

최 종 보 고 서

편집순서 1 (표지)

<p>(뒷면)</p> <div data-bbox="225 1413 432 1529" style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 10px auto; width: fit-content;"> <p>주 의 (편집순서 8)</p> </div> <p>(15 포인트 고딕계열)</p> <div style="text-align: center;"> <p>↑ 6cm ↓</p> </div>	<p>2 0 0 6 3 0 0 9</p> <p>토 양 병 해</p> <p>주 요 작 물 병</p> <p>꽃 마 름 병</p> <p>· 무 름 병</p> <p>의 친 환 경 생 물 농 약 개 발</p> <p>농 림 수 산 식 품 부</p> <p>↑ 3cm ↓</p>	<p style="text-align: right;">(앞면)</p> <p>보안과제(), 일반과제(0) 과제번호 20063009</p> <p style="text-align: center; font-size: 1.2em;">토양병해 주요작물병(꽃마름병, 무름병)의 친환경 생물농약개발</p> <p style="text-align: center;">(Development of environment friendly biopesticide to control soil-borne disease(<i>Ralstonia solanacearum</i>, <i>Erwinia carotovora</i>) of major crops)</p> <p style="text-align: center; font-size: 1.1em; margin-top: 20px;">강원도농업기술원</p> <p style="text-align: center; font-size: 1.1em; margin-top: 20px;">농 립 수 산 식 품 부</p>
---	---	--

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “토양병해 주요작물병(풋마름병, 무름병)의 친환경생물농약개발”과제
보고서로 제출합니다.

2009년 5월 26일

주관연구기관명 : 강원도농업기술원

주관연구책임자 : 김 성 일

세부연구책임자 : 김 성 일

연 구 원 : 강 안 석

연 구 원 : 최 준 근

연 구 원 : 문 윤 기

협동연구기관명 : (주)비아이지

협동연구책임자 : 정 종 상

협동연구기관명 : 경북대학교

협동연구책임자 : 최 용 화

요 약 문

I. 제 목 : 토양병해 주요작물병(풋마름병, 무름병)의 친환경 생물농약개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

토마토폏마름병과 배추무름병은 각각 세균성 토양병원균인 *Ralstonia solanacearum* 과 *Erwinia carotovora*에 의해 발병되며 우리나라 토마토, 배추재배 농가에 피해를 가장 많이 입히는 병원균이다. 두 병원균은 운동성있는 세균으로 토양 내에 3~5년 장기간 독자적으로 생존이 가능하고 고온기에 병확산 속도가 빠르고, 병원균에 감염되면 짧은기간 내에 식물은 시들어 죽게된다.

토마토폏마름병은 토양에 의해 전염되는 병으로 뿌리를 통해 침입한 병원균은 도관부를 통해 전신으로 확산되어 증식하고 목질부를 손상시켜 식물을 고사시키며, 기주식물이 없는 농한기나 지온이 내려가는 겨울철에는 식물잔재물이나 잡초에서 효과적으로 살아남아 월동하여 병을 일으킨다. 병의 확산경로는 발병된 농가에서 사용한 농기계에 붙어있는 흙이나 먼지를 통해 병원균이 유입되거나, 오염된 하천, 강, 수로의 물을 통해 유입되어 피해면적이 매년 확산되고 있다. 감염된 밭에서는 관수나 비에 의한 지표수 흐름이나 시설하우스내 관수자재와 토양사이의 수막의 흐름에 따라 근접한 식물체에 빠르게 전염되어 다른 토양병보다 피해정도가 심하게 나타나는 특징이 있다. 토마토폏마름병이 발생한 농가에서는 방제방법이 없어 화공약품을 토양에 관주하고, 과수나 벼에 등록되어 있는 농약을 관주하여 약해가 빈번히 발생하고, 지방부병으로 오인하여 농약살포횟수를 늘리는 등의 어려움을 겪고 있다. 병이 발생한 토양에서는 일정기간 휴경하거나 풋마름병원균에 감수성이 없는 타작목을 심는 작목전환을 할 필요가 있으나 우리나라 토마토는 모두 시설내에서 재배되어 하우스설치, 관수시설, 선별작업기, 가온시설 등 초기 투자비용이 많이 소요되어 실천하기가 어려운 실정이다. 현재 국내에 토마토폏마름병방제용으로 등록된 약제는 훈증처리제 1품목이 있으나 약제처리기간이 1개월이 소요되고, 통풍이 원활하지 못한 하우스에서 살포시 인체위해성에 대한 염려, 비닐피복, 지온확보를 위한 처리시기의 제한 등으로 농가에서 사용에 어려움을 겪고 있다. 이에 거의 모든 농가에서는 토마토폏마름병에 대한 우려로 저항성대목에 실생묘를 접목한 접목묘를 정식하여 묘구입에 따른 생산비부담을 안고 있다.

토마토포도병에 대한 방제연구는 화학농약, 항균물질, 토양훈증제 등을 사용하여 방제하는 방법을 연구하였으나 효과적인 방제법은 아직까지 알려진 바가 없다. 화학농약을 이용한 방제가 효과를 보지 못하는 이유로 화학물질이 토양내 유기물이나 점토에 흡착되어 병원균에 접촉하는 양이 제한되고, 처리한 화학물질을 영양원으로 사용하여 분해하는 미생물작용, 약제저항성 변종의 출현에 의한 약효의 반감 등이 주요인인 것으로 알려져 있다. 화학농약의 토양방제에 대한 한계를 대신할 수 있는 연구분야로 길항미생물을 이용한 생물적방제법이 연구되어지고 있다. 길항미생물은 토양에 서식하면서 병원균의 기능을 저해하는 기능을 가지고있는 균종을 말하며 길항미생물이 다양하고 풍부하게 분포하고 있는 토양은 같은 작물을 연작하거나 병원균을 인위적으로 접종하여도 병이 발생되지 않는다. 이러한 길항미생물을 대량배양하여 토양에 뿌려줌으로써 토양병을 방제할수 있는데 선진농업선진국에서는 곰팡이성 토양방제를 위해 *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Trichoderma* spp., 비병원성 균종, Yeast 등의 균체를 제형화하여 미생물농약제품으로 판매되고 있다. 토양방제용 미생물농약개발을 위해서는 방제대상병원균에 대해 방제기능이 있고, 토양이나 근권에 처리하였을 때 방제효과가 확인되어야하며, 제형과정에서 사멸하지 않고 생존할 수 있는 길항미생물 확보가 필요하다.

본 연구에서 토마토포도병방제용 미생물농약으로 개발하려는 *S. griseus*0104는 방제효과를 기내 및 하우스내에서 실험을 수행한 결과 방제효과가 높은 것을 확인하였으며, 현장실증을 위해 2003년 포도병피해를 본 농가에 *S. griseus*0104배양액을 분양하여 퇴비살포시 전면살포(20ℓ/ha)와 침지처리(20배 희석, 400ℓ/14,000주)를 병행하여 실시한 결과 2004년과 2005년에 방제효과가 75% 이상으로 정상적인 토마토포도 재배가 가능하게 해준 균주이다. 2005년 까지의 기술수준은 균사상으로 *S. griseus*0104를 생산하여 장기보관이 불가능하기 때문에 농가에서 분양을 요청하면 실험실에서 배양하여 필요한 농가에 배달하는 어려움이 있었다. 따라서 *S. griseus*0104를 필요로하는 농가에 보급하기 위해서는 장기보관이 가능하고, 농가에서 쉽게 처리할 수 있는 제형화기술개발이 필요하였다. 본 연구의 목적이 친환경생물농약개발이기 때문에 균체를 이용해 제품화하는 연구를 목표로하여, 생산된 제품은 생산, 유통, 소비 과정(보존기간-1년)동안 변질되지 않도록, 균밀도를 일정하게 유지하는 제형기술, 습기나 광선으로 인한 균의 손상을 막을 수 있는 포장용기 선발 등을 수행하여 안정된 제품으로 생산하고자 하였다. 국내외 미생물농약등록현황을 조사한 결과 *S. griseus*0104를 원제로 만든 토마토포도병방제용 미생물농약은 없었다.

배추무름병 방제를 위한 미생물농약개발은 그간 여름장마철 포장시험결과 방제효과가 확

인된 *Bacillus* spp.(3종)와 *Pseudomonas* spp.(5종)를 이용하고자하였다. *Bacillus* spp.는 발효배양시 내생포자유도가 가능하여 분사건조(spray dry)시 수분산성이 좋은 Galactose와 수율을 높여주는 sun-cap을 첨가하여 encapsulation한 후 분사건조하면 고온에 의한 생균손실율이 낮았으며, *Pseudomonas* spp.는 내생포자형성이 안되는 균으로 열에 약하여 분사건조가 불가능하였으나 동결건조시에는 생균손실율이 낮았다. 이들 8종의 배추무름병방제용 길항세균들은 건조후 제형화한 후 재배지에서 배추품종, 작기별로 처리하여 생육촉진효과, 병방제효과 등을 확인였다. 미생물농약으로 등록여부는 원제생산능률, 생산비, 방제효과 등을 비교·검토하여 가장 경제성이 높은 1균주를 선택하여 배추무름병방제용 미생물농약제품으로 개발하고자하였다.

원제 및 제품의 안전성조사는 미생물농약으로 등록하여 제품화하는데 필요한 안전성 확인이 목적으로 국내지침자료로“농약의 등록시험기준과 방법(농촌진흥청고시 제2006-7호)”와 미국“US EPA OPPTS 870.1100(Acute oral toxicity), 870.1200(Acute dermal toxicity), 850.1075(Fish acute toxicity test, freshwater and marine)”을 참고하여 확인하였다. 본 연구에서 사용한 길항균주 5종(*Bacillus licheniformis*, *B. subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, *S. griseus*0104)은 모두 미생물농약등록에 필요한 안정성이 확인되었다.

시험생산한 제품의 피해농가현지에서의 방제효과는 전국 120여 농가에 분양하여 실시하였으며, 발정리 시기부터 재배기간까지 *S. griseus*제품을 체계적으로 처리한 농가에서 80%이상 방제효과를 보였다. 배추무름병은 평안지와 고령지에서 방제실험을 수행하여 방제효과가 있음을 확인하였다. *Ralstonia solanacearum*과 *Erwinia carotovora*는 기주범위가 광범위하고 국내는 물론 전세계적으로 피해를 주는 중요한 토양병이다. 특히 토마토폏마름병방제용 농약은 세계적으로 개발되지 않아 제품생산시 판매시장이 클것으로 예견된다. 본 연구에서 개발한 토양혼화처리용 입제(상표명 - 흙향)와 입상수화제(상표명 - 청고탄)는 사용한 농가들이 방제효과를 확인하여 구입을 희망하고 있어 상품생산을 위한 기반구축에 노력하고 있다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

‘토양병해 주요작물병(풋마름병, 무름병)의 친환경생물농약개발’을 위해 다음과 같은 연구를 수행하였다.

제 1절. 토마토포마름병 방제용 미생물제 병방제효과

토마토포마름병의 발생요인을 확인하여 병방제기술개발 방향을 설정하고, 길항균을 이용한 미생물농약생산을 위해 토마토포마름병원균에 대해 생육억제물질, 즉 항균물질생산이 있고, 토양내에서의 정착력이 있으며, 장기보관 할 수 있는 제품으로 생산이 가능한 균주를 찾고자 하였다. 연구과정에서 생산된 제품재료를 피해농가에 적용하여 실제 방제효과를 확인하였다.

- 토마토시설재배지 풋마름병 피해상황 및 방제현황
- 풋마름병 방제용 길항균주 분리·동정 및 유전적유연관계 조사
- *Streptomyces griseus*0104 의 토마토포마름병원균에 대한 길항작용
- *S. griseus*0104 처리에 의한 토마토포마름병원균 토양내 밀도변화
- 대량배양을 위한 배양배지 선발
- 균체 수확 및 원재 생산
- 토양처리용 입체 생산
- 관주처리용 입상수화제 생산
- 제형별 토마토포마름병 피해농가 현지포장 시험
- 토마토포마름병 방제용 기능성 퇴비제조 및 병방제 효과 조사
- 토마토포마름병 방제를 위한 토양살포용 입체(흙향), 관수용 입상 수화제 (청고탄) 체계 처리효과
- 양액재배(코코피트) 농가 입상수화제 처리효과
- 피해농가 현지 방제 시험
- 배추무름병 생물적 방제 실험

제 2절. 길항미생물 제품과 생산을 위한 대량생산 공정 확립

토마토포마름병원균(*Ralstonia solanacearum*)과 배추무름병원균(*Erwinia carotovora*)에 대해 길항작용이 확인된 *Pseudomonas putida*10301, *Bacillus licheniformis*, *S. griseus*

0104. 3균주를 대량배양하여 미생물농약제품생산용 원제로 사용하고자하였다.

- *P. putida*10301 의 소용량 발효로 (5L) 배양 최적화 연구
- 다농도 분석, 균체 농도 측정, Siderophore 생산량 측정, 길항세균의 질소원조사, PH 변화에 따른 실험
- *P. putida* 10301의 300L 발효로 배양최적화 연구
- freeze dry 방법을 통한 세포 안정화
- 흡착(adsorption)을 이용한 세포 안정화
- *Bacillus licheniformis*의 대량배양 및 제제화
- *B. licheniformis* 균주의 Pilot plant fermentor에서의 배양 최적화
- *B. licheniformis* 포자 spray dry
- *S. griseus*0104 의 pilot 배양을 위한 배지 조정
- 5L 발효조에서의 회분식 배양
- Bennett`s 배지와 YM배지의 5L 회분식 배양
- Dextrin을 이용한 5L 회분식 배양
- *S. griseus*0104 pilot 배양에 의한 균체 대량 생산 및 안정화

제 3절. 토양 병해 방제용 미생물제 원제 및 제품에 대한 안전성 조사

식물병제를 위해 개발된 길항미생물제를 제품으로 판매하기 위해서는 “농약의 등록시험 기준과 방법 (농촌진흥청 고시 제 2006-7호)”에 따라 제품의 안전성에 대한 자료를 충분히 갖추어야 한다. 그러나 농촌진흥청 고시 제 2006-7호가 규정한 안전성 조사를 인증받기 위해서는 4-6억원이 소요되어 본 연구의 최종 목표인 미생물 농약개발이 어렵게 된다. 본 연구는 미생물 농약 등록에 필요한 안전성을 자체조사하여 유해성 여부를 잠정적으로 확인하기 위해 수행하였다.

- 길항균주 *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *S. griseus* 0104. 5균주의 안전성 조사
- 경구, 경피 및 어독성 시험
- 제품생산용 *S. griseus*0104원제에 대한 독성 및 병원성 검증
- 급성경구 및 병원성 실험, 급성정맥 및 병원성 실험, 급성경피 및 병원성 실험, 담수 무척추 동물에 대한 영향시험
- 제품의 안전성 평가 (흡향, 청고탄의 독성 및 병원성 검증)
- 흡향, 청고탄의 생산공정 및 유해 미생물, 유효균밀도 조사

IV. 연구개발결과

1) 토마토포마름병 피해현황

토마토포마름병은 전국 재배지역에서 재배작형에 관계없이 발생하여 큰 피해를 주고, 최근에는 겨울과 이른 봄 기온이 상승하여 시기에 관계없이 발생되고있다. 병이 발생한 농가에서는 기존의 살균제나 마이신계통의 농약을 엽면살포하거나 주기적으로 관주하여도 방제되지 않았다. 대부분 농가들은 토마토포마름병예방을 위해 저항성대목을 이용한 접목묘를 정식하여 재배하고있으나 재배년수가 길어짐에 따라 병원균밀도가 증가하여 병발생이 증가하고있다. 병이 발생한 농가는 전염속도가 빨라 경제적 손실이 막대하였고, 병발생이 심한 농가는 방제방법이 없어 토마토농사를 포기하여 이를 해결할 수 있는 대책마련이 시급히 요구되고있었다.

2) 길항균주 분리

토마토포마름병과 배추무름병방제를 위해 *Pseudomonas*속, *Bacillus*속, 방선균류를 토양에서 분리하였다. 채집한 토양은 0.85%생리식염수에 연속희석법으로 희석하여 각 배지에 접종하여 분리하였다. 분리·동정된 *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, *P. synxantha*, *P. aurantica*, *P. marginaris*는 King's medium B agar배지에서, *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*는 토양을 멸균수에 희석한 후 90℃로 열처리한 후 접종배양한 Nutrient agar에서, *Streptomyces griseus*는 Chitin agar배지에서 각각 분리하였다.

토마토포마름병방제용 미생물농약개발을 위해 분리한 *S. griseus*0104균주는 DDBJ/NCBI/Genebank와 Ribosomal Database Project II의 database에서 상동성검색을 수행한 결과, *Streptomyces* 속의 종을 포함하는 계통학적 그룹에 속하는 균주로서 *Streptomyces griseus*ATCC25497^T(D63872)와 99.83%의 유연관계를 나타내었다.

3) *S. griseus*0104의 항균물질생산능

*S. griseus*0104은 PD broth나 Nutrient broth와 같은 영양배지에서 항균물질생산력이 낮았으나 무기영양원을 공급하고 glycerol, glucose, soybean, NaCl을 첨가한 액체배지에서 배양하였을 때 토마토포마름병원균에 대해 항균력이 있는 물질을 생산하였다. *S. griseus*0104가 생산한 항균물질은 유기용매로 정제되지 않고 Amberlite IRC-50에 흡착시킨 후 황산용액으로 추출하여 분리되었다. 정제된 항균물질은 Oxolinic acid와 비슷한 항균활성을 보였다.

4) *S. griseus*0104의 토양 내 정착능 및 풋마름병원균 억제효과

실험에 사용된 토양의 방선균 밀도는 1×10^4 cfu/g.soil이었다. 시판하는 포대퇴비를 시험토양에 넣고 수분을 유지하면서 병원균밀도변화를 조사한 결과 무처리구의 병원균밀도는 꾸준히 증가하여 26일 후에는 4.7×10^6 cfu/g.soil로 400배 이상 증가하였다. *S. griseus*0104를 10^6 cfu/g.soil농도로 접종한 시험구의 토양 내 풋마름병원균 밀도는 10~40 cfu/g.soil로 무처리구 병원균밀도의 1/10,000수준으로 낮아졌다. 조사기간 중 병원균밀도 증가는 토양에 있는 토마토틀리잔재물 내부에 있던 병원균이 토양으로 유출되어 증가된 것으로 확인하였다

5) *S. griseus*0104 제품생산을 위한 제형기술개발

*S. griseus*0104를 액체배양하면 Nutrient broth와 Potato dextrose broth에서 왕성하게 자랐으나 균체를 수확하여 건조시키면 모두 사멸하였다. 액체배양시 균체를 수확하여 건조시킬 수 있는 배지는 무기영양원에 chitin을 첨가하여 준비한 CB broth에서만 균사가 균사분체로 전환되어 동결건조에 의해 건조가 가능하였다. *S. griseus*0104의 포자유도는 고체배지에서만 가능하였고 감자추출물에 무기영양원을 첨가한 고체에서 10일간 배양하여 2×10^6 spores/ml씩 포자를 수확하였다. 고체배지에서 배양한 포자는 물로 수확하면 포자가 뭉치고 물에 떠 손실이 많았으며 이를 해결하기 위해 세제를 1%로 희석하여 배양한 plate에 부은 다음 30분간 정치하면 포자가 쉽게 가라앉아 수확이 용이하였다. 세제로 수확한 포자는 발아율, 물리적, 화학적 외부손상에 영향을 받지 않았다. 수확된 포자를 탈지분유에 현탁하여 동결건조하면 40℃에서 50일간 저장하면 0.04%의 생존손실이 있었으나 상온에서는 손실이 거의없고 1년이상 보존이 가능하였다.

6) 토마토폏마름병방제효과조사

풋마름병원균의 활력이 가장 왕성한 7월 중순 고온기에 토마토폏마름병 피해를 입은 농가에서 실생묘와 접목묘를 정식하여 *S. griseus*0104의 방제효과를 조사하였다.

실생묘를 정식한 시험구에서 무처리구는 정식 20일 후에 모두 고사하였으나 *S. griseus*0104를 정식시 침지처리하고 5일간격으로 3회 처리한 처리구는 5단 수확까지 발병율이 7.6%로 낮았으며, chitin을 부재로 첨가한 *S. griseus*0104처리구는 6단 수확까지 2.3%의 낮은 발병율을 보였다. 저항성대목에 실생묘를 접하여 정식한 시험구의 무처리구는 3단 수확까지 25.7%의 발병율을 보이고 *S. griseus*0104를 3회 관주한 시험구에서는 7단 수확까지 0~0.2%의 낮은 발병율을 보였다. 병이발생한 토마토의 2/3이상이 *Fusarium oxysporum*에 의한 반신위조병으로 확인되었다.

7) *S. griseus*0104 제형제품 토양살포에 의한 풋마름병방제효과조사

*S. griseus*0104를 제형화한 입제, 분말수화제, 액상수화제를 이병된 도양에 처리하여 병원균밀도감소효과를 조사한 결과 3종 모두 무처리구에 비해 병원균밀도가 감소하였으며 입제처리구에서의 감소가 현저하였다. 특히 입제의 포자밀도를 10^7 spores/g으로 높여주면 수확종료까지 병발생이 없었다. 입상수화제는 10^8 spores/g으로 조제하여 처리한 처리구에서 2단 수확까지는 병이 발생하지 않았으나 4단 수확기에 20% 발생하여 약효지속성이 약하였다.

8) 토마토포마름병방제용 기능성퇴비제조

토마토포마름병에서 많이 사용하는 우분의 퇴비기능성을 높이기 위해 퇴비제조실험을 수행하였다. 우분을 발효시키면 자체에 토마토포마름병원균의 생장을 억제시키는 기능이 있어 발효시킨 우분퇴비를 물로 추출하여 항균력을 조사하면 1.3mm정도의 저지원이 형성되었다. 우분에 콩대공 등 농산부산물을 첨가하여 만든 퇴비는 발효속도가 빨라지고 토마토포마름병억제력이 향상되었다. 퇴비온도가 45°C이하로 떨어졌을 때 *S. griseus*0104와 당밀을 살포하여 제조한 퇴비를 발병된 밭에 2년간 살포한 결과 발병율이 0.01%이하로 정상수확이 가능하게 되었다.

9) 토양처리용 입제, 관수처리용 입상수화제 체계처리효과

토마토포마름병방제를 위해 *S. griseus*0104를 원제로 토양살포용 입제와 재배기간 중 관수처리하는 입상수화제 2종의 제품을 개발하였다. 처리방법은 입제를 10a당 30kg씩 밭 전체에 골고루 뿌린 다음 경운하고, 정식시에는 500배로 희석한 입상수화제에 묘를 침지하여 정식하고, 정식 후 10일 간격으로 입상수화제를 10a당 300g씩 3회 관수처리한 농가는 80%이상 방제되어 정상수확을 하였다. 실험에 참여한 농가와 제품을 생산할 산업체의 의견을 모아 입제는 60,000원(20kg/200평용), 입상수화제는 20,000원(200g/200평용)로 가격을 정하였으며 이를 기준으로 0.5ha당 농가 약제구입부담액은 900,000원이었으며, 농가별 병방제효과에 따라 차이는 있었지만 풋마름병방제에 의한 각 농가 평균소득증대에 대한 약제구입비 비중은 14%로 구입비부담이 적은 것으로 확인되었다.

10) 배추무름병 생물적방제실험

배추무름병원균에 길항력이 있는 *Pseudomonas* 5종과 *Bacillus* 2종을 동결건조하여 제형화하여 평안지와 고령지에서 방제실험을 수행하였다. 평안지와 고령지에서 발병율은 각각 32.3%, 32.4%로 병피해가 심한 농가포장이었다. 평안지에서 무름병방제효과가 84.8%였던

*P. aurantica*는 고랭지에서 59.2%로 방제효과가 낮았는데 이는 평난지에 비해 고랭지 배추재배기간 중 잦은 비로 처리균의 밀도확보가 어려운것에 기인한 것으로 사료된다.

11) Freeze dry 방법을 통한 *Pseudomonas putida* 10301 세포안정화

Pseudomonas putida 10301 고열에 견딜 수 있는 열 안정성이 부족하여 순간이지만 고열을 거쳐야하는 spray dry 방법은 *Pseudomonas* sp. 에는 적당치 못하므로 경제적인 면에서 다소 비싸지만 동결건조 방법을 통해 세포의 안정화를 모색하였다. 발효가 종료된 배양액에서 세포를 분리한 후 여기에 10% 농도로 부형제를 한 후 -70°C 에서 24hr 동안 예비 동결한 다음 freeze dry를 수행하고 40°C 에서 저장 안정성 screening을 수행하였다.

다양한 polymer를 안정제로 첨가하여 cell의 저장성을 확보하는 실험을 수행한 결과 수용액 상태에서 점도가 너무 높아 적은 양을 녹일 수 있는 polymer와 불용성 그리고 합성 폴리머 등은 저장 안정성이 떨어졌다. 반면에 일반적으로 많이 사용하고 있는 소재들에서는 무처리에 비해 저장 안정성을 높게 나타내었는데 일반적으로 사용되는 skim-milk에서 가장 좋은 저장 안정성 효과를 나타내었으며, 다음으로 soluble starch, levan 순이었다. skim-milk와 비교해서 말토오즈(maltose)와 물엿(millet jelly)이 더 나은 저장 안정성을 나타냈다. 이상의 결과를 검토하여 보면, *Pseudomonas putida* 10301균을 동결건조 방법을 적용한 경우 적당한 부형제 및 안정제를 투입함으로써 제제 안정성을 일정기간 동안 확보할 수는 있지만 생산 비용이 증가하는 부담이 있었다.

12) *Pseudomonas putida* 10301 흡착(adsorption)을 이용한 세포안정화

배양원액 대 흡착제의 비율은 흡착제의 종류에 따라 다르지만 white carbon의 경우 1:1의 비율로 흡착할 정도로 흡착능이 좋다. 예비 실험 결과 흡착율은 좋지만 aging test에서 급격히 세포수가 감소하는 것으로 조사되었다. 따라서 여기에 동결건조시에 세포 보호 효과가 뛰어난 부형제인 물엿을 첨가하여 white carbon 에 흡착시켜 저장 기간별 세포수 감소 정도를 관찰하였으나, 마찬가지로 세포 안정화에 큰 영향을 미치지 못하는 못하였다. 이상으로 동결건조 방법과 흡착을 통해 *Pseudomonas* 균의 저장 안정성을 높이는 제제화를 시도하였으나 *Pseudomonas putida* 10301균세포의 특성상 단순한 제제 즉, 부형제의 첨가 등에 의한 방법으로는 제제의 한계를 나타내었다.

13) *Bacillus licheniformis*균주의 pilot plant scale에서 배양 최적화

*Bacillus licheniformis*균주를 5L배양조건을 기본으로하여 pilot plant scale(300L)에 배양최적화를 실시하였다. 배양조건은 30°C, pH 6.5로 조절하고 발효조 내의 용존산소(DO)는 aeration과 agitation을 이용하여 20%이상으로 유지하였다. 배양 중 발효조내 압력은 0.2bar로 유지하였다. 그 결과 Fig. 6과 같이 세포의 성장은 약 40 OD에 이르렀고 세포건조 중량은 L당 약 11g 정도가 생산 되었다.

14) *Bacillus licheniformis*원제의 제제 안정화

*B. licheniformis*포자는 열안정성이 있어 비용적인 측면을 고려하여 동결건조방법에 비해 Hot spray dry 방식이 경제적으로 유리하였다. spore는 열에 어느 정도 안정하나 최적의 spray dry 조건과 활성을 유지시킬 수 있는 열 안정화 물질을 탐색하고자 다양한 당류와 polymer를 대상으로 한 결과 sun-cap은 변성 전분으로 기능성물질 등을 포접(encapsulation)하여 안정화시키는 능력이 우수하며, 냉수에 쉽게 용해되고 점도가 낮아 고농도의 용액 제조가 가능하여 분무공정에 적합한 물성을 갖추고 있다. 이와 같이 선정된 galactose와 sun-cap을 사용하여 pilot plant scale인 300L 발효조에서 배양한 *Bacillus licheniformis*를 VMF centrifuge로 harvest 하여 spray dry를 하였다.

15) *S. griseus*0104의 Dextrin을 이용한 500L 회분식 배양

보존중인 균주는 Bennett's 고체배지에서 100mL/1000mL baffled flask 5개에 각각 단일 균락을 접종하여 30°C, 200rpm에서 20시간동안 배양한 1차 seed를 2L/5L baffled flask 5개에 각각 접종한 것을 2차 seed로 사용하였다. 조건은 1차 seed와 마찬가지로 30°C, 200rpm, 배양시간은 15시간으로 하였다. 이 2차 seed를 500L 발효조의 seed로 사용하였다. 500L 발효조의 초기 working volume은 300L였고 온도는 30°C, pH는 암모니아수(28%)로 접종전에 7.0으로 보정한 후 배양 중 보정은 하지 않았다. 사용된 배지는 더 많은 시료확보를 위해 5L에서 사용한 dextrin을 3%에서 8%로 증가시켰고, 0.1% MgSO₄, 2% yeast extract, 0.5% soybean meal, 0.1% KH₂PO₄, 0.3% NaCl, 0.3% CaCO₃를 사용하였다. 배양이 진행되면서 pH가 떨어지기 시작하는 18시간 이후로 세포의 왕성한 성장을 보이고 있고 용존산소의 부족에 따라 점차적으로 rpm과 air량을 증가시킴으로써 최대 균체성장을 이룰 수 있었다. 20시간을 기점으로 pH가 증가하고 그와 함께 용존산소가 증가해야하지만 이미 많이 형성된 균사(mycelium)으로 인해 배양액 자체가 점성이 생기고 그로인해 DO (용존산소) membrane에 균사가 코팅(coating)이 되어 제대로 sensor가 작동하지 않은 것으로 생각된다.

배양 후 45시간에 최대 O.D.값이 56.5이 나왔고 이 시간에 pH가 많이 올라간 것과 cell growth curve가 서서히 멈추는 것으로 이 시간의 시료를 채취하여 동결건조를 실시하여 그 세포수를 측정하였다. 45시간 배양 후의 발효액의 최종 volume은 300L였고 원심분리 후의 wet cell은 23.3kg, 동결건조시 2kg의 skimmilk를 첨가하였고 건조결과 8.3kg이 나왔다. 그 결과 배양액의 세포 수는 2.06×10^7 CFU/g cell, 동결 건조 후 분쇄 후의 세포 수는 1.82×10^7 CFU/g cell을 보여 최종 배양액 대비하여 88.3%의 수율을 보이고 있다. 배양액을 원심분리 한 후의 전체 cell weight는 23.3kg이었고 5% skim milk가 함유된 동결건조 후의 dry cell weight은 8.3kg이었다.

16) 제품의 독성 및 병원성검증

본 시험은 *S. grieus*0104 고상 (10^9 cfu/g)의 안전성 평가를 위하여 농촌진흥청고시 제 2006-7호(2006년 4월 17일) 및 EPA Guideline (OPPTS, adopted : 1996.2)에 의거하여 시험을 진행하였다. 시험항목은 인축독성시험 중 급성경구독성 및 병원성시험, 급성경피독성시험 및 병원성시험, 급성정맥 내 독성 및 병원성시험, 안점막자극성시험, 피부자극성시험, 피부감작성시험과 환경독성시험 중 잉어(*Cyprinus carpio*)영향시험 및 물벼룩(*Daphnia magna*)영향시험을 진행한 결과 인축독성시험인 급성경구독성 및 병원성시험, 급성정맥 내 독성 및 병원성시험, 피부자극성시험, 피부감작성시험에서 *S. grieus*0104의 투여농도로 투여한 결과 특이한 임상증상 및 병원성이 없는 것으로 판단하였다. 또한 안점막자극성시험 및 급성경피독성 및 병원성시험에서 *S. grieus*0104의 투여농도로 투여한 결과 약한 자극이 있었으나 투여 후 7일 이내 회복하였다. 또한 실험동물로 이용된 SPF 랫드, 토끼(NZW) 및 Guinea pig의 체중변화는 대조군과 비교하여 유의차 없이 증가하여 *S. grieus*0104에 의한 장애영향은 없는 것으로 확인되었다.

17) 시제품생산 및 제품화를 위한 유효미생물 검정 및 오염미생물 검사

꽃마름병 방제용 제품으로 2제품을 개발하였다. 토양 처리용 입제는 흙향(발효가 잘된 퇴비나 유기물이 풍부한 토양에서 나는 흙냄새는 토양에 있는 방선균이 생산하는 휘발성물질에 의한것임), 입상수화제는 청고탄(농가들이 사용하는 꽃마름병을 잡는 다는 의미)로 상표등록을 추진하고 있다. 흙향과 청고탄생산에 필요한 재료들은 모두 농산부산물과 천연재료를 사용하여 동물이나 환경에 해를 끼치지 않는다. 두 제품의 품질은 미생물제등록에 필요한 분석의뢰인증기관인 목원대학교에서 품질검사를 받아 유효미생물인 *S. griseus*0104의 생균밀도를 확인하고 유해미생물에 대한 안전성도 확인받아 친환경농자재 목록공시등록에 필요한 제반서류를 제출하여 그 결과를 기다리고 있다.



[토양살포용 입제]



[관주처리용 입제]

V. 연구성과 및 성과활용 계획

(연구성과)

1. 방선균을 이용한 토마토폏마름병방제용 미생물농약은 국내외에 등록되어 있지 않아 제품개발 가치가 높음.
2. 폏마름병원균은 기주범위가 넓어 적용약제개발의 폭이 넓고 국내외에 방제약제가 없어 제품생산시 해외시장개척 가능
3. 시제품을 사용한 폏마름병피해농가들의 방제효과 홍보로 수요농가 증가
4. 폏마름병을 효과적으로 방제하여 피해농가 농약남용 방지
5. 퇴비제조시 흙향 첨가에 의한 폏마름병방제기능향상으로 고품질토마토생산 기반제공
6. 제품생산기술 이전에 의한 산업체 활성화
7. 지력증진에 의한 안전농산물생산으로 농가소득 증대 및 소비자요구 부응

(성과활용계획)

1. 제품생산
2. 특허출원
3. 고추, 감자, 가지 등 폏마름병 피해작물에 적용확대실험추진
4. 인삼재배농가 지방부병 방제제개발(균핵병방제 실험 수행 중)

SUMMARY

Bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) and Soft-rot (*Erwinia carotovora*) damaged on tomato and oriental cabbage respectively is the most economically important soil-borne pathogens. The disease disperse fastly in high temperature and the infected plant wilted in short time to die.

Bacterial wilt of tomato spread through the soil. The bacterium enters tomato tissue through wounds in the root system or stems created by plant stress, other pathogen or horticultural practice. The entered bacteria invades the xylem and destroy the tissue and cause a sudden death of tomato. The disperse of bacteria is by furrow irrigation or surface water, cultivation, transplanting, wounding and pruning. Infested soil transported with seedlings or with farm implements, or infected seedlings are a source of long-distance dispersal of the bacterium. High temperatures (for example, 30–35 °C) and high soil moisture favor disease development. Control of bacterial wilt is generally very difficult. Fumigation with chemicals like basamid is often used to control soil-borne diseases; however, it is highly toxic and not practical for obligate bacterial wilt control. Soil is the primary source of the disease and the bacterium survive in fumigated soil can invade the root. Both crop rotation to nonhosts and planting of resistant cultivars are useful methods to avoid the disease. Grafting susceptible tomato varieties onto the rootstock of resistant wild type lines is widely practiced in Korea. The promising antagonist *Streptomyces griseus* BIG182-B1 grew on agar plate as linear mycelia and its spores oval, the results on morphological, physio-biochemical characteristics and 16S rDNA sequence alignment revealed that *S. griseus* 0104 belonged to *Streptomyces griseus* ATCC25497. *S. griseus* 0104 produced antibiotic metabolite in Medium 1 broth. The purified material selected after affinity column chromatography (Amberlite IRC-50) has antibacterial activity on *R. solanacearum*. The infected root pieces that remain in the soil provide bacteria for infection of new tomato roots. The bacteria can survive in diseased tomato debris. The bacteria are released from the roots of the affected plant into the soil and can infect neighboring plants.

Biological control is one of the more promising approaches to reduce the disease incidence and yield losses caused by this disease. Based on antagonistic activity

against *R. solanacearum* as well as biocontrol efficacy in the greenhouse, *Streptomyces griseus*0104 selected as potential biocontrol agents. In order to find a suitable antagonist inoculation method, we compared the methods of root-dipping with soil-drenching in the aspects including rhizocompetence, biocontrol efficacy under greenhouse conditions. The drenching treatment resulted in a higher biocontrol efficacy, and this method was also easier to operate in the field on a large scale. Field trials were conducted for further evaluation of this antagonist. In both greenhouse and field experiments, the isolate *S. griseus*0104 had good control effect against bacterial wilt. biocontrol efficacy of *S. griseus*0104 was about 80% in diseased farmer's field trials. Three antagonists cultured in pilot plant fermentation, and the cells harvested by centrifuge was dried by freeze dry or spray dry according to temperature resistance. *Pseudomonas Putida*10301 and *Bacillus licheniformis* grew well in large scale fermenter and the cells were produced as powdered flour. Two microbial pesticides named as "heughyang" and "cheungothan" did not harmful to animal and environment and biocontrol efficacy on bacterial wilt on tomato was very promising.. To assess the safety evaluation of *S. griseus*0104 formulae, Test was carried out in compliance with the Testing Guidelines for Safety Evaluation of Pesticides (Notification No. 2006-7 issued by Korea Rural Development Administration) and EPA Guidelines (OPPTS, adopted ; 1996.2). and there was no clinical signs and pathogenicity on Acute oral/Pathogenicity test, Acute intravenous toxicity/ Pathogenicity test, Acute dermal irritation test and Skin sensitization test. Also there was mild irritation on Acute dermal/Pathogenicity test and Acute eye irritation test. Males and females of SPF Rat, Rabbit(NZW) and Guinea pig showed the same growth rate in body weight at the test period after the treatment.

목 차

제 1장 연구개발 과제의 개요	22
제 2장 국내외 기술개발현황	24
1. 국내기술현황과 문제점	24
2. 국외기술현황과 문제점	24
제 3장 연구개발수행 내용 및 결과	25
제 1절 토마토폯마름병 방제용 미생물제 병방제효과	25
1. 토마토시설재배지 풋마름병 피해 및 방제현황	25
가. 피해상황	25
나. 풋마름병 진단	26
다. 풋마름병 발생농가 병방제현황	27
2. 길항균 선발	29
가. 토양내 미생물분리	29
나. 길항균주 길항작용 조사	29
다. 길항균주 동정	31
라. <i>S. griseus</i> 0104의 풋마름병원균에 대한 길항작용	32
(1) 배지조성별 <i>S. griseus</i> 0104 항균물질 생산	32
(2) 항균물질 분리정제	34
(3) <i>S. griseus</i> 0104의 토양내 정착능	36
(4) <i>S. griseus</i> 0104처리에 의한 토양내 풋마름병원균 밀도변화	37
3. <i>S. griseus</i> 0104 제품생산을 위한 제형기술 개발	38
가. 대량배양을 위한 액체배양 배지선발	39
나. 고체배양	40
(1) 배양배지선발	40
(2) 균체수확 및 원제생산	41
(3) 토양혼화처리용 입체 생산	43
(4) 관수처리용 입상수화제 생산	44
4. 토마토 피해농가 현지포장시험	44

가. <i>S. griseus</i> 0104 균체처리에 의한 방제효과	44
나. 제형물 풋마름병 방제효과 기내시험	48
(1) <i>S. griseus</i> 0104 제형물 처리에 의한 토양내 풋마름병 방제효과	48
(2) 제형별 <i>S. griseus</i> 0104 밀도조정에 의한 풋마름병방제 증진효과	49
다. 토마토폏마름병 방제용 기능성 퇴비제조 및 병방제효과 조사	50
(1) 발효퇴비제조	50
(2) 토마토폏마름병 방제용 기능성퇴비 살포효과	51
(가) 발효촉진을 위한 농산부산물 첨가효과	51
(나) 부산물첨가 발효퇴비 <i>S. griseus</i> 0104 균체처리효과	51
(다) 퇴비입제 첨가효과	53
라. 토마토폏마름병 방제를 위한 토양살포용 입제, 관수용 입상수화제 체계처리 효과	54
마. <i>S. griseus</i> 0104 미생물제 처리효과에 의한 경제성 분석	55
바. 양액재배(코코피트)농가 입상수화제 처리효과	56
사. 피해농가 현지방제시험	57
5. 배추무름병 생물적 방제	61
가. 길항균주선발	61
나. 균체시료제조	61
(1) 배양배지선발 및 배양조건	61
(2) 균체 안정화를 위한 수확과정	62
다. 병방제실험	63
(1) 평난지 배추무름병 방제실험	63
(2) 고랭지 배추무름병 방제실험	64
제 2절 길항미생물 제품화 생산을 위한 대량생산공정 확립	66
1. <i>Pseudomonas</i> 10301의 대량배양 및 제제화	66
가. <i>Pseudomonas</i> 10301의 소용량 발효조(5ℓ)배양 최적화연구	66
(1) 분석내용	66
(가) 당도분석	66
(나) 균체농도측정	66
(다) 생균수측정	67
(라) 플라스크 최적배양조건	67
(마) 소용량 발효조(5ℓ)에서의 최적화 연구	67
(바) siderophore 생성량 측정	67

(2) 결과 및 고찰	68
(가) 길항세균의 탄소원 조사	68
(나) 길항세균의 질소원 조사	69
(다) 길항세균의 미량원소에 대한 영향조사	70
(라) 탄소원 농도변화에 따른 실험	70
(마) 질소원 농도변화에 따른 실험	71
(바) 길항세균의 pH에 따른 실험	72
(사) 길항세균의 온도에 따른 실험	73
나. <i>Pseudomonas</i> 10301의 300ℓ 발효조 배양 최적화연구	74
(1) 재료 및 방법	74
(가) 공시균주 및 보존	74
(나) 균체농도측정	74
(다) 포도당농도측정	75
(라) 300ℓ 발효조에서의 배양최적화 연구	75
(2) 결과 및 고찰	75
다. <i>Pseudomonas</i> 10301의 제제 안정화	76
(1) 재료 및 방법	76
(가) 냉동동결건조(Freeze dry)	76
(나) 경시안정성검사	77
(2) 결과 및 고찰	77
(가) Freeze dry방법을 통한 세포안정화	77
(나) 흡착(adsorption)을 이용한 세포안정화	79
2. <i>Bacillus licheniformis</i> 의 대량배양 및 제제화	80
가. 재료 및 방법	81
(1) 공시균주 및 보존	81
(2) 사용배지	82
나. 배양최적화실험	82
(1) <i>Bacillus licheniformis</i> 균주의 jar fermentor에서의 배양최적화	82
(2) <i>Bacillus licheniformis</i> 균주의 pilot plant fermentor에서의 배양최적화	
다. 분석방법	82
(1) 균체량 및 포자농도 측정	82
(2) 포도당농도 측정	83
라. 미생물원제의 안정적 수확기술개발	83
(1) <i>Bacillus licheniformis</i> spore 수확	83

(가) spray dry	83
(나) freeze dry	84
(다) 경시적 변화	84
마. 결과 및 고찰	84
(1) <i>Bacillus licheniformis</i> 균주의 5l jar fermentor에서의 배양최적화 ..	84
(2) <i>Bacillus licheniformis</i> 균주의 pilot plant scale에서의 배양최적화 ..	86
(3) <i>Bacillus licheniformis</i> 원제의 제제안정화	87
3. <i>S. griseus</i> 0104의 pilot 배양을 위한 배양조건실험	89
가. 실험재료	89
(1) 고체배지	89
(2) 액체배지	89
나. 실험방법	89
(1) 균주보관	89
(2) 고체배양	90
(3) 종균배양	90
(4) 본배양	90
(5) 세포수 측정	90
다. 연구수행결과	90
(1) 고체배지선별	90
(2) 플라스크배양을 통한 액체배지 선별	92
(3) 5l 발효조의 회분식 배양	94
① Bennett's배지와 YM배지의 5l 회분식 배양	94
② Dextrin을 이용한 회분식 배양(1)	95
③ Dextrin을 이용한 5l 회분식 배양(2)	98
라. 연구성과 및 향후개발	100
4. <i>S. griseus</i> 0104 pilot배양에 의한 균체 대량생산 및 안정	101
가. 실험재료	101
(1) 생산균주	101
(2) 사용배지	101
① 고체배지	101
② 액체배지	101
나. 실험방법	102
(1) 균주보관	102
(2) 고체배양	102
(3) 종균배양	102

(4) 본배양	102
(5) 세포수측정	102
(6) 분석방법	103
다. 연구수행결과	103
(1) 고체배지선별	103
(2) 플라스크배양을 통한 액체배지선별	103
(3) 5l 발효조의 회분식 배양	111
(4) Dextrin을 이용한 500l 회분식 배양	115
라. 연구성과 및 향후계획	119
제 3절 토양병해방제용 미생물원제 및 제품에 대한 안전성 조사	120
1. 길항균주 5종에 대한 안전성 조사	120
가. 시험목적	120
나. 미생물농약등록을 위한 조사지침 자료	120
다. 길항균의 균주독성 조사	120
라. 균주독성 예비시험	121
마. 연구내용	121
(1) 공시시험동물	121
(2) 순화 및 검역	122
(3) 사육환경	122
(4) 투여약량 수준설정 및 시험물질조제	122
(5) 시험물질투여	124
(6) 관찰 및 조사항목	124
바. 결과 및 고찰	125
(1) 치사동물 및 LD ₅₀ 값	125
(2) 일반중독증상	125
(3) 체중변화	125
(4) 부검소견	126
2. 토양병해방제용 미생물원제 <i>S. griseus</i> 0104에 대한 독성 및 병원성검정 ..	127
가. 시험목적	127
나. 연구수행지침자료	127
다. 연구내용	127
(1) <i>S. griseus</i> 0104원제의 병원성 검증자료	127

(2) 공시시험동물	127
(3) 순화 및 검역	128
(4) 사육환경	128
(5) 투여약량 수준선정 및 시험물질조제	129
(6) 시험물질투여	130
(7) 관찰 및 조사항목	130
(8) 반수치사량(LD ₅₀) 및 반수치사농도(LC ₅₀)산출	132
라. 연구결과 고찰	132
(1) 급성경구 및 병원성시험	132
(2) 급성정맥 및 병원성시험	134
(3) 급성경피 및 병원성시험	135
(4) 담수어류에 대한 영향시험	135
(5) 담수 무척추동물에 대한 영향시험	136
마. 고찰	136
3. 제품의 안전성 평가(흡향, 청고탄 제품의 독성 및 병원성 검증)	138
가. 요약	138
나. 제품의 급성경구독성 및 병원성시험	138
다. 제품의 급성경피독성 및 병원성시험	140
라. 제품의 급성정맥내독성 및 병원성시험	140
마. 제품의 안점막자극성시험	141
바. 제품의 피부자극성시험	142
사. 제품의 피부감작성시험	143
아. 제품의 잉어(<i>Cyprinus carpio</i>)영향시험	145
자. 제품의 물벼룩(<i>Daphnia magna</i>)영향시험	146
제 4절 토마토포마름병 방제용 미생물제 흡향, 청고탄 생산	149
가. 제조기술 확립	149
나. 품질관리시스템 구축	150
다. 토포마름병방제 시제품의 유효미생물 검증 및 오염미생물조사	152
라. 토포마름병방제 시제품의 생물농약 등록	161
제 4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	162
제 5장 연구개발성과 및 성과활용계획	168
제 6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	168
제 7장 참고문헌	169

제1장 연구개발과제의 개요

토양전염병원균인 *Erwinia carotovora*는 작물에 무름증상을 일으키는 병원균으로 고온기 채소재배를 어렵게하는 주요인이며, *Ralstonia solanacearum*은 가지과작물의 도관부에 침입하여 식물전체를 고사시키는 병으로 토마토재배농가에 큰 피해를 주고 있다. 토마토꽃마름병원균은 기주식물이 없는 토양에서 장기간 생존이 가능하여 재배년수가 길어짐에 따라 피해정도가 심해지나 방제약제와 저항성품종이 없어 현재까지 방제법이 없다. 우리나라 토마토재배는 모두 시설하우스에서 재배되고 토마토를 대체할 만한 작목이 없어 윤작이나 꽃마름병에 걸리지 않는 다른 작목으로 작목전환이 어려워 병이 발생한 하우스에서 피해를 감수하면서 토마토농사를 짓고 있는 실정이다. 꽃마름병방제는 주로 훈증처리제나 살균제와 같은 화학물질을 이용한 방제법 연구가 주를 이루었으나 토양환경은 지상부환경과 전혀 달라 방제효과가 기대에 못미치고있다.

토양병방제는 지금까지 사용한 화학농약으로 방제하는 것이 거의 불가능하여 이를 대처할 수 있는 방제법으로 길항미생물을 이용한 생물적방제법이 활발히 연구되고있다. 토양병생물적방제법은 토양에서 분리한 미생물을 원료로 생물적방제법 국내 유기농 및 친환경농산물 수요증대로 농업인들이 화학합성농약을 대신할 수 있는 유일한 수단으로 미생물농약에 대한 관심이 증대되고 있으나 상품으로 생산·판매되는 꽃마름병방제용 미생물농약은 전무한 실정이다. 미생물농약개발의 원제가 되는 길항미생물은 토양에서 분리하여 사용하기 때문에 토양에 서식하는 미생물의 수와 종류가 다양하여 생물농약으로 개발할 수 있는 자원이 무궁무진하며, 화학농약 생산시설에 비해 초기투자비용이 적게 소요되어 소자본으로 생산기반을 구축할 수 있음은 물론 새로운 농약사업 분야로 성장 가능성이 크다. 미생물을 이용한 생물농약생산에 사용되는 재료들은 모두 사용된 미생물이 토양내에 존재하여 추후 인체나 환경에 대한 유해성도래의 위험이 적고, 부재로 사용하는 물질들은 모두 천연유기물로 생산과정에서 발생하는 폐기물의 처리가 용이하고 환경오염의 위험이 적어 친환경BT산업으로 발전가능성이 크다.

본 연구는 토마토꽃마름병원균과 배추무름병원균에 생장억제 길항력이 있는 균주를 제품화하는 데 필요한 생산공정을 확립하고, 시제품을 생산하여 피해농가에서 방제효과를 확인하고, 제품에 대한 경제성분석을 통해 산업화할 수 있는 기반을 구축하기 위해 수행하였다. 방제하고자하는 두 토양병은 기주범위가 광범위하고 지금까지 등록된 미생물농약이 국내외에 없어 국내는 외국 시장개척도 함께 추진하고자한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

(1) 국제수준

- SPL science(1996년)에 소개된 생물농약생산 회사는 세계 18개국에 소재하고 있으며, 미국 31개, 일본 10개, 영국 7개, 독일, 스웨덴, 캐나다, 오스트리아 각 4개 등이 있고, 방제대상 병해충에 대한 생물농약상품이 개발되어 있음.
- 미생물을 이용한 생물농약은 환경친화적인 재료로 미국 EPA(Environmental Protection Agency)에 70여개의 미생물농약이 등록되어 있으며, 길항미생물들이 생산한 물질들은 Biochemical pesticide로 식물체추출천연물농약과 같이 안전한 농약으로 판매중임
- 토양병방제용 생물농약은 근권에 서식하는 길항미생물을 분리하여 분말형수화제, 액상수화제로 상품화하고 있으며 처리방법으로는 종자분의, 침지처리, 엽면살포 등이 있음.

(2) 국내수준

- 생물농약으로 개발가능한 길항미생물에 대한 연구는1980년대 전반에 시작되어 대학과 농촌진흥청 농업과학기술원을 중심으로 학술적연구가 진행되었으며, 제품화에 대한 연구는 1990년대 후반부터 본격화되기 시작하였음
- 국내 미생물농약에 대한 등록규정이 2001년에 마련되어 생물농약시장개척의 계기가 되었으나 등록된 상품은 5종(농림부, 2005)으로 생물농약 도입단계 임
- 친환경농산물에 대한 수요증가로 화학농약을 대신할 미생물농약을 원하는 농가가 증가하고 있어 판매량증가가 예상되고있으나 상품종류가 극소수로 일부 농가 수입품 이용하고 있음

(3) 본 연구의 수준

- 토양병원 토마토폏마름병방제용으로 등록된 미생물농약은 국내외에 없음
- 생산된 제품은 분말, 입제, 입상수화제 등으로 유통과정이 길고 변질의 위험 적음
- 현재 유통되는 미생물제품들은 액상으로 유통년한이 짧음
- 폏마름병방제용 입제와 입상수화제 사용 농가들의 병방제효과 인정으로 미생물농약에 대한 신뢰도 증대의 계기

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절. 토마토포마름병 방제용 미생물제 병방제효과

1. 토마토시설재배지 풋마름병피해 및 방제현황

가. 병피해상황

토마토포마름병은 우리나라 전역에서 발생하여 재배농가에 큰 피해를 주고 있다. 토마토 재배 작형은 겨울을 지나는 축성재배, 1~2월에 정식하는 반축성재배, 5~6월에 정식하는 억제재배로 연중재배하고 있다. 풋마름병원균은 기온에 따라 발생양상이 다르게 나타나 9월에 정식하는 남부 지방과 삼중보온, 수막, 열풍기 시설을 갖춘 중부지방농가들은 2월 중순에 정식하여 토마토를 재배하고 있다. 이 시기는 지온과 기온이 풋마름병원균의 활동이 약한 시기로 풋마름병예방을 위한 재배시기 조절방법으로 권장되는 재배법으로 풋마름병의 진전속도가 느려 토마토가 급속히 시들어 죽지는 않으나 풋마름병원균에 감염된 토마토는 생육이 불량하고 5월 중순 이후 기온이 높아짐에 따라 병징이 나타나기 시작하여 새순부터 시들기 시작하고, 병징이 확인된 토마토는 10일 이내에 고사하였다(그림 1, 좌). 7월 초순에 정식하는 억제작형의 농가에서는 정식 후 10일 이내에 병징이 나타나 시들기 시작하여 정식 후 15일이 지나면 고사하였다(그림 1, 우). 발병된 토마토에 인접한 토마토는 관수시 점적테이프와 토양사이에 형성된 수막, 뿌리의 접촉, 결순 작업시 작업자의 손 접촉 등에 의해 빠른 속도로 전염되어 하루에도 5~10포기 씩 시들어 죽어간다. 식물체 내부에 침입한 병원균은 도관부를 통해 식물전체에 퍼져 병을 일으키기 때문에 항균살균제를 엽면에 살포하여도 방제되지 않았다. 풋마름병이 발생한 농가는 수확을 할 수 없고 방제방법이 없어 작기가 끝날 때까지 하우스를 방치하여 막대한 손해를 입고 있다(그림 2).



[반축성재배]



[억제재배]

(그림 1) 작형별 토마토포마름병 발생양상



그림 2. 토마토농사를 포기한 농가

나. 토마토폏마름병 진단

토마토가 시들어 죽는 요인은 3종류가 확인되었다. 첫번째 요인으로 곰팡이병인 반신위조병 (*Fusarium oxysporum*)에 의한 시들음 증상은 2단 수확시기부터 병징이 나타나기 시작하여 잎이 역병에 의한 병징과 비슷하게 뜨거운 물에 데인 것 같은 증상을 보인다(그림 3, 우). 이에 농가에서는 역병 방제용 농약을 살포하고 있으나 방제되지 않았으며, 병이 진전됨에 따라 하엽부터 황색으로 퇴락되면서 시들어 죽었다(그림 3, 좌). 두 번째 요인은 상처부위오염에 의한 줄기감염으로 발생하는 시들음증상으로 결순을 제거한 부위에서부터 도관부가 갈변하기 시작하여 위아래 양방향으로 진행되어 있는 가장자리부터 타들어가고 열매는 떨어지는 증상을 보였으며 발병부위에서는 3종류의 세균류가 분리되어 재 접종시 병징을 나타내었다(그림 4).



[토마토반신위조병]



[잎마름증상 및 낙과]

그림 3. 토마토반신위조병



[감염부위]



[오염에 의한 도관부손상]

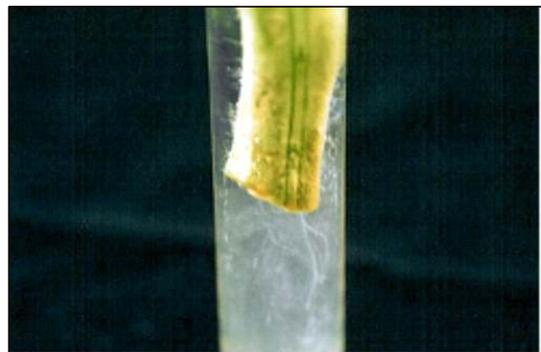
그림 4. 상처부위 오염에 의한 시들음증상

세 번째 요인은 토마토폏마름병원균에 의한 시들음증상으로 병의 진전과 확산속도가 위의 두 요인에 의한 것보다 빠르고, 수확이 불가능한 토마토 줄기를 중단으로 잘라 50배 해부현미경으로 관찰하면 목질부가 심하게 훼손되어 있는 것이 관찰되고 수확후기에는 줄기외부가 진한 갈색으로 함몰 증상을 보인다. 발병된 줄기를 횡단면으로 잘라 물에 담그면 우유빛 ooze가 흘러내렸다(그림 5).

꽃마름병원균에 감염된 토마토는 기온이 낮은 축성재배지에서는 생육속도가 느리고 수확후기 기온이 높아짐에 따라 주간에는 신초부위가 시들고 야간에는 회복되는 증세가 반되어 수량 및 맛이 떨어지고, 기온이 높은 5월~7월초에 정식하여 재배하는 억제작형의 농가에서는 정식 후 15일 이내에 병이 발생하여 전체가 시들어 죽는다. 병원균은 줄기표면을 1% Sodium hypochloride로 소독한 다음 TZC선택배지에 접종하여 배양하면 집락의 가장자리가 우유색깔을 띠고 중앙부위에 연한 붉은색을 띠는 전형적인 병원성 꽃마름병원균으로 확인하였으며, 분리한 균주를 보관하면서 그램 염색, Catalase test, 세균동정기(Biolog)를 이용하여 동정한 결과 *Ralstonia solanacearum*으로 동정되었다(그림 5).



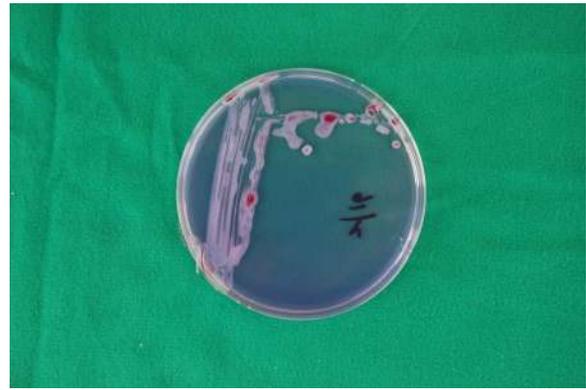
[꽃마름병 초기증세]



[ooze]



[줄기 갈변]



[꽃마름병원균]

그림 5. 토마토폏마름병 진단

다. 꽃마름병 발생농가 방제현황

토마토폏마름병은 처음으로 재배하는 농가에서 발생하여 안전한 지역은 없는 것으로 예견된다. 재배년수가 오래된 농가에서는 수년간 노력하였으나 효과가 없어 방제법이 없는 것으로 간주하고 일정한 손실을 감수하면서 토마토를 재배하고있다. 병방제를 위해 농가에서 시도하는 방법으로 과수나 벼에 등록된 살균제를 2-3종 섞어서 관주하여 방제를 시도하고 있으나 이 방법은 토마토 도관부에 잔존하는 꽃마름병원균에는 방제효과가 없었으며 일부약제는 뿌리를 손상하거나 흡수를 방해하여 생장이 멈추는 경우도 빈번하였다. 물을 90℃이상으로 끓인 물로 소독하는 방법은 처리시간과 노동력이 과도하게 소요되고, 여름철장마기 넘쳐 들어온 물이나 오염된 지하수를 따라 유입된 꽃마름병에 의해 처리당해에 병이 발생하여 실효를 거두지 못하였다. 토마토폏마름병 방제약제로 등록된 훈증소독제는 처리기간이 30일 이상 소요되고 처리시 높은 지온이 필요하여 겨울철 농한기에 처리작업을 할 수 없으며, 살포 후 개스 누출을 막기 위한 비닐덮기작업에 어려움이 있어 농가에서 사용을 기피하고있다(그림 6). 꽃마름병 예방을 위해 대부분 농가는 저항성대목에 실생을 접한 접목묘(그림 7)를 재배하고있으나 발병되었던 농가토양은 재배년수가 길어짐에 따라 토양 내 병원균밀도가 증가되어 접목묘에도 병이 심하게 발생하여 병을 방제하기위한 새로운 기술 개발이 절실히 요구되고 있다.



그림 6. 토양훈증소독



그림 7. 토마토접목

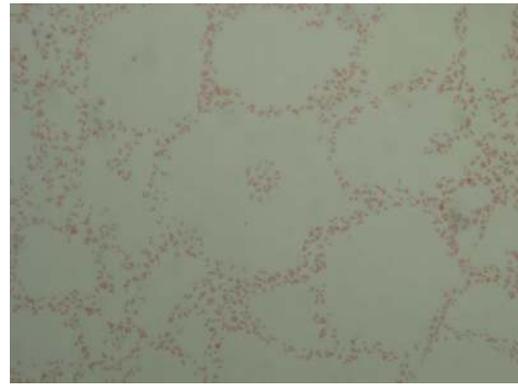
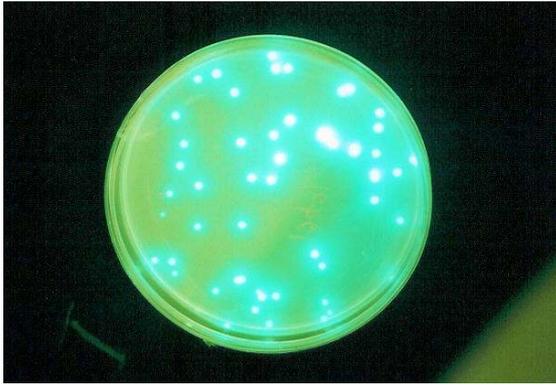
2. 풋마름병 방제용 길항균 선발

가. 토양내 미생물분리

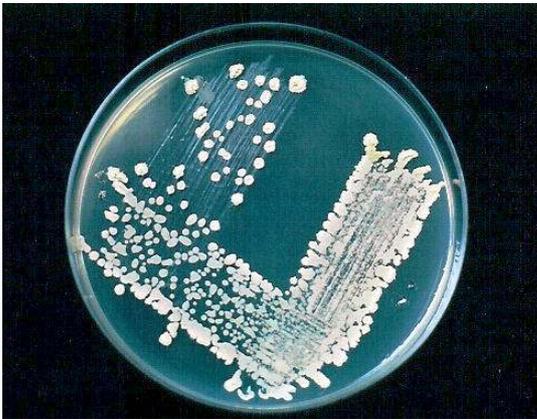
*Pseudomonas*속 5종은 King's medium B배지에서 형광색소를 생산하는 균주들을, *Bacillus*속 3종은 근권토양을 멸균수에 현탁하여 90°C autoclave에 30분간 열처리한 후 Nutrient agar배지에 접종하여 형성된 집락으로부터 endospore를 형성하는 균주, *Streptomyces*는 Lockwood's chitin agar 배지에서 공중균사를 형성하고 chitin분해능이 있는 균주들을 순수분리하여 보존하였다(그림 8).

나. 분리균주 길항작용조사

분리보존 중인 균주들의 풋마름병원균에 대한 길항균은 PDA와 NA를 1:1로 섞어 준비한 Plate에 7일간(세균류-28°C, 방선균류-25°C) 배양하고, 형성된 집락에서 배지와 함께 균체를 cork borer로 떼어내어 glass-petri dish로 옮긴 후 Chloroform으로 균체를 사멸시켜 저지원 조사시료로 준비하였다. 풋마름병 병원균은 nutrient broth에 접종하여 16시간 진탕배양(30°C, 140rpm)하여 멸균수로 3회 세척하여(10,000rpm, 10min)균체를 수확하여 O.D. 0.4가 되게 0.85% 생리식염수에 현탁하였다. 준비한 병원균현탁액은 고압증기멸균 후 40°C로 식힌 0.3% nutrient agar배지 100ml에 5ml씩 접종하여 균질화한 후 basal agar배지 위에 분주하여 bacterial lawn을 준비하고, 준비된 저지원 조사 시료를 Bacterial lawn 위에 Plate 당 2개씩 정치하여 배양한 후 형성된 저지원형성(halo)유무로 길항균을 판정하였다. 풋마름병원균 이외의 병원균에 대한 길항작용을 확인하기 위해 곰팡이 병원균에 대한 길항균분리는 분리보존 중인 균주를 PDA-NA(1:1)배지에 그림 5(우)와 같이 접종하여 3일간 배양한 후 *F. oxysporum*을 접종배양하여 저지원을 형성하는 균주를 길항균으로 분류보존하였다(그림 9). 병원균에 대해 길항력이 확인된 균주들은 동정을 위해 냉동보관(-20°C)하였다.



[*Pseudomonas* 속]



[*Bacillus* 속]

그림 8. 토양미생물분리



그림 9. 길항균선발시험

다. 길항균주 동정

보존 중인 길항균주들은 미생물동정장치(Bio-log), 미생물분류체계(Bergey's manual of Bacteriology, The prokaryote-second edition), 유전적유연관계(한국농용미생물보존센터)를 참고로 동정한 결과 K.B배지에서 수집한 균주는 *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, *P. aurethica*, *P. synxantha*, *P. marginalis* 5종, 열처리하여 NA에 접종하여 분리한 균주는 *Bacillus subtilis*, *B. polymyxa*, *B. licheniformis* 3종, Chitin agar에서 분리된 균주는 *Streptomyces griseus*로 동정되었다. 풋마름병원균에 대해길항력이 확인된 *S. griseus*0104균주는 고체배지상에서 공중균사를 형성하고 연쇄상의 포자를 형성하는 방선균(그림 10)으로 기존에 보고된 균주와의 유전적유연관계를 조사하였다. 16S DNA 염기서열을 분석하기 위하여 DNA를 추출하고, 16S DNA PCR증폭을 실시하였으며 증폭된 PCR 산물을 정제하여 염기서열을 분석하였다. 분석된 염기서열(1,213bp)은 DDBJ/NCBI/Genbank와 Ribosomal Database Project II의 database에서 상동성검색을 수행한 결과, *Streptomyces* 속의 종을 포함하는 계통학적 그룹에 속하는 균주로서 *Streptomyces griseus* ATCC 25497^T (D63872)와 99.83%의 유연관계를 나타내어 *Streptomyces griseus*로 확인되었다(그림11).



그림 10. *S. griseus*0104포자

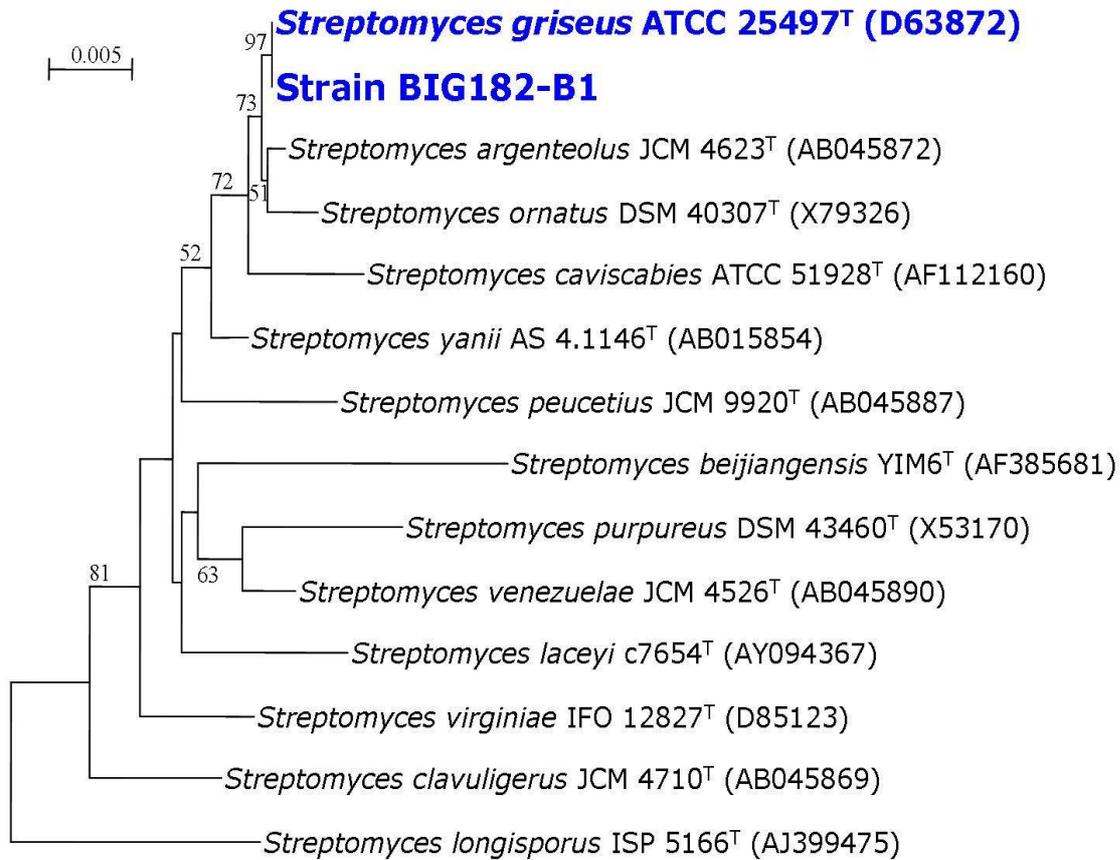


그림11. *S. griseus*0104의 계통학적 위치

라. *S. griseus*0104의 토마토폏마름병원균에 대한 길항작용

(1) 배지조성별 *S. griseus*0104 항균물질 생산

항균물질 생산능을 조사하기 위해 사면배지에 배양하여 형성된 *S. griseus*0104포자를 수확하여 세척한 후 준비된 각 배지에 10^3 spores/ml 접종하여 7일간 배양(25°C, 120rpm)하고, 배양액은 원심분리하여 균체를 제거하였다. 균체를 제거한 배양여액은 동결건조하여 분말상태의 조추출물을 준비하였다. *R. solanacearum*은 24시간 배양한 후 1ml를 취해 원심분리(10,000rpm, 5min)하여 세척한 후 0.3% semi-solid agar(40°C)에 현탁한 후 분주하여 bacterial lawn을 준비하고, *S. griseus*0104를 각 배지에 배양하여 준비한 조추출물을 500배 희석하여 Filter paper disc에 250µl 접종한 후 준비된 *R. solanacearum* lawn위에 정치한 다음 3

0°C 배양기에서 72시간 배양 후 형성된 저지원을 확인하였다. 항균물질생산능은 영양배지인 Nutrient Agar나 PDA에서 배양한 것 보다 무기영양원배지(배지1)에 질소원을 첨가하거나(배지 3) 질소원과 탄소원을 동시에 첨가한 배지2에서 항균물질생산능이 향상되었다. 특히 무기영양배지에 질소원과 탄소원을 첨가한 배지2에서의 항균물질생산능이 크게 높아졌다(그림 12).

표 1] *S. griseus* BIG 182-B1 항세균물질생산능조사를 위한 배지조성

배지명	배지조성
배지1	(NH ₄) ₂ SO ₄ 2.64g, KH ₂ PO ₄ 5.65g, K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O 5.65g, MgSO ₄ ·7H ₂ O 1g, Trace salts 1ml, Distilled water 1 L, agar 20g, pH 6.8~7.0 with 1N NaOH or 1N HCl ※ Trace salts(Pridham & Gottlieb) CuSO ₄ ·5H ₂ O 0.64g, FeSO ₄ ·7H ₂ O 0.11g, MnCl ₂ ·4H ₂ O 0.79g, ZnSO ₄ ·7H ₂ O 0.15g, D.W. 100ml Store for 1month at 3~5°C
배지2	배지1 + glycerol 20g, glucose 4g, 콩가루 10g, NaCl 3g
배지3	배지1 + beef extract 3g, peptone 5g
배지4	배지 1+ yeast extract 10g
배지5	200g감자추출액, Dextrose 20g, agar 20g
배지6	beef extract 3g, peptone 5g

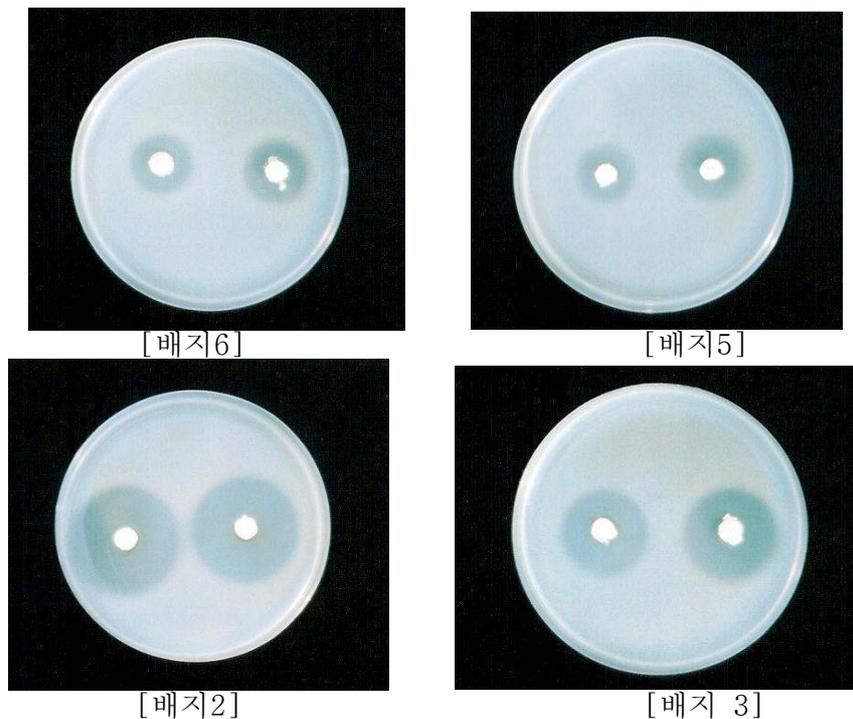


그림 12. *S. griseus*0104 배지조성별 항균물질 생산능

(2) 향균물질 분리정제

고체배양에서 *S. griseus*0104의 향균물질생산능을 높여주는 배지2를 20 L 액체배양기에 16 L 넣어 고압증기멸균한 다음 포자를 10^4 spores/ml 농도로 접종하고, $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 항온실에서 폭기하면서 5일간 배양하였다(그림 13). 배양액은 점도를 낮추기 위해 증류수를 1:1(v/v) 첨가한 후 원심분리하여 균체 및 배지잔여물을 제거한 배양여액을 Amberlite IRC-50에 통과시켜 흡착시킨 후 2.5N sulfuric acid until pH 5.0로 추출하였다(그림 14, 15). 추출하여 수확한 물질/(25g/16 L)는 *R. solanacearum*에 대한 향균력조사에 사용하였다.

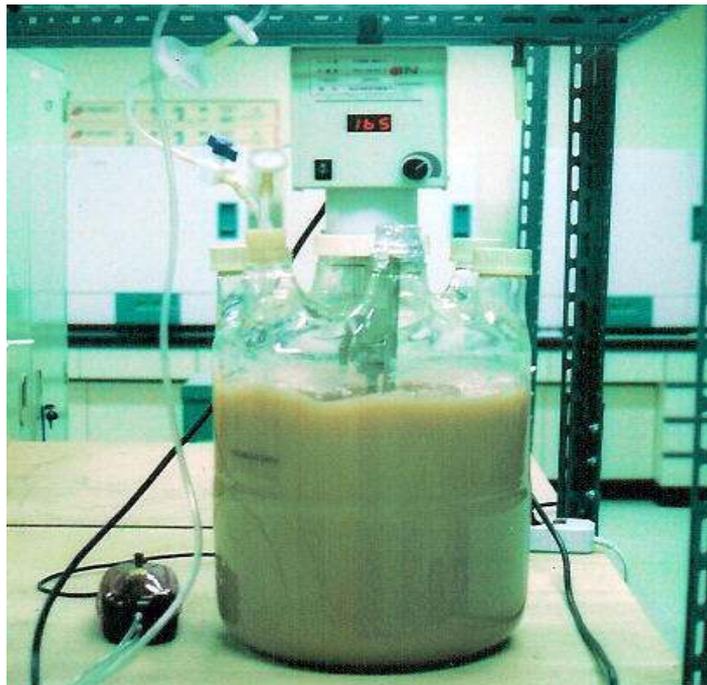


그림 13. *S. griseus*0104 액체배양

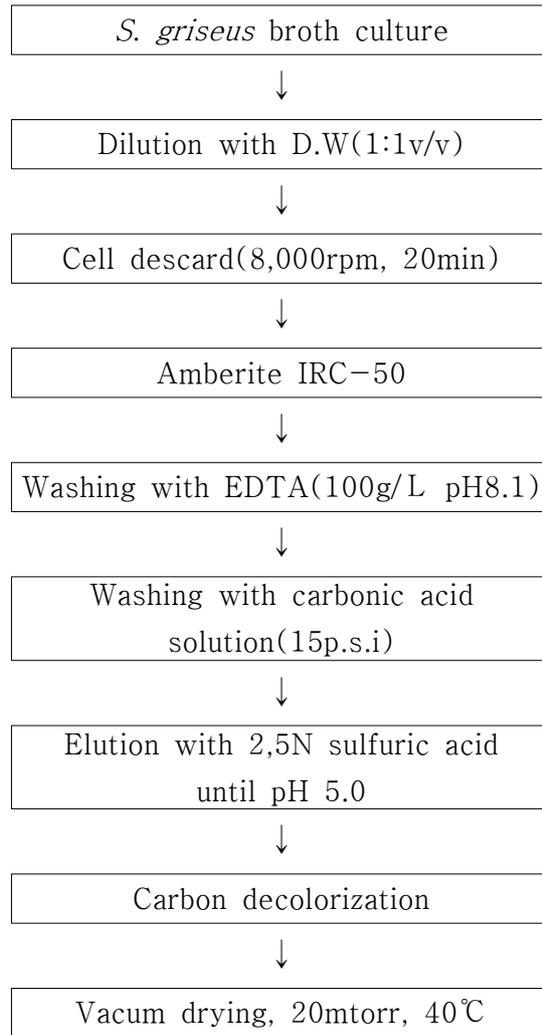


그림 14. 항세균물질 추출과정]



그림 15. 흡착크로마토그래피

*S. griseus*0104 배양여액을 흡착크로마토그래피로 정제한 물질의 *R. solanacearum* 성장억제능을 조사하였다. *R. solanacearum*을 N.B에 10^6 cfu/ml로 접종하고, 준비된 항생제시료를 각각 1/1,000(w/v)농도로 넣어 준다음 30°C에서 진탕배양하면서 풋마름병원균 밀도감소를 각 배양기간별로 배양액을 채취하여 Basal medium(Dextrose 10g, Peptone 10g, Casamino acid 1g, agar 18g, D.W.1L)에 도말접종배양하여 형성되는 집락수로 살아남은 균수를 조사하였다. *S. griseus*0104가 생산한 항생균물질은 항균활성능이 있었다(그림 16).

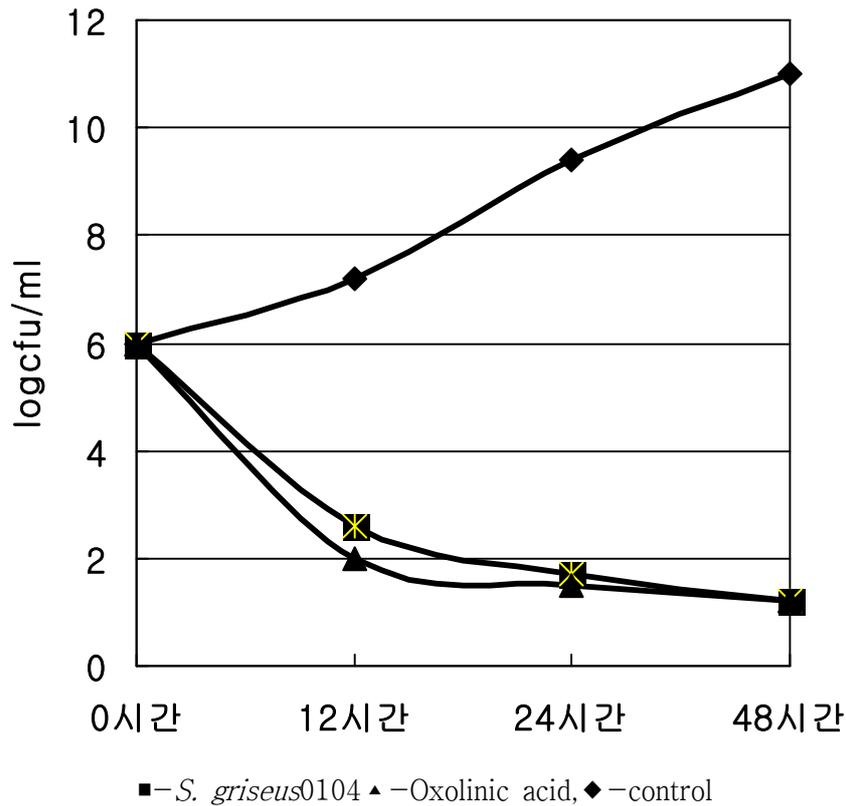


그림 16. *S. griseus*0104 배양여액 풋마름병원균 살균효과

(3) *S. griseus*0104의 토양내 정착능

정착능조사를 위해 사용한 토양시료는 토마토폏마름병으로 고사한 토마토근권토양으로 채취한 토양은 뿌리잔재물을 제거한 후 포트에 분배하고 판매용 푸대거름을 80g씩 뿌려 골고루 섞어주고 액체배양한 *S. griseus*0104 배양액을 토양에 10^5 cfu/g.soil 농도로 접종하였다. 채취한 토양은 3년간 퇴비를 사용하지 않은 농가의 토양으로 토양내 유기물 함량이 0.1%로 낮고 방선균밀도는 10^4 cfu/g.soil 이었다. *S. griseus*0104를 접종한 시험구의 토양내 방선균밀도는 무처리구보다 높게 유지되었고 처리 26일 후에는 토양내 방선균밀도가 무처리구보다 1.7배 높았다(그림 17).

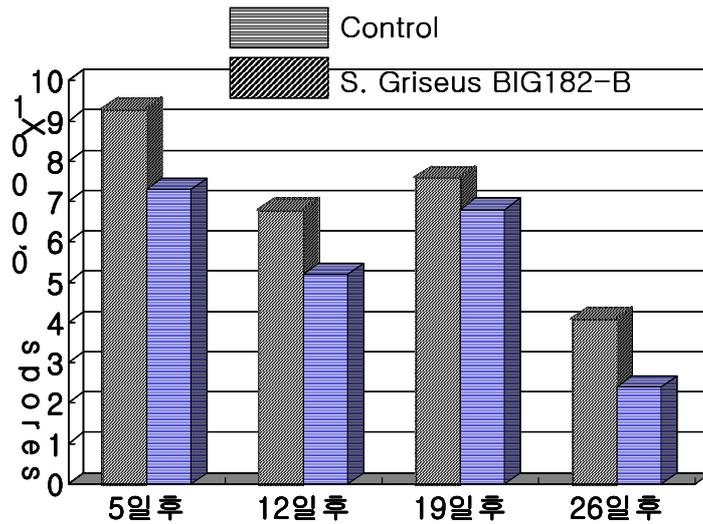


그림17. *S. griseus*0104 토양내 정착력

(4) *S. griseus*0104 처리에 의한 토마토폏마름병원균 밀도변화

채취한 토양은 5월 중순에 정식하여 6월말에 병이 발생되어 토마토를 뽑아낸 토양을 채취한 것으로 토양 1g당 병원균밀도는 100cfu로 높았다. 포트실험을 수행하면서 병원균밀도를 기간별로 흙을 채취하여 밀도를 조사한 결과 시간이 지날수록 밀도가 높아져 26일 후에는 1,000,000~1,500,000cfu/g.soil로 크게 증가하였다. *S. griseus*0104 처리구에서 초기에는 병원균밀도가 증가하였으나 시간이 지날수록 밀도가 감소하여 12일 후부터 밀도가 감소하였고 26일 후에는 실험 초기밀도보다 낮아졌다(표 2).

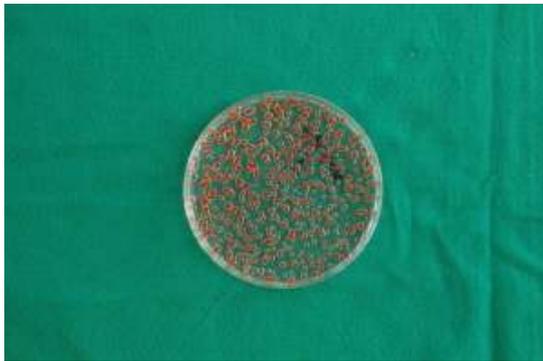
표 2] 길항균처리에 의한 발병지 토양내 폏마름병원균 밀도변화 (logcfu/g.soil)

처리내용	길항균접종전	처리 5일 후	처리 12일 후	처리 19일 후	처리 26일 후
<i>S. griseus</i> 0104	1.63	3.75	3.13	3.00	1.25
control	2.00	2.88	4.38	4.63	6.41

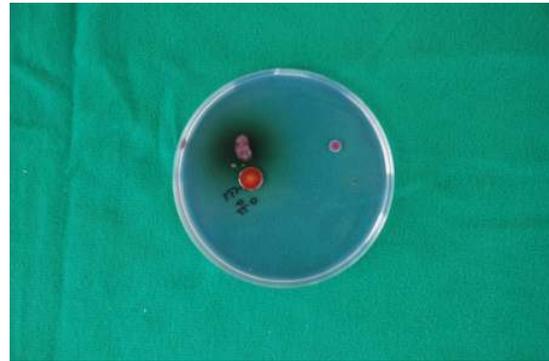
(5) 폏마름병원균의 토양내 잔류양상조사

톏마름병이 발생하였던 농가의 폏마름병원균 월동양상을 조사하기 위해 11월 말 수확이 끝난 후에 토마토넝쿨을 제거하지 않고 다음해 1월에 밭작업을 할때 까지 방치하였다. 1월 초순 밭작업을 하기 바로전에 토양과 뿌리시료를 채취하였다. 토양 자체에서의 월동상태는 토마토 그루터기를 삼으로 굴취하여 조심스럽게 흙을 털어 최대한 뿌리에 붙어있는 흙을 모아 멸균수에 희석하여 선택배지에 도말접종하고, 월동한 뿌리 내부의 폏마름병원균 조사는 흙을 털어낸 뿌리를 수돗물에

헝구어 뿌리에 잔류하는 흙을 제거한 후 표면의 물기를 제거하고 0.1g을 멸균수 10ml와 함께 막자사발에 넣어 으갠 다음 선택배지에 접종하였다. 조사결과 월동한 토마토그루터기의 뿌리는 썩지 않고 원형 그대로 보존되어 있었으며, 근권토양내 풋마름병원균 밀도는 500~700cfu/g.soil이었고, 뿌리잔재물 내 풋마름병원균 밀도는 뿌리 1g당 400,000cfu 씩 월동하고 있었다. 따라서 토마토 연작지 풋마름병원균 밀도 증가요인은 토양에 잔재하는 뿌리에 기인(그림 18)된 것으로 확인되었다.



[잔재뿌리내 병원균밀도]



[근권토양내 병원균밀도]

그림 18. 풋마름병원균 월동양상

3.. *S. griseus*0104제품생산을 위한 제형기술개발

*S. griseus*0104는 배양기간이 길고, 본 연구자들이 지금까지 사용하였던 Nutrient broth에서는 그림 19와 같이 균사상태로 자라 장기보존이 어렵고 수요농가에 보급하는 것이 매우 어려웠다. 특히 병발생이 심한 농가는 토마토근권 내 *S. griseus*0104의 밀도를 유지하기 위해 재배중에 2~3회 처리하여야하는데 이러한 균사는 필터를 통과하지 못하고 실재농가에서 처리할 때는 주전자나 물조루로 포기관주하는 어려움이 있다. 본 연구목표는 *S. griseus*0104를 장보존이 가능하고 농가에서 쉽게 처리할 수 있는 제품을 만들고자하였다.

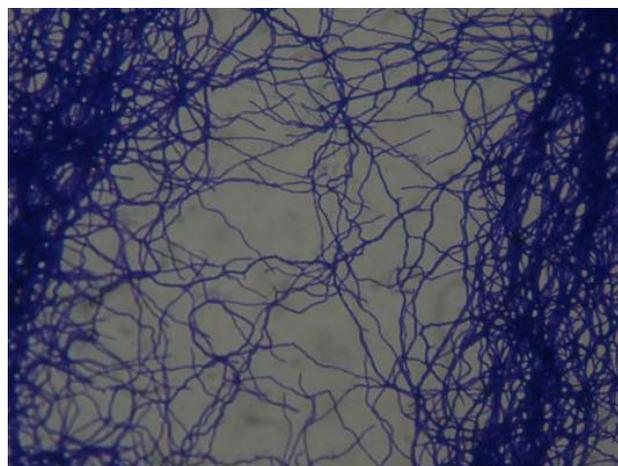


그림 19. Nutrient broth내 균사생장

가. 대량배양을 위한 액체배양배지 선발

많은 연구자들이 사용한 방선균을 분리하거나 포자유도연구에서 제시한 배지조성을 응용하여 *S. griseus*0104 포자대량배양을 시도하였으며 각 배지조성은 한천을 첨가하지 않은 방선균선택배지(egg albumin agar-EAB, Chitin agar-CB, PHSP), 감자배양배지(Potato Dextrose agar-PD), 세균배양배지(Nutrient agar-NB)를 이용하였다. 액체배양은 broth를 배지로 공시하였으며(표 3), 20 L 배양병에 각 액체배지를 18 L씩 분주하여 121°C, 1시간 동안 고압증기살균하였다. 균주접종은 시험관 사면고체배지(Potato Dextrose agar)에 접종하여 28°C 배양기에서 15일 배양하여 형성된 포자를 수확하여 멸균수에 세척한 후 액체배지 1ml당 10^4 spores 농도로 접종하였다. 배양온도는 25°C와 28°C에서 폭기, 교반하면서 배양하였다(그림 9).

표 3] 액체배지조성표

액체배지명	배지조성분
EAB	Dextrose 1g, K ₂ HPO ₄ 0.5g, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.2g, Fe(SO ₄) ₃ 0.01g, Egg albumin 0.25g, pH6.8
CB	colloid chitin 2.5g, KH ₂ PO ₄ 0.7g, KH ₂ PO ₄ 0.5g, MgSO ₄ 0.5g, FeSO ₄ 0.01g, ZnSO ₄ 0.001g
PD	200g/1 L 증류수 감자끓인액, Dextrose 20g
NB	Peptone 5g, Beef extract 8g
PHSB	PD broth, KH ₂ PO ₄ 0.7g, KH ₂ PO ₄ 0.5g, MgSO ₄ 0.5g, FeSO ₄ 0.01g, ZnSO ₄ 0.001g

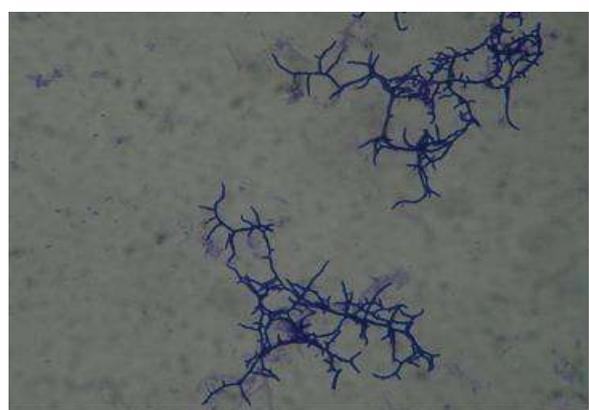


그림 20. *S. griseus*0104액체배양 및 균사분체

각 액체배지에 배양한 *S. griseus*0104는 배양2일 후까지 군사생장이 왕성하여 슴방울형태로 뭉쳐 개체수 증가는 관찰되지 않고, 배양3일 후부터 세균배양액처럼 현탁되면서 자라기 시작하여 개체수 밀도가 증가하였다. 그러나 배양 10일까지 포자전환은 이루어지지 않았으며 배양기간이 5일 이상 지나면 그림 20과 같이 군사단편으로 전환되었다. 군사단편의 생산량은 Chitin broth에서 5일 후에 최대수확량(10^9 cfu/ml)에 도달하였으며(그림 21) 배양된 군사단편을 수확하여(5,000rpm, 10min) 세척한 후 skim milk, 감자분쇄물, beef extract + myo-Inositol 현탁액에 넣어 동결건조시키면 균은 생존하여 분말상태로 생산이 가능하였다.

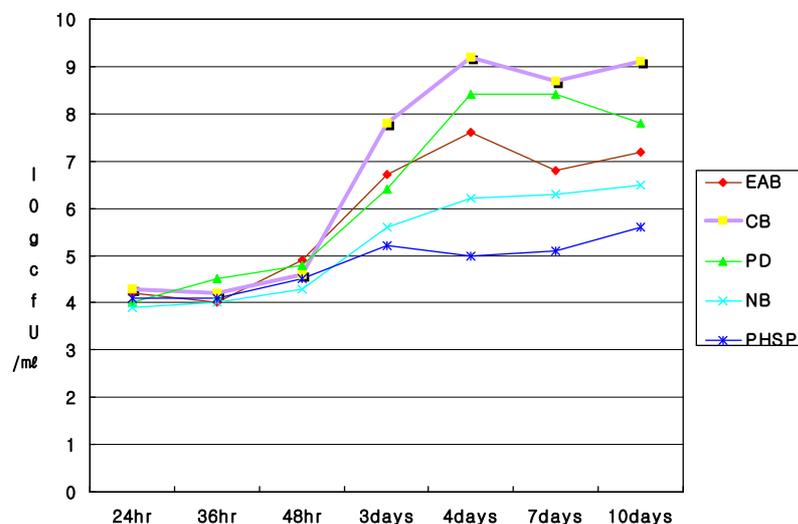


그림 21. 배지조성별 *S. griseus*0104 성장곡선

나. 고체배양

(1) 배양배지선발

액체배양시 사용한 5종의 배양배지에 agar 20g을 첨가하여 고압멸균시킨 후 9cm Petri dish에 분주한 후 10^4 spores/ml 농도로 준비한 *S. griseus*0104 포자현탁액을 0.1ml씩 접종한 후 bead를 사용하여 도말접종하였다. 고체배지에 배양한 *S. griseus*0104는 초기 흰색의 군사생장을 하고, 포자형성기에는 콜로니 표면으로부터 회색빛을 띤다. 배지조성에 따라 포자형성시기는 다르게 관찰되었으며 25°C 배양시 PDA배지에 Chitin agar배지의 무기영양원을 첨가한 배지(PHSB)에서 포자형성이 가장(접종 5일 후)빠르게 진행되었으며 10일 후에는 배지 1ml 당 10^6 spores를 수확할 수 있었다(표 4).

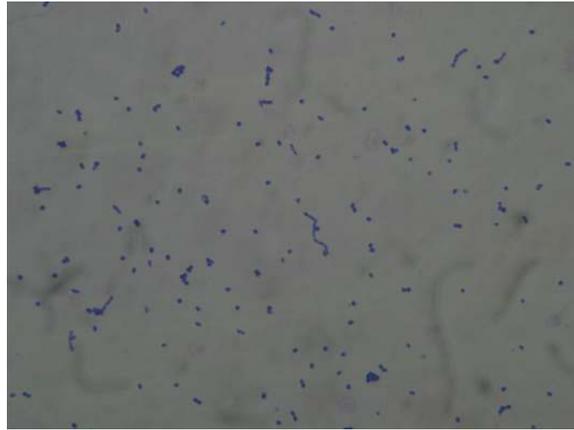


그림 22. *S. griseus*0104 포자(crystal violet 염색)

표 4] *S. griseus*0104 포자형성소요기간

고체배지	포자형성소요일수(일)	spores/ml
EAB agar	22	2×10^5
CB agar	18	4×10^4
PDA	12	1×10^4
NA	25	3×10^4
PHSBA	10	2×10^6

배양온도 25℃

(2) 균체수확 및 원제생산

PHSBA배지에서 배양한 *S. griseus*0104 포자는 배지상에서 회색빛을 띄고 멸균수에 현탁하면 물 표면에 부유하여 배양용기에서 부착되어 수확이 어렵다. 이를 해결하기 위해 계면활성제, 5% ethanol, 1% 세제를 이용한 결과 1%세제로 포자를 수확하였을 때 용기부착에 의한 손실과 포자세척을 위한 원심분리시 저속, 짧은시간(3,000rpm, 10min)에 포자분리작업이 수행되었다. 세제로 수확한 포자는 세제를 제거한 후 멸균수에 현탁시켜도 포자가 떠오르지 않았으며 생존율에도 영향을 주지 않았다(표 5).

표 5] 수확 용매 *S. griseus*0104 포자 발아율^b에 대한 영향

수확용매	발아율(%)			
	12hr	24hr	36hr	48hr
멸균수	37	78	98	99
1% 세제	54	87	97	99
3% tween 80	48	87	98	99

^b 수확후 멸균수세척, 발아율조사매지 NB, 배양온도 28℃

포자수확에 사용된 용액에 의한 포자손상여부를 확인하기 위해 물리적 손상요인인 초음파진동과 분해효소인 lysozyme에 대한 저항성을 확인하였다. 초음파진동은 초음파세척기(JAC4020, Kodo Co.)의 중간과동에서 10분간 노출시키고, lysozyme에 대한 저항성은 20mM TES buffer(pH 7.2) 1ml에 lysozyme 20 μ g을 넣어 준비한 용액에 포자를 현탁하고 37℃에서 1시간 노출시켰다. 처리한 포자는 Phosphate PDA 배지에 접종하여 배양한 후 형성된 집락수로 생존율을 비교하였다. 사용된 용매들은 초음파진동이나 분해효소에 의한 손상을 입지 않아 생존율 감소에 영향을 받지 않았다(표 6).

표 6] 물리적, 화학적 스트레스에 대한 포자안정성

	초음파처리			분해효소처리		
	무처리(a)	진동(b)	b/a	무처리(x)	lysozyme(y)	y/x
멸균수	52.9	59.9	113%	60.78	54.78	90%
1%세제	76.7	80.8	105%	66.6	64.6	97%
3% tween80	64.1	66.1	103%	63.1	66.1	105%

미생물농약 개발을 위해 생산비절감을 필수해결사항이다. 고체배양으로 수확한 *S. griseus*0104 포자는 물리적, 화학적 환경에서 손상을 입지 않아 안정된 세포임을 확인하여, 연구단계에서 사용하였던 고가의 시약을 대신할 수 있는 세포보호재료를 찾고자 하였다. 공시한 재료는 세균보존에 사용하는 NB+inositol, 공업용 탈지분유, 감자분말을 재료로 조사하였다(표 7). 세균보존용으로 사용하는 NB+inositol를 이용하여 동결건조한 포자의 생균수는 40℃고온저장시 50일 후에 0.01% 감소하고, Skim milk로 동결건조한포자는 0.04% 감소하였다. 그러나 저장 30일에는 감소량이 NB+inositol보다 적어 상온에서 보관하거나 저온보관시에는 생균수 손실이 거의 없었다.

표 7] 고온저장에 의한 *S. griseus*0104 포자생균밀도 감소

보조제	40℃ 고온저장시 생균밀도변화(cfu/g)			
	제형시 밀도	10일 후	30일 후	50일 후
Skim milk	3.2×10^{11}	2.8×10^{11}	1.6×10^{10}	1.4×10^8
NB+inositol,	1.4×10^{12}	1.6×10^{11}	2.4×10^9	1.6×10^9
감자분말	1.7×10^{11}	3.4×10^{10}	4.2×10^8	2.9×10^6

1% 세제로 수확한 포자현탁액은 500ml 원심분리관에 담아 원심분리(3,000rpm, 10min)하여 상층액은 버리고 가라앉은 포자에 멸균수를 부어 진탕기로 현탁시킨 후 400mesh 체에 통과시켜 배지부스러기, 균사체, 연쇄상 포자체 등을 제거하였다. 체로 걸러 통과된 단리된 포자는 3회 원심분리하여 대사산물이나 세제성분을 완전히 제거하고(100,000배 이상) 최종 수확된 포자는 15ml conical centrifuge tube를 이용하여 물기를 제거하였다. 수확된 포자는 보호제(skim milk 300g, 증류수 1000ml)에 현탁시켜 동결건조하였다. 동결건조는 보호제에 현탁한 포자를 1 L 가지달린플라스크에 200ml씩 분주하여 -55℃ deep freezer에 12시간 이상 동결시킨 후 7mm torr 진공동결건조기에서 건조시켰다. 동결건조 후 수확한 시료는 멸균된 비닐봉지에 넣어 잘게 부순 후 200mesh 체에 통과시켜 최대한 미세한 입자로 마쇄하여 준비한 다음 입제와 입상 수화제 생산원제로 사용하였다.

(3) 토양혼화처리용 입제생산

*S. griseus*0104를 토양에 쉽게 살포할 수 있게하기 위해 펠렛형태로 입제화하였다. 입제제조시 사용된 부재료는 방선균생장촉진을 위한 C/N율을 고려한 농산부산물 2종, 초기 정착력을 촉진시켜주는 당류, 방선균의 효소활성을 돕는 키틴질을 결체광물질인 벤토나이트와 6:4(무게비)로 섞어준 다음 *S. griseus*0104 포자원제를 첨가하고 수분을 공급하여 반죽하였다. 반죽한 재료는 역회전과립제조기(지름 3mm)로 성형한 다음 45℃ 강제환기식 건조기에서 건조하였다. 생산된 제품은 생균밀도 10^5 spores/g가 되도록 조정하였다(그림 23).



그림 23. 토양온화처리용 입제

(4) 관수처리용 입상수화제 생산

포자상태로 준비한 원제를 제품화하기 위해 키토산, 당밀, 규조토 2종, 분산제를 혼합하여 농가에서 사용할 때 분말이 날리지 않고 물에 짧은 시간내에 혼화되도록 제조하였다. 입상수화제의 생균밀도는 10^7 spores/g가 되도록 조정하였다(그림 24).



그림 24. 관수처리용 입상수화제

4. 토마토폏마름병 피해농가 현지포장시험

가. *S. griseus*0104 균체처리에 의한 방제효과조사

(1). 시험농가 포장선정 및 포장관리

토마토폏마름병 방제시험 농가포장은 2005년에 병발생이 심하여 농사를 포기한 2개 농가에서 각각 하우스 1동(150평)씩 선정하여 길항균(*S. griseus*0104)을 이용한 병방제 효과시험을 추진하였다. 시비관리는 300평당 시판퇴비는 800kg, 비료는 성분량(N-20.4kg, P-10.3kg, K-12.2kg), 붕소 2kg, 소석회120kg을 살포한 후 경운하였다.

(2) 정식 및 *S. griseus*0104 균체처리

길항균처리는 육묘장에서 구입한 실생묘와 접목묘를 정식 2일전에 관수량을 최소한 줄여 육묘관

침지시 길항균현탁액이 충분히 스며들 수 있도록 관리하였다. 육묘판을 담글 수 있는 용기에 *S. griseus*0104 균체(10^{10} cfu/g)를 1,000배로 희석하여 준비한 후 침지처리하였다. 관주처리는 정식 10일 후부터 7일 간격으로 1,000배로 희석한 *S. griseus*0104균체희석액과 chitin을 포기 당 150ml씩 5일간격으로 3회 관주하였다. Chitin은 게껍질을 1M NaOH와 1.2M HCl에 2시간 씩 교대로 담궈 광물질과 단백질성분을 제거하고 건조한 후 0~2°C HCl 원액에 넣어 게껍질가루가 투명해질 때까지 저은 후 증류수로 HCl을 씻어 낸 후 Homogenizer (30,000rpm)로 콜로이드 상태로 마쇄한 후 200mesh에 통과시켜 관수시설에 막히지 않도록 전처리하고 희석량은 물 1L 당 2g씩 첨가하였다.

(3) 풋마름병방제효과

현재 농가에서는 풋마름병피해가 매년 확산되고 발생시 방제방법이 없다. 농가에서 가장 많이 사용하고 있는 방법은 풋마름병저항성대목을 이용한 접목묘를 구입하여 토마토를 재배하고 있으며, 종자비가 2배로 소요되고 접목시 인건비지출에 의한 농가 생산비 부담이 큰 실정이다. 이러한 접목묘도 완전한 방제효과가 완전하지 않아 접목묘 사용농가에서도 풋마름병피해가 매년 증가하고 있다.

풋마름병 피해를 입은 농가에서 실생묘를 대상으로 *S. griseus*0104 균체처리효과를 시험하였다. 무처리구는 정식 후 20일 이내에 고사하여 수확을 전혀 할 수없었으나 *S. griseus*0104 균체처리구에서는 처리횟수와 제형방법에 따라 방제효과 차이가 있었다. 정식기에 1회 침지처리한 시험구는 4단 수확기에 병발생이 12.5%로 나타나 적심하였다. 정식시 침지처리하고 5일간격으로 관주처리한 시험구에서는 5단수확기에 7.5%발병하여 적심하였다. 원제 관수시 chitin을 함께 관주한 시험구는 후확 후기까지 2.3%발병하여 끝까지 토마토수확이 가능하였다(표 8). 저항성대목에 접을한 접목묘는 3단 수확기에 병발생율이 25.7%로 적심하였고, 침지처리와 관주처리를 병행한 시험구는 발병율이 0.2% 이하로 정상수확이 가능하였다(표 9).

표 8] 병피해농가 현지포장시험

(실생묘-7월 중순 정식)

처리내용	발병시기(수확단수) ¹⁾	발병율(%)
<i>S. griseus</i> 0104 침지	4단	12.5
<i>S. griseus</i> 0104 3회관주	5단	7.6
<i>S. griseus</i> 0104 + chitin(3회관주)	6단	2.3
무 처 리	0단	100

¹⁾ 조사시점 : 상위단 수확개시 시기

처리내용	발병시기(수확단수) [♯]	발병율(%)
<i>S. griseus</i> 0104침지	7단	3.5
<i>S. griseus</i> 0104 3회관주	7단	0
<i>S. griseus</i> 0104 + chitin(3회관주)	7단	0.2
무 처 리	3단	25.7

[♯] 조사시점 : 상위단 수확개시 시기



그림 25. 실생묘 *S. griseus*0104 병방제시험

본 농가는 3중보온하우스, 수막 및 온풍기시설이 갖춰져 동계재배하는 농가로 2004년 풋마름병 피해가 커 2005년에는 *S. griseus*0104 균체처리로 병발생이 현저히 감소한 농가로 올해(2006년)에는 풋마름병발생율이 0.2%였다. 수확이 끝난 후 토마토 넝쿨을 제거하기 위해 줄기를 잘라 도관부를 관찰한 결과 도관이 갈변되어 손상되고 하엽이 퇴색되어 단풍이드는 증상주가 90%이상이었다. 이 병된 도관부를 습식처리한 후 현미경관찰한 결과 반신위조병(*Fusarium oxysporum*)으로 확인되었다(그림 27). 이러한 증상은 풋마름병을 막기 위해 토양을 건조하게 관리한 농가에서 자주 관찰되고 있어 이에 대한 대책도 병행해야 할 것으로 사료된다.



그림 26. 반축성재배농가 저온기 풋마름병방제시험



[건전주 도관부]



[반신위조 피해 도관부]



[반신위조병발병주]



[*F. oxysporum*]

그림 27. *F. oxysporum*에 의한 토마토 반신위조병

나. 제형물 풋마름병방제효과 극대화를 위한 기내시험

(1) *S. griseus*0104 제형물 처리에 의한 토양내 풋마름병원균 방제효과조사

풋마름병 발생율이 60%이상인 농가의 토양을 채취하여 가로47cm, 세로30cm, 깊이 20cm 플라스틱 상자에 채운 다음 토양혼화처리용 과립제, 액상수화제, 분말수화제를 처리한 후 풋마름병원균 병원균밀도변화를 선택배지(tetrazolium agar)를 이용하여 형성된 집락수로 조사하였다. 실험을 위해 채취한 토양은 재배 중 풋마름병으로 고사한 근권토양을 채취한 것으로 토양내 풋마름병원균 밀도가 10^6 cfu/g.soil으로 매우 높았다. 준비한 제형물들은 입제(10^4 spores/g), 분말수화제(10^6 spores/g), 액상수화제(10^6 spores/ml)가 되도록 준비하였다. 토양내 살포량은 표 4와 같이 상자의 넓이가 10a(990m²)의 1/6400배로 축소되어 있어 처리량도 이 배율에 준하였다. 실험을 수행한 유리온실의 온도가 높아 풋트내 지온이 26°C 이상으로 유지되었다. 제형물 처리후 시간이 지남에 따라 무처리구의 병원균 밀도는 크게 감소하지 않고 유지되었으나 각 제형물을 살포한 풋트의 풋마름병원균 밀도는 감소하였다. 특히 입제 처리구에서의 병원균 밀도가 낮아져 병방제효과가 높을것으로 예견된다(표 10).

표 10]. 발병토양 *S. griseus*0104 제형물처리에 의한 풋마름병원균 밀도억제효과

제 형 물	10a당 처리량	상자당 처리량	log cfu/g soil	
			10일 후	30일 후
입 제	40kg	6.25g	3.7	2.4
분말수화제	100g	0.016g	6.0	4.7
액상수화제	2L	0.32ml	4.8	3.8
무 처 리	0	0	6.3	6.3



그림 28. 풋마름병 병원균 밀도조사

(2) 제형별 *S. griseus*0104 밀도조정에 의한 풋마름병방제 증진효과조사

수확한 포자는 10^{11} spore/g의 밀도로 원제를 준비하여 입제는 당밀, 키틴질, 면실박, 등겨, 벤토 나이트를 부재로하여 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 spores/g으로 생산하고, 입상수화제는 규조토, 당밀, 키틴산, 분산재를 부재하여 10^7 , 10^8 , 10^9 spores/g으로 생산하였다. 생산된 제품은 발병지 토양을 담아 준비한 상자에 처리하여 병발생양상을 조사하였다. 처리방법은 입제는 정식 15일전에 살포하여 흙과 잘 섞어주고, 입상수화제는 1,000배로 희석하여 주당 100ml씩 10일 간격으로 3회 관주하였다. 방제효과조사결과 입제처리구에서는 평균 12.5%의 발병율을 보이고, 입상수화제 처리구에서는 평균 22.5%의 발병율을 보였다(표 11). 입상수화제의 경우 원제밀도가 높은 처리구에서 수확후기까지 병이 발생하지 않았으나 수확종료기에 지재부에서 갈반증상이 관찰되고 시들음증상을 보였다. 입제는 정식기 1회살포로 2단 수확기 까지 병발생이 없었으며 10^7 spores/g으로 생산한 입제를 처리한 시험구에서는 병이 발생되지 않았다.

표 11] 제형제 방제효과 증대를 위한 원제밀도 시험

방제재료	spores/g	생육단계별 발병율(%)					
		3화방	4화방	5화방	2단수확	4단수확	수확종료
입 제	10^4	0	0	0	10	20	20
	10^5	0	0	0	0	0	10
	10^6	0	0	0	0	10	20
	10^7	0	0	0	0	0	0
입상수화제	10^7	0	0	0	20	40	50
	10^8	0	0	0	0	20	20
	10^9	0	0	0	0	0	20



그림 30. 제품 풋트내 방제효과조사

다. 토마토꽃마름병방제용 기능성퇴비제조 및 병방제효과조사

토마토재배농가는 정해진 공간에서 단기작 또는 이기작을 수년~수십년 간 토마토를 재배한 결과 지력이 약해져 해가 갈수록 수량과 품질이 떨어지는 것은 물론이고 병해충에 대한 저항력이 낮아져 이를 해결할 수 있는 방안마련이 시급한 실정이다. 대부분 농가에서 사용하는 퇴비는 공장형 푸대거름에 의존하고 추가로 생볏짚, 등겨, 왕겨, 수피등을 토양에 살포하고 있다. 이러한 미숙퇴비들은 토양에서 발효되면서 발생하는 가스장애의 위험성이 있고, 염류집적, 비료성분 흡수장애, 발효시 발생하는 유인물질에 의한 해충발생, 토양내 유해미생물의 서식지 역할, 연용시 미분해유기질의 집적으로 오히려 지력을 약하게하는 요인이되고 있다. 이를 해결하기 위해 대부분농가들은 흡수율을 높이는 기능을 첨가한 고가의 비료, 효과기작이 확실하지 않은 액상의자재, 엽면살포용 영양제등에 의존하여 생산비 부담이 매년 증가하고 있다. 이에 대한 유일한 대책은 과거 70년대 후반까지 화학비료가 일반화되지 않았을 때 모든 농사일에 사용되었던 퇴비제조방법을 재적용하여 자신들의 밭에 뿌리는 것 뿐이다.

(1) 발효퇴비 제조

퇴비제조를 위해 필요한 재료들로 깔짚으로 볏짚을 사용한 우사의 우분, 참나무 톱밥과 면실피, 사탕수수박을 배지재료로 병재배하는 버섯재배농가의 폐배지, 등겨, 논에서 겨울을 지난 볏짚을 자른 것, 콩대공을 수집하여 모은 다음 버섯폐배지:등겨:볏짚:콩대공:우분(125:25:3:2:24w/w)비율로 대강 혼합한 후 야외에서 물을 뿌려가면서 층쌓기(높이 1m 20cm 정도)를 하고 비닐로 덮어 수분손실방지 및 보온을하였다. 발효과정 중 퇴비수분이 어느정도 날아가 덮어 놓은 비닐 가장자리에 거름물이 흐르지 않을 때 포크레인으로 뒤집기 작업을 하였다. 뒤집기 작업은 3회 퇴비자리이동을 시켜 충분히 뒤섞고 부족한 물을 뿌려주었다. 45일간 발효(5회 뒤집기)시켜 퇴비온도가 50℃(15cm 깊이)로 안정화될 때 까지 야적하여 발효시켰다. 준비된 퇴비의 톤당 주요비료성분은 칼슘 12.9kg, 가리 25.4kg, 마그네슘 5.3kg, 질소 19kg, 인산 15.1kg으로 비료성분이 골고루 분포하였다(표 12). 퇴비사용은 토양물리성을 향상시켜 보습력과 배수력을 향상시켜 뿌리의 발육을 좋게하고, 토양에 비분을 공급하여 수량을 증가시켜주었다.

표 12] 속성발효퇴비의 비료성분분석

	pH (1:5)	EC (dS/m)	Ca (mg/kg)	K (mg/kg)	Mg (mg/kg)	Na (mg/kg)	T-N % of wt.	P ₂ O ₅ mg/kg
퇴 비	8.7	24.7	12.9	25.4	5.3	6.6	1.9	15153
밭토양	6.4	0.4	10.7	0.5	0.4	0.2	0.1	217

(2) 토마토폏마름병방제용 기능성퇴비 살포효과

(가) 발효촉진을 위한 농산부산물첨가효과

퇴비는 C/N율, 통기성발효, 혐기성발효, 수분, 온도가 적당히 유지되었을 발효가 원활히 이루어져 질 좋은 퇴비를 만들 수 있다. 농가에서는 대부분 납품업자가 공급하는 우분을 밭에 뿌리거나 미리 구입한 우분도 쌓인 채로 방치한 후 밭에 뿌려 퇴비살포 효과를 느끼지 못하고 있다. 우분발효를 위해 첨가한 벼짚, 마늘짚, 양파껍질, 버섯폐배지 등은 모두 퇴비화 과정에서 우분의 통기성을 향상시켜 발효속도를 높여주어 우분자체만을 발효시킨 퇴비보다 온도가 빠르게 상승하였다. 마늘짚과 양파껍질은 농산물도매시장에서 발생한 쓰레기를 유용한 퇴비재료자원으로 활용하였다. 농산부산물을 첨가하여 발효시킨 퇴비는 우분 자체만으로 발효시킨것보다 토마토폏마름병원균에 대한 생장억제 저지원이 크게 확인되어 토양내에서 퓌마름병원균에 대한 정균효과가 있는 것으로 확인되었다(표 13).

표 13] 발효퇴비 물추출물 항균활성조사

부산물재료	저지원(mm)
벼짚 + 우분	3.2
마늘짚 + 우분	2.3
양파껍질 + 우분	3.7
버섯폐배지 + 우분	2.1
우 분	1.3

(나) 부산물첨가 발효퇴비 *S. griseus*0104 균체처리효과

우분과 농산부산물을 버섯폐배지:등겨:벼짚:콩대공:우분(125:25:3:2:24w/w)로 섞어 발효시킨 퇴비의 내부농도가 온도가 45°C이하로 떨어져 발효가 끝난 퇴비에 *S. griseus*0104를 흑설탕액(1kg/100 L·물)에 10⁶ cfu/ml로 희석 한 후 퇴비 1MT 당 10 L씩 접종하였다(그림 31). 준비된 퇴비는 200 평당 1MT 씩 정식 15일전에 살포하고 비료는 농가관행에 따라 처리하였다. 2007년과 2008년도에는 입제가 생산되어 자가제조퇴비살포시 입제를 전면살포한 후 경운하였다. 2005년도에 퓌마름병 피해로 토마토농사를 포기하였으나 2006년에는 기능성퇴비를 살포하여 발병율이 25%로 6단에서 적심하여 5단까지 수확하여 소득을 올리기 시작하였으며 수확한 토마토의 상품성이 좋았다. *S. griseus*0104를 토양살포용으로 생산하여 2007년부터 토양에 처리하고, 재배기간 분말수화제를 3회

관수한 결과 발병율은 1% 미만으로 6단까지 수확하였다. 2008년에는 토마토폏마름병에 대한 위험성이 해소되어 실생묘를 정식하였고 군데군데 발병되어 발병율은 0.01%미만이였다(표 14).

표 14] *S. griseus*0104 접종 제조퇴비 풋마름병방제효과

년 도	사용퇴비	발병상황	재배상황	비고
2005년도	생우분, 생벼짚	정식 한달 후 폐원	-	농사포기
2006년도	기능성퇴비	발병율 25%	6단적심	상품성 좋음
2007년도	자가발효퇴비	1%미만	6단수확	정상수확
2008년도	자가발효퇴비	0.01%미만	6단수확	봄작기실생묘



[퇴비재료준비]



[재료혼합 후 발효]



[*S. griseus*접종]



[농가포장살포]

그림 31. 풋마름병방제용 기능성퇴비제조

(다) 퇴비 입제첨가효과

2006년도 풋마름병피해를 본 2농가는 밀거름으로 수피에 우분을 섞은 퇴비, 계분, 등겨를 정식 2개월 전에 밭에 살포한 후 경운하여 밭을 만든 뒤 토마토를 정식하고있었다. 2007년 8월에 피해상황을 확인하고 퇴비제조를 권유하였으며 10월에 우분을 준비하였다. 우분은 수분함량이 많아 발효시키기 어려워 버섯재배농가에서 얻어온 버섯폐배지를 구입하여 퇴비재료로 준비하였다. 다음 작기에 사용될 퇴비였기에 속효성 발효를 할 필요가 있었으며 준비된 우분은 15일 간격으로 3회 뒤집기 작업을하여 발효시키고, 우분 1톤 당 입제 20kg을 섞어준 다음 포크레인으로 뒤집기 작업을 하여 방선균을 접종하고 비닐로 덮어 보온하면서 후발효를 시켰다. 퇴비살포량은 하우스(7×90m) 1동당 경운기 트레일러 2대 분량(약 1톤)씩 살포한 후 경운 및 골만들기 작업을하였다. 정식은 2008년 2월초에 하였으며 정식후에는 *S. griseus*0104 분말수화제를 2회 관주처리하였다. 그결과 봄작기와 여름작기에 토마토풋마름병 발생율은 0%로 정상수확을 하였다(농가명, 박학중, 김재성 2농가).



[입 제]



[버섯폐배지]



[뒤집기작업]



[농가포장]

그림 32. 입제첨가 퇴비제조퇴비 농가현지적용

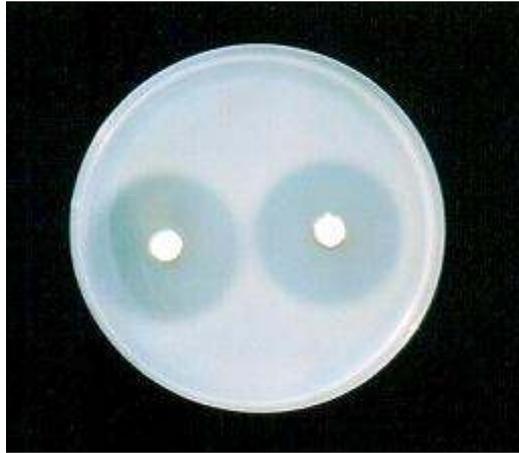


그림 33. 과립제 첨가퇴비에서 추출한 항균물질 역가검정

라. 토마토폯마름병방제를 위한 토양살포용 입제, 관수용 입상수화제 체계처리효과

토마토 풋마름병원균은 토양병원균으로 토양에 장기간 살아남아 토마토재배기간 동안 어느때고 토마토에 침입할 수 있으며, 식물체내에 침투한 병원균은 목질부를 짧은 기간내에 손상을 주어 고사시킨다. 일단 식물체내에 침투한 병원균은 방제할 수 있는 방법이 전혀 없어 침입을 예방하는 것이 이병을 방제하는 유일한 방법이다. 따라서 토마토폯마름병을 방제하기 위해서는 토양내 풋마름병원균 밀도를 낮추어 침입기회를 줄이고, 재배기간 동안 병원균의 침입을 철저히 방지할 수 있는 기술개발이 필요하다.

본 연구에서 개발한 토마토폯마름병방제용 미생물제는 풋마름병원균에 대해 길항력이 뛰어난 *S. griseus*0104를 원제로하여 2종류로 제품화하였다. 입제는 *S. griseus*0104가 토양내에서 잘 정착할 수 있도록 도와주는 영양성분을 첨가해 제형화한 것으로 토양전면살포시 토양내에서 *S. griseus*0104의 길항작용으로 토양내 풋마름병원균의 밀도를 낮춰준다. 입상수화제는 *S. griseus*0104가 필터나 점적테이프가 막히지 않도록 입상수화제로 제형화한 것으로 토마토재배기간 중 관수처리하면 근권에 정착하여 풋마름병의 침입을 방지해주는 역할을 한다. 따라서 토마토폯마름병을 방제하기 위해서는 경운시에 입제를 전면에 살포하고 재배기간 중에는 입상수화제를 주기적으로 관주하는 체계처리가 필요하다. 체계처리 방법은 퇴비살포시 입제를 10a당 30kg을 밭 전체에 살포한 후 로타리작업을 하고, 만약 밭이 너무 건조하면 입제를 뿌린 후 분수호수등으로 관수하여 수분을 공급한 후 로타리작업을 한다. 정식 후 재배기간에는 입상수화제를 10a당 300g 씩 물에 현탁하여

점적테이프로 관수해준다. 관수 횟수는 표층부위에서 새뿌리가 나올때 형성된 연약한 부위로 병원균이 침투하는 것을 방지하기 위해 10일 간격으로 3회 실시해준다(그림 34).



[입제토양처리]



[입상수화제]

그림 34. 토마토폏마름병방제용 *S. griseus*0104 2제품

라. *S. griseus*0104 미생물제 처리효과에 의한 경제성분석

제품생산을 위한 생산회사와 농가부담을 감안한 토마토재배농가들의 의견을 수렴한 결과 입제는 포대당(20kg-200평 처리용) 60,000원, 입상수화제는 1병당(200g-200평처리용) 20,000원으로 결정하였다. 따라서 10a당 농가구입액은 180,000원이 소요되었다.

2006년도 토마토폏마름병으로 피해를 본 4농가를 선정하여 체계처리로 병방제효과를 수치로 계산한 결과 발병이 심한농가 적은농가 모두 방제효과로 얻은 소득증대효과에서 얻은 수익액의 14%정도 부담되 약제구입에 대한 부담액비율이 낮은 것으로 조사되었다(표 15).

표 15] 토마토폏마름병 피해농가 체계처리에 의한 소득증대효과

시험농가	발병율(%)		병방제소득증대효과 ² (원/15,000주)	약제구입비 (원)	실소득 증대효과(원)
	2006년	2007년			
1	38	14	12,600,000	900,000	11,700,000
2	23	0	9,660,000	900,000	8,760,000
3	17	0	7,140,000	900,000	6,240,000
4	83	46	15,540,000	900,000	14,640,000

²10kg/2.5주, 순소득 7,000원/10kg

마. 양액재배(코코피트)농가 입상수화제 처리효과

토마토양액재배를 농가에서는 재배년수에 관계없이 토마토폏마름병이 발생한다. 병이 발생되면 밀식으로 근접한 뿌리를 통해 자루에 심어져있는 토마토가 모두 감염되어 죽게된다. 대부분 양액재배농가에서는 그림 35와 같이 배지경이 토양과 격리되어 병원균의 유입이 안될것으로 생각하고 있다. 배지는 토양과 달리 미생물상이 풍부하지 못해 병원균 유입시 병이 발생할 가능성이 토경보다 훨씬 높다. 폏마름병방제를 호소하는 농가들의 부탁으로 입상수화제를 분양하여 병방제효과를 확인한 결과 3농가 모두 결과에 만족하였다. 처리방법은 토마토 1,000주당 청고탄 200g 한병을 물에 희석하여 관주한다. 관주 시점은 저녁무렵 마지막 관주시 처리하여 *S. griseus*0104포자가 양액과 함께 흘러내리는 것을 최대한 줄일 수 있게한다. 처리횟수는 10일 간격으로 3회 관주해준다(방제효과 확인농가: 김승재, 김동훈, 김종열 3농가)..



그림 35. 코코피트 자루 양액재배농가

바. 피해농가 현지 방제시험

본 연구 수행과정 중 연구결과에 대한 언론매체홍보 결과 토마토폏마름병 피해를 입고있는 농가들의 부탁으로 개발된 입제와 입상수화제를 분양하여 현지에서의 방제효과를 확인하였다.

방제효과에 대한 입소문으로 매년 처리하고자 희망하는 농가가 증가하여 금년에는 100여 농가가 분양을 위하여 협동연구기관인 (주)비아이지와 협력하여 지원하고 있다. 폏마름병이 발생한 농가에서는 발정리시(정식 1달 전)에 입제(흑향 - 상표등록예정명)을 10a당 30kg씩 전면 에 살포한 후 경운하고, 정식 후 10일 간격으로 입상수화제(청고탄 - 상표등록예정명)을 10a 당 300g씩 10일 간격으로 관주하면 거의 모든 밭에서 토마토 폏마름병이 방제되었다.

① 허남신농가 : 강원도 춘천시 사농동 (011-362-5266) - 현지포장관리 연구원

시험연구기간 : 2006 ~ 2009년

재배면적 : 6,600m²(2,000평), 토경재배

주요 처리내용 : 퇴비제조용 입제, 수화제처리, 입제처리

처리효과 : 발병율 60% 이상 ⇒ 1% 미만, 09년 현재 실생묘재배로 생산비절감

② 함경준농가 : 강원도춘천시 신북읍 울문리()

병방제 지원 : 2007 ~ 2009년

재배면적 : 4,950m²(1,500평), 토경재배

주요처리내용 : 입제(150kg), 입상수화제(200g, 24병)

처리효과 : 발병율 40% 이상 ⇒ 1%미만

③ 김복기농가 : 강원도횡성군 마암2리()

병방제지원 : 2007~2009년

재배면적 : 3,300m²(1,000평)

주요처리내용 : 입제(100kg), 입상수화제(200g, 15병)

처리효과 : 병발생을 50% 이상 ⇒ 0.1% 미만

토마토폏마름병피해 농가 병방제용 미생물제분양

농가수	농가명	주 소	연락처
1	박 재 익	춘천시 신동	
2	천 명 현	춘천시 신동	
3	김 태 호	춘천시 우두동	
4	이 종 봉	춘천시 신동	
5	김 진 태	홍천군 내면	
6	이 정 구	춘천시 서면	
7	이 운 회	영월군 주천면	
8	안 영 환	원주시 무실동	
9	이 상 국	정선군 북평면	
10	함 영 근	춘천시 우두동	
11	정 건 수	여주군 가남면	
12	이 재 선	충남 서천군	
13	조 홍 진	충북 옥천군	
14	정 진	충남 논산시	
15	김 대 영	전북 익산군	
16	정 용 일	춘천시 서면	
17	임 성 춘	춘천시 우두동	
18	임 명 조	경남 진주시	
19	임 흥 섭	홍천군 내촌면	
20	유 성 현	춘천시 신북읍	
21	윤 기 주	춘천시 동면	
22	정 시 명	홍천군 내면	
23	김 선 민	춘천시 서면	
24	백 경 열	춘천시 신북읍	
25	박 승 옥	인천시 계양구	
26	김 동 석	춘천시 신동	
27	김 한 섭	춘천시 우두동	
28	김 방 수	춘천시 신북읍	
29	이 영 우	춘천시 사농동	
31	이 운 래	경기도 포천군	
32	박 창 석	충남 논산시	
33	김 광 식	경북 영천시	
34	이 병 재	신북읍 울문리	
35	김 진 호	"	
36	조 한 익	"	
37	김 주 동	"	
38	김 동 환	"	

39	이 재 환	"
40	장 용 운	철원군 생창리
41	조 은 재	김해시 대동면
42	김 근 영	춘천 샘뚜럭작목반
43		
44	김 성 복	"
45	유 재 천	"
46	현 병 식	"
47	김 영 해	"
48	성 문 용	소양강 명품단
49	전 용 재	"
50	용 기 중	"
51	이 승 규	"
52	최 상 희	"
53	임 태 환	"
54	김 길 수	"
55	김 영 수	"
56	강 석 기	횡성군 강림면
57	김 광 섭	횡성군 안흥면
58	김 기 영	횡성군 안흥면
59	김 덕 준	횡성군 안흥면
60	김 돈 영	횡성군 안흥면
61	김 세 철	횡성군 안흥면
62	김 용 상	횡성군 안흥면
63	김 호 영	횡성군 안흥면
64	박 수 복	횡성군 안흥면
65	박 언 수	횡성군 안흥면
66	박 윤 균	횡성군 안흥면
67	박 태 선	횡성군 안흥면

68	배 광 욱	횡성군 안흥면
69	백 종 선	횡성군 안흥면
70	선우영수	횡성군 안흥면
71	오 용 근	횡성군 안흥면
72	원 은 주	횡성군 안흥면
73	정 동 흥	횡성군 안흥면
74	정 매 조	횡성군 안흥면
75	정 영 만	횡성군 안흥면
76	이 상 혁	횡성군 안흥면
77	주 동 석	횡성군 안흥면
78	주 운 석	횡성군 안흥면
79	최 영 관	횡성군 안흥면
80	홍 구 표	횡성군 안흥면
81	홍 철 호	횡성군 안흥면
82	황 은 선	횡성군 안흥면
83	이 정 우	횡성군 안흥면
84	차 인 표	횡성군 안흥면
85	안 일 찬	횡성군 안흥면
86	최 창 환	경북 성주군
87	김 영 복	춘천시 하일리
88	임 흥 섭	홍천군 내촌면
89	안 영 기	정선군 임계면
90	이 원 순	화천군 계상리
91	전 우 택	화천군 계상리
92	송 준 호	춘천시 사농동

제 5절 배추무름병방제용 길항균주

1. 길항균주선발

King's medium B배지에서 형광물질을 생산하는 균주를 분리하여 배추무름병원균(*Erwinia carotovora*)와 대치배양하여 저지원을 형성하는 균주 중 *Pseudomonas synxantha*, *P. aurantica*, *P. marginalis* 3균주는 배추무름병원균에 대해 철이온 영양경쟁관계, *P. fluorescens*, *P. putida* 균주는 영양경쟁과 항균작용이 있었다. Nutrient broth에서 분리한 균주 *Bacillus subtilis*, *B. polymyxa*, *B. licheniformis* 3균주는 대치배양시 저지원이 뚜렷하여 항균물질생산력이 확인되었다. 보존 중인 길항균들은 미생물동정장치(Bio-log), 미생물분류체계(Bergey's manual of Bacteriology, The prokaryote-second edition) 참고하여 동정하였다.

2. 균체시료제조

무름병과 풋마름병에 대해 길항작용이 확인된 *Pseudomonas* 5종, *Bacillus* 2종을 포장에서 사용하기 쉽도록 동결건조하여 균체가 살아있는 상태로 분말수화제제로 제형화하였다. 제형과정은 *Pseudomonas* 속은 K.B broth(proteose peptone 20g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.5g, K_2HPO_4 1.5g, Glycerol 15g, D.W. 1 L)에서 배양하였고, *Bacillus* 속은 Dextrose를 첨가한 Nutrient broth (Bacto-peptone 5g, Beef extract 3g, Dextrose 10g, D.W. 1 L)에 배양하였다. 1 L 삼각플라스크에 액체배지 300ml를 분주하여 진탕배양(130rpm, 25°C, 24시간)한 후 원심분리하여 세척하고 동결건조하였다.



그림 36. 길항세균 액체배양

가. 배양배지 선발 및 배양조건

균체증식을 위한 액체배양용 배지로 *Pseudomonas*는 K.B. 배지에서 24시간 배양 후에 균체를 수확하여 동결건조하면 95%의 높은 수확율을 보였으며, *Bacillus*는 Nutrient broth에 36시간 배양하여 수확하였을 때 최대균체수를 확보하고 수확율은 97%였다. PD broth

는 값이 싸고 배양속도는 빠르나 levan과 같은 끈적한 점액물질이 생성되어 균체 수확율이 떨어지는 단점이 있었다(표 16).

표 16. 균체수확을 위한 배지별 최적배양시간¹⁾

배 지 명	균밀도 (log cfu/ml)	배양시간 (시간)	균체수확율 ¹⁾ (%)
K.B. broth	9.8	24	96
Nutrient broth	10.2	36	97
PD broth	10.0	24	73

¹⁾ 배양조건 : 28℃, 150rpm, 진탕배양 균체수확 : 8,000rpm, 20min(한일Co. supra 30K, A500S-6N)

나. 균체 안정화를 위한 수확과정

세균류는 이분법에 의해 증식되어 포자수확시기인 지수적증가기에는 세포가 서로 붙어 있고 영양성장단계이기 때문에 갑작스러운 물리적, 화학적 외부환경에 약하게 된다. 따라서 균체를 수확할 때는 저온처리에 의해 세포를 단리시켜 안정된 상태로 유도하고, 수확 과정에서 물에 의한 삼투압변화와 원심분리에 의한 물리적 외부환경에 세포가 손상되는 곳을 예방하여 주어야 한다. 이를 위해서 세균배양액은 세균은 4℃ 이하로 1시간 이상 정치하고, 수확과 세척을 위한 원심분리 분리과정에서 0.1M 인산완충용액(pH6.0)을 사용할 때 98%의 생존율을 보였다(표 17). 수확된 균체를 장기보존하기 위해서는 수분이 거의 없는 상태로 보존하여야 하는데 발효산업체에서 대부분 사용하고 있는 동결건조 방법이 가장 안전한 방법이다. 이에 따라 수확된 균체들은 분말상동결건조 Nutrient broth에 Inositol을 섞은 보조제를 사용하여 동결건조하여 저장1년 후에도 log 10¹²cfu/g의 높은 생균밀도를 유지하였다(표 18)

표 17. 균체생균수 확보를 위한 세척용 완충용액선발

완충용액	생존율(%)	비 고
0.1M 인산완충용액(pH6.0)	98.7	
0.85% 생리식염수	96.4	4℃, 8,000rpm, 20min, 3회세척, <i>P. aurantifica</i>
멸 균 수	97.2	

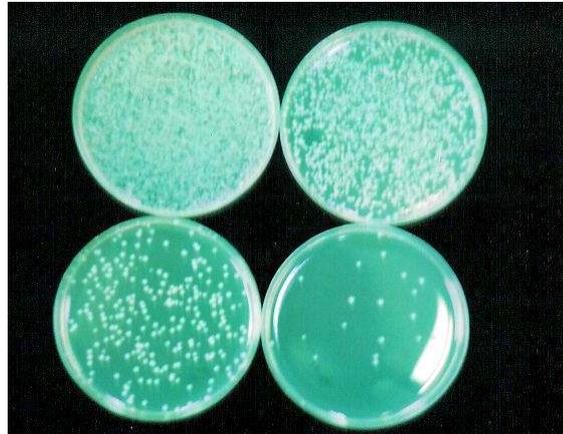
표 18. 장기보관용 *Pseudomonas* spp. 제형물 균체보호제 선발

균체보호제	1년 후 생균밀도 [♯] (log cfu/g)	균체보호제 조성
20% Skim milk	8.7	skim milk 200g, D.W. 1 L
Inositol broth	10.2	nutreint broth 25g, myo Inositol 50g, D.W.1 L.
Nutrient broth	7.8	Beef extract 3g, Peptone 5g, Glucose 2g. D.W. 1 L

[♯] 보관조건-실내(25±7℃), 보존용기-PE병



[시험사업용 길항균 제형물]



[길항균제형물 생균밀도조사]

그림 37. 분의제 제형물[좌] 및 생균밀도조사[우]

3. 병방제실험

가. 평안지 고온기 배추무름병 생물적방제실험

(1). 농가포장선정 및 포장관리

배추무름병방제 시험은 전년에 병발생이 심했던 농가(발병율 67%)에서 농가의 양해를 구해 수행하였다. 퇴비는 우분:콩대공:버섯폐배지:뽕짚:등겨(10:2:3:3:1w/w)를 섞어 75일간(15일간 격 5회 뒤집기) 발효시켜 준비한 다음 300평당 2MT씩 살포하였다. 비료살포는 배추노지 표준시비량에 준하여 살포하고, 벼룩잎벌레 방제를 위해 terfos입제(5kg/300평)를 정식전에 살포한 후 경운하였다.

(2) 시험구배치 및 무름병방제효과조사

시험구배치는 난괴법 3반복으로 구당 30평씩(총면적 900평) 구분하여 시험을 수행하였다(그림 38). 길항균살포는 10^9 cfu/g로 제형한 각 시료를 1,000로 희석한 후 정식 20일 후 부터 7일 간격으로 3회 엽면이 흠뻑 젖게 살포하고 발병율은 수확기에 조사하였다. 시험결과 무처리구 발병율은 27%로 2005년도 발병율 67%보다 크게 감소하였고, 공시한 7종의 길항균주 처리구는 무처리구대비 배추무름병 방제효과가 62.6~84.8%로 높게 확인되었다. 특히 *P. auranthica*, *P. marginalis*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*는 80%이상 높은 방제효과를 보였다(표 19).



그림 38. 고온기 평단지 배추무름병 생물적방제방제실험

표 19] 배추무름병 방제효과

시험구 번호	처 리 내 용	발병율(%)			평균	방제가
		1반복	2반복	3반복		
1	무 처 리	32.3	21.3	27.3	27.0	-
2	<i>Pseudomonas synxantha</i>	8.2	2.9	10.7	7.3	72.9
3	<i>P. auranthica</i>	6.3	1.7	5.3	4.4	<u>84.8</u>
4	<i>P. marginalis</i>	7.3	2.6	3.2	4.4	<u>84.8</u>
5	<i>P. fluorescens</i>	7.3	10.4	11.3	9.6	64.4
6	<i>P. putida</i>	11.3	8.7	12.3	10.7	62.6
7	<i>Bacillus subtilis</i>	3.8	7.4	5.3	5.5	<u>79.6</u>
8	<i>B. licheniformis</i>	3.7	4.2	6.6	4.8	<u>82.2</u>

나. 고랭지배추 무름병 생물적방제실험

(1). 농가포장선정 및 포장관리

시험농가 포장은 해발 700m 고랭지로 5월 중하순에 정식하여 장마철인 7월하순에 출하하는 전형적인 고랭지배추 재배농가이다. 생육기에는 해충이나 잔병이 없어 잘 자라지만 수확기에는 장마에 의한 잦은 비로 무름병발생이 심하여 농약살포에 어려움이 있고 씻겨내려가 3~5일에 한번씩 농약을 살포해야만 수확을 할 수 있었다. 퇴비는 우분을 구입하여 3달간(3회 뒤집기) 발효시켜 준비하고, 시험포장은 유기물함량이 많아 준비한 퇴비를 10a 당 1.5MT씩 살포하였다. 비료살포는 배추노지 표준시비량에 준하여 살포하고, 벼룩잎벌레 방제를 위해 terfos입제(5kg/300평)를 정식전에 살포한 후 경운하였다.

(2) 시험구배치 및 무름병방제효과조사

시험구배치는 난피법 3반복으로 구당 30평씩(총면적 900평) 구분하여 시험을 수행하였다(그림 38). 길항균살포는 10^9 cfu/g로 제형한 각 시료를 1,000로 희석한 후 정식 25일 후 부터 5일 간격으로 5회 엽면이 흠뻑 젖게 살포하고(그림 39) 발병율은 수확기에 조사하였다. 시험결과 무처리구 발병율은 32.4%로 발병율이 높았으며 *P. marginalis*는 73.1%의 방제효과를 보였다(표 20). 상품성이 있는 배추를 수확하여 평균 수량을 조사한 결과 3처리 모두 무처리구에 비해 26~34%의 증수효과를 보였다.

표 20. 고랭지여름배추 배추무름병 생물적방제효과

처리내용	발병율	방제가(%)	구중(kg/주)
무 처리	32.4	-	2.3±0.2a
<i>Pseudomonas synxantha</i>	12.3	62.0	2.9±0.2b
<i>P. aurantica</i>	13.2	59.2	3.1±0.1b
<i>P. marginalis</i>	8.7	73.1	2.9±0.4b

DMRT 0.05



그림 39. 길항미생물 엽면살포

제 2절. 길항미생물 제품화생산을 위한 대량생산 공정확립

1. *Pseudomonas putida* 10301의 대량배양 및 제제화

Pseudomonas putida 10301은 가지과 작물에 큰 피해를 주는 토마토폏마름병 (*Raltonia solanacearum*)과 배추무름병(*Erwinia carotovora*)에 대하여 길항력을 가지고 있어 토양처리시 방제효과가 높아 미생물농약으로 개발할 가치가 높고, 토양처리시 siderophore와 같은 킬레이트화합물생산능력이 뛰어나 뿌리발육촉진은 물론 양분흡수를 도와 고품질농산물생산에 큰도움을 주는 미생물자원이다. 농가보급을 위한 제품생산기술개발을 위해 해결되어야할 대량배양에 필요한 기초자료를 확보하기위해 실험을 수행하였다. 연구개발내용은 보존균주에서 공장형 Pilot배양까지 단계별 배양조건을 확립하여 배지단위부피당 균체수량을 최대한으로 높이고, 생산된 제품은 상온에서 1년이상 변질되지 않고 보존될 수 있도록하고자한다.

가. *Pseudomonas putida* 10301의 소용량 발효조(5L) 배양 최적화 연구

(1) 분석내용

(가) 당농도의 분석

발효가 진행되는 상태에서 발효조 내 배양액에 미생물에 의해 섭취되는 포도당 농도를 조사하기 위하여 Glucose-lactate analyzer(YSI, USA)를 사용하여 분석하였다. 발효조로부터 일정량을 일정시간 간격으로 채취하여 원심분리한 후에 배양상층액을 Glucose-lactate analyzer(YSI, USA)측정하여 glucose 섭취 양상을 조사하였다.

(나) 균체농도 측정

배양과정에서의 균체농도를 측정하기 위하여 spectrophotometer(UVICON 430, Kontron Instruments, Italy)를 사용하였다. 즉 배양액을 멸균증류수로 희석하여 600nm에서 흡광도를 측정하였다. 그리고 건조 균체무게(Dry cell weight, DCW)는 발효조에서 10ml를 취하여 원심분리 후에 상등액은 버리고 생리 식염수로 반복 세척한 다음 일정량의 증류수에 현탁하여 95℃에서 40~50 시간 건조 시킨후 desiccator에 보관하면서 측정하였다. 이 결과로 calibration curve를 작성한 다음 OD 수치를 DCW(dry cell weight)로 환산하였다.

(다) 생균수 측정

생균수 측정은 시료를 serial dilution하여 NA(nutrient agar) 또는 TSA(tryptic soy agar) plate상에서 발생하는 colony를 계수하여 측정하였다.

(라) 플라스크 최적배양조건

M9 basal medium(Na_2HPO_4 6g, KH_2PO_4 3g, NaCl 0.5g, NH_4Cl 1g)를 기본으로 탄소원과 질소원 농도에 따른 성장정도를 측정하였다. 0.1% yeast extract 질소원을 기준으로 탄소원에 따른 성장 정도를 측정하고, 결정된 탄소원을 기준으로 최적 질소원을 결정하였다.

(마) 소용량 발효조(5L)에서의 최적화 연구

냉동보관된 균주를 영양한천배지(nutrient agar plate)상에서 배양한 후 colony를 선택하여 200ml의 flask culture medium이 들어 있는 500ml baffled flask 에 접종하여 30°C, 150rpm으로 12시간 배양하여 준비하였다. 종균배양액을 2L가 들어 있는 5L jar fermentor에 접종하여 본 배양을 실시하였다. 배양조건은 온도는 30°C, 통기량은 1vvm이며 교반 속도는 용존산소(Dissolved Oxygen)의 농도가 20%가 유지 되도록 100rpm에서 단계적으로 증가 시켰다. 또한 발효중에 pH는 25% NH_4OH 를 사용하여 pH 7.0으로 유지 되도록 하였으며 발효시 기포의 발생을 방지하기 위하여 소포제(silicon 303 & Neorin)를 발효 배지내에 첨가 하였다.

5L 발효조에서의 배양공정 최적화를 위하여 5L jar fermentor (KFC5L; Korea Fermentor Co., Korea)를 사용하였다. 플라스크 배양에서의 최적 배지를 기본으로 5L에서 최대 성장배지 조건을 탐색하였다.

(바) siderophore 생성량 측정

UV spectrophotometer를 통해 간접적인 siderophore 생성량을 측정하였다. 변형된 CAS assay 방법을 이용하여 Fe-dye complex 의 탈색정도로 siderophore의 생성 유무를 확인하고, UV scan을 통해 peak를 확인하였다. 배양액을 원심분리하여 cell을 제거하고 상등액을 millipore filter(0.25 μm)를 사용하여 균체를 완전히 제거시키고 흡광도를 측정하였다. Fe-dye complex가 blue color를 나타내는데 siderophore가 첨가되면 dye에서 Fe가 이탈되면서 색이 orange color 로 변색되는 것으로 siderophore 생성유무를 확인하였다.

(2) 결과 및 고찰

(가) 플라스크 배양을 통한 배양 최적화

① 길항세균의 탄소원 조사

Pseudomonas putida 10301의 탄소원 소비 특성을 조사하기 위하여 플라스크 배양을 통해 glucose, fructose, galactose, maltose, sucrose, lactose, cellobiose, mannose, xylose, glycerol, arabinose, starch, mannitol, dextrose등에 대한 선호도를 조사하였다. 같은 조건에서 탄소원만 달리 하여 30°C, 140rpm에서 배양 12시간, 24시간에서 세포 성장도를 측정하였다. 그 결과 다음의 그림과 같이 mannitol이 약 5.24OD 까지 성장을 하였다. 세포건조중량은 L당 2.220g으로 다른 탄소원과 비교하여 가장 좋은 성장을 나타냈다. 그 다음 glycerol으로 세포 성장이 4.55OD로 세포건조 중량이 L당 중량이 1.58g로 나타났다. 이것은 glucose 세포의 성장은 glycerol보다 약간 낮은 4.645OD이지만 세포건조 중량은 L당 2.18g으로 더 많이 생산 되었다. 세포의 성장과 건조중량이 mannitol과 glycerol이 더 높게 나왔지만 kg당 가격이 산업용으로 활용하기엔 가격이 비싼 기질들이다. 따라서 이와 비슷한 수준의 세포 성장을 보이면서 산업적으로 사용하기에도 경쟁력이 우위인 glucose를 탄소원으로 1차 선정하였다(Fig. 1)

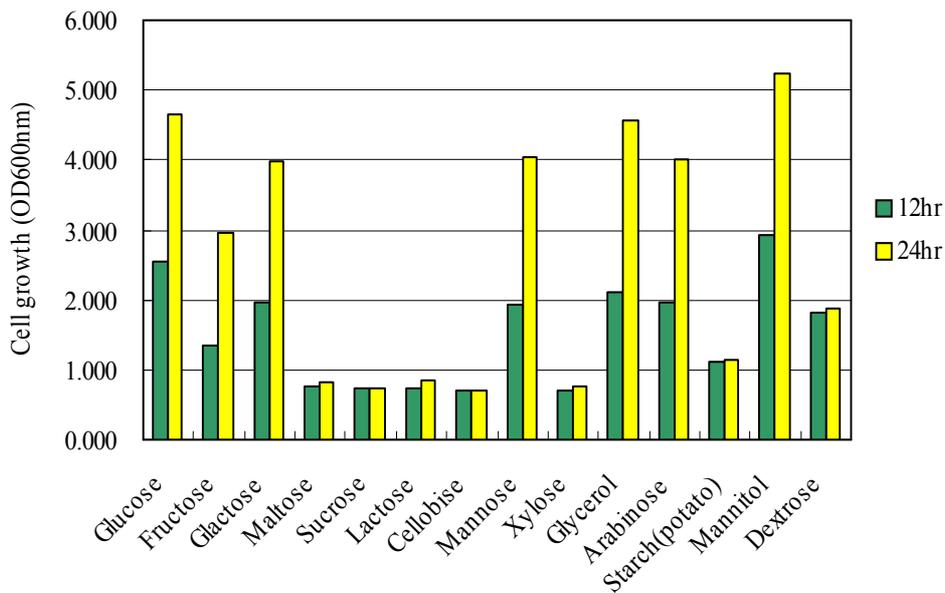


Fig. 1. Effect of various carbon sources on cell growth of antagonistic microorganism(*Pseudomonas putida* 10301).

② 길항세균의 질소원조사

길항세균의 질소원을 조사하기 위하여 soybean meal, proteose peptone, bacto-peptone, peptone G, soytone, tryptone, yeast extract, hydrolyzed casein, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl , NH_4NO_3 등 다양한 질소원에 대한 영향을 조사하였다. 탄소원은 1%로 glucose로 기준으로 하고 위의 다양 질소원을 대상으로 하여 조사하고 세포의 성장도를 탄소원과 같이 12시간, 24시간 경과 하여 흡광도 600nm에서 측정하였다. 그 결과 다음의 그림과 같이 yeast extract는 세포의 성장이 4.845OD정도 자랐으며 soybean meal은 4.610OD정도 까지 자랐다. 하지만 soybean meal은 soybean meal 자체의 입자들 때문에 약간의 오차가 있다. 세포의 건조 중량은 soybean meal과 yeast extract가 L당 1.77g으로 같게 나왔다. 그 밖에 soytone에서 좋은 세포 성장을 나타냈다. 이와 같이 선발된 길항 세균은 콩을 원료로한 질소원 배지에서 잘 자라는 것으로 나타났다. 그러나 배지조제와 가격면에서 뒤지지 않은 yeast extract를 질소원으로 1차 선정하였다(Fig. 2).

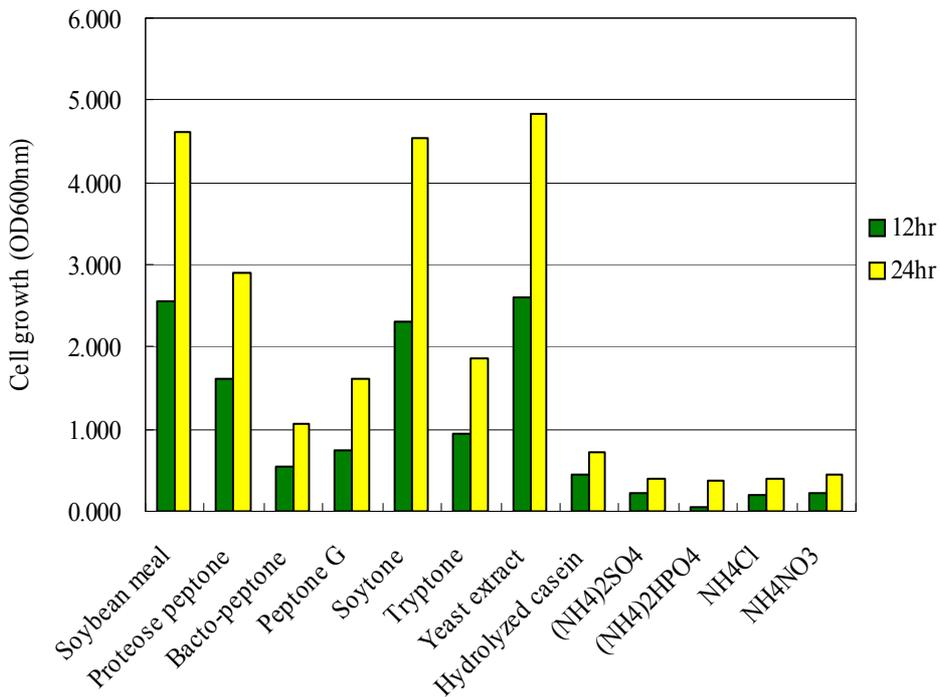


Fig. 2. Effect of various nitrogen sources on cell growth of antagonistic microorganism(*Pseudomonas putida* 10301).

③ 길항세균의 미량원소에 대한 영향 조사

길항세균의 미량원소에 대한 영향을 조사하기 위하여 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , FeCl_3 , $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, CuSO_4 등에 대하여 조사 하였다. 그 결과 FeCl_3 가 가장 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다. 세포의 성장은 다른 미량 원소보다 높은 5.155OD로 가장 잘 자랐다. 세포건조 중량은 L 당 1.45g으로 나타났고 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 은 약간 높은 1.53OD으로 나타났다. $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 와 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, CuSO_4 등은 세포의 성장을 저해하는 것처럼 나타났다. 대조구는 미량원소를 사용하지 않고 탄소원과 질소원 만을 사용하여 같은 조건에서 배양한 결과이다(Fig. 3).

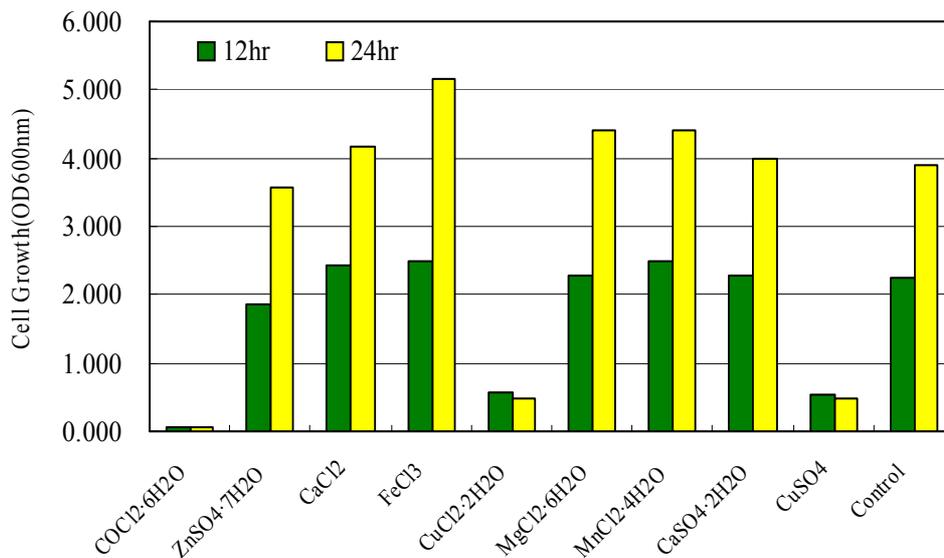


Fig. 3. Effect of various trace element sources on cell growth of antagonistic microorganism(*Pseudomonas putida* 10301).

④ 탄소원 농도변화에 따른 실험

탄소원 실험 결과 세포의 성장과 경제성을 고려하여 선정된 탄소원인 glucose이 길항균주 성장의 농도에 따른 영향을 조사하였다. 다른 배양조건을 동일하게 하고 탄소원의 농도를 L 당 1, 3, 5, 10, 20, 30, 40, 50등의 농도로 변화 시켜 가면서 조사하였다. 그 결과 L 당 10g의 농도에서 24시간 경과 하여 세포의 성장이 3.438OD정도까지 이르게 되었다(Fig. 4).

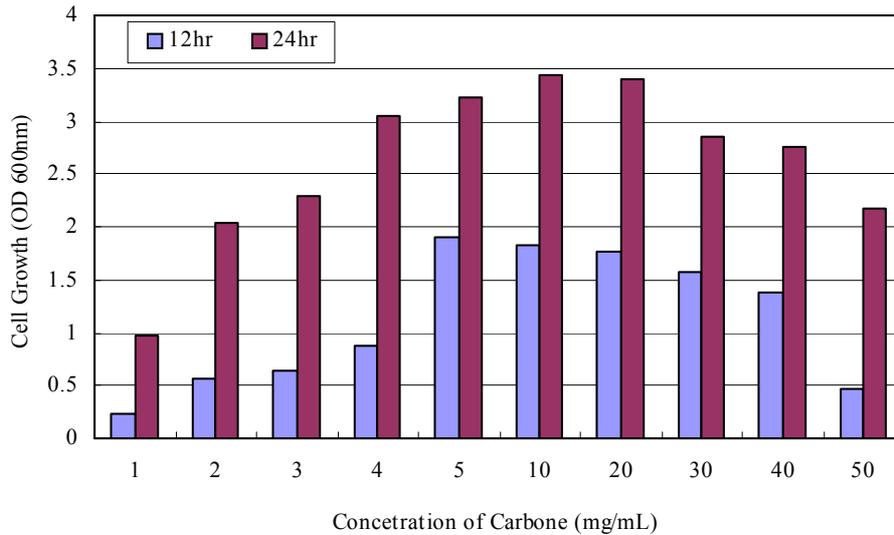


Fig. 4. Effect of cell growth on concentration of carbon sources

⑤ 질소원 농도변화에 따른 실험

다양한 질소원에 대한 실험 결과 선정된 yeast extract 농도에 따른 길항 세균의 성장을 조사하기 위하여 glucose 농도를 10g/L으로 고정하고 yeast 농도를 L 당 1, 2.5, 5, 10, 25, 50g로 변화하여 조사하였다. 12시간 경과하여 25g 첨가시의 세포 성장은 1.22OD로 50g첨가시 1.108보다 더 잘 자랐다. 하지만 24시간 경과 후에는 50g 첨가시는 세포의 성장이 더 이루어져 1.39OD까지 성장을 하였다(OD는 실제보다 10배 희석된 수치임). 전체적으로 세포의 성장은 질소원인 yeast extract량에 비례하여 증가하는 것으로 나타났다 (Fig. 5).

세포의 건조 중량을 나타낸 그림에서 더욱 확실하게 yeast extract 농도에 비례하여 세포의 성장이 증가하는 것으로 나타난다. 세포건조 중량은 질소원인 yeast extract 50g 첨가시 세포건조 중량이 0.5g으로 가장 많은 세포를 생산하는 것으로 나타났다.

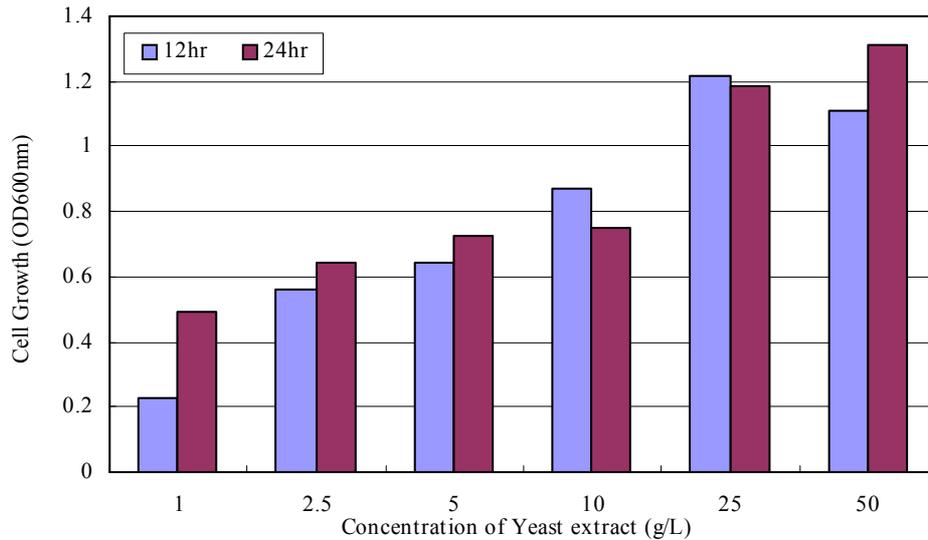


Fig. 5. Effect of cell growth on concentration of nitrogen sources.

⑥ 길항 세균의 pH에 따른 실험

길항세균의 성장에 최적pH를 조사하기 위하여 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5의 범위에서 5 L jar fermentor에서 각각 배양하여 세포의 성장을 비교하여 보았다. 배지와 배양 공정 조건을 동일하게 하고 온도는 30°C하였다. 그 결과 다음의 그림과 같이 pH 7.0에서 가장 좋은 성장을 나타냈다(Fig. 6). pH가 알카리 영역으로 갈수록 급격한 성장 저해가 일어났으며 산성영역에서는 세포의 성장이 알카리 영역보다는 비교적 잘 자랐다. 대부분의 미생물이 중성영역에서 좋은 성장을 나타내는 것과 같이 길항세균도 중성인 7.0과 7.5영역에서 가장 좋은 세포 성장 양상을 나타냈다. pH 7.0에서 성장 양상은 배양 10시간 경과하여 최고의 성장을 나타냈으며 그 이후로 점차 감소하여 death phase로 진행되었다. 이 실험 결과를 통하여 길항세균 배양 중 pH는7.0으로 선정하였다.

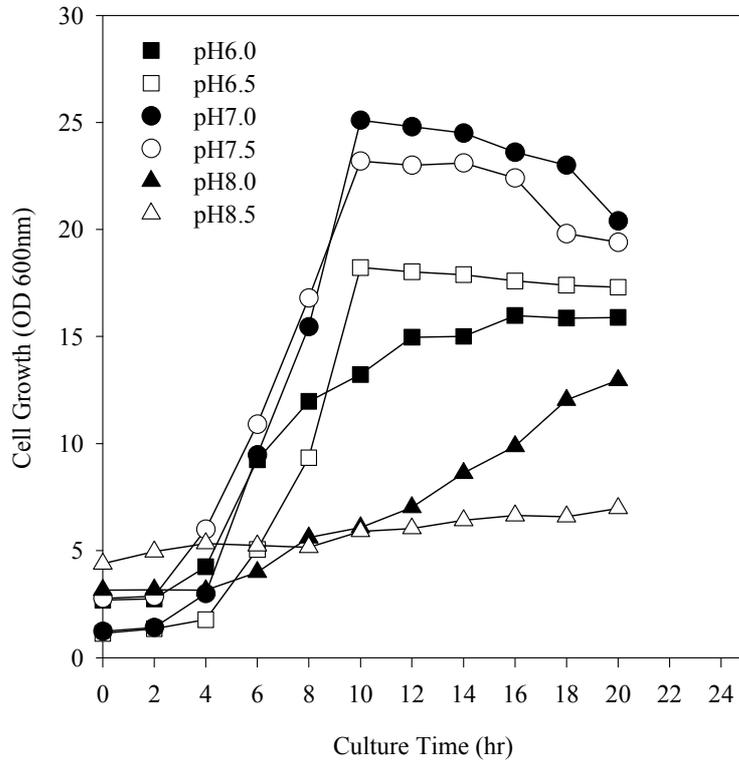


Fig. 6. Growth pattern of *Pseudomonas putida* 10301 at various pH condition.

⑦ 길항 세균의 온도에 따른 실험

길항세균의 성장에 최적온도를 조사하기 위하여 25, 30, 35, 40°C의 범위에서 5L jar fermentaor에서 각각 배양하여 세포의 성장을 비교하여 보았다. 배지와 배양 공정 조건을 동일하게 하고 pH는 7.0으로 조절하였다. 그 결과 다음의 그림과 같이 30°C에서 가장 좋은 균주의 성장을 보였다(Fig. 7). 40°C에서는 lag time이 8시간정도 까지 지속 되었으며 최고성장도 15OD정도 까지 자랐다. 35°C에서는 비교적 40°C에서 보다 lag time이 짧았으나 최고 정장 정도는 40에서와 비슷한 수준인 14OD에 머물렀다. 25°C에서는 초기의 균 성장은 초기는 비교적 다른 온도에서 보다 잘 자랐으나 최고 성장은 18OD에 이르고 이후로 사멸기로 들어갔다. 하지만 30°C에서는 배양 8시간 경과하여 30OD에 이르도록 성장하였다. 이후로 death phase로 들어가 최종 균주 OD는 18에 이르렀다.

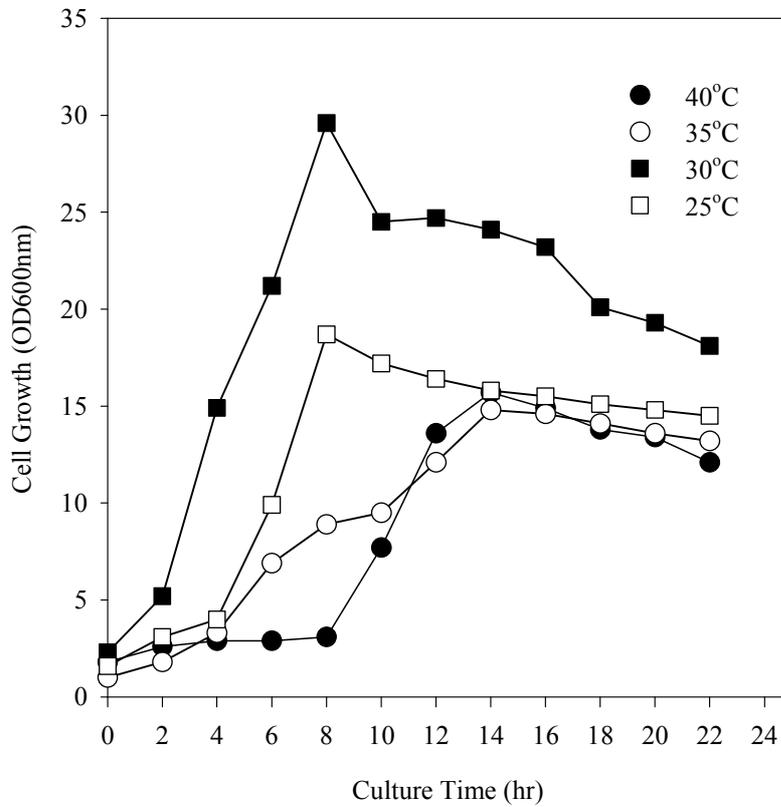


Fig. 7. Growth pattern of *Pseudomonas putida* 10301 at various temperature condition.

나. *Pseudomonas putida* 10301의 300 L 발효조 배양최적화연구

(1) 재료 및 방법

(가) 공시 균주 및 보존

본 실험은 *Pseudomonas putida* 10301을 대량배양하고자 수행하였다. 균주는 NB medium에서 대수기 중기까지 액체배양한 후 30% glycerol에 현탁하여 vial의 형태로 -80°C deep freezer에 장기간 냉동존하면서 종균으로 사용하였으며 연구보존을 위해 동결 건조하여 sealing 된 ampule에 보관하였다.

(나) 균체농도 측정

균체농도를 측정하기 위하여 spectrophotometer(UVICON 430, Kontron Instruments,

Italy)를 사용하였다. 즉 배양액을 멸균증류수로 희석하여 600nm에서 흡광도를 측정하였다. 그리고 건조 균체무게(Dry cell weight, DCW)는 발효조에서 10ml을 취하여 원심분리 후에 상등액은 버리고 생리 식염수로 반복 세척한 다음 일정량의 증류수에 현탁하여 95°C에서 40~50 시간 건조 시킨후 desiccator에 보관하면서 측정하였다. 이 결과로 calibration curve를 작성한 다음 OD 수치를 DCW(dry cell weight)로 환산 하였다

(다) 포도당 농도 측정

발효가 진행되는 상태에서 발효조내 배양액의 미생물에 의해 섭취되는 포도당 농도를 조사하였다. 또한 발효조로부터 일정량을 일정시간 간격으로 채취하여 원심분리한 후에 배양상층액의 포도당 농도를 측정하였으며, 포도당 분석은 glucose-lactate analyzer(YSI 2000, USA)를 사용하여 포도당 농도를 측정하였다.

(라) 300 L 발효조에서의 배양 최적화연구

Pilot plant scale fermentor에서의 최적화 공정을 위하여 한국생명공학연구원에 설치된 300 L pilot plant scale fermentor(한국발효기, 한국)제품을 사용하였다. Seed culture는 본 발효의 10% vol.으로 nutrient broth 로 준비하고 배양온도는 30°C, pH는 NH₄OH와 함께 7.0로 조절 유지하였다. Aeration은 1vvm으로 유지하고 Agitation은 pilot plant scale fermentor에서 100~500으로 조절하여 배양 중의 용존산소(DO)를 20% 이상 유지하여 배양하였다.

(2) 결과 및 고찰

종균배양은 5 L flask에 2 L volume으로 tryptic soy broth를 준비하고 배양온도는 30°C, 140rpm에서 12시간 배양하여 준비하였다. 종배양액을 150 L가 들어 있는 300 L pilot plant fermentor(KFC 300, Korea Fermentor Co.)에 접종하여 본 배양을 실시하였다. 배양조건은 온도는 30°C, 통기량은 1vvm이며 교반 속도는 용존산소(Dissolved Oxygen)의 농도가 20%가 유지 되도록 100rpm에서 단계적으로 증가 시켰다. 또한 발효 중에 pH는 NH₄OH를 사용하여 pH 7.0으로 유지되도록 하였으며 발효시 기포의 발생을 방지하기 위하여 소포제(silicon 303 & Neorin)를 발효 배지내에 첨가 하였다. 300 L 발효 조에서의 배양공정 최적화를 위하여 생명공학연구원 산업화 지원실 300 L pilot plant fermentor (KFC 300, Korea Fermentor Co.)를 사용하였다.

사용한 배지는 산업용 등급제품으로 5 L에서 최적화한 배지와 배양조건을 가지고 사용하였으며 성분(g/L)은 glycerol 60, yeast extract 30, K₂SO₄ 10, MgCl₂ 3.5 을 사용하였다.

glycerol이 소진되는 시점에 30g/L로 2회 feeding 해 줌으로써 최대 세포성장을 유도하였다. 그 결과 최대 세포 성장농도는 80OD 이상을 나타냈고 siderophore 도 분비하였다 (Fig. 8). siderophore 생성량의 측정은 간접적인 방법에 의해 정량하였다. 앞에서 언급했듯이 siderophore 생성배지인 KB 배지를 기준으로 생성량을 간접 정량하였다. 배양액을 5배 희석하여 403nm에서 최대의 흡수과장을 나타내는 값을 읽었다. siderophore 생성은 적정량의 Fe의 존재뿐만 아니라 배지의 배합비와 발효 조건 등에 크게 좌우되며 특히 어떤 배지를 사용하였는지에 따라 생성량에는 많은 차이를 보인다. 세포 농도 증가와 siderophore 생성량과는 완전한 정비례 관계에 있다고 볼 수는 없으며, 일정기간이 지나면 더 이상 증가를 보이지 않고 오히려 더 감소하는 경향이 있다. feeding 후에 생성배지 조건에 변화가 생겨 세포 농도는 높아지나 siderophore 생성량은 많아지지 않았다.

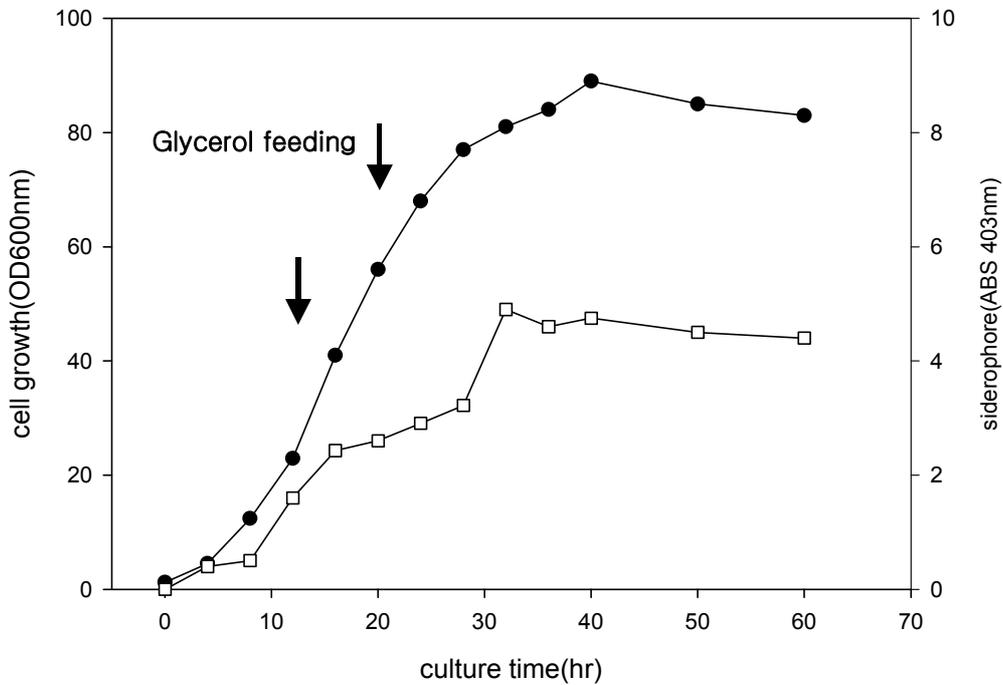


Fig. 8. Growth pattern of *Pseudomonas putida* 10301 by culture time condition (cell growth ; closed circle, siderophore production ; opened square).

다. *Pseudomonas putida* 10301균의 제제 안정화

(1) 재료 및 방법

(가) 냉동동결건조(freeze dry)

삼원엔지니어링에서 제조한 모델명 SFDSM06을 사용하여 동결건조를 수행하였다. 방법은 시료에 부형제를 혼합하여 영하 70℃에서 예비 동결을 한 후 동결 건조 시스템에 의해 건조를 수행하였다.

(나) 경시 안정성 검사

경시변화 검사는 일반적으로 은박봉투에 시료를 밀봉하여 RT, AT, CT에 각각 보관하여 4주, 8주, 12주 후의 분해정도를 검사한다. 여기서 40℃ 4주, 8주, 12주 후의 감소율은 상온 조건하에서 1년, 2년, 3년으로 간주하는 것이 농약 원제 실험에서 통상적인 방법이다. 따라서, 생균수의 감소도 이에 준하여 실험을 하였으나, 40℃에서 4주가 꼭 상온에서 1년을 의미하지는 않는다. RT(room temperature) test ; 상온에 시료를 보관하여 일정 시간 후 검사, AT(aging temperature) test ; 40℃나 50℃에서 시료를 보관하여 일정 시간 후 검사, CT(cooling temperature) test ; 영하 10℃로 시료를 냉동고에서 저온 보관하여 일정 시간 후 검사하였다.

(2) 결과 및 고찰

(가) Freeze dry 방법을 통한 세포안정화

gram(-) 균주인 *Pseudomonas putida* 10301는 spray dry 과정 중에 발생하는 고열에 견딜 수 있는 열 안정성이 부족하여 순간이지만 고열을 거쳐야 하는 spray dry 방법은 *Pseudomonas* sp. 에는 적당치 못하므로 경제적인 면에서 다소 비싸지만 동결건조 방법을 통해 세포의 안정화를 모색하였다. 일반적으로 배양 수확한 세균 세포와 일정량의 부형제를 혼합하여 동결건조 과정을 거치는 것이 손실을 줄임과 동시에 활성 유지를 기대할 수 있다. 부형제는 skim milk, arabic gum, soluble starch, 변성전분(sun-cap), cyclo-dextrin과 sucrose, maltose, galactose, trehalose 등을 이용하였다. 발효가 종료된 배양액에서 세포를 분리한 후 여기에 10% 농도로 부형제를 한 후 -70℃에서 24hr 동안 예비 동결한 다음 freeze dry를 수행하고 40℃에서 저장 안정성 screening을 수행하였다.

다양한 polymer를 안정제로 첨가하여 cell의 저장성을 확보하는 실험을 수행한 결과 수용액 상태에서 점도가 너무 높아 적은 양을 녹일 수 있는 polymer와 불용성 그리고 합성 폴리머 등은 저장 안정성이 떨어졌다. 반면에 일반적으로 많이 사용하고 있는 소재들에서는 무처리에 비해 저장 안정성을 높게 나타내었는데 일반적으로 사용되는 skim-milk에서 가장 좋은 저장 안정성 효과를 나타내었으며, 다음으로 soluble starch, levan 순이었다 (Fig. 9).

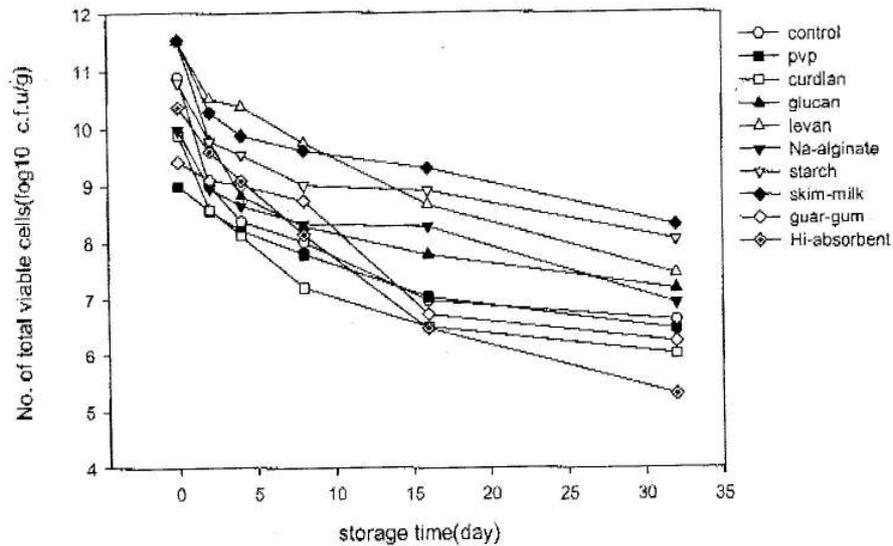


Fig. 9. Effect of various polymer on viability of *Pseudomonas putida* 10301 formulated by the stabilize process and stored at 40°C from 0 to 32days.

또한 다양한 당류에 대한 저장 안정성 실험을 수행한 결과 lactose와 sucrose를 안정제로 첨가한 것을 제외하고는 모두 무처리 보다 좋은 저장 안정성을 나타냈다(Fig. 10). skim-milk와 비교해서 말토오즈(maltose)와 물엿(millet jelly)이 더 나은 저장 안정성을 나타냈다. 이상의 결과를 검토하여 보면, *Pseudomonas putida* 10301균을 동결건조 방법을 적용한 경우 적당한 부형제 및 안정제를 투입함으로써 제제 안정성을 일정기간 동안 확보할 수는 있지만 생산 비용이 증가하는 부담이 있었다.

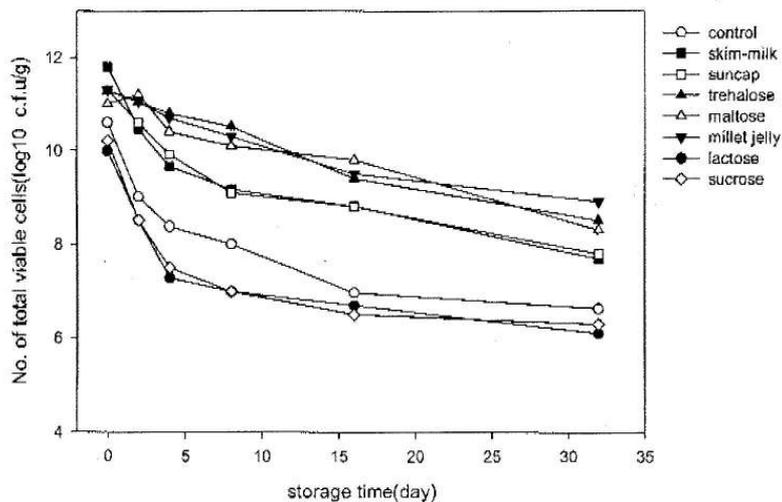


Fig. 10. Effect of various sugar on viability of *Pseudomonas putida* 10301 formulated by the stabilize process and stored at 40°C from 0 to 32days.

(나) 흡착(adsorption)을 이용한 세포안정화

gram(-) 균주인 *Pseudomonas putida* 10301균주는 장시간 보관을 위한 제제가 곤란한 것이 현실이다. 그러나 균체의 수분 stress를 최소화하는 흡착을 통한 제제화는 단순하면서 비용적인 면을 고려한다면 매우 경제적인 방법 중에 하나이다. 흡유·흡수능력이 좋은 증량제를 사용하여 세포를 흡착하여 사용하는 방법인데 증량제의 종류에 따라 흡유가에는 상당한 차이를 보인다.

Table 1. Adsorption[†] rate of a various carrier

Carrier	Adsorption rate(ml/100g) [†]
white carbon	274
diatomite	130
attapulgite	102
zeolite	83
산성백토	78
Bentonite	38
talc	33
clay	27

[†] 흡유가는 물질이 아마인유를 흡착하는 양으로 표시

배양원액 대 흡착제의 비율은 흡착제의 종류에 따라 다르지만 white carbon의 경우 1:1의 비율로 흡착할 정도로 흡착능이 좋다. 예비 실험 결과 흡착율은 좋지만 aging test에서 급격히 세포수가 감소하는 것으로 조사되었다. 따라서 여기에 동결건조시에 세포 보호 효과가 뛰어난 부형제인 물엿을 첨가하여 white carbon에 흡착시켜 저장 기간별 세포수 감소 정도를 관찰하였으나, 마찬가지로 세포 안정화에 큰 영향을 미치지 못하는 못하였다. 이상으로 동결건조 방법과 흡착을 통해 *Pseudomonas* 균의 저장 안정성을 높이는 제제화를 시도하였으나 *Pseudomonas putida* 10301균세포의 특성상 단순한 제제 즉, 부형제의 첨가 등에 의한 방법으로는 제제의 한계를 나타내었다. 따라서 보다 분자생물학적인 접근이 필요할 것으로 판단되며 또한, 활성기작에 활성물질(active compound)이 관여한다면 이런 물질을 대량 생산 배양하는 방법으로 활성을 부여하는 것도 한 방법으로 검토되어야 할 것으로 판단된다.

2. *Bacillus licheniformis*의 대량배양 및 제제화

*Bacillus*속의 세균은 gram양성세균이며 약 $1 \times \mu\text{m}$ 의 간상형 세균으로 호기적 조건에서 열에 강한 약 $1 \mu\text{m}$ 의 단간상형의 내생포자를 형성하는 특징이 있다. *Bacillus macerans*와 *B. polymyxa*를 제외한 대부분의 종이 세포벽을 가지고 있는 전형적인 Gram-positive 균이다. 일반적으로 호기성 내생포자를 형성하며 다수의 종이 조건적 호기성균이다. 특히 대표적인 종들에서 chromosomal DNA의 염기구성비(GC ratio)에 있어 변이가 많은데 *B. cereus*와 *B. thuringiensis*들은 33%이하로 낮으며 일부 고온성 균에서는 60%이상으로 높다. 그러나 대부분의 균은 일부의 고온성균에서는 60%이상으로 높다. 그러나 대부분의 균은 36~54%의 범위를 보이며 이러한 사실은 단일 속에서 나타날 수 있는 최대의 GC 구성비의 변이 범위인 10%보다도 훨씬 높다고 할수 있다. 이러한 유전적 다양성은 ribosomal RNA 분석을 통해서 재확인 할 수 있는데 *Bacillus*속은 진화적으로 20속 이상을 포함하는 Enterobacteriaceae, vibronaceae와 관련하여 분화되어온 집단으로 호산성균, 호염기성균, 호한성균, 호고온성균과 같이 생태적, 생리적으로 광범위한 strain을 갖고 있다. 생리적으로 metabolic pathway가 다양하여 최종산물에 있어서 매우 다양하고 잠재성 있는 생리활성물질들을 많이 생산한다. 대부분의 균은 활력이 강하고 저가의 배지에서도 매우 빠르게 자라며 비병원성이다. 본 연구에 사용된 *Bacillus*. sp. 균주는 미국에서 GRAS(generally regarded as safe)라하여 그 안정성에 있어서 명확히 검증되어 있으며 여기에는 일본인들이 대두발효 식품 natto를 통해 *B. subtilis* var. *nattorbs*을 오래동안 섭취해온 사실이 안정성을 증명하는 좋은 자료가 되었다. 유전학적, 생리학적으로 *B. subtilis*는 대장균에 이어 기초연구가 많이 이루어 있으며 *B. megaterium*, *B. thuringiensis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquifaciens*는 계속 활발히 연구되고 있는 균주로 산업화에 가장 이상적인 균이다. 일반적으로 밝혀진 *B. subtilis*의 생육온도 범위는 10~50°C이며 생육 최적온도는 30~45°C이다. 생육 pH범위는 4.5~9.0이며 최적생육 pH는 6.0~7.0이다. *B. subtilis*의 생활환은 크게 발아생장기(outgrowth), 영양세포증식기(vegetative growth), 포자형성기(spore formation)의 세단계로 이루어 지며 포자형성기는 6개의 단계로 나누어 볼수 있다. 포자형성기의 제1기와 2기는 염색체이동 및 분할기로서 mesosome이 형성되는 시기이며 제3기로 접어들면서 내생포자의 위형질이 생성된다. 제4기에는 cortex층이 형성, 제5기에는 포자각이 형성된다. 마지막 단계인 제6기부터는 성숙기로서 세포는 sporangium의 역할을 하게된다. 성숙된 포자는 외부로 유리되며 다시 발아하여 새로운 영양세포를 생성하게 된다.

Bacillus 속균을 상업적으로 이용한 시기는 1940년대로 향생제 산업으로부터 심부배양

방식의 도입으로 *Bacillus*속 효소의 생산이 상업화 되었다. 현재 8~10종의 *Bacillus*속균이 α -amylase, β -glucanase, exoamylase, alkaline protease 등과 같은 7개의 효소 생산을 위한 목적으로 이용되고 있다. *Bacillus* 속균중 *B.thuringiensis*, *B. lentimorbus*, *B. popilliae*, *B. sphaericus*, *B. larvae* 등은 대표적 곤충병원성 세균으로 1940년대 이후 *B. thuringiensis*가 주로 인시목 해충의 생물학적 방제 목적으로 개발되어 왔다. 포자형성기의 초반기에 생성하는 intracellular crystalline protein(δ -내독소)가 인시류 해충에 살충효과를 가지는 것으로 알려 졌으며 *B. sphaericus*는 모기류의 해충에 살충성이 있어 잠재적 생물학적 방제균주이며 *B. popilliae* 와 *B. lentimorbus*는 풍뎅이류 해충 방제에 이용되고 있다. 이밖에도 항생제, 향신료, 핵산, 아미노산을 생산하는데 이용되고 있는 매우 유용한 균이라 할 수 있다. 본연구에 사용된 *Bacillus licheniformis*균주는 비병원성이며 저가의 배지에서 생장이 우수하고 각종 식물병원균에 대한 길항력이 우수하여 주로 생물학적 방제 목적으로도 사용되고 있다. *B. licheniformis*는 영양원인 탄소원과 질소원이 소진된 이후에 열에 내성을 가진 내생 포자를 형성하며 산업적으로 중요한 세포의 효소, 항생물질, 길항물질 등은 포자형성을 시작하는 단계에서 생산하게 된다. 또한 높은 비율의 포자형성을 유도하기 위해서는 포자형성의 징후가 보일 때 배양액내에 탄소원과 질소원이 동시에 소진되어야 하며 만약 그렇지 못할 경우 포자형성은 늦어지게 되고 발아하게 된다. 현재 친환경적이고 인축에 피해를 주지 않는 생물농약의 관심이 많아지면서 *Bacillus*속균이 생산하는 활성물질 등을 이용하여 토양병원성 미생물을 방제하려는 노력이 계속되고 있다. 이에 본 연구에서는 *Bacillus licheniformis* 를이용, 대량생산을 위한 최적발효조건을 산업화에 적합한 유가식 배양방식을 적용하여 조건을 구명하고 미생물 제제를 생산하기 위한 건조포자 원제를 안전하게 수확하는 것을 목적으로 하였다.

가. 재료 및 방법

(1) 공시균주 및 보존

본 연구에 사용된 균주는 배추무름병균 및 식물병원성 진균류에 길항력이 높은 *Bacillus licheniformis*를 연구재료로 사용하였다. 사용 균주를 NB medium에 대수기 중기 이후로 배양하여 균체가 포자로 완전 전환 된 것을 20% glycerol에 현탁하여 -80°C 에서 보존하여 사용하였다. 또한 보단 안정적인 종균 보존을 위하여 이 균주의 포자를 동결 건조하여 ampule을 제조하여 보관하였다.

(2) 사용배지

길항성균주를 배양하기 위한 최소배지는 Glucose, Yeast extract, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 , CaCl_2 , Trace element(pH 6.5)를 사용하였고 종균배지는 nutrient broth medium(Difco사)를 사용하였다. 미생물의 생육을 부분적으로 저해 할 수 있는 배지의 갈변 현상을 막기 하기 위하여 glucose와 $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 는 분리하여 멸균하여 준비하였다. 각 배지의 pH는 NH_4OH 를 사용하여 pH 6.5로 배양시작과 초기를 조절하고 탄소원 고갈 이후에는 조절하지 않았다.

나. 배양 최적화 실험

(1) *Bacillus licheniformis*균주의 5L jar fermentor에서의 배양 최적화

길항균의 포자를 대량 생산하기 위하여 flask 배양 실험을 통하여 선발된 최적 배지를 위의 사용배지에서 언급한 바와 같이 선발하였다. 발효조건은 pH는 NH_4OH 와 함께 6.5로 조절하였고 배양온도는 30°C , aeration은 1vvm, agitation은 100-1200까지 올리면서 DO 20% 이상을 유지 하였다. 위의 배지와 발효 조건으로 5L 발효기(한국발효기(주)제작, 인천, 한국)을 사용하여 시험 배양하였다. 접종용 종균 배양은 30°C , 140rpm의 조건인 shaking incubator(고려기기, 한국)에서 12시간 배양하여 본양의 10%(v/v)으로 접종하였다.

(2) *Bacillus licheniformis*균주의 pilot plant fermentor에서의 배양 최적화

*Bacillus licheniformis*균주의 발효 scale-up실험의 일환으로 pilot plant scale인 300L fermentor(한국발효기(주), 한국)에서의 발효를 최적 실험을 수행하였다. 배양방식은 batch fermentation 방식으로 배지는 Glucose, Yeast extract, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 , CaCl_2 , Trace element(pH 6.5)를 사용하였다.

다. 분석방법

(1) 균체량 및 포자농도 측정

균체의 농도는 spectrophotometer를 사용하였다. 배양액을 멸균 3차 증류수로 희석하여 600nm에서 흡광도(optical density, OD)를 측정하였다. 또한 건조균체량(dry cell weight, DCW)은 발효조에서 10ml 취하여 원심분리한 후 멸균증류수로 현탁하여 반복 세척한 균체를 95°C에서 40-50시간 건조 시킨 후에 desicator에 보관하면서 측정하였다. 이 결과를 calibration curve를 작성한 다음 OD수치를 DCW로 환산하였다. 포자농도를 측정하기 위하여 배양액을 취하여 광학현미경(BX50, Olympus, Japan)하에서 혈구계수기(Hausser Scientific, USA)를 이용하여 계수하였고, 정확한 활성포자 농도를 측정을 위하여 배양액을 약 80°C에 소 10분간 열처리하여 잔존 활성세포를 사멸 시킨 이후에 멸균증류수로 희석하여 nutrient agar plate에 도말하여 30°C에서 12시간 배양 한 후에 clony forming unit을 측정하였다.

(2) 포도당 농도 측정

포도당 농도는 Miller(1959)의 DNS방법을 응용하여 분석하였으며, 이때 DNS 시약은 다음과 같이 제조하였다. 먼저 0.25g의 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS)와 4g의 NaOH를 250ml의 증류수에 녹인 다음 Rochelle salt 75g을 서서히 첨가하면서 완전히 용해시켰다. 포도당 농도가 0-2.0mg/ml의 범위가 되도록 희석한 시료 0.25ml을 취하고 1ml의 DNS 시약을 첨가한 후 100°C 끓는 물에서 5분간 가열하였다. 이 시료를 상온으로 급속히 냉각시킨 다음 증류수 4ml을 첨가하여 혼합시킨후 spectrophotometer를 사용하여 570nm에서 OD를 측정하였다. 위와 같은 방법으로 우선 각 포도당 농도별로 OD를 측정함으로써 calibration curve를 작성한 후 여기에 측정되어 나오 미지시료의 OD 수치를 적용시켜 포도당 농도를 구하였다. 또한 더욱 정밀한 값을 얻기 위하여 각 시간 별로 시료를 채취하여 원심분리한 후 배양 상층액을 glucose & lactate analyzer(YSI 2000, USA)를 사용하여 포도당 농도를 측정하였다.

4. 미생물 원제의 안정적 수확기술개발

(1) *Bacillus licheniformis* spore 수확

(가) spray dry

실험용 스프레이 드라이어는 BUCHI 社가 제조한 모델명 minispray dryer B-191을 사용하였으며, 생산용 스프레이 드라이어는 생명공학연구원 산업화지원실의 유진테크에서

제조한 처리용량 15kg/hr 의 dish type 기기를 임대하여 사용하였다. inlet temp. 180°C이며, outlet temp. 100°C 조건하에서 분무건조를 수행하였다.

(나) freeze dry

삼원엔지니어링에서 제조한 모델명 SFDSM06을 사용하여 동결건조를 수행하였다. 방법은 시료에 부형제를 혼합하여 영하 70°C에서 예비 동결을 한 후 동결 건조 시스템에 의해 건조를 수행하였다.

(다) 경시변화

경시변화 검사는 일반적으로 은박봉투에 시료를 밀봉하여 RT, AT, CT에 각각 보관하여 4주, 8주, 12주 후의 분해정도를 검사한다. 여기서 40°C 4주, 8주, 12주 후의 감소율은 상온 조건하에서 1년, 2년, 3년으로 간주하는 것이 농약 원제 실험에서 통상적인 방법이다. 따라서, 생균수의 감소도 이에 준하여 실험을 하였으나, 40°C에서 4주가 상온에서 1년을 의미하지는 않는다. RT(room temperature) test ; 상온에 시료를 보관하여 일정 시가 후 검사, AT(aging temperature) test ; 40°C나 50°C에서 시료를 보관하여 일정 시간 후 검사, CT(cooling temperature) test ; 영하 10°C로 시료를 냉동고에서 저온 보관하여 일정 시간 후 검사하였다.

마. 결과 및 고찰

(1) *Bacillus licheniformis*균주의 5L jar fermentor에서의 배양 최적화

*Bacillus licheniformis*균주는 일반적으로 내생포자를 형성하는 그람양성세균의 배양적 특성을 나타냈다. 배양 경과에 따른 cell growth를 보는 OD(optical density)와 탄소원의 섭취를 측정하였다. 발효 시간에 따른 특성을 볼수 있는 pH, 온도, DO, rpm등의 요소들을 on-line으로 monitoring 하여 배양특성을 조사하였다(Fig. 5). 배양 10시간 경과하여 탄소원으로 공급된 glucose가 모두 소진되었다.

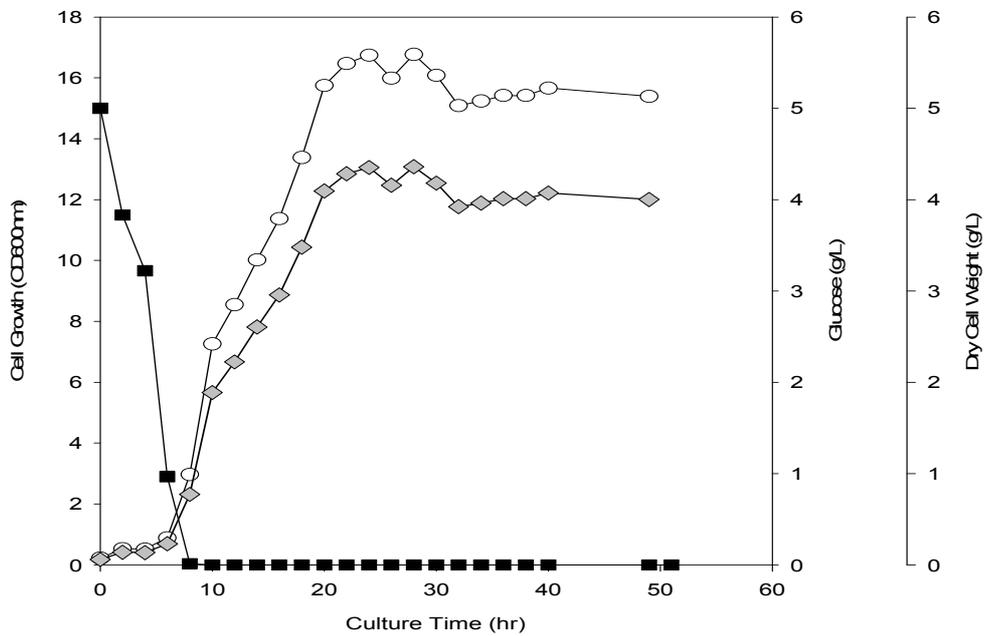
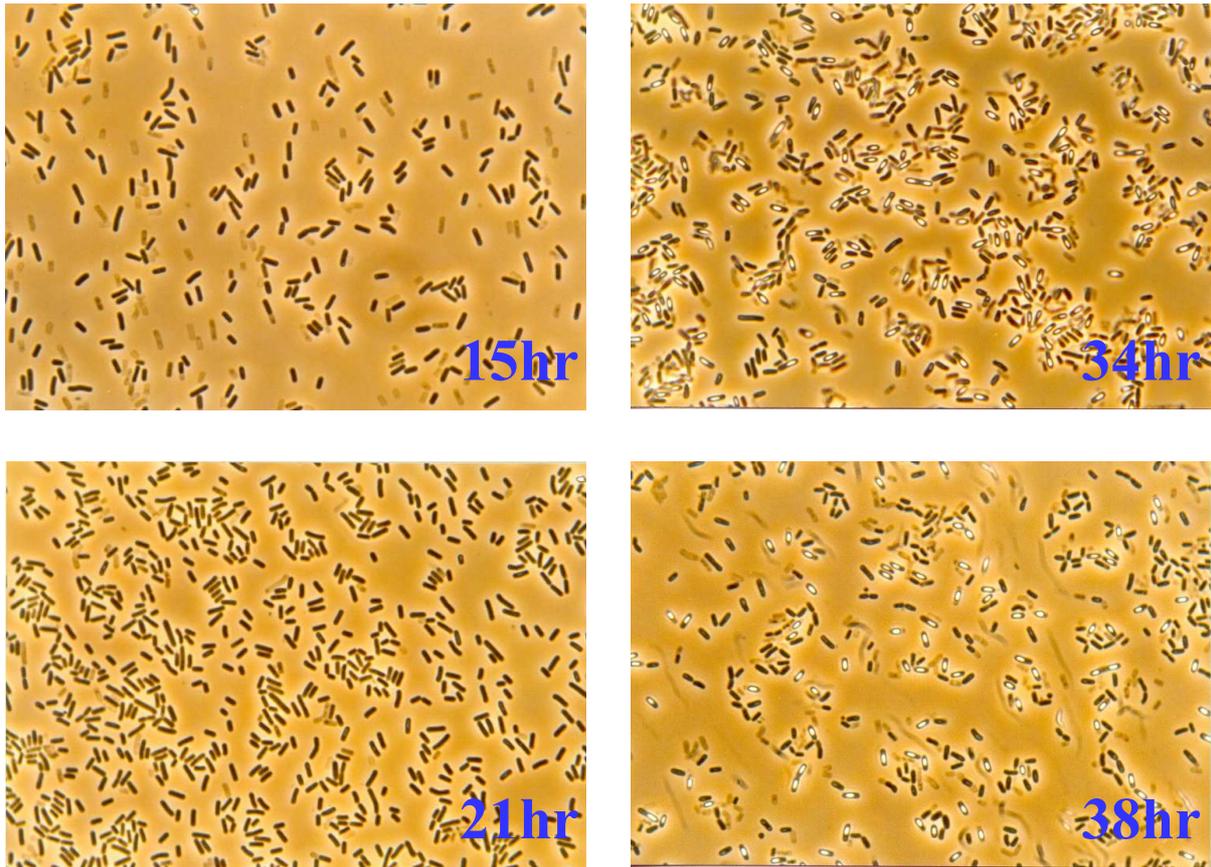


Fig 1. Cell growth pattern and glucose utilization of *Bacillus licheniformis* in 5L fermentor. Fermentator mod is batch culture.

○; cell growth mod is batch culture, ■; glucose, ◆; dry cell weight

(2) *Bacillus licheniformis*균주의 pilot plant scale에서 배양 최적화

*Bacillus licheniformis*균주를 5L배양조건을 기본으로하여 pilot plat scale(300L)에 배양 최적화를 실시하였다. 배양조건은 30℃, pH 6.5로 조절하고 발효조 내의 용존산소(DO)는 aeration과 agitation을 이용하여 20%이상으로 유지하였다. 배양 중 발효조내 압력은 0.2bar로 유지하였다. 그 결과 Fig. 6과 같이 세포의 성장은 약 40 OD에 이르렀고 세포건조 중량은 L당 약 11g 정도가 생산 되었다.

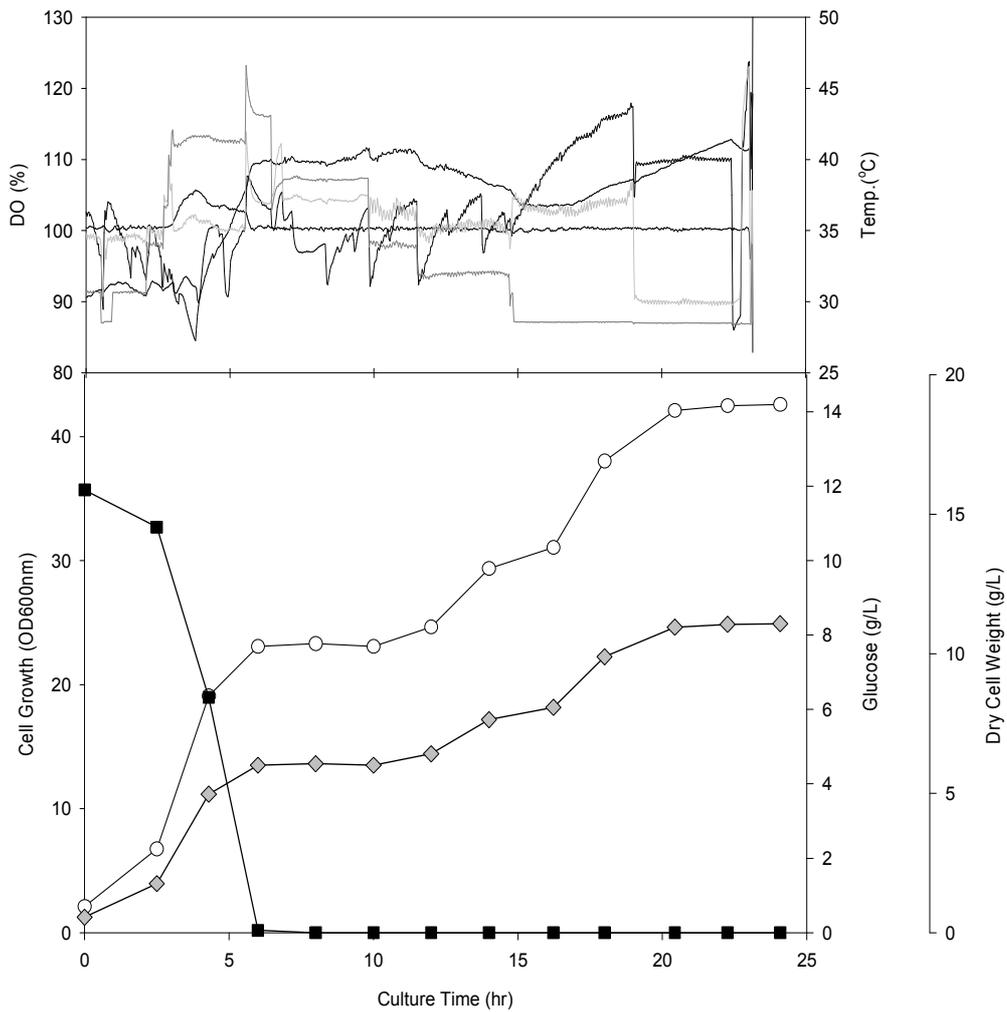


Fig. 2. Cell growth pattern and glucose utilization of *Bacillus licheniformis* in 300L fermentor. Fermentator mod is batch culture.

open circle; cell growth mod is batch culture, close square; glucose
gray diamond; dry cell weight

(3) *Bacillus licheniformis*원제의 제제 안정화

포자의 경우 열안정성이 있으므로 비용적인 측면을 고려하면 동결건조 방법에 비해 Hot spray dry 방식이 경제적으로 유리하다. spore는 열에 어느 정도 안정하나 최적의 spray dry 조건과 활성을 유지시킬 수 있는 열 안정화 물질을 탐색하고자 다양한 당류와 polymer를 대상으로 테스트를 하였다. 포자수 측정은 80℃에서 10분간 열처리하여 세포를 사멸시킨 다음 통상의 평판희석법을 사용하여 측정하였다.

일반적으로 일정량의 부형제를 혼합하여 스프레이 드라이 과정을 거치는 것이 손실을 줄임과 동시에 활성 유지를 기대 할 수 있다. 부형제는 skim milk, arabic gum, soluble starch, 변성전분(sun-cap), cyclo-dextrin과 sucrose, maltose, galactose, trehalose 등을 이용하여 발효가 종료된 배양액에서 세포를 분리한 후 여기에 10% 농도로 첨가하여 spray dry 과정을 수행하였다. 자료에 근거한 수율이 좋은 부형제를 사용했기 때문에 모두 비슷한 수율을 얻을 수 있었다.

Table 1. Yield and dispersibility of *Bacillus licheniformis* wetttable powder on various source

Treatment	Yield	Dispersibility
skim-milk	**	**
arabic gum	**	*
soluble starch	**	*
변성전분(sun-cap)	***	**
cyclo-dextrin	**	**
sucrose	***	**
maltose	***	**
galactose	**	***
trehalose	***	**

*** ; excellent, ** ; very good, * ; good

동결건조와 달리 spray dry의 단점은 부형제 없이 배양액을 분무건조하면 이것이 물에

잘 용해가 되지 않는다는데 있다. 즉, 세포들이 덩어리 형태로 존재하여 서로 엉켜있어 물에 잘 풀리지 않는다. 따라서, 적당한 부형제의 선택은 매우 중요하다. 본 공정에서는 가장 수분산성이 좋은 galactose와 수율이 좋은 sun-cap을 사용하여 분무건조 후 technical powder 를 제조하였다. galactose 는 물에 잘 녹는 성질을 가지고 있어 건조과정 후 세포들 사이에 끼어 있음으로 세포들 사이로 수분이 침투하는 성질을 높여준다. 따라서, 고온 건조과정시에 세포들이 덩어리져 엉켜있는 상태를 물에 잘 용해될 수 있도록 도와준다.

분산제로 사용되고 있는 계면활성제 SLS(sodium lauryl sulfate) 등을 1% 정도 첨가하여도 좋은 효과를 기대할 수 있다. galactose를 사용한 이유 중의 하나는 탄소원은 세균의 생장에 필수적이며, 가장 많은 양으로 소모되는 영양원이다. 여러 탄소원 중에서 galactose, arabinose 등은 세균(*Bacillus* sp.)은 이용할 수 있으나, 토양의 병원성 곰팡이는 이용할 수 없는 성분들이다. 그러므로 *Bacillus* sp. 균에만 유일하게 선택적 생장 및 근권 정착을 유도시킬 수 있다. sun-cap은 또한 arabic gum 이나 cyclo-dextrin 등의 대체 품목으로 개발되어 저렴하고 이용 가치가 높은 소재이다.

이것은 변성 전분으로 기능성물질 등을 포접(encapsulation)하여 안정화시키는 능력이 우수하며, 냉수에 쉽게 용해되고 점도가 낮아 고농도의 용액 제조가 가능하여 분무공정에 적합한 물성을 갖추고 있다. 이와 같이 선정된 galactose와 sun-cap을 사용하여 pilot plant scale인 300L 발효조에서 배양한 *Bacillus licheniformis*를 VMF centrifuge로 harvest 하여 spray dry를 하였다.

3. *Sreptomycetes griseus*0104의 Pilot 배양을 위한 배양조건 실험

토양에서 분리한 *S. griseus*는 다양한 분해효소를 분비하여 토양 내 유기물을 분해하여 식물이 영양원으로 흡수할 수 있게 해주는 분해자의 역할을 하고, 식물병원균이 자라는 것을 방지해 줄 수 있는 항균물질을 생산하여 지력증진에 중요한 역할을 한다. 최근 유용미생물을 대량으로 배양하여 토양에 뿌려 줌으로써 토양병을 방제하고, 농산물의 품질을 향상시킨 연구결과가 다수 보고되어 이에 대한 연구가 필요하다. 이에 본 연구는 토마토폏마름병방제 능력이 있는 *S. griseus*0104를 Pilot규모로 배양하는 공정을 확립하기 위해 수행하였다.

가. 실험재료

(1) 고체배지

본 실험에 사용된 고체배지는 Bennett's 배지(1% glucose, 0.1% Yeast extract, 0.2% Bacto peptone, 0.1% Beef extract, 1.5% agar), MBY배지(1% glucose, 0.2% Meat extract, 0.4% Bacto peptone, 0.2% MgSO₄, 0.5% NaCl, 0.2% Yeast extract, 1.5% agar), YM배지(1% glucose, 0.3% Yeast extract, 0.5% Bacto peptone, 0.3% Malt extract, 0.02% CaCl₂, 1.5% agar), CM배지(1% glucose, 1.2% Malt extract, 0.06% Bacto peptone, 1.5% agar)를 사용하였다.

(2) 액체배지

본 실험에 사용된 액체배지는 Bennett's ,MBY, YM, LB (1% tryptone peptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl)배지를 사용하였고 5L 발효조에서는 3~10% dextrin, 0.1%MgSO₄·7H₂O, 2% yeast extract, 0.5% soybean meal, 0.1% K₂HPO₄, 0.3% NaCl, 0.3% CaCO₃를 사용하였다.

나. 실험 방법

(1) 균주 보관

분양받은 균주를 Bennett's 배지를 baffled flask에 접종한 후 30°C incubator에서 3~5일간 배양하여 5% skim milk로 deep freezer에 보관하여 실험에 사용하였다.

(2) 고체 배양

고체 배양은 skim milk stock을 위에 언급한 각각의 배지에 streaking하여 30°C incubator에서 3~5일 동안 배양하여 종균배양에 접종하도록 하였다.

(3) 종균 배양

종균 배양은 본 배양과 동일한 배지로 만들고 고체 배양에서 키운 cell을 200ml/1L flask에 접종하여 30°C incubator에서 200rpm으로 20~24시간동안 배양시킨 후 본 배양의 seed로 사용하였다.

(4) 본 배양

본 배양인 5L 발효조의 경우 30°C에서 20~24시간 배양된 200ml의 종균 배양액을 2L의 발효 배지를 포함한 5L 발효조에 접종하였다. 발효조의 working volume은 2L로 하였고, 온도는 30, 통기량은 1~2vvm, agitation은 용존산소의 농도가 20%이상 유지되도록 교반 속도를 300~1000rpm까지 단계적으로 증가시켰다. 또한 발효시 기포발생을 방지하기 위해 실리콘 소포제(RS303, 한국다우코닝) 10%를 살균하여 발효 배지내에 간헐적으로 첨가시켜주었다.

(5) 세포수 측정

5L 발효조에서 배양이 끝난 후 멸균된 NaCl 0.08%를 배양액과 희석하여 LB plate에 도말하여 그 수를 측정하였고 배양액을 원심 분리하여 5% skim milk로 동결 건조한 것도 동일한 방법으로 그 수를 측정하였다.

다. 연구 수행 결과

(1) 고체배지선별

포자 형성여부를 확인하기 위한 고체배지에는 Bennett's ,MBY, YM, CM 배지가 사용되었고 각 Plate와 현미경 사진으로 포자형성여부를 확인하였다.

① Bennett's 배지

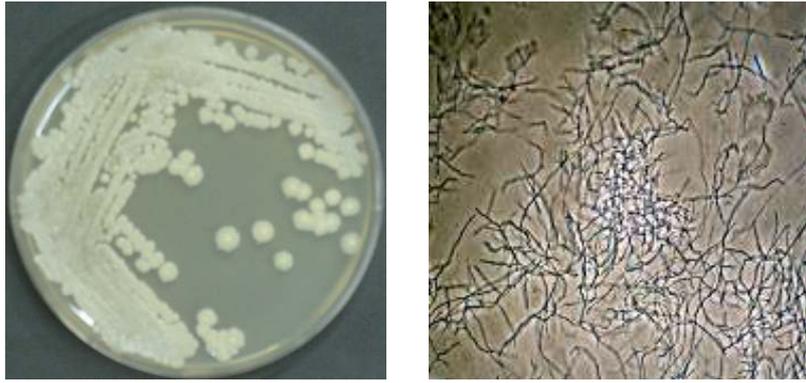


그림 1. Bennett's 고체배지 사진(왼쪽)과 현미경 관찰 사진(오른쪽)

30°C incubator에서 3~5일 동안 배양한 결과 고체배지 상에서는 포자형성여부 확인이 불분명했으나 현미경 사진을 통해 Bennett's 고체배지에서의 포자형성이 되지 않았음을 확인할 수 있다. Bennett's 고체배지는 MBY와 YM 배지에 비해 colony 크기가 작지만 더 많은 세포수를 보이고 있다.

② MBY 배지

30°C incubator에서 3~5일 동안 배양한 결과 MBY 고체배지에서도 현미경 관찰 사진 결과 포자형성에 실패했음을 알 수 있다. 동일 시간 배양결과 세포의 크기는 다른 배지들의 그것보다 다소 크다.



그림 2. MBY 고체배지 사진(왼쪽)과 현미경 관찰 사진(오른쪽)

③ YM 배지

YM 고체배지는 30°C incubator에서 3~5일 동안 배양하였고 현미경 사진결과 포자형성에 실패하였다. Bennett's 고체배지와 마찬가지로 YM 고체배지에서도 많은 세포수를 보이고 있다.



그림 3. YM 고체배지 사진(왼쪽)과 현미경 관찰 사진(오른쪽)

④ CM 배지

CM배지에서는 30°C incubator에서 3~5일 동안 배양을 하여도 희미하게 세포의 흔적만 볼 수 있어 방선균 배지로 부적합함을 알 수 있다.

방선균은 성장속도가 일반세균의 1/20정도에 지나지 않아서 배양시간이 길다. 종균배지에서 배양기간은 짧게는 1~3일이지만, 고체배지에서 형태적 분화 특성을 관찰하거나, 생산배지에서 배양하면 1주일 내지 열흘까지 걸린다. 고체 배양 결과 CM배지를 제외한 나머지 배지에서 세포는 모두 잘 자랐으나 현미경사진에서 보는바와 같이 모든 배지에서 포자를 형성하지 못하였다. 여러 가지 고체배양이 가지고 있는 단점을 보완하기 위해 배양시간이 고체배양보다 다소 짧은 액체 배양으로 포자 형성여부를 확인코자 한다.

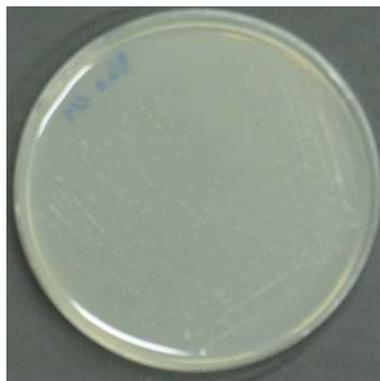


그림 4. CM 고체배지 사진

(2) 플라스크 배양을 통한 액체배지선별

액체 배양실험은 20mL 플라스크 배양용 배지를 포함한 250mL baffled 플라스크에 3~5일 동안 30°C incubator에서 배양한 Bennett's 고체배지에서 단일 균락을 선택하여 접

중하였으며 교반속도는 200rpm, 30°C에서 192시간동안 진탕배양 하였고 샘플은 중간에 두 번을 더 하여 Optical density와 포도당 농도, pH 변화, 현미경 관찰 등으로 포자 형성 여부를 확인하였다. 고체배지와 마찬가지로 CM배지는 액체배양에서도 낮은 Optical density를 보였고 LB배지에서는 배양시간이 너무 길어 세포의 O.D.가 1.5로 세포용해 (cell lysis)가 일어난 것 같다. Bennett's, YM, MBY 액체 배지에는 각각의 O.D. 값은 8.12. 9를 보였고 배양시간이 길어질수록 pH값이 상승하였고 포도당 소비 또한 월등히 높은 것으로 나타났다. 하지만 이번 액체배양 실험에서도 고체배양과 마찬가지로 포자형성에는 실패하였음을 보였다. 본 배양인 5L 발효조 실험에서는 액체배양에서 높은 O.D.값과 포도당 소비를 보이고 있는 Bennett's 배지와 YM 배지를 이용하여 용존산소가 고갈되지 않게 agitation을 조절하여 포자형성 실험을 하고자 한다.

표 1. 액체배양을 통한 배지 선별

Strain	Medium	Culture time (hr)	Optical density (A600)	pH	Glucose (g/L)	포자형성 여부
<i>S. griceus</i>	LB	48	-	-	-	안 됨
		72	-	-	-	
		192	1.5	8.4	-	
	CM	48	-	-	-	안 됨
		72	-	-	6.89	
		192	-	-	6.9	
	Bennett's	48	7.0	6.38	8.1	안 됨
		72	8.0	6.39	6.02	
		192	7.5	6.9	0	
	YM	48	11.0	7.3	2.54	안 됨
		72	12	7.4	0	
		192	11	7.89	0	
	MBY	48	8.9	6.28	0.01	안 됨
		72	9.0	7.14	0	
		192	8	8.29	0	

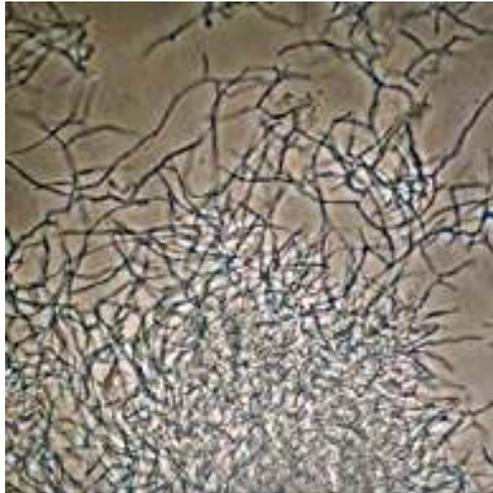


그림 5. LB 액체배지의 현미경 사진

(3) 5L 발효조의 회분식 배양

① Bennett's 배지와 YM 배지의 5L 회분식 배양

액체배양에서 높은 O.D. 값을 보인 Bennett's 배지와 YM 배지로 5L 회분식 배양을 수행하였다. 종균배양은 5L 발효조에 working volume의 10%인 200mL을 주 발효조에 접종하였고 종균배양은 20시간을 진탕배양 하였다. 종균 접종 후 배양초기 균체증식에 있어서 유도기를 거의 거치지 않고 바로 대수 증식기로 균체증식이 이어진 것을 볼 수 있었다. 이것은 종균의 배지가 주 발효조의 배지와 동일했기 때문에 새로운 환경에의 적응이 빨랐던 것으로 짐작된다. Bennett's 배지 실험에서는 최대 O.D.값이 10이고 포도당 농도가 초기 12g/L에서 100시간동안 배양한 후에 0g/L로 떨어지는 것을 확인할 수 있다. 하지만 YM 배지에서는 최대 O.D.값이 15이고 포도당 농도가 0g/L로 떨어지는데 걸린 시간이 50시간으로 Bennett's 배지실험보다 성장 속도가 빠른 것을 확인할 수 있었다. 현미경 사진에서는 두 배지실험 모두가 포자 형성에 실패했음을 볼 수 있었다. 이것으로 이 균주는 포자형성이 상당히 어려움을 보이고 있는 것으로 잠정 결론을 내릴 수 있다. 따라서 다른 실험 방법으로 1×10^8 CFU/g cell이상의 실험목적을 달성할 필요가 있어야 될 것이다. 그렇게 하기 위해서는 먼저 O.D.값을 최대로 올리는 실험을 한 후에 다른 방법을 모색하는 것이 급선무라 하겠다.

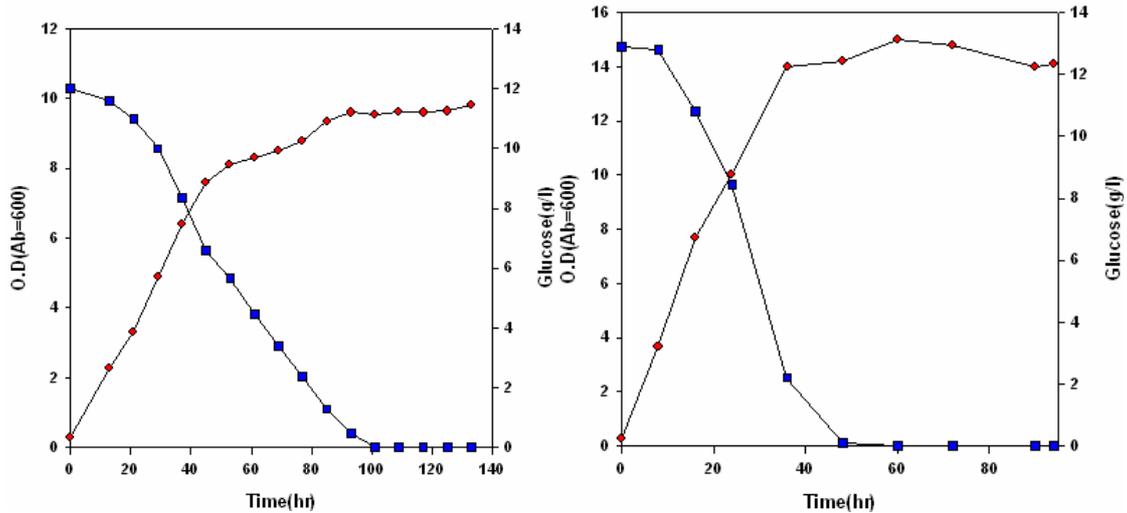


그림 6. Bennett's 배지(왼쪽)와 YM 배지(오른쪽)의 5L 회분식 배양

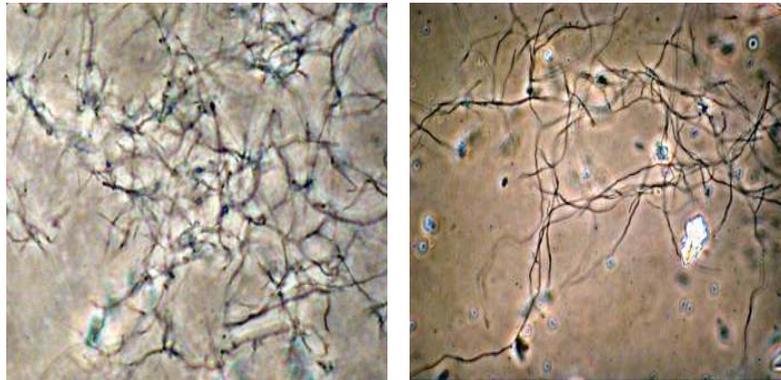


그림 7. Bennett's 배지(왼쪽)와 YM 배지(오른쪽)의 5L 회분식 배양의 현미경 사진

② Dextrin을 이용한 5L 회분식 배양 (1)

*Streptomyces griseus*의 대량 생산 확인을 위해 5L 발효를 수행하였다. Seed는 3일 배양한 고체배지에서 200mL/1000mL baffled flask에 단일 균락을 접종하여 30°C, 200rpm에서 20시간동안 배양한 후 발효기 배양에 seed로 사용하였다. 사용된 배지는 3% dextrin, 0.1% MgSO₄, 2% yeast extract, 0.5% soybean meal, 0.1% KH₂PO₄, 0.3% NaCl, 0.3% CaCO₃를 사용하였다. Working volume은 2L이고 배양이 끝난 후 final volume은 1.5L로 시료와 airation으로 500mL의 배양액이 농축된 것을 알 수 있었다. 배양 후 40시간에 최대 O.D.값이 50이 나왔고 그 시간이 지날수록 탄소원의 고갈로 인해서 세포용해가 일어나 그 값이 급격하게 떨어지는 것을 볼 수 있다. 또한 용존산소(Dissolved oxygen)는 20%이상을 유지하기 위해 rpm을 300~1000까지 서서히 증가시켜주었다. (그림 8)

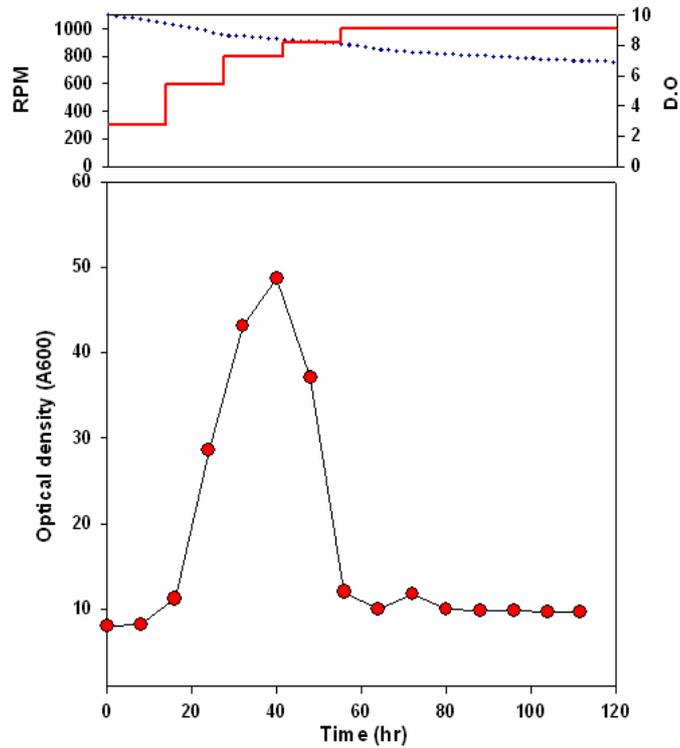


그림 8. Dextrin을 이용한 5L 회분식 배양 (1)

또한 현미경으로 배양 후 40시간, 90시간, 115시간의 시료를 사진 촬영한 것으로 역시 이번실험에서도 포자 형성에 실패한 것으로 나타났다. 하지만 이번 실험에서 flask 실험의 O.D.값보다 최대 5배 이상의 O.D.값이 나온 것을 확인할 수 있었다. 40시간 후에 탄소원의 고갈로 인해 발효가 원활히 진행되지 못하여 추후 실험에서는 탄소원인 dextrin의 함량을 증가시켜 더 많은 세포 군락을 형성하는 데 중점을 두어야 할 것이다. (그림 9)

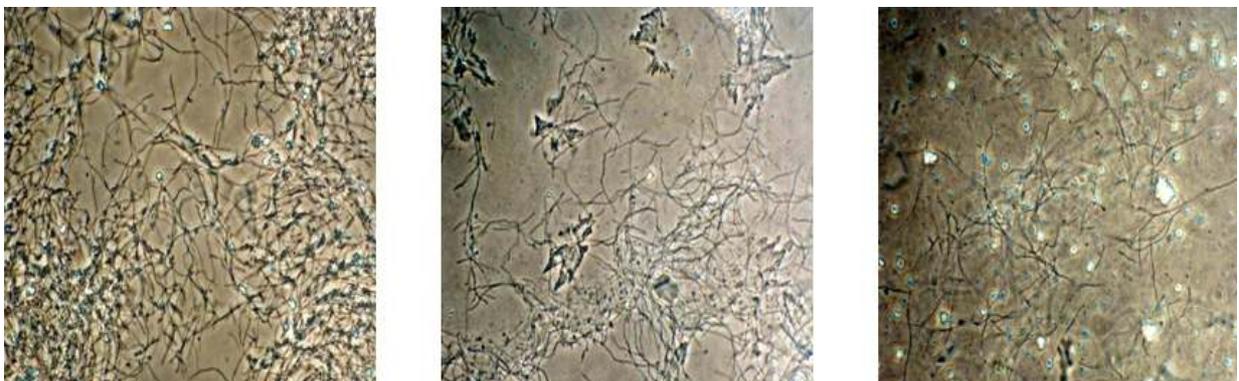


그림 9. Dextrin을 이용한 5L 회분식 배양의 시간별 현미경 사진
 왼쪽부터 배양 후 40시간, 90시간, 115시간

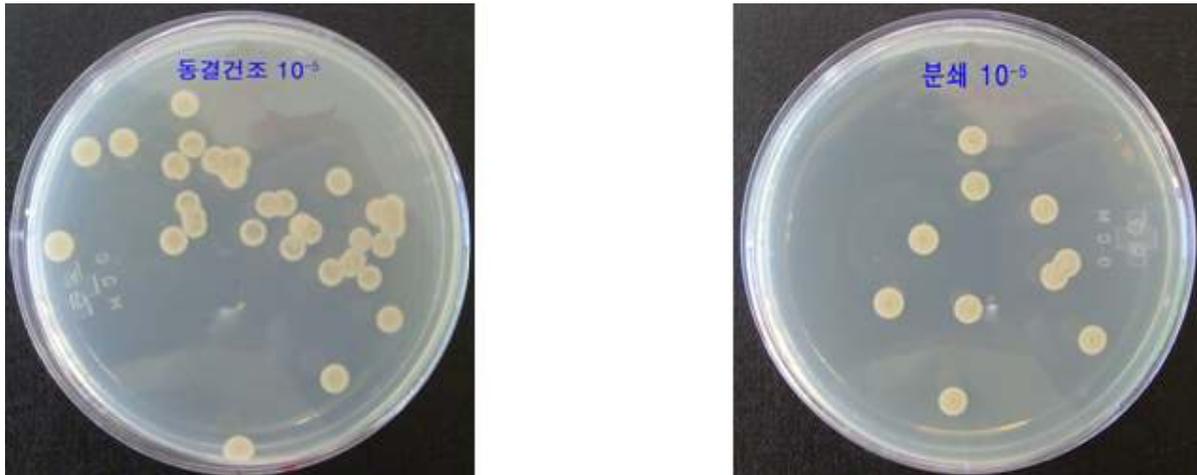


그림 10. Dextrin을 이용한 5L 배양 후의 동결건조와 세포 분쇄 후의 CFU(colony forming unit)

현재까지의 본 실험에 쓰인 균주가 포자형성에 실패하면서 다른 방법으로 동결건조와 동결건조 후의 세포 분쇄를 이용하여 더 많은 세포수 확보에 중점을 두는 실험을 하였다. 그 결과 최대 O.D.값을 보이는 배양 40시간의 배양액을 동결 건조하여 세포수 측정을 위해 0.8% NaCl로 희석하여 LB 평판배지에 도말하고 또한 동결 건조시킨 배양액을 막자사발을 이용하여 분쇄한 후 0.8% NaCl에 10배수로 연속희석하여 그 수를 측정하였다. 그 결과 동결 건조시킨 배양액의 세포수는 5.97×10^7 CFU/g cell, 동결건조 후 분쇄 후의 세포수는 1.87×10^7 CFU/g cell을 보이고 있다. 배양액을 원심분리 한 후의 전체 cell weight는 53.9g이었고 5% skim milk가 함유된 동결건조 후의 dry cell weight은 30.9g이었다.(그림 10). 본 연구과정에서 5L 배양, 동결건조, 건조물의 분쇄 후 균사체의 상태를 현미경으로 확인하였다(그림 11).

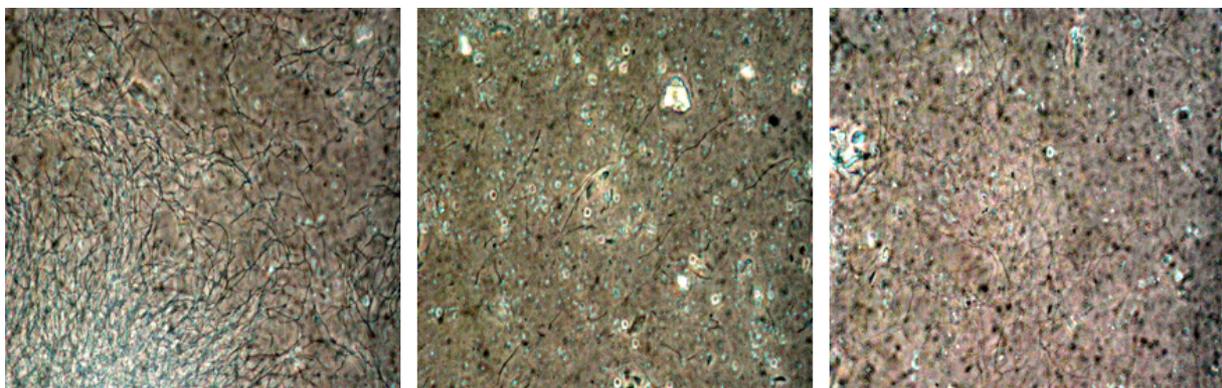


그림 11. Dextrin을 이용한 5L 배양 후의 배양액, 동결건조와 세포 분쇄 후의 현미경 사진

③ Dextrin을 이용한 5L 회분식 배양 (2)

*S. griceus*0104의 대량 생산 확인을 위해 탄소원이 dextrin을 이용한 5L 발효를 다시 수행하였다. Seed는 3일 배양한 고체배지에서 200mL/1000mL baffled flask에 단일 균락을 접종하여 30°C, 200rpm에서 20시간동안 배양한 후 발효기 배양에 seed로 사용하였다. 사용된 배지는 앞선 실험에서와 같게 사용하였으나 dextrin만 3%에서 5%로 증가시켜 동일한 방법으로 실험을 하였다. Working volume은 2L에서 오랜 배양시간후의 배양액 손실을 줄이기 위해서 2.5L로 증가시켰고 배양종료시 final volume은 2480mL이었다. 배양 후 41시간에 최대 O.D.값이 67이 나온 것은 탄소원의 증가가 원인이 되었다. (그림 12)

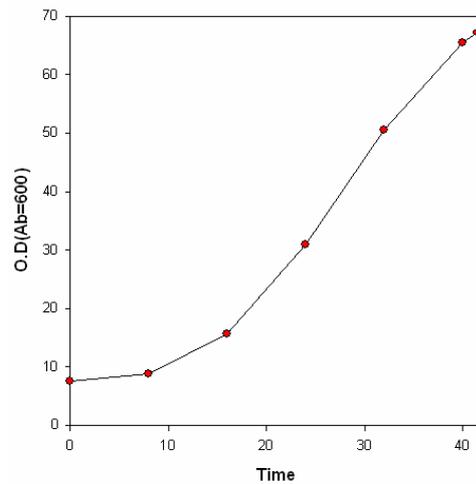


그림 12. Dextrin을 이용한 5L 회분식 배양 (2)

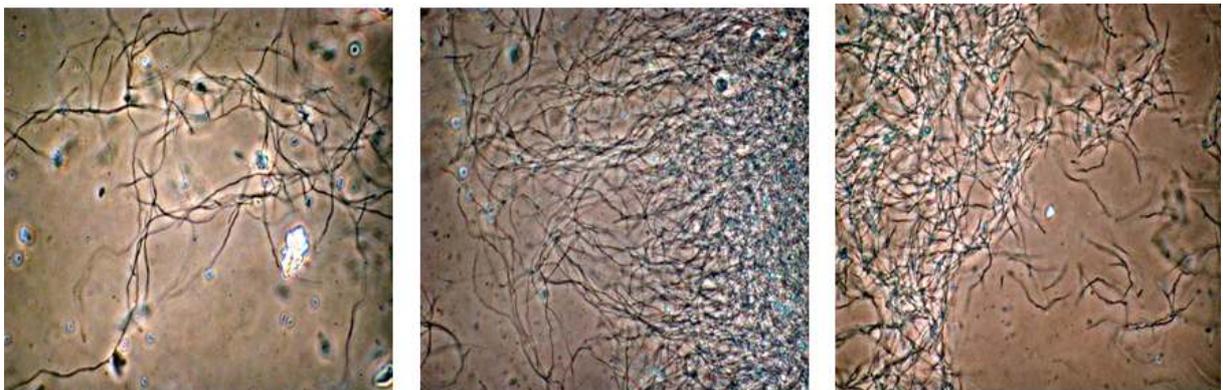


그림 13. 그림 9. Dextrin을 이용한 5L 회분식 배양의 시간별 현미경 사진
왼쪽부터 배양 후 12시간, 24시간, 40시간

또한 현미경으로 배양 후 12시간, 24시간, 40시간의 시료를 사진 촬영한 것으로 역시 이번실험에서도 포자 형성에 실패한 것으로 나타났다. 하지만 이번실험은 탄소원의 증가로 앞선 실험보다 더 많은 세포 수 확보가 되었음을 보여주고 있다. (그림 13)

이번 5L 배양액도 3% dextrin을 이용한 실험에서와 같이 최대 O.D.값을 보이는 배양 40시간의 배양액을 동결 건조하여 적당히 0.8% NaCl로 희석하여 LB 평판배지에 도말하고 또한 동결 건조시킨 배양액을 막자사발을 이용하여 분쇄한 후 역시 동일 방법으로 그 수를 측정하였다. 그 결과 동결 건조시킨 배양액의 세포수는 8.7×10^7 CFU/g, 동결 건조 후 분쇄 후의 세포수는 4.8×10^6 CFU/g 이었다. 배양액을 원심분리 한 후의 전체 cell weight는 343.5g이었고 5% skim milk가 함유된 동결건조 후의 dry cell weight은 91.74g 이었다.(그림 14)

그림 15는 dextrin을 이용한 5L 배양 후의 동결건조 시료 사진을 나타내고 있다.

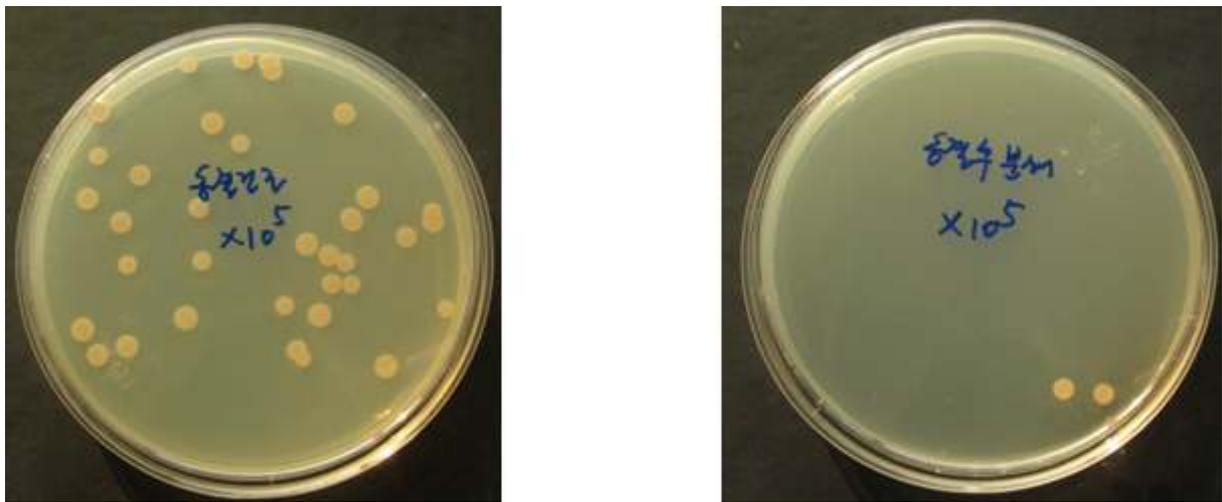


그림 14. Dextrin을 이용한 5L 배양 후의 동결건조와 세포 분쇄 후의 cfu.



그림 15. Dextrin을 이용한 5L 배양 후의 동결건조 시료 사진

라. 연구 성과 및 향후 개발

- 1992년 미국에서 조사된 통계자료에 의하면 한가지 화합물을 성공적인 농약으로 개발하려면 100만회 이상의 실험과 1억불 이상의 비용이 필요하다고 하였고 성공확률이 1/30만으로 낮고 투자효과도 2.5 - 5배로 낮은 편으로 보고된 바 있다.

- 이에 비해 바이오농약은 약 5천회 정도의 실험과 200만불 정도의 비용으로 개발이 가능하며 성공 확률이 1/20로 화학농약에 비하여 매우 높고 투자효과도 30배로 아주 높다. 이런 특성 때문에 기술력만 있다면 아무리 작은 회사라도 개발에 성공할 수 있다는 장점이 있고, 국산제품을 기반으로 아직 성장기에 있는 해외 바이오농약 시장에서 경쟁적 우위를 점하는 것도 가능하므로 농약부문의 수출경쟁력을 강화시키고 국내 업체의 기술적 의존도 탈피를 위해서는 정부의 지속적인 관심과 지원이 요구되는 분야라 할 수 있다.

- 본 연구개발을 통하여 참여기업에서 원하는 만큼의 *S. griceus*0104의 세포수를 확보함과 동시에 대량생산 체제를 갖출 수 있는 기술을 습득할 수 있는 계기가 될 수 있을 것이다.

4. *S. griseus*0104 pilot배양에 의한 균체 대량생산 및 안정화

가. 연구수행 내용 및 결과

(1) 실험재료

(가) 생산 균주

가지과 작물에 큰 피해를 주는 청고병(*R. solanacearum*)에 대하여 방제효과가 높은 *S. griseus*0104를 사용하였다.

(나) 사용 배지

① 고체배지

본 실험에 사용된 고체배지는 Bennett's 배지(1% glucose, 0.1% Yeast extract, 0.2% Bacto peptone, 0.1% Beef extract, 1.5% agar), Difco사의 PDA (Potato Dextrose Agar) 배지로 Lot.6285326, Final pH 5.6 ± 0.2 (Potato starch 0.4%, Dextrose 2g/l, Agar 1.5%), 균체수를 측정하기 위하여 LB 고체배지(1% Tryptone peptone, 0.5% Yeast extract, 0.5% NaCl)를 사용하였다.

② 액체배지

본 실험에 사용된 액체배지는 표 1과 같다. PDB (Potato Dextrose Broth)는Difco사의 Lot.6319397, Final pH 5.1 ± 0.2 (Potato starch 0.4%, Dextrose 0.2%)를 사용하였다.

표 1. 실험에 사용된 액체배지.

Component (%)	PDB	A	B	C	D	E	F	G	H
Glucose				1	1	1	1	1	1
Dextrin		1	3						
Soluble starch		2		2	2	2	2	2	2
Bacto peptone		1	1	1	1	1	1		
Yeast extract		1	1	1	1	1	1		
CaCl ₂		0.2	0.2		0.2		0.2	0.2	
NaCl		0.2	0.2	0.2	0.2		0.2	0.2	
CaCO ₃		0.2	0.2		0.2 (HCl처리)		0.2	0.2	
Ca(NO ₃) ₂				0.5					

나. 실험 방법

(1) 균주 보관

분양받은 *S. griseus*0104를 Bennett's 고체배지에서 48시간동안 배양 후 형성된 하나의 균락을 50mL Bennett's 액체배지가 포함된 250mL baffled flask에 접종한 후 30°C incubator에서 12시간, 200rpm으로 배양하여 이곳에 멸균된 5% skim milk로 현탁 시킨 후 2ml stock bial에 1ml씩 분주하여 deep freezer에 보관하였으며 이를 실험에 사용하였다.

(2) 고체 배양

고체 배양은 skim milk stock 균주를 Bennett's 고체배지와 PDA 고체배지에 streaking하여 30°C incubator에서 3~5일 동안 배양하여 종균배양에 접종하도록 하였다.

(3) 종균 배양

종균 배양은 본 배양과 동일한 배지와 Bennett's 액체배지를 주로 사용하였으며 고체 배양에서 키운 균주를 100ml 또는 200ml의 액체배지를 포함한 1L baffled flask에 접종하여 30°C incubator에서 200rpm으로 20~24시간동안 배양시킨 후 본 배양의 seed로 사용하였다.

(4) 본 배양

본 배양인 5L 발효조의 경우 30°C에서 20~24시간 배양된 200ml의 종균 배양액을 2.5L의 발효 배지를 포함한 5L 발효조에 접종하였으며 500L의 경우에는 2L 발효배지를 포함한 5L baffled flask 5개를 다시 접종하여 발효조의 최적상태를 유지하도록 하였다. 발효조의 working volume은 각각 2L와 300L로 하였고, 온도는 30°C, 통기량은 0.2~1vvm이었으며, agitation은 용존산소의 농도가 20%이상 유지되도록 교반속도를 300~1000rpm까지 단계적으로 증가시켰다. 표. 1의 F배지를 이용한 5L 배양실험에서는 플라스크 배양과 조건을 비슷하게 맞추기 위하여 낮은 rpm과 낮은 agitation으로 실험을 수행하였다. 또한 발효시 기포발생을 방지하기 위해 실리콘 소포제(RS303, 한국다우코닝) 10%를 살균하여 발효 배지 내에 간헐적으로 첨가시켜주었다.

(5) 세포수 측정

시료 확보를 위해 500L 발효조에서 배양이 끝난 후 멸균된 NaCl 0.08%를 배양액과 적

당한 배율로 희석하여 LB plate에 도말하여 그 수를 측정하였고 배양액을 원심 분리하여 5% skim milk로 동결 건조한 것도 동일한 방법으로 그 수를 측정하였다.

(6) 분석 방법

균체 농도는 배양액을 증류수로 적당히 희석한 후 spectrophotometer (JASCO V-530, JASCO Corporation, Japan)를 사용하여 흡광도 600nm에서 측정하였다. 포도당 농도는 YSI Glucose & Lactate Analyzer (YSI 2700 SELECT, Yellow Springs Instruments Co., USA)를 사용하여 분석하였다.

다. 연구 수행 결과

(1) 고체배지선별

연구수행 일차년도에는 포자 형성여부를 확인하기 위한 고체배지에 Bennet's, MBY, YM, CM 배지 등이 사용되었으나 포자형성에는 모두 실패하였고 외부 정보에 의해 PDA고체배지에서 포자형성이 된 결과를 토대로 실험에 착수하였다.

PDA (Potato dextrose agar) 배지 30°C incubator에서 7일 동안 배양한 결과 현미경 사진을 통해 PDA 고체배지에서의 포자형성이 되었음을 확인할 수 있고 백색의 균사가 포자임을 확인할 수 있다. 현미경상으로 포자의 형성은 4일후부터 생성되었고 7일이 넘어서야 대부분의 세포들이 포자생성으로 진행됨을 확인할 수 있었다. 아마도 PDA의 주성분이 potato starch와 dextrose가 포자형성에 많은 영향을 끼친 것으로 생각된다 (그림 1).

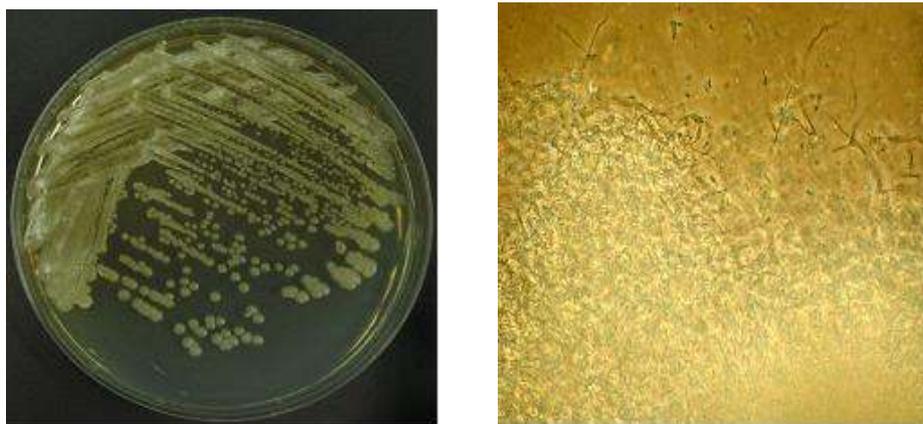


그림 1. PDA 고체배지 배양사진(왼쪽)과 배양 7일 후의 현미경 관찰 사진(오른쪽).

(2) 플라스크 배양을 통한 액체배지선별

PDA 고체배지에서 포자형성에 성공한 결과를 바탕으로 플라스크를 통한 액체 배양을

시도하였다. 위에서 언급했듯이 PDA의 주성분은 Potato starch와 dextrose이므로 이 성분들을 바탕으로 표 1.과 같은 배지 표를 만들어 실험을 수행하였다.

액체 배양실험은 50mL의 배지를 포함한 250mL baffled 플라스크에 2일 동안 30°C incubator에서 배양한 PDA 고체배지에서 단일 균락을 선택하여 접종하였으며 교반속도는 200rpm, 30°C에서 4~7일 동안 진탕배양 하였고 중간에 시료를 채취하여 Optical density와 포도당 농도, pH 변화, 현미경 관찰 등으로 포자 형성 여부를 확인하였다.

① PDB (potato dextrose broth)

Difco사의 PDB 배지를 이용하여 배지 조제 후 멸균전 pH가 5.0인 플라스크와 2N NaOH로 pH 7.2로 높인 플라스크 배양에 각각 접종하여 현미경상으로 포자형성여부를 확인하였다. 하지만 고체배양과는 달리 포자형성에 실패하였다. 그림 (2)는 배양 후 플라스크 사진이며 pH 5.0인 플라스크는 자라지 않았고 pH 7.2인 플라스크는 7일 배양 후 Optical density가 1.5가 나왔다. 그림 (3)은 시간에 따른 현미경 사진이고 시간에 따라 포자형성은 안 되고 배양 7일 후의 현미경 사진 상에 균사들이 모두 용해(lysis)가 일어났을 알 수 있다.

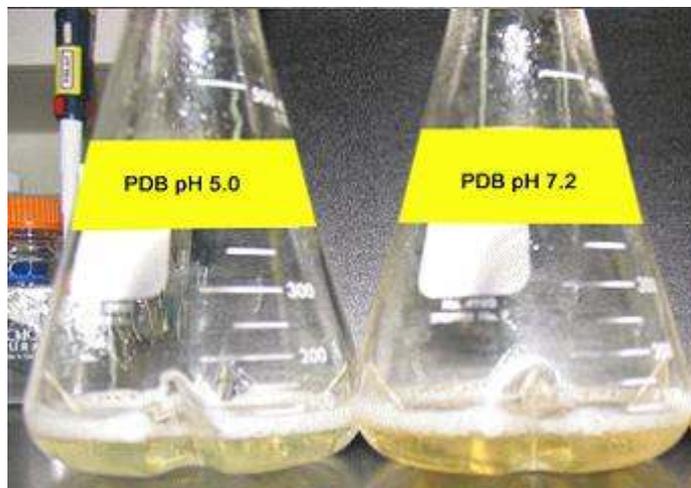
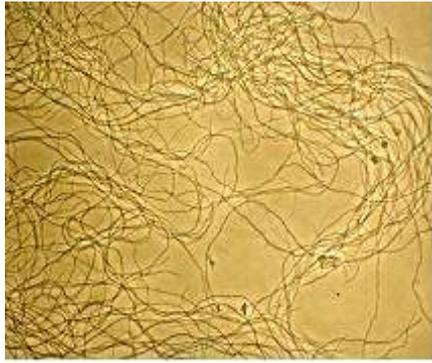
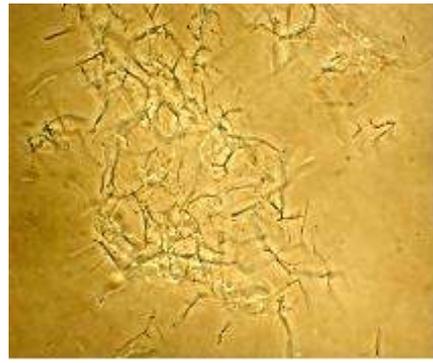


그림 2. PDB 액체배양 플라스크 사진



배양 후 24시간



배양 후 72시간



배양 후 5일



배양 후 7일

그림 3. PDB 액체배양 현미경 사진.

② PDB (potato dextrose broth)의 복합배지 효과실험

㉠ PDB에 효모추출물 추가실험

이번 실험은 앞의 PDB 배양실험에서 포자형성의 실패 원인이 탄소원이 아닌 다른 영양분의 고갈 때문에 일어난것이 아닌가 하는 의구심을 갖고 복합배지를 사용하여 N-source의 첨가를 해주어 높은 O.D값과 포자 형성여부를 확인하고자 하는 실험을 하였다. 50mL PDB 배지에 0.5%의 효모추출물을 포함시켜 8일동안 배양하였다. 그림 (4)는 플라스크 배양사진이고 그림 (5)는 시간에 따른 현미경 사진을 나타내고 있다. 배양 8일후에 O.D값이 8.2를 나타내었다. 효모추출물을 첨가함으로써 cell growth의 상승과 세포의 용해가 일어나지 않도록 하는 것에는 영향을 주었지만 결과적으로 포자형성에는 실패하였다.

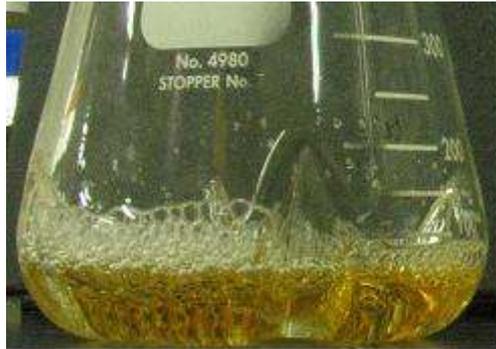


그림 4. PDB와 효모추출물 액체배양 사진.



배양 후 2일

배양 후 4일

배양 후 8일

그림 5. PDB에 효모추출물을 첨가한 액체배양의 현미경 사진.

㉞ PDB에 bacto peptone 추가실험

이번 실험도 복합배지인 bacto peptone을 0.5% 첨가시켰을때 현상을 파악하는 실험을 하였다. 그림 (6)는 플라스크 배양사진이고 그림 (7)는 시간에 따른 현미경 사진을 나타내고 있다. 배양 2일 이후로 균주의 용해가 일어나더니 배양 4일 이후로 cell들이 용해되어 포자형성으로의 전이가 일어나지 않는 것을 확인할 수 있었다. 물론 플라스크 배양이 고체배양과 조건은 다르지만 효모추출물보다 bacto peptone은 세포가 필요로 하는 영양분이 부족하거나 그 어떤 성분이 세포에 독성을 주어 더 이상 포자형성에의 전이를 하지 못하게 하는 것 같다.



그림 6. PDB와 bacto peptone 액체배양 사진.



배양 후 2일

배양 후 4일

배양 후 8일

그림 7. PDB에 Bacto peptone을 첨가한 액체배양의 현미경 사진.

PDA 고체배양의 포자형성 성공을 바탕으로 PDB 액체배양과 영양분의 고갈을 생각하여 복합배지를 첨가하는 실험을 하였으나 모두 포자형성에는 실패하였다. 이와 같은 결과를 토대로 PDA배지의 주성분인 고가의 potato starch를 대신할 수 있는 배지를 찾기 위해서 dextrin, soluble starch, glucose등을 이용하여 표. 1의 플라스크 실험을 수행하였다.

③ 표. 1의 A 배지를 이용한 액체배양

이번 실험은 표.1의 A 액체배지를 이용하여 플라스크 실험을 하였다. 사용배지는 dextrin 1%, soluble starch 2%, Bacto peptone 1%, Yeast extract 1%, CaCl_2 0.2%, NaCl 0.2%, CaCO_3 0.2%를 사용하였다. 균주인 *S. griseus*0104가 dextrin에서 다른 탄소원에서 보다 성장이 좋았고 또한, 고가의 potato starch 대신에 soluble starch를 이용함으로써 scale-up시에 탄소원에 대한 소비를 줄이고자 하였다. 또한, endospore의 주요 구성성분인 calcium을 첨가함으로써 포자형성으로의 전이를 용이하게 할 수 있게 하였다. 효모추출물과 peptone같은 복합배지의 첨가는 많은 세포수를 확보하기 위한 것이었다. 그리고 잦은 실험에서 배양시간이 길어짐에 따라 세포의 용해가 일어나는 원인이 삼투압에 의할 수 있을 것 같아 소량의 sodium chloride를 첨가하였다. 하지만 이번 실험에서 배양 시간이 10일이 경과한 후 시간에 비해 세포의 용해는 많이 일어나진 않았지만 포자 역시 형

성되지 않음을 확인하였다 (그림 8).

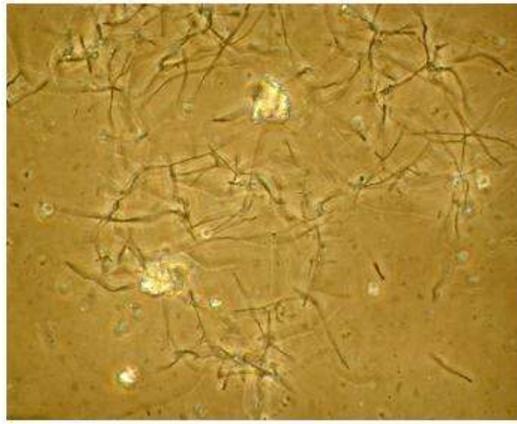


그림 8. A 배지를 이용한 플라스크 실험의 배양 10일 후의 현미경 사진.

④ 표. 1의 B 배지를 이용한 액체배양

이번 실험은 표.1 의 B 액체배지를 이용하여 플라스크 실험을 하였다. 사용배지는 dextrin 3%, Bacto peptone 1%, Yeast extract 1%, CaCl_2 0.2%, NaCl 0.2%, CaCO_3 0.2% 를 사용하였다. A 배지를 이용한 플라스크 실험에서 포자형성을 하지 않은 것이 탄소원 때문인지 확인하고자 위의 실험과 조건은 같지만 soluble starch를 넣지 않고 대신에 높은 세포성장과 탄소원의 효과를 확인하기 위하여 dextrin을 3%로 증가시켜 실험을 하였다. 하지만 이번에도 A 배지를 이용한 실험에서와 마찬가지로 그림 (9)에서와 같이 배양 10일후에도 포자가 형성되지 않음을 확인하였다.

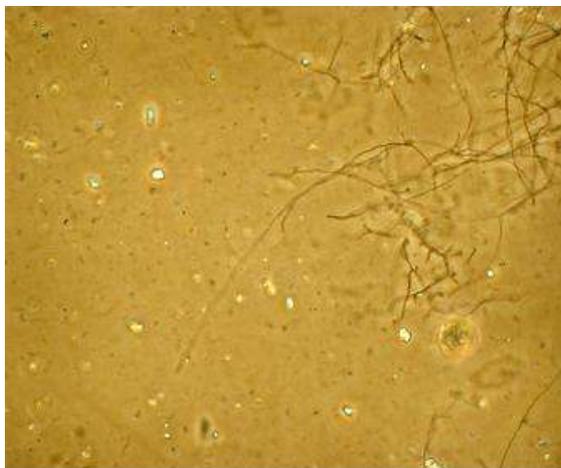


그림 9. B 배지를 이용한 플라스크 실험의 배양 10일 후의 현미경 사진.

⑤ 표. 1의 C 배지를 이용한 액체배양

이번 실험은 표.1 의 C 액체배지를 이용하여 플라스크 실험을 하였다. 사용배지는 glucose 1%, soluble starch 2%, Bacto peptone 1%, Yeast extract 1%, NaCl 0.2%, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.2%를 사용하였다. PDA 고체배지의 주성분인 soluble starch와 glucose를 주 탄소원으로 하고 물에 잘 녹지 않는 CaCl_2 나 CaCO_3 대신에 수용성인 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 를 첨가하였으나 배양 10일후에도 포자가 형성되지 않았고 단지 균사 (mycelium)이 잘게 잘라짐을 보였다. (그림 10).



그림 10. C 배지를 이용한 플라스크 실험의 배양 10일 후의 현미경 사진.

⑥ 표. 1의 D 배지를 이용한 액체배양

이번 실험은 표.1 의 D 액체배지를 이용하여 플라스크 실험을 하였다. 사용배지는 glucose 1%, soluble starch 2%, Bacto peptone 1%, Yeast extract 1%, NaCl 0.2%, CaCO_3 0.2%를 사용하였다. C 액체배지를 이용한 플라스크 실험과 마찬가지로 PDA 고체배지의 주성분인 soluble starch와 glucose를 주 탄소원으로 하고 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 를 첨가했을 경우 단순히 균사 (mycelium)가 잘게 잘라짐만 보여 이번에는 CaCO_3 를 2N HCl에 녹여 첨가하여 실험을 수행하였다. C 배지를 이용한 결과와 대조적으로 균사의 잘림 현상은 일어나지 않았지만 10일 액체배양 후 위의 실험과 마찬가지로 포자 형성은 하지 않았다 (그림 11).

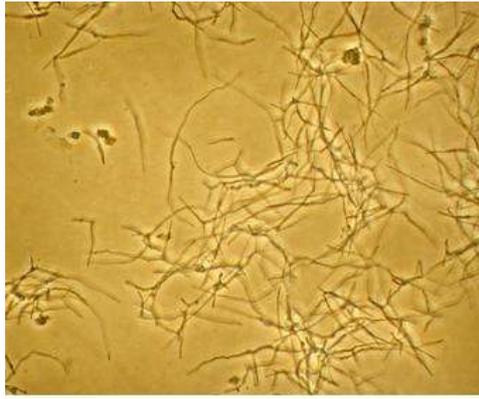


그림 11. D 배지를 이용한 플라스크 실험의 배양 10일 후의 현미경 사진.

⑦ 표. 1의 E 배지를 이용한 액체배양

이번 실험은 표 1의 E 액체배지를 이용하여 플라스크 실험을 하였다. 사용배지는 glucose 1%, soluble starch 2%, Bacto peptone 1%, Yeast extract 1%를 사용하였다. 지금까지의 플라스크 배양에 첨가했던 CaCl_2 0.2%, NaCl 0.2%, CaCO_3 0.2%의 영향을 파악하기 위한 실험을 수행한 결과 배양 2일째에 별다른 이상이 없이 잘 자라던 균이 배양 7일 후의 현미경 사진에서 보듯이 거의 모든 세포들이 용해가 이루어졌음을 알 수 있었다. 이번 실험을 토대로 위의 염(salt)들이 포자형성에 주요 인자로 작용함을 확연히 알 수 있다 (그림 12).

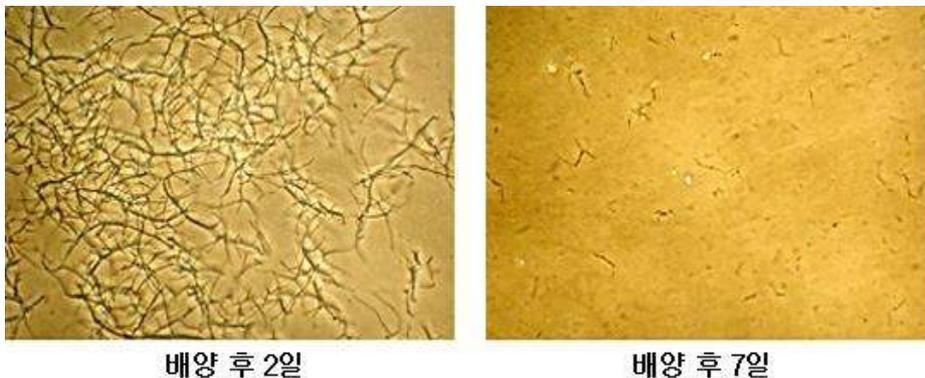


그림 12. E 배지를 이용한 플라스크 실험의 배양 후의 현미경 사진.

⑧ 표. 1의 F 배지를 이용한 액체배양

이번 실험은 표.1 의 F 액체배지를 이용하여 플라스크 실험을 하였다. 사용배지는 glucose 1%, soluble starch 2%, Bacto peptone 1%, Yeast extract 1%, CaCl_2 0.2%, NaCl 0.2%, CaCO_3 0.2%를 사용하였다. 앞선 여러 실험에서 CaCl_2 , NaCl , CaCO_3 등의 배지가 포자형성에 영향을 많이 주는 것으로 확인이 되었기 때문에 배지에 첨가하였고, CaCO_3 를 2N HCl에 녹이던지, 수용성인 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 를 첨가해도 포자형성이 되지 않음을

확인하였기 때문에 이번 실험에서는 모든 배지 성분을 초기 배지상태 그대로 첨가하였다 그 결과 배양 7일째 현미경 사진결과 포자형성이 이루어졌음을 확인할 수 있었다 (그림 13).

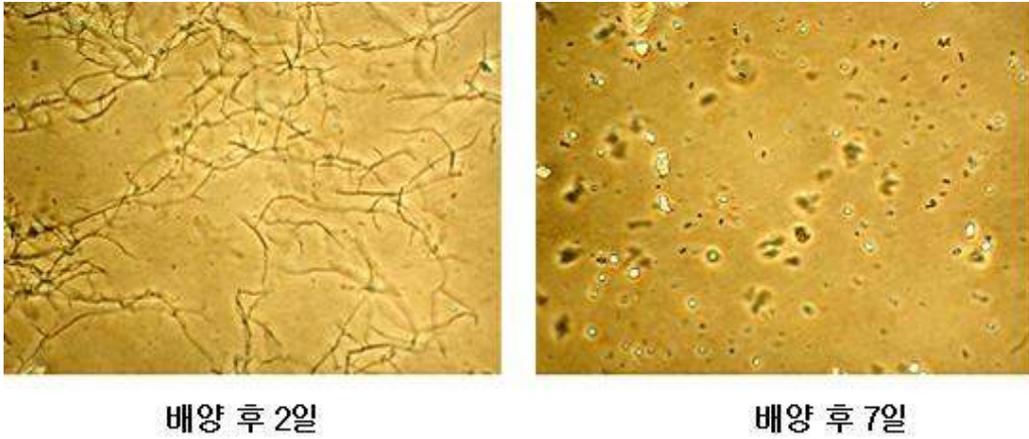


그림 13. F 배지를 이용한 플라스크 실험의 배양 후의 현미경 사진.

⑨ 표. 1의 G, H 배지를 이용한 액체배양

표. 1의 G와 H 액체배지는 PDA의 구성성분만을 사용하였다. G 액체배양에 사용된 배지는 glucose 1%, soluble starch 2%, CaCl₂ 0.2%, NaCl 0.2%, CaCO₃ 0.2%를 사용하였고, H 액체배양에 사용한 배지는 glucose 1%, soluble starch 2%를 사용하였으나 질소원의 부재로 인하여 세포성장을 하지 못하였다. 아마도 PDA 배지 구성에 탄소원 이외에 다른 무기질이 존재하여 그것이 포자형성에 큰 영향을 주는 것으로 사료된다.

(3) 5L 발효조의 회분식 배양

표. 1의 배지를 사용하여 *S. griseus*0104의 5L 발효를 수행하였다. 종균 배양은 3일 배양한 PDA 고체배지에서 200mL의 배양배지를 포함한 1000mL baffled flask에 단일 균락을 접종하여 30°C, 200rpm에서 20시간동안 배양한 후 발효기 배양에 종균으로 사용하였다. 초기 working volume은 2.5L였고, 5L 발효조는(KFC LA-150, Kobiotech Co., Ltd., Korea)를 사용하였다. 각각의 배지는 조제 후 2N NaOH로 pH 7.2로 상승시킨 후 배양을 시작하였고 배양 도중에 다른 pH 조절은 하지 않았다. 표. 1의 F배지의 플라스크 실험에서 포자가 형성되었지만, 플라스크의 조건과 발효조의 조건이 다르기 때문에 F배지를 제외한 다른 배지에서의 발효조의 배양에 따른 효과를 보기 위하여 5L 회분식 배양을 수행하였다.

① 표. 1의 B 배지를 이용한 5L 발효조의 회분식 배양

이번 실험은 표. 1의 B배지를 이용한 5L 발효조의 회분식 배양으로 탄소원의 갈변화를 방지하기 위하여 dextrin을 별도 멸균하였고 배양 중 많은 foam으로 인해 초기 antifoam 2ml을 첨가하였으며 antiform은 다우코닝사의 제품을 사용하였다. 배양조건은 PDA 고체 배지를 2일간 배양 후 B배지를 포함한 100mL 액체배지를 포함한 1000mL baffled flask 를 사용하였다. 용존산소의 농도를 20% 이상으로 유지하기 위하여 rpm을 초기 300에서 700까지 증식에 따라 점차적으로 증가시켜주었고 agitation은 1vvm으로 유지하였다. 결과적으로 배양 60시간에 최대 60 O.D를 나타내었지만 마지막 시료인 배양 후 112시간의 시료 현미경 사진 상으로 세포들이 모두 용해가 일어났다 B배지를 이용한 플라스크 실험에서는 세포의 용해가 일어나지 않았지만 5L 발효조에서 용해가 일어난 것은 아마도 용존산소의 고갈을 고려하여 rpm을 높여준 것이 원인인 것 같다 (그림 14).

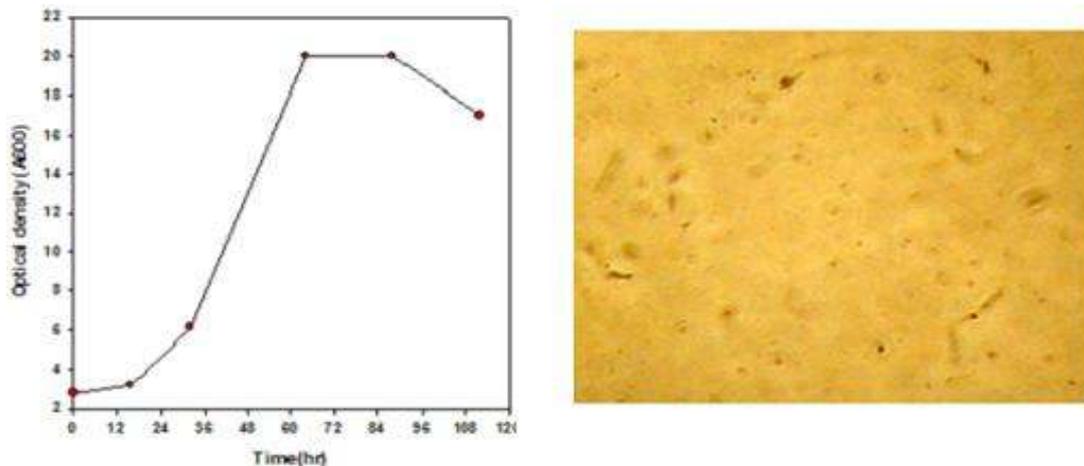


그림 14. 표. 1의 B 배지를 이용한 5L 회분식 배양 (왼쪽)과 현미경 사진(오른쪽).

② 표. 1의 C 배지를 이용한 5L 발효조의 회분식 배양

불용성인 calcium carbonate (CaCO_3)대신에 수용성인 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 를 사용한 플라스크 배양에서는 10일후에 균사들이 모두 잘게 부서지기는 했지만 포자로의 전이는 일어나지 않았다. 플라스크 실험에서 높은 rpm 때문에 이러한 현상이 일어난 것은 아닌가 하는 의구심을 갖고 이번 5L 발효조의 회분식 배양을 수행하였다. 그 결과 20 O.D가 나온 플라스크에서보다 매우 낮은 8 O.D를 나타내었고 최대 O.D를 보이는 시간이 늦어짐을 볼 수 있다. 용존산소에 구애 없이 초기 300rpm으로 처음부터 배양말까지 유지하였고 agitation은 0.2vvm으로 최소로 하였다. 하지만, 예상과는 다르게 플라스크 배양에서와 마찬가지로

균사들의 잘림 현상은 일어났지만 포자로의 전이는 일어나지 않은 것으로 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 는 포자형성 실험에 적절하지 않은 것으로 생각 된다 (그림 15).

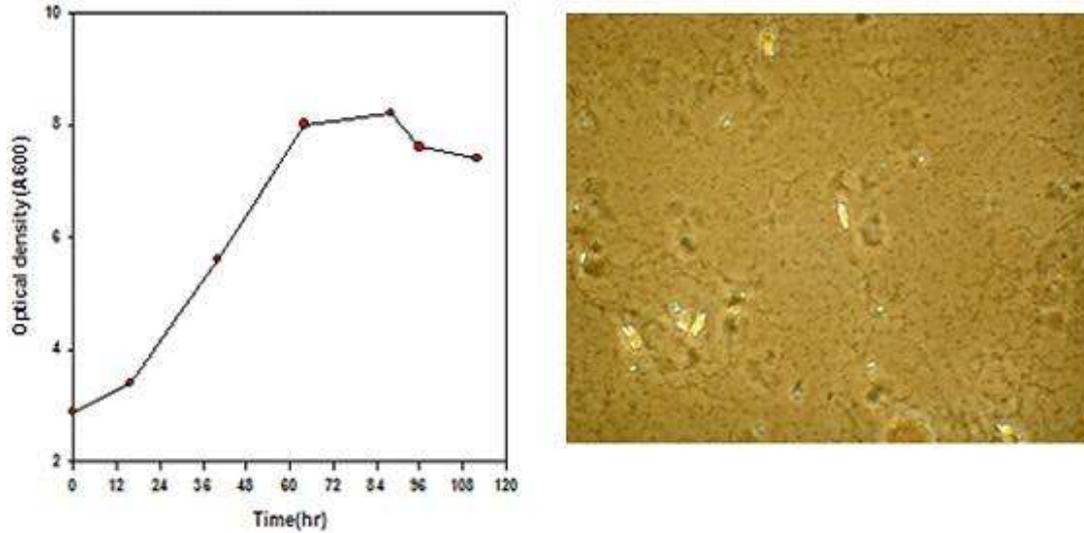


그림 15. 표. 1의 C 배지를 이용한 5L 회분식 배양 (왼쪽)과 현미경 사진(오른쪽).

③ 표. 1의 D 배지를 이용한 5L 발효조의 회분식 배양

이번 실험은 CaCO_3 를 2N HCl에 완전히 녹여 5L 회분식 배양을 수행하였다. 1%의 초기 포도당 농도가 모두 소진되는데 80시간이 걸린 것은 배양 중간에 세포의 용해로 인해 정상적인 세포성장을 하지 않은 것으로 사료된다. 플라스크 배양과 비슷한 조건을 맞추기 위하여 초기에 rpm을 150으로 낮게 유지하였고 48시간 이후에 rpm을 20%의 용존산소를 유지하면서 최대 500rpm까지 올려주었고 agitation은 0.2vvm으로 낮게 유지하였다. 배양 80시간 후에 최대 14.5 O.D를 나타내었다. 현미경 사진에서는 아직도 많은 염들이 남아있고 세포의 용해가 모두 이루어져 있음이 나타난다 (그림 16).

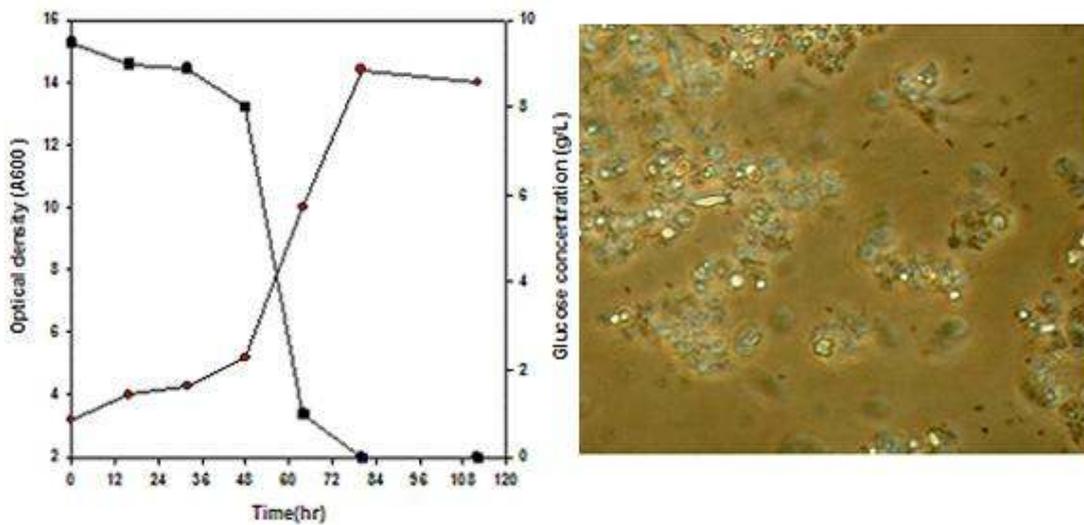


그림 16. 표. 1의 D 배지를 이용한 5L 회분식 배양 (왼쪽)과 현미경 사진(오른쪽).

④ 표. 1의 F 배지를 이용한 5L 발효조의 회분식 배양

고가의 potato starch와 dextrose를 주성분으로 하는 Potato dextrose agar (PDA)의 성분과 비슷하게 구성된 soluble starch, 포도당과 기타 염들로 구성된 표. 1의 F 배지의 플라스크 배양에서 포자형성이 성공하였고 이런 결과를 토대로 플라스크 배양실험과 동일한 결과를 얻기 위한 5L 회분식 배양을 수행하였다. 플라스크 배양의 조건이 rpm 200으로 수일을 배양했을 경우 포자형성을 하였으므로 발효조에서는 rpm조건을 낮게 하고 agitation도 최소로 하여 플라스크 환경과 비슷하게 맞추려 시도하였다. 그림 17-A의 실험은 agitation은 0.2vvm, rpm을 300으로 하여 배양 마지막까지 유지시키는 실험을 수행하였다. 최대 O.D는 7이 나왔고 포도당의 농도가 96시간에 고갈되는 것으로 보아 용존산소의 고갈로 인해 균주가 제대로 자라지 않은 것으로 사료된다. 현미경 사진으로 포자형성에 실패하여 그림 17-B와 같이 재 실험을 하였다. 이번 실험은 rpm은 150으로 유지하고 대신에 agitation을 0.2~1vvm까지 올려주어 공급해주는 공기량에 따른 효과를 보았다. 하지만 이번 실험에서도 초기에는 O.D값이 5.8까지 상승하다가 배양 24시간이 지나면서 A실험과 마찬가지로 용존산소의 고갈로 인해 그 값이 낮아지는 것을 볼 수 있다. 균주는 시간이 갈수록 활성을 잃어가는 것을 볼 수 있다. 그림 17-C의 실험은 초기 rpm 150과 agitation은 0.2vvm으로 배양 후까지 유지시켰다. 이번실험에서도 앞선 실험과 마찬가지로 포자형성의 전이가 일어나지 않았고 공기량이 B 실험보다 적어 성장속도가 늦어짐을 확인할 수 있다. 배양 28시간에 최대 O.D값은 4.8이 나왔다. 표. 1의 F 배지를 이용한 플라스크에서는 20 O.D 안팎의 결과를 보였지만 이번 실험들에서는 낮은 rpm과 적은 agitation으로 상당히 작은 값이 나왔다. 현미경상으로도 시간이 갈수록 세포용해가 진행됨을 알 수 있다. 표. 1의 F 배지를 이용하여 5L 회분식 배양을 수행한 이번 실험들에서 플라스크의 환경을 발효조에 적용시키는데 상당한 어려움이 있음이 확인해졌다. 앞으로 최적 배지 조건과 발효조의 많은 조건들을 바꾸어 플라스크 배양 조건과 비슷한 조건을 만드는데 중점을 두어야 할 것으로 사료된다.

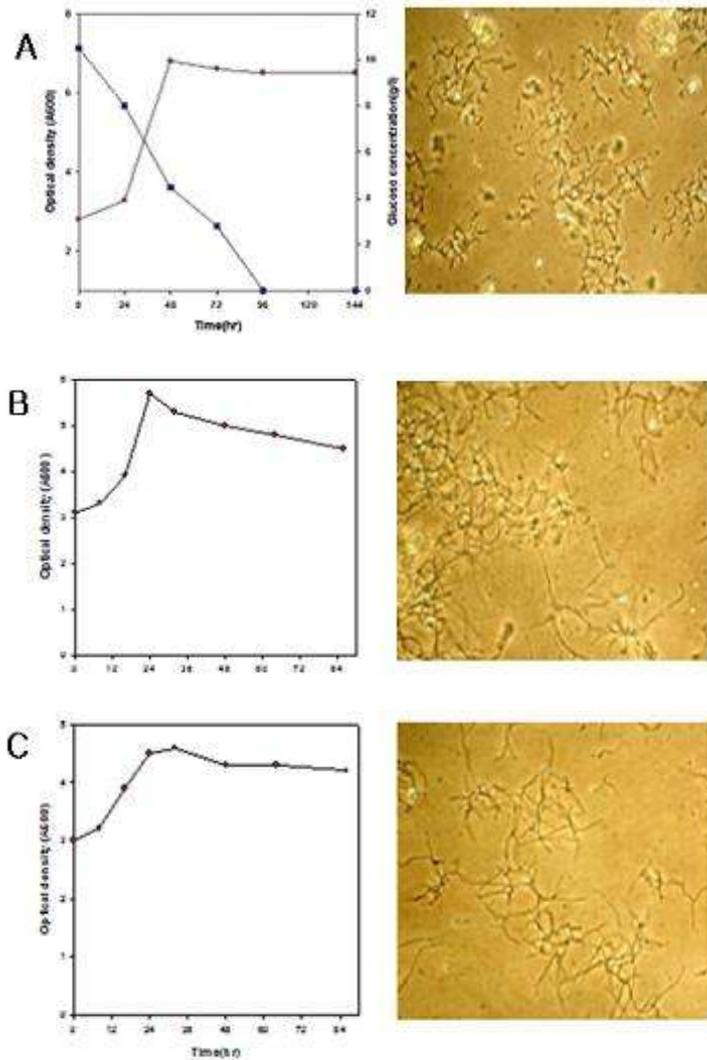


그림 17. 표. 1의 F 배지를 이용한 5L 회분식 배양(왼쪽)과 현미경 사진(오른쪽).

(4) Dextrin을 이용한 500L 회분식 배양

Dextrin을 이용한 5L 회분식 배양결과를 바탕으로 500L scale-up 실험과 동결조건을 통해 더 많은 시료를 확보하였다. 배양조건은 -70°C 에 stock된 균주를 3일 배양한 Benett's 고체배지에서 100mL/1000mL baffled flask 5개에 각각 단일 균락을 접종하여 30°C , 200rpm에서 20시간동안 배양한 1차 seed를 2L/5L baffled flask 5개에 각각 접종한 것을 2차 seed로 사용하였다. 조건은 1차 seed와 마찬가지로 30°C , 200rpm, 배양시간은 15시간으로 하였다. 이 2차 seed를 500L 발효조의 seed로 사용하였다. 500L 발효조의 초기 working volume은 300L였고 온도는 30°C , pH는 암모니아수 (28%)로 접종전에 7.0으로 보정한 후 배양중 보정은 하지 않았다. 사용된 배지는 더 많은 시료확보를 위해 5L에

서 사용한 dextrin을 3%에서 8%로 증가시켰고, 0.1% MgSO₄, 2% yeast extract, 0.5% soybean meal, 0.1% KH₂PO₄, 0.3% NaCl, 0.3% CaCO₃를 사용하였다. 배양이 진행되면서 pH가 떨어지기 시작하는 18시간 이후로 세포의 왕성한 성장을 보이고 있고 용존산소의 부족에 따라 점차적으로 rpm과 air량을 증가시킴으로써 최대 균체성장을 이룰 수 있었다. 20시간을 기점으로 pH가 증가하고 그와 함께 용존산소가 증가해야하지만 이미 많이 형성된 균사(mycelium)으로 인해 배양액 자체가 점성이 생기고 그로인해 DO (용존산소) membrane에 균사가 코팅 (coating)이 되어 제대로 sensor가 작동하지 않은 것으로 생각된다 (그림 18).

배양 후 45시간에 최대 O.D.값이 56.5이 나왔고 이 시간에 pH가 많이 올라간 것과 cell growth curve가 서서히 멈추는 것으로 이 시간의 시료를 채취하여 동결건조를 실시하여 그 세포수를 측정하였다. 이번 500L 배양액도 5L실험에서와 같이 최대 O.D.값을 보이는 배양 45시간의 배양액과 동결 건조한 시료를 적당히 0.8% NaCl로 희석하여 LB 평판배지에 도말하고 over night하여 그 CFU를 측정하였다. 45시간 배양 후의 발효액의 최종 volume은 300L였고 원심분리 후의 wet cell은 23.3kg, 동결건조시 2kg의 skimmilk를 첨가하였고 건조결과 8.3kg이 나왔다. 그 결과 배양액의 세포 수는 2.06×10^7 CFU/g cell, 동결 건조 후 분쇄 후의 세포 수는 1.82×10^7 CFU/g cell을 보여 최종 배양액 대비하여 88.3%의 수율을 보이고 있다. 배양액을 원심분리 한 후의 전체 cell weight는 23.3kg이었고 5% skim milk가 함유된 동결건조 후의 dry cell weight은 8.3kg이었다. 그림 19-A는 dextrin을 이용한 500L 배양액과 동결건조 후의 LB plate 도말 사진과 그림 19-B는 동결건조 시료 사진을 나타내고 있다.

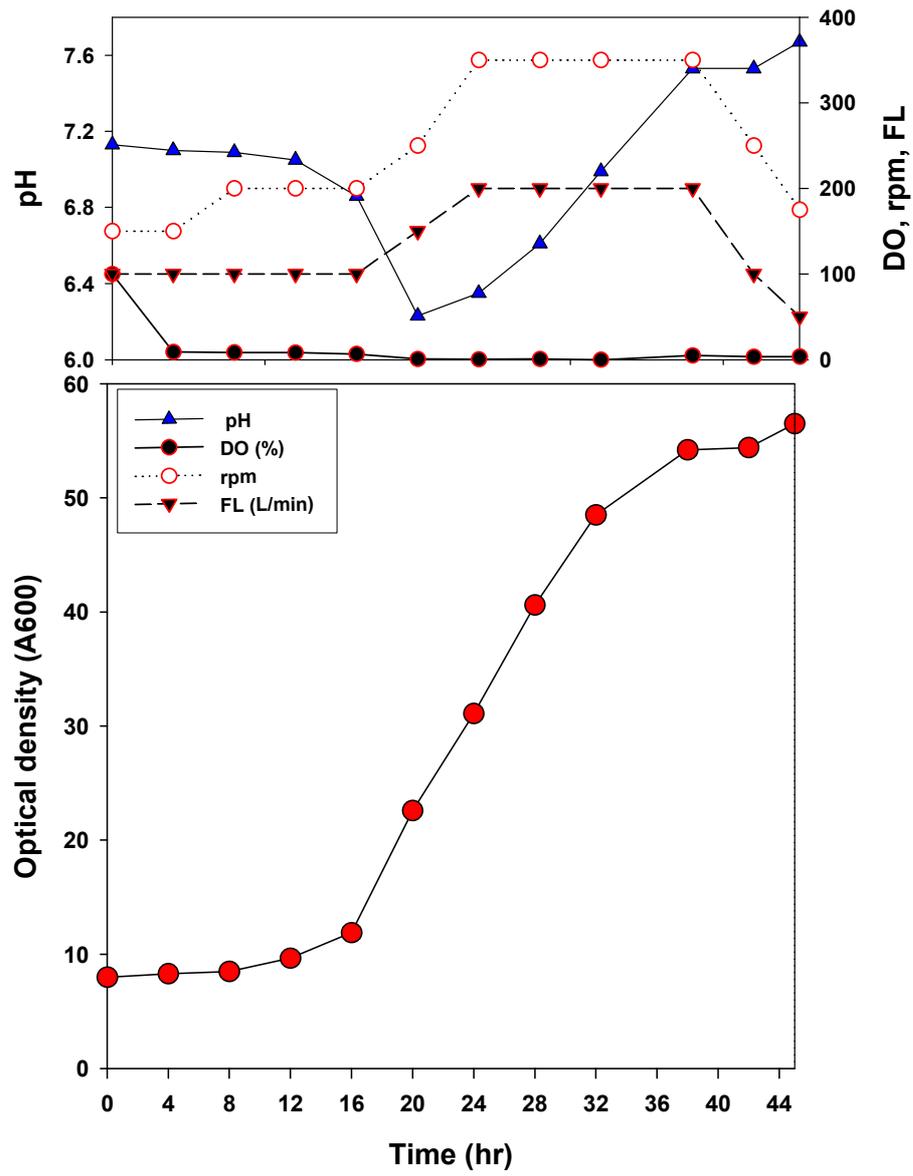
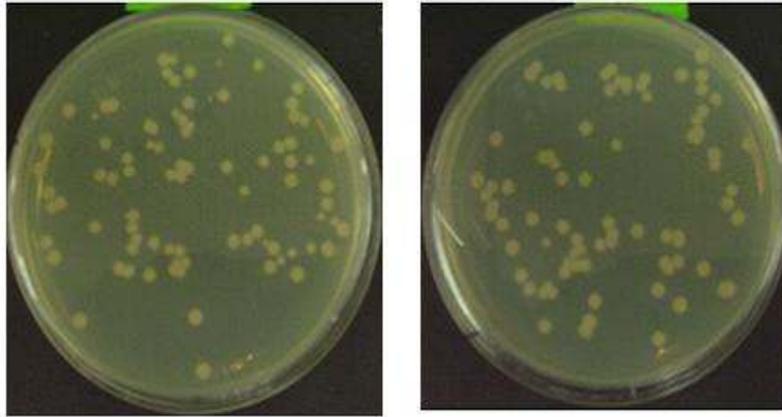


그림 18. Dextrin을 이용한 500L 회분식 배양

A



B



그림 19. Dextrin을 이용한 500L 회분식 배양의 도말사진(A)과 동결건조 후의 사진(B).

라. 연구 성과 및 향후 계획

- . 세계적으로 바이오농약은 200만불 정도의 비용으로 개발이 가능하며 성공 확률이 화학농약에 비하여 매우 높고 투자효과도 30배로 아주 높다. 이런 특성 때문에 기술력만 있다면 아무리 작은 회사라도 개발에 성공할 수 있다는 장점이 있고, 국산제품을 기반으로 아직 성장기에 있는 해외 바이오농약 시장에서 경쟁적 우위를 점하는 것도 가능하므로 농약부문의 수출경쟁력을 강화시키고 국내 업체의 기술적 의존도 탈피를 위해서는 정부의 지속적인 관심과 지원이 요구되는 분야라 할 수 있다.

- . 이런 장점을 배경으로 다양한 배지 조성파 조건들로 실행된 플라스크 배양실험에서 표. 1의 F배지인 glucose 1%, soluble starch 2%, Bacto peptone 1%, Yeast extract 1%, CaCl₂ 0.2%, NaCl 0.2%, CaCO₃ 0.2%를 이용한 플라스크 수준의 액체배양 실험에서 포자형성이 성공되었음을 확인하였다 (그림 13). 비록 그 수는 미미한 수준이지만 앞으로 더욱 다양한 최적 배지조건과 기타 여러 배양 조건 등을 개량한다면 대량 생산 공정에 원하는 만큼의 성과가 있을 것으로 사료된다. 하지만 표. 1의 F배지를 이용한 5L 회분식 배양에서는 플라스크 수준의 조건을 맞추기가 까다로워 계속된 실험에서 포자형성이 얻을 수 없었으나 배양된 균체를 동결건조하여 파우더 형태의 바이오농약 원료를 생산할 수 있었다. (그림 17). 추후 연구에 플라스크 배양조건을 발효조에 적용시킬 수 있는 조건을 찾는 데 중점을 두어야 할 것이고 배지조성에서 soluble starch의 원가가 고가이므로 이를 개선할 수 있는 탄소원을 찾는 것 또한 선행되어야 할 것이다. 만일 대량 배양조건에서 포자형성에 성공한다면 분무건조기(spray dryer)를 통해 배양 후 공정에의 시간과 소비를 크게 줄일 수 있을 것으로 사료된다.

- . 본 연구에서 사용된 토마토폟마름병원균(*R. solanacearum*)에 대하여 방제효과가 높은 *S. griseus*0104가 포자형성균임을 확인하였으며 플라스크 수준의 배양 조건을 발효조 실험에 적용한다면 고농도 배양의 가능성 확인할 수 있었다. 그리고 최적화된 5L, 500L 등의 대량 배양을 통하여 얻어진 결과물을 활용하여 동결건조 및 분쇄 방법 등의 연구를 수행한다면 포장수준의 결과물의 획득할 수 있을 것이다.

제3절. 토양병해방제용 미생물 원제 및 제품에 대한 안전성조사

1. 길항균주 5종에 대한 안전성조사

가. 시험목적

최근 식물병방제를 위해 방제대상 병원균의 생장을 억제하거나 사멸시키는 길항미생물을 이용하는 기술개발에 대한 연구가 국내외에서 활발히 진행되고 있다. 국내의 경우 이러한 미생물제들 중 미생물농약으로 등록된 제품이 극소수에 불과하여 생산회사들은 자사제품의 판매는 물론 홍보에 어려움을 겪고 있다. 그 이유는 미생물농약으로 등록하기 위해서는 “농약의 등록시험기준과 방법(농촌진흥청고시 제 2006-7호)” 따라 제품의 안전성에 대한 자료를 충분히 갖추어야 가능하나 요구하는 자료를 준비하기 위해서는 품목당 4~6억원의 예산이 소요되어 개발회사들의 부담이 크기 때문이다. 본 연구는 후보 길항미생물들에 대해 미생물농약등록에 필요한 안전성 확인을 연차적으로 수행하여 다양한 미생물농약개발에 필요한 자료로 사용하고자한다. 금년도 안전성조사 대상 길항균주는 *S. griseus*0104등 5종에 대한 급성독성 정보를 얻기 위하여 실시하였다.

나. 미생물농약등록을 위한 조사지침자료

- 국내 - 농약의 등록시험기준과 방법(농촌진흥청고시 제 2006-7호)
- 미국 - US EPA OPPTS 870.1100(Acute oral toxicity), 870.1200 (Acute dermal toxicity), 850.1075(Fish acute toxicity test, freshwater and marine)에 준하여 실시하였다.

다. 원제독성조사 길항균주

균 주 명	원재량	원제생균밀도	제형방법
<i>Bacillus licheniformis</i>	170g	10 ⁹ cfu/g	분무건조
<i>Bacillus subtilis</i>	200g	10 ⁹ cfu/g	"
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	80g	10 ⁷ cfu/g	동결건조
<i>Pseudomonas putida</i>	80g	10 ⁷ cfu/g	"
<i>Streptomyces griseus</i> 0104	60g	10 ⁹ cfu/g	"

라. 원제독성 예비시험

*S. grieseus*0104 등 5종에 대한 급성경구, 급성경피 및 급성어독성을 랫드(SD계통) 및 잉어를 이용하여 단회 처리한 후 치사수, 일반중독증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰 조사한 결과는 다음과 같다.

- 시험물질 5종을 수컷과 암컷 모두 1,000mg/개체의 용량으로 단회 경구 투여한 결과 시험기간 중 치사 개체는 발견되지 않았다.
- 단회 경피 투여시 2,000mg/kg의 용량에서 암·수 모두 치사개체가 발견되지 않았다.
- 담수어 급성독성에서는 10mg/L의 처리 농도에서 치사개체가 발견되지 않았다.
- 시험기간 동안 특이한 임상증상은 없었다.
- 급성경구 및 급성경피독성시험에서 이용된 랫드의 체중 변화는 시험 전 기간에 걸쳐 대조군과 비교하여 유의차 없이 증가하는 경향을 보였으며, 급성어독성시험에 이용된 잉어의 경우 시험기준에 적합하였다.
- 급성경구 및 급성경피독성시험 종료 후 실시한 부검에서 약제투여와 관련한 내부장기에 대한 특이한 영향은 없었다.

이상의 결과 *S. grieseus*0104 등 5종은 모두 저독성으로 확인되었다.

마. 연구내용

(1) 공시 시험동물

농촌진흥청고시 제2006-7호 농약의 독성시험기준과 방법에 제시한 Rat(SD계통-(주)오리엔트바이오)는 급성경구 및 급성경피독성 시험에, 잉어(*Cyprinus carpio*-경상북도 수산자원개발연구소 민물고기연구센터)는 어독성 시험동물로 공시하였다. 이 동물들은 조사하고자하는 독성물질에 대한 반응결과가 광범위하게 연구되어 시험결과 해석이 용이하고, 시험결과에 대한 신뢰도를 높일수 있다.

(2) 순화 및 검역

Rat는 입수한 후 암·수 각 10마리를 검역·부검하여 시험결과에 영향을 미칠 수 있는 미생물 등에 의한 오염여부를 확인한 후, 이상이 없는 나머지 동물은 동물 실험실 사육환경 하에서 1주일 이상 순화시키면서, 피모상태 및 건강을 확인한 후 건전한 개체를 선별하여 시험에 이용하였다.

잉어는 실내에서 물의 순화, 여과를 시킬 있는 유리 수조장치를 이용하였고, 시험용수는 지하수를 이용하여 수온 20 ~ 24℃, 조도 200 ~ 300lux/ml 범위내에서 3주간 사육,

순화하였다.

(3) 사육환경

Rat - 순화 및 시험기간 중 폴리카보네이트 사육상자(420×260×180mm)에 버드나무 깔집((주)오리엔트 바이오, 한국)을 깔아 암·수 각각 5마리씩 사육 유지 하였다. 본 실험의 환경은 온도 21±2℃, 상대습도 50±20%, 조도 500~600Lux, 조명시간 12시간(오전 8시 ~ 오후 8시)의 조건에서 사료와 음수를 공급하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다.

잉어 - 원통형의 유리제품 12L 용기((φ24×30cm)에 지하수로 수온(20~24℃)을 유지하고, 조도 200 ~ 300Lux의 범위 내에서 3주간 사육, 순화하였다. 사료는 실험동물용 고형사료(신촌사료(주), 한국)와 잉어용 부상성 고형사료(부산관상어 사료, 한국)를 공급하였고, 음수는 상수도수를 자유 섭수시켰다.



[Rat 사육]

(4) 투여약량 수준설정 및 시험물질 조제

○ 투여약량 설정

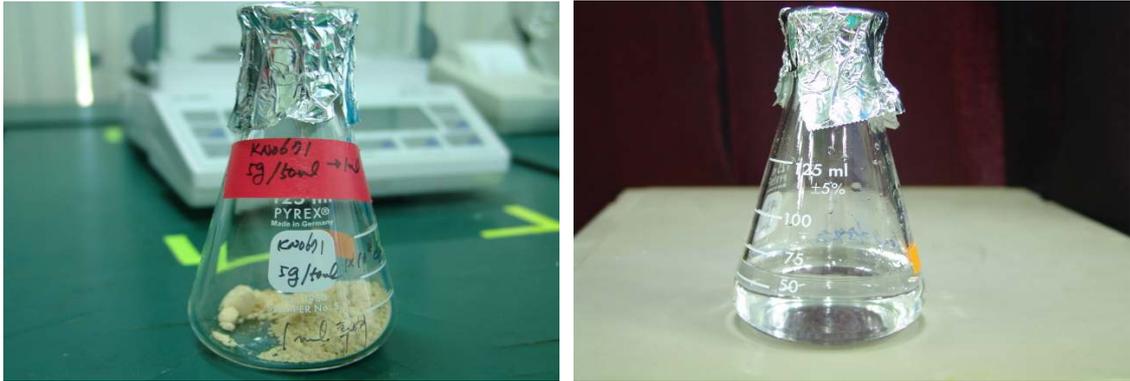
- ▶ 급성경구독성시험에서는 1,000mg/개체로 랫드의 체중이 약 250g인 것을 감안할 때 투여약량 4,000mg/kg 수준으로 시험을 수행하였다.
- ▶ 급성경피독성시험에서는 기초시험투여 약량인 2,000mg/kg로 투여약량을 설정하였다.
- ▶ 급성어독성시험에서는 기초시험농도 10mg/L의 수준에서 수행하였다.

○ 투여약량 수준별 실험동물수

▶ 실험동물수는 농약의 등록시험기준과 방법(농촌진흥청고시 제2006-7호)에 준하여 급성경구 및 경피시험에서 용량당 암·수 각 5마리, 급성어독성시험에서 농도당 10마리를 이용하였다.

○ 대조구의 설정

시험물질이 증류수에 현탁 가능함으로 증류수 대조군만을 두었다.



[원제 희석]

○ 용매의 선택 및 시험물질의 조제

시험물질은 수용성고상으로 용매는 멸균수를 사용하였고, 시험물질의 조제는 멸균 처리된 50ml의 Conical Tube에 시험물질을 각각 칭량한 후 필요량의 멸균수로 volume up하여 조제하였다.



[원제물리성조사]

○ 투여액량의 설정

투여액량은 시험에 이용되는 랫드의 체중과 약액 투여량을 고려하여 모두 1ml/개체(경구), 5ml/kg(경피)로 설정하였다. 급성어독성시험의 경우 시험수조 10L에

10mg/L의 농도로 처리하였다.

(5) 시험물질의 투여

○ 사료의 절식

급성경구독성시험의 경우 투여개시 12시간 전부터 절식을 시켰으며 급성어독성시험에서는 약제 처리 하루 전부터 급이를 중단하였다. 급성경피독성시험에서는 투여 경로를 감안하여 따로 절식 시간을 두지 않았다.

○ 투여경로 및 투여방법

급성경구독성시험의 경우 랫드용 경구 주사침(Zonde)을 이용하여 1ml/개체 액량을 경구로 위내에 삽입, 1회에 한하여 강제투여하였으며 급성경피 독성시험에서는 5ml/kg의 액량을 피부에 도포하였다.



[급성경구투여]

(6) 관찰 및 조사항목

○ 일반중독증상 및 치사동물

투여당일은 투여 후 1시간에서 4시간까지 매시간, 익일부터는 매일 1회씩 일반중독증상을 관찰하였고, 치사된 동물은 발견 즉시 꺼내서 부검 또는 전장과 체중측정을 실시하였다.

○ 체중측정

급성경구 및 경피독성시험에 이용된 모든 동물에 대하여 투여 당일부터 D1, D3, D7, D10, D14일째 개체별 체중을 측정하고, 그 결과를 Excel Program을 이용하여 통계 처리하여 분석하였다.

○ 부검

급성경구 및 경피독성 시험기간 종료 후 살아있는 개체를 CO₂ 가스로 마취시킨 후 부검하여 내부장기의 육안적 이상유무를 확인하고, 그 결과를 기록하였다.



[마취 및 부검]

(7) 반수치사용량(LD₅₀) 및 반수치사농도(LC₅₀) 산출

○ 시험 종료 후 Probit Program을 이용하여 LD₅₀ 및 LC₅₀을 산출하였다.

바. 결과 및 고찰

(1) 치사동물 및 LD₅₀값

이상의 시험결과로 시험물질인 *Streptomyces griseus* 등 5종은 각각의 경구, 경피 및 어독성 처리약량에서 전 시험기간 동안 치사개체가 없고 모두 정상적으로 생존하였다. 따라서 본 시험물질의 반수치사약량(LD₅₀)은 >4,000mg/kg(경구) 및 >2,000mg/kg(경피), 반수치사농도(LC₅₀)>10mg/L로 독성분류상 저독성으로 확인되었다.

(2) 일반중독증상

약제 투여와 관련한 특이한 임상증상은 시험 기간 동안 없었다.

(3) 체중변화

급성경구 및 경피독성시험에 이용된 동물의 D0, D1, D3, D7, D10, D14일째의 개체별 체중기록을 조사한 결과 약제투여군은 대조군과 차이가 없었으며 대조군과 유의차 없이 증가하는 경향을 보였다.

(4) 부검소견

급성경구 및 경피독성시험 종료 후 생존한 전 개체에 대한 육안적 부검을 실시한 결과 전 개체에서 특이한 부검소견은 관찰되지 않았다.

2. 토양병해방제용 미생물 원제(*S. griseus*0104)에 대한 독성 및 병원성검증

가. 시험목적

미생물농약으로 개발하고자하는 길항균주는 동물에 대한 병원성유무를 반드시 확인하여야한다. 이러한 규정에 따라 *S. griseus*0104 원제 후보물질군에 대한 독성시험에서 동물과 어류에 독성이 없는 것으로 확인되어 제품화 전단계인 원제에 대한 독성 및 병원성 검증시험을 수행하였다.

나. 연구수행조사 지침자료

독성시험기준에 준하였다

다. 연구내용

◦ *S. griseus*0104 원제의 병원성검증 재료

원제생산은 미생물농약제품을 생산하기 위해 공시길항균인 *S. griseus*0104를 배양하여 포자를 수확한 후 멸균수로 세척하고 보호제와 함께 동결건조시켜 포자가 살아있는 상태로 생산하였다. 생산된 원제는 g당 10^{11} cfu로 실내온도에서 장기간(1년이상) 보존하여도 생균수의 변화가 없었다(표 1). 생산된 원제는 분말수화제로 생산하였다.

표1. 원제명 및 제형방법

균 주 명	원제량	원제생균밀도	제형방법
<i>S. griseus</i> 0104	80g	10^{11} cfu/g	동결건조

◦공시 시험동물

농촌진흥청고시 제2006-7호 농약의 독성시험기준과 방법에 제시한 Rat(SD계통 - (주)오리엔트바이오)는 급성경구 및 병원성시험, 급성정맥 내 병원성시험, 급성경피 및 병원성시험, 잉어(*Cyprinus carpio* -경상북도 수산자원개발연구소 민물고기연구센터)는 담수어류에 대한 영향시험, 물벼룩(*Daphnia magna*)은 담수무척추동물에 대한 영향시험재료로 공시하였다. 이 동물들은 조사하고자하는 독성물질에 대한 반응결과가 광범위하게

연구되어 시험결과 해석이 용이하고, 시험결과에 대한 신뢰도를 높일 수 있다.

③ 순화 및 검역

Rat는 입수한 후 암·수 각 10마리를 검역·부검하여 시험결과에 영향을 미칠 수 있는 미생물 등에 의한 오염여부를 확인한 후, 이상이 없는 나머지 동물은 동물실험실 사육환경 하에서 1주일 이상 순화시키면서, 피모상태 및 건강을 확인한 후 건전한 개체를 선별하여 시험에 이용하였다.

잉어는 실내에서 물의 순화, 여과를 시킬 수 있는 유리 수조 장치를 이용하였고, 시험용수는 지하수를 이용하여 수온 20 ~ 24℃, 조도 200 ~ 300lux의 범위 내에서 3주간 사육, 순화하였다.

④ 사육환경

Rat - 순화 및 시험기간 중 폴리카보네이트 사육상자(420×260×180mm)에 버드나무 깔집((주)오리엔트 바이오, 한국)을 깔아 암·수 각각 5마리씩 사육 유지 하였다. 본 실험의 환경은 온도 21±2℃, 상대습도 50±20%, 조도 500~600Lux, 조명시간 12시간(오전 8시 ~ 오후 8시)의 조건에서 사료와 음수를 공급하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다.



잉어 - 원통형의 유리제품 12L 용기((φ24×30cm)에 지하수로 수온(20~24℃)을 유지하

고, 조도 200 ~ 300Lux의 범위 내에서 3주간 사육, 순화하였다.

사료는 실험동물용 고품사료(신촌사료(주), 한국)와 잉어용 부상성 고품사료(부산관상어 사료, 한국)를 공급하였고, 음수는 상수도수를 자유 섭수시켰다.

⑤ 투여약량 수준설정 및 시험물질 조제

○ 투여약량 설정

▶ 급성경구독성시험에서는 1,000mg/개체로 랫드의 체중이 약 250g인것을 감안할 때 투여약량 4,000mg/kg 수준으로 시험을 수행하였다.

▶ 급성경피독성시험에서는 기초시험투여 약량인 2,000mg/kg로 투여약량을 설정하였다.

▶ 급성어독성시험에서는 기초시험농도 10mg/L의 수준에서 수행하였다.

○ 투여약량 수준별 실험동물수

▶ 실험동물수는 농약의 등록시험기준과 방법(농촌진흥청고시 제2006-7호)에 준하여 급성경구 및 경피시험에서 용량당 암·수 각 5마리, 급성어독성시험에서 농도당 10마리를 이용하였다.

○ 대조구의 설정

시험물질이 증류수에 현탁 가능함으로 증류수 대조군만을 두었다.

○ 용매의 선택 및 시험물질의 조제

시험물질이 고상으로 증류수에 현탁 가능함으로 용매는 증류수를 사용하였고, 시험물질의 조제는 50ml의 Conical Tube에 시험물질을 각각 칭량한 후 필요량을 증류수로 volume up하여 조제하였다.

○ 투여액량의 설정

투여액량은 시험에 이용되는 랫드의 체중과 약액 투여량을 고려하여 모두 1ml/개체(경구), 5ml/kg(경피)로 설정하였다. 급성어독성시험의 경우 시험수조 10L에 10mg/L의 농도로 처리하였다.

⑥ 시험물질의 투여

○ 사료의 절식

급성경구독성시험의 경우 투여개시 12시간 전부터 절식을 시켰으며 급성어독성 시험에서는 약제 처리 하루 전부터 급이를 중단하였다. 급성경피독성시험에서는 투여 경로를 감안하여 따로 절식 시간을 두지 않았다.

○ 투여경로 및 투여방법

급성경구독성시험의 경우 랫드용 경구사침(Zonde)을 이용하여 1ml/개체 액량을 경구로 위내에 삽입, 1회에 한하여 강제투여하였으며 급성경피독성시험에서는 5ml/kg의 액량을 피부에 도포하였다.



경구투여

⑦ 관찰 및 조사항목

○ 일반중독증상 및 치사동물

투여당일은 투여 후 1시간에서 4시간까지 매시간, 익일부터는 매일 1회씩 일반중독 증상을 관찰하였고, 치사된 동물은 발견 즉시 꺼내서 부검 또는 전장과 체중측정을

실시하였다.

○ 체중측정

급성경구 및 경피독성시험에 이용된 모든 동물에 대하여 투여 당일부터 D1, D3, D7, D10, D14일째 개체별 체중을 측정하고, 그 결과를 Excel Program을 이용하여 통계 처리하여 분석하였다.



체중측정



체중별격리

○ 부검

급성경구 및 경피독성 시험기간 종료 후 살아있는 개체를 CO₂ 가스로 마취시킨 후 부검하여 내부장기의 육안적 이상유무를 확인하고, 그 결과를 기록하였다.



⑧ 반수치사용량(LD₅₀) 및 반수치사농도(LC₅₀) 산출

- 시험 종료 후 Probit Program을 이용하여 LD₅₀ 및 LC₅₀을 산출하였다.

4. 연구결과 고찰

① 급성경구 및 병원성시험

시험에 사용된 개체들은 5~6주령(150g수준)의 SPF Rat(SD계통)으로 시험동물은 표 2와 같이 조사하였다. 각 개체들은 하루전날 절식시킨 후 원제를 1,000배로 생리 식염수에 희석한 후 Rat 1마리당 1.5ml씩(1.5×10^8 cfu/마리) 위 내에 강제투여하고, 4시간 후에 급이를 재개하면서 21일간 사육하였다. 사육 중 폐사, 활동둔화, 설사등의 이상 증상은 관찰되지 않았으며 채변한 시료를 멸균수에 10배, 100배, 1,000배 희석한 후 0.1ml씩 선택배지(egg albumin agar)에 도말접종하여 배양한 결과 방선균 집락은 관찰되지 않았다(표 3). 사육중인 개체들은 기간별로 도살(그림)하여 장기를 적출한 후 Bag mixer로 마쇄한 후 조직내 원제 방선균을 조사한 결과 관찰되지 않았다 (표 4).

표 2. 시험동물 소요개체수

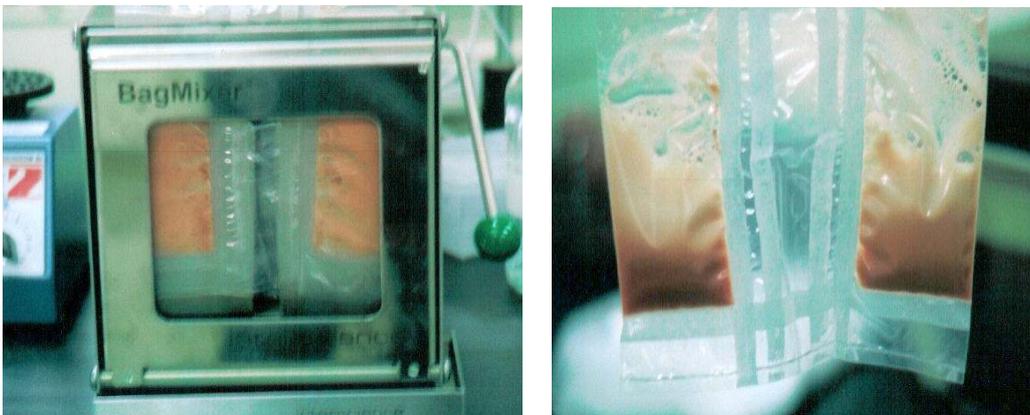
구 분		male	female
투여군	중간도살군(D3, D7, D14)	9	9
	종료도살군(D21)	3	3
대조군	비투여대조군	2	2
	Shelf control	2	2

표 3. 채변내 방선균 수

희석배수	cfu/plate					
	0일	1일	3일	7일	14일	21일
10배 희석	ND	ND	ND	ND	ND	ND
100배 희석	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1,000배 희석	ND	ND	ND	ND	ND	ND



장기적출



장기조직마쇄

표 4. 장기내 방선균 분포조사

경과일수	cfu/plate					
	Kidney	Brain	Liver	Lungs	Spleen	Blood
0일	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3일	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7일	ND	ND	ND	ND	ND	ND
14일	ND	ND	ND	ND	ND	ND
21일	ND	ND	ND	ND	ND	ND

② 급성정맥 및 병원성시험

급성경구 및 병원성시험에 사용한 SPF Rat를 공시시험동물로 사용하였으며 각 개체는 원제를 1,000로 희석한 후 미정맥에 1ml 주사하여 접종하였다. 원제를 접종한 개체(표 5)들은 21일간 사육하면서 각 기간별로 암수 3마리씩 도살하여 혈액 및 장기내에 투입한 원제 균이 생존하는지 여부를 조사하였다. 접종 당일 혈액을 채취한 6마리 중 수컷 2마리에서 방선균이 검출되었으나 장기에서는 발견되지 않았다(그림). 그러나 접종 3일 후 개체에서는 혈액과 장기에서 원제방선균의 생존은 확인되지 않았다.

표 5. 시험동물 소요개체수

구 분		male	female
투여군	중간도살군(D3, D7, D14)	9	9
	종료도살군(D21)	3	3
비투여대조군		2	2

표 6. 장기내 방선균 분포조사

경과일수	cfu/plate					
	Kidney	Brain	Liver	Lungs	Spleen	Blood
0일	ND	ND	ND	ND	ND	♂0 ♀0 ♂35 ♀0 ♂8 ♀0
3일	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7일	ND	ND	ND	ND	ND	ND
14일	ND	ND	ND	ND	ND	ND
21일	ND	ND	ND	ND	ND	ND



혈액내 방선균밀도조사

③ 급성경피 및 병원성시험

시험에 사용된 토끼는 NZW계통으로 2kg정도의 암수 5마리씩 공시하여 수행하였다. 원제를 피부에 도포하여 처리한 후에 피부염이나 기타 이상 징후는 관찰되지 않았다.

④ 담수어류에 대한 영향시험

시험에 사용된 잉어는 3g 수준의 *Cyprinus carpio*로 수조에 사용된 지하수는 pH 7.8, DO 11.3인 일급수이었다. 수조에 접종한 원제의 밀도는 10^6 spores/ml가 되게 접종한 다음 수조 당 2마리씩 넣어 주고 3일간 사육하면서 치사여부를 관찰하였다. 사육기간 동안 물의 pH는 7.8~7.9일정하였고, 산소요구량도 3일 후에도 11.1로 유지되었다(표 7). 시험기간 동안 잉어의 유영상태나 먹이섭취에 이상증상은 관찰되지 않았다.

표 7. 잉어 수조 수질측정 및 누적치사 개체수

구 분	1시간	24시간	48시간	72시간
누적치사 개체수	0	0	0	0
증상	정상	정상	정상	정상
pH	7.8	7.9	7.8	7.9
DO	11.3	11.1	12.0	11.1

⑤ 담수무척추동물에 대한 영향시험

시험에 사용한 공시동물은 물벼룩(*Daphnia magna*)으로 pH 8.2, DO 10.2인 지하수를 넣은 수조에 원제를 10⁶spores/ml 밀도로 접종한 다음 수조 당 10마리를 넣어 주고 누적 치사 개체수를 조사하였다. 처리 6일 후 2개체가 치사하였으나 나머지 개체들은 정상적인 활동을 보였다(표 8).

표 8. 물벼룩 누적치사 개체수 및 수질측정

구 분	1시간	1일	2일	3일	6일	7일
누적치사수	0	0	0	0	2	2
증상	정상(10)	정상(10)	정상(10)	정상(10)	정상(8)	정상(8)
pH	8.2	-	8.1	8.1	8.1	8.1
DO	10.2	9.7	9.5	9.5	10.1	9.6

5. 고 찰

가) 치사동물 및 LD₅₀값

이상의 시험결과로 본 시험의 시험물질인 *Streptomyces grieseus*는 각각의 경구, 경피 및 어독성 처리약량에서 전 시험기간 동안 정상적으로 모두 생존하였다. 따라서 본 시험물질의 반수치사약량(LD₅₀)은 >4,000mg/kg(경구) 및 >2,000mg/kg(경피), 반수치사농도(LC₅₀) >10mg/L로 독성분류상 저독성으로 확인되었다.

나) 일반중독증상

약제 투여와 관련한 특이한 임상증상은 시험 기간 동안 없었다.

다) 체중변화

급성경구 및 경피독성시험에 이용된 동물의 D0, D1, D3, D7, D10, D14일 쯤의 개체별 체중기록을 조사한 결과 약제투여군은 대조군과 비교하여 유의성 없이 대체로 증가하는 경향을 보였다.

라) 부검소견

급성경구 및 경피독성 시험 종료 후 생존한 전 개체에 대한 육안적 부검을 실시한 결과 전 개체에서 특이한 부검소견은 관찰되지 않았다. 이상의 결과 *S. grieseus*0104는 저독성으로 확인되었다.

3. 제품의 안전성 평가(흡향, 청고탄 제품의 독성 및 병원성 검증)

가. 요약

본 시험은 *S. grievus*0104 고상 (10^9 cfu/g)의 안전성 평가를 위하여 농촌진흥청고시 제 2006-7호(2006년 4월 17일) 및 EPA Guideline (OPPTS, adopted : 1996.2)에 의거하여 시험을 진행하였다.

시험항목은 인축독성시험 중 급성경구독성 및 병원성시험, 급성경피독성시험 및 병원성시험, 급성정맥 내 독성 및 병원성시험, 안점막자극성시험, 피부자극성시험, 피부감작성시험과 환경독성시험 중 잉어(*Cyprinus carpio*)영향시험 및 물벼룩(*Daphnia magna*)영향시험을 진행한 결과는 다음과 같다.

○ 인축독성시험인 급성경구독성 및 병원성시험, 급성정맥 내 독성 및 병원성시험, 피부자극성시험, 피부감작성시험에서 *S. grievus*0104의 투여농도로 투여한 결과 특이한 임상증상 및 병원성이 없는 것으로 판단하였다. 또한 안점막자극성시험 및 급성경피독성 및 병원성시험에서 *S. grievus*0104의 투여농도로 투여한 결과 약한 자극이 있었으나 투여 후 7일 이내 회복하였다. 또한 실험동물로 이용된 SPF랫드, 토끼(NZW) 및 Guinea pig의 체중변화는 대조군과 비교하여 유의차 없이 증가하여 *Streptomyses grievus*에 대한 영향은 없는 것으로 판단하였다.

○ 환경독성시험인 잉어(*Cyprinus carpio*)영향시험 및 물벼룩(*Daphnia magna*)영향시험에서 *S. grievus*0104를 투여농도인 10^6 units/mL로 투여한 결과 특이한 임상증상 및 병원성이 없는 것으로 판단하였다. 또한 잉어의 체중과 물벼룩의 산자수를 대조군과 비교한 결과 *S. grievus*0104에 대한 영향은 없는 것으로 판단하였다.

이상의 시험결과로 본 시험물질의 인축독성시험 및 환경독성의 결과를 고려할 경우 *S. grievus*0104 고상(10^9 units/mL)은 독성 및 병원성에 대한 영향은 없는 것으로 확인되었다.

나. *S. grievus*0104고상 (10^9 cfu/g)의 급성경구독성 및 병원성시험

본 시험은 *S. grievus*0104 고상 (10^9 cfu/g)의 SPF랫드(SD계통)를 이용한 급성경구독성 및 병원성을 파악하기 위하여 실시하였다.

독성시험의 투여농도는 개체당 10^8 cfu/g로 하였고, 투여용량은 2ml/100g b.w. 이내로 하여 위내에 1회 강제투여 하였다. 시험에 사용된 동물은 중간부검군, 종료부검군, shelf control 및 대조로 나누어 증상관찰 및 부검을 실시하였다. 노출 후 매일 치사개체수와 독성증상을 관찰하였으며, 투여농도로 나타낸 독성시험 결과는 아래와 같다.

- ▶ 급성경구독성 및 병원성시험은 21일간 진행하였다.
- ▶ 시험개시 전날 절식(overnight)을 실시하고, 위내 1회 강제투여 후 3~4시간이 지난 뒤 급이를 재개하였다.
- ▶ 독성증상은 시험기간 동안(21일) 특이한 증상이 관찰되지 않았다.
- ▶ 중간부검군은 처리 후 3, 7, 14일에 체중 측정 후 부검을 실시하여 육안적으로 장기의 이상여부를 확인하였으며, 종료부검군도 동일한 방법으로 진행하였다.
- ▶ 부검시 장기(신장, 폐, 뇌, 간, 비장) 및 혈액을 채취하여, *S. grievus*0104를 배양한 동일배지에 loading하여 배양하였으나 *S. grievus*0104는 검출되지 않았다.
- ▶ 종료부검군에서의 수컷처리군의 시험개시일 체중은 평균 210.7 ± 2.1 g이었고, 시험종료일 체중은 평균 293.0 ± 7.55 g이었다. 암컷처리군의 시험개시일 체중은 평균 155.7 ± 4.7 g이었고, 시험종료일 체중은 평균 200.3 ± 8.1 g이었다.
- ▶ 급이 및 음수는 각 Cage별로 매일 공급하였다.

이상의 시험결과로 본 시험물질의 랫드에 대한 급성경구독성 및 병원성시험은 특이한 임상 증상이 없었으며, 병원성도 없는 것으로 판단하였다.

다. *S. grievus*0104 고상 (10^9 cfu/g)의 급성경구독성 및 병원성시험

본 시험은 *S. grievus*0104 고상 (10^9 cfu/g)의 토끼(NZW계통)를 이용한 급성경피독성 및 병원성을 파악하기 위하여 실시하였다.

독성시험의 투여량은 2g/kg b.w로 실시되었으며 암, 수 각 5마리씩 노출시켰다. 노출 후 매일 치사개체수와 독성증상을 관찰하였으며, 투여농도로 나타낸 독성시험 결과는 아래와 같다.

▶ 급성경피독성 및 병원성시험은 14일간 진행하였다.

▶ 시험개시 24시간 이전에 제모하여, 체포면에 1회 투여한 후 24시간째 도포물을 제거하고 세척하였다.

▶ 독성증상은 투여 후 1일차에 전 개체에서 발적이 관찰되었으며, 투여 후 7일차에 전 개체가 정상으로 회복하였다.

▶ 수컷처리군의 시험개시일 체중은 평균 1.9 ± 0.2 kg이었고, 시험종료일 체중은 평균 2.3 ± 0.2 kg이었다. 암컷처리군의 시험개시일 체중은 평균 1.9 ± 0.2 kg이었고, 시험종료일 체중은 평균 2.3 ± 0.3 kg이었다.

▶ 급이는 각 Cage별로 매일 공급하였으며, 음수는 자동급수 하였다.

이상의 시험결과로 본 시험물질의 토끼에 대한 급성경피독성 및 병원성시험은 특이한 임상 증상이 없었으며, 병원성도 없는 것으로 판단하였다.

라. *S. grievus*0104 고상 (10^9 cfu/g)의 급성정맥 내 독성 및 병원성시험

본 시험은 *S. grievus*0104 고상 (10^9 cfu/g)의 SPF랫드(SD계통)를 이용한 급성정맥 내 독성 및 병원성을 파악하기 위하여 실시하였다.

독성시험의 투여농도는 개체당 10^7 cfu/g로 하였고, 투여용량은 개체당 0.1ml로 하여 정맥 내 1회 강제투여 하였다. 시험에 사용된 동물은 중간부검군, 종료부검군, 및 대조로 나

누어 증상관찰 및 부검을 실시하였다. 노출 후 매일 치사개체수와 독성증상을 관찰하였으며, 투여농도로 나타낸 독성시험 결과는 아래와 같다.

- ▶ 급성정맥 내 독성 및 병원성시험은 21일간 진행하였다.
- ▶ 투여경로 상 절식은 따로 실시하지 않았다.
- ▶ 독성증상은 시험기간 동안(21일) 특이한 증상이 관찰되지 않았다.
- ▶ 중간부검군은 처리 후 3, 7, 14일에 체중 측정 후 부검을 실시하여 육안적으로 장기의 이상여부를 확인하였으며, 종료부검군도 동일한 방법으로 진행하였다.
- ▶ 부검시 장기(신장, 폐, 뇌, 간, 비장) 및 혈액을 채취하여, *S. grieus*0104를 배양한 동일 배지에 loading하여 배양하였으나 *S. grieus*0104는 검출되지 않았다.
- ▶ 종료부검군에서의 수컷처리군의 시험개시일 체중은 평균 $226.7 \pm 7.1\text{g}$ 이었고, 시험 종료일 체중은 평균 $323.3 \pm 9.6\text{g}$ 이었다. 암컷처리군의 시험개시일 체중은 평균 $162.7 \pm 4.2\text{g}$ 이었고, 시험종료일 체중은 평균 $207.7 \pm 12.4\text{g}$ 이었다.
- ▶ 급이 및 음수는 각 Cage별로 매일 공급하였다.

이상의 시험결과로 본 시험물질의 랫드에 대한 급성경구독성 및 병원성시험은 특이한 임상 증상이 없었으며, 병원성도 없는 것으로 판단하였다.

마. *S. grieus*0104 고상 (10^9cfu/g)의 안점막자극성시험

본 시험은 *S. grieus*0104 고상 (10^9cfu/g)의 토끼(NZW계통)를 이용한 안점막자극성을 파악하기 위하여 실시하였다.

독성시험의 투여량은 0.1g으로 실시되었으며 암·수 각 3마리씩 노출시켰다. 노출 후 매일 치사개체수와 독성증상을 관찰하였으며, 투여농도로 나타낸 독성시험 결과는 아래와 같다.

- ▶ 안점막자극성시험은 72시간 동안 진행하였다.
- ▶ 투여경로 상 절식은 따로 실시하지 않았다.
- ▶ 임상증상은 투여 후 1시간째에 전 개체에서 결막에 발적, 부종, 배출물이 관찰되었으며, 24시간째부터 회복되기 시작하여 72시간째에는 전 개체가 정상으로 돌아왔다.
- ▶ 중독증상은 시험기간 동안(72시간) 특이한 증상이 관찰되지 않았다.
- ▶ 시험기간 중 치사개체는 발견되지 않았다.
- ▶ 약제 투여 후 체중은 시간이 경과함에 따라 증가하였다. 수컷처리군의 시험개시일 체중은 평균 $2.0 \pm 0.0\text{kg}$ 이었고, 시험종료일 체중은 평균 $2.2 \pm 0.0\text{kg}$ 이었다. 암컷처리군의 시험개시일 체중은 평균 $2.8 \pm 0.2\text{kg}$ 이었고, 시험종료일 체중은 평균 $2.8 \pm 0.2\text{kg}$ 이었다.
- ▶ 급이 및 음수는 각 Cage별로 매일 공급하였다.

이상의 결과로 본 시험물질의 M.O.I.(Mean Ocular Irritation Index)는 8.0(1시간), 2.7(24시간), 1.0(48시간), 0.0(72시간)으로 나타났고, A.O.I. (Acute Ocular Irritation Index)는 8.0(1시간)으로 나타났다.

바. *S. griseus*0104 고상 (10^9cfu/g)의 피부자극성시험

본 시험은 *S. griseus*BIG182-B1 고상 (10^9cfu/g)의 토끼(NZW계통)를 이용한 피부자극성을 파악하기 위하여 실시하였다.

독성시험의 투여량은 0.5g으로 실시되었으며 암·수 각 3마리씩 노출시켰다. 노출 후 매일 치사개체수와 독성증상을 관찰하였으며, 투여농도로 나타낸 독성시험 결과는 아래와 같다.

- ▶ 피부자극성시험은 72시간 동안 진행하였다.

▶ 시험개시 24시간 이전에 제모하여, 체포면에 1회 투여한 후 4시간째 도포물을 제거하고 세척하였다.

▶ 투여경로 상 절식은 따로 실시하지 않았다.

▶ 임상증상 및 중독증상은 시험기간 동안(72시간) 특이한 증상이 관찰되지 않았다.

▶ 시험기간 중 치사개체는 발견되지 않았다.

▶ 약제 투여 후 체중은 시간이 경과함에 따라 증가하였다. 수컷처리군의 시험개시일 체중은 평균 $1.9 \pm 0.1\text{kg}$ 이었고, 시험종료일 체중은 평균 $2.1 \pm 0.1\text{kg}$ 이었다. 암컷 처리군의 시험개시일 체중은 평균 $2.6 \pm 0.1\text{kg}$ 이었고, 시험종료일 체중은 평균 $2.7 \pm 0.2\text{kg}$ 이었다.

▶ 급이 및 음수는 각 Cage별로 매일 공급하였다.

이상의 결과로 본 시험물질의 피부일차자극지수(Primary Irritation Index; P.I.I.)는 0.0으로 나타났다.

사. *S. grievus*0104 고상(10^9cfu/g)의 피부감작성시험

본 시험은 *S. grievus*0104 고상 (10^9cfu/g)의 Guinea pig(Hartley계)를 이용한 피부감작성을 파악하기 위하여 실시하였다.

피부에 감작 유도 및 야기 시킨 후 시간별 피부반응 정도와 시험 전 기간동안의 일반 중독증상 및 체중변화를 관찰·조사한 결과는 아래와 같다.

▶ 피부감작성시험은 4주 동안 진행하였다.

▶ 실험동물은 감작유도(1차, 2차 및 3차) 24시간 전에 좌측 옆구리의 피모를 약 $4 \times 4\text{cm}$ 의 넓이로 제모하였다. 감작유도 시 시험물질의 투여는 $2 \times 2\text{cm}$ 의 patch에 감작유도 농도로 준비된 시험물질을 도포하고 동물의 도포부위에 탄력밴드와 의료용반창고를 이용

하여 첩포하였으며, 대조구는 시험물질을 제외한 대조물질만을 첩포하였다. 반면, 감각야기 시는 반대편 옆구리를 제모하여 이용하는데 같은 크기의 patch 2장을 이용하여 한 장은 감각 야기농도의 시험물질을 다른 한 장은 대조물질을 도포한 후 처리구와 대조구의 실험동물에 각각 첩포하였다. 유도 및 야기시 투여 후 6시간째 도포물을 제거하고 세척하였다.

▶ 본 시험물질의 예비시험 결과, 투여농도는 감각유도 및 야기 50%로 결정하였으며, 처리약량은 시험물질이 고상으로 0.1g으로 하였다.

▶ 투여경로 상 절식은 따로 실시하지 않았다.

▶ 야기 후 관찰한 임상증상 및 중독증상은 특이한 증상이 관찰되지 않았다.

▶ 시험기간 중 치사개체는 발견되지 않았다.

▶ 약제 투여 후 체중은 시간이 경과함에 따라 증가하였다. 수컷처리군의 시험개시일 체중은 평균 $322.1 \pm 9.7\text{g}$ 이었고, 시험종료일 체중은 평균 $502.3 \pm 47.0\text{g}$ 이었다. 암컷처리군의 시험개시일 체중은 평균 $322.5 \pm 12.3\text{g}$ 이었고, 시험종료일 체중은 평균 $470.5 \pm 37.1\text{g}$ 이었다.

▶ 급이 및 음수는 각 Cage별로 매일 공급하였다.

▶ 본시험의 피부감작성시험 결과, 홍반과 부종 등의 피부반응은 관찰되지 않았다.

Group	사용 동물 수	관찰 시간	피부반응				감작지수*	빈도지수** (%)
			0	1	2	3		
음성대조군	10	24h	10	0	0	0	0.00	0.0
		48h	10	0	0	0	0.00	0.0
		72h	10	0	0	0	0.00	0.0
처 리 군	20	24h	20	0	0	0	0.00	0.0
		48h	20	0	0	0	0.00	0.0
		72h	20	0	0	0	0.00	0.0
양성대조군	20	24h	3	3	13	1	1.60	85.0

	48h	9	7	4	0	0.75	55.0
	72h	15	5	0	0	0.25	25.0

이상의 결과로 본 시험물질의 본 시험물질의 피부감작율은 0.0%로 평가되었다.

아. *S. grieus*0104 고상 (10^9 cfu/g)의 잉어(*Cyprinus carpio*) 영향시험

본 시험은 *S. grieus*0104(10^9 cfu/g)의 잉어(*Cyprinus carpio*)에 대한 영향을 파악하기 위하여 농촌진흥청고시 제2006-7호 “환경생물독성시험의 기준과 방법 - 담수어류에 대한 영향시험(2006년 4월 17일)”과 EPA Guideline의 “Freshwater fish testing, tier I (OPPTS 885.4200, adopted : 1996. 2)”에 준하여 반지수식으로 실시하였다.

독성시험은 처리군은 투여농도 기준으로 10^6 cfu/g으로 실시되었고 시험용기 당 10마리, 3반복으로 30마리의 잉어를 노출시켰으며, 대조군은 멸균대조군과 무처리 대조군으로 나누어 각각의 시험 용기당 10마리씩으로 반복 없이 잉어를 노출시켰다. 노출 후 매일 치사 개체수와 독성증상을 관찰하였으며, 투여농도로 나타낸 독성시험 결과는 다음과 같다.

구 분	노출시간	
	14일	30일
LC ₅₀ 값	> 10^6 cfu/gL	> 10^6 cfu/g
95% 신뢰한계	-	-
무영향농도	10^6 cfu/g	10^6 cfu/g

- ▶ 영향시험은 30일간 진행하였으며, 7일마다 시험용수를 교체하였다.
- ▶ 시험기간 동안(30일) 임상증상 및 병원성 조사 결과 특이한 증상이 관찰되지 않았다.
- ▶ 처리군의 시험개시일 체중은 평균 0.8 ± 0.3 g이었고, 시험종료일 체중은 평균 1.1 ± 0.3 g, 전장은 평균 3.2 ± 0.5 cm로 조사되어 *S. grieus*BIG182-B1에 의한 어체중의 영향은 없었다.

▶ 시험용수의 수질측정은 Total hardness, pH, DO는 시험수 교체 전/후에 측정하였다. 수온은 임상증상 관찰시마다 매일 측정하였다.

▶ 처리군의 pH는 평균 7.8(최저 7.3 ~ 최고 8.2)이었고, DO는 평균 10.7mg/L(최저 5.1mg/L ~ 최고 13.5mg/L)였으며, 총경도는 평균 78.0mg/L-CaCO₃(최저 45.0mg/L-CaCO₃ ~ 87.0mg/L-CaCO₃)이었다.

▶ 시험기간의 평균 수온은 22.8±0.3℃(최저 22.2℃ ~ 최고 23.4℃)였다.

▶ 미생물농도는 시험수 교체 전/후에 측정하였다.

▶ 처리군의 미생물 농도는 평균 3.6×10⁶cfu/g(최저 1.5×10⁶cfu/g ~ 최고 9.8×10⁶cfu/g)로 측정되었으며, 미생물농도는 교체 주기 7일 동안 변화하지 않았다.

▶ DO를 유지하기 위하여 O₂를 각 수조별 30초씩 매일 공급하였다.

▶ 급이는 시험개시일 어체중에 따라 각 수조별로 약 0.2g씩 매일 공급하였으며, 잔량여부를 확인하였다.

이상의 시험결과로 본 시험물질의 LC₅₀값(cfu/g)은 10⁶cfu/g(30일)이상이었으며 독성증상, 어체중의 변화를 고려할 경우 *S. grieus*0104의 잉어에 대한 영향은 없는 것으로 판단하였다.

자. *S. grieus*0104 고상 (10⁹cfu/g)의 물벼룩(*Daphnia magna*) 영향시험

본 시험은 *S. grieus*0104(10⁹cfu/g)의 물벼룩(*Daphnia magna*)에 대한 영향을 파악하기 위하여 농촌진흥청고시 제2006-7호 “환경생물독성시험의 기준과 방법 - 담수 무척추 동물에 대한 영향시험(2006년 4월 17일)”과 EPA Guideline의 “Freshwater aquatic invertebrate testing, tier I (OPPTS 885.4240, adopted : 1996. 2)”에 준하여 반지수식으로 실시하였다.

독성시험은 투여농도 기준으로 10^6 cfu/g에서 실시되었으며 시험용기 당 10마리, 5반복으로 50마리의 물벼룩을 노출시켰으며, 대조군은 멸균대조군과 무처리 대조군으로 나누어 각각의 시험 용기당 10마리씩으로 반복 없이 물벼룩을 노출시켰다. 노출 후 매일 치사개체수와 독성증상을 관찰하였으며, 투여농도로 나타난 독성시험 결과는 다음과 같다.

구 분	노출시간	
	7일	21일
LC ₅₀ 값	$> 10^6$ cfu/g	$> 10^6$ cfu/g
95% 신뢰한계	—	—
무영향농도	10^6 cfu/g	10^6 cfu/g

- ▶ 영향시험은 21일간 진행하였으며, 일주일에 2회 시험용수를 교체하였다.
- ▶ 시험기간 동안(21일) 임상증상 및 병원성 조사 결과 특이한 증상이 관찰되지 않았다. 처리군에서 시험개시 후 18일째에 1개체가 치사하였다.
- ▶ 미생물농도 및 DO, pH, Total hardness는 시험수 교체 전/후 측정하였고, 수온은 매일 측정하였다.
- ▶ 처리군의 pH는 평균 7.8(최저 7.5 ~ 최고 8.0)이었고, DO는 평균 10.8mg/L(최저 8.2mg/L ~ 최고 13.2mg/L)였으며, 총경도는 평균 157.5mg/L·CaCO₃(최저 145.0mg/L·CaCO₃ ~ 170.0mg/L·CaCO₃)이었다.
- ▶ 시험기간의 평균 수온은 $20.9 \pm 0.2^\circ\text{C}$ (최저 20.6°C ~ 최고 21.3°C)였다.
- ▶ 처리군의 미생물 농도는 평균 3.2×10^6 cfu/g(최저 2.9×10^6 cfu/g ~ 최고 3.6×10^6 cfu/g)로 측정되었으며, 미생물농도는 교체 주기 3~4일 동안 변화하지 않았다.
- ▶ 시험중인 물벼룩에서 태어난 산자수는 수조당 평균 87.4마리(최소 84마리 ~ 최고 95마리)였다.

▶ 급이는 각 수조별로 *Chlorella Vulgaris*($2.5 \sim 5.0 \times 10^5$ cell/mL)를 약 3~5ml씩 매일 공급하였으며, 잔량여부를 확인하였다.

이상의 시험결과로 본 시험물질의 LC₅₀값(cfu/g)은 10^6 cfu/g(21일)이상이었으며 독성증상, 산자수등을 고려할 경우 *S. grieus*0104의 물벼룩에 대한 영향은 없는 것으로 판단하였다.

제4절. 토마토꽃마름병 방제용 미생물제 흠향, 청고탄생산

가. 제조기술확립

토양병방제를 위해 길항미생물을 이용하여 상품으로 개발하기 위해서는 선발된 균주는 배양이 용이하고, 제품생산과정에서 발생하는 열, 과습 또는 건조, 무리적 충격등에 의해 손상을 입지 않는 특성을 가지고 있어야한다. 본 연구에서 사용한 길항균주 중 *Bacillus licheniformis*와 *S. griseus*0104는 이러한 요건을 갖춘 균주이었다. *B. licheniformis*는 300 L fermentor에서 외부환경변화에 손상을 입지 않는 endospore형태로 대량배양되고 spray dry로 균체를 수확할 수 있어 동결건조방식 보다 저렴한 방법으로 원제를 생산하였다. *S. griseus*0104는 액체배양에서는 포자상태로 생산하지 못하였으나 고체배양을 하여 10^6 spores/ml수확이 가능하여 원제를 생산하였다(그림 1).

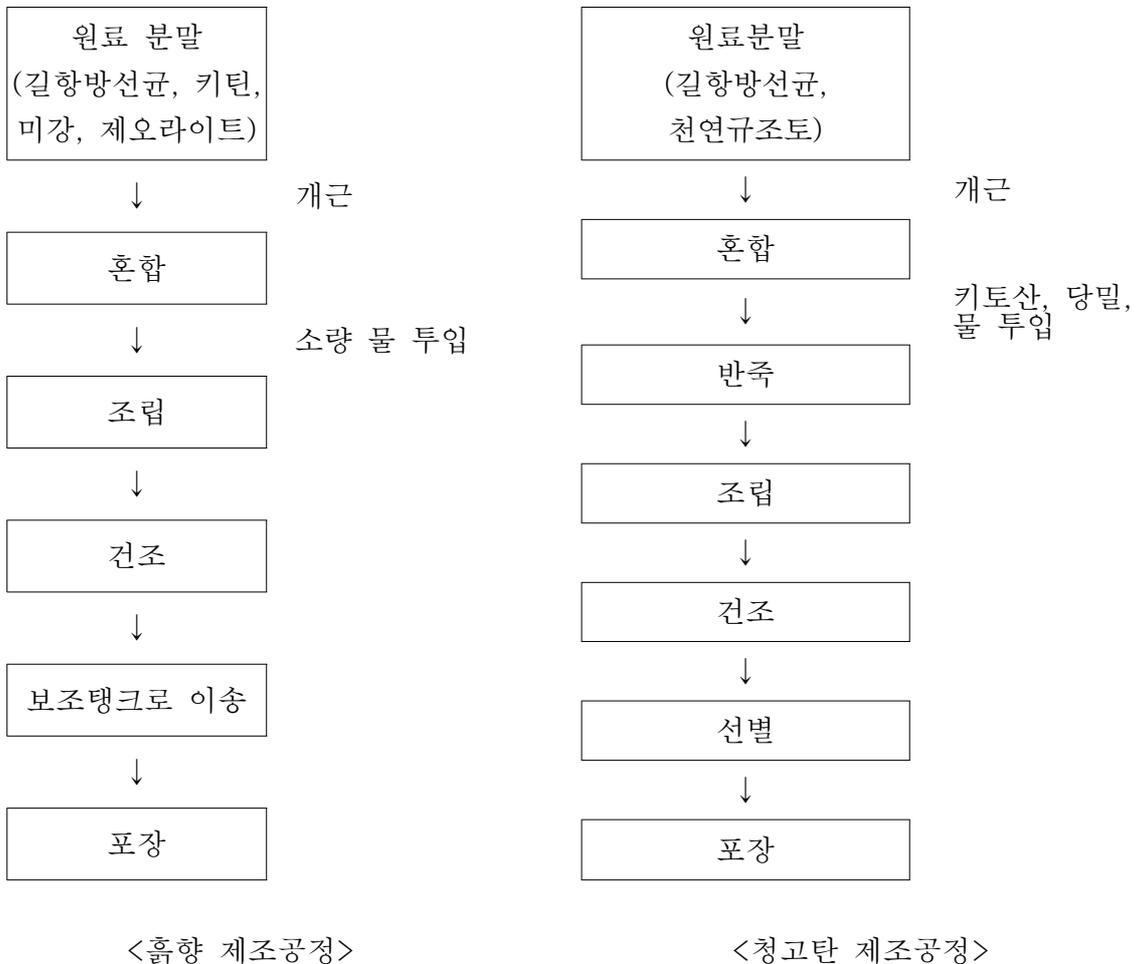


그림 1. 흠향, 청고탄의 제조공정 모식도

나. 품질관리 시스템 구축

품질관리라 함은 제품의 유용성을 결정하는 성질로써 제품에 대한 사용목적에 수행하기 위하여 구비하여야 할 성질을 말한다. 오늘날과 같은 시대에는 사용자의 입장에서 제품의 유용성이 강조되고 있으며 시대의 변천과 더불어 제품의 품질뿐만 아니라 원가(cost), 양(quantity), 납기(delivery) 및 서비스(service)에 이르기까지 고객에게 주는 유용성은 모두 품질에 포함시키고 있고 이것은 넓은 의미의 품질이라 한다. 품질관리에서 의미하는 품질은 소비자를 위한 품질이기 때문에 가격을 무시하고 최상의 품질 특성만을 만들어 내는 절대적 품질이 아니고 가격과 품질 특성이 조화를 이루는 상대적 품질을 제시하여 제품의 유효성분 규격 개선에 초점을 두었다. 휴향, 청고탄은 길항방선균을 원제로 하는 미생물제제이므로 방선균의 포자농도를 기준으로 품질관리를 하는데 기준을 세웠다. 검사의 기준은 항상 일정한 범위 이상의 균일화된 제품을 생산하여야 하는데 그 항목에 해당하는 품목별 기준을 세워 평균 90점 이상일 때를 기준으로 삼았으며 90 이하일 경우는 제품기준에 미달되는 것으로 재생산 혹은 폐기 처리하는 것으로 하였다. 휴향은 그림 2 에서 보는 바와 같이 포자 동결건조와 조립 후에 포자농도를 측정하였으며 청고탄은 방선균 포자 동결건조와 건조 후 포자농도를 측정하였다(그림 3).

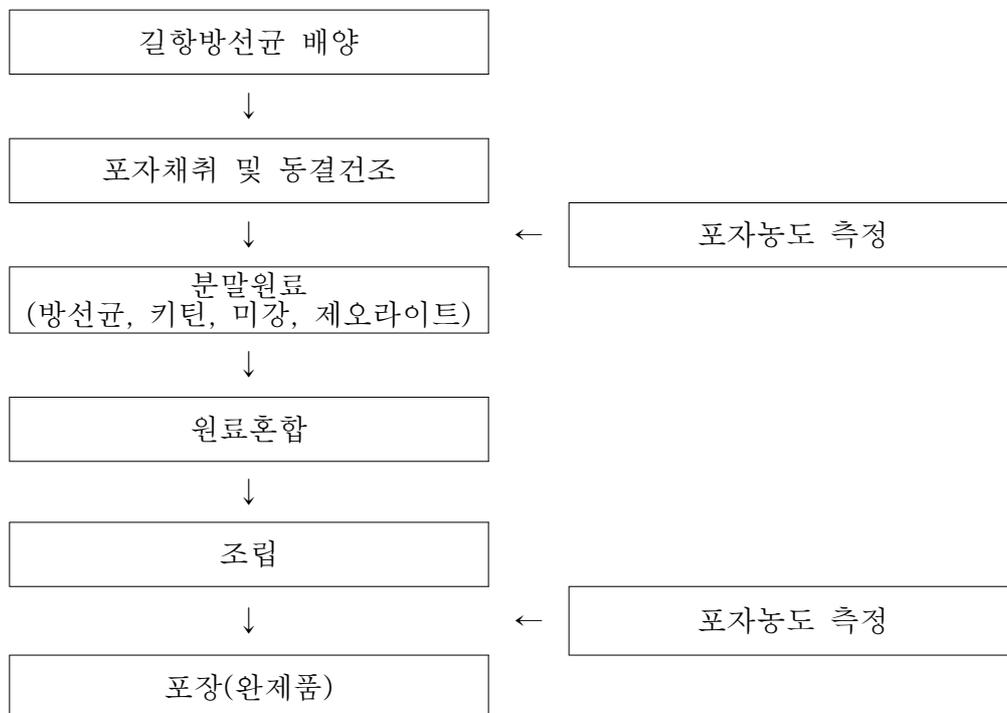


그림 2. 휴향의 품질관리 모식도

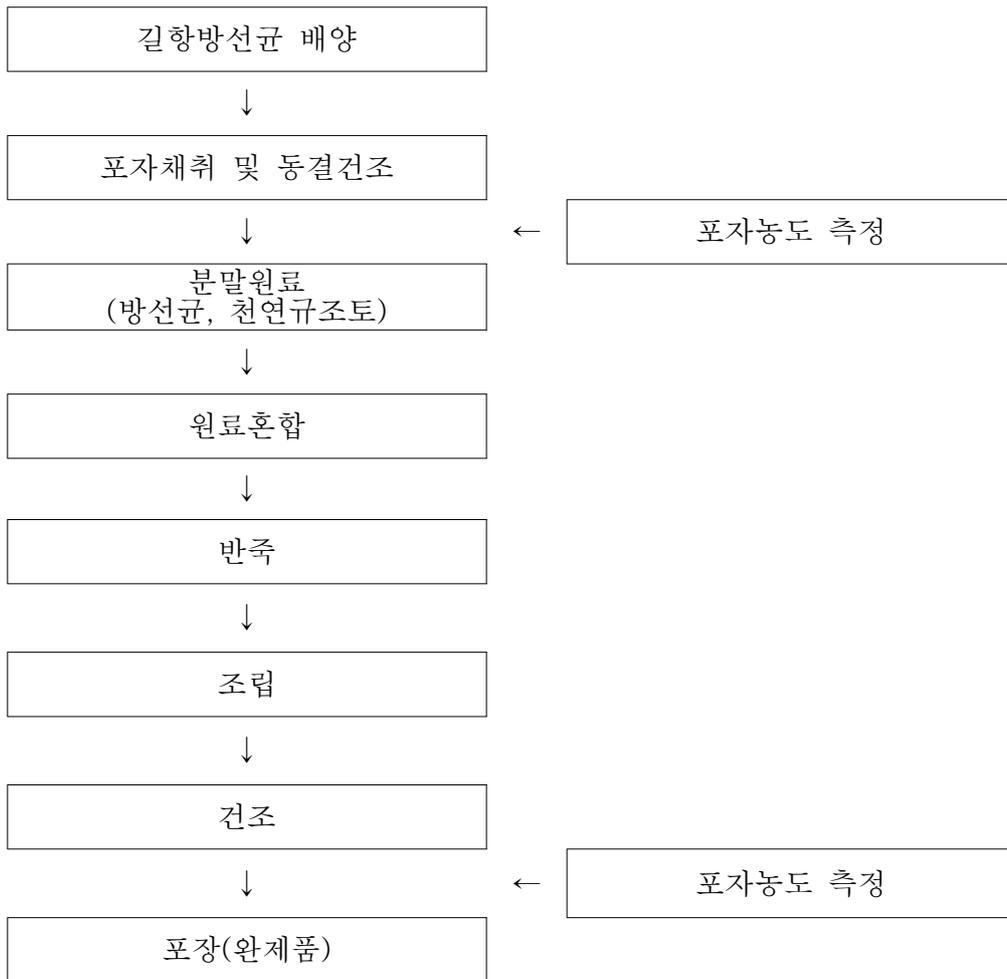


그림 3. 청고탄의 품질관리 모식도



다. 풋마름병방제 시제품의 유효미생물 검정 및 오염미생물 검사

풋마름병방제 시제품의 유효미생물 검정을 위하여 농촌진흥청지정 친환경유기농자재 미생물동정 시험연구기관인 목원대학교 미생물생태자원연구소에 분석 의뢰를 하였다.

가. 입제 제형 흙향의 유효 미생물 및 오염미생물 검정

입제제형인 흙향을 10^{-6} 로 희석하여 방선균 선택배지(starch casein agar; SCA)에 접종하고 28°C에서 5일간 배양한 후, 우점 방선균 콜로니를 선발하고 순수분리하였다(Fig 4). 순수분리된 방선균의 16S DNA 염기서열을 분석하기 위하여 DNA를 추출하고, 16S DNA PCR증폭을 실시하였으며 증폭된 PCR 산물을 정제하여 염기서열을 분석하였다. 분석된 염기서열(1,213bp)은 DDBJ/NCBI/Genebank와 Ribosomal Database Project II의 database에서 상동성 검색을 수행한 결과, *Streptomyces* 속의 종을 포함하는 계통학적 그룹에 속하는 균주로서 *Streptomyces griseus* ATCC 25497^T (D63872)와 99.83%의 유연관계를 나타내어 *Streptomyces griseus*로 확인되었다(Fig 5).

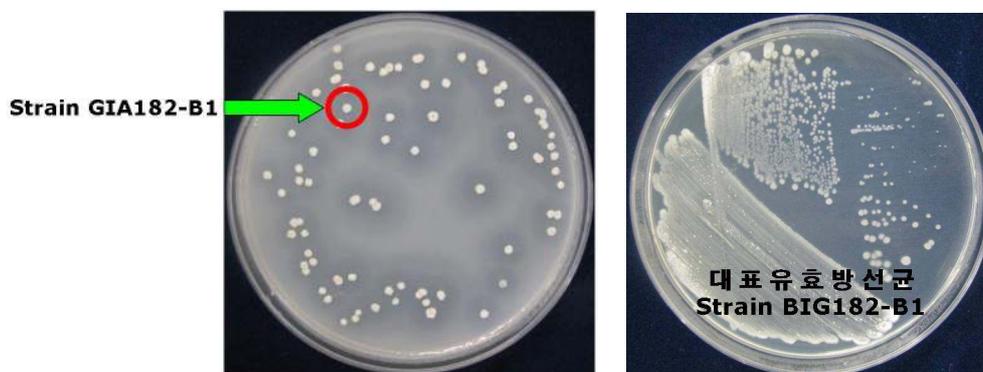


Fig 4. SCA 평판배지로부터 대표 유효방선균(BIG182-B1)의 선발 및 순수분리

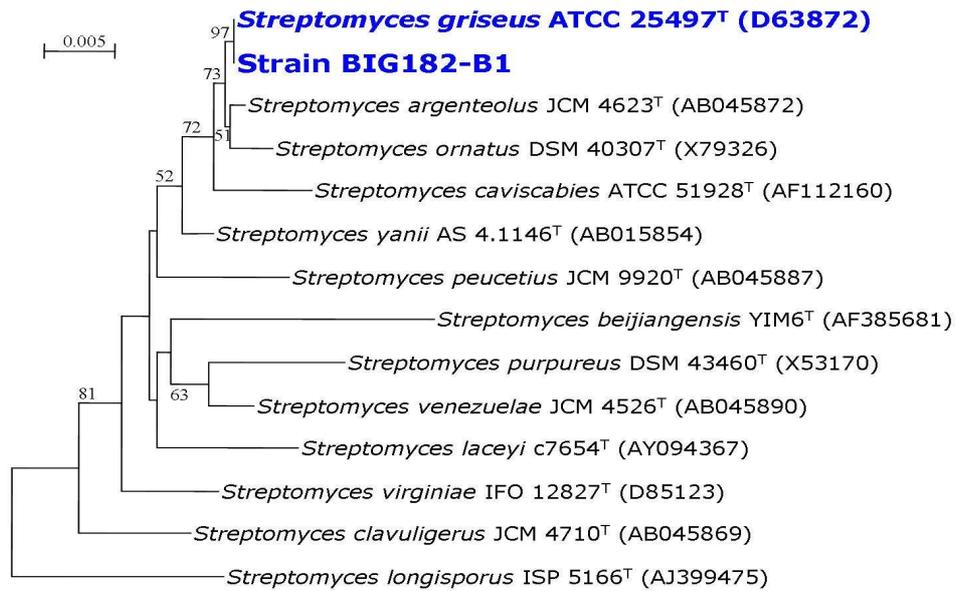


Fig 5. 꽃마름병방제 시제품 흙향 내 방선균의 계통학적 위치

상기의 방선균의 균체 지방산조성을 분석한 결과, 주요 지방산으로 C_{15:0} anteiso(40.53%)를 나타내었으며, C_{14:0} iso, C_{15:0} iso, C_{16:0} iso 그리고 C_{16:0}과 같은 다양한 분지형 지방산을 함유하는 특징으로 흙향 내 대표균주 *Streptomyces griseus* 는 *Streptomyces* 속에 속하는 주요 종과 유사한 균체지방산 조성을 갖는 것으로 확인되었습니다(Table 6).

Table 6. 꽃마름병방제 시제품 흙향 내 대표균주(*Streptomyces griseus*)의 균체지방산 특성

Fatty acid(%)	<i>Streptomyces griseus</i>	<i>Streptomyces beijiagensis</i> YIM6 ^T	<i>Streptomyces jietaisiensis</i> JCM 12279 ^T
Saturated acid			
C _{14:0}	1.62	1.10	*N.D.
C _{15:0}	2.59	1.08	N.D.
C _{16:0}	11.44	6.59	6.2
Branched-chain acids			
C _{14:0} iso	9.67	2.87	1.7
C _{15:0} iso	10.18	6.78	4.3
C _{15:0} anteiso	40.53	30.47	35.7
C _{16:0} iso	8.58	18.25	14.8
C _{17:0} iso	1.98	3.17	1.7
C _{17:0} anteiso	4.40	4.63	18.9

입제제형인 흙향 내 대표 방선균으로 선발된 *Streptomyces griseus*와 동일한 방선균의 생균수를 측정하기 위하여 동일 plate로부터 *Streptomyces griseus*와 동일한 형태의 회백색 방선균 콜로니를 선발하였다(Fig 6). 선발한 방선균 콜로니로부터 16S rDNA 염기서열의 상동성을 대표 균주와 비교한 결과, 16S rDNA 염기서열 상동성이 100%로 확인되었다(Fig 7). 방선균 선택배지(SCA)에 형성된 콜로니에 대한 3반복으로 생균수를 측정한 결과, 7.1×10^7 cfu/g으로 평가되었다(Fig 8).

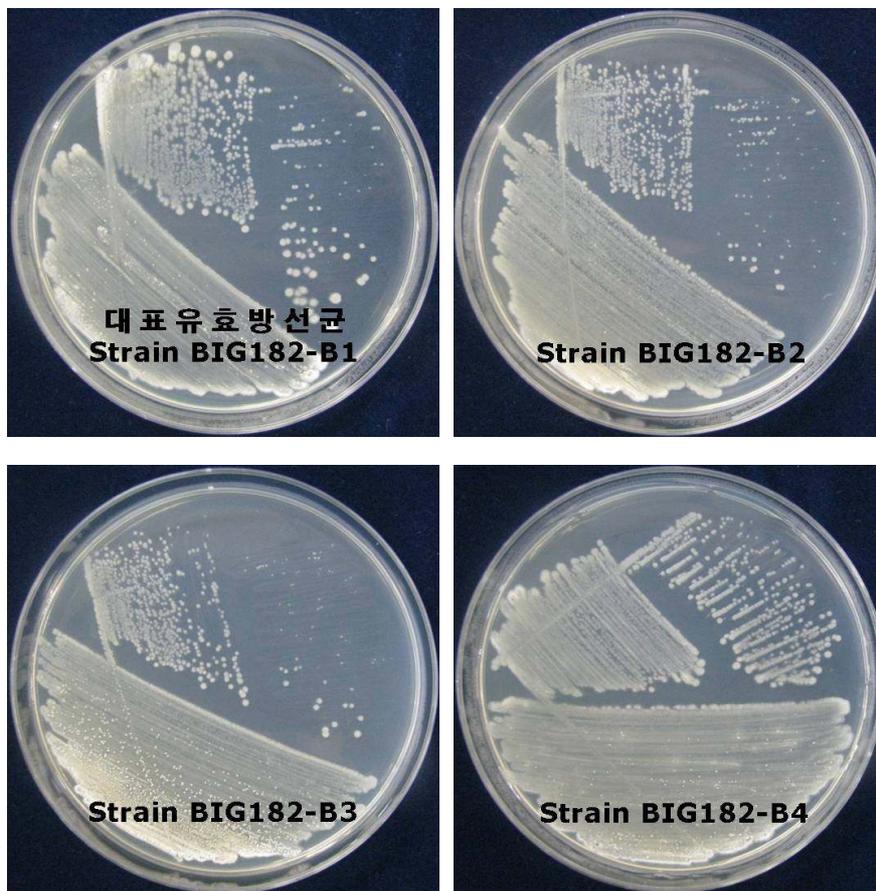


Fig 6. 평판배지로부터 대표 유효방선균(Strain BIG182-B1)과 동일 형태의 방선균 콜로니(Strain BIG182-B2, B3, B4)의 선발

Score = 941 bits (509), Expect = 0.0
 Identities = 509/509 (100%), Gaps = 0/509 (0%)
 Strand=Plus/Plus

BIG182-B1	705	TTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAA	764
BIG182-B2	1	TTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAA	60
BIG182-B1	765	CTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAA	824
BIG182-B2	61	CTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAA	120
BIG182-B1	825	CGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCT	884
BIG182-B2	121	CGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCT	180
BIG182-B1	885	TCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGTGTGTCGTGAGATGTTGGG	944
BIG182-B2	181	TCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGTGTGTCGTGAGATGTTGGG	240
BIG182-B1	945	TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTGTAGTGGCAGCATTGAGTTGGGCACTCT	1004
BIG182-B2	241	TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTGTAGTGGCAGCATTGAGTTGGGCACTCT	300
BIG182-B1	1005	AAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCC	1064
BIG182-B2	301	AAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCC	360
BIG182-B1	1065	TTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAG	1124
BIG182-B2	361	TTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAG	420
BIG182-B1	1125	GTTAAGCCAATCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGT	1184
BIG182-B2	421	GTTAAGCCAATCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGT	480
BIG182-B1	1185	GAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATC	1213
BIG182-B2	481	GAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATC	509

Fig 7. *S. griseus* BIG182-B1/BIG182-B2 상동성 비교



Fig 8. 미생물제제 10⁻⁶ 희석평판배지

풋마름병방제 입제 시제품 흡향 내 병원성대장균(*Escherichia coli*)을 검사하기 위하여 Coliform agar(Merck)에 시제품을 접종한 후 평판상에 형성된 콜로니가 총록색 또는 적색을 띠는 콜로니를 양성으로 판정하였다.

병원성 살모넬라(*Salmonella* spp.) 판정은 전용배지인 SS agar(Digco)에 시제품을 접종

한 후 평판상에 형성된 흑갈색 콜로니를 양성으로 판정하였으며, *Staphylococcus aureus*의 판별은 전용배지인 Mannitol salt agar (Difco)에 시제품을 접종한 후 평판배지상에 형성된 콜로니의 주변의 배지색이 황색으로 변한 콜로니를 양성으로 판정하였다. 또한, *Bacillus cereus*를 판정하는 전요배지인 MYP agar(Difco)에 시제품을 접종한 후 평판상에 형성된 연분홍색의 콜로니를 양성으로 판정하였으며, *Listeria monocytogenes*를 판정하기 위하여 Listeria Enrichment Broth (Difco)에 접종한 후 평판상에 형성된 청록색 콜로니를 양성으로 판정 하였다.

흙향 내 오염미생물을 검사한 결과, 5종의 오염미생물 모두 검출되지 않았다(Table 7).

Table 7. 흙향 내 오염미생물 검사 결과

오염미생물	검출 여부
병원성 대장균(<i>Escherichia coli</i>)	불 검출
병원성 살모넬라(<i>Salmonella</i> spp.)	불 검출
<i>Staphylococcus aureus</i>	불 검출
<i>Bacillus cereus</i>	불 검출
<i>Listeria monocytogenes</i>	불 검출

나. 입상수화제 제형 청고탄의 유효 미생물 및 오염미생물 검정

입제제형인 청고탄을 10^{-6} 로 희석하여 방선균 선택배지(starch casein agar; SCA)에 접종하고 28°C에서 5일간 배양한 후, 우점 방선균 콜로니를 선발하고 순수분리하였다(Fig 9). 순수분리된 방선균의 16S DNA 염기서열을 분석하기 위하여 DNA를 추출하고, 16S DNA PCR증폭을 실시하였다. 증폭된 PCR 산물을 정제하여 염기서열을 분석하였다. 분석된 염기서열(1,393bp)은 DDBJ/NCBI/Genbank와 Ribosomal Database Project II의 database에서 상동성 검색을 수행한 결과, *Streptomyces* 속의 종을 포함하는 계통학적 그룹에 속하는 균주로서 *Streptomyces griseus* ATCC 25497^T (D63872)와 99.85%의 유연관계를 나타내어 *Streptomyces griseus*로 확인되었다(Fig 10).



Fig 9. SCA 평판배지로부터 대표 유효방선균(BIG183-B1)의 선발 및 순수분리

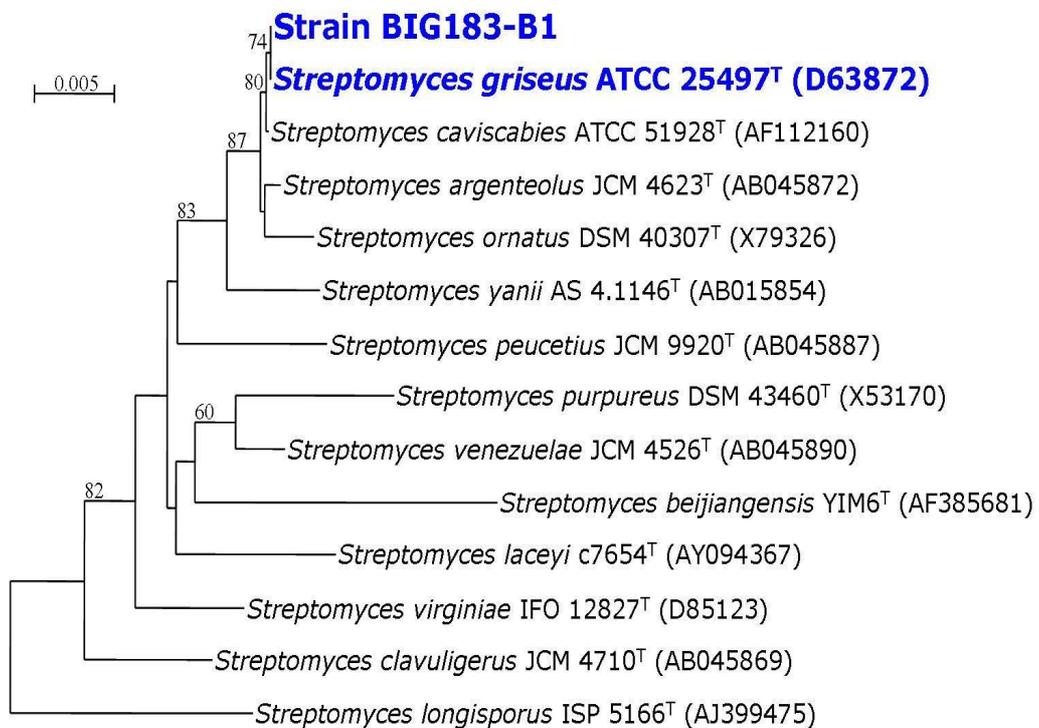


Fig 10. 꽃마름병방제 시제품 청고탄 내 방선균의 계통학적 위치
 상기의 방선균의 균체 지방산조성을 분석한 결과, 주요 지방산으로 C_{15:0}

anteiso(44.99%)를 나타내었으며, C_{14:0} iso, C_{15:0} iso, C_{16:0} iso 그리고 C_{16:0}과 같은 다양한 분지형 지방산을 함유하는 특징으로 흙향 내 대표균주 *Streptomyces griseus* 는 *Streptomyces* 속에 속하는 주요 종과 유사한 균체지방산 조성을 갖는 것으로 확인되었습니다(Table 8).

Table 8. 풋마름병방제 시제품 청고탄 내 대표균주(*Streptomyces griseus*)의 균체지방산 특성

Fatty acid(%)	<i>Streptomyces griseus</i>	<i>Streptomyces beijiagensis</i> YIM6 ^T	<i>Streptomyces jietaisiensis</i> JCM 12279 ^T
Saturated acid			
C _{14:0}	-	1.10	*N.D.
C _{15:0}	-	1.08	N.D.
C _{16:0}	12.29	6.59	6.2
Branched-chain acids			
C _{14:0} iso	10.64	2.87	1.7
C _{15:0} iso	11.59	6.78	4.3
C _{15:0} anteiso	44.99	30.47	35.7
C _{16:0} iso	9.16	18.25	14.8
C _{17:0} iso	-	3.17	1.7
C _{17:0} anteiso	5.43	4.63	18.9

입상수화제제형인 청고탄 내 대표 방선균으로 선발된 *Streptomyces griseus*와 동일한 방선균의 생균수를 측정하기 위하여 동일 plate로부터 *Streptomyces griseus*와 동일한 형태의 회백색 방선균 콜로니를 선발하였다(Fig 11). 선발한 방선균 콜로니로부터 16S rDNA염기서열의 상동성을 대표 rs주와 비교한 결과, 16S rDNA 염기서열 상동성이 100%로 확인되었다(Fig 12), 방선균 선택배지(SCA)에 형성된 콜로니의 생균수를 측정한 결과, 4.4×10^7 cfu/g으로 평가되었다(Fig 13).



Fig 11. 평판배지로부터 대표 유효방선균(Strain BIG183-B1)과 동일 형태의 방선균 콜로니(Strain BIG183-B2, B3, B4)의 선발

Score = 917 bits (496), Expect = 0.0
 Identities = 496/496 (100%), Gaps = 0/496 (0%)
 Strand=Plus/Plus

BIG183-B1	718	TAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTG	777
BIG183-B4	1	TAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTG	60
BIG183-B1	778	ACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTT	837
BIG183-B4	61	ACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTT	120
BIG183-B1	838	ACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGT	897
BIG183-B4	121	ACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGT	180
BIG183-B1	898	GACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAA	957
BIG183-B4	181	GACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAA	240
BIG183-B1	958	CGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCG	1017
BIG183-B4	241	CGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCG	300
BIG183-B1	1018	GTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGC	1077
BIG183-B4	301	GTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGC	360
BIG183-B1	1078	TACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCC	1137
BIG183-B4	361	TACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCC	420
BIG183-B1	1138	CACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCG	1197
BIG183-B4	421	CACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCG	480
BIG183-B1	1198	CTAGTAATCGCGGATC	1213
BIG183-B4	481	CTAGTAATCGCGGATC	496

Fig 12. *Streptomyces griseus* BIG183-B1/BIG183-B4 상동성 비교



Fig 13. 미생물제제 10⁻⁶ 희석평판배지

꽃마름병방제 입상수화제 시제품 청고탄 내 병원성대장균(*Escherichia coli*)을 검사하기 위하여 Coliform agar(Merck)에 시제품을 접종한 후 평판상에 형성된 콜로니가 총록색 또는 적색을 띄는 콜로니를 양성으로 판정하였다.

병원성 살모넬라(*Salmonella* spp.) 판정은 전용배지인 SS agar(Digco)에 시제품을 접종한 후 평판상에 형성된 흑갈색 콜로니를 양성으로 판정하였다. *Staphylococcus aureus*를

판별하는 전용배지인 Mannitol salt agar (Difco)에 시제품을 접종한 후 평판배지상에 형성된 콜로니의 주변이 배지색이 황색으로 변한 콜로니를 양성으로 판정하였다. *Bacillus cereus* 를 판정하는 전요배지인 MYP agar(Difco)에 시제품을 접종 한 후 평판상에 형성된 연분홍색의 콜로니를 양성으로 판정하였으며, *Listeria monocytogenes*를 판정하기 위하여 Listeria Enrichment Broth (Difco)에 접종한 후 평판상에 형성된 청록색 콜로니를 양성으로 판정 하였다.

청고탄 내 오염미생물을 검사한 결과, 5종의 오염미생물 모두 검출되지 않았다(Table 9).

Table 9. 청고탄 내 오염미생물 검사 결과

오염미생물	검출 여부
병원성 대장균(<i>Escherichia coli</i>)	불 검출
병원성 살모넬라(<i>Salmonella</i> spp.)	불 검출
<i>Staphylococcus aureus</i>	불 검출
<i>Bacillus cereus</i>	불 검출
<i>Listeria monocytogenes</i>	불 검출

라. 풋마름병방제 시제품의 생물농약 등록

농촌진흥청에서는 유기농산물 소비자를 보호하고 친환경유기농업 실천 농가의 자재 선택의 편의를 제공하기 위하여 「친환경농업육성법」 제 16조 제2항 및 같은 법 시행규칙 제7조 제5항에 따른 친환경유기농자재의 목록고시를 위해 「친환경유기농자재」 인증을 부여하고 있다.

본 연구를 통해 개발된 방선균을 주원료로 하는 입제제형인 『흙향』 과 입상수화제 제형인 『청고탄』 을 친환경유기농자재 내 작물병해 관리용 자재의 등록을 위하여 신청하였다.

제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연구개발목표의 달성도

<연구개발 목표>

토마토포뭉름병과 배추무름병방제용 미생물농약을 개발하기 위해 두 병원균에 길항력이 있는 균주를 선발하고, 대량배양기술을 개발하여 농가에 보급할 수 있는 제품으로 생산 한다. 생산된 제품은 실제 피해를 입고 있는 농가현지에서 방제효과가 확인되어야하고 인축환경에 해를 주지 않아야한다.

○ 길항미생물의 분리·동정

대상작물(토마토, 배추) 근권에 서식하는 미생물 중 *E. carotovora*, *R. solanacearum* 에 대해 길항력을 가진 세균, 방선균은 기탁기관(한국농용미생물보존센터)에 보존하고 추후 특허출원

○ 대사물질 분석 및 이용방법연구

길항능력이 있는 미생물들은 배지조성, 발효조건 등을 달리하여 향균물질, 식물생장호르몬, siderophore 등을 분리한 후 작용물질들의 구조를 분석·검색하고, 준비된 분리물질을 수화제, 유화제, 유제 등으로 제형화 후 상품개발 가능성여부 검토

○ 균체대량배양을 위한 발효조건 연구

배지조성, 발효조건, 무기영양원, pH조정에 따른 최적 균체생장조건을 확인한 후 *Pseudomonas*속은 균체밀도가 최대, *Bacillus*속은 endospore형성율을 높이고, *Streptomyces*속은 포자형성율을 높일수 있는 조건확립.

○ 길항미생물 이용 오이, 토마토, 배추 토양병방제용 육묘상토개발

버섯폐배지, 볏짚, 왕겨에 길항미생물을 접종하여 퇴비화하여 프리그육묘상토로 개발하고, 이에 필요한 첨가물조성, 발효조건, 포장시기, 보존기간 별 상품성유지 등의 조건구명

○ 제품의 최적약량, 사용간격, 편의성평가

종자분의처리는 파종시 1회로 립당 처리균수별 방제효과, 수화제는 정식시 농도별 침지처리와 재배기간 관수횟수별 병방제효과, 엽면살포시 밀도와 처리횟수별 방제효과를 조사하여 적정희석배수 및 방제횟수 제시

○ 농가현장 적용 포장시험

배추 무름병(*E. carotovora*) 방제효과시험은 고온기 재배작형인 여름배추를 재배하는

평단지, 준고랭지, 고랭지농가에서 수행하고, 풋마름병(*R. solanacearum*)은 토마토 축성재배농가(2월 정식)와 억지재배농가(7월정식)에서 방제효과조사. 포장선정은 2004년 피해를 입은 농가하우스에서 실시

○ 균체대량배양을 위한 발효조건 연구

- 방선균의 배지조성, 발효조건, 무기영양원, pH조정에 따른 최적균체성장조건 확인하고 포자형성율을 높일 수 있는 조건 확립.
- 방선균의 산업적인 스케일에서의 대량배양 공정 확립
- 실험실 규모의 최적 발효공정이 기 확보된 유용미생물(*Bacillus sp. Pseudomonas sp.*)의 산업화 대량배양 공정 확립

○ 제제화 및 안정화.

- 발효 공정시 *Bacillus*속은 spore 전환을 유도하여 제제 및 안정화 효율을 높이고, down stream process 를 개선하여 생산 효율을 높인다.
- 균주 안정화가 힘든 *Pseudomonas*속은 배양시 활성물질의 대량 생산을 유도하여 작물에 처리시 직접적인 생육 촉진효과를 기대할 수 있는 제제화 방안 마련.
- 병 방제력이 우수한 *Streptomyces*속은 생존율을 높일 수 있는 액체배양조건에서의 포자형성을 유도하여 균주 안정화 방안 마련.

○ 시제품 제작

- 안정화된 균주에 증량제 및 기타 첨가제를 혼합하여 최종 시제품 제작.

<년차별연구개발목표와 내용>

1. 1년차

연구개발의 목표	연구개발의 내용	달성도
- 길항미생물 분리·동정	- 풋마름병, 무름병원균 2종에 대해항균 물질생산능이 있는 균주확보	100
- 주요작물 병방제효과조사	- <i>Bacillus</i> 3종, <i>Pseudomonas</i> 5종, <i>S. griseus</i> 의 토양병방제 및 작물생육촉진 효과	100
- 후보 물질균의 독성 확인	- 후보 물질균의 기초독성시험 /약효 스크리닝	100
- 풋마름병 저항성물질 분리	- 활성물질 분리, 정제	100
- 방선균 Lab scale 발효조 최적화	1) 방선균 포자 형성 유도 - 플라스크 수준의 최적생장배지조성 탐색 - 포자 유도 조건 탐색 2) 5L 발효조에서의 최적화 및 재연성 검토	100
- <i>Bacillus</i> 속 대량 배양	1) <i>Bacillus</i> 속 300L 대량 배양 - 5L 발효조에서의 최적 성장배지 조성 - 300L 수준에서 재현 2) 제제화 - spore 전환을 유도하고 down stream 과정(harvest, 건조) - 다양한 부형제와의formula로 제제의 안정성 및 효과 증진	100

2. 2년차

연구개발의 목표	연구개발의 내용	달성도
<ul style="list-style-type: none"> - <i>S. griseus</i> 제형물 풋마름병 방제효과조사 - 길항세균류 무름병방제 효과 조사 	<ul style="list-style-type: none"> - 제형물 보존기간별 생균밀도변화 - 희석배수, 처리방법별 방제효과 	100
<ul style="list-style-type: none"> - 풋마름병방제용 기능성퇴비 조제 및 방제효과조사 	<ul style="list-style-type: none"> - 버섯폐배지 1차발효 - <i>S. griseus</i> 처리방법별 풋마름병방제효과 	100
<ul style="list-style-type: none"> - 원제의 등록용 독성자료 생산 	<ul style="list-style-type: none"> - 원제의 인축/환경독성시험 - 약효/약해 시험 	100
<ul style="list-style-type: none"> - 활성물질의 특성 연구 	<ul style="list-style-type: none"> - 활성물질의 의 생물학적 및 이화학적 특성 연구 	100
<ul style="list-style-type: none"> - 방선균의 산업화배지를 이용한 최적 발효 	<ol style="list-style-type: none"> 1) 방선균 300L 발효조에서의 발효 최적화 <ul style="list-style-type: none"> - scale up 2) 제제화 <ul style="list-style-type: none"> - down stream 과정 - formula를 통한 안정화제 및 효과증진제 첨가 	100
<ul style="list-style-type: none"> - <i>Pseudomonas</i> 속 대량 배양 및 제제화 	<ol style="list-style-type: none"> 1) <i>Pseudomonas</i> 속 300L대량 배양 <ul style="list-style-type: none"> - 5L 발효조에서의 최적 성장배지 조성 탐색 - 활성물질 생성 최적 배지 조성 탐색 - 300L 수준에서 재현 2) 제제화 <ul style="list-style-type: none"> - down stream 과정(harvest, 건조) 	100

3. 3년차

연구개발의 목표	연구개발의 내용	달성도
- 길항미생물 제형물 농가실 증시험	- 풋마름병(축성,반축성재배지) - 무름병(배추여름재배지)	100
- 토양병 완전방제를 위한 길항미생물 처리방법	- 풋마름병,무름병방제용육묘상토조제 - 퇴비살포시 전면살포 - 재배기 관주 및 엽면살포	100
- 제품 등록자료 생산	- 시제품의 인축/환경독성시험 - 약효/약해 시험	100
- 방선균 산업화 발효조건 확립	- 방선균의 2500L 발효조에서의 발효 생산 최적화 및 제제화	100
- 시제품 생산	- 각 안정화된 균주를 이용해 상품성증대를 위한 formula를 적용하여 시제품제작 - 보존환경에 대한 안정성확보 검증실험	100
- 특허출원 - 생물농약등록	- 균주특허 - 토양병방제용	100

본 연구의 목표는 토마토폏마름병과 배추무름병을 환경친화적인 방법으로 방제하는 기술을 개발하는 것으로 길항미생물을 이용한 생물적방제기술개발이었다. 두 병원균 중 풋마름병은 가지과작물인 토마토, 고추, 가지재배농가에 병이 발병되면 피해가 커 방제기술개발이 시급히 요구되고 있는 실정이다. 실제 농가현장에서는 이 병을 잡을 수 있다고 권장하는 사람들의 유혹에 피해농가는 여러 가지 방법이나 재료를 밭에 적용하고 있으나 뚜렷한 방제효과는 확인되지 않고 있다. 본 연구자들도 농가현장에서 방제효과를 확인하기 위해 시료를 들고 피해농가를 방문하면 앞서의 부류로 간주되어 전혀 믿지를 않아 실험수행에 어려움이 있었다. 그러나 한집 두집 방제효과를 확인하고 소문을 내어 3년이

지난 요즈음에는 제품구입하기를 희망하는 농가들의 문의전화는 자주온다. 풋마름병은 현재 훈증소독제가 가장 방제효과가 높다고 하고 있으나 보고서에 언급했듯이 농가에서 사용하기에는 제한요소가 많았다. 본 연구에서 개발한 청고탄과 흙향은 토양에 있는 유기물분해능이 있어 발효가 잘된 퇴비에서 나는 흙냄새를 생성하는 균을 원제로 개발한 제품이다. 이 균주는 Streptomycine을 생산하는데 사용하는 방선균으로 항생제생산에 가장 널리 이용되고 있는 균이다. 항균물질생산능에 의해 독성이나 환경파괴의 가능성이 있어 안전성을 시험한 결과 동물의 혈관에 주사하여도 독성이 없었고 물벼룩이나 잉어에 해를 끼치지 않아 환경오염의 위험성이 없는 친환경자재로 확인하였다. 이번 연구로 토마토재배농가에서는 풋마름병을 방제할 수 있다는 것을 확인하게 되었으며 인축에 해가 없는 농자재인 것이 확인되어 토양을 살리기 위한 좋은 재료로 사용될수 있을 것으로 예견된다. 배추무름병방제에 사용한 *Pseudomonas*와 *Bacillus*는 미국 EPA에서 안전한 토양미생물로 확인된 종으로 제품으로 개발할 충분한 가능성을 가지고 있으나 현재 무름병 방제효과가 좋은 농약이 보급되고 있어 농가에 보급하기에는 시기상조인 것으로 확인하였다. 이들을 제품으로 개발하기 위해서는 병방제효과를 높이고 생육촉진이나 병저항성 유도 등에 대한 효과를 보강하면 충분히 화학농약과 경쟁력이 있을 것으로 예견된다.

2. 관련분야에의 기여도

지금까지 방선균 자체만으로 토양병을 방제하는 연구는 미흡하다. 그 이유는 배양기간이 길고 배지 종류에 따라 포자형성이 되지 않아 토양처리시 약량을 확인할 수없고 보관이 어려워 반복실험을 할 수 없기 때문이다. 본 연구자들도 초기에는 연구논문자료를 참고하여 대량으로 액체배양하여 필요한 균체를 생산할 수 있을 것으로 기대하였으나 fermentor에서의 포자생산은 성공하지 못하고 고체배지에서 포자를 수확하여 제품을 생산하였다.

제5장 연구개발성과 및 성과활용계획

1. 실용화 산업화계획

흑향과 청고탄은 2009년 목록공시에 출원하여 친환경농자재로 신청하여 6월 말 그결과를 기다리고 있어 산업화 할 준비를 하고 있다. 또한 유럽수출을 위해 스페인 주재 소지빗 회사와 국제공동연구를 추진하고 있다. 국내 시장은 농업관련 매체를 통해 두 제품을 소개하고 있다.

2. 교육 · 지도 · 홍보

시군 농업기술센터, 농협, 작목반 등 토양병방제를 위한 미생물이용방법교육 중

3. 특허

국내는 물론 해외 수출을 위해 국제특허 준비 중

4. 추가연구

- 인삼균핵병방제약제 개발 - 4농가 10ha 처리한 결과 균핵병에 의한 죽병이 억제되고 뿌리생육이 왕성(농약사용 절감으로 인삼수출산업에 기여)
- 미생물농약등록에 필요한 추가연구 필요

제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제7장 참고 문헌

Anuratha,C.S/ Gnaanamanickam, S.S. Biological control of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum* in India with antagonistic bacteria. Plant and soil, 124(1990), 109-116.

Asprias, R.B/ De La Cruz, A. Potential biological control of bacterial wilt in tomato and potato with *Bacillus polymyxa* Fu6 and *Pseudomonas fluorescens*. In: Bacterial wilt disease in Asia and the South Pacific, (Ed.: Perseley , G.J.). ACIAR proceeding No.13. Canberra, Australia, 1986, 89-92.

Bagnasco, P., Fuente, D.L., Gualtieri, G., Noya, F., Kloepper, J.W., Leong. J., Tteintze, M., Schroth, M.N. *Pseudomonas* siderophore : a mechanism explaining disease suppressive soil. Curr. Microbiol., 4(1980), 317-320.

Benhamou, N. and G. Theriault, 1992. Treatment with chitosan enhances resistance of tomato plants to the crown and root rot pathogens, *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*. Physiol. Mol. Pl. Pathol., 41: 33-52

Bir6, S., I. Bekesi, S. Vitallis, and G. Szab6. 1980. A substance effecting differentiation in *Streptomyces griseus*. Purification and properties. Eur. J. Biochem. 103:359-363.

Carlos H., Manuel B. Manzanal.1976. Ultrastructural Studies of Sporulation in *Streptomyces*. J. Bacteriology, Sept. p. 1443-1454.

Ensign, J. C. 1978. Formation, properties, and germination of actinomycete spores. Annu. Rev. Microbiol. 32:185-219.

Eui-sang ji. 1994. Sporulation of *Streptomyces griseus* NRRL B-2682 in Submerged Culture. Korean J. food & Nutrition Vol. 7, No. 1, P. 58-63.

- Fegan M. and Prior P. 2005. How complex is the "Ralstonia solanacearum" complex ? Pages 449–461 in: Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum species complex. C., Allen, P., Prior, A. C., Hayward, eds. APS Press, St. Paul, M. N.
- Field, J.A. et al. 1985. Effects of anaerobically digested poultry manure on soil phosphorus absorption and extractability. J. of Environ. Qual. 14: 105–107.
- French, E. R., Gutarra, L., Aley, P., and Elphinstone, J. 1995. Culture media for Pseudomonas solanacearum isolation, identification and maintenance. Fitopatologia 30:126–130.
- Gitaitis, R., McCarter, S., and Jones, J. 1992. Disease control in tomato transplants produced in Georgia and Florida. Plant Disease 76:651–656.
- Hardisson, C., and M. B. Manzanal. 1976. Ultrastructural studies of sporulation in Streptomyces. J. Bacteriol. 127:1443–1454.
- Hayward, A. C. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by Pseudomonas solanacearum. Annual Review of Phytopathology 29:65–87.
- Hirsch, C. F., and J. C. Ensign. 1976. Nutritionally defined conditions for germination of Streptomyces viridochromogenes spores. J. Bacteriol. 126:13–23.
- Hora, T.S. and R. Baker, 1972. Soil fungistasis: Microflora producing a volatile inhibitor. Trans Br. Mycol. Soc., 59: 491–500.
- Jangyul K., Katherine E. 1996. Bald Mutants of *Streptomyces griseus* That Prematurely Undergo Key Events of Sporulation. J. Bacteriology, Aug. p. 4643–4650.
- Jiang H., Katherine K., 1998. Visualization of Penicillin-Binding Proteins during Sporulation of *Streptomyces griseus*. J. Bacteriology, Apr. p. 2125–2132.
- Ji, P., M. T. Momol, S. M. Olson, and P. M. Pradhanang. 2005. Evaluation of thymol

as biofumigant for control of bacterial wilt of tomato under field conditions. *Plant Disease* 89:497–500.

Kathleen E. Kendrick T., Jerald C. Ensign. 1983. Sporulation of *Streptomyces griseus* in Submerged Culture. *J. Bacteriology*, July P. 357–366.

Katshide M., Tomohisa K., Aueharu H., Teruhiko B.. 1990. The A-Factor-Binding Protein of *Streptomyces griseus* Negatively Controls Streptomycin Production and Sporulation. *J. Bacteriology*, June p. 3003–3008.

Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance in a tetrazolium medium. *Phytopathology* 44:693–695.

Kelman, A. and Sequeira, L. 1965. Root-to-root spread of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 55:304–309.

Kempe, J., and L. Sequeira. 1983. Biological control of bacterial wilt of potatoes: attempts to induce resistance by treating tubers with bacteria. *Plant Dis.* 67:499–503.

Kroodsma, I.W. 1986. Treatment of livestock manure: Air drying and composting poultry manure. In: *Odour prevention and Control of Organic Sludge and Livestock Farming*, The Netherlands, pp. 166–174.

Kumar, M. Control of bacterial wilt of potatoes in naturally infested soil by bacterial antagonist. *J. Plant disease and protection*, 104(1997)4, 362–369.

Lane, T.H. and Bates, T.E. 1982. Sampling and chemical analysis of manure. In: *The Manure Management Handbook*, Ont. Soil and Crop Imp. Ass., Ont. Min. of Agriculture and Food, Ont. Agricultural College, Canada, pp. B2–1 to B2–2.

- Lazano, J.C/ Sequeira, L. Differentiation of races of *Pseudomonas solanacearum* by leaf infiltration technique. *Phytopathology*, 60(1970), 833– 838.
- Leloir, L. F., and C. E. Cardini. 1957. Characterization of phosphorus compounds by acid ability. *Methods Enzymol.* 3:840–850.
- McVittie, A. 1974. Ultrastructural studies on sporulation in wild-type and white colony mutants of *Streptomyces coelicolor*. *J. Gen. Microbiol.* 81:291–302.
- Mian, J.H., G. Godoy and R.A. Shelby,1982. Chitin amendments for control *Meloidogyne arenaria* in infested soil. *Nematropica*, 12: 71–84.
- Mitchell, R., Alexander, M., 1962. Microbiological processes associated with the use of chitin for biological control. *Soil Science Society of America Proceedings* 26, 556–558.
- Muyla, K./ Watanabe, M./ Goto,M./ Takikawa,Y./ Tsuyumu, S. Suppression of bacterial wilt disease of tomato by root dipping with *P. fluorescens* pfg 32. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, 62(1996), 134–140.
- Patrice G. C. and Timur M. M. 2008 *R. solanacearum* race 3 biovar 2 USDA–NRI project. All rights reserved. [http://plantpath.ifas.ufl.edu/rsol/RalstoniaPublications _PDF/ BacterialWiltTomato_Revised_PDF.pdf](http://plantpath.ifas.ufl.edu/rsol/RalstoniaPublications_PDF/BacterialWiltTomato_Revised_PDF.pdf).
- Pradhanang, P.M., Ji, P., Momol, M.T., Olson, S.M., Mayfield, J.L., and Jones, J.B. 2005. Application of acibenzolar–S–methyl enhances host resistance in tomato against *Ralstonia solanacearum*. *Plant Disease* 89:989–993.
- Salas A., J. A. Guijarro, C. Hardisson. 1983. High Calcium Content in *Streptomyces* Spores and Its Release as an Early Event During Spore Germination. *J. Bacteriology*, Sept. p. 1316–1323.
- Simon, A./ Ridge, E.H. The use of ampicillin a simplified selective medium for

- isolation of fluorescent pseudomonas. *J. Appl. Bacteriol.*, 37(1974), 459-460.
- Sorensen, J. The rhizosphere as a habitat for soil microorganisms. In: *Modern microbiology* (Eds.: Elsas, J.D.V./ Trevors, J.T./ Wellington, E.M.H.). New York, 1997, 21-45.
- Stewart, R.B. Some plant disease occurring in Keffa Province, Ethiopia. Ethiopia, College of Agriculture Alemaya, 1956. Sunaina,V./ Kishore,V./ Shekhowat,G.S./
- Tahoven, R., A. Hannukkala, and H. Avikainen. 1995. Effect of seed dressing treatment of *Streptomyces griseoviridis* on barley and spring wheat in field experiments. *Agric. Sci. Finl.* 4:419-427.
- Wellington, E. M. H., N. Cresswell, and V. A. Saunders. 1990. Growth and survival of streptomycete inoculants and the extent of plasmid transfer in sterile and non-sterile soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1413-1419.
- Wildermuth, H. 1970. Development and organization of the aerial mycelium in *Streptomyces coelicolor*. *J. Gen. Microbiol.* 60:43-50.
- Zhang, C.L., Zhao, Y.Q., Yu, X.Q., Zhang, W., Xie, Y.M., Li, X.D., Zhang, C.L., 2008. Screening and identification of antagonistic Actinomyces strains against *Ralstonia solanacearum*. Source : *ACTA PHYTOPATHOLOGICA SINICA*, v.38(4):414-419.
- 농경과원예, 고추역병 발생상습지역 은행잎 부숙퇴비시용효과 규명, 봉화군농업기술센터 (이광희), 2002
- 송기원, 박상근, 이동아, 정헌재, 원시연보, 토양수분과 고추의 낙화 및 낙과관계. 1971
- 정인명, 강보구, 정해유, 충북연보, 연작지 토양축적 인산 재활용. 1989
- 김경희, 서정식, 강원연보, 고추연작지 토양개량효과. 1985

신철우, 박준규, 윤정희, 농업기술연구소, 연작재배지의 석회질퇴비의 토양개량 효과. 1986

곽병규, 박선도, 경북연보, 토양개량제 효과. 1988

박은호, 노영팔, 정연태, 영남작사, 고추연작지 제오라이트 처리 효과. 1986