

최 종
연구보고서

**고추역병과 딸기흰가루병의 환경친화적
방제제개발 및 실용화에 따른 안전성 연구**

**Development of Ecofriendly Control
Agents and Reach of Safety to
Industrialization for Latent blight on
Pepper and Powdery mildew on
Strawberry**

연구기관
(주) 흙살림

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “고추역병과 딸기흰가루병의 환경친화적 방제제개발 및 실용화에 따른 안전성 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007년 5월 24일

주관연구기관명 : (주) 흙살림

총괄연구책임자 : 이 태 근

세부연구책임자 : 이 태 근

연 구 원 : 박 동 하

연 구 원 : 윤 영 선

연 구 원 : 노 선 화

연 구 원 : 박 동 윤

연 구 원 : 주 영 직

연 구 원 : 박 은 정

협동연구기관명 : 화학시험연구원

협동연구책임자 : 성 하 정

요 약 문

I. 제목

고추역병과 딸기흰가루병의 환경친화적 방제제 개발 및 실용화에 따른 안전성 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

고추가 17C 이후 우리나라에 전래된 이래로 우리나라 대부분의 지역에서 재배되고 있으며, 조미채소로써 그 소비량이 타작물에 비해 높은 편이다. 또한 전체 채소재배 면적의 25%를 차지하는 경제작물로 자리매김을 하면서 2002년도까지 재배면적 (72,100ha)과 생산량 (192,800 톤)이 꾸준히 증가하였다. 그러나 2003년에는 전년도 대비 6만여 톤이 감소하였고, 2005년도까지 다시 증가 추세를 보여 61,300ha에서 161,400 톤이 생산되었다. 그러나 2006년에 다시 재배면적과 생산량이 대폭 감소되어 53,097ha에서 116,914톤이 생산되었다. 이렇게 재배면적과 생산량이 줄어든 원인은 전년도 고추 생산량 증가에 따른 가격 하락과 노동력 부족 등으로 재배면적 감소 그리고 장마기에 역병의 피해가 늘어났기 때문이라고 볼 수 있다.

노지 고추재배에서 발생하는 주요 병해충으로 고추역병과 탄저병 그리고 담배나방이 있으며, 이들이 고추 수확량 감소에 가장 큰 영향을 미친다. 그 중에 고추역병은 가장 먼저 발생하는 병으로 우리나라 장마철을 기점으로 많이 발생하는데, 포장 과습과 낮은 지온이 발병원인으로 작용한다. 6월 20일경 비가 2~3일간 계속되면서 20~23℃로 유지될 때 토양 내 역병균들이 증식을 시작하여 유주자낭을 형성하고, 그 속에 유주포자를 형성한다. 장마로 인해 포장이 과습하게 되면 유주자낭에서 포자가 배출되어 복토한 흙 가까운 줄기 쪽으로 이동하여 침입하게 된다. 고추역병균에 감염되면 줄기 둘레가 까맣게 썩고, 뿌리도 썩어 지상부가 시들어 죽게 되는데, 비가 그치는 때가 되면 지상부가 말라서 역병에 의한 전형적인 피해 증상을 볼 수 있다.

고추 역병은 토양 전염성 식물병으로 주로 연작지에서 많이 발생하며, 현재까지는 화학적 방제에 많이 의존해왔다. 일부 농가에서는 저항성 품종이나 저항성

대목을 사용하기도 하지만, 생산량이 다수확 품종에 비해 다소 떨어지는 것으로 알려져 있다.

한편 딸기흰가루병은 시설재배지 면적이 확대되면서 그 피해가 심각한 수준에 이르렀다. 육묘기에는 잎과 엽병에 발생하여 생육에 지장을 초래하고, 딸기 수확 시기에는 과 표면에 발생하여 상품성을 저하시킨다. 분생포자에 의해 2차 전염이 이루어지며, 전 재배 기간에 걸쳐 발생하기 때문에 농가에서는 딸기흰가루병을 방제하기 위해 엄청난 양의 유기합성 살균제를 살포하는 상황이다. 그러나 친환경 농업 실천 농가의 경우 고추역병이나 딸기흰가루병에 대한 관리방법이 미흡한 실정이며, 이로 인해 막대한 수확량 감소로 경제적 손실을 보고 있는 상황이다. 그러나 흰가루병에 대한 미생물농약이 개발되어있는 상황이기는 하지만 발생 빈도가 높고, 발생량 또한 심각한 수준이기 때문에 방제에 어려움을 겪고 있다.

따라서 본 연구에서는 딸기흰가루병균과 고추역병균에 대해 항균활성이 우수한 균주를 이용하여 산업화를 위한 대량배양 공정을 개발하고, 이를 제제화하여 포장에 적용함으로써 두 병원균을 방제할 수 있는 미생물농약을 개발하고자 하며, 아울러 독성 평가를 통해 개발 제품의 안전성을 확보하고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

고추역병과 딸기흰가루병의 환경친화적 방제제 개발을 위해 다음과 같은 연구를 수행하였다.

바실러스 서브틸리스와 방선균 균주의 특징과 효과검정을 위한 스크리닝

고추역병에 길항력을 보이는 방선균 *Streptomyces* sp. AG-P와 딸기흰가루병에 효과를 보이는 *Bacillus subtilis* JKK238균주의 항균활성을 알아보기 위해 기내 plate 수준과 온실상의 포트 수준에서 엽권 정착력과 병원균 방제효과를 검정하였으며, 이를 보다 개선하여 환경친화적 방제제를 개발하고자 하였다.

○ 길항미생물의 특징과 효과 검정

- 전자현미경 수준에서의 관찰
- 주요 작물병에 대한 역가 검정
- 길항미생물의 엽권 정착력 확인
- 포트 수준에서의 약효 검정

길항미생물의 대량배양과 미생물농약의 실용화를 위한 제제화 기술 확립

대량배양 조건을 확립하기 위해 미생물의 주 영양원인 탄소원과 질소원 등을 산업적으로 대체 가능한 물질로 전환하였으며 온도, 공기 주입량 등을 검토하였다. 또한 미생물농약으로 개발하기 위해서 방선균과 바실러스 균주에 적합한 제제화 기술을 검토하였다.

- 배양조건과 영양원에 따른 균밀도 변화와 항균 활성
 - 탄소원, 질소원에 따른 균밀도와 항균활성
 - 온도, 공기 주입량, 배양기간에 따른 밀도와 항균활성
- 제형화 기술개발과 제제화
 - 최적 제형 개발
 - 제형에 따른 균주의 밀도 안정성과 항균활성

미생물제품 활용다각화 연구와 미생물 제품의 약효, 약해 포장시험

길항미생물을 산업적으로 대량 배양하여 작물에 직접 적용할 수 있는 제제로 만드는 한편, 육묘기에 처리하여 작물의 생육 전반에 걸쳐 적용할 수 있는 식물병 방제제로 개발하고자 하였다.

- 주요 식물병에 대한 항균활성 검정
 - 고추탄저병, 딸기잣빛곰팡이병
- 입고병방제제로서의 활용방안 연구
 - 육묘기 모입고병 방제 효과 시험
- 약효 시험 (딸기흰가루병, 오이흰가루병, 고추 역병)
 - 제형별 적용 시기, 횟수, 농도 결정

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

가. 길항미생물의 특성과 길항력 연구

소규모 포장시험을 통해 딸기흰가루병 방제에 효율이 높은 균주를 선발하였

다. 방제 효과가 가장 우수한 *B. subtilis* JKK238 [특허등록, 10-0407074-0000, 한국 전통 젓갈 유래 항균 펩타이드 생산 미생물 균주]은 식물 병원균에 대하여 방제 활성을 갖는 항균 펩타이드를 생산하는 미생물로 4 종의 식물병 (벼도열병, 고추탄저병, 딸기잣빛곰팡이병, 딸기흰가루병)에 대하여 항곰팡이 활성을 나타냈다. 또한 딸기재배 포장에 배양액을 처리하였을 때 방제가는 74.1%로 딸기 표면의 흰가루병 포자와 균사를 심하게 변형시켜 딸기 흰가루병원균의 증식을 억제하였다.

한편 *Streptomyces* AG-P는 대전 생명공학연구원 항생물질탐색 팀이 분리한 균주로서 현재 특허 등록 [신균주 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp. AG-P (KTCT 8965P) 및 이를 이용한 식물병방제제]이 완료된 상태이며, 시험 결과 고추역병에 대해 *Streptomyces* AG-P 배양액 50배를 처리하였을 때 방제가가 65.5%, 100배를 처리하였을 때에는 55.2%로 조사되었다. 난균류 외에 고추탄저병균과 딸기잣빛곰팡이균에 대해 길항 효과가 우수하였다.

나. 길항미생물의 대량 배양 조건 확립

B. subtilis JKK238 대량 배양을 위한 탄소원 선발에서 glucose는 다른 탄소원과 달리 균밀도와 항균활성 증가에 영향을 주었다. 따라서 함량별 균밀도와 항균활성 검정을 통해 첨가량을 2.0%로 결정하였다. 질소원으로는 soy bean meal 1.0%, yeast extract 1.0%를 함께 사용하였을 때 항균활성이 가장 크게 증가하였으므로 이 두 가지를 질소원으로 선발함과 동시에 첨가량도 각각 1%로 결정하였다. 탄소원과 질소원 외에 *B. subtilis* JKK238의 항균활성에 결정적 영향을 주는 요인으로는 공기주입량과 온도 등이었다. 따라서 각 요인에 대한 조건별 실험에서 균밀도와 항균활성이 최대가 되는 조건을 결정하였으며, 이때 공기주입량은 1 vvm이고 온도는 30℃였다. 이상의 결과를 종합한 결과 대량배양을 위한 배지 조성은 glucose 2.0%, yeast extract 1.0%, soy bean meal 1.0%, MgSO₄·7H₂O 0.1%, K₂HPO₄ 0.1%으로 결정했고 NGYS배지라 명하였다. 결정된 배양 조건에서 3.5톤 대량 배양이 성공적으로 이루어졌으며, 균밀도는 6.2 × 10⁸ CFU/ml로 나타났다. 벼도열병에 대한 항곰팡이 효과는 22 mm로 기존 배양조건 (16 mm)에서 배양된 경우보다 더 큰 성장억제환을 나타내었다.

Streptomyces AG-P 대량 배양 최적화를 위한 산업용 배지 선발과 배양조건 실험에서 탄소원의 경우 종류와 농도는 균밀도에 큰 영향이 없었으나, 항곰팡이

효과에는 영향을 준다는 결과를 얻었다. 항곰팡이 활성 시험을 통해 효과가 가장 우수한 조합인 soluble starch 0.5%, glucose 1.5%를 탄소원으로 최종 선발하였다. 질소원 선발을 위해 yeast extract와 soybean meal의 함량을 달리하여 조합한 다음 항곰팡이 활성 시험을 실시한 결과 yeast extract 0.6%, soybean meal 3.0%로 결정하였다. 공기주입량에 따른 균밀도와 항곰팡이 활성은 0.2 vvm, 0.5 vvm, 1.0 vvm까지 비례적으로 증가하였고, 시간경과에 따라서도 증가됨을 관찰했다. 배양온도에 따른 성장양상은 28℃에서 24시간 만에 대수성장기에 접어들었으나 26℃와 30℃은 저조하게 나타났으며, 항곰팡이 활성 물질도 적었다. 따라서 대량배양을 위한 온도 조건은 28℃로 최종 결정하였다. 이상의 실험을 통해서 결정된 배지 (탄소원, 질소원), 공기량, 배양온도 등을 종합한 결과, soluble starch 0.5%, glucose 1.5%, yeast extract 0.6%, soybean meal 3.0%, NaCl 0.2%, K₂HPO₄ 0.025%, CaCO₃ 0.2% (SGYS배지로 명명), 온도 28℃, 공기량 1 vvm으로 하였다. 배양 조건 확립 후 시도한 350리터 확대 배양은 성공적으로 이루어져 균밀도는 2.0×10^9 CFU/ml, 벼도열병 성장 억제환은 26 mm였다..

다. 미생물농약 실용화를 위한 제형화 기술 확립과 안정성 연구

B. subtilis JKK238의 보존성과 항균물질 안정화를 위해 전착효과가 있는 칼륨비누 0.1% 혼합, potassium sorbate 0.3%, 황산을 이용한 산도조절 (pH 4) 등 다양한 실험을 수행한 결과 시간 경과 후에도 일정한 균밀도를 유지하는 안정한 상태를 보였으나 항곰팡이 활성이 심하게 떨어지는 것이 확인됨에 따라 화학물질을 첨가하지 않으면서 유기농업에 사용 가능한 고효성의 항곰팡이제제를 개발한다는 취지에서 배양액 상태를 최종 제형으로 결정하였다.

Streptomyces AG-P 배양액을 이용하여 액상제형 및 분말제형화에 대한 연구를 수행하였다. 액상제형 연구 결과는 *B. subtilis* JKK238의 제형 시험 결과와 유사하였으며, 분말제형연구에서 동결건조 방식의 경우 항균활성을 나타내는 성장억제환은 31mm로 분무건조 21mm에 비하여 10mm 정도 차이를 보여 활성이 높은 것으로 조사되었고, 균밀도 또한 동결건조 방식이 3.0×10^{11} CFU/ml로 분무건조(1.8×10^2 CFU/ml)과는 비교도 안 될 정도로 우수하였다. 그러나 생산단가에 있어 동결건조에 소요되는 비용이 kg 당 40만원, 분무건조는 1만원이 소요되기 때문에 비록 효과는 우수하지만 가격 대비 높은 생산단가로 경제성이 없는 것으로 나타났다. 따라서 최종 제형은 배양액 상태의 액상제로 결정하였다.

라. 미생물제제의 정착력과 저항성 연구

희석배수에 따른 엽권에서의 *B. subtilis* JKK238 정착력 연구결과 배양액 100배 희석 처리구에서 5일 정도 밀도가 유지되었으며, 200배 희석 처리구에서는 밀도가 급격하게 감소하였다. 따라서 작물의 잎 표면에서 그 밀도를 유지시키기 위해서는 5일 간격의 약제 처리가 요구되었다.

B. subtilis JKK238 배양액을 이용해 딸기흰가루병원균의 저항성 획득 가능성을 조사한 결과 15회 처리 기간 동안 무처리구를 제외한 모든 처리구에서 대체로 이병과율이 꾸준히 감소하는 추세를 보였으며, 최종 처리까지 발병율이 증가하지는 않았으므로 잠정적으로 약제에 대한 저항성이 발생하지 않은 것으로 판단하였다.

마. 최적 제형을 이용한 처리 방법 및 약효 약해 포장시험

B. subtilis JKK238 제제를 이용한 딸기흰가루병 방제는 시험 결과 5일 간격으로 약제처리를 하였을 때 방제효과가 가장 높았으며, 75%의 방제 효과를 나타낸 100배 희석 처리가 딸기흰가루병 방제에 가장 효과적인 희석 농도로 조사되었다. 따라서 딸기흰가루병을 방제하기 위한 *B. subtilis* JKK238 제제의 처리 간격, 농도 및 처리 횟수는 5일 간격으로 100배 희석액을 3~4회 처리하는 것이 바람직한 것으로 나타났다. 이상의 결과를 종합하여 포장에서 실험을 수행한 결과 *B. subtilis* JKK238 제제는 두 해 모두 약 70% 수준의 방제효과를 나타내어 무처리구와 유의한 차이를 나타냈으며, 대조약제 대비 76~83%의 우수한 방제 효과를 나타냈다.

Streptomyces AG-P 제제의 처리 방법에 관한 시험에서 50배를 처리하였을 때 방제가가 65.5%로 조사되었고, 100배에서는 55.2%로 조사됨에 따라 경제적 처리 농도를 100배로 결정하였다. 또한 처리 간격을 5일로 하였을 경우 7일, 10일 간격에 비해 이병주율이 14% 이상 낮게 나타남에 따라 5일 간격을 최적 처리 간격으로 결정하였다. 처리 횟수에 따른 방제가 조사에서 처리 횟수가 증가할수록 방제가가 높아짐에 따라 4회 처리 이상 약제 방제가 요구되었다.

Streptomyces AG-P 제제와 *B. subtilis* JKK238 제제를 이용한 고추역병 포장시험 결과 포트 수준에서 60% 이상의 방제효과를 보였던 *Streptomyces*

AG-P는 그보다 조금 못 미치는 59 % 정도의 방제효과를 나타냈으며, 딸기흰가루병 약제로 개발한 *B. subtilis* JKK238는 방제효과가 46%로 낮은 편이었다. 그러나 두 미생물 합제 처리구에서 방제효과가 68.7%로 혼합 살포에 의한 상승효과를 나타냈다.

바. 미생물농약 등록

딸기흰가루병에 대한 품목등록시험과 제제의 이화학분석 및 안정성 그리고 원제와 제품의 독성 시험을 통해 *B. subtilis* JKK238 제제가 2006년 3월 미생물농약으로 등록되었으며, *Streptomyces* AG-P 제제는 현재 원제의 독성시험 일부를 마치고, 제품독성 준비 중에 있다.

사. 활용 다각화를 위한 연구

잎살림 미생물농약(*B. subtilis* JKK238 제제)을 오이흰가루병에 적용한 결과 63%의 방제 효과를 나타냈으며, 대조미생물 약제에 비하여 약 5% 이상 방제효과가 높은 것으로 나타남으로써 오이흰가루병 방제 약제로써 가능성을 확인하였다. 고추탄저병에 대한 기내 시험에서도 대조구에 비해 뚜렷한 병 예방 효과를 볼 수 있었으며, 특히 고추탄저병균 Agar plug 접종 실험에서 대조구는 모두 심한 감염을 확인한 반면 50배 희석하여 처리하여도 고추 탄저병의 병반이 커지지 않음을 확인할 수 있었다. 2007년 현재 잎살림 미생물농약에 대해 (사)작물보호협회에 벼잎도열병 적용확대 시험 신청하였으며 포장시험 준비 중이다.

Streptomyces AG-P 제제는 입고병 방제 효과가 72.5%로 우수하였으며, 100배 희석 처리구도 62%의 방제효과를 나타냈고, 기내 시험에서 고추탄저병, 잣빛곰팡이병에 대해서도 억제 효과가 나타났다.

2. 활용에 대한 건의

가. 액상제 제형화 기술을 응용 확대하여 향후 연구될 미생물 제제 또는 미생물농약 개발에 활용할 수 있다.

나. 개발된 미생물농약을 분말수화제로 개선하여 약효와 보존성 및 활용도를 극

대화할 예정이다.

다. 개발된 미생물 농약과 방선균제제는 적용범위를 확대하는 한편 수도 육묘에 있어 입고병 예방을 위하여 육묘에 관주용제제로 활용할 예정이다.

라. *B. subtilis* JKK238과 *Streptomyces* sp. AG-P의 합제 연구를 통해 여러 식물병에 대해 광범위 스펙트럼을 갖는 미생물농약개발에 활용될 예정이다.

마. 고추 정식 전 후 액상제 관주를 통해 본 포에서의 고추 역병 예방 및 방제에 활용될 수 있다.

바. 화학 농약과 교차하여 적용함으로써 농약 사용량을 최소화하는데 활용될 수 있다.

SUMMARY

Antagonistic microorganism against Powdery mildew, *B. subtilis* JKK238 was selected by small scale field test. It showed 74.1% of disease rate against Powdery mildew. It shows antagonism to 4 species of plant pathogens; *Magnapoorthe grisea*, *Colletotricum gloeosporioides*, *Botrytis cinerea*, *Spaerotheca aphanis*. Occurrence of latent blight by *Phytophthora capsici* was controled from 55.2% to 65% by *Streptomyces* AG-P solution in the port test. Including Oomycetes, *Streptomyces* AG-P solution showed excellent antagonistic ability to *Colletotricum gloeosporioides* and *Botrytis cinerea* in *in vivo* test.

Formulation of industrial medium for *B. subtilis* JKK238 called NGYS medium was fixed up 2.0% glucose, 1.0% yeast extract , 1.0% soy bean meal , 0.1% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ and 0.1% K_2HPO_4 in *in vitro* test. Temperature and airspace condition is 30°C, 1 vvm in fermenter. Liquid culture was successful in this optimum conditions. We produced 3.5 ton of *B. subtilis* JKK238, its cell population was 6.2×10^8 CFU/ml. After 48 hour, antagonistic capacity was stronger than other time.

Formulation of industrial medium for *Streptomyces* AG-P called YGYS medium was settled soluble starch 0.5%, glucose 1.5%, yeast extract 0.6%, soybean meal 3.0%, NaCl 0.2%, K_2HPO_4 0.025% and $CaCO_3$ 0.2% in *in vitro* test. Temperature and airspace condition was 28°C, 1vvm in fermenter. In this optimum condition we put out 350 ℓ of *Streptomyces* AG-P successfully, its cell population was 2.0×10^9 CFU/ml.

B. subtilis JKK238 and *Streptomyces* AG-P to industrialize was formulated in liquid phase through various test. When *B. subtilis* JKK238 was sprayed on the surface of plant, it attached to leaf surface for 5day soundly. During the test, resistance of antagonistic microorganism agent had not been found in field.

For two years, *B. subtilis* JKK238 agent showed 70% level of control rate in the field test against Powdery mildew. *Streptomyces* AG-P agent showed

55.2~65.5% level of control rate in the field test against latent blight. Spray interval and frequency of *Streptomyces* AG-P agent are fixed 5 days and 4 times. The mixture of *Streptomyces* AG-P agent and *B. subtilis* JKK238 agent showed synergistic effect of 68.7% level of control rate in the field test against latent blight.

In March. 2006, the *B. subtilis* JKK238 agent ("IPSALIM") was registered as biopesticide on RURAL DEVELOPMENT ADMINISTRATION. And *Streptomyces* AG-P agent is on the process of toxicity assessment.

IPSALIM showed 63% level of control rate in the field test against Powdery mildew on cucumber. Also, It inhibited infection of Anthracnose on pepper.

In 2007, IPSALIM was tried biopesticide on agent against leaf blast. *Streptomyces* AG-P agent showed 62~72.5% of control rate in the test of seedling damping-off on paddy and antagonistic activity to *Botrytis cinerea* and *Glomerella cingulata* in *in vitro* as well.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	17
Chapter 2. Research on background and current status	20
1. Status and problem of domestic technology	20
2. Status and problem of foreign technology	21
Chapter 3. Results and Discussion	23
Section 1. Screening for selection of antagonistic microorganism against powdery mildew on strawberry	23
1. Selection of antagonistic microorganism against powdery mildew on strawberry	23
2. Antagonistic activity test against various plant disease	24
3. Inhibition of growth against powdery mildew on strawberry in small scale	25
Section 2. Identification and classification of <i>Bacillus subtilis</i> JKK238	26
Section 3. Establishment of fermentative technology for <i>B. subtilis</i> JKK238	27
1. Nutritional demands	27
2. Aerial demands and optimal temperature	30
3. Scale up fermentation	31
Section 4. Test of formulation of <i>B. subtilis</i> JKK238 to industrialize	34
1. Research on liquid phase	34
Section 5. Research on effect of settlement to leaf surface and resistant	35
1. Effect of settlement to leaf surface	35

2. Resistant to liquid <i>Bacillus subtilis</i> JKK238 of <i>Sphaerotheca aphans</i>	36
3. MIC of <i>B. subtilis</i> JKK238 against powdery mildewy on Strawberry	37
Section 6. Research on method of treatment and field test using the selected formulation	39
1. Research on method of treatment	39
2. Inhibition of growth against Powdery mildew	41
Section 7. Register of biopesticide for <i>B. subtilis</i> JKK238 agent	43
Section 8. Research on diversified inflection of the biopesticide	45
1. Test of control of Powdery mildew	45
2. Test of control of Anthracnose	46
3. Test of control of Blast	48
Section 9. Identification and classification of <i>Streptomyces</i> sp. AG-P	49
Section 10. Test of antagonistic effect for <i>Streptomyces</i> sp. AG-P	50
Section 11. Establishment of fermentation for <i>Streptomyces</i> sp. AG-P	50
1. Nutritional demands	50
2. Aerial demands and optimal temperature	53
3. Scale up fermentation	54
Section 12. Test of formulation of <i>Streptomyces</i> sp. AG-P to industrialize	57
1. Test of liquid phase	57
2. Test of powdery phase	57
Section 13. Research on application of latent blight on pepper using the <i>Streptomyces</i> AG-P	59

1. Test of control of latent blight in port level	59
2. Decision of method of treatment	61
Section 14. Application to other plant disease of <i>Streptomyces</i> AG-P	63
Section 15. Field trials of <i>Streptomyces</i> AG-P	65
Chapter 4. Achievement and devotion to related field	66
Chapter 5. Application plans of research results	72
Chapter 6. Novel foreign informations collected	74
Chapter 7. Reference	75

목 차

제 1 장 연구개발 과제의 개요	17
제 2 장 국내외 기술개발 현황	20
1. 국내 기술현황과 문제점	20
2. 국외 기술현황과 문제점	21
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	23
제 1 절 딸기 흰가루병 방제 미생물 선발을 위한 스크리닝	23
1. 다양한 길항균을 이용한 딸기흰가루병 방제용 미생물 선발	23
2. 여러 가지 식물병에 대한 <i>B. subtilis</i> JKK238 배양액의 항균활성 검정	24
3. 소포장 수준에서의 흰가루병에 대한 방제 효과 검정	25
제 2 절 보유 균주 <i>B. subtilis</i> JKK238의 분류학적 위치와 특성	26
제 3 절 <i>B. subtilis</i> JKK238 배양 기술 확립	27
1. 영양조건에 따른 배양 최적화	27
가. 탄소원에 따른 배양적 특성과 항진균 활성	27
나. 질소원에 따른 배양적 특성과 항진균 활성	28
2. 공기주입량과 배양 온도에 따른 최적화	30
가. 공기량에 따른 배양적 특성과 항진균 활성	30
나. 배양 온도에 따른 균밀도와 항균활성	31
3. 대량배양 실험	31
제 4 절 <i>B. subtilis</i> JKK238의 실용화를 위한 제제화 기술 확립	34
1. 액상 제형 연구	34
제 5 절 <i>B. subtilis</i> JKK238의 엽권 정착력과 저항성에 관한 연구	35

1. <i>B. subtilis</i> JKK238의 엽권 정착력 조사	35
2. <i>B. subtilis</i> JKK238 배양액에 대한 딸기흰가루병균의 저항성 조사	36
3. <i>B. subtilis</i> JKK238에 의한 딸기흰가루병 최소억제농도 조사	37
제 6 절 선발된 제제의 처리 방법과 포장시험 수행	39
1. 딸기흰가루병에 대한 미생물 제제의 처리 방법 연구	39
2. 미생물제제를 이용한 딸기흰가루병 방제 효과 검정	41
제 7 절 <i>B. subtilis</i> JKK238 제품의 미생물농약 등록	43
제 8 절 <i>B. subtilis</i> JKK238 제품의 활용성 다각화 연구	45
1. 오이흰가루병에 대한 방제 효과 검정	45
2. 고추 탄저병 방제를 위한 효과 검정	46
3. 벼 도열병 방제를 위한 효과 검정	48
제 9 절 보유 균주 <i>Streptomyces</i> AG-P의 분류학적 위치와 특성	49
제 10 절 <i>Streptomyces</i> sp. AG-P 원제의 효과 검정을 위한 스크리닝	50
제 11 절 <i>Streptomyces</i> AG-P 원제 대량배양 기술 확립	50
1. 영양조건에 따른 배양 최적화	50
가. 탄소원에 따른 배양적 특성과 항균활성	50
나. 질소원에 따른 배양적 특성과 항균활성	52
2. 공기주입량과 배양 온도에 따른 최적화	53
가. 공기량에 따른 배양적 특성과 항진균 활성	53
나. 온도에 따른 배양적 특성과 항진균 활성	52
3. scale-up 발효 실험	54
제 12 절 AG-P의 실용화를 위한 제제화 기술 확립	57
1. 배양액 (원제)의 제제 연구 (특성규명)	57
2. 분말제형 연구	57
제 14 절 <i>Streptomyces</i> AG-P의 고추역병에 대한 적용 연구	59

1. 포트 수준에서의 고추역병에 대한 방제 효과 검정	59
2. 처리 방법 결정	61
가. 처리 간격	61
나. 처리 횟수	62
제 14절 <i>Streptomyces</i> AG-P의 활용성 다각화 연구	63
제 15절 방선균제제의 약효 및 약해 포장시험 수행	65
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	66
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	72
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	74
제 7 장 참고문헌	75

제 1 장 연구개발 과제의 개요

우리나라 노지 고추 재배면적은 1996년 이후로 감소 추세에 있으며, 2006년 53,097ha에 이르는 것으로 집계 되었고, 생산량은 1996년도에 218,462톤에 이르던 것이 2006년도까지 꾸준히 감소하여 116,914톤이 생산되었다 (국립농산물품질관리원 농업통계 정보). 이렇게 재배면적과 생산량이 줄어든 원인은 전년도 고추 생산량 증가에 따른 가격 하락과 노동력 부족 등으로 재배면적 감소 그리고 장마기에 역병의 피해가 늘어났기 때문이라고 볼 수 있다.

수량 감소 원인의 하나인 고추역병은 중요한 토양병원균으로서 기주식물의 지상부위에 침입하는데 일단 발병되면 급격하게 병이 진전되어 방제가 매우 어려워 농작물 생산에 큰 손실을 초래하여 전 세계적으로도 매우 중요한 식물병이므로 역병의 방제는 농업의 성패와 밀접히 관련되어 있다.

대부분의 역병균은 기주 식물에 대해 강한 병원성을 가지고 있으며 상처 없이도 기주의 세포벽을 분해하여 침입하는 1차 침입자 (Primary invader)이다. 역병균은 병든 조직을 2차로 침입하지 않으므로 병든 식물체에서 분리된 역병균은 대부분 그 병해의 주 원인이다 (2000, 지형진 등). 이러한 역병균은 난방제성 균으로 잘 알려져 있으며, 이를 방제하기 위해 다양한 약제가 선발되어 현재 사용되고 있다. 역병 방제에 이용 되는 약제들은 mancozeb, metalaxyl, metalaxyl과 mancozeb의 조합, captafol, chlorothalonil, polyram, fentin hydroxide와 kocide, copper oxychloride와 보르도액과 같은 여러 가지 구리화합물 등이다 (1995, 고영진 등). 그러나 이러한 화학농약의 대부분이 친환경농업에서 사용할 수 없도록 규정되어 있기 때문에 현재 국내 여러 연구기관에서 역병균 방제를 위한 다양한 친환경 미생물 살균제가 활발히 연구되고 있다.

한편 딸기는 재배 역사가 다른 채소에 비해 비교적 짧아서 1368년경에 프랑스에서 2배체 야생 딸기를 포장으로 옮겨 재배한 것이 첫 재배 기록으로 알려져 있다. 현재 우리나라를 비롯하여 세계의 여러 나라에서 경제 재배되고 있는 딸기는 프라가리아 버지니아나와 프라가리아 칠로엔시스의 교잡으로 이루어진 것이다. 우리나라에서는 정확한 기록은 없으나, 20세기 초에 일본으로부터 전해진 것으로 추정되고 있다.

딸기는 외관이 아름답고, 향기가 뛰어나며, 적당한 산미와 감미가 조화되어

있어 사람의 입맛을 상쾌하게 해주는 기능이 있다. 산미는 주로 능금산, 구연산, 주석산에 의해 지배되며, 신경통이나 류머티즘에 효과가 있다고 알려진 메탈살리실산염도 함유되어 있다. 딸기의 영양소로서 가장 주목되는 것은 비타민 C이며, 100g 중 약 80mg이 함유되어 있다. 어른이 하루 필요로 하는 비타민 C의 양은 50mg 정도이므로 딸기 과실 5~6개 정도면 충분하다 (나우현, 2001).

우리나라 2006년도 딸기의 생산량은 약 203,000 여 톤 정도에 달하고 있으며, 대부분이 시설에서 재배가 되고 있고, 약 5,000여 톤이 노지에서 재배되고 있으며, 재배 면적은 2002년 7,816ha에서 2005년 6,969ha로 약간 줄어든 추세이다 (국립농산물품질관리원 농업통계 정보).

딸기 재배가 노지보다는 시설에서 주로 이루어짐에 따라 다양한 병충해가 발생되고 있다. 주로 문제가 되는 병은 잣빛곰팡이병, 탄저병, 뿌리썩음병, 역병, 흰가루병 등이 있으며, 연작과 연중 재배로 인해 시설에서 많이 발생한다. 그 중에 흰가루병은 가장 흔하고 눈에 잘 띄며, 쉽게 확인할 수 있는 병이다. 시설을 이용하여 축성 또는 반축성 재배를 할 때 특히 발생이 많다. 병원균은 자낭균류에 속하는 곰팡이로 큰 피해를 주는 경우가 있으며 주로 잎에 발생하나 과실, 엽병, 과경, 꽃받침에도 발생하는데 병이 심하면 잎이 안쪽으로 말리고 잎 표면은 흰가루로 덮이게 된다. 발병적온은 20℃ 전후의 온도와 60% 이상의 다습상태에서 잘 발생하지만 건조한 상태에서도 발생한다. 특히 고랭지 육묘에서는 산지의 기상 조건이 발병에 적합한 상태이므로 발병에 주의해야 한다. 피복재배에도 널리 발생되며 해에 따라서는 가장 피해가 큰 병해가 되고 병이 발생되면 빛깔이 나빠지며 전혀 상품가치가 없어진다 (나우현, 2001).

과거에는 sulfur, dinocap, benomyl과 기타 살균제를 사용하여 방제해왔다. 근래에 들어 triforine, fenarimol, tradimefon, dodemorph와 etsconazole 등 새롭고 더 효과적인 침투성 살균제가 과거 사용되어 왔던 살균제와 교체되었다 (고영진 등, 1995). 그러나 이와 같은 화학농약은 친환경 농업 특히 무농약 재배와 유기재배에는 사용할 수 없는 약제이기 때문에 친환경농업 실천 농가에서 흰가루병 방제에 많은 어려움을 겪고 있다.

이와 같은 이유로 현재 다수의 국공립 연구기관과 농자재 업체에서 생물적 방제에 대한 관심이 높아져 있으며, 특히 중복지생체를 이용한 흰가루병 방제와 길항미생물을 이용한 생물적 방제제 연구가 진행되고 있다. 이에 대한 연구로 *Ampelomyces quissqualis*, *Cladosporium oxysporum*, *Tilletiopsis* sp.와

Verticillium lecanii 등 몇 가지 진균들과 곤충 *Thrips tabacisms* 장미 흰가루병과 몇 가지 작물의 흰가루병에 기생하거나 길항한다고 보고 되었다 (고영진 등, 1995). 특히 *Ampelomyces quisqualis*는 기주범위 조사에서 오이, 멜론, 수박, 참외, 박, 딸기, 토마토, 가지, 장미, 등 12종의 작물을 침해하는 흰가루병균 *Sphaerotheca* 속 1종에 대하여 기생성이 있어 기주 특이성이 없는 것으로 보고한 바 있다(이상엽 등, 2005)

본 연구에서는 위와같은 고추역병과 딸기흰가루병 방제를 위한 환경 친화적 방제제 개발을 위해 보유중인 *Streptomyces* sp. AG-P 균주와 *Bacillus subtilis* JKK238 균주에 대한 연구를 진행하였다. *Streptomyces* sp. AG-P 균주는 난균류 (Oomycetes)에 대해 기내에서 그 역가를 검정한 결과 고추역병, 벼 입고병 등 식물 병원성균에 대해 선택적인 항곰팡이 활성을 나타낼 뿐만 아니라 *in vivo* 상에서 95% 이상의 강력한 방제효과를 확인한 바 있다. 한편 *Bacillus subtilis* JKK238 균주 (국유 특허, 농촌진흥청, 특허번호 2000-0047903, 한국전통 젓갈 유래 항균 펩타이드 생산 미생물 균주)는 딸기 흰가루 병원균 포자를 변형시켜 2차 전염원으로 작용하는 것을 차단하는 효과가 있음을 확인하였다.

따라서 본 연구에서는 고추 역병 방제용 미생물제제와 딸기흰가루병 방제용 미생물제제를 개발하기 위하여 효과검정을 위한 스크리닝, 항균활성을 높이기 위한 배양 조건, 미생물농약의 실용화를 위한 제제화 기술 확립, 길항미생물의 대량배양 기술 확립과 두 미생물 원제의 안전성 평가, 미생물 제품의 약효·약해 포장시험, 미생물제품 활용다각화 연구, 바실러스 서브틸러스 제품의 안전성 평가 등을 통해 미생물농약으로 실용화 및 인축 및 환경생태에 미치는 영향을 조사하고, 이를 미생물농약 품목등록 자료로 활용하고자 한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 국내 기술현황과 문제점

국내의 농업용 미생물 살균제는 2000년도를 기점으로 2006년도 3월까지 총 11종이 미생물농약으로 등록 시판되고 있다. 현재 미생물 살균제에 대한 제제화 기술은 외국에 비해 낮은 편이었지만, 그 동안 각 대학과 연구소 및 농자재 회사에서 활성 균주의 분리, 생태 및 배양조건, *in vitro*상에서의 활성 검정 등을 통해 실제 대량생산이나 제제화 등에 의한 산업화가 이루어지고 있다. 초기에는 농촌진흥청의 농업과학기술원과 대학교를 중심으로 연구가 진행되었으나, 최근에는 (주)경기이노베이티브바이오컨트롤, 그린바이오텍(주), (주)홍살림 등 여러 벤처기업과 동부한농화학(주), (주)경농 등 기존의 합성화학농약 회사들도 이 분야 연구와 실용화에 참여하고 있으며 한국생명공학연구원과 한국화학연구원, 농촌진흥청 등의 연구기관에서도 다양한 항균성미생물 실용화에 많은 노력을 기울이고 있다. 국내에서 미생물에 의한 각종 병 방제 연구사례를 보면 비병원성 세균 및 곰팡이를 이용한 세균성 시들음병 및 고추역병, 길항 미생물을 이용한 오이 및 딸기의 *Fusarium* 시들음병, 사탕무우의 모잘록병 등의 방제에서 보고된 바 있으며, *Trichoderma harzianum*과 *Enterobacter allomerans*를 고추묘에 처리한 후 병방제 효과가 있음을 보고한 바 있다. 미생물을 이용하여 식물병을 방제할 때 생물제제 활성의 지속성 및 효율성을 극대화할 수 있는 제제기술 개발이 필수적이나 제제화 기술 및 제품 보존 기술 등은 선진국대비 40-50% 수준에 머물러 있다. 한편, 국내 몇 연구기관에서 미생물제제를 개발하여 항진균제로 사용한 바 있으나 자낭균류인 *Leveillula taurica*속 균의 방제에는 마이탄, 비타놀, 펜부코나졸, 샤프롤, 웨나리, 피라조 등의 유기 합성농약이 주로 사용되고 있다. 흰가루병 방제를 위해 사용되는 합성화학농약의 과다 사용은 환경생태계에 악영향을 미치고, 저항성 균주의 출현을 조장하여 기존 살균제의 효과를 떨어뜨리고 있으며, 그에 따라 병 방제가 더욱 어려워지고 있다.

흰가루병은 오래전부터 알려진 병으로 세계적으로 가장 널리 퍼져있으며 특히 온실에서 가장 중요한 병으로 알려져 있다. 흰가루병균 (*Leveillula taurica* Arnaud)은 진균계의 자낭균문에 속하는 순환물기생균으로 주로 식물의 잎과 어린가지에 병징을 나타내어 잎이 뒤틀리거나 떨어져서 식물을 죽게 한다. 흰가루

병은 주로 시설재배지에서 많이 발생하는데 그 이유는 시설재배환경이 흰가루병균이 발생하기 알맞은 환경조건을 유지 하고 있기 때문이며 병 발생시 자기 농장뿐만 아니라 이웃의 다른 농가에 전파가 잘 되기 때문에 시설재배지 및 일반 농작물 재배시 우리 농가에 큰 손실을 초래하는 중요한 식물병이므로 흰가루병의 방제는 농업의 성패와 밀접히 관련되어 있다.

항균 펩타이드를 생성하고 식물 병원균에 대하여 방제 활성을 갖는 *B. subtilis* JKK238 균주는 항균활성을 검정한 결과 벼도열병균 (*Pyricularia oryzae*), 포도 및 딸기 잿빛곰팡이균 (*Botrytis cinera*), 고추와 가지의 탄저병균 (*Collectotrichum cocodes*), 감자와 담배의 역병균 (*Phytophthora crytozea*) 및 무의 잘록병균(*Rhizoctonia solani*)에 대하여 뛰어난 항곰팡이 활성을 나타내었고, 포트 및 포장 수준에서 흰가루병에 대한 약효가 나타남에 따라 미생물 살균제로써의 가능성이 충분하다.

한편 한국생명공학연구원 김창진 박사가 분리 선발한 *Streptomyces* sp. AG-P 균주 [특허출원, 2000-79923, 신균주 스트렙토마이세스 속 AG-P 및 이를 이용한 식물병 방제제]는 난균류 식물병원균에 대해 *in vivo* 및 *in vitro*에서 특이적으로 강한 항균활성을 나타내어 새로운 미생물 농약으로 그 활용가능성이 매우 높은 것으로 나타났고, 이를 활용하기 위한 기술실시계약을 체결하여 산업화 연구를 진행하고 있다.

2. 국외 기술현황과 문제점

생물학적 방제는 1920년대 말 미국에서 감자 더덩이병 방제에 방선균을 이용한 것이 최초이며 지금까지 16종이 개발되었으며, 길항 미생물로서는 주로 세균과 곰팡이가 사용되고 있다. 현재 미생물 대사산물을 이용한 농용 항생물질로는 20여종이 알려져 있으며, 그 중 살균제로서는 6종이 실용화되었는데, 1958년 도열병 방제용 항생물질로 개발된 Blasticidin S를 선두로 kasugamycin, polyoxin, validamycin 등이 살균제로 사용되고 있다. 병 방제용 생물농약 중 세균 제제로서 가장 획기적으로 성공한 예는 뿌리혹 세균병(Crown gall)에 길항미생물인 *Agrobacterium radiobacter* 84 및 K1026 균주를 이용한 Galltrol, Dygall, Nogall, Bakuterozu 등이며 그 후 *Pseudomonas* spp.를 이용한 사탕무우, 모잘록병 방제제의 개발 등에 많은 연구가 이루어져 왔다. 곰팡이 미생물제제로서는 주로

Gliocladium 및 *Trichoderma*속 균 등이 토양전염성 식물병 방제용 종자처리제 및 post-harvest, 야채 등의 부패방지용 제제로 자주 사용되는 등 진균류가 현재 25개 이상이 등록, 시판되고 있다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 딸기 흰가루병 방제 미생물 선발을 위한 스크리닝

1. 다양한 길항균을 이용한 딸기흰가루병 방제용 미생물 선발

소규모 포장에서 다양한 종류의 식물병원균에 대해 길항력이 있는 미생물을 이용하여 딸기흰가루병 방제에 효율이 높은 균주를 선발하였다. 약제 살포는 총 6처리 3반복으로 하여 7일 간격 4회 살포하였으며, 약제별 처리농도는 대조약제와 Control을 제외하고 100배 희석액으로 하였다. 약제 살포 시기는 열매에 흰가루병이 발생하는 시기인 3월로 하였으며, 포장 관리는 일반 관행으로 하였다. 실험결과 표 1에서 보는 바와 같이 *B. subtilis* H-1과 *B. subtilis* JKK238 배양액은 control과 5% 수준에서 유의한 차이를 나타냈다. 특히 *B. subtilis* JKK238 배양액의 경우 그림 1과 같이 딸기 표면의 흰가루병 포자와 균사는 심하게 변형시켜 딸기 흰가루병원균의 증식을 억제하였으며, 74.1%의 방제가를 나타냈다. 또한 대조약제 대비 78% 이상의 방제가를 나타냄으로써 딸기흰가루병 방제용 미생물 제제로써 가능성이 높은 것으로 나타났다. 그 외 미생물들의 경우 방제효과가 낮아 실효성이 없는 것으로 조사되었다.

표 1. 다양한 미생물을 이용한 딸기흰가루병 방제 효과검정

처리	이병주율 (%)			평균 (%)	방제가 (%)
	I	II	III		
<i>B. subtilis</i> H-1	21.3	18.7	25.4	21.8bc ^z	44.8
<i>B. subtilis</i> JKK238	12.8	8.8	9.2	10.2cd	74.1
<i>Streptomyces</i> sp. AG-P	23.1	23.7	36.2	27.6ab	30.1
<i>Trichoderma</i> sp.	42.5	27.8	26.8	32.4ab	18.1
Chemical	1.5	2.1	2.7	2.1d	94.7
Control	39.8	47.6	31.2	39.5a	-

^zMean separation within columns Duncan's multiple test, 5% level

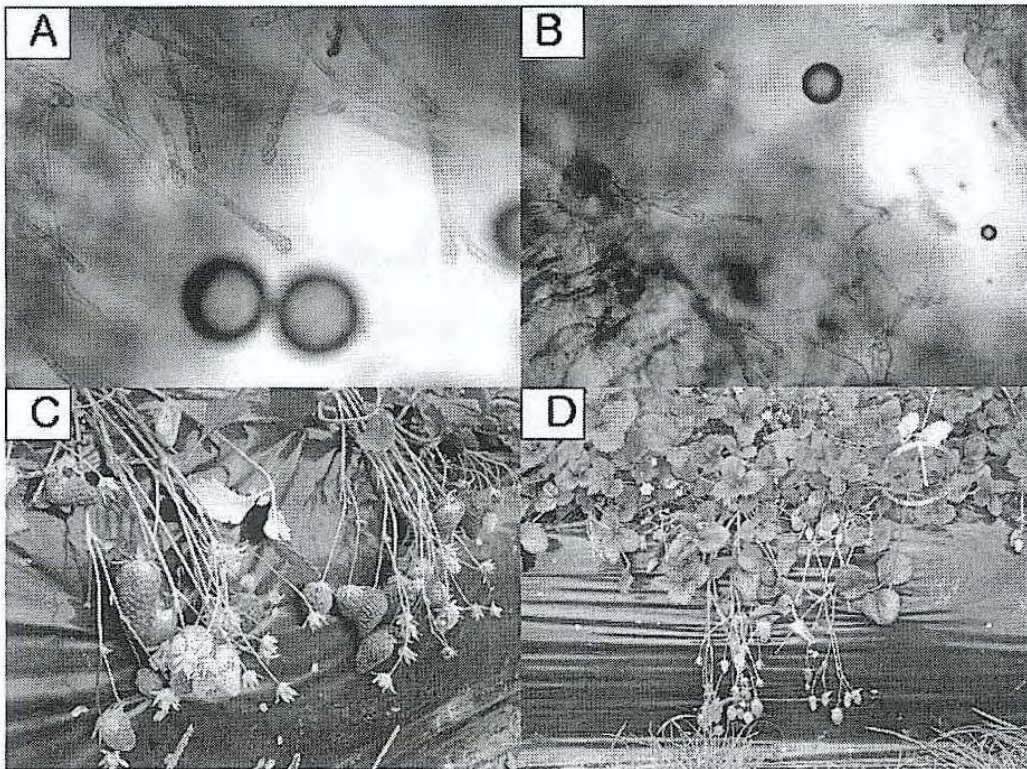


그림 1. 딸기흰가루병에 대한 *B. subtilis* JKK238 배양액 처리 효과

- A: 배양액 처리 전 병원균 포자
- B: 배양액 처리 후 변형된 병원균 포자
- C: 배양액 처리구
- D: 배양액 무처리구

2. 여러 가지 식물병에 대한 *B. subtilis* JKK238 배양액의 항균활성 검정

B. subtilis JKK238 배양액을 이용하여 Growth chamber에서 4 종의 식물병 (벼도열병, 고추탄저병, 딸기잿빛곰팡이병, 딸기흰가루병)에 대하여 항균 활성 검정을 실시하였다. 활성검정을 위해 배양액을 10~200배로 희석한 후 병원균 접종 1일전에 열매(딸기, 고추) 표면에 분무 살포하여 상온에서 24시간 동안 건조시켰다. 실험에 사용한 벼는 지름 45 cm의 플라스틱 포트에 수도용 상토를 70% 정도 채운 후, 묘를 이식하여 25±5°C의 온실에서 3주간 재배하였다. 벼 도열병은 3~4엽기의 유묘에 도열병의 원인균인 *Magnaporthe grisea*의 포자 현탁액 (5×10^5 포자/ml)을 분무 접종하고, 25°C의 습실상에서 하루 동안 습실처리한 후, 25°C의 항온실에서 5일간 배양하여 발병을 유도하였다. 딸기흰가루병과 잿빛곰팡이병, 고추탄저병은 상처가 없는 신선한 열매에 병원균인

Botrytis cinerea, *Sphaerotheca phanis*, *Glomerella cingulata*(10^5 cfu/ml) 포자현탁액을 각각 분무 접종한 후 딸기흰가루병 접종구는 25°C, 딸기잣빛곰팡이 처리구는 20°C, 고추탄저병 처리구는 28°C 습실상에서 2일간 습실 처리하고, 25°C의 항온 항습실에서 발병을 유도하였다. 벼 도열병과 딸기흰가루병, 고추탄저병은 접종 7일 후, 딸기잣빛곰팡이병은 5일 후에 이병과율을 조사하였다. 그 결과 표2에서 보는 바와 같이 *B. subtilis* JKK238 배양액은 벼도열병과 딸기흰가루병에 대해 우수한 항균활성을 나타냈다. 특히 딸기흰가루병에 대해서는 모든 농도에서 60% 이상의 방제 효과를 나타내어 방제제 개발의 가능성을 충분히 나타냈으며, 벼도열병에 대해서도 56~73%의 방제 효과를 나타냄으로써 *B. subtilis* JKK238은 두 가지 이상의 식물병에 우수한 미생물임을 확인하였다.

표 2. *B. subtilis* JKK238 배양액의 주요 식물병원균에 대한 방제 효과 검정 (*in vivo*).

희석배수	식물 병원균			
	M·G ^a	G·C ^b	B·C ^c	S·P ^d
10	73.9	35.7	47.8	87.5
50	56.4	7.1	17.4	66.7
100	60.8	0	13	75
200	43.4	21.4	0	62.5

a: *Magnaporthe grisea*, b: *Glomerella cingulata*, c: *Botrytis cinerea*, d: *Sphaerotheca phanis*

3. 소포장 수준에서의 흰가루병에 대한 방제 효과 검정

기내 실험 결과를 바탕으로 딸기 하우스 재배 포장에서 소규모 실험을 수행하였다. 처리구는 기준량, 반량, 배량 즉, *B. subtilis* JKK238 배양액 50배, 100배, 200배 희석 처리구로 구분하였으며, 무처리 (물) 포함 4처리 3반복으로 실험을 수행하였다. 처리 당 딸기 모 수는 15 주로 하였으며, 결과는 성숙한 열매를 대상으로 조사하였으며, 최종 약제 처리 5일 후 결과를 조사하였다. 시험 결과 표 3에서 보는 바와 같이 50배, 100배 처리구에서 방제가가 67.5, 60%로 기내 시험 결과에 비하여 낮은 방제효과를 나타냈으나, 무처리구와 5% 수준에서 유의한 차이를 보였다. 기내 실험에 비하여 방제가가 낮은 이유는 포장에서의 전염원의 밀도와 온/습도 등 환경 조절의 어려움으로 인해 차이가 발생한 것으로 사료된다.

표 3. *B. subtilis* JKK238 배양액의 희석 농도별 방제효과

희석배수	이병주율 (%)				유의차	방제가 (%)
	I	II	III	Aver.		
50	8.7	10.8	11.8	10.4	a	67.5
100	11.5	14.7	12.2	12.8	a	60
200	17.6	18.8	15.2	17.2	a	46.3
water control	29.7	31.3	35.3	32	b	-

제 2 절 보유 균주 *Bacillus subtilis* JKK238의 분류학적 위치와 특성

Bacillus 속의 대부분은 오랜 세월동안 식품 및 각종 발효산업에서 널리 이용되어진 세균으로써 산업적으로 중요한 균주이다 (Arbige *et al.* 1993). *Bacillus* 속에는 다양한 종이 있고, 이중 대부분이 비 병원성이며 비교적 배양이 간단하고 단백질이나 대사산물을 잘 분비하기 때문에 발효에 의한 물질 생산에 적합한 균주로 사용되어 왔다. 오늘날 상업적으로 사용되는 *Bacillus* 발효산물로는 각종 효소, 향생물질, 살충제, 식품 풍미개선제용인 nucleotide와 nucleosides, 그리고 아미노산 등이 있다 (Katz and Demain, 1977).

Bacillus 속이 생산하는 항진균 물질 (subtilin, surfactin, rhizocticins, alboleutin, bacillomycin, bacilysin, botycin, fengycin, iturin, mycosubtilin)은 종에 따라 다양하나 특히 *B. subtilis*가 생산하는 것이 가장 많이 보고되고 있으며 이들이 거의 대부분 peptide antibiotics라고 알려져 있다 (Zuber *et al.* 1993). 또한 생물 분해성이 있는 계면 활성제인 cyclic lipopeptide 화합물을 생성한다 (Kleinkauf and Dohren, 1984).

B. subtilis JKK238 균주는 식물 병원균에 대하여 방제 활성을 갖는 항균 펩타이드를 생산하는 미생물로 한국 전통 젓갈류로부터 분리되었다. *B. subtilis* JKK238로부터 생성되는 항균 펩타이드는 100℃에서 30분간 처리하여도 그 항균

활성의 감소가 적은 내열성을 가지며, 프로테이나제 K로 처리되어도 항균활성을 잃지 않으며, 벼도열병균 (*Pyricularia oryzae*), 포도 및 딸기 잿빛 곰팡이병균 (*Botrytis cinera*), 과채류의 저장병균 (*Penicillium* sp.), 토마토의 시들음병균 (*Fusarium oxysporum*), 고추와 가지의 탄저병균(*Collectotrichum cocodes*), 감자와 담배의 역병균(*Phytophthora crytogea*) 및 무의 갈록병균(*Rhizoctonia solani*)로 이루어진 7종의 공시 병원성 곰팡이 모두에 항진균 활성을 보인 것으로 보고했다.

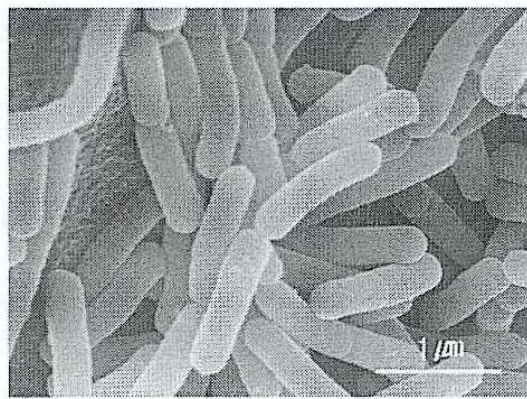


그림 2. *Bacillus subtilis* JKK238의 주사전자현미경 사진

제 3 절 *Bacillus subtilis* JKK238 배양 기술 확립

1. 영양조건에 따른 배양 최적화

가. 탄소원에 따른 배양적 특성과 항진균 활성

항균물질생산을 위한 최적 배지의 선택은 바실러스를 대량 배양하기 위해 사용하는 GMYS (glucose 1.0%, molasses 1.0%, yeast extract 1.0%, soy bean meal 0.5%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1%, K_2HPO_4 0.1%) 배지 조성을 기본으로 하여 일부 성분 및 첨가량을 가감하여 실험하였다. 탄소원 선발을 위하여 배지조성 성분 가운데 일부 성분(yeast extract 1.0%, soy bean meal 0.5%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1%, K_2HPO_4 0.1%)을 고정시키고, 당밀 (molasses)과 glucose를 탄소원으로 하여 각

각 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 %씩 각각 첨가하여 30℃, 48시간 동안 rotary shaker (100 rpm)에서 균을 배양 후 원심분리 (Centrifuge, Hanil science industrial Co., Ltd., MF 550, 2,700×g, 20 min)하여 얻어진 배양 상등액을 0.2 μ m membrane filter로 무균여과하여 벼도열병균 (*Magnaporthe grisea*)의 성장 억제환의 크기에 따라 항진균 활성을 조사하여 탄소원의 종류와 농도를 결정하였다.

그 결과 탄소원의 종류와 농도에 따라 항곰팡이 효과와 균밀도에 영향을 받을 수 있었다. 당밀은 미약하게 균 밀도 증가를 보였으나 항곰팡이 효과에는 아무런 영향을 미치지 못했다. 반면, glucose는 2.0%의 농도까지는 균밀도와 성장억제환의 크기가 증가하다가 그 이상에서는 정체되는 것을 볼 수 있었으며 오히려 3.0%에서는 균밀도가 감소했다. 이러한 결과를 바탕으로 탄소원으로 glucose를 사용하는 것이 항곰팡이 효과에 좋은 영향 미치며 가격도 1kg에 약 1,000원으로 경제적인 것으로 판단되어 최적의 탄소원을 glucose로 결정하고 그 농도는 2.0%로 결정하였다 (그림 3).

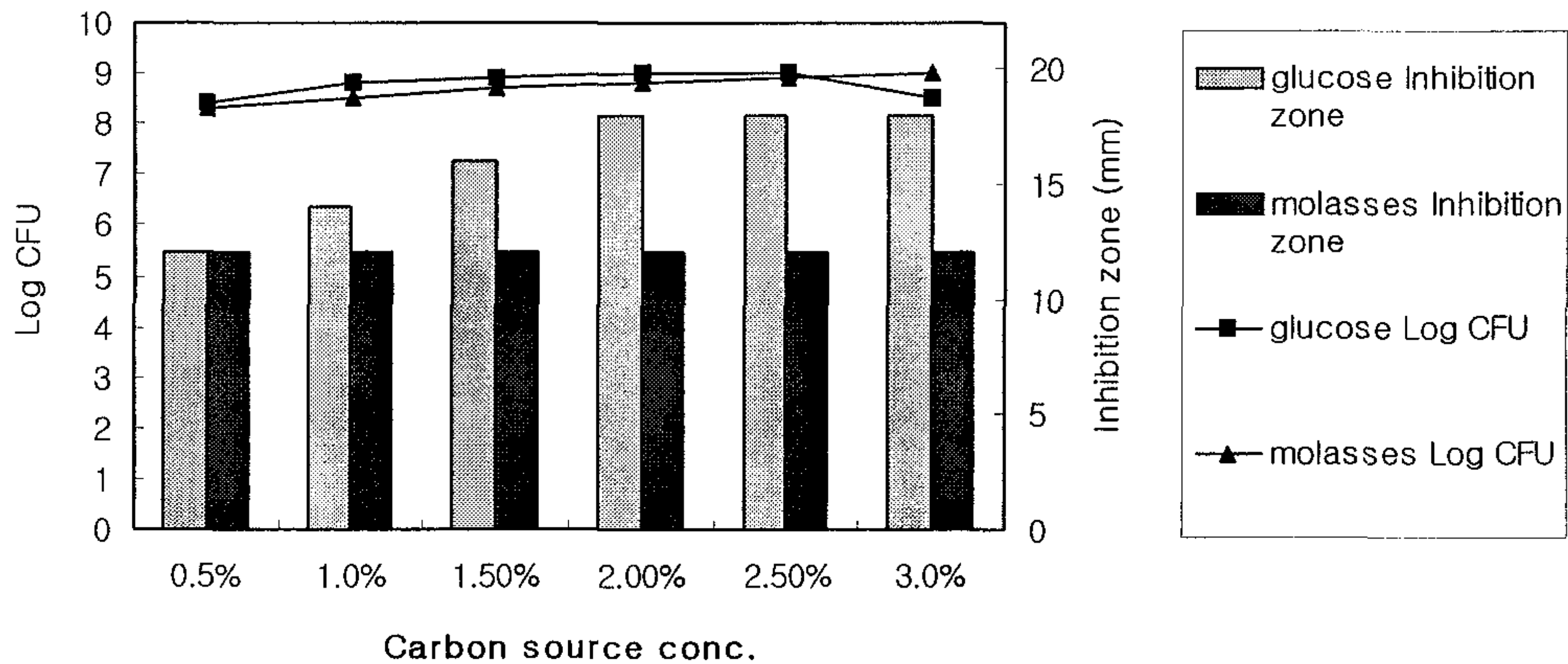
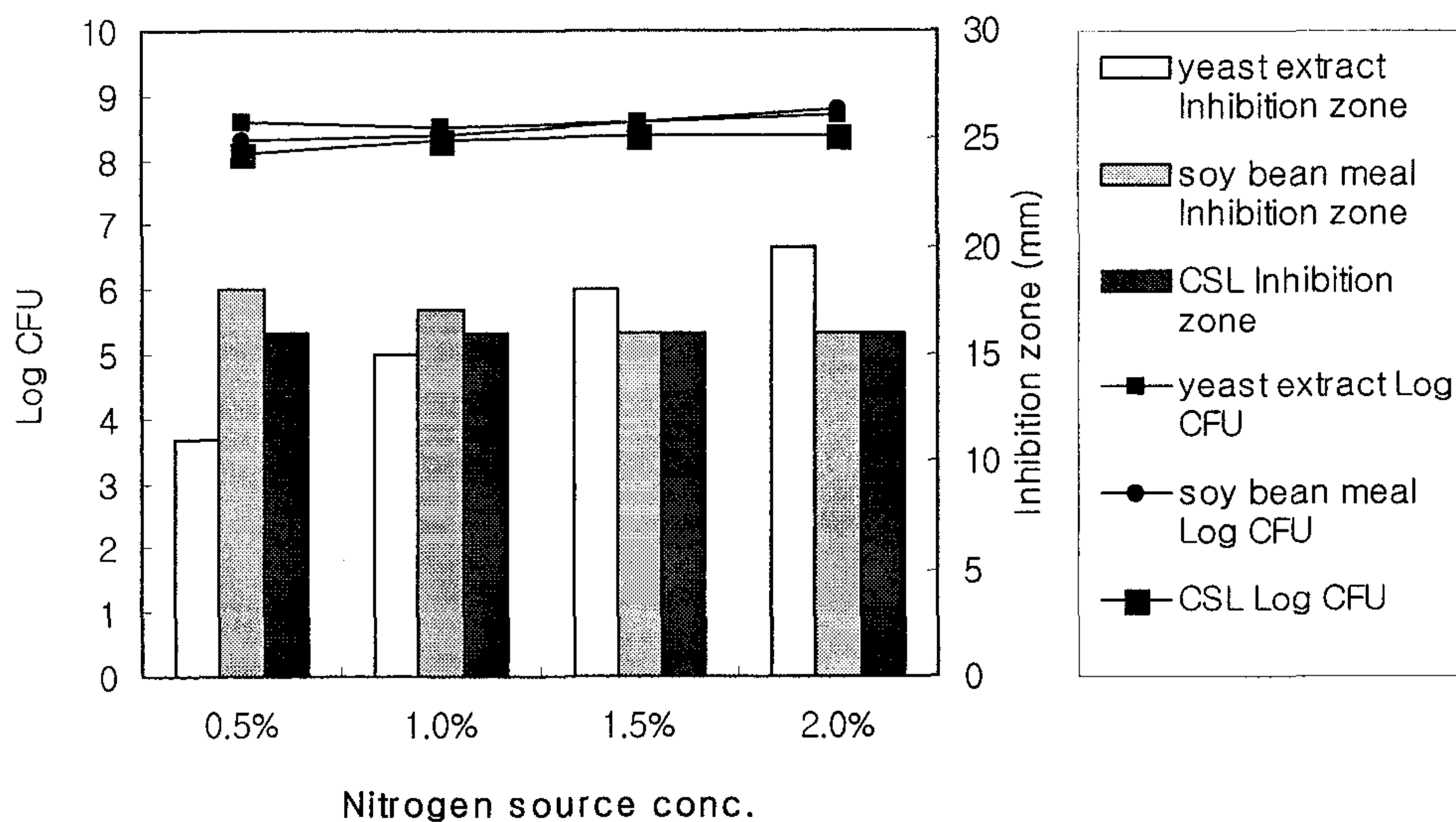


그림 3. 탄소원의 종류에 따른 균밀도와 벼도열병균 (*Magnaporthe grisea*)에 대한 성장억제환 크기

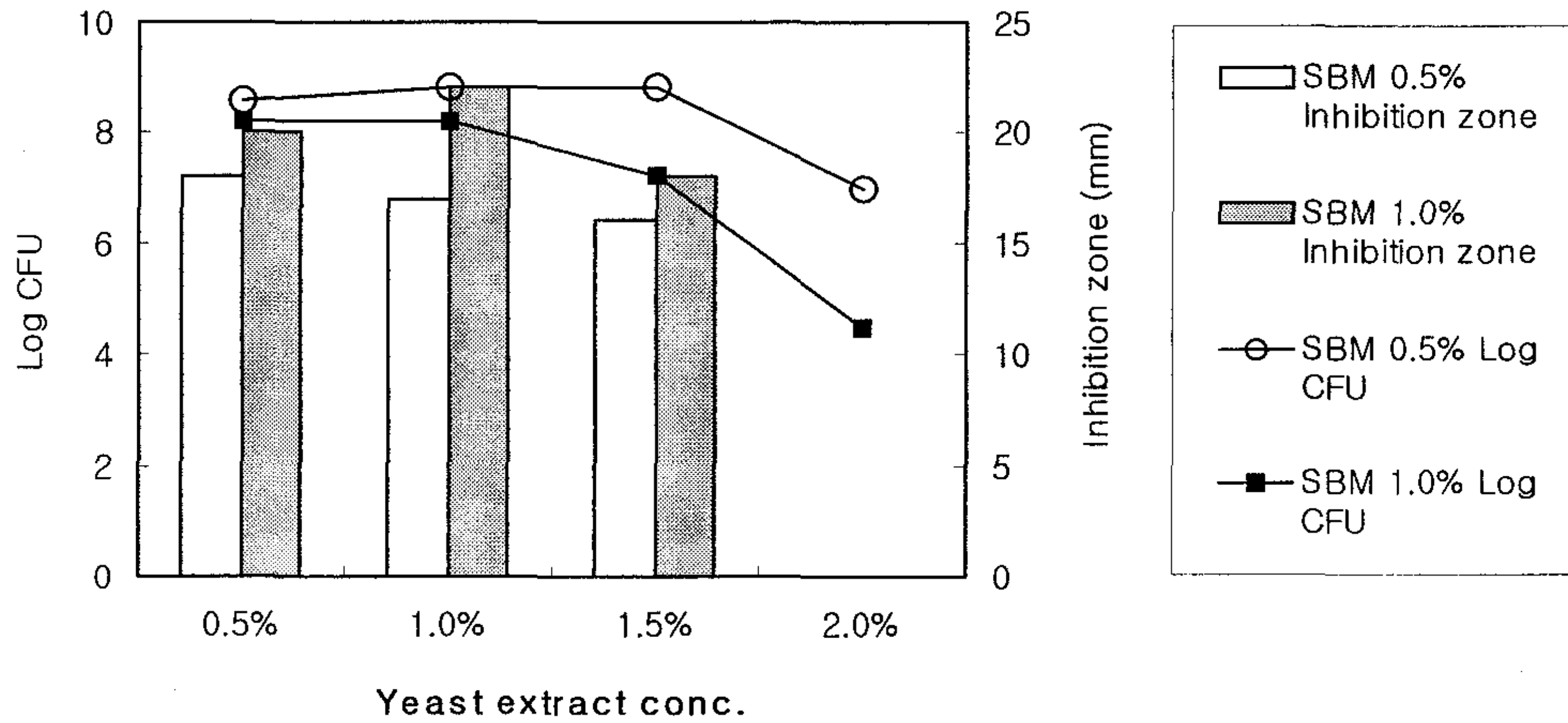
나. 질소원에 따른 배양적 특성과 항진균 활성

기본 배지 조성에서 질소원으로 yeast extract, CSL, soy bean meal 을 농도를 달리하여 균밀도와 벼도열병균주에 대한 성장 억제환을 살펴본 바, 질소원의 배

양조건에 따른 균밀도는 탄소원의 경우와 마찬가지로 종류에 큰 영향을 받지 않았다. 그러나 벼도열병 균주에 대한 항곰팡이 효과에는 큰 차이를 보였다. yeast extract는 그 양이 증가함에 따라서 항곰팡이 활성이 점점 증가함을 알 수 있었으며, soy bean meal 또한 농도가 증가함에 따라 균밀도를 증가시켰으며 0.5%와 1.0%에서는 yeast extract보다 높은 항곰팡이 활성이 나타나는 결과를 얻었다 (그림 4, 가). CSL은 균밀도와 항곰팡이 활성에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 따라서 균밀도와 항곰팡이 활성에 좋은 영향을 미치는 것으로 측정된 yeast extract 와 soy bean meal을 조합하여 균밀도와 항곰팡이 활성을 측정한 결과 yeast extract 1.0%, soy bean meal 1.0%를 함께 첨가하였을 때 항곰팡이 효과가 가장 우수했다 (그림 4, 나). 그리고 1.0%이상이 증가하면 오히려 항곰팡이 효과와 균밀도가 감소하는 것으로 측정되었다. 따라서 이와 같은 실험 결과를 바탕으로 항곰팡이 활성을 증가시키기 위해서는 질소원으로 soy bean meal 1.0%, yeast extract 1.0%를 함께 사용하는 것이 더 좋을 것으로 판단하였다.



(가)



(나)

그림 4. 질소원의 종류에 따른 균밀도와 성장억제환 크기
(YE; yeast extract, SBM; soy bean meal)

2. 공기주입량과 배양 온도에 따른 최적화

가. 공기량에 따른 배양적 특성과 항진균 활성

항진균 물질 생산을 위한 최적 공기량의 규명은 바실러스 대량 배양에 사용하는 GMYS 배지를 기본으로 조사하였다. 공기량에 따른 영향은 각각의 Jar fermenter에 배지량의 1%에 해당하는 균배양액을 접종한 후, 교반 속도를 100 rpm으로 하고, 온도를 30 °C의 조건으로 배양하면서 공기량 0.2 vvm (volume/volume/minute), 0.5 vvm, 1.0 vvm으로 각각 달리하여 12시간마다 시료를 채취하여 항진균 활성을 검토하였다.

그 결과, 공기량에 따라 0.2 vvm, 0.5 vvm, 1.0 vvm 조건 모두 균밀도와 항곰팡이 효과에서 다른 결과를 나타냈다 (그림 5). 공기량이 0.2 vvm일 경우에는 시간이 지남에 따라 균의 밀도가 오히려 감소했으며 벵도열병균에 대한 성장 억제환이 전혀 관찰되지 않았고, 공기량 0.5 vvm과 1.0 vvm에서는 균의 성장상태는 거의 비슷한 양상으로 정상 증가했으나 항곰팡이 활성을 측정된 결과 1.0 vvm의 조건에서 벵도열병 성장억제환이 배양시간에 따라 점점 증가되는 것을 알 수 있

었다. 그러나 균밀도는 더 이상 증가되지 않고 조금씩 감소됨을 관찰했다. 따라서 공기량에 의해 항곰팡이 활성 물질 생산이 상당히 영향을 받고 있는 것으로 판단했으며, 보다 빠른 시간 내에 항곰팡이 활성 물질을 생산할 수 있는 공기주입량인 1 vvm을 최적 공기주입량으로 결정하였다.

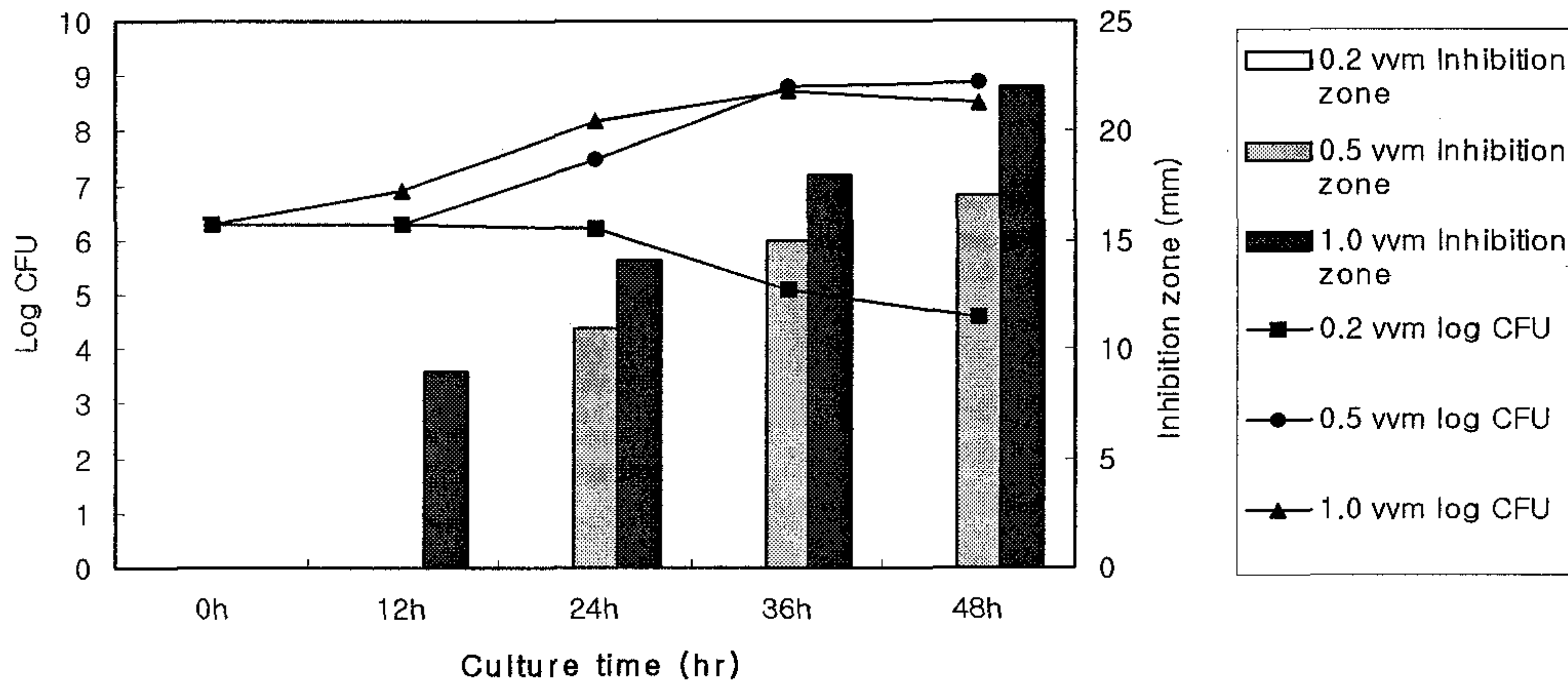


그림 5. 공기량에 따른 *B. subtilis* JKK238균주의 성장과 항곰팡이 효과

나. 배양 온도에 따른 균밀도와 항균활성

배양온도에 따른 배양적 특성은 각기 다른 온도로 설정된 Jar fermenter에 배지양의 1%에 해당하는 균배양액을 접종한 후, 100 rpm, 1 vvm의 조건으로 배양하면서 30, 33, 37 °C에서 12시간마다 시료를 채취하여 각각의 균밀도와 항진균 활성을 조사하여 검토했다.

그 결과 균성장양상과 항곰팡이 효과는 배양온도에 따라 큰 영향을 받음을 알 수 있었다. 적정 배양온도인 30°C에서 20여시간 후부터 대수성장기에 접어들었으며 항곰팡이 활성이 측정되었다. 33°C과 37°C에서는 균의 성장이 거의 이루어지지 않음을 관찰했으며 항곰팡이 활성 또한 미약하게 나타났다 (표 4, 그림 6). 따라서 대량배양을 위한 온도 조건은 30°C로 최종 결정하였다.

3. 대량배양 실험

위 실험을 통해서 선택된 배지 (탄소원, 질소원), 공기량, 배양온도 등을 종합하여 최적 배양 조건을 선정하였다. 대량배양을 위한 배지 조성은 glucose 2.0%, yeast

extract 1.0%, soy bean meal 1.0%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1%, K_2HPO_4 0.1%으로 결정했고 NGYS배지라 명하였다. 또한 배양조건은 위의 결과에 따라 배양온도 30℃, 공기량 1 vvm으로 배양하였다. 그 결과 3.5톤 대량 배양은 성공적으로 이루어졌으며, 균밀도는 6.2×10^8 CFU/ml 로 나타났다 (표 5). 배양과정 중 항곰팡이 효과는 배양 48시간이 가장 좋게 측정되었다 (그림 7). 또한 대량배양 후 벼도열병에 대한 항곰팡이 효과는 22 mm로 기존 배양조건 (16 mm)에서 배양된 경우보다 더 높은 성장억제환을 나타내었다 (표 5). 이러한 전체적인 기존 배양조건과 실험을 통해 변경된 배양조건의 변경 내용 및 항곰팡이 효과를 아래 표 4에 최종 정리하였다.

표 4. 온도에 따른 *B. subtilis* JKK238 균주의 균밀도와 항곰팡이 효과

30 ℃			33 ℃			37 ℃		
시간	균밀도	억제환 (mm)	시간	균밀도	억제환 (mm)	시간	균밀도	억제환 (mm)
5h	4.7×10^7	0	10h	10^4 이하	0	5h	7.0×10^6	0
20h	1.4×10^6	13	25h	1.0×10^5	14	20h	10^4 이하	0
30h	2.7×10^8	16	34h	1.3×10^6	15	30h	10^4 이하	0
50h	1.2×10^9	21	50h	4.4×10^7	14	50h	7.2×10^7	0

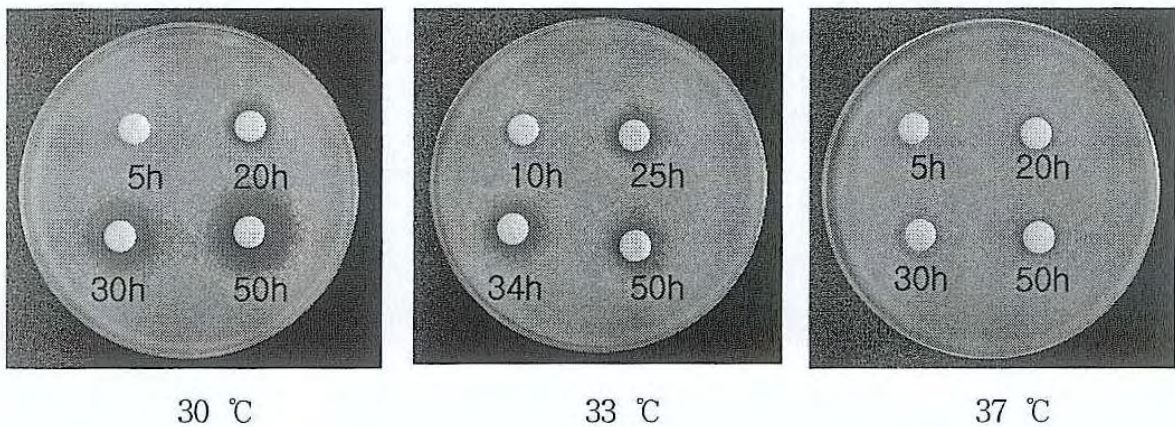


그림 6. 온도에 따른 *B. subtilis* JKK238 균주의 벼도열병균 (*Magnaporthe grisea*)에 대한 성장억제환

표 5. 기존 배양조건과 실험을 통해 변경된 배양조건의 비교

구분	기존배지	선발배지
균밀도 (CFU/ml)	4.0×10^8	6.2×10^8
배양온도	30 °C	30 °C
항곰팡이효과 (clear zone, mm)	16	22
배지조성	glucose 1.0% molasses 1.0% yeast extract 1.0% soy bean meal 0.5% MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.1% K ₂ HPO ₄ 0.1%	glucose 2.0%, yeast extract 1.0% soy bean meal 1.0% MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.1% K ₂ HPO ₄ 0.1%

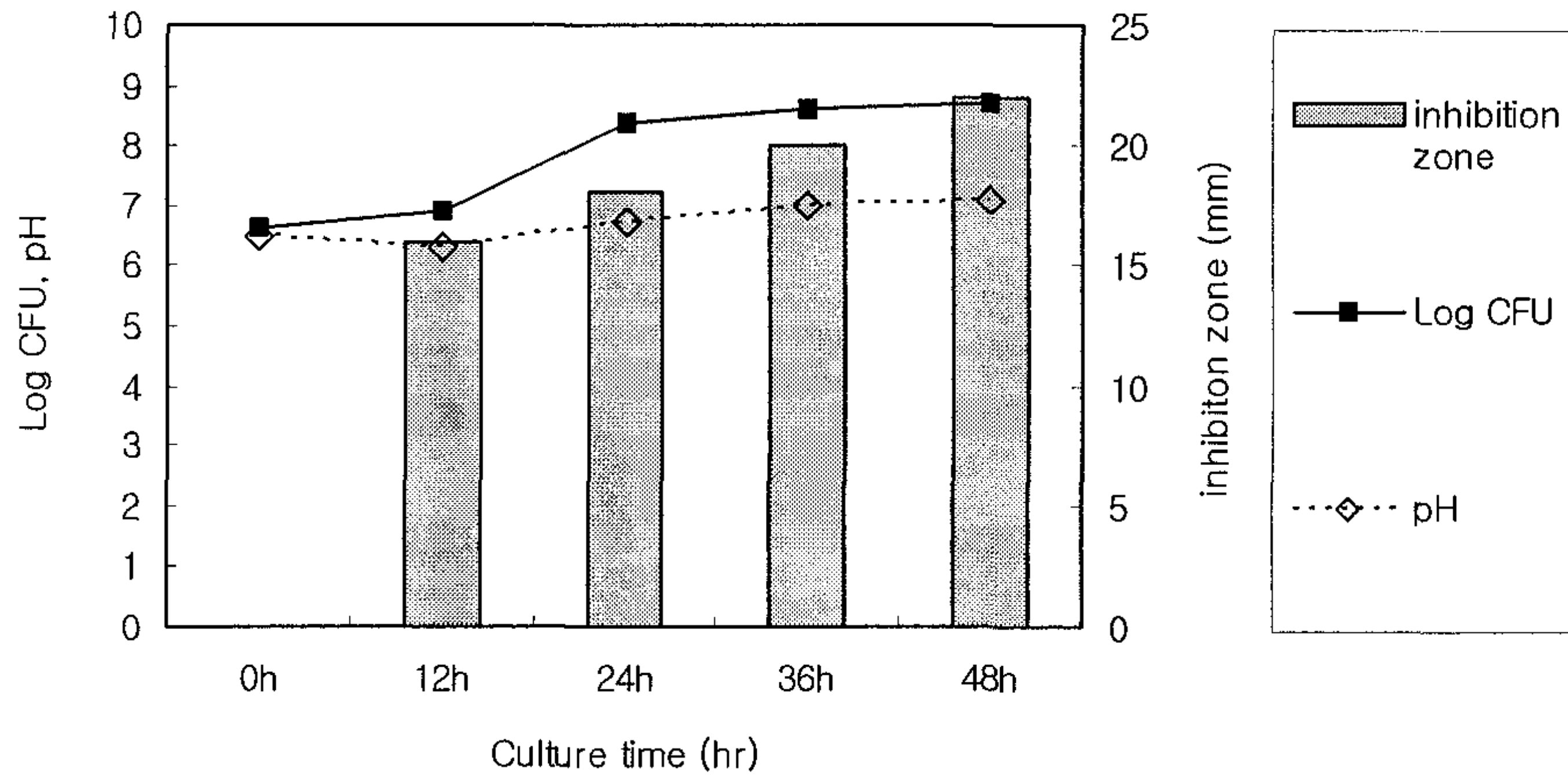


그림 7. 결정된 조건에 의한 3톤 대량 배양 최적화

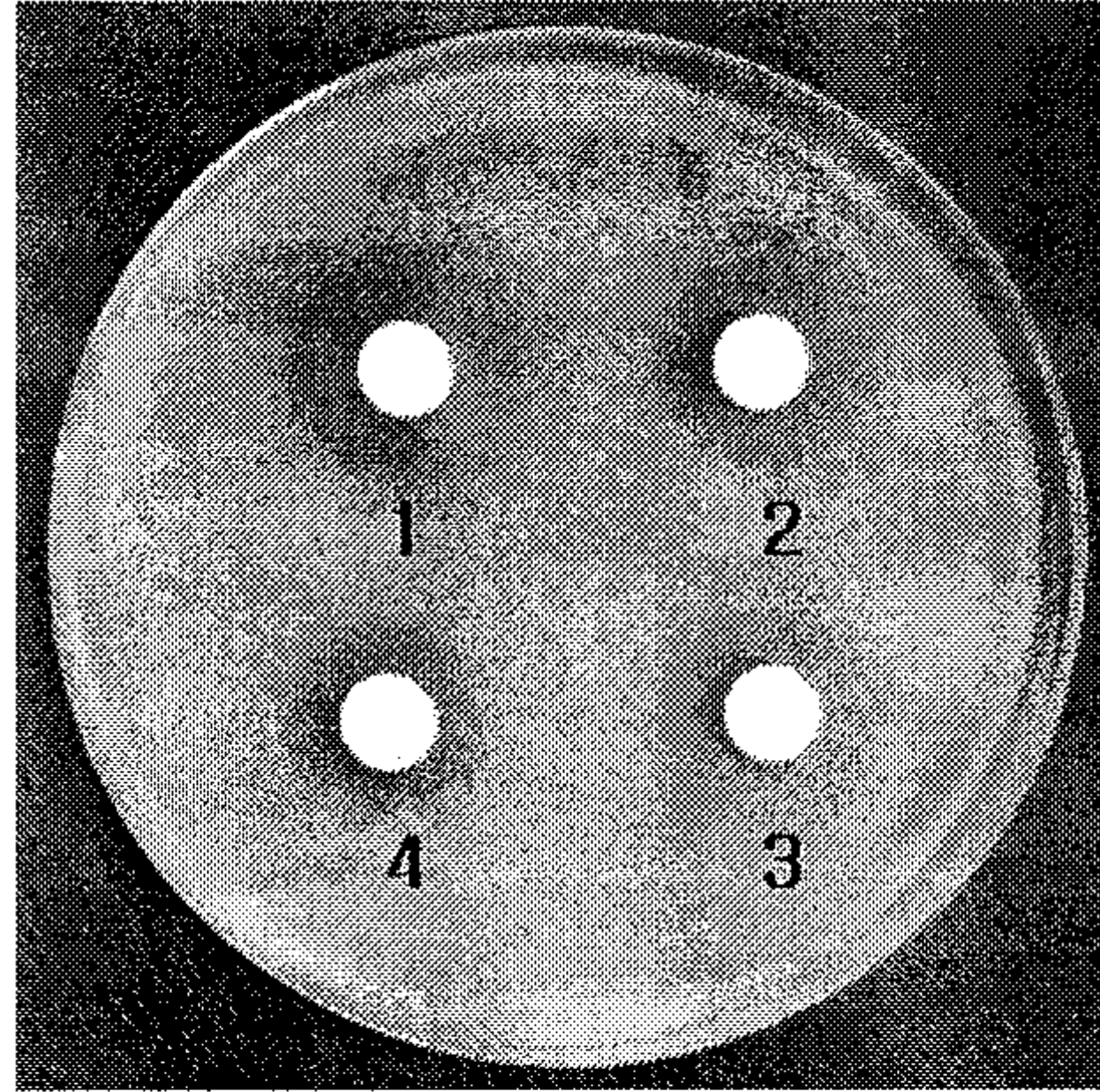


그림 8. 기존 배양조건으로 배양된 배양액과 변경된 배양조건으로 배양된 배양액의 벼도열병에 대한 항곰팡이 효과 비교

- 1: 변경된 조건(NGYS)에서 배양한 배양 여과액
- 2: 변경된 조건(NGYS)에서 배양한 배양 여과액의 1/2 희석액
- 3: 변경된 배지(NGYS)에서 배양한 배양 여과액의 1/3 희석액
- 4: 기존 배지 조건(GMYS)에서 배양한 배양 여과액

제 4 절 *Bacillus subtilis* JKK238의 실용화를 위한 제제화 기술 확립

대량 배양에 의해 만들어진 *B. subtilis* JKK238 배양액은 미생물 농약으로의 개발을 위해 배양액에 첨가물을 넣어 액상제로 제제화하는 방법과 동결건조와 분무건조방식을 이용해 분말수화제로 만든 후 보관 기간에 따라 균밀도와 항곰팡이 활성을 살펴보았다.

1. 액상 제형 연구

대량 발효에 의해 만들어진 *B. subtilis* JKK238 배양액은 미생물 농약으로의 제품 등록을 위해 전착효과가 있는 칼륨비누 0.1% 혼합, potassium sorbate 3g/L, 황산을 이용하여 제품을 pH4로 낮춘 후 54℃에서 보관하는 보존 실험을 진행했다.

표 6. 혼합제 종류에 따른 *B. subtilis* JKK238 배양액의 활성 유지

기간	항목	혼합제 종류			
		배양액	칼륨비누	potassium sorbate	pH 4
시작	균밀도 (CFU/ml)	7.9×10^8	7.1×10^8	5.4×10^8	1.4×10^8
	성장억제환 (mm)	22	21	20	22
1주	균밀도 (CFU/ml)	4.2×10^8	3.8×10^8	4.2×10^8	8.6×10^7
	성장억제환 (mm)	18	17	14	11
2주	균밀도 (CFU/ml)	2.9×10^8	2.0×10^8	2.9×10^8	8.1×10^7
	성장억제환 (mm)	16	15	11	8
3주	균밀도 (CFU/ml)	1.4×10^8	1.8×10^8	2.1×10^8	8.1×10^7
	성장억제환 (mm)	11	9	9	8

그 결과 칼륨비누혼합, potassium sorbate, 황산을 혼합한 모든 경우에서 균밀도와 항곰팡이 활성 유지에 큰 차이를 보이는 것을 알수 있었다. pH4로 유지하여 보관하는 경우는 시간이 지나도 일정한 균밀도를 유지하는 안정한 상태를 보였으나 항곰팡이 활성이 심하게 떨어지는 것을 확인할수 있었으며 나머지 조건에서는 비슷한 균밀도 변화를 볼수 있었다 (표 6). 그러나 항곰팡이 활성은 각 조건마다 조금씩 차이를 보였으며 배양액을 그대로 보관하는 것이 더 좋은 것으로 나타났다. 본 과제는 유기농업에 사용가능한 미생물 제제를 개발함을 목적으로 하고 있어 다른 화학물질을 첨가하지 않으면서 활성이 뛰어난 제제를 개발한다는 취지에서 배양액을 그대로 제품화하기로 최종 결정했다.

제 5 절 *B. subtilis* JKK238의 엽권 정착력과 저항성에 관한 연구

1. *B. subtilis* JKK238의 엽권 정착력 조사

미생물 배양액이 작물에 살포되었을 때 작물의 표면에서 생존할 수 있는 기간이 얼마나 되는 가를 알아보는 것은 식물병 방제 차원에서 중요한 단서를 제공할 수 있다. 특히, 약제 방제기간을 결정하거나 살포 당시의 희석 배수 조절을

알아보는데 도움이 된다. 따라서 작물의 잎에 살포된 *B. subtilis* JKK238 배양액의 정착력을 알아보기 위해 희석배수를 50배와 100배, 200배로 구분하고 딸기 잎에 엽면시비 후 시간 경과에 따른 밀도 변화를 조사하였다. *B. subtilis* JKK238 배양액은 희석배수별로 잎 윗면에 1회 처리하였으며, 살포된 작물의 잎을 2일 간격으로 채취하여 일정 면적(가로×세로;1cm×1cm)으로 자르고 20 개씩을 멸균수가 담긴 Test tube에 넣고 20초간 균질화하고, 희석평판법을 이용하여 시간 경과에 따른 밀도를 조사하였다. 이때 배양액의 밀도는 2.0×10^9 cfu/ml이었다. 시험결과 표 7에서 보는 바와 같이 100배 처리구에서 3일 후까지 10^6 cfu/20cm²의 밀도를 유지하였으며, 5일 후부터 점차 그 밀도가 낮아져서 15일 이후에는 *Bacillus subtilis* JKK238의 밀도가 거의 측정되지 않았다. 200배 희석 처리의 경우 처리 3일 후부터 밀도가 10^4 CFU/20cm² 이하로 측정되었고 100배 희석 처리구에 비하여 보다 빠른 속도로 밀도가 낮아지는 경향을 보였다. 이와 같은 결과로 볼 때 *B. subtilis* JKK238의 처리 간격을 5일로 하여 작물의 잎 표면에서 그 밀도를 유지시키는 것이 딸기흰가루병을 방제하는데 도움이 될 것으로 판단되며, 향후 노지와 하우스 그리고 작물별로 구분하여 엽면 살포 후 그 밀도를 조사함으로써 *Bacillus subtilis* JKK238의 적용확대 실험에 활용해 보고자 한다.

표 7. *B. subtilis* JKK238의 엽면정착력 조사 (CFU/20cm²)

농도 (ml/L)	간격 (2일)							
	1	3	5	7	9	12	15	30
10	4×10^6	2.9×10^6	9×10^5	2.7×10^3	3.1×10^4	5×10^2	>100	ND
5	5.7×10^6	2.5×10^4	1.7×10^3	>100	>100	ND	ND	ND

ND: Not detected

2. *B. subtilis* JKK238 배양액에 대한 딸기흰가루병균의 저항성 조사

화학농약의 오남용으로 이에 대한 저항성 균주들이 보고되면서 동일 품목을 이용한 연속살포 보다는 여러 품목의 약제를 교대로 살포하여 포장에서의 저항성 균주 출현을 방지하고 있다. 그러나 일부 농가에서는 효과 좋은 농약의 경우

타품목으로 교체하고 있지 않아 저항성 균주의 출현이 예상되기도 한다. 약제에 대한 균주의 저항성 획득은 여러 해를 거듭하여 동일 약제를 살포할 경우 그 심각성이 커질 수 있다. 이러한 우려로 인해 미생물농약으로 개발 중인 *B. subtilis* JKK238 배양액을 이용해 딸기흰가루병원균의 저항성 획득 가능성을 간접적으로 알아보고자 5일 간격으로 100배와 200배 희석액을 15회 연속 살포하면서 이병과율의 변화를 조사하였다. 그 결과 그림 9에서 보는 바와 같이 15회 처리 기간 동안 100배, 200배 희석 처리구와 화학농약 처리구에서는 대체로 이병과율이 꾸준히 감소하는 추세를 보였다. 화학농약의 경우 초기 이병과율은 10% 내외였으며, 최종 조사할 때까지 지속적으로 낮아졌으나, 완벽하게 이병과가 없어지지 않는 않았다. 마찬가지로 *B. subtilis* JKK238의 배양액 희석처리구도 초기 약제처리 후 조사했을 때 보다 이병과율이 낮아지기는 하였으나, 최종 처리 후 조사할 때까지 5~11%의 이병과율을 나타냈다. 배양액을 처리하지 않은 Control의 경우 다소 이병율의 증감 폭이 있었으나, 대체로 40~60%를 유지하였다. 포장 내에서 15회의 연속 처리에도 불구하고 약제 처리구에서 이병과가 지속적으로 관찰된 이유는 포장 내 약제 처리구 외의 재배지에 병원균의 밀도가 높았으며, 딸기흰가루병 발생 환경이 조성되어 있어 지속적인 약제 처리에도 불구하고 이병과가 나타난 것으로 판단되었다. 종합적으로 볼 때 *B. subtilis* JKK238 배양액에 의한 저항성은 발생하지 않은 것으로 판단하였으나, 향후 동일 포장에서 보다 장기적 처리와 처리 간격 및 연차별 처리에 따른 병진전도를 통해 보다 다각적으로 규명해볼 예정이다.

3. *B. subtilis* JKK238에 의한 딸기흰가루병 최소억제농도 조사

병원균에 대한 최소억제농도 조사는 포장에서 약제 처리에 있어 적정 희석배수를 알아내는데 중요한 자료가 된다. 따라서 딸기 표면에서 딸기흰가루병원균의 포자의 발아를 억제시키기 위한 농도를 알아보고, 이에 따른 배양액의 적정 적용 농도를 파악하고자 흰가루병에 감염된 딸기를 확보하여 실험을 수행 하였다. *B. subtilis* JKK238 배양의 희석배수는 50배~500배까지 다양하게 희석하였으며, 배양액 희석 처리 후에는 과를 채취하여 2차 감염을 방지하기 위해 뚜껑이 있는 플라스틱용기에 보관하면서 표면을 관찰하였다. 그 결과 표 8에서 보는 바와 같이 배양액 처리 12시간 경과 후 50배와 100배 처리구에서 포자와 균사의 변형이 나타났으며, 그 효과는 미미하였다. 그러나 24시간이 경과 하면서 Control과 비교

하였을 때 확연히 변형된 포자와 균사가 관찰되었으며, 200배 처리구에서도 포자와 균사 변형이 관찰되었다(그림 10). 이때 50배와 100배 처리구에서 관찰된 포자와 균사 변형 정도는 거의 유사하였고, 심하게 변형된 포자와 균사가 관찰되었다. 병원균의 포자나 균사의 변형은 발아력을 상실하거나 생장이 억제됨을 나타내기 때문에 병의 확산을 방제할 수 있음을 말해주는 결과라 할 수 있다.

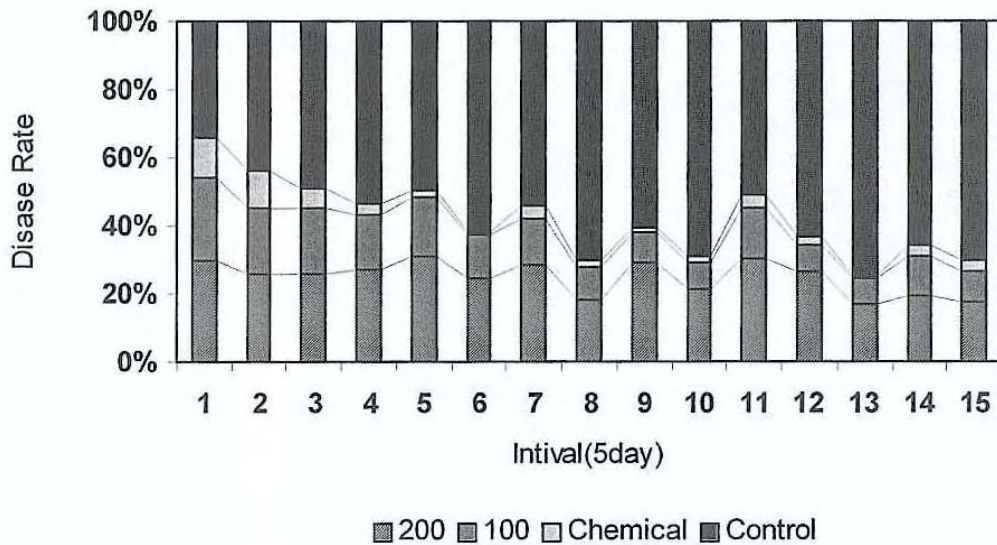


그림 9. 배양액 지속 처리에 따른 이병과율의 변화

표 8. 배양액 처리 후 시간 경과에 따른 농도별 포자 및 균사 변형 정도

		희석배수				
		50	100	200	500	Control(water)
12hr	포자	++	+	-	-	-
	균사	+	+	-	-	-
24hr	포자	+++	+++	++	-	-
	균사	++++	++++	+	-	-

+: 5~10%, ++: 10~30%, +++: 30~60%, ++++: 60% 이상 변형, -: 무증상

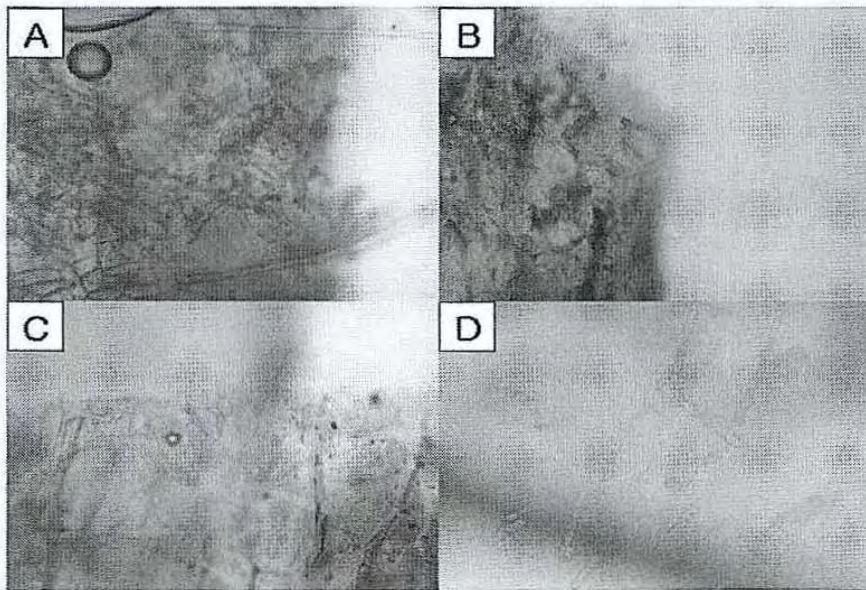


그림 10. *B. subtilis* JKK238 배양액의 처리 24hr 후 농도별 포자 및 군사 변형 정도
(A: 50배, B:100배, C:200배, D:무처리)

제 6 절 선발된 제제의 처리 방법과 포장시험 수행

1. 딸기흰가루병에 대한 미생물 제제의 처리 방법 연구

기내 실험 결과를 바탕으로 *B. subtilis* JKK238 배양액의 최적 적용법을 알아보기 위하여 처리 간격과 처리 회수, 처리 농도를 달리하여 소규모 포장시험을 실시하였다. 처리 간격은 5일, 7일, 10일로 하였으며, 처리 횟수는 3회와 4회로 구분하였고, 희석농도는 1000배, 500배, 200배, 100배로 하였다. 시험은 난피법 5처리 3반복으로 하였다. 그 결과 표 9~11에서 보는 바와 같이 처리 농도에 따라 방제가 차이는 분명히 나타났으며, 대체로 500배와 1000배 희석 처리구는 Control 대비 5% 수준에서 유의성이 인정되지 않았다. 5일 간격과 7일 간격 처리의 경우 100배와 200배 처리구간에 약 20~30%의 방제가 차이를 나타냈으며, Control과 5% 수준에서 유의성을 나타냈다. 그러나 10일 간격 처리구에서는 100배와 200배 처리구 모두 Control과 유의성이 인정되지 않아 10일 간격 처리는 희

수에 관계없이 적합한 처리 간격이 아닌 것으로 나타났고, 7일 간격 보다는 5일 간격이 보다 방제효과를 높일 수 있으며, 75%의 방제 효과를 나타낸 100배 희석 처리가 딸기흰가루병 방제에 가장 효과적인 희석 농도로 조사되었다. 이상의 결과를 종합해 볼 때 딸기흰가루병을 방제하기 위한 *B. subtilis* JKK238 배양액의 처리 간격, 농도 및 처리 횟수는 5일 간격으로 100배 희석액을 3~4회 처리하는 것이 바람직한 것으로 나타났다.

표 9. *B. subtilis* JKK238 배양액의 5일 간격 처리 효과

처리	3 회		4 회	
	평균 (%)	방제가 (%)	평균 (%)	방제가 (%)
500	33.3a ^z	16.5	34.7a	17.6
1,000	32.6a	18.2	36.6a	13.0
100	9.7bc	75.6	10.2bc	75.8
200	17.1b	57.3	19.0b	54.8
Chemical	1.5c	96.2	2.5c	94.0
Control	39.9a	-	42.1a	-

^zMean separation within columns Duncan's multiple test, 5% level

표 10. *B. subtilis* JKK238 배양액의 7일 간격 처리 효과

처리	3 회		4 회	
	평균 (%)	방제가 (%)	평균 (%)	방제가 (%)
500	36.8ab ^z	25.5	44.0a	16.2
1,000	35.4ab	28.4	41.1ab	21.7
100	13.2c	73.4	15.0c	71.4
200	27.4bc	44.5	27.9bc	47.0
Chemical	3.5c	92.9	4.1c	92.1
Control	49.5a	-	52.5a	-

^zMean separation within columns Duncan's multiple test, 5% level

표 11. *B. subtilis* JKK238 배양액의 10일 간격 처리 효과

처리	3 회		4 회	
	평균 (%)	방제가 (%)	평균 (%)	방제가 (%)
500	34.8a ²	2.5	30.7a	7.8
1,000	34.9a	2.3	29.4ab	11.7
100	17.6ab	50.5	16.8ab	49.5
200	30.7a	14.1	27.3ab	18.0
Chemical	2.9b	91.8	2.1b	93.8
Control	35.7a	-	33.3a	-

²Mean separation within columns Duncan's multiple test, 5% level

2. 미생물제제를 이용한 딸기흰가루병 방제 효과 검정

딸기흰가루병 약제 방제 효과 검정은 동일 포장에서 2년에 걸쳐 수행하였다. 시험은 난괴법 4처리 3반복 하였으며, 기타 미생물농약품목등록 규정에 맞게 실시하였다. 연차별 방제약제에 따른 방제효과를 살펴보면 대체로 유사한 경향을 나타냈다. 표 12, 13에서 보는 바와 같이 *B. subtilis* JKK238 제제는 두 해 모두 약 70% 수준의 방제효과를 나타내어 무처리구와 유의한 차이를 나타냈으며, 대조약제 대비 76~83%의 방제 효과를 나타냈다. 따라서 *B. subtilis* JKK238 제제를 미생물농약으로 등록하기에 충분하였다.

표 12. 1차 포장 시험 결과

처리	이병과율 (%)				유의차	방제가 (%)
	I	II	III	Aver.		
<i>B. subtilis</i> JKK238	10.1	11.6	14.6	12.1	a	69.3
<i>B. subtilis</i> Y1336	13.3	11.8	8.5	11.2	a	71.6
Chemical	6.5	6.1	7.4	6.7	a	83.0
Control	41.1	34.0	43.1	39.4	b	-

표 13. 2차 포장 시험 결과

처리	이병과율 (%)				유의차	방제가 (%)
	I	II	III	평균		
<i>B. subtilis</i> JKK238	5.8	9.3	7.4	7.5	a	70.4
<i>B. subtilis</i> Y1336	4.3	6.5	8.2	6.3	a	75.1
Chemical	2.4	1.9	1.3	1.9	a	92.5
Control	30.8	25.4	19.6	25.3	b	-

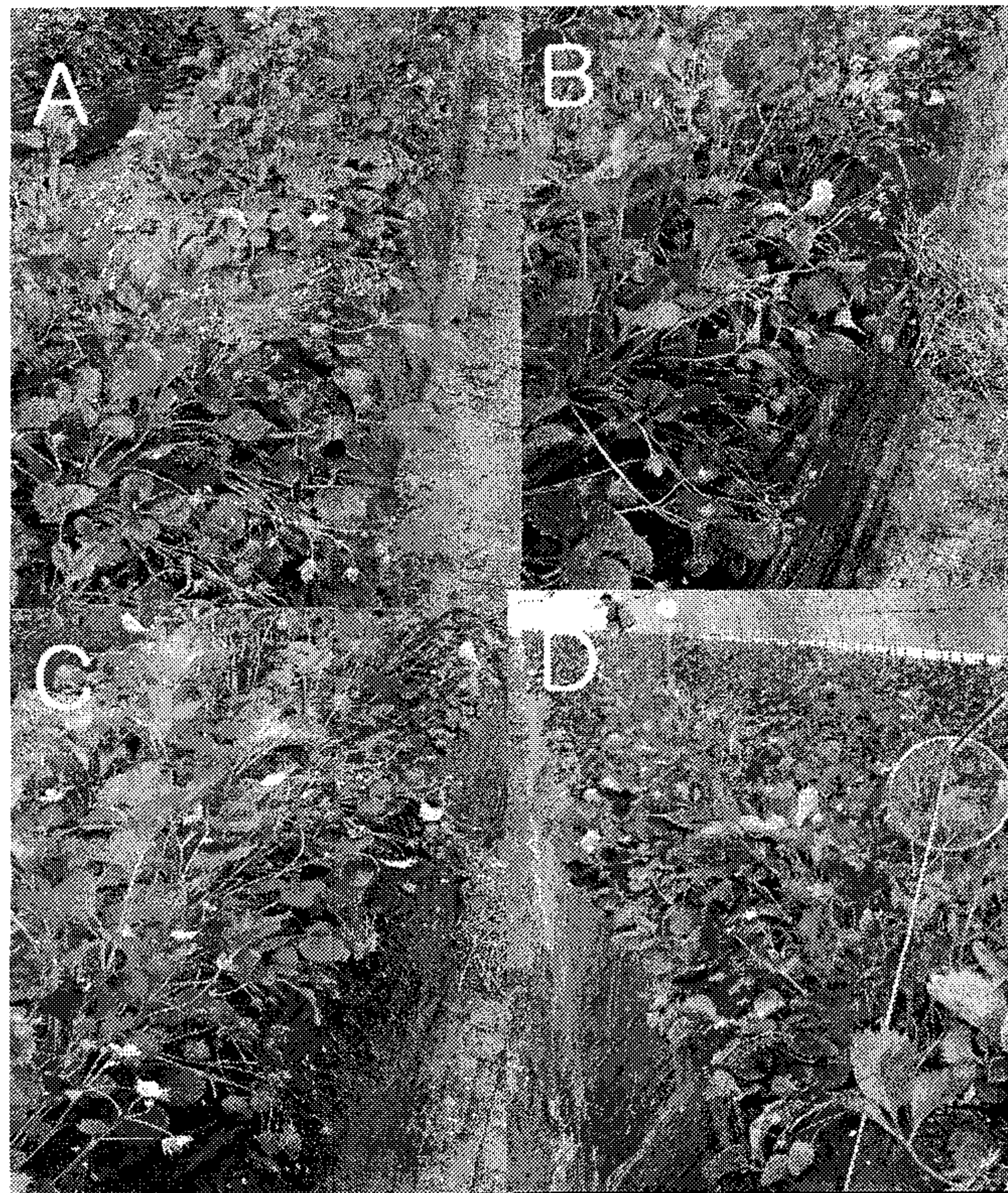


그림 11. 약제 처리에 따른 흰가루병 방제 효과 검정
 (A: *B. subtilis* JKK238 , B: *B. subtilis* Y1336,
 C: Chemical , D: water control)

제 7 절 *Bacillus subtilis* JKK238 제품의 미생물농약 등록

B. subtilis JKK238 배양액을 미생물 농약으로 등록하기 위한 경시변화시험을 실시했다. 경시변화시험은 상온에서 약효보증기간 동안에 시간이 경과함에 따라 물리·화학적으로 변화되는 주성분 또는 물리성을 분석하는데 가열안정성시험, 저온 안정성시험, 상온보관시험을 실시하도록 규정되어 있다.

가열안정성 시험은 등록하고자 하는 약재를 54 ± 2 °C에서 보관하면서 균밀도가 2주일이상 지속되면 1년동안의 약효보증기간을 가질수 있으며, 4주일 이상은 2년의 약효보증기간을 설정할 수 있다. 따라서 대량발효에 의해 만들어진 *B. subtilis* JKK238 배양액을 포장하고자 하는 용기 (재질 poly ethylene)에 담아 54°C에서 보관하면서 균밀도를 측정했다. 그 결과 보관하는 용량에 관계없이 모두 10^8 CFU/ml 이상 유지하여 농약제품의 유효미생물 밀도인 5.0×10^7 CFU/ml을 설정함에 무리가 없는 것으로 판단했다 (표 14).

표 14. *B. subtilis* JKK238 배양액의 가열안정성 시험

보관기간 (54°C)	균밀도 (CFU/ml)	
	10리터 용기 보관	1리터 용기 보관
시작	7.5×10^8	7.9×10^8
1주	4.0×10^8	4.2×10^8
2주	3.0×10^8	2.9×10^8

저온 안정성 시험은 0 ± 2 °C에서 7일간 시험한 성적을 말하며 주성분과 물리성에 변화가 없어야 한다. 이 시험 또한 실제 상품화될 포장용기의 상태로 완포장하여 보관하면서 균밀도를 측정했다. 그 결과 7일 후 제품의 균밀도는 초기와 큰 변화가 없이 유지됨을 관찰했다 (표 15).

표 15. *B. subtilis* JKK238 배양액의 저온안정성 시험

균밀도 (CFU/ml)	보관기간 (0℃)				
	시작	1일	3일	5일	7일
	5.9×10^8	5.2×10^8	3.1×10^8	3.1×10^8	1.1×10^8

상온시험 또한 실제 상품화될 포장용기의 상태로 완포장하여 보관하여 상온의 보관창고에 1년 6개월 동안 보관하면서 균밀도를 측정하였다. 그 결과 *B. subtilis* JKK238 배양액은 1년 6개월 동안 유효 미생물 밀도 이상의 밀도를 유지함을 관찰했다 (표 16).

표 16. *B. subtilis* JKK238 배양액의 상온 보관 시험

균밀도 (CFU/ml)	보관기간 (상온)				
	시작	3개월	6개월	1년	1년 6개월
	7.2×10^8	5.6×10^8	3.4×10^8	1.1×10^8	8.2×10^7

위와 같은 경시변화 시험과 미생물농약 원제와 제품에 대한 독성시험 (후침, 협동연구과제 보고서)을 통해 2006년 3월에 농약품목등록을 완료했고 (그림 13) 상품명은 잎살림으로 10리터와 1리터 제품을 출시 완료했다 (그림 12).



그림 12. *B. subtilis* JKK2380 균주를 이용한 미생물 농약 “잎살림”.

[별지 제16호서식]

제 37-살균-1 호

농 약 제조 품목등록증
 수입

1. 동 록 자 : 주식회사 유살림 2. 영업등록번호 : 제조업 제37호
3. 주 소 : 충북 괴산군 불정면 영원리 628
4. 품 목 명 : 바실러스 서브틸리스 제이케이케이238 액상제
(*Bacillus subtilis* JKK238)
6. 상 표 명 : 일살림
6. 유효성분의 종류 및 함유량 :
Bacillus subtilis JKK238 ----- 5.0×10^7 CFU/ml
7. 적용 병해충 및 농작물의 범위 : 딸기·원가루병
8. 사용방법 및 사용량 : 후면참조
9. 제조장 소재지 : 충북 청원군 오창면 각리 642-6
10. 품목등록 유효기간 : 2016.03.28

농약관리법 제3조 및 동법 제17조의 규정에 의하여 농약제조(수입) 품목의 등록을 하였음을 증명합니다.

2006 년 3 월 29 일

농촌진흥청장



27271-23111호
96. 8. 9. 제정

210mm×297mm
(보존용지 (1종)120g/m²)

그림 13. *Bacillus subtilis* JKK238의 농약품목 등록증

제 8 절 *B. subtilis* JKK238 제품의 활용성 다각화 연구

1. 오이흰가루병에 대한 방제 효과 검정

B. subtilis JKK238 배양액을 다양하게 활용해 보고자 포장에서는 오이흰가루병에 적용하였고, 기내에서는 고추탄저병에 대한 활성을 시험하였다. 화학농약 처리구를 제외하고 딸기흰가루병 시험과 동일하게 시험 설계를 하여 약제를 살포하였다. 시험 결과 표 17에서 보는 바와 같이 63%의 방제 효과를 나타냈으며,

대조미생물 약제에 비하여 약 5% 이상 방제가가 높은 것으로 나타남으로써 오이흰가루병 방제 약제로써 가능성이 충분한 것으로 판단하였다.

표 17. *B. subtilis* JKK238을 이용한 오이흰가루병 방제 시험

처리	발병도 (%)				유의차	방제가 (%)
	I	II	III	평균		
<i>B. subtilis</i> JKK238	26	17.5	19	20.8	a ^z	63.6
<i>B. subtilis</i> EB120	29.8	20.8	21	23.8	a	58.5
<i>B. subtilis</i> Y1336	67.3	32.5	33.3	44.3	bc	21.5
Control	70.8	67.3	34	57.3	c	-

^zMean separation within columns Duncan's multiple test, 5% level

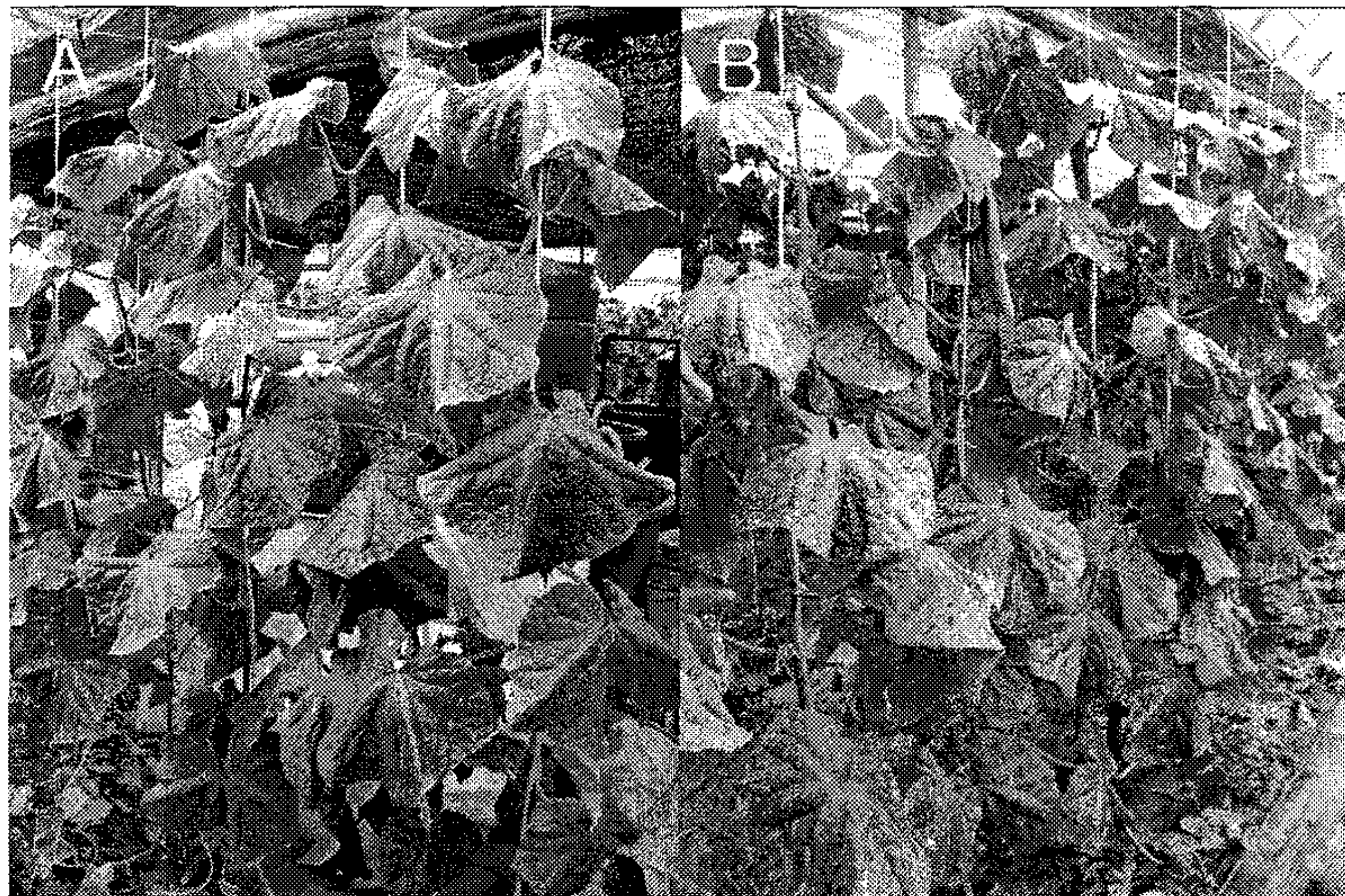


그림 14. *B. subtilis* JKK238처리에 의한 오이흰가루병 방제
A: *B. subtilis* JKK238 액상제 처리구, B: 무처리구

2. 고추 탄저병 방제를 위한 효과 검정

B. subtilis JKK238은 PDA 상에서 고추 탄저병균 (*Collectotrichum*

gloeosporioides)과 대치배양하여 길항력을 검정한 바 있다 (그림 15). 따라서 고추 탄저병 균의 포자를 5ml 취해 50°C로 유지된 PDA 배지 500 ml에 넣어 교반한 후 페트리디쉬에 분주하여 굳힌 후 고추탄저병균에 대한 성장 억제환을 조사하였다. 그 결과 *B. subtilis* JKK238는 배양시간이 증가함에 따라 고추 탄저병에 대한 성장억제환이 측정됨을 알 수 있었다 (그림 16).

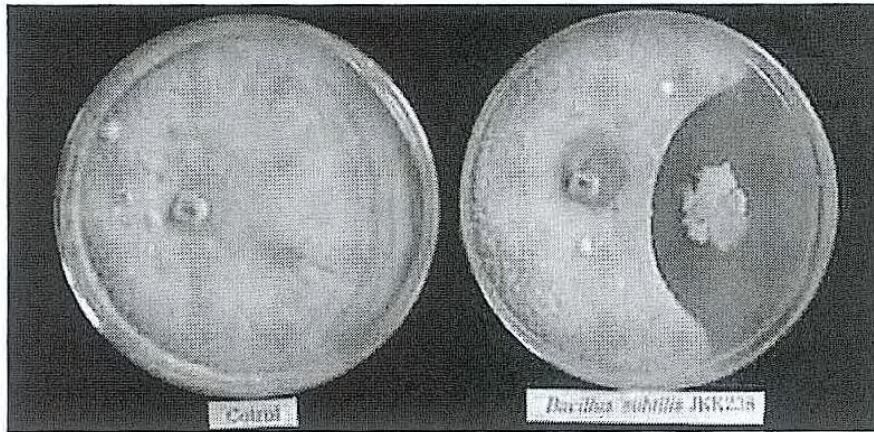


그림 15. *B. subtilis* JKK238의 고추탄저병균에 대한 길항력

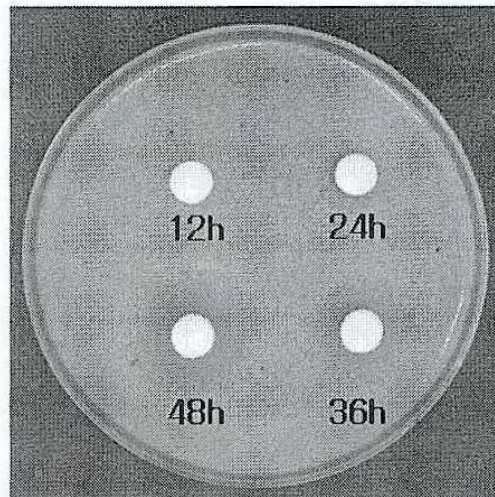


그림 16. *B. subtilis* JKK238의 배양시간에 따른 배양 상등액의 탄저병균에 대한 항곰팡이 효과

위에서 나타난 고추 탄저병균에 대한 *in vitro* 실험결과 *B. subtilis* JKK238 배양액의 길항력이 확인됨에 따라, 실제 병 방제효과를 알아보기 위하여 실험실 내에서 “잎살림”을 10배와 50배로 희석하여 살포한 고추 열매에 대한 탄저병 예방 실험을 2가지로 나누어 수행하였다. 고추 탄저병균의 분생포자를 살포하여 병을 유도하는 방법과 고추열매 위에 PDA 배지에서 배양한 *C. gloeosporioides*의 조각을 올려 접종하는 방법으로, 그 결과 대조구에 비해 뚜렷한 병 예방 효과를 볼 수 있었다 (그림 17). 특히 고추탄저병균 배양 조각을 직접 고추열매 위에 올린 실험에서 대조구는 모두 심한 감염을 확인한 반면 50배 희석하여 처리하여도 고추 탄저병의 병반이 커지지 않음을 확인할 수 있었다.

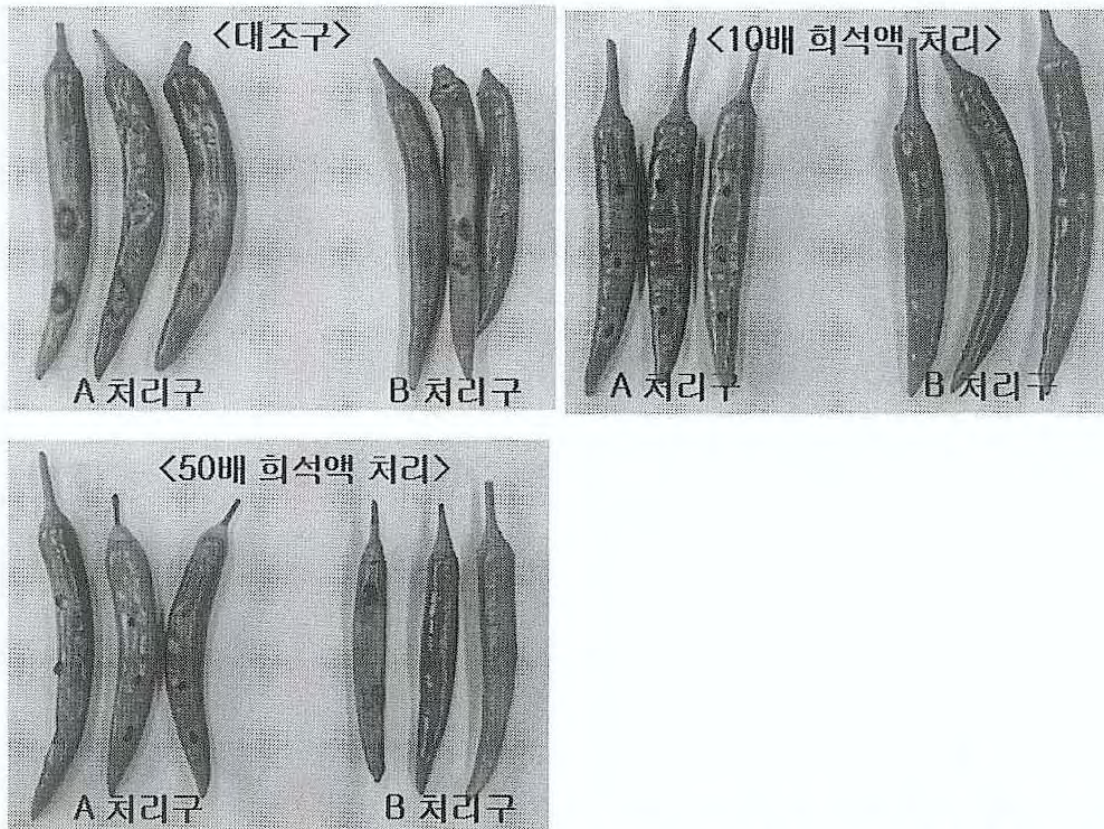


그림 17. *B. subtilis* JKK238 액상제 (잎살림) 처리에 의한 고추탄저병 방제효과

3. 벼 도열병 방제를 위한 효과 검증

본 과제를 수행함에 있어 *B. subtilis* JKK238의 항균활성 변화는 벼도열병균 (*Magnaporthe grisea*)에 대한 Clear Zone의 크기에 의하여 확인되어 왔다. 벼도열병균은 PDA배지에서 그 생육이 양호하고, 또한 *B. subtilis* JKK238의 배양여

액에 대해 민감성을 나타내기 때문에 (주)흙살림에서는 2007년 1월 작물보호협회에 잎살림미생물농약 (*B. subtilis* JKK238)을 벼잎도열병에 대해 신규 1년차 적용확대 시험을 신청하였으며, 향후 2년에 걸친 약효 및 약해 포장시험을 자체 시험 및 공공 시험으로 구분하여 수행함으로써 *B. subtilis* JKK238의 활용성을 넓히고자 한다.

제 9 절 보유 균주 *Streptomyces* AG-P의 분류학적 위치와 특성

Streptomyces AG-P는 대전 생명공학연구원 항생물질탐색 팀이 분리한 균주로서 현재 특허 등록이 완료된 상태이며, 식물 역병균인 파이토프토라 속 (*Phytophthora* sp.) 및 입고병균인 피시움 속 (*Phythium* sp.) 균 등 식물병원성 난균류(Oomycetes)에 대하여 선택적인 항균활성을 나타냄을 기내 실험을 통해 확인한 바 있다. 따라서 본 과제를 통해 다양한 조건에서 고추역병 방제 가능성을 확인하고, 미생물농약 등록을 위한 기초 연구 자료로 활용하고자 *Streptomyces* AG-P균주를 실험에 사용하였다.

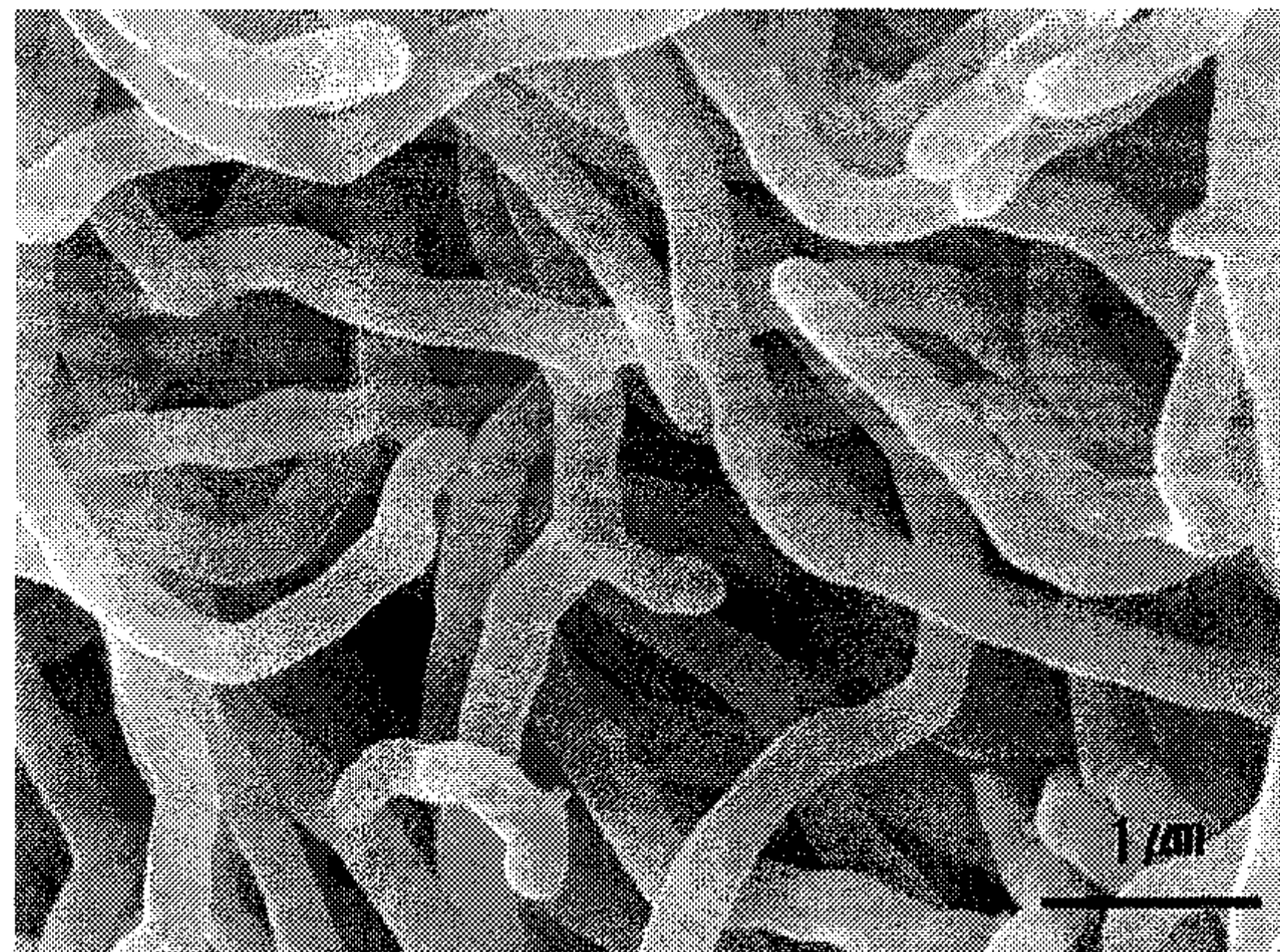
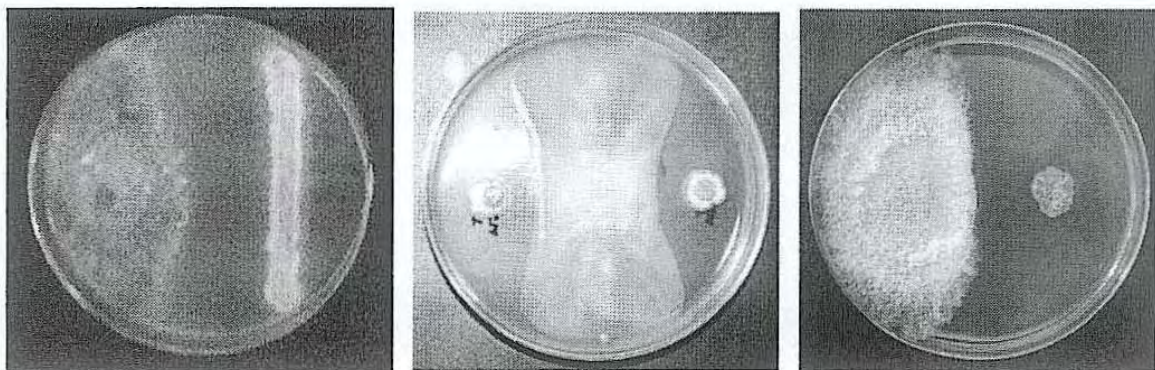


그림 18. *Streptomyces* AG-P의 주사전자현미경 사진

제 10 절 *Streptomyces* sp. AG-P 원제의 효과 검정을 위한 스크리닝

Streptomyces sp. AG-P는 길항균으로서의 특성을 확인하기 위해 PDA 상에서 병원균과 대치배양하며 딸기잿빛곰팡이병 (*Botrytis cinerea*), 고추역병 (*Phytophthora capsici*), 고추탄저병 (*Collectotrichum gloeosporioides*)에 대한 길항력을 검정하였다. 그 결과 AG-P 균주는 병원성 곰팡이들에 대한 강력한 길항력을 갖는 것을 관찰했다 (그림 19).



딸기잿빛곰팡이병

고추 역병

고추탄저병

그림 19. 각종 병원균에 길항력을 보이는 *Streptomyces* sp. AG-P

제 11 절 *Streptomyces* AG-P 원제 대량배양 기술 확립

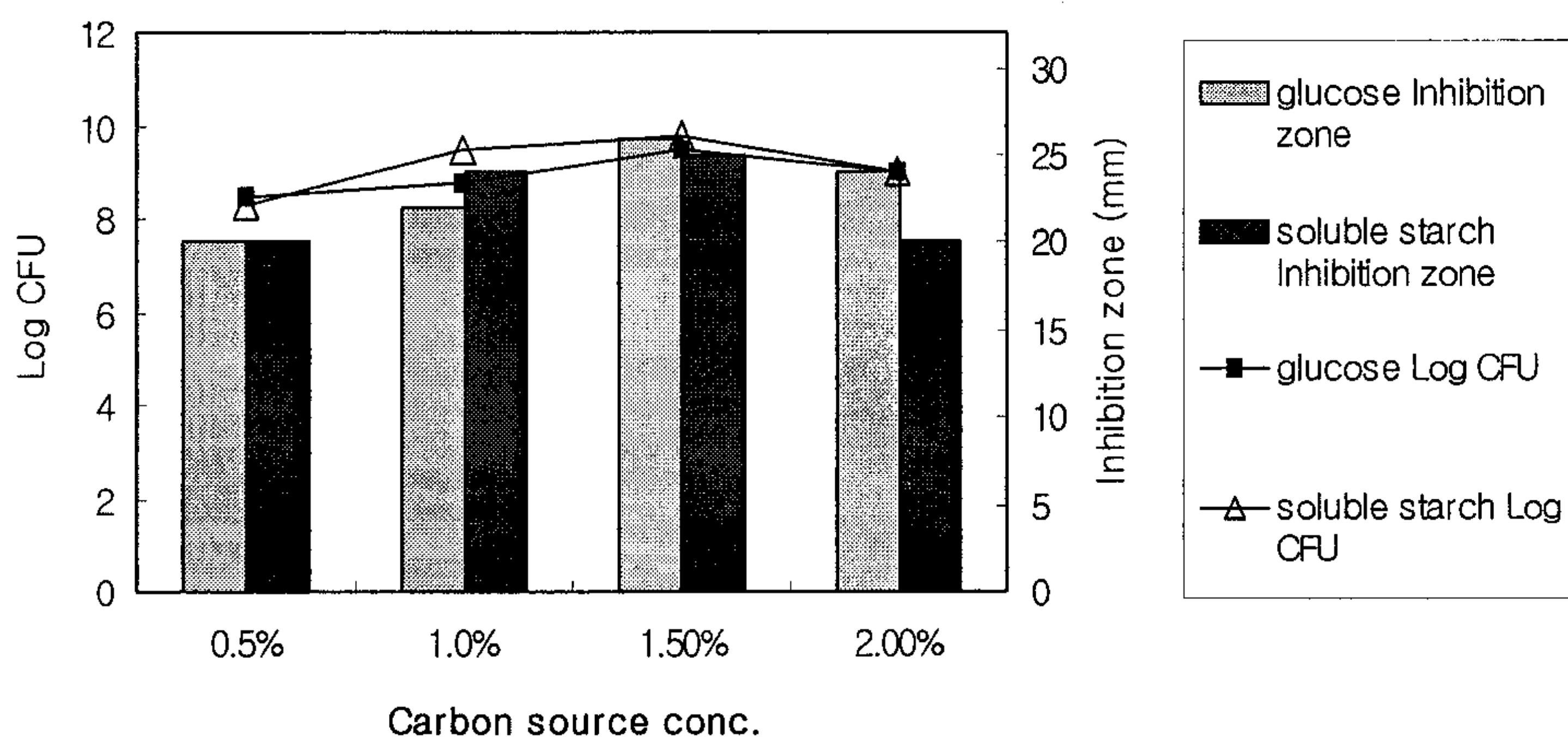
1. 영양조건에 따른 배양 최적화

가. 탄소원에 따른 배양적 특성과 항균활성

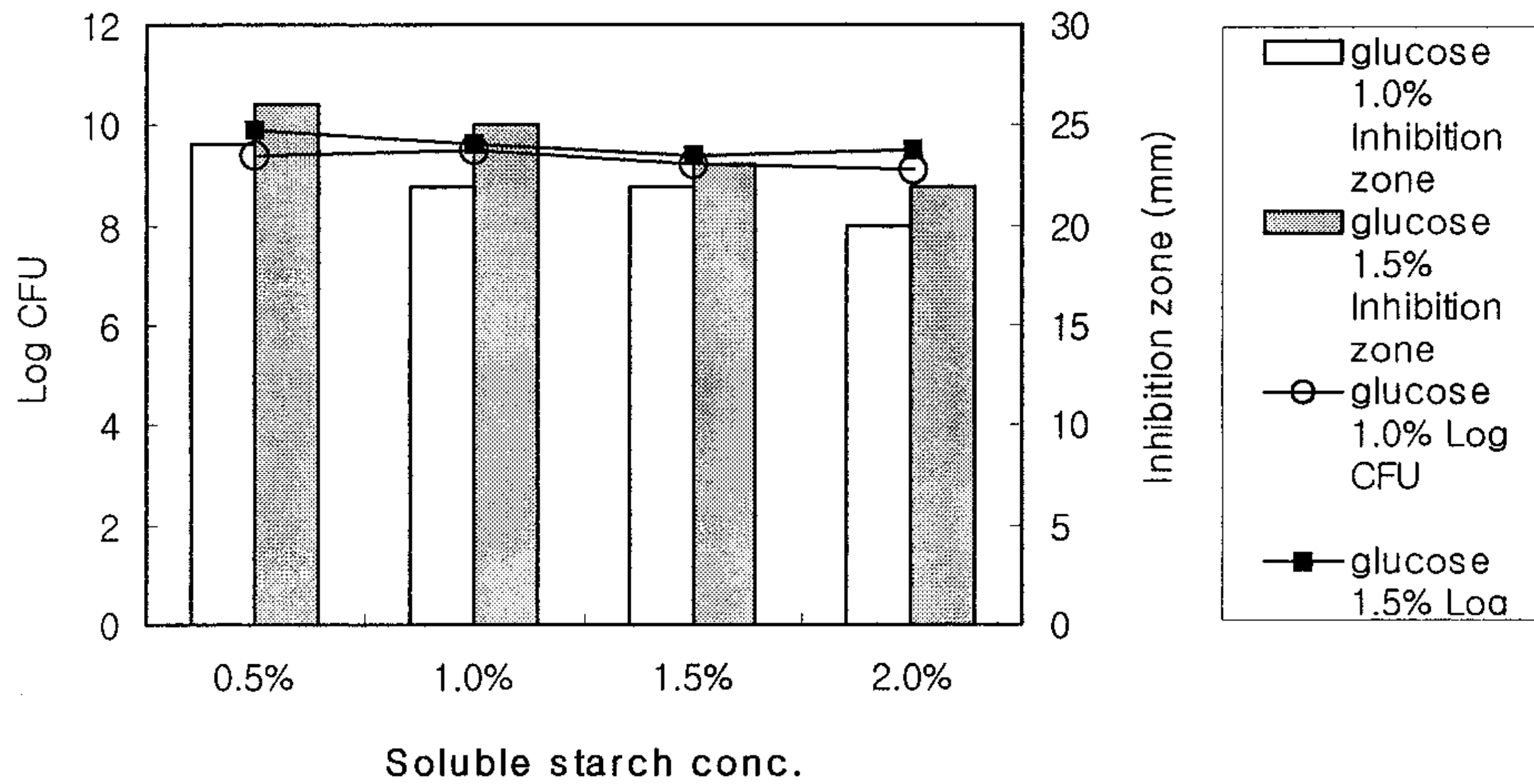
높은 균밀도 생산을 위한 최적 배지의 선택은 방선균을 대량 배양하기 위해 사용하는 GSS (soluble starch 1.0%, glucose 2.0%, soybean meal 2.5%, yeast

extract 0.4%, NaCl 0.2%, K₂HPO₄ 0.025%, CaCO₃ 0.2%) 배지 조성을 기본으로 하여 일부 성분 및 첨가량을 가감하여 실험하였다. 탄소원 선발을 위하여 배지 조성 성분 가운데 일부 성분 (soybean meal 2.5%, yeast extract 0.4%, NaCl 0.2%, K₂HPO₄ 0.025%, CaCO₃ 0.2%)을 고정시키고, soluble starch와 glucose를 탄소원으로 하여 각각 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 %씩 각각 첨가하여 28℃, 2일동안 rotary shaker (100 rpm)에서 균을 배양 후 멸균생리식염수로 희석후 희석평판법에 의해 균밀도를 측정하였다.

탄소원으로 soluble starch와 glucose의 농도를 달리하여 배양하면서 균밀도를 측정한 결과, 균밀도에는 탄소원의 종류와 농도에는 큰 영향이 없었으나, 항곰팡이 효과에는 탄소원의 종류와 농도에 영향을 받았다. soluble starch와 glucose는 모두 1.5%의 농도에서 높은 균밀도와 성장억제환의 크기를 나타냄을 관찰했고, 그 이상에서는 오히려 균밀도가 감소했다 (그림 20). 그러나 soluble starch를 첨가한 곳에서는 거품이 심하게 발생하는 현상이 나타남 따라 대량 배양 과정 중 발생할 수 있는 문제를 최소화하기 위해 두 탄소원의 적절한 조합을 필요로 했다.



(가)



(나)

그림 20. 탄소원의 종류에 따른 균밀도와 성장억제환 크기

soluble starch와 glucose의 혼합량을 결정하기 위해서 기존 고정배지 조성 (soybean meal 2.5%, yeast extract 0.4%, beef extract 0.1%, NaCl 0.2%, K_2HPO_4 0.025%, $CaCO_3$ 0.2%)에서 soluble starch와 glucose를 변화시키는 실험을 진행했다. 그 결과 soluble starch 0.5%, glucose 1.5%를 함께 첨가하였을 때 항곰팡이 효과가 가장 우수했다 (그림 20).

나. 질소원에 따른 배양적 특성과 항균활성

Streptomyces AG-P의 질소 이용성을 알아보기 위하여 일부성분 (soluble starch 1.0%, glucose 2.0%, NaCl 0.2%, K_2HPO_4 0.025%, $CaCO_3$ 0.2%)을 배지 기본 성분으로 하여 soybean meal의 첨가량은 1.5%, 2.0%, 2.5%, 3.0%로 달리 하고 yeast extract는 0.2%, 0.4%로 각각 달리 첨가하여 28°C, 2일동안 rotary shaker (100 rpm)에서 균을 배양 후 탄소원의 경우와 동일한 방법으로 균밀도를 측정하였다. 그 결과 yeast extract 0.6%, soybean meal 3.0%를 함께 첨가하였을 때 항곰팡이 효과가 가장 우수했다 (그림 21).

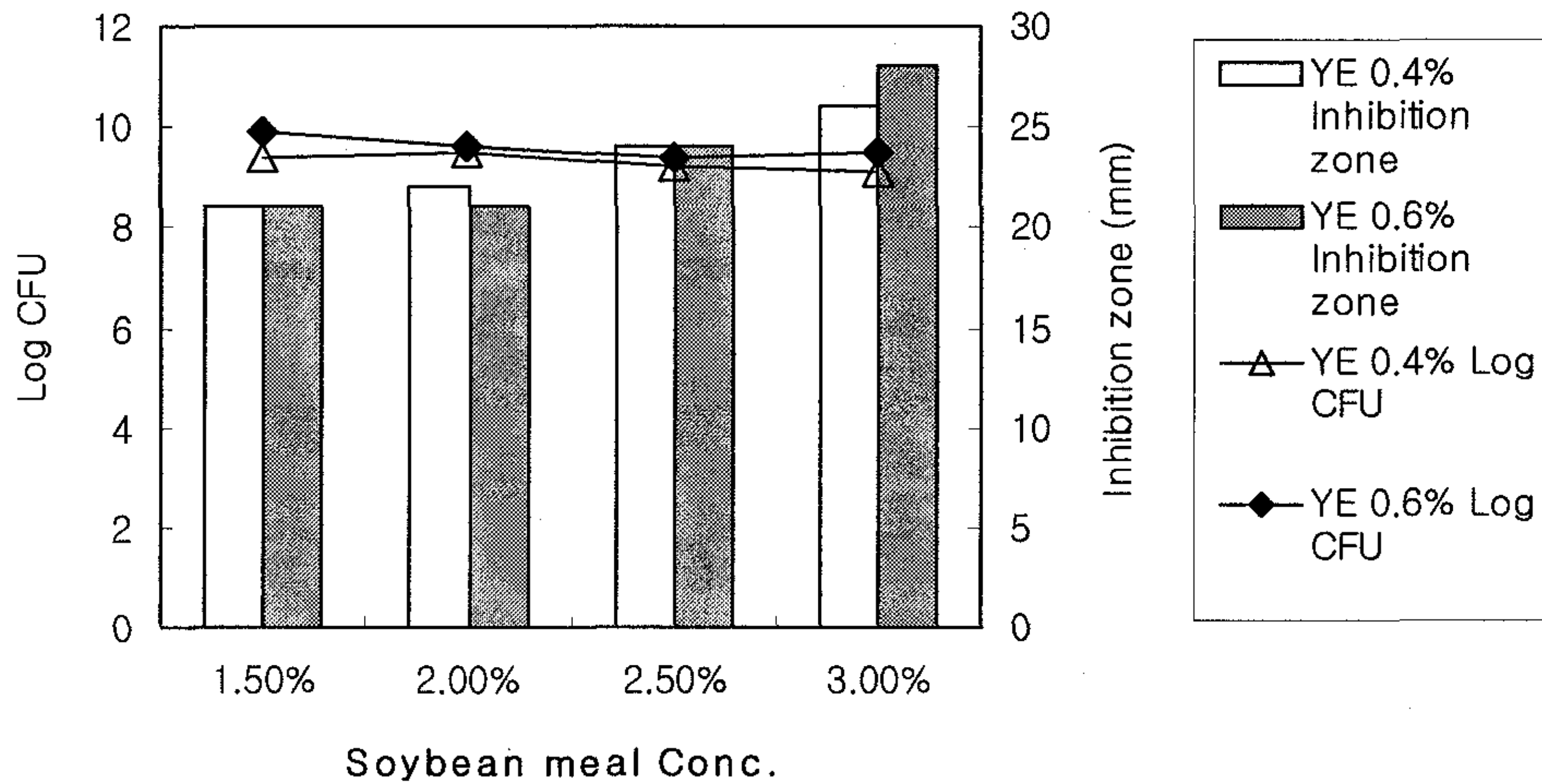


그림 21. 질소원에 따른 *Streptomyces* sp. AG-P의 균밀도와 항곰팡이 효과

2. 공기주입량과 배양 온도에 따른 최적화

가. 공기량에 따른 배양적 특성과 항진균 활성

항진균 물질 생산을 위한 최적 공기량의 규명은 GSS 배지를 기본으로 조사하였다. 공기량에 따른 영향은 각각의 Jar fermenter에 배지양의 1%에 해당하는 균 배양액을 접종한 후, 교반 속도를 100 rpm으로 하고, 온도를 28 °C의 조건으로 배양하면서 공기량 0.2 vvm (volume/volume/minute), 0.5 vvm, 1.0 vvm으로 각각 달리하여 12시간마다 시료를 채취하여 균밀도를 측정하였다.

그 결과 공기량 조건인 0.2 vvm, 0.5 vvm, 1.0 vvm 모두 균밀도와 항곰팡이 효과에서 다른 결과를 나타냈다 (그림 22). 공기량이 0.2 vvm일 경우에는 시간이 지남에 따라 균의 밀도가 오히려 감소했으며 베타열병 성장 억제환이 전혀 관찰되지 않았고, 공기량 0.5 vvm에서 1.0 vvm으로 증가함에 따라 균밀도와 항곰팡이 활성이 시간이 지남에 따라 점차 증가됨을 관찰했다. 이에 따라 공기량에 의해 항곰팡이 활성 물질 생산이 상당히 영향을 받고 있는 것으로 판단했으며, 보다 빠른 시간 내에 항곰팡이 활성 물질을 생산할 수 있는 공기주입량인 1 vvm을 최적 공기주입량으로 결정하였다.

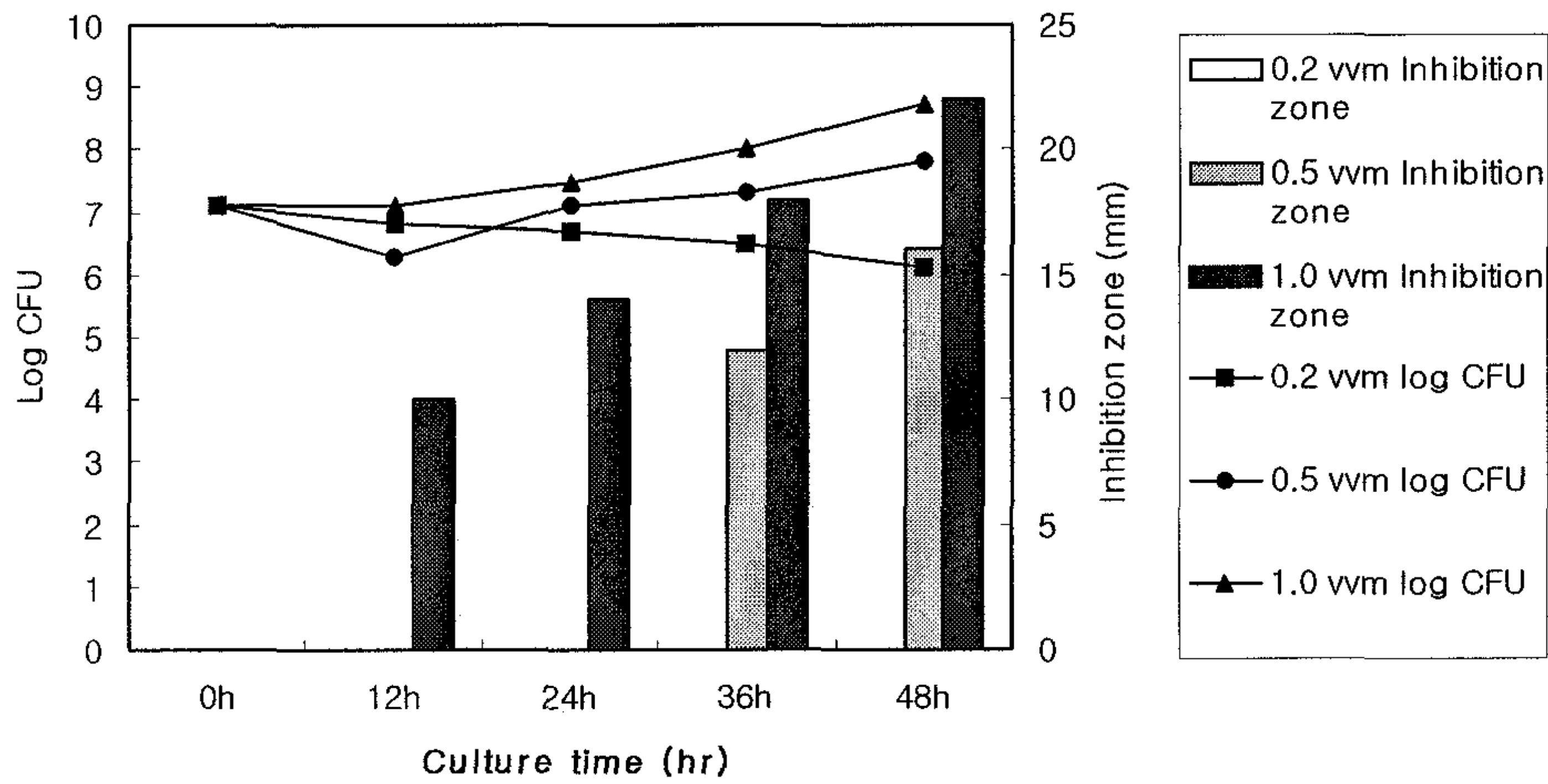


그림 22. 공기량에 따른 *Streptomyces* sp. AG-P 균주의 성장과 항곰팡이 효과

나. 온도에 따른 배양적 특성과 항진균 활성

최적 온도의 규명 역시 바실러스 대량 배양에 사용하는 GSS 배지를 기본으로 하여 조사하였다. 배양온도에 따른 배양적 특성은 각기 다른 온도로 설정된 Jar fermenter에 배지양의 1%에 해당하는 균배양액을 접종한 후, 100 rpm, 1 vvm의 조건으로 배양하면서 26, 28, 30 °C에서 12시간마다 시료를 채취하여 각각의 균 밀도를 조사하여 검토했다.

그 결과, 28°C는 24시간 만에 대수성장기에 접어들었으나 26°C와 30°C는 성장 양상이 저조하게 나타났으며 항곰팡이 활성 물질도 적게 측정되었다. 따라서 대량배양을 위한 온도 조건은 28°C로 최종 결정하였다 (그림 23).

3. scale-up 발효 실험

위 실험을 통해서 선택된 배지 (탄소원, 질소원), 공기량, 배양온도 등을 종합하여 최적 배양 조건을 선정하였다. 대량배양을 위한 배지 조성은 soluble starch 0.5%, glucose 1.5%, yeast extract 0.6%, soybean meal 3.0%, NaCl 0.2%, K₂HPO₄ 0.025%, CaCO₃ 0.2%으로 결정했고 SGYS배지라 명하였다. 또한 기타 배양조건은 기존과 동일한 온도 28°C, 공기량 1 vvm으로 배양하였다. 발효 용량은 350 리터(발효조 용량 500리터)로 5일 동안 배양하면서 1일 마다 시료를 채취하여 균 밀도와 항진균 활성을 측정하였다. 그 결과 350리터 배양은 성공적으로 이루어졌

으며, 균밀도는 2.0×10^9 CFU/ml 로 나타났다 (표 18). 배양과정 중 항곰팡이 효과는 배양시간이 길어짐에 따라 점차적으로 증가됐다 (그림 24, 그림 25). 또한 대량배양 후 벼도열병에 대한 항곰팡이 효과는 26 mm로 기존 배양조건 (22 mm)에서 배양된 경우보다 더 높은 성장억제환을 나타냈다 (표 18). 이러한 전체적인 기존 배양조건과 실험을 통해 변경된 배양조건의 변경 내용 및 항곰팡이 효과를 아래 표 18과 그림 24, 25에 최종 정리하였다.

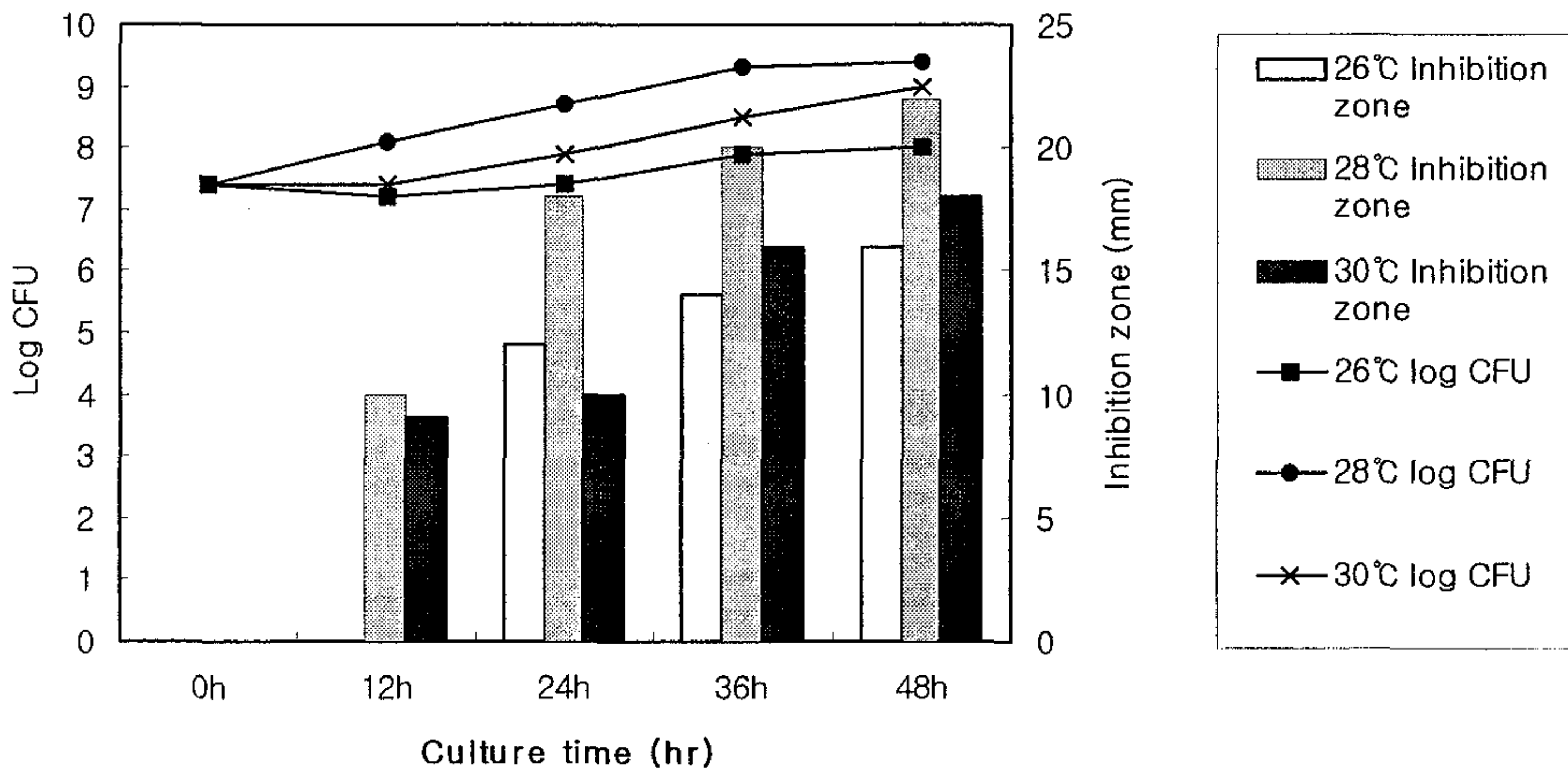


그림 23. 배양온도에 따른 *Streptomyces* sp. AG-P의 성장과 항곰팡이 효과

표 18. 기존 배양조건과 실험을 통해 변경된 배양조건의 비교

구분	기존배지	선발배지
균밀도 (CFU/ml)	1.1×10^9	2.0×10^9
배양온도/공기량	28 °C/1 vvm	28°C/1 vvm
항곰팡이효과 (clear zone, mm)	22	26
배지조성	soluble starch 1.0%, glucose 2.0%, soybean meal 2.5%, yeast extract 0.4%, NaCl 0.2%, K ₂ HPO ₄ 0.025%, CaCO ₃ 0.2%	soluble starch 0.5%, glucose 1.5%, yeast extract 0.6%, soybean meal 3.0%, NaCl 0.2%, K ₂ HPO ₄ 0.025%, CaCO ₃ 0.2%

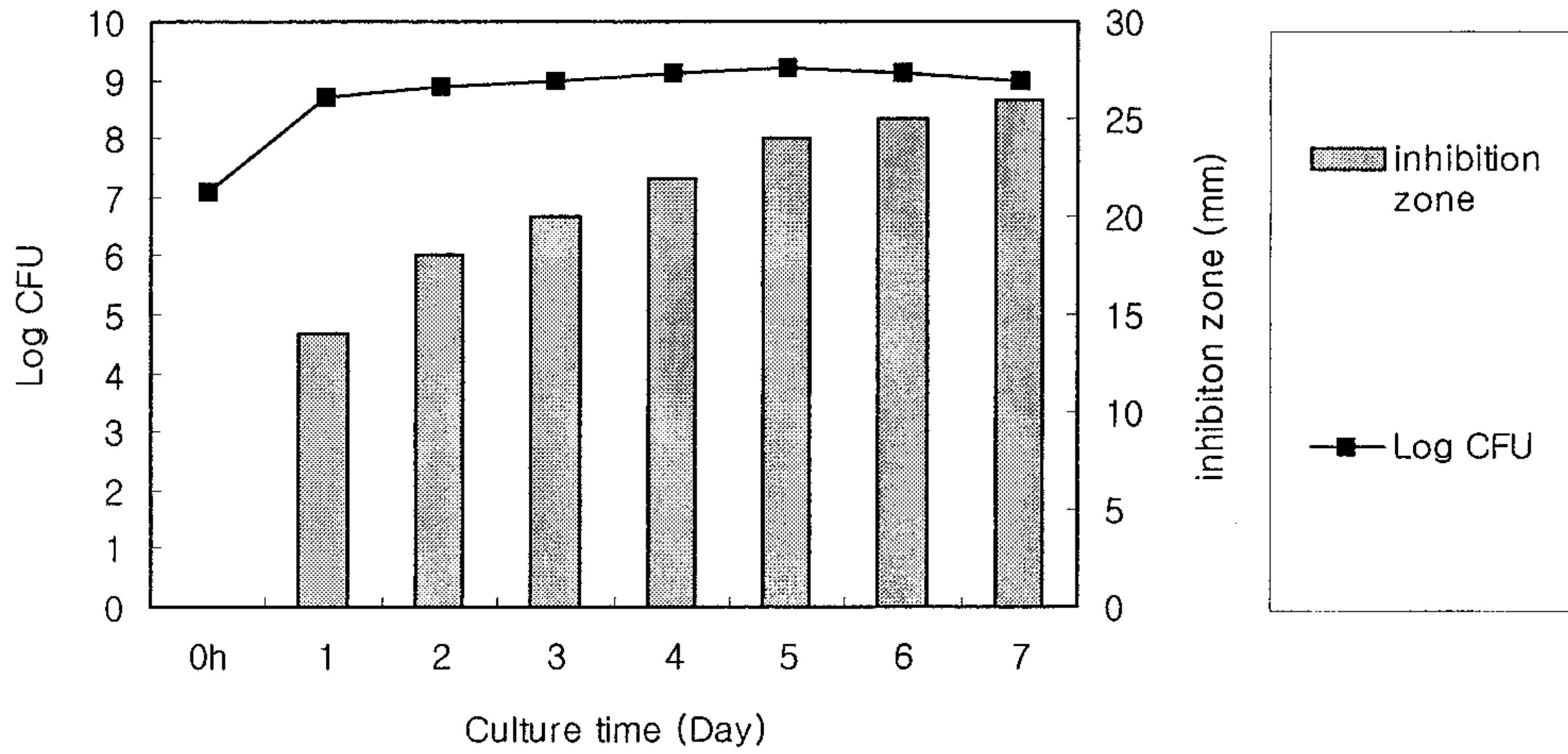
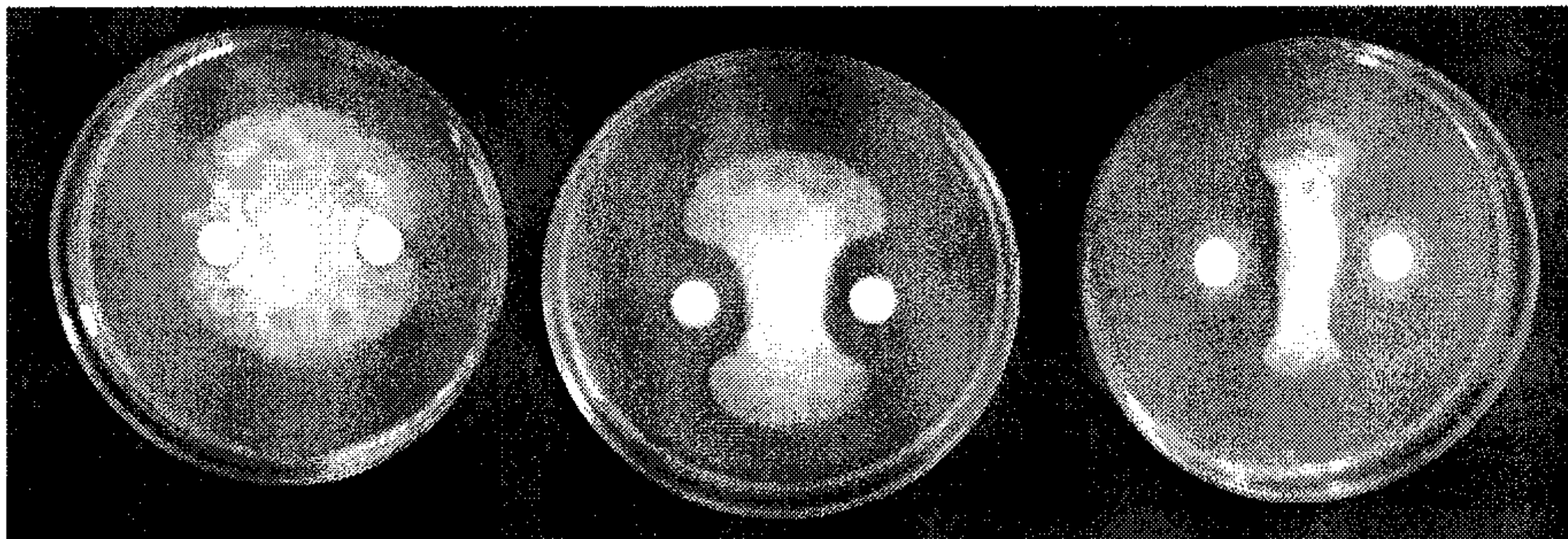


그림 24. *Streptomyces* sp. AG-P의 scale-up에 따른 균밀도와 벼도열병균에 대한 성장억제환



(배양 2일후 상등액) (배양 5일후 상등액) (배양 7일후 상등액)

그림 25. *Streptomyces* AG-P의 배양기간에 따른 배양상등액의 역병균에 대한 항곰팡이 효과

방선균은 균주 특성상 5일 이상 배양을 해야 원하는 항곰팡이 활성물질이 대량으로 나오기에 따라 다른 미생물에 비해 2~3배 가량의 기간을 배양해야하는 단점이 있으며 배양과정 중 세균에 의한 오염 또한 잦다. 따라서 이번 연구에서는 3톤이상의 대용량 보다는 350리터까지 scale-up에 우선 성공을 했으나 후에 보 다많은 용량의 배양연구가 함께 진행되어야 할 것으로 판단했다.

제 12 절 AG-P의 실용화를 위한 제제화 기술 확립

1. 배양액 (원제)의 제제 연구 (특성규명)

scale-up에 의해 배양된 *Streptomyces* sp. AG-P 배양액은 *B. subtilis* JKK238 액상제의 경우와 동일한 방법으로 미생물 농약으로의 제품 등록을 위해 전착효과가 있는 칼륨비누 0.1% 혼합, potassium sorbate 0.3% 혼합, 황산을 혼합 (pH4) 조건에서 54°C에서 보관하는 안정성 실험을 진행했다.

표. 혼합제 종류에 따른 *Streptomyces* sp. AG-P 배양액의 활성 유지

기간	항목	혼합제 종류			
		배양액	칼륨비누	potassium sorbate	pH 4
시작	균밀도 (CFU/ml)	8.4×10^9	5.5×10^9	5.4×10^8	2.1×10^8
	성장억제환 (mm)	24	22	21	22
1주	균밀도 (CFU/ml)	4.4×10^8	3.8×10^8	7.9×10^6	6.8×10^6
	성장억제환 (mm)	18	17	14	15
2주	균밀도 (CFU/ml)	2.1×10^7	2.0×10^7	2.9×10^5	4.6×10^5
	성장억제환 (mm)	15	14	11	8
3주	균밀도 (CFU/ml)	1.4×10^6	7.8×10^5	6.1×10^2	2.1×10^2
	성장억제환 (mm)	13	10	8	0

그 결과 칼륨비누혼합, potassium sorbate, 황산을 혼합한 모든 경우에서 균밀도와 항곰팡이 활성 유지에 큰 차이를 보이는 것을 알 수 있었다 (표 19). potassium sorbate 를 혼합한 경우와 pH4로 유지하여 보관하는 경우는 시간이 지남에 따라 균밀도와 항곰팡이 활성이 떨어지는 것을 확인할 수 있었으며 나머지 조건에서도 균밀도의 변화가 큰 것을 확인할 수 있었으나 다른 조건에 균밀도와 항곰팡이 활성의 유지가 보다 좋은 것으로 나타났다. 따라서 다른 화학물질을 첨가하지 않고 배양액을 그대로 보관하는 것이 더 좋은 것으로 판단했다.

2. 분말제형 연구

항균물질과 균체를 수확하기 위한 건조방식은 분무건조와 동결건조 방식으로 진행하였다. 동결건조는 균배양액을 그대로 진행하였으며, 분무 건조는 white carbon과 dextrin

을 각각 1.0%, 5.0%을 혼합 후 진행하였다.

표 20. 동결건조와 분무건조 조건을 결정하기 위해 사용한 부제의 조성

구 분	동결건조	분무건조
White carbon	0.5%	1.0%
Dextrin	-	5.0%
부제 총량	0.5%	6.0%

얻어진 시료는 각 제형에 따른 항곰팡이 효과를 보기 위하여 획득한 각각의 시료를 1.0 g씩을 취한 후 멸균증류수 9 ml을 가하여 1분간 vortexing 후 0.2 μ m 필터로 여과하였다. 이런 방식을 거쳐 얻어진 추출물은 50 μ l씩 취해 paper disc에 점적한 후 피검균 평판 배지위에 올린 후 25 $^{\circ}$ C에서 2일간 배양한 후 성장 억제환을 조사하였다.

그 결과 동결건조물은 3.0×10^{11} CFU/ml로 분무건조물 1.8×10^2 CFU/ml에 비해 더 높은 균밀도가 측정됐고, 항곰팡이 활성 또한 높았다 (표 21).

표 21. *B. subtilis* 배양액의 건조 조건에 따른 회수율과 벼도열병에 대한 생육저해

구 분	동결건조	분무건조
회수율 (%)	1.1	61.0
균밀도 (CFU/ml)	3.0×10^{11}	1.8×10^2
1/10 희석액의 성장 억제환 (mm)	31	21

동결건조와 분무건조 방식에 의해 제조된 최종 제품에 대해 1kg 기준으로 하여 제품화 비용을 산출하였다 (표 22). 동결건조 조건에 의해 만들어진 제품의 생산비용은 46만원 정도였으며, 분무건조 조건에 의해 만들어진 제품의 생산비용은 2만 2천원 정도였다. 이는 제품화를 시키는 과정에서 들어가는 부제 비용은 큰 차이가 없으나 액상상태의 배양액을 건조시키는 과정에서 큰 비용 차이가 났다. 동결건조는 40만원의 비용이 들며 분무건조는 1만원이 소요됨에 따라 가격 면에서 동결건조는 경제성이 없음을 알 수 있다. 따라서 분말 수화제를 제조하기 위한 건조방식은 분무건조가 더

경제적임을 알 수 있다. 그러나 분무건조 방식에 의해 수확된 분말제제는 균밀도와 항공평이 활성 측면에서 매우 떨어지는 것을 확인할 수 있었으며, 이에 따라 건조방식에 의한 방선균의 분말화는 아직 보다 많은 연구가 필요할 것으로 판단했다.

표 22. 동결건조와 분무건조에 따른 제품 1kg 생산하는데 소요되는 비용
(비용단위 : 원)

시료	배양액 비용	부제 비용	건조 비용	총액
동결건조	56,000	0	400,000	456,000
분무건조	11,400	420	10,000	21,820

제 13 절 *Streptomyces* AG-P의 고추역병에 대한 적용 연구

1. 포트 수준에서의 고추역병에 대한 방제 효과 검정

Streptomyces AG-P 배양액을 이용하여 포트수준에서 고추역병 방제효과를 검정하였다. 처리구는 50배, 100배 희석 처리구와 대조약제, 무처리구로 구분하였다. 포트 실험이었으므로 인위적으로 병원균을 접종하였다. 역병 발병을 위해 애호박에 역병균을 접종한 다음 20℃ 항온기에서 3일 동안 역병균을 증식시켜 유주자낭이 형성된 것을 확인한 다음 병반 부위를 도려내어 믹서기로 분쇄하고, 물에 5배 희석한 다음 포트에 1회 관주(100cc/1주)함으로써 역병 발생을 유도하였다. 실험에 사용한 고추는 처리구별 25주였으며, 모든 약제는 7일 간격으로 2회 관주(200cc/1주)처리 하였다. 최종 약제 처리 7일 후 이병주를 조사하여 방제가를 계산하였다. 수분공급은 1일 1회 실시하여 포트 내 토양의 과습을 유도하였다. 결과 조사는 외관상 시들음 증상을 관찰하여 조사하였으며, 지체부에 병징이 나타난 기주도 이병주에 포함시켰다. 조사 결과 표 23과 같이 *Streptomyces* AG-P 배양액 50배를 처리하였을 때 방제가가 65.5%로 조사되었고, 100배에서는 50배 처리구보다 방제가가 약 10% 낮은 55.2%로 조사되었다. 따라서 미생물농약으로서 가능성이 있는 것으로 판단하였으나, 실험 종료 후 일부 기주에서 감염

확산되는 것이 발견되었다. 이러한 원인은 *Streptomyces* AG-P에 의해 생산된 항생물질의 양과 물질의 안정성이 낮아서 발생한 것으로 판단되며, 따라 향후 산업화 과정에서 제형연구를 통해 포장 수준에서 안정된 약효를 발휘할 수 있는 방안을 지속적으로 연구할 예정이다.

표 23. *Strptomyce* sp. AG-P 희석 농도별 고추역병 방제 효과

희석배수	이병주수	이병주율 (%)	방제가 (%)
50	10	33.3	65.5
100	13	43.3	55.2
Chemical	2	3.3	97
Control	29	96.7	-

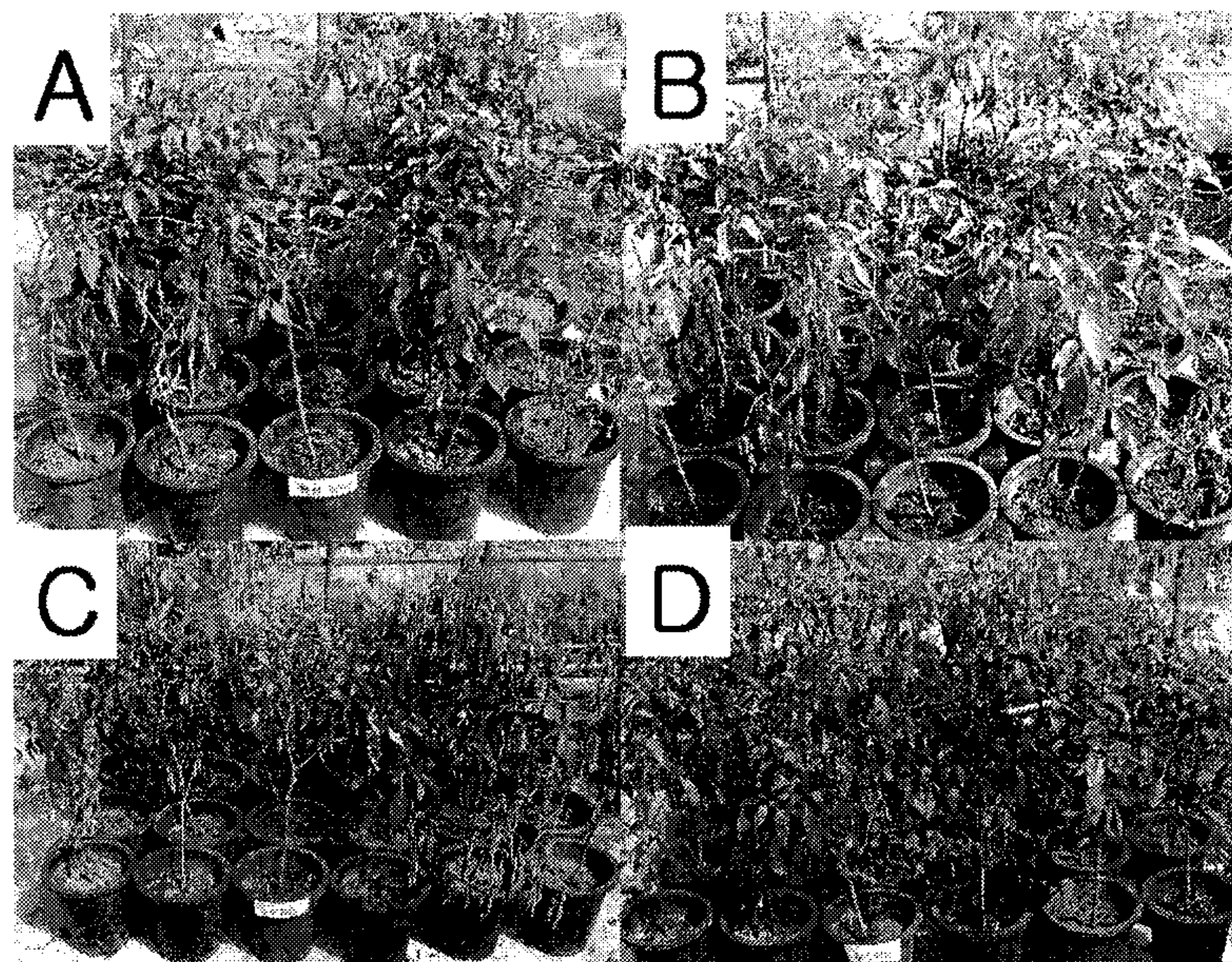


그림 26. 포트 수준에서 *Streptomyces* AG-P 처리에 의한 역병 억제 효과
A: 50배 희석액, B: 100배 희석액, C: control, D: chemical

2. 처리 방법 결정

가. 처리 간격

제 10 절 2항의 결과를 참고하여 *Streptomyces* AG-P 배양액의 처리 농도는 100배로 하고, 처리 간격을 5일, 7일, 10일 간격으로 하여 고추역병 발생양상을 조사하였다. 실험에 사용된 고추는 처리 간격별 50주로 하였다. 그 결과 그림 27에서 보는 바와 같이 처리 간격 처리 간격이 짧을수록 이병주율이 높아지는 경향을 보였다. 5일 간격 처리구와 7일 간격 처리구 그리고 10일 간격 처리구의 이병주 수를 비교해 보면 알 수 있듯이 초기 단계에서는 큰 차이를 보이지 않지만 처리 횟수를 반복할 수 록 감염율에 상이한 차이를 나타냈다. 5일 간격 처리구의 4회 처리 후 17주가 고추역병에 감염되었고, 7일 간격 3회 처리 후 조사에서는 24주가 감염되었으며, 10일 간격 2회 처리 후 조사한 결과에서는 25주가 감염된 것으로 나타났다. 따라서 5일 간격 처리구와 7일, 10일처리 간격에 따른 확연한 감염 차이를 나타냈다. 결과적으로 고추역병을 방제하기 위한 처리 간격은 5일 간격 처리가 가장 적당한 것으로 조사되었다.

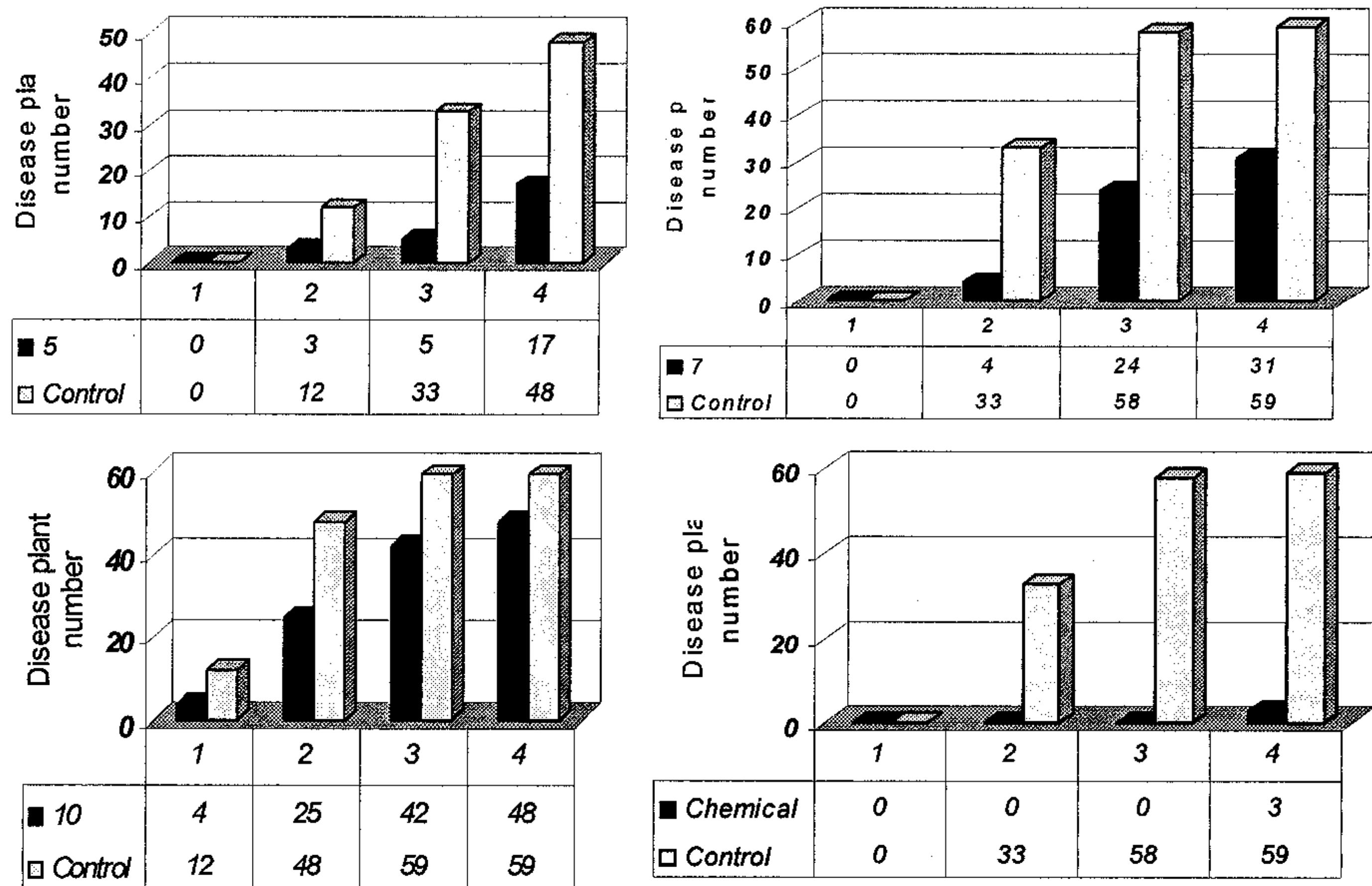


그림 27. 처리 간격에 따른 고추역병 발생 양상

나. 처리 횟수

Streptomyces AG-P 배양액의 처리 횟수에 따른 이병주율의 변화를 파악하여 합리적인 처리 횟수를 결정하고자 실험을 수행하였다. 처리 약제의 희석배수는 10절 2항을 참고하여 100배로 하였으며, 처리 간격은 제 14절 1항의 결과를 바탕으로 하여 5일 간격으로 하였고, 1번 처리한 것부터 4번 처리한 것까지 구분하였으며, 최종 4회 처리 5일 후 모든 처리구의 이병주율을 조사하였다. 각 시험구에 사용된 고추는 50주로 하였다. 포트 내 고추역병 발생을 유도하기 위해 애호박을 이용한 접종원 (제 10 절 2항 참고)을 만들어 약제 처리 12시간 전에 각 포트별로 100cc씩 접종하였다. 시험 결과 그림 28에서 보는 바와 같이 1~2회 처리 후 종료한 처리구에서는 고추역병이 발병율이 지속적으로 증가함으로써 약제 처리에 따른 고추역병 방제 효과가 거의 없는 것으로 나타났다. 그러나 3회 처리 후 종료한 처리구에서는 방제 효과가 약 36% 정도로 조사되었으며, 4회 처리구에서는 63%의 방제효과가 나타났다. 이러한 결과로 볼 때 약제 처리는 최소 3회 이상 실시해야 할 것으로 판단된다. 본 실험에서는 고추역병을 인위적으로 접종하고, *Streptomyces* AG-P 배양액을 처리하였으나, 포장에서는 예방차원으로 접근하여 병 발생 이전 즉, 장마 직전부터 포기 사이에 관주를 한다면 예방적 효과를 얻을 수 있을 것으로 판단하며, 향후 포트 수준에서 예방적 차원에서 보다 정밀한 검토를 수행할 예정이다.

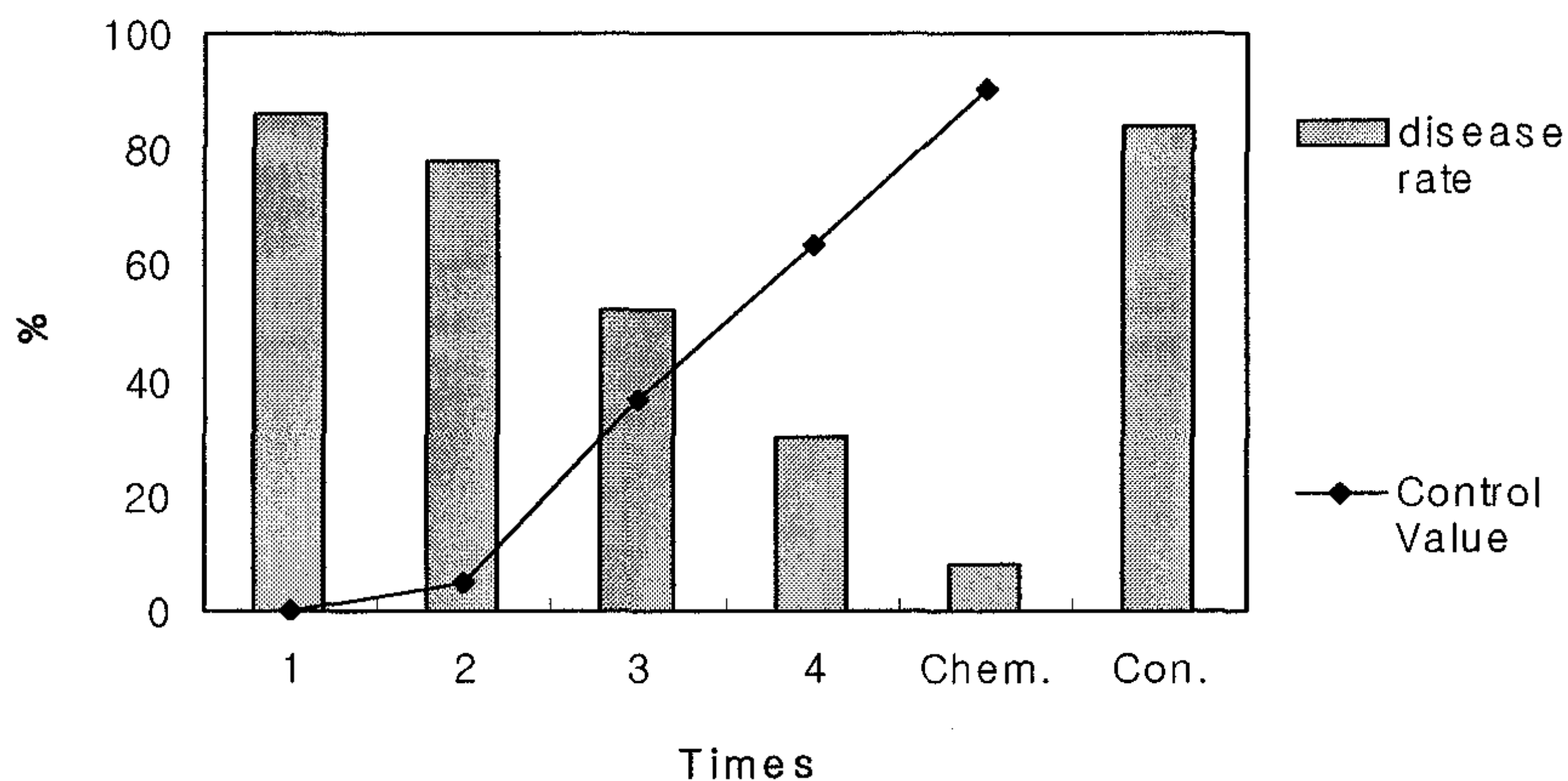


그림 28. *Streptomyces* AG-P 처리 횟수에 따른 이병주율의 변화

제 14절 *Streptomyces* AG-P의 활용성 다각화 연구

Streptomyces AG-P는 앞서 언급한 바와 같이 난균류에 대한 길항효과가 우수하고, 기타 식물병원균에 대해서도 우수한 항균활성을 나타내는 것으로 보고되어 있기 때문에 적용확대를 위해 육묘 중인 모판에 처리함으로써 모입고병 (*Pythium* sp.)에 대한 방제효과를 확인하였다. 입고병 발생을 유도하기 위해 화학살균제가 첨가되지 않은 상토를 사용하였으며, 범씨 과종 후 과습 조건을 유지하였다. 범씨 과종 후 발아하여 녹화기를 거친 다음 약제 처리를 시작하였다. 희석 배수는 고추 포트 시험과 동일한 방법으로 하였으며, 약제 처리는 3일 간격 4회 실시하였고, 1일 1회 충분히 관주하여 과습을 유도하였다. 결과 조사는 최종 약제처리 3일 후 실시하였다. 시험 결과 입고병 발생은 녹화기 이후 7일 경과하면서부터 나타나기 시작하였으며, 대체로 원형 병반을 하였다. 실험 종료 약 10일이 경과하면서부터 잎이 고사되는 증상이 나타났다. 표에서 보는 바와 같이 50배 희석 처리구에서는 입고병 방제 효과가 72.5%로 우수하였으며, 100배 희석 처리구도 62%의 방제효과를 나타냈다 (표 24, 그림 29). 따라서 본 실험을 바탕으로 농약이 첨가되지 않는 친환경상토를 이용한 육묘에 있어 입고병 예방용으로 *Streptomyces* AG-P의 적용이 가능할 것으로 판단된다. 따라서 향후 육묘기 발생하기 쉬운 여러 가지 작물의 모잘록병 방제 관련 연구를 시도할 예정이며, 그림 30에서 보는 바와 같이 고추탄저병, 잿빛곰팡이병에도 길항력을 나타내는 바 이에 대한 *in vivo* 상에서의 기초연구를 통해 *Streptomyces* AG-P의 적용 범위를 보다 넓혀나갈 예정이다.

표 24. 모입고병에 대한 AG-P 배양액의 방제 효과

	처리			
	50배 희석	100배 희석	Conotrol	Chemical
발병도 (%)	11	15	40	0
방제가 (%)	72.5	62	-	100

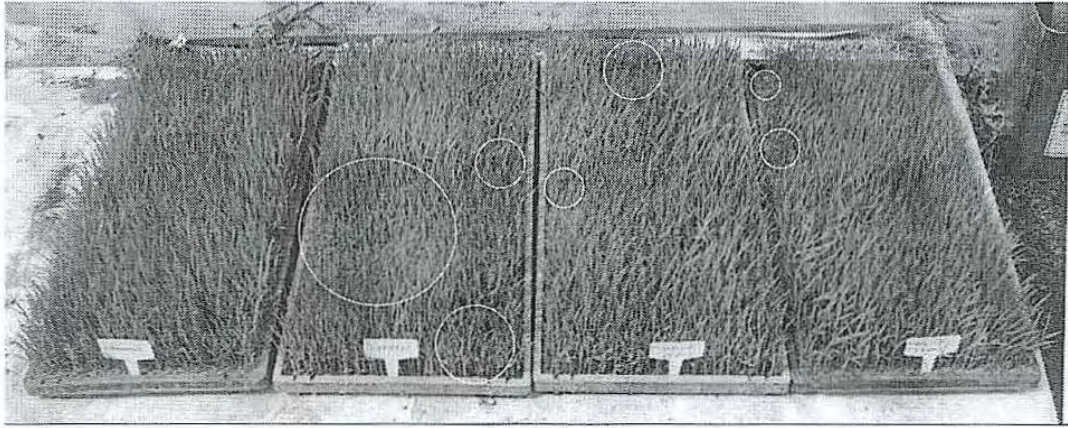


그림 29. *Streptomyces* sp. AG-P 관주처리에 의한 입고병 방제 효과

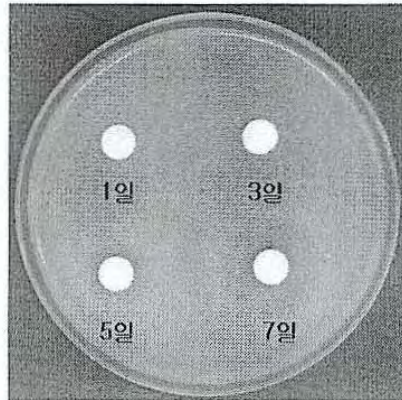


그림 30. *Streptomyces* sp. AG-P 의 배양기간에 따른 고추탄저병균 (*C. gloeosporioides*) 에 대한 항곰팡이 효과



무처리



배양액 10배 희석액 처리

그림 31. 고추 탄저병에 효과를 보이는 *Streptomyces* sp. AG-P

제 15절 방선균제제의 약효 및 약해 포장시험 수행

본 과제를 통해 개발된 두 미생물제제를 이용하여 포장에서 고추역병 방제효과를 검정하였다. 시험 포장은 고추역병이 상습적으로 발생했던 포장으로 피산균 불정면에 위치하였다. 약제는 *Streptomyces* AG-P 배양액 *B. subtilis* JKK238 배양액 그리고 두 가지를 1 : 1 혼용한 합제와 Chemical(디메소모르프 · 염기성 염화동수화제 50% 1000배)을 대조로하였다. 시험은 난피법 5처리 3반복으로 하였으며, 미생물농약 품목등록 규정에 준하여 시험을 수행하였다. 미생물제제의 경우 희석배수를 100배로 하여 포기사이에 관주를 하였다. 원활한 관주를 위해 노즐을 제거하고 포기사이의 비닐을 뚫어가면서 1회에 200cc 정도 방출되도록 조절하면서 관주 처리하였고, 대조약제는 엽면 살포하였다. 모든 5일 간격 4회 처리하였으며, 최종 약제 처리 5일 후 이병주를 조사하여 방제가를 산출하였다. 시험결과 표 25에서 보는 바와 같이 포트 수준 결과 유사한 방제효과를 보였다. 포트 수준에서 60% 이상의 방제효과를 보였던 *Streptomyces* AG-P는 그보다 조금 못 미치는 59% 정도의 방제효과를 나타냈으며, 딸기흰가루병 약제로 개발한 *B. subtilis* JKK238는 방제효과가 46%로 낮은 편이었다. 그러나 두 미생물 합제 처리구에서 68.7% 방제효과를 나타내어 혼합 살포로 상승효과가 있음을 보여주었다. 따라서 본 연구결과를 바탕으로 향후 미생물 합제에 대한 식물병의 적용범위 탐색과 아울러 미생물 농약으로 개발하기 위한 안정화된 제형 연구를 지속적으로 수행할 예정이다. 또한 미생물제제를 활용한 고추역병 방제에 있어 노지 상태에서의 접근 방법 즉, 약제 처리 시기와 기상 조건을 감안한 처리 방법 및 살포 농도 등을 보다 다양한 방향에서 접근함으로써 친환경적인 고추역병 방제법을 지속적으로 연구할 예정이다.

표 25. 고추역병에 대한 길항미생물의 방제 효과 시험

처리	이병주율 (%)				유의차	방제가 (%)
	I	II	III	평균		
<i>Streptomyces</i> AG-P	2	18	8	9.3	ab ^z	44.1
<i>B. subtilis</i> JKK238	6	18	10	11.3	b	32.1
AG-P + JKK238	2	4	14	6.7	ab	60.1
Chemical	0	2	0	0.7	a	96.0
Control	8	18	24	16.7	c	

^zMean separation within columns Duncan's multiple test, 5% level

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연구개발 목표

딸기흰가루병균과 고추역병균에 항균활성을 나타내는 바실러스 서브틸리스와 방선균 스트렙토마이세스를 이용하여 포트 및 소포장 수준에서 효과를 검정하고, 산업용 배지를 선발하는 한편 항균물질이 생산 최적화와 제형연구를 통해 포장에서 효과를 검정하고, 길항미생물 제제의 원제 및 제품의 안정성 평가를 실시하여 미생물농약을 개발 및 등록한다.

바실러스 서브틸리스와 방선균 균주의 특징과 효과검정을 위한 스크리닝

고추역병에 길항력을 보이는 방선균 *Streptomyces* sp. AG-P와 딸기흰가루병에 효과를 보이는 *B. subtilis* JKK238균주의 항균활성을 알아보기 위해 기내 plate 수준과 온실상의 포트 및 포장 수준에서 엽권 정착력과 병원균 방제효과를 검정하며, 이를 보다 개선하여 환경친화적 방제제를 개발한다.

길항미생물의 배양 조건 및 대량배양과 미생물농약의 실용화를 위한 제제화 기술 확립

대량배양 조건을 확립하기 위해 미생물의 주 영양원인 탄소원과 질소원 등을 산업적으로 대체 가능한 물질로 전환하며 온도, 공기 주입량 등을 검토한다. 또한 미생물농약으로 개발하기 위해서 방선균과 바실러스 균주에 적합한 제제화 기술을 검토한다.

미생물제품 활용다각화 연구와 포장에서 미생물 제품의 효과 검정

길항미생물을 산업적으로 대량 배양하여 작물에 직접 적용할 수 있는 제제로 만드는 한편, 딸기흰가루병과 고추역병에 대한 포장 수준에서 방제효과 검정실험을 실시하여 미생물농약품목등록 자료로 활용한다. 또한 활용성 다각화를 위해 여러 작물의 식물병에 적용하고, 또한 벼 육묘기에 처리하여 작물의 생육 전반에 걸쳐 적용여부를 검토한다.

미생물 원제 및 제품의 안정성 평가

바실러스 서브틸리스와 방선균 원제 및 제품의 포유동물에 대한 독성시험과 생태계 생물에 대한 영향시험을 통해 안전성을 확보하는 한편 미생물농약 품목 등록을 위한 자료로 활용한다.

<연차별 연구개발목표와 내용>

연구개발목표	연구개발 내용 및 범위	달성도
<p>바실러스 서브틸리스 균주의 효과검정을 위한 스크리닝</p>	<p>○ 길항미생물의 특징과 효과 검정</p> <ul style="list-style-type: none"> - 전자현미경 수준에서의 관찰 - 주요 작물병에 대한 역가 검정 - 길항미생물의 엽권 정착력 확인 - 소포장 수준에서의 약효 검정 	<p>100</p>
<p>바실러스 서브틸리스 원제의 안전성 평가</p>	<p>○ 미생물농약 원제의 포유동물에 대한 독성시험</p> <ul style="list-style-type: none"> - 급성경구독성(병원성)시험 - 급성경피독성시험 - 급성호흡기투여독성(병원성)시험 - 급성정맥내독성(병원성)시험 - 변이원성시험 <p>○ 생태계 생물에 대한 영향시험</p> <ul style="list-style-type: none"> - 담수어에 대한 영향시험 - 담수무척추동물에 대한 영향시험 - 조류에 대한 영향시험 - 꿀벌에 대한 영향시험 - 토양미생물에 대한 영향시험 	<p>100 100</p>

연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위	달성도
미생물농약의 실용화를 위한 제제화 기술 확립	<ul style="list-style-type: none"> ○ 배양조건과 영양원에 따른 균밀도 변화와 항균 활성 <ul style="list-style-type: none"> - 탄소원, 질소원에 따른 균밀도와 항균활성 - 온도, 공기 주입량, 배양기간에 따른 밀도와 항균활성 ○ 제형화 기술개발과 제제화 <ul style="list-style-type: none"> - 최적 제형 개발 - 선발 제형의 균주의 밀도 안정성과 항균 활성 	<p style="text-align: center;">100</p> <p style="text-align: center;">100</p>
길항미생물의 대량배양 기술 확립	<ul style="list-style-type: none"> ○ 미생물 균주의 배지 선발 연구 ○ 미생물 균주의 대량 배양조건 연구 	<p style="text-align: center;">100</p> <p style="text-align: center;">100</p>
방선균 원제의 안전성 평가	<ul style="list-style-type: none"> ○ 미생물농약 원제의 포유동물에 대한 독성시험 <ul style="list-style-type: none"> - 급성경구독성(병원성)시험 - 급성경피독성시험 - 급성호흡기투여독성(병원성)시험 - 급성정맥내독성(병원성)시험 ○ 생태계 생물에 대한 영향시험 <ul style="list-style-type: none"> - 담수어에 대한 영향시험 - 담수무척추동물에 대한 영향시험 - 조류에 대한 영향시험 - 꿀벌에 대한 영향시험 - 토양미생물에 대한 영향시험 	<p style="text-align: center;">50</p> <p style="text-align: center;">50</p>

연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위	달성도
미생물 제품의 약효, 약해 포장 시험 수행	<ul style="list-style-type: none"> ○ 딸기 흰가루병 방제에 대한 포장시험 ○ 고추 역병 방제에 대한 포장시험 	<p style="text-align: center;">100</p> <p style="text-align: center;">100</p>
미생물제품 활용다각화 연구	<ul style="list-style-type: none"> ○ 식물병에 대한 기내 항균활성 검정 <ul style="list-style-type: none"> - 고추탄저병, 딸기잰빛곰팡이병 ○ 입고병방제제로서의 활용방안 연구 <ul style="list-style-type: none"> - 육묘기 모입고병 방제 효과 시험 ○ 포장에서 방제효과 시험 <ul style="list-style-type: none"> - 오이흰가루병 방제 효과 시험 	<p style="text-align: center;">100</p> <p style="text-align: center;">100</p> <p style="text-align: center;">100</p>
바실러스 서브틸러스 제품의 안전성 평가	<ul style="list-style-type: none"> ○ 미생물농약 제품의 포유동물에 대한 독성시험 <ul style="list-style-type: none"> - 급성경구독성(병원성)시험 - 급성경피독성시험 - 피부자극성시험 - 안점막자극성시험 - 피부감작성시험 ○ 생태계 생물에 대한 영향시험 <ul style="list-style-type: none"> - 담수어에 대한 영향시험 	<p style="text-align: center;">100</p> <p style="text-align: center;">100</p>
방선균 제품의 안전성 평가	<ul style="list-style-type: none"> ○ 미생물농약 제품의 포유동물에 대한 독성시험 <ul style="list-style-type: none"> - 급성경구독성(병원성)시험 - 급성경피독성시험 - 피부자극성시험 - 안점막자극성시험 - 피부감작성시험 ○ 생태계 생물에 대한 영향시험 <ul style="list-style-type: none"> - 담수어에 대한 영향시험 	<p style="text-align: center;">0</p> <p style="text-align: center;">0</p>

동절기 고소득 작물로 손꼽히는 딸기는 대개 4~5월경 영양변식체가 발생하며, 이를 유인하여 육묘를 실시한다. 대개 9월 중하순경 정식하게 되는데 주로 하우스에서 육묘 및 재배가 이루어지기 때문에 여름철 고온기에 묘의 잎과 줄기에 흰가루가 발생하여 생육을 저해하며, 개화기 이후 대개는 2월에서 3월경이 되면 과표면에 흰가루병이 발생하여 상품성을 떨어뜨린다. 지금까지 딸기흰가루병에 대한 환경친화적 방제법이나 제제 등이 개발되지 않아 다수의 친환경딸기 재배 농가에서는 흰가루병 방제에 많은 시간과 노력을 투자하면서도 뚜렷한 방법을 찾지 못하는 어려움을 겪어왔다. 이러한 이유로 (주)흙살림에서는 2000년도 초반부터 딸기흰가루병 방제를 위한 다양한 시도를 수행해왔으며, 2006년 3월 본 과제를 통해 그동안의 연구 성과가 바실러스 서브틸리스를 이용한 딸기흰가루병 방제용 미생물농약 등록으로 이어지게 되었다. 딸기흰가루병방제 미생물농약인 “잎살림”은 등록 이후 현재까지 20여 톤 이상이 생산되어 회원농가를 비롯한 친환경농업 실천 농가에 시험 공급됨으로써 현장에서 그 효과를 확인하고 있으며, 오이흰가루병을 비롯한 토마토, 호박 등의 흰가루병에 대해서도 농가 현장에서도 방제 효과를 인정받고 있는 상황이다. 따라서 당초의 연구 계획을 아주 성공적으로 완수한 것으로 생각된다. 그러나 바실러스 서브틸리스와 동시에 연구를 수행 하였던 방선균은 현재 원제 독성만을 완료한 상황이며, 제품에 대한 독성 시험을 수행하지 못한 상황이다. 그 이유는 본 연구 수행과정에서 밝힌 바와 같이 액상 제형을 최종적으로 선발하였으나, 방선균 균주 특성상 균체가 다량으로 형성되어 상온에 장기 노출될 경우 케익 상태의 균체 덩어리가 형성되는 결함이 현장에서 발견됨에 따라 제품화를 보류하고 있는 실정이며, 다만 배양액을 신선한 상태로 유지하면서 배양 직후 빠른 사용이 이루어 진다면 농가 공급이 가능하지만 현실적으로 상온에서 장기간 보관할 경우 안정성이 낮아질 우려가 있기 때문에 향후 포자 형성조건을 연구하여 분말화하거나, 액체배양 후 균체를 제거하고 항생물질만을 수확하고, 분말화공정을 거친 바실러스 서브틸리스와 합제를 만드는 공정을 연구할 계획이다. 현재로써는 이러한 연구를 수행하기위해 다양한 장비와 시설 투자가 요구되는바 보다 경제성을 확보하여 저비용으로 미생물농약을 개발 생산하고자 한다. 현재 등록된 미생물농약 잎살림은 (사)작물보호협회에 벼잎도열병에 대한 적용확대시험을 신청한 상황이며, 앞으로도 다양한 식물병에 대해 적용함으로써 그 적용범위를 보다 높이고자 한다.

2. 관련분야 기여도

- 가. 보유 미생물의 배양 배양 조건 확립과 선발된 산업용 배지는 향후 선발·응용될 유용미생물의 대량 배양에 이용성이 크다.
- 나. 미생물을 이용한 제형화 기술 경험은 미생물농약의 제형 개발에 있어 기초자료로써 활용성이 크다.
- 다. 생물적 방제에 대한 국내 연구 수준을 격상시킬 수 있는 기초 자료로써 이용성이 크다.
- 라. 친환경농산물 재배에 있어 생산성 향상과 농가 소득 증대에 기여도가 클 것으로 기대된다.
- 마. 합성제제의 대체효과로 인한 환경오염을 감소시킬 수 있다.
- 바. 국내 미생물 농약 원제 확보를 함에 따라 해외 원제 도입에 따른 외화유출 줄일 수 있다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 산업화 추진방안

본 연구에서 개발한 딸기 흰가루병 방제 미생물 농약 (*Bacillus subtilis* JKK238 액상제)은 2006년 3월 최종 등록 완료 했으며 현재 “잎살림”이라는 상품명으로 판매되고 있다. 미생물 농약 “잎살림”은 벼도열병 방제제로의 확대적용을 위해 2006년 12월 약효·약해 실험을 신청하여 2009년 하반기 등록을 목표로 하고 있다. 이미 기존 포장실험에서 벼도열병에 대한 효과검증이 이루어졌으므로 추가적용으로 무리가 없을 것으로 생각한다. 고추역병 방제제로 개발진행한 *Streptomyces* sp. AG-P는 현재 독성실험에서 안전한 것으로 결과가 나왔다. 본 균주는 독성실험, 약효·약해 실험을 기본으로 2007년 3월부터 시행한 친환경 유기농자재 목록공시에 등록에 무리가 없을 것으로 판단되며 후에 제형에 대한 보다 많은 연구를 바탕으로 미생물 농약으로 등록을 추진할 예정이다.

2. 타 연구에의 응용

본 연구를 통해, 각종 병원균주들에 대한 길항력 실험, 약효·약해 실험, 균주의 산업화를 위한 배양조건, 제제화에 대한 많은 기술을 확보하였다. 따라서 아직까지 우리나라에서 부족한 미생물의 산업화에 대한 기술력을 확보하였으며 이를 바탕으로 보다 활성이 뛰어난 균주를 스크리닝하고 활성을 검증하여 길항미생물제로의 개발을 시도한다.

3. 추가연구의 필요성

미생물 농약으로 개발된 *Bacillus subtilis* JKK238 제제의 제형은 액상제로서 배양원액과 동일한 제품이다. 본 과제에서 다른 부형제 첨가에 따른 제형 변화를 시도하였으나 균밀도와 항공팡이 활성을 함께 유지하는 방법을 쉽게 찾을 수 없었다. 액상의 형태로 만들어진 미생물제제는 보관이나 유통중에 오염, 활성저하 등의 문제가 발생할 수 있는 단점이 있다. 따라서 균밀도와 항공팡이 활성을 유지하면서 유통, 사용 상에 문제점을 최소화할 수 있는 제형화 방법을 찾아야 할 것으로 보인다.

방선균인 *Streptomyces* sp. AG-P 균주는 원하는 항공 물질을 얻기 위해서 오

랜기간 배양을 해야하는 것이 단점으로 나타났다. 또한 균주가 포자를 형성하여 보관도를 높일 수 있는 방법을 찾는 것이 중요한 문제로 나타났다. 외국에서는 방선균 제제의 이런 한계점 때문에 동결건조 방식에 의한 분말제형을 만들었으며 보관온도 8℃이하, 유통기간 12개월로 설정하고 있다. 이에 따라 (주)흙살림에서는 본 과제에서 동결건조 방식에 의한 제형화에서 문제가 되었던 비용을 낮추는 것이 본 방선균을 미생물 농약으로 등록하고 산업화 하는 요점이라 생각한다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

최근 생물농약으로 많이 개발되고 있는 *Bacillus subtilis* 균주는 GRAS (Generally Recognized As Safe)에 포함되어 있을 정도로 사람이나 동물에게 해가 없는 것으로 보고되었으며, 동물 실험 결과 1.0×10^8 CFU/rat 을 처리하여도 독성이나 병원성을 나타내지 않음을 보고하였다 (Copping, 1998). 이러한 *Bacillus subtilis*를 생물농약으로 이용하고자하는 연구는 최근 활발하게 진행되고 있으며, 미국에서 1994년 Kodiak이라는 상품명으로 목화과 땅콩의 종자 및 밭고랑 처리제로서 개발된 이후 Quantum 4000, System 3, Rotor 등이 종자 처리제로 개발되었다. 또한, 2001년에는 *B. subtilis*와 *B. amyloliquefaciens*를 섞어 BioYield라는 미생물 살균제를 출시하였다. 중국에서는 *Bacillus*속의 많은 균들을 수확량 증진을 위한 세균이라 하여 널리 사용하고 있으며, 독일 Bayer사에서는 *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens* strain FZB 24균을 이용한 토양전염병 방제제를 개발한 바 있다 (Copping, 1998).

방선균인 *Streptomyces*는 현재 두개의 균주가 biopesticide로 등록이 되어있다. 핀란드의 Helsinki 대학교 식물병리학연구실에서 분리한 *Streptomyces griseoviridis* K61과 미국에서 아마인 (linseed, 식물)의 뿌리에서 분리된 *Streptomyces lydicus* WYEC 108이 있다 (Copping, 1998). 이들은 모두 동결건조방식에 의해 상품화 되었고 만들어진 제제는 보관온도 8°C이하, 유통기간 12달로 설정되어있다. *Streptomyces griseoviridis* K61는 현재 Mycostop이라는 상품명으로 균밀도는 1×10^8 CFU/g로서 *Alternaria* spp., *Pythium* spp., *Phomopsis* spp. 등과 같은 토양매개병에 사용하는 제품으로 판매되고 있다. 이 제품은 동물들에게 전혀 해가 없는 것으로 독성실험 결과가 나왔으며 랫드에 대한 LD₅₀ 값은 2g/kg 이상까지 영향이 없는 것으로 보고했다. *Streptomyces lydicus* WYEC 108은 Actinovate, Actinovate Plus/M, Actino-Iron 이라는 상품명등으로 *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Phytophthora*, *Phytophthora*, *Phytophthora*, *Phytophthora*, *Phytophthora*, *Phytophthora* 등과 같은 토양매개질병 등에 사용하는 제품으로 판매되고 있다. 이 균주 또한 사람에게 독성이나 병원성이 보고되지 않은 균주로 랫드에 경구투여 5.05g/kg 이상까지 영향이 없고, 토양미생물과 환경에 영향을 미치지 않는 것으로 보고했다.

제 7 장 참고문헌

강상모, 이병옥, 이철수. 1994. *Bacillus subtilis* KL-57로부터 생산되는 생체계면활성제 합성 유전자 클로닝. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 22. 593~598.

김수인, 장지윤, 김인철, 장해춘. 2001. *Bacillus subtilis* cx1이 생산하는 박테리오신의 특성. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 29. 50~55.

김창진의 6인. 1996. 신물질 탐색. pp11~101. 자유아카데미.

나우현. 2001. 다수확 딸기재배. pp28~121. 오성출판사.

문병주, 정후섭, 박현철. 1995. 딸기 시들음병균에 대한 *Trichoderma*속 균의 길항작용에 관한 연구 V. 중복지생균 *Trichoderma hazianum*에 대한 딸기 시들음병의 생물적 방제. 한국식물병리학회지. 11. 298~303.

문병주, 노성환, 조종택. 1990. 길항세균 *Pseudomonas gladioli*를 이용한 딸기 시들음병의 생물적 방제. 한국식물병리학회지. 6. 461~466.

문병주, 김철승, 송주희, 김현주, 이재필, 박현철, 신동범. 2002. 들깨 잣빛곰팡이병의 생물학적 방제 II. 미생물 제조 및 그 방제효과. 식물병연구. 8. 184~188.

박성민, 한선희, 유대식. 2005. 작물병원성 곰팡이에 대한 *Bacillus licheniformis* KMU-3의 항진균활성과 배양조건. Kor. J. Microbiol. Biotechnol. 33. 112~116.

신동범, 小林紀彦, 이준탁. 1994. 길항미생물에 의한 시설재배 딸기 눈마름병의 생물학적 방제. 한국식물병리학회지. 19(4) : 112~118.

이남영, 권은미, 김진철, 유승현. 2004. *Ulocladium atrum*을 이용한 백합 잎마름병 및 오이 잣빛곰팡이병의 생물학적 방제. Res. Plant Dis. 10. 319~323.

이상엽, 류재당, 김홍기. 2005. 중복지생균 *Ampelomyces quisqualis* 94013의 배양적 특성. Res. Plant. Dis. 11. 173~178.

이상엽, 류재당, 김홍기. 2005. *Ampelomyces quisqualis* 94013의 오이 흰가루병

- 균 기생에 영향을 미치는 환경조건과 기주범위. Res. Plant. Dis. 11. 167~172.
- 정영호, 김장억, 김정한, 이영득, 임치환, 허장현. 2000. 최신농약학. Σ시그마 프레스. pp570.
- 지형진, 조원대, 김충희. 2000. 한국의 식물역병. pp 41~226. 농촌진흥청 농업과학기술원.
- 황병국, 김은수. 1992. 비병원성 *Phytophthora capsici* 균주에 의한 고추역병의 억제. 한국식물병리학회지. 8, 1-7.
- Arbige, N. V., B. A. Bulhuis, J. Schultz, and D. Crabb. 1993. Fermentation of *Bacillus*. pp 871~895. In Sonenshein, A. L., Hoch, J. A., and Losick, R.(ed.). In *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology and molecular genetics. American Society for Microbiology.
- Bowers, J. H., and Mitchell, D. J. 1991. Relationship between inoculum level of *Phytophthora capsici* and mortality of pepper. Phytopathology. 81. 178~184.
- Bowers, J. H., and Park, J. L. 1993. Epidemiology of Pythium damping-off and Aphanomyces root rot of peas after seed treatment with bacterial agents for biological control. Phytopathology. 83. 1466~1473.
- Callan, N. W., Mathre, D. E., and Miller, J. B. 1990. Bio-priming seed treatment for biological control of *Pythium ultimum* pre-emergence damping-off in sh-2 sweet corn. Plant Disease . 74. 368~372.
- Chao, W. L., Nelson, E. B., Harman, G. E., and Hoch, H. C. 1986. Colonization of the rhizosphere by biological control agents applied to seeds. Phytopathology. 76. 60~65.
- Ham, J. H., Hwang, B. K., Y. J., and Kim, C. H. 1991. Differential sensitivity to metalaxyl of isolates of *Phytophthora capsici* from different geographic areas. Korea J. Plant Pathol. 7. 212~220.
- Hang, S. T. T., Oh, S. O. Kim G. H. Hur, J. S., and Y. J. Koh. 2005. *Bacillus*

subtilis S1-0210 as a biocontrol agent against *Botrytis cinerea* in Strawberries. Plant Pathol. J. 21. 59~63.

Hong, S. S., Nam, K. W. and Kim, C. H. 1991. Performance of antagonist's peat formulation to Phytophthora blight of redpepper in field. Korean J. Plant Pathol. 7. 147~152.

Hong, S. S., Park, K. S., Kim, C. H. and Lee E. J. 1990. Granule formulation of *Pseudomonas cepacia* Antigonistic to *Phytophthora capsici* and its Viability on Red-pepper. Korean J. Plant Pathol. 6. 434~439.

Hur, J. M., Lee, Y. S., Kim, B. S. and Cho, C. H. 1990. Evaluation and Inheritance of Resistance to Phytophthora blight in pepper. Korean J. Plant Pathol. 6. 447~451.

Hwang, B. K. and Kim, C. H. 1995. Phytophthora blight of pepper and its control in Korea. Plant Dis. 79. 221~227.

Hwang, B. K. and Kim, S. E. 1992. Protection fo Pepper Plants Against Phytophthora Blight by an Avirulent Isolate of *Phytophthora capsici* Korean J. Plant Pathol. 8. 1~7.

Hwang, B. K., and Kim, C. H. 1995. Phytophthora blight of pepper and its control in Korea. Plant Dis. 79. 221~227.

Hyun, J. W., Kim, Y. H., Lee, Y. S., and W. M. Park. 1999. Isolation and evaluation of protective effect against Fusarium wilt of sesame platnts antibiotic substance from *Bacillus polymyxa* KB-8. Plant Pathol. J. 15. 152~157.

Jee, H. J., Nam, C. G., Kim, C. H. 1988. Studieds on Biological Control of Phytophthora blight of Red-pepper I . Isolation of Antagonisists and Evaluation of Antagonistic Activity *in vitro* and in Greenhouse. Korean J. Plant Pathol. 4. 305~312.

Jee. H. J., Cho, W. D. and Choi, Y. C. 1998. Utilization of Domestic Vegetable

Juices as a Medium for Growth and Reproduction of *Phytophthora* species. Korean J. Plant Pathol. 14. 299~302.

Jeun, Y. C., Siegrist, J. and Buchenaue, H. 2000. Biochemical and cytological studies on mechanism of systemic induced resistance in tomato plant against *Phytophthora infestans*. J. Phytopathol. 148. 129~140.

Katz, E. and A. L. Demain. 1977. The peptide antibiotics of *Bacillus*: Chemistry, biogenesis, and possible function. Bact. Rev. 41. 449~474.

Kim, B. S. and Hwang, B. K., 1992. Isolation of antibiotic-producing bacteria antagonistic to *Phytophthora capsici* from pepper-growing soils and evaluation of their antibiotic activity Korean J. Plant Pathol. 8. 241~248.

Kim, C. H., Jee, H. J., Park, K. S. and Lee, E. J., 1990. Studies on biological control of *Phytophthora* blight of red-pepper V. Performance of antagonistic agents in fields. Korean J. Plant Pathol. 6. 201~206.

Kim, C. H., Kim, K. D., and Jee, H. J. 1991. Enhanced suppression of red-pepper *Phytophthora* blight by combined application of antagonist and fungicide. Korean J. Plant Pathol. 7, : 221~225.

Kim, H. K., Park, J. H. and Choi, S. L. 1989. Influence of Various In Vitro Conditions on Growth of *Phytophthora capsici*, Pathogen of Pepper Crown and Root Rot. Korean J. Plant Pathol. 5. 230~238.

Kim, K. D., Shim, C. K., Bae, D. W., Kawk, Y. S., Yang, M. S., and H. K. Kim. 2002. Identification and biological characteristics of an antifungal compound extracted from Cocklebur (*Xanthium strumarium*) against *Phytophthora*. Plant Pathol. J. 18. 288~292.

Kleinkauf, H. and von Dohren, H. 1984. Peptide antibiotics, pp.283~307. In H. Rehm, H. J. ed., Biotechnology, Vol. 4. Microbial products II. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Germany.

Kloepper, J. W., and Schroth, M. N. 1981. Development of powder formulation

of rhizobacteria for inoculation of potato seed pieces. *Phytopathology* 71. 590~592.

L. G Copping, 1998, The biopesticide manual. pp20~27, In Micro organisms. British crop protection council.

Lee, E. J., Jee, H. J., Park, K. S. and Kim, C. H. 1990. Studies on Biological control of *Phytophthora* blight of redpepper IV. Performance of antagonistic agents in field under polyethylene filmhouse. *Korean J. Plant Pathol.* 6. 58-64.

Lee, H. U., Kim, C. H. and Lee, E. J. 1990. Effect of pre-and Mixed Cropping with Non-host Plants on incidence of *Phytophthora* Blight of Red-pepper. *Korean J. Plant Pathol.* 6. 440~446.

Lee, H. U., Kim, C. H. and Nam, K. W. 1991. Suppression of *Phytophthora* blight incidence of red pepper by cropping system. *Korean J. Plant Pathol.* 7. 140~146.

Lee, J. H., Kwon, T. R., Moon, J. D. and Lee, J. T. 1998. Effect of Acidic Electrolyte Water on Growth and Infection of *Phytophthora capsici* . *Korean J. Plant Pathol.* 14. 440~444.

Leonian, L. H. 1992. Stem and fruit blight of peppers caused by *Phytophthora capsici* sp. Nov. *Phytopathology.* 12. 401~408.

Mao, W., Lewis, J. A., Lumsden, R. D., and Hebbar, K. P. 1998. Biocontrol of selected soilborne diseases of tomato and pepper plants. *Crop Protec.* 17. 535~542.

Mathre, D. E., Cook, R. J. and Callan, N. W. 1999. From discovery to use: traversing the world of commercializing biocontrol agents for plant disease control. *Plant Disease.* 83. 972~983.

Moon, B. J., Schneider, R. W. and Park, H. C. 1996. Biological control of seed and seedling rot caused by *Pythium arrhenomanes* in water-seeded rice. *Korean J. Plant Pathol.* 12. 407~414.

Nam, C. G., Jee, H. J. and Kim, C. H. 1988. Studies on Biological Control of Phytophthora blight of Red-pepper II. Enhancement of Antagonistic Activity by soil Amendment with Organic Materials. Korean J. Plant Pathol. 4. 313~318.

Oh, J. S. and Kim, C. H. 1992. Warying sensitivity to metlaxyl of Korean isolates of *Phytophthora capsici* from red pepper fields. Korean J. Plant Pathol. 8. 29~33.

Palloix, A., Daubeze, A. M. and Pochard, E. 1988. Time sequences of root infection and resistance expression in an artificial inoculation method of pepper with *Phytophthora capsici*. Phytopathology. 78. 12~24.

Park, K. S., Jang, S. W., Kim, C. H. and Lee, E. J. 1989. Studies on Biological Control of Phytophthora blight of Red-pepperIII. Formulations of *Trichoderma harzianum* and *Pseudomonas cepacia* Antagonistic to *Phytophthora capsici* and Their Preservation. Korean J. Plant Pathol. 5. 131~138.

Randwawa, P. S., and Schaad, N. W. 1985. A seedling bioassay chamber for determining bacterial colonization and antagonism on plant roots. Phytopathology. 75. 254~259.

Shah-smith, D. A., and Burns, R. G. 1996. Biological Control of damping-off of sugar beet by *Pseudomonas putida* applied to seed pellets. Plant pathology. 45. 572~582.

Shen, S. S., Choi, O. H., Lee, S. M., and C. S. Park. 2002. In vitro and in vivo activities of a biocontrol agent, *Serratia plymuthica* A21-4, Against *Phytophthora capsici*. Plant Pathol. J. 18. 221~224.

Zuber, P., Nakano, M. M., and M. A. Marahiel. 1993. Peptide Antibiotics, pp. 897~916. In *Bacillus subtilis* and other Gram-positive Bacteria, American Society for Microbiology Press.

협동연구과제

바실러스 서브틸리스, 방선균 원제 및
제품의 인축, 환경 생물에 대한 안전성
연구

한국화학시험연구원 성하정

목 차

제 1 장 <i>B. subtilis</i> JKK238 2.0 X 10 ⁹ cfu/mL 원제의 포유동물 및 환경생물에 대한 안전성 시험	84
제 1 절 <i>B. subtilis</i> JKK238 2.0 X 10 ⁹ cfu/mL 원제의 포유동물에 대한 안전성 시험	84
1. <i>B. subtilis</i> JKK238 2.0 X 10 ⁹ cfu/mL 원제의 랫드에 대한 급성경구독성/병원성 시험	84
2. <i>B. subtilis</i> JKK238 2.0 X 10 ⁹ cfu/mL 원제의 랫드에 대한 급성경피독성시험	87
3. <i>B. subtilis</i> JKK238 2.0 X 10 ⁹ cfu/mL 원제의 랫드에 대한 급성호흡기투여 독성/병원성 시험	89
4. <i>B. subtilis</i> JKK238 2.0 X 10 ⁹ cfu/mL 원제의 랫드에 대한 급성정맥내독성/병원성 시험	91
제 2 절 <i>B. subtilis</i> JKK238 2.0 X 10 ⁹ cfu/mL 원제의 환경동물에 대한 안전성 시험	94
1. <i>B. subtilis</i> JKK238 2.0 X 10 ⁹ cfu/mL 원제의 담수어(잉어)에 대한 영향 시험	94
2. <i>B. subtilis</i> JKK238 2.0 X 10 ⁹ cfu/mL 원제의 담수무척추동물(물벼룩)에 대한 영향 시험	96
3. <i>B. subtilis</i> JKK238 2.0 X 10 ⁹ cfu/mL 원제의 조류(메추리)에 대한 영향 시험	98
4. <i>B. subtilis</i> JKK238 2.0 X 10 ⁹ cfu/mL 원제의 꿀벌에 대한 영향 시험 ..	101
5. <i>B. subtilis</i> JKK238 2.0 X 10 ⁹ cfu/mL 원제의 토양미생물 영향 시험 ..	103
제 2 장 <i>B. subtilis</i> JKK238 5.0 X 10 ⁷ cfu/mL 제품의 포유동물 및 환경생물에 대한 안전성 시험	106
제 1 절 <i>B. subtilis</i> JKK238 5.0 X 10 ⁷ cfu/mL 제품의 포유동물에 대한 안전성 시험	106
1. <i>B. subtilis</i> JKK238 5.0 X 10 ⁷ cfu/mL 제품의 랫드에 대한 급성경구독성/병원성 시험	106
2. <i>B. subtilis</i> JKK238 5.0 X 10 ⁷ cfu/mL 제품의 랫드에 대한 급성경피독성시험	109

3. <i>B. subtilis</i> JKK238 5.0 X 10 ⁷ cfu/mL 제품의 토끼에 대한 피부자극시험	111
4. <i>B. subtilis</i> JKK238 5.0 X 10 ⁷ cfu/mL 제품의 토끼에 대한 안점막자극시험	114
5. <i>B. subtilis</i> JKK238 5.0 X 10 ⁷ cfu/mL 제품의 기니픽에 대한 피부감작성시험	118
제 2 절 <i>B. subtilis</i> JKK238 5.0 X 10 ⁷ cfu/mL 제품의 환경동물에 대한 안전성 시험	121
1. <i>B. subtilis</i> JKK238 5.0 X 10 ⁷ cfu/mL 제품의 담수어(잉어)에 대한 영향 시험	121
제 3 장 <i>Streptomyces</i> AG-P 2.0 X 10 ⁸ cfu/mL 원제의 포유동물 및 환경생물에 대한 안전성 시험	125
제 1 절 <i>Streptomyces</i> AG-P 2.0 X 10 ⁸ cfu/mL 원제의 포유동물에 대한 안전성 시험	125
1. <i>Streptomyces</i> AG-P 2.0 X 10 ⁸ cfu/mL 원제의 랫드에 대한 급성경구독성/병원성 시험	125
2. <i>Streptomyces</i> AG-P 2.0 X 10 ⁸ cfu/mL 원제의 랫드에 대한 급성경피독성 시험	128
제 2 절 <i>Streptomyces</i> AG-P 2.0 X 10 ⁸ cfu/mL 원제의 환경생물에 대한 안전성 시험	130
1. <i>Streptomyces</i> AG-P 2.0 X 10 ⁸ cfu/mL 원제의 담수어(잉어)에 대한 영향 시험	130
2. <i>Streptomyces</i> AG-P 2.0 X 10 ⁸ cfu/mL 원제의 담수무척추동물(물벼룩)에 대한 영향시험	132
3. <i>Streptomyces</i> AG-P 2.0 X 10 ⁸ cfu/mL 원제의 조류에 대한 영향 시험	135

제 1 장 *Bacillus subtilis* JKK238 2.0 X 10⁹cfu/mL 원제의 포유동물 및 환경생물에 대한 안전성 시험

제 1 절 *Bacillus subtilis* JKK238 2.0 X 10⁹cfu/mL 원제의 포유동물에 대한 안전성 시험

1. *Bacillus subtilis* JKK238 2.0 X 10⁹cfu/mL 원제의 랫드에 대한 급성경구 독성/병원성 시험

가. 서론

본 시험은 랫드를 이용하여 *Bacillus subtilis* JKK238 2.0 X 10⁹cfu/mL 원제를 단회 경구 투여시 나타나는 독성 반응을 평가하기 위하여 "미생물농약의등록 시험방법및등록신청서류 검토기준 (농촌진흥청고시제 2004-3호, 2004. 2. 3.)"을 기준으로 시험을 실시하였다.

나. 재료 및 방법

본시험에 사용된 랫드는 SPF급의 랫드를 (주)오리엔트에서 분양받아 사용하였으며 시험물질 투여시 12마리의 수컷(7주령, 268~280g)과 12마리의 암컷(7주령, 160~230g)을 이용하여 실시하였다.

본 시험의 환경은 온도 22 ± 2 °C, 상대습도 50 ± 10 %, 환기횟수 13~18회/hr, 조명시간 12시간 (오전8시 ~오후8시), 조도 200~300 Lux의 실험실 조건에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 사육하였으며, 순화 및 시험기간 중 철망케이지(wire cage, 500X300X200 mm, 대종기기 제작)에 5마리씩 넣어 사육하였다. 사료는 실험동물용 쥐사료{(주)퓨리나코리아 (경기도 평택시 장당동 85-1)}를, 물은 자외선 살균처리 된 음용수를 자유섭취 시켰다.

시험에 앞서 예비과정으로 동물 입수시 모든 동물의 건강상태에 대한 수의학적인 검역을 실시한 다음 도입하여 6 일간의 순화기간을 거쳐 건강한 동물만을 선정하여 사용하였으며,순화기간을 거친 후 건강한 동물 중에서 체중을 기초로 하여 군 분리하였다. 군 분리시 군 평균체중과 표준편차를 계산하여 균등성 여부

를 확인하였다.

시험생물의 개체식별은 사육상자에는 시험유형, 시험번호, 시험물질, 군번호, 개체번호, 성별, 투여 용량 및 투여액량, 시험기간 및 시험책임자를 기재한 개체 식별카드를 부착하였으며, 개체식별은 유성매직을 이용하여 꼬리에 표시하였다.

시험기간중 시험생물의 대변 및 시험종료후의 장기에서의 *Bacillus subtilis* JKK238 미생물 수를 측정하기 위하여 사용된 배지 Nutrient Agar(Difco, Lot No.3267450)를 1 L당 23 g으로 하여 121 °C에서 15분간 멸균한 후 Plate를 만들어 사용하였다.

시험물질의 투여는 *Bacillus subtilis* JKK238의 경구 노출시의 안전성을 평가하기 위하여 경구로 투여하였으며, 대조군은 시험물질을 처리하지 않은 음성대조군을 설정하고 본 시험물질의 희석액으로 멸균된 생리식염수를 사용하므로 용매 대조군을 별도로 두지 않았다.

투여량의 설정은 농촌진흥청고시 제2004-3호 "미생물농약의등록시험방법및등록신청서류검토 기준"에서의 투여농도는 개체 당 1.0×10^8 단위에 해당되는 미생물을 투여하도록 되어 있으므로 시험물질을 멸균생리식염수를 이용하여 10배 희석하여 1.0×10^8 cfu/ml를 투여하였다.

투여액량은 투여 군별 공히 1 ml/animal로 설정하여 투여하기 전 하룻밤 정도 절식시킨 후 경구 투여용 주사기를 이용하여 위내에 1회 강제 투여하였다.

시험물질을 경구 투여후 임상증상 관찰로 증상의 종류, 발현정도, 진행상황 및 가역성을 경시적으로 관찰, 기록하였다. 최소한 매일 1회 이상 임상증상을 관찰하였고 체중변화를 관찰하기 위하여 시험물질 투여직전, 투여 후 주 1회 및 부검시에 측정하였다.

시험 종료시에는 모든 생존동물은 외관검사를 실시한 후 부검하여 육안적인 이상 소견을 검사하였다.

미생물의 체외 배출상황을 관찰하기 위하여 시험물질 투여 후 1일, 3일, 7일 및 14일째에 대변을 채취하여 멸균생리 식염수에 넣고 균질화시킨 다음 10배 단계 희석하여 plate에 접종한 후 30°C에서 24시간 동안 배양하여 미생물 수를 육안으로 측정하였고, 미생물의 체내 잔존상황을 확인하기 위하여 시험물질 투여 후 3일, 7일, 14일 및 21일째에 부검하여 신장, 뇌, 간장, 폐, 비장, 위, 혈액, 임파절을 채취하여 멸균생리식염수에 넣고 균질시킨 다음 10배 단계 희석하여 plate에 접종한 후 30 °C에서 24시간동안 배양하여 미생물 수를 육안으로 측정하였다.

다. 결 과

관찰기간동안 암·수 모든 투여군에서 시험물질 투여에 기인된 임상증상은 관찰되지 않았고, 체중변화를 측정된 결과 시험기간 중 모든 투여동물에 대한 체중변화에 있어서 정상적인 체중 증가가 인정되었다. 모든 생존동물의 부검은 시험종료 후 에테르로 마취시켜 각 주요장기에 대한 육안적 관찰을 실시한 결과 모든 시험동물에서 시험물질 투여와 관련된 특이한 증상은 관찰되지 않았다. 시험물질 투여 후 1일, 3일, 7일 및 14일째에 대변을 채취하여 체외 배출 미생물 수를 측정된 결과 1일째에는 암·수 각각 3마리에서 검출되었고, 3일째에는 수컷 2마리, 암컷 3마리에서 각각 검출되었고 7일째부터는 검출된 미생물은 없었다.

시험물질 투여 후 3일, 7일, 14일 및 21일째에 부검하여 신장, 뇌, 간장, 폐, 비장, 위, 혈액, 임파절에서의 미생물 수를 측정된 결과 3일째에는 암·수 모든 동물의 위에서 검출되었고, 7일째에는 수컷 3마리, 암컷 2마리의 위에서 검출되었으나 7일째부터는 검출된 미생물은 없었다.

라. 고찰 및 결론

Bacillus subtilis JKK238 2.0×10^9 cfu/ml 원제에 대한 급성경구독성/병원성시험을 SD계 랫드를 사용하여 시험동물 당 1.0×10^8 cfu를 1회 경구 투여한 후 3일, 7일, 14일 및 21일째에 부검하여 장기를 육안으로 관찰한 다음 체내 잔존 미생물 수와 1일, 3일, 7일 및 14일째의 체외 배출 미생물 수를 검사하였다. 또한 전 시험기간 동안 일반증상을 관찰하였으며 투여 후 주 1회씩 체중을 측정하였다.

본 시험결과 전 시험기간 동안 투여군에 있어서 사망례는 물론 시험물질 투여와 관련된 임상증상은 관찰되지 않았고, 체중변화에 있어서는 정상적인 체중증가를 보였다. 체내 잔존 미생물 수를 검사한 결과 암·수 위에서 7일째까지 검출되었고, 체외 배출 미생물 수를 검사한 결과에서는 암·수 3일째까지 대변에서 검출되었다. 생존동물에 대한 부검결과에 있어서는 시험물질 투여와 관련된 특이한 병리학적 소견은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로부터 랫드에 *Bacillus subtilis* JKK238 2.0×10^9 cfu/ml 원제를 단회 경구 투여시 7일까지 위에 잔존하고, 3일까지 대변으로 배출되나 14일 이후부터는 체내·외에서 검출된 미생물도 없고 부검결과에서도 어떠한 병리학적인 소견도 관찰된 것이 없으므로 *Bacillus subtilis* JKK238 2.0×10^9 cfu/ml 원제를 1.0×10^8 cfu/ml의 단위에 해당하는 미생물을 랫드에 단회 경구 투여시 14일 이내에 체내에서 모두 제거되고 영향이 없는 것으로 판단되었다.

2. *Bacillus subtilis* JKK238 2.0×10^9 cfu/mL 원제의 랫드에 대한 급성경피 독성시험

가. 서론

본 시험은 랫드를 이용하여 *Bacillus subtilis* JKK238 2.0×10^9 cfu/mL 원제를 단회 경피 투여시 나타나는 독성 반응을 평가하기 위하여 "미생물농약의등록 시험방법및등록신청서류 검토기준 (농촌진흥청고시제 2004-3호, 2004. 2. 3.)"을 기준으로 시험을 실시하였다.

나. 재료 및 방법

본시험에 사용된 랫드는 SPF급의 랫드를 (주)오리엔트에서 분양받아 사용하였으며 시험물질 투여시 5마리의 수컷(6주령, 180~200 g)과 5마리의 암컷(6주령, 160~180 g)을 이용하여 실시하였다.

본 시험의 환경은 온도 22 ± 2 °C, 상대습도 50 ± 10 %, 환기횟수 13~18회/hr, 조명시간 12시간 (오전8시 ~오후8시), 조도 200~300 Lux의 실험실 조건에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 사육하였으며, 순화 및 시험기간 중 철망케이지(wire cage, 500X300X200 mm, 대종기기 제작)에 5마리씩 넣어 사육하였다. 사료는 실험동물용 쥐사료{(주)퓨리나코리아 (경기도 평택시 장당동 85-1)}를, 물은 자외선 살균처리 된 음용수를 자유섭취 시켰다.

시험에 앞서 예비과정으로 동물 입수시 모든 동물의 건강상태에 대한 수의학적인 검역을 실시한 다음 도입하여 7 일간의 순화기간을 거쳐 건강한 동물만을 선정하여 사용하였으며,순화기간을 거친 후 건강한 동물 중에서 체중을 기초로 하여 군 분리하였다. 군 분리시 군 평균체중과 표준편차를 계산하여 균등성 여부를 확인하였다.

시험생물의 개체식별은 사육상자에는 시험유형, 시험번호, 시험물질, 군번호, 개체번호, 성별, 투여 용량 및 투여액량, 시험기간 및 시험책임자를 기재한 개체 식별카드를 부착하였으며, 개체식별은 유성매직을 이용하여 꼬리에 표시하였다.

시험물질의 투여는 *Bacillus subtilis* JKK238의 노출예상경로가 피부이므로 피부 노출시의 안전성을 평가하기 위하여 피부로 투여하였으며, 대조군은 시험물질을 처리하지 않은 음성대조군을 설정하고 본 시험물질의 희석액으로 멸균된 생리식염수를 사용하므로 용매대조군을 별도로 두지 않았다.

투여량의 설정은 농촌진흥청고시 제2004-3호 "미생물농약의등록시험방법및등록신청서류검토 기준"에서의 투여농도는 개체 당 1.0×10^8 단위에 해당되는 미생

물을 투여하도록 되어 있으므로 시험물질을 멸균생리식염수를 이용하여 10배 희석하여 1.0×10^8 cfu/ml를 투여하였다.

투여방법은 시험물질 처리를 위해 투여 전날 시험동물의 등부위의 체모를 가급적 넓게 피부가 손상되지 않도록 제모하였으며, 시험물질의 도포면적은 체표면적의 10 %정도(랫드: 4 cm×5 cm)로 하였다. 제조된 시험물질을 제모한 부위에 고르게 도포하고 시험물질의 유실을 막기 위해 비자극성 테이프로 24시간 고정시켜 주었다. 노출 종료 후 도포물을 제거하고 피부에 남아 있는 시험물질을 증류수로 잘 닦아 주었다.

시험물질을 경피 투여후 임상증상 관찰로 약제 처리 후 4시간까지는 매 시간마다 일반증상을 관찰하였고 그 다음날부터는 매일 1회씩, 투여 개시 후 14일째까지 일반증상 및 피부의 홍반, 부종 등의 증상을 관찰하였다. 체중변화를 관찰하기 위하여 시험물질 투여직전, 투여 후 7일 및 14일에 측정하였다.

시험 종료시에는 모든 생존동물은 외관검사를 실시한 후 부검하여 육안적인 이상 소견을 검사하였다.

다. 결 과

관찰기간동안 사망동물이 발생하지 않았으며, 암·수 모든 투여군에서 투여에 기인한 일반증상 및 투여부위에서 홍반, 부종 등의 증상은 관찰되지 않았고, 체중변화를 측정한 결과 시험기간 중 모든 투여동물에 대한 체중변화에 있어서 정상적인 체중 증가가 인정되었다. 모든 생존동물의 부검은 시험종료 후 에테르로 마취시켜 각 주요장기에 대한 육안적 관찰을 실시한 결과 모든 시험동물에서 시험물질 투여와 관련된 특이한 증상은 관찰되지 않았다.

라. 고찰 및 결론

Bacillus subtilis JKK238 2.0×10^9 cfu/ml 원제에 대한 급성 경피 독성을 SD계 랫드를 사용하여 시험동물당 1.0×10^8 cfu를 1회 경피 투여한 후 2주간 일반중독 증상 및 체중변화를 관찰 조사하였다.

본 시험결과 투여군에 있어서 암·수 모두 사망례는 물론 피부의 홍반, 부종을 포함한 임상 증상이 관찰되지 않았고, 체중변화에 있어서도 정상적인 체중 증가가 인정되었으며, 또한 생존동물에 대한 부검결과에 있어서도 특이한 육안적 병리소견은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로부터 랫드에 *Bacillus subtilis* JKK238 2.0×10^9 cfu/ml 원제를 단회 경피 투여시 영향이 없는 것으로 판단되었다.

3. *Bacillus subtilis* JKK238 2.0×10^9 cfu/mL 원제의 랫드에 대한 급성호흡기투여독성/병원성 시험

가. 서론

본 시험은 랫드를 이용하여 *Bacillus subtilis* JKK238 2.0×10^9 cfu/mL 원제를 단회 호흡기 투여시 나타나는 독성 반응을 평가하기 위하여 "미생물농약의등록시험방법및등록신청서류 검토기준 (농촌진흥청고시제 2004-3호, 2004. 2. 3.)"을 기준으로 시험을 실시하였다.

나. 재료 및 방법

본시험에 사용된 랫드는 SPF급의 랫드를 (주)오리엔트에서 분양받아 사용하였으며 시험물질 투여시 20마리의 수컷(7주령, 259~268 g)과 20마리의 암컷(7주령, 166~212 g)을 이용하여 실시하였다.

본 시험의 환경은 온도 22 ± 2 °C, 상대습도 50 ± 10 %, 환기횟수 13~18회/hr, 조명시간 12시간 (오전8시 ~오후8시), 조도 200~300 Lux의 실험실 조건에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 사육하였으며, 순화 및 시험기간 중 철망케이지(wire cage, 500X300X200 mm, 대종기기 제작)에 5마리씩 넣어 사육하였다. 사료는 실험동물용 쥐사료((주)퓨리나코리아 (경기도 평택시 장당동 85-1))를, 물은 자외선 살균처리 된 음용수를 자유섭취 시켰다.

시험에 앞서 예비과정으로 동물 입수시 모든 동물의 건강상태에 대한 수의학적인 검역을 실시한 다음 도입하여 6 일간의 순화기간을 거쳐 건강한 동물만을 선정하여 사용하였으며,순화기간을 거친 후 건강한 동물 중에서 체중을 기초로 하여 군 분리하였다. 군 분리시 군 평균체중과 표준편차를 계산하여 균등성 여부를 확인하였다.

시험생물의 개체식별은 사육상자에는 시험유형, 시험번호, 시험물질, 군번호, 개체번호, 성별, 투여 용량 및 투여액량, 시험기간 및 시험책임자를 기재한 개체식별카드를 부착하였으며, 개체식별은 유성매직을 이용하여 꼬리에 표시하였다.

시험기간 중 및 시험종료 후의 장기에서의 *Bacillus subtilis* JKK238 미생물수를 측정하기위하여 사용된 배지 Nutrient Agar(Difco, Lot No.3267450)를1 L당 23 g으로 하여121 °C에서 15분간 멸균한 후 Plate를 만들어 사용하였다.

시험물질의 투여는 *Bacillus subtilis* JKK238의 호흡기 노출시의 안전성을 평가하기 위하여 호흡기로 투여하였으며, 대조군은 시험물질을 처리하지 않은 음성 대조군을 설정하고 본 시험물질의 희석액으로 멸균된 생리식염수를 사용하므로

용매대조군을 별도로 두지 않았다.

투여량의 설정은 농촌진흥청고시 제2004-3호 "미생물농약의등록시험방법및등록신청서류검토 기준"에서의 투여농도는 개체 당 1.0×10^8 단위에 해당되는 미생물을 투여하도록 되어 있으므로 시험물질을 멸균생리식염수를 이용하여 10배 희석하여 1.0×10^8 cfu/0.2 mL를 투여하였다.

투여액량은 투여 군별 공히 0.2 ml/animal로 설정하여 비강내에 1회 강제 투여하였다.

시험물질을 호흡기 투여후 임상증상 관찰로 증상의 종류, 발현정도, 진행상황 및 가역성을 경시적으로 관찰, 기록하였다. 최소한 매일 1회 이상 임상증상을 관찰하였고 체중변화를 관찰하기 위하여 시험물질 투여직전, 투여 후 주 1회 및 부검시에 측정하였다.

시험 종료시에는 모든 생존동물은 외관검사를 실시한 후 부검하여 육안적인 이상 소견을 검사하였다.

미생물의 체내 잔존상황을 확인하기 위하여 시험물질 투여 후 3일, 7일, 14일 및 21일째에 부검하여 신장, 뇌, 간장, 폐, 비장, 맹장, 혈액, 임파절을 채취하여 멸균생리식염수에 넣고 균질시킨 다음 10배 단계 희석하여 plate에 접종한 후 30 °C에서 24시간동안 배양하여 미생물 수를 육안으로 측정하였다.

다. 결 과

관찰기간동안 암·수 모든 투여군에서 시험물질 투여에 기인된 임상증상은 관찰되지 않았고, 시험기간 중 생존동물에 대한 체중변화에 있어서 투여군과 대조군 간의 유의성 있는 체중변화는 관찰되지 않았다. 모든 생존동물의 부검은 시험종료 후 에테르로 마취시켜 각 주요장기에 대한 육안적 관찰을 실시한 결과 모든 시험동물에서 시험물질 투여와 관련된 특이한 증상은 관찰되지 않았다. 시험물질 투여 후 3일, 7일, 14일 및 21일째에 부검하여 신장, 뇌, 간장, 폐, 비장, 맹장, 혈액 및 임파절에서의 미생물 수를 측정한 결과 수컷의 경우 3일째와 7일째에 각각 3마리, 2마리의 폐장에서만 미생물이 검출되었고, 암컷의 경우도 3일째와 7일째에 각각 2마리의 폐장에서만 검출되었다. 투여 후 14일 이후 부터는 미생물이 검출된 동물의 장기는 없었다.

라. 고찰 및 결론

Bacillus subtilis JKK238 2.0×10^9 cfu/ml 원제에 대한 급성호흡기독성/병원성 시험을 SD계 랫드를 사용하여 시험동물 당 1.0×10^8 cfu를 1회 호흡기 투여 후 3

일, 7일, 14일 및 21일째에 부검하여 장기의 육안적 관찰을 한 다음 체내 잔존 미생물 수를 검사하였다. 또한 전 시험기간 동안 일반증상을 관찰하였으며 투여 후 주 1회씩 체중을 측정하였다.

본 시험결과 전 시험기간 동안 투여군에 있어서 사망례는 물론 시험물질 투여와 관련된 임상증상은 관찰되지 않았고, 체중변화에 있어서는 정상적인 체중증가를 보였다. 체내 미생물 수를 검사한 결과에 있어서는 7일째까지 폐장에서 검출되었으나 14일 이후로는 검출된 미생물은 없었으며 생존동물에 대한 부검결과에서는 시험물질 투여와 관련된 병리학적 소견은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로부터 랫드에 *Bacillus subtilis* JKK238 2.0×10^9 cfu/mL 원제를 단회 호흡기 투여시 체내에서는 7일째까지 폐장에서 미생물이 검출되었지만 14일이 후부터는 미생물이 검출된 동물의 장기는 없었으며, 부검결과에 있어서도 특이한 병리학적 소견도 관찰된 것이 없으므로 *Bacillus subtilis* JKK238 2.0×10^9 cfu/mL 원제를 1.0×10^8 cfu의 단위에 해당하는 미생물을 랫드에 단회 호흡기 투여시 14일 이내에 체내에서 모두 제거되고 영향이 없는 것으로 판단된다.

4. *Bacillus subtilis* JKK238 2.0×10^9 cfu/mL 원제의 랫드에 대한 급성정맥 내독성/병원성 시험

가. 서론

본 시험은 랫드를 이용하여 *Bacillus subtilis* JKK238 2.0×10^9 cfu/mL 원제를 단회 정맥내 투여시 나타나는 독성 반응을 평가하기 위하여 "미생물농약의등록시험방법및등록신청서류 검토기준 (농촌진흥청고시제 2004-3호, 2004. 2. 3.)"을 기준으로 시험을 실시하였다.

나. 재료 및 방법

본시험에 사용된 랫드는 SPF급의 랫드를 (주)오리엔트에서 분양받아 사용하였으며 시험물질 투여시 20마리의 수컷(7주령, 248~266 g)과 20마리의 암컷(7주령, 185~221 g)을 이용하여 실시하였다.

본 시험의 환경은 온도 22 ± 2 °C, 상대습도 50 ± 10 %, 환기횟수 13~18 회/hr, 조명시간 12시간 (오전 8시 ~오후 8시), 조도 200~300 Lux의 실험실 조건에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 사육하였으며, 순화 및 시험기간 중 철망케이지(wire cage, 500 X 300 X 200 mm, 대종기기 제작)에 5마리씩 넣어 사육하였다. 사료는 실험동물용 쥐사료((주)퓨리나코리아 (경기도 평택시

장당동 85-1))를, 물은 자외선 살균처리 된 음용수를 자유섭취 시켰다.

시험에 앞서 예비과정으로 동물 입수시 모든 동물의 건강상태에 대한 수의학적인 검역을 실시한 다음 도입하여 6 일간의 순화기간을 거쳐 건강한 동물만을 선정하여 사용하였으며, 순화기간을 거친 후 건강한 동물 중에서 체중을 기초로 하여 군 분리하였다. 군 분리시 군 평균체중과 표준편차를 계산하여 균등성 여부를 확인하였다.

시험생물의 개체식별은 사육상자에는 시험유형, 시험번호, 시험물질, 군번호, 개체번호, 성별, 투여 용량 및 투여액량, 시험기간 및 시험책임자를 기재한 개체 식별카드를 부착하였으며, 개체식별은 유성매직을 이용하여 꼬리에 표시하였다.

시험기간중 및 시험종료후의 장기에서의 *Bacillus subtilis* JKK238 미생물 수를 측정하기 위하여 사용된 배지 Nutrient Agar(Difco, Lot No.3267450)를 1 L당 23 g으로 하여 121 °C에서 15분간 멸균한 후 Plate를 만들어 사용하였다.

시험물질의 투여는 *Bacillus subtilis* JKK238의 정맥 노출시의 안전성을 평가하기 위하여 호흡기로 투여하였으며, 대조군은 시험물질을 처리하지 않은 음성대조군을 설정하고 본 시험물질의 희석액으로 멸균된 생리식염수를 사용하므로 용매대조군을 별도로 두지 않았다.

투여량의 설정은 농촌진흥청고시 제2004-3호 "미생물농약의등록시험방법및등록신청서류검토 기준"에서의 투여농도는 개체 당 1.0×10^7 단위에 해당되는 미생물을 투여하도록 되어 있으므로 시험물질을 멸균생리식염수를 이용하여 10배 희석하여 1.0×10^7 cfu/0.3 ml를 투여하였다.

투여액량은 투여 군별 공히 0.3 ml/animal로 설정하여 일회용 주사기(26 Gauge)를 이용하여 랫드의 미정맥 내로 투여하였다.

시험물질을 정맥 투여후 임상증상 관찰로 증상의 종류, 발현정도, 진행상황 및 가역성을 경시적으로 관찰, 기록하였다. 최소한 매일 1회 이상 임상증상을 관찰하였고 체중변화를 관찰하기 위하여 시험물질 투여직전, 투여 후 주 1회 및 부검시에 측정하였다.

시험 종료시에는 모든 생존동물은 외관검사를 실시한 후 부검하여 육안적인 이상 소견을 검사하였다.

미생물의 체내 잔존상황을 확인하기 위하여 시험물질 투여 후 3일, 7일, 14일 및 21일째에 부검하여 신장, 뇌, 간장, 폐, 비장, 맹장, 임파절을 채취하여 멸균생리식염수에 넣고 균질시킨 다음 10배 단계 희석하여 plate에 접종한 후 30 °C에서 24시간동안 배양하여 미생물 수를 육안으로 측정하였다.

다. 결 과

관찰기간동안 암·수 모든 투여군에서 시험물질 투여에 기인된 임상증상은 관찰되지 않았고, 시험기간 중 생존동물에 대한 체중변화에 있어서 투여군과 대조군 간의 유의성 있는 체중변화는 관찰되지 않았다. 모든 생존동물의 부검은 시험종료 후 에테르로 마취시켜 각 주요장기에 대한 육안적 관찰을 실시한 결과 모든 시험동물에서 시험물질 투여와 관련된 특이한 증상은 관찰되지 않았다. 시험물질 투여 후 3일, 7일, 14일 및 21일째에 부검하여 신장, 뇌, 간장, 폐, 비장, 맹장 및 임파절에서의 미생물 수를 측정된 결과 3일째에 수컷 2 마리, 암컷 1 마리의 비장에서만 미생물이 검출되었다. 투여 후 7일 이후부터는 검출된 미생물은 없었다.

라. 고찰 및 결론

Bacillus subtilis JKK238 2.0×10^9 cfu/ml 원제에 대한 급성정맥독성/병원성시험을 SD계 랫드를 사용하여 시험동물 당 1.0×10^7 cfu를 1회 정맥 투여 후 3일, 7일, 14일 및 21일째에 부검하여 장기의 육안적 관찰을 한 다음 체내 잔존 미생물 수를 검사하였다. 또한 전 시험기간 동안 일반증상을 관찰하였으며 투여 후 주 1회씩 체중을 측정하였다.

본 시험결과 전 시험기간 동안 투여군에 있어서 사망례는 물론 시험물질 투여와 관련된 임상증상은 관찰되지 않았고, 체중변화에 있어서는 정상적인 체중증가를 보였다. 체내 잔존 미생물 수를 검사한 결과 3일째 암·수 비장에서만 검출되었고, 투여 후 7일 이 후부터는 미생물이 검출된 장기는 없었다. 부검결과에 있어서는 시험물질 투여와 관련된 특이한 병리학적 소견은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로 부터 랫드에 *Bacillus subtilis* JKK238 2.0×10^9 cfu/ml 원제를 단회 정맥 투여시 3일째까지 비장에서 검출되었으나 7일 이 후부터는 체내에서 검출된 미생물도 없고 부검결과에 있어서도 어떠한 병리학적인 소견도 관찰된 것이 없으므로 *Bacillus subtilis* JKK238 2.0×10^9 cfu/ml 원제를 1.0×10^7 cfu/ml의 단위에 해당하는 미생물을 랫드에 단회 정맥 투여시 7일 이내에 체내에서 모두 제거되고 영향이 없는 것으로 판단된다.

제 2 절 *Bacillus subtilis* JKK238 2.0 X 10⁹cfu/mL 원제의 환경동물에 대한 안전성 시험

1. *Bacillus subtilis* JKK238 2.0 X 10⁹cfu/mL 원제의 담수어(잉어)에 대한 영향 시험

가. 서론

본 시험은 잉어를 이용하여 *Bacillus subtilis* JKK238 2.0 X 10⁹ cfu/mL 원제의 담수어에 대한 영향을 평가하기 위하여 "미생물농약의등록시험방법및등록신청서류 검토기준 (농촌진흥청고시제 2004-3호, 2004. 2. 3.)"을 기준으로 시험을 실시하였다.

나. 재료 및 방법

본시험에 사용된 잉어는 충청남도 내수면개발시험장에서 분양받아 한국화학시험연구원 환경독성실험실에서 사육 중인 개체를 사용하였으며 시험물질 투여시 전장 5 cm 내외의 개체를 이용하여 실시하였다.

시험생물의 사육 환경은 수온 22 ± 2 °C, 조명시간 16시간 (오전6시 ~오후10시), 조도 200~300 Lux의 실험실 조건에서 1일 1회 사료를 급여하여 사육하였으며, 순화는 시험시작전 7일간 순화수조(유리제 장방형 수조, 80 L 용량, 강남수족관 제작)에서 실시하였다. 사료는 잉어용 고품사료((주)우성사료)를 섭취시켰다.

본시험은 24 L(30×36 cm)용량의 원통형 유리수조에서 pH 6.5-8.0인 1주일 이상 정체시킨 지하수 20 L를 시험용수로 하여 실시하였으며, 시험기간 중 어체중의 약 3 %에 해당하는 사료를 매일 급여하였고, 용존산소를 포화농도의 60 % 이상의 조건을 유지하기 위하여 시험기간 30일동안 일정량의 공기를 지속적으로 공급하였다. 시험어류의 수는 반복당 10마리의 어류를 3반복으로 노출시켰으며, 대조군은 시험용수 자체로 설정하였다.

본 시험의 시험물질인 *Bacillus subtilis* JKK238 2.0 X 10⁹ cfu/mL 원제는 제품(SC 5×10⁷ cfu/mL)의 실제 살포량이 100 배액, 200 L/10 a이므로 미생물농약 등록시험 기준과 방법에 의거해서 수심 15 cm로 계산하고 실제 처리량의 1,000 배를 처리하도록 되어 있어 최종적으로 계산된 시험물질인 *Bacillus subtilis* JKK238 2.0 X 10⁹ cfu/mL 원제 13.35 mL을 시험용수 20 L에 넣고 충분히 교반시킨 후 시험하였다. 이때 시험용수 중 미생물의 농도는 6.68×10⁵ cfu/mL이었다.

시험어류의 노출은 반지수식으로 노출하여 수중 미생물농도를 측정하여 최초 처리한 미생물농도 보다 감소하는 시점에서 시험용수를 교체한 후 미생물 농약을 다시 처리하는 방법으로 시험을 실시하였다.

시험기간 중 시험용수 중의 미생물 농도측정과 어체 중 미생물의 감염유무를 조사하기 위하여 사용된 배지는 Nutrient Agar(Difco, Lot No.3267450)를 1 L당 23 g으로 하여 121 °C에서 15분간 멸균한 후 Plate를 만들어 사용하였다.

시험종료 후 전개체를 해부하여 아가미, 부레, 간을 채취하여 멸균생리식염수에 넣고 균질화시킨 다음 10배 단계 희석하여 nutrient agar plate에 접종한 후 35 °C에서 48시간 배양하여 미생물 수를 육안적으로 측정하였으며, 시험용수는 시험수조에서 시료를 채취한 후 멸균 생리식염수로 단계희석을 한 후 plate에 희석액을 100 μ l씩 분주하여 접종한 후 35 °C에서 48시간 배양하여 미생물 수를 육안적으로 측정하였다.

시험기간 중 검사항목으로 시험당일과 약제처리후 5, 10, 15, 20, 25일 및 시험종료시 DO, pH, 온도를 측정하였으며 DO는 Orion Research Incorporated의 DO meter(Model:810A+)를 pH는 Sartorius사의 pH meter(Model:PP-15)를 사용하여 측정하였다. 또한 약제처리 직후 및 매일 수중 미생물 농도를 측정하였다. 시험생물의 체중은 시험시작 및 시험종료시 측정하였다.

시험종료후 생존개체는 부검하고 부검소견을 기록함과 동시에 미생물농약 감염여부 등을 조사하였다.

다. 결 과

표1. 담수어영향시험 기간 중 잉어의 치사수

처리농도 (cfu/mL)	생물수 (마리)	치사수(마리)						
		0day	5day	10day	15day	20day	25day	30day
대조군	30	0	0	0	0	0	0	0
6.68×10^5	30	0	0	0	0	0	0	0

시험기간 중 대조군 및 처리군 모두 일반중독증상 및 다른 특이증상은 관찰되지 않았다.

체중은 대조군에서 시험시작전 평균 5.09 ± 0.55 g, 시험종료후 평균 $5.55 \pm$

0.61 g 이었고, 약제처리구에서 시험시작전 평균 5.02 ± 0.52 g, 시험종료후 평균 5.29 ± 0.59 g 이었다.

pH는 평균 8.00(최저 7.69 ~ 최고 8.32)이었고, DO는 평균 7.18 mg/L(최저 6.18 mg/L ~ 최고 7.93 mg/L)이었으며 평균수온은 22.3 °C(최저 21.4 °C ~ 최고 23.6 °C)였다.

라. 고찰 및 결론

미생물 농약 *Bacillus subtilis* JKK238 2.0×10^9 cfu/mL 원제의 담수어에 대한 영향시험을 실시한 결과 약제처리후 30일이 경과하는 동안 시험생물의 치사는 없었다. 따라서 미생물 농약 시험기준과 방법에 의거하여 시험종료 후 전개체에 대하여 부검을 실시하였다. 또한 시험약제 처리 후 수중 미생물 농도를 측정한 결과 약제처리후 10일이 경과하는 동안 미생물농도의 변화는 없는 것으로 판단되었으나, 시험용수의 혼탁으로 30일의 시험기간중 10일 경과후, 20일 경과후 2번의 시험용수를 교체하였다.

미생물 농약 시험기준과 방법에 따라 본시험에서도 시험종료후 전 개체에 대하여 부검을 실시한 결과 아가미와 장기에 대해 대조군과 비교하여 육안상의 차이는 발견할 수 없었으며 미생물 배양 결과 아가미에서만 10^2 수준으로 미생물이 검출되었다.

이상의 결과로 보아 간이나 부레 등의 장기에서 미생물이 검출되지 않았으므로 미생물의 체내 축적은 없는 것으로 판단된다.

2. *Bacillus subtilis* JKK238 2.0×10^9 cfu/mL 원제의 담수무척추동물(물벼룩)에 대한 영향 시험

가. 서론

본 시험은 물벼룩(*Daphnia magna*)를 이용하여 *Bacillus subtilis* JKK238 2.0×10^9 cfu/mL 원제의 담수무척추동물에 대한 영향을 평가하기 위하여 "미생물농약의등록시험방법및등록신청서류 검토기준 (농촌진흥청고시제 2004-3호, 2004. 2. 3.)"을 기준으로 시험을 실시하였다.

나. 재료 및 방법

본시험에 사용된 물벼룩(*Daphnia magna*)는 농촌진흥청 농업과학기술원에서 분양받아 한국화학시험연구원 환경독성실험실에서 계대사육 중인 개체를 사용하

였으며 시험물질 투여시 생후 24시간 미만의 어린 개체를 이용하여 실시하였다.

시험생물의 사육 환경은 수온 20 ± 2 °C, 조명시간 16시간 (오전 6시 ~오후 10시)의 실험실 조건에서 1일 1회 순수배양한 *chlorella vulgaris*를 급여하여 사육하였으며, 계대사육은 원통형의 1200 mL 유리용기에서 실시하였다.

본시험은 1200 mL 유리용기에서 재합성수(Hard Reconstituted Water Medium, US EPA, 1991) 1000 mL을 시험용수로 하여 실시하였으며, 시험기간 중 1×10^4 cell/mL이 되도록 *chlorella vulgaris*를 매일 급여하였다. 시험생물의 수는 반복당 20마리의 물벼룩을 3반복으로 노출시켰으며, 대조군은 시험용수 자체로 설정하였다.

본 시험의 시험물질인 *Bacillus subtilis* JKK238 2.0×10^9 cfu/mL 원제는 제품(SC 5×10^7 cfu/mL)의 실제 살포량이 100배액, 200 L/10 a이므로 미생물농약 등록시험 기준과 방법에 의거해서 수심 15 cm로 계산하고 실제 처리량의 1,000 배를 처리하도록 되어 있어 최종적으로 계산된 시험물질인 *Bacillus subtilis* JKK238 2.0×10^9 cfu/mL 원제 0.6675 mL을 시험용수 1000 mL에 넣고 충분히 교반시킨 후 시험하였다. 이때 시험용수 중 미생물의 농도는 6.68×10^5 cfu/mL이었다.

시험물벼룩의 노출은 반지수식으로 노출하여 수중 미생물농도를 측정하여 최초 처리한 미생물농도 보다 감소하는 시점에서 시험용수를 교체한 후 미생물 농약을 다시 처리하는 방법으로 시험을 실시하였다. 시험용수의 양은 40 mL이상/마리로 하고 수온은 20 ± 2 °C, 용존산소량은 포화농도의 60 %이상의 조건에서 21일간 노출하였다.

시험기간 중 시험용수 중의 미생물 농도를 조사하기 위하여 사용된 배지는 Nutrient Agar(Difco, Lot No.3267450)를 1 L당 23 g으로 하여 121 °C에서 15분간 멸균한 후 Plate를 만들어 사용하였다.

시험기간 중 검사항목으로 시험당일과 약제처리후 5, 10, 15, 20, 25일 및 시험 종료시 DO, pH, 온도를 측정하였으며 DO는 Orion Research Incorporated의 DO meter(Model:810A+)를 pH는 Sartorius사의 pH meter(Model:PP-15)를 사용하여 측정하였다. 또한 약제처리 직후 및 매일 수중 미생물 농도를 측정하였다.

다. 결 과

표2. 담수무척추동물영향시험 기간중 물벼룩의 유영저해수

처리농도 (cfu/mL)	생물수 (마리)	유영저해수(마리)				
		0day	5day	10day	15day	21day
대조군	60	0	0	0	0	0
6.68×10^5	60	0	0	0	0	0

시험기간 중 대조군 및 처리군 모두 일반중독증상 및 다른 특이증상은 관찰되지 않았다.

pH는 평균 7.80(최저 7.51 ~ 최고 8.00)이었고, DO는 평균 7.98 mg/L(최저 7.49 mg/L ~ 최고 8.73 mg/L)이다. 시험기간의 평균수온은 20.4 ± 0.35 °C(최저 19.7 °C ~ 최고 21.0 °C)였다.

라. 고찰 및 결론

미생물 농약 *Bacillus subtilis* JKK238 2.0×10^9 cfu/mL 원제의 담수무척추동물에 대한 영향시험을 실시한 결과 약제처리후 21일이 경과하는 동안 시험생물의 유영저해는 없었다. 또한 시험약제처리 후 수중 미생물 농도를 측정한 결과 약제처리후 10일이 경과하는 동안 미생물농도의 변화는 없는 것으로 판단되었으나, 시험용수의 혼탁으로 21일의 시험기간중 10일 경과후 1번의 시험용수를 교체하였다.

미생물 농약 *Bacillus subtilis* JKK238 2.0×10^9 cfu/mL 원제의 담수무척추동물에 대한 영향시험의 종합적인 결론은 미생물 농약 *Bacillus subtilis* JKK238 2.0×10^9 cfu/mL 원제는 담수무척추동물에 대해서 영향이 없는 것으로 판단되었다.

3. *Bacillus subtilis* JKK238 2.0×10^9 cfu/mL 원제의 조류(메추리)에 대한 영향 시험

가. 서론

본 시험은 메추리(*Coturnix japonica*)를 이용하여 *Bacillus subtilis* JKK238

2.0 X 10⁹ cfu/mL 원제의 조류에 대한 영향을 평가하기 위하여 "미생물농약의등록시험방법및등록신청서류 검토기준 (농촌진흥청고시제 2004-3호, 2004. 2. 3.)"을 기준으로 시험을 실시하였다.

나. 재료 및 방법

본시험에 사용된 메추리(*Coturnix japonica*)는 일산 메추리 부화장에서 분양받아 사용하였으며 시험물질 투여시 14 ~ 28일령의 어린 개체를 이용하여 실시하였다.

본 시험의 환경은 온도 24 ± 2 °C, 상대습도 50 ± 10 %, 조명시간 16시간 (오전 6시 ~ 오후 10시), 조도 200~300 Lux의 실험실 조건에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 사육하였으며, 순화 및 시험기간 중 철망케이지 (wire cage, 600 × 415 × 405 mm)에 10마리씩 넣어 사육하였다. 사료는 어린메추리용 사료(축협)를, 물은 자외선 살균처리 된 음용수를 자유섭취 시켰다.

시험생물의 수는 반복당 10마리의 메추리를 4반복으로 노출시켰으며, 대조군은 시험용수 자체로 설정하였다.

시험물질의 투여는 *Bacillus subtilis* JKK238의 경구 노출시의 안전성을 평가하기 위하여 경구로 투여하였으며, 대조군은 시험물질을 처리하지 않은 음성대조군을 설정하고 본 시험물질의 희석액으로 멸균된 생리식염수를 사용하므로 용매 대조군을 별도로 두지 않았다.

투여량의 설정은 농촌진흥청고시 제2004-3호 "미생물농약의등록시험방법및등록신청서류검토 기준"에서의 투여농도는 개체 당 10⁸ 단위에 해당되는 미생물을 투여하도록 되어 있으므로 시험물질을 멸균생리식염수를 이용하여 10배 희석하여 1.0×10⁸ cfu/mL를 매일 0.2 mL 씩 5일간 투여하였다.

시험기간 중 검사항목으로 깃털세움, 날개처짐, 원기소실, 머리떨굶, 눈감음, 침 흘림, 설사, 호흡곤란, 쇠약, 사망 등을 매일 관찰하였다. 시험생물의 체중은 투여 직전, 투여후 7일, 14일, 21일, 28일 또는 사망시 측정하였다. 시험중 이상증상 개체 또는 사망한 개체는 없었으므로 시험 종료 후 농약미생물의 감염여부는 조사하지 않았다.

다. 결 과

표3. 조류(鳥類)에 대한 영향시험 기간중 메추리의 치사수

처리농도 (cfu/mL)	생물수 (마리)	치사수(마리)				
		0day	7day	14day	21day	28day
대조군	40	0	0	0	0	0
1.0×10 ⁸	40	0	0	0	0	0

시험기간 중 대조군 및 처리군 모두 일반중독증상 및 다른 특이증상은 관찰되지 않았다.

시험시작전 조류의 평균체중은 약제처리구에서는 49.56 g(최저 38.94 g ~ 최고 62.15 g), 대조군에서는 48.61 g(최저 38.24 g ~ 최고 66.48 g)이었고, 시험종료후 조류의 평균체중은 약제처리구에서는 123.75 g(최저 107.63 g ~ 최고 145.70 g), 대조군에서는 123.05 g(최저 104.38 g ~ 최고 143.49 g)이었다.

라. 고찰 및 결론

미생물 농약 *Bacillus subtilis* JKK238 2.0×10⁹ cfu/mL 원제의 조류에 대한 영향시험을 실시한 결과 약제처리 후 30일이 경과하는 동안 시험생물의 치사는 없었으며 깃털세움, 날개처짐, 원기소실, 머리떨굼, 눈감음, 침흘림, 설사, 호흡곤란, 쇠약등의 이상증상도 나타내지 않았다. 따라서 미생물 농약 시험기준과 방법에 의거하여 시험생물의 치사가 없었으므로 별도의 부검은 실시하지 않았다. 또한 시험기간 중 실시한 체중측정에서 대조군의 경우 투여직전의 체중에 비해 투여후 28일의 체중이 253.1 % 증가하였고, 약제처리구에서는 투여직전보다 249.7 %의 체중증가율을 나타내어 대조군과 약제처리구간의 체중변화율은 거의 비슷한 결과를 나타냈다.

따라서 미생물 농약 *Bacillus subtilis* JKK238 2.0×10⁹ cfu/mL 원제의 조류에 대한 영향은 없는 것으로 판단된다.

4. *Bacillus subtilis* JKK238 2.0 X 10⁹cfu/mL 원제의 꿀벌에 대한 영향 시험

가. 서론

본 시험은 꿀벌(*Apis mellifera*)를 이용하여 *Bacillus subtilis* JKK238 2.0 X 10⁹ cfu/mL 원제의 꿀벌에 대한 영향을 평가하기 위하여 "미생물농약의등록시험방법및등록신청서류 검토기준 (농촌진흥청고시제 2004-3호, 2004. 2. 3.)"을 기준으로 시험을 실시하였다.

나. 재료 및 방법

본시험에 사용된 꿀벌(*Apis mellifera*)는 밀성양봉원(경기도 여주군 산북면 하품2리 433-1)에서 구입 후 약 4개월 가량 한국화학시험연구원 시험평가본부내에서 사육 후 시험에 사용하였다.

본 시험의 환경은 온도 25 ± 2 °C, 상대습도 60 ± 10 %, 암조건 24시간의 실험실 조건에서 사료(50% 자당 용액)를 급여하면서 시험하였다. 시험기간 중 사육은 철망케이지(wire cage, 50 × 150 mm)에 10마리씩 넣어 사육하였다.

시험생물의 수는 반복당 30마리의 꿀벌을 3반복으로 노출시켰으며, 대조군은 50 %자당 용액 자체로 설정하였다.

시험물질의 투여는 *Bacillus subtilis* JKK238의 섭식 노출시의 안전성을 평가하기 위하여 섭식 투여하였으며, 대조군은 시험물질을 처리하지 않은 대조군을 설정하고 본 시험물질의 희석액으로 50% 자당용액을 사용하므로 용매대조군을 별도로 두지 않았다.

본 시험의 시험물질인 *Bacillus subtilis* JKK238 2.0 X 10⁹cfu/mL 원제는 제품(SC 5×10⁷ cfu/mL)의 실제 살포량이 100배액, 200 L/10 a이므로 미생물농약 등록시험 기준과 방법에 의거해서 실제 처리량의 100배(5 X 10⁷ cfu/mL)를 처리하도록 되어 있으므로 최종적으로 계산된 시험물질인 *Bacillus subtilis* JKK238 2.0 X 10⁹ cfu/mL 원제 2.5 mL을 50 % 자당용액 100 mL에 넣고 충분히 교반시킨 후 10 X 50 mm의 급식관에 2 mL.씩 투입 후 꿀벌이 섭식하도록 노출하였다. 꿀벌은 환기구멍이 있는 밀폐통에 꿀벌을 취한 후 이산화탄소 가스로 벌을 마취시킨 후 한 케이지 당 10마리 씩 3케이지를 1반복으로 하여 총 3반복으로 암조건에서 시험을 실시하였다. 이때 미생물의 농도는 5×10⁷ cfu/mL이었다.

시험기간 중 검사항목으로 이상행동, 사망등을 매일 관찰하였다. 이상행동의 판정은 대조군과 비교하여 판단하였다.

시험기간 중 치사 꿀벌 중 미생물의 감염유무를 조사하기 위하여 사용된 배지는 Nutrient Agar(Difco, Lot No.3267450)를 1 L당 23 g으로 하여 121 °C에서 15분간 멸균한 후 Plate를 만들어 사용하였다.

시험기간 중 치사된 개체에 대하여 꿀벌을 sea sand와 함께 막자사발에서 마쇄한 후 꿀벌 10마리당 생리식염수 25 mL의 비율로 첨가하여 희석한 다음 nutrient agar plate에 접종한 후 35 °C에서 48시간 배양하여 미생물 수를 육안적으로 측정하였다. 시험기간 중 치사개체는 2차 감염을 막기 위하여 즉시 꺼내어 미생물농약 감염유무를 조사하였다.

다. 결과

표4. 꿀벌에 대한 영향시험 기간중 꿀벌의 치사수

처리농도 (cfu/mL)	생물수 (마리)	치사수(마리)					
		0day	4day	8day	12day	16day	20day
대조군	90	0	3	6	9	14	16
5.0×10^7	90	0	4	7	10	16	20

표5. 꿀벌에 대한 영향시험에서 꿀벌중 미생물 검출 결과

처리농도 (cfu/mL)	5.0×10^7					
경과일수	0day	4day	8day	12day	16day	20day
치사수	0	4	7	10	16	20
미생물 검출수	ND*	ND	ND	ND	ND	ND

* ND : Not detected(검출되지 않음)

시험기간 중 대조군 및 처리군 모두 일반중독증상 및 다른 특이증상은 관찰되지 않았다.

라. 고찰 및 결론

미생물 농약 *Bacillus subtilis* JKK238 2.0×10^9 cfu/mL 원제의 꿀벌에 대한 영향시험을 실시한 결과 약제처리 후 20일이 경과하는 동안 시험생물의 치사는 대조군과 비교하여 큰 차이는 보이지 않았고 이상증상도 관찰할 수 없었다. 또한 시험기간 중 치사개체에 대한 미생물농약 감염유무를 조사한 결과 미생물이 검출되지 않아 감염은 없는 것으로 판단되었다.

따라서 미생물 농약 *Bacillus subtilis* JKK238 2.0×10^9 cfu/mL 원제의 꿀벌에 대한 영향은 없는 것으로 판단된다.

5. *Bacillus subtilis* JKK238 2.0×10^9 cfu/mL 원제의 토양미생물 영향 시험

가. 서론

미생물 농약 *Bacillus subtilis* JKK238 2.0×10^9 cfu/mL 원제의 토양미생물 영향 시험을 확인하기 위하여 “미생물농약의등록시험방법및 등록신청서류 검토기준(농촌진흥청고시 제2004-3호, 2004. 2. 3.)”을 기준으로 시험을 실시하였다.

나. 재료 및 방법

본 시험에 사용된 시험토양은 경기도 김포시 월곶면 군하리에 위치한 밭토양을 사용하였으며, 시험구는 $1 \text{ m} \times 1 \text{ m}$ 정도의 크기로 격리, 관리할 수 있는 시설을 사용하여 대조구 1개와 처리구 3개로 하여 시험을 실시하였다.

시험물질 처리시 모든 시험구에 대하여 처리액량은 200 mL로 하고, 대조구는 멸균된 증류수를 사용하였으며, 시험물질은 멸균증류수에 단위면적당의 추천사용량의 10배량을 혼합하고 혼합 깊이는 20 cm 로 하여 토양에 처리하였다.

시험에 사용된 진균용 배지는 PDA(Potato Dextrose Agar)를 1 L당 39 g으로 하여, 121 °C에서 15분간 멸균한 후, 10 % tartaric acid를 18 mL 첨가하여 Plate 를 조제하였으며, 일반세균배지는 표준평판한천배지(Plate Count Agar)를 1 L당 23.5 g으로 하여, 121 °C에서 15분간 멸균한 후 plate에 분주하여 사용하였고, 방선균용 배지는 세균 및 곰팡이의 생육을 저지하기 위하여 각각 asparagines, sodium propionate가 첨가된 고체 배지 (glucose 10.0 g ; asparagines 0.5 g ; K₂HPO₄ 0.5 g ; sodium propionate 4.0 g ; agar 15.0 g ; pH7.0 per liter)를 사용하였다.

토양미생물에 대한 영향을 관찰하기 위하여 0일차, 1일차, 10일차, 90일차에 토양을 채취하였다. 토양 채취는 각각 시험구의 5개소에서 토양을 채취하였으며, 채취된 시료를 잘 혼합하여 토양 10 g을 90 mL의 멸균 생리식염수에 넣어 잘 혼합한 후, 단계 희석하여 각 균주용 Plate에 100 μ L씩 도말하여 진균은 25 $^{\circ}$ C에서 72시간이상, 일반세균은 35 $^{\circ}$ C에서 24시간, 방선균은 30 $^{\circ}$ C에서 72시간 이상 배양하여 균수를 측정하였다.

다. 결과

시험물질의 추천사용량은 100배액, 200 L/10 a이었으며, 단위면적당 시험물질의 처리량은 0.5 mL/m²으로하여 멸균된 증류수 200 mL에 현탁하여 처리하였다.

각각의 대조구와 처리구의 토양을 채취하여 각각의 균수를 측정한 결과는 다음과 같다.

표6. 토양에 대한 영향시험에서 토양중 미생물상의 변화

측정 항목	구분	처리량 (mL/m ²)	균 수(개/g)				
			0일차	1일차	10일차	30일차	90일차
진균수	Control	0	1.5 \times 10 ⁴	1.3 \times 10 ⁴	1.4 \times 10 ⁵	1.6 \times 10 ⁴	4.2 \times 10 ⁵
	T-1		2.7 \times 10 ⁴	1.3 \times 10 ⁴	2.4 \times 10 ⁴	2.1 \times 10 ⁴	1.2 \times 10 ⁵
	T-2	0.5	3.3 \times 10 ⁴	1.2 \times 10 ⁴	1.5 \times 10 ⁶	1.7 \times 10 ⁴	5.8 \times 10 ⁵
	T-3		1.8 \times 10 ⁴	1.5 \times 10 ⁴	5.8 \times 10 ⁵	1.2 \times 10 ⁴	1.7 \times 10 ⁵
	평균		2.6 \times 10 ⁴	1.3 \times 10 ⁴	7.0 \times 10 ⁵	1.7 \times 10 ⁴	2.9 \times 10 ⁵
세균수	Control	0	3.0 \times 10 ⁵	5.0 \times 10 ⁵	1.6 \times 10 ⁶	3.1 \times 10 ⁶	4.7 \times 10 ⁷
	T-1		2.3 \times 10 ⁵	4.0 \times 10 ⁵	2.0 \times 10 ⁶	5.8 \times 10 ⁶	4.3 \times 10 ⁷
	T-2	0.5	4.8 \times 10 ⁵	6.3 \times 10 ⁵	4.4 \times 10 ⁶	3.7 \times 10 ⁶	1.6 \times 10 ⁷
	T-3		6.1 \times 10 ⁵	1.0 \times 10 ⁶	1.7 \times 10 ⁶	3.9 \times 10 ⁶	1.7 \times 10 ⁷
	평균		4.4 \times 10 ⁵	6.8 \times 10 ⁵	2.7 \times 10 ⁶	4.5 \times 10 ⁶	2.5 \times 10 ⁷
방선균수	Control	0	1.1 \times 10 ⁶	8.0 \times 10 ⁵	7.4 \times 10 ⁵	3.5 \times 10 ⁵	8.6 \times 10 ⁶
	T-1		8.7 \times 10 ⁵	4.4 \times 10 ⁵	1.2 \times 10 ⁵	1.7 \times 10 ⁵	5.3 \times 10 ⁶
	T-2	0.5	5.3 \times 10 ⁵	4.2 \times 10 ⁵	3.2 \times 10 ⁵	1.3 \times 10 ⁵	5.5 \times 10 ⁶
	T-3		3.4 \times 10 ⁶	5.0 \times 10 ⁵	1.2 \times 10 ⁶	1.9 \times 10 ⁵	3.8 \times 10 ⁶
	평균		1.6 \times 10 ⁶	4.5 \times 10 ⁵	5.5 \times 10 ⁵	1.6 \times 10 ⁵	4.9 \times 10 ⁶

라. 고찰 및 결론

Bacillus subtilis JKK-238 (2.0×10^9 cfu/g)에 대한 토양 미생물 영향시험을 확인하기 위하여 미생물 농약을 살포한 후 토양을 채취하여 토양 중의 진균, 세균 및 방선균의 수를 측정하였다.

균수는 대조구와 시험구를 비교하였으며, 본 시험 조건하에서 세균, 진균과 방선균에서는 특별한 차이를 나타내는 시험구는 나타나지 않았으며, 또한 세균, 진균과 방선균의 채취 날짜에 따른 균수의 변화를 비교할 때 특별한 차이를 보이지 않았다.

제 2 장 *Bacillus subtilis* JKK238 5.0 X 10⁷cfu/mL 제품의 포유동물 및 환경생물에 대한 안전성 시험

제 1 절 *Bacillus subtilis* JKK238 5.0 X 10⁷cfu/mL 제품의 포유동물에 대한 안전성 시험

1. *Bacillus subtilis* JKK238 5.0 X 10⁷cfu/mL 제품의 랫드에 대한 급성경구 독성/병원성 시험

가. 서론

본 시험은 랫드를 이용하여 *Bacillus subtilis* JKK238 5.0 X 10⁷cfu/mL 제품을 단회 경구 투여시 나타나는 독성 반응을 평가하기 위하여 "미생물농약의등록 시험방법및등록신청서류 검토기준 (농촌진흥청고시제 2004-3호, 2004. 2. 3.)"을 기준으로 시험을 실시하였다.

나. 재료 및 방법

본시험에 사용된 랫드는 SPF급의 랫드를 (주)오리엔트에서 분양받아 사용하였으며 시험물질 투여시 12마리의 수컷(7주령, 250~280 g)과 12마리의 암컷(7주령, 180~225 g)을 이용하여 실시하였다.

본 시험의 환경은 온도 22 ± 2 °C, 상대습도 50 ± 10 %, 환기횟수 13~18회/hr, 조명시간 12시간 (오전 8시 ~오후 8시), 조도 200~300 Lux의 실험실 조건에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 사육하였으며, 순화 및 시험기간 중 철망케이지(wire cage, 500X300X200 mm, 대종기기 제작)에 5마리씩 넣어 사육하였다. 사료는 실험동물용 쥐사료{(주)퓨리나코리아 (경기도 평택시 장당동 85-1)}를, 물은 자외선 살균처리 된 음용수를 자유섭취 시켰다.

시험에 앞서 예비과정으로 동물 입수시 모든 동물의 건강상태에 대한 수의학적인 검역을 실시한 다음 도입하여 6 일간의 순화기간을 거쳐 건강한 동물만을 선정하여 사용하였으며,순화기간을 거친 후 건강한 동물 중에서 체중을 기초로

하여 군 분리하였다. 군 분리시 군 평균체중과 표준편차를 계산하여 균등성 여부를 확인하였다.

시험생물의 개체식별은 사육상자에는 시험유형, 시험번호, 시험물질, 군번호, 개체번호, 성별, 투여 용량 및 투여액량, 시험기간 및 시험책임자를 기재한 개체 식별카드를 부착하였으며, 개체식별은 유성매직을 이용하여 꼬리에 표시하였다.

시험기간 중 시험생물의 대변 및 시험종료 후의 장기에서의 *Bacillus subtilis* JKK238 미생물 수를 측정하기 위하여 사용된 배지 Nutrient Agar(Difco, Lot No.3267450)를 1 L당 23 g으로 하여 121 °C에서 15분간 멸균한 후 Plate를 만들어 사용하였다.

시험물질의 투여는 *Bacillus subtilis* JKK238의 경구 노출시의 안전성을 평가하기 위하여 경구로 투여하였으며, 대조군은 시험물질을 처리하지 않은 음성대조군을 설정하고 본 시험물질의 희석액으로 멸균된 생리식염수를 사용하므로 용매 대조군을 별도로 두지 않았다.

투여량의 설정은 농촌진흥청고시 제2004-3호 "미생물농약의등록시험방법및등록신청서류검토 기준"에서의 투여농도는 개체 당 1.0×10^8 단위에 해당되는 미생물을 투여하도록 되어 있으므로 시험물질을 1.0×10^8 cfu/animal로 투여하였다.

투여액량은 투여 군별 공히 2 mL/animal로 설정하여 투여하기 전 하룻밤 정도 절식시킨 후 경구 투여용 주사기를 이용하여 위내에 1회 강제 투여하였다.

시험물질을 경구 투여 후 임상증상 관찰로 증상의 종류, 발현정도, 진행상황 및 가역성을 경시적으로 관찰, 기록하였다. 최소한 매일 1회 이상 임상증상을 관찰하였고 체중변화를 관찰하기 위하여 시험물질 투여직전, 투여 후 주 1회 및 부검시에 측정하였다.

시험 종료시에는 모든 생존동물은 외관검사를 실시한 후 부검하여 육안적인 이상 소견을 검사하였다.

미생물의 체외 배출상황을 관찰하기 위하여 시험물질 투여 후 1일, 3일, 7일 및 14일째에 대변을 채취하여 멸균생리 식염수에 넣고 균질화시킨 다음 10배 단계 희석하여 plate에 접종한 후 30°C에서 24시간 동안 배양하여 미생물 수를 육안으로 측정하였고, 미생물의 체내 잔존상황을 확인하기 위하여 시험물질 투여 후 3일, 7일, 14일 및 21일째에 부검하여 신장, 뇌, 간장, 폐, 비장, 위, 혈액, 임파절을 채취하여 멸균생리식염수에 넣고 균질화시킨 다음 10배 단계 희석하여 plate에 접종한 후 30 °C에서 24시간동안 배양하여 미생물 수를 육안으로 측정하였다.

다. 결 과

관찰기간동안 암·수 모든 투여군에서 시험물질 투여에 기인된 임상증상은 관찰되지 않았고, 체중변화를 측정된 결과 시험기간 중 모든 투여동물에 대한 체중변화에 있어서 정상적인 체중 증가가 인정되었다. 모든 생존동물의 부검은 시험종료 후 에테르로 마취시켜 각 주요장기에 대한 육안적 관찰을 실시한 결과 모든 시험동물에서 시험물질 투여와 관련된 특이한 증상은 관찰되지 않았다. 시험물질 투여 후 1일, 3일, 7일 및 14일째에 대변을 채취하여 체외 배출 미생물 수를 측정된 결과 3일째까지 암·수 모든 동물에서 검출되었으나 7일째부터는 검출된 미생물은 없었다.

시험물질 투여 후 3일, 7일, 14일 및 21일째에 부검하여 신장, 뇌, 간장, 폐, 비장, 위, 혈액, 임파절에서의 미생물 수를 측정된 결과 7일째까지 암·수 모든 동물의 위에서 검출되었으나 7일째부터는 검출된 미생물은 없었다.

라. 고찰 및 결론

Bacillus subtilis JKK238 5.0×10^7 cfu/mL 제품에 대한 급성경구독성/병원성 시험을 SD계 랫드를 사용하여 시험동물 당 1.0×10^8 cfu를 1회 경구 투여한 후 3일, 7일, 14일 및 21일째에 부검하여 장기를 육안으로 관찰한 다음 체내 잔존 미생물 수와 1일, 3일, 7일 및 14일째의 체외 배출 미생물 수를 검사하였다. 또한 전 시험기간 동안 일반증상을 관찰하였으며 투여 후 주 1회씩 체중을 측정하였다.

본 시험결과 전 시험기간 동안 투여군에 있어서 사망례는 물론 시험물질 투여와 관련된 임상증상은 관찰되지 않았고, 체중변화에 있어서는 정상적인 체중증가를 보였다. 체내 잔존 미생물 수를 검사한 결과 암·수 위에서 7일째까지 검출되었고, 체외 배출 미생물 수를 검사한 결과에서는 암·수 3일째까지 대변에서 검출되었다. 생존동물에 대한 부검결과에 있어서는 시험물질 투여와 관련된 특이한 병리학적 소견은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로부터 랫드에 *Bacillus subtilis* JKK238 5.0×10^7 cfu/mL 제품을 단회 경구 투여시 7일까지 위에 잔존하고, 3일까지 대변으로 배출되나 14일 이후부터는 체내·외에서 검출된 미생물도 없고 부검결과에서도 어떠한 병리학적인 소견도 관찰된 것이 없으므로 *Bacillus subtilis* JKK238 5.0×10^7 cfu/mL 제품을 1.0×10^8 cfu/ml의 단위에 해당하는 미생물을 랫드에 단회 경구 투여시 14일 이내에 체내에서 모두 제거되고 영향이 없는 것으로 판단된다.

2. *Bacillus subtilis* JKK238 5.0×10^7 cfu/mL 제품의 랫드에 대한 급성경피 독성시험

가. 서론

본 시험은 랫드를 이용하여 *Bacillus subtilis* JKK238 5.0×10^7 cfu/mL 제품을 단회 경피 투여시 나타나는 독성 반응을 평가하기 위하여 "미생물농약의등록 시험방법및등록신청서류 검토기준 (농촌진흥청고시제 2004-3호, 2004. 2. 3.)"을 기준으로 시험을 실시하였다.

나. 재료 및 방법

본시험에 사용된 랫드는 SPF급의 랫드를 (주)오리엔트에서 분양받아 사용하였으며 시험물질 투여시 5마리의 수컷(6주령, 185~200 g)과 5마리의 암컷(6주령, 160~180 g)을 이용하여 실시하였다.

본 시험의 환경은 온도 22 ± 2 °C, 상대습도 50 ± 10 %, 환기횟수 13~18회/hr, 조명시간 12시간 (오전 8시 ~오후 8시), 조도 200~300 Lux의 실험실 조건에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 사육하였으며, 순화 및 시험기간 중 철망케이지(wire cage, 500 X 300 X 200 mm, 대종기기 제작)에 5마리씩 넣어 사육하였다. 사료는 실험동물용 쥐사료((주)퓨리나코리아 (경기도 평택시장당동 85-1))를, 물은 자외선 살균처리 된 음용수를 자유섭취 시켰다.

시험에 앞서 예비과정으로 동물 입수시 모든 동물의 건강상태에 대한 수의학적인 검역을 실시한 다음 도입하여 7 일간의 순화기간을 거쳐 건강한 동물만을 선정하여 사용하였으며, 순화기간을 거친 후 건강한 동물 중에서 체중을 기초로 하여 군 분리하였다. 군 분리시 군 평균체중과 표준편차를 계산하여 균등성 여부를 확인하였다.

시험생물의 개체식별은 사육상자에는 시험유형, 시험번호, 시험물질, 군번호, 개체번호, 성별, 투여 용량 및 투여액량, 시험기간 및 시험책임자를 기재한 개체식별카드를 부착하였으며, 개체식별은 유성매직을 이용하여 꼬리에 표시하였다.

시험물질의 투여는 *Bacillus subtilis* JKK238의 노출예상경로가 피부이므로 피부 노출시의 안전성을 평가하기 위하여 피부로 투여하였으며, 대조군은 시험물질을 처리하지 않은 음성대조군을 설정하고 본 시험물질의 희석액으로 멸균된 생리식염수를 사용하므로 용매대조군을 별도로 두지 않았다.

투여량의 설정은 농촌진흥청고시 제2004-3호 "미생물농약의등록시험방법및등록신청서류검토 기준"에서의 투여농도는 개체 당 1.0×10^8 단위에 해당되는 미생

물을 투여하도록 되어 있으므로 1.0×10^8 cfu/animal로 투여하였다.

투여방법은 시험물질 처리를 위해 투여 전날 시험동물의 등부위의 체모를 가급적 넓게 피부가 손상되지 않도록 제모하였으며, 시험물질의 도포면적은 체표면적의 10 %정도(랫드: 4 cm × 5 cm)로 하였다. 제조된 시험물질을 제모한 부위에 고르게 도포하고 시험물질의 유실을 막기 위해 비자극성 테이프로 24시간 고정시켜 주었다. 노출 종료 후 도포물을 제거하고 피부에 남아 있는 시험물질을 증류수로 잘 닦아 주었다.

시험물질을 경피 투여후 임상증상 관찰로 약제 처리 후 4시간까지는 매 시간마다 일반증상을 관찰하였고 그 다음 날부터는 매일 1회씩, 투여 개시 후 14일째까지 일반증상 및 피부의 홍반, 부종 등의 증상을 관찰하였다. 체중변화를 관찰하기 위하여 시험물질 투여직전, 투여 후 7일 및 14일에 측정하였다.

시험 종료시에는 모든 생존동물은 외관검사를 실시한 후 부검하여 육안적인 이상 소견을 검사하였다.

다. 결 과

관찰기간동안 사망동물이 발생하지 않았으며, 암·수 모든 투여군에서 투여에 기인한 일반증상 및 투여부위에서 홍반, 부종 등의 증상은 관찰되지 않았고, 체중변화를 측정한 결과 시험기간 중 모든 투여동물에 대한 체중변화에 있어서 정상적인 체중 증가가 인정되었다. 모든 생존동물의 부검은 시험종료 후 에테르로 마취시켜 각 주요장기에 대한 육안적 관찰을 실시한 결과 모든 시험동물에서 시험물질 투여와 관련된 특이한 증상은 관찰되지 않았다.

라. 고찰 및 결론

Bacillus subtilis JKK238 5.0×10^7 cfu/mL 제품에 대한 급성 경피 독성을 SD계 랫드를 사용하여 시험동물당 1.0×10^8 cfu를 1회 경피 투여한 후 2주간 일반중독증상 및 체중변화를 관찰 조사하였다.

본 시험결과 투여군에 있어서 암·수 모두 사망례는 물론 피부의 홍반, 부종을 포함한 임상 증상이 관찰되지 않았고, 체중변화에 있어서도 정상적인 체중 증가가 인정되었으며, 또한 생존동물에 대한 부검결과에 있어서도 특이한 육안적 병리소견은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로부터 랫드에 *Bacillus subtilis* JKK238 5.0×10^7 cfu/mL 제품을 단회 경피 투여시 영향이 없는 것으로 판단된다.

3. *Bacillus subtilis* JKK238 5.0×10^7 cfu/mL 제품의 토끼에 대한 피부자극 시험

가. 서론

본 시험은 토끼를 이용하여 *Bacillus subtilis* JKK238 5.0×10^7 cfu/mL 제품의 피부자극 반응을 평가하기 위하여 "미생물농약의등록시험방법및등록신청서류검토기준 (농촌진흥청고시제 2004-3호, 2004. 2. 3.)"을 기준으로 시험을 실시하였다.

나. 재료 및 방법

본시험에 사용된 토끼는 New zealand white계를 샘타코에서 분양받아 사용하였으며 시험물질 투여시 6마리의 수컷(4월령, 2200 ~ 2500 g)을 이용하여 실시하였다.

본 시험의 환경은 온도 22 ± 2 °C, 상대습도 50 ± 10 %, 환기횟수 13~18회/hr, 조명시간 12시간 (오전 8시 ~오후 8시), 조도 200~300 Lux의 실험실 조건에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 사육하였으며, 순화 및 시험기간 중 철망케이지(wire cage, 500 X 380 X 300 mm, 정도산업 제작)에 개체별로 넣어 사육하였다. 사료는 토끼사료{(주)퓨리나코리아 (경기도 평택시 장당동 85-1)}를, 물은 자외선 살균처리 된 음용수를 자유섭취 시켰다.

시험에 앞서 예비과정으로 동물 입수시 모든 동물의 건강상태에 대한 수의학적 검역을 실시한 다음 도입하여 10 일간의 순화기간을 거쳐 건강한 동물만을 선정하여 사용하였으며,순화기간을 거친 후 건강한 동물 중에서 체중을 기초로 하여 군 분리하였다. 군 분리시 군 평균체중과 표준편차를 계산하여 균등성 여부를 확인하였다.

시험생물의 개체식별은 사육상자에는 시험유형, 시험번호, 시험물질, 군번호, 개체번호, 성별, 투여 용량 및 투여액량, 시험기간 및 시험책임자를 기재한 개체식별카드를 부착하였으며, 개체식별은 유성매직을 이용하여 꼬리에 표시하였다.

시험물질의 투여는 *Bacillus subtilis* JKK238의 노출예상경로가 피부이므로 피부 노출시의 안전성을 평가하기 위하여 피부로 노출하였으며, 대조군은 시험물질을 처리하지 않은 음성대조군을 설정하고 본 시험물질의 희석액으로 멸균된 생리식염수를 사용하므로 용매대조군을 별도로 두지 않았다.

투여량의 설정은 농촌진흥청고시 제2004-3호 "미생물농약의등록시험방법및등록신청서류검토 기준"에서의 투여농도는 개체 당 0.5 mL에 해당되는 미생물을

투여하도록 되어 있으므로 1.0×10^8 cfu/animal로 투여하였다.

투여방법은 건강한 수컷동물 6마리를 이용하여 시험하였으며, 각 동물의 경배부에 약 2.0cm × 3.0cm 정도의 크기로 척추를 중심으로 좌우 각각 2개소를 설정하여, 상부 2개소는 시험물질을 도포하는 처치구획으로, 하부 2개소는 대조구획으로 정하여 시험하였고, 대조구획에는 생리식염수를 도포하였다. 시험물질의 적용은 24시간 전에 제모를 실시하여 다음의 그림과 같이 처치구획 및 대조구획으로 구분하였다. 2개소의 찰과피부는 18G 주사침을 이용하여, 표피는 손상되거나 진피는 손상되지 않도록 피가나지 않을 정도로 [#]형 찰과상을 입혀서 만들었다. 시험물질은 시험동물 당 찰과부위 2개소와 비찰과부위 2개소로 하여 상부의 찰과부위 1개소와 비찰과부위 1개소에 각각 0.5 mL씩을 1회 도포한 후 거어즈 3겹을 덮고 생리식염수를 가해 피검 약물과 피부가 잘 접촉할 수 있도록 하였으며, 하부의 무처치 대조구획에는 생리식염수를 도포하였다. 도포 후 처치구획과 대조구획을 거어즈로 덮은 후 비자극성 테이프로 잘 고정하여 4시간 동안 노출시켰다. 시험물질 적용 후 미온수를 이용해 도포부위를 부드럽게 세정해 주었다.

시험물질 도포종료 후 적용부위의 패취를 제거하여 1, 24, 48 및 72시간째에 홍반, 가피형성 및 부종 등의 자극성 유무를 관찰하였다. 피부반응의 평가는 [표. 7] 피부반응의 평가표에 따라 실시하였다. 또한 결과에 대한 자극성의 정도판정은 일반적으로 많이 이용되는 Draize의 P.I.I.(Primary Irritation Index) 산출방법을 따랐다.

다. 결 과

관찰기간동안 사망동물이 발생하지 않았으며, 투여에 기인한 일반증상 및 투여부위에서 홍반, 부종 등의 증상은 관찰되지 않았고, 체중변화를 측정한 결과 시험기간 중 모든 투여동물에 대한 체중변화에 있어서 정상적인 체중 증가가 인정되었다. 시험물질 노출 종료 후 적용부의 국소자극성을 관찰한 결과, 시험동물에서 어떠한 피부 반응도 관찰되지 않았으므로, 일차자극지수는 "0.0"으로 산출되었다.

표.7 피부반응의 평가표

(1) 홍반과 가피형성	
홍반이 전혀 없음	0
아주 가벼운 홍반(육안으로 겨우 식별할 정도)	1
분명한 홍반	2
약간 심한 홍반	3
심한 홍반(홍당무색의 발적)과 가벼운 정도의 가피	4
총 가능한 홍반점수(최고점)	4
(2) 부종형성	
부종이 전혀 없음	0
아주 가벼운 부종(육안으로 겨우 식별할 정도)	1
가벼운 부종(뚜렷하게 부어올라서 변연부가 분명히 구별될 정도)	2
보통의 부종(약 1mm정도 부어오른 정도)	3
심한 부종(1mm 이상 부어오르고 노출부위 밖에까지 확장된 상태)	4
총 가능한 부종 점수(최고점)	4

표.8 P.I.I.에 의한 자극 판정

정 도(P. I. I.)	구 분
0.0 ~ 0.5	None irritant (비자극성)
0.6 ~ 2.0	Mild irritant (약한 자극성)
2.1 ~ 5.0	Moderate irritant (중등도 자극성)
5.1 ~ 8.0	Severe irritant (강한 자극성)

라. 고찰 및 결론

Bacillus subtilis JKK238 5.0×10^7 cfu/mL 제품에 대한 피부자극성을 조사하기 위하여 6마리의 New Zealand White계 수컷토끼에게 시험물질을 도포한 후 72시간 동안의 사망률, 일반증상 및 체중변화와 1, 24, 48 및 72시간째의 국소자극성을 평가하였다.

본 시험기간 중 일반증상에서 시험물질의 적용에 기인된 어떠한 이상소견도 인정되지 않았으며, 체중도 시험기간 중 정상적인 체중증가가 인정되었다. 시험

동물에 시험물질 도포 후 적용부위에서 어떠한 피부반응도 관찰되지 않았으며, 그 결과 일차피부자극지수는 "0.0"으로 산출되었다.

이상의 결과로 보아 New Zealand White계 토끼에서 *Bacillus subtilis* JKK238 5.0×10^7 cfu/mL 제품의 일시적인 피부적용(4시간)으로 나타나는 피부자극은 어떠한 피부반응도 일으키지 않았다. 그러므로 본 시험물질의 피부자극성은 일차자극지수 "0.0"으로 "비자극성(none irritant)" 물질인 것으로 판단된다.

4. *Bacillus subtilis* JKK238 5.0×10^7 cfu/mL 제품의 토끼에 대한 안점막자극시험

가. 서론

본 시험은 토끼를 이용하여 *Bacillus subtilis* JKK238 5.0×10^7 cfu/mL 제품의 안점막 투여 시 나타나는 자극반응을 평가하기 위하여 "미생물농약의등록시험방법및등록신청서류 검토기준 (농촌진흥청고시제 2004-3호, 2004. 2. 3.)"을 기준으로 시험을 실시하였다.

나. 재료 및 방법

본시험에 사용된 토끼는 New zealand white계를 샘타코에서 분양받아 사용하였으며 시험물질 투여시 6마리의 수컷(4월령, 2400~2800 g)을 이용하여 실시하였다.

본 시험의 환경은 온도 22 ± 2 °C, 상대습도 50 ± 10 %, 환기횟수 13~18회/hr, 조명시간 12시간 (오전 8시 ~오후 8시), 조도 200~300 Lux의 실험실 조건에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 사육하였으며, 순화 및 시험기간 중 철망케이지(wire cage, 660X500X300 mm, 정도산업 제작)에 개체별로 넣어 사육하였다. 사료는 토끼사료{(주)퓨리나코리아 (경기도 평택시 장당동 85-1)}를, 물은 자외선 살균처리 된 음용수를 자유섭취 시켰다.

시험에 앞서 예비과정으로 동물 입수시 모든 동물의 건강상태에 대한 수의학적인 검역을 실시한 다음 도입하여 10 일간의 순화기간을 거쳐 건강한 동물만을 선정하여 사용하였으며,순화기간을 거친 후 건강한 동물 중에서 체중을 기초로 하여 군 분리하였다. 군 분리시 군 평균체중과 표준편차를 계산하여 균등성 여부를 확인하였다.

시험생물의 개체식별은 사육상자에는 시험유형, 시험번호, 시험물질, 군번호, 개체번호, 성별, 투여 용량 및 투여액량, 시험기간 및 시험책임자를 기재한 개체

식별카드를 부착하였으며, 개체식별은 유성매직을 이용하여 꼬리에 표시하였다.

시험물질의 투여는 *Bacillus subtilis* JKK238의 노출예상경로가 피부이므로 피부 노출시의 안전성을 평가하기 위하여 피부로 노출하였으며, 건강한 숫컷 6마리를 이용하여 비세안군 6마리로 구성하였다. 비세안군 동물에 대해서 우안은 시험물질을 처치하였고, 좌안은 대조를 위해 무처리 하였다.

투여량의 설정은 농촌진흥청고시 제2004-3호 "미생물농약의등록시험방법및등록신청서류검토 기준"에서의 투여농도는 개체당 10^7 단위이며, 본 시료의 5.0×10^7 cfu/mL이므로 시험동물 당 시험물질을 생리식염수로 5배 희석하여 0.1 mL씩 처치하였다.

시험개시 24시간 이내에 동물의 양안을 검사하여 각막 등의 안구손상이 없는 개체를 선발하여 사용하였다. 점안은 토끼를 보정한 후 우안의 결막낭내에 시험물질을 적용하였다. 미생물농약의 투여농도는 개체당 10^7 단위이며, 본 시료의 5.0×10^7 cfu/mL이므로 시험동물 당 시험물질을 생리식염수로 5배 희석하여 0.1 mL씩 처치하였다. 좌안은 대조로 하여 무처리 하였다. 점적 후 시험물질의 유출을 방지하기 위해 약 1초간 양안검을 잡아 폐안시켰다. T1군의 6마리는 점적 후 그대로 두고 세안을 실시하지 않았다.

시험물질 적용 후 7일째까지 일반증상의 변화, 중독증상 및 사망동물의 유무를 관찰하였고, 시험물질 적용 전, 적용 후 3 및 7일째에 개체별 체중을 측정하였다. 적용부위의 관찰은 시험물질 적용 후 1시간, 1, 2, 3, 4 및 7일째에 각막, 홍채 및 결막 등의 이상유무를 관찰하였다.

안자극반응의 평가는 농업진흥청 고시 제2004-3호 "농약의 등록시험 기준과 방법 (2004. 2. 3. 제정)"에 표시된 안구병변의 등급기준(표. 9)에 따라 실시하였다. 결과에 대한 자극성의 정도판정은 안구병변의 등급에 따른 각 관찰시점의 개체별안자극 지수(IOI, individual ocular irritation index)를 산출하였고, 이를 이용하여 각 시기별 평균안자극지수(MOI, mean ocular irritation index)를 산출하였으며, 평균안자극지수 중 최고치를 급성안자극지수(AOI, acute ocular irritation index)로 하였다. 이 결과에서 얻어진 급성안자극지수를 안자극 판정표(표. 10)를 이용하여 자극성의 정도를 판정하였다.

표.9 안구병변의 등급

(1) 각막	
A. 혼탁 : 안구의 농후한 정도(가장 농후한 지점을 관찰함)	
화농이나 혼탁이 없음	0
혼탁이 분산 혹은 밀집되어 있으나(정상적인 투명성이 약간 둔화된 것과는 다름) 홍채의 말단이 명확히 관찰됨	1
반투명한 부분이 쉽게 관측되면서, 홍채의 말단이 약간 불명확함	2
진주 색깔을 나타내고 홍채의 말단이 관찰되지 않으나 동공의 크기가 가까스로 관측됨	3
각막이 불투명하고 혼탁 때문에 홍채가 관찰 안됨	4
B. 혼탁된 각막의 범위	
혼탁이 없음	0
1/4 이하	1
1/4 이상 1/2 미만	2
1/4 이상 3/4 미만	3
3/4 이상 1까지	4
점수 = AXBX5	최대치= 80
(2) 홍채	
A. 반응치	
정상	0
현저한 주름의 형성, 충혈, 종창, 각막 주위에 중등도의 충혈을 보이나 홍채가 빛에 대해 반응함	1
홍채가 빛에 대해 반응이 없거나 출혈 또는 대부분 파괴된 상태	2
점수 = AX5	최대치= 10
(3) 결막	
A. 발적(안검결막 및 안구결막에 한함. 각막, 홍채 제외)	
혈관은 정상	0
일부 혈관 충혈	1
얇은 심홍색을 띠거나 각각의 혈관이 쉽게 관찰 안됨	2
짙은 선홍색	3
B. 결막 부종	
부풀지 않음	0
정상보다 약간 종창(순막포함)	1
안검의 부분적 외전을 동반한 현저한 종창	2
눈이 반쯤 감길 정도의 안검의 종창	3
눈이 반 이상 감길 정도의 안검의 종창	4
C. 배출물	
배출물 없음	0
약간의 배출물(정상 동물의 내부 눈꼬리에서 관찰되는 작은 양 제외)	1
속눈썹과 눈꺼풀을 적시는 배출물	2
눈 주위의 상당 부위와 속눈썹과 눈꺼풀을 적시는 배출물	3
점수 = (A + B + C)X2	최대치= 20

표.10 P.I.I.에 의한 자극 판정

정 도	구 분
0 ~ 5	Nonirritant (비자극물)
5 ~ 15	Mild irritant (경도 자극물)
15 ~ 30	Moderate irritant (자극물)
30 ~ 60	Severe irritant (중등도 자극물)
60 ~ 80	Extreme irritant (중강도 자극물)
80 ~ 110	Maximal irritant (강도 자극물)

다. 결 과

시험물질 적용 후 초기자극에 의한 운동성 감소를 제외하고는 어떠한 임상증상도 관찰되지 않았다. 체중측정 결과 시험물질 적용 후 7일째까지 모두 정상적인 체중증가를 나타내었다.

시험물질 적용 후 시간, 1, 2, 3, 4 및 7일째에 적용부를 관찰한 결과, 적용 후 시험기간 중 어떠한 이상소견도 관찰되지 않았다. 이러한 결과로부터 급성안자극지수는 0으로 평가되었다.

라. 고찰 및 결론

Bacillus subtilis JKK238 5.0×10^7 cfu/mL 제품에 대한 안자극성을 조사하기 위하여 6마리의 New Zealand White계 숫컷토끼에게 시험물질 0.1 mL씩을 결막낭내에 1회 처치한 후 7일 동안의 사망률, 일반증상 및 체중변화와 처치 후 1시간, 1, 2, 3, 4, 및 7일째의 안자극성을 평가하였다.

시험기간 중 일반증상 및 체중에 있어서 시험물질의 적용에 기인된 어떠한 이상소견도 인정되지 않았다. 시험물질 적용 후 각막, 홍채와 결막에서 시험기간 중 어떠한 이상소견도 관찰되지 않았다. 따라서 급성안자극지수는 0으로 평가되었다.

결론적으로 New Zealand White계 토끼에 있어서 *Bacillus subtilis* JKK238 5.0×10^7 cfu/mL 제품의 안점막 적용은 어떠한 이상이 유발되지 않았으므로 급성안자극지수가 "0"으로 평가되어 본 시험물질은 비자극물 (Non irritant)인 것으로

로 판단된다.

5. *Bacillus subtilis* JKK238 5.0×10^7 cfu/mL 제품의 기니픽에 대한 피부감작성시험

가. 서론

본 시험은 기니픽을 이용하여 *Bacillus subtilis* JKK238 5.0×10^7 cfu/mL 제품의 피부감작성 정도를 평가하기 위하여 "미생물농약의등록시험방법및등록신청서류 검토기준 (농촌진흥청고시제 2004-3호, 2004. 2. 3.)"을 기준으로 시험을 실시하였다.

나. 재료 및 방법

본시험에 사용된 기니픽은 Hartley계 수컷 기니픽을 샘타코에서 분양받아 사용하였으며 시험물질 투여시 20마리의 수컷을 이용하여 실시하였다.

본 시험의 환경은 온도 22 ± 2 °C, 상대습도 50 ± 10 %, 환기횟수 10~15회/hr, 조명시간 12시간 (오전 8시 ~오후 8시), 조도 200~300 Lux의 실험실 조건에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 사육하였으며, 순화 및 시험기간 중 철망케이지(wire cage, 700X500X200 mm, 정도산업 제작)에 개체별로 넣어 사육하였다. 사료는 실험동물용 기니픽사료((주)퓨리나코리아 (경기도 평택시 장당동 85-1))를, 물은 자외선 살균처리 된 음용수를 자유섭취 시켰다.

시험에 앞서 예비과정으로 동물 입수시 모든 동물의 건강상태에 대한 수의학적인 검역을 실시한 다음 도입하여 10 일간의 순화기간을 거쳐 건강한 동물만을 선정하여 사용하였으며,순화기간을 거친 후 건강한 동물 중에서 체중을 기초로 하여 군 분리하였다. 군 분리시 군 평균체중과 표준편차를 계산하여 균등성 여부를 확인하였다.

시험생물의 개체식별은 사육상자에는 시험유형, 시험번호, 시험물질, 군번호, 개체번호, 성별, 투여 용량 및 투여액량, 시험기간 및 시험책임자를 기재한 개체식별카드를 부착하였으며, 개체식별은 피모색소(피크린산) 마킹법을 이용하였다.

모든 실험동물의 감각유도와 감각야기시 시험물질의 투여는 피내 경로를 선택하여 투여하였다.

예비시험은 액상제재인 시험물질을 원액을 최고용량으로 하여 멸균증류수에 현탁하고 단계별로 2배 희석한 다음 2단계의 용량 수준을 설정하였다. 투여량은 동물개체 당 0.1mL로 하였다. 각 용량 수준별 개체 수는 2마리로 하였다. 그 결

과 최고용량인 원액에서 자극이나 부종이 관찰되지 않아 감작유도시와 감작야기시의 적용용량을 동일하게 원액의 시험물질을 본시험에 적용 하였다. 음성대조군은 멸균증류수를 투여하였으며 양성대조물질로는 0.1 % DNCB/80 % EtOH를 투여하였다. 또한 모든 군의 투여액량은 동물 개체당 0.1 mL로 하였다.

양성대조물질의 조제는 DNCB(SIGMA, Lot No. 100K1323)를 80 % 에탄올(MERCK, Lot No. K30464483 213)에 용해하여 0.1 % DNCB/80 % EtOH로 제조하였다.

본시험은 감작유도(Induction)단계와 야기(Challenge) 단계로 나누어 진행되었으며, 감작유도는 기니픽의 측복부를 제모한 다음 10회 투여 중 첫번째 투여시에는 개체당 0.05 mL를 피내 주사하였고, 그 후에는 2일 간격으로 0.1 mL씩 9번 피내주사하였다. 투여군에는 시험물질을 적용하였고, 대조군에는 멸균증류수만을 적용하였다. 야기(Challenge) 단계는 감작유도 10회 주사 2주 후에 야기주사를 실시하였다. 기니픽의 사용하지 않은 옆구리의 털을 제모한 다음 야기시의 시험물질 농도와 동일 농도의 시험물질을 적용하였다. 야기 후 24시간과 48시간에 피부반응을 조사하였다.

일반중독증상 관찰은 시험물질 처리 후 매일 1회씩 실시하였고, 모든 동물에 대하여 주 1회 체중을 측정하였다.

피부반응의 평가는 피부반응 평가기준(표 11.)과 피부감작성 평가기준(표 12.)에 따라 시험물질로 감작야기 후 24시간과 48시간째에 홍반과 부종의 평점을 기록하였고, 감작율을 산출하였다. 체중자료에 대해 투여군과 대조군간에 Student's T test를 실시하여 통계학적인 유의차를 확인하였다.

다. 결 과

시험기간 중 시험물질의 적용에 기인된 사망동물은 관찰되지 않았으며, 일반증상 관찰 시 시험물질 적용에 기인된 이상소견은 관찰되지 않았다. 체중측정 결과 양성대조군은 처리군과 음성대조군에 비해 유의성있는 감소를 보였으나 모든 동물에서는 정상적인 체중증가를 보였다. 피부반응의 평가에 있어서 모든 동물의 처리부위의 관찰은 시험물질 야기 후 24시간과 48시간째에 실시한 결과 양성대조군을 제외한 모든 처리군과 음성대조군에서는 홍반과 부종 등의 피부반응이 관찰되지 않아 감작지수(평균피부반응점수)와 빈도지수(감작율)는 "0"으로 평가되었다.

표. 11 피부반응의 평가표

점 수	증 상
0	무반응
1	홍반이 경미하거나 또는 흩어져 나타남
2	홍반이 중등도 또는 전체적으로 나타남
3	전체적으로 강한 홍반 및 부종이 나타남

표. 12 피부감작성 평가기준

감작율(%)	등 급	분 류
0 ~ 8	I	매우약함
9 ~ 28	II	약 함
29 ~ 64	III	보 통
65 ~ 80	IV	강 함
81 ~ 100	V	매우강함

표. 13 *Bacillus subtilis* JKK238 SC (2.0×10⁸ cfu/ml)의 피부감작성시험결과 요약

시험군	사용 동물수	야기	관찰 시간	피부반응				감작지수*	빈도지수** (%)	등급
				0	1	2	3			
처리군	10	야기	24	10	0	0	0	0	0	I
			48	10	0	0	0	0	0	I
음성 대조군	5	야기	24	5	0	0	0	0	0	I
			48	5	0	0	0	0	0	I
양성 대조군	5	야기	24	0	1	2	2	2.2	100	V
			48	0	0	2	3	2.6	100	V

* 감작지수 : 피부반응의 합/Group의 동물수

** 빈도지수(감작율) : (피부반응을 보인 동물수/ Group의 동물수)100

라. 고찰 및 결론

Bacillus subtilis JKK238 5.0 X 10⁷ cfu/mL 제품의 기니피크에 대한 피부감작 정도를 확인하기"미생물농약의 등록시험 방법 및 등록 신청서 서류 검토 기준" (농촌진흥청고시 제 2004-3호, 2004. 2. 3.)을 기준으로 본 시험을 실시하였다.

예비시험결과 원액을 0.1 mL 적용한 결과 홍반이나 부종이 관찰되지 않아 감각 유도 및 감각야기시의 투여농도를 원액으로 설정 하였다.

본 시험결과 원액의 시험물질 0.1 mL을 Hartley계 수컷 기니픽의 피부에 피내 주사법으로 투여한 결과 시험기간 중 치사동물은 관찰되지 않았으며, 일반증상에 있어서는 시험물질 적용으로 인한 이상소견은 관찰되지 않았다.

처리군과 음성대조군에서 정상적인 체중의 증가를 보였다. 모든 동물의 처리 부위의 관찰은 시험물질 야기 후 24시간과 48시간째에 실시한 결과 양성대조군을 제외한 모든 처리군과 음성대조군에서는 홍반과 부종 등의 피부반응이 관찰되지 않아 감각지수는 "0"점이며 빈도지수는 0 %로 산출되어 I등급으로 평가되었다.

이상의 결과로 Hartley계 암컷 기니픽에 있어서 *Bacillus subtilis* JKK238 5.0 X 10⁷ cfu/mL 제품은 홍반과 부종 등의 피부반응을 유발하지 않아 본 시험물질은 피부에 대해 매우 약한 감작성을 가진 물질로 평가되었다.

제 2 절 *Bacillus subtilis* JKK238 5.0 X 10⁷cfu/mL 제품의 환경동물에 대한 안전성 시험

1. *Bacillus subtilis* JKK238 5.0 X 10⁷cfu/mL 제품의 담수어(잉어)에 대한 영향 시험

가. 서론

본 시험은 잉어를 이용하여 *Bacillus subtilis* JKK238 5.0 X 10⁷ cfu/mL 제품의 담수어에 대한 영향을 평가하기 위하여 "미생물농약의등록시험방법및등록신청서류 검토기준 (농촌진흥청고시제 2004-3호, 2004. 2. 3.)"을 기준으로 시험을 실시하였다.

나. 재료 및 방법

본시험에 사용된 잉어는 충청남도 내수면개발시험장에서 분양받아 한국화학시험연구원 환경독성실험실에서 사육 중인 개체를 사용하였으며 시험물질 투여시 전장 5 cm 내외의 개체를 이용하여 실시하였다.

시험생물의 사육 환경은 수온 22 ± 2 °C, 조명시간 16시간 (오전 6시 ~오후

10시), 조도 200~300 Lux의 실험실 조건에서 1일 1회 사료를 급여하여 사육하였으며, 순화는 시험시작전 7일간 순화수조(유리제 장방형 수조, 80 L 용량, 강남수족관 제작)에서 실시하였다. 사료는 잉어용 고형사료((주)우성사료)를 섭취시켰다.

본시험은 24 L(30 × 36 cm)용량의 원통형 유리수조에서 pH 6.5-8.0인 1주일 이상 정체시킨 지하수 20 L를 시험용수로 하여 실시하였으며, 시험기간 중 어체 중의 약 3 %에 해당하는 사료를 매일 급여하였고, 용존산소를 포화농도의 60 % 이상의 조건을 유지하기 위하여 시험기간 30일동안 일정량의 공기를 지속적으로 공급하였다. 시험어류의 수는 반복당 10마리의 어류를 3반복으로 노출시켰으며, 대조군은 시험용수 자체로 설정하였다.

본 시험의 시험물질인 *Bacillus subtilis* JKK238 5.0×10^7 cfu/mL 제품은 실제 살포량이 100배액, 200 L/10 a이므로 미생물농약 등록시험 기준과 방법에 의거해서 수심 15 cm로 계산하고 실제 처리량의 1,000배를 처리하도록 되어 있어 최종적으로 계산된 시험물질인 *Bacillus subtilis* JKK238 5.0×10^7 cfu/mL 제품 267 mL을 시험용수 20 L에 넣고 충분히 교반시킨 후 시험하였다. 이때 시험용수 중 미생물의 농도는 6.68×10^5 cfu/mL이었다.

시험어류의 노출은 반지수식으로 노출하여 수중 미생물농도를 측정하여 최초 처리한 미생물농도 보다 감소하는 시점에서 시험용수를 교체한 후 미생물 농약을 다시 처리하는 방법으로 시험을 실시하였다.

시험기간 중 시험용수 중의 미생물 농도측정과 어체 중 미생물의 감염유무를 조사하기 위하여 사용된 배지는 Nutrient Agar(Difco, Lot No.3267450)를 1 L당 23 g으로 하여 121 °C에서 15분간 멸균한 후 Plate를 만들어 사용하였다.

시험종료 후 전개체를 해부하여 아가미, 부레, 간을 채취하여 멸균생리식염수에 넣고 균질화시킨 다음 10배 단계 희석하여 nutrient agar plate에 접종한 후 35 °C에서 48시간 배양하여 미생물 수를 육안적으로 측정하였으며, 시험용수는 시험수조에서 사료를 채취한 후 멸균 생리식염수로 단계희석을 한 후 plate에 희석액을 100 μ l씩 분주하여 접종한 후 35 °C에서 48시간 배양하여 미생물 수를 육안적으로 측정하였다.

시험기간 중 검사항목으로 시험당일과 약제처리후 5, 10, 15, 20, 25일 및 시험종료시 DO, pH, 온도를 측정하였으며 DO는 Orion Research Incorporated의 DO meter(Model:810A+)를 pH는 Sartorius사의 pH meter(Model:PP-15)를 사용하여 측정하였다. 또한 약제처리 직후 및 매일 수중 미생물 농도를 측정하였다. 시험생물의 체중은 시험시작 및 시험종료시 측정하였다.

시험종료후 생존개체는 부검하고 부검소견을 기록함과 동시에 미생물농약 감

염여부 등을 조사하였다.

다. 결 과

표14. 담수어영향시험 기간 중 잉어의 치사수

처리농도 (cfu/mL)	생물수 (마리)	치사수(마리)						
		0day	5day	10day	15day	20day	25day	30day
대조군	30	0	0	0	0	0	0	0
6.68×10^5	30	0	0	0	0	0	0	0

시험기간 중 대조군 및 처리군 모두 일반중독증상 및 다른 특이증상은 관찰되지 않았다.

체중은 대조군에서 시험시작전 평균 5.07 ± 0.56 g, 시험종료후 평균 5.43 ± 0.66 g 이었고, 약제처리구에서 시험시작전 평균 5.03 ± 0.57 g, 시험종료후 평균 5.30 ± 0.66 g 이었다.

pH는 평균 8.07(최저 7.65 ~ 최고 8.36)이었고, DO는 평균 7.53 mg/L(최저 6.70 mg/L ~ 최고 8.18 mg/L)이으며, 시험기간의 평균수온은 21.7 °C(최저 21.0 °C ~ 최고 22.4 °C)이었다.

라. 고찰 및 결론

미생물 농약 *Bacillus subtilis* JKK238 5.0×10^7 cfu/mL 제품의 담수어에 대한 영향시험을 실시한 결과 약제처리후 30일이 경과하는 동안 시험생물의 치사는 없었다. 따라서 미생물 농약 시험기준과 방법에 의거하여 시험종료 후 전개체에 대하여 부검을 실시하였다. 또한 시험약제처리 후 수중 미생물 농도를 측정된 결과 약제처리후 10일이 경과하는 동안 미생물농도의 변화는 없는 것으로 판단되었으나, 시험용수의 혼탁으로 30일의 시험기간중 10일 경과후, 20일 경과후 2번의 시험용수를 교체하였다.

미생물 농약 시험기준과 방법에 따라 본시험에서도 시험종료후 전 개체에 대하여 부검을 실시한 결과 아가미와 장기에 대해 대조군과 비교하여 육안상의 차이는 발견할 수 없었으며 미생물 배양 결과 아가미에서만 10^2 수준으로 미생물이 검출되었다.

이상의 결과로 보아 간이나 부레 등의 장기에서 미생물이 검출되지 않았으므로 미생물의 체내 축적은 없는 것으로 판단된다.

제 3 장 *Streptomyces* AG-P 2.0 X 10⁸cfu/mL 원제의 포유동물 및 환경생물에 대한 안전성 시험

제 1 절 *Streptomyces* AG-P 2.0 X 10⁸cfu/mL 원제의 포유동물에 대한 안전성 시험

1. *Streptomyces* AG-P 2.0 X 10⁸cfu/mL 원제의 랫드에 대한 급성경구독성/병원성 시험

가. 서론

본 시험은 랫드를 이용하여 *Streptomyces* AG-P 2.0 X 10⁸ cfu/mL 원제를 단회 경구 투여시 나타나는 독성 반응을 평가하기 위하여 "생물농약의등록시험방법및등록신청서류 검토기준 (농촌진흥청고시제 2006-19호, 2006. 10. 16.)"을 기준으로 시험을 실시하였다.

나. 재료 및 방법

본시험에 사용된 랫드는 SPF급의 랫드를 (주)오리엔트에서 분양받아 사용하였으며 시험물질 투여시 12마리의 수컷(7주령, 268 ~ 280 g)과 12마리의 암컷(7주령, 160 ~ 230 g)을 이용하여 실시하였다.

본 시험의 환경은 온도 22 ± 2 °C, 상대습도 50 ± 10 %, 환기횟수 13~18회/hr, 조명시간 12시간 (오전 8시 ~오후 8시), 조도 200~300 Lux의 실험실 조건에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 사육하였으며, 순화 및 시험기간 중 철망케이지(wire cage, 500X300X200 mm, 대종기기 제작)에 5마리씩 넣어 사육하였다. 사료는 실험동물용 쥐사료((주)퓨리나코리아 (경기도 평택시 장당동 85-1))를, 물은 자외선 살균처리 된 음용수를 자유섭취 시켰다.

시험에 앞서 예비과정으로 동물 입수시 모든 동물의 건강상태에 대한 수의학적인 검역을 실시한 다음 도입하여 6 일간의 순화기간을 거쳐 건강한 동물만을 선정하여 사용하였으며, 순화기간을 거친 후 건강한 동물 중에서 체중을 기초로 하여 군 분리하였다. 군 분리시 군 평균체중과 표준편차를 계산하여 균등성 여부

를 확인하였다.

시험생물의 개체식별은 사육상자에는 시험유형, 시험번호, 시험물질, 군번호, 개체번호, 성별, 투여 용량 및 투여액량, 시험기간 및 시험책임자를 기재한 개체 식별카드를 부착하였으며, 개체식별은 유성매직을 이용하여 꼬리에 표시하였다.

시험기간 중 시험생물의 대변 및 시험종료 후의 장기에서의 *Streptomyces* AG-P 미생물 수를 측정하기 위하여 사용된 배지 Nutrient Agar(Difco, Lot No.3267450)를 1 L당 23 g으로 하여 121 °C에서 15분간 멸균한 후 Plate를 만들어 사용하였다.

시험물질의 투여는 *Streptomyces* AG-P의 경구 노출시의 안전성을 평가하기 위하여 경구로 투여하였으며, 대조군은 시험물질을 처리하지 않은 음성대조군을 설정하고 본 시험물질의 희석액으로 멸균된 생리식염수를 사용하므로 용매대조군을 별도로 두지 않았다.

투여량의 설정은 농촌진흥청고시 제2004-3호 "미생물농약의등록시험방법및등록신청서류검토 기준"에서의 투여농도는 개체 당 1.0×10^8 단위에 해당되는 미생물을 투여하도록 되어 있으므로 시험물질을 멸균생리식염수를 이용하여 10배 희석하여 1.0×10^8 cfu/mL를 투여하였다.

투여액량은 투여 군별 공히 1 mL/animal로 설정하여 투여하기 전 하룻밤 정도 절식시킨 후 경구 투여용 주사기를 이용하여 위내에 1회 강제 투여하였다.

시험물질을 경구 투여후 임상증상 관찰로 증상의 종류, 발현정도, 진행상황 및 가역성을 경시적으로 관찰, 기록하였다. 최소한 매일 1회 이상 임상증상을 관찰하였고 체중변화를 관찰하기 위하여 시험물질 투여직전, 투여 후 주 1회 및 부검시에 측정하였다.

시험 종료시에는 모든 생존동물은 외관검사를 실시한 후 부검하여 육안적인 이상 소견을 검사하였다.

미생물의 체외 배출상황을 관찰하기 위하여 시험물질 투여 후 1일, 3일, 7일 및 14일째에 대변을 채취하여 멸균생리 식염수에 넣고 균질화시킨 다음 10배 단계 희석하여 plate에 접종한 후 30°C에서 24시간 동안 배양하여 미생물 수를 육안으로 측정하였고, 미생물의 체내 잔존상황을 확인하기 위하여 시험물질 투여 후 3일, 7일, 14일 및 21일째에 부검하여 신장, 뇌, 간장, 폐, 비장, 위, 혈액, 임파절을 채취하여 멸균생리식염수에 넣고 균질화시킨 다음 10배 단계 희석하여 plate에 접종한 후 30°C에서 24시간동안 배양하여 미생물 수를 육안으로 측정하였다.

다. 결 과

관찰기간동안 암·수 모든 투여군에서 시험물질 투여에 기인된 임상증상은 관찰되지 않았고, 체중변화를 측정한 결과 시험기간 중 모든 투여동물에 대한 체중변화에 있어서 정상적인 체중 증가가 인정되었다. 모든 생존동물의 부검은 시험종료 후 에테르로 마취시켜 각 주요장기에 대한 육안적 관찰을 실시한 결과 모든 시험동물에서 시험물질 투여와 관련된 특이한 증상은 관찰되지 않았다. 시험물질 투여 후 1일, 3일, 7일 및 14일째에 대변을 채취하여 체외 배출 미생물 수를 측정한 결과 1일째에는 암·수 각각 3마리에서 검출되었고, 3일째에는 수컷 2마리, 암컷 3마리에서 각각 검출되었고 7일째부터는 검출된 미생물은 없었다.

시험물질 투여 후 3일, 7일, 14일 및 21일째에 부검하여 신장, 뇌, 간장, 폐, 비장, 위, 혈액, 임파절에서의 미생물 수를 측정한 결과 3일째에는 암·수 모든 동물의 위에서 검출되었고, 7일째에는 수컷 3마리, 암컷 2마리의 위에서 검출되었으나 7일째부터는 검출된 미생물은 없었다.

라. 고찰 및 결론

Streptomyces AG-P 2.0 X 10⁸ cfu/mL 원제에 대한 급성경구독성/병원성시험을 SD계 랫드를 사용하여 시험동물 당 1.0×10⁸ cfu를 1회 경구 투여한 후 3일, 7일, 14일 및 21일째에 부검하여 장기를 육안으로 관찰한 다음 체내 잔존 미생물 수와 1일, 3일, 7일 및 14일째의 체외 배출 미생물 수를 검사하였다. 또한 전 시험기간 동안 일반증상을 관찰하였으며 투여 후 주 1회씩 체중을 측정하였다.

본 시험결과 전 시험기간 동안 투여군에 있어서 사망례는 물론 시험물질 투여와 관련된 임상증상은 관찰되지 않았고, 체중변화에 있어서는 정상적인 체중증가를 보였다. 체내 잔존 미생물 수를 검사한 결과 암·수 위에서 7일째까지 검출되었고, 체외 배출 미생물 수를 검사한 결과에서는 암·수 3일째까지 대변에서 검출되었다. 생존동물에 대한 부검결과에 있어서는 시험물질 투여와 관련된 특이한 병리학적 소견은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로부터 랫드에 *Streptomyces* AG-P 2.0 X 10⁸ cfu/mL 원제를 단회 경구 투여시 7일까지 위에 잔존하고, 3일까지 대변으로 배출되나 14일 이후부터는 체내·외에서 검출된 미생물도 없고 부검결과에서도 어떠한 병리학적 소견도 관찰된 것이 없으므로 *Streptomyces* AG-P 2.0 X 10⁸ cfu/mL 원제를 1.0×10⁸ cfu/ml의 단위에 해당하는 미생물을 랫드에 단회 경구 투여시 14일 이내에 체내에서 모두 제거되고 영향이 없는 것으로 판단되었다.

2. *Streptomyces* AG-P 2.0 X 10⁸cfu/mL 원제의 랫드에 대한 급성경피독성 시험

가. 서론

본 시험은 랫드를 이용하여 *Streptomyces* AG-P 2.0 X 10⁸ cfu/mL 원제를 단회 경피 투여시 나타나는 독성 반응을 평가하기 위하여 "생물농약의등록시험 방법및등록신청서류 검토기준 (농촌진흥청고시제 2006-19호, 2006. 10. 16.)"을 기준으로 시험을 실시하였다.

나. 재료 및 방법

본시험에 사용된 랫드는 SPF급의 랫드를 (주)오리엔트에서 분양받아 사용하였으며 시험물질 투여시 5마리의 수컷(6주령, 180 ~ 200 g)과 5마리의 암컷(6주령, 160 ~ 180 g)을 이용하여 실시하였다.

본 시험의 환경은 온도 22 ± 2 °C, 상대습도 50 ± 10 %, 환기횟수 13~18회/hr, 조명시간 12시간 (오전 8시 ~오후 8시), 조도 200~300 Lux의 실험실 조건에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 사육하였으며, 순화 및 시험기간 중 철망케이지(wire cage, 500 X 300 X 200 mm, 대중기기 제작)에 5마리씩 넣어 사육하였다. 사료는 실험동물용 쥐사료((주)퓨리나코리아 (경기도 평택시 장당동 85-1))를, 물은 자외선 살균처리 된 음용수를 자유섭취 시켰다.

시험에 앞서 예비과정으로 동물 입수시 모든 동물의 건강상태에 대한 수의학적인 검역을 실시한 다음 도입하여 7 일간의 순화기간을 거쳐 건강한 동물만을 선정하여 사용하였으며,순화기간을 거친 후 건강한 동물 중에서 체중을 기초로 하여 군 분리하였다. 군 분리시 군 평균체중과 표준편차를 계산하여 균등성 여부를 확인하였다.

시험생물의 개체식별은 사육상자에는 시험유형, 시험번호, 시험물질, 군번호, 개체번호, 성별, 투여 용량 및 투여액량, 시험기간 및 시험책임자를 기재한 개체 식별카드를 부착하였으며, 개체식별은 유성매직을 이용하여 꼬리에 표시하였다.

시험물질의 투여는 *Streptomyces* AG-P의 노출예상경로가 피부이므로 피부 노출시의 안전성을 평가하기 위하여 피부로 투여하였으며, 대조군은 시험물질을 처리하지 않은 음성대조군을 설정하고 본 시험물질의 희석액으로 멸균된 생리식염수를 사용하므로 용매대조군을 별도로 두지 않았다.

투여량의 설정은 농촌진흥청고시 제2004-3호 "미생물농약의등록시험방법및등록신청서류검토 기준"에서의 투여농도는 개체 당 1.0×10⁸ 단위에 해당되는 미생

물을 투여하도록 되어 있으므로 시험물질을 멸균생리식염수를 이용하여 10배 희석하여 1.0×10^8 cfu/ml를 투여하였다.

투여방법은 시험물질 처리를 위해 투여 전날 시험동물의 등부위의 체모를 가급적 넓게 피부가 손상되지 않도록 제모하였으며, 시험물질의 도포면적은 체표면적의 10 %정도(랫드: 4 cm × 5 cm)로 하였다. 제조된 시험물질을 제모한 부위에 고르게 도포하고 시험물질의 유실을 막기 위해 비자극성 테이프로 24시간 고정시켜 주었다. 노출 종료 후 도포물을 제거하고 피부에 남아 있는 시험물질을 증류수로 잘 닦아 주었다.

시험물질을 경피 투여후 임상증상 관찰로 약제 처리 후 4시간까지는 매 시간마다 일반증상을 관찰하였고 그 다음날부터는 매일 1회씩, 투여 개시 후 14일째까지 일반증상 및 피부의 홍반, 부종 등의 증상을 관찰하였다. 체중변화를 관찰하기 위하여 시험물질 투여직전, 투여 후 7일 및 14일에 측정하였다.

시험 종료시에는 모든 생존동물은 외관검사를 실시한 후 부검하여 육안적인 이상 소견을 검사하였다.

다. 결 과

관찰기간동안 사망동물이 발생하지 않았으며, 암·수 모든 투여군에서 투여에 기인한 일반증상 및 투여부위에서 홍반, 부종 등의 증상은 관찰되지 않았고, 체중변화를 측정한 결과 시험기간 중 모든 투여동물에 대한 체중변화에 있어서 정상적인 체중 증가가 인정되었다. 모든 생존동물의 부검은 시험종료 후 에테르로 마취시켜 각 주요장기에 대한 육안적 관찰을 실시한 결과 모든 시험동물에서 시험물질 투여와 관련된 특이한 증상은 관찰되지 않았다.

라. 고찰 및 결론

Streptomyces AG-P 2.0 X 10^8 cfu/mL 원제에 대한 급성 경피 독성을 SD계 랫드를 사용하여 시험동물당 1.0×10^8 cfu를 1회 경피 투여한 후 2주간 일반증상 및 체중변화를 관찰 조사하였다.

본 시험결과 투여군에 있어서 암·수 모두 사망례는 물론 피부의 홍반, 부종을 포함한 임상 증상이 관찰되지 않았고, 체중변화에 있어서도 정상적인 체중 증가가 인정되었으며, 또한 생존동물에 대한 부검결과에 있어서도 특이한 육안적 병리소견은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로부터 랫드에 *Streptomyces* AG-P 2.0 X 10^8 cfu/mL 원제를 단회 경피 투여시 영향이 없는 것으로 판단되었다.

제 2 절 *Streptomyces* AG-P 2.0 X 10⁸cfu/mL 원제의 환경생물에 대한 안전성시험

1. *Streptomyces* AG-P 2.0 X 10⁸cfu/mL 원제의 담수어(잉어)에 대한 영향 시험

가. 서론

본 시험은 잉어를 이용하여 *Streptomyces rimosus* AG-P 2.0 X 10⁸ cfu/mL 원제의 담수어에 대한 영향을 평가하기 위하여 "생물농약의등록시험방법및등록신청서류 검토기준 (농촌진흥청고시제 2006-19호, 2006. 10. 16.)"을 기준으로 시험을 실시하였다.

나. 재료 및 방법

본시험에 사용된 잉어는 경기도 민물고기연구소에서 분양받아 한국화학시험연구원 환경독성실험실에서 사육 중인 개체를 사용하였으며 시험물질 투여시 전장 5 cm 내외의 개체를 이용하여 실시하였다.

시험생물의 사육 환경은 수온 22 ± 2 °C, 조명시간 16시간 (오전 6시 ~ 오후 10시), 조도 200~300 Lux의 실험실 조건에서 1일 1회 사료를 급여하여 사육하였으며, 순화는 시험시작전 7일간 순화수조(유리제 장방형 수조, 80 L 용량, 강남수족관 제작)에서 실시하였다. 사료는 잉어용 고품사료((주)우성사료)를 섭취시켰다.

본시험은 24 L(30 × 36 cm)용량의 원통형 유리수조에서 pH 6.5-8.0인 1주일 이상 정체시킨 지하수 20 L를 시험용수로 하여 실시하였으며, 시험기간 중 어체 중의 약 3 %에 해당하는 사료를 매일 급여하였고, 용존산소를 포화농도의 60 % 이상의 조건을 유지하기 위하여 시험기간 30일동안 일정량의 공기를 지속적으로 공급하였다. 시험어류의 수는 반복당 10마리의 어류를 3반복으로 노출시켰으며, 대조군은 시험용수 자체로 설정하였다.

본 시험의 시험물질인 *Streptomyces rimosus* AG-P 2.0 X 10⁸ cfu/mL 원제는 제품(2×10⁶cfu/mL)의 실제 살포량이 100 배액, 300 L/10 a이므로 미생물농약 등록시험 기준과 방법에 의거해서 수심 15 cm로 계산하고 실제 처리량의 1,000배를 처리하도록 되어 있어 최종적으로 계산된 시험물질인 *Streptomyces rimosus* AG-P 2.0 X 10⁸ cfu/mL 원제 4.00 mL을 시험용수 20 L에 넣고 충분히 교반시

킨 후 시험하였다. 이때 시험용수 중 미생물의 농도는 4×10^4 cfu/mL이었다.

시험어류의 노출은 반지수식으로 노출하여 수중 미생물농도를 측정하여 최초 처리한 미생물농도 보다 감소하는 시점에서 시험용수를 교체한 후 미생물 농약을 다시 처리하는 방법으로 시험을 실시하였다.

시험기간 중 시험용수 중의 미생물 농도측정과 어체 중 미생물의 감염유무를 조사하기 위하여 사용된 배지는 1L Flask에 Bennett's agar (glucose 1.0 %, yeast extract 0.1 %, beef extract 0.1 %, peptone 0.2 %, agar 1.5 %) 을 증류수에 녹인 후 최종 부피 500 mL 로 맞춰 잘 혼합한 후 멸균(autoclave, 121 °C 15~20 분) 한 다음 plate를 만들어 사용하였다.

시험종료후 전 개체에 대하여 해부하여 아가미, 부레, 간을 채취하여 멸균생리 식염수에 넣고 균질화시킨 다음 10배 단계 희석하여 Bennett's agar plate에 접종한 후 30 °C에서 72시간 배양하여 미생물 수를 육안적으로 측정하였으며, 시험용수는 시험수조에서 시료를 채취한 후 멸균 생리식염수로 단계희석을 한 후 plate에 희석액을 100 μ l씩 분주하여 접종한 후 35 °C에서 48시간 배양하여 미생물 수를 육안적으로 측정하였다.

시험기간 중 검사항목으로 시험당일과 시험용수 교체전, 후 및 시험종료시 DO, pH, 온도를 측정하였으며 DO는 Orion Research Incorporated의 DO meter(Model:810A+)를 pH는 Sartorius사의 pH meter(Model:PP-15)를 사용하여 측정하였다. 또한 약제처리 직후 및 시험용수 교체전, 후에 수중 미생물 농도를 측정하였다. 시험생물의 체중은 시험시작 및 시험종료시 측정하였다.

시험종료후 생존개체는 부검하고 부검소견을 기록함과 동시에 미생물농약 감염여부 등을 조사하였다.

다. 결 과

표15. 담수어영향시험 기간 중 잉어의 치사수

처리농도 (cfu/mL)	생물수 (마리)	치사수(마리)						
		0day	5day	10day	15day	20day	25day	30day
대조군	30	0	0	0	0	0	0	0
4.0×10^4	30	0	0	0	0	0	0	0

시험기간 중 대조군 및 처리군 모두 일반중독증상 및 다른 특이증상은 관찰되지 않았다.

체중은 대조군에서 시험시작전 평균 2.70 ± 0.51 g, 시험종료후 평균 3.01 ± 0.53 g 이었고, 약제처리구에서 시험시작전 평균 2.64 ± 0.46 g, 시험종료후 평균 2.96 ± 0.54 g 이었다.

pH는 평균 8.26(최저 7.70 ~ 최고 8.61)이었고, DO는 평균 7.95 mg/L(최저 6.54 mg/L ~ 최고 8.48 mg/L)이었으며 평균수온은 22.2 °C(최저 21.0 °C ~ 최고 23.4 °C)였다.

라. 고찰 및 결론

미생물 농약 *Streptomyces rimosus* AG-P 2.0×10^8 cfu/mL 원제의 담수어에 대한 영향시험을 실시한 결과 약제처리후 30일이 경과하는 동안 시험생물의 치사는 없었다. 또한 시험약제처리 후 수중 미생물 농도를 측정된 결과 약제처리후 1일 경과시 미생물농도가 초기농도의 1/10 이하로 떨어졌으므로 시험기간중 매일 시험용수를 교체하였다.

미생물 농약 시험기준과 방법에 따라 본시험에서도 시험종료후 전 개체에 대하여 부검을 실시한 결과 아가미와 장기에 대해 대조군과 비교하여 육안상의 차이는 발견할 수 없었으며 미생물 배양 결과 아가미, 장기 및 근육에서 미생물이 검출되지 않았다.

이상의 결과로 보아 장기 및 근육에서 미생물이 검출되지 않았으므로 미생물의 체내 축적은 없는 것으로 판단된다.

2. *Streptomyces* AG-P 2.0×10^8 cfu/mL 원제의 담수무척추동물(물벼룩)에 대한 영향 시험

가. 서론

본 시험은 물벼룩(*Daphnia magna*)를 이용하여 *Streptomyces rimosus* AG-P 2.0×10^8 cfu/mL 원제의 담수무척추동물에 대한 영향을 평가하기 위하여 "생물 농약의등록시험방법및등록신청서류 검토기준 (농촌진흥청고시제 2006-19호, 2006. 10. 16.)"을 기준으로 시험을 실시하였다.

나. 재료 및 방법

본시험에 사용된 물벼룩(*Daphnia magna*)는 농촌진흥청 농업과학기술원에서 분양받아 한국화학시험연구원 환경독성실험실에서 계대사육 중인 개체를 사용하였으며 시험물질 투여시 생후 24시간 미만의 어린 개체를 이용하여 실시하였다.

시험생물의 사육 환경은 수온 20 ± 2 °C, 조명시간 16시간 (오전 6시 ~ 오후 10시)의 실험실 조건에서 1일 1회 순수배양한 *chlorella vulgaris*를 급여하여 사육하였으며, 계대사육은 원통형의 1200 mL 유리용기에서 실시하였다.

본시험은 1200 mL 유리용기에서 재합성수(Hard Reconstituted Water Medium, US EPA, 1991) 1000 mL을 시험용수로 하여 실시하였으며, 시험기간 중 1×10^4 cell/mL이 되도록 *chlorella vulgaris*를 매일 급여하였다. 시험생물의 수는 반복당 20마리의 물벼룩을 3반복으로 노출시켰으며, 대조군은 시험용수 자체로 설정하였고 멸균대조군은 처리농도와 동일한 농도의 시험물질을 멸균(autoclave, 121 °C 15~20 분) 한 다음 여과하여 투여하였다.

본 시험의 시험물질인 *Streptomyces rimosus* AG-P 2.0 $\times 10^8$ cfu/mL 원제는 제품(2×10^6 cfu/mL)의 실제 살포량이 100배액, 300 L/10 a이므로 미생물농약 등록시험 기준과 방법에 의거해서 수심 15 cm로 계산하고 실제 처리량의 1,000배를 처리하도록 되어 있어 최종적으로 계산된 시험물질인 *Streptomyces rimosus* AG-P 2.0 $\times 10^8$ cfu/mL 원제 0.20 mL을 시험용수 1000 mL에 넣고 충분히 교반시킨 후 시험하였다. 이때 시험용수 중 미생물의 농도는 4.0×10^4 cfu/mL이었다.

시험물벼룩의 노출은 반지수식으로 노출하여 수중 미생물농도를 측정하여 최초 처리한 미생물농도 보다 감소하는 시점에서 시험용수를 교체한 후 미생물 농약을 다시 처리하는 방법으로 시험을 실시하였다. 시험용수의 양은 40 mL이상/마리로 하고 수온은 20 ± 2 °C, 용존산소량은 포화농도의 60 %이상의 조건에서 21일간 노출하였다.

시험기간 중 시험용수 중의 미생물 농도를 조사하기 위하여 사용된 배지는 1L Flask에 Bennett's agar (glucose 1.0 %, yeast extract 0.1 %, beef extract 0.1 %, peptone 0.2 %, agar 1.5 %) 을 증류수에 녹인 후 최종 부피 500 mL 로 맞춰 잘 혼합한 후 멸균(autoclave, 121 °C 15~20 분) 한 다음 plate를 만들어 사용하였다.

시험기간 중 검사항목으로 시험당일과 시험용수 교체전, 후 및 시험종료시 DO, pH, 온도를 측정하였으며 DO는 Orion Research Incorporated의 DO meter(Model:810A+)를 pH는 Sartorius사의 pH meter(Model:PP-15)를 사용하여 측정하였다. 또한 약제처리 직후 및 시험용수 교체전, 후 수중 미생물 농도를 측

정하였다.

다. 결 과

표16. 담수무척추동물영향시험 기간 중 물벼룩의 유영저해수

처리농도 (cfu/mL)	생물수 (마리)	유영저해수(마리)				
		0day	5day	10day	15day	21day
대조군	60	0	0	0	0	0
멸균대조군	60	0	0	0	0	0
4.0×10^4	60	0	0	0	0	0

시험기간 중 대조군, 멸균대조군 및 처리군 모두 일반중독증상 및 다른 특이증상은 관찰되지 않았다.

pH는 평균 7.80(최저 7.51 ~ 최고 8.00)이었고, DO는 평균 7.98 mg/L(최저 7.49 mg/L ~ 최고 8.73 mg/L)이다. 시험기간의 평균수온은 20.4 ± 0.35 °C(최저 19.7 °C ~ 최고 21.0 °C)였다.

라. 고찰 및 결론

미생물 농약 *Streptomyces rimosus* AG-P 2.0×10^8 cfu/mL 원제의 담수무척추동물에 대한 영향시험을 실시한 결과 약제처리후 21일이 경과하는 동안 시험생물의 유영저해는 없었다. 또한 시험약제처리 후 수중 미생물 농도를 측정된 결과 약제처리후 1일 경과시 미생물농도가 초기농도의 1/10 이하로 떨어졌으므로 시험기간중 매일 시험용수를 교체하였다.

미생물 농약 *Streptomyces rimosus* AG-P 2.0×10^8 cfu/mL 원제의 담수무척추동물에 대한 영향시험의 종합적인 결론은 미생물 농약 *Streptomyces rimosus* AG-P 2.0×10^8 cfu/mL 원제는 담수무척추동물에 대해서 영향이 없는 것으로 판단되었다.

3. *Streptomyces* AG-P 2.0 X 10⁸cfu/mL 원제의 조류에 대한 영향 시험

가. 서론

본 시험은 메추리(*Coturnix japonica*)를 이용하여 *Streptomyces rimosus* AG-P 2.0 X 10⁸ cfu/mL 원제의 조류에 대한 영향을 평가하기 위하여 "생물농약의등록시험방법및등록신청서류 검토기준 (농촌진흥청고시제 2006-19호, 2006. 10. 16.)"을 기준으로 시험을 실시하였다.

나. 재료 및 방법

본시험에 사용된 메추리(*Coturnix japonica*)는 일산 메추리 부화장에서 분양받아 사용하였으며 시험물질 투여시 14 ~ 28일령의 어린 개체를 이용하여 실시하였다.

본 시험의 환경은 온도 24 ± 2 °C, 상대습도 50 ± 10 %, 조명시간 16시간 (오전 6시 ~오후 10시), 조도 200~300 Lux의 실험실 조건에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 사육하였으며, 순화 및 시험기간 중 철망케이지(wire cage, 600 × 415 × 405 mm)에 10마리씩 넣어 사육하였다. 사료는 어린메추리용 사료(축협)를, 물은 자외선 살균처리 된 음용수를 자유섭취 시켰다.

시험생물의 수는 반복당 10마리의 메추리를 3반복으로 노출시켰으며, 대조군은 시험용수 자체로 설정하였고, 멸균대조군은 처리농도와 동일한 농도의 시험물질을 멸균(autoclave, 121 °C 15~20 분) 한 다음 여과하여 투여하였다.

시험물질의 투여는 *Streptomyces rimosus* AG-P의 경구 노출시의 안전성을 평가하기 위하여 경구로 투여하였으며, 대조군은 시험물질을 처리하지 않은 음성 대조군을 설정하고 본 시험물질의 희석액으로 멸균된 생리식염수를 사용하므로 용매대조군을 별도로 두지 않았다.

투여량의 설정은 농촌진흥청고시 제2004-3호 "미생물농약의등록시험방법및등록신청서류검토 기준"에서의 투여농도는 개체 당 10⁸ 단위에 해당되는 미생물을 투여하도록 되어 있으므로 시험물질 원액 2.0×10⁸ cfu/mL를 매일 0.2mL 씩 5일간 투여하였다.

시험기간 중 검사항목으로 깃털세움, 날개처짐, 원기소실, 머리떨굼, 눈감음, 침 흘림, 설사, 호흡곤란, 쇠약, 사망 등을 매일 관찰하였다. 시험생물의 체중은 투여 직전, 투여후 7일, 14일, 21일, 28일에 측정하였다. 시험중 이상증상 개체 또는 사망한 개체는 없었으므로 시험 종료 후 농약미생물의 감염여부는 조사하지 않았다.

다. 결 과

표17. 조류(鳥類)에 대한 영향시험 기간중 메추리의 치사수

처리농도 (cfu/mL)	생물수 (마리)	치사수(마리)				
		0day	7day	14day	21day	28day
대조군	30	0	0	0	0	0
멸균대조군	30	0	0	0	0	0
1.0×10 ⁸	30	0	0	0	0	0

시험기간 중 대조군 및 처리군 모두 일반중독증상 및 다른 특이증상은 관찰되지 않았다.

시험시작전 조류의 평균체중은 약제처리구에서는 69.20 g(최저 44.71 g ~ 최고 88.20 g), 대조군에서는 67.19 g(최저 45.21 g ~ 최고 90.52 g), 멸균대조구에서는 65.26 g(최저 43.29 g ~ 최고 80.78 g)이었고, 시험종료후 조류의 평균체중은 약제처리구에서는 98.24 g(최저 51.15 g ~ 최고 124.54 g), 대조군에서는 107.78 g(최저 76.53 g ~ 최고 137.91g), 멸균대조구에서는 101.35 g(최저 58.34 g ~ 최고 147.37 g)이었다.

라. 고찰 및 결론

미생물 농약 *Streptomyces rimosus* AG-P 2.0 X 10⁸ cfu/mL 원제의 조류에 대한 영향시험을 실시한 결과 약제처리 후 30일이 경과하는 동안 시험생물의 치사는 없었으며 깃털세움, 날개처짐, 원기소실, 머리떨굼, 눈감음, 침흘림, 설사, 호흡곤란, 쇠약등의 이상증상도 나타내지 않았다. 따라서 미생물 농약 시험기준과 방법에 의거하여 시험종료시 시험생물 전개체를 부검하여 대조군, 멸균 대조군 및 처리군을 부검하여 육안상으로 이상여부를 판단하였을 때 차이를 발견할 수 없었으므로 병리적인 이상은 없는 것으로 판단되었다. 또한 시험기간 중 실시한 체중측정에서 대조군의 경우 투여직전의 체중에 비해 투여 후 28일의 체중이 160.4 %, 멸균 대조군에서는 155.3% 증가하였고, 약제처리구에서는 투여직전보다 142.0 %의 체중증가율을 나타내어 대조군, 멸균대조군 및 약제처리구간의 체중변화율은 거의 비슷한 결과를 나타냈다.(분산분석 결과 P >0.05 이었으므로 유의성

이 인정되지 않았다)

따라서 미생물 농약 *Streptomyces rimosus* AG-P 2.0×10^8 cfu/mL 원제의 조류에 대한 영향은 없는 것으로 판단된다.