

발간등록번호

1-1543000-000992-01

(온실/담배)가루이 방제를 위한 곤충병원성
곰팡이를 활용한 미생물살충제의 산업화 기술

(Industrialization of Microbial Insecticide using
Endomopathogenic fungi for the prevention of
Greenhouse whitefly and Bemisia tabasi)

안동대학교 산학협력단

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “(온실/담배)가루이 방제를 위한 곤충병원성 곰팡이를 활용한 미생물살충제의 산업화 기술에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2015년 09월 일

주관연구기관명 : 안동대학교 산학협력단

주관연구책임자 : 권 기 석

연 구 원 : 강 경 목

연 구 원 : 이 은 호

협동연구기관명 : (주)엠 텍

협동연구책임자 : 김 범 수

협동연구기관명 : 예천농업기술센터

협동연구책임자 : 김 진 원

연 구 원 : 임 대 준

요 약 문

I. 제 목

(온실/담배)가루이 방제를 위한 곤충병원성 곰팡이를 활용한 미생물살충제의 산업화기술

II. 연구성과 목표 대비 실적

1. 제 1 차년도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)
1차 년도 (2012. 8.10~ 2013.8.9)	(온실/담배)가루이병 방제를 위한 곤충병원성 곰팡이를 활용한 미생물살충제의 산업화 (주관)	최적화된 조건에서의 대량포자 생산을 위한 고체배양 기술 확립	100
		제제화를 위한 제형화별 약효평가 및 보조제 탐색 및 조사	
	현장포장 방제력 검정 및 방제시스템개발 (협동1)	현장 포장 방제력 검정	100
	포자 회수기 개발 (협동2)	포자 회수기 개발	100

2. 제 2 차년도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)
2차 년도 (2013. 8.10~ 2014.8.9)	(온실/담배)가루이병 방제를 위한 곤충병원성 곰팡이를 활용한 미생물살충제의 산업화 (주관)	안정제·보조 물질 탐색 및 조사	100
		대량포자를 이용한 제제 및 제형화 기술	100
		친환경목록고시& 품질인증 및 천연식물보호제를 위한 안전성 평가	100
	현장포장 방제력 검정 및 방제시스템개발 (협동1)	타 생물학적 방제시스템 조사 및 방제효율현장포장 방제력 검정	100
포자 회수기 개발(협동2)	포자 회수기 개발	100	

3. 제 3 차년도

구분 연도	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)
3차 년도 2014.08.10~201 5.08.09)	제형화된 제제의 살충력 검정 및 현장포장 시험 (주관&협동1)	온실/담배 가루이 증식, 실내생물 검정, 현장포장 검정,이병충에 대한 포자발아율 조사과 작물의 생육조사	100
	산업화에 따른 경제성 검토 (주관&협동 2)	우수균주의 선발에 따른 검증 개발시 예상 생산비에 따른 경제성 분석	100
	포자회수기 개발완성 (협동 2)	포자회수기 개발 (물링커터사이클론 방식과 드럼회 전마찰사이클론 방식 중 회수율이 우수한 방식으로 개발)	100
	상품화 타당성 조사 (홍보 및 교육) (주관&협동 1, 2)	박람회(전시회), 마스크 활용 광고 등 각 인근 농업기술센터와 연계된 친환경 자재교육 및 제품 효능 설명	100

III. 연구개발의 목적 및 필요성

● 연구개발 목적

- (온실/담배)가루이 방제를 위한 국내토착균주를 이용한 친환경 미생물 살충제 상용화
- 고체배양에서의 포자대량생산 최적화(배지·배양 최적조건), 포자회수(화학·물리적)기 개발 및 제제화기술(발아율 증대) 확보를 통해 발아율과 병원성이 우수한 국내토착균주의 유전자원화 및 생물학적 방제시스템(시기, 횡수, 포자농도) 개발 확보
- 확보된 자원과 기술에 의한 미생물살충제제의 현장포장 검정을 통한 생물학적 방제가 증진 요인규명 및 상품화
- 현장에서의 살충력 효과 증진 및 유지를 위한 기술(포자착생증진물질)확보 (안정성, 물리적 개선)
- 살충력 효과 증진을 위한 타 생물학적 방법(천적-온실가루이좀벌)과의 복합처리 방제 시스템 (교차·혼용살포, 시기, 횡수) 확립 및 적용
- 안정성 평가를 통한 친환경목록고시 & 품질인증 및 천연식물보호제 상품화
- 우수 국내토착 유용균주를 이용한 상품화(미생물살충제)에 의한 수입대체 효과 및 국제경쟁력 강화 수단

● 필요성

- 친환경경제매면적 2015년까지 12% 확대 & 화학비료·농약 매년 3% 이상 감축(친환경농업 5개년 계획 시행 중), 경북지역 (온실/담배)가루이 조사 결과(2008년) 전체하우스에서 80% 발견(온실-73%, 담배-27%)-경북도농업기술원, 경북 주요 소득작물 참외(온실-7%, 담배-93%), 토마토(온실-80%, 담배-20%)와 오이 등의 소득작물에 대한 피해 심각

- 생식용 과일·채소 화학농약으로만 방제하기 어려운 현실에 따른 안전성 문제 발생
- 온실가루이 약충과 번데기는 작물의 잎 뒷면에 존재하며 왁스를 내어 외부를 보호, 화학적으로 방제가 매우 어려운 해충, 정확한 발생예찰 및 발생밀도 추정기술이 매우 중요
- 외국에서는 Botanigard, Mycotal, Vertalec 등의 제품이 개발되어 사용, 유럽이나 일본 등 친환경 농업인 많이 사용되며 국내에의 경우 전부 수입되어져 사용
- 국내 토착균주와의 비교 시 환경적 적응력이 떨어져 방제효과가 다소 떨어지므로 국내 토착 균주를 제품으로 개발, 활용하면 안정적이고 높은 방제 효과 및 수입대체 효과 기대되며, 우수한 발아율, 병원성, 고온에 대한 내성 등 국내 환경에 적응 된 토착균주의 실용화 필요
- 미생물농약에 적합한 실험 방법에 따른 살충효능 검증, 향 후 우수한 국내 토착미생물 살충제로의 역할
- 연구기술개발을 통해 연구된 외국 회사제품(Botanigard) 균주보다 우수한 병원성 및 살충력이 입증된 국내 토착균주인 *Beauveria bassiana* 균주를 이용하여 (온실/담배)가루이에 대한 친환경적 미생물살충제 개발이 필요
- 미생물살충제로서의 역할을 입증 할 수 있는 실험 방법에 의거하여 특정 해충에 대한 살충력을 검정함으로써 해당 균주 및 제제가 농업적으로 이용 가능함을 입증하며 단순한 환경조건의 실험실 안에서 수행한 생물검증만으로는 포장에서 유효한 방제효과를 단정 할 수 없으므로 포장조건에서의 방제 효과 검정 필요
- 2015년까지 유·무기농약 재배면적 증대 정책에 따른 친환경농자재 수요 급증 예상

IV. 연구개발 내용 및 범위

● 연구개발내용

- 연구기술개발을 통해 연구된 농업부산물을 이용한 액체배양 최적화 기술을 활용한 포자 대량 생산을 위한 고체배양기술 최적화 확립
- 곡물을 이용한 분생포자의 농도 보다 더 높은 농업부산물을 이용한 고체 대량배양 조건 규명
- 현장검증에 의한 높은 온실가루이에 대한 높은 방제력 검증
- 친환경목록고시 & 품질인증 및 천연식물보호제를 위한 안정성 평가
- 곤충병원성 곰팡이 포자 발아력 증대 및 방제효율 증진 조사
- 높은 포자생산에 따른 효율적인 포자회수기 개발

V. 연구개발결과

- 온실가루이에 대해 곤충병원성활성을 보이는 *B. bassiana* M130의 배양을 최적화 하였다.
- *B. bassiana* M130은 키틴나야제와 프로테아제 활성이 우수하며, 균체량 생산성 높은 것으로 조사되었다.
- 액체배양시 배양의 최적 조건은 20℃에서 가장 우수하였으며, 고체배양시 미강 추출물을 사용하였을때 3.5×10^8 conidium/ml 이상의 포자를 생산하는 것으로 조사되었다.
- 고체배지의 최적화를 위해 탄소원, 질소원, pH, 수분함량 및 온도 조건을 최적화한 결과 미강을 이용하여 0.5% (NH₄)₂SO₄, pH5조건, 수분조건 40%에서 28℃배양시 가장 최적

조건으로 나타났다.

- *B. bassiana* M130 포자건조시 상온에서 가장 열안정성 좋았으며, 자외선에 대해서는 민감도가 높아 제제화시 자외선 차단제가 꼭 필요한 것으로 조사되었다.
- 다량의 포자를 생산하기 위해서는 곡물인 보리를 이용하여 배양하는것이 다량의 포자를 생산할 수 있으며, matrix를 재활용이 가능한 것으로 나타났다.
- 제제화를 위한 보조제 탐색에서는 자외선차단제는 Lowlite 22, 분산제는 DO-113, 보습제는 Gelatin, 수분보호제 발아제로 옥수수기름과 증량제로 규조토를 이용하여 수화제 형태로 개발하였다.
- *B. bassiana* M130 포자의 생물검정결과 온실가루이에 대한 방제효과가 화분실험에서는 84.6%의 높은 방제가를 보였으나, 현장실험에서는 포자만으로는 그리 높지 못한 것으로 나타났다.
- *B. bassiana* M130 포자 프로토타입의 생물검정결과 90%이상의 방제효과를 보였으며, 제품인 보타니가드 보다 우수 한 것으로 조사되었다.
- *B. bassiana* M130 포자 시제품 '가루자비'의 생물검정결과 살충생물보다는 활성이 우수 하였으며, 보타니 가드보다도 우수하였다.
- 향후 제품의 완성도를 높이기 위해서는 저온에서 저장기간에 대한 안전성에 관한 연구가 더욱 진행이 되어야 할 것이다.
- 포자회수기 개발에 있어서는 보리를 이용하여 배양한 *B. bassiana* M130의 포자를 드럼 회전 마찰 싸이클론형식의 포자 회수기를 개발하였다.
- 친환경제품목록고시를 위해 동물 실험 및 약해 실험결과 가루자비는 무해하며, 약해가 없어 유기농자재로의 실용성이 있는 것으로 나타났다.

VI. 연구성과 및 성과활용 계획

- 과제에서는 *B. bassiana*라는 곤충병원성곰팡이를 분리하여 해충방제 활성을 가진 곰팡이 생산을 통해, 곰팡이 포자를 대량 생산하여 산업화를 통해 경제성 있는 곤충병원성곰팡이 친환경 제품을 개발하고, 환경오염에 대한 다양한 문제들을 해결하였다.
- *B. bassiana*로 부터 포자를 대량생산 할 수 있는 배양방법을 최적화했으며, 배양된 *B. bassiana*로부터 포자를 쉽게 회수 할 수 있는 포자 회수기를 개발하여 원재 수급에 어려움을 극복할 수 있어 세계적으로 독점할 수 있는 원재를 국내에서 생산 할 수 있게 되는 성과를 얻었다고 할 수 있다.
- 그리고 본 과제를 통해 얻어진 시험 데이터를 바탕으로 현적용이 가능할 수 있도록 하였으며, 동시에 친환경 농자재로 등록이 가능할 수 있도록 독성 실험이 완료된 상태이다.
- 본 연구 과제를 통해 개발된 '가루자비'(제품)은 기존 수입제품인 '보타니가드'에 비해 가격 경쟁력이 좋으며, 활성 또한 우수 한 것으로 조사되어 경제성과 원재의 국산화를 이루었으며, 위해성과 환경에 안전하고 무해한 완성도가 높은 친환경 제품의 개발을 완성하였다.
- 또한 본 연구과제의 결과를 통해 학술지와 학술대회를 통해 결과를 발표하였으며, 특허출원 및 등록, 언론보도, 농민교육, 인력양성 및 홍보 등을 실시하였다.

- 본 연구 과제의 결과를 바탕으로 분리된 곤충병원성곰팡이 *B. bassiana*를 균주 기탁과 함께 포자를 이용하여 만든 ‘가루자비’(제품)을 등록하고자 한다. 현재 등록 시험은 2, 3년 차에 수행이 완료되었으며, 등록을 위해 업체에서 작업중 임.
- 예천군 농업기술센터를 통해 친환경 유기농에 대한 교육을 2년차 3년차과제 수행중에 진행하였으며, 이를 기반으로 지속적인 교육을 실시하고, 예천 뿐 만 아니라 안동, 영양, 청송 등 농업기술센터에서도 과제 결과에 대한 성과를 활용하여 친환경 유기농 교육에 지속적으로 이용할 것임.
- 포자회수 방법 등에 관한 특허가 등록된 상태이므로 이를 이용하여 제품개발에 활용 및 원재 판매 방안 또한 모색할 것임.
- 생물학적 해충방제의 일환으로 화학적 살충제를 대신할 수 있는 살충곰팡이를 활용하여 온실가루이에 대한 환경 친화적이고 저항성기작이 보고되지 않은 곤충병원성 곰팡이를 이용한 생물방제 살충제로 사용함으로써 농가에 있어 작물의 피해를 줄이는 것은 물론이며, 친환경적 재배로 인해 농가의 소득을 극대화할 수 있을 것으로 기대됨.
- 생물농약으로 가루이 방제 가능성 확인하여 예천 농업기술센터와 업무 협조를 통해 친환경 단지조성을 통한 유기농 재배가 가능하도록 함.

SUMMARY

Interdependence of global markets for agricultural products is necessary to develop agricultural practices, simultaneously, can mitigate the negative side effects on the environment. On this account, insect pest control has relied mostly on chemical insecticides till the late 1940s. Chemical controls have not only improvement of agricultural productivity, but it can also lead to efficient cultivation. Thanks to the chemical controls, productivity of crops of worldwide has been improved. But, the side effects such as ground water and soil pollution, ecocide. To solve these problems, many advanced country instituted biological control agent. Biological control is a method of controlling pests using other living organisms and extraction of natural products. It relies on predation, parasitism or other mechanisms and there are many types. Recently, some commercial bioinsecticides have been developed and registered to control diamond back moth, beet armyworm, oriental tobacco budworm, greenhouse whitefly, root knot nematodes Entomopathogenic fungi have been recognized as important natural enemies of insect pests and can be used as effective biological control agents against agriculture pests. Entomopathogenic fungi are usually identified, based on the fungal growth observed on insect cadavers. But most research on entomopathogenic fungi have been aimed at developing them as biological control agents of insects, mites and ticks, despite great potential for use in conservation and classical biocontrol strategies. This is normally achieved through a strategy in which pest control relies on the action of the released agent but not on successive generations of the fungus. For the development of hyphomycete fungi as suitable biocontrol agents against greenhouse whitefly leads to the isolation of various insect pathogenic fungi. Among of them, one of the most studied entomopathogenic fungus is *Beauveria bassiana*.

This investigated to determine the optimal liquid culture conditions in shake flasks for maximal sporulation of *B. bassiana* M130 by used ricebran. The optimal initial pH for the sporepro duction of *B. bassiana* using extracted ricebran medium was 5.2 and temperature 28°C. The screening in shake flasks of carbon and nitrogen sources resulted in the identification of an optimal medium based on 0.5% (NH₄)₂SO₄, with extracted ricebran 8:1. Using this medium, a production level of 2.15×10⁹ conidial/ml, was obtained after 6days of culture inoculation at 28°C in a rotary shaking incubator operated at 130 rpm. And, the specific activity of extracellular enzyme of chitinase and protease were 4,296 umol and 375 umol, respectively. These results suggested that *B. bassiana* M130 could be biopesticide for the control of greenhouse whitefly.

Entomopathogenic fungi have been studied to develop for biological control agents as an alternative to chemical control agents in insect pest management. Greenhouse whitefly,

Bemisia tabaci is considered as one of the most destructive pests of crops. The purpose of this study was to develop strains of *B. bassiana* M130 spores, diatomaceous earth, 0.5% Gelatin, 25% Lolite 22 and DO-113 2.5%, a mixture of the powdered preparations for the purpose of environmentally friendly greenhouse whitefly and whitefly control. It was found to exhibit a 96.0±1.3% of control effect when treated in the greenhouse whitefly larvae through in field assay experiments utilizing this. In conclusion, *B. bassiana* M130 spore formulation as 'GaRuJaBi' which showed high mortality rate against greenhouse whitefly will be used effectively in the integrated pest management programs against the greenhouse whitefly.

And, to industrially use *B. bassiana* M130 as an entomopathogenic fungus, a spore collector for collecting dried spores effectively was developed. For the development of the spore collector, *B. bassiana* M130 was cultivated in a solid state by using grains, a ceramic bowl, a mesh colander, and a sponge medium, the solid-state cultivation was implemented. At the result, polished barley as a cereal medium showed the best growth, and it was selected as the cereal medium. After *beauveria bassiana* which was grown at the selected cereal medium was dried at room temperature under 2% in aridic water content, produced spores were collected.

For spore collection, the rolling cutter method, drum rotation friction cyclone method and vacuum suction method were investigated. From the result, based on mass and efficiency of spore collection, a spore collector of the drum rotation friction cyclone method was developed. After mass-cultivated fungi for polished barley were dried, by using the spore collector, at the result of collecting dry spores, only pure spores of 250g in good quality were recollected among 13 kg dry solid media weight. By using the collected spores, they were used for biological eco-friendly material development. In this study, to increase the performance of spore collection more, a modified drum cyclone method was developed finally based on the drum rotation friction cyclone method.

CONTENTS (영 문 목 차)

Chapter 1. Introduction and The goles of the proposed Research development	1
Chapter 2. Research development status	6
Chapter 3. Method and Results of Research Development	9
Chapter 4. Research goal attainment and contribution to related area	143
Chapter 5. Plane for application of research results	148
Chapter 6. The collected information about the related international technologies	149
Chapter 7. Research facilities and equipment	150
Chapter 8. References	151

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과 목표	1
제 2 장 국내외 기술개발 현황	6
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	9
제 4 장 목표달성도 및 성과활용 계획	143
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	148
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	149
제 7 장 연구시설·장비 현황	150
제 8 장 참고문헌	151

제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표

제 1 절 연구 목표

- (온실/담배)가루이 방제를 위한 국내토착균주를 이용한 친환경 미생물 살충제 상용화
- 고체배양에서의 포자대량생산 최적화(배지·배양 최적조건), 포자회수(화학·물리적)기 개발 및 제제화기술(발아율 증대) 확보
- 발아율, 병원성이 우수한 국내토착균주의 유전자원화 및 생물학적 방제시스템(시기, 횟수, 포자농도) 개발 확보
- 확보된 자원과 기술에 의한 미생물살충제제의 현장포장 검정을 통한 생물학적 방제가 증진 요인규명 및 상품화
- 현장에서의 살충력 효과 증진 및 유지를 위한 기술(포자착생증진물질)확보 (안정성, 물리성 개선)
- 살충력 효과 증진을 위한 다 생물학적 방법(천적-온실가루이좀벌)과의 복합처리 방제 시스템 (교차·혼용살포, 시기, 횟수) 확립 및 적용
- 안정성 평가를 통한 친환경목록고시 & 품질인증 및 천연식품보호제 상품화
- 우수 국내토착 유용균주를 이용한 상품화(미생물살충제)에 의한 수입대체 효과 및 국제경쟁력 강화 수단

제 2 절 연구개발의 필요성

- 친환경재배면적 2015년까지 12% 확대 & 화학비료·농약 매년 3% 이상 감축(친환경농업 5개년 계획 시행 중)
- 경북지역 (온실/담배)가루이 조사 결과(2008년), 전체하우스에서 80% 발견(온실-73%, 담배-27%)-경북도농업기술원
- 경북 주요 소득작물 참외(온실-7%, 담배-93%), 토마토(온실-80%, 담배-20%) 오이 등의 소득작목에 대한 피해 심각
- 생식용 과일·채소 화학농약으로만 방제하기 어려운 현실에 따른 안전성 문제 발생
- 온실가루이 약충과 번데기는 작물의 잎 뒷면에 존재하며 왁스를 내어 외부를 보호, 화학적으로 방제가 매우 어려운 해충, 정확한 발생예찰 및 발생밀도 추정기술이 매우 중요
- 화학적 방제 이외에도 트랩, 천적(온실가루이좀벌) 등을 이용한 방제기술 및 *V. lecanii* 등 생물 적 방제 활발히 진행
- 외국에서는 Botanigard, Mycotal, Vertalec 등의 제품이 개발되어 사용, 유럽이나 일본 등 친환경 농업인 많이 사용되며 국내에의 경우 전부 수입되어져 사용
- 국내 토착균주와의 비교 시 환경적 적응력이 떨어져 방제효과가 다소 떨어지므로 국내 토착 균주를 제품으로 개발, 활용하면 안정적이고 높은 방제 효과 및 수입대체 효과 기대

- 우수한 발아율, 병원성, 고온에 대한 내성 등 국내 환경에 적응 된 토착균주의 실용화 필요
- 미생물농약에 적합한 실험 방법에 따른 살충효능 검증, 향 후 우수한 국내 토착미생물 살충제로의 역할
- 국내 포자대량생산, 회수 및 제제화(상품화)기술 국외 기술 보다 낮으므로 최적화 기술 필요, 국내 폭넓은 연구실적에 비해 상품화 전무 (외국포자 생산량- 5×10^{18} cfu/ml, Emerald BioAgriculture Company, 미시간주)
- 연구기술개발을 통해 연구된 외국 회사제품(Botanigard) 균주보다 우수한 병원성 및 살충력이 입증된 국내 토착균주인 *Beauveria bassiana* 균주를 이용하여 (온실/담배)가루이에 대한 친환경적 미생물살충제제 개발이 필요
- 미생물살충제로서의 역할을 입증 할 수 있는 실험 방법에 의거하여 특정 해충에 대한 살충력을 검증함으로써 해당 균주 및 제제가 농업적으로 이용 가능함을 입증하며 단순한 환경조건의 실험실 안에서 수행한 생물검증만으로는 포장에서 유효한 방제효과를 단정 할 수 없으므로 포장조건에서의 방제 효과 검증 필요
- 2015년까지 유·무기농약 재배면적 증대 정책에 따른 친환경농자재 수요 급증 예상
- 국내에서 경쟁력이 있는 미생물 살충제 제품을 개발하지 못할 경우 선진국으로부터 수입할 수밖에 없으며, 이는 국내 미생물 살충제 개발 기업들의 퇴보를 가지고 올 뿐만 아니라 국내 미생물 살충제 산업이 선진국에 종속되는 결과를 초래하므로 국내에서 경쟁력이 높은 미생물 살충제를 개발하는 것이 시급히 요구되고 있음. 최근 미국, 일본 등으로 국내의 농산물의 수출 시 안전성이 확보되지 않아서 불이익을 당하는 경우가 빈번하게 발생되어 대한민국의 농산물이 신뢰성 확보를 하지 못하고 불이익을 당하는 경우가 발생하고 있음.
- 현재 국내의 경우에는 미생물 살충제, 천적 및 친환경 농자재를 포함한 국내 생물농약 시장은 약 700억 정도로 추정되고 있으며, 2020년에는 전체 농약 시장의 10% 규모인 2,000억 원 정도에 이를 것으로 추정된다. 새로운 미생물 살충제가 개발되면 농약 수입 대체 효과도 크리라 기대가됨.

제 3 절 경제적·산업적 중요성

- 토착 곤충병원성미생물 이용 미생물 제제 개발로 신규 생물농약산업 창출
- 선진국에서 개발한 다른 미생물살충제에 대한 수입대체 및 수출효과
- 관련 미생물특허, 제조특허 등 지적·산업재산권 확보로 선진국의 특허장벽 극복
- 국가보유 생물자원 활용 및 부가가치 증대로 국가경쟁력 향상
- 환경 친화적 방제를 통해 기존 방제방법에 따른 경제적 손실 경감
- 지구 온난화와 관련하여 한국에서 발생하지 않던 해충이 점차 발생하여 토착화되고, 월동형 해충의 생존율이 급격히 증가하는 등 국내에 없던 해충이 쉽게 도입, 확산, 정착되고, 예전에는 문제시되지 않던 병해가 문제시 될 수 있는 다양한 환경적 여건이 조성되고 있어, 외래 매개충과 함께 도입, 확산될 경우 막대한 경제적 손실이 야기될 수밖에 없는 처지에 놓이게 됨.
- 세계 작물보호제 산업의 규모는 360억불로 추정되고 있으며, 제초제 46%, 살충제 26%, 살균제 23%, 기타 5%를 차지하고 있어, 작물보호제 시장은 원제의 생산 기술 및 특허를 보유하고 있는 다국적기업(신젠타, 바이엘, 듀폰 등)이 주도하고 있으며, 특허기간이 만료된 copy원제는 인도나 중국과 같은 국가에서 생산하고 있는 실정임.
- 국내 작물보호제의 생산은 주로 수입 원제나 물질특허 기간이 지난 원제의 복제품(copy원제)을 이용하고 있는데, 이는 원제 개발의 투자효율이 현저히 낮고, 중국이나 인도에 비해 복제품(copy원제) 생산단가의 경쟁력이 낮기 때문임.
- 세계적으로 볼 때 생물농약의 시장은 도입단계를 지나 성장초기단계로서 전 세계적으로 친환경정책 및 안전산농산물에 대한 관심이 증가함에 따라 폭발적으로 시장이 신장하리라 기대됨.
- 화학농약의 사용 절감 정책과 안전농산물 생산에 대한 사회적 관심이 증대됨에 따라 환경 친화적인 제품에 대한 관심이 증가되어 친환경제제에 대한 연구·개발이 더욱 각광받고 있음.
- 최근 깨끗한 환경과 삶의 질 향상에 대한 요구가 높아짐에 따라 환경오염이나 인축독성이 거의 없는 친환경 제제에 대한 개발 요구가 매우 높아지고 있음.
- 인체에 무해한 친환경 곤충병원성곰팡이를 이용한 제품은 쾌적한 약제 살포 여건을 조성하고, 농업인의 농약중독을 없애 주어 건강한 농업환경을 조성할 수 있으며, 화학농약의 오남용으로 인한 생태계 파괴 및 교란을 억제하여 환경 보전형 지속가능농업의 실현을 가속화 할 수 있음.

제 4 절 연구성과 대비 목표 실적

1. 제 1 차년도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)
1차 년도 (2012.08.10 ~2013.08.09)	(온실/담배)가루이병 방제를 위한 곤충병원성 곰팡이를 활용한 미생물살충제의 산업화 (주관)	최적화된 조건에서의 대량포자 생산을 위한 고체배양 기술 확립	100
		제제화를 위한 제형화별 약효평가 및 보조제 탐색 및 조사	
	현장포장 방제력 검정 및 방제시스템개발 (협동1)	현장 포장 방제력 검정	100
	포자 회수기 개발 (협동2)	포자 회수기 개발	100

2. 제 2 차년도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)
2차 년도 (2013.08.10 ~2014.08.09)	(온실/담배)가루이병 방제를 위한 곤충병원성 곰팡이를 활용한 미생물살충제의 산업화 (주관)	안정제·보조 물질 탐색 및 조사	100
		대량포자를 이용한 제제 및 제형화 기술	100
		친환경목록고시& 품질인증 및 천연식물보호제를 위한 안전성 평가	100
	현장포장 방제력 검정 및 방제시스템개발 (협동1)	타 생물학적 방제시스템 조사 및 방제효율 현장포장 방제력 검정	100
	포자 회수기 개발 (협동2)	포자 회수기 개발	100

3. 제 3 차년도

구분 연도	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)
3차 년도 (2014.08.10 ~2015.08.09)	제형화된 제제의 살충력 검정 및 현장포장 시험 (주관&협동1)	○온실/담배 가루이 증식 ○실내생물검정 ○현장포장 검정 ○이병충에 대한 포자발아율 조사 ○작물의 생육조사	100
	산업화에 따른 경제성 검토 (주관&협동 2)	○우수균주의 선발에 따른 검증 ○개발시 예상 생산비에 따른 경제성 분석	100
	포자회수기 개발완성 (협동 2)	○포자회수기 개발 (롤링커터사이클론 방식과 드럼회 전마찰사이클론 방식 중 회수율이 우수한 방식으로 개발)	100
	상품화 타당성 조사 (홍보 및 교육) (주관&협동 1, 2)	○박람회(전시회), 매스컴 활용 광고 등 ○각 인근 농업기술센터와 연계된 친환경 자재교육 및 제품 효능 설명	100

제 2 장 국내외 기술개발 현황

- 친환경재배면적 2015년까지 12% 확대 & 화학비료·농약 매년 3% 이상 감축(친환경농업 5개년 계획 시행 중), 경북지역 (온실/담배)가루이 조사 결과(2008년), 전체하우스에서 80% 발견(온실-73%, 담배-27%)-경북도농업기술원, 경북 주요 소득작물 참외(온실-7%, 담배-93%), 토마토(온실-80%, 담배-20%) 오이 등의 소득작목에 대한 피해 심각함.
- 생식용 과일·채소 화학농약으로만 방제하기 어려운 현실에 따른 안전성 문제 발생
- 온실가루이 약충과 번데기는 작물의 잎 뒷면에 존재하며 왁스를 내어 외부를 보호, 화학적으로 방제가 매우 어려운 해충, 정확한 발생예찰 및 발생밀도 추정기술이 매우 중요
- 화학적 방제 이외에도 트랩, 천적(온실가루이좀벌) 등을 이용한 방제기술 및 *V. lecanii* 등 생물적 방제 활발히 진행
- 외국에서는 Botanigard, Mycotal, Vertalec 등의 제품이 개발되어 사용, 유럽이나 일본 등 친환경 농업인 많이 사용되며 국내에의 경우 전부 수입되어져 사용
- 국내 토착균주와의 비교 시 환경적 적응력이 떨어져 방제효과가 다소 떨어지므로 국내 토착 균주를 제품으로 개발, 활용하면 안정적이고 높은 방제 효과 및 수입대체 효과 기대
- 우수한 발아율, 병원성, 고온에 대한 내성 등 국내 환경에 적응된 토착균주의 실용화 필요
- 미생물농약에 적합한 실험 방법에 따른 살충효능 검증, 향 후 우수한 국내 토착미생물살충제로의 역할
- 국내 포자대량생산, 회수 및 제제화(상품화)기술 국외 기술 보다 낮으므로 최적화 기술 필요, 국내 폭넓은 연구실적에 비해 상품화 진무(외국포자 생산량- 5×10^{18} cfu/ml, Emerald BioAgriculture Company, 미시간주)
- 연구기술개발을 통해 연구된 외국 회사제품(Botanigard) 균주보다 우수한 병원성 및 살충력이 입증된 국내 토착균주인 *B. bassiana* 균주를 이용하여 (온실/담배)가루이에 대한 친환경적 미생물살충제 개발이 필요
- 미생물살충제로서의 역할을 입증 할 수 있는 실험 방법에 의거하여 특정 해충에 대한 살충력을 검정함으로써 해당 균주 및 제제가 농업적으로 이용 가능함을 입증하며 단순한 환경조건의 실험실 안에서 수행한 생물검증만으로는 포장에서 유효한 방제효과를 단정할 수 없으므로 포장조건에서의 방제 효과 검증 필요
- 2015년까지 유·무기농약 재배면적 증대 정책에 따른 친환경농자재 수요 급증 예상
- 국내의 신물질 원재 탐색 및 개발에 대한 기술수준은 높은 편이나 원재 개발에 최소 10년 이상의 시간, 1,000억 원 이상의 개발비가 소요되어 당해 업체에서 미온적으로 운영하고 있으며, 더 이상의 R&D 투자 확대를 기대하기 어려운 실정임.
- 실제로국 내에서 원재를 개발하고도 막대한 등록비용으로 인해 원재를 다국적 기업에 넘겨 제품으로 개발된 사례가 있음.

제 1 절 국외 기술현황

- 현재 시판중인 곤충병원성 곰팡이를 이용한 미생물농약은 전 세계 11개 회사에서 9종 18균주를 이용한 18제품
- 미국 : 농무성(USDA-ARS)의 균주보존센터, 현재 850종의 균주로부터 약 5,000균주의 곤충병원성 곰팡이 수집·보존
- 유럽 : 캐나다, 영국, 스위스, 네덜란드, 연합 LUBILOSA 조직, 메뚜기 방제를 위한 'Green Muscle' 개발
- 영국 : BBSRC 산하 IACR-Rothamsted Entomology & Namatology Dept, 진딧물 방제 성공
- 네덜란드 : IPO-DLO Research Institute for Plant Protection, 진딧물 방제 성공
- 호주 : 농림부 산하 연구소, 녹강균(*Metarhizium*)의 대량생산 및 연구 수행 중
- 중국 : 중국농업과학원 산하 생물방치연구소, 굽벥기 방제를 위한 백강균 (*Beauveria brongniartii*) 포자를 연 2만톤 생산
- 일본 : 백강균(*Beauveria bassiana*)를 이용한 배추 좀나방 방제 연구

균 주	제 품 명	제 조 회사	등 록 국 가
<i>Beauveria bassiana</i>	Ago biocontrol Bassiana 50	Ago Biocontrol	콜롬비아
<i>Beauveria bassiana</i>	Mycotrol, Botari Gard, Corngard	Mycotech Corporation	미국, 멕시코 등
<i>Beauveria bassiana</i>	Ostrinil	Natural Plant Protection	프랑스
<i>Beauveria brongniartii</i>	Ago biocontrol Beauveria 50	Ago Biocontrol	콜롬비아
<i>Beauveria brongniartii</i>	Engerlingspilz	Andematt Biocontrol	스위스
<i>Beauveria and Metarhizium spp</i>	Beauveria Schweizer, Metarhizium Schweizer	Eric Schweizer Seeds	스위스
<i>Chondrostereum purpureum</i>	Biochon	Koppert	전세계
<i>Lagenidium giganteum</i>	Laginex	AgraQuest	미국
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Ago biocontrol Metarhizium 50	Ago Biocontrol	콜롬비아
<i>Metarhizium anisopliae isolate F-100</i>	Biogreen Granule	Bio-Care Technology	오스트리아
<i>Metarhizium anisopliae</i>	BIO 1020	Bayer AG	독일
<i>Metarhizium anisopliae var. acridum isolate IMI 330189</i>	Green Muscle	Biological Control Products SAPTY	남아프리카
<i>Nomuraea rileyi</i>	Ago biocontrol Nomuraea 50	Ago Biocontrol	콜롬비아
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	Ago biocontrol Paecilomyces 50	Ago Biocontrol	콜롬비아
<i>Paecilomyces fumosoroseus Apopka 97</i>	PF9-97 biological insecticide	Themo Trilogy Corporation	유럽연합(미국)
<i>Verticillium lecanii</i>	Ago biocontrol Verticillium 50	Ago Biocontrol	콜롬비아
<i>Verticillium lecanii</i>	Mycotal	Koppert	네덜란드 등 유럽 7개국
<i>Verticillium lecanii</i>	Vertalec	Koppert	영국, 스위스, 노르웨이, 덴마크, 핀란드
9종 18균주	18제품	11개사	

- 미생물 살충제의 경우에는 대기업보다는 주로 벤처기업이나 중소기업들이 주도적으로 시장을 선도하고 있으며, 이들 중에서 연간 500억 원 이상 매출의 비교적 큰 규모의 회사로는 Valent BioSciences사, Certis USA사, Koppert사 등이 있으며, 작지만 성공적인 회사로 평가받고 있는 회사로는 AgraQuest사, BioWorks사 및 E-nema사 등이 있다.

그리고 혁신적인 기술로서 이제 막 시작하는 회사로는 Pasteuria BioSciences사, Exosect사 등이 있음. 2002년 현재 미국 EPA에는 76개의 미생물농약과 113개의 생화학농약(Biochemical pesticides)이 등록되어 있으며, 유럽의 경우에는 미국과 그 정의가 조금 다르지만 BCPC(British Crop Protection Council)에서 출판한 "The Manual of Biocontrol Agents, 3rd edition"에 따르면 미생물농약이 112개가 등록되어 시판되고 있으며, 천연물농약은 58개가 등록되어 있고, Semiochemicals, 즉 반합성화학물 농약이 56개가 등록되어 있음.

- 유럽에 등록되어 있는 미생물 종류로는 Bacteria가 *Bacillus thuringiensis* (Bt) subsp. *kurstaki*, *B. sphaericus*, Bt subsp. *aizawai*, Bt subsp. *tenebrionis* 등이고, Fungi가 *Beauveria bassiana*, *B. brongniartii*, *Paecilomyces fumosoroseus*, *M. etarhizium flavoviride*, *Verticillium lecanii* 등이 있음.

제 2 절 국내 기술현황

- 농업적으로 유용한 곤충, 미생물, 및 병원성 천적 등을 이용하여 해충을 효과적으로 방제하는 연구 활발함.
- 주로 시설재배지 내에서 문제해충인 응애류, 진딧물류, 가루이류, 총채벌레류 등의 방제에 토착 및 외래 천적이 활용 부분적으로 효과 입증, 아직까지 해당 분야의 산업적 기반이 취약
- 농업과학기술원, 대학 : 배추 좀나방, 온실가루이 등 농업해충 방제용 곰팡이 살충제 개발을 목표로 연구 활발
- 임업연구원, 한국생명공학연구원 : 솔잎혹파리 등 임업 해충에 백강균을 이용한 방제 시도

개발분야	국외	국내
균주 수집 및 동정	약 5,000균주	약 1,000균주
균주 개발	성공	초보
대량 생산	성공	전무
세계	성공	전무
이용 기술	성공	전무

출처 : 한국과학기술정보연구원

- 한국화학연구원과 생명공학연구원의 정부출연연구소, 경상대학교, 충남대학교, 충북대학교, 서울대학교 등의 대학교, 그리고 (주)경농, (주)동부한농화학, (주)그린바이오텍, (주)비아이지 등의 기업체에서 연구를 진행해왔다. 이 밖에도 현재 국내에서는 생물농약으로 개발되지 않았지만 살충, 살균 효과가 있다고 알려져 있는 미생물제제 및 생화학제제가 제품화되어 유통되고 있으며, 이들 제품들은 약 500 - 1000여개, 생산업체만 해도 퇴비를 포함 100개가 넘는 것으로 추정되고 있으며, 현재 지속적으로 증가하는 추세에 있음.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 1세부과제 : (온실/담배)가루이병 방제를 위한 곤충병원성 곰팡이를 활용한 미생물살충제의 산업화

1. 재료 및 방법

가. 균주 선발 및 동정

- 곤충병원성 곰팡이인 *B. bassiana*는 불완전균류(Hyphomycetes)에 속하며 기주곤충만 치사시켜 자연계에서 곤충의 밀도를 조절하는 역할을 한다. 또한 사람과 동물, 식물에는 무해하지만 곤충에 대해 높은 병원성을 가진다(Lacey *et al.*, 2001).
- 또한 곤충유래 진균인 백강균 *B. bassiana*는 동충하초로 이용을 하며, 활성 및 기생성이 매우 높아 한방재료 및 고기능식품 등 인체 대상 활성 물질을 활용하는 천연 자원으로 인체에 무해하며, 안전한 것으로 보고되고 있다
- 곤충병원성 곰팡이는 대상곤충에 대한 고도의 병원성으로 인해 살충범위가 제한되어 있지만, 기주의 저항성 기작이 잘 발현되지 않아 난방제 해충의 생물적 방제를 위한 생물인자로 적합한 것으로 보고되었다(Lacey *et al.*, 2011).
- 곤충의 섭식에 의해서 병원성이 발현되는 곤충병원성 바이러스와 세균과 달리 곤충병원성 곰팡이류는 곤충과의 접촉을 통해 물리적으로 표피를 침투하며 기주의 면역 작용 억제와 독성물질 분비를 통하여 곤충을 치사시킨다(Charnley, 1997).
- 또한 감염된 곤충병원성 곰팡이는 기주의 혈강 내에 존재하는 영양분을 이용하며 대량으로 증식함으로써 기주의 영양분을 고갈시켜 사망에 이르게 한다. 치사된 기주 곤충에서 형성된 포자는 이 후 다른 건전한 개체를 추가로 감염시킬 수 있는 병원성의 전파력을 가지고 있다(Hajek and Leger, 1994).
- 살충미생물 선발을 위하여 이병충 채집법을 통하여 *B. bassiana* 곰팡이에 감염된 개체에서 병원균을 분리하였으며 농촌진흥청, 농업기술원에서 균주를 분양을 받아 시험에 사용하였다.



그림 1. *B. bassiana* 감염된 온실가루이와 사마귀.

- 분리균주는 *B. bassiana*에 감염된 시료로부터 균주 분리를 위해 감염된 병원체를 NaCl 0.85%용액에 현탁하여, 현탁액을 다단희석법을 통해 PDA배지에 100 ul를 도발한 후 28℃에서 배양하면서 살충성 곰팡이를 분리 하였다. 또한 농촌진흥청, 농업기술원에서 균주를 분양은 *B. bassiana* 균주를 활성화하기 위해 PDA에 계대하여 사용하였다.
- 분리한 곰팡는 동정을 위해 18sRNA sequence를 이용하여 분자 유전학적특성을 조사하여 분계통도를 확인하여 동정하였다. Primer ITS1 (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G)과 ITS4 (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC)를 이용하여 PCR 조건 95℃에서 30초, 55℃에서 30초, 72℃에서 45초의 조건으로 35 cycle을 진행하여 1% agarose gel에서 증폭된 밴드를 확인한 후 Gel SV Kit (GeneAll, Seoul, Korea)를 이용하여 순수정제 하여 솔젠트(주)에서 염기서열을 분석하였다. 분석된 염기서열은 GenBank (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)의 Blast N 검색 프로그램을 이용하여 유사성이 있는 염기서열과 비교분석 하였으며, Clustal W 프로그램 (www.clustalw.genome.ad.jp)을 이용하여 염기서열 사이의 상동성이 결정되었다. 이후MEGA 6 프로그램 내의 Neighbor-Joining 방법을 사용하여 계통분석 및 계통도를 구축하였다(Tamura *et al.*, 2013).
- 최종 선발된 균주의 형태학적인 특징을 조사하기 위하여 6 일간 PDA 배지에 배양하여 곤충병원성 곰팡이 M130을 광학현미경(Olympus CX21, Japan)과 주사전자현미경(Scanning Electron Microscope, Model: Hitachi S-2500, Japan)을 이용하여 균체의 격벽 유무 및 포자의 모양, 크기 등 형태학적 특징을 조사하였다.
- 균체량을 측정하기 위하여 PDB(Potato dextrose broth) 배지 49ml에 각각의 균주 포자현탁액 1ml(1.0×10^6 conidium/ml)을 접종하여 8일 동안 28℃에서 130rpm으로 진탕배양 하였으며, 접종한 후 48시간 단위로 균주를 회수하여 균체량을 측정하였다. 균체량 측정은 배양액 50ml을 GF/C(Whatman 47mΦ)여과 필터기를 이용하여 상등액을 제거한후 잔여배지 성분을 세척한 다음 80℃에서 24시간 동안 건조시킨 후, 그 무게를 측정하였다.
- 키티나아제 효소활성 측정(Chitinase assay)은 1%의 Colloidal chitin을 첨가한 PDB 배지에 각 균주의 포자현탁액 1ml(1.0×10^6 conidium/ml)을 접종하여 8일 동안 28℃에서 130rpm으로 진탕배양 하였으며, 접종한 후 48시간 단위로 배양액을 회수하여 DNS 방법에 의해 키티나아제 효소활성을 측정하였다.
- 프로테아제 효소활성 측정(Protease assay) 1%의 Skim milk를 첨가한 PDB 배지에 각 균주의 포자현탁액 1ml(1.0×10^6 conidium/ml)을 접종하여 8일 동안 28℃에서 130rpm으로 진탕배양 하였다. 접종한 후 48시간 단위로 배양액을 회수하여 Anson, M.L 등의 측정법을 modified하여 프로테아제효소활성을 측정하였다.

나. 포자대량생산을 위한 분리균주의 최적화 및 고체배양기술 개발

- 분리균주 *B. bassiana* M130의 포자 대량배양방법을 위해 먼저 배지의 최적화를 위해 농업부산물인 미강을 이용하여 액체배양을 최적화 하고자 하였다. 곰팡이의 포자 생산방법으로 고체 배양에 관하여 많이 연구되었으며, 고체배양을 행하는 경우 쌀, 보리, 옥수수 등의 곡물류나, 밀기울 등의 곡물에서 유래하는 고체성분 등으로 사용하고 있다. 또한, 농업부산물을 이용하여 미생물을 배양할 경우 미생물배양에 있어 경제적이며 효과적일 것이다. 이러한 농업용 부산물 중 미강(rice bran)은 현미에서 정백미로 도정하는 과정에서 생기는 과피, 종피, 호분층 등의 분쇄혼합물을 말하며 영양소 및 유효성분 등에 대한 효능이 규명되고 다양한 산업적 이용가치가 매우 높아지고 있는 실정이다. 미강은 경북 안동 인근 임의의 지역에 위치한 정미소(안동복주, 안동 임하, 예천 호명)에서 미강을 구입하여 미강과 증류수를 혼합하여 5분 동안 고온(121℃)과 고압(1.5 기압)을 가하여 미강추출물을 제조하여 사용하였다. 제조된 미강추출물을 기본배지(Extracted Rice Bran Medium, ERBM)로 하여 최종 선발된 M130 포자현탁액을 접종한 후, 28℃, 130 rpm에서 8 일간 배양하여 시간경과에 따른 포자농도를 확인하였다.
- *B. bassiana* M130의 균체성장 및 대량포자 유도에 영향을 미치는 탄소원에 대한 영향을 조사하기 위하여 ERBM에 glucose와 5 종 (sucrose, starch, chitin, mannose)의 탄소원을 각각 0.5%를 첨가한 후 M130 포자현탁액을 접종하여 8 일 동안 130 rpm에서 진탕 배양한 후 포자농도와 균체량(DCW)을 측정하여 비교하였다.
- *B. bassiana* M130의 배지 최적화를 위해 유기질소원과 무기질소원은 대량배양 시 배지의 경제적 효율성을 기준으로 선발하기 위해 본 연구에서는 유기질소원으로는 Corn Steep Liquor (CSL)와 무기질소원으로는 (NH₄)₂SO₄을 이용하여 각각 0.1%, 0.5%와 1% 각 농도별로 첨가하여 대량포자 생산에 미치는 영향을 조사하였다.
- pH에 따른 포자생산량을 조사하기 위하여 미강추출물 배지(pH5.85)에 0.5% (NH₄)₂SO₄를 첨가한 후 pH를 3, 5, 7, 9로 조정하여 M130을 배양하여 pH에 따른 최적화를 조사하였다
- 고체배양을 위해 고체배지에서의 분생포자를 대량생산하기 위한 고체 배지로는 쌀을 이용하였으며, 고온에 견딜 수 있는 비닐봉지에 5시간 이상 침지한 4종(쌀, 보리, 미강, 찌라기)곡물배지 1 kg과 물 600 ml을 넣은 후, 고압멸균기에 넣어 121℃(1.5기압)에서 15분간 멸균하여 실험에 사용하였다.
- 선정된 고체배지 배양조건의 최적화를 위해 미강추출액을 각각 미강: DW(W/V) 비율 1:4, 8:1와 16:1혼합한 미강추출물을 만들어 M130 포자현탁액을 접종한 후 8 일 동안 130 rpm에서 진탕배양하여 chitinase 활성과 protease 활성 및 포자농도를 측정하여 최적비율의 배지를 설정하였다.
- 최적 생육온도의 설정을 위해 온도에 따른 조사를 20, 26, 28와 30℃에서 포자의 생

성을 조사하였다.

- 곤충병원성곰팡이 M130 접종 무균 작업대에 자외선을 조사한 상태로 멸균된 고체 배지를 식힌 후, 72시간동안 배양한 M130 포자 접종액을 40 ml을 접종하였으며, 배양액이 고르게 접종 되도록 잘 흔들어 준 다음 고체배양 챔버에 넣어 배양하였다. 접종 7일 후 균사 생육상태가 균일해 질 때, 고체배지를 비벼주면 입자와 입자 간격이 넓어져 보다 더 많은 분생포자를 유도 하였고 수분이 많은 상태로 배양하게 되면 세균에 의한 오염이 발생하기 쉬우므로 공기 중 습도를 70~80%로 유지하였다. 접종 후 15일 이후 포자가 발생되지만 더 많은 포자를 생성하기 위하여 20일 이상 배양하였다.
- 선발배지의 최적 생육 수분함량 선정을 위해 배지 내 수분함량 30%, 40%와 50%로 설정하여 배양시기에 따라 포자의 생산량을 조사하였다.
- *B. bassiana* M130의 포자 대량 생산을 위한 최적 생육 배지 조건은 탄소원, 유기질소원 무기염류에 따른 조사를 따라 대량 포자 생산을 위한 고체배지의 생육조건을 조사하였다.
- 포자의 열안정성조사는 고체배지를 이용하여 배양된 *B. bassiana* M130을 상온, 40℃, 50℃와 60℃에서 각각 건조를 시키며 시간에 따른 생존 포자를 조사하여 열안정성을 조사하였다.
- 분생포자의 안전성 조사는 *B. bassiana* M130 포자현탁액 3.4×10⁷conidium/ml을 페트리디쉬에 40ml을 넣고 자외선(UV-B, 280~320nm)조사 후 24시간 경시적 변화 조사하여 포자의 생성 유무를 파악하였다.
- 고온에서의 안정성 조사는 *B. bassiana* M130 포자현탁액(1.1×10⁷conidium/ml) 500μl을 E-Tube에 넣고 20, 30, 40와 50℃에서 Water-bath에 10, 30, 60분 처리 후 PDA에 도말하여 배양을 통해 포자의 발아능으로 안전성을 조사하였다.
- 저온에서의 안정성 조사는 *B. bassiana* M130 포자현탁액(1.1×10⁷conidium/ml) 500μl을 E-Tube에 넣고 -20와 4℃에 10, 30, 60분 처리 후 PDA에 도말하여 배양을 통해 포자의 발아능으로 안전성을 조사하였다.
- 고체배지 배양방법의 차별화 및 다양화를 위해 문제점을 파악하고 해결방안을 모색하여 포자 분리 및 회수 공정에 따라 고체배지 배양방법에 대해 조사 하였다.
- 회수된 포자의 발아율 측정하였다. 접종된 포자를 28℃ 항온기에 넣어 포자를 발아시켜 48시간 후 현미경으로 발아포자를 측정하였다. *B. bassiana* M130 포자는 원형으로 발아관이 포자 두께 이상으로 자라 나왔거나 포자의 정상모양인 원형에서 변형된 것만을 발아한 것으로 간주하였다.

다. 살충력 증대를 위한 생물학적 안정성·보조물질 탐색 조사

- 포자 발아율을 습윤제(보습제), 증량제 및 자외선 차단제에 대한 농도별 첨가를 통해 보조물질을 탐색 조사하였다.

라. 제제화를 위한 보조제 탐색 및 제형화 기술 조사

- 제제화를 하는데 있어 가장 중요한 문제는 균사체 또는 포자를 대량으로 생산하기 위해 고농도 배양과 배양조건에 적합한 영양분의 선택 및 대량생산으로 생산된 포자들이 실제 포장에서 작용할 수 있도록 상품화하기 위한 물리적, 화학적인 안정제, 효율적 증진제의 연구를 통해 최적의 제제화 기술이 필요하다.
- 제제화를 위해 보조제 탐색을 분산제, 습윤제(보습제), 증량제 및 자외선 차단제에 대한 농도별 첨가를 통해 제형화에 따라 포자의 안전성인 발아능 및 포자의 밀도, 분산정도와 wetting력 등을 조사하였다.
- 제제화된 제품의 안전성 조사를 위해 저장성을 시간에 따라 조사하여 포자의 밀도를 확인하여 시제품의 안전성을 조사하였다.

2. 연구결과

가. 균주 선발 및 동정

1) 분리 균주의 특성

살충미생물 선발을 위하여 이병충 채집법을 통하여 *B. bassiana* 곰팡이에 감염된 개체에서 병원균을 분리하여 M130으로 명명하였으며, 농촌진흥청, 농업기술원에서 분양받은 균를 PDA에 도말하여 균주를 그림 2과 같이 선발 및 분리하였다.

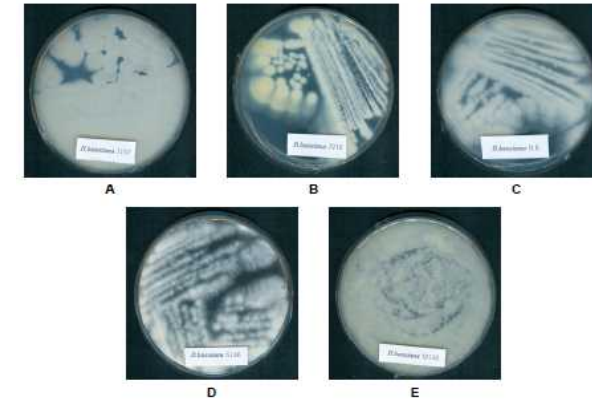


그림 2. *B. bassiana* 곰팡이의 PDA배지에서 형태학적 특성. (A: *B. bassiana* J157, B: *B. bassiana* J216, C: *B. bassiana* BK, D: *B. bassiana* S186, E: *B. bassiana* M130)

2) 분리균주의 효소활성 측정

일반적으로 살충력은 곤충의 외피를 구성하고 있는 키틴 또는 단백질을 분해하여 살충을 할 수가 있다. 따라서 키틴나아제와 프로테아제의 활성을 조사하여 활성이 가장 우수한 균주를 선택하고자 하였다. 그 결과 시간경과에 따른 키틴나아제 효소활성 결과, J157과 M130 두 균주만이 효소활성을 보였다. 그러나 그림 3에서와 같이, 두 균주 모두 접종 후 48시간까지는 거의 활성이 나타나지 않았으나, 48시간 경과 후 두 균주의 활성이 조금씩 나타났다. 하지만 J157은 96시간째 최대 효소 활성을 보이다가 점차 감소하는 것으로 조사되었다. M130은 144시간에 2524umol 최대 활성을 보였다.

프로테아제의 경우 모든 균주가 48시간까지 높은 프로테아제 효소활성을 보였으나 그 이후 점차 감소되는 것으로 나타났다. 균주 M130의 프로테아제 농도는 311u mol로 나타났으며, J157균주는 48시간 후 계속적으로 프로테아제 활성이 감소되었으나, M130의 경우 96시간 이후 프로테아제 활성이 다시 높아지는 경향을 보였다. 키틴나아제와 프로테아제활성의 144시간에 최대를 보이는 것은 포자의 생산량과 비교하였을 때 144시간에 최대의 포자 생산량을 보이는 결과와 상관관계가 있는 것으로 사료된다.

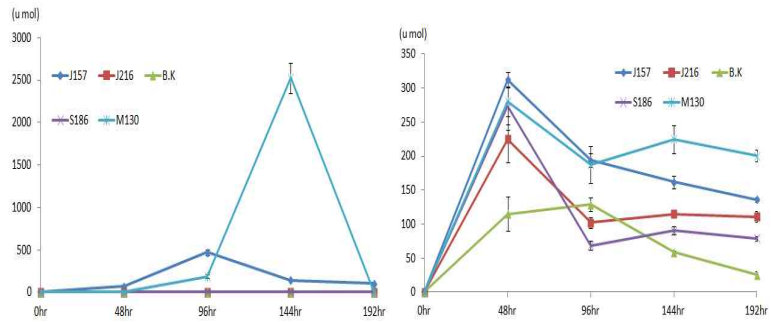


그림 3. 분리균주의 시간 변화에 따른 키티나아제(left)와 프로테아제(right)효소활성.

3) M130의 최종 선발

M130은 J157에 비하여 48시간동안 키티나아제와 프로티아제 효소활성에서는 조금 떨어지나, 96시간 이후 키티나아제와 프로테아제 효소활성이 높아지며, 균체량 생성이 높은 M130을 최종 선발하였다.

선발된 M130의 형태학적 특성은 그림 4에서와 같이 포자를 형성하고 백색으로 전형적인 *B. bassiana*의 형태를 보이는 것으로 조사되었다.

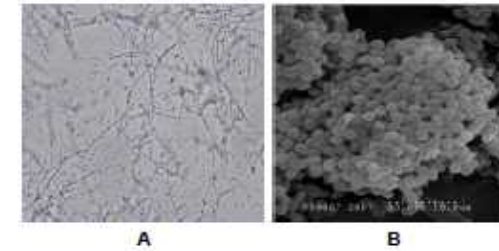


그림 4. *B. bassiana* M130의 형태학적 특성 (A: 광학현미경 x200, B: SEM x2000).

최종선발된 M130의 보다 더 정확한 분류속(genus) 내 종(species)을 결정하기 위해서 높은 신뢰도를 보이는 18 rRNA 유전자 염기서열분석 방법을 이용하여 분류·동정 하였다. 따라서 M130 균주의 정확한 분류 동정을 위하여 18s rRNA 유전자의 보존 부위에 해당하는 Primer를 제작하여 PCR(Polymerase Chain Reaction) 수행한 결과 571bp의 DNA 증합 절편을 얻었으며 M130의 18s rRNA 유전자 염기서열을 결정하였다(그림. 5) 분석된 유전자 염기서열은 NCBI(National Center for Biotechnology Information)에서 제공하는 BLAST program을 이용하여 유전자 상동성 검색을 수행하였다. 그 결과 M130은 *Beauveria bassiana*로 판명되었으며 또한 염기 상동성 검사결과를 바탕으로 계통유연성 분석(Phylogenetic Tree Analysis) 프로그램인 MEGA를 이용하여 계통 발생학적 유연관계를 작성하였다(그림 6).

TTCTGTGAACCTACCTATCGTTGCTTCGGCGGACTCGCCCCAGCC
 CGGACGCGGACTGGACCAGCGGCCCGGGGACCTCAAACCTTT
 GTATTCCAGCATCTTCTGAATACGCCGAAGGCAAAACAAATGA
 ATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGA
 AGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATCC
 AGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCAT
 TCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCGACCT
 CCCCTTGGGGAGGTTCGGCGTTGGGGACCGGCAGCACACCGCCGGC
 CCTGAAATGGAGTGGCGGCCCGTCCGCGGCGACCTCTGCGTAGT
 AATACAGCTCGCACCGGAACCCCGACGCGGCCACGCCGTAAC
 ACCCAACTTCTGAACGTTGACCTCGAATCAGGTAGGCTACCCGC
 TGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA

그림 5. 분리균주 M130의 18S rRNA 유전자 염기서열(517bp).

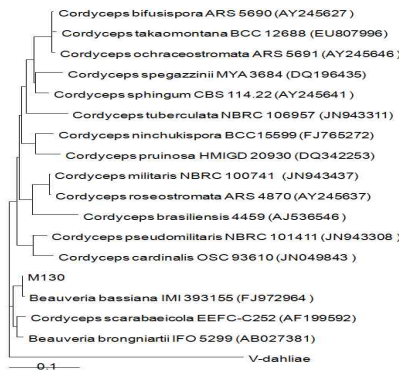


그림 6. *B. bassiana* M130의 계통분류도. (Numbers at nodes indicate levels of bootstrap support (%) based 1000 resembled data sets; only values above 70% are given. Bar, 0.1 substitutions per nucleotide position.)

나. 포자대량생산을 위한 분리균주의 최적화 및 고체배양기술 개발

1) 액체배양 시 최적 온도 설정

액체배양 시 최적 온도의 설정을 위한 실험 결과 그림 7과 같이 *B. bassiana* M130은 28°C에서 가장 우수한 균체의 성장을 보였다. 일반적으로 곤충병원성곰팡이들은 20~25°C에서 우수한 균체량을 보인다고 보고되어 있다. 하지만 곰팡이는 종 또는 균주에 따라 그 범주가 다양하다고 알려져 있다. *B. bassiana*에 관한 여러 논문들의 연구결과에서, *B. bassiana*의 최적배양 온도는 27±1°C로 설정하고 있다. 이러한 결과는 본 연구 결과와도 일치하여 M130의 최적배양 온도는 최종적으로 28°C로 설정하였다.

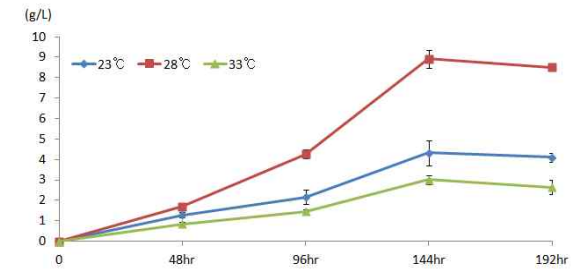


그림 7. *B. bassiana* M130의 온도에 따른 배양학적 특성.

2) 고체배지 선발

고체배지 선발을 위해 4종(쌀, 보리, 미강, 쌀래기)의 곡물배지를 이용하여 포자의 생산량을 조사한 결과 미강 처리구 3.5×10^8 conidium/ml 이상 가장 많은 포자를 생산하는 것으로 조사되었다(그림 8).

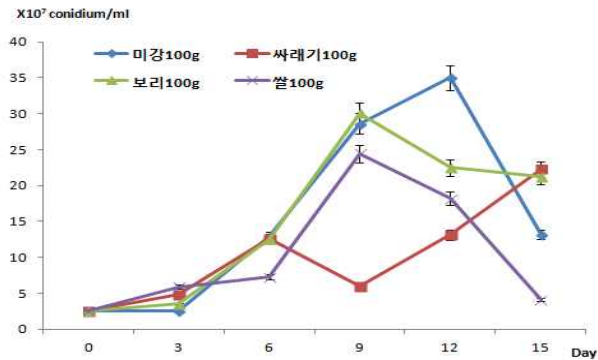
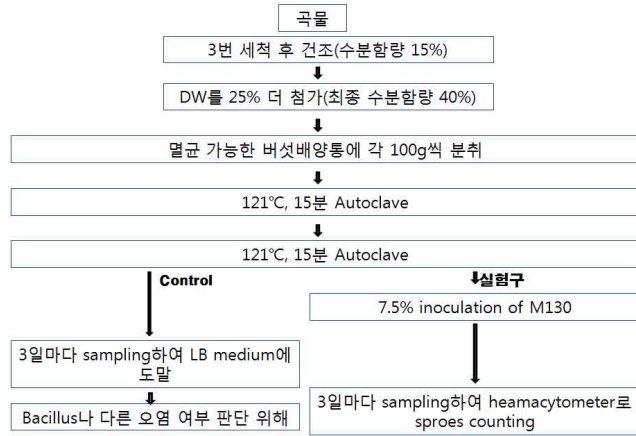


그림 8. 고체배지 선발을 위한 4종 곡물을 이용한 *B. bassiana* M130의 포자 생산량.

3) 미강추출물을 이용한 배지에서의 M130의 최적화

선행되어진 여러 연구결과에서, 이미 미강은 미생물의 대량배양에 적합하다고 알려져 있다. 미강뿐만 아니라 여러 농작물의 부산물 또한 다양한 미생물을 배양하는 배지로 이용되고 있다. *Arthrotrrys dactyloides*, *Streptomyces actuosus*, *Lactobacillus brevis* 등에 관한 연구결과에서, 미강같은 농업부산물을 이용한 배지에서 우수한 성장을 보인다고 알려져 있다. 본 연구에서는 그림 9에서와 같이 미강추출물을 이용하여 배지를 조성하였으며, 미강추출물 배지에서 모두 PDB 보다 더 높은 포자농도 6.1×10^8 conidium/ml를 보였다. 이러한 결과로 미강추출물 배지 역시 곤충병원성곰팡이 *B. bassiana* M130의 대량 배양배지로서 이용이 용이함을 알 수 있었다. 또한 임하정미소에서 회수한 미강을 이용한 미강추출물배지(ERBM)에서 가장 높은 포자농도를 보였다. 이러한 결과는 지역에 따르는 정미방법의 차이 또는 벼의 종류에 따르는 것으로 사료되며, 향후 미강의 종류에 따른 포자농도에 대한 연구를 진행하여야 할 것으로 생각된다.

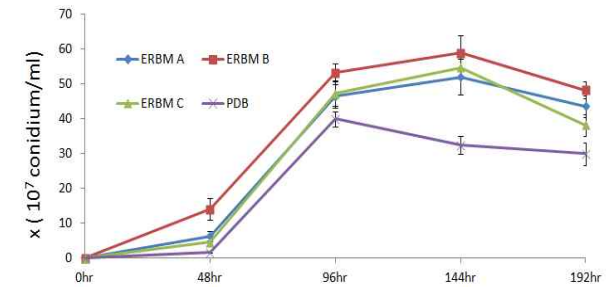


그림 9. 미강종류에 따른 *B. bassiana* M130 포자 생산량.

ERBM A : Bokju Andong, ERBM B : Imha Andong, C : Homyeong Yecheon

4) 미강추출물의 최적 비율

그림 10에서와 같이 모든 비율의 미강추출물배지(ERBM)은 PDB 배지보다 높은 포자농도를 가졌으며, 4:1(w/v)과 8:1(w/v)의 미강추출물배지(ERBM)에서 키티나아제의 효소활성이 PDB보다 우수하였으나 프로테아제 효소활성에서는 8:1(w/v)의 미강추출물배지(ERBM)만이 PDB보다 우수하였다. 키티나아제와 프로테아제 효소는 병원균의 숙주 곤충 침입에 있어서 큰 역할을 한다고 알려져 있다. 그림 11에서와 같이 PDB배지에서 곤충병원성곰팡이 M130을 배양했을 때, 키티나아제 효소는 96시간부터 활성을 나타내고 있으나 미강추출물배지에서 키티나아제 효소는 48시간에 4296umol로 가장 높은 효소활성을 보이며, PDB배지 비교시 몇 배 이상의 효소활성을 보이고 있다. 이는 병원균의 침입 기간을 단축시키며 침입에 있어서 더욱 높은 활성을 보일 것이라 사료된다. 이러한 결과를 토대로 미강추출물배지(ERBM) 제조시 사용되는 미강의 경제성, 추출과정의 효율 및 결과를 고려하여, 8:1(w/v)의 미강추출물배지(ERBM)을 기본배지로 선정하였다.

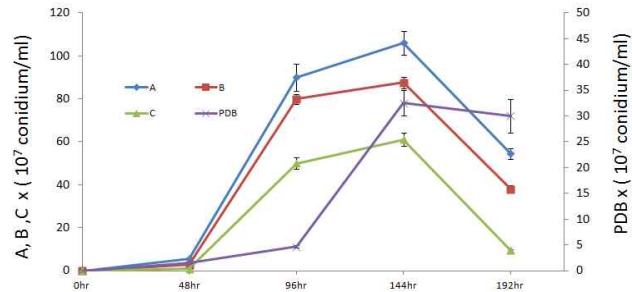


그림 10. 미강추출물 비율에 따른 *B. bassiana* M130 포자 생산량.

A : Rice bran blend distilled water 4:1(w/v), B : Rice bran blend distilled water 8:1(w/v),
C : Rice bran blend distilled water 16:1(w/v)

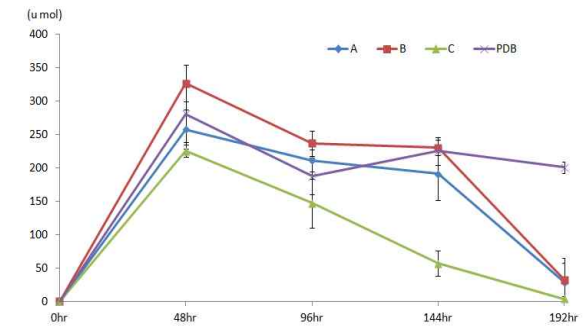
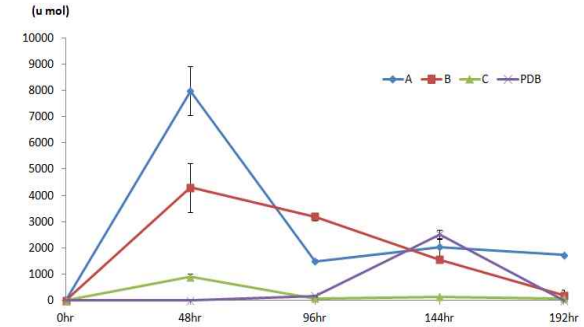


그림 11. 미강 추출물 비율에 따른 *B. bassiana* M130의 키티나아제(left) 와 프로테아제 효소활성. A : Rice bran blend distilled water 4:1(w/v), B : Rice bran blend distilled water 8:1(w/v), C : Rice bran blend distilled water 16:1(w/v)

5) *B. bassiana* M130의 대량포자 생산에 미치는 탄소원의 선정

각각의 탄소원을 첨가한 배지에서와 기본배지에서 배양된 *B. bassiana* M130의 포자 농도는 144시간에 최대 1ml 당 8.17×10^8 conidium/ml의 농도를 보였다. 또한 기본배지는 탄소원을 첨가한 배지에 비하여 형성된 건조 균체량은 비교적 작았으나, 포자의 생성량의 결과 기본배지에서 높은 생산량을 보였기에 탄소원의 첨가는 불필요하다고 사료된다. 미강추출물 배지내에 함유되어 있는 탄수화물 함량으로 충분히 곤충병원성곰팡이 *Beauveria bassiana*의 포자를 생성하는데 큰 문제가 없는 것으로 생각되며, Vega 등의 연구결과에 따르면 미강에 함유되어 있는 탄수화물의 농도는 36g/L으로 보고되어 기본배지로의 이용이 충분하다고 보인다(그림 12).

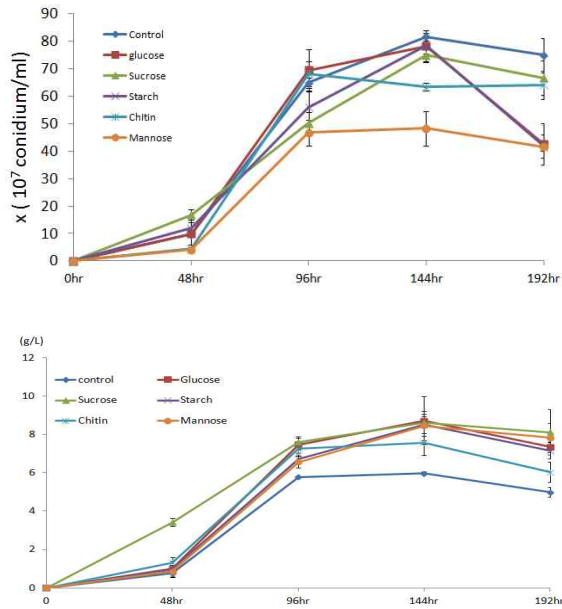


그림 12. 미강추출물 배지의 당농도에 따른 *B. bassiana* M130의 포자생산량과 건조중량.

6) *B. bassiana* M130의 대량포자 생산에 미치는 유기질소원의 선정

유기질소원 CSL의 농도에 따른 대량포자 생산에 관한 실험을 한 결과, 그림 13에서와 같이 기본배지에 비하여 0.5%의 CSL을 첨가한 배지에서 가장 높은 1 ml 당 1.45×10^9 conidium/ml의 포자가 형성되었다. 기본배지와 비교하여 유기질소원으로서 CSL의 첨가는 불필요하다 생각되나, Tuan Anh Pham의 연구결과에 따르면 0.5%의 CSL은 1%의 CSL과 비교시 포자생성에 큰 차이가 없었으나, 2% CSL에서는 2배 이상의 포자를 생성 하였다. 본 연구결과에서도 1%와 0.5%에서는 그 값이 두배 이상을 보이지 않았으나, CSL의 농도를 2%로 조정하여 실험을 이용한다면, 최적화를 통해 대량포자의 생성에 유리할 것이라 사료된다.

무기질소원의 경우 0.5% (NH₄)₂SO₄에서는 기본배지와 0.1%, 1% 농도의 배지에서 보다 약 두배 정도의 포자를 생성하여 M130의 최적배양조건으로 0.5% (NH₄)₂SO₄가 선정되었다(그림 18).

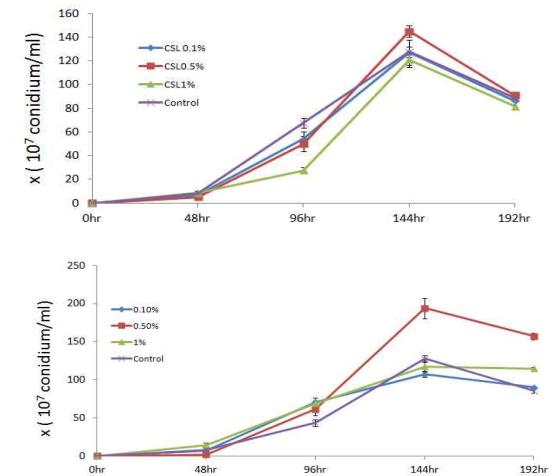


그림 13. 미강추출물 배지에 질소원 CSL(organic nitrogen) 와 (NH₄)₂SO₄ (inorganic nitrogen) 첨가 농도에 따른 *B. bassiana* M130의 포자생산량.

7) *B. bassiana* M130의 대량포자 생산에 미치는 pH의 영향

그림 14에서와 같이 pH의 영향에서는 pH 3과 pH 9에서 *Beauveria bassiana* M130은 전혀 성장하지도 않았으며, 포자를 생성하지도 않았다. pH 5에서 M130의 생육 및 포자생성 양이 가장 많았다. 따라서 M130의 대량포자 생산을 목적으로 배양할 시에는 pH를 5로 맞추어 주는 것이 가장 효과적이다. 또 다른 *B. bassiana*의 연구에서는, pH 3과 9에서도 양호한 성장을 보였으며, 오히려 pH 6~8에서 우수한 성장을 하였다. 하지만 대부분의 곰팡이류는 약산성의 조건에서 최적의 성장을 보인다는 연구결과가 우세하다. Control의 pH가 5.85인 것을 감안할 때, M130의 최적 pH범위는 pH 5~6으로 약산성의 조건에서 우수한 성장보이는 것으로 나타났다.

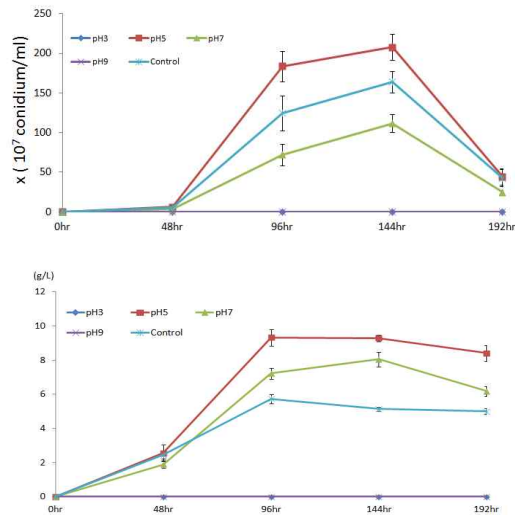


그림 14. 미강추출물 배지의 pH 변화에 따른 *B. bassiana* M130의 포자 생산량.

8) 선별된 균주 *B. bassiana* M130의 배양시의 최적배지 조건

미강추출물 8:1의 배지를 기본으로 하여 *B. bassiana* M130의 액체배지 최적 조건은 유기질소원을 제외한 0.5% (NH₄)₂SO₄을 첨가한 배지로 최적화를 하였다(표 1).

표 1. *B. bassiana* M130 포자생산을 위한 최적 배지 조건

Ingredient	Conc.(%)
Extracted Rice Bran	100
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5
pH	5
Temp.	28℃

9) 고체배지의 최적 생육 수분함량 선정

수분함량 30%일 때 배양 6일 이후부터 배지내 수분 증발이 빨라 생육 및 포자생산이 좋지 않은 것으로 조사되었으며, 수분함량 40%일 때 배양 종결 후 배지내 수분함량이 양호한 상태이, 생육 및 포자생산이 우수한 것으로 조사됐다. 수분함량 50%일 때 초기 배지내 수분함량이 너무 많으며 배양시 오염률이 높게 나타났으며, 생육중 배지가 덩어리져 생육 상태가 매우 불량하며, 오염율이 매우 높아 최적 수분함량은 40%인 것으로 나타났다.

표 2. *B. bassiana* M130의 수분함량에 따른 포자 생산량

배양 시간	수분함량에 따른 포자생산량 (conidium/ml)		
	30%	40%	50%
6일	3.4×10 ⁵	1.3×10 ⁸	3.6×10 ⁵
8일	2.1×10 ⁵	2.9×10 ⁸	-
10일	2.8×10 ⁶	3.1×10 ⁹	2.8×10 ⁴
12일	3.7×10 ⁶	3.5×10 ⁹	-

10) 대량포자 생산을 위한 최적 생육조건

미강고체배지를 이용한 대량생산 생육조건을 조사한 결과 표 3 에서와 같이 미강 100g 에 수분 함량 40%, 28℃에서 가장 생육이 잘되는 것으로 조사되었다.

표 3. 고체배양을 위한 대량포자 생산 조건

Ingredient	Conc.
Rice Bran	100g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5%
pH	5
Temp.	28℃
Moisture	40%

11) 고체 배양 후 포자회수를 위한 건조조건에 따른 포자의 열안정성

건조조건에 따른 포자의 열안정성을 조사한 결과 표 4에서와 같이 온도와 건조시간에 따라 포자 수가 감소하는 것으로 조사되었다. 특히 50℃와 60℃에서는 시간에 따라 그 수가 급격히 감소가 되어 포자를 이용하기 어려운 정도로 되는 것으로 조사되었으며, 가장 최적 건조 온도는 상온에서 서서히 건조시키는 것이 가장 좋은 것으로 조사되었다(표 4).

표 4. 고체 배양 후 포자회수를 위한 건조 조건의 열안정성

온도 \ 시간	건조조건	6시간	12시간	18시간	24시간
상온	2.7×10 ⁸	2.3×10 ⁸	2.1×10 ⁷	1.8×10 ⁷	2.0×10 ⁷
40℃	1.8×10 ⁸	2.3×10 ⁶	1.5×10 ⁵	7.1×10 ³	1.0×10 ³
50℃	3.8×10 ⁸	2.1×10 ⁴	6.1×10 ²	1.1×10 ¹	1.8×10 ¹
60℃	2.1×10 ⁷	1.4×10 ¹	-	-	-

12) 분생포자의 안정성 조사

UV-B 조사에 따른 포자의 안정성 실험은 페트리디쉬에 포자액(3.4×10^7 conidium/ml) 40 ml 넣고 자외선(UV-B, 280~320 nm)조사 후 24시간 경시적 변화 조사한 결과 포자의 농도가 시간이 지나면서 급히 감소하는 것으로 조사되어 자외선에 대한 민감도가 매우 높은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 제제화 및 포자의 안정성을 유지하는데 있어 자외선 차단제의 중요성을 보여주는 결과로 제제화하는데 있어 자외선 차단제의 선별에 유의하여야 한다.

표 5. 자외선 조사에 따른 분생포자의 안전성 조사

	0hr	6hr	12hr	18hr	20hr	24hr
포자농도 (conidium/ml)	3.4×10^7	1.2×10^5	2.9×10^4	1.1×10^3	3.1×10^1	-

고온에서 안정성 조사는 포자현탁액(1.1×10^7 conidium/ml) 500 μl을 E-Tube에 넣고 20, 30, 40, 50℃에서 Water-bath에 10, 30, 60분 처리 후 조사를 하였다. 처리시간 10, 30, 60분의 처리구가 0시간인 무처리구에 비해 포자 농도가 높게 조사되었다. 이는 포자에 있어 20, 30, 40℃의 온도처리가 포자의 발아를 촉진하는 작용을 하므로 생장이 신장되면 많은 포자를 생산하였을 것으로 사료, 단 50℃ 이상부터는 무처리에 비해 급격히 포자 발아가 발생되지 않았다.

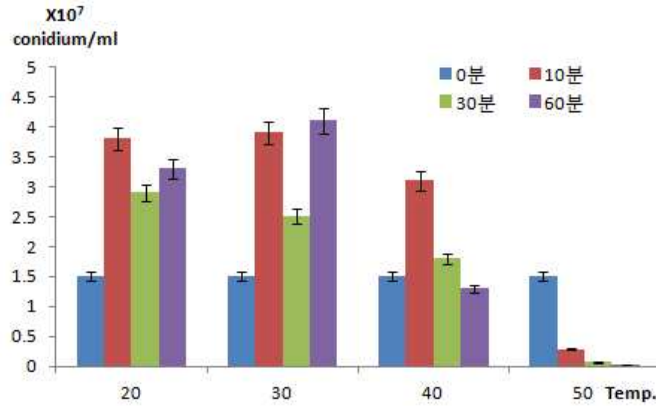


그림 15. 온도에 따른 B. bassiana M130 포자의 안정성

저온에서의 안정성 조사 -20와 4℃에 처리시 무처리구와 비교해 처리 시간이 길어질 수록 포자 생존력이 높아짐을 알 수 있었다. 이는 고온에서 열안정성과 같이 저온에서도 처리시간이 포자에 있어 발아 촉진역할의 작용으로 발아 및 생장이 촉진된 것으로 사료된다.

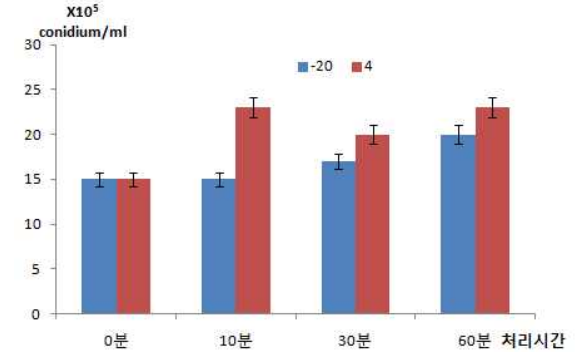


그림 16. 저온에서의 B. bassiana M130의 포자 안정성 조사

13) 다량의 포자 회수를 위한 고체배양 시 배양방법 차별화 기술(배지의 펠렛 및 필름화)

고체배양에 있어 가장 큰 문제점은 농산을 이용하였을 경우에 경제성에 대한 문제점을 야기 할 수 있다. 미강을 이용한 곡류배지에서 포자 분리 회수 시 배지에 포함된 불용성 물질, 유기물찌꺼기 혼재되어 순수한 포자만을 회수하기 어려운 것으로 나타났다.



그림 17. 미강을 이용하여 회수한 포자

미강을 펠렛화 하여 배양시 수분으로 인해 시간이 경과할수록 경도가 떨어지나, 배양은 우수한 것으로 조사되었다. 하지만, *B. bassiana* M130 살충곰팡이의 포자분리 및 회수시 미강을 이용한 곡류배지에서 문제점이 동일하게 나타나는 것으로 조사되었다.

또한 이러한 문제는 현장 살포하는데 있어 농약살포기에 불용성 물질과 유기물찌꺼기 혼재되어 제품내 분산의 안정성 및 노즐 막힘 발생할 것으로 사료된다.

이와 같은 문제 점을 해결하기 위해 본 연구를 통해 matrix를 다양한 방법으로 접근하여 포자만 순수하게 회수 하는 방법으로 접근을 하였다.

- 천연세라믹블(제오라이트,활성탄) 표면에 교착물질(영양원공급+교착역할+접종) 코팅 처리 후 배양통에 넣어 배양
- চেম & স্পঞ্জ 평판배지 표면에 교착물질 평판화 후 배양통에 넣어 배양
- 각 담체 표면에 균사신장 및 포자 형성
- 항온항습기에서 배양

천연세라믹블(제오라이트, 활성탄) 고체배지 배양시 포자 생산량을 한 결과 그림 18과 같이 천연세라믹블을 matrix로 하였을 때 활성탄블과 천연제오라이트블에서 *B. bassiana* M130이 배양이 잘되어 포자의 형성이 우수한 것으로 조사되었으며, 특히 미강추출물을 코팅했을 경우 M130 포자가 10^9 conidium/ml까지 그 량을 높일 수 있는 것으로 조사되었다.

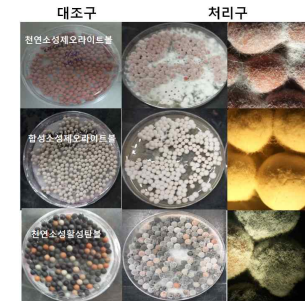
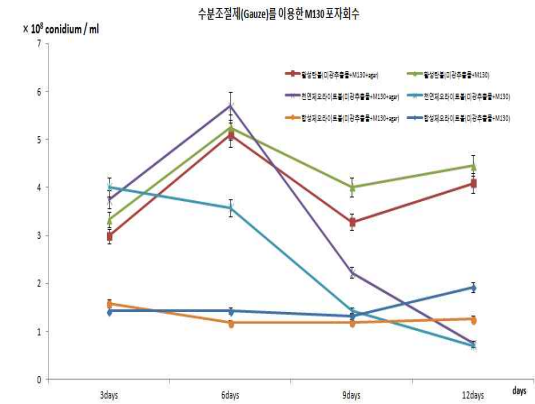


그림 18. 세라믹블을 이용하여 배양한 *B. bassiana* M130과 포자생산량.

채망 평판고체배지 배양시 포자 생산량을 조사한 결과 그림 19와 같이 *B. bassiana* M130 포자가 10^8 conidium/ml까지 포자를 생산할 수 있으나 천연세라믹볼 보다는 약간 못미치는 수준으로 조사되었다.

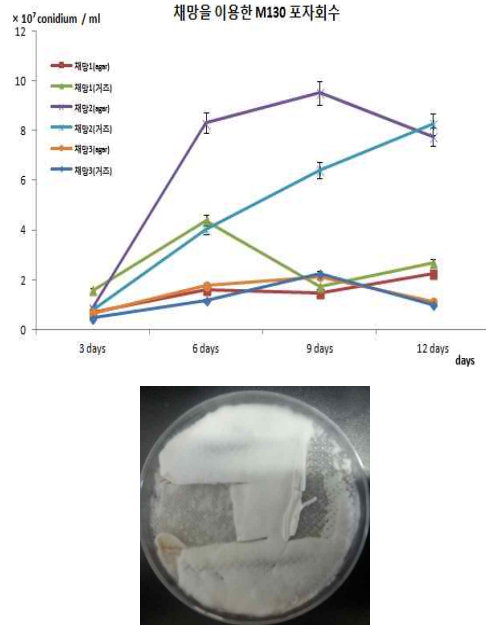


그림 19. 채망을 이용한 *B. bassiana* M130 배양 및 포자생산량.

스펀지를 이용한 평판고체배지 배양시 포자 생산량을 조사한 결과 M130 포자가 10^9 conidium/ml까지 포자의 회수 할 수 있었다.

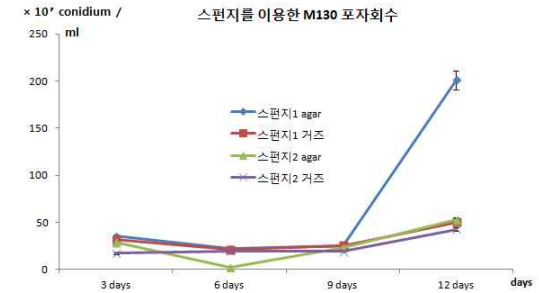


그림 20. 스펀지를 이용한 *B. bassiana* M130 평판고체배지 및 포자생산량.

천연세라믹볼(제오라이트,활성탄) 표면에 교착물질(영양원공급+교착역할+접종) 코팅처리 후 배양통에 넣어 배양, 채망 & 스펀지 평판배지 표면에 교착물질 평판화 후 배양통에 넣어 배양을 통해 각 담체 표면에 균사신장 및 포자 형성 조사결과 천연세라믹 볼에서 대량생산이 가장 좋을 것으로 사료된다.

천연세라믹볼 고체배양시 포자유도 조절인자 조사하기 위해 pH와 염농도에 따른 포자의 생산량을 조사한 결과 그림 21에서와 같이 pH3과 염농도 5%에서 가장 높게 포자를 생산하는 것으로 조사되었다.

- 교착물질을 pH별로 조절한 후 배양 후 포자생산량
- pH3 다른 처리구에 비해 높게 포자 생산

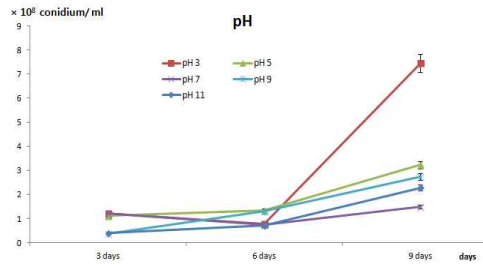


그림 21. 교착물질을 pH별로 조절한 후 배양 후 포자생산량.

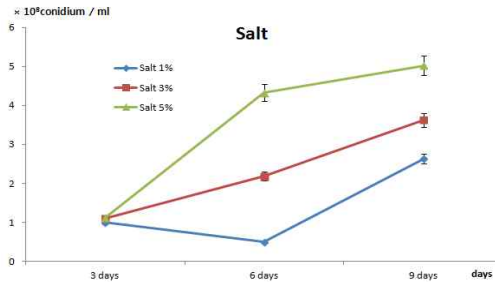


그림 22. 교착물질을 염농도별로 조절한 후 배양 후 포자생산량

대량 배양 방법을 위한 분생포자 배양 유도조사결과 세라믹볼, 채망, 스펀지, 쌀과 보리를 이용하여 포자의 회수량을 조사한 결과 곡물인 보리를 이용하여 생산하는 포자량이 높은 것으로 조사되었다.

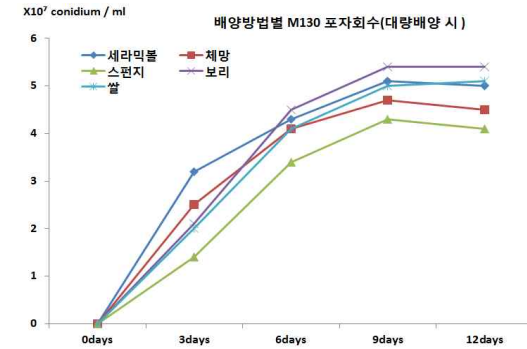


그림 23. 대량배양을 위한 matrix에 따른 포자 생산량.

각 배양방법별 분생포자 대량배양 유도 시 오염도에 대한 문제점이 나타날 수 있다. 순수하게 포자만을 회수와 원제의 안정성을 확보하기 위해서는 포자 생산시 오염에 대한 주의가 필요하여 배양방법에 따른 오염을 조사한 결과 그림에서와 같이 순수한 분생포자의 대량생산 조사하기 위한 각 배양방법별 M130의 알맞은 배양조건을 조사해본 결과 소규모의 배양에서는 곡물배지와 세라믹볼, 채망, 스펀지의 모두 비슷한 양의 포자가 조사되었으며 이 결과를 토대로 대량배양을 실시하였으며 세라믹볼, 채망, 스펀지의 경우 여러 반복을 통해 조사해 본 결과 오염율이 곡물배지 보다 많이 높았다. 이러한 결과는 세라믹볼, 채망, 스펀지 대량 배양 시 교착물질을 각 재료 표면에 골고루 도포할 때 공기중에 장시간 노출이 되는 과정에서 오염율이 높아지는 것으로 사료된다. 그러므로 손쉬운 배양방법과 효율적인 분생포자의 유도를 위해서는 오염율이 가장 낮은 곡물배지 중 보리를 활용하는 방법을 선택하였다. 또한 보리의 경우 포자를 회수한 후 재 사용이 가능한 장점을 보이는 것으로 나타났다.

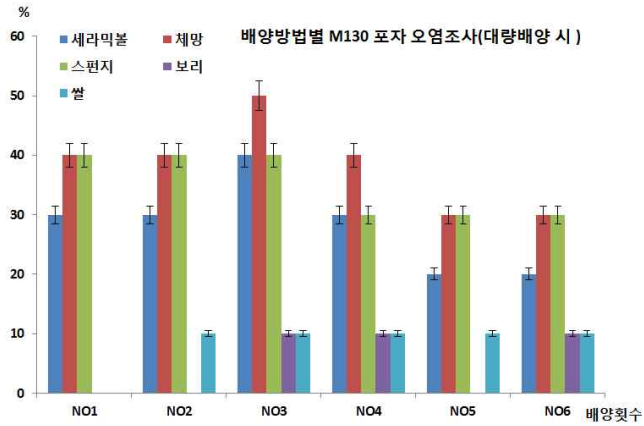


그림 24. 보리를 이용하여 배양한 *B. bassiana* M130 포자와 오염비율.

라. 살충력 증대를 위한 생물학적 안정성·보조물질 탐색 조사

일반적으로 곤충병원성 곰팡이를 이용한 살충제는 살충속도가 느린것이 단점으로 지적되고 있다. 또한 살충속도는 작물의 피해와 직접적인 관련이 있어 경제적으로도 중요한 의미가 있어 발아가 빨리 촉진 될수록 병원성의 발현이 빨리 일어날 것으로 보인다. 분산제의 경우 포자를 잘 퍼트려 곰팡이 포자의 뭉침을 해결할 수 있으므로 1차적으로 분산제 종류에 따른 포자의 분산성과 wetting 정도를 조사한 결과 EM-SLS가 wetting력과 분산정도가 우수한 것으로 조사되었다.

이러한 결과는 포자 상태에서의 생물학적 착생증진이 중요하여, 본 실험은 제제화를 위한 보조제 탐색에 포함시켜 보습제, 습윤제와 UV차단제에 대해 실험을 실시 하였다.

표 6. 분산제 종류에 따른 포자분산성 및 Wetting성 조사

구분	사용농도		비고	
	25ppm	50ppm	Wetting	분산정도
EM-APW #2	3~4	2~3	++	+++
EM-APW #3	2~3	2~3	++	+++
EM-SLS	2~3	2~3	+++	+++
EM-ADO #113	3~4	3~4	++	+++
EM-AGC	4~5	3~4	+++	+++
EM-APK 1218	5~6	3~4	+++	+++

* + : 양호, ++ : 우수, +++ : 매우우수

마. 제제화를 위한 보조제 탐색 및 제형화 기술 조사

원제의 자외선 차단효과를 증진시키기 위해 자외선 차단제 (Lowilite 20, 22, 62)를 *B. bassiana* M130의 포자와 자외선 차단제 10, 50, 100, 200 mg/L 농도로 처리하여 UV-A와 UV-B에 대한 효과를 조사한 결과는 그림 25와 같다.

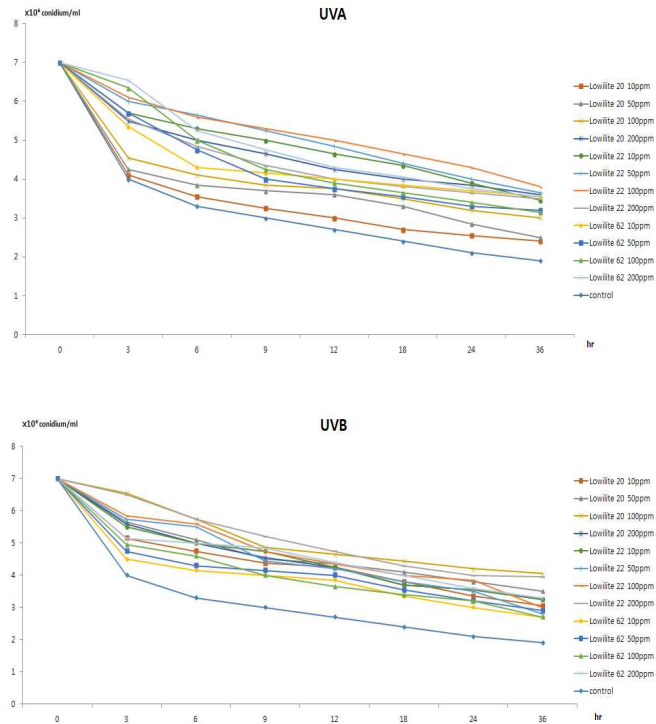


그림 25. 자외선 차단제에 농도에 따른 포자 발아저해율.

대조구의 경우 3시간 뒤 50%이상 포자가 억제 되는 것으로 나타났으며 1일 36시간 뒤에는 70%이상 억제된 것으로 나타났으나 Lowilite 시리즈의 경우 농도에 따라 UV-A와 UV-B에 각각 차단 효과를 보이며 포자를 보호하는 것으로 조사되었다. UV차단제의 농도별로 차이점을 보였지만, Lowilite 20과 62의 경우 UV-A와 UV-B에서 평균적으로 한쪽에 좋은 효과를 보이면, 다른 파장의 자외선에서의 효과가 떨어지는 문제점을 보여 평균적으로 UV-A 와 UV-B에 평균적 차단 효과가 우수한 Lowilite 22를 UV 차단제로 선정을 하였으며, 최적 농도는 100 mg/L로 설정하였다.

분산제는 수화제 또는 액상으로 현장에서 제품을 물에 희석하는 데 있어서 포자의 분산

성을 높여주고, 포자의 wetting 력을 증진시켜 소수성을 갖게 하여 해충표면 또는 절각에 포자가 효율적으로 붙어 지속적으로 묻어 있고 발아율을 증진시킬 수 있도록 하기 위한 것으로 계면활성제(Tween 20, Tween 80, DO-113)을 선별하여 10, 50, 100, 200 mg/L의 농도로 *B. bassiana* M130 spore와 혼합한 후 일정시간 배양하면서 포자의 뭉침 정도와 wetting 정도를 확인하였다.

포자의 분산정도를 파악한 결과 Tween 20은 농도에 따라 포자의 뭉침 정도와 wetting이 좋지 않은 것으로 조사 되었으며, DO-113의 경우 포자의 분산정도가 농도가 높아짐에 따라 포자의 뭉침이 없이 퍼져있는 것으로 조사 되었으며 wetting력도 tween계열보다 우수한 것으로 조사되어 분산제는 DO-113으로 선정을 하였다. 분산제 DO-113의 최적 농도는 100 mg/L로 설정을 하였다 200 mg/L의 경우도 100 mg/L와 유사한 퍼짐성과 wetting력을 보이는 것으로 나타났으나 *B. bassiana* M130의 포자 발아를 억제하는 것으로 나타나 적정 농도를 100mg/L로 설정하여 제형화시에 첨가량으로 정하였다.

표 7. 분산제 농도에 따른 포자의 분산력과 Wetting

분산제 농도별 종류	Cong number of spores	Wetting
Tween 20 10ppm	15~	+
Tween 20 50ppm	15~	+
Tween 20 100ppm	10~	+
Tween 20 200ppm	10~	+
Tween 80 10ppm	7~8	+
Tween 80 50ppm	6~7	+
Tween 80 100ppm	5~6	++
Tween 80 200ppm	5~6	++
DO-113 10ppm	4~5	++
DO-113 50ppm	4~5	++(+)
DO-113 100ppm	3~4	+++
DO-113 200ppm	3~4	+++

(wetting력은 분말포자와 계면활성제를 혼합하였을 때 혼합이 잘되는 유무를 파악하여 +, ++, +++로 표시)

보습제에 관한 실험은 제품 개발에 있어서 *B. bassiana* M130 포자가 발아를 하는데 있어서 일정량의 수분을 함유하고 있어야 해충체에 분사된 후 습도를 유지하여 포자를 발아 시키거나 촉진을 유도할 수 있으므로 제품개발에 있어서는 저장성 뿐 만 아니라 현장 살포에 있어서 매우 중요한 조건중의 하나이다. *B. bassiana* M130 포자액에 각각의 보습제(gelatin, gellan gum, arabic gum)을 각각 0.1, 0.5, 1.0 2.0 %의 농도로 설정하여 배양하면서 포자의 증진 효과를 조사하였다.

그림 26에서와 같이 시간이 지날수록 일반적으로 보습제 종류에 상관없이 모두 대조구에 비해서 *B. bassiana* M130 포자를 발아 촉진을 하는 것으로 조사되었다. Arabic gum의 경우 농도에 상관없이 3시간 이후 급격히 발아가 되는 것으로 조사되었으나 시간이 지날수록 발아력이 낮아지는 것으로 보였다. 하지만 Gelatin의 0.5%의 경우 시간이 지날수록 발아율이 더욱 증가하는 것으로 조사되었으며, 농도가 높아질수록 다른 보습제 보다는 발아율이 좋으나 gelatin 농도 종류에서는 *B. bassiana* M130 포자의 발아를 조금 저해하는 것으로 보여 최적 농도를 Gelatin 0.5%로 설정하였다.

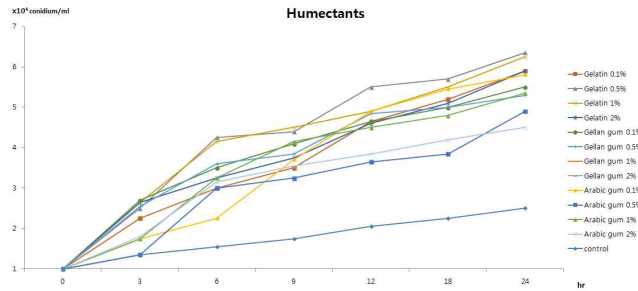


그림 26. *B. bassiana* M130 포자의 보습제 농도에 따른 포자 발아율.

이상의 연구결과 자외선 차단제, 분산제와 보습제를 이용하여 제형화를 위한 formulation 농도를 포자 10^{8-9} spore/ml(포자의 농도는 현장 실험을 통해 조절이 가능)으로 하여 Lowilite 22 100 mg/L, DO-113 100 mg/L와 gelatin 0.5%로 설정을 하여 250배 희석하여 사용할 수 있는 수화제 형태로 개발하였다.

식물성 오일을 첨가 원제의 수분 보호를 통해 효과적이고 안정성을 높이기 위해 식물성 오일 옥수수기름, 콩기름, 올리브오일 카놀라유를 각각 1, 5, 10, 20%를 첨가하여 formulation을 한 후 *B. bassiana* M130의 포자 발아율을 측정하였다.

그 결과 그림 27에서와 같이 식물성 기름의 종류에 따라 *B. bassiana* M130 포자의 발아율이 다르게 나타나는 것으로 조사되었다. 특히 올리브오일과 카놀라유는 농도에 상관없이 *B. bassiana* M130 포자의 발아를 억제하는 것으로 조사되어 향후 포자에 대한 독성 유무를 확인

하여야 할 것으로 생각된다. *B. bassiana* M130 포자의 발아율은 시간이 지남에 따라 콩기름과 옥수수기름이 발아율이 우수 한 것으로 조사 되었다. 하지만 경제적으로 보아 옥수수기름이 콩기름 보다 저렴하여 formulation화를 통해 제품 개발에 있어서는 옥수수기름이 더 효율적일 것으로 사료된다. 따라서 옥수수기름 10%를 제형화과정에 있어 최적 농도로 사용하였다. Luz와 Batagin (2005)의 보고에서도 옥수수기름이 포자의 발아율에 가장 좋은 것으로 보고되고 있다.

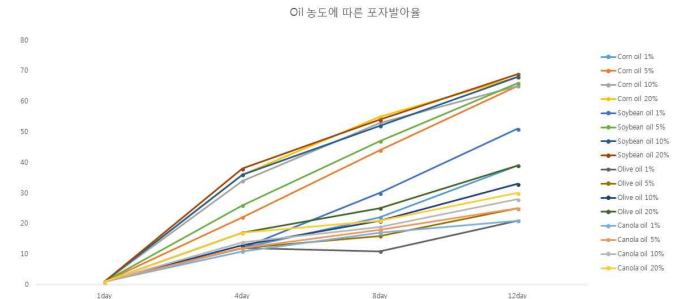


그림 27. 수분 보호를 위한 oil 종류에 따른 포자 발아율

B. bassiana M130 포자를 이용한 온실가루이 제어를 위한 제품개발에 있어서 보습제, 분산제, UV-차단제의 농도 설정이 완성되었으나, 제품 소재의 증량성을 높이기 위해서는 증량제의 첨가가 필수적이다. 본 연구에서는 증량제로 규조토를 선정하여 *B. bassiana* M130 포자와 증량제의 농도를 각각 1:9, 2:8, 3:7, 4:6의 비율로 혼합하여 PDA 배지에서 *B. bassiana* M130의 포자 발아능을 조사한 결과 포자 농도에 의존적으로 발아율이 높아지는 것으로 조사되었다. 하지만 경제성 및 현장에서의 사용과 타 제품과의 비교를 해본다면, *B. bassiana* M130의 포자 농도가 10%를 첨가 제형화하였을 때 가장 효과적인 것으로 나타났다.

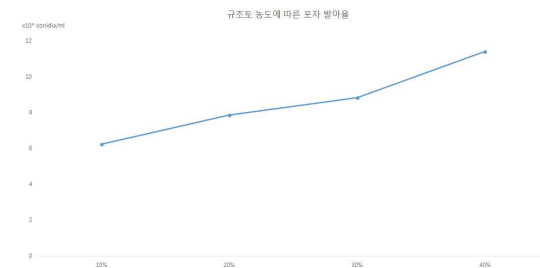


그림 28. 증량제 농도에 따른 포자 발아능 조사

이러한 결과를 바탕으로 제형화를 한 시제품 제품명 ‘가루자비’를 완성하여 하우스 실험에의 생물검정에 적용하였다.

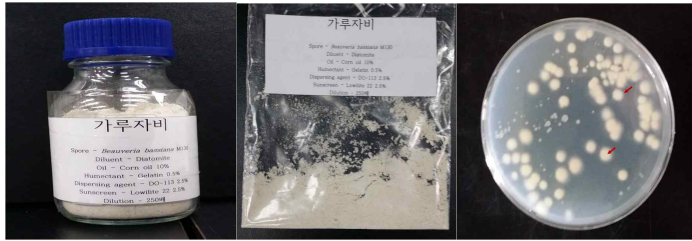


그림 29. 제형화된 *B. bassiana* M130과 포자 발아조사

가루자비의 안전성을 조사하기 위해 장기 저장을 통해 포자의 보관기간 및 온도별 발아율을 조사한 결과 표에서와 같이 4℃ 저장하였을 경우 6개월이 지나도 90%이상의 포자 발아율을 보이는 것으로 나타나 저장성이 우수한 것으로 조사되었다. Hong 등(1999)은 20℃, 30℃, 40℃와 50℃등 일정한 온도에 분과날 경우 분생포자가 119일간 보관이 가능하다고 하였다. Walstad 등 (1970)이 *B. bassiana* 포자를 8℃와 21℃에 12개월간 보존기간 동안 저장효과를 본 결과 1개월 후부터 현저히 활력이 떨어진다고 하여 동일한 결과를 보였다. 따라서 향후 제품의 완성도를 높이기 위해서는 저온에서 저장기간에 대한 안전성에 관한 연구가 더욱 진행이 되어야 할 것이다.

표 8. *B. bassiana* M130 시제품 가루자비의 저장성 및 기간에 따른 포자 발아율

보관기간	보관온도별 발아율 (%)		
	상온	4℃	-15℃
0개월	96	96	96
3개월	50	92	80
6개월	20	92	20

제형화 방안에 있어서 제품의 업그레이드를 위해서는 향후 micro capsule화에 대한 연구가 향후에 진행되어 제품의 완성도를 더 높일 수 있는 방안을 간구하여야 할 것으로 사료된다.

제 2 절 협동 1과제 : 현장포장 방제력 검정 및 방제시스템개발

1. 분리 균주 *B. bassiana* M130 포자를 이용한 방제력 검정

가. 연구내용

(1) 생물검정을 위한 온실가루이 및 담배가루이의 증식

분리균주인 *B. bassiana* M130의 생물검정을 위하여 온실가루이와 담배가루이를 하우스에서 사육 실시 하였다(그림 1). 기주식물로는 고추와 토마토를 이용하였으며, 각 사육상자에 기주식물을 심은 후, 온실가루이와 담배가루이를 각각 접종하여 싹에 산란을 유도하였다.



(A)

(B)

그림 1. 온실가루이(A)와 담배가루이(B)를 하우스에서 사육 실시.

(2) Petri-dish를 이용한 간이 생물검정

분리균주인 *B. bassiana* M130을 배양하여 회수한 M130 포자를 1.0×10^8 conidium/ml의 농도로 조절하여 0.1% Tween 80이 첨가된 포자현탁액을 만들었다. Tween 80은 분산에 효과를 주기 위해 첨가하여 사용하였다. 알과 약충이 혼재한 고추 잎(A)을 포자현탁액에 약 5초간 침지한 후 수분을 제거하여 Petri-dish에 넣어 7일 후 감염체를 조사하였다(B). 하지만 Petri-dish 상에서는 감염체의 포자형성 확인이 어려워 0.1% 항생제(클로람페니콜)를 첨가한 PDA 배지에 옮겨 감염체의 포자형성 즉 포자를 배양하여 세균오염없이 순수 M130포자를 증식시켜 감염여부를 조사하였다(C). 반복구당 각각 30개의 가루이 약충을 채취하여 PDA 배지에 치상하여 3일 후 M130에 감염된 전형적인 증상을 나타내는 감염체를 조사하였으며, 조사의 유의성을 높이기 위하여 3회에 걸쳐 조사하였다.

(3) 화분재배 시험(Pot-test)

화분에 토마토를 심은 후 온실가루이 및 담배가루이를 접종하여, 접종 15일 후, 알과 약충을 확인한 다음, M130 포자를 1.0×10^8 conidium/ml의 농도로 조절하여 0.1% Tween 80이 첨가된 포자현탁액을 만들어 엽면시비를 하였다. 처리 회수별 방제효과를 검정하기 위하여 반복 3회까지 처리하였으며, M130 포자 발아를 유도하기 위하여 인위적으로 온도를 $27^\circ\text{C} \pm 1$, 습도 85%를 유지하였다. 엽면시비 후 3일, 항생제를 첨가한 PDA 배지에 토마토 잎에 기생한 가루이 약충 30개체를 접종하였으며, 유의성을 높이기 위하여 포기를 달리하여 5반복으로 조사하였다.

표 1. Pot 실험을 위한 *B. bassiana* M130 포자의 접종

구 분	1차 처리일		2차 처리일		3차 처리일		처리 회수	처리 포기수 (<i>B. bassiana</i> 2종)
	미생물 처리	PDA배 지	미생물 처리	PDA배 지	미생물 처리	PDA배 지		
1회 처리구							2	10
2회 처리구	10.25	10.31	10.28	11.4			2	10
3회 처리구					10.31	11.7	2	10
무처리구							2	10

(4) 포장시험

포장상태에서의 곤충병원성곰팡이 M130의 살충률을 조사하기 위하여 가루이류 피해가 발생한 포장(A)을 이용하여 방제 시험을 하였다. 우선 M130 포자를 1.0×10^8 conidium/ml의 농도로 조절하여 0.1% Tween 80이 첨가된 포자현탁액(B)을 만들어 엽면시비를 하였다(C). 살포 3일 후, 임의의 5개 지점의 잎을 채취하여 5개의 Petri-dish에 각각 30마리의 약충을 접종하여 M130에 감염된 개체수를 조사하였다. (동기간의 시설하우스 최고온도는 28°C , 최저온도는 12°C , 평균습도는 60% 정도로 유지되었다.)



그림 2. *B. bassiana* M130 포자를 이용한 포장 실험.

(A) : Damage caused by whitefly (B) : *B. bassiana* M130 spore solution
(C) : Spraying of spore solution

표 2. *B. bassiana* M130 포자를 이용한 포장 실험방법

구 분	1차 처리일		2차 처리일		3차 처리일		사충율 조사일	조사엽/ 집중마리수
	미생물 처리	PDA 배지	미생물 처리	PDA 배지	미생물 처리	PDA 배지		
1회 처리구		11.3					11. 8	10/60
2회 처리구	11.1		11.3	11.8			11.11	10/60
3회 처리구					11.7	11.11	11.14	10/60
무처리구							11.14	10/60

나. 연구결과

(1) Petri-dish를 이용한 간이 생물검정 결과

B. bassiana M130 포자를 이용하여 petri-dish를 이용한 간이 생물검정을 실시하였다. 그 결과 그림 3에와 같이 M130 포자에 온실가루이가 감염되어 죽은 사체를 확인 할 수 있었다. 죽은 가루이 사체로부터 살충병원성곰팡이에 의한 것인지 유무를 확인한 결과 그림에서와 같이 PDA 배지상에서 M130의 포자가 증식하는 것을 확인할 수 있었다.



그림 3. 페트리디쉬상에서의 생물 검정.

(A) : Leaf which were mixed whitefly (B) : Petri-dish bioassay

(C) : Survey unreinheiten

3회에 걸쳐 절편잎을 이용하여 *Beuveira bassiana* M130을 이용한 간이 생물검정 결과, 표 3에서와 같이 평균방제가가 53.7%로 화학농약에 비하여 방제가가 낮은 편으로 조사되었다. 시기에 따라 60%가 넘는 경우도 있었지만 대체적으로 40%에서 60% 사이로 다소 낮은 편으로 나타났다. 이러한 결과는 화학농약이 고독성으로 총에 대한 살균력이 강한 것으로 나타나기 때문으로 생각된다.

표 3. 페트리디쉬를 이용한 생물검정 결과

처리 회수	조사일	반복수	M130	control
1회	8.2	1	17	0
		2	21	0
		3	14	0
	평균		17.33	0.00
	방제가(%)		57.8	0
	8.11	1	16	0
		2	21	0
		3	14	0
	평균		17.00	0.00
	방제가(%)		56.6	0
	9.16	1	13	0
		2	19	0
		3	23	0
	평균		18.33	0.00
	방제가(%)		61.1	
	10.21	1	12	0
		2	9	0
		3	16	0
		4	14	0
		5	17	0
평균		13.60	0.00	
방제가(%)		45.3	0	
총 평균			23.22	0.00
방제가(%)			53.8	0

(2) 화분시험 결과

화분 시험결과 그림 4에서와 같이 반복 처리를 통해 처리 횟수를 증가 시키면 방제가가 증가하는 것으로 나타났는데, 3회 처리시 최대 84.6%의 방제가를 보였다. 이처럼 곤충병원성곰팡이 *B. bassiana* M130의 온실가루이 및 담배가루이에 대한 높은 방제가를 가질 수 있었던 요인으로는 적정 온도와 습도가 필요하다고 생각된다. 본 시험에서는 *B. bassiana* M130을 가루이에 접종한 후, 27±1℃, 습도는 80%로 유지하였다. 일반적으로 곤충병원성곰팡이의 포자는 위의 조건에서 가장 잘 발아하며, 부착기를 쉽게 형성한다고 알려져 있다. 84.6%의 방제가는 곤충병원성곰팡이 *B. bassiana* M130이 화학농약을 충분히 대체할 수 있는 가능성을 보여 준다고 사료된다.

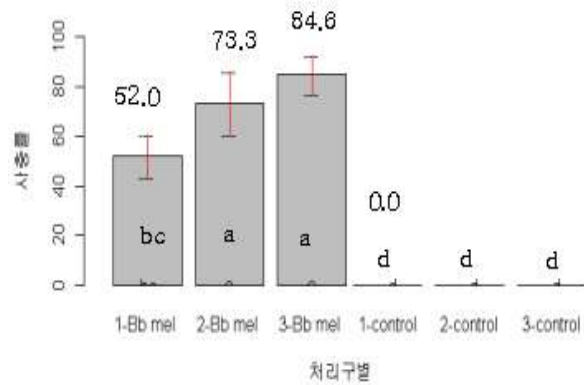


그림 4. *B. bassiana* M130 포자를 이용한 포트 생물검정에 따른 사충률.

1-Bb mel : *Beauveria bassiana* mel 1회 처리구, 2 - 2회처리구, 3 - 3회처리구

(3) 포장시험 결과

화분시험에서와는 달리 포장시험에서는 일반적으로 방제가가 낮은 편으로 나타난다. 그림 5에서와 같이 45.3%의 방제가를 보였는데 본 실험에 이용된 시설하우스의 최고온도는 28℃, 최저온도는 12℃이며 평균습도는 60% 정도로 살충곰팡이가 발아하고 부착기를 형성하는데 나쁜 조건으로 생각되며 방제율이 낮게 나타난 것 또한 환경적 요인인 것으로 생각된다. 따라서 화분시험에서와 같이 포장시험에서도 역시 방제횟수를 늘릴수록 방제가가 높아질 수 있을 것으로 생각된다. 이는 환경적으로 곤충병원성곰팡이의 포자가 발아함에 있어서 악조건이라도, 방제 횟수를 늘린다면 얼마든지 방제가를 높일 수 있는 것으로 사료된다. 또한 시설하우스 온도가 다소 높고 습도가 높은 7~8월 장마기에 살포하면 방제효과가 높아질 것으로 예상되나 1년차 시험에서는 결과를 예측하기가 어려운 실정이다. 곤충병원성곰팡이를 이용한 생물학적 처리에 있어서는 환경내의 수분에 대한 조건이 매우 중요한 것으로 보인다.

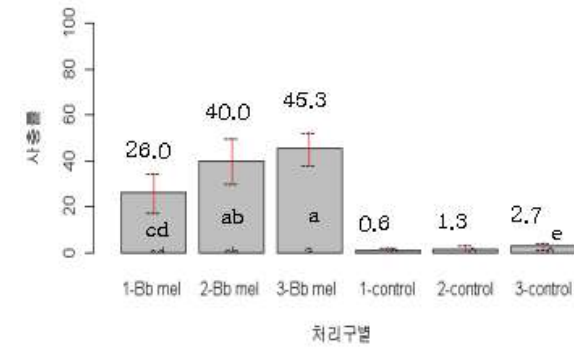


그림 5. *B. bassiana* M130 포자를 이용한 포장 실험에 따른 사충률.

1-Bb mel : *Beauveria bassiana* mel 1회 처리구, 2 - 2회처리구, 3 - 3회처리구

2. 분리 균주 *B. bassiana* M130 포자 프로토타입을 이용한 방제력 검증
가. 연구내용

(1) 온실가루이 사육 및 증식

온실가루이 사육을 통하여 안정적인 *B. bassiana* M130의 시험을 진행하기위해 온실가루이에 대한 저항성이 높으면서 온실가루이가 잘 증식할 수 있는 식물소재를 탐색한 결과 “운향”을 이용하였다. 온실가루이는 산란을 위하여 어린잎에 집중적으로 모여 산란을 하며 대체적으로 1cm² 50마리 이상 모이기도 한다. 따라서 온실가루이에 대한 저항력이 약한 식물은 고사한다. 온실가루이 증식이 잘 되면서도 저항력이 강한 “운향”을 이용하여 그림 6과 같이 생물검정에 사용할 온실가루이를 생산하였다.



그림 6. 온실가루이 증식을 위한 운향 재배.

온실가루이 산란 유도를 위하여 본엽 4매의 호박 호박모종을 상위엽 1매만 남기고 제거한 후 온실가루이가 발생된 포장(실내 사육)에 넣어 2일간 산란을 유도하였다(그림 7). 접종 2일후 온실가루이 알이 산란된 호박모종에 붙은 온실가루이를 제거한 후 상온에서 10일간 부화 및 2령충이 될 때까지 사육하였다.



그림 7. 호박잎을 이용한 온실가루이 산란유도.

(2) *B. bassiana* M130 접종 준비 및 조사구 설치

살충곰팡이가 포장에서 잘 정착하기 위하여 프로토타입 형태로 자외선 차단제, 보습제와 분산제를 첨가하고 적은 량의 포자가 적정량으로 희석되기 위하여 증량체를 첨가하였다.

증량체는 규조토 99%, Gelatin 0.5%, Lowilite 20 50ppm, Bo-113 0.5% 첨가하였다. 첨가제 총량 100g당 규조토 99.0095g, Gelatin 0.495g, Lowilite 20 0.0005g, Bo 113 0.495g으로 조성 물 1리터에 희석하여 처리하였다.

B. bassiana M130포자의 포자 밀도에 따른 조사를 위해 먼저 고체 배양된 *B. bassiana* M130 포자밀도를 조사한 결과 포자밀도는 6.5×10^{10} conidium/ml로 조사되어 생물 검정을 위하여 1.0×10^9 conidium/ml, 1.0×10^8 conidium/ml와 1.0×10^7 conidium/ml을 만들어 처리할 때는 10배로 희석하여 적정농도의 처리액을 만들었다.

(3) 시험구 및 대조구

전년도 시험결과 *Beauveria bassiana* M130은 1.0×10^7 conidium/ml 방제효과가 높은 것으로 나타났으나 자외선을 차단하고 발아율을 높이는 보습제 및 분산제를 사용할 경우 방제효과를 알아보기 위하여 보습제, 차단제와 증량제로 만든 첨가제를 넣어서 그림 3과 같이 처리하는 시험을 하였으며 조사구는 살충미생물 처리구 3개와 대조구 2개에 대하여 각각 3개의 반복구를 설치하였다.



그림 8. *B. bassiana* M130 프로토타입 처리시험.

시험 결과의 신뢰도를 높이기 위하여 그림9 와 같이 온실가루이가 증식하고 있는 딸기에도 호박과 동일하게 3반복으로 조사구를 설치하였다.



그림 9. 딸기를 이용한 온실가루이 배양 시험.

(4) *B. bassiana* M130 프로토타입 1차 생물검정

(가) 1차 처리

호박잎에 산란된 온실가루이 알이 부화되어 2 ~ 3령 중이 되는 10일째에 각 조사구별로 증량제 10g과 각각 희석된 *B. bassiana* M130 포자액 10 ml을 넣고 물 100ml 맞추어 집중액을 만들었다. 이때 첨가제 만들 때 액체 상태인 전착제는 물 100 ml을 맞춘 후 50 ml를 넣고, 대조구인 “보타니가드”와 처리구는 1,000로 희석하여 실시하였으며, 무처리구는 동량의 물을 처리하였다. 분무처리 시 타 조사구에 집중포자가 확산되는 것을 막기 위하여 침지처리 한 후 흔들어서 물방울 떨어낸 후, 동 기간 하우스 내 평균온도는 25℃이상이며 평균습도는 70%정도 하여 생물 검정을 하였다.

(나) 2차 처리

1차 집중 후 9일이 지난 후 1차 처리와 동일하게 증량제 10g과 각각 희석된 *B. bassiana* M130 포자액 10 ml을 넣고 물 100ml 맞추어 집중액을 만들었다. 이때 첨가제 만들 때 액체 상태인 전착제는 물 100 ml을 맞춘 후 50 ml를 넣고, 대조구인 “보타니가드”와 처리구는 1,000로 희석하여 실시하였으며, 무처리구는 동량의 물을 처리하였다. 분무처리 시 타 조사구에 집중포자가 확산되는 것을 막기 위하여 침지처리 한 후 흔들어서 물방울 떨어낸 후, 동 기간 하우스 내 평균온도는 25℃이상이며 평균습도는 70%정도 하여 생물 검정을 하였다.

(라) 살충율 조사 및 사충을 이용한 살충곰팡이 확인

살충률 조사는 현미경 하에서 총 온실가루이 개체수에 대한 사충을 조사하였으며, 죽은 가루이 구분은 같은 나이의 개체를 이용하므로 살아있는 개체는 4령중 이상 되어 2 ~3령 중의 죽은 개체와 쉽게 식별이 가능하였다.

B. bassiana M130 포자 감염으로 인한 사충을 보기 위하여 1.0×10^8 conidium/ml 처리구의 사충을 확인하기 위하여 항생제를 넣은 PDA배지에 사충 30마리 접종하여 포자배양을 통해 확인하였다.

(5) *B. bassiana* M130 프로토타입의 2차 생물검정

(가) 온실가루이 산란유도

B. bassiana M130 프로토타입의 1차 시험 결과 후 첨가제에 대한 영향 및 살충곰팡이 포자만 사용하였을 때 방제효과 및 작물에 따른 살충효과를 조사하기 위하여 육묘 중인 딸기 모종을 이용하여 산란을 유도하였다.

시험을 위하여 육묘중인 딸기 모종은 분엽 6 ~7매 중 미성숙된 상위엽 1매만 남기고 제거한 후 사육중인 온실가루이 온실에 2일간 입식 후 성충을 털어내고 9일간 사육 하였다.



그림 10. 생물 검정을 위한 온실가루이 산란유도.

(나) 시험구 및 대조구 설정

조사구는 총 7개를 두어 1조사구당 1회 처리, 2회 처리로 구분하고 각 조사구는 총 5개의 반복구를 설치하였다. 조사구는 1차 조사와 같이 첨가제에 1.0×10^6 conidium/ml, 1.0×10^7 conidium/ml과 1.0×10^8 conidium/ml 혼합한 처리구를 설치하고 대조구는 시중에 판매되는 친환경 제제인 보타니가드 1,000배액처리구와 무처리구를 설치하였으며 추가로 첨가제만 처리한 조사구와 살충곰팡이 포자 1.0×10^7 conidium/ml을 처리한 조사구를 추가하여 첨가제에 의한 살충효과가 나타나는지를 조사하였다.

(다) *B. bassian* M130 처리 시험

1차 시험과 동일한 방법으로 회석하여 1회 침지 처리하였으며(그림 11) 사충율을 조사하였다.



그림 11. 딸기 모종을 이용한 생물 검정.

나. 연구결과

B. bassiana M130의 포자량을 1.0×10^7 conidium/ml로 제제화하여 처리하였을 때 80.7 %에 살충효과가 있었으며, 대조구로 시중에 판매되는 “보타니가드” 1,000배액 처리와 비교하였을 때 18% 이상의 높은 살충효과가 나타났다. 프로토타입 내 *B. bassiana* M130 포자량을 1.0×10^6 conidium/ml에서는 보타니가드와 유의성이 없는 것으로 나타나 상품화 할 경우 1.0×10^7 conidium/ml적당할 것으로 조사되었다. 특히 1.0×10^8 conidium/ml의 경우 94.7 % 이상 높은 방제효과를 보였으나, 2반복 실험에서 유의성을 보이지 않아 1.0×10^7 conidium/ml 살충력이 높은 것을 알 수 있었다. 또한 보타니가드와 1.0×10^7 conidium/ml을 2회 처리하였을 때와 유의성이 없는 것으로 볼 때 1.0×10^7 conidium/ml으로 만들어 2회 처리하는 방향으로 제품화 하는 것이 적당할 것으로 보여진다.

표 3. *Beauveria bassian* M130 농도별 살충효과 (conidium/ml)

	1.0×10^6	1.0×10^7	1.0×10^8	보타니가드	대조구
1회 처리	48.6 b	80.7 a	94.7 a	62.7 b	8.0c
2회 처리	91.6 a	96.1 a	97.3a	88.8	

Yoon 등의 보고에 의하면 포자현탁액 1 ml ($1 \times 10^5 - 10^8$ conidia/ml with 0.02% Tween80)을 이용하여 온실가루이 유충에 대하여 살충력을 검정한 결과, 접종 후 5일차부터 사충이 발생하기 시작하였고 농도가 높아질수록 살충률도 증가하였으며, 특히 일반적인 포자처리 농도인 1×10^8 conidia/ml에서 5일차부터 90% 이상의 높은 살충률을 보였다. 본 연구를 통해 개발된 가루자비는 2회 처리 후 90%이상의 살충률을 보이는 것을 조사되었다.

배양여액을 이용하여 *B. bassiana* SF205균주를 이용한 목화진딧물 대상으로의 살충력결과 회석배수에 따라 3.15-94.3%의 살충률을 보였다. *Lecanicillium lecanii*의 배양여과액을 이용한 어린 선충(*Heterodera glycines* Ichinohe의 second stage juvenile)으로 살충력을 측정한 결과 *L. lecanii* 균주에 따라 2.0-20.7%의 살충률을 보였다.

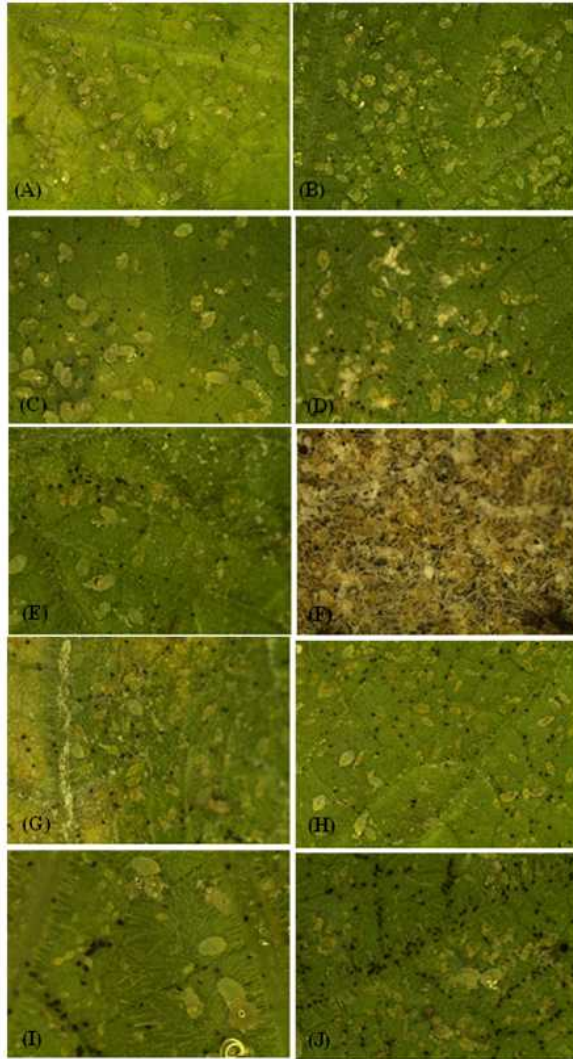


그림 12. 프로토타입 *B. bassiana* M130을 이용한 옆면 처리 생물 검정. (A) and (B) Control, (C) 10^6 conidium/ml of 1st treatment, (D) 10^6 conidium/ml of 2nd treatment, (E) 10^7 conidium/ml 1st treatment (F) 10^7 conidium/ml of 2nd treatment, (G) 10^8 conidium/ml 1st treatment, (H) 10^8 conidium/ml of 2nd treatment (I) BotaniGard¹ (1,000x)² of 1st treatment, (J) BotaniGard¹ (1,000x)² of 2nd treatment, 1: BotaniGard[®] represents a commercial biopesticide. 2: Dilution factor (10^8 spore/ml)

3. 시제품 가루자비와 보타니가드와의 생물 검정 비교실험.

(가) 연구방법

생물검정을 위하여 시설하우스 330m² 운향을 재배하여 온실가루이를 증식하였다. 일반 작물은 온실가루이가 발생되면 감도가 생기고 세력이 떨어져 고사하지만 숙근초인 운향은 온실가루이가 심하게 발생되어도 고사하지 않아 온실가루이를 증식하기에 알맞다.

생물검정을 위하여 1차에는 호박을 이용하여 시험하였으며 2차는 운향을 이용하였다. 1차 방제시험은 살충곰팡이(*B. bassiana* M130)를 제품화한 “가루자비”, 기존 제품인 “보타니가드”, 천적인 “온실가루이좀벌” 처리구와 무처리구를 설치하였으며 “가루잡이”와 “보타니가드”는 1,000배액으로 희석하여 처리하였으며 온실가루이는 1,000m²당 10,000마리를 기준하여 방사하는 것을 감안하며 1,000m² 2,500포기를 심는 것을 기준으로하여 1포기당 4마리를 기준하여 5개의 시험포트에 20마리의 온실가루이 좀벌머리를 접종하여 시험하였다. 2차 검정시에는 화학농약인 을 첫 번째 처리할 때 1회 처리하여 방제효과를 비교 하였다.

1차 생물검정을 위하여 생육이 빠른 호박을 파종하여 제1 본엽이 완전히 전개된 후에 본엽 1매만 남기고 성장점을 제거한 후 온실가루이 사육장에 넣어주었다. 접종 3일후에 회수하여 야간온도 15℃, 주간온도 28℃를 유지하여 온실가루이 부화와 발육을 유도하여 3~4령층으로 키워 1차 처리와 2차 처리를 실시하였다. 처리 후 평균습도 80% 유지시간이 16시간 이상 유지시켜 한여름 장마기에 온도와 습도를 인위적으로 조성하였다. 방제가 조사는 성충이 우화된 번데기 껍질과 우화되지 못하고 죽은 개체를 조사하여 총 개체수에 대하여 죽은 개체수 비율을 방제가로 조사하였다.

2차 생물 검정은 생육기간이 긴 운향을 이용하기 위하여 시험 2개월 전에 파종하여 온실가루이를 접종하였다. 접종 3일후 회수하여 상온에서 온실가루이를 발육시켰으며 처리방법은 3 ~ 4령층에 1차 접종과 2차 접종을 실시 하였으며, 온실가루이 좀벌머리는 5포기에 20마리를 넣었으면 농약처리구는 1회처리하여 사충률을 비교하였다. 방제가 조사는 성충이 우화된 번데기 껍질과 우화되지 못하고 죽은 개체를 조사하여 총 개체수에 대하여 죽은 개체 비율을 방제가로 조사하였다.

(나) 연구결과

호박잎을 이용하여 1차 생물 검정결과 그림 13에서와 같이 가루자비 살포시에 81.6%의 높은 살충율을 보이는 것으로 조사되었으며, 대조구로 사용하였던 보타니가드는 가루자비보다 7.8% 정도 낮은 것으로 조사되었으며, 생물해충인 좀벌은 오히려 사충율이 매우 낮은 것으로 나타났다. 이러한 결과로 보아 본 과제를 통해 개발되어진 가루자비의 사충률이 우수하여 좀벌을 대신하여 친환경생물방제제로의 사용이 가능할 것으로 보인다.

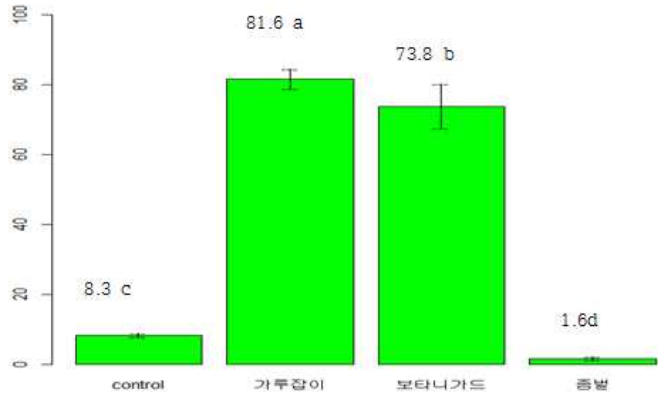


그림 13. 가루자비 시제품을 이용한 생물검정

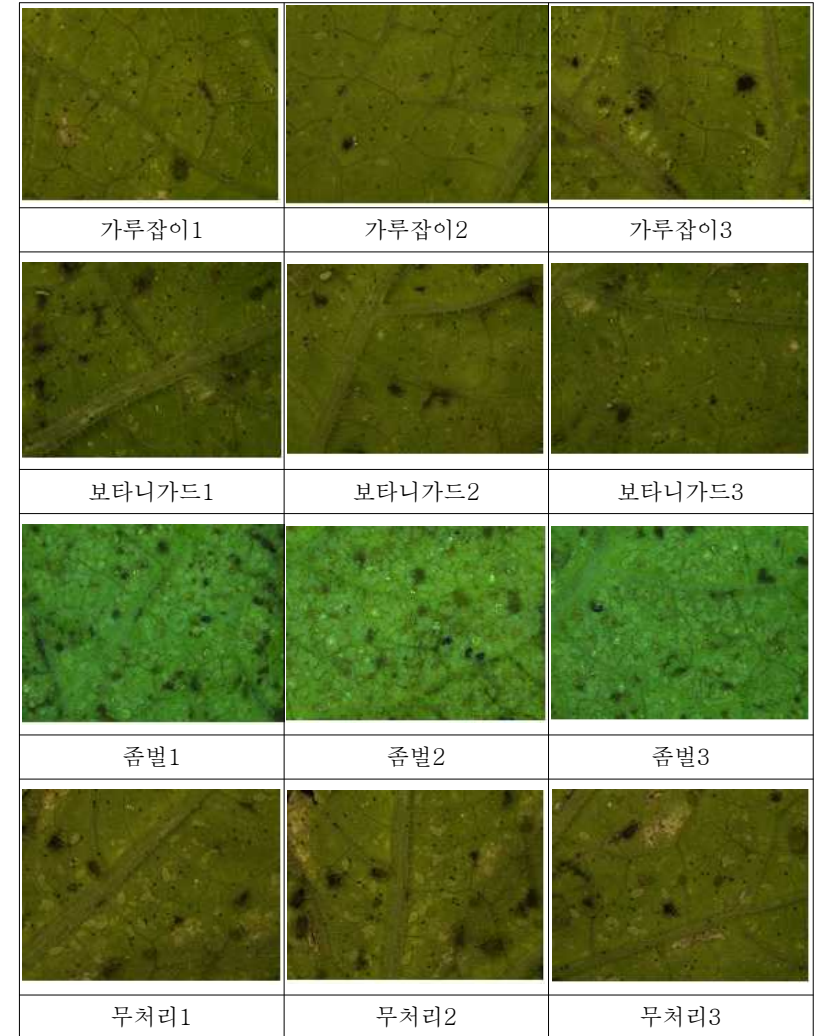


그림 14. 옆면 처리 사충률.

나. 2차 생물검정

2차 생물 검정은 1차 검정이후 4회에 걸쳐서 호박을 이용하여 생물검정을 하였으나 온실 가루이 산란부터 조사까지 약 40여일이 소요되며, 이 기간 동안 호박잎이 죽어서 정상적인 조사가 어려운 것으로 나타났다. 따라서 산란부터 조사기간 40여일을 견딜 수 있는 식물로 운향을 이용하여 생물검정을 재검정하였다. 그 결과 그림 15 에서와 같이 농약의 경우 1차 생물검정 때 가루자비의 사충률과 유사한 결과를 보였으나 가루자비와 대조로 사용된 제품 보타니가드와 사충률이 유사한 44.0-45.3%로 나타나 1차년도에 비해 50%이상의 사충률이 저하되는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 제품의 보관상에 현장 조사에 사용한 가루자비와 보타니가드의 보관상에 문제가 나타난 것으로 사료된다. Hong 등(1999)은 20℃, 30℃, 40℃와 50℃등 일정한 온도에 분과날 경우 분생포자가 119일간 보관이 가능하다고 하였다. Walstad 등 (1970)이 *B. bassiana* 포자를 8℃와 21℃에 12개월간 보존기간 동안 저장효과를 본 결과 1개월 후부터 현저히 활력이 떨어진 다고 하여 동일한 결과를 보였다. 따라서 향후 제품의 완성도를 높이기 위해서는 저온에서 저장기간에 대한 안전성에 관한 연구가 더욱 진행이 되어야 할 것이다.

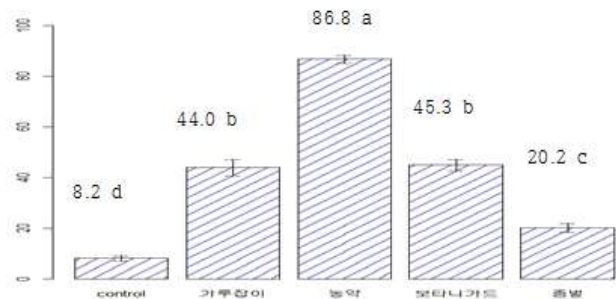


그림 15. 시제품 가루자비와 대조구의 가루자비 생물검증.

곤충병원성 곰팡이의 해충방제제로서 이용은 대부분 포자를 직접 처리하는 방법이 많이 이용되고 있는데, 이러한 관행적인 방법은 자연환경의 온도, 자외선 그리고 습도 등의 영향을 많이 받게 되며, 체내 침입 후 증식과정을 통해 살충성을 보임으로써 그 효과가 늦게 발현되는 단점을 가지고 있다. 그리하여 최근에는 이런 단점을 보완하고 새로운 형태의 방제원 개발을 위하여 곤충병원성 곰팡이의 포자가 아닌 배양액을 해충방제에 이용하고자 하는 연구가 진행되고 있다. 이는 곤충병원성 곰팡이가 기주를 침입시 생산하는 주요 효소인 chitinase, protease 및 lipase를 비롯하여 다양한 살충성 물질을 이용하는 것으로, 실제로 살충성 효소만을 처리하였을 경우 포자를 처리하는 것보다 더 높은 살충률을 나타낸다는 보고도 있다[12]. 따라서 본 연구의 결과는 향후 이러한 결과에 따라 *B. bassiana* M130 포자를 이용하여 개발된 ‘가루자비’는 온실

가루이와 같은 해충에 대한 높은 살충력을 가지고 있기에 친환경농자재로 이용이 가능 할 것으로 사료된다. *B. bassiana* M130포자를 이용하여 수화제 형태로 개발된 시제품 ‘가루자비’는 온실가루이와 같은 해충에 대한 높은 살충력을 가지고 있어 이를 이용하여 친환경농자재로의 등록이 가능함을 제시하고 있다. 향후 ‘가루자비’는 국내에서 국내 기술로 개발된 곤충병원성 곰팡이 해충방제제로 이용이 가능하며, 친환경자재로 현장에서 활용이 가능할 것으로 판단된다.

제 3 절 협동 2과제 : 포자회수기 개발

1. 재료 및 방법

가. 고체배지 접종용 액체배지 및 배양조건

대량포자 생산을 위해 조사된 고체배양 시 필요한 접종용 *Beauveria bassiana*의 최적의 배지 및 배양조건은 미강추출액(DW:미강=1:8), 무기질소원인 (NH₄)₂SO₄ 0.5%, 생육온도 28℃, pH 5의 생육조건으로 배양 후 고체배지에 접종해 사용하였다.

표 1. 접종용 액체배지 및 배양조건

Ingredient	Conc.
ERB	DW:Rice Bran=1:8
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5%
Temp.	28℃
pH	5

나. 다양한 고체배양별 배지선정 및 포자생산, 포자 분리·회수방법

곡물, 세라믹볼, 채망, 스펀지 배양에 대한 다양한 배양 및 소재에 있어서 선정 기준으로 배지별 불순물이 함유되지 않는 양질의 포자와 포자수 그리고 대량배양 시 오염율이 낮아야 한다. 곡물배지의 경우 유기물인 곡물내의 다른 오염균을 제거하기 위하여 간헐멸균으로 곡물배지를 멸균하였고 세라믹볼 배지는 무기물이므로 일정시간 한번의 멸균을 하였으며 채망과 스펀지도 세라믹볼 배지와 동일하게 준비하였다.

(1) 곡물배지에 의한 포자생산 및 포자분리·회수방법

다양한 고체배지 및 배양방법을 통한 고체 배양방법의 조사는 최적의 대량생산 조건 및 효율적인 포자의 생산 방법을 찾고자 함이다. 현재까지 곰팡이 배양 시 곡물배지가 가장 많이 사용되고 있지만 각 곡물의 특성에 따라 곡물의 비용 및 포자 필요 시 양질의 포자 생산에 있어 선택의 폭이 좁아졌다. 이러한 점을 충분히 고려해 다양한 곡물배지에서의 최적의 배양조건 및 최적의 포자생산 및 분리방법이 필요하다.

(2) 세라믹볼에 의한 포자생산 및 포자분리·회수방법

높은 온도에서 소성된 소성 세라믹볼을 곰팡이 배양 시 담체로 활용 하므로써 양질의 포자 회수와 한번 사용한 세라믹볼 담체를 반복 사용하므로 배양의 비용을 절감할 수 있는 경제적 이점이 있다. 또한 세라믹볼 표면에서 자란 곰팡이와 포자를 이물질 없는 포자로 생산하고 회수 할 수 있다.

(3) 채망에 의한 포자생산 및 포자분리·회수방법

곡물과 세라믹볼의 경우와는 다르게 채망에 의한 고체배양은 일정한 평면적에 배양 물질이 함유된 교착물질을 도포하여 고체 평판배양법으로 자란 곰팡이에서 포자를 생산하고 회수 할 수 있다.

(4) 스펀지에 의한 포자생산 및 포자분리·회수방법

채망에 의한 고체 평판배양법과 동일한 방법으로 일정한 평면적에 배양물질이 함유된 교착물질을 평면 스펀지에 도포하여 고체 평판배양법으로 자란 곰팡이에서 포자를 생산하고 회수 할 수 있다.

표 2. 고체배양에 의한 포자분리 및 포자회수방법

방식	방법
롤링커터 사이클론 방식	롤링커터 사이클론 방식은 곡물배지에서 자란 곰팡이 포자를 회전하는 롤러에 배양된 곡물배지를 넣어 곰팡이 포자가 자란 곡물 표면을 깎아내어 깎긴 표면의 곡물가루를 사이클론 공기 흡입으로 집진통에 원하는 포자를 수집하는 방식이다.
드럼회전마찰 사이클론 방식	마찰 사이클론 방식은 곰팡이가 자란 곡물배지를 드럼 안에 넣어서 빠른 회전을 통해 각각의 곡물이 회전을 통해 서로간의 마찰에 의해 포자가 곡물에서 이탈되면서 분진 상태인 것을 사이클론 공기 흡입으로 집진통에 원하는 포자를 수집하게 된다. 특히 이 경우 배양된 곡물배지의 수분이 매우 중요하며 이는 포자량과 밀접한 관계를 가진다.
진공흡입 방식	진공흡입 방식은 진공방식을 대기중의 공기를 흡입해 집진통 내의 필터에 흡착시켜 흡착된 포자를 다시 물리적으로 포자를 수집하는 방식으로 진공청소기와 비슷한 원리이다.

다. 선정된 곡물배지인 보리를 이용한 대량배양 조사

(1) 품종별에 따른 보리 곡물배지 선정

1차적으로 곡물배지 중 보리를 이용한 곡물배지를 선정하였으며 보다 더 최적의 배양 조건을 조사하기 위하여 품종별에 따른 배양을 조사하였다. 현재 시중에 유통되고 있는 보리의 종류는 쌀보리, 늘보리, 찰보리 세 종류로 각각의 보리를 구입해 품종별에 따른 최적의 보리를 선정하였다. 배양방법으로는 각각의 보리 100g, 세 번 세척 후 건조 후(수분함량 15%) 배양통에 넣고 간헐멸균을 하였으며 방냉 후 최종 수분함량 35~40%가 되도록 포자현탁액을 접종 후 15일간 배양하였다. 배양 중 일정한 시간에 샘플을 채취하여 포자수와 불순물 함유 상태 및 오염율을 조사하였다.



그림 1. 보리 품종별 배양준비.



그림 2. 보리 품종별 배양기에서 배양.



그림 3. 보리 곡물을 이용한 포자 생산 전처리방법.

(2) 선정된 보리 곡물배지의 대량배양 조사

(가) 선정된 늘보리 대량배양

보리 품종별에 따른 최적의 품종으로 늘보리가 선정되었고 선정된 늘보리를 이용한 대량 배양을 조사하였다. 멸균이 가능한 비닐팩에 늘보리 1kg을 넣어 100g기준 최종수분함량 35~40%로 하여 배양 하였으나 열배 증가된 보리량과 배양통이 아닌 비닐팩이라는 달라진 조건으로 배양 3일째 전체적으로 오염이 되거나 몽침현상이 발생하므로 대량배양이 정상적으로 이루어지질 않았다. 2차 배양 시 달라진 조건을 검토 해 최종수분함량 20~25%로 감소하여 배양하였으며 그 결과 정상적인 배양으로 포자를 생산할 수 있었다.



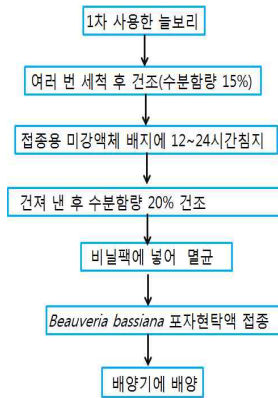
그림 4. 늘보리 대량배양 모습.

(나) 대량배양 시 최적의 수분함량 조사

곡물인 보리의 소량배양 시 최적화된 최종수분함량은 40% 이었으나 늘보리를 이용한 대량배양 시 열배 증가된 보리량과 배양통이 아닌 비닐팩에 의한 달라진 배양환경으로 정상적인 배양에 의한 포자생산이 이루어지질 않고 오염과 뭉침현상이 발생되었다. 이러한 원인으로 변화된 배양환경을 검토 후 대량배양 시 비닐팩 내에서의 최적의 수분함량을 조사하였다.

(다) 늘보리를 재활용한 고체대량배양 조사

늘보리를 이용한 곡물배지는 1차 배양을 통해 포자 회수를 마친 늘보리를 2차 배양에 재활용함으로 경제적 비용을 줄일 수 있을 것으로 사료된다. 포자 회수를 마친 늘보리를 아래의 방법으로 재활용 하여 2차 배양을 하였고 정상적인 배양과 포자를 형성하였으며 최종 건조 포자회수량을 조사하였다.



라. 늘보리 이용한 대량 배양된 곰팡이의 최적의 포자회수방법 조사

선정된 늘보리로 대량 배양된 곰팡이를 최종 건조수분함량 2%미만이 될 때까지 상온에서 음건 하였고 건조된 늘보리 표면에 생산된 다량의 포자를 회수하기 위해 포자회수방법을 조사하였다. 포자회수방법으로 롤링커터 사이클론방식, 드럼회전마찰 사이클론방식을 선택하였으며 건조포자량과 그리고 불순물 함유 정도를 선정기준으로 하였다.



그림 5. 롤링커터 사이클론 방식.



그림 6. 드럼회전마찰사이클론방식.

마. 선정된 최적의 곱팡이 포자회수기 개발

대량 생산된 곱팡이 포자의 효율적 회수방법으로 사이클론방식과 비 사이클론방식인 진공흡입 방식이 있다. 사이클론방식의 경우 야외에서 식물로부터 대기중에 포자 수집을 하는데 이용되어졌으며 진공흡입 방식은 주로 연구실에서 실험용으로 포자를 포집 또는 회수하는데 이용되어졌다.

사이클론방식의 포자 수집기는 연구적 시간을 통하여 포자 수집의 질량과 효율성의 필수적 요인을 바탕으로 산업적으로 발전하였고 또한 곱팡이 포자의 유형에 따라서도 포자 수집기가 다양하게 개발되어졌다. 이러한 개발과 발전의 기반은 대기로부터 먼지를 제거하기 위한 산업에서 활용이 폭이 넓어졌으며 생물학적으로 사이클론 원리는 꽃가루나 진균포자 같은 생물학적 입자를 효율적으로 수집할 수 있는 분야에 널리 활용되었다.

그러므로 사이클론 방식으로 건조 곱팡이 포자의 수집은 손쉽고 편리하게 할 수 있으며 고체배양 표면의 건조 곱팡이 포자의 물질이 상당량 필요 할 때 유용하게 사용될 수 있는 장점을 가지고 있다.

본 연구에서도 고체배양 시 늘보리에서 생산된 포자를 다량 회수하기 위해 먼저 선정된 드럼회전마찰 사이클론방식에서 보다 더 포자의 질량과 효율성을 높이기 위하여 최종적으로 변형된 드럼회전마찰 사이클론방식인 포자회수기를 국내에서도 독자적이며 유일한 포자회수기를 개발하였다.

2. 연구결과

가. 다양한 고체배양별 포자생산 및 포자 분리·회수방법

본 연구의 최종 목표는 양질의 다량의 포자를 생산 및 회수하는 것으로 다량의 포자를 생산하기 위하여 곡물, 세라믹볼, 채망, 스펀지배지에 대하여 조사하였고 1차 배양 결과 곡물과 세라믹볼 배지에서 포자 생산의 가능성이 조사되었다. 최종적으로 포자수, 최종 포자량, 불순물 정도, 오염도, 배양 시 비용을 기준으로 검토한 결과 곡물배지인 늘보리 배지가 최종선정 되었으며 아래 표와 같이 세라믹볼 배지의 경우 배양 시 소요되는 비용을 예상해 보았으며 그 결과 가장 저렴한 비용이 산출 되었다. 하지만 세라믹볼 배지와 기타배지에서는 적은 포자량과 오염율이 높게 나타났으며 이러한 matrix를 이용한 배양 연구는 앞으로 충분한 시간을 통한 보다 더 많은 연구가 있다면 대량배양이 가능하다고 사료된다.

표 3. 세라믹볼배지의 대량배양 시 예상 소요경비 산출

구분	내용 및 소요경비
기본사항	· 1회 제조기간 12일 · 생산량 : 100kg
배양방식	· 천연제오라이트세라믹볼 고체배양
1회당 필요한 성분량	· 접종원 : 포자현탁액 10리터 · 미강추출액 : 1리터 (2,000원) · 세라믹볼 : 100kg (130,000원) · 황산암모늄 : 5kg (5,000원) · 전분 : 500g (1,000원) · 물 : 20리터 (500원)
배양용기	· 배양용기 (30cm×40cm)당 1kg = 100개 (500,000원)
전기세	· 배양기간 12일 (60,000원)
결론	· 초기 소요 경비 : 698,500원 · 재사용 원재료 : 세라믹볼, 배양용기 · 2차 배양시 소요경비 : 68,500원

표 4. 곡물배지와 세라믹볼배지의 포자비교

	포자 회수방법	포자총량/건조배지량	회수된 포자사진	비고
세라믹볼배지 (천연제오라이트)	드럼 회전 마찰 싸이클론 방식	40g/5kg		-95%이상의 순수 포자만 회수, 양이 적음
곡물배지 (보리&쌀)	롤링커터 싸이클론 방식	250g/5kg		-포자 보다 곡물의 잔여물이 많이 혼재 -포자총량에 비해 순수포자량은 적음
	드럼 회전 마찰 싸이클론 방식	85g/5kg		- 95% 이상의 순수 포자만 회수 -천연세라믹과의 포자 밀도 차이

표 5. 곡물배지와 세라믹볼 배지의 배양상태

배양 방식	배양상태	
세라믹볼배지		
곡물배지		

나. 선정된 곡물배지인 보리를 이용한 대량배양 조사

(1) 품종별에 따른 보리 곡물배지 선정

최종 선정된 곡물배지인 보리에 있어서 보다 더 다량의 포자를 생산하기 위하여 보리 품종별에 따른 배양을 조사하였다. 그 결과 늘보리>쌀보리>찰보리 순으로 배양 및 포자량이 차이를 보였으며 배양 15일 동안 일정한 시간을 단위로 샘플을 확보해 포자수, 오염율, 회수포자의 최종포자량을 조사하였다.

최종포자량의 경우 소량단위로 배양해 포자회수기를 사용하여 회수를 못하였으며 건조 후 밀폐용기에 넣어 물리적으로 포자를 떨어뜨려 진공흡입 방식으로 포자를 회수하였다.

배양 단위별 포자수를 측정한 결과 늘보리와 쌀보리는 비슷한 결과를 나타내었고 찰보리는 배양상태가 두 품종에 비해 양호하지 않았다. 오염율은 세 품종 모두에서 오염이 발생하지 않았으며 최종 건조포자량은 늘보리(1.12g/100g), 쌀보리(1.05g/100g), 찰보리 (0.4g/100g) 순이며 각 건조포자의 불순물 상태는 각각 순수밀도가 높은 양질의 상태였다.

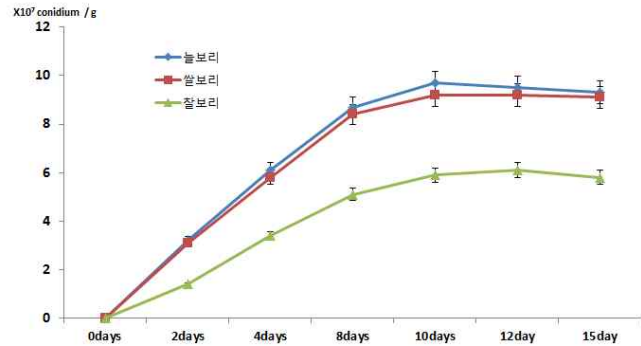


그림 7. 보리 품종별 B. bassiana M130 포자수.

표 6. 품종별 최종 건조포자에 대한 불순물 정도 및 최종 건조포자량

품종	늘보리	쌀보리	찰보리
불순물정도			
최종포자량 (건조포자량/건조배지량)	1.12g/100g	1.05g/100g	0.4g/100g

표 8. 품종별 배양일수에 따른 배양상태

배양 상태	배양 일수	품종		
		늘보리	쌀보리	찰보리
배양 일수에 따른 배양 사진	4일			
	6일			
	8일			
	10일			
	11일			
	12일			
	15일			

(2) 선정된 보리 곡물배지의 대량배양 조사

(가) 선정된 늘보리 대량배양

세가지 품종별 고체배양 조사에서 포자수, 최종 건조포자량 및 불순물 정도, 배양상태, 오염도에서 선정된 늘보리를 멸균이 가능한 비닐팩에 늘보리 1kg을 분취 후 최종수분 함량 20%로 하여 대량배양 하였고 건조포자량 및 오염도를 조사하였다. 오염의 경우 총 20개 배양 중 4개가 오염 배양되어 전체량에 배양성공률이 80%였으며 배지 양의 증가에 따른 오염이 발생되어 세척에도 주의가 필요한 것으로 사료된다.

표 9. 늘보리 곡물배지를 이용한 대량배양

배지	배양 일수	초기 배지량	정상 배양량	오염 배양량	건조조건	건조포자 회수방법	건조포자 회수량	비고
곡물배지 (늘보리)	12일	20kg	16kg	4kg	-수분함량 2%(↓) -상온에서 음건	드럼회전마찰 사이클론방식	250g/13kg	-초기배지량은 건조 후 약 10~15% 감소됨 -초기배지량에서 오염배지량을 뺀



그림 8. 정상적인 배양과 오염된 배양.

(나) 대량배양시 최적의 수분함량 조사

소량 배양 시 배양 수분함량의 경우 40%로 조사되었으며 대량배양 시 1차로 멸균이 가능한 비닐팩 봉지에 곡물배지 1kg을 넣고 최종 수분함량 40%를 맞추어 배양을 하였으나 배양 2~3일 경과 후 정상적인 배양이 될지 않고 오염이 발생되었다.

이는 배양용기와 배지량의 변화로 배양 시 함유하고 있는 수분의해 오염이 된 것으로 판단하여 변화된 조건에 맞는 수분을 조사하였다.

그 결과 최종 수분함량이 20~25%일 경우 정상적인 배양이 이루어졌으며 이는 배지 내 수분이 다소 있을 경우 비닐팩과 증가된 배지량에 의해 내·외부로의 수분 이동이 원활하지 못해 계속해서 비닐팩내 포화 수분이 존재하기 때문에 다소 오염이 발생할 수 있는 경우라 사료된다.

표 10. 대량배양 시 최적의 최종수분함량 조사

수분함량	#1	#2	#3	#4	#5
20%	○	○	○	○	○
25%	○	○	△	○	○
30%	×	△	○	○	×
35%	△	×	×	×	△

○ 정상배양, △ 포자형성 없이 균사만 생장, × 오염배양

(라) 늘보리를 재활용한 고체대량배양 조사

천연세라믹볼 배지의 장점은 matrix를 이용해 배양하므로 1차 배양 후 2차 배양 시 재사용 할 수 있기에 고체 배양에 소요되는 비용 부분을 감소시킬 수 있다. 최종 선정된 곡물배지인 늘보리의 경우도 보리의 표면 조직이 다른 곡물에 비해 단단하며 1차 배양 후 쌀은 포자 회수 후 조직이 깨지는 반면 늘보리는 포자회수 후 조직을 그대로 유지하고 있다. 포자 회수하고 남은 늘보리를 여러번 세척해 건조 후 고체배지 접종용 미강액체배지에 12~24시간 침지 후 건져 낸 후 최종 수분함량 20%로 건조하여 비닐팩에 넣고 멸균 후 접종 배양하면 정상적인 배양이 가능한 것을 확인하고 대량배양을 실시하였다.

그 결과 건조포자회수량은 1차로 늘보리로 배양 했을 때와는 약간의 차이를 보였으나 액체배지를 좀 더 보안을 한다면 2~3번의 반복배양을 통하여 고체배양에 소요되는 비용부분을 다소나마 줄일 수 있을 것으로 사료된다.

표 11. 재활용된 늘보리 곡물배지를 이용한 2차 대량배양

배지	배양 일수	초기 배지량	정상 배양량	오염 배양량	건조조건	건조포자회수 방법	건조포자회수량	비고
곡물배지 (재활용된 늘보리)	12일	5kg	5kg	0kg	-수분함량 2%(↓) -상온에서 음건	드럼회전마찰 사이클론방식	52g/4.1kg	-초기배지량은 건조 후 약 10~15% 감소됨

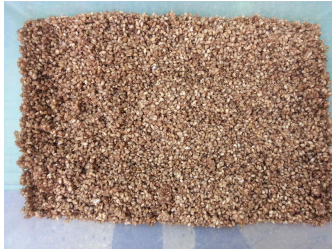
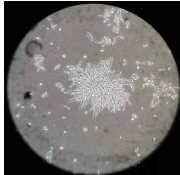


그림 9. 1차 배양 후 세척된 늘보리.

다. 늘보리 이용한 대량 배양된 곰팡이의 최적의 포자회수방법 조사

최종 선정된 곡물배지인 늘보리를 대량배양 후 생성된 건조 포자를 두 가지 방법으로 회수하였으며 그 결과 이전에 곡물배지 선정 실험에서와 같은 롤링커터 방식에서는 건조포자 총량은 많은데 비해 유기물 및 불순물이 많이 함유되어 있어 순수 포자의 양은 별로 되질 않았고 드럼회전마찰 방식은 이전 시험과 동일하게 95%이상의 순수 포자만 회수 되었다. 그러므로 곡물배지의 최적의 포자회수방식은 드럼회전마찰 싸이클론방식을 선정되었다.

표 12. 늘보리 이용한 대량 배양된 곰팡이배양모습과 포자회수량

배지	포자 회수방법	포자총량/건조배지량	회수된 포자사진	비고
곡물배지 (늘보리)	롤링커터 싸이클론 방식	310g/5kg		-포자 보다 곡물의 잔여물이 많이 혼재 -포자총량에 비해 순수포자량은 적음
	드럼 회전 마찰 싸이클론 방식	89g/5kg		- 95% 이상의 순수 포자만 회수

라. 선정된 최적의 곰팡이 포자회수기 개발

늘보리 곡물배지를 고체배양 하여 생산된 포자를 산업적으로 이용하기 위하여 최적의 포자 회수방법에 의한 포자회수기를 개발 하였다. 현재 국내의 경우 이 분야에 있어 연구적 기반이 부족하여 산업화가 되어져 있지 못하다. 더불어 곰팡이를 제제화한 제품도 생산 판매되지 않으며 대부분 외국 제품으로 대체되고 있다.

반대로 외국의 경우 이런 제품들이 생산 판매되고 있으며 포자회수기에 대한 산업적으로도 발전되었다. 포자 회수방법의 연구에 있어 화분이나 실험실에서 사용할 수 있는 작은 규모에서부터 대기중에 포자를 수집할 수 있는 실외적인 규모의 회수기도 활용 중이다.

특히나 이러한 회수기는 분진과 관련된 산업을 통해 더욱 더 연구 개발되어졌으며 여러 가지 방식과 다양한 형태들이 있다.

본 연구에서 이러한 곰팡이를 소재로 한 생물학적 친환경적인 제품을 만들고자 제품의 주요 소재인 건조곰팡이 포자를 가장 효율적이며 높은 질량으로 회수할 수 있는 독자적인 포자회수기를 만들었으며 그 결과 늘보리 곡물배지를 이용한 대량생산에 의한 양질의 건조 곰팡이 포자를 다량 수확할 수 있었다.



그림 10. 변형된 드럼 회전 마찰 싸이클론 포자회수기.

(4) 관찰 및 측정

- 증독증상 및 치사율

시험한 모든 케이지에 대하여 처리 후 4시간 및 관찰종료 시까지 매일 관찰하였다. 꿀벌의 증독증상관찰은 일반증독증상, 특이증상 및 치사개체를 관찰하였다. 치사개체의 판정은 육안으로 관찰하여 움직임이 없고 주사침을 이용하여 건드렸을 때 더듬이, 다리 및 몸통의 움직임이 중단된 경우 치사로 판정하였다.

- 병리검사

시험 중 치사 개체는 2차 감염을 막기 위하여 관찰 즉시 꺼내어 미생물 시험물질의 감염 여부를 조사하였다.

- 미생물 측정방법

미생물 검출에 사용된 배지는 Potato Dextrose Agar (MBcell, Lot NO. 2292204)를 증류수 1 L당 39.0 g 평량하여 121℃에서 15분간 멸균한 후 Plate를 만들어 사용하였다. 시험기간 중 치사된 꿀벌을 멸균증류수로 세척한 후 1마리당 멸균 생리식염수 1 mL의 비율로 첨가하여 균질화시킨 다음 PDA plate에 희석액을 100 µL 씩 분주하여 도말한 후 30℃, 24시간 배양한 후 colony를 관찰, 계수하였다.

- 실내온도 및 상대습도

실험실 실내온도 및 상대습도는 시험개시부터 60분 간격으로 자동 전자 온습도 기록계 (Thermo recorder TR-72U ; Thermo Scientific™, USA)를 이용하여 측정하였다.

- 시험결과의 표시 및 통계처리방법

관찰종료일인 시험물질 노출 후 14일째 기준으로 각 설정농도 당 누적치사수를 대조군과 비교하여 통계처리 하였다. 이때, 통계처리방법은 Minitab 프로그램 version 14를 이용하여 ANOVA 분석을 실시하였다.

나. 시험결과 [Results]

(1) 시험환경 조건 (Appendix 1)

관찰기간 동안 꿀벌실험실의 실내온도는 평균 25.5℃ (23.7~27.1℃) 그리고 상대습도는 평균 59.9% (48.0~68.0%) 이었다. 실험실 내의 실내온도 및 상대습도가 일부시간대 에서 시험가이드 라인의 범위 (온도: 23.0~27.0℃, 습도: 50.0~70.0%) 중 실내온도의 최고범위로부터 0.1℃, 상대습도의 최저범위로부터 2.0% 이탈이 발생하였으나, 이탈범위가 작고 음성대조군에 미치는 영향이 없는 것으로 보아 시험물질 처리군에 대한 영향은 적은 것으로 판단되었다.

(2) 관찰 및 영향시험결과

노출 후 14일차 경과 시, 음성대조군의 누적치사율은 20.0% (15/75개체)로 음성대조군의 치사율이 20.0% 이상이 되어 시험을 종료하였다. 추천사용약량 (250배 희석)의 10, 50배 농도로 시험한 결과, 관찰종료일의 누적치사율은 각각 22.7%, 77.3%로 관찰되었다 (표 1).

관찰기간동안 음성대조군 치사개체를 제외한 이상증상을 보인 개체는 관찰되지 않았다. 시험물질 처리군에서는 1일차에 보행장애 개체 2마리, 6일차에 무기력한 증상을 보인 개체 1마리가 관찰되었다 (표 2).

시험 중 치사한 개체에 한하여 미생물 감염을 조사한 결과, 음성대조군과 시험물질 처리군의 치사개체에서 미생물은 검출되지 않았다 (표 3).

가루자비의 꿀벌에 대한 영향시험을 14일차까지 수행한 결과, 추천사용약량 (250배 희석)의 50배 높은 농도에서 77.3% 치사하여 음성대조군의 치사율 대비 꿀벌에 유의하게 영향을 미치는 것으로 나타났다. 음성대조군 및 추천사용약량의 10배 높은 농도에서는 통계적으로 유의하지 않아 꿀벌에 대한 영향이 없는 것으로 나타났다. 따라서 꿀벌에 대한 최대무영향농도 (NOEC)는 추천사용약량의 10배 높은 농도인 것으로 추정된다.

㉟ 1. Cumulative mortality of honeybees

Starting date		Cumulative mortality after exposure								
2014.08.25										
Dosage ^a	Number of honeybee	4hr	1day	2day	3day	4day	5day	6day	7day	8day
0 ^b	25	0	0	0	0	0	0	0	1	1
	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0	0	0	0	0	0	0	1	1
10	25	0	1	1	1	1	1	1	1	2
	25	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0	1	1	1	1	1	1	1	3
50	25	10	10	10	12	13	14	15	16	17
	25	16	16	18	18	19	22	22	24	24
	25	4	4	7	7	8	9	9	11	11
	Total	30	30	35	37	40	45	46	51	52

Dosage ^a	Number of honeybee	Cumulative mortality after exposure						14 days Mortality (dead / total)
		9day	10day	11day	12day	13day	14day	
0 ^b	25	1	1	1	1	1	2	20.0% (15 / 75)
	25	0	2	4	5	5	8	
	25	0	4	4	4	4	5	
	Total	1	7	9	10	10	15	
10	25	2	3	4	4	4	6	22.7% (17 / 75)
	25	2	2	2	2	2	4	
	25	1	2	3	3	3	7	
	Total	5	7	9	9	9	17	
50	25	17	17	17	18	18	20	77.3% (58 / 75)
	25	24	24	24	24	24	24	
	25	12	13	13	13	13	14	
	Total	53	54	54	55	55	58	

a: Fold concentration of recommended dosage

b: Negative control (Non-treatment)

㉟ 2. Behavioural abnormalities of honeybees

Starting date		Cumulative mortality after exposure														
2014.08.25																
Dosage ^a	Number of honeybee	4hr	1 day	2 day	3 day	4 day	5 day	6 day	7 day	8 day	9 day	10 day	11 day	12 day	13 day	14 day
0 ^b	25	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	25	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	25	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
10	25	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	25	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
50	25	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	25	N	N	N	N	N	N	C(1)	N	N	N	N	N	N	N	N
	25	N	B(2)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

a: Fold concentration of recommended dosage

b: Negative control (Non-treatment)

※ Observation key

A : Hyperactivity

B : Mobile but not working or flying normally

C : Alive but unable to walk or fly

N : Normal

NA : Not applicable, not observed because of 100% mortality

표 3. Check microbial infections of lethal honeybees

Dosage ^{a)}	0 ^{b)}														
Days after exposure	4hr	1 day	2 day	3 day	4 day	5 day	6 day	7 day	8 day	9 day	10 day	11 day	12 day	13 day	14 day
Cumulative mortality	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	7	9	10	10	15
Number of microbial	NA ^{c)}	NA	NA	NA	NA	NA	NA	ND ^{d)}	NA	NA	ND	ND	ND	NA	-

Dosage ^{a)}	10														
Days after exposure	4hr	1 day	2 day	3 day	4 day	5 day	6 day	7 day	8 day	9 day	10 day	11 day	12 day	13 day	14 day
Cumulative mortality	0	1	1	1	1	1	1	1	3	5	7	9	9	9	17
Number of microbial	NA	ND	NA	NA	NA	NA	NA	NA	ND	ND	ND	ND	NA	NA	-

Dosage ^{a)}	50														
Days after exposure	4hr	1 day	2 day	3 day	4 day	5 day	6 day	7 day	8 day	9 day	10 day	11 day	12 day	13 day	14 day
Cumulative mortality	30	30	35	37	40	45	46	51	52	53	54	54	55	55	58
Number of microbial	ND	NA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NA	ND	NA	-

a: Fold concentration of recommended dosage

b: Negative control (Non-treatment)

c: Not available

d: Not detected

2. 가루자비의 토끼 (New Zealand White계)에 대한 피부자극성시험

가. 시험재료 및 방법

(1) 시험물질

- 물질명 : 가루자비
- 입수일 : 2014년 08월 11일
- 입수량 : 1 kg
- 시료번호 : 14-1-080
- 외관 및 성상 : 흰회색의 고상
- 주원료 : 뷰베리아 포자
- 주원료 투입비율 : 1×10^8 conidial/mL
- 보관조건 : 실온
- 공급원 : 안동대학교 산학협력단

(2) 시험동물

- 시험계 : 토끼 (New Zealand White계)
- 공급원 : 주식회사 코아텍
- 명칭 : 경기도 평택시 진위면 진위로 181-21
- 소재지 : 031-611-8221
- 연락처 : -

- 시험계의 선택사유

농촌진흥청고시 제 2013-21호 인축독성 시험기준과 방법에 백색토끼를 사용하도록 되어 있으며 New Zealand White계 토끼는 농약의 독성시험에 널리 사용되고 있어 기초자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험결과 해석 및 평가가 용이하여 선택되었다.

- 체중범위

구 분	입수시 체중 (kg)	처리시 체중 (kg)
시험동물	1.8 ~ 2.0	2.1 ~ 2.2

- 순화 및 검역

동물을 구입한 후 7일 동안 동물실험실의 환경하에서 순화시키면서 일반 건강상태를 관찰하여 건강한 개체만을 시험에 이용하였다.

- 군분리

군분리 시 제모를 실시하여 피부에 이상이 없는 동물만 선택하여 시험하였다.

- 개체식별

사육 상자에 개체식별정보를 부착하여 식별하였다.

(3) 사육환경 및 관리

- 사육환경

본 시험의 사육환경은 온도 23±2℃, 상대습도 50±10%, 환기시설 (공조기), 조명시간 12시간 (오전7시~오후7시) 및 조도 200 ~ 300 Lux의 실험실조건에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다.

- 사육상자

순화 및 시험기간 중 stainless steel 사육상자 (50×38×40 cm)안에 넣어 사육하였다.

- 사료 및 음용수

사료는 토끼용 펠릿사료 [Cargill Agri Purina Korea Inc.]를 자외선 멸균시켜 자유급식시켰으며 음용수는 정수필터를 통과한 지하수를 자유 섭취시켰다.

(4) 시험물질의 투여

- 시험군의 구성

실험동물은 건강하고 성숙한 동물 3마리를 사용하여 1군으로 구성하였다.

- 시험물질 조제

시험물질이 고상으로 처리부위에 직접 투여함으로 조제하지 않고 처리하였다.

- 투여량 설정

투여량은 투여 군별 공히 0.5 g로 설정하였다.

- 투여방법

실험동물은 시험물질 투여 24시간 전에 전기면도기를 이용하여 경배부 (등부위)의 털을 15×15cm 넓이로 제모한 다음 건강하고 깨끗한 피부를 가진 동물만을 사용하였다. 2×3 cm로 절개한 거즈를 이용하여 0.5 g을 정확히 평량하여 도포 후 증류수를 사용하여 흐르지 않게 습윤 처리하였다. 시험물질의 유실 및 방출을 방지하기 위해 비자극성테이프 (Tegaderm™, 3M社)와 Coban™ (self-adherent wrap, 3M社)으로 고정 유지시켜 시험물질이 경구 및 안점막 등 타 경로로 유입되지 않게 처리하였다. 대조부위는 증류수로 처리하여 처리부위와 증상관찰 비교 용도로 활용하였다.

- 시험물질의 제거

시험물질 처리 4시간 후 패치를 제거하고 피부에 묻은 잔여물질은 증류수로 세척하여 모두 제거 한 후 의료용 탈지면으로 물기를 흡수시킨 다음 케이지에 넣어 두었다.

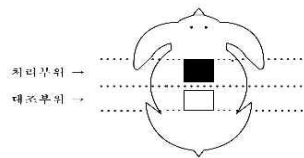


그림. 피부자극성시험 부위별 투여방법

(5) 관찰 및 측정

- 일반중독증상

시험물질 처리 후 72시간까지 일반증상의 변화, 중독증상 및 치사동물의 유·무를 관찰하였다.

- 체중 측정

시험물질 처리직전과 처리 후 48, 72시간에 개체별 체중을 측정하였다.

- 처리부위 관찰

시험물질 도포 종료 후 1, 24, 48 및 72시간에 홍반, 부종 및 가피형성 유·무를 관찰하였다.

- 피부반응의 평가 및 자극성의 판정

피부반응의 평가는 [피부반응 평가표]에 준하여 실시하였고 결과에 대한 자극성은 [피부 1차 자극표]의 자극성기준에 따라 자극성을 판정하였다.

- 피부반응 평가표

(1) 홍반과 가피형성	
홍반이 전혀 없음	0
아주 가벼운 홍반 (육안으로 겨우 식별할 정도)	1
분명한 홍반	2
약간 심한 홍반	3
심한 홍반 (홍당무 색의 발적)과 가벼운 정도의 가피형성	4
총 가능한홍반점수	4
(2) 부종형성	
부종이 전혀 없음	0
아주 가벼운 부종 (육안으로 겨우 식별할 정도)	1
가벼운 부종 (뚜렷하게 부어 올라서 변연부가 분명히 구별될 경우)	2
보통의 부종 (약 1 mm 정도 부어 올랐을 경우)	3
심한 부종 (1 mm 이상 부어오르고 노출부위 밖까지 확장된 상태)	4
총 가능한부종점수	4

- 피부 1차 자극표

자극성구분	기준
없 음	1차 피부자극지수 (P.I.)가 1.0 이하
경 도	1차 피부자극지수 (P.I.)가 1.1 ~ 2.0
중 도	1차 피부자극지수 (P.I.)가 2.1 ~ 5.0
강 도	1차 피부자극지수 (P.I.)가 5.1 이상

나. 시험결과

(1) 일반중독증상 및 치사 동물수 (표 1.)

모든 시험동물에 있어서 어떠한 일반증상도 관찰되지 않았으며, 치사동물 또한 발견되지 않았다.

(2) 체중변화 (표 2.)

시험물질 처리직전, 처리 후 48시간과 72시간에 개체별 체중을 측정된 결과, 시간이 경과함에 따라 증가추세를 보였다.

(3) 피부반응의 평가 (표 3.)

시험물질 노출 종료 후 1, 24, 48 및 72시간에 피부반응평가표를 기준으로 피부반응을 관찰한 결과, 시험물질 처리 후 홍반 및 부종 등의 어떠한 피부반응도 관찰되지 않았다.

(4) 자극성의 판정 (표 4.)

피부반응평가표에 의해 1차 피부자극지수 (Primary Irritation Index, P.I.I.)를 산출한 결과, P.I.I.는 “0.0” 이었고 피부 1차 자극표에 의해 자극성을 구분하면 “없음” 이었다. 이상의 결과로부터 가루자비는 New Zealand White계 토끼의 피부에 처리 시 자극성이 없는 물질로 구분되었다.

표 1. Mortality and clinical signs

Animal No.	Days after application				Mortality
	0	1	2	3	
1	NOR ^{a)}	NOR	NOR	NOR	0/3 ^{b)}
2	NOR	NOR	NOR	NOR	
3	NOR	NOR	NOR	NOR	

a) Normal

b) Number of dead animals/Number of tested animals

표 2. Body weight changes

Animal No.	Days after application (g)			
	0	2	3	Gain
1	2093.0	2302.5	2347.5	254.5
2	2222.5	2248.5	2308.5	86.0
3	2187.5	2215.0	2267.5	80.0
Mean	2167.7	2255.3	2307.8	140.2
S.D. ^{a)}	67.0	44.1	40.0	-

a) Standard Deviation

표 3. Evaluation of skin irritation (1/2)

Phases ^{a)}	Animal No.	Sites	Days after application			
			0	1	2	3
Erythema & Eschar	1	Control sites	0	0	0	0
		Test sites	0	0	0	0
	2	Control sites	0	0	0	0
		Test sites	0	0	0	0
	3	Control sites	0	0	0	0
		Test sites	0	0	0	0
Edema	1	Control sites	0	0	0	0
		Test sites	0	0	0	0
	2	Control sites	0	0	0	0
		Test sites	0	0	0	0
	3	Control sites	0	0	0	0
		Test sites	0	0	0	0

a) Time after topical application

표 4. Evaluation of skin irritation (2/2)

Sites	Control sites				Test sites			
	Erythema & Eschar		Edema		Erythema & Eschar		Edema	
Change	24 hr	72 hr	24 hr	72 hr	24 hr	72 hr	24 hr	72 hr
Phases ^{a)}	24 hr	72 hr	24 hr	72 hr	24 hr	72 hr	24 hr	72 hr
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	0	0	0	0	0	0	0	0
Mean	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Sum ^{b)}	0.0				0.0			
P.I.I. ^{c)}	0.0				0.0			

a) Time after topical application

b) Sum of means at 24 and 72hr

c) P.I.I. (Primary Irritation Index) = Total/2

3. New Zealand White계 토끼에 대한 가루자비의 안점막자극성시험

가. 시험재료 및 방법

(1) 시험물질

- 물질명 : 가루자비
- 입수일 : 2014년 08월 11일
- 입수량 : 1 kg
- 시료번호 : 14-1-080
- 외관 및 색상 : 흰회색의 고상
- 주원료 : 뷰베리아 포자
- 주원료 투입비율 : 1×10^8 conidial/mL
- 보관조건 : 실온
- 공급원 : 안동대학교 산학협력단

(2) 시험동물

- 시험계 New Zealand White계 토끼
- 공급원 주식회사 코아텍
- 명칭 경기도 평택시 진위면 진위로 181-21
- 소재지 031-611-8221
- 연락처

- 시험계의 선택사유

본 시험에 사용된 New Zealand White계 토끼는 안점막자극성시험에 널리 사용되고 있으며 본 계통에 대한 기초자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험결과 해석 및 평가가 용이하여 선택되었다.

- 체중범위

표 1. 시험동물의 체중범위

구 분	입수시 체중 (kg)	처리시 체중 (kg)
비세척군	1.8 ~ 2.0	2.0 ~ 2.2

- 순화 및 검역

실험동물이 입수된 후 7일 동안 동물실험실에서 순화시키면서 일반 건강상태를 관찰하여 건강한 개체를 선별, 본 시험에 사용하였다.

- 군분리

시험동물은 시험물질 처리 24시간 전에 양쪽 눈을 검사하여 눈에 이상이 없는 동물을 사용하였다.

- 개체식별

사육 상자에 개체식별정보를 부착하여 식별하였다.

(3) 사육환경 및 관리

- 사육환경

본 시험의 사육환경은 온도 23±2℃, 상대습도 50±10%, 환기시설 (공조기계), 조명시간 12시간 (오전7시~오후7시) 및 조도 200 ~ 300 Lux의 실험실조건에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다.

- 사육 상자

순화 및 시험기간 중 stainless steel 사육상자 (50×38×40 cm)안에 넣어 사육하였다.

- 사료 및 음용수

사료는 토끼용 펠렛사료 [Cargill Agri Purina Korea Inc.]를 자외선 멸균시켜 자유 급식시켰으며 음용수는 정수필터를 통과한 지하수를 자유 섭취시켰다.

(4) 시험물질의 처리

- 시험군의 구성

표 2. 시험군

군	동물수	좌우구분	처리
비세척군	3	좌 안	시험물질
		우 안	무 처 리

- 시험물질 조제

시험물질이 미세분말상태로 처리부위에 직접 투여함으로 조제하지 않고 처리하였다.

- 처리량 설정

시험물질인 가루자비는 미생물 친환경유기농업자재로 미생물 시험법에 의거 개체당 10⁷ 단위에 해당하는 약제를 투여해야 한다. 시험약제의 유효성분이 10⁸ cfu/mL 이므로 0.1 g을 처리약량으로 설정하였다.

- 처리방법

시험동물은 시험개시 전 24시간 이내에 양쪽 눈을 검사하여 눈에 이상이 없는 동물을 사용하였다. 약제처리는 좌안의 하안검을 가볍게 잡아당겨 결막낭 내에 시험물질 0.1 g을 한 번에 넣어 처리하고 시험물질의 손실을 막기 위해 양안검을 느슨하게 맞춰 잡고 약 1초간 유지하였다. 무처리한 우안은 대조부위로 하여 처리부위와 증상관찰 비교 용도로 활용하였다. 비세척군의 실험이므로 시험물질 처리 후 별도로 안구 세척은 실시하지 않았다.

(5) 관찰 및 측정

- 일반중독증상

시험물질 처리 후 72시간까지 일반증상의 변화, 중독증상 및 치사동물의 유·무를 관찰하였다.

- 체중 측정

시험물질 처리직전과 처리 후 48, 72시간에 개체별 체중을 측정하였다.

- 안반응 (眼反應)의 평가

안반응의 평가는 “안반응평가표”에 따라 실시하였다. 시험물질 처리 후 1, 24, 48시간 및 72시간에 각막혼탁, 홍채이상, 결막발적, 부종, 배출물 등 평점을 기록하였다.

- 자극성의 평가

안반응평가표에 의해 개체별 안자극 지수 (I.O.I., individual ocular irritation) 및 평균 안자극 지수 (M.O.I., mean ocular irritation)를 산출하여 평균안자극 지수 중 최고치를 급성안자극 지수 (A.O.I., acute ocular irritation)로 하였다. 이 결과로 안점막자극표를 이용하여 자극성의 정도를 평가하였다.

표 3. 안반응평가표

1) 각막	평점
(A) 혼탁 : 안구의 농후한 정도(가장 농후한 지점을 관찰함)	0
◦ 화농이나 혼탁이 없음	0
◦ 혼탁이 분산 혹은 밀집되어 있으나(정상적인 투명성이 약간 둔화 된 것과는 다름)홍채의 말단이 명확히 관찰됨	1
◦ 반투명한 부분이 쉽게 관찰됨, 홍채의 말단이 약간 불명확함	2
◦ 진주색깔을 나타냄, 홍채의 말단이 관찰안됨, 동공의 크기가 가까스로 관측됨	3
◦ 각막이 불투명, 혼탁 때문에 홍채가 관찰안됨	4
(B) 혼탁된 각막의 범위	
◦ 1/4이하(그러나 0은 아니다)	1
◦ 1/4이상 1/2미만	2
◦ 1/2이상 3/4미만	3
◦ 3/4이상 1까지	4
A×B×5 최대치 = 80	
2) 홍채	
(C) 반응치	
◦ 정상	0
◦ 현저한 주름의 형성, 충혈, 종창, 각막주위에 중등도의 충혈, 이상과 같은 단독 혹은 혼합, 홍채는 빛에 대해 반응함(둔한 반응은 양성)	1
◦ 빛에 대해 반응 없음, 충혈, 대부분 파괴(이상과 같은 증상의 일부 혹은 전부)	2
C×5 최대치 = 10	
3) 결막	
(D) 발적(안검결막, 안구결막에 한함, 홍채 제외)	
◦ 혈관은 정상	0
◦ 일부 혈관 충혈	1
◦ 얇은 선홍색을 띄거나 각각의 혈관이 쉽게 관찰 안됨	2
◦ 짙은 선홍색	3
(E) 결막부종	
◦ 부풀지 않음	0
◦ 정상보다 약간 종창(순막 포함)	1
◦ 안검의 부분적 외전을 동반한 현저한 종창	2
◦ 눈이 반쯤 잠길 정도의 안검의 종창	3
◦ 눈이 반 이상 잠길 정도의 안검의 종창	4
(F) 배출물	
◦ 배출물 없음	0
◦ 약간의 배출물(정상동물의 내부 눈꼬리에서 관찰되는 작은양 제외)	1
◦ 속눈썹과 눈꺼풀을 적실 정도의 배출물	2
◦ 눈주위의 상당한 부위와 속눈썹 및 눈꺼풀을 적실 정도의 배출물	3
점수(D+E+F) × 2 최대치 = 20	

표 4. 안점막자극표

자극성 구분	기 준
없 음	급성안자극지수 (A.O.I)가 10.0 이하
경 도	급성안자극지수 (A.O.I)가 10.1 ~ 30.0
중 도	급성안자극지수 (A.O.I)가 30.1 ~ 60.0
강 도	급성안자극지수 (A.O.I)가 60.1 이상

나. 시험결과

(1) 일반중독증상 및 치사동물 수 (표 1.)

모든 시험동물에 있어서 어떠한 일반중독증상도 관찰되지 않았으며, 치사동물 또한 발견되지 않았다.

(2) 체중변화 (표 2.)

시험물질 처리직전, 처리 후 48시간과 72시간에 개체별 체중을 측정된 결과, 시간이 경과함에 따라 증가추세를 보였다.

(3) 안반응의 평가 (표 3.)

표 5. 시험군별 안자극지수

Group	No eyes washed											
	1 hr			24 hr			48 hr			72 hr		
Animal No.	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
I.O.I. ^{a)}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M.O.I. ^{b)}	0.0			0.0			0.0			0.0		
A.O.I. ^{c)}	0.0											

a) I.O.I.(Individual Ocular Irritation)

b) M.O.I.(Mean Ocular Irritation)

c) A.O.I.(Acute Ocular Irritation) = the maximum value of M.O.I.

비세척군-1

- 1 시간째부터 72 시간째까지, 결막의 발적 및 부종에 대한 자극증상과 배출물이 관찰되지 않았다.

비세척군-2

- 1 시간째부터 72 시간째까지, 결막의 발적 및 부종에 대한 자극증상과 배출물이

관찰되지 않았다.

비세척군-3

- 1 시간째부터 72 시간째까지, 결막의 발적 및 부종에 대한 자극증상과 배출물이 관찰되지 않았다.

(4) 자극성의 판정 (표 3.)

안반응 평가표에 의해 평가된 안점막자극정도를 처리하여 급성안자극지수 (A.O.I.)를 산출한 결과, A.O.I.는 “0.0”이었다. 이상의 시험결과, New Zealand White계 토끼에 대한 가루자비의 안점막자극성시험에서 자극성은 [안점막자극표]에 의해 “없음”으로 평가되었다.

표 1. Mortality and clinical signs

Group	Animal No.	Days after application				Mortality
		0	1	2	3	
No eye washed	1	NOR ^{a)}	NOR	NOR	NOR	0/3 ^{b)}
	2	NOR	NOR	NOR	NOR	
	3	NOR	NOR	NOR	NOR	

a) Normal

b) Number of dead animals/Number of tested animals

표 2. Body weight changes

Group	Animal No.	Days after application (g)			
		0	2	3	Gain
No eye washed	1	2207.5	2268.0	2317.0	109.5
	2	2011.5	2051.0	2100.5	89.0
	3	2199.5	2263.5	2338.0	138.5
	Mean	2139.5	2194.2	2251.8	112.3
	S.D. ^{a)}	110.9	124.0	131.5	-

a) Standard Deviation

표 3. No eyes washed evaluation of eye irritation

Time	Animal No.	Cornea		Iris (C)	Conjunctiva			I.O.I. ^{a)}	M.O.I. ^{b)}	A.O.I. ^{c)}
		Degree of opacity (A)	Diffuse-areas of Opacity (B)		Redness (D)	Edema (E)	Lacrima (F)			
1 hr	1	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	
	2	0	0	0	0	0	0			
	3	0	0	0	0	0	0			
24 hr	1	0	0	0	0	0	0	0.0		
	2	0	0	0	0	0	0			
	3	0	0	0	0	0	0			
48 hr	1	0	0	0	0	0	0	0.0		
	2	0	0	0	0	0	0			
	3	0	0	0	0	0	0			
72 hr	1	0	0	0	0	0	0	0.0		
	2	0	0	0	0	0	0			
	3	0	0	0	0	0	0			

a) I.O.I. (Individual Ocular Irritation) = (A × B × 5)+(C × 5)+(D + E + F) × 2

b) M.O.I. (Mean Ocular Irritation)

c) A.O.I. (Acute Ocular Irritation) = The maximum value of M.O.I.

4. 가루자비의 담수어류 (잉어, *Cyprinus carpio*)에 대한 영향시험

가. 시험재료 및 방법

(1) 시험물질

- 물질명 : 가루자비
- 입수일 : 2015년 03월 05일
- 입수량 : 3 kg
- 시료번호 : 15-1-009
- 외관 및 성상 : 흰회색의 고상
- 주원료 : 뷰베리아 포자
- 주원료 투입비율 : 1×10^8 conidial/mL
- 보관조건 : 실온
- 공급원 : 안동대학교 산학협력단

(2) 시험생물

- 시험어종 (학명) 잉어 (*Cyprinus Carpio*)
- 시험종 선정이유 본 시험에 사용된 *Cyprinus Carpio*는 수생 생태계의 유해성 평가에 널리 사용되고 있고, 본 계통에 관한 비교할 수 있는 충분한 시험기초자료가 축적되어 있으며, 농촌진흥청 및 OECD 가이드라인에서 추천된 종이기에 때문에 선정하였다.

- 공급원

명칭 경북민물고기연구센터
소재지 경북 영덕군 병곡면 고래불로 178
연락처 054-783-9413

- 부화일 2014년 06월 20일
- 입수일 2014년 09월 01일

- 사육

사육장소 GLP 연구동 잉어사육실
사육온도 20.0~24.0℃
광조건 조명 16시간, 암 8시간
먹이급이 1일 1~2회 급이, Top Meal, 제일사료㈜

(3) 시험방법

- 순화

순화장소 GLP 연구동 어독성실험실
사용수조 시험어류의 단위체중 1 g 당 시험용수의 양이 1 L가 넘도록 80 L (30×60×45 cm) 용량의 직육면체 수조를 사용하였다.

순화환경 순화기간동안 시험조건과 동일한 수온에서 유지되도록 하였으며, 순화중인 사육수의 용존산소량을 포화농도의 80%이상으로 유지하기 위하여 연속폭기로

산소공급을 실시하였다.

순화온도 20.0~24.0℃

광조건 조명 16시간, 암 8시간

마리수 및 기간 독성시험에 필요한 마리수의 110%를 시험시작 7일전에 순화하였다. 먹이급이 사육시 공급한 사료를 1일 1회 급이 하였다.

- 시험물질 적용방법

사용수조 원통형의 유리제품 24 L (높이 38 cm×Ø 30 cm) 용기

노출기간 시험물질 노출개시일로 부터 30일

시험용수 지하수를 전처리필터 (1.0 µm)와 중간필터 (0.5 µm) 또한 세균제거필터 (0.1 µm)로 정수된 지하수로 1주 이상 연속 폭기하며 정제하여 사용하였다. 수온은 순화온도와 동일한 범위 (20.0~24.0℃)내로 유지하되 시험기간 중 수온의 변화는 ±1℃ 이상 변화되지 않도록 하였다. 또한 시험용수의 용존산소량은 최소한 포화농도의 60%를 유지하도록 하였다.

- 시험농도설정

예비시험 결과, 단위면적당 살포량을 수심 15cm 물 중에 직접 살포한 경우로 환산한 농도의 1000배인 2.1×10^5 conidial/mL와 10배 낮은 농도인 2.1×10^4 conidial/mL 사이에 최대무작용량이 있을 것으로 예측되어 2.1×10^4 , 6.6×10^4 및 2.1×10^5 conidial/mL의 3개 시험농도를 설정하여 용량반응 시험을 실시하였다.

- 시험물질의 조제

시험물질인 가루자비 4.2, 13.3 및 42.0 g을 각각 3번씩 정확하게 평량하여 24 L 시험수조에 넣고 20 L가 되도록 시험용수를 채운 후 완전히 현탁될 때 까지 충분히 교반시켜 시험용수로 사용하였다.

- 시험생물수

군	농도 (conidial/mL)	반복수	생물수(마리)
음성대조군	-	1	10
시험물질 처리군	2.1×10^4	3	30
	6.6×10^4	3	30
	2.1×10^5	3	30

- 시험용액 교체시기

본 시험전에 실시한 농도유지확인 시험결과 시험물질을 노출한 후 시간이 경과함에 따라 시험용수 중 미생물농도는 7일차까지 최초 노출시 보다 상회하는 농도가 유지되는 것을 확인하였다. 따라서 시험용액을 주 1회 (월요일) 간격으로 교체하여 반지수식으로

시험을 진행하였다. 시험용액의 교체는 시험 실시 후 7, 14, 21, 28일에 실시하였다.

- 산소공급

시험기간 동안 에어스톤(Airstone)을 시험수조에 설치하여 연속하여 산소를 공급하였다.

- 시험기간 중 시험어 먹이급여

30일의 시험기간 동안 어체중의 약 3%에 해당하는 양을 매일 사료급여 하였다.

- 시험 대조구

음성대조군 시험용수인 지하수로 음성대조군시험을 실시하였다.

양성대조군 Pentachlorophenol sodium salt (KANTO CHEMICAL, JAPAN Lot.30602312)를 양성대조물질로 하여 0.050, 0.071, 0.100, 0.141, 0.200 mg/L (공비 1.41)로 시험한 GLP 급성어류독성시험 (14-KET-PC002)결과를 적용하였다 (2014.06.16-2014.06.20).

(4) 관찰 및 측정

- 중독증상 및 치사율

시험개시 1시간 후 그리고 24시간 간격으로 일반중독증상 및 치사어를 기록하였으며 치사어의 판정은 공시어에 유리막대로 건드렸을 때 움직임이 없거나 아가미 호흡이 중단된 경우 치사로 판정하였다.

- 수질측정 (수온, pH, DO) 조사시기 및 방법

시험기간 중 수질검사는 시험물질 처리 1시간 후에 측정하였고 주기적 (주 1회 [월])으로 측정하여 조사하였다. 수온은 유리제 수온온도계로, pH 및 DO는 Orion 4 star (Thermo SCIENTIFIC)모델로 측정하였고, 경도의 측정은 HI-96735-total (HANNA) 모델을 사용하여 조사하였다.

- 전장 및 체중 측정

시험 시작 전 순화 중인 시험어 10마리를 무작위로 선별하여 전장 및 체중을 측정하였고, 시험 종료 후 음성대조군 10마리 및 시험물질 처리군 전 개체 중 각 농도별로 살아있는 개체 10마리씩을 무작위로 선별하여 전장 및 체중을 측정하였다.

- 시험용액의 미생물 측정

미생물 검출에 사용된 배지는 Potato Dextrose Agar (Difco, Lot NO.4155898)를 1 L당 39 g 평량하여 121℃에서 15분간 멸균한 후 Plate를 만들어 사용하였다. 미생물의 측정을 위하여 시료채취는 주 1회 (월) 실시하였으며 채취한 sample을 2.1×10^4 conidial/mL와 6.6×10^4 conidial/mL 농도군은 1×10^1 배로, 2.1×10^5 conidial/mL 농도군은 1×10^2 배로 희석하여 미리 준비한 Potato Dextrose Agar plate에 100 μ L씩 분주하여 도말한 후 30℃에서 48시간 배양하여 미생물 수를 육안으로 측정하였다.

- 병리검사

시험기간 중 치사나 병원성을 보인 개체는 치사가 발견된 당일 시험생물 조직을 homogenizer로 분쇄한 후 희석하여 미리 준비한 Potato Dextrose Agar plate에 도말한 후 30℃에서 48시간 배양하여 미생물 수를 육안으로 측정하였고, 종료 후 생존한 전 개체를 부검하여 육안으로 미생물 감염여부를 대조구와 비교하여 검사하였다.

- 최대무작용량 (NOEC) 산출법

2.1×10^4 , 6.6×10^4 및 2.1×10^5 conidial/mL의 3개 농도로 용량반응 시험을 실시하여 최대무작용량 (NOEC)를 확인하였다.

나. 시험결과

(1) 누적치사수 및 일반증상 (표 1, 2)

가루자비의 잉어(*Cyprinus carpio*)에 대한 담수어류영향시험을 시험농도 2.1×10^4 , 6.6×10^4 및 2.1×10^5 conidial/mL로 30일 동안 반지수식으로 실시한 결과 2.1×10^5 conidial/mL 농도군에서는 2일차 관찰시 30마리의 치사 개체가 관찰되었고, 2.1×10^4 conidial/mL, 6.6×10^4 농도군에서는 시험 종료시까지 치사 개체가 관찰되지 않았다.

각 농도군의 생존한 개체에서는 시험기간 중 어떠한 중독증상도 관찰되지 않았다.

(2) pH 및 DO (표 3, 4)

시험용수의 pH는 음성대조군에서 7.55 (7.45~7.64)이었고, 2.1×10^4 conidial/mL 농도군에서는 7.62 (7.45~7.77), 6.6×10^4 conidial/mL 농도군에서는 7.64 (7.50~7.79), 2.1×10^5 conidial/mL 농도군에서는 7.60 (7.55~7.67)이었다.

시험용수의 DO는 음성대조군에서 97.9 %_{sat.} (87.2~108.3)이었고, 2.1×10^4 conidial/mL 농도군에서는 95.7 %_{sat.} (84.7~104.9), 6.6×10^4 conidial/mL 농도군에서는 95.9 %_{sat.} (84.6~107.4), 2.1×10^5 conidial/mL 농도군에서는 87.3 %_{sat.} (83.9~89.1)이었다.

(3) 수온 및 경도 (표 5, 6)

시험용수의 수온은 음성대조군에서 21.8 °C (21.3~22.1 °C)이었고, 2.1×10^4 conidial/mL 농도군에서는 21.5 °C (21.3~22.1 °C), 6.6×10^4 conidial/mL 농도군에서는 21.4 °C (21.2~21.7 °C), 2.1×10^5 conidial/mL 농도군에서는 21.4 °C (21.3~21.4 °C)이었다.

시험용수의 경도는 음성대조군에서 56 mg/L CaCO₃ (50~64 mg/L CaCO₃)이었고, 2.1×10^4 conidial/mL 농도군에서는 56 mg/L CaCO₃ (54~61 mg/L CaCO₃), 6.6×10^4 conidial/mL 농도군에서는 56 mg/L CaCO₃ (53~60 mg/L CaCO₃), 2.1×10^5 conidial/mL 농도군에서는 56 mg/L CaCO₃이었다.

(4) 전장 및 체중 (표 7)

시험시작 전 무작위 10마리의 체장은 4.71 ± 0.17 cm 이었고, 체중은 1.08 ± 0.13 g 이었다. 시험종료 후 시험생물의 체장은 음성대조군에서 4.75 ± 0.31 cm 이었고, 2.1×10^4 conidial/mL 농도군에서는 4.74 ± 0.37 cm, 6.6×10^4 conidial/mL 농도군에서는 4.91 ± 0.35 이었다.

시험종료 후 시험생물의 체중은 음성대조군에서 1.18 ± 0.25 g 이었고, 2.1×10^4 conidial/mL 농도군에서는 1.23 ± 0.33 g, 6.6×10^4 conidial/mL 농도군에서는 1.20 ± 0.27 이었다. 2.1×10^5 conidial/mL 농도군에서는 시험종료 시 생존한 개체가 없어 전장 및 체중을 측정하지 않았다.

(5) 시험용액의 미생물 측정 (표 8, 9)

농도유지확인시험기간 중 0, 1, 2, 3, 4, 7일에 시험용액의 미생물을 측정하여 미생물의 농도가 유지되는지 확인하여 표 8에 정리하였고, 시험기간 중 실험시작일과 미생물 농도 유지를 위하여 시험물질을 재처리한 7, 14, 21, 28일에 시험용액의 미생물을 측정하여 표 9에 정리하였다.

(6) 병리검사

시험기간 중 치사나 병원성을 보인 개체는 치사가 발견된 당일 시험생물 조직을 homogenizer로 분쇄한 후 멸균 증류수로 회석하여 미리 준비한 Potato Dextrose Agar plate에 도말한 후 30°C에서 48시간 배양하여 미생물 수를 육안으로 측정하여 표 10에 정리하였고, 시험 종료 후 생존한 전 개체에 대해 부검하여 육안으로 미생물 감염여부를 실시한 결과 아가미, 장기 및 근육에 대해 대조군과 비교하였을 때 육안상 차이를 발견할 수 없었다. 이상의 시험결과가루자비의 잉어에 대한 30일 동안 최대무작용량 (NOEC)은 6.6×10^4 conidial/mL 이었고, 반수치사농도 (LC₅₀)는 6.6×10^4 conidial/mL 이상이었다.

㉟ 1. Cumulative mortality of *Cyprinus carpio*

Nominal concentration (conidial/mL)	Number of fish	Cumulative mortality							
		0day	1day	2day	3day	4day	5day	6day	7day
Control	10	0	0	0	0	0	0	0	0
2.1×10 ⁴	30	0	0	0	0	0	0	0	0
6.6×10 ⁴	30	0	0	0	0	0	0	0	0
2.1×10 ⁵	30	0	0	30	30	30	30	30	30

Nominal concentration (conidial/mL)	Number of fish	Cumulative mortality							
		8day	9day	10 day	11 day	12 day	13 day	14 day	15 day
Control	10	0	0	0	0	0	0	0	0
2.1×10 ⁴	30	0	0	0	0	0	0	0	0
6.6×10 ⁴	30	0	0	0	0	0	0	0	0
2.1×10 ⁵	30	30	30	30	30	30	30	30	30

Nominal concentration (conidial/mL)	Number of fish	Cumulative mortality							
		16 day	17 day	18 day	19 day	20 day	21 day	22 day	23 day
Control	10	0	0	0	0	0	0	0	0
2.1×10 ⁴	30	0	0	0	0	0	0	0	0
6.6×10 ⁴	30	0	0	0	0	0	0	0	0
2.1×10 ⁵	30	30	30	30	30	30	30	30	30

Nominal concentration (conidial/mL)	Number of fish	Cumulative mortality							
		24 day	25 day	26 day	27 day	28 day	29 day	30 day	
Control	10	0	0	0	0	0	0	0	
2.1×10 ⁴	30	0	0	0	0	0	0	0	
6.6×10 ⁴	30	0	0	0	0	0	0	0	
2.1×10 ⁵	30	30	30	30	30	30	30	30	

㉟ 2. Abnormal response of *Cyprinus carpio*

Nominal concentration (conidial/mL)	Number of fish	Abnormal response							
		0day	1day	2day	3day	4day	5day	6day	7day
Control	10	N ^a (10 ^b)	N(10)	N(10)	N(10)	N(10)	N(10)	N(10)	N(10)
2.1×10 ⁴	30	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)
6.6×10 ⁴	30	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)
2.1×10 ⁵	30	N(30)	N(30)	NA ^c	NA	NA	NA	NA	NA

Nominal concentration (conidial/mL)	Number of fish	Cumulative mortality							
		8day	9day	10 day	11 day	12 day	13 day	14 day	15 day
Control	10	N ^a (10 ^b)	N(10)	N(10)	N(10)	N(10)	N(10)	N(10)	N(10)
2.1×10 ⁴	30	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)
6.6×10 ⁴	30	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)
2.1×10 ⁵	30	NA ^c	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Nominal concentration (conidial/mL)	Number of fish	Cumulative mortality							
		16 day	17 day	18 day	19 day	20 day	21 day	22 day	23 day
Control	10	N ^a (10 ^b)	N(10)	N(10)	N(10)	N(10)	N(10)	N(10)	N(10)
2.1×10 ⁴	30	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)
6.6×10 ⁴	30	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)
2.1×10 ⁵	30	NA ^c	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Nominal concentration (conidial/mL)	Number of fish	Cumulative mortality							
		24 day	25 day	26 day	27 day	28 day	29 day	30 day	
Control	10	N ^a (10 ^b)	N(10)	N(10)	N(10)	N(10)	N(10)	N(10)	
2.1×10 ⁴	30	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)	
6.6×10 ⁴	30	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)	
2.1×10 ⁵	30	NA ^c	NA	NA	NA	NA	NA	NA	

a: Normal

b: Number of fish

c: Not applicable

표 3. pH-values

Nominal concentration (conidial/mL)	0 day	7 day	14 day	21 day	28 day
Control	7.56	7.45	7.64	7.56	7.54
2.1×10 ⁴	7.60	7.48	7.73	7.71	7.59
6.6×10 ⁴	7.59	7.54	7.76	7.70	7.58
2.1×10 ⁵	7.60	NA ^a	NA	NA	NA

pH meter - Orion 4 star [Thermo SCIENTIFIC]

a: Not applicable

표 4. Dissolved oxygen concentration

Nominal concentration (conidial/mL)	0 day	7 day	14 day	21 day	28 day
Control	87.2 ^a	97.2	101.9	94.7	108.3
2.1×10 ⁴	86.3	98.4	96.2	94.3	103.1
6.6×10 ⁴	85.1	96.8	94.8	97.0	105.9
2.1×10 ⁵	87.3	NA ^b	NA	NA	NA

DO meter - Orion 4 star [Thermo SCIENTIFIC]

a: Unit - %_{sat}.

b: Not applicable

표 5. Changes of water temperature

Nominal concentration (conidial/mL)	0 day	7 day	14 day	21 day	28 day
Control	21.3 ^a	22.1	22.1	21.6	21.7
2.1×10 ⁴	21.3	21.6	21.6	21.5	21.6
6.6×10 ⁴	21.4	21.4	21.5	21.4	21.3
2.1×10 ⁵	21.4	NA ^b	NA	NA	NA

a: Unit - °C

b: Not applicable

표 6. Changes of water hardness

Nominal concentration (conidial/mL)	0 day	7 day	14 day	21 day	28 day
Control	54	54	64	58	50
2.1×10 ⁴	54	57	56	61	54
6.6×10 ⁴	53	54	60	59	53
2.1×10 ⁵	56	NA ^a	NA	NA	NA

Hardness meter - HI-96735-total [HANNA]

a: Not applicable

표 7. Size and Body weight measured of *Cyprinus carpio*

Day	Size (cm)	Body weight (g)
0 ^a	4.71±0.17 ^c	1.08±0.13
30 (Control)	4.75±0.31	1.18±0.25
30 (2.1×10 ⁴ conidial/mL) ^b	4.74±0.37	1.23±0.33
30 (6.6×10 ⁴ conidial/mL) ^b	4.91±0.35	1.20±0.27
30 (2.1×10 ⁵ conidial/mL) ^b	NA ^d	NA

a: 시험시작 전 시험생물 순화조에서 무작위 10마리의 측정결과

b: 시험종료 후 무작위 10마리의 측정결과

c: Mean±Standard deviation

d: Not applicable

표 8. 시험용수의 미생물 측정 (농도유지확인시험)

Nominal concentration (conidial/mL)	관측된 미생물 농도 ^a (conidial/mL)						
	회석배수	0 day	1 day	2 day	3 day	4 day	7 day
2.1×10 ⁵	1×10 ³	1013.3	UC ^b	UC	UC	UC	UC
	1×10 ⁴	108.0	666.7	500.7	890.7	1032.0	UC
	1×10 ⁵	10.3	42.0	81.0	97.7	133.7	590.7

a: 30°C에서 48시간 배양 후 관측한 자료

b: UC (Uncountable), 균수가 많아 측정이 불가

표 9. 시험용수의 미생물 측정 (본시험)

Nominal concentration (conidial/mL)	관측된 미생물 농도 ^a (conidial/mL)				
	0 day	7 day	14 day	21 day	28 day
2.1×10 ⁴	295.8 ^b	519.6	514.2	497.8	434.7
6.6×10 ⁴	934.7	1134.9	1252.2	771.6	1201.8
2.1×10 ⁵	254.1	NA ^c	NA	NA	NA

a: 30℃에서 48시간 배양 후 관측한 자료

b: 10²으로 희석하여 관찰

c: Not applicable

표 10. 치사개체 조직의 미생물 측정

Nominal concentration (conidial/mL)	관측된 미생물 농도 ^a (×10 ³ conidial/mL)	
	치사여 발생일 조직	2 day
2.1×10 ⁵	아가미	ND ^b
	간	ND
	부레	ND

a: 30℃에서 48시간 배양 후 관측한 자료

b: Not detected

표 11. LC₅₀ values

Test substance	LC ₅₀ (mg/L)			NOEC ^d
	48 hr	96 hr	30 day	
control	NA ^b	NA	-	-
PCP-Na salt ^a (14-KET-PC002)	0.101 ^c	0.101	-	-
가루자비	-	-	> 6.6×10 ⁴ conidial/mL	6.6×10 ⁴ conidial/mL

a: Duration of reference substance test ; 2014.06.16-2014.06.20

b: Not applicable

c: Active ingredient

d: Lowest observed effect concentration

5. 가루자비의 랫드에 대한 급성경구독성/병원성시험

가. 시험재료 및 방법

(1) 시험물질

- 물질명: 가루자비
- 입수일: 2014년 08월 11일
- 입수량: 1 kg
- 시료번호: 14-1-080
- 외관 및 색상: 흰회색의 고상
- 주원료: 뷰베리아 포자
- 주원료 투입비율: 1 × 10⁸ conidial/mL
- 보관조건: 냉장
- 공급원: 안동대학교 산학협력단

(2) 시험동물

- 시험계: SPF SD Rat
- 공급원 명칭: (주) 코아텍
- 소재지: 경기도 평택시 진위면 진위로 181-21
- 연락처: 031-611-8221

- 시험계의 선택사유

농촌진흥청고시 제 2013-21호 인축 독성 시험기준과 방법에 시험동물로 랫드를 추천하고 있으며, SD계통은 농약의 독성시험에 널리 사용되고 있어 기초자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험결과 해석 및 평가가 용이하기 때문이다.

- 주령 및 체중범위

구 분	Male	Female
구입시 주령	7주령	7주령
구입시 체중	189.5 ~ 199.5	156.0 ~ 166.0
투여시 주령	8주령	8주령
투여시 체중	209.5 ~ 245.0	167.0 ~ 197.0

- 순화 및 검역

동물을 구입한 후 6일 동안 동물실험실의 환경하에서 순화시키면서 일반 건강상태를 관찰하여 건강한 개체를 선별, 본 시험에 사용하였다.

(3) 사육환경 및 관리

- 사육환경

본 시험의 사육환경은 온도 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$, 환기시설 (공조기계), 조명 시간 12시간 (오전7시~오후7시) 및 조도 200 ~ 300 Lux의 실험실조건에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다.

- 사육상자

순화 및 시험기간 중 폴리카보네이트 사육상자 (26 × 42 × 18 cm)에 3마리씩 넣어 깔짚을 깔아 사육하였다.

- 사료 및 음용수

사료는 실험동물용 고형사료[E.P 수퍼피드(주)]를 자외선 멸균시켜 자유급식 시켰으며 음용수는 정수필터를 통과한 지하수를 자유 섭취시켰다.

(4) 투여약량수준설정 및 약제조제

- 투여약량수준설정

“농촌진흥청고시 제 2013-21호 농약의 독성시험기준과 방법”에 의하면 경구병원성시험의 투여농도는 개체당 10^8 단위에 해당되는 미생물을 투여하도록 되어있다. 시험약제의 미생물농도는 1.0×10^8 cfu/g 고상이므로 증류수로 50% 희석하여 2.0 mL/개체를 투여약량으로 설정하였다. 투여약량 2.0 mL/개체 투여 시 노출되는 시험약제의 미생물 수는 1.0×10^8 cfu/개체가 된다.

- 투여약량수준별 시험동물수

시험군 (투여군)은 암수 각각 3마리씩 24마리를 4군 (중간부검군-3개군, 최종부검군)으로 하였으며 각 군의 비투여대조군으로 암수 각 2마리씩 16마리, 총 40마리를 사용하여 시험하였다. 사용된 용매는 증류수이기에 용매대조군을 따로 설정하지 않았다.

표 1. 시험군별 시험동물수

구분		중간부검군			최종부검군 (21일차)
		3일차	7일차	14일차	
시험군	Male	3 ¹⁾	3	3	3
	Female	3	3	3	3
비투여대조군	Male	2	2	2	2
	Female	2	2	2	2

¹⁾단위 : 마리수

- 미생물 수 측정에 사용된 배지

미생물 검출에 사용된 배지는 Potato Dextrose Agar (Difco, Lot NO.3025438)를 1

L당 39.0 g 평량하여 121℃에서 15분간 멸균한 후 Plate를 만들어 사용하였다.

- 용매의 선택과 시험용액 조제

시험물질이 고상이므로 증류수로 50% 희석해 조제하였다.

- 투여액량 (volume)설정

투여약량수준별 2.0 mL/개체로 설정하여 시험하였다.

(5) 시험물질의 투여

- 사료의 절식

시험용액 투여하기 전 하루밤 정도 먹이를 주지 않았고, 사료는 투여 3~4시간 후에 급여하였다.

- 투여경로 및 투여방법

Rat 경구투여용 зонде (Sonde)를 이용하여 경구투여경로를 이용하여 위내 1회 강제 투여하였다.

(6) 관찰 및 검사항목

- 일반중독증상 및 치사동물

투여 당일은 투여 후 매일 1회 이상 일반중독증상 및 치사된 동물수를 21일간 관찰·조사하였다.

- 체중 측정

시험물질 투여직전, 투여 후 3일, 주 1회 및 부검 시 에 측정하였다.

- 부검

시험용액 투여 후 3일, 7일, 14일 및 21일에 CO₂ 마취시켜 부검하여 내부장기의 육안적 이상유무를 관찰하였다.

- 미생물 체외 배출상황

시험용액 투여 후 1일, 3일, 7일 및 14일째 대변을 채취하여 멸균생리식염수에 넣고 균질화 한 다음 10⁵ 도말 희석하여 Potato Dextrose Agar Plate 에 접종한 후 30℃에서 24시간 배양하여 미생물 수를 육안적으로 측정하였다.

- 미생물의 체내잔존상황

시험용액 투여 후 3일, 7일, 14일 및 21일째에 부검하여 신장, 뇌, 간장, 폐, 비장, 위, 혈액, 임파절을 채취하여 멸균생리식염수에 넣고 균질화 한 다음 10⁵ 도말 희석하여 Potato Dextrose Agar Plate 에 접종한 후 30℃에서 24시간 배양하여 미생물 수를 육안으로 측정하였다.

나. 시험결과

(1) 일반중독증상 및 치사동물

본 시험에서 경구투여 후 일반중독증상은 관찰되지 않았으며, 치사동물은 없었다.

(2) 체중변화

체중변화는 암·수 모두에서 시험 종료 시 까지 시간이 경과함에 따라 증가추세를 보였다.

(3) 부검소견

각 부검군별 3일, 7일, 14일 및 21일째에 CO₂ gas로 마취시킨 후 부검하여 주요 장기에 대하여 육안관찰을 실시한 결과 약제투여에 의한 특이한 이상증상은 관찰되지 않았다.

(4) 미생물 체외 배출상황

시험물질 투여 후 1일, 3일, 7일 및 14일째에 대변을 채취하여 체외 배출 미생물수를 측정 한 결과 암·수 모두에게서 미생물이 검출되지 않았다.

(5) 미생물 체내 잔존상황

시험물질 투여 후 3일, 7일, 14일 및 21일째에 부검하여 신장, 뇌, 간장, 폐, 비장, 위, 혈액, 임파절에서의 미생물 수를 측정 한 결과, 어떤 장기에서도 가루자비에 의한 미생물은 검출되지 않았다.

이상의 시험결과, 가루자비의 랫드에 대한 단회 경구투여 시 어떤 장기에서도 미생물이 검출되지 않았고, 채취한 대변에서도 미생물이 검출되지 않았으며, 부검 시에는 어떠한 이상증상도 관찰되지 않았다. 따라서 가루자비의 1.0 × 10⁸ 단위 (cfu/개체)에 해당하는 미생물을 랫드에 단회 경구투여 시 주요 장기에서 잔존하지 않았으며 실험종료 시까지 중독 증상 및 치사가 없는 것으로 보아 급성독성으로 인한 영향은 없는 것으로 판단된다.

표 1. 시험기간중 시험생물 치사 및 중독증상

구분	성별	시험생물수	치사수	중독증상
시험군 (투여군)	Male	12	0	N.D. ¹⁾
	Female	12	0	N.D.
대조군 (비투여군)	Male	8	0	N.D.
	Female	8	0	N.D.

¹⁾N.D. : Not Detected

표 2. 시험생물체중변화

(단위 : g)

구분	성별	투여 후 경과일수				
		투여전	3일	7일	14일	21일
시험군 (투여군)	Male	222.8	265.2	297.1	314.8	371.2
		± 6.6	± 8.3	± 12.4	± 41.7	± 10.7
	Female	173.5	198.7	211.3	230.8	240.8
		± 3.9	± 7.0	± 8.7	± 11.7	± 0.3
대조군 (비투여군)	Male	238.1	262.3	297.2	325.8	352.5
		± 3.8	± 5.9	± 18.6	± 6.6	± 4.9
	Female	189.1	199.2	211.4	226.1	240.3
		± 4.6	± 5.6	± 4.7	± 6.8	± 7.4
마리수		8	8	6	4	2

표 3. 부검 후 육안적 관찰소견

부검소견	부검동물수	시험군 (투여군)		대조군 (비투여군)	
		Male	Female	Male	Female
N ¹⁾	40	12	12	8	8

¹⁾N : Normal

표 4. 미생물 관찰

장기	투여 후 경과일									
	시험군 (투여군)					대조군 (비투여군)				
	1	3	7	14	22	1	3	7	14	22
대변	N.D. ¹⁾	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-
신장	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
뇌	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
간장	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
폐	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
비장	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
위	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
혈액	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
임파절	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

¹⁾N.D. : Not Detected

표 5. 임상관찰기록 : 시험군 (투여군)

성별	부검일	No. ¹⁾	투여 후 경과일											
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Male	3	1101	N ²⁾	N	N	N	N	-	-	-	-	-	-	-
		1102	N	N	N	N	-	-	-	-	-	-	-	
		1103	N	N	N	N	-	-	-	-	-	-	-	
	7	1204	N	N	N	N	N	N	N	N	N	-	-	-
		1205	N	N	N	N	N	N	N	N	N	-	-	-
		1206	N	N	N	N	N	N	N	N	N	-	-	-
	14	1307	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1308	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1309	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	21	1410	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1411	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1412	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
			No.	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
	14	1307	N	N	N	N	-	-	-	-	-	-	-	-
		1308	N	N	N	N	-	-	-	-	-	-	-	-
		1309	N	N	N	N	-	-	-	-	-	-	-	-
	21	1410	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1411	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1412	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
			No.	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	3	2101	N	N	N	N	-	-	-	-	-	-	-	-
2102		N	N	N	N	-	-	-	-	-	-	-	-	
2103		N	N	N	N	-	-	-	-	-	-	-	-	
7	2204	N	N	N	N	N	N	N	N	N	-	-	-	
	2205	N	N	N	N	N	N	N	N	N	-	-	-	
	2206	N	N	N	N	N	N	N	N	N	-	-	-	
14	2307	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	2308	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	2309	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
21	2410	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	2411	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	2412	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		No.	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
14	2307	N	N	N	N	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2308	N	N	N	N	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2309	N	N	N	N	-	-	-	-	-	-	-	-	
21	2410	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	2411	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	2412	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	

¹⁾No. : 동물번호, ²⁾N : No Abnormality Detected

표 6. 임상관찰기록 : 대조군 (비투여군)

성별	부검일	No. ¹⁾	투여 후 경과일											
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Male	3	3101	N ²⁾	N	N	N	-	-	-	-	-	-	-	-
		3102	N	N	N	N	-	-	-	-	-	-	-	-
	7	3203	N	N	N	N	N	N	N	N	-	-	-	-
		3204	N	N	N	N	N	N	N	N	-	-	-	-
	14	3305	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3306	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	21	3407	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3408	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		No.	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
	14	3305	N	N	N	N	-	-	-	-	-	-	-	-
		3306	N	N	N	N	-	-	-	-	-	-	-	-
	21	3407	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3408	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		No.	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Female	3	4101	N	N	N	N	-	-	-	-	-	-	-	
		4102	N	N	N	N	-	-	-	-	-	-	-	
	7	4203	N	N	N	N	N	N	N	N	-	-	-	-
		4204	N	N	N	N	N	N	N	N	-	-	-	-
	14	4305	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		4306	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	21	4407	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		4408	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		No.	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
	14	4305	N	N	N	N	-	-	-	-	-	-	-	-
		4306	N	N	N	N	-	-	-	-	-	-	-	-
	21	4407	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		4408	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

¹⁾No. : 동물번호, ²⁾N : No Abnormality Detected

표 7. 동물체중측정치 : 시험군 (투여군)

(단위 : g)

성별	No. ¹⁾	투여 후 경과일				
		0	3	7	14	21
Male	1101	226.5	261.5			
	1102	218.5	260.0			
	1103	218.5	262.0			
	1204	224.0	275.5	310.5		
	1205	216.5	262.5	289.5		
	1206	217.0	263.0	288.5		
	1307	209.5	246.5	275.0	301.0	
	1308	228.5	264.5	287.0	315.0	
	1309	226.0	268.0	305.5	337.5	
	1410	230.0	269.5	303.5	239.0	359.0
	1411	227.5	270.5	304.0	345.0	379.0
	1412	230.5	279.0	310.0	351.0	375.5
	2101	171.5	191.5			
	2102	177.0	199.0			
2103	175.0	201.5				
2204	177.0	200.0	214.0			
2205	167.0	187.5	199.0			
2206	175.5	203.0	210.5			
2307	175.5	208.0	219.5	240.0		
2308	168.5	194.5	205.0	221.0		
2309	179.5	212.0	228.0	243.0		
2410	170.0	193.5	211.0	241.0	240.5	
2411	175.0	200.0	211.5	223.0	241.0	
2412	170.0	193.5	203.5	217.0	241.0	

¹⁾No. : 동물번호

표 8. 동물체중측정치 : 대조군 (비투여군)

(단위 : g)

성별	No. ¹⁾	투여 후 경과일				
		0	3	7	14	21
Male	3101	236.0	259.5			
	3102	239.0	259.5			
	3203	236.5	256.0	271.0		
	3204	235.5	257.0	280.5		
	3305	245.0	272.5	313.0	321.5	
	3306	237.5	265.5	294.5	329.5	
	3407	242.0	268.5	317.5	333.0	356.0
	3408	233.5	260.0	306.5	319.0	349.0
Female	4101	197.0	206.5	216.0		
	4102	192.0	201.5	213.0		
	4203	186.0	194.5	206.0	229.5	
	4204	189.0	203.0	214.5	230.0	
	4305	184.0	197.0	205.0	216.0	235.0
	4306	192.0	205.0	214.0	229.0	245.5
	4407	197.0	198.5	205.5	224.5	247.5
	4408	191.0	204.0	219.0	222.5	236.5

¹⁾No. : 동물번호

표 9. 부검일지 : 시험군 (투여군)-Male

시험동물번호 : 1101	노출량 : 1.0×10^8	cfu/개체	부검시기 : 3 일차
GrossFindings:	2014-08-14		
No Gross Finding			
시험동물번호 : 1102	노출량 : 1.0×10^8	cfu/개체	부검시기: 3 일차
GrossFindings:	2014-08-14		
No Gross Finding			
시험동물번호 : 1103	노출량 : 1.0×10^8	cfu/개체	부검시기: 3 일차
GrossFindings:	2014-08-14		
No Gross Finding			
시험동물번호 : 1204	노출량 : 1.0×10^8	cfu/개체	부검시기: 7 일차
GrossFindings:	2014-08-18		
No Gross Finding			
시험동물번호 : 1205	노출량 : 1.0×10^8	cfu/개체	부검시기: 7 일차
GrossFindings:	2014-08-18		
No Gross Finding			
시험동물번호 : 1206	노출량 : 1.0×10^8	cfu/개체	부검시기: 7 일차
GrossFindings:	22014-08-18		
No Gross Finding			
시험동물번호 : 1307	노출량 : 1.0×10^8	cfu/개체	부검시기: 14 일차
GrossFindings:	2014-08-25		
No Gross Finding			
시험동물번호 : 1308	노출량 : 1.0×10^8	cfu/개체	부검시기: 14 일차
GrossFindings:	2014-08-25		
No Gross Finding			
시험동물번호 : 1309	노출량 : 1.0×10^8	cfu/개체	부검시기: 14 일차
GrossFindings:	2014-08-25		
No Gross Finding			
시험동물번호 : 1410	노출량 : 1.0×10^8	cfu/개체	부검시기: 21 일차
GrossFindings:	2014-09-01		
No Gross Finding			
시험동물번호 : 1411	노출량 : 1.0×10^8	cfu/개체	부검시기: 21 일차
GrossFindings:	2014-09-01		
No Gross Finding			
시험동물번호 : 1412	노출량 : 1.0×10^8	cfu/개체	부검시기: 21 일차
GrossFindings:	2014-09-01		
No Gross Finding			

표 10. 부검일지 : 대조군 (비투여군)-Male

시험동물번호 : 3101	노출량 : 1.0×10^8	cfu/개체	부검시기: 3 일차
GrossFindings: 2014-08-14			
No Gross Finding			
시험동물번호 : 3102	노출량 : 1.0×10^8	cfu/개체	부검시기: 3 일차
GrossFindings: 2014-08-14			
No Gross Finding			
시험동물번호 : 3203	노출량 : 1.0×10^8	cfu/개체	부검시기: 7 일차
GrossFindings: 2014-08-18			
No Gross Finding			
시험동물번호 : 3204	노출량 : 1.0×10^8	cfu/개체	부검시기: 7 일차
GrossFindings: 2014-08-18			
No Gross Finding			
시험동물번호 : 3305	노출량 : 1.0×10^8	cfu/개체	부검시기: 14 일차
GrossFindings: 2014-08-25			
No Gross Finding			
시험동물번호 : 3306	노출량 : 1.0×10^8	cfu/개체	부검시기: 14 일차
GrossFindings: 2014-08-25			
No Gross Finding			
시험동물번호 : 3407	노출량 : 1.0×10^8	cfu/개체	부검시기: 21 일차
GrossFindings: 2014-09-01			
No Gross Finding			
시험동물번호 : 3408	노출량 : 1.0×10^8	cfu/개체	부검시기: 21 일차
GrossFindings: 2014-09-01			
No Gross Finding			

표 11. 부검일지 : 시험군 (투여군)-Female

시험동물번호 : 2101	노출량 : 1.0×10^8	cfu/개체	부검시기: 3 일차
GrossFindings: 2014-08-14			
No Gross Finding			
시험동물번호 : 2102	노출량 : 1.0×10^8	cfu/개체	부검시기: 3 일차
GrossFindings: 2014-08-14			
No Gross Finding			
시험동물번호 : 2103	노출량 : 1.0×10^8	cfu/개체	부검시기: 3 일차
GrossFindings: 2014-08-14			
No Gross Finding			
시험동물번호 : 2204	노출량 : 1.0×10^8	cfu/개체	부검시기: 7 일차
GrossFindings: 2014-08-18			
No Gross Finding			
시험동물번호 : 2205	노출량 : 1.0×10^8	cfu/개체	부검시기: 7 일차
GrossFindings: 2014-08-18			
No Gross Finding			
시험동물번호 : 2206	노출량 : 1.0×10^8	cfu/개체	부검시기: 7 일차
GrossFindings: 2014-08-18			
No Gross Finding			
시험동물번호 : 2307	노출량 : 1.0×10^8	cfu/개체	부검시기: 14 일차
GrossFindings: 2014-08-25			
No Gross Finding			
시험동물번호 : 2308	노출량 : 1.0×10^8	cfu/개체	부검시기: 14 일차
GrossFindings: 2014-08-25			
No Gross Finding			
시험동물번호 : 2309	노출량 : 1.0×10^8	cfu/개체	부검시기: 14 일차
GrossFindings: 2014-08-25			
No Gross Finding			
시험동물번호 : 2410	노출량 : 1.0×10^8	cfu/개체	부검시기: 21 일차
GrossFindings: 2014-09-01			
No Gross Finding			
시험동물번호 : 2411	노출량 : 1.0×10^8	cfu/개체	부검시기: 21 일차
GrossFindings: 2014-09-01			
No Gross Finding			
시험동물번호 : 2412	노출량 : 1.0×10^8	cfu/개체	부검시기: 21 일차
GrossFindings: 2014-09-01			
No Gross Finding			

표 12. 부검일자 : 대조군 (비투여군)-Female

시험동물번호 :	4101	노출량 :	1.0×10 ⁸	cfu/개체	부검시기:	3 일차
GrossFindings:	2014-08-14					
No Gross						
Finding						
시험동물번호 :	4102	노출량 :	1.0×10 ⁸	cfu/개체	부검시기:	3 일차
GrossFindings:	2014-08-14					
No Gross						
Finding						
시험동물번호 :	4203	노출량 :	1.0×10 ⁸	cfu/개체	부검시기:	7 일차
GrossFindings:	2014-08-18					
No Gross						
Finding						
시험동물번호 :	4204	노출량 :	1.0×10 ⁸	cfu/개체	부검시기:	7 일차
GrossFindings:	2014-08-18					
No Gross						
Finding						
시험동물번호 :	4305	노출량 :	1.0×10 ⁸	cfu/개체	부검시기:	14 일차
GrossFindings:	2014-08-25					
No Gross						
Finding						
시험동물번호 :	4306	노출량 :	1.0×10 ⁸	cfu/개체	부검시기:	14 일차
GrossFindings:	2014-08-25					
No Gross						
Finding						
시험동물번호 :	4407	노출량 :	1.0×10 ⁸	cfu/개체	부검시기:	21 일차
GrossFindings:	2014-09-01					
No Gross						
Finding						
시험동물번호 :	4408	노출량 :	1.0×10 ⁸	cfu/개체	부검시기:	21 일차
GrossFindings:	2014-09-01					
No Gross						
Finding						

표 13. 대변중의 미생물수

(단위 : 10⁵ cfu/mL)

성별	투여 후 경과일									
	No. ¹⁾	시험군 (1.0 × 10 ⁸ cfu/개체 투여군)				No.	대조군 (비투여군)			
		1	3	7	14		1	3	7	14
Male	1101	N.D. ²⁾	-	-	-	3101	N.D.	-	-	-
	1102	N.D.	-	-	-	3102	N.D.	-	-	-
	1103	N.D.	-	-	-	3203	-	N.D.	-	-
	1204	-	N.D.	-	-	3204	-	N.D.	-	-
	1205	-	N.D.	-	-	3305	-	-	N.D.	-
	1206	-	N.D.	-	-	3306	-	-	N.D.	-
	1307	-	-	N.D.	-	3407	-	-	-	N.D.
	1308	-	-	N.D.	-	3408	-	-	-	N.D.
	1309	-	-	N.D.	-					
	1410	-	-	-	N.D.					
	1411	-	-	-	N.D.					
	1412	-	-	-	N.D.					
Female	2101	N.D.	-	-	-	4101	N.D.	-	-	-
	2102	N.D.	-	-	-	4102	N.D.	-	-	-
	2103	N.D.	-	-	-	4203	-	N.D.	-	-
	2204	-	N.D.	-	-	4204	-	N.D.	-	-
	2205	-	N.D.	-	-	4305	-	-	N.D.	-
	2206	-	N.D.	-	-	4306	-	-	N.D.	-
	2307	-	-	N.D.	-	4407	-	-	-	N.D.
	2308	-	-	N.D.	-	4408	-	-	-	N.D.
	2309	-	-	N.D.	-					
	2410	-	-	-	N.D.					
	2411	-	-	-	N.D.					
	2412	-	-	-	N.D.					

¹⁾No. : 동물번호, ²⁾N.D. : Not Detected

표 14. 장기중 미생물수 : 시험군 (투여군)

(단위 : 10⁵ cfu/mL)

성별	투여 후 경과일	장 기								
		No. ¹⁾	신장	뇌	간장	폐	비장	위	혈액	입과절
Male	3	1101	N.D. ²⁾	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
		1102	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
		1103	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	7	1204	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
		1205	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
		1206	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	14	1307	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
		1308	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
		1309	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	21	1410	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
		1411	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
		1412	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Female	3	2101	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
		2102	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
		2103	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	7	2204	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
		2205	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
		2206	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	14	2307	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
		2308	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
		2309	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	21	2410	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
		2411	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
		2412	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

¹⁾No. : 동물번호, ²⁾N.D. : Not Detected

표 15. 장기중 미생물수 : 대조군 (비투여군)

(단위 : 10⁵ cfu/mL)

성별	투여 후 경과일	장 기									
		No. ¹⁾	신장	뇌	간장	폐	비장	위	혈액	입과절	
Male	3	3101	N.D. ²⁾	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
		3102	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
	7	3203	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
		3204	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
	14	3305	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
		3306	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
	21	3407	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
		3408	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
	Female	3	4101	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
			4102	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
		7	4203	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
			4204	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
14		4305	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
		4306	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
21		4407	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
		4408	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	

¹⁾No. : 동물번호, ²⁾N.D. : Not Detected

6. 랫드에 대한 가루자비의 급성경피독성시험

가. 재료 및 방법

(1) 사육환경 및 관리

- 사육환경

본 시험의 사육환경은 온도 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$, 환기시설 (공조기), 조명시간 12시간 (오전7시~오후7시) 및 조도 200 ~ 300 Lux의 실험실조건에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다.

- 사육상자

순화 및 시험기간 중 폴리카보네이트 사육상자 ($26 \times 42 \times 18 \text{ cm}$)에 5마리씩 넣어 깔짚을 깔아 사육하였다.

- 사료 및 음용수

사료는 실험동물용 고품사료 [Cargill Agri Purina Korea Inc.]를 자외선 멸균시켜 자유급식 시켰으며 물은 정수필터를 통과한 지하수를 자유 섭취시켰다.

(2) 처리농도설정 및 약제조제

- 처리농도설정

시험물질이 미생물 (제제)로 미생물 시험법에 의거 투여농도는 개체당 10^8 단위에 해당되는 미생물을 투여하도록 되어 있으므로 투여량은 “ $1.0 \times 10^8 \text{ cfu/개체}$ ”로 설정하여 투여하였다.

- 실험동물 수 / 개체식별

시험 동물 수는 암수 각각 5마리씩 10마리를 1군으로 하였으며, 개체식별은 피크린산 용액을 이용하여 피모색소 표시를 하고, 사육 상자는 군 식별정보를 부착하여 관리하였다.

- 대조군의 설정

시험물질이 고상이고 직접 처리하였으므로 용매대조군은 설정하지 않았다.

- 용매의 선택과 시험물질 조제

시험물질을 타 용매와 혼합하거나 조제하지 않고 직접 처리 하였다.

- 약제처리 약량 (volume)설정

약제처리약량은 1 g/개체로 설정하여 투여하였다.

(3) 시험물질의 처리

- 약제처리경로 및 처리방법

시험동물은 시험물질처리 24시간 전에 등부위에 제모기를 이용하여 $5 \times 6 \text{ cm}$ 이상 크기 넓이로 제모하였다. 약제처리는 $4 \times 5 \text{ cm}$ 크기 면적의 거즈에 조제된 시험물질을 1.0 g씩 균일하게 묻힌 다음 습윤처리를 하고 제모 된 부위에 도포한 후 시험물질의 유실을 막기 위해 Coban™ (self-adherent wrap, 3M 社)으로 고정 및 유지 시켰다.

- 시험물질의 제거

랫드의 등부위에 도포시킨 시험물질은 24시간 후 제거하고 피부에 묻은 잔여 물질은 증류수로 잘 닦고 의료용 탈지면으로 물기를 흡수시킨 다음 시험생물을 케이지에 넣어두었다.

(4) 관찰 및 검사항목

- 일반중독증상 및 치사동물

처리 당일은 처리 후 30분, 1시간에서 4시간까지 매시간 그리고 익일부터는 매일 1회씩 일반중독증상 및 치사된 동물수를 14일간 관찰 조사하였다.

- 체중 측정

모든 시험동물에 대하여 투여당일과 투여 후 체중을 측정하였고 생존한 동물에 대하여는 1, 3, 7일 및 14일째 개체별 체중을 측정하였다.

- 부검

모든 시험동물에게서 특이한 중독증상 및 치사개체가 발견되지 않아 부검을 실시하지 않았다.

(5) 반수치사약량(LD₅₀) 산출

농촌진흥청고시 제 2013-21호 농약의 독성시험기준과 방법에 의해 시험을 실시한 결과, 시험고시의 최고용량에서 시험물질에 의한 치사개체가 없어서 시험종료 후 통계처리는 생략하였다.

나. 시험결과

(1) 치사동물

시험결과 수컷과 암컷 모두 처리약량 “ 1.0×10^8 cfu/개체” 수준에서 치사동물은 발견되지 않았다.

(2) 일반중독증상

Male - 1번

- 약제처리 후, 3일 째부터 7일째까지 가피가 발견되었다가 소실되었다.

Male - 2번

- 약제처리 후, 3일 째부터 6일째까지 가피가 발견되었다가 소실되었다.

Male - 3번

- 약제처리 후, 3일 째부터 6일째까지 가피가 발견되었다가 소실되었다.

Male - 4번

- 약제처리 후, 3일 째부터 6일째까지 가피가 발견되었다가 소실되었다.

Male - 5번

- 약제처리 후, 3일 째부터 8일째까지 가피가 발견되었다가 소실되었다.

Female - 6번

- 약제처리 후, 3일 째부터 5일째까지 가피가 발견되었다가 소실되었다.

Female - 7번

- 약제처리 후, 3일 째부터 6일째까지 가피가 발견되었다가 소실되었다.

Female - 8번

- 약제처리 후, 3일 째부터 5일째까지 가피가 발견되었다가 소실되었다.

Female - 9번

- 약제처리 후, 3일 째부터 5일째까지 가피가 발견되었다가 소실되었다.

Female - 10번

- 약제처리 후, 3일 째부터 5일째까지 가피가 발견되었다가 소실되었다.

(3) 체중변화

모든 시험동물의 체중은 약제투여 후 경과 일에 따라 증가추세를 보였다.

이상의 시험결과, 랫드에 가루자비를 개체당 1.0×10^8 cfu씩 단회 경피 투여 시 영향이 없는 것으로 판단된다.

표 1. Mortality of rats

Group	Dose (cfu/animal)	Sex	Number of animals	Time / Days after administration								
				Time				Days				
				30 min	1hr	4hr	1	2	3	4	5	
1	1.0×10^8	Male	5	0 ^{a)}	0	0	0	0	0	0	0	0
2	1.0×10^8	Female	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Group	Dose (cfu/animal)	Sex	Number of animals	Days after administration									
				6	7	8	9	10	11	12	13	14	
1	1.0×10^8	Male	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	1.0×10^8	Female	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

a) Number of dead animals

표 2. Clinical signs of rats

Group	Dose (cfu/animal)	Sex	Number of animals	Time / Days after administration									
				Time				Days					
				10 min	30 min	1hr	4hr	1	2	3	4	5	
1	1.0x10 ⁸	Male	1	NAD ^{a)}	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	S ^{b)}	S	S
			2	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	S	S	S	
			3	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	S	S	S	
			4	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	S	S	S	
			5	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	S	S	S	
2	1.0x10 ⁸	Female	6	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	S	S	S	
			7	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	S	S	S	
			8	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	S	S	S	
			9	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	S	S	S	
			10	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	S	S	S	

Group	Dose (cfu/animal)	Sex	Number of animals	Days after administration									
				6	7	8	9	10	11	12	13	14	
1	1.0x10 ⁸	Male	1	S	S	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
			2	S	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
			3	S	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
			4	S	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
			5	S	S	S	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
2	1.0x10 ⁸	Female	6	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
			7	S	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
			8	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
			9	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
			10	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD

a) No abnormality detected

b) Scab (가피)

표 3. Body weights

Group	Dose (mg/kg bw)	Sex	Number of animals	Days after administration (g)				
				0	3	7	14	Gain
1	1.0x10 ⁸	Male	1	236.0	243.0	250.0	304.5	68.5
			2	245.5	250.5	260.5	317.5	72.0
			3	260.0	264.5	281.5	352.5	92.5
			4	250.5	252.5	271.5	317.0	66.5
			5	244.0	247.5	257.5	303.0	59.0
MEAN				247.2	251.6	264.2	318.9	71.7
S.D. ^{a)}				8.9	8.0	12.4	20.0	-
2	1.0x10 ⁸	Female	6	185.0	193.5	202.5	210.5	25.5
			7	198.0	206.5	217.0	230.5	32.5
			8	186.0	193.5	215.0	239.0	53.0
			9	210.5	214.5	221.0	244.5	34.0
			10	200.0	206.5	220.0	252.5	52.5
MEAN				195.9	202.9	215.1	235.4	39.5
S.D.				10.6	9.2	7.4	16.1	-

a) Standard deviation

제 4 절 목록고시를 위한 시제품 ‘가루자비’의 약해시험

1. 가루자비 고추 약해시험

가. 실험방법

(1) 시험약제 : **가루자비**

(2) 시험작물(품종) : 고추(독야청청)

(3) 처리내용

시험약제	유효성분함량	처리 방법	약해시험		의뢰회사
			기준량	배량	
가루자비	뷰베리아 포자 1.0x10 ⁸ conidial/ml	경엽처리 (12/19)	250배 (12/19)	125배 (12/19)	안동대학교 산학협력단
무 처리	-	-	-	-	-

(4) 경종개요

- 2014년 11월 10일 파종하였으며, 파종 36일 후 컵포트에 정식하였음(12/16).
- 시험약제는 정식 후, 고추 본엽이 2엽(온실 조건)시 처리하였음.

(5) 시험구 배치 및 면적 : 완전임의 배치법 3반복

구 분	처리수	반복수	총구수	구당pot	소요pot
약해	3	3	9	5 pot	45 pot

(6) 조사 방법

조사항목	조사횟수	조사일자	조사방법
약해유무	3	12/22, 24, 26	약제처리 3, 5, 7일 후 외관상 나타나는 약해유무 3회 달관조사

나. 결과

(1) 시험성적(약제처리 3, 5, 7일 후)

시험약제	시험작물 (품종)	약해정도(0~5)		비고
		기준량	배량	
가루자비	고추 (독야청청)	0	0	약해없음

○ 가루자비의 고추에 대한 약해시험 결과 기준량 및 배량에서 외관상 나타난 약해증상은 없었음.

○ 가루자비는 고추에 대하여 기준량 및 배량에서 약해가 없어 유기농업자재로 실용성이 있을 것으로 판단됨.



그림 1. 고추 포장진경.



그림 2. 고추 약제처리.

2. 가루자비 배추 약해시험

가. 시험방법

- (1) 시험약제 : 가루자비
- (2) 시험작물(품종) : 배추(CR장금이)
- (3) 처리내용

시험약제	유효성분함량	처리 방법	약해시험		의뢰회사
			기준량	배량	
가루자비	뷰베리아 포자 1.0x10 ⁸ conidial/ml	경엽처리 (12/19)	250배 (12/19)	125배 (12/19)	안동대학교 산학협력단
무 처리	-	-	-	-	-

(4) 경종개요

- 2014년 11월 17일 파종하였으며, 파종 29일 후 키포트에 정식하였음(12/16).
- 시험약제는 정식 후, 배추 본엽이 3엽(온실 조건)시 처리하였음.

(5) 시험구 배치 및 면적 : 완전임의 배치법 3반복

구 분	처리수	반복수	총구수	구당pot	소요pot
약해	3	3	9	5 pot	45 pot

(6) 조사 방법

조사항목	조사횟수	조사일자	조사방법
약해유무	3	12/22, 24, 26	약제처리 3, 5, 7일 후 외관상 나타나는 약해유무 3회 달관조사

나. 결과

(1) 시험성적(약제처리 3, 5, 7일 후)

시험약제	시험작물 (품종)	약해정도(0~5)		비고
		기준량	배량	
가루자비	배추 (CR장금이)	0	0	약해없음

○ 가루자비의 배추에 대한 약해시험 결과 기준량 및 배량에서 외관상 나타난 약해증상은 없었음.

○ 가루자비는 배추에 대하여 기준량 및 배량에서 약해가 없어 유기농업자재로 실용성이 있을 것으로 판단됨.



그림 3. 배추 포장전경.



그림 4. 배추 약제처리.

3. 가루자비 상추 약해시험

가. 시험방법

- (1) 시험약제 : **가루자비**
- (2) 시험작물(품종) : 상추(탑그린)
- (3) 처리내용

시험약제	유효성분함량	처리 방법	약해시험		의뢰회사
			기준량	배량	
가 루 자 비	뷰베리아 포자 1.0x10 ⁸ conidial/ml	경엽처리 (1/2)	250배 (1/2)	125배 (1/2)	안동대학교 산학협력단
무 처 리	-	-	-	-	-

(4) 경종개요

- 2014년 12월 8일 파종하였으며, 파종 22일 후 키포트에 정식하였음(12/30).
- 시험약제는 정식 후, 상추 본엽이 2엽(온실 조건)시 처리하였음.

(5) 시험구 배치 및 면적 : 완전임의 배치법 3반복

구 분	처리수	반복수	총구수	구당pot	소요pot
약해	3	3	9	5 pot	45 pot

(6) 조사 방법

조사항목	조사횟수	조사일자	조사방법
약해유무	3	1/5, 7, 9	약제처리 3, 5, 7일 후 외관상 나타나는 약해유무 3회 달관조사

나. 결과

(1) 시험성적(약제처리 3, 5, 7일 후)

시험약제	시험작물 (품종)	약해정도(0~5)		비고
		기준량	배량	
가루자비	상추 (탑그린)	0	0	약해없음

○ 가루자비의 상추에 대한 약해시험 결과 기준량 및 배량에서 외관상 나타난 약해증상은 없었음.

○ 가루자비는 상추에 대하여 기준량 및 배량에서 약해가 없어 유기농업자재로 실용성이 있을 것으로 판단됨.



그림 5. 상추 포장전경.



그림 6. 상추 약제처리.

4. 가루자비 오이 약해시험

가. 시험방법

- (1) 시험약제 : 가루자비
- (2) 시험작물(품종) : 오이(네박자)
- (3) 처리내용

시험약제	유효성분함량	처리 방법	약해시험		의뢰회사
			기준량	배량	
가루자비	뷰베리아 포자 1.0x10 ⁸ conidial/ml	경엽처리 (12/19)	250배 (12/19)	125배 (12/19)	안동대학교 산학협력단
무 처리	-	-	-	-	-

(4) 경종개요

- 2014년 11월 28일 파종하였으며, 파종 18일 후 키포트에 정식하였음(12/16).
- 시험약제는 정식 후, 오이 본엽이 2엽(온실 조건)시 처리하였음.

(5) 시험구 배치 및 면적 : 완전임의 배치법 3반복

구 분	처리수	반복수	총구수	구당pot	소요pot
약해	3	3	9	5 pot	45 pot

(6) 조사 방법

조사항목	조사횟수	조사일자	조사방법
약해유무	3	12/22, 24, 26	약제처리 3, 5, 7일 후 외관상 나타나는 약해유무 3회 달관조사

나. 결과

(1) 시험성적(약제처리 3, 5, 7일 후)

시험약제	시험작물 (품종)	약해정도(0~5)		비고
		기준량	배량	
가루자비	오이 (네박자)	0	0	약해없음

○ 가루자비의 오이에 대한 약해시험 결과 기준량 및 배량에서 외관상 나타난 약해증상은 없었음.

○ 가루자비는 오이에 대하여 기준량 및 배량에서 약해가 없어 유기농업자재로 실용성이 있을 것으로 판단됨.



그림 7. 오이 포장전경.



그림 8. 오이 약제처리.

5. 가루자비 콩 약해시험

가. 시험방법

- (1) 시험약제 : 가루자비
- (2) 시험작물(품종) : 콩(백태)
- (3) 처리내용

시험약제	유효성분함량	처리 방법	약해시험		의뢰회사
			기준량	배량	
가루자비	뷰베리아 포자 1.0x10 ⁸ conidial/ml	경엽처리 (12/19)	250배 (12/19)	125배 (12/19)	안동대학교 산학협력단
무 처리	-	-	-	-	-

(4) 경종개요

- 2014년 11월 28일 파종하였으며, 파종 18일 후 컵포트에 정식하였음(12/16).
- 시험약제는 정식 후, 콩 본엽이 2엽(온실 조건)시 처리하였음.

(6) 조사 방법

조사항목	조사횟수	조사일자	조사방법
약해유무	3	12/22, 24, 26	약제처리 3, 5, 7일 후 외관상 나타나는 약해유무 3회 달관조사

나. 결과

(1) 시험성적(약제처리 3, 5, 7일 후)

시험약제	시험작물 (품종)	약해정도(0~5)		비고
		기준량	배량	
가루자비	콩 (백태)	0	0	약해없음

○ 가루자비의 콩에 대한 약해시험 결과 기준량 및 배량에서 외관상 나타난 약해증상은 없었음.

○ 가루자비는 콩에 대하여 기준량 및 배량에서 약해가 없어 유기농업자재로 실용성이 있을 것으로 판단됨.



그림 9. 콩 포장전경.



그림 10. 콩 약제처리.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 목표 달성도

연차별 연구 개발 목표와 목표 달성도를 아래와 같이 나타냈다.

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)
1차 년도 (2012. 8.10~ 2013.8.9)	(온실/담배)가루이병 방제를 위한 곤충병원성 곰팡이를 활용한 미생물살충제의 산업화 (주관)	최적화된 조건에서의 대량포자 생산을 위한 고체배양 기술 확립	100
		제제화를 위한 제형화별 약효평가 및 보조제 탐색 및 조사	
	현장포장 방제력 검정 및 방제시스템개발 (협동1)	현장 포장 방제력 검정	100
	포자 회수기 개발 (협동2)	포자 회수기 개발	100

2. 제 2차년도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)
2차 년도 (2013. 8.10~ 2014.8.9)	(온실/담배)가루이병 방제를 위한 곤충병원성 곰팡이를 활용한 미생물살충제의 산업화 (주관)	안정제·보조 물질 탐색 및 조사	100
		대량포자를 이용한 제제 및 제형화 기술	100
		친환경목록고시& 품질인증 및 친연식물보호제를 위한 안전성 평가	100
	현장포장 방제력 검정 및 방제시스템개발 (협동1)	타 생물학적 방제시스템 조사 및 방제효율 현장포장 방제력 검정	100
	포자 회수기 개발 (협동2)	포자 회수기 개발	100

3. 제 3차년도

구분 연도	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)
3차 년도 (2014.08.10~201 5.08.09)	제형화된 제제의 살충력 검정 및 현장포장 시험 (주관&협동1)	○온실/담배 가루이 증식 ○실내생물검정 ○현장포장 검정 ○이병충에 대한 포자발아율 조사 ○작물의 생육조사	100
	산업화에 따른 경제성 검토 (주관&협동 2)	○우수균주의 선발에 따른 검증 ○개발시 예상 생산비에 따른 경제성 분석	100
	포자회수기 개발완성 (협동 2)	○포자회수기 개발 (틀링커터사이클론 방식과 드럼회 전마찰사이클론 방식 중 회수율이 우수한 방식으로 개발)	100
	상품화 타당성 조사 (홍보 및 교육) (주관&협동 1, 2)	○박람회(전시회), 메스컴 활용 광고 등 ○각 인근 농업기술센터와 연계된 친환경 자재교육 및 제품 효능 설명	100

제 2 절 관련 분야에의 기여도

미래의 식량 생산에 있어서는 계속적으로 친환경 유기농에 대한 관심이 커지고, 친환경 유기농을 통해 재배한 농산물만이 시장경쟁에서 살아남을 것이다. 이로 인해 유기 합성 농약의 개발로 경제적 독약인 농약을 사용하여 농산물 생산에 걸림돌인 각종 병·충해를 인간이 컨트롤 할 수 있게 되었다. 하지만, 농산물 생산량은 증가 되었으나, 유기 합성 농약으로 인한 환경적 피해가 늘어나고, 농산물에 대한 병폐가 증가되고 있다. 최근 친환경농산물에 대한 정책적 지원에 따라 화학농약의 규제가 이루어지고 있으며, 매 개충의 적기 방제시기를 놓칠 수 있는 요인도 있다. 그리고 화학농약의 지속적 살포로 약제에 대한 내성이 발생하고, 약효가 낮아지기 때문에 생물 친화적인 제품을 개발하여 산업화를 하여야 할 것이다.

본 과제에서는 *B. bassiana* M130 곤충병원성곰팡이를 분리하여 해충방제 활성을 가진 곰팡이 생산을 통해, 곰팡이 포자를 대량 생산하여 산업화를 통해 경제성 있는 곤충 병원성곰팡이 친환경 제품을 개발하고, 환경오염에 대한 다양한 문제들을 해결하였다. *B. bassiana*로 부터 포자를 대량생산 할 수 있는 배양방법을 최적화했으며, 배양된 *B. bassiana*로부터 포자를 쉽게 회수 할 수 있는 포자 회수기를 개발하여 원제 수급에 어려움을 극복할 수 있어 세계적으로 독점할 수 있는 원제를 국내에서 생산 할 수 있게 되는 성과를 얻었다고 할 수 있다. 그리고 본 과제를 통해 얻어진 시험 데이터를 바탕으로 현 적용이 가능할 수 있도록 하였으며, 동시에 친환경 농자재로 등록이 가능할 수 있도록 독성 실험이 완료된 상태이다.

본 연구 과제를 통해 개발된 '가루자비'(제품)은 기존 수입제품인 '보타니가드'에 비해 가격 경쟁력이 좋으며, 활성 또한 우수 한 것으로 조사되어 경제성과 원제의 국산화를

이루었다. 위해성과 환경에 안전하고 무해한 완성도가 높은 친환경 제품의 개발을 완성하였다.

또한 본 연구과제의 결과를 통해 학술지나 학술대회를 통해 결과를 발표되었다.

● 학회발표

- ▶ Min-Hye Lee, Beam-Su Kim, Seung-Yeon Choi, Shun-Pyo Jeon and Gi-Seok Kwon. 2013. Selection of entomopathogenic fungi to Green house whitefly *Trialeurodes Vaporariorum*. 한국미생물·생명공학회 영남지부 학술대회 (The-K Gueongju Hotel)
- ▶ Kee-Sun ShinMin-Hye Lee, Beam-Su Kim, Seung-Yeon Choi, Jin-Won Kim, and Gi-Seok Kwon. 2013. The mass production of *Beauveria bassiana* M130 conidia by By-product of Agriculture. KMB's 40th Anniversary 2013 International symposium & Annual Meeting.(Alpensia, Pyeongchang)
- ▶ Kyeong-Muk Kang, Jung-Bok Lee, Beam-Su Kim, Jin-Won Kim, Chang-Su Kim and Gi-Seok Kwon. 2014. A study on formulation of microbial bioinsecticide using Entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* M130. 2013 International symposium & Annual Meeting. (BEXCO, Busan)
- ▶ Kyeong-Muk Kang, Jung-Bok Lee, Beam-Su Kim, Jin-Won Kim, Chang-Su Kim, Eun-Jin Lim, Ha-Neul Jeon, and Gi-Seok Kwon. 2014. Investigation of adjuvants for formulation toward entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* M130. International Meeting of the federation of Korean Microbiological societies.(KINTEX)
- ▶ Kyeong-Muk Kang, Jung-Bok Lee, Beam-Su Kim, Jin-Won Kim, Chang-Su Kim, Eun-Jin Lim, Ha-Neul Jeon, and Gi-Seok Kwon. 2015. Formulation Development and Insecticidal Effect for the Greenhouse Whitefly Insecticide Development. 한국미생물·생명공학회 영남지부 학술대회.(경주코롱호텔)

● 발표논문

- ▶ 김창수, 이증복, 김범수, 이민혜, 강경목, 주우홍, 김진원, 임대준, 권기석. 2013. 미강추출물을 이용한 곤충병원성 곰팡이 *Beauveria bassiana*의 최적 배양조건 및 효소활성. *한국생명과학회지*. 23: 1010-1018.
- ▶ Chang-Su Kim, Jung-Bok Lee, Beam-Soo Kim, Young-Ho Nam, Kee-Sun Shin, Jin-Won Kim, Jang-Eok Kim, Gi-Seok Kwon. 2014. A Technique for the Prevention of Greenhouse Whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*) Using the Entomopathogenic Fungus (*Trialeurodes vaporariorum*) Using the Entomopathogenic Fungus. *J. Microbiol. Biotechnol.* 24: 1-7.
- ▶ 권정자, 이증복, 김범수, 이은호, 강경목, 심장섭, 주우홍, 전춘표, 권기석. 2014. *Bacillus* sp. CS-52를 이용한 고추 탄저병 (*Colletotrichum gloeosporioides*) 방제 특성. *한국미생물학회지*. 50: 201-209.

- ▶ Jung-Bok Lee, Beam-Soo Kim, Kyeong-Muk Kang, Woo-Hong Joo, Chon-Pyo Jeon, Jin-Won Kim, and Gi-Seok Kwon. Development of "GaRuJaBi" Bioinsecticide Using Entomopathogenic Fungus, *Beauveria bassiana* M130. *한국생명과학회지*. (submitted)
- ▶ 이증복, 김범수, 주우홍, 권기석. 2015. 천연 제오라이트 세라믹볼을 이용한 곤충병원성 곰팡이 포자 생산 방법. *환경농학회지* (submitted)

● 특허

- ▶ 신규한 뷰베리아 바시아나 엠130 균주 및 그를 이용한 온실가루이와 담배가루이에 대한 생물학적 방제 방법(출원번호: 10-2012-0013972)
- ▶ 천연제오라이트 세라믹볼을 이용한 곤충병원성 곰팡이의 포자 생산방법 및 그 분리방법 (출원번호:10-2013-0076113)
- ▶ 천연제오라이트 세라믹볼을 이용한 곤충병원성 곰팡이의 포자 생산방법 및 그 분리방법 (등록번호:1014996920000)

● 홍보실적

- ▶ 유기농재배, 무농약 재배를 꿈꾼다, 지방전문지-경북인신문 외 5건. 2014.11.2
- ▶ 천적활용 친환경 병해충 방제기술 평가회. 지방전문지-경북매일 외 3건. 2015.07.24
- ▶ 친환경 병충해 방제기술 평가회. 지방TV방송- 안동MBC 2015.07.24

● 교육 및 컨설팅

- ▶ 농업미생물을 활용한 친환경 농법구현. 2012.09.04.
- ▶ 온실 담배 가루이 방제를 위한 곤충병원성 곰팡이를 활용한 친환경 재배기술 현장교육. 2015.07.24.

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
①최적화된 대량포자 생산을 위한 고체배양 기술 확립	- 최적화된 고체배지 조성을 통해 포자수($1.0 \times 10^9 \sim 10^{10}$), 포자발아율(90%이상), 고체배양조건(일수, 집종량, 온도, 습도)조건을 완성하였음.
②제제화를 위한 보조제 탐색 및 조사	- 제제화를 위한 보조제인 분산제, 습윤제, 증량제를 최적화하였음.
③안전성 평가 조사	- 안전성 평가조사결과 무해한 것으로 조사됨.
④현장포장 방제력 검증	- 제품의 현장 포장 방제력 검증결과 우수함
⑤포자회수기 개발	- 포자회수기 개발을 완료함
⑥안정성·보조 물질 탐색 및 조사	- 안정성, 보조물질조사 완료
⑦타 생물학적 방제시스템 조사	- 타 생물학적 방제 시스템과 비교하여 우수한 것으로 조사됨.
⑧제형화(상용화) 기술	- 제제화 방안을 통해 '가루자비' 시제품을 완성함
⑨상품화 타당성 조사(홍보 및 교육)	- 시제품을 활용하여 홍보 및 교육을 실시함.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

- 본 연구 과제의 결과를 바탕으로 분리된 곤충병원성곰팡이 *Beauveria bassiana*를 균주 기탁과 함께 포자를 이용하여 만든 '가루자비'(제품)를 등록하고자 한다. 현재 등록 시점은 2, 3년 차에 수행이 완료되었으며, 등록을 위해 업체에서 작업중 임.
- 예천군 농업기술센터를 통해 친환경 유기농에 대한 교육을 2년차 3년차과제 수행중에 진행하였으며, 이를 기반으로 지속적인 교육을 실시하고, 예천 뿐 만 아니라 안동, 영양, 청송 등 농업기술센터에서도 과제 결과에 대한 성과를 활용하여 친환경 유기농 교육에 지속적으로 이용할 것임.
- 포자회수 방법 등에 관한 특허가 등록된 상태이므로 이를 이용하여 제품개발에 활용 및 원재 판매 방안 또한 모색할 것임.
- 생물학적 해충방제의 일환으로 화학적 살충제를 대신할 수 있는 살충곰팡이를 활용하여 온실가루이에 대한 환경 친화적이고 저항성기작이 보고되지 않은 곤충병원성 곰팡이를 이용한 생물방제 살충제로 사용함으로써 농가에 있어 작물의 피해를 줄이는 것은 물론이며, 친환경적 재배로 인해 농가의 소득을 극대화할 수 있을 것으로 기대됨.
- 생물농약으로 가루이 방제 가능성 확인하여 예천 농업기술센터와 업무 협조를 통해 친환경단지조성을 통한 유기농 재배가 가능하도록 함.
- 유기농 생산체계 확립을 위한 미생물 살충체와 친환경농자재 체계처리방법 적용연구를 통해 향후 친환경 재배를 광범위 하게 할 수 있음
- 곰팡이 살충제 이용 해충 방제 매뉴얼 작성에 응용 가능함.
- 우리나라 환경에 적응된 토착 균주들을 주성분으로 하는 곤충병원성 곰팡이 살충제를 만들기 위해서, 그 균주의 특성에 맞는 대량배양 조건과 제제화 연구를 통해 최적의 곰팡이살충제 제작을 하고 이를 목적 난방제 해충 방제에 적용함으로써 기업의 이윤 추구와 농가의 소득에 크게 기여할 수 있을 것으로 기대됨.
- 분리 균주로부터 향 후 물질의 탐색, 분리, 동정, 생물특성 및 현장 적용에 대한 가능성을 열어 두어 계속 연구가 가능할 것으로 사료됨.
- 향 후 제품의 효율을 높일 수 있는 방안으로 micro capsule화에 대한 방안을 추가적으로 연구를 진행하고자 함.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 현재 시판중인 곤충병원성 곰팡이를 이용한 미생물농약은 전 세계 11개 회사에서 9종 18 균주를 이용한 18제품
 - 미국 : 농무성(USDA-ARS)의 균주보존센터, 현재 850종의 기주로부터 약 5,000 균주의 곤충병원성 곰팡이 수집·보존
 - 유럽 : 캐나다, 영국, 스위스, 네덜란드, 연합 LUBILOSA 조직, 메뚜기 방제를 위한 'Green Muscle' 개발
 - 영국 : BBSRC 산하 IACR-Rothamsted Entomology & Nematology Dept, 진딧물 방제 성공
 - 네덜란드 : IPO-DLO Research Institute for Plant Protection, 진딧물 방제 성공
 - 호주 : 농림부 산하 연구소, 녹강균(*Metarhizium*)의 대량생산 및 연구 수행 중
 - 중국 : 중국농업과학원 산하 생물방치연구소, 굽벵이 방제를 위한 백강균 (*Beauveria brongniartii*)포자를 연 2만톤 생산
 - 일본 : 백강균(*Beauveria bassiana*)를 이용한 배추 줄나방 방제 연구
- 생물농약 개발은 대기업보다는 주로 벤처기업이나 중소기업들이 주도적으로 시장을 선도 하 있으며, 전 세계적으로 약 110여개의 회사들이 생물농약을 개발, 판매함
- 연간 3천만 불 이상 매출의 비교적 큰 규모의 미생물농약 회사로는 AgraQuest사(미생물 농약 시장의 6%), Certis USA사(미생물 농약 시장의 6%)와 Verdera OY사(미생물 농약 시장의 5%), 등이 있다. BioWorks사와 E-nema사가 있으며 강소기업이며, 혁신적인 기술로서 이제 막 시작하는 회사로는 Pasteuria Biosciences 사와 Exosect사 등이 알려져 있다
- 일반적으로 외국 기업들은 정부의 친환경농업정책의 일환으로 정부로부터 정책적 후원을 받으면서, 독자적으로 미생물과 천연물을 선별하거나 대학 및 연구소로 부터 아웃소싱을 통하여 우수한 후보물을 확보하여 생물농약을 개발하고 있다.
- 포자회수기는 외국의 경우 이런 제품들이 생산 판매되고 있으며 포자회수기에 대한 산업 적으로도 발전되었다. 포자 회수방법의 연구에 있어 화분이나 실험실에서 사용할 수 있는 작은 규모에서부터 대기중에 포자를 수집할 수 있는 실외적인 규모의 회수기도 활용 중이다.

제 7 장 연구시설·장비 현황

해당사항 없음

제 8 장 참고문헌

Anson ML. 1938. Estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* 22:79-89.

Avery, P. B., Faull, J., and Simmonds, M. S. J. 2004. Effect of different photoperiods on the growth, infectivity and colonization of Trinidadian strains of *Paecilomyces fumosoroseus* on the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*, using a glass slide bioassay. *J. Insect. Sci.* 4:38-48.

Byrne, D. N., Bellows, T. S., and Parrella, M. P. 1990. Whiteflies in agricultural systems. In "Whiteflies: Their biology, pest status and management" (Gerling, D., Ed.), Intercept, Andover, UK. pp. 227 - 261.

Burges, H. D. 1998. Formulation of mycopesticides. pp. 131-186. In: Burges, H. D. (ed.), Formulation of Microbial Biopesticides Biopesticides: Beneficial Microorganisms, Nematodes and Seed Treatment. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands.

Chandler, D., Heale, J. B., and Gillespie, A. T. 1993. Germination of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* on scales of the glasshouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum*. *Biocontrol Sci. Technol.* 3:161-164.

Charnley, A. K. 1997. Entomopathogenic fungi and their role in pest control, in the Mycota IV environmental and microbial relationships. Wicklow DT, Soderstrom BE (eds.), Springer, Berlin. pp. 185-201.

Evans HC, Samson RA. 1984. Cordyceps species and their anamorphs pathogenic on ants (Formicidae) in tropical forest ecosystems. 2. The camponotus (Formicinae) complex. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 82:127-150.

Fargues J, Goettel MS, Smits N, Ouedraogo A, Rougier M. 1997. Effect of temperature on vegetative growth of *Beauveria bassiana* isolates from different origins. *Mycologia.* 89:383 - 392.

Faria, M. R., and Wraight, S. P. 2007. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biol Control.* 43:237 - 256.

Feng, M. G., Poprawski, T. J., and Khachatourians, G. G. 1994. Production, formation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. *Biocontrol Sci Technol.* 4:3-34.

Folin, O., and Ciocalteu, V. 1929. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *J. Biol. Chem.* 73:627-650.

Gottlieb, D. 1950. The Physiology of spore germination fungi. *The Botanical Review.* 16:229-257.

Griesch, J., and Vilcinskis, A. 1998. Proteases released by entomopathogenic fungi impair phagocytic activity, attachment and spreading of Plasmatocytes isolated from haemolymph of the greater wax moth *Galleria mellonella*. *Biocontrol Sci. Technol.* 8:517-531.

Gilberto, U. L. B., Ricardo, H. R. D., and Claudio, L. M. 1999. Oxygen consumption by *Metarhizium anisopliae* during germination and growth on different carbon sources. *J Invertebr Pathol.* 74:112-119.

Guzman, P., Arredondo, C. R., Emmatty, D., and Gilbertson, R. L. 1997. Partial characterization of two whitefly-transmitted geminiviruses infecting tomatoes in Venezuela. *Plant Dis.* 81:312.

Hall, R. A., and Papierok, B. 1982. Fungi as biological agents of arthropods of agricultural and medical importance. *Parasitology.* 84:205-240.

Hywel-Jones, N. L. 1995. Cordyceps sphecocephala and a *Hymenostilbe* sp. infecting wasps and bees in Thailand. *Mycol. Res.* 99:154-158.

Han, J. H., Kim, H., Leam, H. T., Kim, J. J., and Lee, S. 2013. Characteristics and virulence assay of entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* for the microbial control of *Spodoptera exigua*. *Korean J Pestic Sic.* 17:454-459.

Hwang, J. H., Park, B. R., Lee, S. G., and Kim, Y. 2009. Identification of an entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi* ANU101, infecting the beet armyworm, *Spodoptera exigua*, in Korea. *Kor J Mycol.* 37:139-143.

Inglis, G. D., Goettel, M. S., Butt, T. M., and Strasser H. 2001. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In: Butt TM, Jackson CW, Magan N (Eds.), Fungi as biocontrol agents: Progress, problems and potential. *CABI International AAFRC*, Wallingford, United Kingdom, 23-69.

Jeon, H. Y., Kim, H. H., Yang, C. Y., Kang, T. J., and Kim, D. S. 2009. A tentative economic injury level for greenhouse whitefly on cucumber plant in protective cultivation. *Korean J Hort Sci Technol.* 27: 81-85.

Kim, J. J., Lee, S. G., and Jee, H. J. 2010. Asisa : South Korea. In: Kabaluk JT, Svircev AM, Goettel M S, Woo SG (eds.), The use and regulation of microbial pesticides in representative jurisdictions worldwide. IOBC Golbal. 18-23.

Khan, S., Guo, L., Shi, H., Mijit, M., and Qiu, D. 2012. Bioassay and enzymatic comparison of six entomopathogenic fungal isolates for virulence or toxicity against green peach aphids *Myzus persicae* Afr *J Biotechnol.* 11:14193 - 114203.

Kim, J. S., Roh, J. Y., Choi, J. Y., Wang, Y., Shim, H. J., and Je, Y. H. 2009. Correlation of the aphicidal activity of *Beauveria bassiana* SFB-205 supernatant with enzymes. *Fungal Biol.* 114:1120 - 1128.

Kim, J. S., Je, Y. H., and Yu, Y. M. 2011. Mass production of aphicidal *Beauveria bassiana* SFB-205 supernatant with the parameter of chitinase. *J Microbiol Biotechnol.* 21:604-612.

Kim C. S., Lee, J. B., Kim, B. S., Lee, M. H., Kang, K. M., Joo W. H., Kim, J. W., Im, D. J., and Kwon, G. S. 2013. Optimal Condition and Enzyme Activity of Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* by used Extracted Rice Bran. *J Life Sci.* 23:1010-1018.

Kim, C. S., Lee, J. B., Kim, B. S., Shin, K. S., Kim, J. W., and Kwon, G. S. 2014. A study on prevention technique for the greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*) by using entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* M130. *J Micro Biotech.* 24:1-7.

Kim, J. J. 2007. Influence of *Lecanicillium attenuatum* on the development and reproduction of the cotton aphid, *Aphis gossypii*. *Bio Control.* 52:789-799.

Massimiliano, F., Jean-Louis, L., and Federici, F. 1998. Chitinolytic enzymes activity of *Penicillium janthinellum* p9 in bench top bioreactor. *J. Ferment Bioeng.* 86:620-622.

Lacey, L. A., Liu, T. X., Buchman, J. L., Munyaneza, J., Goolsby A., and Horton, D. R. 2011. Entomopathogenic Fungi (Hypocreales) for control of potato psyllid, *Bactericera cockerelli*(Sulc) (Hemiptera:Triozidae) in an area endemic for zebra chip disease of potato. *Biol. Contr.* 56:271-278.

Lacey, L. A., Frutos, R., Kaya, H. K., and Vail, P. 2001, Insect pathogens as biological control agents : Do they have a future? *Biol. Control.* 21:230-248.

Luz, C., and Fargues, J. 1997. Temperature and moisture requirements for conidial germination of an isolate of *Beauveria bassiana*, pathogenic to *Rhodnius prolixus*. *Mycopathologia.* 138:117-125.

Luz, C., and Fargues, J. 1999. Dependence of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, on high humidity for infection of *Rhodnius prolixus*. *Mycopathologia.* 146:33-41.

Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* 31:426-428.

Malasis, M. H., and Ravensberg, W. J. 2003. Knowing and Recognizing: The biology of glasshouse pest and their natural enemies. p. 288. Koppert B. V systems and Reed Business Information, Netherlands.

Morley, D., Moore, J. D., and Prior, C. 1995. Screening of metarhizium and *Beauveria* spp. Conida with exposure to simulated sunlight and a range of temperature. *Mycol. Res.* 100:31-38.

Oerke, E. C. 2006. Crop losses to pests. *J. Agri. Sci.* 144:31-43.

Pham, T. A., Kim, J. J., Kim, S. G. and Kim, K. 2009. Production of blastospore of entomopathogenic *Beauveria bassiana* in a submerged batch culture. *Mycobiology*. 37:218-224.

Rajiv, V., Pranav, V., and Chhatpar, H. S. 2003. Statistical optimization of medium components for the production of chitinase, by *Alcaligenes xylosoxydans*. *Enzyme Microbial Technol.* 33:92-96.

Roberts, D. R., and Hajek, A. E. 1992. Entomopathogenic fungi as bioinsecticides: in frontiers in industrial mycology. Leatham, GF(ed.), Chapman and Hall, New York. 144-159.

Roberts, D. W., and Humber, R. A. 1981. Entomogenous fungi. In : Cole GT, Kendrick B (eds.). Biology of Conidial Fungi. Academic Press, New York, 201-236.

Shin, T. Y., Choi, J. B., Bae, S. M., Cha, Y. R., Oh, J. M., Koo, H. N., and Woo, S. D. 2010. Study on selective media for isolation of entomopathogenic fungi. *Int J Indust Entomol.* 20:7 - 12.

Shinya, R., Aiuchi, D., Kushida, A., Tani, M., Kuramochi, K., and Koike, K. 2008. Effects of fungal culture filtrates of *Verticillium lecanii*(*Lecanicillium* spp.) hybrid strains on Heterodera glycines eggs and juveniles. *J Invertebr Pathol.* 97:291-297.

Sato, H., Mitsuhashi, W., and Shimazu, M. 1993. Effect of temperature on mycelial growth of three muscardine fungi. Trans. 44th Meet. Kanto Branch Jpn. For. Soc. p.103-104.

Stephen, A., and Rehner, E. B. 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps teleomorphs*. *Mycologia.* 97:84-95.

Sudhakar, P., and Nagarajan, P. 2011. Production of Chitinase by Solid State Fermentation from *Serratia marcescens*. *Intl. J. Chem. Tech. Res.* 3:590-598.

Thomas, K. C, Khachatourians, G. G., and Ingledew, W. M., 1987. Production and properties of *Beauveria bassiana* conidia cultivated in submerged culture. *Can J Microbiol.* 33:12-20.

Thacker, J. R. M. 2002. An Introduction to Arthropod Pest Control. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.

Thomas, K. C., Khachatourians, G. G., and Ingledew, W. M., 1987. Production and properties of *Beauveria bassiana* conidia cultivated in submerged culture. *Can. J. Microbiol.* 33:12-20.

Ulhoa, C. J., and Peberdy, J. F. 1991. Regulation of chitinase synthesis in *Serratia marcescens*. *J. Gen. Microbiol.* 14:2163-2169.

Vega, F. E., Goettel, M. S., Blackw, M., Chandler, D., Jackson, M. A., Keller, S., Koike, M., Maniania, N. K., Monzóon, A., Ownley, B. H., Pell, J. K., Rangel, D. E. N., and Roy, H. E. 2009. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecolo.* 2:149-159.

Vey, A., Matha, V., and Dumas C. 2002. Effects of the peptide mycotoxin destruxin E on insect Haemocytes and on dynamics and efficiency of the multicellular immune reaction. *J. Invertebr. Pathol.* 80:177-187.

Yatin, B. T., Venkataraman, N. S., Parija, T. K., Panneerselvam, D., Govindanayagi, P., and Geetha, K. 2006. The new biopesticide market. Business Communications Research, Denver, CO, U.S.A.

Yoon, H. G., Shin, T. Y., Yu, M. R., Lee, W. W., Ko, S. H., Bae, S. M., Choi, J. B. and Woo, S. D. 2013. Characterization of entomopathogenic fungus from *Trialeurodes vaporariorum* and evaluation as insecticide. *Korean J Microbio.* 49: 64-70.

<첨부>

특허, 논문, 제품(시장) 분석보고서

신청과제명	(온실/담배)가루이 방제를 위한 곤충병원성 곰팡이를 활용한 미생물살충제 산업화기술		
주관연구책임자	권기석	주관기관	안동대학교

1. 본 연구관련 국내외 기술수준 비교

개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비고
		우리나라	연구신청팀		
균주수집	미국	50	70	80	
대량생산 기술	미국, 유럽,	10	50	70	
제제화 기술	유럽, 미국	0	50	100	
이용기술	미국, 유럽, 중국	0	25	50	

- 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
- 2) 현재 기술수준은 선진국 100% 대비 우리나라 및 신청한 연구팀의 기술수준 표시
- 3) 기술개발 목표수준은 당해과제 완료 후 선진국 100% 대비 목표수준 제시
- 4) 부가설명이 필요한 경우 비교란에 작성

2. 특허분석

가. 특허분석 범위

(예시)

대상국가	국내, 국외(미국, 일본, 유럽)
특허 DB	특허정보원 DB(www.kipris.or.kr), Aureka DB
검색기간	최근 5년간
검색범위	제목 및 초록

나. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명	(기술 1)	(기술 2)
Keyword	<i>Beauveria bassiana</i> , 미생물살충제	미생물살충제제, 온실가루이, 담배가루이
검색건수	6	11
유효특허건수	2	3
핵심특허 및 관련성	특허명	살충활성이 있는 곤충병원성 곰팡이 보베리아 바시아나 MaW 1 균주 및 이의 용도
	보유국	한국
	등록년도	2011.11.04
	관련성(%)	10
	유사점	살충활성 곰팡이
	차이점	살충 타겟이 다름
	유해생물방제용 조성물(PESTICIDAL COMPOSITION)	일본
		2008.03.27
		5
		농업 및 원예상 허용가능한 유해생물방제 조성물
		친환경제제로 살충미생물배양 조성물

- 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
- 2) keyword는 검색어를 의미하며, 검색건수는 keyword에 의한 총 검색건수를, 유효특허건수는 검색한 특허 중 핵심(세부)개발기술과 관련성이 있는 특허를 의미
- 3) 핵심특허는 개발기술과의 관련성이 높고 인용도가 높은 특허를 기준으로 분석

3. 논문분석

가. 논문분석 범위

(예시)

대상국가	미국, 일본, 유럽
논문 DB	Aureka DB, pubmed DB(www.ncbi.nlm.nih.gov), 국회도서관(www.nanet.go.kr)
검색기간	최근 5년간
검색범위	제목, 초록 및 키워드

나. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명	(기술 1)	(기술 2)
Keyword	<i>Beauveria bassiana</i> , biopesticide	<i>Beauveria bassiana</i> , biopesticide
검색건수	9	21
유효논문건수	2	10
핵심논문 및 관련성	논문명	A novel biopesticide production: attagel-mediated precipitation of chitinase from <i>Beauveria bassiana</i> SFB-205 supernatant for thermotolerance
	학술지명	<i>Applied Microbiology and Biotechnology</i>
	저자	Jae Su Kim and Yeon Ho Je
	게재년도	2010
	관련성(%)	20
	유사점	<i>Beauveria bassiana</i> 액체배양을 통한 Chitinase 생성
차이점	Cuticle (chitin fibrils+protein matrix+lipids) 중 분해효소를 생산하는 <i>Beauveria bassiana</i> 의 포자대량생산 배양	
	Optimization of Solid-State Fermentation for Improved <i>Conidia</i> Production of <i>Beauveria bassiana</i> as a Mycoinsecticide	미생물 살충제용 조성물(PESTICIDAL COMPOSITION)
	Mycobiology	일본
	Tuan Anh Pham, Jeong Jun Kim and Keun Kim	2008.03.27
		5
		농업 및 원예상 허용가능한 유해생물방제 조성물
		친환경제제로 살충미생물배양 조성물

4. 제품 및 시장 분석

가. 생산 및 시장현황

1) 국내 제품생산 및 시장 현황

- 온실/담배가루이 방제용 친환경 미생물 농약 생산 전무
- 이와 관련된 제품 수입에 의존
- 2008년 미생물살충제 시장 20여억원 달성, 매년 10 ~ 30% 현저한 성장률
- 2015년 친환경 5개년 계획 정책 실시로 2015년 까지 친환경 재배면적 12% 확대 & 학비료·농약 매년 3% 이상 감축 및 유기·무기농약 재배면적 증대에 따른 친환경 농자재 수요 급증

2) 국외 제품생산 및 시장 현황

- 현재 시판 중인 곤충병원성 곰팡이를 이용한 미생물농약은 전 세계 11개 회사에서 9종 18군주를 이용한 18제품

군 주	제 품 명	제 조 회사	등록 국가
Beauveria bassiana	Ago biocontrol Bassiana 50	Ago Biocontrol	콜롬비아
Beauveria bassiana	Mycotrol, Botani Gard, Comgard	Mycotech Corporation	미국, 멕시코 등
Beauveria bassiana	Ostrinil	Natural Plant Protection	프랑스
Beauveria brongniartii	Ago biocontrol Beauveria 50	Ago Biocontrol	콜롬비아
Beauveria brongniartii	Engerlingspilz	Audematt Biocontrol	스위스
Beauveria and Metarhizium spp	Beauveria Schweizer, Metarhizium Schweizer	Eric Schweizer Seeds	스위스
Chondrostereum purpureum	Biochon	Koppert	전세계
Lagenidium giganteum	Laginex	AgraGuest	미국
Metarhizium anisopliae	Ago biocontrol Metarhizium 50	Ago Biocontrol	콜롬비아
Metarhizium anisopliae isolate F-100	Biogreen Granule	Bio-Care Technology	오스트리아
Metarhizium anisopliae	BIO 1020	Bayer AG	독일
Metarhizium anisopliae var. acridum isolate IMI 330189	Green Muscle	Biological Control Products SAPTY	남아프리카
Nomuraea rileyi	Ago biocontrol Nomuraea 50	Ago Biocontrol	콜롬비아
Paecilomyces fumosoroseus	Ago biocontrol Paecilomyces 50	Ago Biocontrol	콜롬비아
Paecilomyces fumosoroseus Apopka 97	PFR-97 biological insecticide	Thermo Trilog Corporation	유럽연합, 미국
Verticillium lecanii	Ago biocontrol Verticillium 50	Ago Biocontrol	콜롬비아
Verticillium lecanii	Mycotal	Koppert	네덜란드 등 유럽 7개국
Verticillium lecanii	Vertalec	Koppert	영국, 스위스, 노르웨이, 덴마크, 핀란드
9종 18군주	18제품	11개사	

나. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

1) 산업화 방향(제품의 특징, 대상 등)

- 세계시장에서 농약 약제별 사용 현황을 살펴보면 제초제와 살균제의 사용량이 증가하였으나 살충제의 사용량의 증가는 미비하다. 이는 해충종합관리(IPM)기술의 확대보급으로 인하여 천적 및 미생물살충제의 사용이 증가하고 있기 때문이라 하겠다.

- 국내시장에서도 국가정책과 더불어 소비자들의 안전한 먹거리 요구에 따라 관행농법에서 친환경농법으로 많이 전환되고 있으며 연평균 증가율이 50%에 가깝다. 또한 저농약 인정이 향 후 2015년을 기점으로 점진적으로 사라지게 되면서 친환경 생산비율이 높아지게 될 것이고 따라서 친환경농산물 시장규모도 가속적으로 증가세를 보여 줄 것으로 예상된다.
- 국내미생물농약 시장을 살펴보면 농약시장에 비해 규모는 작지만 증가세는 높다. 또한 살균제 시장보다 살충제 시장이 다소 높으며 최근 6년간 매출액도 살충제가 2배 이상 많음을 알 수 있다.
- 앞으로 이와 같이 국내외적으로 미생물살충제 시장의 규모 및 현장에서의 요구도가 급속하게 높아질 것이며 전체 농약시장에서 차지하는 비중도 점차 증가할 것으로 전망되고 있다.

2) 산업화를 통한 기대효과

(단위 : 백만원)

항 목	산업화 기준					
	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과	50	100	200	400	600	1,350
경제적 파급효과	25	50	100	200	300	675
부가가치 창출액	50	100	200	400	600	1,350
합 계	125	250	500	1,000	1,500	3,375

- 1) 직접 경제효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 제품의 매출액 추정치
- 2) 경제적 파급효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통한 농가소득효과, 비용절감효과 등 추정치
- 3) 부가가치 창출액 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 수출효과, 브랜드가치 등 추정치

5. 3P(특허, 논문, 제품)분석을 통한 연구추진계획

가. 분석결과 향후 연구계획(특허, 논문, 제품 측면에서 연구방향 제시)

1) 특허분석 측면

- 기존 특허는 화학적 방제 및 단일 물질을 통한 살충효과를 보이고 있으며, 친환경 살충제제화의 조성물분야 등 제한적인 분야에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 농업부산물을 이용하여 제형화를 통해 친환경 미생물 살충제개발에 있어 seed 개념의 포자 대량생산에 초점을 맞추어 연구를 추진하여 특허 등을 국내 및 국외에 출원할 계획임
- 기존 특허는 한가지 층에 대한 살충효과에만 의존하고 있으나, 본 연구에서는 개발된 친환경 미생물 살충제는 가루이를 대상으로 여러 가지 작물에 이용이 가능하도록 다양화할 것임

2) 논문분석 측면

- 기존 논문은 미생물을 탐색하여 최적화를 통해 살충효과를 보이는 것, 즉 생리생화학적 분야에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 농업부산물을 이용하여 포자의 대량생산을 통해 곤충의 큐티클층을 분해하는 다양한 효소학적인 접근과 포자대량생산 방향으로 연구를 추진하여 국내외논문 등을 학술지 등에 게재할 계획임
- 또한 논문 분석에 있어 포자의 대량생산과 관련되어 유사한 논문의 경우 백미를 이용하여 포자의 대량 생산을 하였다. 하지만 본 연구에서는 자원순환의 개념을 바탕으로 농업부산물인 미강을 통한 최적화에 따른 살충효과를 보이는 미생물제제를 대량생산하고자 한다.

3) 제품 및 시장분석 측면

- 국내 및 국외시장 분석결과 원제의 경우 수입 제품 등의 생산 및 판매가 이루어지고 있으며, 국내의 경우 균주개량 및 대량생산, 제제화 등이 전무한상태이다. 본 연구과제에서는 원제로 사용이 가능한 포자를 농업용 부산물을 이용하여 대량 생산 할 수 있는 방향으로 연구를 추진하여 미생물 살충제제 제품 등을 생산하여 국내 및 국외에 판매할 계획임
- 현재 국내 연구는 매우 미진한 상태이고, 주로 시설재배지 내에서 문제충인 진딧물류, 가루이류 등에 대한 방제 및 외래 천적을 활용한 부분이 미약하며, 산업적 기반이 취약한 상태이다.
- 따라서 본 연구 과제를 통해 농업부산물을 이용하여 친환경 미생물 살충제를 대량배양 방법 최적화를 통해 친환경농업 제제로 활용및 산업화하고자 한다.