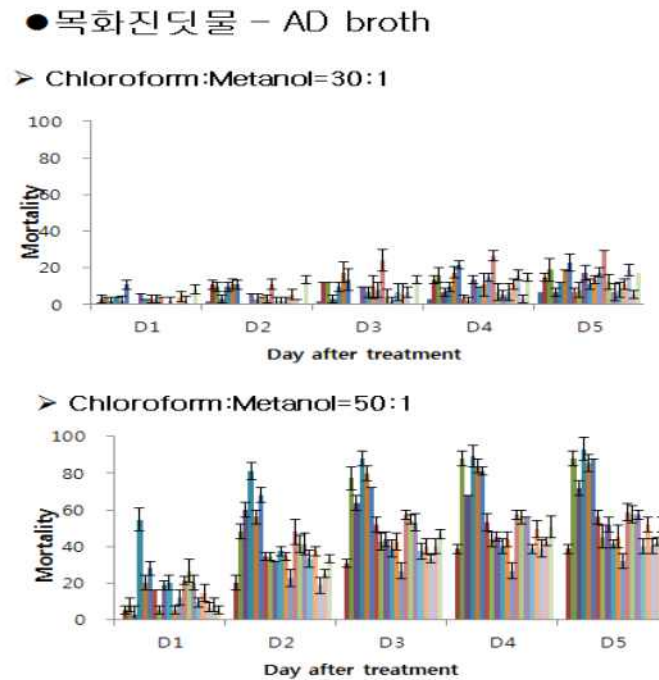


Fig. 31. AD broth 배양 곰팡이 균주의 배양여액 컬럼크로마티그래피 분획의 목화진딧물에 대한 살충율

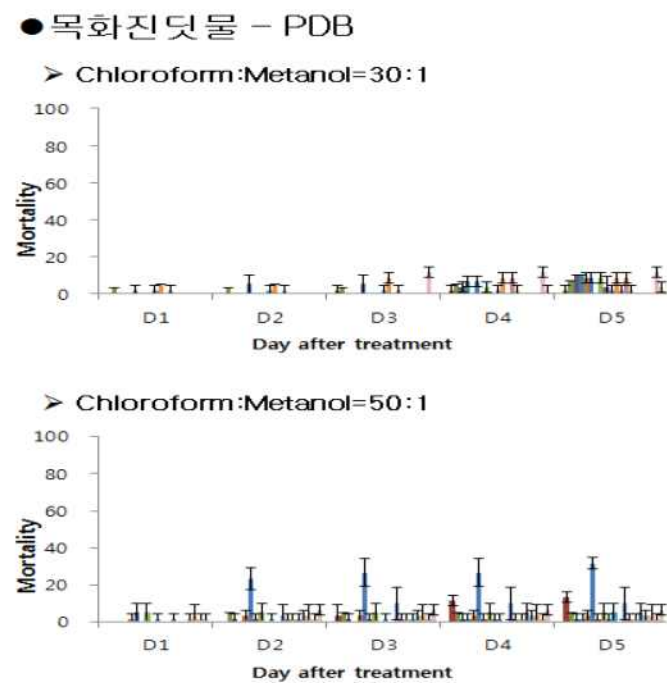


Fig. 32. PDB broth 배양 곰팡이 균주의 배양여액 컬럼크로마티그래피 분획의 목화진딧물에 대한 살충율

Bb18균의 살충활성 물질의 특성을 파악하기 위하여, Bb18균을 PDB 및 AD 배지 배양하였고, 얻어진 배양여액을 크로마토그래피하여 여액 분획을 취하여 목화진딧물과 복숭아혹진딧물에 살포한 결과, PDB 배양여액 분획에서는 목화진딧물 및 복숭아혹진딧물에 살충력이 매우 낮게 나타났다.

AD 배양여액의 분획 중 chloroform:methanol = 50:1 분획의 살충율이 30:1 보다 높게 나타났으며, 특히 초기 분획의 살충율이 높은 것으로 보아 저분자 물질에서 살충율이 높을 것으로 추정되었다.

AD 배양여액의 30:1 분획 살충율이 PDA보다 높게 나타나 AD 배지에서 곰팡이 균을 배양시 살충성 물질의 생산이 많은 것으로 추정되며, 분획의 살충율이 배양액 전체에 비해 낮은 것은 생산 대사산물의 조합에 의한 상승효과로 추정되어 각 분획의 조합에 의한 적정 살충물질 분리 및 동정이 추가로 수행되어야 할 것으로 생각된다.

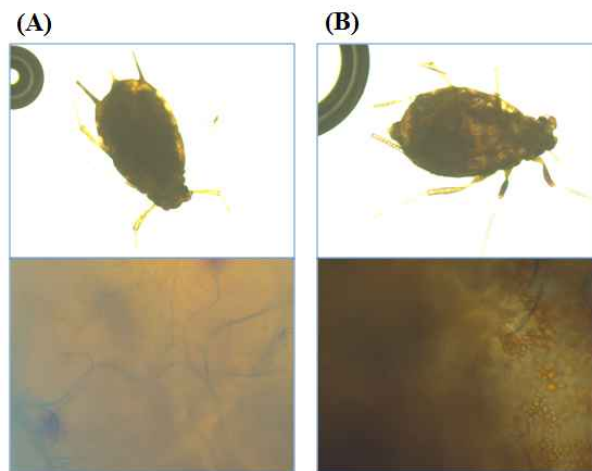


Fig. 33. Bb18 포자현탁액(1×10^8 conidia/ml)에 spray접종된 후 3시간 후의 목화진딧물(A) 및 복숭아혹진딧물 현미경 사진. 위 50배; 아래 400배

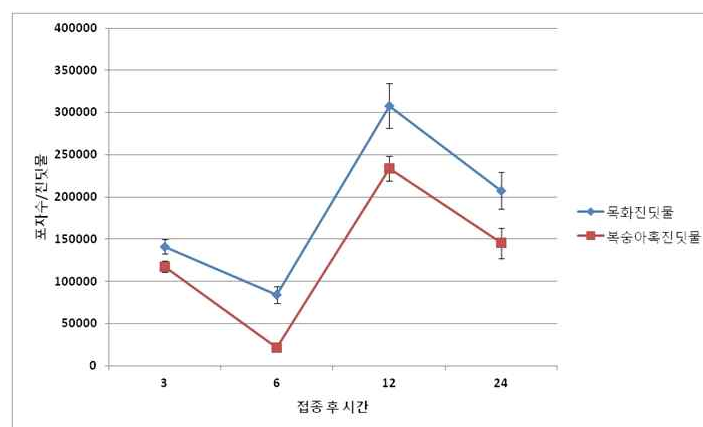


Fig. 34. Bb18 포자현탁액(1×10^8 conidia/ml)에 spray접종된 후 시간에 따른 3시간 후의 목화진딧물(A) 및 복숭아혹진딧물에 부착된 포자 수

Bb18 균의 두 종의 진딧물에 대한 병원성 기작을 곤충병원성 곰팡이 포자의 첫 병원성

기작인 포자 부착능으로 평가하고자 하였다. 그 결과, Bb18균은 진딧물의 종류에 따라서 부착되는 포자의 수가 다른 것을 확인할 수 있었고, 복숭아혹진딧물 보다 목화진딧물에 부착되는 포자가 많음을 확인할 수 있었다.

Bb18 균의 두 종의 진딧물에 대한 포자 발아율, 침입 개시일 및 2차 포자 형성율은 현미경 관찰을 통해 직접적으로 관찰하기는 어려웠으나, 유기용매를 이용한 진딧물에 부착된 균을 현탁시켜 간접적으로 관찰하는 방법으로 유추할 수 있었다. 그 결과, 진딧물 표면에 부착된 균수가 Bb18균 처리 6시간 후 줄어드는 경향에 따라서, 부착 6시간 이전에 침입이 개시되는 것으로 생각되며, Bb18균 처리 12시간 후 표면의 부착 포자가 증가함에 따라 2차 포자의 형성은 Bb18처리 12시간부터 이루어지는 것으로 평가 된다. 하지만 명확한 결과를 위하여 전자현미경을 이용한 직접적인 관찰과 더 추가적인 실험이 필요하다고 생각된다.

사. Bb18균의 항균활성 기작

(1) 기생활성검정

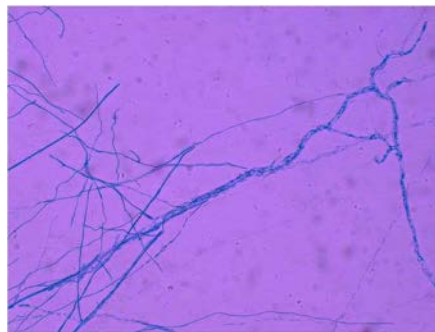


Fig. 35. Bb18균(왼쪽)과 균핵병원균(오른쪽)의 slide glass culture한 모습

Bb18균의 균핵병원균에 대한 항균활성이 기생활성인지 확인하기 위하여, Bb18균과 균핵병원균을 slide glass에 대치배양하여 Bb18균의 기생활성을 현미경 관찰하여 확인한 결과, Bb18균의 균핵병원균에 coli 형태의 기생활성을 보이지 않음에 따라 기생활성에 따른 항균활성은 아닌 것으로 판단되었다. 즉, Bb18균은 균핵병원균을 분해하지 못하는 것으로 평가 되었다.

(2) 항균활성물질검정

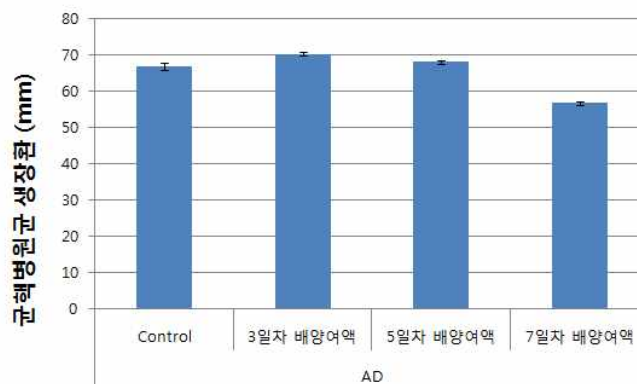


Fig. 36. AD배지에서 배양한 Bb18 배양여액의 균핵병원균에 대한 항균활성

Bb18 균의 항균활성이 대사산물에 의한 활성인지 확인하기 위하여 Bb18균을 PDB, SDB 그리고 AD 배지이 3, 5, 7일 배양 한 배양여액을 이용하여 항균활성을 검정 하였다. 그 결과, AD배지에서 7일간 배양한 Bb18균의 배양여액에서만 항균활성을 관찰할 수 있었고, 이를 통해서 Bb18 균의 항균활성 물질이 배양여액 안에 존재하는 것도 확인할 수 있었다.

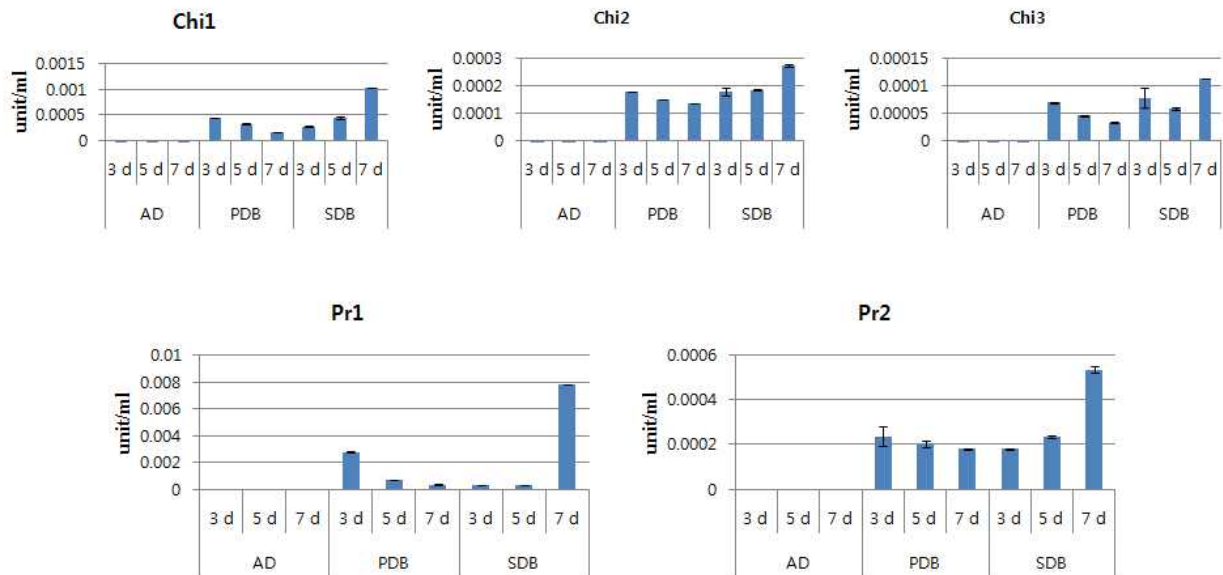


그림 37. PDB, SDB 그리고 AD배지에서 배양한 Bb18 배양여액의 세포외효소 활성. Chi1,

4-Nitrophenyl N-acetyl-b-D-glucosaminide;

Chi2, 4-Nitrophenyl N,N'-diacetyl-b-D-chitobioside;

Chi3, 4-Nitrophenyl b-D-N,N',N''-triacetylchitotriose;

Pr1, succinyl-(alanine)2-proline-phenylalanine-p-nitroanilide;

Pr2, benzoyl-phenylalanine-valine-arginine-p-nitroanilide.

Bb18 균의 항균활성 물질의 세포외효소와의 연관성을 알아보기 위하여 위의 실험에서 얻어진 다양한 배양여액을 이용하여 chitinase 그리고 proteinase에 활성을 측정한 결과, AD 배지에서 생성된 Bb18 균 배양여액에서는 다른 배양여액에 비해 낮은 세포외활성이 나타남에 따라 항균활성 물질은 세포외효소와 연관성이 없는 것으로 확인 되었다.

제2절 병해충 동시방제 가능 미생물의 배양 및 특성 구명 연구

1. 재료 및 방법

가. 살충활성이 우수한 선발 균주 연구

(1) 균주의 배양적 특성 규명

주관기관인 국립농업과학원 농업미생물과로부터 살충활성이 우수한 균주 3종(*Isaria* pf59, *Beauveria bassiana* 18, *Verticillium lecanii* 625)을 분양 받았으며, 배양 특성 규명 실험을 위하여 PDB agar 배지에 순수분리 및 배양을 실시하였다. 또한, 당사에서 보유 중인 1종의 균주(*Metarhizium anisopliae* KACC40029)도 살충 균주 적용 실험을 위하여 PDB agar 배지에 접종하였고, 28℃ 인큐베이터에 배양하였다.

(가) 기본 배지 조건 탐색

살충활성이 우수한 균주 4종의 기본 배양 조건을 탐색하기 위하여 문헌조사(Sung, et al., 2003; Sim et al., 1999; 홍, 2014))를 통하여 7종류 배지를 선발하였다(Table 1.). 선발한 7종의 배지에 agar 2%씩 첨가하여 평판배지를 제조하였고, 각 조건의 배지에 4종의 살충균주를 접종하여 28℃ 인큐베이터에 5일간 배양하였다. 무처리인 water agar(agar 2%)를 사용하였다.

(나) 2차 배지 선발을 위한 액상 배양 적용 실험

1차 선발한 3종의 기본 배지를 이용하여 살충균주 4종을 액상 배양에 적용하였다. 500ml의 삼각플라스크에 각 배지를 300ml 씩 제조하였고, autoclave를 이용하여 121℃에서 약 15분간 멸균하였다. 평판배지에 배양한 살충균주 4종의 piece(지름 0.5cm)를 10개씩 멸균된 각 배지에 접종하였고, shaking incubator KSI 200FL(고려기기, Korea)를 이용하여 28℃에서 120rpm으로 진탕 배양하였다. 5일 후, 각 배지에서 배양한 균체를 회수하기 위하여 삼각플라스크에 유리갈때기를 올린 후 filter paper 110mm(Toyo Roshi Kaisha, Japan)를 깔고 24시간 동안 수분을 최대한 분리한 다음 균체의 무게(wet weight)를 측정하였다(강, 1997).

Table 1. 살충활성 균주 배양 적용을 위한 7종의 선발 배지 및 조성 비율

구 분	구성 성분	함 량(g/ℓ)	비 고
MEP	Malt extract	30	대체 : Peptone
	Soya peptone	3	
SDY	Glucose	40	
	Peptone	10	
	Yeast extract	10	
MSM	Maltose	20	대체 : Peptone
	Proteose peptone	40	
	Potassium nitrate	5	
	Ammonium chloride	0.5	
	Calcium chloridedihydrate	2	
CD	Inulin	10	
	Sodium nitrate	2	
	Potassium dihydrogen	1	
	phosphate		
	MgSO ₄	0.5	
	KCl	0.5	
	Rose - bengal	1/10000	
Adamek 's liquid Medium	Glucose	40	
	Yeast extract	40	
	Corn steep liquid	30	
PDB	Potato starch	4	
	Dextrose	20	
SDB	Peptic digest of animal tissue	5	
	Pancreatic digest of casein	5	
	Dextrose	20	

(2) 대량 배양을 위한 최적 조건 탐색

(가) 대량 배양 적용을 위한 최적 배양 온도 조사

각 살충균주별 최적 배지에서 대량 배양에 적용 시 최적 온도를 조사하기 위하여 500 ml의 삼각플라스크에 각 배지를 300ml 씩 제조하였고, autoclave를 이용하여 121℃에서 약 15분간 멸균하였다. 평판배지에 배양한 살충균주 4종의 piece(지름 0.5cm)를 10개씩 멸균된 각 배지에 접종하였고, shaking incubator KSI 200FL(고려기기, Korea)를 이용하여 20, 28, 35℃에서 120rpm으로 진탕 배양하였다. 5일 후, 각 배지에서 배양한 균체를 회수하기 삼각플라스크에 유리칼때기를 올린 후 Filter papper 110mm(Toyo Roshi Kaisha, Japan)를 깔고 24시간 동안 수분을 최대한 분리한 다음 균체의 무게(wet weight)를 측정하였다.

(나) 대량 배양 적용을 위한 최적 배양 시간 조사

각 살충균주별 최적 배지에서 대량 배양에 적용 시 최적 배양 시간을 조사하기 위하여 500ml의 삼각플라스크에 각 배지를 300ml 씩 제조하였고, autoclave를 이용하여 121℃에서 약 15분간 멸균하였다. 평판배지에 배양한 살충균주 4종의 piece(지름 0.5cm)를 10개씩 멸균된 각 배지에 접종하였고, shaking incubator KSI 200FL(고려기기, Korea)를 이용하여 28℃에서 120rpm으로 진탕 배양하였다. 배양 종료는 3일, 5일, 7일 후 실시하였으며, 배양 종료된 처리구의 균체를 회수하기 위하여 삼각플라스크에 유리칼때기를 올린 후 Filter paper 110mm(Toyo Roshi Kaisha, Japan)를 깔고 24시간 동안 수분을 최대한 분리한 다음 균체의 무게(wet weight)를 측정하였다(Kim et al., 2013).

(3) 살충 활성이 우수한 균주의 제형 탐색 및 연구

살충 활성이 우수한 균주를 이용하여 Fig. 1와 같이 제제화 단계를 설정하였다. 살충 균주의 경우, 내열성이 낮기 때문에 분무건조법이 아닌 동결건조법을 선택하여 진행하였다.

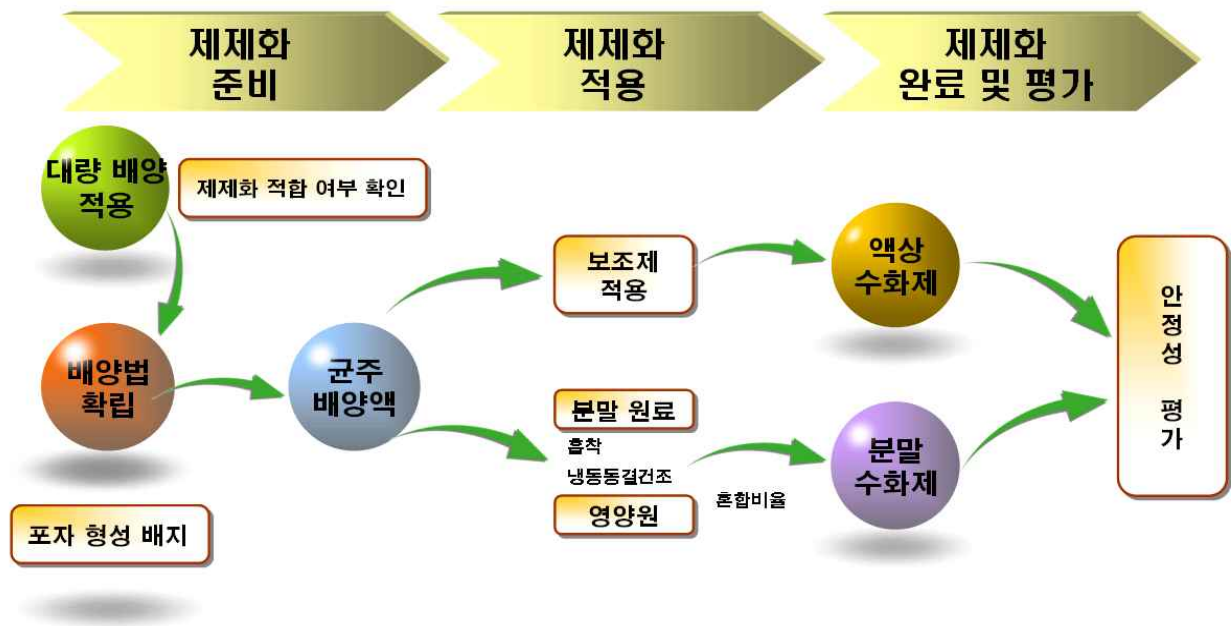


Fig. 1. 선발된 살충균주의 제제화 모식도

(가) 제제화를 위한 균주별 대량 배양 최적 조건 적용

① 최종 대량 배양액의 특성 조사

1년차 연구에서 확립된 각 살충균주 별 대량 배양 최적 조건을 바탕으로 액상수화제로 제제화하기 위하여 30 l 배양기에 적용하였다. 선발된 살충균주 4종을 500ml의 삼각플라스크에 각 균주 별 적용배지를 300ml씩 제조하여 접종하였고, 28℃ 120rpm의 진탕배양기(고려기기, Korea)에 5일간 배양하였다. 배양이 완료된 배양액을 이용하여 동일하게 30 l의 배양기에 각 균주 별 적용배지에 맞게 배양하였다. 배양이 완료된 후, PDB(Potato dextrose broth) agar에 단계희석평판도말법으로 균수를 측정하였고, 배양액의 포자형성유무를 조사하였다.

② 포자형성 배지 선발 및 적용

살충균주의 포자 형성율을 높이기 위하여 Table 2과 같이 2종의 배지를 선발하였다

(Kim, et al., 2013; Kim, 2012). 새롭게 선발한 배지와 기존 배지인 SDY, ALM 배지와 비교를 위하여 500ml의 삼각플라스크에 각 선발 배지 300ml을 제조하고 고압멸균기(Autoclave)를 이용하여 121℃에서 15분간 멸균하고, 준비된 *B. bassiana* 18 균주의 포자 현탁액 1ml을 각각 접종 후 28℃ 120 rpm의 진탕배양기에서 배양하였다. 배양 시작 후, 매 24시간마다 5ml씩 샘플링하여 광학현미경(OLYMPUS BX50, Japan)하에서 혈구계수기(Hausser Scientific, USA)를 이용하여 포자형성율을 조사하였다(Go, et al., 2013; Seo, et al., 1996)).

Table 2. 살충균주 대량 배양 시 포자형성율을 높이기 위하여 선발된 신규 배지 2종

구분	배지제조법	
	성분명	첨가비율
GY	Glucose	2
	Yeast extract	0.5
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.02
	K ₂ HPO ₄	0.1
ERBM	미강추출물(10%)	99.5
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5

(나) 액상 수화제 제제화

① 선발한 보조제의 살충균주에 대한 영향평가

살충균주의 액상 수화제 제제화를 위하여 작물의 표면에 확산과 부착이 용이하도록 도와주는 보조제로 살균 균주에 적용하였던 계면활성제 4종을 이용하여 살충균주에 대한 영향 평가를 실시하였다. 준비된 PDB(Potato dextrose broth) agar에 살충 균주 포자현탁액을 평판도말하고, 멸균된 페이퍼디스크(Paperdisc)를 올렸다. 계면활성제 4종은 0.2μm의 필터(Sartorius, Minisart)에 필터링한 후, 페이퍼디스크에 30μl씩 접종하였고, 28℃의 인큐베이터에 보관하였다. 길항 유무는 각 계면활성제 별 처리된 페이퍼디스크 주변의 클리어존 형성 유무로 판단을 하였다.

② 제제화된 액상 수화제의 안정성 평가

포자형성배지에서 배양한 후, 최종 선발된 보조제가 5% 첨가된 액상 수화제의 안정성을 평가하기 위하여 농진청에서 고시한 경시변화 시험기준과 방법(미생물농약 및 생화학농약 공통)에 따라 가열안정성시험을 실시하였다. 제제화된 액상 수화제를 멸균된 500ml의 삼각플라스크에 300ml씩 담았고, 54℃로 온도가 설정된 drying oven에 보관하였다. 제형화된 액상 수화제의 유효미생물 보증기간을 2년으로 설정하여 균수조사는 1주일 간격으로 4주간 실시하였으며, 시험은 3반복 실시하였다.

(다) 분말 수화제 제제화

① 흡착(Adsorption)

흡착 방법을 통하여 분말 원료를 만들기 위해 농업분야에 통상적으로 사용되고 있는 부형제 중에서 물에 희석하여 분무 시 노즐을 막지 않고 균주 포자가 흡착 가능한 부형제를

선발하였다.(Table 3), 선발한 부형제와 배양액의 적합한 투입비율을 조사하기 위하여 부형제 100g에 각 균주 배양액을 10, 20, 30ml의 비율로 흡착한 후, 단계희석평판도말법을 이용하여 균수를 측정하였다. 균수 측정 후, 가열안정성시험을 위하여 54℃로 온도가 설정된 drying oven에 보관하였다. 균수조사는 1주일 간격으로 2주간 실시하였으며, 시험은 3반복 실시하였다.

Table 3. 흡착을 위하여 선발한 부형제

구 분	선발된 부형제의 종류			
	이산화규소	제오라이트	규조토	카올린
성 상				

② 동결건조(Freeze dry)

㉔ 동결건조를 위한 적정 혼합비율 탐색

동결건조 시 통상적으로 사용되는 skim milk를 사용하였으며, 포자 형성 배양액과 부형제와의 혼합 비율을 4:6, 5:5, 6:4 로 설정하여 혼합하였다. 혼합이 완료된 처리구는 ultra-low temperature freezer(삼원, Korea)에 -72℃로 24시간 냉동 처리를 하였고, 24시간 후, freeze dry system(삼원, Korea)으로 동결건조하였다. 동결건조 종료 후, 수확물은 분쇄하여 혼합비율 별 균수를 측정하였다(Park, et al. 2012).

㉕ 첨가 부형제의 선발 및 적정혼합 비율 탐색

첨가 부형제의 적정혼합 비율을 탐색하기 위하여 살충 균주의 분말 수화제 제제화 시 선발되었던 증량제 7종을 사용하였다. 준비된 분말원료와 혼합비율을 1:9, 2:8 3:7의 비율로 혼합하였다. 혼합한 후, 균수를 비교하기 위하여 혼합비율 별로 샘플링하여 LB(Luria-Bertani) agar에 단계희석평판도말법으로 균수 측정을 실시하였다.

③ 제제화된 분말 수화제의 안정성 평가

확립된 분말 수화제의 안정성을 평가하기 위하여 농진청에서 고시한 경시변화 시험기준과 방법(미생물농약 및 생화학농약 공통)에 따라 가열안정성시험을 실시하였다. 제제화된 분말 수화제의 초기 균수를 측정한 후, 알루미늄 포장지에 500g을 넣어 밀봉하여 54℃로 온도가 설정된 drying oven에 보관하였다. 균수조사는 1주일 간격으로 4주간 실시하였으며, 시험은 3반복 실시하였다(제, 2012).

(1) 살충균주를 이용한 시제품 생산

(가) 생산공정 확립 및 시제품 생산

살충 활성이 우수한 미생물 방제제의 시제품 생산을 위하여 Fig. 2와 같이 생산공정도를 설정하였으며, 제제화 시험 결과를 바탕으로 Table 4에 나타난 원료 및 부형제의 배합비율로 공정도의 순서에 따라 시제품을 생산하였다. 시제품 생산 시 각 공정과정마다 균수 밀도

를 조사하기 위하여 준비된 PDB(Potato dextrose broth) agar에 단계희석평판도말법을 이용하여 도말 후, 30℃의 인큐베이터에 48시간 배양하였다.

Table 4. 복합 미생물 방제제 원료 및 부형제의 배합비율

구 분	원료명	투입비율(%)
[주성분] 미생물 및 함량	<i>B. bassiana</i> 18 5.3×10^7 cfu/g	30
[보조제] 효력증진용 부형제	제오라이트 (Zeolite)	70

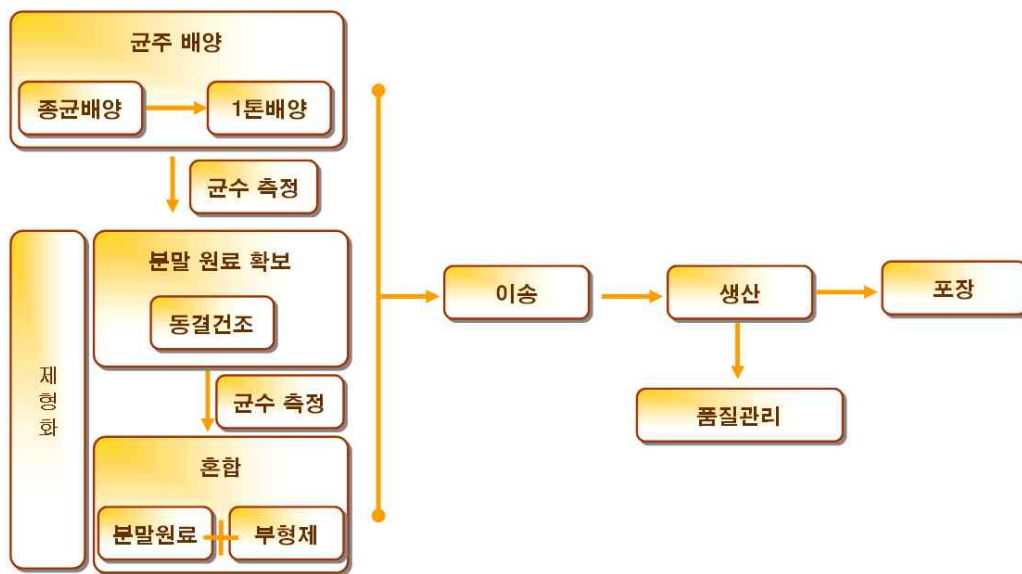


Fig. 2. 생산공정도

(나) 생산된 시제품의 품질관리(농약관리법)

① 외관 및 물리성 검사

㉠ 외관조사

생산된 시제품의 외관조사는 육안으로 실시하였으며, 성상, 색상, 냄새를 조사하였다.

㉡ 수화성

생산된 시제품의 수화성을 조사하기 위하여 농촌진흥청 고시에 나와있는 방법에 따라 500ml의 비커에 20℃의 물 200ml을 넣고 여기에 시료 5g을 수면상 약 10cm의 위치에서 얇게 퍼지도록 떨어뜨려 수면에서 물속으로 들어가는 속도를 관찰하였고 초자봉으로 교반하여 현탁의 균일성 여부를 관찰하였다.

㉢ 분말도(건식법)

생산된 시제품 시료 20g을 sieve(내경 20cm, 높이 4.5cm)에 넣고 뚜껑을 덮은 다음 한쪽 손으로 매분 150회 속도로 sieve를 톡톡치며 매 25회 칠 때마다 sieve를 약 90도 회전시켰다. 입자가 응집되어 있는 덩어리는 솔로 가볍게 쓸어서 부수어 주었으며, sieve에서

통과하는 양이 1분간 0.1g이하가 되었을 때 남은 시료를 평량하고 시료의 통과량을 백분율로 산출하였다.

㉔ 수분

생산된 시제품의 수분 측정을 위하여 가열 건조법을 원리로 측정되는 수분측정기 (Kett사 FD-720, Japan)를 이용하였다.

㉕ 시제품 내 유효미생물 함량 분석

생산된 시제품의 유효미생물 함량 분석을 위하여 준비된 PDB(Potato dextrose broth) agar에 단계희석평판도말법을 이용하여 도말하였다. 결과조사는 30℃의 인큐베이터에 48시간 배양한 후 조사하였다.

(5) 살충균주 시제품의 안정성 개선

(가) 살충균주(*B. bassiana* 18) 배양액의 안정성 개선 시험

① 보존제를 이용한 안정성 개선

살충균주의 액상제의 경우, 밀도가 서서히 감소하는 것을 확인하였다. 그리하여, 균주 배양 종료 후 제형화 적용 전과 보관 시에 발생할 수 있는 배양액 내 균의 밀도 감소에 대한 해결방안으로 배양액의 안정성을 높일 수 있는 방법을 조사하였다. 500ml의 삼각플라스크에 300ml의 GY배지를 조제한 다음 *B. bassiana* 18 균주를 접종하여 72시간 동안 30℃로 설정된 진탕배양기에 배양하였다. 72시간 후, 각각의 *B. bassiana* 18 균주가 배양된 삼각플라스크에 글리세롤 함량이 2, 5, 10%의 비율로 첨가하여 54℃로 설정된 Drying oven에 보관 후, 2주, 4주째에 단계희석평판도말법을 활용하여 균수를 측정하였다.

② pH 조절을 통한 안정성 개선

B. bassiana 18 액체배양 시 최대포자 생성기간이 배양마다 일정하지 않아 *B. bassiana* 18 배양 조건의 안정성을 높이하고자 500ml 삼각플라스크에 GY배지(Glucose 2%, Yeast extract 0.2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%, K_2HPO_4 0.1%) 300ml를 넣고 구연산을 넣어 pH5.0, pH4.8, pH4.6, pH4.4로 조제하여 121℃에서 15분간 멸균하고 혈구계수기 측정 시 Bb18 포자 5.0×10^7 농도의 현탁액을 10ml를 접종하여 28℃에서 7일간 배양하였다. 실험은 3반복 실시하였다.

③ 살충균주(*B. bassiana* 18)의 제형 개선을 위한 첨가제 투입비율별 안정성 실험

동결건조된 살충균주의 안정성을 개선시키기 위하여 살충균주 원료의 투입비율을 30%로 고정하고 살충균주(*B. bassiana* 18)에 우수한 성장능력을 나타낸 ERBM 배지의 미강추출물, GY 배지의 Yeast extract를 활용하여 제오라이트의 혼합비율을 조정하였다(Table 5.). 혼합비율과 동일하게 제조된 시료 4종의 안정성을 조사하기 위하여 54℃로 온도가 설정된 drying oven에 보관 후, 1주일 간격으로 4주간 PDA 배지에 단계희석평판도말법을 활용하여 균수를 측정하여 살충균주의 생물학적 안전성을 조사하였다.

Table 5. 살충균주(*B. bassiana* 18)의 제형별 첨가제 투입비율

구분	각 원료 및 부형제별 투입량(%)			
	<i>B. bassiana</i> 18	미강추출물	Yeast extract	제올라이트
기존 제형	30	—	—	70
시료 1	30	20	—	50
시료 2	30	—	20	50
시료 3	30	10	10	50

(다) 살충균주(*B. bassiana* 18)의 고체배양을 이용한 안정성 향상 시험

동결건조 방식이나 제올라이트 흡착을 이용한 제형에서 균의 성장과 안정성이 불안정함을 보여 균주를 직접 고체 배양함으로써 균의 성장과 포자량 증가 등을 향상 시킬 수 있는 시험을 수행하였다.

고체배지로 사용한 원료로는 미강, 대두분, 탈지대두분, 깻묵 그리고 제올라이트를 사용하였다. 50% 구연산 희석용액 5ml를 각각의 고체배지 100g당 혼합한후 90℃ 항온수조에서 1시간 방치 후 멸균하고 *B. bassiana* 18 액체배양액 (2.0×10^8 cfu/ml) 10ml를 접종하고 25℃에서 24시간, 72시간, 96시간 배양 후 혈구계수기로 포자수를 측정하여 고체배지별 *B. bassiana* 18의 균사생장과 포자생성이 안정한 고체배지를 선발하였다.

나. 살균 활성이 우수한 균주 연구

(1) 살균활성이 우수한 균주선발

살균력과 살충력을 동시에 가지는 미생물 선발을 기본으로 하지만 살충, 살균 동시 효능 균주 선발에는 다소 시간이 필요하고 작물의 재배 특성과 병해충 발생양상을 고려하여 살균과 살충 균주를 각각 선발하여 최종 제형화 단계에서 복합 제형화 하는 것이 더욱 올바른 것으로 판단하여 우선적으로 살균력을 가지는 균주를 선발하여 연구를 수행하였다.

(가) 1차 균주선발

경상도와 전라도 지역의 작물재배지 등에서 토양시료 35점을 채취하여 1차 균주선발을 실시하였다. 1차 균주선발은 채취한 토양에서 임의적으로 1g씩 채취하여 10^3 , 10^4 으로 희석 후 단순 평판도말을 실시하였고, 30℃ 인큐베이터에 48시간동안 배양 후, 콜로니를 형성한 균주들 중 클리어존(clear zone)을 형성한 균주를 선발하는 1 layer 방법과 병원균으로 흰비단병(*Sclerotium rolfsii*)을 이용하여 중층배양법을 실시한 후, 흰비단병 균사생장에 높은 길항능력을 나타내는 균주를 선발하는 2 layer 방법을 활용하였다. 선발된 균주들은 LB agar 배지에 순수 분리하여 보관하였다(Park, et al., 2012; Kwak, et al., 2012).

(나) 2차 균주선발

선발한 25종의 균주 중 2차 선별을 위하여 PDB agar(potato dextrose broth 2.5%, Agar 2.0%) 평판배지에 3종의 병원균(흰비단병(*Sclerotium rolfsii*), 고추탄저병(*Colletotrichum acutatum*), 토마토잰빛곰팡이병(*Botrytis cinerea*))을 배양하였고, 병원균 접종 24시간 후, 1차 선발한 균주와 대치배양을 실시하였다. 균주와 대치 배양 후, 30℃ 인큐

베이터에 보관하였고, 병원균과 대치하였을 때 나타나는 클리어존의 크기가 1.0cm 이상인 균주를 선발하였다(Chon et al., 2013).

(다) 3차 균주선발

2차 선발한 8종의 균주 중 길항능력이 우수한 균주를 3차 선발하기 위하여 PDB agar(potato dextrose broth 2.5%, Agar 2.0%) 평판배지에 흰비단병, 잿빛곰팡이병, 탄저병 병원균을 배양하였고, 병원균 배양 24시간 후, 2차 선발한 균주와 4면 대치배양을 실시하였다. 대치 배양 후, 30℃ 인큐베이터에 보관하였으며, 병원균에 대하여 안정적인 길항능력을 나타내는 균주를 선발하였다(Errakhi et al., 2009).

(라) 3차 선발된 3종의 균주에 대한 분류학적 유연관계 및 생화학 특성 비교

3차 선발된 4종의 균주 중 3종의 균주가 형태학적으로 유사하여 동일한 균주인지 확인하고자 분류학적 유연관계를 조사하였다. 분류학적 유연관계 조사는 16S rRNA 간이분석을 경상대학교에 의뢰하여 실시하였다.

형태학적으로 유사한 3종의 균주에 대하여 O/F test, arginine hydrolysis, oxidase test, catalase test, starch hydrolysis, casein hydrolysis, lipid hydrolysis, gelatin hydrolysis, indole test, methyl red test, voges proskauer test, citrate utilization, cellulose hydrolysis, 염류분해 유무를 조사하였다(Kim et al., 2004).

(마) 최종 길항균주 선발

① 고추탄저병에 대하여 길항능력이 우수한 균주 선발

고추탄저병(*Colletotrichum acutatum*) 적용 실험

3차 선발된 균주 4종의 고추탄저병 적용실험을 위하여 고추에 임의로 5곳을 지정하여 니들(needle)로 상처를 내었고, LB 액상배지(Difco TM LB Broth, Miller 2.5%)에 배양한 3종의 균주를 500배 희석하여 처리하였다. 균주처리 6시간 후, 상처부위에 고추탄저병 포자를 처리하였으며, 48시간 동안 상온에서 보관 후 결과를 조사하였다(Park, et al., 2012; Kwak, et al., 2012).

고추탄저병(*Colletotrichum acutatum*) 포자발아 억제실험

고추탄저병의 경우, 군사 생장뿐만 아니라 포자의 발아를 억제하는 것이 중요하므로 3차 선발된 균주 4종의 고추탄저병 포자발아 억제실험을 실시하였다. WA(agar 2%)에 3종의 균주 배양액을 500배 희석하여 처리하였고, 6시간 후 PDA 배지에 순수 배양한 고추탄저병에서 포자를 회수하여 처리하였다. 처리후, 30℃의 인큐베이터에 보관하였고, 24시간 후, 포자발아 유무를 현미경을 이용하여 조사하였다.

② 흰비단병(*Sclerotium rolfsii*)에 대하여 길항능력이 우수한 균주 선발

3차 선발된 4종의 균주 중 가장 효과가 우수한 균주를 최종 선발하기 위하여 LB 액상배지(Difco TM LB Broth, Miller 2.5%)에 4종의 균주를 각각 30℃의 진탕배양기에서 24시간 동안 배양을 하였고, 병원균 접종은 멸균된 모래와 직경 19cm의 둥근 유리페트리디쉬에 흰비단병 균액을 처리한 후 상온에서 24시간 배양하였다. 24시간 후, 3차 선발된 3종의 균주 배양액 500배 희석액을 각 50ml씩 처리 후 48시간째에 결과를 조사하였다.

(바) 최종 선발된 길항균주 2종의 동정 및 분류학적 위치 조사

최종으로 선발된 2종(5-1, 23-15)의 균주를 동정하기 위하여 LB agar 배지에 순수하게 분리하여 30℃ 인큐베이터에서 2일간 배양 후 단일 균주임을 확인하였다. 순수하게 분리된 균주를 목원대학교 미생물생태자원연구소에 분석을 의뢰하였다.

(2) 최종선발 균주의 배양적 특성 규명

(가) 최종 선발된 균주 2종의 최적배양 조건 탐색

① 기본 배양 조건에서 생육특성 조사

최종 선발된 균주 2종의 생육특성을 조사하기 위하여 500ml의 삼각플라스크에 LB Broth 300ml을 조성하였고, 여기에 각 균주 배양액 1ml(1.0×10^6 cfu/ml) 씩 처리한 다음 shaking incubator KSI 200FL(고려기기, Korea)를 이용하여 30℃에서 120rpm으로 진탕 배양하였다. 결과조사는 6시간 간격으로 각 균주 배양액 1ml씩을 채취하여 단계희석 평판도 말법으로 균수를 조사하였다(Park. et al., 2005; Kim et al., 2006).

② 배양 온도별 생육특성 조사

최종 선발된 균주 2종의 온도조건에 따른 생육특성을 조사하기 위하여(Park, et al., 2006) 500ml의 삼각플라스크에 LB Broth 300ml을 조성하였고, 여기에 각 균주 배양액 1ml(1.0×10^6 cfu/ml) 씩 접종하여 25℃, 30℃, 35℃의 조건으로 나누어 120rpm으로 진탕 배양하였다. 결과조사는 6시간 간격으로 각 균주 배양액 1ml씩을 채취하여 단계희석평판도말법으로 균수를 조사하였다.

③ 배양 초기 pH별 생육특성 조사

최종 선발된 균주 2종의 배양 초기 pH에 따른 생육특성을 조사하기 위하여 500ml의 삼각플라스크에 LB Broth 300ml을 조성하였고, pH를 각 4, 5, 7, 9로 나누어 제조한 다음 각 처리별로 균주 2종의 배양액 1ml(1.0×10^6 cfu/ml) 씩 처리하였다. 처리 후 shaking incubator KSI 200FL(고려기기, Korea)를 이용하여 30℃에서 120rpm으로 진탕 배양하였으며, 결과조사는 24시간, 48시간 후에 분광광도계를 이용하여 흡광도(660nm)를 측정하였다.

(나) 최종선발 균주의 대량배양 조건 탐색

① 탄소원 선발

최종 선발된 균주 2종의 대량 배양에 알맞은 탄소원을 알아보기 위하여 기본 LB broth에 탄소원의 종류를 달리하여 각각 1% 첨가하였으며, 탄소원의 종류로는 arabinose, fructose, galactose, ribose, sorbitol, mannitol, sucrose, raffinose, trehalose, dextrose, xylose, sodium acetate, lactose, soluble starch를 사용하였다. 각 탄소원이 1%씩 함유된 LB broth에 최종선발된 2종의 균주 배양액 1ml(1.0×10^6 cfu/ml)을 접종하여 30℃의 진탕배양기에서 24시간 배양하였고 결과조사는 660nm에서 흡광도를 측정하여 균주의 성장 정도를 측정하였다(Min & Han, 2002).

② 질소원 선발

최종 선발된 균주 2종의 대량 배양에 알맞은 질소원을 알아보기 위하여 aater agar 배지에 질소원의 종류를 달리하여 각각 1% 첨가하였다. 질소원의 종류로는 arginine, tryptone, beef extract, lysin, malt extract, polypeptone, KNO₃, cystein, NaNO₂, (NH₄)₂SO₄, (NH₄)Cl, NH₄NO₃, soy bean meal, yeast extract를 사용하였고, 각 질소원이 1%씩 함유된 배지에 최종선발된 2종의 균주 배양액 1ml(1.0×10^6 cfu/ml)을 접종하여 30℃의 진탕배양기에서 24시간 배양하였다. 결과조사는 660nm에서 흡광도를 측정하여 균주의 성장 정도를 측정하였다.

③ 무기염류의 선발

균주의 대량 배양에 사용할 무기염류의 선발을 위하여 선발된 탄소원 1%와 질소원

1%를 기본 배지로 하여 무기염류 14종($\text{FeCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, AgNO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 4-5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KCl , $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)을 각 0.1%씩 첨가하였다. 각 미량원소가 첨가된 배지에 선발된 2종의 균주 배양액 1ml(1.0×10^6 cfu/ml)을 접종하여 30℃의 진탕배양기에서 24시간 배양하였고 균주 배양액 접종 후 24시간 쯤 각 균주의 농도를 단계희석평판도말법을 이용하여 조사하였다.

(다) 대량 생산 배양을 위한 영양성분 적정농도 탐색

① 탄소원의 비율 탐색

대량 배양에 적용 시 선발한 탄소원의 적정 비율을 조사하기 위하여 기본 LB broth에 선발한 탄소원의 농도를 1%, 2%, 3%, 4%, 5%로 조절하여 첨가하였으며, 최종선발된 2종의 균주 배양액 1ml(1.0×10^6 cfu/ml) 씩 접종하여 30℃의 진탕배양기에서 24시간 배양하였고 결과는 균주 배양액 접종 후 24시간 쯤 각 균주의 농도를 단계희석평판도말법을 이용하여 조사하였다.

② 질소원의 비율 탐색

대량 배양에 적용 시 선발한 질소원의 적정 비율을 조사하기 위하여 선발된 탄소원 2%가 함유된 배지에 선발한 질소원의 농도를 0.1%, 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0%로 조절하여 첨가하였다. 그리고 최종선발된 2종의 균주 배양액 1ml(1.0×10^6 cfu/ml)을 접종하여 30℃의 진탕배양기에서 24시간 배양하였고 결과는 균주 배양액 접종 후 24시간 쯤 각 균주의 농도를 단계희석평판도말법을 이용하여 조사하였다.

③ 무기염류의 비율 탐색

무기염류의 비율을 조사하기 위하여 위 실험에서 조사된 질소원 2%와 탄소원 0.5%가 함유된 배지에 선발된 무기염류 2종의 농도를 각 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2%씩 첨가하였다. 각 무기염류가 첨가된 배지에 선발된 2종의 균주 배양액 1ml(1.0×10^6 cfu/ml) 씩 접종하여 30℃의 진탕배양기에서 24시간 배양하였고 균주 배양액 접종 후 24시간 쯤 각 균주의 농도를 단계희석평판도말법을 이용하여 조사하였다.

(3) 살균 활성이 우수한 균주의 제형 연구

살균 활성이 우수한 균주 2종을 이용하여 Fig. 3과 같이 제제화 추진 단계를 설정하여, 액상 수화제, 유상 현탁제, 분말 수화제로 구분하여 각각의 제형에 맞는 원료, 보존제 및 보조제를 첨가하여 제제화를 수행하였다.

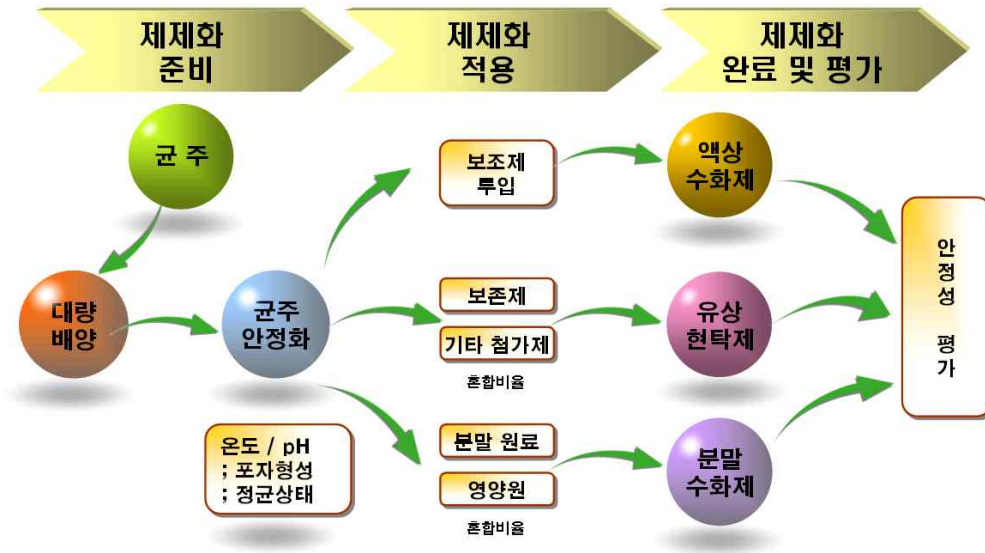


Fig. 3. 선발된 살균균주의 제제화 모식도

(가) 대량 배양액의 안정화

① 대량 배양액의 내세포자 형성을 조사

최종 선발한 균주 2종(*B. subtilis* KBC1005, *B. amyloliquefaciens* KBC1009)을 확립된 최적 대량 배양 조건에 따라 1ton의 대량 배양기에 적용하였다. 균주별 대수 생장기(exponential growth)를 지나 최대 생장점을 나타내는 시점(*B. subtilis* KBC1005 ; 30hr, *B. amyloliquefaciens* KBC1009 ; 36hr)에서 멸균된 5ℓ의 삼각플라스크에 배양액 3ℓ를 샘플링한 후 LB(Luria-Bertani) agar에 단계희석평판도말법을 이용하여 균수를 측정하고, 광학현미경(OLYMPUS BX50, Japan)으로 cell의 형태와 포자형성율을 조사하였다.

② 온도 처리에 의한 대량 배양액의 안정화

각 균주 별로 대량 배양 최적조건에서 최대 생장기를 나타내는 시점에서 샘플링한 배양액 3ℓ를 이용하여 멸균된 500ml의 삼각플라스크에 배양액 300ml씩 나누어 담고, 40, 50, 60℃ 온도로 설정된 Drying oven(세영과학, Korea)에 6시간 정치 배양하였다(최대 생장점에 도달한 후 정지기(stationary phase) ; 6~12hr). 6시간 후 LB(Luria-Bertani) agar 배지에 단계희석평판도말법을 이용하여 균수를 측정하였고, 광학현미경(OLYMPUS BX50, Japan)하에서 혈구계수기(Hausser Scientific, USA)를 이용하여 포자형성율을 조사하였다(정, 2005).

③ pH 조절에 의한 대량 배양액의 안정화

각 균주 별로 대량 배양 최적조건에서 최대 생장기를 나타내는 시점에서 샘플링한 배양액 3ℓ를 이용하여 pH 조절이 정균 상태 유도 유무와 내세포자형성에 미치는 영향(Park et al., 2006)을 조사하고자 멸균된 500ml의 삼각플라스크에 대량 배양액 300ml씩을 나누어 담았고, 멸균된 구연산 희석액을 이용하여 pH를 4, 5, 6으로 조절하여 30℃의 120rpm의 속도로 진탕배양기(고려기기, Korea)에서 12시간 진탕 배양하였다. 12시간 후, 각 처리구 별 균수를 조사하였고, 광학현미경(OLYMPUS BX50, Japan)하에서 혈구계수기(Hausser Scientific, USA)를 이용하여 포자형성율을 조사하였다(Shim, et. al., 1992).

(나) 안정화한 대량 배양액을 이용한 액상 수화제 제제화

① 보조제 선발 및 균주에 대한 영향 평가

액상 수화제 제제화를 위하여 작물의 표면에 확산과 부착이 용이하도록 도와주는 보조제로 농업분야에서 사용되는 대표적인 계면활성제 4종을 선택하였고(Table 6), 이들 계면활성제가 균주에 미치는 영향을 평가하기 위하여 LB(Luria-Bertani) agar에 균주 2종을 평판도말하였다. 0.2 μ m의 필터(Sartorius, Minisart)에 필터링한 계면활성제를 페이퍼디스크에 30 μ l씩 처리한 후 agar 배지 위에 접종하고, 30℃의 인큐베이터에 보관하였다. 길항 유무는 각 계면활성제 별 처리된 페이퍼디스크 주변의 클리어존 형성 유무로 판단을 하였다.

Table 6. 액상 수화제 제제화를 위하여 선발된 보조제

시 판 명	화 학 명	비 고
Tween 20	Polyoxyethylene(20) monolaurate	sorbitan HLB ; 16.7
Tween 80	Polyoxyethylene sorbitan mono-oleate	HLB ; 15.0
KBC 3030	POE Sorbitan Ester	HLB ; 11
PPG	Polypropylene glycol	—

② 제제화된 액상 수화제의 안정성 평가

양호한 성상을 보였던 보조제 5% 함유된 최종 액상 수화제의 안정성을 조사하기 위하여 농진청에서 고시한 경시변화 시험기준과 방법(미생물농약 및 생화학농약 공통)에 따라 가열안정성시험을 실시하였다. 제형화된 액상 수화제의 유효미생물 보증기간을 2년으로 설정하여 멸균된 500ml의 삼각플라스크에 대량 배양액 300ml씩을 나누어 담고, 단계희석평판도말법을 활용하여 균수를 측정한 후, 54℃로 설정된 drying oven에 보관하였다. 균수조사는 1주일 간격으로 4주간 실시하였으며, 시험은 3반복 실시하였다.

[별첨 1.] 경시변화 시험기준과 방법 (미생물농약 및 생화학농약 공통)

1. 경시변화시험은 상온에서 약효보증기간 동안에 시간이 경과함에 따라 물리·화학적으로 변화되는 주성분 또는 물리성을 분석하는 것을 원칙으로 하되, 다음의 기준에 의한 학대시험 성적도 인정할 수 있다. 다만, 약효보증기간이 1년 미만인 약제는 상온에서 약효보증기간 동안 시험한 성적만 인정한다.

1-1 가열안정성시험

가. 약효보증기간 1년 설정약제는 54 \pm 2℃에서 2주일 이상 시험한 성적

나. 약효보증기간 2년 설정약제는 54 \pm 2℃에서 4주일 이상 시험한 성적

(다) 안정화한 대량 배양액을 이용한 유상 현탁제 제제화

① 보존제와 보조제 선별 및 첨가비율 조사

균주 2종 중 *B. amyloliquefaciens* KBC1009의 대량 배양액을 이용하여 유상 현탁제 형으로 제제화하기 위하여 균주를 보호해 줄 수 있는 오일로 카놀라유, 대두유, 파라핀유 3종을 선별하였고, 보존제와 배양액의 첨가비율과 제제화에 적합한 성상을 나타내는 보조제를 선별하기 위하여 Table 7과 같이 첨가비율을 달리하여 적용한 후, 층분리 유무, 외관성상 등을 조사하였다(Kim, et. al., 2011; 윤, 2014).

Table 7. 보존제, 배양액, 보조제의 첨가비율 탐색을 위한 조성표

보존제	보존제 첨가비율	배양액 첨가비율	보조제 첨가비율
카놀라유	31.5	63.5	5
대두유	47.5	47.5	(Tween 20,
파라핀유	63.5	31.5	Tween 80,
			KBC 3030,
			PPG)

② 제제화된 유상 현탁제의 안정성 평가

확립된 유상 현탁제의 안정성을 평가하기 위하여 농진청에서 고시한 경시변화 시험기준과 방법(미생물농약 및 생화학농약 공통)에 따라 가열안정성시험을 실시하였다. 제형화된 유상 현탁제의 유효미생물 보증기간을 2년으로 설정하여 멸균된 500ml의 삼각플라스크에 대량 배양액 300ml씩을 나누어 담고, 단계희석평판도말법을 활용하여 균수를 측정한 후, 54℃로 설정된 drying oven에 보관하였다. 균수조사는 1주일 간격으로 4주간 실시하였으며, 시험은 3반복 실시하였다.

③ 분말 수화제 제제화

온도, 수분 등 외부 환경요소에 안정적인 분말제제화를 위해 분무건조법을 활용하였다(소노야마, 1999).

㉔ 분무건조법을 이용한 분말 원료 제조

투입시료의 혼합비율 탐색

(재)진주바이오산업진흥원의 분무건조기를 활용하였으며, 분무건조 시 균주의 흡착 부형제로 통상적으로 사용하는 텍스트린을 사용하였다. 분무건조에 적합한 배양액과 부형제의 혼합비율을 찾고자 배양액의 투입비율을 50 l로 고정한 후, 부형제인 텍스트린의 혼합비율을 각 30, 50, 70kg의 비율로 투입하였다. 투입 후, 분무건조를 실시하였고, 결과 시료별 성상과 균수를 조사하였다.

수율 향상을 위한 조건 탐색

분무건조 시 생산 수율 향상을 위하여 고정된 조건(Table 8)을 제외한 pump speed, chamber 내 온도 조절에 따른 수율과 균수 차이를 조사하기 위하여 pump speed를 5~7, chamber 내 온도를 110~140으로 각각 조절하여 분무건조를 실시하였다 (Fig. 4). 수확한 시료는 전자저울을 이용하여 무게를 측정한 후, 샘플링하고, LB agar에 단계희석평판도말법을 활용하여 균수를 조사하였다.

Table 8. 분무건조기의 기본 장치 설정 조건

부분 기기 장치	기본 설정 조건
Atomizer(RPM)	5500
Agitator(Hz)	27~28
Supply Tank TIC(℃)	30~35
Chamber Pressure	5~10
배양액 : 부형제	50 : 30



Fig. 4. 분무건조기

㉞ 첨가부형제의 탐색 및 적정혼합비율 조사

분말수화제는 액상 제형과 달리 제품 내 내생포자를 형성한 균주가 활성 상태로 전환할 수 있도록 도와주고 작물에 처리 후 빠르게 정착할 수 있도록 영양원을 첨가할 수 있는 장점이 있다. 따라서, 분말원료 이외에 첨가될 영양원과 증량제로 7종을 선택하였다(Table 9). 분말 수화제 내 증량제의 혼합비율을 조사하기 위하여 준비된 분말원료와 영양제 및 증량제의 혼합비율을 1:9, 2:8 3:7로 혼합하였으며, 균수를 비교하기 위하여 혼합비율 별로 시료를 채취하였다. 시료는 LB(Luria-Bertani) agar에 단계희석평판도말법으로 균수 측정을 실시하였다.

Table 9. 분말 수화제 제제화를 위하여 선발한 첨가 증량제

구 분	성 분 명	구 분	성 분 명
영양원	Sucrose	증량제	이산화규소
	Dextrose		제오라이트
	Dextrin		규조토
			카올린

㉔ 제제화된 분말 수화제의 안정성 평가

확립된 분말 수화제의 안정성을 평가하기 위하여 농진청에서 고시한 경시변화 시험기준과 방법(미생물농약 및 생화학농약 공통)에 따라 가열안정성시험을 실시하였다. 제형화된 분말 수화제의 초기 균수를 측정한 후, 알루미늄 포장지에 500g을 넣어 밀봉하여 54℃로 온도가 설정된 drying oven에 보관하였다. 균수조사는 1주일 간격으로 4주간 실시하였으며, 시험은 3반복 실시하였다.

(4) 최종선발한 살균균주를 활용한 시제품 제작

(가) 원료 및 보조제 투입비율에 따른 안정성 조사

분무건조(Spray drying)를 통하여 확보한 살균균주(*B. amyloliquefaciens* KBC1009) 원료와 부형제 Dextrose, 제오라이트를 이용하여 아래 Table 10과 같이 혼합비율을 설정하여 시제품을 제조하였다.

Table 10. 살균균주 원료를 이용한 시제품 원료 별 투입비율

구분	각 원료 및 부형제별 투입량(%)		
	<i>B. amyloliquefaciens</i> KBC1009	Dextrose	Zeolite
시료 1	10	90	—
시료 2	10	—	90
시료 3	10	50	40
시료 4	10	40	50

① 각 원료 투입비율 별 제조된 시제품의 외관 및 물리성 검사

원료 투입비율별로 생산된 시제품 4종의 외관 및 물리성을 평가하기 위하여 외관, 수화성, 분말도, 수분을 조사하였다. 또한, 물리적 안정성을 확인하기 위하여 알루미늄 포장지에 포장하여 54℃의 drying oven에 보관하였고, 4주 후 동일하게 외관 및 물리성 검사를 실시하였다(농약관리법).

㉔ 외관조사

생산된 시제품의 외관조사는 육안으로 실시하였으며, 색상, 냄새를 조사하였다.

㉔ 수화성

생산된 시제품의 수화성을 조사하기 위하여 농촌진흥청 고시에 나와있는 방법에 따라 500ml의 비커에 20℃의 물 200ml을 넣고 여기에 시료 5gdmf 수면상 약 10cm의 위치에서 얹게 퍼지도록 떨어뜨려 수면에서 물속으로 들어가는 속도를 관찰하였고 초자봉으로 교반하여 현탁의 균일성 여부를 관찰하였다.

㉔ 분말도(건식법)

생산된 시제품 시료 20g을 sieve(내경 20cm, 높이 4.5cm)에 넣고 뚜껑을 덮은 다음 한쪽 손으로 매분 150회 속도로 sieve를 툭툭치되 매 25회 칠 때마다 sieve를 약 90도 회전시켰다. 입자가 응집되어 있는 덩어리는 솔로 가볍게 쓸어서 부수어 주었으며, sieve에서 통과하는 양이 1분간 0.1g이하가 되었을 때 남은 시료를 평량하고 시료의 통과량을 백분율로

산출하였다.

㉔ 수분

생산된 시제품의 수분 측정을 위하여 가열 건조법을 원리로 측정되는 수분측정기 (Kett사 FD-720, Japan)를 이용하였다.

㉕ 각 원료 투입비율 별 제조된 시제품의 생물학적 안정성 평가

원료 투입비율별로 생산된 시제품 4종의 유효미생물 보증기간을 2년으로 설정하여 5 4℃로 온도가 설정된 drying oven에 보관 후, 1주일 간격으로 4주간 단계희석평판도말법을 활용하여 균수의 변화를 측정하였다.

(나) 시제품의 농약 저항성 시험

시제품에 함유된 유효미생물인 *B. amyloliquefaciens* KBC1009가 포함된 LB 고체 배지를 제조하여 굳힌 후, 각각의 농약을 농약사용지침서에 의거하여 기준량, 2배량 그리고 5배량으로 각각 희석하여 Paper disc에 40 μ l를 주입하고 24시간 후, LB 고체배지위에 나타난 Clear zone 생성 유무로서 저항성을 판단하였다.

시험에 사용한 농약으로는 살균제 8종 (그레탐 액상수화제; thifluzamide 21%(1), 헥사코나졸 액상수화제; hexaconazole 2%(2), 안타 유제; etridiazole 25%(3), 메탈리온 수화제; fludioxonil 50%(4), 뉴그린 수화제; flutolanil 25% +isoprothiolane 20%(5), 호리쿠어 유제; tebuconazole 25%(6), 살림꾼 액상수화제; metconazole 20%(7), 갈무리 수화제; pencycuron 25%(8))과 제초제 6종(디넨존 유타제; dithiopyr 32%(9), 캐치폴 액상수화제; isoxaben 50%(10), 그린키퍼 입상수화제; pyrazosulfuron-ethyl 5%(11), 뉴갈론 액제; triclopyr-TEA 30%(12), 엠시피피 액제; mecoprop 50%(13), 톤-알 액제; imazaquin 20%(14))이다.

(다) 시제품의 방제 효과 시험

① 시제품의 흰비단병에 대한 효과시험

비닐하우스에 고추모종을 정식하고 20일 후에 무처리구와 길항균 처리구로 나누고 처리구당 고추모 15주씩 나누어 시험을 진행하였다. 병원균 처리는 고추 흰비단병에서 분리한 병원균을 PDA 배지에서 배양하여 형성된 균핵을 고추 1주당 10개씩 고추모 주변에 접종하였고, 시제품(5×10^8 cfu/g)을 500배 희석하여 10L 관주처리하였다. 길항균은 10일 간격 3회 처리하고 30일간 재배하면서 고추 흰비단병 발병정도를 조사하여 무처리에 대한 방제가를 계산하였으며 모든 시험은 3반복으로 시험하였다(Errakhi & Barakate, 2009; 강, 2014).

$$\frac{\text{무처리구 조사값} - \text{처리구 조사값}}{\text{무처리구 조사값}} \times 100$$

② 식물기생성선충에 대한 살선충 효과시험

살균균주의 식물기생성선충에 대한 살선충 효과를 조사하기 위하여 5 l 용량의 삼각플라스크에 3 l 씩 배지를 조성하여 48시간 동안 30℃의 진탕배양기에서 *B. amyloliquefaciens* KBC1009를 배양하였고, 1.0×10^{10} cfu/ml의 농도로 맞추기 위하여 Ultra 원심분리기를 이용하여 농축하였다. 실험에 사용할 선충은 토양으로부터 버만갈대기법을 이용하여 분리하였고, 멸균된 직경 50mm의 페트리디쉬에 50마리/ml의 농도로 1ml씩 처리하였다. 선충이 처리된 페트리디쉬에 *B. amyloliquefaciens* KBC1009 배양액을 1.0×10^5 , 1.0×10^6 , 1.0×10^7 ,

1.0×10^8 , 1.0×10^9 cfu/ml의 농도가 되도록 처리하였고, 24시간 후 치사율을 조사하였다 (Jang, et al., 2015).

(라) 시제품의 유기농업자재 등록을 위한 안전성 평가

① 시제품의 인축 및 환경에 대한 독성 시험

안전성 평가는 농촌진흥청고시 제2013-15호 “유기농업자재 시험연구기관 지정 및 관리기준(2013년 6월18일)”의 유기농업자재 시험연구기관 규정에 따라 실시 하였으며, 농촌진흥청고시 제2015-13호 (2015년 6월 12일) “농약 및 원제의 등록기준”의 별표 12 인축 독성 시험기준과 방법, 농촌진흥청 고시 제 2014-36호 (2014년 11월 28일) 별표 13 환경생물 독성 시험기준과 방법에 준하여 실시하였다.

㉞ 인축독성 시험

시제품의 인축 독성시험을 수행하였다. 인축독성 시험항목으로는 급성경구 독성 및 병원성 시험, 급성경피 독성시험, 피부자극성 시험, 안점막 자극성 시험으로 수행하였다.

㉟ 환경독성 시험

최종 시제품의 환경독성시험을 수행하였다. 환경독성 시험항목으로는 담수어류영향시험, 꿀벌영향시험으로 수행하였다.

(마) 시제품의 유기농업자재 등록을 위한 시험

① 시제품의 유효 및 유해미생물 조사

㉞ 시제품의 유효미생물 분석

최종 시제품의 유효미생물 분석은 공인분석기관인 목원대학교 미생물생태자원연구소에 의뢰하여 분석하였다. 유효미생물의 동정을 위한 16S rRNA를 분석하기 위하여 프라이머 27F(5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3')와 1492R (5'-GGTTACCTTGTTAC GACTT-3')를 사용하여 16S rRNA gene 부분을 PCR로 증폭하였으며, 증폭산물은 PCR Product Purification Kit(Qiagen)를 사용하여 정제하였고, DNA Sequencer 3730xl(Applied Biosystems)를 사용하여 염기서열을 분석하고, 이를 NCBI/Genbank와 Ribosomal Database Project II (RDP II)의 database(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>)에서 상동성 검색으로 유전적 동정을 하였으며, 평판회석법을 이용하여 시제품내에 함유된 생균수를 측정하였다.

㉟ 시제품의 유해미생물 분석

최종 시제품의 유해미생물 분석은 공인분석기관인 목원대학교 미생물생태자원연구소에 의뢰하여 분석하였다. 유해미생물 항목으로는 병원성 대장균(*Escherichia coli*), 병원성 살모넬라(*Salmonella* sp.), *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*이다.

② 시제품의 유식물에 대한 약해 시험

시제품의 유식물에 대한 약해 유무를 조사하기 위하여 (주)생물안전성연구소에 의뢰하였으며, 약해 적용 작물은 고추, 상추, 콩, 가지, 토마토 5종을 대상으로 시험하였다. 약제처리 는 기준량(500배 희석), 배량 (250배 희석)으로 각각의 작물을 정식 후 토양관주 처리하였다. 조사 방법으로는 약제처리 3, 7, 14일 후 외관상 나타나는 약해유무를 3회 달관 조사하였다.

③ 최종 시제품의 농약잔류분석

시제품의 제품 내 농약잔류분석을 위하여 농업기술실용화재단에 의뢰하였으며, 분석

항목은 총 330항목으로 설정하여 분석하였다.

(바) 유기농업자재 목록공시

상기 모든 시험자료를 바탕으로 순천대학교에 유기농업자재 목록공시 신청을 진행하였다.

2. 연구결과

가. 살충활성이 우수한 선발 균주 연구

(1) 균주의 배양적 특성 규명

주관기관인 국립농업과학원 농업미생물과로부터 살충활성이 우수한 균주 3종(*Isaria* pf59, *Beauveria bassiana* 18, *Verticillium lecanii* 625)과 당사에서 보유 중인 1종의 균주(*Metarhizium anisopliae* KACC40029)를 배양한 후 균의 형태를 확인하였다 (Fig. 5).

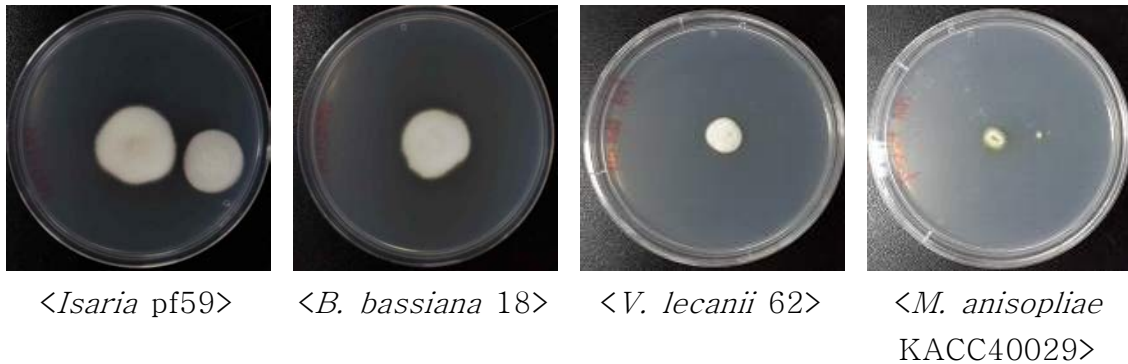


Fig. 5. 살충성 곰팡이 균주의 PDA plate 배양모습

(가) 기본 배지 조건 탐색

살충활성이 우수한 균주 4종의 기본 배양 조건을 탐색하기 위하여 문헌조사를 통하여 7종류 배지를 선발 후 4종의 살충균주를 접종하여 28℃ 인큐베이터에 5일간 배양하였고, 결과조사는 성장한 살충균주의 직경을 측정하였다(Table 11, 12).

Table 11. 살충균주 4종의 각 선발 배지 별 성장 결과









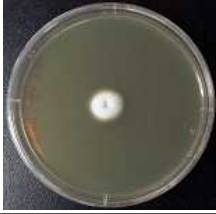








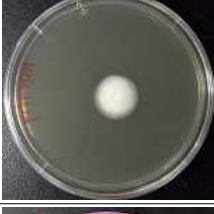






(단위 : cm)

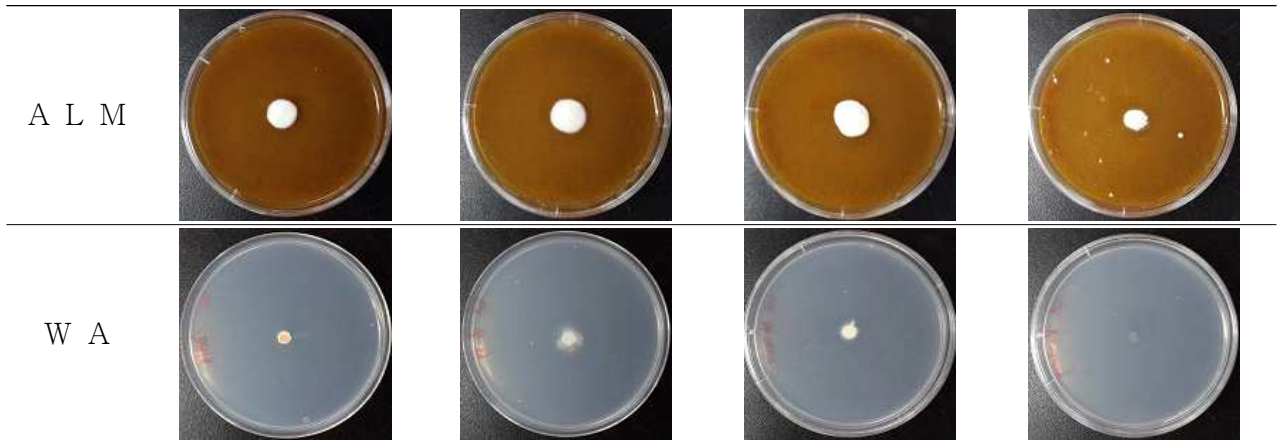
구 분	살 충 균 주 명			
	<i>B. bassiana</i> 18	<i>Isaria</i> pf59	<i>V. lecanii</i> 625	<i>M. anisopliae</i> KACC40029
P D B	1.3	2.0	1.3	0.9
S D B	1.6	2.2	1.7	0.8
S D Y	1.5	2.4	1.5	2.1
M E P	1.4	2.0	1.2	1.0
M S M	1.6	2.1	1.4	0.7
C D	0.5	0.5	0.5	0.5
A L M	1.7	1.8	1.7	1.4

W A 0.5 1.9 1.1 0.5

위 결과에서, *B. bassiana* 18균주는 SDB, ALM(Adamek 's liquid Medium)배지, *Isaria* pf59 균주는 SDB, SDY, 배지, *V. lecanii* 625균주는 SDB, ALM 배지, *M. anisopliae* KACC40029 균주는 SDY, ALM 배지를 기본 배지로 사용하는 것이 가장 적당한 것으로 조사되어 SDB, SDY, ALM 배지를 1차 선발하였다.

Table 12. 살충균주 4종의 각 선발 배지 별 생장 모습

구 분	살 충 균 주 명			
	<i>B. bassiana</i> 18	<i>Isaria</i> pf59	<i>V. lecanii</i> 625	<i>M. anisopliae</i> KACC40029
P D B				
				
S D Y				
M E P				
M S M				
C D				



(나) 2차 배지 선별을 위한 액상 배양 적용 실험

1차 선별한 3종의 기본 배지를 이용하여 살충균주 4종을 액상 배양에 적용하여 측정한 균체의 무게는 Table 13과 같았다. *B. bassiana* 18균주, *V. lecanii* 625균주는 ALM(Adamek 's liquid Medium)배지, *Isaria* pf59 균주, *M. anisopliae* KACC40029 균주는 SDY 배지를 사용하는 것이 가장 적당한 것으로 조사되었다. 또한, Fig. 6에서 나타난 것과 같이 *B. bassiana* 18 균주와 *V. lecanii* 625 균주의 경우, ALM 배지에서 배양하였을 때에는 0.3~0.4cm 크기의 아주 작은 구형의 균체를 형성하여 제형화에 적합한 성상으로 배양된 것을 알 수 있었다.

Table 13. 살충균주 4종의 각 선별 배지 별 성장 결과

(단위 : wet weight, g)

구 분	살 충 균 주 명			
	<i>B. bassiana</i> 18	<i>Isaria</i> pf59	<i>V. lecanii</i> 625	<i>M. anisopliae</i> KACC40029
S D B	19.72	23.13	20.17	23.49
S D Y	19.83	24.52	19.91	26.11
A L M	21.52	21.36	22.46	22.64
W A	5.31	6.90	5.89	3.71



< ALM >



< SDY >

Fig. 6. *B. bassiana* 18 균주의 ALM, SDY배지 적용시 생육 차이

(2) 대량 배양을 위한 최적 조건 탐색

(가) 대량 배양 적용을 위한 최적 배양 온도 조사

2차 선발된 배지를 활용하여 최적 배양 온도를 조사하기 위하여 20, 28, 35℃에서 배양 후 균체의 무게를 측정한 결과는 Table 14에 나타내었다. 결과에서 나타난 것과 같이 살충균주 4종의 가장 적합한 배양 온도는 28℃인 것을 알 수 있었다.

Table 14. 살충균주 4종의 각 선발 배지 별 온도에 따른 생장 결과 (단위 : wet weight, g)

구 분	살 충 균 주 명											
	<i>B. bassiana</i> 18			<i>Isaria</i> pf59			<i>V. lecanii</i> 625			<i>M. anisopliae</i> KACC40029		
	20℃	28℃	35℃	20℃	28℃	35℃	20℃	28℃	35℃	20℃	28℃	35℃
S D Y	—	—	—	15.8 4	24.5 2	22.7 1	—	—	—	16.2 2	26.1 1	21.4 0
A L M	14.3 7	21.5 2	20.0 6	—	—	—	13.9 9	22.4 6	19.8 2	—	—	—
W A	2.43	5.31	5.07	4.32	6.90	5.03	4.71	5.89	5.34	2.03	3.71	3.24

(나) 대량 배양 적용을 위한 최적 배양 시간 조사

각 살충균주별 최적 배지에서 대량 배양에 적용 시 최적 배양 시간을 조사하기 위하여 3일, 5일, 7일 후 배양을 종료하여 균체를 측정한 결과는 Table 15와 같았다. 결과와 같이 살충균주 4종을 3일간 배양 후 종료하였을 때 보다 5일, 7일 배양 후 종료하는 것이 회수된 균체량이 많은 것을 알 수 있었으며, 경제적인 측면을 고려하였을 때, 5일간 배양 후 종료 하는 것이 가장 적합한 것으로 사료되었다.

Table 15. 살충균주 4종의 각 선발 배지 별 배양시간에 따른 생장 결과 (단위 : wet weight, g)

구 분	살 충 균 주 명											
	<i>B. bassiana</i> 18			<i>Isaria</i> pf59			<i>V. lecanii</i> 625			<i>Metarhizium anisopliae</i> KACC40029		
	3일	5일	7일	3일	5일	7일	3일	5일	7일	3일	5일	7일
S D Y	—	—	—	22.5 4	24.5 2	24.8 0	—	—	—	22.7 5	26.1 1	26.6 2
A L M	19.7 4	21.5 2	21.7 7	—	—	—	19.6 3	22.4 6	22.7 3	—	—	—
W A	4.31	5.31	5.49	5.37	6.90	6.95	5.20	5.89	6.04	2.53	3.71	3.85

위의 결과들을 종합하였을 때, 살충 균주 4종의 가장 적합한 배양 조건은 Table 16과 같음을 알 수 있었다.

Table 16. 살충균주 4종의 대량 배양 최적 조건

구 분	살 충 균 주 명			
	<i>B. bassiana</i> 18	<i>Isaria</i> pf59	<i>V. lecanii</i> 625	<i>M. anisopliae</i> KACC40029
적용배지	ALM	SDY	ALM	SDY
배양온도	28℃	28℃	28℃	28℃
배양종료시간	5일	5일	5일	5일
회수된 균체량	21.52g	24.52g	22.46g	26.11g

(3) 살충 활성이 우수한 균주의 제형 탐색 및 연구

(가) 제제화를 위한 균주별 대량 배양 최적 조건 적용

① 최종 대량 배양액의 특성 조사

1년차 연구에서 확립된 각 살충균주 별 대량 배양 최적 조건을 적용한 결과는 Table 17와 같이 조사되었다. 결과와 같이 대량 배양 최적 조건을 적용하였을 때, 높은 밀도를 나타낸 균주는 *B. bassiana* 18균주였으며, 포자형성율도 높았기 때문에 제제화에 적합한 균주로 판단되었다. 하지만, ALM 배지에 적용하여 배양할 경우, 포자가 형성되기까지 약 15일이 소모되는 것을 확인 할 수 있었다. 따라서, 균주의 군사 생장보다 포자의 밀도를 높게 수확할 수 있는 포자 형성 배지를 탐색하였다.

Table 17. 선발된 살충 균주 별 대량 배양 최적 조건 적용 결과

구분	대량 배양 적용 별 조사결과		현미경 관찰 사진
	균수측정결과 (cfu/ml)	포자형성율	
<i>B. bassiana</i> 18	3.1×10^7	++++ ¹⁾	
<i>Isaria</i> pf59	6.7×10^6	+	
<i>V. lecanii</i> 625	—	—	오염으로 측정 불가
<i>M. anisopliae</i> KACC40029	1.0×10^7	++	

¹⁾ : 0 ; —, 1~25% ; +, 26~50% ; ++, 50~75% ; +++, 75~100% ; ++++

② 포자형성 배지 선발 및 적용

B. bassiana 18 균주의 대량 배양 적용 시 포자 형성을 위하여 선발한 배지 2종에 적용한 결과는 Table 18에 나타내었다. 신규 2종의 배지에 적용한 결과, 3일차에 *B. bassiana* 18 균주가 포자를 형성하기 시작하였고, 최종 종료일에 높은 밀도를 나타낸 배지는 ERBM이었으나, GY배지에서 포자형성율이 가장 높아 제제화에 가장 적합한 것을 알 수 있었다.

(나) 액상 수화제 제제화

① 선발한 보조제의 살충균주에 대한 영향평가

살충균주의 액상 수화제 제제화를 위하여 보조제의 살충균주에 대한 영향평가 결과는 Table 19와 같았다. Tween 20과 Tween 80은 *B. bassiana* 18균주의 생장에 영향을 주는 것으로 나타났으며, KBC3030과 PPG는 영향을 주지 않는 것으로 조사되었다. 그리하여, 살균균주의 제제화 시 가장 적합한 성상을 나타내었던 KBC3030을 5% 첨가하여 액상 수화제로 제제화 하였다.

Table 18. 선발한 포자형성 배지의 적용 결과










배지종류	배양 후 pH	균수 (cfu/ml)	균체량(g)	포자수 (conidia/ml)	포자형성사 진	배지모습
SDY	5.03	1.9×10^6	4.37	4.0×10^6		
ALM	5.14	8.3×10^6	4.63	9.7×10^6		
GY	4.68	1.1×10^7	4.88	5.9×10^7		
ERBM	5.21	2.0×10^7	5.14	4.8×10^7		

Table 19. 선발한 포자형성 배지의 적용 결과

구 분	계면활성제 종류				비 고
	Tween 20	Tween 80	KBC3030	PPG	
<i>B. bassiana</i> 18	++ ¹⁾	+++	—	—	

¹⁾ 클리어존 크기 : 없음 ; —, 0.5cm 이하 ; +, 0.6~1.0cm; ++, 1.1~1.5 ; +++, 1.6~2.0 ; +++++

²⁾ 제제화된 액상 수화제의 안정성 평가

② 선발한 보조제의 살충균주에 대한 영향평가

최종으로 제제화된 액상 수화제의 안정성을 평가한 결과는 Table 20과 같았다. 안정성 시험결과, 시간이 지남에 따라 균의 밀도가 감소하였으며, 4주차 조사 시, 1.0×10^6 cfu/g 이하로 조사가 되었다. 하지만, 이러한 결과는 액상 수화제 형태로 제제화하더라도 약 1년 이상의 기간을 보증해 줄 수 있는 가능성을 나타내었다.

Table 20. 제제화된 액상 수화제의 안정성 평가 결과

구 분	처리전 밀도 (cfu/g)	54℃ 처리 후 경과 시간에 따른 균수 측정 결과(cfu/g)			
		1 week	2 week	3 week	4 week
<i>B. bassiana</i> 18	1.0×10^7	8.7×10^6	5.3×10^6	2.1×10^6	9.1×10^5

(다) 분말 수화제 제제화

① 흡착(Adsorption)

살충균주 대량 배양액을 분말 형태로 제제화하기 위해 이산화규소, 제오라이트, 소성 규조토, 카올린 각 100g에 각 균주 배양액을 10, 20, 30ml의 비율로 흡착한 결과는 Table 21에 나타내었다. 2주차 조사 시 모든 처리구에서 1.0×10^6 cfu/g 이하로 조사되어 부형제에 배양액을 흡착하는 것은 적합하지 않은 것으로 나타났으며, 특히, 이산화 규소의 경우, 배양액을 10ml 혼합하였을 때 2주차에는 8.7×10^4 cfu/g까지 균 밀도가 낮아지는 것을 알 수 있었다. 하지만, 제오라이트와 카올린에 배양액 30ml을 혼합한 처리구의 경우, 2주차까지 어느정도 안정성을 나타내어 흡착법을 통한 가능성을 보여주었다(성, 1998).

② 동결건조(Freeze dry)

㉠ 동결건조를 위한 적정 혼합비율 탐색

동결건조 시 적합한 대량 배양액과 부형제(skim milk)와의 혼합 비율을 조사하기 위하여 각각 4:6, 5:5, 6:4로 혼합하여 freeze dry system(삼원, Korea)으로 동결건조하였고, 그 결과는 Table 22에 나타내었다. 배양액과 부형제의 혼합 비율에 따라 균의 밀도와 성장에서 약간의 차이가 있었으며, 6:4의 비율로 혼합한 처리구가 가장 적합한 것을 알 수 있었다.

Table 21. 부형제 별 배양액 혼합량에 따른 안정성 조사 결과

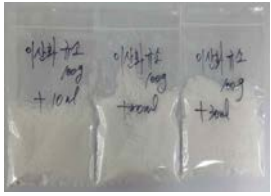
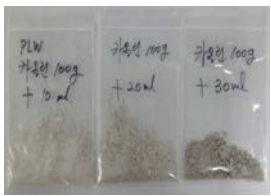



부형제 (100g)	조사기간	<i>B. bassiana</i> 18(1.1×10^7 cfu/ml) 배양액 투입량(ml)에 따른 균수 결과			비고
		10	20	30	
이산화규소	처리전	1.1×10^6	1.9×10^6	2.7×10^6	
	1 week	3.3×10^5	4.1×10^5	4.7×10^5	
	2 week	8.7×10^4	1.3×10^5	2.0×10^5	
제오라이트	처리전	1.7×10^6	2.7×10^6	3.3×10^6	
	1 week	5.1×10^5	6.3×10^5	2.1×10^6	
	2 week	2.3×10^5	3.1×10^5	9.3×10^5	
소성규조토	처리전	1.7×10^6	2.3×10^6	3.1×10^6	
	1 week	4.0×10^5	5.5×10^5	5.7×10^5	
	2 week	1.3×10^5	2.7×10^5	3.0×10^5	
카울린	처리전	1.3×10^6	2.3×10^6	3.3×10^6	
	1 week	5.7×10^5	6.3×10^5	1.1×10^6	
	2 week	2.1×10^5	3.0×10^6	8.7×10^5	

Table 22. 부형제(skim milk)와 배양액 혼합량에 따른 안정성 조사 결과

구 분	배양액 : 부형제 균수 측정 결과(cfu/g)		
	4:6	5:5	6:4
	5.3×10^6	7.1×10^6	7.7×10^6
<i>B. bassiana</i> 18			

㉔ 첨가 부형제의 선발 및 적정혼합 비율 탐색

동결건조한 분말 원료를 이용하여 분말 수화제로 제제화하고자 증량제의 혼합비율에 따른 균수 측정 결과는 Table 23에 나타내었다. 이산화규소를 혼합한 처리구를 제외한 모든 처리구에서 1.0×10^6 cfu/g이상의 밀도를 나타내었으며, 3:7의 비율로 혼합하는 것이 가장 적합한 것으로 조사되었다. 이산화규소의 경우, 앞에서 언급한 바와 같이 무게 대비 부피가 크기 때문에 균수 측정 시 낮게 나타나는 것으로 사료된다. 최종 분말 수화제 제제화를 위하여

제오라이트를 이용하여 3:7로 혼합하여 안정성 실험을 실시하였다.

Table 23. 부형제 혼합비율에 따른 균수 측정 결과

균 주	부형제의 종류	혼합비율		
		1:9	2:8	3:7
<i>B. bassiana</i> 18	영양원	Sucrose	1.3×10^6	2.3×10^6
		Dextrose	1.1×10^6	1.7×10^6
		Dextrin	1.7×10^6	2.1×10^6
	증량제	이산화규소	7.3×10^5	8.0×10^5
		제오라이트	1.3×10^6	1.9×10^6
		규조토	1.1×10^6	2.0×10^6
		카올린	1.3×10^6	2.3×10^6

③ 제제화 된 분말 수화제의 안정성 평가

확립된 분말 수화제의 안정성을 평가한 결과는 Table 24에 나타내었다. 4주차 결과 조사에서도 1.0×10^6 cfu/g 의 밀도를 나타내어 안정성을 보여주었으나 지속적으로 균수가 감소하는 경향을 보여 제형의 개선이 필요할 것으로 판단된다.

Table 24. 최종 제제화된 분말 수화제의 안정성 평가 결과

구 분	처리전 밀도 (cfu/g)	54℃ 처리 후 경과 시간에 따른 균수 측정 결과(cfu/g)			
		1 week	2 week	3 week	4 week
<i>B. bassiana</i> 18	3.1×10^7	2.3×10^6	2.0×10^6	1.7×10^6	1.1×10^6

(4) 살충균주를 이용한 시제품 생산

(가) 생산공정 확립 및 시제품 생산

살충 활성이 우수한 미생물 방제제의 시제품 생산을 위하여 설정된 생산공정도에 따라 시생산을 수행하였으며(Fig. 7) 생산단계별 유효미생물을 분석한 결과는 Table 25에 나타내었다.

Table 25. 시제품 생산 단계별 유효미생물 분석 결과

생산단계			<i>B. bassiana</i> 18 (cfu/ml, g)
1	균주 배양	종균배양	3.7×10^7
		1 ton 배양	8.1×10^7
2	분말화	동결건조	5.3×10^7
3	혼합	부형제	1.7×10^7
4	생산	시제품	1.3×10^7



Fig. 7. 시제품 생산을 위한 생산공정도

(나) 생산된 시제품의 품질관리

① 외관 및 물리성 검사

생산한 시제품의 외관(성상, 색상, 냄새)과 물리성 검사(수화성, 분말도, 수분)한 결과는 Table 26에 나타내었다.

Table 26. 최종 생산된 시제품의 외관 및 물리성 검사 결과

구 분		조 사 결 과	비 고
외관	성상	분말	농진청 고시 제2015-28호 별표 2 참조
	색상	연회색	
	냄새	특이취	
물리성 검사	수화성	양호	
	분말도	325 mesh에서 98%이상 통과	
	수분	10.25%	

외관 및 물리성 검사 결과 농진청 고시에서 제시한 기준을 모두 통과하는 것으로 나타났다.

(5) 살충균주 시제품의 안정성 개선

생산된 시제품의 보존 안전성이 가혹조건에서 일정한 안정성을 나타내었으나 보관기간이 경과될 수록 균수가 감소하는 경향을 보였으며, 실제 6개월간 보관 (실내, 냉장소보관 조건) 후의 균수가 1.3×10^3 cfu/g으로 급격히 감소한 것으로 조사되어 살충균주를 이용한 시제품

의 안정성 개선을 위한 연구가 필요할 것으로 판단되다.

(가) 살충균주(*B. bassiana* 18) 배양액의 안정성 개선 시험

① 보존제를 이용한 안정성 개선

B. bassiana 18 균주 배양액의 보관안정성을 높이고자 GY배지에 Glycerol을 2, 5, 10%씩 첨가하여 54℃ 보관안정성시험을 진행한 결과는 Table 27와 같다. 54℃ 처리 후, 2주, 4주차 조사 결과, Glycerol 2%, 5%, 10% 처리구와 무처리구간의 큰 차이는 없는 것으로 조사되어 개선 효과는 나타나지 않았다.

Table 27. *B. bassiana* 18액상제형의 균 밀도 유지하고자 보조제 Glycerol 첨가에 따른 결과

구분	주 (week)	생균수 (cfu/ml)			평균 (cfu/ml)
		1	2	3	
<i>B. bassiana</i> 18	0	1.2×10^7	1.0×10^7	1.8×10^7	1.3×10^7
	2	6.7×10^6	6.3×10^6	6.7×10^6	6.6×10^6
	4	9.7×10^5	9.0×10^5	1.0×10^6	9.6×10^5
<i>B. bassiana</i> 18+2% Glycerol	2	6.3×10^6	5.7×10^6	5.3×10^6	5.8×10^6
	4	9.3×10^5	8.4×10^5	9.7×10^5	9.1×10^5
<i>B. bassiana</i> 18+5% Glycerol	2	7.1×10^6	6.3×10^6	6.5×10^6	6.6×10^6
	4	1.0×10^6	1.2×10^6	9.0×10^5	1.0×10^6
<i>B. bassiana</i> 18+10% Glycerol	2	6.7×10^6	6.5×10^6	5.9×10^6	6.4×10^6
	4	9.7×10^5	9.3×10^5	9.3×10^5	9.4×10^5

② pH 조절을 통한 안정성 개선

pH 조건에 따른 *B. bassiana* 18 액체배양의 안정성에 대한 결과는 Table 28에 나타내었다. pH 5.0으로 조절한 처리구는 1.0×10^7 cfu/ml으로 조사된 반면 pH를 5.0이하로 조절한 처리구에서 적게는 5.3×10^7 cfu/ml에서 많게는 1.0×10^8 cfu/ml로 조사되어 상대적으로 향상된 결과를 나타내었고, 특히, pH 4.6에서 최대 밀도와 반복에 따른 안정적인 배양특성을 나타내었다. 그러므로, GY배지를 pH 4.6으로 조정하여 배양하는 것이 조금 더 안정적인 배양액을 확보할 수 있을 것으로 사료된다.

Table 28. pH 조건에 대한 결과는 pH 별 *B. bassiana* 18 액체배양 7일 후 생균수 실험결과

pH	생균수 (cfu/ml)			평균
	1	2	3	
5.0	1.0×10^7	1.2×10^7	1.5×10^7	1.2×10^7
4.8	5.7×10^7	4.8×10^7	5.4×10^7	5.3×10^7
4.6	1.0×10^8	9.7×10^7	1.1×10^8	1.0×10^8
4.4	8.3×10^7	8.0×10^7	6.3×10^7	7.5×10^7

③ 살충균주(*B. bassiana* 18)의 제형 개선을 위한 첨가제 투입비율별 안정성 실험

기존제형이 4주 후 균수가 감소하는 경향을 보여 안정성 향상을 위하여 균의 성장에 영향을 미친 첨가제를 투입하여 살충균주의 저장 안정성을 향상 여부를 조사한 결과 Table 29에 나타내었다. 미강 추출물과 yeast extract의 첨가 후에도 기존 제형과 유사한 균수를 보임으로써 첨가제의 안정성 향상 효과가 낮은 것으로 판단되어 지속적인 제형개선 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Table 29. 살충균주(*B. bassiana* 18)의 제형별 안정성 조사 결과

구분	처리전 밀도 (cfu/g)	54℃ 처리 후 경과 시간에 따른 균수 (cfu/g)			
		1 week	2 week	3 week	4 week
기존제형	3.0×10^6	2.3×10^6	1.8×10^6	7.2×10^5	1.0×10^5
개선제형 1	4.6×10^6	4.2×10^6	3.3×10^6	8.1×10^5	1.5×10^5
개선제형 2	4.0×10^6	3.0×10^6	2.2×10^6	7.7×10^5	1.3×10^5
개선제형 3	6.0×10^6	5.0×10^6	3.2×10^6	8.8×10^5	1.6×10^5

(다) 살충균주(*B. bassiana* 18)의 고체배양을 이용한 안정성 향상 시험

Beuveria bassiana 18에 대한 군사생장과 포자생성이 향상되는 고체배지를 선별하고자 미강, 대두분, 탈지대두분, 깻묵 그리고 제올라이트에 *Beuveria bassiana* 18 액체배양액을 접종하여 25℃에서 96시간 동안 배양하였고 24시간 마다 포자수를 측정 한 결과 (Table 30) 대두분과 탈지대두분은 접종 후 균의 생장이 거의 이루어지지 않고 오히려 감소하는 경향을 보였다. 제올라이트, 미강 그리고 깻묵은 접종 24시간 후 접종한 포자수만큼 확인되었으며, 제올라이트의 경우 96시간 후에는 10^1 cfu/g 정도 포자수가 감소하였다. 깻묵의 경우도 제올라이트보다는 포자수가 사멸하지 않았지만 줄어드는 경향을 보였으나 미강은 지속적인 균의 성장을 통해 포자생성력이 유지되고 있음을 확인하였다.

Beuveria bassiana 18의 군사생장과 포자생성에 안정적인 영향을 주는 고체배지로는 미강을 사용한 고체배양을 사용하는 방법도 고려해 보아야 할 것이다.

Table 30. 고체배지별 *Beuveria bassiana* 18의 포자 수

고체배지	<i>Beuveria bassiana</i> 18 포자 수(cornidia/g)		
	24시간 배양	72시간 배양	96시간 배양
제올라이트	4.2×10^7	2.0×10^6	1.8×10^6
미강	4.6×10^7	8.4×10^7	7.0×10^8
깻묵	6.0×10^7	2.5×10^7	2.1×10^7
대두분	2.0×10^6	2.0×10^6	2.4×10^6
탈지대두분	1.2×10^6	1.2×10^6	—

Table 31. 고체배지 원료별 *Beauveria bassiana* 18의 배양모습.

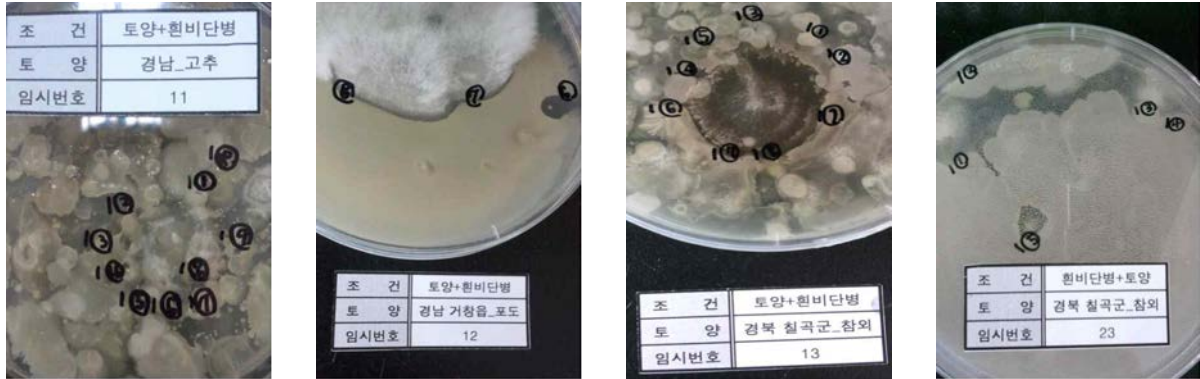
고체배지	24시간 배양	48시간 배양	72시간 배양
제올라이트			
미강			
깨묵			
대두분			
탈지대두분			

나. 살균 활성이 우수한 균주 연구

(1) 살균활성이 우수한 균주선발

(가) 1차 균주선발

경상도와 전라도 지역의 작물재배지 등에서 토양시료 35점을 채취하여 1 layer과 2 layer 방법을 통하여 1차 균주 선발을 실시한 결과, 총 25종의 균주를 선발하였으며, 선발 후 LB agar에 순수 분리하였다(Fig. 8.)



< 경남 _ 고추 >

< 경남 _ 포도 >

< 경북 _ 참외 >

< 경북 _ 참외 >

Fig. 8. 중층배양법(2 layer)을 활용한 1차 균주 선발

(나) 2차 균주선발

선발한 25종의 균주 중 2차 선별을 위하여 흰비단병(*Sclerotium rolfsii*), 고추탄저병(*Colletotrichum acutatum*), 토마토잿빛곰팡이병(*Botrytis cinerea*)에 대하여 길항능력을 조사한 결과, 높은 길항능력을 나타내는 8종의 균주(5-1, 11-14, 11-15-1, 11-15-2, 13-12-1, 13-18, 23-1-1, 23-15)를 2차 선발하였다(Fig. 9, 10, 11).

Fig. 9. 흰비단병(*Sclerotium rolfsii*)에 대한 길항능력Fig. 10. 고추탄저병(*Colletotrichum acutatum*)에 대한 길항능력

(라) 3차 선발된 3종의 균주에 대한 분류학적 유연관계 및 생화학 특성 비교

① 3종의 균주에 대한 분류학적 유연관계 조사

3차 선발된 4종의 균주 중 3종의 균주가 형태학적으로 유사하여 동일한 균주인지 확인하고자 분류학적 유연관계를 조사한 결과는 Fig. 14와 같다. 결과와 같이 *Bacillus* sp. 13-12-1, 23-15균주는 유사하나 *Bacillus* sp. 13-18 균주와는 다른 종으로 분류가 되었다. 또한, *Bacillus* sp. 13-12-1, 23-15는 *Bacillus velezensis*와 같은 그룹에 속해 진 것으로 보아 *B. subtilis* 보다는 *B. velezensis*에 더 가깝다고 볼 수 있었으며, *B. velezensis*는 *B. amyloliquefaciens*의 heterotypic synonym으로 알려져 있어서 *B. amyloliquefaciens* 으로 1차 동정되었으며, *Bacillus* sp. 13-18은 *B. subtilis*와 같은 그룹에 속해 있는 것으로 판단되어 *Bacillus subtilis*로 1차 동정되었다.

② 3종의 균주에 대한 생화학 특성 조사

형태학적으로 유사한 3종의 균주에 대하여 O/F Test, arginine hydrolysis, oxidase test, catalase test, starch hydrolysis, casein hydrolysis, lipid hydrolysis, gelatin hydrolysis, indole test, methyl red test, voges proskauer test, citrate utilization, cellulose hydrolysis, 염류분해 유무를 조사한 결과는 Table 32와 같았다. 아래 결과와 같이 *B. amyloliquefaciens* 13-12-1와 *B. amyloliquefaciens* 23-15 균주는 생화학적 특성이 다른 것으로 조사되어 전혀 다른 균주임을 알 수 있었다.



Fig. 14. 3차 선발된 균주 3종의 분류학적 유연관계

(마) 최종 길항균주 선발

① 고추탄저병에 대하여 길항능력이 우수한 균주 선발

고추탄저병 (*Colletotrichum acutatum*) 적용 실험

3차 선발된 균주 4종의 고추탄저병 적용실험에 대한 결과는 Fig. 15와 같다. 4종의 균주 모두 무처리구 보다 발병률이 낮았으며, 23-15균주가 가장 낮은 발병률을 나타내었고 그다음으로 5-1균주 처리구가 낮은 발병률을 나타내었다.

Table 32. 3차 선발한 균주 3종의 생화학적 특성 조사 결과

균주명	23-15	13-12-1	13-18
시험항목	(<i>B.amyloliquefacie</i> <i>ns</i>)	(<i>B.amyloliquefacie</i> <i>ns</i>)	(<i>Bacillus subtilis</i>)
O/F Test	AY	FY	AY
Arginine hydrolysis	+	+	+
Oxidase Test	+	+	+
Catalase Test	+	+	+
Starch hydrolysis	+	+	+
Casein hydrolysis	+	+	+
Lipid hydrolysis	-	-	-
Gelatin hydrolysis	+	+	+
Indole Test	+	+	+
Methyl Red Test	-	-	-
Voges proskauer Test	+	+	+
Citrate utilization	+	-	+
Cellulose hydrolysis	-	-	-
염류분해	-	-	-



< 무처리 >



< 5-1 >



< 23-15 >



< 13-12-1 >



< 13-18 >

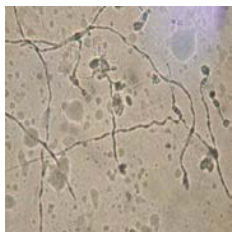
Fig. 15. 3차 선발 균주 3종의 고추탄저병 적용실험

고추탄저병 (*Colletotrichum acutatum*) 포자말아 억제실험

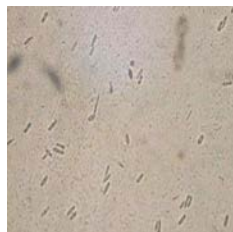
3차 선발된 균주 4종의 고추탄저병 포자발아 억제 능력 조사 결과, 무처리 포자발아율이 94.31%인 반면에 23-15균주와 5-1균주가 각 6.35%, 8.69%의 포자발아율을 나타내어 우수한 포자 발아 억제 능력을 나타내었으며, 고추탄저병에 대한 균사 길항능력이 높았던 13-18균주의 경우, 35.53%의 포자발아율을 나타내어 포자 발아 억제능력은 낮은 것으로 조사되었다(Table 33, Fig. 166).

Table 33. 선발된 균주 4종의 고추탄저병 포자발아율(%)

구분	포자발아율(%)			평균(%)
	I	II	III	
무처리	96.81	92.03	94.08	94.31
5-1	10.24	6.01	9.84	8.69
13-12-1	17.79	7.78	11.32	12.30
13-18	31.10	46.07	29.44	35.53
23-15	8.94	4.10	6.02	6.35



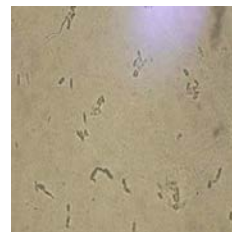
< 무처리 >



< 5-1 >



< 23-15 >



< 13-12-1 >



< 13-18 >

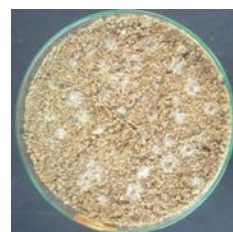
Fig. 16. 3차 선발 균주 3종의 고추탄저병 포자발아 억제실험

② 흰비단병(*Sclerotium rolfsii*)에 대하여 길항능력이 우수한 균주 선발

3차 선발된 4종의 균주 중 흰비단병 균핵 발아에 대한 길항능력 조사 결과는 Fig. 17과 같다. 결과와 같이 모든 균주 처리구에서 무처리와 대비하여 균핵 발아 억제능력은 나타내었으나, 가장 우수한 길항 능력을 나타낸 균주는 23-15균주였으며, 흰비단병과의 대치배양을 통한 길항능력 재검증 실험에서 23-15균주보다 낮은 길항능력을 나타내었던 13-18 균주는 흰비단병 균핵 발아에 낮은 억제능력을 나타내었다.



< 무처리 >



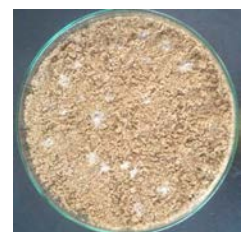
< 5-1 >



< 13-12-1 >



< 13-18 >



< 23-15 >

Fig. 17. 3차 선발 균주 3종의 흰비단병 적용실험

위에서 나타난 고추탄저병 적용실험, 고추탄저병 포자발아 억제실험, 흰비단병 적용실험의 결과를 바탕으로 고추탄저병의 균사 생장 및 포자 발아 억제능력, 그리고 흰비단병 균핵 발아 억제 능력이 가장 우수하였던 23-15 균주를 최종 선발 함과 동시에 5-1 균주를 보조 균주로 함께 선발하게 되었다.

(바) 최종 선발된 길항균주 2종의 동정 및 분류학적 위치 조사

① 23-15 균주의 16S rRNA 유전자 전염기서열 분석

최종으로 선발된 23-15 균주의 동정을 위하여 목원대학교 미생물생태자원연구소에 분석을 의뢰한 결과는 Fig. 18, 19와 같다.

```
GTCGAGCGGACCGACGGGAGCTTGCTCCCTTAGGTGACGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCT
GTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGATTGAACCGCATGGTTCAATCATAAA
AGGTGGCTTTTAGCTACCACTTGCAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAG
GCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAAACACGGCCCAGACTCCTACGGGA
GGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAACAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCG
GATCGTAAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAG
AAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCG
TAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACT
GGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACA
CCAGTGCGCAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGA
TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCAAA
CGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAG
CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAG
AGATAGGGCTTCCCCTTCGGGGGCGAGGTGACAGGTGGTGATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTG
GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCC
GGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTA
CAATGGGCAGAACAAAGGGCAGCGAAGCCGCGAGGCTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGC
AGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCC
GGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTA//
```

Fig. 18. 23-15 균주의 16S rRNA 유전자 전염기서열(1,393bp)의 분석결과

Sequences producing significant alignments			
Accession	Description	Total score	Max ident
AJ276351	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> (T); DSM10	1.000	100.0%
AB021191	<i>Bacillus mojavensis</i> (T); IFO15718	0.987	99.50%
AB021198	<i>Bacillus vallismortis</i> (T); DSM11031	0.978	99.70%
AF074970	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> (T); NRRL B-23049	0.983	99.49%
AB255669	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (T); NBRC 15535	0.970	99.86%

Fig. 19. 23-15 균주의 RDP BLAST 상동성 검색 결과

[RDP BLAST Search : http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp]

23-15균주의 16S rRNA 유전자 염기서열에 기초한 분자계통학적 분석결과, *Bacillus* 속의 종을 포함하는 계통학적 그룹에 속하는 균주로서 *Bacillus amyloliquefaciens* NBRC15535T(AB255669)와 99.9%, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* DSM10T(AJ276351)와 100%로 *Bacillus subtilis* 그룹의 표준 균주를 포함하는 근연종과 99% 이상의 유연관계를 나타내는 것으로 확인이 되어 *gyrB* 유전자에 의한 동정이 요구되었다.

② 23-15균주의 *gyrB* 유전자 전염기서열 분석

23-15균주의 *gyrB* 유전자는 *Bacillus subtilis* 그룹들의 근연종 간에 중간 유연관계를 파악하는데 유용한 정보로 사용되고 있고, *gyrB* 유전자의 전염기서열(1,090bp)을 분석한 결과는 다음과 같았다(Fig. 20, 21).

```
GTCAGTCGTAAACGCCCTGTCGACTATTCTTGAAGTTACGGTTTCATCGTGACGGAAAAATCCATTATCAGGCGT
ACGAGCGCGGTGTACCTGTGGCCGATCTTGAAGTGATCGGTGATACTGATAAGACCGGAACGATTACGCACTTC
GTTCCGGATCCGGAAATTTTCAAAGAAACAACCGTATACGACTATGATCTGCTTTCAAACCGTGTCCGGGAATT
GGCCTTCCTGACAAAAGGCGTAAACATCACGATTGAAGACAAACGTGAAGGACAAGAACGGAAAAACGAGTACC
ACTACGAAGGCGGAATCAAAAAGCTACGTTGAGTACTTAAACCGTTCCAAAGAAGTCGTTTCATGAAGAGCCGATT
TATATCGAAGGCGAGAAAGACGGCATAACGGTTGAAGTTGCACTGCAATACAACGACAGCTATACAAGCAATAT
TTATTCTTTCACAAATAATATCAACACATACGAAGGCGGCACGCACGAAGCCGGATTTAAAACCGGTCTGACCC
GTGTCATAAACGACTATGCAAGAAGAAAAGGGATTTTCAAAGAAAATGATCCGAATTTAAGCGGGGATGATGT
GAGAGAAGGGCTGACTGCCATTATTTCAATTAAGCACCTGATCCGCAATTCGAAGGGCAGACGAAAACGAAGC
TCGGCAACTCCGAAGCGAGAACGATCACTGATACGCTGTTTTTTTTTTCGCTGGAAACATTCCTTCTTGAAAAAT
CCGGACTCAGCCCGCAAAATCGTTGAAAAAGGTTTAATGGCCGCAAGAGCGCGGATGGCAGCGAAAAAAGCGCG
GGAATTGACCCGCGCAAAAGTGCGCTTGAGATTTCCAATCTGCCGGGCAAACTGGCGGACTGTTCTTCTAAAG
ATCCGAGCATTTCCGAGCTGTATATCGTAGAGGGTGACTCTGCCGGGCGGATCAGCGAAACAGGGACGGGACCGT
CATTTCCAAGCCATTCTGCCGCTGCGCGGTAAGATTCTGAACGTTGAGAAAAGCCAGACTTGATAAGATTCTCTC
AAACAATGAGGTCAGATCAATGATCACGGCCCTCGGAACAGGAATCGGAGAAGAT//
```

Fig. 20. 23-15 균주의 *gyrB* 유전자 전염기서열(1,090bp)의 분석결과

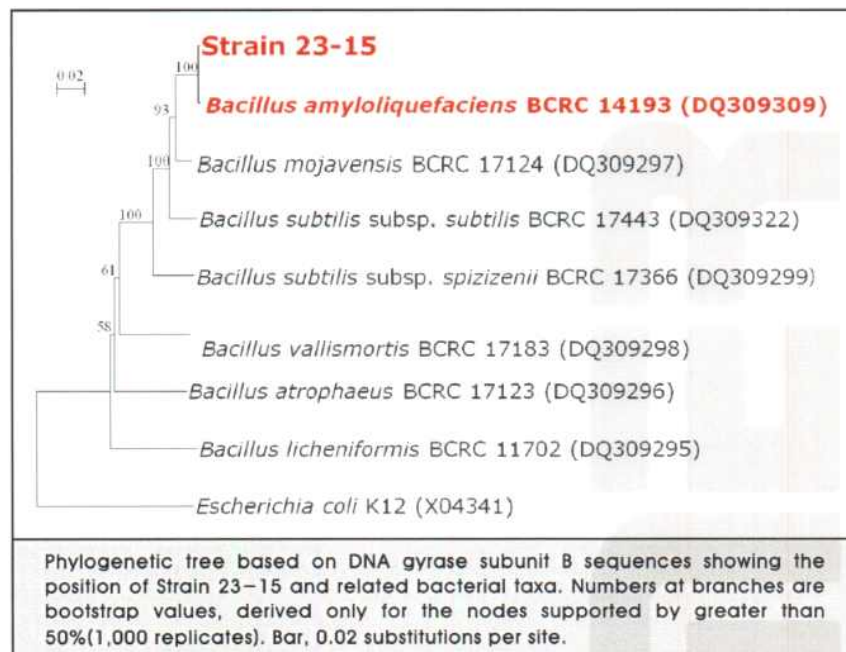


Fig. 21. 23-15균주의 계통학적 위치

23-15균주의 *gyrB* 유전자 염기서열에 기초한 분자계통학적 분석결과, *Bacillus mojavenensis*(DQ309297)와 82.1%, *Bacillus amyloliquefaciens*(DQ309309)와 98.8%의 유

연관계를 나타내는 것으로 확인되어 *Bacillus amyloliquefaciens*로 동정되었다. 또한, 위 균주는 한국생명공학연구원 미생물자원센터에 *Bacillus amyloliquefaciens* KBC1009로 특허미생물 기탁하였다(미생물 기탁번호 : KCTC18312P).

③ 5-1 균주의 16S rRNA 유전자 전염기서열 분석

선발된 5-1 균주의 동정을 위하여 목원대학교 미생물생태자원연구소에 분석을 의뢰한 결과는 Fig. 22, 23과 같다.

```
GTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCT
GTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAA
AGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGG
CGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAG
GCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGG
ATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGA
AAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGT
AAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTG
GGGAACTTGAGTGACAGAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACAC
CAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGAT
ACCTTGGTAGTCCACGCGCTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAAC
GCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGC
GGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGA
GATAGGACGTCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGG
GTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGTATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCG
GTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTAC
AATGGACAGAAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCCGATCGCA
GTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCG
GGCCTTGACACACCGCCGTCACACCACGAGAGTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCT//
```

Fig. 22. 5-1 균주의 16S rRNA 유전자 전염기서열(1,397bp)의 분석결과

Sequences producing significant alignments			
Accession	Description	Total score	Max ident
AJ276351	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> (T); DSM10	0.976	99.64%
AB021191	<i>Bacillus mojavenis</i> (T); IFO15718	0.963	99.43%
AB021198	<i>Bacillus vallismortis</i> (T); DSM11031	0.983	99.71%
AF074970	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> (T); NRRL B-23049	0.957	99.49%
AB255669	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (T); NBRC 15535	0.993	99.86%

Fig. 23. 5-1 균주의 RDP BLAST 상동성 검색 결과

[RDP BLAST Search : http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp]

5-1균주의 16S rRNA 유전자 염기서열에 기초한 분자계통학적 분석결과, *Bacillus* 속의 종을 포함하는 계통학적 그룹에 속하는 균주로서 *Bacillus amyloliquefaciens*

NBRC15535T(AB255669)와 99.9%, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* DSM10T(AJ276351)와 99.6%로 *Bacillus subtilis* 그룹의 표준 균주를 포함하는 근연종과 99% 이상의 유연관계를 나타내는 것으로 확인이 되어 *gyrB* 유전자에 의한 동정이 요구되었다.

④ 5-1균주의 *gyrB* 유전자 전염기서열 분석

5-1균주의 *gyrB* 유전자는 *Bacillus subtilis* 그룹들의 근연종 간에 중간 유연관계를 파악하는데 유용한 정보로 사용되고 있고, *gyrB* 유전자의 전염기서열(1,035bp)을 분석한 결과는 다음과 같았다(Fig. 24, 25).

```
TGGAATTGACCATTCATCGTGCCGGTAAAATTACGAACAAGAATACCGTCATGGCGATTTCACAGTATCCATTA
AAAGTGGTGGGCGATACCGATAGAACC GGTA CTCTGTCGGTTTCTGGCCAAGTGCCGAGACTTTTAGTCAGAC
CATTTTTAATGTTGATATTTTGGCGCGTCGTTTGCCTGAACTGTCGTTCTCTAAACGCAGGTGTACGTATTGTG
CTGCGTGACGAACGCATTAATGCCGAGCATGTCTTTGATTATGAAGGCGGTCTGTCTGAGTTTCGTTAAATATA
TTAACGAAGGCAAAACTCACCTGAATGATATTTTCCATTTTACTGCTGCGCAGGCTGATAACGGTATTACGGTA
GAAGTCGCATTGCAGTGGAATGATTCTTATCAGGAAAAATGTGCGTTGCTTTACCAATAACATCCCGCAAAAGGA
TGGGGGTACGCATTTGGCCGGTTTCCGCGCTGCGTTGACCCGTGGTTTAAATAACTACATGGACAGCGAAAATA
TCCTGAAAAAGGAAAAAGTTGCGGTATCGGGTGATGATGCACGTGAAGGTCTGACTGCCATCGTGTTCAGTCAA
AGTACCTGATCCAAAATTTCTTTCACAGACCAAAAGAAAAACTGGTGTGAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGT
AAGCCATGAACAAGGCATTTTCTGAATATTTATTGGAAAAATCCACAAGCAGCCAAGGCGATTGCCGGCAAGATT
ATTGATGCAGCACGTGCGCGTGATGCAGCGCGTAAAGCCCGTGAAATGACACGTGCTAAGAGTGCCTAGATAT
TGCCGGTCTTCCAGGTAACTGGCCGATTGTGAGGAAAAAGATCCAGCTTTGTCTGAACTGTACCTGGTTCGAGG
GTGATTCTGCAGGTGGTTTCAGCCAAGCAAGGTGCTAACCGTAAAAATGCAGGCGATTTTACCGCTGAAAGGTAA
GATCCTGAACGTGGAACGTGCCCGTTTGGACCGCATGATTTCCTCTGCTGAAGTCGGTACGCTGATTACTGCC
TCG//
```

Fig. 24. 5-1 균주의 *gyrB* 유전자 전염기서열(1,035bp)의 분석결과

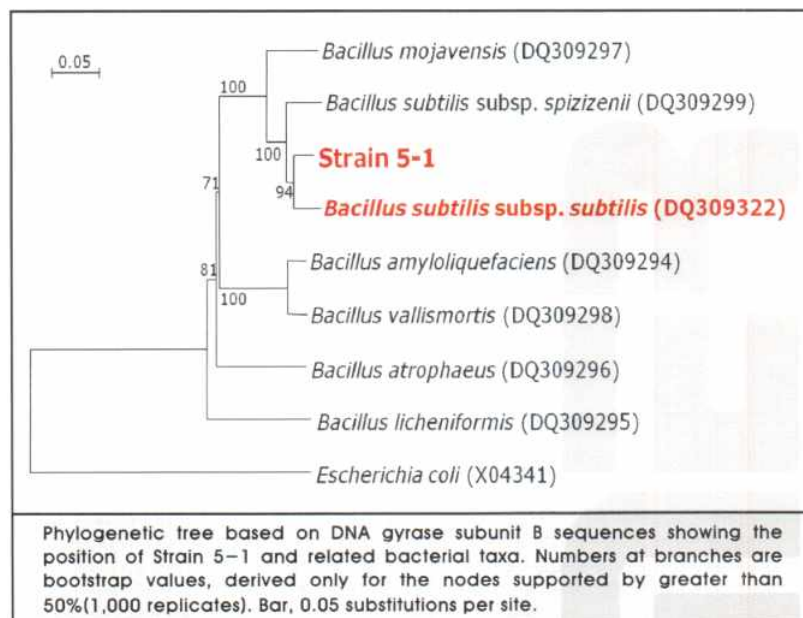


Fig. 25. 5-1균주의 계통학적 위치

5-1균주의 *gyrB* 유전자 염기서열에 기초한 분자계통학적 분석결과, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*(DQ309299)와 92.58%, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*(DQ309322)와

99.42%의 유연관계를 나타내는 것으로 확인되어 *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*로 동정되었다. 또한, 위 균주는 한국생명공학연구원 미생물자원센터에 *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* KBC1005로 특허미생물 기탁하였다(미생물 기탁번호 : KCTC18330P).

(2) 최종선발 균주의 배양적 특성 규명

(가) 최종 선발 균주의 최적배양 조건 탐색

① 기본 배양 조건에서 생육특성 조사

㉠ *B. amyloliquefaciens* KBC1009

B. amyloliquefaciens KBC1009 균주의 기본 배양 조건(LB)에서 생육특성은 Fig. 26과 같다.

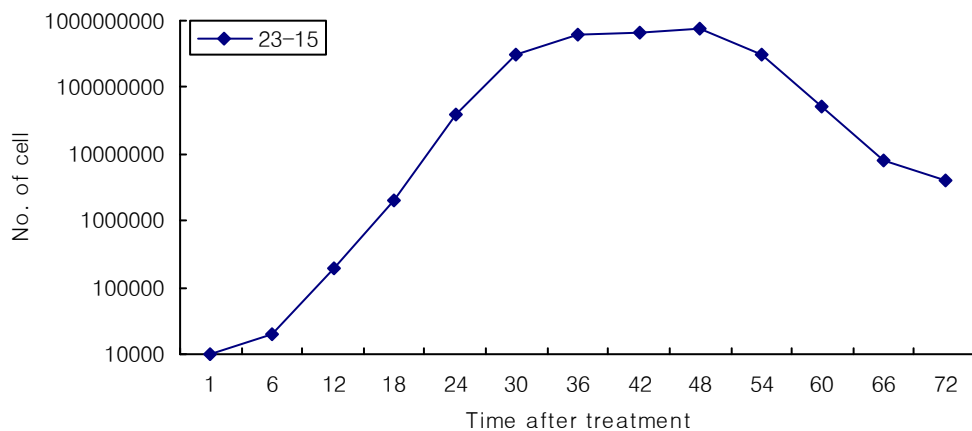


Fig. 26. *B. amyloliquefaciens* KBC1009 균주의 생육 특성

㉡ *B. subtilis* KBC1005

B. subtilis KBC1005 균주의 기본 배양 조건(LB)에서 생육특성은 Fig. 27과 같다. 총 72시간 동안 조사 결과, *B. amyloliquefaciens* KBC1009 균주와 *B. subtilis* KBC1005 균주의 최대 생장 기간은 30~36시간으로 유사하였으나, *B. amyloliquefaciens* KBC1009 균주의 경우, 48시간까지 1.0×10^9 cfu/ml 이상의 밀도로 유지하는 반면에 *B. subtilis* KBC1005 균주의 경우, 30시간 이후에 균주의 밀도가 감소하는 것을 알 수 있었다.

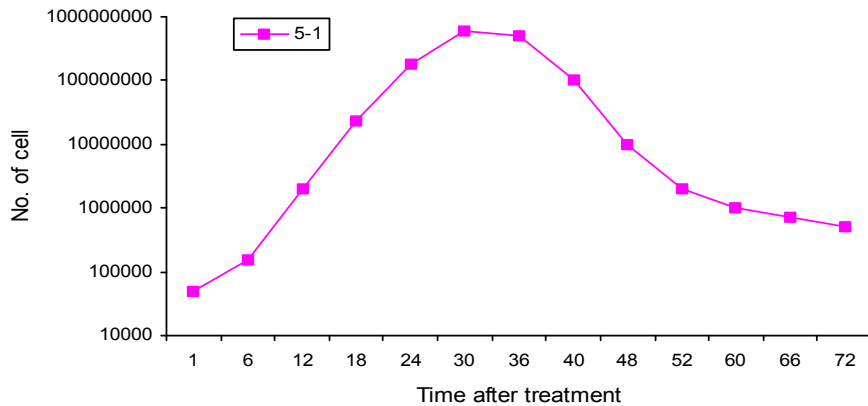


Fig. 27. *B. subtilis* KBC1005 균주의 생육 특성

② 배양 온도별 생육특성 조사

㉠ *B. amyloliquefaciens* KBC1009

B. amyloliquefaciens KBC1009 균주의 온도조건에 따른 생육특성에 대한 조사 결과는 Fig. 28과 같다. 총 72시간동안 조사한 결과, 30℃, 35℃에서 성장 패턴은 유사하였으나, 25℃에서는 성장속도가 30℃와 35℃보다 느린 것을 알 수 있었다. 위 결과를 바탕으로 30~35℃의 온도 조건이 *B. amyloliquefaciens* KBC1009 균주의 배양에 적합한 것으로 조사되었다.

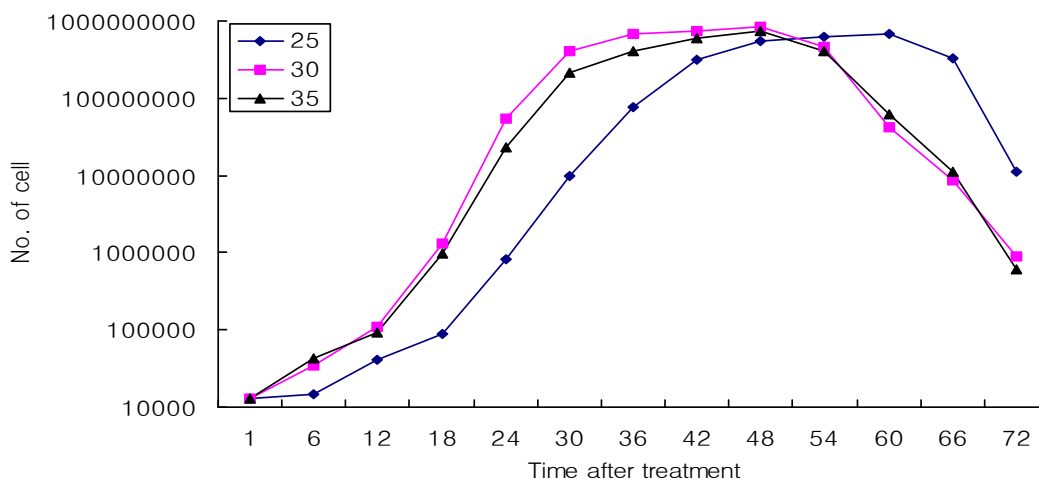


Fig. 28. 최종선발 균주(KBC1009)의 온도별 생육특성

㉡ *B. subtilis* KBC1005

B. subtilis subsp. *subtilis* KBC1005 균주의 온도조건에 따른 생육특성에 대한 조사 결과는 Fig. 29와 같다. 총 72시간동안 조사한 결과, 온도조건에 따라서 25℃에서는 40시

간, 30℃에서는 30시간, 35℃에서는 24시간 후에 최대생육을 나타낸 것을 알 수 있었으며, 25℃의 경우 성장 속도가 상대적으로 느린 것을 알 수 있었다. 또한, 30℃에서 배양하였을 경우, 가장 안정적인 패턴을 보여 30℃의 온도 조건이 *B. amyloliquefaciens* KBC1009 균주의 배양에 적합한 것으로 조사되었다.

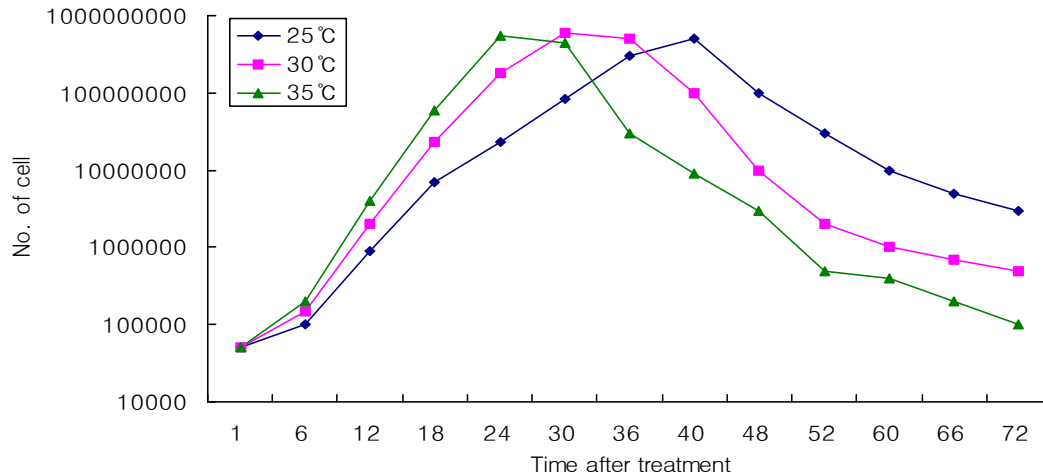


Fig. 29. 최종선발 균주(KBC1005)의 온도별 생육특성

위의 결과와 같이, *Bacillus amyloliquefaciens* KBC1009 균주는 온도에 대하여 안정적인 반면에 *Bacillus subtilis* KBC1005 균주는 온도에 대한 생육 환경이 민감하다는 것을 알 수 있었다.

③ 배양 초기 pH별 생육특성 조사

선발된 균주 2종의 배양 초기 pH에 따른 생육특성을 조사한 결과는 Table 34와 같다. 2종의 균주 모두 pH 4에서는 거의 생장을 못하는 것으로 조사되었으며 pH 5, 7에서는 OD값을 비교한 결과, 거의 차이가 없는 것으로 조사되었다. 또한, 초기 배양 pH가 9인 처리구에서는 24시간 후 OD값이 pH 5, 7보다 상대적으로 낮았으나 48시간 후에 초기 pH 5, 7과 거의 유사한 수치를 나타내었다. 이러한 결과는 선발된 균주 2종 모두 배지 구성에 따른 pH의 영향을 크게 받지 않은 것으로 사료되며, pH 5~9 사이라면 대량 배양에는 큰 영향을 받지 않을 것으로 판단된다.

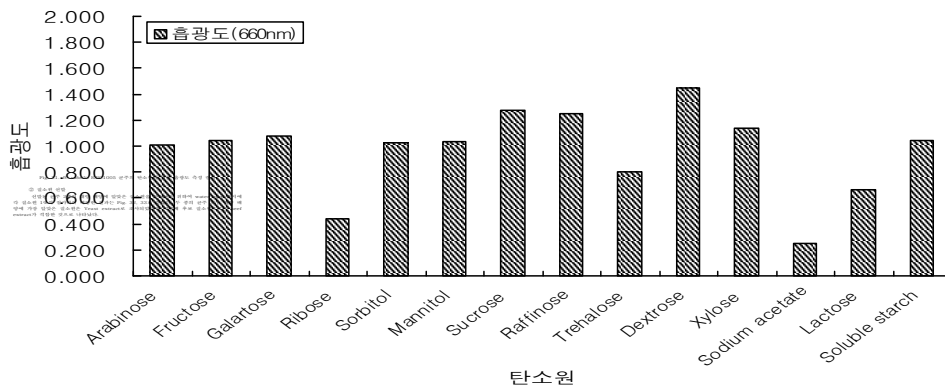
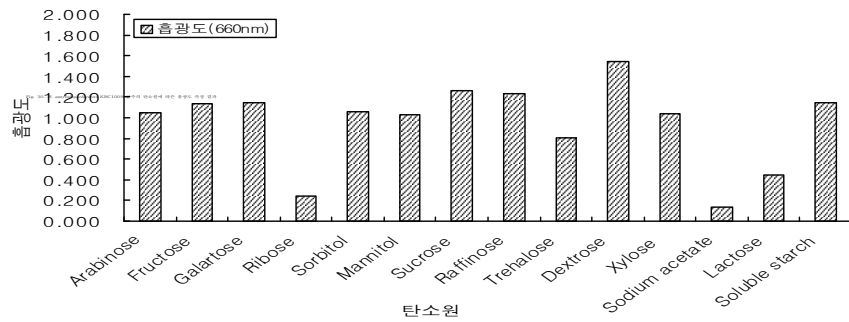
Table 34. 선발된 균주 2종의 배양 초기 pH에 따른 생육특성

구 분		초기 pH			
		4	5	7	9
<i>B. amyloliquefaciens</i> KBC1009	24시간 후	0.005	1.160	1.168	0.897
	48시간 후	0.007	1.482	1.399	1.461
<i>B. subtilis</i> KBC1005	24시간 후	0.006	1.153	1.165	1.036
	48시간 후	0.009	1.420	1.445	1.384

(나) 최종선발 균주의 대량배양 조건 탐색

① 탄소원 선발

선발된 균주 2종의 대량 배양에 알맞은 탄소원을 알아보기 위하여 기본 LB broth에 탄소원의 종류를 달리하여 각각 1% 첨가하여 조사한 결과, Fig. 30, 31과 같이 두 균주 모두 가장 적합한 탄소원은 dextrose로 조사되었으며, 2번째 후보 탄소원으로는 sucrose가 가장 적합한 것으로 조사되었다.



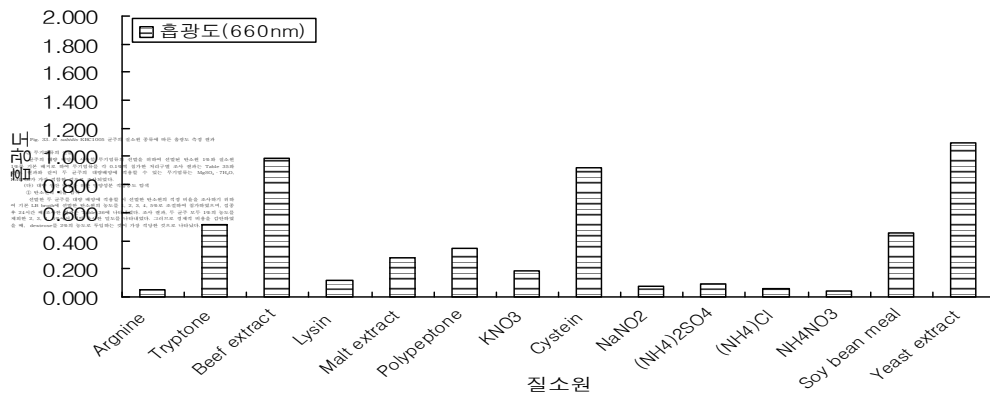
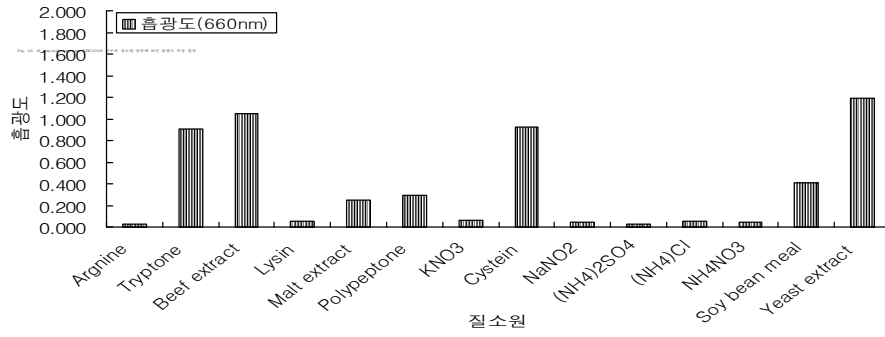


Table 35. 무기염류 14종의 첨가에 따른 선발된 균주 2종의 균수 측정 결과

구 분	24시간 배양 후 균수 측정 결과(10^9 cfu/ml)	
	<i>B. amyloliquefaciens</i> KBC1009	<i>B. subtilis</i> KBC1005
$\text{FeCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4.9	4.3
AgNO_3	4.7	4.3
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5.7	6.3
K_2HPO_4	5.3	5.9
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3.3	3.7
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.7	4.3
$\text{MnSO}_4 \cdot 4-5\text{H}_2\text{O}$	4.0	3.9
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	3.7	3.1
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4.1	3.0
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.9	3.3
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	3.7	3.1
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4.3	3.7
KCl	4.3	3.9
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3.7	4.3

Table 36. 선발한 두 균주의 탄소원 비율에 따른 균수 측정 결과 (단위 : cfu/ml)

구 분 (균 수)	탄소원(Dextrose)의 농도				
	1%	2%	3%	4%	5%
<i>B. amyloliquefaciens</i> KBC1009	7.3×10^7	5.3×10^8	5.7×10^8	7.0×10^8	7.3×10^8
<i>B. subtilis</i> KBC1005	7.0×10^8	3.1×10^9	4.3×10^9	5.0×10^9	5.7×10^9

② 질소원의 비율 탐색

대량 배양에 적용 시 선발한 질소원의 적정 비율을 조사하기 위하여 Water agar 배지에 선발한 탄소원 2%를 함유시키고, 선발한 질소원의 농도를 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0%로 첨가하여 배양한 결과는 Table 37과 같았다. 조사 결과, 두 균주 모두 0.1%의 농도를 제외한 0.5, 1.0, 1.5, 2.0%에서 거의 유사한 밀도를 나타내었다. 그러므로 경제적 비용을 감안하였을 때, Yeast extract를 0.5%의 농도로 투입하는 것이 가장 적당한 것으로 나타났다.

Table 37. 선발한 두 균주의 질소원 비율에 따른 균수 측정 결과

(단위 : cfu/ml)

구 분 (균 수)	질소원(Yeast extract)의 농도				
	0.1%	0.5%	1.0%	1.5%	2.0%
<i>B. amyloliquefaciens</i> KBC1009	9.7×10^7	3.0×10^8	7.3×10^8	8.3×10^8	8.7×10^8
<i>B. subtilis</i> KBC1005	8.3×10^8	4.7×10^9	6.9×10^9	7.7×10^9	8.3×10^9

③ 무기염류의 비율 탐색

무기염류의 비율을 조사하기 위하여 위 실험에서 조사된 질소원 2%와 탄소원 0.5%가 함유된 배지에 선발된 무기염류 2종의 농도를 각 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2%씩 첨가하여 조사한 결과는 Table 38과 같다. 조사 결과, 두 균주 모두 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 농도에서 0.01%의 농도를 제외한 0.02, 0.05, 0.1, 0.2%에서 거의 유사한 밀도를 나타내었고, K_2HPO_4 의 농도에서는 두 균주 모두 0.1%에서 균수가 약간 증가하는 것을 알 수 있었다. 그러므로 경제적 비용을 감안하였을 때, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 는 0.02%, K_2HPO_4 는 0.1%의 농도로 투입하는 것이 가장 적당한 것으로 사료된다.

Table 38. 선발한 두 균주의 무기염류 비율에 따른 균수 측정 결과

(단위 : cfu/ml)

구 분		24시간 후 균수 측정 결과	
		<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>B. subtilis</i> KBC1005
		KBC1009	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01	2.9×10^8	4.0×10^9
	0.02	4.3×10^8	5.1×10^9
	0.05	4.7×10^8	5.3×10^9
	0.1	4.7×10^8	5.3×10^9
	0.2	5.0×10^8	5.9×10^9
K_2HPO_4	0.01	3.1×10^8	3.3×10^9
	0.02	3.1×10^8	3.3×10^9
	0.05	3.3×10^8	3.7×10^9
	0.1	4.0×10^8	4.7×10^9
	0.2	4.6×10^8	5.1×10^9

위 결과를 바탕으로, *B. amyloliquefaciens* KBC1009와 *B. subtilis* KBC1005 균주는 Table 39와 같이 대량 배양을 하는 것이 가장 알맞은 것으로 조사되었다.

Table 39. 최종 선발된 두 균주의 최적 대량 배양 조건

구 분	<i>B. amyloliquefaciens</i> KBC1009	<i>B. subtilis</i> KBC1005
대량 배양 배지 조성	Dextrose ; 2% Yeast extract ; 0.5% MgSO ₄ · 7H ₂ O ; 0.02% K ₂ HPO ₄ ; 0.1%	Dextrose ; 2% Yeast extract ; 0.5% MgSO ₄ · 7H ₂ O ; 0.02% K ₂ HPO ₄ ; 0.1%
p.H	5~7	5~7
배양온도 / rpm	30℃ / 120rpm	30℃ / 120rpm
배양종료시간	36H	30H
배양종료 후 균수 측정 결과 (cfu/ml)	5.7×10^8	6.3×10^9

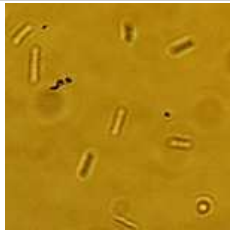



(3) 살균 활성이 우수한 균주의 제형 연구

(가) 대량 배양액의 안정화

① 대량 배양액의 내세포자 형성을 조사

최종 선발한 균주 2종(*B. amyloliquefaciens* KBC1009, *Bacillus subtilis* KBC1005)을 확립된 최적 대량 배양 조건에 따라 1ton의 대량 배양기에 적용한 후 cell의 형태와 포자형성을 조사한 결과는 Table 40과 같다.

Table 40. 최적 대량 배양 조건 적용 후 포자형성을

구 분	최적 대량 배양 조건 적용 후 결과			비고
	현미경 관찰 사진	포자형성을	균수측정 결과 (cfu/ml)	
<i>B. subtilis</i> KBC1005		+ ¹⁾	3.3×10^9	
<i>B. amyloliquefaciens</i> KBC1009		+	6.3×10^8	

¹⁾ : 0 ; -, 1~25% ; +, 26~50% ; ++, 50~75% ; +++, 75~100% ; ++++

최대 성장점을 나타내는 시점에 샘플링한 균주 2종(*B. amyloliquefaciens* KBC1009, *B. subtilis* KBC1005)의 대량 배양액을 관찰한 결과, 균수에 비하여 포자형성율이 낮은 것을 알 수 있었다. 적용한 대량 배양법은 짧은 시간에 배양액 내 균의 밀도가 높게 함유될 수 있도록 특화된 배양법이기에 때문에 대부분은 포자로 전환되지 않은 것으로 사료된다. 이러한 상황에서 액상 수화제로 제제화 할 경우, 날씨, 생산조건, 보관조건, 외부의 물리적 충격 등 기타 영향 요소들로부터 안정적이지 않기 때문에 포자로 전환되지 않은 cell을 포자의 형태로 유도할 필요가 있었다. 정 등(2008, 특허등록번호 ; 10-0866611)은 *Bacillus subtilis* AH18 균주의 제제화 시 안정성을 높이기 위하여 열 유도 내생포자를 생성시키는 단계를 설명한 바 있어 당사에서 이와 같은 방법을 활용하여 내생포자를 유도하는 조건을 탐색하였다.

② 온도 처리에 의한 대량 배양액의 안정화

균주 2종의 대량 배양액을 온도별로 처리한 후, 균수 변화와 광학현미경하에서 혈구계수기를 이용하여 포자 형성율을 조사한 결과는 Table 41과 같다.

Table 41. 최적 대량 배양 조건 적용 후 온도 처리에 따른 포자형성율

구분	처리온도	균수변화(cfu/g)		포자형성율		비고	
		처리전	처리후	처리전	처리후	처리전	처리후
<i>B. subtilis</i> KBC1005	40	3.3×10^9	2.1×10^8	+ ¹⁾	+		
	50	3.3×10^9	4.7×10^6	+	++		
	60	3.3×10^9	1.1×10^6	+	++		
<i>B. amyloliquefa</i> <i>-ciens</i> KBC1009	40	6.3×10^8	7.9×10^7	+	++		
	50	6.3×10^8	5.1×10^7	+	+++		
	60	6.3×10^8	3.7×10^7	+	+++		

¹⁾ : 0 ; -, 1~25% ; +, 26~50% ; ++, 50~75% ; +++, 75~100% ; ++++

B. subtilis KBC1005 균주의 경우에는 대량 배양 후 온도 처리에 따라 포자형성율은 증가하였으나 균의 밀도가 감소하는 것을 알 수 있었으며, *B. amyloliquefaciens* KBC1009 균

주의 경우에는 온도 처리에 따라 포자형성율이 증가하였으며, 모든 처리구에서 1.0×10^7 cfu/ml 이상의 밀도를 유지하여 온도 처리에 보다 안정적인 경향을 나타내었다.

③ pH 조절에 의한 대량 배양액의 안정화

대량 배양이 종료된 균주 2종의 배양액을 이용하여 pH 조절이 내성포자형성에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 42에 나타내었다.

Table 42. 최적 대량 배양 조건 적용 후 pH 조절에 따른 포자형성율 조사 결과

구분	처리 pH	균수변화(cfu/g)		포자형성율		비고	
		처리전	처리후	처리전	처리후	처리전	처리후
<i>B. subtilis</i> KBC1005	4	3.3×10^9	3.9×10^6	+ ¹⁾	+		
	5	3.3×10^9	6.7×10^8	+	+		
	6	3.3×10^9	1.3×10^8	+	+		
<i>B. amyloliquefa</i> -ciens KBC1009	4	6.3×10^8	5.3×10^6	+	+		
	5	6.3×10^8	4.0×10^7	+	+		
	6	6.3×10^8	1.7×10^7	+	+		

¹⁾ : 0 ; -, 1~25% ; +, 26~50% ; ++, 50~75% ; +++, 75~100% ; ++++

B. subtilis KBC1005, *B. amyloliquefaciens* KBC1009 두 균주 모두 대량 배양 후 pH 변화를 줄 경우에 포자형성율이 증가하지 않았으며, 균의 밀도도 감소하는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 pH 조건에 따라 배양액 내 균이 영향을 받는 것으로 판단되며, 안정적인 포자가 형성된 후 적용해야 할 것으로 사료된다. 따라서, 균의 안정화를 위해서 배양 30~36hr 후 온도를 증가시켜 포자 형성율을 향상시키고 배양 종료 후 pH를 4 수준으로 조절하여 균의 안정성을 확보하는 것이 바람직 할 것으로 판단된다.

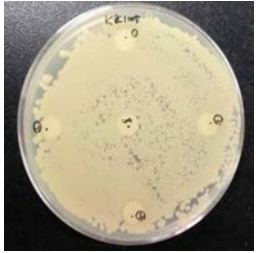

(나) 안정화한 대량 배양액을 이용한 액상 수화제 제제화

① 보조제 선발 및 균주에 대한 영향 평가

액상 수화제 제제화를 위하여 선발 균주 2종에 대한 보조제의 영향을 평가한 결과는

Table 43과 같다. 선발한 보조제 4종 모두 각 균주에 대하여 미치는 영향이 없는 것으로 나타났다기 때문에 상업적 측면을 고려하여 KBC 3030을 5% 첨가하여 액상 수화제로 제제화하였다.

Table 43. 선발한 보조제의 균주에 대한 영향

구분	계면활성제 종류				비고
	Tween 20	Tween 80	KBC3030	PPG	
<i>B. subtilis</i> KBC1005	— ¹⁾	—	—	—	
<i>B. amyloliquefaciens</i> KBC1009	—	—	—	—	

¹⁾ 클리어존 크기 : 없음 ; —, 0.5cm 이하 ; +, 0.6~1.0cm; ++, 1.1~1.5 ; +++, 1.6~2.0 ; +++++

② 제제화된 액상 수화제의 안정성 평가

최종 제형화된 액상 수화제의 안정성을 조사한 결과는 Table 44에 나타내었다. 두 균주 모두 4주후에 1.0×10^6 cfu/ml의 밀도를 나타내어 안정성에는 큰 문제가 없는 것으로 사료되었으나, *B. subtilis* KBC1005 균주의 경우에는 2.7×10^8 cfu/ml에서 시작하여 4주 후, 약 10^2 cfu/ml이 감소한 3.1×10^6 cfu/ml을 나타낸 반면에 *B. amyloliquefaciens* KBC1009 균주의 경우, 4.3×10^7 cfu/ml에서 시작하여 4주 후, 약 10^1 cfu/ml이 감소한 7.1×10^6 cfu/ml을 나타내어 *B. subtilis* KBC1005 균주보다 안정적인 경향을 나타내었다.

Table 44. 제제화된 액상 수화제의 안정성 평가 결과

구분	처리전 밀도 (cfu/g)	54℃ 처리 후 경과 시간에 따른 균수 측정 결과(cfu/g)			
		1 week	2 week	3 week	4 week
<i>B. subtilis</i> KBC1005	2.7×10^8	9.7×10^7	5.1×10^7	8.3×10^6	3.1×10^6
<i>B. amyloliquefaciens</i> KBC1009	4.3×10^7	2.3×10^7	1.7×10^7	8.9×10^6	7.1×10^6

(다) 안정화한 대량 배양액을 이용한 유상 현탁제 제제화

① 보존제 탐색 및 선발

유상 현탁제 제제화를 위하여 선발한 오일과 균주 배양액 비율 별 보조제의 적용 결과는 Table 45와 같다.

Table 45. 보존제, 배양액, 그리고 보조제의 첨가 비율 별 성상





































보존제		배양액 첨가비율	보조제의 종류			
원료명	첨가비율		Tween 20	Tween 80	KBC3030	PPG
카놀라유	31.5	63.5				
	47.5	47.5				
	63.5	31.5				
대두유	31.5	63.5				
	47.5	47.5				
	63.5	31.5				

Table 45. 보존제, 배양액, 그리고 보조제의 첨가 비율 별 성장 조사 결과 -continued

보존제		배양액 첨가비율	보조제의 종류			
원료명	첨가비율		Tween 20	Tween 80	KBC3030	PPG
파라핀유	31.5	63.5				
	47.5	47.5				
	63.5	31.5				

위 결과에서 배양액과의 다양한 혼합 비율에서 우수한 성상을 나타낸 보존제는 대두유였으며, 대두유와 배양액의 모든 혼합 비율에서 우수한 성상을 나타낸 보조제는 KBC3030이었다. 파라핀유의 경우에는 KBC3030을 보조제로 사용하였을 때, 우수한 성상을 나타낸 것처럼 보였으나, 500배로 물에 희석 시 물의 표면에 기름이 부유되는 것을 확인 할 수 있었다.

확립된 유상 현탁제의 안정성을 평가하기 위하여 54℃에 보관 후, 4주간 균수를 측정한 결과는 Table 46에 나타내었다.

Table 46. 제제화된 유상 현탁제의 안정성 평가 결과

구 분	처리전 밀도 (cfu/g)	54℃ 처리 후 경과 시간에 따른 균수 측정 결과(cfu/g)			
		1 week	2 week	3 week	4 week
<i>B. subtilis</i> KBC1005	2.3×10^8	1.3×10^8	9.0×10^7	7.7×10^6	5.3×10^6
<i>B. amyloliquefaciens</i> KBC1009	4.1×10^7	2.7×10^7	2.0×10^7	1.1×10^7	9.3×10^6

유상 현탁제 적용 시, 액상 수화제와 비교하였을 때 보다 안정적으로 균주의 밀도를 유지시켜 주는 것을 알 수 있었으며, 4주차(2년)의 결과에서 두 균주 모두 1.0×10^6 cfu/ml의 밀도를 나타내어 안정성에는 큰 문제가 없는 것으로 사료되었으나, *B. subtilis* KBC1005 균주의 경우에는 2.3×10^8 cfu/ml에서 시작하여 4주 후, 약 10^2 cfu/ml이 감소한 반면에 *B.*

amyloliquefaciens KBC1009균주의 경우, 4.1×10^7 cfu/ml에서 시작하여 4주 후, 약 0.5×10^1 cfu/ml이 감소한 결과를 나타내어 액상 수화제와 유사한 결과를 보였다.



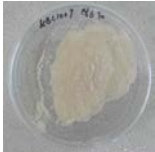

② 분말 수화제 제제화

㉔ 분무건조법을 이용한 분말 원료 제조

투입시료의 혼합비율 탐색

분무건조에 적합한 배양액과 부형제의 혼합비율을 찾고자 배양액 50 l에 텍스트린의 혼합비율 별로 적용한 결과는 Table 47과 같다. 결과와 같이 성상에는 큰 차이가 없었으나, 텍스트린의 혼합비율이 높을 수록 균주의 밀도가 낮은 것으로 측정이 되었다. 이것은 흡착되는 배양액에 비하여 부형제의 양이 많아지기 때문인 것으로 사료된다.

Table 47. 분무 건조 시 투입시료 별 균수 측정 결과

구 분	텍스트린 혼합비율	분무 건조 적용 후 결과	
		균 수(cfu/g)	성 상
<i>B. subtilis</i> KBC1005 3.1×10^8 cfu/ml	30	2.7×10^7	
	50	1.3×10^7	
	70	— ¹⁾	—
<i>B. amyloliquefaciens</i> KBC1009 5.3×10^7 cfu/ml	30	3.1×10^7	
	50	2.0×10^7	
	70	—	—

¹⁾ : 텍스트린의 함량이 높아 supply tank에서 모두 용해되지 않아 측정이 불가능 하였음.

수율 향상을 위한 조건 탐색

분무건조 시 수율 향상을 위하여 고정된 조건을 제외하고 pump speed, chamber 내 온도를 조절하여 수확량과 균수를 측정한 결과는 Table 48, 49에 나타내었다.

B. subtilis KBC1005, *B. amyloliquefaciens* KBC1009 균주 모두 chamber 내 온도가 140℃일 때, 가장 높은 수율을 나타내었으나, 시료 내 균수의 함량이 낮은 것으로 조사되었으며, chamber 내 온도가 120~130℃로 유지될 때, pump speed를 6으로 설정하는 것이 수율과 시료 내 균수의 함량이 높아 가장 효율적인 것으로 조사되었다.

Table 48. Chamber 내 온도와 Pump Speed 에 따른 수확량과 균수 측정 결과(*B. subtilis* KBC1005)

Chamber TI(°C)	Pump speed	Yield(%) ¹⁾	균수(cfu/g)
110	5	65	5.7×10^7
	6	67	6.1×10^7
	7	— ²⁾	—
120	5	71	8.3×10^7
	6	76	2.3×10^8
	7	70	3.3×10^8
130	5	73	3.7×10^8
	6	71	4.7×10^8
	7	70	4.3×10^8
140	5	72	4.7×10^6
	6	76	7.3×10^6
	7	74	4.1×10^6

¹⁾ : Yield(%) = 수확한 시료 양(kg) / 투입된 부형제(kg) × 100

²⁾ : Chamber 온도가 110°C일때, pump speed를 7로 조절 시 chamber 내 온도가 내려가면서 배양액이 흘러나옴.

Table 49. Chamber 내 온도와 Pump Speed 에 따른 수확량과 균수 측정 결과(*B. amyloliquefaciens* KBC1009)

Chamber TI(°C)	Pump speed	Yield(%) ¹⁾	균수(cfu/g)
110	5	61	8.7×10^7
	6	62	9.7×10^7
	7	—	—
120	5	68	1.7×10^8
	6	74	8.7×10^8
	7	67	2.3×10^8
130	5	70	3.1×10^8
	6	71	2.3×10^8
	7	65	7.0×10^8
140	5	70	9.3×10^6
	6	72	6.7×10^6
	7	73	8.3×10^6

¹⁾ : Yield(%) = 수확한 시료 양(kg) / 투입된 부형제(kg) × 100

㉔ 첨가부형제의 탐색 및 적정혼합비율 조사

첨가부형제의 적정혼합비율을 조사하기 위하여 각 부형제 별 분말원료와 혼합하여 균수를 측정한 결과는 Table 50과 같다. 1:9의 비율로 혼합 시 2:8, 3:7로 혼합하였을 때 보다 상대적으로 낮게 측정이 되었으며, 2:8과 3:7로 혼합한 결과는 큰 차이가 없었다. 이산화 규소를 제외한 나머지 부형제는 사용이 가능한 것으로 판단되었으며, 이산화 규소의 경우, 무게에 대비하여 부피가 크게 차지하기 때문에 균수 측정 시 반영이 된 것으로 사료된다. 최종 분말 수화제 제형으로 분말 원료와 dextrose의 비율을 3:7로 고정하여 제제화하였다.

Table 50. 부형제 혼합비율에 따른 균수 측정 결과

균 주	부형제의 종류	혼합비율		
		1:9	2:8	3:7
<i>B. subtilis</i> KBC1005 ; 5.7×10^7 cfu/ml	Sucrose	6.3×10^6	1.5×10^7	2.4×10^7
	Dextrose	6.0×10^6	1.2×10^7	1.8×10^7
	Dextrin	5.1×10^6	1.2×10^7	1.5×10^7
	이산화규소	6.0×10^5	1.5×10^6	2.1×10^6
	제오라이트	9.7×10^6	1.2×10^7	2.1×10^7
	규조토	6.7×10^6	1.8×10^7	2.4×10^7
	카올린	5.7×10^6	1.3×10^7	1.9×10^7
<i>B. amyloliquefaciens</i> KBC1009 ; 6.3×10^7 cfu/ml	Sucrose	7.1×10^6	1.5×10^7	2.7×10^7
	Dextrose	6.7×10^6	1.1×10^7	2.1×10^7
	Dextrin	6.0×10^6	9.7×10^6	1.8×10^7
	이산화규소	6.3×10^5	1.5×10^6	2.1×10^6
	제오라이트	6.7×10^6	1.2×10^7	1.7×10^7
	규조토	7.7×10^6	1.7×10^7	2.9×10^7
	카올린	6.7×10^6	1.5×10^7	2.7×10^7

㉔ 제제화된 분말 수화제의 안정성 평가

확립된 분말 수화제의 안정성을 평가한 결과는 Table 51과 같다. 분말 수화제의 경우, 액상 수화제, 유상 현탁제 제형보다 우수한 안정성을 나타내었다.

Table 51. 제제화된 분말 수화제의 안정성 평가 결과

구 분	처리전 밀도 (cfu/g)	54℃ 처리 후 경과 시간에 따른 균수 측정 결과(cfu/g)			
		1 week	2 week	3 week	4 week
<i>B. subtilis</i> KBC1005	3.3×10^7	2.7×10^7	2.0×10^7	1.1×10^7	9.3×10^6
<i>B.amyloliquefaciens</i> KBC1009	2.7×10^7	2.1×10^7	1.7×10^7	1.0×10^7	9.0×10^6

(4) 최종선발한 살균균주(*B.amyloliquefaciens* KBC1009)를 활용한 시제품 제작

(가) 원료 및 보조제 투입비율에 따른 안정성 조사

① 각 원료 투입비율 별 제조된 시제품의 외관 및 물리성 검사

원료 투입비율별로 생산된 시제품 4종의 외관 및 물리성을 평가한 결과는 Table 52에 나타내었다. 영양원만 90% 함유되어 있는 시료 1번의 경우, 시생산 직후에는 대체적으로 양호하였으나 54℃에서 4주동안 보관 시 수분이 현저하게 감소한 것을 알 수 있었다. 그리고, 부형제만 90% 함유되어 있는 시료 2번의 경우에는 수화성이 낮은 것으로 조사되었으나, 54℃에서의 보관 안정성은 양호한 것으로 조사되었다. 시료 3, 4번은 대체적으로 양호한 것으로 조사되었다.

Table 52. 원료 및 보조제 투입비율 별 외관 및 물리성 검사 결과

구분	외관조사			물리성 검사			비고 (54℃ 4주후) 수분 : 4.32
	성상	색상	냄새	수화성	분말도	수분	
시료 1	분말	흰색	특이취	양호	98%이상	10.27	수분 : 4.32
시료 2	분말	회색	특이취	낮음	98%이상	11.30	양호
시료 3	분말	연회색	특이취	양호	98%이상	10.75	양호
시료 4	분말	연회색	특이취	양호	98%이상	10.42	양호

② 각 원료 투입비율 별 제조된 시제품의 생물학적 안정성 평가

원료 투입비율별로 제조된 4종의 유효미생물 보증기간을 2년으로 설정하여 54℃로 온도가 설정된 drying oven에 보관 후, 1주일 간격으로 4주간 단계희석평판도말법으로 생물학적 안정성을 평가한 결과는 Table 53에 나타내었다.

Table 53. 원료 투입비율 별 제조된 시제품의 안정성 평가 결과

구 분	처리전 밀도 (cfu/g)	54℃ 처리 후 경과 시간에 따른 균수 측정 결과(cfu/g)			
		1 week	2 week	3 week	4 week
시료 1	2.1×10^7	7.3×10^6	5.7×10^6	2.3×10^6	8.3×10^5
시료 2	2.3×10^7	1.7×10^7	1.0×10^7	8.1×10^6	6.0×10^6
시료 3	2.3×10^7	2.0×10^7	1.1×10^7	9.0×10^7	7.7×10^6
시료 4	2.3×10^7	2.1×10^7	1.5×10^7	1.1×10^7	9.3×10^6

각 원료 투입비율 별 제조된 시료 4종의 생물학전 안정성을 평가한 결과, 시료1번을 제외하고 설정기간동안 안정적인 것으로 조사되어 졌다. 시료 1번의 경우, 외관 및 물리성 검사 결과에서 시료 내 균주가 안정성에 영향을 받을 수 있는 수치까지 수분이 감소되었기 때문으로 판단된다. 시료 4종 중 외관 및 물리성 검사에서 안정적이었으며, 생물학적 안정성에서도 가장 안정적이었던 시료 4번(*B. amyloliquefaciens* KBC1009 10%, Dextrose 40%, 제오라이트 50%) 제형을 최종 제형으로 선정하게 되었다.

(나) 시제품 내 함유된 선발균주의 농약 저항성 시험

유효미생물이 농업환경에서 다량 살포되어지는 다양한 화학농약에 대하여 저항성을 가지고 있어야만 효율적으로 방제 및 예방 효과가 지속적으로 발현될 것이다. 이에 농업현장에서 많이 사용하고 있는 살균제 8종과 제초제 6종에 대한 유효미생물 *Bacillus amyloliquefaciens* KBC1009의 농약 저항성 시험을 실시하였다.

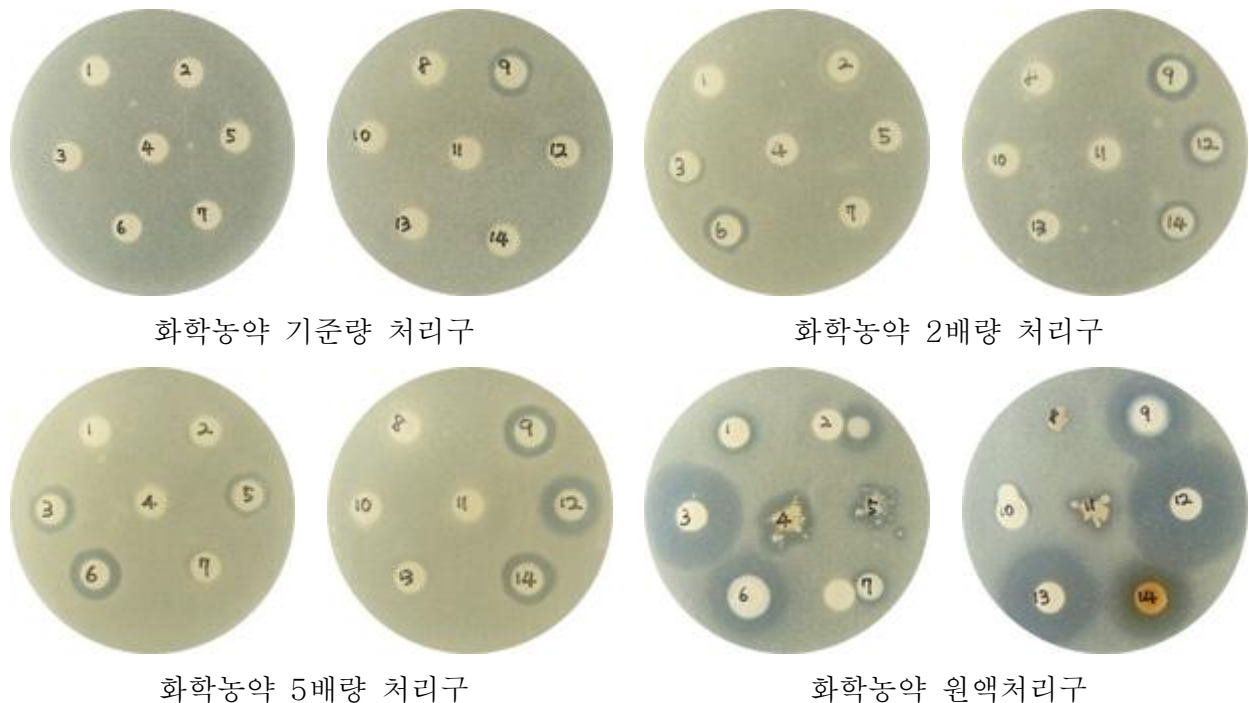


Fig. 34. *B. amyloliquifaciens* KBC1009의 화학농약에 대한 저항성 결과

그 결과 (Fig. 34) 살균제에 대해서는 기준량에서 모두 저항성을 보였으며, 제초제의 경우 Dithiopyr 32%(9)와 Triclopyr-TEA 30%(12)에 대하여 감수성을 보였을 뿐 모두 저항성을 나타내었다. 그리고 고농도인 2배량과 5배량에서는 살균제의 경우 Etridiazole 25%(3), Flutolanil 25% +Isoprothiolane 20%(5) 그리고 Tebuconazole 25%(6)에 대하여 감수성을 나타내었고 제초제의 경우는 Dithiopyr 32%(9), Triclopyr-TEA 30%(12)와 Imazaquin 20%(14)에 대하여 감수성을 나타낸바 상기 화학농약과의 혼용 시에는 주의가 필요한 것으로 나타났다.

(다) 시제품의 방제 효과 시험

① 시제품의 흰비단병에 대한 효과시험

비닐하우스에 고추를 정식하고 흰비단병균 *S. rolfsii* 균핵을 처리한 후 시제품을 관주 처리한 후 흰비단병의 발병정도를 조사한 결과 병원균처리구는 7일째부터 발병되기 시작하여 재배 24일째에는 모든 고추모에서 흰비단병이 발병되었다. 그러나 시제품(*B. amyloliquifaciens* KBC1009)처리구에서는 17일째부터 발병되기 시작하여 재배 30일째에는 고추 5주만 흰비단병이 발병되었다. 따라서 병원균처리구 대비 방제가는 66.7%로 생물적 방제제로서는 비교적 높은 방제율을 보였다(Table 54).

Table. 54. 시설하우스에서 고추 흰비단병에 대한 시제품의 방제효과

처리구	발병율(%)	방제가(%)
<i>B. amyloliquifaciens</i> KBC1009	33.3±6.65	66.7
대조구	100±0	—



병원균 처리구

시제품(*B. amyloliquefaciens* KBC1009)
처리구

Fig. 35. 시험포장 모습

② 식물기생성선충에 대한 살선충 효과시험

살균균주의 식물기생성선충에 대한 살선충 효과를 조사하기 위하여 *B. amyloliquefaciens* KBC1009를 배양액을 농도별로 식물기생성 선충에 적용한 결과는 Table 55에 나타내었다. *B. amyloliquefaciens* KBC1009균주의 밀도가 높아짐에 따라 살선충 활성을 나타내는 것을 알 수 있었다.

Table 55. *B. amyloliquefaciens* KBC1009의 농도별 선충에 대한 4살선충효과

시험농도 (cfu/ml)	균주 처리전 평균 선충 밀도	평균 생충수	방제율(%)
1.0×10^5	43	40	6.42
1.0×10^6	41	38	6.73
1.0×10^7	50	36	25.76
1.0×10^8	44	28	45.45
1.0×10^9	49	22	49.39
Control	50	46	—



살아있는 선충의 모습



미생물에 영향을 받아 죽은 선충의 모습

Fig. 36. 미생물 처리에 따른 선충의 모습

(라) 시제품의 유기농업자재 등록을 위한 안전성 평가

①(가) 최종 시제품의 인축 및 환경에 대한 독성 시험

㉔ 인축독성 시험

Rat에 대한 급성경구독성 및 병원성 시험

시험물질 투여로 인한 사망동물은 암수 모두 관찰되지 않았으며, 일반 증상 관찰에서도 암수 모두 시험물질과 관련된 이상소견과 체중감소는 관찰되지 않음으로써 시제품을 급성으로 경구 투여하였을 때 시험물질의 투여에 따른 독성학적 변화 및 병원성은 관찰되지 않았다.

Rat에 대한 급성경피 독성시험

수컷과 암컷 모두 시험물질의 노출로 인한 치사 동물은 없었으며, 암수 모두 체중변화와 같은 시험물질과 관련된 이상소견은 관찰되지 않음으로 시제품을 급성으로 경피투여하였을 때 시험물질의 투여에 따른 독성학적 변화는 관찰되지 않았다.

토끼를 이용한 피부자극성 시험

시험물질 투여로 인한 사망동물은 암수 모두 관찰되지 않았으며, 정상적인 체중증가를 나타내었다. 시험물질 적용 후 1h, 24h, 48h 및 72h 쯤에 적용부위의 피부자극성을 관찰한 결과 시험물질에 의한 이상소견이 관찰되지 않으므로 시제품은 무자극성 물질인 것으로 사료된다.

토끼를 이용한 안점막자극시험

시험물질 투여로 인한 사망동물은 암수 모두 관찰되지 않았으며, 정상적인 체중증가를 나타내었다. 시험물질 적용 후 1h, 1, 2, 3, 4, 및 7일째에 적용부위의 안점막자극성을 관찰한 결과 시험물질에 의한 이상소견이 관찰되지 않으므로 시제품은 무자극성 물질인 것으로 사료된다.

㉕ 환경독성 시험

어류영향시험

시험물질의 단위 면적당 살포량 (500g/10a)을 수심 15cm 물 중에 직접 살포한 경우로 환산한 농도의 1000배 농도를 제품의 유효성분 (1×10^6 cfu/g)으로 처리농도를 계산하면 3.33×10^3 cfu/ml 이므로, 본 시험은 대조군 및 0.026×10^3 cfu/ml, 0.13×10^3 cfu/ml, 0.67×10^3 cfu/ml (공비 5.0)의 농도에서 실시하였다.

시험용액은 시험물질을 희석수에 직접 투여하는 방법으로 조제하였으며, 일주일에 2번 교체하는 반지수식으로 시험을 실시하였다. 각 농도별 시험물질을 처리한 시험용액에 10마리의 어류를 3반복 노출하였으며 30일 동안 치사 및 독성영향을 관찰한 결과 30일의 시험기간 동안 대조군 및 설정농도 0.026×10^3 cfu/ml, 0.13×10^3 cfu/ml, 0.67×10^3 cfu/ml의 시험용액에서 어류의 치사가 관찰되지 않았고 독성증상도 나타나지 않았으나 최고농도인 3.33×10^3 cfu/ml 에서는 모든 어류가 치사하였다.

시험기간동안 설정농도로 나타난 시제품의 잉어(Cyprinus carpio)에 대한 30일 LC50 값(95% 신뢰한계)은 1.49×10^3 cfu/ml (0.67×10^3 cfu/ml ~ 3.33×10^3 cfu/ml)으로 타나났다.

Table 56. 어류 영향시험 결과

Exposure time	30 day
LC ₅₀ values	1.49×10^3 cfu/ml
95% confidence limit	0.67×10^3 cfu/ml ~ 3.33×10^3 cfu/ml

미생물 감염 여부 관찰에서도 농도별 노출된 개체들에게서는 이상 소견이 관찰되지 않았다.

꿀벌 영향 시험

독성영향을 평가하기 위하여 대조군 (50% 자당용액) 및 50% 자당용액을 이용하여 조제한 미생물 농도 3.33 cfu/g, 33.3 cfu/g, 333 cfu/g의 시험용액을 급식관을 통하여 노출하였다. 시험 농도 당, 30마리의 꿀벌을 노출시켰으며, 대조군의 치사율이 20%이상 되는 시점까지 꿀벌의 생존 및 행동이상 여부를 관찰하였다.

그 결과, 시험물질을 처리 후, 10일 (240시간)째 되는 날, 대조군에서 26.7% 개체가 치사하여 시험을 종료하였다. 3.33 cfu/g, 33.3 cfu/g, 333 cfu/g 처리군에서는 각각 10, 13.3, 20%의 치사가 발생하였으므로 시험기간 동안 시험물질로 인한 독성 영향은 없는 것으로 판단하였다.

노출 농도에서 영향이 나타나지 않았으므로 독성값은 최고농도 이상으로 표시하였다.

Table 57. 꿀벌 영향 시험 결과

Exposure time	96 hr	240 hr
LD ₅₀ values	> 333	> 333
95% confidence limit	NA	NA

NA: Not available

(마) 유기농업자재 등록을 위한 시험

① 시제품의 유효 및 유해미생물 조사

㉠ 시제품의 유효미생물 분석

시제품의 유효미생물을 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석하였고, NCBI blast 분석 결과 *Bacillus amyloliquefaciens* KBC1009로 동정, 명명하였으며, 생균수를 측정한 결과 8.4×10^6 cfu/g으로 조사되었다.

㉡ 시제품의 유해미생물 분석

시제품의 유기농업자재 목록공시 등록을 위한 제품 내 병원성 미생물의 오염여부를 검사한 결과는 Table 58과 같이 병원성 오염미생물은 불검출 되었다.

② 시제품의 음식물에 대한 약해 시험

시제품의 고추, 상추, 콩, 가지, 토마토 5종의 음식물에 대한 약해 유무를 조사한 결과 Table 59과 같다.

③ 시제품의 농약잔류분석

시제품의 제품 내 농약잔류 여부를 확인하기 위하여 농업기술실용화재단을 통하여 330종의 농약에 대한 잔류 시험을 수행한 결과 다성분 농약 (330성분)에 대하여 불검출 결과를 통보 받았다 (Fig. 38).

(바) 유기농업자재 목록공시

상기 시제품 (제품명: 노팡스)은 유기농업자재 목록공시 제품으로 등록을 완료하였다 (Fig. 39).

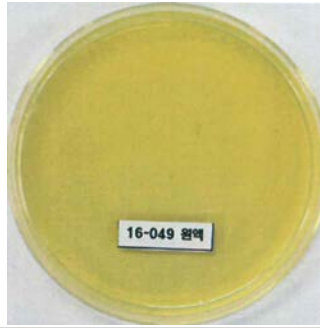
공시번호: 공시-3-6-009

유효기간 : 2016년 8월 26일 ~ 2019년 8월 25일

Table 58. 시제품의 유해 미생물 분석 결과

분석항목	분석사진	판정
병원성 대장균(<i>Escherichia coli</i>)		청록색 또는 적색을 띄는 콜로니가 검출되지 않아 불검출로 판정
병원성 살모넬라(<i>Salmonella</i> sp.)		흑갈색을 띄는 콜로니가 검출되지 않아 음성으로 판정
<i>Staphylococcus aureus</i>		콜로니 주변에 황색을 띄는 세균이 검출되지 않아 음성으로 판정
<i>Bacillus cereus</i>		연분홍색의 콜로니가 확인되었으나 유전자 분석을 통하여 음성으로 확정

Listeria monocytogenes



청록색을 띄는 콜로니가 검출되지
않아 음성으로 판정

Table 59. 시제품의 유식물 약해 시험 결과

시험약제	시험작물 (품종)	약해정도(0~5)		비고
		기준량	배량	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> KBC1009 (1.0×10^6 cfu/g)	고추 (독야청청)	0	0	약해없음
	상추 (탑그린)	0	0	약해없음
	콩 (백태)	0	0	약해없음
	토마토 (썬글로브)	0	0	약해없음
	가지 (흑명흑장)	0	0	약해없음



고추 시험포



토마토 시험포



콩 시험포



상추시험포



가지 시험포

Fig. 37. 시제품의 약해시험포


발급번호: 제 16-FPA-7-00380 호				분 석 성 적 서	
① 의 뢰 인	성 명	주)한국바이오테크미칼	사업자등록번호	608-81-39104	
	주 소	52840 경상남도 진주시 문산읍 월아산로950번길 14-20((주)KBC)			
② 의 뢰 내 용	대상 물품명	노팡스			
	시험 개요	MS/MS를 이용한 성분 검사			
	용 도	유기농업자재신청서 제출용			
③ 분석(시험) 성적					
성 분 명		분석결과(단위)		성 분 명	
다성분농약(330성분)		불검출 ug/kg 이하 미백			
④ 비 고					
<p>「농업기술실용화재단 분석검정 의뢰 및 처리규정」 제4조의 규정에 의하여 2016년 04월 22일 자로 의뢰한 시료에 대한 분석(시험) 성적입니다.</p> <p>이 성적은 신청서에 제출한 시료를 분석한 것으로 관련사항 이외의 선전 소용 등 증거자료로 사용하실 수 없습니다.</p> <p>2016년 05월 04일</p> <p>농업기술실용화재단 이사 </p>					

Fig. 38. 농약잔류 분석 성적서



공시번호: 제 공시-3-6-009 호	
유기농업자재 [○] 공시서 [] 품질인증서	
1. 업 체 명: ㈜한국바이오테크미칼 2. 대표자 성명: 한 상 훈 3. 주소(사업장): 경남 진주시 문산읍 월아산로 950번길 14-20 4. 자재의 명칭: 미생물 5. 자재의 구분: 병해충관리용 자재 6. 상표명: 노팡스 7. 주성분(원료)의 종류 및 함량 - 주 성 분: 미생물(<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>) - 원료함량(%): 미생물배양액(<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>) 10, 보조제 90 8. 유효기간: 2016.08.26. ~ 2019.08.25. 9. 제조장 주소 또는 수입원산지(국가, 제조사) : 경남 진주시 문산읍 월아산로 950번길 14-20 10. 최초 공고일: 2016.08.26. 11. 최초 공시등기관: 순천대학교 산학협력단	
<p>「친환경농어업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률」 제38조 제2항 및 「농림축산식품부 소관 친환경농어업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률 시행규칙」 제49조제2항에 따라 위와 같이 유기농업자재 공시임을 증명합니다.</p> <p style="text-align: right;">2016 년 08 월 26 일</p> <p style="text-align: center;">  순천대학교 산학협력단장  </p>	

Fig. 39. 유기농업자재 목록공시서

제 4 장 목표달성도 및 관련분야 기여도

제1절 : 목표대비 달성도

당초 목표	가중치(%)	개발 내용	달성도(%)
1) 병해충 동시방제 다기능성 미생물 선발	15	○ 목화진딧물 및 복숭아혹진딧물에 높은 병원성을 보이는 곤충병원성 곰팡이 균주 선발 ○ 균핵병원균, 검은곰팡이균, 모잘록병원균에 대한 곤충병원성 곰팡이 선발	100
2) 선발 균주의 배양적 특성 구명	15	○ 신규활성 미생물 2종 분리 선발 ○ 선발 미생물의 배양적 특성 - 질소원, 탄소원, 무기영양원 선발 - 배양온도, 배양기간 등 배양조건 확립 ○ 선발 미생물의 식물병에 대한 효과 검정 ○ 살충성 곰팡이의 배양조건 확립	100
3) 다기능성 미생물의 병해충 동시 방제 효능 포장 검정	15	○ 다기능성 미생물 Bb18의 실내 동시방제 효능 검정 ○ 다기능성 미생물 Bb18 수화제의 목화진딧물에 대한 하우스 조건에서의 방제효과 검정	100
4) 병해충 동시 방제제 제형 연구 및 시제품 생산	20	○ 살균활성 미생물을 이용한 제제화 ○ 살충활성 곰팡이균을 이용한 제제화 ○ 시제품 생산	100
5) 다기능성 미생물의 병해충 방제 기작 구명	15	○ Bb18시제품 목화진딧물의 살충활성 기작 검정 ○ Bb18균의 항균활성 물질의 특성 조사	100
6) 시제품의 안정성 및 안정성 평가	20	○ 시제품의 안전성 평가완료 ○ 유기농업자재 목록공시 등록 완료	100
	100%		100

제2절 : 정량적 성과

성과지표명 \ 연도		당초 목표 (전체)	실적	달성도 (%)	가중치 (%)
논문게재	SCI	2	1	50	10
	비SCI	3	3	100	10
산업재산권	출원	2	6	300	10
학술발표	국제	3	6	200	10
	국내	4	8	200	10
기술이전		1	1	100	10
영농기술 · 정보 기관제출		1	1	100	10
생물자원 등록·기탁		2	4	200	10
농자재 심사/등록		1	1	100	10
홍보		1	1	100	10
농가기술지도 및 컨설팅		0	1		
계		20	31	150	100

제 5 장 연구 결과의 활용 계획

시설작물 병해충 복합방제 군주의 특허 출원과 선발 군주의 대량배양법 및 효율증진법에 대해서도 특허 출원할 것임

제 6 장 연구 과정에서 수집한 해외 과학 기술 정보

국외의 생물농약 개발은 대기업보다는 벤처기업이나 중소기업들이 주도적으로 시장을 선도하고 있다. 전세계적으로 110여개 회사들이 생물농약 사업을 펼치고 있으며 이중 연간 3천만불이상 매출 규모의 회사로는 Verdera OY사, Ceris USA사, AgraQuest사 등이 있다.

현재 미국 EPA에는 76개의 미생물농약과 113개의 생화학농약이 등록되어 있으며 (2004, 농약연찬회). 유럽의 경우에는 미생물농약이 112개가 등록되어 시판되고 있으며, 천연물 농약은 58개가 등록되어 있다(Copping & Menn, 2000). 외국에서 개발되어진 "BINAB T", "MYCOSTOP" 등 최소한 10 종류가 이미 국내에 소개되었으며 향후 미생물농약과 생화학농약에 대한 연구, 개발은 꾸준히 증가 할 것으로 예상된다.

생물농약 개발은 대기업보다는 주로 벤처기업이나 중소기업들이 주도적으로 시장을 선도하고 있고, 전 세계적으로 약 110여개의 회사들이 생물농약을 개발, 판매하는 것으로 알려져 있다. 이들 중에서 연간 3천만 불 이상 매출의 비교적 큰 규모의 미생물농약 회사로는 Verdera OY사(미생물 농약 시장의 5%), Certis USA사 (미생물 농약 시장의 6%), AgraQuest사 (미생물 농약 시장의 6%) 등이 알려져 있다. 2010년 매출액 기준으로 *B. thuringiensis*를 기반으로 한 Bacterial 미생물 농약은 전체 시장의 80%를 차지하였다.

Faria와 Wraight (2007)는 2007년 현재 80여 개국 이상에서 171 품목의 곰팡이 이용 미생물 살충제가 개발 등록되어 있으며, 이들 품목 중 43%가 남미의 회사 또는 연구소에서 개발되었고, 그 외에 미국, 유럽 등에서 개발된 제품이 대부분이라고 보고하였다. 네덜란드와 캐나다의 연구 중 곤충병원성 곰팡이로 알려진 곰팡이 균주 중 일부가 오이 흰가루병 방제에 효과가 있다고 보고되어 있으며, 캐나다에서 분리된 곤충병원성 곰팡이 *Verticillium lecanii* 한 균주는 감자수염진딧물과 흰가루병 모두에 방제효과가 있는 것으로 보고하였다(Shah and Pell, 2003; Kim et al., 2010; Ownley et al., 2010).

제 7 장 연구 개발 결과의 보안 등급

보안 등급 분류	보안	일반
		일반과제
결정 사유	「국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」 제24조의4에 해당하지 않음	

제 8 장 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

－ 해당사항 없음

제 9 장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

○ 연구실 일일안전점검

- 실시대상 : 과학기술분야 해당 연구실험실 / 실시주기 : 매일 점검(연구활동시작 전)
- 실시자 : 해당 연구실책임자, 해당 연구실 연구활동종사자
- 점검양식 : 연구실안전관리센터에서 배부한 일상점검 체크리스트

○ 연구실 정기안전진단 및 정밀안전점검 실시

- 진단주기 : 매달 1회 전체 연구실에 대하여 정기안전점검 및 정밀안전진단 실시
- 진단대상 : 연구실험실
- 진단방법 : 진단기기를 통하여 화공, 가스, 전기, 위생, 기계 등 종합점검
 - ※ 전문 안전점검기관을 통하여 진단 시행
- 추후조치 : 진단결과 미비점에 대하여 개선조치가 될 수 있도록 시정요청 후 피드백

○ 교육훈련 체계

- 집합 안전교육

- 가. 교육대상 : 전체 연구활동종사자
- 나. 교육주기 : 반기 6시간 이상, 신규채용자 : 8시간 이상 시행
- 다. 교육방법 : 전문강사 초빙하여 교육

- 신규 연구활동종사자 교육

- 가. 교육대상 : 신규 연구활동종사자
- 나. 교육주기 : 신규채용자(계약직포함): 8시간 이상 시행
- 다 . 교육방법 : 집합교육

라. 교육내용 : 연구실 특성에 맞는 안전교육실시

- 연구수행에 맞는 자체 안전교육 계획수립 및 이행

○ 연구활동종사자 건강검진 실시 : 매년 1회 실시

- 검진대상 : 산업안전보건법에 따른 유해물질 및 유해인자를 취급하는 연구활동종사자/
연구원 등 건강보험 가입자
- 검진기관 : 계약된 기관에서 출장검진 또는 원내검진 시행

제 10 장 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문 게재지/ 특허등록국가	Impact Factor	논문 게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/ 인용횟수 등)
1	논문	Effects of culture conditions on conidial production of the sweet potato whitefly pathogenic fungus <i>Isaria javanica</i>	국립농업과학원		Mycoscienc e	1.165	2015.10.23	단독	SCIE
2	논문	<i>Beauveria bassiana</i> 대량배양을 위한 탄소원, 질소원, 및 고체 기질 선발	국립농업과학원		한국균학회지		2014.12.13	단독	KCI
3	특허	뷰베리아 바시아나 Bb18 균주 또는 이를 이용한 진딧물 및 균핵병균의 동시방제용 조성물	국립농업과학원		대한민국 (출원)				
4	기술 이전	뷰베리아 바시아나 Bb18 균주 또는 이를 이용한 진딧물 및 균핵병균의 동시방제용 조성물	국립농업과학원		(주)한국바이 오케미칼				
5	논문	길항세균 <i>Bacillus</i> sp. KBC1004를 이용한 고추탄저병의 생물학적 방제제 개발	(주)한 국바이 오케미 칼		식물병연구		2015.07.02	단독	비SCI
6	논문	길항세균 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> KBC1009를 이용한 고추 흰비단병의 생물학적 방제	(주)한 국바이 오케미 칼		농업생명과학 연구		2016.08.25	단독	비SCI
7	특허	곤충병원성 곰팡이균의 포자형성 향상을 위한 액체배지 조성 및 배양방법	(주)한 국바이 오케미 칼		대한민국 (출원)		2015.10.14 (특허출원일)		
8	기타	유기농업자재 목록공시	(주)한 국바이 오케미 칼				2016.08.26		

제 11 장 기타사항

연차	당초계획	변경내용	변경사유(근거문서 포함)
3년차 (2016)	주관 및 세부과제 연구책임자 변경	(변경 전) 김정준 (변경 후) 한지희	김정준 파견 (2016.07.11~2017.06.10) (농업미생물과-1051, 2016.08.04.)



농촌진흥청

수신 내부결재
(경유)

제목 연구과제 책임자 변경 승인 요청

함께해요 을지연습! 튼튼해요 국가안보!

국립농업과학원



1. 관련 : 농촌진흥청 공동연구사업 운영규정
2. 농업미생물과에서 수행하고 있는 공동연구과제 「국내 토착 미생물 자원을 이용한 병해충 복합 방제제 개발」의 주관 및 세부과제 책임자를 아래와 같이 변경하고자 하오니 승인하여 주시기 바랍니다.

주관과제명 (책임자)	세부과제명 (책임자)	변경 전	변경 후	변경 사유
국내 토착 미생물 자원을 이용한 병해충 복합 방제제 개발(김정준)	유용미생물의 병해충 동시방제 효능 검정 및 기작 구명 연구(김정준)	○ 주관 책임자 : 김정준 ○ 세부 책임자 : 김정준	○ 주관 책임자 : 한지희 ○ 세부 책임자 : 한지희	과제책임자 (김정준) 파견 (16.7.11 ~17.6.10)

붙임 : 협약 변경 승인요청서 1부(별송). 끝.

농업연구사 한지희 농업연구관 출장 농업미생물과 2016. 8. 4.
과장 박민철
협조자
시행 농업미생물과-1051 접수
우 55365 전라북도 완주군 이서면 농생명로 166 (국립농업과학원) 농 / www.naas.go.kr
업생물부 513호
전화번호 063-238-3052 팩스번호 063-238-3834 / bijouhee@rda.go.kr / 대국민 공개
위대한 여정 새로운 도약

제 12 장 참고문헌

1. Ahmad M & Arif MI (2008) Susceptibility of Pakistani populations of cotton aphid *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae) to endosulfan, organophosphorus and carbamate insecticides. *Crop Protection*, 27, 523–531.
2. Backman, P. A. and Sikora, R. A. 2008, Endophytes: an emerging tool for *biological control*, *Biological Control*, 46: 1.
3. Baker, K. F. and Cook, R. J. 1974. Biological control of plant pathogens. W. H. Freeman and Co. pp. 43.
4. Campbell, R. 1989. Biological control of microbial plant pathogen. Cambridge University Press. pp. 8–24.
5. Chandler, D., Davidson, G., Grant, W. P., Greaves, J. and Tatchell, G. M. 2008, Microbial biopesticides for integrated crop management: an assessment of environmental and regulatory sustainability, *Trends in Food Science and Technology*, 19: 275.
6. Chang, K. F., Hwang, S. F., Wang, H., Turnbull, G. and Howard, R. 2006. Etiology and biological control of Sclerotinia blight of coneflower using *Trichoderma* species. *Plant Pathology J.* 5(1): 15–19.
7. Chon, B. G., Park, S. J. and Kim, J. W. 2013. Biological control of Sclerotinia sclerotiorum in Lettuce using antagonistic bacteria. *Research in Plant Disease*. 19(1): 12–20.
8. Copping, L. G. and Menn, J. J. 2000, Biopesticides: a review of their action, application and efficacy, *Pest Management Science*, 56: 651.
9. Cui L, Qi H, Yang D, Yuan H & Rui C (2016) Cycloxaprid: A novel cis-nitromethylene neonicotinoid insecticide to control imidacloprid-resistant cotton aphid (*Aphis gossypii*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*.
10. De Faria MR & Wraight SP (2007) Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, 43, 237–256.
11. Erkol, D., Dilek D. and Cakir E. 2011. In vitro antagonistic activity of fungi isolated from sclerotia on potato tubers against *Rhizoctonia solani*. *Turk Biol.* 35: 457–462.
12. Errakhi, R., Lebrihi, A. and Barakate, M. 2009. *In vitro* and *in vivo* antagonism of actinomycetes isolated from Moroccan rhizospheric soils against *Sclerotium rolfsii* : a causal of root rot on sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Journal of Applied Microbiology*. 107(2): 672–681.

13. Gal, S. W. 1992. Purification and characterization of chitinase isozymes and cloning of a gene for 58kD from *Serratia marcescens* KCTC2172. Doctor's thesis. Gyeongsang National University.
14. Go, E. S., Lim, Y. H., Jeong, H. C., Choi, J. P., Park, I. S., Kim, J. J., Lee, D. J. and Kim, K. 2013. Statistical optimization of culture conditions for the production of aphicidal Metabolites of *Beauveria bassiana* Bb08. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.*, 41(4): 398–406.
15. Jang, J. Y., Choi, Y. H., Joo, Y. J., Kim, H., Choi, G. J., Jang, K. S., Kim, C. J., Cha, B. J., Park, H. W. and Kim J. C. 2015. Characterization of *Streptomyces netropsis* showing a nematocidal activity against *Meloidogyne incognita*. *Res. Plant Dis.*, 21(2): 50–57.
16. Kim, C. S. 2012. A Study on Prevention Technique for the Greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*) by using Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* M130, Andong national university, 10–12.
17. Kim, C. S., Lee, J. B. Kim, B. S., Lee, M., H., Kang, K., M., Joo, W., H., Kim, J., W., Im, D. J. and Kwon, G., S., 2013. The Optimal Condition and Enzyme Activity of Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* Using Extracted Rice Bran, *Journal of Life Science*, 23(8): 1010–1018.
18. Kim, C. S., Lee, J. B., Kim, B. S., Lee, M. H., Kang, K. M., Joo, W. H., Kim, J. W., Im, d. J. and Kwon, G. S. 2013. The Optimal Condition and Enzyme Activity of Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* Using Extracted Rice Bran. *Journal of Life Science*, 23(8): 1010–1018.
19. Kim, G. H., Oh, S. O., Hur, J. S., Yun, K. J. and Koh, Y. J. 2006. Optimum cultivation conditions for mass production of an antagonistic bacterium *Bacillus subtilis* BD310 for development of a microbial agent controlling gray blight of tea plants. *Res. Plant Dis.*, 12(2): 85–90.
20. Kim, G. H., Park, J. Y., Cha, J. H., Jeon, C. S., Hong, S. J., Kim, Y. H., Hur, J. S. and Koh, Y. J. 2011. Control effect of major fungal diseases of cucumber by mixing of biofungicides resistered for control of powdery mildew with other control agents. *The Korean Journal of Pesticide Science* 15(3): 323–328.
21. Kim, H. J., Lee, E. J., Park, S. H., Lee, H. S. and Chung, N. H. 2014. Biological control of anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) in pepper and cherry tomato by *Streptomyces* sp. A1022. *J. Agric. Sci.* 6: 54–62.
22. Kim, H. W., Lee, K. Y., Baek, J. W., Kim, H. J., Park, J. Y., Lee, J. W., Jung, S. J. and Moon, B. J. 2004. Isolation and Identification of antagonistics bacterium

- active against *Sclerotinia sclerotium* causing sclerotinia rot on Crisphead Lettuce. *Research in Plant Disease*. 10(4): 331–336.
23. Kim JJ, Goettel MS & Gillespie DR (2010) Evaluation of *Lecanicillium longisporum*, Vertalec against the cotton aphid, *Aphis gossypii*, and cucumber powdery mildew, *Sphaerotheca fuliginea* in a greenhouse environment. *Crop Protection*, 29, 540–544.
 24. Kwak, Y. K., Kim, I. S., Cho, M. C., Lee, S. C. and Kim, S. 2012. Growth inhibition effect of environment friendly farm materials in *Colletotrichum acutatum* in vitro. *Journal of Bio-Environment Control*, 21(2): 127–133.
 25. Lee, G. W., Kim, M. J., Park, J. S., Chae, J. C., Soh, B. Y., Ju, J. E. and Lee, K. J. 2011. Biological control of Phytophthora blight and anthracnose disease in red-pepper using *Bacillus subtilis* S54. *Res. Plant Dis.* 17: 86–89.
 26. Madi, L., Katan, T., Katan, J. and Henis, Y. 1997. Biological control of *Sclerotium rolfsii* and *Verticillium dahliae* by *Talaromyces flavus* is mediated by different mechanisms *Phytopathology*. 87(10): 1054–1060.
 27. Min, E. G. and Han, Y. H. 2002. Optimal condition for mycelial growth of *Beauveria bassiana* and its extracellular enzyme activity. *The Korean Journal of Microbiology*. 38(1): 50–53.
 28. Morang, P, Dutta, B. K., Ranjita, A. and Dileep, B. S. 2013. Antagonistic potential of some isolated fungi against brown root rot disease of tea in Barak Valley of Assam. *Pure and Applied Microbiology*. 7(1): 711–716.
 29. Ownley BH, Gwinn KD, Vega FE, 2010. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. *BioControl* 55: 113–128.
 30. Park, G. S., Jang, E. K., Kim, M. S. and Shin, J. H. 2012. Insecticidal activity and stability by freeze-drying of Entomopathogenic Bacteria, *Photorhabdus temperata* M1021. *J. Appl. Biol. Chem.*, 55(2): 123–127.
 31. Park, J. Y., Kim, H. W., Kim, H. J., Chun, O. J., Jung, S. J., Choi, W. B., Lee, S. W. and Moon, B. J. 2005, cultivation conditions for mass production of an antagonistic bacterium *Stenotrophomonas maltophilia* BW-13. *Res. Plant Dis.*, 11(2): 158–161.
 32. Park, S. J., Kim, G. H., Kim, A. H., Lee, H. T., Gwon, H. W., Kim, J. H., Lee, K. H. and Kim, H. T. 2012. Controlling effect of agricultural organic materials on Phytophthora blight and anthracnose in red pepper. *Res. Plant Dis.* 18: 1–9.
 33. Park, S. J., Kim, G. H., Kim, A. H., Lee, H. T., Gwon, H. W., Kim, J. H., Lee, K. H. and Kim, H. T. 2012. Controlling effect of agricultural organic materials on phytophthora blight and anthracnose in red pepper. *Res. Plant Dis.*, 18(1): 1–9.

34. Park, S., M., Jung, J. H. and Yu, T. S. 2006. Screening of an antagonistic bacterium for red-pepper anthracnose, *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal of Life Science*, 16(3): 420–426.
35. Rimando, A. M. and Duke, S. O. 2006, Natural products for pest management. American Chemical Society, Washington, USA.
36. Seo, J. B., Jin, B. R., Shin, S. C., Park, H. Y., Lee, B. Y., Lee, C. K. and Kang, S. K. 1996. Development of solid culture media for the mass production of *Beauveria bassiana* conidia. *Korean J. Seric. Sci.* 38(1): 31–35.
37. Shah P, Pell J, 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology* 61: 413–423.
38. Shim, C. W., Shin, W. C. and Yu J. H. 1992. Effect of pH on growth and cultural characteristics of *Bacillus* sp. SH-8과 *Bacillus* sp. SH-8M. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 20(4): 371–376.
39. Sim, H. J., Kim, S. K., Ziwen, Y., Je, Y. H. and Kang, S. K. 1999. Effect of *Paecilomyces fumosoroseus* SFP-198 on greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* in greenhouse. *The Korean Journal of Pesticide Science*. 3(1): 90–95.
40. Soh, J. W., Han, K. S., Lee, S. C., Park, J. H. and Kim, H. T. 2014. Control effect of environment-friendly materials on anthracnose pathogen in red pepper. *Korean J. Int. Agric.* 26: 162–168.
41. St Leger RJ, Wang C, 2010. Entomopathogenic fungi and genomics era. In: Stock SP, Vanderberg J, Boemare N, Glazer I (eds), *Insect pathogens: molecular approaches and techniques*. CABI, Wallingford, pp 365–395.
42. Sung, J. M., Hong, S. J., Humber, R. A. and Spatafora, J. W. 2003. Asexual stage and fruit formation of *Cordyceps staphylindaecola*. *The Korean Journal of Mycology* 31(1): 1–7.
43. Tsahouridou, P. C. and Thanassouloupoulos, C. C. 2002. Proliferation of *Trichoderma koningii* in the tomato rhizosphere and the suppression of damping-off by *Sclerotium rolfsii*. *Soil Biology & Biochemistry*. 34: 767–776.
44. Tweddell, R. J., Jabaji-Hare, S. H. and Charest, P. M. 1994. Production of chitinase and β -1,3-glucanase by *Stachybotrys elegans*, a mycoparasite of *Rhizoctonia solani*. *Applied and Environmental Microbiology*. 60: 489–495.
45. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor, JW, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds), *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, New York, pp 315–322.
46. Yoo, J. H., Park, I. C. and Kim, W. G. 2012. Biocontrol of anthracnose of chili

- pepper by *Bacillus* sp. NAAS-1. *Korean J. Mycol.* 40: 277- 281.
47. Zimmermann G (2007a) Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology*, 17, 553-596.
 48. Zimmermann G (2007b) Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology*, 17, 879-920.
 49. 강석권, 진병래, 우수동, 김호산, 박현우, 서중복, 김우진, 이대원. 1997. 솔잎혹파리 방제를 위한 유효병원사상균의 분리 및 배양체계의 개발, 연구보고서. pp. 80-82.
 50. 강훈석, 2014. 식물 병원균 방제기술, 방제방법 및 조성물. 특허 10-1447019호.
 51. 김진철, 2009, 생물농약의 연구개발 동향. 농업생명공학.
 52. 김창길, 2009, 최근 국내외 친환경농산물의 생산실태 및 시장전망, 농정연구속보 제58권, 한국농촌경제연구원.
 53. 농약관리법 - [별표2]농약의 검사항목별 검사방법.
 54. 농촌진흥청, 2011, 천연식물보호제 등록현황.
 55. 박윤석, 2015. 뿌리혹선충 방제를 위한 항선충 미생물 대량배양복합체 개발. 농림축산식품부 연구보고서.
 56. 성재모, 1998. 곤충기생균을 이용한 무공해 미생물 살충제 개발. 농림부 연구보고서.
 57. 소노야마 다카야스, 1999. 미생물 살충제제의 제조방법, 특허 10-0186032호.
 58. 윤영남, 2014, 미생물과 천연물 유래 물질을 이용한 흰가루병 및 선충병 친환경방제제 개발. 농촌진흥청 연구보고서.
 59. 정수희, 2005, 온도 변화에도 안정한 바실러스 서브틸러스 AH18의 제제화 방법, 특허 10-0866611호.
 60. 제연호. 2012. 해충 방제용 미세물 살충제의 현장 활용증진 기술개발에 관한 연구. 농촌진흥청 연구보고서. pp. 65-78.
 61. 한국기술은행, 2006, 환경친화적 생물농약: 기술 및 시장 동향.
 62. 홍석일. 2014. 유용미생물 유래 물질을 활용한 진딧물 방제제 개발. 농촌진흥청 연구보고서. pp. 28.

주 의

1. 이 보고서는 농촌진흥청에서 시행한 「친환경안전농축산물생산기술사업」의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농촌진흥청에서 시행한 「친환경안전농축산물생산기술사업」의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.