

115083  
-2

핵다각체병바이러스를 이용한 고추담배나방 방제용 친환경경제제 개발 최종 보고서

(견고닥 14p)

20xx  
(견고닥13p)

농림축산식품부  
안동대학교 산학협력단

(견고닥 17p)

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

발간등록번호

11-1543000-002261-01

(견고닥31p)

# 핵다각체병바이러스를 이용한 고추담배나방 방제용 친환경경제제 개발 최종보고서

2017. 12. .  
(견고닥15p)

주관연구기관 / 안동대학교 산학협력단  
협동연구기관 / 예천농업기술센터  
협동연구기관 / (주)엠텍  
(견고닥 15.5p)

농림축산식품부

(전문기관) 안동대학교 산학협력단  
(견고닥 20p)

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “핵다각체병바이러스를 이용한 고추담배나방 방제용 친환경제제개발”  
(개발기간 : 2015. 12. 18. ~ 2017. 12. 17. )과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017. 12 . .

주관연구기관명 : 안동대학교 산학협력단 (대표자) (인)  
협동연구기관명 : (주)엠텍 (대표자) (인)  
협동연구기관명 : 예천농업기술센터 (대표자) (인)

주관연구책임자 : 권 \* \*

협동연구책임자 : 김 \* \*

협동연구책임자 : 김 \* \*

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

## 보고서 요약서

과제 고유 번호	115083-2	해당 단계 연구 기간	2015.12.18. - 2017.12.17.	단계구분	(2)/(2)
연구사업명	중사업명	농식품기술개발사업			
	세부사업명	농생명			
연구과제명	대과제명	대과제가 있을 경우 기재합니다(단위과제일 경우에는 아래에 기재합니다)			
	세부과제명	핵다각체병바이러스를 이용한 고추담배나방 방제용 친환경제제개발			
연구책임자	권 기 석	해당단계 참여연구원 수	총: 18명 내부: 18명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부:100,000천원 민간: 33,340천원 계:133,340천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 18명 내부: 18명 외부: 명	총 연구개발비	정부:200,000천원 민간: 66,680천원 계:266,680천원
연구기관명 및 소속 부서명	안동대학교 산학협력단			참여기업명 (주)엠텍	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
협동연구	연구기관명:예천농업기술센터			연구책임자:김진원	

※ 국내·외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	보안/업체의 시제품 개발과 관련되어 보안과제로 하고자함,
-------------------------	---------------------------------

### 9대 성과 등록 · 기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호		2	1								

### 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설 · 장비 현황

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

<p><b>요약</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 곤충병원성 핵다각체병바이러스를 분리 대량 생산 방법을 모색하였으며, 현장적용을 위한 바이러스의 최적 함량을 조사 하였고, 현장 포장 실험 및 시설재배를 통해 고추담배나방의 방제를 확인하였으며, 제형화 방안을 통해 시제품인 ‘디펜스’ 를 완성하여 참여기업에 기술을 이전 하기로 하였음.</li> <li>- 본 연구결과를 바탕으로 2건의 특허 출원과 다수의 학회발표 및 현장 교육지도도를 통해 친환경농업에 대한 정착을 유도하였으며, 과제 완료 후에도 계속적으로 농업에 적용 할 수 있도록 지도할 예정임.</li> </ul>	보고서 면수 126페이지
--	------------------

## 요약문

연구의 목적 및 내용	<p>○ 연구 목표</p> <p>고추담배나방 핵다각체병바이러스의 탐색을 통해 선발된 고추담배나방 핵다각체병바이러스의 형태 및 생화학특성조사하고 대량생산 최적조건 및 생산체계 구축 확립을 통해실내 / 실외 생물검정 및 방제효과 증진을 위한 미생물살충제 증진기술개발(핵다각체병바이러스 +곤충병원성세균)과 기주곤충(고추담배나방) 증식의 최적화조건 및 안정화된 사육법 개발을 이용하여 핵다각체병바이러스의 대량생산 최적조건 및 생산체계 구축과 생물검정에 의한 고추담배나방방제용 핵다각체병바이러스의 제형화를 바탕으로 곤충병원성 핵다각체병바이러스 친환경 제제 개발에 그 목표를 두고 있다.</p> <p>○ 연구 내용</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 연구기술개발을 통해 연구된 고추담배나방 핵다각체병바이러스의 선별 및 탐색</li> <li>- 선별된 고추담배나방 핵다각체병바이러스의 형태학적, 생화학적 특성을 조사하고 배양방법에 대한 최적화기술의 규명</li> <li>- 핵다각체병바이러스의 대량생산을 위한 최적조건 및 생산체계 구축을 위해 host 배양 방법의 확립과 감염 host를 통한 virus 회수 방법 조사</li> <li>- 핵다각체병바이러스의 실내/외 생물검정을 통한 방제력 조사</li> <li>- 방제효과 증진을 위한 미생물살충제 증진기술개발(핵다각체병바이러스 +곤충병원성세균)</li> <li>- 선발된 핵다각체병바이러스의 대량생산 최적조건 및 생산체계 구축 방안 확보</li> <li>- 생물검정에 의한 고추담배나방방제용 핵다각체병바이러스의 제형화 방법 조사 및 보조물질 탐색</li> <li>- 제형화된 제품의 안전성 및 안정성 조사</li> <li>- 제형화된 제제의 살충력 검증과 기존 제품과의 살충력 비교 검증 및 상품화 타당성 조사</li> <li>- 핵다각체병바이러스의 살충성 친환경 제제 개발을 통한 시장성 분석</li> </ul>				
연구개발성과	<p>○ 고추담배나방 핵다각체병바이러스 대량 생산 방법 완성</p> <p>○ 핵다각체병바이러스의 현장적용 실험을 통해 적정 최적 농도를 확인함.</p> <p>○ 고추담배나방 제어 핵다각체병바이러스 제제 시제품 ‘디펜스’ 개발</p> <p>○ 특히 2건 출원, 기술이전 1건, 사업화 1건, 연구기반 학술 발표 4건, 교육 지도 9건, 인력양성 2건과 홍보전시 5건, 정책활용 1건 및 학회 포스터상 1건을 통해 연구 개발 성과를 얻음.</p>				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 농가에서 농약사용절감 및 경영비 감소</li> <li>- 친환경 유기농산물 생산에 필요한 친환경농자재 역할</li> <li>- 관련 농산업 활성화 및 차별화된 효능으로 생물농약 및 제제의 시장 진입</li> <li>- 친환경농산물 생산으로 안전한 먹거리 보장</li> <li>- 바이러스를 이용한 고효성 생물살충제 제품으로 등록(친환경목록고시) 및 시판</li> <li>- TV, 신문 및 잡지 기사에 의한 제품의 홍보 효과에 따른 매출기대</li> <li>- 고추담배나방에 대한 살충활성이 우수한 새로운 생물학적 살충제 개발</li> <li>- 시설·노지작물 등에 발생하는 해충에 대한 미생물을 이용한 방제로 친환경농업 구현</li> <li>- WTO/FTA 대응 수입 및 수출작물의 재배안정화 유도 소재 확보</li> <li>- 수입대체 효과 및 소재의 신시장 창출에 따른 국제경쟁력 확보</li> <li>- 화학합성농약의 오, 남용 등으로 인한 환경오염부담 경감</li> </ul>				
국문핵심어 (5개 이내)	고추담배나방	기주곤충	핵다각체병 바이러스	살충제	친환경농업
영문핵심어 (5개 이내)	<i>Helicoverpa assulta</i> Guenee	Host-insect	Nuclear Polyhedrosis virus	Insecticide	Ecofriendly Agriculture

## < SUMMARY >

<p>Purpose&amp; Contents</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Screening and isolation of <i>Helicoverpa assulta</i> using HasNPV</li> <li>- Optimal production yields condition of <i>Helicoverpa assulta</i> using HasNPV and biochemical characteristics</li> <li>- Mass production and formulation on <i>Helicoverpa assulta</i> using HasNPV</li> <li>- Biological control effect <i>Helicoverpa assulta</i> using HasNPV of field and greenhouse test.</li> <li>- Development of biological control increase efficacy (HansNPV+ enthomopathogenic bacteria)</li> <li>- Mass production and optical condition formulation on HasNPV</li> <li>- Field experiment and enhanced effectiveness of HasNPV with additives</li> <li>- Safety and suability of pathogenicity on formulation HasNPV</li> <li>- Verification of insecticidal power of formulated formulation and comparison of insecticidal power with products and feasibility study on commercialization</li> <li>- Analysis of marketability for ecofriendly biopesticide of HasNPV</li> </ul>				
<p>Results</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mass production and optical condition formulation on HasNPV</li> <li>- The Effect of temperature and storage on the Pathogenicity of the HasNPV</li> <li>- Selection of biological control method of HasNPV</li> <li>- Optimal concentration of HasNPV <math>1 \times 10^7</math> PIBs/ml for field test</li> <li>- Development of biopesticide product 'DEFENSE'</li> <li>- Patent 2, Technology transfer 2, Commercialization 1, Poster 4, Education 9, Higher Education 2, Promotion 5, Political Application 1, Poster awards 1</li> </ul>				
<p>Expected Contribution</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Reduce the use of agricultural chemicals at farmers, decrease operating costs</li> <li>- Role of environmental agricultural materials necessary for the production of environmentally friendly organic agricultural products</li> <li>- Differentiated effectiveness from activation of agricultural industry</li> <li>- Use of HasNPV for register and sell to biological insecticide products</li> <li>- Sales forecast due to product publicity effect</li> <li>- Development of enthomopathogenic biopesticide</li> <li>- Implement environmentally friendly agriculture for biological controlling</li> <li>- Secure international competitiveness through import substitution effect and creation of new market for materials</li> </ul>				
<p>Keywords</p>	<p><i>Helicoverpa assulta</i> Guenee</p>	<p>Host-insect</p>	<p>Nuclear Polyhedrosis virus</p>	<p>Insecticide</p>	<p>Ecofriendly Agriculture</p>

## 영문목차

1. Outline of research .....	1
2. Current status of related research developed in Korea and foreign country ....	4
3. Results of research .....	8
4. Achievements of aims and contribution to related area .....	111
5. Application of results .....	113
6. Information collected from abroad during the research period .....	115
7. Protection of research and development results .....	116
8. Research facilities and equipment .....	117
9. Performance of safety measures .....	118
10. Representative research achievements of research and development issues ....	119
11. References .....	120

## < 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요 .....	1
2. 국내외 기술개발 현황 .....	4
3. 연구수행 내용 및 결과 .....	8
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	111
5. 연구결과의 활용계획 등 .....	113
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	115
7. 연구개발성과의 보안등급 .....	116
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황 .....	117
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 .....	118
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적 .....	119
11. 참고문헌 .....	120

## 뒷면지

### 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.



# 1. 연구개발과제의 개요

## 가. 연구개발 목적

- 고추담배나방 핵다각체병바이러스의 탐색
- 선발된 고추담배나방 핵다각체병바이러스의 형태 및 생화학특성조사
- 선발된 핵다각체병바이러스의 대량생산 최적조건 및 생산체계 구축 확립
- 선발된 핵다각체병바이러스의 실내 / 실외 생물검정
- 방제효과 증진을 위한 미생물살충제 증진기술개발(핵다각체병바이러스 +곤충병원성세균)
- 기주곤충(고추담배나방) 증식의 최적화조건 및 안정화된 사육법 개발
- 선발된 핵다각체병바이러스의 대량생산 최적조건 및 생산체계 구축
- 생물검증에 의한 고추담배나방방제용 핵다각체병바이러스의 제형화
- 곤충핵다각체병바이러스 친환경 제제 개발

## 나. 연구개발의 필요성

- 기술적 중요성
  - 친환경재배면적 2015년까지 12% 확대 & 화학비료·농약 매년 3% 이상 감축(친환경농업 5개년 계획 시행 중)
  - 국내 원제 개발을 통해 제품 개발로 이어진다면 활용하면 안정적이고 높은 방제 효과 및 수입 대체 효과 기대
  - 과실 속에서 주로 생활하며 발생양상이 복잡하고 주 발생 시기를 예측하기 어려움, 모든 방제방법에 있어 높은 방제효과를 높이기 위해서 알에서 깨어나 과실로 들어가기 전까지가 중요한 방제 시기이므로 방제가 어려운 해충, 정확한 발생예찰 및 발생밀도 추정기술이 매우 중요
  - 화학적 방제 이외도 트랩, 천적(쌀줄알벌-알기생봉) 등을 이용한 방제기술 및 곤충병원성 미생물 (세균/곰팡이)을 이용한 생물학적 방제 진행 중이나 주위환경에 따른 방제력 저하 및 내성 발생
  - 외국에서 Gemstar LC (Certis USA Corp, Columbia, MD, USA), Elcar (Novartis Corp Protection, Inc., Greensboro, NC, USA), Biotrol-VHZ (Nutrilite Products, Buena Park, CA, USA) 등의 제품이 개발되어 사용, 유럽이나 일본 등 친환경농업인 많이 사용, 국내에의 경우 전부 수입 또는 수입 Bt제제만으로 방제 활용.
  - 곤충에 질병을 일으키는 바이러스 900여종에 14과(Family), 이 중 곤충핵다각체병바이러스(NPV)은 520여종, 과립병바이러스(GV)은 70여종 보고.
  - 기주곤충에만 감염되는 기주특이성, 인축과 환경에 무해하고 안정성 높아 여러 나라에서 바이러스 살충제 개발 주목.
  - 효율적면에서 기존의 화학살충제와 비교 살충범위 좁고, 살충효과 늦게 나타나고, 저장중이나 야외 살포 후 태양광선에 의해 바이러스 병원성 저하(실용화 개선점 필요)
  - 곤충병원성 살충제로서의 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

- 기주곤충의 대량사육시설과 기술체계 확립이 필요, 국내 연구 수준은 기주곤충과 바이러스의 대량증식 시설이나 바이러스 제제화 등에 관한 연구가 매우 미진.

○ 경제·산업적 중요성

- 경북지역 고추 총생산량 대비 매년 5%이상 피해 발생으로 경제적 손실 발생.
- 우리나라 친환경농업 5개년 계획 확정(2011년), 2015년까지 저농약 인증 폐지·친환경재배 면적 12% 확대, 화학비료·농약 사용량 매년 3%씩 감소.
- 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.
- 세계적 생물농약은 185종으로 작물보호시장의 1%에 불과, 이중 곤충바이러스 살충제는 24종차지, 미국의 경우 미생물농약 시장 바이러스 살충제 1%에 불과. (CPL Business consultants, 2006년)
- 미국 1973년 목화 해충인 *Heliothis zea* 방제 약제로 Elcar라는 상표로 상품화, 각 나라의 주요 방제해충을 대상으로 수 십 여종의 바이러스 살충제 개발 및 시판.
- 일본의 경우 16종, 중국에서는 22종에 대해 각각 포장시험을 미치고 일부 상품화 단계에 있어 각국의 바이러스 상품권 등록 경쟁 치열 전망.
- 세계농약시장에서 화학농약 시장 둔화, 미생물 살충제 10~30%의 현저한 성장률.
- 미생물 살충제 등을 이용 환경 친화적으로 생산된 농산물 시장에서 경제성 선점
- 현재 국내의 경우에는 미생물 살충제, 천적 및 친환경 농자재를 포함한 국내 생물농약시장은 약 700억 정도로 추정되고 있으며, 2020년에는 전체 농약 시장의 10% 규모인 2,000억 원 정도에 이를 것으로 추정된다. 새로운 미생물 살충제가 개발되면 농약 수입대체 효과도 크리라 기대가됨.
- 관련 미생물특허, 제조특허 등 지적·산업재산권 확보로 선진국의 특허장벽 극복과 국가 보유 생물자원 활용 및 부가가치 증대로 국가경쟁력 향상
- 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

다. 연구개발 범위

- 핵다각체병바이러스수집·분리 및 특성 조사
  - 핵다각체병바이러스의 확보를 통해 분리 방법 및 바이러스의 생화학적 특성 조사
- 제형화 방안 조사
  - 핵다각체병바이러스의 친환경제 개발을 위한 제형화 방안에서 부가제 탐색 및 제조 방법 검증 (자외선 차단제, 부용제 및 약효증진제 탐색 및 농도 조사)
- 안정성 조사(바이러스 불활성화 조사)
  - 핵다각체병바이러스의 온도 및 습도에 따른 안정성 조사
  - 제형화된 시제품의 저장성 실험
- 안전성 검사 : 관련기관에 분석 의뢰
  - 친환경제등록을 위한 생물 안전성 검사
  - 원재에 대한 독성시험 : 인축독성(급성경구, 급성경피, 피부자극, 안점막 자극, 어독성), 환경독성(꿀벌)
- 핵다각체병바이러스의 대량생산 확립
  - 온도, 습도에 따른 바이러스 대량생산과 host에 대한 접종농도, 유충영양, 온도조건 등을 조사
- 생물검정
  - 온실 및 노지에서의 살충범위 및 살충효과 검증
  - 사용 매뉴얼 개발
- 살충범위 및 효과 검증
  - 제형화된 제품의 생물 검증을 통해 기존 제품과의 차이점을 조사하고 미생물 살충제와의 혼용 효과에 대한 조사
- 홍보 및 교육
- 바이러스 회수방안 확립
  - 핵다각체병바이러스의 바이러스 회수 및 정제 방법 개발
- 생물검정
  - 실내검정 (접종농도, 시기 및 회수)에 따른 바이러스 농도의 최적화
- 제형화 및 생산 연구
  - 안정제 및 보조제 선별을 통해 제형화 형태(수화제, 액상수화제 등) 연구를 통해 제조방법 및 제형과 확립
  - 유인제, 보조제, 자외선 차단제, 안정제 및 약효증진물질을 이용한 제형화 조사
- 바이러스 병원성 증대 방안을 통한 시제품 생산
  - 바이러스 살포량 및 방법을 통해 최적생산 조건의 규명
- 실용화 및 산업화에 대한 경제적 분석
  - 시장조사 및 원료원가 분석을 통한 경제성 분석

## 2. 국내외 기술개발 현황

### 가. 국내 기술현황

- 농업적으로 유용한 곤충, 미생물, 및 병원성 천적 등을 이용하여 해충을 효과적으로 방제하는 연구 활발해지고 있음.
- 주로 시설재배지 내에서 문제해충인 나방류, 응애류, 진딧물류, 가루이류, 총채벌레류 등의 방제에 토착 및 외래 천적이 활용 부분적으로 효과 입증, 아직까지 해당 분양의 산업적 기반이 취약함.
- 1974년 뽕나무해충인 흰불나방에서 핵다각체병바이러스를 분리하여 병원성이 매우 높은 것을 확인되어 연구 시작됨
- 기주곤충과 바이러스의 대량증식 시설이나 바이러스 살충제 제제화 연구 미약함
- *Bacillus thuringiensis* 내독소와 초록색형광물질을 *Autographa californica* 유전자와 재조합하여 recombination ColorBtrus.의 빠른 살충효과 확인함.
- 유기산 등을 혼합하여 살포함으로써 살충기간을 단축하고 살충효과도 높이는 연구 수행.

병원미생물		분리 동정	특성 조사	배양증식		효과검증		대량 증식	제형화	상품 등록	
				<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>	실내	포장				
바이 러 스	NP V	<i>Spodoptera litura</i>	○	○	○	-	○	○	○	○	-
		<i>S. exigua</i>	○	○	○	-	○	○	○	○	-
		<i>Mamestra brassicae</i>	○	○	○	-	○	-	-	-	-
		<i>Helicoverpa assulta</i>	○	○	○	-	-	-	-	-	-
		<i>Hyphantria cunea</i>	○	○	○	-	○	○	○	-	-
	GV	<i>Plutella xylostella</i>	○	○	○	-	○	-	-	-	-

출처 : 한국과학기술정보연구원

- 국내의 신물질 원제 탐색 및 개발에 대한 기술수준은 높은 편이나 원제 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.
- 실제로 국내에서 원제를 개발하고도 막대한 등록비용으로 인해 원제를 다국적 기업에 넘겨 제품으로 개발된 사례가 있음.

### 나. 국외 기술현황

- 생물 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 있음.

- 미국 1973년 목화 해충인 *Heliothis zea*와 *H. virescens* 방제 약제로 Elcar라는 상표로 처음 상품화, 이후 각 나라마다 주요방제해충을 대상으로 수 십 여종의 바이러스 살충제 개발 및 시판중 임.
- 일본의 경우 16종, 중국에서는 22종에 대해 각각 포장시험을 미치고 일부 상품화 단계
- 1913년 알팔파에 담배나방류의 병사충을 물에 현탁하여 최초의 현장 포장시험 수행 후 1940년 후반부터 미국, 캐나다, 프랑스, 등에서 본격적으로 연구 시작.
- 태양광선에 곤충바이러스 다각체를 보호하기 위해 peroxidases, uric acids, *p*-aminobenzoic acid 등 UV 보호제 개발.
- Tinopal UNPA-GA라는 형광표백제를 처리함으로 살충기간 단축시킬 뿐 아니라 살충효과 90배 높임.
- 현재 바이러스 살충제 중 세계 각국에서 가장 많이 사용되는 NPV의 대표적인 예와 그 대상해충임.
- *Heliothis zea*는 실용, 공예, 사료작물에 광범위하게 피해를 주는 해충인데, 1960년대 초 미국에서 NPV를 이용한 방제가 시도된 이후, 전 세계의 면화 생산국에서 NPV를 이용한 *H. zea* 방제가 연구되었다. 1970년대에는 활성이 높고 잔효성이 좋은 Sandoz-074-4 제제가 개발되어 1975년에 공시되었으며, 1976년에는 Elcar라는 상품명으로 등록되었음.
- *Trichoplusia ni*는 유채에 피해가 큰 해충으로 TnNPV를 ha당 123~250 LE (larval equivalent) 량으로 살포하여 양배추 등의 *Trichoplusia ni*를 재배기간 동안에 완전히 방제할 수 있었다. 한편 기주범위가 넓은 AcNPV와 혼합 사용되었는데, TnNPV+AcNPV를  $7.7 \times 10^{11}$  다각체/ha 되도록 4년 연속 살포했을 때는 Bt제나 화학살충제의 관행방제보다 높은 효과를 얻을 수 있었음.
- *Lymantria dispar* NPV에 관해서는 일본, 이탈리아, 독일, 유고슬라비아, 루마니아, 미국, 캐나다, 러시아 등에서 많이 연구되었다. 1978년 미국에서 Gypchek이란 상품명으로 등록되어  $2.5 \times 10^{11}$  다각체/ha 농도로 잎의 50% 전개기 (난의 50% 부화)와 그 후 5~10일 후 (잎의 전개기, 1~3령 유충기)에 2회 공중 살포하는 방법으로 1979년부터 펜실바니아, 뉴욕, 미시간주 등의 4,000 ha의 산림에 짚시나방을 대상으로 사용하였음.
- *Pieris rapae* GV는 1956년 캐나다에서 브로콜리의 배추흰나비 방제에 PrGV를 이용한 실험에서 효과가 확인된 이래, 1973년에 양배추의 배추흰나비 방제를 위해  $2.47 \times 10^{11-13}$  캡슐/ha 량으로 살포한 후 9일간 87 ~ 97%가 방제되었으며,  $2.47 \times 10^{11}$  캡슐/ha를 살포한 포장에서 상품가치가 있는 배추 생산량이 무처리의 22%에 비해 84%나 되었다. 러시아에서는 PrGV의 제제로 Virin-GKB가 개발 사용되고 있음.
- 세포질다각체병 바이러스 CPV는 일본에서 소나무 해충인 솔나방 방제에 이용한 예가 대표적이다. 원래 CPV는 야외에서 솔나방의 서식밀도를 낮추는 직접요인은 되지 않지만 6~7령 유충을 대상으로  $1.7 \times 10^6$  다각체/ml의 농도로 ha 당 60리터 (200 LE/ha)를 공중살포했을 때 솔나방의 서식밀도를 현저히 감소시킬 수 있었다. 이때 CPV 살포효과는 솔나방이 밀도 의존적이어서 고밀도 일 때 효과가 높았으며, 그 효과가 수년간 지속되었으므로 장기 방제용으로 적합하며, 이 CPV는 일본에서 Matzgem인란 상품명으로 1974년에 농약등록되었음.

바이러스명	제품명 (생산국)
<i>Lymantria dispar</i> NPV	Virin-Ensh (러시아), Gypchek (미국)
<i>Heliothis virescens</i> NPV	Biotrol VHZ, Elcar (미국), Viron (미국)
<i>Autographa californica</i> NPV	SAN-404, -405 (미국)
<i>Neodiprion lecontei</i> NPV	Leontvirus (캐나다)
<i>Heliothis zea</i> NPV	Biotrol VHZ, Elcar (미국), Vitrex (미국)
<i>Mamestra brassicae</i> NPV	Virin-Ensh (러시아), Mamestrin (프랑스)
<i>N. sertifer</i> NPV	Virin-Diprion (러시아), NPV (핀란드), Neoscheck-S (미국)
<i>Porthetria dispar</i> NPV	Virin-es (러시아)
<i>Prodenia ornithogalli</i> NPV	Biotrol VPO, Virin/P (미국), Viron/S (미국)
<i>Spodoptera exigua</i> NPV	Biotrol VSE, Viron/S (미국)
<i>Trichoplusia ni</i> NPV	Biotrol VTN, Viron/T (미국)
<i>Orygia pseudotsugata</i> NPV	TM-Bio Control-1 (미국), Virtuss (캐나다)
<i>Pieris rapae</i> GV	Virin-GKB (러시아)
<i>Dendrolimus spectabilis</i> CPV	Matzgemim (일본)

출처 : 한국과학기술정보연구원

- 국내 해충방제는 최근 까지 농약에 의존하고 있으며, 국내 농약사용량은 지속적으로 증가되다, 농약의 문제점으로 인해 친환경으로 전환되고 있는 실정임.
- 유기합성농약의 사용감소에 관한 국가간 협약에 이어 WTO 및 FTA 협정에 따라 국가간의 무역확대 민 농약 사용 규제로 인해 농약 잔류에 대한 문제가 대두되고 있음.
- 중국과 대만의 경우 치열한 농산물 수출경쟁이 심화되고 있어 농민의 경제적인 부담과 방제에 대한 문제점을 보완하지 않을 수 없음.
- 현재 국내에서는 소비자의 식생활 패턴의 변화로 육류와 함채 채소류의 소비 증가가 계속되고 있으며 농약안전에 대한 문제점으로 유기농 및 친환경 농산물 선호도가 증대되고 있어 농약 사용의 문제는 국내외적으로 해결해야 할 큰 문제 임.
- 국내 농업의 변화로 인하여 새로운 농약 대체재 기술개발이 시급하나 그 효과가 아직 미미하고 최근 들어 많은 변화가 일어나고 있음.
- 외국에서는 친환경적 방제 기술로 곤충에 질병을 일으키는 즉, 바이러스, 세균, 곰팡이, 원생동물, 곤충기생 선충 등의 자원을 확보하여 보관하면서 생물농약으로 활용하고자 미생물 살충제로 개발하여 상품화하거나 자국에서 생산하여 판매 보급하는 체제를 이루고 있음.
- 최근 국내에서는 농업 기술센터 등을 활용하여 친환경 미생물을 보급하는 각 시군이 증가되고 있는 실정임.
- 세계무역 자유화에 따라 농산물의 수출 경쟁, 각 국의 농약사용 규제에 대비한 친환경 해충방제 기술 개발, 고품질의 안전채소 생산 환경의 지속화를 위한 농업환경 조성, 소비자의 안전농

산물 선호도 증가로 미생물 자원의 지식재산권보호를 위해 미래 대처하고 연구하여야함.

- 전 세계에서 생물농약은 185종으로 작물보호시장의 1%에 지나지 않고 있으며 이중 곤충 바이러스 살충제는 24종을 차지함.
- 외국에서의 바이러스살충제 개발은 1960년대를 시작으로 미국에서 1973년 목화 해충인 *Heliothis zea*와 *H. virescens*방제약제로 Elcar라는 상표로 상품화한 것이 처음이며 지금까지 각 나라의 주요 방제해충을 대상으로 수 십 여종의 바이러스살충제가 개발되어 시판되고 있음.

### 3. 연구수행 내용 및 결과

#### 가. 고추담배나방 핵다각체병바이러스의 선별 및 탐색

최근까지 다른 해충과 마찬가지로 고추담배나방도 화학적 방제가 주를 이루고 있었으나 약제에 대한 저항성으로 방제가 어려워 재배작물이 큰 피해를 입을 뿐 아니라 저항성해충의 출현, 인축이나 동식물에 대한 직·간접적인 피해와 잔류성으로 인한 환경오염 및 생태계 파괴 등의 심각한 문제를 야기 시키고 있다. 이를 해결하기 위한 방안중 하나로 생물적 방제법을 도입하여 화학적 방제의 보완 또는 대체수단으로서 종합적 해충방제 체계 확립에 연구의 초점을 집중시키고 있다. 그 중에서도 곤충 질병을 일으키는 세균, 바이러스, 사상균, 원생동물 등 해충의 방제에 큰 비중을 두고 있다. 이 중에서 바이러스는 기주곤충에 대한 특이성이 높아, 농작물이나 산림해충 방제에 효과적이어서 이미 일부 선진국에서는 살충제가 상품화되고 있다. 하지만 바이러스의 특성상 안정성에 대한 보증이 쉽게 이루어지지 않아 농가에서 사용하는 비율이 높지 않으며, 바이러스 생산과 관련되어 생산기업에서도 쉽게 접근하지 못하고 있다. 곤충바이러스는 숙주곤충에 대한 특이성이 높고 누에나 꿀벌과 같은 익충에는 피해를 주지 않으면서 목적해충을 방제할 수 있다는 장점을 지니고 있어 바이러스를 살충제화 하여 해충방제에 널리 이용하고 있다. 곤충바이러스를 생물적 방제 인자로 이용할 경우 유기합성 농약의 획일적인 대량사용으로 인한 문제의 심각성을 경감시키기 위하여 핵다각체병바이러스의 병원에 따른 고추담배나방 생육 및 바이러스 감염충의 생장을 보기 위하여 본 연구에서는 바이러스에 감염된 곤충으로부터 핵다각체병바이러스의 분리 및 선별을 실시하였다.

##### (1) 핵다각체병바이러스의 분리 배양

실험 곤충인 고추담배나방은 예천군 개포면 고추 재배 농가를 대상으로 고추담배나방 예찰을 실시하였고 고추담배나방 출현 고추포장에서 유충을 채집하였다. 확보된 담배나방 유충을 항온 항습이 조절되는 실내에서 누대 사육하였으며 성충사육은 아크릴 용기(지름 9 cm, 높이 12 cm)에 5%의 설탕물을 넣은 뒤 성충을 3개체씩 방사하여 산란망에 산란을 받아서 사육하였다.

유충은 페트리디쉬(Ø 9, 높이 1.5 cm)를 이용하여 사육 하였으며 1~2령까지 페트리디쉬에서 유충 10마리씩 넣어서 집단사육, 3~5령은 동종포식을 방제하기 위하여 각각 1마리씩 넣어서 개별 사육하였다. 실험곤충은 온도  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , RH 60~65%, 광주기 16L:8D의 조건에서 사육하였다. 고추담배나방의 생육 특성상 고추잎을 먹으며 증식을 하고 고추과육에 구멍을 뚫고 들어가 서식하면서 다시 먹이를 먹으로 나오는 습성을 가지고 있어 누대사육방법을 통해 핵다각체병바이러스 감염으로 탐색으로 하였다.



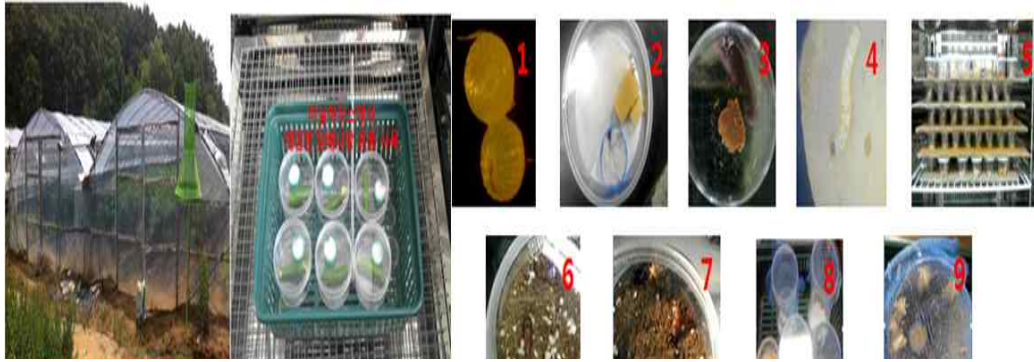


그림. 핵다각체병바이러스 수집 및 인공 배양.

(1. 고추담배나방 알 2. 부화 3~4. 담배나방 유충 5. 대량사육 6. 번데기 7. 우화 8~9.산란)

자연 상태에서 감염되어 이병되어 죽은 고추담배나방 및 곤충의 사체로부터 분리되어진 핵다각체병바이러스 HasNPV-kor, HasNPV-sha, HasNPV-bei를 확보하였으며, 이들 중 목적 곤충인 고추담배나방에 대하여 가장 병원성이 우수한 HasNPV-kor를 선발하였다.

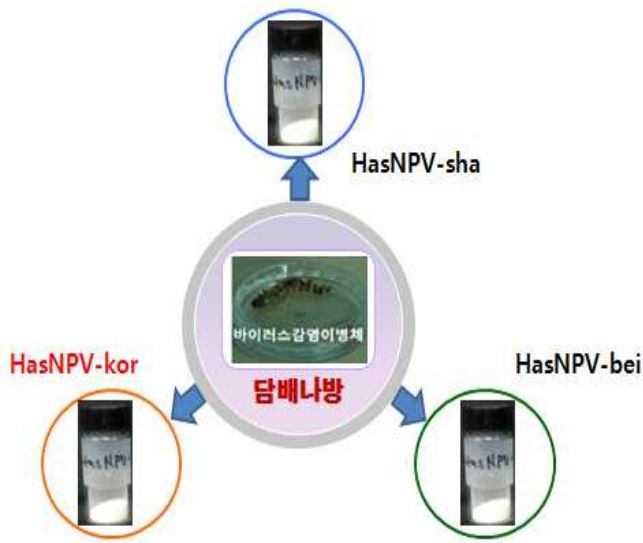


그림. 고추담배나방 애벌레와 사충으로부터 분리된 핵다각체병바이러스(HasNPV).

핵다각체병바이러스 형태를 관찰하기 위한 분리, 정제는 Im *et al.*,(1989)의 방법을 사용하였으며 핵다각체병바이러스 감염유충에 약 10배(v/w)의 0.01% SDS용액을 가하여 마쇄한 후 이중거즈로 여과하고 3~4회 원심분리(3,000 rpm, 10min.)하여 유백색의 다각체 침전물을 얻었다. 이 침전물을 0.01% SDS에 부유시킨 다음 40ml 원심분리시험관에 40~60% 연속 당밀도구배를 만들어 위에 다각체 부유물 8ml를 서서히 분주 후 원심분리(22,000 rpm)하여 다각체 band를 얻었다. 이 band를 증류수로 희석하여 원심분리(15,000 rpm, 30min.)하여 당을 제거한 후 -20℃에 보관하면서 사용하였다.



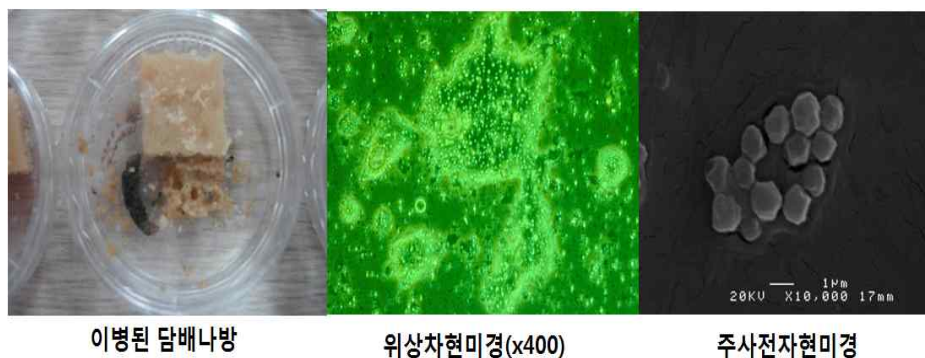
그림. 원심분리 시험관 정제 바이러스

순수 정제된 다각체를 알칼리 용액에 부유시켜 저속원심으로 용해되지 않은 다각체를 제거하고 sucrose density gradient에 의하여 분리하였다. 원심분리 후에 원심분리 시험관에서 관찰된 virion band는 선명하게 나타났으며 형태를 관찰하기 위해서 전자현미경으로 확인하였다.

분리된 핵다각체병바이러스(HasNPV) 다각체의 형태학적 특징을 조사하기 위하여 다각체 용액을 슬라이드 글라스에 올려놓고 커버글라스를 덮은 후 위상차현미경에서 관찰하였다.

핵다각체병바이러스의 주사전자현미경 관찰은 다각체 분말 시료를 SDS용액(0.01%)에 넣어 섞은 후 알루미늄 시료대 위에 도말 후 이산화탄소로 CPD(critical point drying)하여 건조 시키고 금으로 coating하여 주사전자현미경으로 관찰하였다.

HasNPV-kor에 감염된 고추담배나방 유충은 NPV의 전형적인 병징을 보여 충체가 물러지고 유백색의 체액이 관찰되었다. 감염 유충으로부터 다각체를 분리하고 그 형태를 광학현미경으로 비교 관찰한 결과 바이러스는 다각체로 구형에 가까운 부정형의 형태로 서로 유사하게 보였다. 다각체의 외부 형태를 자세히 관찰하기 위하여 주사 전자현미경(SEM)으로 관찰한 결과, 위상차 현미경 관찰과 유사하게 모두 부정형의 형태를 보였으며 HasNPV-kor 다각체는 구형에 가까운 형태로 크기는 0.8 $\mu$ m에서 1.5 $\mu$ m로 다양하며 평균 약 1.0 $\mu$ m 정도의 크기로 관찰되었다.



이병된 담배나방

위상차현미경(x400)

주사전자현미경

그림. 핵다각체병바이러스에 감염된 고추담배나방과 형태학적 특성

## (2) 분리 바이러스의 동정

분리한 바이러스의 동정은 HanNPV-kor과 HanNPV-sha를 비교 동정 하였다. DNA추출은 Fast DNA Spin kit for Soil (MP bio, USA)를 이용하여 추출하였다. 분리한 virus의 동정은 Virus DNA polymerase (pol) gene을 이용하여 동정하고자, 추출된 DNA를 주형으로 1차 PCR과 nested-PCR을 수행하였다. DNA polymerase (pol) gene의 증폭을 위한 1차 PCR은 AVA1 (5'-GAR GGI GCI ACI GTI YTI GAY GC-3')과 AVS2 (5'-GCI GCR TAI CKY TTY TTI SWR TA-3') primer를 이용하여 50  $\mu$ l 안에 1 $\times$  PCR buffer, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 40mM dNTP mixture, 각 primer (1  $\mu$ M), template DNA와 0.5 U *Taq* polymerase를 첨가하였다 (Feng & Curtis, 1995). PCR 반응조건은 우선 94  $^{\circ}$ C에서 8 min 동안 DNA를 pre-denaturation 시킨 후, 94  $^{\circ}$ C에서 60 sec denaturation, 55  $^{\circ}$ C에서 60 sec annealing, 72  $^{\circ}$ C에서 60 sec extension을 35 cycles을 수행한 후 72  $^{\circ}$ C에서 5 min 동안 final extension을 수행하였다. PCR products는 ethidium bromide 염색 후 1 % agarose gel에서 확인하였다.

1차 PCR의 증폭산물을 주형으로 2차 PCR을 수행하였으며, 이때 double strand DNA virus를 증폭하기 위하여 사용된 primer는 AVA1과 Pol (5'-SWR TCI GTR TCI CCR TA-3')를 이용하였으며, 2차 PCR 산물을 주형으로 3차 PCR을 한번 더 수행하여 밴드를 확보하여 염기서열 분석에 사용하였다.

염기서열 분석은 Agarose gel로부터 회수한 DNA는 DNA recovery kit (Biofact, Korea)로 정제한 후 cloning 하였다. Cloning은 All-in-one vector (Biofact, Daejeon, Korea)을 이용하였고, manufacturer's protocol을 따라 수행하여 유전자 염기서열을 결정하였다. LaboPass Gel Extraction kit (CosmoGen, Korea)를 이용하여 정제한 후, All-in-one vector (Biofact, Korea)에 ligation하고, 이 plasmid를 *E. coli* DH5 $\alpha$  (RBC Korea, Korea)에 넣은 후 LB + kanamycin (50 ug/mL)배지에서 키워 생성된 colony들을 유전자 염기서열 분석에 이용하였다. 결정된 염기서열은 NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))의 GenBank database를 이용하여 BLAST search를 통해 분석하였다.

그 결과 시료로부터 추출된 DNA를 주형으로 1차 PCR과 2번의 nested-PCR을 수행하여 그림과 같은 약 300 bp의 PCR product를 얻었으며, sequence 분석을 위해 cloning을 수행한 후 염기서열을 결정하였다

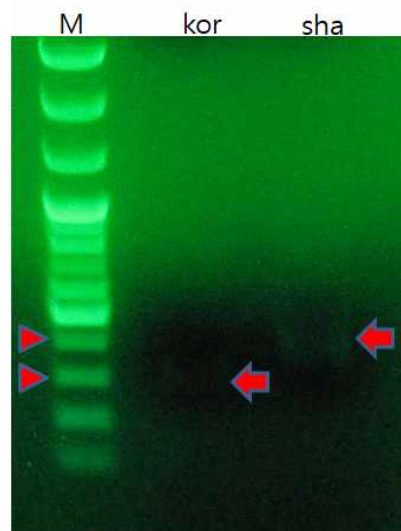


그림. Agarose gel of the PCR product of double strand DNA virus.

결정된 염기서열은 그림을 각각 나타내었다. 각각 결정된 염기서열을 기초로하여 BLAST search (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)를 수행하였으며, 그 결과는 표에 나타냈다.

```
TTCAAAGGCATCTGATGTAGCGAGATGCACGGCCTATACAGGTAATCTTGCGCCTTCTTT
GACTGTTTGGCTACAAACAATAAGATCCTGCCACCACTTTTTCAAATAGATATCAATCC
CGATAGGACAGGCAGCCCGTAAGGCTCGGTTTAGGTCATCTTCTTTATAATTAATGCAGG
CGTCAAAGCCTAAGGTATCAACGACATATCGACACTTCTCTTCGCTGCCAGCCAGACCAA
CAACCCGGCATCCAACACCGTCGCCCCCTCAA
```

그림. kor type NPV virus의 염기서열.

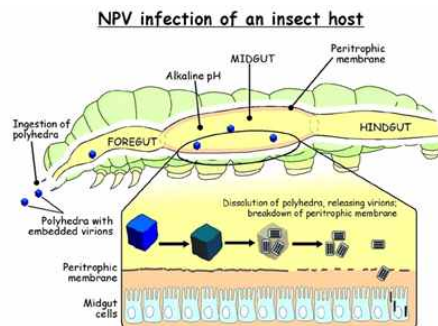
```
GTCGGTCTGCGATCGATGTTGTTTCGACGATATATTCTTTTCCTTGTCGCCAATATTTTTTCAT
TTCGTTGTCTCGCGCAAGCATCACCTCTTTGGGAATGCGGTAATCTCCGATGCCCATGCCG
TTGACGTAAAAAATGACAGATCGTTGTAACGTTTCTTTGGTGACCGATCTTAATTTTTGCCT
GCGGATGCATGGCTCTCCAAGATCACCGACCGGTCTCTGACGTGATGCCGTGTCAAATCA
ACATTGAGAAATAACGCGTCCAATGCAATGAAATGCGTCTCCACACTTAGGCACTAAATGA
TTTTTGTAAGTCTCCTCCACCGCCGCCCTCATCAGGGCCCCCTCAA
```

그림. sha type NPV virus의 염기서열.

본 염기서열 조사결과 두 개의 바이러스가 각각 다른 염기서열로 이루어진 바이러스로 조사되어 분리한 핵다각체병바이러스와 다른 형태인 것으로 조사되었다.

(3) 생체를 이용한 Petri-dish 간이 실내 생물검정을 통한 감염과정

고추 생체를 이용한 Petri-dish 간이 실내 생물검정을 조사하였으며 바이러스 처리 후 8일 경과 각각의 Petri-dish 안에 있는 생고추잎과 고추열매의 피해 정도를 해부현미경과 SEM 으로 관찰 한 결과 비처리구에서 각각의 Petri-dish 안의 담배나방 유충이 90% 이상 생존 하였으며 반대로 처리구에서 각각의 Petri-dish 안의 담배나방 유충이 70% 이상의 죽어있는 것을 확인하였다.



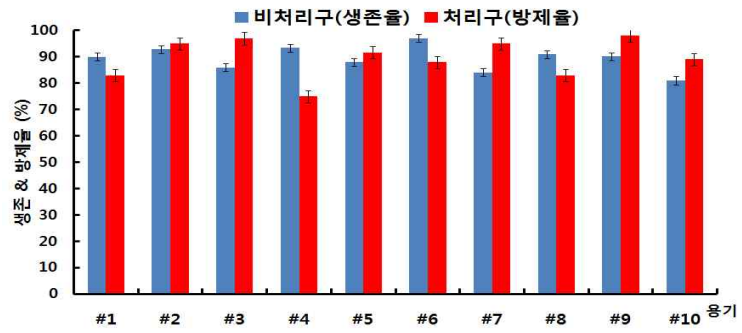


그림. 생물 검정을 통한 고추 담배나방의 생존율 및 방제율.

## 나. 선별된 고추담배나방 핵다각체병바이러스의 형태학적, 생화학적 특성 조사 및 배양방법에 대한 최적화기술의 규명

정밀화학농업의 발달로 많은 화학농약이 계속적으로 만들어 지고 있으며, 이러한 화학농약의 다량 사용으로 인해 환경오염 뿐 만 아니라 농산물에 대한 신뢰도가 감소되고 있다. 이러한 문제점으로 인해 고추농업에도 최근까지 다른 해충과 마찬가지로 고추담배나방도 화학적 방제가 주를 이루고 있으나 화학농약에 대한 저항성으로 방제가 어려워지고 있는 추세로, 재배작물이 큰 피해를 입을 뿐 아니라 저항성 해충의 지속적인 출현, 인축이나 동식물에 대한 직·간접적인 피해와 농약의 생태계 잔류성으로 인한 환경오염 및 생태계 파괴 등의 심각한 문제를 야기 되고 있다. 이를 해결하기 위한 방안중 하나로 친환경 생물적 방제법을 도입하여 화학적 방제의 보완 또는 대체수단으로서 종합적 해충방제 체계 확립에 연구의 초점을 집중시키고 있으며 그 중에서도 곤충 질병을 일으키는 세균, 바이러스, 사상균, 원생동물 등 해충의 방제에 큰 비중을 두고 있다. 이 중에서 미생물 바이러스는 기주 곤충에 대한 특이성이 높아, 농작물이나 산림해충 방제에 효과적이어서 이미 일부 선진국에서는 살충제가 상품화되고 있다. 이러한 상품의 수입대체효과를 위해 원제의 국산화가 필요한 실정이고 원제 개발을 위해 기본적으로 핵다각체병바이러스의 형태 및 안정성 확보가 필요하다.

### (1) 핵다각체병바이러스의 형태학적 생화학적 특성

핵다각체병바이러스의 고추담배나방을 죽이는 기작은 기존에 보고된바와 유사한 것으로 바이러스 살포시 표면에 위치하고 있던 바이러스를 섭취하고 섭취한 애벌레의 장내에서 핵다각체병바이러스의 증식과 함께 체외로 방출되면서 바이러스의 함량이 증가되고 다른 애벌레를 함께 살충하는 효과를 보이는 것을 보여진다. 일반적으로 핵다각체병바이러스에 감염된 고추담배나방 애벌레는 움직임이 둔해지고 몸이 녹서나 까맣게 타들어가는 모양을 보이는 것으로 조사되어졌다.

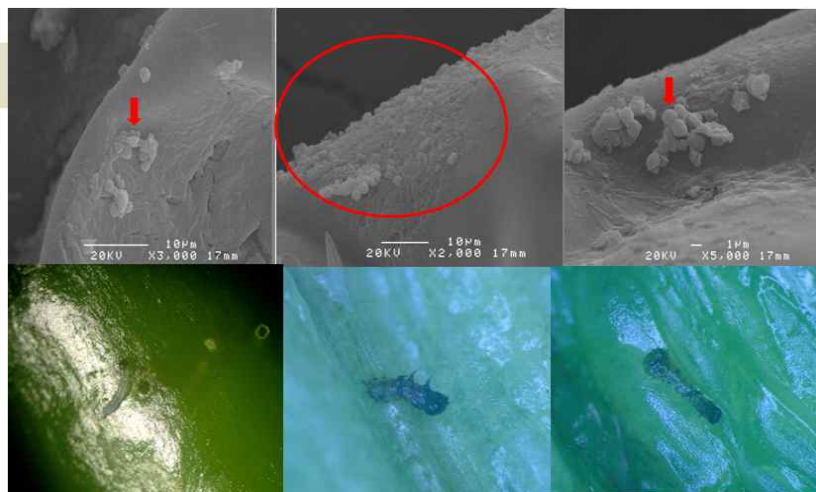


그림. 핵다각체병바이러스에 감염된 고추담배나방 애벌레와 표면에 감염된 형태

핵다각체병바이러스에 감염된 유충은 먹이 섭취가 감소되며 번데기로의 탈피가 되지 못하고 애벌레에서 검게 타들어가는 형태로 검정색을 띠기 시작한다. 감염유충의 조직학적 관찰결과 감염 유충 내 및 표피에서 핵다각체병바이러스가 형성되어 있으며, 증식이 되는 것을 확인할 수 있었다. 전자 현미경을 통해 확인한 결과 4면체에 가까운 8각형과 4각형 등 부정형 모양인 입체 형태로 나타났다.

(2) 핵다각체병바이러스 유충기간별 온도에 따른 병원성 검정

핵다각체병바이러스의 고추담배나방에 대한 병원성 조사를 위하여 3령과 4령 유충을 이용하여 수행하였다. 바이러스 농도는  $2.0 \times 10^7$ (PIBs/ml) 농도로 100 $\mu$ l씩을 인공사료 표면에 도포하여 섭식을 통해 체내에 접종 되도록 하였고 1시간 정도 음건한 다음 영기별로 접종하여 사육스탠드에 온도조건을 20 $^{\circ}$ C와 30 $^{\circ}$ C에서 각각 Petri Dish( $\varnothing$  9, 높이 1.5cm) 당 1한 마리 씩 개체 사육하면서 5반복 3회 실시하여 살충율을 조사하였다. 실험 전 칼이나 핀셋, 아크릴판 등은 오염을 막기 위하여 모두 75%의 알코올 또는 500배액으로 희석된 정제 차아염소산나트륨을 침지 처리 하여 깨끗이 소독하였다. 바이러스 접종에 사용된 인공사료는 일정한 크기(1.0 $\times$ 1.0 $\times$ 0.3cm)를 정하여 공급하였으며 접종된 인공사료를 공급하기 전 유충이 빨리 섭식할 수 있도록 1일정도 금식 시킨 후 실험에 사용 하였다. 접종된 먹이를 모두 섭취 했을 시 접종 되지 않은 먹이를 2~3일 간격으로 계속해서 공급하였다. 접종 후 매일 일정한 시간에 사충수를 조사하여 발견 즉시 핀셋을 이용해 수거한 후 빈 Petri Dish에 넣어 냉동보관 하였으며 수거 시기가 늦어 사충이 터지거나 말랐을 경우에는 미량의 증류수를 가한 후 피펫을 이용하여 완전히 수거하였다.

표. 핵다각체병바이러스의 온도에 따른 병원성

No. of larva	Virus	Inoculum conc. (PIBs/ml)	Mortality (%)	
			20 $^{\circ}$ C	30 $^{\circ}$ C
3 <sup>rd</sup> (3령)	HasNPV-kor	$2.0 \times 10^7$	60	82
	HasNPV-bei		55	82
	HasNPV-sha		51	77
No. of larva	Virus	Inoculum conc. (PIBs/ml)	Mortality (%)	
			20 $^{\circ}$ C	30 $^{\circ}$ C
4 <sup>th</sup> (4령)	HasNPV-kor	$2.0 \times 10^7$	45	40
	HasNPV-bei		40	35
	HasNPV-sha		47	36

분리된 핵다각체병바이러스의 담배나방 유충의 영기별 및 온도 조건에 따른 병원성을 조사하기 위해 20℃, 30℃에서 3령 및 4령 유충을 대상으로 조사하였다. 3령충에서는  $2.0 \times 10^7$  PIBs/ml의 농도로 접종한 결과 분리된 바이러스 중 HasNPV-kor가 30℃ 조건에서 가장 높은 82%의 살충률을 보였다.

반면 20℃의 경우 60%의 살충률을 보여 약 20% 정도의 낮은 살충률을 나타냄으로써 온도가 높을수록 살충률도 높게 나타났다. 4령에서도 3령과 비슷한 경향으로 조사되었으며 영기가 높을수록 살충률이 2배 정도 낮아지는 것으로 조사되었다. 이는 고추담배나방 유충의 고령영기에 따른 유충의 무게증가에 의한 유충내에서 바이러스 살충 발현이 시기가 늦어지는 것으로 판단되며 병원성 조사 중 4령의 고추담배나방에서는 살충이 되질 못하고 번데기로 되는 것도 간혹 발견되었다.

이러한 결과로 보아 고추담배나방의 가장 적절한 방제시기로 영기가 적을수록 방제 효과가 높아짐을 알 수 있으며 알에서 갓 부화된 1령을 대상으로 할 경우 이 보다 더 높은 방제 효과가 있을 것을 판단된다. 접종 후 초기 감염충 수거는 같은 농도에서 3일차부터 가능했으며 핵다각체병바이러스 HasNPV-kor의 경우 높은 살충력에 의해 5일째 가장 많은 감염충 수거를 보였으며 나머지 바이러스는 이보다 늦은 6~7일째 가장 많은 수거를 보였다.

(3) 고추담배나방 핵다각체병바이러스에 대한 접종농도별 바이러스 증식을 조사

병원성 검정을 통해 얻어진 사충을 이용하여 고추담배나방 유충을 이용한 바이러스 증식 효율을 알아보기 위하여 접종농도에 따른 다각체 생산량을 비교 조사하였다. HasNPV-kor의 90%의 사충을 보인  $2.0 \times 10^4 \sim 10^5$  PIBs/ml 저농도구에서  $8.5 \times 10^8$  PIBs/ml와  $7.3 \times 10^8$  PIBs/ml의 다각체 생산량이 나타난 반면,  $2.0 \times 10^6 \sim 10^8$  PIBs/ml의 농도구에서는  $1.6 \sim 2.5 \times 10^9$  PIBs/ml의 최대 다각체 생산량을 나타내었다. HasNPV-kor의 경우 고농도에서 사충율의 증가와 동시에 다각체 생산량 또한 높게 나타나는 것으로 조사되었다.

표. 핵다각체병바이러스 접종 농도별 사충에 따른 바이러스 생산량

NO. of larva	Inoculum conc. (PIBs/ml)	No. of polyhedra production per
		Larva (PIBs/ml)
		28℃ (±1)
3rd	$2.0 \times 10^3$	-
	$2.0 \times 10^4$	$8.5 \times 10^8$
	$2.0 \times 10^5$	$7.3 \times 10^8$
	$2.0 \times 10^6$	$1.6 \times 10^9$
	$2.0 \times 10^7$	$1.9 \times 10^9$
	$2.0 \times 10^8$	$2.5 \times 10^9$



(4) 온도에 따른 핵다각체병바이러스의 안정성 조사

곤충바이러스를 이용한 해충방제는 Ignoffo (1973)가 Heliothis 방제를 위해 처음 바이러스 살충제인 Elcar를 상품화 이래 새로운 방제법으로 대두되고 있다. 핵다각체병바이러스의 대량증식 방법은 숙주곤충의 대량사육을 통한 생체증식 방법이 주로 이용되고 있으며 곤충 세포배양계를 이용한 생산체계도 시도되고 있으나 경제적인 문제로 실용화되지 못하고 있으며(Kurstak, 1982), 생체증식에 의한 바이러스의 증식 목적은 숙주곤충의 조직을 최대한 이용하는 동시에 병원성이 높은 바이러스를 생산함에 있다. 고추담배나방의 증식을 통해 생산한 핵다각체병바이러스의 온도에 따른 안정성을 조사 하였다.

보관 조건이 핵다각체병바이러스에 미치는 영향을 알아보기 위해 보관온도 조건을 -20℃, -5℃, 4℃, 20℃, 상온으로 처리하여 접종농도  $2.0 \times 10^7$  PIBs/ml로 각 보관 온도별 바이러스를 인공사료에 첨가하여 유충에 섭식시켜 사충수를 조사하였다.

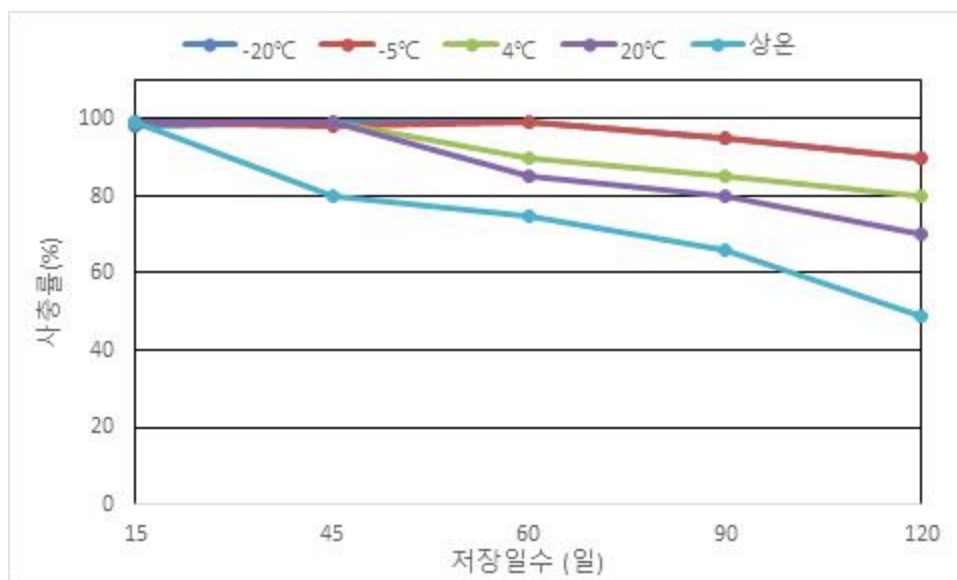


그림. 핵다각체병바이러스의 저장온도에 따른 안정성

저장조건에 따른 고추담배나방 핵다각체병바이러스의 불활성화 주지 않는 온도는 -5℃ 까지 저장을 한다면 병원성을 상실하지 않는 것으로 조사 되었으나 4℃, 20℃, 또는 외부 상온에 저장하였을 경우 1달 뒤부터 급격히 병원성이 떨어지는 것으로 조사 되었다. 이러한 결과는 제품을 산업화하는데 있어 제형화에 안정성을 유지하기 위한 방안으로 보조제 종류 및 첨가 농도에 대한 데이터로 활용이 가능 할 것이다.

## 다. 핵다각체병바이러스의 대량생산을 위한 최적조건 및 생산체계 구축을 위해 host 배양 방법의 확립과 감염 host를 통한 virus 회수 방법 조사

원제의 대량생산은 제품의 상품화하는데 있어 경제성과 함매우 중요한 부분이다. 현재 국내에서 직접 생산되는 원제는 미미한 실정으로 대부분 수입에 의존하고 있다. 이러한 문제점을 해결하고 국산화를 통해 제품의 가격을 낮추는 방안도 필요하다. 일반적으로 병원성 곤충의 방제는 화학적 방제가 주를 이루고 있으며 이로 인하여 환경오염 및 생태계 파괴 등 심각한 문제로 대두되고 있다. 고추담배나방은 기주범위가 넓어 채소, 화훼, 과수 등의 40과 200여종에 달하는 것으로 알려져 있고 국내에서도 최근 고추와 담뱃재재지 등에 발생하여 피해가 심한 것으로 보고되었으며, 특히 고추 작물을 가해하여 극심한 피해를 주고 있다. 특히 3령 유충 이후에는 살충제에 대한 저항성이 강하여 방제가 어려운 해충으로 구분하고 있다. 이와 같이 유기합성 살충제에 저항성을 나타내며 *Bacillus thuringiensis*에도 감수성이 약한 고추담배나방에는 바이러스를 이용한 방제법이 가장 효과적인 것으로 알려져 있다. 핵다각체병바이러스의 대량증식 방법은 숙주곤충의 대량사육을 통한 생체증식 방법이 주로 이용되고 있으며 곤충세포 배양 계를 이용한 생산체계도 시도되고 있으나 경제적인 문제로 실용화되지 못하고 있으며, 생체증식에 의한 바이러스의 증식 목적은 숙주곤충의 조직을 최대한 이용하는 동시에 병원성이 높은 바이러스를 생산함에 있다. 따라서 본시험은 고추담배나방 핵다각체병바이러스를 이용한 미생물 살충제 개발에 있어서 가장 중요한 바이러스 대량생산의 기초연구로 사료된다.

고추담배나방에 대한 약제도 높은 내성을 가지고 있으므로 방제가 어려우며 그로 인한 화학 살충제를 남용하고 있다. 이를 해결하기 위한 방안 중 하나로 생물적 방제법을 도입하여 화학적 방제의 보완 또는 대체수단으로 해충방제 체계 확립에 노력하고 있다. 그러한 가운데 세계적으로 개발된 생물농약은 작물보호의 1%에 지나지 않으며 이중 곤충바이러스 살충제는 거의 미비한 제품을 차지한다. 특히나 기주곤충과 바이러스의 대량증식 및 제형화 등에 대한 연구가 매우 미진하며 생물농약의 경우 안정적인 약효를 갖는 화학농약에 비해 살아있는 활성을 유지시켜야하기 때문에 제형화의 중요성은 매우 크다고 할 수 있다. 이러한 고추담배나방 핵다각체병바이러스의 대량 생산은 숙주의 대량 생산방법 또는 인공사료를 통한 방법 두 가지 연구방법이 가장 쉽게 접근 할 수 있을 것이다. 이에 먼저 인공사료를 개선하여 대량 사육하기 위하여 실시하였다.

### (1) 인공사료에 의한 핵다각체병바이러스의 대량생산

최근 새로운 해충 방제 기술로 널리 연구되고 있는 생물적 방제는 병해충 방제방법 중 가장 성공적인 접근방법의 하나로 병해충을 경제적 피해수준 이하로 유지하기 위해 곤충바이러스, 천적 등을 이용하는 방법이다, 또한 최근 들어 식물에서 추출한 물질을 이용한 식물성 농약의 상용화가 이루어지고 있는 실정이다.

이중에서 미생물 바이러스는 기주곤충에 대한 특이성이 높고 목적 해충만을 방제할 수 있다는 장점을 가지고 있어 원예해충을 중심으로 방제에 효과적이다. 그러나 핵다각체병바이러스의 증식은 기주곤충과 배양 세포계에서 가능하지만 세포배양액이 비싸서 살충제용 바이러스 생산에는 기주곤충의 대량사육법이 이용되고 있어 값이 싸고 실용적인 인공사료 개발 등이 선행되어야 한다.

바이러스 대량생산 시 숙주해충인 고추담배나방의 대량사육이 필요하며 현재 대량사육 시 많은 양의 인공사료가 이용됨에 따라, 경제적 부담이 발생된다. 그러므로 고가의 원료를 사용한 인공사료는 대량사육용 인공사료로서 적합하다고 할 수가 없다. 이에 보다 더 경제적 부담이 감소될 수 있는 원료를 이용해야 되며 이러한 차원에서 생고추를 이용한 인공사료가 적합한 활용적 원료의 가치가 있다고 할 수 있다.

또한 생고추는 고추담배나방의 주요 가해 열매로 각종미네랄이 함유된 영양원으로 고추포장지에서 고추담배나방의 주요 먹이원이다. 그러므로 대량사육용 인공사료 조성물에서 생고추를 주요조성물로 하여 변형된 인공사료를 제조하여 확인하였다.

표. 고추의 영양성분

영양성분 : 100g										
성분	니아신	나트륨	단백질	비타민 A	비타민 B1	비타민 B2	식이 섬유	아연	엽산	칼륨
함량	1.10mg	10.0mg	1.6mg	52 $\mu$	0.1mg	0.05mg	7.76g	0.19mg	15.8 $\mu$	246.0mg
성분	칼슘	당질	레티놀	베타 카로틴	비타민 B6	비타민 C	비타민 E	인	지질	철분
함량	13.0mg	3.6g	0.01 $\mu$	312.0 $\mu$	0.27mg	72.0mg	0.69mg	38.0mg	0.3g	0.5mg

고추담배나방을 대량생산 하여 핵다각체병바이러스를 안정적으로 생산하기 위한 인공사료의 조성물 재료를 달리하여 Diet 1, Diet2, Diet 3, Diet4를 준비하였다. Diet1은 현재 일반적인 실험실 사육용 인공사료이며 Diet 2, 3, 4는 생고추를 주성분으로 조성을 달리 하여 변형된 인공사료이다. 사육조건은 각각의 인공사료에 고추담배나방 2령 유충을 온도조건 28℃에서 각각 Petri Dish(Ø 9, 높이 1.5cm) 당 1마리씩 개체 사육하였다. 습도는 40~70% 범위에서 10%로 간격으로 조절하였으며 습도조절은 온습도계를 설치한 후 습도를 조사하고, 가습기를 이용하여 습도를 맞추어 주었다.

표. 고추담배나방 인공사료 조성표

Ingredient	Unit	Diet 1	Diet 2	Diet 3	Diet 4
Water	mℓ	900.0	752.0	752.0	500
Agar	g	34.5	31.7	31.7	31.7
Casein	g	6.0	9.7	-	9.7
Yeast	g	36.0	-	-	-
Milk	g	9.0	-	9.7	-
Sucrose	g		10.3	10.3	10.3
Corn meal	g	96.0	-	-	-
Soybean meal	g	2.0	-	-	-
Raw pepper	g	-	330.0	330.0	660.0
Pepper oil	mℓ	6.0	-	-	-
L-Ascorbic acid	g	3.75	-	-	-
Linseed oil	mℓ	-	2.0	2.0	2.0
Vit.mixture	g	37.5	2.9	2.9	2.9
Salt mix.	g	-	2.8	2.8	2.8
Sorbic acid	g	3.3	-	-	-
Potassium sorbate	g	-	1.3	1.3	1.3
Methyl-p-hydroxybenzoate	g	3.6	1.8	1.8	1.8
Aureomycin	g	-	1.3	1.3	1.3
Formaldehyde(40%)	g	4.5	-	-	-



그림. 고추담배나방 인공사료의 형태

고추담배나방을 안정적으로 인공 누대사육 통해 고추담배나방 및 고추담배나방핵다각체 병바이러스의 대량생산을 할 수 있다. 그러나 현재 사용 중인 인공사료 Diet 1의 경우 세대가 진행되면서 산란수의 감소로 인한 고추담배나방 및 고추담배나방핵다각체 바이러스의 대량생산에 많은 어려움이 따른다. 그러므로 고추담배나방에 알맞은 인공사료의 조성물의 주재료로 생고추를 달리하여 Diet 2 Diet 3 Diet 4의 변형된 인공사료를 만들었으며 주재료인 생고추가 인공사료 조성물로서의 알맞은 재료임을 알아보기 위해 고추담배나방 1세대를 통하여 준비된 인공사료를 일정한 크기로(1.0×1.0×0.3cm) 10일 동안 공급하면서 고추담배나방 유충의 생체량 증식율을 조사하였다. 그 결과 일반적으로 사용되고 있는 Diet 1의 경우 생고추가 들어간 인공사료(Diet 2, Diet 3, Diet 4) 보다 적게 생체량 증식율을 나타내었으며 반대로 생고추가 들어간 인공사료는 모두가 높은

증식율을 보였다. 그 가운데 Diet 4의 경우 생고추가 Diet 2와 Diet 3 보다 두 배로 조성되어졌으며 그에 따른 결과 역시 인공사료 중에서 가장 높은 생체량 증식율을 타나내었다.

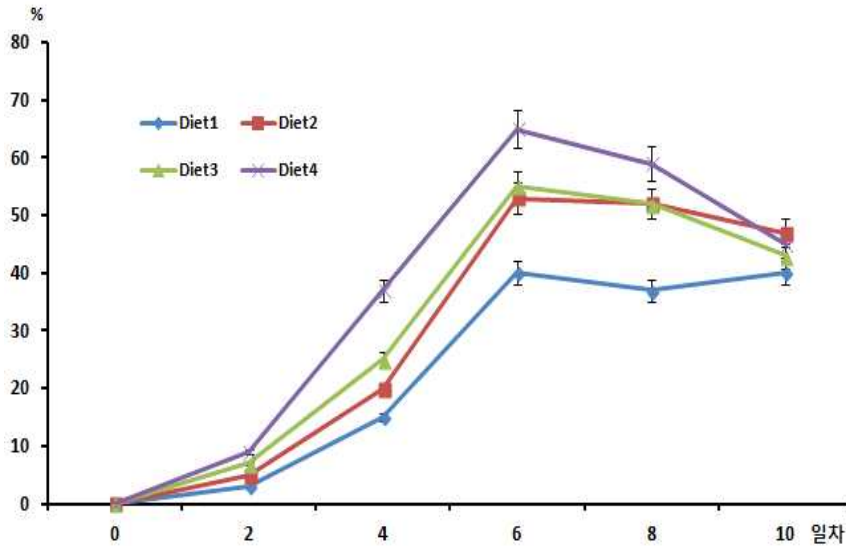


그림. 인공사료를 이용한 고추담배나방의 증식률.

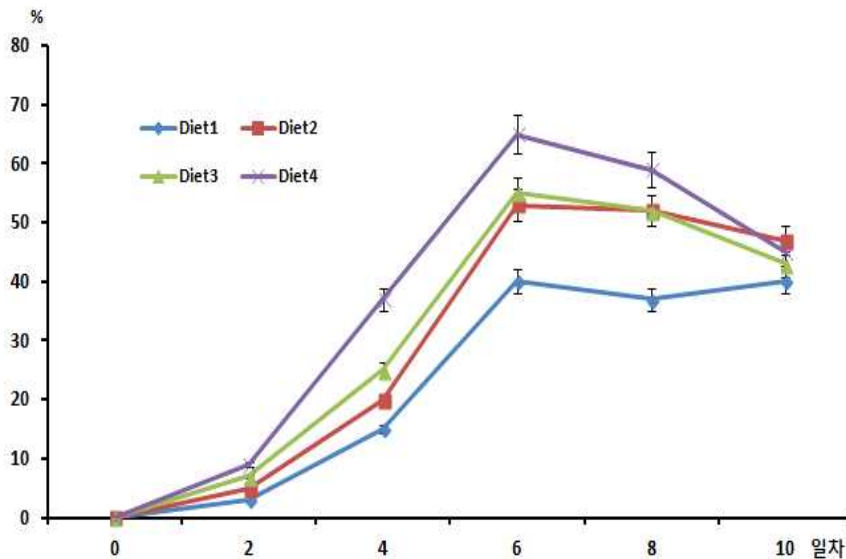


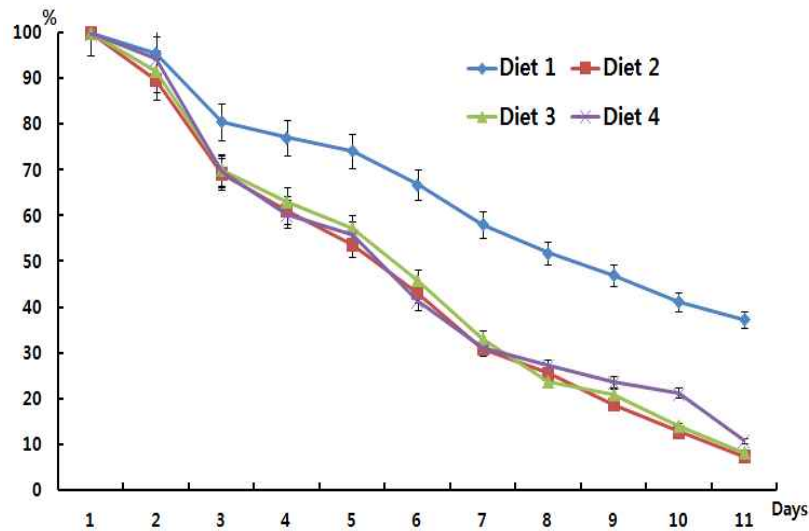
표 인공사료 섭취를 통한 고추담배나방의 생체량 증식률.

## (2) 고추담배나방에 대한 인공사료별 감소율 조사

고추담배나방의 대량 사육에 알맞은 최적의 인공사료를 선별하기 위하여 고추담배나방에 대한 인공사료 Diet 1, Diet 2, Diet 3, Diet 4의 섭취에 의한 사료감소율을 조사하였다. 공급된 인공사료는 일정한 크기(1.0×1.0×0.3cm)를 정하여 초기 무게를 측정 후 공급하였고

사육스탠드에 온도조건을 28℃에서 각각 Petri Dish(Ø 9, 높이 1.5cm) 당 1마리씩 개체 사육하면서 10반복 3회 실시하였고 고추담배나방을 사육하지 않은 인공사료가 들어 있는 Petri Dish을 두어 동일한 생육조건에서 수분에 의한 인공사료의 감소량을 보정 하므로 각 처리구마다 수분에 의한 감소량을 보정하였다.

고추담배나방 및 고추담배나방 핵다각체병바이러스 대량생산을 위한 최적의 인공사료 주 조성물로 생고추가 함유된 인공사료 Diet 2, Diet 3, Diet 4와 대조구로 생고추가 함유되지 않은 Diet 1의 인공사료의 고추담배나방 유충에게 섭식시켜 이에 따른 인공사료별 감소율을 조사하였다. 고추담배나방 생체량 증식율 조사에서도 생고추가 가장 많이 구성된 Diet 4가 가장 높은 생체량 증식율을 보인 것으로 보아 인공사료별 감소율 조사에서도 생고추가 구성된 인공사료에서 빠른 감소율을 나타내었다.



고추담배나방의 인공사료 섭취에 따른 사료 감소율.

(3) 고추담배나방에 대한 인공사료별 산란수 및 부화율 조사

산란수 조사는 성충사육용 아크릴 용기(지름 9cm, 높이 12cm)에 5%의 설탕물을 넣은 뒤 우화된 성충을 10개체 씩 방사하여 산란망에 산란을 받아 산란수를 조사하였으며 부화율은 산란망에 산란된 알이 부화되는 정도로 조사하였다.



그림. 고추담배나방의 산란 및 산란 채취

각각의 인공사료에 따른 산란수 조사는 아크릴 산란용기에 우화된 고추담배나방 암수 각각 5쌍씩 넣은 후 채란망에 채란을 받은 후 산란수를 조사하였으며 그 결과 생고추 구성량이 제일 많은 Diet 4에서 가장 많은 산란수가 조사되었다. 부화율의 경우 모든 인공사료에서 큰 차이가 없었으며 그 중에서 Diet 4가 아주 조금 높게 조사되었다. 부화율을 높이기 위해서는 일정 습도와 온도의 유지가 가장 필요한 것으로 판단된다.

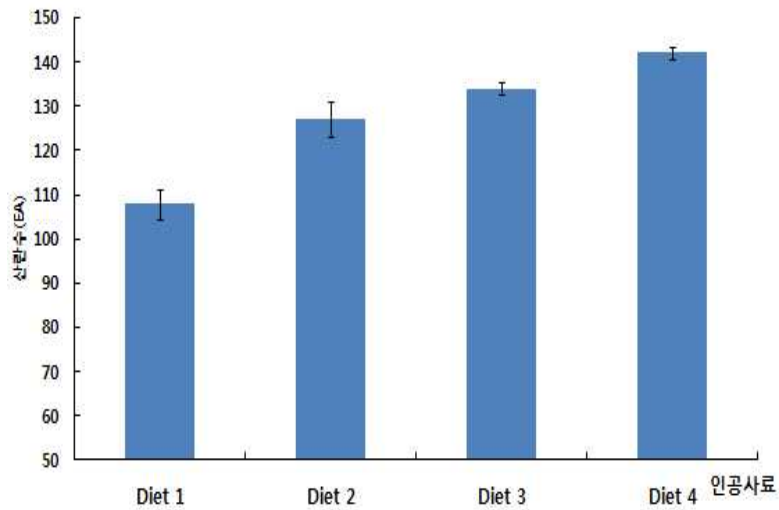


그림. 고추담배나방의 인공사료 섭취에 따른 산란수

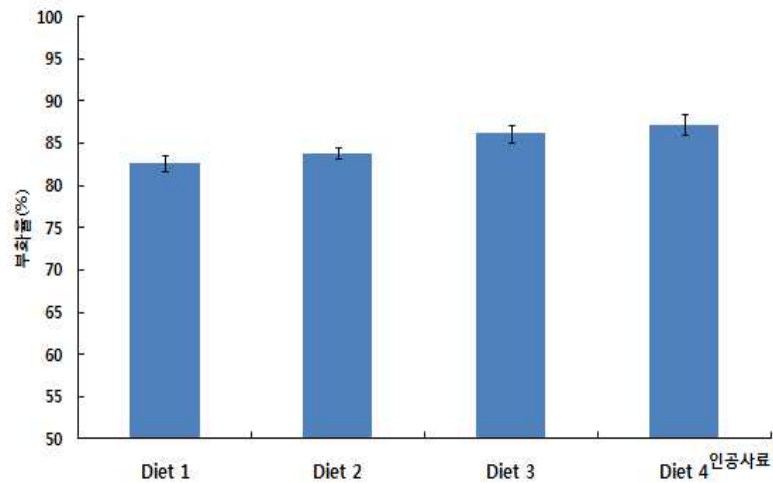


표. 고추담배나방의 인공사료 섭취에 따른 부화율.

(4) 선별된 인공사료에 대한 고추담배나방 생육조사

고추담배나방의 대량사육에 알맞은 최적의 인공사료로 선별된 Diet 4에 대하여 사육온도 별에 따른 고추담배나방의 섭식에 의한 인공사료의 배설물량 및 먹이 이용효율을 조사하였다. 공급된 인공사료 Diet 4는 일정한 크기(1.0×1.0×0.3 cm)를 정하여 초기 무게를 측정 후 공급하였고 사육스탠드에 온도조건을 20℃, 24℃, 28℃, 30℃에서 각각 Petri Dish(Ø 9, 높이 1.5 cm) 당 3령 유충 1마리씩 개체 사육하면서 10반복 3회 실시하였다. 고추담배나방을 사육하지 않은 인공사료가 들어있는 Petri Dish을 두어 동일한 생육조건에서 수분에 의한 인공사료의 감소량을 보정하므로 각 처리구마다 수분에 의한 감소량을 보정하였다.

고추담배나방 인공사료로 최적의 주조성물로 생고추가 함유된 인공사료에 대하여 감소율, 산란수, 부화율을 조사한 결과 생고추가 가장 많이 함유된(660g/l) Diet 4가 조사되었다. 그러므로 고추담배나방 대량생산을 위한 최적의 인공사료는 Diet 4를 선발하였다.

선발된 고추담배나방 인공사료 Diet 4에 대한 사육 온도별에 따른 인공사료 배설물량 및 먹이이용효율을 조사하였다. 그 결과 고추담배나방 유충이 인공사료를 섭식 후 성장하면서 나오는 인공사료 배설물량은 생육최적 온도인 28℃에서 가장 많은 배설물량이 조사되었고 이 보다 더 높은 32℃에서는 오히려 온도에 대한 생육 스트레스로 섭식량이 적은 관계로 배설량이 28℃ 보다는 적었다. 그 외 온도인 20℃와 24℃의 온도에서는 고추담배나방의 적정 생육온도 보다 낮은 온도로 활동량이 낮아 배설량이 적은 것으로 조사되었다. 이와 동시에 먹이 이용효율을 조사 하였으며 28℃에서 다른 처리구와 비교해 각각 생육 날짜별로 먹이 이용효율이 높게 조사되었다.

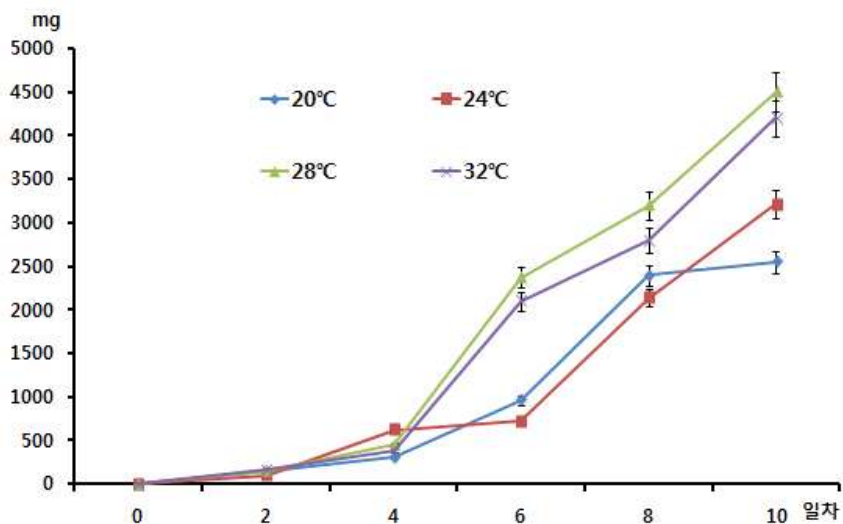


그림. 온도에 따른 고추담배나방의 인공사료 섭취량.



표. 온도에 따른 고추담배나방의 인공사료 섭취량.

Temp \ Day	단위 :%				
	2day	4day	6day	8day	10day
20℃	1.2	2.9	7.46	9.5	10.1
24℃	3.91	7.31	8.23	11.2	12.2
28℃	5.61	6.27	12.3	15.8	19.7
32℃	4.2	5.8	11.5	14.7	18.3

(5) 고추담배나방 유충 무게 증가율

고추담배나방의 대량사육에 알맞은 최적의 인공사료로 선별된 Diet 4에 대하여 사육온도별에 따른 고추담배나방의 인공사료 섭취에 의한 고추담배나방 유충의 무게 증가율을 조사하였다. 공급된 인공사료 Diet 4는 일정한 크기(1.0×1.0×0.3 cm)를 정하여 공급, 1마리씩 개체 사육하면서 10반복 3회 실시하였고 각 처리구마다 사육된 3령의 고추담배나방의 초기 무게를 측정 후 10일간의 사육기간 동안의 유충 생체무게를 측정 후 사육온도별에 따른 증가율을 조사하였다.

선별된 고추담배나방 인공사료 Diet 4에 대한 사육 온도별에 따른 인공사료 배설물량 및 먹이용효율을 조사한 결과 사육온도 28℃에서 가장 좋은 결과를 보였으며 고추담배나방이 인공사료 Diet 4를 섭취 후 생육 중 증가하는 유충 무게증가율을 조사하였다. 그 결과 각 사육 온도별에 따라 생육 6일째 가장 높은 유충 무게증가율을 보였으며 특히 사육 적정온도인 28℃에서 가장 높은 증가율을 나타내었다.

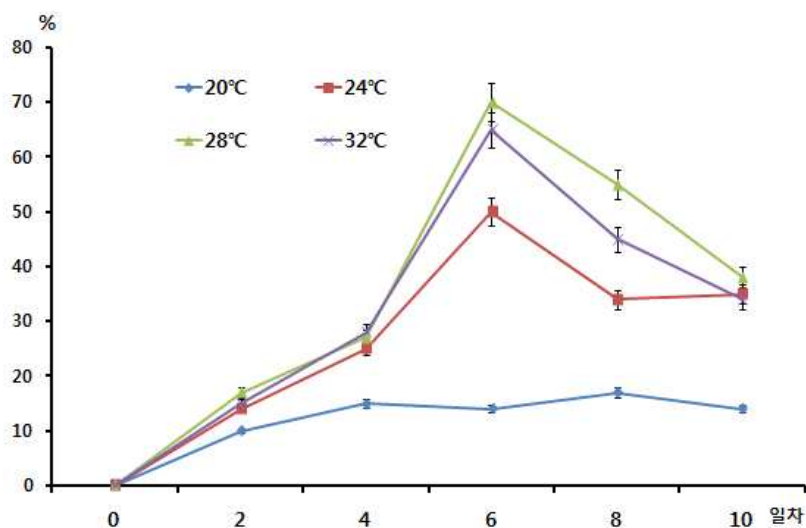


그림. 인공사료 섭취에 따른 고추담배나방의 무게 변화.

(6) 인공사료별 조성에 따른 고추담배나방 핵다각체병바이러스 생산량 조사

각각 조성이 다른 인공사료를 Diet 1, Diet 2, Diet 3, Diet 4에 대하여  $1.0 \times 10^6$  PIBs/ml 농도의 바이러스를 접종 시킨 후 각각의 인공사료 처리구별로 1마리씩 30반복으로 계수하여 수거된 사충에 일정량의 증류수(2ml/사충 1마리)를 혼합하여 Tissu grind를 이용해 분쇄한 후 거즈를 3~4겹으로 겹쳐 2회 이상 반복을 거쳐 수거 혼합된 유충의 배설물과 잔류된 표면조직 등을 여과 시켜 최종적으로 바이러스가 포함된 혼합액을 수거하였다. 수거된 혼합액을 고속원심분리기를 이용하여 혼합액에 있는 핵다각체병바이러스를 최종 수집하였다.

수집된 핵다각체병바이러스 stock을 100배 희석한 후 희석액 안에 들어있는 각각의 다각체를 균일하게 분포시키기 위해 SDS를 약간 첨가하여 심하게 Vortexing한 후 다시 초음파를 이용 다각체를 균일하게 분포시켜 hemacytometer의 격자 위에 소량의 희석액을 떨어뜨린 후 광학현미경( $\times 400$ )을 통해 계수하였다.



그림. 인공 사료 종류에 따른 핵다각체병바이러스의 증식량

각기 다른 인공사료(Diet 1, Diet 2, Diet 3, Diet 4)에  $1.0 \times 10^6$  PIBs/ml 농도의 핵다각체병 바이러스를 접종하여 바이러스의 증식량을 조사하였다. 최대 사충율을 보인 Diet 4에서 바이러스 생산량 또한  $5.9 \times 10^9$  PIBs/ml 가장 높게 나타냈으며 생고추가 함유된 인공사료에서 전반적으로 바이러스가 높게 나타내었고 그와는 달리 생고추가 함유되지 않은 Diet 1에서는 가장 낮은 생산량을 나타내었다. 이와 같이 Diet 4에서 바이러스 생산량이 높게 나타난 이유로 Diet 4에 함유된 생고추가 고추담배나방 유충의 섭식에 알맞은 조성물로 유충의 성장이 촉진되고 섭식 활동도 활발해져 고추담배나방 유충이 선호하는 먹이가 서로 다른 것으로 판단된다.

표. 인공사료에 따른 바이러스수율

인공사료	바이러스 농도(PIBs/ml)
Diet 1	$2.0 \times 10^7$
Diet 2	$8.3 \times 10^8$
Diet 3	$4.5 \times 10^9$
Diet 4	$5.9 \times 10^9$

(7) 인공사료별 온도에 따른 고추담배나방 핵다각체병바이러스 병원성 조사

각각의 인공사료 Diet 1, Diet2, Diet 3, Diet4에 대하여 사육 온도에 따른 병원성 조사를 위해 고추담배나방 3령 유충에 바이러스 접종액  $1.0 \times 10^6$  PIBs/ml 농도의 바이러스를 각각의 인공사료에 접종 시킨 후 약 10분 정도 음건 후 유충이 섭식 하도록 하였으며 온도 조건을 24°C, 28°C에서 Petri Dish(Ø 9, 높이 1.5 cm) 당 1마리씩 개체 사육하면서 10반복 3회 실시하여 인공사료 구성에 따른 사충률 및 감염기간,  $LT_{50}$  값을 비교 조사하였다.

각기 다른 인공사료(Diet 1, Diet 2, Diet 3, Diet 4)에  $1.0 \times 10^6$  PIBs/ml 농도의 바이러스를 접종하여 각각 24°C 와 28°C 온도조건에서 고추담배나방 유충에 대한 병원성을 조사하였다. Diet 4의 경우  $LT_{50}$ 값이 28°C에서 6.1일로 24°C의 7.9일 보다 1.8일 빠르게 나타났으며 생고추가 함유된 Diet 2, Diet 3도  $LT_{50}$ 값이 6.7일과 6.3일로 Diet 4와 큰 차이를 보이지 않았다. 그러나 생고추가 함유되지 않은 Diet 1의 경우  $LT_{50}$ 값이 7.5일로 가장 높게 조사되었다. 24°C 조건에서도 28°C 조건에서와 비슷한 경향을 보였다. 한편 사충율을 조사한 결과는 각각의 인공사료에 따라 차이를 보였으며 24°C에서는 Diet 4가 90%의 가장 높은 사충율을 보였고 28°C에서도 Diet 4에서 94%의 가장 높은 사충율을 나타내었다.

이와 같은 결과로 28°C 조건에서 생고추가 함유된 Diet 4의 섭식에 의한 고추담배나방의 활동성을 촉진하므로 생체내 바이러스 생산 및 사충율을 촉진하는 것으로 보이며 24°C 조건에서는 온도가 낮아짐에 따라 고추담배나방의 섭식 및 활동성이 저하되므로 사충율이 감소한 것으로 보여진다.

표. 인공사료 종류 섭취에 따른 고추담배나방의 배양온도 변화 사충율

Temp (°C)	Artificial diet	$LT_{50}$ (Days)	95% CL (Days)	Mortality (%)
24°C(±1)	Diet 1	10.2	9.9-10.4	60
	Diet 2	8.5	8.2-8.8	80
	Diet 3	8.2	7.8-8.6	85
	Diet 4	7.9	7.6-8.2	90
28°C(±1)	Diet 1	7.5	6.9-8.1	78
	Diet 2	6.7	6.4-7.0	91
	Diet 3	6.3	5.8-6.8	88
	Diet 4	6.1	5.7-6.4	94

(8) 선별된 인공사료에 의한 핵다각체병바이러스 생산량 조사

최종 선별된 인공사료 Diet 4에 대한 고추담배나방 사육온도별 핵다각체병바이러스 생산량을 조사한 결과 각각의 온도에서 생산된 바이러스 생산량은 그중에서도 28℃에서  $1.2 \times 10^{10}$  PIBs/ml로 가장 많은 바이러스가 생산되었다.

한편 32℃에서는 온도가 높아짐에 따라 인공사료가 쉽게 건조가 되므로 유충이 접촉된 사료를 모두 섭식하지 못하는 경우가 발생되기도 하였다.

표. 선별된 인공사료에 따라 온도별 고추담배나방의 핵다각체병바이러스 생산량.

인공사료	바이러스 농도 (PIBs/ml)			
	20℃	24℃	28℃	32℃
Diet 4	$2.6 \times 10^7$	$2.8 \times 10^8$	$1.2 \times 10^{10}$	$6.2 \times 10^8$

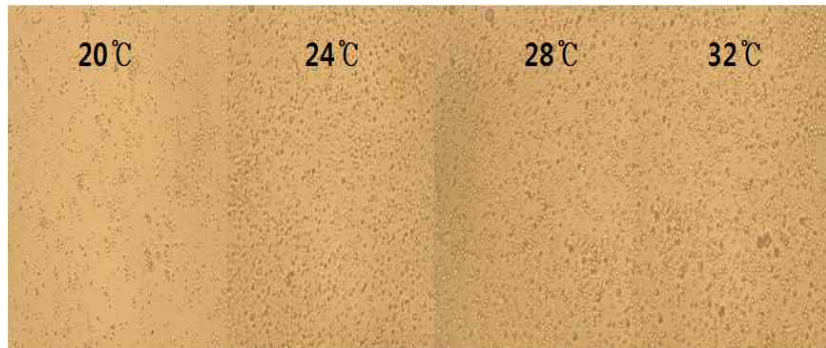


그림. 선별된 인공사료에 따라 온도별 고추담배나방의 핵다각체병바이러스

(9) 대량생산된 바이러스 회수방법

생고추가 첨가된 바이러스 대량용 인공사료에 의해 생산된 핵다각체병바이러스를 회수하기 위한 방법으로 바이러스에 감염된 고추담배나방 사충을 모아 믹스에 넣어서 세포를 파쇄 후 고추담배나방 사체와 바이러스가 함께 함유된 내용물을 고운천을 이용해 사체만 제거 후 바이러스가 함유된 내용물만 회수하였다. 이렇게 회수된 내용물 속에는 미세하게 남은 고추담배나방 사체가 함유되어 있으므로 최종 단계로 이를 제거하기 위해 원심분리를 사용하였다. 만약 사체를 제거되지 않으면 제품화 시제품 내에서 부패가 발생할 수 있으며 이로 인해 제품의 효과가 떨어지는 결과가 발생할 수 있다. 이와 같이 바이러스 회수와 정제에 있어서 이러한 방법이 선정된 이유는 제품 시 바이러스의 효율적인 회수에 의한 원료의 생산성 절감을 위한 것이다.

대량생산 인공사료에 의해 사육 후 감염된 고추담배나방 사충을 수거해 믹스기에 넣어서

세포를 파쇄 후 고추담배나방 사체와 바이러스가 함유된 내용물을 고운천을 이용해 사체를 제거하였으며 사체가 제거된 내용물을 원심분리기에(500 rpm) 넣어 미세한 사체를 완전히 제거하였다. 바이러스 함유된 내용물속의 바이러스 양을 계수하였으며 그 결과 아래와 같이 고농도의 바이러스를 회수할 수 있었다.

	회수 #1	회수 #2	회수 #3	회수 #4
바이러스 농도 (PIB <sub>5</sub> /ml)	$1.2 \times 10^{17}$	$2.4 \times 10^{18}$	$1.6 \times 10^{15}$	$3.2 \times 10^{15}$

## 라. 핵다각체병바이러스의 실내/외 생물검정을 통한 방제력 조사 및 살포방법

곤충바이러스는 숙주곤충에 대한 특이성이 높고 누에나 꿀벌과 같은 익충에는 피해를 주지 않으면서 목적해충을 방제할 수 있다는 장점을 지니고 있어 바이러스를 살충제화 하여 해충방제에 널리 이용하고 있다. 그러나 태양광선에서 나오는 자외선은 핵다각체병바이러스를 둘러싸고 있는 결정성 단백질을 불활화 시키기 때문에 이를 방지하기 위한 연구가 중요하다. 따라서 고추담배나방 핵다각체병바이러스를 기주식물에 살포할 때 사용할 방제기구를 선발함으로써 바이러스가 식물체에 현장 실험을 통해 숙주곤충인 고추담배나방에 잘 섭식 및 제제화에 하는데 있어 핵다각체병바이러스 농도를 설정하기 위하여 본 시험을 실시하였다.

### (1) 실내외포장 생물검정

#### (가) 노지고추 포장

노지고추는 오촌고추를 2월 파종하여 5월 정식하였다. 재식거리는 100cm 이랑에 40cm 간격으로 정식하였으며 잡초 억제를 위하여 검은 비닐로 피복한 후 이랑은 부직포를 설치하였다. 1개 이랑은 32m 로 80포기가 정식되었으며 관리는 일반농가에 준하였다.

#### (나) 시설포장

시설하우스 고추는 녹광고추로 1월 5일 파종하여 4월 10일 정식하였다. 하우스는 1-2W형 6연동 하우스로 길이 48m 1동 하우스 폭이 7m로 4개 이랑을 설치하였으며 포기사이 35cm하고 검은 비닐을 피복하여 잡초를 방제하고 관수자동화 기계를 이용하여 물과 비료 관리는 자동화 하였다.

### (2) 고추담배나방 핵다각체병바이러스 처리

#### (가) 처리시기

고추담배나방 성충이 발생하는 시기와 담배나방유충이 부화하는 시기에 3회에 걸쳐 서 처리하고 2회 조사하였다. 1차 처리는 7월 16일, 7월 23일, 7월 30일로 7일 간격 3회 처리 하였으며, 2차 처리는 8월 6일, 8월 13일, 8월 20일로 7일 간격 3회 처리 하였다.

노지고추에 2차 처리할 때는 처리 전에 포기에 달린 모든 과일을 제거하여 새로운 고추가 달리도록 한 후 처리하였다. 하우스 고추는 기존에 달려있는 고추를 제거하지 않았다.

#### (나) 처리방법

시설하우스는 하우스 4동을 이용하여 핵다각체병바이러스  $1.0 \times 10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  PIBs/ml 로 각각 1동씩 처리하였으며 대조구는 농약 및 핵다각체병바이러스를 전혀 사용하지 않았다. 노지고추는 이랑1개를 1개 조사구로 4개 조사구를 설치하여 핵다각체병바이러스를 처리 하였다.



그림. 핵다각체병바이러스 처리 시설하우스.



그림. 핵다각체병바이러스 노지처리

(다) 조사방법

조사는 고추 2화기를 1차, 3화기를 2차로 구분하여 조사하였다. 핵다각체병바이러스 방제 효과를 위한 과실피해율 조사는 핵다각체병바이러스 2회 처리 후 3일경에 1차, 3회 처리 후 3일 경에 2차 조사하였다. 조사는 한주의 모든 고추를 수확하여 고추담배나방 피해과를 조사하여 피해과율을 산출하였다. 시설하우스에서 조사지점은 1동의 하우스에 4개 이랑이각각의 반복구로 설정하고 각 반복구는 전면에서부터 20번째 주의 고추를 조사하였다. 노지고추는 1이랑에 7포기 간격으로 1반복구로 하여 3반복구를 설정하였다.

(3) 실외포장 생물검정(노지 & 시설)

(가) 2화기 조사

고추담배나방 핵다각체병바이러스를 3회 처리한 후 조사 결과 처리하지 않은 구에 비하여 바이러스를 처리한 구에서 노지고추는 피해과율이 0.6~3.2 %로 핵다각체병바이러스를 처리하지 않은 대조구 5.6%에 비하여 뚜렷하게 감소하였다. 시설고추에서도 처리한구에도 피해과율이 2.0~4.8% 감소되었다. 또한 처리구 내에서도 농도가 10배 높아갈

수록 30~40% 방제가가 높아지는 것으로 나타났다.

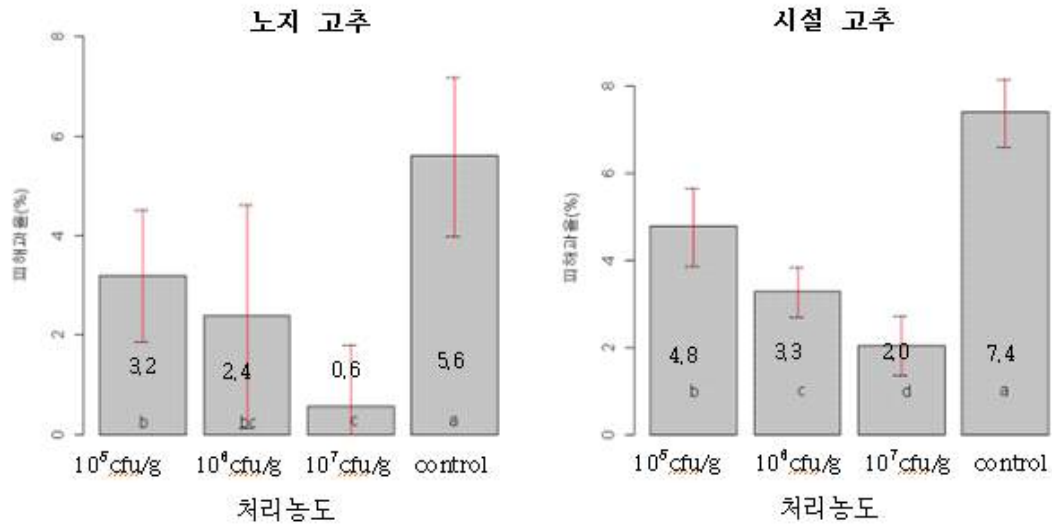


그림. 핵다각체병바이러스 2회기 처리시 고추담배나방의 방제가

#### (나) 3회기 조사

3회기의 고추담배나방 피해과율 조사에서 노지고추는 열매를 모두 제거한 후 핵다각체병바이러스를 처리하여 고추담배나방의 피해가 다소 적었으며, 시설고추에서는 과일이 달린 채 3회기 피해과율을 조사하여 피해가 다소 많았다. 핵다각체병바이러스를 처리한 노지에서는 1.0~2.6%로 피해과율이 낮았으며 처리하지 않은 대조구에서는 4.2 %로 높았다.

시설고추에서는 1차 조사 후 고추를 제거하지 않은 상태로 2차 처리하여 피해가 매우 많았다. 그러나 핵다각체병바이러스를 처리한 조사구에서는 피해과율이 0.2~32.6%로 처리하지 않은 대조구에 38.7%에 대하여 적은편이다. 특히 1차 조사와 마찬가지로 2차 조사에서도 농도가 높을수록 피해과율이 적었다. 따라서 방제를 위해서는  $1.0 \times 10^7$  PIBs/ml 이상으로 처리해야 효과가 있을 것으로 생각된다. 이러한 결과는 향후 핵다각체병바이러스의 제형 화하는데 있어 핵다각체병바이러스의 함량을 정하는데 매우 중요한 결과이다.



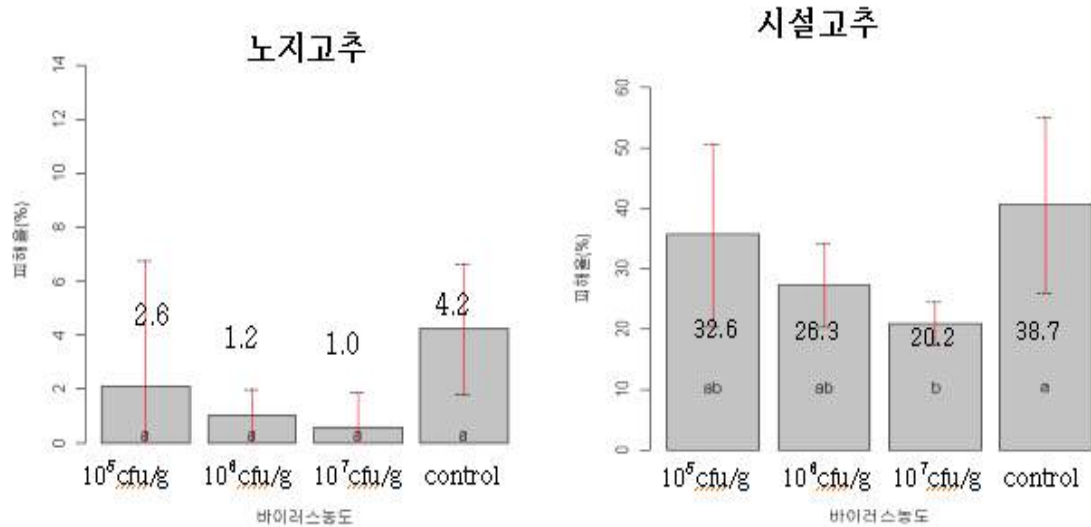


그림. 3화기 고추담배나방 피해과율 조사

(4) 핵다각체병바이러스 접종농도 구명

2016년 핵다각체병바이러스 접종농도를 구명하기 위하여 1×10<sup>5</sup>, 1×10<sup>6</sup>, 1×10<sup>7</sup> PIBs/ml 및 무처리구로 나누어 2회 처리한 후 포기전체의 과일을 따서 피해과일률을 조사한 결과 1×10<sup>5</sup> PIBs/ml 처리구에서는 9.8%, 1×10<sup>6</sup> PIBs/ml 처리구 4.9%, 1×10<sup>7</sup> PIBs/ml 처리구에서 2.4%의 과실이 피해를 받았으나 무처리구에서는 16.2%의 피해가 발생하였다.

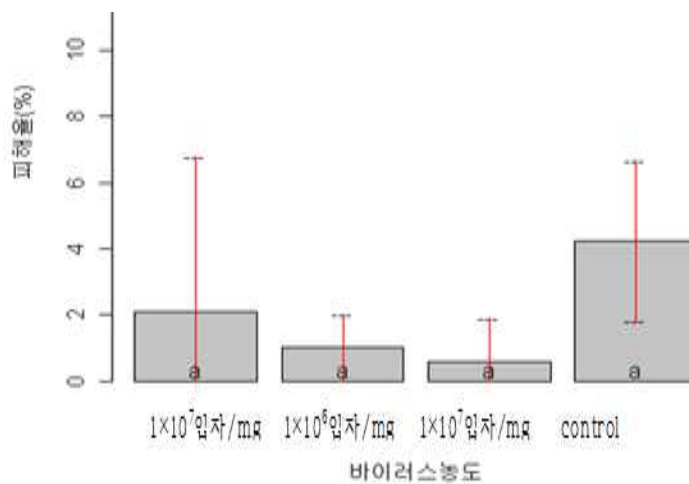


그림. 핵다각체병바이러스 접종 농도에 따른 피해율 1차 조사

2차 시험을 위하여 처리농도구별 3포기에 대하여 모든 고추를 제거한 후 2회 핵다각체병 바이러스를 처리한 후 피해율을 조사한 결과 1×10<sup>5</sup> PIBs/ml 처리구에서는 5.4%, 1×10<sup>6</sup> PIBs/ml 처리구 2.6%, 1×10<sup>7</sup> PIBs/ml 처리구에서는 1.2%의 과실이 피해를 받았으나 무처리구에서는 10.1%의 피해가 나타났다.

3차 시험은 다른 농가포장에서 같은 방법으로 조사구별 3포기에 대하여 모든 열매를 제거하고 핵다각체병바이러스를 처리한 후 조사한 결과 1×10<sup>5</sup> PIBs/ml 처리구에서는 2.6%,

$1 \times 10^6$  PIBs/ml 처리구 1.2%,  $1 \times 10^7$  PIBs/ml 처리구 1.0%의 과실이 피해를 받았으나 무처리구에서는 4.2 %의 피해가 발생되었다.

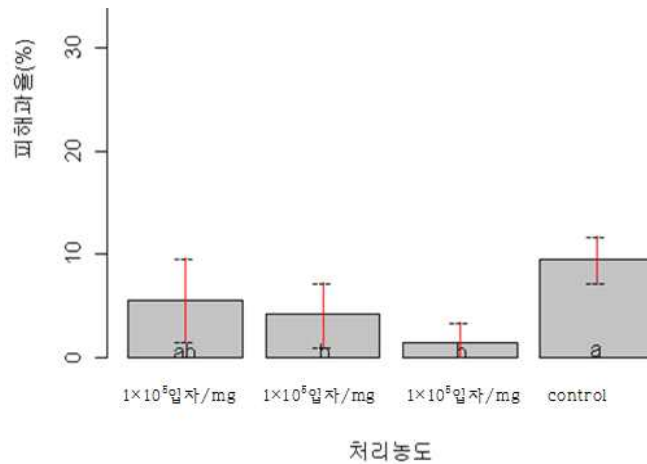


그림. 핵다각체병바이러스 집중 농도에 따른 피해율 2차 조사

시기별, 포장에 따라서 처리농도별 피해과율이 무처리구에 비하여 처리구에서 낮았으며 처리농도가 높을수록 피해과율이 낮았다. 처리농도를  $1 \times 10^7$  PIBs/ml 피해율이 1 ~ 2% 정도로 낮으므로 핵다각체병바이러스 적정희석 농도라 생각된다. 이러한 결과는 노시시험과 현장시설시험과 동일한 결과이다.

#### (5) 처리시기별 처리회수 구명

제품 개발을 하는데 있어 해충방제를 하는데 있어서는 살포 할 때 사용방법인 살포횟수가 중요하다, 방제방법을 통해 숙주곤충인 고추담배나방이 핵다각체병바이러스에 의해 살충력 확인을 위해 본 실험을 실시하였다.

#### (가) 담배나방 발생 2화기 처리시기별, 방제 횟수별 방제효과

2017년 핵다각체병바이러스 효과 검증을 위하여 처리회수와 시기별 방제효과를 검정하였다. 노지고추 담배나방 피해는 2화기부터 나타나므로 2화기 피해가 나타나는 8월 3일 조사하였다.

먼저 노지고추포장에 18개 이랑을 설치하여 1이랑당 1개조사구에 1반복구로 총 6개조사구 3반복을 설치하였다. 이랑길이는 20m, 포기사이 40cm로 정식하여 살충제를 사용하지 않고 관리하였다. 각 조사구당 3포기에 대하여 그동안 착과된 고추를 모두 제거하였으며 다음과 같이 조사구를 설치하였다

- 1회처리구 : 7월14일, 7월21일, 7월28일, 각각 조사구별 3반복구
- 2회처리구 : 7월21일, 7월28일 1개조사구 3반복구
- 3회처리구 : 7월14일, 7월21일, 7월28일 1개조사구 3반복구
- 무처리구 : 무처리 3반복구

먼저 핵다각체병바이러스를  $1 \times 10^7$  PIBs/ml로 조사구에 3반복 처리하였으며 7월 21일 조사구, 7월 28일 조사구에 각각 1회씩 3반복 처리하였다.

2회 처리구 역시 핵다각체병바이러스  $1 \times 10^7$  PIBs/ml로 7월 21일, 7월 28일에 1개 조사구에 3반복 처리하였다.

3회 처리구는 7월14일, 7월 21일, 7월 28일에 1개조사구에 3반복 처리하였으며 무처리구는 바이러스를 처리하지 않은 3반복을 설치하였다.

조사는 마지막 처리 7일후 인 8월 3일에 고추크기가 1cm 이상 되는 모든 고추를 수확하여 고추담배나방피해과실을 분리한 후 피해율을 조사하였다.

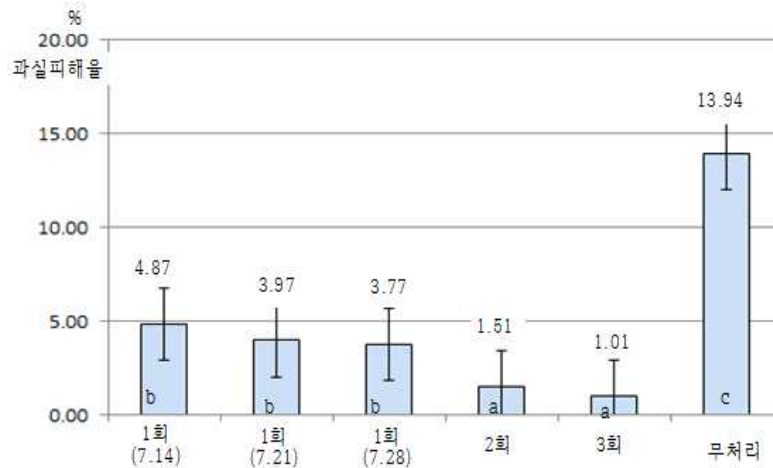


그림. 2화기 방제시기별, 처리회수별 피해과율

표에서 보는 바와 같이 방제하지 않는 무처리구는 약 14%의 피해과율이 나타났으나 시기에 관계없이 1회 이상 바이러스를 처리하면 방제효과가 나타났으며 2 ~ 3회 처리시에는 1%대 피해과율이 있는 것으로 볼 때 핵다각체병바이러스 처리효과가 있었다. 처리에 따른 피해율의 차이를 보이는 것은 잎 전체에 골고루 퍼지지 않아 살충력의 차이를 보이는 것으로 판단된다.

#### (6) 고추담배나방 발생 3화기 처리시기별, 방제 횟수별 방제효과

3화기 방제효과를 검증하기 위하여 2화기 시험포장의 각각의 조사구를 활용하였다. 8월 10일 2화기 조사포기를 제외한 조사구내 3포기에 대하여 고추 과실을 완전히 제거하여 조사구에 대하여 균일성을 유지하였다.

처리시기별 조사를 위하여 1회 처리구는 3화기에 해당되는 8월 25일, 9월 1일, 9월 8일에 핵다각체병바이러스를  $1 \times 10^7$  PIBs/ml 농도로 각각 3반복에 처리하였으며 2회 처리구는 8월 25일, 9월1일에 처리하였다. 3회 처리구는 8월25일, 9월1일, 9월8일 3회 처리 하였으며 9월15일에 1cm 이상 모든 과실을 수확하여 고추담배나방유충 피해과율을 조사하였다.

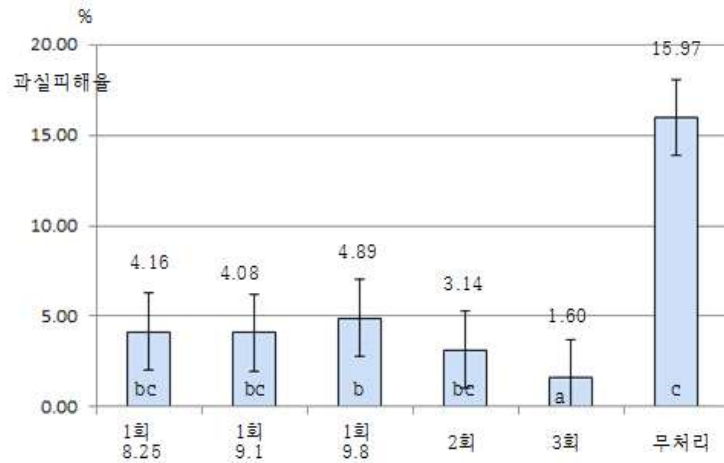


그림. 3회기 방제시기별, 횟수별 피해과율

표에서 보는 바와 같이 핵다각체병바이러스를 처리하지 않은 조사구에서는 16%의 피해과율이 나타났으나 1회 이상 처리한 포장에서는 4%이하의 피해과율이 나타나는 것으로 볼 때 핵다각체병바이러스 효과가 있는 것으로 조사 되었다.  
7일 간격 3회 이상 방제할 때는 피해과율이 1.6% 정도만 생기는 것으로 볼 때 화학농약을 대체할 수 있을 것으로 기대된다.



그림. 핵다각체병바이러스 처리 후 고추 생산량.

#### 다. 방제효과 증진을 위한 미생물살충제 증진기술 개발(핵다각체병바이러스+곤충병원성세균)

곤충병원성 해충의 경우 일반적으로 화학적 방제기방을 통해 방제 방제가 주를 이루고 있었으나 약제에 대한 저항성으로 방제가 어려워 재배작물이 큰 피해를 입을 뿐 아니라 저항성해충의 출현, 인축이나 동식물에 대한 직·간접적인 피해와 잔류성으로 인한 환경오염 및 생태계 파괴 등의 심각한 문제를 야기 시키고 있다. 이를 해결하기 위한 방안중 하나로 생물적 방제법을 도입하여 화학적 방제의 보완 또는 대체수단으로서 종합적 해충방제 체계 확립에 연구의 초점을 집중시키고 있으며 그 중에서도 곤충 질병을 일으키는 세균, 바이러스, 사상균, 원생동물 등 해충의 방제에 큰 비중을 두고 있다. 또한 최근에는 천적을 이용하는 천적농업도 증가하고 있는 실정이다. 이중에서 미생물 바이러스는 기주곤충에 대한특이성이 높아, 농작물이나 산림해충 방제에 효과적이어서 이미 일부 선진국에서는 살충제가 상품화되고 있다. 국내에서는 고추담배나방 핵다각체병바이러스를 이용하여 실제 포장에 이용할 수 있는 방제체계가 이루어지고 있지 않은 실정이다. 따라서 본 실험은 예천군 농업기술센터에서 고추담배나방을 대상으로 포장에서 미생물 살충제 증진을 위해 핵다각체병바이러스와 곤충병원성세균을 혼합 살포를 통해 고추담배나방 방제 시 상승효과를 기대할 수 있을 것으로 사료 되어, 혼합 살포의 가능성을 검증하기 위해 실내검정과 노지와 비닐하우스에서 실시하였다.

##### (1) 생체를 이용한 간이 실내 생물검정

고추담배나방에 대한 선발된 HasNPV의 고추를 이용한 간이 생물검정을 조사하기 위하여 담배나방 사육장(40 cm×40 cm×40 cm)에 담배나방 성충 암수 각각 10마리씩 방사 후 고추잎과 사육장 벽면에 산란을 유도하였다. 사육장 벽면에 산란한 담배나방 알을 유충 채집용 붓에 0.85% NaCl 을 적신 후 벽면에 붙은 알을 훼손되지 않게 조심스럽게 채취하여 각각의 생고추 잎에 30알 씩 일정하게 치상 고정하였고 생고추 잎자루 끝부분에 젖은 솜을 말아서 실험기간 동안의 건조를 방지하기 하였다.

동시에 고추열매를 500배액으로 희석된 차염소산나트륨에 2분간 침지처리 하여 깨끗이 소독한 후 담배나방 알이 치상된 고추잎과 함께 준비된 Petri-dish(Ø9, 높이 4cm)에 넣어 HasNPV-kor 접종농도  $2.0 \times 10^6$  PIBs/ml와 곤충병원성세균과 혼합 분무하여 사육온도 28°C, 10반복 3회 간이 생물검정을 실시하였다. 비처리구는 위의 동일한 방법으로 준비하였으며 HasNPV-kor와 곤충병원성세균을 분무하지 않았다. 처리 후 8일 경과 후 각각의 Petri-dish 안에 있는 생고추잎과 고추열매의 피해정도를 조사 확인하였다.



고추 생체를 이용한 Petri-dish 간이 실내 생물검정을 조사하였으며 바이러스 처리 후 8 일 경과 각각의 Petri-dish 안에 있는 생고추잎과 고추열매의 피해정도를 해부현미경으로 관찰 한 결과 비처리구에서 각각의 Petri-dish 안의 고추담배나방 유충이 90%이상 생존하였으며 반대로 처리구에서 각각의 Petri-dish 안의 고추담배나방 유충이 70% 이상의 죽어 있는 것을 확인하였다.

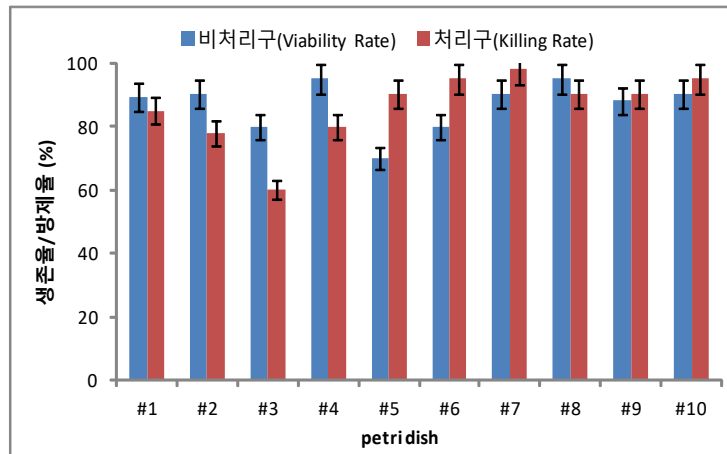


그림. 생체를 인용한 혼용제의 생존율 및 방제율

## (2) 핵다각체병바이러스와 곤충병원성세균 혼용 온실 실험

고추를 가해하는 고추담배나방의 보다 더 상호 협력적 사충력을 발휘하고자 개발된 제형화에 그람양성균인 토양 곤충병원성세균인 Bt(*Bacillus thuringiensis*)와의 혼용 시 나타날 수 있는 병원성을 조사하였다. 시제품 디펜스에 Bt 미생물( $\times 250$ )을 희석하여 시설하우스는 하우스를 이용하여 핵다각체병바이러스와 대조구는 Bt 농약 및 핵다각체병바이러스를 고추담배나방에 대한 상호 협력적 사충력을 조사하였다. 그 결과 핵다각체병바이러스 처리구와 Bt 미생물 단독처리구에 비교해 높은 사충율이 조사되었으며, 이와 같은 결과로 보다 더 효율적인 담배나방 방제를 위한 방법으로 Bt 미생물을 함께 혼용 살포하는 것이 방제가를 높일 수 있는 방안으로 제시할 수 있을 것으로 보여진다. 이러한 결과를 바탕으로 (주)엠텍에서 핵다각체병바이러스 제품인 디펜스 뿐 만 아니라, 2015년에 완료한 ‘온실가루이 방제를 위한 곤충병원성 곰팡이 활용한 미생물 살충제의 산업화 기술에 관한 연구’를 통해 생산하는 온실가루이 포자와 함께 혼합제제를 개발한다면, 그 살충력이 더욱 증가 될 것으로 판단되며, (주)엠텍에서는 과제 완료 후 류베리아 포자와 핵다각체병바이러스를 병용 처리하여 현장 실험을 실시하여 그 결과를 확인할 예정이다.

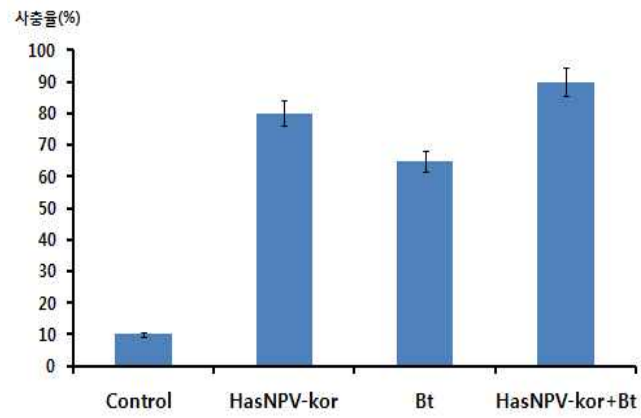


그림. 고추담배나방 핵다각체병바이러스와 곤충병원성 세균을 이용한 방제율.

**바. 선발된 핵다각체병바이러스의 대량생산 최적조건 및 생산체계 구축 방안 확보**

원제의 대량생산은 산업화하는데 있어 매우 중요한 포인트이다. 원제의 가격 단가를 낮추어야 생산 원가가 낮아지며, 농민들에게 경제적 부담을 적게 줄 수 있다. 일반적으로 미생물의 경우 대량생산을 위해서는 배지의 최적화를 통해 대사산물 또는 미생물수를 증가 시키는 방안을 모색하고 있다. 곤충병원성 바이러스의 경우는 숙주의 여부에 따라 바이러스의 생산량의 차이를 보일 수 있다. 핵다각체병바이러스를 대량 생산하기 위한 방안으로는 현장에서 직접 고추담배나방을 키우는 방안도 고려할 수 있다. 일반적으로 핵다각체병바이러스의 대량증식 방법은 숙주곤충의 대량사육을 통한 생체증식 방법이 주로 이용되고 있으며 곤충 세포 배양기를 이용한 생산체계도 시도되고 있으나 경제적인 문제로 실용화되지 못하고 있으며, 생체증식에 의한 바이러스의 증식 목적은 숙주곤충의 조직을 최대한 이용하는 동시에 병원성이 높은 바이러스를 생산함에 있다. 하지만 농가에서 농가의 소득원으로 활용하거나, 직접 배양을 통해 바이러스를 생산한다면 그 의미가 달라 질 수 있을 것이다. 따라서 숙주인 고추담배나방을 농가에 의뢰하여 수집을 하고 수집한 숙주에 바이러스를 감염 시키는 방법과 하우스에서 고추담배나방을 키워가면서 곤충 공장 형태의 host배양 방법을 통해 핵다각체병바이러스 대량생산을 위한 생산체계를 구축하였다.

**(1) 숙주곤충의 안정화된 공급방법**

고추담배나방 핵다각체병바이러스를 생산하기 위해서는 반드시 담배나방 유충 확보가 필요하다. 그간 담배나방 유충을 생산하기 위하여 인공사료를 이용하여 인공사육기술을 개발하였다. 그러나 고추담배나방 유충을 4회 이상 계대 사육할 경우 첫 회에 비하여 산란수가 50% 이하로 급격하게 줄어들고 부화율도 현저하게 떨어진다. 유충 사육 중에도 폐사량이 많고 성충으로 우화되는 비율도 떨어진다.

계대사육을 하게 되면 유전적으로 순계화가 되어 환경에 적응할 수 있는 저항성이 떨어질 수 있어 자연 상태에서는 도태되었을 개체가 인공사육을 통하여 정상적인 개체가 되어 다음 세대에 환경에 적응할 수 있는 저항성을 더욱 떨어지게 하는 원인되고 있다. 이러한 문제점을 해결하여 안정적인 담배나방 유충 생산을 위한 사육기술을 개발하고자 하였다.

표. 계대 4회사육시 담배나방 번데기 생산량

구분	계	사용가능 번데기			사용 불가능 번데기		
		계	정상	왜소	계	탈피불량	사충
번데기수	101마리	52	22	30	49	16	33





그림. 계대 4회사육시 번데기생산량

## (2) 시설하우스를 이용한 고추담배나방 유충 생산

시설고추를 재배하는 농가의 하우스 일부를 이용하여 고추담배나방 유충을 생산하는 방법이다. 이런 문제를 해결하기 위하여 시설하우스에 방충망을 설치하여 고추담배나방을 격리하여 사육하면 불량한 개체는 도태되고 우량한 개체만 남아서 안정적인 노숙유충과 성충을 공급 받을 수 있다. 서리가 내리지 않는 시기인 4월 하순(시험포장은 4월 21일 정식)에 고추를 정식하고 하우스 일부분은 방충망을(100㎡) 설치하여 하우스에서 발생된 고추담배나방 성충과 유충이 외부로 탈출하지 않도록 관리한다. 고추 품종은 잎이 충분히 두꺼워 고추 과실이 없더라도 잎을 먹고 클 수 있는 시설하우스 풋고추용인 녹광고추를 이용하면 효과적이다.

고추담배나방 산란을 위해서 고추잎이 충분히 발생되고 고추 과실이 커지기 시작하는 5월 중순(5월 17일 방사)에 실내에서 월동한 담배나방 번데기 100마리를 접종하였다. 담배나방 성충이 열매에 알을 낳아 열매 속으로 들어가면 채집이 어렵다. 따라서 열매 속으로 들어가는 유충을 줄이기 위해서 담배나방 번데기가 성충으로 우화되기 전에 착과된 고추열매를 제거하였다.

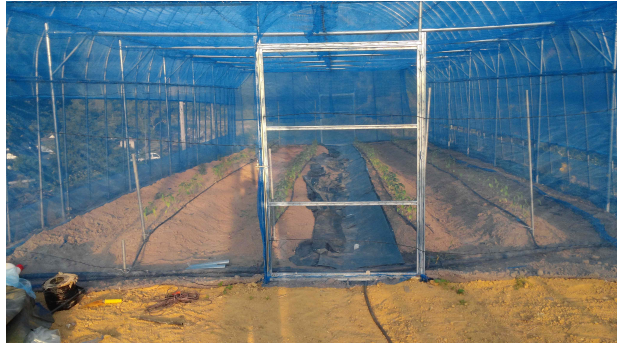


그림. 고추담배나방 유충 생산을 위한 사육시설  
(시설하우스 내 일부포장)

접종된 담배나방 번데기에서 5일(5월 22일) 후부터 성충이 우화되기 시작하였다. 성충이 충분한 당분을 섭취하면 산란이 많아지므로 물 1리터당 설탕 500 g을 희석하여 20㎡ 당 1개소, 총 5개소에 각각 100 ml을 접시에 붓고 설탕물 위에는 흰색의 얇은 천을 깔아서 성충의 먹이로 하였다.



그림. 담배나방 유충 채집 적기(4령말 ~5령초)

담배나방의 산란은 성충 우화를 확인한 4일부터 (5월 26일) 시작하였다. 담배나방유충은 산란확인 후 22일(6월 17일)부터 채집하였다. 채집은 5령충과 4령충 중 큰 것을 채집하였다. 채집된 유충은 종종으로 활용하기 위하여 인공사료를 먹여서 개체별로 사육하여 번데기를 확보하였다.

표. 번데기 접종 후 1차에 채집한 유충 마리수

월 일	6.17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
마 리	7	32	27	76	251	489	331	325	388	293	218	57	21	8

표. 시설하우스에서 채집한 담배나방 유충이 번데기로 탈피한 개체수

구분	계	정상	사 총		
			계	유충	탈피불량
마리수	2,523	2245(89%)	278	235	43

시설하우스에서 번데기를 우화시켜서 채집한 유충을 인공 사육한 결과 정상적인 번데기가 된 개체는 89 %가 되었다.

시설상태에서 유충을 다량으로 채집하기 위하여 담배나방을 실내에서 산란방을 설치하여 채란 및 부화를 시켰다. 부화 된 1령의 어린 유충을 10일 간격으로 10,000마리 이상 접종 시켰으며 6월부터 9월까지 채집한 유충은 아래 표와 같다.

표. 6월부터 9월까지 채집된 담배나방 유충

구분	6중	6하	7상	7중	7하	8상	8중	8하	9상	9중	9하	계
마리(수)	142	2,391	1,344	2,120	2,515	1,842	2,437	2,712	2,267	1,459	362	19,591
채집일수	6	10	6	6	8	7	7	8	8	7	6	79 일
채집시간	66	1,155	604	956	1,132	828	1,096	1,265	1057	679	168	9,006분

채집일수는 총 79일이며 19,591마리를 채집하는데 150.1 시간이 소요되어 채집과 임차료를 포함하여 마리당 77.1원이 소요되었다.

경영분석

- 총 채집량 19,591마리
- 채집시간 : 150.1시간(9,006분)
- 1일 채집량 : 1,044마리(1일 8시간 기준)
- 부대경비 : 310,400원
- 임차료(작물관리비 포함) : 300,000원(100㎡)
- 시설, 관수장치 등 감가상각비 10,400
- 인건비 : 1,200,800
- 채집시간을 시간당 8,000원으로 계산(150.1시간 × 8,000원)
- 마리당 가격 : 77.1원
- (310,400원 + 1,200,800원) ÷ 19,591마리 = 77.1원

마리당 77.1원은 부화부터 어린유충까지 생산비가 포함되지 않았음.

(3) 고추담배나방 유충 전문 사육장

일반농가의 시설하우스를 이용하여 고추담배나방 유충을 생산할 경우 어린유충이 방충을 통하여 다른 포장으로 탈출하는 문제가 발생된다. 특히 강한 햇볕과 고온으로 인공으로 채란된 알과 유충을 접종하여도 정착하여 유충으로 채집되는 량이 적어서 경제성이 떨어진 다. 따라서 강한 햇볕과 한여름 고온을 막아줄 전문적인 담배나방 유충 사육장이 필요하였 다. 본군 센터의 유리온실은 차광시설과 관수시설이 완비되어 있고 고추포장과 격리되어 있어 고추담배나방 유충 생산에 적합하다.

시설규격은 가로2.5 × 세로4 × 높이 2 m 사각 프레임에 2 mm 방충망을 설치하여 어린 유충과 외부의 천적이 들어오지 못하도록 하였다.

고추 정식은 가로15× 길이 90× 높이 15 cm 사각화분에 3포기를 심어 2열로 배치하고 한 줄에 14개의 화분이 들어가도록 하였다. 양액자동관비를 통하여 고추를 재배하고 고추 꽃이 피기 시작하면 부화된 담배나방 유충을 접종하여 15일부터 채집한다. 채집이 시작되면 부화된 어린 고추담배나방 유충을 지속적으로 접종하여 고추담배나방 유충을 지속적으로 생산할 수 있도록 하였다.

10 m<sup>2</sup>에 매일 평균 349마리의 고추담배나방 유충이 생산되었다. 고추담배나방유충을 지속적으로 생산하기 위해서는 고추 포기 관리가 중요하다. 고추 양액은 농촌진흥청 고추액비를 사용하였으며 1일 1회 관주하였으며 고추 심은 배지는 시중에서 구입한 상토를 사용하였다. 고추는 정식 후 50일 이상 지나면 뿌리가 약해져서 노화되므로 고추가 심겨진 화분을 50일 간격으로 교체하여 주면 지속적인 담배나방 유충을 확보할 수 있다.

표. 6월부터 9월까지 유리온실에서 채집된 고추담배나방 유충

구분	6중	6하	7상	7중	7하	8상	8중	8하	9상	9중	9하	계
마리 (수)	260	2,820	3132	2958	3003	2385	2279	3318	3715	1034	249	25,153
채집 일수	1	8	6	8	7	8	5	9	5	8	7	72 일
채집 시간	78	987	1,130	1,144	1,142	872	835	1204	1,257	312	132	9,093분

관리방법은 20일간은 화분만 별도로 관리한 후에 고추담배나방 유충 사육실에 넣어서 30 일간 유충채집을 채집한 후 폐기하였다.



그림. 고추담배나방 유충 채집

경영분석

- 총채집량 25,153마리
- 채집시간 : 151.2시간(9,093분)
- 1일 채집량 : 1,331마리(1일 8시간 기준)
- 부대경비 : 130,330원
  - 화분 28개 × 3,000원 ÷ 10회 사용 = 8,400원
  - 고추모종 : 28개 × 3포기 × 200원 = 16,800원
  - 비료 및 관수자재 1식 = 25,130원
  - 시설, 관수장치 등 감가상각비 80,000
- 인건비 : 1,209,600
  - 채집시간을 시간당 8,000원으로 계산(151.2시간 × 8,000원)
- 마리당 가격 : 53.3원
  - (130,300원 + 1,209,600원) ÷ 25,153마리 = 53.3원
  - 부화부터 어린유충까지 생산비는 포함되지 않았음.

(4) 풋고추 생산농가에서 피해과실 수거

시설풋고추 재배농가에서 풋고추를 수확하여 피해과실을 선별할 때 발생하는 피해과실을 수거하여 피해과실 속의 고추담배나방 유충을 채집하는 방법이다. 농가에서 수거한 피해과실 중 약 10.8%에서 고추담배나방 유충을 채집할 수 있으며 유충의 형태도 2령부터 5령까지 다양하였다.

표. 채집한 벌레 먹은 고추에서 채집된 유충

	A 농가		B 농가		c 농가		d 농가	
	고추	유충	고추	유충	고추	유충	고추	유충
7. 20	2023	139	3598	548	3044	157	3120	386
7. 27	2820	158	2230	134	1633	185	4320	551
계	4,843	297	3,828	682	4,677	342	7,440	937
비율(%)		6.1		17.8		7.3		12.6

- 고추는 벌레먹은 고추 총 개수 ,유충은 고추에서 채집된 담배나방유충
- 고추 총개수 29,788개, 1개 해체 시 평균 11초소요,
- 유충 2,258마리 채집, 유충 있을 때 추가 15초소요

고추 피해과실은 농가에서는 폐기대상이므로 별도의 구입비용을 필요하지 않지만 수거와 고추 속에 고추담배나방 유충을 채집하는 인건비가 소요되며 채집된 유충도 상처를 받아서 발육기간 중에 죽는 개체가 많았다. 따라서 인건비 대비 유충 생산량이 낮은 것으로 판단된다.

표. 채집된 유충 사육으로 번데기가 된 개체

	7월20일 채집	7월27일 채집	계
유충수	1,437	1,028	2,465
번데기 개체	1,182	893	2,075
사충수(사충률 %)	255(17.7)	135(13.1)	390(15.8)

경영분석

- 총채집량 : 2,258마리
- 채집시간 : 72.9시간  
고추 해체 1개 하는데 평균 11초 × 29,788개, 총 63.5 시간 소요  
유충 채집 2,258마리 × 15초 총 9.4시간 소요
- 부대경비 : 300,000원  
차량 임차 2회 × 150,000원
- 인건비 : 583,000원  
72시간 × 8,000원
- 마리당 가격 : 391.0원  
(300,000원 + 583,000원) ÷ 2,258마리 = 391원

(5) 인공사육을 통한 안정적인 고추담배나방 유충 생산

고추담배나방 유충을 인공사육하게 되면 다량의 유충을 확보할 수 있다. 그러나 3회 이상 누대사육을 하게 되면 사육 중에 많은 량의 유충이 죽게 된다. 따라서 야외에서 생산된 유충을 이용하면 인공사육이 지속적으로 할 수 있다.

시설하우스 등 야외조건에서 생산된 고추담배나방 유충 및 번데기는 자연 도태에서 살아남은 것으로 실내에서 인공사육 할 수 있는 종충으로 사용할 수 있다.

인공사육방법은 먼저 지름 500 mm, 두께 8 mm의 펄트리디쉬에 인공사료 2 g을 넣고 으긴 후에 뚜껑을 덮어서 3령까지 키우는데 먼저 용기에는 우화된 1령충 유충을 5~6 마리 잡아넣고 소독된 휴지를 덮어서 인공사료와 유충의 호흡작용으로 생긴 수분에 유충이 빠

져 죽지 않도록 한다. 소독된 휴지위에 뚜껑을 덮고 인공사료의 수분이 마르지 않도록 셀로판지로 밀봉하여 27℃에 9~10일 경과하면 3령 층까지 키울 수 있다.

3령 이후 균집사육을 하게 되면 스트레스와 동중포식으로 개체수가 갑자기 줄어들는데 3령이 되는 부화 10일 부터는 개별사육을 한다. 개별사육에는 핵다각체병바이러스를 생산하는 것과 성충을 생산하여 종충으로 사용하는 경우에 따라 사육용기 크기를 달리한다.

핵다각체병바이러스를 생산하는 경우 성충으로 생산하여 채란을 하는 경우에는 지름 40mm, 두께15mm 의 페트리디쉬를 사용한다.

핵다각체병바이러스를 생산할 때에는 지름 50 mm, 두께 15 mm의 페트리디쉬를 사용하며 3령층 이층시킨다. 이층 전에 용기에 인공사료 3~4 g을 넣어 7~10일 후 유충무게가 0.4~0.5g 될 때까지 사육한다. 적당한 크기에 유충은 선별하여 핵다각체병바이러스를 처리한 인공사료 1 g 넣어 먹이면 2~3일 부터 감염개체가 발생한다. 바이러스를 먹고 감염된 개체는 별도로 모아서 유충이 액체화 되었을 때 냉동실에 얼려 둔다.

3령층 사육 시에는 뚜껑만 덮고 3령이하 사육 시기처럼 용기를 밀폐하지는 않는데 용기를 밀폐할 경우 질식사한다.

경영분석(담배나방유충 5령 2일차까지 소요되는 경비)

o 1령층 사육 : 870,000원

- 유충 10,000마리생산에 필요한 1령 유충수 30,000마리
- 개별사육용기 (페트리디쉬 ) 6,000개 × 10원 = 60,000원
- 집합용기(개별용기담는 용기) 150 × 6,000원/10회=90,000원
- 개별용기 6,000개 담는데 소요된 시간

. 1인 × 9일 × 80,000원 = 720,000원

. 인공사료담기, 밀봉 등 총 소요 시간

o 3령 유충 사육: 630,000원

- 개별용기 12,500개 담는데 소요된 시간

. 1인 × 6일 × 80,000원 = 480,000원

- 개별용기 12,500 × 12원 = 150,000원

o 전기, 시설, 장비 등 20일간 소요된 경비 ; 400,000원

- 전기, 시설 감가상각비( 20일간 임차료)

. 1일 10,000원 × 20일 = 200,000원

. 인건비 1일 1시간 × 20일 × 10,000원 = 200,000원

o 총액 : 1,990,000

(6) 사육방법별 비교분석

	하우스	유리온실	농가채집	인공사육
총채집량	19,591	25,153	2,258	10,000
채집시간	9006분 (150.1시간)	9,093 (151.1시간)	72.9시간	20일
1일 채집량(생산량)	1,044	1,332	248	500
마리당 부대경비	15.8원	5.2원	13.2원	30
생산 총 인건비	1,200,800	1,209,800	583,000	1,400,000
마리당 인건비	61.3원	48.1원	258.3원	140
마리당 가격	77.1	53.3	391.1원	170.0

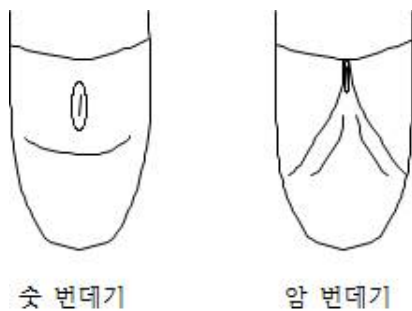
1령충 유충 가격은 성충을 이용한 산란을 유도하여 생산할 경우 100,000마리를 생산할 경우 마리당 6원정도 소요된다.

담배나방 유충 생산은 시설하우스 또는 유리온실 등 실내에서 태양광을 이용하여 사육할 경우 단가가 낮아서 경제성이 있으나 인공사육 또는 농가에서 채집할 경우 단가가 비싸서 경제성이 떨어진다.

(7) 고추담배나방 인공사육 방법

(가) 고추담배나방 번데기 암수구분

먼저 고추담배나방 번데기를 암수로 구분하여 암수가 같은 비율로 산란방에 넣으면 교미율이 높아서 산란량이 많아진다. 번데기를 이용한 암수구분은 번데기 배의 마지막 마디 밑을 아래그림 우측에서 보는 것처럼 타원형으로 약간 도드라져 보이는 것이 숫 번데기이며 우측 그림처럼 배마디에서 거튼을 늘려 놓은 것처럼 보이면 암 번데기다



번데기 암수구분



산란방



(나) 채란

고추담배나방으로부터 채란을 위해서는 우화 중 곰팡이병이 걸리지 않도록 시중에서 구입한 락스 5%(차아염소산나트륨 3%)액에 1분간 소독 후 맑은 물에 3회 씻어서 사용한다.

채란을 위해서는 먼저 암수로 구분한 고추담배나방 유충을 각각 6마리를 1.5리터 pp병을 이용하여 산란방을 만들어서 통에 넣는다. 우화 된 성충을 산란방에 넣으면 탈출하려고 날아다녀 인편이 많이 떨어지고 수명과 산란수도 떨어진다.

표. 채란을 위하여 번데기와 성충을 넣었을 때 평균 산란수(3쌍/10반복)와 수명(6마리/3반복)

성충		번데기	
산란수	평균수명	산란수	평균수명
227.2	8.3	4001.7	11.1

(다) 산란방

고추담배나방 성충의 산란을 유도하기 위하여 페트리디쉬와 PP병을 이용하면 간이 산란방을 만들 수 있다. 산란방은 지름이 10 cm, 높이 5 cm 페트리디쉬에 거즈를 깔고 그 위에 아래위를 자른 1.5리터 PP병을 끼운 후 0.5 mm 망을 덮고 뚜껑으로 고정하여 사용하였다. 성충은 당분을 공급하면 산란수가 증가하고 수명도 늘어나기 때문에 1회용 스포이드를 잘라서 20%의 설탕물 넣고 면으로 된 실을 넣어서 설탕물이 스며 나오도록 하였다.



그림. 담배나방 산란방

(라) 부화

실내온도 28℃에 3~4일정도 지나면 일시적으로 부화하기(96%) 시작하며 20℃일 때는 부화일수가 5~6일 정도 길어지고 부화율 낮다(75%). 32℃ 이상이 되면 부화일수가 다소 빨라지지만(3.1일) 부화율이 떨어져(87%) 28℃에서 부화시켰다.

(마) 1 ~ 3령 충 관리

부화된 고추담배나방 유충은 지름 45 mm, 높이 7 mm 페트리디쉬에 인공사료 3 g을 넣

고 소독된 손가락으로 눌러 납작하게 만든다. 털의 굵기가 가는 붓을 이용하여 알에서 깬 유충을 3~5마리 정도 접종한 후 소독된 탈지면을 덮고 뚜껑을 덮은 후 셀로판테이프로 밀봉한다.

탈지면을 덮지 않으면 유리된 수분으로 인하여 어린유충이 익사한다. 셀로판지로 밀봉하지 않으면 젖은 탈지면을 통하여 곰팡이가 발생되므로 반드시 밀봉해야 한다.

작업능률을 올리기 위하여 여러 마리를 넣을 경우 10일이 지나면 카니발리즘이 생겨 생존율이 떨어지는 문제가 발생하므로 3~5마리를 넣는 것이 적당하다.



그림. 1~3령충 사육케이지

표. 패트리디쉬를 이용 인공사료에 키운 고추담배나방 유충 생존율 (마리수/ 패트리디쉬, 3반복)

접종마리수	3	5	10	15
생존마리수 (생존율)	1.8 (60%)	2.1 (42%)	2.8 (29%)	2.9 (19%)

(바) 4령충 이후 관리

부화된 유충을 페트리디쉬에 담아 셀로판테이프로 밀봉한 유충은 15일이 지나면 급격히 사충율이 늘어나므로 10일경 밀봉을 해제하고 지름 50 mm, 높이 15 mm 페트리디쉬로 옮겨 키운다.

표. 부화유충 집단사육 기간별 유충 10마리 개별사육 시 정상번데기 수

사육일수 \\ 개체별	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	평균
5일		0	0			0		0			4
8일	0	0		0			0			0	5
11일	0	0	0		0	0	0		0	0	8
15일	0	0	0	0		0	0	0	0	0	9

- 0 정상번데기, 빈칸은 사충 또는 불량번데기
- 이충일수 : 페트리디쉬에 1령충 5마리를 이충 일수
- 부화유충은 5마리 집단사육, 이후부터 개별사육(동종포식 회피)

이때 인공사료는 약 5~6 g 되도록 잘라서 넣고 유충을 1마리씩 넣는다. 4령충이 지나면서 카니발리즘이 심하며 탈피를 위하여 움직이지 않은 유충을 움직이는 유충이 잡아먹는다. 옮겨진 유충은 약 10일이 지나면 번데기가 된다.



그림. 외부에서 채집된 유충사육



그림. 4 ~ 5령충 사육케이지

(바) 번데기 관리

번데기가 된 후 4~5일경 번데기를 수거하여 암수로 구분한 후 소독하여 관리한다. 3 ~9 월까지 생산된 번데기는 번데기가 된 후 평균 12~13일 정도가 되면 우화하게 되므로 저장할 수가 없다. 번데기 기간을 조사하기 위하여 8월 13일부터 8월 17일 까지 야외에서 채집한 유충 100마리를 이용하여 용 및 번데기 기간을 조사한 결과 용기간은 평균 1.4일이며, 최소 1일, 최대 3일이 소요되었다. 번데기 기간은 평균 12.9일이며 최소 11일, 최대 18일이 소요 되었으며 암수 비율은 63 : 37로 나타났다. 인공사육 시 일장기간이 긴 시기에 많은 량의 번데기를 갖게 되면 갑자기 우화되는 성충이 많아지게 되어 관리하기 어렵게 된다. 바이러스에 접종하지 않을 유충에 대해서는 일장처리를 하여 번데기로 관리하면 매우 편리하다. 일장처리 하는 방법은 부화 후 5 ~ 6일경부터 주간 8시간, 야간 16시간으로 일장을 조절하여 만들어진 번데기는 약 3개월간 우화되지 않는다.

자연적으로 일장이 짧아지는 시기인 10월에 만들어진 번데기는 우화되지 않고 월동형 번데기가 되므로 3개월 후 우화시킨다.

(8) 핵다각체병바이러스 대량생산 및 접종농도 구명

(가) 핵다각체병바이러스 접종

핵다각체병바이러스를 생산할 유충은 5령 2일 정도 되어 체장이 20 mm 정도 되는 것이 알맞다. 핵다각체병바이러스를 급이 할 개체는 그동안 급이 된 인공사료를 제거한 후 24

시간 굵긴다. 굵긴 담배나방 유충에 인공사료를 5×5 mm로 잘라 용기에 담은 후  $1.0 \times 10^5$  PIBs/ml으로 희석한 핵다각체병바이러스를 피복하여 1 g씩 급여한다. 인공사료 먹인 후 2일 정도 지나면 사료를 먹지 않고 가만히 있으며 7일이 지나면 죽어 투명하게 된다. 핵다각체병바이러스에 감염되어 죽은 유충은 냉동실에 넣어서 얼려둔다. 바이러스 먹이를 먹고 2일이 지나도 움직이는 개체는 핵다각체병바이러스에 접종된 먹이 2 ~ 3g 더 넣어주어 바이러스에 이병토록 유도하며 약 1% 정도는 바이러스에 감염되지 않는 개체가 있으므로 제거한다.

#### (나) 핵다각체병바이러스 추출

농가에서 사용할 때는 냉동실에 얼려둔 개체가 녹으면 10~15마리 정도 갈아서 100~ 150 리터 물에 희석하여 사용하면 농약으로 효과가 발생된다. 그러나 바이러스만 정제하고자 할 때는 원심분리기를 이용한다.

분리하는 방법은 먼저 핵다각체병바이러스에 감염된 고추담배나방유충을 해동시켜서 분쇄한 후 체로 찌꺼기를 거른다. 걸러진 핵다각체병바이러스 희석액은 원심분리기에 3,000 rpm으로 10분간 돌리면 부유물이 가라 앉는데 상등액을 모아두고 찌꺼기는 다시 갈아서 원심분리기에 다시 넣고 3,000 rpm으로 10분간 작동시켜 상등액을 채취하고 발생하는 찌꺼기는 버린다.

모아진 상등액은 15,000 rpm으로 10분간 작동시키면 바이러스가 바닥에 가라앉게 되므로 상등액을 버리고 가라앉은 입자만 수집하면 바이러스를 쉽게 수집할 수 있다. 이때 상등액도  $2.2 \times 10^2$  PIBs/ml 정도의 바이러스가 남아 있지만 수집에 비해 노력이 많이 들어 제거한다.

## 사. 생물검증에 의한 고추담배나방방제용 핵다각체병바이러스의 제형화 방법 조사 및 보조물질 탐색

제제화를 하는데 있어 가장 중요한 문제는 바이러스의 대량 생산 및 대량생산으로 생산된 바이러스 들이 실제 포장에서 작용할 수 있도록 상품화하기 위한 물리적, 화학적인 안정제, 효율적 증진제의 연구를 통해 최적의 제제화 기술이 필요하다. 제제화를 하는데 있어서는 보조제 탐색이 매우 중요하며 바이러스의 안정성인 재생 능력과 밀도가 중요하다. 이러한 보조제를 이용하여 제형화를 통해 개발된 제품들의 사용으로 첨가제로 인한 농산물의 안전성 또한 확인 하여야 한다. 최근까지 해충방제에는 화학적 방제가 주를 이루고 있으며 이로 인하여 환경오염 및 생태계 파괴 등 심각한 문제로 대두되고 있다. 곤충바이러스는 숙주곤충에 대한 특이성이 높고 누에나 꿀벌과 같은 익충에는 피해를 주지 않으면서 목적해충을 방제할 수 있다는 장점을 지니고 있어 바이러스를 살충제화 하여 해충방제에 널리 이용하고 있다. 곤충바이러스를 생물적 방제 인자로 이용할 경우 바이러스의 병원력, 기주식물에 대한 영향, 태양광선에 의한 불활성화, 바이러스 보관 시 온도의 영향 등 환경에 대한 안정성 연구가 수행되어야 살충효과를 증진시킬 수 있다. 특히 태양광선에서 나오는 자외선은 핵다각체병바이러스를 둘러싸고 있는 결정성 단백질을 불활화 시키기 때문에 이를 방지하기 위한 연구가 중요하다. 고추담배나방의 경우 이러한 문제들에서 효과적인 생물학적 방제를 위해서는 곤충 유효병원 미생물인 *Bacillus thuringiensis*나 곤충 바이러스를 이용한 미생물적 방제법이 환경오염, 저항성 및 잔류독성 등을 고려할 때 효과적인 방제법 중의 하나로 기능성이 높으며 화학적 방제의 보완 또는 대체수단 으로서 종합적 해충방제 체계 확립에 연구의 초점을 집중시키고 있다. 세계적으로 생물농약은 185종으로 작물보호시장의 1%에 지나지 않고 있으며 이중 곤충바이러스 살충제는 24종을 차지하고 있다. 과거 곤충 바이러스 연구는 곤충바이러스 연구는 분리·동정, 병원성 검정을 중심으로 실시하였으나 외국의 곤충병리 연구현황과 비교할 때 국내 연구수준은 기주곤충과 바이러스의 대량증식 시설이나 바이러스 살충제 제형화 등에 관한 연구가 매우 미진하다. 곤충 병원성바이러스의 해충방제 이용 확대를 위해 바이러스 살충제의 제형화가 필요하다. 그러나 핵다각체병바이러스 제형화는 태양자외선에 의하여 급격히 불활성화되기 때문에 제형화를 위해서는 필수적으로 바이러스를 안정화 물질이 포함되어지므로 초기 살충율을 향상시키야 한다.

구분	유효물질명	비고
유효성분물질	HasNPV-kor	핵다각체병 바이러스
유인제	Stevioside	
보조제 & 첨가제	Surfactant (#1,#2)	유화 및 분산
	Nature oil	
자외선차단제 & 안정제	Fluorescent brightner	
	White carbon	
	Titanium dioxide	
약효증진물질	Boric acid	
	Ascorbic acid	
	Succinic acid	
	Sulfanilic acid	

그림. 제형화를 위한 유효물질 및 첨가제

(1) 제형화를 위한 약효증진 및 첨가제 물질 조사

고추담배나방 방제를 위한 핵다각체병바이러스 제형화를 위한 구성성분으로는 유효성분 물질인 고추담배나방 핵다각체병바이러스 (*Helicoverpa assulta* nuclear polyhedrosis virus), 고추담배나방 유인제인 Stevioside, 분산-보조제인 Surfactant, Natural oil, 자외선차단제 및 안정제 인 Fluorescent brightner, White carbon, Titanium dioxide, 약효증진물질로 유기산인 Boric acid, Ascorbic acid, Succinic acid, Sulfanilic acid을 포함하였다.

이렇게 구성된 각각의 물질들의 특성에 맞게 비율을 달리하여 Formulation recipe #1, Formulation recipe #2, Formulation recipe #3, Formulation recipe #4로 제형화를 만들어 고추담배나방에 대한 병원성 및 살충율을 조사하였다.

표. 제제의 구성성분 종류에 따른 핵다각체병바이러스 제제

Formulation recipe #1		Formulation recipe #2		Formulation recipe #3		Formulation recipe #4	
HasNPV-kor	$1.0 \times 10^{10}$ PIBs/mL	HasNPV-kor	$1.0 \times 10^{10}$ PIBs/mL	HasNPV-kor	$1.0 \times 10^{10}$ PIBs/mL	HasNPV-kor	$1.0 \times 10^{10}$ PIBs/mL
Stevioside	3%	Stevioside	3%	Stevioside	3%	Stevioside	3%
Surfactant #1	5%	Surfactant #1	5%	Surfactant #2	5%	Surfactant #2	5%
Nature oil	1.5%	Nature oil	1.5%	Nature oil	1.5%	Nature oil	1.5%
Fluorescent brightner	1%	Fluorescent brightner	1%	Fluorescent brightner	1%	Fluorescent brightner	1%
White carbon	1%	Titanium dioxide	1%	White carbon	1%	Titanium dioxide	1%
Boric acid <sup>※</sup>	180g/100ℓ	Boric acid <sup>※</sup>	180g/100ℓ	Boric acid <sup>※</sup>	180g/100ℓ	Boric acid <sup>※</sup>	180g/100ℓ

(2) 약효증진물질 탐색 및 선발

고추담배나방 핵다각체병바이러스 (*Helicoverpa assulta* nuclear polyhedrosis virus)의 제형화에 유기산을 첨가하는 것은 바이러스가 충체 내에서 접종이 잘 되도록 하며 또한 살충력 증가를 위한 것으로 사용된 유기산의 종류는 Boric acid, Ascorbic acid, Succinic acid, Sulfanilic acid 이며 처리농도는 500 ppm, 1,000 ppm이며 무처리와 비교하여 여러 종류의 유기산에 대한 살충력 및 LT<sub>50</sub>값을 비교 조사하였으며 사육 온도조 건은 28℃에서 각각 개체사육하면서 조사하였다.

(가) 제형화를 위한 유효증진 및 첨가제 물질 조사

고추담배나방 방제를 위한 유효성분물질인 고추담배나방 핵다각체병바이러스의 제형화에 유효 성분물질의 약효증진 효과를 증대시키기 위한 방법으로 유기산을 첨가하는데 이는 바이러스가 충체 내에서 접종이 잘 되도록 하며 또한 살충력 증가를 위한 것으로 많이 이용되고 있다. 이와 같이 약효증진물질로 사용된 유기산인 Boric acid, Ascorbic acid, Succinic acid, Sulfanilic acid 이며 처리농도는 500ppm, 1,000ppm이며 무처리와 비교하여 여러 종류의 유기산에 대한 살충력 및 LT<sub>50</sub>값을 비교 조사하였다.

그 결과 Boric acid 500ppm, 1,000ppm 처리구에서 LT<sub>50</sub> 값이 6.1일과 5.1일로 가장 빨랐으며 사충율도 비교구인 바이러스처리구와 비교해 100%로 조사되었다. 반면 다른 유기산 처리구에서 LT<sub>50</sub>값이 Boric acid 처리구에 비해 길었으며 사충율도 감소하였다.

표. 유효증진 및 첨가제에 따른 고추담배나방 핵다각체병바이러스의 LT<sub>50</sub>

Treatment	LT <sub>50</sub> (days)	95%CL(days)	Mortality <sup>5)</sup> (%)
HasNPV-kor 1.0×10 <sup>7</sup> PIBs/ml alone	5.9	5.2-6.9	100
HasNPV-kor 1.0×10 <sup>7</sup> PIBs/ml +AA <sup>1)</sup> 500ppm	8.3	7.1-8.9	75
HasNPV-kor 1.0×10 <sup>7</sup> PIBs/ml +AA 1,000ppm	7.0	3.4-7.7	85
HasNPV-kor 1.0×10 <sup>7</sup> PIBs/ml +SuA <sup>2)</sup> 500ppm	8.8	7.5-10.3	65
HasNPV-kor 1.0×10 <sup>7</sup> PIBs/ml +SuA 1,000ppm	7.1	6.3-7.9	80
HasNPV-kor 1.0×10 <sup>7</sup> PIBs/ml +SulA <sup>3)</sup> 500ppm	7.3	6.4-8.2	80
HasNPV-kor 1.0×10 <sup>7</sup> PIBs/ml+SulA 1,000ppm	9.7	8.5-12.4	60
HasNPV-kor 1.0×10 <sup>7</sup> PIBs/ml+BA <sup>4)</sup> 500ppm	6.1	5.8-7.0	100
HasNPV-kor 1.0×10 <sup>7</sup> PIBs/ml+BA 1,000ppm	5.1	4.6-5.9	100

(3) 핵다각체병바이러스 제형화별 병원성 조사

제형별 병원성 조사는 실내검정을 통하여 실시하였으며 약효증진물질로 선발된 Boric acid가 첨가된 액상형태로 구성된 4종류를 가지고 사충율을 조사하였고 적정 살포 농도는 1.0×10<sup>6</sup>(PIBs/ml)농도의 바이러스를 3령 고추담배나방에 살포 후 사육 온도 조건은 28℃ 감염기간에 따른 살충효과를 조사하였다.

약효증진물질로 선발된 Boric acid가 첨가된 액상형태로 제형화된 4종류에 대하여 고추담

배나방에 대한 병원성을 조사하였다. 병원성 조사 결과 제형화된 4종류 모두 비슷한 사충율을 나타내었으며 그 중에서 제형화 2가 아주 근소한 차이를 보였다.

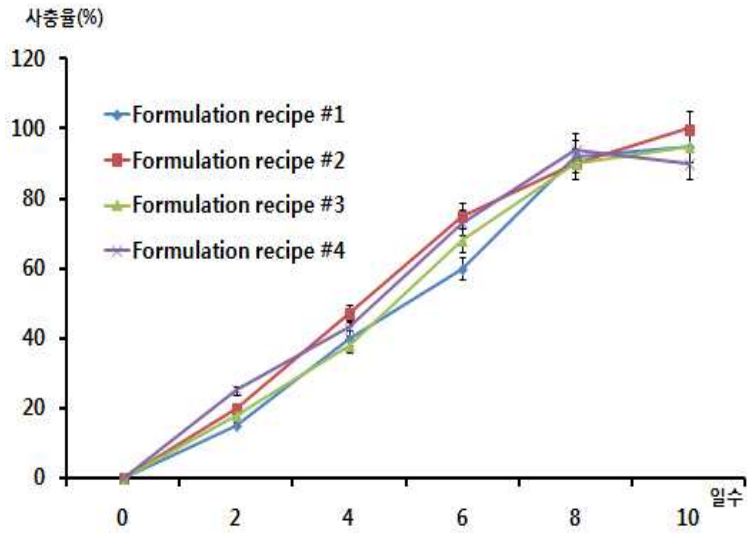


그림. 제형화 종류에 따른 고추담배나방 핵다각체병바이러스의 사충률.

Formulation recipe #2	
HasNPV-kor	1.0×10 <sup>10</sup> PIBs/ml
Stevioside	3%
Surfactant #1	5%
Nature oil	1.5%
Fluorescent brightner	1%
Titanium dioxide	1%
Boric acid*	100g/100t

그림. 고추담배나방 핵다각체병바이러스 시제품.



(5) 시제품의 안정성

일반적으로 원제에 대한 안정성이 매우 중요하다. 안정성에 있어서는 보조제의 첨가를 통해 저장성에 대한 확인을 하여야 한다. 따라서 디펜스 시제품을 보관 저장온도에 따라 안정성을 조사 하였다. 보관온도는 -20℃, 4℃, 20℃와 상온에서 각각 디펜스 시제품을 저장하여 생물 검정 시료로 사용하였다. 생물 검정 실험은 실내검증으로 실시하였다. 시제품을 액상형태로 조사하였고 적정 살포 농도는  $1.0 \times 10^6$  PIBs/ml 농도의 바이러스를 3령 고추담배나방에 살포 후 사육 온도 조건은 28℃ 감염기간에 따른 살충효과를 조사하였다. 그 결과 디펜스 시제품을 -20℃에 동결 보관에서 4개월 이상 병원성이 지속되어 90%이상의 사충률을 보였으며, 4℃에서에서도 -20℃와 유사한 경향을 보였다. 그러나 20℃와 상온에서는 90일 이후부터 70%수준으로 사충률에 떨어지는 것으로 조사 되어 본 제품의 80%이상의 사충률 활성정도를 유지하기 위해서는 농가에서 냉장 보관을 통해 사용하는 것이 효과적인 것으로 조사 되었다. 3개월 정도까지의 저장성을 보이 90일 정도 병원성 활성이 유지되었다. 원제를 생산하여 시제품 생산까지의 시간동안 핵다각체병바이러스의 활성이 떨어지지 않으므로 농가에서 디펜스를 구입하여 쉽게 살포를 통해 고추담배나방제어가 가능 할 것으로 사료된다.

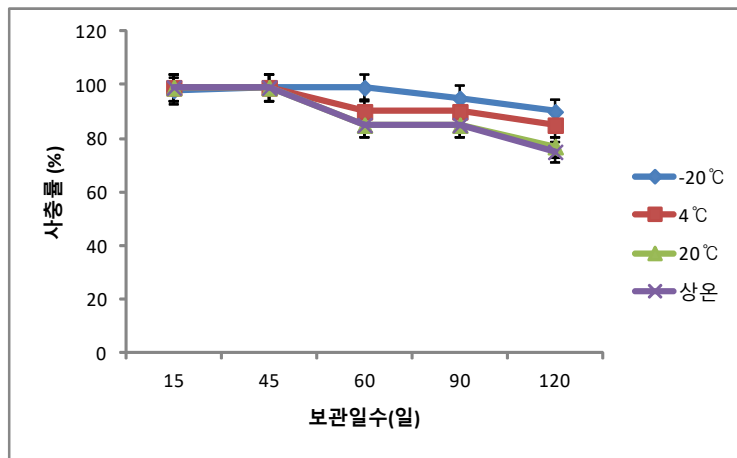


그림. 저장온도에 따른 제품 안정성 조사

(6) 시제품의 잔류실험

농약잔류는 농산물에 있어서 많은 문제를 야기 시킬 수 있다. 핵다각체병바이러스는 기주특이성을 가지고 인어 인체에는 무해하나 살포 후 고추 열매 수확 후 일반적 가정에서 세척 후 고추 표면 잔류 되는 핵다각체병바이러스의 유무확인을 위해 PCR을 이용하여 세척 후 바이러스 잔류 여부를 확인하였다. 추출된 DNA를 주형으로 1차 PCR과 nested-PCR을 수행하였다. DNA polymerase (pol) gene의 증폭을 위한 1차 PCR은 AVA1 (5'-GAR GGI GCI ACI GTI YTI GAY GC-3')과 AVS2 (5'-GCI GCR TAI CKY TTY TTI SWR TA-3') primer를 이용하여 50  $\mu$ l 안에 1 $\times$  PCR buffer, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 40mM dNTP mixture, 각 primer (1  $\mu$ M), template DNA와 0.5 U *Taq* polymerase를 첨가하였다 (Feng & Curtis, 1995). PCR 반응조건은 우선 94  $^{\circ}$ C에서 8 min 동안 DNA를 pre-denaturation 시킨 후, 94  $^{\circ}$ C에서 60 sec denaturation, 55  $^{\circ}$ C에서 60 sec annealing, 72  $^{\circ}$ C에서 60 sec extension을 35 cycles을 수행한 후 72  $^{\circ}$ C에서 5 min 동안 final extension을 수행하였다. PCR products는 ethidium bromide 염색 후 1 % agarose gel에서 확인하였다. 1차 PCR의 증폭산물을 주형으로 2차 PCR을 수행하였으며, 이때 double strand DNA virus 를 증폭하기 위하여 사용된 primer는 AVA1과 Pol (5'-SWR TCI GTR TCI CCR TA-3')를 이용하였으며, 2차 PCR 산물을 주형으로 3차 PCR을 한번 더 수행하여 밴드를 확인하였다. 그 결과 그림에서와 같이 세척 후 고추 열매에서는 핵다각체병바이러스의 밴드가 나타나지 않는 것으로 조사되었다. 이러한 결과는 핵다각체병바이러스 제품인 디펜스를 살포 후 잔류가 되지 않는 것으로 보인다. 이러한 결과는 약해 약혼 실험에서도 문제가 없는 것으로 조사되었다.

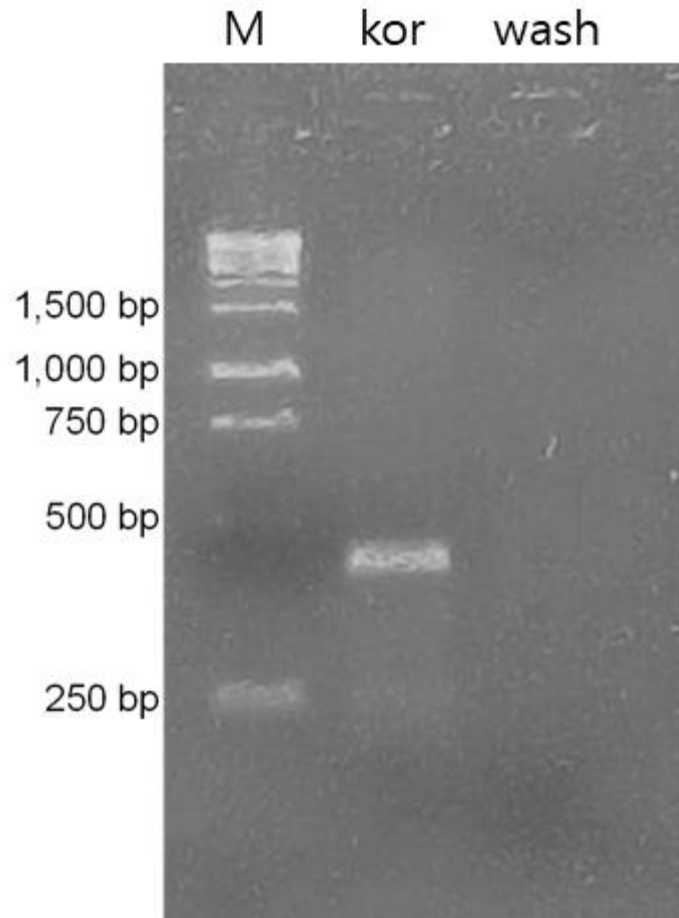


그림. 디펜스 살포 고추 과육과 세척 후 핵다각체병바이러스 잔류 실험.  
(M:size maker, kor: 살포 과육, t:세척 후 시료)

## 아. 제형화된 제제의 살충력 검증과 기존 제품과의 살충력 비교 검증 및 상품화 타당성 조사

### (1) 살충력 검증

최근에까지 이 해충의 방제는 유기합성 농약을 위주로 방제가 이루어지고 있으며 이러한 유기합성 농약의 계속적인 사용은 해충의 약제 저항성은 물론 천적상의 파괴, 잠재해충의 key pest화, 인축 독성, 환경오염 등 심각한 문제를 야기하고 있다. 이러한 유기합성 농약 중심의 해충 방제의 부작용을 최소화하기 위하여 해충 종합관리라는 새로운 개념의 전략이 선진농업국을 중심으로 1960년대부터 환경에 대한 영향과 부작용이 적은 생물농약 개발과 실용화 연구가 점진적으로 증대되어 오고 있는 실정이다. 이와 같은 생물적 방제는 해충을 경제적 피해수준이하로 유지하기 위해 기생성 및 포식성 천적과 곤충병원 미생물 등을 활용하는 방법으로 특히 곤충병원 미생물 중 핵다각체병바이러스(Nucleopolyhedrovirus;NPV)는 기주곤충에 대한 특이성이 높고 목적 해충만을 방제할 수 있다. 또한 인축과 환경에 무해하고 안정성이 높다는 장점을 가지고 있어 일부 선진국에서는 미생물살충제가 상품화되어 시판되고 있다. 본 연구를 통해 개발된 ‘디펜스’와 곤충병원성 세균을 혼합하여 처리를 통해 더 높은 상승효과 조사 하였다.

처리 3회 처리를 통해 노지 고추와 시설하우스의 고추담배나방 피해를 조사 하였다. 처리 방법은  $10^7$  PIBs/ml의 농도로 된 핵다각체병바이러스와 곤충병원성 세균을 각각 처리 및 1:1 혼합 처리하여 3회 살포를 통해 조사 하였다. 시설하우스의 경우 그 결과 야간온도 15°C, 주간온도 28°C를 유지하여 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.

핵다각체병바이러스를 이용하여 해충방제제로서의 이용은 대부분 직접 처리하는 방법을 이용하고 있는 관행적인 방법은 환경에 영향을 많이 받게 되고, 이로 인한 살충 효과가 많이 떨어진다. 이러한 문제점을 보완하기 위해 방제 방법을 병용처리 한다면 보다 좋은 효과를 보일 것으로 판단되어 혼합제제로 만들어 처리한 결과 단일 처리보다 10%이상의 효율이 증가 되는 것으로 조사 되었다. 하지만 단순히 핵다각체병바이러스만 처리 하였을 경우 보다 큰 차이를 보이지 않으므로 경제적 비용측면으로 보아 본 연구를 통해 개발된 ‘디펜스’ 핵다각체병바이러스 단독 처리를 3회 정도로 처리 하는 것이 농가에서는 더 효율적일 것으로 사료된다.

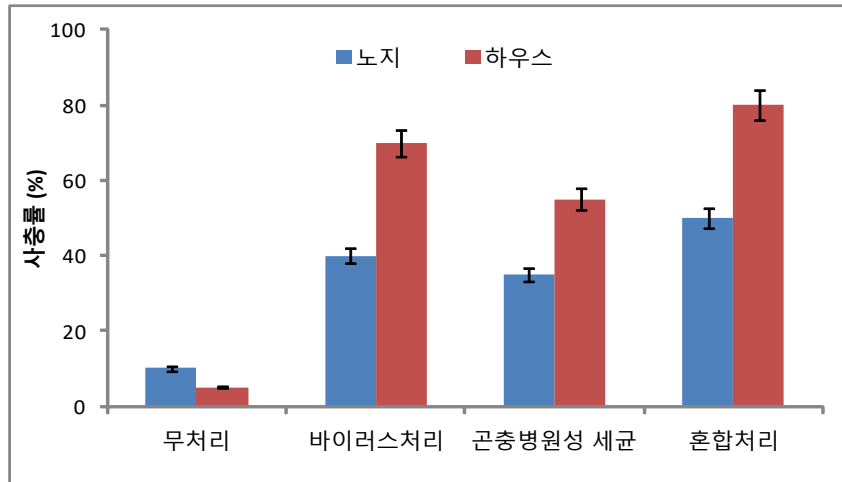


그림. 생물농약과 혼합처리 검정

## (2) 상품화 타당성 검토

### (가) 국내·외 미생물소재 현황

국내에서 병해충 방제용 미생물소재는 ‘생물농약’ 과 ‘친환경유기농자재목록공시’ 두 가지 형태로 생산 및 판매를 하고 있다. 생물농약의 경우 농약관리법 상에 ‘친환경농업에 사용할 수 있는 농약’ 을 법 테두리 안에서 관리하며 농약관리법 상에서 먼저 등록돼 사용되어 져야 한다. 보다 더 정확한 정의는 ‘진균, 세균, 바이러스, 또는 원생동물 등 살아있는 미생물을 유효성분을 하여 제조한 농약’ 과 ‘자연계에서 생성된 유기화합물 또는 무기화합물을 유효성분으로 하여 제조한 농약’ 이다. 이와 같이 생물농약은 친환경농업을 위해 만들어진 농약이다.

현재 생물농약에서 작물보호제의 세계시장 규모는 2006년 해외 미생물 농약 시장의 규모는 약 260백만 달러 있었으며(CPL Business Consultants, 2006) 이 중 Bt 살충제가 159백만 달러의 규모로 해외 미생물 농약 시장의 대부분을 차지하고 있다. 해외 미생물 농약의 시장 규모는 각국의 화학 농약 사용 절감 정책에 의하여 확장되어 2014년에는 약 330-400백만 달러의 시장규모가 될 것이라 예상되고 있다.

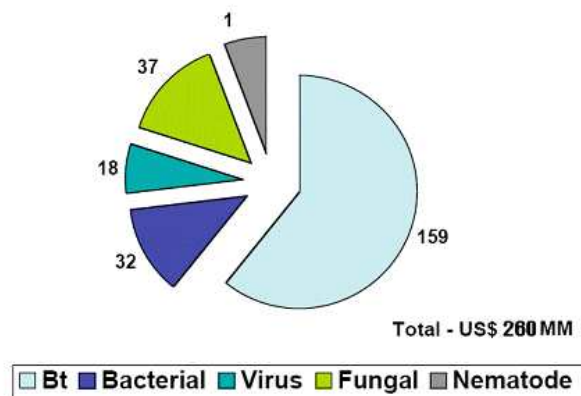


그림. 전세계 미생물 농약 시장 규모

표. 2014년 해외 미생물 농약 시장 규모 예측치 (단위 : 100만 달러)

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

출처 : International Biocontrol Manufacturer's Association, 2004

또한 2008년부터 작물보호제 시장 규모가 매년 5% 성장을 하고 있으며 이중 미생물(바이오)작물보호제 시장도 미비하게나마 조금씩 성장세를 이어가고 있다.

이와 반대로 국내의 미생물농약을 살펴보면 먼저 농약관리법에 준한 작물보호제로 등록하여야 하는데 등록하는 비용만 2~3억 원이 소요되며 독성 등의 안전성 검사는 까다롭게 하며 효과에 대한 검증도 진행하는데 그렇게 어렵게 등록 후 소비자에게 공급을 하게 된다. 또한 다른 방법으로는 07년부터 실시된 ‘친환경유기목록공시제’ 중 “병해충관리용자재”로 공시를 받아서 판매가 가능하다. 하지만 생물농약으로서의 작물보호제는 친환경유기목록공시제가 시행되면서 파행의 길을 걸어오고 있으며 대부분의 관련 산업에서의 제조사들은 비용이 적게 들고 빠른 시간 내에 판매가 가능한 친환경유기목록공시제를 선택하고 있다. 현재 국내에서 병해충관리용자재로 등록된 공시품목은 2014년 346품목이 공시되어져 있으며 여기에 따른 국내 시장의 규모는 2015년 1,973백만 원으로 전체 시장에 비해 작은 규모를 형성하고 있다.

표. 연도별 유기농업자재 공시 및 품질인증 현황

년도	공시			품질인증			합계
	토양·작물	병해충	계	토양·작물	병해충	계	
2007	42	28	70	-	-	-	70
2008	412	125	537	-	-	-	537
2009	615	340	955	-	-	-	955
2010	659	399	1,058	-	-	-	1,058
2011	939	478	1,417	-	-	-	1,417
2012	822	390	1,212	2	19	21	1,233
2013	830	341	1,171	5	31	36	1,207
2014	854	346	1,200	4	33	37	1,237

표. 생물농약 판매 현황

(작물보호협회 연보, 단위 : 병/봉, 백만 원)

제품명	품목명	회사명	단가	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2015년 금액
에코제트	바실루스서브틸리스큐에스티73수화제	광한농	20,000	-	7,800	20,045	-	31,850	32,350	647
단독	아자다라틴입제	아리스티	20,000	52,888	43,555	52,189	56,897	24,563	21,681	434
젠타리	비티아이지와이입상수화제	농협	14,500	30	28	9,896	10,092	7,345	10,653	154
노스팟	바실루스서브틸리스W42-1 역상형탁제	그린바이오	20,000	-	6,740	6,600	13,940	11,300	13,600	272
발리스	바실루스서브틸GB0365역	그린바이오	3,500	150,744	63,904	48,400	51,384	42,098	44,120	154
합세이버	바실루스서브틸CJ-9역상수화제	그린바이오	10,000	440	730	510	4,930	5,030	5,960	60
솔빌제	비티아이지와이GB413역상수화제	그린바이오	10,000	20,095	25,667	14,886	14,276	9,947	11,929	119
합시드	페니바실루스톨리믹사예이	그린바이오	13,000	43,045	14,114	8,469	12,303	5,190	7,933	103
알살림	바실루스서브틸리스제이케이케이238역상제	효상원	8,000	88,451	14,555	5,780	3,630	2,322	1,075	9
토박이	비티아이지와이엔티423수화제	광한농	7,500	77,375	43,250	12,550	380	-246	-	-
큐팩트	일페로마이세스AQ84013수화제	그린바이오	20,000	10,580	4,265	2,400	1,880	1,330	120	2
세이프그루	스트렙토마이신 고시카엔시스WYE334역제	KBC	34,000	8,400	-	-	-	-	-	-
바이봉	바실루스서브틸리스와이1336수화제	SG	20,000	5,764	3,980	-1,148	-	28	-62	-1
그린올	바실루스서브틸GB965수화제	그린바이오	40,000	-	60	30	-	-	-	-
토박이	비티아이지와이엔티423역상수화제	광한농	11,000	21,582	-7,267	5,935	6,082	-	-	-
테라스	바실루스서브틸DBB1501수	아그로텍	35,000	-220	-	3,378	5,872	-	-	-
단팍	바실루스서브틸리스엔27 고상제	농협	20,000	-	-	-	-	-	43	1
영일비티	비티쿠르스타키 수화제	농협	6,800	11,054	10,091	25,890	3,560	5,995	2,990	19
합계										1,973

병해충관리용자재의 원료를 살펴보면 60%이상이 식물추출물 및 오일을 사용하고 있으며 친적 및 페르몬이 24%, 미생물이 11%, 그 외 나머지 기타로 구분할 수 있다. 미생물에 있어서 대부분이 세균과 곰팡이를 소재로 한 제품이며 바이러스를 원료로 한 제품이 현재 생산 및 판매가 이루어지지 못하고 있다. 또한 이러한 제품들은 고가의 가격으로 소비자들에게 구매에 대한 부담을 주고 있으며 효과에 대한 지속성 및 향상성이 현장에서 잘 이루어지지 못해 판매하는데 많은 어려움을 가지고 있다.

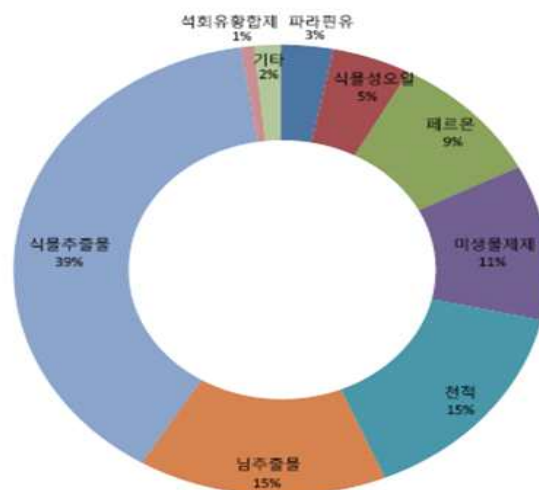


그림. 총해 관리용자재의 원료별 현황

본 연구를 통하여 ①국내 최초로 바이러스를 원료로 하는 병해충관리용자재의 제품 개발, ②효과가 우수함과 동시에 효율적인 생산비에 의한 저렴한 친환경 병해충관리용자재의 공급을 해결방안으로 하고 있다.



## 자. 곤충병원성 핵다각체바이러스 살충성 친환경 제제 개발을 통한 시장성 분석

### (1) 핵다각체바이러스를 원료 친환경유기목록공시 병해충관리용자재의 제품 개발

국내 및 국외시장 분석결과 원제의 경우 수입 제품 등의 생산 및 판매가 이루어지고 있으며, 국내의 경우 균주개량 및 대량생산, 제제화 등이 전무한 상태이다. 또한 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. 본 연구과제에서는 원제로 사용이 가능한 핵다각체바이러스를 사육방법과 인공사육 방법을 통해 대량생산 할 수 있는 방안을 모색하기 위해 두 가지를 비교 검토하였다. 바이러스가 원료이므로 전체적인 제품에 대한 비용을 줄이기 위해서는 초기 단계에서의 생산비 절감을 위한 저비용 원료생산 시스템이 갖추어져야 한다. 숙주곤충의 효율적인 사육시스템이 필요 하므로 여러 형태(하우스, 유리온실, 농가채집, 인공사육)를 조사하였고 현재는 숙주곤충을 인공사육 방식으로 사육하고 있지만 이는 생산비용이 많이 요구되는 방식이다. 그러므로 여러 형태를 조사해 본 결과 숙주곤충(담배나방) 마리당 생산비가 저렴하게 소요되는 시설하우스 방식과 유리온실 방식을 1차적으로 선정하게 되었고 최종적으로 시설하우스 방식을 선정하게 되었다. 유리온실의 경우 시설하우스 방식과 비교해 마리당 비용이 23.8원이 적었으나 초기설비 비용이 시설하우스 보다 많이 소요되므로 본 연구에서는 시설하우스 방식을 선정하였고 향후 사육이 증가 시 고민을 해 보아야 할 것으로 본다.

초기 생산원료인 숙주곤충 담배나방을 시설하우스에서 사육 시 마리당 생산비용은 77.1원이 소요되고 사육된 담배나방을 숙주곤충으로서 바이러스를 접종 후 체내에서 바이러스 감염, 증식, 생산의 단계까지의 소요기간을 약 7~10일 소요되며 이 기간에는 인공사육 방식으로 사육 및 바이러스 생산을 해야 한다. 숙주곤충 사육시스템 조사 시 인공사육의 경우 10,000마리 사육 시 약 1명충 사육기간에 소요되는 비용이 870,000원이 산정되었고 마리당 87원의 생산비용이 산출되었다. 그러므로 제품의 원료인 숙주곤충인 담배나방사육과 바이러스 생산단계까지의 마리당 생산비용은 164.1원이 소요되고 효율적인 생산에 의한 제품 원료인 바이러스( $2.0 \times 10^{15}$  PIBs/ml)를 확보 할 수 있고 제품내 이를 보증 성분( $2.0 \times 10^{10-12}$  PIBs/ml)으로 하는 시제품을(디펜스)생산 가능하였다.(표-참고)

시제품 한 봉지 생산 시 최종 생산비용은 3,719원이며 국내에 관련된 제품과 가격 비교해 저렴한 가격으로 공급이 가능하다고 판단하며 수입 가능한 동일한 제품과 비교 시 가까운 중국의 경우 \$29~30/kg으로 시제품인 디펜스 동일무게와(250 g)비교 시 9,000원이다. 하지만 기타 부대비용(관세, 물류비, 기타수수료, 국내 영업비용) 등이 포함되어지면 가격은 적어도 1.5배는 높게 책정되고 이러한 가격은 최종소비자인 농민들이 부담하게 될 수밖에 없다.

이와 같이 시제품인 디펜스의 생산으로 인하여 해결방안인 ①국내 최초로 바이러스를 원료로 하는 병해충관리용자재의 제품 개발, ②효과가 우수함과 동시에 효율적인 생산비에 의한 저렴한 친환경 병해충관리용자재의 공급이 해결될 것으로 판단한다. 또한, 본 연구과제를 통해 핵다각체바이러스 대량생산 방법의 최적화를 통해 국내 최초의 바이러스 원제로 제품개발이 가능하며 나아가 친환경 미생물 시장에서 새로운 형태의 친환경농업 제제로 활용 및 산업화가 가능 할 것으로 판단된다.

표. 핵다각체병바이러스 생산을 위한 제품 상용화 경제성 분석

	초기 담배나방 사육 생산비	바이러스 생산비	제품 생산비														
	유충사육 (비닐하우스)	인공 사육	제품명 : 디펜스(250g)														
총채집량 (마리)	19,591	-초기 담배나방 인공 사육 시 1령충 10,000마리 사육비용 : 870,000원 <sup>3)</sup>	<table border="1"> <tr> <td>HasNPV-kor</td> <td>1.0×10<sup>15</sup> PIBs/ml</td> </tr> <tr> <td>Stevioside</td> <td>3%</td> </tr> <tr> <td>Surfactant #1</td> <td>5%</td> </tr> <tr> <td>Nature oil</td> <td>1.5%</td> </tr> <tr> <td>Fluorescent brightner</td> <td>1%</td> </tr> <tr> <td>Titanium dioxide</td> <td>1%</td> </tr> <tr> <td>Boric acid<sup>®</sup></td> <td>100g/100g</td> </tr> </table> <p>                     &gt; HasNPV-kor 원료                      -담배나방 2,000마리 회수                      -2.0×10<sup>15</sup>(PIBS/ml)                      -제품 생산량 : 200개                 </p> <p>                     &gt; 제품(디펜스)내 바이러스 농도                      -2.0×10<sup>10-12</sup>(PIBS/ml)                      -제품내 HasNPV-kor 원료 1% 함유                 </p> <p>                     ❖ 2,000마리× 164.1원(77.1원 + 87 원) = 328,200원                      ❖ 2,000마리에서 제품(디펜스) 생산갯수 = 200봉지                      ❖ 제품당 바이러스 원료비 = 1,641원                      ❖ 기타부대비용(전기, 인건비, 원/부재료) = 3,000원                      ❖ <b>제품 총 생산비용 = 1,641원 + 3,000원 = 4,641원</b> </p>	HasNPV-kor	1.0×10 <sup>15</sup> PIBs/ml	Stevioside	3%	Surfactant #1	5%	Nature oil	1.5%	Fluorescent brightner	1%	Titanium dioxide	1%	Boric acid <sup>®</sup>	100g/100g
HasNPV-kor	1.0×10 <sup>15</sup> PIBs/ml																
Stevioside	3%																
Surfactant #1	5%																
Nature oil	1.5%																
Fluorescent brightner	1%																
Titanium dioxide	1%																
Boric acid <sup>®</sup>	100g/100g																
채집시간 (분)	9,006																
채집량(마리)/day	1,044																
부대비용(원)/마리	15.8																
총인건비(원)	1,200,800																
인건비(원)/마리	61.3																
가격(원)/마리	77.1	87															



HaSNPV natural pesticide  
 Min. Order: 1000 Kilograms  
 FOB Price: US \$29 - 30 / Kilogram

그림. 개발된 시제품 '디펜스'와 판매중인 중국 제품

## 아. 제형화된 제품의 안전성 및 안정성 조사

최근까지 해충방제에는 화학적 방제가 주를 이루고 있으며 이로 인하여 환경오염 및 생태계 파괴 등 심각한 문제로 대두되고 있다. 고추담배나방도 약제에 매우 높은 내성 및 과육으로 숨어 들어가는 특징을 보여 방제가 어려우며 가해하는 작물의 수도 많아 피해가 커서 화학살충제를 남용하고 있다. 이를 해결하기 위한 방안중 하나로 생물적 방제법을 도입하여 화학적 방제의 보완 또는 대체수단으로서 종합적 해충방제 체계 확립에 연구의 초점을 집중시키고 있으며 그 중에서도 세균, 바이러스, 사상균, 원생동물등 미생물을 이용한 해충의 방제에 큰 비중을 두고 있다. 세계적으로 생물농약은 185종으로 작물보호시장의 1%에 지나지 않고 있으며 이중 곤충바이러스 살충제는 24종을 차지하고 있다. 과거 곤충 바이러스 연구는 곤충바이러스의 분리·동정, 병원성 검정을 중심으로 실시하였으나 외국의 곤충병리 연구현황과 비교할 때 국내 연구수준은 기주곤충과 바이러스의 대량증식 시설이나 바이러스 살충제 제형화 등에 관한 연구가 매우 미진하다. 곤충 병원성 바이러스의 해충방제 이용 확대를 위해 바이러스 살충제의 제형에 필요한 물질들의 안정성을 검정하고 가장 안정한 제형형태를 구명하기 위하여 실시하였다.

제품 안정성 독성 실험은 생물안전성연구소 시제품인 디펜스를 시험물질로 의뢰하여 진행하였다. 제품의 최종처방을 확립하여 제제 시험을 통해 선발된 보조제 인 약효증진제를 이용하여 핵다각체병바이러스 제품인 디펜스를 제조하였으며, 제조된 시료는 농약관리법상의 검사 및 검토항목을 검사하기 위해 최종 시제품을 확립하여 사용하였다.

### (1) 시험제목 : 디펜스의 꿀벌 (*Apis mellifera*)에 대한 영향시험

시험목적 : 꿀벌 (*Apis mellifera*)에 대한 영향시험을 통하여 유기농업자재 공시에 관한 기초 자료로 활용코자 한다.

시험법 : “농약 및 원제의 등록기준” [별표 13] 환경생물 독성시험 기준과 방법 (농촌진흥청 고시 제2017-5호)에 준하여 실시하였다.

시험물질 핵다각체병바이러스 유효성분함량 :  $1.0 \times 10^8$  PIBs/mL

희석배수: 100배

보관조건: 냉장

공급원: (주)엠텍

시험생물 시험종 : 꿀벌 (*Apis mellifera*)

공급원 명칭: (주)한국생물안전성연구소

소재지: 충청북도 음성군 감곡면 성주로 362-20

시험종의 선정 : 본 시험에 사용된 꿀벌 (*Apis mellifera*)은 환경생물독성 시험생물로 널리 사용되고 있고, 본 계통에 관한 비교할 수 있는 충분한 시험 기초자료가 축적되어 있으며, 해당 시험법에서 추천된 종이기 때문에 선정하였다.

사육장소 : (주)한국생물안전성연구소 꿀벌 야외사육소

사육조건 : 당 연구소의 기존 봉군으로부터 자연 분봉된 꿀벌세력을 입수 (2014.07.28)하여 본 시험 시까지 순화 및 자연사육 하였다.

사육관리 : 입수 이후 동절기 (월동), 장마 기간 등 사육관리자의 판단에 의해 필요 시 고농도 (60% 이상) 자당용액을 급이 하였으며, 하절기

(3월~10월)에는 월 2회 이상 별집 내부를 점검하여 봉군의 건강상태를 확인하고, 세력이 강할 경우 분봉 등을 통하여 관리하였다.

시험용 용기 : 스테인리스 철망을 이용하여 길이 15 cm, 직경 5 cm 크기의 원통형으로 만들어진 시험용 케이지에 입구를 원통형 유리제 급식관 (직경 1 cm, 길이 5 cm 정도)을 끼울 수 있도록 구멍을 뚫은 스펀지 마개를 사용하였다.

시험물질 노출 전 시험생물 처리 : 환기구멍이 있는 밀폐통에 한 벌통에서 생산된 건강하고 활동성이 좋은 일벌을 채집하여 CO<sub>2</sub> gas로 마취시킨 후, 한 케이지 당 25마리씩 넣어 25°C ± 2의 압조건에서 회복시킨 다음 시험에 사용하였다.

시험농도 및 노출 마리 수 : 미생물농약 등록시험기준과 방법에 의거, 시험의 농도는 추천사용약량의 10~100배 높은 농도로 처리하되 가능한 한 고농도액을 처리하도록 되어있으나 본 시험물질의 경우 추천 사용약량 (100배 희석)으로 인해 100배 높은 농도는 시험물질 자체를 섭취시키게 된다. 따라서 시험물질 노출기간인 48시간동안 꿀벌이 생존하기 위한 최소의 영양공급 조건을 고려해 최대 시험농도를 추천사용약량보다 50배 높은 농도로 설정하였고, 이 외에 하위 농도로서 추천사용약량보다 2, 10배 높은 농도를 추가로 설정하였다.

시험용액의 조제 : 시험물질을 20 mL volumetric flask에 각각 0.4, 2.0, 10.0 mL씩 넣고, 50% (w/v) 자당용액을 일부 가하여 현탁시킨 다음 표선까지 정용하였다. 이후 vortex mixer를 이용해 충분히 교반하여 추천 사용약량 (100배 희석)보다 2, 10, 50배 높은 농도의 시험용액 (test solution)을 조제하였다.

시험물질 노출 : 각 시험농도의 케이지 당 유리급식관에 시험용액을 넣어 공급하였으며, 48시간 동안 섭식하도록 하였다.

대조군 설정 : 무처리를 원칙으로 하였다.

시험환경 조건 :

광주기: 압조건 (관찰시간 제외), 온도: 23.0~27.0°C, 상대습도: 50.0~70.0%, 먹이공급: 시험물질 노출종료 후, 신선한 50% 자당용액이 들어있는 급식관을 48시간마다 교체하여 공급하였다.

## 관찰 및 측정

중독증상 및 치사율 : 시험한 모든 케이지에 대하여 시험물질 노출 후 4시간 및 관찰종료 시까지 매일 관찰하였다. 꿀벌의 중독증상관찰은 일반중독증상, 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 꺼내었으며, 치사 개체에 한하여 시험물질의 미생물 감염 여부를 조사하였다.

미생물 측정방법 : 치사 개체를 멸균증류수로 세척한 후 1마리당 멸균증류수 1 mL의 비율로 첨가하여 균질화시킨 다음 현미경과 hemacytometer를 사용하여 계수하였다.

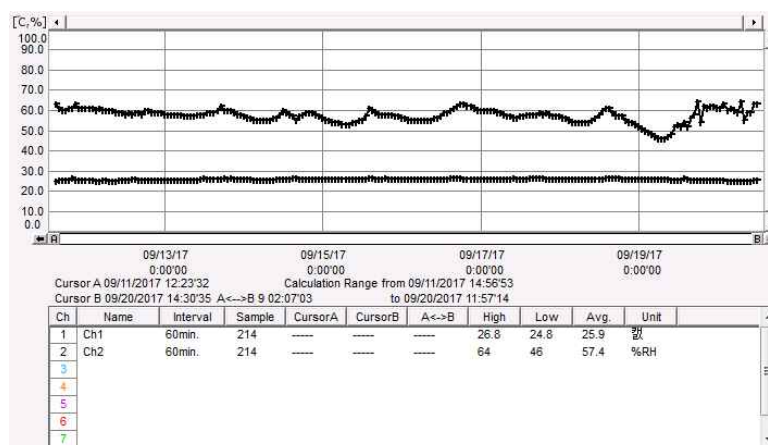
실내 온도 및 상대습도 : 실험실 실내온도 및 상대습도는 시험개시부터 60분 간격으로 자동 전자 온도 습도 기록계 (Thermo recorder TR-72U, Thermo Scientific™, USA)를 이용하여 측정 하였다.

시험결과와의 표시 및 통계처리방법: 관찰종료일인 시험물질 노출 후 9일째의 누적치사 수를 기준으로 대조군 대비 각 설정농도와 비교하여 통계처리 하였다. 산출된 결과에 따라 시험물질 처리군의 영향여부를 판단하여 최대 무영향농도 (NOEC)를 산출하였다. 이때, 통계프로그램은 IBM SPSS statistics version 20을 이용하였고, levene test (분산의 동질성 검정)를 통해 등분산성을 나타낼 경우, 일원배치 분산분석 (ANOVA test)의 사후검정으로 dunnett t-test 결과를 적용하였으며, 등분산성이 없을 경우 dunnett T3의 결과를 적용하였다.

## 시험결과

시험환경 조건 : 관찰기간 동안 측정된 꿀벌실험실의 실내 온도는 평균 25.9°C (24.8~26.8°C), 상대습도는 평균 57.4% (46~64%) 이었다. 상대습도가 일부 시간대에서 시험 가이드라인의 범위 (50~70°C)로부터 벗어나 이탈이 발생하였으나, 시험에 미치는 영향은 적은 것으로 판단되었다.

Figure. Temperature and relative humidity



관찰 및 영향시험결과: 노출 후 9일차 경과 시, 대조군의 누적치사율이 22.7% (17/75개체)로 20.0%를 초과 하여 시험을 종료하였다. 시험물질 처리군을 추천 사용약량 (100배 희석)보다 2, 10, 50배 높은 농도로 설정하여 노출한 결과, 관찰종료일의 누적치사율은 각각 26.7%, 20.0%, 34.7%로 관찰되었다 (Table).

Table. Cumulative mortality of honeybees

Dosage <sup>a</sup>	No. of exposed honeybees	Cumulative mortality after exposure										9 days mortality (Death / Total)
		4 hr	1 day	2 day	3 day	4 day	5 day	6 day	7 day	8 day	9 day	
0 <sup>b</sup>	25	0	0	1	1	2	3	3	3	5	5	22.7% (17 / 75)
	25	0	0	0	2	2	5	6	6	6	8	
	25	0	0	0	3	3	3	3	3	3	4	
	<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>12</b>	<b>14</b>	<b>17</b>	
2	25	0	0	0	0	0	0	1	1	3	3	26.7% (20 / 75)
	25	0	0	0	1	1	1	2	6	6	7	
	25	0	0	0	0	0	2	4	6	8	10	
	<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>13</b>	<b>17</b>	<b>20</b>	
10	25	0	0	0	0	1	1	1	4	4	4	20.0% (15 / 75)
	25	0	0	0	0	0	0	2	2	4	4	
	25	0	0	0	0	0	0	3	4	4	7	
	<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>6</b>	<b>10</b>	<b>12</b>	<b>15</b>	
50	25	0	0	0	0	0	0	3	4	5	6	34.7% (26 / 75)
	25	0	0	1	1	1	2	3	3	6	7	
	25	0	0	0	1	5	7	10	13	13	13	
	<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>6</b>	<b>9</b>	<b>16</b>	<b>20</b>	<b>24</b>	<b>26</b>	

a: Fold concentration of recommended dosage

b: Untreated control

관찰기간동안 대조군에서 치사 개체를 제외한 이상증상을 보인 개체는 관찰되지 않았다. 시험물질 처리군에서는 보행 장애 증상을 보인 소수 개체가 관찰되었다 (Table).

Table. Behavioral abnormalities of honeybees

Dosage <sup>a</sup>	No. of exposed honeybees	Abnormal response after exposure										
		4 hr	1 day	2 day	3 day	4 day	5 day	6 day	7 day	8 day	9 day	
0 <sup>b</sup>	25	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	25	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	25	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2	25	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	25	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	25	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
10	25	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	25	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	25	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
50	25	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	25	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	25	N	N	N	N	N	N	B(1°)	N	N	N	N

a: Fold concentration of recommended dosage

b: Untreated control

c: Number of honeybee

관찰기간 중 대조군과 시험물질 처리군의 각 농도에서 관찰된 치사 개체에 한해 시험물질에 의한 미생물 감염을 조사한 결과, 대조군과 시험물질 처리군의 모든 농도에서 검출되지 않았다 (Table).

Table. Check microbial infections of lethal honeybees

Dosage <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>									
Days after exposure	4 hr	1 day	2 day	3 day	4 day	5 day	6 day	7 day	8 day	9 day
Cumulative mortality	0	0	1	6	7	11	12	12	14	17
Number of microbial	- <sup>c</sup>	-	ND <sup>d</sup>	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND

Dosage	2									
Days after exposure	4 hr	1 day	2 day	3 day	4 day	5 day	6 day	7 day	8 day	9 day
Cumulative mortality	0	0	0	1	1	3	7	13	17	20
Number of microbial	-	-	-	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND

Dosage	10									
Days after exposure	4 hr	1 day	2 day	3 day	4 day	5 day	6 day	7 day	8 day	9 day
Cumulative mortality	0	0	0	0	1	1	6	10	12	15
Number of microbial	-	-	-	-	ND	-	ND	ND	ND	ND

Dosage	50									
Days after exposure	4 hr	1 day	2 day	3 day	4 day	5 day	6 day	7 day	8 day	9 day
Cumulative mortality	0	0	1	2	6	9	16	20	24	26
Number of microbial	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

a: Fold concentration of recommended dosage

b: Untreated control

c: It is not carried out

d: Not detected

고찰 및 결론 : 시험물질 노출 후 9일차까지 관찰된 대조군의 누적치사 수와 시험물질 처리군의 각 농도별 누적치사 수에 대하여 분산의 동질성 검정을 실시한 결과, 등분산성이 확인됨 (p-value (유의확률) > 0.05)에 따라 일원배치 분산분석의 사후검정으로 dunnett t-test 결과를 적용하였다. Dunnett t-test 통계처리를 적용한



결과, 대조군과 추천사용약량 (100배 희석)의 2, 10, 50배 높은 농도에서 통계적으로 유의하지 않아 (p-value > 0.05) 꿀벌에 대한 영향이 없는 것으로 나타났다. 따라서 디펜스의 꿀벌에 대한 최대 무영향농도 (NOEC)는 추천사용약량보다 50배 높은 농도인 것으로 확인되었다.

(2) 시험제목 : New Zealand White계 토끼에 대한 디펜스의 안점막자극성시험

시험물질 : 디펜스

시험목적 : 토끼에 대한 안점막자극성시험을 통하여 유기농업자재 목록공시에 관한 기초자료로 활용코자 한다.

시험방법 : “농약 및 원제의 등록기준” [별표 12] 인축독성시험 기준과 방법 (농촌진흥청고시 제2016-38호)에 준하여 실시하였다.

시험동물

시험계: New Zealand White계 토끼

공급원

- 명칭 : 한림실험동물연구소
- 소재지 : 경기도 화성시 봉담읍 유리 254-1
- 연락처 : 031-227-5955

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 선택하였다.

체중범위 : 시험동물의 체중범위

구 분	입수시 체중 (kg)	처리시 체중 (kg)
비세척군	1.9 ~ 2.0	1.9 ~ 2.1

순화 및 검역 : 동물을 구입한 후 5일 동안 동물실험실의 환경 하에서 순화시키면서 일반 건강상태를 관찰하여 건강한 개체를 선별, 본 시험에 사용하였다.

군분리 : 시험동물은 시험물질 투여 24시간 전에 양쪽 눈을 검사하여 눈에 이상이 없는 동물을 사용하였다.

개체식별 : 사육 상자에 개체식별정보를 부착하여 식별하였다.

사육환경 및 관리

사육환경 : 본 시험의 사육환경은 온도  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , 상대습도  $50 \pm 10\%$ , 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.

시험물질의 투여

시험군의 구성 : 시험군

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

시험물질 조제 : 시험물질이 액상으로 처리부위에 직접 처리함으로 조제하지 않고 처리하였다.

투여량 설정 : 시험물질인 디펜스는 미생물 유기농업자재로 미생물 시험법에 의거 개체당  $10^7$  단위에 해당하는 약제를 투여해야 한다. 시험약제의 유효성분이  $1.0 \times 10^8$  PIBs/mL이므로 최대처리량 0.1 mL( $1.0 \times 10^7$  PIBs)를 처리약량으로 설정하였다.

투여방법 : 시험동물은 시험개시 전 24시간 이내에 양쪽 눈을 검사하여 눈에 이상이 없는 동물을 사용하였다. 약제처리는 좌안의 하안검을 가볍게 잡아당겨 결막낭 내에 시험물질 0.1 mL를 한 번에 넣어 처리하고 시험물질의 손실을 막기 위해 양안검을 느슨하게 맞춰 잡고 약 1초간 유지하였다. 무처리한 우안은 대조부위로 하여 처리부위와 증상관찰 비교 용도로 활용하였다.

관찰 및 측정

일반중독증상 : 시험물질 처리 후 7일까지 일반증상의 변화, 중독증상 및 치사동물의 유·무를 관찰하였다.

체중 측정 : 시험물질 처리직전과 처리 후 48, 72시간, 96시간, 7일에 개체별 체중을 측정하였다.

안반응 (眼反應)의 평가 : 안반응의 평가는 “안반응평가표”에 따라 실시하였다. 시험물질 처리 후 1, 24, 48, 72, 96시간 및 7일에 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 구분하였다.

[안반응평가표]

1) 각막	
(A) 혼탁 : 안구의 농후한 정도(가장 농후한 지점을 관찰함)	평점
◦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
◦진주색갈을 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
◦깊은 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	

[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

시험결과

일반중독증상 및 치사 동물 수

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

Table. Mortality and clinical signs

Group	No. of treatment	Days after application						Mortality
		1 hr	24 hr	48 hr	72 hr	96 hr	7 Day	
No eye washed	1	NOR <sup>a</sup>	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	0/3 <sup>b</sup>
	2	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	
	3	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	

a : Normal

b : Number of dead animals/Number of tested animals

체중변화

시험물질 처리직전, 처리 후 48, 72시간, 96시간 및 7일에 개체별 체중을 측정한 결과, 시간이 경과함에 따라 증가추세를 보였다.

Table. Body weight changes

Group	Animal. No.	Days after application (g)					
		0 hr	48 hr	72 hr	96 hr	7 Day	Gain
No eye washed	1	2138.0	2154.0	2160.0	2191.5	2260.5	122.5
	2	2039.5	2061.0	2072.0	2098.5	2170.0	130.5
	3	1919.5	1943.5	1989.0	2111.0	2245.5	326.0
Mean		2032.3	2052.8	2073.7	2133.7	2225.3	193.0
S.D. <sup>a</sup>		109.4	105.5	85.5	50.5	48.5	-

a : Standard Deviation

안반응의 평가

비세척군-1

- 무처리 대조군인 우안에서는 어떠한 자극성도 관찰되지 않았다.
- 1 시간부터 7일째 관찰 시까지, 시험물질 처리군에서 결막의 발적 및 부종에 대한 자극증상과 배출물이 관찰되지 않았다.

비세척군-2

- 무처리 대조군인 우안에서는 어떠한 자극성도 관찰되지 않았다.
- 1 시간부터 7일째 관찰 시까지, 시험물질 처리군에서 결막의 발적 및 부종에 대한 자극증상과 배출물이 관찰되지 않았다.

비세척군-3

- 무처리 대조군인 우안에서는 어떠한 자극성도 관찰되지 않았다.
- 1 시간부터 7일째 관찰 시까지, 시험물질 처리군에서 결막의 발적 및 부종에 대한 자극증상과 배출물이 관찰되지 않았다.

Table. No eyes washed evaluation of eye irritation (Non-treatment)

Time	Animal . No.	Cornea		Iris (C)	Conjunctiva			I.O.I. <sup>a)</sup>	M.O.I. <sup>b)</sup>	A.O.I. <sup>c)</sup>
		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	0.0
	2	0	0	0	0	0	0	0		
	3	0	0	0	0	0	0	0		
24 hr	1	0	0	0	0	0	0	0	0.0	
	2	0	0	0	0	0	0	0		
	3	0	0	0	0	0	0	0		
48 hr	1	0	0	0	0	0	0	0	0.0	
	2	0	0	0	0	0	0	0		
	3	0	0	0	0	0	0	0		
72 hr	1	0	0	0	0	0	0	0	0.0	
	2	0	0	0	0	0	0	0		
	3	0	0	0	0	0	0	0		
96 hr	1	0	0	0	0	0	0	0	0.0	
	2	0	0	0	0	0	0	0		
	3	0	0	0	0	0	0	0		
7 day	1	0	0	0	0	0	0	0	0.0	
	2	0	0	0	0	0	0	0		
	3	0	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.

표. 시험군별 안자극지수

Time	Animal. No.	Non-treatment			Treatment		
		I.O.I. <sup>a)</sup>	M.O.I. <sup>b)</sup>	A.O.I. <sup>c)</sup>	I.O.I. <sup>a)</sup>	M.O.I. <sup>b)</sup>	A.O.I. <sup>c)</sup>
1 hr	1	0	0	0.0	0	0	0.0
	2	0			0		
	3	0			0		
24 hr	1	0	0		0	0	
	2	0			0		
	3	0			0		
48 hr	1	0	0		0	0	
	2	0			0		
	3	0			0		
72 hr	1	0	0		0	0	
	2	0			0		
	3	0			0		
96 hr	1	0	0	0	0		
	2	0		0			
	3	0		0			
7 d	1	0	0	0	0		
	2	0		0			
	3	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.

자극성의 판정

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 디펜스의 안점막자극성시험에서 자극성은 [안점막자극표]에 의거 “없음” 으로 구분되었다.

Table . No eyes washed evaluation of eye irritation (Treatment)

Time	Animal. No.	Cornea		Iris (C)	Conjunctiva			I.O.I. <sup>a)</sup>	M.O.I. <sup>b)</sup>	A.O.I. <sup>c)</sup>
		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	0.0
	2	0	0	0	0	0	0	0		
	3	0	0	0	0	0	0	0		
24 hr	1	0	0	0	0	0	0	0	0.0	
	2	0	0	0	0	0	0	0		
	3	0	0	0	0	0	0	0		
48 hr	1	0	0	0	0	0	0	0	0.0	
	2	0	0	0	0	0	0	0		
	3	0	0	0	0	0	0	0		
72 hr	1	0	0	0	0	0	0	0	0.0	
	2	0	0	0	0	0	0	0		
	3	0	0	0	0	0	0	0		
96 hr	1	0	0	0	0	0	0	0	0.0	
	2	0	0	0	0	0	0	0		
	3	0	0	0	0	0	0	0		
7 day	1	0	0	0	0	0	0	0	0.0	
	2	0	0	0	0	0	0	0		
	3	0	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.

③ 시험제목 : New Zealand White계 토끼에 대한 디펜스의 피부자극성시험

시험물질 : 디펜스

시험목적 : 토끼에 대한 피부자극성시험을 통하여 유기농업자재 목록공시에 관한 기초자료로 활용코자 한다.

시험방법 : “농약 및 원제의 등록기준” [별표 12] 인축독성시험 기준과 방법 (농촌진흥청고시 제2016-38호)에 준하여 실시하였다.

시험동물

시험계 : 토끼 (New Zealand White계)

공급원 :

- 명칭: 한림실험동물연구소
- 소재지: 경기도 화성시 봉담읍 유리 254-1
- 연락처: 031-227-5955

시험계의 선택사유: 농촌진흥청고시 제 2016-38호 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 선택하였다.

체중범위

구 분	입수시 체중 (kg)	처리시 체중 (kg)
시험동물	1.9 ~ 2.0	1.9 ~ 2.1

순화 및 검역 : 동물을 구입한 후 5일 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.

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 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.

시험물질의 처리

시험군의 구성: 실험동물은 건강하고 성숙한 동물 3마리를 사용하여 1군으로 구성하였다.

시험물질 조제: 시험물질이 액상으로 처리부위에 직접 처리함으로 조제하지 않고 처리하였다.

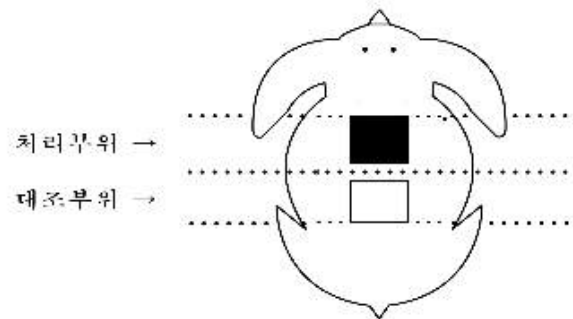
처리량 설정: 처리량은 처리 군별 공히 0.5 mL로 설정하였다.

처리방법: 실험동물은 시험물질 처리 24시간 전에 전기면도기를 이용하여 경배부



(등부위)의 털을 15×15 cm 넓이로 제모한 다음 건강하고 깨끗한 피부를 가진 동물만을 사용하였다. 2×3 cm로 절개한 거즈를 이용하여 0.5 mL의 시험물질을 처리부위에 도포한 후 소정의 증류수를 이용하여 처리부위에 직접 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 처리방법



#### 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
<b>총 가능한 홍반 점수</b>	<b>4</b>
(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 밖에까지 확장된 상태)	4
<b>총 가능한 부종 점수</b>	<b>4</b>

- 피부 1차 자극표

자극성 구분	기 준
없 음	1차 피부자극지수 (P.I.D)가 1.0 이하
경 도	1차 피부자극지수 (P.I.D)가 1.1 ~ 2.0
중 도	1차 피부자극지수 (P.I.D)가 2.1 ~ 5.0
강 도	1차 피부자극지수 (P.I.D)가 5.1 이상

시험결과

일반중독증상 및 치사 동물수

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

Table. Mortality and clinical signs

Number of animals	Days after treatment				Mortality
	0	1	2	3	
1	NOR <sup>a</sup>	NOR	NOR	NOR	0/3 <sup>b</sup>
2	NOR	NOR	NOR	NOR	
3	NOR	NOR	NOR	NOR	

a : Normal

b : Number of dead animals/Number of tested animals

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

Table. Body weight changes

Number of animals	Days after treatment (g)			
	0	2	3	Gain
1	1964.5	1980.0	2014.5	50.0
2	2053.5	2078.5	2100.0	46.5
3	2146.5	2192.0	2209.0	62.5
Mean	2054.8	2083.5	2107.8	53.0
S.D. <sup>a</sup>	91.0	106.1	97.5	-

a : Standard Deviation

피부반응의 평가: 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.

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

Phases <sup>a</sup>	Number of animals	Sites	Days after treatment			
			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 treatment

자극성의 판정 : 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 디펜스는 New Zealand White계 토끼의 피부에 처리 시 자극성이 없는 물질로 구분되었다.

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

Sites	Control sites				Test sites			
Change	Erythema & Eschar		Edema		Erythema & Eschar		Edema	
Phases <sup>a</sup>	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 <sup>b</sup>	0.0				0.0			
P.I.I. <sup>c</sup>	0.0				0.0			

a : Time after topical treatment

b : Sum of means at 24 and 72hr

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

④시험제목: 디펜스의 랫드에 대한 급성경구독성/병원성시험

시험물질: 디펜스

시험목적: 랫드에 대한 급성경구독성 / 병원성시험을 통하여 유기농업자재의 제품등록에 관한 기초자료로 활용코자 한다.

시험방법: “농약 및 원제의 등록기준” [별표 12] 인축독성시험 기준과 방법 (농촌진흥청고시 제2016-38호)에 준하여 실시하였다.

시험재료 및 방법

시험동물

시험계: SPF SD Rat

공급원:

- 명칭: 한림실험동물연구소
- 소재지: 경기도 화성시 봉담읍 최루백로 313
- 연락처: 031-227-5955

시험계의 선택사유: 농촌진흥청고시 제2016-38호 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	197.5 ~ 215.0	151.5 ~ 159.0
투여시 주령	8주령	8주령
투여시 체중	241.5 ~ 274.0	176.0 ~ 202.0

순화 및 검역: 동물을 구입한 후 5일 동안 동물실험실의 환경하에서 순화시키면서 일반 건강상태를 관찰하여 건강한 개체를 선별, 본 시험에 사용하였다.

사육환경 및 관리

사육환경: 본 시험의 사육환경은 온도  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , 상대습도  $50 \pm 10\%$ , 환기시설 (공조기계), 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 × 42 × 18 cm)에 3마리씩 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.

투여약량수준설정 및 약제조제

투여약량수준설정: 농촌진흥청고시 제 2016-38호 농약의 독성시험기준과 방법”에 의하면 경구병원성 시험의 투여농도는 개체당  $10^8$  단위에 해당되는 미생물을 투여하도록 되어 있어서,

1.0×10<sup>8</sup> 단위 (PIBs/개체)로 설정하였다.

투여약량수준별 시험동물수: 시험군 (투여군)은 암수 각각 3마리씩 4군 24마리를 (중간부검군-3개군, 최종부검군) 각 군의 비투여대조군으로 암수 각 2마리씩 4군 16마리, 총 40마리를 사용하여 시험하였다. 용매대조군은 따로 설정하지 않았다.

Table. 시험군별 시험동물수

구분		중간부검군			최종부검군 (21일차)
		3일차	7일차	14일차	
시험군	수컷	3 <sup>1)</sup>	3	3	3
	암컷	3	3	3	3
비투여대조군	수컷	2	2	2	2
	암컷	2	2	2	2

<sup>1)</sup>단위 : 마리수

미생물 수 측정에 사용된 배지: 핵다각체병바이러스는 미생물 검출에 배지를 이용하지 않고 현미경을 사용하여 계수하였다.

용매의 선택과 시험용액 조제: 시험약제가 액상이고 미생물농도는 1.0×10<sup>8</sup> PIBs/mL이므로 조제하지 않고 1.0×10<sup>8</sup> PIBs/mL의 시험용액 (test solution)으로 사용하였다.

투여액량 (volume)설정: 투여약량수준별 1.0 mL/PIBs (1.0x10<sup>8</sup> PIBs/mL)로 설정하여 시험하였다.

#### 시험물질의 투여

사료의 절식: 시험용액 투여하기 전 하룻밤 정도 먹이를 주지 않았고, 사료는 투여 3~4시간 후에 급여하였다.

투여경로 및 투여방법: Rat 경구투여용 зонде (Sonde)를 이용하여 경구투여 경로를 이용하여 위내에 1회 강제 투여하였다.

#### 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 시에 측정하였다.

부검: 시험용액 투여 후 3일, 7일, 14일 및 21일에 CO<sub>2</sub> 마취시켜 부검하여 내부 장기의 육안적 이상 유무를 관찰하였다.

미생물 체외 배출상황: 시험용액 투여 후 1일, 3일, 7일 및 14일째에 대변을 채취하여 멸균생리식염수에 넣고 균질화한 다음 10배 단계 희석하여 현미경과 hemacytometer를 사용하여 계수하였다.

미생물의 체내잔존상황: 시험용액 투여 후 3일, 7일, 14일 및 21일째에 부검하여 신장, 뇌, 간장, 폐, 비장, 위, 혈액, 임파절을 채취하여 멸균생리식염수에 넣고 균질화한 다음 10배 단계 희석하여 현미경과 hemacytometer를 사용하여 계수하였다.

#### 시험결과

일반중독증상 및 치사동물: 본 시험에서 경구투여 후 일반중독증상은 관찰되지 않았으며, 치사동물은 없었다.

체중변화: 체중은 암·수 모두에서 시험기간 동안 증가하였다.

부검소견: 각 부검군별 3일, 7일, 14일 및 21일째에 CO<sub>2</sub>로 마취시켜 각 주요 장기에 대한 육안적 관찰을 실시한 결과 약제투여에 의한 특이한 이상증상은 관찰되지 않았다.

미생물 체외 배출상황: 시험물질 투여 후 1일, 3일, 7일 및 14일째에 대변을 채취하여 체외 배출 미생물수를 측정한 결과, 1일째부터 마지막 관찰일인 21일까지 미생물이 관찰되지 않았다.

미생물 체내 잔존상황: 시험물질 투여 후 3일, 7일, 14일 및 21일째에 부검하여 신장, 뇌, 간장, 폐, 비장, 위, 혈액, 임파절에서의 미생물 수를 측정한 결과, 어떤 장기에서도 디펜스에 의한 미생물은 검출되지 않았다. 이상의 시험결과, 디펜스의 랫드에 대한 단회 경구 투여 시 장기에서는 미생물이 검출되지 않았고, 채취한 대변에서도 미생물이 검출되지 않았으며, 부검 시에는 어떠한 이상증상이 관찰되지 않았다. 따라서 디펜스의  $1.0 \times 10^8$  PIBs/ml 단위에 해당하는 미생물을 랫드에 단회 경구 투여 시 주요 장기 (위)에서 잔존하지 않았으며 시험 종료 시 까지 중독 증상 및 치사가 없는 것으로 보아 급성독성으로 인한 영향은 없는 것으로 판단된다.

#### ⑤ 시험제목: 랫드에 대한 디펜스의 급성경피독성시험

시험물질: 디펜스

시험목적: 랫드에 대한 급성경피독성시험을 통하여 유기농업자재 공시에 관한 기초자료로 활용코자 한다.

시험방법: “농약 및 원제의 등록기준” [별표 12] 인축독성시험 기준과 방법 (농촌진흥청고시 제2016-38호)에 준하여 실시하였다.

시험동물

시험계: Rat Sprague-Dawley (SD), SPF

공급원

- 명칭: 한림실험동물연구소
- 소재지: 경기도 화성시 봉담읍 최루백로 313
- 연락처: 031-227-5955

시험계의 선택사유: 농촌진흥청고시 제 2016-38호 인축독성시험 기준과 방법에 시험동물로 랫드를 추천하고 있으며, 본 계통에 대한 기초자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험결과 해석 및 평가가 용이하기 때문에 선택하였다.



## 주령 및 체중범위

시험약제 투여시	Male	Female
주령 (주)	8	8
체중 (g)	253.0 ~ 270.5	186.0 ~ 200.0

순화 및 검역: 동물을 구입한 후 5일 동안 동물실험실의 환경하에서 순화시키면서 일반 건강 상태를 관찰하여 건강한 개체를 선별, 본 시험에 사용하였다.

### 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 × 42 × 18 cm)에 5마리씩 넣어 깔짚을 깔아 사육하였다.

사료 및 음용수: 사료는 실험동물용 고형사료 [Cargill Agri Purina Korea Inc.]를 자외선 멸균시켜 자유급식 시켰으며 물은 정수필터를 통과한 지하수를 자유 섭취시켰다.

### 투여약량수준설정 및 약제조제

투여약량수준설정: 시험물질이 미생물 (제제)로 미생물 시험법에 의거 투여농도는 개체당  $10^8$  단위에 해당되는 미생물을 투여하도록 되어 있고, 시험약제의 미생물 유효성분이  $1.0 \times 10^8$  PIBs/mL이므로  $1.0 \times 10^8$  PIBs/개체로 처리약량을 설정하였다.

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.

용매대조군의 설정: 시험약제가 액상이고 미생물 유효성분이  $1.0 \times 10^8$  PIBs/mL이므로 용매대조군은 따로 설정하지 않았다.

용매의 선택과 시험용액 조제: 시험약제가 액상이고 미생물 유효성분이  $1.0 \times 10^8$  PIBs/mL이므로 조제하지 않고  $1.0 \times 10^8$  PIBs/mL의 시험용액 (test solution)으로 사용하였다.

처리액량 (volume) 설정: 약제 처리액량은 1.0 mL/PIBs ( $1.0 \times 10^8$  PIBs/mL)로 설정하여 투여하였다.

### 시험물질의 투여

약제처리경로 및 처리방법: 시험동물은 시험물질처리 하루 전에 등부위에 제모기를 이용하여 5×6 cm이상 크기 넓이로 제모하고, 4×5 cm 크기 면적의 거즈에 시험용액을 균일하게 묻힌 다음 제모 된 부위에 Coban (self-adherentwrap, 3M 社)으로 고정 / 유지 시켰다.

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

#### 관찰 및 측정

일반중독증상 및 치사동물: 처리 당일은 처리 후 30분, 1시간에서 4시간까지 매 시간마다 일반중독증상 및 치사수를 관찰하였으며, 익일부터는 매일 1회씩, 투여 개시 후 14일째까지 관찰 및 조사하였다.

체중측정: 시험된 모든 동물에 대하여 시험물질 투여 직전에 체중을 측정하였고 생존한 동물에 한하여 투여 후 3일, 7일, 실험종료일인 14일째 개체별 체중을 측정하였다.

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

반수치사약량(LD<sub>50</sub>) 산출: 농촌진흥청고시 제2016-38호 농약의 독성시험기준과 방법에 의해 시험을 실시한 결과, 시험고시의 최고용량에서 모든 시험동물이 생존하여 시험종료 후 통계처리는 생략하였다.

#### 시험결과

일반중독증상 및 치사동물: 디펜스를 한계투여약량 1.0x10<sup>8</sup> PIBs로 경피 노출한 결과, 생존한 모든 개체에서 특이한 일반중독 증상은 관찰되지 않았으며 치사개체도 관찰되지 않았다.

Table. Mortality and clinical signs

Group	Dose (PIBs/g)	Sex	Number of animals	Clinical signs	Mortality (dead / total)	LD <sub>50</sub>
1	1.0x10 <sup>8</sup> PIBs	Male	5	No abnormality detected	0% (0 / 5 <sup>a</sup> )	> 1.0x10 <sup>8</sup> PIBs
2	1.0x10 <sup>8</sup> PIBs	Female	5	No abnormality detected	0% (0 / 5)	

a : Number of Death animals / Number of tested animals

Table. Mortality of rats

Group	Dose (PIBs/g)	Sex	Number of animals	Time / Days after administration										
				Time					Days					
				30 min	1hr	2hr	3hr	4hr	1	2	3	4	5	
1	1.0x10 <sup>8</sup>	Male	5	0 <sup>a</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	1.0x10 <sup>8</sup>	Female	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Group	Dose (PIBs/g)	Sex	Number of animals	Days after administration										
				6	7	8	9	10	11	12	13	14		
1	1.0x10 <sup>8</sup>	Male	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	1.0x10 <sup>8</sup>	Female	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

a : Number of dead animals

Table. Clinical signs of rats

Group	Dose (PIBs/g)	Sex	Number of animals	Time / Days after administration										
				Time					Days					
				30 min	1hr	2hr	3hr	4hr	1	2	3	4	5	
1	1.0x10 <sup>8</sup> PIBs	Male	1	NAD <sup>a</sup>	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
			2	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
			3	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
			4	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
			5	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
2	1.0x10 <sup>8</sup> PIBs	Female	6	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
			7	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
			8	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
			9	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
			10	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD

Group	Dose (PIBs/g)	Sex	Number of animals	Days after administration									
				6	7	8	9	10	11	12	13	14	
1	1.0x10 <sup>8</sup> PIBs	Male	1	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
			2	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
			3	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
			4	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
			5	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
2	1.0x10 <sup>8</sup> PIBs	Female	6	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
			7	NAD	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

체중변화 : 모든 시험동물의 체중은 약제투여 후 경과 일에 따라 증가추세를 보였다.

Table. Mean body weights

Group	Dose (PIBs/g)	Sex	Number of animals	Days after administration (g)		
				0	7	14
1	1.0x10 <sup>8</sup> PIBs	Male	5	262.1 ± 7.4 <sup>a</sup>	311.4 ± 16.1	372.6 ± 22.8
2	1.0x10 <sup>8</sup> PIBs	Female	5	193.8 ± 5.0	219.5 ± 5.4	253.2 ± 17.1

a : Mean ± standard deviation

Table. Body weights

Group	Dose (PIBs/g)	Sex	Number of animals	Days after administration (g)				
				0	3	7	14	Gain
1	1.0x10 <sup>8</sup> PIBs	Male	1	270.5	286.0	319.0	376.5	106.0
			2	256.0	280.0	306.0	370.5	114.5
			3	267.5	287.0	333.5	405.0	137.5
			4	263.5	277.5	308.5	370.0	106.5
			5	253.0	271.0	290.0	341.0	88.0
MEAN				262.1	280.3	311.4	372.6	110.5
S.D. <sup>a</sup>				7.4	6.6	16.1	22.8	-
2	1.0x10 <sup>8</sup> PIBs	Female	6	194.5	218.0	227.5	280.5	86.0
			7	195.0	206.0	218.5	240.0	45.0
			8	193.5	203.0	214.5	240.5	47.0
			9	200.0	211.0	222.0	259.0	59.0
			10	186.0	198.0	215.0	246.0	60.0
MEAN				193.8	207.2	219.5	253.2	59.4
S.D.				5.0	7.7	5.4	17.1	-

a : Standard deviation

반수치사약량 (LD<sub>50</sub>): 랫드에 대한 디펜스의 급성경피독성시험 시험 결과, LD<sub>50</sub>값은 1.0x10<sup>8</sup> PIBs 이상 이었다.

⑥ 시험제목: 디펜스의 담수어류 (잉어, *Cyprinus carpio*)에 대한 영향시험

시험물질: 디펜스

시험목적: 디펜스의 잉어에 대한 담수어류영향을 평가하기 위하여 실시하였다.

시험방법: “농약 및 원제의 등록기준” [별표 13] 환경생물 독성시험 기준과 방법 (농촌진흥청 고시 제2016-38호)에 준하여 실시하였다.

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 종이기 때문에 선정하였다.

시험방법

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°C (± 1°C)

광조건: 조명 16시간, 암 8시간

마리수 및 기간: 독성시험에 필요한 마리수의 110%를 시험시작 7일전에 순화하였다.

먹이급여: 사육시 공급한 사료를 1일 1회 급여 하였다.

시험물질 적용방법:

- 사용수조: 원통형의 유리제품 12.5 L (높이 25.5 cm×Ø 25.5 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°C)내로 유지하되 시험기간 중 수온의 변화는±1°C 이상 변화되지 않도록 하였다. 또한 시험용수의 용존산소량은 최소한 포화농도 60%를 유지하도록 하였다.

시험농도설정: 시험농도설정은 예비 시험을 실시한 결과 1.0×10<sup>6</sup> PIBs/mL에서 치사 개체가 없었으므로 1.0×10<sup>6</sup> PIBs/mL (추천사용 농도의 1000배) 농도로 본 시험을 실시하였다.

시험물질의 조제: 시험물질인 디펜스 100.0 g을 각각 3반복씩 정확하게 평량하여 12.5 L 시험수조에 넣고 10 L가 되도록 시험용수를 채운 후 완전히 현탁될 때 까지 충분히 교반시켜 시험용수로 사용하였다.

## 시험생물수

군	농도 (PIBs/mL)	반복수	생물수(마리)
음성대조군	-	1	10
시험물질 처리군	$1.0 \times 10^6$	3	30

시험용액 교체시기: 본 시험전에 실시한 농도유지확인 시험결과 시험물질을 노출한 후 시간이 경과함에 따라 시험수중 미생물농도는 7일차까지 0일차농도보다 농도가 감소되는 것을 확인하였다. 따라서 시험용액을 주 2회 간격으로 교체하는 반지수식으로 시험을 진행하였다. 시험용액의 교체는 시험 실시 후 3, 7, 10, 14, 17, 21, 24, 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 사료급여하였다.

시험 대조군: 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 1.4)로 시험한 GLP 급성어류독성시험 (16-KET-PC001)결과를 적용하였다.

## 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 시험용수 교체시마다 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 10마리를 무작위로 선별하여 전장 및 체중을 측정하였다.

시험용액의 미생물 측정: 미생물 검출에는 현미경과 hemacytometer를 사용하여 계수하였다. 미생물의 측정을 위하여 시료채취는 시험용수 교체시마다 실시하였으며 채취한 sample을 현미경과 hemacytometer를 사용하여 계수하였다.

병리검사: 시험기간 중 치사나 병원성을 보인 개체는 치사가 발견된 당일 시험생물 조직을 homogenizer로 분쇄한 후 멸균 증류수로 희석하여 현미경과 hemacytometer를 사용하여 계수하였고, 종료 후 생존한 전 개체를 부검하여 육안으로 미생물 감염여부를 대조구와 비교하여 검사하였다.

최소무영향관찰농도 (NOEC) 산출법:  $1.0 \times 10^6$  PIBs/mL의 농도로 시험을 실시하여 무영향관찰농도 (NOEC)를 확인하였다. 무영향관찰농도는 치사 및 이상증상 개체가 발생하지 않은 시험농도를 기준으로 하였다.

시험결과

누적치사수 및 일반증상: 디펜스의 잉어(*Cyprinus carpio*)에 대한 담수어류영향시험을 시험농도  $1.0 \times 10^6$  PIBs/mL로 30일 동안 반지수식으로 실시한 결과 시험 종료시까지 치사 개체가 관찰되지 않았고, 어떠한 중독증상도 관찰되지 않았다.

Table. Cumulative mortality of *Cyprinus carpio*

Nominal concentration (PIBs/mL)	Number of fish	Cumulative mortality							
		0 day	1 day	2 day	3 day	4 day	5 day	6 day	7 day
Control	10	0	0	0	0	0	0	0	0
$1.0 \times 10^6$	30	0	0	0	0	0	0	0	0

Nominal concentration (PIBs/mL)	Number of fish	Cumulative mortality							
		8 day	9 day	10 day	11 day	12 day	13 day	14 day	15 day
Control	10	0	0	0	0	0	0	0	0
$1.0 \times 10^6$	30	0	0	0	0	0	0	0	0

Nominal concentration (PIBs/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
$1.0 \times 10^6$	30	0	0	0	0	0	0	0	0

Nominal concentration (PIBs/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	
$1.0 \times 10^6$	30	0	0	0	0	0	0	0	

Table. Abnormal response of *Cyprinus carpio*

Nominal concentration (PIBs/mL)	Number of fish	Abnormal response							
		0 day	1 day	2 day	3 day	4 day	5 day	6 day	7 day
Control	10	N <sup>a</sup> (10 <sup>b</sup> )	N(10)	N(10)	N(10)	N(10)	N(10)	N(10)	N(10)
1.0 × 10 <sup>6</sup>	30	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)

Nominal concentration (PIBs/mL)	Number of fish	Cumulative mortality							
		8 day	9 day	10 day	11 day	12 day	13 day	14 day	15 day
Control	10	N <sup>a</sup> (10 <sup>b</sup> )	N(10)	N(10)	N(10)	N(10)	N(10)	N(10)	N(10)
1.0 × 10 <sup>6</sup>	30	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)

Nominal concentration (PIBs/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 <sup>a</sup> (10 <sup>b</sup> )	N(10)	N(10)	N(10)	N(10)	N(10)	N(10)	N(10)
1.0 × 10 <sup>6</sup>	30	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)

Nominal concentration (PIBs/mL)	Number of fish	Cumulative mortality							
		24 day	25 day	26 day	27 day	28 day	29 day	30 day	
Control	10	N <sup>a</sup> (10 <sup>b</sup> )	N(10)	N(10)	N(10)	N(10)	N(10)	N(10)	
1.0 × 10 <sup>6</sup>	30	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)	N(30)	

a: Normal

b: Number of fish



pH 및 DO: 시험용수의 pH는 음성대조군에서 7.66 (7.23~7.89)이었고,  $1.0 \times 10^6$  PIBs/mL 농도군에서는 7.65 (7.41~7.90)이었다. 시험용수의 DO는 음성대조군에서 89.2%<sub>sat.</sub> (79.7~98.2)이었고,  $1.0 \times 10^6$  PIBs/mL 농도군에서는 88.4%<sub>sat.</sub> (82.2~92.6)이었다.

Table. pH-values

Nominal concentration (PIBs/mL)	Replication	0 day	3 day	7 day	10 day	14 day	17 day	21 day	24 day	28 day
Control	-	7.72	7.78	7.85	7.79	7.70	7.89	7.51	7.23	7.47
$1.0 \times 10^6$	1	7.68	7.65	7.79	7.74	7.68	7.90	7.43	7.55	7.48
	2	7.67	7.69	7.78	7.69	7.68	7.88	7.42	7.53	7.50
	3	7.65	7.71	7.78	7.71	7.66	7.88	7.41	7.55	7.51
	Mean	7.67	7.68	7.78	7.71	7.67	7.89	7.42	7.54	7.50

pH meter - Orion 4 star [Thermo SCIENTIFIC]

Table. Dissolved oxygen concentration (%<sub>sat.</sub>)

Nominal concentration (PIBs/mL)	Replication	0 day	3 day	7 day	10 day	14 day	17 day	21 day	24 day	28 day
Control	-	89.6 <sup>a</sup>	98.2	89.8	90.7	87.2	85.9	87.0	79.7	94.4
$1.0 \times 10^6$	1	88.1	92.0	92.2	90.3	86.8	83.6	87.0	87.4	92.2
	2	86.7	92.6	88.1	90.5	84.2	82.2	87.2	88.0	91.3
	3	86.6	92.5	88.8	91.4	83.9	85.7	88.9	88.3	89.8
	Mean	87.1	92.4	89.7	90.7	85.0	83.8	87.7	87.9	91.1

DO meter - Orion 4 star [Thermo SCIENTIFIC]

a: Unit - %<sub>sat.</sub>

수온 및 경도: 시험용수의 수온은 음성대조군에서 22.1 °C (21.8~22.4)이었고,  $1.0 \times 10^6$  PIBs/mL 농도군에서는 22.1 °C (21.7~22.4)이었다. 시험용수의 경도는 음성대조군에서 70 mg/L CaCO<sub>3</sub> (64~76)이었고,  $1.0 \times 10^6$  PIBs/mL 농도군에서는 71 mg/L CaCO<sub>3</sub> (62~84)이었다.

Table. Changes of water temperature

Nominal concentration (PIBs/mL)	Replication	0 day	3 day	7 day	10 day	14 day	17 day	21 day	24 day	28 day
Control	-	22.1 <sup>a</sup>	22.2	21.8	21.8	21.9	22.4	22.3	22.0	22.1
1.0×10 <sup>6</sup>	1	22.2	22.0	22.1	21.7	22.0	22.4	22.2	21.9	22.0
	2	22.1	22.1	22.1	21.8	21.9	22.3	22.2	22.0	22.1
	3	22.1	22.1	22.2	21.9	21.9	22.3	22.1	22.0	22.1
	Mean	22.1	22.1	22.1	21.8	21.9	22.3	22.2	22.0	22.1

a: Unit - °C

Table. Changes of water hardness

Nominal concentration (PIBs/mL)	0 day	3 day	7 day	10 day	14 day	17 day	21 day	24 day	28 day
Control	74 <sup>a</sup>	76	70	64	69	66	64	71	72
1.0×10 <sup>6</sup>	77	73	68	67	70	84	71	62	68

Hardness meter - HI-96735-total [HANNA]

a: Unit - mg/L CaCO<sub>3</sub>

전장 및 체중: 시험시작 전 무작위 10마리의 전장은 3.94 ± 0.27 cm이었고, 체중은 0.76 ± 0.16 g 이었다. 시험종료 후 시험생물의 전장은 음성대조군에서 3.93 ± 0.25 cm이었고, 1.0×10<sup>6</sup> PIBs/mL 농도군에서는 4.00 ± 0.23 cm이었다. 시험종료 후 시험생물의 체중은 음성대조군에서 0.88 ± 0.22 g이었고, 1.0×10<sup>6</sup> PIBs/mL 농도군에서는 0.92 ± 0.12 g이었다.

Table. Size and Body weight measured of *Cyprinus carpio*

Day	Size (cm)	Body weight (g)
0 <sup>a</sup>	3.94 ± 0.27 <sup>c</sup>	0.76 ± 0.16
30 (Control)	3.93 ± 0.25	0.88 ± 0.22
30 (1.0×10 <sup>6</sup> PIBs/mL) <sup>b</sup>	4.00 ± 0.23	0.92 ± 0.12

a: 시험시작 전 시험생물 순화조에서 무작위 10마리의 측정결과

b: 시험종료 후 무작위 10마리의 측정결과

c: Mean ± Standard deviation

시험용액의 미생물 측정 : 농도유지확인시험기간 중 0, 1, 2, 3, 4 및 7일에 1.0×10<sup>6</sup> PIBs/mL 농도 시험용액의 미생물을 현미경과 hemacytometer를 사용하여 계수한 결과

0일차에  $1.9 \times 10^5$  PIBs/mL이었고, 6일차는  $1.7 \times 10^5$  PIBs/mL로  $\pm 20\%$  이내로 유지되었으나 7일차에  $7.5 \times 10^4$  PIBs/mL로 미생물의 농도가 7일 동안 최초 농도 80% 미만으로 확인되어 주 2회 시험용수를 교체하였다. 시험기간 중 실험시작일과 미생물 농도유지를 위하여 시험물질을 재처리한 0, 3, 7, 10, 14, 17, 21, 24 및 28일에 시험용액의 미생물을 측정된 결과 각각  $1.8 \times 10^5$ ,  $1.8 \times 10^5$ ,  $1.7 \times 10^5$ ,  $1.7 \times 10^5$ ,  $1.7 \times 10^5$ ,  $1.9 \times 10^5$ ,  $1.7 \times 10^5$ ,  $1.7 \times 10^5$  및  $1.7 \times 10^5$  PIBs/mL이었다.

Table. 시험용수의 미생물 측정 (농도유지확인시험)

Nominal concentration (PIBs/mL)	관측된 미생물 농도 <sup>a</sup> ( x 10 <sup>4</sup> PIBs/mL)					
	0 day	1 day	2 day	3 day	4 day	7 day
$1.0 \times 10^6$	19.4	15.4	17.0	15.5	17.4	7.5

a: 현미경과 hemacytometer를 사용하여 계수함

Table. 시험용수의 미생물 측정 (본시험)

Nominal concentration (PIBs/mL)	관측된 미생물 농도 <sup>a</sup> ( x 10 <sup>4</sup> PIBs/mL)								
	0 day	3 day	7 day	10 day	14day	17 day	21 day	24 day	28 day
$1.0 \times 10^6$	17.5	18.0	16.9	16.6	16.5	18.5	16.7	16.9	17.1

a: 현미경과 hemacytometer를 사용하여 계수함

병리검사: 시험기간 중 치사나 병원성을 보인 개체는 관찰되지 않았고, 시험 종료 후 생존한 전 개체에 대해 부검하여 미생물 감염여부를 확인한 결과 아가미, 장기 및 근육에 대해 대조군과 비교하였을 때 육안상 차이를 발견할 수 없었다.

이상의 시험결과 디펜스의 잉어에 대한 30일 동안 반수치사농도 (LC<sub>50</sub>)는 미생물 설정농도 기준으로  $1.0 \times 10^6$  PIBs/mL 이상이었고, 최소무영향관찰농도 (NOEC)는  $1.0 \times 10^6$  PIBs/mL이었다.

Table. LC<sub>50</sub> values

Nominal concentration (PIBs/mL)	Number of fish	Cumulative mortality (30 days)	LC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (PIBs/mL)	NOEC <sup>b</sup> (PIBs/mL)
Control	10	0	> $1.0 \times 10^6$	$1.0 \times 10^6$
$1.0 \times 10^6$	30	0		

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

b: No observed effect concentration

⑦ 디펜스 고추 약해시험

시 험 기 관 : (주)한국생물안전성연구소 ○ 시 험 년 도 : 2016년

○ 담 당 자 : 박철순

○ 실험개시일: 2016. 12. 13 ○ 실험종료일: 2016. 12. 23

○ 시 험 장 소 : 충북 음성군 감곡면 ○ 시험입지조건(토성): 시설하우스(상토)

시험목적 : 디펜스의 고추에 대한 약해시험을 통하여 유기농업자재 공시 기초자료로 활용코자 함.

시험방법

- 시험약제 : 디펜스
- 시험작물(품종) : 고추(독야청청)
- 처리내용

시험약제	원료투입율(%)	처리방법	약해시험		의뢰회사
			기준량	배량	
디펜스	핵다각체병바이러스 10 <sup>8</sup>	경엽처리	100배 (12/16)	50배 (12/16)	안동대학교 산학협력단
무 처 리	-	-	-	-	-

○ 11월 4일 파종하였으며, 파종 39일 후 컵포트에 정식하였음(12/13).

○ 시험약제는 정식 3일 후, 고추 본엽이 2엽(온실 조건)시 처리하였음

- 시험구 배치 및 면적 : 완전임의배치법 3반복

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

- 조사방법

조사항목	조사횟수	조사일자	조사방법
약해유무	3	12/19, 21, 23	약제처리 3, 5, 7일 후 외관상 나타나는 약해유무 3회 달관조사

- 시험성적 (약제처리 3, 5, 7일 후)

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



Fig.1. 고추 포장현황



Fig.2. 고추 약제처리(12/18) 배양



Fig.3. 기준량 3일차



Fig.4. 기준량 5일차



Fig.5. 기준량 7일차



Fig.6. 배양 3일차



Fig.7. 배양 5일차



Fig.8. 배양 7일차



Fig.9. 무처리 3일차



Fig.10. 무처리 5일차



Fig.11. 무처리 7일차

- 결과 요약 : 디펜스의 고추에 대한 약해시험 결과 기준량 및 배양에서 외관상 나타난 약해증상은 없었음.

⑧ 디펜스 배추 약해시험

시 험 기 관 : (주)한국생물안전성연구소 ○ 시 험 년 도 : 2016년

○ 담 당 자 : 박철순

○ 실험개시일: 2016. 12. 13 ○ 실험종료일: 2016. 12. 23

○ 시 험 장 소 : 충북 음성군 감곡면 ○ 시험입지조건(토성): 시설하우스(상토)

시험목적 : 디펜스의 배추에 대한 약해시험을 통하여 유기농업자재 공시 기초자료로 활용코자 함.

시험방법

- 시험약제 : 디펜스
- 시험작물(품종) : 배추(장금이)
- 처리내용

시험약제	원료투입율(%)	처리방법	약해시험		의뢰회사
			기준량	배량	
디펜스	핵다각체병바이러스 10 <sup>8</sup>	경엽처리	100배 (12/16)	50배 (12/16)	안동대학교 산학협력단
무 처 리	-	-	-	-	-

○ 11월 25일 파종하였으며, 파종 18일 후 컵포트에 정식하였음(12/13).

○ 시험약제는 정식 3일 후, 배추 본엽이 2엽(온실 조건)시 처리하였음.

- 시험구 배치 및 면적 : 완전임의배치법 3반복

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

- 조사방법

조사항목	조사횟수	조사일자	조사방법
약해유무	3	12/19, 21, 23	약제처리 3, 5, 7일 후 외관상 나타나는 약해유무 3회 달관조사

- 시험성적(약제처리 3, 5, 7일 후)

시험약제	시험작물 (품종)	약해정도(0-5)		비고
		기준량	배량	
디펜스	배추 (CR장금이)	0	0	약해없음



Fig. 1. 배추 포장전경



Fig. 2. 배추 약제처리(12/18)



Fig. 3. 기준량 3일차



Fig. 4. 기준량 5일차



Fig. 5. 기준량 7일차



Fig. 6. 배양 3일차



Fig. 7. 배양 5일차



Fig. 8. 배양 7일차



Fig. 9. 무처리 3일차



Fig. 10. 무처리 5일차



Fig. 11. 무처리 7일차

- 결과 요약 : 디펜스의 배추에 대한 약해시험 결과 기준량 및 배양에서 외관상 나타난 약해증상은 없었음.

⑨ 디펜스 상추 약해 시험

시 험 기 관 : (주)한국생물안전성연구소 ○ 시 험 년 도 : 2016년

○ 담 당 자 : 박철순

○ 실험개시일: 2016. 12. 13 ○ 실험종료일: 2016. 12. 23

○ 시 험 장 소 : 충북 음성군 감곡면 ○ 시험입지조건(토성): 시설하우스(상토)

시험목적 : 디펜스의 상추에 대한 약해시험을 통하여 유기농업자재 공시 기초자료로 활용코자 함.

시험방법

- 시험약제 : 디펜스
- 시험작물(품종) : 상추(탑그린)
- 처리내용

시험약제	원료투입율(%)	처리방법	약해시험		의뢰회사
			기준량	배량	
디펜스	핵다각체병바이러스 10 <sup>8</sup>	경엽처리	100배 (12/16)	50배 (12/16)	안동대학교 산학협력단
무 처 리	-	-	-	-	-

○ 11월 25일 파종하였으며, 파종 18일 후 컵포트에 정식하였음(12/13).

○ 시험약제는 정식 3일 후, 상추 본엽이 2엽(온실 조건)시 처리하였음.

- 시험구 배치 및 면적 : 완전임의배치법 3반복

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

- 조사방법

조사항목	조사횟수	조사일자	조사방법
약해유무	3	12/19, 21, 23	약제처리 3, 5, 7일 후 외관상 나타나는 약해유무 3회 달관조사

- 시험성적 (약제처리 3, 5, 7일 후)

시험약제	시험작물 (품종)	약해정도(0-5)		비고
		기준량	배량	
디펜스	상추 (탑그린)	0	0	약해없음





Fig.1. 상추 포장현경



Fig.2. 상추 약제처리(12/18)



Fig.3. 기준량 3일차



Fig.4. 기준량 5일차



Fig.5. 기준량 7일차



Fig.6. 배양 3일차



Fig.7. 배양 5일차



Fig.8. 배양 7일차



Fig.9. 무처리 3일차



Fig.10. 무처리 5일차



Fig.11. 무처리 7일차

- 결과요약 : 디펜스의 상추에 대한 약해시험 결과 기준량 및 배양에서 외관상 나타난 약해증상은 없었음.

⑩ 디펜스 오이 약해 시험

시 험 기 관 : (주)한국생물안전성연구소 ○ 시 험 년 도 : 2016년

○ 담 당 자 : 박철순

○ 실험개시일: 2016. 12. 13 ○ 실험종료일: 2016. 12. 23

○ 시 험 장 소 : 충북 음성군 감곡면 ○ 시험입지조건(토성): 시설하우스(상토)

시험목적 : 디펜스의 오이에 대한 약해시험을 통하여 유기농업자재 공시 기초자료로 활용코자 함.

시험방법

- 시험약제 : 디펜스

- 시험작물(품종) : 오이(네박자)

- 처리내용

시험약제	원료투입율(%)	처리방법	약해시험		의뢰회사
			기준량	배량	
디펜스	해다각체병바이러스 10 <sup>8</sup>	경엽처리	100배 (12/16)	50배 (12/16)	안동대학교 신학철력단
무 처리	-	-	-	-	-

○ 11월 18일 파종하였으며, 파종 25일 후 컵포트에 정식하였음(12/13).

○ 시험약제는 정식 3일 후, 오이 본엽이 3엽(온실 조건)시 처리하였음.

- 시험구 배치 및 면적 : 완전임의배치법 3반복

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

- 조사방법

조사항목	조사횟수	조사일자	조사방법
약해유무	3	12/19, 21, 23	약제처리 3, 5, 7일 후 외관상 나타나는 약해유무 3회 달관조사

- 시험성적

시험약제	시험작물 (품종)	약해정도(0-5)		비고
		기준량	배량	
디펜스	오이 (네박자)	0	0	약해없음



Fig.1. 오이 포장현황



Fig.2. 오이 익제자리(12/18)



Fig.3. 기준양 3일차



Fig.4. 기준양 5일차



Fig.5. 기준양 7일차



Fig.6. 배양 3일차



Fig.7. 배양 5일차



Fig.8. 배양 7일차



Fig.9. 무처리 3일차



Fig.10. 무처리 5일차



Fig.11. 무처리 7일차

- 요약결과 : 디펜스의 오이에 대한 약해시험 결과 기준양 및 배양에서 외관상 나타난 약해증상은 없었음.

① 디펜스 콩 약해 시험

시 험 기 관 : (주)한국생물안전성연구소 ○ 시 험 년 도 : 2016년

○ 담 당 자 : 박철순

○ 실험개시일: 2016. 12. 13 ○ 실험종료일: 2016. 12. 23

○ 시 험 장 소 : 충북 음성군 감곡면 ○ 시험입지조건(토성): 시설하우스(상토)

시험목적 : 디펜스의 콩에 대한 약해시험을 통하여 유기농업자재 공시 기초자료로 활용코자 함.

시험방법

- 시험약제 : 디펜스

- 시험작물(품종) : 콩(백태)

- 처리내용

시험약제	원료투입율(%)	처리방법	약해시험		의뢰회사
			기준량	배량	
디펜스	해다각제병바이러스 10 <sup>8</sup>	경엽처리	100배 (12/16)	50배 (12/16)	안동대학교 산학협력단
무 처 리	-	-	-	-	-

○ 11월 25일 파종하였으며, 파종 18일 후 컵포트에 정식하였음(12/13).

○ 시험약제는 정식 3일 후, 콩 본엽이 2엽(온실 조건)시 처리하였음.

- 시험구 배치 및 면적 : 완전임의배치법 3반복

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

- 조사방법

조사항목	조사횟수	조사일자	조사방법
약해유무	3	12/19, 21, 23	약제처리 3, 5, 7일 후 외관상 나타나는 약해유무 3회 달관조사

- 시험성적

시험약제	시험작물 (품종)	약해정도(0-5)		비고
		기준량	배량	
디펜스	콩 (백태)	0	0	약해없음



Fig. 1. 종 포장전경



Fig. 2. 종 약제처리(12/16) 배양



Fig. 3. 기준량 3일차



Fig. 4. 기준량 5일차



Fig. 5. 기준량 7일차



Fig. 6. 배양 3일차



Fig. 7. 배양 5일차



Fig. 8. 배양 7일차



Fig. 9. 무처리 3일차



Fig. 10. 무처리 5일차



Fig. 11. 무처리 7일차

- 결과 요약 : 디펜스의 콩에 대한 약해시험 결과 기준량 및 배양에서 외관상 나타난 약해증상은 없었음.
- 시험담당자 의견 : 디펜스는 기준량 및 배양에서 약해가 없어 유기농업자재로 실용성이 있을 것으로 판단됨.

## 자. 사업화성과 및 매출실적

- 기술이전을 받는 참여기업 (주)엠텍에서는 본 연구개발을 통해 완성된 시제품 ‘디펜스’를 이용하여 상업화할 계획임.
- 사업화 성과

항목	세부항목			성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	100만원	
			향후 3년간 매출	3천만원	
		관련제품	개발후 현재까지	5억원	
			향후 3년간 매출	15억원	
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 20 % 국외 : - %	
			향후 3년간 매출	국내 : 50% 국외 : 10 %	
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 60 % 국외 : - %	
			향후 3년간 매출	국내 : 50 % 국외 : - %	
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위			5위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위			2위

## - 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목		성 과		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)		2		
	소요예산(백만원)		200		
	예상 매출규모 (억원)		현재까지	3년후	5년후
			1,000	20,000	50,000
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	50	60	80
국외		-	-	10	
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		- 핵다각체병바이러스를 이용한 분상형 친환경 제품 - 고주담배나방 및 탄저병 예방 혼합 미생물 제제			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	-	5	20	
	수 출	-	-	20	

## 4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

### 4-1. 목표달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)
고추담배나방 핵다각체병바이러스의 탐색	5	5
선발된 고추담배나방 핵다각체병바이러스의 형태 및 생화학특성조사	5	4
선발된 핵다각체병바이러스의 실내 / 실외 생물검정	10	10
방제효과 증진을 위한 미생물살충제 증진기술개발(핵다각체병바이러스+곤충병원성세균)	10	10
기주곤충(고추담배나방) 증식의 최적화조건 및 안정화된 사육법 개발	15	8
선발된 핵다각체병바이러스의 대량생산 최적조건 및 생산체계 구축	10	8
생물검증에 의한 고추담배나방방제용 핵다각체병바이러스의 제형화	20	20
곤충핵다각체병바이러스 친환경 제제 개발	25	25
합계	100	90

#### ○ 본 연구를 통해

- 기술이전 1건 완료
- 핵다각체병바이러스를 이용한 (주)엠텍에서 시제품 ‘DEFENSE’ 개발 완료
- 교육지도로 핵다각체병바이러스를 이용한 친환경농업 관련으로 9건을 진행
- 핵다각체병바이러스 이용 고추담배나방 방제에 대해 예천군에 정책 건의 1건
- 현장실용화를 위한 친환경 농업기술개발의 타연구에 활용 1건
- 연구인력 2명 양성
- 특허 출원 2건(출원번호 102016014884, 1020170167407)
- 학술발표대회 4건
- 홍보 4건(현장견학 등)
- 한국미생물 생명공학회 우수포스터 수상을 하였음.

### 4-2. 관련분야 기여도

- 산업화의 발전과 환경오염에 따른 미래의 식량 생산에 있어서는 계속적으로 친환경 유기농에 대한 관심이 높아지고, 친환경 유기농을 통해 재배한 농산물만이 농업시장경쟁에서 살아남 수 있을 것이다. 유기 합성 농약의 지속적 사용은 경제적 독약인 농약을 사용하므로 최근 농업트렌드를 벗어나는 행위일 수 있다. 농산물 생산에 걸림돌인 각종 병·충해를 인간이 컨트롤 하여 농산물 생산량은 증가 되었으나, 유기 합성 농약으로 인한 환경적 피해

가 늘어나고, 농산물에 대한 병폐가 증가되고 있다. 최근까지 다른 해충과 마찬가지로 고추담배나방 등 해충들에 대해서는 화학적 방제가 주를 이루고 있었으나, 약제에 대한 저항성의 증가로 방제가 어려워 작물이 큰 피해를 입을 뿐 아니라 저항성해충의 출현 및 인축이나 동식물에 대한 직·간접적인 피해와 잔류로 인한 환경오염 및 생태계 파괴 등의 환경적 문제가 발생하고 있다. 이를 해결하기 위한 방안중 하나로 생물적 방제법을 도입을 통해 화학적 방제의 보완 또는 대체수단으로서 종합적 해충방제 체계 확립에 연구의 초점을 집중시키고 있으며, 그 중에서도 곤충 질병을 일으키는 세균, 바이러스, 사상균, 원생동물 등 해충의 방제에 큰 비중을 두고 있다. 이중에서 미생물 바이러스는 기주곤충에 대한 특이성이 높아, 농작물이나 산림해충 방제에 효과적이어서 이미 일부 선진국에서는 살충제가 상품화되고 있다. 곤충바이러스는 숙주곤충에 대한 특이성이 높고 누에나 꿀벌과 같은 익충에는 피해를 주지 않으면서 목적해충을 방제할 수 있다는 장점을 지니고 있어 바이러스를 살충제화 하여 해충방제에 널리 이용하고 있다.

본 과제에서는 고추담배나방 핵다각체병바이러스 HasPNV의 분리를 통해 해충방제에 효과를 보이는 핵다각체병바이러스의 대량생산을 산업화하여 친환경적이고 경제성 있는 곤충 병원성바이러스 제품을 개발하고 친환경농업 및 환경오염에 대한 다양한 문제점들을 해결하였다. 핵다각체병바이러스의 재배지에서의 최적 농도를 조사하여 살포량의 최적화를 통해 2차적이 오염문제를 해결하였으며, 핵다각체병바이러스의 대량생산 및 국산화를 통해 원제의 생산성과를 얻을 수 있으며, 본 과제를 통해 독성 평가 등을 완료하여 친환경농자 재료의 등록이 가능할 수 있다. 본 과제 연구를 통해 기술이전을 받는 (주)엠텍에서는 시제품 ‘디펜스’의 생산을 통해 기존 고추담배농약의 대체효과 및 가격 경쟁력이 좋아 농업인들에게 부담을 주지 않고 활성 또한 우수한 것으로 조사되어 농업경제에 기여를 할 것이다. 또한 지속적 농업이 교육을 통해 친환경 농업 및 유기농업에 대한 발전을 기여할 것이다.



## 5. 연구결과와 활용계획

### 가. 연구개발 결과의 활용방안

- 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, 매개충의 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.
- 살충성 생물농약 및 제제의 새로운 가이드라인 제시방안
- 친환경농업인에게 공급할 시작품 제작방안
- 관련 특허출원 및 제조특허에 따른 지적재산권 활용
- 제품개발에 대한 업체로의 기술이전 및 상용화추진
- 예천군 농업기술센터를 통해 친환경 유기농에 대한 교육을 연구과제 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.
- 살충성 생물농약 및 제제의 새로운 가이드라인 제시방안
- 친환경농업인에게 공급할 시작품 제작방안
- 관련 특허출원 및 제조특허에 따른 지적재산권 활용
- 제품개발에 대한 업체로의 기술이전 및 상용화추진
- 수입에 의존한 미생물살충제에 대한 수입 대체효과
- 농가에서 농약사용절감 및 경영비 감소에 따른 농가소득 증대
- 친환경농산물 생산에 필요한 친환경농자재 역할
- 관련 산업 활성화 및 생물농약의 시장 진입
- 고추담배나방 방제용 핵다각체병바이러스 살충제 시판
- 연구결과를 통해 한 가지 곤충에만 작용하는 바이러스의 특성을 활용하여 향 후 다양한 바이러스의 조합을 통해 다양한 곤충 종을 제어할 수 있는 제품개발 활용
- 병원성곤충 뿐 만 아니라 식물병을 제어할 수 있는 멀티 친환경 제제 개발이 가능 함.
- 지역성특성을 파악하기 위해 향후 타 지역에서도 포장 시험을 진행하여야 함.
- 참여기업인 (주)엠텍으로 기술이전을 통해 기업에서 제품을 생산할 예정이며 지속적 포장 실험을 통해 디펜스의 사용 범위를 넓일 예정임.
- 또한 (주)엠텍에서 보유하고 있는 미생물 제제를 활용하여 핵다각체병바이러스와 혼합제를 만들어 계속적으로 제품을 준비할 계획임.
- 향 후 제품의 효율을 높일 수 있는 방안으로 micro capsule화에 대한 방안을 추가적으로 연구를 진행하고자 함.

나. 기대성과

- 수입에 의존한 미생물살충제에 대한 수입 대체효과
- 농가에서 농약사용절감 및 경영비 감소에 따른 농가소득 증대
- 친환경농산물 생산에 필요한 친환경농자재 역할
- 관련 산업 활성화 및 생물농약의 시장 진입
- 고추담배나방 방제용 핵다각체병바이러스 살충제 시판

## 6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 생물농약 개발은 대기업보다는 주로 벤처기업이나 중소기업들이 주도적으로 시장을 선도하고 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 선발하거나 대학 및 연구소로부터 아웃소싱을 통하여 우수한 후보물을 확보하여 생물농약을 개발하고 있다.

## 7. 연구개발결과의 보안등급

- 인공사료 등 핵다각체병바이러스의 대량생산 방법과 관련되어 기술이전 받는 참여업체의 요구사항에 따라 보안요청

8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	코드번호		D-10	
					구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호

## 9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

- 사업수행 연구실 안전 점검 수행
- 학내 안전점검 실시

항 목	적 용 범 위	시행기관	비고
연구실 일상 안전점검 (연구활동 시작 전 매일 1회)	이·공계열 학과(부) 및 연구소 등 연구개발활동을 위해 설치한 모든 연구실과 학기 기술분야 모든 연구실	안동대학교 (주)엠텍 예천농업기술센터	
연구실 정기 안전점검 (년 1회 이상)	이·공계열 학과(부) 및 연구소 등 연구개발활동을 위해 설치한 모든 연구실과 학기 기술분야 모든 연구실	안동대학교 (주)엠텍 예천농업기술센터	
연구실 정밀 안전진단 (2년 1회 이상)	유해물질 및 유해인자 취급 연구실 정기점검 결과 추가점검이 필요한 연구실	안동대학교 (주)엠텍 예천농업기술센터	
연구활동종사자에 대한 안전교육 (년 12시간 이상)	이·공계열 학과(부) 및 연구소 등에 소속된 모든 연구활동종사자	안동대학교 (주)엠텍 예천농업기술센터	
연구활동종사자 건강검진 (매년 실시)	치명적인 위험물질 및 바이러스 등에 노출 위험성이 있는 연구활동종사자	안동대학교 (주)엠텍 예천농업기술센터	
연구활동종사자 안전공제 (매년 실시)	이·공계열 학과(부) 및 연구소 등에 소속된 모든 연구활동종사자	안동대학교	

- 보험가입(연구활동종사자 안전공제)
- (주)엠텍 산업재해보험으로 대체
- 안동대학교 산학협력단 실시

## 10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	특허	핵다각체병바이러스를 이용한 고추담배나방 방제용 친환경 제제 조성물	안동대		한국		2016.10 (10-2016-014 1884)	단독	
	특허	고추담배나방 제어를 위한 핵다각체병바이러스를 유효성분으로 함유하는 친환경 생물 농약 조성물 및 그 제조방법	안동대		한국		2017.12 (10-2017-016 7407 )	단독	
2	발표	Development of ecofriendly agent for the prevention of <i>Helicoverpa assulta</i> using HasNPV	안동대		KMB 2016 43 <sup>rd</sup> Annual Meeting and International symposium		2016.06	단독	
3	기술 이전	핵다각체병 바이러스 대양배양 후 회수방법 및 제형화	안동대				2017.	단독	
4	사업 화	핵다각체병바이러스를 이용한 제품 '디펜스'개발	안동대				2018	단독	시제품
5	발표	Bioinsecticide agent of entomopathogenic HasNPV using for the biological control of chili <i>Helicoverpa assulta</i>	안동대		KMB 2017 44th Annual meeting & International symposium		2017.06	단독	우수 포스터상 수상

## 12. 참고문헌

- Ahuja D. B. and A. Noor. 1991. Effect of different host plants on the development of *Spodoptera litura* (Fab.). *J. Insect Sci.* 4: 176~177.
- Argauer, R. and M. Shapiro. 1997. Fluorescence and relative activities of stilbene optical brighteners as enhancers for the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) baculovirus. *J. Econ. Entomol.* 90: 416-420
- Bae S. D. and H. J. Cho. 1998. Study on the physio-biology and control of *Spodoptera litura* Fabricius. *Pl. Environ. Res. Rept. Nat. Yeongnam Agric. Expt. Sta. RDA.* pp. 877~907.
- Bae S. D. and K. B. Park, 1999. Effects of Temperature and Food Source on Pupal Development, Adult Longevity and Oviposition of the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* Fabricius. *Korean J. Appl. Entomol.* 38: 23~28.
- Bae S. D., K. B. Park and Y. J. Oh 1997. Effects of Temperature and Food Source on the egg and larval Development of tobacco cutworm, *Spodoptera litura* Fabricius. *Korean J. Appl. Entomol.* 36: 48~54.
- Battu G. S. 1987. Propagation of nuclear polyhedrosis virus of the lucerne caterpillar, *Spodoptera exiqua*(Hubner). *Indian J. of Ecology* 14: 161~163.
- Balasubramanian, G., S. Chelliah and M. Balasubramanian. 1984. Effects of host plants on the biology of *Spodoptera litura* Fabricius. *Indian J. Agric. Sci.* 54: 1075~1080.
- Bergold G. H., and B. Flaschentrager, 1975. The polyhedral virus of *Prodenia litura*(Fabr.) (Lepidoptera : Noctuidae). *Nature*, 180: 1046~1047.
- Behle, R. W., P. Tamez-Guerra and M. R. McGuire. 2003. Field activity and storage stability of *Anagrapha falcifera* nucleopolyhedrovirus(AfMNPV) in spray-dried lignin-based formulations. *J. Econ. Entomol.* 96: 1066-1075
- Birnbaum, M. J. Clean, R. J. and Miller, L. K. 1994. An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs. *J Virol.* 68:2521-8.
- Burges, H. D. and Jones, K. A. 1998. Formulation of bacteria, viruses and protozoa to control insects. pp. 33-128, In *Formulation of Microbial Biopesticides beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments* (ed. H. D. Burges), Kluwer Academic Publishers, UK.
- 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 Netherland.
- Choo H. Y., K. S. Woo, P. J. Shea and Y. D. Park. 1992. Phytophagous Insects Associated with Compositae(Campanulales: Dicotyledonear). *Korean J. Appl. Etomol.* 31: 509~515.



- 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.
- Choi J. Y., H. S. Kim, B. R. Jin, K. Y. Seol, H. Y. Park and S. K. Kang. 1996. Pathogenicity and Production of Spodoptera exiqua Nuclear Polyhedrosis Virus. *Korean J. Appl. Entomol.* 35: 228~231.
- Cisneros, J., J.A. Perez, D.I. Penagos, R.V. Jaime, D. Goulson, P. Caballero, R.D. Cave and T. Williams. 2002. Formulation of a nucleopolyhedrovirus with boric acid for control of Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) in maize. *Biol. Contr.* 23: 87-95.
- Cook S.P., R.E. Webb and K.W. Thorpe. 1996. Potential enhancement of the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nuclear polyhedrosis virus with the triterpene azadirachin. *Environ. Entomol.* 25: 1209~1214.
- Danielli A, Kafatos F.C, and Loukeris T.G. 2003. Cloning and characterization of four Anopheles gambiae serpin isoforms, differentially induced in the midgut by Plasmodium berghei invasion. *J Biol Chem.* 278:4184-93.
- Dandurand, L.M., Morra, M.J. Chaverra, M.H. and Orser. C.S. 1994. Survival of Psuedomonas spp in air-dried mineral powders. *Soil Biol. Biochem.* 26: 1423-1430.
- Dhandapani N., S. Jayaraj, and R.J. Rabindra. 1993. Cannibalism on nuclear polyhedrosis virus infected larva by Heliothis armigera(Hubn) and its effect on viral infection. *Ins. Sci. and its App.* 14: 427~430.
- Dougherty E.M., K.P. Guthrie and M. Shapiro. 1996. Optical brighteners provide baculovirus activity enhancement and UV radiation protection. *Bio. Con.* 7: 71~74.
- Draize, J.H. 1959. Dermal. Assoc. Food and Drug officals, U.S. Appraisal of the Safety of Chemicals in Food, Drugs and Cosmetics. Texas State Dept. of Health, Austin, pp 46~59, Texas.
- Ekesi, S., N. K. Maniania, S. A. Mohamed and S. A. Lux. 2005. Effect of soil application of different formulations of Metarhizium anisopliae on African tephritid fruit flies and their associated endoparasitoids. *Biol. Contr.* 35: 83-91.
- El-Saadany. G.B., G.M. Moaward, M.A. Rizk and S. Tantawy. 1992. The complex interaction between temperature and bioactivity of nuclear polyhedrosis virus infecting Spodoptera littoralis(Boisd.) larva. *Egy. J. of Agri. Res.* 70: 117~127.
- Evans H. C., and Samson R. A. 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.
- Feng, M. G., Poprawaki, T. J., and Khachatourians, G. G. 1994. Production, formation and application of the entomopathogenic fungus Beaveria bassiana for insect control: current status. *Biocontrol Sci Technol.* 4:3-34.
- Fuxa J.R. and A.R. Richter. 1996. Effect of agricultural operations and precipitation on vertical distribution of a nuclear polyhedrosis virus in soil. *Biological control* 6:

324~329.

- Galande S. M. and D. S. Ajri. 1997. Consumption, digestion and utilization of sunflower leaves by *Helicoverpa armigera*(Hubner) treated with nuclear polyhedrosis virus. *J. of Bio. Con.* 11: 11~16.
- Ganguli R.N. and V.K. Dubey. 1998. Management of tomato fruit borer, *Helicoverpa armigera* Hubner in Chhattisgarh region of Madhya Pradesh. *Insect Environ.* 4: 25.
- Geissler K. 1995. Application and importance of entomopathogenic viruses with respect to integrated pest management. *Archives of hytopathology and Plant Protection* 29: 479~483.
- Han, J. H., Kim, H., Leam, H. T., Kim, J. J., and Lee, S. 2013. Characterisites and virulence assay of entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* for the microbial control of *Spodoptera exigua*. *Korean J Pestic Sic.* 17:454-459.
- Hamm, J. J., L. D. Chandler and H. R. Summer. 1994. Field tests with a fluorescent brightener to enhance infectivity of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus. *Florida Entomologist* 77: 425-437.
- Hwang, J. H., Park, B. R., Lee, S. G., and Kim, Y. 2009. Identification of an entomopatogenic fungus, *Nomuraea rileyi* ANU101, infecting the beet armyworm, *Spodoptera exigua*, in Korea. *Kor J Mycol.* 37:139-143.
- Hedlund R. C. and W. G. Yendol. 1974. Gypsy moth nuclear polyhedrosis virusproduction as related to inculating time, dosage, and larval weight. *J. Econ. Entomol.* 67: 61~63.
- Hugar P., K.A. Kulkarni and S. Lingappa. 1995. Persistence of the nuclear polyhedrosis virus of sorghum armyworm, *Mythimna separata*(Walker) in soil. Karnataka. *J. of Agri. Sci.* 8: 5~9.
- Hywel-Jones, N. L. 1995. *Cordyceps sphecocephala* and a *Hymenostilbe* sp. infecting wasps and bees in Thailand. *Mycol. Res.* 99:154-158.
- Ignoffo C.M. 1966. Effects of age on mortality of *Heliothis zea* and *Heliothis virescens* larva exposed to a nuclear polyhedrosis virus production as related to inoculating time, dosage, and larval weight. *J. Econ. Entomol.* 6: 279~282.
- Ignoffo C.M. 1973. Development of a viral insecticides:Concept to commertialization. *Experimental Parasitology*, 33: 380~406.
- Ignoffo C.M. and M. Shapiro. 1978. Characteristics of baculovirus preparations processes from living and dead larva. *J. Econ. Entomol.* 71: 186~188.
- Im D.J., B.R. Jin, K.M. Choi, and S.K. Kong. 1990. Microbial control of the tobacco cutworm, *Spodoptera litura*(Fab.), using *S. litura* nuclear polyhedrosis virus. III. Field evaluation of the viral inseciticides. *Korean J. of Appl. Entomol.* 29: 252~256.
- Im D.J., B.S. Park, K.M. Choi, S.K. Kang and David K. Reed. 1989. Purification and Morphological Observation of a Nuclear Polyhedrosis Virus from the Tobacco Cutworm, *Spodoptera Litura*(Fab.). *Korean J. of Entomol.* 19: 69~77.
- Im D. J., K. M. Choi, M. H. Lee, B. R. Jin and S. K. Kang. 1989. In vitro Mass

- Production of *Spodoptera litura* nuclear polyhedrosis virus. Korean J. Appl. Entomol. 28: 82~87.
- Im, D.J., B. S. Park, B. R. Jin K. M. Choi and S.K. Kang. 1988. Pathogenicity of nuclear polyhedrosis virus isolated from the tobacco cutworm, *Spodoptera litura*. Korean. J. Appl. Entomol. 27: 219 ~ 224.
  - Jaques, R. P. 1977. Stability of entomopathogenic viruses. Misc. Publ. Entomol. Soc. Am. 10:99~116.
  - Jiang JieXian, Guang Wen Liang, Z. X. Jiang, and G. W. Liang. 1999. Efficacy of a nuclear polyhedrosis virus for control of an experimental population of *Spodoptera litura*. Natural Enemies of insects. 21: 13~17.
  - Kelly D. C., D. A. Brown, M. D. Ayres, C. J. Allen, and L. O. Walker, 1983. Properties of major nucleocapsid proteins of *Heliothis zea* singly enveloped nuclear polyhedrosis virus. J. Gen. Virol., 64: 339~348.
  - Kim, S. G., D. I. Kim, J. D. Park, H. G. Choi and Y. M. Yu. 2003. Pathogenicity of *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus with different temperatures. Korean. J. Appl. Entomol. 42: 159~163.
  - 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.
  - Knowles, D. A. 1998. Formulation of agrochemicals. pp. 44-45, In Chemistry and Technology of Agrochemical Formulations (ed. D. A. Knowles), Kluwer Academic Publishers, UK.
  - Kulkarni G.G. S.S.R. Kumar, P.S. Hugar and K.A. Kulkarni. 1999. Persistence of NPV against *Spodoptera litura* Fab. on strawberry in transitional tract of Karnataka. Annals of Agri. Bio. Res. 4: 45~47.
  - Kurstak E. 1982. In Microbial and Viral pesticides. pp. 335~507. Dekker. New York.
  - 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.
  - Li S.Y. and I.S. Otvos. 1999. Comparison of the activity enhancement of a baculovirus by optical brighteners against laboratory and field strains of *Choristoneura occidentalis*(Lepidoptera: Tortricidae). J. of Eco. Entomol. 92: 534~538.
  - Li S.Y. and I.S. Otvos. 1999. Optical brighteners enhance activity of a nuclear polyhedrosis virus against western spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae). J. of Eco. Entomol. 92: 335~339.
  - Li, S. Y. and I. S. Otvos. 1999b. Comparison of the activity enhancement of a baculovirus by optical brighteners laboratory and field strains of *Choristoneura occidentalis* (Lepidoptera: Tortricidae). J. Econ. Entomol. 92: 534-538.
  - Martignoni M.E. and P.C. Iawi. 1986. A catalog of viral diseases of insects, mites, ticks. 4th ed. Gen Tech. Rep. PNW-195. Portland. 51p.
  - Martinez, AM., O. Simon, T. Williams and P. Caballero. 2003. Effect of optical

- brighteners on the insecticidal activity of a nucleopolyhedrovirus in three instars of *Spodoptera frugiperda*. *Entomol. Exp. Appl.* 109:139–146.
- 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.
  - McGuire, M. R., P. Tamez-Guerra, R.W. Behle and D. A. Streett. 2001. Comparative field stability of selected entomopathogenic virus formulations. *J. Econ. Entomol.* 94: 1037–1044.
  - McLeod, P. J., W. C. Yearian and S. Y. Young. 1977. Inactivation of Baculovirus heliothis by ultraviolet irradiation, dew and temperature. *J. Invertebr. Pathol.* 30: 237 ~241.
  - Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* 31:426–428.
  - Moawad G. M., G. B. El-Saadany and S. Tantawy. 1992. Transmission of nuclear polyhedrosis virus to larval instars of the cotton leafworm *Spodoptera littoralis* Boisd. *Egyptian J. of Agri. Res.* 70: 87~96.
  - Mochida O. and T. Okada. 1974. A bibliography of *Spodoptera* spp.(Lepidoptera: Noctuidae). *Misc. Bull. Kyushu Nat. Agr. Expt. Sta.* 49: 1~110.
  - Mohan K. S., R. Asokan and C. Gopalakrishnan. 1996. Isolation and field application of a nuclear polyhedrosis virus for the control of the fruit borer, *Helicoverpa armigera*(Hubner) on tomato. *Pest management in Horti. Ecosy.* 2: 1~8.
  - Monobrullah, Md. 2003. Optical brighteners pathogenicity enhancers of entomopathogenic viruses. *Current Science* 84: 640–645.
  - Murugan K. and D. Jeyabalan. 1998. Neem enhances the activity of microbial pesticides. *Insect Environ.* 4: 3~4.
  - Murry D. A. H., C. J. Monsour, R. E. Teakle, K. P. Rynne and J. A. Bean. 1995. Interactions between nuclear polyhedrosis virus and three larval parasitoids of *Helicoverpa armigera* (Hubner)(Lepidoptera :Noctuidae). *J. of the Australian Entomol. Soc.* 34: 319~322.
  - Nasr E. S., M. A. Moussa and A. S. Hassan. 1960. Soil moisture in relation to pupation and moth emergence of the cotton leaf worm, *Prodenia litura* Fabricius. *Bull. Soc. Entom. Egypte.* XLIV: 377~382.
  - OECD. 1996. OECD Guidelines for Testing of Chemicals, No. 203, Fish, Acute Toxicity Test
  - Peng F., J. R. Fuxa, A. R. Richter, and S. J. Johnson. 1999. Effects of heat-sensitive agents, soil type, moisture, and leaf surface on persistence of *Anticarsia gemmatilis*(Lepidoptera : Noctuidae) nucleopolyhedrosis. *Environ. Entomol.* 28: 330~338.
  - Rabindra R. J., B. Rajasekaran and S. Jayaraj. 1997. Combined action of nuclear polyhedrosis virus and neem bitter against *Spodoptera litura* (Fabricius) larva. *J. of*

- Bio. Con. 11: 5~9.
- Rao G. V. Ranga., J. A. Wightman and D. V. Ranga Rao. 1989. Threshold temperatures and thermal requirements for the development of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environ. Entomol.* 18:548~551.
  - Santharam G. and S. Jayaraj. 1987. Effect of host plants and site of application on the infectivity of nuclear polyhedrosis virus to *Spodoptera litura* larva. *J. of Bio.Con.* 1: 39~43.
  - Santharam G. and S. Jayaraj. 1989. Studies on the transmission of nuclear polyhedrosis virus of *Spodoptera litura* (Fabricius) to its progenies. *J. of Bio. Con.* 3: 40~43.
  - Sarode S. V., Y. S. Jumade and S. L. Borkar. 1997. Efficacy of *Heliothis* nuclear polyhedrosis virus and neem seed kernel extract combinations against *Helicoverpa armigera* (Hb) on pigeonpea. *PKV Res. J.* 21: 227~229.
  - Sarode S. V., P. P. Patil and S. L. Borkar. 1995. Evaluation of neem seed kernel extract in combinations with *Heliothis* nuclear polyhedrosis virus against cotton bollworms. *J. of Entomol. Res.* 19: 219~222.
  - Schmutterer H. 1997. Side-Effects of neem (*Azadirachta indica*) products on insect pathogens and natural enemies of spider mites and insects. *J. Appl. Entomol.* 121: 121~128.
  - Shapiro M., L. Jacqueline, Robertson and R.E. Webb. 1994. Effect of Neem Seed Extract upon the Gypsy Moth(Lepidoptera: Lymantriidae) and Its Nuclear Polyhedrosis Virus. *Biological and Microbial Control.* 87: 356~360.
  - Shapiro, M., and R. A. Bell. 1982. Enhanced Effectiveness of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) Nucleopolyhedrosis Virus Formulated with Boric Acid. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 75: 346~349.
  - Shin H. Y., C. H. Kim, C. G. Park and Y. S. Lee. 1987. Biology of Tobacco Cutworm, *Spodoptera litura*(F.),(Lepidoptera: Noctuidae), 1. Seasonal Occurrence of Tobacco Cutworm in Southern Korea and Larval Development, Pupal Period, Adult Longevity and Oviposition on the Different Food Sources. *Res. Rept. RDA.* 29: 301~307.
  - Slininger, P. J., R. W. Behle, M. K. Jackson and D. A. Schisler. 2003. Discovery and development of biological agents to control crop pests. *Neotropical Entomology.* 183-195.
  - Smith R. P., S. P. Wraight, M. F. Tardif, M. J. Hasenstab and J. B. Simoon. 1976. Mass rearing of *Porthethia dispar* (L)(Lepidoptera: Lymantriidae) for in host production of nuclear polyhedrosis virus. *N.Y. Entomol. Soc.* 84: 212~213.
  - Sonalkar V. U., S. D. Deshmukh, U. S. Satpute and S. T. Ingle. 1998. Efficacy of nuclear polyhedrosis virus in combination with adjuvants against *Helicoverpa armigera* (HBN). *J. of Soils and Crops.* 8: 67~69.
  - Starr R, Hilton DJ SOCS. suppressors of cytokine signalling. *Int J Biochem Cell Biol.*

1998. 30:1081-1085.
- Sudhakar S., R. Varatharajan, and S. Mathavan. 1997. Simple method to purify polyheral inclusion bodies from Nosema(Microspora: Nosematidae) contamination. Entomon. 22: 89~93.
  - Tamez-Guerra, P., M. R. McGuire, R. W. Behle, J. J. Hamm, H. R. Sumner and B. S. Shasha. 2000. Sunlight persistence and rainfastness of spray-dried formulations of baculovirus isolated from *Anagrapha falcifera* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol. 93: 210-4218.
  - Tamez-Guerra, P., M. R. McGuire, R. W. Behle, B. S. Shasha and R. L. Pingel. 2002. Storage stability of *Anagrapha falcifera* nucleopolyhedrovirus in spray-dried formulations. J. Invertebr. Pathol. 79: 7-16.
  - Vasconcelos S. D., J. S. Cory, K. R. Wilson, S. M. Sait and R. S. Hails. 1996. Modified behavior in baculovirus infected lepidopteran larva and its impact on the spatial distribution of inoculum. Bio. Con. 7: 299~306.
  - Vilaplana L, O'Reilly DR. Functional interaction between *Cydia pomonella* granulovirus IAP proteins. Virus Res. 2003 Mar;92: 107-11.
  - Willink E., M. Y. Romero, V. M. Osoreo, J. C. Ramallo and M. Y. De-Romero. 1995. Baculovirus for the biological control of the maize worm. Avance-Agroindustrial. 16: 18~23.
  - Young S. Y. and W. C. Yearian. 1987. *Nabis roseipennis* adults(Hemiptera :Nabidae) as disseminators of nuclear polyhedrosis virus to *Anticarsia gemmatilis*(Lepidoptera: Noctuidae) larva. Environ. Entomol. 16:1330~1333.
  - Zhang G. Y., Z. X. Zhang, XiuLian Sun, G. Y. Zhang Z. X. Zhang and X. L. Sun. 1996. Evaluation of the application effectiveness of a new formulation of *Heliocoverpa* NPV insecticide - an emulsifiable suspension. Chinese J. of Bio. con. 12: 24~28.
  - 농촌진흥청 (2016) 농촌진흥청 고시 제2016-38호 「농약 및 원제의 등록기준」
  - 농촌진흥청 (2016) 농촌진흥청 고시 제2016-44호 「유기농업자재 공시 및 품질 인증 기준」
  - 국립농산물품질관리원 고시 제 2017-33호 (2017.06.03) “유기농업자재 공시 및 품질 인증 기준”.