

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개(), 발간등록번호(O)

농생명산업기술개발사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003562-01

파지테라피를 이용한 중요 식물세균병 제어법 개발 및 실용화

2021. 06. 21

주관연구기관 / 경희대학교산학협력단
협동연구기관 / 부경대학교산학협력단
협동연구기관 / 동아대학교산학협력단
협동연구기관 / 고려바이오(주)

농 립 축 산 식 품 부
(전문기관) 농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “파지테라피를 이용한 중요 식물세균병 제어법 개발 및 실용화”(개발기간 : 2017. 04. 21. ~ 2020. 12. 31.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2021년 06월 21일

주관연구기관명 : 경희대학교 산학협력단 (대표자) 김우식

협동연구기관명 : 부경대학교 산학협력단 (대표자) 오정환

협동연구기관명 : 동아대학교 산학협력단 (대표자) 김집수

협동연구기관명 : 고려바이오(주) (대표자) 김영권



(직인)



(직인)



(직인)

주관연구책임자 : 오창식

협동연구책임자 : 최태진

협동연구책임자 : 이선우

협동연구책임자 : 윤여준

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의 합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	317012-4	해 당 단 계 연 구 기 간	2017.04.21. - 2020.12.31	단 계 구 분	(총 단 계)
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	농생명산업기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	파지테라피를 이용한 중요 식물세균병 제어법 개발 및 실용화			
연구책임자	오창식 (경희대학교)	해당단계 참여연구원 수	총: 명 내부: 명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부: 천원 민간: 천원 계: 천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 95 명 내부: 20 명 외부: 75 명	총 연구개발비	정부: 1,125,000 천원 민간: 375,000 천원 계: 1,500,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	경희대학교 산학협력단(주관/제1세부) 부경대학교 산학협력단(제1협동) 동아대학교 산학협력단(제2협동)			참여기업명 고려바이오(주)(제3협동)	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명: 전라남도 농업기술원			연구책임자: 정현주	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	일반과제임
-------------------------	-------

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호	6	4	1					1	4		

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)

보고서 면수

- 연구 주요 목적은 파지요법을 이용한 식물병원세균에 의해 발생하는 5개의 중요 식물세균병 방제 기술 개발 및 제품화
- 키위 궤양병, 수박 과실썩음병, 토마토 풋마름병, 배추 무름병 방제용 박테리오파지 다량 확보 및 특성 규명
- 선별된 박테리오파지들이 대상 식물세균병에 대해 온실과 포장 조건에서 우수한 방제효과 규명
- 방제효과 검정 시 토양관주, 엽면살포, 종자처리 등 여러 가지 처리방법으로도 효과가 유지됨을 규명
- 방제효과가 좋은 박테리오파지를 유효성분으로 하는 시제품 4개 개발
- 대상 박테리오파지들이 온도, 산도, 자외선 노출 등 환경조건과 다양한 보조제에 대한 안정성 규명
- 대상 박테리오파지의 다량 토양 처리 후 토양 미생물상 변화에 무영향 규명
- 정량적 성과로 신규 파지 작물보호제 시제품 4개 개발, SCI 논문 5편과 KCI논문 1편 출판, 특허등록 4건, 특허출원 5건, 기술이전 3건, 학술발표 34건, 인력양성 4건 달성

165쪽

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>박테리오파지의 특성규명, 환경안정성, 방제효과 검정을 통해 주요 식물세균병인 키위 궤양병, 토마토 풋마름병과 궤양병, 배추 무름병, 수박 과실썩음병 방제용 신규 박테리오파지 작물보호제 제품 5개 개발을 주요 목표로 하였다. 이를 위해 각 식물세균병에 효과적인 박테리오파지 분리, 특성 규명, 온실과 포장조건에서의 방제효과 검정, 파지처리 후 환경 미생물상에 미치는 영향 등 연구를 진행하였다. 또한, 시제품 제작을 위해 필요한 다양한 환경조건에 대한 안정성, 보조제에 대한 안정성 등도 분석하였다.</p>				
<p>연구개발성과</p>	<p>정성적 성과로는 키위 궤양병, 수박 과실썩음병, 토마토 풋마름병, 배추 무름병 방제용 박테리오파지를 다량 확보하였고, 다양한 특성들을 규명하였다. 선별된 박테리오파지들이 대상 식물세균병에 대해 온실과 포장 조건에서 방제효과가 우수함을 밝혔고, 방제효과 검정 시 토양관주, 엽면살포, 종자처리 등 여러 가지 처리방법으로도 효과가 유지됨을 밝혔다. 방제효과가 좋은 박테리오파지를 선발하여 이들을 유효성분으로 하는 시제품 4개를 개발하였다. 대상 박테리오파지들은 온도, 산도, 자외선 노출 등에 안정성을 보였고, 다양한 보조제에 대해서도 안정적으로 활성을 유지하였다. 또한, 대상 박테리오파지를 다량 토양에 처리하였음에도 불구하고 토양 미생물상 변화에 영향이 없어 환경친화적인 특성을 나타내었다. 정량적 성과로는 신규 파지 작물보호제 시제품 4개 개발, SCI 논문 5편과 KCI논문 1편 출판, 특허등록 4건, 특허출원 5건, 기술이전 3건, 학술발표 34건, 인력양성 4건 달성하였다.</p>				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>주요 작물의 중요 식물세균병 제어를 위한 신규 기술인 파지요법의 개발을 통해 신규 친환경 작물보호제로서 작물의 안정적인 생산에 활용하고, 기존의 항생제 대체제로서의 미래원천기술 확보도 기대되었다. 향후 다양한 식물세균병을 대상으로 파지요법의 활용 범위를 확대하는 후속연구에 활용할 계획이다. 항생제 내성균 제어와 더불어 항생제 내성균 출현 가능성을 감소시켜 환경안전성을 높일 수 있고, 농산물 생산 이외의 농산물 및 식품저장 분야에도 적용할 수 있어 다른 분야로의 파급효과도 기대된다.</p>				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>박테리오파지</p>	<p>치료법</p>	<p>식물세균병</p>	<p>제어</p>	<p>실용화</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>Bacteriophage</p>	<p>therapy</p>	<p>Bacterial plant diseases</p>	<p>control</p>	<p>commercialization</p>

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요 6
2. 연구수행 내용 및 결과 17
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 151
4. 연구결과의 활용 계획 등 161

붙임. 참고 문헌 164

- <별첨 1> 연구개발보고서 초록
- <별첨 2> 주관연구기관의 자체평가의견서
- <별첨 3> 연구성과 활용계획서

1장. 연구개발과제의 개요

1절. 연구개발 목적

1. 연구개발의 개요

본 연구개발과제의 주 목적은 ‘과지요법을 이용한 식물병원세균에 의해 발생하는 5개의 중요 식물세균병 방제 기술 개발 및 제품화’에 있다(그림 참조).

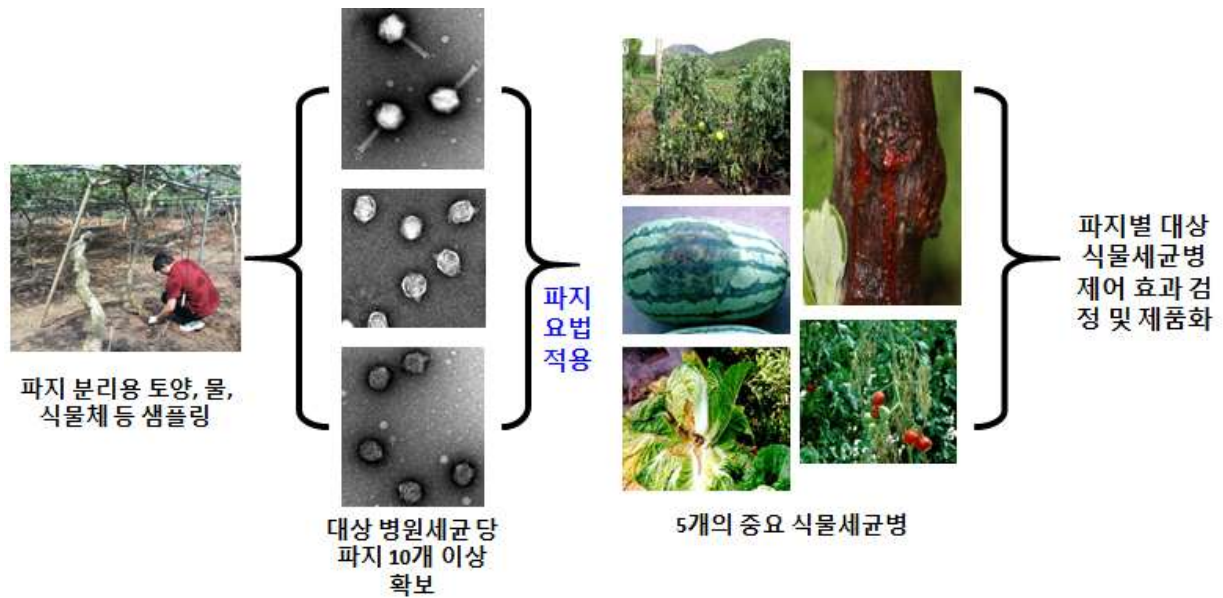


그림 2. 연구개발 단계별 목표

2. 연구개발의 핵심 연구목표

본 과제 대상 5개의 중요 식물세균병은 키위 궤양병, 수박 과실썩음병, 토마토 풋마름병, 배추 무름병, 토마토 궤양병이다. 구체적인 목적은 이들 5개의 식물세균병을 대상으로 아래와 같은 목표를 달성하는 것이다.

[핵심 연구목표]

- 키위 궤양병 방제용 신규 파지 작물보호제 제품 1개 이상 개발
- 수박 과실썩음병 방제용 파지 10개 이상 신규 확보 및 신규 파지 작물보호제 제품 1개 이상 개발
- 토마토 풋마름병 방제용 신규 파지 작물보호제 제품 1개 이상 개발
- 배추 무름병 방제용 파지 10개 이상 신규 확보 및 신규 파지 작물보호제 제품 1개 이상 개발
- 토마토 궤양병 방제용 파지 10개 이상 신규 확보 및 신규 파지 작물보호제 제품 1개 이상 개발

2절. 연구개발의 필요성

1. 기술적 필요성

식물병원세균에 의한 식물병의 화학적 방제법으로 스트렙토마이신계 항생제와 구리화합물을 이용하는 방법 등이 세계적으로 가장 많이 사용되고 있는데(Pohronezny et al., 1994), 현재 저항성 균주의 출현으로 사실상 효과적이지 못하며 유럽이나 뉴질랜드와 같은 나라들에서 항생제 사용을 제한하는 추세여서 새로운 전략의 방제방법 개발이 시급한 실정이다. 항생제 대체제의 하나로 과지에 대한 관심도가 증가하고 있는 추세인데, 과지는 환경친화적이며, 특정세균에만 작용하는 세균선택성이 높고, 스스로 증식이 가능한 지속성이 높아 반복적인 살포가 불필요하다는 장점이 있다(Pires et al., 2016)). 식품이나 동물에서의 병원세균 방제용 과지요법은 이미 활발히 연구가 진행되어 신선 식품의 품질 유지를 위한 전처리 방법이나 동물사료에 혼합 처리하는 방법 등이 이미 상용화되어 실제 적용 사례가 빠르게 증가하는 추세이다(Buttimer et al., 2017). 과지는 돌연변이 발생에 따른 내성세균 극복 능력이 있고 과지사용에 따른 작물의 맛, 색, 성숙도에 대하여 영향을 끼치지 않는 강점을 가진 과지요법을 개발할 필요성 있다. 과지를 이용하여 식물병원세균을 제어하는 방법 개발은 세계적으로 관련 연구가 초기 단계이므로 곧바로 원천 기술 확보가 가능할 것으로 판단되어 국제적인 경쟁력 또한 있는 것으로 판단된다.

키위 궤양병은 키위 재배에 있어 중국, 유럽, 뉴질랜드, 대한민국 등 주요 생산국에서 가장 문제가 되는 요인으로 방제법에 대한 필요성이 매우 높다(Koh et al., 2020). 하지만, 항생제 사용의 제한으로 신규 친환경 작물보호제 개발이 시급한 상황이다. 수박 과실썩음병을 일으키는 *Acidovorax citrulli*는 종자로부터 전파되는 것으로 알려져 있으나, Streptomycin, sodium hypochlorite, Hydrochloric acid 등을 이용한 종자 소독은 세균을 완전하게 제거하지 못하거나, 발아에 영향을 줄 수 있는 것으로 알려져 있다(Zhao and Walcott, 2018). 이러한 이유로 종자발아에 영향이 없는 친환경 종자소독 혹은 종자코팅제 개발이 필요하다. 하지만, 수박 과실썩음병에 대한 다양한 연구가 진행되고 있는 외국과 달리 국내에서는 실제로 수박 과실썩음병 방제에 관한 연구는 매우 제한적이다. 토마토 풋마름병의 경우 토마토 재배에서 현재까지도 문제가 되고 있는 대표적인 세균병으로 토양을 통한 전염이 매우 흔한 경우다(Yuliar et al., 2015). 그럼에도 불구하고 항생제/구리제와 같은 화학제품이외에 이를 대체할 방법이 마땅치 않다. 배추 무름병과 토마토 궤양병도 유사한 상황이다. 이러한 이유들로 기존 화학제품 대체용 신규 친환경 작물보호제 개발이 매우 시급한 상황이다.

2. 경제·산업적 필요성

본 연구과제의 주제인 식물세균병 제어를 위한 과지요법 개발 결과는 화학농약으로 해결이 어려운 식물세균병들의 방제를 위한 작물보호제 개발의 신규 아이템 제공으로 기존 친환경 농자재 회사들의 사업분야 확장이 가능할 것이다. 과지 요법이 과수작물에 발생하는 식물세균병이나 토양세균병 등을 친환경적으로 해결하는 수단으로 이용되어 경제적 사회적 파급효과가 막대할 것이며, 동일한 방법의 생물학적 방제방법이 여타의 식물세균병 방제에 적용되는 기폭제가 될 것이다. 식물세균병 제어를 위해 사용되고 있는 항생제에 비해

파지를 이용할 경우 개발 기간을 획기적으로 단축하며 개발비용 또한 100배 이상 절약이 가능할 것이다.

키위 궤양병의 경우 최근 화분에 의한 병원세균의 오염 및 전파로 국내 거의 모든 키위 재배지에서 동시 다발적으로 병이 발생하고 있는 상황이다(Kim et al., 2016). 따라서 많은 수입화분의 폐기 및 과원의 폐원 등이 최근에 다시 진행되고 있어 친환경적인 화분 소독용과 약해가 없는 수간주사용 작물보호제 개발로 국내 키위 산업 보호에 기여할 것이다. 가지과 작물 풋마름병은 세계적으로 발병하며 토마토, 고추 가지, 담배, 감자, 파프리카, 바나나 등 그 기주범위가 가지과를 포함하여 50과 200 여종의 식물에 이르는 광범위하며 세계적으로 막대한 수량 손실을 일으키는 병이다(Peeters et al., 2013). 지구 온난화 현상에 의해 온대기후 지역에도 풋마름병이 자주 발병되어 그 피해가 점점 심각해지며 풋마름병에 의한 토마토 수확량 감소는 필리핀에선 평균 15% (*Capsicum* spp.의 경우 10%)에 이르며 유럽의 감자재배 단지에서 오염된 피경의 cutting에 의한 재배에 따라 수확량이 40%까지 감소한다는 보고가 있다(EPPO quarantine 자료). 풋마름병은 최근 우리나라의 기온 상승으로 인해 토마토, 고추, 남부지방의 감자재배 단지에서 심각한 문제가 되며, 효과적인 방제방법의 개발로 이들 산업에 기여할 것이다. 수박 과실썩음병은 1980년대 미국의 여러 주에서 상업적 수박생산에 100% 손실을 일으키면서 관심을 가지게 된 병으로서 감염에 의하여 심각한 피해를 줄 수 있는데, 국내에서는 1991년 전북 고창 수박 재배지역에서의 발생이 최초 보고된 이래 전국의 주요 수박, 멜론재배지에서 지속적으로 병발생과 그 피해가 보고되고 있다(Song et al., 2015). 특히 과실 수확 1주 전 썩에 많이 발생하고, 중요한 종자전염성 병으로 종자소독용 혹은 종자코팅용 작물보호제 개발이 시급하다. 배추 무름병에 의한 배추를 비롯한 다양한 채소/화훼 작물의 피해는 국내에서만 전체적으로 수백억원에 이를 정도로 상당한 수준이다(Myung et al., 2008). 특히 배추 재배 시 뿐만 아니라 수확, 유통 시에도 큰 피해를 주고 있다. 채소작물의 경우 생식하는 경우가 많아 화학제품 대체 친환경 작물보호제 개발이 시급한 상황이다. 토마토 궤양병의 경우 종자전염성병으로 최근 주요 토마토 재배지와 육묘장 등에서 발병이 증가하는 추세이다(Myung et al., 2008). 최근 충남 논산의 한 육묘장에서 300,000주의 토마토를 모두 폐기할 정도로 한번 발생한 경우에는 비용적인 측면에서 뿐만 아니라 육묘장 혹은 재배지의 완전 폐원으로 이르게 할 수 있다.

3. 사회·문화적 필요성

유기 합성 화학 농약 및 항생제의 이용은 토양 및 지하수 오염 등 환경문제를 유발하므로 저독성의 친환경적인 방제방법의 개발이 필수적이다. 또한, 농산물의 농약 오염에 대한 소비자의 부정적인 인식 개선을 위해서도 파지요법과 같은 친환경 작물보호제 개발이 필요하다. 항생제를 대체할 새로운 살세균 방법이 필요한 시점에서 새로운 방법으로 파지가 다시금 주목받고 있는데(Pal and Gardener, 2006), 이는 환경 친화적이면서 항생제 내성 병원세균을 제어할 수 있을 것으로 판단되기 때문이다. 이러한 파지요법은 사람, 동물, 식품 등에서 문제가 되는 병원세균 제어를 위해서도 이미 활발히 연구가 진행되고 있다(Buttimer et al., 2017).

본 연구과제의 대상 수박 과실썩음병이나 토마토 궤양병과 같은 식물세균병들은

육묘기부터 전 생육기간 동안 발생하나 주 감염원이 종자감염으로 알려져 있어, 병 발생이 그 원인 및 피해보상과 관련한 법적 책임에 대한 공방이 종종 발생하고 있다. 예를 들어 2011년 전북 고창, 2103년 경북 영주에서 발생한 수박 과실썩음병의 발생 원인에 대한 종묘회사와 농민들간의 법적분쟁이 있었다. 이러한 분쟁의 해결책으로 오염종자의 선별 및 제거가 중요하지만, 기술적인 한계로 100% 제거는 불가능하다. 따라서 종자소독을 통해 병원세균 제거가 더 효과적일 것이다.

3절. 연구개발 범위

1. 주관/제1세부연구기관(경희대학교)

가. 1차년도

(1) 키위 궤양병 방제용 파지를 이용한 병 방제 효과 온실 검정

- 현재 보유하고 있는 70여개의 파지들 중 그룹별 대표인 7개 파지를 이용하여 국내에 알려진 키위 궤양병 병원세균 Psa2와 Psa3 그룹의 균주들을 대상으로 기주 범위 재검정
- 접목된 키위(대목: 헤이워드 품종, 접수: 감수성이 높은 혜향 품종)를 온실 내 화분에서 키운 후 파지 조합별, 그리고 파지 농도별 키위 궤양병 방제효과 온실 검정
- 기존에 등록된 항생제 작물보호제(예: 아그리마이신)를 대조군으로 방제효과 비교, 분석

(2) 키위 궤양병 발병 재배지에서의 병 방제 효과 검정(위탁연구: 전남도 농업기술원)

- 기존의 키위 궤양병 발병 포장에 파지 조합별/농도별 처리를 통해 병 방제 및 치료 효과 검정
- 키위 궤양병 발병 나무에 파지 조합별/농도별 처리를 통해 병 방제 및 치료 효과 검정
- 분무, 수간주사, 토양처리와 같은 처리방법에 따른 병 방제 효과 검정

(3) 배추 무름병 방제용 파지 10개 이상 확보 및 특성 조사

- 배추를 비롯한 다양한 채소작물 재배지 토양을 샘플링하여 현재 보유하고 있는 배추 무름병 병원세균들 중 10균주를 대상으로 효과적인 10여 종 이상의 파지 신규 분리
- 제한효소 처리를 통한 분리된 파지의 게놈 패턴 분석 및 기주범위 분석을 통해 파지 그룹화
- 그룹별 파지의 전자현미경을 이용한 형태 분석 및 토양 pH, 온도, UV 등의 환경요인에 대한 안정성 검정

(4) 토마토 궤양병 방제용 파지 10개 이상 확보 및 특성 조사

- 토마토 궤양병 발병이 보고된 토마토 재배지 토양을 샘플링하여 현재 보유하고 있는 토마토 궤양병 병원세균들 중 10균주를 대상으로 효과적인 10여 종 이상의 파지 신규 분리
- 제한효소 처리를 통한 분리된 파지의 게놈 패턴 분석 및 기주범위 분석을 통해 파지 그룹화
- 그룹별 파지의 전자현미경을 이용한 형태 분석 및 토양 pH, 온도, UV 등의 환경요인에 대한 안정성 검정

나. 2차년도

(1) 키위 궤양병 방제용 파지 테라피 최적화(위탁과제팀과 공동 진행)

- 온실과 포장 조건에서 파지의 처리 시기와 처리 방법 등 결정 및 최적화
- 파지 전처리 및 후처리, 그리고 분무, 토양관주, 수간주사 등의 처리방법 검정

- 파지의 제제화 첨가물질 및 제제화 과정에서의 고려요인 등에 대한 파지 안정성의 단계별 영향 분석

(2) 파지 처리 후 미생물상의 변화 분석(제2협동연구팀과 공동 진행)

- 파지 처리 후 처리 파지에 대한 키위 궤양병 내성 균주 출현 분석
- 파지 처리 전후의 토양내 미생물상 분석

(3) 배추 무름병 방제용 파지의 방제효과 온실 검정

- 1차년도에 이어서 배추 무름병 방제용 파지의 분리 및 특성 조사 계속 진행
- 확보된 파지의 농도별, 조합별로 온실조건에서의 방제 효과 검정
- 기존에 등록된 항생제 작물보호제(예: 아그리마이신)를 대조군으로 방제효과 비교, 분석

(4) 토마토 궤양병 방제용 파지의 방제효과 온실 검정

- 1차년도에 이어서 토마토 궤양병 방제용 파지의 분리 및 특성 조사 계속 진행
- 확보된 파지의 농도별, 조합별로 대표적인 감수성 품종인 ‘베타티니’를 이용하여 온실조건에서의 방제 효과 검정
- 기존에 등록된 항생제 작물보호제(예: 아그리마이신)를 대조군으로 방제효과 비교, 분석

다. 3차년도

(1) 키위 궤양병 방제용 파지 시제품 제작 및 방제효과 검정 (위탁과제팀, 제3협동연구팀과 공동 진행)

- 제3협동팀에서 제작된 방제용 파지 시제품의 온실과 포장 조건에서의 방제효과 검정
- 시제품은 액상 혹은 분말 형태로 제작될 것이며, 균 제거후 바로 1,000배 정도로 희석해서 사용할 수 있도록 제작할 계획임.
- 대상 파지에 대한 내성균주 출현 가능성 검정: 배지상에서 처리후 검정

(2) 배추 무름병 방제용 파지 테라피 최적화

- 온실과 포장 조건에서 파지의 처리 시기와 처리 방법 등 결정
- 파지 전처리 및 후처리, 그리고 엽면살포, 토양관주 등의 처리방법 검정
- 파지의 제제화 첨가물질 및 제제화 과정에서의 고려요인 등에 대한 파지 안정성의 단계별 영향 분석

(3) 배추 무름병 파지 처리 후 미생물상의 변화 분석(제2협동연구팀과 공동 진행)

- 파지 처리 후 파지 배추 무름병 내성 균주 출현 분석
- 파지 처리 전후의 토양내 미생물상 분석

(4) 과수 화상병 방제용 파지 테라피 최적화

- 실험실 혹은 배양실 조건에서 파지의 화상병균 대상 효과 검정
- 파지의 토양 및 꽃, 잎 등 식물 표면에서의 안정성 검정
- 파지의 제제화 첨가물질 및 제제화 과정에서의 고려요인 등에 대한 파지 안정성의 단계별 영향 분석

라. 4차년도

(1) 키위 궤양병 방제용 파지 처리 후 변화 검정(제3협동팀과 공동 진행)

- 방제용 파지 처리 후 노출 환경, 저장 및 유통과정에서의 파지 활성 검정

(2) 병행요법에 의한 방제 효과 개선 분석

- 기존의 항생제나 구리수화제와의 병행요법을 통해 방제 효과 상승 및 지속 기간 검증

(3) 배추 무름병 방제용 파지 시제품 제작 및 방제효과 검증(제3협동팀과 공동 진행)

- 제3협동팀에서 제작된 방제용 파지 시제품의 온실과 포장 조건에서의 방제효과 검증
- 시제품은 액상 혹은 분말 형태로 제작될 것이며, 균 제거후 바로 1,000배 정도로 희석해서 사용할 수 있도록 제작할 계획임.

(4) 과수화상병 방제용 파지 방제효과 검증(화상병균이 검역금지균이어서 독립된 시설 필요)

- 확보된 박테리오파지의 실험실내에서의 방제효과 검증(BL2급 실험실내 성장상에서 진행 계획)
- 제3협동팀에서 제작된 방제용 파지 시제품의 실험실내에서의 방제효과 검증
- 시제품은 액상 혹은 분말 형태로 제작될 것이며, 균 제거후 바로 1,000배 정도로 희석해서 사용할 수 있도록 제작할 계획임.

2. 제1협동연구기관(부경대학교)

(가) 1차년도

(1) 수박 과실썩음병 병원세균 *Acidovorax citrulli* 균주 40개 이상 확보 및 특성 조사

- 현재 보유하고 있는 19균주 이외에 국내외 보유기관을 통한 유·무상 분양, 수박 재배지 등에서의 분리를 통하여 40 균주 이상을 확보함
- 토양 또는 식물체 등으로부터의 분리를 위해서는 Kubota *et al* [Gen. Plant Pathol. (2011) 77:112 - 115]의 논문에 나와 있는 incomplete selective medium을 이용하여 분리.
- 분리된 균주에 대해서는 Zivanovic and Walcott [Phytopathology (2017) 107(1): 29-35]의 primer를 이용하여 확인 및 genetic grouping을 실시(Group I, II, 또는 putative type III)
- 확보된 균주에 대해서는 수박과 멜론에 대한 병원성 검증을 실시하며, 배양액에 대한 Mytomyacin C 처리에 의하여 내재하는 프로바이러스 확인.

(2) 수박 과실썩음병 방제용 파지 10개 이상 확보 및 특성 조사

- 현재 보유하고 있는 4개 이외에 수박 등의 재배지 또는 식물체에서 신규 6종 이상 파지 분리
- 분리를 위해서는 그룹 I, II, III에 해당하는 숙주를 혼합한 배양액에 시료 현탁액을 첨가하여 파지 개체수를 늘린 후 플라크 분리법을 이용하여 파지 순수 분리
- 분리된 파지는 확보된 40균주의 *A. citrulli*를 대상으로 감염성을 조사
- 감염성이 우수한 파지에 대하여는 성장 곡선, burst size, pH 및 온도 등에 대한 안정성 등 조사
- 파지의 대량 생산 및 순수분리 후 전자현미경을 이용한 형태관찰, 계놈의 염기서열 분석 등 계놈에 대한 분자생물학적 특성 조사

(3) 분리된 파지를 이용한 수박 과실썩음병의 방제 효과 온실 검증

- *A. citrulli*에 대한 용균 능력이 탁월한 파지를 대상으로 수박 과실썩음병의 예방효과를 온실에서 실시

- 순수 분리된 파지로 수박 종자를 코팅 후 파종하고 발아율 등을 조사하여 코팅이 식물에 미치는 영향 조사
- 파지로 코팅된 종자 파종과 *A. citrulli* 접종 발병률 조사에 의한 파지 테라피의 효율 검증

나. 2차년도

(1) 수박 과실썩음병 대상 파지의 처리 시기 및 처리 방법의 최적화

- 파지를 이용한 수박종자 코팅 방법(농도, 코팅 시간)에 따른 방제 효과 비교 분석
- 파지의 단일 코팅과 혼합 코팅에 의한 수박 과실썩음병 발병 억제 효과의 비교 실험을 통하여 코팅에 적절한 조건 확립
- 파지의 토양 (육묘 상토 또는 식재 토양) 처리 시 파지의 안정성 및 병발생 억제 효과를 검증하여 종자 코팅 이외의 처리 방법 개발
- 수박 육묘에 *A. citrulli*를 접종하기 전 또는 접종 후 파지를 처리하여 예방 또는 치료 효과를 조사하여 종자 코팅 이외의 현장 적용성 검토

(2) 수박 과실썩음병 파지 제재화 고려요인의 효과 분석

- 제재화 물질에 대한 종자 및 파지의 안정성을 조사하기 위하여, 파지와 제재용 물질을 혼합한 후 플라크 분석법을 통하여 파지에 대한 영향 조사
- 제재화 여부에 따른 바이러스의 안정성을 알아보기 위하여, 제재로 처리한 파지에 UV, 다양한 pH 및 온도 조건을 준 후 플라크 분석법을 통하여 파지의 안정성에 미치는 영향분석

다. 3차년도

(1) 수박 과실썩음병 제재 시제품의 온실 및 포장 실증실험

- 2차년도에 참여기업이 제작한 파지 시제품에 대하여 온실 및 포장에서의 방제 효과를 검증함
- 시제품은 종자 코팅용 제품과 육묘장 또는 농장에서 사용할 수 있는 2가지 형태로 제작될 예정임
- 종자 코팅용 시제품의 경우 파지로 코팅된 수박 종자를 파종한 후 병원균인 *A. citrulli*를 접종한 후 종자의 발아율과 감염율을 파지 코팅 처리하지 않은 종자와 비교함
- 육묘장 또는 농장에서의 파지 시제품의 경우 육묘토양, 발아육묘, 이식된 식물체에 파지 시제품을 처리하기 전 또는 이후에 병원균인 *A. citrulli*를 접종하고 이에 병의 발생을 조사하여 개발된 시제품들의 수박 과실 썩음병의 예방 또는 치료 효과를 검증할 예정임

(2) 파지 시제품을 이용한 멜론에서의 예방 및 치료 효과 검증

- 수박 과실썩음병은 수박뿐만 아니라 멜론에서도 중요한 병으로 경제적 손실을 일으키고 있음
- *A. citrulli*의 유전자형 구별에서 group I은 주로 멜론에, group II는 주로 수박에 병을 일으키는 것으로 알려져 있으며, 현재 분리된 모든 파지는 group I과 group II 모두에 감염 가능함
- 따라서 개발된 종자 코팅제와 엽면 살포용 시제품을 수박에서와 같은 방법으로 처리한 후 멜론에서의 방제 효과를 검증할 예정임

라. 4차년도

(1) 수박 과실썩음병 파지 제재의 안정성 검증

- 2차년도에 참여기업이 제작한 파지 시제품의 유통 및 저장 과정에서의 안정성을 조사하기 위하여 다양한 조건 (온도, 햇빛 노출 등)에서 보관하며 플라크 분석을 통한 파지의 활성을 조사
- 시제품을 토양 중에 처리한 후 처리된 토양에서의 바이러스의 활성을 조사

- 엽면 살포 후 일정 시간 간격으로 파지 재분리 실험을 수행하여 파지의 유지기간 및 이에 따른 살포 간격 등에 대한 최적 조건 확립

(2) 병행 요법에 의한 방제 효과 향상

- 종자 코팅 시 구리 제제 또는 streptomycin과 같은 항생제를 함께 처리하였을 경우의 방제 효과가 향상되는 지를 조사함
- 일차적으로 이들 물질에 대한 파지의 안전성을 조사하고 병행 처리 시 최적 농도 결정
- 종자 코팅 또는 엽면 살포에서 파지 단일제제와 병행 처리에서의 효과를 비교 검증

3. 제2협동연구기관(동아대학교)

(가) 1차년도

(1) 토마토 풋마름병 방제용 파지의 추가 확보 및 기주범위 분석

- 국내 가지과 작물 재배토양으로부터 현재 보유하고 있는 국내의 토마토 풋마름병 병원세균을 대상으로 신규 파지의 분리(기존의 방법처럼 *R. solanacearum* enrichment 방법을 통해 분리)
- 토마토, 고추, 가지, 담배를 감염하는 풋마름병균 10종을 대상으로 분리한 파지의 감염성을 바탕으로 기주범위를 분석함 분석
- 분리한 기주 계놈의 제한효소처리, RNase, S1 nuclease 처리를 통한 계놈의 유형분석 및 각 유형별 파지의 정제 및 전자현미경 관찰
- 광범위 기주의 용균형 파지를 대상으로 pH, 온도 등에 대한 안정성 및 풋마름병 방제효과를 분석함

(2) 토마토 풋마름병 방제용 파지의 농도별/종류별 풋마름병 방제효과 검증

- 토양 관주에 의한 병 방제효과를 파지 농도에 따라 파지 종류에 따라 온실에서 검정함
- 기존에 분리한 파지와 신규로 분리한 파지에 대하여 토마토 유묘에서 풋마름병에 대한 방제효과를 분석함
- 풋마름병 방제효과는 대조구로 스트렙토마이신 처리하며 병 발생 index를 비교하여 우수 파지를 선발함
- 풋마름병 처리는 토양관주법에 의한 접종을 시도하며 본 연구실에서 확립한 병원균 농도 수준에서 파지의 농도별/종류별 방제효과를 검정함
- 파지의 전처리에 의한 예방효과와 후처리에 의한 치료효과를 검정함

나. 2차년도

(1) 토마토 풋마름병 방제용 파지의 처리방법 최적화

- 1차년도에 이어 토양 관주에 의한 병 방제효과를 파지 농도에 따라 파지 종류에 따라 온실에서 검정함
- 풋마름병 방제효과는 대조구로 스트렙토마이신 처리하며 병 발생 index를 비교하여 우수 파지를 선발함
- 토양관주법에 의한 파지의 예방효과/치료효과를 기반으로 다양한 파지 안정제를 포함한 제제를 액제형 또는 수화제형으로 준비하여 희석 농도별 방제효과를 검정함
- 외과다당류를 생산하지 못하는 자연 변이체를 기주로 이용하여 파지를 증식하고 포장에 처리하는 방법을 시도함: 지속적인 계대배양에 따른 eps- *R. solanacearum* 변이체 확보와 변이 표현형의 안정성 검정
- 변이체의 토마토 풋마름병 병원성 검정을 통한 파지 전달의 기주로서 효용성 평가

(2) 파지 혼합에 의한 방제효과 검정

- 기존에 분리한 파지와 신규 선발한 파지를 이용하여 파지 혼합물을 준비하여 온실에서 방제 효과 검정함
- 파지 혼합물의 혼합별/농도별 방제효과를 3차년도 초반까지 지속적으로 검정

다. 3차년도

(1) 선발파지 및 파지 혼합에 의한 방제효과 검정

- 2차년도에 선발한 파지 또는 파지의 혼합물의 처리방법에 따라 온실에서 토마토 풋마름병의 방제효과를 검정함
- 파지의 혼합물의 경우 액제와 수화제형 종류와 희석농도에 따른 방제효과를 반복 확인함
- 2차년도 선발한 변이체에 파지를 감염시켜 처리하는 방법을 위해 파지와 기주세균의 적정 혼합농도 결정
- 항생제 스트렙토마이신을 대조구로 처리하여 비교함

(2) 토마토 풋마름병 방제용 파지의 저장성 검정

- 선발한 토마토 풋마름병 방제용 파지의 온도별, pH 별 파지의 감염능력을 기준으로 저장 시간에 따른 감염력을 pfu 기준으로 정량화하여 평가함
- 선발한 제형에 따른 파지의 실온에서 저장 안정성을 파지의 기주세균 감염능력을 기준으로 정량화하여 검정함
- 선발한 파지의 제품화를 위한 파지의 제품화 기준을 모두 확립함

라. 4차년도(제3협동기관의 위탁기관으로 과제 수행)

(1) 토마토 풋마름병 방제용 파지의 저장성 검정

- 혼합 파지의 제형에 따른 각 파지의 저장 안정성을 3차년도와 동일한 방법으로 검정함
- 선발한 파지 제형 시제품의 저장성 검정과 파지 혼합물의 저장성의 비교

(2) 토마토 풋마름병 방제용 파지의 토양 생존률 검정

- 선발한 파지와 파지의 제형을 건전토양과 풋마름병 발병 토양 처리후 파지의 활성을 시간별로 검정함
- 이를 위해 토양을 획득하여 멸균 또는 비멸균 토양에 파지를 처리후 토양을 시기별로 채취하여 파지의 활성을 plaque 형성을 정량화하여 검정함
- 토마토 풋마름병 방제효과 검정과 동일한 방법으로 파지 처리후 건전식물의 근권에서 파지의 활성을 시간별로 검정하여 토양 및 토마토 근권에 파지의 생존률을 검정함

4. 제3협동연구기관(고려바이오(주))

(가) 1차년도

(1) 파지의 제제화 고려요인 분석

- 주관/제1세부, 제1, 2협동연구팀에서 보유하고 있는 키위 궤양병, 수박 과실썩음병, 토마토 풋마름병 방제용 파지들을 분양받아 파지 대량증식 및 제제화 시 고려요인 분석을 진행

(2) 안정제, 부형제, 효력증진제, 동결보호제 등 보조제 선발

- 분양받은 파지에 대해 효력증진을 위한 보조제를 선별하고, 제형화를 위한 안정제, 부형제 등을 농도별로 시험하여 최적의 보조제를 선별. 또한 제형에 따라 고착제, 유화제, 물성조정제 등의 시험을 통해 각각의 파지에 맞는 제형별 보조제를 선별

(3) 제제화 및 제형화(액상 또는 분말) 공정 최적화

- 선별된 보조제에 대해 파지별 농도를 결정하고, 각각의 파지에 적합한 제형을 결정.
- 각각의 보조성분들과 파지와 다양한 조건에서 안정성을 확인하고 이에 맞는 최적의 공정, 배합을 결정

나. 2차년도

(1) 온도, 배양시간, 산업용 배지 등 생산최적화 조건 확립

- 선별된 파지의 상업화를 위한 최대 배양성 확보시험(배지, 배양조건 등)을 실시하여, 기초 산업배지에서의 배양능을 평가하고 각각의 파지별 생산최적화 조건을 확립

(2) 파지별 대량생산 공정 최적화 확립

- 파지별 특성 분석을 토대로 250L, 1ton Fermenter에서 산업용 배지 및 배양 조건을 활용한 배양수율, 유효성분 최적화 등 대량생산을 위한 공정 최적화 확립

(3) 파지활성, 안정성 확인 / 개발제품 이화학적, 경시적 안정성 확인

- 시제품의 유통기한 확립을 위한 조건별 경시적 안정성을 조사
- 보관 온도를 달리하여 파지의 활성, 물리/화학적 물성변화 및 생물학적 변화를 경시적으로 확인

(4) 시제품 제조

- 파지별 대량생산 공정에 따라 각각의 시제품을 제조

다. 3차년도

(1) 시제품의 농가실증시험 1 (처리농도, 처리방법 등 농가적용방법 최적화)

- 파지별 시제품에 대해 실제 농가포장 수준에서 대상병해, 작물별 최적 처리농도 구명 시험을 실시하고, 처리시기, 처리간격 및 처리횟수 등 최적의 처리방법 확립을 위한 시험 진행하여 농가적용방법을 최적화

(2) 제품화를 위한 공인기관시험 1

- 파지별 시제품에 대한 공인기관의 시험(효과평가시험, 미생물관련시험, 안전성 시험 등)을 진행

(3) 제품화 및 사업화 연구 1

- 개발 시제품의 초기 상업화를 위한 국내외 전시회 홍보, 경쟁제품군과 화학농약과의 비교 평가를 실시하고, 사업성, 경제성 분석을 통해 사업화 연구

라. 4차년도

(1) 시제품의 농가실증시험 2 (처리농도, 처리방법 등 농가적용방법 최적화)

- 파지별 시제품에 대해 실제 농가포장 수준에서 대상병해, 작물별 최적 처리농도 구명 시험을 실시하고, 처리시기, 처리간격 및 처리횟수 등 최적의 처리방법 확립을 위한 시험 진행하여 농가적용방법을

최적화

(2) 제품화를 위한 공인기관시험 2

- 파지별 시제품에 대한 공인기관의 시험(효과평가지험, 미생물관련시험, 안전성 시험 등)을 진행

(3) 제품화 및 사업화 연구 2

- 개발 시제품의 초기 상업화를 위한 국내외 전시회 홍보, 경쟁제품군과 화학농약과의 비교 평가를 실시하고, 사업성, 경제성 분석을 통해 사업화 연구

2장. 연구수행 내용 및 결과

1절. 연구 방법

1. 연구개발 추진전략 및 방법

가. 추진전략

(1) 연구기관별 담당 연구내용

본 연구과제에서는 기 보유한 파지를 이용한 식물세균병 대상 방제를 우선하였다. 경희대(주관/제1협동기관)는 키위 궤양병 방제용 파지 방제제 개발을, 부경대(제1협동기관)은 수박 과실썩음병 방제용 파지 방제제 개발을, 동아대(제2협동기관)는 토마토 풋마름병 방제용 파지 방제제 개발을, (주)고려바이오(산업체, 제3협동기관)에서는 주관/협동기관으로부터 제공되는 파지들을 대상으로 대량증식 및 제제화 관련 연구 담당하였다.

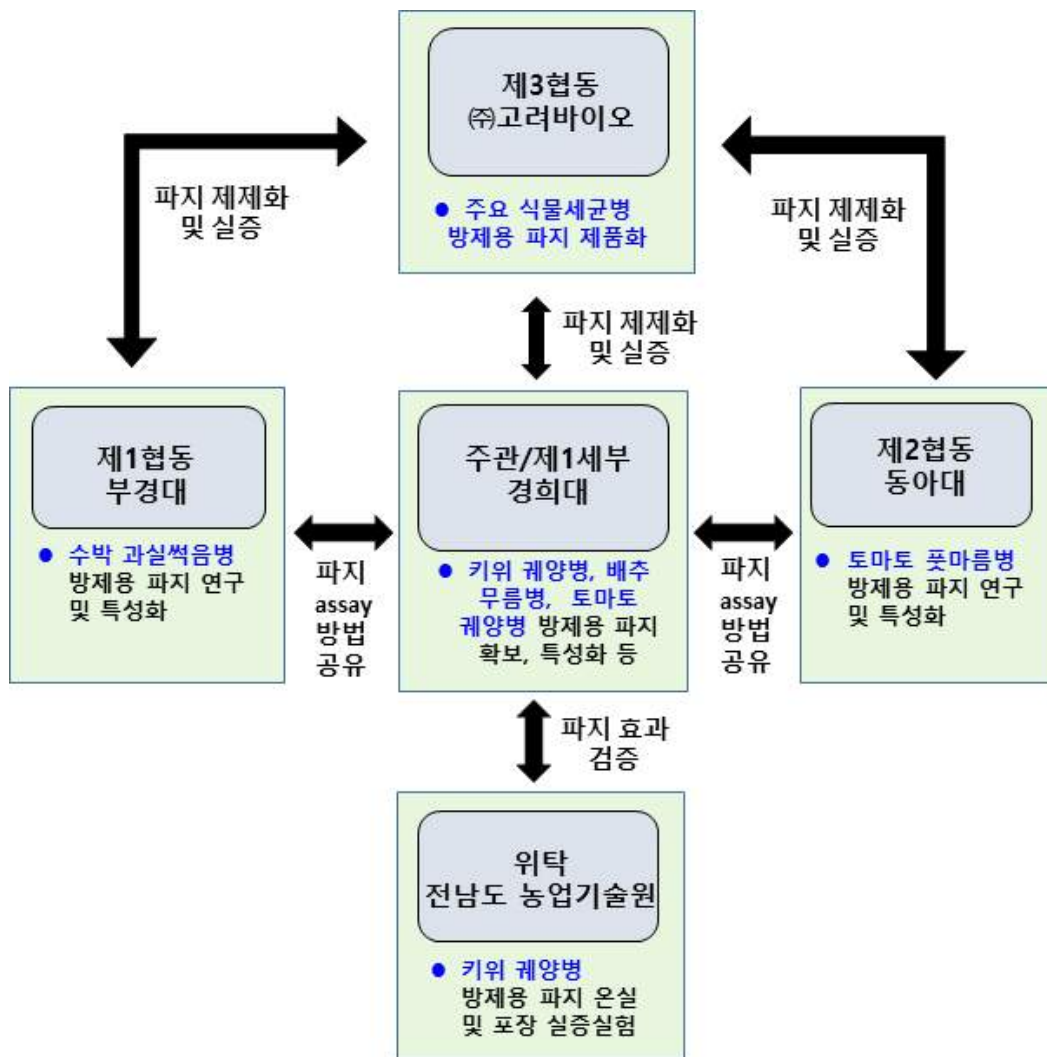


그림 3. 연구팀간 연구협력 체계도

(2) 파지 관련 기술정보 수집

주관기관을 비롯한 대학 연구팀들의 경우 논문이나 학술발표 등의 자료들을 통해 신규 파지 및 그들의 효과에 대한 기술 정보를 수집하였고, 참여기업의 경우는 특허 분석을 통해 지속적으로 파지 관련 기술정보 수집하였다. 이들의 정보들은 모든 참여 연구팀이 공유할 수 있도록 정기적인 연구팀 미팅을 통해 공유하였다.

(3) 연구팀간 연구진행 상황 공유

정기적인 연구팀 미팅을 진행하여 연구팀의 연구진행 상황을 상시적으로 모니터링하였고, 연구팀간 정보 공유를 통해 모든 연구팀에서 연구진행상의 균형을 맞출 수 있도록 하였다.

나. 추진방법

(1) 파지 분리 방법

파지의 신규 분리를 위해서는 대상 작물의 재배지 토양, 특히 병이 발병되었던 재배지 토양과 그 주변의 식물잔재, 물 등을 샘플링하고, 이들로부터 분리하였고, 파지가 형성하는 plaque의 형태에 따라 다양하게 분리를 진행하였다(그림 참조).

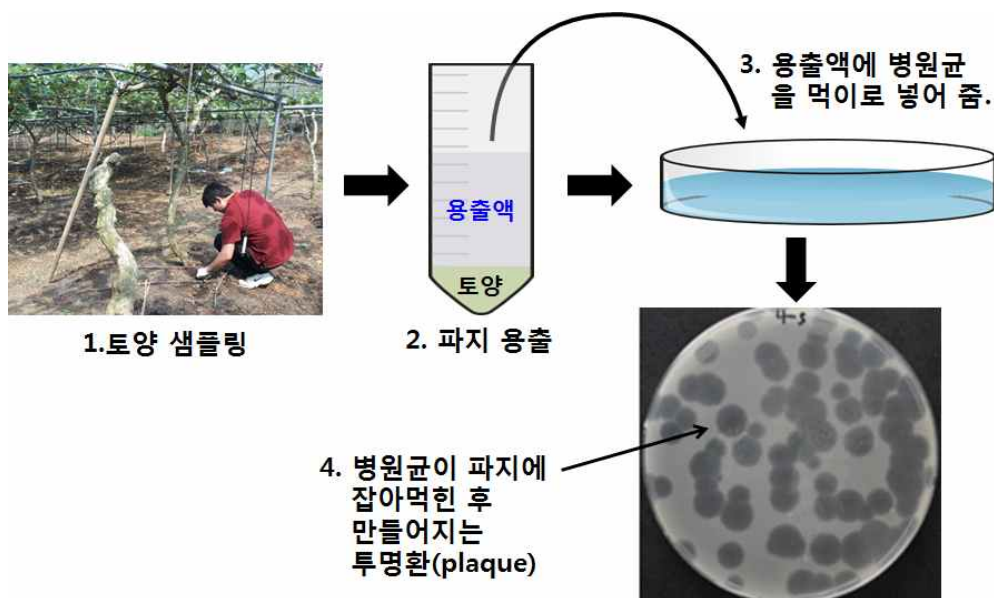


그림 4. 전체적인 파지의 분리 및 bioassay 과정

(2) 파지 bioassay 방법

파지의 bioassay는 대상 병원세균과의 overlay 방법에 의한 plaque 형성 유무로 진행하였다(Park et al., 2018). 간단히 대상 병원세균과 특정 농도의 파지를 섞어서 배지에 overlay 하는 방식으로 진행하였다. 파지의 농도는 원액을 희석하여 동일한 방식으로 진행함으로써 계산이 가능하도록 하였다. 1ml 당 plaque forming unit인 pfu/ml을 사용하여 농도를 표시하였다.

(3) 파지 방제 효과 검정(온실 검정)

파지의 방제 효과 검정을 위해 우선적으로 온실에서 검정을 실시하였다. 1차적으로 $10^7 \sim 10^8$ pfu/ml 정도의 농도로 효과 검정을 진행하였고, 연구 결과에 따라 농도별로 방제 및 치료 효과를 검정하였다. 구체적인 진행은 작물별로 최적화하여 진행하였고, 2절 연구내용 및 결과 부분에 상세히 기록하였다.

(4) 파지의 대량 증식 및 제제화

주관/협동기관으로부터 제공받은 각각의 파지들을 대상으로 상업화를 위한 최대 배양성 확보 시험(배지조건, 배양조건 등)을 실시하여 기초 산업배지에서의 배양능을 평가하고, 대용량 발효기에서 상업용 배지 및 배양조건을 활용한 배양수율, 유효성분 최적화 등을 통해 대량생산을 위한 최적화 조건을 확립하였다. 또한 각각의 파지들의 특성에 따라 효과적인 처리농도 기준으로 제품 내 파지의 농도를 결정하고 파지의 특성에 맞는 제형을 결정하고 그에 따른 효력증진을 위한 보조제를 선별하였다. 보조제는 안정제, 보습제, UV차단제, 확산제, 고착제, 유화제, 물성조정제 등의 시험을 진행하였다. 각각의 보조성분들과 파지에 대해 다양한 조건에서의 안정성을 확인하고 이에 맞는 배합을 결정하여 최적의 제제화/제형화 조건을 확립하였다.

2. 연구개발 추진체계

본 연구과제 수행을 위한 추진체계는 아래와 같다.



그림 5. 연구개발 추진체계

3. 연구개발 추진 일정

본 연구과제 수행을 위한 연차별 추진 일정은 아래와 같다.

1차년도															
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	키위 궤양병 방제용 파지를 이용한 병 방제 효과 온실 검정				■	■	■	■						30,000	오창식 (경희대)
2	키위 궤양병 발병 재배지에서의 병 방제 효과 검정				■	■	■							15,000	오창식 (경희대)
3	배추 무름병 방제용 파지 10개 이상 확보 및 특성 조사				■	■	■	■	■	■	■	■	■	15,000	오창식 (경희대)
4	토마토 궤양병 방제용 파지 10개 이상 확보 및 특성 조사				■	■	■	■	■	■	■	■	■	15,000	오창식 (경희대)
5	<i>A. citrulli</i> 균주 확보 및 특성 조사				■	■	■	■	■					15,000	최태진 (부경대)
6	<i>A. citrulli</i> 감염 파지 분리 및 특성 연구					■	■	■	■	■				25,000	최태진 (부경대)
7	파지를 이용한 수박 과실썩음병 방제 효과 온실 검정									■	■	■	■	20,000	최태진 (부경대)
8	토마토 풋마름병 방제용 파지의 추가 확보 및 기주범위 분석				■	■	■	■	■	■	■	■	■	20,000	동아대 (이선우)
9	토마토 풋마름병 방제용 파지의 농도별/종류별 풋마름병 방제효과 검정					■	■	■	■	■	■	■	■	25,000	동아대 (이선우)
10	선발된 파지의 제제화 고려요인 분석				■	■	■							10,000	최재필 (고려바이 오)
11	보조제 선발					■	■	■	■	■	■	■	■	20,000	최재필 (고려바이 오)
12	제제화/제형화 공정 최적화						■	■	■	■	■	■	■	15,000	최재필 (고려바이 오)

2차년도																
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1	키위 궤양병 방제용 파지 테라피 최적화		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	30,000	오창식 (경희대)
2	파지 처리 후 미생물상의 변화 분석								■	■	■	■	■	■	20,000	오창식 (경희대)
3	배추 무름병 방제용 파지의 방제효과 온실 검정	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	25,000	오창식 (경희대)
4	토마토 궤양병 방제용 파지의 방제효과 온실 검정	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	25,000	오창식 (경희대)
5	수박 과실썩음병 파지 처리 시기 및 방법 최적화	■	■	■	■	■	■	■	■	■					40,000	최태진 (부경대)
6	수박 과실썩음병 파지 제재화 고려 요인 효과 분석								■	■	■	■	■	■	30,000	최태진 (부경대)
7	토마토 풋마름병 방제용 파지의 처리방법 최적화	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	25,000	동아대 (이선우)
8	파지 혼합에 의한 방제효과 검정						■	■	■	■	■	■	■	■	25,000	동아대 (이선우)
9	생산최적화 조건 확립	■	■	■	■										30,000	최재필 (고려바이 오)
10	파지별 대량생산공정 최적화 확립			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	30,000	최재필 (고려바이 오)
11	활성 및 안정성 확인			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	10,000	최재필 (고려바이 오)
12	시제품 제조										■	■	■	■	10,000	최재필 (고려바이 오)

3차년도																
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1	키위 궤양병 방제용 파지 시제품 제작 및 방제효과 검정														30,000	오창식 (경희대)
2	배추 무름병 방제용 파지 테라피 최적화														25,000	오창식 (경희대)
3	과수 화상병 방제용 파지 테라피 최적화														25,000	오창식 (경희대)
4	배추 무름병 파지 처리 후 미생물상의 변화 분석														20,000	오창식 (경희대)
5	수박 과실썩음병 제재 시제품의 온 실 및 포장 실증 실험														35,000	최태진 (부경대)
6	파지 시제품을 이 용한 멜론에서의 예방 및 치료 효 과 검증														25,000	최태진 (부경대)
7	선발파지 및 파지 혼합에 의한 방제효과 검정														25,000	동아대 (이선우)
8	토마토 풋마름병 방제용 파지의 저장성 검정														25,000	동아대 (이선우)
9	시제품의 농가실증시험 1														10,000	윤여준 (고려바이 오)
10	제품화를 위한 공인기관시험 1														60,000	윤여준 (고려바이 오)
11	사업화 연구 1														20,000	윤여준 (고려바이 오)

4차년도																
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1	키위 궤양병 방제용 파지 처리 후 변화 검정	■	■	■	■	■	■								15,000	오창식 (경희대)
2	병행요법에 의한 방제 효과 개선 분석			■	■	■	■	■	■	■	■	■			15,000	오창식 (경희대)
3	배추 무름병 방제용 파지 시제품 제작 및 방제효과 검정	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	20,000	오창식 (경희대)
4	과수 화상병 방제용 파지 방제효과 검정	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	20,000	오창식 (경희대)
5	수박 과실썩음병 파지 제제의 안정 성 검증	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■			30,000	최태진 (부경대)
6	병행 요법에 의한 방제 효과 향상					■	■	■	■	■	■	■	■	■	30,000	최태진 (부경대)
7	토마토 풋마름병 방제용 파지의 저장성 검정	■	■	■	■	■	■	■							10,000	동아대 (이선우)
8	토마토 풋마름병 방제용 파지의 토양 생존률 검정					■	■	■	■	■	■	■	■	■	10,000	동아대 (이선우)
9	시제품의 농가실증시험 2	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■			15,000	윤여준 (고려바이 오)
10	제품화를 위한 공인기관시험 2							■	■	■	■	■	■	■	110,000	윤여준 (고려바이 오)
11	제품화 및 사업화 연구 2					■	■	■	■	■	■	■	■	■	25,000	윤여준 (고려바이 오)

2절. 연구 내용 및 결과(세부/협동 과제별로 구체적인 연구내용 및 결과 작성)

1. 키위 궤양병, 배추 무름병, 토마토 궤양병 방제용 파지요법 기술 개발[주관/제1세부연구(경희대)]

가. 키위 궤양병 방제용 박테리오파지 연구

(1) 키위 궤양병 파지의 기주 범위 검정

기준에 확보 중인 70여개의 키위 궤양병 파지 중, 계능 및 기주범위 분석을 통해 분류한 7개의 대표적 파지를 대상으로 보다 넓은 범위의 대상 균주들을 대상으로 기주 범위를 재검정하였다. 선정한 7개의 파지는 국내에서 분리된 다양한 키위 궤양병 균주를 포괄적으로 기주로 하는 것을 기준에 확인한 바 있다. 이에 더 넓은 범위의 식물병원세균을 대상으로 기주 범위 검정을 실시하여 선별한 7개의 파지가 키위 궤양병 이외의 식물병 방제 및 치료에 효과적일 수 있음을 확인하였다(표 15).

표 13. 키위 궤양병 파지의 기주 범위

No	식물병원세균	세균기주	키위 궤양병 파지							
			Φ3 2	Φ3 3	Φ3 4	Φ3 8	Φ4 4	Φ5 9	Φ7 4	
1	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>antirrhini</i> KACC 10392	Snapdragon	-	○	○	○	○	○	○	○
2	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>aptata</i> KACC 12132	Sugar beet and garden beet	○	○	○	○	○	○	○	○
3	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>atrolaciens</i> KACC 11626	Wheat	○	○	○	○	○	○	○	○
4	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>atropurpurea</i> DSM 50255	Smooth brome garss	○	○	○	○	○	○	○	○
5	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>berberidis</i> KACC 12850	Japanese barberry	○	-	-	○	-	○	○	○
6	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>ciccaronei</i> KACC 12841	Carob tree	○	○	○	○	○	○	○	○
7	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>coronafaciens</i> KACC 12133	Oat and rye	○	○	○	○	○	○	○	○
8	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>coronafaciens</i> KACC 13262	Oat and rye	○	○	○	○	○	○	○	○
9	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>delphinii</i> KACC 10394	New Zealand mahogany	-	-	○	-	○	○	○	○
10	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>dysoxylis</i> KACC 12842	New Zealand mahogany	○	○	○	○	○	○	○	○
11	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>eriobotryae</i> KACC 10395	Loquat	○	-	○	○	○	○	○	○
12	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i> KACC 10398	Coffee	-	-	-	○	○	○	○	○
13	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>glycinea</i> ATCC 8727	Soybean	-	○	○	○	-	○	○	○
14	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>helianthi</i> KACC 11618	Sunflower	○	○	○	○	○	○	○	○
15	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>japonica</i> KACC 11638	Rye	○	○	○	○	○	○	○	○
16	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lapsa</i> KACC 12216	Corn	○	○	○	○	○	○	○	○
17	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i> KACC 11617	Cruciferae members	-	○	○	○	-	○	○	○

18	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i> KACC 11637	Cruciferae members	-	-	0	-	0	0	0
19	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i> LMG 5071	Cruciferae members	0	0	0	0	0	0	0
20	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>mellea</i> KACC 12844	Tobacco	0	-	0	0	0	0	0
21	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>mori</i> KACC 10390	Mulberry	-	-	0	0	0	0	0
22	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i> DSM 50277	Cherry	0	-	0	0	-	0	-
23	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i> KACC 10397	Cherry	0	0	0	0	0	0	0
24	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>myricae</i> KACC 12845	Yamamomo/ Chinese bayberry	0	0	-	0	0	0	0
25	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>panici</i> KACC 11619	Broomcorn millet	0	0	0	0	0	0	0
26	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>papulans</i> LMG 5077	European crabapple	-	-	0	0	0	0	0
27	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>papulans</i> LMG 5571	European crabapple	-	-	0	0	0	0	0
28	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>passiflorae</i> KACC 12846	Passion fruit	-	-	0	0	0	0	0
29	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> NPS 3121	Common bean	0	0	0	-	0	0	0
30	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>pisi</i> KACC 11620	Pea	0	0	-	0	0	0	0
31	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>pisi</i> LMG 5679	Pea	0	0	0	0	0	0	0
32	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>pisi</i> LMG 8612	Pea	0	0	0	0	0	0	0
33	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> DSM 10604	Lilac	0	0	0	0	0	0	0
34	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i> DSM 1856	Tobacco	0	0	0	0	0	0	0
35	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i> KACC 10388	Tobacco	-	-	0	-	-	0	0
36	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tagetis</i> KACC 10389	Marigold	0	-	0	0	-	0	0
37	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>theae</i> LMG 5092	Tea	0	0	0	0	0	0	0
38	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000	Tomato	-	0	0	0	-	0	0
39	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DSM 50315	Tomato	0	0	0	0	0	0	0
40	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>ulmi</i> KACC 11633	Elm	-	0	-	0	0	0	0
41	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> SHPS 005	Apple	0	0	0	0	0	0	0
42	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> SHPS 0056	Apple	0	0	0	0	0	0	0
43	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> SHPS 007	Apple	0	0	0	0	0	0	0
44	<i>Pseudomonas syringae</i> pv.	Apple	0	0	0	0	0	0	0

	<i>syringae</i> SHPS 022								
45	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> WSPS 039	Apple	O	O	O	O	O	O	O
46	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> WSPS 042	Apple	O	O	O	O	O	O	O
47	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> WSPS 048	Apple	O	O	O	O	O	O	O
48	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> WSPS 050	Apple	O	O	O	O	O	O	O

선별한 7개의 파지는 키위 궤양병 세균 (*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, 이하 Psa) 이외에도 35~48개의 유사 식물병원세균을 기주로 하기 때문에, 키위 이외에도 다양한 작물에 대하여 활용될 가능성이 있다.

(2) 키위 궤양병 방제용 파지를 이용한 병 방제 효과 온실 검정

키위는 덩굴성 식물이기 때문에 간이로 온실에서 재배할 수 있는 환경을 조성하여 키위 궤양병이 인공적으로 발생할 수 있도록 그림 5와 같이 세팅하였다. 키위는 농가에서 재배하는 방법으로 접목된 키위(대목: 헤이워드 품종, 접수: 키위 궤양병에 감수성이 높은 해향 품종)를 사용하였고, 화분에 심어 온실 환경에 2주 이상 적응시켜 건전한 개체들을 사용하였다.

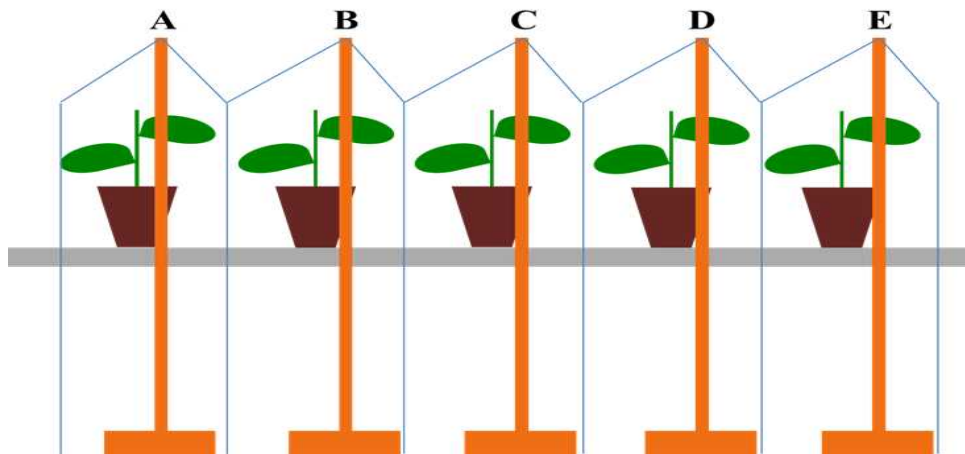


그림 6. 온실에서 간이로 키위를 재배하고 파지 및 병원균을 처리하는 모식도. 재배상(회색) 양 끝에 나무지지대(주황색)를 설치하여 끈을 연결하고 비닐(파란색)을 덮어 각 처리군을 구분지음. A, SM buffer + 10mM MgCl₂; B, SM buffer + Psa 10⁸ cfu/ml; C, 10⁷ pfu/ml 파지 + Psa 10⁸ cfu/ml; D, 10⁸ pfu/ml 파지 + Psa 10⁸ cfu/ml; E, 아그리마이신 0.65g/L + Psa 10⁸ cfu/ml.

키위 궤양병 세균을 처리하기 전이나 후에 SM buffer(파지를 희석한 완충용액, 이하 버퍼), 10⁷ pfu/ml과 10⁸ pfu/ml 농도의 파지각테일(선행연구에서 키위 궤양병 세균에 가장 효과적이었던 ϕ34, ϕ38, ϕ44를 섞어서 제조), 대조군이 될 항생제 아그리마이신(0.65g/L)을 처리하였다. 키위 궤양병 세균은 10⁸ cfu/ml 로 처리하였다. 키위 궤양병 세균을 처리하기 전에 파지를 전처리한 처리군은 파지의 병 방제효과를, 파지를 후처리한 처리군은 파지의 병 치료효과를 보기 위한 셋팅이었는데, 결과적으로 파지각테일은 키위 궤양병 치료효과보다는 키위 궤양병 방제에 탁월한 효과가 있음을 확인하였다(그림 6).

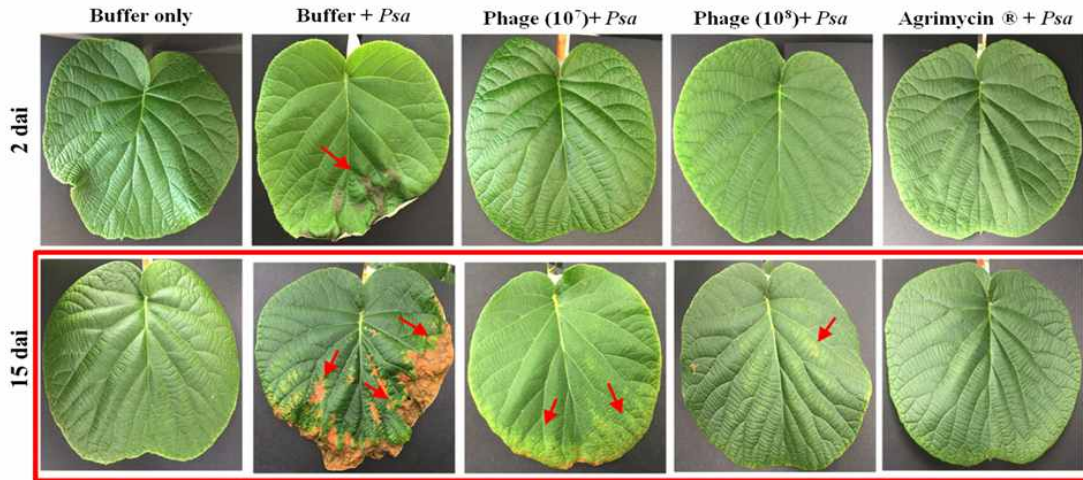


그림 7. 파지 전처리 후 키위 궤양병 발생 억제 모습. 화살표는 잎 반점 병징.

농가에서 한가지의 파지만 처리할 경우 키위 궤양병 세균이 내성을 가질 수 있기 때문에 선행연구에서 그 효과가 좋았던 세 개의 파지를 선별하여 각테일로 제작하였다. 선별한 파지들은 선행연구를 통해 온도, UV, pH 등의 부분에서 자연적으로 발생할 수 있는 환경에서는 매우 안정적임을 확인한 바 있다. 이번 검정에서는 10^7 pfu/ml 과 10^8 pfu/ml 의 농도로 병원세균을 처리하기 전에 처리하였을 때 파지 농도에 비례하여 병 방제효과가 있음을 확인하였다 (그림 7).

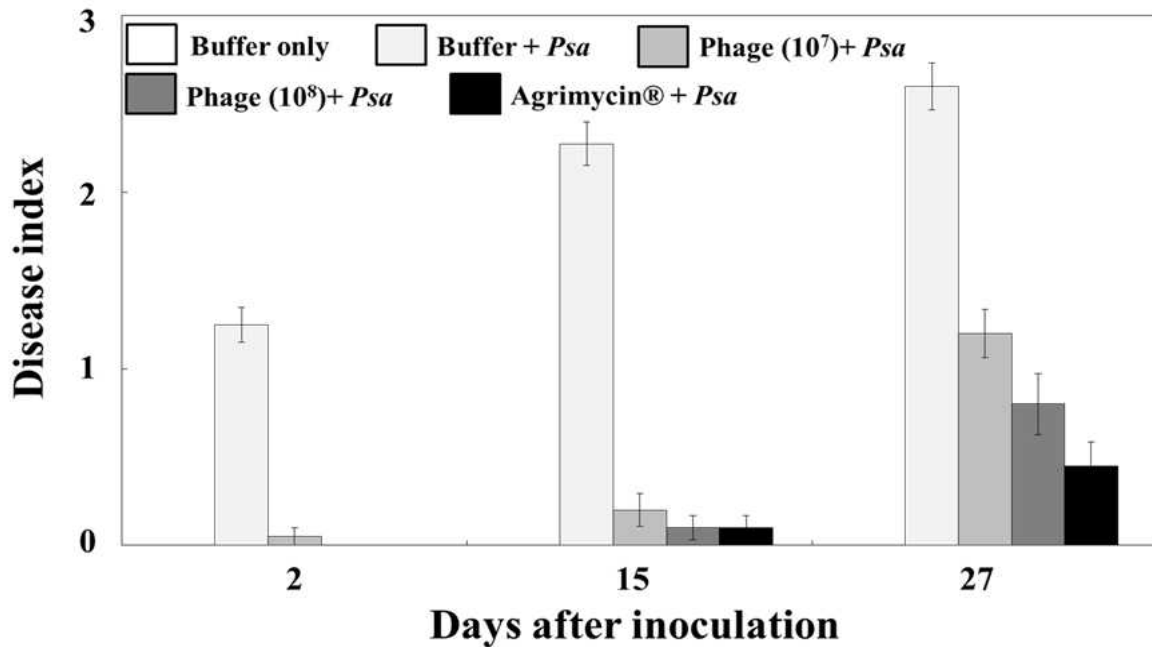


그림 8. 키위 궤양병 파지의 방제효과 검정 결과. 버퍼만 전처리 한 뒤 키위 궤양병 세균을 처리한 처리군은 2일 만에 병이 발생하는 것을 볼 수 있음. 10^8 pfu/ml 농도로 파지를 전처리 한 처리군은 15일 뒤에도 항생제 전처리군 만큼 병 방제에 효과가 있었음. Disease index: 0 = No symptoms, 1 = Mild symptoms on leaf edge, 2 = Mild necrosis or spread over the leaf under 25%, 3 = Severe necrosis and spread over the leaf under 50%, 4 = Extensive and severe necrosis covering over 50% or death (n=20).

대조군으로 사용된 항생제 아그리마이신의 경우 국외에서는 토양 잔류의 위험, 세균의 내성 습득 등을 이유로 금지하고 있다. 생물작용제인 파지카테일이 화학물질인 항생제에 비할 수 있을 정도로 병 발생률을 떨어뜨릴 수 있다는 점에 중요한 의의가 있다.

(3) 키위 궤양병 발병 포장 조건에서의 병 방제 효과 검정(위탁과제팀과 공동 진행)
 선별하여 증식한 키위 궤양병 방제용 파지가 이미 병이 난 키위를 치료할 수 있을 것인지 조사하기 위해 유묘와 성목에 각각 스프레이 혹은 수간 주사하여 그 효과를 조사하였다 (그림 8). 파지의 효과와 비교하기 위하여 농가에서 치료 목적으로 사용하고 있는 아그리마이신(옥시테트라사이클린+스트렙토마이신황산)을 대조군으로 사용하였다. 파지는 제3협동과제팀에서 제공해준 시제품을 1,000배로 희석하여 10^8 pfu/ml이 되도록 하였다.

처리방법	시험주	균 접종	파지 처리	
		접종시기	처리시기	농도 및 양
스프레이	유 목 무병주	전엽기	발병초기	처리 농도 : 10^8 처리 양 : 모든 잎에 흠뻑 물을 정도
수간주사 (중력식)	성 목 이병주	이미 이병주	4월 중	처리 농도 : 10^8 처리 양 : 4L
대 조 구 (옥시테트라사이클린· 스트렙토마이신황산염)		처리구와 동일		처리 농도 : 1500배 처리 양 : 처리구와 동일
무 처리		-		-

그림 9. 파지의 키위 궤양병 치료능을 검정하기 위한 처리구 별 처리 방법

유묘에 먼저 병원세균 처리후 스프레이로 파지 배양액을 처리한 결과 아래 그림 9와 같이, 병원세균 만 처리한 식물만큼 병 진행이 계속되는 것을 볼 수 있었다(붉은 화살표). 대조군인 항생제와 무처리구는 병이 발생하지 않았다.

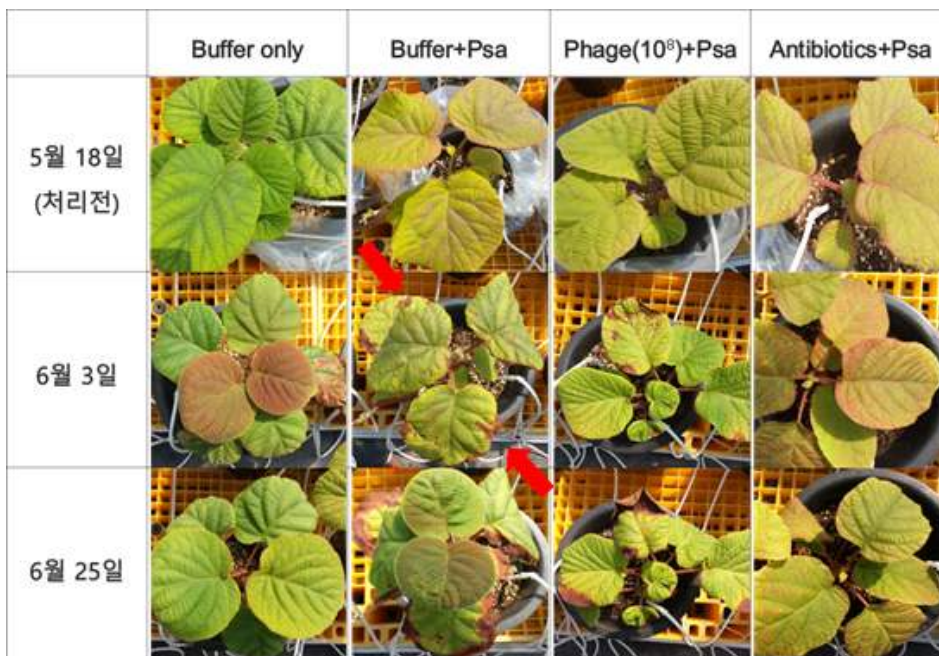


그림 10. 4. 5월 키위 궤양병 파지의 스프레이 처리 후 기간별 엽병반 진행(치료효과)

파지를 처리한 처리구에서 병이 발생한 정도는 파지 대신 버퍼를 처리한 처리구와 비슷한 정도로, 유묘에서는 병이 이미 발생한 이후에 파지를 처리하는 것은 효과적이지 않은 것으로 판단된다. 또한 병이 발생한 성묘에서 파지가 치료효과가 있는지 조사하기 위해 그림 10과 같이 중력식의 수간 주사 방법으로 파지를 처리하였다.



그림 11. 성묘에 수간 주사(중력식) 방법으로 파지액을 처리하는 모습

키위 궤양병이 발생한 성묘는 낙엽이 발생하는 특성이 있으므로, 먼저 이를 이용하여 파지의 병 저해 효과를 분석하였음. 이미 병이 발생한 성묘에 파지액을 처리한 결과, 아래의 그림 11과 같이 무처리구와 대조구인 항생제 처리구에 비하여 남아있는 미낙엽수의 수가 가장 높은 것을 볼 수 있었다.

		미낙엽 수				
		처리 당시	1주후	3주후	5주후	7주후
그린키위 성묘	무 처 리	197	184	167	161	120
	파 지	196	187	161	158	147
	항 생 제	198	186	148	139	114

그림 12. 수간주사 처리에 따른 키위 이병주의 미낙엽 수 비교 결과

또한, 병 발생이 진행되는 정도를 면밀히 조사하기 위해 각 처리구의 앞에서 병반이 진행되는 정도를 아래의 그림 12와 같이 조사하였다. 처리 당시인 5월 15일에는 병반 분포가 비슷하다가(그림 12, 좌) 처리 2개월 후인 7월 24일에는 무처리와 항생제 처리에 비해 파지 처리구에서 50%이상 병반을 가진 잎수와 낙엽수가 적은 것을 알 수 있다 (그림 12, 우).

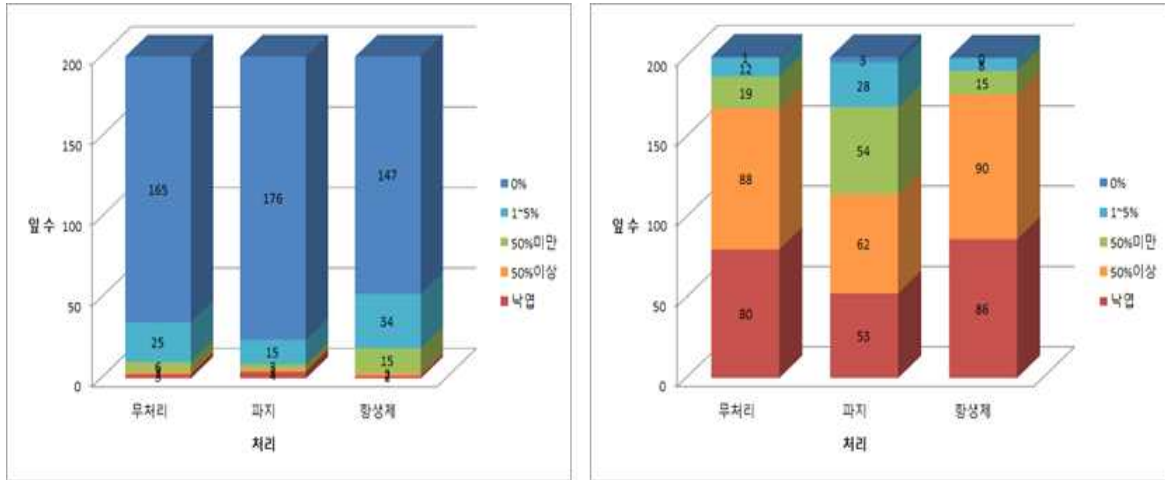


그림 13. 처리별 수간주사 처리 당시와 2개월 후 병반 경과모습(좌 : 5월 15일, 우 : 7월 24일)

결과적으로 유묘에서보다는 성묘에서 병 발생 이후 파지의 병 저해 효과가 크다는 것을 알 수 있었고, 이는 현재 농가에서 사용되고 있는 항생제보다 효과적인 것으로 추정된다. 또한, 스프레이 방법으로 엽면에 처리하는 것보다는 병원세균이 직접적으로 증식하는 수간에 주입하는 것이 더 효과적일 수 있다.

(4) 파지 시제품 제작 및 방제효과 검정(위탁과제팀, 제3협동팀과 공동 진행)

(가) 대상 병원세균의 대량 배양용 배지에서의 생장 검정

실험실내에서 배양용으로 사용하는 배지 대신에 농업용 배지에서의 파지 증식 가능 여부를 판단하기 위하여 농업용 배지에서 과제에서 대상으로 하는 병원세균들의 배양이 가능한지 조사하였다. 고려바이오(주)로부터 공급받은 KAM, 고려메디움을 각각 고체배지(KAM or 고려메디움 20g, water up to 1L, bacto agar 15g)와 액체배지(KAM or 고려메디움 20g, water up to 1L)로 각각 만들어 *Acidovorax citrulli* (Ac), *Ralstonia solanacearum* (R. sol), *Clavibacter michiganensis* (Cm), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc), *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) 각각 streaking 혹은 single colony를 접종 배양하여 각 배지에서 배양 가능 여부를 조사하였다.

고체배지로 만든 KAM과 고려메디움에 각 병원세균들을 streaking하여 도말한 뒤, Ac와 Cm, Pcc, Psa는 26°C, R. sol은 30°C에서 각각 incubation 해주었다(그림 13). 모든 병원세균은 KAM과 고려메디움에서 2일 이내에 colony를 형성하였다. Cm은 KAM(상)에서 prototype의 colony로 나타나지 않았으며, 전체적으로 모든 세균의 colony 색깔이 KAM(상)에서 노랗게 나타났다. 또 모든 세균이 고려메디움(하)에서 비교적 투명한 colony 색깔을 나타내어 육안으로는 확인이 가능하지만 사진상으로 잘 보이지 않았다. Psa는 고려메디움(하)에서 불투명했던 배지를 투명하게 하는 특성을 보였다.

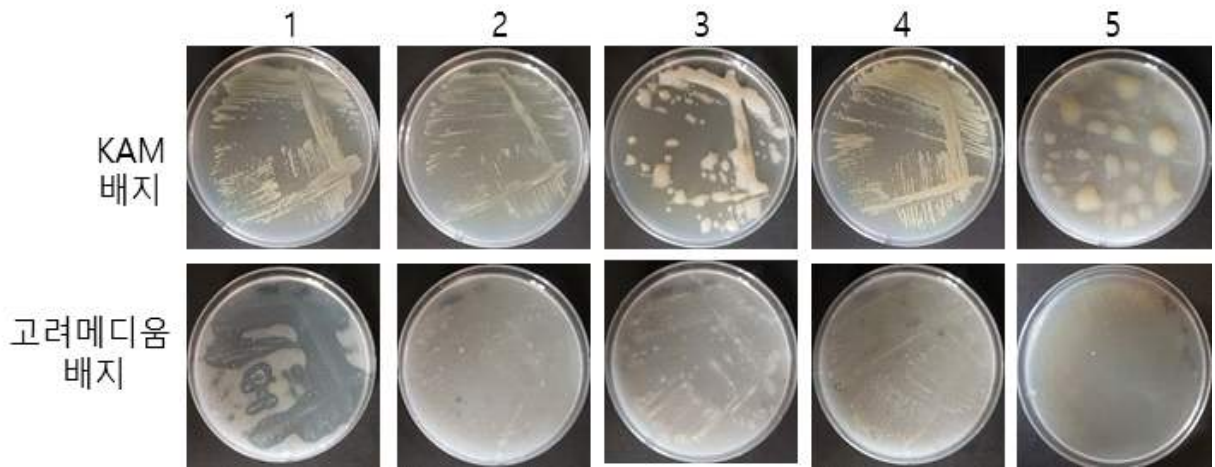


그림 14. KAM(상)과 고려메디움(하) 고체배지에서 배양 가능성 여부 조사 결과.
 1; *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa), 2; *Acidovorax citrulli* (Ac), 3; *Ralstonia solanacearum* (R. sol), 4; *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc),
 5; *Clavibacter michiganensis* (Cm).

배지에서 자란 각 colony가 해당 세균임을 확인하기 위하여 표 16의 primer를 이용하여 polymerase chain reaction (PCR) 반응하여 그림 14과 같이 전기영동 상에서 band size를 확인하였다.

표 14. 확인에 사용한 각 병원세균의 특이 프라이머

Strain	Primer name	Sequence	Annealing Temp.	Band Size
Psa	Psa-F	CAGAGGCGCTAACGAGGAAA	55°C	311bp
	Psa-R	CGAGCATACATCAACAGGTCA		
Ac	SEQ_4R	TCGTCATTACTGAATTTCAACA	55°C	250bp
	SEQ_5F	CCTCCACCAACCAATACGCT		
R.sol	Rsol_filC_F	GAACGCCAACGGTGCGAACCT	65°C	400bp
	Rsol_filC_R	GGCGGCCTTCAGGGAGGTC		
Pcc	Y1	TTACCGGACGCCGAGCTGTGGCGT	60°C	434bp
	Y2	CAGGAAGATGTCGTTATCGCGAGT		
Cm	Cmm atpDF	CGGTCTACAACGCCCTCAAGA	60°C	697bp
	Cmm atpDR	TGCGTGAAGCGGAAGATGTTG		

본래 병원세균을 가장 많이 배양하는 적합배지와 비교하여 농업용 배지에서의 성장속도를 비교하기 위하여 각 배지 50ml에 병원세균을 접종하여 shaking incubator로 배양하였다. 각 적합배지는 Ac는 KB(proteose peptone 20g, K₂HPO₄ 1.5g, MgSO₄·7H₂O 1.5g, glycerol 10 mL, water up to 1L)에 rifampicin(50mg/L)을 넣은 선택배지를, R.sol은 CPG(Casamino acid 1g, Peptone 10g, Glucose 5g, water up to 1L), Cm은 KB, Psa는 TSA(tryptone 15g, soytone 5g, sodium chloride 5g, water up to 1L), Pcc는 LB 배지를 사용하였으며 R.sol은 30°C, 그 외 모든 균주는 26°C에서 배양하였다.

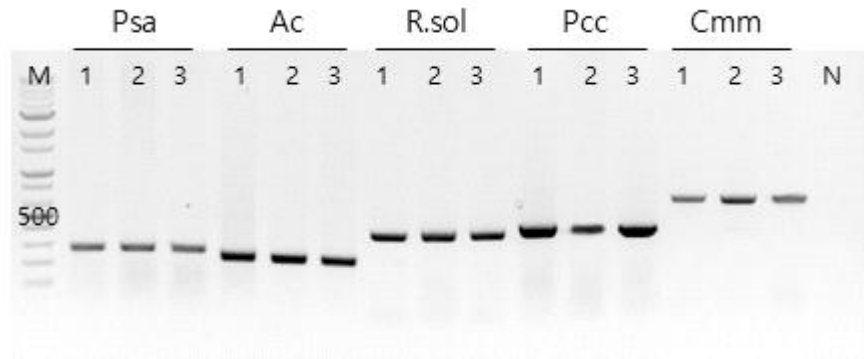


그림 15. 고체배지에서 자란 colony가 해당 병원세균이 맞는지 PCR 확인한 결과. 1;적합배지, 2;KAM, 3; 고려메디움.

그림 15과 같이 공업용 배지 KAM과 고려메디움은 탁도가 높아 OD값 측정으로 세균의 배양정도를 확인하기 어려우므로, 0시간, 3시간, 6시간, 12시간, 24시간, 48시간에 cfu를 측정함으로 그래프를 나타내었다(그림 16).



그림 16. Autoclave 후의 각 배지 사진.
왼쪽 CPG, 중앙 고려메디움, 오른쪽 KAM.

모든 대상 병원세균은 각 공업용 배지에서도 적합배지에서 만큼 증식이 가능한 것으로 확인이 되었다. 오히려 공업용 배지에서 적합배지에서보다 더 증식이 잘 되는 것으로 나타나기도 하였다. 또한, 고체배지와 액체배지 상에서 대상 병원세균들은 모두 증식 가능한 것으로 확인되었다.

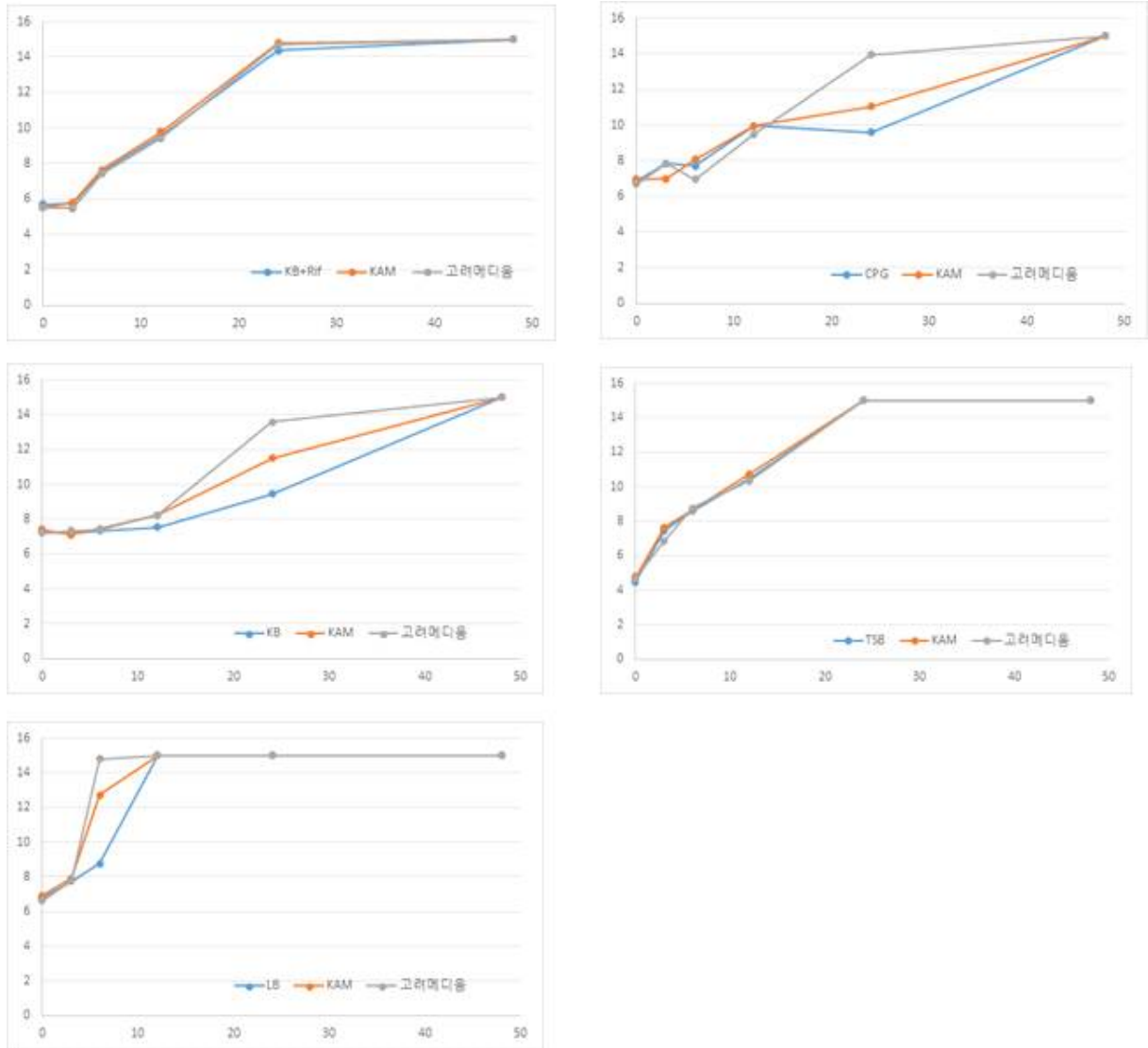


그림 17. 적합배지(파란색)와 KAM(주황색), 고려메디아(회색)에서 각 병원세균의 배양 가능성 검정 결과. Y축은 LOG(cfu/ml), X축은 시간(hours). 첫줄: Ac, R.sol. 두 번째줄: Cm, Psa. 세 번째줄: Pcc.

(나) 파지의 제제화용 첨가물질에서의 안정성 검정

파지의 제제화에 필요한 제제화용 첨가물질 11가지를 고려바이오(주)로부터 확보하였다. 확보된 제제화용 첨가물질이 파지 용액에 첨가되었을 때 파지가 받는 영향을 농도별로 확인하였다. 이때 제품화되었을 때의 파지 농도인 10^{11} pfu/ml를 사용하였다. 첨가물질의 양을 0.5%, 1%로 하여 각각 파지를 처리하여 파지의 활성 유지 여부를 검정하였다. 그 결과 모든 첨가물질들에서 파지 활성이 안정함을 확인하였다(그림 17).

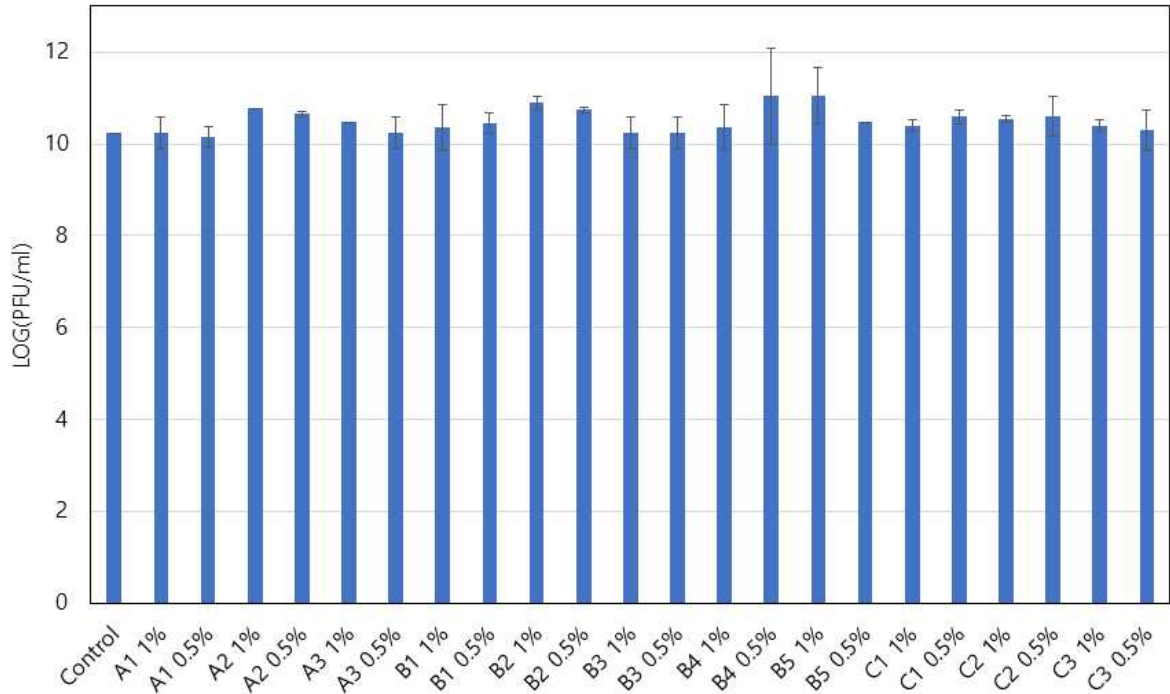


그림 18. 제제화 첨가물질에서 파지 활성 검정 결과

(다) 키위 궤양병 파지의 대량 증식 조건 확립

제품화를 위해서는 해당 파지를 대량으로 증식하는 기술이 필요하다. 키위 궤양병을 방제하기 위한 방제제를 제작하기 위해 파지를 대량으로 증식시킬 때, 기주로 하는 세균의 적정 농도를 확인하기 위한 실험을 진행하였다. 균과 파지의 농도 비율에 따른 값을 MOI (multiplicity of infection)라고 하는데, 적정 세균 농도를 알기 위해 MOI 값을 0.01로 고정하고 세균의 농도를 OD₆₀₀ 0.5, 1.0, 2.0 (5*10⁸, 10⁹, 2*10⁹ cfu/ml)로 조정하였다. 따라서 처리된 파지의 최종농도는 각각 5*10⁶, 10⁷, 2*10⁷ pfu/ml 이다. 대량으로 증식될 때의 조건과 유사하게 만들기 위하여 균액의 양은 1L flask에 200ml로 하였다. 처리 한 뒤 6시간, 12시간, 18시간 마다 5ml의 균액을 샘플링하여 4°C, 10,000rpm에 10분 원심분리 한 뒤 상층액을 pore size 0.22µm 짜리 filter로 filtering 해서 세균을 제거해 보관했다. 해당 샘플에서의 파지 농도를 알기 위해 녹였다가 식힌 0.4% soft agar TSA 배지 5ml에 균액 200µl을 넣어 TSA 배지에 부어준 뒤 완전히 굳혀준 다음 각 샘플들을 serial dilution 한 것을 dotting하여 26°C overnight 배양하였다. 각 농도에 대하여 2개의 flask 씩 샘플링했으며 총 두 반복 실험하였다. 파지는 대표적으로 가장 기주범위가 넓은 44번 파지를 사용하였다.

그림 18에서 볼 수 있듯이, 결과는 균액의 농도가 OD₆₀₀ 0.5일 때 파지의 증식률이 가장 좋았다. 앞으로 반복실험을 더 진행해보아야 하겠지만, 현재까지의 결과를 보았을 때 파지의 대량 증식을 위해 파지를 처리할 기주는 0.5의 농도일 때가 가장 적합할 것으로 보인다.

다음으로 대량 증식을 위한 파지의 초기 최적 접종농도를 검정하기 위하여 대상 균액의 농도가 OD₆₀₀ 0.5일 때 MOI 값을 0.001, 0.0001, 0.00001로 줄이면서 18시간까지 파지 증식량을 측정하였다. 그 결과 MOI가 0.00001일 경우에 6시간후에 증식량이 최대치에 도달하였다(그림 19).

MOI = 0.01

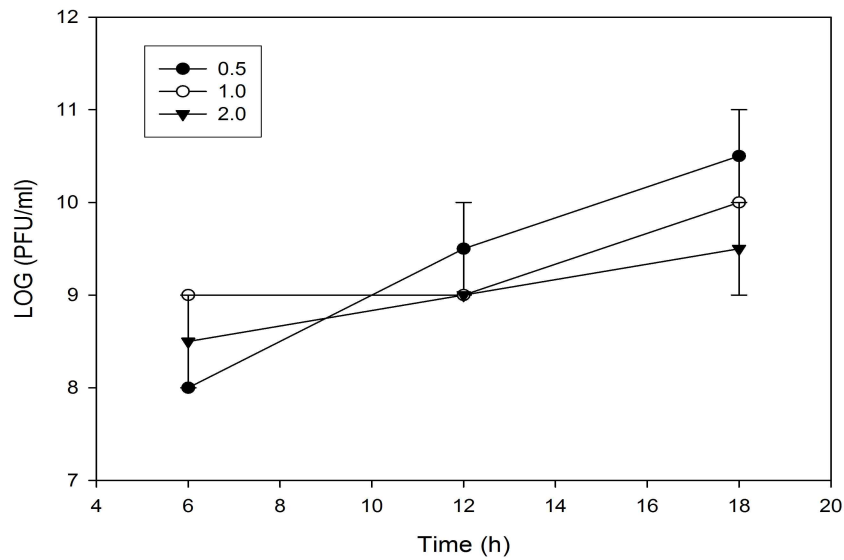


그림 19. MOI 0.01일 때 키위 궤양병 파지의 시간별 검출량

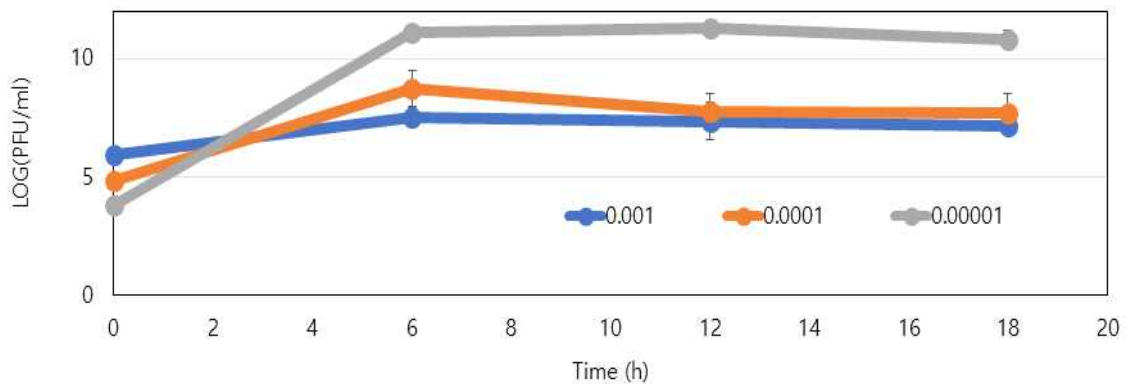


그림 20. 파지의 초기 최적 접종농도 검정 결과

(라) 파지 시제품의 온실에서의 방제효과 검정

위의 결과들을 바탕으로 제3협동과제팀과 함께 파지 시제품을 제작하였고, 시제품을 이용하여 온실에서의 방제효과 검정 실험을 진행하였다. 실제 농가에서 사용하고 있는 환경과 유사한 식물환경을 조성하기 위해 국내에서 대목으로 주로 사용되는 헤이워드에서 키위 궤양병 세균에 감수성인 국내 품종 해향을 접목시킨 뒤 온실 조건에서 3개월 재배하여 잎을 넓게 키워 건전한 키위 식물을 32개주 이상 준비하였다. 스프레이로 병원균 처리 및 파지 처리, 항생제 처리를 할 경우 중력에 의해 키위 잎 가에 집중적으로 접종되는 문제가 있어 이번 실험에서는 그림 20과 같이 실리콘 붓으로 모든 처리를 진행하였다. 실리콘 붓은 모두 멸균된 상태로 사용하였으며 사용한 붓은 멸균하기 전까지 재사용하지 않았다.



그림 21. 건전한 키위 잎에 실리콘
붓으로 처리하는 모습

시제품에 들어가는 세 가지의 파지 각 희석액, 세가지 파지 배양액의 혼합액, 그리고 시제품의 키위 궤양병 방제효과를 검증하기 위해 각 처리구별로 식물 4개주씩 사용하였으며, 각 식물당 3개의 잎에 아래의 표 17과 같이 처리하였다. 항생제 agrimycin은 대조구로 사용하였다. 파지 희석액을 희석할 때 사용한 SM buffer 및 키위 궤양병 병원세균액을 키위 잎에 잘 달라붙게 하기 위해 silwet L-77을 0.02% 섞어주었다. 키위 궤양병 병원세균은 TSB배지를 사용하여 26°C에 배양한 뒤 10^8 cfu/ml의 농도로 10mM $MgCl_2$ buffer를 사용해 희석하였다. 따라서 무처리구인 negative control에는 10mM $MgCl_2$ buffer를 발라주었다. 국내에서는 biovar2와 biovar3에 해당하는 키위 궤양병 병원세균이 모두 발견되고 있으므로 이에 각각 해당하는 국내 strain KBE9과 SYS3를 섞어 처리하였다. 표 17에서 각 처리구의 첫 번째 줄에 해당하는 buffer 및 파지 희석액, 시제품, 항생제를 먼저 잎에 발라준 뒤, 2시간 후에 buffer 및 병원세균을 발라주었다.

표 15. 파지 희석액과 시제품의 키위 궤양병 방제효과 검증 시 사용한 처리구

Negative control	Positive control	Φ34	Φ38	ΦPsaP44	Mixture	Prototype	Agri- mycin
SM buffer	SM buffer	Φ34 (10^8 pfu/ml)	Φ38 (10^8 pfu/ml)	ΦPsaP44 (10^8 pfu/ml)	Φ34 +Φ38 +ΦPsaP44 (각 10^8 pfu/ml)	시제품 (1000배 희석, 10^8 pfu/ml)	Agri- mycin (13g/20L)
10mM $MgCl_2$	KBE9 (biovar2) + SYS3 (biovar3) bacterial suspension (10^8 cfu/ml)						

처리 후 2일, 4일, 6일, 14일에 각 잎에 생긴 병반의 수를 세어 병이 발생한 정도를 확인하였으며 그 결과는 아래 그림 21과 같았다.

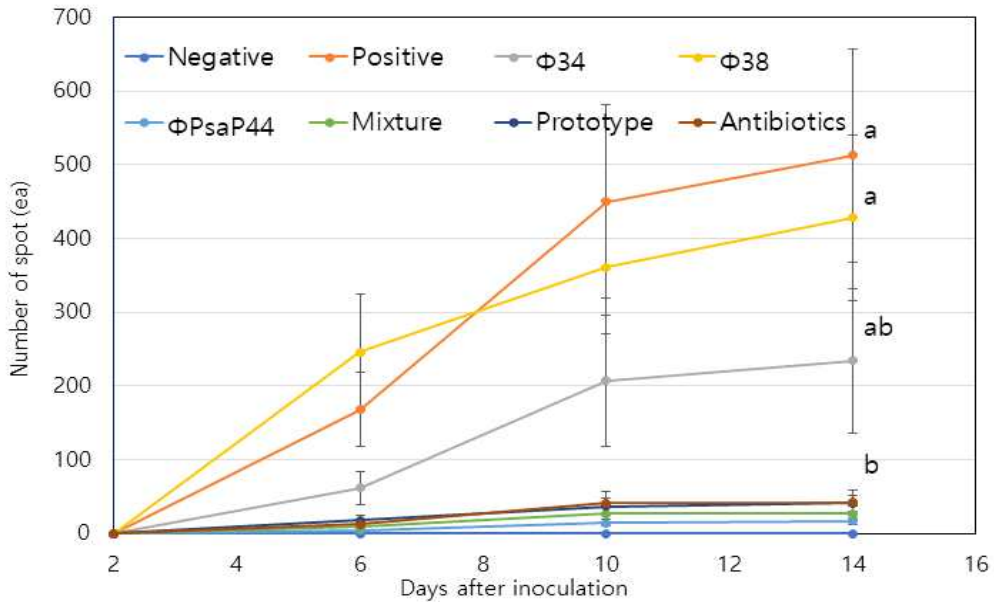


그림 22. 파지 희석액 및 항생제 처리 후 키위 잎에 발생한 병반 수

파지 34와 파지 38도 병이 발생한 정도가 병원세균만 처리한 처리구보다 낮지만, 파지 44를 처리한 처리구는 항생제 처리구와 같이 월등히 병 발생이 낮았다. 세 파지를 혼합한 것과 시제품 역시, 파지 44를 포함하고 있어 파지 44를 처리한 것과 같이 병 발생 억제 효과가 뛰어난 것을 볼 수 있었다. 각 처리 이후 열흘째의 잎 사진(그림 22)을 보면, 파지 처리구는 항생제 처리 보다도 병반의 수가 적다.

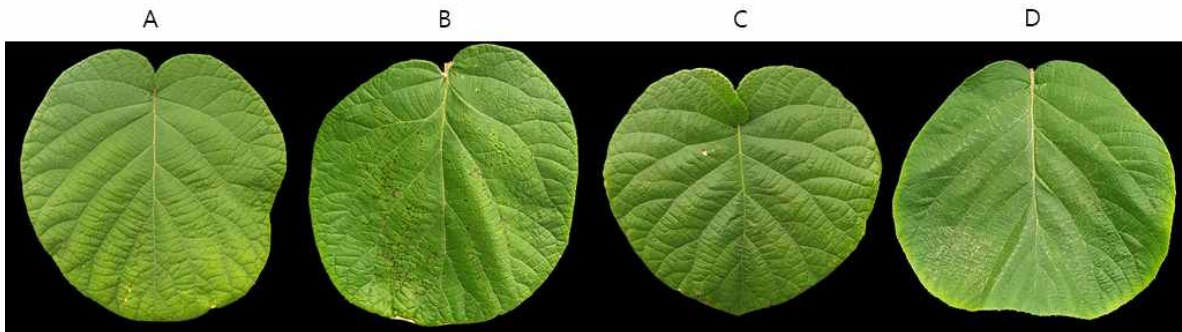


그림 23. 처리 후 10일 째의 잎 사진. A: Negative control (SM buffer+silwet0.02%/10mM MgCl₂+silwet 0.02%), B: Positive control (SM buffer+silwet0.02%/KBE9 (biovar2)+SYS3 (biovar3)), C: ΦPsaP44+SM buffer+silwet 0.02%/KBE9 (biovar2)+SYS3 (biovar3), D: Antibiotics (Agrimycin/KBE9 (biovar2)+SYS3 (biovar3))

종합적으로, 파지 희석액 및 혼합액은 병 발생 억제 효과가 뛰어났으며 이를 기반으로 만든 시제품 역시 병 발생 억제 효과가 뛰어났다.

(5) 파지 처리 후 미생물상 변화 분석(제2협동팀과 공동 진행)

(가) 파지 처리 후 처리 파지에 대한 키위 궤양병 병원세균 내성 균주 출현 분석

파지처리 후 배지내에서 키위 궤양병 병원세균이 재증식하는 경우는 거의 없었다. 하지만, 가끔 특정 파지의 경우 파지 처리 후 OD₆₀₀값이 줄다가 다시 증가하는 양상을 보이는 경우가 있었다. 일례로, OD₆₀₀값 0.5가 되었을 때 44번 파지를 MOI값 0.00001로 처리 후, 6시간 이후부터 OD값이 증가하는 경우를 가끔 확인할 수 있었다. 초기에는 이를 내성균주의 출현때문이라 생각하여, 배지내의 세균들을 모아 고체배지상에서 dotting assay를 수행한 결과 박테리오파지에 의한 plaque이 생기는 것을 확인하였다. 이러한 이유로 OD값이 증가한 이유가 내성균주의 출현은 아닌 것으로 판단하였다.

(나) 키위 궤양병 방제용 파지의 토양 안정성

파지를 토양에 처리한 이후, 파지가 토양에서 안정적으로 잔존하는 파지 농도를 먼저 확인하였다. 아래와 같이 토양에서 키위궤양병균 방제용 파지가 토양내에서 생존하는 기간을 확인하였다. 전남농업기술원에서 보내준 키위농원의 토양 300mg에 10⁸ pfu/ml의 파지 용액 200 μ l씩을 처리한 뒤 0시간, 12시간, 48시간, 4일, 7일, 10일 후에 SM buffer 1ml을 넣어 파지 농도를 측정하였다. 결과적으로 처리한 모든 파지들이 토양내에서 10일 이상 안정적으로 생존하고 있음을 확인하였다(그림 23). 따라서 토양미생물 군집변화 분석은 파지 처리 후 일주일째에 확인하기로 결정하였다.

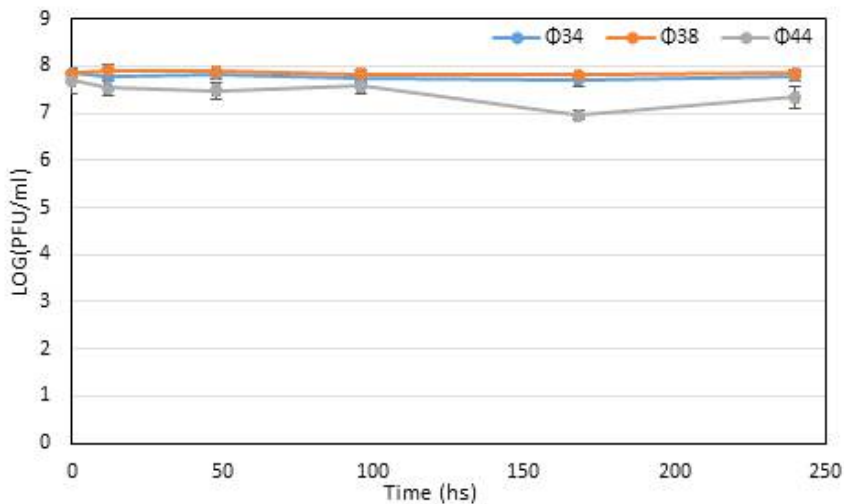


그림 24. 키위 궤양병 방제용 파지의 토양 안정성 검정 결과

(다) 파지 처리 후 토양 미생물 군집 변화 분석

미생물 군집변화를 확인할 토양은 마찬가지로 전남농업기술원에서 보내준 키위농원의 토양 300mg에 10⁸ pfu/ml의 파지 용액 200 μ l씩을 처리한 뒤 7일 째에 total DNA를 분리하였다. 파지별로 10반복을 진행하였고, 대조구로 SM buffer를 처리하였다. 회수된 토양으로부터 미생물 DNA 분리를 위해 FastDNA Spin kit (MP Biomedicals, Irvine, CA)를 사용하였음. 추출된 DNA는 0.7% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였으며, Nanodrop기기를 사용하여 정량 및 정성평가를 실시하였다.

미생물 군집 분석을 위해 바코드를 가지고 있는 universal primer들을 통하여 세균

16S rRNA 유전자의 V3-V4 부분을 ~500 bp 정도로 증폭하였고, 16S rRNA 유전자는 polymerase chain reaction (PCR)로 증폭하였다. PCR 반응물은 5 ng/ul 농도의 template DNA 4 ul와 200 mM의 deoxynucleoside triphosphate 혼합액, 2.5%의 dimethyl sulfoxide, 400 nM의 각각의 primer, 150 uM ATP, 1.25 ul EX-Taq DNA polymerase가 포함된 50 ul 용액을 사용하였다. PCR 합성 조건은 다음과 같다: 94도 for 3 min of initial denaturation; 25 cycles of denaturation at 94도 for 15 s, annealing at 60도 for 45 s, extension at 72도 for 1 min, and a final extension at 72도 for 8 min.

획득한 16S rRNA 유전자 서열들은 기본적으로 USEARCH를 integration 한 QIIME pipeline을 통해 토양 내 미생물 군집을 분석하였다(그림 24). 획득한 16S rRNA amplicon 서열들을 index로 별로 sorting 한 후 fastq 정보들에 기초하여 trimming 과 quality control을 DADA2 package를 이용하여 R program(3.4.4)에서 수행하였다. Trimming 과 quality control 이 끝난 sequence들을 pandaseq 프로그램을 이용하여 merge하고 merge된 sequence들은 VSEARCH 프로그램을 통하여 dereplication함. 그 후, dereplication된 sequence들을 USEARCH algorithm을 이용하여 clustering 작업을 수행하였다. 각각의 sequencing 서열에서 대표 sequence들을 선발하여 RDP classifier와 Greengenes database 를 이용하여 각각의 대표 염기서열을 동정하고 OTU table을 완성하였다.

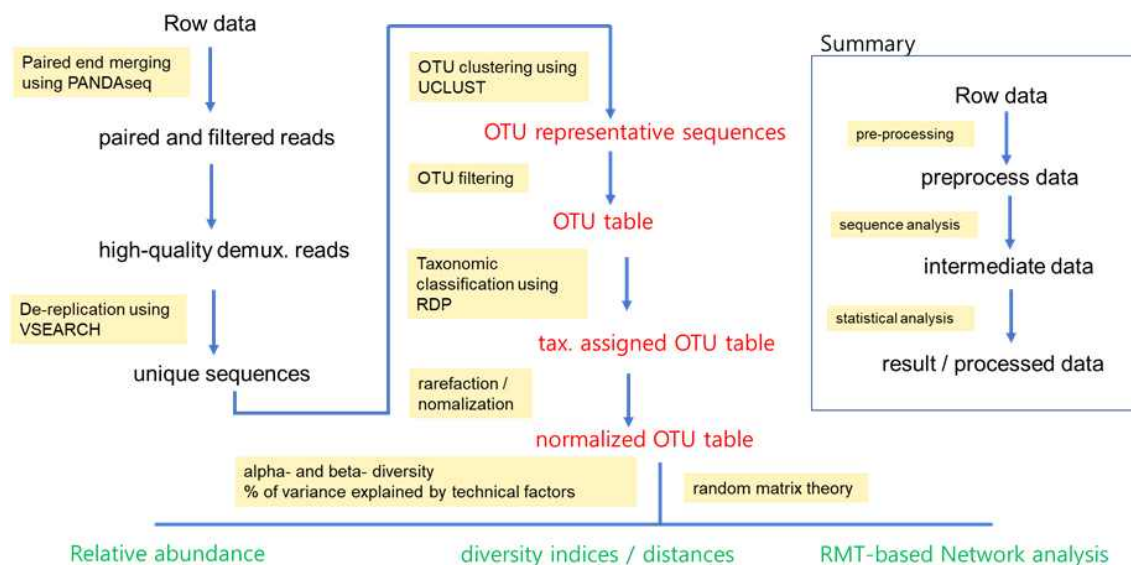


그림 25. 토양 미생물 군집 분석 모식도

미생물 군집내의 비교 분석은 R program을 통한 phyloseq, ggplot2 package 들을 이용하여 observed species, Chao1, ACE, shannon index를 시각화하고, 이를 토대로 미생물 군집의 species richness 와 evenness정도를 분석하였다. 파지 처리구와 무처리구간의 미생물 군집의 비교는 R을 통한 VEGAN, phyloseq, ggplot2 packages를 이용하여 Bray-Curtis dissimilarity measures를 수치화하고 non-metric multidimensional scaling (NMDS)방법으로 시각화하여 군집간의 거리를 보여주었다.

토양 내 미생물 군집의 richness와 evenness를 비교 결과(그림 25), 두 군집간의 richness와 evenness는 ANOVA 분석 결과 유의한 차이가 없음을 확인하였다(observed

OTU ($p=0.079$), Chao1 ($p = 0.107$), ACE ($p=0.354$), Shannon ($p= 0.473$)). 파지 처리구와 무처리구의 토양 미생물 군집간의 분석은 Bray-Curtis dissimilarity를 이용하여 계산하였으며, nonmetric multidimensional scaling (NMDS) 방법을 통하여 시각화하였다(그림 26). 파지 처리구와 무처리 사이의 군집의 차이를 ADONIS 분석한 결과 전체 실험구간에 통계적으로 차이가 없음($R^2=0.10999$, $p=0.056$)을 확인하였다. 이러한 결과는 이후에 파지를 노지에 처리하더라도 토양 내 유익미생물에 미치는 영향이 없을 것으로 보이는 긍정적인 결과로, 방제용 파지용액 처리가 환경적으로 안전함을 보여준다.

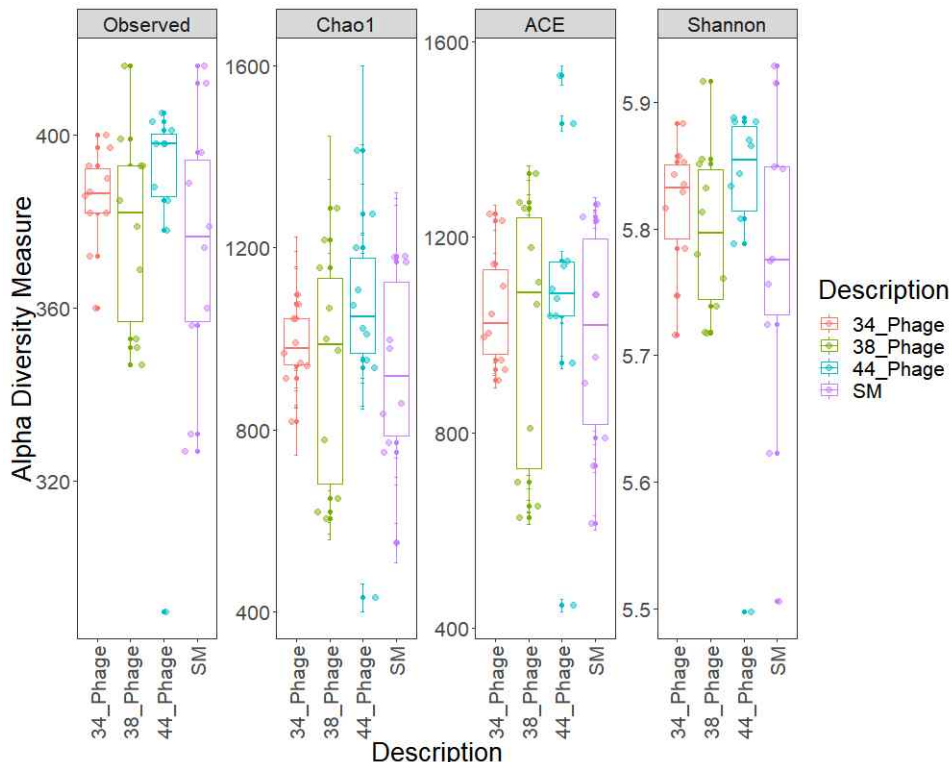


그림 26. 파지 처리구와 무처리 간의 토양 마이크로바이옴의 종 richness와 evenness를 비교

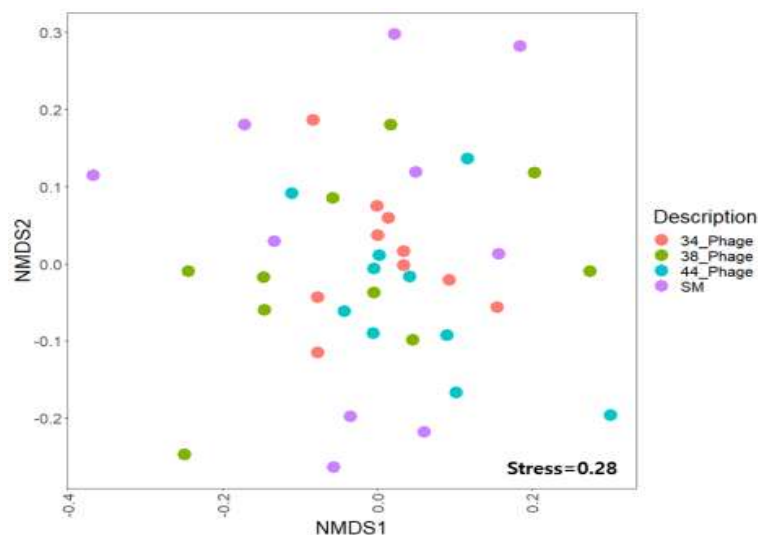


그림 27. Bray-Curtis dissimilarity을 이용한 파지 처리구와 무처리구의 미생물 군집 분석

(6) 병행요법에 의한 방제 효과 분석

(가) 항생제 저항성 Psa 균에 대한 파지 효과 검정

Psa 방제를 위해 아그리마이신이 사용되고 있는데, 유효성분 중 하나인 streptomycin에 저항성을 보이는 Psa 균주들이 보고되어 있다 (Lee et al., 2005). 이들에 대한 파지의 방제 효과 검정을 위해 항생제 저항성 균주 4개, YCS3, JYS5, KACC10584, KACC10595를 선발하였다. 아그리마이신과 더불어 strptomycin만이 유효성분으로 들어있는 부라마이신도 검정에 사용하였다. 그림 27에서처럼 Psa균을 배지상에 도말한 후 paper disc에 파지 혹은 항생제를 떨어뜨린 후 clear zone형성 유무 및 크기를 조사하였다. 예측한대로 부라마이신은 4개의 모든 streptomycin 저항성 균주들에 효과가 없는 반면, 아그리마이신과 44번파지 (PPPL-1)의 경우 모든 항생제 저항성 균주들에도 방제효과를 나타내었다(그림 27, 28).

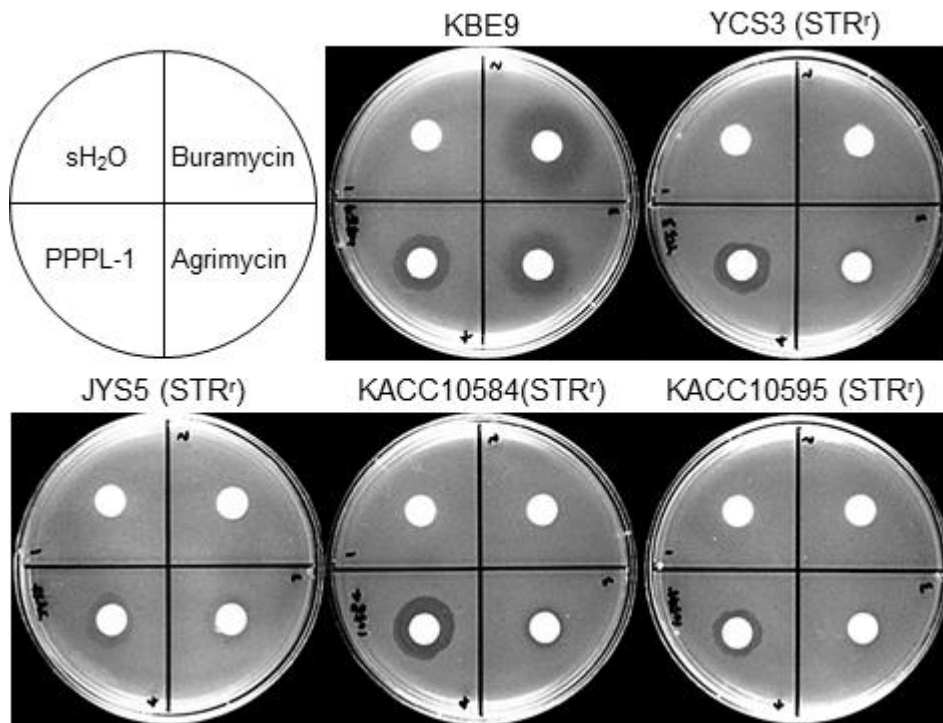


그림 28. 항생제 저항성 Psa 균주에 대한 파지 효과 검정 모습

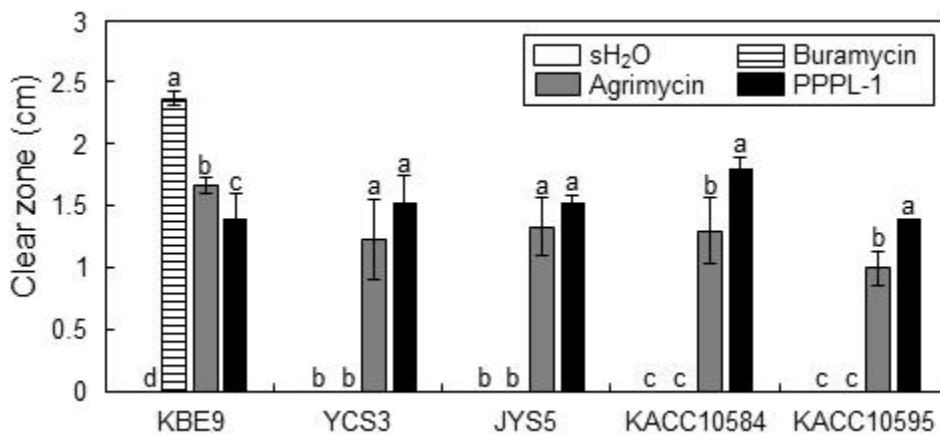


그림 29. 항생제 저항성 Psa 균주에 대한 파지 효과 검정 정량화

나. 배추 무름병 방제용 박테리오파지 연구

(1) 토마토 껍질병 방제용 파지 10개 이상 확보 및 특성 조사

(가) 파지 분리 및 확보

배추 무름병 세균은 broad-host pathogenic bacteria로 다양한 채소작물을 기주로 하기 때문에, 배추 밭이 아닌 다른 작물의 농가에서도 존재할 가능성이 높다. 경상도, 충청도, 전라도 지역 31곳의 농가에서 토양을 샘플링하여 비슷한 지역균을 묶어 그룹으로 설정하였다. 파지 분리에는 그룹을 기준으로 사용하였다 (표 18). 각 그룹에서 배추 무름병 파지를 찾기 위해 사용한 균주는 오이, 토마토 등에서 분리한 10개의 균이다 (표 19).

표 16. 배추 무름병 파지를 분리할 토양 샘플 목록

No.	장소	Group	재배작물
1	대구 달성군 참살이달성농장	1	토마토(노지)
2	대구 달성군 참살이달성농장		토마토(겉목)
3	경북 성주 농업기술원 참외과채류연구소		참외
4	경북 성주 대가면 옥화리 714-6		참외
5	경북 안동 풍천면 어담리 105-1 ①		고추 (풋마름병)
6	경북 안동 풍천면 어담리 105-1 ②		고추 (풋마름병)
7	경북 안동 일직면 국곡리 116-3		고추 (풋마름병)
8	경북 청송 진촌면 기곡리 176		고추 (풋마름병)
9	경북 영양 입압면 방전리 551-2	2	고추
10	경북 영양 청기면 정족리 1		고추
11	경북 영양 청기면 정족리 2		고추
12	경북 영양 청기면 당리 973-10		고추
13	경북 영양 청기면 행화리 297-2		담배
14	충남 논산 부적면 덕평리 1086-9 1	3	토마토
15	충남 논산 부적면 덕평리 1086-9 2		토마토
16	충남 논산 부적면 덕평리 1086-9 3		토마토 풋마름병발병
17	충남 논산 성동면 병촌리 57-1		토마토
18	충남 논산 성동면 개척리 562	토마토 TSWV발병	
19	충북 음성 대소면 부윤리 1-ㄱ	4	토마토
20	충북 음성 대소면 부윤리 1-ㄴ		토마토
21	충북 음성 대소면 부윤리 2		토마토
22	충북 음성 대소면 부윤리 3		토마토
23	충북 음성 농업기술원 수박연구소		수박
24	충남 부여 세도면 가회리 604 1	3	토마토 풋마름병발병
25	충남 부여 세도면 가회리 604 2		토마토
26	전북 부안군 줄포면 파산리 28-2	5	고추 풋마름병 발병
27	전남 장성 진원면 산동리 529-17		토마토
28	전남 담양 수북면 황금리 663		메론 (토마토 재배이력)
29	전남 담양 수북면 황금리 121	토마토	
30	천안 안성지역	6	토마토
31	경희대학교 유리온실	7	토마토

표 17. 배추 무름병 파지 분리를 위해 사용된 균주 목록

No.	Strains	Note
1	<i>Pcc1</i>	오이, 부여, 1997
2	<i>Pcc3</i>	토마토, 남양주, 1997
3	<i>Pcc6</i>	감자, 제주, 1997
4	<i>Pcc10</i>	감자, 춘천, 1997
5	<i>Pcc11</i>	배추, 홍천, 1997
6	<i>Pcc13</i>	당근, 평창, 1997
7	<i>Pcc14</i>	양배추, 평창, 1997
8	<i>Pcc18</i>	담배, 예산, 1997
9	<i>Pcc20</i>	미국, 1999
10	<i>Pcc21</i>	

각 그룹의 토양은 증류수 10ml에 현탁해 원심분리(10,000rpm, 4°C, 15분)하여 상층액을 분리한 뒤, 여과지에 걸러 부유물을 제거했다. 파지는 이 상층액에 있을 것으로 추정하는데, 어떤 균주를 기주로 하는지 알 수 없기 때문에 10가지 균배양액을 섞어 cocktail로 제작했다. 상층액 10ml과 LB 10ml, 균배양액 cocktail 5ml을 섞어 48시간 동안 26°C 현탁배양하여 상층액의 파지가 증식 될 수 있도록 해주었다. 배양 후에 원심분리(10,000rpm, 4°C, 10분)한 상층액을 filter(0.22 μ m)로 여과하여 오염요인을 제거했다. 각 그룹의 상층액에서 파지를 분리하기 위해 overlay assay를 하였다. 녹였다가 적당히 식힌 0.4% agar LB 배지 5ml에 균액 200 μ l과 상층액 100 μ l을 섞어 준 뒤 고체 LB 배지에 부어주어 식혔다. 이를 26°C 에 하루 동안 배양해주면, 해당 균주를 기주로 하는 파지가 있을 때, 균이 자라지 못해 투명하게 되는 plaque가 생성 된다 (그림 29).



그림 30. 배추 무름병 균을 기주로 하는 파지로 인하여 plaque(화살표)가 형성된 모습

사용된 31곳의 토양 샘플 중에서는 그룹 5번에 해당하는 샘플에서 plaque가 형성되었다. Plaque는 4가지의 균주에 걸쳐 총 20개가 형성되었는데, 이를 순수한 한 종류의 파지로 분리하기 위하여 각각을 자른 팁 끝을 이용해 peaking하여 SM buffer에 풀어주었고 이를 다시 overlay assay하는 방식을 5번 수행했다. 이렇게 얻은 순수한 20가지의 배추 무름병 파지를 이용해 제한효소를 이용한 그룹핑, host range test, 외부 환경 안정성 검사 등을 수행하였다.

(나) 배추 무름병 방제용 파지의 기주범위 및 안정성 검정

분리한 20개의 파지들 중 검정에 사용할 파지를 선정하기 위하여 실험실에서 보유하고 있는 배추 무름병 병원세균 31종에 대하여 host range를 조사하였다(그림 30).

그림 31. 배추 무름병 방제용 파지의 기주범위 결과

<i>P. Carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	Bacteriophage																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
<i>Pcc</i> 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pcc</i> 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pcc</i> 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pcc</i> 6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pcc</i> 10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pcc</i> 11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pcc</i> 12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pcc</i> 13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pcc</i> 14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pcc</i> 15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pcc</i> 17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pcc</i> 18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pcc</i> 19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pcc</i> 20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pcc</i> 21	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pcc</i> 24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pcc</i> 27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pcc</i> 28	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pcc</i> 41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
<i>Pcc</i> 42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pcc</i> 43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pcc</i> 44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pcc</i> 45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pcc</i> 48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pcc</i> 49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pcc</i> 50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pcc</i> 51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pcc</i> 52	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pcc</i> 53	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pcc</i> KKH3-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pcc</i> KKH3-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

기주범위검정 결과를 바탕으로 두 그룹으로 나누었으며, 각 그룹에서 2개의 파지(1과 3 / 11과 13)를 선정하여 안정성 검정을 진행하였다. 방제용 파지용액을 노지에 처리하기 위해서는 온도와 pH 및 토양 내에서의 안정성이 중요하므로, 각 환경에서의 안정성을 우선 검정하였다. 먼저 온도에 대한 안정성을 확인하기 위하여 10⁵ pfu/ml의 파지용액을 상온에서부터 70도까지의 구간으로 한시간 동안 처리한 뒤 파지의 활성을 확인하였다(그림 31). 파지는 50도까지 안정적인 것으로 나타났으므로 국내 여름을 지나기에 안정적인 것으로 생각되었다. 그러나 50도 이상에서는 점점 활성이 떨어지는 것으로 나타났다.

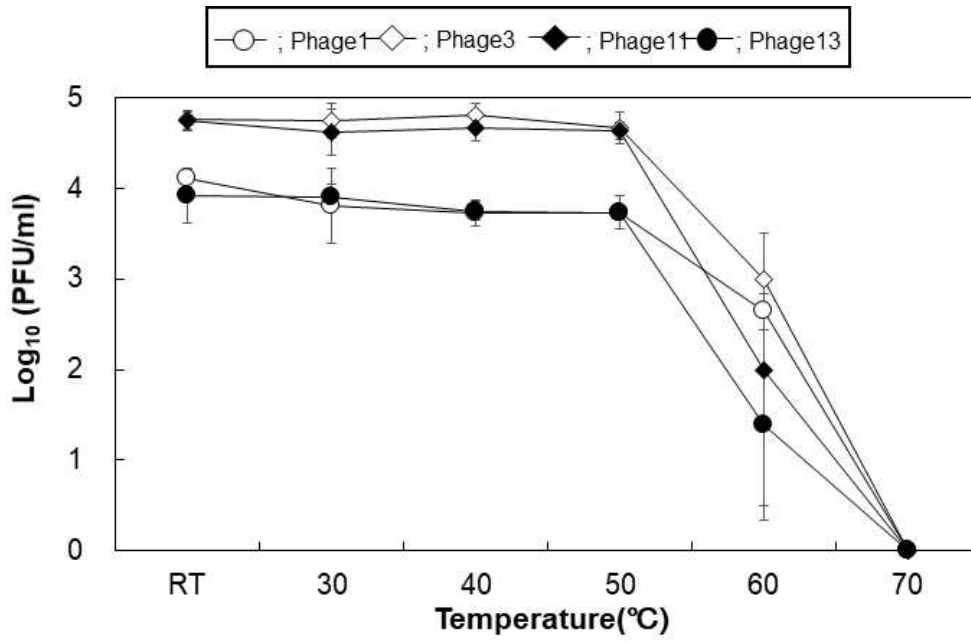


그림 32. 온도에 따른 파지안정성 검정 결과

그림 32에서 볼 수 있듯이 각 pH환경에 10^7 pfu/ml 파지용액을 4°C, 16시간 처리한 이후 활성을 확인 한 결과, 낮게는 pH 4에서부터 높게는 pH 11까지 매우 안정적인 것을 알 수 있었음.

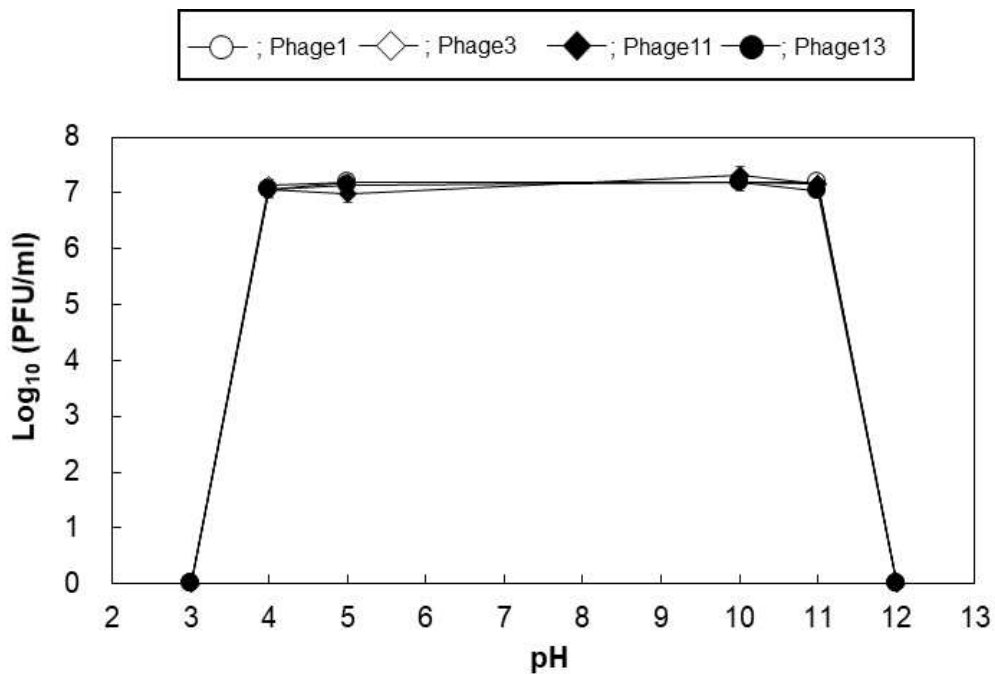


그림 33. pH에 따른 배추무름병 방제용 파지의 안정성 검정 결과

토양 내에서의 안정성을 확인하기 위하여 10^7 pfu/ml 파지용액을 300mg의 상토에 $200\mu\text{l}$ 처리하여 그림 33과 같이 15일 동안 pfu를 측정하였다. 파지는 초기의 10^7 pfu/ml에서 보름동안 서서히 감소하는 추세를 보였으나, 기주 및 다른 미생물이나 양분이 없는 환경에서 열흘 이상 활성을 유지하고 있음을 알 수 있었다. 결과적으로, 선정된 배추 무름병 방제용 파지들은 다양한 온도, pH 및 토양 내 환경에서 안정적인 것으로 나타났다.

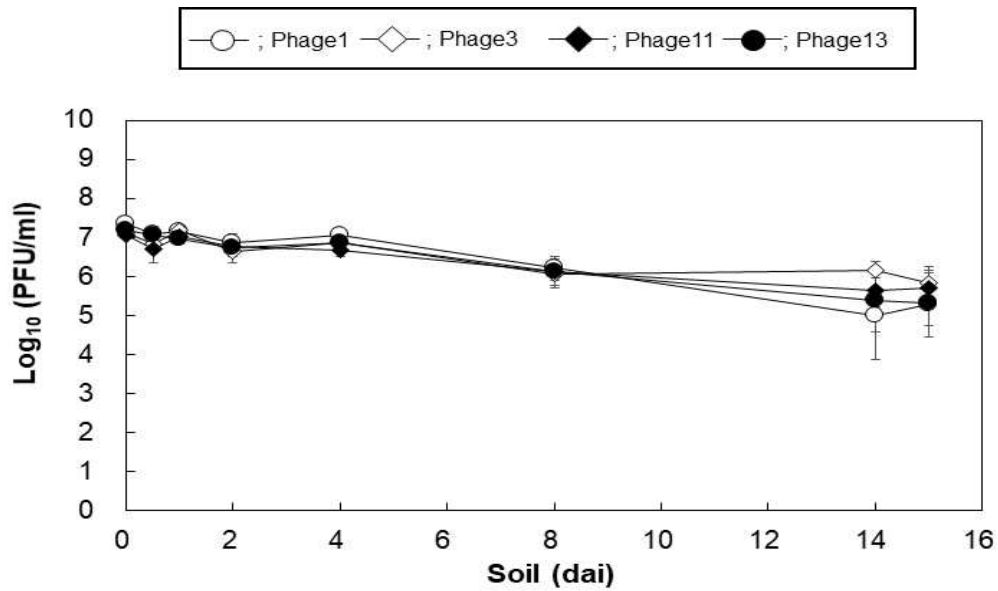


그림 34. 배추무름병 방제용 파지의 토양 내 안정성 검정 결과

5개의 파지를 추가로 분리하였다. 기존에 분리한 1, 13번 파지와 기주범위를 비교 분석한 결과(표 20) G10 파지의 기주범위가 제일 넓은 것으로 확인되었다. 따라서 G10 파지를 이후 실험을 위해 선발하였다

표 18. 선발된 5개 파지의 기주 범위 비교 분석 결과

	G1	G2	G10	G14	G40	Φ1	Φ13
<i>Pcc</i> 1	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pcc</i> 3	○	○	○	○	○	○	○
<i>Pcc</i> 4	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pcc</i> 6	○	○	○	○	○	○	○
<i>Pcc</i> 10	○	○	○	○	○	○	○
<i>Pcc</i> 11	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pcc</i> 12	○	○	○	○	○	○	○
<i>Pcc</i> 13	○	○	○	○	○	-	-
<i>Pcc</i> 14	○	○	○	○	○	-	-
<i>Pcc</i> 15	○	○	○	○	○	-	-
<i>Pcc</i> 17	○	○	○	○	○	○	○
<i>Pcc</i> 18	-	-	○	-	-	-	-
<i>Pcc</i> 19	-	-	○	-	-	-	-
<i>Pcc</i> 20	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pcc</i> 21	○	○	○	○	○	○	○
<i>Pcc</i> 24	-	-	-	-	-	-	-

<i>Pcc</i> 27	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pcc</i> 28	-	-	○	-	-	-	-
<i>Pcc</i> 41	○	○	○	○	○	-	○
<i>Pcc</i> 42	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pcc</i> 43	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pcc</i> 44	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pcc</i> 45	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pcc</i> 48	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pcc</i> 49	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pcc</i> 50	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pcc</i> 51	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pcc</i> 52	○	○	○	○	○	○	○
<i>Pcc</i> 53	○	○	○	○	○	○	○
<i>Pcc</i> KKH3-1	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pcc</i> KKH3-2	-	-	-	-	-	-	-

선발한 G10 파지의 온도, pH, 자외선에 대한 활성 안정성을 조사한 결과 이 파지는 30도 이하까지, pH 4-11까지, 365nm 자외선 노출에 매우 안정함을 확인하였다(그림 34).

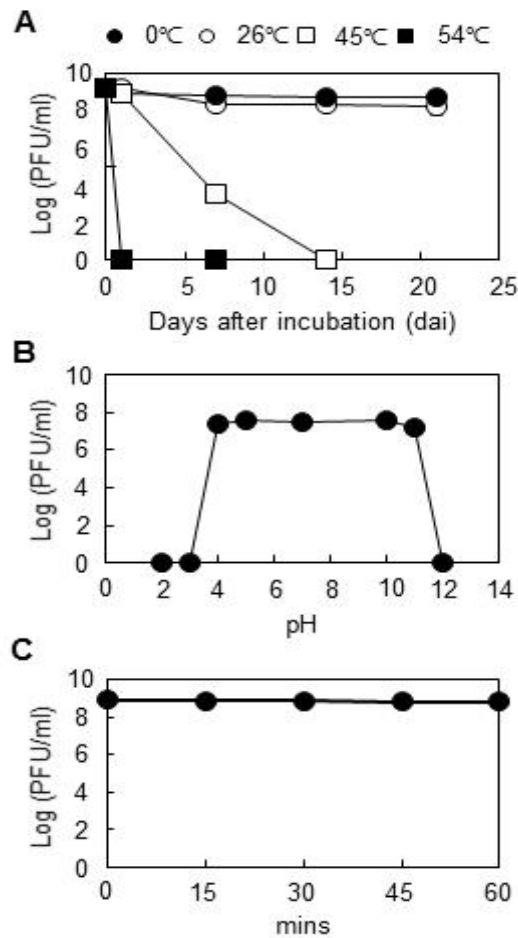


그림 35. G10 파지의 온도, pH, 자외선에 대한 안정성. A, 온도; B, pH; C, 자외선.

파지분리를 더 진행하여 총17개의 파지를 추가로 분리하여 기주범위를 조사하였다. 그 결과 #7(phiPccP-2)와 #11번(phiPccP-3) 파지가 보다 넓은 기주범위를 가지는 것을 확인하였다(표 18, 19). 따라서 이 2개의 파지도 향후 실험을 위해 선발하였다.

표 19. 추가로 선발된 17개 파지의 기주 범위 비교 분석 결과

	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12	#13	#14	#15	#16	#17
Pcc1	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Pcc3	-	-	0	-	-	-	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Pcc4	0	0	-	-	-	0	0	-	-	-	0	0	-	-	0	-	-
Pcc6	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	0	0	-	-	0	-	0
Pcc10	-	-	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Pcc11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pcc12	-	-	-	-	-	-	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0
Pcc13	-	-	-	-	-	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-
Pcc14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pcc15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pcc17	0	-	0	0	0	-	0	0	-	-	0	-	-	-	0	-	0
Pcc18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pcc19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pcc20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pcc21	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	0	0	-	-	0	-	0
Pcc24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-
Pcc27	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-
Pcc28	0	0	0	-	0	-	0	-	-	-	0	0	-	-	0	-	-
Pcc41	-	-	-	-	0	0	0	0	-	-	0	0	-	-	0	-	0
Pcc42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pcc43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pcc44	-	-	-	-	-	-	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-
Pcc45	-	-	-	-	-	-	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-
Pcc48	-	-	0	0	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-

표 20. 추가로 선발된 17개 파지의 기주 범위 비교 분석 결과

	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12	#13	#14	#15	#16	#17
Pcc49	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-
Pcc50	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-
Pcc51	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-
Pcc52	0	0	-	0	0	-	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Pcc53	0	0	-	-	0	-	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	0
PccKK H3-1	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-
PccKK H3-2	-	-	-	-	-	-	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-
Pc1	-	-	-	-	-	-	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pc2	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	0	0	-	0	0	-	0

Pc3	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	0	0	0	0	0	-	0
Pc4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pc5	0	0	-	-	-	-	0	-	-	-	0	0	-	-	0	0	-

선발한 phiPccP-2와 phiPccP-3 파지의 온도, pH, 자외선에 대한 활성 안정성을 조사한 결과 이 파지들은 50도 이하까지, pH 4-11까지, 365nm 자외선 노출에 매우 안정함을 확인하였다(그림 35).

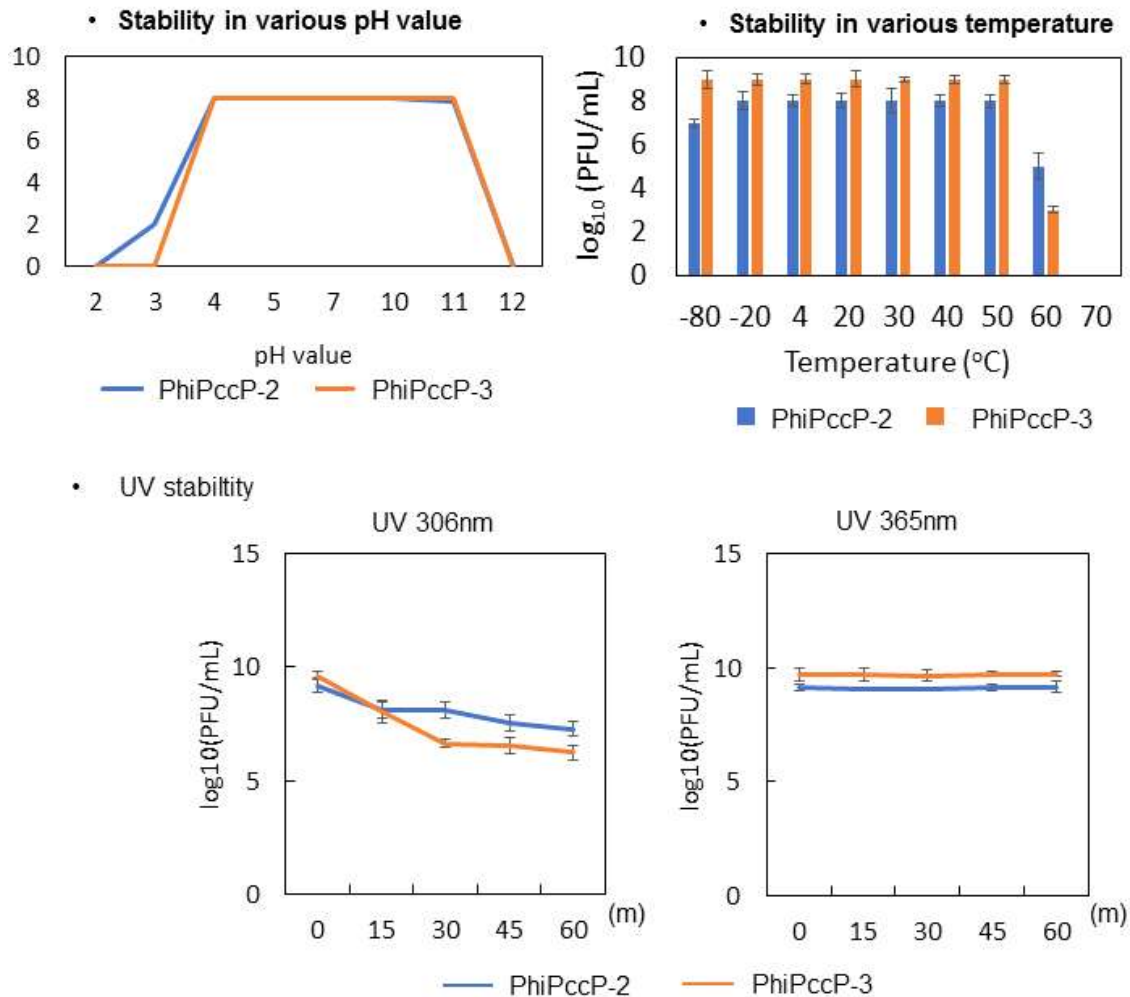


그림 36. phiPccP-2와 phiPccP-3 파지의 온도, pH, 자외선에 대한 활성 안정성

(다) 선별된 파지 형태 분석

최종 선별된 G10, phiPccP-3 파지를 증식한 후 순수분리를 진행하였다. 이후에 전자현미경을 이용하여 형태 분석을 진행하였다. 그 결과 G10 파지는 Podoviridae에, phiPccP-2은 Myoviridae에, phiPccP-3은 Siphoviridae에 속하는 것으로 확인되었다(그림 36, 37). 또한, 이 파지의 genomic DNA(gDNA)를 분리하여 EcoRI, BamHI, HindIII로 절단하여 그 패턴을 분석하였는데, EcoRI과 HindIII로 잘려서 여러 밴드를 형성하였다.

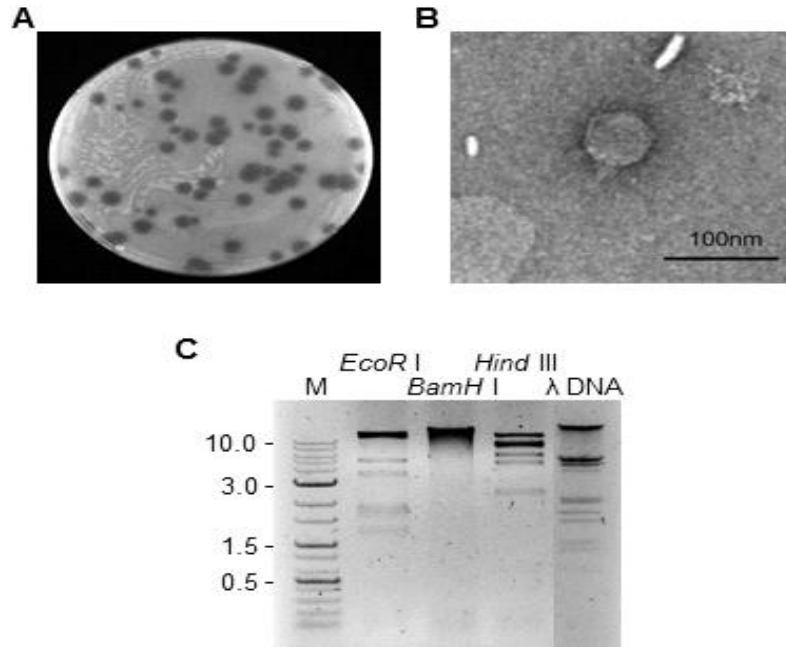


그림 37. G10 파지의 형태 및 gDNA 제한요소절단 패턴

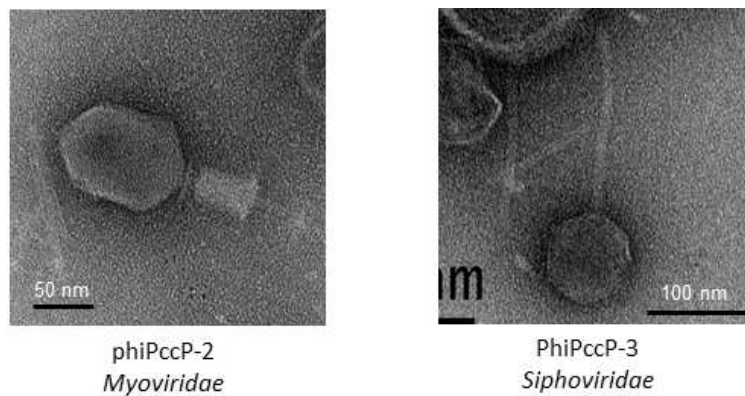


그림 38. phiPccP-2와 phiPccP-3 파지 형태

(2) 배추 무름병 방제용 파지의 방제효과 온실 검증

(가) 배추잎에서 파지의 배추 무름병 억제 효과 검증

포장 재배 시에 배추에 난 상처를 통해 배추 무름병이 발생하는 것을 모방하여, 배추 잎에 상처를 내어 병원세균을 접종하는 방법으로 파지의 병 억제효과를 검증하였다. 최종 선발된 G10 파지를 먼저 잎에 뿌려 처리한 후, 병원세균액을 묻힌 면도날로 상처를 내준 뒤, 상처로부터 병반이 뺏어나간 길이를 재어 병 발생한 정도를 수치화하였다.

그림 38, 39과 같이 파지를 처리한 처리구에서 병 억제효과가 매우 뛰어났다. 병처리구의 배추잎이 거의 전부 물러질 동안, 파지를 처리한 처리구는 평균 1cm 길이의 병반만 나타났다. 또한 유묘처리에서와 배추잎처리에서 모두 MOI 값 0.1로 병원세균보다 1/10 낮은 농도로 파지를 처리하여도 그 효과가 매우 좋았다. 이에 선발된 파지는 배추 무름병 억제효과가 매우 좋은 것으로 나타났다.

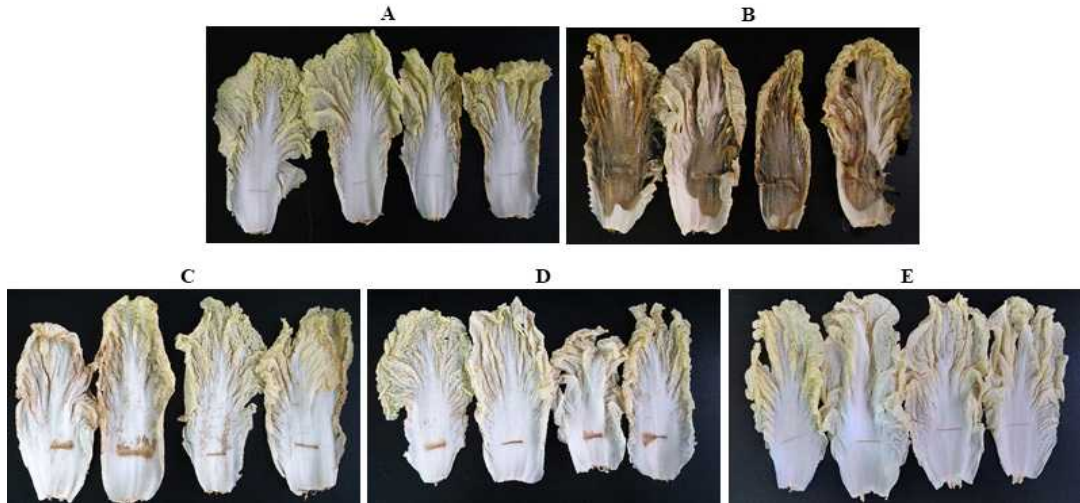


그림 39. 배추잎에서 파지 전처리 후 배추무름병 억제 효과 검정 결과. A:SM buffer+10mM MgCl₂, B:SM buffer+*Pcc*, C:PhageG10+*Pcc*(MOI=1.0), D:PhageG10+*Pcc*(MOI=0.1), E:Antibiotics.

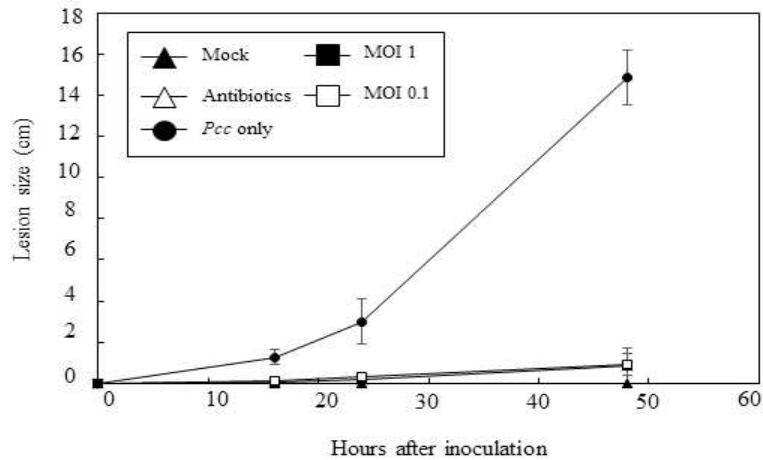


그림 40. 배추 무름병이 발생한 병반 길이를 수치화한 그래프

(나) 배추 유묘에서 파지의 배추 무름병 억제 효과 검정

온실 환경에서 재배시에 배추 유묘에 병원 세균이 오염되는 것을 모방하여 유묘에 파지 희석액을 전처리 후 병원세균을 처리하는 방법으로 파지의 병 억제 효과를 검정하였다. 이때 병이 발생한 정도를 판단하는 척도는 아래 그림 40과 같다.



그림 41. 배추 무름병이 발생한 정도에 따른 병 발생 척도

병원세균과 파지를 처리할 때에 부착능을 좋게 하기 위해 silwet L77 0.02%를 섞어 스프레이하였으며, 파지를 먼저 처리한 뒤 2시간 이후 병원세균을 후처리 하였다. 파지의 병 억제 효과를 비교하기 위해 파지와 병원세균을 희석할 때 사용한 buffer만 처리한 무처리구와 파지 없이 병원세균만 처리한 병처리구, 항생제 처리구를 대조구로 함께 처리하였다. 그 결과, 그림 38와 같이 병처리구에서 배추 유묘에 배추 무름병이 창궐할 동안 (그림 41, B) 파지 희석액을 처리한 처리구(그림 41, C, D)에서는 배추유묘가 건전한 것을 볼 수 있었다.

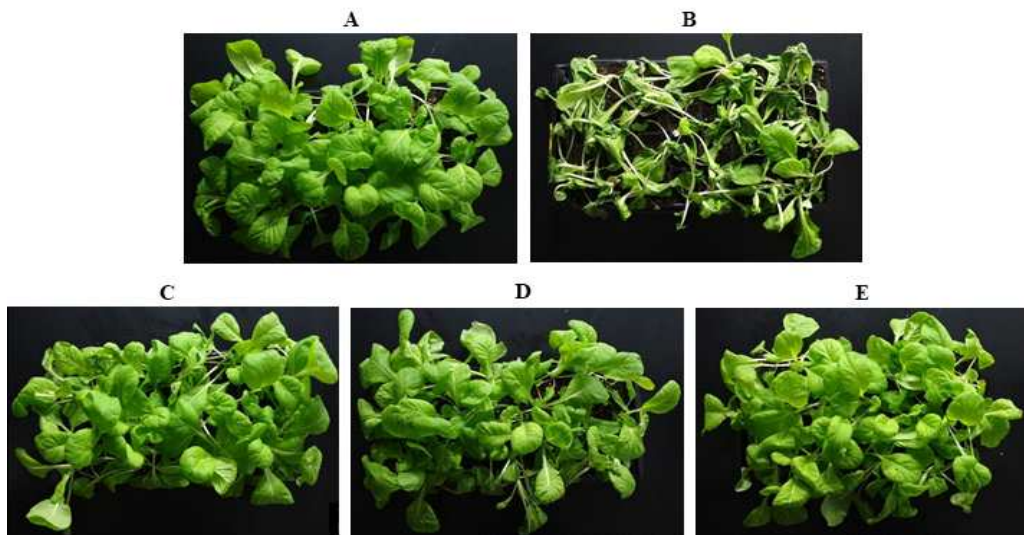


그림 42. 배추 유묘에서 배추 무름병 파지의 병 억제 효과 검정 결과.
A:SM buffer+10mM MgCl₂, B:SM buffer+*Pcc*, C:PhageG10+*Pcc*(MOI=1.0),
D:PhageG10+*Pcc*(MOI=0.1), E:Antibiotics.

이를 그림 40에서 명시한 척도로 그래프화 한 결과가 아래의 그림 42인데, 파지의 병 억제 효과가 월등한 것을 확인하였다.

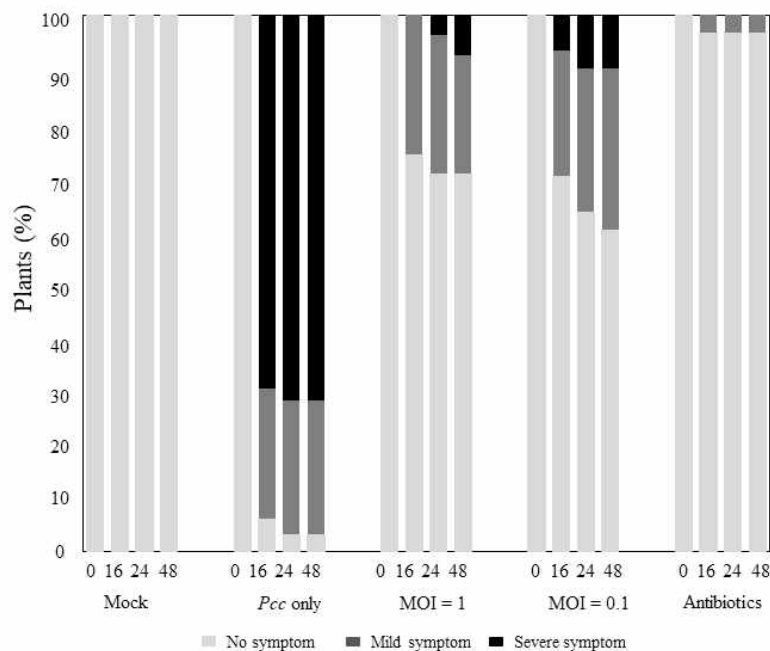


그림 43. 처리 시간 별 배추 무름병 발생 정도

phiPccP-2와 phiPccP-3 파지의 방제 효과 검정도 진행하였는데, phiPccP-2 파지의 방제 효과가 높게 나타남을 알 수 있었다(그림 43).

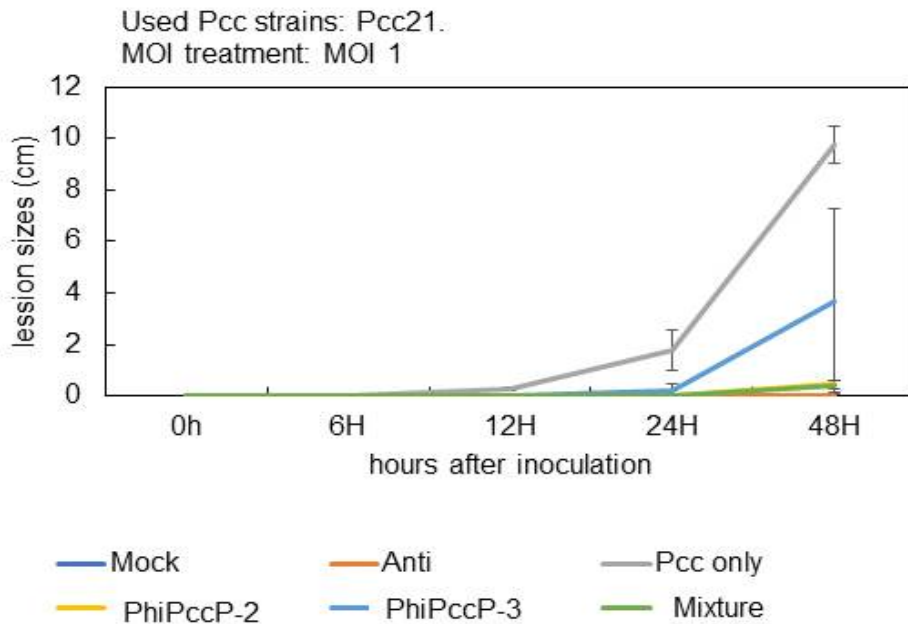


그림 44. 배추 무름병이 발생한 병반 길이를 수치화한 그래프

(4) 파지 처리 후 미생물상 변화 분석(제2협동팀과 공동 진행)

친환경 방제제로 사용할 수 있는지, 토양 내 미생물이 파지 처리 이후에도 안정적인지를 확인하기 위해 파지를 처리하지 않은 토양 내 미생물 군집과 파지를 처리한 토양 내 미생물 군집을 비교하였다. 미생물 군집변화를 확인할 토양은 배추를 재배 중인 농원의 토양 300mg에 10^8 pfu/ml의 G10 파지 용액 $100\mu\text{l}$ 씩을 처리한 뒤 7일 째에 토양을 이용하였다. 10 반복으로 진행할 수 있도록 열 개의 tube에 처리하였으며, 대조구로 SM buffer를 처리한 tube도 열 개 준비하였다. 회수된 토양으로부터 미생물 DNA 분리를 위해 FastDNA Spin kit (MP Biomedicals, Irvine, CA)를 사용하였다. 추출된 DNA는 0.7% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였으며, Nanodrop기기를 사용하여 정량 및 정성평가를 실시하였다.

미생물 군집 분석을 위해 바코드를 가지고 있는 universal primer들을 통하여 세균 16S rRNA 유전자의 V3-V4 부분을 ~ 500 bp 정도로 증폭했다. 16S rRNA 유전자는 polymerase chain reaction (PCR)로 증폭하였으며, PCR 반응물은 5 ng μl^{-1} 농도의 template DNA 4 μl 와 200 mM의 deoxynucleoside triphosphate 혼합액, 2.5%의 dimethyl sulfoxide, 400 nM의 각각의 primer, 150 μM ATP, 1.25 μl EX-Taq DNA polymerase가 포함된 50 μl 용액을 사용하였다. PCR 합성 조건은 다음과 같다: 94도 for 3 min of initial denaturation; 25 cycles of denaturation at 94도 for 15 s, annealing at 60도 for 45 s, extension at 72도 for 1 min, and a final extension at 72도 for 8 min.

획득한 16S rRNA 유전자 서열들은 기본적으로 USEARCH를 integration 한 QIIME pipeline을 통해 토양 내 미생물 군집을 분석하였다. 획득한 16S rRNA amplicon 서열들을

index로 별로 sorting 한 후 fastq 정보들에 기초하여 trimming 과 quality control을 DADA2 package를 이용하여 R program(3.4.4)에서 수행했다. Trimming 과 quality control 이 끝난 sequence들을 pandaseq 프로그램을 이용하여 merge 하고 merge된 sequence들은 VSEARCH 프로그램을 통하여 dereplication했다. 그 후, dereplication된 sequence들을 USEARCH algorithm을 이용하여 clustering 작업을 수행하였다. 각각의 sequencing 서열에서 대표 sequence들을 선발하여 RDP classifier와 Greengenes database 를 이용하여 각각의 대표 염기서열을 동정하고 OTU table을 완성했다.

미생물 군집내의 비교 분석은 R program을 통한 phyloseq, ggplot2 package 들을 이용하여 observed species, Chao1, ACE, shannon index를 시각화 하고 이를 토대로 미생물 군집의 species richness 와 evenness정도를 분석했다. 파지 처리구와 무처리구간의 미생물 군집의 비교는 R을 통한 VEGAN, phyloseq, ggplot2 packages를 이용하여 Bray-Curtis dissimilarity measures를 수치화하고 non-metric multidimensional scaling (NMDS)방법으로 시각화 하여 군집간의 거리를 보여주었다.

토양 내 미생물 군집의 richness와 evenness를 비교 결과(그림 44), phage_G10의 경우 두 군집간의 richness와 evenness는 ANOVA 분석결과 (observed OTU ($p=0.42$), Shannon index ($p=0.2345$)) 유의한 차이가 없음을 확인하였다. 파지 처리구와 무처리구의 토양 미생물 군집간의 분석은 UniFrac (weighted)를 이용하여 계산하였으며 Principal Coordinates Analysis (PCoA) 방법을 통하여 시각화하였다(그림 45).

파지 처리구와 무처리 사이의 군집의 차이를 ADONIS 분석한 결과 전체 실험구간에 통계적으로 차이가 없음($R^2=0.06028$, $p=0.236$)을 확인하였다. 이러한 결과는 이후에 파지를 노지에 처리하더라도 토양 내 미생물 군집에 미치는 영향이 없을 것으로 보이는 긍정적인 결과로, 방제용 파지용액 처리가 환경적으로 안전함을 보여준다.

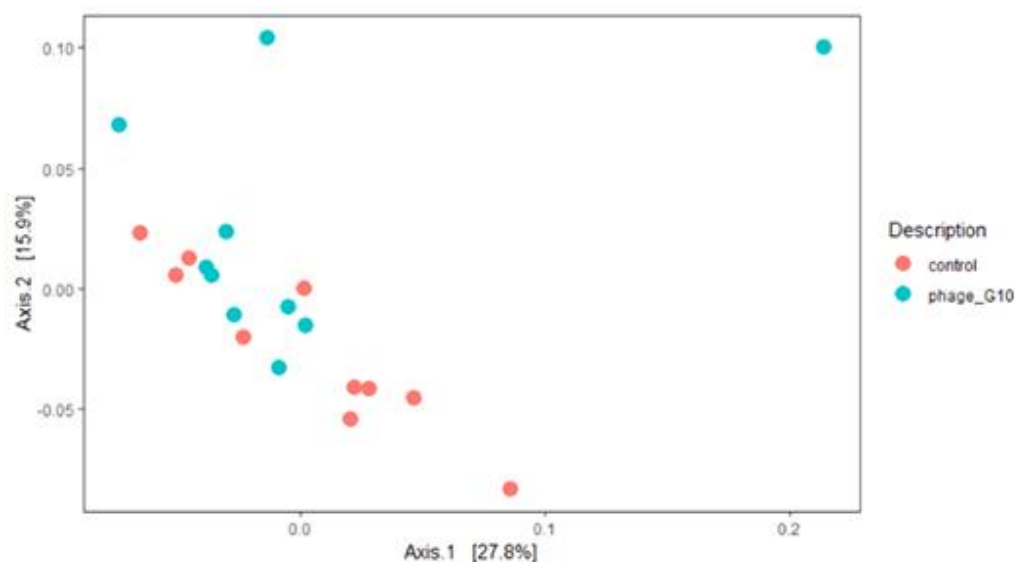


그림 45. Bray-Curtis dissimilarity을 이용한 파지 처리구와 무처리구의 미생물 군집 분석

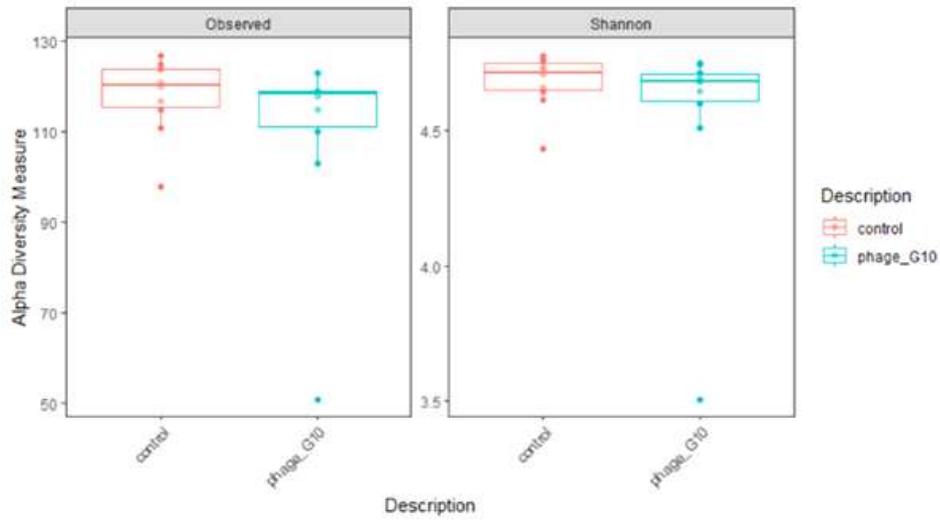


그림 46. 파지 처리구와 무처리 간의 토양 마이크로바이옴의 종 richness와 evenness를 비교

(4) 파지 시제품 제작 및 방제효과 검증(제3협동팀과 공동 진행)

(가) 파지의 제제화 첨가물질에 대한 파지 안정성

선별된 G10 파지는 2년차 결과에서 이미 고온 및 저온과 pH 3.5-11, 또 토양에서 안정적인 것을 이미 확인하였다. 따라서 환경적인 요인으로 파지의 활성이 떨어지지 않을 것으로 예상된다. 이에 실제 제품화로 이어질 예정이며, 시제품으로 만들어진 이후 함께 들어간 제제화용 보조제 등에 의해 파지의 활성이 떨어지는지 확인하였다. 시제품으로 만든 이후에도 파지의 활성이 떨어지지 않고 셀 수 있는 plaque로 자라는 것을 확인할 수 있었으며 농도 또한 떨어지지 않았다(그림 46). 따라서 배추 무름병 방제용 파지는 제품화에 필요한 제제화용 보조제에 안정적인 것으로 나타났다.

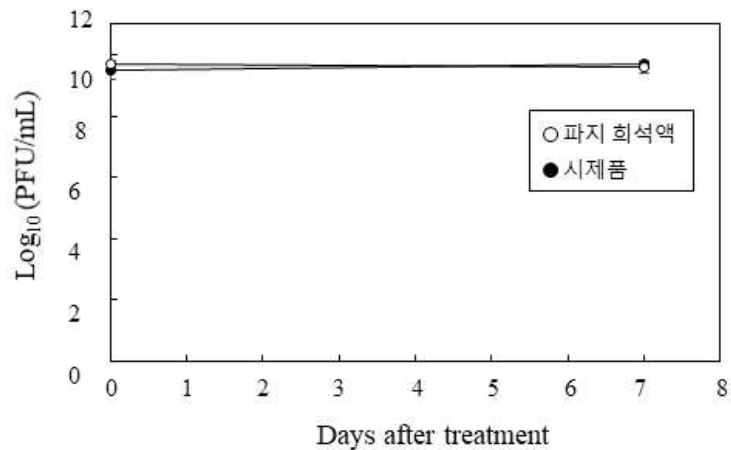


그림 47. G10 파지 희석액과 파지 희석액으로 만든 시제품 내의 파지 농도 분석 결과

(나) 파지 증식을 위한 최소접종농도 결정

대량 증식을 위한 G10 파지의 초기 최적 접종농도를 검정하기 위하여 대상 균액의 농도가 OD₆₀₀ 0.5(10⁸ CFU/ml)일 때 MOI 값을 0.0001, 0.00001로 줄이면서 12시간까지 파지 증식량을 측정하였다. 그 결과 MOI가 0.00001일 경우에 12시간후에 증식량이 최대치에 도달하였다(그림 47).

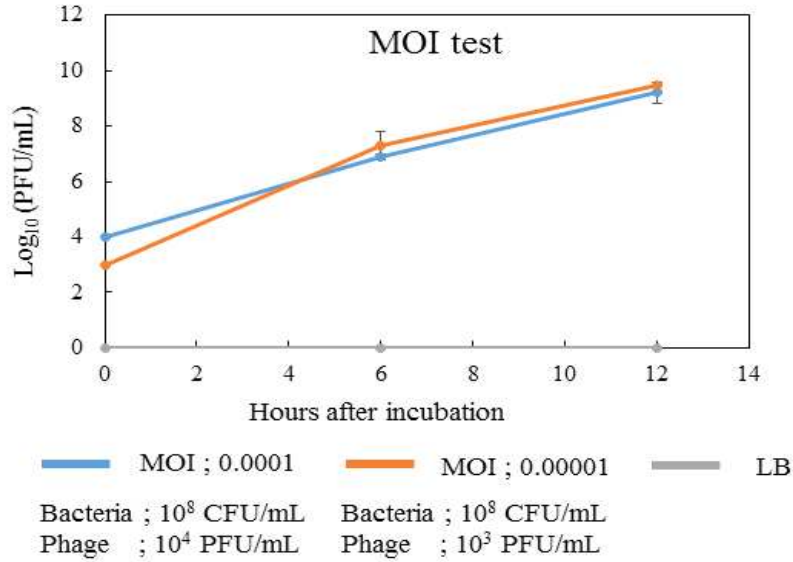


그림 48. 파지의 초기 최적 접종농도 검정 결과

phiPccP-2와 phiPccP-3 파지의 경우도 동일한 실험을 진행하였다. 그 결과 MOI 0.0001에서도 12시간 정도에 최고치로 증식이 됨을 확인하였다(그림 49).

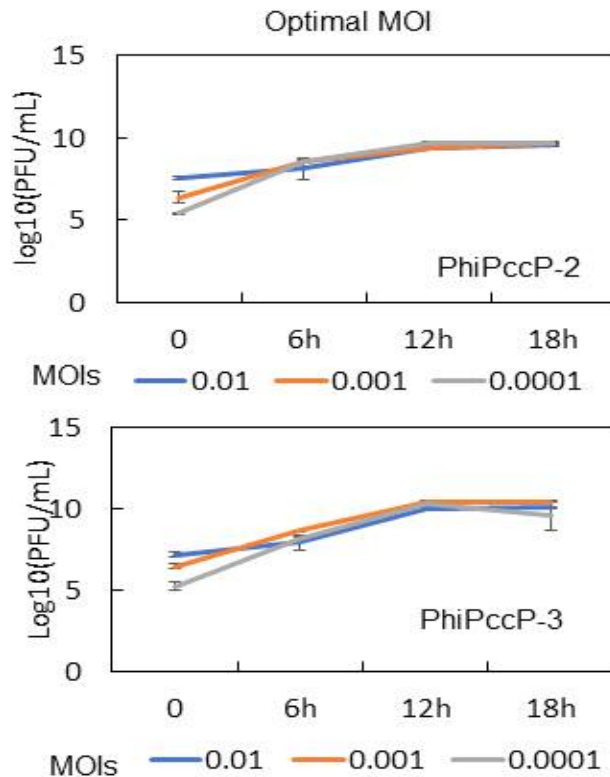


그림 49. 파지의 초기 최적 접종농도 검정 결과

다. 토마토 궤양병 방제용 박테리오파지 연구

(1) 토마토 궤양병 방제용 파지 10개 이상 확보 및 특성 조사

토마토 궤양병 세균은 토마토에 궤양을 일으키는 그람양성 세균으로 현재까지 이를 기주로 하는 파지가 많이 밝혀져 있지 않다. 국내 토마토 궤양병 발병 이력이 있는 농가를 비롯하여 총 64곳의 토양을 채취하였다(표 20).

[표 21. 토마토 궤양병 파지를 분리하기 위한 토양 샘플 목록]

No.	장소	Group
1	충남 논산시 지산육묘장	1
2	충남 논산시 성동면 개척리	
3	충남 부여군 세도면 청포리 68-4	
4	충남 부여군 세도면 청포리 407-10	
5	충남 부여군 세도면 가회리	
6	충남 부여군 규암면 합송리	
7	부여군 세도면 가회리 토마토 재배농가	
8	부여군 세도면 가회리 토마토 재배농가	
9	부여군 세도면 가회리 토마토 재배농가	
10	부여군 세도면 가회리 장미 재배농가	
11	부여군 세도면 가회리 토마토 재배농가	
12	충남 논산시 부창동 한국농어촌공사 논산,금산지사 봉화배수장	
13	세종특별시 부강면 갈산리 채소밭	
14	청주시 서원구 현도면 양지리 채소밭	
15	청주시 서원구 현도면 중척리 토마토재배농가	
16	청주시 서원구 현도면 시목리 채소밭	
17	청주시 서원구 현도면 달계리 채소밭	3
18	익산시 망성면 토마토 재배농가	
19	익산시 용동면 토마토재배농가	
20	익산시 망성면 토마토 재배농가	
21	익산시 용안면 채소밭	
22	익산시 망성면 토마토 재배농가	
23	익산시 용안면 토마토 재배농가	4
24	경기도 광주시 퇴촌면 텃밭	
25	경기도 광주시 퇴촌면 정지리 토마토 재배농가	
26	경기도 광주시 퇴촌면 텃밭	
27	경기도 광주시 퇴촌면 텃밭	
28	경기도 광주시 퇴촌면 가지고추 재배농가	
29	경기도 광주시 퇴촌면 토마토 재배농가	
30	경기도 광주시 퇴촌면 토마토 재배농가	
31	경기도 광주시 퇴촌면 관음리 노지 텃밭	
32	천안 안성지역	5
33	대구 달성군 참살이달성농장	
34	대구 달성군 참살이달성농장	
35	경북 성주 농업기술원 참외과채류연구소	
36	경북 성주 대가면 옥화리 714-6	
37	경북 안동 풍천면 어담리 105-1 ①	
38	경북 안동 풍천면 어담리 105-1 ②	
39	경북 안동 일직면 국곡리 116-3	

40	경북 청송 진촌면 기곡리 176	
41	경북 영양 입암면 방전리 551-2	
42	경북 영양 청기면 정족리 1	
43	경북 영양 청기면 정족리 2	
44	경북 영양 청기면 당리 973-10	
45	경북 영양 청기면 행화리 297-2	
46	충남 논산 부적면 덕평리 1086-9 1	6
47	충남 논산 부적면 덕평리 1086-9 2	
48	충남 논산 부적면 덕평리 1086-9 3	
49	충남 논산 성동면 병촌리 57-1	
50	충남 논산 성동면 개척리 562	
51	충남 부여 세도면 가회리 604 1	
52	충남 부여 세도면 가회리 604 2	
53	전북 부안군 줄포면 파산리 28-2	
54	충북 음성 대소면 부윤리 1-ㄱ	7
55	충북 음성 대소면 부윤리 1-ㄴ	
56	충북 음성 대소면 부윤리 2	
57	충북 음성 대소면 부윤리 3	
58	충북 음성 농업기술원 수박연구소	
59	전남 장성 진원면 산동리 529-17	8
60	전남 담양 수북면 황금리 663	
61	전남 담양 수북면 황금리 121	
22	익산시 망성면 토마토 재배농가	9
63	강원도 횡성군 토양	10
64	강원도 횡성군 토양	

토마토 껍질병 파지를 분리하기 위해 사용된 균주는 총 9가지를 확보하였다(표 21). 파지 분리에 사용된 세균은 KB (King's broth B)에서 26°C에 overnight 배양하였다. 균액으로 사용할 때에는 OD₆₀₀가 0.2일 때 사용하였다.

[표 22. 토마토 껍질병 파지를 분리하기 위해 사용된 토마토 껍질병 세균 목록]

No.	Strains	Note
1	Cmm PPP1	공주줄기분리
2	Cmm PPP2	포천분리균주
3	Cmm KACC16995	미생물자원센터
4	Cmm 4357	토마토
5	Cmm 1591 (#2644)	충북대학교
6	Cmm TS004 (#1593)	충북대학교
7	Cmm LMG3687(#1587)	충북대학교
8	Cmm T (LMG7333)	충북대학교
9	Cmm LMG3685 (#1588)	충북대학교

배추 무름병 파지를 분리할 때와 마찬가지로, 토양 샘플을 지역단위로 그룹핑하여 하나의 샘플로 합쳐서 실험에 사용했다. 토양샘플에 들어있을 파지가 어떤 세균을 기주로 할지 알 수 없으므로, KB 액체배지와 토양샘플과 먼저 배양해둔 토마토 껍질병 세균 균액을 섞어 26°C에서 현탁배양 해주었다. 충분히 파지가 자랐을 것이라고 예상되는 이틀 후, 원심분리한 뒤 filter paper로 걸러 상층액을 얻었다. 얻은 상층액은 overlay방법으로 파지의 유무를 확인했다. 각 균주의 균액과 녹였다가

식힌 0.4% soft agar KB배지를 KB 고체배지 위에 붓고 식혀준 다음 각 토양샘플 그룹의 상층액을 dotting 해주고 21°C에 이틀간 배양했다. dotting한 자리에 투명한 원이 생기면 이를 파지에 의한 plaque라고 염두에 둘 수 있다.

이렇게 처리한 토양 샘플 중, 6번과 9번 그룹을 dotting한 자리가 투명해지는 것을 볼 수 있었다(그림 49). 이를 파지에 의한 plaque일 것으로 보고 각 그룹의 상층액을 다시 overlay하여 더 많은 plaque를 확보하고 순수분리하기 위한 실험을 진행하였다.

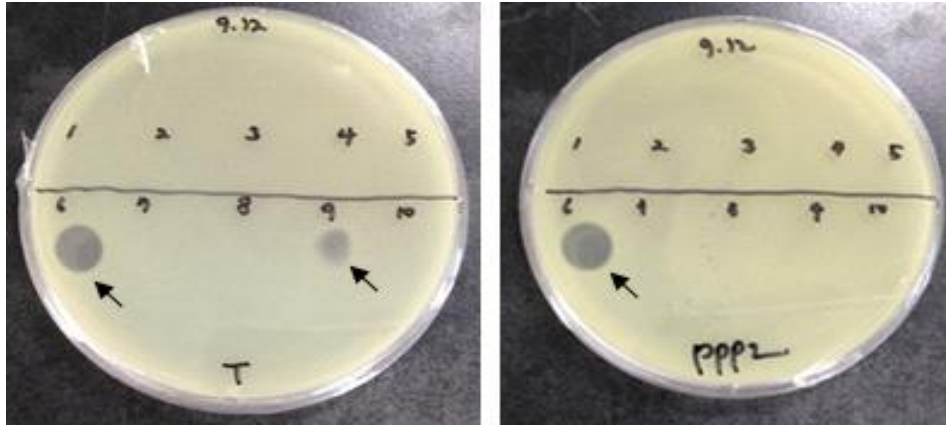


그림 50. 토마토 궤양병 파지에 의한 것으로 추정되는 plaque (화살표)

결과적으로 이들 모두가 파지에 의한 plaque 아닌 다른 원인에 의한 것으로 확인되었다. 1차년도에 이어 2차년도에도 토마토, 고추 재배지 토양을 샘플링하여 토마토 궤양병 병원세균인 *Clavibacter michiganensis*에 효과를 보이는 박테리오파지 분리를 시도하였으나 결과적으로 모두 실패하였다.

(2) 토마토 궤양병균 유전체 분석

파지 분리에 실패한 이유를 알아보기 위해서 토마토 궤양병 병원세균인 *Clavibacter michiganensis*의 유전체 정보를 이용하여 prophage 유전자군을 분석하였다. 분석결과 이 병원세균의 유전체내에 불완전한 형태의 prophage 유전자군이 일부 존재하고 있지만, 일반적으로 박테리오파지가 잘 알려진 세균들과는 달리 prophage 유전자군의 숫자도 매우 작고, 형태도 불완전한 상태였음을 확인하였다(그림 50). *Clavibacter* 속에 속하는 유사 병원세균들인 *C. sepedonicus*와 *C. nebraskensis*의 유전체들도 일부 분석한 결과 유사한 결과를 보였다.

이러한 이유로 *Clavibacter* 속에 속하는 병원세균들의 경우 G+C content가 70% 이상으로 매우 높아 박테리오파지들이 chromosome에 integration이 잘 이루어지지 않아서 prophage 형태를 가지기 힘들 것으로 추정하였다. 또한, 이유는 정확치 않지만, 이 속에 속하는 병원세균들이 박테리오파지에 대한 대응 능력이 매우 뛰어날 수도 있을 것으로 판단하였다.

Clavibacter michiganensis NCPPB382, GC%: 73.4%

Total : 0 prophage regions have been identified, of which 0 regions are intact, 0 regions are incomplete, 0 regions are questionable.

REGION	REGION_LENGTH	COMPLETENESS	SCORE	#CDS	REGION_POSITION	POSSIBLE PHAGE	GC_PERCENTAGE	DETAIL
--------	---------------	--------------	-------	------	-----------------	----------------	---------------	--------

Legend:

REGION: the number assigned to the region

REGION_LENGTH: the length of the sequence of that region (in bp)

COMPLETENESS: a prediction of whether the region contains a intact or incomplete prophage based on the above criteria

SCORE: the score of the region based on the above criteria

#CDS: the number of coding sequence

REGION_POSITION: the start and end positions of the region on the bacterial chromosome

PHAGE: the phage with the highest number of proteins most similar to those in the region

GC_PERCENTAGE: the percentage of gc nucleotides of the region

DETAIL: detail info of the region

gi|170780462|ref|NC_010407.1| *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* chromosome, complete .3258645, GC%: 72.56%, length = 3258645 bps

Total : 1 prophage regions have been identified, of which 0 regions are intact, 1 regions are incomplete, 0 regions are questionable.

REGION	REGION_LENGTH	COMPLETENESS	SCORE	#CDS	REGION_POSITION	POSSIBLE PHAGE	GC_PERCENTAGE	DETAIL
1	8.5Kb	incomplete	30	9	254527-263053	PHAGE Tricho_2c	73.28%	Detail

Legend:

REGION: the number assigned to the region

REGION_LENGTH: the length of the sequence of that region (in bp)

COMPLETENESS: a prediction of whether the region contains a intact or incomplete prophage based on the above criteria

SCORE: the score of the region based on the above criteria

#CDS: the number of coding sequence

REGION_POSITION: the start and end positions of the region on the bacterial chromosome

PHAGE: the phage with the highest number of proteins most similar to those in the region

GC_PERCENTAGE: the percentage of gc nucleotides of the region

DETAIL: detail info of the region

Clavibacter nebraskensis NCPPB 2581, GC%: 73%

Total : 0 prophage regions have been identified, of which 0 regions are intact, 0 regions are incomplete, 0 regions are questionable.

REGION	REGION_LENGTH	COMPLETENESS	SCORE	#CDS	REGION_POSITION	POSSIBLE PHAGE	GC_PERCENTAGE	DETAIL
--------	---------------	--------------	-------	------	-----------------	----------------	---------------	--------

Legend:

REGION: the number assigned to the region

REGION_LENGTH: the length of the sequence of that region (in bp)

COMPLETENESS: a prediction of whether the region contains a intact or incomplete prophage based on the above criteria

SCORE: the score of the region based on the above criteria

#CDS: the number of coding sequence

REGION_POSITION: the start and end positions of the region on the bacterial chromosome

PHAGE: the phage with the highest number of proteins most similar to those in the region

GC_PERCENTAGE: the percentage of gc nucleotides of the region

DETAIL: detail info of the region

그림 51. *Clavibacter* 속 균들이 가지는 prophage 유전자군 분석 결과

본 과제 대상 다른 병원세균에서의 prophage 분석 결과를 보면, prophage 유전자군이 많이 존재하고 있었다(그림 51).

gi|300327263|ref|AEAL000000001| *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* str. M302091 .1, whole .5849032, GC%: 58.84%, length = 5849032 bps

Total : 5 prophage regions have been identified, of which 3 regions are intact, 2 regions are incomplete, 0 regions are questionable.

REGION	REGION LENGTH	COMPLETENESS	SCORE	#CDS	REGION POSITION	POSSIBLE PHAGE	GC PERCENTAGE	DETAIL
1	51.5Kb	intact	150	65	982355-1003900	<i>Pseudomonas</i> phage phiCTX	56.83%	Detail
2	14.3Kb	incomplete	50	7	3349768-3364134	Prophage <i>Xylella fastidiosa</i> Temecula1	59.72%	Detail
3	45.5Kb	intact	110	36	5044416-5089976	<i>Haemophilus</i> phage HP2	59.52%	Detail
4	10.3Kb	incomplete	50	18	5782323-5792705	<i>Klebsiella</i> phage phiKO2	58.03%	Detail
5	33Kb	intact	150	67	5815502-5848574	Prophage <i>Pseudomonas putida</i> KT2440	55.06%	Detail

Legend:

REGION: the number assigned to the region
REGION LENGTH: the length of the sequence of that region (in bp)
COMPLETENESS: a prediction of whether the region contains an intact or incomplete prophage based on the above criteria
SCORE: the score of the region based on the above criteria
#CDS: the number of coding sequence
REGION POSITION: the start and end positions of the region on the bacterial chromosome
PHAGE: the phage with the highest number of proteins most similar to those in the region
GC PERCENTAGE: the percentage of gc nucleotides of the region
DETAIL: detail info of the region

gi|198440708|ref|ABVY000000000| *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* WPP14 .4823187, GC%: 52.01%, length = 4823187 bps

Total : 4 prophage regions have been identified, of which 1 regions are intact, 2 regions are incomplete, 1 regions are questionable.

REGION	REGION LENGTH	COMPLETENESS	SCORE	#CDS	REGION POSITION	POSSIBLE PHAGE	GC PERCENTAGE	DETAIL
1	16.6Kb	incomplete	30	23	177505-194137	<i>Burkholderia</i> phage BeepMu	52.33%	Detail
2	11.1Kb	incomplete	30	14	1246614-1257733	<i>Pasteurella</i> phage F108	43.67%	Detail
3	12.1Kb	questionable	90	11	4706497-4718647	<i>Erwinia</i> phage ENT90	54.19%	Detail
4	71.2Kb	intact	150	141	4720017-4791289	PHAGE <i>Yersinia</i> 411C	55.84%	Detail

Legend:

REGION: the number assigned to the region
REGION LENGTH: the length of the sequence of that region (in bp)
COMPLETENESS: a prediction of whether the region contains an intact or incomplete prophage based on the above criteria
SCORE: the score of the region based on the above criteria
#CDS: the number of coding sequence
REGION POSITION: the start and end positions of the region on the bacterial chromosome
PHAGE: the phage with the highest number of proteins most similar to those in the region
GC PERCENTAGE: the percentage of gc nucleotides of the region
DETAIL: detail info of the region

그림 52. *Pseudomonas*와 *Pectobacterium*속 균들의 prophage 유전자군 분석 결과

(3) 결론

위의 결과들을 바탕으로 토마토 궂양병 방제용 파지 관련 연구내용은 2차년도에서 종료하기로 결정하였다. 대신에 3차년도부터 연구실에서 보유하고 있던 과수 화상병 방제용 파지 관련 연구내용을 추가하여 연구를 진행하기로 결정하였다.

라. 과수 화상병 방제용 박테리오파지 연구

(1) 다양한 환경조건에서의 파지 안정성 분석

다른 연구과제를 통해 선별된 과수 화상병 방제용 파지 21개 중 활성이 가장 좋은 1개를 선별하였으며, 이를 사용해 3차년도부터 파지 테라피 관련 연구를 진행하였다. 파지를 제품화에 이용하기 위해 선별한 파지의 특성을 우선 조사하였다. 방제용 파지용액을 노지에 처리하기 위해서는 온도와 pH 및 토양 내에서의 안정성이 중요하므로, 각 환경에서의 안정성을 우선 검정하였다.

먼저 온도에 대한 안정성을 확인하기 위하여 10^5 pfu/ml의 파지용액을 상온에서부터 60°C 까지의 구간으로 1시간 동안 처리한 뒤 파지의 활성을 확인하였다. 파지의 활성을 검정한 결과 선별된 파지는 50°C 까지 안정적인 것으로 확인되었는데(그림 52), 국내의 여름 환경을 지내기에 안정적인 것으로 보인다. 또한 토양의 산성화로 인한 낮은 pH, 비료 등으로 인한 높은 pH에 안정적이어야 하므로, 과수 화상병 방제용 파지의 pH에 대한 안정성을 확인하였다. 각 pH환경에 10^7 pfu/ml 파지용액을 4°C , 16시간 처리한 이후 활성을 확인한 결과, 낮게는 pH 5에서부터 높게는 pH 10까지 매우 안정적인 것을 알 수 있었다(그림 53).

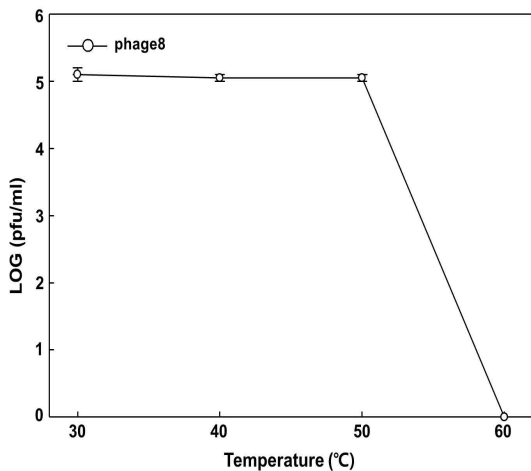


그림 53. 과수 화상병 방제용 파지의 온도 안정성 검정 결과

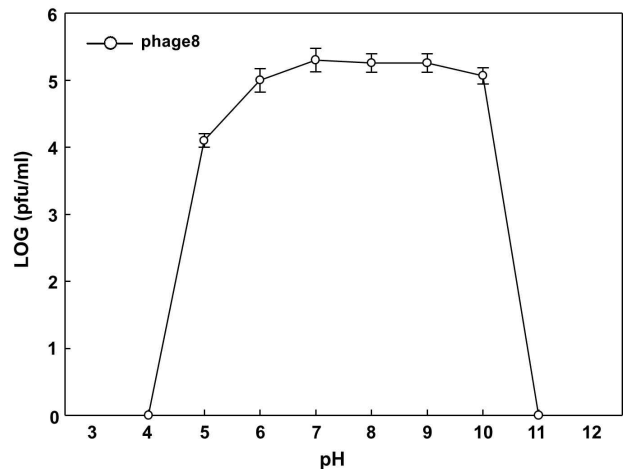


그림 54. 과수 화상병 방제용 파지의 pH 안정성 검정 결과

파지를 제품화시키기 위해 들어가는 여러 가지 제제화용 보조제 후보물질에 대해 선별된 파지의 안정성을 검정하였다. 과수 화상병 방제용 파지 초기농도 10^9 pfu/ml에 각 보조제를 1%의 농도로 처리한 뒤 7일 후 농도 변화를 조사하였다. 검정결과 과수 화상병 방제용 파지는 A2와 C1에 미약하게 활성이 떨어진 것 반면, 나머지 다른 보조제들은 파지 활성에 영향이 없는 것을 확인하였다(그림 54). 이들은 제품 제작에 사용될 예정이다.

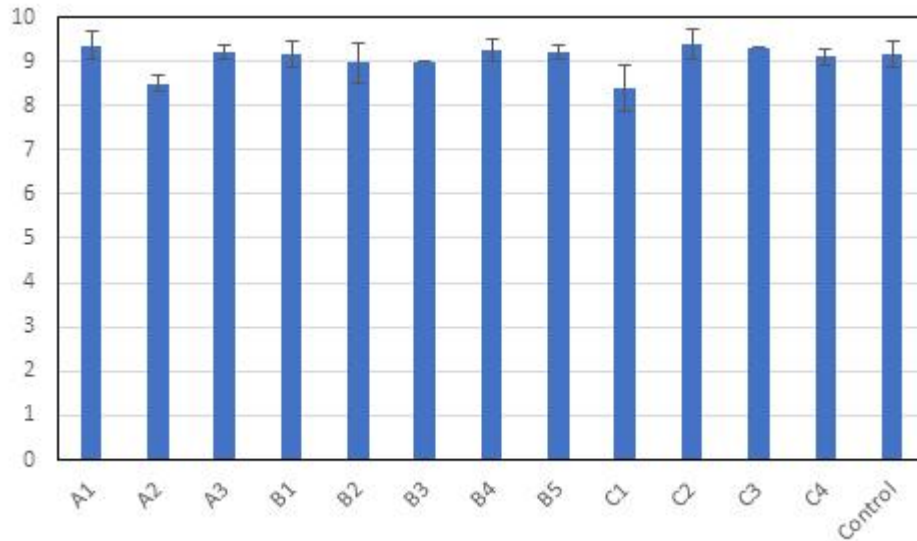


그림 55. 각 제제화용 보조제들을 과지에 처리 한 결과 (7일 후)

(2) 과지 처리 후 미생물상 변화 분석(제2협동팀과 공동 진행)

- 또한 제제화를 위해 친환경 방제제로서 토양 내 미생물 군집을 해치지 않는지 검정하였다. 검정 방법은 배추 무름병 과지가 토양 내 미생물 군집에 미치는 방법을 조사한 것과 같다. 사과과수원의 근권토양 300mg에 과수 화상병 과지를 10^7 cfu/g으로 처리한 뒤 7일째에 확인하였다.
- 과지 처리구와 무처리구간의 미생물 군집의 비교는 R을 통한 VEGAN, phyloseq, ggplot2 packages를 이용하여 Bray-Curtis dissimilarity measures를 수치화하고 non-metric multidimensional scaling (NMDS)방법으로 시각화 하여 군집간의 거리를 보여주었다.
- phage_phi8의 경우 역시 두 군집간의 richness와 evenness의 ANOVA 분석 결과 (observed OTU ($p=0.314$), Shannon index ($p=0.6404$)) 유의한 차이가 없음을 확인하였다(그림 55).

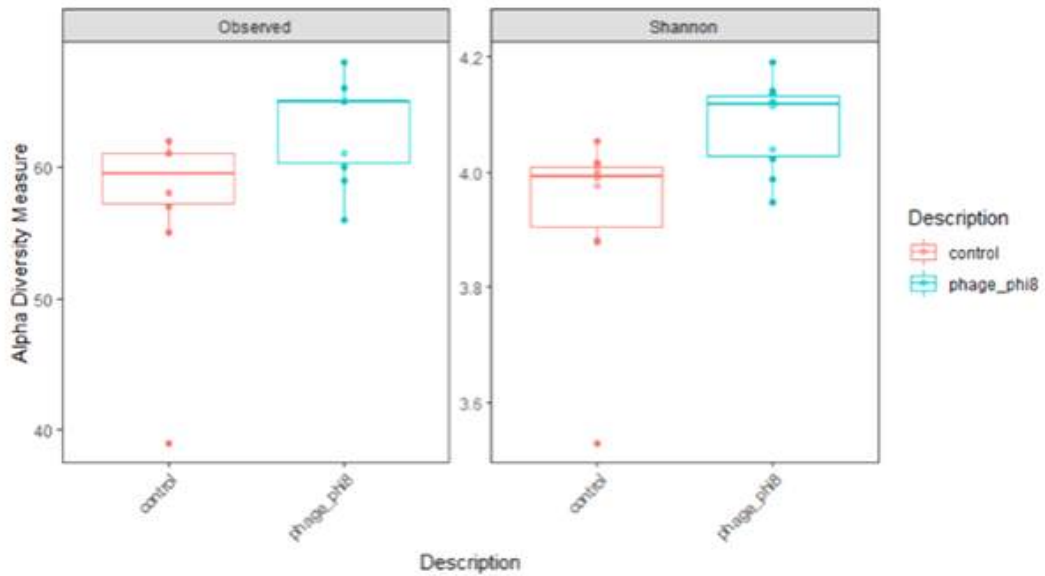


그림 56. 파지 처리구와 무처리 간의 토양 마이크로바이옴의 종 richness와 evenness를 비교

- 파지 처리구와 무처리구의 토양 미생물 군집간의 분석은 UniFrac (weighted)를 이용하여 계산하였으며 Principal Coordinates Analysis (PCoA) 방법을 통하여 시각화하였다(그림 56).

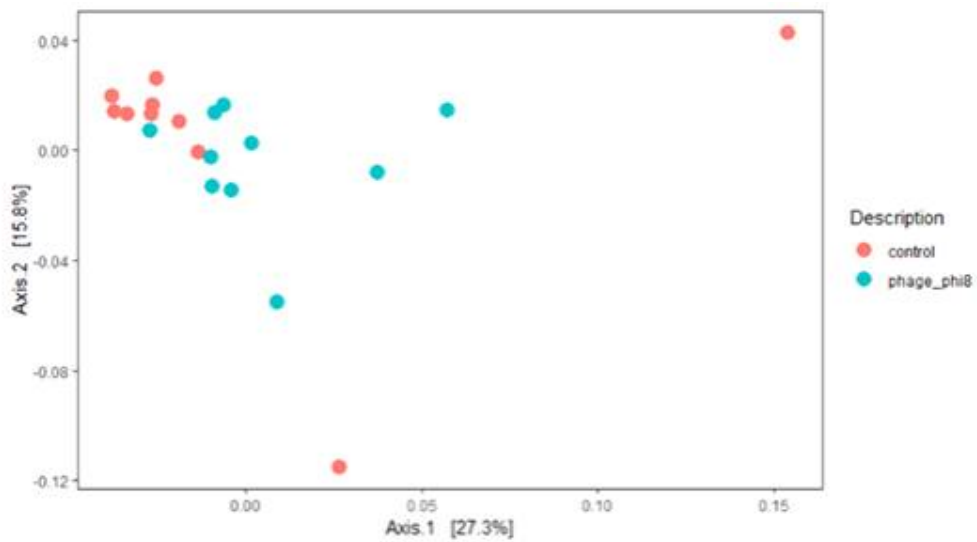


그림 57. Bray-Curtis dissimilarity을 이용한 파지 처리구와 무처리구의 미생물 군집 분석

- 파지 처리구와 무처리 사이의 군집의 차이를 ADONIS 분석한 결과 전체 실험구간에 통계적으로 차이가 없음($R^2=0.05207$, $p=0.473$)을 확인하였다.
- 따라서 과수 화상병 방제용 파지 역시 노지에 처리하더라도 토양 내 미생물 군집에 미치는 영향이 없을 것으로 예상되며, 방제용 파지용액이 환경적으로 문제 없을 것으로 예상된다.

2. 수박 과실썩음병 방제용 파지요법 기술 개발[제1협동연구(부경대)]

가. 가. 균주 확보 및 특성 조사

(1) 신규 *Acidovorax citrulli* 균주 확보

실험에 사용한 *Acidovorax citrulli* 균주는 기존 확보 중인 19균주 외에 충북대학교, 경희대학교, 농촌진흥청, 전라북도농업기술원 등으로부터 21 균주를 분양받아서 추가로 확보하였으며, 재배지에서의 추가 균주 확보를 위하여 밀양, 담양, 성주, 예산, 부여, 봉화, 제주, 고창 등 수박 재배지에서 확보한 토양 및 식물체 샘플을 Kubota et al (2011)의 incomplete selective medium을 이용하여 분리하였다. 10g의 토양 또는 식물체를 10ml의 KB배지에 넣고 34°C, 48시간 배양한 다음 100 μ l의 배양액을 selective media에 평판도말하여 34°C에서 72시간동안 배양하였다. 배양 결과로 얻어진 초록색을 띠는 colony들을 genotype 분석한 결과 2개의 신규 *A. citrulli* 균주를 분리하였으며, 기존확보, 신규분양 및 분리 과정을 통하여 총 42개의 *A. citrulli* 균주를 확보하였다.

(2) 확보된 균주의 genotype 확인

확보된 총 42 *A. citrulli* 균주의 genotype을 확인하기 위해 Zivanovic and Walcott (2017)의 3종류의 primer [G2AcFwd, G12AcFwd, G12AcRev]를 이용하여 PCR을 수행하고, 결과 산물의 형성 여부에 따라 두 그룹으로 분류하였으며, Group I의 경우 G12AcFwd (5'-CCGAAGAGATAAACTGCATC-3')와 G12AcRev (5'-ACG TACTGCCGATTTTTGC-3')를 이용해 PCR을 수행하여 PCR 밴드가 형성될 경우 *A. citrulli* genotype 그룹으로 분류하였고, 이들 중 아래의 Group II primer에 대하여 PCR 밴드가 형성되지 않을 시 Group I으로 최종적으로 분류하였다. Group II의 경우는 G2AcFwd (5'-CGATAGGGTTGGGTTCAAG-3')와 G12AcRev (5'-ACG TACTGCCGATTTTTGC-3')를 사용한 PCR 및 전기영동 결과로 밴드 형성 시 Group II로 분류하였으며, 이와 같은 방법으로 보유하고 있는 42 균주들을 분석한 결과 Group I 25종, Group II 17종으로 분류 하였다(표 22).

(3) 병원성 확인 및 Mytomycin C 처리에 의하여 내재하는 프로바이러스 확인

Mitomycin C (1 μ g/ml)을 이용하여 *A. citrulli* genome에 존재할 수 있는 provirus의 induction을 유도하였으며, provirus의 유도는 *A. citrulli* NWB SC206 strain을 대상으로 실시하였다. Mitomycin C에 의하여 provirus가 유도될 경우 lysis에 의한 흡광도 감소가 예상되나, 배양액에 접종한 후 6시간마다 흡광도(OD₆₀₀)값을 측정한 결과 OD₆₀₀ 값은 첫 측정치 0.603에서 시작하여 6시간 후 OD₆₀₀ = 1.11가 나왔고 계속해서 증가하여 바이러스가 검출되지 않았다.

표 23. 42종의 Genotyping 결과

Genetic group	Host strain (<i>A.citrulli</i>)	Genetic group	Host strain (<i>A.citrulli</i>)
Group I	AC37	Group II	KHU1
	LB09-308		AC42
	LB10-232		LB09-309
	LB10-233		LB10-234
	KACC17022		KACC17000
	NWB SC107		KACC17005
	NWB SC108		KACC17909
	NWB SC109		KACC17913
	NWB SC111		JBARES-1
	NWB SC172		JBARES-2
	NWB SC196		KHU2
	NWB SC202		CHNU-3
	NWB SC205		PKNU-1
	NWB SC206		PKNU-2
	NWB SC212		KACC17910
	NWB SC238		KACC17911
	NWB SC058		KACC17912
	NWB SC076		
	NWB SC175		
	NWB SC195		
	CHNU-1		
	CHNU-2		
	CHNU-4		
KACC17001			
KACC18649			

나. 파지 확보 및 특성 조사

(1) 신규 파지의 분리

10g의 식물체를 증류수에 섞어 3000g, 4°C에서 20분간 원심분리한 후 상등액을 0.2µm filter로 여과하고 *A. citrulli* cock tail과 함께 섞어 2일간 배양한 후 spotting assay를 통하여 파지의 존재 유·무를 확인하였다. *A. citrulli* cocktail은 확보한 42개 균주를 1ℓ의 KB medium에 각각 5ml씩 첨가하여 37°C에서 8시간 동안 배양하여 준비하고, Spotting assay는 보유한 42 균주 모두에 대하여 각각 *A. citrulli* 배양액 300µl와 KB top agar 4ml (약 50°C)을 섞어 KB 고체배지 위에 상층배지를 만들어 20~30분 말린 후 여과액을 3µl씩 점 접종하여 34°C에서 overnight 배양하여 진행하였다. Spotting assay로 확인된 파지는 KB top Agar 4 (약 50°C)에 *A. citrulli* 300µl와 파지 100µl를 섞어 넣고, KB 고체배지 위에 부어 상층을 형성하게 한 다음 34°C에서 overnight 배양하여 end-cut pipette tip으로 plaque를 분리해내는 plaque assay 방법으로 분리하였고, plaque assay를 2~3회 반복하여 순수한 바이러스를 분리하였다.

(2) 신규 분리 파지의 host range 조사

확보된 총 121개 파지 중 분리된 순서에 따라 50개 파지의 host range를 42종의 *A.*

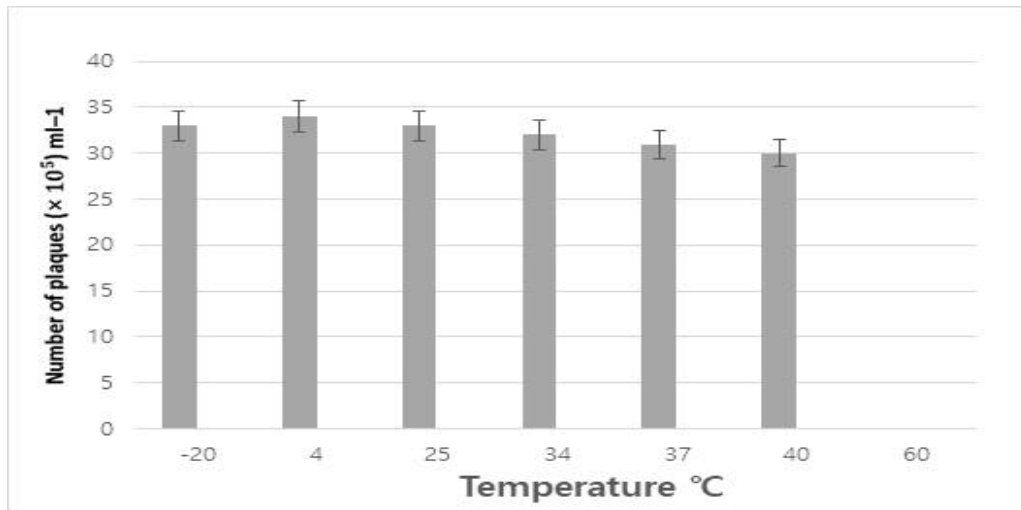


그림 59. ACP17의 온도에 따른 안정성.

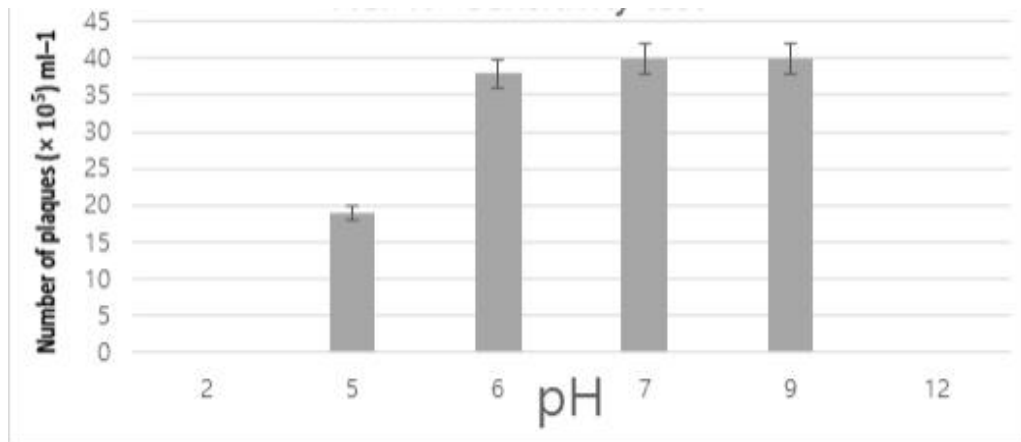


그림 60. ACP17의 pH에 따른 안정성.

성장곡선 및 burst size에 대한 조사는 선행된 Ellis and Delbruck (1939)의 연구방법에 기초하여 조사하였다. 파지 ACP17 200 μ l (7.15 \times 10⁸PFU/ml)을 *A. citrulli* 배양액 25ml (O.D600nm : 0.7, 6.15 \times 10⁸CFU/ml)에 넣어 M.O.I를 약 0.01로 설정하고, 파지가 숙주세포 속으로 침투하도록 실온에서 10분간 방치하였다. 그 후 3470.27g, 4 $^{\circ}$ C 조건에서 30분간 원심분리 하여 모인 pellet을 새로운 KB 액체배지에 재현탁하여 34 $^{\circ}$ C에서 배양하였고, 10분마다 배양액 샘플 500 μ l을 채취하여 plaque assay를 통해 파지의 농도를 측정하였으며, 그 결과 그림 60에 나타난 바와 같이 파지 ACP17의 성장 곡선에서 잠복기(Latent period)는 약 50 \pm 5분으로 나타났고, 암흑기(Eclips period) 약 25 \pm 5분, burst size 약 120PFU/ml로 나타났다.

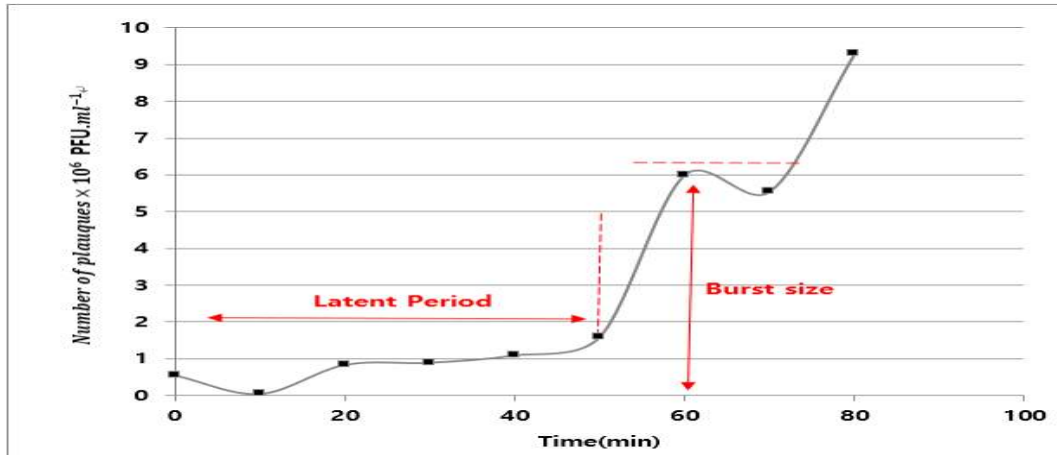


그림 61. 파지 ACP17의 성장곡선.

전자현미경 샘플은 300 mesh cooper grid에 바이러스를 접종하고 4% Uracil acetate 10 μ l 를 사용하여 음성염색을 통해 준비되어 부경대학교 공동기계실(장영실관) 전자현미경실에서 주사전자현미경(TEM)을 사용하여 측정하였으며, 그림 61에 나타난 바와 같이 ACP17은 전자현미경 관측 결과 head 크기는 101nm, tail 크기는 15nm 정로 확인되었다.

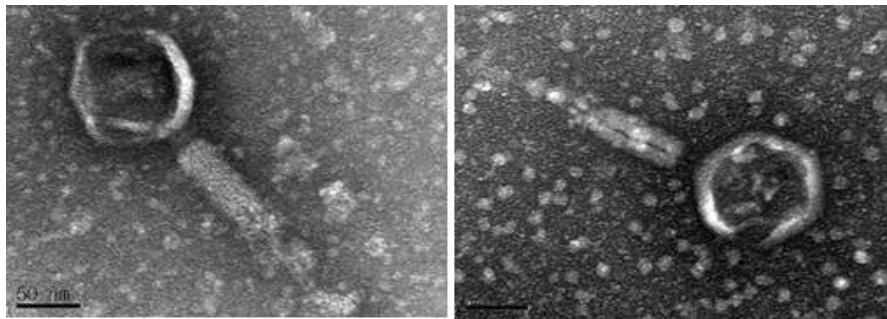


그림 62. 파지 ACP17의 전자현미경 관찰 결과.

파지 ACP17의 게놈 특성을 확인하기 위하여 ACP17의 핵산을 분리한 후 정제된 ACP17의 게놈에 1kb ladder(M), Non-treated genome(N), DNase(D), RNase(R) 그리고 ExonucleaseIII(E)의 처리를 하고 전기영동 하여 확인하였으며 ACP17 게놈은 DNase와 ExonucleaseIII에 의해서 완벽하게 분해가 되어 ACP17이 선형의 이중나선 DNA임을 확인하였다 (그림 62).



그림 63. 파지 ACP17 게놈의 특성. 1kb ladder(M), Non-treated genome(N), DNase(D), RNase(R) 그리고 ExonucleaseIII(E).

파지 ACP17의 게놈 분석은 Teragene Korea Co.에 의뢰하여 실시하였으며, 게놈의 분석 결과 전체 유전자 서열은 총 156,281bp, G+C content 58.7%, 263개의 ORF(Open Reading Frame), 4개의 tRNA 로 구성됨을 확인하였고, 한국생명공학연구원 생물자원센터에 기탁번호 KCTC18593P로 기탁하였다.

(4) 신규 파지 ACPWH 특성 조사

파지 ACP17과 혼합하여 사용함으로써 방제 효과를 증진 시킬 수 있는 파지를 선별하고자, 2017년 분리된 파지 중 *A. citrulli*의 다양한 strain에 감염하는 파지를 선별하고 이를 ACPWH로 명명하고 이 파지에 대한 추가적인 분석을 실시하였다. 전자현미경 샘플은 300 mesh cooper grid에 바이러스를 접종하고 4% Uracil acetate 10 μ l를 사용하여 음성염색을 통해 준비하여 부경대학교 공동실험실습관 전자현미경실에서 주사전자현미경(TEM)을 사용하여 측정하였으며, 그림 63에 나타난 바와 같이 ACPWH는 전자현미경 관측 결과 head 크기는 60 \pm 5nm, tail 크기는 180 \pm 5nm 정도로 확인되었고 파지의 긴 꼬리의 형태로 보아 Shipoviridae에 속하는 바이러스로 확인되었다.

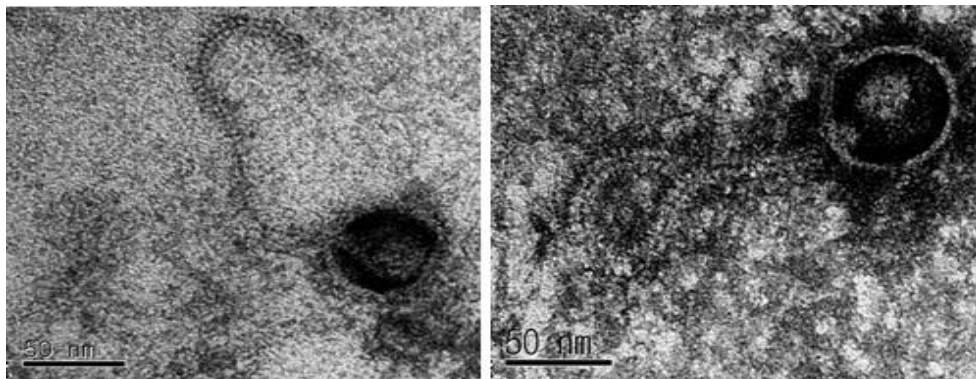


그림 64. ACPWH의 전자현미경 관찰 결과.

ACPWH의 기주 범위에 대한 조사에서 표 23에 제시된 바와 같이, 파지 ACPWH는 파지 ACP17가 감염하지 못하는 4개의 *A. citrulli* 균주에 감염성을 보여 좀 더 확장된 기주 범위를 나타내었다.

표 24. 신규파지의 ACPWH와 ACP17 Host range 비교

	Bacteria	Strain	Genetic group	ACPWH	ACP17
1	<i>Acidovorax citrulli</i>	KHU	II	+	-
2	<i>Acidovorax citrulli</i>	AC37	I	+	+
3	<i>Acidovorax citrulli</i>	AC42	II	+	+
4	<i>Acidovorax citrulli</i>	LB09-308	I	+	+
5	<i>Acidovorax citrulli</i>	LB09-309	II	+	-
6	<i>Acidovorax</i>	LB10-232	I	-	-

	<i>citrulli</i>				
7	<i>Acidovorax citrulli</i>	LB10-233	I	+	+
8	<i>Acidovorax citrulli</i>	LB10-234	II	+	-
9	<i>Acidovorax citrulli</i>	KACC17000	II	+	+
10	<i>Acidovorax citrulli</i>	KACC17002	I	+	+
11	<i>Acidovorax citrulli</i>	KACC17005	II	+	+
12	<i>Acidovorax citrulli</i>	KACC17909	II	+	+
13	<i>Acidovorax citrulli</i>	KACC17913	II	+	-
14	<i>Acidovorax citrulli</i>	JBARES-1	II	+	+
15	<i>Acidovorax citrulli</i>	JBARES-2	II	+	+
16	<i>Acidovorax citrulli</i>	NWB SC107	I	+	+
17	<i>Acidovorax citrulli</i>	NWB SC108	I	+	+
18	<i>Acidovorax citrulli</i>	NWB SC109	I	+	+
19	<i>Acidovorax citrulli</i>	NWB SC111	I	+	+
20	<i>Acidovorax citrulli</i>	NWB SC172	I	+	+
21	<i>Acidovorax citrulli</i>	NWB SC196	I	+	+
22	<i>Acidovorax citrulli</i>	NWB SC202	I	+	+
23	<i>Acidovorax citrulli</i>	NWB SC205	I	-	-
24	<i>Acidovorax citrulli</i>	NWB SC206	I	+	+
25	<i>Acidovorax citrulli</i>	NWB SC212	I	+	+
26	<i>Acidovorax citrulli</i>	NWB SC238	I	+	+
27	<i>Acidovorax citrulli</i>	NWB SC58	I	+	+
28	<i>Acidovorax citrulli</i>	NWB SC076	I	+	+
29	<i>Acidovorax citrulli</i>	NWB SC175	I	+	+
30	<i>Acidovorax citrulli</i>	NWB SC195	I	+	+
31	<i>Acidovorax citrulli</i>	KHU	II	+	+
32	<i>Acidovorax citrulli</i>	CHNU-1	I	+	+
33	<i>Acidovorax citrulli</i>	CHNU-2	I	+	-

34	<i>Acidovorax citrulli</i>	CHNU-3	II	+	-
35	<i>Acidovorax citrulli</i>	CHNU-4	I	+	+
36	<i>Acidovorax citrulli</i>	PKNU-1	II	+	+
37	<i>Acidovorax citrulli</i>	PKNU-2	II	+	+
38	<i>Acidovorax citrulli</i>	KACC17001	I	+	-
39	<i>Acidovorax citrulli</i>	KACC17910	II	+	-
40	<i>Acidovorax citrulli</i>	KACC17911	II	+	-
41	<i>Acidovorax citrulli</i>	KACC17912	II	+	-
42	<i>Acidovorax citrulli</i>	KACC18649	I	-	-

파지 ACPWH의 열에 대한 안전성을 알아보기 위하여 파지 ACPWH 용액을 SM 완충액을 이용하여 약 4.0×10^5 PFU/ml로 희석한 후 -80 , -20 , 4 , 25 , 34 , 37 , 45 , 50 , 55 , 및 60°C 에서 24시간 동안 보관한 후 *A. citrulli* KACC 17000 균주를 이용하여 플라크 분석법에 의하여 살아남은 박테리오파지의 수를 결정하였다. 또한, 다양한 pH에서의 ACPWH의 안정성을 알아보기 위하여 SM 완충액을 pH 2, 5, 5.5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 및 12로 조정한 후 여기에 박테리오파지 ACPWH를 최종농도 4.0×10^5 CFU/ml로 첨가한 후 상온에서 24시간 보관한 후 위와 같은 방법으로 살아남은 박테리오파지 ACPWH의 수를 결정하였다.

ACPWH의 열과 pH 실험은 1 주 동안 24시간 마다 확인하였으며, 그 결과 파지 ACPWH는 $-80 \sim 40^\circ\text{C}$ 의 온도에서는 감염가가 안정하게 유지 되었으나, 50°C 이후에 감염가가 떨어지기 시작하여 55°C 에서는 불안정한 결과를 나타내었고 (그림 64), pH의 경우 pH 6~7까지는 안정적인 감염가가 확인되었으나, pH 5는 감염가가 다소 떨어졌고 pH 2 이하와 12 이상에서는 감염가가 급격하게 떨어져 불안정함이 확인되었다 (그림 65).

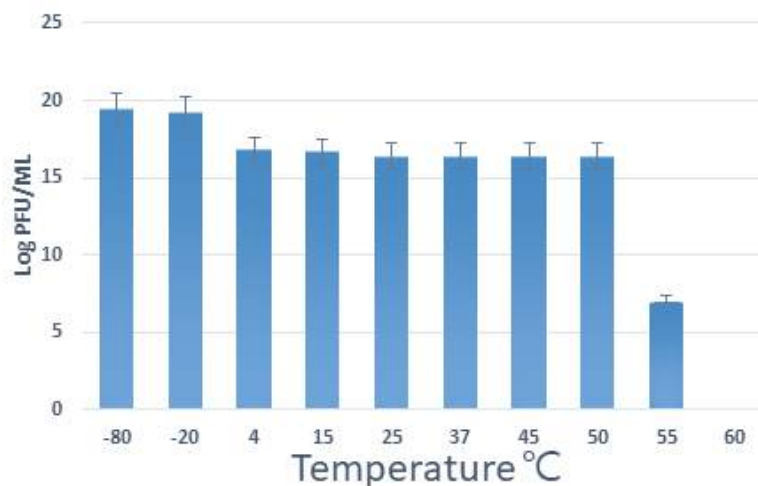


그림 65. ACPWH의 온도에 따른 안정성.

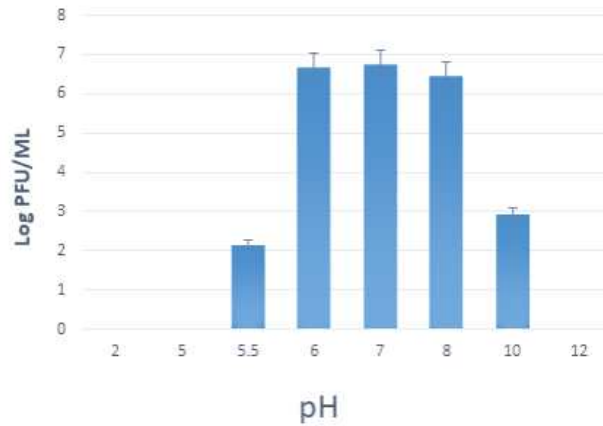


그림 66. ACPWH의 pH에 따른 안정성.

성장곡선 및 burst size에 대한 조사는 선행된 Ellis and Delbruck (1939)의 연구방법에 기초하여 조사하였으며, 구체적으로는 파지 ACPWH 200 μ l(7.15x10⁸PFU/ml)을 *A. citrulli* 배양액 25ml (O.D600nm : 0.7, 6.15x10⁸CFU/ml)에 넣어 M.O.I를 약 0.01로 설정하고, 파지가 숙주세포 속으로 침투하도록 실온에서 10분간 방치한 후 3470.27g, 4 $^{\circ}$ C조건에서 30분간 원심 분리 하여 모인 pellet을 새로운 KB액체배지에 재현탁하여 34 $^{\circ}$ C에서 배양하였고, 매 10분마다 배양액 샘플 500 μ l을 채취하여 plaque assay를 통해 파지의 농도를 측정하였다. 그 결과 그림 66에 나타난 바와 같이 파지 ACPWH의 성장 곡선에서 잠복기(Latent period)는 약 15 \pm 5분으로 나타났고 burst size 약 189 pfh/ml로 나타났다.

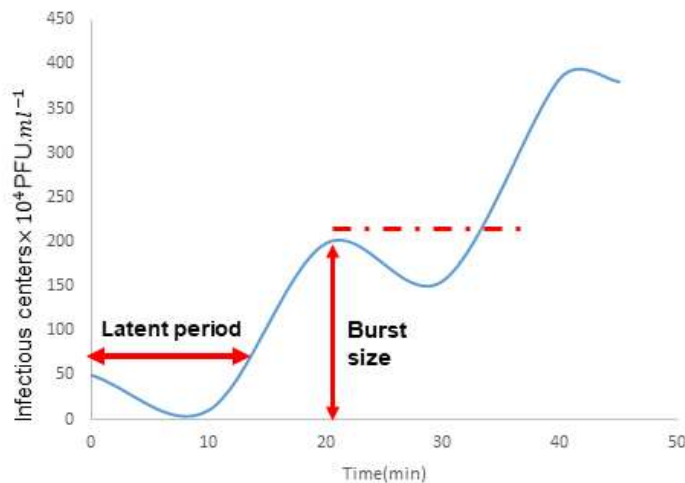


그림 67. ACPWH의 성장곡선.

ACPWH를 (주)테라젠이텍스 바이오연구소(Illumina, HiSeq 2500)를 통해 full genome sequence, NGS 방법으로 진행하였으며, 분석결과 ACPWH의 genome의 크기는 49,300bp이며, GC 비율 64 %로 확인되었다. 결정된 genome의 유전 정보는 GenBank Accession number MH727593.1에 저장되어 있다. ACPWH 유전체는 총 64개의 ORF를 암호화하고 있으며(그림 67), 이들 중 대표적인 유전자는 표 24에 제시하였다. 전체 염기서열을 바탕으로 다른 파지들과 유연관계를 분석한 결과, ACPWH는 Pseudoalteromonas phage PHS21과 유

연관계가 있었으나, 기타 다른 파지와는 연관성이 낮아, 새로운 바이러스임이 확인되었다(그림 68).

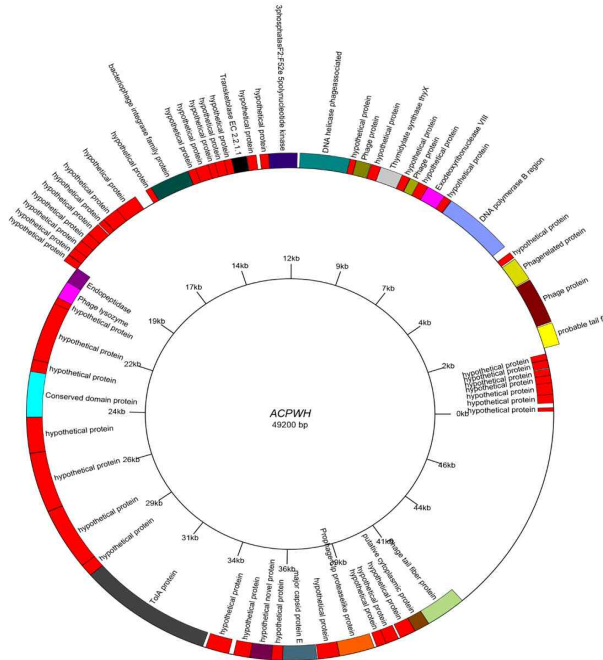


그림 68. ACPWH의 원형 유전체 지도

표 25. 파지 ACPWH에 의해 암호화된 주요 유전자의 기능적 그룹

ORF type	Encoding protein
Hypothetical protein	44 hypothetical protein
Structural protein	Phage protein
	Phage protein
	Phage protein
	Phage tail fiber protein
	Phage-related protein
	Probable tail fiber protein
	TolA protein
	Major capsid protein E
Enzyme	Phage outer membrane lytic protein Rz 3' -phosphatase, 5' -polynucleotide kinase, phage-associated
	Bacteriophage intergrase family protein
	Phage lysozyme
	Prophage Clp protease-like protein
	Thymidylate synthase thyX
Other phage related proteins	Transketolase (EC 2.2.1.1)
	Conserved domain protein
DNA replication	Putative cytoplasmic protein
	DNA helicase, phage-associated
	DNA polymerase B region
	Exodeoxyribonuclease VIII

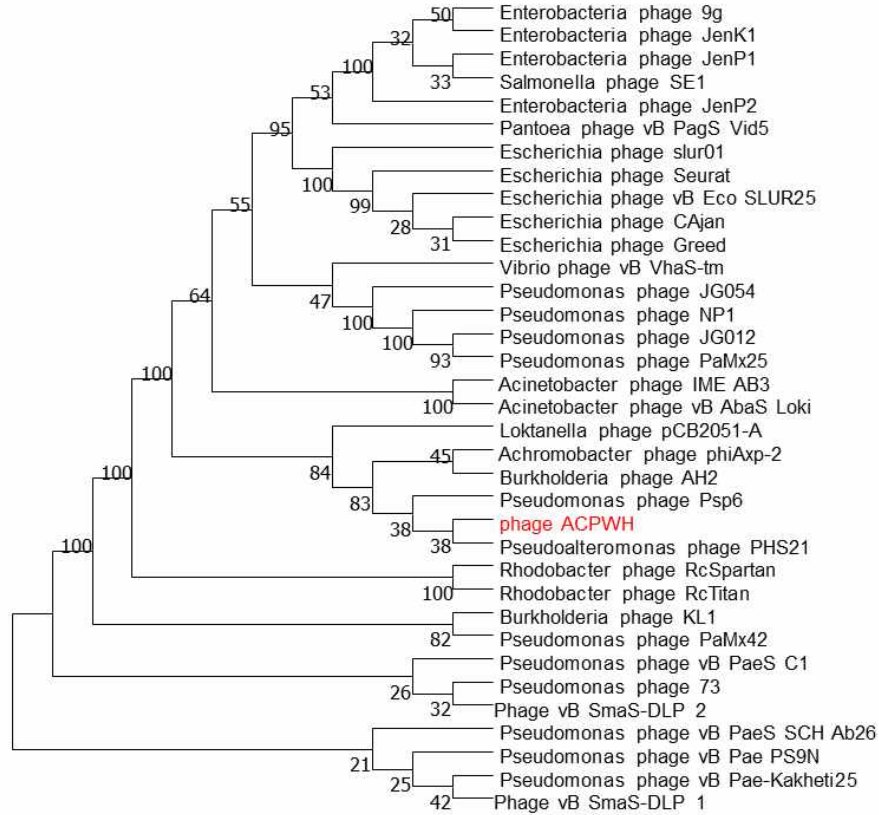


그림 69. 박테리오파지 ACPWH의 Phylogenetic tree

다. 파지를 이용한 방제효과 검증

(1) ACP17의 방제 효과 분석

수박 종자는 1% NaClO 용액으로 5분간 표면을 씻고 증류수에 5번 이상 행구어 준비되고, 오염을 피하기 위해 화분은 락스로 세척하고 흙은 고압증기멸균하여 준비하였다. 준비된 종자의 일부는 *A. citrulli* (10^7 CFU/ml)을 포함하고 있는 증류수 (또는 NaCl)로 코팅하였고, 일부는 ACP17 (10^8 PFU/ml)을 포함하는 SM buffer로 코팅하였다. *A. citrulli*를 코팅한 종자를 화분에 파종한 뒤 50ml의 ACP17 (10^8 PFU/ml)을 추가 접종한 실험군과 추가접종하지 않은 대조군으로 나누었고, 마찬가지로 ACP17을 코팅한 종자를 화분에 파종한 뒤 50ml의 *A. citrulli* (10^7 CFU/ml)를 접종한 실험군과 접종하지 않은 대조군으로 구분하였다. ACP17과 *A. citrulli* 둘 중 어느 것도 코팅하지 않은 음성대조군과 여기에 *A. citrulli* (10^7 CFU/ml)을 50ml 접종한 실험군을 두었으며(표 25), 모든 화분은 500g의 흙을 넣어 7cm의 높이가 되도록 하였고, 26°C에서 2주간의 실험을 반복 진행하여 발아율과 생존율을 측정하였다.

그림 69와 그림 70에 나타난 바와 같이 아무런 처리도 되지 않은 음성대조군 (D 실험군)은 발아율과 생존율에서 모두 100%의 결과를 보였지만, *A. citrulli*가 접종된 종자 (C 실험군)는 25%, 17%의 발아율과 3%, 0%의 생존율을 보였다. *A. citrulli*가 접종된 종자에서 ACP17이 코팅된 종자의 발아율과 생존율이 모두 100%의 결과를 보였고, ACP17이 코팅된 종자에 *A. citrulli*가 접종된 실험군은 각각 100%, 91%의 결과를 보였다.

표 26. 파지 ACP17을 이용한 과실썩음병 방제효과 검정에 사용된 실험군 및 대조군의 분류

Treatments	Seed	Inoculations
A	Phage coated seed	Bacterial inoculation
		No inoculation (control)
B	Bacterial coated seed	Phage inoculation
		No inoculation (control)
C	Non-coated seed	Inoculation of bacteria
		Bacterial covered peat pellets
D	Non-coated seed	No Inoculation (control)

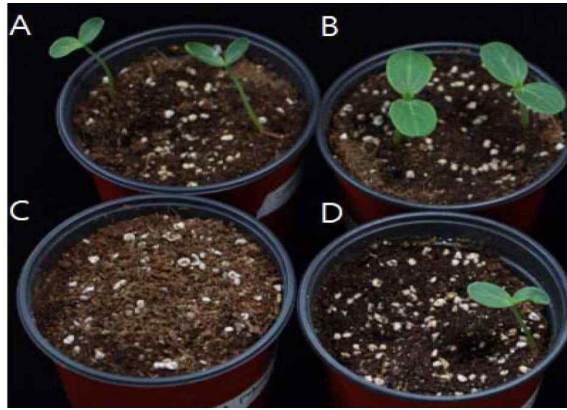


그림 70. 파지 ACP17에 의한 수박 과실썩음병 예방 효과. A; 세척 종자 + 무접종, B; 파지 ACP17 코팅 종자 + *A. citrulli* 접종, C; 세척 종자 + *A. citrulli*를 접종, D; *A. citrulli* + ACP17 접종.

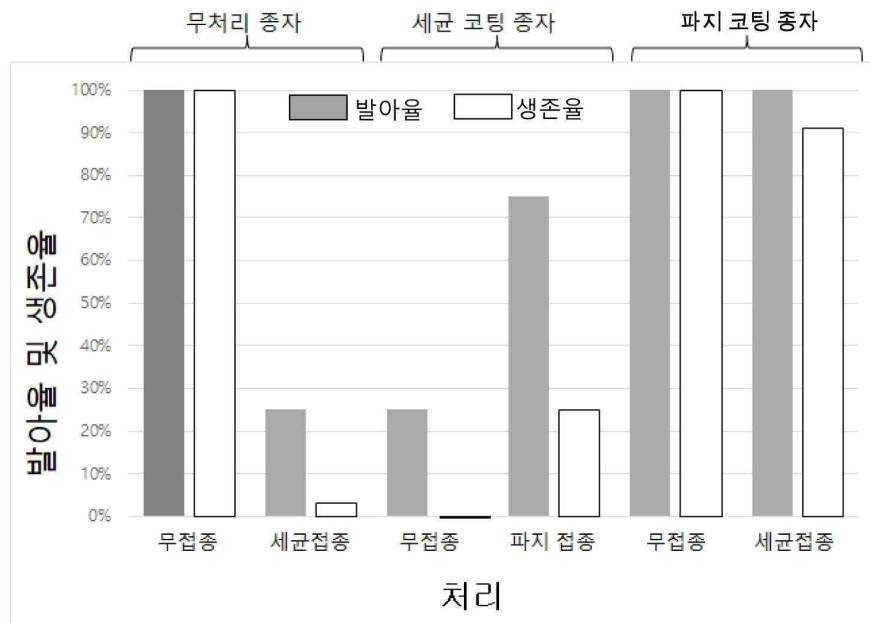


그림 71. ACP17의 방제효과 검정

(2) ACPWH의 방제 효과 분석

ACP17과 같은 방법을 사용하고 실험군과 대조군을 위의 표 3과 동일하게 분류하여 ACPWH에 대한 발아율을 측정하였다(그림 71, 그림 72). 아무런 처리도 되지 않은 음성대조군(D 실험군)은 발아율 100%의 결과를 보였지만, *A. citrulli*가 접종된 종자 (C 실험군)는 31%의 발아율을 보였다. *A. citrulli*가 코팅된 종자를 파종하면 10%의 발아율을 나타내었지만 ACPWH를 접종하여 줌으로써 발아율이 85%로 크게 증가함을 보였고 (B 실험군), 반면 A실험군에서는 ACPWH가 코팅된 종자의 발아율이 100%, ACPWH이 코팅된 종자에 *A. citrulli*가 접종된 실험군은 95%의 발아율을 보였다.

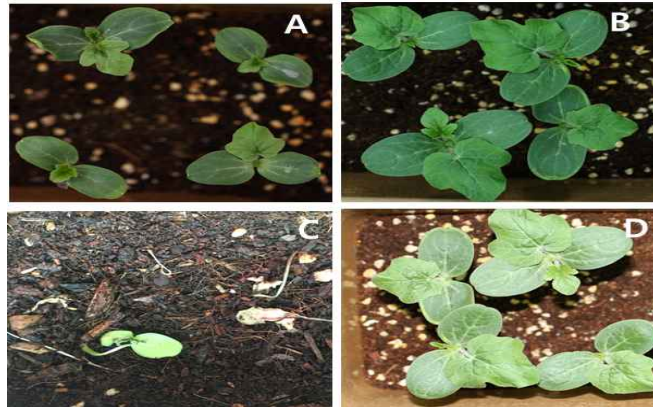


그림 72. 파지 ACPWH에 의한 과실썩음병 예방 효과. A; 아무런 처리를 하지 않은 종자를 파종한 결과이다. B; ACPWH를 코팅한 종자를 파종하여 *A. citrulli*를 접종하였고, C; 종자를 파종한 후 *A. citrulli*를 접종하여 병에 대한 증상이 발생하였다. D; *A. citrulli* (10^5 CFU/ml)를 50ml 섞은 토양에 종자를 파종하고 ACPWH를 접종하였다. 사진은 파종 후 14일 후의 결과

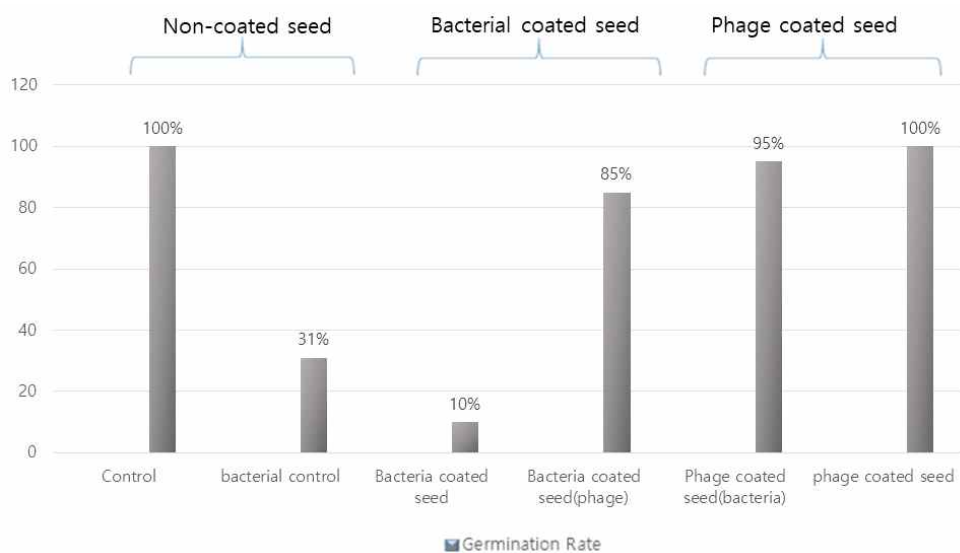


그림 73. ACPWH의 방제효과 검증

(3) 단일 코팅과 혼합 코팅에 의한 수박 과실썩음병 발병 억제 효과의 비교 실험

동원농산종묘의 동방꿀 품종을 이용하여 박테리오파지 ACPWH과 ACP17의 수박 과일썩음병에 대한 단일처리 및 혼합처리의 방제효과를 비교하였다. 수박종자는 1% NaClO 용액에서 5분간 담근 후 멸균 증류수로 5회 세척하여 준비하였으며, 주식회사 부농의 상토 2호를 사용 전에 고압증기멸균기를 이용하여 121℃에서 15분간 멸균하였고, 플라스틱 화분(가로 x 높이 x 세로, 35.5 x 17 x 15cm)에 1kg의 흙을 넣고 각 실험군을 파종하였다. 각 실험군 종자는 실험군에 따라 1.0×10^8 PFU/ml의 ACPWH와 ACP17의 박테리오파지가 각각 또는 혼합되어 들어 있는 SM buffer에 30분간 담근 후 꺼내어 사용하였으며, 박테리오파지가 처리된 화분에 100ml의 *A. citrulli* KACC 17000 (1.0×10^7 CFU/ml, genotype I)와 *A. citrulli* NWB SC109 (1.0×10^7 CFU/ml, genotype II)를 각각 또는 혼합하여 접종하였다. 대조군은 실험군과 같이 박테리오파지를 코팅 한 후 *A. citrulli*를 처리하지 않은 것을 사용하였다. 실험은 식물용 LED를 이용하여 12시간 광/12시간 암의 광주기로 빛을 비추어주면서 26℃에서 2주간 배양시키며 관찰하였다.

모든 실험에서 파지 코팅과 접종을 모두 하지 않은 음성대조군 (그림 73D, 파란색), 및 ACPWH와 ACP17을 혼합 코팅하고 *A. citrulli*를 접종하지 않은 처리구 (그림 73D, 녹색; 그림 74D)에서는 발아율 100%의 결과를 보였지만, 파지를 코팅하지 않고 genotype I 및 II *A. citrulli*가 접종된 종자는 각각 28%와 10%의 발아율을 보였다.(그림 73D, 회색과 노란색). ACPWH가 코팅된 종자는 *A. citrulli* II 접종에서 98% (그림 73A, 노란색), ACP17가 코팅된 종자는 *A. citrulli* I 접종에서 에 대해서 95% (그림 73B, 회색)의 발아율을 나타내었다. 또한, ACPWH와 ACP17을 혼합하여 코팅한 종자의 경우 *A. citrulli* genotype I 과, II를 모두 접종하여도 발아율이 92%로 높게 나타났으나 (그림 73C 파란색; 그림 74A), 파지코팅 없이 *A. citrulli* genotype I 과, II를 모두 접종하였을 경우 일부 발아가 확인되었으나, 병징을 보였으며 모두 생존하지 못하였다 (그림 74B).

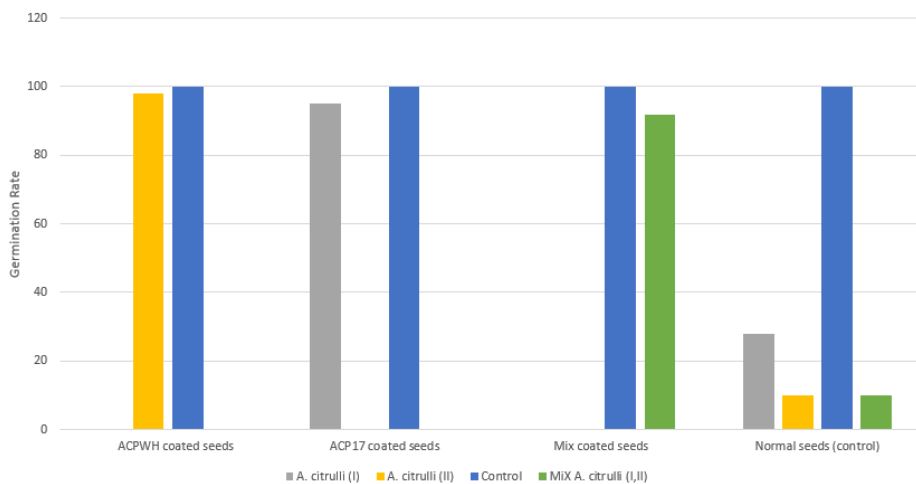


그림 74. ACPWH와 ACP17의 혼합 코팅에 의한 방제효과 검정. A; ACPWH 코팅 종자, B; ACP17 코팅 종자, C; ACPWH와 ACP17의 혼합 코팅, D; 코팅 없는 음성대조군. 노란색; *A. citrulli* genotype II 접종, 회색; *A. citrulli* genotype I 접종, 파란색; *A. citrulli* 를 접종하지 않은 음성 대조군, 녹색; *A. citrulli* genotype I과 II 혼합 접종

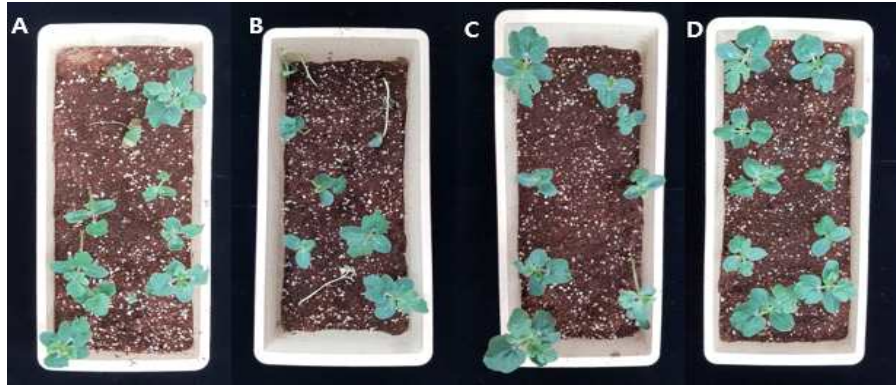


그림 75. ACPWH와 ACP17의 혼합 코팅에 의한 방제효과 검증. A: ACPWH와 ACP17 혼합 코팅 + *A. citrulli* I과 II 혼합 접종, B: 파지 코팅 없이 *A. Citrulli* I과 II 혼합 접종, C: 코팅 및 세균 감염 없는 대조군, D: ACPWH과 ACP17 파지 코팅 후 *A. citrulli* 접종하지 않은 대조군.

라. 토양에서의 박테리오파지의 안정성 및 방제효과

(1) 토양에서의 박테리오파지의 안정성

10ml의 박테리오파지 ACPWH (6.0×10^5 PFU/ml)를 10g의 흙에 섞어서 1주 동안 4°C와 상온에서 보관하면서 1, 3, 5, 7일에 Plaque assay 방법으로 관찰하였으며, 그 결과 그림 75에 나타난 것과 같이 파지 titer의 변화가 관찰되지 않아, 토양에서의 파지의 안전성이 확인되었다.

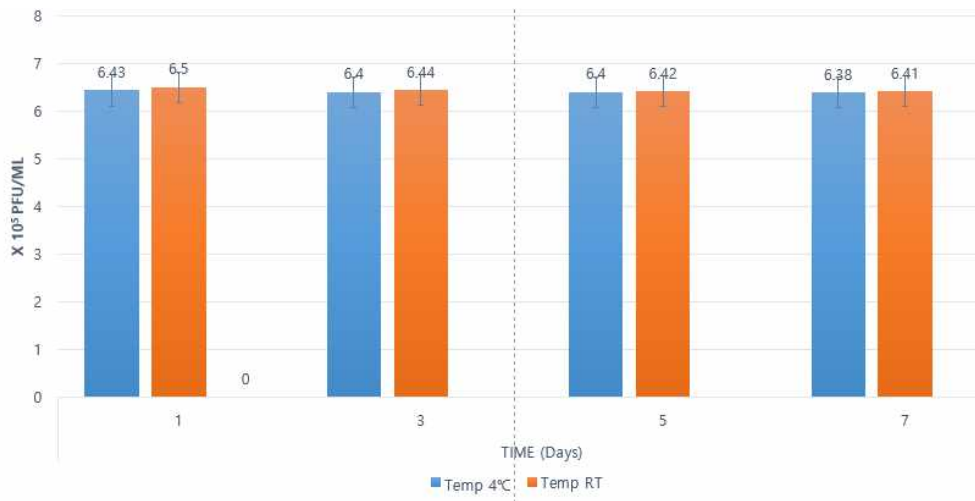


그림 76. 흙에 혼합된 ACPWH의 온도에 따른 안정성.

(2) 파지의 토양 접종에 의한 방제 효과

1L의 ACPWH 파지(1.0×10^7 PFU/ml)를 1kg흙에 섞은 후 플라스틱 화분(가로 x 높이 x 세로, 35.5 x 17 x 15cm)에 넣고 아무런 처리가 되지 않은 종자와 *A. citrulli*에 감염된 종자를 파종하고, 식물용 LED 등을 이용하여 12시간 광/12시간 암의 광주기로 빛을 비추어주면서 28°C에서 2주간 배양시키며 관찰하였다. *A. citrulli*에 감염되지 않은 종자는 파지가 첨가되지 않은 토양과 파지가 첨가된 토양에서 100%의 발아율을 보였으나(그림 76. 파란색),

*A. citrulli*에 감염된 종자의 경우 파지가 첨가된 토양에서는 96%의 발아율 및 100%의 생존율을 보였으나 (그림 76 주황색, 그림 77A), 파지가 첨가되지 않은 토양에서는 36%의 발아율을 보였으나 발아한 줄기 및 잎에서 병에 대한 증상이 확인되었고, 이 후 모두 고사하여 0%의 생존율을 보였다 (그림 77B).

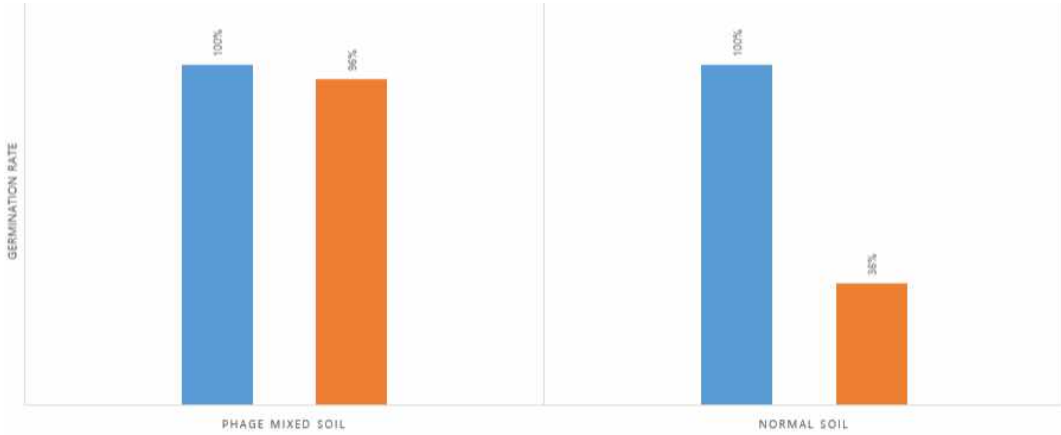


그림 77. 흙에 혼합된 ACPWH의 방제효과 검증. 파란색과 주황색은 각각 무감염 종자와 감염된 종자의 파종

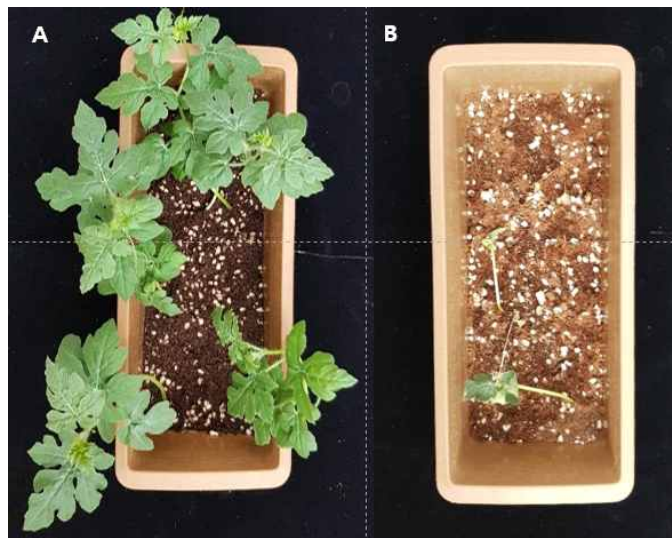


그림 78. 흙에 혼합된 ACPWH의 방제효과 검증. A; ACPWH 혼합 + *A. citrulli* 접종, B; ACPWH 혼합 없이 *A. citrulli* 접종.

(3) 병원균과 파지의 처리 순서에 따른 예방 또는 치료 효과

*A. citrulli*에 의한 질병 발생 후의 치료 효과를 관찰하기 위하여 발아한 수박 유묘의 잎에 *A. citrulli* (10^5 CFU/ml)를 spray 방법으로 접종하였다. 접종 3일 후 과일썩음병의 전형적인 증상이 잎에서 관찰되었다 (그림 78A). 병징을 보이는 식물이 자라는 토양에 토양 700g당 100 ml ACPWH (10^8 X PFU/ml)를 첨가하고, 5 일 후 식물의 상태를 관찰한 결과, ACPWH를 접종한 토양에서는 모든 식물이 생존하였으나 (그림 78B), ACPWH를 접종하지 않은 식물은 모두 고사하였다 (그림 78C). 이를 통하여 ACPWH는 종자 코팅에 의한 예방효과뿐만

아니라, 토양 처리에 의한 치료 효과가 있음을 확인하였다.

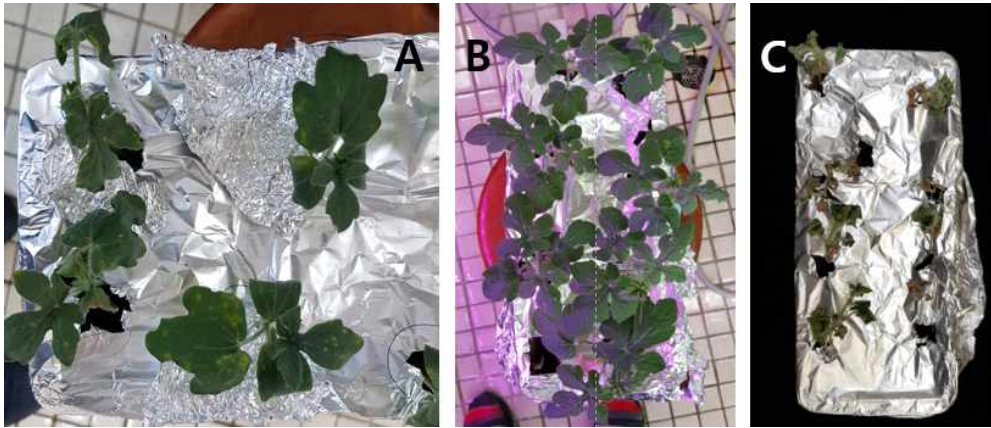


그림 79. ACPWH의 처리에 의한 과일 썩음병 치료 효과. 발아한 수박 유묘에 *A. citrulli*를 엽면 접종 3일 후 나타난 병징 (A), ACPWH의 처리 5일 후의 치료효과 (B) 및 대조군에서의 식물 고사 (C). 토양에 접종한 ACPWH의 비산을 막기 위하여 알루미늄 포일로 화분을 덮어 주었다.

마. 수박 과실썩음병 파지 제제화 고려요인의 효과 분석

(1) 제제화 물질에 대한 종자 및 파지의 안정성을 조사

ACPWH를 생물 농약으로 제제화 하는데 가장 적절한 물질을 알아보기 위하여, (주)고려바이오로부터 농약 제제화용 물질을 공급 받아, 이들이 ACPWH에 미치는 영향을 조사하였으며, 실험에 사용된 물질은 표 26에 제시하였다.

표 27. ACPWH에 미치는 제제화 물의 영향을 알아보기 위하여 사용한 물질

Chemical-name
SABD-100
Lc50D
LN-10
SABO-40
PG
DOA
DMA
Mo
0.3% eugenol
36%Rasin
80euoil

제제화 물질의 처리 여부에 따른 바이러스의 안정성을 알아보기 위하여 ACPWH (1.0×10^3 PFU/ml)를 1%, 0.5%, 0.01%의 다양한 제제와 함께 섞어서 1주간 보관한 후 plaque assay 방법으로 살아남은 박테리오파지 ACPWH의 수를 측정하였다. 측정 결과 그림 79에 나타난 바와 같이 LC50D, LN-10과 0.3% EUGENOL에서는 처리한 세 가지 농도에서 ACPWH의 titer에 큰 변화가 없어, 이들 물질은 ACPWH를 안정성에 영향을 주지 않는 것으로 확인되었다. 80% euoil의 경우 1%에서는 ACPWH의 titer가 현저히 감소하였으나, 0.5%, 0.01%의 농도에서는 titer에 큰 변화가 없었다.

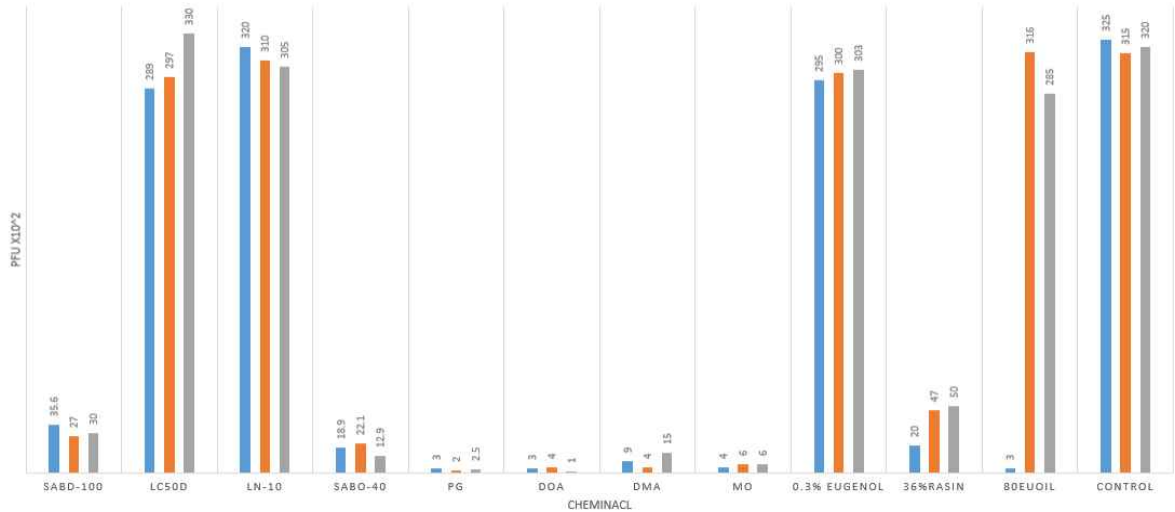


그림 80. 제재화 물질의 처리에 따른 안정성 검사. 제재화 물질 각 1%, 0.5%, 0.01%에 ACPWH (1.0×10^3 PFU/ml)를 섞어서 1주간 보관한 후 plaque assay를 실시하였다.

(2) 제재화 물질이 파지의 안정성에 미치는 영향 분석

(가) 다양한 pH에서 제재화 물질이 ACPWH의 안정성에 미치는 영향

제재화 물질의 처리에 따른 ACPWH의 안정성에 따라 LC50D, LN10 및 0.3% EUGENOL을 선택하고 다양한 조건에서 이들 물질이 미치는 영향을 조사하였다. 제재화 물질의 다양한 pH에서의 ACPWH의 안정성을 알아보기 위하여 1% 농도의 LC50D, LN10 및 0.3% eugenol 용액을 Tris-Cl 완충액을 이용하여 pH 2, 6, 7, 8, 9, 10, 12로 조절한 후 박테리오파지 ACPWH를 최종농도 4.0×10^5 CFU/ml로 첨가하고 상온에서 1주간 보관한 뒤 plaque assay 방법으로 살아남은 박테리오파지 ACPWH의 수를 측정하였다. 세 가지 물질을 혼합하였을 때가 파지가 다양한 pH 조건에서 좀 더 안정적인 것으로 확인되었으며, 특히 LN10 및 LC50과 혼합하였을 경우 보다 넓은 범위의 pH에서 파지의 안정성이 확인됨 (그림 80).

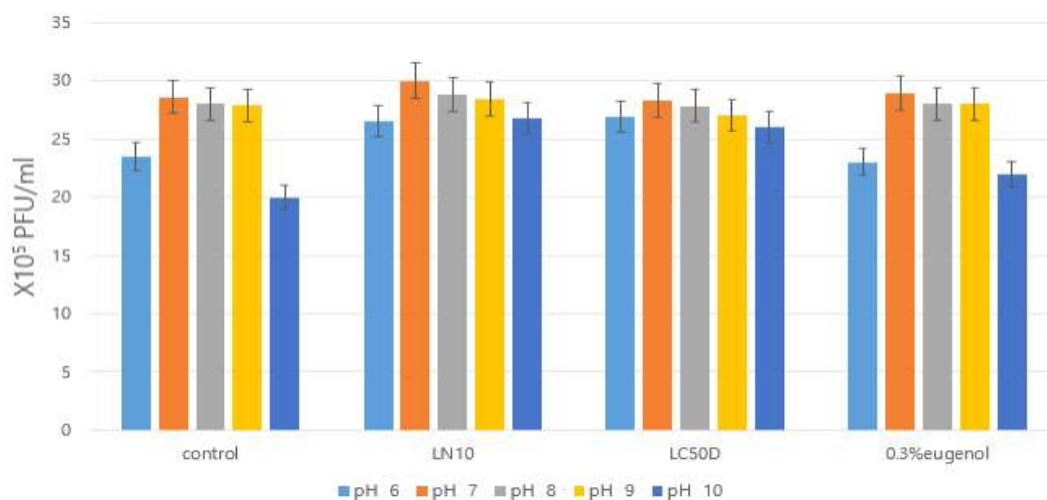


그림 81. 제재화 물질의 처리에 따른 안정성 검사. 제재화 물질 1% 용액을 다양한 pH로 조절하고 4.0×10^5 CFU/ml로 ACPWH를 첨가하고 상온에서 1주간 보관한 뒤 plaque assay 방으로 titer를 조사하였다.

(나) 제재화 물질에 의한 UV 조사로부터의 ACPWH 보호 기능

UV 조건하에서 제재화 물질과 섞인 ACPWH의 안정성을 알아보기 위하여 1% LC50D, LN10 및 0.3% eugenol 용액에 박테리오파지 ACPWH를 최종농도 4.0×10^5 CFU/ml로 첨가한 후 clean bench에서 UV를 10, 20, 30초간 조사한 후 plaque assay 방법으로 살아남은 박테리오파지 ACPWH의 수를 측정하였다. 그림 81에 제시된 바와 같이 SM buffer에 들어 있는 파지의 경우 15초간의 조사에도 대부분이 불활성화 된 반면, LN10 및 LC50C에 희석된 ACPWH는 UV 조사로부터 보호되었으며, 특히 1% LC50C 용액의 경우 30초간의 조사에서도 ACPWH의 titer에 큰 변화가 없어 파지 ACPWH를 위한 효율적인 혼합물로 사용될 수 있을 것으로 확인되었다.

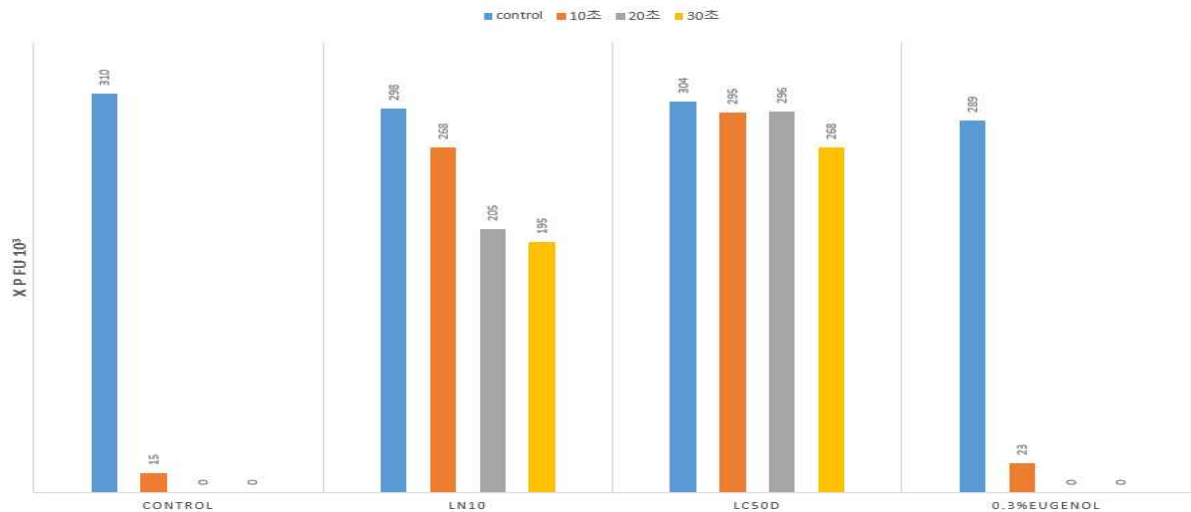


그림 82. 제재화 물질의 처리에 따른 ACPWH의 UV 안정성 검사. 제재화 물질 1% 용액에 ACPWH를 4.0×10^5 CFU/ml로 첨가한 후 UV를 10초, 20초, 30초간 조사한 후 titer를 조사하였다.

바. 수박 과실썩음병 제재 시제품의 온실 및 포장 실증실험

(1) 시제품 처리에 의한 질병 치료 효과 실험

2차연도에 참여기업이 제작한 파지 시제품에 대하여 온실 및 포장에서의 방제 효과를 검증하였다. 시제품은 첨가물 4%와 ACPWH를 ($\sim 10^{10}$ PFU/ml) 96%로 제조하였으며 제재 시제품은 혼합한 후 1,000배 희석하여 사용하였다. 항생제는 시중에서 판매하는 일품 수화제 (동방아그로)를 1,000배 희석하여 사용하였다. 병징이 나타난 후 수박 식물에 spray 방법으로 처리하였고 2주 후 스코어링 시스템을 사용하여 식물 질병 발생을 측정하였다 (1: 증상 없음, 2: 잎의 작은 괴사성 병변, 식물의 20%, 3: 잎 50%의 괴사 병변, 4: 잎에서 클로로시스 있는 괴사 병변 70% 괴사 잎, 5: 큰 확산 병변, 식물의 70% 이상 또는 죽음). 질병지수 (DI, disease index)는 아래의 공식을 사용하여 계산하였다.

$$DI (\%) = \left(\frac{\sum \text{disease scale} \times \text{number of leaves}}{\text{The most serious disease scale} \times \text{total number of leaves}} \right) \times 100$$

실험 결과 접종된 수박 유묘는 평균 질병 지수 69%를 나타내었으며, 시제품 또는 항생제 처리 2주 후 확인한 질병 지수에서는 시제품 처리 수박 식물은 24.6%, 항생제 처리 수박 식

물은 25%로 감소하였으나 비처리 수박 식물의 경우 70% 질병지수를 나타내었다(그림 82, 그림 83).

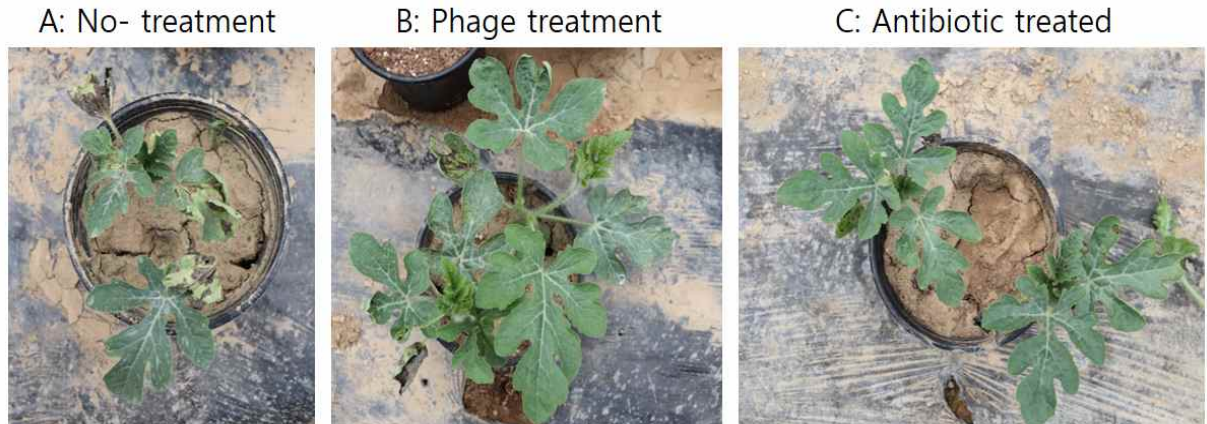


그림 83. 과실썩음병 수박 식물에 파지 시제품 및 항생제 처리 실험. A: 수박에 *A. citrulli*를 처리하여 3주 동안 재배, B: 과실썩음병 증상이 나타난 후 시제품 적용, C: 과실썩음병 증상이 나타난 후 항생제 적용.

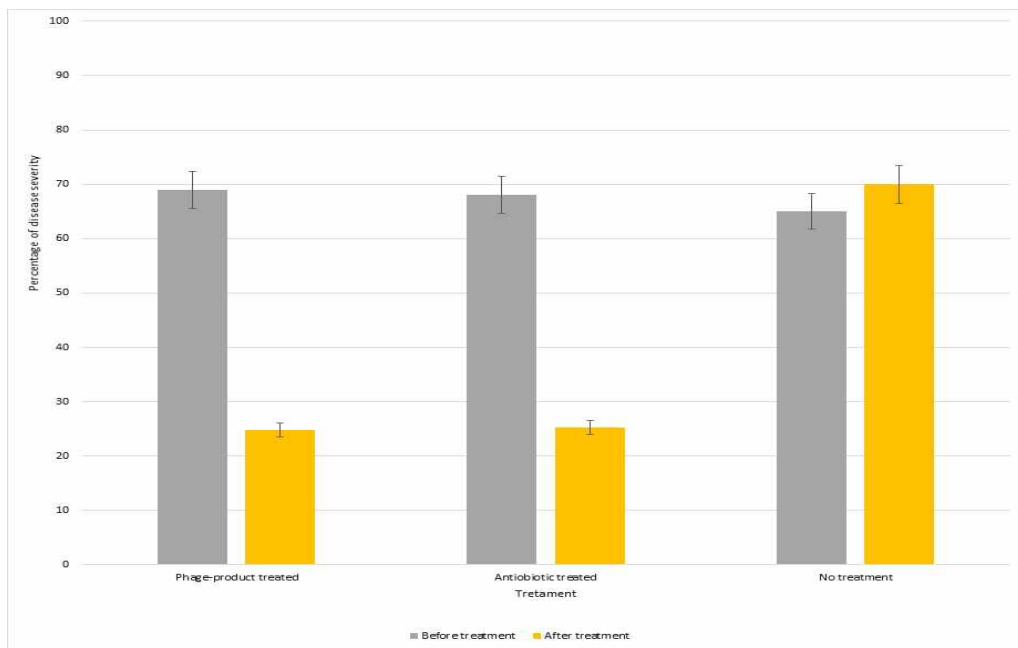


그림 84. 과실썩음병이 발생한 수박에 파지 시제품 및 항생제 처리 2주 후 질병지수 결과

(2) 시제품으로 코팅한 수박 종자의 발아 및 생존율

시제품은 종자 코팅용 제품과 육묘장 또는 농장에서 사용할 수 있는 2가지 형태로 제작될 예정으로, 본 실험에서는 시제품을 이용한 종자 코팅실험을 실시하였다. 종자 코팅용 시제품의 경우 파지로 코팅된 수박 종자를 파종한 후 병원균인 *A. citrulli*를 접종하여 종자의 발아율과 감염율을 파지 코팅 처리하지 않은 종자와 비교하였다. 시제품의 수박 과실썩음병에 대한 방제효과를 확인하기 위해 사용한 수박 종자는 동원농산종묘의 동방꿀 품종으로 온라인으로 구입하여 사용하였으며, 구입한 수박종자는 1% NaClO 용액에서 5분간 담근 후 멸균 증류수로 5회 세척하여 준비하였

다. 종자 파종에 사용한 흙은 주식회사 부농의 모관흙을 사용하였으며, 사용 전에 고압증기 멸균기를 이용하여 121℃에서 15분간 멸균하였고 플라스틱 화분 (가로 x 높이 x 세로, 35.5 x 17 x 15 cm)에 1 kg의 흙을 넣고 각 실험군을 파종하였다. 각 실험군 종자는 실험군에 따라 1,000배로 희석한 시제품 (희석 후 파지 titer는 1.0×10^7 PFU/ml)에 30분간 담근 후 상온에서 건조하여 사용하였으며, 실험군은 시제품이 처리된 화분에 100 ml의 *A. citrulli* KACC 17000 (1.0×10^7 CFU/ml, genotype II)을 혼합하여 접종하였고 대조군은 실험군과 같이 시제품을 코팅한 후 *A. citrulli* 를 처리하지 않은 것을 사용하였다. 실험은 식물용 LED를 이용하여 12시간 광/12시간 암의 광주기로 빛을 비추어주면서 26℃에서 2주간 배양시키며 관찰하였다. 준비된 종자를 *A. citrulli* (1.0×10^6 CFU/ml)가 들어있는 증류수 (또는 NaCl)로 코팅하였고, *A. citrulli*를 코팅한 종자를 화분에 파종한 뒤 희석된 100 ml의 시제품 (1.0×10^7 PFU/ml)을 추가 접종한 실험군과 추가 접종하지 않은 대조군으로 나누었으며, 시제품과 *A. citrulli*를 코팅하지 않은 음성대조군과 여기에 *A. citrulli* (1.0×10^6 CFU/ml)을 100 ml 접종한 실험군을 두고 실시하였다.

모든 실험에서 파지 코팅과 접종을 모두 하지 않은 음성대조군 (그림 2-16, 주황색) 및 시제품으로 코팅하고 *A. citrulli* 를 접종하지 않은 처리구 (그림 84A, 주황색)에서는 발아율 100%의 결과를 보였다. 제품 코팅된 종자 파종 후 세균을 접종한 경우(그림 84A, 파란색)는 발아율이 87% 인 반면, 항생제로 종자를 코팅하고 세균을 접종하였을 경우 25%의 발아율을 보였다 (그림 84D, 파란색).

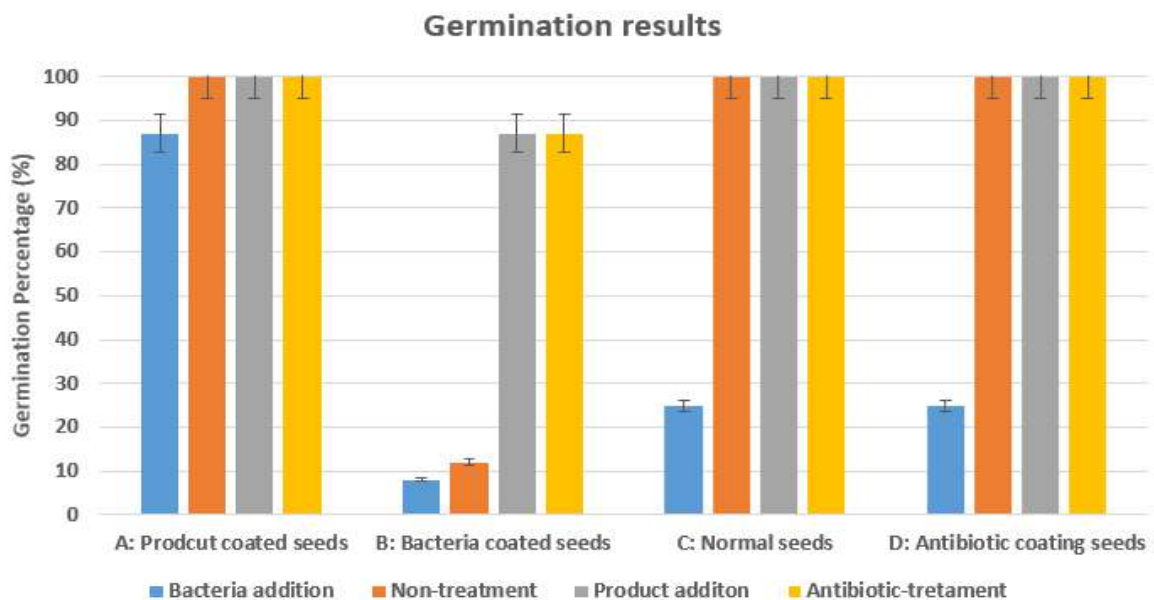


그림 85. 시제품을 이용한 종자 코팅 후 발아 결과. A: 시제품 코팅 종자, B: 세균 코팅 종자, C: 무처리 종자, D: 항생제로 코팅된 종자. 각 종자에 대한 처리는 색으로 표시하였으며, 결과는 3반복의 평균과 표준편차로 표시하였다.

시제품으로 코팅된 종자를 파종한 화분에 세균을 접종한 경우 100%의 생존율을 보였으나, 세균으로 코팅한 종자에서는 0%의 생존율을 나타내었다 (그림 85, 파란색). 세균으로 코팅된 종자 파종 후 토양에 시제품을 첨가한 경우와 항생제를 첨가한 경우 모두 100%의 생존율을 보였으며, 코팅처리를 하지 않은 종자를 파종한 토양에 시제품을 첨가한 경우에도 100%의 생존율을 보여 시제품 자체는 식물에 약해가 없는 것이 확인되었다 (그림 86).

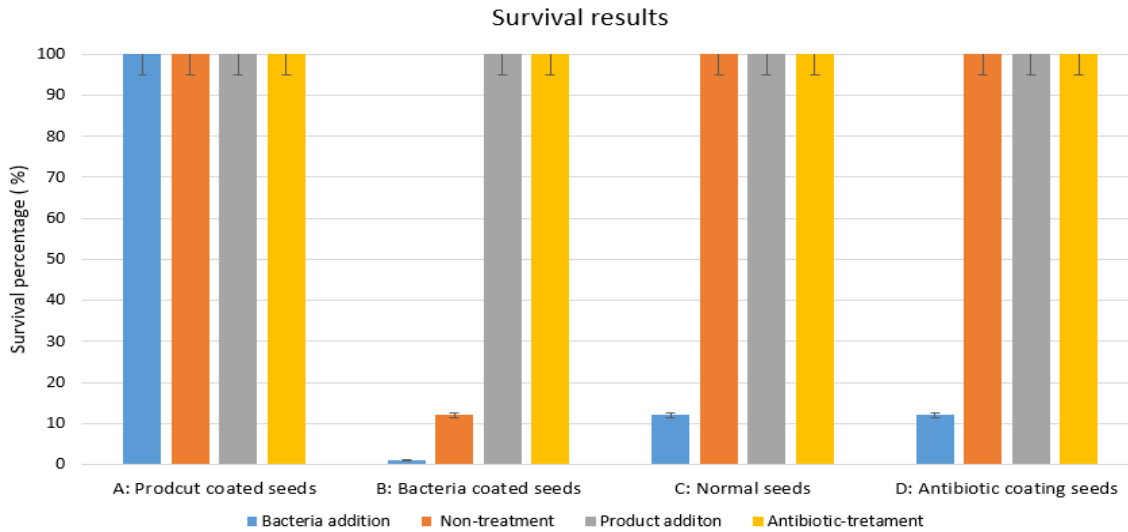


그림 86. 시제품, 항생제 및 세균 코팅 종자의 생존율.

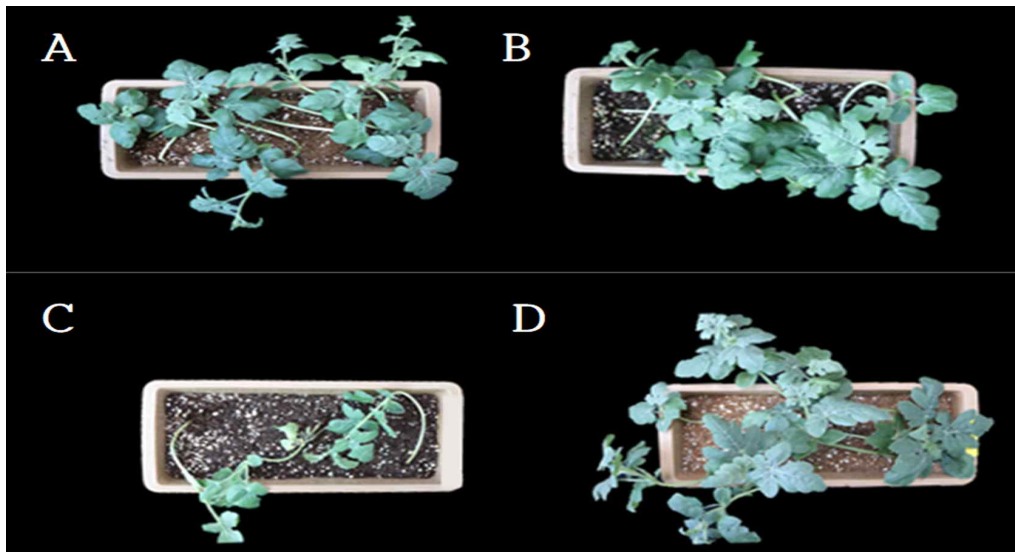


그림 87. 시제품, 항생제 및 세균 코팅 종자의 생존율 실험. A: 시제품으로 코팅한 종자에 *A. citrulli*를 접종한 수박. B: *A. citrulli* 코팅 종자에 항생제 처리한 수박. C: 코팅하지 않은 종자에 *A. citrulli* 접종한 수박. D: *A.*

citrulli 코팅 종자에 시제품 처리한 수박.

사. 파지 시제품을 이용한 멜론에서의 예방 및 치료 효과 검증

(1) 시제품을 이용한 멜론 종자 코팅 실험

*A. citrulli*의 유전자형 구별에서 group I은 주로 멜론에, group II는 주로 수박에 병을 일으키는 것으로 알려져 있으며, 현재 분리된 모든 파지는 group I과 group II 모두에 감염 가능하며, 이에 따라 개발된 종자 코팅제와 엽면 살포용 시제품을 수박에서와 같은 방법으로 처리한 후 멜론에서의 방제 효과를 검증하였다. 시중에서 구매한 멜론 종자(얼스탈런트, 농우바이오)는 1% NaClO 용액에서 5분간 담근 후 멸균 증류수로 5회 세척 하여 준비하였다. 종자 파종에 사용한 흙은 주식회사 부농의 상토를 사용하였으며, 사용 전에 고압증기멸균기를 이용하여 121°C에서 15분간 멸균하였고, 플라스틱 화분 (가로 x 높이 x 세로, 15 x 17 x 15cm)에 1 kg의 흙을 넣고 각 실험

균을 파종하였다.

각 실험군 종자는 실험군에 따라 1,000배로 희석된 시제품 (1.0 x 10⁷ PFU/ml)에 30분간 담근 후 꺼내어 건조하여 사용하였고, 시제품으로 코팅된 종자를 파종한 화분에 100 ml의 *A. citrulli* KACC 17000 (1.0 x 10⁷ CFU/ml, genotype I)를 접종하였고 대조군은 실험군과 같이 시제품을 코팅한 후 *A. citrulli* 를 처리하지 않은 것을 사용하였다. 실험은 식물용 LED를 이용하여 12시간 광/12시간 암의 광주기로 빛을 비추어주면서 30℃에서 2주간 배양시키며 관찰하였다.

준비된 종자의 일부는 *A. citrulli* (1.0 x 10⁶ CFU/ml)을 포함하고 있는 증류수 (또는 0.8% NaCl)로 처리하였고, *A. citrulli*를 코팅한 종자를 화분에 파종한 뒤 100 ml의 희석된 시제품 (1.0 x 10⁷ PFU/ml)을 추가 접종한 실험군과 추가접종하지 않은 대조군으로 나누었다. 시제품과 *A. citrulli* 둘 중 어느 것도 코팅하지 않은 음성대조군과 여기에 *A. citrulli* (1.0 x 10⁶ CFU/ml)을 100 ml 접종한 실험군을 두었으며, 다른 그룹의 씨앗은 시장에서 구매한 항생제 (일품 수화제, 동방아그로)로 코팅하였다. 세균 코팅된 종자 파종 후 토양에 100ml의 1,000배 희석된 항생제를 접종하거나 항생제로 코팅된 종자에 100 ml의 *A. citrulli*를 처리하였다.

시제품으로 코팅한 씨앗은 세균을 접종한 경우에 83%의 발아율을 보였으며, 세균으로 코팅된 종자 파종 포양에 희석된 시제품을 첨가한 결과 83% 발아되었고, 무처리 종자를 파종한 토양에 1,000배 희석된 시제품을 접종하였을 경우 100%의 발아 및 생존율을 보여 시제품의 독성은 확인되지 않았다 (그림 87). 1,000배 희석된 시제품으로 코팅된 종자 파종 후 *A. citrulli*를 접종한 경우 100 % 생존율을 보였다 (그림 88, 파란색). 세균으로 코팅된 종자 파종 후 시제품을 토양에 첨가한 경우에도 100%의 생존율을 보였으며 (그림 88, 회색), 무처리 종자의 경우 12%의 생존율을 보였으나, 시제품이나 항생제를 토양에 처리하였을 때는 100%의 생존율을 나타내었다 (그림 88, 주황색). 이와 관련된 사진 자료는 그림 89에 제시하였다.

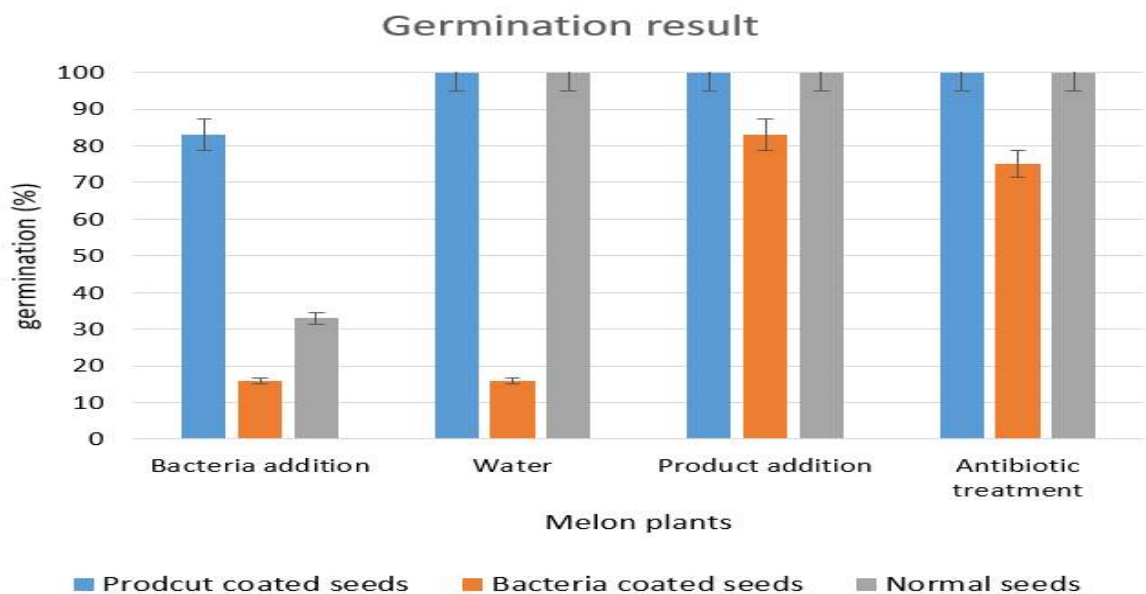


그림 88. 시제품으로 처리한 멜론 씨앗의 발아 실험. 세균 코팅된 종자 (주황색), 시제품 코팅된 종자 (파란색) 및 정상 종자 (회색)를 파종 후 세균, 증류수, 시제품, 항생제를 토양에 처리하였다.

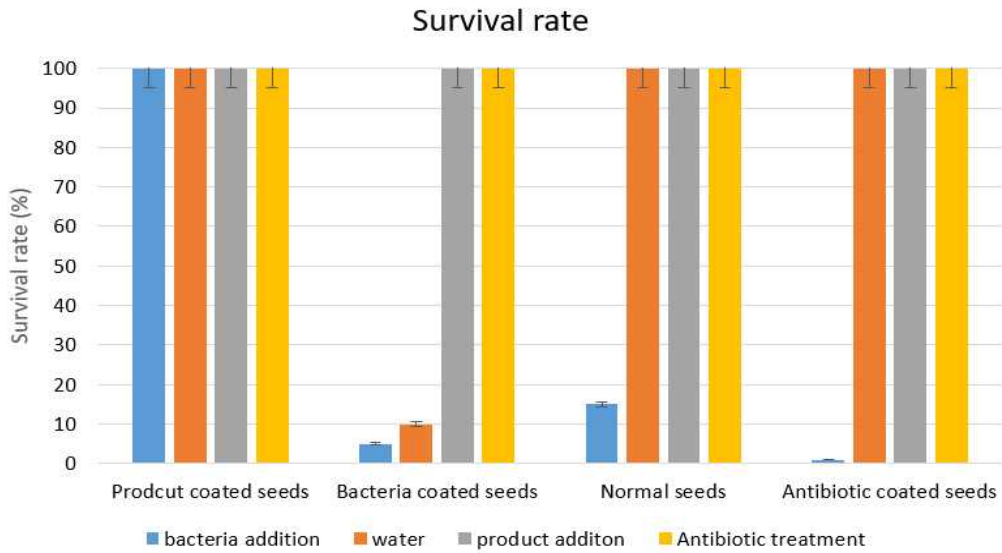


그림 89. 시제품 처리에 의한 멜론 유묘의 생존 결과

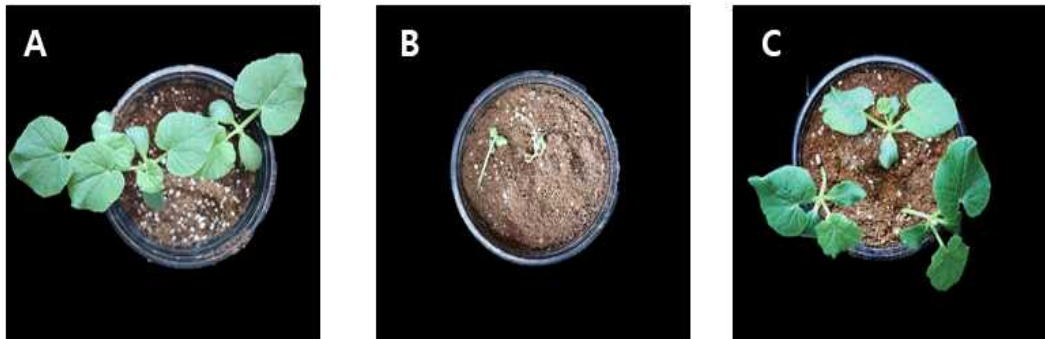


그림 90. *A. citrulli* 로 코팅된 멜론에 제품 적용 실험 결과. 세균으로 코팅된 멜론 씨앗을 파종한 후 A: 항생제 (A), 증류수 (B), 시제품 (C)을 토양에 첨가하였을 때의 유묘의 생존율 차이를 보여준다.

(2) 시제품을 이용한 멜론의 과일 썩음병 방제 효과 검증

김해시 대동면에 위치한 동아대학교 실험농장의 온실을 이용하여 본 실험을 실시하였다. 20개의 멜론 씨앗을 30cm 간격으로 파종하고 발아 3주 후 멜론 줄기에 주사바늘을 이용하여 상처를 내고 *A. citrulli* 그룹 I을 접종하고 2일 후에 동일한 위치에 시제품, 항생제로 처리한 후 2주 동안 온실에서 병의 진전을 관찰하였으며, 병의 중증정도는 수박의 경우에서 사용한 계산식을 이용하였다.

시제품을 처리한 경우 질병은 36%의 중증도를 보였고 처리하지 않은 경우 63%의 중증도가 나타났으나, 반면 항생제 처리 한 경우 38%의 중증도가 나타났다 (그림 90, 그림 91).

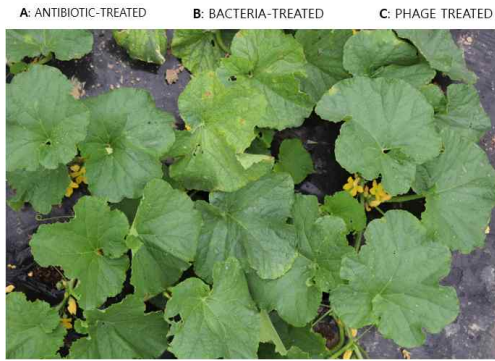


그림 91. 멜론에 *A. citrulli* 로 처리한 2일 후 시제품 및 항생제로 처리한 결과. A: 항생제 치료. B: *A. citrulli* 만 처리(Negative control). C: 시제품 처리

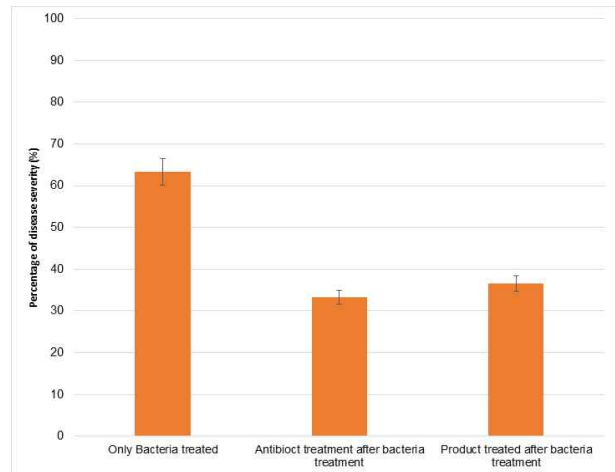


그림 92. 멜론에 *A. citrulli* 처리한 후 시제품 및 항생제 처리 결과

(3) 병원균과 파지의 처리 순서에 따른 예방 또는 치료 효과

A. citrulli 에 의한 질병 발생 후의 치료 효과를 관찰하기 위하여 발아한 멜론 유묘의 잎에 *A. citrulli* (1×10^5 CFU/ml)를 spray 방법으로 접종하였으며 접종 3일 후 과일 썩음병의 전형적인 증상이 잎에서 관찰되었다(그림 92). 병증을 보이는 식물이 자라는 토양에 토양 700 g 당 100 ml ACPWH (1×10^8 PFU/ml)를 첨가하고 5일 후 식물의 상태를 관찰한 결과 ACPWH를 접종한 토양에서는 모든 식물이 생존하였으나(그림 92A.), ACPWH를 접종하지 않은 식물은 80% 이상의 병징이 나타났다(그림 92B). 이를 통하여 ACPWH는 종자 코팅에 의한 예방 효과뿐만 아니라, 토양 처리에 의한 치료 효과도 확인되었다(그림 93).

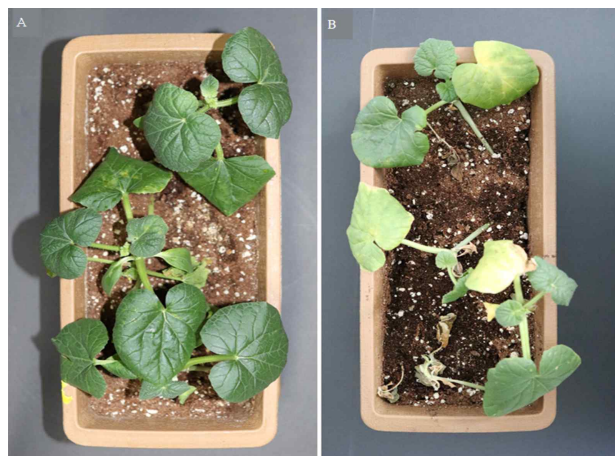


그림 93. 과일 썩음병 발병 멜론에 대한 파지 ACPWH의 치료 효과. *A. citrulli* 접종에 의하여 과일 썩음병 증상이 나타난 멜론 유묘가 자라는 토양에 파지 ACPWH를 접종한 경우 (A)와 무처리구 (B)에서의 식물 성장을 보여준다.

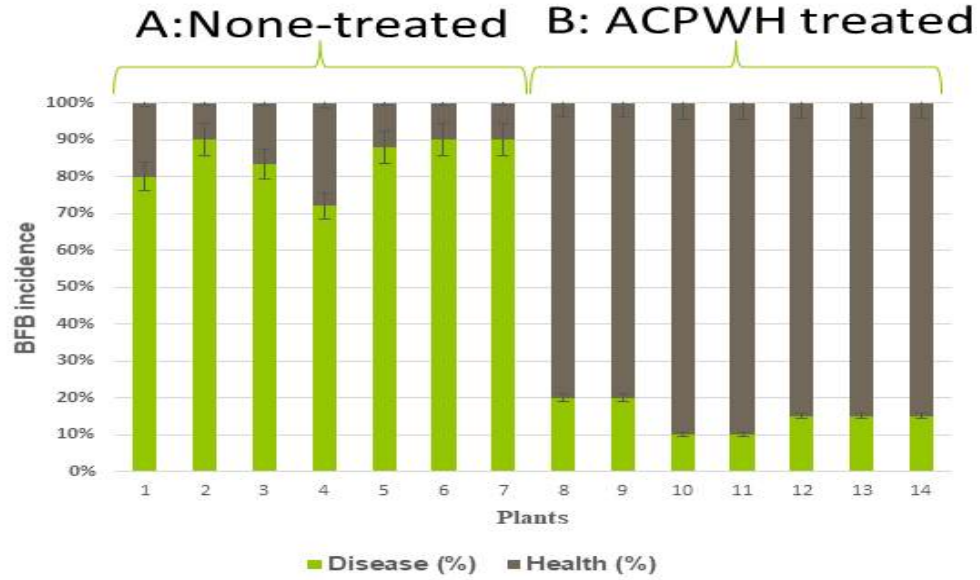


그림 94. 병징이 나타난 멜론에 파지 ACPWH 처리한 결과. *A. citrulli* 처리 후 4일간 유지하여 식물에 병징이 나타나도록 하였으며 1일 후 박테리오파지를 토양에 첨가하여 박테리오파지의 치료 효과를 평가하였다. 총 14개의 멜론에 대해 평가를 진행하였다.

병발생 멜론이 자라는 토양에 파지 ACPWH를 접종하였을 경우 병이 치료되는 이유가 토양에 첨가한 파지의 이동에 의한 것인지를 알아보기 위하여, 처리된 식물의 조직으로부터 PCR을 이용하여 바이러스를 검출하였다. 파지를 토양에 첨가한 후 8시간 후에 식물의 각 조직에서 DNA를 추출하고, 캡시드 단백질 서열의 forward primer (5'-CTCGGCGACAAAGGTCT CTT-3')과 reverse primer (5'-ATGATCGATGCCTTGTC-3')를 사용한 PCR 실험을 진행하였으며 PCR은 95°C: 5분, 1 cycle, 95°C: 30초, 60°C: 20초, 72°C: 20초, 31 cycle, 72°C: 5분의 조건에서 실시하였다. 토양에 파지를 처리한 멜론의 잎과 줄기에서 DNA를 추출한 후 PCR을 수행한 결과 멜론의 잎과 줄기 모두에서 파지가 검출되었으며(그림 94), 이러한 결과는 토양에 첨가한 파지가 식물의 지상부로 이동하여 *A. citrulli*에 의한 병을 억제한다는 것을 보여준다.

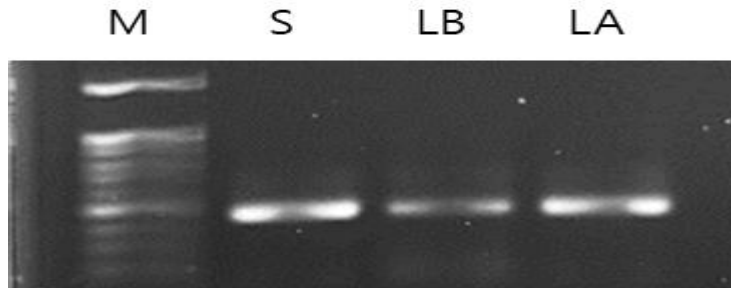


그림 95. 토양에 첨가한 파지 ACPWH의 식물 조직에서의 검출. 토양에 파지를 첨가하고 8시간이 지난 후 각 조직에서 DNA를 추출하여 PCR를 진행하였다. M: 100 bp DNA ladder, S: 줄기, BS: leaf blade base, BA: leaf blade apex.

(4) 시제품 제작용 첨가물이 박테리오파지 안정성

0.3% 유계질, LC50D, LN10, 자외선 차단제 각 25%를 함유하고 있는 시제품 제작용 첨가물이 박테리오파지에 미치는 영향을 알아보기 위하여 ACPWH (1×10^9 PFU/ml)에 이들 혼합물을 4% 및 0.4 % 및 0.04 %의 최종 농도로 혼합하고, 각 샘플을 교반하면서 3일, 6일, 9일, 14일 후 파지 농도를 plaque assay 방법으로 확인한 결과 모든 농도에서 파지 역가에는 영향을 미치지 않음을 확인하였으며 (그림 95), 이 결과에 따라 시제품은 보조제 4%와 1×10^9 PFU/ml의 ACPWH 96%로 제작하여 사용하였다.

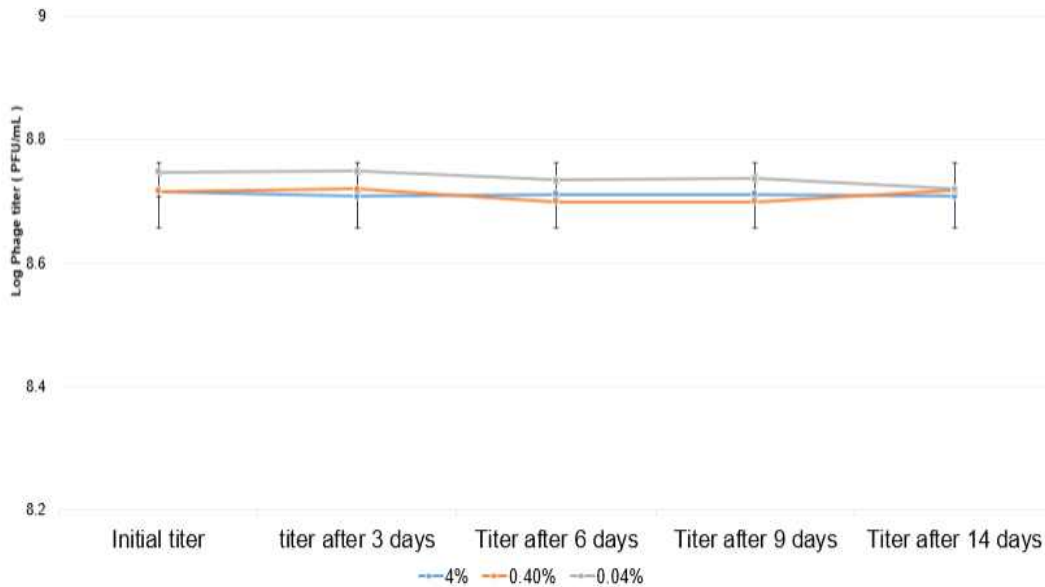


그림 96. 파지와 혼합된 시제품 보조제의 파지 안정성에 미치는 영향. 파란색: 제품 4%, 주황색: 제품 0.4%, 회색: 제품 0.04 %.

아. 수박 과실썩음병 파지 제제의 안정성 검증

(1) 제제의 온도 안정성

2차년도에 참여기업이 제작한 파지 시제품의 유통 및 저장 과정에서의 안정성을 조사하기 위하여 다양한 조건 (온도, 햇빛 노출 등)에서 보관하며 플라크 분석을 통한 파지의 활성을 조사하였다. 제제는 ACPWH의 titer 1×10^{10} PFU/ml 와 보조제를 최종 농도가 4 %가 함유되게 만들었으며, 실제 현장에서의 사용 희석 배수와 동일하게 하여 DW로 1,000배 희석하여 ACPWH의 titer가 1×10^7 PFU/ml가 되게 하여 안정성 검사를 하였다. 희석액을 -80°C , -20°C , 4°C , 20°C , 25°C , 37°C , 45°C , 50°C , 55°C 에서 4주 동안 보존하면서 3일 간격으로 플라크 분석법을 사용하여 파지 농도를 확인하였다. ACPWH의 titer는 -80°C 에서 45°C 까지 4주 동안 변화가 없었으나, 55°C 에서는 12일 이후 titer가 감소하여, 30일 후에는 바이러스가 검출되지 않았으며, 별도의 실험에서 60°C 에서는 1시간 바이러스가 검출되지 않았다 (그림 96).

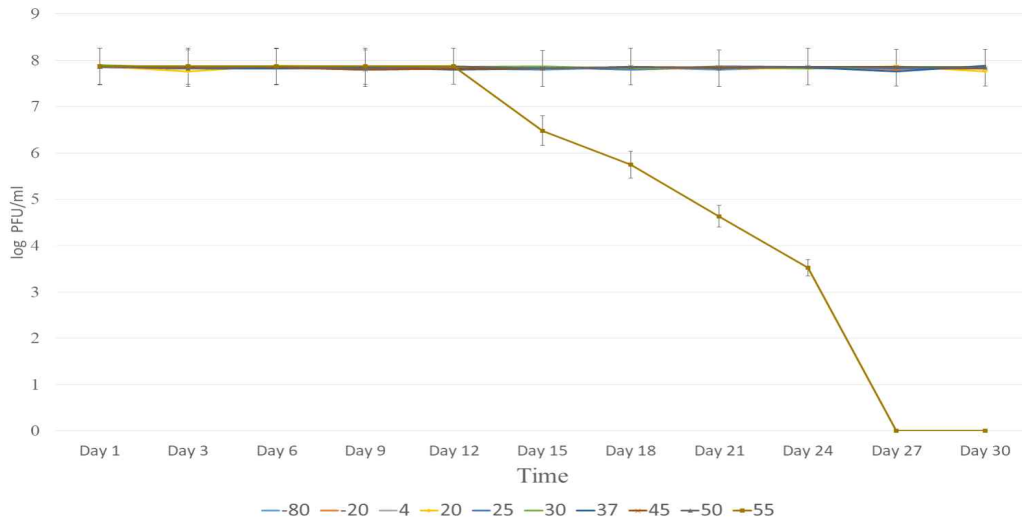


그림 97. 파지 제제의 온도 안정성. 4 주 동안 안정성 실험. 표시된 온도에서 1,000배 희석된 제제를 보존하면서 3일 간격으로 plaque assay를 실시하였다.

또한, 장기간 (최대 22개 주) 제제의 안정성을 확인하였다. 위와 같이 준비한 1,000배 희석액을 -80°C, -20°C, 4°C, 20°C, 25°C, 37°C, 45°C에서 22주일간 보존하면서 1주일 간격으로 plaque assay를 실시하였다. 그 결과 -80°C에서 25°C까지의 온도에서는 22주까지 titer의 변화가 없었으나, 45°C에서는 파지의 titer가 지속적으로 감소하였고, 37°C에서는 16주부터 감소하기 시작하여 22주 후에는 1 log 감소하였으며, 30°C에서는 18주에서 titer의 감소가 나타나 22주에는 0.5 log의 감소가 확인되었다 (그림 97).

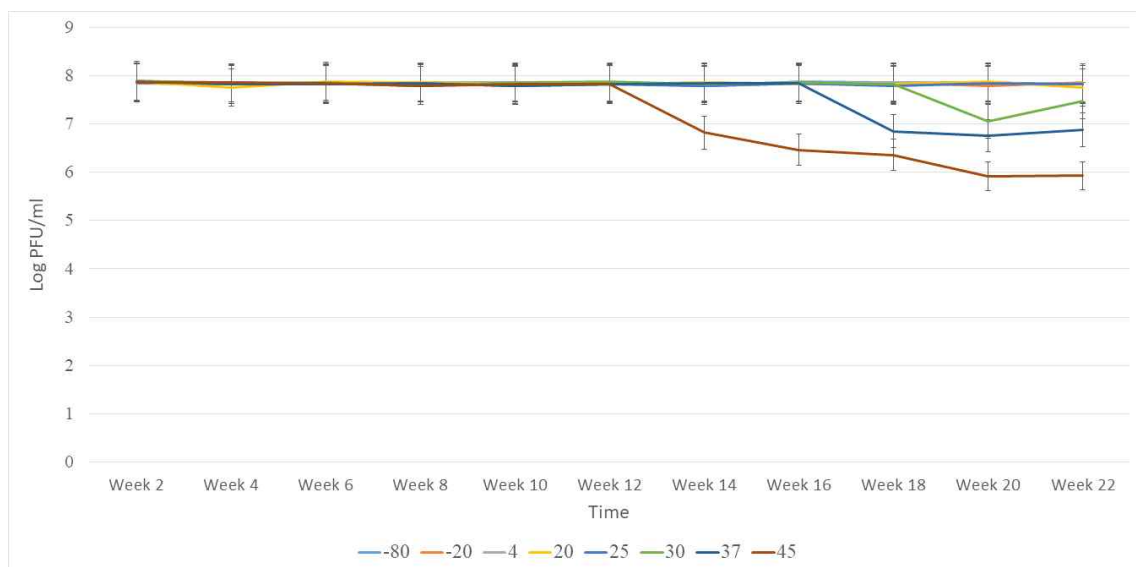


그림 98. 파지 제제의 장기 보존에서의 온도 안정성. 1,000배로 희석한 제품을 22주간 표시된 온도에서 보존하면서 1주일 간격으로 plaque assay를 실시하였으며, 결과는 3반복의 평균을 나타낸다.

(2) 제제의 옆면에서의 안정성

제제의 처리 후 식물체 표면에서의 파지의 안정성을 확인하기 위하여 위에서 준비한 제제를 1,000배 희석한 후 2주된 수박 1주 당 5ml씩 분무한 후 식물용 LED를 이용하여 12시간 광/12시간 암의 광주기로 빛을 비추어주면서 30℃에서 10일간 유지하면서 매일 2g의 잎을 회수하여 plaque assay를 통하여 바이러스의 titer를 조사하였다. 그 결과 관찰이 이루어진 10일 동안 바이러스의 titer에 유의한 감소가 관찰되지 않아 식물 잎에서의 파지의 안정성이 확인되었다 (그림 98).

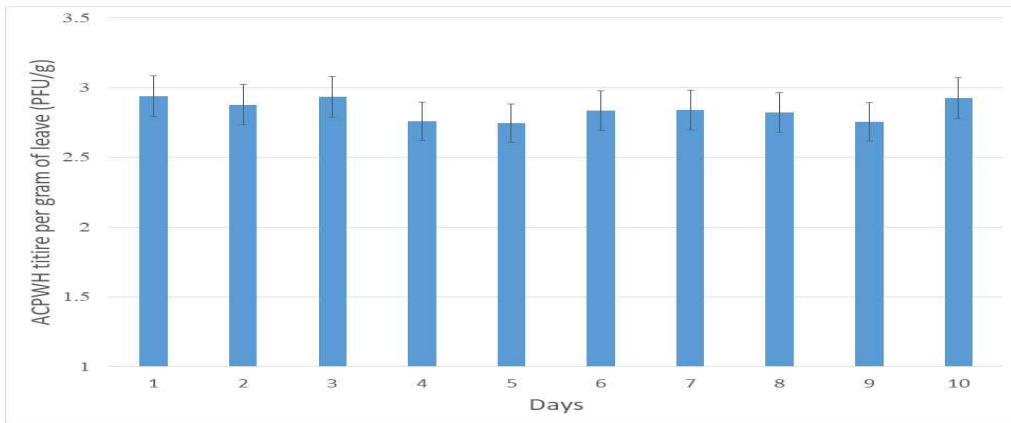


그림 99. 수박 식물 잎에서의 제제의 안정성. 1,000배 희석된 제제를 분무한 수박 식물을 생육실에 10일간 보존하면서 매일 2g의 잎을 회수하여 plaque assay를 실시하였으며, 결과는 3주의 식물에서의 평균값이다.

(3) 제제의 햇빛 노출 안정성

제제의 햇빛 노출에 대한 안정성을 조사하기 위하여 위에서 준비한 제제 1,000배를 2주된 수박 1주당 5ml씩 분무처리하고 8일 동안 햇빛 아래 보존하면서 매일 2g의 수박 잎을 회수하여 plaque assay를 실시하였다. 대조군으로는 ACPWH를 증류수에 1×10^7 PFU/ml로 희석하여 사용하였다. 실험 결과 대조군에서는 1일째부터 titer가 감소하기 시작하여 1주일 후에는 바이러스가 검출되지 않았으나, 시제품에서는 ACPWH의 역가가 3 일 후부터 감소하기 시작하였으나 감소 비율이 낮아 8일후에도 3×10^2 PFU /g의 파지가 확인되었다 (그림 99).

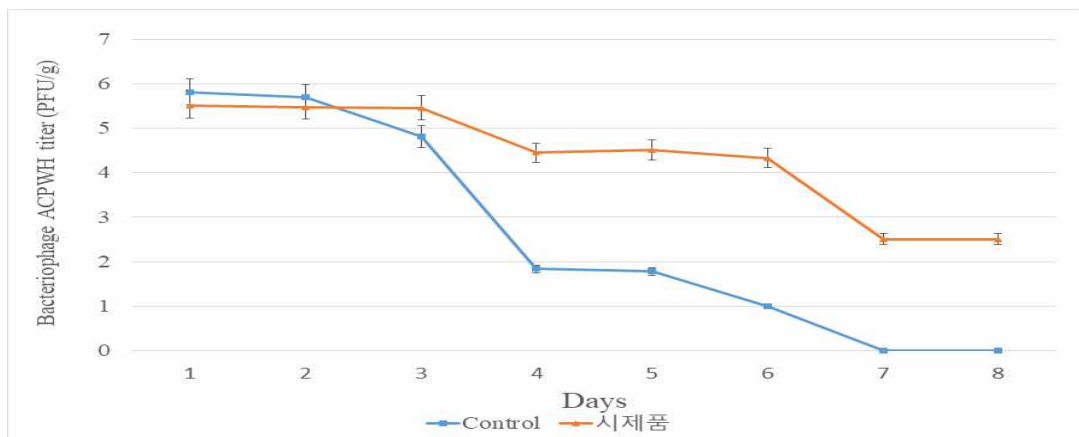


그림 100. 박테리오파지 ACPWH 및 제제의 햇빛 노출에 대한 안정성. 희석된 제제와 (주황색) 보조제가 포함되지 않은 파지 (파란색) 수박 잎에 분무한 후 1일 간격으로 plaque assay를 실시하였으며, 결과는 3반복의 평균을 나타낸다.

(4) 제제의 토양에서의 안정성

파지 ACPWH 및 제제를 10g의 흙에 7×10^7 PFU/g으로 섞은 후 4°C보관하면서 1, 3, 5, 7일에 plaque assay 방법으로 titer를 조사하였다. 그림 100에 나타난 것과 같이 순수한 파지와 제제에서 보존 기간동안 titer의 변화가 관찰되지 않아, 토양에서의 파지의 안전성을 확인하였다.

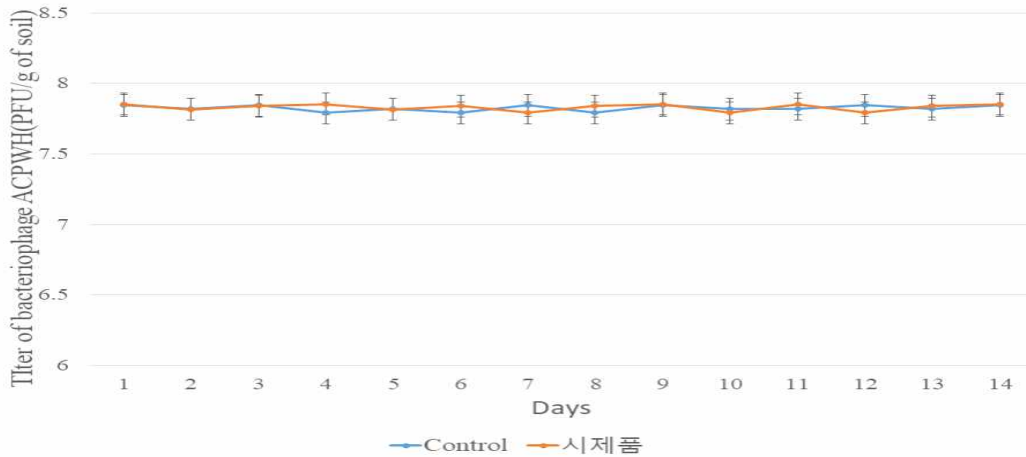


그림 101. 토양에서 박테리오파지 및 혼합의 안정성. 파란색은 대조군에서 파지 역가를 나타내었고 주황색은 제제에서의 파지 역가를 나타냈다.

자. 병행 요법에 의한 방제 효과 향상

(1) 항생제가 파지에 미치는 영향

종자 코팅 시 구리 제제 또는 streptomycin과 같은 항생제를 함께 처리하였을 경우의 방제 효과가 향상되는지를 조사하기 위하여, 일차적으로 이들 물질에 대한 파지의 안전성을 조사하고 병행 처리 시 최적 농도를 결정하였다. ACPWH 100ul (1×10^8 PFU/ml)과 1ml 스트렙토 마이신과 (1mg / ml)을 혼합한 후 1주 동안 상온에서 보존하면서 매일 plaque assay을 통하여 titer를 조사하였으며, 그림 101에 나타난 바와 같이 파지 titer의 변화가 관찰되지 않아 streptomycin의 경우 파지에 영향을 주지 않는 것이 확인되었다.

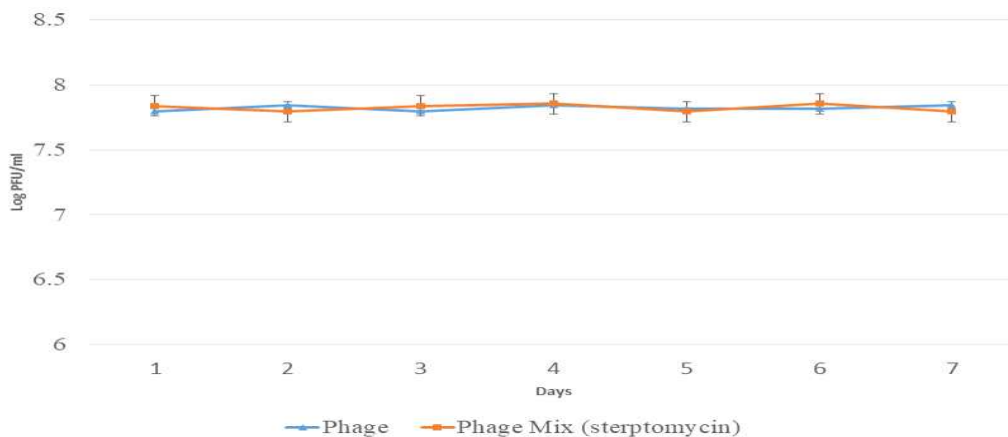


그림 102. 항생제의 파지 ACPWH에 대한 영향. 병행처리를 위하여 사용할 항생제의 영향을 알아보기 위하여 혼합 후 1주일간 plaque assay를 실시하였으며, 결과는 3반복의 평균값이다.

(2) 병행 처리에 의한 발병 억제 실험

시중에서 구매한 수박 종자 (얼스텔런트, 농우바이오)는 1% NaClO 용액에서 5분간 담근 후 멸균 증류수로 5회 세척 하여 준비하였다. 종자 파종에 사용한 흙은 주식회사 부농의 상토를 사용하였으며, 사용 전에 고압증기멸균기를 이용하여 121℃에서 15분간 멸균하였고, 플라스틱 화분 (가로 x 높이 x 세로, 15 x 17 x 15cm)에 1kg의 흙을 넣고 각 실험군을 파종하였다. 종자 코팅에는 1,000배 제재 희석액 (1×10^7 PFU/ml), 스트렙토마이신 (농도 1mg/ml), 1,000배 제재 희석액 (1×10^7 PFU/ml) + 스트렙토마이신 (농도 1mg/ml) 혼합액이 사용되었으며, 종자를 해당 용액에 30 분간 담근 후 꺼내어 건조하여 사용하였고, 코팅된 종자를 파종한 화분에 100ml의 *A. citrulli* KACC 17005 (1.0×10^7 CFU/ml, genotype II)를 접종하였고, 대조군은 코팅을 하지 않은 일반 종자를 이용하였다. 실험은 식물용 LED를 이용하여 12시간 광/12시간 암의 광주기로 빛을 비추어주면서 30℃에서 유지하면서 진행하였고, 발아율은 파종 후 10일, 생존율은 3주 후에 결정하였다.

그 결과 파지 또는 항생제를 단일 코팅한 종자는 92%의 발아율을 보였으며 발아된 종자는 모두 생존하였다. 반면에 제재와 스트렙토마이신을 병행처리한 종자는 100%의 발아 및 생존율을 보였으며, 처리를 하지 않은 종자의 경우 매우 낮은 발아율과 생존율을 보였다 (그림 102, 그림 103).

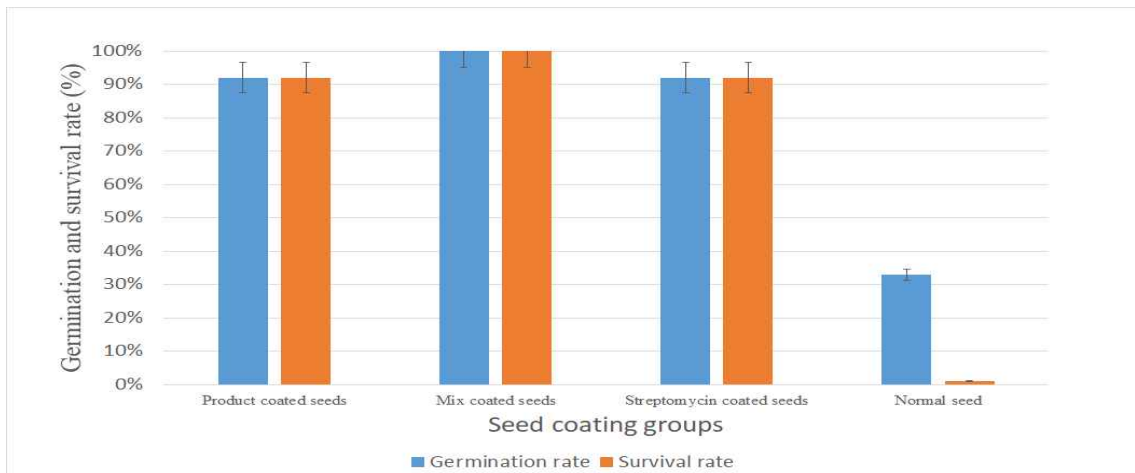


그림 103. 시제품과 항생제 병행 처리에 의한 종자 발아율 및 생존율 비교. 1,000배 제재 희석액, 스트렙토마이신, 1,000배 제재 희석액 + 스트렙토마이신 혼합액으로 코팅한 종자를 파종한 토양에 *A. citrulli*를 접종하고 발아율과 생존율을 비교하였다. 파란색은 발아율을, 주황색은 생존율을 나타낸다.



그림 104. 시제품, 항생제 및 병행 처리에 의한 발병 억제 비교. A: 시제품으로 코팅한 종자에 *A. citrulli*를 접종한 수박. B: 제재와 항생제 혼합 코팅 후 *A. citrulli*를 접종한 수박, C: 코팅하지 않은 종자에 *A. citrulli* 접종한 수박.

3. 토마토 풋마름병 방제용 파지요법 기술 개발[제2협동연구(동아대)]

가. 토마토 풋마름병 방제용 파지의 확보와 특성 분석

(1) 토마토 풋마름병균을 용균하는 파지의 분리와 기주범위 분석

토마토 풋마름병 방제에 사용하기 위한 신규 파지들을 확보할 목적으로 국내의 다양한 지역에서 작물 재배지 토양 또는 농수로 시료를 확보하여 파지에 분리에 활용하였다(표 27).

표 28. 파지 분리에 사용된 토양 시료 목록

수집지역	재배기주	파지존재
경남 김해 대동면	토마토	○
경남 하동 양보면	토마토	○
전북 익산시 망성면	박과작물	○
경남 함안군 범수면	박과작물	○
충남 부여군 세도면	토마토	○
충남 부여군 규암면	수박	○
충남 논산 성동면	토마토	○
경기 용인 경희대 과수원	사과	○
경기 용인 경희대 농장	채소	○
전북 고창 성내면	배추	○
충남 당진시 월곡리	양파, 대파, 보리, 상추	×
대전 대덕구 신탄진동	상추	○
충북 재천시 화당리	채소	○
경기 광주시 퇴촌면	토마토, 가지, 고추	×
강원 횡성 둔내면	채소, 고추	×
강원 횡성 안흥면	채소, 고추	×
대구 달성군 참살이달성농장	토마토	○
경북 성주 농업기술원	참외	○
경북 안동 풍천면	고추	○
경북 안동 일직면	고추	○
경북 청송 진촌면	고추	○
경북 영양 입암면	고추	○
경북 영양 청기면	담배	×
경북 진천 덕산면 용몽리	농수로	×
충남 논산 부적면	토마토	×
충북 음성 대소면	토마토	○
충북 음성 농업기술원	수박	○
전북 부안 줄포면	고추	×
전남 장성 진원면	토마토	○
전남 담양 수북면 황금리	토마토, 멜론	○
전북 전주 국립농업과학원	토마토	×
제주 애월읍 어음리	수박	×
제주 애월읍 하가리	수박	○
제주 애월읍 신엄리	수박	○
제주 조천읍 신촌리	수박	○
강원 평창 고령지농업연구소	감자	○
강원 평창 고령지농업연구소	옥수수	○
부산 강서구 대저동	토마토	×

전국의 38개 지역 토양 시료 중 27개 지역의 토양 시료에서 *Ralstonia solanacearum*을 감염하는 파지가 검출되었으며(표 28), 아래는 각 지역에서 파지가 분리된 지역과 분리되지 않은 지역을 우리나라 지도에 도식화 하였다(그림 104).

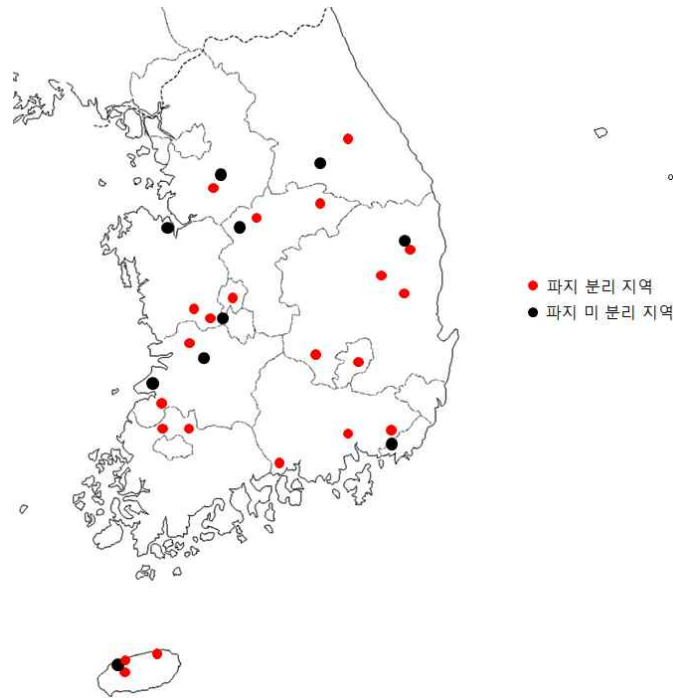


그림 105. 토마토 풋마름병 방제용 파지 시료의 분리지역과 분리현황

파지를 분리하기 위해서는 각각의 토양시료에 5 개 strain의 *R. solanacearum* 균주를 토양에 1% 포도당액과 처리하여 25도 상온에서 2일간 유지하여 파지의 밀도를 농화하였다. 이후 사용한 5 strain들 별로 각각 토양당 double agar layer plaque assay 방법을 통하여 파지의 plaque를 관찰하고 파지의 형태와 용균여부에 따라 파지를 순수분리 하였다. 순수분리한 파지는 SM buffer에 plaque 로부터 파지를 회수하여 보관하며 후속 연구에 사용하였다. 필요한 경우 선발된 파지의 경우 대량으로 정제하여 최종 SM buffer에 현탁하여 4℃에서 보관하며 후속연구에 활용하였다. 용균반(plaque)의 형태와 5종에 대하여 기주범위에 기초하여 분리한 파지는 72종인데 이들을 각각 단 용균반을 계대하여 순수분리하고 20 strain의 *R. solanacearum* 균주들을 사용하여 분리된 파지의 기주범위를 결정하고 그에 따라 분류하였다(그림 105-107). 위의 분리한 72종을 기주범위에 따라 각 파지의 종류와 가해하는 기주 strain 들, 그리고 용균반 크기를 데이터로 목록화하고 이를 대상으로 clustering 한 결과 8 개의 군으로 구별을 할 수 있었다(그림 108). 각 군으로부터 대표 파지를 각각 선발하고 기주 범위에 따라 토마토 풋마름병 방제연구를 위해 아래의 표 3에 선발된 파지를 후속연구에 사용하였다. 그림 109는 후속 연구에 사용한 6종의 파지의 기주범위를 결정한 결과이다. 이들 파지중 기주범위가 넓은 파지 RpY2 와 RpT1을 단독 또는 혼합으로 파지의 방제효과 검정에 사용하였으며 그 외의 파지는 파지의 신규성, 기주범위 분석, 방제효과 대조용으로 활용하였다.

그림 106. 풋마름병균 감염 파지들의 기주특이성에 따른 그룹화 1

		<i>Ralstonia solanacearum</i> strains																			
Group	Phage	SL312	SL341	SL535	SL740	SL1944	SL1971	SL2029	SL2064	SL2264	SL2268	SL2313	SL3395	SL3400	GMI1000	K60-1	LMG17144	LMG2300	LMG2294	LMG2303	LMG2296
A	RpY1	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	++
B	RpH2	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	++	++	+	++	-	+	++	+
	DB1	++	++	++	++	-	+	++	-	-	-	-	-	++	++	++	+	-	+	++	++
	UDT1	++	++	++	++	-	+	++	-	-	-	-	-	++	++	++	-	-	+	++	++
	UDT2	++	++	++	++	-	+	++	-	-	-	-	-	++	++	++	-	-	+	++	++
	UDT3	++	++	++	++	-	+	++	-	-	-	-	-	++	++	++	-	-	+	++	++
	UDT4	++	++	++	++	-	+	++	-	-	-	-	-	++	++	++	+	-	+	++	++
	UDT5	++	++	++	++	-	+	++	-	-	-	-	-	++	++	++	+	-	+	++	++
	UAM01	++	++	++	++	-	+	++	-	-	-	-	-	++	++	++	-	-	+	++	++
	UAM02	++	++	++	++	-	+	++	-	-	-	-	-	++	++	++	+	-	+	++	++
	BST01	++	++	++	++	-	+	++	-	-	-	-	-	++	++	++	+	-	+	++	++
	BST02	++	++	++	++	-	+	++	-	-	-	-	-	++	++	++	-	-	+	++	++
	JIT01	++	++	++	++	-	+	++	-	-	-	-	-	++	++	++	+	-	+	++	++
	JIT02	++	++	++	++	+	+	++	-	-	-	-	-	++	++	++	-	-	+	++	++
	DST02	++	++	++	++	-	+	++	-	-	-	-	-	++	++	++	+	-	+	++	++
	1_1S	++	+	++	++	-	-	+++	-	-	-	+	-	++	+	+++	+	-	++	++	++
	1_2S	++	+	++	++	-	-	+++	-	-	-	+	-	++	+	+++	+	-	++	++	++

그림 107. 풋마름병균 감염 파지들의 기주특이성에 따른 그룹화 2

C	8G	++	++	++	++	-	+	++	+	-	-	-	+	+++	+++	++	-	+	+++	+	-
D	14G	++	+	++	++	+	+	+	++	-	-	-	-	+++	++	++	+	-	+++	++	-
	14G2	+	+	++	+	-	-	+	++	-	-	-	-	+++	+++	+++	+	-	+++	++	-
E	6G	+++	++	+++	+++	-	++	+++	++	+	-	+	-	++	+++	+++	-	+	+++	+++	-
	13G	++	++	+++	+++	+	++	+++	+	-	-	-	++	+++	+++	+++	-	+	+++	++	-
	9G	++	++	++	++	+	++	++	+	-	-	-	++	+++	+++	+++	-	+	+++	+++	-
	12G	+++	++	+++	+++	-	+	++	+	-	-	-	+	+++	++	+++	-	+	+++	++	-
	1G	++	++	+++	+++	-	+++	+++	+	-	-	-	-	++	++	+++	-	+	++	++	-
	7G	++	++	++	+++	-	++	+++	++	+	-	-	-	++	+++	++	-	+	+++	+++	-
	7G2	++	++	++	+++	+	+++	+++	+	+	-	-	+	++	++	++	-	+	+++	+	-
	2_341	+++	+++	+++	+++	-	+	+++	+	-	-	+	-	+++	++	+++	+	+++	+++	++	-
	9_2029	+++	+++	++	+++	-	-	+++	++	-	-	-	-	+++	+++	+++	+	+	+++	++	-
	2_2029	++	++	++	+++	-	++	+++	++	-	-	+	-	+++	+++	+++	+	+	+++	+++	-
	8_2029	++	++	++	+++	-	++	+++	++	-	-	+	-	+++	++	+++	+	-	++	++	-
	5_2029	+++	++	+++	+++	-	++	+++	+	-	-	++	-	++	+++	+++	+	-	++	++	-
	10G	+++	+++	++	++	-	+	++	+	+	-	-	+	+++	++	+++	+	+	+++	+++	-
F	B2_2	+++	++	+++	++	++	-	+++	-	+	+	+	++	+++	+++	+++	+	+	++	+++	+++
	B2_3	+++	++	+++	++	++	-	+++	-	+	+	+	++	+++	+++	+++	+	+	++	+++	+++
	B2_4	+++	++	+++	++	++	-	+++	-	+	+	+	++	+++	+++	+++	+	+	++	+++	+++
	B2_6	+++	++	+++	++	++	-	+++	-	+	+	+	++	+++	+++	+++	+	+	++	+++	+++
	B2_7	+++	++	+++	++	++	-	+++	-	+	+	+	++	+++	+++	+++	+	+	++	+++	+++

그림 108. 꽃마름병균 감염 파지들의 기주특이성에 따른 그룹화 1

DG	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	++
19G	+++	+	+++	+++	+++	-	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+++	++
19_3400	+++	+	+++	+++	-	-	+++	+++	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+	-	+++	++
RpY2	+++	-	+++	++	+++	+++	+++	++	-	++	-	+++	+++	+++	+++	++	-	+++	+++
19_2268	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	-	+++	+++	+++	+++	-	-	+++	+
11GL	+++	+	+++	+++	+++	-	+++	+++	+	+++	+	+++	+++	+++	+++	+	-	+++	++
RpT1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++	++
2_1G	+++	-	+++	+++	+++	-	+++	+++	-	+++	+	+++	+++	+++	+++	-	-	+++	+
I																			
K3	+++	-	+++	+++	+++	++	+++	+++	-	++	-	+++	+++	+++	+++	-	-	+++	-
TG	+++	-	+++	+++	+++	+	+++	+++	-	+++	-	+++	+++	+++	+++	-	-	+++	-
MG	+	-	++	++	+++	++	+++	++	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++	++	-
PG	-	-	-	-	+	+	+	++	-	+	+	++	+++	+++	++	++	+	+	-
J																			
RpR2	+	-	-	-	+++	+++	-	+++	-	+++	++	+++	+++	+++	+++	-	-	+++	+

* +++: plaque size over 3 mm, ++: plaque size 1-3 mm, +: blur plaque, -: no plaque

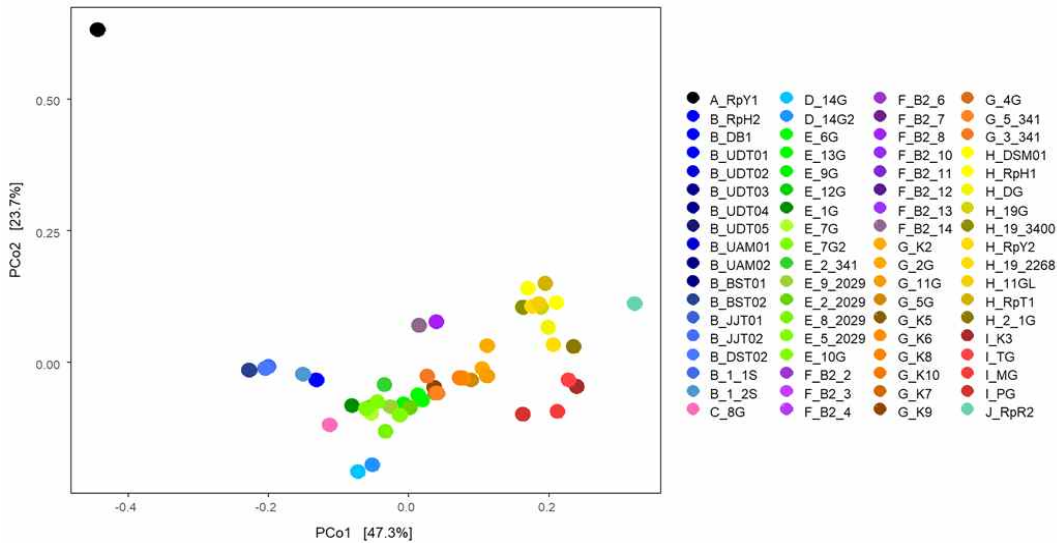


그림 109. 분리한 phage 를 기주범위에 따라 clustering 한 결과

그림 110. 기주범위에 따라 그룹화한 파지 중 후속연구를 위해 선발한 파지의 기주범위

Phage	<i>R. solanacearum</i> strain																				
	SL 312	SL 341	SL 535	SL 740	SL 1944	SL 1917	SL 2029	SL 2064	SL 2264	SL 2268	SL 2313	SL 3395	SL 3400	GMI 1000	K 60-1	LMG 17144	CCUG 14274	LMG2 294	PU20	LMG 2296	
RpH1	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++
RpH2	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	++	++	+	++	-	+	++	+	
RpY1	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	++	-	-	-	
RpY2	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	+++	+++	
RpT1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	+++	++	
RpT2	+	-	-	-	+++	+++	-	+++	-	+++	++	+++	+++	++	+++	+++	-	-	+++	+	

(2) 토마토 꽃마름병 방제용 파지의 형태와 유전체 분석

선발한 6종의 파지들의 형태를 전자현미경으로 관찰하였다. 선발한 파지를 정제하기 위해서는 우선 기주인 *R. solanacearum*을 CPG 배지에서 밤새 전 배양하고 새로운 배지에 1/100 희석하여 접종하였다. 그리고 기주세균을 대량배양하며 600 nm에서 OD가 0.1에 도달하면 파지를 multiplicity of infection (MOI)가 0.01 되도록 첨가하고 30도에서 24-48시간 추가 현탁배양 하였다. 이후 배양액을 회수한 뒤 원심분리하여 용균 상등액을 회수하였다. 필요한 경우 용균 상등액을 0.2 um 직경의 구멍을 가진 여과지에 막 여과한 후 정제에 사용하였다. 1차 정제는 용균 상등액에 NaCl-Polyethylene glycol (PEG)를 첨가하여 0.5 M NaCl, 5% PEG 8000 이 되도록 하고 4℃에서 밤새 반응한 뒤, 파지 입자를 침전시켜 회수하였다. 파지는 최종 SM 완충액에 현탁하여 사용하였다. 파지의 형태관찰은 전자현미경용 grid 위에서 정제한 파지 용액을 떨어뜨리고 phosphotungstic acid을 사용한 음성염색법을 통해 염색후 건조하여 투과전자현미경(TEM)으로 파지의 형태를 관찰하였다.

형태를 관찰한 6종 중 5종(RpH1, RpT1, RpT2, RpY1, RpY2)는 꼬리가 짧은 icosahedral 형태의 Podoviridae 에 속하며 그 머리(head)의 크기가 60-75 nm에 달하였으며 유전체 분석결과도 dsDNA를 유전체로 가지는 Podoviridae의 파지로 나타났다(그림 110). 그러나 RpH2 는 약 1,000 - 1,200 nm의 길이를 가지는 사상형 파지인 Inoviridae 에 속하는 것으로 나타났다.

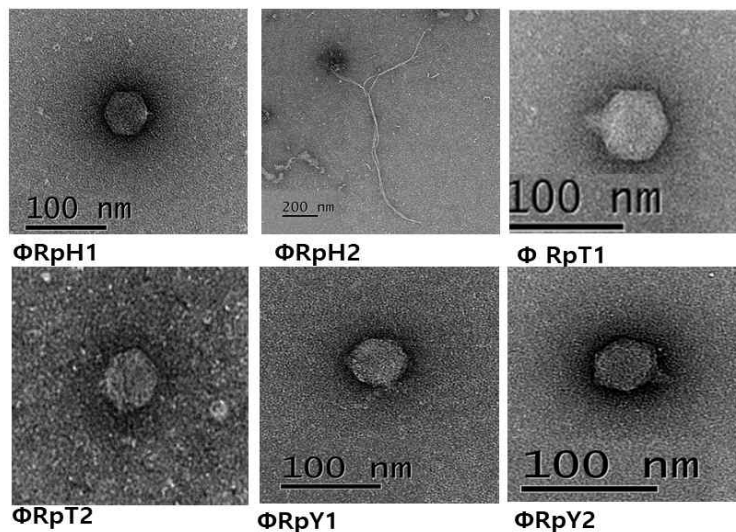


그림 111. 파지 6종의 전자현미경을 이용한 형태 분석

파지의 유전체 분석을 위해서는 정제된 파지 현탁액을 phenol:chloroform (1:1) 용액을 사용하여 파지의 핵산을 분리하고 RNase, S1 nuclease, 그리고 제한효소를 처리하여 새로운 파지의 핵산 유형을 분석하였다. 위의 Podoviridae 파지는 dsDNA를 유전체로 Inoviridae 파지는 ssDNA를 유전체로 보유하는 것으로 나타났다. 위의 4종의 podoviridae에 속하는 phage의 유전체를 분석한 결과 RpY1은 파지 DU_RPII와 95% 유사하며 과 RpT1은 phiTL-1 과 88% 유사한 유전체를 보유하며, RpH1과 RpY2는 서로 99% 유사한 유전체를 보유하며 근연의 파지 phiTL-1 과 87% 유사한 것으로 나타났다. 각 파지의 유전체 분석 결과를 그림 111-113에 나타냈으며, 52-56개의 coding ORF를 보유하나 19-38개의 동정되지

많은 hypothetical protein 이 대다수였다.

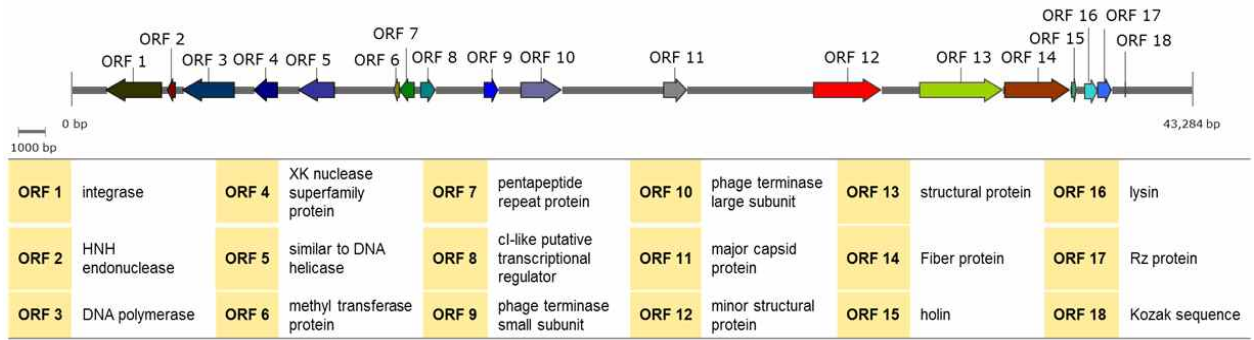


그림 112. RpY1의 유전체 지도: 전체 55개의 유전자중 18개의 유전자가 동정됨(유전체 크기: 43,284 bp)

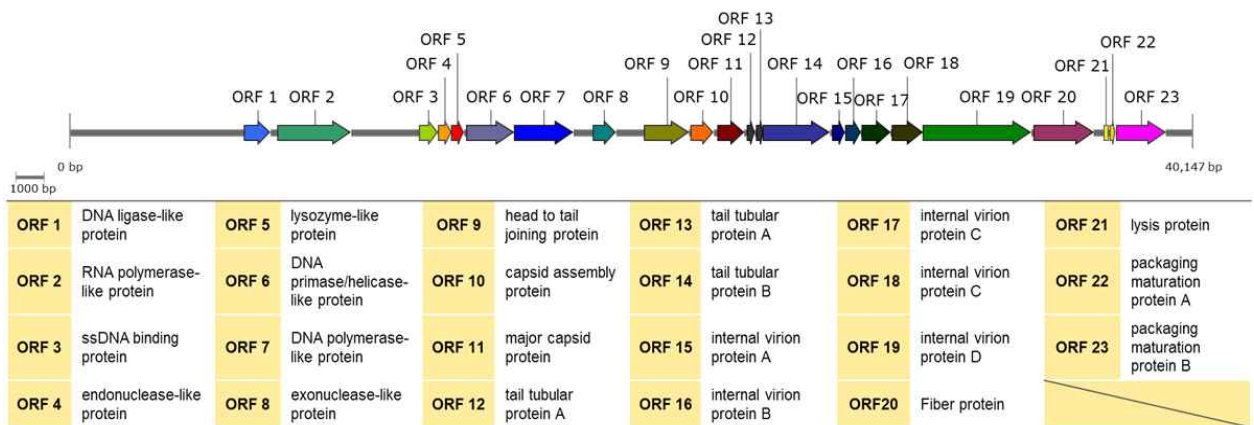


그림 113. RpY2의 유전체 지도: 전체 52개의 유전자중 23개가 동정되며 유전체 크기는 40,147 bp 이며 RpH1의 경우 매우 유사한 유전체를 보유함

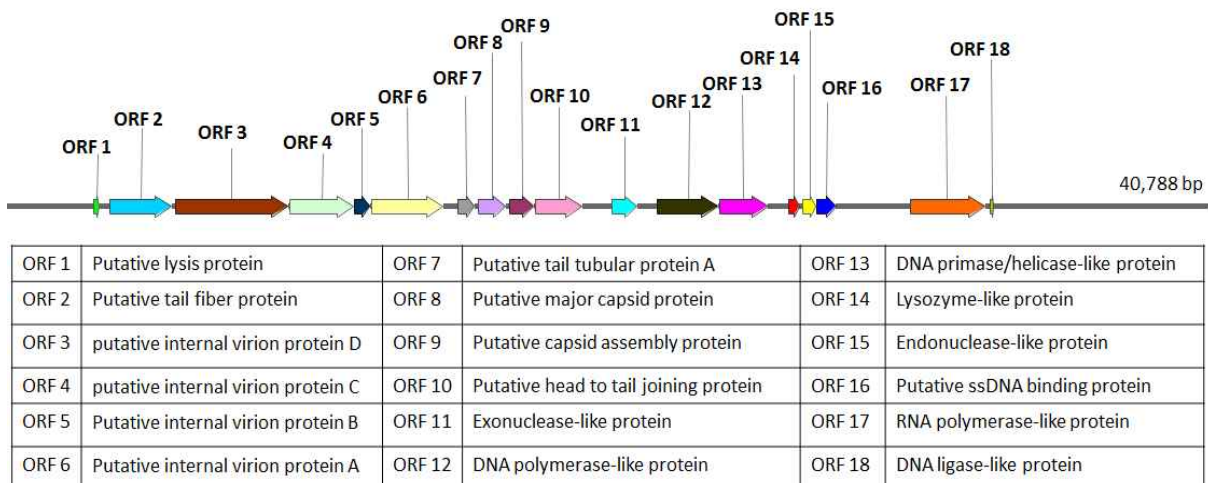


그림 114. RpT1의 유전체 지도: 전체 56개의 유전자 중 18개의 유전자가 동정되었으며 크기는 40,788 bp 에 해당함

분석한 4종의 파지중 RpY2의 경우 RpH1과 매우 유사한 유전체를 보유한 것으로 나타났으며 기주범위도 매우 유사하여 동종의 파지로 예상된다. 따라서 3종의 파지 유전체 정보를 이용하여 Podoviridae 파지의 계통을 분석하고 계통도를 작성하였다(그림 114).

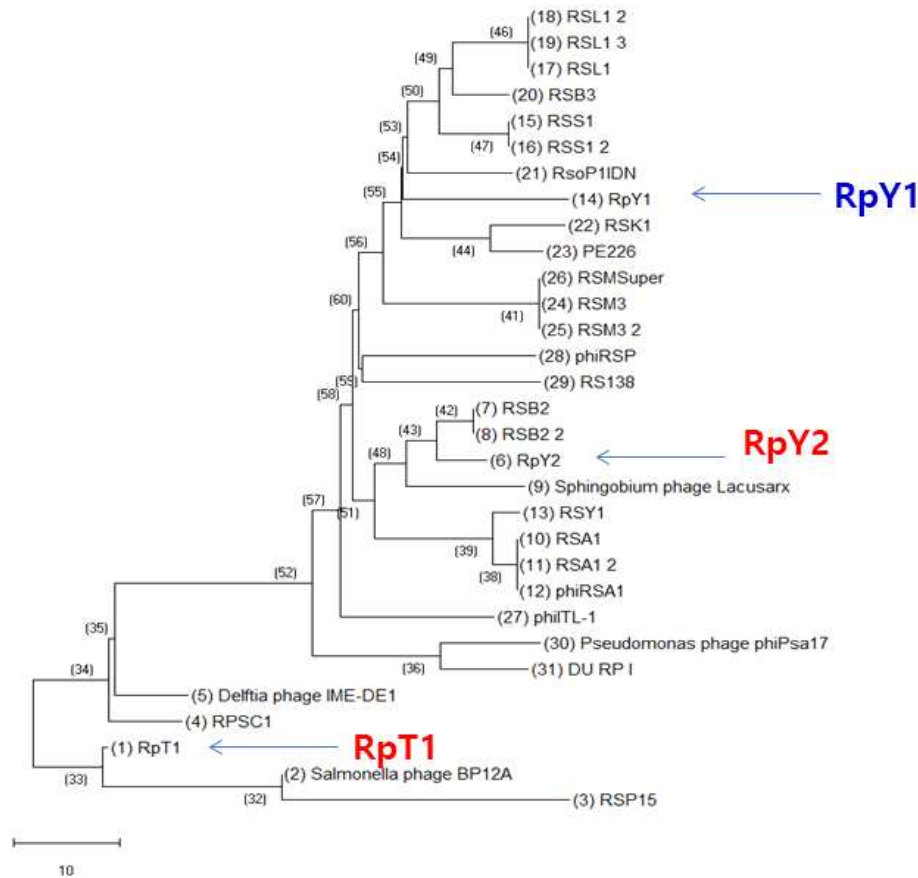


그림 115. 파지 전장 유전체 분석에 따른 파지의 계통도

분석한 파지의 계통에 따르면 RpY1, RpY2, RpT1 모두 같은 Podoviridae 에 속하는 파지임에 불구하고 그 계통이 서로 다른 종류의 파지 군에 속하는 것으로 나타났다. 따라서 후속 연구에서는 기주범위가 넓은 RpY2 와 RpT1을 이용하여 풋마름병 방제를 위한 파지요법 분석에 이용하였다.

나. 토마토 풋마름병 방제를 위한 파지 처리 기술

(1) 토마토 풋마름병 방제용 파지의 단독처리 방제효과

파지에 의한 토마토 풋마름병 방제효과는 시판 상업품종인 Zuiken을 구매하여 사용하였다. 토마토를 종자를 표면소독 후 멸균수에서 발아하여 발아 1주후 부농상토에서 이식하고 3주간 재배하여 기주로 준비하였다. 파지 단독처리에 의한 방제효과의 분석을 위해서는 파지의 종류에 따라 기주세균으로 *R. solanacearum* GMI1000 균주와 SL341 균주를 사용하여 풋마름병의 방제를 조사하였다. 병원세균의 현탁액을 준비하여 토마토를 키운 포트의 1 g 당 10^7 cfu 가 되도록 병원균을 관주하여 병원균을 접종하고 이후 2주간 병징을 관찰하여 병진 전 곡선(시들은 앞의 백분율)으로 도식화 하였다. 병원균 접종전 또는 후로 파지는 10^8

pfu/g 토양이 되도록 관주하였다. 이때 처리구를 다음과 같이 준비하였다. 1)무처리구, 2)병원균만 접종한 처리구, 3)파지만 접종한 처리구, 4)파지를 접종전 병원균을 접종한 처리구, 5)파지와 병원균을 섞어서 함께 접종한 처리구, 6)병원균을 접종 후 파지를 접종한 처리구 총 6가지의 다른 조건의 식물을 사용하여 실험을 수행하였다. 각 처리구의 반복은 토마토 10개체씩 3반복으로 총 30개체를 사용하였으며 28도에서 유지하면서 발병율을 시든 잎의 백분율로 조사하였다. 파지에 의한 방제효과는 날짜별로 병진전 곡선을 확보하고 통계처리는 Repeated measures ANOVA 방법을 사용하였다. 파지 농도별 처리결과는 10^6 , 10^7 , 10^8 pfu/g 의 농도로 토양 처리하여 방제효과를 조사하였다.

네가지 종류의 파지에 대한 단독처리 효과를 분석하였다. 우선 기주범위가 매우 좁은 RpY1의 경우 SL341을 기주인 병원세균으로 그리고 RpY2의 경우 GMI1000를 기주세균으로 풋마름병 방제효과를 검정하였다. 파지 처리농도는 10^8 pfu/g 의 농도로 검정하였다. 풋마름병 병진전곡선을 토대로 RpY1와 RpY2의 경우 파지의 병진전 억제효과는 아래 그림 115과 같이 나타났다.

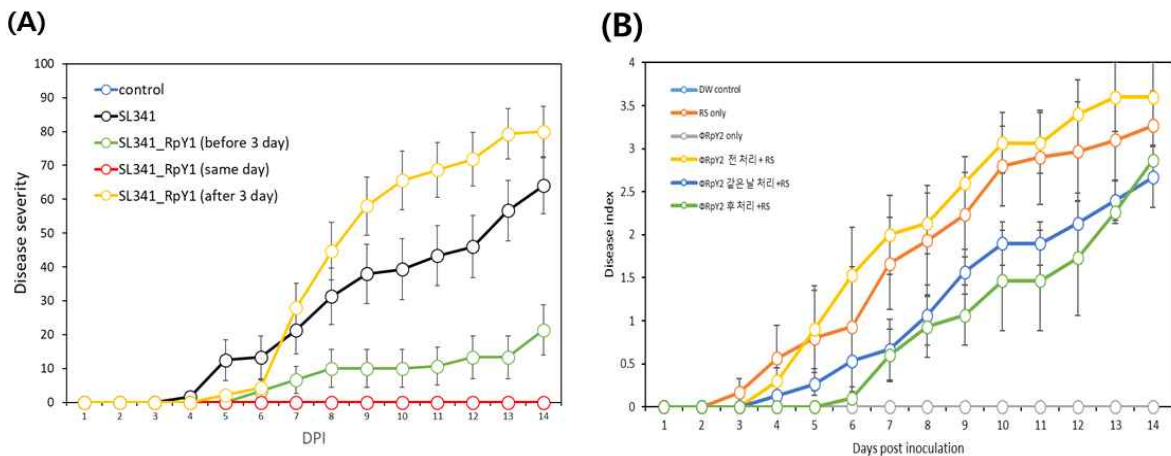


그림 116. 파지 RpY1 (A)과 RpY2 (B)의 처리에 의한 풋마름병 방제효과

기주범위가 매우 좁은 RpY1의 경우 병원성이 강한 SL341 균주에 대하여 파지를 병원균과 동시처리하거나 3일 전처리 했을 경우 방제효과가 우수한 반면 파지를 병원균 접종 3일 후 처리했을 경우 방제효과가 사라졌다(그림 115A). 또 다른 파지인 RpY2의 경우 파지를 전처리하는 경우 거의 효과가 없었으나 동시처리 또는 후처리의 경우 방제효과가 나타나며(그림 115B) 특히 6-7일 간격으로 반복처리를 고려하여야 하는 것으로 판단되었다. RpY2의 경우 기주 범위가 매우 넓고 예방효과가 확인되어 후속 방제효과 검정을 위해 선발되었다. RpY2의 경우도 예방효과가 우수하나 기주범위가 매우 좁아 후속 방제효과 검정에서는 배제되었다.

다른 Podoviridae에 속하며 기주범위가 넓은 RpT1의 경우 GMI1000를 기주세균으로 풋마름병 방제효과를 검정하였다. 그리고 기주범위가 넓은 또 다른 파지 RpT2의 경우 기주세균을 SL3395를 대상으로 병진전억제를 검정하였고 파지 처리농도는 10^8 pfu/g 의 농도로 검정하였다. 풋마름병 병진전곡선을 토대로 파지의 병 억제효과는 아래 그림 116과 같이 나타났다.

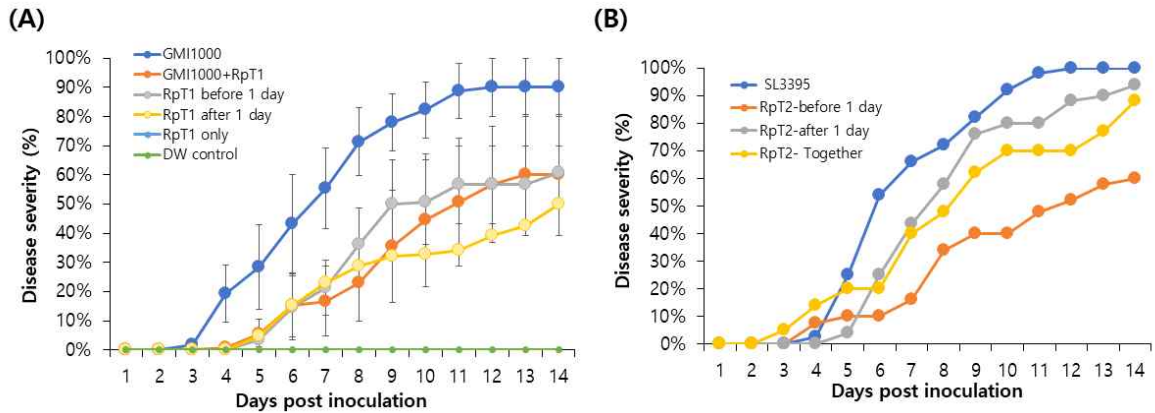


그림 117. 파지 RpT1 (A)과 RpT2 (B)에 의한 토마토 풋마름병 병진전과 방제효과

기주범위가 매우 넓은 RpT1과 RpT2의 경우 모두 각각 GMI1000 균주와 SL33395 균주에 대하여 파지를 병원균과 동시처리하거나 전처리 또는 후처리 했을 경우 RpT1에서 방제효과가 우수한 반면 RpT2의 경우에는 전처리의 경우에만 병 억제효과가 관찰되었다(그림 116). 두 파지 모두 방제효과가 인정되나 RpT1이 좀더 우수한 방제효과를 보이며 기주 범위가 매우 넓어 후속 방제효과 검정을 위해 선발되었다. 이상의 결과를 종합하여 두가지 파지 RpT1과 RpY2는 서로 다른 유전체(상호 85% identity)를 보유하며 기존에 알려진 파지와도 유사도가 높지 않으며 기주범위가 넓어 파지의 혼합과 밀도별 방제효과 연구에 사용하였다.

(2) 토마토 풋마름병 방제용 파지의 혼합 처리 효과

파지 단독처리 연구결과에 따라 기주범위가 넓은 2종의 파지를 RpT1과 RpY2를 선발하고 파지의 단독처리와 혼합처리의 효과를 검정하였다. 토마토 풋마름병 방제효과를 토양 g 당 10^8 pfu를 검정한 결과 단독처리도 풋마름병 방제효과가 있으나 저항성 변이를 억제하기 위해서는 2 종의 파지를 혼합하는 방식으로 제품이 개발되어야 할 것으로 판단되었다.

파지 RpY2와 RpT1를 2종 혼합하여 다양한 조건에서 처리하였는데 토양 g 당 10^8 pfu를 기준으로 처리하여 최적 처리시기를 결정하였다. 병원세균 GMI1000에 대하여 혼합파지를 병원균 접종 3일 후 처리의 경우 토마토 풋마름병 방제효과가 가장 우수한 것으로 나타났다(그림 117A). 그리고 그림 117B에서 확인된 것처럼 파지 RpY2와 RpT1를 단독처리하거나 혼합처리하는 경우 모두 우수한 방제효과를 보였다. 그러나, 저항성 변이를 억제하기 위해서는 2 종의 파지를 혼합하는 방식을 지속적으로 연구할 필요성이 인정되어 혼합파지를 처리 파지의 밀도를 낮추어 가며 방제효과를 검정하였다.

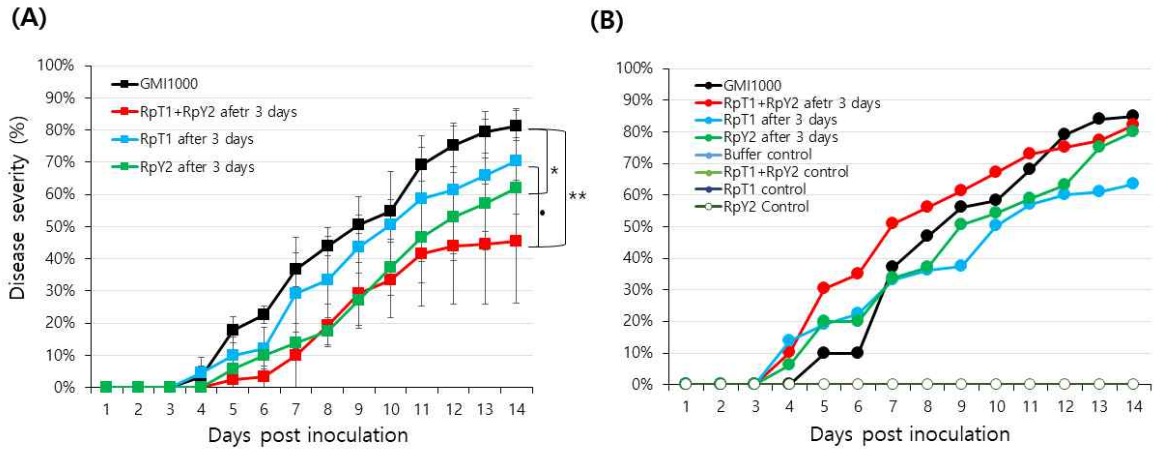


그림 118. 파지 밀도에 따른 방제효과. (A)파지 10^7 pfu/g 토양, (B)파지 10^6 pfu/g 토양 처리에 따른 방제효과

두 종의 파지를 단독 또는 혼합으로 토양 g 당 10^7 pfu 또는 10^6 pfu 처리한 경우의 풋마름병 방제효과를 분석하였다. 파지를 10^7 pfu 처리의 경우 파지 단독처리도 방제효과가 확인되었으나 대조구에 비해 혼합처리가 우수한 방제효과($p < 0.01$, repeated measures ANOVA)를 보였다(그림 118A). 그러나, 파지를 10^6 pfu 처리한 경우 단독처리와 혼합처리 모두에서 대조구와 비교하여 동일한 병진전을 보였다(그림 118B). 그러므로 두 종의 파지 RpT1과 RpY2를 혼합하여 최소한 토양 g 당 10^7 pfu 처리하였을 경우 토마토 풋마름병을 효과적으로 억제할 수 있을 것으로 판단된다. 그리고 병원균 접종후 3일 후 처리까지 안정적인 방제효과를 보이므로 혼합파지를 포장에서 1주일 정도의 반복 살포하여 포장의 토마토 근권의 병원균의 밀도를 낮추면 풋마름병을 예방할 수 있을 것으로 판단된다.

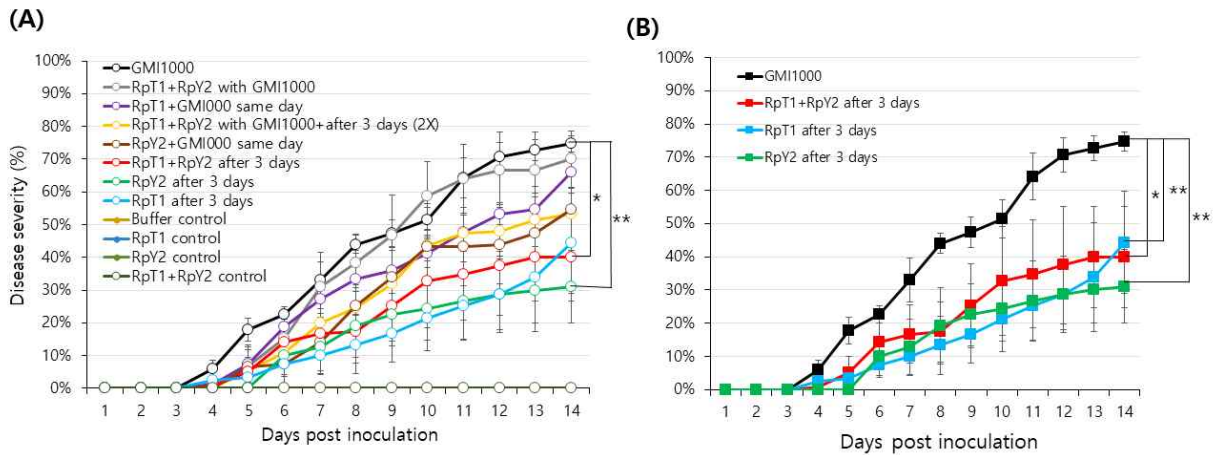


그림 119. 2종의 파지 혼합처리에 의한 풋마름병 방제효과 (A) 처리시기와 방법에 따른 방제효과, (B) 3일 후 처리만의 방제효과

(3) 파지의 포장토양에서의 보조제 첨가 후 풋마름병 방제효과

파지 RpT1과 RpY2를 혼합하여 실제 토마토를 10년이상 재배한 포장의 발토양에 처리하여 병 방제효과를 검정하였다. 발토양은 동아대학교 종합농장 토마토 재배포장에서 획득하였으나 포트에서 재배시 토양의 경화와 물빠짐의 어려움으로 인해 상토를 발토양과 동일한 비율

로 혼합하여 실험하였다. 파지의 처리는 토양 g 당 10^8 pfu를 처리하였다. 발토양에 혼합한 상토는 멸균하거나 비멸균하여 실험하였다. 두 경우 모두 파지를 혼합처리한 경우 풋마름병을 효과적으로 억제함을 확인할 수 있었다(그림 119). 이는 파지가 토마토를 재배하는 포장에서도 그 효과가 단 한번의 처리로도 유지될 수 있으며 반복처리하면 토마토 풋마름병을 효과적으로 제어할 수 있을 것으로 판단된다.

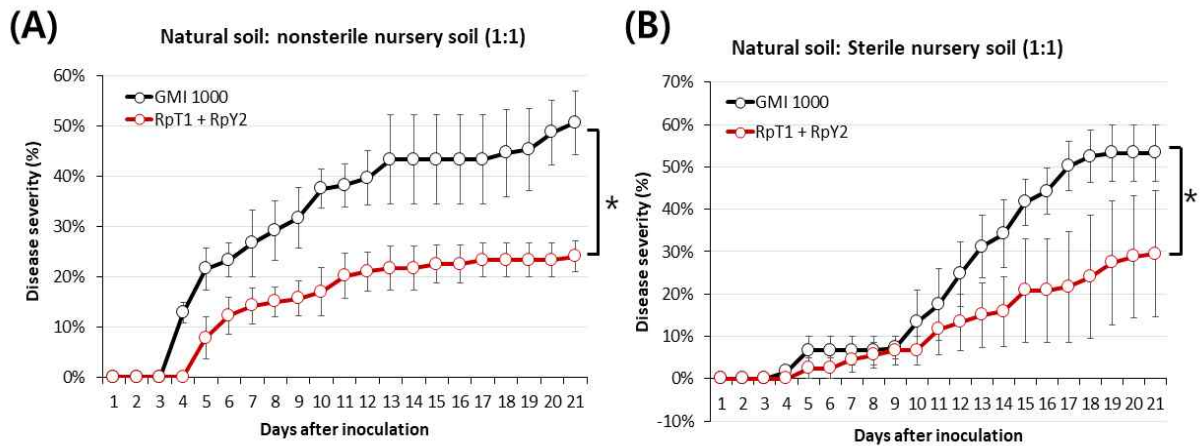


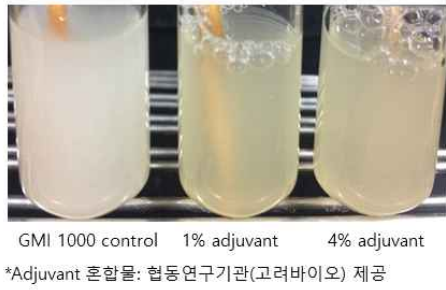
그림 120. 발토양과 멸균 또는 비멸균 상토가 혼합된 토양에 혼합파지를 처리 후 토마토 풋마름병 발병도. 병원균 접종 후 10^8 pfu/g 토양의 농도로 파지를 처리한 결과(repeated measures ANOVA (*, $p < 0.05$))

그리고 파지 RpT1과 RpY2를 혼합하여 협동연구기관인 참여기업(고려바이오)이 추천하고 제공한 adjuvant(보조제) 혼합물과 혼용처리하였을 때의 토마토 풋마름병 방제효과를 검정하였다. 토마토는 상토에 재배하여 파지의 처리는 토양 g 당 10^8 pfu를 처리하였다.

협동연구기관인 참여기업(고려바이오)이 추천한 보조제 혼합물을 1%-4%로 생리식염수로 희석하여 처리한 결과 *R. solanacearum*에 대한 직접적인 항세균 효과는 확인되지 않았다(그림 120A). 따라서 보조제 4%를 첨가하여 파지와 혼합하여 풋마름병 방제효과를 검정하였다. 보조제 첨가는 파지를 혼합하거나 단독처리한 경우 모두 매우 우수한 방제효과를 보였다(그림 120B). 그러나, 보조제를 첨가하지 않은 대조구와 비교실험이 누락되어 보조제 첨가의 직접적인 방제효과의 상승을 확인할 수는 없었다. 아래의 그림 121은 위 결과의 병원균 접종 후 14일 경과후 발병양상을 확인할 수 있는 사진이다.

이상의 연구결과, 토마토에 *R. solanacearum*에 대한 풋마름병의 방제를 위해 본 연구에서 선별한 기주범위가 넓은 파지 RpY2와 RpT1의 혼합물을 보조제등을 혼용하여 실제로 제품으로 개발할 수 있을 것으로 판단된다. 본 연구결과의 RpY2 파지는 이미 협동연구기관에 이전하여 제품화하기 위한 후속연구가 진행되었다.

(A)



(B)

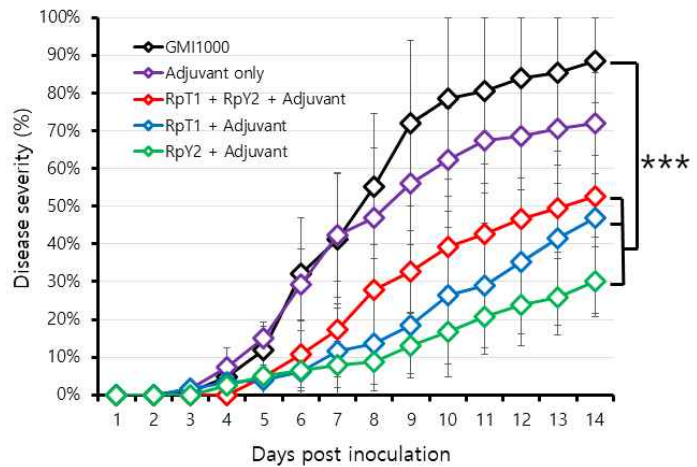


그림 121. 보조제 첨가에 의한 풋마름병 방제효과. (A)보조제의 in vitro에서 항미생물 효과, (B)보조제 첨가에 따른 방제효과

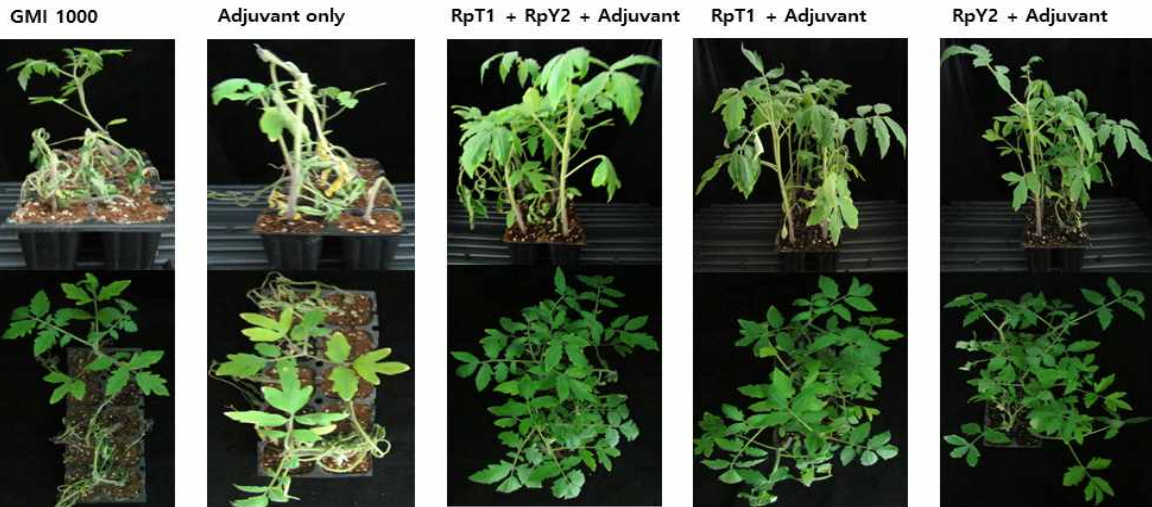


그림 122. 파지 단독 또는 혼합과 보조제 첨가에 따른 풋마름병 방제효과(병원균 접종 후 14일 결과)

다. 토마토 풋마름병 방제용 파지의 안정성

(1) 파지의 저장 안정성 검정: 파지의 온도와 산도별 안정성

분리한 phage 들의 다양한 온도에서 안정성을 조사하기 위해 농축된 파지현탁액을 SM buffer로 적절히 희석하여 희석액을 4°C, 25°C, 30°C, 37°C, 45°C, 65°C 등의 온도에서 2주간 유지하였다. 24시간 후 각 파지의 용액을 연속 희석법으로 희석하여 0.1 ml을 기주 세균 현탁액 0.25 ml과 혼합하여 CPG soft agar 5 ml에 섞어 CPG 배지에 증충하여 형성된 plaque 수를 계수하였다. 각 실험은 3반복으로 3일 간격으로 plaque 형성능력을 조사하였다. 그리고 다양한 pH에서 파지의 안정성을 조사하기 위해 pH 3-10의 범위의 다양한 완충에서 파지 희석액을 접종하여 상온에서 24시간 유지하였다. 파지는 정제된 고농도의 파지를 희석하는 동안 멸균수에서 희석하여 각 pH 완충액에 혼합하여 최종 농도가 10^7 - 10^8 pfu/ml 되도록 하였다. 사용한 pH 완충액은 다음과 같다. pH 3-5를 위해 sodium citrate buffer 0.1 M, pH 6,

7을 위해 sodium phosphate buffer 0.1 M, pH 8, 9, 10을 위해 Tris-HCl 0.1 M을 이용하였다. 24시간 후 각 파지의 용액을 연속 희석법으로 희석하여 0.1 ml을 기주 세균 현탁액 0.25 ml과 혼합하여 CPG soft agar 5 ml에 섞어 CPG 배지에 증충하여 형성된 plaque 수를 계수하였다. 각 실험은 3반복으로 plaque 형성능력을 조사하였다. 3종의 파지 RpY1, RpY2, RpT1를 다양한 온도와 pH에서 저장기간에 따른 안정성을 검정한 결과는 아래의 그림 122와 같다.

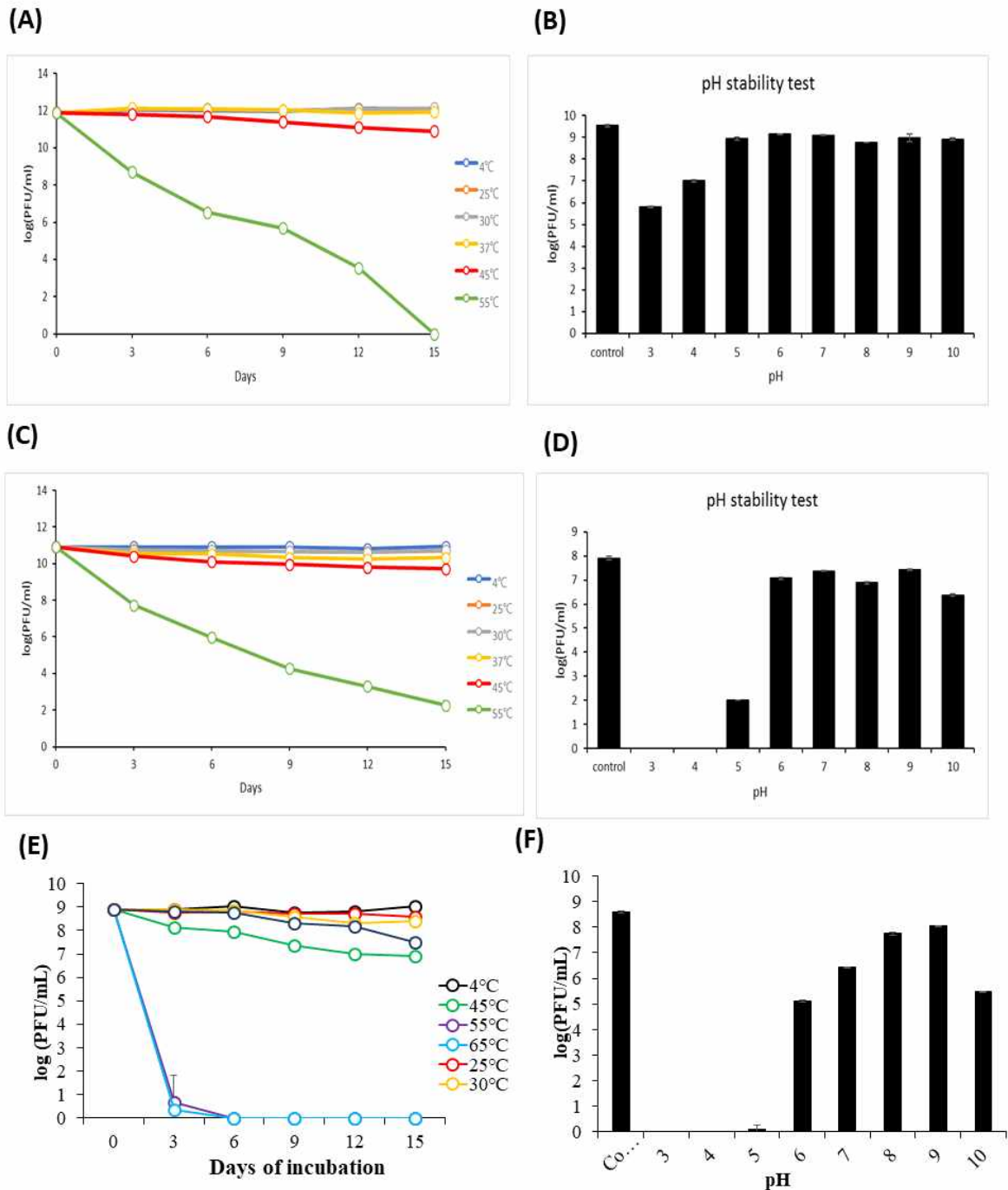


그림 123. 파지 3종의 온도와 산도에 안정성, (A, B)파지 RpY1 의 온도와 pH 안정성, (C, D)파지 RpY2 의 온도와 pH 안정성, (E, F)파지 RpT1 의 온도와 pH 안정성

세 종의 파지 모두 온도 4°C-37°C 사이에서는 2주간 titer 에 거의 변화가 없었으며 온도 4 5°C도 까지는 15 일간 그 감염 가능한 입자의 밀도가 10% 가량으로 감소하였으나 감염능이 안정적으로 유지되었다(그림 122). 그러나 55°C 에서는 서서히 또는 급격히, 65°C 이상의 고온에서는 3일 내에 대부분의 파지가 완벽히 활성을 잃었다. 따라서 해당 파지는 일반적인 재배환경의 상온에서는 안정성이 뛰어난을 알 수 있었다. 적정 pH는 용균력이 우수하나 기주범위가 좁은 RpY1의 경우 pH 3-4 에서 24시간내에 안정성이 감소하나 pH 5-10 까지는 매우 안정적으로 유지되었다(그림 122B). 그에 반해 RpY2와 RpT1의 경우 pH 3- 5의 산성 환경에서 안정성이 매우 낮으며 일반적으로 pH 6 - 10 사이에서 24시간 안정적으로 유지되었다(그림 122D와 F). 토마토가 재배되는 토양환경 최적의 산도는 pH 6- 7 사이이므로 RpY2와 RpT1의 파지 혼합처리는 용균 기주범위도 넓으며 중성의 산도에서 그 제형을 유지하며 토마토 재배토양에 처리하였을 경우 안정적으로 그 활성을 기대할 수 있을 것으로 판단된다.

그리고 RpT1과 RpY2 두종의 파지(SM 완충액 용액에 있는 파지 용액)에 각 화학제제를 1% 첨가하여 24시간 유지하고 용균반 분석을 통해 파지의 안정성을 검정하였다. 두 종의 파지 모두 검정한 모든 제제에서 파지의 용균력에 거의 변화가 없이 안정적인 것으로 확인되었다(그림 123). 따라서 다양한 보조제가 두 종의 파지 혼합물을 제형화 하는데 활용될 수 있을 것으로 판단된다. 그리고 앞선 결과(그림 120)에서 나타난 것처럼 보조제 혼합물을 이용한 제형을 첨가한 파지도 토마토 풋마름병 방제효과가 효과적으로 유지됨을 확인할 수 있었다.

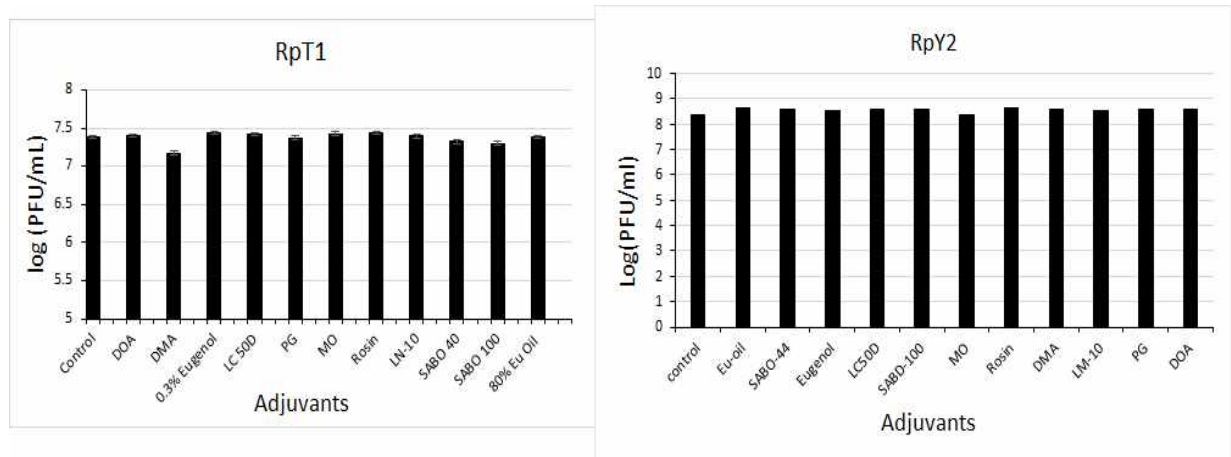


그림 124. 제제용 화학물질에 대한 2종 파지의 안정성

(2) 파지 용균액의 유지와 토양 생존성 검정

분리된 phage 들의 용균액에서의 안정성을 감염력을 평가하여 분석하였다. 기주세균이 밀도 10^8 cfu/ml 까지 자란 CPG 배지에 파지를 MOI 0.1 로 접종하여 24시간 배양하여 용균하고 상온에서 용균액을 보관하면서 파지 밀도를 추적하였다. 각 용균액을 연속 희석법으로 희석하여 0.1 ml을 기주 세균 현탁액 0.25 ml과 혼합하여 CPG soft agar 5 ml에 섞어 CPG 배지에 중층하여 형성된 plaque 수를 계수하였다. 각 실험은 3반복으로 12개월까지 plaque 형성능력을 조사하였다.

분리한 phage 들의 용균액에서의 안정성을 감염력으로 평가한 결과 RpT1의 경우 파지 titer 가 초기에는 증가하는 양상을 보이다가 서서히 감소하여 6개월 후에는 초기 용균당시의 파 지 밀도와 유사해지는 경향을 보였다(그림 124A). 그러나, 파지 RpY2의 경우에는 초기 용균 이 매우 빨라 높은 파지 밀도에서 출발하여 시간이 갈수록 서서히 감소하였으나 1개월까지 는 10^9 pfu/ml의 밀도를 2개월까지는 10^8 pfu/ml의 밀도를 유지하였다(그림 124B). 장기간 보존으로 기주세균은 거의 제거가 된 상태로 유지되었다. 그러므로 파지 용균액을 상온 보 관하며 직접적으로 풋마름병 방제를 위한 제형 개발에 활용할 수 있을 가능성을 제시하였 다.

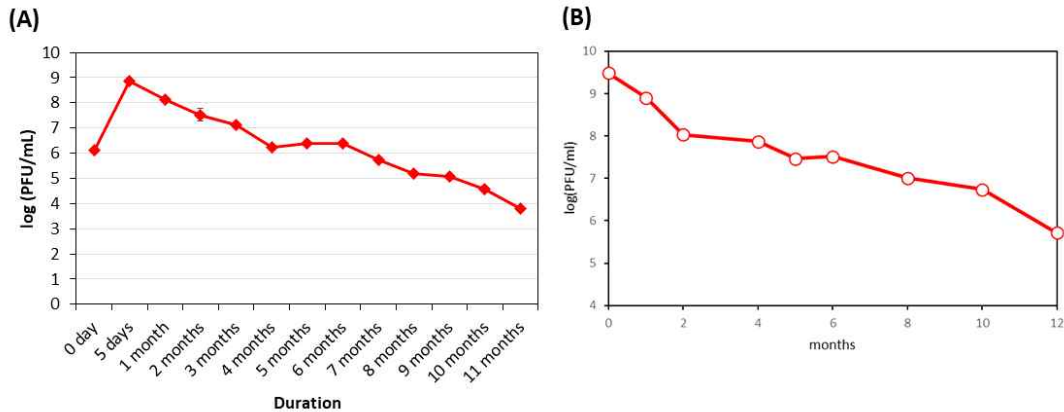


그림 125. 파지 용균액에서 파지의 장기간 안정성. (A) 파지 RpT1 용균액의 안정성, (B) 파지 RpY2 용균액의 안정성

한편, 선발한 파지 RpT1과 RpY2의 토양에서의 생존을 정량적으로 검정하였다. 파지를 각각 SM buffer로 희석해서 서로 다른 3가지 토양(부농상토, 동아대 농장의 토마토 재배 밭 토양, 부산 승학산 산림토양)에 파지가 토양 1 g 당 10^8 pfu의 초기 밀도를 가지도록 처리하였다. 이후 매 2일 간격으로 토양을 일부 회수하여 SM buffer에 현탁 희석하고 희석액 0.1 ml을 기주 세균 현탁액 0.25 ml과 혼합하여 CPG soft agar 5 ml에 섞어 CPG 배지에 중층 하여 형성된 plaque 수를 계수하였다. 각 실험은 3반복으로 16일까지 수행하였다.

토양에서 파지의 생존은 RpT1이 RpY2에 비해 상대적으로 우수한 것으로 나타났다(그림 125). RpT1의 경우 산림토양에서는 밀도가 서서히 감소하였으나 밭토양이나 상토에서 1주일까지는 거의 감소하진 않고 유지되었으며 2주까지도 미세하게 감소하는 경향을 보였다(그림 125A). 그러나, RpY2의 경우 토양에 관계없이 서서히 파지의 밀도가 감소하였으나 밭 토양과 상토에서 그 감소가 산림토양에 비해 느림을 알 수 있었다. RpY2의 경우 2주 후에는 초기 밀도에 비해 0.1% 수준까지 감소하였다(그림 125B). 따라서 두 파지를 혼합하여 토 마토 재배 토양에 관주 처리하는 경우 보조제를 이용하여 파지의 토양 안정성을 높이고 병 원균 밀도 증가 억제를 위해 1주일 간격으로 처리하면 토마토 풋마름병 방제에 효과적일 것 으로 판단된다.

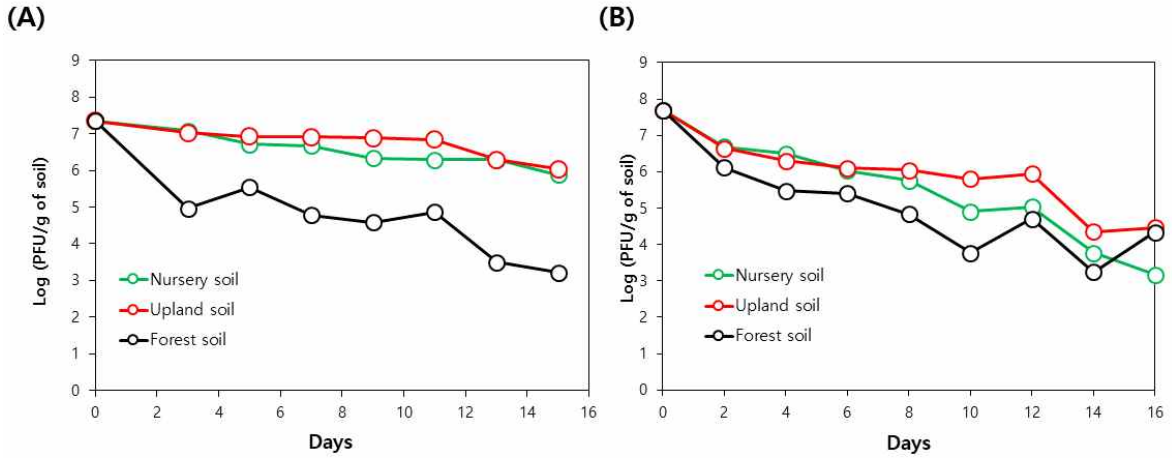


그림 126. 상토, 밭토양, 산림토양에서 파지 RpT1 (A)과 RpY2의 안정성

라. 결론

본 연구에서는 우리나라 다양한 작물 재배 토양에서 파지를 72종 분리하였고 기주범위와 용균력에 의해 그룹화하였다. 연구의 목표처럼, 토마토 풋마름병 방제용 후보 파지를 6종이상 (목표 5종) 확보하였으며 이들을 모두 형태분석, 유전체 분석, 기주범위를 확인하였다(목표 3종). 그리고 토마토 풋마름병 방제효과 검정을 통해 3종의 파지를 확보하고 처리 밀도와 기주범위를 평가하여 2종의 파지 RpY2와 RpT1을 방제용 후보로 최종 선발하였다(목표 1종). 선발한 2종의 파지를 단독 또는 혼합하여 처리하면 토마토 풋마름병을 효과적으로 방제할 수 있음을 입증하였다. 각 제제용 보조제를 혼합한 경우 방제효과가 파지 혼합물에서 유지됨을 확인하였다. 다양한 온도와 pH에서 그리고 보조제 혼합으로 파지의 안정성을 분석한 결과 중성의 제형으로 준비하여 상온에서 보관하며 토마토 재배토양에 처리할 수 있을 것으로 판단된다. 배지에서 파지의 용균액을 상온에서도 2개월 이상 보관할 수 있는 반면 보조제 없이 토양에서 파지의 안정성은 1주일 이상 밀도를 동일하게 유지 할 수 없는 것으로 나타났다. 따라서 RpY2와 RpT1을 단독으로 또는 혼합으로 토양에 매주 관주하여 병원균의 밀도를 낮추어 토마토 풋마름병을 방제할 수 있을 것으로 판단된다. 본 연구성과로 RpY2는 협동연구기관 고려바이오에 이전하여 제품화 연구가 진행되었으며 연구의 당초 목표를 모두 달성하였다.

4. 주요 식물세균병 방제용 파지요법 기술 검증 및 실용화[제3협동연구(고려바이오(주))]

가. 파지의 제제화 고려요인 분석

파지 대량증식 및 제제화 시 필요한 사항과 고려요인 분석으로 첫 번째는 파지의 대량증식을 위한 배양용 배지를 선별하고자 하였다. 파지의 특성상 기주세균을 배양한 후 파지를 감염시키고 기주세균이 lysis된 상태에서 제제화를 진행해야 한다. 파지를 대량증식하기 전에 기주세균을 배양해야 하기 때문에 기주세균에 대한 배양성을 확인하고자 하였다(그림 126). 산업용 배지는 당사에서 사용되고 있는 일반적인 산업배지(M-204, OL-3, KCS 등) 6종과 실험실용 배지(TSB, LB, NA 등)를 이용하였고, 기주세균은 주관기관으로부터 분양받은 키위 켈양병균(*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*)을 이용하여 배양성을 확인한 결과 배양성에는 큰 차이를 나타내지 않았다. 다만 파지를 감염시킨 후 기주세균의 lysis 과정에서 산업배지는 두 가지 형태로 구분되어 있는데 배지원이 고형물이 남게 되어 현탁 상태인 다소 탁한 물성을 나타내는 경우와 고형물이 남지 않는 완전 수용성 상태인 경우가 있으며, 실험실용 배지는 맑은 형태의 물성을 나타내었다. 고형물이 남아 있는 경우 제제화 단계에서 멍침 또는 침전현상 등이 발생할 수 있기 때문에 제제화에 어려움이 수반되지만, 고형물이 남지 않는 수용성 상태의 물성은 제제화에 용이한 점이 있다. 이를 바탕으로 확인한 결과 고형물이 남지 않는 수용성 배지 (KCS, KAM, TSB, LB 등)를 사용하는 것이 유리한 것으로 확인되었다.



그림 127. 파지 대량증식을 위한 기주세균 배양배지 선별

제제화에 있어 유효성분인 파지 증식액은 기주세균을 배양하고 파지를 감염시킨 후 기주세균을 lysis 시켜 파지 증식액을 확보하게 되는 데, 이때 남아 있을 수 있는 기주세균의 완전 사멸을 위해 파지를 농축해야 한다. 파지의 농축과정으로는 물리적인 방법인 필터를 활용한 방법과 화학적인 방법인 용매를 처리하는 방법이 있다.

과지를 대량증식하기 위해서는 배양용량을 확대한 발효기 수준에서의 기주세균 배양과 이에 적합한 과지 infection 등이 필요하다. 과지 대량증식을 위한 조건으로 당사에서 보유하고 있는 7L Jar fermenter를 이용하여(그림 127) 기주세균(키위 궤양병균)을 배양한 결과 26~27℃에서 2일 배양 시 과지 infection에 적절한 수준까지 배양되는 것을 확인하였다. 따라서 기주세균 배양 후 과지를 infection 하고 세균 lysis 과정을 거쳐 과지를 농축하게 된다.



그림 128. 7L Jar fermenter를 이용한 기주세균 배양

과지를 대량증식한 후 얻어지는 수확물인 과지액을 이용하여 제형화 시 다른 제형으로 개발하기 위해서는 분말화 공정을 거쳐야 한다. 분말 형태의 제형으로는 수화제 형태로서 과지액을 분말화하는 공정으로 동결건조 또는 분무건조를 거치게 된다. 동결건조의 경우 열에 민감한 원료를 분말화할 수 있는 장점이 있는 반면, 대용량으로 처리 시 오랜 시간이 소요됨에 따른 고비용이 발생하는 문제가 있다. 분무건조의 경우 빠른 시간 내에 액상의 형태를 건조된 미분말 형태로 변화시킬 수 있는 장점이 있는 반면, 180℃ 내외의 열처리를 거치게 되어 과지에 영향을 주는 것으로 확인되었다. 또한 분말화된 과지의 경우 다른 보조제와 제제화 시 혼합하는 데 여러 문제점이 발생되었다. 따라서 이러한 요인들을 고려할 때 개발제품은 액상 제형이 적합한 것으로 확인되었다.

나. 보조제 선발

효력증진을 위한 첨가제 선발을 위해 천연유래 친환경 추출물을 대상으로 실내 항균효과를 비교해 보았다. 시험시료는 Eucalyptus oil, Eugenol, Clove oil, Geraniol, Oregano oil을 대상으로 50배, 100배 희석한 뒤 식물병원세균에 대해 항균효과를 비교한 결과 Eugenol, Oregano oil에서 항균효과를 보이는 것으로 확인되었다(표 28).

표 29. 효력증진용 천연유래 친환경 추출물 선발

	희석배수	항균효과(halo size)
Eucalyptus oil	50	+

	100	-
Eugenol	50	+++
	100	++
Clove oil	50	+
	100	-
Geraniol	50	+
	100	-
Oregano oil	50	+++
	100	+

* 향균효과(mm) : 0~5 : + , 5~10 : ++ , 10 이상 : +++

액상제형에 맞는 제제화용 보조제 선발을 위해 농업용으로 사용이 가능한 EPA inerts list 4에 해당되는 계면활성제를 이용하여 유화제, 분산제를 선발하였고, 기타 보조제로 처리 후 자외선에 대한 안정성을 유지하기 위해 UV차단제와 안정적인 물성을 유지하기 위한 물성조정제로 점도증가제를 선발하였다.

유화제는 여러 종류의 계면활성제를 이용하여 다양한 농도별로 투입하고 유화도를 측정하였으며, 유화정도가 양호한 Polyoxyethylene sorbitan monooleate, Castor oil, ethoxylated, Polyoxyethylene (1,1,3,3-tetramethylbutyl) phenyl ether를 선발하였다(표 29, 30, 그림 128, 129).

표 30. 제제화용 계면활성제(유화제) 선발

구분	CAS No.	EPA List	유화정도		비고
			5%	10%	
Polyoxyethylene sorbitan monooleate	9005-65-6	4B	○	◎	유화력 强
Polyoxyethylene (1,1,3,3-tetramethylbutyl) phenyl ether	9036-19-5	4B	△	◎	유화력 强
Castor oil, ethoxylated	61791-12-6	4B	△	○	혼입처리 시 유화력 상승
Methyl oleate	112-62-9		△	△	유화력 弱
Polyoxyethylene monooleate	9004-96-0	4B	×	△	유화력 弱
Polyoxyethylene dodecyl monoether	9002-92-0	4B	×	×	유화력 弱
Sorbitan monooleate	1338-43-8	4B	×	△	유화력 弱
Polyethylene glycol	25322-68-3	4B	×	△	유화력 弱

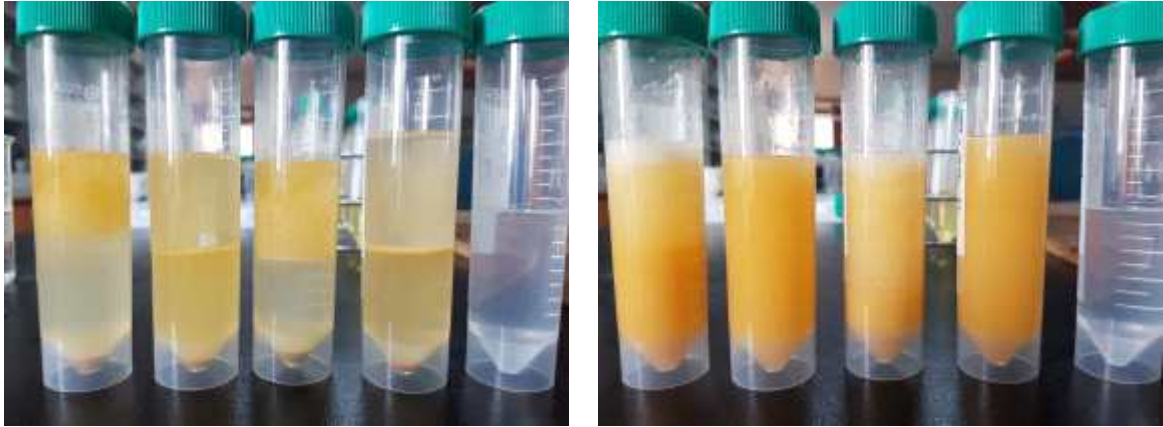


그림 129. 제제화용 유화제 선발

표 31. 첨가제 유화 배합

구분	원료명	투입비율(%)
효력증진용 첨가제 유화 배합	Eugenol (or Oregano oil)	80~90
	Polyoxyethylene sorbitan monooleate	5~10
	Castor oil, ethoxylated	2.5~5
	Polyoxyethylene (1,1,3,3-tetramethylbutyl) phenyl ether	2.5~5



그림 130. 유화 배합 물성 비교

기타 보조제로 살포 후 야외에서 자외선에 대한 안정성을 확보하기 위해 화장품에 사용되는 자외선 차단제를 이용하여 자외선 차단효과를 간접 비교한 결과 Lowilite 62를 선발하였다. 자외선 차단제의 경우 살포방법에 따라 제품 내에 투입여부가 달라지기 때문에 투입비율 결정 시 선택사항으로 고려해야 할 것으로 여겨진다.

제품 내에서 원료의 고른 분산 특성을 나타내기 위한 보조제로 다양한 계면활성제를 이

용하여 원료의 분산성을 확인한 결과 UT-34TDP와 TWO 1015를 선발하였다. 제품 물성 및 원료의 안정성을 위한 점도증가제(잔탄검, CMC 등)를 처리하여 물성안정성을 확인한 결과 Xanthan gum이 양호한 물성을 나타내는 것으로 확인하였다.

다. 제제화 및 제형화 공정 최적화

선발된 효력증진용 첨가제에 대해 배합에 적당한 1종을 선정하고 이에 대한 적정농도를 결정하기 위한 시험을 진행 중이다. 선발된 효력증진용 첨가제의 유화를 위해 유화제 3종과 기타 보조제를 대상으로 적정 투입농도에 따른 배합 시험 중이며, 이를 바탕으로 투입 공정 및 배합에 대한 최적화를 결정하려고 한다. 현재 투입비율에 따른 유화상태, 층분리 등 물성변화 여부, 이화학적 안정성에 대한 시험을 진행 중이다.

라. 온도, 배양시간, 산업용 배지 등 생산 최적화 조건 확립

(1) 키위 궤양병(*Pseudomonas syringae*) 과지의 배양조건 확인 및 배양능 평가

주관연구기관에서 진행한 선행연구 및 최근 연구결과를 활용하여 7ℓ Jar Fermenter에서 키위 궤양병 과지의 배양조건 및 산업용 배지에서의 배양능을 평가하기 위하여 26℃, 150rpm, 1vvm의 배양조건에서 기주세균의 농도가 OD₆₀₀=0.5(5×10⁸ cfu/ml)일 때, MOI=0.00001의 농도(5×10³ pfu/ml)로 과지를 접종하고 8시간 배양하였으며, 산업용 배지는 KAM, M-204, KCS, OL-3를 사용하였다.

각각의 산업용 배지에 배양한 배양액에서 기주세균을 제거하고 과지의 배양성을 확인하기 위해 4℃, 10,000rpm으로 10분 원심분리한 상등액을 0.22μm filter로 filtering하여 Plaque assay를 진행하였다. 시험 결과, KAM 배지에서 배양성이 준수한 것으로 확인되었으며, 3종의 키위궤양병 과지 중 ϕ38의 배양성이 가장 우수한 것으로 확인되었다(표 31).

표 32. 과지의 산업용 배지별 배양밀도 확인

	KAM	M-204	KCS	OL-3
	1×10 ⁹ pfu/ml			
ϕ34	1.4	0.8	0.06	0.02
ϕ38	2.1	1.5	0.05	0.04
ϕ44	1.2	0.7	0.05	0.05
ACPWH	0.2	0.4	0.08	0.03
ACPI7	0.2	0.2	0.05	0.05
RpY2	1.5	0.9	0.02	0.02

(2) 수박 과실썩음병(*Acidovorax citrulli*) 과지의 배양조건 확인 및 배양능 평가

제1협동기관에서 진행한 선행연구 및 최근 연구결과를 활용하여 7ℓ Jar Fermenter에서 수박 과실썩음병 과지의 배양조건 및 산업용 배지에서의 배양능을 평가하기 위하여 34℃, 150rpm, 1vvm의 배양조건에서 기주세균의 농도가 OD₆₀₀=0.7(6×10⁸ cfu/ml)일 때, MOI=0.01의 농도(6×10⁶ pfu/ml)로 과지를 접종하고 8시간 배양하였으며, 산업용 배지는 KAM, M-204, KCS, OL-3를 사용하였다.

각각의 산업용 배지에 배양한 배양액에서 기주세균을 제거하고 과지의 배양성을

확인하기 위해 4℃, 10,000rpm으로 10분 원심분리한 상등액을 0.22μm filter로 filtering하여 Plaque assay를 진행하였다. 시험 결과, M-204 배지에서 배양성이 준수한 것으로 확인되었으며, 2종의 수박과실썩음병 파지 중 ACPWH의 배양성이 우수한 것으로 확인되었다(표 31).

(3) 토마토 풋마름병(*Ralstonia solanacearum*) 파지의 배양조건 확인 및 배양능 평가

제2협동기관에서 진행한 선행연구 및 최근 연구결과를 활용하여 7ℓ Jar Fermenter에서 토마토 풋마름병 파지의 배양조건 및 산업용 배지에서 배양능을 평가하기 위해 30℃, 150rpm, 1vvm의 배양조건에서 기주세균의 농도가 OD₆₀₀=0.2(1×10⁸ cfu/ml)일 때, MOI=0.01의 농도(1×10⁶ pfu/ml)로 파지를 접종하고 24시간 배양하였으며, 산업용 배지는 KAM, M-204, KCS, OL-3를 사용하였다.

각각의 산업용 배지에 배양한 배양액에서 기주세균을 제거하고 파지의 배양성을 확인하기 위해 4℃, 10,000rpm으로 10분 원심분리한 상등액을 0.22μm filter로 filtering하여 Plaque assay를 진행하였다. 시험 결과, 토마토풋마름병 파지인 RpY2는 KAM 배지에서 준수한 배양성이 확인되었다(표 31).

마. 파지별 대량생산 공정 최적화 확립

(1) 키위 궤양병(*Pseudomonas syringae*) 파지의 대량배양 조건 확인

상기의 시험결과를 바탕으로 250ℓ Fermenter에서 키위궤양병 파지(φ38)의 대량배양조건 및 KAM 배지에서 배양능을 평가하기 위해 26±2℃, 100rpm, 0.6vvm의 배양조건에서 기주세균의 농도가 OD₆₀₀=0.5(5×10⁸ cfu/ml)일 때, MOI=0.01(5×10⁶ pfu/ml)의 농도로 파지를 접종하고 2시간 후부터 2시간 간격으로 12시간까지 500ml의 배양액을 샘플링하여 파지의 배양밀도를 확인하였다. 샘플링한 배양액을 4℃, 10,000rpm으로 10분 원심분리 한 상등액을 0.22μm filter로 filtering하여 보관하고 Plaque assay를 진행하였으며, 시험결과, 배양 8시간 까지는 배양시간에 따라 파지의 밀도가 증가하였으나 8시간 이후에는 파지의 밀도가 크게 증가하지 않아 최적배양 시간은 8시간으로 확인되었다(그림 130).



그림 131. 키위 궤양병 파지의 대량배양 시간별 파지 밀도 측정

(2) 수박 과실썩음병(*Acidovorax citrulli*) 파지의 대량배양 조건 확인

상기의 시험결과를 바탕으로 250 l Fermenter에서 수박 과실썩음병 파지(ACPWH)의 대량배양조건 및 KAM배지에서의 배양능을 평가하기 위해 34±2℃, 100rpm, 0.6vvm의 배양조건에서 기주세균의 농도가 OD₆₀₀=0.7(6×10⁸ cfu/ml)일 때, MOI=0.01(6×10⁶ pfu/ml)의 농도로 파지를 접종하고 2시간 후부터 2시간 간격으로 12시간까지 500ml의 배양액을 샘플링하여 파지의 배양밀도를 확인하였다. 샘플링한 배양액을 4℃, 10,000rpm으로 10분 원심분리 한 상등액을 0.22µm filter로 filtering하여 보관하고 Plaque assay를 진행하였으며, 시험결과, 배양 8시간 까지는 배양시간에 따라 파지의 밀도가 증가하였으나 8시간 이후에는 파지의 밀도가 일정수준으로 유지되어 최적배양 시간은 8시간으로 확인되었다(그림 131).

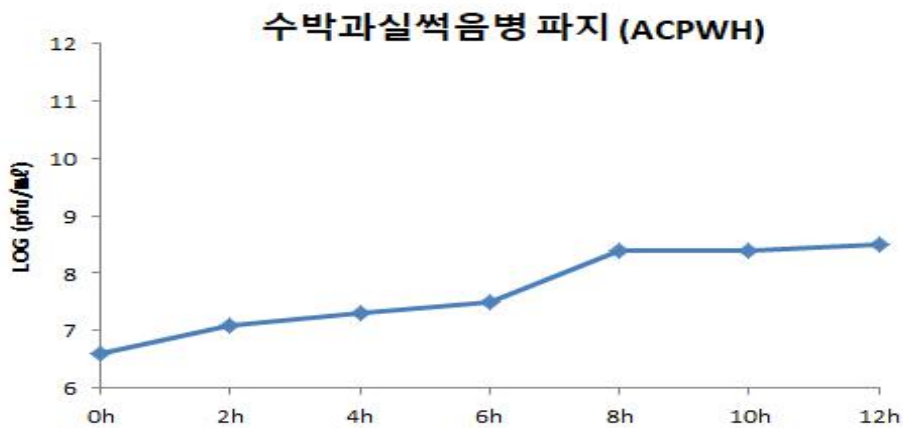


그림 132. 수박 과실썩음병 파지의 대량배양 시간별 파지 밀도 측정

(3) 토마토 풋마름병(*Ralstonia solanacearum*) 파지의 배양조건 확인 및 배양능 평가

상기의 시험결과를 바탕으로 250 l Fermenter에서 토마토 풋마름병 파지(RpY2)의 대량배양조건 및 KAM배지에서의 배양능을 평가하기 위해 30±2℃, 100rpm, 0.6vvm의 배양조건에서 기주세균의 농도가 OD₆₀₀=0.2(1×10⁸ cfu/ml)일 때, MOI=0.01(1×10⁶ pfu/ml)의 농도로 파지를 접종하고 12시간 후부터 4시간 간격으로 32시간까지 500ml의 배양액을 샘플링하여 파지의 배양밀도를 확인하였다. 샘플링한 배양액을 4℃, 10,000rpm으로 10분 원심분리 한 상등액을 0.22µm filter로 filtering하여 보관하고 Plaque assay를 진행하였으며, 시험결과, 배양 24시간 까지는 배양시간에 따라 파지의 밀도가 증가하였으나 24시간 이후에는 파지의 밀도가 크게 증가하지 않아 최적배양 시간은 24시간으로 확인되었음(그림 132).

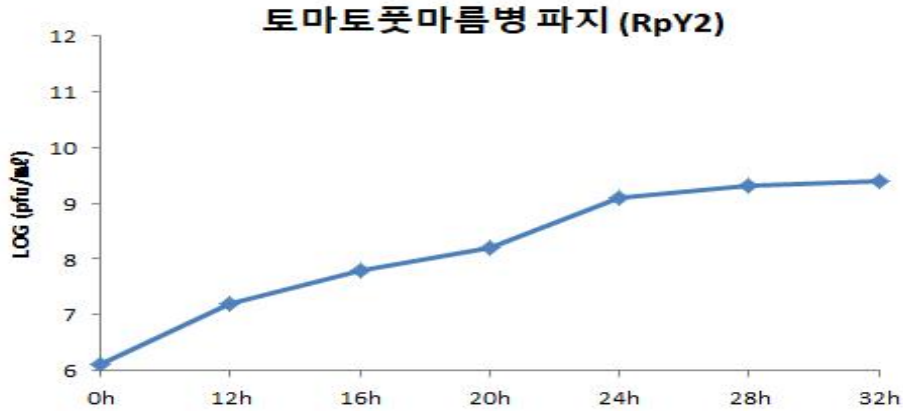


그림 133. 토마토 풋마름병 파지의 대량배양 시간별 파지 밀도 측정

(4) 파지의 대량배양 후 기주세균 제거 방법 연구

파지의 배양을 위해서는 먼저, 기주세균을 배양한 뒤 파지를 배양하게 되므로 최종 파지 배양액에 기주세균이 일부 잔존할 가능성이 있어 파지 배양액을 filtering 하지 않고 기주세균의 밀도를 분석한 결과, 낮은 밀도지만 기주세균이 잔존(약 1×10^4 cfu/ml)하는 것으로 확인되었으며 이를 제거하기 위해서는 산업용 필터, 분무건조 등을 이용한 물리적인 방법과 보조제의 첨가를 이용한 화학적인 방법이 있으며, 각각의 방법을 이용하거나 두가지 방법의 병행 가능성을 검토 중이다.

바. 시제품 제조

상기의 시험을 통해 대용량 Fermenter에서 배양한 파지 3종($\phi 38$, ACPWH, RpY2)을 파지별 최적배양시간에 샘플링하고, 1차년도 연구를 통해 선발된 보조제를 혼합하여 시제품을 제조하였으며, 파지의 시제품 내 밀도 확보를 위해 보조제의 투입비율은 최소화하였다. 시제품은 각각의 파지별로 시제품 A(키위 껌양병파지, $\phi 38$), 시제품 B(수박 과실썩음병 파지, ACPWH), 시제품 C(토마토 풋마름병 파지, RpY2)로 제조하였으며 시제품 내 파지와 보조제의 투입비율은 동일하게 적용하였다(표 32).

표 33. 파지별 각각의 시제품 제조 배합

구분	원료명			투입비율 (%)
	시제품 A	시제품 B	시제품 C	
유효성분	키위 껌양병 파지 ($\phi 38$)	수박 과실썩음병 파지 (ACPWH)	토마토 풋마름병 파지 (RpY2)	95.0
효력증진용 첨가제	Eugenol			1.5
계면활성제	Polyoxyethylene sorbitan monooleate			0.2
	Cator oil, ethoxylated			0.1
	Polyoxyethylene (1,1,3,3-tetramethylbutyl) phenyl ether			0.1
자외선차단제	Lowilite 62			1.0
분산제	UT-34TDP			2.0
물성안정제	NK-XG (Xanthan gum)			0.1
	합 계			100.0

사. 파지활성, 안정성 확인 / 개발제품 이화학적, 경시적 안정성 확인

(1) 대용량 Fermenter에서 배양한 파지의 경시적 안정성 확인

대용량 Fermenter에서 배양한 파지 3종(Φ38, ACPWH, RpY2)을 파지별 최적배양 시간에 샘플링하여 각각 -4℃, 25℃, 50℃의 온도에서 보관하고 1주 간격으로 샘플링하여 Plaque assay를 통해 파지의 경시적 안정성을 확인하였다. 시험결과, -4℃에서 보관한 배양액은 동결되었으나 상온에서 해동하여 Plaque assay를 진행하였으며, 25℃, 50℃에서 보관한 배양액과 같이 안정성에 이상은 발견되지 않았으며, 시험기간이 충분하지 못해 지속적인 관찰을 진행할 계획이다(그림 133).

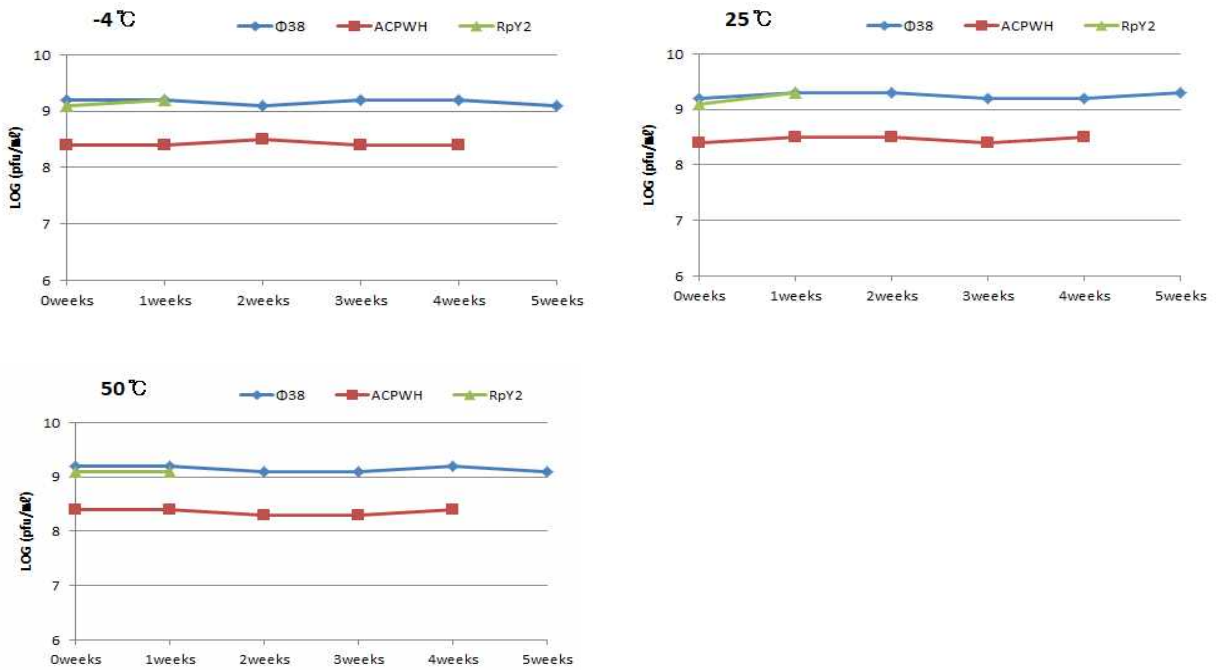


그림 134. 대량배양한 파지 3종의 보관 온도별 경시적 안정성 확인

(2) 시제품의 보관 온도별 파지의 활성, 물리/화학적 물성변화 및 생물학적 변화 확인

각각의 파지별 시제품을 -4℃, 25℃, 50℃의 온도에서 보관하고 1주 간격으로 샘플링하여 시제품의 보관 온도에 따른 물성변화 및 폴립성 등의 물리/화학적 경시적 변화를 확인하고, Plaque assay를 통해 시제품 내 파지의 경시적 안정성을 확인하였다. 시험결과, 25℃, 50℃에서 보관한 각 시제품의 물리/화학적 경시적 변화는 관찰되지 않았으며, -4℃에서 보관한 시제품은 동결되었으나 상온에서 해동하여 확인 시 물리/화학적 이상은 발견되지 않았다. Plaque assay를 통한 파지의 보관 온도에 따른 경시적 안정성 확인 결과, 시제품 별로 파지의 안정성에 이상은 관찰되지 않았으며, 시험기간이 충분하지 못해 지속적인 관찰을 진행할 계획이다(그림 134).

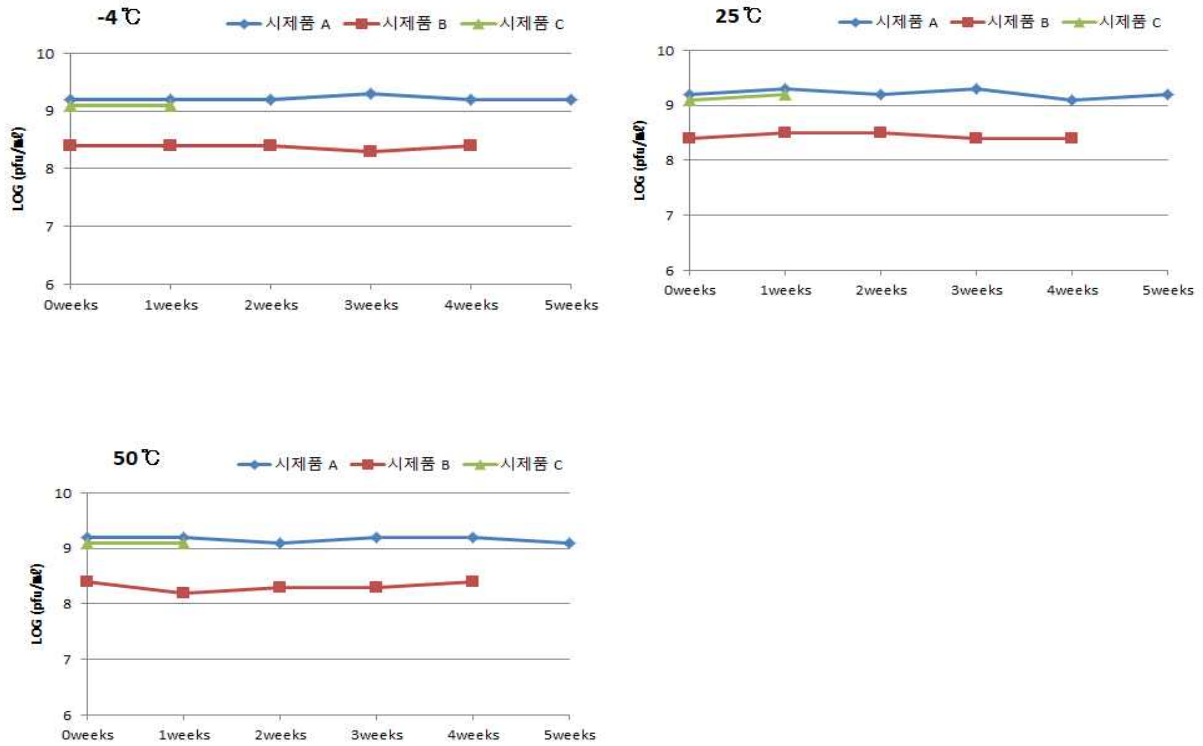


그림 135. 시제품 3종의 보관 온도별 파지의 경시적 안정성 확인

아. 시제품의 농가실증시험 1

(1) 농가실증시험을 통한 키위 궤양병 파지 시제품의 최적 적용방법 확립

키위는 재배 작형이 연속해서 재배하기 때문에 궤양병의 예방을 위한 처리방법 확립이 어려운 환경으로 병원균의 확산 방지 및 밀도를 감소를 위한 처리방법, 처리농도, 처리주기 및 횟수 등 적절한 방제방법의 확립이 중요하다. 이를 위해 제주특별자치도 조천읍 소재 농가에서 농가실증시험을 실시하였으며, 재배품종은 제시골드 품종이며, 구당 1주로 하여 완전임의배치법에 의해 3반복으로 시험을 진행하였고 최종약제처리 21일 후 시험구내 발생엽수를 조사하였다(그림 135).



그림 136. 키위 궤양병 농가실증시험 포장 및 키위 궤양병 병징

시험결과, 시제품은 관주처리 시에는 200배의 농도로 주당 2L, 7일 간격 3회 처리의 경우 가장 우수한 방제효과(무처리 대비 66.7%)를 나타내었으며, 경엽처리 시에는 200배의 농도로 5일 간격 3회 처리의 경우 가장 우수한 방제효과(무처리 대비 68.9%)를 나타내었다. 다만, 경제적인 측면이나 농가 편의성을 고려하여 관주처리 시에는 200배의 농도로 주당 2L, 7일 간격으로 2회 처리(63.6%), 경엽처리 시에는 500배의 농도로 5일 간격으로 2회 처리(63.8%)로 시제품의 적용방법을 결정하였다(표 33, 34, 35).

표 34. 처리방법 및 처리농도 설정을 위한 시제품의 키위 궤양병 방제효과 시험

시료명	처리방법	희석배수	처리주기 및 횟수	이병엽수				방제가 (%)
				I 반복	II 반복	III 반복	평균	
시제품	관주처리	200배 주당 2L	7일 간격 2회처리	7.0	7.0	7.0	7.0	65.6
		500배 주당 2L		9.0	8.0	8.0	8.3	59.0
	경엽처리	200배	5일 간격 3회처리	7.0	6.0	6.0	6.3	68.9
		500배		6.0	8.0	6.0	6.7	67.2
		1,000배		9.0	8.0	9.0	8.7	57.4
	무처리			17.0	24.0	20.0	20.3	-

표 35. 관주처리 처리주기 및 횟수 설정을 위한 시제품의 키위 궤양병 방제효과 시험

시료명	처리방법	희석배수	처리주기 및 횟수	이병엽수				방제가 (%)
				I 반복	II 반복	III 반복	평균	
시제품	관주처리	200배 주당 2L	7일 간격 2회처리	8.0	9.0	7.0	8.0	63.6
			7일 간격 3회처리	8.0	7.0	7.0	7.3	66.7
			10일 간격 2회처리	8.0	9.0	10.0	9.0	59.1
			10일 간격 3회처리	7.0	8.0	9.0	8.0	63.6
무처리			20.0	22.0	24.0	22.0	-	

표 36. 경엽처리 처리주기 및 횟수 설정을 위한 시제품의 키위 궤양병 방제효과 시험

시료명	처리방법	희석배수	처리주기 및 횟수	이병엽수				방제가 (%)
				I 반복	II 반복	III 반복	평균	
시제품	경엽처리	500배	5일 간격 2회처리	8.0	6.0	7.0	7.0	63.8
			5일 간격 3회처리	6.0	6.0	7.0	6.3	67.2
			7일 간격 2회처리	8.0	8.0	8.0	8.0	58.6
			7일 간격 3회처리	8.0	7.0	8.0	7.7	60.3
무처리			18.0	20.0	20.0	19.3	-	

(2) 농가실증시험을 통한 토마토 풋마름병과지 시제품의 최적 적용방법 확립

시제품의 처리방법, 처리농도, 처리주기 및 횟수 등 적절한 방제방법을 확립하기 위해 경기도 화성시 소재 농가에서 농가실증시험을 실시하였으며, 구당 30주로 하여 완전임의배치법에 의해 3반복으로 시험을 진행하였으며, 최종약제처리 21일 후 시험구내 발병주수를 조사하였다(그림 136).



그림 137. 토마토 꽃마름병 농가실증시험 포장

시험결과, 시제품은 관주처리 시에는 500배의 농도로 주당 500ml, 7일 간격 3회 처리의 경우 가장 우수한 방제효과(무처리 대비 66.6%)를 나타내었으며, 경엽처리 시에는 200배의 농도로 5일 간격 3회 처리의 경우 가장 우수한 방제효과(무처리 대비 69.5%)를 나타내었다. 다만, 경제적인 측면이나 농가 편의성을 고려하여 시제품은 관주처리 시에는 500배의 농도로 주당 500ml, 7일 간격으로 2회 처리(64.3%), 경엽처리 시에는 200배의 농도로 7일 간격으로 2회 처리(66.7%)로 시제품의 적용방법을 결정하였다(표 36, 37, 38).

표 37. 처리방법 및 처리농도 설정을 위한 시제품의 토마토 꽃마름병 방제효과 시험

시료명	처리방법	희석배수	처리주기 및 횟수	이병엽수				방제가 (%)
				I 반복	II 반복	III 반복	평균	
시제품	관주처리	200배 주당 500ml	7일 간격 2회처리	13.3	13.3	10.0	12.2	68.6
		500배 주당 500ml		13.3	16.7	13.3	14.4	62.9
	경엽처리	200배	5일 간격 3회처리	13.3	13.3	13.3	13.3	65.8
		500배		16.7	16.7	13.3	15.6	59.9
		1,000배		20.0	23.3	20.0	21.1	45.7
			무처리		40.0	33.3	43.3	38.9

표 38. 관주처리 처리주기 및 횟수 설정을 위한 시제품의 토마토 꽃마름병 방제효과 시험

시료명	처리방법	희석배수	처리주기 및 횟수	이병엽수				방제가 (%)
				I 반복	II 반복	III 반복	평균	
시제품	관주처리	500배 주당 500ml	7일 간격 2회처리	20.0	16.7	13.3	16.7	64.3
			7일 간격 3회처리	16.7	13.3	16.7	15.6	66.6
			10일 간격 2회처리	23.3	20.0	23.3	22.2	52.4
			10일 간격 3회처리	20.0	20.0	20.0	20.0	57.1
					무처리	43.3	50.0	46.7

표 39. 경엽처리 처리주기 및 횟수 설정을 위한 시제품의 토마토 풋마름병 방제효과 시험

시료명	처리방법	희석배수	처리주기 및 횟수	이병엽수				방제가 (%)
				I 반복	II 반복	III 반복	평균	
시제품	경엽처리	200배	5일 간격 2회처리	13.3	13.3	13.3	13.3	66.8
			5일 간격 3회처리	13.3	13.3	10.0	12.2	69.5
			7일 간격 2회처리	13.3	10.0	16.7	13.3	66.7
			7일 간격 3회처리	20.0	16.7	20.0	18.9	52.8
무처리				36.7	40.0	43.3	40.0	-

자. 제품화를 위한 공인기관시험1

(1) 시제품의 주성분 분석

시제품의 제품화를 위한 유기농업자재 등록의 일환으로 2가지 시제품(키위 궤양병 파지, 토마토 풋마름병 파지)에 대한 주성분 분석 및 병원성미생물 검사를 진행하였다. 주성분 분석은 시제품 내 유전자 염기서열 상동성 검색을 통한 파지의 동정, plaque assay을 통한 생균수 측정을 실시하며, 병원성미생물 검사는 5종의 병원성미생물(병원성 대장균, 병원성 살모넬라, 황색포도상구균, 리스테리아 모노사이토제네스, 바실러스 세레우스) 선택배지를 이용한 검정을 실시하였다. 시험은 유기농업자재 공인시험기관인 목원대학교 산학협력단 미생물자원연구센터와 강원대학교 친환경농산물안전성센터에 의뢰하여 진행하였다.

1) 키위 궤양병파지 시제품(제품명 : 참깨)

① 병원성 대장균(*Escherichia coil* O157:H7) 검사

선택배지인 Eosin Methylene Blue Agar 배지에 조제된 시료 100 μ l를 접종한 후 이를 37 $^{\circ}$ C에서 48~72시간 배양한 후 청록색 colony의 유무를 확인한 결과, 음성으로 판정되었다.

② 병원성 살모넬라(*Salmonella* spp.) 검사

선택배지인 Hektoen Enteric Agar 배지에 조제된 시료 100 μ l를 종한 후 이를 37 $^{\circ}$ C에서 48~72시간 배양한 후 검은색 colony의 유무를 확인한 결과, 음성으로 판정되었다.

③ 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 검사

선택배지인 Baird Parker Agar 배지에 조제된 시료 100 μ l를 종한 후 이를 37 $^{\circ}$ C에서 24~48시간 배양한 후 검은색 colony의 유무를 확인한 결과, 음성으로 판정되었다.

④ 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*) 검사

선택배지인 Oxford Agar 배지에 조제된 시료 100 μ l를 종한 후 이를 37 $^{\circ}$ C에서 24~48시간 배양한 후 검은색 colony의 유무를 확인한 결과, 음성으로 판정되었다.

⑤ 바실러스 세레우스 (*Bacillus cereus*) 검사

선택배지인 Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar 배지에 조제된 시료 100 μ l를 종한 후 이를 37 $^{\circ}$ C에서 24~48시간 배양한 후 연분홍색 colony의 유무를 확인한 결과, 음성으로 판정되었다.

2) 토마토 풋마름병과지 시제품(제품명 : 풋안제)

① 병원성 대장균(*Escherichia coil* O157:H7) 검사

선택배지인 Eosin Methylene Blue Agar 배지에 조제된 시료 100 μ l를 접종한 후 이를 37 $^{\circ}$ C에서 48~72시간 배양한 후 청록색 colony의 유무를 확인한 결과, 음성으로 판정되었다.

② 병원성 살모넬라(*Salmonella* spp.) 검사

선택배지인 Hektoen Enteric Agar 배지에 조제된 시료 100 μ l를 종한 후 이를 37 $^{\circ}$ C에서 48~72시간 배양한 후 검은색 colony의 유무를 확인한 결과, 음성으로 판정되었다.

③ 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 검사

선택배지인 Baird Parker Agar 배지에 조제된 시료 100 μ l를 종한 후 이를 37 $^{\circ}$ C에서 24~48시간 배양한 후 검은색 colony의 유무를 확인한 결과, 음성으로 판정되었다.

④ 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*) 검사

선택배지인 Oxford Agar 배지에 조제된 시료 100 μ l를 종한 후 이를 37 $^{\circ}$ C에서 24~48시간 배양한 후 검은색 colony의 유무를 확인한 결과, 음성으로 판정되었다.

⑤ 바실러스 세레우스 (*Bacillus cereus*) 검사

선택배지인 Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar 배지에 조제된 시료 100 μ l를 종한 후 이를 37 $^{\circ}$ C에서 24~48시간 배양한 후 연분홍색 colony의 유무를 확인한 결과, 음성으로 판정되었다.

(2) 시제품의 독성평가

시제품의 제품화를 위한 유기농업자재 등록의 일환으로 2가지 시제품(키위 궤양병과지, 토마토 풋마름병과지)에 대한 독성시험을 진행하였다. 독성시험은 포유동물에 대한 독성시험(랫드에 대한 급성경구독성/병원성시험, 랫드에 대한 급성경피독성시험, 토끼에 대한 피부자극성시험, 토끼에 대한 안점막자극성시험)과 생태계 생물체에 대한 영향시험(담수어류에 대한 영향시험, 꿀벌에 대한 영향시험)에 대해 실시하였으며, 시험은 유기농업자재 공인시험기관인 (주)한국생물안전성연구소에 의뢰하여 진행하였다.

1) 키위 궤양병과지 시제품(제품명 : 참궤)

① 랫드 급성경구독성/병원성시험

시제품에 대한 급성 경구/병원성 시험을 랫드를 사용하여 시험동물 당 1.0×10^8 cfu를 1회 경구 투여 후 3일, 7일, 14일 및 21일째에 부검하여 장기의 육안적 관찰한 다음 체내 잔존 미생물 수와 1일, 3일, 7일 및 14일째의 체외 배출 미생물 수를 검사하였다. 또한 전 시험기간 동안 일반증상을 관찰하였으며 투여 전, 투여 후, 3일, 주 1회씩 체중을 측정하였다.

○ 투여한 미생물 농도 1.0×10^8 cfu/개체에서 치사동물은 없었다.

○ 일반중독증상은 관찰되지 않았다.

○ 체중변화는 정상적인 증가추세를 보였다.

○ 체내 잔존 미생물 수를 검사한 결과 어떠한 장기에서도 미생물이 검출되지 않았다.

○ 체외 배출 미생물 수를 검사한 결과 대변에서 검출되지 않았다.

○ 부검결과 시험물질 투여와 관련된 특이한 이상 소견은 관찰되지 않았다.

이상의 시험결과, 랫드에 대한 시제품의 단회 경구 투여 시 장기 (위) 및 채취한 대변에서 미생물이 검출 되지 않았으며, 부검 시 이상증상이 관찰되지 않았다. 따라서 시제품의 1.0×10^8 cfu 단위에 해당하는 미생물을 랫드에 단회 경구 투여 시 주요 장기 (위)에 잔존하지 않았으며 시험 종료 시 까지 중독 증상 및 치사가 없는 것으로 보아 급성독성으로 인한 영향은 없는 것으로 판단된다.

② 랫드 급성경피독성시험

시제품에 대한 급성경피독성을 랫드를 사용하여 1.0×10^8 cfu의 약량을 단회 경피 투여한 후 14일 동안 치사 수, 일반중독증상, 체중 변화를 관찰 조사한 결과는 다음과 같다.

- 한계시험의 투여약량수준인 1.0×10^8 cfu에서 치사개체가 관찰되지 않았다.
- 일반중독증상이 관찰되지 않았다.
- 체중변화는 약제투여 후 경과일수에 따라 증가추세를 보였다.

따라서 랫드에 대한 시제품의 급성경피독성시험 LD50값은 1.0×10^8 cfu 이상으로 농약관리법에 의거 독성을 구분하면 IV급(저독성)에 해당한다.

③ 토끼에 대한 피부자극성시험

시제품에 대한 피부자극성을 평가하기 위하여 3마리의 New Zealand White계 토끼 등 부위에 시험물질을 0.5ml씩 4시간 동안 처리한 후 72시간 동안의 일반중독증상, 치사 수, 체중변화 및 피부자극성을 관찰·조사한 결과는 다음과 같다.

- 시험기간 중 시험물질의 처리에 기인된 치사개체가 관찰되지 않았다.
- 일반 증상 관찰 시 시험물질의 처리에 기인된 중독증상이 관찰되지 않았다.
- 개체별 체중결과, 시간이 경과함에 따라 증가추세를 보였다.
- 시험물질 제거 후 처리부의 국소자극성을 관찰한 결과, 피부자극이 관찰되지 않아 1차 피부자극지수 (P.I.)는 “0.0”을 산출되었다.

이상의 결과로부터 New Zealand White계 토끼에 대한 시험물질의 피부 처리는 [피부 1차 자극표]에 의거 자극성 없는 물질인 것으로 구분되었다.

④ 토끼에 대한 안점막자극성시험

New Zealand White계 토끼에 대한 시제품의 안점막자극성시험을 수행하여 일반중독증상, 치사 수, 체중변화 및 안점막 자극증상을 관찰·조사한 결과는 다음과 같다.

- 시험물질 0.1ml을 New Zealand White계 토끼에 투여한 결과 시험기간 중 일반중독증상 및 치사동물은 관찰되지 않았다.
- 체중측정결과 모든 개체에서 체중이 시간이 경과함에 따라 증가하였다.
- 비세척군의 급성안자극지수 (A.O.I.)는 “0.0”으로 산출되었다.

이상의 결과, 시제품의 안점막자극성시험에서 비세척군의 자극성은 [안점막자극표]에 의거 “없음”으로 구분되었다.

⑤ 담수어류에 대한 안점막자극성시험

시제품의 잉어(Cyprinus carpio)에 대한 담수어류 영향시험을 30일 동안 반지수식으로 실시하여 생사수와 일반중독증상을 관찰하고 체중 및 전장을 조사하였다.

시험용액 중 시험물질의 농도는 유효성분 (5.50×10^8 cfu/ml)을 기준으로 3.3×10^6 cfu/ml 및 무처리한 대조군으로 시험을 실시하였으며, 결과는 아래와 같다(표 39).

표 40. 담수어류에 대한 안점막자극성 시험 결과

Nominal concentration (cfu/ml)	Number of fish	Cumulative mortality (30 days)	LC ₅₀ ^a (cfu/ml)	NOEC ^b (cfu/ml)
Control	10	0	> 3.3×10 ⁶	3.3×10 ⁶
3.3×10 ⁶	30	0		

a: Median lethal concentration, based on nominal concentration of active ingredient
 b: No observed effect concentration

이상의 시험결과 시제품의 잉어에 대한 30일 동안 반수치사농도(LC50)는 3.3 × 10⁶ cfu/ml 이상이였다.

⑥ 꿀벌에 대한 영향시험

시제품의 꿀벌에 대한 영향을 평가하고, 최대 무영향농도(NOEC)를 산출하기 위해 꿀벌영향시험을 수행하였다.

시험의 농도는 대조군(무처리) 및 추천사용약량(1000배 희석)의 10, 50, 100배를 높은 농도로 설정하였다. 노출 후 8일차 경과 시 대조군의 누적치사율이 20.0%를 초과하여 관찰을 종료하였으며, 시험에 대한 결과는 다음과 같다(표 40).

표 41. 꿀벌에 대한 영향시험 결과

Test substance	8 days Cumulative mortality				NOEC ^c
	0 ^a	10 ^b	50	100	
시제품	28.0%	29.3%	25.3%	26.7%	100 ^b

a: Negative control (Non-treatment)
 b: Fold concentration of recommended dosage
 c: No observed effect concentration

해당시험 조건하에서 8일차 대조군의 누적치사 수와 각 설정농도의 누적치사 수를 비교하여 통계처리를 실시한 결과, 시제품의 꿀벌에 대한 최대 무영향농도(NOEC)는 추천사용약량(1000배 희석)의 100배 높은 농도인 것으로 확인되었다.

2) 토마토 풋마름병과지 시제품(제품명 : 풋안제)

① 랫드 급성경구독성/병원성시험

시제품에 대한 급성 경구/병원성 시험을 랫드를 사용하여 시험동물 당 1.0 × 10⁸ cfu를 1회 경구 투여 후 3일, 7일, 14일 및 21일째에 부검하여 장기의 육안적 관찰한 다음 체내 잔존 미생물 수와 1일, 3일, 7일 및 14일째의 체외 배출 미생물 수를 검사하였다. 또한 전 시험기간 동안 일반증상을 관찰하였으며 투여 전, 투여 후, 3일, 주 1회씩 체중을 측정하였다.

- 투여한 미생물 농도 1.0 × 10⁸cfu/개체에서 치사동물은 없었다.
- 일반중독증상은 관찰되지 않았다.
- 체중변화는 정상적인 증가추세를 보였다.

- 체내 잔존 미생물 수를 검사한 결과 어떠한 장기에서도 미생물이 검출되지 않았다.
- 체외 배출 미생물 수를 검사한 결과 대변에서 검출되지 않았다.
- 부검결과 시험물질 투여와 관련된 특이한 이상 소견은 관찰되지 않았다.

이상의 시험결과, 랫드에 대한 시제품의 단회 경구 투여 시 장기 (위) 및 채취한 대변에서 미생물이 검출 되지 않았으며, 부검 시 이상증상이 관찰되지 않았다. 따라서 시제품의 1.0×10^8 cfu 단위에 해당하는 미생물을 랫드에 단회 경구 투여 시 주요 장기 (위)에 잔존하지 않았으며 시험 종료 시 까지 중독 증상 및 치사가 없는 것으로 보아 급성독성으로 인한 영향은 없는 것으로 판단된다.

② 랫드 급성경피독성시험

시제품에 대한 급성경피독성을 랫드를 사용하여 1.0×10^8 cfu의 약량을 단회 경피 투여한 후 14일 동안 치사 수, 일반중독증상, 체중 변화를 관찰 조사한 결과는 다음과 같다.

- 한계시험의 투여약량수준인 1.0×10^8 cfu에서 치사개체가 관찰되지 않았다.
- 일반중독증상이 관찰되지 않았다.
- 체중변화는 약제투여 후 경과일수에 따라 증가추세를 보였다.

따라서 랫드에 대한 시제품의 급성경피독성시험 LD50값은 1.0×10^8 cfu 이상으로 농약관리법에 의거 독성을 구분하면 IV급(저독성)에 해당한다.

③ 토끼에 대한 피부자극성시험

시제품에 대한 피부자극성을 평가하기 위하여 3마리의 New Zealand White계 토끼 등 부위에 시험물질을 0.5ml씩 4시간 동안 처리한 후 72시간 동안의 일반중독증상, 치사 수, 체중변화 및 피부자극성을 관찰·조사한 결과는 다음과 같다.

- 시험기간 중 시험물질의 처리에 기인된 치사개체가 관찰되지 않았다.
- 일반 증상 관찰 시 시험물질의 처리에 기인된 중독증상이 관찰되지 않았다.
- 개체별 체중결과, 시간이 경과함에 따라 증가추세를 보였다.
- 시험물질 제거 후 처리부의 국소자극성을 관찰한 결과, 피부자극이 관찰되지 않아 1차 피부자극지수 (P.II)는 “0.0”을 산출되었다.

이상의 결과로부터 New Zealand White계 토끼에 대한 시험물질의 피부 처리는 [피부 1차 자극표]에 의거 자극성 없는 물질인 것으로 구분되었다.

④ 토끼에 대한 안점막자극성시험

New Zealand White계 토끼에 대한 시제품의 안점막자극성시험을 수행하여 일반중독증상, 치사 수, 체중변화 및 안점막 자극증상을 관찰·조사한 결과는 다음과 같다.

- 시험물질 0.1ml을 New Zealand White계 토끼에 투여한 결과 시험기간 중 일반중독증상 및 치사동물은 관찰되지 않았다.
- 체중측정결과 모든 개체에서 체중이 시간이 경과함에 따라 증가하였다.
- 비세척군의 급성안자극지수 (A.O.I)는 “0.0”으로 산출되었다.

이상의 결과, 시제품의 안점막자극성시험에서 비세척군의 자극성은 [안점막자극표]에 의거 “없음”으로 구분되었다.

⑤ 담수어류에 대한 안점막자극성시험

시제품의 잉어(Cyprinus carpio)에 대한 담수어류 영향시험을 30일 동안 반지수식으로 실시하여 생사수와 일반중독증상을 관찰하고 체중 및 진장을 조사하였다.

시험용액 중 시험물질의 농도는 유효성분 (4.50×10^8 cfu/ml)을 기준으로 2.7×10^6 cfu/ml 및 무처리한 대조군으로 시험을 실시하였으며, 결과는 아래와 같다(표 41).

표 42. 담수어류에 대한 안점막자극성 시험 결과

Nominal concentration (cfu/ml)	Number of fish	Cumulative mortality (30 days)	LC ₅₀ ^a (cfu/ml)	NOEC ^b (cfu/ml)
Control	10	0	> 2.7×10^6	2.7×10^6
2.7×10^6	30	0		

a: Median lethal concentration, based on nominal concentration of active ingredient

b: No observed effect concentration

이상의 시험결과 시제품의 잉어에 대한 30일 동안 반수치사농도(LC50)는 2.7×10^6 cfu/ml 이상이였다.

⑥ 꿀벌에 대한 영향시험

시제품의 꿀벌에 대한 영향을 평가하고, 최대 무영향농도(NOEC)를 산출하기 위해 꿀벌영향시험을 수행하였다.

시험의 농도는 대조군(무처리) 및 추천사용약량(1000배 희석)의 10, 50, 100배를 높은 농도로 설정하였다. 노출 후 8일차 경과 시 대조군의 누적치사율이 20.0%를 초과하여 관찰을 종료하였으며, 시험에 대한 결과는 다음과 같다(표 42).

표 43. 꿀벌에 대한 영향시험 결과

Test substance	8 days Cumulative mortality				NOEC ^c
	0 ^a	10 ^b	50	100	
시제품	28.0%	30.4%	26.2%	24.1%	100 ^b

a: Negative control (Non-treatment)

b: Fold concentration of recommended dosage

c: No observed effect concentration

해당시험 조건하에서 8일차 대조군의 누적치사 수와 각 설정농도의 누적치사 수를 비교하여 통계처리를 실시한 결과, 시제품의 꿀벌에 대한 최대 무영향농도(NOEC)는 추천사용약량(1000배 희석)의 100배 높은 농도인 것으로 확인되었다.

(3) 시제품의 약해평가

시제품의 제품화를 위한 유기농업자재 등록의 일환으로 2가지 시제품(키위 궤양병파지, 토마토 풋마름병파지)에 대한 약해시험을 진행하였다. 약해시험은 5종의 유식물에 기준량과 배량으로 경엽처리 및 관주처리하여 약해의 유무를 관찰하며, 유기농업자재 공인시험기관인 강원대학교 친환경농산물안전성센터에 의뢰하여 진행하였다(표 43, 44, 45).

표 44. 농약피해의 판정기준

정도	판정기준
0	육안으로 농약피해가 인정되지 않음
1	아주 가벼운 농약피해로서 작은 약반이 약간 인정됨
2	처리된 잎의 소부분에서 농약피해가 인정됨
3	처리된 잎의 50% 정도 농약피해가 인정됨
4	상당한 피해를 받고 있으나 아직 건전한 부분이 남아 있음

표 45. 키위 궤양병과지 시제품 처리 후 농약피해 조사 결과

시험작물	처리농도	농약피해(0~4)			농약피해증상
		3일	5일	7일	
벼	무처리	-	-	-	-
	기준량	0	0	0	없음
	배량	0	0	0	없음
가지	무처리	-	-	-	-
	기준량	0	0	0	없음
	배량	0	0	0	없음
고추	무처리	-	-	-	-
	기준량	0	0	0	없음
	배량	0	0	0	없음
오이	무처리	-	-	-	-
	기준량	0	0	0	없음
	배량	0	0	0	없음
토마토	무처리	-	-	-	-
	기준량	0	0	0	없음
	배량	0	0	0	없음

표 46. 토마토 풋마름병과지 시제품 처리 후 농약피해 조사 결과

시험작물	처리농도	농약피해(0~4)			농약피해증상
		3일	5일	7일	
벼	무처리	-	-	-	-
	기준량	0	0	0	없음
	배량	0	0	0	없음
가지	무처리	-	-	-	-
	기준량	0	0	0	없음
	배량	0	0	0	없음
고추	무처리	-	-	-	-
	기준량	0	0	0	없음
	배량	0	0	0	없음
오이	무처리	-	-	-	-
	기준량	0	0	0	없음
	배량	0	0	0	없음
토마토	무처리	-	-	-	-
	기준량	0	0	0	없음
	배량	0	0	0	없음

(4) 시제품의 잔류농약검사

시제품의 제품화를 위한 유기농업자재 등록의 일환으로 2가지 시제품(키위 궤양병과지, 토마토 풋마름병과지)에 대한 잔류농약검사를 진행하였다. 잔류농약검사는 제품 내 화학농약성분의 유무를 확인하기 위한 시험으로 Abamectin B1을 비롯해 총 322종의 화학농약성분을 LC/MSMS, GC/MSMS를 이용하여 분석하며, 유기농업자재 공인시험기관인 (주)피캠코리아에 의뢰하여 진행한 결과, 각각의 시제품에서 잔류농약은 검출되지 않았다.

차. 제품화 및 사업화 연구1

(1) 개발제품의 초기 상업화를 위한 국내외 전시회 홍보

국내외 전시회 및 박람회에 참가하여 행사기간동안 연구개발성과물의 홍보와 수출을 위한 해외 바이어들과의 상담을 진행하였다(표 46, 그림 137).

표 47. 홍보와 수출을 위해 참가한 전시회 및 박람회 목록

	전시회/박람회 명칭	기간	장소	비고
1	2019 The 19th China International Agrochemical & Protection Exhibition (CAC)	2019.03.05.~07	중국 상하이	
2	2019 국제농업박람회	2019.10.17.~27	대한민국 나주	
3	2019 Turkey GROWTECH EURASIA INTERNATIONAL AGRICULTURE FAIRS	2019.11.27.~20	터키 안탈리아	예정



그림 138. 국내외 전시회 및 박람회 참가사진

(2) 사업성·경제성 분석

참다래(*Actinidia deliciosa* C.F. Liang et A. R. Ferguson)는 1970년대 후반에 국내에 도입되어 남해안 지방에서 재배되고 있는 아열대 과수로서 중국남부가 원산지이다. 국내에서는 제주도와 남해안 지역에서 주로 재배되고 있으며, 재배면적은 약 1,300ha로 국산 품종의 재배면적은 약 260ha이다.

키위 궤양병은 제주도에서 1987년에 처음 발생하였으며, 1990년대 이후 전남 해남, 완도, 고흥에서 대발생하였다. 전남지역의 특산 과수작물인 참다래의 고질병인 궤양병이 번지면서 참다래 농가의 재배 기피 현상이 늘고 있어 대책 마련이 시급한 실정이다. 전남지역의 참다래 궤양병은 지난 90년부터 완도지역을 중심으로 발병, 주산지인 해남, 진도, 고흥 등 전 지역으로 확산돼 전체면적의 50% 가량이 감염된 것으로 추정되고 있다. 그러나 발병한지 7년이 넘도록 뚜렷한 방제법조치 연구되지 않아 참다래 재배 기피현상은 늘어가고 있는 실정이다. 궤양병이 창궐하면서 폐원된 과수원 면적이 20여ha에 육박하고 있다. 참다래 궤양병은 재배지역마다 가장 중요한 병의 하나로 심한 경우에는 폐원에 이른다.

키위 궤양병의 방제를 위해 항생제와 동제 계통의 경엽처리제와 수간주입에 의한 방제법이 제시되었으나 방제가 어려운 실정이며, 일본에서는 항생제와 동제에 대한 약제 저항성이 보고되었다. 현재 국내에서는 스트렙토마이신 항생제를 주성분으로 하는 약제가 참다래 궤양병 약제로 추가 등록되었다.

키위 궤양병은 해외에서는 주로 일본, 미국, 이탈리아, 이란 등에서 발생되고 있으며, 뉴질랜드에서 2010년 11월 최초로 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* biovar 3(Psa3 또는 Psa-V)에 의한 궤양병이 발생되어 2013년 뉴질랜드에서는 제스프리골드키위 생산량을 40%나 감소시킬 만큼 피해를 입혔다. 2018년에는 12,860ha(재배 면적의 92%), 2949개 농가 과수원에서 궤양병이 발생하였다. 이탈리아에서는 제스프리골드키위 700ha(재배면적의 88%)에서 발생해 500여ha이 폐원됐다. 특히, 일본에서는 1984년 시즈오카에서 162ha 중 56ha에 대발생하였고, 인접지역으로 급속히 전파되어 큰 피해를 초래하였다.

국내 토마토 풋마름병과 같은 토양병 방제는 지금까지 사용한 화학농약으로 방제하는 것이 거의 불가능하여 이를 대처할 수 있는 방제법으로 박테리오파지를 이용한 생물적 방제법이 연구되었다. 토양병 생물적방제법은 병원성 토양에서 분리한 박테리오파지를 원료로 생물적방제법 국내 유기농 및 친환경농산물 수요증대로 농업인들이 화학합성농약을 대신할 수 있는 수단으로 박테리오파지를 상품으로 생산·판매되는 풋마름병 방제제는 전무한 실정이다.

(4) 경쟁제품군과 화학농약과의 비교평가

1) 키위 궤양병 파지 시제품과 화학농약의 효과비교

현재 키위 궤양병 방제용으로 등록되어 있는 화학농약과의 효과비교를 통해 시제품의 경쟁력을 확인하고자 하였다. 키위 궤양병 방제용으로 등록된 화학농약 중 1종을 선택하여 대조약제로 사용하였다(그림 138).

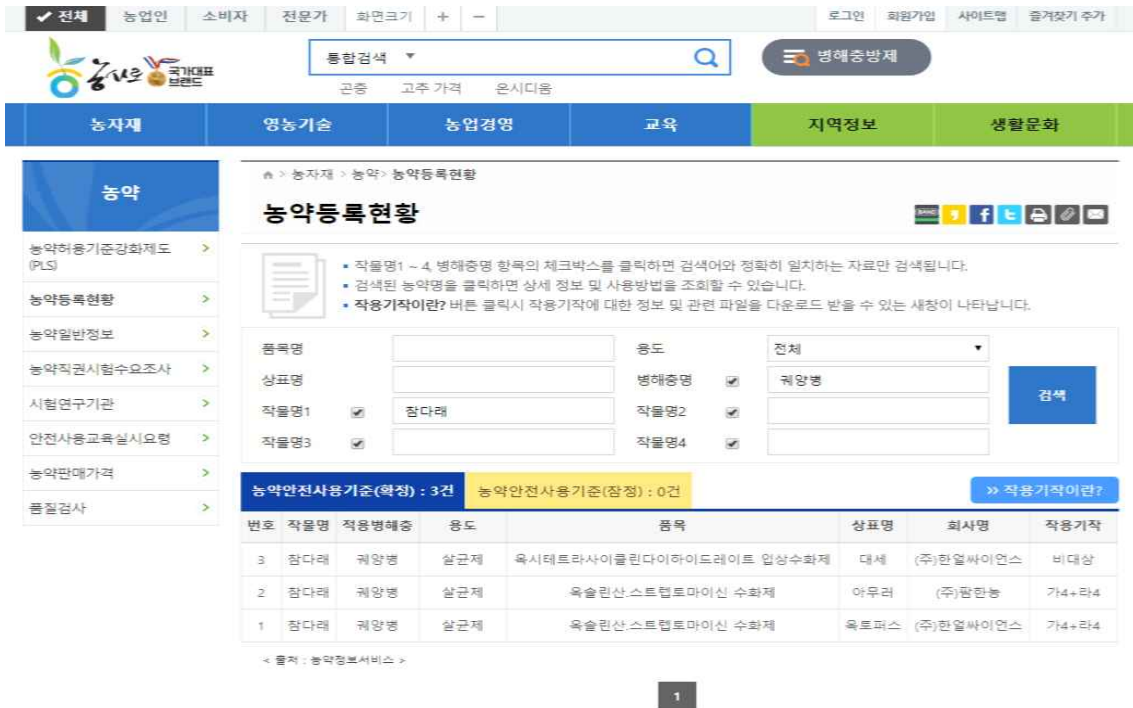


그림 139. 키위 귀양병 방제용으로 등록된 화학농약 현황(출처:농사로)

시험결과, 시제품은 무처리 대비 65.6%의 방제가를 나타내어 유기농업자재로서 충분한 효과를 보였으며(유기농업자재 효능·효과표시 기준 : 무처리 대비 50%) 화학농약대비 81.6%의 방제가를 보여 충분한 경쟁력을 갖춘 것으로 판단된다(표 47).

표 48. 시제품과 화학농약의 키위 귀양병 방제효과 비교시험

시료명	처리방법	희석배수	처리주기 및 횟수	이병엽수				방제가 (%)
				I반복	II반복	III반복	평균	
시제품	경엽처리	500배	5일 간격 2회처리	7.0	6.0	8.0	7.0	65.6
대조약제*	경엽처리	1,000배	10일 간격 3회처리	4.0	4.0	4.0	4.0	80.3
무처리				16.0	23.0	22.0	20.3	-

* 대조약제 : 옥솔린산·스트렙토마이신 수화제

2) 토마토 풋마름병과지 시제품과 화학농약의 효과비교

토마토 풋마름병 방제용으로 등록되어 있는 화학농약과의 효과비교를 통해 시제품의 경쟁력을 확인하고자 하였다. 토마토 풋마름병 방제용으로 등록된 화학농약 중 1종을 선택하여 대조약제로 사용하였다(그림 139).



그림 140. 토마토 풋마름병 방제용으로 등록된 화학농약 현황(출처:농사로)

시험결과, 시제품은 무처리 대비 64.9%의 방제가를 나타내어 유기농업자재로서 충분한 효과를 보였으며(유기농업자재 효능·효과표시 기준 : 무처리 대비 50%) 화학농약대비 82.8%의 방제가를 보여 충분한 경쟁력을 갖춘 것으로 판단된다(표 48).

표 49. 시제품과 화학농약의 토마토 풋마름병 방제효과 비교시험

시료명	처리방법	회석배수	처리주기 및 횟수	이병엽수				방제가 (%)
				I번엽	II번엽	III번엽	평균	
시제품	경엽처리	500배 주당 500ml	7일 간격 2회처리	13.3	16.7	13.3	14.4	64.9
대조약제*	경엽처리	2,000배 주당 500ml	10일 간격 3회처리	10.0	10.0	6.7	8.9	78.3
무처리				43.3	40.0	40.0	41.1	-

* 대조약제 : 옥시테트라사이클린칼슘알킬트리메탈암모늄·발리다마이신에이 수화제

카. 시제품의 농가실증시험 2

(1) 포트시험을 통한 수박 과일썩음병 파지 시제품의 약해 확인

농가실증시험을 진행하기 전 포트시험을 통해 시제품의 수박 유묘에 대한 약해를 확인하였다. 시험은 당사 온실에서 진행하였으며 처리구당 5포트로 진행하였으며, 시제품을 1회 경엽처리 후 7일간(3, 5, 7일후) 총 3회에 걸쳐 외관상 약해유무를 달관조사하였다(그림 140).



그림 141. 시제품의 수박 유묘에 대한 약해 확인

시험결과, 시험기간 동안 시제품 처리에 의한 작물의 피해는 발견되지 않았으며, 무처리와 기준량 및 배량을 비교하여도 약해로 판단될만한 특이한 증상은 없었다(표 49, 50).

표 50. 농약피해의 판정기준

정도	판정기준
0	육안으로 농약피해가 인정되지 않음
1	아주 가벼운 농약피해로서 작은 약반이 약간 인정됨
2	처리된 잎의 소부분에서 농약피해가 인정됨
3	처리된 잎의 50% 정도 농약피해가 인정됨
4	상당한 피해를 받고 있으나 아직 건전한 부분이 남아 있음

표 51. 처리 후 농약피해 조사 결과

시료명	처리농도	농약피해(0~4)			농약피해증상
		3일	5일	7일	
시제품	무처리	-	-	-	-
	기준량	0	0	0	없음
	배량	0	0	0	없음

(2) 농가실증시험을 통한 시제품의 최적 적용방법 확립

시제품의 처리방법, 처리농도, 처리주기 및 횟수 등 적절한 방제방법을 확립하기 위해 전북 고창군 소재 농가에서 농가실증시험을 실시하였으며, 구당 30주로 하여 완전임의배치법에 의한 3반복으로 시험을 진행하였다(그림 141).



그림 142. 수박 과일썩음병 병징

시험결과, 시제품의 처리방법은 관주처리보다 경엽처리가 효과적이었으며, 경엽처리 시에는 200배 처리 시 가장 우수한 방제효과(무처리구 대비 64.9%)를 나타내었지만 500배 처리구에서도 충분한 방제효과(무처리구 대비 63.2%)를 보여 경제적인 측면을 고려하여 시제품의 적정 처리농도는 500배로 결정하였다(표 51). 시제품의 처리주기는 5일 간격 3회처리(무처리구 대비 63.6%)가 가장 우수한 방제효과를 보였으나 경제적인 측면과 농가 편의성을 고려하여 시제품의 적정 처리주기는 7일 간격 3회 처리(무처리구 대비 61.8%)로 결정하였다(표 52).

표 52. 처리방법 및 처리농도 설정을 위한 시제품의 수박 과일썩음병 방제효과 시험

시료명	처리방법	희석배수	처리주기 및 횟수	이병엽수				방제가 (%)
				I 반복	II 반복	III 반복	평균	
시제품	관주처리	200배 주당 500ml	7일 간격 3회처리	30.0	26.7	36.7	31.1	50.9
		500배 주당 500ml		26.7	23.3	30.0	26.7	57.9
	경엽처리	200배	7일 간격 3회처리	26.7	23.3	16.7	22.2	64.9
		500배		20.0	26.7	23.3	23.3	63.2
		1,000배		30.0	33.3	26.7	30.0	52.6
	무처리				66.7	60.0	63.3	63.3

표 53. 처리주기 및 횟수 설정을 위한 시제품의 수박 과일썩음병 방제효과 시험

시료명	처리방법	희석배수	처리주기 및 횟수	이병엽수				방제가 (%)
				I 반복	II 반복	III 반복	평균	
시제품	경엽처리	500배	5일 간격 2회처리	26.7	26.7	23.3	25.6	58.2
			5일 간격 3회처리	26.7	20.0	20.0	22.2	63.6
			7일 간격 2회처리	36.7	26.7	23.3	28.9	52.7
			7일 간격 3회처리	26.7	16.7	26.7	23.3	61.8
무처리				63.3	56.7	63.3	61.1	-

타. 제품화를 위한 공인기관시험 2

(1) 시제품의 주성분 분석

시제품의 제품화를 위한 유기농업자재 등록의 일환으로 2가지 시제품(수박 과일썩음병파지, 배추 무름병파지)에 대한 주성분 분석 및 병원성미생물 검사를

진행하였다. 주성분 분석은 시제품 내 유전자 염기서열 상동성 검색을 통한 파지의 동정, plaque assay을 통한 생균수 측정을 진행하며, 병원성미생물 검사는 5종의 병원성미생물(병원성 대장균, 병원성 살모넬라, 황색포도상구균, 리스테리아 모노사이토제네스, 바실러스 세레우스) 선택배지를 이용한 검정을 유기농업자재 공인시험기관인 강원대학교 친환경농산물안전성센터에 의뢰하여 진행하였다.

1) 수박 과일썩음병과지 시제품(제품명 : 과안제)

① 병원성 대장균(*Escherichia coil* O157:H7) 검사

선택배지인 Eosin Methylene Blue Agar 배지에 조제된 시료 100 μ l를 접종한 후 이를 37 $^{\circ}$ C에서 48~72시간 배양한 후 청록색 colony의 유무를 확인한 결과, 음성으로 판정되었다.

② 병원성 살모넬라(*Salmonella* spp.) 검사

선택배지인 Hektoen Enteric Agar 배지에 조제된 시료 100 μ l를 종한 후 이를 37 $^{\circ}$ C에서 48~72시간 배양한 후 검은색 colony의 유무를 확인한 결과, 음성으로 판정되었다.

③ 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 검사

선택배지인 Baird Parker Agar 배지에 조제된 시료 100 μ l를 종한 후 이를 37 $^{\circ}$ C에서 24~48시간 배양한 후 검은색 colony의 유무를 확인한 결과, 음성으로 판정되었다.

④ 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*) 검사

선택배지인 Oxford Agar 배지에 조제된 시료 100 μ l를 종한 후 이를 37 $^{\circ}$ C에서 24~48시간 배양한 후 검은색 colony의 유무를 확인한 결과, 음성으로 판정되었다.

⑤ 바실러스 세레우스 (*Bacillus cereus*) 검사

선택배지인 Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar 배지에 조제된 시료 100 μ l를 종한 후 이를 37 $^{\circ}$ C에서 24~48시간 배양한 후 연분홍색 colony의 유무를 확인한 결과, 음성으로 판정되었다.

2) 배추 무름병과지 시제품(제품명 : 배무)

① 병원성 대장균(*Escherichia coil* O157:H7) 검사

선택배지인 Eosin Methylene Blue Agar 배지에 조제된 시료 100 μ l를 접종한 후 이를 37 $^{\circ}$ C에서 48~72시간 배양한 후 청록색 colony의 유무를 확인한 결과, 음성으로 판정되었다.

② 병원성 살모넬라(*Salmonella* spp.) 검사

선택배지인 Hektoen Enteric Agar 배지에 조제된 시료 100 μ l를 종한 후 이를 37 $^{\circ}$ C에서 48~72시간 배양한 후 검은색 colony의 유무를 확인한 결과, 음성으로 판정되었다.

③ 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 검사

선택배지인 Baird Parker Agar 배지에 조제된 시료 100 μ l를 종한 후 이를 37 $^{\circ}$ C에서 24~48시간 배양한 후 검은색 colony의 유무를 확인한 결과, 음성으로 판정되었다.

④ 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*) 검사

선택배지인 Oxford Agar 배지에 조제된 시료 100 μ l를 종한 후 이를 37 $^{\circ}$ C에서 24~48시간 배양한 후 검은색 colony의 유무를 확인한 결과, 음성으로 판정되었다.

⑤ 바실러스 세레우스 (*Bacillus cereus*) 검사

선택배지인 Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar 배지에 조제된 시료 100 μ l를 증한 후 이를 37 $^{\circ}$ C에서 24~48시간 배양한 후 연분홍색 colony의 유무를 확인한 결과, 음성으로 판정되었다.

(2) 시제품의 독성평가

시제품의 제품화를 위한 유기농업자재 등록의 일환으로 2가지 시제품(수박 과일썩음병과지, 배추 무름병과지)에 대한 독성시험을 진행하였다. 독성시험은 포유동물에 대한 독성시험(랫드에 대한 급성경구독성/병원성시험, 랫드에 대한 급성경피독성시험, 토끼에 대한 피부자극성시험, 토끼에 대한 안점막자극성시험)과 생태계 생물에 대한 영향시험(담수 어류에 대한 영향시험, 꿀벌에 대한 영향시험)을 유기농업자재 공인시험기관인 (주)한국생물안전성연구소에 의뢰하여 진행하였다.

1) 수박 과일썩음병과지 시제품(제품명 : 과안제)

① 랫드 급성경구독성/병원성시험

시제품에 대한 급성 경구/병원성 시험을 랫드를 사용하여 시험동물 당 1.0×10^8 cfu를 1회 경구 투여 후 3일, 7일, 14일 및 21일째에 부검하여 장기의 육안적 관찰한 다음 체내 잔존 미생물 수와 1일, 3일, 7일 및 14일째의 체외 배출 미생물 수를 검사하였다. 또한 전 시험기간 동안 일반증상을 관찰하였으며 투여 전, 투여 후, 3일, 주 1회씩 체중을 측정하였다.

- 투여한 미생물 농도 1.0×10^8 cfu/개체에서 치사동물은 없었다.
- 일반중독증상은 관찰되지 않았다.
- 체중변화는 정상적인 증가추세를 보였다.
- 체내 잔존 미생물 수를 검사한 결과 어떠한 장기에서도 미생물이 검출되지 않았다.
- 체외 배출 미생물 수를 검사한 결과 대변에서 검출되지 않았다.
- 부검결과 시험물질 투여와 관련된 특이한 이상 소견은 관찰되지 않았다.

이상의 시험결과, 랫드에 대한 시제품의 단회 경구 투여 시 장기 (위) 및 채취한 대변에서 미생물이 검출 되지 않았으며, 부검 시 이상증상이 관찰되지 않았다. 따라서 시제품의 1.0×10^8 cfu 단위에 해당하는 미생물을 랫드에 단회 경구 투여 시 주요 장기 (위)에 잔존하지 않았으며 시험 종료 시 까지 중독 증상 및 치사가 없는 것으로 보아 급성독성으로 인한 영향은 없는 것으로 판단된다.

② 랫드 급성경피독성시험

시제품에 대한 급성경피독성을 랫드를 사용하여 1.0×10^8 cfu의 약량을 단회 경피 투여한 후 14일 동안 치사 수, 일반중독증상, 체중 변화를 관찰 조사한 결과는 다음과 같다.

- 한계시험의 투여약량수준인 1.0×10^8 cfu에서 치사개체가 관찰되지 않았다.
- 일반중독증상이 관찰되지 않았다.
- 체중변화는 약제투여 후 경과일수에 따라 증가추세를 보였다.

따라서 랫드에 대한 시제품의 급성경피독성시험 LD50값은 1.0×10^8 cfu 이상으로 농약관리법에 의거 독성을 구분하면 IV급(저독성)에 해당한다.

③ 토끼에 대한 피부자극성시험

시제품에 대한 피부자극성을 평가하기 위하여 3마리의 New Zealand White계 토끼 등 부위에 시험물질을 0.5ml씩 4시간 동안 처리한 후 72시간 동안의 일반중독증상, 치사 수, 체중변화 및 피부자극성을 관찰·조사한 결과는 다음과 같다.

- 시험기간 중 시험물질의 처리에 기인된 치사개체가 관찰되지 않았다.
- 일반 증상 관찰 시 시험물질의 처리에 기인된 중독증상이 관찰되지 않았다.
- 개체별 체중결과, 시간이 경과함에 따라 증가추세를 보였다.
- 시험물질 제거 후 처리부의 국소자극성을 관찰한 결과, 피부자극이 관찰되지 않아 1차 피부자극지수 (P.I.I)는 “0.0”을 산출되었다.

이상의 결과로부터 New Zealand White계 토끼에 대한 시험물질의 피부 처리는 [피부 1차 자극표]에 의거 자극성 없는 물질인 것으로 구분되었다.

④ 토끼에 대한 안점막자극성시험

New Zealand White계 토끼에 대한 시제품의 안점막자극성시험을 수행하여 일반중독증상, 치사 수, 체중변화 및 안점막 자극증상을 관찰·조사한 결과는 다음과 같다.

- 시험물질 0.1ml을 New Zealand White계 토끼에 투여한 결과 시험기간 중 일반중독증상 및 치사동물은 관찰되지 않았다.
- 체중측정결과 모든 개체에서 체중이 시간이 경과함에 따라 증가하였다.
- 비세척군의 급성안자극지수 (A.O.I)는 “0.0”으로 산출되었다.

이상의 결과, 시제품의 안점막자극성시험에서 비세척군의 자극성은 [안점막자극표]에 의거 “없음”으로 구분되었다.

⑤ 담수어류에 대한 안점막자극성시험

시제품의 잉어(Cyprinus carpio)에 대한 담수어류 영향시험을 30일 동안 반지수식으로 실시하여 생사수와 일반중독증상을 관찰하고 체중 및 전장을 조사하였다.

시험용액 중 시험물질의 농도는 유효성분 (6.80×10^8 cfu/ml)을 기준으로 4.1×10^6 cfu/ml 및 무처리한 대조군으로 시험을 실시하였으며, 결과는 아래와 같다(표 53).

표 54. 담수어류에 대한 안점막자극성시험 결과

Nominal concentration (cfu/ml)	Number of fish	Cumulative mortality (30 days)	LC ₅₀ ^a (cfu/ml)	NOEC ^b (cfu/ml)
Control	10	0	> 4.1×10^6	4.1×10^6
4.1×10^6	30	0		

a: Median lethal concentration, based on nominal concentration of active ingredient

b: No observed effect concentration

이상의 시험결과 시제품의 잉어에 대한 30일 동안 반수치사농도(LC50)는 4.1×10^6 cfu/ml 이상이였다.

⑥ 꿀벌에 대한 영향시험

시제품의 꿀벌에 대한 영향을 평가하고, 최대 무영향농도(NOEC)를 산출하기 위해 꿀벌영향시험을 수행하였다.

시험의 농도는 대조군(무처리) 및 추천사용약량(1000배 희석)의 10, 50, 100배를 높은

농도로 설정하였다. 노출 후 8일차 경과 시 대조군의 누적치사율이 20.0%를 초과하여 관찰을 종료하였으며, 시험에 대한 결과는 다음과 같다(표 54).

표 55. 꿀벌에 대한 영향시험 결과

Test substance	8 days Cumulative mortality				NOEC ^c
	0 ^a	10 ^b	50	100	
시제품	27.4%	25.2%	22.8%	23.6%	100 ^b

a: Negative control (Non-treatment)

b: Fold concentration of recommended dosage

c: No observed effect concentration

해당시험 조건하에서 8일차 대조군의 누적치사 수와 각 설정농도의 누적치사 수를 비교하여 통계처리를 실시한 결과, 시제품의 꿀벌에 대한 최대 무영향농도(NOEC)는 추천사용약량(1000배 희석)의 100배 높은 농도인 것으로 확인되었다.

2) 배추 무름병과지 시제품(제품명 : 배무)

① 랫드 급성경구독성/병원성시험

시제품에 대한 급성 경구/병원성 시험을 랫드를 사용하여 시험동물 당 1.0×10^8 cfu를 1회 경구 투여 후 3일, 7일, 14일 및 21일째에 부검하여 장기의 육안적 관찰한 다음 체내 잔존 미생물 수와 1일, 3일, 7일 및 14일째의 체외 배출 미생물 수를 검사하였다. 또한 전 시험기간 동안 일반증상을 관찰하였으며 투여 전, 투여 후, 3일, 주 1회씩 체중을 측정하였다.

- 투여한 미생물 농도 1.0×10^8 cfu/개체에서 치사동물은 없었다.
- 일반중독증상은 관찰되지 않았다.
- 체중변화는 정상적인 증가추세를 보였다.
- 체내 잔존 미생물 수를 검사한 결과 어떠한 장기에서도 미생물이 검출되지 않았다.
- 체외 배출 미생물 수를 검사한 결과 대변에서 검출되지 않았다.
- 부검결과 시험물질 투여와 관련된 특이한 이상 소견은 관찰되지 않았다.

이상의 시험결과, 랫드에 대한 시제품의 단회 경구 투여 시 장기 (위) 및 채취한 대변에서 미생물이 검출 되지 않았으며, 부검 시 이상증상이 관찰되지 않았다. 따라서 시제품의 1.0×10^8 cfu 단위에 해당하는 미생물을 랫드에 단회 경구 투여 시 주요 장기 (위)에 잔존하지 않았으며 시험 종료 시 까지 중독 증상 및 치사가 없는 것으로 보아 급성독성으로 인한 영향은 없는 것으로 판단된다.

② 랫드 급성경피독성시험

시제품에 대한 급성경피독성을 랫드를 사용하여 1.0×10^8 cfu의 약량을 단회 경피 투여한 후 14일 동안 치사 수, 일반중독증상, 체중 변화를 관찰 조사한 결과는 다음과 같다.

- 한계시험의 투여약량수준인 1.0×10^8 cfu에서 치사개체가 관찰되지 않았다.
- 일반중독증상이 관찰되지 않았다.
- 체중변화는 약제투여 후 경과일수에 따라 증가추세를 보였다.

따라서 랫드에 대한 시제품의 급성경피독성시험 LD50값은 1.0×10^8 cfu 이상으로 농약관리법에 의거 독성을 구분하면 IV급(저독성)에 해당한다.

③ 토끼에 대한 피부자극성시험

시제품에 대한 피부자극성을 평가하기 위하여 3마리의 New Zealand White계 토끼 등 부위에 시험물질을 0.5ml씩 4시간 동안 처리한 후 72시간 동안의 일반중독증상, 치사 수, 체중변화 및 피부자극성을 관찰·조사한 결과는 다음과 같다.

- 시험기간 중 시험물질의 처리에 기인된 치사개체가 관찰되지 않았다.
- 일반 증상 관찰 시 시험물질의 처리에 기인된 중독증상이 관찰되지 않았다.
- 개체별 체중결과, 시간이 경과함에 따라 증가추세를 보였다.
- 시험물질 제거 후 처리부의 국소자극성을 관찰한 결과, 피부자극이 관찰되지 않아 1차 피부자극지수 (P.I.)는 “0.0”을 산출되었다.

이상의 결과로부터 New Zealand White계 토끼에 대한 시험물질의 피부 처리는 [피부 1차 자극표]에 의거 자극성 없는 물질인 것으로 구분되었다.

④ 토끼에 대한 안점막자극성시험

New Zealand White계 토끼에 대한 시제품의 안점막자극성시험을 수행하여 일반중독증상, 치사 수, 체중변화 및 안점막 자극증상을 관찰·조사한 결과는 다음과 같다.

- 시험물질 0.1ml을 New Zealand White계 토끼에 투여한 결과 시험기간 중 일반중독증상 및 치사동물은 관찰되지 않았다.
- 체중측정결과 모든 개체에서 체중이 시간이 경과함에 따라 증가하였다.
- 비세척군의 급성안자극지수 (A.O.I.)는 “0.0”으로 산출되었다.

이상의 결과, 시제품의 안점막자극성시험에서 비세척군의 자극성은 [안점막자극표]에 의거 “없음”으로 구분되었다.

⑤ 담수어류에 대한 안점막자극성시험

시제품의 잉어(Cyprinus carpio)에 대한 담수어류 영향시험을 30일 동안 반수시식으로 실시하여 생사수와 일반중독증상을 관찰하고 체중 및 진장을 조사하였다.

시험용액 중 시험물질의 농도는 유효성분 (3.60×10^8 cfu/ml)을 기준으로 2.2×10^6 cfu/ml 및 무처리한 대조군으로 시험을 실시하였으며, 결과는 아래와 같다(표 55).

표 56. 담수어류에 대한 안점막자극성시험

Nominal concentration (cfu/ml)	Number of fish	Cumulative mortality (30 days)	LC ₅₀ ^a (cfu/ml)	NOEC ^b (cfu/ml)
Control	10	0	> 2.2×10^6	2.2×10^6
2.2×10^6	30	0		

a: Median lethal concentration, based on nominal concentration of active ingredient

b: No observed effect concentration

이상의 시험결과 시제품의 잉어에 대한 30일 동안 반수치사농도(LC50)는 2.2×10^6 cfu/ml 이상이었다.

⑥ 꿀벌에 대한 영향시험

시제품의 꿀벌에 대한 영향을 평가하고, 최대 무영향농도(NOEC)를 산출하기 위해 꿀벌영향시험을 수행하였다.

시험의 농도는 대조군(무처리) 및 추천사용약량(1000배 희석)의 10, 50, 100배를 높은 농도로 설정하였다. 노출 후 8일차 경과 시 대조군의 누적치사율이 20.0%를 초과하여 관찰을 종료하였으며, 시험에 대한 결과는 다음과 같다(표 56).

표 57. 꿀벌에 대한 영향시험 결과

Test substance	8 days Cumulative mortality				NOEC ^c
	0 ^a	10 ^b	50	100	
시제품	28.0%	29.2%	25.4%	22.1%	100 ^b

a: Negative control (Non-treatment)

b: Fold concentration of recommended dosage

c: No observed effect concentration

해당시험 조건하에서 8일차 대조군의 누적치사 수와 각 설정농도의 누적치사 수를 비교하여 통계처리를 실시한 결과, 시제품의 꿀벌에 대한 최대 무영향농도(NOEC)는 추천사용약량(1000배 희석)의 100배 높은 농도인 것으로 확인되었다.

(3) 시제품의 약해평가

시제품의 제품화를 위한 유기농업자재 등록의 일환으로 2가지 시제품(수박 과일썩음병 파지, 배추 무름병파지)에 대한 약해시험을 진행하였다. 약해시험은 5종의 유식물에 기준량과 배량으로 경엽처리 및 관주처리하여 약해의 유무를 관찰하며, 유기농업자재 공인시험기관인 강원대학교 친환경농산물안전성센터에 의뢰하여 진행하였다.(표 57, 58, 59)

표 58. 농약피해의 판정기준

정도	판정기준
0	육안으로 농약피해가 인정되지 않음
1	아주 가벼운 농약피해로서 작은 약반이 약간 인정됨
2	처리된 잎의 소부분에서 농약피해가 인정됨
3	처리된 잎의 50% 정도 농약피해가 인정됨
4	상당한 피해를 받고 있으나 아직 건전한 부분이 남아 있음

표 59. 수박 과일썩음병과지 시제품 처리 후 농약피해 조사 결과

시험작물	처리농도	농약피해(0~4)			농약피해증상
		3일	5일	7일	
벼	무처리	-	-	-	-
	기준량	0	0	0	없음
	배량	0	0	0	없음
가지	무처리	-	-	-	-
	기준량	0	0	0	없음
	배량	0	0	0	없음
고추	무처리	-	-	-	-
	기준량	0	0	0	없음
	배량	0	0	0	없음
수박	무처리	-	-	-	-
	기준량	0	0	0	없음
	배량	0	0	0	없음
토마토	무처리	-	-	-	-
	기준량	0	0	0	없음
	배량	0	0	0	없음

표 60. 배추 무름병과지 시제품 처리 후 농약피해 조사 결과

시험작물	처리농도	농약피해(0~4)			농약피해증상
		3일	5일	7일	
벼	무처리	-	-	-	-
	기준량	0	0	0	없음
	배량	0	0	0	없음
가지	무처리	-	-	-	-
	기준량	0	0	0	없음
	배량	0	0	0	없음
고추	무처리	-	-	-	-
	기준량	0	0	0	없음
	배량	0	0	0	없음
오이	무처리	-	-	-	-
	기준량	0	0	0	없음
	배량	0	0	0	없음
배추	무처리	-	-	-	-
	기준량	0	0	0	없음
	배량	0	0	0	없음

(4) 시제품의 잔류농약검사

시제품의 제품화를 위한 유기농업자재 등록의 일환으로 2가지 시제품(수박 과일썩음병과지, 배추 무름병과지)에 대한 잔류농약검사를 진행하였다. 잔류농약검사는 제품 내 화학농약성분의 유무를 확인하기 위한 시험으로 Abamectin B1을 비롯해 총 322종의 화학농약성분을 LC/MSMS, GC/MSMS를 이용하여 분석하며, 유기농업자재 공인시험기관인 (주)피캄코리아에 의뢰하여 진행한 결과, 각각의 시제품에서 잔류농약은 검출되지 않았다.

과. 제품화 및 사업화 연구 2

(1) 병해관리용 유기농업자재 공시

해외에서는 박테리오파지를 이용한 제품으로는 유럽의 경우, 리스테리아균에 의한 식중독을 방지하는 식품첨가제 제품인 Listerix-PIOO를 개발하여 미국 FDA의 승인을 받았고, 리스테리아균 통제 식품첨가제 박테리오파지 제품 LMP-102 를 개발하여 미국 FDA의 GRAS (Generally regarded as safe) list에 등재되어 있다. 또한 미국의 농업, 식품, 물, 산업, 의약, 환경 등에서 활용할 수 있는 박테리오파지의 개발과 판매를 위해 OmniLytics라는 박테리오파지 전문회사가 설립되었고, 농업분야에서는 박테리오파지로 *Xanthomonas* sp.와 *Pseudomonas* sp.와 같은 식물병원세균을 효과적으로 제어하는 Agriphage라는 제품이 판매되고 있다.

국내에서는 축산, 식품, 농업분야에서 박테리오파지를 이용한 연구가 활발히 이루어지고 있으며 특히, 농업분야의 채소류 썩음병, 배추 무름병, 고추 풋마름병, 과수 화상병, 벼 흰잎마름병을 발생시키는 병원성 세균의 제어를 위해 국가기관 및 대학교 등에서 연구가 진행 되고 있다.

그러나 현재, 박테리오파지의 제품의 국내 등록 기준이 명확치 않아 국가기관과 대학교들의 활발한 연구에도 불구하고 제품화하여 상용화 시킬 수 없으며 국제적인 흐름에 뒤쳐지고 있는 안타까운 현실이다.

제품화는 당초, 본 과제의 시제품을 친환경농업에 사용할 수 있는 병해관리용 유기농업자재로 공시할 계획이었으나 관리기관과 공시기관에서 「국립농산물품질관리원소관 친환경농어업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률, [별표 13] 유기농업자재의 공시 또는 품질인증 기준 (제47조제1항 관련), 원료 검토 기준」 중 ‘인체·식물·동물에 해롭게 할 수 있는 병원성 미생물 [병원성 미생물로부터 발생한 대사산물(물질대사 과정에서 생성되는 물질)을 포함한다], 원균 등이 함유되거나 오염된 원료(그림 142)’에 의거하여 유기농업자재로서 공시할 수 없다는 의견을 받은 상황이다. 이를 타개하기 위해 유관기관 관계자들과의 면밀한 협의를 진행 중이다.

<친환경농어업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률>
 [별표 13] [시행2019.08.26.] [농림축산식품부령 제 391호, 2019.08.26. 타법개정]
 유기농업자재의 공시 또는 품질인증 기준(제47조제1항 관련)
 나. 원료의 특성 등에 관한 자료

심사 사항	검토 기준
1) 원료	1) 공시등을 받으려는 자재에 사용한 원료는 별표 1의 허용물질에 한하여 사용하여야 한다. 2) 보조제는 천연에서 유래한 물질을 사용하는 것을 원칙으로 하되 별표 1 제3호에 적합하여야 한다. 3) 다음의 원료는 유기농업자재에 혼입되어서는 아니 된다. 가) 인체·식물·동물에 해롭게 할 수 있는 병원성 미생물[병원성 미생물로부터 발생한 대사산물(물질대사 과정에서 생성되는 물질)을 포함한다], 원균 등이 함유되거나 오염된 원료 나) 유전자를 변형한 물질(추출물을 포함한다)이 함유되거나 오염된 원료 다) 항생제·합성항균제 및 합성호르몬 등이 함유되거나 오염된 원료 라) 유기합성농약이 함유되거나 오염된 원료 마) 「식물방역법」 제10조에서 정한 병해충 또는 이들 병해충이 함유되거나 오염된 원료 바) 「축산물위생관리법 시행규칙」 제9조 및 별표 3에서 정하는 도축이 금지된 가축과 그 가축의 사체·축산물 및 부산물 사) 석면이 함유되거나 오염된 원료 아) 아주까리 및 아주까리 유박(油粕, 식물성 원료에서 원하는 물질이 짜고 남은 찌꺼기를 말한다. 이하 이 표에서 같다)을 사용한 자재는 「비료관리법」 제 4조에 따라 농촌진흥청장이 고시한 비료공정규격에서 정한 리친(Ricin)의 유해성분 최대량을 초과하지 않을 것

그림 143. 친환경농어업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률

(2) 개발제품의 초기 상업화를 위한 국내외 전시회 홍보

COVID-19로 인해 대부분의 국내외 전시회가 취소되거나 내년으로 연기되어 국내외 농업관련 전시회를 통한 홍보를 진행할 수 없었으며, 내년에도 사태가 진정되지 않는다면 제품홍보용 리플렛을 제작하고 농업전문지에 광고를 게재하여 적극적인 홍보를 이어나갈 계획이다.

(3) 경쟁제품군과 화학농약과의 비교평가

유기농업자재와 수박 과일썩음병 방제용으로 등록되어 있는 화학농약과의 효과비교를 통해 시제품의 경쟁력을 확인하고자 하였다. 화학농약은 수박 과일썩음병 방제용으로 등록된 제품 중 1종을 선택하여 대조약제로 사용하였다(그림 143).

농약제품검색

• 상표명 • 회사명
 • 품목명 • 일반명
 • 작물1 수박 • 작물2 예) 감귤 • 작물3 예) 오이 • 작물4 예) 배추
 • 병해충 과일썩음병 • 용도 • 작용기작

총 건수: 22건 10개씩 보기

순번	구조	품목명	주성분량(%)	상표명	독성	어독성	용도	회사명	작용기작
1	제조	옥솔린산 수화제	Oxolinic acid - 20%	일품	4급(저독성)	3급	살균제	(주)동영아그로	기4
2	수입	옥시테트라사이클린칼슘알킬트리메틸암모늄 수화제	Oxytetracycline calcium alkyltrimethylammonium - 17%	성보사이클린	4급(저독성)	3급	살균제	성보화학(주)	리5
3	제조	스트렙토마이신빌리다마이신에이 수화제	streptomycin+validamycin-a - 20(5+15)%	쌍번대	4급(저독성)	3급	살균제	(주)광한농	리4+리3
4	제조	옥솔린산 수화제	Oxolinic acid - 20%	고수	4급(저독성)	3급	살균제	인비이오(주)	기4
5	제조	옥솔린산 수화제	Oxolinic acid - 20%	일취월창	4급(저독성)	3급	살균제	(주)한일사이먼스	기4
6	제조	옥솔린산 수화제	Oxolinic acid - 20%	무름반침독	4급(저독성)	3급	살균제	(주)대유	기4
7	수입	옥솔린산 수화제	Oxolinic acid - 20%	태양	4급(저독성)	3급	살균제	(주)케이씨생명과학	기4
8	제조	옥솔린산스트렙토마이신 수화제	Oxolinic acid+Streptomycin - 25(10+15)%	아무러	4급(저독성)	3급	살균제	(주)광한농	기4+리4

그림 144. 수박 과일썩음병 방제용으로 등록된 화학농약 현황(출처:농촌진흥청)

시험결과, 시제품의 수박 과일썩음병에 대한 방제가는 무처리구 대비 64.7%로 유기농업자재로 충분한 효과를 보였으며(유기농업자재 효능·효과 표시 기준 : 무처리구 대비 50% 이상 방제효과), 경쟁 유기농업자재보다 높은 방제효과를 보였으며, 화학농약 대비 78.6%의 방제가를 보여 충분한 경쟁력을 갖춘 것으로 판단된다(표 60).

표 61. 시제품과 유기농업자재, 화학농약의 수박 과일썩음병 방제효과 비교시험

시료명	처리방법	희석배수	처리주기 및 횟수	이 병엽수				방제가 (%)
				I반복	II반복	III반복	평균	
시제품	경엽처리	500배	7일 간격 3회처리	20.0	23.3	16.7	20.0	64.7
유기농업자재*	경엽처리	1,000배	7일 간격 3회처리	23.3	20.0	20.0	21.1	62.7
대조약제**	경엽처리	1,000배	7일 간격 3회처리	10.0	10.0	10.0	10.0	82.4
무처리				56.7	60.0	53.3	56.7	-

* 유기농업자재 : 황 32%, 벤토나이트 4% 액상수화제

** 대조약제 : 옥솔린산·스트렙토마이신 25(10+15)% 수화제

3절. 연구개발 성과

1. 논문게재

가. SCI 논문

- (1) Park, J., Lim, J.-A., Yu, J.-G., and Oh, C.-S. 2018. Genomic features and lytic activity of the bacteriophage PPPL-1 effective against *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, a cause of bacterial canker in kiwifruit. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(9):1542-1546
(주관연구팀에서 키위 궤양병 방제용 PPPL-1 파지의 유전체 정보 및 활성 관련 결과들을 보고한 논문임.)
- (2) Park, J., Lee, G. M., Kim, D., Park, D. H., and Oh, C.-S. 2018. Characterization of the lytic bacteriophage phiEaP-8 effective against both *Erwinia amylovora* and *Erwinia pyrifoliae* causing severe disease in apple and pear. *Plant Pathology Journal*, 34(5):445-450
(주관연구팀에서 과수 화상병 방제용 phiEaP-8 파지의 분리, 특성 조사, 그리고 유전체 정보 관련 결과들을 보고한 논문임.)
- (3) Vu, N. T. and Oh, C.-S. 2020. Bacteriophage usage for bacterial disease management and diagnosis in plants. *Plant Pathology Journal*, 36(3):204-217
(주관연구팀에서 파지를 식물에서 병 방제 및 병원균 진단에 활용한 예들을 종합 정리하여 특성 및 향후 필요 연구내용들을 보고한 논문임.)
- (4) Rahimi-Midani, A., Kim, J.-O., Kim, J. H., Lim, J., Ryu, J.-G., Kim, M.-K., and Choi, T.-J. 2020. Potential use of newly isolated bacteriophage as a biocontrol against *Acidovorax citrulli*. *Archives of Microbiology*, 202:377-389
(제1협동연구팀에서 수박 과실썩음병 방제용 파지 분리, 특성 조사, 그리고 방제 효과 검정 결과들을 보고한 논문임)
- (5) Rahimi-Midani and Choi, T.-J. 2020. Transport of phage in melon plants and inhibition of progression of bacterial fruit blotch. *Viruses* 12, 477; doi:10.3390/v12040477
(제1협동연구팀에서 수박 과실썩음병 방제용 파지의 토양 처리 후 멜론 식물로의 전이 및 방제 효과 검정 결과들을 보고한 논문임)

나. 비SCI 논문

- (1) 이영선, 김경희, 송유림, 오창식, 고영진, 정재성. 2020. 국내에서 분리된 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* 균주들의 스트렙토마이신 저항성. *Research In Plant Disease*, 26: 44-47
(주관연구팀에서 순천대학교 연구팀과 공동으로 국내에서 분리된 키위궤양병균 중 일부가 streptomycin 항생제에 저항성을 보인다는 결과를 보고한 논문임.)

2. 특허 출원/등록

가. 특허 등록

- (1) 대한민국 특허, 과수 화상병 세균에 효과적인 신규한 박테리오파지 EaP-8 및 이의 용도. 2019.09.19. 경희대학교 산학협력단(주관), 등록번호: 10-2025403.
- (2) 대한민국 특허, 과수 화상병 세균에 효과적인 신규한 박테리오파지 EaP-21 및 이의 용도. 2019.09.19. 경희대학교 산학협력단(주관), 등록번호: 10-2025411
- (3) 대한민국 특허, 신규 박테리오파지 ACPWH 및 이의 용도. 2019.08.05. 부경대학교 산학협력단(제1협동), 등록번호: 10-2009174
- (4) 대한민국 특허, 신규 박테리오파지 ACP17 및 이의 용도. 2018.08.07. 부경대학교 산학협력단(제1협동), 등록번호: 10-1887987

나. 특허 출원

- (1) 대한민국 특허, 과수 화상병 세균에 효과적인 신규한 박테리오파지 EaP-8 및 이의 용도. 2018.04.27. 경희대학교 산학협력단(주관), 출원번호: 10-2018-0049051
- (2) 대한민국 특허, 과수 화상병 세균에 효과적인 신규한 박테리오파지 EaP-21 및 이의 용도. 2018.04.27. 경희대학교 산학협력단(주관), 출원번호: 10-2018-0049052
- (3) 대한민국 특허, 신규 박테리오파지 ACPWH 및 이의 용도. 2018.06.15. 부경대학교 산학협력단(제1협동), 출원번호: 10-2018-0068700
- (4) 대한민국 특허, 신규 박테리오파지 ACP17 및 이의 용도. 2017.08.22. 부경대학교 산학협력단(제1협동), 출원번호: 10-2017-0106150
- (5) 대한민국 특허, 배추 무름병 세균에 효과적인 신규한 박테리오파지 phiPccP-1 및 이의 용도, 2020.04.03. 경희대학교 산학협력단(주관), 출원번호: 10-2020-0041136

3. 기술이전

- (1) 박테리오파지를 이용한 가지과 작물 풋마름병 방제기술. 동아대학교 산학협력단(제2협동), 고려바이오(주)로 유상 노하우 기술이전, 2019.10.28. 기술료 1,000,000원, 통상실시권
- (2) 수박 과실썩음병 방제용 박테리오파지 기술이전, 부경대학교 산학협력단(제1협동), 고려바이오(주)로 유상 특허 기술이전, 2020.09.25. 기술료 4,000,000원, 전용실시권
- (3) 과수 화상병 방제용 박테리오파지 기술이전, 경희대학교 산학협력단(주관), 고려바이오(주)로 유상 특허 기술이전, 2020.11.26. 기술료 4,000,000원, 통상실시권

4. 시제품

- (1) 과안제: 수박 과실썩음병 방제용 박테리오파지를 유효성분으로 하는 병해관리용 유기농업자재 시제품. 2020년 12월. 고려바이오(주)(제3협동)와 부경대(제1협동)
- (2) 배무: 배추 무름병 방제용 박테리오파지를 유효성분으로 하는 병해관리용 유기농업자재 시제품. 2020년 12월, 고려바이오(주)(제3협동)와 경희대(주관)
- (3) 참깨: 키위 껍질병 방제용 박테리오파지를 유효성분으로 하는 병해관리용 유기농업자재 시제품. 2020년 12월, 고려바이오(주)(제3협동)와 경희대(주관)
- (4) 풋안제: 토마토 풋마름병 방제용 박테리오파지를 유효성분으로 하는 병해관리용 유기농업자재 시제품. 2020년 12월, 고려바이오(주)(제3협동)와 동아대(제2협동)

5. 생명정보(생물자원과 생명정보)

- (1) 수박 과실썩음병 방제용 ACP17 파지: KCTC에 기탁. 부경대(제1협동), 2017.08.17. 기탁번호: KCTC18593P.
- (2) 수박 과실썩음병 방제용 ACPWH 파지 유전체 정보: GenBank에 등록. 부경대(제1협동), 2018.09.18. 등록번호: MH727593
- (3) 과수 화상병 방제용 phiEaP-8 파지: 한국미생물보존센터에 기탁. 경희대(주관), 2018.04.19. 기탁번호: KFCC11769P
- (4) 과수 화상병 방제용 phiEaP-21 파지: 한국미생물보존센터에 기탁. 경희대(주관), 2018.04.19. 기탁번호: KFCC11770P
- (5) 배추 무름병 방제용 phiPccP-1 파지: 한국미생물보존센터에 기탁. 경희대(주관), 2020.03.12. 기탁번호: KFCC11851P

6. 기타

- (1) 학술발표: 34건
- (2) 인력양성: 석사학위 4명
- (3) 고용창출: 1명, 제3협동
- (4) 전시회: 1회, 제3협동
- (5) 수상실적: 2020년도 한국식물병리학회 온라인학술대회 우수포스터상 수상, 주관

3장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

1절. 목표 달성도

1. 정성적 목표 달성도

(1) 1차년도

세부과제명	세부연구목표	목표 달성도	기술발전에의 기여도
키위 궤양병, 배추 무름병, 토마토 궤양병 방제용 파지 요법 기술 개발 (주관)	키위 궤양병 방제용 파지를 이용한 병 방제 효과 온실 검정 및 재배지에서의 병 방제 효과 검정 (위탁과제팀과 공동으로 진행)	온실 및 포장 조건에서 병 방제 효과 검정 100% 달성	파지 병방제효과 검정 기술 확보
	배추 무름병 방제용 파지 10개 이상 확보 및 특성 조사	무름병 파지 25개 이상 확보 및 특성 조사로 100% 달성	신규 파지 분리 기술 확보
	토마토 궤양병 방제용 파지 10개 이상 확보 및 특성 조사	토마토 궤양병 파지 분리 실패로 미달성	병원균 유전체 prophage 분석 필요성 제기
수박 과실썩음병 방제용 파지 요법 기술 개발 (제1협동)	균주 40개 이상 확보 및 특성 조사	총 42 개의 <i>A. citrulli</i> 균주를 확보하였음	파지 분리를 위한 균주 확보
	감염 파지 10 균주 이상 확보 및 특성 조사	총 121개의 <i>A. citrulli</i> 감염 파지를 분리 확보	파지를 이용한 수박 과실썩음병의 방제를 위한 파지 확보
	분리된 파지를 이용한 방제효과 온실 검정	수박과 멜론에 대한 종자처리에 의한 예방 효과 및 발병 후 치료 효과 검증	종자 코팅용 및 포장 처리용 시제품 개발에 활용 가능

<p>토마토 꽃마름병 방제용 파지 요법 기술 개발 (제2협동)</p>	<p>토마토 꽃마름병 방제용 파지의 추가확보와 기주범 위 분석</p>	<p>토마토 꽃마름병 방제용 파지 72종 분리, 기주범위 분석 후 추가연구 위한 6종 선발 (100% 달성)</p>	<p>다수의 신규 파지의 확보 분류기술 발전에 기여</p>
	<p>토마토 꽃마름병 방제용 파지의 농도별/종류별 꽃 마름병 방제효과 검증</p>	<p>토마토 꽃마름병 방제용 파지 6종의 꽃마름병 방제효과 검증 진행(100% 달성)</p>	<p>꽃마름병 방제용 파지 선발기술 발전에 기여</p>
<p>주요 식물세균병 방제용 파지요법 기술 검증 및 실용화 (제3협동)</p>	<p>파지의 제제화 고려요인 분석</p>	<p>파지 대량증식용 배지, 기주세균 제거 및 제형화 과정 분석을 통해 액상제형 결정(100% 달성)</p>	<p>제제화 시 원료성분에 대한 다양한 고려요인 분석</p>
	<p>보조제 선발</p>	<p>보조제(효력증진제, 계면활성제, 자외선차단제, 분산제, 물성안정제) 선발(100% 달성)</p>	<p>제품화 시 파지 안정성 확보 기술 개발</p>
	<p>제제화 및 제형화 공정 최 적화</p>	<p>파지와 선발된 보조제의 적적투입농도 결정 및 유화상태, 이화학적 안정성 확인(100% 달성)</p>	<p>파지를 이용한 제제화 및 제형화 기술 발전</p>

(2) 2차년도

세부과제명	세부연구목표	목표 달성도	기술발전예의 기여도
키위 궤양병, 배추 무름병, 토마토 궤양병 방제용 파지 요법 기술 개발 (주관)	키위 궤양병 방제용 파지 테라피 최적화 (위탁과제팀과 공동 진행)	최적 파지 선정 및 효과 검정 완료로 100% 달성	과수작물에서의 파지 방제효과 검정 기술 확보
	파지 처리 후 미생물상의 변화 분석(제2협동연구팀과 공동 진행)	분석 완료로 100% 달성	토양내 마이크로바이옴 양상 분석 기술 확보
	배추 무름병 방제용 파지의 방제효과 온실 검정	선별된 파지를 이용하여 배추잎에서 방제 효과 검정 완료로 100% 달성	배추에서 파지 병 방제효과 검정 기술 확보
	토마토 궤양병 방제용 파지의 방제효과 온실 검정	토마토 궤양병 파지 분리 실패로 미달성	병원균 유전체 prophage 분석 필요성 제기
수박 과실썩음병 방제용 파지 요법 기술 개발 (제1협동)	수박 과실썩음병 대상 파지의 처리 시기 및 처리 방법의 최적화	파지 CP17과 ACPWH의 혼합 코팅에 방제효과 증진 확인 및 토양 및 감염 후 처리의 효과 검증 (100% 달성)	제품 개발 시 처리법에 대한 정보로 활용
	수박 과실썩음병 파지 제재화 고려요인의 효과 분석	제재화 물질에 대한 종자 및 파지의 안정성을 조사 및 제재화 여부에 따른 바이러스의 안정성 분석 완료 (100% 달성)	파지 제재의 기존 조건을 확립함
토마토 풋마름병 방제용 파지 요법 기술 개발 (제2협동)	토마토 풋마름병 방제용 파지의 처리방법 최적화	선발한 토마토 풋마름병 방제용 파지의 처리시기, 밀도 분석으로 최적밀도와 치료효과 예방효과 확인함 (100% 달성)	파지 처리방법 최적화를 위한 평가기술 발전에 기여

	과지 혼합에 의한 방제효과 검정	과지 혼합을 위한 2종을 최종 선발하여 꽃마름병 방제효과 확인함 (100% 달성)	과지 혼합에 의한 꽃마름병 방제효과 평가기술 발전에 기여
주요 식물세균병 방제용 과지요법 기술 검증 및 실용화 (제3협동)	온도, 배양시간, 산업용 배지 등 생산최적화 조건 확립	과지 배양용 배지 선발 및 과지별 배양조건 확립(100% 달성)	과지 배양기술 확인
	과지별 대량생산 공정 최적화 확립	산업용 fermenter에서 과지별 배양조건 확립(100% 달성)	과지 산업용 배양기술 확립
	시제품 제조	시제품 배합 결정(100% 달성)	과지를 이용한 제품화 기술개발
	과지활성, 안정성 확인 / 개발제품 이화학적, 경시적 안정성 확인	개발제품의 경시적 과지 활성, 이화학적 안정성 확인완료(100% 달성)	미생물제제의 경시적 안정성 확보 기술개발

(3) 3차년도

세부과제명	세부연구목표	목표 달성도	기술발전에의 기여도
키위 궤양병, 배추 무름병, 토마토 궤양병 방제용 파지 요법 기술 개발	키위 궤양병 방제용 파지 시제품 제작 및 방제효과 검정	시제품 제작 완료 및 온실에서 방제 효과 검정 완료로 100% 달성	시제품 제작 관련 보조제 안전성 검정 기술 확립
	배추 무름병 방제용 파지 테라피 최적화	배추잎과 유묘에서 방제 효과 검정 완료로 100% 달성	유묘 조건에서 방제효과 검정 기술 확보
	배추 무름병 파지 처리 후 미생물상의 변화 분석((제2협동연구팀과 공동 진행)	분석 완료로 100% 달성	토양내 마이크로바이옴 분석 기술 확보
	과수 화상병 방제용 파지 테라피 최적화	파지의 환경조건 및 보조제에 대한 안정성 확인 및 파지처리 후 미생물상 분석 완료로 100% 달성	시제품 제작 관련 보조제 안전성 검정 기술 및 토양내 마이크로바이옴 분석 기술 확보
수박 과실썩음병 방제용 파지 요법 기술 개발	수박 과실썩음병 제재 시제품의 온실 실증 실험	2주 된 수박에 <i>A. citrulli</i> 를 접종하여 발병 후, 항생제, 파지 시제품 처리를 통하여 시제품의 효과를 확인하여 100% 달성	파지 방제제 효과 검증 기술 확보
	수박 과실썩음병 제재 시제품의 포장 실증 실험	시제품을 종자 코팅 후 포장 실험을 통하여 발아율과 생존율을 확인하는 실증실험 실시 (100% 달성)	시제품의 포장에서의 효능 검증
	파지 시제품을 이용한 멜론에서의 예방 및 치료 효과 검증	시제품의 효과 검증 완료(100% 달성)	파지 방제제 효과 검증 기술 확보
토마토 풋마름병 방제용 파지 요법 기술	선발파지 및 파지 혼합에 의한 방제효과 검정	파지 2종 혼합 후 밀도별 방제효과 분석 완료(100% 달성)	파지 혼합하여 병 방제 최적화 평가기술 발전에 기여

개발	토마토 풋마름병 방제용 파지의 저장성 검정	파지 3종의 용균액, 온도별 안정성 분석(100% 달성)	파지 안정성 분석 평가기술 발전에 기여
주요 식물세균병 방제용 파지요법 기술 검증 및 실용화	시제품의 농가실증시험1	시제품 2종의 농가실증시험을 통한 최적 적용방법 확립(100% 달성)	시제품의 농가 적용방법 확립 완료
	제품화를 위한 공인기관시험1	시제품의 주성분 분석, 독성평가, 약해평가 및 잔류농약검사(일부시험 진행 중, 70% 달성)	시제품 안전성 확인
	사업화 연구1	국내외 전시회 홍보, 사업성·경제성 분석, 경쟁제품군과의 비교평가(100% 달성)	시제품 홍보 및 비교평가 완료

(4) 4차년도

세부과제명	세부연구목표	목표 달성도	기술발전에의 기여도
키위 궤양병, 배추 무름병, 토마토 궤양병 방제용 과지 요법 기술 개발 (주관)	키위 궤양병 방제용 과지 처리 후 검정(제3협동팀과 공동 진행)	노출 환경, 저장 온도별 안정성 확인으로 100% 달성	과지 시제품의 저장, 유통 시 활성 검정 기술 확보
	병행요법에 의한 방제 효과 개선 분석	항생제 저항성 균주에 대한 효과 검정 완료로 100% 달성	과지의 활용범위 확대
	배추 무름병 방제용 과지 시제품 제작 및 검정(제3협동팀과 공동 진행)	과지의 환경조건 및 보조제에 대한 안정성 확인으로 시제품 제작 완료로 100% 달성	시제품 제작 관련 보조제 안전성 검정 기술 확보
	과수화상병 방제용 과지 방제효과 검정	실험실 조건에서 방제 효과 검정 진행 중으로 50% 정도 달성	검역금지균의 방제효과 검정 시 고려사항 확인
수박 과실썩음병 방제용 과지 요법 기술 개발 (제1협동)	수박 과실썩음병 방제용 과지 시제품의 안정성 검증	제재의 다양한 온도, pH, 식물 표면 및 햇빛 노출 조건에서의 안정성을 확인하여 100% 달성	제재의 다양한 환경 조건에서의 안정성을 확인함
	병행 요법에 의한 방제 효과 향상	제제와 항생제의 복합처리에 의한 방제효과 증진을 확인하여 100% 달성	복합처리에 의한 처리 효과 증진의 자료를 제공함
토마토 풋마름병 방제용 과지 요법 기술 개발	토마토 풋마름병 방제용 과지의 저장성 검정	과지 3종의 산도별, 보조제 첨가 안정성 분석(100% 달성)	과지 안정성 분석 평가기술 발전에 기여

(제2협동)	토마토 풋마름병 방제용 파지의 토양 생존률 검정	파지 2종의 3종 토양에서 생존률 분석완료 (100% 달성)	파지의 토양 생존 평가기술 발전에 기여
주요 식물세균병 방제용 파지요법 기술 검증 및 실용화 (제3협동)	시제품의 농가실증시험 2	시제품의 농가실증시험을 통한 최적 적용방법 확립 완료(100% 달성)	시제품의 농가 적용방법 확립 완료
	제품화를 위한 공인기관시 험 2	시제품의 주성분 분석, 독성평가, 약해평가 및 잔류농약검사(진행 중, 미달성)	시제품 안전성 확인
	제품화 및 사업화 연구 2	제품화 (미달성), 경쟁제품군과의 비교평가 완료(100% 달성)	파지 제품화를 위한 등록기준 필요성 제기

2. 정량적 목표 달성도

성과 목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍 보		기 타 (타 연 구 활 용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논 문		학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
												SC I	비 SC I						
단위	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건		
가중치	10	15		15		30							15		15				
최종목 표	3	3		3		5						3	5		8		4		
1 차 년 도	목 표	1													2				
	실 적	1													3		1	1	
2 차 년 도	목 표	2										1	1		2		1		
	실 적	3	1						1			2			15		1	4	
3 차 년 도	목 표		1		1		2					1	2		2		1		
	실 적		3		1	1	0					0	0		12		2		
4 차 년 도	목 표		2		2		3					1	2		2		2		
	실 적	1			2	8	4					3	1		4		0	1	
소 계	목 표	3	3		3		5					3	5		8		4		
	실 적	5	4		3	9	4		1			5	1		34		4	6	
달성도 (%)	16 6	13 3		10 0		80						16 6	20		42 5		10 0		

2절. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

1. 토마토 궤양병 방제용 파지 확보

토마토 방제용 파지의 경우 1,2차년도에 다양한 환경에서 분리를 진행하였으나 실패하였다. 토마토 궤양병균의 유전체를 분석한 결과 prophage 흔적이 거의 발견되지 않았다. 따라서 2차년도까지 연구를 진행하고 중단을 결정하였다. 그럼에도 불구하고 미국의 Omnilytics 회사에서 토마토 궤양병균 방제용 파지 제품 1개가 시판 중이다. 이는 토마토 궤양병균 대상 파지가 존재할 가능성이 있음을 시사한다. 따라서 과제 종료 이후에도 보다 토양, 물, 식물 샘플 등 보다 다양한 환경에서 분리를 지속적으로 시도할 계획이다.

2. 박테리오파지를 이용한 제품의 국내 등록 기준 마련 필요

국내에 박테리오파지를 이용한 농자재가 등록된 이력이 전무하며, 그 기준 또한 마련되어 있지 않은 실정이다. 본 과제를 통해 개발된 시제품을 공인기관시험을 진행하여 병해관리용 유기농업자재로 공시하고자 하였으나 박테리오파지를 증식하기 위해 기주병원균을 사용하면 유기농업자재 공시 기준에 적합하지 않다는 의견을 받아 등록을 완료하지 못했다. 최근 본 과제의 주관기관 연구팀에 의해 키위 궤양병파지가 기주병원균이 아닌 비병원성 토양 미생물로 증식이 가능하다는 사실이 밝혀졌으며, 해당 시제품을 등록하기 위해 유기농업자재 공시기관 등 관련기관들과 협의 중이다. 다만, 박테리오파지 관련 등록기준을 신설해야하므로 적지 않은 시간이 소요될 것으로 예상된다.

3. 비SCI 논문 출판

정량적 성과 목표로 비SCI논문 5편이 계획되어 있었는데, 1편만 출판하였다. 대신에 SCI 논문의 경우 3편이 계획되어 있었는데, 5편을 출판하였다. 4장의 연구결과 활용방안에도 기술하였듯이 현재 적어도 4편의 논문이 SCI 저널에 투고되어 리뷰가 진행 중이다. 부족한 비SCI 논문을 SCI 논문으로 대체하여, 현재 출판된 5편의 논문 포함 총 9편의 논문 출판을 과제 종료후에 완료할 계획이다.

4장. 연구결과의 활용 계획 등

1절. 연구성과 활용분야 및 활용방안

1. 배추 무름병 방제용 파지 중 특허출원된 파지를 제외한 다른 파지들의 경우 일부는 기주범위가 다르거나 넓은 것들이 있어 이들 파지를 파지 칵테일 형태의 시제품 개발에 활용할 수 있을 것이다. 또한, 대상 병원균의 receptor 규명을 통해 파지 칵테일 제작 시 활용할 수 있을 것이다.
2. 배추 무름병 방제용 파지 연구 결과 논문이 “Phage therapy of soft rot caused by *Pectobacterium odoriferum* with bacteriophage phiPccP-1 in Korean cabbage”란 제목으로 현재 SCI급 국제학술지에 현재 투고되어 심사 중에 있어 향후 논문 성과 증대에 활용될 것이다. 또한, 키위 궤양병 방제용 파지의 온실과 포장 조건에서의 방제효과 검증 연구 결과도 논문으로 작성되어 “Phage PPPL-1, a new biological agent to control bacterial canker caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in kiwifruit”이란 제목으로 SCI급 국제학술지에 투고될 계획이다.
3. 수박 과실 썩음병을 일으키는 *A. citrulli*에 감염하는 121종의 파지를 분리하여 이 중 42종의 *A. citrulli*에 대하여 넓은 숙주범위를 가지는 ACP17과 ACPWH를 이용하여 종자 코팅용 제재 및 포장에서의 병발생 후에 치료제로 사용할 수 있는 시제품을 개발하여 기술이전을 함에 따라 앞으로 제품의 생산을 통한 질병 방제의 효과가 기대된다.
4. 제2협동연구를 통해 토마토 풋마름병 방제용 파지 RpY2는 기술이전 되었으나 RpT1과의 혼합파지로 활용성도 평가할 필요가 있다. 이는 두 파지를 혼합하였을 경우 병 방제효과가 우수할 뿐 아니라 파지에 대한 저항성을 획득하는 병원균의 출현을 현저히 감소시킬 수 있기 때문이다.
5. 제2협동연구의 성과는 2편의 SCI급 국제학술지로 추가 발표될 예정이다. 그 중 한편은 심사 중이며 심사 중인 논문이 게재 수락되면 2번째 논문을 제출할 계획이다.
6. 제2협동연구의 성과로 얻어진 토마토 풋마름병 방제용 파지 RpY2는 기술이전 되었으나 RpT1과의 혼합파지로 활용성을 위해 RpT1의 기술이전이나 제품화 연구, 또는 RpY2와 RpT1과의 혼합파지로 제품화 연구를 통한 기업화 추진이 필요하다.

2절. 추가 연구의 필요성

1. 토마토 궤양병 방제용 파지의 경우 분리에 실패하였는데, 미국의 예를 보면 대상 병원균에 대한 파지 1종이 보고되어 있다. 따라서 보다 다양한 장소에서 파지 분리를 재시도하는 연

구가 필요할 듯 하다. 또한, 토마토 궤양병균의 경우 유전체 분석 결과를 보면, prophage가 거의 존재하지 않는 것으로 나타났는데, 그 원인에 대한 분석도 추가로 필요하다.

2. 3차년도부터 추가된 과수 화상병 파지의 경우 아직 방제효과 검증이나 시제품 제작 관련 연구가 충분치 않아 추가로 시제품 제작을 위한 다양한 연구들이 필요하다.
3. *A. citrulli*에 감염하는 121종의 파지 중 2개만을 선별하여 효과 검증 및 시제품 제작에 활용하였으며, 병원균의 저항성 획득 여부에 따라 기존에 분리된 파지 중 다른 파지 또는 추가적인 분리를 통하여 억제력이 우수한 파지를 추가 확보하여 혼합 적용함으로써 방제 효율을 높이고 개발된 제품의 장기적인 이용이 가능하도록 할 필요가 있다
4. 제2협동연구를 통해 토마토 풋마름병 방제용 파지를 발굴하여 개발하는 연구를 수행하였는데 기업화를 위한 제품개발단계의 연구, 파지의 생태계에서 미치는 영향 등에 대한 연구가 추가될 필요가 있다. 뿐만 아니라 파지를 이용한 식물 병 방제 요법은 환경친화형 작물재배에 매우 활용가치가 우수하므로 다양한 파지를 추가 분리하고 혼합형 파지 제제로 개발하는 연구가 필요하다.
5. 토마토 풋마름병을 파지를 이용한 방제의 경우 파지 제제를 제품화 한 이후의 제품의 안정성과 실제 농가 포장에 처리하기 위한 최적 처리방법에 대한 포장실험이 진행되어야 한다. 그러나, 풋마름병의 상습발병지의 균일한 발병을 예측하기 용이하지 않아 매우 어려운 연구이나 이는 기업체가 최종 제품으로 여러 회 반복 연구하여 그 유용성이 판단될 수 있을 것으로 여겨진다.

3절. 타 연구에의 응용

1. 여러 가지 파지 처리 후 토양 미생물상 변화를 분석하였는데, 파지에 의한 영향은 미미한 것으로 나타났다. 개별 파지 처리에 의한 변화 분석이 아닌 토양내 파지군에 의한 토양내 미생물상 구조에 대한 분석 관련 연구에 응용될 수 있다.
2. 본 연구과제에서 대상으로 한 식물세균병 이외의 다양한 식물세균병에도 파지를 활용한 파지테라피 기술 확립 관련 연구에 응용될 수 있다.
3. 본 연구를 통해 토마토 풋마름병 방제용 파지를 발굴하여 개발하는 연구를 수행한 결과는 토양 전염성 식물 병 방제에 파지와 바이러스를 활용할 가능성을 제시한다. 특히 토양 전염성 세균병에는 파지를 토양 전염성 진균병에는 진균을 감염하는 바이러스를 이용하는 연구에 본 연구결과가 응용될 수 있다.
4. 본 연구과제의 주요 주제는 파지를 활용한 병방제제 개발인데, 파지는 식물병원세균의 진단에도 응용가치가 매우 높다. 파지의 높은 기주특이성은 특정 식물병원세균을 진단하는 기술

혹은 센서 개발에도 응용될 수 있다.

4절. 기업화 추진방안

1. 시장진입전략

고려바이오(주)는 전국 13개의 사업본부와 100여개의 대리점으로 구성된 국내 유통망을 보유하고 있으며, 다양한 생물농약, 유기농업자재 및 기타농자재를 다년간 판매하고 있어 본 연구에서 개발된 제품의 시장진입에 매우 용이할 것으로 판단된다. 본 과제의 시험 결과물을 사업본부 및 대리점에 홍보하고 대상작물 주요 재배지의 농업기술센터, 농협, 작목반에 대한 홍보 및 세미나 등을 계획하고 있다.

2. 판로확보 및 마케팅 계획

개발제품에 대한 등록이 완료되는 대로 다양한 지원사업을 통해 판매할 수 있도록 할 계획이며, 고려바이오(주)에서 보유하고 있는 국내 유통망을 통해 내수판매를 활성화하고 국가농업기관들과 연계하여 현장평가 및 적용 확대를 실시하여 사용 농가와의 접촉기화 확대와 객관적 효과 검증 자료를 추가 확보할 예정이다. 또한, 국내외 전시회 참가 및 홍보를 통해 해외시장까지도 개척하고자 하며, 기존 수출국(페루, 필리핀, 말레이시아 등)을 비롯하여 친환경 농산물을 생산하는 국가에 수출을 모색하고 수출관련 유관기관의 연계 또는 협조를 받아 수출 확대를 계획하고 있다.

3. 사업화 계획

	사업화 년도		
	제품등록 후 1년	제품등록 후 2년	제품등록 후 3년
사업화 제품	4종	4종	4종
투자계획(백만원)	50	70	100
판매계획 (백만원)	내수	70	120
	수출	-	10
	계	70	130
수입대체효과(백만원)	30	60	120
고용창출(명)	1	1	2

붙임. 참고문헌

- Ellis, E. L., & Delbruck, M. (1939). The growth of bacteriophage. *Journal of General Physiology*, 22(3), 365-384.
- Buttimer C, McAuliffe O, Ross RP, Hill C, O'Mahony J, Coffey A. (2017) Bacteriophages and Bacterial Plant Diseases. *Front Microbiol.* 20(8): 34.
- Francis, F., Miller, R., & Nagra, M. (2017). Phage overlay assay for quantification of infectious bacteriophage particles. *JEMI Meth*, 1, 18-21.
- García-Anaya, M. C., Sepúlveda, D. R., Rios-Velasco, C., Zamudio-Flores, P. B., Sáenz-Mendoza, A. I., & Acosta-Muñiz, C. H. (2020). The role of food compounds and emerging technologies on phage stability. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 102436.
- Kim GH, Kim KH, Son KI, Choi ED, Lee YS, Jung JS, Koh YJ. (2016) Outbreak and Spread of Bacterial Canker of Kiwifruit Caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* Biovar 3 in Korea. *Plant Pathol J.* 32(6): 545-551.
- Koh YJ, Kim GH, Jung JS, Lee YS, Hur JS. (2010) Outbreak of Bacterial Canker on Hort16A (*Actinidia chinensis* Planchon) caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Korea. *N. Z. J. Crop Hortic. Sci.* 38(4): 275-282.
- Kubota, M., Hagiwara, N., & Shirakawa, T. (2011). A method to evaluate percentage of cucurbit seeds infested with *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, pathogen of bacterial fruit blotch *Journal of General Plant Pathology*, 77(2), 112-115.
- Lee JH, Kim JH, Kim GH, Jung JS, Hur JS, Koh YJ. (2005) Comparative Analysis of Korean and Japanese Strains of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* Causing Bacterial Canker of Kiwifruit. *Plant Pathol J.* 21(2):119-126.
- Myung IS, Kim DG, An SH, Lee YK, Kim WG. (2008) First Report of Bacterial Canker of Tomato Caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in Korea. *Plant Dis.* 92(10): 1472.
- Pal KK, Gardener BMS. (2006) Biological Control of Plant Pathogens. The Plant Health Instructor DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.
- Park J, Lee GM, Kim D, Park DH, Oh CS. (2018) Characterization of the Lytic Bacteriophage phiEaP-8 Effective against Both *Erwinia amylovora* and *Erwinia pyrifoliae* Causing Severe Diseases in Apple and Pear. *Plant Pathol J.* 34(5): 445-450.
- Peeters N, Guidot A, Vaillau F, Valls M. (2013) *Ralstonia solanacearum*, a Widespread Bacterial Plant Pathogen in the Post-genomic era. *Mol Plant Pathol.* 14(7): 651-62.
- Pires DP, Cleto S, Sillankorva S, Azeredo J, Lu TK. (2016) Genetically Engineered Phages: a Review of Advances over the Last Decade. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1:80(3): 523-543.
- Pohronezny K, Sommerfeld, ML, Raid RN. (1994) Streptomycin resistance and copper tolerance among strains of *Pseudomonas cichorii* in celery seedbeds 78(2): 150-153.
- Song JY, Seo MW, Lim HS, Lee YS. (2015) Genetic Characteristics of *Acidovorax citrulli*

Population causing Bacterial Fruit Blotch against Cucurbits in Korea. *Research in Plant Disease* 21:82-88.

Vu, N. T., & Oh, C. S. (2020). Bacteriophage Usage for Bacterial Disease Management and Diagnosis in Plants. *The plant pathology journal*, 36(3), 204.

Yuliar, Nion YA, Toyota K. (2015) Recent Trends in Control Methods for Bacterial wilt Diseases caused by *Ralstonia solanacearum*. *Microbes Environ.* 30(1): 1-11.

Zhao, M., and Walcott, R. R. (2018). “*Acidovorax citrulli*: History, Epidemiology, and Management of Bacterial Fruit Blotch of Cucurbits,” in *Plant Pathogenic Acidovorax Species*, eds S. Burdman and R. R. Walcott (St. Paul, MN: American Phytopathological Society Press), 39 - 57.

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 파지테라피를 이용한 중요 식물세균병 제어법 개발 및 실용화				
	(영문) Development and commercialization of phage therapy to control plant disease caused by plant-pathogenic bacteria				
주관연구기관	경희대학교산학협력단		주 관 연 구 책 임 자	(소속) 경희대학교 생명과학대학	
참 여 기 업	고려바이오(주)			(성명) 오창식	
총연구개발비 (1,500,000 천원)	계	1,500,000천원	총 연 구 기 간	2017.04. ~ 2020.12.(3년 9월)	
	정부출연 연구개발비	1,125,000천원	총 연 구 원 수	총 인 원	95
	기업부담금	375,000천원		내부인원	20
	연구기관부담금			외부인원	75
<p>○ 연구개발 목표 및 성과 연구 주요 목표는 파지요법을 이용하여 식물병원세균에 의한 5개의 중요 식물세균병 방제 기술 개발 및 제품화에 있다. 주요 성과로는 키위 궤양병, 수박 과실썩음병, 토마토 풋마름병, 배추 무름병 등 4개의 식물세균병 방제용 파지 시제품 4개를 개발하였다. 또한, 특허등록 4건과 특허출원 5건, 기술이전 3건도 달성하였다.</p> <p>○ 연구내용 및 결과 주요 연구내용으로는 키위 궤양병, 수박 과실썩음병, 토마토 풋마름병, 배추 무름병 방제용 박테리오파지 다량 확보 및 특성 규명을 진행하였고, 선별된 박테리오파지들이 대상 식물세균병에 대해 온실과 포장 조건에서 우수한 방제효과를 규명하였다. 또한, 방제효과 검정 시 토양관주, 엽면살포, 종자처리 등 여러 가지 처리방법으로도 효과가 유지됨을 규명하였다. 대상 박테리오파지들이 대상 작물들의 주요 재배지 환경조건하에서의 안정성 확인을 위해 온도, 산도, 자외선 노출 등 환경조건에 대한 안정성을 확인한 결과 활성이 매우 안정하게 유지됨을 확인하였다. 시제품 제작 시 다양한 보조제가 사용되는데, 이들에 대한 안정성 또한 확인하였는데, 대부분의 보조제 성분들에 활성이 안정함을 확인하였다. 대상 박테리오파지의 다량 처리 시 환경에 대한 안정성 확인을 위해 토양 처리 후 토양 미생물상 변화를 분석한 결과 미생물상에 미치는 영향이 거의 없음을 확인하였다.</p> <p>○ 연구성과 활용실적 및 계획 본 과제의 연구결과들을 활용하여 SCI 논문 5편과 KCI논문 1편 출판을 출판하였고, 현재 4편의 논문을 추가로 작성하여 투고를 진행 중에 있다. 또한, 연구결과들을 다양한 학술대회에서 총 34건의 학술발표에 활용되었다. 향후 파지각테일에 의한 방제효과 증대 및 기술이전 등에 활용될 것이다. 파지를 종자코팅제나 예방제로서의 가능성과 더불어 치료제로서의 가능성 연구에도 활용될 것이다.</p>					

[별첨 2]

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호		317012-4	
사업구분	농림축산식품 연구개발사업사업				
연구분야	농림축산식품분야		과제구분	단위	
사업명	농생명산업기술개발사업			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	과지테라피를 이용한 중요 식물세균병 제어법 개발 및 실용화		과제유형	개발	
연구기관	경희대학교산학협력단		연구책임자	오창식	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2017.04-12	225,000	75,000	300,000
	2차연도	2018.01-12	300,000	100,000	400,000
	3차연도	2019.01-12	300,000	100,000	400,000
	4차연도	2020.01-12	300,000	100,000	400,000
	5차연도				
	계				
참여기업	고려바이오(주)				
상대국		상대국연구기관			

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2021. 01. 12

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
경희대학교 생명과학대학	교수	오창식

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확약	
-----------	--

I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

식물세균병 4종류에 대해 파지를 활용한 유기농업자재 시제품 개발까지 완료함. 국내에서도 파지 관련 연구는 진행되어져 왔으나, 본 연구결과는 국내에서 최초임.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

식물세균병 방제에 주요 사용되는 기존 항생제에서 벗어나 친환경적인 항생제 대체 혹은 병행처리로 항생제 사용 감소를 유도할 수 있을 것으로 보여, 새로운 식물세균병 방제방제 전략 수립에 파급효과가 클 것으로 보임.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

파지를 이용한 다양한 식물세균병 방제제 개발에 본 연구결과 및 기술들이 활용될 것으로 보이며, 향후 친환경 식물세균병 방제제 관련 사업화에도 활용될 것으로 보임.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본래 계획한 연구내용을 대부분 달성할 정도로 모든 세부/협동 연구팀들이 성실하게 연구를 수행했다고 판단됨.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

4년간 SCI논문 5편, 특허등록 4건, 특허등록 5건, 기술이전 3건(총기술료: 9백만원), 학술대회발표 34건 등을 달성하였음. 연구비 규모 대비 이러한 성과달성은 매우 우수한 것으로 판단됨.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
키위 궤양병 방제용 파지 제품 1개 이상 개발	20	100	계획대로 잘 달성됨.
수박 과실썩음병 방제용 파지 10개 이상 신규 확보 및 제품 1개 이상 개발	25	100	계획대로 잘 달성됨.
토마토 풋마름병 방제용 파지 제품 1개 이상 개발	20	100	계획대로 잘 달성됨.
배추 무름병 방제용 파지 10개 이상 신규 확보 및 제품 1개 이상 개발	25	100	계획대로 잘 달성됨.
토마토 궤양병 방제용 파지 10개 이상 신규 확보 및 제품 1개 이상 개발	10	30	외국의 경우 제품 1건이 보고되어 있어 파지 분리 및 연구가 가능할 것으로 계획했으나 파지 분리 자체를 실패함. 따라서, 2차년도 이후에 연구내용을 과수 화상병 파지 연구로 변경하여 진행함.
합계	100점		

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

전체적으로 연구 계획 대비 연구가 잘 진행된 것으로 보임. 연구결과를 바탕으로 한 정성적인 연구성과와 더불어 정량적 성과도 계획대비 잘 달성된 것으로 보임.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

토마토 궤양병 방제용 파지 연구의 경우 파지 분리 실패로 연구내용을 변경하게 되었는데, 이는 병원세균이 갖는 유전적인 특성으로 보임. 대신에 3,4차년도에 다른 식물세균병으로 대체하여 연구를 진행하여 충분한 결과를 얻었음. 따라서 이 부분에 대한 고려가 필요할 것으로 보임.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

연구결과들은 향후 논문과 다른 형태의 시제품 제작 등에 활용될 것임. 또한, 시제품들이 실제 제품으로 출시될 수 있도록 관련 법규 정비도 제안할 것임.

IV. 보안성 검토

o 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

--

2. 연구기관 자체의 검토결과

--

[별첨 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	농림축산식품분야	
연구과제명	파지테라피를 이용한 중요 식물세균병 제어법 개발 및 실용화			
주관연구기관	경희대학교산학협력단		주관연구책임자	오창식
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	1,125,000,000	375,000,000		1,500,000,000
연구개발기간	2017.04.21. - 2020.12.31			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(특허, 논문 등) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 키위 궤양병 방제용 파지 제품 1개 이상 개발	시제품 1개를 개발하여 100% 달성하였음.
② 수박 과실썩음병 방제용 파지 10개 이상 신규 확보 및 제품 1개 이상 개발	파지 40개 이상 확보하고, 시제품 1개를 개발하여 100% 달성하였음.
③ 토마토 풋마름병 방제용 파지 제품 1개 이상 개발	시제품 1개를 개발하여 100% 달성하였음.
④ 배추 무름병 방제용 파지 10개 이상 신규 확보 및 제품 1개 이상 개발	파지 20개 이상 확보하고, 시제품 1개를 개발하여 100% 달성하였음.
⑤ 토마토 궤양병 방제용 파지 10개 이상 신규 확보 및 제품 1개 이상 개발	외국의 경우 제품 1건이 보고되어 있어 파지 분리 및 연구가 가능할 것으로 계획했으나 파지 분리 자체를 실패함. 따라서, 2차년도 이후에 연구내용을 과수 화상병 파지 연구로 변경하여 진행

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기 타 (타 연 구)
												논문		학 술	정 책			홍 보		
	특 허	특 허	품 종	건 수	기 술	제 품	매 출	수 출	고 용	투 자	SC I	비 SC	논 문			정 책	홍 보			

	출원	등록	등록	료	화	액	액	창출	유치		I	평균 IF	발표		활용	전시	활용 등)
단위	건	건	건	건	백만 원	백만 원	백만 원	백만 원	명	백만 원	건	건	건	건	명	건	건
가중치	10	15		15	30								15		15		
최종목표	3	3		3	5						3	5	8		4		
연구기간내 달성실적	5	4		3	9	4		1			5	1	34		4		6
달성율(%)	166	133		100	80						166	20	425		100		

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	키위 궤양병 방제용 친환경 파지 유기농업자재
②	수박 과실썩음병 궤양병 방제용 친환경 파지 유기농업자재
③	토마토 풋마름병 방제용 친환경 파지 유기농업자재
④	배추 무름병 방제용 친환경 파지 유기농업자재

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장에로 해결	정책 자료	기타
①의 기술		v				v	v	v		
②의 기술	v					v	v	v		
③의 기술		v					v	v		
④의 기술		v				v	v	v		

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	제품 등록 완료로 병 방제에 활용, 친환경적인 방법으로 방 발생 감소 기대
②의 기술	제품 등록 완료로 병 방제에 활용, 친환경적인 방법으로 방 발생 감소 기대
③의 기술	제품 등록 완료로 병 방제에 활용, 친환경적인 방법으로 방 발생 감소 기대
④의 기술	제품 등록 완료로 병 방제에 활용, 친환경적인 방법으로 방 발생 감소 기대

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책활용	홍보전시	
												SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명				
가중치	10	15		15		30								15		15			
최종목표	3	3		3		5					3	5		8		4			
연구기간내 달성실적	5	4		3	9	4			1		5	1		34		4		6	
연구종료후 성과창출 계획		1					100				4								

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾			
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간		실용화예상시기 ³⁾	
기술이전시 선행조건 ⁴⁾			

- 1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성
- 2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리
통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리
- 3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등
- 4) 기술이전시 선행조건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발 사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발 사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.