

발간등록번호

11-1543000-000662-01

마늘 흑색썩음균핵병 방제를 위한
생물농약 개발 및 상품화

Development and product of biopesticides for control of
white rot on garlic

한국삼공(주)

농 립 축 산 식 품 부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “마늘 흑색썩음균핵병 방제를 위한 생물농약 개발 및 상품화” 과제의 보고서로 제출합니다.

2014 년 11 월 28 일

주관연구기관명 : 한국삼공(주)

주관연구책임자 : 정 창 국

세부연구책임자 : 정 창 국

연 구 원 : 박 은 희

연 구 원 : 박 매 솔

연 구 원 : 백 철 기

연 구 원 : 채 명 진

연 구 원 : 박 미 연

협동연구기관명 : 충청남도농업기술원

협동연구책임자 : 한 광 섭

협동연구기관명 : 호서대학교 GLP 센터

협동연구책임자 : 오 승 민

요 약 문

I. 제 목

마늘 흑색썩음균핵병 방제를 위한 생물농약 개발 및 상품화

II. 연구개발의 목적 및 필요성

마늘 흑색썩음균핵병은 1988년 고흥지방의 난지형 마늘포장에서 처음 발생하여 큰 피해를 주었는데, 봄에 기온이 상승함에 따라서 병징이 발현된다.(Kim et al., 2004). 또한, 양파, 파, 쪽파와 함께 최근에는 달래의 주산지에서도 피해가 확산되고 있으며, 한지형보다는 난지형에서, 논보다는 밭에서 피해가 크다(Kim et al., 2004).

마늘 흑색썩음균핵병은 토양 전염성 병원균의 일종으로(*Sclerotium cepivorum*) 흑색의 구형 또는 편구형 균핵을 형성하며 크기는 보통 0.5-0.6mm로서 다른 균핵병의 균핵보다 매우 작으며 생육적온은 15-20°C이고, 1°C에서도 균사생장이 가능하며 점염경로는 토양에서 균핵 상태로 존재하다가 파종과 함께 씨 마늘에 감염이 될 뿐만 아니라 농기구 등에 의해서도 가능하며, 환경이 불리하게 되면 휴면상태로 토양 중에 장기간 생존이 가능하게 되는데, 이러한 이유로 이 병의 방제가 더욱 어려운 실정이다. 국내에서 마늘 흑색썩음균핵병의 현실적 방제는 화학방제에 의존하고 있으며 종구소독약제인 베노람 수화제를 비롯하여 50종이 등록되어 있다. 이러한 화학적 방제는 마늘 흑색썩음균핵병에 효과적일 수 있으나, 지속적인 사용과 남용으로 인한 토양의 오염과 작물의 안전성에 대한 우려가 높아질 수밖에 없어 미생물을 이용한 생물학적 방제제의 개발 필요성이 대두 되고 있다. 외국의 경우 흑색썩균핵병에 대한 생물학적방제가 1969년부터 지금까지 활발히 이루어지고 있는데, 대표적인 개발 균주로는 *Coniothyrium minitans*, *Cheatonium globosum*, *Trichoderma hazianum*, *T. viride*, *T. koningii* 등이 있으나(Mclean et al., 2000; Clarkon et al., 2002), 등록되어 사용되는 생물농약은 없는 실정이며, 국내 또한 마찬가지다.

본 연구는 마늘의 안정적인 생산과 상품성을 높이기 위하여 마늘 흑색썩음균핵병에 대해 항균물질을 분비하는 *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 균주를 이용한 효과적인 방제기술 체계를 확립하고 생물농약 개발 및 상품화를 하는데 있다

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구개발의 내용은 마늘 흑색썩음균핵병 방제에 특별한 활성을 띠는 *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4균주의 항균활성물질의 동정, 대량배양법 확립, 제형 개발, 독성 및 안전성 평가시험, 품목등록을 위한 약효, 약해 시험을 포함하며 구체적인 연구내용과 범위는 다음과 같다.

1. 제 1세부

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2011)	대상균주의 대량배양 조건 확립	○제제화에 적합한 배양조건 확립 - 영양원, 총용량, 온도, rpm등의 탐색
	제형 및 처방 확립	○개발 제형에 맞는 부자재 선발 ○선발된 부자재에 따른 최적조합 결정 ○유효성분의 안정성 확보를 위한 조건 확립
	제품제조 및 이화학적 안정성 확인	○제품제조 ○제품의 이화학적 특성 확인 ○유효성분의 안정성 확인
	제품의 효과 검증	○농약품목등록 예비시험 실시 ○유효성분의 대상병해에 대한 효과 평가
2차 년도 (2012)	제품의 경시적 안정성 확인	○경시적 이화학 안정성 확인 ○온도변화에 따른 저장안정성 확인
	대량배양조건에 따른 안정화 방안 확립	○영양배지 추가선발 - Scale up(Fermenter)
	상품화 추진 (생물농약등록준비 1년차)	○생물농약품목등록 약효, 약해 시험(1년차) ○제품의 이화학분석 시험 ○제주와 전남지역에서 약효 실증시험 실시
	친환경유기농자재 목록공시 신청	○친환경유기농자재 목록공시 신청
	미생물제제의 적용확대	○양파 흑색썩음균핵병 적용확대 검토
3차 년도 (2013)	제품의 경시적 안정성 확인	○경시적 이화학 안정성 확인 ○온도변화에 따른 저장안정성 확인
	상품화 추진 (생물농약등록준비2년차)	○생물농약품목등록 약효, 약해 시험(2년차) ○추가제형연구(액상, 수화제등) ○제품의 이화학분석 시험 ○지역별농가실증(전시포실시) ○체계처리를 통한 방제효과 검토 (토양처리, 생육기 관주처리)

2. 제 1협동기관

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2011)	길항미생물 특성 검정	○제형화 기술개발을 위한 생물학적 특성 조사
	항균활성물질의 특성 검정	○다양한 병원균에 대한 항균 스펙트럼 분석 ○항균물질의 분리·동정
	흑색썩음균핵병 발생 모니터링	○한지형, 난지형 마늘의 병발생 양상조사 - 서산, 태안, 의성, 해남, 제주
	길항미생물의 방제효과 농가실증	○한지형 마늘 (충남 예산, 태안)
2차 년도 (2012)	마늘 흑색썩음균핵병 발생 모니터링	○한지형, 난지형 마늘의 병발생양상조사 - 서산, 태안, 의성, 해남, 제주
	길항미생물의 방제효과 실증	○한지형 및 난지형 마늘 - 방제적기 구명
	미생물제제의 적용확대	○쪽과 흑색썩음균핵병 생물적방제 - 방제효과 검정
	항균물질 정량분석	○최적배양시 항균물질 생산량 - 최대생산 배양시간 등
3차 년도 (2013)	마늘 흑색썩음균핵병 발생 모니터링	○한지형, 난지형 마늘의 병발생양상조사 - 서산, 태안, 의성, 해남, 제주
	길항미생물의 방제효과 실증	○한지형 및 난지형 마늘 - 방제적기 구명
	미생물제제의 적용확대	○쪽과 흑색썩음균핵병 생물적방제 - 방제효과 검정

3. 제 2협동기관

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2011)	원제의 안전성 평가	○급성 경구독성(병원성)시험 ○급성 경피독성시험 ○급성 호흡기투여독성(병원성)시험 ○급성 정맥내독성(병원성)시험 ○담수어에 대한 영향시험 ○담수무척추동물에 대한 영향 시험 ○조류에 대한 영향시험 ○꿀벌에 대한 영향시험 ○토양미생물에 대한 영향시험
2차 년도 (2012)	친환경유기농업자재 목록공시 신청을 위한 안전성 평가	○급성 경구독성(병원성)시험 ○급성 경피독성 시험 ○급성 어독성 시험
3차 년도 (2013)	천연작물보호제 등록신청을 위한 제품의 안전성 평가	○급성 경구독성(병원성)시험 ○급성 경피독성시험 ○안점막 자극성시험 ○피부자극성시험 ○피부감작성시험 ○담수어에 대한 영향시험

IV. 연구개발결과

1. 제 1세부기관

가. 대상균주의 대량배양조건 확립

B. pyrrocinia CAB08106-4 균주의 상품화를 위해 필요한 대량배양조건을 확립하였다. 항균 활성과 생육정도를 동시에 충족시키는 탄소원과 질소원을 조사하여 13종의 탄소원과 8종의 질소원 중 Glucos와 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 최종 선발하였다. 또한 각각의 탄소원과 질소원의 농도는 1%, 0.1%에서 가장 좋은 것으로 나타났으며 추가 영양원으로 Yeast extract 1%를 최종 선발하였다. 최적 배양 조건은 28℃, 150rpm and pH7 이었다.

나. 제형 및 처방 확립

B. pyrrocinia CAB08106-4 균주는 마늘 흑색썩음균핵병원균에 우수한 활성을 나타내는 길항미생물로 희석 살포하는 희석제나, 토양에 직접 살포하는 입제의 형태를 고려하였으며 균주의 특성이 *Bacillus*속 균주처럼 아포자를 형성하지 않기 때문에 온도와 장기보관에 민감함으로 균의 활성과 유지에 유리한 입제를 제형으로 선발을 하였다. 입제 제조는 조립식과 흡착식의 두 가지 방법이 있는데, *B. pyrrocinia* CAB08106-4 균주가 열과 계면활성제 성분에 매우 약하여 조립식으로 제조는 불가능하여, 최종 흡착식 입제를 선택하여 제품을 제조하였다.

다. 제품제조 및 이화학적 안정성확인

확립한 대량배양조건으로 *B. pyrrocinia* CAB08106-4균주를 액상원제(1×10^9 cfu/ml)로 제조하여 흡착식 입제로 시제품을 제조하여 이화학실험과 유효성분의 안정성을 확인하였다. 온도조건에서는 정온(30℃)과 실온(4℃~34℃), 균주의 특성이 호기성임을 고려한 천공과 진공포장조건 및 상품화를 위한 소량포장과 대량포장조건에 따른 유효생균수의 변화를 측정하였다. 시험결과 실온보관과 천공포장으로 제조하였을 경우에 12개월까지 유효생균수의 측정이 가능하였다.

라. 제품의 효과검증

B. pyrrocinia CAB08106-4균주를 배양한 후 흡착식 입제로 제조하여 천연작물보호제 등록 신청시 필요한 병원성 실험을 하였다. 수생식물 2종과 육상식물 4종에 대해 실험한 결과 병원성이 나타나지 않아 안전성을 확인하였다. 그리고, 미생물제제의 약효검증을 위해 마늘 종구 파종전 2011년 11월 10일에 토양혼화 처리하여 예비시험을 수행하였다. 시험결과 20kg 처리구에서 66.0%의 방제효과를 나타냈으며 10kg에서는 62.3%로 무처리와 유의차가 있었고, 5kg에

서는 35.8%로 유의차가 없었다. 사용량에 있어서 10kg와 20kg의 경우 20kg에서 방제효과가 더 높았으나 유의차가 없어 제품화 이후 판매가를 고려하여 10kg으로 결정하였다.

마. 천연작물보호제 등록을 위한 약효, 약해시험 및 현장실증시험

B. pyrocinia CAB08106-4 GR의 천연작물보호제 등록신청을 위하여 공인 시험기관인 한국식물환경연구소와 식물보호연구소에서 마늘 흑색썩음균핵병에 대해 약효·약해 시험을 2년간 실시하였다. 시험방법은 마늘 과종전 10kg/10a로 토양혼화처리 한 후 수확기에 최종 조사하였다. 2년간 시험한 성적 모두에서 무처리 대비 50%이상의 방제효과를 나타내어 천연작물보호제 등록신청에 만족하는 결과를 나타내었다. 또한, 제주와 고흥에서 실시한 농가 현장실증시험결과에서도 50%이상의 방제효과를 나타내어 상품화 후 1회 처리가 아닌 지속적으로 처리를 한다면 미생물의 토양내 밀도를 높여줌으로써 방제효과를 더 높일 수 있을 것으로 생각된다.

2. 제 1협동기관

가. 길항미생물의 특성 검정

마늘 흑색썩음균핵병균의 증식을 억제하는 *B. pyrocinia* CAB08106-4 균주는 상추 셋빛곰팡이병, 균핵병, 생강 근경썩음병, 고추 탄저병 등 다범성 항균스펙트럼을 갖고 있고, 대부분의 당을 탄소원으로 이용할 수 있었다. 또한 길항미생물 *B. pyrocinia* CAB08106-4 균주는 20ppm의 황산스트렙토마이신에서도 생육이 가능하기 때문에 토양 정착시 기타의 미생물에 대하여 우점할 수 있을 것으로 판단된다. 그리고 이 균주는 마늘 이외의 작물 발아에 독성을 나타내지 않았다. 따라서 CAB08106-4 균주는 미생물 농약으로서 광범위한 작물에 사용이 가능하며 약해의 위험성이 없을 것으로 생각된다.

나. 항균활성물질의 특성 검정

B. pyrocinia CAB08106-4 균주의 배양액으로부터 마늘 흑색썩음균핵병에 항균활성을 보이는 물질의 분리를 위해 ethyl acetate 및 chloroform을 첨가하여 유기 용매 분획물을 제조하였다. Chloroform 분획은 silica gel 크로마토그래피를 이용하여 항균 활성을 갖는 chloroform-methanol 분획을 얻었고, 이 항진균 물질은 6 개의 양성자 및 ^1H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼에 의해 10 개의 탄소로 구성된 방향족 화합물 인 것을 밝혔다. ^1H - ^1H COSY 스펙트럼, HMBC 스펙트럼 및 HMQC 스펙트럼에서이 방향족 화합물은 1,2,3-trisubstituted benzene 과 pyrrole로 구성되어 있었다. NMR 분광법으로 이 활성물질은 분자식 $\text{C}_{10}\text{H}_6\text{C}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$, 분자량 265의 pyrrolnitrin으로 확인하였다.

다. 항균활성물질의 정량분석

B. pyrrocinia CAB08106-4 균주는 배양 배지별 항균활성에 차이를 나타내었는데, 배양액 1 ml의 양으로부터 추출된 활성물질은 KB(King's medium B)에서는 생산이 확인되지 않았고, TSB(tryptic soy broth)에서는 72시간 배양하였을 때 소량 확인되었다. NB(nutrient broth)와 LB(Luria-Bertani media)에서는 배양 48시간에서 항균활성이 확인되었고, PSB(potato sucrose broth)에서는 배양 48시간부터 72시간 까지 항균활성물질이 생산되었는데, 48시간에서 가장 큰 활성을 보였다. 이때의 pyrrolnitrin 생성량은 22.9ng/ml 이었다.

라. 흑색썩음균핵병 발생 모니터링

마늘 흑색썩음균핵병은 4월 초부터 시작되어 4월 중순부터는 발병이 급격하게 증가하는 특성이 있었다. 지역별 마늘 흑색썩음균핵병의 발생면적률은 충남 서산지역이 3.0~6.8%, 충남 태안지역은 4.5~5.4%, 경북 의성군은 0.2~1.1%, 전남 해남군은 1.9~2.8%, 제주시는 0.4~2.4%로 각각 조사 되었다. 충남지역에서는 난지형 및 한지형 마늘 모두 4월 중순부터 발병하기 시작하였고, 해남군은 4월 상순, 제주도는 3월 하순부터 이며, 의성군은 5월 초 발병하였지만 1% 미만의 발병율을 보였다.

마. 미생물제제의 방제효과 실증

한지형 마늘의 초장 경태 등 생육 상황은 미생물제제의 처리에 의하여 차이를 보이지 않았다. 하지만 출현률은 무처리구에 비하여 유의적으로 증가하였다. 미생물제제의 흑색썩음균핵병 방제효과는 한지형과 난지형 마늘 각각 58.3~66.0%, 74.6~64.2%로 평균 70% 정도를 나타내었다. 이처럼 *B. pyrrocinia* CAB008106-4는 매년 65% 이상의 안정적인 방제효과를 보이는 매우 우수한 생물방제인자이며, 농가 포장에서 지속적인 방제효과를 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

바. 미생물제제의 적용 확대

B. pyrrocinia CAB08106-4 제제는 쪽파의 흑색썩음균핵병에 대하여도 우수한 방제효과를 보였다. 2년간 무처리구의 발병률은 12.9~17.1%로 방제효과 검토에 충분하였고, 방제가는 55.6~58.9%로 생물적 방제제로서의 효과가 인정되는 수준이었다. 이러한 결과는 마늘 흑색썩음균핵병에 대한 길항미생물제제가, 다른 작물의 흑색썩음균핵병에 대하여도 방제효과를 유지함을 나타내는 것이며, 쪽파 이외의 양파, 달래 등 적용확대의 가능성이 매우 높고 다범성의 생물적 방제인자로 기대할 수 있다.

3. 제 2협동기관

가. 원제의 안전성 평가

Burkholderia pyrrocinia CAB08106-4 균주의 원제의 안정성 평가를 위해 농촌진흥청 고시 독성시험 기준과 방법에 준하여 시험을 실시하였다. Rat를 이용하여 급성경구, 경피, 정맥, 호흡기, 병원성을 평가하였다. 시험결과 병리학적 소견이 관찰되지 않았으며, 모든 그룹에서 미생물이 검출되지 않았다. 또한, 환경독성 시험에서도 투여량 6.67×10^4 cfu/mL에서 잉어와 물벼룩에서 독성이 발견되지 않아 시험물질의 안정성을 확인하였다.

나. 친환경유기농업자재 목록공시 신청을 위한 안전성 평가

친환경유기농업자재 공시를 위한 시제품의 독성평가 연구를 수행하였다. 시제품의 급성 독성/병원성, 급성 경구, 경피, 안점막에 대한 독성을 평가한 결과, *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 GR가 모든 시험항목에서 안전성이 확인되었다. 또한, 환경독성시험에서 잉어와 물벼룩에 6.67×10^4 cfu/mL양으로 노출시 치사개체가 발견되지 않았으며, 물벼룩에 대한 LC₅₀ 값은 9.07×10^4 cfu/mL였다.

다. 천연작물보호제 등록신청을 위한 제품의 안전성 평가

천연작물보호제 등록신청을 위한 시제품의 독성평가 연구를 수행하였다. 급성 경구, 병원성, 급성 경피, 안점막에 대한 독성을 평가하였다. 시험결과 *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 GR(1.0×10^6 cfu/g)가 모든 시험항목에서 독성이 없는 것을 확인하였다. 환경독성평가의 결과에서도 잉어와 물벼룩에 6.67×10^4 cfu/mL을 투여하여 시험한 결과 치사개체가 발견되지 않는다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

본 과제는 생물농약의 상품화에 목적을 두고 있기 때문에 국내 마늘 흑색썩음균핵병 방제제 시장의 80억 원에 달하는 화학농약을 본 연구의 성과물인 버크홀데리아 파이로시니아 씨에 이비08106-4 균주를 이용한 식물병 방제제로서 대체할 계획이다. 또한 본 과제의 수행 중에 친환경유기농자재 목록공시 등록을 위한 시험이 포함되어 있기 때문에 친환경유기농자재 목록공시에 등록된 제품으로서 우선 판매 가능하고, 이후 검증된 천연작물보호제로서 판매 가능하다.

화학농약의 경우 대다수의 원제를 해외에서 수입하기 때문에 개발된 농약을 국내시장이 아닌 해외시장에서 판매하는 것은 현실적으로 어렵다. 그러나 본 연구의 성과물은 친환경유기농자재이므로 상대적으로 수출장벽이 낮고, 원천기술을 국내에서 가지고 있기 때문에 제품화 후 해외수출에 대한 제한이 없다는 장점이 있다. 이와 같은 이유로 생물농약의 해외수출 방안을 모색 후, 본 연구 성과물의 제품화를 통해 해외에 수출할 계획을 갖고 있다.

SUMMARY

(영문 요약문)

Development and Product of Biopesticide for Control of White rot on garlic

White rot of garlic occurred the first in Goheung province in 1988. The symptoms appear as rising of temperature. White rot of outbreak on garlic, onions, leeks, and scallions in a soil-borne disease, is expanding gradually on cultivated area. This disease occurs violently in garlic cultivation of fields, particularly, the damage is large Nan-Ji than Han-Ji garlic.

White rot fungus will enable long-term survival in the soil in the dormant state, but this reason, the more difficult the control of this disease is a reality. Control of this disease depends on chemical pesticide in domestic. Chemical control is effective for control of white rot. But Continuous use of chemical products and abuse can cause problems like pollution of the soil and safety of crops. Therefore, Development of the biological control using microorganisms is necessary. In this study, to improve marketability and stable production of garlic, and control an effective technique for the development and commercialization of biopesticides using *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 strains that produce antimicrobial substance to white rot disease was carried out to establish the control system.

The results obtained are summarized as follows.

1. Condition for mass culture of antagonistic bacterium

We established optimum culture conditions of *B. pyrrocinia* CAB08106-4 strains. The optimum culture conditions including temperature, pH, enzyme activity, carbon and Nitrogen sources were determined. The optimum cultural conditions of *B. pyrrocinia* CAB08106-4 strains were 28°C, 150rpm and pH7. The highest cell growth and antifungal activity was obtained with 1% glucose and 0.1% (NH₄)₂SO₄, respectively.

2. Established formulations and recipe.

B. pyrrocinia CAB08106-4 strains has antifungal activity against white rot of garlic. We selected granular formulations with considered this strains characteristics. There are two methods of Granular formulations by impregnation and assembly. This strains has weak characteristics about heat and some surfactants. Assembly formulation needs some surfactant and generates heat in manufacturing process. Therefore, Final microbial formulations selected granular formulation by impregnation.

3. Product manufacturing and Check physicochemical stability.

Validity period is the important factor for development of microbial formulations. We investigated cell numbers of *B. pyrrocinia* CAB08106-4 strains by storage temperature and packaging conditions. First of all, We cultured *B. pyrrocinia* CAB08106-4 strains(1×10^9 cfu/ml) using the optimum mass culture conditions. And We investigated physicochemical stability after microbial formulations manufacturing. The result of experiments, *B. pyrrocinia* CAB08106-4 strains was possible to keep cell numbers until 12 months in case of room temperature storage and perforated packaging.

4. Control effect of microbial formulations.

Pathogenicity tests were required when applying for registration. We confirmed safety about two kinds of aquatic plants and the four kinds of land plants. In addition,. We carried out preliminary test through the method of soil mixing treatment with micobial formulations before planting garlic on November 10, 2011. The micobial formulations represented control effect of 66.0, 62.3 % on 20kg, 10kg/10a treatments. respectively. According to the result, 20kg/10a was high than 10kg/10a but there is not significant. And then we determined amounts of 10kg/10a in consideration of the sales price in the after development

5. Field trials for biopesticide registration

KPER(Korea Plant Environmental Research Station) and Plant Protection Institute carried out field trials of microbial formulation for 2 years. The method of test is soil mixing treatment with 10kg/10a microbial formulation before planting garlic. The control efficacy of it showed about 61.0 to 66.0%. That results indicate that microbial formulation is sufficient

to control of white rot of garlic. In addition, We tested the microbial formulation for commercial in Jeju and Goheung. Also. The control efficacy showed above 50%.

As a result, The microbial formulation can expected to improve control effect by increasing the density of microorganism in soil.

6. Characteristics of antagonistic microorganisms

B. pyrrocinia CAB08106-4 strain has wide antifungal spectrums such as gray molds of lettuce, Sclerotinia disease, rhizome rot of ginger, anthracnose of red pepper, and can be used as a carbon source for most of the sugar. In addition, CAB08106-4 strain is capable of growth in streptomycin sulfate of 20ppm, it can be dominant against microorganisms in the soil at the time of colonization. Then, this strain did not show toxicity to the germination of other crops. So *B. pyrrocinia* CAB08106-4 strain, is capable of use in a wide range of crops as a microbial pesticide, and there is no risk of the chemical injury.

7. Antibacterial properties of the active substance

We were prepared organic solvent fraction for the identification of the antifungal substance producing *B. pyrrocinia* strain CAB08106-4 against white rot disease of garlic by adding ethyl acetate and chloroform to the culture medium. With silica gel column chromatography in chloroform layers showing the antimicrobial activity, the antimicrobial activity was detected in chloroform-methanol fraction. This antifungal substance was found to be aromatic compound composed of six proton and ten carbon by ^1H and ^{13}C NMR spectrum. From the ^1H - ^1H COSY spectrum, HMBC spectrum and HMQC spectrum, this aromatic compound consists of a 1,2,3-trisubstituted benzene and pyrrole. As a result of a database and literature search on the basis of results, the compound was found to be in good agreement with pyrrolnitrin. In NMR spectroscopy, pyrrolnitrin confirmed the 265 molecular weight, the molecular formula $\text{C}_{10}\text{H}_6\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_2$.

8. Quantitative analysis of the antifungal substance

B. pyrrocinia CAB08106-4 strains showed a different antifungal activity in the several culture medium. When the active substance is extracted from the amount of the culture medium 1ml, the active substance is not identified in the KB, was produced in small quantities for 72 hours from the TSB culture.

Antifungal substance were produced when cultured 48 to 72 hours at PSB, showed the maximum activity at 48 hours, yields of pyrrolnitrin at that time was 22.9ng/ml(media).

9. Monitoring of white rot incidence

White rot of garlic is initiated from the beginning of April, the onset is rapidly increased from mid-April. Diseased area ratio are 3.0 to 6.8% at Seosan district, 4.5 to 5.4% at Taean district. 0.2 to 1.1% at Euseong, and 1.9 to 2.8% at Haenam, respectively. Garlic of Chungnam province was all starting to onset from mid-April, Haenam is the beginning of April, and Jeju from late March, although the incidence of the disease was less than 1% in early May in Seoul.

10. Control effects of microbial formulation

The growth of garlic, especially plant length and stem diameter, there was no differences by treatment of microbial formulation. However, emergence ratio was significantly increased compared to untreated control plot. The control efficacy of microbial formulation showed about 58.3 to 66.0% in Han-Ji and 74.6 to 64.2% in Nan-Ji garlic, respectively. Average control effect of three years was about 70%. In this way, *B. Pyrocinia* CAB008106-4 is a very useful biological control factor to show the control effect were stable more than 65% every year, and can be expected sustainable control effect on farmers fields.

11. Expanded application of microbial formulation

We investigated the control effect on white rot of shallot for the expanded application of microbial formulation. Control efficacy was the level of effect as biological control agents are found in the 55.6 to 58.9%. These results indicate that it contains control effect antagonistic microorganism agents to white rot of garlic, also white rot of other crops, have potential application expansion to onion, shallot, wild garlic, and it is expected to serve as biological control agents which has the ability of broad spectrum ranges.

12. Toxicity test of the *Burkholder pyrocinia* CAB08106-4 culture broth

The aim of this study was to assess and to compare the pathogenicity of *B. pyrocinia* CAB08106-4 in rats through oral, intranasal and intravenous single dosing. The

environmental toxicity using *Cyprinus carpio* and *Daphnia magna*. *B. pyrrocinia* CAB08106-4 (1.0×10^9 cfu/mL) was administrated to *Cyprinus carpio* and *Daphnia magna* according to the toxicity test guideline for pesticide. For the result that examined the numbers of internal/external microbes, they were not detected in every group. The pathological findings were not observed in relation to the administration of the *B. pyrrocinia* CAB08106-4 in the necropsy result to survived animals. It could be concluded that the tested microorganism was not toxic or pathogenic to rats via oral, intranasal and intravenous route. No effect was observed at 6.67×10^4 cfu/mL and we concluded that *B. pyrrocinia* CAB08106-4 has no toxicity for *Cyprinus carpio* and *Daphnia magna*.

13. Toxicity test of the microbial formulation for registration of Eco-friendly organic product

The acute oral toxicity/pathogenicity, acute dermal toxicity, skin and eye irritation studies were performed using animal. In summary, the present study demonstrated that the *B. pyrrocinia* CAB08106-4 is not acutely toxic via dermal route and would not cause skin and eye irritation to tested animals. Acute oral toxicity/ pathogenicity were not observed in relation to the administration of the *B. pyrrocinia* CAB08106-4 in the necropsy result to survived animals. It could be concluded that the tested microorganism was not toxic or pathogenic to rats via oral. The environmental toxicity using *Cyprinus carpio* and *Daphnia magna*. *B. pyrrocinia* CAB08106-4 GR(1.0×10^6 cfu/mL) was administrated to *Cyprinus carpio* and *Daphnia magna* according to the toxicity test guideline for pesticide. There was no mortality and adverse effect in any of the fish exposed to 6.67×10^4 cfu/mL. The 21 days LC50 value of *B. pyrrocinia* CAB08106-4 GR(1.0×10^6 cfu/mL) to *Daphnia magna* were determined 9.07×10^4 cfu/mL.

14. Toxicity test of the microbial formulation for registration of biopesticide.

The acute oral toxicity/pathogenicity and acute dermal toxicity studies were performed using rats. Skin and eye irritation studies were performed using rabbits and skin sensitization study performed using guinea pigs. In summary, the present study demonstrated that the *B. pyrrocinia* CAB08106-4 is not acutely toxic via dermal route and would not cause skin and eye irritation or hypersensitivity to tested animals. Acute oral

toxicity/pathogenicity were not observed in relation to the administration of the *B. pyrrocinia* CAB08106-4 in the necropsy result to survived animals. It could be concluded that the tested microorganism was not toxic or pathogenic to rats via oral. The environmental toxicity using *Cyprinus carpio*. *B. pyrrocinia* CAB08106-4 GR(1.0×10^6 cfu/mL) was administrated to *Cyprinus carpio* according to the toxicity test guideline for pesticide. There was no mortality and adverse effect in any of the fish exposed to 6.67×10^4 cfu/mL.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1. Overview of the research project	20
Chapter 2. The current status of research and development in domestic and foreign countries	21
Chapter 3. Research contents and results	24
Section 1. Development and formulation of biopesticide for registration	24
1. Contents and results	
A. Condition for mass culture of antagonistic bacterium	24
B. Established formulations and recipe	37
C. Product manufacturing and Check physicochemical stability	38
D. Control effect of microbial formulations	43
E. Field trials for biopesticide registration	44
Section 2. Establishment of biological control system for white rot of garlic	48
1. Contents and results	48
A. Characteristics of antagonistic microorganisms	48
B. Antibacterial properties of the active substance	49
C. Quantitative analysis of the antifungal substance	56
D. Monitoring of white rot incidence	58
E. Control effects of microbial formulation	61
F. Expanded application of microbial formulation	68
Section 3. Evaluation of toxicity for registration of microbial formulation	73
1. Contents and results	73

A. Toxicity test of the <i>Brukholder pyrrocinia</i> CAB08106-4 culture broth	73
B. Toxicity test of the microbial formulation for registration of Eco-friendly organic product	83
C. Toxicity test of the microbial formulation for registration of biopesticide	91
Chapter 4. Attainability of the research goal and contributions to related fields	100
Chapter 5. Application plan of results	103
Chapter 6. Scientific and technical informations obtained from abroad	104
Chapter 7. Research facilities and equipment	105
Chapter 8. References	106

목 차

제 1 장 연구개발 과제의 개요	20
제 2 장 국내외 기술개발현황	21
1. 세계 생물농약 개발현황과 시장규모	21
2. 국내 생물농약 기술현황과 시장규모	22
3. 본 연구관련 선행연구 결과(특허내용일부)	23
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	24
제 1절 생물농약 상품화를 위한 제형개발 및 생물농약 품목등록 준비	24
1. 대상균주의 대량배양 조건 확립	24
2. 제형 및 처방 확립	37
3. 제품제조 및 이화학적 안정성 확인	38
4. 제품의 효과 검증	43
5. 천연작물보호제 등록을 위한 약효, 약해시험 및 현장실증시험	44
제 2절 마늘 흑색썩음균핵병 생물농약의 방제기술 체계 확립	48
1. 길항미생물의 특성 검정	48
2. 항균활성물질의 특성 검정	49
3. 항균활성물질의 정량분석	56
4. 흑색썩음균핵병 발생 모니터링	58
5. 미생물제제의 방제효과 실증	61
6. 미생물제제의 적용 확대	68
제 3절 원제 및 제품의 안전성평가	73

1. 원제의 안전성 평가	73
2. 유기농업자재 목록공시 신청을 위한 안전성 평가	83
3. 제품의 등록을 위한 안전성 평가	91
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	100
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	103
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	104
제 7 장 연구시설·장비 현황	105
제 8 장 참고문헌	106

제 1 장 연구개발과제의 개요

우리나라 마늘 재배면적은 1975년에는 13,561 ha였고, 1990년에는 49,160 ha로 증가하다가 2008년에는 26,986 ha로 감소하였으며(Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, 2008), 충남서산, 경북의성, 전남해남 등에는 대규모 마늘 재배단지가 형성되어 지방특화작목으로 자리 잡고 있다. 그러나 최근에는 마늘 주산단지를 중심으로 연작에 의한 흑색썩음균핵병의 발생이 증가하고 있어 농가에서는 이 병에 의한 피해가 점점 늘어나고 있는 추세이다. 마늘 흑색썩음균핵병은 토양전염성 병해로 국내에서 1989년 전남 고흥지방에서 처음 보고된 이후, 마늘, 양파, 과, 쪽파 등 백합과 작물의 주산단지를 중심으로 피해면적이 점차 확대되고 있으며(Kim, 2003; Cho 등, 1996), 농가에서 퇴화 등의 이유로 다른 지역에서 생산한 마늘을 구입하여 종구로 재배하기 때문에 병의 발생 면적 및 지역이 증가될 가능성이 매우 높다(Kim 등, 2005). 특히 밭마늘 재배에서 발생이 심하며, 한지형마늘 보다는 난지형 마늘에서 피해가 크다(Kim 등, 2002). 마늘 흑색썩음균핵병균은 환경이 불리하게 되면 휴면상태로 토양 중에 장기간 생존이 가능하게 되는데(Coley-Smith 등, 1990; Crowe, 1996) 이러한 이유로 이 병의 방제가 더욱 어려운 실정이다. 국내에서는 *Trichoderma harzianum* 23 WP와 *Bacillus subtilis* 122 WP를 이용한 마늘 흑색썩음균핵병의 생물학적 방제 연구(Lee 등, 2006)외에는 전무한 실정이다. 외국에서의 흑색썩음균핵병에 대한 생물적 방제 연구로는 길항균으로 *Cheatonium globosum*, *Trichoderma harzianum* *T. viride*, *T. koningii*의 미생물을 이용하는 방법 등이 시도 되었으며(Mclean 등, 2000; Clakon 등, 2002), 길항세균으로는 *Bacillus subtilis* QST 만이 균핵병(*Sclerotium minor*)에 적용병해로 되어 있을 뿐 흑색썩음균핵병에 대하여 외국에서 등록되어 사용되는 생물농약은 없는 실정이다(Copping, 2004). 또한 흑색썩음균핵병의 적용약제로 등록되어 있는 화학농약조차 방제효과가 그다지 높지 않아 재배농가에서는 많은 어려움을 겪고 있는 실정이다. 따라서 본 연구는 마늘의 안정적인 생산과 상품성을 높이기 위하여 마늘 흑색썩음균핵병에 대해 항균물질을 분비하는 *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 균주(특허 등록번호: 특허 제 10-0961786호)를 이용한 생물농약 개발 및 상품화를 위하여 효과적인 방제 기술 체계를 확립하고자 실시하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 세계 생물농약 개발현황과 시장규모

- 세계적으로 볼 때 생물농약의 시장은 도입단계를 지나 성장 초, 중기 단계로 볼 수 있음. 2005년 세계 생물농약시장의 규모는 약 7억 달러로 전체 농약시장 약 280억 달러의 2.5%에 불과한 수준임. 하지만 세계적인 친환경 농업의 확산에 힘입어 생물농약시장은 비교적 빠르게 성장하고 있음. 2010년엔 약 10억 달러로 전체 농약시장의 4.2%를 차지하며 2005년부터 2010년까지 연평균 9.9%의 성장률을 보여주었고, 2015년엔 약 28억 달러의 규모로 성장할 것이 예상 됨.
- 생물농약 시장이 가장 빠르게 성장하는 곳은 유럽으로 2005년 약 1억3천5백만 달러에서 2010년 약 2억7천만 달러로 성장하여 연평균 15%의 성장률을 보여주었음. 다음으로 아시아 지역으로 2010년 약 1억2천만 달러 규모로 연평균 12%의 성장률을 보여주었음. 생물농약시장이 가장 낮게 성장하는 곳은 라틴아메리카 지역이며 2005년 약 7천만 달러에서 2010년 8천8만 달러로 연평균 5%의 성장률을 보여주었음. 대표적인 생물농약 기업으로는 AG Biotech Australia Pty Ltd., AgraQuest Inc., Amit Biotech Pvt. Ltd., BionTech Inc., Certis USA LLC, Embrapa Milho E Sorgo, Greeneem, Isagro SpA, Kumiai Chemical Industry Co. Ltd., Prophyta Biologischer Pflanzenschutz GmbH, San Jacinto Environmental Supplies, Sumitomo Chemical Co. Ltd., Syngenta International AG, Troy Biosciences Inc 등이 있음.
- 생물농약의 기술개발 속도는 기대수준에는 미치지 못하고 있음. 그 이유는 무엇보다 기술적인 불안정성, 화학농약 대비 낮은 약효, 높은 가격 문제 때문이며 이러한 상황으로 인해 기존의 대규모 농약회사들은 기술개발 투자보다는 벤처기업의 인수 혹은 상품의 판매에 집중하고 있고 상대적으로 자본, 기술, 마케팅 등에서 열세인 기업이 기술개발에 집중하고 있음.
- 2002년 현재 미국 EPA에는 76개의 미생물농약과 113개의 생화학농약이 등록되어 있음. 유럽의 경우 미국과 그 정의가 조금 다르지만 BCPC(British Crop Protection Council)에서 출판한 “The Manual of Biocontrol Agents, 3rd edition”에 따르면 미생물농약 112 품목이 등록되어 시판되고 있으며, 천연물농약은 58 품목이 등록되어 있고, Semicchemicals, 즉 반합성화합물 농약은 56 품목이 등록되어 있음.
- 미생물을 이용한 생물농약 시장이 전체 생물농약 시장의 약 80%를 차지하고 있으며 미생물을 이용한 시장을 주요 중별로 정리하면 다음과 같음.

※ 미생물 중에 따른 미생물농약의 세계시장

분 류	2003	2004	2005	2010	성장률(%)
<i>Bacillus thuringiensis</i>	242.2	290.4	347.8	611	11.9
<i>Bacillus subtilis</i>	51.9	62.3	74.6	94	4.7
<i>Pseudomonas fluorescense</i>	34.6	41.5	49.7	62	4.5
기 타	17.3	20.8	24.9	29	3.1
총 계	346	415	397	796	9.9

참조: The New Biopesticide Market, Business Communications Co., Inc., 2006. 1)

단위: 백만 불

2. 국내 생물농약 기술현황과 시장규모

- 국내 생물농약 시장의 규모를 정확하게 파악하기는 대단히 어려운데, 이는 정확한 수입실적을 얻을 수 없고, 농약관리법의 관리 밖에서 제조 및 판매되는 제품에 대한 수집이 불가능하기 때문임. 대략적으로 국내 미생물농약 시장규모는 2005년 24억7천만 원에서 2008년 17억8천만 원으로 줄었음. 이는 안전농산물에 대한 관심증대로 연구개발은 확대추세이나 진입이 쉽고 비용이 적게 드는 친환경유기농자재로 판매하고 있기 때문으로 해석 됨. 하지만 전체 친환경유기농자재 시장의 규모는 정부의 지원정책으로 인해 확대추세 임.
- 국내의 생물농약에 대한 본격적인 연구는 1990년대 후반부터 이뤄졌음. 한국화학연구원과 생명공학연구원의 정부출연연구소, 경상대학교, 충남대학교, 충북대학교, 서울대학교 등의 대학교, 충청남도농업기술원, 전라남도농업기술원 등의 정부기관 고려바이오(주), (주)그린바이오텍과 같은 기업에서 꾸준히 연구하고 있음. 본 연구의 주관기관인 한국삼공(주) 역시 2010년 충청남도농업기술원에서 개발한 특허 균주 4종에 대한 연구를 진행 중임.
- 2010년 6월 현재 국내에 등록된 생물농약은 33품목이며 그 중 살균제 19품목, 살충제 13품목, 제초제 1품목이고 분야별로 미생물농약 31품목, 생화학농약 2품목 임.

3. 본 연구관련 선행연구 결과(특허내용일부)

가. 미생물 특허등록

(1) 특허등록번호: 특허 제 10-0961786호(2010년 5월 28일)

(2) 발명의 명칭: 버크홀데리아 파이로시니아 씨에이비08106-4균주를 이용한 식물병 방제제

나. 발명의 내용

(1) 해결 하고자하는 과제

본 발명은 마늘 흑색썩음균핵병에 대해 항균활성을 갖는 버크홀데리아 파이로시니아 CAB08106-4(*Burkholderia pyrocinia* CAB08106-4, 미생물기탁번호 KACC91479P) 균주를 이용하여 환경 친화적으로 마늘 흑색썩음균핵병을 포함한 여러 가지 식물 병원균을 방제하

는 미생물 제제를 제공하는 데에 있다.

(2) 과제 해결수단

본 발명은 버크홀데리아 파이로시니아 CAB08106-4를 이용한 흑색썩음균핵병 등의 식물 병 방제제와 방제방법을 그 구성으로 한다. 먼저 토양에서 균주를 분리하여, 생물검정을 통하여 식물병 진진 억제효과가 우수한 균주를 선발하고 이후에 형태적, 생리 생화학적 특성 및 DNA 프로파일 비교 등을 통하여 균주를 동정하였고 상기 균주는 버크홀데리아 파이로시니아 CAB08106-4로 동정되었다.

본 발명은 버크홀데리아 파이로시니아 CAB08106-4 균주의 배양조건을 제공한다. 산업적 사용을 위해서는 상기 균주를 단시간 내에 대량으로 배양할 수 있는 방법이 필수적이다. 본 발명의 버크홀데리아 파이로시니아 CAB08106-4 균주는 배양 배지로서 NA(Nutrient agar)배지 상에서 잘 자라며, 10-38°C 온도범위에서 생육이 가능하고, 생육 pH 범위는 5.5-7.5이고, 배양시간은 48-98시간이 좋으며 72시간 전후가 더 적절하다.

본 발명은 버크홀데리아 파이로시니아 CAB08106-4 균주를 이용한 식물 병원 방제제 및 이를 이용한 식물 병원균의 방제 방법을 제공한다. 본 발명의 버크홀데리아 파이로시니아 CAB08106-4 균주를 이용하여 방제할 수 있는 처리 대상균은 균핵을 형성하는 *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotinia Sclerotium cepivorum*, *Botryis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Pythium myriotylum*, *Penicillium hirstum* 등이 해당된다.

본 발명의 버크홀데리아 파이로시니아 CAB08106-4 균주는 상기 식물 병원균의 생육을 저지하여 방제할 수 있다.

(3) 효과

버크홀데리아 파이로시니아 CAB08106-4 균주를 이용한 미생물제제는 마늘 흑색썩음균핵병을 포함한 여러 가지 식물 병원균을 효과적으로 방제할 수 있었다. 또한 안전한 농산물을 생산가능하게 함으로써 농가의 소득증대 및 소비자의 농약에 대한 문제제기를 불식시키고 화학농약의 사용을 절감하거나 대체할 수 있기 때문에 환경오염을 줄일 수 있다.

본 발명은 재배 중에 발생하는 각종 채소류의 균핵병 등에 대한 생물농약으로서 기능할 수 있어 작물잔류로 인한 문제점을 방지할 수 있고, 농업 생태계 보전과 병해종합방제를 위한 획기적인 생물학적 방제방법을 제공하는 효과가 있다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1절 생물농약 상품화를 위한 제형개발 및 생물농약 품목등록 준비

1. 대상균주의 대량배양 조건 확립

가. *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 균주의 항균활성 조사

특허균주인 *B. pyrrocinia* CAB08106-4 균주와 항균활성 검정을 위한 마늘 흑색썩음균핵병원균을 충남농업기술원에서 분양받아 균주의 싱글콜로니를 관찰하기 위해 Nutrient Agar(DIFCO, USA)배지에 일회용 루프(SPL, KOREA)를 사용하여 4분할 희석도말하고 28℃ 항온기에 3일간 배양하여 1일 단위로 관찰하였다. 육안으로 관찰하여 싱글콜로니가 나타나고 오염이 되지 않아 실험에 사용을 하였다.

PDA(Potato Dextrose Agar, DIFCO, USA)배지에 마늘 흑색썩음균핵병원균 agar plug 8mm(코르크보어 이용)를 올려놓은 다음 *B. pyrrocinia* CAB08106-4균주의 싱글콜로니를 2.5 cm 간격으로 일회용 루프를 사용해 대치배양을 실시하였다. 20℃ 항온기에 보관하여 10~14일 후에 항균활성을 버니어캘리퍼스를 이용해 측정하였다. 특허균주인 *B. pyrrocinia* CAB08106-4 균주 배양액에서 1.4cm 의 강한 항균활성을 관찰할 수 있었다(Table 1).

Table 1. Antifungal activity of *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 cultured broth against white rot caused by *Sclerotium cepivorum* on mycelia.

Strains	Inhibition zone width(Cm)
A	1.4
B	Full

A: *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 cultured broth

B: Control

나. 대량배양을 위한 영양원 선발

(1) 탄소원 선발

B. pyrrocinia CAB08106-4 균주를 Nutrient Broth(DIFCO, USA)배지에 100ml 용량으로 3일간 배양하였다. 최적의 탄소원을 선발하기 위해 고·저분자 탄소원 13종류를 실험에 사용하였다(Table 2). Pseudomonas basal medium(K_2HPO_4 2.56 g, KH_2PO_4 2.08 g, NH_4Cl 1.0 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g, agar 2%, g/ℓ)에 13종류의 탄소원을 3% 농도로 첨가하여 각각의 배지를

제조한 후 미리 배양한 *B. pyrrocinia* CAB08106-4를 50 μ l씩 첨가하였다. 다음으로 28 $^{\circ}$ C, 150 rpm 조건으로 Shaking incubator에 배양하여 3, 5, 7일 후에 Spectrophotometer(SHIMADZU, JAPAN)를 이용해 660 nm 파장으로 OD 값을 측정하였다. 또한, 각 시료채취시기에 배양액과 배양여액으로 분리하여 마늘 흑색썩음균핵병원균과 대치배양을 실시하였다.

실험 결과 Glucose, Rice bran oil을 첨가한 배지에서 가장 큰 생균수를 측정할 수 있었으나, 항균활성 측정결과 Rice bran oil의 경우 항균활성이 나타나지 않아 다음으로 항균활성이 가장 강하고 배양이 잘되는 Glucose를 최종적으로 선발하였다(Table 3., Fig, 1,2).

Table 2. List of high and low molecular weight carbon source

No.	High molecular weight carbon source	No.	Low molecular weight carbon source
1	Cellulose	1	Corn starch
2	Fructose	2	Potato starch
3	Glucose	3	Black sugar
4	Lactose	4	Yellow sugar
5	Maltose	5	Rice bran oil
6	Mannitol		
7	Mannose		
8	Sucrose		

Table 3. Effects of low & high molecular weight carbon sources on cell growth of *B. pyrrocinia* CAB08106-4 at 28 $^{\circ}$ C, 150 rpm in flask culture for 3, 5, 7 days

No.	Carbon source	OD value($\times 10$)		
		3 days	5 days	7 days
1	Cellulose	0.038	0.040	0.039
2	Fructose	0.075	0.070	0.064
3	Glucose	0.129	0.591	0.407
4	Lactose	0.090	0.118	0.089
5	Maltose	0.125	0.185	0.155
6	Mannitol	0.038	0.690	0.641
7	Mannose	0.075	0.392	0.330
8	Sucrose	0.129	0.741	0.469
9	Corn starch	0.090	0.057	0.047
10	Potato starch	0.125	0.043	0.041
11	Black sugar	0.129	0.495	0.490
12	Yellow sugar	0.090	0.586	0.397
13	Rice bran oil	0.846	1.173	0.868
14	Basal medium	0.040	0.054	0.048
15	Nutrient broth	0.981	1.796	1.391
16	CK	0	0	0

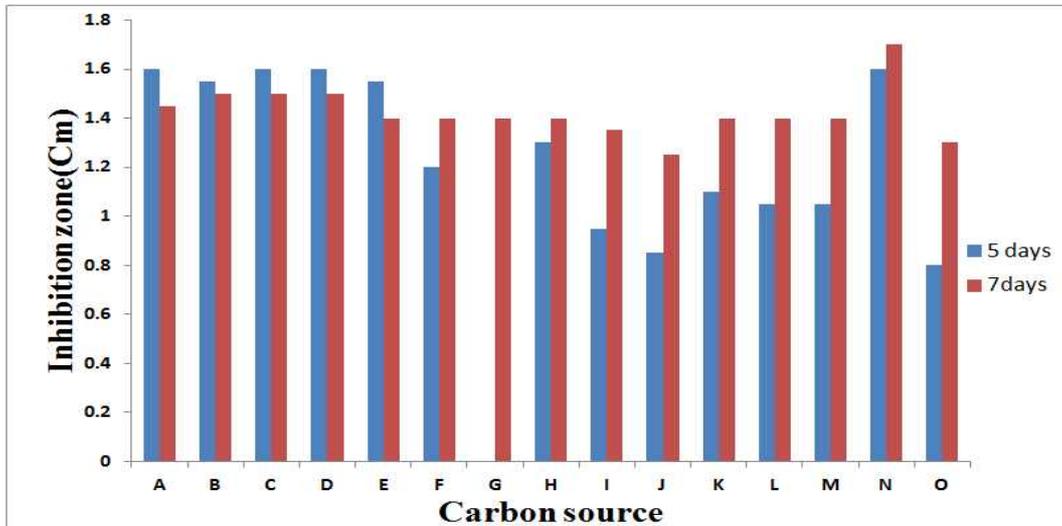


Fig. 1. Effect of high and low molecular weight carbon sources for the antifungal activity of *B. pyrrocinia* CAB08106-4 culture broth against white rot caused by *Sclerotium cepivorum* on PDA medium after 5, 7 days dual incubation
 A: Cellulose, B: Fructose, C: Glucose, D: Lactose, E: Maltose, F: Mannitol, G: Mannose, H: Sucrose, I: Corn starch, J: Potato starch, K: Black sugar, L: Yellow sugar, M: Rice bran oil, N: NB, O: Basal medium, P: Control

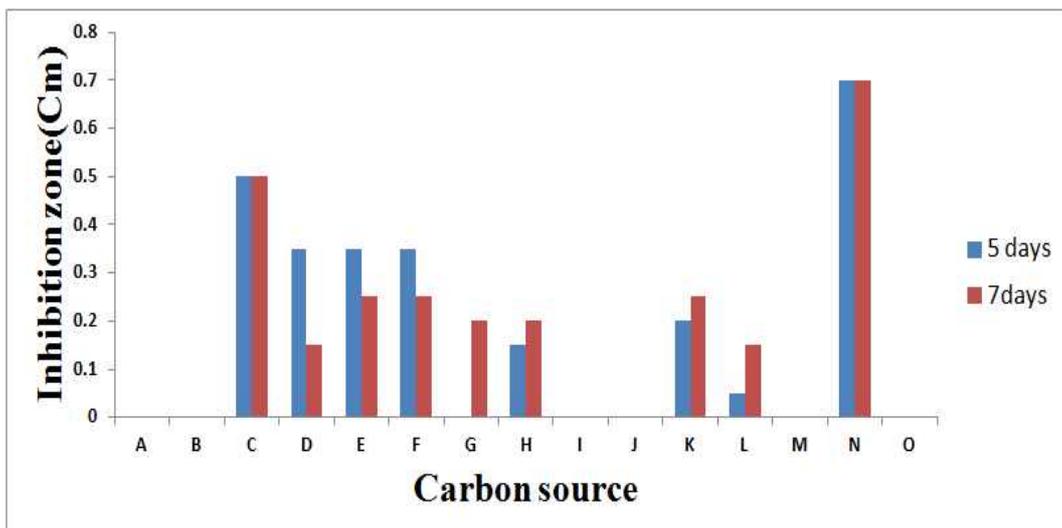


Fig. 2. Effect of high and low molecular weight carbon sources for the antifungal activity of *B. pyrrocinia* CAB08106-4 cell-free culture broth against white rot caused by *Sclerotium cepivorum* on PDA medium after 5, 7 days dual incubation
 A: Cellulose, B: Fructose, C: Glucose, D: Lactose, E: Maltose, F: Mannitol, G: Mannose, H: Sucrose, I: Corn starch, J: Potato starch, K: Black sugar, L: Yellow sugar, M: Rice bran oil, N: NB, O: Basal medium, P: Control

선발한 Glucose의 최적농도를 결정하기 위하여 Pseudomonas basal medium에 1~5%의 농도로 각각 첨가한 후 멸균을 실시한 다음 미리 준비해둔 접종원을 각각의 배지에 100 μ l를 접종하여 Shaking incubator에 28°C, 150rpm 조건으로 배양하였다. 배양한 각각의 시료는 3, 5, 7 일차에 일정량을 취하여 Spectrophotometer를 이용하여 OD값을 측정하였다. 측정결과 Glucose 1% 농도에서 가장 높은 값을 나타내어 최적농도로 설정하였다(Table 4).

Table 4. Effects of different density glucose for cell growth of *B. pyrrocinia* CAB08106-4 at 28°C, 150 rpm in flask culture for 3, 5, 7 days

Glucose concentration	OD value($\times 10$)		
	3 days	5 days	7 days
1%	0.490	0.712	0.272
2%	0.387	0.709	0.235
3%	0.343	0.607	0.228
4%	0.132	0.448	0.220
5%	0.069	0.369	0.215

(2) 질소원 선발

B. pyrrocinia CAB08106-4 균주의 싱글콜로니를 미리 준비한 Nutrient Broth배지 100ml에 72 시간 배양하여 접종원을 준비하였다. 질소원의 선발을 위해 Pseudomonas basal medium의 질소원(NH_4Cl)을 미리 제거하였다. 다음으로 8종의 질소원을 0.5%씩 첨가하여 멸균하고 미리 준비한 접종원을 100 μ l씩 첨가한 후 Shaking incubator에 28°C, 150 rpm 조건으로 배양하였다.

배양한 각각의 시료는 3, 5, 7일차에 일정량을 취하여 Spectrophotometer를 이용해 660 nm 파장으로 OD 값을 측정하여 질소원을 선발하였다. 또한, 각각의 시료에 대한 항균활성을 조사하였다. 항균활성은 PDA배지에 마늘 흑색썩음균핵병원균을 agar plug 8 mm로 만들어 치상한 다음 2.5cm 간격으로 8mm Paper disc를 정치하여 8종류의 질소원을 첨가하여 배양한 배양액 및 배양여액을 20 μ l씩 점적하고 음건한 뒤 실행하여 20°C Incubator에 보관하여 대치 배양하였다. 배양시료는 매일 관찰하여 Control의 마늘 흑색썩음균핵병원균이 Petri dish에 다 자랄 때 항균활성을 조사하였다.

실험 결과 배양이 잘되는 질소원은 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 이었고, 항균활성 측정결과 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 의 경우 항균활성이 나타나지 않아 항균활성이 가장 강하고 배양이 잘되는 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 로 최종 선발하였다.

Table 5. Effects of nitrogen sources on cell growth of *B. pyrrocinia* CAB08106-4 at 28°C, 150 rpm in flask culture for 3, 5, 7 days

Nitrogen source	OD value(X10)		
	3 days	5 days	7 days
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.50	0.840	0.664
NH ₄ Cl	0.10	0.379	0.276
NaNO ₂	0.02	0.066	0.064
KNO ₃	0.40	0.650	0.649
NaNO ₃	0.50	0.812	0.800
NH ₄ NO ₃	0.10	0.211	0.198
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.50	0.838	0.782
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.80	1.004	0.852

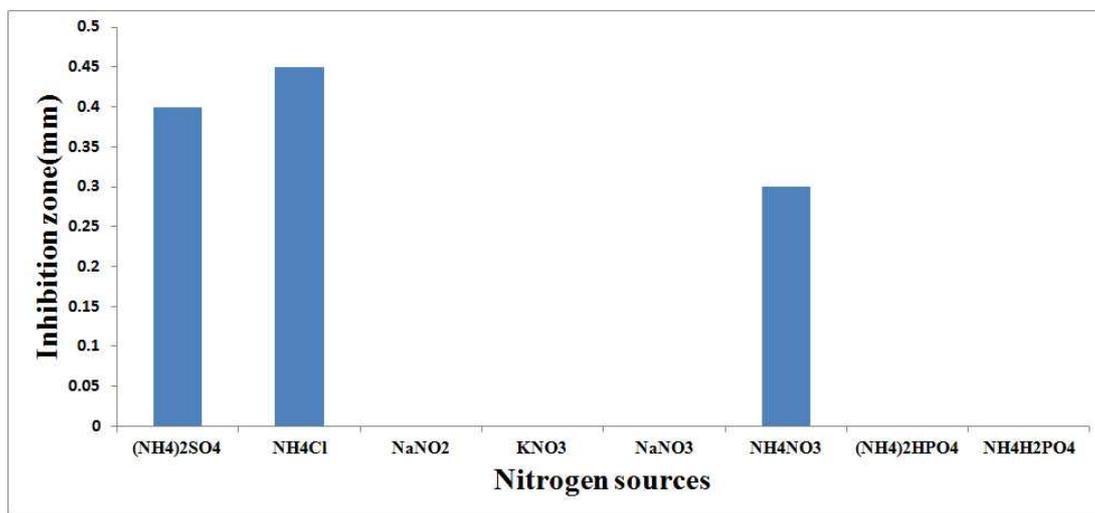


Fig. 3. Effects of nitrogen sources for *B. pyrrocinia* CAB08106-4, antagonistic fungi to the mycelia growth of white rot caused by *Sclerotium cepivorum* on PDA medium

선발한 (NH₄)₂SO₄의 최적농도를 결정하기 위하여 Pseudomonas basal medium의 질소원(NH₄-Cl)을 제거하고 0~0.5%까지 0.1 단위로 첨가하여 멸균하였다. 다음으로 미리 준비한 접종원을 100μl씩 첨가하여 Shaking incubator에 28°C, 150rpm으로 배양하여 7일 동안 Spectrophotometer를 이용해 660 nm파장으로 OD 값을 매일 측정하여 최적의 질소원 농도를 선발하였고, 각각의 시료를 채취해 마늘 흑색썩음균핵병원균에 대한 항균활성을 조사하였다. 항균활성 조사 방법은 질소원 선발실험과 동일하게 실시하였다.

실험 결과 (NH₄)₂SO₄ 0.1%에서 가장 높은 값을 나타내어 최적 농도로 선발하였다(Fig. 4).

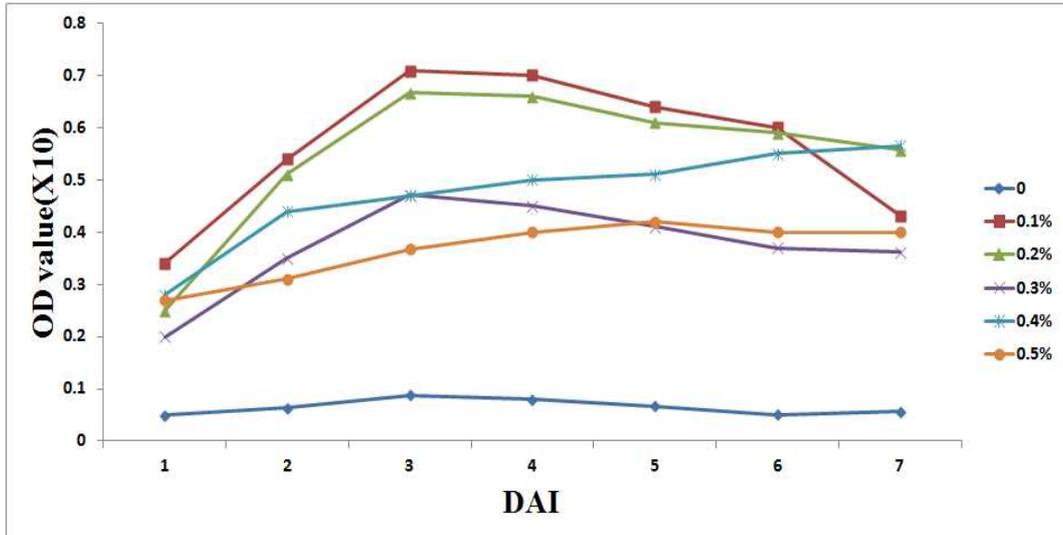


Fig. 4. Effects of different density $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ for cell growth of *B. pyrrocinia* CAB08106-4 at 28°C, 150 rpm in flask culture for 7 days

(3) 선발한 최적배지와 기존배지의 비교 및 당 이용성 실험

Pseudomonas basal medium에 선발한 탄소원(Glucose, 1%), 질소원($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.1%)을 첨가하여 선발한 최적배지를 제조하였다. 기존배지는 Nutrient broth를 멸균하여 준비하였다. 위와 같이 제조한 배지에 *B. pyrrocinia* CAB08106-4 배양액을 100 μl 씩 첨가하여 9일 동안 균의 성장정도를 Spectrophotometer, 660 nm를 이용하여 측정하였다(Fig. 5). 그 결과 최적배지에서 배양한 유효생균수가 기존배지에 비해 낮게 측정이 되어 추가영양분의 필요성을 판단하게 되었다. 추가 영양분의 공급시기를 판단하기 위해 당이용성 실험을 한 결과 3~4일차에 공급한다면 더 많은 유효생균수를 획득할 수 있다는 판단을 하였다. 당이용성 실험은 선발한 최적배지에 9일 동안 배양하여 매일 시료를 채취하여 DNS법을 이용하여 측정하였다. 먼저 표준곡선은 Glucose를 일정한 농도로 희석하여 제조한 후 DNS용액과 반응시켜 발색의 정도를 측정하였다(Fig. 6). 그리고 각각의 시료채취 시기에 일정량을 취하여 0.2 μm membrane filter를 이용해 배양여액을 만들어 DNS용액과 반응시킨 다음 Spectrophotometer, 550 nm를 이용하여 그 값을 그래프로 나타내었다(Fig. 7).

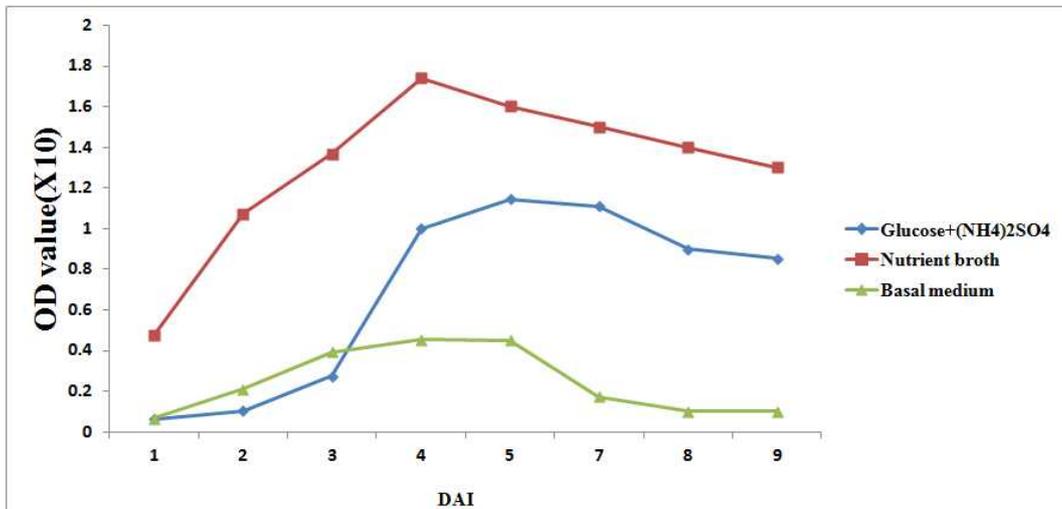


Fig. 5. Effects of glucose in $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ medium and nutrient broth for cell growth of *B. pyrocinia* CAB08106-4 at 28°C, 150 rpm in flask culture for 9 days

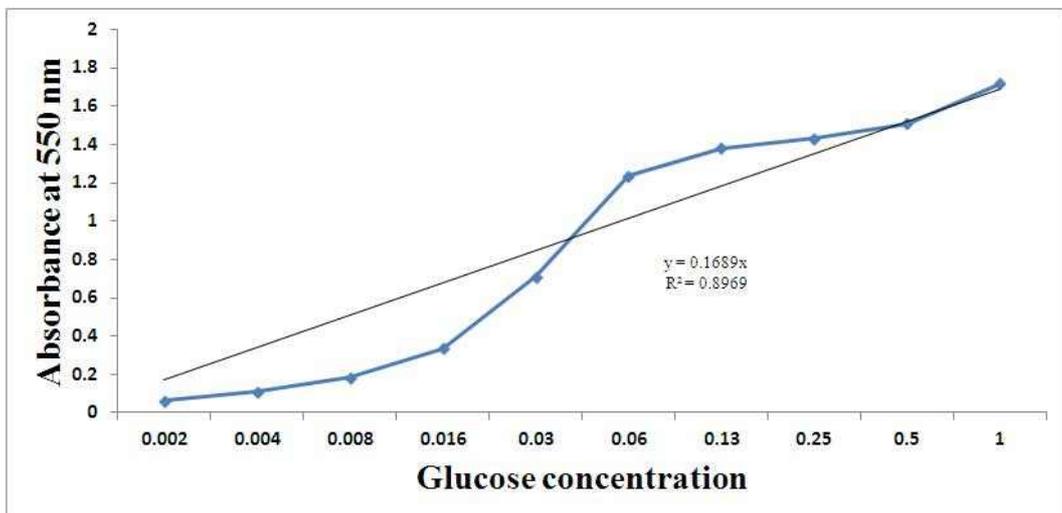


Fig. 6. Glucose standard curve

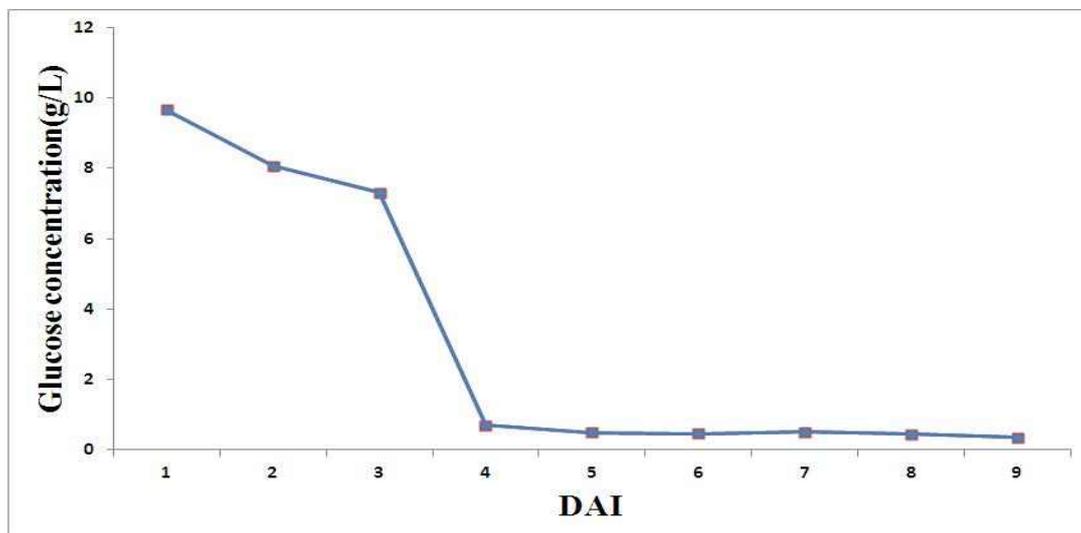


Fig. 7. Glucose in $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ medium for reducing sugar used DNS method

(4) 추가 영양원 선별 실험

Pseudomonas basal medium에 선별한 탄소원(Glucose, 1%), 질소원($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.1%)을 첨가하여 선별한 최적배지를 제조하여 *B. pyrrocinia* CAB08106-4의 싱글콜로니를 접종한 후 Shaking incubator에 28°C, 150rpm 조건으로 배양하였다. 배양일로부터 3일차에 추가 영양원으로 저분자 질소원인 Yeast extract, Beef extract, Casein, Casamino acid를 각각 3% 첨가하여 유효생균수를 Spectrophotometer, 660 nm를 이용해 측정하였다. 실험 결과 Beef extract에서 가장 우수하였다(Fig. 8). 추가영양원으로 선별한 Yeast Extract, Beef Extract의 농도를 1~3%로 첨가한 후 최적배지에 3일간 배양한 후에 동일한 방법으로 추가영양원을 첨가하여 배양을 실시한 후 첨가한 시기부터 Spectrophotometer, 660 nm를 이용해 생육조사를 실시하였다.

실험결과 먼저 추가 영양분을 넣고 배양하였을 때 Beef extract 3%에서 가장 많은 생균수를 관찰할 수 있었고, 3일간 배양한 후 추가영양원을 첨가한 것에서도 Beef extract 3%가 가장 배양이 잘 되었으며 그 다음에는 Yeast extract 1%였다. 그러나, Beef extract의 경우 배양은 우수하나 가격이 높아 상품화 추진시 제품의 제조 단가를 높이게 되는 원인이 되므로 추가 영양원으로 적당하지 않다고 판단이 되었다. 이에 비해 Yeast extract는 가격이 저렴하고 Beef extract와 유사한 효과를 관찰할 수 있어 최종 추가 영양원으로 선별하였으며 1%로 결정하였다. 또한, 모든 결과를 종합하면 추가영양분 첨가 실험은 Yeast extract 1%를 첨가시기에 상관없이 동일한 결과를 관찰할 수 있어 어느 시기에 넣어도 무관할 것으로 판단된다.

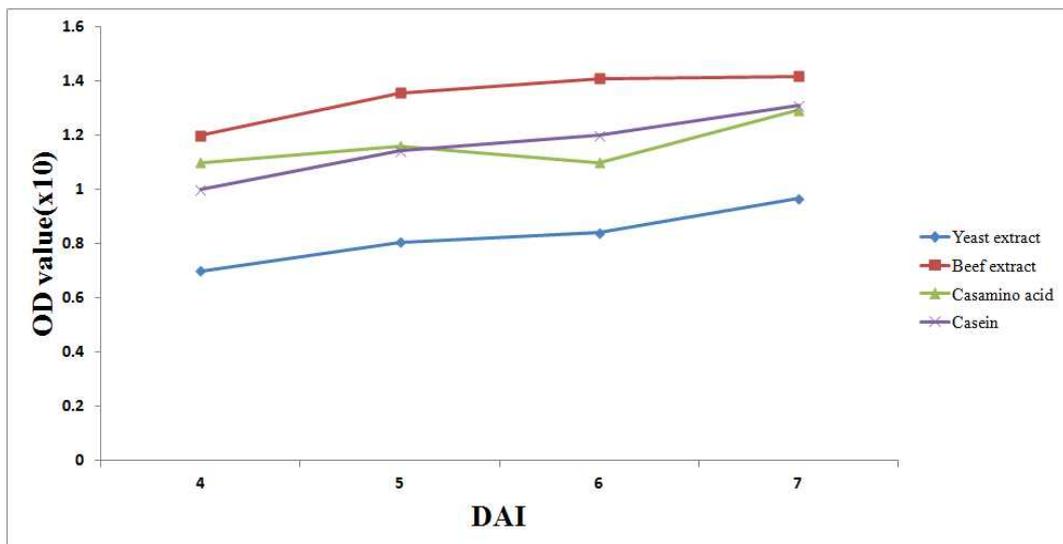


Fig. 8. Effects of glucose in $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ medium was added additional nutrients for cell growth of *B. pyrrocinia* CAB08106-4 at 28°C, 150 rpm in flask culture for 9 days

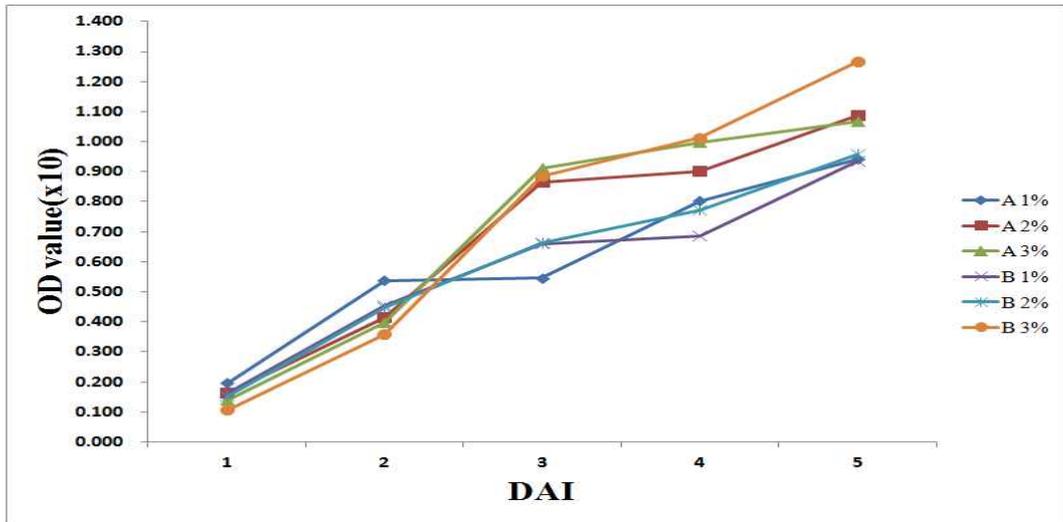


Fig. 9. Effects of glucose in $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ medium was before the added additional nutrients for cell growth of *B. pyrrocinia* CAB08106-4 at 28°C, 150 rpm in flask culture for 7 days
A : Beef extract, B : Yeast extract

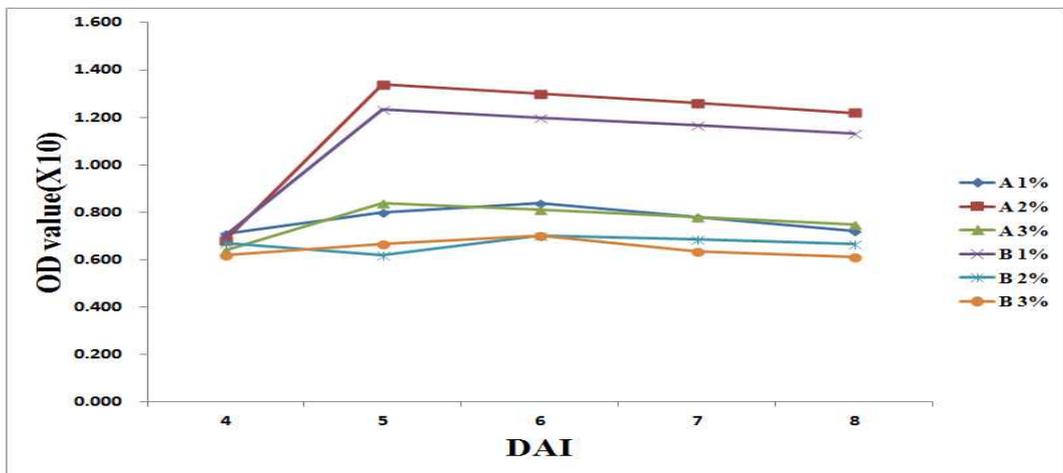


Fig. 10. Effects of glucose in $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ medium was later-added additional nutrients for cell growth of *B. pyrrocinia* CAB08106-4 at 28°C, 150 rpm in flask culture for 7 days
A : Beef extract, B : Yeast extract

다. *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 균주의 Jar-fermentor 활용실험

(1) 배지 단순화 실험(질소원)

Jar-fermentor를 활용하여 *B. pyrrocinia* CAB08106-4 균주 배양을 실시함에 있어 Pseudo-*monas* basal medium에 포함된 질소원과 최적 질소원을 동시에 첨가한 것과 첨가하지 않는 것의 생육을 비교하기 위해 실험을 실시하였다. Jar-fermentor 배양을 실시하기 위해 Seed culture를 실시하였다. Seed culture는 king's B 배지에 *B. pyrrocinia* CAB08106-4균주의 싱글 콜로니를 접종해 28°C, 150rpm 조건으로 17시간 배양해 사용하였다. 본 배양은 5L용

Jar-fermentor에 3L의 액체배지를 넣고 배양하였다. 액체배지는 최적 배지 조건인 Pseudomonas basal medium(NH_4Cl 제거 & 제거하지 않은 것) + 0.1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 에 glucose의 농도를 1%로 하여 배양을 하였다. 6시간 단위로 흡광도(660nm)를 이용해 배양정도를 측정하였다. 실험결과 전배양을 실시하고 본 배양을 실시할 때 최초 생균수는 fermentor A는 1.4×10^8 cfu/ml, fermentor B는 1.2×10^8 cfu/ml,이었다. 24시간 배양 후 생균수는 1.7×10^{10} cfu/ml, 1.5×10^{10} cfu/ml 으로 각각 관찰되었다. 질소원을 두 가지 첨가한 것과 한 가지 첨가한 것의 생균수는 차이가 없는 것으로 관찰되어 추후 Jar-fermentor 배양은 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 만 첨가하여 배지를 단순화하였다.

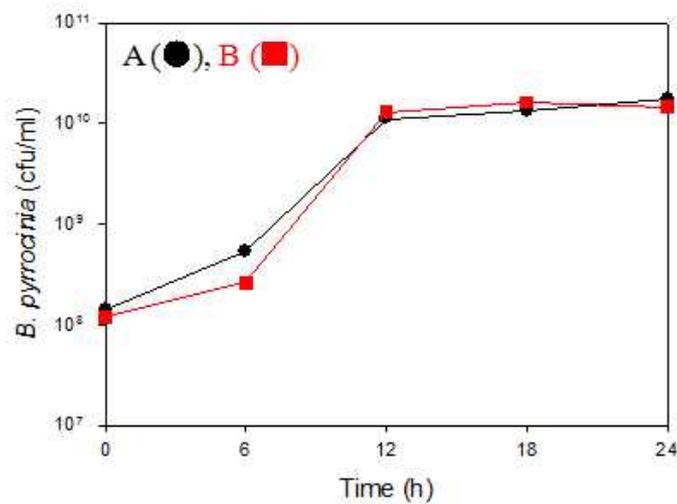


Fig. 11. Cultured in two different nitrogen source. A : NH_4Cl + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, B : $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

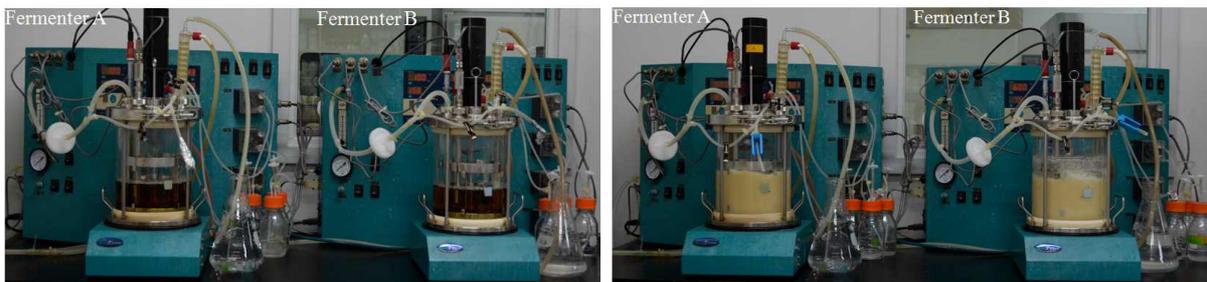


Fig. 12. Photos of Cultivation using Jar-fermentor before and after

(2) 최적 배양조건배지의 탄소원 이용능 조사

Jar-fermentor 배양을 실시하기 위해 Seed culture를 실시하였다. seed culture는 king's B 배지에 *B. pyrrocinia* CAB08106-4균주의 싱글클로니를 접종해 30°C, 150 rpm 조건으로 17시간 배양해 사용하였다. 본 배양은 5L용 Jar-fermentor에 3L의 배지액을 넣고 배양하였다. 배지액은 최적 배지 조건인 pseudomonas basal medium(NH_4Cl 제거) + 0.1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 1~5%

glucose 으로 탄소원 농도를 달리하여 배양하였고 DNS법을 이용해 탄소원의 잔량을 조사하였다. 1~5%까지 Jar-fermentor를 이용해 배양한 결과 5%에서 최적의 탄소원을 이용한 것으로 조사되었다. 플라스크에서 배양할 때보다 Jar-fermentor를 활용한 배양에서 탄소원을 짧은 시간에 많이 이용하는 것으로 관찰되었다.

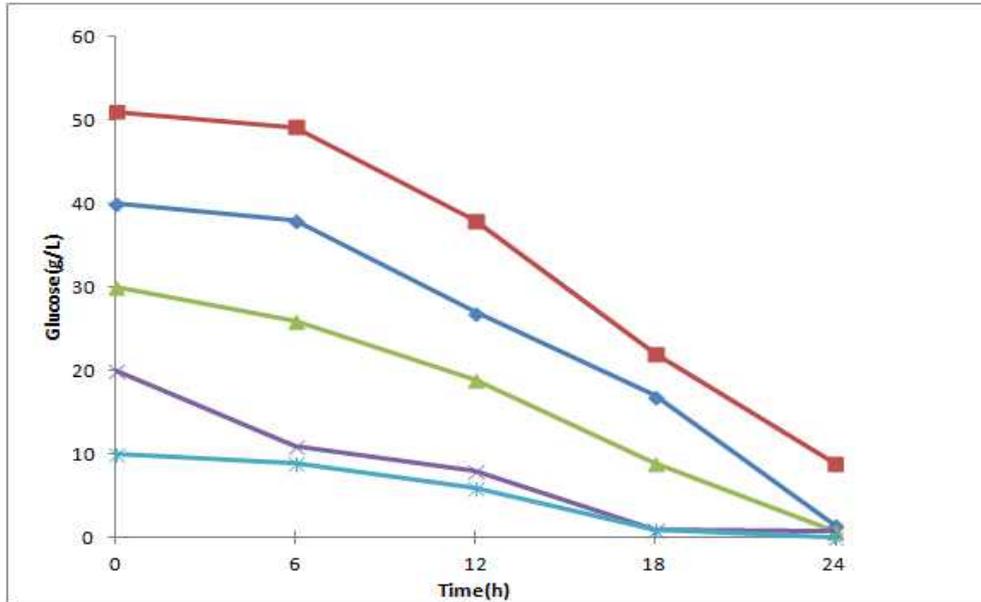


Fig. 13. Degree of concentration of carbon source used by *B. pyrrocinia* CAB08106-4

(3) 최종선발조건의 배양

B. pyrrocinia CAB08106-4 균주의 생육정도, 탄소원, 질소원의 이용정도를 조사하기 위해 Seed culture를 실시하였다. Seed culture는 king's B 배지에 *B. pyrrocinia* CAB08106-4균주의 싱글콜로니를 접종해 30°C, 150 rpm 조건으로 17시간 배양해 사용하였다. 본배양은 5L용 Jar-fermentor에 3L의 배지액을 넣고 배양하였다. 배지액은 최적 배지 조건인 *Pseudomonas* basal medium(NH₄Cl 제거) + 5% glucose + 0.1% (NH₄)₂SO₄으로 배양을 하였다. 6시간 단위로 흡광도(660 nm)를 이용해 배양정도를 측정하였고 DNS법, Ammonium 분석법을 이용해 탄소원 및 질소원의 잔량을 조사하였다. 그 결과 균주의 생육정도는 흡광도 37.5로 관찰이 되었고 탄소원은 8.8g, 질소원은 1.2g 정도가 남아있음을 알 수 있었다(Fig. 14).

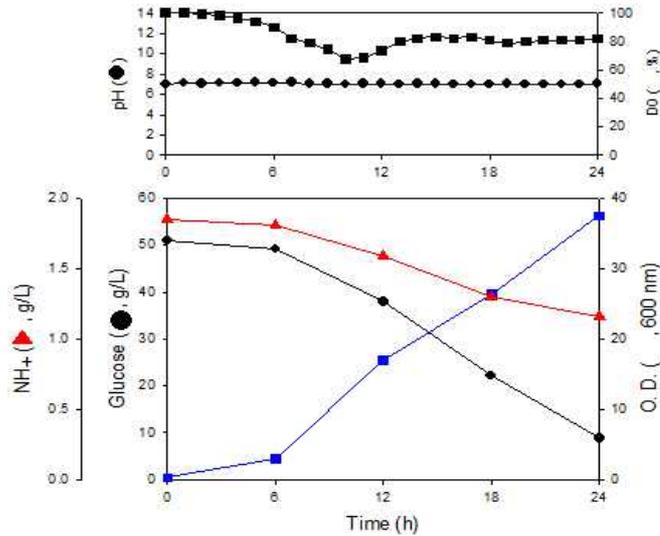


Fig. 14. Analysis of carbon(black) and nitrogen(red) sources on cultivation time of *B. pyrrocinia* CAB08106-4. strains.

라. 배양원제의 경시적 안정성 확인

B. pyrrocinia CAB08106-4 GR의 제조는 미생물 원료배양 완료된 후 담체에 흡착시켜 제조한다. 그러나, 제조설비나 환경 등의 변수가 발생하여 원료배양이 완료된 후 제품제조가 지연될 경우 배양원료를 임시 보관해야 할 경우가 발생하게 된다. 이에, 배양액의 보관온도와 일수를 조사하기 위하여 온도별, 시기별 유효생균수의 변화와 그에 따른 항균활성을 조사하였다. 배양이 완료된 대상균주 배양액은 4°C, 20°C, 30°C 항온기에 보관하면서 1일, 3일, 7일, 10일, 15일 간격으로 유효생균수 변화를 조사하였다. 원료배양은 *B. pyrrocinia* CAB08106-4 균주의 stock을 Nutrient Agar 배지에 획선 도말 한 뒤 30°C 항온기에서 72시간 배양하였다. 이후 형성된 싱글 콜로니를 Nutrient Broth배지에 24시간 접종 및 배양하여 seed culture를 만든 뒤 NB배지 100ml에 seed culture 100 μ l씩 접종하여 30°C 항온기에서 72시간 배양하였다. 준비된 배양액은 위의 조건으로 보관하며 유효생균수를 조사하였다. 시험 결과 4°C 보관에서는 최초 배양된 배양액의 생균수보다 소폭 감소하였으나, 보관 10일차 까지 유효생균수가 10⁸cfu/ml을 유지되었다가 15일차에서 다시 약간 감소하는 경향을 보였다. 반면 20°C 보관조건인 경우에는 보관 3일차까지 10⁸cfu/ml을 유지하다 7일차에서는 유효생균수 밀도가 감소하는 것을 확인 할 수 있었으며, 30°C 보관 조건에서는 배양 완료 후 보관 다음날부터 유효생균수가 지속적으로 감소하는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 15).

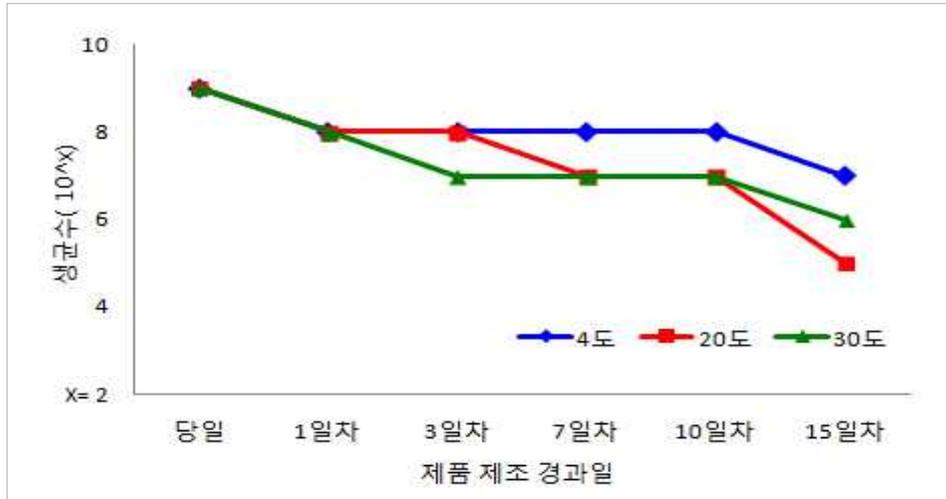


Fig. 15. Change of cell numbers of *B. pyrrocinia* CAB08106-4 strains by storage temperature

온도조건에 따른 실험결과 유효생균수 유지가 가장 좋았던 4°C 보관 배양액에 대한 항균활성을 조사하였다. PDA에서 배양한 마늘 흑색썩음균핵병원균인 *Sclerotium cepivorum* 균주의 균총 선단부를 8mm cork borer를 이용해 절편을 만든 뒤 4°C에서 보관한 배양액과 약 5cm간격을 두고 대치배양 시켰다. 시험 결과 4°C에서 1일, 3일, 7일, 10일, 15일 보관한 배양액 모두 *S. cepivorum* 균주에 대해 우수한 항균활성을 보였다(Fig. 16). 결론적으로 대상균주 배양액을 4°C 보관할 경우 유효생균수 변화가 크지 않으며, 항균활성 또한 큰 변화가 없는 것으로 확인되었다. *B. pyrrocinia* CAB08106-4 GR 제조 시 대상균주의 원료배양 직후 제품 제조를 하는 것이 바람직하겠으나, 부득이하게 일정기간 보관을 해야 하는 경우가 생긴다면, 최대 10일까지는 4°C에서 보관이 가능할 것으로 생각된다.

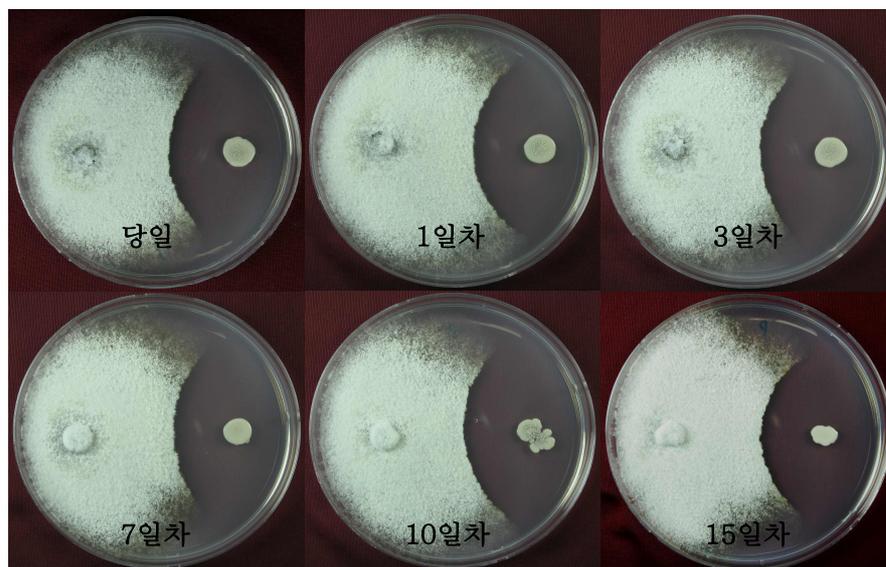


Fig. 16. Activity of *B. pyrrocinia* CAB08106-4 strains by storage at 4°C

2. 제형 및 처방 확립

가. 제품생산을 위한 제형 선발

B. pyrrocinia CAB08106-4균주는 마늘 흑색썩음균핵병원균에 우수한 활성을 나타내는 길항 미생물로 일반적인 농가의 마늘 흑색썩음균핵병 방제방법을 생각하여 희석 살포하는 희석제나, 토양에 직접살포하는 입제의 형태를 고려하였으며 균주의 특성이 *Bacillus*속 균주처럼 아포자를 형성하지 않기 때문에 온도와 장기보관에 민감함으로 균의 활성과 유지에 유리한 입제를 1차 제형으로 선발을 하였다.

나. 제제화 및 부자재 선발

일반적인 입제의 제조방법으로는 조립식, 샌드코팅, 흡착식이 있다. 본 연구에서는 샌드코팅의 경우 길항미생물인 *B. pyrrocinia* CAB08106-4의 특성이 호기성이기 때문에 유효생균수의 유지가 어려울 것으로 판단하여 조립식과 흡착식 입제를 검토하였다. 먼저 조립식 입제의 경우 증량제와 결합제 및 계면활성제(분산제, 습윤제 등)를 넣어 분쇄기(에머밀, 해머밀)에서 일정한 크기로 분쇄한 후에 반죽기(kneader)에서 물을 첨가하여 반죽하고, 조립기에서 1mm스크린을 사용하여 압출 조립을 한 후 건조하여 성형한다. 위와 같은 방법으로 5종의 증량제(Dextrin, Celite, Bentonite, Talc, Calcium carbonate)와 2종의 계면활성제인 고분자 음이온 2-Methyl-2-propenoic acid polymer with butyl 2-propenoate and ethenylbenzene, sodium salt와 습윤력이 우수하고 침투력과 붕괴력이 우수한 음이온인 Alenes, C14-16 alpha-sulfonated sodium salt를 선발하여 각각의 조건으로 액상원제로 제조한 *B. pyrrocinia* CAB08106-4균주를 총량에 10%씩 첨가하여 조립식 입제를 제제화 하였다.

두 번째 흡착식 입제의 경우는 일반적인 제조과정이 입상제오라이트나 입상규조토를 문선믹서에 투입하고 액상원제나 부성분을 함께 혼합한 후에 노즐을 통하여 균일하게 스프레이(spray)하여 제품화하게 되는 데, 본 연구에서는 Ken-mixer를 이용하였으며 부자재인 렉셈 C-200과 렉셈 Diagreeen 2종을 선발하여 액상원제로 제조한 균주를 총량에 10%씩 첨가하여 흡착식 입제를 제조하였다.

다. 제제 안정성 확인

선발한 부자재와 성형방법에 따라 제제화 한 시료를 희석평판도말법으로 유효생균수를 측정하였다. 각각의 시료를 5g씩 정량하여 45ml의 멸균수에 넣은 후 5분간 교반한 후 1ml를 취하여 멸균수 9ml이 담긴 테스트튜브에 넣고 총 볼륨을 10ml로 맞춘 다음 다시 1ml를 취하여 동일한 방법으로 10^{-7} 까지 희석하였다. 다음으로 $10^{-4} \sim 10^{-7}$ 까지의 희석액에서 100 μ l씩을 취해 NA배지에 평판도말 하였다. 도말한 NA배지는 30 $^{\circ}$ C Incubator 에 72시간 배양하여 유효생균수를 측정

하였다.

선발한 부자재로 제제화하여 유효성분의 안정성 확인 결과 조립식 입제의 경우 계면활성제가 첨가된 제제에서는 유효생균수가 검출되지 않았으며, 계면활성제를 제외하고 제조한 경우에는 압출 성형에 의한 열 발생과 열풍건조로 인하여 대상 균주가 사멸되어 유효생균수의 유지가 어려웠다. 이에 압출 성형시 압력을 낮추어 열 발생을 최소화 하고 자연풍에 의한 건조방법으로 제조를 하였지만 생균수 유지기간이 짧아 *B. pyrocinia* CAB08106-4균주의 제제화에 적합하지 않다고 판단되었다. 흡착식 입제의 경우에는 조립식과 달리 유효생균수의 유지가 비교적 안정적으로 나타났다(표 1). 이는 제제화 과정에서 열의 발생이 없고, 선발한 부자재의 특성이 흡착력과 흡수력이 매우 우수하여 건조과정이 필요하지 않기 때문인 것으로 판단된다.

표 1. 제조 방법에 따른 유효생균수 변화

제제별	유효생균수(1×10^8 cfu/g)				
	제조당일	7일차	14일차	21일차	28일차
조립식 입제	9.3×10^6	8.0×10^6	-	-	-
흡착식 입제	1.7×10^8	1.7×10^8	1.0×10^8	8.3×10^8	5.3×10^8

3. 제품제조 및 이화학적 안정성 확인

가. 제품제조 및 이화학적 안정성 특성

최종 선발한 2종의 부자재를 이용하여 *B. pyrocinia* CAB08106-4균주를 액상원제 (1×10^9 cfu/ml)로 제조하여 흡착식 입제로 시제품을 제조하여 이화학실험과 유효성분의 안정성 조건 및 확인을 위한 실험에 사용을 하였다. 렉셈 C-200으로 제조한 시제품의 이화학적 특성은 균일한 입자분포로 다공성이 우수하여 흡수능이 좋고 황갈색을 띠며 경도가 높다. pH는 6.24, 가비중 0.84이고 조성은 SiO₂가 75.5%, Al₂O₃가 12.7% 이고, 입도분포는 1-2mm가 85%, 1-0.5mm가 13%로 분포되어있다. 렉셈 Diagree의 경우는 pH가 5.44로 약산성이고 수분을 9% 정도 함유하고 있으며 경도가 C-200에 비하여 약하고 부정형의 연갈색이다.

나. 유효성분의 안정성 확보를 위한 조건 확립 및 안정성 확인

(1) 온도에 따른 유효성분의 변화

2종의 부자재를 사용하여 흡착식 입제로 제조한 시제품의 유효기간을 조사하기 위하여 보관 온도에 따른 유효생균수의 변화를 조사하였다. 온도 조건은 제품 생산 후 판매처의 보관을 고려하여 변온(실온)과 30℃(정온) 조건으로 보관하여 15일 간격으로 유효생균수를 조사하였다.

그 결과 렉셈 C-200 시제품의 경우 제조 후 15일 조사에서 유효생균수가 약간 증가하였으며

이 후에는 안정적으로 유지하였고, 렉셈 Diagreen의 경우 제조 후 75일차까지 유효생균수의 변화가 다소 심하였고 이후에는 안정적으로 유지하였다(그림 1).

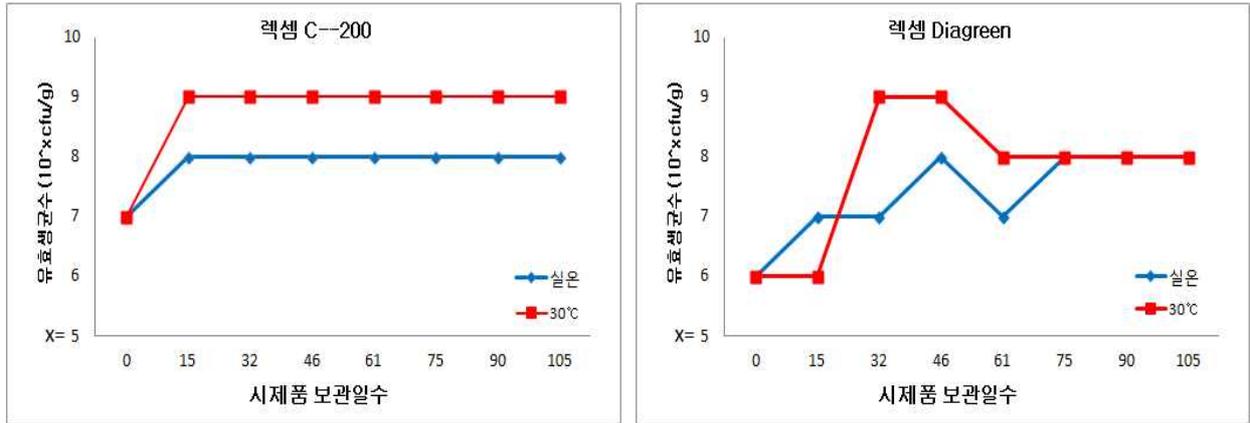


그림 1. 보관조건에 따른 유효생균수 변화

(가) 정온(30°C, 40°C)조건에 따른 생균수 변화

천공과 진공포장을 한 *B. pyrrocinia* CAB08106-4 GR의 온도변화에 따른 유효생균수 변화를 확인하기 위해 30°C, 40°C로 보관하여 조사하였다. 유효생균수 조사방법은 포장조건 시험과 동일하게 수행하였다. 시험결과 30°C(정온) 보관 조건에서는 천공포장의 경우 270일차까지 유효생균수가 10⁷cfu/g을 유지되었다가 300일차부터 유효생균수 급격히 감소하였으며, 진공포장 조건에서는 90일차까지 10⁸cfu/g 을 유지하였으나, 이후 계속적으로 감소되어 150일차부터는 유효생균이 검출되지 않았다(그림 2). 또한, 40°C 보관 시료의 경우 15일차에서 10⁶cfu/g을 유지하였으나, 30일차부터는 유효생균이 검출되지 않아 *B. pyrrocinia* CAB08106-4가 고온조건에서는 유효생균수 유지가 매우 어렵다는 것을 확인 할 수 있었다.



그림 2. 정온(30°C)보관의 제조일 경과에 따른 유효생균수 변화

(나) 실온(변온, 3.9~34.0℃) 조건에 따른 생균수 변화

시제품 제조 후 유통 및 장기보관을 고려하여 실온(변온, 3.9~34.0℃)조건에서 유효생균수 변화를 조사하였다. 유효생균수 조사는 포장조건 시험과 동일하게 수행하였다. 그 결과 실온에서 보관한 천공포장 제품은 360일차까지 유효생균수 10^7 cfu/g을 유지하였으나, 진공포장한 제품의 경우에는 180일차까지 10^7 cfu/g의 유효생균수를 나타내었으나 지속 감소하여 300일차부터는 유효생균이 검출되지 않았다(그림 3).

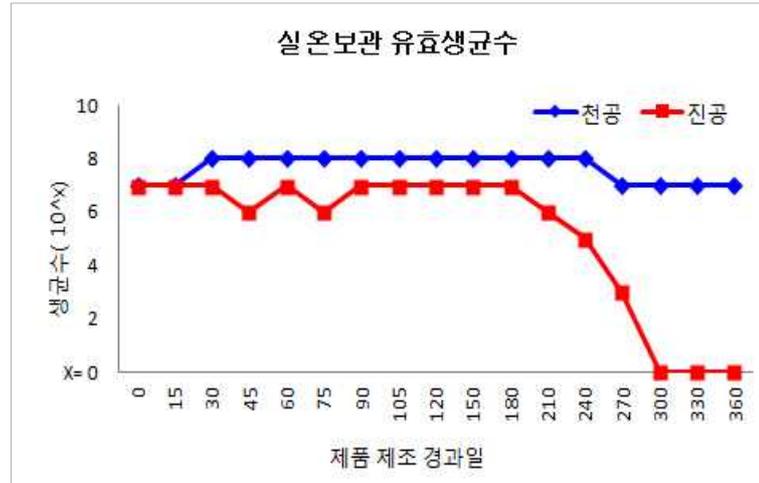


그림 3. 실온보관의 제조일 경과에 따른 유효생균수 변화

1차년도 소량포장 시험결과에서는 105일차까지 30℃ 조건에서 유효생균수 유지가 더 안정적인 것으로 조사되었으나, 2차년도 시험 결과에서는 시간이 경과될수록 30℃에서 유효생균의 밀도가 감소되는 것으로 확인되었으며, 오히려 실온에서 더 안정적인 양상을 나타내었다. 이는 대상균주가 특정조건에 의해 생육이 증진되거나 휴면포자를 형성하는 특성이 없어 생육중인 상태로 부자체에 흡착되었고, 생육적정온도와 비슷한 30℃에서 장기간 보관되면서 증식과 사멸이 반복되어 유효생균의 밀도와 활성이 차츰 감소된 것으로 생각되며, 실온의 경우에는 30℃이상의 온도에서도 보관되었으나, 일정기간 생육적온 이하의 온도 조건에 보관되어 대상균주의 증식과 사멸이 30℃ 보관에 비해 매우 더디게 발생되었기 때문으로 생각된다.

결론적으로 *B. pyrrocinia* CAB08106-4 GR은 30℃이상의 온도에서는 장기간 유효생균의 유지가 불가하나, 천공포장 조건 하에 보관 조건이 30℃이하라면 제품의 유통기간은 제조일로부터 12개월 이상까지도 가능할 것으로 생각된다.

(2) 포장 조건에 따른 유효성분의 변화

두 번째로 포장 조건에 따른 유효생균수의 변화를 조사하기 위하여 진공포장과 포장지 외부에 미세하게 구멍을 뚫어 내부에 적당한 산소의 공급과 수분의 유지를 위해 천공포장을 하여 실온과 정온 조건 하에 보관하여 조사하였다.

그 결과 렉셈 C-200의 경우 실온 보관시 천공포장의 경우 안정한 유효생균수를 유지한 반면에 진공포장에서는 유효생균수의 변화가 다소 심하였고, 정온 보관에서는 두 조건 모두 안정적으로 유지하였다(그림. 4). 렉셈 Diagreen의 경우 실온 보관시 천공포장의 경우 유효생균수의 변화가 약간 있었으나 비교적 안정하였고, 진공포장의 경우도 동일한 결과를 나타냈다. 반면에, 정온보관에서는 두 포장 조건 모두 유효생균수가 다소 불안정하였다(그림. 5). 또한, 흡착식 입제는 렉셈 C-200을 사용하며 천공포장하여 정온(30℃)에 보관하는 방법이 생균수 유지에 현재까지 가장 안정한 것으로 확인되었다.

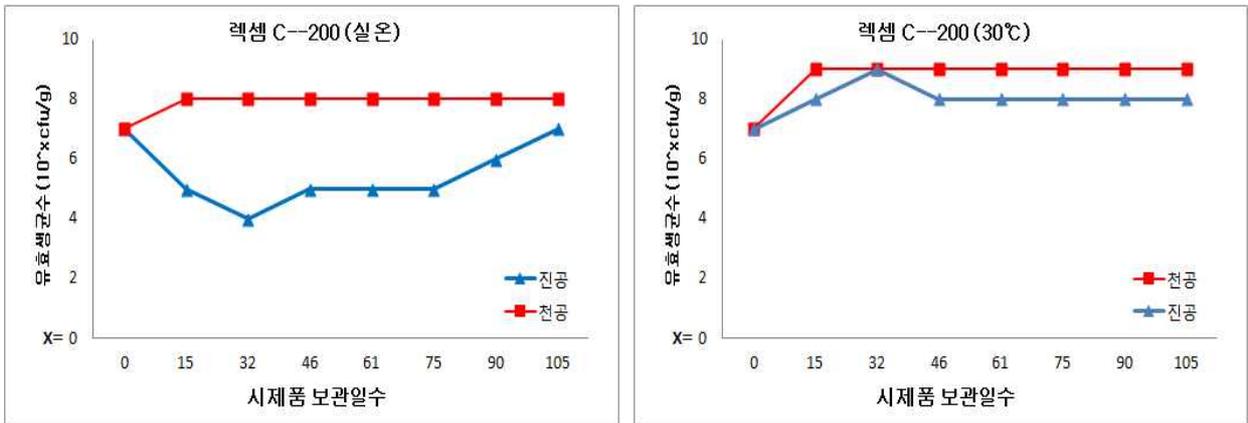


그림. 4. 렉셈 C-200 시제품의 포장조건 및 보관조건에 따른 유효생균수 변화

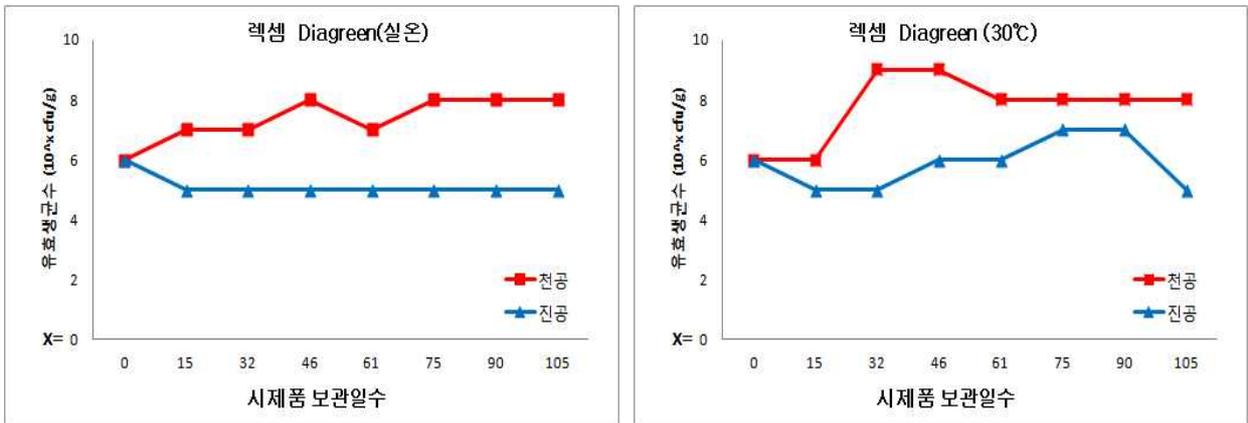


그림. 5. 렉셈 Diagreen의 포장조건 및 보관조건에 따른 유효생균수 변화

(3) 최종 선발 부자재의 이화학적 안정성 확인

앞서 실험을 통하여 최종 선발한 부자재인 렉셈 C-200(제오라이트)를 이용하여 제조한 *B. pyrocinia* CAB08106-4 GR의 안정성을 확인하였다. 대상균주의 호기성 특성을 반영한 포장봉투에 미세한 구멍을 뚫은 천공포장과 반대인 진공포장으로 10g씩 분포장하여 보관하면서 유효생균수를 측정하였다. 또한, 상품화시 판매될 제품 용량을 고려하여 포장용량을 확대하여 천공포장과 진공포장하여 유효생균수를 조사하였다. 유효생균수 조사는 120일차까지 15일 간격으로, 120일 이후부터는 30일 간격으로 360일까지 조사하였다. 유효생균수 측정은 1년차와 동일하게 희석평판 도말법을 이용하였다. 시험결과 천공포장 조건의 소량포장 시료는 360일차까지 유효생균수 10^7 cfu/g을 유지하였으며, 대량포장조건의 시료는 10^6 cfu/g을 유지하였다. 진공포장의 소량포장 조건일 경우 240일차까지 10^5 cfu/g의 유효생균수를 유지하였으나, 그 이후 270일차부터는 검출되지 않았으며, 대량포장 조건일 경우 105일차부터 유효생균수가 차츰 감소하는 경향을 보이다 240일차부터는 유효생균이 검출되지 않았다(그림. 6).

이러한 결과로 시간이 경과될수록 공기 유출입이 가능한 천공포장이 유효생균수 유지에 안정적인 것을 확인하였다.

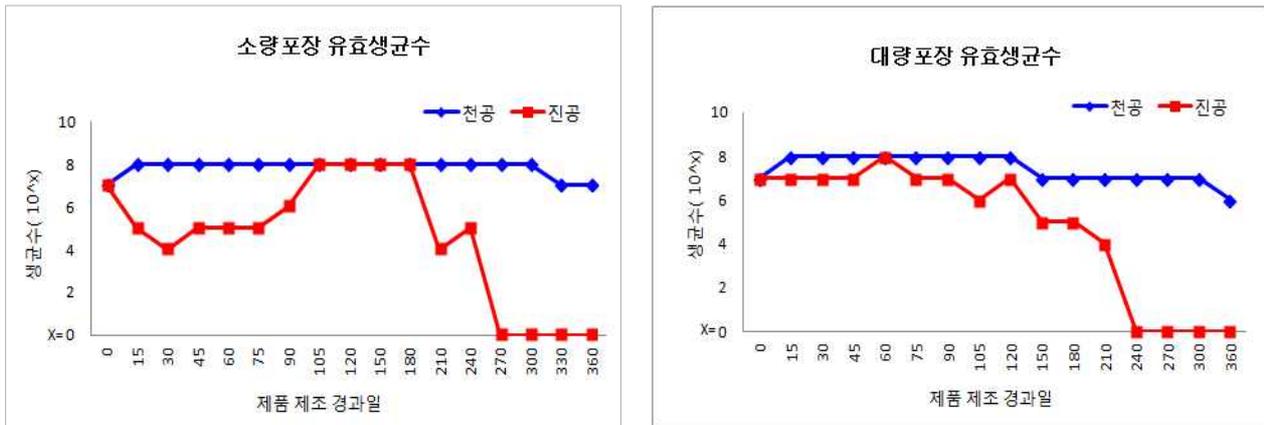


그림. 6. 소량포장(왼쪽)과 대량포장(오른쪽)조건에 따른 유효생균수 변화

4. 시제품의 효과 검증

가. 표적 외 작물에 대한 약해시험(병원성 검증)

농약품목등록 예비시험 실시를 위해 표적 외 작물에 대한 약해 시험을 수행하였다. 본 시험은 길항미생물인 *B. pyrrocinia* CAB08106-4균주의 마늘외의 작물에 병원성 유무를 조사하기 위한 시험으로 수생식물 2종은 벼와 부레옥잠으로 시험하였고, 육상식물 5종으로는 오이, 고추, 상추, 콩, 파를 선택하여 시험하였다. 수생식물 중 벼는 30℃에서 최아 후 모판에 파종하여 3~4엽기에 유묘를 사용했으며, 부레옥잠은 성체를 구입하여 신초가 나올 때 시험에 사용하였다. 육상식물은 각 작물의 발아 조건에 따라 트레이에 파종하여 2~3엽기 이후 원형 포트(Ø80mm)에 정식하여 사용하였다. 길항미생물의 처리는 액상원액을 100배, 200배로 희석하여 식물의 전체에 약액이 충분히 묻도록 분무살포(200L/10a)하였다. 조사는 처리 3, 5, 7일 후 식물외관상에 나타는 반점, 괴사, 갈변, 등의 변화를 관찰하였다. 그 결과 수생식물 2종, 육상식물 5종 모두에서 이상 증상은 발견되지 않아 병원성은 없는 것으로 판단되었다.

나. 길항미생물제제의 사용량에 따른 방제효과

길항미생물제제의 친환경자재등록 및 생물농약품목등록을 위한 시험신청을 위한 예비자료로 사용량에 따른 방제효과를 검토하였다. 길항미생물을 입제로 제조하여 마늘 종구 파종전 2011년 11월 10일에 토양혼화 처리하여 예비시험을 수행하였다. 시험결과 20kg처리구에서 66.0%의 방제효과를 나타냈으며 10kg에서는 62.3%로 무처리와 유의차가 있었고, 5kg에서는 35.8%로 인정되지 않았으나, 무처리의 발병율이 5.3% 다소 낮아 정확한 방제효과를 기대하기는 어려웠다(표 1). 그러나, 사용량 10kg와 20kg의 경우 20kg에서 방제효과가 더 높았으나 유의차가 없어 제품화 이후 판매가를 고려하여 10kg으로 결정하였다.

표 1. 전북 부안군 포장의 사용량에 따른 마늘 흑색썩음균핵병 방제효과

처 리 내 용	사용량 (10a당)	발 병 주 율(%)			평균	방제가 ^b (%)
		I 반복	II 반복	III 반복		
<i>B. pyrrocinia</i> CAB08106-4 GR	5kg	3.2	2.8	4.2	3.4 ab ^a	35.8
	10kg	1.6	2.4	2.0	2.0 b	62.3
	20kg	2.2	1.4	1.8	1.8 b	66.0
무 처 리		5.4	4.2	6.4	5.3 a	-

C.V.(%) ----- 21.4

^aValues designated by the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test ($P \leq 0.05$).

$${}^b\text{방제가}(\%) = 1 - \frac{\text{처리구 발병율}}{\text{무처리구 발병율}} \times 100$$

5. 천연작물보호제 등록을 위한 약효, 약해시험 및 현장실증시험

가. 등록시험 1년차

B. pyrocinia CAB08106-4 GR의 천연작물보호제 등록신청을 위하여 공인 시험기관인 한국 식물환경연구소와 식물보호연구소에서 마늘 흑색썩음균핵병에 대해 약효·약해 시험을 실시하였다. 한국식물환경연구소의 경우 충남 태안지역에서 시험하였으며, 마늘 파종전 10kg/10a로 토양혼화처리 한 후 파종하여 226일차에 최종 조사한 결과 무처리 대비 64.0%의 방제효과를 나타내었다. 식물보호연구소의 경우 전남 고흥지방에서 시험하였으며 동일한 방법으로 처리하여 231일차에 최종 조사한 결과 무처리 대비 66.0%의 방제효과를 나타내어 천연작물보호제 등록기준인 무처리 대비 50%를 만족하는 결과를 나타내었다(Table 1).

Table 1. Control effect of *Burkholderia pyrocinia* CAB08106-4 GR on Garlic white rot in field trials in Taeon and Goheung.

시험약제	이병주율(%)				유의차 ^a (DMRT)	방제가 ^b (%)
	I 반복	II 반복	III 반복	평균		
<i>Burkholderia pyrocinia</i> CAB08106-4 GR	7.7	5.3	6.3	6.4	a	64.0
무 처 리	20.2	17.8	15.4	17.8	b	-

C. V. (%) ----- 11.5

^aValues designated by the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test ($P \leq 0.05$).

$${}^b\text{방제가}(\%) = 1 - \frac{\text{처리구 발병율}}{\text{무처리구 발병율}} \times 100$$

시험약제	이병주율(%)				유의차 ^a (DMRT)	방제가 ^b (%)
	I 반복	II 반복	III 반복	평균		
<i>Burkholderia pyrocinia</i> CAB08106-4 GR	11.0	12.5	9.0	10.8	a	66.0
무 처 리	30.5	29.5	35.5	31.8	b	-

C. V.(%) ----- 16.3

나. 등록시험 2년차

1년차와 마찬가지로 *B. pyrocinia* CAB08106-4 GR의 천연작물보호제 등록신청을 위하여 공인 시험기관인 한국식물환경연구소와 식물보호연구소에서 마늘 흑색썩음균핵병에 대해 2년

차 약효·약해 시험을 실시하였다. 한국식물환경연구소의 경우 충남 태안지역에서 시험하였으며, 마늘 파종전 10kg/10a로 토양혼화처리 한 후 파종하여 245일차에 최종 조사한 결과 무처리 대비 61.8%의 방제효과를 나타내었다. 식물보호연구소의 경우 1년차와 달리 전남 함평지방에서 시험하였으며 동일한 방법으로 처리하여 243일차에 최종 조사한 결과 무처리 대비 65.7%의 방제효과를 나타내어 천연작물보호제 등록신청 기준인 무처리 대비 50%를 만족하는 결과를 나타내었다(Table 2).

Table 2. Control effect of *Burkholderia pyrocinia* CAB08106-4 GR on Garlic white rot in field trials in Taeon and Hampyeong.

시험약제	이병주율(%)				유의차 ^a (DMRT)	방제가 ^b (%)
	I 반복	II 반복	III 반복	평균		
<i>Burkholderia pyrocinia</i> CAB08106-4 GR	4.5	4.0	5.5	4.7	a	61.8
무 처리	11.5	12.5	13.0	12.3	b	-

C.V. ----- 6.4

^aValues designated by the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test ($P \leq 0.05$).

$$^b\text{방제가}(\%) = 1 - \frac{\text{처리구 발병율}}{\text{무처리구 발병율}} \times 100$$

시험약제	이병주율(%)				유의차 ^a (DMRT)	방제가 ^b (%)
	I 반복	II 반복	III 반복	평균		
<i>Burkholderia pyrocinia</i> CAB08106-4 GR	8.0	9.5	11.5	9.7	a	65.7
무 처리	31.0	26.5	27.5	28.3	b	-

C.V. -----14.1

다. 미생물제제의 적용 확대 및 농가실증

양파 흑색썩음균핵병은 또한 토양전염성 병해로 마늘이나 파, 쪽파에 발생하는 흑색썩음균핵병균과 동일하다. 따라서 본 연구에서는 *B. pyrocinia* CAB08106 GR의 양파 흑색썩음균핵병에 방제효과를 검토하여 천연작물보호제의 등록 후 적용확대를 가능성을 보고자 실시하였다.

시험은 2012년 10월 6일 시험약제를 정식전 토양혼화 처리하였으며, 대조약제로 플로린코나 줄 수화제를 정식전 뿌리침지 처리하여 실시하였다. 모든 처리구는 난괴법 3반복으로 시험구를 배치하여 수행하였으며 이병주율을 조사하였다. 그 결과 시험약제의 방제효과는 무처리 대비 57.9%로 생물농약으로 등록가능한 수준이었으며, 마늘 이외에 *Sclerotium cepivorum*에 의해

발생하는 균핵병에 대해 방제가능성이 높다고 판단된다(Table 3).

Table 3. Control effect of *B. pyrocinia* CAB08106-4 GR on Onion white rot caused by *Sclerotium cepivorum*.

시험약제	이병주율(%)				유의차 ^a (DMRT)	방제가 ^b (%)
	I 반복	II 반복	III 반복	평균		
<i>Burkholderia pyrocinia</i> CAB08106-4 GR	5.3	6.4	5.5	5.8	a	57.9
플루퀸코나졸 수화제 (대조)	2.0	4.5	0.8	2.4	a	82.5
무처리	14.3	18.4	8.6	13.7	b	-
C. V. (%)	-----				31.8	

^aValues designated by the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test ($P \leq 0.05$).

$$^b\text{방제가}(\%) = 1 - \frac{\text{처리구 발병율}}{\text{무처리구 발병율}} \times 100$$

또한, 전남 고흥 지방과 제주 지역에 자체 실증시험을 한 결과 고흥 시험포장의 경우 56.1%, 제주 포장의 경우 61.7%의 방제효과를 나타내었다(Table 4). 모든 시험에서 천연작물보호제 등록기준인 무처리 대비 50%이상의 방제효과를 나타내었으며, 미생물제제의 특성상 지역의 토성이나, 환경조건에 영향을 많이 받기 때문에 1회 처리가 아닌 지속적으로 처리를 한다면 미생물의 토양내 밀도를 높여줌으로써 충분히 방제효과를 높일 수 있을 것으로 생각된다.

Table 4. Control effect of *Burkholderia pyrocinia* CAB08106-4 GR on Garlic white rot caused by *Sclerotium cepivorum* in Goheung and Jeju.

시험약제	이병주율(%)				유의차 ^a (DMRT)	방제가 ^b (%)
	I 반복	II 반복	III 반복	평균		
<i>Burkholderia pyrocinia</i> CAB08106-4 GR	5.7	6.8	5.8	6.1	a	56.1
테부코나졸 유제 (대조)	2.5	1.8	3.0	2.4	a	82.7
무처리	13.7	15.2	12.8	13.9	b	-
C.V. (%)	-----				12.4	

시험약제	이병주율(%)				유의차 ^a (DMRT)	방제가 ^b (%)
	I 반복	II 반복	III 반복	평균		
<i>Burkholderia pyrocinia</i> CAB08106-4 GR	5.1	7.5	6.6	6.4	a	61.7
테부코나졸 유제 (대조)	3.1	1.6	3.3	2.7	a	83.8
무 처 리	17.3	17.9	15.0	16.7	b	

C.V. (%) ----- 17.0

^aValues designated by the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test ($P \leq 0.05$).

$$^b\text{방제가}(\%) = 1 - \frac{\text{처리구 발병율}}{\text{무처리구 발병율}} \times 100$$

제 2절 마늘 흑색썩음균핵병 생물농약의 방제기술 체계 확립

1. 길항미생물의 특성 검정

마늘 흑색썩음균핵병균의 증식을 억제하는 *B. pyrrocinia* CAB08106-4 균주는 상추 잿빛곰팡이병, 균핵병, 생강 근경썩음병, 고추 탄저병 등에도 우수한 길항력을 나타내었으나 고추 역병균에는 효과가 없었다(표 1). 따라서 앞으로 이 균주는 생물농약으로 상용화 되면 광범위한 미생물제제로서 그 이용 가치가 높을 것으로 판단된다.

표 1. *Burkholderia pyrrocinia* CAB080106-4의 다른 병원균에 대한 길항력

마늘 흑색썩음균핵병균	생강 근경썩음병균	길 항 력(ϕ mm)			
		상추 잿빛곰팡이병균	상추 균핵병균	고추 탄저병균	고추 역병균
32	42	30	40	34	0

B. pyrrocinia CAB08106-4 균주는 시험에 사용한 모든 당을 탄소원으로 이용할 수 있었다(표 2). 이러한 결과는 배양배지의 선택을 폭넓게 할 수 있기 때문에 미생물농약의 생산을 위하여 대량 배양시 균체 생산비용을 낮출 수 있는 우수한 특징으로 여겨진다.

표 2. *Burkholderia pyrrocinia* CAB080106-4의 영양 요구도

Cellobiose	Trehalose	D-Pratinose	Mannitol	Sorbitol	Sucrose	Glucose
+	+	+	+	+	+	+

※ + : 이용, - : 이용 못함

토양전염성 식물병원균의 예방 및 방제를 위하여는 길항미생물 또한 토양에 처리되어야 한다. 토양 중에는 무수히 많은 미생물이 존재하여 서로 영양 경합을 하거나, 각종 항생물질을 생산하여 상호 길항을 하고 있다. 길항미생물 *B. pyrrocinia* CAB08106-4 균주는 20ppm의 황산스트렙토마이신에서도 생육이 가능하기 때문에 토양 정착시 기타의 미생물에 대하여 우점할 수 있을 것으로 판단된다(표 3).

표 3. *Burkholderia pyrrocinia* CAB080106-4균주의 항생제 내성

항 생 제	농 도(ppm)		
	5	10	20
Streptomycin sulfate	+	+	+

길항미생물 *B. pyrrocinia* CAB08106-4 균주는 마늘 이외의 작물 발아에 독성을 나타내지 않았다. 따라서 CAB08106-4 균주는 미생물 농약으로서 광범위한 작물에 사용이 가능하며 약해의 위험성이 없을 것으로 생각된다(표 4).

표 4. *Burkholderia pyrrocinia* CAB080106-4균주의 작물에 대한 독성

구 분	발 아 율 (%)			
	무	과	콩	참깨
<i>B. pyrrocinia</i> CAB08106-4	87	93	100	100
무 처 리	90	100	70	97

2. 항균활성물질의 특성 검정

가. 활성성분의 분리 및 정제

항균활성을 보이는 미생물 배양액의 chloroform분획층을 농축한 뒤 다시 시료를 chloroform에 녹여 silica gel column에 loading한 후, chloroform, chloroform : methanol(50:1), chloroform : methanol(20:1), chloroform : methanol(10:1), methanol 용매를 이용하여 단계별로 300ml 씩 silica gel column chromatography를 수행하였다

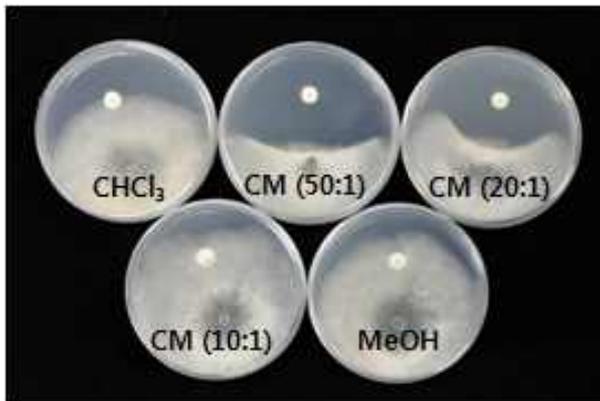


그림 1. Silica gel column 분획물의 항균활성



그림 2. Silica gel column 분획물의 TLC 분석

각 용출물에 대하여 항균활성을 검정한 결과, chloroform : methanol(50:1)과 chloroform : methanol(20:1) 분획에서 항균활성이 검출되었다(그림 1). 또한 이들 분획물에 대하여 hexane : ethyl acetate(5:1)를 전개용매로 TLC 분석을 수행하였다(그림 2).

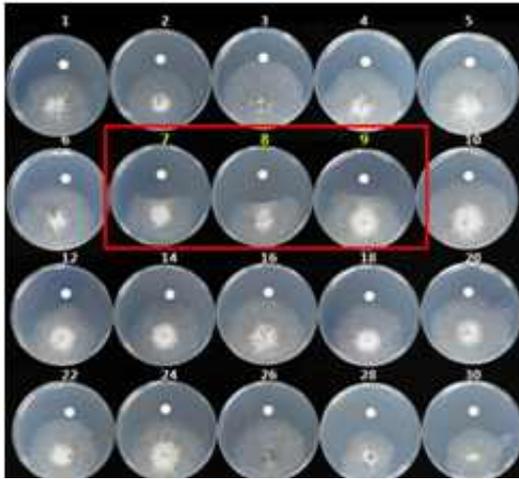


그림 3. Sephadex LH-20 column 분획물의 항균활성

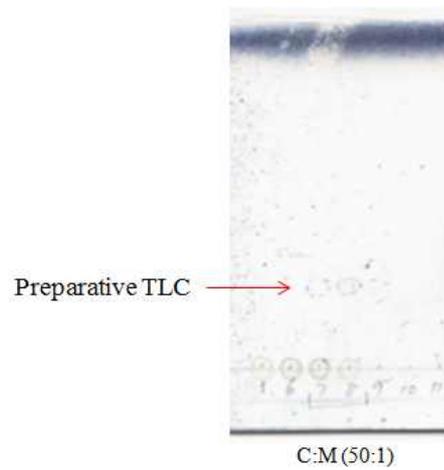


그림 4. Sephadex LH-20 column 분획물의 TLC 분석

이후 chloroform : methanol(50:1) 분획을 농축한 후, chloroform : methanol(1:1)의 전개용매를 이용하여 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하였다. Sephadex LH-20 column에서 용출된 각 분획물에 대하여 항균활성을 검정한 결과, 일군의 활성분획을 얻었으며(그림 3), 또한 이들 분획물에 대하여 hexane : ethyl acetate(5:1)를 전개용매로 TLC 분석을 수행하였다(그림 4). 이들 활성분획을 농축한 후 hexane : ethyl acetate(5:1)를 전개용매로 preparative silica gel TLC(thin layer chromatography)를 수행하였으며, 그 결과 활성성분 compound 1(약 0.8 mg)을 정제하였다(그림 5).

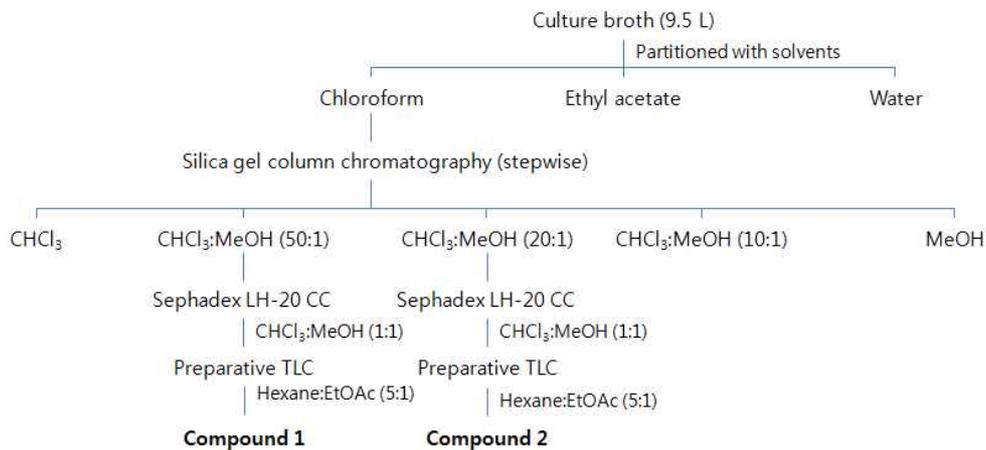


그림 5. 미생물 배양여액으로부터 활성화합물의 분리 및 정제 과정

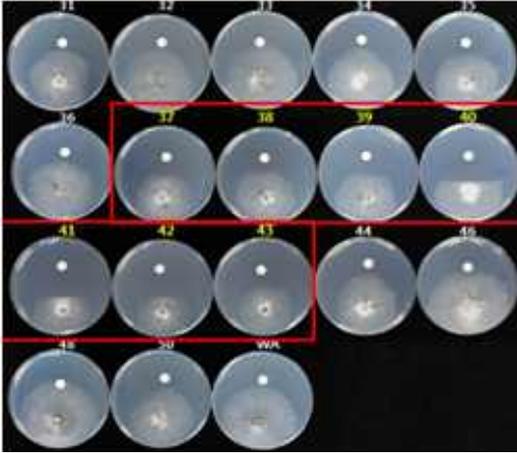


그림 6. Sephadex LH-20 column 분획물의 항균활성

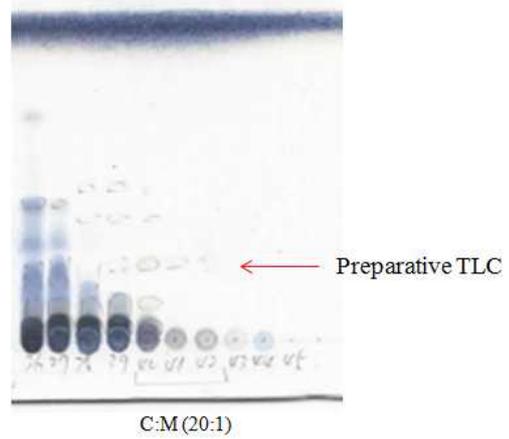


그림 7. Sephadex LH-20 column 분획물의 TLC 분석

Chloroform : methanol(20:1) 분획의 활성화합물 또한 위와 유사한 방법으로 정제하였다. 즉 chloroform : methanol(20:1) 분획을 농축한 후, chloroform : methanol(1:1)을 전개용매로하여 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하였다. 각 분획물에 대하여 항균활성을 검정하고 TLC분석을 수행한 후(그림 6 및 그림 7), 활성분획은 농축하여 hexane : ethyl acetate(5:1)를 전개용매로 preparative silica gel TLC(thin layer chromatography)를 수행하였다. 그 결과 활성성분 compound 2(약 0.3 mg)를 정제하였다(그림 5). Preparative silica gel TLC로부터 정제한 각 화합물의 항균활성을 검정한 결과(그림 8), chloroform : methanol(50:1) 및 chloroform : methanol(20:1)에서 분리한 각각의 항균화합물은 그림 4와 그림 7에 나타낸 바와 같이 동일한 Rf 값을 지니고 있었다. 따라서 두 항균 화합물을 HPLC(그림 9)로 비교하였으며 그 결과 동일한 화합물로 판명되었다. 그림 10에 항균활성물질의 UV spectrum을 나타내었다.

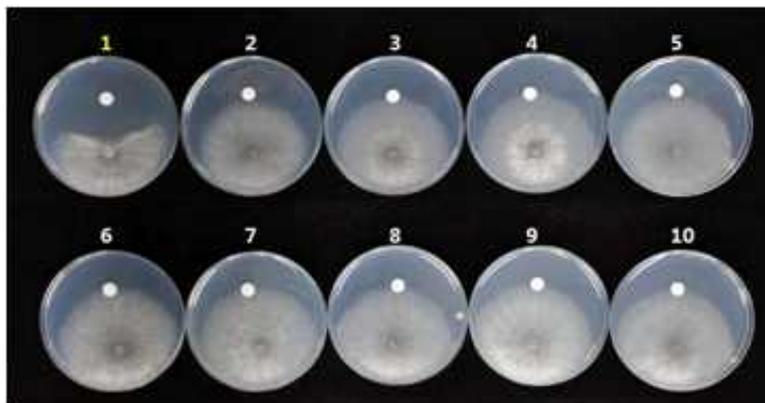


그림 8. Preparative TLC로 정제한 화합물들의 항균활성 (1번은 그림 7에서 화살표로 나타낸 화합물임)

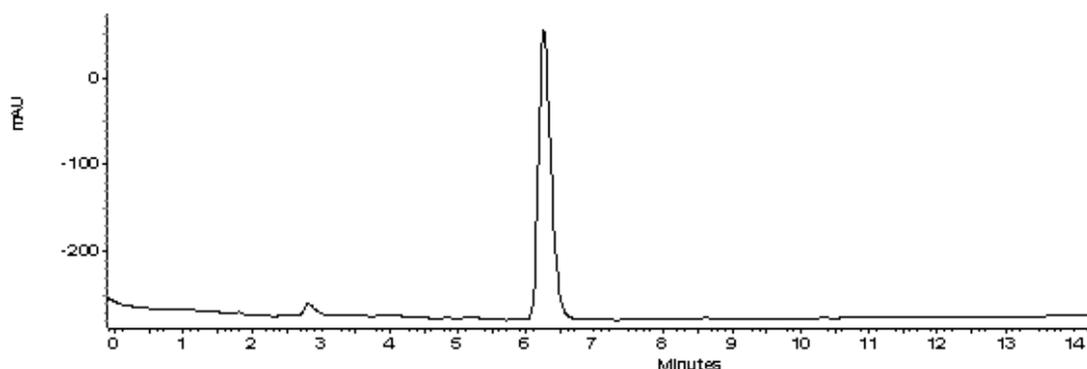


그림 9. 정제한 향균활성물질의 HPLC profile (column: ODS ϕ 4.6 \times 150 mm; flow rate: 1.0 ml/min; solvent: 0-2 min (30% aqueous MeOH), 2-12 min (30 \rightarrow 100% aqueous MeOH gradient), 12-14 min (100% MeOH))

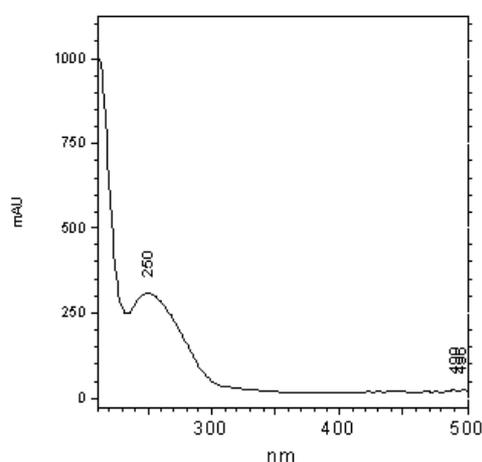


그림 10. 정제한 향균활성물질의 UV spectrum

나. 활성성분의 화학구조 해석

(1) NMR spectrum의 측정 및 해석

활성화합물의 화학구조를 규명하기 위하여 CDCl_3 에 녹여 ^1H NMR, ^{13}C NMR, ^1H - ^1H COSY, HMQC 및 HMBC spectrum을 측정, 해석하였다. ^1H NMR spectrum의 측정 및 해석: ^1H NMR spectrum(그림 11)을 측정한 결과, 8.27 ppm에서 NH 혹은 OH에 기인하는 exchangeable singlet proton, 7.52, 7.45, 7.43, 6.84, 6.83 ppm에서 다섯 개의 aromatic methine proton이 관찰되었다. 이같은 ^1H NMR spectrum은 본 화합물이 aromatic compound임을 제시하였다.

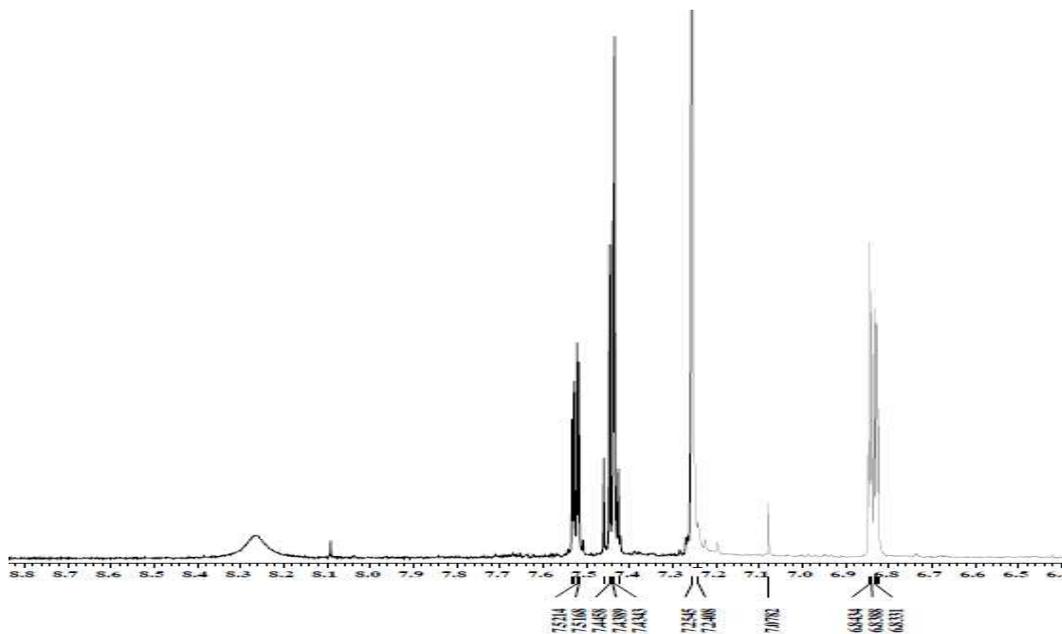


그림 11. 활성화합물의 ^1H NMR spectrum

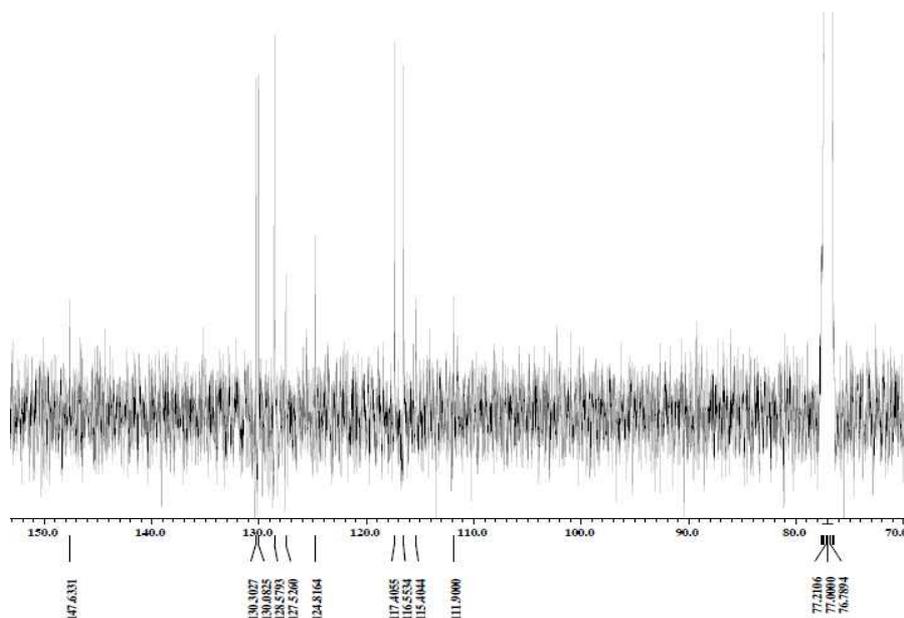


그림 12. 활성화합물의 ^{13}C NMR spectrum

^{13}C NMR spectrum의 측정 및 해석: ^{13}C NMR spectrum(그림 12)을 측정한 결과, 130.3, 130.1, 128.6, 117.4, 116.6 ppm에서 다섯 개의 sp^2 methine carbon, 147.6, 127.5, 124.8, 115.4, 111.9 ppm에서 다섯 개의 sp^2 quaternary carbon이 관찰되었다. 이는 ^1H NMR spectrum으로부터 유추한 바와 같이 본 화합물이 aromatic compound임을 나타내었으며, 또한 본 화합물은 6개의 proton과 10개의 carbon으로 구성된 방향족 화합물임을 제시하고 있다.

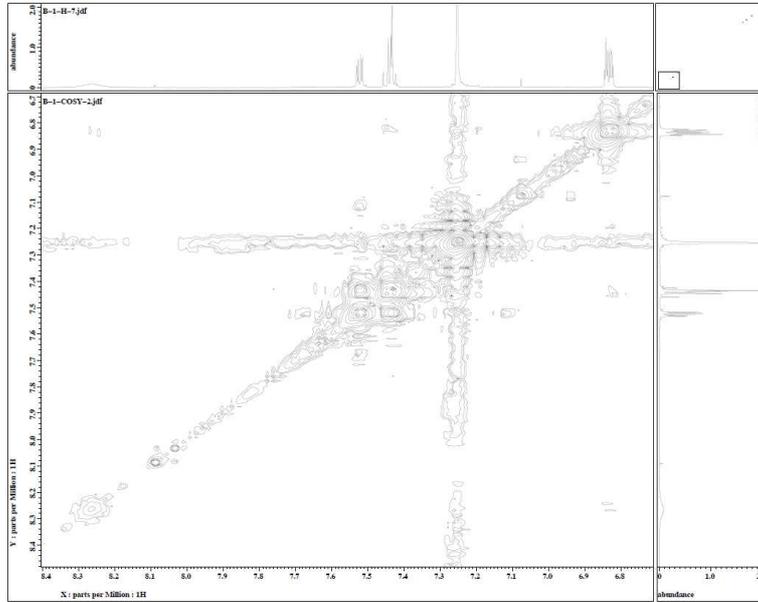


그림 13. 활성화합물의 ^1H - ^1H COSY spectrum

^1H - ^1H COSY spectrum의 측정 및 해석: 본 화합물의 화학구조는 2D-NMR spectrum의 측정 및 해석에 의하여 규명되었다. 활성화합물의 부분구조($^3J_{\text{H-H}}$)를 규명하기 위하여 ^1H - ^1H COSY spectrum(그림 13)을 측정하여 해석하였으며, 그 결과, 그림 16에 도시한 두 개의 부분구조가 밝혀졌다.

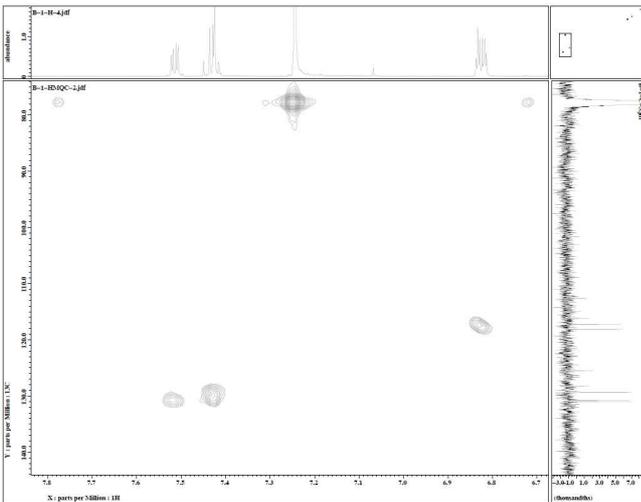


그림 14. 활성화합물의 HMQC spectrum

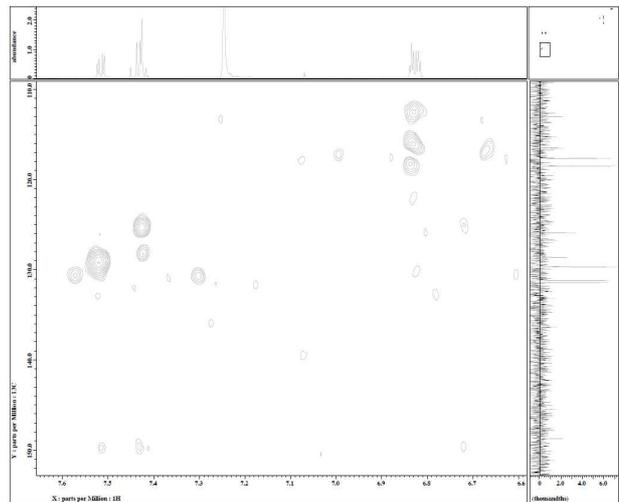


그림 15. 활성화합물의 HMBC spectrum.

HMQC spectrum 및 HMBC spectrum의 측정 및 해석: HMQC spectrum(그림 14)을 측정하여 해석한 결과, 모든 proton-bearing carbon ($^1J_{\text{C-H}}$)을 규명할 수 있었다. 즉 δ_{H} 7.52와 δ_{C} 130.3, δ_{H} 7.45와 δ_{C} 130.1, δ_{H} 7.43과 δ_{C} 128.6, δ_{H} 6.84와 δ_{C} 116.6, δ_{H} 6.83과 δ_{C} 117.4 사이에서

correlation이 관찰되었다. 또한 HMBC spectrum(그림 15)을 측정하여 해석한 결과, 그림 16에 나타낸 바와 같이 6.84 및 6.83 ppm의 methine proton으로부터 115.4와 111.9 ppm의 quaternary carbon에 long-range correlation이 관찰되어 pyrrole moiety의 존재가 확인되었다. 또한, 7.52 ppm의 aromatic methine proton으로부터 147.6 ppm의 quaternary carbon과 128.6 ppm의 methine carbon에, 7.45 ppm의 aromatic methine proton으로부터 127.5 및 124.8 ppm의 quaternary carbon에, 7.43 ppm의 aromatic methine proton으로부터 147.6 ppm의 quaternary carbon에 long-range correlation이 관찰되어 1,2,3-trisubstituted benzene moiety가 밝혀졌다. 따라서 본 화합물은 pyrrole과 1,2,3-trisubstituted benzene으로 구성된 방향족 화합물로 규명되었다. 이같은 결과를 바탕으로 database 검색 및 문헌검색을 수행한 결과, 본 화합물이 *Burkholderia* 속 미생물로부터 항균활성물질로 분리, 보고된 바 있는 pyrrolnitrin과 잘 일치함을 알 수 있었다. 그림 17에 ^1H NMR 및 ^{13}C NMR spectrum에서 관찰된 각 피크들의 귀속을 나타내었다.

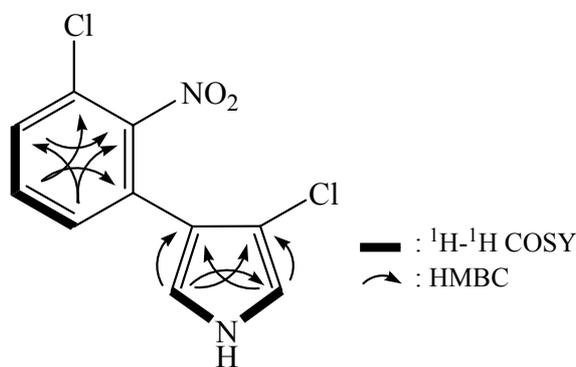


그림 16. 활성화합물의 2차원 NMR correlation

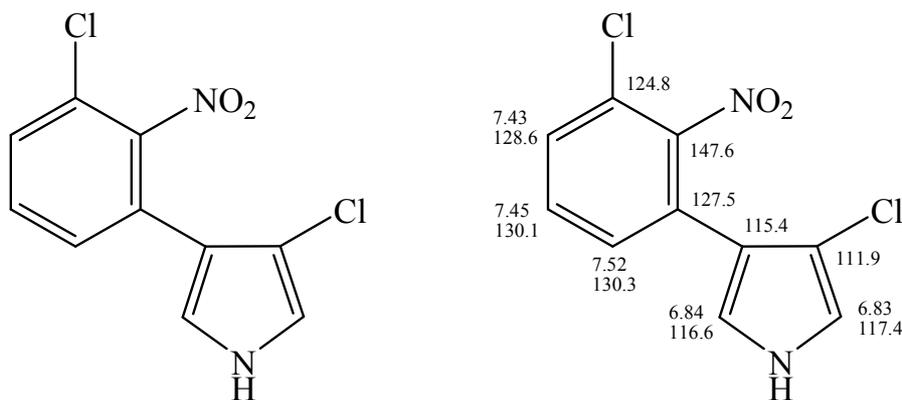


그림 17. 활성화합물의 화학구조 및 2차원 NMR correlation

(2) Mass spectrum의 측정 및 해석

NMR 분광분석으로부터 본 활성화합물의 화학구조를 pyrrolnitrin으로 유추하였다.

Pyrrolnitrin은 2분자의 chlorine기와 nitro기로 구성되어 있어 이들의 규명을 위하여 mass 분석을 수행하였다. 즉 EI-mass(그림 18)를 측정된 결과 m/z 256에서 M^+ 가 관찰되어 분자량이 256임을 확인하였다. 특히 m/z 258에서 $M+2$ 의 chlorine 동위원소의 자연존재비로부터 기인하는 피크가 관찰되어 본 활성 화합물을 분자량 256, 분자식 $C_{10}H_6Cl_2N_2O_2$ 의 pyrrolnitrin으로 확인하였다.

3. 항균활성물질의 정량분석

길항미생물 *B. pyrocinia* CAB08106-4 균주는 pyrrolnitrin이라는 항생물질을 생성하여 흑색썩음균핵병을 길항한다. 길항미생물을 이용한 생물학적 방제는 길항미생물의 농업생태계 정착 여부로 그 성패가 좌우된다. 다시 말해 길항미생물이 효과적으로 작물의 환경에 정착되면, 추가 투입 없이 미생물의 지속적인 증식으로 병원균에 대한 길항작용 또한 지속적으로 일어난다. 이러한 과정에서 길항작용의 주 원인이 되는 항생물질은 길항미생물에 의하여 끊임없이 생성된다.

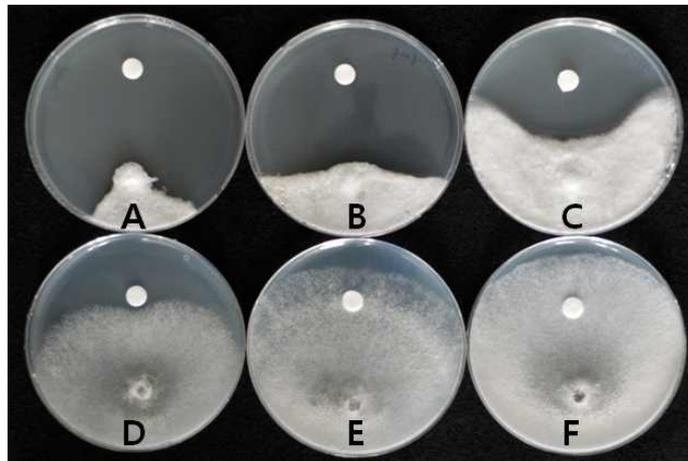


그림 18. Pyrrolnitrin 농도별 흑색썩음균핵병균 균사생육억제.

A, 1 μ g; B, 100ng; C, 10ng; D, 1ng; E, 0.1ng; F, 0.01ng

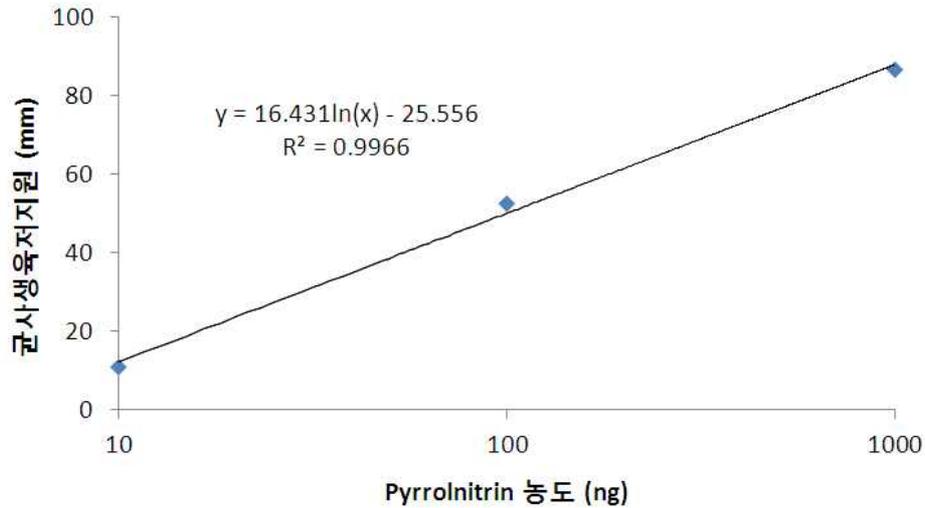


그림 19. Pyrrolnitrin 농도별 흑색씩음균핵병균 균사생육억제 표준곡선

생물학적 방제에 있어서 항생물질은 병원균 억제에 주된 역할을 하지만, 직접적인 생물적 방제인자로 이용되지는 않고, 생합성을 통한 생화학농약 또는 화학합성 농약으로 그 이용이 가능하다. 먼저 pyrrolnitrin 농도별 흑색씩음균핵병균 균사생육 억제 표준곡선 회귀식의 산출을 위하여 pyrrolnitrin 농도별 반응을 실행한 결과 그림 18에서와 같이 1 μ g에서 가장 큰 항균활성을 보였으며, 10ng의 농도까지 활성이 유지되었다. 하지만 1ng부터는 미약한 활성만 보이고, 이 이하의 농도에서는 활성이 없었다. 얻어진 결과를 이용하여 흑색씩음균핵병균 균사생육억제 표준곡선을 구한 결과 그림 19에서와 같이 $Y=16.431\ln(x)-25.556$ ($R^2=0.9966$)의 식을 얻을 수 있었다.

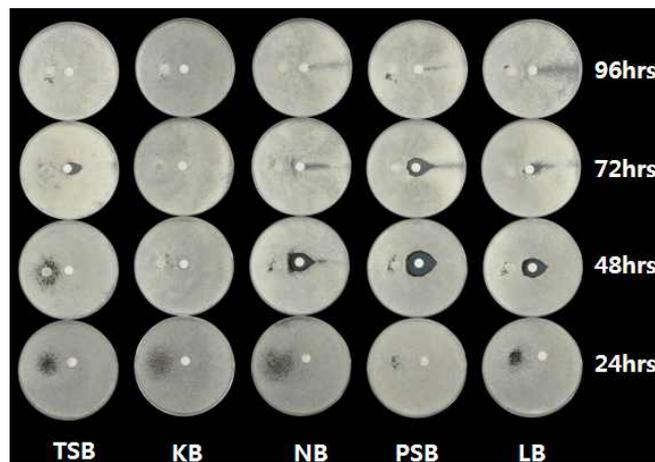


그림 20. 배지 종류별, 배양시간별 *B. pyrocinia* CAB08106-4 균주의 항균활성 정도

B. pyrocinia CAB08106-4 균주의 배양 배지별, 배양시간별 pyrrolnitrin 생성량을 조사하기 위하여 28 $^{\circ}$ C에서 135rpm으로 배양된 균주는 매 24시간 간격으로 배양액을 회수하여

chloroform를 동량으로 섞어 추출한 결과 그림 20에서와 같이 배양 배지별 항균활성에 차이를 나타내었다.

표 5. 배지 종류별, 배양시간별 pyrrolnitrin 생성량

배양시간	Pyrrolnitrin 생성량 (ng)				
	TSB	KB	NB	PSB	LB
24	0	0	0	0	0
48	0	0	17.2	22.9	17.2
72	12.9	0	0	19.8	0
96	0	0	0	0	0

배양액 1ml의 양으로부터 추출된 활성물질은 KB에서는 생산이 확인되지 않았고, TSB에서는 72시간 배양하였을 때 소량 확인되었다. NB와 LB에서는 배양 48시간에서 항균활성이 확인되었고, PSB에서는 배양 48시간부터 72시간 까지 항균활성물질이 생산되었는데, 48시간에서 가장 큰 활성을 보였다. 이상의 결과로 *B. pyrocinia* CAB08106-4 균주는 PSB 배지에서 48시간 배양하였을 때 가장 많은 양의 항균활성물질을 생산하였다. 이때의 pyrrolnitrin 생성량은 22.9ng/ml 이었다(표 5).

4. 흑색썩음균핵병 발생 모니터링

마늘 흑색썩음균핵병은 마늘의 구가 흑색으로 변해 썩는데, 초기증상은 잎이 아랫잎부터 갈색으로 변하며, 윗잎으로 진전되는 특성을 가지고 있으며, 발병된 구에 무수히 많은 흑색 소형 균핵이 형성되어 전염원이 된다(그림 21).



그림 21. 마늘 흑색썩음균핵병이 발생된 재배포장

연차별 우리나라 마늘 주산단지의 흑색썩음균핵병 발생정도는 다음과 같다.

2012년 마늘 흑색썩음균핵병의 발병은 4월 하순경부터 발병되기 시작하여 5월 상순 부터는 발병률이 급격히 증가하는 것으로 조사 되었다(그림 22). 지역별로 발병정도에 차이가 있었고, 2012년은 평년에 비하여 발병정도가 극히 낮았다. 이는 흑색썩음균핵병의 발병 최성기인 5월 상순부터 극심한 건조현상으로 인하여 병원균의 토양 내 증식 및 유효 감염이 일어나지 못했기 때문으로 생각된다. 발병 정도는 낮았지만 4월 중·하순경에 예방적 차원의 방제를 실시하는 것이 흑색썩음균핵병의 방제에 유리할 것으로 생각된다.

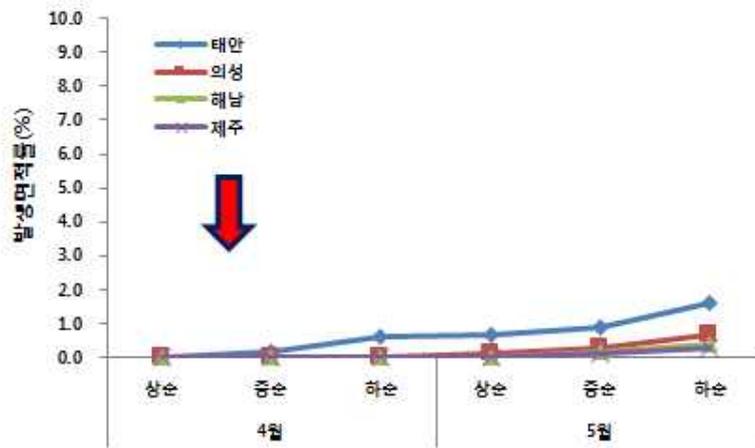


그림 22. 2012년 마늘 흑색썩음균핵병 발생 소장

2013년의 마늘 흑색썩음균핵병은 4월 초부터 시작되어 4월 중순부터는 발병이 급격하게 증가하였다(그림 23). 조사 지역별로 발병에 차이가 있었으며, 2012년에 비하여 흑색썩음균핵병의 초발생 시기는 10일 정도 빨라진 것으로 조사되었다. 이것은 4월 초 기온이 상승하고, 잦은 비의 영향으로 병의 발생이 증가한 것으로 생각된다. 지역별 마늘 흑색썩음균핵병의 발생 면적률은 충남 서산지역이 3.0%, 충남 태안지역은 5.4%, 경북 의성군은 0.2%, 전남 해남군은 2.8%, 제주시는 2.4%로 각각 조사 되었다.

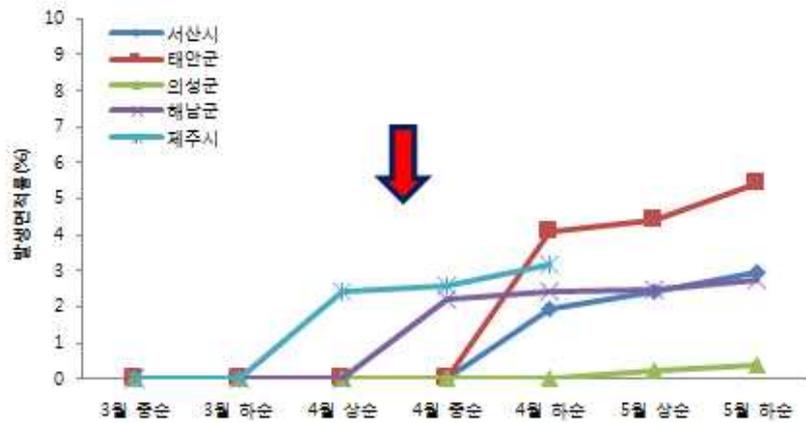


그림 23. 2013년 마늘 흑색씩음균핵병 발생 소장

충남지역에서는 난지형 및 한지형 마늘 모두 4월 중순부터 발병하기 시작하였고, 해남군은 4월 상순, 제주도는 3월 하순부터 이며, 의성군은 5월 초 발병하였지만 1% 미만의 발병율을 보였다. 이러한 결과로 마늘 흑색씩음균핵병은 2012년에서와 유사하게 4월 상순에서 중순 사이에 예방적 차원의 방제를 실시하는 것이 적절한 것으로 평가되었다.

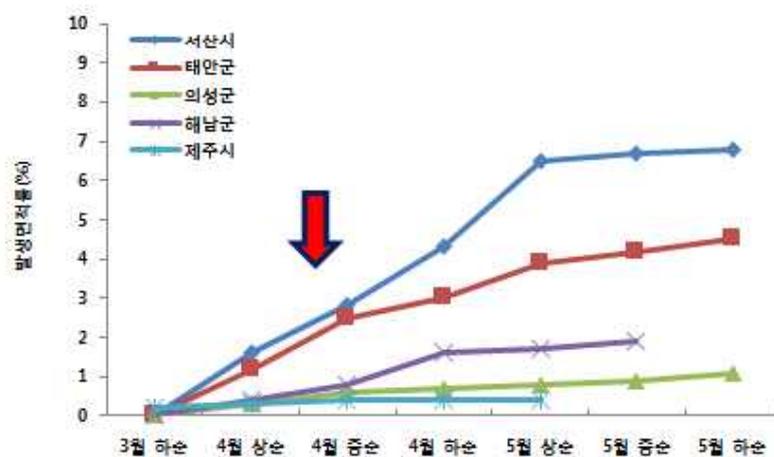


그림 24. 2014년 마늘 흑색씩음균핵병 발생 소장

2014년에는 마늘 흑색씩음균핵병이 3월 하순부터 시작되어 4월 상순에서 중순에 발병이 증가하였다(그림 24). 조사 지역별로 발병에 차이가 있었으며, 2013년에 비하여 흑색씩음균핵병의 초발생 시기는 7일 정도 빨라졌다. 올해 월동기의 온도가 높고, 1~2월 건조한 상태로 경과되면서 병원균의 확산에 영향을 준 것으로 생각된다. 지역별 마늘 흑색씩음균핵병의 발생면적률은 충남 서산지역이 6.8%, 충남 태안지역은 4.5%, 경북 의성군은 1.1%, 전남 해남군은 1.9%, 제주시는 0.4%로 각각 조사 되었다. 충남지역에서는 난지형 및 한지형 마늘 모두 4월

중순부터 발병하기 시작하였고, 해남군은 4월 상순, 제주도는 3월 하순부터이며, 의성군은 4월 중순에 발병하였지만 1% 미만의 발병율을 보였다. 따라서 3년간의 마늘 흑색썩음균핵병 발생 모니터링 결과 이 병의 방제는 4월 상순에서 중순 사이에 예방적 차원의 방제를 실시하는 것이 병으로부터의 피해를 최소화 할 수 있을 것으로 판단되었다.

5. 미생물제제의 방제효과 실증

2012년 마늘 흑색썩음균핵병의 생물적 방제효과는 충남 예산군 농업기술원내 포장 (660m²)과 충남 태안군 농가포장(990m²)에서 길항미생물 제제를 이용 검정하였다. 2011년 11월 8일 종구를 파종하였으며 길항미생물, 대조약제, 무처리구로 구분하여 실증실험을 수행하였다. 대조약제는 테부코나졸 유제를 사용하였다.

표 6에서와 같이 충남 예산군 포장에서는 마늘의 출현률, 초장 엽수 등 처리구 별 약간의 차이를 보였으며, 생산된 마늘의 수량에서도 약간의 차이를 보였지만 유의적인 차는 없었다. 생물적 방제효과는 표 7에서와 같이 방제가 58.3%로 나타났지만 처리구 별 발병주율에 유의적인 차는 없었으며, 무처리 발병률이 1.2%로서 매우 낮기 때문에 방제효과 검정은 어려웠다.

표 6. 충남 예산군 포장의 마늘 시험구별 생육 및 수량

처 리 내 용	출현률 (%)	초장 (cm)	경태 (cm)	수량(kg/10a) ^a				수량지수 ^b
				상품	중품	하품	계 ^a	
<i>B. pyrrocinia</i> CAB08106-4	82.5	90.0	9.7	96.8 (18.4)	320 (60.8)	109.3 (20.8)	526.1 (100)	102
테부코나졸 유제	85.7	84.7	8.7	119.1 (21.1)	310.3 (55.1)	134 (23.8)	563.3 (100)	109
무 처 리	79.8	80.0	9.0	72.9 (14.1)	300.9 (58.1)	144.2 (27.8)	517.9 (100)	100

^a상품 : 50g이상/중구, 중품 : 30~50g/중구, 하품 : 30g미만/중구

$$^b\text{수량지수} = \frac{\text{처리구 수량}}{\text{무처리 수량}} \times 100$$

표 7. 충남 예산군 포장의 마늘 시험구별 흑색썩음균핵병 방제효과

처 리 내 용	발 병 주 율(%)				평균 ^a	방제가 (%)
	I 반복	II 반복	III 반복	평균 ^a		
<i>B. pyrrocinia</i> CAB08106-4	0.7	0.6	0.2	0.5	a	58.3
테부코나졸 유제	0.4	2.6	0.3	1.1	a	8.3
무 처 리	1.4	1.5	0.7	1.2	a	-

^aValues designated by the same letter are not significantly different by Duncan's multiple

range test ($P \leq 0.05$).

$${}^b\text{방제가}(\%) = 1 - \frac{\text{처리구 발병율}}{\text{무처리구 발병율}} \times 100$$

충남 태안군 농가 포장에서 또한 처리구별 마늘의 출현률, 초장 엽수 등에 차이를 보였고, 생산된 마늘의 수량에서도 대조약제 처리구의 수량이 무처리에 비하여 18% 많았지만 유의적인 차는 없었다(표 8). 흑색썩음균핵병 방제효과는 대조약제 처리구에서 76.1%로 높았으며 길항미생물 처리구에서도 74.6%로 높게 나타났다(표 9). 각 처리구별 발병주율 또한 무처리구와 유의적인 차이를 보였으나, 명확한 방제효과를 검토하기에는 무처리구의 발병률이 6.7%로 낮았다.

표 8. 충남 태안군 포장의 마늘 시험구별 생육 및 수량

처 리 내 용	출현률 (%)	초장 (cm)	경태 (cm)	수량(kg/10a) ^a				수량지수 ^b
				상품	중품	하품	계 ^a	
<i>B. pyrocinia</i> CAB08106-4	87.2	91.5	10.2	215.6 (29.7)	383.7 (52.9)	125.8 (17.3)	725.1 (100)	108
테부코나졸 유제	88.5	88.3	9.8	222.0 (27.9)	414.8 (52.2)	158.2 (19.9)	795.1 (100)	118
무 처 리	82.4	85.6	9.4	179.0 (26.6)	357.1 (53.0)	137.6 (20.4)	673.8 (100)	100

^a상품 : 50g이상/중구, 중품 : 30~50g/중구, 하품 : 30g미만/중구

$${}^b\text{수량지수} = \frac{\text{처리구 수량}}{\text{무처리구 수량}} \times 100$$

표 9. 충남 태안군 포장의 마늘 시험구별 흑색썩음균핵병 방제효과

처 리 내 용	발 병 주 율(%)				방제가 (%)
	I 반복	II 반복	III 반복	평균 ^a	
<i>B. pyrocinia</i> CAB08106-4	2.4	1.1	1.7	1.7 <i>b</i>	74.6
테부코나졸 유제	0.9	1.7	2.2	1.6 <i>b</i>	76.1
무 처 리	6.5	7.8	5.7	6.7 <i>a</i>	-

^aValues designated by the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test ($P \leq 0.05$).

$${}^b\text{방제가}(\%) = 1 - \frac{\text{처리구 발병율}}{\text{무처리구 발병율}} \times 100$$

2013년 마늘 흑색썩음균핵병의 생물적 방제효과는 충남 예산군 농업기술원내 포장(1,650m²)

에서 길항미생물 *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 제제를 이용하여 검정하였다. 2012년 11월 19일 종구를 파종하였으며 길항미생물, 대조약제, 무처리구로 구분하여 실증실험을 수행하였다. 대조약제는 테부코나졸 유제를 사용하였다. 그 결과 표 10에서와 같이 충남 예산군 포장에서 한지형 마늘의 출현률, 초장 경태 등의 생육 상황은 처리구 별 차이가 없었다. 생산된 마늘의 품질에서는 길항미생물제제 처리구에서 상품의 비율이 높았고, 총 수량에서도 12% 증가하였지만 유의적인 차이는 없었다. 표 11의 난지형 마늘은 약제처리구의 출현율이 가장 높았으며, 길항미생물처리구도 무처리에 비하여 출현율이 높았다.

표 10. 충남 예산군 포장의 한지형 마늘 생육 및 수량

처 리 내 용	출현률 ^a (%)	초장 (cm)	경태 (cm)	수량(kg/10a)				수량지수 ^c
				상품 ^b	중품	하품	계 ^a	
<i>B. pyrrocinia</i> CAB08106-4	90.8a	77.8	12.1	532 (48.7)	351 (32.1)	209 (19.2)	1,092a (100)	112
테부코나졸 유제	90.3a	76.6	12.4	501 (46.0)	369 (33.9)	218 (20.1)	1,088a (100)	111
무 처 리	88.4a	76.9	11.9	475 (48.9)	300 (30.9)	197 (20.2)	972a (100)	100

^aValues designated by the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test ($P \leq 0.05$).

^b상품 : 50g이상/종구, 중품 : 30~50g/종구, 하품 : 30g미만/종구

$$^c\text{수량지수} = \frac{\text{처리구 수량}}{\text{무처리 수량}} \times 100$$

수량의 경우 약제처리구에서 총 수량 및 상품의 수량이 가장 높았고, 길항미생물 처리구 또한 무처리구에 비하여 품질 및 14%의 수량이 증가하였으나 유의적인 차이는 없었다. 하지만 이러한 결과로 마늘 재배포장의 면적이 늘어나고 처리구의 처리 횟수가 누적된다면 길항미생물 처리는 마늘의 생육 및 수량, 그리고 품질 향상에 큰 영향을 줄 것으로 기대할 수 있다.

표 11. 충남 예산군 포장의 난지형 마늘 생육 및 수량

처 리 내 용	출현률 ^a (%)	초장 (cm)	경태 (cm)	수량(kg/10a)				수량지수 ^c
				상품 ^b	중품	하품	계 ^a	
<i>B. pyrocinia</i> CAB08106-4	86.5 ^b	76.8	14.7	586 (44.4)	429 (32.5)	305 (23.1)	1,320 ^a (100)	114
테부코나졸 유제	92.9 ^a	76.5	13.5	680 (48.0)	458 (32.3)	279 (19.7)	1,417 ^a (100)	123
무 처 리	90.3 ^{ab}	76.6	13.8	501 (43.3)	415 (35.9)	240 (20.8)	1,156 ^a (100)	100

^aValues designated by the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test ($P \leq 0.05$).

^b상품 : 50g이상/중구, 중품 : 30~50g/중구, 하품 : 30g미만/중구

$$^c\text{수량지수} = \frac{\text{처리구 수량}}{\text{무처리구 수량}} \times 100$$

생물적 방제효과 검정결과는 표 12에서와 같이 한지형 마늘에서는 각 처리구의 발병율은 유의적인 차이를 보였고, 흑색썩음균핵병 생물적 방제효과는 84.2%로 높게 나타났다. 하지만 무처리구의 발병율이 1.9%로 방제효과를 검토하기에는 매우 낮았다.

표 12. 충남 예산군 포장의 한지형 마늘 흑색썩음균핵병 생물적 방제효과

처 리 내 용	발 병 주 율(%)				방제가 ^b (%)
	I 반복	II 반복	III 반복	평균 ^a	
<i>B. pyrocinia</i> CAB08106-4	0.7	0.2	0	0.3 ^b	84.2
테부코나졸 유제	1.7	1.4	1.0	1.4 ^a	26.3
무 처 리	1.7	1.4	2.4	1.9 ^a	-

^aValues designated by the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test ($P \leq 0.05$).

$$^b\text{방제가}(\%) = 1 - \frac{\text{처리구 발병율}}{\text{무처리구 발병율}} \times 100$$

표 13. 충남 예산군 포장의 난지형 마늘 흑색썩음균핵병 생물적 방제효과

처 리 내 용	발 병 주 율(%)				방제가 ^b (%)
	I 반복	II 반복	III 반복	평균 ^a	
<i>B. pyrocinia</i> CAB08106-4	5.3	5.6	0.7	3.9 ^a	70.7
테부코나졸 유제	4.0	3.7	4.7	4.1 ^a	69.2
무 처 리	17.4	18.0	4.4	13.3 ^a	-

^aValues designated by the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test ($P \leq 0.05$).

$$^b\text{방제가}(\%) = 1 - \frac{\text{처리구 발병율}}{\text{무처리구 발병율}} \times 100$$

표 13의 한지형 마늘에서는 흑색썩음균핵병 방제효과가 70.7%였으며, 무처리 발병율 또한 13.3%로 방제효과를 검토하기 충분하였다. 이러한 결과는 동일한 시험포장에서 과거 3년간 방제효과를 검정한 결과 71.1~67.3%의 방제효과를 보였으며 3년 평균 방제효과는 69.3%였다. 이처럼 *B. pyrocinia* CAB008106-4는 매년 70% 정도의 안정적인 방제효과를 보이는 매우 우수한 생물방제인자이며, 제형화의 개선으로 더 높은 방제효과를 기대할수 있을 것으로 생각된다.

2014년 마늘 흑색썩음균핵병의 생물적 방제효과는 충남 예산군 농업기술원내 포장(1,650m²)에서 길항미생물 *Burkholderia pyrocinia* CAB08106-4 제제를 이용하여 검정하였다. 2013년 11월 20일 종구를 파종하였으며 길항미생물, 대조약제, 무처리구로 구분하여 실증실험을 수행하였다. 대조약제는 테부코나졸 유제를 사용하였다.

표 14. 충남 예산군 포장의 한지형 마늘 생육 및 수량

처 리 내 용	출현률 ^a (%)	초장 (cm)	경태 (cm)	수량(kg/10a)				수량지수 ^c
				상품 ^b	중품	하품	계 ^a	
<i>B. pyrocinia</i> CAB08106-4	94.8 ^a	70.5	11.6	556 (42.8)	604 (46.5)	139 (10.7)	1,299 ^a (100)	113
테부코나졸 유제	95.8 ^a	71.2	11.4	451 (34.9)	605 (46.7)	237 (18.3)	1,293 ^a (100)	112
무 처 리	87.0 ^b	70.9	11.0	414 (35.9)	524 (45.5)	214 (18.6)	1,152 ^a (100)	100

^aValues designated by the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test ($P \leq 0.05$).

^b상품 : 50g이상/중구, 중품 : 41~50g/중구, 하품 : 40g미만/중구

$$^c\text{수량지수} = \frac{\text{처리구 수량}}{\text{무처리 수량}} \times 100$$

표 14에서와 같이 충남 예산군 포장에서 한지형 마늘의 초장 경태 등의 생육 상황은 처리구 별 차이가 없었다. 하지만 출현률은 무처리구에 비하여 94.8%로 증가하였다. 이것은 과중된 중구가 월동기에 흑색썩음균핵병균에 의하여 침입, 발병되지 않았기 때문에 효과적인 출현이 가능한 것으로 여겨진다. 생산된 마늘의 품질에서는 길항미생물제제 처리구에서 상품의 비율이 높았고, 총 수량에서도 13% 증가하였지만 유의적인 차이는 없었다. 표 15의 난지형 마늘의 경우, 약제처리구 보다 미생물제제 처리구의 출현율이 가장 높았으며, 한지형마늘에서과 같이 월동기의 병원균에 의한 피해가 줄어든 것으로 평가되었다. 수량의 경우 약제처리구에서 총 수량 및 상품의 수량이 가장 높았고, 길항미생물 처리구 또한 무처리구에 비하여 품질 및 15%의 수량이 통계적으로 유의하게 증가하였다. 따라서 마늘 재배포장의 면적이 늘어나고 처리구의 처리 횟수가 누적된다면 길항미생물제제 처리는 마늘의 생육 및 수량, 그리고 품질 향상에 큰 영향을 줄 것으로 기대할 수 있다.

표 15. 충남 예산군 포장의 난지형 마늘 생육 및 수량

처 리 내 용	출현률 ^a (%)	초장 (cm)	경태 (cm)	수량(kg/10a)				수량지수 ^c
				상품 ^b	중품	하품	계 ^a	
<i>B pyrrocinia</i> CAB08106-4	91.3 ^a	72.8	13.3	592 (43.5)	449 (33.0)	321 (23.6)	1,362 ^{ab} (100)	115
테부코나졸 유제	93.1 ^a	73.3	12.8	668 (46.5)	472 (32.9)	296 (20.6)	1,436 ^a (100)	121
무 처 리	89.0 ^b	74.1	13.0	485 (40.8)	455 (38.4)	247 (20.8)	1,187 ^b (100)	100

^aValues designated by the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test ($P \leq 0.05$).

^b상품 : 61g이상/중구, 중품 : 51~60g/중구, 하품 : 50g미만/중구

$$^c\text{수량지수} = \frac{\text{처리구 수량}}{\text{무처리 수량}} \times 100$$

표 16. 충남 예산군 포장의 한지형 마늘 흑색썩음균핵병 생물적 방제효과

처 리 내 용	발 병 주 율(%)			평균 ^a	방제가 ^b (%)
	I 반복	II 반복	III 반복		
<i>B. pyrocinia</i> CAB08106-4	4.1	3.2	3.6	3.6 ^b	66.0
테부코나졸 유제	2.2	2.7	2.0	2.3 ^b	78.3
무 처 리	9.6	10.4	11.7	10.6 ^a	-

^aValues designated by the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test ($P \leq 0.05$).

$$^b\text{방제가}(\%) = 1 - \frac{\text{처리구 발병율}}{\text{무처리구 발병율}} \times 100$$

표 17. 충남 예산군 포장의 난지형 마늘 흑색썩음균핵병 생물적 방제효과

처 리 내 용	발 병 주 율(%)			평균 ^a	방제가 ^b (%)
	I 반복	II 반복	III 반복		
<i>B. pyrocinia</i> CAB08106-4	3.6	3.8	4.4	3.9 ^b	64.2
테부코나졸 유제	2.9	2.8	2.3	2.7 ^c	75.2
무 처 리	10.5	10.9	11.3	10.9 ^a	-

^aValues designated by the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test ($P \leq 0.05$).

$$^b\text{방제가}(\%) = 1 - \frac{\text{처리구 발병율}}{\text{무처리구 발병율}} \times 100$$

표 16에서와 같이 한지형 마늘에서는 각 처리구의 발병율은 유의적인 차이를 보였고, 흑색썩음균핵병 생물적 방제효과는 84.2%로 높게 나타났다. 또한 무처리구의 발병율도 10.6%로 방제효과를 검토하기에 충분하였다. 표 17의 난지형 마늘에서는 흑색썩음균핵병 방제효과가 64.2%였으며, 무처리 발병율 또한 10.9%로 방제효과를 검토하기에 충분하였다.

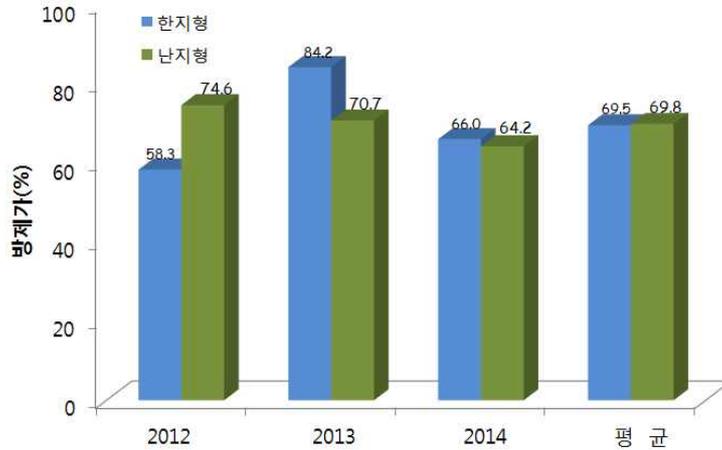


그림 25.. 미생물제제의 3년간 흑색썩음균핵병 방제효과

이러한 결과는 동일한 시험포장에서 과거 3년간 방제효과를 검정한 결과 58.3~84.2%의 방제효과를 보였으며 3년 평균 방제효과는 69.7%였다(그림 25). 이처럼 *B. pyrocinia* CAB008106-4 제제는 매년 65% 이상의 안정적인 방제효과를 보이는 매우 우수한 생물방제인자이며, 농가 포장에서 지속적인 방제효과를 기대할수 있을 것으로 생각된다.

6. 미생물제제의 적용 확대

쪽파 흑색썩음균핵병은 곰팡이균(*Sclerotium cepivorume*)에 의한 토양전염성 병해로 마늘, 양파, 대파 등 작물에서 쪽파에 이르기까지 농가에 많은 피해를 주고 있는 것으로 알려져 있다. 흑색썩음균핵병은 지하부의 부패를 일으켜 생산성 및 품질을 크게 저하시키고 있으나 파속작물의 재배 주산지에서는 적절한 대체작목을 찾지 못하여 부득이 연작을 하고 있는 실정이다. 최근 국내의 연구기관에서는 이러한 애로사항을 해결하기 위하여 마늘, 양파, 대파에 대한 흑색썩음균핵병은 병원균의 생리·생태와 방제방법에 대한 연구를 실시하여 문제점이 어느 정도 해결되었으나 쪽파의 경우 생육기간이 짧고 환경적응력이 좋아 연중 재배가 가능하며 작형도 다양하여 연작을 하는 경우가 많으므로 흑색썩음균핵병 발병률이 증가 추세에 있다. 또한 종구 교환시에 생육과 품질이 더 좋은 것으로 알려져 재배주산지간 종구를 교환하여 재배하는 경우가 많아 원거리 전염 우려가 높고 피해도 확산되고 있다. 쪽파 흑색썩음균핵병은 마늘, 양파에 발생하는 병원균과 생리 생태가 같아 발병적온이 15~20℃이고, 25℃ 이상의 고온에서는 거의 발병되지 않는다. 균핵은 고온에 약하여 35℃이상에서 4일 이내에 사멸하고 30℃에서도 13~15일 정도면 사멸하게 된다.



그림 54. 쪽파 흑색썩음균핵병 피해포장(A) 및 병징(B)

기주범위는 마늘 양파, 파, 쪽파, 달래 등 Allium속 식물이며 9~10월 중순경 기온이 떨어지면서 균핵이 발아하여 기주에 침입하는데, 10월 하순~11월에 발병을 육안으로 관찰할 수 있으며, 추운 12~1월은 잠시 멈추었다가 이듬해 2월 상·중순경부터 다시 진전되거나 발생이 시작하여 3월까지 증식하고 4월 상·중순에 가장 피해가 크다. 5월 이후 발병이 급격히 줄어들어 5월 하순부터 균핵을 형성하여 여름철에는 휴면상태로 경과한다. 쪽파 흑색썩음균핵병은 토양 전염성 병원균의 일종으로 흑색의 구형 또는 편구형 균핵을 형성하며 농기구나, 인축, 바람, 강우시 물을 통하여 접촉 전염한다. 발병과정은 지하부의 인경에 처음 흰균사가 나타나며, 침입한 균은 줄기 하단부로 병이 진전되면서 연백부를 부패·흑변시키고 심하면 뿌리와 줄기 전체가 흑색으로 변하여 썩고 지상부를 고사 수확불가능 상태로 만든다(그림 26).

쪽파 흑색썩음균핵병균의 균핵은 기주식물의 뿌리가 많이 분포해 있는 지표 10cm 이내에 97%, 5cm까지의 표층에 80%정도가 분포되어 있으며 기주로부터 수평방향 20cm 이내에 86%의 균핵이 분포한 것으로 나타나, 호기성이고 기주 주변에 주로 분포되어 있는 것으로 알려져 있다. 2001년까지 흑색썩음균핵병은 부정형의 소립균핵을 형성하는 *Sclerotium* sp.에 의해서 발생되는 것으로 알려져 왔으나 2002년에 일부 마늘 재배 주산단지에서 형태적, 배양적 특성이 현저하게 다른 작은 구형의 균핵을 형성하는 *Sclerotium cepivorum*에 의한 병이 발생되고 있다(김용기 등, 2004. 식물병연구 10: 105~111). 흑색썩음균핵병균은 환경이 불리하게 되면 휴면상태로 토양 중에 장기간 생존이 가능하게 되는데(Coley-Smith 등, 1990. Plant Pathology 39: 58~69), Crowe, 1996. Compendium of onion and garlic disease. The APS Press) 이러한 이유로 이 병의 방제가 더욱 어려운 실정이다. 또한 쪽파 흑색썩음균핵병의 적용약제로 등록되어 있는 화학농약은 플루킨코나졸 입체(작물보호협회, 2012)가 유일하고, 그나마 방제효과가 그다지 높지 않아 재배농가에서는 많은 어려움을 겪고 있는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 쪽파의 안정적인 생산과 상품성을 높이기 위하여 마늘 흑색썩음균핵병에 생물적 방제에 효과가 있는 길항미생물을 쪽파 흑색썩음균핵병 생물적 방제 적용확대 시

험을 통한 방제효과를 검토하고, 이에 대한 기술을 농가에 보급하고자 실시하였다.

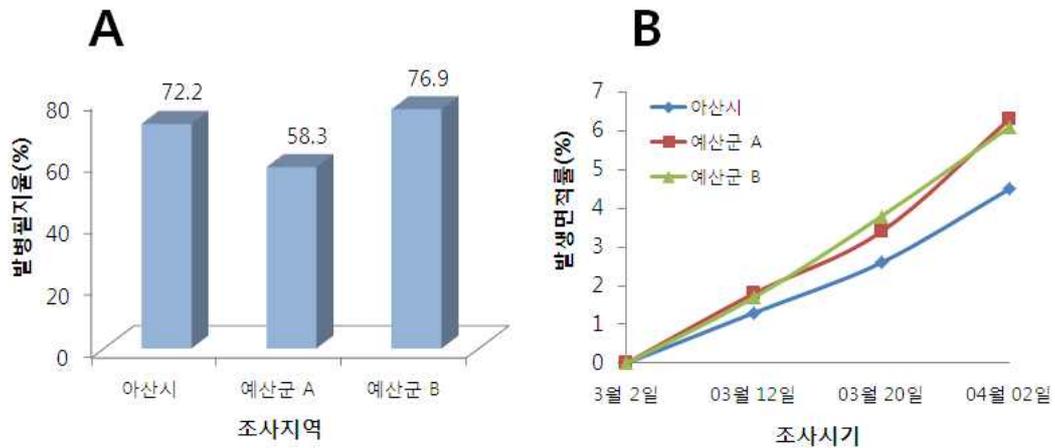


그림 55. 충남 쪽파 재배단지의 흑색썩음균핵병 발생필지율(A) 및 시기별 발생 면적률(B)

충남의 쪽파 재배면적은 1,193 ha로 전국 재배면적의 23.8%를 차지하고 있으며 매년 22,309 톤을 생산하고 있는 작물이다(주요 농업현황 및 통계, 2012, 충청남도농업기술원). 특히 충남 재배의 80% 이상의 재배면적이 아산시 및 예산군에 분포하고 있다. 2월 중순부터 4월 초까지 충남의 쪽파 재배지역에서 흑색썩음균핵병의 발생을 조사한 결과 3월 초부터 발병이 시작되었고, 4월 초에 발병이 증가하였다(그림 27A). 평균 발병 수준은 10% 미만으로 유지되었지만 지역에 따라 50% 이상의 발생면적을 보인 포장도 있었으며, 생육 후기에는 대부분의 포장에 발병하여 76.9%의 발병필지율을 보인 지역도 있었다(그림 27B). 이와 같이 쪽파 재배지역에서 흑색썩음균핵병은 지역간 고르게 분포하여 발생하고 수확기 까지 지속적으로 발생하는 특징을 보였다.

2013년 쪽파 흑색썩음균핵병 생물적 방제효과 검정을 위한 시험포장은 충남 예산군 농업기술원내 포장(1,000m²)에서 수행하였다. 2012년 9월 5일 종구를 파종하였고, 토양 내 길항미생물 제제는 종구 파종 전 10a 당 10kg 토양혼화 처리 하였다. 대조약제는 메트코나졸 액상수화제를 사용하였다(그림 28).

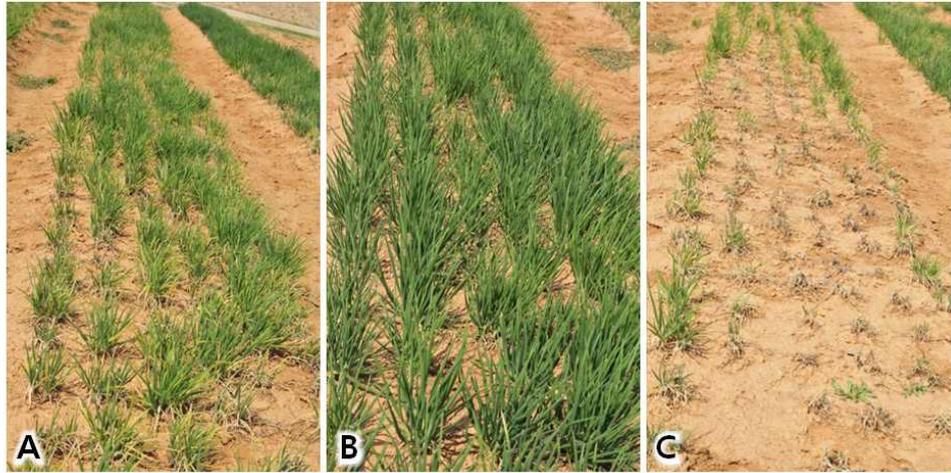


그림 56. 쪽파 흑색썩음균핵병 피해포장(A) 및 병징(B)

표 18의 결과에서 *B. pyrocinia* CAB08106-4 제제는 쪽파의 흑색썩음균핵병에 대하여도 우수한 방제효과를 보였다. 병든 포기율은 5.3%로 무처리의 12.9%에 비하여 현저히 낮았고, 방제가는 58.9%로 생물적 방제제로서의 효과가 인정되는 수준이었다.

표 18. 충남 예산군 포장의 쪽파 흑색썩음균핵병 생물적 방제효과

처 리 내 용	병든포기율(%)					평균 ^a	방제가 ^b (%)
	1반복	2반복	3반복	4반복	5반복		
<i>B. pyrocinia</i> CAB08106-4	4.0	5.3	6.0	6.7	4.7	5.3 ^b	58.9
메트코나졸 액상수화제	4.0	7.3	4.7	3.3	5.3	4.9 ^b	62.0
무 처 리	12	14	10.7	15.3	12.7	12.9 ^a	-

^aValues designated by the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test ($P \leq 0.05$).

$$^b\text{방제가}(\%) = 1 - \frac{\text{처리구 발병율}}{\text{무처리구 발병율}} \times 100$$

2014년 쪽파 흑색썩음균핵병 생물적 방제효과 검정을 위한 시험포장은 충남 예산군 농업기술원내 포장(1,000m²)에서 수행하였다. 2013년 9월 25일 중구를 파종하였고, 토양 내 길항미생물 제제는 중구 파종 전 10a 당 10kg 토양혼화 처리 하였다. 대조약제는 메트코나졸 액상수화제를 사용하였다

표 19. 충남 예산군 포장의 쪽파 흑색썩음균핵병 생물적 방제효과

처 리 내 용	병든포기율(%)					평균 ^a	방제가 ^b (%)
	1반복	2반복	3반복	4반복	5반복		
<i>B. pyrrocinia</i> CAB08106-4	8.3	6.2	9.3	8.5	5.8	7.6 ^a	55.6
메트코나졸 액상수화제	4.5	8.4	6.7	4.8	6.3	6.1 ^a	64.3
무 처 리	18.4	18.7	12.4	15.3	20.7	17.1 ^b	-

^aValues designated by the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test ($P \leq 0.05$).

$$^b\text{방제가(\%)} = 1 - \frac{\text{처리구 발병율}}{\text{무처리구 발병율}} \times 100$$

표 19의 결과에서 *B. pyrrocinia* CAB08106-4 제제는 쪽과의 흑색썩음균핵병에 대하여 병든 포기율은 7.6%로 무처리의 17.1%에 비하여 현저히 낮았고, 방제가는 55.6%로 생물적 방제제로서의 효과가 인정되었다. 이러한 2년 동안의 결과는 마늘 흑색썩음균핵병에 대한 길항미생물 제제가, 다른 작물의 흑색썩음균핵병에 대하여도 방제효과를 유지함을 나타내는 것이며, 쪽과 이외의 양파, 달래 등 적용확대의 가능성이 매우 높고 다범성의 생물적 방제인자로 기대할 수 있었다.

제 3절 원제 및 제품의 안전성 평가

1. 원제의 안전성 평가

가. *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 원제(1.0×10^9 cfu/mL)의 랫드에 대한 급성경구독성/병원성시험

(1) 시험방법

- 시험계 : SD Rat
- 시험약제 : *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4원제(1.0×10^9 cfu/mL)
- 시험군 구성

시험물질	성	동물번호	투여량 (cfu/animal)	투여액량 (ml/animal)
비투여대조군	수컷	1101 ~ 1108	0	0
	암컷	2101 ~ 2108		
<i>Burkholderia pyrrocinia</i> CAB08106-4 원제(1.0×10^9 cfu/mL)	수컷	1201 ~ 1212	1.0×10^8	1
	암컷	2201 ~ 2212		

(2) 투여량 설정

농약의 등록기준(농촌진흥청 고시 제2012-13호, 2012년 2월 7일), [별표 12] 인축 독성 시험 기준과 방법”에서의 투여농도는 개체 당 1.0×10^8 단위에 해당되는 미생물 농약을 투여하도록 되어 있으므로 본 시험물질인 *B. pyrrocinia* CAB08106-4 원제는 1.0×10^8 cfu/g농도로 설정하여 투여하였다.

(3) 투여방법

투여하기 전 하룻밤 정도 먹이를 주지 않았고 랫드용 경구 투여용 주사기를 이용하여 경구 투여 경로를 이용하여 위내에 1회 강제 투여하였다.

(4) 미생물의 체내 및 체외 잔존상황

시험물질 투여 후 1일, 3일, 7일 및 14일에 대변을 채취하였고, 3일, 7일, 14일 및 21일에 부검하여 신장, 뇌, 간장, 폐, 비장, 위, 혈액, 임파절을 채취하여 멸균생리식염수에 넣고 균질시킨 다음 10배 단계 희석하여 plate에 접종한 후 30℃에서 48시간 배양하여 미생물 수를 육안으로

측정하였다.

(5) 결과 및 고찰

본 시험결과 투여군에 있어서 암·수 모두 사망례는 물론 시험물질 투여에 의한 일반증상은 관찰되지 않았고, 체중변화에 있어서는 정상적인 체중증가를 보였다. 또한 생존동물에 대한 부검결과에 있어서도 이상증상은 관찰되지 않았다. 미생물의 체외 및 체내 잔존상황을 검사한 결과 검출된 미생물은 없었다. 이상의 결과로부터 랫드에 *B. pyrrocinia* CAB08106-4 원제 (1.0×10^9 cfu/mL)를 단회 경구 투여시 체외 및 체내에서 검출된 미생물은 없고 부검결과에서도 어떠한 병리학적인 소견도 관찰된 것이 없으므로 *B. pyrrocinia* CAB08106-4 원제 (1.0×10^9 cfu/mL)를 1.0×10^8 cfu의 단위에 해당하는 미생물을 랫드에 단회 경구 투여 시 영향이 없는 것으로 판단된다.

나. *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 원제(1.0×10^9 cfu/mL)의 랫드에 대한 급성정맥 독성/병원성시험

(1) 시험방법

- 시험계 : SD Rat
- 시험약제 : *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4원제(1.0×10^9 cfu/mL)
- 시험군 구성

시험물질	성	동물번호	투여량 (cfu/animal)	투여액량 (ml/animal)
비투여대조군	수컷	1101 ~ 1108	0	0
	암컷	2101 ~ 2108		
<i>Burkholderia pyrrocinia</i> CAB08106-4 원제(1.0×10^9 cfu/mL)	수컷	1201 ~ 1212	1.0×10^7	0.1
	암컷	2201 ~ 2212		

(2) 투여량 설정

농약의 등록기준(농촌진흥청 고시 제2012-13호, 2012년 2월 7일), [별표 12] 인축 독성 시험 기준과 방법”에서의 투여농도는 개체 당 1.0×10^7 단위에 해당되는 미생물 농약을 투여하도록 되어 있으므로 본 시험물질인 *B. pyrrocinia* CAB08106-4원제(1.0×10^9 cfu/mL)는 1.0×10^7 cfu/g 농도로 설정하여 투여하였다.

(3) 투여방법

시험물질인 미생물농약의 정맥 노출시의 안전성을 평가하기 위하여 랫드의 꼬리 정맥에 투여하였다.

(4) 미생물의 체내 잔존상황

시험물질 투여 후 3일, 7일, 14일 및 21일에 부검하여 신장, 뇌, 간장, 폐, 비장, 맹장, 임파절을 채취하여 멸균생리식염수에 넣고 균질시킨 다음 10배 단계 희석하여 plate에 접종한 후 30°C에서 48시간 배양하여 미생물 수를 육안으로 측정하였다.

(5) 결과 및 고찰

본 시험결과 투여군에 있어서 암·수 모두 사망례는 물론 시험물질 투여에 의한 일반증상은 관찰되지 않았고, 체중변화에 있어서는 정상적인 체중증가를 보였다. 또한 생존동물에 대한 부검결과에 있어서도 이상증상은 관찰되지 않았다. 미생물의 체내 잔존상황을 검사한 결과 검출된 미생물은 없었다.

이상의 결과로부터 랫드에 *B. pyrrocinia* CAB08106-4 원제(1.0×10^9 cfu/mL)를 단회 정맥투여 시 체내에서 검출된 미생물은 없고 부검결과에서도 어떠한 병리학적인 소견도 관찰된 것이 없으므로 *B. pyrrocinia* CAB08106-4 원제(1.0×10^9 cfu/mL)를 1.0×10^7 cfu의 단위에 해당하는 미생물을 랫드에 단회 경구 투여 시 영향이 없는 것으로 판단된다.

다. *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 원제(1.0×10^9 cfu/mL)의 랫드에 대한 급성호흡기 독성/병원성시험

(1) 시험방법

- 시험계 : SD Rat
- 시험약제 : *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4원제(1.0×10^9 cfu/mL)
- 시험군 구성

시험물질	성	동물번호	투여량 (cfu/animal)	투여액량 (ml/animal)
비투여대조군	수컷	1101~1108	0	0
	암컷	2101~2108		
<i>Burkholderia pyrrocinia</i> CAB08106-4 원제(1.0x10 ⁹ cfu/mL)	수컷	1201~1212	1.0x10 ⁸	0.1
	암컷	2201~2212		

(2) 투여량 설정

농약의 등록기준(농촌진흥청 고시 제2012-13호, 2012년 2월 7일), [별표 12] 인축 독성 시험기준과 방법”에서의 투여농도는 개체 당 1.0x10⁷ 단위에 해당되는 미생물 농약을 투여하도록 되어 있으므로 본 시험물질인 *B. pyrrocinia*CAB08106-4원제(1.0x10⁹cfu/mL)는 1.0x10⁷cfu/g 농도로 설정하여 투여하였다.

(3) 투여방법

시험물질인 미생물 농약의 호흡기 노출 시의 안전성을 평가하기 위하여 호흡기로 투여하였다.

(4) 미생물의 체내 잔존상황

시험물질 투여 후 3일, 7일, 14일 및 21일에 부검하여 신장, 뇌, 간장, 폐, 비장, 맹장, 혈액, 임파절을 채취하여 멸균생리식염수에 넣고 균질시킨 다음 10배 단계 희석하여 plate에 접종한 후 30℃에서 48 시간 배양하여 미생물 수를 육안으로 측정하였다.

(5) 결과 및 고찰

본 시험결과 투여군에 있어서 암·수 모두 사망례는 물론 시험물질 투여에 의한 일반증상은 관찰되지 않았고, 체중변화에 있어서는 정상적인 체중증가를 보였다. 또한 생존동물에 대한 부검결과에 있어서도 이상증상은 관찰되지 않았다. 미생물의 체내 잔존상황을 검사한 결과 검출된 미생물은 없었다.

이상의 결과로부터 랫드에 *B. pyrrocinia* CAB08106-4 원제(1.0x10⁹cfu/mL)를 단회 호흡기 투여 시 체내에서 검출된 미생물은 없고 부검결과에서도 어떠한 병리학적인 소견도 관찰된 것이 없으므로 *B. pyrrocinia* CAB08106-4 원제(1.0x10⁹cfu/mL)를 1.0x10⁸cfu의 단위에 해당하는 미생물을 랫드에 단회 경구 투여 시 영향이 없는 것으로 판단된다.

라. *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 원제(1.0×10^9 cfu/mL)의 랫드에 대한 급성경피 독성시험

(1) 시험방법

- 시험계 : SD Rat
- 시험약제 : *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4원제(1.0×10^9 cfu/mL)
- 시험군 구성

시험물질	성	동물번호	투여량 (cfu/animal)	투여액량 (ml/animal)
<i>Burkholderia pyrrocinia</i> CAB08106-4 원제(1.0×10^9 cfu/mL)	수컷	1101 ~ 1105	1.0×10^8	1
	암컷	2101 ~ 2105		

(2) 투여량 설정

농약의 등록기준(농촌진흥청 고시 제2012-13호, 2012년 2월 7일), [별표 12] 인축 독성 시험 기준과 방법”에서의 투여농도는 개체 당 1.0×10^8 단위에 해당되는 미생물 농약을 투여하도록 되어 있으므로 본 시험물질인 *B. pyrrocinia* CAB08106-4원제(1.0×10^9 cfu/mL)는 1.0×10^8 cfu/g 농도로 설정하여 투여하였다.

(3) 투여방법

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

(4) 결과 및 고찰

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

이상의 결과로부터 *B. pyrrocinia* CAB08106-4원제(1.0×10^9 cfu/mL)를 1.0×10^8 cfu의 단위에 해당하는 미생물을 랫드에 단회 경피 투여시 영향이 없는 것으로 판단된다.

마. *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 원제(1.0×10^9 cfu/mL)의 꿀벌 (*Apis mellifera*)
영향시험

(1) 시험방법

- 시험종 : 꿀벌 (*Apis mellifera*)
- 시험약제 : *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4원제(1.0×10^9 cfu/mL)

(2) 처리내용

- 노출기간 : 18일
- 노출수 : 30마리/반복, 3반복/약량
- 시험농도 : 5.0×10^6 cfu/mL
- 시험농도 설정
- *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4원제(1.0×10^9 cfu/mL)를 제품(1.0×10^6 cfu/mL) 사용량 (200배, 100L/10a)으로 환산한 농도의 100배인 농도로 5.0×10^6 cfu/mL농도로 하였다.

(3) 시험물질 조제

시험물질(1.0×10^9 cfu/mL)을 50% 자당용액을 가하여 충분히 현탁될 때까지 교반시켜 시험물질 용액 (1.0×10^7 cfu/mL)로 조제한 후 50% 자당용액을 가하여 충분히 현탁될 때까지 교반시켜 시험용액 (5.0×10^5 cfu/mL)으로 조제하였다.

(4) 노출조건

온도 : 23 ~ 27 °C, 습도 : 50 ~ 80 % 암조건으로 이동한 다음 회복을 확인 후 시험을 실시하였다.

(5) 결과

본시험을 실시한 결과 18일 경과시 음성대조군에서 24.4%(22개체/90개체)의 치사가 발생하여 시험을 중지시켰다. 처리군에서 22.2%(20개체/90개체)의 치사가 발생하였다. 일반중독증상은 운동능력 저하 및 운동능력 상실 개체가 관찰되었다. 미생물 감염 여부는 음성대조군에서는 치사한 22 개체에 대해서는 검출되지 않았고, 처리군에서는 20개체 중 19개체에서 2.2×10^2 cfu/mL로 미생물이 검출되었다. 실온은 평균 25.3°C(21.5°C ~ 29.5°C) 측정되었고, 상대습도는 평균 57.6%(30% ~ 99%)로 측정되었다.

(6) 결론

B. pyrrocinia CAB08106-4 원제(1.0×10^9 cfu/mL)의 꿀벌 (*Apis mellifera*) 영향시험을 실시한 결과 18일-LC₅₀는 5.0×10^6 cfu/mL 이상이었다. SPSS 통계프로그램을 이용하여 T-검정을 실시한 결과 음성대조군과 처리군 간의 유의성이 없는 것으로 판단($p > 0.05$) 되었으므로, 18일 무영향관찰농도는 5.0×10^6 cfu/mL이었다.

바. *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 원제(1.0×10^9 cfu/mL)의 조류(메추리) 영향시험

(1) 시험방법

- 시험종 : 조류(메추리)
- 시험약제 : *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 원제(1.0×10^9 cfu/mL)

(2) 처리내용

- 노출기간 : 30일
- 노출수 : 10마리/반복, 3반복/약량
- 시험농도 : 1.0×10^8 cfu/mL
- 시험농도 설정 : 미생물농약 등록시험 기준과 방법에 의거하여 10^8 단위로 매일 마리당 0.2 mL씩 경구투여 하였다.

(3) 시험물질 조제

시험물질(1.0×10^9 cfu/mL)을 멸균증류수를 가하여 시험용액(1.0×10^8 cfu/mL)으로 조제하였다. 투여기간 5일 동안 시험용액을 당일 투여 전에 조제하였다.

(4) 노출조건

실온 : 25~28 °C, 습도 : 50 ~ 75 %, 광조건(16시간 광조건, 8시간 암조건), 먹이 및 음용수는 매일 1회 공급하여 자유섭취하게 하였다.

(5) 결과

본 시험을 30일 실시한 결과 처리군, 음성대조군 및 멸균대조군에서 치사 개체 및 일반중독 증상 개체가 발견되지 않았다. 시험종료 후 생존개체에 대해 부검을 실시한 결과 장기에 대해 미생물 감염에 의한 육안상의 차이는 발견할 수 없었다. 처리군은 평균 88.3%, 음성대조군은 평균 85.3%, 멸균대조군은 평균 89.9% 체중이 증가하였다. 실온은 평균 26.1°C(25.1°C ~ 27.0

℃), 상대습도는 평균 56.6%(51.5% ~ 60.7%)로 측정되었다.

(6) 결론

B. pyrrocinia CAB08106-4 원제(1.0×10^9 cfu/mL)의 조류(메추리) 영향시험을 실시한 결과 30일-LD₅₀ 1.0×10^8 cfu/mL이상이었다. *B. pyrrocinia* CAB08106-4 원제(1.0×10^9 cfu/mL)의 조류(메추리)에 대한 영향은 없는 것으로 판단되었다.

사. *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 원제(1.0×10^9 cfu/mL)의 토양미생물에 대한 영향시험

(1) 시험방법

- 시험약제 : *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4원제(1.0×10^9 cfu/mL)
- 시험토양 : 충남 천안시 풍세면
- 시험군 구성

시험물질	구분	포장	
		약제처리횟수	살포약량
<i>Burkholderia pyrrocinia</i> CAB08106-4 원제(1.0×10^9 cfu/mL)	Control	0	0
	T-1	1	0.3 g/m ²
	T-2	1	0.3 g/m ²
	T-3	1	0.3 g/m ²

(2) 처리액량 및 토양채취

처리액량은 시험구 당 1000ml로 설정하여 시험구당 5개소에서 시험물질 처리 후 1일, 10일, 30일 및 90일에 토양시료 채취기구를 사용해서 시료를 채취하였다.

(3) 결과

B. pyrrocinia CAB08106-4 원제(1.0×10^9 cfu/mL)에 대한 토양미생물영향시험을 확인하기 위하여 미생물 농약을 살포한 후 토양을 채취하여 토양중의 진균, 세균 및 방선균의 수를 측정하였다. 균수는 대조구와 비교하여 본 결과 특별한 차이를 나타내는 처리구는 나타나지 않았다. 또한 채취 날짜에 따른 균수의 변화를 비교하여도 특별한 차이를 보이지 않았다.

아. *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 원제(1.0×10^9 cfu/mL)의 담수어(잉어)에 대한 영향시험

(1) 시험방법

- 시험종 : 잉어(*Cyprinus carpio*)
- 시험약제 : *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4원제(1.0×10^9 cfu/mL)
- 노출기간 : 30일
- 노출수 : 10마리/반복, 3반복/약량
- 시험농도 : 6.77×10^4 cfu/mL(수심 15cm의 농도의 1,000배)
- 시험농도 설정 : 상기농도에서 영향이 인정될 경우 용량반응 시험을 실시한다.

(2) 시험물질 조제

시험물질(1.0×10^9 cfu/mL)을 시험용수(사육수)에 직접 처리하여 시험용액(6.77×10^4 cfu/mL)으로 조제하였다. 노출기간 동안 반지수식으로 노출하며, 시험용액은 시험물질의 처리 당일 조제한다.

(3) 노출조건

수온 : 23 ± 2 °C, pH : 6.5 ~ 8.0 %, 광조건(16시간 광조건, 8시간 암조건), 용존산소량: 60 % 이상, 시험용수량: 1 L이상/g(체중), 먹이공급: 배합사료(어체중의 3%)를 1일 1회 공급

(4) 관찰항목

- 수질검사: 수온, 용존산소량, pH, 총경도, 시험용수 중 미생물농도
- 증상관찰: 외관, 먹이섭식, 유영이상, 사망
- 체중측정: 시험시작 및 부검시에 측정
- 병리검사: 치사나 병원성을 보이면 시험생물 조직으로부터 균을 분리 동정, 시험 종료후 전 개체는 부검하여 육안으로 미생물 감염여부를 대조군과 비교하여 기록

(5) 결과

- 담수어류인 잉어(*Cyprinus carpio*)를 이용하여 실시한 시험결과는 다음과 같다.

관찰시간	LC ₅₀ (cfu/mL)	95% 신뢰한계	무영향농도 (cfu/mL)
30 days	$> 6.67 \times 10^4$	-	6.67×10^4

시험기간 동안 임상증상 및 병원성 조사 결과 특이한 증상은 관찰되지 않았다. 시험에 사용된 대조군에 대한 시험시작전 시험어의 전장은 $4.62 \text{ cm} \pm 0.24 \text{ cm}$, 체중은 평균 $0.95 \text{ g} \pm 0.20 \text{ g}$ 이었고, 시험종료후 시험어의 전장은 $4.72 \text{ cm} \pm 0.23 \text{ cm}$, 체중은 평균 $1.19 \text{ g} \pm 0.23 \text{ g}$ 이었으며, 처리군에 대한 시험시작전 시험어의 전장은 $4.71 \text{ cm} \pm 0.28 \text{ cm}$, 체중은 평균 $1.03 \text{ g} \pm 0.22 \text{ g}$ 이었고, 시험종료후 시험어의 전장은 $4.80 \text{ cm} \pm 0.30 \text{ cm}$, 체중은 평균 $1.09 \text{ g} \pm 0.24 \text{ g}$ 이었다. *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4의 영향은 관찰할 수 없었다. 시험기간 중 pH는 평균 7.44(최소 6.69 ~ 최대 7.91), DO는 평균 7.40 mg/L(최소 6.14 mg/L ~ 최대 8.34 mg/L)으로 포화용존산소량의 평균 86.4 %(최소 70.7 % ~ 최대 99.1 %)이었으며, 수온은 평균 22.2 °C(최소 21.4 °C ~ 최대 23.3 °C)이었으며, 경도는 33.8 mg/L(최소 20 mg/L ~ 최대 44 mg/L)이었다.

(6) 결론

이상의 결과로 본 시험물질 *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4의 어류에 미치는 영향은 없는 것으로 판단되었다.

자. *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 원제($1.0 \times 10^9 \text{ cfu/mL}$)의 담수무척추동물에 대한 영향 시험

(1) 시험방법

- 시험종 : 물벼룩(*Daphnia magna*)
- 시험약제 : *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 원제($1.0 \times 10^9 \text{ cfu/mL}$)
- 노출기간 : 21일
- 노출수 : 20마리/반복, 3반복/약량
- 시험농도 : $6.77 \times 10^4 \text{ cfu/mL}$ (수심 15cm의 농도의 1,000배)
- 시험농도 설정 : 예비시험을 실시한 결과 최고농도인 $6.77 \times 10^4 \text{ cfu/mL}$ 에서 치사개체가 관찰되지 않았으므로 본시험을 $6.77 \times 10^4 \text{ cfu/mL}$ 의 설정농도로 한계시험(limit test)을 실시하였다.

(2) 시험물질 조제

시험물질(1.0×10^9 cfu/mL)을 시험용수(사육수)에 직접 처리하여 시험용액(6.77×10^4 cfu/mL)으로 조제하였다. 노출기간 동안 시험용액을 48시간 간격으로 교환하는 반지수식으로 노출하였고, 시험용액은 시험물질의 처리 당일 조제하였다.

(3) 노출조건

시험기간 중 pH는 평균 7.97(최소 7.64 ~ 최대 8.62), DO는 평균 7.97 mg/L(최소 7.60 mg/L ~ 최대 8.36 mg/L)으로 포화용존산소량의 평균 89.6 %(최소 81.3 % ~ 최대 94.8 %)이었으며, 수온은 평균 20.2 °C(최소 19.8 °C ~ 최대 20.8 °C)이었다, 시험용수량은 1 L이상/g(체중), 먹이는 *chlorella vulgaris*를 1일 1회 공급하였다.

(4) 관찰항목

- 수질검사: 수온, 용존산소량, pH, 총경도, 시험용수 중 미생물농도
- 증상관찰: 외관, 유영이상, 사망

(5) 결과

담수무척추동물인 물벼룩(*Daphnia magna*)를 이용하여 실시한 시험결과는 다음과 같다.

관찰시간	LC ₅₀ (cfu/mL)	95% 신뢰한계	무영향농도 (cfu/mL)
21 days	$> 6.67 \times 10^4$	-	6.67×10^4

시험기간 동안 치사개체나 일반증상개체는 관찰되지 않았다. 시험기간 중 pH는 평균 7.97(최소 7.64 ~ 최대 8.62), DO는 평균 7.97 mg/L(최소 7.60 mg/L ~ 최대 8.36 mg/L)으로 포화용존산소량의 평균 89.7 %(최소 85.0 % ~ 최대 94.8 %)이었으며, 수온은 평균 20.2 °C(최소 19.8 °C ~ 최대 20.8 °C) 이었으며, 경도는 199.4 mg/L(최소 180 mg/L ~ 최대 230 mg/L)이었다. 이상의 결과로 본 시험물질 *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4의 물벼룩에 미치는 영향은 없는 것으로 판단되었다.

2. 친환경유기농업자재 목록공시 신청을 위한 안전성 평가

가. *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 입제(1.0×10^6 cfu/mL)의 랫드에 대한 급성경구 독성/병원성시험

(1) 시험방법

- 시험계 : SD Rat
- 시험약제 : *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 입제(1.0×10^9 cfu/mL)
- 시험군 구성

시험물질	성	동물번호	투여량 (cfu/animal)	투여액량 (ml/animal)
비투여대조군	수컷	1101~1108	0	0
	암컷	2101~2108		
<i>Burkholderia pyrrocinia</i> CAB08106-4 친환경유기농 자재 (1.0×10^6 cfu/mL)	수컷	1201~1212	2.0×10^6	2
	암컷	2201~2212		

(2) 투여량 설정

농약의 등록기준(농촌진흥청 고시 제2012-37호, 2012년 07월 12일), [별표 12] 인축 독성 시험기준과 방법”에서의 투여농도는 개체 당 1.0×10^8 단위에 해당되는 미생물 농약을 투여하도록 되어 있으나, 시험물질을 기술적으로 투여가능한 최대투여액량을 개체당 2 mL로 설정하였고, 투여량은 2.0×10^6 cfu를 투여하였다.

본 시험물질인 *B. pyrrocinia* CAB08106-4 를 2.0×10^6 cfu/g농도로 설정하여 투여하였다.

(3) 투여방법

투여하기 전 하루밤 정도 먹이를 주지 않았고 랫드용 경구 투여용 주사기를 이용하여 경구 투여 경로를 이용하여 위내에 1회 강제 투여하였다.

(4) 미생물의 체내 및 체외 잔존상황

시험물질 투여 후 1일, 3일, 7일 및 14일에 대변을 채취하였고, 3일, 7일, 14일 및 21일에 부검하여 신장, 뇌, 간장, 폐, 비장, 위, 혈액, 임파절을 채취하여 멸균생리식염수에 넣고 균질시킨 다음 10배 단계 희석하여 plate에 접종한 후 30°C에서 48시간 배양하여 미생물 수를 육안으로 측정하였다.

(5) 결과 및 고찰

본 시험결과 투여군에 있어서 암·수 모두 사망례는 물론 시험물질 투여에 의한 일반증상은 관찰되지 않았고, 체중변화에 있어서는 정상적인 체중증가를 보였다. 또한 생존동물에 대한 부검결과에 있어서도 이상증상은 관찰되지 않았다. 미생물의 체외 및 체내 잔존상황을 검사한 결

과 검출된 미생물은 없었다. 이상의 결과로부터 랫드에 *B. pyrrocinia* CAB08106-4 친환경유기농 자제(2.0×10^6 cfu/mL)를 단회 경구 투여시 체외 및 체내에서 검출된 미생물은 없고 부검결과에서도 어떠한 병리학적인 소견도 관찰된 것이 없으므로 *B. pyrrocinia* CAB08106-4 친환경유기농 자제(1.0×10^6 cfu/mL)를 2.0×10^6 cfu의 단위에 해당하는 미생물을 랫드에 단회 경구 투여시 영향이 없는 것으로 판단된다.

나. *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 입제(2.0×10^6 cfu/mL)의 랫드에 대한 급성경피 독성시험

(1) 시험방법

- 시험계 : SD Rat
- 시험약제 : *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4입제(1.0×10^6 cfu/mL)
- 시험군 구성

시험물질	성	동물번호	투여량 (cfu/animal)	투여액량 (ml/animal)
<i>Burkholderia pyrrocinia</i> CAB08106-4 친환경유기농 자제(2.0×10^6 cfu/mL)	수컷	1101 ~ 1105	2.0×10^6	2
	암컷	2101 ~ 2105		

(2) 투여량 설정

농약의 등록기준(농촌진흥청 고시 제2012-37호, 2012년 7월 12일), [별표 12] 인축 독성 시험기준과 방법”에서의 투여농도는 개체 당 1.0×10^8 단위에 해당되는 미생물 농약을 투여하도록 있으나, 시험물질을 기술적으로 투여가능한 최대투여액량을 개체당 2 mL로 설정하였고, 투여량은 2.0×10^6 cfu를 투여하였다.

본 시험물질인 *B. pyrrocinia* CAB08106-4 를 2.0×10^6 cfu/g농도로 설정하여 투여하였다.

(3) 투여방법

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

(4) 결과 및 고찰

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

이상의 결과로부터 *B. pyrrocinia* CAB08106-4원제(1.0x10⁹cfu/mL)를 1.0x10⁸cfu의 단위에 해당하는 미생물을 랫드에 단회 경피 투여시 영향이 없는 것으로 판단된다.

다. *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 입제(1.0x10⁶cfu/mL)의 토끼에 대한 피부자극성시험

(1) 시험방법

- 시험계 : New Zealand White 토끼
- 시험약제 : *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4입제(1.0x10⁶cfu/mL)
- 시험군 구성 : 건강한 동물 6 마리를 1군으로 구성하였다.

시험물질	성	동물번호	투여액량 (ml/animal)
<i>Burkholderia pyrrocinia</i> CAB08106-4 친환경유기농 자제(2.0x10 ⁶ cfu/mL)	암컷	2101~2106	0.5

(2) 투여량 설정

농촌진흥청고시 제2012-37호 “농약 및 원제의 등록기준” 따라 적용부위당 0.5 mL씩 시험물질을 피부와 접촉시켰다.

(3) 투여방법

시험물질 적용 24 시간 전에 전기 제모기를 이용하여 토끼의 배부 피부에 상처가 나지 않도록 15 cm x 15 cm 의 넓이로 제모하였다. 토끼의 척추를 중심으로 좌우에 대각선 방향으로 18 G 주사침을 이용 하여 피부에 약 2 cm x 3 cm 넓이의 [#]형 철판상을 입혔다. 이때 진피에 손상을 입히거나 출혈은 발생하지 않았으며 각질층만 파괴되었다. 처리는 척추를 중심으로 좌우 1개소씩 모두 2개소에 처리하였고, 적용방법으로는 표시한 적용구획 위에 가로, 세로 2 cm x 3 cm의 조제된 시험물질을 피부와 접촉시켰다. 시험물질의 위에는 침투성이 없는 비자극성 의료용 테이프(Tegardern, 3 M)로 감아주었다. 시험물질은 적용 4 시간 경과 후 제거하였고, 시험물질의 접촉부위는 미온수로 가볍게 씻어내었다.

(4) 결과 및 고찰

본 시험결과 투여군에 있어서 사망례는 물론 피부의 홍반, 부종을 포함한 일반 증상이 관찰되지 않았고, 체중변화에 있어서도 정상적인 체중증가를 보였다. 시험물질 적용 부위에서 어떠한 자극반응도 관찰되지 않아 일차피부자극지수(P.I.I)는 0.0 으로 산출되었다. 이상의 결과로부터 *Burkholderia Pyrrocinia* CAB08106-4 GR (1.0 x 10⁶cfu/g)의 New Zealand White계 토끼의 피부에 적용 시 [피부 자극표]에 의해 자극성이 없는 물질인 것으로 관찰되었다.

라. *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 입제(1.0x10⁶cfu/mL)의 토끼에 대한 안점막자극성시험

(1) 시험방법

- 시험계 : New Zealand White 토끼
- 시험약제 : *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 입제(1.0x10⁶cfu/mL)
- 시험군 구성 : 건강한 동물 6 마리를 1군으로 구성하였다.

시험물질	성	동물번호	투여액량 (ml/animal)
<i>Burkholderia pyrrocinia</i> CAB08106-4 친환경유기농 자제(2.0x10 ⁶ cfu/mL)	암컷	2101~2106	0.1

(2) 투여량 설정

농촌진흥청고시 제2012-37호 “농약 및 원제의 등록기준” 따라 적용부위당 0.1 mL씩 시험물질을 피부와 접촉시켰다.

(3) 투여방법

시험물질의 적용은 토끼를 고정된 후 우안의 하안검을 가볍게 잡아당기고 결막낭 내에 106 단위에 해당하는 시험물질을 마리당 0.1 mL 적용하였고, 좌안은 대조로 하여 무처리 하였다. 시험물질 적용 후 시험물질의 손실을 방지하기 위하여 약 1 초간 양안검을 잡아 폐안시켰다. 비세척군 6 마리는 시험물질 적용 후 세안을 실시하지 않았다.

(4) 결과 및 고찰

시험기간 중 일반증상 및 체중에 있어서 시험물질의 적용에 의한 이상소견은 관찰되지 않았다. 시험물질 적용 후 1 시간, 1 일, 2 일, 3 일, 4 일 및 7 일 후에 적용부의 자극성을 관찰한 결과, 자극성이 관찰되지 않아 급성안자극지수(A.O.I)는 0.0 으로 산출되었다.

이상의 결과로부터 *Burkholderia Pyrrocinia* CAB08106-4 GR (1.0×10^6 cfu/g)를 New Zealand White계 토끼의 안점막에 적용 시 [안점막 자극표]에 의해 자극성이 없는 물질인 것으로 판단되었다.

마. *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 입체(1.0×10^6 cfu/mL)의 담수어(잉어)에 대한 영향 시험

(1) 시험방법

- 시험종 : 잉어(*Cyprinus carpio*)
- 시험약제 : *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4입체(1.0×10^6 cfu/mL)
- 노출기간 : 30일
- 노출수 : 10마리/반복, 3반복/약량
- 시험농도 : 6.77×10^4 cfu/mL(수심 15cm의 농도의 1,000배)
- 시험농도 설정 : 상기농도에서 영향이 인정될 경우 용량반응 시험을 실시한다.

(2) 시험물질 조제

시험물질(1.0×10^9 cfu/mL)을 시험용수(사육수)에 직접 처리하여 시험용액(6.77×10^4 cfu/mL)으로 조제하였다. 노출기간 동안 반지수식으로 노출하며, 시험용액은 시험물질의 처리 당일 조제한다.

(3) 노출조건

수온 : 23 ± 2 °C, pH : 6.5 ~ 8.0 %, 광조건(16시간 광조건, 8시간 암조건), 용존산소량: 60 % 이상, 시험용수량: 1 L이상/g(체중), 먹이공급: 배합사료(어체중의 3%)를 1일 1회 공급

(4) 관찰항목

- 수질검사: 수온, 용존산소량, pH, 총경도, 시험용수 중 미생물농도
- 증상관찰: 외관, 먹이섭식, 유영이상, 사망
- 체중측정: 시험시작 및 부검시에 측정

- 병리검사: 치사나 병원성을 보이면 시험생물 조직으로부터 균을 분리 동정, 시험 종료후 전 개체는 부검하여 육안으로 미생물 감염여부를 대조군과 비교하여 기록

(5) 결과

- 담수어류인 잉어(Cyprinus carpio)를 이용하여 실시한 시험결과는 다음과 같다.

관찰시간	LC ₅₀ (cfu/mL)	95% 신뢰한계	무영향농도 (cfu/mL)
30 days	$> 6.67 \times 10^4$	-	6.67×10^4

시험기간동안 임상증상 및 병원성 조사 결과 특이한 증상은 관찰되지 않았다. 시험에 사용된 대조군에 대한 시험시작전 시험어의 전장은 $4.93 \text{ cm} \pm 0.25 \text{ cm}$, 체중은 평균 $1.37 \text{ g} \pm 0.24 \text{ g}$ 이었고, 시험종료후 시험어의 전장은 $5.17 \text{ cm} \pm 0.36 \text{ cm}$, 체중은 평균 $1.63 \text{ g} \pm 0.37 \text{ g}$ 이였으며, 처리군에 대한 시험시작전 시험어의 전장은 $5.03 \text{ cm} \pm 0.22 \text{ cm}$, 체중은 평균 $1.46 \text{ g} \pm 0.22 \text{ g}$ 이었고, 시험종료후 시험어의 전장은 $5.22 \text{ cm} \pm 0.29 \text{ cm}$, 체중은 평균 $1.73 \text{ g} \pm 0.32 \text{ g}$ 이었다. *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4의 영향은 관찰할 수 없었다.

시험기간 중 pH는 평균 7.74(최소 7.57 ~ 최대 7.95), DO는 평균 7.45 mg/L(최소 6.72 mg/L ~ 최대 8.29 mg/L)으로 포화용존산소량의 평균 88.5 %(최소 80.2 % ~ 최대 98.4 %)이였으며, 수온은 평균 22.6 °C (최소 22.1 °C ~ 최대 23.5 °C)이였으며, 경도는 49.0 mg/L(최소 42 mg/L ~ 최대 54 mg/L)이었다.

(6) 결론

이상의 결과로 본 시험물질 *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4의 어류에 미치는 영향은 없는 것으로 판단되었다.

바. *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 입체($1.0 \times 10^6 \text{ cfu/mL}$)의 담수무척추동물에 대한 영향 시험

(1) 시험방법

- 시험종 : 물벼룩(*Daphnia magna*)
- 시험약제 : *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 친환경유기농자재($1.0 \times 10^6 \text{ cfu/mL}$)
- 노출기간 : 21일

- 노출수 : 20마리/반복, 3반복/약량
- 시험농도 : 6.77×10^4 cfu/mL(수심 15cm의 농도의 1,000배)
- 시험농도 설정 : 예비시험을 실시한 결과 최고농도인 6.77×10^4 cfu/mL에서 치사개체가 관찰되지 않았으므로 본시험을 6.77×10^4 cfu/mL의 설정농도로 한계시험(limit test)을 실시하였다.

(2) 시험물질 조제

시험물질(1.0×10^9 cfu/mL)을 시험용수(사육수)에 직접 처리하여 시험용액(6.77×10^4 cfu/mL)으로 조제하였다. 노출기간 동안 시험용액을 48시간 간격으로 교환하는 반지수식으로 노출하였고, 시험용액은 시험물질의 처리 당일 조제하였다.

(3) 노출조건

시험기간 중 pH는 평균 7.97(최소 7.64 ~ 최대 8.62), DO는 평균 7.97 mg/L(최소 7.60 mg/L ~ 최대 8.36 mg/L)으로 포화용존산소량의 평균 89.6 %(최소 81.3 % ~ 최대 94.8 %)이었으며, 수온은 평균 20.2 °C(최소 19.8 °C ~ 최대 20.8 °C)이었다, 시험용수량은 1 L이상/g(체중), 먹이는 *chlorella vulgaris*를 1일 1회 공급하였다.

(4) 관찰항목

- 수질검사: 수온, 용존산소량, pH, 총경도, 시험용수 중 미생물농도
- 증상관찰: 외관, 유행이상, 사망

(5) 결과 및 결론

수무척추동물인 물벼룩(*Daphnia magna*)를 이용하여 실시한 시험결과는 다음과 같다.

관찰시간	LC ₅₀ (cfu/mL)	95% 신뢰한계	무영향농도 (cfu/mL)
21 days	9.066×10^4	$7.813 \times 10^4 \sim 10.547 \times 10^4$	1.42×10^4

시험기간 중 치사가 일어나지 않는 최고 농도는 1.42×10^4 cfu/mL이었고, 100% 치사가 일어나는 최저농도는 33.3×10^5 cfu/mL 이었다. 시험기간 중 대조군 및 멸균여과대조군에서는 치사개체 및 일반증상은 관찰되지 않았다. 시험기간 중 pH는 평균 7.93(최소 7.41 ~ 최대 8.32), DO는 평균 7.94 mg/L(최소 7.46 mg/L ~ 최대 8.38 mg/L)으로 포화용존산소량의 평균 89.8

%(최소 84.3 % ~ 최대 94.4 %)이었으며, 수온은 평균 20.2 °C(최소 19.9 °C ~ 최대 20.5 °C) 이었으며, 경도는 169.7 mg/L(최소 160 mg/L ~ 최대 180 mg/L)이었다.

이상의 결과로 본 시험물질 *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 입제의 물벼룩에 미치는 영향은 없는 것으로 판단되었다.

다. 천연작물보호제 등록신청을 위한 제품의 안전성 평가

가. *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 입제(1.0×10^6 cfu/mL)의 랫드에 대한 급성경구 독성/병원성시험

(1) 시험방법

- 시험계 : SD Rat
- 시험약제 : *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 입제(1.0×10^9 cfu/mL)
- 시험군 구성

시험물질	성	동물번호	투여량 (cfu/animal)	투여액량 (ml/animal)
비투여대조군	수컷	1101 ~ 1108	0	0
	암컷	2101 ~ 2108		
<i>Burkholderia pyrrocinia</i> CAB08106-4 친환경유기농 자재 (1.0×10^6 cfu/mL)	수컷	1201 ~ 1212	2.0×10^6	2
	암컷	2201 ~ 2212		

(2) 투여량 설정

농약의 등록기준(농촌진흥청 고시 제2013-21호, 2013년 06월 28일), [별표 12] 인축 독성 시험기준과 방법”에서의 투여농도는 개체 당 1.0×10^8 단위에 해당되는 미생물 농약을 투여하도록 되어 있으나, 시험물질을 기술적으로 투여가능한 최대투여액량을 개체당 2 mL로 설정하였고, 투여량은 2.0×10^6 cfu를 투여하였다.

본 시험물질인 *B. pyrrocinia* CAB08106-4 를 2.0×10^6 cfu/g 농도로 설정하여 투여하였다.

(3) 투여방법

투여하기 전 하룻밤 정도 먹이를 주지 않았고 랫드용 경구 투여용 주사기를 이용하여 경구투여 경로를 이용하여 위내에 1회 강제 투여하였다.

(4) 미생물의 체내 및 체외 잔존상황

시험물질 투여 후 1일, 3일, 7일 및 14일에 대변을 채취하였고, 3일, 7일, 14일 및 21일에 부검하여 신장, 뇌, 간장, 폐, 비장, 위, 혈액, 임파절을 채취하여 멸균생리식염수에 넣고 균질시킨 다음 10배 단계 희석하여 plate에 접종한 후 30℃에서 48시간 배양하여 미생물 수를 육안으로 측정하였다.

(5) 결과 및 고찰

본 시험결과 투여군에 있어서 암·수 모두 사망례는 물론 시험물질 투여에 의한 일반증상은 관찰되지 않았고, 체중변화에 있어서는 정상적인 체중증가를 보였다. 또한 생존동물에 대한 부검결과에 있어서도 이상증상은 관찰되지 않았다. 미생물의 체외 및 체내 잔존상황을 검사한 결과 검출된 미생물은 없었다.

이상의 결과로부터 랫드에 *B. pyrrocinia* CAB08106-4 친환경유기농 자제(2.0×10^6 cfu/mL)를 단회 경구 투여시 체외 및 체내에서 검출된 미생물은 없고 부검결과에서도 어떠한 병리학적인 소견도 관찰된 것이 없으므로 *B. pyrrocinia* CAB08106-4 친환경유기농 자제(1.0×10^6 cfu/mL)를 2.0×10^6 cfu의 단위에 해당하는 미생물을 랫드에 단회 경구 투여 시 영향이 없는 것으로 판단된다.

나. *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 입제(2.0×10^6 cfu/mL)의 랫드에 대한 급성경피 독성시험

(1) 시험방법

- 시험계 : SD Rat
- 시험약제 : *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4입제(1.0×10^6 cfu/mL)
- 시험군 구성

시험물질	성	동물번호	투여량 (cfu/animal)	투여액량 (ml/animal)
<i>Burkholderia pyrrocinia</i> CAB08106-4 친환경유기농 자제(2.0×10^6 cfu/mL)	수컷	1101 ~ 1105	2.0×10^6	2
	암컷	2101 ~ 2105		

(2) 투여량 설정

농약의 등록기준(농촌진흥청 고시 제2013-21호, 2013년 6월 일), [별표 12] 인축 독성 시험

기준과 방법”에서의 투여농도는 개체 당 1.0×10^8 단위에 해당되는 미생물 농약을 투여하도록 있으나, 시험물질을 기술적으로 투여가능한 최대투여액량을 개체당 2 mL로 설정하였고, 투여량은 2.0×10^6 cfu를 투여하였다. 본 시험물질인 *B. pyrrocinia* CAB08106-4 를 2.0×10^6 cfu/g농도로 설정하여 투여하였다.

(3) 투여방법

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

(4) 결과 및 고찰

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

이상의 결과로부터 *B. pyrrocinia* CAB08106-4원제(1.0×10^9 cfu/mL)를 1.0×10^8 cfu의 단위에 해당하는 미생물을 랫드에 단회 경피 투여시 영향이 없는 것으로 판단된다.

다. *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 입제(1.0×10^6 cfu/mL)의 토끼에 대한 피부자극성시험

(1) 시험방법

- 시험계 : New Zealand White 토끼
- 시험약제 : *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4입제(1.0×10^6 cfu/mL)
- 시험군 구성 : 건강한 동물 6 마리를 1군으로 구성하였다.

시험물질	성	동물번호	투여액량 (ml/animal)
<i>Burkholderia pyrrocinia</i> CAB08106-4 친환경유기농 차제(2.0×10^6 cfu/mL)	암컷	2101 ~ 2106	0.5

(2) 투여량 설정

농촌진흥청고시 제2013-21호 “농약 및 원제의 등록기준” 따라 적용부위당 0.5 mL씩 시험물질을 피부와 접촉시켰다.

(3) 투여방법

시험물질 적용 24 시간 전에 전기 제모기를 이용하여 토끼의 배부 피부에 상처가 나지 않도록 15 cm x 15 cm 의 넓이로 제모하였다. 토끼의 척추를 중심으로 좌우에 대각선 방향으로 18 G 주사침을 이용 하여 피부에 약 2 cm x 3 cm 넓이의 [#]형 절과상을 입혔다. 이때 진피에 손상을 입히거나 출혈은 발생하지 않았으며 각질층만 파괴되었다. 처리는 척추를 중심으로 좌우 1개소씩 모두 2개소에 처리하였고, 적용방법으로는 표시한 적용구획 위에 가로, 세로 2 cm x 3 cm의 조제된 시험물질을 피부와 접촉시켰다. 시험물질의 위에는 침투성이 없는 비작극성 의료용 테이프(Tegardern, 3 M)로 감아주었다. 시험물질은 적용 4 시간 경과 후 제거하였고, 시험물질의 접촉부위는 미온수로 가볍게 씻어내었다.

(4) 결과 및 고찰

본 시험결과 투여군에 있어서 사망례는 물론 피부의 홍반, 부종을 포함한 일반 증상이 관찰되지 않았고, 체중변화에 있어서도 정상적인 체중증가를 보였다. 시험물질 적용 부위에서 어떠한 자극반응도 관찰되지 않아 일차피부자극지수(P.I.I)는 0.0 으로 산출되었다.

이상의 결과로부터 *Burkholderia Pyrrocinia* CAB08106-4 GR (1.0 x 10⁶cfu/g)의 New Zealand White계 토끼의 피부에 적용 시 [피부 자극표]에 의해 자극성이 없는 물질인 것으로 관찰되었다.

라. *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 입체(1.0x10⁶cfu/mL)의 토끼에 대한 안점막자극성시험

(1) 시험방법

- 시험계 : New Zealand White 토끼
- 시험약제 : *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 입체(1.0x10⁶cfu/mL)
- 시험군 구성 : 건강한 동물 6 마리를 1군으로 구성하였다.

시험물질	성	동물번호	투여액량 (ml/animal)
<i>Burkholderia pyrrocinia</i> CAB08106-4 친환경유기농 자제(2.0x10 ⁶ cfu/mL)	암컷	2101~2106	0.1

(2) 투여량 설정

농촌진흥청고시 제2013-21호 “농약 및 원제의 등록기준” 따라 적용부위당 0.1 mL씩 시험물질을 피부와 접촉시켰다.

(3) 투여방법

시험물질의 적용은 토끼를 고정된 후 우안의 하안검을 가볍게 잡아당기고 결막낭 내에 106단위에 해당하는 시험물질을 마리당 0.1 mL 적용하였고, 좌안은 대조로 하여 무처리 하였다. 시험물질 적용 후 시험물질의 손실을 방지하기 위하여 약 1 초간 양안검을 잡아 폐안시켰다. 비세척군 6 마리는 시험물질 적용 후 세안을 실시하지 않았다.

(4) 결과 및 고찰

시험기간 중 일반증상 및 체중에 있어서 시험물질의 적용에 의한 이상소견은 관찰되지 않았다. 시험물질 적용 후 1 시간, 1 일, 2 일, 3 일, 4 일 및 7 일 후에 적용부의 자극성을 관찰한 결과, 자극성이 관찰되지 않아 급성안자극지수(A.O.I)는 0.0 으로 산출되었다.

이상의 결과로부터 *Burkholderia Pyrrocinia* CAB08106-4 GR (1.0 x 10⁶cfu/g)를 New Zealand White계 토끼의 안점막에 적용 시 [안점막 자극표]에 의해 자극성이 없는 물질인 것으로 판단되었다.

마. *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 입제(1.0x10⁶cfu/mL)의 기니픽에 대한 피부감작성시험

(1) 시험방법

- 시험계 : Hartley계 수컷 기니픽(Guinea pig, SPF)
- 시험약제 : *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 입제(1.0x10⁶cfu/mL)
- 시험군 구성 :

시험군	번호	마리	감작유도단계	감작야기단계
G1 (시험물질투여군)	1101 ~ 1110	10	시험물질	시험물질
G2 (음성대조군)	1201 ~ 1205	5	멸균증류수	시험물질
G3 (양성대조군)	1301 ~ 1305	5	0.1 %(w/v) DNCB	0.1 %(w/v) DNCB

(2) 투여량 설정

예비시험 결과, *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 입체(1.0×10^3 cfu/mL)까지 자극성이 관찰되어 시험물질 투여량은 *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 입체(1.0×10^2 cfu/mL) 설정 하였다.

(3) 시험방법

(가) 감작유도단계

시험물질은 투여하기 전날 기니픽의 등부위를 제모를 실시한 다음 일회용 syringe를 이용하여 각 개체당 0.05 mL를 피내주사하였다(1차 감작유도). 1차 감작유도 후 2일 간격으로 3주간 9번을 각 개체당 0.1 ml씩 동일한 방법으로 피내주사하였다(총 10회 감작유도).

(나) 감작야기단계

최종 감작유도한 다음 2주 후, 감작야기 전날 기니픽의 한쪽 옆구리의 털을 제거하고, 감작야기 농도의 시험물질을 감작유도단계 처리방법과 동일한 방법으로 피내주사 투여하였다. 투여 후, 24시간 및 48시간에 피부반응을 조사하였다.

(4) 결과 및 고찰

시험기간 동안 시험물질 적용과 관련된 사망동물 및 이상소견을 보인 동물은 관찰되지 않았다. 또한 체중측정 결과, 모든 시험동물에서 정상적인 체중증가를 보였다. 시험물질 야기 후 24시간과 48시간에 적용부위의 피부를 관찰한 결과, 홍반 및 부종 등의 피부반응이 관찰되지 않아 감작지수와 빈도지수는 각각 “0”과 “0 %”로 산출되어 *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 입체(1.0×10^2 cfu/mL)는 매우 약한 감작성의 물질인 것으로 평가 되었다.

바. *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 입제(1.0×10^6 cfu/mL)의 담수어(잉어)에 대한 영향시험

(1) 시험방법

- 시험종 : 잉어(*Cyprinus carpio*)
- 시험약제 : *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4입제(1.0×10^6 cfu/mL)
- 노출기간 : 30일
- 노출수 : 10마리/반복, 3반복/약량
- 시험농도 : 6.77×10^4 cfu/mL(수심 15cm의 농도의 1,000배)
- 시험농도 설정 : 상기농도에서 영향이 인정될 경우 용량반응 시험을 실시한다.

(2) 시험물질 조제

시험물질(1.0×10^9 cfu/mL)을 시험용수(사육수)에 직접 처리하여 시험용액(6.77×10^4 cfu/mL)으로 조제하였다. 노출기간 동안 반지수식으로 노출하며, 시험용액은 시험물질의 처리 당일 조제한다.

(3) 노출조건

수온 : 23 ± 2 °C, pH : 6.5 ~ 8.0 %, 광조건(16시간 광조건, 8시간 암조건), 용존산소량: 60 % 이상, 시험용수량: 1 L이상/g(체중), 먹이공급: 배합사료(어체중의 3%)를 1일 1회 공급

(4) 관찰항목

- 수질검사: 수온, 용존산소량, pH, 총경도, 시험용수 중 미생물농도
- 증상관찰: 외관, 먹이섭식, 유영이상, 사망
- 체중측정: 시험시작 및 부검시에 측정
- 병리검사: 치사나 병원성을 보이면 시험생물 조직으로부터 균을 분리 동정, 시험 종료후 전 개체는 부검하여 육안으로 미생물 감염여부를 대조군과 비교하여 기록

(5) 결과

- 담수어류인 잉어(*Cyprinus carpio*)를 이용하여 실시한 시험결과는 다음과 같다.

관찰시간	LC ₅₀ (cfu/mL)	95% 신뢰한계	무영향농도 (cfu/mL)
30 days	$> 6.67 \times 10^4$	-	6.67×10^4

시험기간 동안 임상증상 및 병원성 조사 결과 특이한 증상은 관찰되지 않았다. 시험에 사용된 대조군에 대한 시험시작전 시험어의 전장은 $4.93 \text{ cm} \pm 0.25 \text{ cm}$, 체중은 평균 $1.37 \text{ g} \pm 0.24 \text{ g}$ 이었고, 시험종료후 시험어의 전장은 $5.17 \text{ cm} \pm 0.36 \text{ cm}$, 체중은 평균 $1.63 \text{ g} \pm 0.37 \text{ g}$ 이었으며, 처리군에 대한 시험시작전 시험어의 전장은 $5.03 \text{ cm} \pm 0.22 \text{ cm}$, 체중은 평균 $1.46 \text{ g} \pm 0.22 \text{ g}$ 이었고, 시험종료후 시험어의 전장은 $5.22 \text{ cm} \pm 0.29 \text{ cm}$, 체중은 평균 $1.73 \text{ g} \pm 0.32 \text{ g}$ 이었다. *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4의 영향은 관찰할 수 없었다. 시험기간 중 pH는 평균 7.74(최소 7.57 ~ 최대 7.95), DO는 평균 7.45 mg/L(최소 6.72 mg/L ~ 최대 8.29 mg/L)으로 포화용존산소량의 평균 88.5 %(최소 80.2 % ~ 최대 98.4 %)이었으며, 수온은 평균 22.6 °C(최소 22.1 °C ~ 최대 23.5 °C)이었으며, 경도는 49.0 mg/L(최소 42 mg/L ~ 최대 54 mg/L)이었다.

(6) 결론

이상의 결과로 본 시험물질 *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4의 어류에 미치는 영향은 없는 것으로 판단되었다.

사. *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 입체($1.0 \times 10^6 \text{ cfu/mL}$)의 담수무척추동물에 대한 영향 시험

(1) 시험방법

- 시험종 : 물벼룩(*Daphnia magna*)
- 시험약제 : *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 친환경유기농자재($1.0 \times 10^6 \text{ cfu/mL}$)
- 노출기간 : 21일
- 노출수 : 20마리/반복, 3반복/약량
- 시험농도 : $6.77 \times 10^4 \text{ cfu/mL}$ (수심 15cm의 농도의 1,000배)
- 시험농도 설정 : 예비시험을 실시한 결과 최고농도인 $6.77 \times 10^4 \text{ cfu/mL}$ 에서 치사개체가 관찰되지 않았으므로 본시험을 $6.77 \times 10^4 \text{ cfu/mL}$ 의 설정농도로 한계시험(limit test)을 실시하였다.

(2) 시험물질 조제

시험물질($1.0 \times 10^9 \text{ cfu/mL}$)을 시험용수(사육수)에 직접 처리하여 시험용액($6.77 \times 10^4 \text{ cfu/mL}$)으로 조제하였다. 노출기간 동안 시험용액을 48시간 간격으로 교환하는 반지수식으로 노출하였고, 시험용액은 시험물질의 처리 당일 조제하였다.

(3) 노출조건

시험기간 중 pH는 평균 7.97(최소 7.64 ~ 최대 8.62), DO는 평균 7.97 mg/L(최소 7.60 mg/L ~ 최대 8.36 mg/L)으로 포화용존산소량의 평균 89.6 %(최소 81.3 % ~ 최대 94.8 %)이었으며, 수온은 평균 20.2 °C(최소 19.8 °C ~ 최대 20.8 °C)이었다, 시험용수량은 1 L이상/g(체중), 먹이는 *chlorella vulgaris*를 1일 1회 공급하였다.

(4) 관찰항목

- 수질검사: 수온, 용존산소량, pH, 총경도, 시험용수 중 미생물농도
- 증상관찰: 외관, 유영이상, 사망

(5) 결과 및 결론

수무척추동물인 물벼룩(*Daphnia magna*)를 이용하여 실시한 시험결과는 다음과 같다.

관찰시간	LC ₅₀ (cfu/mL)	95% 신뢰한계	무영향농도 (cfu/mL)
21 days	9.066×10^4	$7.813 \times 10^4 \sim 10.547 \times 10^4$	1.42×10^4

시험기간 중 치사가 일어나지 않는 최고 농도는 1.42×10^4 cfu/mL이었고, 100% 치사가 일어나는 최저농도는 33.3×10^5 cfu/mL 이었다. 시험기간 중 대조군 및 멸균여과대조군에서는 치사개체 및 일반증상은 관찰되지 않았다. 시험기간 중 pH는 평균 7.93(최소 7.41 ~ 최대 8.32), DO는 평균 7.94 mg/L(최소 7.46 mg/L ~ 최대 8.38 mg/L)으로 포화용존산소량의 평균 89.8 %(최소 84.3 % ~ 최대 94.4 %)이었으며, 수온은 평균 20.2 °C(최소 19.9 °C ~ 최대 20.5 °C) 이었으며, 경도는 169.7 mg/L(최소 160 mg/L ~ 최대 180 mg/L)이었다.

이상의 결과로 본 시험물질 *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 입제의 물벼룩에 미치는 영향은 없는 것으로 판단되었다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 년차별 연구개발목표와 달성도

가. 1차년도

세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
대상균주의 대량배양 조건 확립	- 제제화에 적합한 배양조건 확립	100
제형 및 처방 확립	- 개발 제형에 맞는 부자재 선발 - 선발된 부자재에 따른 최적조합 결정 - 유효성분의 안정성 확보를 위한 조건 확립	100
제품제조 및 이화학적 안정성 확인	- 제품제조 및 이화학적 특성 확인 - 유효성분의 안정성 확인	100
제품의 효과 검증	- 농약품목등록 예비시험 실시 - 유효성분의 대상병해에 대한 효과 평가	100
길항미생물 특성 검정	- 제형화 기술개발을 위한 길항미생물 생물학적 특성 조사	100
항균활성물질의 특성 검정	- 다양한 병원균에 대한 항균 스펙트럼 분석 - 항균물질의 분리·동정	100
흑색썩음균핵병 발생 모니터링	- 한지형, 난지형 마늘의 병발생 양상조사 (서산, 태안, 의성, 해남, 제주)	100
길항미생물의 방제효과 농가실증	- 한지형 마늘 (충남 예산, 태안)	100
원제의 안전성 평가	- 원제의 인축/환경독성시험 평가	100

나. 2차년도

세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
제품의 경시적 안정성 확인	- 경시적 이화학 안정성 확인 - 온도변화에 따른 저장안정성 확인	100
대량배양조건에 따른 안정화 방안 확립	- 영양배지 추가선발 - Scale up(Fermenter)	100
상품화 추진 (생물농약등록준비 1년차)	- 생물농약품목등록 약효, 약해 시험(1년차) - 제품의 이화학분석 시험 - 제주와 전남지역에서 약효 실증시험 실시	100
친환경유기농자재 목록공시 신청	- 친환경유기농자재 목록공시 신청	100
미생물제제의 적용확대	- 양파 흑색썩음균핵병 적용확대 검토	100
마늘 흑색썩음균핵병 발생 모니터링	- 한지형, 난지형 마늘의 병발생양상조사 (서산, 태안, 의성, 해남, 제주)	100
길항미생물의 방제효과 실증	- 한지형 및 난지형 마늘 - 방제적기 구명	100
미생물제제의 적용확대	- 쪽파 흑색썩음균핵병 생물적방제 - 방제효과 검증	100
항균물질 정량분석	- 최적배양시 항균물질 생산량 - 최대생산 배양시간 등	100
친환경유기농업자재 목록공시 신청을 위한 안전성 평가	- 제품에 대한 인축/환경독성평가	100

다. 3차년도

세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
제품의 경시적 안정성 확인	- 경시적 이화학 안정성 확인 - 온도변화에 따른 저장안정성 확인	100
상품화 추진 (생물농약등록준비2년차)	- 생물농약품목등록 약효, 약해 시험(2년차) - 추가제형연구(액상, 수화제등) - 제품의 이화학분석 시험 - 지역별농가실증(전시포실시) - 체계처리를 통한 방제효과 검토 (토양처리, 생육기 관주처리)	100
마늘 흑색썩음균핵병 발생 모니터링	- 한지형, 난지형 마늘의 병발생양상조사 (서산, 태안, 의성, 해남, 제주)	100
길항미생물의 방제효과 실증	- 한지형 및 난지형 마늘 - 방제적기 구명	100
미생물제제의 적용확대	- 쪽과 흑색썩음균핵병 생물적방제 - 방제효과 검증	100
천연작물보호제 등록신청을 위한 제품의 안전성 평가	- 제품에 대한 인축/환경독성평가	100

2. 관련분야에의 기여도

마늘 흑색썩음균핵병에 대한 길항미생물의 생물학적 특성을 밝히고, 이를 효과적으로 억제할 수 있는 포장 적용기술을 밝혀내어 개발 제제의 천연작물보호제로서의 가능성 확인하였고, 항균활성물질을 분리·동정하여 길항미생물이 갖는 항균기작의 해석과 배양조건의 개선을 가능하게 하였다. 길항미생물을 제제화하여 처리량 및 처리방법을 확립함으로써 농가에서 보다 효율적으로 마늘 흑색썩음균핵병을 방제할 수 있는 방안을 마련하였으며, 천연작물보호제로 등록을 추진 중에 있어 농가에 생산비 절감 및 소득증대에 기여할 수 있을 것으로 예상된다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 실용화 산업화계획

시제품의 상표명을 알차니 입제로 하여 2014년 7월 유기농업자재 공시 신청을 하여 결과를 기다리고 있으며, 12월에는 천연작물보호제 등록 신청을 진행을 하여 사업화를 준비중에 있다.

2. 교육·지도·홍보

대농민 교육을 통하여 미생물제제에 대한 편견 및 인식을 변화시키고 있으며, 공시 신청이 완료된 후 충남농업기술원과 협약하여 홍보 및 지도 예정이다.

3. 특허

기 특허 균주임.

4. 추가연구

마늘 흑색썩음균핵병의 적용대상작물 확대

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

Pyrrolnitrin은 1964년 Arima등에 의해 *Pseudomonas*속 균에 의해 생산되는 항생물질로 최초 보고되었고(Agricultural and Biological Chemistry 28: 575~576), Nishida 등은 피부사상균에 대한 광범위한 항균활성을 확인하였다 (1965. Journal of Antibiotics 18: 211~219). 최근 pyrrolnitrin은 많은 종류의 *Burkholderia*속, *Pseudomonas*속 균류, *Myxococcus*속 및 *Enterobacter agglomerans*에 의해서도 생산되며 식물 병원균에 대한 길항작용과 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되었다. Pyrrolnitrin의 항균활성은 균류의 호흡과정 중 succinate 또는 환원 nicotinamide adenine dinucleotide (NADH)와 coenzyme Q 사이의 전자전달계 말단에 작용하여 pyrrolnitrin이 적정 농도가 되면 균류의 내생 또는 외생 호흡기작을 즉시 교란시키기 때문에 균류의 생육을 억제하여 생물학적방제인자로 이용된다 (Tripathi 와 Gottlieb. 1969. Journal of Bacteriology 100(1): 310~318). 현재 pyrrolnitrin은 삼투성신호전달(osmotic signal transduction)를 방해하는 Fludioxonil 성분과 혼합하고, 광 안전성을 향상시켜 화훼류 잣빛곰팡이병 방제용 살균제로 이용되고 있다. 주성분인 Fludioxonil은 균의 세포막을 교란시켜 수분흡수, 세포막 투과성 및 합성을 저해하는 독특한 작용기작을 나타내고, 여기에 Pyrrolnitrin을 혼합하여 Fludioxonil에 반응하지 않는 *Pythium ultimum*, *Phytophthora capsici*, and *Saccharomyces cerevisiae*에도 강력한 살균작용을 나타낸다(Okada 등, 2005. Journal of Pesticide Science 30(4) : 378~383)

제 7 장 연구시설·장비 현황

해당없음

제 8 장 참고문헌

1. Arima, K., Imanaka, H., Kousaka, M., Fukuta, A., and Tamura, G. 1964. Pyrrolnitrin, a new antibiotic substance, produced by *Pseudomonas*. *Agricultural and Biological Chemistry* 28(8): 575~576.
2. Cho W. D., and Kim W. G. 1996. Qccurrence of white rot on Alliaceous vegetable crops. *Korean J. Plant Pathol.* 12(2): 251~254.
3. Clarkon, J. P., Payne, T., Mead, A. and Whipps, J. M. 2002. Selectin of fungal biological control agents for control of white rot by sclerotial degradation in a UK soil. *Plant Pathology* 51: 735~745.
4. Coley-Smith, J. R., Mitchel, C. M. and Sanford, C. E. 1990. Long-term survival of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* and *Stromtinia gladioli*. *Plant Pathology* 39: 58~69.
5. Copping, L. G. 2004. The manual of biocontrol agents. third edition, BCPC. UK. 702p.
6. Crowe, F. 1996. White rot. In: *Compendium of onion and garlic diseases*, ed. by H. F. Schwartz and S. K. Mohaneds. The APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
7. Crowe, F. J. 1996. White rot. *Compendium of Onion and Garlic Diseases*, eds. Schwartz, H. F. and Mohan, S. K. *APS Press*, USA, 14~16pp.
8. Han K. S., Kim B. R., Hahm S. S., Yang E. S. Kwon K. H. and Choi J. E. 2011. Biological control of soilborn disease on garlic by antifungal bacteria *Burkholderia pyrocinia*. *Res. Plant Dis.* 17(3): 423
9. Kim, C. H. 2003. Review of disease incidence of major crops in 2002. *Res. Plant Dis.* 9(1): 10~17.(In Korean)
10. Kim, C. H. and Kim, Y. K. 2002. Present status of soilborne disease incidence and scheme for its intergrated management in Korea. *Res. Plant Dis.* 8(3): 146~161.(In Korean)
11. Kim, Y. K., Kwon M. K., Shim H. S., Kim T. S., Yeh W. H., Cho W. D., Choi I. H., Lee S. C., Ko S. J., Lee Y. H. and Lee C. J. 2005. Various cultural factors associated with disease development of garlic white rot caused by two species of *Sclerotium*. *Res. Plant Dis.* 11(1): 28~34.(In Korean)
12. Lee S. Y., Lee S. B., Kim Y. K. and Hawang S. J. 2006. Biological control of white rot accused by *Sclerotium cepivorum* and *Sclerotium* sp. using *Bacillus subtilis* 122 and

Trichoderma harzianum 23. *Res. Plant Dis.* 12(2): 81~84.

13. Mclean, K. L and Stewart, A. 2000. Infection site of *Sclerotium cepivorum* on onion roots. *New Zealand Plant Protection* 53: 118~121.
14. Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries Republic of Korea. 2008. Food, Agriculture, Forestry and Fisheries Statistical Yearbook.
15. Nishida, M., Matsubara, T., and Watanabe, N. 1965. Pyrrolnitrin, a new antifungal antibiotic. Microbiological and toxicological observations. *The Journal of Antibiotics* 18(5): 211~219.
16. Okada, A., Banno, R., Ichiishi, A., Kimura, M., Yamaguchi, I., and Fujimura, M. 2005. Pyrrolnitrin interferes with osmotic signal transduction in *Neurospora crassa*. *Journal of Pesticide Science* 30(4): 378~383.
17. The Korean Society of Plant Pathology. 2009. List of plant diseases in Korea 5: 95~98.
18. Tripathi, R. K. and Gottlieb, D. 1969. Mechanism of action of the antifungal antibiotic Pyrrolnitrin. *J. Bacteriol.* 100(1): 310~318.
19. 김용기, 권미경, 조원대. 2004. 마늘의 흑색썩음균핵병에 대한 품종저항성의 역학적 평가. *식물병연구* 10(2): 105~111.
20. 박지현, 최경자, 이선우, 장경수, 최용호, 정영륜, 조광연, 김진철. 2004. 탄저병균에 대하여 길항작용을 보이는 *Burkholderia cepacia* EB215로부터 분리한 Pyrrolnitrin의 항균활성. *한국균학회지* 32(1): 31~38.
21. 작물보호협회. 2012. 작물보호제지침서.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.