

내생·근권세균을 이용한 환경친화적
고추역병 방제용 미생물살균제 개발
Development of biocontrol agents using
antagonistic bacteria against Phytophthora
blight of pepper

연구기관
고려대학교

농림수산식품자료실



0015955

농림수산식품부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “내생·근권세균을 이용한 환경친화적 고추역병 방제용 미생물 살균제 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2008 년 4 월 24 일

주관연구기관명 : 고려대학교

총괄연구책임자 : 김 기 덕

세부연구책임자 : 김 기 덕

참 여 연 구 원 : 천 세 철

연 구 원 : 김 의 남

연 구 원 : 상 미 경

연 구 원 : 오 지 연

연 구 원 : 김 홍 조

협동연구기관명 : (주) 경농

협동연구책임자 : 황 인 천

연 구 원 : 장 철

연 구 원 : 김 형 민

연 구 원 : 김 남 규

요 약 문

I. 제 목

내생·근권세균을 이용한 환경친화적 고추역병 억제용 미생물 살균제 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

현재 우리 나라의 고추 재배에 있어서 가장 많은 수량 손실을 일으키는 병은 역병이며, 현재 고추 역병의 방제는 주로 유기 합성 농약을 사용하여 수행되어지고 있다. 그러나 이런 유기 합성 농약의 오남용은 저항성 균주의 출현, 오존층의 파괴, 토양과 작물내의 잔류 등의 문제를 야기 시키며, 가장 널리 사용되는 토양 훈증제는 토양 미생물상을 파괴시키므로 유기 합성 농약을 대체하기 위한 많은 연구들이 이뤄져 왔고, 그 중에도 환경친화적인 방제방법으로 길항 미생물을 이용한 생물적 방제가 가장 바람직한 방제 방법으로 생각되어지고 왔다. 고추 역병의 생물적 방제를 위한 내생·근권 세균 및 진균의 상용화 가능성을 탐색하기 위하여 재배 토양에 존재하는 내생·근권 세균 및 진균을 이용하여 농생태계에 있어 안정하고, 고추 역병 방제에 대하여 효과적으로 억제할 수 있는 균주를 선발하여, 배양실, 온실, 포장 조건 아래에서 기존의 농용살균제와 비교하여 실제 상용화에 대한 가능성에 대한 평가가 필요하다. 본 연구의 대상인 내생·근권 세균은 이미 생물학적으로 근권정착력이 뛰어난 만큼, 시용시기부터 정착시기까지의 생존율유지를 위한 간단한 제재법 및 시용법의 개발을 통해 효과적으로 방제효과를 상승시키며, 이를 통하여 그동안 확립되지 않았던 미생물 농약의 표준화를 위한 기반기술을 제공하게 될 것이다. 또한 내생·근권 세균의 유용 미생물 자원을 확보하며, 이를 이용한 미생물 살균제 개발로 인하여 우리나라의 고추 재배의 농약 의존 및 외화 유출을 감소시킬 수 있을 것이다. 최근에 친환경적 상품에 대한

소비자 선호도 증가함에 따라 미생물 농약을 이용한 친환경적 재배 방법에 대한 관심이 증가하고 있으며, 이러한 미생물 농약을 이용하여 재배한 작물에 대한 수요가 증가할 것이다. 그러므로, 본 과제의 내생·근권세균을 이용한 고추역병 방제용 미생물 살균제 개발과 생물적 방제용 미생물제제의 상업화연구를 통하여 고추 역병을 방제하기 위한 미생물 농약은 농가에 고부가가치를 창출할 수 있을 것이며, 친환경적 재배 방법으로 이용될 수 있을 것이다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 내생·근권세균을 이용한 환경친화적 고추역병 억제용 미생물 살균제 개발을 위하여, 선발된 내생·근권세균(CCR04, CCR80, GSE09, ISE13, ISE14)의 고추 역병에 대한 포장검정을 수행하였다. 포장실험에서 내생·근권세균의 병 방제효과 기준 설정 및 방제가 결정을 하였고, 상용 농약과의 내생·근권세균 역병 방제 효과 능력 비교 검정하였다. 선발된 내생·근권 세균과 길항미생물의 생리, 분자생물학적 분류, 동정을 위하여, 16S rDNA 염기서열 분석, Biolog system, FAMES analysis, TEM 과 SEM을 통한 morphological analysis, 생리, 생화학적 방법을 통한 분류를 하였으며, 선발된 내생·근권 세균의 고추병에 대한 병 억제 작용 기작 연구를 위하여, 선발 내생·근권세균이 처리된 토양에서 미생물상, 총 진균 및 세균의 미생물상을 조사하였고, fluorescent diacetate analysis에 의한 토양 미생물 및 내생·근권세균의 활성 평가를 하였다. 또한 선발 내생·근권세균의 spontaneous rifampicin - resistance mutant 제조하여 이를 이용한 식물체 근권정착력을 조사하였고, 선발 내생·근권세균이 분비 하는 효소 및 siderophore, HCN, antibiotics 생성에 의한 병억제 기작을 연구하였다. 내생·근권세균을 처리한 고추에서 길항세균의 식물근권 정착 능력을 연구하기 위하여, 고추 근권에 내생·근권세균 처리 후 시간 별로 뿌리를 채취하여 근권에서의 미생물상 조사하였으며, 채취한 뿌리 조직에서 현미경을 이용한 식물 근권에서 선발 내생·근권세균의 존재 형태를 관찰하였다. 탄소원 첨가에 의한 생물학적 방제 효과의 증진 연구를 위하여, 선발된 내생·근권세균의 생물적 방제 효과 증진을 위한

연구를 수행하였으며, 생물학적 방제 균주에 의해서만 잘 이용되는 탄소원 선발하여 방제 효과 증진에 관하여 연구하였다.

이러한 내생·근권세균의 상용화를 위하여, 균주의 기초배양연구를 수행하여 선발된 균주가 반복적인 계대배양을 통해 고유한 특성이 불활성화 되지 않는 여부를 검정하여 산업용 균주로 사용될 수 있는 안정성을 확보하였으며, 길항미생물 시험용원제를 확보하였다. 확보된 길항미생물 시험용원제를 대량배양하기 위한 최적화된 배양법을 확립하였으며, 생물농약 등록에 만족하는 제형화기술을 개발하였다. 이를 위하여 미생물농약이 요구하는 생존하고 있는 유효미생물의 밀도를 일정수준으로 유지시켜 주는 제형화기술을 개발하였으며, 각각의 균주의 특성에 따른 제품의 경제성을 확보하기 위한 최소한의 실용성 기준을 설정하고 이 규격에 맞는 제형을 개발하였다. 이렇게 개발된 원제를 생물농약 등록을 위한 원제독성시험을 수행하였으며, 대량배양을 통한 시제품을 상업화에 필요한 약효 및 경제성을 확보할 수 있도록 제작하였다. 이러한 시제품에 대한 독성평가를 수행하여 상업화 가능성을 확인하였으며, 생산된 시제품이 등록시험의 요건을 만족하는지에 대한 포장시험을 수행하여 상업화 가능성을 평가하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

2001년부터 2003년까지 우리나라 전국 12개 지역의 고추, 토마토, 오이의 재배 포장과 식물뿌리에서 내생근권세균 439균주를 분리하였으며, 이 중 고추의 radicle, seedling과 성체식물에서 고추 역병에 대하여 병억제 효과가 뛰어난 5균주 (CCR04, CCR80, GSE09, ISE13, ISE14)를 포장에서 root-dip처리와 관주처리하여 고추 역병에 대한 생물적 방제 효과를 검증하였다. 2005년과 2006년 선발세균을 관주처리한 인위병접종 포장검증에서 선발된 3균주(CCR04, CCR80, ISE14)가 고추 역병에 대하여 병억제 효과가 있었다. 2006년과 2007년 선발세균을 root-dip 처리한 자연병발생 포장에서는 4균주 (CCR04, CCR80, GSE09, ISE14)

가 지속적인 병억제 효과를 나타내었다. ISE13균주는 2006년도 실험에서 고추 역병을 억제하지 못하였다. 2007년도 고추 수량 평가에서는 CCR80과 ISE14 균주가 고추의 수량을 증가시켰으며, 세균을 포장에 처리하는 방법과 관계없이 처리된 세균은 병평가 결과와 유사하게 고추 역병에 의한 감염율이 감소되었다. 또한 처리된 세균은 근권토양에 존재하는 세균과 미생물의 밀도에 영향을 주지 않았다. 그러므로 순차적 선발 방법에 의해 선발된 길항 세균은 고추 뿌리에 정착함으로써 역병으로부터 보호할 것이며, 이 선발 내생근권세균은 관주처리나 root-dip 처리에 의해 고추 역병을 방제하는 생물적 방제제로써 효과적이다. 선발된 내생·근권세균 (CCR04, CCR80, GSE09, ISE13, ISE14)와 이미 고추 역병에 대한 포장검증을 완료한 기선발 내생·근권세균 (KJ1R5, KJ9C8, KJ2C12)를 16S rDNA 염기서열, FAME 분석과 biologi 분석, 생리생화학적 분석을 통하여 동정하였다. 그 결과 KJ1R5는 *Chryseobacterium* sp., KJ9C8은 *Chryseobacterium wanjuense*, KJ2C12는 *Bacillus luciferensis*, CCR04와 CCR80은 *Pseudomonas corrugata*, GSE09는 *Flavobacterium* sp. ISE13은 *Lysobacter enzymogenes*이고, ISE14는 *Chryseobacterium indologenes*로 동정되었다. 선발 내생 세균의 병억제 기작을 밝히기 위하여 선발 세균이 항생물질과 세포외 효소 분비, biofilm, HCN, siderophore을 형성하는지 특성을 조사하였으며, 식물 뿌리에서의 정착률과 고추 역병균과의 경쟁 관계를 평가하였다. 선발 세균 중 ISE13 균주는 항생물질과 세포외 효소를 분비하는 능력이 있었으며, CCR04와 CCR80균주는 biofilm 형성과 swarm 능력과 식물 뿌리에서의 정착률이 매우 뛰어났다. 다른 GSE09, ISE13, ISE14균주도 대조균으로 사용한 *E. coli* 균주에 비하여 식물 뿌리 정착률이 현저하게 뛰어났으며 이러한 결과로 보아, 선발 세균은 식물 뿌리와 근권에 효과적으로 생존 및 정착함으로써 고추 역병으로부터 감염부위를 보호할 것이라 예상된다.

역병 방제용 미생물농약의 개발을 위해 *Chryseobacterium* sp. ISE14 균주를 갖고 배양적 특성분석 및 제제화, 대량배양 그리고 시생산한 제품의 소면적 포장 활성검정을 실시하였다. ISE14 균주는 10회 연속 계대배양 후에도 7.5×10^8 cfu/ml 수준의 생존균수를 유지하였으며, 배양에 적합한 탄소원은 glucose 1%, 질소원은

yeast extract 2%를 선발하였다. 선발된 배지조성으로 5L jar fermentor에서 30°C, 600rpm, 1vvm 조건으로 24hr 배양한 결과 2×10^9 cfu/ml 수준의 최대생존균수를 확보하였으며, 이 균주를 50L Jar fermentor(working volume 30L)에서 배양 중 2차례의 glucose (50g/150ml)를 feeding한 결과 O.D.(optical density)값이 21.3에서 37.0으로 상승하였으나 최대생존균수의 증가는 발생하지 않았다. 이 균주의 원제는 고상과 액상의 형태로 검토하여 균주의 생존에 유리한 형태인 고상으로 결정하였다.

동결건조된 고상원분의 생존균수는 8×10^9 cfu/g이며, 이 원분의 제형은 고상의 수화제, 입제, 입상수화제, 액상의 액상수화제를 검토하였으며, 그 결과 제제의 경시안정성시험을 통해 균주 생존력이 우수한 고상의 수화제를 선발하였으며, 부재 및 계면활성제를 검토하여 구조토와 음이온 계면활성제인 PX를 선발하였다. 선발된 수화제는 50°C보관 7일 후 5.2×10^4 cfu/g, 14일 후 2×10^2 cfu/g이었으며, 이후에는 생존균수가 나타나지 않았다. 실온보관의 경우 7일 후 6.7×10^6 cfu/g, 14일 후 2.8×10^5 cfu/g이었고, 처리56일까지 $9 \sim 5.6 \times 10^3$ cfu/g수준의 생존균수를 유지하였다.

ISE14의 원제 및 시제품에 대해 급성경구독성, 급성경피독성, 어독성을 검토한 결과 급성경구, 급성경피 독성시험에서 반수치사약량(LD₅₀)은 5,000mg/kg이상으로 독성분류상 저독성으로 확인되었으며, 어독성시험의 경우 반수치사농도(LC₅₀, 48hrs)는 10ppm이상으로서 독성분류상 어독성Ⅲ급으로 확인되었다.

ISE14균주의 대량생산은 산업용 발효기(5톤)와 동결건조기를 이용하여 2.7×10^8 cfu/g의 원제를 생산한 후 혼합기에서 부자재와 혼합하여 30%수화제를 시생산하였다. 생산된 원제의 생물활성 결과 온실 51.3%와 소규모 포장 49.0%의 역병 방제효과를 보였으며, 시제품의 경우 역병 다발생 노지포장(경북 의성 소재)에서 검증하였으며, 그 결과 500배 회석처리시 최종약제처리 8일후 36.4%, 29일후 16.5%의 낮은 방제효과를 나타내었다.

2. 활용에 대한 건의

본 연구를 통한 결과를 바탕으로 하여, 선발 세균 5균주 (CCR04, CCR80, GSE09, ISE13, ISE14)는 고추 역병에 대한 생물적 방제제 혹은 식물 성장 촉진 세균으로써 현재 특허 출원중에 있으며, 3균주 (KJ1R5, KJ9C8, KJ2C12)는 일반 기탁 균주로 등록하였다. 이러한 생물적 방제 세균에 대하여 우리나라 토착의 생물 자원으로써 확보함으로써 앞으로 이 균주를 이용한 다양한 연구 및 제형화 공정 개발을 통한 대량 배양 및 이용이 가능할 것으로 예상된다.

본 연구 결과에서 도출된 생물적 방제 세균에 대한 연구 결과에 대하여 국내 및 국제학술지 (SCIE와 SCI 공인 잡지)에 이미 게재되었거나 게재 중에 있으며, 앞으로 선발된 내생근권세균의 활용 방안과 병억제 기작 등에 대하여 국내외 학술지에 게재하거나 학술회의에서 발표할 예정이다. 본 연구를 통하여 확인된 내생근권세균의 생물적 방제 효과를 바탕으로 실제 농가에서의 재배 기술과 국내외 생물적 방제 분야에 크게 기여하여 앞으로 우리나라의 친환경 무공해 고추 재배 및 방제 시스템 개발에 활용될 수 있을 것이다.

SUMMARY

Currently, yield and quality of marketable peppers are frequently limited by Phytophthora blight caused by the oomycete pathogen *Phytophthora capsici* in Korea. The control for Phytophthora blight of pepper is dependent on use of chemicals such as metalaxyl, phenylamide fungicide or fosetyl-Al. However, consistent application and misuse of these chemicals can cause development of fungicide resistant pathogen, destruction of an ozone layer, residue problems of agrichemicals. Therefore, as an alternative for these control measures, biological control with many different types of microorganisms has been regarded as an attractive, environmental-sound alternative for plant disease control. In addition, consumers prefer environmental friendly vegetables and concerns and demands on environmentally friendly biocontrol agents have been increased. Therefore we will produce a higher value added in agriculture and environmentally friendly growing procedures through development of biocontrol agents using antagonistic rhizobacteria against Phytophthora blight of pepper.

In this study, we isolated 439 rhizobacterial strains from soil of cucumber, pepper and tomato of 12 regions of Korea from 2001 to 2003. Out of 439 bacterial strains, 16 potentially antagonistic strains were screened through radicle and seedling assays and *in planta* trials, and five candidate strains, CCR04, CCR80, GSE09, ISE13, and ISE14, were selected for field tests. we conducted a sequential screening procedure to select antagonistic rhizobacteria against *Phytophthora capsici* and evaluated control efficacy of drench or root-dip treatments with the selected strains against Phytophthora blight of pepper in the field. In 2005 and 2006 tests, the control efficacy of the five strains was examined against Phytophthora blight of pepper plants drenched with the bacterial suspension in artificial pathogen inoculation. Three strains,

CCR04, CCR80, and ISE14, consistently reduced the disease in both tests. As another form of application, the control efficacy of root-dip treatment was examined on pepper plants just prior to transplanting in the field with natural inoculation in 2006 and 2007. In these tests, four strains, CCR04, CCR80, GSE09, and ISE14, showed consistently good control efficacy against *P. capsici*, and strains CCR80 and ISE14 increased pepper fruit yield. The strain-treated roots had less infection rates by *P. capsici* compared with control roots regardless of drench or root-dip treatments. In addition, the strains did not affect the populations of bacteria and fungi in the rhizosphere soil. Therefore, the antagonistic strains selected from the screening procedure provided significant protection against *P. capsici* through pepper root colonization. These strains could be applied by either drench or root-dip treatment as alternatives to agricultural chemicals to control Phytophthora blight of pepper. We identified previously selected antagonistic bacteria KJ1R5 as *Chryseobacterium* sp., KJ9C8 as *Chryseobacterium wanjuae*, KJ2C12 as *Bacillus luciferensis* and CCR04 and CCR80 as *Pseudomonas corrugata*, GSE09 as *Flavobacterium* sp., ISE13 as *Lysobacter enzymogenes*, and ISE14 as *Chryseobacterium indologenes*. For estimation of disease suppressive mechanisms of antagonistic rhizobacteria, production of antibiotics, extracellular enzyme, biofilm, HCN, siderophore and root colonization and competition by the selected antagonistic rhizobacteria were tested. Strain ISE13 produce antibiotics and extracellular enzyme such as proteinase and chitinase, and strain CCR04 and CCR80 have biofilm production, swarming ability and effective root colonization ability. Strain GSE09, ISE13, ISE14 also have root colonization ability compared to *E. coli* as control strain. Therefore, the selected antagonistic rhizobacteria will effectively colonize on pepper roots and protect infection courts against *Phytophthora capsici* and have biocontrol effects.

For the development of biological control agents to Phytophthora blight, culture characteristic analysis, formulation, industrial fermentation and field test were conducted with *Chryseobacterium* sp. ISE14. Strain ISE14 was maintained of 7.5×10^8 cfu(colony forming unit)/ml after ten times of subculture. 1% glucose as a carbon source and 2% yeast extract as a nitrate source were selected to optimized culture condition. Strain ISE14 was cultured on 5L jar fermentor in selected medium for 24hr at 30°C (600rpm, 1vvm). This culture broth has 2×10^9 cfu/ml of survival colony unit. Twice glucose feeding were conducted during the strain ISE14 culture on 50L jar fermentor. From the fermentation test, cultured broth's OD (optical density) was increased from 21.8 to 37.0, but maximum survival colony units were not increased. Solid type was selected as strain ISE14 technical type because this type have advantage of colony survival compared with liquid type.

Survival colony units of freeze-dried solid technical powder in strain ISE14 was 8×10^9 cfu/g. This technical powder was examined in wettable powder, granule, water dispersible granule and suspension concentrate formulation. Through the aging test of each formulation, wettable powder was selected. After it was examined to change inerts and surfactants, diatomaceous earth as inert and anion surfactant PX as surfactant were selected. CFU at 50°C was maintained 5.2×10^4 cfu/g during 7days and 2.8×10^5 cfu/g during 14days in wettable powder formulation, but cfu was decreased after 14days. Survival cfu at room temperature was maintained 6.7×10^6 cfu/g during 7days, 2.8×10^5 cfu/g during 14days and $9-5.6 \times 10^3$ cfu/g during 56days.

Technique and formulation of strain ISE14 were examined to acute oral toxicity, acute dermal toxicity and fish toxicity. As a results, each lethal dose 50 (LD₅₀) of acute oral toxicity and acute dermal toxicity were over 5,000mg/kg. In case of fish toxicity, lethal concentration (LC₅₀,48hrs) was over 10ppm, these results not have any problem of toxicity.

Through the fermentation of strain ISE14, 2.7×10^8 cfu/g of technical was produced by using five ton industrial fermenter and freeze dryer and then 30% wettable powder was produced after mixed with co-fomulants. Efficacies of strain ISE14 technical against Phytophthora blight in greenhouse and small scale field were 51.3 and 49.0%, respectively. Strain ISE14 formulation was tested in pepper field of prevalent Phytophthora blight (Uiseong in Korea), but efficacies were low being 36.4% at 8 days after last treatment and 16.5% at 29 days after last treatment, respectively.

CONTENTS

Chapter 1. Overview of research and development-----	21
Chapter 2. The current status of national and international research and development -----	30
Chapter 3. Contents and results of research and development -----	39
1. Contents of research and development -----	39
2. Results of research and development -----	56
I. Development of biocontrol agents using antagonistic bacteria against Phytophthora blight of pepper	
1. Evaluation of anatagonistic activity of selected rhizobacteria against Phytophthora blight through a sequential procedure and field test-----	56
1.1 Collection of antagonistic rhizobacteria -----	56
1.2. Sequential selection through a radicle assay -----	57
1.3. Sequential selection through a seedling assay -----	59
1.4. Sequential selection through a plant trial -----	59
1.5. Field tests of selected antagonistic rhizobacteria -----	61
2. Identification of selected antagonsitic rhizobacteria through physiological and molecular analysis -----	78
2.1. Identification of 16S rDNA sequence analysis-----	78
2.2. Morphological observation of antagonistic rhizobacteria by the	

transmission electron microscopy-----	85
2.3. Biolog analysis-----	87
2.4. Fatty acid methyl ester (FAME) analysis-----	88
2.5. Physiological and biochemical characterization -----	92
3. Disease suppressive mechanisms of selected antagonistic rhizobacteria against <i>Phytophthora capsici</i> -----	98
3.1. Production of antibiotic(s)-----	98
3.2. Production of extracellular enzymes -----	103
3.3. Biofilm production-----	106
3.4. HCN production-----	107
3.5. Siderophore production-----	108
3.6. Swarming ability-----	109
3.7. Phytohormone IAA production by antagonistic rhizobacteria---	110
4 .Colonization of antagonistic rhizobacteria on pepper roots-----	111
5. Competition between antagonistic rhizobacteria and <i>Phytophthora capsici</i> in the rhizosphere soil-----	113
6. Enhancement of biocontrol activity of antagonistic rhizobacteria with amendment of carbon sources against <i>Phytophthora capsici</i> -----	114
6.1. Utilization of carbon sources by strain ISE14-----	114
6.2. Enhancement of biocontrol activity of antagonistic rhizobacteria strain KJ1R5 with amendment of carbon sources-----	118
6.3. Enhancement of biocontrol activity of antagonistic rhizobacteria strain KJ1R5 with amendment of various carbon sources against <i>Phytophthora capsici</i> -----	120

II. Commercialization study of a microbial agent for biological control of Phytophthora blight of pepper

1. Basic culture condition study and confirmed experimental technical of strain	123
1.1. Pure line of strain certification and stabilization	123
1.2. Study of culture pattern through the type culture of selected strain	124
2. Pilot scale culture and determination of technical formulation	125
2.1. Establishment of optimum culture conditions for biological control	125
2.2. Preliminary test for development of pilot scale fermentation process	133
3. Development of formulation	139
3.1. Basic formulation study	139
3.2. Investigation of formulation and recipe improvement	143
3.3. Investigation of co-formulants	144
3.4. Establishment of stable formulation	145
3.5. Field experiment and production of experimental product	148
4. Toxicity test of the biopesticide technical and product	148
4.1. Acute oral toxicity test of ISE14 technical	148
4.2. Acute dermal toxicity test of ISE14 technical	152
4.3. Acute fish toxicity test of ISE14 technical	156
4.4. Acute oral toxicity test of ISE14 30% wettable powder	159
4.5. Acute dermal toxicity test of ISE14 30% wettable powder	162

4.6. Acute fish toxicity test of ISE14 30% wettable powder-----	166
5. Production of experimental product through the mass production-----	170
5.1. Large scale fermentation of strain ISE14-----	170
5.2. Production of experimental product-----	170
6. Bioassay and field experiment-----	170
6.1. <i>In vivo</i> bioassay of basic formulation-----	170
6.2. Bioassay of basic formulation in small scale field test-----	171
6.3. Efficacy test of experimental product in field-----	173
Chapter 4. The achievements of research goals and contribution to the related research areas-----	175
Chapter 5. The plans for practical application of results of research and development -----	181
Chapter 6. Degree of accomplishment of the objects-----	185
Chapter 7. References-----	190

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요-----	21
제 2 장	국내의 기술개발 현황-----	30
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과-----	39
	1절 연구개발수행 내용-----	39
	2절 연구개발수행 결과-----	56

세부과제 : 내생·근권세균을 이용한 생물적 방제용 미생물 살균제 개발

1.	기선발된 내생·근권세균의 고추 역병에 대한 길항 효과 및 포장 검정-----	56
	가. 길항 근권 세균의 수집-----	56
	나. 길항 세균의 순차적 선발 (유근 검정)-----	57
	다. 길항 세균의 순차적 선발 (유묘 검정)-----	59
	라. 길항 세균의 순차적 선발 (성체식물 검정)-----	59
	마. 길항 세균의 포장 검증-----	61
2.	선발된 내생·근권세균과 길항 미생물의 생리, 분자생물학적 분류 및 동정--	78
	가. 16S rDNA sequence 분석을 통한 동정-----	78
	나. 고추 역병에 대한 내생근권 길항 세균의 투과전자현미경 관찰--	85
	다. Bdg 분석-----	87
	라. Fatty acid methyl ester (FAME) analysis를 통한 동정 -----	88
	마. 생리생화학적 특성에 의한 동정-----	92
3.	선발된 내생·근권 세균의 고추병에 대한 병억제 작용 기작 연구-----	98
	가. 항생 물질 분비-----	98

나. 세포의 효소 분비-----	103
다. Biofilm 형성-----	106
라. HCN 형성-----	107
마. Siderophore 형성-----	108
바. Swarming ability-----	109
사. 근권 세균에 의한 식물호르몬 IAA의 생성-----	110
4. 내생·근권세균을 처리한 고추에서 길항 세균의 식물근권 정착 능력 연구--	111
5. 내생·근권세균의 고추역병균과의 경쟁에 대한 연구-----	113
6. 탄소원 첨가에 의한 생물학적 방제 효과의 증진 연구-----	114
가. ISE14의 탄소원 이용도 조사-----	114
나. 탄소원 첨가에 의한 생물적 방제균 KJ1R5의 고추 역병 방-----	118
다. 여러 탄소원의 추가에 의한 KJ1R5의 <i>P. capsici</i> 에 의한 고추 역병 방제 효과 증진-----	120

협동과제 : 생물적 방제용 미생물제제의 상업화 연구

1. 선발된 균주에 대한 기초배양연구 및 시험용 원제 확보-----	123
가. 생산균주의 순계 확인 및 안정화-----	123
나. 선발 균주의 type culture를 통한 배양 양상 구명-----	124
2. Pilot scale 배양 수행 및 배양액의 원제형태 결정-----	125
가. 기존배지를 출발점으로 생물적 방제를 위한 최적 조건으로 배양법 확립-----	125
나. 대량배양 공정개발을 위한 예비시험-----	133

3. 생물농약 등록에 만족하는 제형화 개발-----	139
가. 기본 제형 연구 -----	139
나. 제형개발 및 처방개선 검토-----	143
다. 약효증진용 부자제 탐색 -----	144
라. 계면활성제의 종류에 따른 안정적인 제형개발-----	145
마. 포장시험 및 제조허가용 시제품 제조-----	148
4. 생물농약 원제 및 제품에 대한 독성시험 -----	148
가. ISE14원제의 마우스를 이용한 단회 투여 경구독성시험-----	148
나. ISE14 원제의 랫드를 이용한 단회 투여 경피독성시험-----	152
다. ISE14 원제의 잉어를 이용한 단회 투여 급성독성시험-----	156
라. ISE14 30% 수화제의 마우스를 이용한 단회 투여 경구독성시험-----	159
마. ISE14 30% 수화제의 랫드를 이용한 단회 투여 경피독성시험-----	162
바. ISE14 30% 수화제의 잉어를 이용한 단회 투여 급성 독성시험-----	166
5. 대량생산을 통한 시제품 제작-----	170
가. ISE14 균주의 대량배양-----	170
나. 시제품제작-----	170
6. 생물약효시험 및 포장시험-----	170
가. in vivo 시험에서 기본제제의 활성 검정-----	170
나. 소포장실험을 통한 기본제제의 활성 검정-----	171
다. 포장시험에서 시제품의 활성 검정-----	173
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	175
제 5 장 연구개발결과의 활용계획-----	181

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보-----185

제 7 장 참고문헌-----190

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절. 연구개발의 목적

1. 순차적 선발방법인 radicle assay와 seedling assay를 통하여 고추 역병 균에 대해 우수한 길항효과를 나타내는 균주를 이미 선발하였다. 이러한 선행 연구에서 3균주(KJ1R5, KJ9C8, KJ2C12)는 포장시험에서도 고추 역병에 우수한 억제 효과가 있음을 밝혀내었다. 따라서 이러한 방법으로 지속적인 연구 결과로 전국 토양에서 분리된 새로운 5균주(CCR04, CCR80, GSE09, ISE13, ISE14)가 성체 고추 식물에서 고추 역병에 억제 효과가 있었다. 이러한 기 선발 균주를 포장에서 병 억제 효과를 검증하고자 하였다.
2. 길항세균에 의한 저항성은 직접적인 항균효과에 의해서 나타날 수 있으므로, 내생·근권세균을 고추 역병균과 대치 배양함으로써 길항세균의 직접적인 항균효과 여부를 조사하고자 하였다.
3. 선행 연구에서 고추 역병 억제 효과가 있는 KJ1R5, KJ9C8, KJ2C12와 새로 선발된 CCR04, CCR80, GSE09, ISE13, ISE14 균주를 16S rDNA 염기서열 분석, 생리 생화학적 실험, 지방산 분석에 의한 분석 및 동정을 하였다.
4. 고추병에 대한 길항 효과를 갖는 미생물 균주가 분비하는 하는 enzyme (cellulase, laminarinase 등)과 siderophore 및 HCN, 근권내 정착 능력 등 병 억제 작용 기작을 연구하였다.
5. 선발된 길항 미생물의 영양학적 기초 연구를 시행함으로써 양분에 대한 요구도를 조사하여 고추병 억제 효과를 극대화 하며, 제형화를 위한 기초 연구를 시행하였다.

6. 상용화를 위한 선발된 균주의 기초배양연구를 수행한다. 선발된 균주가 반복적인 계대배양을 통해 고유한 특성이 불활성화 되지 않는 여부를 검정하여 산업용 균주로 사용될 수 있는 안정성을 확보하며 균주의 배양특성을 검정하고 이에 따른 기초배양조건을 확립하였다.
7. 생물농약 등록을 만족하는 제형화를 위해 미생물농약이 요구하는 생존하고 있는 유효미생물의 밀도를 일정수준으로 유지시키며 각각의 균주의 특성에 따른 제품의 경제성을 확보하기 위한 최소한의 실용성 기준을 설정하고 이 규격에 맞는 제형을 개발하였다.
8. 생물농약 등록을 위한 원제독성시험을 시행한다. 생물농약으로 등록하기 위한 등록법상의 시험법 확립하고 독성시험을 수행한 후 시험성제제출 면제항목 검토하였다.
9. 대량배양을 통한 시제품제작을 위하여 2차년도 수행된 pilot 생산법 및 제형화 기술을 바탕으로 대량배양을 수행하고 이에 따른 시제품을 생산하고, 상업화에 필요한 약효 및 경제성을 확보할 수 있도록 제작하였다.
10. 생물농약 등록시험에 준하는 포장시험을 하여 생산된 시제품이 등록시험의 요건을 만족하는지에 대해 검증하여 실제 상업화 됐을 때의 경제성을 판단하였다..

제 2 절. 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

가. 고추 역병 방제를 위한 미생물 농약의 필요성

고추 식물에 있어서 가장 많은 수량 손실을 일으키는 병은 역병이며, 현재 고추 역병의 방제는 주로 유기 합성 농약을 사용하여 수행되어지고 있다. 그러나

이런 유기 합성 농약의 오남용은 저항성 균주의 출현, 오존층의 파괴, 토양과 작물내의 잔류 등의 문제를 야기 시키며, 가장 널리 사용되는 토양 훈증제는 토양 미생물상을 파괴시키므로 유기 합성 농약을 대체하기 위한 많은 연구들이 이뤄져 왔고, 그 중에도 환경친화적인 방제방법으로 길항 미생물을 이용한 생물적 방제가 가장 바람직한 방제 방법으로 생각되었다 (Okami and Hotta, 1988).

나. 21세기 고추 역병의 생물적 방제를 위한 내생·근권 세균 및 진균의 상용화 가능성

최근 환경 보전적 지속농업과 관련지어 고추 역병의 생물학적 방제연구가 집중적으로 수행되어야 하며, 이 연구를 통하여 재배 토양에 존재하는 내생·근권 세균 및 진균을 이용하여 농생태계에 있어 안정하고, 고추 역병 방제에 대하여 효과적으로 억제할 수 있는 균주를 선발하여, 배양실, 온실, 포장 조건 아래에서 기존의 농용살균제와 비교하여 실제 상용화에 대한 가능성에 대한 평가가 필요하다.

다. 고추 역병의 생물적 방제를 위한 내생·근권 세균의 미생물 농약으로서의 이용 가능성

내생·근권 세균은 포장에서의 생존율을 높임으로써 온실조건이나 포장에서의 방제효과를 유지시켜야 한다. 따라서 길항 미생물 제제법과 사용법에 대한 표준화 연구가 필요한 실정이다. 본 연구의 대상인 내생·근권 세균은 이미 생물학적으로 근권정착력이 뛰어난 만큼, 시용시기부터 정착시기까지의 생존율유지를 위한 간단한 제제법 및 시용법의 개발을 통해 효과적으로 방제효과를 상승시킬 수 있을 것이다. 또 이를 통하여 그동안 확립되지 않았던 미생물 농약의 표준화를 위한 기반기술을 제공하게 될 것이다.

라. 내생·근권 세균의 자원 확보의 필요성

내생·근권세균의 생태적 파악은 기존에 알려져 있지 않은 근권 미생물의 자원을 확보를 통해 농업적으로 유용 미생물군을 다양화할 수 있다는 점에서 유용하

다. 따라서 이들 내생·근권세균의 분자적 분류를 통하여 이들 미생물군의 근권 생태계에서의 생태학적 위치를 파악하고, 개체군변동양태를 쉽게 감지할 수 있는 분자적 지표의 개발이 시급한 실정이다.

2. 경제·산업적 측면

가. 우리나라의 고추 재배의 현황

고추는 1614년 우리나라에 도입된 후 쌀과 함께 전통적으로 중요한 식품 중 하나로 고추와 고추 부산물을 이용한 식품이 69종에 달하며, 농가 소득기여도가 연간 8,500억원으로 농가 경제 주요작물 8~11위를 차지하고 있는 중요 작물이다. 농수산물의 개방과 함께 국제적으로 품질 경쟁력을 볼 때 중국의 산동성산 고추만이 경쟁 상대가 되고 있지만, 가격 경쟁력은 외국에 비해 3배정도 높은 수준이기 때문에 품질 우위를 지키기 위한 노력이 요구되고 있다.

나. 우리나라의 고추 재배의 농약 의존 및 외화 유출

우리나라의 집약적 고추 재배는 현재 매우 농약에 의존적이고 사용되는 농약은 거의 전량 원제를 외국에서 수입하고 있으며 이로 인한 외화 유출은 매우 심각하며 환경오염 또는 큰 사회문제가 되고 있다. 그리고 특허제도에 의한 새로운 기술사용은 막대한 기술료 등의 외화유출을 유발하고 있으며 외국선진국의 기술적 종속을 탈피하기 위하여 토착 길항미생물을 이용한 고추 역병 방제기술의 개발이 매우 필요하다.

다. 친환경적 상품에 대한 소비자 선호도와 미생물 농약의 가능성

우리나라를 비롯한 전 세계는 현재 식량 및 식품의 안정성에 많은 관심을 기울이고 있다. 특히 채소의 경우 기존의 유기 합성 농약을 사용한 것보다는 농약을 사용하지 않고 재배한 채소가 더 비싼 가격임에도 불구하고 소비자의 선호도가 증가하고 있는 실정이다. 따라서 고추 역병을 방제하기 위해 유기 합성 농약보다는 미생물 농약을 사용하여 친환경적으로 재배한 것이 더 높은 소비자 선호

도를 가질 것으로 예상된다.

라. 고추 역병 방제를 위한 미생물 농약의 고부가가치 창출

우리나라의 집약적 고추재배는 현재 매우 농약에 의존적이고 사용되는 농약은 거의 전량 원제를 외국에서 수입하고 있으며 이로 인한 외화 유출은 매우 심각하다. 그러므로 외국선진국의 기술적 종속을 탈피하기 위하여 토착 길항미생물과 내생·근권 세균을 이용한 고추 역병 방제기술의 개발은 고부가가치의 무공해 고추생산과 수확 후 농산물 저장, 유통은 21세기의 소비자에게 안전한 농산물의 공급과 풍요로운 삶을 가져다 줄 것이다.

3. 사회·문화적 측면

가. 친환경적 고추 역병의 방제를 위한 생물적 방제의 필요성

현대 농업에서 고추 역병의 효율적인 방제를 위해서는 합성 농약사용이 불가피한 실정이다. 그러나 이들 합성 농약의 오남용에 따른 환경 및 인체에 부작용이 생긴다. 따라서, 최근의 신농약으로서 기존의 약효위주에서 벗어나 인축에 독성이 낮고, 병해충 및 잡초에 대한 활성이 높은 반면 환경 및 자연 생태계에 안전한 방향으로 전환되어 고도의 선택성, 저독성 및 환경안정성이 기대되는 길항미생물을 이용한 고추 역병 방제법 개발연구가 절실하게 요구되고 있다.

나. 내생·근권 세균을 이용한 친환경농약 개발 및 실용화의 필요성

WTO의 출범과 중국의 WTO 가입으로 우리나라 농업생산물을 지키기 위해서는 친환경농업을 통한 고품질 생산물이 경쟁력이 있다. 또한 유엔환경개발회의(UNCED)에 우리나라에서도 화학적 농약사용량을 2004년까지 25% 내리기로 하는 등 친환경적 식물병 방제 수단을 육성해야하는 상황에서 내생·근권 세균을 이용한 고추 역병 방제는 유기합성농약과는 달리 생태계를 파괴하거나 작물에 독성이 잔류하는 등의 부작용이 없어 요즘 특히 강조되는 친환경적 방제방법이라고 할 수 있다.

4. 기술도입의 타당성

가. 미생물을 이용한 생물적 방제 기술은 외국에서 도입하여 국내에서 발생하는 식물병을 방제하는데 있어서 도입된 길항 미생물들이 우리나라의 기후 및 풍토에 정착하고 국내에 존재하는 다양한 병원미생물상에 효과를 발휘하는데 많은 문제점이 있다.

나. 길항근권세균의 작물에 병방제 능력은 길항근권세균이 작물 근권에 얼마나 정착할 수 있는냐에 따라 결정된다. 특히, 토양의 물리 화학적 상태, 근권의 미생물상, 작물의 종류에 따라 길항 근권세균의 정착력은 큰 차이를 나타낸다. 그러므로 외국에서 개발된 고효성 길항 근권세균 일지라도 국내에서의 작물재배환경에서 정착하여 그 기능을 발휘하기란 기대하기 어렵다.

다. 국내의 고추 역병을 방제하기 위해서는 방제 효과가 뚜렷한 내생근권세균을 개발하는 것이 보다 더 실용적이다. 그리고 도입 기술료(Royalty)를 고려해 볼 때 국내 생리활성 길항 미생물제제를 개발하는 것이 훨씬 저렴하고 장기적으로 새로운 고추 역병 방제제 개발 기반을 확립할 수 있을 것이다.

제 3 절. 연구개발의 범위

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2005)	<ol style="list-style-type: none"> 1. 기선발된 내생·근권 세균 (CCR04, CCR80, GSE09, ISE13, ISE14)의 고추 역병에 대한 1차년도 포장검정 2. 선발된 내생·근권 세균과 길항 미생물의 생리, 분자생물학적 분류, 동정 3. 탄소원 첨가에 의한 생물학적 방제 효과의 증진 연구 4. 상용화를 위한 선발된 균주의 기초배양연구 5. 길항미생물 시험용 원제 확보 	<ul style="list-style-type: none"> - 내생·근권세균의 병방제효과 기준 설정 및 방제가 결정 - 상용 농약과의 내생·근권세균 역병 방제 효과 능력 비교 검정 - 포장에서 선발 내생·근권세균의 고추 역병 방제효과 검정 - Biolog system, FAMES analysis, TEM 과 SEM을 통한 morphological analysis, 생리, 생화학적 방법을 통한 분류, 동정 - 16S rDNA gene sequence를 통한 분류, 동정 - 지방산 분석, G+C 함량 분석 - DNA 교잡에 의한 분류, 동정 - 선발된 내생·근권세균의 생물적 방제 효과 증진을 위한 연구를 수행 - 생물학적 방제 균주에 의해서만 잘 이용되는 탄소원 선발 및 방제 효과 증진 - 메타락실과의 혼용 효과 구명 - 선발된 균주가 반복적인 계대배양을 통해 고유한 특성이 불활성화 되지 않는 여부를 검정하여 산업용 균주로 사용될 수 있는 안정성을 확보 - 균주의 배양특성을 검정하고 이에 따른 기초배양조건을 확립 - Complex매지 배양을 통해 안정된 약효를 갖는 원제를 확보

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
2차 년도 (2006)	1. 기선발된 내생·근권세균의 고추 역병에 대한 2차년도 포장검정	<ul style="list-style-type: none"> - 내생·근권세균의 병방제효과 기준 설정 및 방제가 결정 - 상용 농약과의 내생·근권세균 역병 방제 효과 능력 비교 검정 - 포장에서 선발 내생·근권세균의 고추 역병 방제 효과 검정
	2. 선발된 내생·근권 세균의 고추병에 대한 병역제 작용 기작 연구	<ul style="list-style-type: none"> - 선발 내생·근권세균이 처리된 토양에서 미생물상, 총 진균 및 세균, actinomycetes, pseudomonas, 고추역병 등의 미생물상 조사 - fluorescent diacetate analysis에 의한 토양 미생물 및 내생·근권세균의 활성 평가 - 선발 내생·근권세균의 spontaneous rifampicin - resistance mutant 제조 및 이를 이용한 식물체 근권정착력 조사 - 선발 내생·근권세균이 분비 하는 enzyme (cellulase, laminarinase 등) 및 siderophore, HCN, antibiotics 생성에 의한 병역제 기작 연구
	3. 내생·근권 세균을 처리한 고추에서 길항세균의 식물근권 정착 능력의 연구	<ul style="list-style-type: none"> - 고추 근권에 내생·근권세균 처리 후 시간 별로 뿌리를 채취하여 근권에서의 미생물 상 조사 - 채취한 뿌리 조직에서 현미경을 이용한 식물 근권에서 선발 내생·근권세균의 존재 형태 관찰
	4. 탄소원 첨가에 의한 생물학적 방제 효과의 증진 연구	<ul style="list-style-type: none"> - 선발된 내생·근권세균의 생물적 방제 효과 증진을 위한 연구를 수행 - 생물학적 방제 균주에 의해서만 잘 이용되는 탄소원 선발 및 방제 효과 증진 - 메타락실과의 혼용 효과 구명
	5. Scale up 생산을 위한 pilot 배양	<ul style="list-style-type: none"> - 1차 년도에 확보된 미생물 기초배양 정보를 pilot scale에 적용하여 상용화 가능성 여부를 검토 - 미생물 growth에 의한 생존 미생물수 뿐만 아니라 생물적 방제에 적용되는 factor가 최적화될 수 있게 배양법을 확립
	6. 생물농약 등록을 만족하는 제형화기술의 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 미생물농약이 요구하는 생존하고 있는 유효미생물의 밀도를 일정수준으로 유지시켜 주는 제형화 기술의 개발 - 각각의 균주의 특성에 따른 제품의 경제성을 확보하기 위한 최소한의 실용성 기준을 설정하고 이 규격에 맞는 제형의 개발
	7. 생물농약 등록을 위한 원제독성시험	<ul style="list-style-type: none"> - 생물농약으로 등록하기 위한 등록법상의 시험법 확립 - 독성시험 tier 1 수행 후 시험성제 제출 면제항목 검토

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
3차 년도 (2007)	1. 탄소원 첨가에 의한 생물학적 방제 효과의 증진 연구	<ul style="list-style-type: none"> - 선발된 내생·근권세균의 생물적 방제 효과 증진을 위한 연구를 수행 - 생물학적 방제 균주에 의해서만 잘 이용되는 탄소원 선발 - 탄소원 첨가에 의한 생물학적 방제 효과의 증진 - 메타락실과의 혼용 효과 구명
	2. 내생·근권세균의 고추역병균과의 경쟁에 대한 연구	<ul style="list-style-type: none"> - 내생·근권세균의 근권에서의 population과 고추 식물의 정착 부위를 현미경상에서 고추 역병균과의 경쟁에 대한 연구
	3. 대량배양을 통한 시제품제작	<ul style="list-style-type: none"> - 2차 년도 수행된 pilot 생산법 및 제형화기술을 바탕으로 대량배양을 수행하고 이에 따른 시제품을 생산 - 상업화에 필요한 약효 및 경제성을 확보할 수 있도록 제작
	4. 시제품에 대한 독성시험	<ul style="list-style-type: none"> - 대량생산을 통해 생산된 시제품에 대한 독성평가를 수행 - 제품독성 tier 1 수행 -> 상업화 가능성확인
	5. 생물농약 등록 시험에 준하는 포장시험	<ul style="list-style-type: none"> - 생산된 시제품이 등록시험의 요건을 만족하는지에 대한 포장시험을 통해 실제 상업화 했을 때의 경제성을 판단

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1절. 국내외 관련기술의 현황과 문제점

1. 국내에서의 현황과 문제점

가. 국내 연구기관들이 선진 외국처럼 세균, 진균 등을 사용하여 식물병 방제를 위한 길항미생물 탐색 및 실용화 연구를 하고 있으나 여전히 연구 단계 및 기초 단계의 실용화 연구를 수행하여 왔다. 작물재배에서 길항미생물을 이용한 식물병 방제에 대한 연구는 대학교, 농업관련 국가연구소, 정부출연연구소 등을 중심으로 추진되고 있으나, 아직 국내 연구 인력 및 기술 축적이 외국보다는 충분하지 않고 국내 재배여건에 적용되어 작물생산에 효과 있는 농용 생물농약의 사용 및 실용화는 미미한 실정이다.

나. 국내 제품생산 및 시장 현황

1) 국내 생물농약 등록 및 제품 시장 현황

현재 국내 생물농약 등록은 총 28건이며, 이 중 살균제와 살충제는 각각 14건으로 아직 미흡한 실정이다.

2) 국내 생물농약 등록 현황

(2007.12.31, 농촌진흥청)

번호	용도	구분	농약 품목명	등록 규격 (주 성분함량)	상표명	등록회사
1	살균	제조	바실루스서브틸리스디비비1501 수화제	1.0×10 ⁹ cfu/g	테라스	(주)동부하이텍
2		제조	바실루스서브틸리스디비비1501 입제	1×10 ⁶ cfu/g	홀인원	(주)동부하이텍
3		수입	바실루스서브틸리스와이1336 수화제	1×10 ⁹ cfu/g	바이봉	한국삼공(주)
4		제조	바실루스서브틸리스제이케이케이238 액상제	5.0x10 ⁷ cfu/ml	잇살림	(주)흙살림
5		제조	바실루스서브틸리스지비365 수화제	3.0×10 ⁷ cfu/g	그린울	(주)그린바이오텍

6		제조	바실루스서브틸리스지비365 액상수화제	1.0×10 ⁷ cfu/ml	셀러스	(주)그린바이오텍
7		제조	바실루스서브틸리스케이비시1010 수화제	1x10 ⁵ cfu/g	재노탄	(주)한국바이오케미칼
8		수입	바실루스서브틸리스큐에스티713 수화제	5×10 ⁹ cfu/g	에코제트	(주)신영아그로
9		수입	바실루스서브틸리스큐에스티713 액상수화제	1x10 ⁹ cfu/g	에코스마트	(주)신영아그로
10		수입	바실루스푸밀루스큐에스티2808 액상수화제	1x10 ⁹ cfu/g	에코센스	(주)신영아그로
11		제조	스트렙토마이세스고시킴엔시스더블유와이324 액제	1×10 ⁵ cfu/ml	췌이프그로	(주)케이아이비씨
12		제조	스트렙토마이세스콜롬비엔시스더블유와이20 액제	1×10 ⁴ cfu/ml	마이코싸이드	(주)케이아이비씨
13		제조	암펠로마이세스퀴스팔리스에이큐94013 수화제	1.0×10 ⁷ cfu/g	큐팩트	(주)그린바이오텍
14		제조	패니바실루스폴리믹사에이시-1 액상수화제	5×10 ⁶ cfu/ml	탐시드	(주)그린바이오텍
15	살충	제조	모나클로스포르툼타우마습케니비시3017 고상제	1.0×10 ⁴ cfu/g	땅거미	(주)한국바이오케미칼
16		수입	뷰베리아바시아나지에이치에이 유상현탁제	1.0×10 ⁸ cfu/ml	보타니가드	아리스타라이프사이언스
17		수입	뷰베리아바시아나티비아-1 액상제	1.0×10 ⁶ cfu/ml	세레모니	(주)동부하이텍
18		수입	비티아이자와이 액상수화제	8.5BIU/kg	비오칸	(주)동방아그로
19		수입	비티아이자와이 입상수화제	35,000DBMU/mg	미성살충탄스폴피온	바이엘크롭사이언스(주) (주)영일케미컬
20		제조	비티아이자와이엔티423 수화제	1×10 ⁹ cfu/g	토박이	(주)동부하이텍
21		제조	비티아이자와이엔티423 액상수화제	1×10 ⁸ cfu/ml	토박이	(주)동부하이텍
22		제조	비티아이자와이지비413 액상수화제	1×10 ⁷ cfu/ml	솔빛채	(주)그린바이오텍
23		제조	비티쿠르스타키 수화제	16BIU/kg	그물망바이오비트 마이충 비결 삼공비티 슈리사이드 영일비티	(주)동부하이텍 (주)동방아그로 인바이오믹스(주) 동부정밀화학(주) 한국삼공(주) 바이엘크롭사이언스(주) (주)영일케미컬
24		수입	비티쿠르스타키 액상수화제	1%	엠펜틸	(주)경농
25	수입	비티쿠르스타키 입상수화제	15%	-	(주)동부하이텍	
26	수입	비티쿠르스타키 입상수화제	64BIU/kg	툰업	(주)경농	

27	제 조	아자디락틴 유제 (생화학농약)	2%	단독	아리스타라이프사 이언스
28	제 조	패실로마이세스퓨모소로세우스디비비 -2032 수화제	5.0×10^7 cfu/g	방시리	(주)동부하이텍

3) 생물농약의 적용대상 등록현황

(2007.12.31, 농촌진흥청)

번호	용도	구분	농약 품목명	등록 규격 (주성분함량)	상표명	농작물	적용병해충
1	살균	제조	바실루스서브틸리스디비비1501 수화제	1.0×10^9 cfu/g	테라스	오이	흰가루병
2		제조	바실루스서브틸리스디비비1501 입제	1×10^6 cfu/g	홀인원	잔디	갈색일마름병
3		수입	바실루스서브틸리스와이1336 수화제	1×10^9 cfu/g	바이봉	고추(단고추류포함) 딸기 오이	흰가루병 흰가루병 흰가루병
4		제조	바실루스서브틸리스제이케이케이이238 액상제	5.0×10^7 cfu/ml	잇살림	딸기	흰가루병
5		제조	바실루스서브틸리스지비365 수화제	3.0×10^7 cfu/g	그린올	잔디	피티움마름병
6		제조	바실루스서브틸리스지비365 액상수화제	1.0×10^7 cfu/ml	셀러스	무화과 토마토(방울토마토포함)	역병 잿빛곰팡이병
7		제조	바실루스서브틸리스케이비시1010 수화제	1×10^5 cfu/g	제노탄	오이	잿빛곰팡이병
8		수입	바실루스서브틸리스큐에스티713 수화제	5×10^9 cfu/g	에코제트	고추(단고추류포함) 딸기 복숭아 오이 인삼 참외	흰가루병 잿빛곰팡이병 세균성구멍병 흰가루병 점무늬병 흰가루병
9		수입	바실루스서브틸리스큐에스티713 액상수화제	1×10^9 cfu/g	에코스마트	딸기 오이 토마토(방울토마토포함)	잿빛곰팡이병 흰가루병 잿빛곰팡이병
10		수입	바실루스푸밀루스큐에스티2808 액상수화제	1×10^9 cfu/g	에코센스	고추(단고추류포함)	역병
11		제조	스트렙토마이세스고시킴엔시스더블유와이이324 액제	1×10^5 cfu/ml	셰이프그로	벼 잔디	일집무늬마름병 라이족토니아마름병
12		제조	스트렙토마이세스콜롬비엔시스더블유와이이20 액제	1×10^4 cfu/ml	마이코싸이드	딸기 잔디 호박	잿빛곰팡이병 갈색일마름병 흰가루병
13		제조	암펠로마이세스퀴스칼리세이큐94013 수화제	1.0×10^7 cfu/g	큐펙트	딸기 오이 향미나리	흰가루병 흰가루병 흰가루병

번호	용도	구분	농약 품목명	등록 규격 (주성분함량)	상표명	농작물	적용병해충
14		제조	패니바실루스폴리믹사에이시-1 액상수화제	5×10 ⁶ cfu/ ml	탑시드	고추(단고추류포 합)	역병
						오이	흰가루병
15	살충	제조	모나클로스포름타우마습켄니비 시3017 고상제	1.0×10 ⁴ cfu /g	땅거미	수박(복수박포함)	뿌리혹선충
16		수입	뷰베리아바시아나지에이치에이 유상현탁제	1.0×10 ⁸ cfu /ml	보타니가 드	오이	총채벌레
						토마토(방울토마토 포함)	온실가루이
17		수입	뷰베리아바시아나티비아이-1 액 상제	1.0×10 ⁶ cfu /ml	세레모니	딸기	점박이응애
						토마토(방울토마토 포함)	온실가루이
18	수입	비티아이자와이 액상수화제	8.5BIU/kg	비오칸	배추	배추좀나방	
19	수입	비티아이자와이 입상수화제	35,000DBM U/mg	미성살충 탄 스콜피온	녹색꽃양배추(브로 코리)	도둑나방	
						배추좀나방	
						파밤나방	
					들깨	일말이명나방	
					미나리	담배거세미나방	
					배추	배추좀나방	
						배추흰나비	
						파밤나방	
					부추	파좀나방	
					쭉갓	파밤나방	
오이	목화바둑명나방						
	쪽파	파좀나방					
	차	애모무늬일말이 나방					
20	제조	비티아이자와이엔티423 수화제	1×10 ⁹ cfu/g	토박이	고추(단고추류포 합)	담배나방	
					들깨	담배거세미나방	
						일말이명나방	
					배추	배추좀나방	
						파밤나방	
					벼	혹명나방	
					오이	목화바둑명나방	
취나물	파밤나방						
21	제조	비티아이자와이엔티423 액상수 화제	1×10 ⁸ cfu/ ml	토박이	배추	배추좀나방	
22	제조	비티아이자와이지비413 액상수 화제	1×10 ⁷ cfu/ ml	솔빛채	들깨	담배거세미나방	
						일말이명나방	
					배추	배추좀나방	
					벼	혹명나방	
	취나물	파밤나방					
23	제조	비티쿠르스타키 수화제	16BIU/kg	그물망 바이오비 트 바이충	감	감꼭지나방	
					단호박	목화바둑명나방	
					목초지(화본과)	멸강나방	
	배	애모무늬일말이 나방					

번호	용도	구분	농약 품목명	등록 규격 (주성분함량)	상표명	농작물	적용병해충
					비결 삼공비티 슈리사이 드 영일비티	배추	배추좀나방 배추흰나비
						부추	과좀나방
						사과	사과굴나방
						소나무	솔나방
						양버즘나무(프라타 나스)	미국흰불나방
						오이	목화바둑명나방
						쪽파	과좀나방
						케일	배추좀나방
						배추	배추좀나방 배추흰나비
24		수입	비티쿠르스타키 액상수화제	10%	엠펜릴	갓나무	솔얼룩명나방
25		수입	비티쿠르스타키 입상수화제	15%	-	배추	배추좀나방
26		수입	비티쿠르스타키 입상수화제	64BIU/kg	툰업	들깨	잎말이명나방
						배추	배추좀나방
						취나물	과밤나방
27		수입	아자디락틴 유제 (생화학농약)	2%	단독	토마토(방울토마토 포함)	온실가루이
28		제조	패실로마이세스퓨모소로세우스 디비비-2032 수화제	$5.0 \times 10^7 \text{cfu/g}$	방시리	딸기	점박이응애
						오이	온실가루이
						토마토(방울토마 토포함)	온실가루이

미생물 농약의 매출 실적은 2005년도 기준으로 매출액이 13.6억원으로 전체 농약 시장의 0.14% 수준으로 대단히 미약하며, Bt제를 포함하더라도 총 시장규모는 24.7억원으로 전체 농약 시장의 0.25%수준이다.

4) 2003-2006년 국내 미생물농약 연별 판매 실적 현황 (단위:백만원) (2006, 2007년 농약연보)

연도	미생물농약 매출	Bt제 매출	계
2003	73 (3)	691 (3)	764 (6)
2004	455 (7)	784 (4)	1,239 (11)
2005	1,368 (7)	1,107 (4)	2,475 (11)
2006	863 (8)	354 (3)	1,217 (11)

괄호 안의 수치는 매출이 집계된 미생물농약의 수

5) 친환경 농산물의 시장 변화

현재 국내의 소비자의 농산물 선택 기준이 점차 안정성과 품질 중심으로 변화되고 있다.

○ 도시민의 농산물 구매시 고려사항 ('07.1 농경연 조사)

- 안전성 54.6% > 맛 24.7 > 영양 10.1 > 가격 8.6 > 포장 2

○ 일부 농산물에서 유해물질 검출로 소비 위축 등 피해 발생

6) 연도별 국내 친환경인증 농산물 인증실적 변화 (단위: 호, ha, 톤, %) (국립농산물 품질관리원, 2007)

연도	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	연평균 증가율
농가수	2,448	4,678	11,872	23,301	28,951	53,478	79,635	78.7
면적	2,039	4,554	11,239	22,238	28,216	49,807	74,995	82.4
인증량	35,406	87,279	200,374	365,203	460,735	797,747	1,128,093	78.1

이러한 소비자 선호도 변화와 더불어 국내 친환경 재배 면적이 연 80% 이상의 고도성장을 지속하고 있기 때문에 친환경 농업을 위한 미생물농약 시장의 개발이 필요하다.

2. 국외에서의 현황과 문제점

가. 현대 농업에서 사용되고 있는 농용 살균제들은 인간 및 환경에 대한 부정적인 영향에도 불구하고 안정적인 농업생산을 위해서 지속적인 사용이 불가피하다. 이런 이유로 인해 많은 연구자들이 새롭고 보다 안전한 미생물 농약 개발을 위한 노력을 경주하고 있다 (Okami and Hotta, 1988). 새로이 개발될 미생물 농약은 높은 방제효과와 함께 인체뿐 아니라 동식물과 농업생태계에 안전성이 요구되므로 미생물 자체 이용가능성 타진이 환경친화적인 이유로 연구개발 대상으로 주목받고 있다 (Fravel, 1988; Godfrey, 1994).

나. 이미 외국에선 근두암증병의 방제를 위해 *Agrobacterium radiobacter* K84, 종자 및 해충 방제용으로 세균인 *Bacillus subtilis*에 의한 제제인 Quantum4000 와 Kodiak등은 현재 미국 등에서 원예작물병 방제용으로 사용되고 있다. 또한 토양 병원균의 생물적 방제를 위해 *Pseudomonas* spp.가 여러 가지 작물과 근권 정착, 항생물질, 길항 효과에 관련된 분자 생물학적 접근과 실용화 연구가 이루어지고 있고, 미국 코넬대에서 개발한 곰팡이인 *Trichoderma harzianum*은 Gustafson 회사에 의해 상업화 되었으며, Garace 회사는 상품명인 Gliogard라는 잘록병에 대한 길항 진균인 *Gliocladium virens*를 제형화 한 바 있다. 그러나 길항 미생물을 가지고 고추 역병의 생물적 방제는 이루어지고 있지 않은 실정이다.

다. 실험실에서 제한된 조건으로 선발된 길항능력을 갖는 미생물들이 근권에서의 정착력이 떨어져 포장에서는 길항 효과를 발휘하지 못하는 경우가 매우 많다. 이러한 이유로 Williams와 Asher(1996)는 식물체의 근권에서 세균을 분리하고 *Pythium ultimum*과 *Aphanomyces cochlioides*에 의한 토양병을 억제시키는 길항세균을 선발하였다. 또한 Wilson은 생활사의 전체 혹은 일부분을 식물체의 조직에 침투하여 병을 일으키지 않고 생존하는 곰팡이와 세균을 내생균(endophyte) 이라고 정의하였는데, 이 내생균 역시 최근에 유용 미생물로써 식물병을 억제시키기 위한 길항 세균으로서 많은 연구가 이루어지고 있다. 최근에는 Kazuhiko의 연구진들이 몇몇 내생·근권세균을 가지고 가지에서 *Verticillium wilt*의 생물적 방제를 수행하였다.

라. 내생·근권세균에 의한 병억제 기작을 밝히기 위하여 항생물질을 분비하여 길항효과를 나타내는 길항미생물 즉, *Pseudomonas fluorescens*의 root colonization에 대해 활발한 연구가 이루어지고 있다. 한편, 정착에 영향을 끼치는 motility, LPS의 O-antigen의 생성, cellulose, thiamine, aminoacid와 biotin의 생성 등의 특징을 발현 시키지 못하게 mutant를 제작하여 정착력에 대한 연구가 Dekker, Bloemberg, Pierson 등에 의해 연구가 활발히 이뤄지고 있다.

마. 국외 제품생산 및 시장 현황

○ 국외 생물농약 등록 및 제품 시장 현황

2006년 해외 미생물 농약 시장의 규모는 약 260백만 달러로 추정되며, 이중 Bt 살충제가 159백만 달러로 해외 미생물농약 시장의 대부분을 차지하고 있다. 해외 미생물농약의 시장규모는 화학농약 사용 절감 정책에 의해 2014년에는 약 330-400백만 달러의 시장 규모가 될 것이라고 예상된다.

1) 2014년 해외 미생물농약 시장규모 예측치 (단위 :100만 달러)

(International Biocontrol Manufacturer's Association, 2004)

원제	유럽	NAFTA	남미	아프리카	아시아	오세아니아	합계
세균	15	80	10	5	20	30	160
바이러스	10	15	10	2	5	10	42
곰팡이	25	45	20	3	15	20	128
합계	50	140	40	10	40	60	330

현재 미국의 경우는 개발된 모든 미생물 농약의 EPA 등록을 의무화하여 원제와 생산품을 관리하고 있는데, 2005년 EPA에 등록된 미생물 농약 품목 수는 78개로, 25종의 미생물이 등록되어 상품화 되고 있으며, 109백만 달러의 매출을 기록하였다 (CPL Business consultants, 2005).

3. 앞으로의 전망

가. 고추 역병 방제를 위한 신기능성 유용 내생·근권 세균 선발 및 농업적 이용이 가능해 질수 있다. 고추 역병 방제용 미생물제의 안전성 평가와 실용화 기술 개발이 이루어 질수 있다.

나. 본 연구 결과 예상되는 미생물을 이용하여 생물적 방제제를 개발하여 고추

역병을 효과적, 종합적인 고추 역병 방제 시스템을 확립함으로써 농가에 보급하고 실용화하여 작물 재배에서 환경친화적인 청정 작물생산에 적용 할 수 있을 것이다.

다. 환경친화적 미생물 유래 생물 농약의 개발 및 상용화가 가능해질 것이다.

라. 본 과제 수행결과에서 길항 미생물을 유해한 환경으로부터 보호하고, 정착성을 높일 수 있는 보조제로서 탐색되어 개발되어질 재료들은 다른 여러 미생물에 대해서도 동일한 효과를 기대할 수 있으므로 앞으로 개발될 여러 생물 농약의 품질향상에 기여할 수 있을 것이다.

마. 주로 고추를 재배하는 국내 농민에게 선택적 저독성 내지 무독성 미생물농약을 공급하여 농민 및 소비자의 건강 보호와 토양 및 수질 오염을 방지하여 건전한 생태계 보전에 기여할 수 있을 것이다. 또한, 난방제 병해인 고추 역병의 방제가 가능함에 따른 고추 생산성 증대와 환경친화적 가치 부여를 통한 농가 소득 증대에 기여할 것이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절. 연구개발 수행 내용

제 1 세부과제 : 내생·근권세균 이용한 생물적 방제용 미생물 살균제 개발

1. 기선발된 내생·근권세균의 고추 역병에 대한 길항효과 재검정 및 포장검정

가. 길항 근권 세균의 수집

2001년부터 2003년까지 우리나라 12 지역의 고추, 오이, 토마토의 근권토양을 샘플링 하였다. 토양에서 세균을 분리하기 위하여 근권토양 10g을 100ml 살균수에 넣은 후, 160rpm으로 28℃에서 30분간 진탕배양하였으며, 뿌리 내부에서 세균을 분리하기 위하여 채취한 뿌리를 표면살균 한 후 마쇄시켜 현탁액을 만들었다. 이 현탁액을 cyclohexamide가 50mg/L의 농도로 혼합되어 있는 tryptic soy agar (TSA, Difco, Detroit, USA) 배지에 도말하여 48시간동안 배양 한 후, 형태적으로 다른 세균을 분리하였으며, 분리한 균주는 20% 글라이세롤이 혼합된 Nutrient broth (NB, Difco, Detroit, USA) 배지에 배양되어 -70℃에서 보관되었다.

나. 길항세균의 순차적 선발 - 유근 검정

분리한 근권세균이 고추 유근(radicle)에서 고추 역병을 감소시키는 효과가 있는지를 평가하기 위하여, 고추 종자는 10립씩 3반복을 하여 실험하였으며, 고추 종자를 1% NaOCl에서 1분 30초동안 표면 살균 한 후, 살균 증류수로 5회 세척하였다. 이와 같이 표면 살균된 고추 종자를 살균된 필터페이퍼 위에 침종하여 28℃에서 3일 동안 배양하여 고추의 유근 형성을 유도하여 사용하였다. 고추 역병균 *Phytophthora capsici*는 V-8 juice agar 배지에서 3일동안 배양하였으며, 3일 배양된 고추 역병균의 균사 가장자리를 코르크보러(corkborer)로 지름 0.5cm

의 일정한 크기로 만든 후, 글루코스가 0.02% 첨가된 water agar (WA)배지의 증양에 접종하여 5일동안 28℃에서 배양하였다. 분리한 균주는 NA에서 48시간동안 배양한 후 10mM MgSO₄ buffer로 수확한 후 세균 현탁액을 만들었으며, 세균현탁액에 표면 살균한 종자를 3시간동안 침지하였다. 세균 현탁액에 침지한 고추 종자를 WA에서 5일동안 배양한 역병균의 군사 가장자리에 고추 종자의 유근의 끝 부분이 닿게 올려 놓아 28℃에서 2-3일동안 배양하였다. 고추 역병균이 자라면서 유근이 형성된 고추 종자에 침입하여 갈색의 병징을 야기한 것을 감염된 것으로 하여, 10개 종자에 대한 고추 역병에 감염된 종자의 비율로 감염율을 평가하였다.

다. 길항세균의 순차적 선발 - 유묘 검정

고추의 유근(radicle)에서 효과적인 병억제를 보인 균주에 대하여 고추 유묘 (seedling)에서의 고추역병 방제 효과를 검증하였다. 길항 세균은 NA (Nutrient agar, Difco, USA) 배지에서 48시간동안 28℃에서 배양하였고, 단일 균총을 NB (Nutrient broth, Difco, USA) 5ml에 전배양 한 후, 전배양한 세균을 500ml의 NB에 접종하여 48시간동안 28℃에서 160rpm으로 배양하였다. 배양된 세균을 5,000rpm에서 15분동안 원심분리하여, 균주의 세포를 수확한 후 10mM MgSO₄ buffer로 세균 현탁액을 만들었다. 세균현탁액은 분광광도계로 흡광도를 측정하여 10mM MgSO₄ buffer로 A600에서 O.D. 0.5 (약 10⁸ cell/ml)의 농도로 맞추었다. 고추 종자는 8립씩 3반복으로 TKS2:peat moss가 1.5:1 (v/v)로 혼합된 상토가 담긴 128구 트레이에 파종하였으며, 세균 현탁액을 상토 1g에 1ml의 농도로 처리하였다. 이 때 대조구로는 10mM MgSO₄ buffer에 침지한 종자를 사용하였다. 파종한 고추는 16시간 광조건의 배양실에서 2주 동안 생육하였으며, 파종 2주 후 고추 역병균을 인위접종하였다. 고추 역병균은 오토밀(oatmeal) 배지에서 7일동안 28℃에서 배양되었으며, 이후 살균증류수 15ml을 관주한 후 24시간동안 빛이 있는 조건에서 7일동안 배양되었다. 그 후 고추 역병균의 주요 접종원인 유주포자를 형성하기 위하여 4℃에서 30분, 상온에서 30분동안 처리한 후 거즈로 걸러서 유주포자만 수확하였다. 수확된 유주포자는 헤모사이트미터를 사용하여

12,000 유주포자/ml의 농도로 맞추었다. 고추 역병균의 접종원인 유주포자를 2주 동안 생육한 고추 종자에 1cm 깊이로 접종하였으며, 균일한 병발생을 위하여 병접종 이후 병징이 발생할 때 동안 지속적인 토양 수분을 유지하였다. 병접종후 4 일 후 고추 유묘에서 발생하는 모잘록 증상을 기준으로 병발생수율을 평가하였다.

라. 길항세균의 순차적 선발 - 성체 식물 검정

고추 유근과 유묘에서 병억제 효과가 있는 세균의 고추 성체 식물에서 고추 역병 감소시키는 길항 효과를 평가하기 위하여, 고추 종자를 상토가 담긴 128구에 파종 한 후 3주 동안 배양하였으며, 3주된 고추 유묘를 살균된 포트 (지름 9cm)의 발토양에 정식하였다. 정식한 1주일 후에 상기에 명시된 방법대로 세균 현탁액을 준비하여 25ml/포트의 농도로 관주처리하였으며, 대조구로는 10mM MgSO₄ buffer를 사용하였다. 세균 현탁액을 처리한 1주일 이후에 상기에 명시한 것과 같이 고추 역병균의 유주포자를 형성하였으며, 25유주포자/g 토양의 농도로 병접종하였다. 병 접종한 이후 균일한 병발생을 위하여 토양 수분을 유지시켜주었으며, 약 4-5일 이후 병징이 발생하는 시점부터 병피해도로 병을 평가하였다. 병평가를 위하여 0 (건전한 식물)-5 (죽은 식물)의 기준으로 병피해도를 매일 평가하였으며, 15개의 식물을 2회 반복 실험하였다.

마. 길항세균의 포장 검증

고추 유근(radicle), 유묘(seedling)과 성체식물(plant)에서 모두 뛰어난 고추 역병 억제 효과가 있는 길항세균이 실제 포장에서도 동일한 고추 역병에 대한 병억제 길항 효과가 있는지 평가하기 위하여 경기도 남양주시 덕소에 위치한 고려대학교 부속농장에서 2005년-2007년의 3년에 걸친 포장 실험을 통하여 검증하였다. 2005년과 2006년도 포장 검증에서는 병원균을 인위 접종한 포장에 길항세균을 고추 식물에 관주처리하여 검증하였으며, 2006년과 2007년에는 자연적으로 고추 역병이 발생하는 포장에서 길항세균을 고추 정식시 세균 현탁액에 고추 유묘를 담근 후 정식하여 보다 재배 방법에 효과적으로 적용하여 실험하였다.

2005년과 2006년에 인위병접종 포장 검증을 위하여, 고추 종자는 2005년 3월 26일, 2006년 3월 16일에 파종되었으며 포장에 2005년 6월 1일, 2006년 5월 10일에 각각 정식되었다. 포장에서 처리구는 임의배치하였으며, 처리당 40식물씩 4반복을 하였고 대조구로는 10mM MgSO₄ buffer와 고추 역병을 방제하기 위하여 가장 많이 사용되고 있는 살균제인 메타락실(metalaxyl)을 제조사의 권장사항에 따라 처리하였다. 길항 세균은 세균 현탁액을 만들어 2005년에는 7월 23일과 8월 6일, 2006년에는 7월 26일과 8월 2일에 2회에 걸쳐 포장에 심겨진 고추 식물에 각각 100ml씩 관주처리되었다. 이후 상기에 명시된 방법대로 고추 역병균의 유주자를 형성하여 10⁵ 유주포자/고추식물의 농도로 2005년 8월 11일, 2006년 8월 7일에 각각 인위접종 하였다.

또한 실제 고추 뿌리를 채집하여 길항세균이 역병에 의한 뿌리 침입율도 감소시켰음을 확인하기 위하여 2005년에는 4개 식물씩 4반복, 2006년에는 5개 식물씩 4반복하여 임의로 샘플링 하였다. 샘플링한 고추 뿌리를 1cm의 크기로 자른 후 고추 역병균 선택배지로 널리 사용되고 있는 PARPH (Pimaricin-ampicillin-rifampicin-PCNB-hymexazol) 배지에서 뿌리 감염율(%)을 평가하였다. PARPH 배지는 기본 배지로 cornmeal agar (CMA) 17g/L를 고압멸균 한 후, pimaricin 5mg, sodium ampicillin 250mg, rifampicin 10mg, PCNB 100mg, Hymexazol (70% a.i.) 50mg/L의 농도로 혼합하여 준비하였다. 뿌리에 역병 감염율은 PARPH 배지에 1cm의 크기로 고추 뿌리를 잘라 올려 놓은 후 고추 역병균에 의해 감염된 뿌리에서 자라나오는 역병균의 유무를 백분율로 평가하여 감염율을 조사하였다.

근권길항세균이 토착 미생물에 영향을 주는지를 알아보기 위하여 근권 포장에 존재하는 총 세균과 곰팡이 수를 양적으로 평가하였다. 2005년에는 포장의 반복에 대하여 4개, 2006년에는 5개의 고추 근권토양을 임의적으로 샘플링하였다. 샘플링한 토양 10g을 100ml의 살균수에 현탁한 후 토양 현탁액을 사이크로헥사마이드(cyclohexamide)가 50mg/L의 농도로 혼합된 TSA (Tryptic soy agar)배지에 도말하여 토양내 존재하고 있는 총 세균의 수를 평가하였으며, OAES 배지 (agar 20g, sucrose 5g, yeast extract 2g, NaNO₃ 1g, MgSO₄ 7H₂O 0.5g,

KH₂PO₄ 1g, Na propionate 1g, Oxgall 1g, streptomycin sulfate 50mg, chloramphenicol 50mg/L)에 도달하여 토양내 존재하고 있는 총 곰팡이의 수를 평가하였다.

2006년과 2007년 포장 실험을 위하여 상기에 명시한 것처럼 길항세균의 세균 현탁액을 준비하였으며, 준비된 근권길항세균의 현탁액을 포장에 고추를 정식하기 직전에 고추 유묘를 길항세균 현탁액에 30분동안 담근 후, 고추 역병균이 이미 토양내 존재하고 있는 토양에 정식함으로써 병억제 효과를 평가하였다. 또한 실제 고추 뿌리에서 고추 역병에 의한 감염율을 확인하기 위하여 상기에 명시한 것과 마찬가지로 고추 역병 선택배지인 PARPH 배지에 고추 뿌리를 1cm 크기로 잘라서 올려놓은 후 감염율을 평가하였다.

2. 선발된 내생·근권 세균의 생리, 분자생물학적 분류, 동정

가. 16S rDNA analysis

고추 역병에 대하여 병억제 효과가 있는 근권 길항세균을 분자적, 생리적 특성을 이용하여 방법을 사용하여 동정하였다. 세균 동정을 위하여 일반적으로 사용하는 세균의 16S rRNA 염기서열(sequence)을 증폭하기 위하여 길항세균의 DNA를 분리하였다. 길항세균을 배양한 후 3,000rpm에서 10분동안 원심분리하여 세균을 수확하여, 300 μ l 의 SET 버퍼(buffer)로 섞어주었다. 라이소자임(lysozyme)을 50mg/ml의 농도로 만든 후 6 μ l 를 섞어준 후 37 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 배양하였다. 배양한 후 1/10 부피의 SDS를 첨가한 후 proteinase K를 0.5mg/ml의 농도로 혼합하여 55 $^{\circ}$ C에서 2시간동안 배양한 후, 75 $^{\circ}$ C에서 20분동안 처리함으로써 proteinase K를 불활성화시켰다. 이 후 RNase를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 30분동안 배양한 후 1/3 부피의 5M NaCl과 1부피의 클로로포름을 혼합하여 상온에서 30분동안 배양하였다. 배양후 10,000rpm에서 10분동안 원심분리하여 얻은 상등액만 수거하여 같은 양의 isopropanol을 혼합한 후 DNA를 수확하였다. 수확한 DNA는 70% 에탄올로 2회 세척하여 사용하였다.

이와 같이 분리한 CCR04 균주의 DNA를 universal primer인 fd1 (AGAGT TTVAT CCTGGG)와 rp2 (ACGGC TACCT TGTTA CGACTT) 프라이머를 사용하여, PCR을 수행하였다. 16S rDNA를 PCR을 통해 증폭하기 위한 조건으로, 초기 95°C에서 4분을 한 후 95°C에서 4분, 58°C에서 1분, 72°C에서 2분을 35회 시행하였으며, 마지막 extension step으로 72°C에서 10분동안 PCR하였다. PCR 산물을 0.8% 아가로스 젤에 전기 영동한 후 순화하였다. PCR 산물의 순화를 위하여 전기 영동하여 UV에서 확인된 PCR 증폭된 밴드를 분리하여 -20°C에서 15분 동안 놓은 후, parafilm으로 PCR 증폭된 밴드가 있는 액체 부분 50µl를 수확하여 1.5ml의 멸균된 튜브에 담은 후 400µl의 TE buffer와 혼합하였다. 이후 450µl의 페놀:클로로포름(24:1) 용액을 첨가하여 3분동안 섞어준 후 13,000rpm에서 7분동안 원심분리하였다. 원심분리한 상등액 400µl를 새로운 튜브에 넣은 후 44µl의 3M Sodium acetate (pH 5.2)를 첨가하고 섞어주었으며, 1ml의 99% 에탄올을 첨가한 후 -20°C에서 15분간 두었다. 이후 13,000rpm에서 15분동안 원심분리한 후 액체 부분을 제거하고, 다시 70% 에탄올 500µl를 혼합하여 13,000rpm에서 5분간 원심분리하여 순수한 PCR 산물을 얻었다. 이와 같은 방법으로 순화된 PCR 산물을 fd1 (AGAGT TTVAT CCTGGG)와 rp2 (ACGGC TACCT TGTTA CGACTT) 프라이머로 염기서열결정(sequencing)을 하였으며 약 1,400개의 염기서열을 분석하여 NCBI에서 blast하여 분석하였다.

나. 투과전자현미경

또한 투과전자현미경을 통하여 길항세균의 편모와 세균의 형태를 관찰하기 위하여 NA배지에서 24시간동안 길항세균을 배양하였으며, 단일 균총의 길항 세균 현탁액을 gold coater 위에 고정시킨 후 투과전자 현미경으로 관찰하였다.

다. Biolog 분석

길항세균이 서로 다른 96종류의 당을 이용할 수 있는지를 확인하기 위하여 GN2 Biolog system을 사용하여 분석하였다. Biolog system을 이용하기 위하여, 길항세균은 24시간동안 TSA 배지에서 배양하였으며, 0.8%의 생리 식염수로 세

균 현탁액을 준비하여 분광광도계로 A600에서 O.D=0.5로 세균 농도를 맞추었다. 이 세균 현탁액을 GN2 Biolog 96well plate에 100 μ l씩 넣은 후 28 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양된 GN2 Biolog 96well plate는 당 이용 정도에 따라 반응이 되어 Miolog GN Microplate system에서 Microlog 3 database release 4.01A (Biolog, Hayward, CA)로 분석하였다.

라. Fatty acid methyl ester (FAME) analysis

세균의 지방산 함량에 따른 세균 분류 및 동정을 하기 위하여 길항세균의 Fatty acid methyl ester (FAME) 부분을 추출하여 MIDI시스템을 이용한 가스 크로마토그래피에 의해 동정하였다.

3. 선발된 내생·근권 세균의 고추병에 대한 병 억제 작용 기작 연구

가. 항생물질 분비

길항세균이 항생물질을 분비하여 고추 역병균의 발생을 억제하는지를 평가하기 위하여 V8 agar 배지에서 식물병원균의 균사생장 억제를 관찰하였다. 길항세균을 V8 배지의 가운데에 배양한 후 *Alternaria mali*, *Colletotrichum orbiculare*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Magnaporthe oryzae*, *Phytophthora capsici*와 *Rhizoctonia solani*의 균사를 5mm의 크기로 잘라 배지의 양 끝에 접종 한 후 길항세균에 의한 식물병원균의 균사 생장 억제 효과를 평가하였다. 또한 배지의 성분별에 따른 균사생장 억제 효과를 평가하기 위하여 glycerol, glucose, galactose가 첨가된 배지에서 식물 병원균의 균사 생장 억제 효과도 평가하였다.

나. 세포외 효소 분비

길항세균이 세포외로 효소를 분비함으로써 병원균에 의한 병발생을 감소시키는지를 평가하기 위하여 proteolytic와 chitinase activity를 평가하였다. proteolytic activity는 milk agar에서 평가하였으며, chitinase activity는 chitin

oatmeal agar에서 세균에 의해 형성되는 diffusion-clearing zone으로 평가하였다.

다. Biofilm 형성

길항 세균이 biofilm을 형성하는지를 microtiter plate assay를 통하여 평가하였다. 길항 세균을 96-well-PVC microtiter plate (Fischer Scientific)의 biofilm growth media에서 48시간동안 배양하였으며, microtiter plates well에 부착된 세균을 0.1% crystal violet으로 염색한 후 과도한 crystal violet 염색 시약을 제거한 후 80% ethanol과 20% acetone으로 용해시켜 흡광도를 측정하여 평가하였다.

라. HCN 형성

길항세균에 의한 병 감소에 길항 세균이 형성하는 HCN이 관련이 있는지를 평가하기 위하여, 1%의 picric acid와 2%의 sodium carbonate 용액에 전처리한 paper disc를 사용하여, paper disc가 노란색에서 붉은색으로 변하는 것을 관찰하여 평가하였다.

마. Siderophore 형성

길항세균이 Fe-chelator인 siderophore를 형성하는지를 평가하기 위하여 CAS media를 제작하여 세균에 의한 siderophore 형성 유무를 평가하였다. 세균을 배양한 후 파란색의 CAS media가 노란색이나 주황색으로 변화하는 것을 positive reaction으로 평가하였다.

바. Swarming ability

길항세균이 swarming을 함으로써 기주 뿌리에 정착과 생존에 유리할 것이라 생각되어, swarm agar를 0.5% agar로 만들어 세균을 배양하여, 길항세균의 swarming ability를 평가하였다. swarm agar에는 고추 뿌리 삼출물을 혼합하여 뿌리 표면과 유사한 조건을 만들어 주어 평가하였다.

4. 내생·근권 세균을 처리한 고추에서 길항세균의 식물근권 정착 능력 연구

길항세균의 고추 식물 근권 정착능력을 평가하기 위하여 gnotobiotic system을 사용하였다. 발아한 종자를 1% NaOCl 용액으로 표면살균 한 후 세균현탁액에 침지하여 살균된 quartz sand가 담긴 배양병에 파종하였다. 파종 한 고추는 growth chamber에서 70% 상대습도와 16시간 광주조건을 유지하면서 배양되었고, 배양 후 2주와 4주 후에 고추 뿌리를 샘플링하여 부착된 길항세균의 밀도를 NA 배지에 도말하여 평가하였다. 또한 전자 현미경을 통하여 정착된 길항 세균을 관찰하여 확인하였다.

5. 내생·근권세균의 고추역병균과의 경쟁에 대한 연구

내생·근권세균의 고추역병균과의 경쟁에 대한 연구하기 위하여, spontaneous rifampicin mutant를 제작하여 고추 성체식물에서 시간에 따른 길항세균과 고추 역병균의 개체군 밀도 변화양상을 평가하였다. 4주된 고추 식물에 길항세균을 처리한 1주일 후 역병균을 접종하여 길항세균은 rifampicin이 첨가된 TSA배지에 도말하여 평가하였고, 고추 역병균은 역병균 선택배지인 PARPH media에 도말하여 평가하였다.

6. 탄소원 첨가에 의한 생물학적 방제 효과의 증진 연구

가. ISE14의 탄소원 이용도 조사

1) 기본배지 (PYCV Broth ; Peptone, Yeast, Carbon Source, Vitamin sol.)

증류수 780ml에 다음의 Mineral salt sol. ("Hutner/Cohen-Bazire") 20ml, Peptone (Bacto) 0.25g, Yeast extract (Bacto) 0.25g 을 넣고 121°C에서 20분간 멸균 처리하였다. 멸균 처리한 후 60°C로 식힌 후에 Vitamin sol. 5ml과 다음의 탄소원 용액을 필터(0.45µl)여과하여 첨가하였다. 기본배지의 탄소원의 최종농도는 2.5%로 하였다.

2) Mineral salt solution

증류수 900ml에 Nitrilotriacetic acid (NTA) 10g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 29g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3.34g, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 12.67g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 99g 및 Metals 44 용액 50ml을 첨가하여 제조하였다.

3) Metals 44

증류수 100ml에 Na-EDTA 250mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1095mg, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 500mg, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 154mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 39.2mg, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 24.8mg, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 17.7mg을 각각 첨가하여 제조하였다.

4) Vitamin solution

증류수 1000ml에 Biotin 4mg, Folic acid 4mg, Pyridoxine-HCl 20mg, Riboflavine 100mg, Thiamine-HCl \cdot 2H $_2$ O 10mg, Nicotinamide 10mg, D-Ca-pantothenate 10mg, Vitamin B $_{12}$ 0.2mg, p-Aminobenzoic acid 10mg을 넣고 녹인 후 5°C에서 암보관하여 기본배지 용액 제조에 사용하였다.

5) Carbon source solution

10개 탄소원 (D-(+)-glucose, D-(+)-cellobiose, D-(+)-maltose, D-(+)-melezitose, D-manitol, D-sorbitol, D-(+)-galactose, β -lactose, L-arabinose, glycerol)(Sigma Korea, seoul)을 200ml의 증류수에 각각 25g씩 녹여 각각의 carbon source solution을 제조하였다.

6) 세균 접종

Tryptic Soy Agar(TSA)배지에 토양세균 ISE14을 streaking하여 32°C의 incubator에서 48시간 동안 배양하였다. 48시간 동안 토양세균 ISE14을 배양한 각각의 petri dish에 멸균증류수를 첨가하여 600nm에서 흡광도가 0.1이 되도록 조절하였다. 만들어진 10개의 PYCV Broth가 100ml씩 첨가된 250ml 삼각플라스크에 세균 현탁액(O.D=0.1 at 600nm) 200 μ l를 넣고 32°C의 shaking incubator

에서 5일간 배양한 후 600 nm에서 흡광도를 측정하였다.

나. 탄소원을 첨가에 의한 생물적 방제균 KJ1R5의 고추 역병 방제 효과 증진

1) 파종

고추종자를 Whatman No. 2 필터페이퍼를 두겹 놓고 멸균수로 적신 후 28°C에 3일간 발아시켰다. TKS2 (Flora Gard LTD., Germany)와 peat moss (Acadian peat moss LTD., Canada)를 이틀간 연속으로 40분간 고압증기 살균한 후, TKS2와 peat moss (1.5:1, v/v)를 plastic tray (128 hole)에 넣은 후 발아한 종자를 파종하였다.

2) 접종원과 세균 현탁액의 준비

*P. capsici*는 주관 연구기관인 고려대학교에서 분양을 받아서 V-8 주스 배지에 28°C에 3일간 배양하였다. V-8 juice 배지는 V-8 주스 200ml, 한천 17g, CaCO₃ 2g을 증류수 1 리터에 넣고 고압증기 멸균하여 제조하였다. 3일간 V-8 주스 배지에서 28°C에 배양한 후 균사 조각 (직경 7mm)을 가장 자리에서 코크 보러를 이용하여 편치한 후 오토밀 배지에 28°C에 7일간 암배양하였다. 오토밀 배지는 오토밀 30g과 한천 15g가 1 리터의 증류수에 첨가하여 제조하였다. 배양 7일 후, 균사 위에 멸균 증류수를 넣어 균사가 물에 약간 잠기도록 한 후 형광등 아래 5일 동안 28°C에 배양하여 유주자낭 형성을 유도하였다. 배양 5일 후에, 4°C에 놓고 30분간 유주자의 방출을 유도하여 멸균 거즈로 유주자를 수득하였다. 유주자의 농도는 $1.2 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ (4, 20, 21)가 되도록 하여 접종원으로 사용하였다.

세균 처리를 위해서는 *Chryseobacterium* sp. KJ1R5를 tryptic soy agar (TSA, Difco)에 도말하여 32°C에 3일간 배양하고, 멸균수와 L-arabinose 용액(1%, 2%, 4%, 8%)로 세균의 현탁액을 만들고 세균 현탁액의 농도는 spectrophotometer (Mecasys co.,Ltd, Seoul, Korea)로 600 nm에서 흡광도가 0.5가 되도록 조정하여 고추에 처리하였다.

3) 병원균의 접종과 세균의 처리

고추묘가 2주 자랐을 때, 병원균 현탁액 (1ml)을 접종하기 직전에 후 세균 현탁액 (1 ml)을 고추의 pot에 충분히 적시도록 관주하였다. 무접종 처리구, 병원균 처리구, 병원균과 KJ1R5, 병원균과 1% L-arabinose에 현탁된 KJ1R5, 병원균과 2% L-arabinose에 현탁된 KJ1R5, 병원균과 4% L-arabinose에 현탁된 KJ1R5, 병원균과 8% L-arabinose에 현탁된 KJ1R5 처리구가 실험에 포함하였다. 플라스틱 트레이는 28°C/24°C (day/night, 12h/12h)에 생장실에서 배양되었다. 처리는 4반복으로 구성되었고, 처리구는 난괴법으로 배치되었고, 방제효과는 접종 14일후 측정되었다.

4) 여러 가지 탄소원의 첨가가 *P. capsici*에 대한 KJ1R5의 생물적 방제 효과에 미치는 영향

고추 묘종이 2주간 되었을 때, 병원균이 앞서 기술한 바와 같이 세균 현탁액을 처리한 직후 접종되었다. 세균의 현탁액은 다음과 같은 탄소원 2%의 용액으로 제조되었다; 세균과 병원균이 모두 잘 이용하는 D-(+)-glucose, D-(+)-maltose, 세균만이 잘 이용하는 L-arabinose, β -lactose, L-arabinose, D-(+)-melezitose, D-(+)-galactose, D-mannitol, glycerol, D-(+)-cellobiose, D-sorbitol . 대조 처리구에는 무접종구, 병원균 처리구, 탄소원이 첨가되지 않은 세균 처리구 등이 있었다. 처리한 플라스틱 트레이는 28°C/24°C (day/night, 12h/12h) 생장실에서 배양되었다. 처리는 4반복으로 구성되었고 난괴법이 적용되었다. 방제 효과는 접종 14일 후에 기록되었다.

협동과제 : 생물적 방제용 미생물제제의 상업화연구

7. 선발된 균주에 대한 기초배양연구 및 시험용 원제확보

가. 생산균주의 순계 확인 및 안정화

주관기관(고려대학교)에서 분양받은 균주는 Gram negative의 *Chryseobacterium*

속의 ISE14이다. ISE14 균주의 계대배양 안정성 확인을 위해 일반적으로 세균 생육이 원활하다고 알려진 nutrient broth를 이용하였다. 계대별 접종은 연속 10회 실시하였으며, 24시간 배양 후 1%(v/v)의 접종원을 연속적으로 접종하였다. Sample의 생존균수(colony forming unit, cfu/ml)는 접종 24시간 후에 채취하여 조사하였다.

나. 선발 균주의 type culture를 통한 배양 양상 구명

ISE14의 시간에 따른 배양 양상 구명을 위한 기본배지는 nutrient broth를 이용하였다. 전 배양은 500ml baffled flask (working volume 100ml), 30°C, 180rpm의 조건으로 12시간 배양을 하였다. 본 배양은 1L flask (working volume 200 ml), 30°C, 180rpm의 조건으로 48시간 배양을 하였으며 6시간 별로 sample을 회수하여 세포성장, pH 및 생존균수를 측정하였다.

8. Pilot scale 배양수행 및 배양액의 원제형태 결정

가. 기본배지를 출발점으로 생물적 방제를 위한 최적조건으로 배양법 확립

1) 탄소원

ISE14을 최적조건으로 배양하기 위한 탄소원 선발을 위하여, 생육 및 최대 생존균수 확보에 적합한 탄소원을 규명하기 위하여 glucose, soluble starch, sucrose, dextrin, glycerol을 이용하여 균체성장속도와 최대 생존균수 확보에 대해 검토하였다. 기본배지는 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2%, KH_2PO_4 0.2%, Na_2HPO_4 0.5%, yeast extract 0.3%, casein peptone 0.5%으로 탄소원을 배제시킨 뒤 상기의 탄소원을 각 1%씩 첨가하여 검정용 배지를 제조하였다. ISE14의 대량배양에 선발된 탄소원의 적정 농도를 찾기 위한 기본배지는 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2%, KH_2PO_4 0.2%, Na_2HPO_4 0.5%, yeast extract 0.3%, casein peptone 0.5%으로 탄소원을 배제시킨 뒤 glucose를 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%의 농도로 첨가한 시켜 검정용 배지를 제조하여, 48시간 배양하면서 세포성장값(O.D.), 생존균수를 측정하였다.

2) 질소원

ISE14의 생육 및 최대 생존 균수 확보에 적합한 질소원을 규명하기 위하여 peptone, yeast extract, casein peptone, malt extract, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 이용하여 균체성장속도와 최대 생존균수 확보에 대해 검토하였다. 기본배지는 glucose 1%, KH_2PO_4 0.2%, Na_2HPO_4 0.5%으로 질소원을 배제시킨 뒤 상기의 질소원을 각 1%씩 첨가하여 검정용 배지를 제조하여, 48시간 배양하면서 24시간별로 sampling 하여 세포성장값(O.D.), 생존균수를 측정하였다. ISE14의 대량배양에 선발된 질소원의 적정 농도를 찾기 위한 기본배지는 glucose 1%, KH_2PO_4 0.2%, Na_2HPO_4 0.5%으로 질소원을 배제시킨 뒤 상기의 질소원을 각 1%씩 첨가하여 검정용 배지를 제조하여, 48시간 배양하면서 24시간별로 sampling 하여 세포성장값(O.D.), 생존균수를 측정하였다.

3) 미량요소 선발

ISE14의 미량요소 영양 요구성을 검토하기 위하여 MgSO_4 , BaCl , MnCl_2 , CuCl_2 , CaCl_2 , ZnSO_4 , NaCl , FeSO_4 , KCl , $\text{Al}_2(\text{SO}_4)$ 를 이용하여 균체성장속도와 최대 생존균수 확보에 대해 검토하였다.

나. 대량배양 공정개발을 위한 예비시험

대량 배양 공정 개발을 위한 예비실험으로 5L jar 배양, 50L 배양, 500L 배양을 수행하였으며, 본 과제에서 사용되는 ISE14의 제형화를 위해 고상과 액상형태 원제의 균주 생존율을 검토하였다. 원제 형태 검토를 위한 균주 배양액은 5L jar fermentor(K5L, Kbiotec, working volume 3L)를 이용하여 준비하였다. 배지원으로 glucose 1%, yeast extracts 2%, KH_2PO_4 0.04%, K_2HPO_4 0.06%를 이용하였고, 30°C, 600rpm, 1vvm의 조건으로 24시간 배양하였다. antifoam으로는 다우 코닝 303 silicon oil을 이용하였다. 배양이 끝난 ISE14의 배양액을 초고속원심분리기(Beckman, rotor6, 6,000rpm, 20min, 10°C)를 이용하여 pellet과 상등액으로 분리한 뒤 7×10^{11} cfu/g의 pellet을 확보하였다.

9. 생물농약 등록에 만족하는 제형화 개발

가. 기본 제형연구

ISE14 균주의 액상 형태의 원제는, glycerol을 포함하는 액상이었으므로 우선적으로 액상제형인 액상수화제를 검토하였다. 또한, ISE14 동결건조 원분의 경우, 고상제형에 대하여 검토하였다. 검토제형으로는 고상제형의 기본제형인 수화제를 선발하여 검토를 실시하였다.

나. 제형개발 및 처방개선 검토

1차 검토에서 선발된 고상제형인 수화제 이외에 다양한 제형개발과 처방개선을 위한 정보를 수집하고자 직접처리제인 입제와 희석식처리제인 입상수화제에 대하여 처방검토를 추가로 실시하였으며, 처방개선을 위하여 1차에서 검토되었던 액상수화제에 대하여 처방개선을 실시하였다. 처방검토에 사용된 ISE14는 액상의 원제를 사용하였으며, 제형개발 및 처방개선을 위하여 보조제이면서도 안정제로서의 효과가 알려져 있는 Glycerin의 효과를 검토하였다.

다. 약효증진용 부자재 탐색

수화제의 약효증진용 부자재의 탐색을 위하여 수화제에 사용이 가능한 부자재를 대상으로 사용가능성 및 제제가능성을 탐색하였다. 처방검토에 사용된 ISE14는 균주의 생존력 측면에서 배양액 보다 안정적인 것으로 확인된 동결건조 원분을 사용하였다.

라. 계면활성제의 종류에 따른 안정적인 제형개발

부자재 선발시험에서 선발된 규조토를 활용하여 수화제의 물성을 개선하면서도 약효를 증진시킬 수 있는 계면활성제의 선발을 위하여 수화제의 기본처방으로는 ISE14 동결건조원분을 30% 사용하였으며, 증량제로는 보조제 검토를 통하여 선발된 규조토를 사용하였고 계면활성제는 5%로 고정하여 시험처방을 확립하여 처방별로 비교를 실시하였다.

마. 포장시험 및 제조허가용 시제품 제조

포장시험용 시료 및 시제품 제조를 위하여 상기에서 선발된 부자재와 계면활성제를 활용하여 제조된 시료는 농약관리법상의 검사 및 검토항목을 검사한 다음 포장시험용 시료로 사용하였다.

10. 생물농약 원제 및 제품에 대한 독성시험

생물농약 원제 및 제품에 대한 독성시험을 위하여, ISE14 원제의 마우스를 이용한 단회 투여 경구독성시험, ISE14 원제의 랫드를 이용한 단회 투여 경피독성시험, 잉어를 이용한 단회 투여 급성독성시험, ISE14 30% 수화제의 마우스를 이용한 단회 투여 경구독성시험, ISE14 30% 수화제의 랫드를 이용한 단회 투여 경피독성시험, ISE14 30% 수화제의 잉어를 이용한 단회 투여 급성독성시험을 수행하였다.

11. 대량생산을 통한 시제품 제작

가. ISE14 균주의 대량배양

ISE14 균주의 대량배양은 경북 안동소재 경북바이오산업연구원의 산업용 발효기를 이용하여, 기 시험에서 확립된 배양조건으로 단계적인 배양을 통해 scale up을 하였다. 50L 발효조에서 배양 17시간 만에 500L 발효조로 배양액을 transfer 하였으며, 500L 발효조에서 12시간의 배양을 통해 9×10^9 cfu/ml의 배양액을 얻은 후 연속 원심분리기(TOMOE ASM 260PL)를 통해 cell을 회수하였다. 회수한 cell에 멸균된 12% skim milk를 섞은 뒤 동결건조기(PVTFD 500R, 일신랩)를 이용하여 고상의 동결건조 원분을 생산하였다.

나. 시제품 제작

대량배양을 통한 얻어진 고상의 원분을 갖고 기 시험을 통해 확립된 처방조건대로 ISE14 30% WP를 제작하였다.

12. 생물약효시험 및 포장시험

가. *in vivo* 시험에서 기본제제의 활성 검정

ISE14 균주 기본제제의 활성검정은 (주) 경농 중앙연구소에 위치한 유리온실에서 실시되었다. 고추는 금탑 품종을 사용하였으며, 유리온실에서 8주간 육묘시킨 것으로 처리구당 20pot 3반복으로 시험하였다. 약제처리는 ISE14 WP 기본제제 500배, 1,000배, 대조약제로는 디메쏘모르프 수화제(25%, 동방아그로) 1000배 희석액을 주당 200ml 관주 처리하였다. 약제 처리 7일 후 고추 역병균의 유주자를 접종하고 14일후 이병주율을 조사하였다.

나. 소포장실험을 통한 기본제제의 활성검정

ISE14 WP 기본제제의 소포장 활성검정은 (주) 경농 중앙연구소 내의 역병 검정용 간이 포장에서 실시되었다. 고추의 품종은 금탑이며 4엽기의 고추 유묘를 역병 검정용 간이 포장에 정식하였다. 정식 2주후에 ISE14 WP 기본제제 500배, 1000배, 대조약제로는 디메쏘모르프 수화제(25%, 동방아그로) 1000배 희석액을 주당 200ml 관주 처리하였다. 약제 처리 7일 후 고추 역병균의 유주자를 접종하고 14일후 이병주율을 조사하였다.

다. 포장시험에서 시제품의 활성 검정

ISE14 30% WP 시제품의 포장 활성검정은 경북 의성의 고추 역병 다발생 노지 포장에서 진행되었다. 고추 품종은 재래종이었으며, 3반복 난괴법으로 처리구당 300주로 시험포의 구획을 나누었다. 약제처리는 2007년 6월 12일, 6월 21일, 7월 2일 3차례에 걸쳐 ISE14 WP 500배, 대조약제로는 디메쏘모르프 수화제(25%, 동방아그로) 1,000배 희석액을 지제부에 200ml 씩 관주처리 하였다. 약효 조사는 2차례에 걸쳐 실시되었으며, 최종약제 처리 8일, 29일 후에 실시되었다.

제 2절. 연구개발 결과

제 1 세부과제 : 내생·근권세균 이용한 생물적 방제용 미생물 살균제 개발

1. 기선발된 내생·근권세균의 고추 역병에 대한 길항효과 재검정 및 포장검정

가. 길항 근권 세균의 수집

2001년부터 2003년까지 충주, 덕소, 부여, 덕소, 군산, 서산, 익산, 예산, 당진, 홍성, 공주, 용인과 경주 13개 지역의 고추, 오이, 토마토 재배 포장에서 채취한 고추, 오이 식물체를 샘플링하였다(Figure 1). 채취한 식물체의 root interior, rhizosphere soil에서 미생물을 분리하기 위해 뿌리에서 털어낸 토양을 희석하였고, 내생균을 분리하기 위하여 1% hypochlorite에 뿌리를 표면살균 한 후 표면 살균된 뿌리를 마쇄시켜 cycloheximide가 첨가된 Tryptic soy agar에 도말하여 총 439균주를 분리하였다(Table 1).



Figure 1. Sampling sites of bacterial strains for isolation of potential antagonists from cucumber, pepper and tomato from 2001 to 2003 in Korea.

Table 1. Sampling locations, sources and numbers of bacterial strains isolated from cucumber, pepper and tomato plants grown in the fields in Korea from 2001 to 2003

Location	Year collected	Source	Host	No. of bacterial strain
Buyeo	2002	RI ^a , RS, S	Pepper	8
Chuncheon	2003	RI, RS	Cucumber, Tomato	180
Dangjin	2002	RS, S	Cucumber	7
Deokso	2001	RI, RS, S	Pepper	13
Gongju	2002	RI, RS, S	Pepper	9
Gunsan	2002	RI, RS	Cucumber	16
Gyeongju	2003	RS	Pepper	76
Hongseong	2002	RS, S	Pepper	21
Iksan	2002	RI, RS, S	Cucumber	29
Seosan	2002	RI, RS, S	Cucumber	22
Yeasan	2002	RI, RS, S	Pepper	52
Yongin	2002	RI, RS, S	Pepper	6
Total				439

^aEach bacterial strain was isolated from plant root interiors (RI), root surfaces (RS), or rhizosphere soils (S) of various plants.

나. 길항세균의 순차적 선발 - 유근 검정 (radicle assay)

식물 뿌리 및 토양과 관련된 내생·근권 세균을 이용하여 고추 역병균에 대한 길항 효과가 있는 세균을 선발하기 위해 Radicle assay를 실행하였다. glucose가 첨가된 water agar에 고추 역병균을 배양 한 후 균사 가장자리에 세균 현탁액에

침지한 동일하게 발아한 고추 종자 cultivar Nockwang (Hung Nong Seed Ltd., Korea)를 올려 놓았다. 439균주로 radicle assay를 수행하여 70% 이하의 disease incidence (%)을 보이는 38 균주를 선발하였다. 70% 이상의 disease incidence를 보였던 균주는 모두 401균주였으며, 이 radicle assay를 통하여 전체 균주 중에서 8.4% 인 38 균주를 일차적으로 선발 할 수 있었다(Figure 2). 이 38균주 중에서 2균주는 40% radicle infection을, 11균주는 50%, 12균주는 60%, 13균주는 70%의 radicle infection을 나타내었다.

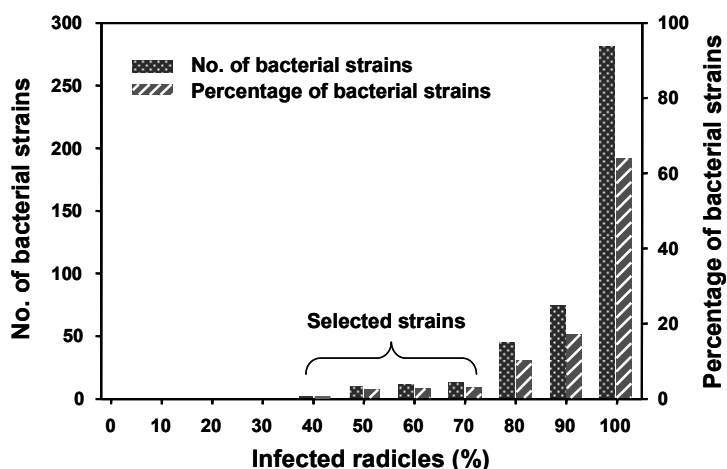


Figure 2. Numbers and percentage of bacterial strains among the 439 strains tested in a radicle assay using pepper seeds (cv. Nockwang) for radicle infection by *Phytophthora capsici*. In the radicle assay, germinated seeds treated with 10 mM MgSO₄ buffer (control, untreated) or bacterial strains (108bacterial cells/ml) for 3 hours were placed onto the margin of 5-day-old cultures of *P. capsici* on water agar containing 0.02% glucose. Incidence (%) of radicles infected by *P. capsici* on seeds treated with the bacterial strains was determined 2–3 days after treatments when all control seeds were completely infected. The experiment was conducted with three replications of 10 seeds each per treatment.

다. 길항세균의 순차적 선발 - 유묘 검정 (seedling assay)

Radicle assay를 통해 선발된 38균주를 순차적으로 검증하고 선발하기 위해 seedling assay를 수행하였다. 발아된 고추 종자를 potting mixture-TKS2 (Floragard Product, Germany):peat moss (Acadian Peat Noss Ltd., Lamegue, New Brunswick, Canada) = 1.5:1- 과중하였고 과중시 세균 현탁액($A_{600}=0.5$)을 potting mixture에 처리하여 과중 2주 후 *P. capsici* 유주자를 접종하여 Disease incidence(%)를 평가하였다(Table 2). 이러한 seedling assay를 통해 16 균주가 순차적으로 선발되었으며, 선발된 16균주는 근권 토양과 뿌리 내생에서 분리한 균주가 많았다. 이러한 결과는 고추 역병균에 길항 효과가 있는 미생물은 고추 역병과의 공진화를 하면서 존재하며 따라서 길항균을 효과적으로 분리 및 선발하기 위해서는 역병이 존재하는 고추 재배 지역의 근권이나 내생균을 분리하여야 한다는 가설을 내릴 수 있다. 선발된 16 균주를 가지고 radicle과 seedling assay를 2반복 실험을 수행한 결과, 모두 통계적으로 10mM $MgSO_4$ buffer를 사용한 대조구에 비해 고추 역병균의 radicle infection과 고추 유묘에서의 damping-off에 대한 길항 능력이 있었다(Table 2).

라. 길항세균의 순차적 선발 - 성체식물 검정 (plant trial)

Seedling assay에 의해 이차적으로 선발된 16균주를 이용하여 식물 배양실에서 5주된 고추 성체 식물체에 고추 역병을 접종하여 길항균을 선발하기 위해 plant trial를 수행하였다. 실제 포장의 토양에서 고추 역병에 대한 병억제 효과가 있는지를 검증하기 위해 3주 동안 생육된 고추 식물을 살균된 포장 토양에 옮겨 심고, 세균 처리 1주일 후 고추 역병균의 유주포자를 접종하여 병접종 후 3~5일 후부터 고추 역병 병피해도 관측을 시작하였으며, 병 피해도는 0 (건진 식물)~5 (식물체 죽음)의 단계로 하여 평가하였다. 그 결과 16균주 중 최종적으로 선발된 CCR04, CCR80, ISE13, ISE14와 GSE09 5균주의 경우에는 radicle 및 seedling assay에서의 병억제 효과도 매우 컸으며(Table 2), 고추 성체 식물을 이용한 plant trial에서 대조구에 비해 AUDPC와 final disease severity에서 동시에 2회의 실험에서 안정적으로 병억제 효과를 나타냈었다(Table 2).

Table 2. Disease incidence (%) and severity, and areas under the disease progress curves (AUDPC) caused by *Phytophthora capsici* on pepper (cv. Nockwang) seedlings and plants treated with 16 potentially antagonistic bacterial strains selected from the radicle assay

Treatment ^{a,b}	Seedling assay ^c (Disease incidence)	Plant trial ^d	
		Disease severity	AUDPC
Untreated	95.8 a	4.1 a	18.6 a
CCR01	52.1 bc	3.1 bc	12.6 bc
CCR04	21.1 g	1.6 gh	4.5 h
CCR10	52.1 bc	3.2 b	14.8 b
CCR40	29.5 fg	2.2 d-g	7.0 e-h
CCR43	27.4 fg	1.4 h	4.3 h
CCR48	35.1 d-f	1.6 gh	5.8 f-h
CCR55	55.1 b	2.4 d-f	10.1 c-e
CCR80	32.2 e-g	1.7 f-h	5.2 gh
GSE06	36.2 c-f	2.3 d-f	8.4 d-g
GSE07	49.1 b-d	2.7 b-d	12.5 bc
GSE09	29.5 fg	1.8 e-h	5.8 f-h
GSE10	40.8 b-f	2.7 b-d	11.4 cd
ISE13	31.8 e-g	1.8 f-h	6.1 f-h
ISE14	37.5 c-f	1.9 e-h	8.6 d-f
SSS08	47.0 b-e	2.7 b-d	10.6 cd
YSE20	36.3 c-f	2.5 c-e	8.6 d-f

^aMeans within a column followed by the same letter are not significantly different when tested with LSD at $P=0.05$. For disease incidence, arcsine square root-transformed data were used for statistical analyses; however, untransformed data are presented.

^bPlants were treated with 10 mM MgSO₄buffer (untreated control) or bacterial cells (10⁸ bacterial cells/ml).

^cTwo-week-old pepper seedlings in a potting mixture incorporated with the bacterial strains were

inoculated with 2×10^3 zoospores of *P. capsici* per g potting mixture. Disease incidence (%) of the seedlings was determined 4 days after inoculation. Values are means of six replications with eight seedlings each from combined data of two experiments.

⁴Five-week-old pepper plants were inoculated with 25 zoospores per g soil. Disease severity was evaluated on a scale of 0 (symptomless) – 5 (plants dead) 11 and 14 days after inoculation in two experiments. AUDPC was determined based on disease severity for eight and 10 observations over 11 and 14 days after inoculation in two experiments, respectively. Values are means of 30 replications from combined data of two experiments.

이러한 결과를 종합하여 CCR04, CCR80, ISE13, ISE14와 GSE09의 5균주는 radicle 및 seedling assay에서의 병억제 효과도 매우 컸으며, 고추 성체 식물을 이용한 plant trial에서도 뛰어난 고추 역병을 방제하는 효과를 가지므로 이들 균주를 선발하여 포장실험을 수행하였다.

마. 길항세균의 포장 검증



Figure 3. A field growing pepper plants at Deokso Research Farm of Korea University, Namyangju, Korea in 2005.

1) 2005–2006년 인위 병접종 포장에서 길항세균 관주 처리에 의한 병억제 효과 포장 검증

포장에 처리하여 실용화 가능성을 검증하기 위해 총 439개의 내생 및 근권 세

균을 가지고 radicle, seedling assay와 plant assay를 통하여 순차적으로 선발된 CCR04, CCR80, ISE13, ISE14와 GSE09의 5균주와 난균류에 대한 병억제 효과가 좋은 살균제인 metalaxyl을 가지고 고려대학교 부속 농장(경기도 덕소 소재)에서 2005년도 1차 포장시험을 수행하였다(Figure 3). 1120개체의 고추 식물을 가지고 28 raised beds(15 cm high × 60 wide)로 하여 4개의 block을 만들어 randomize complete block design을 실행하였다(Figure 4). 고추 정식 후 병 접종 전에 5 균주의 세균 현탁액, 10mM MgSO₄ buffer (negative control), metalaxyl (a.i. 7.5%, Ridomil MG, Dongbu Hannong Chemicals Co., LTD, Seoul, Korea; positive control)을 관주 처리하고, 5일 후 *P. capsici* 유주자를 접종하였다. 고추 역병의 병징이 나오기 시작 한 후부터 병 평가를 3일 간격으로 하였으며 30일 동안 병평가를 수행하였다.

포장에 처리하여 실용화 가능성을 검정하기 위해 1차년도(2005년)에 포장실험을 수행한 CCR04, CCR80, ISE13, ISE14와 GSE09의 5균주와 난균류에 대한 병억제 효과가 좋은 살균제인 metalaxyl을 가지고 고려대학교 부속 농장(경기도 덕소 소재)에서 2006년도 2차 포장시험을 수행하였다. 1260체의 고추 식물을 가지고 14 raised beds(20 cm high × 50 wide, 24m)로 하여 4개의 block을 만들어 randomized block design을 실행하여 고추 정식 후 병접종 전에 5 균주의 세균 현탁액, 10mM MgSO₄ buffer (negative control), metalaxyl 을 관주 처리하고, 5일 후 *P. capsici* 유주자를 접종하였다(Figure 5). 고추역병의 병징이 나오기 시작 한 후부터 병 평가를 3일 간격으로 하였으며 30일 동안 병평가를 수행하였다.

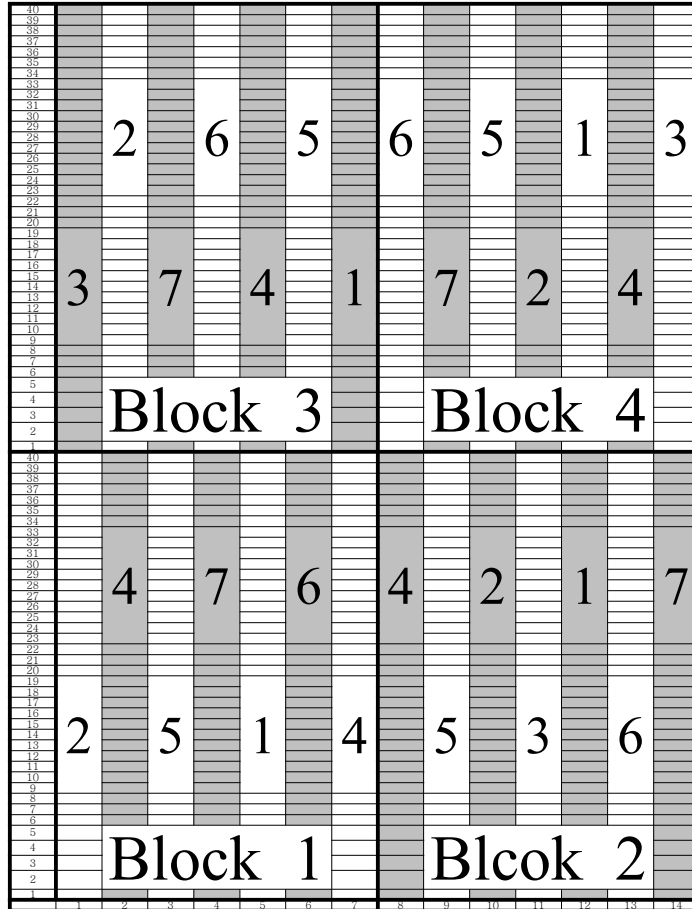


Figure 4. A randomized complete block design used in the field test in 2005. This test utilized 14 beds, with 6m long plots and 4 replications per treatment. 1: Untreated control, 2: Metalaxyl, 3: GSE09, 4: CCR80, 5: ISE14, 6: ISE13, 7: CCR04.

과가 있었다. 2005년에는 CCR04 균주의 처리구는 난균류에 효과가 좋은 metalaxyl 처리구와 통계적으로 유사한 병억제 효과가 나타났으며, CCR80 균주 처리구의 경우에는 metalaxyl 처리구 보다 통계적으로 병억제 효과가 더 높았다. AUDPC에서도 위와 동일한 효과가 나타났다(Figure 6). 2006년에는 세균을 관주 처리한 실험구에서는 고추 역병을 접종 한 후 4block에서 모두 포장 전체에 균일하게 병이 발생하였으며, 처리한 길항 세균과 대조구의 disease incidence (%)를 비교하였을 때, 처리한 5균주 중 ISE13 균주를 제외한 4균주 CCR04, CCR80, ISE14, GSE09가 병억제 효과가 있었다(Figure 6). 특히 병억제 효과가 있는 이들 균주는 난균류에 효과가 좋은 metalaxyl 처리구와 통계적으로 유사한 병억제 효과가 나타났다. 이러한 병억제 효과는 disease incidence (%) 뿐만 아니라 병진 전곡선(AUDPC)에서도 동일한 효과가 나타났다(Figure 6).

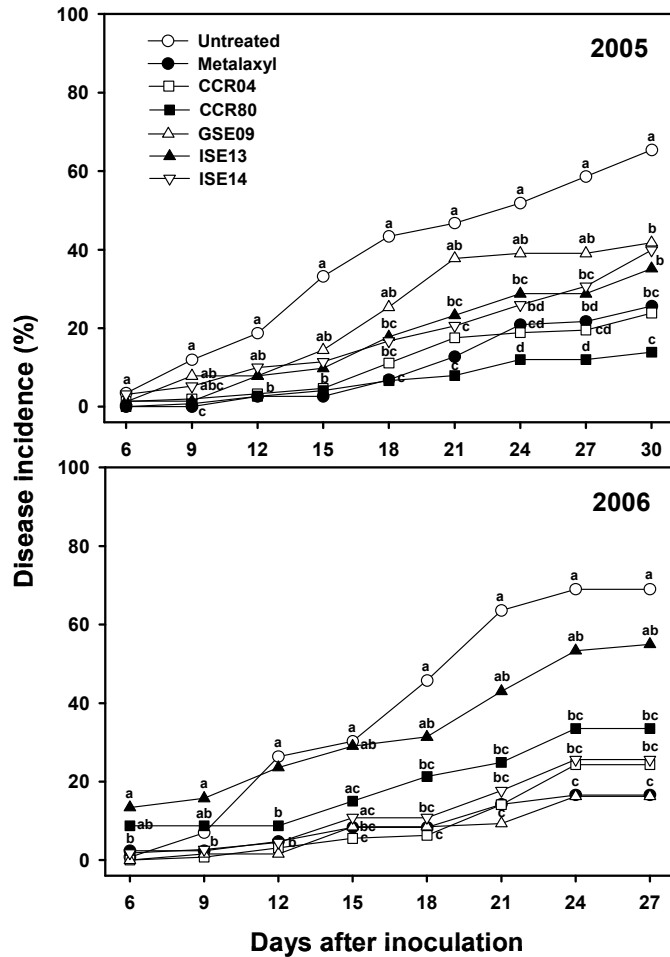


Figure 6. Progress curves for incidence of *Phytophthora* blight of pepper plants (cv. Nockwang) drenched with five candidate antagonistic bacterial strains, CCR04, CCR80, GSE09, ISE13 and ISE14, 10 mM MgSO₄ buffer (untreated control), or metalaxyl (fungicide-treated control) under artificially inoculated field conditions at Deokso Experiment Farm of Korea University, Namyangju, Korea in 2005 and 2006. Means followed by the same letter are not significantly different when tested with LSD at $P=0.05$. For disease incidence, arcsine square-root transformed data were used for statistical analyses; however, untransformed data are presented.

인위적으로 배양된 길항 세균을 토양에 적용시킴으로써 토양에 자생적으로 존재하고 있던 미생물상에 어떠한 영향을 주는지 알아보기 위하여 길항 세균, control (10mM MgSO₄ buffer)과 metalaxyl(positive control)을 처리한 포장의 토양을 채취하여 근권 토양내 총 세균과 곰팡이의 수를 평가하였다. 근권 토양 내 총 세균 수를 알아보기 위하여 cychloheximide가 함유된 TSA, 총 곰팡이 수를 알아보기 위해 OAES 배지에 토양 희석액을 도말하였다. 실험의 결과 인위적으로 세균 현탁액을 처리한 포장의 근권 토양내 총 세균의 수는 control (10mM MgSO₄ buffer)와 차이가 없었다(Table 3). 길항 세균을 처리한 토양에서도 곰팡이의 밀도가 control과 비교하였을 때 차이가 없었다. 또한 실제 고추 역병균을 접종했을 때 감염된 뿌리의 비율을 고추 뿌리를 임의적으로 채취하여 root fragment를 *Phytophthora* spp.의 selective media인 pimaricin-ampicilin-rifampicin-PCNB-hymexazol (PARPH) 배지에 올려 놓아 실제로 감염된 뿌리를 알아보았다. 그 결과 실제로 감염된 뿌리는 병평가 결과와 유사한 경향을 나타냈으며, GSE09 균주를 제외하고는 감염된 뿌리의 비율이 대조구에 비해 적었으며 CCR04, CCR80과 ISE13 균주는 난균류에 효과가 좋은 metalaxyl과 유사한 뿌리 감염율을 보이며 병억제 효과가 나타났다(Figure 7).

Table 3. Total bacteria and fungi in rhizosphere soils of pepper plants drenched with various antagonistic bacterial strains and metalaxyl under artificially inoculated field conditions in 2005 and 2006

Treatment ^{a,b}	Total bacteria ^c		Total fungi	
	(Log ₁₀ CFU/g dry wt. soil)		(Log ₁₀ CFU/g dry wt. soil)	
	2005	2006	2005	2006
Untreated	6.62 ± 0.11 a–c	6.23 ± 0.16 a	4.45 ± 0.05 ab	3.38 ± 0.01 a
Metalaxyl	6.52 ± 0.05 bc	6.00 ± 0.08 a	4.31 ± 0.08 b	3.27 ± 0.06 a
CCR04	6.79 ± 0.03 a	6.06 ± 0.09 a	4.51 ± 0.07 a	3.32 ± 0.04 a
CCR80	6.57 ± 0.03 bc	6.10 ± 0.08 a	4.48 ± 0.03 a	3.33 ± 0.00 a
GSE09	6.70 ± 0.08 ab	6.20 ± 0.09 a	4.50 ± 0.03 a	3.23 ± 0.06 a
ISE13	6.64 ± 0.03 a–c	6.27 ± 0.04 a	4.54 ± 0.03 a	3.40 ± 0.02 a
ISE14	6.50 ± 0.06 c	5.93 ± 0.08 a	4.49 ± 0.03 a	3.28 ± 0.07 a

^aMeans ± standard errors within a column followed by the same letter are not significantly different when tested with LSD at $P=0.05$.

^bPlants were treated twice with bacterial strains or 10 mM MgSO₄ buffer(untreated control) on July 23 and August 6 for the 2005 test, and on July 26 and August 2 for the 2006 test. Plants were also treated once with metalaxyl (fungicide–treated control) on August 6, 2005 and August 2, 2006. The plants were transplanted into the beds on June 1, 2005 and May 10, 2006.

^cTotal bacteria and fungi were determined on TSA medium amended with cycloheximide and OAES medium, respectively. These experiments were conducted with four replications of four and five plants each in 2005 and 2006, respectively.

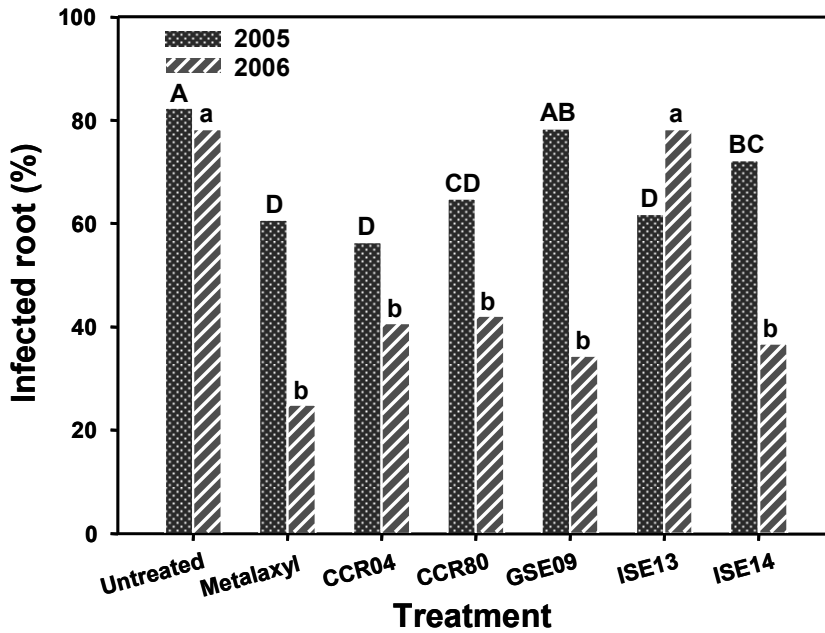


Figure 7. *Phytophthora capsici*-infected roots of pepper plants that were drenched with antagonistic bacterial strains, 10 mM MgSO₄ buffer (untreated control), or metalaxyl (fungicide-treated control) just prior to transplanting under artificially inoculated field conditions in 2005 and 2006. Percentage of infected plant roots was determined on the PARPH medium as follows: number of infected root fragments (1cm) / total number of root fragments x 100%. Different capital or small letters on bars indicate significant difference when tested with LSD at $P=0.05$ in a test year. Arcsine square root-transformed data were used for statistical analyses; however, untransformed data are presented.

2) 2005-2006년 인위 병접종 포장에서 길항세균 Root-dipping 처리에 의한 병억제 효과 포장 검증

2005년과 2006년도 포장 실험을 실행하면서 길항 세균의 처리에 의한 고추 수확량의 증감과 길항 세균의 처리 방법을 보다 효율적이고 실용적으로 고안하기 위하여 고추 정식시 세균 현탁액에 침지한 후 포장에 정식하여 인위적으로 병을 접종하였을 때의 병억제 효과를 평가하였다. 2005년과 2006년도에 5개의 길항세균에 대해 10개체씩 3반복하여 고추 유묘를 정식하기 길항균 현탁액에 root-dipping 한 후 재배하였다. 정식 2개월 후 2회에 걸쳐 고추를 수확하여 고추 개체 당 고추의 생체중과 고추의 수량을 측정하였다. 그 결과 2005년에는 선발된 균주들이 고추 역병의 발생을 억제시키는 효과가 현저하였으며, CCR04와 CCR80균주는 난균류에 효과가 좋은 metalaxyl과 동일하거나 혹은 더 높은 병억제 효과를 나타내어 실용화에 대한 가능성을 보였을 뿐만 아니라 CCR80과 GSE09균주는 수확량의 증가에 영향을 줄 가능성이 있음을 검정하였다. 2006년도에는 ISE13균주를 제외한 4균주, CCR04, CCR80, GSE09, ISE14균주에서 고추 역병균의 병억제 효과가 있었다(Figure 8). 또한 병진전 양상도 2005년도와 2006년도에 병평가 결과와 유사하였다(Table 4). 세균 처리에 의한 고추 수량 증진 효과가 있는지 평가하였더니, 2005년에 CCR80과 GSE09 균주는 대조구에 비해 각각 23.1%, 31.1%의 수확량이 증가하였으며(Table 5), 고추 수에는 통계적인 차이가 없으나 고추의 생체중이 증가하였다. 2006년에는 CCR04, CCR80, ISE13균주를 처리할 경우에 대조구에 비하여 고추의 수량이 증가하였다(Table 6). 이러한 현상은 처리된 길항세균의 직접적인 고추의 생육 촉진에 의한 것이기 보다는 토양내 존재하고 있는 토착 미생물, 특히 고추 생육에 부정적인 영향을 주는 미생물상의 diversity에 변화를 주어 고추 뿌리를 보다 건전하게 발달하게 해주어 양분 및 수분 흡수가 증가하여 발생한 결과라고 예상된다.

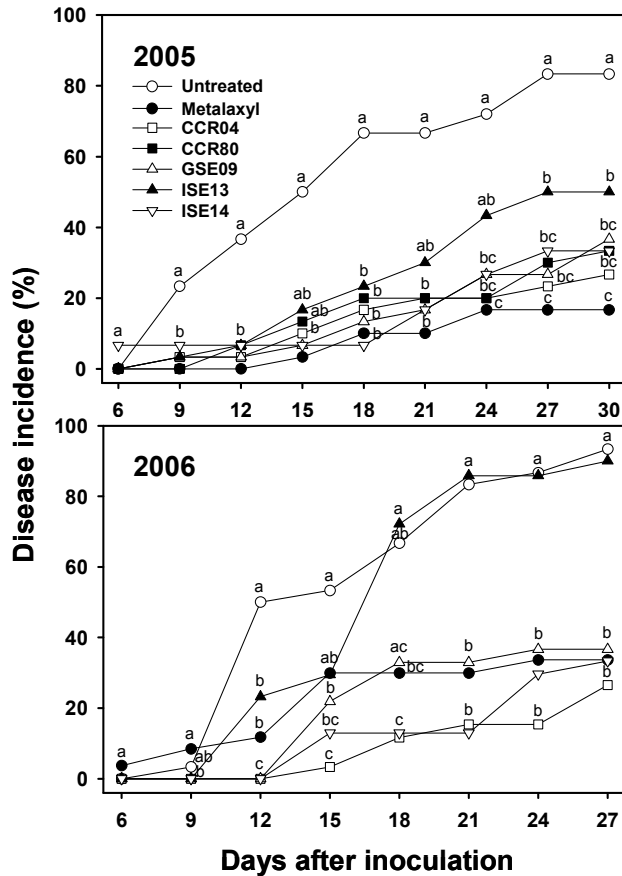


Figure 8. Progress curves for incidence of *Phytophthora* blight of pepper plants (cv. Nockwang) treated with five potentially antagonistic bacterial strains (CCR04, CCR80, GSE09, ISE13, and ISE14), 10 mM $MgSO_4$ buffer (untreated control), and metalaxyl (fungicide-treated control) in the field at the Deokso Experimental Farm of Korea University, Namyangju, Korea in 2005 and 2006. The bacterial strain CCR80 was not included in the 2006 test. These experiments were conducted with three replications (10 plants/replication) per treatment in both years. Means given by same letters are not significantly ($P=0.05$) different according to least significant difference (LSD) test. For disease incidence, arcsine square-root transformed data were used for statistical analysis; however, untransformed data are presented.

Table 4. Areas under the disease progress curves (AUDPC) of *Phytophthora* blight of pepper plants (cv. Nockwang) treated with five potentially antagonistic bacterial strains (CCR04, CCR80, GSE09, ISE13, and ISE14), metalaxyl (fungicide-treated control), and 10 mM MgSO₄ buffer (untreated control) in the field at the Deokso Experimental Farm of Korea University, Namyangju, Korea in 2005 and 2006

Treatment	AUDPC ^a	
	2005	2006
Untreated ^b	1325 a ^c	1170 a
Metalaxyl ^d	195 b	465 b
CCR04	330 b	177 b
CCR80	380 b	ND ^e
GSE09	345 b	428 b
ISE13	595 b	1025 a
ISE14	370 b	256 b

^aAUDPC was determined based on disease incidence (%) for 10 and nine observations over 30 and 27 days after inoculation in 2005 and 2006, respectively.

^bPlants were root-dipped in 10 mM MgSO₄ buffer or bacterial suspensions just before transplanting on June 1, 2005 and May 10, 2006. These experiments were conducted with three replicates (10 plants/replication) per treatment in both years.

^cMeans designated with the same letters are not significantly ($P=0.05$) different according to least significant difference (LSD) test.

^dPlants were treated with 100 ml of metalaxyl (1 g per liter of water) prepared at rates recommended by the supplier on August 6, 2005 and August 2, 2006.

^eND = not detected.

Table 5. Fresh weights and numbers of fruits of pepper plants (cv. Nockwang) treated with five potentially antagonistic bacterial strains (CCR04, CCR80, GSE09, ISE13, and ISE14) and 10 mM MgSO₄ buffer (untreated control) in the field at the Deokso Experimental Farm of Korea University, Namyangju, Korea in 2005 and 2006

Treatment	Fruit fresh weight (g) ^a / plant		Fruit number / plant	
	2005	2006	2005	2006
Untreated ^b	227 c ^c	73 c	20 b	8 c
CCR04	249 bc	192 a	23 ab	15 a
CCR80	280 ab	123 b	23 ab	12 ab
GSE09	298 a	71 c	26 a	7 c
ISE13	256 abc	134 b	25 b	11 b
ISE14	256 abc	104 bc	23 ab	10 bc

^aFresh weights (g) and numbers of fruits per pepper plant were determined with two harvests on August 6 and 13, 2005, and August 6 and 14, 2006. These experiments were conducted with 15 and 10 replicate plants in 2005 and 2006, respectively.

^bPlants were root-dipped in 10 mM MgSO₄ buffer or bacterial suspensions just before transplanting on June 1, 2005 and May 10, 2006. In case of metalaxyl treatment, fruit harvests were not possible since no differences were found between treatment and harvest dates in both years.

^cMeans designated with the same letters are not significantly ($P=0.05$) different according to least significant difference (LSD) test.

3) 2006-2007년 자연 병발생 포장에서 길항세균 Root-dipping 처리에 의한 병억제 효과

2006-2007년 포장에서 자연적으로 고추 역병이 포장전체에 균일하게 발생하였으며, 2006년도에는 11-87%, 2007년에는 23-65%의 범위로 최종적으로 병이 발생하였다. 2006년도에는 CCR04, CCR80, GSE09와 ISE14균주가 대조구에 비하여 병발생을 감소시켰으나, ISE13균주는 고추 역병 발생을 감소시키지 못하였다 (Table 6). 2007년도에는 처리된 5균주에서 모두 대조구에 비하여 고추 역병의 발생을 감소시켰으며, metalaxyl을 처리한 식물에서 가장 병이 적게 발생하였다 (Table 6). 이와 유사한 결과가 고추 뿌리 감염률 평가에서도 관찰되었다 (Table 6). Root-dipping의 방법으로 세균을 처리한 경우에 근권토양에 존재하는 토착 세균과 곰팡이의 수에 영향을 주지 않았으며, 이러한 경향은 2006년과 2007년 포장 검증에서 유사하게 관찰되었다 (Table 7). 세균 처리에 의한 고추 수확량 증가 효과를 평가하였더니, CCR80, ISE13과 ISE14균주에서 푸른 혹은 붉은 고추의 수나 무게가 증가하였다. 그러나 CCR04, GSE09균주와 metalaxyl를 처리한 고추에서는 대조구에 비하여 고추 수확량이 증가하지 않았다 (Table 8).

Table 6. Disease incidence and *Phytophthora capsici*-infected roots in pepper plants that were root-dipped with various antagonistic bacterial strains and metalaxyl just prior to transplanting in the field with natural inoculum in 2006 and 2007

Treatment ^{a,b}	Disease incidence (%) ^c		Infected root (%) ^d	
	2006	2007	2006	2007
Untreated	87.3 ± 5.6 a	65.3 ± 2.3 a	86.0 ± 2.8 a	65.7 ± 2.9 a
Metalaxyl	– ^e	22.5 ± 3.1 c	–	40.5 ± 8.8 b
CCR04	36.7 ± 2.4 b	33.8 ± 6.8 bc	49.3 ± 1.8 b	39.5 ± 5.8 b
CCR80	11.4 ± 4.5 b	30.6 ± 1.9 bc	40.9 ± 6.1 b	41.2 ± 1.7 b
GSE09	19.6 ± 8.9 b	33.8 ± 2.2 b	51.2 ± 5.9 b	48.2 ± 4.8 b
ISE13	78.6 ± 15.2 a	38.8 ± 2.6 b	70.8 ± 0.3 a	46.6 ± 2.4 b
ISE14	25.5 ± 8.6 b	38.3 ± 2.6 b	24.2 ± 2.9 c	46.6 ± 1.6 b

^aMeans ± standard errors within a column followed by the same letter are not significantly different when tested with LSD at $P=0.05$.

^bPlants were treated with antagonistic bacterial strains, 10 mM MgSO₄ buffer (untreated control), or metalaxyl (fungicide-treated control) on May 10 and June 1 for 2006 and 2007 tests.

^cDisease incidence was evaluated on September 4, 2006 and September 18, 2007. These experiments were conducted with three replications of 15 plants each in 2006 and four replications of 40 plants each in 2007.

^dPercentage of infected plant roots (%) was determined on the PARPH medium as follows: number of infected root fragments (1cm) / total number of root fragments x 100%. These experiments were conducted with three replications of five plants each in 2006 and four replications of three plants each in 2007.

^e–, not tested.

Table 7. Total bacteria and fungi in rhizosphere soils of pepper plants root-dipped with various antagonistic bacterial strains and metalaxyl just prior to transplanting in the field with natural inoculum in 2006 and 2007

Treatment ^{a,b}	Total bacteria ^c		Total fungi	
	(Log ₁₀ CFU/g dry wt. soil)		(Log ₁₀ CFU/g dry wt. soil)	
	2006	2007	2006	2007
Untreated	5.72 ± 0.11 a	6.46 ± 0.12 a	3.08 ± 0.07 a	3.12 ± 0.10 a
Metalaxyl	– ^d	6.63 ± 0.14 a	–	3.30 ± 0.17 a
CCR04	5.92 ± 0.16 a	6.65 ± 0.18 a	3.11 ± 0.17 a	3.29 ± 0.09 a
CCR80	5.73 ± 0.09 a	6.69 ± 0.12 a	3.19 ± 0.15 a	3.23 ± 0.13 a
GSE09	5.69 ± 0.11 a	6.48 ± 0.09 a	3.08 ± 0.07 a	3.19 ± 0.05 a
ISE13	5.98 ± 0.12 a	6.56 ± 0.11 a	3.17 ± 0.03 a	3.30 ± 0.12 a
ISE14	5.75 ± 0.12 a	6.56 ± 0.09 a	3.15 ± 0.09 a	3.08 ± 0.04 a

^aMeans ± standard errors within a column followed by the same letter are not significantly different when tested with LSD at $P=0.05$.

^bPlants were treated with bacterial strains, 10 mM MgSO₄ buffer (untreated control), or metalaxyl (fungicide-treated control) on May 10 and June 1 for 2006 and 2007 tests.

^cTotal bacteria and fungi were determined on TSA medium amended with cycloheximide and OAES medium, respectively. These experiments were conducted with three replications of five plants each in 2006 and four replications of three plants each in 2007.

^d–, not tested.

Table 8. Numbers and fresh weights of pepper fruits harvested from plants root-dipped with various antagonistic bacterial strains and metalaxyl just prior to transplanting in the field with natural inoculum in 2007

Treatment ^{a,b}	Number of pepper fruit ^c			Fresh weight of pepper fruit (g)		
	Green	Red	Combined	Green	Red	Combined
Untreated	287 c	150 b	437 c	2423 a	1728 b	4151 c
Metalaxyl	324 a-c	38 b	62 bc	621 a	674 b	295 bc
CCR04	297 bc	177 ab	473 bc	2381 a	2200 ab	4581 a-c
CCR80	433 a	221 a	654 a	3480 a	2646 a	6126 ab
GSE09	318 a-c	167 ab	485 a-c	2747 a	1971 ab	4718 a-c
ISE13	421 ab	168 ab	588 a-c	3364 a	1984 ab	5348 a-c
ISE14	395 a-c	220 a	616 ab	3417 a	2761 a	6178 a

^aMeans \pm standard errors within a column followed by the same letter are not significantly different when tested with LSD at $P=0.05$.

^bPlants were treated with bacterial strains, 10 mM MgSO₄ buffer (untreated control), or metalaxyl (fungicide-treated control) on June 1, 2007.

^cNumber and fresh weights (g) of pepper fruits per replication were described with total fruit numbers and weights from three harvests on August 13, 27, and September 22, 2007. At the first harvest, only ripe (red) pepper fruits were collected and at the second and third harvests, red and green pepper fruits were collected. These experiments were conducted with four replications of 40 plants each.

2. 선발된 내생·근권 세균과 길항미생물의 생리, 분자생물학적 분류, 동정

가. 16S rDNA sequence 분석을 통한 동정

16S rDNA sequence 분석을 통하여 동정을 수행한 결과 기선발균주인 KJ9C8은 *Chryseobacterium* 속에 속하였으며 *Chryseobacterium wanjuense*와 99% 정도의 근연 관계를 맺고 있었다(Figure 9 and 10). KJ2C12 균주는 16S rDNA sequence 분석 결과 1545 nucleotide를 가졌으며 *Bacillus luciferensis*와 98.2% 정도의 근연 관계를 맺고 있었다(Figure 11 and 12). 새롭게 선발한 5균주(CCR04, CCR80, GSE09, ISE13, ISE14)를 16S rDNA sequence 분석을 통하여 동정을 수행한 결과 CCR04 *Pseudomonas corrugata*와 99% 정도의 근연관계를 맺고 있었으며(Figure 13 and 14), CCR80균주는 *Pseudomonas corrugata*와 99% 정도의 근연관계를 맺고 있었다(Figure 15). GSE09는 *Flavobacterium denitrificans* 와 *F. johnsoniae*와 약 96%의 근연관계가 있으며(Figure 16 and 17), ISE13은 *Lysobacter enzymogenes*와 99% (Figure 18 and 19), ISE14균주는 *Chryseobacterium indologenes*와 99%의 근연관계를 맺고 있었다(Figure 20 and 21).

```
GTGACGCTCCCGGNNCGCTAACACATGCAAGCCGAGCGGTATTTATTCTTCGGAATAGAGAGCGCGGTACGG
GTGCGGAACACGTGTGCAACCTGCCCTTTATCAGGGGGATAGCCTTTCGAAAAGGAAGATTAATACCCCATAAATTTA
AGATGGCATCATTTTAAATGAAAACACGGTGGATAAAGATGGGCACGCGCAAGATTAGATAGTTGGTGAGGTAA
CGGCTCACCAAGTCAGTGATCTTTAGGGGGCTGAGAGGGTGATCCCCCAGACTGGTACTGAGACACGGACAGACTC
CTACGGGAGCCAGCAGTGAGGAATATTGGACAATGGGTGAGAGCCTGATCCAGCCATCCCGCGTGAAGGACGAGGCC
CTATGGGTTGTAAACTCTTTTGTATAGGGATAAACCTAGATACGTGTATCTAGCTGAAGGTAATAACGAATAAG
CACCAGCTAACCTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTATCCGGATTTATTTGGGTTTAAAGGG
TCCGTAGGCGGATCAGTAAGTCAGTGGTGAAATCTCATAGCTCAACTATGAACTGCCATTTGATCTGCTGGTCTTG
AGTAAGGTAGAAGTAGCTGGAATAAGTAGTGTAGCGGTGAAATGCAATAGATATTAAGTACACCAATTTGCGAAG
GCAGTTACTATGNTTAACTGACGCTGATGGACGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCA
CGCTGTAACGATGCTAACCTCGTTTTTGGGTTTTTCGGATTTCAGAGACTAAGCGAAAGTGATAAGTTAGCCACCTGGG
GAGTACGAAACGCAAGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGATTAATGTGGTTTAAATTCGA
TGATACGCGAGGAACCTTACCAAGGCTTAAATGGGAATTGATCGGTTTAAAGAAATAGACCTTCCCTCGGGCAATTTTC
AAGGTGCTCATGGTTGTGCTCAGCTCGTCCCGTGAGGTGTAGGTTAAGTCTGCAACGAGCGCAACCCCTGTTACT
AGTTGCTACCATTAAGTTGAGGACTCTAGTAAAGACTGCCTACGCAAGTACAGAGGAAAGTGGGGATGACGCTCAAAATC
ATCAGGGCCCTTACGCTTGGCCACACAGTAATACAATGGCCGTTACAGAGGGCAGCTACACAGCGGATGTGATGCA
AATCTCGAAAAGCCGTTCTCAGTTCCGATTTGGATCTGCACTCGACTCTAAGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGC
ATCAGCCATGGCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCCGCTCAAGCCATGGAAGTCTGGGGTACTGA
AGTCGGTAGCCGTAAGGAGTGCCTAGGGTAAACAGGTAACCTAGGGCTAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTA
```

Figure 9. Nucleotides of 16S rDNA of an antagonistic bacterium, KJ9C8.

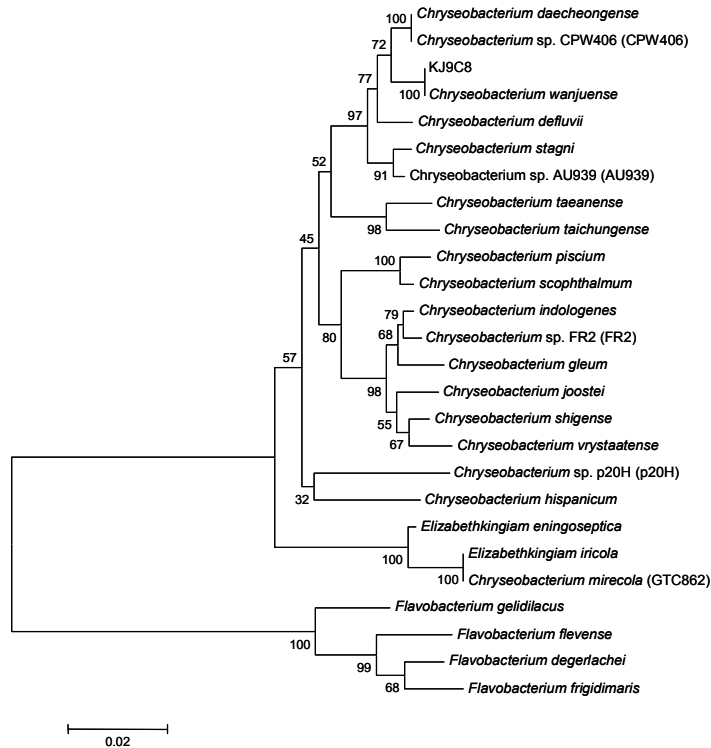


Figure 10. Phylogenetic neighbor-joining dendrogram showing the relationship of antagonistic rhizobacterial strain KJ9C8 with other related species in the *Chryseobacterium* family. Bootstrap values of 100 analyses are shown at the branch points. The scale bar represents 2 nucleotide substitutions per 100 nucleotides of 16S rDNA sequence.

TGCCCTAACATGCAAGNCGAGCGGACTAATGGGAGCTTGCTCCCNNTAGTTAGCGGGGACGGGTGAGTAAACAGTGG
 GCAACCTACCTGTAAGACTGGGATAAAGTTCGGGAAACCGGAGCTAAATACCGGATGACATAAAGGAACTCCTGTTCCT
 TTATTGAAAGAATGGCCCTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGCCGCAATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCAC
 CAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGTACGGCCACACTGGGACTGAGACACCGCCAGACTCCTACGGGA
 GGCACGATAGGAACTCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGCGATGAAGGCCCTCGGCTC
 GTAAAGCTCTGTGTAGGGAAGAACAAAGTCTAGTTGAAATAGCTGGCACCTTGACCGTACCTAACCGAAAGGCCA
 CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATAAGTGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTAATGGGCGTAAAGCGCGCG
 CAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCAATTGGAAACTGGGAAACTTGAGTG
 CAGAAGAGGAAAGTGAATTCCAAAGTGTAGNAGTCCAAATGCGTAGAGATTGGAGAAACACAGTGGCGAAGGCCA
 CTTTCTGTCTCTAACTGACGCTGAGCGCGAAAGCGTGGGGACCAAAACAGATTAGATACCTGTACTCCACGGCT
 GTAAACGATGAGTGAAGTGTLAGAGGGTTCCGCCCTTAGCGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGG
 GAGTACGGTCCGCAAGCAACTCAAAGGAAATGACGGGGCCCGCAAGTGGTAGCAATGGGTTTAAATCGA
 AGCAACGGGAAAGCTTACCAAGTCTTGACATCCCTGACAAACCTAGAGATAGGGCTTCCCTCCGGGACAGAT
 GACAGGTGTGCAATGCTTTCGTCAGCTCTGCTGCTGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCCAAACCTTGATC
 TTAGTTGCCAGCAATAGTTGGGCACTAAAGGTGACTGCCGTTGACAAACCGGAGGAAGTTGGGGATGACGTCAAA
 TCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAGTGTACAATGGATAGTACAAGGGTTGCAAAGACCCGAGGTGG
 AGCTAATCCCAATAAACTATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCTACATGAAAGCCGGAATCACTAGTAAT
 CGCGGATACGATGCCCGGTGAATACGTTCCCGGCCCTGTACACACCCCGCTCACACCACGAGAGTTGTAAAC
 CCGAAGTCGGTGGGTAACCTTTAGGGCCAGCCGCTAAGTGGGACAGATGATTGGGTTGAGTCTGTAACAAG
 TAAGCCGTA

Figure 11. Nucleotides of 16S rDNA of an antagonistic bacterium, KJ2C12.

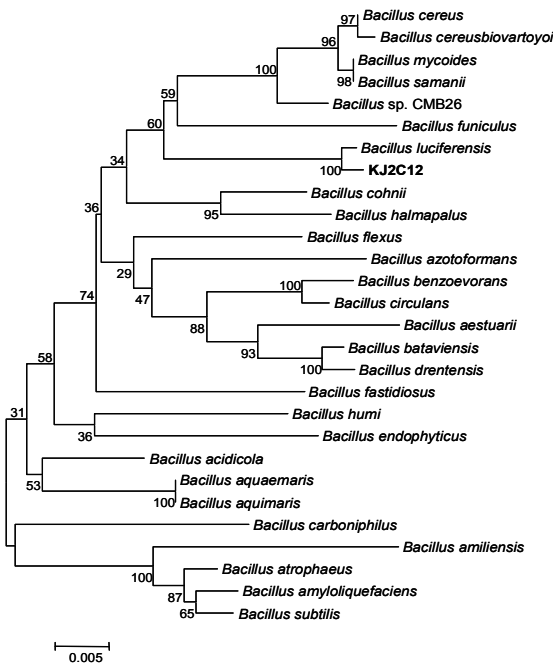


Figure 12. Phylogenetic neighbor-joining dendrogram showing the relationship of antagonistic rhizobacterial strain KJ2C12 with other related species in the *Bacillaceae* family. Bootstrap values of 1000 analyses are shown at the branch points. The scale bar represents 5 nucleotide substitutions per 1000 nucleotides of 16S rDNA sequence.

```

TGCAAGTCGAGCGGTAGAGAGGTGCTTGCACCTCTTGAGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTG
GTAGTGGGGGATAACGCTCGGAAACGGACGCTAATACCGCATACGTCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGCCT
TGCGGTATCAGATGACCTAGGTCGGATTAGCTAGTGGTGAGGTAATGGCTGACCAAGCGGACGATCCGTAACTGG
TCTGAGAGGATGATCAGTACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGG
ACAATGGGGAAAGCTGATCCAGCCAAGCGCGGTGTGGAAGAAAGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTAAAGTTGGG
AGGAAGGCGATTAACTAATACGTTAGTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTTGTGCCAGCAG
CCGGGTAATACAGAGGGTCAAGCGTTAATCGGAATFACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTTGTAAAGTTGG
ATGTGAAAGCCCGGCTCAACTGGGAAGTGCATTCAAAAAGTCAAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGAATT
TCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGGGACCACTGGACTGAATGACA
CTGAGGTGGAAAGCTGGGGACAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGGCTAAACGATGCAACTAGCCG
TTGGAGCCTTGACTCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAA
CTCAAATGAATTGACGGGGGCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCCTTACA
GGCCTTGACATCAAATGAACCTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCAATGGCTGC
GTCAGCTCGTTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAAACGAGCGCAACCCTTTCCTTAGTTACGACAGCTTATG
GTGGGCACTTAAGGAGACTGCGGGTGACAAACCGGAGGAAGTGGGGATGACGTCGAAGTCAATCAATGGCCCTTACGGC
CTGGGCTACACAGCTGCTACAATGGTCCGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGGAGGTGGAGCTAATCCATAAAACCGA
TCGTAGTCCGGATCCAGTCTGCAACTCGACTCGTGAAGTCCGAAATCGCTAGTAAATCCGGAATCAGAATGTCCGGG
TGAATACGTTCCGGGCTTGTACACACCGCCGTCACACCAAGGAGTGGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAAC
TTCGGGGGACGGT

```

Figure 13. Nucleotides of 16S rDNA of an antagonistic bacterium, CCR04.

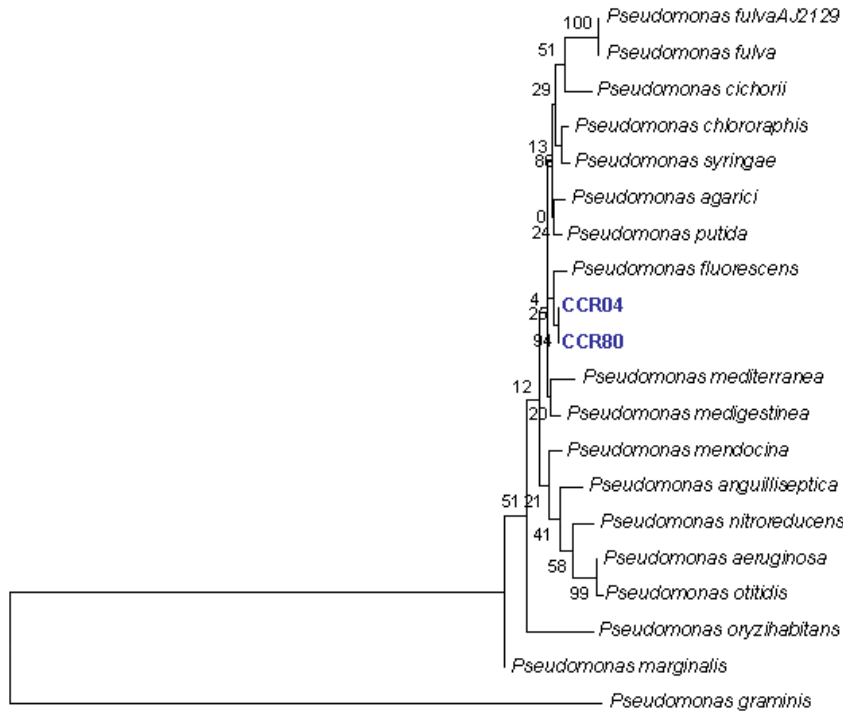


Figure 14. Phylogenetic neighbor-joining dendrogram showing the relationship of CCR04 and CCR80 with other related species in the *Pseudomonas* family. Bootstrap values of 100 analyses are shown at the branch points. The scale bar represents 10 nucleotide substitutions per 100 nucleotides of 16S rDNA sequence.

```

TGCAAGTCGAGCGGTAGAGAGGTGCTTGCACCTTTGAGAGCGGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTG
GTAGTGGGGATAAACGCTCGGAAACGGACGCTAATACCGCATACGTCTACGGGAGAAAGCAGGGACCTTCGGGCT
TGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACAAAGCGCAGGATCCGTAACCTGG
TCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAC TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATTTGG
ACAAATGGGGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGG
AGGAAGGGCATTAACTAATACGTTAGTGTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACGGCTAACTCTGTGCCAGCAG
CCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTTGTAAAGTTGG
ATGTGAAAGCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCAAAACTGACAAGCTAGAGTAAGTTAGAGGGTGGTGGAAAT
TCCTGTGTAGCGGTGAAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACAGTGGCGAAGCGCACCCTGGACTGATACTGACA
CTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATTACCTGTTAGTCCACGGCGTAAAACGATGTCAACTAGCAA
TTGGGAGCCTTGAGCTCTTAGTGGCCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAA
CTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGAGCAATGTTGGTTTAAATTCGAAGCAACCGCAAGAACCTTACCA
GGCCTTGACATCCAAATGAAGTTCCAGAGATGGATTGGTGCTTCGGGAAACATGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTC
GTCAGCTCCTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTTAGTTACAGCAGCTTATG
GTGGCACTCTAAGGAGATGCCGGTGCAAAACCGGAGGAAGGTGGGATGACGCTCAAGTCAATCATGGCCCTTACGGC
CTGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCCGAGGTGGAGCTAATCCACAAAACCGAT
CGATGTCGGATCCGAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGTAGTAAATCCGAAATCAGATGTCCCGGT
GAATACGTTCCCGGCCCTGTACACACCCCGCTCACACCATGGGATGGGTTGCACCCAGAAAGTAGCTAGTCTAACCT
TCGGGGGACGGTAC

```

Figure 15. Nucleotides of 16S rDNA of an antagonistic bacterium, CCR80.

CCAGTTTTACCCTAGGCAGCTCCTTGC GGTCACCGACTTCAGGCACCCAGCTTCCATGGCTTGACGGGGCGGTGTGT
 ACAAGGCCGGGAACGTATTCACCGGATCATGGCTGATATCCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGGAGTCGAGTT
 GCAGACTCCGATCCGAACGTGTACCGGCTTTATAGATTTCGCTCCCCCTCGCGGGTGGCTGCTCTGTACCGGCCAT
 TGTAGCACGTGTGTAGCCCAAGGCGTAAGGGCGGTGATGATTGACGTCATCCCCACCTTCTCACAGTTTGCACTGG
 CAGTCTTGCTAGAGTTCCCGACATGACTCGCTGGCAACTAACACAGGGGTTCGGCTCGTTATAGAGCTTAACCTGA
 CACCTCACGGCACGAGCTGACGACAACCATGCAGCACCTTGTAGACCGCTTTCGGAAAAGGTTCTTTCCAAACCGGTC
 AGTCTGCATTTAAGCCTTGGTAAGGTTCCCTCGCGTATCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGGGGGCC
 CGTCAATTCCTTTGAGTTTCAAACCTTGCCTTCGTACTCCCGAGTGGGATACTTATCACTTTCGCTTAGCCACTGAA
 CTTGGCCCAACAGCTAGTATCCATCGTTTACGGCTGGACTACCAGGATCTAATCCTGTTCGCTACCCACGCTTT
 CGTCCATCAGCGTCAATCCATTGGTAGCAACCTGCCTTCGCAATGGTATTCATGTAATCTCTAAGCAATTCACCGC
 TACACTACATATCTAGTTGCTTCCCAATAATCAAGTCCAGCAGTATCAAATGGCCGTTCCACCGTTGAGCGATGGC
 TTTCCACCTGACTTACAAGACCGCTACAGACCCTTAAACCCAATGATTCCGGATAACGCTTGGATCTCCGATT
 ACCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGATCCTTATCTTACGGTACCGTCAAGCTCTACAGTAGGAGGTTTCTT
 CCCGTACAAAAGCAGTTTACAATCCATAGGACCGTCATCCTGCACGGCGCATGGCTGGTTCAGGCTTGCGCCATTGA
 CCAATATTCCTCACTGCTGCCCTCCCGTAGGAGTCTGGTCCGTCTCAGTACCAAGTGTGGGGATCTCCCTCAGGA
 CCCCTACCCATCGTAGCCTTGGTAAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATGGGACGCATGCTCATCTCCACCGTTGT
 GACTTTAATCATATCCCGATGCCGGTTCATGATGCTATGAGGTATTAATCCAAATTTCTCTGGCTATCCCTCTGTG
 GAAGGCAGATTGCATACCGGTTACGCACCCGTCGCGCGGTCTCAAGGCCGAAAGCCTCTACCCTCGACTTG

Figure 16. Nucleotides of 16S rDNA of an antagonistic bacterium, GSE09.

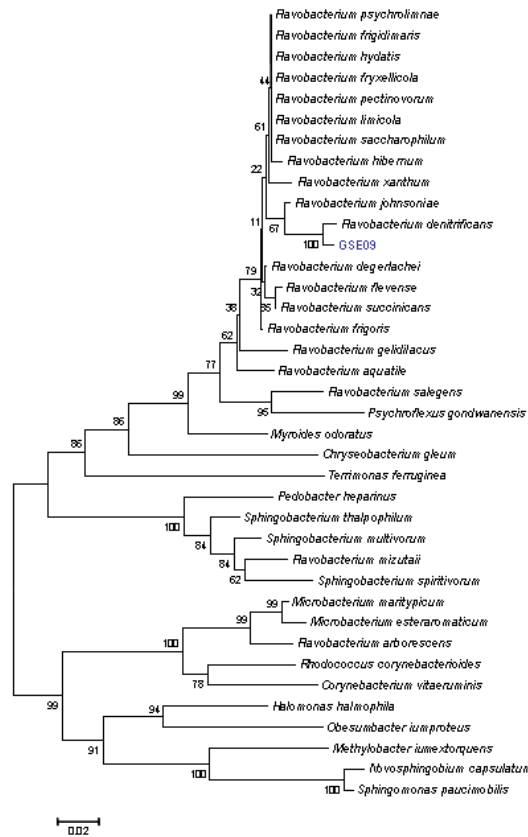


Figure 17. Phylogenetic neighbor-joining dendrogram showing the relationship of GSE09 with other related species in the *Flavobacteriaceae* family. Bootstrap values of 100 analyses are shown at the branch points. The scale bar represents 2 nucleotide substitutions per 100 nucleotides of 16S rDNA sequence.

CATGCAAGTCGAACGGCAGCACAGAGGAGCTTGCTCCTGGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGGAATACGTCGGAA
TCTGCCTATTTGTGGGGATAACGTAGGGAACTTACGCTAATACCGCATACGACCTACGGGTGAAAGTGGGGACC
GCAAGGCCTCAGCAGATAGATGAGCCGAGTGGATTAGCTAGTTGGCGGGTAAAGGCCCAACGAAGCCGACGATCC
GTAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGGAGACCGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGAGTGGGG
AATATGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGCCCTTCGGGTGTAAAGCACTTT
TGTCCGAAAGAAAAGCTTAGGGTTAATAACCTTGAGTCATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGT
GCCAGCAGCCGGTAATACGAAGGGTGAAGCGTTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCAGTGGTGGTTTGT
TAAGTCTGATGTGAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGAATGGCATTGGAAACTGGCTTACTAGAGTGCAGTACGAGGTA
GCGGAATTCGGGTGTAGCAGTGAATGCGTAGATACTGGGAGGAACATCTGTGGGAAAGGGCGCTACCTGGACCAG
CACTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCCA
ACTGGATGTGGGGCAACTTGGCCCTCAGTATCGAAGCTAACCGCTTAAGTTCGCCCCTGGGAAAGTACGGTCCGAA
GACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTCGATGCAACCGGAAGAA
CCTTACCTGGCCTTGACATGTGCGAAGCTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAAGTTCGAAACAGGTGCTGCA
TGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCTTGTCTTAGTTGCCAGCA
CGTAAATGTGGAACTCTAAGGAGACCGCGGTGACAAAACGGAGGAAGTGGGGATGACGTCAGTCAATCATGGCC
CTTACGGCCAGGCTACACACGTAACAATGGTAGGGACAGAGGGCTGCAAAACCCGCGAGGGCAAGCCAATCCAG
AACCTATCTCAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCCGAAATCGTAGTAAATCGCAGATCAGCAT
TGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGCCCTGTACACACCGCCCTCACACCATGGGAGTTTGTGTGACCAGAAGCAGGTA
GCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTC

Figure 18. Nucleotides of 16S rDNA of an antagonistic bacterium, ISE13.

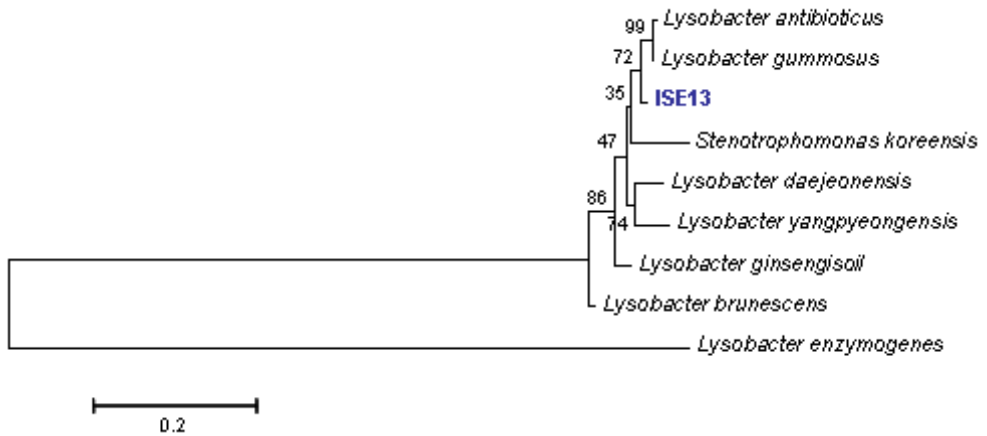


Figure 19. Phylogenetic neighbor-joining dendrogram showing the relationship of ISE13 with other related species in the *Lysobacteriaceae* family. Bootstrap values of 100 analyses are shown at the branch points. The scale bar represents 2 nucleotide substitutions per 100 nucleotides of 16S rDNA sequence.

CATGCAAGCCGAGCGGTAGAGATCTTTCGGGATCTTGAGAGCGGCGTACGGGTGCGGAACACGCTGTGCAACCTGCCTT
TATCTGGGGGATAGCCTTTCGAAAGGAAGATTAAACCCATAATACTGGATGGCATCATTCCGGTATTGAAAAAC
TCCCGTGGATAGAGATGGGCACGCGCAAGATTAGATAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGTCTACGATCTTTAGG
GGCCCTGAGAGGGTATCCCCACACTGGTACTGAGACACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAAATATT
GGACAATGGGTGAGAGCCTGATCCAGCCAATCCCGCGTGAAGGACGACGGCCCTATGGGTGTAACCTCTTTTGAT
AGGGATAAACCTACTCTCGTGAGAGTAGCTGAAGGTACTATACGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCG
CGGTAAATACGGAGGGTGCAAGCGTTATCCGGATTTATGGGTTTAAAGGGTCCGTAGGCGGATGTGTAAAGTCAGTGG
TGAAATCTCACAGCTTAACCTGTGAACTGCCATTGATACTGCATGCTTGAGTGTGTTGTAAGTAGCTGGAATAAG
TAGTGTAGCGGTGAAATGCATAGATACTACTAGAACACCAATTCGGAAGGCAGGTTACTAAGCAACAACCTGACGC
TGATGGACGAAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGGTAACAGATGCTAACTCGTTTT
TGGAGCGCAAGCTTCAGAGACTAAGCGAAAGTGATAAGTTAGCCACCTGGGGAGTACGTTTCGCAAGAAATGAACTCA
AAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGATTATGTGGTTTAAATTCGATGATACGGGAGGAACCTTACCAAGGC
TAAATGGGAAATGACAGGTTTAGAAATAGACTTTCTTCGGACATTTTCAAGGTGCTGCATGGTTGTCGTCAGC
TCGTGCCGTGAGGTGTTAGGTTAAGTCTGCAACGAGCGCAACCCCTGTCACTAGTTGCCATCATTAAGTTGGGGAC
TCTAGTGAGACTCCCTACGCAAGTAGAGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAATCATCACGGCCCTTACGCCTTGGGCC
ACACACGTAATAACAATGGCCAGTACAGAGGGCAGCTACACGGTGACGTGATGCAAAATCTCGAAAGCTGGTTCAGTT
CGGATTTGGAGTCTGCAACTCGACTCTATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGCATCAGCCATGCGCGGTGAATAC
GTTCCCGGGCCTTGTAACACACCGCCGTCGAAGCCTGGAAGTCTGGGGTACCTGAAGTCCGTGACCGTAACAGGAGCT
GCCTAGG

Figure 20. Nucleotides of 16S rDNA of an antagonistic bacterium, ISE14.

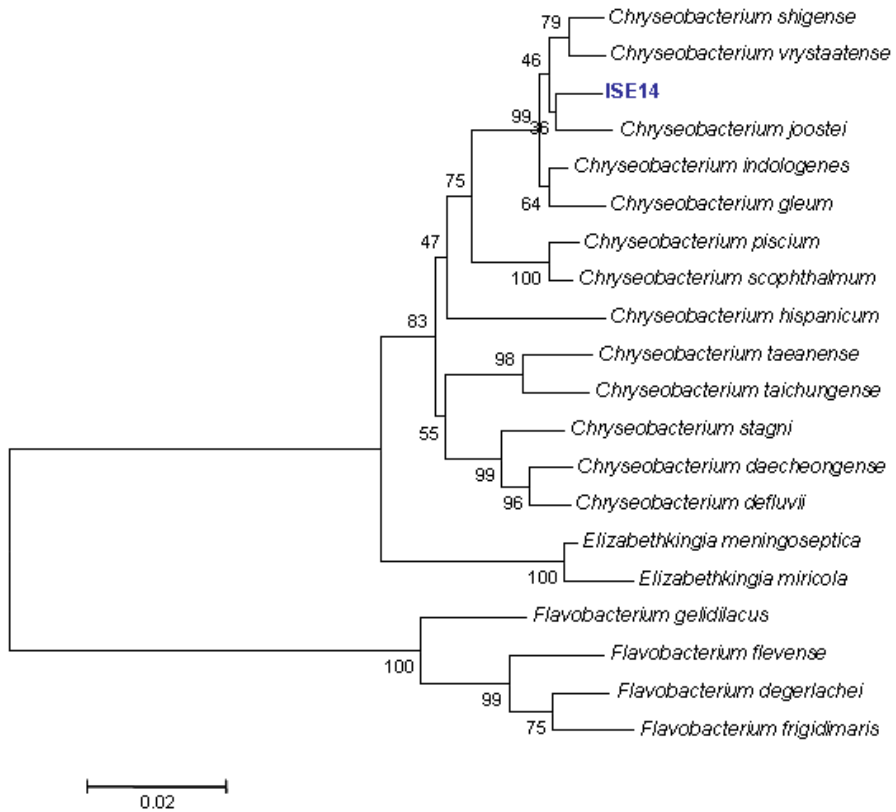


Figure 21. Phylogenetic neighbor-joining dendrogram showing the relationship of ISE14 with other related species in the *Chryseobacterium* family. Bootstrap values of 100 analyses are shown at the branch points. The scale bar represents 2 nucleotide substitutions per 100 nucleotides of 16S rDNA sequence.

나. 고추 역병에 대한 기선발 내생·근권 길항 세균의 투과전자현미경 관찰

투과 전자 현미경 (Transmission electronic microscopy)를 사용하여 기선발균주인 KJ9C8균주를 관찰한 결과, 그람 음성균으로써 일반적인 짧은 간상형이며 크기는 $0.7-0.9 \mu\text{m} \times 1.5-2.1 \mu\text{m}$ 정도로 편모를 가지고 있지 않았다(Figure 22).

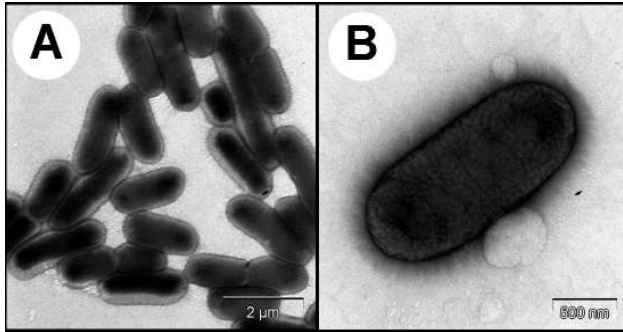


Figure 22. Transmission electron micrograph of an antagonistic bacterial strain KJ9C8 grown on nutrient agar for 24 h. A: aggregated bacterial cells. B: single cell of KJ9C8.

KJ2C12균주의 SEM을 관찰한 결과 막대모양의 streptobacillus 이고 편모를 가지고 있지 않았다. KJ2C12 세포의 크기는 거의 $0.8-0.9 \mu\text{m} \times 1.3-1.6 \mu\text{m}$ 이었다 (Figure 23)

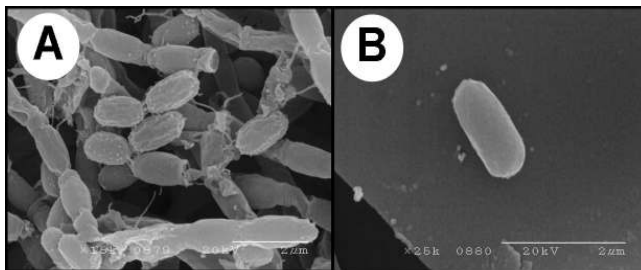


Figure 23. Scanning electron micrograph of an antagonistic bacterial strain KJ2C12 grown on nutrient agar for 48 h. A: aggregated bacterial cells. B: single cell of KJ2C12

투과 전자 현미경을 사용하여 새롭게 선발된 길항세균 CCR04의 형태를 관찰한 결과 막대형의 세포모양을 가지며 편모는 1-3개로 polar이었다(Figure 24). CCR80균주는 그람 음성균으로써 막대형의 모양을 가지며, CCR04와 유사하게 polar로 2-4개의 편모를 갖고 있었다.

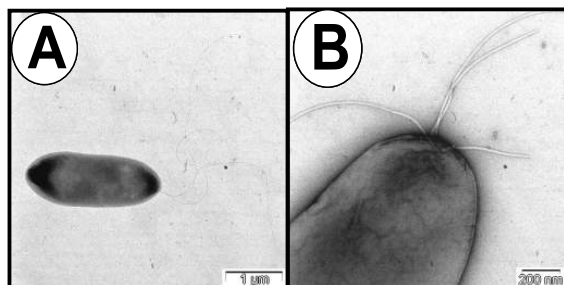


Figure 24. Transmission electron micrograph of an antagonistic bacterial strain CCR04 and CCR80 grown on nutrient agar for 24 h. A: single cell of CCR04. B: single cell of CCR80.

GSE09균주를 TEM을 통해 관찰한 결과 간상형이었고, 두꺼운 slime 층을 가지고 있었으며, 편모나 섬모는 가지고 있지 않았다(Figure 25).

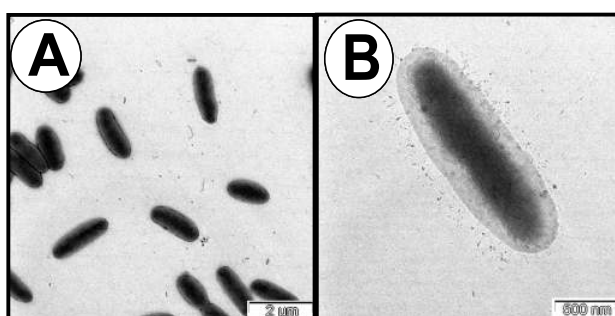


Figure 25. Transmission electron micrograph of an antagonistic bacterial strain GSE09 grown on nutrient agar for 24 h. A: aggregated bacterial cells. B: single cell of GSE09.

ISE13균주는 긴 막대형이었고, polar로 2-4개의 편모를 가지고 있는 것이 관찰되었으며, ISE14균주는 간상형으로 수많은 섬모가 관찰되었으며, 편모는 가지고 있지 않았다(Figure 26).

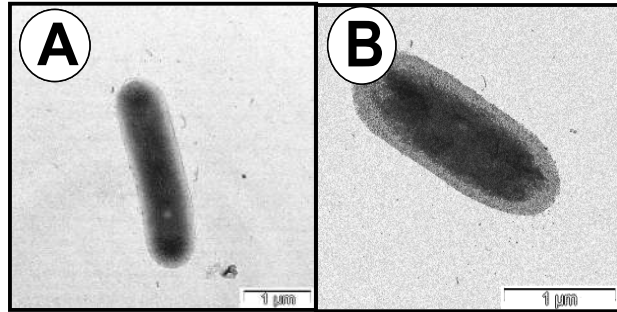


Figure 26. Transmission electron micrograph of an antagonistic bacterial strain ISE13 and ISE14 grown on nutrient agar for 24 h. A: single cell of ISE13. B: single cell of ISE14.

다. Biolog 분석

탄소원의 이용율을 통하여 Microlog 3 database release 4.01A (Biolog, Hayward, CA)를 가진 Miolog GN Microplate system이 이용하여 reaction data로 동정을 하였다. 그 결과 Biolog system에서 기선발균주인 KJ9C8은 *Chryseobacterium scopthalmum* (similarity; 0.85%) 으로 동정되었으며 이와 유사한 결과가 fatty acid profile 분석에 의해 나왔다. 95 탄소 이용도의 분석을 Biology system에 의해 식행 및 분석할 수 있었으며, 이러한 결과로 기선발균주인 KJ9C8은 KJ1R5와 동일한 *Chryseobacterium* 속에 포함되었다. 새로운 길항세균으로 선발된 균주인 CCR04와 CCR80은 각각 similarity 0.91%와 0.75%로 *Pseudomonas corrugata* 로 동정이 되었으며, GSE09는 *Photobacterium loeji*(similarity; 0.61%)로, ISE13은 *Photobacterium loeji*(similarity; 0.74%), ISE14는 *Chryseobacterium gleum/indologenes* (similarity; 0.81%)로 동정되었다. 95개의 탄소 이용도의 분석을 Biology system에 의해 수행하여 분석할 수 있었으며, 이와 유사한 결과가 fatty acid profile 분석에 의해 나왔다.

라. Fatty acid methyl ester (FAME) analysis를 통한 동정

지방산 (fatty acid)의 종류와 그 함량을 TSBA database (Microbial ID Inc., Nwea가, DE)로 기선발균주인 KJ1R5, KJ9C8과 KJ2C12의 동정을 수행하였으며, 새롭게 길항세균으로 선발된 CCR04, CCR80, GSE09, ISE13, ISE14 균주를 분석하였다. 그 결과 KJ9C8은 *Chryseobacterium balustinum*으로 동정되었다. biolog와 FAMEs 분석을 통하여 KJ1R5가 *Flavobacterium* 혹은 *Chryseobacterium* sp. 일 것이라고 추정할 수 있다. KJ9C8의 지방산 분석을 수행한 결과 대부분 anteioso-15:0과 iso-15:0 이었다. KJ2C12는 FAMEs 분석에 의하면 *Bacillus marinus*와 0.535% similarity를 가지며 동일하였다 (Table 9). CCR04와 CCR80은 *Pseudomonas corrugata*(similarity; 0.82%, 0.85%), GSE09는 *Flavobacterium johnsoniae*(similarity; 0.71%), ISE13은 *Lysobacter enzymogenes*(similarity; 0.87%)으로 ISE14는 *Chryseobacterium indologenes*(similarity; 0.84%)와 *Chryseobacterium balustinum* (similarity; 0.84%)으로 각각 동정되었다. biolog와 FAMEs 분석을 통하여 CCR04와 CCR80은 *Pseudomonas corrugata*. 이며, GSE09는 *Flavobacterium* sp., ISE13은 *Lysobacter enzymogenes*., ISE14는 *Chryseobacterium indologenes* 일 것이라고 추정할 수 있다(Table 10).

Table 9. Fatty acid profiles of antagonistic bacterial strains KJ1R5 and KJ9C8 and type strains, *Chryseobacterium* spp. by fatty acid methyl-esters (FAMES) of total cellular fatty acids by gas chromatography using the MIDI system (Microbial Identification System, Inc., Newark, USA)

Fatty acid	1 ^a	2	3	4	5	6	7
14:00	0.2	2.1	0.2	–	–	–	–
15:00	0.1	–	–	–	–	–	0.4
16:00	1.1	1.6	1.2	1.1± 0.1	Tr	Tr	2.7
18:00	0.2	–	–	–	–	–	–
13:0 ISO	0.8	Tr	0.5	Tr	Tr	1.4	0.5
14:0 ISO	–	–	–	–	–	–	6.9
15:0 ISO	40.8	32.3	38.3	34.9±0.5	30.8	41.2	30.2
16:0 ISO	0.1	–	–	–	–	–	9.7
17:0 ISO	0.9	1	1.6	1.1±0.1	Tr	Tr	1
14:0 ISO 3OH	0.1	–	–	–	–	–	–
15:0 ISO 3OH	3.2	2.7	3.6	2.9±0.1	2.7	3.5	–
16:0 ISO 3OH	1.1	Tr	0.9	Tr	–	Tr	–
17:0 ISO 3OH	11.9	16.8	13.4	17±0.2	18.1	16.3	–
14:1 ISO E	0.1	–	0.1	–	–	–	–
15:1 ISO F	–	–	–	–	–	–	–
15:0 ANTEISO	0.3	Tr	0.3	Tr	Tr	2.2	40.4
17:0 ANTEISO	–	–	–	–	–	–	3.3
16:0 2OH	0.2	–	0.2	–	–	–	–
17:0 2OH	0.1	Tr	–	Tr	–	Tr	–
16:0 3OH	0.6	1.4	0.4	1.3±0.1	Tr	2.2	–
13:1 AT 12–13	0.3		0.2	–	–	–	–
16:1 w7c alcohol	–	–	–	–	–	–	1.1
16:1 w11c	–	–	–	–	–	–	0.8
18:1 w5c	0.3	–	0.3	Tr	Tr	Tr	Tr

18:1 w7c	–	0.6	–	–	–	–	–
ISO 17:0 w9c	17	–	14.7	21.3±0.4	27.1	27.7	7
unknown 11.543	0.4	–	0.6	–	–	–	–
unknown 13.565	–	–	7.8	–	–	–	–
unknown 13.566	–	1.6	–	3.3±0.5	1.2	1.5	–
unknown 14.565	7.3	–	–	–	–	–	–
unknown 16.580	–	1.3	–	1.7±0.2	1.7	1.7	–
unknown 16.582	1.1	–	1.3	–	–	–	–
Sum in feature 2	0.1	–	–	–	–	–	–
Sum in feature 3	11.5	–	14.2	–	–	–	0.3
Sum in feature 4	0.3	–	0.4	–	–	–	0.2
Summed feature 2	0.1	–	–	–	–	–	–
Summed feature 3	11.5	–	14.2	–	–	–	0.3
Summed feature 4	0.3	9.2	0.4	11.8±0.6	12.9	18	0.2
Summed feature 5	–	Tr	–	–	Tr	Tr	–

^a The numbers represent strains, 1, KJ1R5; 2, *C. balustinum* 3, KJ9C8; 4, *Chryseobacterium scophthalmum* 5, *C. indologenes* 6, *C. meningosepticum*. 7, KJ2C12.

^b –, not detected; Tr, trace (<0.1).

Table 10. Fatty acid profiles of five antagonistic bacteria, CCR04, CCR80, GSE09, ISE13, and ISE14 by fatty acid methyl-esters (FAMES) of total cellular fatty acids by gas chromatography using the MIDI system (Microbial Identification System, Inc., Newark, USA)

Fatty acid	1 ^a	2	3	4	5
10:0	0.41	0.32	– ^b	–	–
12:0	4.07	4.10	–	0.38	–
14:0	0.24	–	1.70	0.56	0.22
16:0	23.67	24.60	10.19	3.01	0.82
18:0	0.54	0.67	0.21	0.76	–
20:0	–	–	–	0.26	–
11:0 Iso	–	–	–	3.81	–
13:0 Iso	–	–	0.27	0.23	0.87
15:0 Iso	–	–	22.55	40.76	38.64
16:0 Iso	–	–	0.37	0.62	0.09
17:0 Iso	–	–	0.46	5.95	1.35
11:0 Iso 3OH	–	–	–	7.53	–
14:0 Iso 3OH	–	–	–	–	0.12
15:0 Iso 3OH	–	–	5.62	–	3.02
15:1 Iso F	–	–	–	–	0.16
15:1 Iso G	–	–	3.16	–	–
16:0 Iso 3OH	–	–	0.62	–	0.24
17:0 Iso 3OH	–	–	5.99	–	17.55
15:0 Anteiso	–	–	0.94	0.32	0.31
10:0 2OH	–	–	–	0.23	–
12:0 2OH	3.48	3.42	–	–	–
15:0 2OH	–	–	0.55	–	–
16:0 2OH	–	0.58	0.28	–	–
17:0 2OH	–	–	–	–	0.13
8:0 3OH	0.37	0.36	–	–	–
10:0 3OH	4.83	4.63	–	0.38	–
12:0 3OH	4.46	4.16	–	–	–
15:0 3OH	–	–	0.99	–	–
16:0 3OH	0.64	0.63	9.29	–	1.44

17:0 3OH	—	—	0.39	—	—
12:1 3OH	1.06	0.85	—	—	—
13:1 AT 12-13	—	—	1.23	—	—
17:0 Cyclo	2.39	2.42	—	—	—
19:0 Cyclo w8c	0.24	0.28	—	—	—
15:1 w6c	—	—	1.64	—	—
16:1 w5c	—	—	0.41	—	—
16:1 w7c alcohol	—	—	—	0.76	—
17:1 w6c	—	—	1.17	—	—
17:1 w8c	—	—	0.50	—	—
18:1 w5c	—	—	0.15	—	0.62
18:1 w7c	19.95	19.53	0.31	2.00	—
Iso 17:1 w9c	—	—	2.07	14.96	20.73
unknown 11.799	—	—	—	1.8	—
unknown 12.484	0.20	—	—	—	—
unknown 13.565	—	—	1.13	—	1.93
unknown 13.957	0.85	1.15	—	—	—
unknown 14.502	0.57	0.63	—	—	—
unknown 16.582	—	—	0.33	—	1.05
Sum In Feature1	—	—	—	0.22	Tr
Sum In Feature2	1.58	1.14	1.29	—	—
Sum In Feature3	30.44	30.53	26.20	14.50	10.24
Sum In Feature4	—	—	—	0.41	0.38
Summed Feature1	—	—	—	0.22	0.08
Summed Feature2	1.58	1.14	1.29	—	—
Summed Feature3	30.44	30.53	26.2	14.5	10.24
Summed Feature4	—	—	—	0.41	0.38

^aThe numbers represent strains, 1, CCR04; 2, CCR80 3, GSE09; 4, ISE13 5, ISE14.

^b—, not detected; Tr, trace (<0.1).

마. 생리생화학적 특성에 의한 동정

생리 생화학 실험은 Biolog, FAMES, 16S rDNA 분석에서 나타난 결과인 KJ1R5가 *Chryseobacterium*의 한 속이라는 것을 바탕으로 KCTC에서 분양받은

Chryseobacterium 6 종을 대조구로 사용하여 실험을 수행하였다. 그 결과 KJ1R5의 생리 생화학 결과와 가장 비슷한 것은 *Chryseobacterium indoltheticum* 로 나타났다. 이는 indole 형성을 제외한 모든 실험에서 KJ1R5와 동일한 결과를 나타냈다(Table 11). KJ2C12의 colony의 pigments는 하얀색이었으며, non-motile이었고 MacConkey agar에서는 배양이 되지 않았으며 28와 37°C 온도 범위에서 자랐다. 젤라틴을 가수분해 하며 malonate 이용하였으나 KJ2C12균주의 경우에는 exculin과 urea를 가수분해하지 못하였다. 반면 KJ2C12는 nitrate 환원이 관찰되었으며 indole을 생성하였다(Table 12).

Table 11. Physiological and biochemical characteristics of antagonistic bacteria, KJ1R5 and KJ9C8 and type strains, *Chryseobacterium* spp.

Characteristics	1 ^a	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Color of colonies	Y ^b	Y	W	Y	Y	Y	Y	Y	YW	Y
Motility	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Gram staining	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–
Enzyme activity :										
Nitrate reduction	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–
Degradation activity:										
Esculin	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+
Gelatin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Urea	–	+	+	+	–	+	+	–	–	+
Malonate	–	–	–	+	–	+	+	–	–	–
Growth at :										
28°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37°C	–	–	+	+	–	+	+	–	+	–
Production of indole	–	–	+w	–	–	–	–	–	–	–
Growth on nutrient broth containing	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1% NaCl										
2% NaCl	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+
3% NaCl	+	+	+	–	–	+	+	+	+	+
4% NaCl	–	–	+	–	–	–	–	+	+	–
Growth on MacConkey agar										
5°C										
37°C	–	–	+	–	–	+	+	+	–	–
42°C	+	+	+	+	–	+	+	+	–	–
Starch hydrolysis	+	–	+	+	–	–	–	–	–	–
Casein hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–
ONPG hydrolysis	–	–	–	–	–	+	+	+	+	+
Phenylalanine deaminase	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+

^a The numbers indicated strains, 1, Antagonistic bacterium, KJ1R5 2. *C. vrystaatense* 3, Antagonistic bacterium, KJ2C12; 4, Antagonistic bacteria, KJ9C8; 5, *Chryseobacterium balustinum* 6, *C. gleum* 7. *C. indologenes* 8: *C. indoltheticum* 9, *C. meningosepticum* 10, *C. scopthalmum*.

^b This abbreviations indicated Y, yellow; YW, yellowish white; W, white; +, a strain positive; +w, weakly positive; –, a strains negative; ND, not determined.

Table 12. Physiological and biochemical characteristics of antagonistic bacteria, KJ2C12 and type strains, *Bacilliaece* spp.

Characteristic	KJ2C12	<i>B. luciferensis</i>	<i>B. funiculus</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. mycoides</i>
Motility	– ^a	–	–	–	–
Anaerobic growth	–	+	–	+	+
Gelatin hydrolysis	–	–	–	–	–
Casein hydrolysis	+	+	+	–	–
Aesculin hydrolysis	+	+	+	+	+
Starch hydrolysis	+	+w	+	–	–
Tween 80 hydrolysis	–	–	–	–	–
Nitrate reduction	+/-	–	–	–	–
DNase	+	+w	–	+	+
Acid production from:					
Lactose	+w	+w	–	–	–
D-Glucose	+	+	+w	+	+
D-Mannitol	+	–	–	+w	+w
D-Mannose	+	–	–	+	+
D-xylose	–	–	+w	–	–
Growth on:					
D-Galactose	+	+	+	–	–
D-Cellobiose	+	+	–	+	–
Sucrose	+	+	+	+	+
Maltose	+	-	+	+	-

^a This abbreviations indicated +, a strain positive; +w, weakly positive; -, a strains negative; ND, not determined.

16S rDNA 염기서열분석, Biolog, FAME 분석을 통하여 GSE09균주가 *Flavobacterium*의 속(genus)에 속하는 것으로 확인이 되었으나 위 분석에 의한 결과에서 GSE09 균주와 가장 유사하다고 분류된 세균과의 유사성이 적기 때문에, *Flavobacterium* 속의 다른 세균을 분양을 받아 생리생화학적인 특성을 비교하였다. 이러한 생리 생화학적 특성을 비교하기 위하여 한국 생명공학연구원의 농업미생물 보존센터로부터 *Flavobacterium* 11종을 분양받았다. 균주의 콜로니 색깔과 이동성 그람 반응과 배지에서의 성장력, 효소 분비, 양분의 이용과 산화에 관한 특성을 비교하여 양성 반응(+)과 음성반응(-) 그리고 중간 정도의 반응(+w)로 평가하였다. GSE09균주는 노란색의 콜로니를 형성하였으며, 이동성이 있었고 그람 음성 세균이었다. 그리고 tryptic soy agar(TSA)와 nutrient agar(NA)에서 모두 생존할 수 있었으며, 25°C의 조건에서도 생장이 가능하였다. 플라보박테리움 속의 세균이 형성하기도 하는 flexirubin type pigment는 GSE09 균주의 경우 형성하지 못하였으며, congo red를 흡수하는 능력이 있었다. 또한 urea를 분해할 수 있는 효소인 urease를 형성하지 못하며, 젤라틴과 카세인을 분해할 수 있고, carboxymethyl cellulose, 한천, 펙틴을 분해하지 못하였다. 키틴을 분해하는 능력은 중간정도의 반응이 일어났으며, alginate, 전분, DNA, 타이로신을 분해할 수 있었고 egg-yolk 배지에서 침전하는 특성이 있었다. 반면 ONPG에 반응하지 않았다. 이러한 생리생화학적 특성을 분양받은 균주와 비교하여 보았을 때 congo red 흡수력, urea를 비롯한 기질 분해 능력 등에서 다른 특성을 가지는 것으로 확인이 되었다 (Table 13). 그러므로 16S rRNA 분석, 전자현미경에 의한 형태적 관찰, Biolog 분석에 의한 탄소원 이용 정도, 세균의 지방산 분석, 생리생화학적 특성 비교 분석을 통하여 GSE09 균주는 *Flavobacterium*의 속(genus)에 속하는 새로운 종(species)의 균주인 것으로 확인되었다.

Table 13. Physiological and biochemical characteristics of antagonistic bacteria, GSE09 and type strains, *Flavobacterium* spp.

Characteristics	1 ^a	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Color of colonies	Y ^b	Y	Y	Y	W	Y	W	Y	Y	Y	W	Y
Motility	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gram staining	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth on												
Tryptic soy agar	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nutrient agar	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at 25C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Flexirubin-type pigment	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
Congo red absorption	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
Urease	-	+w	-	-	-	-	-	-	+w	-	-	+
Degradation of :												
Gelatin	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-
Casein	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+
Carboxymethyl cellulose	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
Agar	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Pectin	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Chitin	+w	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Alginate	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Starch	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
DNA	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+w	-
Tyrosine	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+w	-
Precipitation on egg-yolk agar	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+
ONPG	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-

^a 1; GSE09, 2; *Flavobacterium johnsoniae*, 3; *F. pectinovorum*, 4; *F. saccharophilum*, 5; *F. hydatis*, 6; *F. psychrolimnae*, 7; *F. daejeoneanse*, 8; *F. sundheonense*, 9; *F. flevense*, 10; *F. calogense*, 11; *F. aguatile*, 12; *F. branchiophilum*

^b This abbreviations indicated Y, yellow; YW, yellowish white; W, white; +, a strain positive; +w, weakly positive; -, a strains negative; ND, not determined.

3. 선발된 내생·근권 세균의 고추병에 대한 병 억제 작용 기작 연구

내생·근권세균에 의한 고추 역병에 대한 길항 효과 기작 규명을 위하여, 선발된 내생·근권세균이 길항균에 의한 병억제 기작으로 잘 알려져 있는 항생물질, 식물 병원균 분해 효소, HCN, siderophore와 biofilm을 형성하는지 알아보았다.

가. 항생물질 분비

포장실험에서 병억제 효과가 검증된 새로운 내생근권 길항 세균 5 strains(CCR04, CCR80, GSE09, ISE13, ISE14)이 항생물질을 분비하여 주요 식물 병원균의 성장을 억제하는지 알아보기 위하여 V8-juice 배지에 8개의 식물병원균과 선발 길항 세균을 대치배양하여 식물 병원균의 균사 성장 억제를 평가하였다. 그 결과 CCR04와 CCR80은 *Phytophthora capsici*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria mali*의 균사 성장을 대치 배양에서 약 4-6mm 정도 억제하였으며, GSE09 세균의 경우에는 *P. capsici*와 *Rhizoctonia solani*를 제외하고 약 6mm 이상 균사 성장을 억제하였다. ISE13의 경우는 비교적 실험한 식물병원균의 균사 성장을 효과적으로 억제하였다(Figure 27). 반면, ISE14균주의 경우는 *Botrytis cinerea*를 제외하고는 실험에 사용된 식물병원균의 성장을 억제하지 못하였다(Figure 27). 5개의 길항 미생물 중에서 *Lysobacter* 속에 속하는 ISE13 균주가 가장 효과적으로 식물 병원균의 균사 성장을 억제하였는데, 일반적으로 *Lysobacter* 속에 속하는 세균은 항생물질과 세포외 효소를 다량 분비한다고 알려져 있다. ISE13 균주도 식물병원균에 성장 억제에 효과적인 항생물질과 세포외 효소를 분비하는 것으로 예상된다.

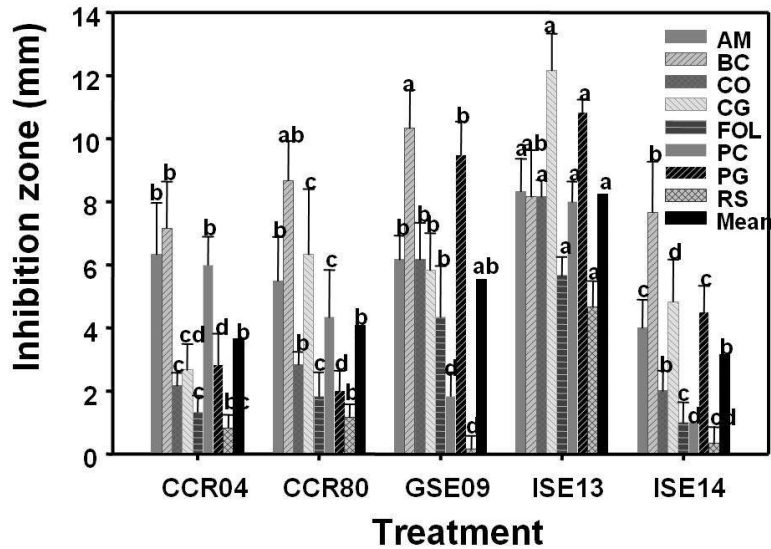


Figure 27. Inhibition of mycelial growth of various pathogen on V8 by seven potential antagonistic bacteria. Inhibition of mycelial growth was determined when mycelia in sterile water controls reached the centers of the V8 juice agar plates. Bacterial strains or water (control) were streaked in a line down the centers of the V8 juice agar plates before inoculation of the plant pathogenic fungi. *Phytophthora capsici*(PC), *Collectotrichum gloeosporioides*(GC), *Rhizoctonia solani*(RS), *Botrytis cinerea*(BC), *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*(FOL), *Pyricularia grisea*(PG), *Alternaria mali*(AM). Values are means of six replications from two experiments. Bar=STD.

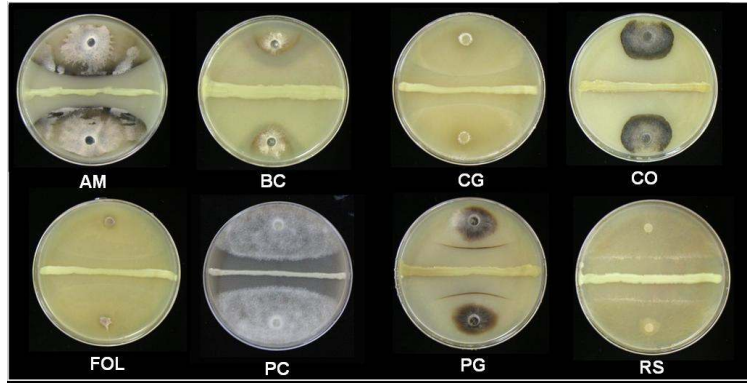


Figure 28. Inhibition of mycelial growth of plant pathogenic fungi, *Alternaria mali*, *Botrytis cinerea*, *Collectotrichum gloeosporioides*, *C. orbiculare*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, *Phytophthora capsici*, *Pyricularia grisea*, *Rhizoctonia solani* by ISE13. Pictures were taken when fungal mycelia in water controls reached the centers of the V8 juice agar plates. Bacterial strains or water (control) were streaked in a line down the centers of the V8 juice agar plates before inoculation of the plant pathogenic fungi.

V8-juice 배지에서 대치배양의 결과 가장 효과적으로 병원균 성장을 억제하는 ISE13균주가 배지의 양분 조성에 따라 식물 병원균의 성장 억제에 영향을 받는지를 평가하기 위하여, 양분 조성이 다른 glucose peptone agar, glycerol peptone agar, starch yeast extract agar, tryptic soy agar와 V8-juice agar를 사용하여 8개의 식물병원균과 대치배양하여 균사 성장 억제를 평가하였다. 그 결과 *Botrytis cinerea*와 *Collectotrichum orbiculare*의 경우에 모든 배지에서 효과적으로 균사 생장이 억제되었으며, glycerol peptone agar에서 실험된 식물 병원균이 가장 효과적으로 균사 생장이 억제되었다(Table 14). 이것으로 보아 ISE13균주는 양분에 따라 식물 병원균의 균사 성장 억제 효과가 달라 질 수 있으며, 특히 glycerol이 첨가된 배지에서 효과적으로 균사 성장을 억제함을 알 수 있었다.

Table 14. Antifungal activity of ISE13 of antagonistic bacteria to eight plant pathogenic fungi on various media

pathogen	Inhibition of mycelial growth (mm) ^a											
	glucose peptone agar		glycerol peptone agar		strach yeast extract agar		Tryptic soy agar		V8–juice agar		Mean	
AM ^b	9.3 ^c	dB ^d	15.2	dA	15.1	bA	15.3	cA	7.8	cdB	12.5	CD
BC	18.8	aB	23.3	aA	19.6	aB	20.8	aAB	11.0	aC	18.7	A
CG	10.1	dC	15.1	dA	12.1	cB	11.8	deB	8.3	bdD	11.5	D
CO	16.5	bB	18.5	bcAB	20.7	aA	19.3	abA	11.9	aC	17.4	A
FOL	6.6	eB	8.9	eA	8.4	dA	9.7	eA	5.3	eB	7.8	E
PC	13.2	cC	20.6	abA	11.7	cCD	16.2	bcB	9.8	acD	14.3	BC
PG	13.4	cC	19.7	bcA	17.2	bB	14.6	bdC	10.3	abD	15.0	B
RS	3.7	fC	17.3	cdA	9.8	cdBC	15.0	cdAB	6.8	deC	11.5	D
Mean	12.0	c	17.3	a	14.5	b	15.3	b	8.9	d		

^aInhibition of mycelial growth was determined when mycelia in sterile water controls reached the centers of the various media plates. Bacterial strains or water (control) were streaked in a line down the centers of the various media plates before inoculation of the plant pathogenic fungi.

^bAM=*Alternaria mali*, BC=*Botrytis cinerea*, CG=*Collectotrichum gloeosporioides*, CO=*Collectotrichum orbiculare*, FOL=*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, PC=*Phytophthora capsici*, PG=*Pyricularia grisea*, RS=*Rhizoctonia solani*.

^cValues are means six replications from two experiments.

^dMeans followed by same big and small letters indicate are not significantly differences as horizontal and vertical according to least significant difference (LSD) test at $P=0.05$ respectively.

선발된 내생·근권 세균 중 가장 효과적으로 식물 병원균의 성장을 억제하는 ISE13균주가 형성하는 항생물질이 고추 역병균의 발달에 미치는 영향을 알아보기 위하여, ISE13균주의 배양액을 ethyl acetate로 추출한 것과 water-soluble, Freeze dried culture로 나누어 고추 역병균의 유주자 발아율과 lysis에 주는 영

향을 알아보았다. 이 때 역병균 방제 농약으로 사용되는 metalaxyl(95%, a.i.)를 positive control로 사용하여, 비교하였다. 그 결과 ISE13 균주의 배양액을 ethyl acetate로 추출한 부분에서 metalaxyl과 유사하게 발아율을 억제하였으며, lysis를 일으키는 것이 관찰되었다(Table 15). 즉, ISE13균주가 분비하는 항생물질은 ethyl acetate로 추출이 가능하며, 약 1,000 μ g/ml의 농도에서는 metalaxyl과 유사하게 유주자의 발달을 억제시켰다.

Table 15. Effect of extracts of ISE13 culture and metalaxyl on inhibition of zoospore germination and lysis of *Phytophthora capsici*

Treatment	Dose (μ g/ml)	Activity (%)	
		Germination	Lysis
Freeze-dried culture	1,000	82 \pm 4	4 \pm 0
	100	88 \pm 3	3 \pm 0
	10	85 \pm 2	3 \pm 0
	1	85 \pm 3	2 \pm 0
EtOAc-soluble fraction	1,000	1 \pm 0	81 \pm 4
	100	44 \pm 1	23 \pm 3
	10	71 \pm 1	5 \pm 1
	1	82 \pm 3	2 \pm 0
Water-soluble fraction	1,000	31 \pm 1	29 \pm 2
	100	42 \pm 4	23 \pm 4
	10	51 \pm 2	4 \pm 0
	1	80 \pm 1	3 \pm 0
Metalaxyl	1,000	1 \pm 0	92 \pm 2
	100	15 \pm 1	47 \pm 4
	10	41 \pm 1	23 \pm 2
	1	81 \pm 3	3 \pm 0
Methanol control	1,000	83 \pm 1	2 \pm 0
	100	87 \pm 1	2 \pm 0
	10	85 \pm 2	3 \pm 0
	1	89 \pm 3	2 \pm 0
Water control	1,000	81 \pm 3	4 \pm 0
	100	83 \pm 1	3 \pm 0
	10	85 \pm 5	4 \pm 1
	1	85 \pm 3	2 \pm 0

나. 세포외 효소 분비

선발된 내생·근권세균이 세포외 효소를 분비하여 고추 역병균의 발달을 억제하는지를 알아보기 위하여 세균 현탁액을 filtering하여, 역병균의 균사 발달에 주는 영향을 현미경을 통해 관찰하였다. 그 결과 대조구에 비하여 세균 현탁액을 처리한 역병균의 균사는 중간 부분이 부풀고, 비정상적으로 균사가 가지를 치고, 균사가 얇아지는 것이 관찰되었다(Figure 29).

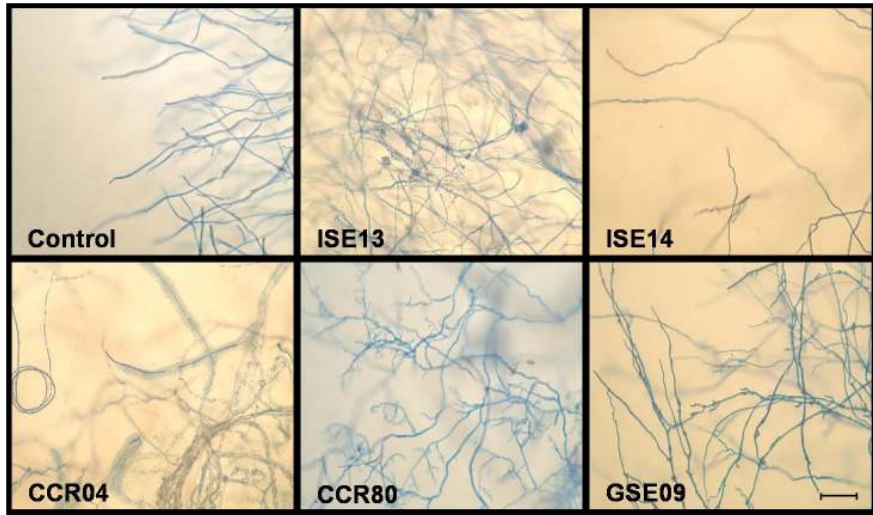


Figure 29. Deformations of hyphae of *Phytophthora capsici* such as thin, abnormal branching and swelling on middle of hyphae. It is observed three hours after treatment with filtered bacterial suspension, CCR04, CCR80, GSE09, ISE13 and ISE14 and control. Control was 10mM MgSO₄ buffer. The staining dye was cotton blue suspended with lactic acid. A bar indicated 50μm.

선발된 내생·근권 길항 세균이 세포외 효소를 분비하여 역병균의 균사 발달에 영향을 주는 지를 평가하기 위하여, 식물병원균의 세포벽 구성성분 중 단백질과 키틴을 분해되는지를 평가하였다. 내생·근권 길항 세균인 CCR04, CCR80, GSE09, ISE13과 ISE14는 모두 단백질 분해를 할 수 있었으며, 그 중에서 ISE14

균주에 의한 단백질 분해 활성이 가장 컸다(Figure 30). 반면, 키틴을 분해하는 능력은 ISE13균주와 GSE09균주만 가지고 있었으며, ISE13균주의 경우 가장 활성이 높았다(Table 16).

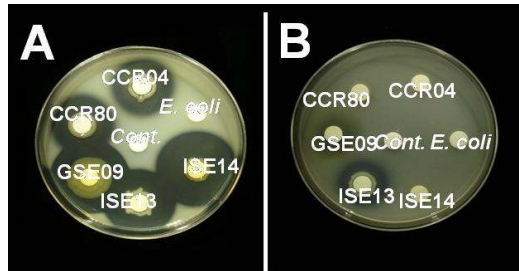


Figure 30. (A) Proteinase and (B) chitinase activities (mm) by antagonistic bacterial strains, CCR04, CCR80, GSE09, ISE13, and ISE14, respectively. Proteinase and chitinase activities of the bacteria were detected clear zone (mm) using media containing casein and chitin, respectively.

Table 16. Proteinase and chitinase activities (mm) by the antagonistic bacterial strains, CCR04, CCR80, ISE13, ISE14, and GSE09 on media containing casein and chitin respectively

Bacteria ^a	Proteinase activity	Chitinase activity
CCR04	6.5 ^b bc ^c	0 b
CCR80	5.8 c	0 b
ISE13	7.5 b	7.3 a
ISE14	11.5 a	0 b
GSE09	3.0 d	0.3 b
<i>Escherichia coli</i>	0.0 d	0.0 b

^aSteriled paper disks (0mm in diameter) dipped in bacterial suspensions harvested with MgSO₄ buffer for 1 hr were placed in the media. Proteinase and chitinase activities of the bacteria were detected clear zone (mm) using media containing casein and chitin, respectively.

^bValues are means of three replications.

^cMeans followed by same letters are not significantly different according to least significant difference (LSD) test at $P = 0.05$.

이렇게 세포 외로 분비된 세포벽 분해 효소가 고추 역병균의 발달에 주는 영향을 알아보기 위하여 세균 배양액을 filtering과 열처리하여 역병균의 유주자 발아율과 lysis율에 미치는 영향을 평가하였다. 그 결과 실험된 내생·근권 길항 세균 배양액을 열처리하면 filtering한 것에 비하여 역병균의 유주자 발아율이 증가하였으며, lysis율은 감소하였다(Figure 31). 이러한 현상은 세균 배양액을 열처리함으로써 세균 배양액 내에 존재하고 있던 효소가 열에 의해 불활성화 되어 효소에 의한 영향이 제거되기 때문에, 역병균의 발아율이 증가한 것으로 예상된다. 즉, 선발된 내생·근권 세균은 세포 외부로 식물 병원균의 세포벽을 분해시킬 수 있는 효소를 분비함으로써 역병균의 발달을 저해할 수 있으며, 특히 ISE13균주 경우는 다른 실험된 세균에 비하여 단백질과 키틴 분해 효소를 분비하여 역병균의 발달을 더 효과적으로 저해하는 것을 알 수 있다.

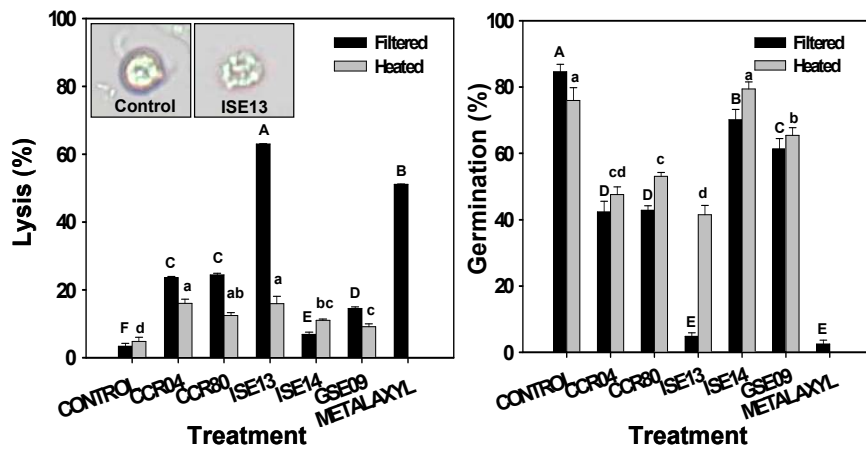


Figure 31. Lysis (%) and germination (%) of encysted zoospores of *Phythophthora capsici* after amendment with culture filtrates and heat treatment of the bacterial strains. Control was 10mM MgSO₄ buffer and metalaxyl was positive control. Means followed by same letters on each bar are not significantly different according to least significant (LSD) test at $P=0.05$. Bars=Standard errors of three replications.

다. Biofilm 형성

길항 세균이 생물적 방제 효과를 가지기 위해서 세균 세포막에 점액질의 막을 형성하여 서로 응집하여 개체군을 유지시키고, 식물 뿌리에 정착하기도 하므로, 선발된 길항 세균이 이러한 역할을 하는 것 중에서 biofilm을 형성하는지를 알아보았다. biofilm media에 배양한 세균을 PVC-96well microtiter plate에 접종하여 24시간 동안 배양 한 후 crystal violet stain을 하여 관찰하여 평가하였으며, 그 결과 CCR04와 CCR80은 biofilm을 형성하는 것이 관찰되었다(Figure 32). CCR04와 CCR80은 가장 효과적으로 고추역병을 억제하였는데, 길항효과 및 siderophore, HCN형성 외에 biofilm도 형성하였으며, 이러한 특징이 이들 세균의 응집이나 개체군 유지에 중요한 역할을 하여 고추 역병균 억제에 기여할 것으로 예상된다.

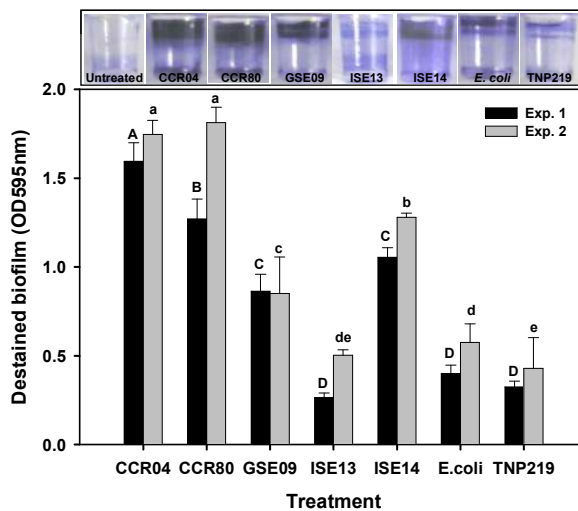


Figure 32. Biofilm formation by antagonistic bacteria, CCR04, CCR80, GSE09, ISE13, and ISE14, and negative control, *E. coli*, and TNP219. The bacterial strains ($OD_{600}=0.1$) were inoculated on PVC 96-well plates with biofilm media for 24 hours. The biofilm was evaluated using crystal violet stain. Destained biofilm were measured at OD_{595} . The data shown are the means of six replications.

라. HCN 형성

또다른 병억제 기작중에 하나인 HCN 생성은 길항 세균에 의해 형성된 기체 상태의 HCN가 식물 병원균의 성장 및 발달을 저해하기 때문에 병억제 기작으로써 중요하게 연구되어 왔다. 선발된 길항 세균이 HCN을 생성하는지 평가하기 위하여 1%의 picric acid와 2%의 sodium carbonate 용액에 전처리한 paper disc를 사용하여, paper disc가 노란색에서 붉은색으로 변하는 것을 관찰하여 평가하였다. 그 결과 CCR04와 CCR80이 HCN을 형성하였으며, 특히 CCR80의 경우 실험된 길항 세균 중에서 가장 많은 HCN을 형성하였다(Figure 33). 이것으로 보아서 CCR04와 CCR80은 siderophore와 HCN을 모두 효과적으로 생성하여, Fe이 결핍된 토양이나, 유해한 미생물이 존재하는 조건에서도 모두 효과적으로 경쟁하여 길항 효과를 나타낼 것으로 생각된다.

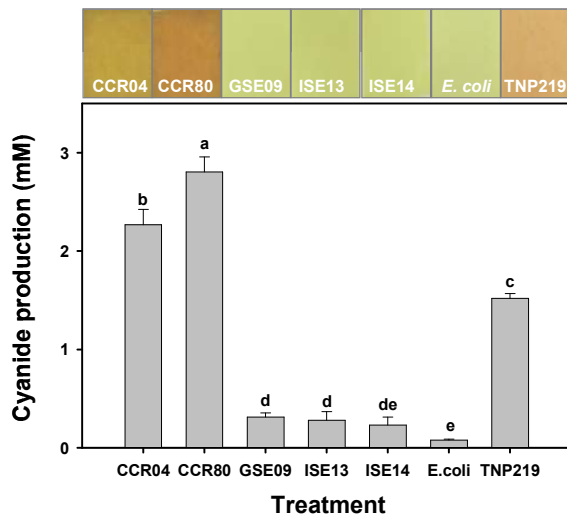


Figure 33. Cyanide production by antagonistic bacteria, CCR04, CCR80, GSE09, ISE13, and ISE14, and negative control, *E. coli*, and TNP219. Water extracts of picrate papers were assayed for cyanide by spectrophotometer at 510nm. A standard curve of absorbance of picrate paper were evaluated as potassium cyanide.

마. Siderophore 형성

Siderophore는 Fe-chelator으로써 Fe이 결핍된 토양에서 길항 세균에 의해 분비됨으로써 siderophore를 형성하지 못하는 병원균이나 다른 유해 미생물과의 Fe 경쟁에서 우위를 가질 수 있기 때문에 식물병억제 기작으로써 중요하다. 또한 siderophore는 길항 세균의 근권 정착과 지속, 항생물질 분비 등과도 밀접한 관련이 있다고 알려져 있다. 선발된 내생·근권 길항 세균 (CCR04, CCR80, GSE09, ISE13, ISE14)가 Fe-chelator인 siderophore를 생성하는지를 알아보기 위하여 siderophore detection media인 modified CAS media를 사용하여 siderophore 생성을 평가하였다. 그 결과 선발된 내생·근권 길항 세균은 모두 siderophore를 분비하였으며, 그 중에서 CCR04와 CCR80이 가장 많은 siderophore를 형성하였다 (Figure 34). CCR04와 CCR80이 속하는 *Pseudomonas*는 일반적으로 pseudobactin이라고 하는 siderophore를 형성한다고 알려져 있으며 이외에도 다양한 종류의 siderophore를 형성하여 식물병 억제에 기여하는 것으로 알려져 있다. 이러한 *Pseudomonas* 속에 속하는 CCR04와 CCR80도 이와 유사한 siderophore를 형성하여 식물병 억제에 관여할 것으로 예상된다.



Figure 34. Production of siderophore by antagonistic bacteria, CCR04, CCR80, GSE09, ISE13 and ISE14 in modified CAS media as detection media of siderophore. The picture was taken on two weeks after bacterial incubation.

바. Swarming ability

근권길항세균이 고추 뿌리에 효과적으로 정착함으로 인해 고추 역병균의 감염으로부터 보호되는지 알아보기 위하여 근권세균이 뿌리에 효과적으로 정착하기 위한 요인 중 하나인 세균의 swarming 능력을 평가하였다. 고추의 뿌리 환경과 유사하게 조성하기 위하여, 고추 뿌리의 삼출물 중 대표적인 aspartic acid, glycine, glutamic acid, oligosaccharide, fructose, arabinose, oxalic acid, citric acid와 succinic acid가 각각 혼합된 swarm agar에서 길항 세균의 swarming 능력을 평가하였다. 그 결과 CCR04가 매우 현저하게 swarming하는 능력이 다른 세균에 비하여 뛰어났으며, CCR80과 ISE13균주도 swarming 능력이 있었다 (Table 17). 반면, GSE09의 경우에는 swarming 능력이 관찰되지 않았는데, 이는 GSE09의 경우에 swarming과 직접적으로 관련이 있는 편모와 pili가 발달하지 않았기 때문인 것으로 생각된다. 실험된 길항 세균의 swarming 능력은 각각의 아미노산과 당이 혼합된 배지에서 모두 생장을 하기 때문에, 생장에 의한 차이는 아니라고 생각된다(Table 18).

Table 17. Swarming as a function of the amino acid provided as the sole nitrogen source, organic acid, and carbohydrate

Treatment	Swarming								
	aspartic acid ^a	glycine	glutamic acid	oligosaccharide	fructose	arabinose	oxalic acid	citric acid	succinic acid
CCR04	++ ^b	+	++	++	++	+	++	++	++
CCR80	±	-	+	+	±	±	±	±	±
GSE09	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ISE13	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ISE14	-	-	-	±	-	-	±	±	±
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TNP219	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^a Swarming were determined on minimal medium plates with glucose as the carbon source and supplemented with the indicated amino acid, organic acid, and carbohydrate at a final concentration of 1,000 µg/ml. Swarm plates were incubated and scored after incubation for 48 h at 28°C.

^b -, not detected; ±, weak; +, intermediate; ++, strong.

Table 18. Bacterial growth in minimal media amended with the amino acid provided as the sole nitrogen source, organic acid, and carbohydrate

Treatment	Bacterial growth								
	aspartic acid ^a	glycine	glutamic acid	oligosaccharide	fructose	arabinose	oxalic acid	citric acid	succinic acid
CCR04	+ ^b	++	+	++	++	++	±	++	+
CCR80	+	±	++	+	++	±	±	+	++
GSE09	+	±	±	+	+	++	±	+	+
ISE13	+	±	+	+	+	+	±	+	++
ISE14	+	++	±	++	+	±	±	±	±
<i>E. coli</i>	++	±	±	+	++	±	±	±	±
TNP219	±	±	±	±	±	±	±	±	±

^a Bacterial strains were incubated in minimal medium broth with glucose as the carbon source and supplemented with the indicated amino acid, organic acid, and carbohydrate at a final concentration of 1,000 µg/ml. Bacterial growth were determined by spectrophotometer after shaking incubation for 48 h at 28°C.

^b -, not grow ±, weak; +, intermediate; ++, strong.

사. 근권 세균에 의한 식물호르몬 IAA의 생성

근권 세균이 식물 호르몬인 IAA를 형성함으로써 근권내 정착과 식물 생육에 영향을 준다고 알려져 있는데, 일반적으로 IAA를 형성하는 세균이 근권내 식물 뿌리에 비교적 효과적으로 정착하는 반면, 식물의 지하부 성장에는 negative effect를 준다고 알려져 있다. 그러나 세균이 형성하는 IAA의 영향은 식물의 종류나 세균에 따라 차이가 있는 것으로 알려져 있다. 선발된 내생·근권 길항 세균이 IAA를 형성하는지를 알아보기 위해 IAA 형성 전구체로 작용하는 tryptophan이 함유된 배지에서 세균을 배양 한 후 Salkowski's reagent를 사용하여 IAA 형성을 측정하였다. 그 결과 배양 5일 째에 CCR80이 가장 많은 IAA를 형성하였다 (Figure 35). 포장실험에서 관찰하였을 때 IAA를 형성하는 CCR04나 CCR80이 식물의 생육을 저해하기 보다는 오히려 고추 수량을 증가시켰기 때문에 이들 세균이 형성하는 IAA가 식물의 생육을 저해하지는 않는 것으로 생각되며, 이들 세균이 식물 뿌리에 정착하는데 positive effect를 줄 것으로 예상된다.

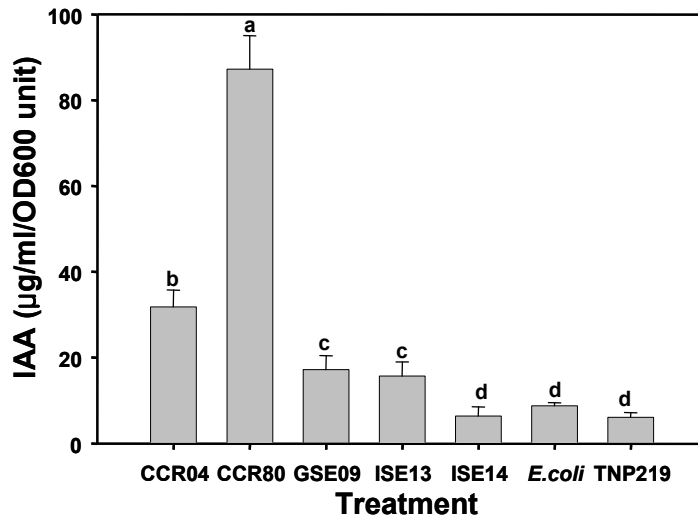


Figure 35. Production of indole-3-acetic acid (IAA) by antagonistic bacterial strains, CCR04, CCR80, GSE09, ISE13, and ISE14 and negative control, *Escherichiacoli*, and TNP219. The amount of IAA produced was plotted as a function of time. Culture filtrates from cells grown in nutrient broth amended with tryptophan (500µl/ml) were assayed for IAA by chromogen formation at 530nm with Salkowski's reagent. Purified IAA (sigma-aldrich) was used as the standard.

4. 내생·근권 세균을 처리한 고추에서 길항세균의 식물근권 정착 능력 연구

내생·근권 세균이 효과적으로 식물병원균을 억제하기 위해서는 우선적으로 식물에 처리된 이후에 식물 근권에서 효과적으로 정착하여 지속하는 것이 중요하다. 내생·근권 세균이 식물 근권에서 정착하는 능력을 평가하기 위하여 조직배양 원리를 이용한 무균환경 시스템을 도입하여, mutant를 만들지 않고 정착 능력을 평가하였다. 살균된 종자에 세균현탁액을 침지시킨 후 살균된 규사토가 담긴 배양병에 파종하여, 파종 후 14일, 28일 후에 각각 고추 뿌리를 3부분(root tip, elongation, top)으로 나누어 배지에 도말하여 양적 평가하였다. 그 결과 대조구의

고추 뿌리는 멸균상태를 유지하였고, CCR04와 CCR80은 식물 뿌리 cm당 약 10^6 cfu로 정착하였으며, 뿌리가 신장됨에 따라 뿌리 끝을 따라 정착하였다(Figure 36). 이외에 GSE09, ISE13, ISE14균주는 약 10^4 – 10^6 cfu/cm로 정착하였으며, 뿌리 끝을 따라 정착이 감소하였다. 이에 반하여 negative control로 사용한 *E. coli*와 TNP219균주는 10^2 – 10^3 cfu/cm로 고추 근권에서 효과적으로 정착하지 못하였다. 처리된 세균은 모두 식물을 배양하는 시간이 길어질수록 정착하는 능력이 감소하였으나, 선발된 내생·근권 세균은 10^4 – 10^6 로 비교적 높게 개체군을 유지하였다. 특히 CCR04와 CCR80은 매우 효과적으로 고추 뿌리에 정착을 하며, 이러한 정착 능력은 siderophore, biofilm 형성과도 관련이 있을 것으로 예상되며 이외에 세균의 LPS의 O-antigen 부분과 식물 뿌리에서 분비되는 exudate도 중요하게 영향을 주었으리라 예상된다. 식물체 실험과 포장실험을 거쳐 고추 역병을 가장 효과적으로 억제한 CCR04와 CCR80은 다양한 병억제 기작을 다양하게 가지고 있었으며, 특히 매우 뛰어난 정착 능력을 가지고 있어 근권에서 장시간동안 정착하여 생존하기 때문인 것으로 생각된다.

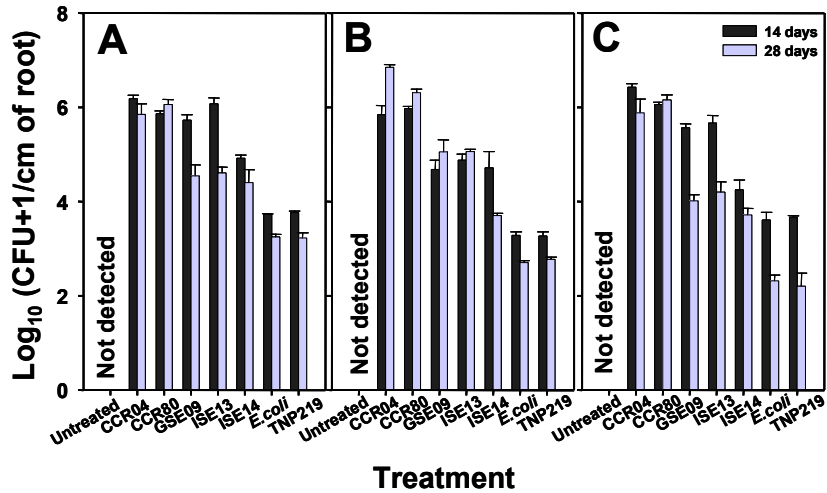


Figure 36. Temporal changes in root colonization by antagonistic bacteria, CCR04, CCR80, GSE09, ISE13, ISE14, and negative controls, *E. coli* and TNP219 14, and 28 days after bacterial inoculation in the germinated pepper roots. Root colonizations by antagonistic bacteria were assessed by serial dilution plating on NA. A, root bases; B, root elongations; C, root tips.

또한 전자현미경을 통하여 고추 뿌리 표면에 처리한 근권 세균이 정착하였는지를 관찰하였더니, 대조군주인 *E. coli*와 비교하였을 때 뿌리 표면에 효과적으로 정착하고 있으며, 정착시 서로 군락을 형성하는 것이 관찰되었다(Figure 37).

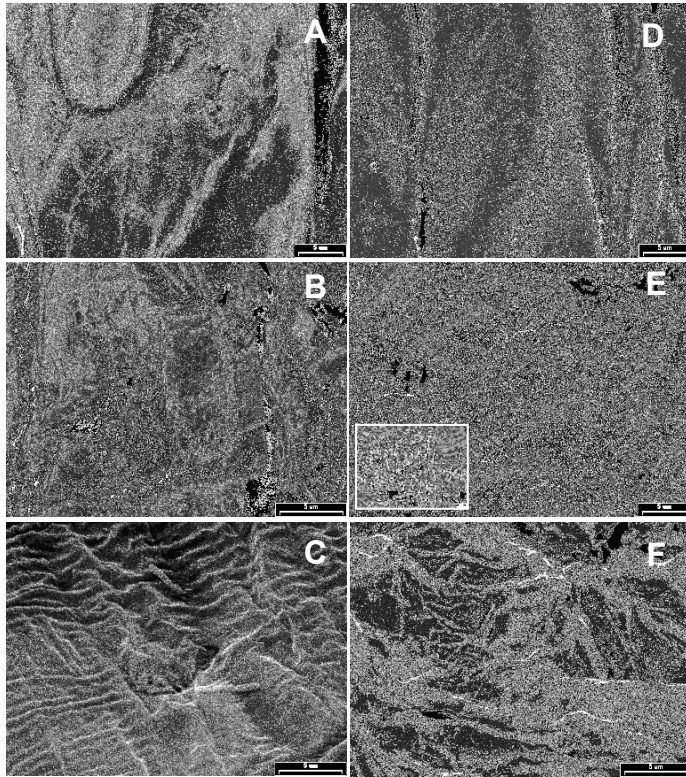


Figure 37. The pictures of pepper roots treated with 10mM MgSO₄ buffer (untreated control), CCR04 (antagonistic bacteria), *E. coli* (negative control strain) by scanning electron microscopy (SEM). A, untreated control; B, CCR04; C, *E. coli* 0 hr after inoculation and D, untreated control; E, CCR04; F, *E. coli* 72 hr after inoculation.

5. 내생·근권세균의 고추역병균과의 경쟁에 대한 연구

처리된 내생·근권세균이 근권에서 고추 역병균과 경쟁하는지를 평가하기 위하

여 길항세균의 rifampicin mutant를 사용하였으며, 근권토양에서 고추 역병균과의 개체군 밀도를 평가하였다. 지속적으로 포장에서 효과가 있었던 CCR04, CCR80과 ISE14 균주의 rifampicin mutant로 실험한 결과 이들 길항 세균이 처리된 근권에서는 고추 역병균의 개체군이 시간이 지남에 따라 감소하였고, 반면 처리된 길항 세균은 감소한 후 일정 수준의 개체군을 유지하였다(Figure 38).

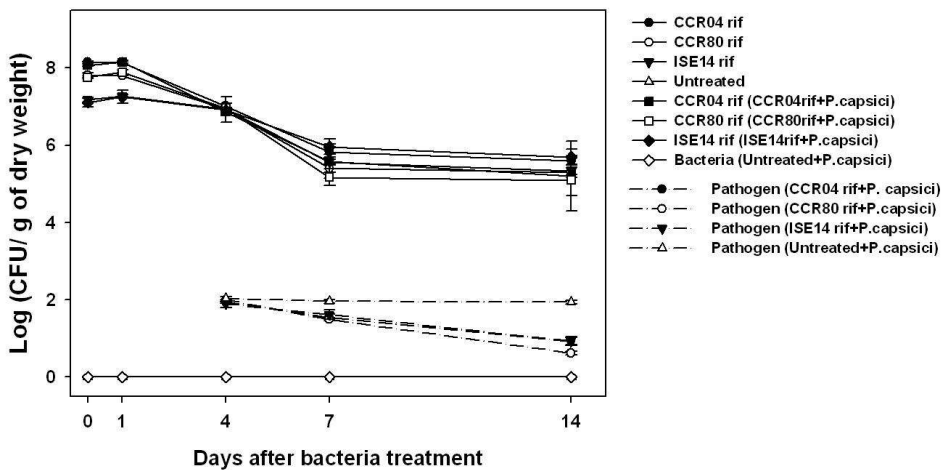


Figure 38. Population of spontaneous rifampicin-resistant mutants of antagonistic bacteria, CCR04, CCR80, and ISE14. 10 g of rhizosphere soil were put into 250 ml Erlenmeyer flask containing 100 ml of 10 mM MgSO₄ buffer, and then shaken at 160 rpm at 28°C for 30 min. The suspension was cultured on TSA amended with 100 µl of rifampicin/ml (TSArif).

6. 탄소원 첨가에 의한 생물학적 방제 효과의 증진 연구

가. ISE14의 탄소원 이용도 조사

배양 5일 후 O.D 측정결과 토양세균 ISE14는 D-(+)-glucose (O.D 0.427), D-(+)-maltose(O.D 0.342), glycerol(O.D 0.363), L-arabinose(0.365),

D-mannitol(O.D 0.387), β -lactose(O.D 0.393)등은 흡광도가 0.3 이상으로 잘 이용하였으며, D-(+)-galactose(O.D 0.194), D-(+)-melezitose(0.201), D-(+)-cellobiose(0.231), D-sorbitol(0.275) 등은 흡광도가 0.3 이하로 잘 이용하지 못하는 것으로 나타났다 (Figure 39).

토양세균 ISE14를 32°C에서 5일간 배양할 때 maltose, sorbitol, lactose 등 일부탄소원에서 더 이상 세균이 증식하지 않는 것으로 조사되었으며 cellobiose, arabinose등의 탄소원은 5일 배양시 부터는 침전물이 생기기 시작하여 5일 배양을 기준으로 탄소원 이용도를 조사하였다.

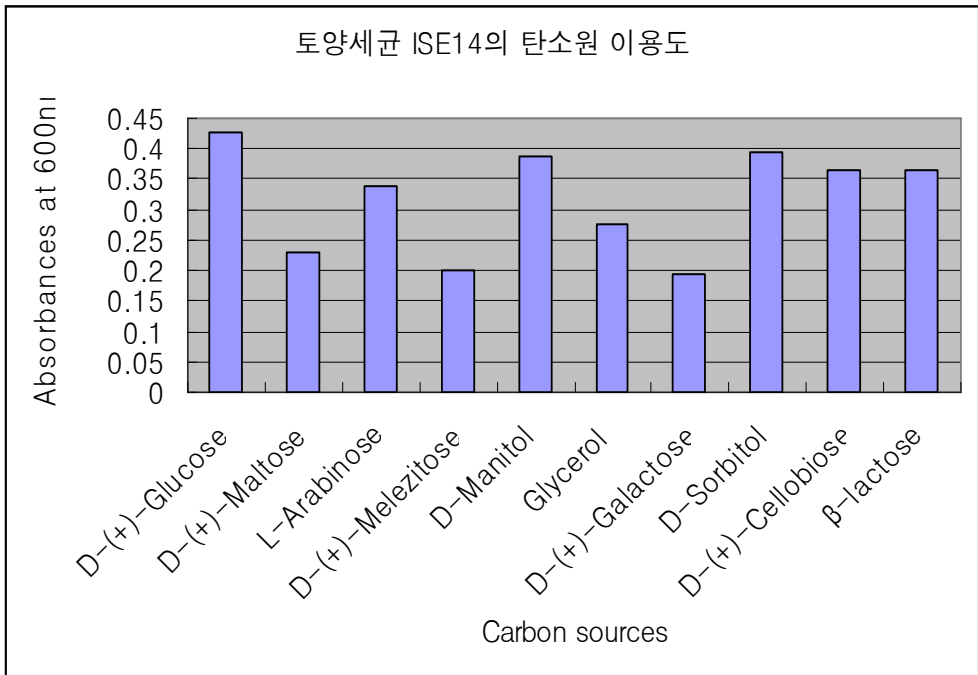


Figure 39. Utilization of different carbon sources by *Chryseobacterium* sp. ISE14. Absorbances of ISE14 were measure at 5 days inoculation at 600nm

균주 KJ1R5는 흡광도가 0.570(at 600nm)이상으로 L-arabinose, D-cellobiose, β -lactose and D-galactose 등을 잘 이용하였으나 *P. capsici*는 흡광도가 600nm에서 0.100 정도로서 L-arabinose, D-cellobiose, β -lactose, D-galactose 등을 잘 이용하지 못하였다 (Figure 40). 10개의 탄소원 중에서 KJ1R5는

L-arabinose를 가장 잘 이용하였으며, *P. capsici*는 L-arabinose를 잘 이용하지 못하였다 (Figure 40).

균주 ISE 14는 흡광도가 600nm에서 0.380로 D-(+)-glucose, D-mannitol, β -lactose와 같은 탄소를 적절히 이용할 수 있었고, *P. capsici*는 흡광도가 600nm에서 0.427로 D-(+)-glucose를 잘 이용하였다. 그러나, *P. capsici*는 D-mannitol, β -lactose 등을 잘 이용하지 못하여 흡광도가 600nm에서 0.049이었다 (Figure 41).

균주 ISE 13는 흡광도가 600nm에서 0.695로 D-(+)-maltose를 잘 이용하였지만, *P. capsici*는 흡광도가 0.228로 ISE13에 비하여는 잘 이용하지 못하였다 (Figure 42).

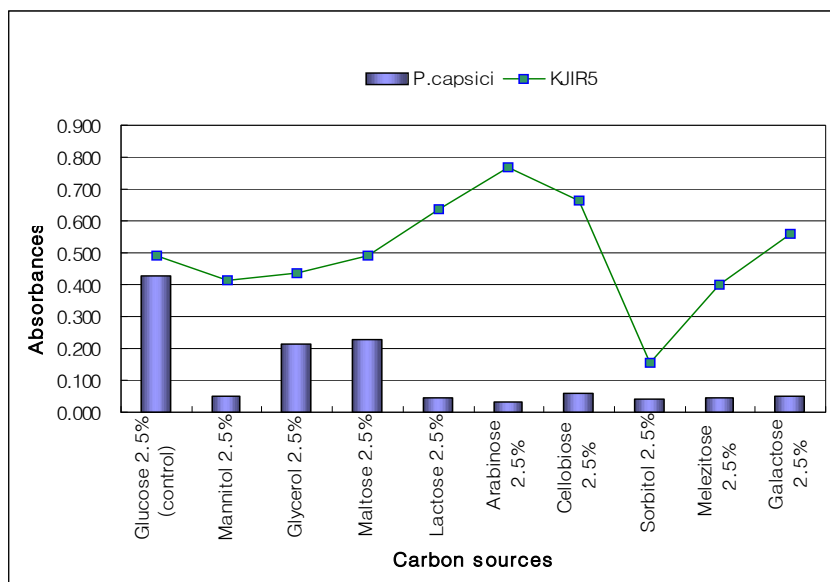


Figure 40. Utilization of different carbon sources by *Phytophthora capsici* and endophytic *Chryseobacterium* sp. KJ1R5. Absorbances of *P. capsici* were mean for 8 days after inoculation. Absorbances of KJ15R were measure at 5 days inoculation at 600nm

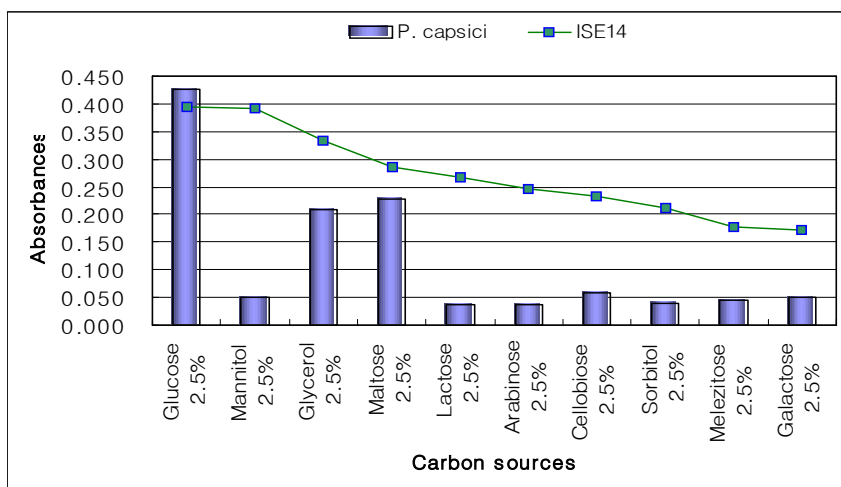


Figure 41. Utilization of different carbon sources by *Phytophthora capsici* and endophytic *Chryseobacterium* sp. ISE14. Absorbances of *P. capsici* and ISE14 were determined at 8 and 5 days, respectively, after inoculation. Absorbances were determined at 600nm.

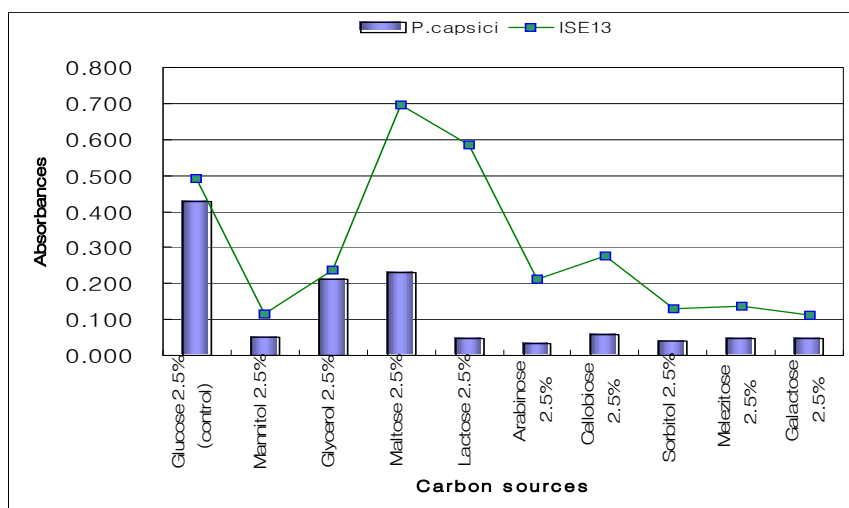
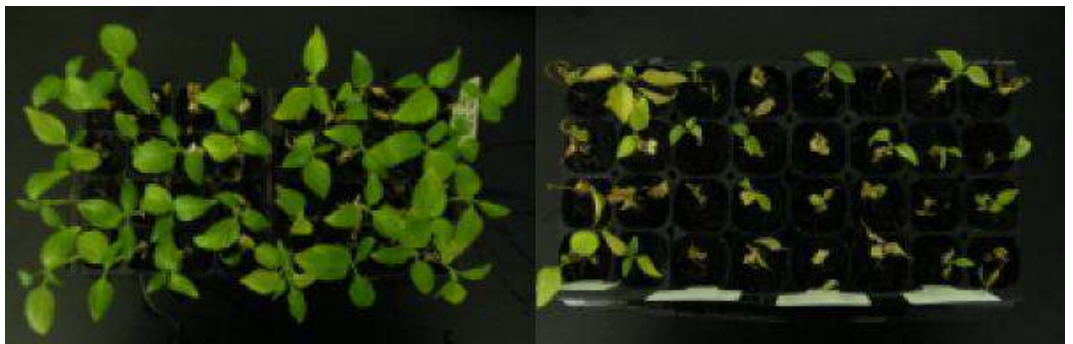


Figure 42. Utilization of different carbon sources by *Phytophthora capsici* and unidentified gram negative bacteria ISE13.

나. 탄소원을 첨가에 의한 생물적 방제균 KJ1R5의 고추 역병 방제 효과 증진

병원균 무접종구에서는 병이 전혀 발생하지 않았다. 그러나 병원균 접종구에서는 발병율이 68.8%로 매우 높았다. KJ1R5 처리구에서는 이병율이 25.0%로 병원균 처리구에 비하여 방제 효과가 뚜렷하였다 (Figure 43, Table 19). 2% arabinose의 세균현탁액으로 근권부를 처리한 것은 발병율이 10.9%로 탄소원을 첨가하지 않은 처리구의 25.%보다도 방제 효과가 더 높게 나타나서 2% arabinose가 생물적 방제 효과를 증진할 수 있음을 제시하여 주었다(Figure 44, Table 19). 그러나 1%, 4%와 8%에서는 방제 효과가 증진이 되지 않았는데, 이것은 아마도 농도가 너무 낮았거나 또는 높았기 때문이 아닌가 하고 생각되지만 기타 알지 못하는 다른 원인에 기인할 수도 있을 것이다 (Table 19).



(A)

(B)

Figure 43. Effect of biological control of KJ1R5 against *P. capsici*

A : untreated control, B : only pathogen control

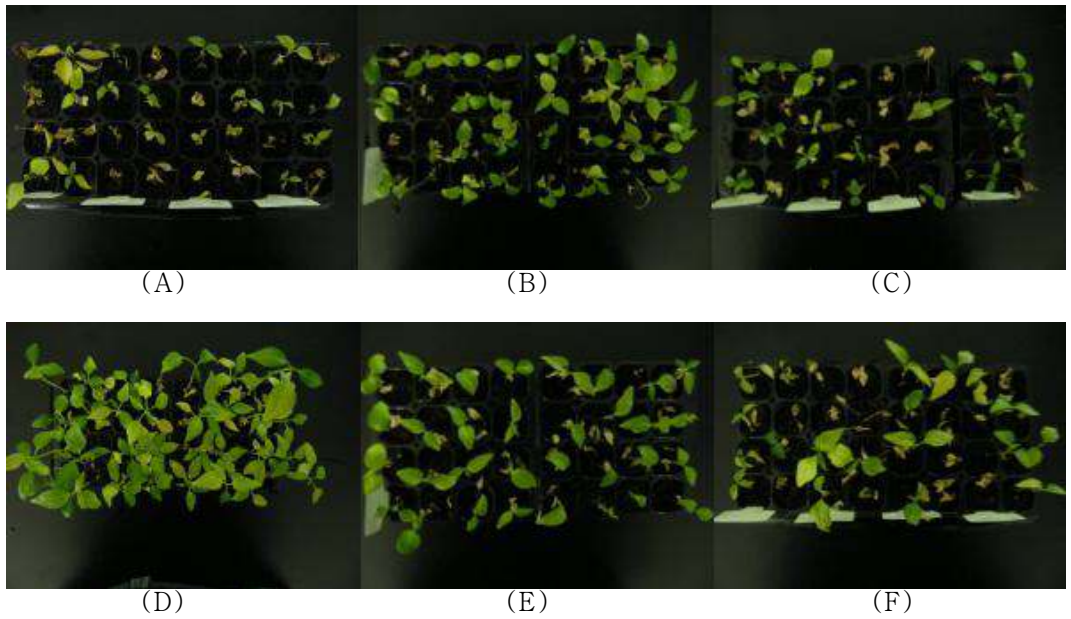


Figure 44. Effect of different concentration of L-arabinose on biological control of KJ1R5 against *P. capsici*,

A : only pathogen control, B : pathogen with KJ1R5, 0% L-arabinose solution, C : pathogen with KJ1R5, 1% L-arabinose solution, D : pathogen with KJ1R5, 2% L-arabinose solution, E : pathogen with KJ1R5, 4% L-arabinose solution, F : pathogen with KJ1R5, 8% L-arabinose solution

Table 19. Effect of various concentrations of L-arabinose on the biocontrol activity of endophytic *Chryseobacterium* strain KJ1R5 against *P. capsici*

Treatment	Disease incidence ^a (%)
Untreated	0.0 ± 0.0 e ^b
<i>P. capsici</i>	68.8 ± 6.8 a
<i>P. capsici</i> + KJ1R5	25.0 ± 3.6 c
<i>P. capsici</i> + KJ1R5+ Arabinose 2%	10.9 ± 1.6 d
<i>P. capsici</i> + KJ1R5+ Arabinose 4%	25.0 ± 2.6 c
<i>P. capsici</i> + KJ1R5+ Arabinose 8%	35.9 ± 2.9 b

^aDisease incidence was determined 14 days after inoculation. There were sixteen plants per replication and the experiment was repeated once. Statistical analysis of disease incidence was conducted with arcsine-transformed data however, untransformed data are presented.

^bMean ± standard error of the means. Means followed by the same letters are not significantly different (LSD, $P=0.05$).

다. 여러 탄소원의 추가에 의한 KJ1R5의 *P. capsici* 에 의한 고추 역병 방제 효과 증진

병원균 무접종구는 병이 발생하지 않았으나, 병원균 처리구는 발병율이 81.3%로 매우 높게 나타났다. KJ1R5 처리구는 발병율이 21.9%로 생물적 방제 효과가 매우 현저하였다. 2% L-arabinose와 D-(+)-glucose의 현탁액으로 고추를 처리한 것은 발병율이 6.3%로 나타나 방제 효과가 매우 증진되었다. 그러나, Glycerol, D-(+)-galactose, β-lactose 등과 같이 세균에 의해서만 잘 이용되는 탄소원에 의하여도 생물적 방제 효과가 탄소원을 처리하지 않은 구에 비하여 크게 증진되지 않은 경우도 있었는데, 이것은 고추 역병의 생물적 방제 효과의 증진은 단순히 세균에게 잘 이용되는 탄소원에 의한 양분 제공에 의해서만 방제 효과가 증진되는 것은 아니고 다른 알지 못하는 어떤 원인에 의하여 일어날 수 있음을 제시하여 준다고 할 수 있다 (Figure 45 and 46, Table 20).

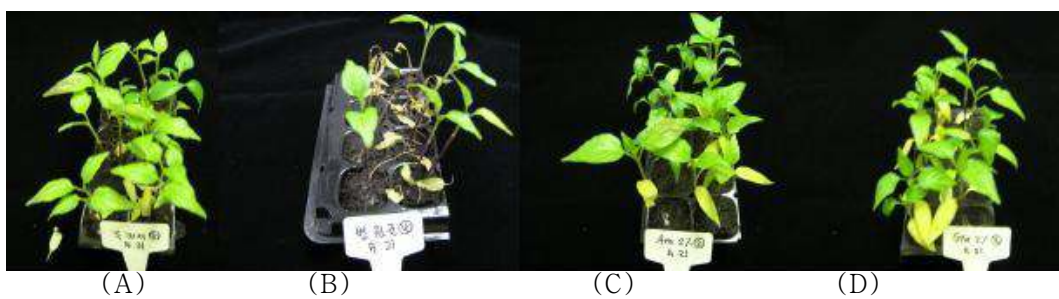


Figure 45. Effect of L-arabinose, D-(+)-glucose on biological control of KJ1R5 against *P. capsici*, A : untreated control, B : only pathogen control, C : pathogen with KJ1R5, 2% L-arabinose solution, D : pathogen with KJ1R5, 2% D-(+)-glucose solution.

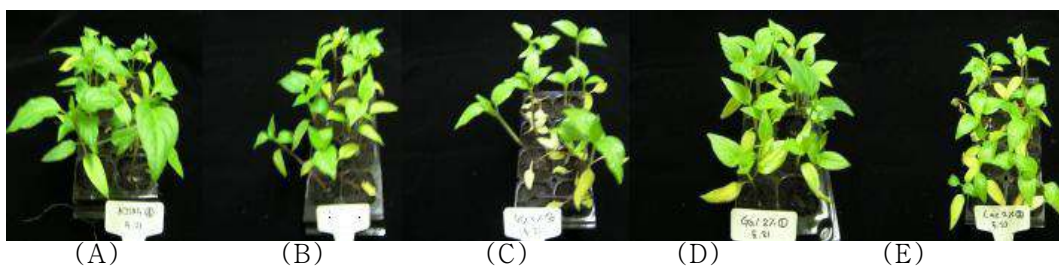


Figure 46. Effect of D-(+)-melezitose, glycerol, D-(+)-galactose and β -lactose on biological control of KJ1R5 against *P. capsici*, A : pathogen with KJ1R5, B : pathogen with KJ1R5, 2% D-(+)-melezitose solution, C : pathogen with KJ1R5, 2% glycerol solution, D : pathogen with KJ1R5, 2% D-(+)-galactose solution, E : pathogen with KJ1R5, 2% β -lactose solution.

Table 20. Effect of various carbon sources on biocontrol activity of endophytic *Chryseobacterium* strain KJ1R5 against *P. capsici*

Treatment ^a	Disease incidence ^b (%)
Untreated	0.0 ± 0.0 d ^c
<i>P. capsici</i>	81.3 ± 3.6 a
<i>P. capsici</i> +KJ1R5	21.9 ± 9.4 b
<i>P. capsici</i> +KJ1R5+Arabinose	6.3 ± 6.3 c
<i>P. capsici</i> +KJ1R5+Glucose	6.3 ± 3.6 c
<i>P. capsici</i> +KJ1R5+Maltose	12.5 ± 5.1 bc
<i>P. capsici</i> +KJ1R5+Mannitol	15.6 ± 6.0 bc
<i>P. capsici</i> +KJ1R5+Melezitose	21.9 ± 6.0 b
<i>P. capsici</i> +KJ1R5+Glycerol	21.9 ± 6.0 b
<i>P. capsici</i> +KJ1R5+Galactose	21.9 ± 12.9 bc
<i>P. capsici</i> +KJ1R5+Lactose	21.9 ± 6.0 b
<i>P. capsici</i> +KJ1R5+Cellobiose	25.0 ± 10.2 b
<i>P. capsici</i> +KJ1R5+Sorbitol	75.0 ± 13.5 a

^aConcentration of amended carbon sources was 2.5%. There were eight plants per replication and the experiment was repeated once. Disease incidence was determined 14 days after inoculation.

^bStatistical analysis of disease incidence was conducted with arcsine-transformed data however, untransformed data are presented. Mean ± standard error of the replications.

^cMeans followed by same letters are not significantly different (LSD, $P=0.05$).

협동과제: 생물적 방제용 미생물제제의 상업화 연구

1. 선발된 균주에 대한 기초배양연구 및 시험용 원제확보

가. 생산균주의 순계 확인 및 안정화

주관기관(고려대학교)에서 분양받은 균주는 Gram negative의 *Chryseobacterium indologenes*로써 code는 ISE14이다. 본 균주는 endospore를 형성하지 않으며 nutrient medium에서 노란색의 colony를 형성하는 특징을 갖고 있다(표-1).

표-1. 고추 역병에 활성을 갖는 ISE14 균주의 특성.

	ISE14
Genus	Chryseobacterium
Gram staining	Negative(-)
Endospore (malachite green staining)	X
Colony color	Yellow

ISE14 균주의 보관은 24시간 배양된 액체배양액(nutrient broth)을 20% glycerol stock으로 만들어 -70°C 에 보관하는 초저온 동결방법 및 액체배양액을 12% skim milk 혼탁액으로 만들어 동결시켜 앰플로 보관하는 동결건조법으로 보관하였다.

ISE14 균주의 계대배양 안정성 확인을 위해 일반적으로 세균 생육이 원활하다고 알려진 nutrient broth를 이용하였다. Seed culture는 500ml baffled flask (working volume 50ml), 30°C , 180rpm 조건하에 18시간 배양을 하였다. Main culture는 500ml baffled flask (working volume 50ml), 30°C , 180rpm 의 조건으로 24시간 배양하였다. 계대별 접종은 연속 10회 실시하였으며, 24시간 배양 후

1%(v/v)의 접종원을 연속적으로 접종하였다. Sample의 생존균수(colony forming unit, cfu/ml)는 접종 24시간 후에 채취하여 조사하였다(그림-1).

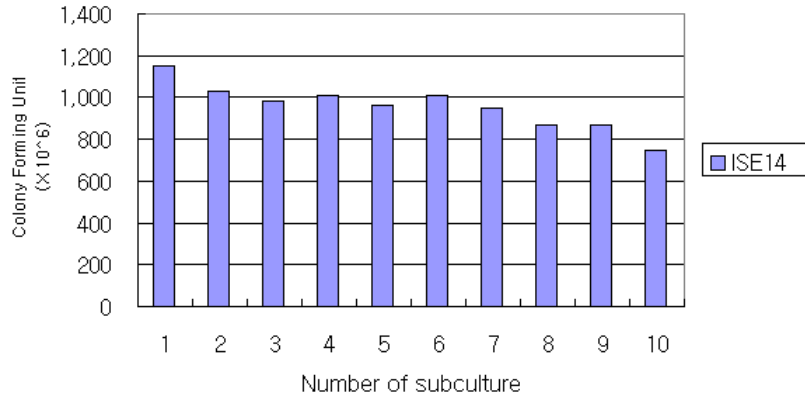


그림-1. ISE14 균주의 연속 계대배양에 따른 생존균수

10회 계대배양 결과 ISE14의 생존균수는 계대횟수가 증가함에 따라 감소하는 경향을 보였으나 10회 계대 후에도 7.5×10^8 cfu/ml 수준의 생존균수가 유지되어 균주의 유전적 안정성이 높은 것으로 파악되었다. 그러나 안정적인 생존균수 확보를 위해서는 계대배양의 횟수를 줄이는 것이 필요하고, 대량배양에서도 transfer를 위한 전배양의 횟수를 줄이는 것이 방법이 검토되어야 할 것이다.

나. 선발 균주의 type culture를 통한 배양 양상 구명

ISE14의 시간에 따른 배양 양상 구명을 위한 기본배지는 nutrient broth를 이용하였다. 전 배양은 500ml baffled flask (working volume 100ml), 30°C, 180rpm의 조건으로 12시간 배양을 하였다. 본 배양은 1L flask (working volume 200 ml), 30°C, 180rpm의 조건으로 48시간 배양을 하였으며 6시간 별로 sample을 회수하여 세포성장, pH 및 생존균수를 측정하였다(그림-2).

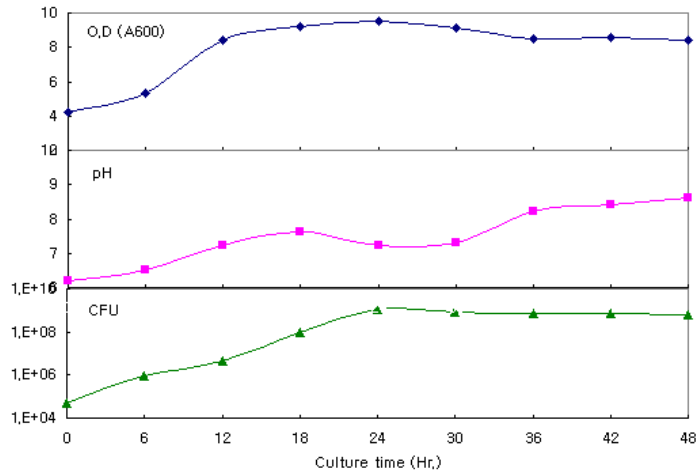


그림-2. Nutrient 배지에서 ISE14 균주의 배양 양상

Nutrient 배지에서 ISE14의 세포성장(optical density, A 600nm)은 12시간까지 빠른 속도로 증가한 이후 8 O.D. 전후로 유지되고, 생존균수는 접종초기부터 24시간까지 지속적으로 증가하여 1.2×10^9 cfu/ml 에 이른 후 배양 종료 시까지 6.5×10^8 cfu/ml 의 수준으로 유지되었다. 이와 같은 결과는 ISE14의 세포성장과 실제 생존균수와의 상관관계가 일치하지 않음을 나타내며, 미생물농약의 개발에 세포성장 값을 지표로 하는 것이 오히려 부정적인 결과를 초래할 수 있다는 것을 나타내고 있다. 또한 ISE14의 생존균수가 24시간 만에 최대치에 이른 후 더 이상 증가되지 않는 점으로 미루어 보아 ISE14는 24시간 배양만으로도 최대 생존균수를 확보하기에 충분할 것으로 판단된다.

2. Pilot scale 배양수행 및 배양액의 원제형태 결정

가. 기존배지를 출발점으로 생물적 방제를 위한 최적조건으로 배양법 확립

ISE14는 항생물질과 같은 지표물질의 생산이 확인되지 않아, 미생물농약의 개발 목적에 부합되는 최대 생존균수 확보를 위한 배양조건 확립에 초점을 맞추어

실험을 진행하였다.

1) 탄소원

가) 탄소원 선발

ISE14의 생육 및 최대 생존균수 확보에 적합한 탄소원을 규명하기 위하여 glucose, soluble starch, sucrose, dextrin, glycerol을 이용하여 균체성장속도와 최대 생존균수 확보에 대해 검토하였다. 기본배지는 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2%, KH_2PO_4 0.2%, Na_2HPO_4 0.5%, yeast extract 0.3%, casein peptone 0.5%으로 탄소원을 배제시킨 뒤 상기의 탄소원을 각 1%씩 첨가하여 검정용 배지를 제조하였다. Seed culture는 500ml baffled flask (working volume 50ml), 30°C, 180rpm 조건하에 18시간 배양을 하였다. 1%의 seed를 접종한 뒤 30°C, 180rpm의 조건으로 48시간 배양하면서 24시간별로 sampling하여 pH, O.D.과 생존균수를 측정하였다(그림-3).

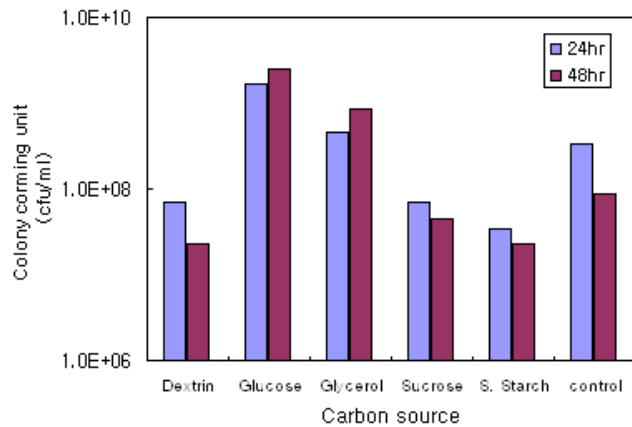
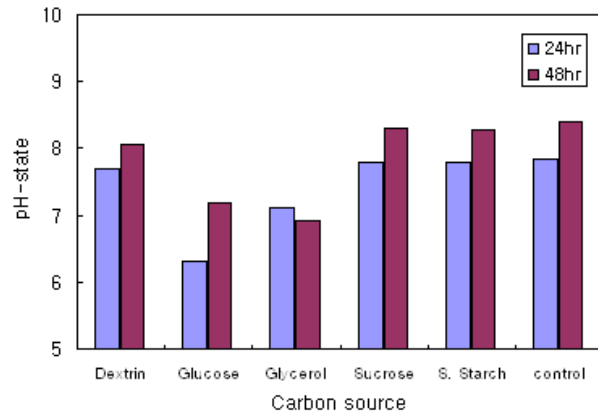
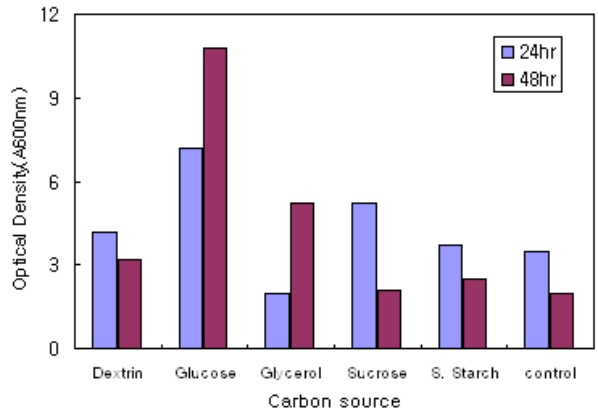


그림-3. 다양한 탄소원들에 대한 ISE14 균주의 배양 양상

ISE14는 glucose와 glycerol을 첨가한 배지에서 $4.5 \times 10^8 \sim 2.5 \times 10^9$ cfu/ml로 최대 생존 균수가 나타났으며, O.D. 값도 48시간까지 지속적으로 증가된 반면 나머지 탄소원은 모두 유사한 균체 성장속도와 최대 생존균수를 나타냈다. ISE14는 glucose를 첨가한 배지에서 2.5×10^9 cfu/ml의 최대 생존세포수가 확보되어 대량배양을 위한 탄소원으로 glucose를 선발하였다.

나) 탄소원의 농도 선발

ISE14의 대량배양에 선발된 탄소원의 적정 농도를 찾기 위한 기본배지는 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2%, KH_2PO_4 0.2%, Na_2HPO_4 0.5%, yeast extract 0.3%, casein peptone 0.5%으로 탄소원을 배제시킨 뒤 glucose를 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%의 농도로 첨가한 시켜 검정용 배지를 제조하였다. Seed culture는 500ml baffled flask (working volume 50ml), 30°C , 180rpm 조건하에 18시간 배양을 하였다. 1%의 seed를 접종한 뒤 30°C , 180rpm의 조건으로 48시간 배양하면서 세포 성장값(O.D.), 생존균수를 측정하였다(그림-4).

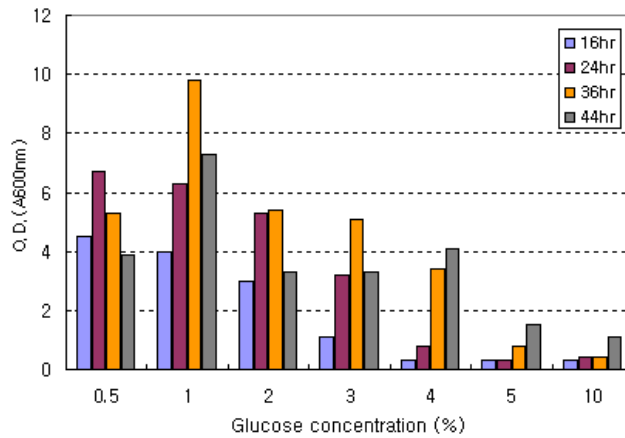
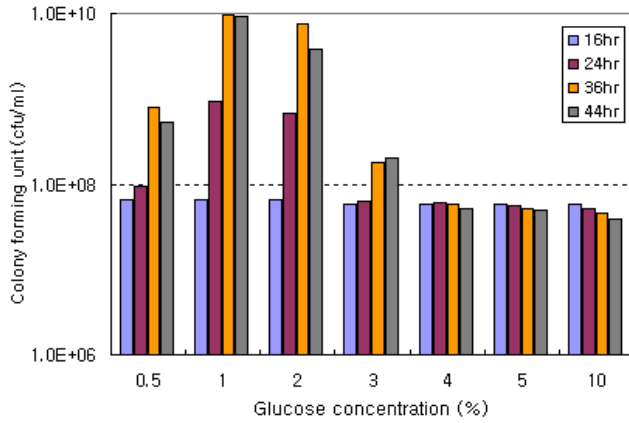


그림-4. Glucose 농도에 따른 ISE14 균주의 배양 양상

ISE14는 glucose의 농도에 따라 다른 생육 패턴을 보였으나 대체적으로 glucose의 농도가 높을수록 생육이 억제되는 양상을 나타냈다. 최대 생존균수는 glucose 1% ~ 2% 배지에서 36시간째에 $7.5 \sim 9.7 \times 10^9$ cfu/ml 로 나타났고, O.D. 값도 동시간대에 최고치를 나타냈다. 대량배양을 위한 glucose의 농도 선정은 1% ~ 2% 사이에서 최대 생존균수의 차이가 미비하기 때문에 경제성을 고려하여 1%로 결정하였다.

2) 질소원

가) 질소원 선발

ISE14의 생육 및 최대 생존 균수 확보에 적합한 질소원을 규명하기 위하여 peptone, yeast extract, casein peptone, malt extract, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 이용하여 균체성장속도와 최대 생존균수 확보에 대해 검토하였다. 기본배지는 glucose 1%, KH_2PO_4 0.2%, Na_2HPO_4 0.5%으로 질소원을 배제시킨 뒤 상기의 질소원을 각 1%씩 첨가하여 검정용 배지를 제조하였다. Seed culture 는 500ml baffled flask (working volume 50ml), 30°C , 180rpm 조건하에 18시간 배양을 하였다. 1%의 seed를 접종한 뒤 30°C , 180rpm의 조건으로 48시간 배양하면서 24시간별로 sampling 하여 세포성장값(O.D.), 생존균수를 측정하였다(그림-5).

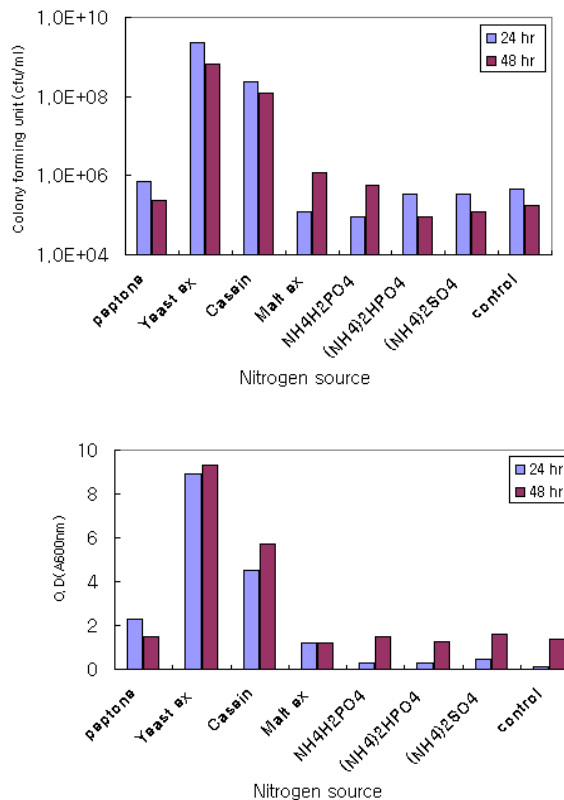


그림-5. 다양한 질소원들에 대한 ISE14 균주의 배양 양상

ISE14는 yeast extract와 casein을 첨가한 배지에서 $1.2 \times 10^8 \sim 2.3 \times 10^9$ cfu/ml 로 최대 생존 균수가 나타났고, O.D. 값도 yeast extract와 casein을 첨가한 배지에서 4.5 ~ 9.3 으로 나타났으며 나머지 질소원들은 나머지 질소원들은 모두 유사한 균체 성장속도와 최대 생존균수를 나타내어 yeast extract와 casein을 제외한 기타 질소원에 대한 이용성이 매우 낮은 것으로 나타났다. Yeast extract를 첨가한 배지에서 2.3×10^9 cfu/ml 의 최대 생존세포수가 확보되어 대량배양을 위한 질소원으로 yeast extract를 선발하였다.

나) 질소원 농도 선발

ISE14의 대량배양에 선발된 질소원의 적정 농도를 찾기 위한 기본배지는 glucose 1%, KH_2PO_4 0.2%, Na_2HPO_4 0.5%으로 질소원을 배제시킨 뒤 상기의 질소원을 각 1%씩 첨가하여 검정용 배지를 제조하였다. Seed culture는 500ml baffled flask (working volume 50ml), 30°C, 180rpm 조건하에 18시간 배양을 하였다. 1%의 seed를 접종한 뒤 30°C, 180rpm의 조건으로 48시간 배양하면서 24시간별로 sampling 하여 세포성장값(O.D.), 생존균수를 측정하였다(그림-6).

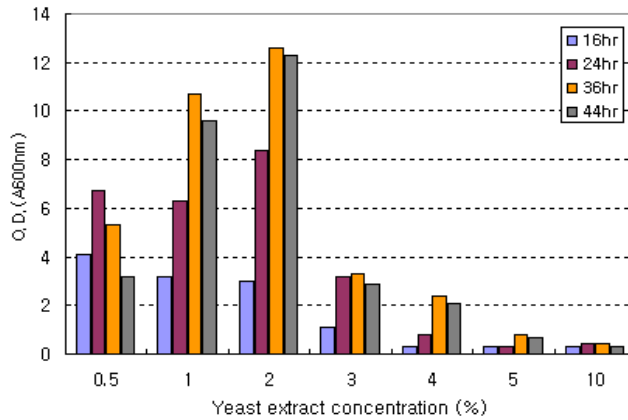
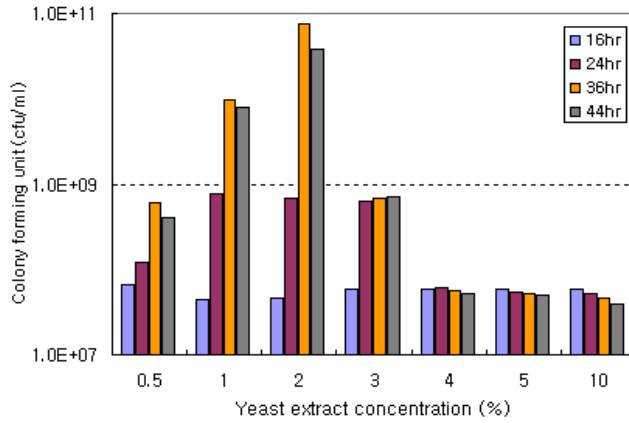


그림-6. Yeast extract 농도에 따른 ISE14 균주의 배양 양상

ISE14는 yeast extract 0.5 ~ 2% 사이의 농도에서 높은 O.D. 값과 최대 생존균수가 나타났고, 대체적으로 yeast extract의 농도가 높을수록 생육이 억제되는 양상을 나타냈다. 최대 생존균수는 yeast extract 2% 배지에서 36시간째에 7.5×10^{10} cfu/ml 로 나타났고, O.D. 값도 동시간대에 최고치를 나타냈다. 대량배양을 위한 yeast extract의 농도 선정은 최대 생존균수가 확보된 2%로 결정하였다.

3) 미량요소 선발

ISE14의 미량요소 영양 요구성을 검토하기 위하여 $MgSO_4$, $BaCl$, $MnCl_2$,

CuCl₂, CaCl₂, ZnSO₄, NaCl, FeSO₄, KCl, Al₂(SO₄)를 이용하여 균체성장속도와 최대 생존균수 확보에 대해 검토하였다. 기본배지는 기 실험에서 선발된 glucose 1%, yeast extract 2%, KH₂PO₄ 0.2%, Na₂HPO₄ 0.5%으로 조제한 뒤 상기의 무기염류를 각 0.001%씩 첨가하여 검정용 배지를 제조하였다. Seed culture는 500 ml baffled flask (working volume 50ml), 30°C, 180rpm 조건하에 18시간 배양을 하였다. 1%의 seed를 접종한 뒤 30°C, 180rpm의 조건으로 48시간 배양하면서 24 시간별로 sampling 하여 세포성장값(O.D.), 생존균수를 측정하였다.

시험결과 ISE14는 미량요소의 종류에 관계없이 대체로 유사한 O.D. 값과 최대 생존균수가 나타나 미량요소는 ISE14의 O.D. 값과 최대 생존균수와 큰 영향이 없는 것으로 판단된다.

나. 대량배양 공정개발을 위한 예비시험

1) 5L jar 배양

기초배양 연구를 바탕으로 ISE14의 최대 생존균수를 확보하기 위한 최적화 배양을 5L jar fermentor(K5L, Kobotec)를 이용하여 수행하였다. 기본 배양을 위한 배지원으로 glucose 1%, yeast extracts 2%, KH₂PO₄ 0.04%, K₂HPO₄ 0.06%를 이용하였고, 30°C, 600rpm, 1vvm의 조건으로 배양하였다. antifoam으로는 다우코닝 303 silicon oil을 이용하였다(그림-7).

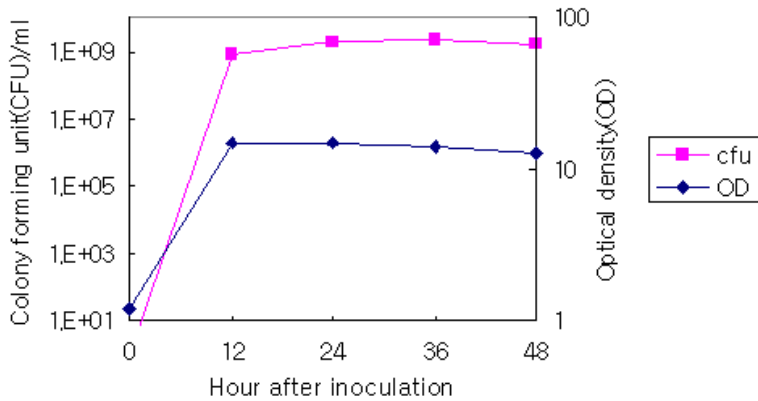
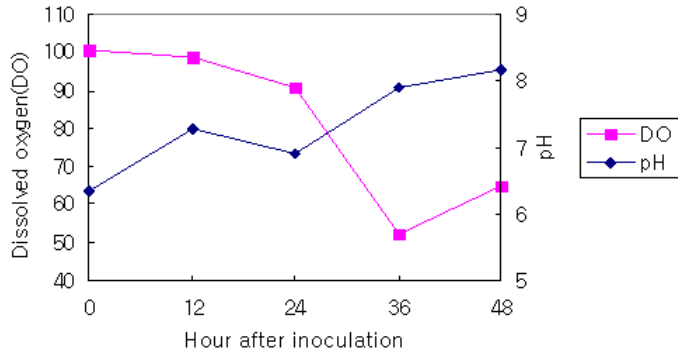


그림-7. ISE14 균주의 5L 발효조에서의 배양 양상

ISE14를 5L jar fermentor를 이용하여 fed-batch 배양을 한 결과 12시간 만에 O.D. 값이 15정도로 올라갔으며, cfu도 동시간대에 $1 \sim 2 \times 10^9$ cfu/ml 까지 급속히 증가되고 48시간까지 유지하는 것을 알 수 있었다. 그에 반해 D.O.는 배양 초기부터 24시간까지 서서히 감소하다 36시간째 49%까지 떨어진 뒤 배양 후기로 갈수록 상승하고, pH는 접종 초기부터 서서히 증가한 후 감소하다 다시 증가하여 pH 8.2까지 상승하였다. 이와 같은 결과는 5L jar 배양조건이 flask 배양조건과 상당히 다르며, 빠르게 O.D. 값과 cfu가 증가하는 반면 산소를 이용하는 패턴이 배양 36시간째 최저치를 나타내는 것으로 보아 빠른 균체 증식 이후 2차 대사산물의 생성이 이루어지고 있음을 알 수 있었다. 이는 대수증식기에 많은 산소

가 필요하지 않다는 것을 의미하며, 배양 시간을 길게 가져갈 필요 없이 짧은 시간의 배양만으로도 최대 생존균수가 확보될 수 있음을 나타낸다.

2) 50L 배양

미생물의 액체 발효에서 접종하는 seed의 양은 통상적으로 working volume의 5 ~ 10%로 알려져 있다. 따라서 미생물 발효의 scale이 커짐에 따라 seed의 volume도 상당히 늘어나는데, large scale의 미생물 발효에 flask를 이용하여 seed를 제조하여 접종을 하는 것은 많은 어려움과 문제점이 대두된다. 특히 여러 개의 flask seed를 배양하여 5 ~ 10%의 seed volume을 맞추는 것은 seed 배양시 오염 또는 본배양 seed 접종시 오염의 기회가 늘어난다는 점에서 부적절한 방법이라 할 수 있다. 이러한 문제는 단계적인 배양을 통해 해결될 수 있는데, 전단계 배양액을 seed 배양액으로 생각하고 다음 단계의 발효조에 배양액 transfer를 통해 해결할 수 있다.

50L 배양은 경북 안동에 위치한 경북 바이오산업 연구원의 발효조(Kobiotec)를 이용하였다. Jar fermentor에서 선발된 배지 조성인 yeast extract 2%, glucose 1%로 하여 working volume 30L 배양을 실시하였다. 배양조건은 300rpm, 30°C, 1vvm, 0.2kg/1cm³ inner pressure 이었으며, 접종원으로는 ISE14 균주 (20% glycerol working stock vial 1ea - 5ml)를 5L baffle flask(working volume 1.5L)에 접종한 뒤 30°C, 100rpm에서 24시간 배양한 배양액을 이용하였다. 보다 많은 세포수 배양을 위해서 배양 12시간과 17시간째에 glucose 50g/150ml을 feeding 하였다(그림-8).

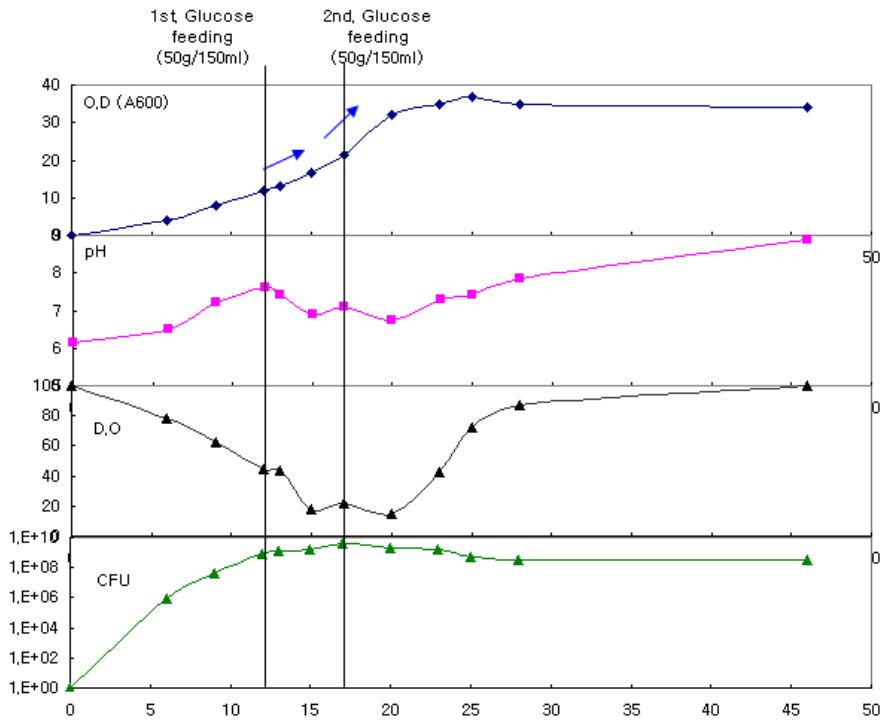


그림-8. Glucose 추가 공급을 통한 ISE14 균주의 50L 발효조에서의 배양 양상

O.D. 값은 배양초기부터 12시간째까지 지속적으로 상승하여 12에 도달한 후 1차 glucose feeding (50g/150ml) 후 21.3까지 급속히 상승하고 2차 glucose feeding (50g/150ml) 후 25시간째 37까지 상승한 뒤 45시간까지 35 수준을 유지하였다. 이는 기존 배양에 비해 탄소원 feeding을 통해 O.D. 값이 2배 이상 상승될 수 있음을 보여 주었다. 하지만 실제 생존 균수 colony forming unit (cfu/ml)은 17시간째 4×10^9 cfu/ml을 정점으로 더 이상의 추가적인 상승은 일어나지 않아 O.D. 값과 생존균수와 큰 상관관계가 없음을 확인 할 수 있었다.

3) 500L 배양

500L 배양은 50L 배양 후 transfer를 통해서 실시하였다. 50L 발효조에 yeast

extract 2%, glucose 1%, working volume 30L로 배양을 실시하였다. 배양조건은 300rpm, 30°C, 1vvm, 0.2kg/1cm³ inner pressure 이었으며, 접종원으로는 ISE14 균주 (20% glycerol working stock vial 1ea - 5ml)를 5L baffle flask(working volume 1.5L)에 접종한 뒤 30°C, 100rpm에서 24시간 배양한 배양액을 이용하였다. 50L 발효조 배양 18시간째 500L (working volume 300L) 발효조로 transfer를 실시하여 500L 배양을 실시하였다. 500L 발효조의 배지 조성은 50L 발효조와 동일하며, 200rpm, 30°C, 1vvm, 0.2kg/1cm³ inner pressure의 조건으로 배양하였으며, antifoam으로는 다우코닝 303 silicon oil을 이용하였다(그림-9).

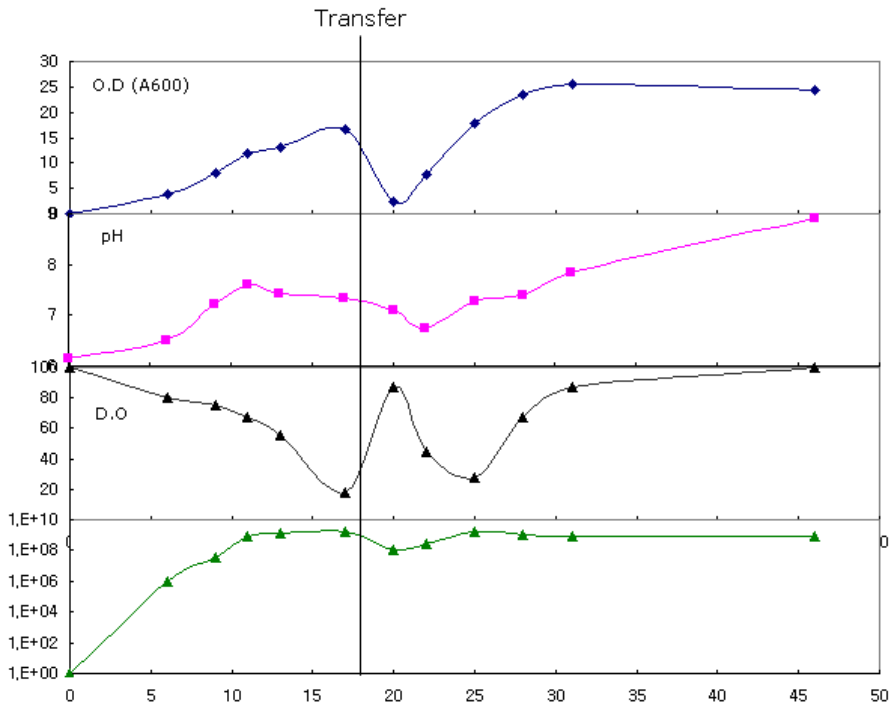


그림-9. ISE14 균주의 배양액 transfer를 통한 500L 발효 양상

50L 배양에서는 17시간만에 최대 cfu인 1.5×10^9 cfu/ml에 도달되었으나 배양액 transfer를 실시한 후 8시간 만에 최대 cfu인 1.5×10^9 cfu/ml에 도달되어

transfer를 통해 배양시간이 단축됨을 확인할 수 있었다. 이와 같이 ISE14의 짧은 배양시간은 오염의 확률을 낮춰주어 오염으로 인한 시간적, 비용적 손실을 줄여주고, 발효조의 운용비용 절감 효과도 나타날 것으로 사료된다.

4) 배양액을 제형화 하기 위한 원제 확보

ISE14는 gram negative 균주으로써 endospore 등과 같은 내구체를 형성하는 *Bacillus* sp. 와는 다르게 균주의 장기간 보존 및 생존이 매우 어렵다는 특징을 갖고 있다. 따라서 ISE14의 제형화를 위해서는 원제의 형태에 따른 균주의 생존을 검토가 필수적이다.

일반적으로 gram negative 균주의 장기간 보존을 위해 주로 동결보존법과 동결건조보존법이 이용되는데 동결보존법은 10% glycerol를 이용하여 -70°C 에서 보관하는 방법으로 액상 형태이고, 동결건조보존법은 10% skim milk를 이용하여 동결건조 시킨 뒤 보관하는 방법으로 고상의 형태이다.

본 과제에서 사용되는 ISE14의 제형화를 위해 고상과 액상형태 원제의 균주 생존율을 검토하였다. 원제 형태 검토를 위한 균주 배양액은 5L jar fermentor(K5L, Kobotec, working volume 3L)를 이용하여 준비하였다. 배지원으로 glucose 1%, yeast extracts 2%, KH_2PO_4 0.04%, K_2HPO_4 0.06%를 이용하였고, 30°C , 600rpm, 1vvm의 조건으로 24시간 배양하였다. antifoam으로는 다우 코닝 303 silicon oil을 이용하였다. Seed 접종은 1L baffled flask (working volume 150ml), 30°C , 100rpm 조건하에 18시간 배양을 한 것을 이용하였다. 배양이 끝난 ISE14의 배양액을 초고속원심분리기(Beckman, rotor6, 6,000rpm, 20min, 10°C)를 이용하여 pellet과 상등액으로 분리한 뒤 7×10^{11} cfu/g의 pellet을 확보하였다. 고상의 원제에는 멸균된 0.5%(w/v) skim milk를 첨가하고 동결건조하여 (Cleanvac 8, Biotron) 8×10^9 cfu/g의 고상 형태 원제를 확보하였고, 액상의 원제는 pellet 자체에 멸균된 10% glycerol을 첨가하여 7×10^9 cfu/ml의 액상 형태 원제를 확보하였다.

3. 생물농약 등록에 만족하는 제형화 개발

가. 기본 제형연구

신물질의 제형화 검토를 위해서는 1차적으로 신물질의 이화학적 특성에 근거하여 검토가능한 제형별 이화학적 특성을 비교 검토하고, 선발 가능한 처방을 다양한 계면활성제 및 보조제를 이용하여 연구한다. 2차적으로 제형화된 시료들의 약효 및 약해시험 결과와 제형의 특성을 상호 비교하여 처방을 수정 보완하여 최종적인 처방으로 확립하게 된다.

주관연구기관으로부터 입수한 ISE14 균주를 자체 배양하여 얻어진 배양액과 이를 동결건조하여 얻어진 원분을 대상으로 액상제형 및 고상제형에 대하여 제형화 가능성을 검토하였다. 생물농약의 경우, 원료물질의 특성상 일반제형으로의 제제가 불가능한 경우도 발생될 수 있으므로 이에 대한 사전 검토는 필수적이라고 할 수 있다.

1) 액상수화제형

ISE14 균주의 액상 형태의 원제는, glycerol을 포함하는 액상이었으므로 우선적으로 액상제형인 액상수화제를 검토하였다. 액상수화제는 농약관리법상 액상 또는 점질액상으로서 물에 희석하였을 때 수화되는 농약을 말하는 것으로 제제 검토시 분산제의 선발과 입도관리 그리고 저장안정성의 확보가 중요하다. 먼저 분산제의 경우 다양한 선택이 가능하지만 기초적인 제형화 가능성에 대한 정보를 얻고자 일반 액상수화제의 범용적 처방에 사용되는 것을 이용하였고, 입도문제는 기본적인 액상수화제의 자체 관리규격에 준하여 검토하였다. 저장안정성은 주로 경시적인 층 분리와 입도성장과 관련된 것으로 10% 미만의 함량을 가지는 액상수화제의 경우, 처방 검토시 저장안정성을 확보하기 위하여 증점제 및 보조제에 대한 고려가 필수적이므로 여러 가지 실험을 통하여 적절한 조합과 요구되는 함량을 결정하였다(표-2).

표-2. 기본제형 검토를 위한 ISE14 액상 원제의 액상수화제 처방

원부재명	함 량(%)	비 고
ISE14 액상 원제	50	7×10^9 cfu/ml
부동제	10	PG
보조제	3	BSW
안정제	1	BA
증점제	0.2	XG
방부제	0.1	LX150
소포제	0.2	OAF900
증량제	Rest	water
Total	100	

2) 수화제형

ISE14 동결건조 원분의 경우, 고상제형에 대하여 검토하였다. 검토제형으로는 고상제형의 기본제형인 수화제를 선발하여 검토를 실시하였다. 수화제는 농약관리법상 분상으로서 물에 희석하여 사용하는 농약을 말하는 것으로 제제 검토시 계면활성제의 선발과 입도관리 그리고 저장안정성의 확보가 중요하다. 먼저 계면활성제의 경우 증량제의 종류에 따라 다양한 종류가 사용되고 있지만 원가 및 제제상의 선호도 등을 고려하여 습윤제와 분산제를 복합적으로 선발하여 이용하였고, 입도는 기본적인 수화제의 자체 관리규격에 준하여 검토하였다. 수화제의 저장안정성은 액상수화제와는 달리 주로 경시적인 분말도의 악화현상과 입도성장 문제로 원제가 액상일 경우 더욱 큰 문제가 된다. 하지만 ISE14 동결건조분의 경우 주성분이 고상이었으므로 증량제와 계면활성제 그리고 보조제의 적절한 조합을 선발하여 이러한 문제를 극복하였다. 10% 이하의 저함량 수화제의 경우 원제보다는 기타 부재에 의한 영향이 크므로 적절한 부재의 선발은 매우 중요하다. 그러므로 여러 가지 실험을 통하여 적절한 조합과 요구되는 함량을 결정하였다 (표-3).

표-3. 기본제형 검토를 위한 ISE14 고상 원제의 수화제 처방

원부재명	함 량(%)	비 고
ISE14 고상 원제	50	8×10^9 cfu/g
분산제 1	3	NPS
분산제 2	1	SLS
습윤제	1	SDS
보조제	5	WC
증량제	Rest	Kaolin
Total	100	

이렇게 확보된 각각의 제제를 50°C에서 보관하면서 7일 간격으로 4회 sampling 하여 생존 균수를 측정하였다(그림-10).

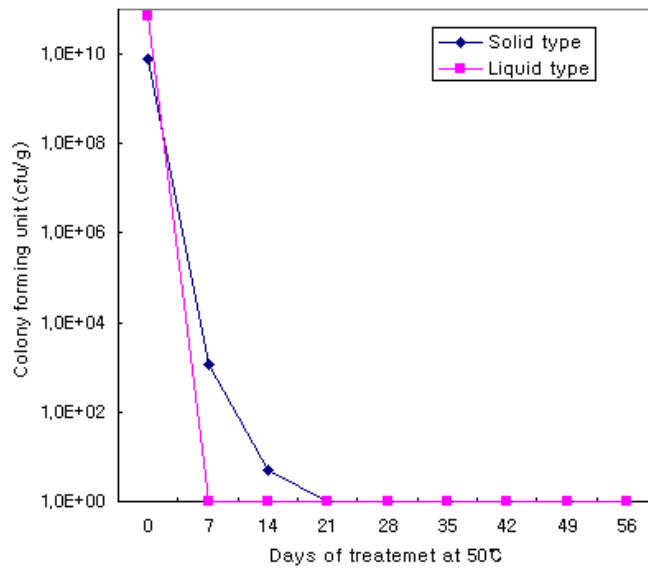


그림-10. ISE14 균주의 제형별 50°C 경시 안정성 시험

50°C 처리 7일 후 균주 생존율은 수화제 5.2×10^4 cfu/g, 액상수화제에서는 생존균주가 나타나지 않았다. 14일 이후 수화제는 2×10^2 cfu/g의 생존균주가 나타났고 그 이후에는 발견되지 않았다. 이와 같은 결과는 액상수화제형으로의 제형화는 추가적인 검토가 필요할 것으로 판단되며, 수화제형도 고온에서 균주 생존율이 급격히 떨어져 제품의 보존기간이 제한적일 것으로 사료된다.

이에 따라 각 제형의 실온 생존기간을 검토하였다. 각 원제를 실온(25°C)에서 보관하며 7일 간격으로 sampling 하여 생존 균수를 측정하였다(그림-11).

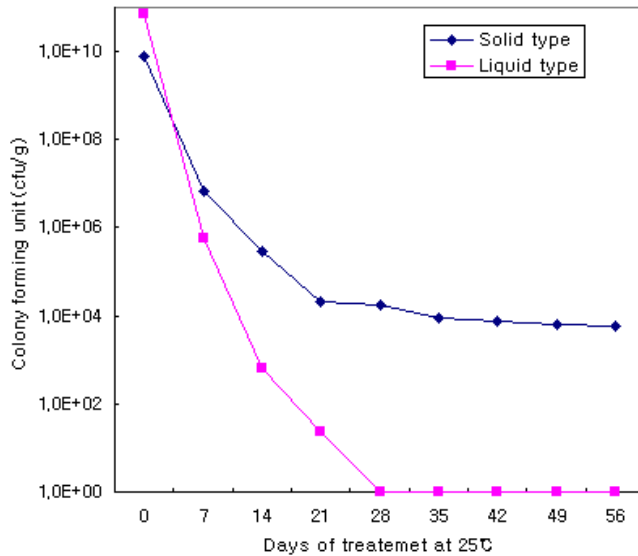


그림-11. ISE14 균주의 제형별 실온 경시 안정성 시험

시험결과 액상수화제의 생존균수는 보존 7일 후 5.6×10^4 cfu/ml 이었으며 이후 급속히 균주 생존율이 떨어져 28일 후에는 생존균주가 발견되지 않았다. 수화제는 액상수화제보다 높은 생존율을 보여주었다. 생존 균수는 7일 후 6.7×10^6 cfu/g, 14일 후 2.8×10^5 cfu/g 이었고, 처리 56일까지 $9 \sim 5.6 \times 10^3$ cfu/g 수준의 생존 균수를 유지하였다.

기본 제형 검토결과, 액상제형인 액상수화제보다는 고상제형인 수화제가 제조 특성 및 경시적인 측면 그리고 활성적인 측면에서 안정적이었다.

나. 제형개발 및 처방개선 검토

1차 검토에서 선발된 고상제형인 수화제 이외에 다양한 제형개발과 처방개선을 위한 정보를 수집하고자 직접처리제인 입제와 회석식처리제인 입상수화제에 대하여 처방검토를 추가로 실시하였으며, 처방개선을 위하여 1차에서 검토되었던 액상수화제에 대하여 처방개선을 실시하였다. 처방검토에 사용된 ISE14는 액상의 원제를 사용하였으며, 제형개발 및 처방개선을 위하여 보조제이면서도 안정제로서의 효과가 알려져 있는 Glycerin의 효과를 검토하였다.

직접처리제인 입제는 농약관리법상 입상으로서 원상태로 처리되는 농약을 말하는 것으로 제조공정 측면에서 3가지 형태의 입제가 존재한다. 본 연구에서는 다양한 처방검토가 가능한 조립식 입제와 제조과정이 가장 경제적인 흡착식 입제를 대상으로 검토를 실시하였다. 조립식 입제의 경우, 수증붕괴성 및 압출성이 우수한 부자제를 선발하여 처방을 검토하였고, 약효증진을 위하여 습윤/분산제를 첨가하여 처방을 확립하였다. 흡착식 입제의 경우는 경제적인 측면을 고려하여 입상 zeolite를 활용한 처방을 검토하였다. 액상수화제의 경우는 습윤/분산제의 효과를 검토하고자 처방을 검토하였다. 입상수화제의 경우, 농약관리법상 입상으로서 물에 회석하여 사용하는 농약을 말하는 것으로 제제 검토시 계면활성제의 선발과 입도관리 그리고 저장안정성의 확보가 중요하다. 먼저 계면활성제의 경우 증량제의 종류에 따라 다양한 종류가 사용되고 있지만 원가 및 제제상의 선호도 등을 고려하여 습윤제와 분산제를 복합적으로 선발하여 이용하였고 입도는 기본적인 입상수화제의 자체 관리규격에 준하여 검토하였다(표-4).

표-4. 추가제형 검토를 위한 ISE14 제형별 처방

원부제명	제 형(%)				비 고
	SC	GR1	GR2	WG	
ISE14 액상 원제	70	12	12	12	7×10^9 cfu/ml
습윤/분산제	5	1	1	1	GPG
습윤/분산제				8	PX100/SDS
보조용제	Rest	4	4	4	Glycerin
보조제			4	4	WC
물성개선제			20		BSW
보조제				12	Dicalite
증량제		Rest			Zeolite
증량제			33		Talc
증량제			Rest	Rest	CaCO ₃
Total	100	100	100	100	

추가제형 검토결과, 검토된 모든 제형에서 1차에서 검토되었던 수화제보다 경시적인 측면과 활성적인 측면에서 우수하지 못하였다. 그러므로 이후의 제형검토는 수화제를 중심으로 처방검토를 실시하였다.

다. 약효증진용 부자재 탐색

수화제의 약효증진용 부자재의 탐색을 위하여 수화제에 사용이 가능한 부자재를 대상으로 사용가능성 및 제제가능성을 탐색하였다. 처방검토에 사용된 ISE14는 균주의 생존력 측면에서 배양액 보다 안정적인 것으로 확인된 동결건조 원분을 사용하였다. 수화제의 저장안정성은 주로 경시적인 분말도의 약화현상과 입도성장 문제에 의하여 결정되므로 증량제와 계면활성제 그리고 보조제의 적절한 조합의 선발이 중요하다. 특히 10% 이하의 저함량 수화제의 경우 원제보다는 기

타 부재에 의한 영향이 크며, 미생물 제제인 경우는 계면활성제 이외의 부재에 의한 영향은 더욱 크다고 할 수 있으므로 적절한 부재의 선발은 매우 중요하다. 수화제의 검토를 위하여 문헌자료와 자체적으로 축적된 정보를 바탕으로 다양한 보조제를 검토하여 국내에서 수배가 가능한 부재 8종에 대하여 표-5의 처방대로 제제를 실시하였으며, 처방별 선발을 위하여 각 시료는 실온에 보관하면서 해당 기간별로 유효성분을 검토하였다.

표-5. 부재 선발을 위한 ISE14 수화제의 부재별 처방별 균주 생존률

구 분	code	유효성분량 [$\times 10^6$ cfu/g]				비 고
		0주	1주	2주	3주	
원 제	ISE14	854	14.84	4.13		원제만을 실온보관 원제(30%)+ 부제 (70%)
부 제	K	26.97	1.23	0.47		
"	C	26.97	0.43	0.04		"
"	D	26.97	2.31	0.84		"
"	DE	26.97	5.72	1.52	1.59	"
"	T	26.97	1.62	0.17		"
"	B	26.97	3.56	1.09	2.46	"
"	G	26.97	0.04	ND		"
"	X	26.97	5.93	2.12	1.88	"

검토결과, 검토된 8종의 부재 중에서는 경시적인 측면과 활성적인 측면에서 구조토, 벤토나이트, 텍스트린 등이 안정적인 것으로 판단되었으나, 제제적인 측면에서의 수화성, 분말도, 저장안정성 등이 우수한 구조토를 선발하여 이후의 처방검토를 진행하였다.

라. 계면활성제의 종류에 따른 안정적인 제형개발

부재 선발시험에서 선발된 구조토를 활용하여 수화제의 물성을 개선하면서도 약효를 증진시킬 수 있는 계면활성제의 선발을 위하여 계면활성제의 계통 및

종류별로 처방검토를 실시하였다. 수화제의 기본처방으로는 ISE14 동결건조원분을 30% 사용하였으며, 증량제로는 보조제 검토를 통하여 선발된 규조토를 사용하였고 계면활성제는 5%로 고정하여 시험처방을 확립하여 처방별로 비교를 실시하였다(표-6).

표-6. 계면활성제 선발을 위한 ISE14 수화제 시험처방

원부제명	함 량 (%)	비 고
ISE14 원분	30	8×10^9 cfu/g
계면활성제	5	음이온/비이온
증량제	Rest	규조토
Total	100	

계면활성제의 경우, 단순히 제형의 물성개선 효과와 함께 많은 경우 농약의 약효를 증진시키는 것으로 보고됨에 따라 적절한 계면활성제의 선발은 제품 개발 측면에서 필수적인 요소라 할 수 있다. 특히, 계면활성제는 계통 및 종류별로 효과의 차이가 크므로 본 시험에서는 수화제에 사용이 가능한 음이온 및 비이온 계면활성제 각각 9종과 천연물 유래 계면활성제 1종을 선발하여 종류별로 시험을 실시하였다(표-7).

표-7. 계면활성제 선발을 위한 ISE14 수화제 처방별 시험결과

구 분	code	유효성분량 [$\times 10^6$ cfu/g]				비 고	
		0주	1주	2주	3주		
음이온 SAA	N5	25.62	0.12	0.16		시험처방	
	"	N7	25.62	0.22	0.04	"	
	"	PX	25.62	2.08	2.16	1.34	"
	"	EPB	25.62	0.14	0.01		"
	"	SDS	25.62	0.58	0.11		"
	"	SLS	25.62	0.75	0.22		"
	"	CLS	25.62	0.5	0.04		"
	"	A	25.62	1.17	0.21		"
	"	KSW	25.62	0.84	0.04		"
비이온 SAA	NV	25.62	2.09	0.38		"	
	"	NP	25.62	0.43	0.04	"	
	"	OP	25.62	0.11	0.03	"	
	"	LE	25.62	0.07	ND	"	
	"	SF	25.62	0.08	0.07	"	
	"	TDE	25.62	0.39	0.09	"	
	"	CE	25.62	0.22	0.04	"	
	"	OE	25.62	0.27	0.01	"	
	"	TZ	25.62	0.05	0.09	"	
기타	TS	25.62	3.92	0.66		"	

시험결과, 비이온보다는 음이온 계면활성제가 안정적이었고 음이온 중에서는 PX가 가장 안정적이고 우수한 것으로 판단되었다. 이에 따라 이후의 포장시험 및 제조허가용 시제품 제조는 규조토와 PX를 활용하여 확립된 처방으로 제조된 시료로 시험을 실시하였다.

마. 포장시험 및 제조허가용 시제품 제조

포장시험용 시료 및 시제품 제조를 위하여 상기에서 선발된 부자재와 계면활성제를 활용하여 표-8과 같은 처방을 확립하였으며, 이렇게 하여 제조된 시료는 농약관리법상의 검사 및 검토항목을 검사한 다음 포장시험용 시료로 사용하였다.

표-8. 포장시험용 ISE14 수화제 최종처방

원부제명	함 량 (%)	비 고
ISE14 원분	30	8×10^9 cfu/g
습윤/분산제	5	PX
증량제	Rest	규조토
Total	100	

4. 생물농약 원제 및 제품에 대한 독성시험

가. ISE14 원제의 마우스를 이용한 단회 투여 경구독성시험

ISE14 원제 (8×10^9 cfu/g) 에 대한 급성경구독성을 마우스(ICR계통)를 이용하여 1회 경구처리한 후 2주간 치사수, 일반중독증상, 체중 변화 및 부검소견을 관찰 조사한 결과는 다음과 같다.

1) 시험계

가) 동물종(계통) : Mou(ICR계)

나) 공급원

명 칭 : (주)샘타코

주 소 : 경기도 오산시 서량동 77-1번지

☎ 031 - 372 - 3636

대표이사 : 배 치 남

다) 시험계의 선택사유

농촌진흥청고시 제2005-7호 농약의 독성시험기준과 방법에 마우스를 사용하도록 되어있으며 ICR계통은 농약의 경구독성시험에 널리 사용되고 있어 기초 자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험결과의 해석 및 평가에 이용하는 것이 용이하다.

라) 순화 및 검역

동물을 입수한 후 암·수 각 10마리를 검역·부검하고, 나머지 동물은 동물실험실 사육환경 하에서 7일간 순화시키면서, 피모상태 및 건강을 확인한 후 건전한 개체를 선별하여 시험에 이용하였다.

2) 사육환경

가) 사육환경

본 실험의 환경은 온도 $21\pm 1^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $55\pm 5\%$, 조명시간 12시간(오전 8시 ~ 오후 8시)의 실험조건에서 사료와 음수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다.

나) 사육 상자

순화 및 시험기간 중 폴리카보네이트 사육 상자($270\times 220\times 130\text{mm}$)에 대팻밥 깔집 (삼육실험동물, 한국)을 깔아 대형 고압멸균기를 이용하여 멸균, 건조한 후 암·수 각각 5마리씩 사육 유지하였다.

다) 사료 및 음용수

사료 및 음수의 급여방법 : 사료는 실험동물용 고품사료(삼양사료(주), 한국)를, 음수는 상수도수를 대형 고압멸균기를 이용하여 멸균 후 자유 섭식 및 섭취 시켰다.

3) 관찰 및 조사항목

가) 일반중독증상 및 치사동물

투여당일은 투여 후 1시간에서 4시간까지 매시간, 익일부터는 매일 1회(오전 9시)씩 일반중독증상을 관찰하였고, 치사된 동물은 발견 즉시 꺼내서 부검을 실시하였다.

나) 체중측정

시험에 이용된 모든 동물에 대하여 투여 당일부터 D1, D3, D7, D10, D14일째 개체별 체중을 측정하고 그 결과를 통계 처리하여 분석하였다.

다) 부검

시험기간 종료 후 살아있는 개체를 이산화탄소(CO₂) 가스로 마취시킨 후 내부장기의 육안적 이상유무를 확인하고, 그 결과를 개체별 부검기록 용지에 기록하였다.

4) 투여약량 수준설정 및 약제조제

가) 투여약량 설정

기초시험 투여약량인 5,000mg/kg에서 암·수 공히 시험을 수행하였다.

나) 투여약량 수준별 실험 동물수

실험 동물수는 농약의 등록시험기준과 방법(농촌진흥청고시 제2005-7호)에서와 같이 암·수 각 5마리를 이용하였고, 개체식별은 등부에 Picric acid를 이용하여 일련번호로 표시하였다.

다) 대조구의 설정

시험물질이 액상으로 투여약제 조제시 증류수에 잘 현탁되므로 용매 대조군을 제외한 증류수 대조군만을 두었다.

라) 용매의 선택 및 시험물질의 조제

시험물질이 증류수에 잘 현탁되는 관계로 용매는 증류수로 하였으며, 시험물질의 조제는 20ml의 Teflon Cap Vial을 이용하여 칭량한 후 증류수를 가하여 용해 및 현탁 시켜 조제하였다.

마) 투여액량의 설정

투여액은 시험에 이용되는 마우스의 체중과 약액 투여량을 고려하여 투여액량 수준별 공히 10ml/kg(체중)으로 설정하였다.

5) 시험물질의 투여

가) 사료의 절식

투여개시 3 - 4시간 전부터 절식을 시킨 후 투여 3 ~ 4시간 후 사료 급이를 재개하였다.

나) 투여경로 및 투여방법

마우스용 경구 주사침(Zonde)을 이용하여 체중측정치를 기준으로 10mg/kg 용량을 경구로 위내에 삽입, 1회에 한하여 강제투여 하였다.

6) 결과 및 고찰

가) 치사동물 및 LD50값

이상의 시험결과로 본 시험의 시험물질인 ISE14 원제는 기초시험 약량인 5,000mg/kg에서 시험기간(14일)동안 암수 모두 치사개체가 발견되지 않았다. 따라서 본 시험물질의 반수치사약량(LD50)은 > 5,000mg/kg으로 독성분류상 저독성을 나타내었다.

나) 일반중독증상

전 개체에서 시험기간(14일)동안 특이증상이 관찰되지 않았다.

다) 체중변화

시험에 이용된 동물의 시험개시D0, D1, D3, D7, D10, D14일째의 개체별 체중기록 결과로 보아 약제투여군은 무처리 대조군과 비교하여 유의차가 없었다.

라) 부검소견

육안적 부검소견으로 전 개체에서 특이한 이상 소견은 관찰되지 않았다.

7) 요약

가) 시험물질을 암·수 모두 기초시험 투여약량인 5,000mg/kg를 투여하여 관찰한 결과 시험기간(14일)중 치사개체가 발견되지 않았다.

나) 일반중독증상은 전 개체에서 시험기간(14일)동안 특이증상이 관찰되지 않았다.

다) 체중변화의 통계처리에 있어 체중측정 전 기간에 걸쳐 유의차가 인정되지 않았다.

라) 약제투여와 관련한 내부 장기에 대한 영향은 없었다.

이상의 결과 본 시험물질의 반수치사약량(LD50)은 > 5,000mg/kg으로 독성분류상 저독성으로 확인되었다.

나. ISE14 원제의 랫드를 이용한 단회 투여 경피독성시험

ISE14 원제 (8×10^9 cfu/g) 에 대한 급성경피독성을 SPF 랫드(SD계통)를 이용하여 1회 경피 처리한 후 2주간 치사수, 일반중독증상, 체중 변화 및 부검소견을 관찰 조사한 결과는 다음과 같다.

1) 시험계

가) 동물종(계통) : SPF Rat(SD계)

나) 공급원

명 칭 : (주)샘타코

주 소 : 경기도 오산시 서량동 77-1번지

☎ 031 - 372 - 3636

대표이사 : 배 치 남

다) 시험계의 선택사유

농촌진흥청고시 제2005-7호 농약의 독성시험기준과 방법에 랫드를 사용하도록 되어있으며 SD계통은 농약의 경피독성시험에 널리 사용되고 있어 기초 자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험결과의 해석 및 평가

에 이용하는 것이 용이하다.

라) 순화 및 검역

동물을 입수한 후 암·수 각 10마리를 검역·부검하고, 나머지 동물은 동물실험실 사육환경 하에서 7일간 순화시키면서, 피모상태 및 건강을 확인한 후 건전한 개체를 선별하여 시험에 이용하였다.

2) 사육환경

가) 사육환경

본 실험의 환경은 온도 $21\pm 1^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $55\pm 5\%$, 조명시간 12시간(오전 8시 ~ 오후 8시)의 실험조건에서 사료와 음수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다.

나) 사육 상자

순화 및 시험기간 중 폴리카보네이트 사육 상자($420\times 260\times 180\text{mm}$)에 대팻밥 깔집 (삼육실험동물, 한국)을 깔아 대형 고압멸균기를 이용하여 멸균, 건조한 후 암·수 각각 5마리씩 사육 유지하였다.

다) 사료 및 음용수

사료 및 음수의 급여방법 : 사료는 실험동물용 고품사료(삼양사료(주), 한국)를, 음수는 상수도수를 대형 고압멸균기를 이용하여 멸균 후 자유섭식 및 섭취 시켰다.

3) 관찰 및 조사항목

가) 일반중독증상 및 치사동물

투여당일은 투여 후 1시간에서 4시간까지 매시간, 익일부터는 매일 1회(오전 9시)씩 일반중독증상을 관찰하고, 치사된 동물은 발견 즉시 꺼내서 부검을 실시하였다.

나) 체중측정

시험에 이용된 모든 동물에 대하여 투여 당일부터 D1, D3, D7, D10, D14일째 개체별 체중을 측정하고 그 결과를 통계 처리하여 분석하였다.

다) 부검

시험기간 종료 후 살아있는 개체를 이산화탄소(CO₂) 가스로 마취시킨 후 내부 장기의 육안적 이상 유무를 확인하고, 그 결과를 개체별 부검기록용지에 기록하였다.

4) 투여약량 수준설정 및 약제조제

가) 투여약량 설정

기초시험 투여약량인 4,000mg/kg에서 암·수 공히 시험을 수행하였다.

나) 투여약량 수준별 실험 동물수

실험 동물수는 농약의 등록시험기준과 방법(농촌진흥청고시 제2005-7호)에서와 같이 암·수 각 5마리를 이용하였고, 개체식별은 미부에 유성매직을 이용하여 일련번호로 표시하였다.

다) 대조구의 설정

시험물질이 액상으로 투여약제 조제시 증류수에 잘 현탁되므로 용매 대조군을 제외한 증류수 대조군만을 두었다.

라) 용매의 선택 및 시험물질의 조제

시험물질이 증류수에 잘 현탁되는 관계로 용매는 증류수로 하였으며, 시험물질의 조제는 20ml의 Teflon Cap Vial을 이용하여 칭량한 후 증류수를 가하여 용해 및 현탁시켜 조제하였다.

마) 투여액량의 설정

투여액량은 시험에 이용되는 랫드의 체중과 약액 투여량을 고려하여 투여액량 수준별 공히 5ml/kg(체중)으로 설정하였다.

5) 시험물질의 투여

가) 사료의 절식

경피독성시험의 투여경로상 절식시간은 따로 두지 않았다

나) 투여경로 및 투여방법

시험개시 전 약제처리를 위한 공시동물의 등부위를 동물용 제모기를 이용하여 체표면적의약 10%를 제모하고, 조제된 공시약제를 체표에 골

고루 바른 후 약제유실을 방지하기 위하여 임상용 거즈로 고르게 감고 비자극성 테이프로 고정시켜 주었다. 약제처리 24시간이 경과한 후 도포 물을 제거하고, 한편 피부에 남아 있는 공시약제를 증류수를 이용하여 잘 닦아주었다.

6) 결과 및 고찰

가) 치사동물 및 LD50값

이상의 시험결과로 본 시험의 시험물질인 ISE14 원제는 기초시험 약량인 4,000mg/kg에서 시험기간(14일)동안 암수 모두 치사개체가 발견되지 않았다. 따라서 본 시험물질의 반수치사약량(LD50)은 > 4,000mg/kg으로 독성분류상 저독성을 나타내었다.

나) 일반중독증상

전 개체에서 시험기간(14일)동안 특이증상이 관찰되지 않았다.

다) 체중변화

시험에 이용된 동물의 시험개시D0, D1, D3, D7, D10, D14일째의 개체별 체중기록 결과로 보아 약제투여군은 무처리대조군과 비교하여 유의차가 없었다.

라) 부검소견

육안적 부검소견으로 전 개체에서 특이한 이상소견은 관찰되지 않았다.

7) 요약

가) 시험물질을 암·수 모두 기초시험 투여약량인 4,000mg/kg를 투여하여 관찰한 결과 시험기간(14일)중 치사개체가 발견되지 않았다.

나) 일반중독증상은 전 개체에서 시험기간(14일)동안 특이증상이 관찰되지 않았다.

다) 체중변화의 통계처리에 있어 체중측정 전 기간에 걸쳐 유의차가 인정되지 않았다.

라) 약제투여와 관련한 내부장기에 대한 영향은 없었다.

이상의 결과 본 시험물질의 반수치사약량(LD50)은 > 4,000mg/kg으로 독성분류상 저독성으로 확인되었다.

다. ISE14 원제의 잉어를 이용한 단회 투여 급성독성시험

ISE14 원제 (8×10^9 cfu/g) 에 대한 급성어독성을 잉어를 이용하여 96시간 동안 생사수, 일반중독증상을 관찰하고 체중 및 전장을 조사한 결과는 다음과 같다.

1) 시험계

가) 공시어 : 잉어(Cyprinus carpio)

나) 공급원

명 칭 : 경상북도 수산자원개발연구소 민물고기연구센터

주 소 : 경상북도 울진군 근남면 행곡리 228번지

☎054 - 783 - 9413

기관장 : 한 중 대

다) 시험계의 선택사유

농촌진흥청고시 제 2005 - 7호 농약의 독성시험기준과 방법에 급성어독성시험의 경우 시험어류는 잉어를 사용하도록 되어 있으며, 농약의 어독성시험에 널리 사용되고 있어 기초 자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험결과의 해석 및 평가에 이용하는 것이 용이하다.

라) 순화 및 사육

시험어류는 분양 후 약 2주간 실험실내 환경 하에서 순화 사육시켰다.

2) 사육환경

가) 사육환경

본 시험의 환경은 실내에서 물의 순화, 여과를 시킬 수 있는 유리 수

조장치를 이용, 시험용수는 지하수를 이용하여 수온은 22 ~ 24℃, 조도는 200 - 300Lux의 범위 내에서 사육, 순화시켰다.

나) 사료 급여

사료는 잉어용 부상성 고형사료(부산 관상어용 식품, 한국)를 1일 1회 급여 하였다.

3) 관찰 및 검사항목

가) 일반중독증상 및 생사율

처리당일은 1시간에서 4시간까지는 매시간, 그 이후에는 24, 48, 72, 96시간 간격으로 일반중독증상 및 생사수를 관찰 조사하였다.

나) 체중측정 및 크기측정

시험 중 치사된 개체는 발견 즉시 꺼내어 체중 및 전장을 측정하였으며, 시험 종료 후 살아 남은 개체는 시험 종료시 체중과 전장을 측정하였다.

4) 시험농도 수준설정 및 약제조제

가) 시험농도 설정

기초시험 투여농도인 10ppm에서 시험을 수행하였다.

나) 시험용 수조

원통형의 유리제품 10 L (φ24×30cm)용기를 사용하였다.

다) 시험어류의 크기 및 시험어류 수

잉어의 크기는 전장 5cm정도의 것으로 선별하였으며, 수조당 시험 어류수는 5마리를 수용하고, 시험농도 수준당 2개의 수조를 사용하였다.

라) 시험용수 및 수온

시험용수는 지하수를 72시간 이상 정체시켰다가 사용하였으며, 수온의 조절은 항온수조 내에 시험용 유리 수조를 담귀서 23±1℃로 시험기간 동안 유지시켰다.

마) 산소공급

시험 기간중 시험 중인 수조 내에 인위적인 산소공급은 시키지 않았다.

바) 사료 급여

시험개시 48시간 전부터 시험 종료 시까지 사료 급여를 중단하였다.

사) 대조구 설정

시험물질 무처리를 음성대조구로 하고, PCP-Na염(90%, Aldrich, USA)을 양성대조구로 하였다.

아) 약제 조제

시험물질이 고상이므로 칭량 후 증류수를 이용하여 현탁 후 처리하였다.

5) 결과 및 고찰

가) 생사어류 및 LC50값(48h, 96h)

이상의 시험결과로 본 시험의 시험물질인 ISE14 원제는 기초시험 투여농도인 10ppm으로 10마리의 잉어에 투여한 결과 시험기간(96h) 중 치사개체가 발견되지 않았다. 따라서 본 약제의 반수치사약량(LC50)은 48시간에서 > 10ppm, 96시간에서 > 10ppm으로 판명되었으며, 독성분류상 어독성 III급으로 사료된다.

나) 일반중독증상

처리군에서 시험물질 투여 후 96시간동안 관찰되지 않았다.

6) 요약

가) 일반중독증상은 처리군에서 시험물질 투여 후 48시간 경과시 수면 부상하는 개체가 관찰되었다.

나) 체중은 평균 $1.01 \pm 0.21\text{g}$, 전장은 평균 $4.08 \pm 0.26\text{cm}$ 이었다.

다) pH는 평균 7.03(최저 6.60 - 최고 7.31)이었고, DO는 평균 6.81(최저 5.55 - 최고 8.47)였다.

라) 시험기간의 평균수온은 22.8°C (최저 22.0°C - 최고 23.0°C)였다.

마) Total Hardness는 82.4 (Moderately Hard), Alkalinity는 70.1 (Moderately Hard)였다.

이상의 결과 본 시험물질의 LC50(48hrs)은 > 10ppm이었으며, 독성분류상 어독성Ⅲ급으로 확인되었다.

라. ISE14 30% 수화제의 마우스를 이용한 단회 투여 경구독성시험

ISE14 30% 수화제 (2.7×10^8 cfu/g) 에 대한 급성경구독성을 마우스(ICR계통)를 이용하여 1회 경구처리한 후 2주간 치사수, 일반중독증상, 체중 변화 및 부검소견을 관찰 조사한 결과는 다음과 같다.

1) 시험계

가) 동물종(계통) : Mou(ICR계)

나) 공급원

명 칭 : (주)샘타코

주 소 : 경기도 오산시 서량동 77-1번지

☎ 031 - 372 - 3636

대표이사 : 배 치 남

다) 시험계의 선택사유

농촌진흥청고시 제2005-7호 농약의 독성시험기준과 방법에 마우스를 사용하도록 되어있으며 ICR계통은 농약의 경구독성시험에 널리 사용되고 있어 기초 자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험결과의 해석 및 평가에 이용하는 것이 용이하다.

라) 순화 및 검역

동물을 입수한 후 암·수 각 10마리를 검역·부검하고, 나머지 동물은 동물실험실 사육환경 하에서 7일간 순화시키면서, 피모상태 및 건강을 확인한 후 건전한 개체를 선별하여 시험에 이용하였다.

2) 사육환경

가) 사육환경

본 실험의 환경은 온도 $21\pm 1^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $55\pm 5\%$, 조명시간 12시간(오전 8시 ~ 오후 8시)의 실험조건에서 사료와 음수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다.

나) 사육 상자

순화 및 시험기간 중 폴리카보네이트 사육 상자($270\times 220\times 130\text{mm}$)에 대팻밥 깔집 (삼육실험동물, 한국)을 깔아 대형 고압멸균기를 이용하여 멸균, 건조한 후 암·수 각각 5마리씩 사육 유지하였다.

다) 사료 및 음용수

사료 및 음수의 급여방법 : 사료는 실험동물용 고품사료(삼양사료(주), 한국)를, 음수는 상수도수를 대형 고압멸균기를 이용하여 멸균 후 자유 섭식 및 섭수 시켰다.

3) 관찰 및 조사항목

가) 일반중독증상 및 치사동물

투여당일은 투여 후 1시간에서 4시간까지 매시간, 익일부터는 매일 1회(오전 9시)씩 일반중독증상을 관찰하였고, 치사된 동물은 발견 즉시 꺼내서 부검을 실시하였다.

나) 체중측정

시험에 이용된 모든 동물에 대하여 투여 당일부터 D1, D3, D7, D10, D14일째 개체별 체중을 측정하고 그 결과를 통계 처리하여 분석하였다.

다) 부검

시험기간 종료 후 살아있는 개체를 이산화탄소(CO_2) 가스로 마취시킨 후 내부 장기의 육안적 이상 유무를 확인하고, 그 결과를 개체별 부검기록용지에 기록하였다.

4) 투여약량 수준설정 및 약제조제

가) 투여약량 설정

기초시험 투여약량인 5,000mg/kg에서 암·수 공히 시험을 수행하였다.

나) 투여약량 수준별 실험 동물수

실험 동물수는 농약의 등록시험기준과 방법(농촌진흥청고시 제2005-7호)에서와 같이 암·수 각 5마리를 이용하였고, 개체식별은 등부에 Picric acid를 이용하여 일련번호로 표시하였다.

다) 대조구의 설정

시험물질이 액상으로 투여약제 조제시 증류수에 잘 현탁되므로 용매 대조군을 제외한 증류수 대조군만을 두었다.

라) 용매의 선택 및 시험물질의 조제

시험물질이 증류수에 잘 현탁되는 관계로 용매는 증류수로 하였으며, 시험물질의 조제는 20ml의 Teflon Cap Vial을 이용하여 칭량한 후 증류수를 가하여 용해 및 현탁 시켜 조제하였다.

마) 투여액량의 설정

투여액량은 시험에 이용되는 마우스의 체중과 약액 투여량을 고려하여 투여액량 수준별 공히 10ml/kg(체중)으로 설정하였다.

5) 시험물질의 투여

가) 사료의 절식

투여개시 3 - 4시간 전부터 절식을 시킨 후 투여 3 ~ 4시간 후 사료 급이를 재개하였다.

나) 투여경로 및 투여방법

마우스용 경구 주사침(Zonde)을 이용하여 체중측정치를 기준으로 10mg/kg 용량을 경구로 위내에 삽입, 1회에 한하여 강제투여 하였다.

6) 결과 및 고찰

가) 치사동물 및 LD50값

이상의 시험결과로 본 시험의 시험물질인 ISE14 수화제는 기초시험

약량인 5,000mg/kg에서 시험기간(14일)동안 암수 모두 치사개체가 발견되지 않았다. 따라서 본 시험물질의 반수치사약량(LD50)은 > 5,000mg/kg으로 독성분류상 저독성을 나타내었다.

나) 일반중독증상

전 개체에서 시험기간(14일)동안 특이증상이 관찰되지 않았다.

다) 체중변화

시험에 이용된 동물의 시험개시D0, D1, D3, D7, D10, D14일째의 개체별 체중기록 결과로 보아 약제투여군은 무처리 대조군과 비교하여 유의차가 없었다.

라) 부검소견

육안적 부검소견으로 전 개체에서 특이한 이상 소견은 관찰되지 않았다.

7) 요약

가) 시험물질을 암·수 모두 기초시험 투여약량인 5,000mg/kg를 투여하여 관찰한 결과 시험기간(14일)중 치사개체가 발견되지 않았다.

나) 일반중독증상은 전 개체에서 시험기간(14일)동안 특이증상이 관찰되지 않았다.

다) 체중변화의 통계처리에 있어 체중측정 전 기간에 걸쳐 유의차가 인정되지 않았다.

라) 약제투여와 관련한 내부 장기에 대한 영향은 없었다.

이상의 결과 본 시험물질의 반수치사약량(LD50)은 > 5,000mg/kg으로 독성분류상 저독성으로 확인되었다.

마. ISE14 30% 수화제의 랫드를 이용한 단회 투여 경피독성시험

ISE14 30% 수화제 (2.7×10^8 cfu/g) 에 대한 급성경피독성을 SPF 랫드 (SD계통)를 이용하여 1회 경피 처리한 후 2주간 치사수, 일반중독증상, 체

중 변화 및 부검소견을 관찰 조사한 결과는 다음과 같다.

1) 시험계

가) 동물종(계통) : SPF Rat(SD계)

나) 공급원

명 칭 : (주)샘타코

주 소 : 경기도 오산시 서량동 77-1번지

☎ 031 - 372 - 3636

대표이사 : 배 치 남

다) 시험계의 선택사유

농촌진흥청고시 제2005-7호 농약의 독성시험기준과 방법에 랫드를 사용하도록 되어있으며 SD계통은 농약의 경피독성시험에 널리 사용되고 있어 기초 자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험결과의 해석 및 평가에 이용하는 것이 용이하다.

라) 순화 및 검역

동물을 입수한 후 암·수 각 10마리를 검역·부검하고, 나머지 동물은 동물실험실 사육환경 하에서 7일간 순화시키면서, 피모상태 및 건강을 확인한 후 건전한 개체를 선별하여 시험에 이용하였다.

2) 사육환경

가) 사육환경

본 실험의 환경은 온도 $21\pm 1^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $55\pm 5\%$, 조명시간 12시간(오전 8시 ~ 오후 8시)의 실험조건에서 사료와 음수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다.

나) 사육 상자

순화 및 시험기간 중 폴리카보네이트 사육 상자($420\times 260\times 180\text{mm}$)에 대팻밥 깔집 (삼육실험동물, 한국)을 깔아 대형 고압멸균기를 이용하여 멸균, 건조한 후 암·수 각각 5마리씩 사육 유지하였다.

다) 사료 및 음용수

사료 및 음수의 급여방법 : 사료는 실험동물용 고품사료(삼양사료(주), 한국)를, 음수는 상수도수를 대형 고압멸균기를 이용하여 멸균 후 자유 섭식 및 섭취 시켰다.

3) 관찰 및 조사항목

가) 일반중독증상 및 치사동물

투여당일은 투여 후 1시간에서 4시간까지 매시간, 익일부터는 매일 1회(오전 9시)씩 일반중독증상을 관찰하고, 치사된 동물은 발견 즉시 꺼내서 부검을 실시하였다.

나) 체중측정

시험에 이용된 모든 동물에 대하여 투여 당일부터 D1, D3, D7, D10, D14일째 개체별 체중을 측정하고 그 결과를 통계 처리하여 분석하였다.

다) 부검

시험기간 종료 후 살아있는 개체를 이산화탄소(CO₂) 가스로 마취시킨 후 내부 장기의 육안적 이상 유무를 확인하고, 그 결과를 개체별 부검기록용지에 기록하였다.

4) 투여약량 수준설정 및 약제조제

가) 투여약량 설정

기초시험 투여약량인 4,000mg/kg에서 암·수 공히 시험을 수행하였다.

나) 투여약량 수준별 실험 동물수

실험 동물수는 농약의 등록시험기준과 방법(농촌진흥청고시 제2005-7호)에서와 같이 암·수 각 5마리를 이용하였고, 개체식별은 미부에 유성 매직을 이용하여 일련번호로 표시하였다.

다) 대조구의 설정

시험물질이 액상으로 투여약제 조제시 증류수에 잘 현탁되므로 용매 대조군을 제외한 증류수 대조군만을 두었다.

라) 용매의 선택 및 시험물질의 조제

시험물질이 증류수에 잘 현탁되는 관계로 용매는 증류수로 하였으며, 시험물질의 조제는 20ml의 Teflon Cap Vial을 이용하여 칭량한 후 증류수를 가하여 용해 및 현탁시켜 조제하였다.

마) 투여액량의 설정

투여액량은 시험에 이용되는 랫드의 체중과 약액 투여량을 고려하여 투여액량 수준별 공히 5ml/kg(체중)으로 설정하였다.

5) 시험물질의 투여

가) 사료의 절식

경피독성시험의 투여경로상 절식시간은 따로 두지 않았다

나) 투여경로 및 투여방법

시험개시 전 약제처리를 위한 공시동물의 등부위를 동물용 제모기를 이용하여 체표면적의약 10%를 제모하고, 조제된 공시약제를 체표에 골고루 바른 후 약제유실을 방지하기 위하여 임상용 거즈로 고르게 감고 비자극성 테이프로 고정시켜 주었다. 약제처리 24시간이 경과한 후 도포물을 제거하고, 한편 피부에 남아 있는 공시약제를 증류수를 이용하여 잘 닦아주었다.

6) 결과 및 고찰

가) 치사동물 및 LD50값

이상의 시험결과로 본 시험의 시험물질인 ISE14 수화제는 기초시험 약량인 4,000mg/kg에서 시험기간(14일)동안 암수 모두 치사개체가 발견되지 않았다. 따라서 본 시험물질의 반수치사약량(LD50)은 > 4,000mg/kg으로 독성분류상 저독성을 나타내었다.

나) 일반중독증상

전 개체에서 시험기간(14일)동안 특이증상이 관찰되지 않았다.

다) 체중변화

시험에 이용된 동물의 시험개시D0, D1, D3, D7, D10, D14일째의 개체별 체중기록 결과로 보아 약제투여군은 무처리대조군과 비교하여 유의차가 없었다.

라) 부검소견

육안적 부검소견으로 전 개체에서 특이한 이상소견은 관찰되지 않았다.

7) 요약

가) 시험물질을 암·수 모두 기초시험 투여약량인 4,000mg/kg를 투여하여 관찰한 결과 시험기간(14일)중 치사개체가 발견되지 않았다.

나) 일반중독증상은 전 개체에서 시험기간(14일)동안 특이증상이 관찰되지 않았다.

다) 체중변화의 통계처리에 있어 체중측정 전 기간에 걸쳐 유의차가 인정되지 않았다.

라) 약제투여와 관련한 내부장기에 대한 영향은 없었다.

이상의 결과 본 시험물질의 반수치사약량(LD50)은 > 4,000mg/kg으로 독성분류상 저독성으로 확인되었다.

바. ISE14 30% 수화제의 잉어를 이용한 단회 투여 급성독성시험

ISE14 30% 수화제 (2.7×10^8 cfu/g) 에 대한 급성어독성을 잉어를 이용하여 96시간 동안 생사수, 일반중독증상을 관찰하고 체중 및 전장을 조사한 결과는 다음과 같다.

1) 시험계

가) 공시어 : 잉어(Cyprinus carpio)

나) 공급원

명 칭 : 경상북도 수산자원개발연구소 민물고기연구센터

주 소 : 경상북도 울진군 근남면 행곡리 228번지

☎054 - 783 - 9413

기관장 : 한 중 대

다) 시험계의 선택사유

농촌진흥청고시 제 2005 - 7호 농약의 독성시험기준과 방법에 급성어독성시험의 경우 시험어류는 잉어를 사용하도록 되어 있으며, 농약의 어독성시험에 널리 사용되고 있어 기초 자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험결과와 해석 및 평가에 이용하는 것이 용이하다.

라) 순화 및 사육

시험어류는 분양 후 약 2주간 실험실내 환경 하에서 순화 사육시켰다.

2) 사육환경

가) 사육환경

본 시험의 환경은 실내에서 물의 순화, 여과를 시킬 수 있는 유리 수조장치를 이용, 시험용수는 지하수를 이용하여 수온은 22 ~ 24℃, 조도는 200 - 300Lux의 범위 내에서 사육, 순화시켰다.

나) 사료 급여

사료는 잉어용 부상성 고형사료(부산 관상어용 식품, 한국)를 1일 1회 급여 하였다.

3) 관찰 및 검사항목

가) 일반중독증상 및 생사율

처리당일은 1시간에서 4시간까지는 매시간, 그 이후에는 24, 48, 72, 96시간 간격으로 일반중독증상 및 생사수를 관찰 조사하였다.

나) 체중측정 및 크기측정

시험 중 치사된 개체는 발견 즉시 꺼내어 체중 및 전장을 측정하였으며, 시험 종료 후 살아 남은 개체는 시험 종료시 체중과 전장을 측정하였다.

4) 시험농도 수준설정 및 약제조제

가) 시험농도 설정

기초시험 투여농도인 10ppm에서 시험을 수행하였다.

나) 시험용 수조

원통형의 유리제품 10 L ($\phi 24 \times 30$ cm)용기를 사용하였다.

다) 시험어류의 크기 및 시험어류 수

잉어의 크기는 전장 5cm 정도의 것으로 선별하였으며, 수조당 시험 어류수는 5마리를 수용하고, 시험농도 수준당 2개의 수조를 사용하였다.

라) 시험용수 및 수온

시험용수는 지하수를 72시간 이상 정제시켰다가 사용하였으며, 수온의 조절은 항온수조 내에 시험용 유리 수조를 담겨서 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 시험기간 동안 유지시켰다.

마) 산소공급

시험 기간중 시험 중인 수조 내에 인위적인 산소공급은 시키지 않았다.

바) 사료 급여

시험개시 48시간 전부터 시험 종료 시까지 사료 급여를 중단하였다.

사) 대조구 설정

시험물질 무처리를 음성대조구로 하고, PCP-Na염(90%, Aldrich, USA)을 양성대조구로 하였다.

아) 약제 조제

시험물질이 고상이므로 칭량 후 증류수를 이용하여 현탁 후 처리하였다.

5) 결과 및 고찰

가) 생사어류 및 LC50값(48h, 96h)

이상의 시험결과로 본 시험의 시험물질인 ISE14 수화제는 기초시험

투여농도인 10ppm으로 10마리의 잉어에 투여한 결과 시험기간(96h) 중 치사개체가 발견되지 않았다. 따라서 본 약제의 반수치사약량(LC50)은 48시간에서 > 10ppm, 96시간에서 > 10ppm으로 판명되었으며, 독성분류상 어독성 III급으로 사료된다.

나) 일반중독증상

처리군에서 시험물질 투여 후 96시간동안 관찰되지 않았다.

6) 요 약

가) 일반중독증상은 처리군에서 시험물질 투여 후 48시간 경과시 수면 부상하는 개체가 관찰되었다.

나) 체중은 평균 $1.01 \pm 0.21\text{g}$, 전장은 평균 $4.08 \pm 0.26\text{cm}$ 이었다.

다) pH는 평균 7.03(최저 6.60 - 최고 7.31)이었고, DO는 평균 6.81(최저 5.55 - 최고 8.47)였다.

라) 시험기간의 평균수온은 22.8°C (최저 22.0°C - 최고 23.0°C)였다.

마) Total Hardness는 82.4 (Moderately Hard), Alkalinity는 70.1 (Moderately Hard)였다.

이상의 결과 본 시험물질의 LC50(48hrs)은 > 10ppm이었으며, 독성분류상 어독성 III급으로 확인되었다.

5. 대량생산을 통한 시제품 제작

가. ISE14 균주의 대량배양

ISE14 균주의 대량배양은 경북 안동소재 경북바이오산업연구원의 산업용 발효기를 이용하였다. 기 시험에서 확립된 배양조건으로 단계적인 배양을 통해 scale up을 하였다. 50L 발효조에서 배양 17시간 만에 500L 발효조로 배양액을 transfer 하였으며, 500L 발효조에서 12시간의 배양을 통해 9×10^9 cfu/ml의 배양액을 얻었다. 이후 연속 원심분리기(TOMOE ASM 260PL)를 통해 cell을 회수하였다. 회수한 cell에 멸균된 12% skim milk를 섞은 뒤 동결건조기(PVTFD 500R, 일신랩)를 이용하여 고상의 동결건조 원분을 생산하였다. 동결건조의 선반 가열 sequence는 표-9와 같다.

표-9. ISE14 원제의 동결건조 선반가열 sequence

설정단계	SV1	SV2	SV3	SV4	SV5	SV6	SV7	SV8	SV9	SV10
온도 (°C)	-20	-5	5	10	35	35	35	35	35	35
설정시간 (min)	100	100	100	100	990	990	990	990	990	990
진행시간 (min)	0	0	0	0	0	0	371	990	990	990

나. 시제품 제작

대량배양을 통한 얻어진 고상의 원분을 갖고 기 시험을 통해 확립된 처방조건 대로 ISE14 30% WP를 제작하였다. 생산된 시제품의 생존균수는 2.7×10^8 cfu/g 이었다.

6. 생물약효시험 및 포장시험

가. *in vivo* 시험에서 기본제제의 활성 검정

ISE14 균주 기본제제의 활성검정은 (주) 경농 중앙연구소에 위치한 유리온실

에서 실시되었다. 고추의 품종은 금탑이며 유리온실에서 8주간 육묘시킨 것으로 처리구당 20pot 3반복으로 시험하였다. 약제처리는 ISE14 WP 기본제제 500배, 1,000배, 대조약제로는 디메쏘모르프 수화제(25%, 동방아그로) 1000배 희석액을 주당 200ml 관주 처리하였다. 약제 처리 7일 후 고추 역병균의 유주자를 접종하고 14일후 이병주율을 조사하였다(표-10).

표-10. 온실에서의 ISE14 수화제 고추역병 약제 방제 효과시험

약 제 명	희석배수 및 사용량(/10a)	이병주율(%)				유의차 (DMRT)	방제가 (%)
		A	B	C	평균		
1 ISE14 WP	500	24.8	36.6	26.6	29.3	b	51.3
2 ISE14 WP	1,000	42.3	34.4	29.8	35.5	b	41.1
3 디메쏘모르프 수화제(대조)	1,000	12.6	8.8	15.4	12.3	a	79.6
4 무처리	-	56.8	63.4	60.6	60.3	c	

C.V.(%) ----- (16.4)

무처리 발병율은 60.3%로 약효판정 하기에 적합할 정도로 발병되었다. ISE14 WP 기본제제의 방제가는 500배에서 51.3%, 1000배에서 41.1%로서 대조약제인 디메쏘모르프 수화제 79.6%에 미치지 못하지만 생물농약 등록기준인 50% 근처에서 방제 활성이 나타나고 처리간 유의차가 있는 것으로 나타나 ISE14 WP 기본제제는 고추역병에 대한 방제활성이 있는 것으로 나타났다.

나. 소포장실험을 통한 기본제제의 활성검정

ISE14 WP 기본제제의 소포장 활성검정은 (주) 경농 중앙연구소 내의 역병 검정용 간이 포장에서 실시되었다. 고추의 품종은 금탑이며 4엽기의 고추 유묘를 역병 검정용 간이 포장에 정식하였다. 정식 2주후에 ISE14 WP 기본제제 500배, 1000배, 대조약제로는 디메쏘모르프 수화제(25%, 동방아그로) 1000배 희석액을 주당 200ml 관주 처리하였다. 약제 처리 7일 후 고추 역병균의 유주자를 접종하고 14일후 이병주율을 조사하였다(표-11).

표-11. 역병 검정용 간이 소포장에서의 ISE14 수화제 약제 방제 효과시험

약효 시험 : 고추 역병 약제방제 효과시험(소포장)

약 제 명	희석배수 및 사용량(/10a)	이병주율(%)				유의차 (DMRT)	방제가 (%)
		A	B	C	평균		
1 ISE14 WP	500	22.2	37.4	56.4	38.7	a b	49.0
2 ISE14 WP	1,000	62.8	28.2	49.2	46.7	a b	38.3
3 디메쏘모르프 수화제(대조)	1,000	8.6	6.4	14.8	9.9	a	83.5
4 무처리	-	78.2	80.4	68.8	75.8	c	

C.V.(%) ----- (32.2)

무처리 발병율은 75.8%로 약효관정 하기에 적합할 정도로 발병되었다. ISE14 WP 기본제제의 방제가는 500배에서 49.0%, 1000배에서 38.3%로서 대조약제인 디메쏘모르프 수화제 83.5%에 미치지 못하지만 생물농약 등록기준인 50% 근처에서 방제 활성이 나타나고 처리간 유의차가 있는 것으로 나타나 ISE14 WP 기본제제의 소포장 고추역병 방제활성은 있는 것으로 나타났다(그림-12).



포장 조성 및 고추 정식 ISE14 WP 대조 무처리

그림-12. 역병 검정용 간이 포장에서의 역병 방제 시험사진

다. 포장시험에서 시제품의 활성 검정

ISE14 30% WP 시제품의 포장 활성검정은 경북 의성의 고추 역병 다발생 노지 포장에서 진행되었다. 고추 품종은 재래종이었으며, 3반복 난괴법으로 처리구 당 300주로 시험포의 구획을 나누었다. 약제처리는 2007년 6월 12일, 6월 21일, 7월 2일 3차례에 걸쳐 ISE14 WP 500배, 대조약제로는 디메쏘모르프 수화제(25%, 동방아그로) 1,000배 희석액을 지체부에 200ml 씩 관주처리 하였다. 약효 조사는 2차례에 걸쳐 실시되었으며, 최종약제 처리 8일, 29일 후에 실시되었다(표-12).

표-12. 역병 다발생 포장에서의 ISE14 수화제 약제 방제 효과시험

약효 시험 : 고추 역병 약제방제 효과시험(역병 다발생 포장) - 1차 조사; 최종약제처리 8일 후

약 제 명	희석배수 및 사용량(/10a)	이병주율(%)				유의차 (DMRT)	방제가 (%)
		A	B	C	평균		
1 ISE14 WP	500	23.9	1.3	9.6	11.6	a	36.4
2 디메쏘모르프 수화제(대조)	1,000	5.1	13.0	7.1	8.4	a	53.9
3 무처리	-	19.8	1.6	33.3	18.2	a	

C.V.(%) ----- (92.1)

약효 시험 : 고추 역병 약제방제 효과시험(역병 다발생 포장) - 2차 조사; 최종약제처리 29일 후

약 제 명	희석배수 및 사용량(/10a)	이병주율(%)				유의차 (DMRT)	방제가 (%)
		A	B	C	평균		
1 ISE14 WP	500	39.4	16.3	30.1	28.6	a	16.5
2 디메쏘모르프 수화제(대조)	1,000	20.6	18.1	9.4	16.0	a	53.2
3 무처리	-	40.7	21.8	40.2	34.2	a	

C.V.(%) ----- (45.3)

무처리 발병율은 1차 약효 조사시 18.2%, 2차 약효 조사시 34.2%로 약효를 관정하기에 충분하게 발병하였다. 1차 약효조사 결과 ISE14 처리구의 방제가는 36.4%로 생물농약 등록기준인 50%에 미치지 못하였다. 2차 약효조사는 1차 약효

조사 때보다 방제가가 떨어져 16.5%로 나타났다(그림-13).



ISE14

디메쏘모르프 수화제

무처리

그림-13. 역병 다발생 포장에서 ISE14 수화제의 약제 방제 효과시험 사진

이와 같은 결과는 ISE14 WP 제제가 포트나 간이 포장시험에서와 같이 길항균주를 먼저 처리하고 그 이후에 병원균을 접종하는 방식이 아닌 조건에서는 방제 활성이 떨어진다는 것을 의미하여, 고추 역병균이 잠재적으로 존재하는 토양(역병 다발생 또는 이전에 역병이 발생하였던 포장)에 처리할 경우 고추 역병에 대한 방제효과를 기대하기 어려울 것으로 판단된다. 또한 시간이 지남에 따라 ISE14 처리구의 이병주율이 11.6%에서 28.6%로 높아지는 것으로 보아 ISE14 균주의 토양내 정착 기간이 짧을 것으로 판단된다. 이러한 문제점을 해결하기 위해서는 ISE14 WP 제제를 고추 역병 발생 초기 보다 이전 시기부터 처리해야 할 것이며, 통상적으로 3 ~ 4회 약제 처리하는 것에 비해 보다 많은 처리가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 1차년도 연구개발의 목표 달성도

제 1 세부과제 : 내생·근권세균 이용한 생물적 방제용 미생물 살균제 개발

가. 기선발된 내생·근권 세균(CCR04, CCR80, GSE09, ISE13)의 고추 역병에 대한 포장 검정

순차적인 선발 방법인 radicle assay, seedling assay와 고추 성체식물 실험을 통하여 토양에서 분리한 내생·근권 세균이 고추 역병에 대해 방제 효과 검정 및 선발하였다. 포장에서 일반 농약처리 및 기선발 내생·근권 세균 첨가 후 고추 병의 발병 억제 효과 조사를 하기 위하여 radomize block design을 통한 4block으로 포장실험 수행하였다. 포장 실험 수행의 결과 순차적인 선발 방법을 통한 기선발 내생·근권세균이 고추 역병에 대하여 뚜렷한 병억제 효과가 있었으며, 감염된 고추 뿌리에서 *P. capsici*의 감염율도 병억제 효과 결과와 유사하였다. 또한 내생·근권세균을 처리한 토양의 샘플을 취하여 토양 내 미생물의 개체군 밀도 조사한 결과 인위적으로 처리한 길항 세균이 토착 미생물의 수에 영향을 주지 않았다.

나. 기선발된 내생·근권 세균의 생리, 분자생물학적 분류, 동정

길항 세균의 생리, 분자생물학적 특성을 이용하여 type strain과 비교하여 분류 및 동정하기 위하여, 생리,생화학적 실험, 16S rRNA sequence 분석, Biolog와 FAME analysis를 이용하여 선발된 내생·근권세균의 동정을 수행하였다. 적정 생육 조건 및 효소의 생성 등의 특성을 이용하여 Biochemical test와 16S rDNA sequence analysis를 통하여 기존의 data base와 비교하여 분자생물적으로 계통도 분석등을 통하여, CCR04와 CCR80균주는 *Pseudomonas corrugata*, GSE09는 *Flavobacterium* sp., ISE13은 *Lysobacter enzymogenes*, ISE14는 *Chryseobacterium indologenes*로 동정되었다.

협동과제 : 생물적 방제용 미생물제제의 상업화연구

가. 선발된 균주에 대한 기초배양시험

기초배양(Type culture)을 위하여 complex 배지에서 배양관련 검토data 확보하였으며, 안정성확인을 위하여 wild type균주의 산업화 가능성 검토data 확보하였다. Type culture을 통한 배양특성조사에서 optical Density, Colony Forming Unit측정하였으며, 체계대배양 시 배양특성의 변화검토하여 균주의 denaturation 가능성관찰하였다.

나. 길항미생물 원제확보

배양액 후처리를 통한 미생물원제 생산법 확립하기 위하여, 배양, 세포분리, pellet 제작, 방법을 고안하였으며, 배양액을 제형화 원제(고상)으로 만드는 방법 개발하여 온도, 시간, shaking rpm 등의 배양조건을 확립하였다.

다. 상용화를 위한 예비시험

제형의 생존확인 시험을 위하여 예비제형의 생존율 변화검정하였고, 부제별 영향 검토를 하여 미생물농약의 부재에 따른 생존율에 대한 영향비교를 하였다. 또한, 경시변화시험으로 50℃가열안전성 시험에서 생존율(cfu/g)변화측정, 부제별 조합에 따른 생존율 변화측정, 증량제, 계면활성제 조합에 관하여 수행하였다.

2. 2차년도 연구개발의 목표 달성도

제 1 세부과제 : 내생·근권세균 이용한 생물적 방제용 미생물 살균제 개발

가. 기선발된 내생·근권세균의 고추 역병에 대한 2차년도 포장검정

내생·근권세균의 병방제효과 기준 설정 및 방제가 결정을 하였으며, 상용 농약 metalaxyl 과의 내생·근권세균 역병 방제 효과 능력 비교 검정하였다. 수행 결과 포장에서 내생·근권세균의 현저한 고추 역병 방제 효과가 있음을 검정하였다.

나. 선발된 내생·근권 세균의 고추병에 대한 병 억제 작용 기작 연구

선발 내생·근권세균이 처리된 토양에서 미생물상, 총 진균 및 세균, 등의 미생물상 조사를 수행하였으며, 그 결과 도입된 내생·근권세균이 토양내 존재하는 토착 미생물의 수에 영향을 주지 않았다. fluorescent diacetate analysis에 의한 토양 미생물 및 내생·근권세균의 활성 평가를 수행한 결과 선발 내생·근권세균은 토양의 미생물 활성을 높게 유지하고 있는 것이 확인되었다. 선발 내생·근권세균의 spontaneous rifampicin resistance mutant 제조 및 이를 이용한 식물체 근권정착력 조사한 결과 일정 수준의 개체군을 근권 토양에서 유지하였으며, 선발 내생·근권세균 중 ISE13 균주는 antibiotics를 생성하였으며, 또한 세포외부로 proteinase와 chitinase를 분비하였다. 또한, 선발된 내생·근권세균은 siderophore, HCN 형성과 swarming activity 등에 의한 병억제 기작을 가지고 있었다.

다. 내생·근권 세균을 처리한 고추에서 길항세균의 식물근권 정착 능력의 연구
고추 근권에 내생·근권세균 처리 후 시간 별로 뿌리를 채취하여 근권에서의 미생물상 조사한 결과, 높은 밀도로 고추 뿌리 표면에서 정착하고 있는 것이 확인되었다. 또한 전자 현미경을 통하여 채취한 뿌리 조직에서 현식물 근권에서 선발 내생·근권세균 CCR04균주의 존재 형태 관찰한 결과, 점액질의 물질을 형성하면서 군락을 형성하여 뿌리 표면에 존재하고 있는 것이 관찰되었다.

라. 탄소원 첨가에 의한 생물학적 방제 효과의 증진 연구

선발된 내생·근권세균의 생물적 방제 효과 증진을 위한 연구를 수행하기 위하여, 생물학적 방제 균주에 의해서만 잘 이용되는 탄소원 선발 및 방제 효과 증진을 평가하였다.

협동과제 : 생물적 방제용 미생물제제의 상업화연구

가. Scale up 생산을 위한 pilot 배양

1차 년도에 확보된 미생물 기초배양 정보를 pilot scale에 적용하여 상용화 가능성 여부를 검토하기 위하여 미생물 growth에 의한 생존 미생물수 뿐만 아니라 생물적 방제에 적용되는 factor가 최적화될 수 있게 배양법을 확립하였다.

나. 생물농약 등록을 만족하는 제형화기술의 개발

미생물농약이 요구하는 생존하고 있는 유효미생물의 밀도를 일정수준으로 유지시켜 주는 제형화기술의 개발을 위하여 각각의 균주의 특성에 따른 제품의 경제성을 확보하기 위한 최소한의 실용성 기준을 설정하고 이 규격에 맞는 제형의 개발하였다.

다. 생물농약 등록을 위한 원제독성시험

생물농약으로 등록하기 위한 등록법상의 시험법 확립하였으며, 독성시험 tier 1 수행 후 시험성제제출 면제항목 검토하였다.

3. 3차년도 연구개발의 목표 달성도

제 1 세부과제 : 내생·근권세균 이용한 생물적 방제용 미생물 살균제 개발

가. 탄소원 첨가에 의한 생물학적 방제 효과의 증진 연구

선발된 내생·근권세균의 생물적 방제 효과 증진을 위한 연구를 수행하였으며, 생물학적 방제 균주에 의해서만 잘 이용되는 탄소원 선발하였다. 그 후 탄소원 첨가에 의한 생물학적 방제 효과의 증진에 관하여 연구를 수행하였다.

나. 내생·근권세균의 고추역병균과의 경쟁에 대한 연구

내생·근권세균의 rifampicin mutant 균주를 제작하여 고추 역병균과의 근권에서의 population을 평가하였으며, 근권에서 내생·근권세균의 개체군은 초기에 감소한 후 일정 수준을 유지한 반면, 고추 역병균의 밀도는 지속적으로 감소하였다.

협동과제 : 생물적 방제용 미생물제제의 상업화연구

가. 대량배양을 통한 시제품제작

2차 년도 수행된 pilot 생산법 및 제형화기술을 바탕으로 대량배양을 수행하고 이에 따른 시제품을 생산하였으며, 상업화에 필요한 약효 및 경제성을 확보할 수 있도록 제작하였다.

나. 시제품에 대한 독성시험

대량생산을 통해 생산된 시제품에 대한 독성평가를 수행하였으며, 제품독성 tier 1 수행하여 상업화 가능성확인하였다.

다. 생물농약 등록시험에 준하는 포장시험

생산된 시제품이 등록시험의 요건을 만족하는지에 대한 포장시험을 통해 실제 상업화 됐을 때의 경제성을 판단하였다.

4. 최종평가의 착안점 및 관련 분야에의 기여도

본 연구에서 최종평가의 착안점 및 척도는 가) 방제활성도 (25), 나) 안정성: 1-2회 처리로 고추역병 방제가능성 (25), 다) 환경평가: 기존살균제와 비교 (25), 라) 대량생산 경제성과 시장성: Lab scale 배양비용의 1./10이하와 실용성 및 경쟁력 (25)에 두었다. 본 연구를 통하여 얻은 내생·근권세균은 높은 방제활성도를 가졌으며, 1-2회의 내생·근권세균의 관주처리와 정식시 1회의 root-dipping 처리에서도 모두 우수한 방제 활성과 안정성을 나타내었다. 또한 토착 미생물에 영향을 주지 않았으며, 그 외 환경평가에서도 독성을 나타내지 않았다.

본 연구를 통하여 생물 농약 기술 및 체계가 축적되었고, 고추 역병이 효율적으로 제어될 것이다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구 결과를 바탕으로 주관기관에서 선발한 내생·근권 세균을 고추 역병에 대한 길항 세균으로써 논문 및 특허 균주 기탁을 완료하였으며, 특허를 출원하고자 한다.

논문 게재 (4건; SCI 2편, SCIE 2편)

1. (SCIE) Sang, M. K., Oh, J. Y., and KIM, K. D. 2007. Root-dipping application of antagonistic rhizobacteria at transplanting for the control of Phytophthora blight of pepper under field conditions. The Plant Pathology Journal 23:109-112.
2. (SCI) Kim, H. S., Sang, M. K., Jeun, Y.-C., Hwang, B. K., and KIM, K. D. 2008. Sequential selection and efficacy of antagonistic rhizobacteria for controlling Phytophthora blight of pepper. Crop Protection 27:436-443.
3. (SCI) Sang, M. K., Chun, S.-C., Kim, K. D. Biological control of Phytophthora blight of pepper by antagonistic rhizobacteria selected from a sequential screening procedure. Biological Control (2008), doi:10.1016/j.biocontrol.2008.03.017
4. (SCIE) Kim, Y. S., Chung, I.-M., Sang, M. K., Ku, H.-M., Kim, K. D., and Chun, S.-C. 2008. Enhancement of biocontrol activity of antagonistic *Chryseobacterium* strain KJ1R5 with amendment of carbon sources against *Phytophthora capsici*. The Plant Pathology Journal 24: (in press).

학술 대회 발표 (7건)

1. Sang, M. K. Lee, S. Y., and Kim, K. D. 2006. Field tests of antagonistic rhizobacteria for plant growth-promoting effects and biocontrol of *Phytophthora* blight of pepper. *The Plant Pathology Journal* 22, 399.
2. Sang, M. K., Chun, S.-C., and Kim, K. D. 2006. Extracellular hydrolytic enzyme activities of different bacterial strains antagonistic to *Phytophthora capsici*, the oomycete pathogen of *Phytophthora* blight of pepper. *The Plant Pathology Journal* 22, 400.
3. Kim, Y.-S., Kim, J. -S., Kim, K. D., Won, H.-Y., and Chun, S.-C. 2006. Utilization of different carbon sources by *Phytophthora capsici* and endophytic *Chryseobacterium* sp. ISE14 as a biological control agent of *Phytophthora* rot of pepper. *The Plant Pathology Journal* 22, 398-399.
4. Kim, Y. S., Kim, N. G., Kim, H. M., Jang, C., and Hwang, I. C. 2006. Culture and formulation of rhizobacteria as biocontrol agents against *Phytophthora* blight of pepper. *The Plant Pathology* 22, 396.
5. Sang, M. K., and KIM, K. D. 2006. Evaluation of antagonistic rhizobacteria as biocontrol agents to *Phytophthora* blight of pepper in the field. *The Plant Pathology Journal* 22:183-184.
6. Sang, M. K., Chun, S.-C. and KIM, K. D. 2007. Growth promotion and biocontrol of *Phytophthora* blight of pepper plants by application of antagonistic rhizobacteria. *The Plant Pathology Journal* 23:325.
7. Sang, M. K., and KIM, K. D. 2007. Characterization of antagonistic rhizobacteria in relation to the colonization of pepper roots against infection of *Phytophthora capsici*. *The Plant Pathology Journal* 23:329.

국내 세미나 발표 (1건)

1. “환경 친화적 식물병 생물적 방제” 심포지움 (제주대학교, 2006년 8월 18일)

특허 균주 기탁 (5건)

1. *Pseudomonas corrugata* CCR04 (KACC 91366P)
2. *Pseudomonas corrugata* CCR80 (KACC 91367P)
3. *Flavobacterium* sp. GSE09 (KACC 91368P)
4. *Lysobacterium enzymogenes* ISE13 (KACC 91369P)
5. *Chryseobacterium indologenes* ISE14 (KACC 91370P)

국내 일반 기탁 균주 (3건)

1. *Chryseobacterium* sp. KJ1R5 (KACC13029)
2. *Chryseobacterium wanjuense* KJ9C8 (KACC13030)
3. *Bacillus luciferensis* KJ2C12 (KACC13031)

특허 출원 완료 (5건)

출원 번호	발명의 명칭	출원일
1. 특허 출원 제 10-2008-0042068 호	고추 역병에 대한 길항 효과를 나타내는 토양 근권세균 플라보박테리움 균주 GSE09	2008.05.06
2. 특허 출원 제 10-2008-0042069 호	고추 역병에 대한 길항 효과를 나타내는 토양 근권세균 크라이세오박테리움 인돌로제네스 ISE14	2008.05.06
3. 특허 출원 제 10-2008-0042070 호	고추 역병에 대한 길항 효과를 나타내는 토양 근권세균 슈도모나스 코루가타 CCR04	2008.05.06
4. 특허 출원 제 10-2008-0042071 호	고추 역병에 대한 길항 효과를 나타내는 토양 근권세균 라이조박터 엔지모제네스 균주 ISE13	2008.05.06
5. 특허 출원 제 10-2008-0042073 호	고추 역병에 대한 길항 효과를 나타내는 토양 근권세균 슈도모나스 코루가타 CCR80	2008.05.06

2007년 한국식물병리학회 우수 포스터상 수상

"Recognition of Excellence KSPP-2007 Poster Competition" at the KSPP-2007 Conference held at SunChon, Korea on October 26, 2007

○ 내생·근권세균의 고추의 토양병과 공기 전염성 병의 방제를 위한 종자 및 유묘 처리 기술이 개발되며, 길항균을 증식시킨 유기물 첨가 기술이 개발될 것이다. 또한 생물 농약 처리가 매우 편리한 제제화 기술이 개발될 수 있을 것이다.

○ 친환경적 고추 역병 방제는 국내 뿐 아니라 세계 여러 국가에서 개발에 힘을 기울이고 있어 공동연구와 같은 국제교류가 활발히 이루어질 수 있다. 또한 전 세계적으로 고추병에 대한 환경친화적 방제제의 상품화는 거의 이루어져 있지 않은 것을 감안, 상품화 성공시 제품 및 기술의 수출도 기대된다. 유기합성농약 사용을 줄일 수 있어 농약의 잔류문제나 병원체의 약제 저항성 문제를 해결할 수 있으며, 친환경적 식물병 방제는 국내 뿐 아니라 세계 여러 국가에서 개발에 힘을 기울이고 있어 공동연구와 같은 국제교류가 활발히 이루어질 수 있다. 개발된 내생·근권세균은 특허로써 기술을 보호하여 향후 지적 재산권으로 활용될 수 있을 것이며, 생물농약의 입상 제제화 기술 개발은 생물농약 벤처 회사 등에 기술이전이 될 것이다. 본 연구를 통하여 획득된 연구 기술은 배출된 연구 인력에 의하여 우리나라 첨단 농업기술개발 인적, 지적 자원으로 활용 될 수 있을 것이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보

1. 생물 농약의 개발 상황

화학농약이 갖는 단점을 보완할 수 있다는 장점이 있으나 현재의 생물농약의 세계시장은 미미하지만, 이러한 기술은 20-30년 전부터 개발이 시도되었으며 최근 3년간 총 104개의 제품이 개발되었고 이중 42개가 상품화되었다. 생물농약은 미생물 자체를 직접이용, 미생물의 대사산물 이용, 곤충의 호르몬 등의 천연물 이용 방법이 있다. 또 용도별로 구분해 보면 살균성, 상충성, 그리고 제초성 생물농약으로 구분된다. 미생물 농약으로 Bt (*Bacillus thuringiensis*) 제품이 가장 큰 비중을 차지하고 있다. 여기에는 대량배양기술과 제제 기술이 유효한 미생물의 발견 못지 않게 중요한 핵심기술이다.

2. 국외의 생물 농약의 개발 상황

전세계적으로 2006년을 기준으로 biopesticide로 등록된 예는 아래의 표와 같다. 이 중 식물병을 방제하기 위하여 우리나라에서 등록된 것은 단 2건에 불과하였다. 그러므로 전세계적인 추세에 비추어 국내의 생물 농약 원재 확보 및 개발 투자가 시급한 실정이다.

미생물농약이 새로운 발전단계에 접어드는데 기반이 되었다. 2001년부터 시작된 국가발전개혁위원회의 생물기술 산업화프로젝트 가운데 생물농약 산업화개발이 포함되어 있었다. 제1생물농약 산업화 세부항목으로 진균제제 산업화가 채택되었으며 지원 금액은 8760만위엔에 달하였고 길림연변춘퇴생물제품유한공사에서 담당하여 진행해 왔다. 생물농약산업화제품(연간 생산 1000만위엔 이상)은 2001년에 13개가 되었다. 그 제품으로는 Jinggangmycin, Bt, Agricultural Antibiotic 120, Avermectin, Gibberemycin, Streptomycin, Matrine, Azadirachtin, HaNPV, Polyoxins, Zhongshengmycin, Ningnanmycin이 있으며, 중국과학원 무한바이러스연구소에서는 최초로 HaNPV의 전체서열을 분석하고 이 가운데 egt 서열분석 결과는 국제 유전자DB에 등록되었다. Avermectin을 화학적으로 개조한 Emamectin benzoate는 Avermectin의 살충작용보다 10배 이상 강화되었으며 독성은 7배 이하로 떨어뜨렸다. 5개의 Bt 신형제품이 검증에 통과하여 2001년 말까지 중국에서는 Bt와 관련하여 12개의 제품이 출시되었다. Lepidoptera, Coleoptera의 유전자 변형 Bt WG001과 재조합바이러스 NaSNPVegt-GFP+와 VAcPhBtPE는 시험 생산과 환경방출허가를 받았다. 진균살충제분야에서도 *Verticillium chlamydozporium*이 등록되었는데 이는 연초(담배)뿌리에서 *Meloidogyne* spp를 제거하는데 효과가 있다. 이렇듯 중국에서도 생물 농약에 대한 관심과 투자가 지속되고 있다.

3. 국내 생물 농약 동향

우리 나라에서도 1987년에 물질특허의 도입으로 인하여 기존물질의 복사품에 의한 신의, 농약의 판매는 곧 한계가 올 것이라는 절박감이 닥쳐왔었다. 일본의 경우와 달리 국내 농약개발은 국내 시장을 목표로 연구개발비를 투자하기에 국내 농약 시장이 너무 좁다는 불리한 여건 하에서도 세계시장을 목표로 연구개발을 산업체, 학계, 그리고 출연연구소 등이 뭉쳐 이에 관련된 연구를 시작하였다. 그러나 신물질의 연구개발은 많은 비용과 긴 시간, 그리고 많은 노력이 필요하고 무엇보다도 신물질 개발에서 필수적인 기반시설 및 기술력이 필요한 것이다. 신

물질 개발에 관련된 기술은 선진국에서 노하우로 철저히 감추어진 기술이었기 때문에 국내에서는 전무한 상태에서 그에 관한 연구를 시작할 수밖에 없었다. 그 후 수년 동안의 신물질 개발에 대한 과학기술부에서 시행한 특정연구개발사업을 수행한 경험을 바탕으로 1992년에 시작된 두 단계로 구성된 6년 동안의 선도기술개발사업은 신물질의 연구개발에 관련된 기반시설 및 유기합성, 스크리닝, 독성, 그리고 대사연구에 이르는 여러 분야의 기술축적을 가져왔다. 뿐만 아니라 중간핵심 연구과제, 농림기술개발 사업, 중점국가 연구개발 사업 등에서 소규모나마 제형 및 신물질 (천연물 포함)과 관련된 연구를 수행해 오고 있다. 그러한 노력의 결과의 일부로 LG화학에서 제초제, 피리벤족심 (피안커), 살균제, 에타복삼 (가디안), 그리고 정보화학에서 살충제 프루피라조포스 등이 국내에 등록을 마쳤거나 등록을 진행 중에 있고 시장에 출범하는 개가를 올렸다. 유기합성법에 의한 신농약의 개발이외에 비록 소규모이기는 하지만 여러 가지 장점이 있는 생물농약의 개발을 위해서 일부 기업과 여러 연구소에서 연구 중에 있고 일부는 시장에 출시중에 있다. 신농약의 개발에 심혈을 기울이고 있는 국가 기관 연구소에서는 현재 차세대정밀화학 연구의 일환으로 살균제 및 제초제의 개발을 위해서 연구팀이 일부의 산업체와 공동연구로 활발히 활동을 하고 있으며, 필수적인 기반시설인 스크리닝과 안전성 연구에 대한 연구도 한국화학연구소 및 산업체에서 특색에 맞게 수행되고 있지만 전 세계적인 추세로 보았을 때 미미한 수준이다.

4. 앞으로의 전망

신농약에 대한 지속적인 요구가 있는 한 이에 관련된 연구는 필수적이다. 독성, 환경, 내분비 교란물질에 관련된 문제 등에 의한 저독성, 저오염, 고효율성, 환경친화적인 농약이 계속 요구되고 있다. 신농약의 개발로 인한 경제적인 파급효과는 엄청나고 기술적인 파급효과도 상당하다. 그 동안의 선도기술개발 사업 등을 통한 유기합성, 스크리닝, 그리고 독성 및 대사연구에 관련된 인력 및 기술축적 및 기반기술이 국내에서 어느 정도 확충되었다. 앞으로 과학자들의 노력에 의하여 더 선택적인, 아마도 환경적으로 더 친화적인 유기화합적인 합성법에 의하여

화합물이 도출될 수 있을 것이다. 그리고 새로운 정밀농업과 통합된 농산물 처리 방법 등의 역할이 요구된다. (한국과학기술연구소)

제 7 장 참고문헌

- Berg, G., Fritze, A., Roskot, N., Smalla, K., 2001. Evaluation of potential biocontrol rhizobacteria from different host plants of *Verticillium dahliae* Kleb. *Journal of Applied Microbiology* 91, 963–971.
- Bloemberg, G.V., Lugtenberg, B.J.J., 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current Opinion in Plant Biology* 4, 343–350.
- Bolwerk, A., Lagopodi, A.L., Wijfjes, A.H.M., Lamers, G.E.M., Chin-A-Woeng, T.F.C., Lugtenberg, B.J.J., Bloemberg, G.V., 2003. Interactions in the tomato rhizosphere of two *Pseudomonas* biocontrol strains with the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16, 983–993.
- Chang, S.H., Kwack, M.S., Kim, Y.S., Lee, J.Y., Kim, K.D., 2001. A rapid radicle assay for prescreening antagonistic bacteria against *Phytophthora capsici* on pepper. *Mycobiology* 29, 218–223.
- Chang, S.H., Lee, J.Y., Kim, K.D. and Hwang, B.K. 2000. Screening for in vitro antifungal activity of soil bacteria against plant pathogens. *Mycobiology* 28, 190–192.
- Chatterton, S., Sutton, J.C., Boland, G.J., 2004. Timing *Pseudomonas chlororaphis* applications to control *Pythium aphanidermatum*, *Pythium*

- dissotocum*, and root rot in hydroponic peppers. *Biological Control* 30, 360–373.
- Cohen, Y., Coffey, M.D., 1986. Systemic fungicides and the control of oomycetes. *Annual Review of Phytopathology* 24, 311–338.
- Dupler, M. and Baker, R. 1984. Survival of *Pseudomonas putida*, a biological control agent, in soil. *Phytopathology* 74, 195–200.
- Fox, G.E., Pechman, K.R., Woese, C.R., 1977. Comparative cataloging of 16S ribosomal ribonucleic acid: molecular approach to prokaryotic systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology* 27, 44–57.
- Fravel, D. R. 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. *Annual Review of Phytopathology* 26, 75–91.
- Georgakopoulos, D.G., Fiddaman, P., Leifert, C., Malathrakis, N.E., 2002. Biological control of cucumber and sugar beet damping-off caused by *Pythium ultimum* with bacterial and fungal antagonists. *Journal of Applied Microbiology* 92, 1078–1086.
- Godfrey C. R. A. 1994. Fungicides and bactericides. pp.311–340. In C. R. A. Godfrey. (ed.), *Agrochemicals from natural products*, Marcel Dekker Inc., New York.
- Gu, Y.-H., Mazzola, M., 2001. Impact of carbon starvation on stress resistance, survival in soil habitats and biocontrol activity of *Pseudomonas putida* strain 2C8. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 1155–1162.

- Hase, C., Mascher, F., Moëgne–Loccoz, Y., Défago, G., 1999. Nutrient deprivation and the subsequent survival of biocontrol *Pseudomonas fluoresces* CHA0 in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 31, 1181–1188.
- Hausbeck, M.K., Lamour, K.H., 2004. *Phytophthora capsici* on vegetable crops: research progress and management challenges. *Plant Disease* 88, 1292–1303.
- Heungens, K., Parke, J.L., 2001. Postinfection biological control of oomycete pathogens of pea by *Burkholderia cepacia* AMMDR1. *Phytopathology* 91, 383–391.
- Howell, C. R., and Stipanovic, R. D. 1979. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescences* and with an antibiotic produced by the bacterium. *Phytopathology* 69, 480–482.
- Hynes, R. K., and Boyetchko, S. M. 2006. Research initiatives in the art and science of biopesticide formulations. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 845–849.
- Hwang, B.K., Kim, C.H., 1995. Phytophthora blight of pepper and its control in Korea. *Plant Disease* 79, 221–227.
- Jensen, P. R., and Fenical, W. 1994. Strategies for the discovery of secondary metabolites from marine bacteria : Ecological perspectives. *Annual Review of Microbiology* 62, 249–253.
- Jiang, Z.-Q., Guo, Y.-H., Li, S-M., Qi, H.-Y., Guo, J.-H., 2006. Evaluation of biocontrol efficacy of different *Bacillus* preparations and field application

- methods against Phytophthora blight of bell pepper. *Biological Control* 36, 216–223.
- Kamilova, F., Kravchenko, L.V., Shaposhnikov, A.I., Azarova, T., Makarova, N., Lugtenberg, B., 2006. Organic acids, sugars, and L-tryptophane in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 19, 250–256.
- Kim, B. S., and Hwang, B. K. 2003. Biofungicides. In: *Handbook of Fungal Biotechnology* Ed by Arora, D. K., Bridge, P. K., and Bhatnagar, D. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Kim, B. S., Lee, J. Y., and Hwang, B. K. 2000. In vivo control efficacy and in vitro antifungal activity of rhamnolipid B, a glycolipid antibiotic against *Phytophthora capsici* and *Colletotrichum orbiculare*. *Pest Management Science*. 56: 1029–1035.
- Kim, H.S., Sang, M.K., Jeun, Y.-C. Hwang, B.K., Kim, K.D., 2008. Sequential selection and efficacy of antagonistic rhizobacteria for controlling Phytophthora blight of pepper. *Crop Protection* 27, 436–443.
- Kim, K.D., Nemeč, S., Musson, G., 1997. Control of Phytophthora root and crown rot of bell pepper with composts and soil amendments in the greenhouse. *Applied Soil Ecology* 5, 169–179.
- Kim, Y.J., Hwang, B.K., Park, K.W., 1989. Expression of age-related resistance in pepper plants infected with *Phytophthora capsici*. *Plant Disease* 73, 745–747.

- Kokalis–Burelle, N., Kloepper, J.W., Reddy, M.S., 2006. Plant growth–promoting rhizobacteria as transplant amendments and their effects on indigenous rhizosphere microorganisms. *Applied Soil Ecology* 31, 91–100.
- Lamour, K.H. and Hausbeck, M.K., 2000. Mefenoxam insensitivity and the sexual stage of *Phytophthora capsici* in Michigan cucurbit fields. *Phytopathology* 90, 396–400.
- Landa, B.B., Navas–Cortés, J.A., Jiménez–Díaz, R.M., 2004. Influence of temperature on plant–rhizobacteria interaction related to biocontrol potential for suppression of Fusarium wilt of chickpea. *Plant Pathology* 53, 341–352.
- Lee, J. Y., Moon, S. S., and Hwang, B. K. 2003. Isolation and antifungal and antioomycete activities of aerugine produced by *Pseudomonas fluorescens* strain MM–B16. *Applied Environmental Microbiol.* 69, 2023–2031.
- Li, J., Kremer R.J., 2006. Growth response of weed and crop seedlings to deleterious rhizobacteria. *Biological Control* 39, 58–65.
- Lugtenberg, B.J.J., Kravchenko, L.V., Simons, M., 1999. Tomato seed and root exudate sugars: composition, utilization by *Pseudomonas* biocontrol strains and role in rhizosphere colonization. *Environmental Microbiology* 1, 439–446.
- Mao, W., Lumsden, R.D., Lewis, J.A., Hebbar, P.K., 1998. Seed treatment using pre–infiltration and biocontrol agents to reduce damping–off of corn caused by species of *Pythium* and *Fusarium*. *Plant Disease* 82, 294–299.
- Maplestone, P. A. and Cambell, R. 1989. Colonization of roots of wheat seedlings by bacilli proposed as biocontrol agents against take–all. *Soil*

Biology and Biochemistry 21, 543–547.

Matheron, M.E., Porchas, M., 2000. Impact of azoxystrobin, dimethomorph, fluazinam, fosetyl–Al, and metalaxyl on growth, sporulation, and zoospore cyst germination of three *Phytophthora* spp. Plant Disease 84, 454–458.

Mena–Violante, H.G., Olalde–Portugal, V., 2007. Alteration of tomato fruit quality by root inoculation with plant growth–promoting rhizobacteria (PGPR): *Bacillus subtilis* BEB–13bs. Scientia Horticulturae 113, 103–106.

Monaghan, R. L., and Tkacz, J. S. 1990. Bioactive microbial products : Focus upon mechanism of action. Annual Review of Microbiology 44, 271–301.

Orhan, E., Esitken, A., Ercisli, S., Turan, M., Sahin, F. 2006. Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry. Scientia Horticulturae 111, 38–43.

Parke, J. L. 1991. Root colonization by indigenous and introduced microorganism. Pages 33–42 in: The Rhizosphere and Plant Growth. D. L. Keister and P. B. Cregan, eds. Kluwer Academic Publishers, Boston, MA.

Parra, G., Ristaino, J.B., 2001. Resistance to mefenoxam and metalaxyl among field isolates of *Phytophthora capsici* causing Phytophthora blight of bell pepper. Plant Disease 85, 1069–1075.

Ping, L., Boland, W., 2004. Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. Trends in Plant Science 9, 263–266.

- Powell, K. A. 1992. Biocontrol product fermentation, formulation and marketing. Pages 381–387 in: Biological Control of Plant Diseases. Progress and Challenges for the Future. E. C. Tjamos, G. C. Papavizas, and R. J. Cook, eds. Pleum Press, NY.
- Ristaino, J.B., Johnston, S.A., 1999. Ecologically based approaches to management of Phytophthora blight on bell pepper. Plant Disease 83, 1080–1089.
- Ryu, C.–M., Farag, M.A., Hu, C.–H., Reddy, M.S., Wei, H.–X., Paré, P.W., Kloepper, J.W., 2003. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences 100, 4927–4932.
- Ryu, C.–M., Kim, J., Choi, O., Kim, S.H., Park, C.S., 2006. Improvement of biological control capacity of *Paenibacillus polymyxa* E681 by seed pelleting on sesame. Biological Control 39, 282–289.
- Sang, M.K., Chiang, M.H., Yi, E.S., Park, K.W., and Kim, K.D., 2006. Biocontrol of Korean ginseng root rot caused by *Phytophthora cactorum* using antagonistic bacterial strains ISE13 and KJ1R5. The Plant Pathology Journal 22, 103–106.
- Sang, M.K., Oh, J.Y., Kim, K.D., 2007. Root–dipping application of antagonistic rhizobacteria for the control of Phytophthora blight of pepper under field conditions. The Plant Pathology Journal 23, 109–112.
- Sasser, M., 1990. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. Technical Note no. 101. MIDI Inc., Newark.

- Shaner, G., Finney, R.E., 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology* 67, 1051–1056.
- Shaukat, S.S., Siddiqui, I.A., 2003. The influence of mineral and carbon sources on biological control of charcoal rot fungus, *Macrophomina phaseolina* by fluorescent pseudomonads in tomato. *Letters in Applied Microbiology* 36, 392–398.
- Shen, S.-S., Piao, F.-Z., Lee, B.-W., Park, C.-S., 2007. Characterization of antibiotic substance produced by *Serratia plymuthica* A21-4 and the biological control activity against pepper Phytophthora blight. *The Plant Pathology Journal* 23, 180–186.
- Siddiqui, I.A., Shaukat, S.S., 2003. Combination of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pochonia chlamydosporia* for control of root-infecting fungi in tomato. *Journal of Phytopathology* 151, 215–222.
- Spadaro, D., Gullino, M.L., 2005. Improving the efficacy of biocontrol agents against soilborne pathogens. *Crop Protection* 24, 601–613.
- Stanghellini, M.E., Kim, D.H. Rasmussen, S.L. and Rorabaough, P.A. 1996. Control of root rot of peppers caused by *Phytophthora capsici* with nonionic surfactant. *Plant Disease* 80, 1113–1116.
- Szczech, M., and Shoda, M. 2004. Biocontrol of Rhizoctonia damping-off of tomato by *Bacillus subtilis* combined with *Burkholderia cepacia*. *Journal of Phytopathology* 152, 549–556.

- Tjamos, E.C., Tsitsigiannis, D.I., Tjamos, S.E., Antoniou, P.P., and Katinakis, P. 2004. Selection and screening of endorhizosphere bacteria from solorized soils as biocontrol agents against *Verticillium dahliae* of solanaceous hosts. *European Journal of Plant Pathology* 110, 35–44.
- Weller, D. M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 26, 379–407.
- Whipps, J.M., 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 52, 487–511.
- Williams, G. E. and Asher, M. J. C. 1996. Selection of rhizobacteria for the control of *Pythium ultimum* and *Aphanomyces cochlioides* on sugar-beet seedlings. *Crop Protection* 15, 479–48.
- Williams, L.E., Schmitthenner, A.F., 1960. Effect of growing crops and crop residues on soil fungi and seedling blights. *Phytopathology* 50, 22–25.
- Williams, S.T., Sharpe, M.E., Holt, J.G., Murray, R.G.E., Brenner, D.J., Krieg, N.R., Moulder, J.W., Pfennig, N., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. 1989. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 4., Williams & Willkins, Co., Baltimore.