

최 종
연구보고서

작물의 토양병 억제 및 생육촉진 효과를 지닌
미생물 펠렛팅 종자 개발

(주) 비 아 이 지

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “작물의 토양병 억제 및 생육촉진 효과를 지닌 미생물 펠렛
팅 종자 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005년 10 월 14 일

주관연구기관명 : (주)비아이지

총괄연구책임자 : 정 종 상

세부연구책임자 : 정 종 상

연 구 원 : 문 선 주

연 구 원 : 박 종 철

연 구 원 : 차 광 호

연 구 원 : 박 형 근

연 구 원 : 김 형 중

협동연구기관명 : 강 원 대 학 교

협동연구책임자 : 이 윤 수

연 구 원 : 김 명 조

연 구 원 : 정 희 선

요약문

I. 제 목

작물의 토양병 억제 및 생육촉진 효과를 지닌 미생물 펠렛팅 종자 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

농산물의 수입 개방화에 대응하여 국제 경쟁력을 갖춘 고품질, 고부가가치 농산물을 생산하기 위해서는 작물재배 환경을 적극적으로 조절할 수 있는 기술집약적 및 노동절약적 재배법 확립이 절실하게 요구되고 있다. 특히 종자 생산과 보급은 작물을 재배하는 농업의 기본이며 가장 기술집약적 농업이고 또한 가장 부가가치가 높은 부분이다. 농자재 산업 측면에서 농업 종사자의 고령화와 농업 생산 비용 상승으로 인한 가격 경쟁력을 상실한 국내 농업 분야에서는 한 번 파종만으로 농약 및 비료사용을 줄이며, 고품질의 농산물을 생산할 수 있는 미생물 종자 처리 기술은 어려운 농가 경제는 물론 국가 경제에 큰 기여를 할 수 있을 것으로 기대된다.

미생물 종자 처리에 의한 작물의 생장촉진과 병 방제는 화학 비료나 합성농약의 과다 사용으로 각종 부작용을 없애고, 생태계 보호와 환경농업을 실천하는 중요한 기술이다. 또한 육묘 후 이식재배를 기본으로 하는 채소재배에서는 묘 생산이 중요한 부분을 차지하고 있고 미생물에 의한 생장촉진 및 병억제는 전체적으로 생장소요일수를 단축시키거나 묘 소질 향상은 물론 상품성있는 농산물생산 크게 기여 할 수 있다. 최근들어 길항미생물을 식물체 근권에 선택적으로 적용하여 토양병해를 효율적으로 방제하기 위한 방법 중의 하나로 길항 미생물을 제제화 하여 종자 pelleting에 적용하려는 시도가 이루어 지고 있으나 단순 coating 종자나, 혹은 액상, 분상 형태의 제제만을 토양에 처리하는 연구에 그치고 있어 처리방법이 복잡하고 환경에 따른 미생물 제제의 효과 발현이 떨어지는게 사실이다. 이에 대한 대안으로 유용미생물을 종자에 처리하는 미생물 pelleting 종자 개발이 절실히 요구되고 있다. 미생물 pelleting 종자는 농민들이 사용하기에 대단히 편리한 이점이 있으며, 또한 농약과 비료의 사용을 줄일 수 있으므로 생산 비용 절감에 의한 가격 경쟁력을 제고시킬 수 있을 것으로 기대된다.

따라서 본 연구에서는 작물의 생육촉진 및 길항력이 뛰어난 *Pseudomonas fluorescens*와 *Bacillus* sp.를 선발하여 안정적 제제화 형태로 종자에 처리함으로써 토양병해 예방 및 작물생장을 촉진할 수 있는 미생물 pelleting 종자를 개발하고자 본 연구를 수행하였다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 작물의 토양병 억제 및 생육촉진 효과를 지닌 미생물 펠레팅 종자 개발에 관한 연구이다. 이를 위하여 토양에 존재하는 주요 작물의 성장 촉진과 유해 병원균에 대한 길항력을 갖는 유용 미생물 자원을 확보하고 균주의 대량 배양공정 연구를 통하여 산업화 기틀을 마련하고 제제화 연구를 통한 주요작물의 종자에 펠레팅화를 통해 실제 농민 입장에서 작물 재배시 효과적인 토양병억제 및 생육촉진 효과를 지닌 펠레팅종자 개발연구를 수행하였다.

제 1 세부 과제는 유용 미생물의 선발 및 동정으로 토양에 서식하는 미생물중 길항력과 성장촉진 효과가 있는 *Bacillus sp.* BIG21003(이하 BIG21003)과 *Pseudomonas fluorescens* K95009(이하 K95009)을 선발하여 *in vivo*, *in vitro*에서 식물병원균에 대한 길항력과 각 작물별 종자 발아 및 성장촉진 효과를 조사하였다.

제 2 세부 과제는 배양 최적화 연구로 선발된 2가지 균주 BIG21003과 K95009에 대해 300L와 2500L 발효조에서의 배양 최적화를 수행하였다. 배양은 step by step 로 5L 플라스크에 seed를 배양하고 12hr 후에 300L에 접종하여 working volume 150L로 12hr 배양 후 2500L로 이송라인을 통해 transfer 하는 방법을 통해 발효를 수행하였다.

제 3세부 과제는 미생물 안정적 제제 개발로 종자 pelleting에 유용 미생물을 적용하기 위해서는 안정적인 제제화가 필수적이다. Pelleting 후에 유효미생물이 적정량 일정 기간 동안 보존되어야 약효를 발휘할 수 있다. 본 연구에서는 안정적 균의 생존율을 유지할 수 있는 미생물제제를 개발하기 위해 다양한 부형제 및 안정제를 사용하여 균주 안정화를 시도하였으며, spray dry, freeze dry 방법을 통해 powder 형태로 제조하고자 하였다.

제 4 세부 과제는 주요 작물의 생리적 특성 및 priming 조건 구명으로 본 연구에서는 종자 pelleting 전 priming 처리를 통해 pelleting 후 감소되는 발아율을 보완하고, 유용 미생물 제제가 포함된 pelleting 종자의 농가 실증시험시 실용적인 입모율 확보를 위해 각 작물별 priming 조건을 조사하였다.

제 5 세부 과제는 seed pelleting 기술 개발로 다양한 접촉물질을 농도별 혹은 상호 조합(1:1)을 통하여 발아에 안정한 접촉물질을 선발하였다. 또한 제조후 수분흡수력, 경도등 물리적 특성을 조사하였으며 다양한 토양수분조건에서의 발아율을 조사하였다. 최종적으로 종자 발아에 안전한 피복물질과 접촉물질을 선발하여 종자 pelleting 에 적용하였다.

제 6세부 과제는 미생물 pelleting 종자 개발로 제 5세부 과제를 통해 확보한 종자 pelleting 기술 즉, 발아 지연이나 생육 불균형등의 부작용 없는 종자 pelleting

기술을 바탕으로 여기에 길항 미생물을 안정적으로 투입 적용함으로써 미생물 pelleting 종자를 완성하였다. 각각의 특성이 있는 2가지 균을 pelleting 종자에 적용함으로써 단점을 보완하고 특성화시켰다. 다양한 토양 병원성균에 길항력이 있는 BIG21003을 먼저 코팅처리하고 길항력과 생장 촉진효과를 지닌 K95009를 나중에 코팅하여 마무리하는 미생물 pelleting 종자를 만들었다.

제 7 세부 과제는 미생물 pelleting 종자의 길항력 검증으로 성공적인 생물학적 방제효과를 위해서는 근권부위의 여러 이화학적, 생물학적 환경에 순응할 수 있는 길항균의 확보가 관건이 되며 우선적으로 길항균의 식물체 부위(토양병해의 경우 근권)에서 생존 증식여부가 조사되어야 한다. spray dry를 통해 제조된 BIG21003 technical powder와 freeze dry를 통해 제조된 K95009를 pelleting 공정방법 및 순서에 의한 다양한 변형처리를 통해 기간에 따른 생존율을 조사하였으며, 근권부위별 균정착밀도를 조사하였다. 또한 in vitro상에서 토양병원균에 대한 길항력을 조사하였다.

제 8세부 과제는 농가 실증 포장실험으로 미생물 pelleting 종자를 이용한 농가 실증실험은 경기도 양평군 지제면, 경북 김천시 남면, 경기도 용인시 백암면, 전북 정읍시 산외면, 경남 함양군 함양읍 포장등을 이용하였다. 미생물 pelleting 종자의 온실에서의 초기 발아율, 유묘초기 생육촉진정도 및 field 에서의 상추와 양파의 생육촉진 및 토양병 억제 실험을 수행하였다.

제 9세부 과제는 siderophore 외에 *Pseudomonas fluorescens* K95009가 생산하는 또 촉진물질을 찾기 위하여 활성 분획을 1, 2차 column chromatography 작업을 수행하여 가장 활성이 우수한 분획을 얻어 HPLC, EI-MS, GC-MS, ¹H-, ¹³C-NMR, RI 등의 분석작업을 수행하였다.

GC-MS결과 동정된 물질은 1,2-Benzenedicarboxylic acid, Butyl 2-methylpropyl ester, phthalic acid, butyl isobutyl로 확인 할 수 있었지만, 전체적으로 분석결과를 종합하여보면 활성물질은 불안정한 면이 많아 일관된 실험결과를 얻을 수 없었고 정확한 물질구조를 규명하기는 힘들었다. 추후 정밀한 분석작업이 필요할 것으로 생각된다.

제 10세부 과제는 시제품 개발로 본 연구에서는 미세종자이면서 부정형의 종자이기 때문에 과종시 애로가 많은 상추와 양파종자를 pelleting 실험의 재료로 이용하였으며 개발된 pelleting 기술을 적용하여 대용량의 pelleting 종자를 제조하여 산업화 단계의 실험을 수행하였다. 또한 본 연구에서 선발된 토양병 억제 길항균과 작물 생장촉진 균의 투입에 따른 pelleting 종자의 활력을 극대화 하고 유용미생물의 효과적인 발현을 위한 실용적인 미생물 pelleting 종자를 개발하였으며 포장실험을 거쳐 □□BioCaps□□로 시제품이 완성 되었다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 길항력과 작물생육촉진 효과가 있는 BIG21003과 K95009를 선발하여 산업용 규모의 배양 최적화를 확립하였다. 두 균주 모두 modified fed batch culture 방식으로 최대세포성장을 유도하였으며, BIG21003은 안정적으로 포자로 전환되었고, K95009는 siderophore를 생성하였다.
2. 본 연구를 통해 선발된 *Pseudomonas fluorescens* K95009는 hydroxamate type의 siderophores(pseudobactin or pyoverdin)를 분비함으로써 토양내의 철원소와 상호 결합에서 우위를 확보함으로써 병원균의 성장억제 및 작물의 근권생장(PGPR) 능력을 높여주거나, 항생물질을 생산함으로써 병원균이 저해 또는 사멸되거나, 식물체 합성저항성 (systemic resistance)을 유도하여 병원균의 감염으로부터 식물을 보호하여 간접적으로 식물 생육을 촉진할 수 있을 것으로 생각된다.
3. 두 균주에 대해 종자코팅에 적용하기 위한 formulation을 수행하였으며, 확립된 종자코팅 공정에 균주를 단계적으로 코팅종자에 적용함으로써 작물병 억제와 생육촉진 효과를 갖는 미생물 펠릿종자 “바이오캡스(BioCaps)”를 완성하였다.
4. 작물생장에 직접적인 생육촉진 효과를 지닌 물질을 동정하고자 물질분리를 시도하였다. 생육촉진효과를 보이는 candidate를 선발하여 구조 동정 및 특성을 조사하고 있다.
5. 농업의 세분화 추세에 비추어 농작업도 파종 및 육묘, 재배, 수확 후 품질 관리, 유통등의 세분화가 이루어지고 있는 시점에서 향후 파종 및 육묘분야에서의 대형 육묘장 위주의 위탁 파종 및 육묘가 진행될 것으로 예상되며 종자 pelleting에 의한 산업화가 가시화 될 것으로 기대된다.

SUMMARY

To isolate the beneficial microorganisms that can promote vegetable growth and suppress soil borne disease, different fields were surveyed intensively where potato and chinese cabbage have been cultivated. Total 233 bacterial strains were isolated from different rhizosphere.

Pseudomonas fluorescens are known to inhibit plant pathogenic fungi in the sugar beet rhizosphere. Production of secondary metabolites, e.g., antibiotics, Fe-chelating siderophores, and cyanide, is most often associated with fungal suppression by *Pseudomonas fluorescens* in the rhizosphere of sugar beets. moreover *Pseudomonas fluorescens* includes strains able to promote plant growth and suppress plant pathogens through a production of 2,4-diacetylphloroglucinol(Phl) and phenazine.

Microbes are applied to perform specific functions which benefit plant productivity. Including biological nitrogen fixation, phosphate solubilization, plant growth promotion and biological of pathogens. With increased public awareness of the potential environmental and health hazards of chemicals and advances in biotechnology to improve the performance of microorganisms to seeds may become more popular.

The practice of applying beneficial microorganisms to seeds has not, however, always been very popular. firstly because chemical treatments have been used so successfully and secondly because of the inconsistent performance of many microbial products. Often the inconsistent performances can be traced to inappropriate formulations.

The most important criterion of success in formulating microbes is the ability to deliver a critical number of viable microorganisms consistently. How many microbes need to be delivered depends on the biological activity of the microbes, the size of the seeds and their spacing when planted.

Dry powder and dry granules are most successfully produced with spore-forming microbes. Drying processes such as spray-dry, freeze-dry or air-dry(with or without the use of a fluidized bed) are used. Additional cost is usually incurred by the drying processes, although there could be savings in transportation costs. Certain protectants such as skimmed milk and gelatin are sometimes included to increase microbial yield and stabilize the products.

Formulated microbes can be treated with seed. For example seed coating,

seed pelleting and mixed with the seed at planting.

Pelleting of seed is the best performed with a formulation containing dormant microbes since desiccation and substances present on the seed coat are deleterious to metabolically active microbes upon prolonged exposure.

Formulations that contain a high moisture level are not desirable since the moisture may swell the seed coat, weaken the physical strength of the seed and trigger premature seed germination. By engineering additional biological activities into the inoculant strains, the use of microbial inoculants as seed treatments may expand beyond its present scope and help develop new marks in agriculture.

Double pelleting is a process designed to alter the timing of microbial activity on *Pseudomonas fluorescens* treated seeds to favour the bioprotectant. This process consists of a slurry coating of *Pseudomonas fluorescens* applied to the seed.

This study was conducted to screen the antagonistic bacteria which inhibit the growth of plant pathogen and promote the growth of plant. We isolated an effective bacterial strains and investigated into the antifungal activity of the antagonistic microorganism and its identification. 6 bacterial strains which strongly inhibited *Pyricularia grisea*, *Phythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Mycosphaerella melons*, *Phytophthora capsici*, *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum* and the best antagonistic bacterial strain designated as BIG21003, was selected. The antagonistic strain BIG21003 was identified to be the genus *Bacillus* sp. based on the morphological and biochemical characterization.

Pelleting seed with K95009 strain was planted in 5 different areas. we investigate the effect of microbial product on microorganisms in soil and the growth of leaf lettuce and onion. The results were summarized as follows : Among application of microorganisms treatments by pelleting including K95009 strain was effective considering growth of leaf lettuce and onion as compared control plot. specially soil drenching treatments shows the most significant.

The change of microorganisms number in soil for cultivation of leaf lettuce and onion was a little decreased with pelleting seed including microorganisms treatment plot as compared with soil drenching.

In this study we tried to employ PGPR isolates for plant growth instead of

chemical pesticides to enhance the seed vigor as well as to produce healthy stands and growth promotion.

Key Words : PGPR, *Pseudomonas fluorescens*, Soil borne diseases, Pelleting seed.

Contents

Chapter 1. Synopsis research development Project -----	15
Chapter 2. The present status of domestic and international technology development -----	24
Chapter 3. Scope of the research and results -----	27
Section 1. The selection of an usefulness microorganism, screening and identification -----	27
1. The selection of beneficial microorganism -----	27
2. Effect of plant promote by beneficial microorganism -----	33
3. Identification of beneficial microorganism -----	38
4. Activity assay of beneficial microorganism -----	44
Section 2. Research of optimization medium and formulation -----	52
1. Research of optmization condition in small fermentor -----	53
2. Research of optmization condition in large fermentor -----	67
Section 3. The formulation for stable survival of microorganism ---	76
1. Stability of <i>Bacillus</i> sp. BIG21003 -----	76
2. Stability of <i>Pseudomonas fluorescens</i> K95009 -----	79
Section 4. Study of physiological characteristic for crops -----	83
1. Study of priming material for seed vitality in the major crops ---	83
Section 5. Development of seed pelleting technique -----	100
1. Screening of adhesive and covering material for seed pelleting ----	100
2. Development of seed pelleting technique -----	107
Section 6. Effect of plant growth promotion by microbial pelleting seed -----	121
1. Manufacture of microbial pelleting seed -----	121
2. Effect of plant growth promotion -----	124
Section 7. Suppression effect of soil borne disease by microbial pelleting seed -----	130
1. Examination of bacterial survivality about microbial pelleting seed -	130
2. Root colonizing ability of antagonists -----	138
Section 8. Fild test -----	144
1. Plant growth enhancement by microbial pelleting seed -----	144
2. Suppression of soil borne diseases -----	155
Section 9. Identification of plant growth promotion material -----	167
Section 10. Products of test product -----	192
Chapter 4. Achievment scope and contribution to the Related	

Fields -----	198
Chapter 5. Applications of the study -----	200
Chapter 6. Informations from other institutes -----	201
References -----	206

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 -----	15
제 2 장 국내외 기술개발 현황 -----	24
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과 -----	27
1절 유용 미생물의 선발 -----	27
1. 유용 미생물의 선발에 따른 길항성 검정 -----	27
가. 서언 -----	27
나. 재료 및 방법 -----	27
1) 1차 유용 미생물의 선발 및 길항성 검정 -----	27
2) 2차 유용 미생물의 선발 및 길항성 검정 -----	28
다. 결과 및 고찰 -----	30
1) 1차 유용 미생물의 선발 및 길항성 검정 -----	30
2) 2차 유용 미생물의 선발 및 길항성 검정 -----	32
2. 유용 미생물의 작물생장촉진효과 검정 -----	33
가. 재료 및 방법 -----	33
1) 발아촉진 효과 검정 -----	33
2) 작물 생장촉진 효과 검정 -----	34
나. 결과 및 고찰 -----	34
1) 발아촉진 효과 -----	34
2) 작물 생장촉진 효과 -----	36
3. 유용 미생물의 동정 -----	38
가. 재료 및 방법 -----	38
나. 결과 및 고찰 -----	38
4. <i>Pseudomonas fluorescens</i> 가 생산하는 siderophore의 특성 ---	44
1) 재료 및 방법 -----	44
2) 결과 및 고찰 -----	47
2절 배지 최적화 및 제제화 연구 -----	52
1. 소용량 발효조에서의 최적화 연구 -----	52
가. 재료 및 방법 -----	52
1) 당농도의 분석 -----	52
2) 균체농도 측정 -----	52
3) 생균수 측정 -----	52
4) 플라스크 최적 배양 조건 -----	52
5) 소용량 발효조(5L) 에서의 최적화 연구 -----	53
6) siderophore 생성량 측정 -----	53
나. 결과 및 고찰 -----	54
1) 플라스크 배양을 통한 배양 최적화 -----	54
가) 길항세균의 탄소원 조사 -----	54
나) 길항세균의 질소원 조사 -----	55
다) 길항세균의 미량 원소에 대한 영향 -----	56
라) 탄소원 농도 변화에 따른 실험 -----	57
마) 질소원 농도 변화에 따른 실험 -----	58

바) 길항 세균의 pH에 따른 실험 -----	59
사) 길항 세균의 온도에 따른 실험-----	60
아) 플라스크 조건에서 최대성장 배지 조성-----	62
자) siderophore 생성 배지 조성 탐색-----	63
차) siderophore 최대 생성배지 조건-----	65
2) 5L 발효조 배양공정의 최적화 -----	66
2. 대용량 발효조에서의 최적화 연구 -----	67
가. <i>Bacillus</i> sp. BIG21003의 300L 및 2500L 발효조 최적화 연구	67
1) 재료 및 방법 -----	67
가) 공시균주 및 보존 -----	67
나) 균체농도 측정 -----	68
다) 포도당 농도 측정 -----	68
라) 300L 및 2500L 발효조에서의 최적화 연구 -----	68
2) 결과 및 고찰 -----	68
가) 300 liter modified fed-batch culture공정 -----	68
나) 2500 liter modified fed-batch culture공정 -----	69
나. <i>Pseudomonas fluorescens</i> K95009의 300L 및 2500L 발효조 최적화 연구 -----	71
1) 재료 및 방법 -----	71
2) 결과 및 고찰 -----	71
가) 대용량 발효조(300L)의 대량생산 공정 연구 -----	71
나) 대용량 발효조(2500L)의 대량생산 공정 연구 -----	73
3절 미생물 안정적 제제 개발 -----	76
1. <i>Bacillus</i> sp. BIG21003 균의 안정화 -----	76
가. 재료 및 방법 -----	76
1) Spray dry -----	76
2) Freeze dry -----	76
3) 경시 변화 -----	76
나. 결과 및 고찰 -----	76
2. <i>Pseudomonas fluorescens</i> K95009 균의 안정화 -----	79
가. 재료 및 방법 -----	79
나. 결과 및 고찰 -----	79
1) Freeze dry 방법을 통한 세포 안정화 -----	79
2) 흡착(adsorption)을 이용한 세포 안정화 -----	81
4절 주요 작물의 생리적 특성에 관한 연구 -----	83
1. 주요작물의 priming 조건 구명 -----	83
가. 공시재료 및 조사방법 -----	83
나. 결과 및 고찰 -----	84
1) 더덕 -----	94
2) 상추 -----	86
3) 양파 -----	90
4) 당근 -----	93

5) 담배 -----	96
5절 Seed pelleting 기술 개발 -----	100
1. Seed pelleting 성형 물질 선발 -----	100
가. 서언 -----	100
나. 재료 및 방법 -----	100
1) Seed pelleting 물질 선발 -----	100
가) 접착물질 선발 -----	100
나) 피복물질 선발 -----	101
2) 발아율 조사방법 -----	101
가) 접착물질 선발에 따른 발아율 -----	101
나) 피복물질 선발에 따른 발아율 -----	101
다. 결과 및 고찰 -----	102
1) 펠렛 피복·접착물질이 발아에 미치는 영향 -----	102
가) 접착물질이 발아에 미치는 영향 -----	102
나) 피복물질이 발아에 미치는 영향 -----	105
2. Seed pelleting 기술 개발 -----	107
가. 재료 및 방법 -----	107
1) 접착물질 slurry액의 제조 -----	107
2) 피복물질 powder의 제제화 -----	108
3) Pelleting 종자 제조 -----	108
4) Pelleting 종자의 물리적 특성 조사 -----	108
가) 피복재료에 따른 물리성 특성 -----	108
나) 수분흡수력 측정 -----	108
5) Pelleting 종자의 발아율 -----	108
가) 피복물질조합에 따른 발아율 -----	108
나) 토양함수량에 따른 발아율 -----	109
6) Pelleting 종자 제조시 온도의 영향 -----	109
나. 결과 및 고찰 -----	110
1) Pelleting 종자의 제조 -----	110
2) Pelleting 종자의 발아율 -----	111
가) 토양함수율에 따른 발아율 -----	111
3) Pelleting 종자의 물리적 특성 -----	112
가) 피복재료에 따른 경도 및 균일도 -----	115
나) 수분흡수력 -----	118
4) Pelleting 종자 제조시 온도의 영향 -----	120
6절 미생물 pelleting 종자의 성장촉진 활성 검정 -----	121
1. 미생물 pelleting 종자의 제조 -----	121
가 재료 및 방법 -----	121
1) 미생물 제제화 -----	121
2) 미생물 pelleting 종자 제조 -----	121
3) 미생물 pelleting 종자 활력 검정 -----	122
4) Priming 처리된 미생물 pelleting 종자의 활력검정 -----	122
나. 결과 및 고찰 -----	122

1) 미생물 pelleting 종자의 활력검정 -----	122
2) Priming 처리된 미생물 pelleting 종자의 활력 검정 -----	124
2. 생육촉진 효과 검정 -----	126
가. 재료 및 방법 -----	126
나. 결과 및 고찰 -----	126
7절 미생물 pelleting 종자의 길항력 검정 -----	130
1. 미생물 종자 처리에 따른 균 생존력 검정 -----	130
가. 재료 및 방법 -----	130
1) Pelleting 성형물질을 이용한 미생물 coating처리 -----	130
2) 미생물 pelleting 종자의 안정적 균 활력 유지 기술 -----	131
나. 결과 및 고찰 -----	131
1) Pelleting 성형물질을 이용한 미생물 coating -----	131
2) 미생물 pelleting 종자의 안정적 균 활력 유지 기술 -----	135
2. 미생물 pelleting 종자의 근권정착능력 -----	138
가. 재료 및 방법 -----	138
1) 공시 재료 -----	138
2) 재배 기간에 따른 밀도변화 -----	138
3) 근권정착능력 검정 -----	138
4) 병억제 효과 -----	139
나. 결과 및 고찰 -----	139
1) 균의 접종후 기간경과에 따른 밀도변화 -----	139
2) 근권 정착능력 -----	140
3) 병억제 효과 -----	141
8절 농가 실증 포장실험 -----	144
1. 작물 생육촉진 효과 -----	144
가. 서언 -----	144
나. 재료 및 방법 -----	144
1) 공시재료 -----	144
2) 포장 선정 및 정리 -----	144
다. 결과 및 고찰 -----	147
1) 초기 발아율 비교 -----	147
2) 온실 생육 비교 -----	147
3) 지역별 농가 실증 시험 -----	149
가) 실험포장의 물리·화학적 성질 -----	149
나) 포장 실험 기간 기상 변화 -----	150
다) 상추 지역별 field 생육촉진 효과 검증 -----	151
라) 양파 지역별 field 생육촉진 효과 검증 -----	155
2. 토양병 억제 효과 -----	155
가. 재료 및 방법 -----	161
1) 길항미생물 pelleting 종자의 경시적 활력 조사 -----	161
2) 모잘록병 억제 효과 -----	161
나. 결과 및 고찰 -----	161
1) 길항미생물 pelleting 종자의 경시적 활력 변화 -----	161

2) 모질록병 억제 효과 -----	162
9절 성장촉진 물질의 성분 분석 및 구명 -----	167
1. 성장촉진 물질의 성분 분석 및 구명 -----	167
가. 재료 및 방법 -----	167
1) 공시균주 -----	167
2) 기기 및 시약 -----	167
3) 배지와 상등액 간의 HPLC 분석 -----	167
4) 추출 및 분획 -----	168
가) Pellet과 suspension의 추출 -----	168
나) 극성에 따른 순차적 용매 분석 -----	168
다) 분획층별 발아율 검사 -----	168
라) Column chromatography에 의한 생리활성 물질 분리 및 정제 -----	169
5) Crystal 분석 -----	170
가) crystal을 이용한 종자의 발아율 조사 -----	170
나) RI 분석 -----	170
다) 당 가수분해 -----	170
나. 결과 및 고찰 -----	170
1) 분획층별 발아율 검사 -----	170
2) 배지와 상등액간의 함량 비교 -----	177
3) 추출 및 분획에 따른 분획층별 함량 비교 -----	177
4) Amberlite XAD-2 resin column chromatography -----	179
5) Thin Layer Chromatography -----	180
6) Silicagel column chromatography -----	180
7) Mass 및 NMR 분석 -----	182
8) Crystal을 이용한 성장촉진 실험 -----	186
9) RI 분석 -----	190
10) 당 추정 분석 -----	191
10절 시제품 개발 -----	192
1. 서언 -----	192
2. 시제품 제조 -----	192
가. 재료 및 방법 -----	192
나. 결과 및 고찰 -----	193
1) 상추 미생물 pelleting 종자 제조 -----	193
2) 양파 미생물 pelleting 종자 제조 -----	194
3. 미생물 pelleting 종자 시제품 완성 -----	195
가. Pelleting 종자와 나종자 비교 -----	195
나. 시제품 BioCaps 생산 -----	196
제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	198
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 -----	200
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학 기술정보 -----	201
Reference-----	206

1장 연구개발과제의 개요

본 연구의 목적은 유용미생물 자원의 확보와 유용미생물의 특성 및 작물에 대한 작용기작의 학술적 구명 그리고 이들 균주의 배양 공정 연구를 통하여 산업화의 기틀을 마련하고 제제화 연구를 통한 주요작물의 pelleting 종자를 이용한 파종의 기계화를 이룩하여 실제 수요자인 농민들의 노동력 절감과 종자의 손실을 줄여 안전하고 무해한 농산물을 소비자에게 공급할 수 있도록 하는 것이다.

1. 유용 미생물의 선발 및 동정

토양에 서식하는 미생물중 길항력과 성장촉진 효과가 있는 *Bacillus* sp. BIG21003(이하 BIG21003)과 *Pseudomonas fluorescens* K95009(이하 K95009)을 선발하여 in vivo, in vitro에서 식물병원균에 대한 길항력과 작물 발아 및 성장 촉진 효과를 조사하였다. BIG21003은 *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Alternaria solani*, *Pythium ultimum* 모두에 길항력이 있었으며, 4가지 배지에서 *Aphanomyces raphani*에 모두 길항력을 나타내었던 K95009 균을 *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Alternaria solani*, *Phytophthora capsici*, *Pythium ultimum*, *Fusarium oxysporum*에 대치배양하여 길항력을 검정한 결과 *Pythium ultimum*, *Fusarium oxysporum* 병원균에 대하여 매우 뚜렷한 길항능력을 보여주었다. 선발된 2가지 균주에 대해 종자 발아와 작물 성장 촉진에 관한 실험을 수행한 결과 K95009에서 일부 작물에 대해 뚜렷한 성장 촉진 효과를 나타내었다. K95009는 일반적으로 *Pseudomonas fluorescens* 가 나타내는 형광을 나타냈으며 CAS assay 등의 방법을 통해 siderophore 생성 균임을 확인되었다. 생성되는 siderophore는 Fe 분자에 대한 강력한 리간드로 작용하여 토양 중의 극미량의 Fe 을 흡착하여 다른 병원균이 사용하지 못하고 오직 *Pseudomonas* sp.만 사용할 수 있는 형태로 receptor를 통해 받아 들여 생장에 이용한다. 따라서, 생장에 필수적인 아주 수용성 낮은 철에 대해 병원균과 경쟁적 경합에서 우위를 선점함으로써 토양 및 뿌리 근권에서 병원균으로부터 식물을 보호하는 효과를 나타낸다.

2. 배양 최적화 연구

선발된 2가지 균주 BIG21003과 K95009에 대해 300L와 2500L 발효조에서의 배양 최적화를 수행하였다. BIG21003의 경우 glucose 와 yeast extract를 주요배지를 사용하여 modified fed-batch culture 방식으로 glucose가 소모되는 시점에 feeding 하는 방법을 사용하였다. 최고 OD(600nm) 88까지 세포농도를 높일 수

있었고 안정적으로 spore 를 유도할 수 있었다. 2500L의 경우 세포가 성장을 멈추고 완전히 spore로 전환되는데 걸리는 시간은 약 40시간이 소요되었다. 주 영양원인 glucose가 완전히 고갈된 약 8시간 후부터 spore로 전환을 시작하여 배양 40시간 후 거의 완전히 전환됨을 확인 할 수 있었다. 이때 사용한 배지조성은 glucose 2%, MgSO₄ 0.1%, yeast extract 3.3%, K₂HPO₄ 0.1%, (NH₄)SO₄ 0.4%, CaCl₂ 0.01%, MnSO₄ 0.007%를 start 배지로하여 glucose 가 소진되는 시점에 glucose 20g/L 으로 2회 feeding 하는 방식으로 배양하였다. 배양은 step by step 으로 5L 플라스크에 seed를 배양하고 12hr 후에 300L에 접종하여 working volume 150L로 12hr 배양 후 2500L로 이송라인을 통해 transfer 하는 방법을 통해 발효를 수행하였다. K95009 같은 *Pseudomonas fluorescens* 균의 경우는 일반배지에서도 잘 자라지만 King's B 배지(이하 KB 배지)하에서 siderophore를 생성하면서 자란다. 일반적으로 siderophore 생성배지로 탈철화된 KB 배지를 사용하여 철이 없거나 극소량 존재하는 medium 상태를 만들어 생성을 유도한다. 이외에도 siderophore 생성을 위한 변형된 배지로 다양한 배지 조건들이 검토된 바 있으나 산업용 규모의 생산성을 지닌 배지 조성은 아니었다. 일례로 KB배지를 산업용 생산배지로 사용한다는 것은 배지 가격이 비싸 비경제적이며, 지금까지 보고된 자료에 의한 기타 변형된 siderophore 생산배지 조성으로는 산업단계까지 생산성이 나오질 않았다. 따라서, 저렴한 배지 조건에서 산업화에 적합한 세포의 최대 성장을 유도하면서 siderophore 을 생성할 수 있는 배양 조건을 확립하였다. 플라스크 배양을 통해 다양한 탄소원과 질소원에 대한 이용을 검토하여 glucose과 yeast를 1차로 배양배지로 선발하였으나 세포 성장은 좋으나 siderophore를 생성하지는 못하였다. siderophore 의 생성은 탄소원의 종류, 탄소원과 질소원의 비율, 무기염류의 종류, pH 등에 따라 생성유무와 생성량에 큰 차이를 보였다. 따라서, 탄소원은 glucose 대신에 glycerol, peptone 대신에 yeast extract를 주요 배지 성분으로하는 GLYE 3배지(glycerol 6%, yeast extract 3%, K₂SO₄ 1%, MgCl₂ 0.4%)를 siderophore 생산 기본 배지로 결정하였다. 이 선택 배지는 탈철화시키지 않는 조건에서 siderophore를 유도함으로 탈철화에 필요한 경비를 줄일 수 있어 산업화에 적합한 배지 조성이다. 5L 발효조에서 modified fed-batch culture 방식을 적용하여 glycerol이 소모되는 시점에 30g/L feeding 하여 최대 세포 성장을 유도하였다. siderophore 생성은 세포농도와 정비례하여 증가하지 않았으며, 배양 start 배지 조성에 의해 큰 영향을 받는 것으로 판단된다. 탄소원인 glycerol이 feeding 되어 세포농도가 증가하지만 비례적으로 siderophore 가 증가하지는 않았다. glycerol과 yeast extract의 경우 탄소원과 질소원의 비율이 1:1 보다는 2:1조건에서 더 많은 siderophore를 생성하는 것으로 조사되었다. BIG21003과 같이 300L와 2500L에서 최대의 세포성장을 OD(600nm) 80

이상 유도할 수 있었고, siderophore 생성도 유도할 수 있었다. 최대 성장 OD(600nm)에 도달하는 시간은 *Bacillus* sp.에 비해 조금 늦은 40시간 정도에, siderophore 생성은 발효 20~30 시간 후에 최대에 이르렀다. 결론적으로, 2가지 균주에 대해 산업용 생산에 적합한 경제적인 배지조성과 생산 공정을 마련하였다.

3. 미생물 안정적 제제 개발

종자 pelleting에 유용 미생물을 적용하기 위해서는 안정적인 제제화가 필수적이다. Pelleting 후에 유효미생물이 적정량 일정 기간 동안 보존되어야 약효를 발휘할 수 있다. 본 연구에서는 안정적 균의 생존율을 유지할 수 있는 미생물제제를 개발하기 위해 다양한 부형제 및 안정제를 사용하여 균주 안정화를 시도하였으며, spray dry, freeze dry 방법을 통해 powder 형태로 제조하고자 하였다.

발효가 완료되면 세포를 분리수거하는 정제과정이 필요하며, 이에 사용되는 산업용 원심분리 공정은 basket centrifuge, multi-chamber centrifuge, decanter centrifuge, disc bowl centrifuge, tubular-bowl centrifuge 등의 방식을 사용하고 있다. separator centrifuge 방식은 긴 원통형 회전 rotor 에 시료를 연속적으로 주입시켜 고형질은 rotor 내벽에 모이도록 하고 액상은 rotor 밖으로 나오도록 고안된 장비이다. 단위시간당 처리용량은 시료에 따라 조금은 차이가 있지만 대략 24L/hr이다. 단점은 rotor 내에 고형질이 쌓이면 이를 제거하기 위해 운전을 중단해야 한다. VMF는 membrane의 vibration을 이용하여 세포 등의 고형물과 상층액을 분리하는 방식으로 720L/hr의 처리 능력을 가지고 있어 매우 효율적인 장비이다. 2500L 발효 후 세포를 수거하기 위해 VMF방식인 poll sep. 400을 이용하여 세포를 수거하였다.

BIG21003은 spore를 형성하는 균주로 외부환경에 매우 강한 형질을 가지고 있어, 높은 열에 안정하므로 spray dry방법을 통해 제제화를 시도하였다. 기능성 고분자 및 다당류는 균주를 capsulation 시키고 열 스트레스를 최소화시킬 수 있어야 하고 균주 안정성이 우수하여야 한다. 따라서 skim-milk, arabic gum, soluble starch, 변성전분, 싸이클로 텍스트란, sucrose, maltose, galactose, trehalose 등을 이용하여 hot spray dry 과정 중의 발생하는 열에 안정성을 검토하여, 수율이 좋은 변성전분, 말토오즈, 갈락토오즈 등을 선발하였다. 동결건조와 달리 부형제 없이 분무건조하면 이것이 물에 잘 용해가 되지 않는다. 즉, 세포들이 덩어리 형태로 존재하여 서로 엉켜있어 물에 잘 풀리지 않는다. 따라서, 적당한 부형제의 선택은 매우 중요하다. galactose는 수분산성과 제조 수율이 좋아 적합한 부형제이며 또한, 여러 탄소원 중에서 galactose, arabinose 등은 세균

(*Bacillus* sp.)는 이용할 수 있으나, 토양 병원성 곰팡이는 이용할 수 없는 성분이다. 그러므로 *Bacillus* 균 자체에만 선택적 생상 및 근권 정착을 유도시킬 목적으로 첨가하면 일거양득의 효과를 기대할 수 있다. 변성전분인 suncap 또한 arabic gum이나 싸이클로 텍스트란 등의 대체 품목으로 개발되어 저렴하고 이용 가치가 높은 소재이다. 포집능력이 우수하고 냉수에 쉽게 용해되고 점도가 낮아 고농도의 용액 제조가 가능하여 분무공정에 적합한 물성을 갖추고 있다. 이와 같이 선정된 galactose와 suncap을 사용하여 pilot plant scale인 2500L 발효조에서 배양한 BIG21003를 VMF centrifuge 로 harvest 하여 spray dry 과정을 수행하여 technical powder을 얻었다.

gram(-)균주인 K95009는 spray dry 과정 중에 발생하는 고열에 견딜 수 있는 열 안정성을 부여하는 물질을 찾을 수 없었다. 따라서, 순간이지만 고열을 거쳐야 하는 spray dry 방법은 적합하지 않은 방법으로 판단되었다. 제조원가가 비싼 것이 단점이지만 동결건조 방법을 이용하여 어느 정도까지는 안정적 제제화가 가능하였다. 일반적으로 많이 사용하는 소재에서부터 폴리머, 당류까지 다양한 소재를 대상으로 검토한 결과 일반적으로 사용하고 있는 skim-milk에서 좋은 효과를 보였으며, skim-milk와 비교해서 말토오즈(maltose)와 물엿(millet jelly)이 더 나은 저장 안정성을 나타냈다. 이상의 결과를 검토하여 보면, *Pseudomonas fluorescens* 균을 동결건조 방법을 통해 적당한 부형제/안정제를 투입하여 안정성을 일정기간 동안 확보할 수는 있지만 동결건조를 해야 하는 비용부담을 안고 있다. 또한, 안정성이 확보되었다 하더라도 이것을 종자 펠렛팅 적용에는 여러 가지 문제점을 가지고 있다. 종자펠렛팅과정은 필연적으로 수분과 접촉해야 하는 몇 분 혹은 몇 시간의 공정과정과 건조과정이 있다. 이때 spore 형성균을 제외한 대부분의 cell 들은 큰 damage를 입게 된다. 따라서, 전처리 즉, 제제화가 잘 되었다 하더라도 pelleting과정이 동반되기 때문에 cell survival rate은 많이 떨어진다.

마지막으로 흡착을 통한 세포 안정화는 단순하면서 비용적인 면을 고려한다면 매우 경제적인 방법 중에 하나이다. 흡수능이 좋은 증량제를 선택 사용하여 세포를 안정화시키는 방법이다. 흡착제의 종류에 따라 배양액을 흡착하는 정도에는 많은 차이가 있지만 white carbon의 경우 1:1의 비율로 흡착할 정도로 흡착능이 좋다. 흡착 후 survival rate 를 조사한 결과 시간이 경과함에 따라 세포 수는 급격히 감소하였다. 따라서, 동결건조시 좋은 안정제인 물엿을 첨가하여 흡착해 보았으나 마찬가지로 세포 안정화에는 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 조사되었다. 따라서, 보다 분자생물학적인 접근이 필요할 것으로 판단되며 또한, 활성기작에 활성물질(active compound)이 관여한다면 이런 물질을 대량 생산 배양하는 방법으로 활성을 부여하는 것도 한 방법으로 검토되어야 할 것이다.

4. 주요 작물의 생리적 특성 및 priming 조건 구명

종자 priming이란 수분압이 조정된 용액에 종자를 일정한 기간동안 침지시켜 종자가 발아 할 수 있는 모든 조건을 인위적으로 갖추게 하는 기술로서 주로 무기염류를 이용하여 삼투압을 조절하거나 PEG같은 고분자 물질을 이용하여 수분압을 조절함으로써 발아율 혹은 발아세를 단축시키는 기술이다. 본 연구에서는 종자 Pelleting 전 priming처리를 통해 pelleting 후 감소되는 발아율을 보완하고, 유용 미생물 제제가 포함된 pellet 종자의 농가 실증시험시 실용적인 입모율확보를 위해 각 작물별 priming조건을 조사하였다.

실험 결과 더덕은 온도 20℃에서 GA₃ 처리구의 발아율이 97%로 가장 높았으며, 양과의 priming 처리물질로는 PEG-8000 -0.5MPa과 Ca(NO₃)₂ 200mM이 발아율 향상 및 MDG, T₅₀이 단축되었다.

상추는 KH₂PO₄ 50mM, GA₃ 500ppm, PEG-8000 -0.25MPa순으로 발아율이 높았으며, PEG-8000을 이용한 당근의 priming 실험에서는 Mussang-5-chon, Kounyurum당근은 PEG -0.50MPa에서 발아율, MDG, T₅₀이 가장 양호하였으며 Goldrich당근은 PEG -0.75MPa에서 발아율, MDG, T₅₀이 가장 양호하였다.

담배는 PEG-8000 0.50(-MPa)에서 발아율 향상및 발아세 단축에 효과적이었다.

5. Seed pelleting 기술 개발

종자 pelleting은 토양의 발아 미세환경을 개선시킬 수 있는 경제적인 종자처리법이다. 현재 우리나라의 농업은 급속한 산업화로 농촌의 노동력이 부족한 상태이고, 노동임금이 급격히 상승되고 있어 작물재배의 생력화가 절실히 요구된다. 또한 화학비료나 합성농약의 남용으로 염류집적 등 토양오염이 가속화 되고 있어 토양병방제 및 작물생장을 촉진할수 있는 다기능성 펠렛종자를 개발하였다. Pelleting 종자는 종자 표면에 피복물질을 투입하고 접착물질을 동시에 분무하여 종자주위에 피복물질을 피복시켜 크기를 증가시킨 것으로 pelleting 물질(피복물질+접착물질)의 물리 화학적 특성에 따라서 pelleting 종자 형태가 불균일 하거나 상품성이 없는 pellet 종자가 생산될 수 있으며 pelleting 종자 형태가 균일하더라도 발아를 저해하는 물질은 적합하지 않다. 또한 실용적으로 이용되기 위해서는 가격이 저렴하고 토양에 환경친화적이어야 하며 작업이 용이한 물질이어야 한다.

본 연구에서는 다양한 접착물질을 농도별 혹은 상호 조합(1:1)을 통하여 발아에 안정한 접착물질을 선발하였다. 또한 제조후 수분흡수력, 경도등 물리적 특성을 조사하였으며 다양한 토양수분조건에서의 발아율을 조사하였다. 최종적으로 종자 발아에 안전한 피복물질과 접착물질을 선발하여 유용 미생물 제제를 종자 pelleting에 적용하였다.

작물별 발아율에 미치는 영향이 접착물질에 따라 조금씩 다르게 나타났는데, 각 작물별 발아율이 가장 높았던 접착물질은 상추의 경우 AG, 양파와 당근은 PVA, 담배는 CMC, 더덕은 PVP였다. 결과적으로 사용된 접착물질중 PVA(polyvinyl alcohol)와 AG(arabic gum)은 각 작물에 모두 발아가 양호하였으며 Alginate, MC(methyl cellulose), HEC(hydroxyethyl cellulose) 접착물질은 발아율이 낮았다.

피복물질별 발아율을 조사한 결과 상추, 당근, 양파 담배는 Pyrophyllite+Illite+Diatomite의 피복물질 조합에서 발아율이 가장 높았으며, 더덕은 Ilite 단용처리에서 발아율이 가장 높았다. 피복물질 조합처리에 따른 발아율의 경우 더덕은 Illite > PID > PIB, 상추는 PID > PIT > BT, 당근은 PID > PIT > Diatomite, 양파는 PID > PIK > PIT, 담배는 PID > PIK > PIT 순으로 높았다. 본 실험을 통해 발아율을 감소시키지 않는 안정한 5개의 기본 피복물질 조합 Pyrophyllite+Illite+Diatomite, Pyrophyllite+Illite+Talc, Bentonite+Talc, Diatomite, Illite 를 최종선발하였다.

6. 미생물 pelleting 종자의 성장촉진 활력 검증

종자 pelleting에 길항력이 있는 미생물을 적용한 예는 Homma 등과 Kloepper 등이 무종자에 길항성 *Pseudomonas* spp. 를 코팅하여 모잘록병을 방제하였고, Leben 등도 *Pseudomonas fluorescens* strain M-4로 감자에 병원균 발병억제와 생육촉진효과를 보고하였다. Weller 등은 장기연작 포장의 밀뿌리에서 분리한 형광성 *Pseudomonas*를 종자에 코팅시켜 밀마름병 발생 토양에 파종 할 경우 발병이 감소되고, 수량이 증수되었다고 보고하였다. 본 과제를 통해 확보한 종자 pelleting 기술 즉, 발아 지연이나 생육 불균형등의 부작용 없는 종자 pelleting 기술을 바탕으로 여기에 길항 미생물을 안정적으로 투입 적용함으로써 미생물 pelleting 종자를 완성하였다. 각각의 특성이 있는 2가지 균을 pelleting 종자에 적용함으로써 단점을 보완하고 특성화시켰다. 다양한 토양 병원성균에 길항력이 있는 BIG21003을 먼저 코팅처리하고 길항력과 성장 촉진효과를 지닌 K95009를 나중에 코팅하여 마무리하는 미생물 pelleting 종자를 만들었다.

한편, 코팅 후 저장 안정성 실험 위해 BIG21003 coating처리는 증량제에 1~5% 정도로 미생물 원제를 투입하여 제조하여 미생물 농도를 10^8 c.f.u/g이상으로 유지하도록 하였다. BIG21003는 technical powder 형태로 제조되었으며, 포자 형성 균이라 코팅 후 장기간 균이 안전하게 생존되는 것으로 조사되었다. siderophore를 생성하는 K95009는 제제화를 통하여 균의 안정성을 확보하기가 현실적으로

곤란하였다. 따라서, 선행 연구에서 발효과정을 통해 활성물질인 siderophore 을 생성하는 pilot plant scale 의 발효 공정을 고안하였다. 종자 pelleting 시에 활성 물질이 많이 포함된 배양액을 첨가해 줌으로써 직접적인 길항력과 생육촉진효과를 얻고자 하였다. 상추, 더덕, 당근 등에 적용하여 실험한 결과 K95009 처리에서 생육촉진효과를 나타내는 것을 알 수 있었다. 넓은 의미의 작물생육촉진이란 작물 전체가 병에 걸리지 않고 잘 자라는 것을 말한다고 할 수 있고, 좁은 의미에서 보면 개개의 작물이 무처리에 비해 더 잘 자란다고 해석할 수 있을 것이다. 후자의 경우 siderophore 가 직접적인 생육촉진 즉, 성장을 촉진한다고 볼 수 있는 근거는 없으므로 siderophore 이외에 직접적인 성장을 촉진하는 다른 물질이 존재한다고 추측할 수도 있다. 따라서, 본 과제에서도 siderophore 이외에 성장을 촉진하는 물질을 찾고자 노력하였다(물질분리 참조).

7. 미생물 펠렛팅 종자의 길항력 검증

미생물 펠렛팅 종자 제조시 가장 중요한 부분 중의 하나가 사용한 미생물이 작물의 근권에서 얼마나 오랫동안 정착 할 수 있느냐에 달려있는데 지금까지의 여러 시험결과 미생물의 정착능력이 사용 후 시간이 경과할수록 감소하여 소기의 방제효과를 달성할 수 없는 경우가 많았다. 성공적인 생물학적 방제효과를 위해서는 근권부위의 여러 이화학적, 생물학적 환경에 순응할 수 있는 길항균의 확보가 관건이 되며 우선적으로 길항균의 식물체 부위(토양병해의 경우 근권)에서 생존 증식여부가 조사되어야 한다. spray dry를 통해 제조된 BIG21003 technical powder와 freeze dry를 통해 제조된 K95009를 종자 및 코팅 종자에 여러 가지 방법과 순서에 의해 처리하여 기간에 따른 생존율을 검사하였다. BIG21003 처리구에서는 장기간 저장 안정성이 확보되었으나 K95009 처리구에서는 시간이 경과함에 따라 생존율이 급격히 감소함을 알 수 있었다. 앞에서 언급했듯이 길항력이 지닌 K95009를 제제화하여 적정기간 유효 세포수를 유지할 수는 있으나 종자 pelleting 과정에서 damage 를 입기 때문에 활성물질을 과량 투입 pelleting 처리하여 효과를 기대하거나 다른 생물학적 접근 방법이 모색되어야 할 것으로 판단된다. 본 과제에서는 siderophore 생성 발효액을 투입 처리하여 소기의 목적을 달성하였다.

일반적으로 근권 정착능력이 우수한 토양미생물은 식물체의 지체부와 뿌리의 근단 부위에서 균의 밀도가 높고 중간 부위에는 밀도가 낮은 경향이 있는데 본 실험에서 BIG21003의 균 밀도가 같은 경향을 보이므로 근권 정착능력이 우수한 것으로 판단할 수 있다. *Rhizoctonia solani*에 의한 damping-off에 대한 길항력

을 검증하였는데 미생물 pelleting 종자 처리에서 발병 억제 효과를 입증 할 수 있었다.

8. 농가 실증 포장시험

미생물 pellet 종자를 이용한 농가실증시험은 Green house와 field시험으로 진행하였는데 온실하우스 실험은 경기도 양평 지체면 포장을 이용하였다. 노지 포장실험은 경북 김천시 남면, 경기도 용인시 백암면, 전북 정읍시 산외면, 경남 함양군 함양읍 포장을 이용하였다. 포장 면적은 각 150평이었고, N-P-K(4.2-6.0-6.0)과 석회 100kg, 퇴비 200kg을 포장에 작물 이식전 30일전 처리하고 경운 후 멀칭하여 포장으로 사용하였다.

본 연구에서는 in vitro 실험 결과 생육촉진효과가 있었던 K95009균 배양 (siderophore 대량 생성조건)하여 균주배양액을 관주처리 및 종자 pelleting에 적용하여 각 지역별 생육초기 작물 성장 촉진 효과를 조사하여 양과, 상추에서 성장 촉진 효과를 확인하였으며 그 결과 상추의 경우 엽수, 엽면적, 생체중은 SD+MPS와 MPS처리가 control 처리에 비해 모두 증가하였으며 증가 폭은 조사 항목에 따라 차이가 있었다. 뿌리의 건진성을 나타내는 T/R율은 MPS처리가 가장 낮아 뿌리의 발달에 가장 효과적인 것으로 생각된다. 2004년과 2005년 실험을 통해 미생물 pelleting 종자의 농가실용 가능성을 제시하였으며 MPS처리에 따른 성장촉진을 SD+MPS처리로 보완할 경우 보다 효율적인 미생물 pelleting 종자 활용이 가능할 것으로 생각된다.

양과도 상추와 유사한 결과를 나타냈는데 지역별로 초장 성장촉진이 높았던 곳은 경북 김천 남면으로 SD+MPS처리에서 136%의 성장촉진 효과가 있었으며, 구직경은 함양지역 SD+MPS처리에서 control 대비 117%로 가장 높은 성장촉진효과가 나타났으며 MPS처리는 평균 105%의 구직경의 성장촉진효과를 나타냈다.

한편 지역별 평균 모잘록병 이병율을 각 처리에 따라 비교해 본 결과 미생물 pelleting 종자처리의 경우 35.5%의 이병율을 나타냈으며, SD+MPS처리를 통하여 이병율을 21.6%로 낮출 수 있었으며 미생물 pelleting 종자의 보완 방법으로 토양관주를 병행 한다면 농가에서 보다 실용적으로 사용 할 수 있을 것으로 생각된다.

9. 성장촉진 물질의 성분 분석 및 성분 구명

일반적으로 *pseudomonas fluorescens*가 분비하는 물질은 식물의 근권생장을 도와주는 siderophore로 알려져 있다.

이에 여러 지역의 고추, 토마토, 배추, 감자를 재배한 토양으로부터 총 500 개의 균주를 분리하였다. 여러 개의 isolates 중 병원균에 대한 길항성과 식물의 생장 촉진에 효과를 가진 균주를 선발하고자 하였으나, 그러한 균주를 선발할 수 없었다. 그 중 생장촉진에만 효과적인 K95009를 선발하였고, 길항성 균으로써 *Bacillus* sp. BIG21003를 선발하였다.

물질분석에서 *Pseudomonas fluorescens* K95009 배양액을 가지고 활성물질을 분리하고자 노력하였으나, 활성물질이 극소량으로 분리에 어려움이 있었으며, 물질이 불안정하여 쉽게 확인하기 어려워 실험단계 별 일관된 실험결과를 도출할 수 없었다.

2장 국내 · 외 기술개발 현황

미생물을 이용한 병해를 줄이는 방법은 길항(항생·항균)·경쟁·기생·저항성 유도·공생·간섭등으로 나뉜다. 지상부 병해 방제에 이용되는 엽면 미생물의 에너지원은 탄수화물과 아미노산·유기산·당알콜·미네랄·비타민 및 호르몬류·테스벤노이드 등이 있다. 이들은 미생물의 에너지원이기도 하고 항생물질의 생산에 간접적인 영향을 미치기도 한다. 살포한 살균제·살충제 등 농약과 산성비나 오존등 환경 오염 물질도 엽면 미생물의 서식환경에 큰 영향을 미친다. 강우, 이슬, 온도, 습도, 서리, 광량, 황사 등도 엽면 미생물의 증식과 생존에 영향을 미친다. 따라서 유용 미생물의 이용 효과를 높이려면 이 같은 환경 요인의 영향을 고려할 필요가 있다. 친환경 농산물 생산을 위해 유용 미생물을 이용하려는 생물적 방제방법은 1950년대부터 사용해 오고 있으나 그 중요성을 인식하기 시작한 것은 1970년대에 들어서면서 부터이다. 잎 표면에 서식하는 곰팡이, 효모 및 세균이 어떤 생태적 시스템을 구성하고 있는지를 구명하는 것은 이런 미생물을 개발, 이용하여 생물적 방제법을 확립하는 데 아주 중요하다. 국내에는 현재 흰가루병 방제용으로 개발한 미생물 농약 에이큐수화제(*Ampelomyces quisqualis* 94013)와 뉴 흰나라액상수화제(*Bacillus* so. AC-1)등이 시판되고 있다. 국외에는 2001년 흰가루병, 잿빛곰팡이병등의 방제를 위해 18종의 미생물 농약이 등록·시판되고 있다.

외국의 경우 토양병해를 막고, 식물의 생육을 촉진하는 미생물 제제에 대한 연구가 매우 활발히 진행되고 있으나, 미생물 제제를 파종시에 종자에 분의 처리하는 제품은 개발되었으나, 종자에 직접 코팅 또는 펠릿 처리한 제품은 상업화된 경우가 없으며 국내의 경우 90년대 후반부터 미생물 종자처리에 대한 관심이 고조되어, 몇몇 대학, 연구소 그리고 기업에서 연구를 진행하고 있으나, 미생물 제제기술 및 종자처리 기술의 부족으로 상업화하기에는 어려움이 많은게 현실이다.

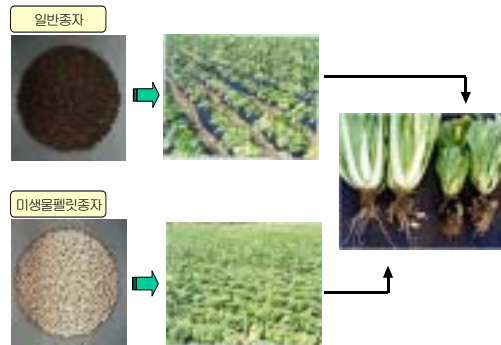
종자의 크기를 일정하게 키워 기계화 파종이 가능하도록 함과 동시에 종자 발아 및 입모율을 향상시키는 종자 pelleting 기술은 네덜란드, 미국, 일본의 몇몇 다국적 기업들이 가지고 있으나, 특허나 기술제휴 등으로 공개를 극히 꺼리는 기술이며 미생물을 종자에 고농도로 처리하여 토양병을 방제하는 기술은 아직 개발된 전례가 없는 실정이다. 특히 2000년 초에 국내 모 기업에서 배추종자에 미생물을 처리하여 상품화하였으나, 미생물 제제 기술 및 종자처리 기술 부족으로 인하여 많은 어려움을 겪었으며, 사업의 지속 가능성도 불확실한 실정이다.

사용 균주	적용 해충	기주 식물	등록회사 (최초 등록일)	상표
<i>Bacillus subtilis</i>	잿빛곰팡이병	토마토	그린바이오텍 (2004.4.3)	그린올G
<i>Streptomyces colombiensis</i> WYE20	잿빛곰팡이병 흰가루병 갈색잎마름병	딸기 호박 잔디	케이아이비씨 (2003.9.2) (2004.1.13) (2004.1.13)	마이코싸이드
<i>Streptomyces goshikiensis</i> WYE324	라이족토니아 마름병 잎집무늬 마름병	잔디 벼	케이아이비씨 (2003.9.2) (2004.1.13)	세이프그로
<i>Ampelomyces quisqualis</i> AQ94013	흰가루병	오이	그린바이오텍 (2004.4.3)	에이큐
<i>Paenibacillus polymyxa</i> AC-1	흰가루병	오이	그린바이오텍 (2003.3.27)	탑시드
<i>Trichoderma harzianum</i> YC459	잿빛곰팡이병 탄저병 모갈록병 녹병 라지팻취 브라운팻취	여러 작물	제일그린산업 (2000.8.18)	토리 상토리 트리코다
<i>Bacillus, Arthrobacter, Pseudomonas</i>	뿌리썩음병	인삼, 채소류	투엠바이아 연구소 (충청북도)	바이코나 1,2
<i>Bacillus, Pseudomonas</i>	흰가루 무사마귀병	채소류	고려바이오 연구소 (경기도)	청고탄 사마귀왕 블랙스타

미생물 농약 등록 현황(2004년 7월 31일 현재, 농촌진흥청)

<선행연구 결과>

○ (주)비아이지는 종자의 크기를 기계화가 가능한 크기로 펠렛화 하였을 경우에도 발아 및 입모율에 전혀 문제가 없는 종자 펠렛 기술을 확보하고 있다. 옆의 그림은 배추종자를 미생물로 코팅하여 포장 시험한 결과를 보여주고 있다. 주요 작물들에 대한 각각의 발아 및 생리적 특성을 고려한 미생물과 조합한 종자 펠렛팅 기술은 농업 생산성과 발전에 큰 영향을 줄 것으로 기대한다.



○ 강원대에서는 국내 토양에서 식물의 생육을 촉진하고, 각종 토양 병해를 억제하는 여러 근권 미생물들을

선발하였으며, 그 중 *Pseudomonas fluorescens*으로 판명된 K95009는 과, 양배추, 무, 당근, 상추, 시금치, 호박 등 작물의 생장을 150%-800% 까지 증대시키는 것이 확인 되었으며, 특히 무, 당근, 상추, 호박의 생장을 크게 촉진하는 것이 관찰되었다. 또한 배추, 오이에 대한 토양관주시 생육촉진과 병에 대한 억제 효과도 뛰어났다.

3장. 연구개발 수행 내용 및 결과

1절 유용 미생물의 선발 및 동정

1. 유용 미생물의 선발에 따른 길항력 검정

가. 서언

토양에 서식하는 미생물중 많은 종류는 식물생육촉진, 토양병해의 억제 및 환경정화 등 여러 측면에서 매우 중요하며, 이중 식물과 공생체를 만들어 공기중의 질소를 고정하는 뿌리혹박테리아, 식물의 인산흡수를 촉진하는 근균과 인용해균, 병해충 억제에 관련된 미생물의 이용에 관한 연구 및 이들을 미생물제제로 활용하고자 하는 시도가 여러 분야에서 이루어지고 있다.

식물의 생장을 촉진시키는 유용한 근권미생물을 Kloepper는 식물생장촉진 근권미생물(plant growth promoting rhizobacteria ; PGPR)이라고 칭하였는데, 이러한 근권미생물의 성장촉진 메카니즘을 보면 양수분의 흡수촉진, 항생작용 및 식물생장조절물질의 생산 등으로 이루어 진다.

근권 미생물을 집중하여 양수분 흡수를 촉진시키려는 연구는 양수분 이용성의 향상과 촉진이라는 측면에서 주로 이루어지고 있으며, 특히 용인균을 이용한 토양내 불용성 인의 분해 및 흡수 등에 좋은 연구결과를 보이고 있다.

한편, 현재 농가에 유통되고 있는 미생물제제를 보면 함유되어 있는 균주의 활성유지에 문제점이 있고, 농가에서는 미생물과 식물과의 상호작용 및 효과에 대한 인식이 부족한 것으로 보인다. 따라서 식물의 생장 촉진과 내병성에 좀 더 효과적이고 생리활성이 우수한 유용 미생물의 균주 선발이 필요하다고 본다.

나. 재료 및 방법

1) 1차 유용 미생물의 선발 및 길항성 검정

강원 및 충청지역의 토양에서 다양한 미생물을 분리용배지를 사용하여 항진균 활성을 보이는 약 200여 균주를 선발하였다(Table 1-1). 선발된 균주에 대하여 생물활성 실험을 통해 식물 병원성 진균에 특히 활성이 높은 균주 6종(BIG20850, BIG20966, BIG20969, BIG20979, BIG21000, BIG21003)을 선발하였다. 다시 6종의 균들 중 우수한 길항 균주를 선발하기 위하여 10개의 식물병원진균(*Pyricularia grisea*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Botryoshaeria dothidea*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Mycosphaerella*

melons, *Phytophthora capsici*, *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum*)을 PDA와 NA배지를 1:1로 섞은 배지에 접종 및 배양하여 선발 균주에 의한 식물병원균의 균사 생균억제 정도를 측정하여 항진균 활성을 비교하였다.

Table 1-1. Screening of Bacterial isolates that collected from the roots of different crops in Chungcheong and Kangwon

Collected area	Sampling site	Total isolate for screening	No. of selected isolates
Hongseong	8	22	-
Boryeong	3	8	-
Kumsan	7	19	1
Chungju	6	25	1
Jecheon	6	9	-
Umsong	5	19	-
Jincheon	7	8	-
Chungju	8	20	-
Cheonan	3	14	-
Gongju	6	35	1
Okcheon	5	17	-
Yesan	3	6	-
Pyungchang	11	23	1
Chuncheon	13	43	2
Jinbu	5	11	-
Total	96	198	6

2) 2차 유용 미생물의 선발 및 길항성 검정

춘천, 홍천, 평창, 횡성 등지의 배추재배토양, 이병배추, 감자 토양, 감자 괴경 등에서 토양 시료를 채취하여 PDA(Difco, USA), KB, GYE, RA(Radish dextrose medium) 등 각종 배지를 이용하여 미생물들을 분리하였다. 1차 선발한 500 isolates의 세균을 대상으로 실험을 수행하여 실험에 필요한 균주를 선발하였다.

유망 길항균들이 *A. raphani*에 대하여 길항성을 지니고 있는지 서로 다른 구성 성분들로 구성된 배양배지인 PDA, KB, GYE, 그리고 RA 배지를 이용하여 확인하였고, 각종 검정 세균 중 길항성이 있는 것으로 확인된 *Pseudomonas fluorescens* K95009(이하 K95009로 표기)균을 *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Alternaria solani*, *Phytophthora capsici*, *Pythium ultimum*, *Fusarium oxysporum* 등 각종 진균에 대치배양하여 길항력을 검정하였다.

Table 1-2. Screening of Bacterial isolates that Collected from different sources

Isolate No.	Source	Location	Scientific Name
P1	Potato tuber	Pyungchang	<i>Pseudomonas</i> sp.
P2	Potato tuber	Pyungchang	<i>Pseudomonas</i> sp.
P3	Potato tuber	Pyungchang	<i>Pseudomonas</i> sp.
P4	Potato tuber	Pyungchang	<i>Pseudomonas</i> sp.
P5	Potato tuber	Pyungchang	<i>Pseudomonas</i> sp.
P6	Potato tuber	Pyungchang	<i>Pseudomonas</i> sp.
P7	Potato tuber	Pyungchang	<i>P. fluorescens</i>
P8	Potato tuber	Pyungchang	<i>P. fluorescens</i>
P28	Chinese cabbage field	Jinbu	<i>Pseudomonas</i> sp.
P29	Chinese cabbage field	Jinbu	<i>Pseudomonas</i> sp.
P32	Chinese cabbage field	Jinbu	<i>Pseudomonas</i> sp.
P33	Chinese cabbage field	Chuncheon	<i>Pseudomonas</i> sp.
P38	Chinese cabbage field	Chuncheon	<i>Pseudomonas</i> sp.
P41	Chinese cabbage field	Chuncheon	<i>Pseudomonas</i> sp.
P45	Chinese cabbage field	Jinbu	<i>Pseudomonas</i> sp.
P50	Chinese cabbage field	Jinbu	<i>Pseudomonas</i> sp.
P56	Chinese cabbage field	Chuncheon	<i>Pseudomonas</i> sp.
P57	Chinese cabbage field	Chuncheon	<i>Pseudomonas</i> sp.
K95001	Potato field	Pyungchang	Bacteria
K95002	Potato field	Pyungchang	Bacteria
K95003	Chinese cabbage field	Pyungchang	<i>Pseudomonas</i> sp.
K95004	Chinese cabbage field	Pyungchang	<i>Pseudomonas</i> sp.
K95005	Chinese cabbage field	Chuncheon	<i>Pseudomonas</i> sp.
K95006	Chinese cabbage field	Chuncheon	<i>Pseudomonas</i> sp.
K95007	Chinese cabbage field	Chuncheon	<i>Pseudomonas</i> sp.
K95009	Chinese cabbage field	Chuncheon	<i>P. fluorescens</i>
K950010	Chinese cabbage field	Hongcheon	<i>Pseudomonas</i> sp.
K950011	Chinese cabbage field	Chuncheon	<i>Pseudomonas</i> sp.
K950012	Chinese cabbage field	Chuncheon	<i>Pseudomonas</i> sp.
K950013	Chinese cabbage field	Chuncheon	<i>P. fluorescens</i>
K950014	Chinese cabbage field	Chuncheon	<i>P. fluorescens</i>

나. 결과 및 고찰

1) 1차 유용 미생물의 선발 및 길항성 검정

충청 및 강원지역에서 수집한 200여 균주중에서 식물병원성 진균에 활성이 높은 균주 6종을 선발, 접종하여 균사의 생육억제 정도를 측정하여 항진균 활성을 비교한 결과는 Table 1-3과 같다. 항진활성을 보면 PG(*P. grisea*)에 대해서는 BIG20850, BIG20969 및 BIG21003이, PU(*P. ultimum*)에는 BIG21000, BIG21003이, RS(*R. solani*)에는 BIG20979와 BIG21003이, PC(*P. capsici*)는 BIG21000과 BIG21003등이 뚜렷하게 높았다. 나머지 PU(*P. ultimum*), BC(*B. cinerea*) 및 FO(*F. oxysporum*)에는 BIG21003만이 가장 효과적이었고 MM(*M. melons*)과 AS(*A. solani*)에 대해서도 양호한 항진활성을 나타냈다(Table 1-3). 이상에서와 같이 BIG21003만이 10종의 식물병원성 진균에 대해 폭 넓은 항진활성을 나타냈고 특히 *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Alternaria solani* 및 *Pythium ultimum*에 가장 효과적이었다(Fig. 1-1).

Table 1-3. Antifungal spectra of bacteria isolated in this study against several plant pathogenic fungi

Strains	Antifungal Activity ^a									
	PG ^b	PU	RS	BD	BC	CG	MM	PC	AS	FO
BIG20850	***	**	**	*	**	**	*	**	*	**
BIG20966	**	-	**	-	-	*	-	*	-	-
BIG20969	***	**	*	**	*	*	**	*	**	**
BIG20979	*	-	***	-	-	-	*	-	**	-
BIG21000	*	***	**	**	-	*	*	***	-	**
BIG21003	***	***	***	***	***	***	**	*	***	*

^a Antifungal activity against each fungus was measured at 5 days after inoculation of antagonistic bacteria (***: Very good **: Good *: Small Efficiency).

^b PG: *Pyricularia grisea*, PU: *Pythium ultimum*, RS: *Rhizoctonia solani*, BD: *Botryoshaeria dothidea*, BC: *Botrytis cinerea*, CG: *Colletotrichum gloeosporioides*, MM: *Mycosphaerella melons*, PC: *Phytophthora capsici*, AS: *Alternaria solani*, FO: *Fusarium oxysporum*.

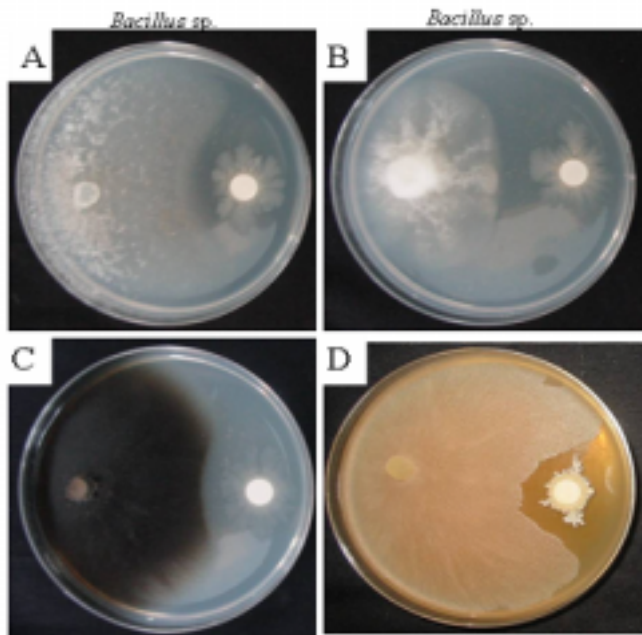


Fig. 1-1. Antifungal activity of *Bacillus* sp. BIG21003 against four different plant pathogens. (A: *Rhizoctonia solani*, B: *Colletotrichum gloeosporioides*, C: *Alternaria solani*, D: *Pythium ultimum*)

2) 2차 유용 미생물의 선발 및 길항성 검정

춘천, 홍천, 평창, 횡성 등지의 배추재배토양, 이병배추, 감자 토양, 감자괴경 등에서 각종 미생물들을 분리하였다. 분리된 미생물들 중 길항균으로 추정되는 균으로 25개의 *Pseudomonas* sp., 6개의 *Pseudomonas fluorescens*, 2개의 미확인 Bacteria, 12개의 Actinomycetes균, 그리고 5개의 진균을 선발하여 본 연구에 활용하여 과제를 수행하였다.

유망 길항균들이 *Aphanomyces raphani*와 다른 진균류에 대하여 길항성을 지니고 있는지 서로 다른 구성성분들로 구성된 PDA, KB, GYE, 그리고 RA 배지를 이용하여 길항성을 검정하여 보았다. 그 결과 균주 K95009, P7, P45는 PDA 배지에서 매우 강한 길항성을 나타내었고, 균주 K95009, K95014, P29, P50는 KB 배지에서 비교적 강한 길항성 나타내었다(Table 1-4). 4가지 배지에서 *Aphanomyces raphani*에 모든 길항력을 나타내었던 K95009균을 각종 병원성 진균에 대치배양하여 길항력을 검정한 결과 *Pythium ultimum*, *Fusarium oxysporum* 균주에 대하여 매우 뚜렷한 길항능력을 보여주었다(Fig. 1-2.). 다른 균주들에 대해서도 길항성을 보였으나 특별히 높은 결과는 보이지 않았다(data not shown).

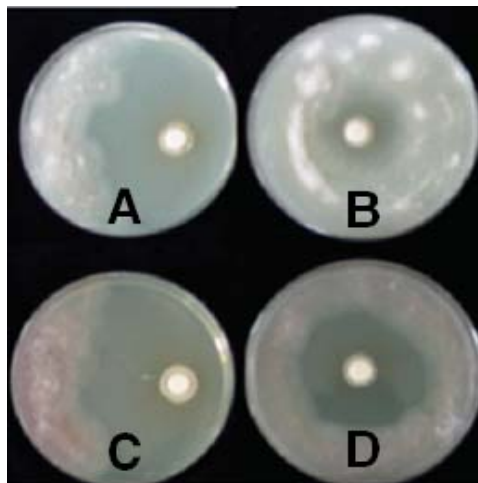


Fig. 1-2. Antifungal activity of *Pseudomonas fluorescens* K95009 against four different plant pathogens.

(A: *Pythium ultimum* replacement culture. B: *Pythium ultimum* overlap culture, C: *Fusarium oxysporum* replacement culture, D: *Fusarium oxysporum* overlap culture)

Table 1-4. Antibiotic activities of selected bacterial isolates against *Aphanomyces raphani* when the bacterial isolated coinoculated on various culture media

Isolate No.	Antagonism observed on different media test			
	PDA ^b	KB ^c	GYE ^d	RA ^e
P7	****	***	****	****
P28	**	***	**	**
P29	***	****	****	****
P32	-	**	**	**
P33	-	*	*	**
P38	**	**	**	**
P45	****	***	****	****
P50	***	****	**	****
K95009	****	****	****	****
K950010	**	***	**	****
K950013	**	***	**	***
K950014	***	****	**	***

^a++++: very strong inhibition and -: no inhibitions observed

^bPDA: potato dextrose agar ^cKB: King's B medium

^dGYE: Glucose yeast extract medium ^eRD: Radish dextrose medium

2. 유용 미생물의 작물생장촉진효과 검정

가. 재료 및 방법

1) 발아촉진 효과 검정

종자발아촉진에 가장 효과적이었던 K95009균주를 이용하여 종자 발아에 효과적인 배양액의 적정농도를 검정하고자 농도별 배양액에 침종시 발아촉진 효과를 검정하였다. 배양액을 100배, 300배, 500배로 희석하여 사용하였다. 처리 방법은 상추와 양파의 종자 각 100립씩을 적정농도로 희석된 배양액에 1시간 침종한 후 음건하여 사용하였다. 건조된 종자는 9cm petridish에 filter paper 2매를 깔고 치상 후 10시간째부터 상추는 3일, 양파는 6일까지 각각 발아율을 조사하였다. 유근의 측정은 과중 후 10일 후 한 개체씩 꺼내어 뿌리 길이를 측정하였다.

2) 작물 성장촉진 효과 검정

1차 실험은 온실에서 다양한 작물별 성장 촉진 효과를 검정하기 위하여 10x10 cm 포트에 홍농바이오 상토를 충전하고 각 작물 종자 2립씩을 파종후 1주간 육묘시킨 파, 배추, 양배추, 무, 당근, 상추, 호박, 오이, 시금치에 K95009 배양액을 10x, 100x, 500x 희석하여 포트당 25ml씩을 4일 간격으로 3회 처리하여 강원대 온실에서 재배하고 생체중량을 조사하였다.

2차 실험은 1차 실험에서 특히 효과적이었던 작물중 종자 pelleting이 요구되는 상추와 양파종자를 대상으로 성장촉진 실험을 진행하였다. 상추와 양파 종자를 멸균한 홍농바이오 상토를 Plug tray(200 hole)에 충전하고 상추와 양파 종자를 2립씩 파종하였다. 파종후 4일동안 강원대 온실에서 생육시키고 온실내 작물의 성장촉진효과를 검정하기 위하여 12개의 선발미생물을 액체배양하여 각각 hole에 충전된 상토 1g당 유용미생물 1ml씩으로 토양관주하였다. 작물의 성장촉진효과는 처리된 작물의 지상부의 건물중으로 검정하였다. 작물 생육 4주후 각 작물의 지상부를 잘라 dry oven 65℃에서 건조시켜 건물중(dry weight)을 측정하였다. 각 처리는 10반복으로 하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 발아촉진 효과

상추와 양파의 발아를 현저하게 향상시킨 것은 2개 균주 였으며 이중 K95009가 가장 우수하였다. 뿌리의 생장을 촉진시킨 균주는 상추의 경우 4개, 양파는 2개 균주 였으며, K95009 뿌리신장을 뚜렷하게 향상시켜 최종 작물성장촉진 균주로 선발하였다.

최종 선발된 K95009균 배양액을 100x, 300x, 500x로 희석하여 상추와 양파종자를 침종한후 건조하여 발아율을 조사한 결과 상추는 100x 처리구에서 종자치상 3일후 96%로 무처리 88%에 비해 발아율이 높았으며 최종발아율에 있어서는 유사하였다. 양파는 300x 처리시 종자치상 후 6일후 92%로 무처리에 88%에 비해 발아율이 높게 나타나 균 배양액을 300x에 침종 처리 했을때 무처리에 비해 가장 효과적이었다. K95009균 배양액의 발아촉진 시험결과 상추의 발아율은 100x > 300x > Control > 500x 순으로 높았으며 양파는 300x > 500x > Control > 100x순으로 발아율이 높았다.(Table 1-6).

Table 1-5. Some bacterial isolates enhancing plant growth after seed treatment that collected from chungcheong and kwangwon area

Bacterial isolate	Genus	Lettuce		Onion	
		A	B	A	B
BIG20850	<i>Bacillus</i>	91	3.4	89	6.6
BIG20966	"	93	3.5	86	6.4
BIG20969	"	90	3.3	84	6.2
BIG20979	"	91	3.6	86	6.6
BIG21000	"	92	3.5	83	6.1
BIG21003	"	91	3.6	88	6.9
P7	<i>Pseudomonas</i>	94	4.1	86	6.9
P28	"	93	4.0	89	6.8
P29	"	94	4.1	92	8.0
P32	"	90	3.8	86	6.4
P33	"	93	4.1	90	7.2
P38	"	90	3.5	88	7.0
P45	"	89	3.0	84	6.8
P50	"	92	3.5	88	6.9
K95009	"	98	4.6	94	8.9
K950010	"	89	3.0	86	6.8
K950013	"	89	3.0	85	6.5
K950014	"	91	3.3	88	6.9
Control	-	94	4.0	92	7.8

A= Germination(%) B= Root length(cm)

Table 1-6. Enhancement of germination rate of lettuce by soaking treatment of *Pseudomonas fluorescens* K95009

Treat.		Germination rate(%)						
		10*	20	48	72	96	120	144
100×	Lettuce	7	23	51	96	98	99	99
	Onion	-	-	-	-	29	82	89
300×	Lettuce	5	20	49	92	96	97	98
	Onion	-	-	-	5	37	86	92
500×	Lettuce	0	10	29	86	89	94	98
	Onion	-	-	-	-	23	80	89
Control	Lettuce	2	12	38	88	93	96	97
	Onion	-	-	-	-	21	85	88

*: Hours after treatment



Fig. 1-2. Comparison of Seedling vigour between soaking(300x) and non soaking with by *Pseudomonas fluorescens* K95009.

L : non soaking, R : soaking

2) 작물 성장촉진 효과

1차 시험으로 다양한 작물에 성장촉진효과를 검정하였다. 과, 배추, 양배추, 무, 당근, 상추, 호박, 오이, 시금치 등을 대상으로 온실내 성장촉진 시험을 수행한 결과 10x 처리구에서 시험작물 모두에서 10%~400%의 성장촉진 효과를 나타냈다. 100x 처리구에서는 상추, 호박, 시금치에서 각각 130%, 200%, 108%의 성장촉진 효과가 나타났다(Table 1-7).

2차 시험에서는 상추와 양파를 대상으로 작물성장촉진효과를 조사한 결과 상추에서는 P29, P33, K95009 이상 4가지 균주에서 각각 무처리와 비교하여 106%, 119%, 150%의 건물중 증가율을 나타냈으며, K95009는 통계적으로 유의한 ($P=0.05$) 차이를 보였다. 양파에서는 P7, P29, K95009에서 각각 대조구와 비교하여 109%, 128%, 142%의 건물중 증가율을 나타냈으며 K95009가 상추에서와 같이 유의한($P=0.05$)차이를 보였다. 선발된 12개의 생육촉진 균주를 이용하여 상추와 양파 생육촉진시험을 수행한 결과 K95009 만이 두작물 모두에서 가장 성장을 촉진시키는 것으로 선발되었다.

Table 1-7. Enhancement of plant growth by soaking treatment of *Pseudomonas fluorescens* K95009

Crops	Fresh weight(g)			
	10x	100x	500x	Control
Welish onion	3.1	2.9	2.8	2.9
Chinese Cabbage	11.3	10.8	10.9	10.7
Radish	19.2	8.5	6.4	7.2
Carrot	13.7	5.2	6.8	4.4
Lettuce	49.9	20.5	16.4	15.0
Pumpkin	33.5	25.6	16.4	12.8
Cucumber	23.3	20.1	17.0	17.5
Spinach	46.8	35.2	33.5	32.4

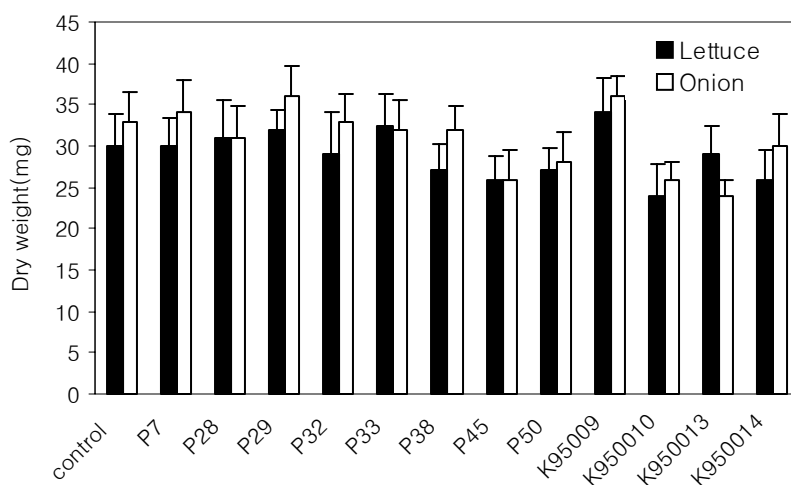


Fig. 1-3. Plant growth promoting by soil bacteria determined as effective one on previous tests-germination after bacterial inoculation plant roots. Vertical bars represented standard errors of means of twelve treatments. An asterisks indicates a significant difference compared to the control at $P=0.05$.

3. 유용미생물의 동정

가. 재료 및 방법

BIG21003과 K95009를 동정하기 위하여 형태적 특성은 Bergey's manual of systematic bacteriology와 Identification of plant pathogenic bacteria의 자료를 토대로 그램염색과 전자현미경 관찰로 확인하였고, 생화학적 효소분해능, 세포내 포자형성, 배지상의 생육특성, 세포내 영양물질 저장능력 그리고 다양한 탄수화물영양원 실험을 수행하였다.

또한 16S rRNA sequencing을 위하여 단일콜로니를 MACROGEN에 의뢰하여 진행하였으며 아래와 같은 공정을 거쳐 분석하였다. 먼저 template DNA를 만들기 위해 단일 colony을 집어서 1.5ml 원심분리 튜브에 넣고 멸균된 saline를 0.5 ml 넣어 서스펜션 시켜 준다. 10분동안 10,000rpm으로 원심분리 하였다. 그 후에 상등액을 제거하고 pellet에 InstaGene Matrix(Bio-Rad, USA)를 0.5ml 넣어 서스펜션하여 56°C에서 30분 배양한 후 100°C에서 10분 처리 한 후 상등액을 PCR에 사용하였으며 최종 Sequencing은 Big Dye terminator(Applied BioSystems, USA)sequencing kit 를 사용하여 Sequencing한 후 Biosystems model 3730XL(Applied Biosystems, USA)을 사용하여 automated DNA sequencing system 공정을 수행하였다. 시퀀싱 결과를 NCBI blast search와 RDP database에서 시퀀싱 매치를 사용하여 최종적으로 동정하였다.

나. 결과 및 고찰

1) *Bacillus* sp. BIG21003

BIG21003은 약간의 운동성을 갖는 호기성 및 혐기성 단간균(직경 $>1\mu\text{m}$)으로 4°C와 42°C에서 생육하지 않고 포자를 형성하는 Gram(+)균으로서 Propionate 액화능은 음성이나 starch 분해능은 있었고, catalase가 양성, citrate는 양성, nitrate reduction은 양성, indole검사는 음성이었다. Methyl red 반응은 음성, VP반응은 약하게 나타났으며, H₂S형성은 K/A이었고, 당분해능은 포도당, xylose, mannitol 및 arabinose는 모두 양성으로 나타났다. 본 연구에서 분리한 균주와 비교균주인 *Bacillus subtilis*를 비교 검토한 결과 형태학적, 생리학적 및 생화학적 특성이 거의 동일한 것으로 보였다. 이러한 결과를 토대로 Bergey's manual of systematic bacteriology, Microbiological method 등에 기술된 분류 기준에 따라 BIG21003 균주는 *Bacillus* sp.로 추정되었다.

또한 분자생물학적 16S rRNA sequencing 결과도 *Bacillus* sp.로 확인되어 최종적으로 Bergey's manual of systematic bacteriology와 Identification of plant pathogenic bacteria의 자료와 비교하여 동정한 결과 BIG21003균은 *Bacillus subtilis*와 유사하였다. 이 균주는 한국 생명공학 연구원에 KCTC10236BP로 균주 등록하였다.

2) *Pseudomonas fluorescens* K95009

K95009은 운동성을 갖는 호기성 간균(length>2 μ m)으로 flagella를 가지고 있으며 젤라틴 액화능을 가지고 있었다. 보통의 *Pseudomonas fluorescens* 균들이 가지는 특성인 형광 색소를 가지고 있었으며, 4 $^{\circ}$ C에서는 성장이 관찰되었으나 42 $^{\circ}$ C에서는 생육하지 않는 것으로 확인되었으며 VP test와 MR test는 음성으로 나타났다.

본 연구에서 분리한 균주와 비교균주인 *Pseudomonas fluorescens* biovar 1를 비교 검토한 결과 형태학적, 생리학적 및 생화학적 특성이 거의 동일한 것으로 보였다. 이러한 결과를 토대로 Bergey's manual of systematic bacteriology, Microbiological method등에 기술된 분류 기준에 따라 K95009 균주는 *Pseudomonas fluorescens*로 추정되었다.

또한 분자생물학적 16S rRNA sequencing 결과도 *Pseudomonas fluorescens*로 확인되었다.

Table 1-8. Morphological cultural and Physiological characteristics of K95009 strains

Classification	Characteristics	
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> biovar I	K95009
Cell form	Rod	Rod
Gram staining	-	-
Aerobic	+	+
Motility	+	+
Levan formation	+	+
Denitrification	+	+
Flagella	+	+
Arginine dihydrolase	+	+
Gelatin liquefaction	+	+
Pigment of fluorescence	+	+
Growth at 4°C	+	+
at 41°C	-	-
Hydrolysis of Starch	-	+
Tween80	+	+
Casein	+	+
Reaction of Oxidase	+	+
VP test	-	-
MR test	-	-
Mol% G +C of DNA	67.5	67.5

Symbol

ND : No data available

+ : Positive reaction

- : Negative reaction

D : Differs among species

Table 1-9. Morphological, cultural and Physiological characteristics of BIG21003 strains

Classification	Characteristics	
	<i>Bacillus subtilis</i>	BIG21003
Cell form	Rod	Rod
Gram staining	+	+
Aerobic	+	+
Catalase	+	+
VP test	+	+
Gas from Glucose	-	-
Acids from D-Glucose	+	+
L-Arabinose	+	+
D-Xylose	+	+
D-Mannitol	+	+
Utilization of Citrate	+	+
Propionate	-	-
pH in V-P broth		
<6	d(+/-)	d(+/-)
<7	-	-
Degradation of tyrosine	-	-
Formation of Indole	-	-
Dihydroxyacetone	nd	-
Nitrate reduced to nitrate	+	+
Growth at pH 6.8(NB)	+	+
5.7(NB)	+	+
Growth in NaCl 2%	+	+
5%	+	+
7%	+	+
10%	ND	ND
at 5°C	-	-
10°C	d	+
30°C	+	+
40°C	+	+
50°C	d	+
60°C	-	-

ND : No data available, D : Differs among species

+ : 90% or more and positive reaction

- : 90% or more are negative reaction, d : 11-89% are positive reaction

COMMENT

Corresponding GenBank entry: AY801723

ORIGIN

```
1 CTCAGGACGA ACGCTGGCGG CGTGCCTAAT ACATGCAAGT CGAGCGGACA GATGGGAGCT
61 TGCTCOCTGA TGTTAGCGGC GGACGGGTGA GTAACACGTG GGTAACCTGC CTGTAAGACT
121 GGGATAACTC CGGGAAACCG GGGCTAATAC CGGATGGTTG TTTGAACCGC ATGGTTCAGA
181 CATAAAAGGT GGCTTCGGCT ACCACTTACA GATGGACCG CGGCGCATTG GCTAGTTGGT
241 GAGGTAACGG CTCACCAAGG CGACGATGCG TAGCCGACCT GAGAGGGTGA TGGCCACAC
301 TGGGACTGAG ACACGGCCCA GACTCCTACG GGAGGCAGCA GTAGGGAATC TTCGCAATG
361 GACGAAAGTC TGACGGAGCA ACGCCGCGTG AGTGATGAAG GTTTTGGGAT CGTAAAGCTC
421 TGTTGTTAGG GAAGAACAAG TGCCGTTCAA ATAGGGCGGC ACCTTGACGG TACCTAACCA
481 GAAAGCCACG GCTAACTACG TGCCAGCAGC CGCGTAATA CGTAGGTGGC AAGCGTTGTC
541 CGGAATTATT GGGCGTAAAG GGCTCGCAGG CGGTTTCTTA AGTCTGATGT GAAAGCCCCC
601 GGCTCAACCG GGGAGGGTCA TTGGAAACTG GGGAACTTGA GTGCAGAAGA GGAGAGTGG
661 ATCCACGCTG TAGCGGTGAA ATGCGTAGAG ATGTGGAGGA ACACCACTGG CGAAGGGGAC
721 TCTCTGCTCT GTAACTGACG CTGAGGAGCG AAAGCGTGGG GAGCGAACAG GATTAGATAC
781 CCTGGTAGTC CACGCGTAA ACGATGAGTG CTAAGTGTA GGGGGTTTCC GCCCCTTAGT
841 GCTGCAGCTA ACGCATTAA GACTCCGCT GGGGAGTACG GTCGCAAGAC TGAAACTCAA
901 AGGAATTGAC GGGGGCCCGC ACAAGCGGTG GAGCATGTGG TTTAATTCGA AGCAACCGA
961 AGAACCTTAC CAGGTCTTGA CATCCTCTGA CAATCCTAGA GATAGGACGT CCCCTTCGGG
1021 GGCAGAGTGA CAGGTGGTGC ATGGTTGTG TCAGCTCGTG TCGTGAGATG TTGGGTTAAG
1081 TCCCACAACG AGCGCAACCC TTGATCTTAG TTGCCAGCAT TCAGTTGGGC ACTCTAAGGT
1141 GACTGCGGT GACAAACCGG AGGAAGGTGG GGATGAAGTC AAATCATCAT GCCCCTTAGT
1201 ACCTGGGCTA CACACGTGCT ACAATGGACA GAACAAAGGG CAGCGAAACC GCGAGGTTAA
1261 GCCAATCCCA CAAATCTGTT CTCAGTTCGG ATCGCAGTCT GCAACTCGAC TGCGTGAAGC
1321 TGGAATCGCT AGTAATCGCG GATCAGCATG CCGCGGTGAA TACGTTCCCG GGCCTTGTAC
1381 ACAACGCCCG TCACACCACG AGAGTTTGTA ACACCGAAG TCGGTGAGGT AACCTTTTAG
1441 GAGCCAGCCG CCGAAGGTGG GACAGATGAT TGGGGTGAAG TCGTAACAAG GTAGCCGTAT
1501 CGGAAGGTGC GGCTGGAT
```

Fig. 1-4. A full sequence of 16S ribosomal RNA of BIG21003 isolate from the rhizosphere.

COMMENT

Corresponding GenBank entry: AB181894

ORIGIN

```

1 TTGCTCCTGG ATTCAGCGGC GGACGGGTGA GTAATGCCTA GGAATCTGCC TGGTAGTGGG
61 GGACAACGTT TCGAAAGGAA CGCTAATAOC GCATACGTCC TACGGGAGAA AGCAGGGGAC
121 CTTCGGGCTT TCGCCTATCA GATGAGCCTA GGTCGGATTA GCTAGTTGGT GAGGTAATGG
181 CTCACCAAGG CGACGATCCG TAACTGGTCT GAGAGGATGA TCAGTCACAC TGGAAGTGG
241 ACACGGTCCA GACTCCTACG GGAGGCAGCA GTGGGGAATA TTGGACAATG GCGGAAAAGC
301 TGATCCAGCC ATGCCCGGTG TGTGAAGAAG GTCTTCGGAT TGTAAGGCAC TTTAAGTTGG
361 GAGGAAGGGT TGTAGATTAA TACTCTGCAA TTTTGACGTT ACCGACAGAA TAAGCACCGG
421 CTAAGTCTGT GCCAGCAGCC GCGGTAATAC AGAGGGTGCA AGCGTTAATC GGAATTACTG
481 GCGGTAAAGC GCGCGTAGGT GGTGGTTAA GTTGGATGTG AAATCCCGG GCTCAACTG
541 GGAAGTGCAT CAAAAGTGG CAAGCTAGAG TATGGTAGAG GGTGGTGGAA TTTCTGTGT
601 AGCGGTGAAA TGCCTAGATA TAGGAAGGAA CACCAAGTGC GAAGGCGACC ACCTGGACTG
661 ATACTGACAC TGAGGTGCGA AAGOGTGGGG AGCAACAGG ATTAGATACC CTGGTAGTCC
721 ACGCCGTAAA CGATGTC

```

Fig. 1-5. A full sequence of 16S ribosomal RNA of K95009 isolate from the rhizosphere.

Table 1-10. Primers of amplification and sequencing

	primer	Amplification
27F	AgA gTT TgA TCM TGG CTC Ag	●
1492R	TAC ggY TAC CTT gTT ACg ACT T	●

Analysis : <http://rdp.cme.msu.edu/html/>

Reference : *Nucleic Acids Research, Vol. 18, Supplement*

4. *Pseudomonas fluorescens* K95009가 생산하는 siderophore의 특성

가. 재료 및 방법

1) 생물방제균의 생성 물질 확인

*Pseudomonas fluorescens*는 일반적으로 Fe를 선점하여 토양 식물병원성균의 성장저해 작용을 하여 작물의 바른 성장을 유도하게 도와주는 세균으로 널리 알려져 있다. 기존의 자료를 참고로 본 미생물의 siderophore 생성유무를 조사하였다. *Pseudomonas fluorescens* K95009가 siderophore를 생산하는지의 여부를 CAS 배지를 하여 알아보았다. CAS 배지를 만든 후 배지위에 paper disc를 올려 놓고 K95009를 20 μ l, 40 μ l를 접종한 후 관찰하였다.

CAS 배지조성(1L)은 다음과 같다.

CAS 24.2mg, 10 μ M FeCl₃, 100 μ M HCl, 72.9mg HDTMA, 6g NaHPO₄, 0.3g KH₂PO₄, 0.5g NaCl, 1g NH₄Cl, 1M MgSO₄, 10% glucose, 1M CaCl₂, 15g Agar, 30.24 Pipes, 6g NaOH, 10% casamino acid를 넣고 D.W를 1L로 맞춘다.

CAS 배지는 Alexander and Zuberer와 Scnrurn and Neilands 논문의 방법을 사용하였으며 반응기작은 아래와 같다.



Fe-CAS는 배지에 파란색을 띄게 하는 역할을 하며 siderophore를 형성하면 배지 주변의 Fe-CAS에서 Fe는 강력한 ligand(siderophore)에 의하여 결합하게 되고 Dye⁻는 분리되어 오렌지 색을 띄게 된다.

2) 생성된 siderophore의 특성 동정

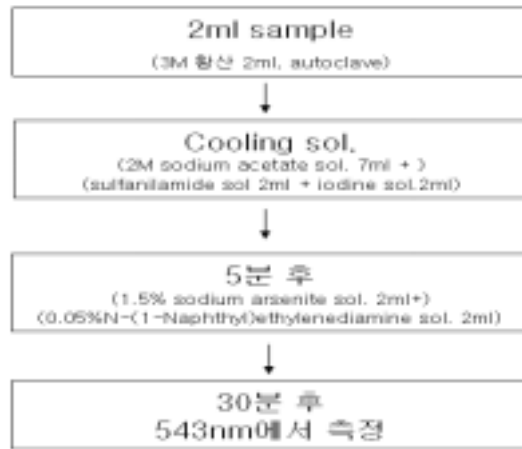
*Pseudomonas fluorescens*가 생성하는 물질로는 여러 가지가 있지만 대체로 Pyochelin과 ferric bactin은 300nm대에서 최대 흡수 spectrum을 나타내며 pseudobactin(395-405nm)과 pyoverdin(365-381nm)은 365-405nm대에서 최대 흡수 spectrum을 보인다.

이 물질의 형태를 알아보기 위하여 최대 흡광 spectrum 영역을 찾아 동정하였으

며, siderophore 생성유무는 물질의 특정 형태와는 관계가 없는 화학적인 분석방법을 사용하였다.

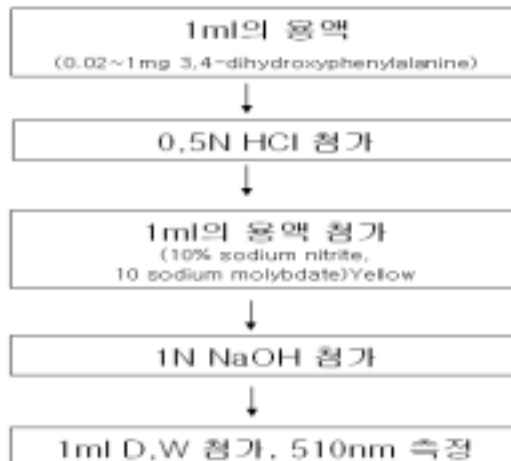
Siderophore는 가용성인 저분자 ferric iron-chelating 화합물이며 일반적으로 peptide 사슬로 연결된 황록색(yellow-green)의 색소를 띠는 fluorescent chromophore이다. 이는 peptide 사슬의 구성과 크기에 따라 크게 2가지의 구조적 형태로 나누어지는데, catechol(β -dihydroxybenzene)의 유도체로 catechol amides(phenolates, catecholates) 형태와 hydroxamic acid의 유도체로 hydroxamate 형태가 있다. catechol 형태의 siderophore는 enterobactin, parabactin, agrobactin, anguibacclin, vibriobactin, azotochelin 등이 있으며, hydroxamate 형태의 siderophore는 ferrichrome, ferrioxamine, coprogen, nocardamine 등이 있다. 또한 최근에 citrate-hydroxamate 형태의 siderophore로 arthrobactin, aerobactin, schizokinen, quinoline 형태의 siderophore로 pseudobactin이나 pyoverdin 등이 밝혀져 있다.

Catechol type의 siderophore는 배지 상등액을 Arraw의 방법을 사용하여 OH group를 가진 페놀계 물질인지를 510nm에서 확인하였으며, hydroxamate type의 siderophore는 Csaky과 Gillam 논문의 방법을 참조하여 hydroxylamine를 사용하여 543nm에서 측정하였다.



Standard solution : hydroxylamine HCl

Fig. 1-6. Determination of hydroxamate type of siderophore produced by *Pseudomonas fluorescens* K95009.



Standard solution :

1. 50mg, 3,4- dihydroxyphenylalanine(500ml)
2. 192mg, catechol(1liter)

Fig. 1-7. Determination of catechol type of siderophore produced by *Pseudomonas fluorescens* K95009.

나. 결과 및 고찰

1) *Pseudomonas fluorescens* K95009의 siderophore 생성 확인 실험

아래 그림(Fig. 1-8)에서 보면 siderophore 생성배지인 KB 배지에서만 형성을 나타내며 TSA(tryptic soy agar)와 NA(nutrient agar)에서는 형광을 관찰 할 수 없었다. 형광을 나타내는 주요물질이 siderophore 인지를 확인하기 위해 CAS 배지를 만든 후 배지위에 paper disc를 올려놓고 K95009를 20 μ l, 40 μ l를 접종 관찰한 결과 12시간 후 K95009를 접종한 paper disc 주위로 오렌지 색의 환이 관찰되었다. 대조군으로 접종한 *Bacillus* sp.에서는 색의 변화가 없었으나 *Pseudomonas fluorescens* K95009에서는 오렌지색의 환이 12시간내에 관찰되었다. 그리고 배양시간이 지속될수록 이 환의 크기는 지름 4cm 까지 커졌다. 이 결과로 인하여 볼 때 시간이 지남에 따라 Fe를 선점하여 다른 병원성 세균의 Fe 이용을 억제하여 병원성곰팡이의 발병을 낮출 수 있는 가능성 물질인 siderophore가 생성된 것으로 유추할 수 있다(Fig. 1-8, 9).

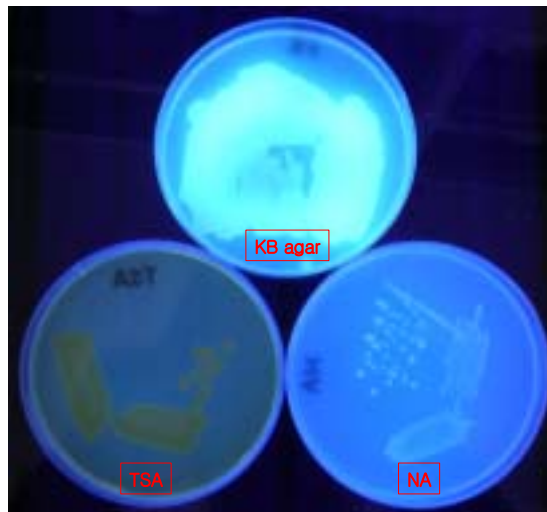


Fig. 1-8. Fluorescent formation of the siderophore produced by *Pseudomonas fluorescens* K95009 in KB, TSA, NA medium.

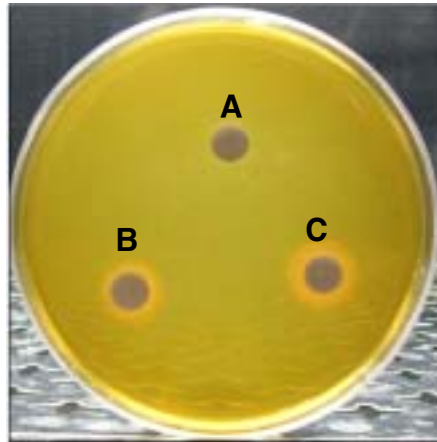


Fig. 1-9. Orange halo formation of the siderophore produced by *Pseudomonas fluorescens* K95009 in CAS medium.

A: *Bacillus* sp. 21003(20 μ l), B: *Pseudomonas fluorescens* K95009(20 μ l), C: *Pseudomonas fluorescens* K95009(40 μ l)

2) Siderophore의 항진균활성 실험

KB배지에 길항균을 배양한 후 cell을 제거한 supernatant 만을 이용하여 식물 병원균에 대한 항진균활성을 실험하였다. Fig. 1-10 에서 보는 것처럼 supernatant 를 농도별로 처리하였을때 농도에 비례하여 항진균활성을 나타내었다. 이것은 siderophore와 항진균물질의 작용으로 판단되어진다. 항진균성 항생물질 및 siderophore가 실제로 *Fusarium oxysporum*, *Pythium ultimum* 에 효과가 있는지를 pot에서 실험하였다(Fig. 1-11).

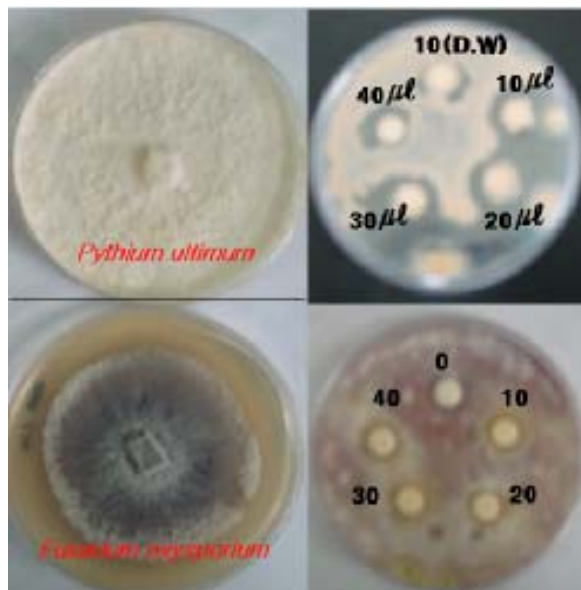


Fig 1-10. *In vitro* antagonistic test of siderophore produced by *Pseudomonas fluorescens* K95009 on phytopathogenic fungi after siderophore was applied on the paperdisc, it was placed on PDA agar plates, on which spores of *Pythium. ultimum.* , spores of *Fusarium oxysporum* were already scraped.



Fig. 1-11. *In vivo* antagonistic test of siderophore produced by *Pseudomonas fluorescens* K95009 on Fusarium wilt (*Fusarium oxysporum*).

A: Control, B: Only *Fusarium oxysporum*, C : Lettuce infected by *Fusarium oxysporum* and treated with 10ml of *Pseudomonas fluorescens* K95009 supernatant, D : Lettuce infected by *Fusarium oxysporum* and treated with 20 ml of *Pseudomonas fluorescens* K95009 supernatant.



Fig. 1-12. *In vivo* antagonistic test of siderophore produced by *Pseudomonas fluorescens* K95009 on Damping off (*Pythium ultimum*).

A: Control, B: Only *Pythium ultimum*, C : Cucumber infected by *Pythium ultimum* and treated with 10ml of *Pseudomonas fluorescens* K95009 supernatant, D : Cucumber infected by *Pythium ultimum* and treated with 20 ml of *Pseudomonas fluorescens* K95009 supernatant.

3) *Pseudomonas fluorescens* K95009가 생성하는 siderophore의 종류 및 특성

재료 및 방법에 나타난 두 가지 실험방법을 통해 대부분의 *Pseudomonas* sp. 들이 생산하는 물질들을 분류하는데 catechol type과 hydroxamate type 중 어느 부류에 속하는지를 실험한 결과 hydroxamate type의 형태로 밝혀졌으며 이 형태의 물질로는 pseudobactin과 pyoverdin 등이 대표적이다. 일반적으로 pyochelin과 ferric bactin은 300nm대에서 최대 흡수 spectrum을 나타내며 pseudobactin(395~405nm)과 pyoverdin(365~381nm)은 365-405nm대에서 최대 흡수 spectrum을 보인다고 알려져 있다. *Pseudomonas fluorescens* K95009가 생산하는 siderophore는 free siderophore 일때 390~405nm에서 최대의 흡수 spectrum을 나타내며 ferric siderophore 일때 최대 흡수 spectrum도 390~ 405nm을 약간만 벗어난다. 따라서 hydroxamate type의 pseudobactin 계열의 siderophore 인 것으로 판단된다. 지금까지 알려진 pseudobactin은 분자량이 989Da으로 2,3-diano-6,7-dihydroxy quinoline 형태의 yellow green fluorescent chromophore로 구성되며, 그 N-terminal의 6개의 아미노산이 직쇄상의 올리고 펩타이드로 연결되어 있다. 또한 N ϵ -hydroxyornitine 로 유도된 hydroxamate group과 β -hydroxyaspartic acid로 유도된 α -dihydroxy aromatic group 을 포함한다.

결론적으로 *Pseudomonas fluorescens* K95009는 siderophores(pseudobactin)를 분비함으로써 철의 고갈로 인하여 병원균의 생장이 억제 및 작물의 근권생장 (PGPR) 능력을 높여주거나, 항생물질을 생산함으로써 병원균이 저해 또는 사멸되거나, 식물체 합성저항성 (systemic resistance)을 유도하여 병원균의 감염으로부터 식물을 보호하여 간접적으로 식물 생육을 촉진할 수 있을 것으로 생각된다.

2절 길항세균의 배지 최적화 및 제제화 연구

1. 소용량 발효조에서의 최적화 연구

가. 재료 및 방법

1) 당농도의 분석

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

2) 균체농도 측정

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

3) 생균수 측정

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

4) 플라스크 최적 배양조건

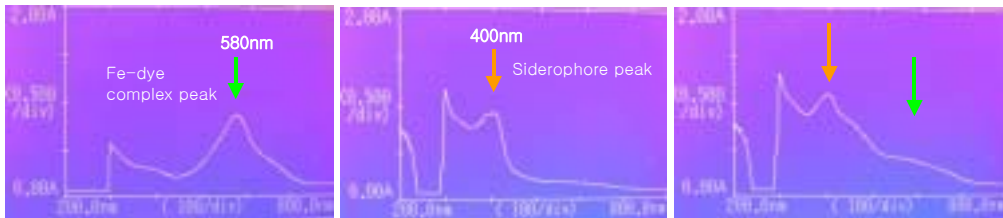
M9 basal medium(Na_2HPO_4 6g, KH_2PO_4 3g, NaCl 0.5g, NH_4Cl 1g)를 기본으로 탄소원과 질소원 농도에 따른 성장정도를 측정하였다. 0.1% yeast extract 질소원을 기준으로 탄소원에 따른 성장 정도를 측정하고, 결정된 탄소원을 기준으로 최적 질소원을 결정하였다.

5) 소용량 발효조(5L)에서의 최적화 연구

냉동보관된 균주를 영양한천배지(nutrient agar plate)상에서 배양한 후 colony를 선택하여 200ml의 flask culture medium이 들어 있는 500ml baffled flask에 접종하여 30℃, 150rpm으로 12시간 배양하여 준비하였다. 종균배양액을 2L가 들어 있는 5L jar fermentor에 접종하여 본 배양을 실시하였다. 배양조건은 온도는 30℃, 통기량은 1vvm이며 교반 속도는 용존산소(Dissolved Oxygen)의 농도가 20%가 유지 되도록 100rpm에서 단계적으로 증가 시켰다. 또한 발효중에 pH는 25% NH₄OH를 사용하여 pH 7.0으로 유지되도록 하였으며 발효시 기포의 발생을 방지하기 위하여 소포제(silicon 303 & Neorin)를 발효 배지내에 첨가 하였다. 5L 발효조에서의 배양공정 최적화를 위하여 5L jar fermentor (KFC5L; Korea Fermentor Co., Korea)를 사용하였다. 플라스크 배양에서의 최적 배지를 기본으로 5L에서 최대 성장배지 조건을 탐색하였다.

6) siderophore 생성량 측정

UV spectrophotometer를 통해 간접적인 siderophore 생성량을 측정하였다. 변형된 CAS assay 방법을 이용하여 Fe-dye complex의 탈색정도로 siderophore의 생성 유무를 확인하고, UV scan을 통해 peak를 확인하였다. 배양액을 원심분리하여 cell을 제거하고 상등액을 millipore filter(0.25µm)를 사용하여 균체를 완전히 제거시키고 흡광도를 측정하였다(Fig. 2-1)



A. Fe-dye solution B. KB culture supernatant C. Mix A and B

Fig. 2-1. Change of UV absorbance in the presence of siderophore.

Fe-dye complex가 blue color를 나타내는데 siderophore가 첨가되면 dye에서 Fe가 이탈되면서 색이 orange color로 변색되는 것으로 siderophore 생성유무를 확인하였다(Fig. 2-2).

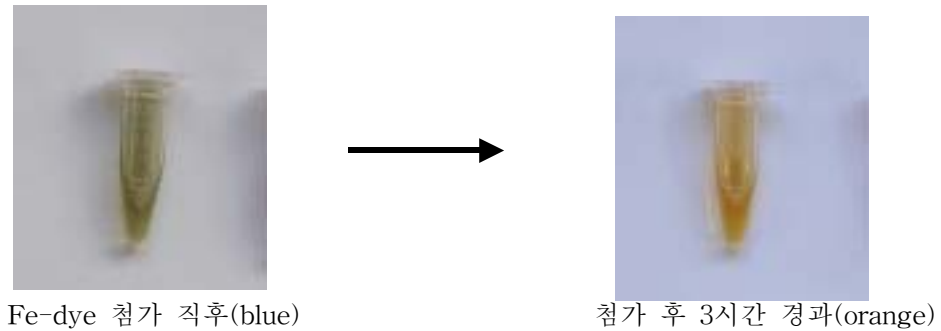


Fig. 2-2. Change of color in the presence of siderophore.

나. 결과 및 고찰

1) 플라스크 배양을 통한 배양 최적화

가) 길항세균의 탄소원 조사

Pseudomonas fluorescens K95009의 탄소원의 특성을 조사하기 위하여 플라스크 배양을 통해 glucose, fructose, galactose, maltose, sucrose, lactose, cellobiose, mannose, xylose, glycerol, arabinose, starch, mannitol, dextrose등에 대한 선호도를 조사하였다. 같은 조건에서 탄소원만 달리 하여 30℃, 140rpm에서 배양 12시간, 24시간에서 세포 성장도를 측정하였다. 그 결과 다음의 그림과 같이 mannitol이 약 5.24OD 까지 성장을 하였다. 세포건조중량은 L당 2.220g으로 다른 탄소원과 비교하여 가장 좋은 성장을 나타냈다. 그 다음 glycerol으로 세포 성장이 4.55OD로 세포건조 중량이 L당 중량이 1.58g로 나타났다. 이것은 glucose 세포의 성장은 glycerol보다 약간 낮은 4.645OD이지만 세포건조 중량은 L당 2.18g으로 더 많이 생산 되었다. 세포의 성장과 건조중량이 mannitol과 glycerol이 더 높게 나왔지만 kg당 가격이 산업용으로 활용하기엔 가격이 비싼 기질들이다. 따라서 이와 비슷한 수준의 세포 성장을 보이면서 산업적으로 사용하기에도 경쟁력이 우위인 glucose를 탄소원으로 1차 선정하였다(Fig. 2-3)

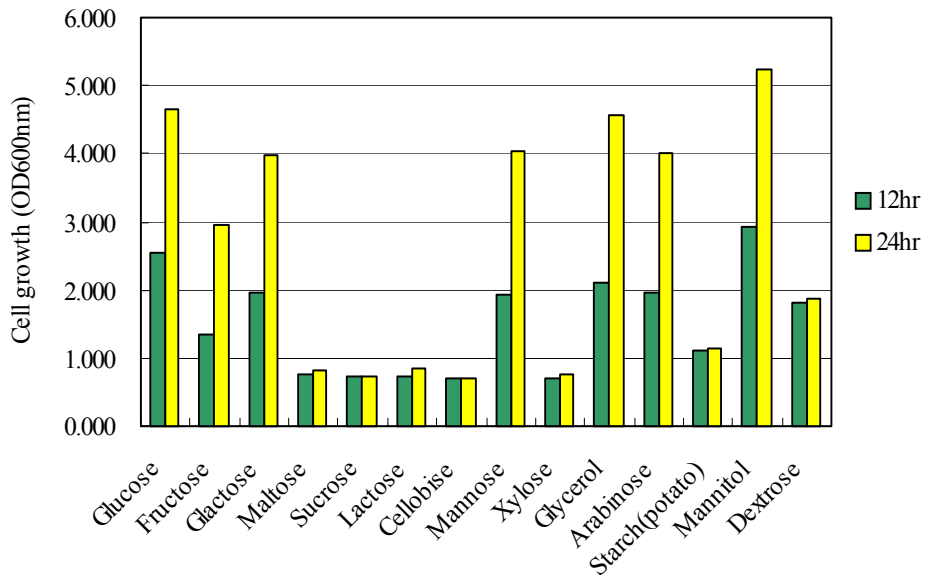


Fig. 2-3. Effect of various carbon sources on cell growth of antagonistic microorganism(*Pseudomonas fluorescens* K95009).

나) 길항세균의 질소원조사

길항미생물의 질소원을 조사하기 위하여 soybean meal, proteose peptone, bato-peptone, peptone G, soytone, tryptone, yeast extract, hydrolyzed casein, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl , NH_4NO_3 등 다양한 질소원에 대한 영향을 조사하였다. 탄소원은 1%로 glucose로 기준으로 하고 위의 다양 질소원을 대상으로 하여 조사하고 세포의 성장도를 탄소원과 같이 12시간, 24시간 경과 하여 흡광도 600nm에서 측정하였다. 그 결과 다음의 그림과 같이 yeast extract는 세포의 성장이 4.845OD정도 자랐으며 soybean meal은 4.610OD정도 까지 자랐다. 하지만 soybean meal은 soybean meal 자체의 입자들 때문에 약간의 오차가 있다. 세포의 건조 중량은 soybean meal과 yeast extract가 L당 1.77g으로 같게 나왔다. 그밖에 soytone에서 좋은 세포 성장을 나타냈다. 이와 같이 선발된 길항 세균은 콩을 원료로한 질소원 배지에서 잘 자라는 것으로 나타났다. 그러나 배지조제와 가격면에서 뒤지지 않은 yeast extract를 질소원으로 1차 선정하였다(Fig. 2-4).

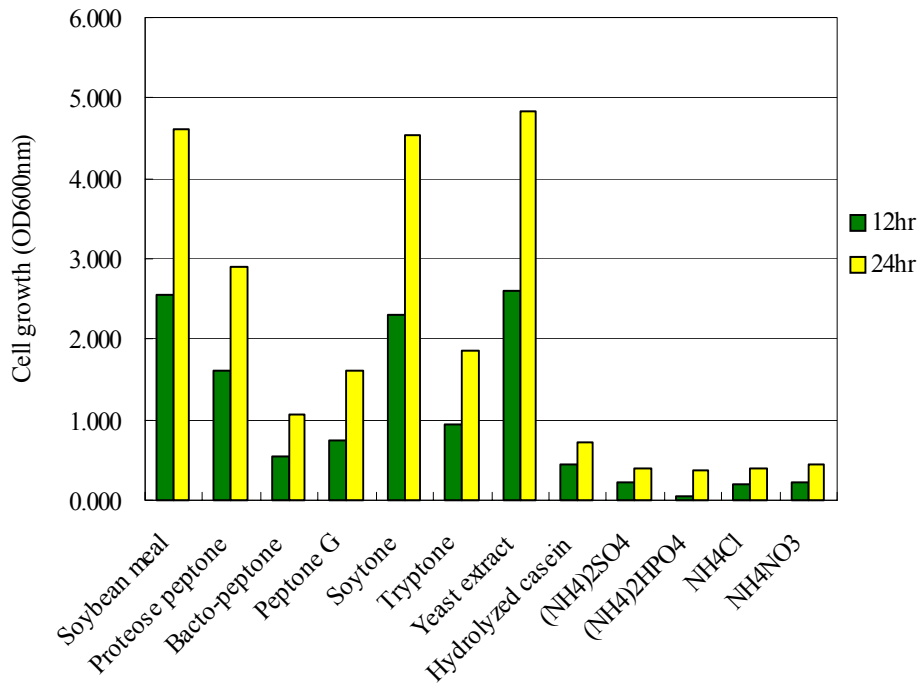


Fig. 2-4. Effect of various nitrogen sources on cell growth of antagonistic microorganism(*Pseudomonas fluorescens* K95009).

다) 길항세균의 미량 원소에 대한 영향 조사

길항미생물의 미량원소에 대한 영향을 조사하기 위하여 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , FeCl_3 , $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl} \cdot 6\text{HO}$, $\text{MnCl} \cdot 4\text{HO}$, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, CuSO_4 등에 대하여 조사 하였다. 그 결과 FeCl_3 가 가장 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다. 세포의 성장은 다른 미량 원소보다 높은 5.155OD로 가장 잘 자랐다. 세포건조 중량은 L당 1.45g으로 나타났고 $\text{MgCl} \cdot 6\text{HO}$ 은 약간 높은 1.53OD으로 나타났다. $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 와 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, CuSO_4 등은 세포의 성장을 저해하는 것처럼 나타났다. 대조구는 미량원소를 사용하지 않고 탄소원과 질소원 만을 사용하여 같은 조건에서 배양한 결과이다(Fig. 2-5).

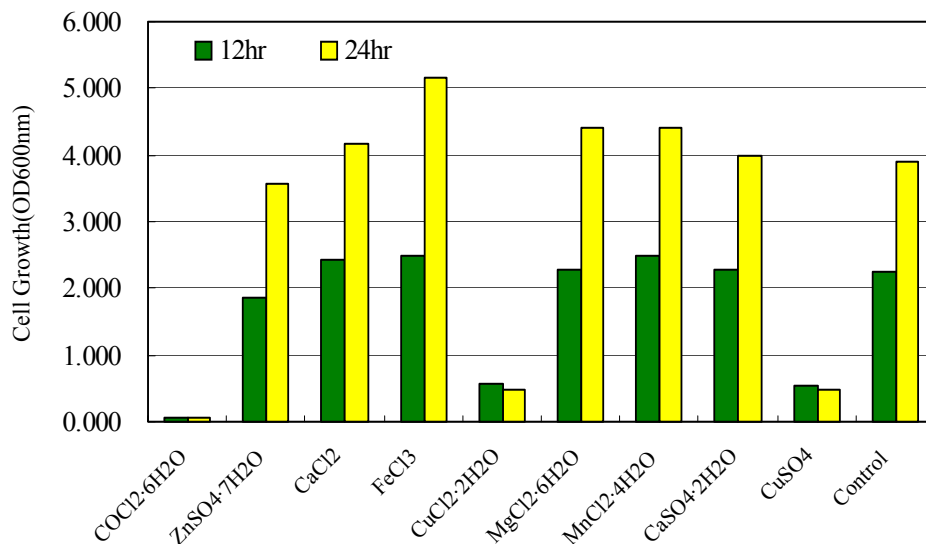


Fig. 2-5. Effect of various trace element sources on cell growth of antagonistic microorganism(*Pseudomonas fluorescens* K95009).

라) 탄소원 농도 변화에 따른 실험

탄소원 실험 결과 세포의 성장과 경제성을 고려하여 선정된 탄소원인 glucose 이 길항 균주 성장의 농도에 따른 영향을 조사하였다. 다른 배양조건을 동일하게 하고 탄소원의 농도를 L당 1, 3, 5, 10, 20, 30, 40, 50등의 농도로 변화 시켜 가면서 조사하였다. 그 결과 L당 10g의 농도에서 24시간 경과 하여 세포의 성장이 3.438OD정도까지 이르게 되었다(Fig. 2-6).

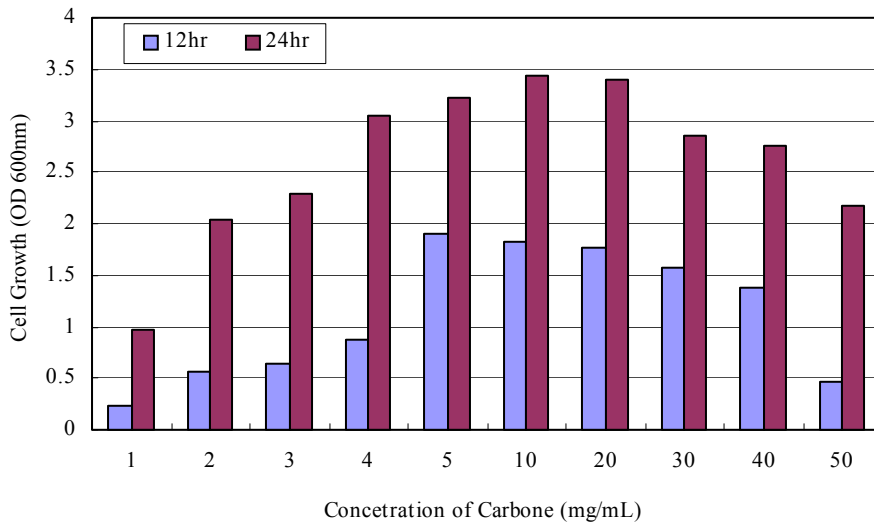


Fig. 2-6. Effect of cell growth on concentration of carbon sources

마) 질소원 농도 변화에 따른 실험

다양한 질소원에 대한 실험 결과 선정된 yeast extract 농도에 따른 길항 세균의 성장을 조사하기 위하여 glucose 농도를 10g/L으로 고정하고 yeast 농도를 L당 1, 2.5, 5, 10, 25, 50g로 변화하여 조사하였다. 12시간 경과하여 25g 첨가시의 세포 성장은 1.22OD로 50g첨가시 1.108보다 더 잘 자랐다. 하지만 24시간 경과 후에는 50g 첨가시는 세포의 성장이 더 이루어져 1.39OD까지 성장을 하였다(OD는 실제보다 10배 희석된 수치임). 전체적으로 세포의 성장은 질소원인 yeast extract량에 비례하여 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 2-7).

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

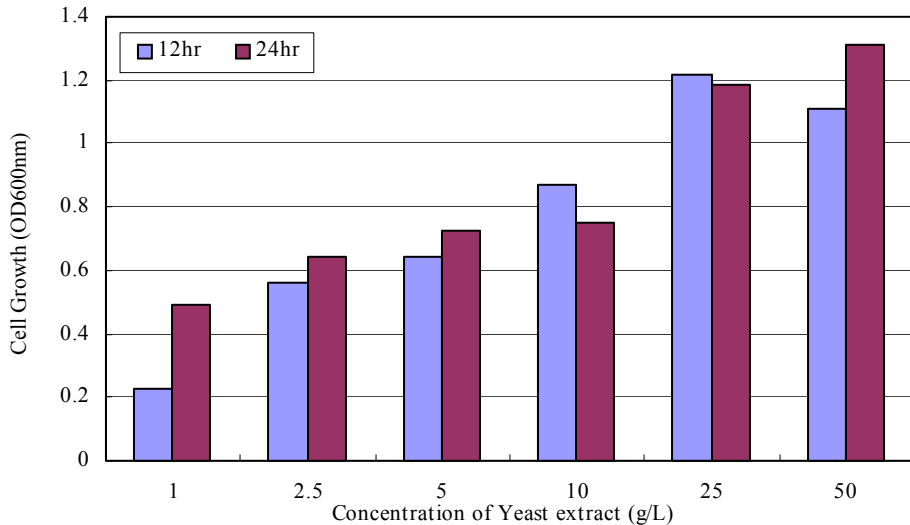


Fig. 2-7. Effect of cell growth on concentration of nitrogen sources.

바) 길항 세균의 pH에 따른 실험

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

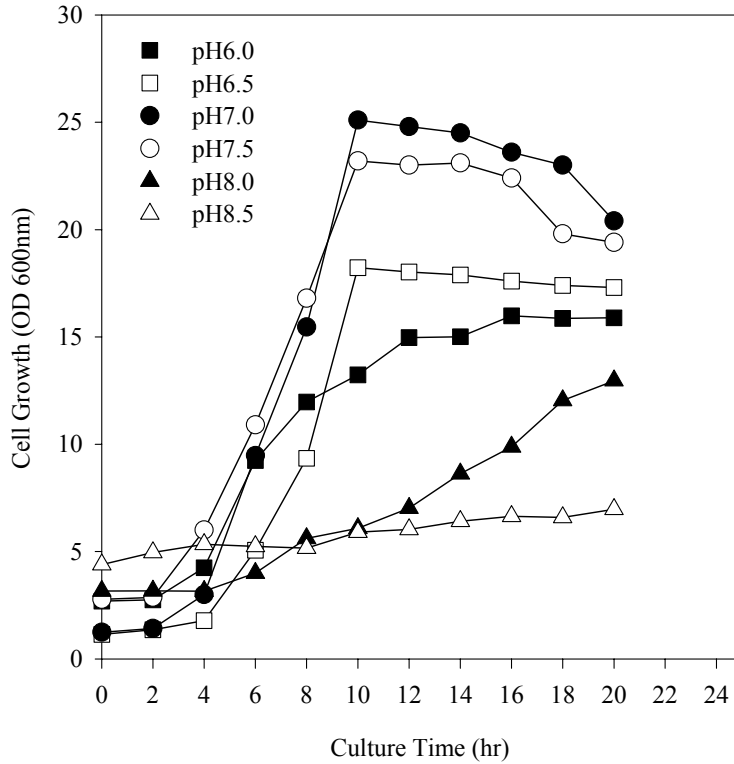


Fig. 2-8. Growth pattern of *Pseudomonas fluorescens* K95009 at various pH condition.

사) 길항 세균의 온도에 따른 실험

길항세균의 성장에 최적온도를 조사하기 위하여 25, 30, 35, 40°C의 범위에서 5L jar fermentaor에서 각각 배양하여 세포의 성장을 비교하여 보았다. 배지와 배양 공정 조건을 동일하게 하고 pH는 7.0으로 조절하였다. 그 결과 다음의 그림과 같이 30°C에서 가장 좋은 균주의 성장을 보였다. 40°C에서는 lag time이 8시

간정도 까지 지속 되었으며 최고성장도 15OD정도 가지 자랐다. 35℃에서는 비교적 40℃에서 보다 lag time이 짧았으나 최고 정장 정도는 40에서와 비슷한 수준인 14OD에 머물렀다. 25℃에서는 초기의 균성장은 초기는 비교적 다른 온도에서 보다 잘 자랐으나 최고 성장은 18OD에 이르고 이후로 사멸기로 들어갔다. 하지만 30℃에서는 배양 8시간 경과하여 30OD에 이르도록 성장하였다. 이후로 death phase로 들어가 최종 균주 OD는 18에 이르렀다.

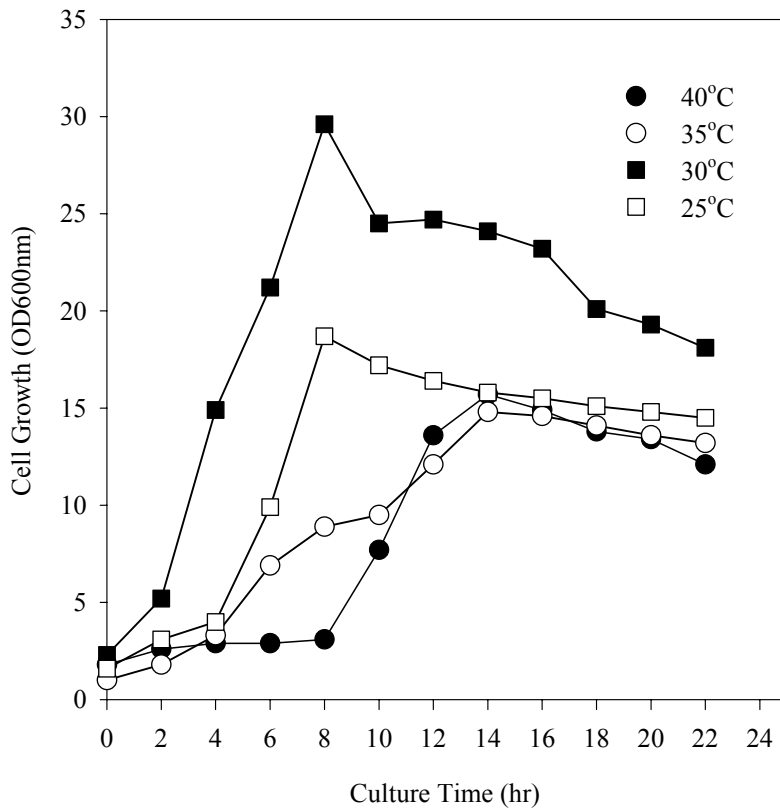


Fig. 2-9. Growth pattern of *Pseudomonas fluorescens* K95009 at various temperature condition.

아) 플라스크 조건에서 최대성장 배지 조성

여러 가지 배지 조성으로 성장을 검토한 결과 플라스크 배양에서 최적배지로 선발된 1번 배지(glucose 10g/L, yeast extract 25 10g/L, MgSO₄ 1g/L, K₂PO₄ 5g/L, (NH₄)₂SO₄ 10g/L)의 경우 최대 OD 값이 KB 배지와 비슷하게 성장하였고, glucose 량을 2배로 증가 시킨 2번 배지에서는 더욱 좋은 성장을 보였다. 그 이외에 asparagine 배지, succinate 배지 등에서는 성장이 저조하였으나 glycerol과 polypeptone 을 사용한 6번 배지에서 가장 높은 OD수치를 나타내었다(Table 2-1). 따라서, 질소원으로 polypeptone과 yeast extract을 사용하고 탄소원의 농도 별 성장 상태를 실험하였다(Table 2-2). glycerol 농도가 높아질수록 세포 농도가 높았으며, yeast extract와 polypeptone 에서는 같은 조건에서 비슷한 세포 농도를 나타내므로 polypeptone 보다 저렴한 yeast extract 가 적당한 질소원일 것으로 판단하였다.

Table. 2-1. Various composition of culture media for the maximum growth rate

	Medium (g/L)	max. OD(600nm)
KB	proteose-peptone No3 20, glycerol 10, K ₂ SO ₄ 10, MgCl ₂ 3.5	21.3
1	glucose 10, yeast extract 25, MgSO ₄ 1, K ₂ PO ₄ 5, (NH ₄) ₂ SO ₄ 10	24.0
2	glucose 20, yeast extract 25, MgSO ₄ 1, K ₂ PO ₄ 1, (NH ₄) ₂ SO ₄ 4	31.4
3	glucose 30, (NH ₄) ₂ SO ₄ 10, CaCO ₃ 5, NaCl 2, K ₂ HPO ₄ 0.5 MnSO ₄ 0.05	3.4
4	sucrose 20, asparagine 2, K ₂ HPO ₄ 1, MgSO ₄ 0.5, (NH ₄) ₂ SO ₄ 5	1.6
5	sucrose 20, peptone 20, K ₂ HPO ₄ 2.5, MgSO ₄ 6	17.0
6	glycerol 20, polypeptone 20, K ₂ HPO ₄ 1.5, MgSO ₄ 1.5	35.5
7	sodium succinate 4, K ₂ HPO ₄ 6, K ₂ HPO ₄ 3, (NH ₄) ₂ SO ₄ 2, MgSO ₄ 0.2	1.25

Table 2-2. Various composition of culture media for the maximum growth rate

	Medium (g/L)	max. OD(600nm)
KA	proteose-peptone No3 20, glycerol 10, K ₂ HPO ₄ 1.5, MgSO ₄ 1.5	35.0
1	glucose 20, polypeptone 20, K ₂ HPO ₄ 1.5, MgSO ₄ 1.5, (NH ₄) ₂ SO ₄ 4	32.0
2	sodium succinate 20, polypeptone 20, K ₂ HPO ₄ 1.5, MgSO ₄ 1.5, (NH ₄) ₂ SO ₄ 4	27.0
3	glucose 20, yeast extract 25, K ₂ HPO ₄ 1.5, MgSO ₄ 1.5	30.9
4	glycerol 40, polypeptone 20, K ₂ HPO ₄ 1.5, MgSO ₄ 1.5	50.0
5	glycerol 40, yeast extract 20, K ₂ HPO ₄ 1.5, MgSO ₄ 1.5	49.7

자) siderophore 생성 배지 조성 탐색

앞선 실험에서 플라스크 상에서 최대 세포 농도 OD(600nm) 50까지 성장시킬 수 있는 배지 조건을 선별하였다. 하지만, 이것은 길항력과 생육 촉진에 관여하는 siderophore 생성 배지 조성은 아니다. 따라서 최대 성장을 하며 siderophore를 생성할 수 있는 배지 조성을 검색하였다(Table 2-3). 이 실험에서 모든 배지는 탈철화를 시키지 않은 상태로 실험을 수행하였다. 왜냐하면, 산업화 규모의 배지에서 탈철화를 시킨 배지를 사용한다는 것은 추가 비용 부분이 상당히 발생하므로 경제성을 고려하지 않을 수 없다. *Pseudomonas fluorescens*의 경우 적정량의 철(Fe) 성분이 배지에 존재할 때 최대의 siderophore를 생성한다는 보고들이 있었다. 2번 배지에서 가장 강한 yellow green을 나타내며 UV 스캔에서도 403nm에서 가장 큰 peak를 나타냈다(Fig. 2-10, 11). siderophore 생성배지인 KB 배지보다 많은 양을 생성하였으며, 배양 36시간에 가장 많은 siderophore를 생성하였고 그 이후로는 조금씩 감소하는 경향을 보였다. 따라서, 고가의 siderophore 생성배지인 KB 배지를 대신하여 저렴한 배지 조성으로 많은 양의 siderophore를 생성할 수 있는 배지 조성을 찾아 GLYE 배지라 명명하였다.

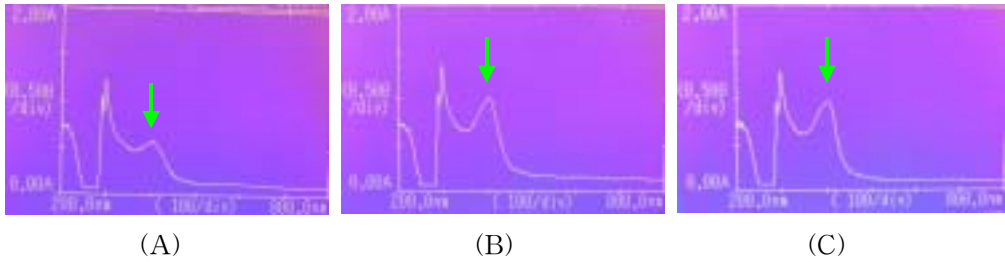


Fig. 2-10. Absorption spectra(200-800nm) of clear supernatants from cultures of the *Pseudomonas fluorescens* K95009 strain grown in the GLYE medium(A; after 24hr, B ; after 36hr, C ; after 48hr).

구분	12hr	18hr	24hr	30hr	36hr	48hr	60hr	KB
ABS(403nm)	-	2.43	2.91	3.92	5.08	4.89	4.18	2.53
OD(600nm)	12.0	21.5	27.6	30.8	35.7	36.3	35.5	29.4

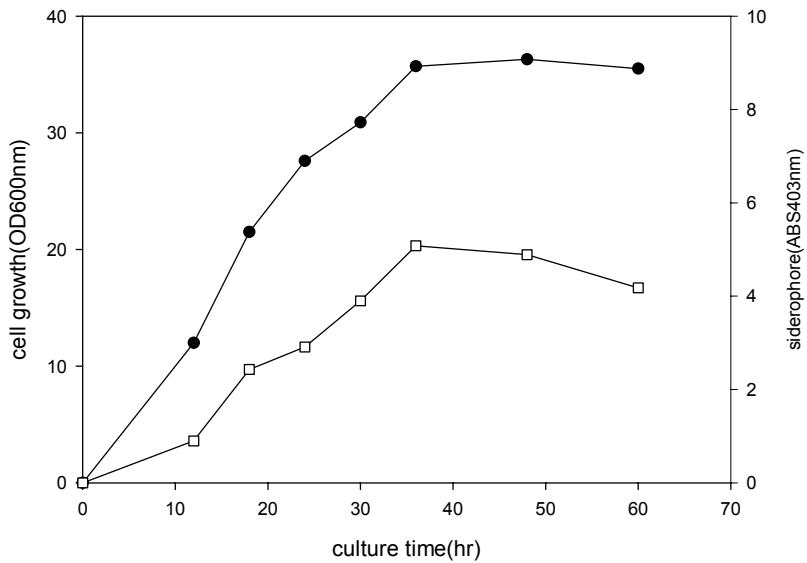


Fig. 2-11. Cell growth pattern and siderophore production at NO. 2 culture medium(cell growth ; closed circle, siderophore productivity ; open square).

Table 2-3. Composition of culture media for siderophore production.

	Medium (g/L)	max. OD(600nm)
KB	proteose-peptone No3 20, glycerol 10, K ₂ SO ₄ 10, MgCl ₂ 3.5	29.4
KA	proteose-peptone No3 20, glycerol 10, K ₂ HPO ₄ 1.5, MgSO ₄ 1.5	37.0
1	glycerol 40, polypeptone 20, K ₂ SO ₄ 10, MgCl ₂ 3.5	46.1
2	glycerol 40, yeast extract 20, K ₂ SO ₄ 10, MgCl ₂ 3.5	36.5
3	glucose 20, polypeptone 20, K ₂ SO ₄ 10, MgCl ₂ 3.5	23.1
4	succinate 20, polypeptone 20, K ₂ SO ₄ 10, MgCl ₂ 3.5	27.0

차) siderophore 최대 생성배지 조건

GLYE 배지 조성으로 다양한 조합을 통한 최대의 siderophore 생성배지 조건을 탐색하였다. 몇 번의 실험을 통해 검증한 결과 배지의 조합에 따라 siderophore 생성량이 크게 좌우되었다. 최대의 세포 농도 OD를 나타내는 GLYE 배지 조성일지라도 siderophore 생성과는 비례관계에 있지 못하며, 무기염의 종류에 따라서도 siderophore 생성이 크게 좌우되었다(Table 2-4). 무기염이 다른 GLYE 1과 GLYE 4를 비교하면 GLYE 4는 GLYE 1에 비해 최대 세포성장은 높지만 siderophore 생성량은 매우 적다. GLYE 2의 경우 GLYE 1에 비해 배지 농도와 최대 세포 성장은 높지만 siderophore 생성량은 적다. 그리고, GLYE 3의 경우도 배지 농도는 GLYE 1의 2배나 높고 최대 성장 농도 또한 1.5배도 높음에도 불구하고 생성 siderophore 량은 배수로 늘지 않았다. 따라서, glycerol 과 yeast extract 의 조합 및 비율이 siderophore 생성에 매우 중요한 변수로 작용한다는 것을 알 수 있었다.

Table 2-4. Composition of culture media for maximum siderophore production

	Medium (g/L)	max OD(600nm)	ABS (403nm)
GLYE 1	glycerol 40, yeast extract 20, K ₂ SO ₄ 10, MgCl ₂ 3.5	33.5	3.52
GLYE 2	glycerol 30, yeast extract 30, K ₂ SO ₄ 10, MgCl ₂ 3.5	40.4	-
GLYE 3	glycerol 60, yeast extract 30, K ₂ SO ₄ 10, MgCl ₂ 3.5	47.3	4.76
GLYE 4	glycerol 40, yeast extract 20, K ₂ SO ₄ 1.5, MgSO ₄ 1.5	50.9	-

2) 5L 발효조에서의 배양공정의 최적화

Pseudomonas fluorescens K95009를 이용한 탄소원, 질소원, 미량원소 실험을 통하여 최대의 성장과 siderophore를 생성하는 GLYE 3배지 조성을 최적배지로 결정하였다. 그리고 균주의 성장 최적 온도와 pH를 조사하여 배양 자료로 활용하였다. 배양온도는 30℃로 유지 하였으며 pH는 NH₄OH를 사용하여 7.0으로 조절하였다. 종배양은 tryptic soy broth 에 12시간 배양하여 사용하였다. 종배양은 주배양의 5%를 접종하여 사용하였다. 주배양은 working volume 2L로 하였으며 aeration과 agitation을 이용하여 배양 중 배양액의 용존산소(DO)를 10%이상으로 유지하였다. 그 결과 Fig. 2-12에서와 같은 성장을 보였다. GLYE 3 배지 (glycerol 60g/L, yeast extract 30g/L, K₂SO₄ 10g/L, MgCl₂ 3.5g/L)를 기본으로 batch culture 방식의 최대 성장농도는 OD(600nm) 47.0까지 이르렀다. fed-batch culture 방식으로 최대 성장 농도를 높이고자 glycerol 30g/L 농도로 2회 첨가하였다. 첨가시점은 세포가 급격히 성장하는 시점인 용존산소량이 급격히 감소하고 pH가 감소하다가 상승으로 전환하기 직전에 첨가하는 방식으로 2회 feeding 하였다. fed-batch culture 의 최대의 세포 농도는 104OD까지 이르렀다. 이때의 세포수는 5.4×10^{11} c.f.u/ml 이었다. 따라서, 대량 발효조인 300L 와 2500L에서 재현하고자 하였다.

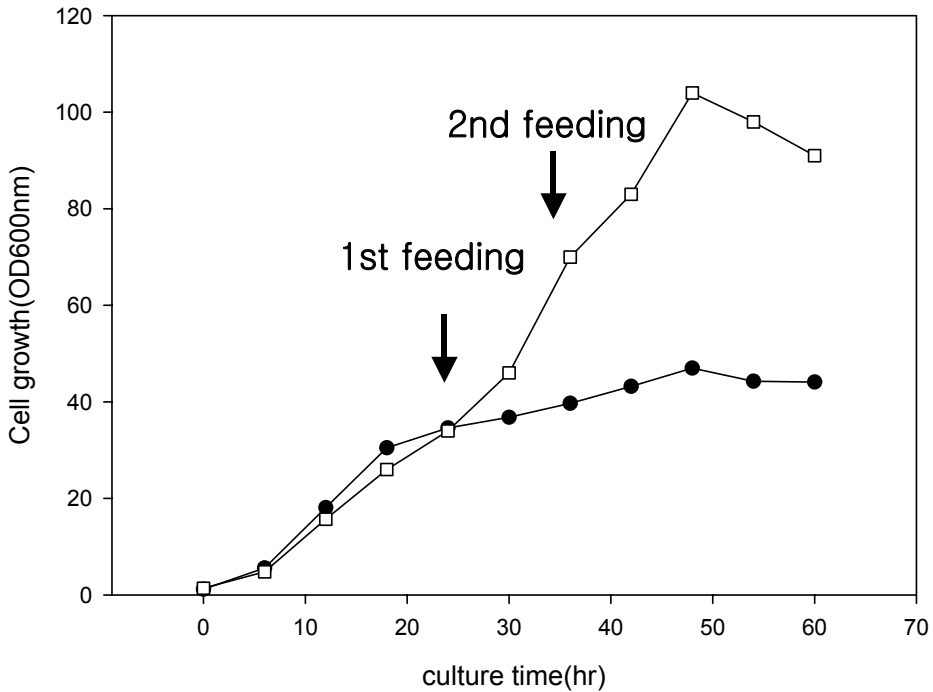


Fig. 2-12. Growth pattern of *Pseudomonas fluorescens* K95009 by culture time condition(batch culture ; closed circle, fed batch culture ; opened square).

2. 대용량 발효조에서의 최적화 연구

가. *Bacillus* sp. BIG 21003 균주의 300L 및 2500L 발효조 최적화연구

1) 재료 및 방법

가) 공시 균주 및 보존

본 연구에 사용된 균주는 *Bacillus*. sp. BIG21003을 사용하였다. 사용 균주는 NB medium에서 대수기 중기까지 액체 배양한 후 30% glycerol에 현탁하여 vial의 형태로 80°C deep freezer에서 장기적으로 냉동 보존하면서 주로 사용하였다. 또한 동결 건조하여 ampule을 제조하여 보관하였다.

나) 균체농도 측정

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

다) 포도당 농도 측정

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

라) 300 L 및 2500L 발효조에서의 최적화 연구

Pilot plant scale fermentor에서의 최적화 공정을 위하여 한국생명공학연구원에 설치된 300L pilot plant scale fermentor(한국발효기, 한국)제품을 사용하였다. 5L jar fermentor는 비아이지 자체 보유하고 있는 한국발효기 5L fermentor를 사용하여 최적화 하였다. Seed culture는 본 발효의 10% vol.으로 nutrient broth로 준비하고 배양온도는 30℃, pH는 NH₄OH와 함께 7.0로 조절 유지하였다. Aeration은 1vvm으로 유지하고 Agitation은 5L에서는 100~1400으로, pilot plant scale fermentor에서는 100~500으로 조절하여 배양 중의 용존산소(DO)를 20% 이상 유지하여 배양하였다.

2) 결과 및 고찰

가) 300 liter modified fed-batch culture공정

본 연구에서 확립한 *Bacillus* sp. 에 대한 산업용 배지 조건을 BIG21003에 적용하여 배양을 수행한 결과 산업용 수준의 생산성을 나타냈다. 배양조건은 배지 glucose 20g/L, MgSO₄ 1g/L, yeast extract 33g/L, K₂HPO₄ 1g/L, (NH₄)₂SO₄ 4g/L, CaCl₂ 0.1g/L, MnSO₄ 0.07g/L 를 start 배지로 하여 glucose 가 소진되는 시점에 glucose 20g/L 으로 2회 feeding 방식으로 배양하였다. 이것을 300 liter 발효기 조건 하에서 working volume 150L 로 재현하였다.

배양 14시간 후에 glucose를 1차 feeding 하였고 4시간이 경과한 배양 18시간에 2차 feeding 을 하였다. 배양 26시간 후부터 포자형성이 관찰되었으며 접종 40시간 후 배양을 종료하였다. 5L 발효기에서와 거의 비슷한 수준의 최대 세포 88.0OD 까지 성장하였다(Fig. 2-13).

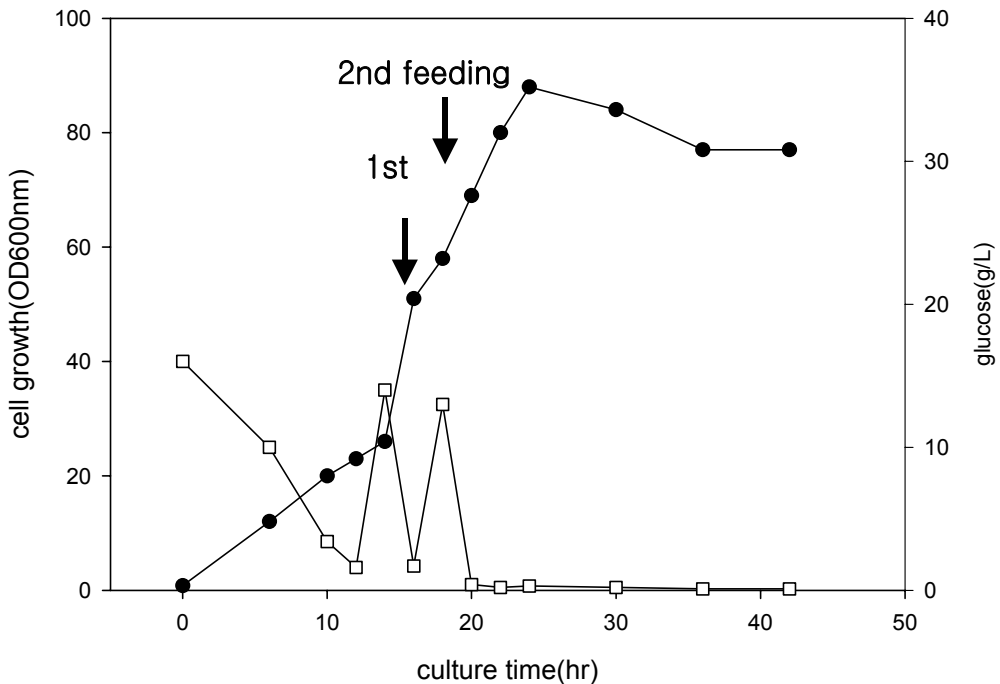


Fig. 2-13. Growth pattern and glucose utilization of *Bacillus* sp. BIG21003 at 300L pilot plant fermentor(cell growth ; closed circle, glucose concentration ; opened square).

나) 2500 liter modified fed-batch culture공정

300L에서의 배양 결과를 바탕으로 2500L에서 재현하였다. NB 배지 5L 플라스크에 seed를 접종하여 12시간 배양한 다음 300L 배양기에 접종하여 12hrs 배양한 것을 2500L 접종원으로 transfer하였다. working volume 1500L로 배양을 수행한 결과 접종 6시간이 지나자 처음 배지에 포함되어 있던 glucose가 대부분 소모되었으며 feeding을 시작 하였다. 1차 feeding은 접종 후 배양 6시간 후, 2차는 2시간이 경과한 배양 8시간째에 feeding을 완료하였다. 포자형성은 feeding 완료 후 10시간 경과 시점부터 관찰되었으며, 20시간 후에 배양을 완전 종결하였다.

300L부터 2500L까지 총 배양시간은 40hrs 이었으며, 300L에서 보다 2500L에서 성장 속도가 매우 빨랐다. 즉, 최대 OD에 이르는 시간과 glucose 소모시간이 짧았다. 이것은 배양초기에 충분한 DO와 RPM을 유지하는 것이 매우 중요하다는 것을 보여준다. 결론적으로 glucose 를 feeding 하는 fed-batch culture 방식으로 높은 수준의 세포농도를 얻을 수 있었다.

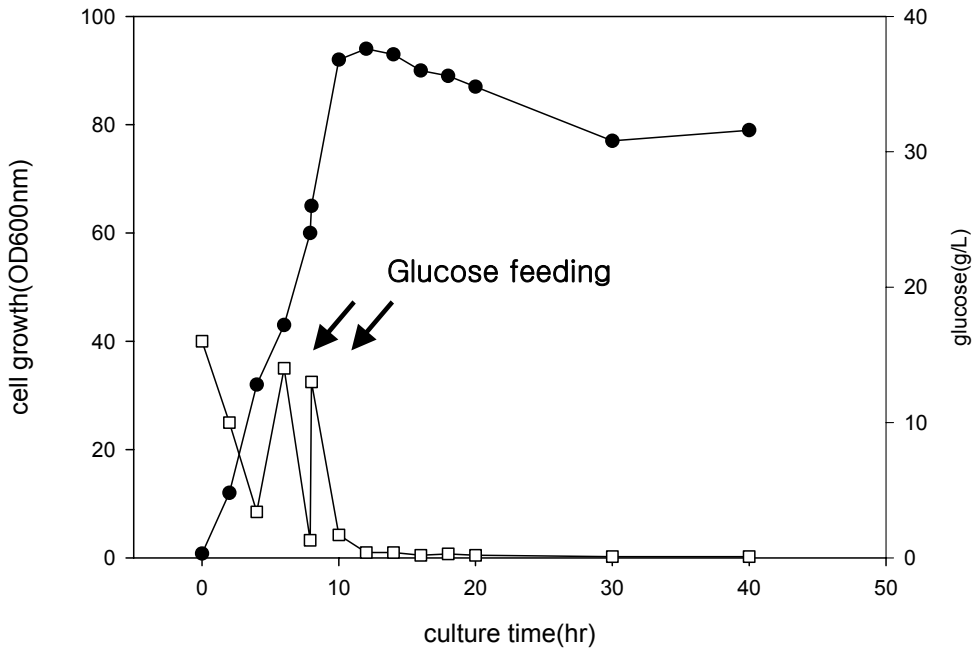


Fig. 2-14) Growth pattern and glucose utilization of *Bacillus* sp. BIG21003 at 2500L pilot plant fermentor (cell growth ; closed circle, glucose concentration ; opened square).

나. *Pseudomonas fluorescens* K95009의 300L 및 2500L 발효조 최적화연구

1) 재료 및 방법

Bacillus sp. BIG21003의 재료 및 방법과 동일.

2) 결과 및 고찰

가) 대용량 발효조(300L)의 대량생산 공정 연구

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

300L 발효조에서의 배양공정 최적화를 위하여 생명공학연구원 산업화 지원실 300L pilot plant fermentor (KFC 300, Korea Fermentor Co.)를 사용하였다.

이 실험을 위해 사용한 발효기는 Fig. 2-15 에 300L, 2500L발효조의 geometric 구조를 자세히 나타내었다. 발효조의 impeller type은 Fed-batch시 발효조 내에서 mixing에 가장 효과적인 제일 하부 1단 impeller는 six-blade type(43%) 그리고 중간부와 상부 impeller는 six-blade pitched type(43%)을 사용하였다. Six-blade pitched type(43%)의 pitch angle은 30°로 된 impeller를 사용하였다.

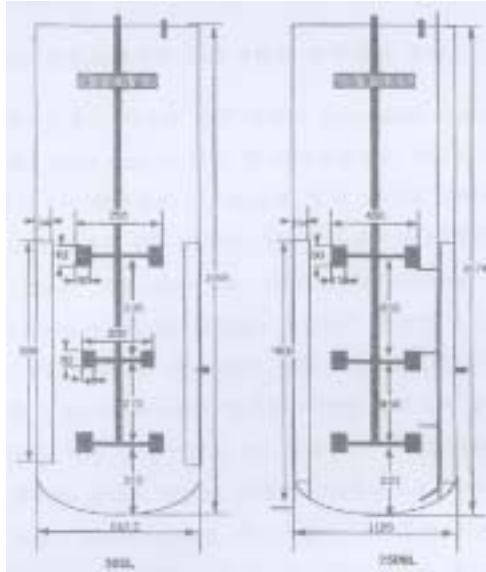


Fig. 2-15. Geometric structure of 300L and 2500L fermentor (the numbers indicate the scale in millimeter)

사용한 배지는 산업용 등급제품으로 5L에서 최적화한 배지와 배양조건을 가지고 사용하였으며 성분(g/L)은 glycerol 60, yeast extract 30, K_2SO_4 10, $MgCl_2$ 3.5 을 사용하였다. glycerol이 소진되는 시점에 30g/L로 2회 feeding 해 줌으로써 최대 세포성장을 유도하였다. siderophore 생성량의 측정은 간접적인 방법에 의해 정량하였다. 앞에서 언급했듯이 siderophore 생성배지인 KB 배지를 기준으로 생성량을 간접 정량하였다. 배양액을 5배 희석하여 403nm에서 최대의 흡수파장을 나타내는 값을 읽었다. siderophore 생성은 적정량의 Fe의 존재뿐만 아니라 배지의 배합비와 발효 조건 등에 크게 좌우되며 특히 어떤 배지를 사용하였는지에 따라 생성량에는 많은 차이를 보인다. 세포 농도 증가와 siderophore 생성량과는 완전한 정비례 관계에 있다고 볼 수는 없으며, 일정기간이 지나면 더 이상 증가를 보이지 않고 오히려 더 감소하는 경향이 있다. feeding 후에 생성배지 조건에 변화가 생겨 세포 농도는 높아질지는 모르나 siderophore 생성량은 많아지지 않았다.

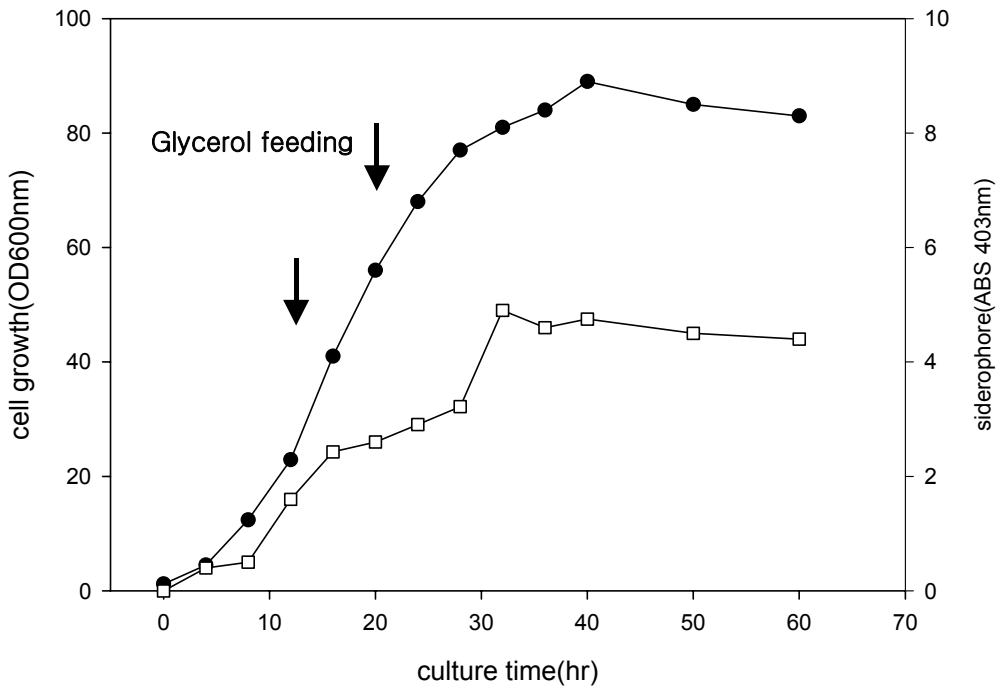


Fig. 2-16. Growth pattern of *Pseudomonas fluorescens* K95009 by culture time condition (cell growth ; closed circle, siderophore production ; opened square).

나) 대용량 발효조(2500L)의 대량생산 공정 연구

1차 종배양은 본 발효의 5L flask에 2L vol.으로 tryptic soy broth 로 준비하고 배양온도는 30℃, 140rpm에서 12시간 배양하여 준비하였다. 2차 seed 배양은 300L에서 배양온도는 30℃로 조절하고 pH는 NH₄OH와 함께 7.0로 조절 유지하였다. 2차 seed 배양은 배양 12시간 경과하여 working vol. 1500L의 배지가 준비된 2500L 발효조로 멸균 라인을 통하여 접종하였다. 배양조건은 온도는 30℃, 통기량은 1vvm이며 교반 속도는 용존산소(DO)의 농도가 20%가 유지 되도록 100rpm에서 단계적으로 증가 시켰다. 또한 발효 중에 pH는 NH₄OH를 사용하여 pH 7.0으로 유지되도록 하였으며 발효시 기포의 발생을 방지하기 위하여 소포제

(silicon 303 & Neorin)를 발효 배지 내에 첨가 하였다.

2500L 발효조에서의 배양공정 최적화를 위하여 2500L pilot plant fermentor (KFC 300, Korea Fermentor Co.)를 사용하였다. 2500L에서도 300L에서 최적화한 배지와 배양조건을 가지고 배양하였으며 배지는 GLYE 3 로 배양조건은 pH는 7.0, 온도는 30℃로 유지하였으며 aeration은 1vvm 그리고 agitaiton은 100~200rpm까지 사용하여 배양 중 배지 내 용존산소(DO)를 20% 이상으로 유지하도록 하였다. 300L와 마찬가지로 glycerol이 소진되는 시점에 30g/L 농도로 2회 feeding하여 최대 세포 농도를 얻고자 하였다. 발효 수행시 배지 내 pH는 NH₄OH를 사용하여 조절하였다.

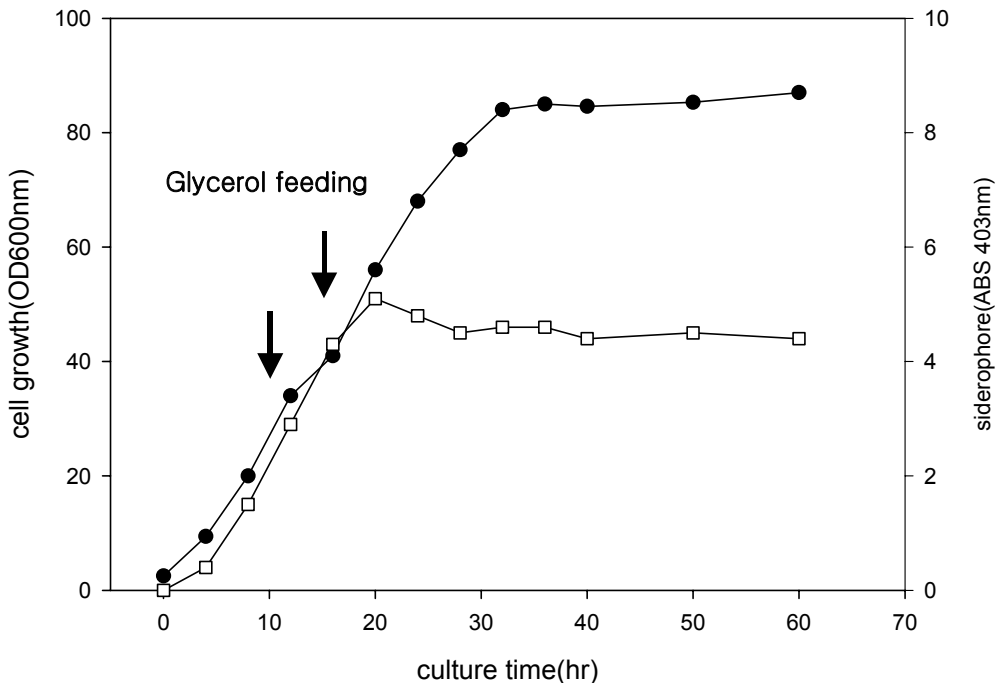


Fig. 2-17. Growth pattern of *Pseudomonas fluorescens* K95009 by culture time condition (cell growth ; closed circle, siderophore production ; opened square)

준 산업용 발효조인 2500L에서 최대 세포 성장농도는 80OD 이상을 나타냈고 siderophore 도 분비하였다. 산업용 규모의 경제성을 고려한다면 저렴한 배지와 단기간의 배양시간이 상당히 중요하다. 본 배양 조건을 토대로 배양을 수행한다면 탈철화되지 않은 배지로 siderophore 생성을 유도할 수 있고, 비교적 저렴한 배지 조성으로 생산력을 높일 수 있을 것으로 판단된다. 최초 배양시에 사용한 배지 조성에서 siderophore의 생성이 결정되었고 추가적으로 feeding하는 glycerol 은 세포 농도를 높이거나 siderophore 생성에는 큰 영향을 미치지 못하였다.

3절 미생물 안정적 제제 개발

1. *Bacillus* sp. BIG21003균의 안정화

가. 재료 및 방법

1) spray dry

실험용 스프레이 드라이어는 BUCHI 社가 제조한 모델명 minispray dryer B-191을 사용하였으며, 생산용 스프레이 드라이어는 생명공학연구원 산업화지원실의 유진테크에서 제조한 처리용량 15kg/hr 의 dish type 기기를 임대하여 사용하였다. inlet temp. 180℃이며, outlet temp. 100℃ 조건하에서 분무건조를 수행하였다.

2) freeze dry

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

3) 경시변화

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

나. 결과 및 고찰

포자의 경우 열안정성이 있으므로 비용적인 측면을 고려하면 동결건조 방법에 비해 Hot spray dry 방식이 경제적으로 유리하다. spore는 열에 어느 정도 안정하나 최적의 spray dry 조건과 활성을 유지시킬 수 있는 열 안정화 물질을 탐색

하고자 다양한 당류와 polymer를 대상으로 테스트를 하였다. 포자수 측정은 80℃에서 10분간 열처리하여 세포를 사멸시킨 다음 통상의 평판회석법을 사용하여 측정하였다.

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

Table 3-1. Yield and dispersibility of *Bacillus sp.* BIG21003 wettable powder on various source

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

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

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

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

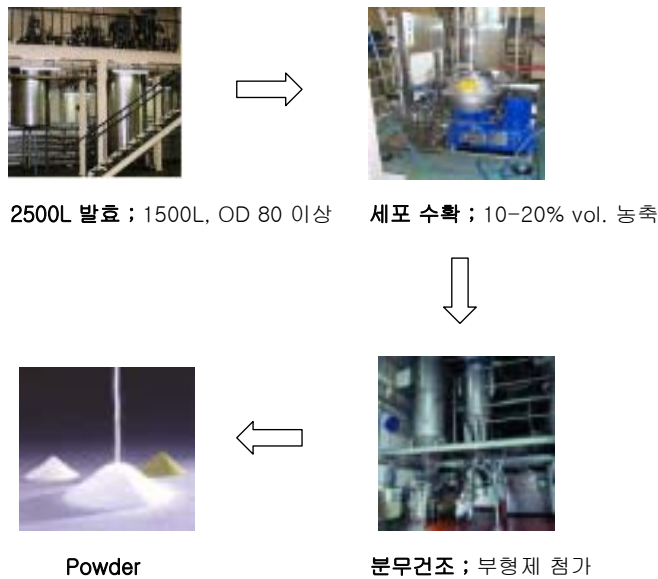


Fig. 3-1. Scheme of spray dry process.

이것은 변성 전분으로 기능성물질 등을 포집(encapsulation)하여 안정화시키는 능력이 우수하며, 냉수에 쉽게 용해되고 점도가 낮아 고농도의 용액 제조가 가능하여 분무공정에 적합한 물성을 갖추고 있다. 이와 같이 선정된 galactose와 sun-cap을 사용하여 pilot plant scale인 300L와 2500L 발효조에서 배양한 배양 *Bacillus* sp. BIG21003를 VMF centrifuge로 harvest 하여 spray dry를 하였다.

2. *Pseudomonas fluorescens* K95009균의 안정화

가. 재료 및 방법

Bacillus sp. 제제 안정화 방법과 동일.

나. 결과 및 고찰

1) Freeze dry 방법을 통한 세포 안정화

gram(-) 균주인 K95009는 spray dry 과정 중에 발생하는 고열에 견딜 수 있는 열 안정성을 부여하는 물질은 찾을 수 없었다. 따라서, 순간이지만 고열을 거쳐야하는 spray dry 방법은 *Pseudomonas* sp. 에는 적당하지 않는 것으로 판단하였다. 경제적인 면에서 다소 비싸지만 동결건조 방법을 통해 세포의 안정화를 모색하였다. Hot spray dry 방법과 동일하게 각 시료와 cell을 처리한 후 -70℃에서 24hr 동안 예비 동결한 다음 freeze dry를 수행하고 40℃에서 저장 안정성 screening을 수행하였다.

다양한 polymer를 안정제로 첨가하여 cell의 저장성을 확보하는 실험을 수행한 결과 수용액 상태에서 점도가 너무 높아 적은 양을 녹일 수 있는 polymer와 불용성 그리고 합성 폴리머 등은 저장 안정성이 떨어졌다. 반면에 일반적으로 많이 사용하고 있는 소재들에서는 무처리에 비해 저장 안정성을 나타내었는데 일반적으로 사용되는 skim-milk에서 가장 좋은 저장 안정성 효과를 나타내었으며, 다음으로 soluble starch, levan 순이었다(Fig. 3-2).

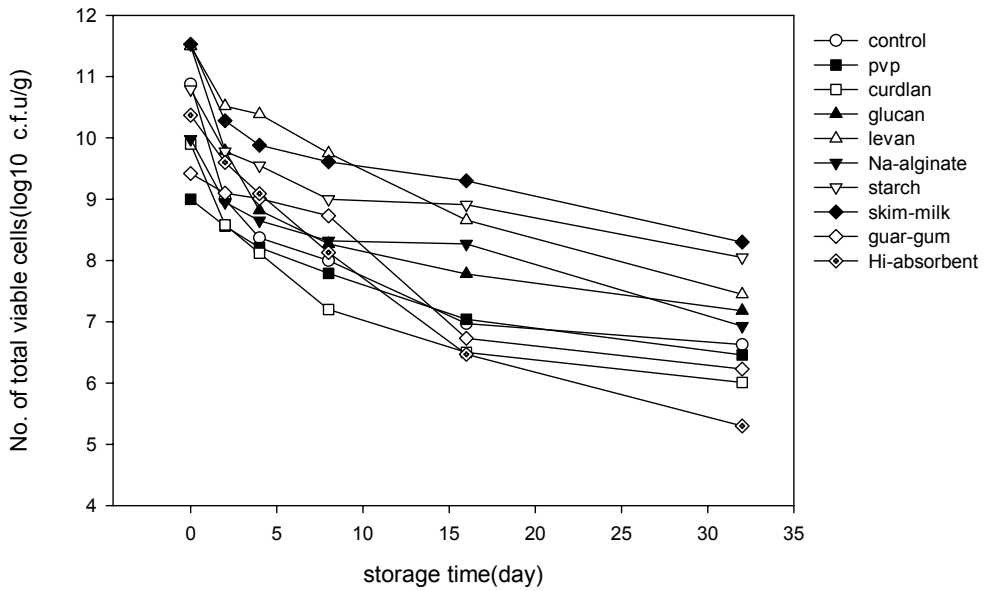


Fig. 3-2. Effect of various polymer on viability of *Pseudomonas fluorescens* K95009 formulated by the stabilize process and stored at 40°C from 0 to 32days.

다양한 당류에 대한 저장 안정성 실험을 수행하였다. lactose와 sucrose를 안정제로 첨가한 것을 제외하고는 무처리 보다 좋은 저장 안정성을 나타냈다. skim-milk와 비교해서 말토오즈(maltose)와 물엿(millet jelly)이 더 나은 저장 안정성을 나타냈다. 이상의 결과를 검토하여 보면, K95009 균을 동결건조 방법으로 적당한 부형제/안정제를 투입하여 안정성을 일정기간 동안 확보할 수는 있지만 동결건조를 해야하는 비용부담을 안고 있다. 또한, 안정성이 확보되었다 하더라도 이것을 종자 코팅에 적용하는데는 여러 가지 문제점을 가지고 있다.

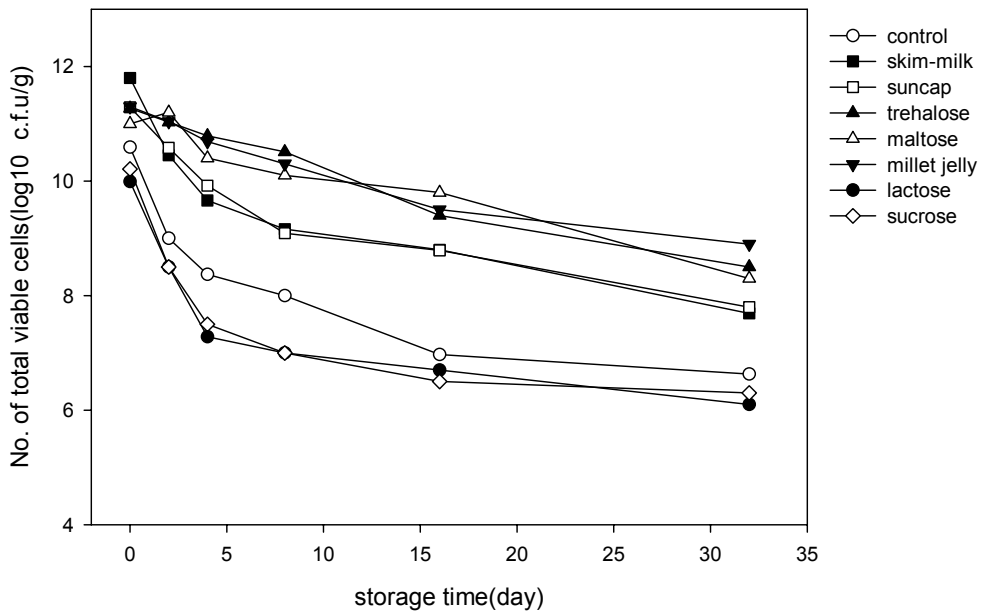


Fig. 3-3. Effect of various sugar on viability of *Pseudomonas fluorescens* K95009 formulated by the stabilize process and stored at 40°C from 0 to 32days.

2) 흡착(adsorption)을 이용한 세포 안정화

gram(-) 균주인 *Pseudomonas* sp. 은 장시간 보관을 위한 제제가 곤란한 것이 현실이며, 장기 보관용 제제가 성공적으로 이루어졌다고 하더라도 종자코팅에 적용하여 균주를 안정화시키기는 어렵다. 왜냐하면, 수분이 없는 종자코팅을 수행할 수 없으며 따라서, 반듯이 코팅과정에는 제제화된 균주가 몇 분에서 몇 시간까지 수분과 접촉해 있어야 함으로 균주는 damage 를 입게 된다. 또한, 코팅 후에 건조과정을 거치므로 여기에도 2차 damage 를 입게 된다. 전처리 즉, 제제가 아무리 잘 되었다고 하더라도 코팅과정에서 거쳐야 하는 공정상의 문제로 완벽한 제제를 기대하기는 힘들다. 흡착을 통한 제제화는 단순하면서 비용적인 면을 고려한다면 매우 경제적인 방법 중에 하나이다. 흡유·흡수능력이 좋은 증량제를 사용하여 세포를 흡착하여 사용하는 방법인데 증량제의 종류에 따라 흡유가에는 상당한 차이를 보인다.

Table 3-3. Adsorption rate of a various carrier

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

† 흡유가는 물질이 아미닌유를 흡착하는 양으로 표시

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

4절 주요 작물의 생리적 특성에 관한 연구

1. 주요작물의 Priming 조건 구명

가. 공시재료 및 조사방법

Table 4-1. List of seed used in this experiment

Crop	C.V	Production company
Codonopsis	Taekisan	태기산더덕육묘농가
	U-rake	Mikado, Japan
Lettuce	Seonpung	Kwonong, Korea
	Grand rapid	Kaneko, Japan
Onion	Changnyung-daego	창녕농협
	Higuma	Takii, Japan
	Mussang-5-chon	Hungnong, Korea
Carrot	Goldrich	Sakada, Japan
	Kounyurum	Konong, Korea
	KB108	한국엽연초연구소
Tobacco	Burley. 21	한국엽연초연구소
	Reams 266	National tobacco administration

공시재료는 Table 4-1과 같이 5종 작물을 대상으로 더덕을 제외하고 작물별 3 품종으로 선정하여 실험에 이용하였다. 더덕의 경우는 실제 종묘회사를 통한 유통이 현실적으로 이루어지지 않고 있어서 강원도 태기산 더덕재배 농가로부터 분양받아 실험에 사용하였다.

최종발아율에 대한 50% 발아에 소요되는 일수(T_{50})는 다음의 공식을 이용하여 조사하였다).

$$T_{50} = T_i + \frac{(N + 1)/2 - N_i}{(N_j - N_i)} \times (T_j - T_i)$$

N : 최종 발아조사기간까지 발아된 전체 종자수

N_i : N에 대한 50% 직전까지 발아된 종자수의 합계

N_j : N에 대한 50% 직후에 발아된 종자수의 합계

Ti : Ni 시점까지 소요된 발아기간
Tj : Nj 시점까지 소요된 발아기간
단, Ni < (N+1)/2 < Nj 이어야 한다.

평균 발아일수는 다음과 같은 공식을 이용하였으며, 기타 조사항목은 AOSA, ISTA 기준에 준하여 실시하였다.

$$MDG = \frac{\sum(Gt \times Dt)}{\sum Gt},$$

Gt : t 시간당 종자 발아립수, Dt : 발아 소요일수

더덕 종자는 강원도 태기산에서 분양받아 사용하였으며, 종자의 priming 처리는 2℃에서 7일간 저온처리 후 처리된 종자를 다시 GA₃ 1000ppm에 침지하여 10일간 종자를 2℃에 암상 저온처리, KNO₃ 100uM에 침지하여 3일간 종자를 암상 실온처리하였다. 시험은 filterpaper 2매를 간 직경 9cm petridish에 12ml의 증류수를 넣고 100립의 종자를 3반복 치상한후 각 온도별로 암상태의 incubator에서 매일 발아율을 조사하였다.

상추 종자는 양상추인 U-RAKE, 적상추인 선풍포참, 청상추인 그랜드래피드를 이용하였다. 상추 종자의 적정 priming 처리물질을 선발하기 위하여 KH₂PO₄, GA₃, PEG-8000을 12시간 침지처리하였고 처리별로 3수준으로 농도를 달리 처리한 후 distilled water로 3회 수세후 온풍기 25℃에서 건조하였으며, 건조된 종자는 직경 9cm petri dish에 filter paper 2매를 깔고 100립씩 3반복 치상한후 20℃ incubator에서 발아율, 평균발아일수, T₅₀을 조사하였다.

양파 종자는 Higuma(Japan), Changnyungdaego(Korea)를 이용하였으며 priming에 효과가 있는 KH₂PO₄, Ca(NO₃)₂, PEG-8000을 이용하여 10℃에서 48시간 처리후, 처리별로 3수준으로 농도를 달리 처리한 후 distilled water로 3회 수세후 온풍기 25℃에서 건조하였으며, 건조된 종자를 직경 9cm petridish에 filter paper 2매를 깔고 100립씩 3반복으로 치상하여 22℃ incubator에서 발아율, 평균 발아일수, T₅₀을 조사하였다.

당근 종자는 Mussang-5-chon, Goldrich, Kounyurum 품종을 이용하였으며, priming에 효과가 있는 PEG-8000, GA₃를 이용하여 10℃에서 48시간 처리후, 처리별로 3수준으로 농도를 달리 처리한 후 distilled water로 3회 수세하여 온풍기 25℃에서 건조하였으며, 건조된 종자를 직경 9cm petridish에 filter paper 2매를 깔고 100립씩 3반복으로 치상하여 21℃ incubator에서 발아율, 평균발아일수, T₅₀을 조사하였다.

담배 종자는 KB108, Burley 21. Reams 266(National Tobacco Administration, 2001)을 이용하였다. Priming처리 물질로는 Lee 및 Kang등이 발아율 증진 및 발

아세 단축에 효과가 있다고 보고한 KNO₃, PEG-8000 및 GA₃등을 이용하여 농도별로 처리하였다. 처리 기간은 48시간, 처리온도는 25℃로 적색광을 조사하며 처리하였으며, 처리후 distilled water로 3회 수세후 20℃ 온풍기에서 건조시킨 종자를 직경 9cm의 petridish에 filter paper 2매를 깔고 100립씩 3반복으로 치상하여 28℃ light incubator에서 평균발아일수, T₅₀을 조사하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 더덕

Table 4-2와 Fig. 4-1에서 보는 것처럼 온도 20℃에서 GA₃ 처리구의 발아율이 97%로 가장 높은 발아율을 보였고, 무처리 대비 22.7%의 발아율이 증가되었음을 알 수 있었다. 처리물질은 GA₃가 KNO₃ 보다 효과적임을 알 수 있었다. 특히 30℃의 처리에서는 GA₃처리의 경우 73.9%, 20℃에서는 97%로 고온하에서 발아율이 떨어지며, 온도별로는 20℃>25℃>15℃>30℃순으로 발아율이 좋게 나타났다. 평균발아소요일수는 20℃에서 GA₃ 처리구에서 8.6일로 무처리 10.1일에 비해 1.5일이 단축되었다. 한편, T₅₀은 30℃에서 무처리 대비 1.7일이 단축된 GA₃처리구가 가장 priming처리 효과가 있었는데 이는 생육적온인 20℃에서 고온처리구로 갈수록 GA₃의 T₅₀의 단축효과가 크다는 것으로 사료된다.

Table 4-2. The relation between temperature and seed vigour in dark place

Temperature	Treat.	MDG(days) ^y	T ₅₀ (days) ^z
15℃	Control	10.4	9.5
	GA ₃	8.8	8.1
	KNO ₃	9.3	8.6
20℃	Control	10.1	9.0
	GA ₃	8.6	7.9
	KNO ₃	9.4	8.2
25℃	Control	11.3	10.8
	GA ₃	9.6	9.3
	KNO ₃	9.8	9.4
30℃	Control	14.2	12.6
	GA ₃	11.2	10.9
	KNO ₃	13.0	11.7

^y MDG: Mean germination days

^z T₅₀ : days to 50% of the final germination

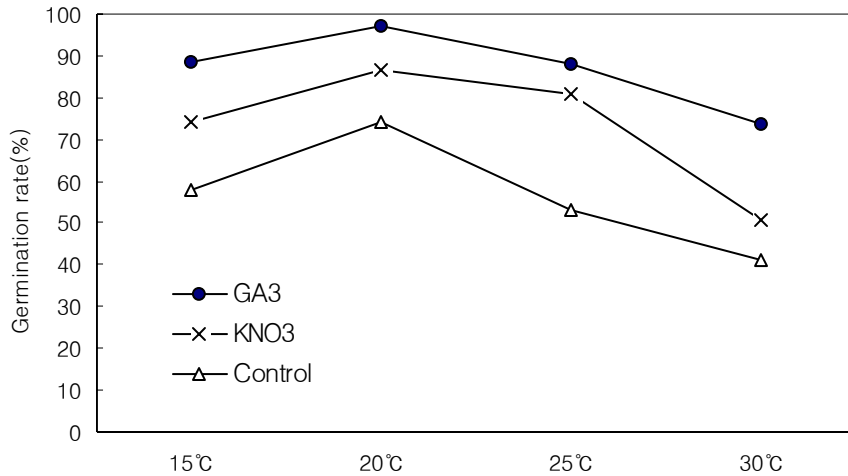


Fig. 4-1. Effect of temperature on germination in dark place.

2) 상추

양상추 U-rake는 KH_2PO_4 50mM, GA_3 500ppm, PEG-8000 -0.25MPa에서 각각 98.3%, 98.2%, 97.1%로 무처리 95.3%보다 발아율이 향상 되었으며, 적상추 Seonpung도 유사한 경향이였다. 상추 종자의 발아는 여러 가지 특이성 때문에 수많은 생리실험에서 다루어지고 있으며 gibberellin, kinetin, benzyladenine은 고온상태 하에서도 발아촉진의 효과가 있다고 보고되어 가을재배를 위한 여름 파종시 pellet 종자 가공전 GA_3 priming처리를 한다면 발아율 및 노지 포장에서의 안정적인 입모율 확보가 가능할 것으로 사료된다. 한편 청상추 Grandrapid는 KH_2PO_4 100mM에서 93.7%의 발아율로 무처리 88.7%보다 발아율이 좋게 나타냈다. U-rake, Grandrapid의 경우 PEG-8000 -0.25MPa, Seonpung은 KH_2PO_4 50mM에서 무처리에 비해 0.7~0.5일정도 T_{50} 이 단축되는 경향이였다.

Table 4-3. Germination and T_{50} of Lettuce as affected by KH_2PO_4 concentrations at different cultivars

C.V	Concentration (mM)	MDG (days) ^y	T_{50} (days) ^z
U-rake	Control	1.3	2.1
	50	1.1	1.9
	100	1.1	2.0
	200	1.1	2.0
Seonpung	Control	1.6	2.4
	50	1.3	1.9
	100	1.3	2.2
	200	1.3	2.2
Grand rapid	Control	2.3	2.8
	50	2.0	2.3
	100	1.7	2.2
	200	1.9	2.2

^{y, z} ; See the Table 4-2.

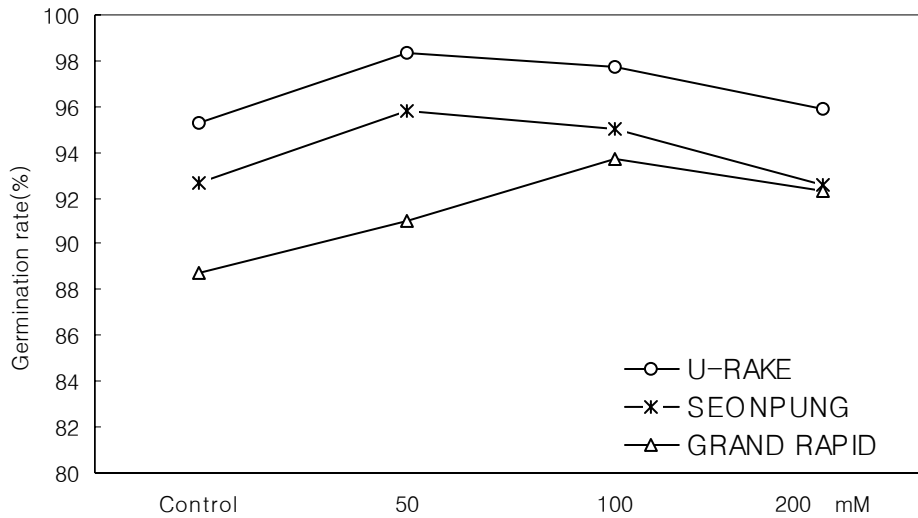


Fig. 4-2. Final percentage germination of lettuce at the different cultivars as influenced by KH_2PO_4 concentrations.

Table 4-4. Germination and T₅₀ of Lettuce as affected by GA₃ concentrations at different cultivars

C.V	Concentration (ppm)	MDG(days) ^y	T ₅₀ (days) ^z
R-rake	Control	1.3	2.1
	100	1.2	1.9
	500	1.1	1.7
	1000	1.2	1.9
Seonpung	Control	1.6	2.4
	100	1.3	2.3
	500	1.2	2.0
	1000	1.3	2.2
Grand rapid	Control	2.3	2.8
	100	2.0	2.4
	500	1.5	2.1
	1000	1.9	2.2

y, z ; See the Table 4-2.

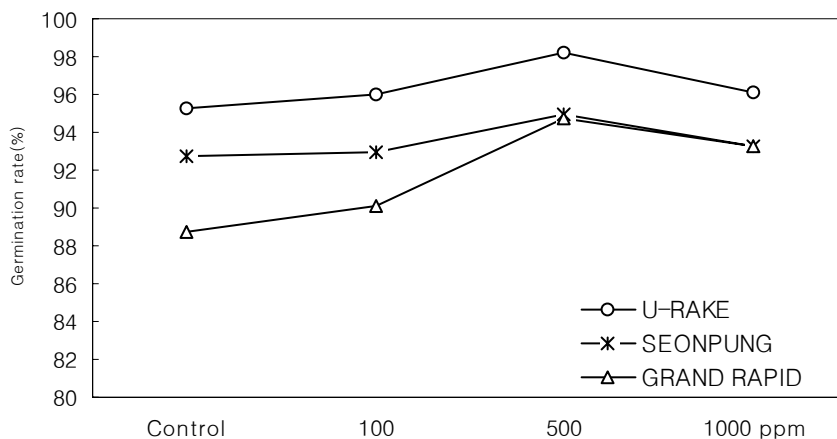


Fig. 4-3. Final percentage germination of Lettuce at the different cultivars as influenced by GA₃ concentrations.

Table 4-5. Germination and T_{50} of Lettuce as affected by PEG-8000 concentrations at different cultivars

C.V	Concentration (-MPa)	MDG (days) ^y	T_{50} (days) ^z
U-rake	Control	1.3	2.1
	0.25	1.0	1.5
	0.50	1.1	1.7
	0.75	1.2	1.7
Seonpung	Control	1.6	2.4
	0.25	1.3	2.0
	0.50	1.2	2.1
	0.75	1.2	2.1
Grand rapid	Control	2.3	2.8
	0.25	1.9	2.0
	0.50	2.1	2.1
	0.75	2.1	2.2

^{y, z} ; See the Table 4-2.

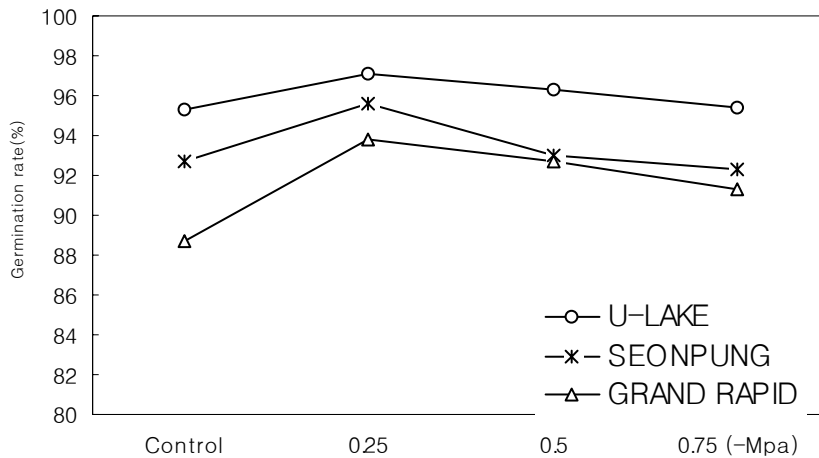


Fig. 4-4. Final percentage germination of Lettuce at the different cultivars as influenced by PEG-8000 concentrations.

3) 양파

Changnyung-daego는 KH_2PO_4 200mM에서 발아율, MDG, T_{50} 이 가장 양호하였으며, 50mM에서는 오히려 무처리에 비해 발아율, MDG, T_{50} 등이 불량하였다. Higuma의 경우도 창녕대고와 마찬가지로 KH_2PO_4 200mM에서 발아율, MDG, T_{50} 이 가장 양호하였으나 무처리에 비해 큰 증가는 없었다.

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 를 이용한 priming처리에서는 창녕대고, 히구마 모두 200mM에서 대조구에 비해 발아율 향상 및 MDG, T_{50} 의 단축현상이 뚜렷하였다. 창녕대고의 경우 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 200mM에서 MDG가 2.9일로 무처리 3.9일에 비해 1일이 단축되었다.

PEG-8000 -0.5MPa에서도 창녕대고, 히구마 모두 발아율 향상 및 MDG, T_{50} 의 단축효과가 뚜렷하였는데 특히 MDG의 단축효과가 크게 나타났다. Haigh 등은 양파종자를 ($\text{K}_3\text{PO}_4+\text{KNO}_3$) -1.00MPa의 priming처리에서 무처리종자에 비하여 발아소요일수는 2배이상 단축되었다고 하였다. 또한 양파종자의 Priming은 발아율 향상 및 발아소요일수가 단축되었으며, 봄과 여름과중시 유묘출현소요일수 단축에 효과적 이었다. 또한 양파 종자처리시 발아율은 종자처리와 처리온도에 따라서는 0.1%수준에서 유의차가 있었으며, 처리기간에 따라서는 5%수준에서 유의차가 인정된다는 보고도 있다.

양파의 Priming 처리물질로는 PEG-8000 -0.5MPa과 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 200mM이 발아율 향상 및 MDG, T_{50} 의 단축이 뚜렷하여 적용가능성이 높다고 사료된다.

Table 4-6. Germination and T_{50} of Onion as affected by KH_2PO_4 concentrations at different cultivars

C.V	concentration (mM)	MDG (days) ^y	T_{50} (days) ^z
Changnyung - daego	Control	3.9	3.1
	50	4.1	3.3
	100	4.0	3.0
	200	3.9	2.9
Higuma	Control	3.3	2.9
	50	3.6	3.3
	100	3.2	2.8
	200	3.1	2.6

^{y, z} ; See the Table 4-2.

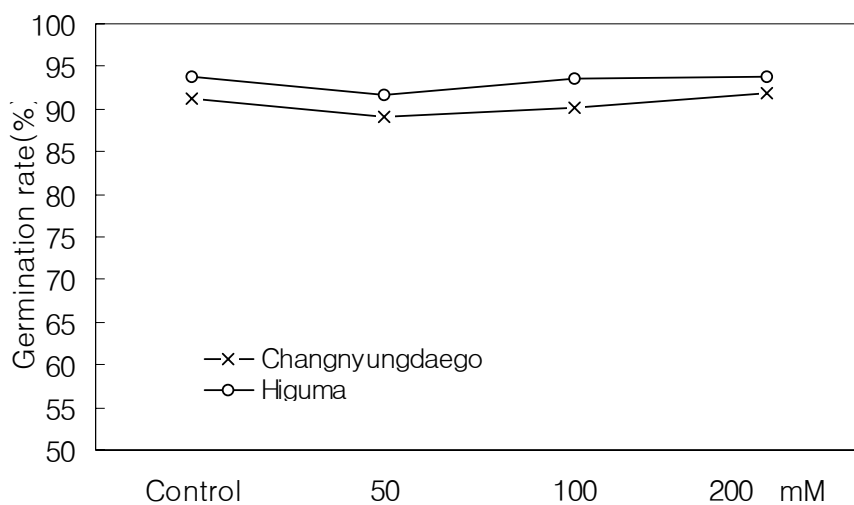


Fig. 4-5. Final percentage germination of Onion at the different cultivars as influenced by KH_2PO_4 concentrations.

Table 4-7. Germination and T_{50} of Onion as affected by $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ concentrations at different cultivars

C.V	Concentration (mM)	MDG (days) ^y	T_{50} (days) ^z
Changnyung - daego	Control	3.9	3.1
	50	4.1	3.3
	100	3.4	2.9
	200	2.9	2.5
Higuma	Control	3.3	2.9
	50	3.6	3.1
	100	3.2	2.8
	200	2.5	2.2

^{y, z} ; See the Table 4-2.

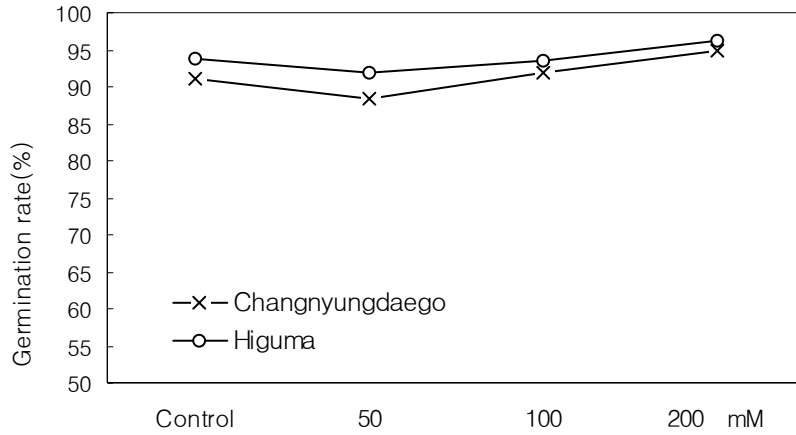


Fig. 4-6. Final percentage germination of Onion at the different cultivars as influenced by Ca(NO₃)₂ concentrations.

Table 4-8. Germination and T₅₀ of Onion as affected by PEG-8000 concentrations at different cultivars

C.V	Concentration (-MPa)	MDG (days) ^y	T ₅₀ (days) ^z
Changnyung - daego	Control	3.9	3.1
	0.25	3.7	3.0
	0.50	3.0	2.5
	0.75	4.2	3.3
Higuma	Control	3.3	2.9
	0.25	3.3	2.9
	0.50	2.4	2.2
	0.75	3.7	3.1

^{y, z} ; See the Table 4-2.

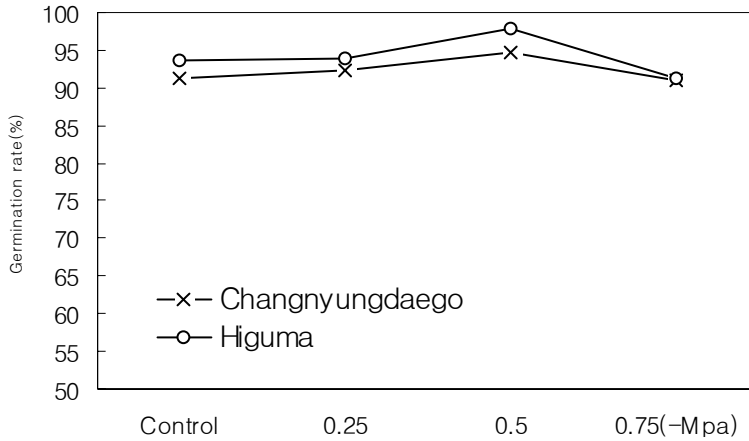


Fig. 4-7. Final percentage germination of Onion at the different cultivars as influenced by PEG-8000 concentrations.

4) 당근

PEG-8000을 이용한 당근의 priming 실험에서는 Mussang-5-chon, Kounyurum당근은 PEG -0.50MPa에서 발아율, MDG, T₅₀이 가장 양호하였으며 Goldrich당근은 PEG -0.75MPa에서 발아율, MDG, T₅₀이 가장 양호하였다. 한편 PEG를 이용한 당근 priming 적용 연구를 살펴보면 PEG 15℃에서 2주 처리와 PEG 20℃에서 -1.20MPa로 2주처리하여도 포장에서의 T₅₀ 단축효과가 인정되었다고 하였으나 Haigh21)은 K₃PO₄+KNO₃ -1.60MPa에 priming시 처리온도와 처리기간에 따라서 유묘출현율은 영향을 미치지 못하였지만, 20℃에서 2주처리가 가장 좋았다고 하는 보고등이 제시되고 있다.

GA₃ priming처리시 골드리치는 GA₃ 100ppm에서 무처리에 비해 발아율 2.4%, 증가하였으며, MDG와 T₅₀은 각각 1.4일, 1.1일 단축되는 결과를 나타냈다. 무쌍5촌과 고운여름 당근 또한 GA₃ 100ppm에서 양호한 결과를 얻었다.

Table 4-9. Germination and T_{50} of Carrot as affected by PEG-8000 concentrations at different cultivars

C.V	Concentration (-MPa)	MDG (days) ^y	T_{50} (days) ^z
Mussang -5-chon	Control	8.3	5.1
	0.25	5.9	4.5
	0.50	5.4	3.6
	0.75	6.2	3.9
Goldrich	Control	6.7	4.9
	0.25	6.6	4.8
	0.50	6.2	4.1
	0.75	4.9	3.1
Kounyurum	Control	8.6	4.3
	0.25	8.4	4.1
	0.50	4.9	3.2
	0.75	5.1	3.4

^{y, z} ; See the Table 4-2.

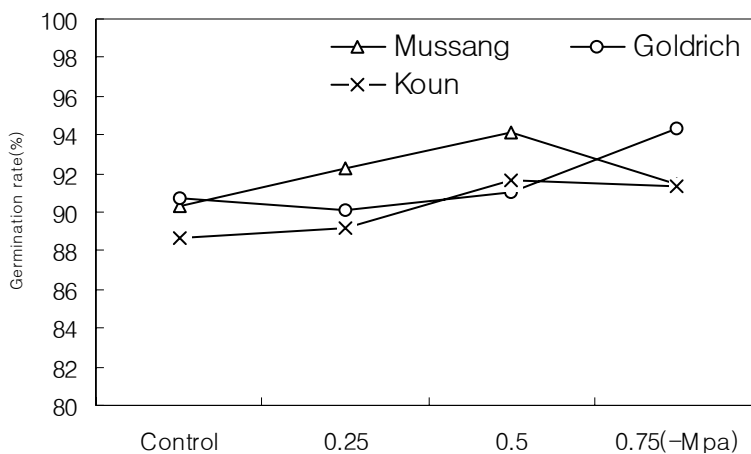


Fig. 4-8. Final percentage germination of Carrot at the different cultivars as influenced by PEG-8000 concentrations.

Table 4-10. Germination and T₅₀ of Carrot as affected by GA₃ concentrations at different cultivars

C.V	Concentration (ppm)	MDG (days) ^y	T ₅₀ (days) ^z
Mussang-5-chon	Control	8.3	5.1
	100	6.5	4.1
	500	6.9	4.7
	1000	7.1	4.9
Goldrich	Control	6.7	4.9
	100	5.3	3.8
	500	5.6	4.0
	1000	6.5	4.5
Kounyurum	Control	8.6	4.3
	100	6.2	3.6
	500	6.6	3.8
	1000	7.0	3.9

^{y, z} ; See the Table 4-2.

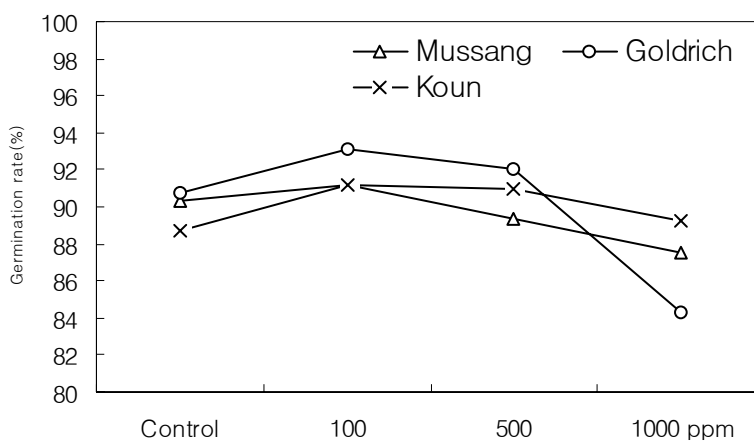


Fig. 4-9. Final percentage germination of Carrot at the different cultivars as influenced by GA₃ concentrations.

5) 담배

담배 종자의 발아율은 Reams 266 > Burley 21 > KB108 순이었으며 PEG-8000 처리시 KB108, Burley 21, Reams 266 모두 -0.75MPa농도에서 발아율이 가장 높게 나타났으며, MDG, T₅₀도 단축되었다.

KNO₃ 처리구에서는 KB108, Burley 21은 무처리에 비해 떨어지거나 비슷한 경향이었으나, Reams 266은 0.10M에서 발아율 92.2%, MDG 7.9일, T₅₀ 6.5일로 가장 양호하였다. GA₃처리에서는 0.100mM에서 priming 효과가 우수하였는데, 0.001, 0.010mM에서도 무처리에 비해 양호하였다. priming처리 효과는 KB108 > Burley 21. > Reams 266순으로 좋게 나타났다. GA₃처리에서는 0.100mM에서 발아율이 높았는데 특히, KB108의 증가 경향이 뚜렷한 편이었다.

이는 Saha가 주장한 담배 종자의 GA₃처리시 광요구도가 소멸됨으로 인해 광발아성이 담배의 발아율이 증가된다는 원인에 기인한 것으로 사료된다. 세 품종 모두 무처리 T₅₀은 7일 내외였는데 0.100mM처리에서는 평균 5.3일도 단축되는 효과를 나타냈다. MDG는 평균 무처리에 비해 0.100mM처리시 1일정도 단축되는 결과였다.

Table 4-11. Germination and T₅₀ of tobacco as affected by PEG-8000 concentrations at different cultivars

C.V	Concentration (-MPa)	MDG (days) ^y	T ₅₀ (days) ^z
KB108	Control	8.3	7.1
	0.25	7.9	6.3
	0.50	6.6	6.0
	0.75	5.4	4.6
Br. 21.	Control	7.7	6.9
	0.25	7.6	7.2
	0.50	7.2	6.5
	0.75	5.9	4.9
Rm. 266.	Control	8.6	7.2
	0.25	8.4	7.6
	0.50	7.9	7.1
	0.75	6.1	5.2

^{y, z} ; See the Table 4-2.

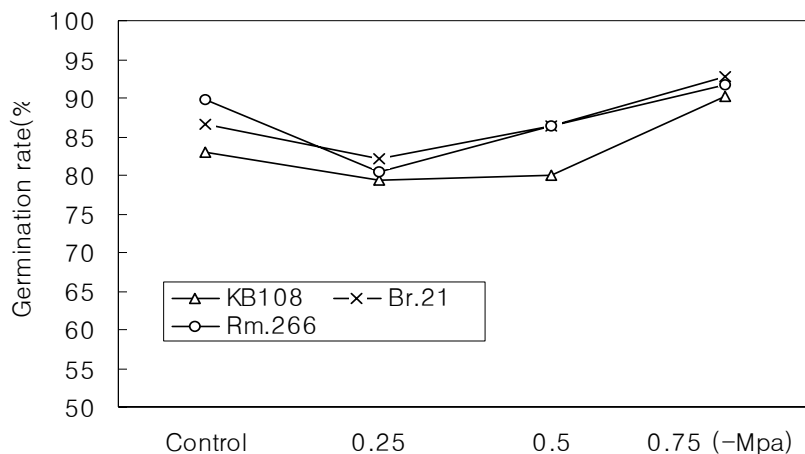


Fig. 4-10. Final percentage germination of tobacco at the different cultivars as influenced by PEG-8000 concentrations.

Table 4-12. Germination and T_{50} of tobacco as affected by KNO_3 concentrations at different cultivars

C.V	Concentration (M)	MDG (days) ^y	T_{50} (days) ^z
KB108	Control	8.3	7.1
	0.10	7.3	6.0
	0.30	8.2	6.8
	0.50	8.9	7.8
Br. 21.	Control	7.7	6.9
	0.10	7.2	6.3
	0.30	7.6	6.5
	0.50	7.8	7.1
Rm. 266.	Control	8.6	7.2
	0.10	7.9	6.5
	0.30	8.7	7.3
	0.50	8.8	7.6

^{y, z} ; See the Table 4-2.

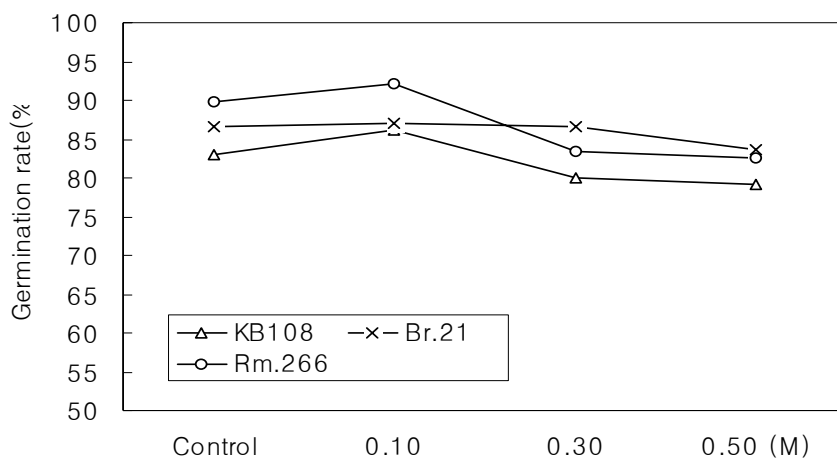


Fig. 4-11 Final percentage germination of tobacco at the different cultivars as influenced by KNO₃ concentrations.

Table 4-13. Germination and T₅₀ of tobacco as affected by GA₃ concentrations at different cultivars

C.V	Concentration (mM)	MDG (days) ^y	T ₅₀ (days) ^z
KB108	Control	8.3	7.1
	0.001	7.8	6.5
	0.010	7.5	6.2
	0.100	7.1	5.9
Br. 21.	Control	7.7	6.9
	0.001	7.3	6.6
	0.010	7.1	6.5
	0.100	6.9	6.0
Rm. 266.	Control	8.6	7.2
	0.001	8.0	6.4
	0.010	7.7	6.1
	0.100	7.0	5.6

^{y, z} ; See the Table 4-2.

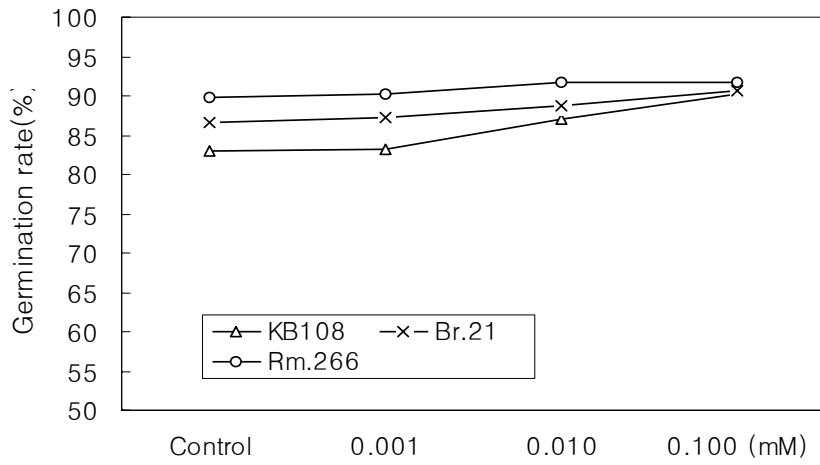


Fig. 4-12. Final percentage germination of tobacco at the different cultivars as influenced by GA₃ concentrations.

5절 Seed pelleting 기술 개발

1. Seed pelleting 접착·피복물질 선발

가. 서언

Seed pelleting시 접착물질과 피복물질의 결합력에 관한 선행연구들에 의하면 Hirota는 종자 펠렛팅에 methyl cellulose와 arabic gum를 혼합한 결합제가 결합 능력이 우수하다고 하였으며, 목초종자를 이용한 실험에서는 석회를 피복물질로 할 경우 methyl cellulose, 황성탄을 피복물질로 할 경우는 PVA(polyvinyl alcohol)가 효과적이라고 보고하였는데 본 실험에서는 대량 공정의 수월성을 위하여 발아에 안정한 단독 접착물질을 선발하였다.

Pelleting 종자는 종자 표면에 피복물질을 투입하고 접착물질을 동시에 분무하여 종자주위에 피복물질을 피복시켜 크기를 증가시킨 것으로 pellet 물질(피복물질+접착물질)의 물리 화학적 특성에 따라서 pellet 종자 형태가 불균일 하거나 상품성이 없는 pelleting 종자가 생산될 수 있으며 pelleting 종자 형태가 균일하더라도 발아를 저해하는 물질은 적합하지 않다. 또한 실용적으로 이용되기 위해서는 가격이 저렴하고 토양에 환경친화적이어야 하며 작업이 용이한 물질이어야 한다.

Pelleting 종자 생산은 접착물질(binder, polymer)을 종자 표면에 분사하여 피복물질을 종자표면에 결합시키면서 시작된다. pellet 피복물질(powder)들은 수분이 투입되면 어느정도 결합능력이 있지만 운송하는 과정이나 농가에서 실제 파종시 충격에 의한 파손의 우려가 많아 종자와 피복물질의 결합력을 강화시켜야 한다. 따라서 수분외에 보조 접착물질이 필요하며 이러한 접착물질은 일정농도에서 종자 발아를 감소시키지 않으면서 pelleting 종자 모양 형성에 수월해야한다. 본 실험에서는 다양한 접착물질을 농도별 혹은 상호 조합(1:1)을 통하여 발아에 안정한 접착물질을 선발하였다.

나. 재료 및 방법

1) Seed pelleting 성형 물질 선발

가) 접착물질 선발

Pellet 접착물질 선발 조합은 PVA(polyvinyl alcohol), AG(arabic gum), Alginate, MC(methyl cellulose), CMC(carboxymethyl cellulose), Starch, PVP(polyvinyl pyrrolidone), CD(Cyclo Dextrin), HEC(hydroxyethyl cellulose), XG(xanthan gum) 등을 dH₂O에 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5% 및 3%로 농도로 용해시켜 사용하였다.

나) 피복물질 선발

Pellet 피복물질 선발 조합은 Limestone, Pyrophyllite, Illite, Bentonite, Talc, Diatomite, Kaolin, Pyrophyllite+Illite, Pyrophyllite+bentonite, Pyrophyllite+talc, Pyrophyllite+Diatomite, Pyrophyllite+Kaolin, Pyrophyllite+Illite+Bentonite, Pyrophyllite+Illite+Talc, Pyrophyllite+Illite+Diatomite, Pyrophyllite+Illite+Kaolin, Bentonite+Talc, Bentonite+Diatomite, Bentonite+Kaolin, Bentonite+Talc+Diatomite, Bentonite+Talc+Kaolin, Talc+Diatomite, Talc+Kaolin, Diatomite+Kaolin 등이며 중량비(w/w)를 1:1 혹은 1: 1: 1 비율로 혼합하여 사용하였다.

2) 발아율 조사방법

가) 접착물질 선발에 따른 발아율

접착물질의 종류 및 농도가 발아율에 미치는 영향을 조사하기 위하여 직경 15cm의 petridish(Falcon, USA)에 용해된 각 농도별 접착물질 9ml을 넣고 종자를 치상한 후 발아율을 조사하였다. 발아시험은 petridish에 일반휴지 4겹을 깔 후 100립씩 완전임의배치 4반복으로 하였다.

종자별 발아온도는 상추 20℃, 당근 22℃, 양파 23℃, 더덕 18℃, 담배 28℃로 하였다. 광조건은 상추와 담배는 광상태, 당근, 양파, 더덕은 암상태의 향온기에서 실시하였다. 발아조사는 종자 치상후 1일~3일간은 6시간 간격으로, 4일부터는 12시간 간격으로 발아율을 조사하였으며 유근이 1.0mm 이상 돌출된것을 정상발아한 것으로 인정하였다.

나) 피복물질 선발에 따른 발아율

피복물질의 종류 및 농도가 발아율에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각각의 조합된 피복물질 100g과 dH₂O 100ml을 1리터의 삼각 플라스크에 넣어 shaker로 15분간 교반시킨 후 삼각 플라스크내 혼합액 9ml을 취하여 9cm petri dish에 넣고 종자를 치상한후 발아율을 조사하였다.

발아시험은 petridish에 흡습지(Whattman No. 1) 2매를 깔 후 100립씩 완전임의배치 4반복으로 하였다. 종자별 발아온도는 상추 20℃, 당근 22℃, 양파 23℃, 더덕 18℃, 담배 28℃로 하였다. 광조건은 상추와 담배는 광상태, 당근, 양파, 더덕은 암상태의 향온기에서 실시하였다. 발아조사는 종자 치상후 1일~3일간은 6시간 간격으로, 4일부터는 12시간 간격으로 발아율을 조사하였으며 유근이 1.0mm 이상 돌출된것을 정상발아한 것으로 인정하였다.

다. 결과 및 고찰

1) 펠렛 피복·접착물질이 발아에 미치는 영향

가) 접착물질이 발아에 미치는 영향

접착물질의 종류 및 농도에 따라 발아율이 다르게 나타났다. 사용된 접착물질의 농도가 1% 보다 높아짐에 따라 발아율은 감소하였으며, 1%농도의 접착물질이 종자 발아에 큰 영향을 끼치지 않아 적정 농도로 선발하였다.

상추종자에 접착물질을 농도와 종류에 따른 발아율을 검정한 결과 0.5, 1, 1.5% 농도에서 AG, PVA, CMC, Starch등은 94% 이상의 발아율을 나타냈으며 PVP, CD등은 92-93%정도의 발아율을 나타냈다.

양파의 경우 0.5%농도 조건에서 PVA가 94.3%로 가장 발아율이 양호하였으며, AG, CMC, Starch, PVP등이 93%정도의 발아율을 나타냈다. 접착물질 1%농도 조건 MC, Alginate는 83-84%의 발아율을 보여 종자 pelleting 접착물질로 사용이 어려울 것으로 생각된다.

당근은 종자 특성상 일반 나종자의 정상 발아율이 90.8%로 비교적 낮았다. 그러나 PVA 0.5%에서 91.1%로 약간 발아율 향상이 나타났다. 그러나 접착물질의 농도가 0.5%보다 높아짐에 따라 발아율이 감소하여 1%농도에서 90%미만의 발아율을 보였다.

담배는 PVA와 CMC는 0.5~1.5%농도에서 90%이상의 종자 발아율을 나타냈으며, 접착물질의 농도가 2%부터는 90% 미만의 발아율을 나타냈다.

더덕은 PVP 농도 0.5~1%에서 발아율이 84%정도의 발아율로 나종자의 발아율과 유사하여 1%의 농도까지는 종자 발아에 큰 영향을 미치지 않았다.

작물별 발아율에 미치는 영향이 접착물질에 따라 조금씩 다르게 나타났는데, 각 작물별 발아율이 가장 높았던 접착물질은 상추의 경우 AG, 양파와 당근은 PVA, 담배는 CMC, 더덕은 PVP였다. 결과적으로 사용된 접착물질중 PVA(polyvinyl alcohol)와 AG(arabic gum)은 각 작물에 모두 발아가 양호하였으며 Alginate, MC(methyl cellulose), HEC(hydroxyethyl cellulose) 접착물질은 발아율이 낮았다.

Table 5-1. Effect of pelleting sticker and concentrations on percent germination of lettuce

Treat.	Concentration of sticker					
	0.5%	1%	1.5%	2%	2.5%	3%
PVA [▷]	95.2 [#]	95.0	92.5	92.1	91.6	89.8
AG	96.5	95.9	93.8	92.8	92.4	90.5
Alginate	89.5	89.4	85.4	80.4	79.6	75.6
MC	88.6	86.9	83.6	83.1	80.4	79.2
CMC	94.6	94.2	94.2	91.5	86.5	79.4
Starch	94.5	94.6	94.2	91.0	84.6	82.1
PVP	93.5	92.5	92.4	89.7	80.6	79.4
CD	93.6	93.1	93.0	90.4	89.5	87.6
HEC	89.6	86.4	82.5	80.1	78.1	71.5
XG	90.2	90.1	88.4	85.6	82.1	81.0
dH ₂ O	96.2					

[▷] PVA(polyvinyl alcohol), AG(arabic gum), Alginate, MC(methyl cellulose), CMC(carboxymethyl cellulose), Starch, PVP(polyvinyl pyrrolidone), CD(cyclo dextrin), HEC(hydroxyethyl cellulose), XG(xanthan gum).

[#] Percentage of Germination(%).

Table 5-2. Effect of pelleting sticker and concentrations on percent germination of onion

Treat.	Concentration of sticker					
	0.5%	1%	1.5%	2%	2.5%	3%
PVA [▷]	94.3 [#]	94.0	92.4	90.9	89.4	88.8
AG	93.9	93.3	92.0	90.7	88.6	86.6
Alginate	83.7	83.1	82.5	79.5	75.6	70.2
MC	86.4	84.7	82.4	79.8	74.6	71.9
CMC	93.7	92.1	91.6	89.6	83.5	81.5
Starch	93.7	92.1	90.6	89.5	85.4	82.3
PVP	93.6	92.7	90.4	86.7	81.9	75.7
CD	91.6	91.4	87.5	84.6	79.8	76.1
HEC	90.8	90.7	89.1	86.4	84.2	80.6
XG	91.2	90.5	88.7	84.2	81.5	79.2
dH ₂ O	94.2					

^{▷, #} See the table 5-1.

Table 5-3. Effect of pelleting sticker and concentrations on percent germination of carrot

Treat.	Concentration of sticker					
	0.5%	1%	1.5%	2%	2.5%	3%
PVA [♯]	91.1 [#]	89.7	88.3	85.7	83.4	80.6
AG	90.6	88.7	87.1	84.5	81.1	77.1
Alginate	77.8	75.5	73.9	69.4	67.6	63.4
MC	82.4	81.7	77.3	74.5	72.6	69.7
CMC	86.6	83.7	81.2	78.6	73.8	69.8
Starch	83.7	82.2	78.5	75.4	72.4	67.6
PVP	83.5	83.2	80.4	76.4	74.2	71.5
CD	83.6	83.1	79.6	77.4	73.8	71.1
HEC	80.7	79.8	77.1	72.9	70.3	67.8
XG	84.5	83.1	80.1	76.4	72.5	70.3
dH ₂ O	90.8					

[♯], # See the table 5-1.

Table 5-4. Effect of pelleting sticker and concentrations on percent germination of tobacco

Treat.	Concentration of sticker					
	0.5%	1%	1.5%	2%	2.5%	3%
PVA [♯]	92.3 [#]	92.2	90.4	88.1	84.6	82.3
AG	90.7	90.3	88.7	85.8	83.0	80.7
Alginate	82.7	82.4	80.4	77.1	72.5	70.2
MC	83.3	82.8	81.3	78.4	76.6	72.5
CMC	93.4	92.7	90.8	87.5	83.6	81.0
Starch	84.7	84.0	82.8	80.4	77.5	74.9
PVP	86.6	85.7	83.2	81.4	76.3	73.5
CD	87.2	86.8	83.7	81.4	79.0	77.2
HEC	85.7	85.4	84.1	80.9	77.5	72.8
XG	86.7	84.5	80.6	77.4	73.6	71.4
dH ₂ O	94.0					

[♯], # See the table 5-1.

Table 5-5. Effect of pelleting sticker and concentrations on percent germination of codonopsis

Treat.	Concentration of sticker					
	0.5%	1%	1.5%	2%	2.5%	3%
PVA [♯]	75.8 [♯]	73.8	72.8	68.7	65.2	62.7
AG	83.4	82.5	80.4	78.7	72.6	70.1
Alginate	75.3	74.6	73.0	71.3	70.2	67.8
MC	76.8	76.0	74.6	72.0	68.8	65.4
CMC	79.5	77.4	74.8	71.0	68.5	64.1
Starch	76.7	75.4	73.8	70.6	67.4	64.8
PVP	84.7	84.0	82.4	80.4	78.6	76.5
CD	72.5	72.0	70.2	66.7	62.3	60.4
HEC	73.8	72.5	71.6	67.8	64.6	62.8
XG	74.2	72.6	70.5	68.7	64.2	61.8
dH ₂ O	83.3					

[♯], # See the table 5-1.

나) 피복물질이 발아에 미치는 영향

지금까지 종자 Pelleting에 사용되고 있는 피복물질로는 백운석을 포함하여 석고, 석회, montmorillonite, rock phosphate와 같은 점토물질과 bentonite, calcium carbonate, cellite, chalk, pyrophyllite, cork, peatmoss, sand, sawdust, krilium, zeolite 및 vermiculite 등이며, bauxite, diatomite, talc등과 같은 광물질들이 사용된다고 보고되고 있다.

피복물질별 발아율을 조사한 결과 상추, 당근, 양파 담배는 Pyrophyllite+Illite+Diatomite의 피복물질 조합에서 발아율이 가장 높았으며. 더덕은 illite 단용처리에서 발아율이 가장 높았다. 피복물질 조합처리에 따른 발아율의 경우 더덕은 Illite > PID > PIB, 상추는 PID > PIT > BT, 당근은 PID > PIT > Diatomite, 양파는 PID > PIK > PIT, 담배는 PID > PIK > PIT 순으로 높았다. 본 실험을 통해 발아율을 감소시키지 않는 안정한 5개의 기본 피복물질 조합 Pyrophyllite+Illite+Diatomite, Pyrophyllite+Illite+Talc, Bentonite+Talc, Diatomite, Illite 를 최종선발하였다.

Table 5-6. Effect of pelleting powder mixing formulation on percent germination

Powder	Germination (%)				
	Codonopsis	Lettuce	Carrot	Onion	Tobacco
Limestone	57.4	82.5	78.5	78.6	45.6
Pyrophyllite	72.8	88.4	79.6	72.3	56.0
Illite	76.4	91.8	75.4	70.4	78.9
Bentonite	71.4	90.4	77.1	71.5	70.1
Talc	61.6	89.1	73.8	79.1	72.5
Diatomite	67.1	92.2	87.1	75.8	65.8
Kaolin	64.5	79.9	84.1	72.6	66.2
Pyrophyllite+Illite	66.9	83.3	82.4	78.4	67.4
Pyrophyllite+Bentonite	69.0	83.1	71.5	77.3	75.1
Pyrophyllite+Talc	71.4	84.5	73.4	74.6	70.3
Pyrophyllite+Diatomite	72.8	86.4	78.6	73.9	72.6
Pyrophyllite+Kaolin	69.4	83.1	82.1	79.6	76.1
Pyrophyllite+Illite+Bentonite	73.8	87.3	81.1	84.1	79.8
Pyrophyllite+Illite+Talc	72.9	93.5	87.4	85.9	81.5
Pyrophyllite+Illite+Diatomite	75.4	97.4	90.3	93.4	87.7
Pyrophyllite+Illite+Kaolin	64.1	92	86.7	87.4	84.1
bentonite+Talc	68.7	93.3	76.8	80.5	64.5
bentonite+Diatomite	60.5	86.4	74.9	80.1	68.8
bentonite+Kaolin,	72.0	84.5	73.8	79.5	69.4
bentonite+Talc+Diatomite	67.8	83.7	77.1	79.8	67.2
bentonite+Talc+Kaolin	71.4	83.6	70.4	72.5	70.5
Talc+Diatomite	73.4	83.7	72.6	74.6	71.6
Talc+Kaolin	68.5	82.4	71.5	70.2	53.1
Diatomite+Kaolin	67.2	86.4	74.1	69.8	59.7

2. Seed pelleting 기술 개발

종자는 일정량의 수분, 온도, 산소조건이 이루어 지면 발아를 위한 준비를 하게 된다. 특히 수분은 발아에 필요한 제 1조건으로서 양분의 분해를 위한 효소의 활성화와 양분의 전이 내지는 저장양분의 이용을 위해 매우 필요하다. 하지만 일정 온도에 미치지 못하면 대사활동은 멈추게 된다. 종자 pelleting은 수분에 접착물질을 용해시켜 분무의 과정을 되풀이하면서 pelleting 종자를 성형하게되는데 여름철 제조시설내 온도상승으로 공정중 종자의 활력을 잃어버리는 결과를 초래할 수 있다. 따라서 제조시설 내 적정 온도 조건을 파악하여 보다 건전하고 활성이 높은 pelleting 종자를 생산해야할 필요성이 있다.

가. 재료 및 방법

본실험에 사용된 공시재료는 더덕, 상추, 양파, 당근, 담배이다. 펠렛피복물질과 접착물질선발 실험 결과 각 작물별 발아율이 높았던 접착물질 AG, PVA, CMC, PVP등 4종 및 피복물질 5개 조합(PIT: Pyrophyllite+Illite+Talc, BT: Bentonite+Talc, PID: Pyrophyllite+Illite+Diatomite, D: Diatomite, I: Illite)을 최종 선발하여 종자 pelleting에 적용하였다.

1) 접착물질 Slurry액의 제조

최종선발된 AG(arabic gum), PVA(polyvinyl alcohol), CMC(carboxymethyl cellulose), PVP(polyvinyl pyrrolidone)등을 각각 50g씩 dH2O 5ℓ에 용해시켜 1%농도의 Slurry액을 제조하였다.

Table 5-7. Seed pelleting material recipe

Treat.	Ratio of Powder mixing (%)	Sticker
I [♪]	I(100)	
D	D(100)	Lettuce: AG
PID	P: I: D (34: 33: 33)	Onion, Carrot : PVA
PIT	P: I: T (34: 33: 33)	Tobacco : CMC
BT	B: T (50: 50)	Codonopsis : PVP

[♪] (PIT: Pyrophyllite+Illite+Talc, BT: Bentonite+Talc, PID: Pyrophyllite+Illite+Diatomite, D: Diatomite, I: Illite).

2) 피복물질 powder 제제화

예비 실험결과 종자 발아에 비교적 영향이 적은 5개 조합을 선발하였다. 각각의 조합별 배합비율은 Table 1과 같다. Mixing 방법은 PID조합의 피복물질 10kg을 만들 경우 Pyrophyllite 3.4kg, Illite 3.3kg, diatomite 3.3kg을 측정하여 v-mixer로 30분간 혼합하여 제조하였다.

3) pelleting 종자 제조

종자 pelleting에 사용된 pellet화 기계는 원형의 pan으로 자체제작하여 회전속도 조절이 가능하고 회전 pan의 경사도를 조절할 수 있는 기계를 이용하였다. pelleting 방법은 기계의 rpm과 경사도를 조절하여 회전시키면서 원형의 pan내에 나종자를 넣고 pellet 피복물질을 소량씩 투입하면서 binder를 미세한 nozzle로 분무하면서 pellet 종자의 모양과 크기를 조절하였다. pan의 회전속도의 경우 초기에는 60-70rpm, 최종 polishing 단계에서는 40-50rpm으로 속도를 줄여 pellet 종자의 수분함량 80% 될 때 까지 rolling하였다. rolling이 끝난 종자는 선별기로 각 작물별 일정 mesh로 선별하여 건조하여 사용하였다.

4) pelleting 종자의 물리적 특성조사

가) 피복재료 별 pellet 종자의 경도 및 균일도 측정

자체 제작한 경도계를 이용하여 pelleting 종자의 경도를 측정하였다. 경도측정은 압력이 가해진후 pellet 종자 표면에 1mm이상 크랙 혹은 파열정도에 따라 최대하중(kg/cm²)으로 표시하였다. 균일도는 1차적으로 pellet 제조중 선별기를 이용하였고, 2차적으로는 건조후 버니어 캘리퍼스를 이용하였다. 조사방법은 표본 시료에서 무작위 추출하여 10반복으로 조사하였다.

나) pelleting 종자의 수분흡수력 측정

직경 9cm petridish 에 20ml의 물을 담고 pellet 종자 100립씩을 침지시킨 후 (1분, 3분, 5분, 7분, 9분, 15분, 30분)로 흡수시켜 주기별 pelleting 종자의 수분흡수력을 수분측정기로 측정하여 흡수된 수분량을 계산하였다.

5) pelleting 종자의 발아율

가) 피복물질조합에 따른 pelleting 종자의 발아율

피복물질이 5개 작물 pelleting 종자의 발아율에 미치는 영향을 조사하기 위하여

직경 15cm의 petri dish에 dH₂O 9ml을 넣고 종자를 치상한후 발아율을 조사하였다. 발아시험은 petridish에 일반휴지 4겹을 깔 후 100립씩 완전임의배치 4반복으로 하였다. 종자별 발아온도는 상추 20℃, 당근 22℃, 양파 23℃, 더덕 18℃, 담배 28℃로 하였다. 상추와 담배는 광상태, 당근, 양파, 더덕은 암상태의 항온기에서 실시하였다. 발아조사는 종자 치상후 1일~3일간은 6시간 간격으로, 4일부터는 12시간 간격으로 발아율을 조사하였으며 유근이 1.0mm 이상 돌출된것을 정상발아한 것으로 인정하였다. 기타 발아율 조사는 International Seed Testing Association(ISTA)와 Association of Seed Analysts(AOSA)방법기준에 따랐다.

나) 토양함수량에 따른 pelleting 종자의 발아율

토양의 수분 함수량이 pelleting seed의 유묘출현에 미치는 영향을 조사하기 위하여 petri dish내 발아율과 동일하게 pellet 종자를 포장용수량 50, 75, 100%로 조정된 각각의 상토(Berger 社, canada)를 채운 file box(30.5cm×23.5cm×4cm)에 파종거리 2cm×3cm로 100립씩 파종하여 출아율을 조사하였고 또 출아소요시간은 각각 5시간마다 50% 출아율을 기준으로 하여 조사하였다.

6) Pelleting 종자 제조시 온도의 영향

Pelleting 종자 제조시 온도에 에어컨을 설치하여 15℃, 18℃, 21℃, 24℃, 27℃, 30℃ 조건을 설정하여 각 온도별 제조된 pelleting 종자의 발아율에 미치는 영향을 조사하였다.

공시품종으로는 상추(선풍포잡, 권농종묘), 양파(천주중고황, 농우종묘), 당근(무쌍 5촌, 흥농종묘)등을 이용하였다. 조사방법은 직경 15cm petridish에 dH₂O 9ml을 넣고 종자를 치상한후 발아율을 조사하였다. 발아시험은 petri dish에 일반휴지 4겹을 깔 후 100립씩 완전임의배치 4반복으로 하였다. 종자별 발아온도는 상추 20℃, 당근 22℃, 양파 23℃로 하였다. 상추는 광상태, 당근, 양파는 암상태의 항온기에서 실시하였다. 발아조사는 종자 치상후 1일~3일간은 6시간 간격으로, 4일부터는 12시간 간격으로 발아율을 조사하였으며 유근이 1.0mm 이상 돌출된 것을 정상발아한 것으로 인정하였다.

나. 결과 및 고찰

1) pelleting 종자의 제조

종자 pelleting을 위하여 pan 내부에 상추, 양파, 당근, 더덕, 담배종자를 각각 1ℓ씩 넣고 일정속도의 pan 회전시키면서 각각의 피복물질과 접착물질을 투입하여 일정형태의 pelleting seed를 제조하였다.

작물별 일반 나종자 1ℓ를 pelleting 하는데 pan속도는 평균 45~70rpm으로 공정시간은 3~4시간이 소요된다. 피복물질은 담배 2.6kg으로 가장 적게 소요되었으며, 더덕 4.6kg, 상추 8kg, 당근 10kg, 그리고 양파 17kg이 소요되었다. 접착물질은 담배가 1.2ℓ로 가장 적게 소요되었으며, 당근과 양파가 5ℓ로 가장 많이 소요되었다. pelleting seed의 크기는 양파 3.5mm, 당근 3.3mm, 더덕 3mm, 상추 2.8mm, 담배 0.7mm였으며 pelleting seed의 크기가 클수록 pan의 속도는 느리게 요구되었다.

일본의 스미토모 종묘회사에서는 작물의 pelleting 배율을 작물에 따라 분류하여 pelleting seed의 피복두께가 1.5~2.0mm일 때 SS형, 2.0~3.0mm 일 때 S형, 2.5~3.5mm일 때, L형, 3.5~4.5mm일 때 LL형, 4.5~6.0mm일 때 LLL형으로 구분하고 있다. 본실험에서 상추, 당근, 양파의 경우는 스미토모 구분에 준하였으며, 더덕은 종피날개를 제거했을 때 나종자 성상을 근거로 90% 피복 되었을때를 적정 크기로 판단하였으며, 담배는 한국엽연초연구소에서 생산되는 pelleting seed의 크기에 맞게 제조하여 사용하였다.

Table 5-8. Classification of target crops as the ratio of pelleting seed size

Type	Size	Target crops
SS	1.5-2.2mm	셀러리, 페추니아, 릭
S	2.0-3.0mm	상추, 파슬리,
L	25-3.5mm	상추, 배추, 양배추, 당근
LL	3.5-4.5mm	파, 양파, 토마토, 가지
LLL	4.5-6.0mm	무, 오이, 고추

Table 5-9. Efficiency of Manufacture on seed pelleting

	PV(kg)	SV(ℓ)	T(hr)	APS(rpm)	RS	PS	RS/PS(%)	SPS(mm)
상추	8	3.4	3	55	400,000	398,000	99.50	2.8
양파	17	5	3.8	60	120,000	116,500	97.08	3.5
당근	10	5	2.3	45	330,000	314,000	95.15	3.3
더덕	4.6	4	4	65	120,000	116,000	96.66	3
담배	2.6	1.2	4	70	6,500,000	610,000	93.84	0.7

PV: Powder volume, SV: Slurry volume, T: the necessary time, APS: Average of pan speed, NRS: Number of Raw seed(In put) NPS: Number of pelleting seed(Out put), RS/PS: $(PS \div RS) \times 100$ SP S: Sizes of pelleting seed.

각 작물별 종자 pelleting시 일반종자를 투입하여 제조된 pelleting seed의 성형비율은 상추가 99.5%로 가장 손실이 적었으며 가장 미세한 종자 크기를 가진 담배의 경우 93.84%로 비교적 양호하였다. 기타 양파, 당근, 더덕은 각각 97.08%, 95.15%, 96.66%로 3~5%의 손실종자가 발생하였다.

2) Pelleting 종자의 발아율

가) 피복물질조합에 따른 pelleting 종자의 발아율

Table 5-10. Germination of pelleting seed treated with by powder material

Treat.	Germination(%)				
	Lettuce	Onion	Carrot	Tobacco	Codonopsis
I [♪]	92.7	90.6	82.8	75.8	74.0
PIT	90.3	90.1	85.4	91.5	70.4
PID	94.7	93.4	90.5	86.5	78.7
D	89.4	82.3	83.8	88.2	73.9
BT	93.3	89.1	73.6	81.2	62.7

[♪] see the Table 5-7.

다양한 피복물질로 pelleting한 pelleting 종자의 발아율은 상추의 경우 PID처리에서 94.7%로 가장 높았으며, Diatomite 처리에서는 89.4%로 가장 낮았다. 양파, 당근, 더덕의 경우도 상추와 유사한 경향이었으나 담배는 PIT처리에서 91.5%로 가장 높은 발아율을 나타냈다. 5개 작물을 대상으로 각 피복물질의 발아율을 조

사한 결과 PID의 처리가 상추, 양파, 당근, 더덕에서 발아율이 가장 높게 나타났으며, PIT의 처리는 담배에서 가장 높았다.

나) 토양함수율에 따른 pelleting 종자의 발아율

선진외국에서는 종자가 파종될 장소가 과습한 토양 또는 건조 토양이나에 따라 수분보유력이 각각 다른 종자 pelleting 피복물질이 이용하고 있다.

상추, 양파, 당근, 담배, 더덕 의 출현율은 토양함수율과 피복물질에 따라 차이가 있었다. 상추의 경우 토양함수율이 50% 조건에 파종된 pelleting 종자의 출현율은 Pyrophyllite+Illite+Diatomite 처리에서 92.1%로 다른 처리에 비해 출현율이 높았다. 출현속도 또한 펠렛 피복물질에 따라 차이를 보였는데 Diatomite 처리에서 T₅₀과 MDG가 1.5일과 2.0일 소요되었으나, Pyrophyllite+Illite+Diatomite로 펠렛된 종자는 1.0일과 1.7일 소요되었다. 토양함수율이 90% 조건에 파종된 pelleting 종자의 출현율은 Pyrophyllite+Illite+Diatomite 처리에서 95.6%로 다른 처리에 비해 출현율이 높았으며, 출현속도 또한 T₅₀과 MDG가 0.8일과 1.3일 소요되었다. 토양함수율 50% 조건과 비교하면 T₅₀과 MDG가 0.2일과 0.4일 단축되었다.

Table 5-11. Effect of soil moisture content on emergence, T₅₀ and MDG of pelleting lettuce seeds

Soil moisture content	Treat.	Emergence(%)	T ₅₀ (days)	MDG(days)
50%	I	86.5	1.2	1.8
	PIT	86.3	1.3	1.8
	PID	92.1	1.0	1.7
	D	87.5	1.5	2.0
	BT	89.4	1.4	1.9
70%	I	89.7	1.1	1.6
	PIT	88.9	1.1	1.7
	PID	94.2	0.8	1.4
	D	90.0	1.2	1.6
	BT	92.4	1.0	1.5
90%	I	91.5	1.0	1.4
	PIT	90.1	1.1	1.5
	PID	95.6	0.8	1.3
	D	90.2	1.1	1.5
	BT	93.5	0.9	1.4

^b see the Table 5-7.

Table 5-12. Effect of soil moisture content on emergence, T_{50} and MDG of pelleting onion seeds

Soil moisture cotent	Treat.	Emergence(%)	T_{50} (days)	MDG(days)
50%	I	85.1	3.1	5.1
	PIT	85.9	3.1	5.0
	PID	88.5	2.8	4.7
	D	80.3	3.3	5.4
	BT	87.2	3.0	4.9
70%	I	86.4	3.0	4.7
	PIT	87.1	2.9	4.7
	PID	90.7	2.6	4.4
	D	82.5	3.2	5.1
	BT	88.2	2.9	4.7
90%	I	91.0	2.4	4.4
	PIT	91.2	2.5	4.4
	PID	94.2	2.3	4.2
	D	84.5	2.8	4.8
	BT	90.2	2.6	4.5

^b see the Table 5-7.

Table 5-13. Effect of soil moisture content on emergence, T_{50} and MDG of pelleting carrot seeds

Soil moisture cotent	Treat.	Emergence(%)	T_{50} (days)	MDG(days)
50%	I	78.9	5.3	8.3
	PIT	81.9	5.1	8.2
	PID	84.2	5.0	8.0
	D	81.2	5.1	8.1
	BT	70.0	5.6	8.4
70%	I	81.5	5.1	7.9
	PIT	83.9	5.0	7.8
	PID	88.4	4.9	7.6
	D	81.6	5.1	8.1
	BT	72.8	5.5	8.2
90%	I	82.6	4.8	7.7
	PIT	86.4	4.9	7.6
	PID	90.4	4.7	7.4
	D	83.5	5.0	7.9
	BT	74.2	5.3	8.1

Table 5-14. Effect of soil moisture content on emergence, T₅₀ and MDG of pelleting tobacco seeds

Soil moisture cotent	Treat.	Emergence(%)	T ₅₀ (days)	MDG(days)
50%	I	73.1	8.7	14.5
	PIT	86.4	7.9	11.8
	PID	82.7	8.0	12.6
	D	84.6	8.0	12.7
	BT	78.5	8.2	13.0
70%	I	75.8	8.3	13.1
	PIT	90.8	7.7	11.3
	PID	86.6	7.9	11.9
	D	87.1	7.9	11.7
	BT	81.5	8.0	12.6
90%	I	78.8	8.1	12.5
	PIT	92.6	7.5	10.8
	PID	88.9	7.8	11.5
	D	89.5	7.7	11.3
	BT	83.3	7.9	12.1

^b see the Table 5-7.

Table 5-15. Effect of soil moisture content on emergence, T₅₀ and MDG of pelleting codonopsis seeds

Soil moisture cotent	Treat.	Emergence(%)	T ₅₀ (days)	MDG(days)
50%	I	67.7	9.4	12.3
	PIT	65.1	9.5	13.2
	PID	73.8	8.2	11.3
	D	68.9	9.3	12.6
	BT	60.1	9.9	14.3
70%	I	72.9	9.0	12.0
	PIT	69.1	9.2	12.1
	PID	77.7	8.8	11.9
	D	72.5	8.3	11.5
	BT	64.3	9.6	13.6
90%	I	75.3	8.7	11.6
	PIT	71.6	9.1	12.2
	PID	79.8	8.1	11.2
	D	74.9	8.8	11.8
	BT	68.4	9.3	12.5

3) pelleting seed의 물리적 특성

가) 피복재료에 따른 pelleting 종자의 경도 및 균일도 측정

피복재료에 따른 pellet 종자의 경도 및 균일도 측정한 결과 상추의 경우 pelleting 성형은 PID처리가 가장 좋았다. 경도 또한 PID 처리구에서 가장 높았으며, 분진발생도 적었다. 그러나 수분접촉에 따른 Crack 시간은 0.7h로 다른 처리구에 비해 늦었다.

양파와 당근도 상추와 유사하였다. 담배는 PIT처리구에서 강도가 가장 높았으며, 분진은 약간 발생하였다. 아마도 담배 나종자의 크기가 매우 미세하여 여타의 pelleting 종자와 다른 경향이 나타난 것으로 생각된다.

더덕은 PID처리구가 성형을 가장 좋았고 강도는 Illite 단독 처리가 가장 높았다. 이는 성형율이 좋지 않아 pelleting machine pan내 종자 rolling시간이 길어져 강도가 높게 나온 것으로 생각된다. 상기 피복물질 조합에 따른 pelleting 종자의 발아율이 대체로 PID처리구에서 가장 높았는데 이는 pelleting 종자의 물리적 특성의 Crack 형태와 연관지어 생각해볼때 split+melt형이 전반적으로 발아율에 가장 효과적이면서 pellet 종자로서 적당할것으로 생각된다.



종자 압축강도 시험기



수분흡수측정기

Fig. 5-1. Testing machine of hardness and moisture absorption on pelleting seed.

Table 5-16. Physical property and uniformity of lettuce pelleting seeds

Treat.	Physical properties of pelleting seed				
	pelleting handling	hardeness	crack type	Crack time(h)	dust
I ^b	****	284±34.7	swell	0.5	-
PIT	***	240±24.6	split	0.4	+
PID	*****	364±41.2	split+melt	0.7	-
D	****	198±16.4	swell+melt	0.2	+
BT	***	308±27.7	melt	0.5	+

^b see the Table 5-7.

Table 5-17. Physical property and uniformity of onion pelleting seeds

Treat.	Physical properties of pelleting seed				
	pelleting handling	hardeness	crack type	Crack time(h)	dust
I ^b	***	385±36.3	melt	0.9	+
PIT	***	381±76.4	split+melt	1.2	+
PID	*****	520±41.2	split+melt	1.4	-
D	****	292±65.4	swell	0.6	++
BT	***	298±40.8	melt	0.8	++

^b see the Table 5-7.

Table 5-18. Physical property and uniformity of carrot pelleting seeds

Treat.	Physical properties of pelleting seed				
	pelleting handling	hardeness	crack type	Crack time(h)	dust
I ^b	****	330±21.0	melt	0.7	+
PIT	***	349±20.8	split+melt	0.9	+
PID	*****	437±80.1	split+melt	1.2	-
D	****	206±12.7	swell	0.3	++
BT	***	220±33.5	melt	0.5	++

^b see the Table 5-7.

Table 5-19. Physical property and uniformity of tobacco pelleting seeds

Treat.	Physical properties of pelleting seed				
	pelleting handling	hardeness	crack type	Crack time(h)	dust
I ^b	****	559±11.1	swell+split	0.7	++
PIT	*****	736±63.5	split+melt	0.4	+
PID	***	324±66.2	split	0.2	-
D	*****	150±25.8	swell	0.5	+
BT	****	505±28.0	melt	0.9	-

^b see the Table 5-7.

Table 5-20. Physical property and uniformity of Codonopsis pelleting seeds

Treat.	Physical properties of pelleting seed				
	pelleting handling	hardeness	crack type	Crack time(h)	dust
I ^b	***	516±71.2	melt	2	-
PIT	***	371±38.2	swell+melt	1.4	+
PID	*****	448±07.95	split	0.8	-
D	****	210±15.7	swell+melt	0.4	+
BT	***	308±27.7	swell	0.8	++

^b see the Table 5-7.

나) pelleting 종자의 수분흡수력 측정

Pelleting 종자의 수분흡수는 1시간 경과시 BT 처리 조건이 가장 빨리 흡수하여 48%의 수분 흡수력을 나타냈으며 4시간 경과시 Diatomite의 처리구에서 약 80%정도의 수분 흡수율을 나타내어 가장 높은 수분 흡수력을 보였다. 이는 상기 피복물질조합에 따른 발아율에서 Diatomite의 처리구의 발아율이 높지 않았는데 pelleting 종자가 수분 접촉후 피복물질인 Diatomite가 과도한 수분을 보유하고 있어 종피의 투수·투기성을 저하시켜 발아율을 떨어뜨린 것으로 생각된다. 한편 PID처리구의 수분흡수 양상은 S형의 수분 흡수력을 보였다.

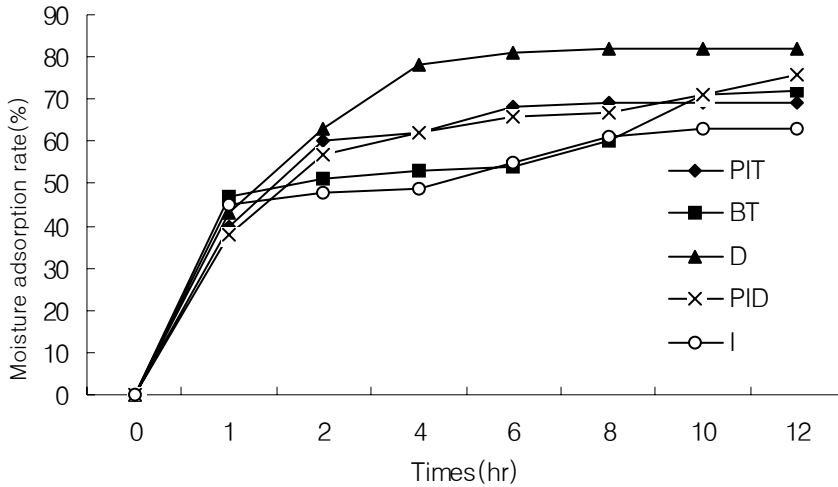


Fig. 5-2. Effects of moisture absorption as different pelleting particulate matter. (PIT: Pyrophyllite+Illite+Talc, BT: Bentonite+Talc, PID: Pyrophyllite+Illite+Diatomite, D: Diatomite, I: Illite).

4) Pelleting 종자 제조시 온도의 영향

Pelleting 종자 제조시설내 온도 조건에 따른 pelleting 종자의 발아율을 조사한 결과 상추는 21℃ 공정조건에서는 발아율에 큰 영향을 미치지 않는었는데 24℃ 이상 온도가 상승할 경우 발아율이 90% 미만으로 떨어졌다.

양파의 경우는 비교적 온도에 덜 민감했는데 24℃까지는 발아율 저하에 큰 영향을 미치지 않았으며 27℃ 정도 부터는 발아율 감소가 나타났다.

당근의 경우는 상추와 마찬가지로 21℃까지는 발아율에 비교적 큰 영향을 미치지 않는었는데 27℃ 이상이 되면 급격히 발아율이 감소되었다.

담배는 24℃까지는 발아율 저하는 관찰되지 않았으나 27℃에서부터 서서히 감소하였다.

더덕은 21℃ 보다 높아지면 발아율 감소가 나타났으며 온도가 상승할 수록 급격한 발아율 감소가 나타났다. 대체적으로 종자의 발아적온에 알맞은 온도대에서 발아율 저하가 진행되기 시작했으며 pelleting 과정시 수용성 접착물질의 분무 및 pellet machine의 drum의 회전에 따른 종자끼리의 마찰에 의해 더욱 종자의 활성이 떨어진 것으로 생각된다. 따라서 종자 활력을 유지할 수 있는 종자

pelleting 시설내 적정 온도대는 상추 18℃, 양파 21℃, 당근 21℃, 담배 24℃, 더덕 18℃ 였다. 한편, 유용미생물을 첨가하여 pelleting을 할 경우 pelleting 종자는 공정 도중 수분 stress 및 pelleting pan의 회전에 의한 pelleting 종자끼리의 마찰에 의한 열 발생으로 종자 활력감소 및 균 생존력 감소 등 여러 가지 미생물 pelleting 종자의 기능감소를 동반하기 때문에 더 낮은 온도가 요구되리라 생각된다. 그러나 유용미생물을 포함하지 않고 pelleting을 할 경우 경제적 생산면에서 상기 온도 조건이 적당하다고 생각된다.

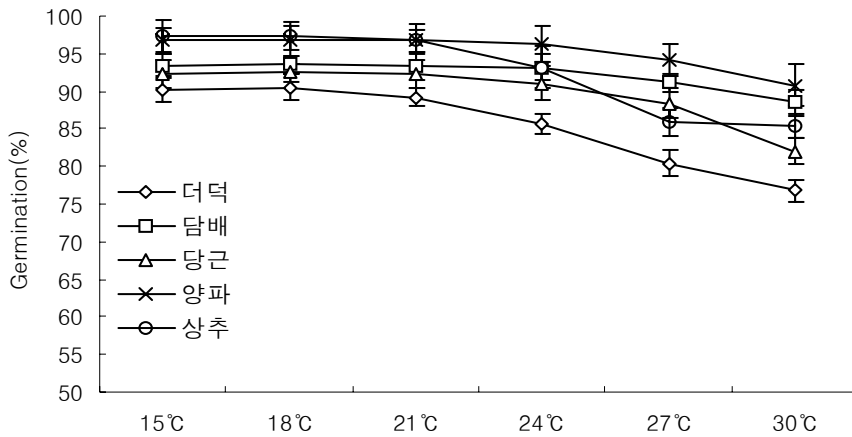


Fig. 5-3. Germination of pelleting seed as affected by operating environment Changes in temperature while seedpelleting.

6절 미생물 pelleting 종자의 성장촉진 활력 검정

최근 식물근권에서 분리한 길항성 *Pseudomonas sp.* 를 이용한 토양병 방제에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 토양병 방제제로서의 길항미생물은 대상병원균에 대해 in vitro에서 길항성이 높을 뿐만 아니라 실제로 식재토양에서도 우월한 병방제효과가 있어야 한다. 즉 실내에서 단기간내에 적은 비용으로 많은 길항성균주를 선발하였어도 포장에서 이들 균주의 발병억제효과가 떨어지거나 작물생육에 장애가 있다면 실용화할 수 없기 때문이다. 또한 병방제 효과를 높이기 위하여 이들 길항세균을 종자에 coating 하거나 유묘 뿌리에 침적하는 등 다양한 처리방법이 시도되고 있다.

미국, 유럽, 일본등에서는 유용미생물(*Bacillus sp.*)로 pelleting된 종자가 실용화되고 있으나, 우리나라에서는 유용미생물을 이용한 pelleting에 관한 연구는 극히 미진한 실정이다. 본 실험에서는 분상 및 액상으로 제제화시켜 종자 pelleting에 길항미생물 첨가시 작물의 성장촉진 및 토양병 억제효과를 알아보고 저장기간에 따른 길항미생물의 생존율을 구명하고자 한다.

1. 미생물 pelleting 종자의 제조

가. 재료 및 방법

1) 미생물 제제화

길항미생물이 첨가된 종자 pelleting 종자를 이용한 작물 재배시 작물의 성장촉진 및 토양병 억제 효과를 알아보기 위해 BIG21003균은 powder형태로 제제화하여 코팅시에 증량제에 혼합하여 pelleting하였다. 제제화가 어려운 K95009는 siderophore 를 많이 생산하는 배지조건에서 배양한 배양액을 이용한 pelleting 처리 방법과 동결건조 방법을 통해 제조한 powder 형태로 증량제에 투입하여 pelleting 처리 방식으로 pelleting을 하였다.

2) 미생물 pelleting 종자 제조

상기 실험 결과 받아들여 가장 좋았던 pellet 종자 피복물질 pyrophyllite, ilite, diatomite를 일정비율 pyrophyllite 25 중량 %, ilite 35 중량%, diatomite 25 중량%, 계면활성제 10 중량%를 혼합하여 증량원제를 제조하고 spray dry 과정을 통해 얻은 BIG21003 technical powder 5 중량%로 혼합하여 증량제를 제조하였다. 제조된 증량제와 binder의 반복투여로 미생물 펠렛팅 종자를 제조하였다. K95009도 마찬가지로 powder 형태는 증량제 5%를 혼합하여 미생물 펠렛팅 종자를 만들었으며 또한, siderophore 생성 배지에서 배양된 배양액을 그대로 종자

pelleting에 적용하여 제조하였다.

3) 미생물 pelleting 종자 활력 검정

제제화된 두 종의 미생물 BIG21003과 K95009균을 종자 pelleting에 혼합하여 제조된 미생물 pellet 종자를 15cm의 petridish(Falcon社, USA)에 9ml의 distilled water를 whattman No.1 흡습지에 흡습시킨 후 각 작물별 pelleting 종자와 나종자를 100립씩 4반복 처리하였다. 종자별 발아온도는 상추 20℃, 당근 22℃, 양파 23℃, 더덕 18℃, 담배 28℃로 하였다. 광조건은 상추와 담배는 광상태, 당근, 양파, 더덕은 암상태의 항온기에서 실시하였다.

4) Priming 처리된 미생물 pelleting 종자의 활력검정

각 작물종자의 priming은 무기염류를 이용한 chemical-priming과 미생물을 이용한 biopriming 두 가지로 나누어 pelleting 종자의 활력을 검정하였다. 예비 실험결과 발아율 향상 및 발아세 단축에 효과적인 처리 물질은 상추 KH_2PO_4 50mM, 양파와 당근은 PEG8000 -0.50MPa, 담배는 PEG8000 -0.75MPa, 더덕은 GA_3 1000ppm 이었다.

미생물을 이용한 biopriming은 상기 실험에서 발아촉진 및 성장촉진 효과가 있는 *Pseudomonas fluorescens* K95009를 King's B 배지에서 배양하여 각각의 작물 종자를 1시간 침지하여 음건한 후 petridish에서 종자활력을 검정하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 미생물 pelleting종자의 활력 검정

상추의 경우 BIG21003 처리에서는 발아율이 control와 유사한 경향이었으며, BIG21003와 K95009 혼합 처리에서 발아율이 가장 높았다. T_{50} 및 MDG 는 control에 비해 K95009 단독, BIG21003과 K95009 혼합 처리에서 단축되었다. 박 등은 *Bacillus polymyxa* E681균 배양액을 분무하여 pelleting한 종자가 무처리 pelleting 종자에 비해 T_{50} 및 MDG가 단축되었다는 결과와 일치하는 경향이 있었다.

Table 6-1. Effect of the different microbes on germination of pelleting lettuce seeds

	Treat.	Germination(%)	T ₅₀ (days)	MDG(days)	c.f.u/g Seed
Lettuce	A	96.2	1.03	2.20	8.7×10 ⁹
	B	96.7	1.00	2.13	-
	C	96.8	0.95	1.99	4.3×10 ⁹
	Control	96.3	1.04	2.18	-
Onion	A	95.2	2.49	3.33	1.8×10 ¹⁰
	B	96.1	2.45	3.20	-
	C	96.4	2.21	3.16	5.6×10 ⁹
	Control	95.2	2.48	3.55	-
Carrot	A	92.2	2.63	4.58	3.4×10 ⁹
	B	92.0	2.53	4.18	-
	C	92.9	2.44	3.99	9.1×10 ⁸
	Control	92.0	2.87	4.63	-
Tobacco	A	91.2	5.54	7.97	3.5×10 ¹⁰
	B	92.2	5.97	7.33	-
	C	92.0	5.55	7.56	1.7×10 ¹⁰
	Control	91.8	6.11	8.05	-
Codonopsis	A	88.6	8.32	12.84	8.7×10 ⁹
	B	88.6	8.10	12.38	-
	C	89.9	7.97	11.90	2.5×10 ⁹
	Control	87.4	8.20	12.92	-

A ; treatment with BIG21003, B ; treatment with K95009, C ; treatment with A+B

양파의 경우 K95009 단독과 BIG21003+K95009 처리에서 무처리에 비해 발아율이 높았으며, K95009 단독 처리에서 T₅₀ 및 MDG가 무처리에 비해 각각 0.3일, 0.5일 유의적으로 단축되었다. T₅₀ 및 MDG는 BIG21003+K95009>K95009>BIG21003>control 순으로 단축되어 *Bacillus* sp. BIG21003와 *Pseudomonas fluorescens* K95009균이 첨가된 처리에서 균이 첨가되지 않은 처리에 비해 단축되었다.

당근의 경우 BIG21003+K95009처리가 control 및 다른 처리에 비해 발아율이 높았으며, T₅₀ 및 MDG는 모든처리가 control에 비해 단축되었다.

담배의 경우 발아율은 K95009 단독과 BIG21003+K95009 처리에서 유사한 경향이 있으며 K95009 단독 처리에서 T₅₀ 및 MDG가 가장 짧았다.

더덕의 경우 BIG21003과 K95009 혼합 처리에서 가장 높은 발아율을 나타냈으며 T₅₀ 및 MDG도 유사한 경향이였다.

2) Priming처리된 미생물 pelleting 종자의 활력 검정

상추의 경우 나종자의 biopriming은 chemical priming보다 발아율이 약간 낮았으나 T₅₀ 및 MDG는 유사하였다. 그러나 biopriming후 완성된 pelleting 종자는 priming을 하지 않은 종자에 비해 약 3.2% 발아율이 높았으며 T₅₀ 및 MDG가 각각 0.3일 0.4일씩 단축되었다. 최종 발아율은 biopriming처리한 종자에서 가장 높았으며 T₅₀과 MDG도 가장 짧았다. 이는 K95009를 이용한 biopriming 처리를 통해 K95009균 및 세포가 생성하는 대사산물 등이 종자 활력을 높이는 것으로 추정된다.

양파에서 biopriming후 완성된 펠렛종자는 unpriming 종자보다 발아율이 5.4% 높았으며 T₅₀ 및 MDG는 각각 0.5일, 0.3일 단축되었다. 특히 프라이밍 하지 않은 종자의 발아율이 90%정도로 낮아 실제 농가의 보급을 위해선 반드시 priming처리를 해야 할 것으로 사료된다. biopriming한 pelleting 종자는 chemical priming 종자와 T₅₀ 및 MDG가 비슷하였으나 unpriming한 pelleting 종자는 프라이밍하지 않은 일반 나종자에 비해 발아세 지연경과가 길게 나타났다. 따라서 무기염류를 이용한 priming이나 미생물을 이용한 biopriming처리가 절실히 요구되어지며, 종자 pelleting시 종자의 활력감소를 줄일 수 있을 것으로 기대된다.

당근의 나종자는 비교적 발아율이 낮아 priming을 통한 발아율증진에 관한 연구가 많이 이루어지고 있다. 그러나 나종자를 priming처리 후 과중시 유모종자의 경우 어려움이 많다. 이러한 단점을 극복할 수 있는 방법이 pelleting을 통한 종자성형인데 아직까지 실용가능한 종자 pelleting 기술이 확보되지 못하고 있는 실정이다. 본 실험에서 K95009를 이용한 biopriming종자는 unpriming종자에 비해 4%정도의 발아율이 증가하였으며, biopriming+pelleting 종자는 unprimng+pelleting 종자보다 무려 6.9%정도의 발아율이 증가하였다. T₅₀은 biopriming 처리가 가장 단축되었으며 일반 무기염류를 이용한 priming처리리는 0.2일 더 길었다. MDG는 priming 처리와 biopriming+pelleting 처리가 6.1일로 같았으며 biopriming처리가 5.9일로 가장 짧았다.

Table 6-2. Effect of priming on germination, T₅₀ and MDG of pelleting seeds

	Seed treat.	Germ.(%)	T ₅₀ (days)	MDG(days)
Lettuce	Biopriming	98.4	0.6	1.1
	Priming	97.5	0.7	1.2
	Biopriming +Pelleting	97.0	0.8	1.2
	Unpriming +Pelleting	93.4	1.3	1.6
	Unpriming	95.6	1.1	1.4
Onion	Biopriming	96.8	2.8	3.8
	Priming	95.3	3.1	4.0
	Biopriming +Pelleting	95.6	3.2	3.9
	Unpriming +Pelleting	90.2	3.6	4.6
	Unpriming	93.3	3.3	4.2
Carrot	Biopriming	93.1	3.9	5.9
	Priming	92.5	4.1	6.1
	Biopriming+Pelleting	92.3	4.2	6.1
	Unpriming +Pelleting	85.4	5.2	7.8
	Unpriming	90.8	4.7	7.3
Tobacco	Biopriming	94.0	5.7	9.0
	Priming	93.9	5.9	9.2
	Biopriming +Pelleting	93.6	5.9	9.4
	Unpriming +Pelleting	90.4	6.5	9.8
	Unpriming	92.8	6.1	9.5
Codonopsis	Biopriming	92.1	6.8	9.4
	Priming	90.3	7.1	9.9
	Biopriming +Pelleting	90.2	7.2	10.8
	Unpriming +pelleting	76.8	8.2	13.1
	Unpriming	80.2	7.4	11.6

담배의 경우 biopriming종자의 발아율은 94%로 unpriming종자보다 1.2% 높았으며 T₅₀ 및 MDG는 각각 0.4일 0.5일 단축되었다. biopriming+pelleting종자는 priming처리만 한 종자보다 발아율이 0.3% 감소되었으나 유사한 경향이었으며, unpriming+pelleting종자는 unpriming 나종자보다 2.4% 감소하여 priming을 하지 않고 pelleting을 할 경우 발아율 감소의 정도가 컸다.

더덕은 야생식물로서의 특성을 많이 가지고 있는 약용작물이다. 종자번식으로의 재배법이 확립되어 종자채종을 통하여 재배가 이루어지고 있으나, 종자에 부착되어 있는 날개모양의 종모가 있어 파종시 어려움이 많다. 또한 일정기간 휴면을 하고 있어 휴면타파를 처리해야 발아하기 때문에 입모율 확보가 어렵다. 두 가지의 단점을 보완하고 비닐 멀칭을 통한 기계화 파종을 위해선 pellet 종자로의 전환이 절실한 실정이다.

K95009를 이용한 biopriming 종자는 unpriming종자보다는 발아율이 11.2%, priming 종자에 비해서는 1.8% 증가하였다. 또한 T₅₀과 MDG는 K95009를 이용한 biopriming처리를 할 경우 unpriming에 비해 각각 0.6일 2.2일 단축되었다. biopriming+pelleting 종자는 biopriming처리 종자에 비해 발아율이 감소하였지만 priming처리 종자와는 유사하였다. 이는 종자 pelleting과정시 종자의 활력이 일부 감소되는 부분을 K95009를 이용한 biopriming처리를 통해 보완 할 수 있음을 나타내는 결과였다. 한편 biopriming+pelleting 종자는 unpriming+pelleting 보다 발아율이 13.4% 높았으며 T₅₀ 및 MDG는 각각 1일, 2.3일 단축되었다.

2. 생육촉진 효과 검정

가. 재료 및 방법

생육촉진 효과 길항미생물이 첨가된 pelleting 종자의 파종 후 길항미생물에 의한 생육촉진 및 토양 병억제 효과를 알아보기 위해 2004년 2월부터 8월까지 강원대 농대 유리 온실 및 포장을 이용하였다. 공시작물은 상추, 당근, 담배, 더덕으로 시중에서 구입하여 미생물 pelleting종자를 제조하여 실험에 이용하였다. 생육조사는 농촌진흥청 생육조사특성요령에 준하였다. 발아율조사는 ISTA, AOSA 기준에 따라 1mm이상 지상에 유묘가 돌출한 것을 발아로 간주하였다.

상추 200홀, 양파 406홀, 담배 400홀 트레이(범농社)에 상토 (Berger社, Canada)를 충전하고 각 작물별 미생물 pelleting 종자와 일반 나종자를 각각 2립씩 파종하여 실험에 사용하였다. 상추는 파종후 10일 육묘, 담배는 30일 육묘후 강원대 포장에 이식하였으며 이식후 상추는 15일째, 양파는 20일째, 담배는 30일째 생육조사를 실시하였다. 당근은 120cm 이랑을 만들어 유공비닐로 피복하여 직파하였으며, 더덕은 토양 경운 후 정지하여 30cm 이랑을 흑색비닐로 멀칭 후 8cm간격으로 구멍을 뚫고 파종하였다.

나. 결과 및 고찰

길항미생물 BIG21003과 K95009균을 각각 분말형태와 액상으로 종자 pelleting 시 첨가하여 작물생육촉진 정도를 조사한 결과 상추의 묘 출현율은 처리별로 약간의 차이는 있었으나 94.2~94.8%로 비슷하였으며, BIG21003 처리구에서 묘 출현율을 제외하고는 엽장, 엽폭, 엽수, 생체중이 control에 비해 생육이 우수하였다. 길항미생물 처리구인 BIG21003과 K95009 처리 비교에서는 K95009 처리구의 생육이 좋았으며 이는 *in vitro* 시험과 일치하는 경향이였다.

Table 6-3. Growth characteristics of lettuce pelleting seed under different antagonistic microbe

Treat.	Emergence (%)	Leaves			FW (mg/plant)
		Length(cm)	Width(cm)	Number	
A ^{□□}	94.4	5.2	2.8	4.2	648
B	95.1	5.8	2.9	4.6	671
C	96.2	6.2	3.3	4.8	712
Control	94.6	5.1	2.7	4.2	651

□□ see the table 6-1.

당근의 경우 묘 출현율은 혼합 처리구에서 가장 높았으며, 다른 처리구는 비슷하였다. 초장은 혼합 처리구에서 control 대비 3.4cm 컷으며, 근장과 근직경과 각각 6.4cm, 0.98cm으로 다른 처리구에 비해 높았다. 길항미생물간의 생육촉진 효과는 BIG21003 균보다 K95009균의 처리구에서 좋았으며 이는 예비실험 결과와 일치하는 경향이였다.

당근 재배에서 최고로 노동을 요하는 작업은 솎음과 수확으로 전체의 90%를 점유하고 있다. 솎음작업의 생력화를 위해서는 솎음하기 쉬운상태에서 파종을 하든지, 솎음횟수가 적게 되도록 파종하든지 새로운 방안을 강구해야한다. 본 실험에서 비닐멀칭을 이용한 pelleting 종자의 파종은 솎음작업과 제초문제를 해결할 수 있는 방안으로 제시될수 있을 것으로 기대되며, 향후 pelleting 종자의 비닐멀칭 재배시 적정재식정도를 파악하고 멀칭과 파종을 동시에 할 수있는 기계의 개발이 필요하다고 생각된다. 이를 위해 멀칭비닐의 기계멀칭시 적정 인장력이 요구되는 제품의 연구도 필요하다고 사료된다.

미생물을 이용한 pelleting 종자를 트레이에 파종 후 50일 정도 경과된 담배묘의 생육조사를 실시한 결과는 Table 6-5와 같다. 묘의 출현율은 혼합 처리구에서 90.8%으로 가장 높았으며 control과 BIG21003처리구는 각각 89.2, 89.3%로 비슷

한 출현율을 나타냈다. 초장은 K95009 단독, 혼합 처리가 control에 비해 높았으며, 엽장, 엽폭도 유사한 경향이었다. 묘의 건정성 지표인 T/R율은 혼합 처리에서 5.56으로 무처리 5.86보다 낮아 건전 육묘에 적당한 처리 조건으로 향후 연구 가능성이 있을 것으로 기대된다.

Table 6-4. Growth characteristics of carrot pelleting seed under different antagonistic microbe

Treat.	Emergence (%)	Plant height(cm)	Root		FW (g/plant)	DW (mg/plant)
			Length(cm)	Diameter(cm)		
A [♪]	94.1	24.4	5.2	0.90	3.95	477
B	94.3	26.4	5.2	0.98	4.25	466
C	95.2	26.7	5.3	0.92	4.92	535
control	94.2	23.6	5.3	0.91	3.93	472

□□see the table 6-1.

Table 6-5. Growth characteristics of tobacco pelleting seed under different antagonistic microbe

Treat.	Emergence (%)	Plant height(cm)	Leaves		FWT [♪] (g/plant)	FWR (g/plant)	T/R ratio
			length(cm)	width(cm)			
A [♪]	89.3	8.4	8.0	4.2	2.58	0.43	6.00
B	89.8	8.6	8.3	4.3	2.64	0.45	5.85
C	90.8	8.9	8.3	4.3	2.78	0.48	5.56
Control	89.2	8.4	7.9	4.3	2.55	0.41	5.97

□□see the table 6-1.

[♪] FWT : Fresh weight of trunk. FWR : Fresh weight of root.

더덕의 유용미생물 이용한 pelleting 종자의 직파시 출현율은 in vitro 실험에 비해 낮았으나 무처리 대비 처리구의 출현율은 85%정도로 비슷하였다. K95009 처리구에서 만장, 근장, 근경, 근중 모두 무처리에 비해 생육이 양호하였으며, 뿌리의 생육에 있어 근장은 무처리와 비슷하였으나 근경과 근중은 각각 무처리 대비 생육이 좋았다. 분말 형태로 제제화된 BIG21003균을 첨가한 처리구는 무처리에

비해 생육촉진의 효과가 미비하였으며 액상 형태로 분무 첨가한 *Pseudomonas fluorescens* K95009균 처리구는 무처리에 비해 생육촉진효과가 비교적 뚜렷하였다.

Table 6-6. Growth characteristics of codonopsis pelleting seed under different antagonistic microbe

Treat.	Emergence (%)	Plant height(cm)	Root		
			length(cm)	diameter(cm)	weight(g/plant)
A ^b	85.5	15.3	6.9	0.73	5.34
B	83.1	13.8	6.0	0.70	4.59
C	85.1	16.4	7.1	0.87	6.52
Control	84.2	14.6	6.3	0.82	5.27

□□ see the table 6-1.

7절 미생물 pelleting 종자의 길항력 검정

토양병해는 토양내에 서식하는 미생물 및 이에 관련된 비생물학적 환경요인이 서로 복잡하게 연관되어 있으므로 토양 생태학적 환경조건에 크게 좌우된다. 특히 비닐하우스에서 재배하는 채소의 경우 다년간 연속재배를 통하여 화학비료 및 합성농약에 노출되어 미생물의 서식이 어려워 토양병해로 인한 생산물의 손실이 큰 실정이다. 본 실험에서는 기내실험을 통하여 길항력이 우수한 유용미생물을 선발하여 종자에 처리함으로써 파종과 동시에 근권부위의 환경변화를 유도하여 건전한 작물재배를 모색하였다. 그러나 미생물을 살아있는 상태로 사용하여 작물병을 방제하는 방법은 생물학적 방제 방법중에서도 고도의 기술을 요하는 매우 어려운 방법중의 하나이다. 따라서 토양병의 방제가 높이기 위해서는 토양병원균에 대해 길항작용을 유도하거나, 영양경쟁, 기생, 교차방어 등의 이론이 제시되고 있다.

이러한 방법의 성공과 실패를 좌우하는 가장 큰 요인은 사용한 미생물이 작물의 근권에서 얼마나 오랫동안 정착할 수 있는지에 달려있는데 지금까지의 여러 시험결과 미생물의 정착능력이 사용후 시간이 경과할 수록 감소하여 소기의 방제효과를 달성할 수 없는 경우가 많았다. 성공적인 생물학적 방제효과를 위해서는 근권부위의 여러 이화학적, 생물학적 환경에 순응할 수 있는 길항균의 확보가 관건이 되며 우선적으로 길항균의 식물체부위(토양병해의 경우 근권)에서의 생존 증식여부가 조사되어야 한다. 다음으로는 길항균의 생존 증식력을 증가시키기 위한 여러 가지 방법이 모색되어야 하는데 그 방법으로는 길항균의 여러 계통중 생존력이 우수한 길항균을 선발하는 방법이 있고 다른 방법으로는 길항균의 생존을 돕기 위한 유기물의 시용 또는 영양매체의 공급에 의한 것이 있다.

1. 미생물 종자 처리에 따른 균 생존력 검정

가. 재료 및 방법

1) pelleting 성형물질을 이용한 미생물 coating

상기 실험에서 길항력이 우수한 BIG21003균과 작물생장촉진효과가 좋은 K95009균주를 공시균주로 이용하였고, 종자는 오이종자를 사용하였다.

종자 처리는 분말 형태 첨가제와 액상 형태 첨가제로 나누어 실험을 수행하였다. 분말 형태 첨가제는 상기 종자 pelleting 실험 에서 종자활력에 가장 안정적인 PID 피복물질 중 pyrophyllite, illite, diatomite를 각각 사용하였고, 두 균을 액체 배양한 후 K95009는 freeze dry, BIG21003은 spray dry하여 powder를 제조하고 최종 증량제 무게의 5%를 첨가하여 혼합하여 분무·투입하면서 오이 종자에 피

막 coating 처리 하였다. 처리종자는 40℃에서 경시적변화를 통해 균 생존력을 조사하였다. 액상형태의 K95009 배양액에 binder AG, PVA, CMC, PVP 를 각각 1%농도로 용해하여 사용하였다. 접착제가 용해된 균 현탁액에 오이 종자를 1시간 침중 시킨 후 음건하여 상온에 보관하면서 기간별로 종자에서의 균 생존력을 조사하였다.

2) 미생물 pelleting종자의 안정적 균 활력 유지 기술

오이종자 coating 및 soaking 처리시 K95009의 생존율이 매우 짧기 때문에 이를 보완하기 위해 pelleting 공정 방법을 개선하여 균의 생존율을 높이고자 K95009균을 액체 배양하여 일부는 배양액 형태로 사용하고 일부는 freeze dry 하여 분말 형태로 제제화 하여 pelleting에 사용하였다.

또한, 미생물 종자 pelleting은 4℃와 25℃ 조건에서 실시하였으며, 완성된 미생물 pelleting 종자는 제조공정온도에 맞추어 180일 동안 균 생존력을 조사하였다.

나. 결과 및 고찰

1) pelleting 성형물질을 이용한 미생물 coating 처리

제제화된 BIG21003을 각 피복물질에 혼합하여 coating처리한 결과 pyrophyllite를 피복물질로 활용할 경우 가장 균 생존력이 좋았으며, BIG21003균을 spray 건조한 powder 처리와도 균 생존력에 큰 차이가 없었다. 한편, K95009균을 freeze 건조한 powder 처리는 pyrophyllite, illite, diatomite를 피복물질 처리들보다 30일 경과시 가장 높은 균 생존력이 나타내 실용적으로 종자 pelleting에 활용할 수 있는 적정 균 생존력을 유지할 수는 없었다.

BIG21003과 K95009를 오이 종자에 coating 처리한 후 coating 종자의 coating 피복물질에서 미생물의 생존력을 조사한 결과 BIG21003 처리구들은 endospore를 형성하여 종자 coating처리 후 40℃에서 30일 경과시 대략 10^7 c.f.u/g seed 의 밀도를 유지하였지만 K95009는 5일 경과 후 급격히 감소하여 15일째에는 균을 관찰 할 수 없었다.

Table 7-1. Various seed pelleting process as additive method and source

Steps	Control	P1	P2	P3	P4
1	Seed priming	Seed priming	Seed biopriming	Seed biopriming	Seed biopriming
2	binder 분사	binder +K95009 배양액 분사	binder +K95009 배양액 분사	binder 분사	binder 분사
3	powder 투입	powder 투입	powder +K95009 제제 투입	powder +BIG21003 제제 투입	powder +BIG21003 제제 투입
4	1st size sieving	1st size sieving	1st size sieving	1st size sieving	1st size sieving
5	binder 분사	binder 분사	binder 분사	binder +K95009 배양액 분사	binder +K95009 배양액 분사
6	powder 투입	powder +BIG21003 제제 투입	powder +BIG21003 제제 투입	powder 투입	powder +K95009 제제 투입
7	2st size sieving	2st size sieving	2st size sieving	2st size sieving	2st size sieving
8	pellet 종자 완성	미생물 pellet 종자 완성			

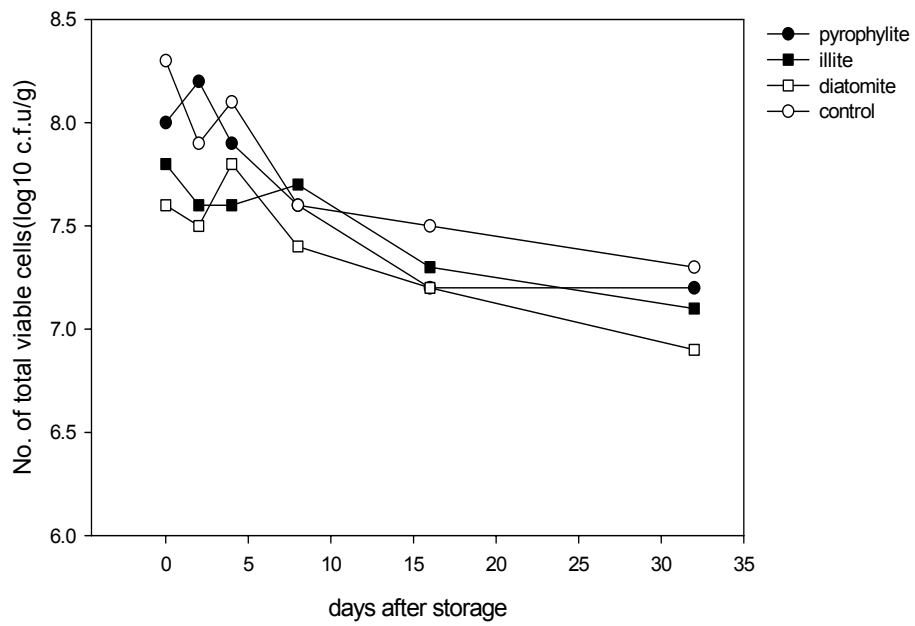


Fig. 7-1. Survivability of BIG21003 on coating seed of cucumber at 40°C aging test.

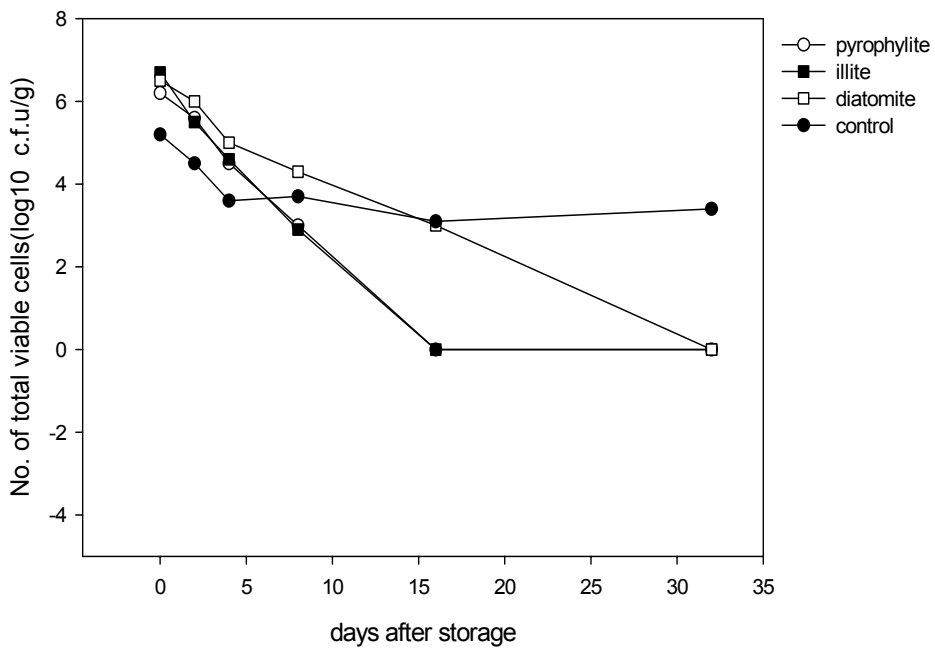


Fig. 7-2. Survivability of *Pseudomonas fluorescens* K95009 on seed coating of cucumber at 40°C aging test.

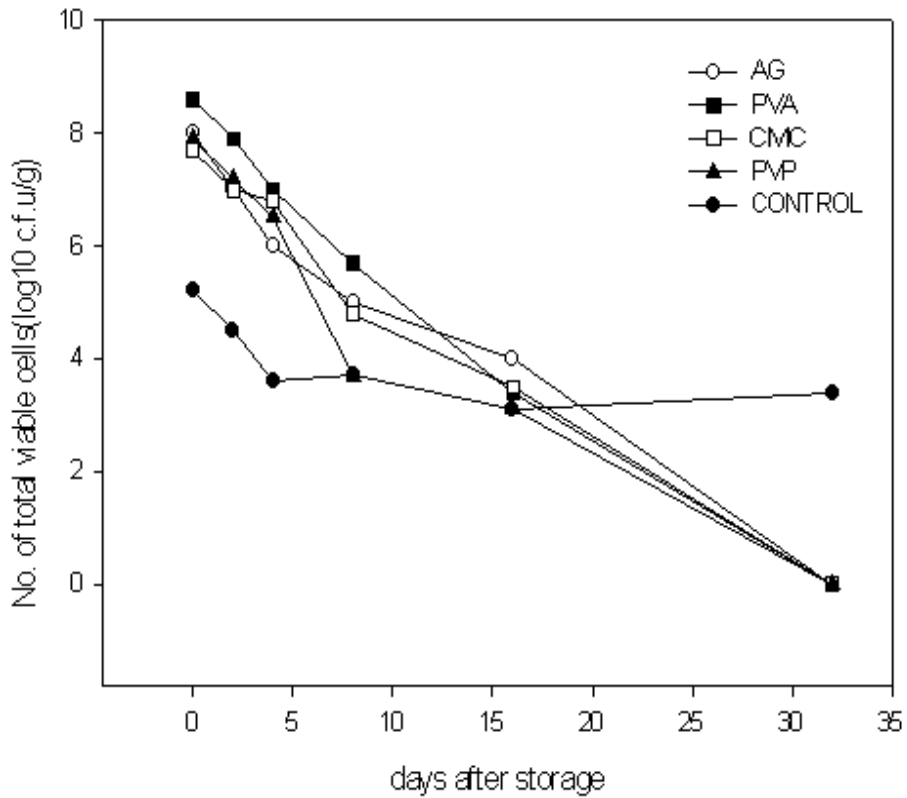


Fig. 7-3. Survivability of *Pseudomonas fluorescens* K95009 on seed soaking cucumber with various stickers.

Control : unsoaking with cell broth culture

K95009 배양액에 각각의 binder를 용해시켜 저장기간에 따른 균 밀도는 control 과 PVP를 제외한 모두에서 8일째 $\times 10^5$ c.f.u/g seed 을 유지하였으며 그 후로는 급격히 감소하였다.

2) 미생물 pelleting 종자의 안정적 균 활력 유지 기술

K95009균의 종자 pelleting에 따른 생존력 감소를 보완하기 위해 pelleting 방법을 일부 변형하여 그에 따른 pelleting 종자 저장 온도 및 기간별 균 밀도 변화를 조사한 결과는 Fig. 7-4,5와 같다.

25°C 조건의 pelleting 공정 환경에서는 P1, P2, P3, P4 처리 모두에서 저장 10 일째 10^4 c.f.u/g seed를 나타냈으며 이후 급격히 감소하였다.

4°C 조건의 pelleting 공정 환경에서 미생물 pelleting 종자를 제조할 경우 P1처리는 저장 60일 경과시 10^4 c.f.u/g seed 였으며 그 이후 급격히 감소하였으며, P3와 P4는 유사한 감소 경향을 나타냈다. 한편 P2 처리는 저장 150일 경과시 10^5 c.f.u/g seed로 저장기간의 경과에 따른 균밀도의 감소가 작아 장기간 저장에 가장 적당한 처리 조건이었다.

결과적으로 4°C 에서 미생물 pelleting 공정을 수행하여 4°C 에 저장할 경우 60 일 정도 까지 K95009균의 활력을 10^4 c.f.u/g seed 이상 유지하였으며, 25°C 에서의 미생물 pelleting 공정 및 저장은 10일 정도까지는 10^4 c.f.u/g seed 이상 유지하였으나 이후 K95009의 장기간 생존율은 급격히 감소하여 일정 생존율을 유지할 수는 없었다.

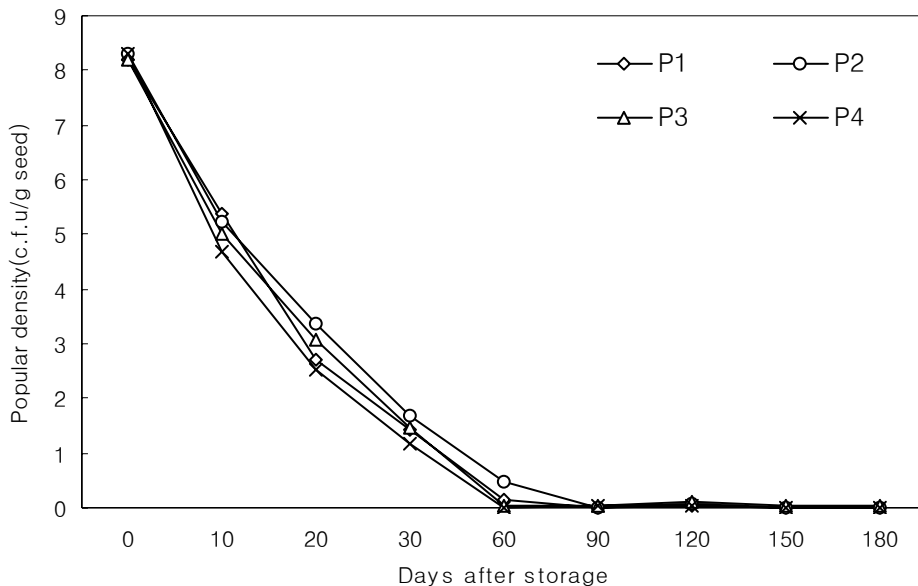


Fig. 7-4. Survivability of *Pseudomonas fluorescens* K95009 for storage period on cucumber pelleting seed made by at 25°C.

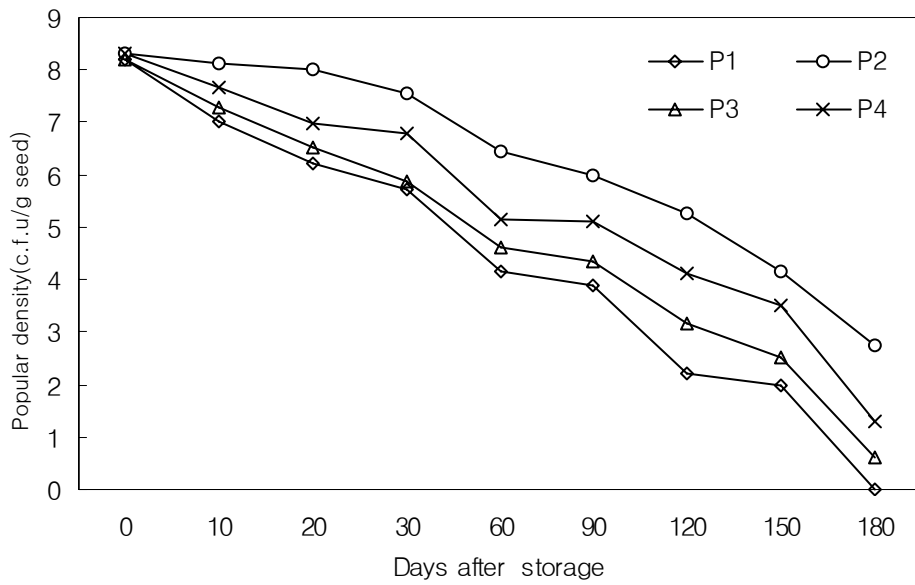


Fig. 7-5. Survivability of *Pseudomonas fluorescens* K95009 for storage period on cucumber pelleting seed made by at 4°C.



Fig. 7-6. Photo of cucumber pelleting seed.

2. 미생물 pelleting 종자의 근권정착능력

가. 재료 및 방법

1) 공시재료

공시 균주로는 길항력이 가장 우수한 *Bacillus* sp. BIG21003을 사용하였으며, 재배기간별 근권내 균 밀도변화를 비교하기 위하여 육묘 후 이식재배하는 상추와 양파를 사용하였다. 또한 근권부위별 근권정착능력을 검증하기 위하여 배추를 육묘하여 25일 생육시켜 사용하였다.

균 처리는 토양관주와 종자 pelleting의 2가지 방법으로 나누어 시험하였는데 pelleting전 미생물 배양액(3.5×10^8 cfu/ml)에 종자를 1시간 Soaking하여 biopriming처리를 하여 사용하였다. 토양관주의 경우는 강원대 온실에서 상추 200홀, 양파 406홀 트레이(범농社)에 상토 (Berger社, Canada)를 충전하고 pelleted 종자와 unpelleting 종자를 2립씩 파종하여 상추는 25일, 양파는 40일 육묘 후 원형플라스틱 포트(12×10cm)에 이식하고 길항미생 BIG21003균은 $\times 10^8$ (c.f.u/g in soil) 농도로 주당 10ml을 토양 관주하였으며, 종자 pelleting은 길항미생물 BIG21003 균을 첨가하여 상기 기술한 pelleting 방법을 적용하였다.

상추와 양파는 pelleting후 BIG21003균은 각각 2.8×10^8 (c.f.u/g of pelleting seed), 5.9×10^8 (c.f.u/g of pelleting seed)였으며, pelleting 처리된 종자는 원형플라스틱 포트(12×10cm)에 멸균된 상토를 충전하고 2립씩 파종하여 육묘하였다.

2) 미생물 pelleting 종자의 재배 기간에 따른 밀도변화

종자 처리는 biopriming과 biopriming+pelleting 처리 두가지로 수행하였다. biopriming 처리는 BIG21003과 K95009를 액체 배양한 배양액에 상추와 양파 종자를 1시간 침종 후 음건하여 사용하였다. 이후 상기 종자 pelleting 기술을 적용하여 미생물 pelleting종자를 제조하여 실험에 사용하였다.

균의 토양내 밀도는 상추의 경우 처리 20일, 40일 후, 양파의 경우 30일, 60일 후에 조사하였다. 각 작물은 포트에서 뽑아 뿌리에 묻어 있는 상토를 털어낸 후 뿌리 표면에 묻어있는 길항균을 측정하기 위함 뿌리 생체중을 측정하고 2차 distilled water에 씻어 BIG21003 균은 80℃에서 autoclave한후 NA배지에서 30℃ 인큐베이터에서 배양한 후 총균수를 측정하여 g 뿌리당 길항균 수를 조사하였다.

3) 근권정착능력 검증

BIG21003 미생물 원제(10^{11} c.f.u/g 이상, 1%) 5%, pyrophyllite 30%, illite 35%, diatomite 25%, D-galactose 5%을 혼합하여 증량제를 만든 후, slurry액 2ml을 배추, 상추 종자 5g의 표면에 최대한 두껍게 묻힌 후 상온에서 24시간 건조하였다. 건조가 끝난 후 직경 10cm petridish에 germination paper를 놓은 후 물 9ml을 뿌려서 충분히 흡습시켰다. 흡습지 위에 배추, 상추는 30개를 올려 놓고 25°C 배양기에 넣고 시간별로 종자의 발아율 및 곰팡이 발생률을 조사하였다.

16구 연결포트에 홍농바이오 상토를 3/4 정도 담은 후, BIG21003 미생물 펠렛 종자(5.6×10^9 c.f.u/g seed)를 2립 파종하여 7일간 25°C (16시간 light/ 8시간 dark)에서 육묘하였다. 또한 토양관주처리를 위해 16구 연결포트에 홍농바이오 상토를 3/4 정도 담은 후, 배추와 상추종자를 2립씩 파종하고, BIG21003균 배양액 1%를 물에 희석하여 관주하고 3일간 25°C (16시간 light, 8시간 dark)에서 육묘하였다. 파종 3일 후 1주만 남겨두고 솟아내기 하였다. *in vitro*에서 육묘한 배추, 상추 뿌리를 6개 부위로 자른 후 6주의 같은 부위를 함께 모아 10ml 멸균수에서 30분 동안 진탕한 후 100ml씩 BIG21003 균은 nutrient agar (NA) medium 상에 spreading하여 colony수를 조사하였다.

4) 미생물 pelleting 종자의 병억제 효과

공시 균주로 BIG21003과 K95009균을 이용하였으며 토양병원균은 *Rhizoctonia solani*이었다. 상기 실험의 BIG21003과 K95009균의 제제를 양파 종자에 pelleting 시 첨가하여 양파의 모잘록병에 대한 방제효과를 강원대 부속농장 온실에서 수행하였다. 양파 모잘록병의 주요 병원균은 *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp.으로 알려져 있는데 본 실험에서 *Rhizoctonia solani* 방제효과를 조사하였다.

전년도 모잘록병이 심하게 발생된 온실토양을 채취하여 pot에 채우고 양파 미생물 pelleting 종자를 파종하였다. 또한 대조구로 복토용 톱밥과 모래에 미생물제제를 10g/kg 으로 섞은 후 관행법으로 종자를 덮어준 처리(CSM; Covering soil mixture)와 미생물제제를 액상으로 제제화 하여 토양관주처리(SD; Soil drenching)하여 미생물 pelleting 종자의 병억제 효과를 비교 조사하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 균의 접종 후 기간경과에 따른 밀도변화

길항미생물 *Bacillus* sp. BIG21003 균에 대한 상추와 양파 뿌리표면에서의 생존력을 미생물 pelleting과 biopriming+미생물 pelleting 두가지 처리방법으로 조

사하였다.

미생물 펠렛 상추 육묘 20일 후의 밀도변화를 보면 단순 종자 pelleting 보다는 pelleting 처리 전 미생물 배양액에 1시간 정도 침지 시켜 biopriming 처리 하였을 경우 생존력이 우수한 것으로 나타났다. 한편 접종 40일 후에는 20일 후의 밀도에 비해 밀도가 떨어졌으나 큰 감소는 나타나지 않았다.

양파에 접종 30일 후의 밀도변화를 보면 미생물 pelleting처리가 biopriming후 미생물 pelleting한 처리보다 균 밀도가 떨어졌으며, 60일 후에는 biopriming+pelleting 처리에서 $\times 10^2$ c.f.u/g seed 더 높았다. 이는 단순 pelleting 처리를 통해 종자 피복물질 내에 많은 세균을 부착시키더라도 미생물 배양액에 종자를 biopriming처리 후 제제화된 미생물을 pelleting 처리하는 것이 근 정착밀도를 높이는 데 효과적이기 때문이라고 생각된다.

Table 7-2. Density of antagonist on roots by seed treatments

Crop	days after seedling	Density of antagonist (c.f.u/g root)	
		biopriming + microbial pelleting	microbial pelleting
Lettuce	20	7.3×10^8	7.1×10^7
	40	6.8×10^8	6.4×10^7
Onion	30	6.9×10^6	2.3×10^6
	60	3.2×10^9	2.6×10^7







2) 근권 정착능력







일반적으로 근권 정착 능력이 우수한 토양미생물은 식물체의 지체부와 뿌리의 근단 부위에서 균의 밀도가 높고 중간 부위에는 밀도가 낮은 경향이 있는데 본 실험에서 BIG21003 균의 밀도가 뿌리 지체부와 근단에서 높아지는 경향을 보이므로 근권 정착능력이 우수한 것으로 판단할 수 있다. 한편, 토양관주처리시 BIG21003 길항균의 c.f.u/root(g)는 지체부에서 7.3×10^7 으로 펠렛종자 처리구 1.5×10^7 와 비슷하였다.

그리고 K95009의 c.f.u/root(g)는 토양관주시는 부위별 근권정착능력이 BIG21003과 유사하였으나, 종자 pelleting 처리에서는 밀도가 급격히 감소하였을 뿐만 아니라 근권 정착능력 또한 낮았다. 이는 K95009균이 endospore를 형성하지 못하는 *Pseudomonas* sp.로 건조 혹은 기타 불량환경 조건에서 사멸 혹은 생존력 감소로 근권정착능력이 감소한 것으로 생각되며, 토양관주 형태로 처리할 경우 *Bacillus* sp. BIG21003과 비슷한 생존력을 나타내 K95009를 이용한 미생물

pelleting 종자의 균 활력을 유지 할 수 있을 것으로 생각된다. 상기 실험에서 선 발과정에서 K95009균은 siderophore를 생성하여 작물생장촉진 및 주요 토양병에 길항력을 나타냈는데 이는 균이 생성하는 siderophore의 생성량에 따라 그 길항 정도가 강함을 나타내 본 연구 2절에서 새로이 확립한 대량 배양공정 배지 조건을 이용하여 siderophore량을 최대한 많이 생성시켜 이를 종자 pelleting에 적용한다면 균의 사멸에 따른 근권정착능력이 감소되더라도 siderophore에 의한 유묘 초기의 토양병방제 및 작물생장촉진 효과는 가능하리라 생각된다.

Table 7-3. Colonization and proliferation of microbial pelleting seed to the root

Root area	soil drenching		seed pelleting	
	c.f.u/ root	Root fresh weight(mg)	c.f.u/g root	Root fresh weight(mg)
1 	7.3×10^7	1.40	1.5×10^7	1.44
2 	5.9×10^6	1.31	1.6×10^7	1.38
3 	5.2×10^5	1.23	6.5×10^5	1.20
4 	4.7×10^5	1.20	8.3×10^5	1.23
5 	2.8×10^6	1.25	2.8×10^5	1.30
6 	6.4×10^6	1.26	2.3×10^6	1.27

Root area	soil drenching		seed pelleting	
	c.f.u/g root	Root fresh weight(mg)	c.f.u/g root	Root fresh weight(mg)
1 	3.4×10^6	0.40	4.7×10^4	2.90
2 	9.1×10^5	0.30	2.6×10^3	1.69
3 	6.2×10^4	0.23	5.9×10^3	1.31
4 	2.8×10^5	0.20	1.5×10^4	1.09
5 	2.9×10^6	0.19	4.7×10^3	1.00
6 	7.3×10^5	0.14	3.6×10^5	0.40

up: *Bacillus* sp. BIG21003 down: *Pseudomonas fluorescens* K95009

3) 미생물 pelleting 종자의 병억제 효과

분리된 유용미생물 BIG21003과 K95009를 각각 NB 배지와 King's B 배지에서 액체 배양하여 배양액에 양파 종자를 1시간 침종 후 pelleting 하여 CSM첨가 및

SD 처리시 *R.solani*에 의한 모잘록병 발병 억제 효과는 Table 7-4와 같다. 실험 결과 BIG21003의 길항력이 우수하였으며 미생물 펠렛종자 처리시 K95009이 길항력은 나타나지 않았다. 이는 상기 실험에서 K95009균이 *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*에 in vitro 실험에서는 길항 효과가 있었던 결과와 상이하였다. 미생물을 이용한 펠렛종자의 모잘록병 발병억제 실험에서 BMPB+ CSM+ SD처리가 평균 11.7%의 발병율을 나타내 가장 효과적이었다. 미생물 pelleting 종자의 경우 BIG21003이 K95009에 비해 모잘록병 발병을 억제하였으며 일반적으로 사용되는 무기염류를 이용한 PMPB처리가 priming처리를 통한 발아세 단축으로 MPB처리에 비해 약간의 발병율이 낮게 나타났다.

Table 7-4. Efficiency of the microbial product treatment in controlling damping-off(*Rhizoctonia solani*) of onion seedlings in nursery bed soils

Treatment	Disease severity (%)		
	I	II	average
PMPB [†]	19.1	18.3	18.7
PMPK	53.9	56.8	55.4
MPB	22.6	24.3	23.5
MPK	55.6	60.8	58.2
BMPB	15.2	16.0	15.6
BMPB+CSM+SD	11.2	12.1	11.7
control	56.3	62.5	59.4

[†] PMPB : priming+microbial pelleting with BIG21003

PMPK : priming+microbial pelleting with K95009

MPB : microbial pelleting with BIG21003

MPK : microbial pelleting with K95009

BMPB : biopriming+microbial pelleting with BIG21003

CSM : Covering soil mixture with BIG21003

SD : Soil drenching with K95009

Control : Made by only basic powder and slurry without microbes

한편 BMPB처리와 MPB처리를 비교해 볼때 평균 발병율이 각각 15.6%, 23.5%로 K95009 배양액에 biopriming 처리 과정을 거치게 될 경우 약 10% 이상의 발병 억제 효과가 있었다. 이는 상기 실험에서 K95009균이 첨가된 미생물 pelleting 종자 파종시 균의 사멸에 따른 근권정착력이 감소하더라도 포함되어 있는 siderophore와 biopriming을 통한 초기 발아를 촉진하여 유근 및 유아의 토양병원균에 대한 감수성을 감소시킬 수 있으며, *Bacillus* sp. BIG21003를 종자

pelleting에 혼합 pelleting 하여 근권정착력을 향상 시킬수 있음을 보여주는 것으로 반복 실험을 통해 농가에서 실용적으로 활용할 수 있는 기술로 개발하였다.

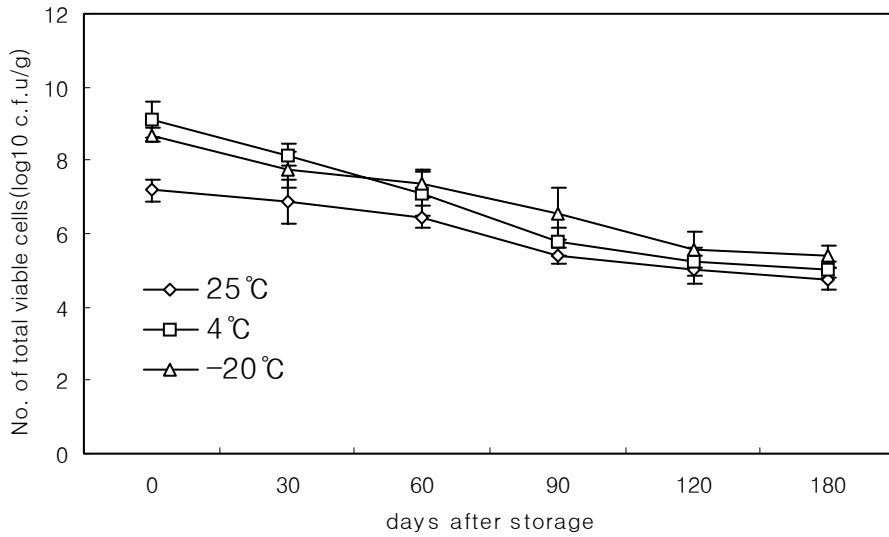


Fig. 7-5. Survivability of BIG21003 for storage period on lettuce pelleting seed.

8절 농가 실증 포장실험

1. 작물 성장 촉진 효과

가. 서언

원예분야에서 식물성장촉진 근권 미생물(Plant growth promoting rhizobacteria : PGPR)의 이용성을 보면 첫째, 역병, 모잘록병 및 위조병 등의 뿌리전염성 병해에 대하여 항진균작용을 갖는 길항성 미생물 둘째, 광합성 세균 등과 같이 식물의 양수분 이용성을 높이거나 유용물질을 생산하여 식물에게 공급하므로 식물생장을 촉진하는 미생물 셋째, 미숙퇴비와 농업부산물 등의 발효성을 높여주는 발효 촉진 미생물등이 주로 이용되고 있다. 그러나 농가에서는 이와 같은 미생물제제의 종류에 따른 사용이 차별화 되지 않아 미생물제제의 이용에 따른 효과를 최대화하지 못하는 경우가 많다. 또한, 균주의 종류별 유용작용과 활성유지가 부족하므로 이에 대한 많은 연구가 필요한 실정이다.

따라서 본연구에서는 *in vitro*, *in vivo* 실험 결과 생육촉진효과가 있었던 *Pseudomonas fluorescens* K95009를 자연계에서 분리 및 동정하였으며, K95009 균주 배양액을 상추와 양파 육묘 중 관주처리 및 제제화된 powder 형태로 종자 pelleting에 적용하여 field 에서의 작물 성장촉진 효과를 구명하고자 실험하였다.

나. 재료 및 방법

1) 공시재료

작물성장촉진 미생물 pelleting 종자의 육묘 출현과 초기 생육을 공시 작물 더덕, 상추, 당근, 양파, 담배 등을 대상으로 조사하였다. 미생물 pelleting종자는 미생물 생존율이 안정적으로 유지되면서 발아를 억제하지 않은 적정 pelleting 물질을 이용하여 pelleting 종자를 제조하였다.

한편 field 실험을 위해 pelleting을 하기 직전에 미생물 배양액에 1시간 동안 양파와 상추 종자를 biopriming 처리 하였으며 pelleting된 각각의 종자를 각 작물의 적정 트레이에 1립씩 과중하여 실험을 수행하였다.

Table 8-1. seed pelleting recipes

구분	pellet 성형 물질
Powder	Pyrophyllite, Illite, Diatomite
Sticker	AG(arabic gum), PVA(polyvinyl alcohol)
Bacterial isolates	<i>Pseudomonas fluorescens</i> K95009

육묘용 트레이는 (주)범농 200홀, 406홀을 사용하였고, 바이오상토(흥농)를 트레이에 충전하여 미생물 pelleting 종자를 파종하였다. 작물의 포장에서의 생육정도를 조사하기 위하여 육묘가 필요한 상추, 양파, 담배는 각각 20일, 40일, 60일 육묘하여 이용하였다. 육묘 기간동안 3회에 걸쳐 균배양액 50ml을 파종후 3회/week 육묘 상토에 토양 관주하였다.

발아율 조사는 ISTA규정에 따라 유근이 1mm이상 돌출 된것을 발아로 간주하였으며, 기타 생육조사는 농촌진흥청 생육조사특성요령에 준하여 실시하였다.

초기 발아율 및 생육촉진 실험은 더덕, 상추, 당근, 양파, 담배등 5개 공시작물에 대하여 온실하우스 실험을 수행하였으며, 포장 실험은 상추, 양파를 공시작물로 하여 실험을 진행하였다.

3) 포장 선정 및 정리

미생물 pellet 종자를 이용한 농가실증실험은 Green house와 field실험으로 진행하였는데 2004년, 2005년 각각 3월부터 9월까지 경기도 양평 지제면, 경북 김천시 남면, 경기도 용인시 백암면, 전북 정읍시 산외면, 경남 함양군 함양읍 포장을 이용하였다. 포장 면적은 각 150평이었고, N-P-K(4.2-6.0-6.0)와 석회 100kg, 퇴비 200kg을 작물 이식 30일전 혼화 처리하고 경운 후 멀칭하여 포장으로 사용하였다

Pelleting 종자 파종 과정	
	파종용 트레이 준비
	트레이에 상토 충전
	간이 파종기를 이용한 파종
	트레이 1 cell당 1립씩 정밀 파종
	균일하고 건전한 육묘

Fig. 8-1. Processing of pelleting seed sowing into tray cell.

다. 결과 및 고찰

1) 초기 발아율 비교

작물생육촉진에 효과가 있는 *Pseudomonas fluorescens* K95009균을 종자 pelleting에 적용하여 작물생육초기의 생육촉진여부를 조사하기 위해 온실 트레이에서의 발아율을 확인한 결과는 Table 8-2와 같다.

미생물 pelleting 종자와 나종자를 온실에서의 발아율을 조사한 결과 더덕은 나종자 파종에 비해 발아율이 낮았다. 그러나 관행재배에서 파종시 더덕 나종자의 경우 1립 파종이 어려우며, 실제 파종시 조파, 혹은 산파를 하기 때문에 종자파종량이 과다 소요되기 때문에 1립씩 파종하였을 경우의 상대적 비교는 큰 의미가 없는 것으로 생각된다. 당근과 담배의 발아율은 나종자처리와 유사하였으며, 상추, 양파는 높게 나타났다.

Table 8-2. Comparison of early germination by seed pelleting

seed treatment	Codonopsis	Lettuce	Carrot	Onion	Tabacco
MPS [‡]	80%	96%	81.6%	96.5%	87%
RS	81%	94%	81.3%	95.3%	89%

[‡] MPS: Microbial pelleting seed

RS: Raw seed

2) 온실 생육 비교

초장생육은 더덕, 상추, 양파에서 뚜렷하게 높았으며, 담배와 당근은 유사하였다. 생체중은 상추, 양파, 담배에서 control에 비해 상대적으로 높았다.

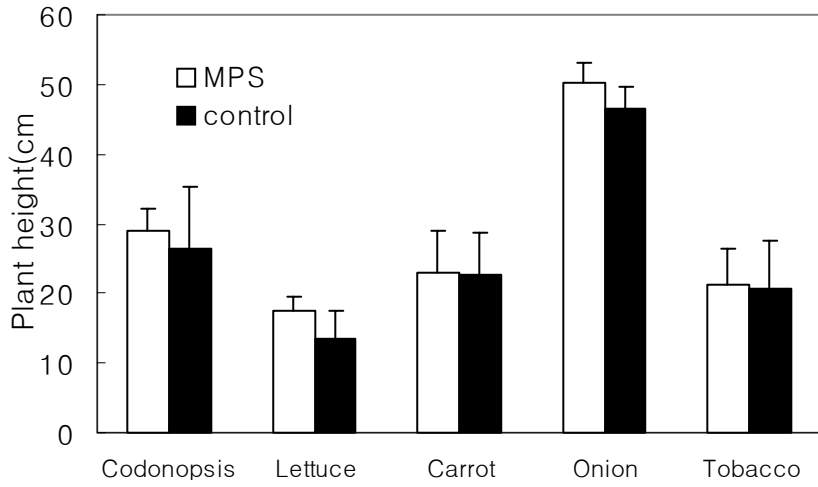


Fig. 8-2. Comparison of plant height between microbial pelleting seed and raw seed.

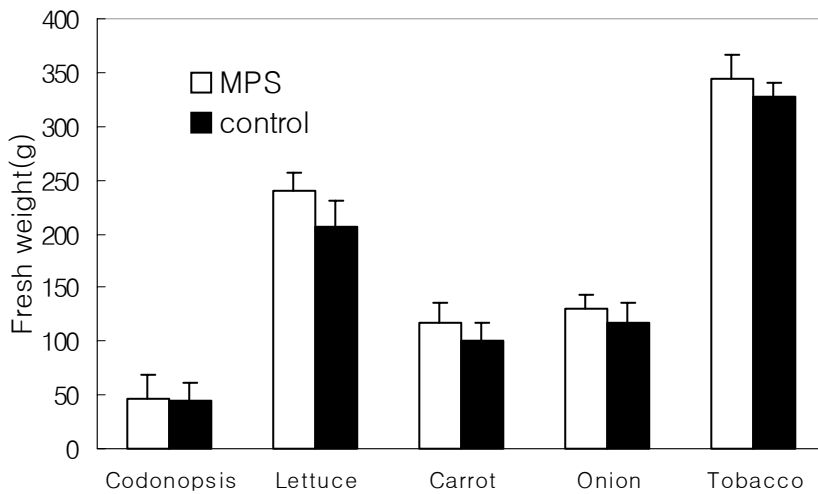


Fig. 8-3. Comparison of fresh weight between microbial pelleting seed and raw seed.



Fig. 8-4. Effect of lettuce growth promoting by microbial pelleting seed.

3) 지역별 농가 실증 시험

가) 실험포장의 물리·화학적 성질

시험포장 토양의 화학적 성질은 Table 8-3과 같다. 토양의 pH는 5개 포장 평균 6.5였으며 유기물 함량은 남면 포장에서 3.52%로 가장 높았으며, 전질소 함량도 높은 경향을 보였다.

Table 8-3. Chemical property of soil

Field	pH (1:5H ₂ O)	EC (dS/m)	organic matter(%)	total nitrogen(%)	cmol+/kg				P (ppm)	Fe (mg/kg)
					K	Ca	Mg	Na		
Backam -myun	6.2	0.43	3.11	0.20	0.26	5.09	1.59	0.04	451	2.2
Hamyang -eup	6.7	0.58	3.08	0.18	0.42	6.83	2.34	0.05	528	1.6
Jije -myun	6.2	0.41	3.05	0.15	0.37	6.02	1.78	0.04	466	1.6
Nam -myun	6.5	0.52	3.52	0.31	0.34	6.21	2.05	0.06	425	1.8
Sano -myun	6.8	0.46	3.25	0.21	0.39	7.77	1.80	0.09	675	1.5

P; available phosphate

나) 포장 실험 기간 기온 변화

2004년 3월 16일부터 6월 16일 까지 1차 실험 기간 동안 월 평균기온은 25℃를 넘지 않아 비교적 상추 생육에 적당한 기후 였다. 그러나 2005년 2차 실험에서는 김천 남면의 경우 6월 평균기온이 27℃로 고사 상추가 발생하기도 하였다. 양파와 상추 모두 육묘를 통해 본포장에 이식하여 초기 입모을 확보는 어렵지 않았으나 2005년 잦은 비로 일부 습해 경기도 용인 포장의 경우 과습 피해가 발생하기도 했다.

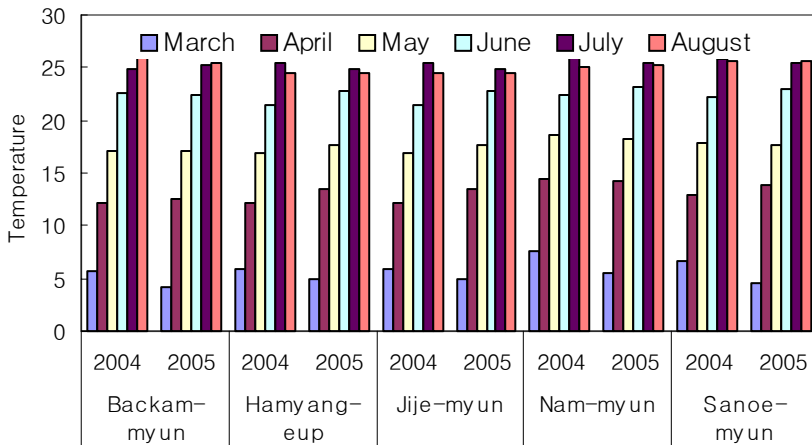


Fig. 8-5. Meteorological data about mean temperature(°C) on 5 different areas during crop cultivation.

Table 8-4. Meteorological data about rain falling(mm) on different areas during crop cultivation.

Field	Year	March	April	May	Jun	July	August	October
Backam-myun	2004	14.4	63.8	125.2	135.7	382.0	157.4	183.4
	2005	25.6	85.6	89.6	160.8	251.7	357.5	315.2
Hamyang-eup	2004	22.0	89.0	89.0	260.5	260.0	493.5	207.5
	2005	72.3	66.0	75.0	157.0	478.5	248.5	62.0
Jije-myun	2004	16.2	60.5	131.0	140.2	360.7	162.5	178.2
	2005	24.0	87.0	90.4	171.5	368.0	360.0	179.5
Nam-myun	2004	12.3	85.0	58.5	244.0	236.5	408.5	162.5
	2005	61.5	38.5	52.5	103.0	229.5	380.5	90.0
Sanoe-myun	2004	24.5	48.5	76.0	247.5	195.5	334.5	171.0
	2005	54.0	44.0	43.5	156.5	350.5	468.0	231.5

다) 상추 지역별 field 생육촉진 효과 검증

① Plant height

2004년 : 청상추 경우 P 처리구는 지역별 평균 17.2cm으로 김천 남면, 함양 함양읍 포장에서 약간 높았으며 control 처리구와 비슷하였다. 그러나 MPS와 SD+MPS 처리는 23.1, 23.7cm으로 control 대비 5cm정도의 초장이 높았으며, 지역별로는 김천 남면 포장의 생육이 가장 좋았다.

적상추는 SD+MPS > MPS > P > control 순으로 높았으며, control에 비해 SD+MPS처리에서 129%의 성장촉진 효과가 나타났다. 상추 품종별로는 청상추의 생육촉진 정도가 적상추에 비해 높았으며, 처리별로는 SD+MPS처리가 가장 좋게 나타났는데 MPS처리와 차이는 크지 않았다.

2005년 : 청상추 경우 P처리가 지역별 평균 7.5cm으로 가장 낮았으며, 김천 남면과 함양 함양읍 포장에서 이보다 약간 높았다. 처리별 초장 생육촉진은 SD+MPS > MPS > control > P 순으로 높았다. 단순히 pelleting만 하여 파종할 경우 무처리와 유사한 생육을 나타냈는데 MPS 처리의 경우 초장 생육이 높게 나타나 K95009에 의한 생육촉진효과로 생각된다.

초장의 경우 2004년과 2005년 실험 결과 SD+MPS, MPS처리가 control처리에 비해 높았으며, P처리와 control의 초장생육은 비슷하였다.

② Leaf area

2004 : 청상추의 경우 SD+MPS처리가 지역별 평균 299.8 cm²로 무처리 269.5cm²보다 111% 높았으며, 처리별로는 SD+MPS > MPS > control > P 처리 순으로 높게 나타났다. 적상추도 처리별 엽면적 성장촉진은 청상추와 유사하게 나타났다. 한편 적상추의 경우 청상추보다 엽면적이 전체적으로 높았는데 이는 품종의 고유특성에 기인한 것으로 생각된다.

2005 : 2005년 엽면적이 2004보다 낮았던 이유는 2005년 잦은 강우로 인한 결과로 추정되며, SD+MPS, MPS처리가 control에 비해 높은 성장촉진결과는 2004년과 일치하였으나 P처리는 상이하게 나타나 control 처리와 P처리의 엽면적 성장 차이는 나타나지 않는 것으로 생각된다.

Table 8-5. Enhancement of plant height(cm) growth for lettuce by seed treatment with *Pseudomonas fluorescens* K95009 in different field

Treat.		Nam-myun		Backam -myun		Sanoe -myun		Hamyang -eup		Average	
		A ^b	B	A	B	A	B	A	B	A	B
		2004	P ^{□□}	17.5	15.9	16.5	15.6	18.3	15.8	16.3	14.5
MPS	22.7		19.2	24.5	19.7	23.2	18.5	21.8	18.7	23.1	19.0
SD+MPS	23.0		19.5	25.4	19.6	23.6	19.1	22.6	19.2	23.7	19.4
control	17.3		16.8	16.8	13.4	18.1	16.2	16.9	13.6	17.3	15
2005	P	18.9	16	16.5	15.0	16.9	16.2	17.8	16.3	17.5	15.9
	MPS	20.3	18.5	22.9	18.9	21.3	18.1	21.8	17.7	21.2	18.3
	SD+MPS	22.2	19.8	23.6	20.8	22.8	19.4	21.9	18.8	22.6	19.7
	control	18.6	15.7	17.3	15.3	17.7	15.0	17.2	15.8	17.7	15.5

MPS = Microbial pelleting seed

SD = Soil drenching

control : by raw seed

♪ A: lettuce of var. cheong-chi-ma(green color)

B: lettuce of var. Seonpoong(red color)

Table 8-6. Enhancement of leaf area(cm²) growth for lettuce by seed treatment with *Pseudomonas fluorescens* K95009 in different field

Treat.		Nam-myun		Backam -myun		Sanoe -myun		Hamyang -eup		Average	
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
		2004	P ^{□□}	265.7	372.4	256.8	343.3	266.8	300.8	278.9	377.5
MPS	296.8		399.5	292.5	377.4	290.5	356.2	291.3	392.6	292.8	381.4
SD+MPS	300.1		407.3	308.2	413.4	295.4	392.6	295.6	395.4	299.8	402.2
control	276.2		376.5	242.2	352.5	271.4	312.7	288.2	372.5	269.5	353.6
2005	P	260.4	342.1	260.5	328.3	250.7	291.5	258.7	298.6	257.6	315.1
	MPS	268.5	375.2	270.0	346.3	273.4	352.0	270.9	357.6	270.7	357.8
	SD+MPS	298.6	400.5	286.5	389.5	295.4	338.4	295.6	377.8	294.0	376.6
	control	255.3	355.2	263.1	310.6	244.9	286.9	240.4	300.2	250.9	313.2

See the table 8-6.

③ Number of leaf

2004 : 청상추의 경우 SD+MPS처리가 29.9개로 가장 많았으며, MPS, P, control순으로 많았다. 적상추도 청상추와 비슷하였으나 P처리와 control 처리의 차이는 나타나지 않았다.

2005 : 청상추는 용인 백암면 SD+MPS처리에서 33.5개로 가장 많았으며 지역별 평균 31.4개에 비해 높게 나타났다. 처리별로는 SD+MPS > MPS > control > P 순으로 많았다. 적상추도 청상추와 유사한 결과 였으며 P처리와 control처리의 엽수 차이는 나타나지 않았다.

Table 8-7. Enhancement of numbers of leaf growth for lettuce by seed treatment with *Pseudomonas fluorescens* K95009 in different field

Treat.	Nam-myun		Backam -myun		Sanoe -myun		Hamyang -eup		Average		
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	
	2004	P	28.0	23.3	27.9	22.1	27.0	19.8	25.3	20.5	27.1
MPS		30	24.3	29.2	22.5	28.6	21.9	26.4	22.2	28.6	22.7
SD+MPS		30.5	24.9	31.0	23.7	29.4	22.8	28.8	23.4	29.9	23.7
control		28.4	23.8	28.3	20.7	26.1	20.6	25.0	20.4	27.0	21.4
2005	P	25.6	23.2	27.6	23.1	26.3	21.0	25.4	19.7	26.2	21.8
	MPS	28.2	23.5	29	24.6	27.2	23.2	27.8	21.8	28.1	23.3
	SD+MPS	31.5	26.2	33.5	27.1	29.6	25.9	30.8	25.4	31.4	26.2
	control	26.2	22.7	27.4	22.8	26.5	20.8	26.9	20.6	26.8	21.7

See the table 8-6.

④ Fresh weight

2004 : 청상추의 생체중은 SD+MPS 처리에서 지역별 평균 366.5g로 control처리 311.7g과 비교하여 약 54.8g 증가하였다. 한편 토양 관주를 하지 않은 MPS처리도 control에 비해 25.9g이 증가하였다. 처리별로는 SD+MPS > MPS > P > control 순으로 높았다. 적상추는 청상추와 처리별 증가경향이 유사하였다.

2005 : 청상추의 경우 지역별 평균 SD+MPS처리가 가장 높았으며 control 처리에 비해 65.2g의 생체중 차이가 나타났다. 적상추도 SD+MPS 처리가 가장 높았으며 control에 비해 46.4g의 차이를 나타냈다. 처리별로는 청상추 적상추 모두 SD+MPS > MPS > control > P으로 높아 2004년 조사 결과와 비교해 보면 P 처리와 control 처리간에는 일관된 결과를 얻을 수 없었다.

Table 8-8. Enhancement of fresh weight(g) growth for lettuce by seed treatment with *Pseudomonas fluorescens* K95009 in different field

Treat.		Nam-myun		Backam -myun		Sanoë -myun		Hamyang -eup		Average	
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
		2004	P	300.6	315.7	320.5	333.4	322.5	307.8	306.7	322.1
MPS	324.6		350.1	354.6	353.0	346.7	349.5	324.3	344.8	337.6	349.4
SD+MPS	344.5		349.8	392.0	377.9	395.6	355.2	333.7	349.6	366.5	358.1
control	302.5		313.4	315.8	326.1	323.2	310.8	305.2	311.7	311.7	315.5
2005	P	279.8	304.4	308.6	323.8	303.0	309.7	300.7	305.8	298.1	311.0
	MPS	308.9	344.3	361.8	336.5	322.8	324.6	333.9	329.7	331.9	333.8
	SD+MPS	334.2	362.8	388.4	369.5	375.8	355.2	362.7	346.8	365.2	358.6
	control	286.5	300.5	312.4	325.6	303.5	312.8	297.6	309.8	300.0	312.2

See the table 8-6.

⑤ T/R

2004 : 청상추는 SD+MPS 처리가 7.5로 가장 높아 다른 처리에 비해 지상부의 생육이 지하부의 생육에 비해 높았음을 알 수 있었다. MPS 처리에서 7.2로 가장 낮아 지하부의 생육이 가장 좋게 나타났다. 처리별 T/R율은 MPS > SD+MPS > P, control 순으로 낮았다.

적상추의 처리별 T/R율은 MPS > P > SD+MPS, control 순으로 낮았으며 이는 청상추와 상이한 결과였다.

한편, 적상추의 T/R율은 10.6-10.9 정도 였는데 이는 청상추에 비해 지상부가 번무함을 나타내며 품종 특성에 기인하는 것으로 생각된다.

2005 : 청상추는 MPS=control > P > SD+MPS 순으로 낮았으며, 적상추는 MPS > P > control > SD+MPS 순으로 낮게 나타났다.

미생물 pellet 종자 처리를 통해 생육초기 성장촉진 실험을 진행한 결과 초장, 엽수, 엽면적, 생체중은 SD+MPS와 MPS 처리가 control 처리에 비해 모두 증가하였으며 증가 폭은 조사항목에 따라 차이가 있었다. 뿌리의 건전성은 MPS 처리가 가장 낮아 뿌리의 발달에 가장 효과적인 것으로 생각된다. 2004년과 2005년 실험을 통해 미생물 pelleting 종자의 농가실용 가능성을 제시하였으며 MPS 처리에 따른 성장촉진을 SD+MPS 처리로 보완할 경우 보다 효율적인 미생물 pelleting 종자 활용이 가능할 것으로 생각된다.

Table 8-9. Enhancement of T/R(%) growth for lettuce by seed treatment with *Pseudomonas fluorescens* K95009 in different field

Treat.		Nam-myun		Backam -myun		Sano -myun		Hamyang -eup		Average	
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
		2004	P	7.7	10.1	7.5	11.6	6.9	10.5	7.5	10.4
	MPS	7.6	10.2	7.3	11.5	6.6	10.1	7.4	10.5	7.2	10.6
	SD+MPS	7.6	10.5	7.5	11.8	7.4	10.6	7.4	10.8	7.5	10.9
	control	7.6	10.3	7.4	11.8	6.9	10.7	7.6	10.8	7.4	10.9
2005	P	6.9	9.3	7.5	10.9	7.5	10.9	7.3	10.5	7.3	10.4
	MPS	6.8	9.7	7.2	10.3	7.5	10.7	7.2	9.9	7.2	10.2
	SD+MPS	7.2	10.2	7.4	10.9	7.8	11.0	7.3	10.3	7.4	10.6
	control	7.3	10.6	7.4	10.5	7.3	10.8	7.2	10	7.3	10.5

See the table 8-6.

라) 양파 지역별 field 성장촉진 효과 검증

① Plant height

2004년 실험 결과 초장의 경우 SD+MPS처리가 64.3cm으로 control에 48.7cm에 비해 약 132% 높았으며, 처리별 지역 평균 SD+MPS > MPS > P > control 순으로 초장 생장이 높았다. 용인 백암면 포장에서 초장의 생육이 다른 지역에 비해 낮았던 것은 물빠짐 불량하여 초기 뿌리 활착이 늦었습에 기인한 것으로 생각된다.

2005년 실험 결과 처리별 초장은 SD+MPS > MPS > control > P 순으로 높았으며, 이는 2004년 결과와 일치하는 경향이였다.

Table 8-10. Enhancement of plant height growth by onion seed pelleting with *Pseudomonas fluorescens* K95009 in different field

	Treat.	Nam-myun	Backam	Sanoe-my	Hamyang	Average
			-myun	un	-eup	
2004	P	52.6	46.5	52.8	56.3	52.1
	MPS	59.5	53.4	61.8	63.5	59.6
	SD+MPS	67	57.2	63.5	69.4	64.3
	control	49.1	43.2	49.8	52.5	48.7
2005	P	48.3	53.6	48.5	49.8	50.1
	MPS	53.8	55.8	52.8	59.3	55.4
	SD+MPS	62.5	60.8	59.2	63.5	61.5
	control	50.1	52.0	49.6	54.5	51.6

See the table 8-6.

② Diameter of bulb

2004년 실험 결과 구 직경은 SD+MPS > MPS > P, control 순으로 컸으며, 함양 SD+MPS 처리에서 8.2cm으로 지역 평균 7.6cm보다 0.6cm 더 컸다

2005년 실험 결과 SD+MPS > MPS > P > control 순으로 컸으며 2004년 결과 유사하였다.

Table 8-11. Enhancement of diameter of bulb growth by onion seed pelleting with *Pseudomonas fluorescens* K95009 in different field

	Treat.	Nam-myun	Backam	Sanoe	Hamyang	Average
			-myun	-myun	-eup	
2004	P	6.5	6.8	6.4	7.1	6.7
	MPS	7.1	7.0	7.0	7.3	7.1
	SD+MPS	7.5	7.3	7.5	8.2	7.6
	control	6.7	6.5	6.5	7.0	6.7
2005	P	6.0	6.0	6.0	6.2	6.1
	MPS	6.3	6.5	6.2	6.6	6.4
	SD+MPS	6.5	6.8	6.5	6.9	6.7
	control	5.9	6.1	5.9	6.2	6.0

See the table 8-6.

③ Fresh weight of bulb

2004년 포장 실험 결과 SD+MPS처리가 138.6g으로 가장 높았으며 control처리 123.3g보다 15.3g 증가하였다. 처리별로는 SD+MPS > MPS > P > control 순으로 컸으며, 지역별로는 함양 함양읍 포장에서 가장 구생체중의 생육이 좋았다. 2005년 포장 실험 결과도 2004년 결과와 유사하였다.

Table 8-12. Enhancement of fresh weight(g) of bulb growth by onion seed pelleting with *Pseudomonas fluorescens* K95009 in different field

	Treat.	Nam-myun	Backam	Sanoe-myu	Hamyang	Average
			-myun	n	-eup	
2004	P	120.9	125.8	120.4	128.5	124.0
	MPS	130.7	129.5	125.6	134.8	130.2
	SD+MPS	135.2	132.1	139.3	147.9	138.6
	control	122.5	123.2	120.7	126.7	123.3
2005	P	119.8	118.0	118.5	120.4	119.2
	MPS	122.6	119.8	123.0	125.6	122.8
	SD+MPS	135.0	130.3	131.3	138.1	133.7
	control	120.3	116.2	119.6	118.5	118.7

See the table 8-6.

지역별로 초장 생장축진이 높았던 곳은 경북 김천 남면으로 SD+MPS처리에서 136%의 생장축진 효과가 있었으며, 구 직경은 함양지역 SD+MPS처리에서 control 대비 117%로 가장 높은 생장축진효과가 나타났으며 MPS처리는 평균 105%의 구직경의 생장축진효과를 나타냈다.

구 생체중은 MPS처리에서 함양 함양읍>정읍시 산외면>용인 >김천시 남면 순으로 높았으며, SD+MPS처리에서는 함양 함양읍>정읍시 산외면>김천시 남면>용인시 순으로 높았다.

미생물 pelleting 종자를 이용한 생육축진 포장 시험 결과 SD+MPS 처리구에서 초장 구직경, 구중이 가장 높았으며, 지역별로는 초장의 경우 정읍, 구직경과 구중은 함양포장에서 가장 높았다.

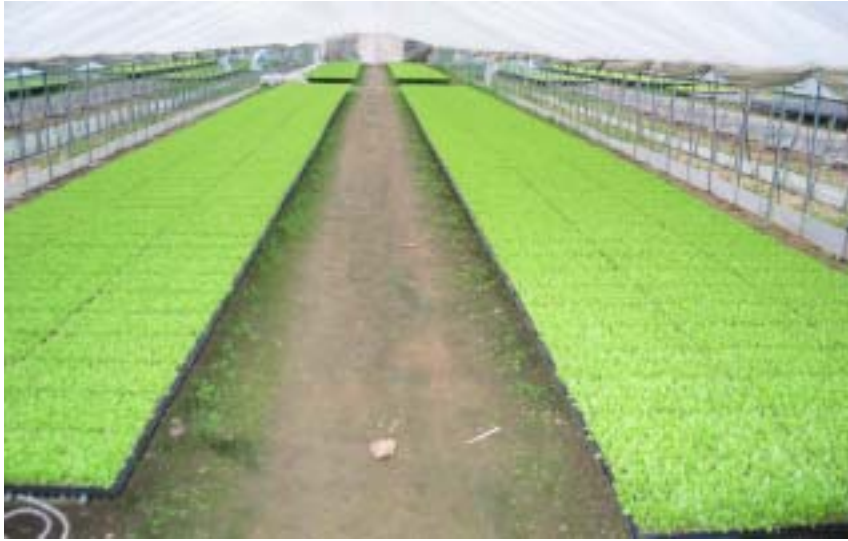


Fig. 8-6. Growth of lettuce seedling before trans planting at green house.



Fig. 8-7. Growth of onion as 40 days after trans planting at Hamyang field.



Fig. 8-8. Growth of lettuce as days after trans planting at green house.



Fig. 8-9. Growth of onion at 90 days after planting.

A: Control B: SD+MPS C: MPS

2. 토양병에 대한 억제 효과

가. 재료 및 방법

1) 길항미생물 펠렛종자의 경시적 활력 조사

상추와 양파 종자에 pelleting 처리한 길항미생물의 활력은 pelleting 처리한 상추와 양파 종자를 직접 5립씩 TSA에 접종 후 27°C 배양기에서 배양하여 48시간 후 길항미생물의 생장을 조사하였다.

2) 모잘록병 억제 효과

길항균 BIG21003을 이용한 미생물 pelleting 종자의 모잘록병 억제효과를 조사하기 위하여 양파 육묘 트레이 406구 트레이에 흥농 바이오 상토를 채우고 실험에 사용하였다. 파종후 5일째 *Rhizoctonia solani* 접종액을 트레이 1ml/cell씩 접종하였으며 균접종 20일 후 발병율을 조사하였다. 병원균 접종후 각 지역 육묘비닐 하우스에서 관행 방법으로 육묘하였다. 실험 반복은 완전임의 4반복으로 접종 후 7일째(본엽 1매 전개시점) 모잘록병 이병 식물체를 조사하였으며, 건전식물체 대비 이병율을 조사하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 길항미생물 pelleting 종자의 경시적 활력 변화

길항미생물 *Bacillus* sp. BIG21003을 종자에 pelleting 처리한 후 pelleting 물질 내 길항미생물의 경시적 활력을 조사한 결과 Table 8-13과 같다.

상추와 양파 미생물 펠렛종자의 경우 조사 120일 까지 길항미생물의 활력이 그대로 유지되고 있었다.

Table 8-13. Viability of seed pelleting antagonistic microorganisms

Antagonistic microorganisms	Colony formation				
	15*	30	60	120	240
Lettuce	+++	+++	+++	+++	++
Onion	+++	+++	+++	+++	+++

* Days after seed pelleting with antagonistic microorganisms.

2) 모잘록병 억제효과

① 경기도 용인

2004년 : 양파를 *Bacillus* sp. BIG21003 길항균을 양파 종자에 pelleting 하여, 토양관주 및 길항균이 첨가되지 않은 일반 pelleting 양파 종자와 병원균 접종시작물 생육기간에 따른 모잘록병 억제정도를 2004년과 2005년에 걸쳐 다양한 지역별 포장실험을 수행한 결과 경기도 용인 포장에서는 control 처리가 82.9%의 이병율을 나타냈으며, SD+MPS 처리구가 31.9%, MPS처리가 42.7%로 control에 비해 매우 효과적이었다. 2005년 실험에서는 P 처리가 control 처리보다 높은 이병율을 나타냈으며 이는 2004년 결과와 상이 하였다. SD+MPS처리는 2004년에 비해 이병율이 감소하였다.

Table 8-14. Suppressive effect of biocontrol treatment, *Bacillus* sp. BIG21003 on the damping-off of onion caused by *Rhizoctonia solani* at Yongin backam myun

	Treat.	No. of plant	No. of infected plant	Rate of Infected plant (%)
2004	P	386	308	79.7(96.1)
	MPS	384	164	42.7(51.5)
	SD+MPS	382	122	31.9(38.4)
	control	384	320	82.9(100)
2005	P	369	325	88.0(101.6)
	MPS	365	158	43.2(49.9)
	SD+MPS	365	82	22.5(26.0)
	control	367	319	86.6(100)

See the table 8-6.

② 경기도 양평

경기도 양평 지제면 포장에서 2004년도에는 control의 모잘록병 이병율은 89.8%로 P 처리구와 비슷하였다. MPS처리와 SD+MPS처리는 각각 26.4%, 20.3%로 control에 비해 낮은 이병율을 나타냈다.

2005년도 실험에서는 P처리구의 이병율이 control에 비해 높았으며, 다른 처리구는 2004년 결과와 유사한 경향이였다.

Table 8-15. Suppressive effect of biocontrol treatment, *Bacillus* sp. BIG21003 on the damping-off of onion caused by *Rhizoctonia solani* at Yangpyung jijemyun

	Treat.	No. of plant	No. of infected plant	Rate of Infected plant (%)
2004	P	372	328	88.2(98.2)
	MPS	378	100	26.4(29.4)
	SD+MPS	374	76	20.3(22.6)
	control	374	336	89.8(100)
2005	P	380	317	83.4(100.8)
	MPS	365	85	23.3(28.2)
	SD+MPS	369	63	17.1(20.7)
	control	370	306	82.7(100)

See the table 8-6.

Table 8-16. Suppressive effect of biocontrol treatment, *Bacillus* sp. BIG21003 on the damping-off of onion caused by *Rhizoctonia solani* at Jeongeup sanoemyun

	Treat.	No. of plant	No. of infected plant	Rate of Infected plant (%)
2004	P	380	320	84.2(101.8)
	MPS	386	154	39.9(48.2)
	SD+MPS	378	84	22.2(26.8)
	control	382	316	82.7(100)
2005	P	376	298	79.3(101.9)
	MPS	369	127	34.5(44.3)
	SD+MPS	368	57	15.5(19.9)
	control	370	316	77.8(100)

See the table 8-6.

③ 전북 정읍

2004년도 control의 이병율이 82.7%로 가장 낮았으며 SD+MPS처리와 지오판 처리간에 모잘록병 이병율은 약 20%로 비슷하였다. MPS처리는 39.9%로 비교적 효과적이었다.

2005년도 control의 이병율은 77.8%로 2004년에 비해 모잘록병 발병이 낮았으며, SD+MPS 처리구의 경우 15%로 매우 효과적이었다.

④ 경북 김천

2004년 경북 김천 남면 포장의 control의 이병율은 74.7%로 낮은 이병율을 나타냈으며, SD+MPS처리구의 이병율이 합성농약 지오판의 이병율보다 낮게 나타났다. 한편 P 처리구는 76.4%로 control에 비해 약간 높은 이병율을 나타냈다.

2005년도에는 control에서 90.4%로 높은 이병율을 나타내 2004년에 비해 상대적으로 모잘록병 발병이 심하였다. 처리별 이병율은 지오판 > SD+MPS > MPS > P > control 순으로 낮았다.

Table 8-17. Suppressive effect of biocontrol treatment, *Bacillus* sp. BIG21003 on the damping-off of onion caused by *Rhizoctonia solani* at Kimcheon nammyun

	Treat.	No. of plant	No. of infected plant	Rate of Infected plant (%)
2004	P	382	292	76.4(102.3)
	MPS	388	82	21.1(28.2)
	SD+MPS	380	50	13.2(17.7)
	control	372	278	74.7(100)
2005	P	373	300	80.5(89.0)
	MPS	366	172	46.9(51.9)
	SD+MPS	378	112	29.6(32.7)
	control	369	333	90.4(100)

See the table 8-6.

⑤ 경남 함양

2004년 control의 모잘록병 이병율은 77.2%였으며 P 처리구는 81.3%로 P처리가 높게 나타났다. 처리별 이병율은 지오판 > SD+MPS > MPS > control > P 순으로 낮았다.

2005년 control의 모잘록병 이병율은 85.8%로 2004년에 비해 높았으며, 처리별 이병율은 SD+MPS > MPS > P > control 순으로 낮았다.

Table 8-18. Suppressive effect of biocontrol treatment, *Bacillus* sp. BIG21003 on the damping-off of onion caused by *Rhizoctonia solani* at Hamyang hamyangeup

Treat.		No. of plant	No. of infected plant	Rate of Infected plant (%)
2004	P	380	309	81.3(105.3)
	MPS	382	138	36.1(46.8)
	SD+MPS	380	80	21.0(27.2)
	control	386	298	77.2(100)
2005	P	379	318	83.9(97.8)
	MPS	362	147	40.7(47.4)
	SD+MPS	365	82	22.6(26.3)
	control	368	298	85.8(100)

See the table 8-6.

지역별 평균 모잘록병 이병율을 각 처리에 따라 비교해 본 결과 미생물 pelleting 종자처리의 경우 35.5%의 이병율을 나타냈으며, SD+MPS처리를 통하여 이병율을 21.6%로 낮출 수 있었으며 미생물 pelleting 종자의 보완 방법으로 토양관주를 병행 한다면 농가에서 보다 실용적으로 사용 할 수 있을 것으로 생각된다.

Table 8-19. Suppressive effect of biocontrol treatment, *Bacillus* sp. BIG21003 on the damping-off of onion caused by *Rhizoctonia solani* at total area

Treat.	Rate of Infected plant (%)
P	82.5(99.3)
MPS	35.5(42.7)
SD+MPS	21.6(25.9)
Jiopan	17.1(20.7)
control	83.1(100)

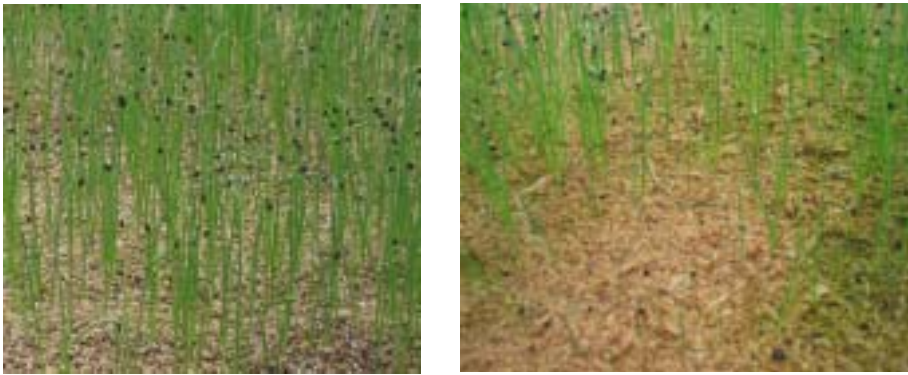


Fig. 8-10. Comparison of damping off on onion seedling

L : Healthy seedling R : Damping off

9절. 생장촉진 물질의 성분 분석 및 성분 구명

1. 생장촉진 물질의 성분분석 및 성분 구명

가. 재료 및 방법

1) 공시균주

본 연구에서 식물의 생장을 촉진하는 것으로 선발된 *Pseudomonas fluorescens* K95009는 King' B broth에서 shaking incubator를 이용하여, 72시간 동안, 30℃에서 160rpm의 속도로 배양하여, 3500rpm의 속도로 20분간 원심분리하여 상등액(1ℓ)과 pellet(10g)으로 구분하여 예비실험을 진행한 후 본 실험을 실시하였다.

2) 기기 및 시약

본 연구에서 물질분리 및 생리활성 측정에 사용한 rotary vacuum evaporator는 EYELA社의 N-N series를 사용하였다. Mass는 EI-mass로 Autospec. 365 series(Micromass, Euroscience, Manchester. U.K.)을 사용하여 negative mode로 측정하였고, GC-MS는 8000 top series(CE instrument, USA)를 사용하였으며, Column은 DB-5MS(30m× 0.32mm× 0.25μm)를 이용하였으며, column온도는 80℃에서 2min 유지시킨 후 15℃/min으로 승온하여 250℃에서 2min 조건으로 분석하였다. Injector 온도는 200℃였으며, Carrier gas는 He(1.5ml/min)을 사용하였다. 1H-NMR 및 13C-NMR spectra는 Varian Gemini 200 spectrometer를 사용하여 측정하였으며 chemical shift는 δ unit로 나타내었다

TLC 전개용매 및 기타 시약은 일급 및 특급을 사용하였고, TLC plate는 Merck社의 Precoated Kieselgel 60 FII254s(layer thickness 0.25mm, 20x20cm, Merck Art, 5715), RP-8 F254s를 사용하였으며, Column chromatography의 충전제는 Amberlite XAD-2 resin 및 silicagel 7734를 사용하여 분리하였으며, NMR 분석용 DMSO-d₆ (0.05% v/v TMS)는 Sigma社 제품을 구입하여 사용하였다.

3) 배지와 상등액 간의 HPLC 분석

control로 미생물을 배양하지 않은 K.B broth와 *Pseudomonas fluorescens* 배양액의 상등액을 성분을 비교하기 위하여 각각의 용출액을 rotary vacuum evaporator로 농축한 후 10,000ppm으로 조제한 후 ODS(3.9 300mm-Bondapack 18)column을 사용하여 MeOH 30%에서부터 90%가 되도록 그라데이션시켜 HPLC로 정량분석하였다. 유속은 0.8ml/min 였으며, UV 265nm에서 검출하였다. rotary vacuum evaporator는 EYELA사의 N-N series를 사용하였다(Table 2).

Table 9-1. HPLC analysis condition

Requester	Condition
Instrument	varian
wave	265nm
Column	ODS-18
Mobile phase	MeOH: H ₂ O=10: 9
Flow rate	0.8ml/min

4) 추출 및 분획

가) Pellet과 suspension의 추출

Pellet은 -178℃의 액체질소를 넣어 급속 동결시켜 약사발을 이용하여 잘게 마쇄한 후 MeOH을 Pellet의 두 배 정도를 첨가하여 추출하고, 상등액은 Ethyl acetate층, BuOH층, aqueous층으로 나누어 분획(Fraction)을 실시하고, 감압 농축하여 이용하였다.

나) 극성에 따른 순차적 용매 분석

Pseudomonas fluorescens k95009추출물의 용매 분획별로 생리활성을 측정하고자 Fig. 9-1와 같이 용매의 극성차이를 이용하여 여러 용매에서 분획물을 얻었다. K95009 배양액을 원심분리 한 상등액과 Ethyl acetate를 분획 깔때기에 넣은 후, 혼합하여 잘 흔들어 준 후 두 층이 완전히 분리되면 Ethyl acetate층을 얻었으며, 남은 aqueous layer에 Butanol 1/2을 넣고 잘 혼합한 후 진탕하여 정치하면 aqueous층과 BuOH층을 얻었다. 위 과정은 각각 3회 반복하였다.

다) 분획층별 발아율 검사

Pseudomonas fluorescens K95009 배양하여 원심분리후 상등액을 이용해 Ethyl acetate layer, BuOH layer, Aqueous layer으로 분획된 각각의 추출물을 dH₂O를 이용해 100, 500, 1,000, 10,000, 15,000, 20,000 ppm 농도로 조제액을 만들었다. 각 농도별 발아율을 알아보기위해 12 well plate 에 종자 10립씩 넣고, 조제액을 500μl을 넣고 발아율을 조사하였다. 원심분리후 Pellet은 MeOH을 넣어 추출한 후 농축한 것을 가지고 10,000ppm으로 조제하여 확인하였다. 발아율은 1 일 단위로 조사하였으며, 총 개수는 30개중 발아된 개수를 확인하였고, 신장한 유묘의 길이를 측정하였다.

라) Column chromatography에 의한 생리활성 물질 분리 및 정제

배지의 성분은 주로 다당체 화합물로 구성되어 있으므로 우선, 다당체 성분을 제거하기 위하여 용매로 분획을 실시한 후 첫 번째 단계로 Amberlite XAD-2 resin 400g을 충전한 뒤 이 충전된 glass open column은 MeOH로 활성화시킨 후 H₂O로 washing하여 준 다음 column의 상단부에 K95009의 상등액을 분획하여 농축한 aqueous layer 200ml을 넣은 후, 50% 증류수와 50% MeOH을 혼합하여 용출시킨 뒤, 용출물은 삼각 플라스크에 50ml씩 분리하여 받은 후, HPLC로 분석하였다. 분리한 각각의 용출물은 농축한 후 10,000ppm으로 조제하여 silicagel plate를 이용하여 BuOH : EtOH : H₂O=4:3:2의 용매 조건 하에서 TLC plate를 전개하고 TLC plate를 chamber로부터 꺼내 말린 후 UV lamp(파장 254nm, 360nm)를 조사하여 형광의 spot이 R_f value= 0.4~0.8 부근에서 존재하는지 확인하였다. 이와 같은 실험 과정은 Fig. 9-1에 도식화하였으며, 분리된 화합물은 1H-NMR, 13C-NMR, Mass 등의 기기분석을 통하여 그 구조를 밝혔다 (Markiewity et al, 1965; Du et al, 1984; Yamauchi et al, 1982; Elsohly et al, 1982).

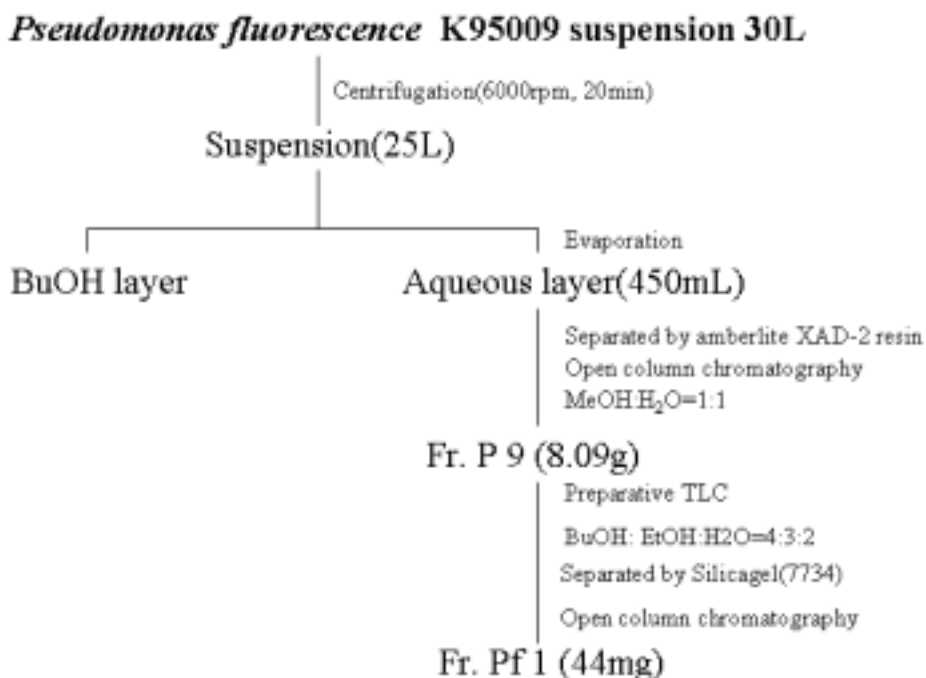


Fig. 9-1. Schematic isolation procedure of active compound from *Pseudomonas fluorescens* K95009.

5) Crystal 분석

가) Crystal을 이용한 종자의 발아율 조사

BuOH로 분획한 후 4℃ 냉장고에 저장했을때 생성된 crystal을 이용하여 종자 발아촉진효과가 있는지를 확인하기 위하여, crystal powder를 10,000ppm으로 조제한 후 물, 배지성분과 각각 비교하여 발아양상을 확인하였다. 종자발아에 사용한 종자는 상추(선풍), 양파(히구마) 두 품종이었다.

나) RI 분석

HCl에 용해시킨 crystal이 방사선에서 Detection 되는지 확인하기 위하여 RI분석을 수행하였다. RI의 용매조건은 water 100%, 유속은 2ml/min, column은 Jaigel-GS 310을 사용하였다.

다) 당 가수분해

Silicagel plate에서 crystal을 detection되는지 확인하기 위하여 대조구인 D-glucose를 증류수에 녹인 후 사용하였으며, HCl로 용해된 crystal을 spotting하여 CHCl₃: MeOH: H₂O = 1 : 1 : 0.2의 용매 조건으로 전개시킨 후 황산을 뿌리고 Heating하여 spot의 유무를 확인하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 분획층별 발아율 검사

1차로 *Pseudomonas fluorescens* K95009를 1ℓ의 K.B broth 내에서 72시간 동안 배양한 후 원심분리한 상등액은 Ethyl acetate, 수포화 BuOH로 순차적으로 분획하고, Pellet은 MeOH로 분획하여 rotary vacuum evaporator로 농축하여 얻은 수율은 상등액의 경우 EtOAc 층에서 약 0.36%로 0.1434g을 얻을 수 있었으며, 수포화 BuOH층에서는 1.0569g으로 약 2.71%의 수율을 얻을 수 있었다. 그 중 96.93%를 포함하는 aqueous 층에서 37.90g의 수율을 얻을 수 있었다.

이와 같은 방법으로 얻은 각 층의 조추출물을 가지고 100, 500, 1,000, 5,000, 10,000, 15,000, 20,000ppm의 농도로 증류수를 첨가하여 조제하고 상추, 양파 종자의 발아율을 조사하였다. 상추 종자는 12 well plate에 각각 10립씩 처리한 후 1일 간격으로 확인하였다. Ethyl acetate layer, 수포화 BuOH layer, aqueous layer을 가지고 여러 가지 농도에서 수행하였으나, 효과가 없었다. 그 중 가장 발아율이 좋았던 1,000, 15,000, 20,000ppm의 경우, 배양시작 후 약 36 h에서 발아하

기 시작하여 7일에 발아를 끝마쳤으며, Ethyl acetate 층으로 조제한 각각의 농도는 water를 처리한 경우보다 발아율이 저조한 것으로 나타났다. 그 중 조추출물의 농도가 증가할수록 발아한 종자의 개수는 적어지는 것을 알 수 있었다(Fig. 9-3).

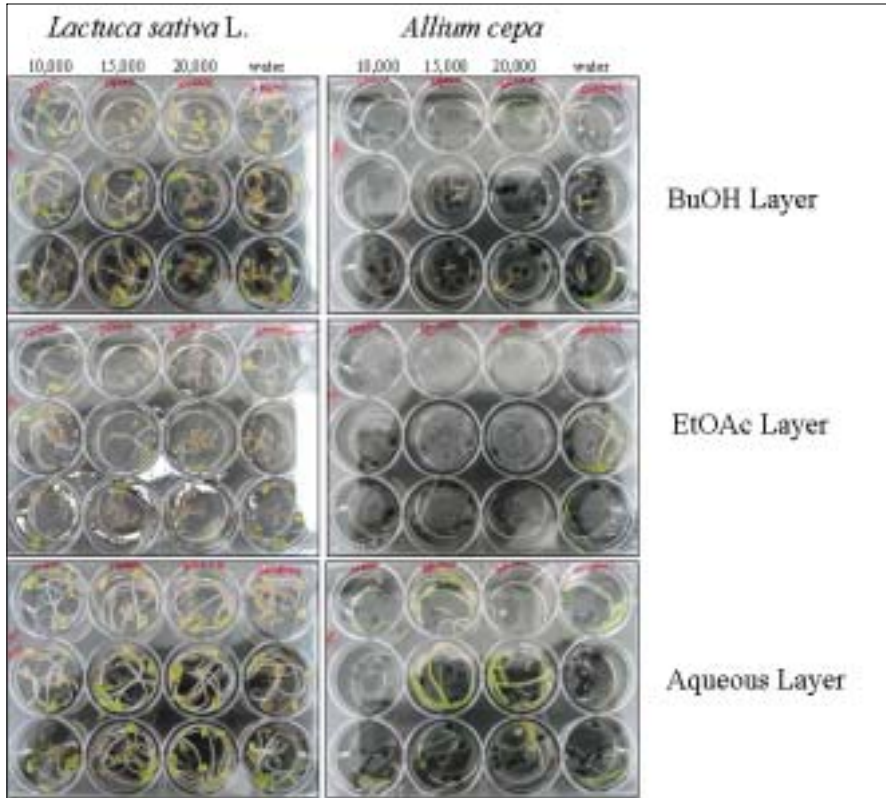


Fig. 9-2. Lettuce and onion treated with different fractions extracted from *Pseudomonas fluorescens* K95009 culture suspension.

BuOH layer에서도 물을 처리한 경우 발아율이 가장 좋았으며 10,000ppm의 농도로 처리하였을 경우가 15,000, 20,000ppm으로 처리한 경우보다 발아율이 24시간 까지는 좋았으나, 36시간부터 4일까지는 15,000ppm의 발아율이 더 좋은 것을 확인할 수 있었다. 다시 배양 5일째에는 15,000ppm보다 10,000ppm에서 종자의 발아율이 더 좋은 것을 확인할 수 있었다(Fig. 9-4).

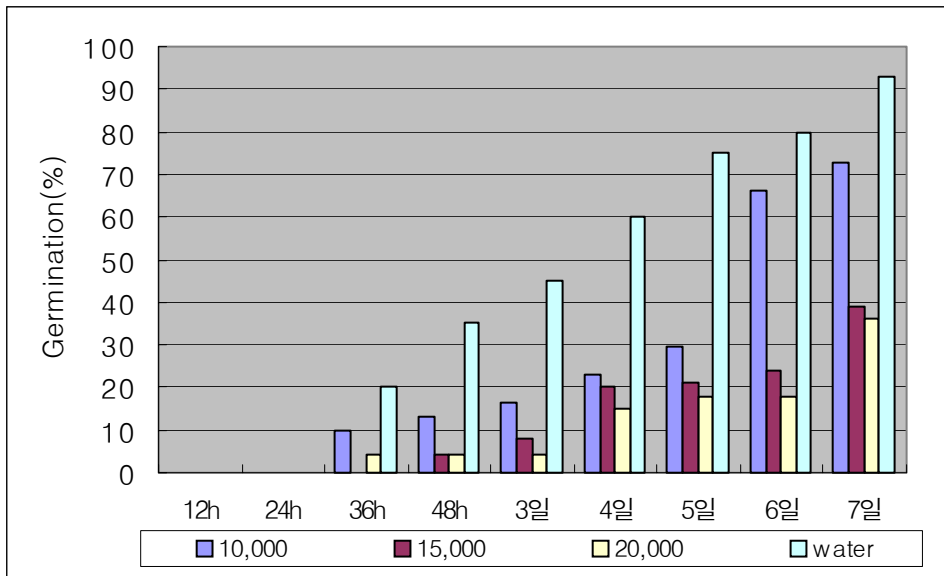


Fig. 9-3. Growth of lettuce treated with ethyl acetate layer of *Pseudomonas fluorescens* K95009 culture suspension.

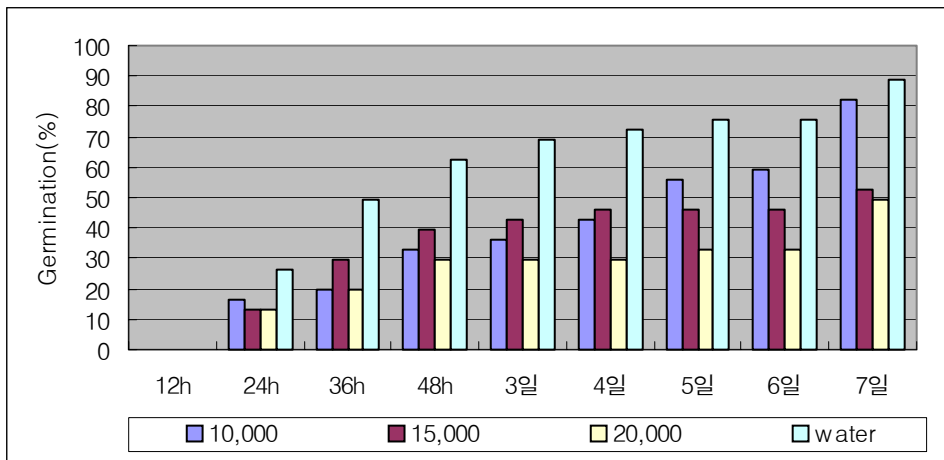


Fig. 9-4. Growth of lettuce treated with BuOH layer of *Pseudomonas fluorescens* K95009 culture suspension.

Aqueous layer에서는 대부분 발아율이 양호하게 확인되었는데, 추출물의 농도가 진해질수록 발아율이 좋게 나타났으며, 배양 4일 후에는 20,000ppm을 처리한

종자와 물을 처리한 경우 발아 종자의 개수가 동일하게 측정되었다. 그 이후 5일에서는 20,000ppm으로 처리한 경우 물을 처리한 경우보다 높게 나타났으나, 배양 7일 후에는 15,000ppm에서 종자의 발아율이 가장 좋게 나타났다. 배양 8일 이후로는 모든 처리구에서 모두 발아한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 9-5).

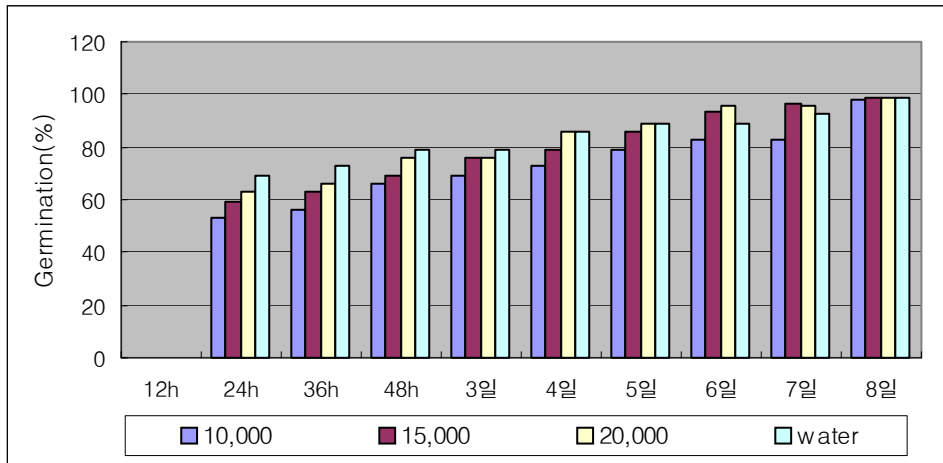


Fig. 9-5. Growth of lettuce treated with aqueous layer of *Pseudomonas fluorescens* K95009 culture suspension.

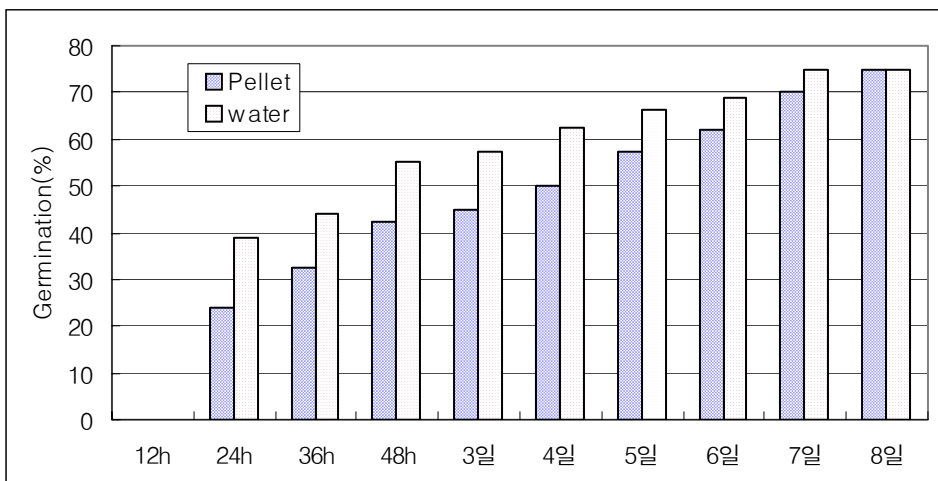


Fig. 9-6. Lettuce of lettuce treated with pellet extracts of *Pseudomonas fluorescens* K95009 culture suspension.

Pellet을 MeOH로 추출하여 얻은 추출물을 가지고 상추 종자에 발아율을 조사한 결과 물을 처리한 경우 Pellet 추출물을 처리한 경우보다 발아율이 현저히 차이가 나는 것을 확인할 수 있었다. 배양초기 단계인 24h에 발아개수에 의하여 Pellet을 처리한 경우 19개, 물을 처리한 경우는 31개로 약 40% 정도 발아율이 더 좋은 것으로 확인되었다(Fig. 9-6).

EtOAc 층에서 분리한 추출물을 가지고 양파 종자의 발아율을 조사한 결과, 초기 24시간에서는 물 보다 20,000ppm에서 유아의 출현속도가 빠르게 나타났으나 36h부터는 물을 처리한 종자의 발아속도가 증가하여 꾸준히 발아가 되는 것을 확인할 수 있었다. 시간이 지날수록 양파의 발아 개수도 증가하는 편이나 물에 비해 효율이 50% 정도에 지나지 않은 것으로 보인다. 최종 확인 시간인 배양 7일의 발아율을 볼 경우 추출물이 첨가된 종자보다 물을 처리한 경우 발아된 종자의 개수가 약 2배 정도 차이 나는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 9-7).

BuOH 층에서의 발아율은 배양 초기부터 계속적으로 물보다 저조한 발아 양상을 보인다. 특히 에틸아세테이트 층과 비교할 때 양파 종자의 발아율이 저조한 것으로 나타났다. 부탄올 층에서는 고농도의 20,000ppm으로 처리한 경우보다 10,000ppm으로 처리한 경우 발아율이 가장 양호한 것으로 나타났다(Fig. 9-8).

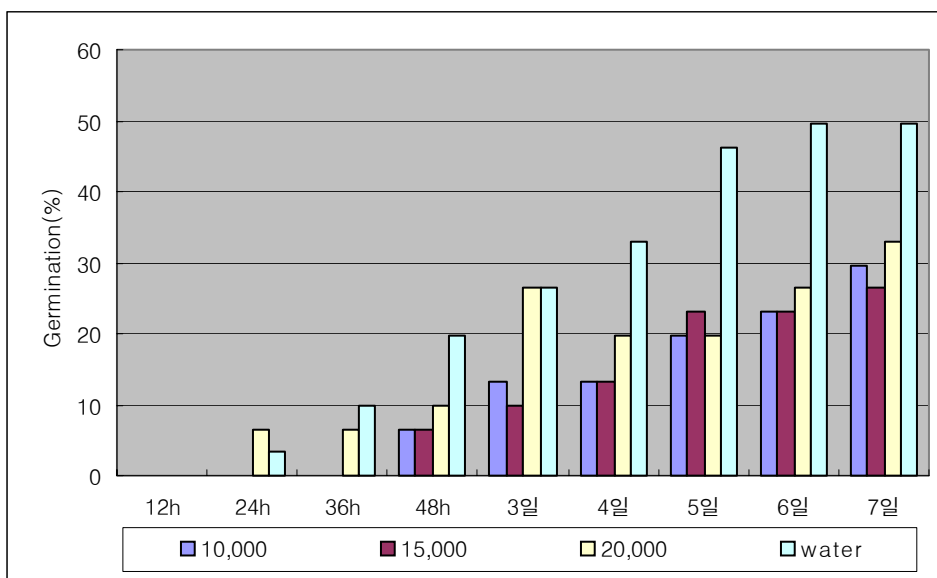


Fig. 9-7. Growth of onion treated with ethyl acetate layer of *Pseudomonas fluorescens* K95009 culture suspension.

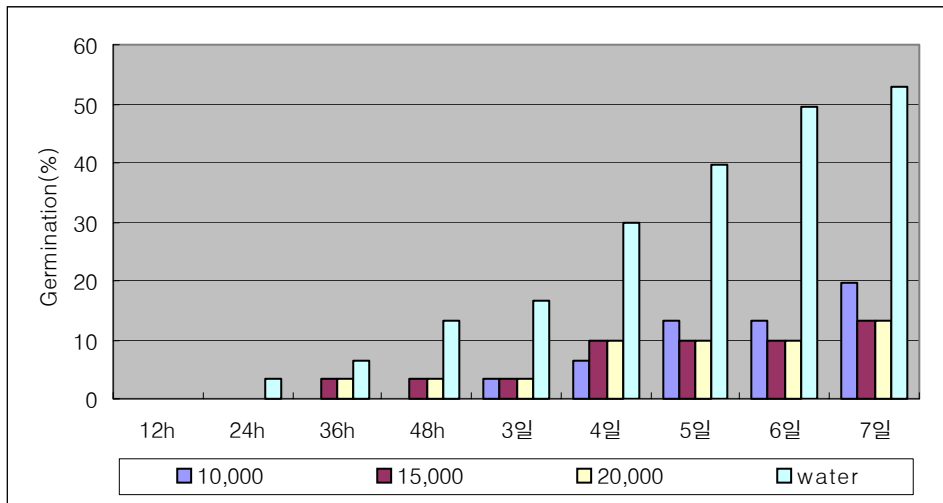


Fig. 9-8. Growth of onion treated with BuOH layer of *Pseudomonas fluorescens* K95009 culture suspension

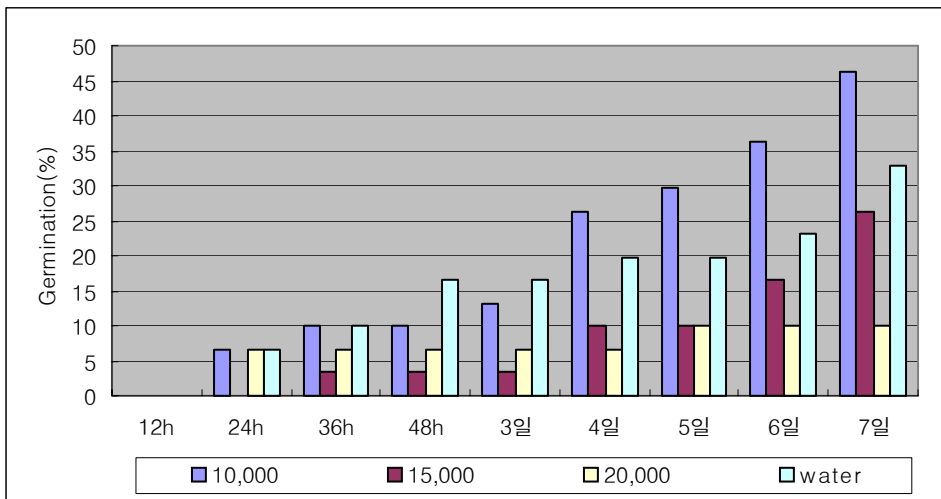


Fig. 9-9. Growth of onion treated with aqueous layer of *Pseudomonas fluorescens* K95009 culture suspension.

상추의 경우 물층에서의 발아양상은 거의 물을 처리한 경우와 거의 비슷하게 발아하는 것과는 대조적으로 양파의 경우 배양 초기인 24h에 15,000ppm을 제외하고 물과 거의 동일한 속도로 발아하다가 배양 4일 이후로는 물보다 10,000ppm으로 처리한 경우 발아율이 더 좋게 나타났다(Fig. 9-9).

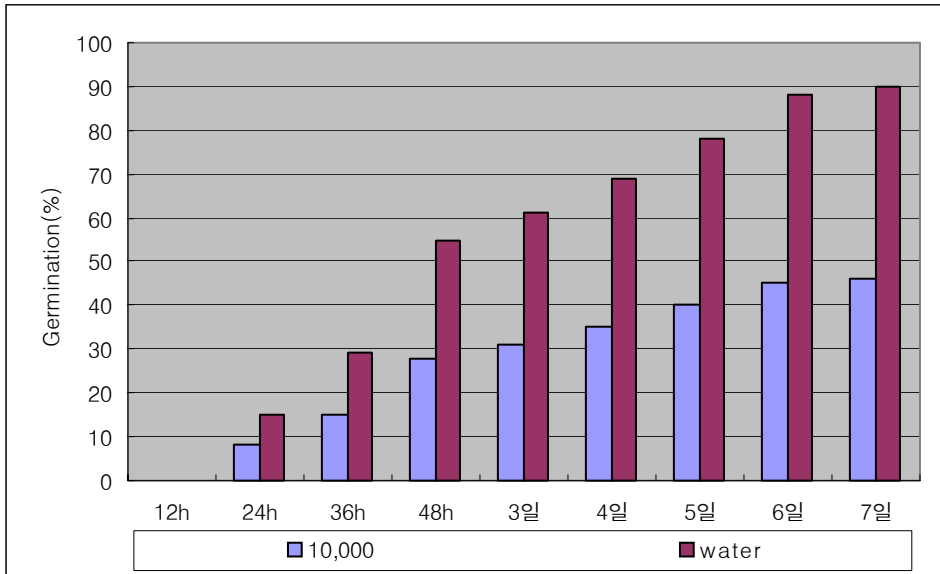


Fig. 9-10. Growth of onion treated with ethyl pellet of *Pseudomonas fluorescens* K95009 culture suspension.

양파의 pellet층의 추출물을 가지고 배양한 경우 상추와 마찬가지로 물을 처리한 경우에 더 발아율이 좋은 것으로 나타났다. 물을 처리한 양파의 종자는 배양 48 h부터 급격하게 발아하고, Pellet을 처리한 양파는 꾸준히 증가하기는 하나 물을 처리한 양파의 발아율에 비하여 현저하게 낮게 나타났다. 최종 확인일을 기준으로 보았을 경우 물을 처리한 경우가 Pellet을 처리한 경우보다 약 50%정도 발아율이 좋은 것으로 나타났다. 이로써 이 실험은 Ethyl Acetate layer과 수포화 BuOH, Pellet 층을 제외하고 aqueous 층만을 가지고 실험을 진행하게 되었다 (Fig. 9-10). 다음은 aqueous 층에서 배양한 상추와 양파의 신장의 길이를 측정 한 것으로 추출물로부터 세 가지의 농도로 처리하였고, 대조구로서 물을 처리한 결과 상추의 경우 15,000ppm에서 4.37cm로 가장 신장의 길이가 크게 나타났으며, 10,000ppm으로 처리한 경우는 다른 처리에 비하여 3.47cm로 현저하게 낮은 신장을 한 것으로 나타났다. 양파의 경우도 이와 마찬가지로 15,000ppm으로 처리한 경우 5.44cm로 가장 길게 신장하였고, 물을 처리한 대조구보다 10,000ppm에서는 4.62cm, 20,000ppm으로 처리한 경우 4.25cm 신장한 것으로 확인되었다 (Table 9-2).

Table 9-2. Lettuce and onion root growth promotion tests with aqueous layer of *Pseudomonas fluorescens* K95009

Crop	10,000ppm	15,000ppm	20,000ppm	water
Lettuce	3.47	4.37	4.10	4.00
Onion	4.62	5.44	4.25	4.61

2) 배지와 상등액간의 함량 비교

Pseudomonas fluorescens K95009를 배양하여 원심분리한 상등액과 배지간의 차이점을 알아보기 위하여 HPLC 분석을 실시한 결과 Fig. 9-11와 같이 3.057, 3.990, 5.267분에서 새로운 물질을 확인 할 수 있었다. 이중 3.990분에서 검출된 물질은 0.8657%, 5.267분에 검출된 물질은 6.7493%의 함량을 보였으나 3.057분에 검출된 물질은 26.563%의 함량을 나타내어 가장 많은 양을 함유 하고 있었다. 따라서 우리는 3.057분에 검출된 물질이 생장을 유도하는 물질로 추측하고, 실험을 진행하였다.

3) 추출 및 분획에 따른 분획층별 함량 비교

Pseudomonas fluorescens K95009를 1ℓ의 K.B broth 내에서 72시간 동안 배양한 후 원심분리한 상등액은 Ethyl acetate, BuOH로 순차적으로 분획하고, Pellet은 MeOH로 분획하여 rotary vacuum evaporator로 농축하여 얻은 수율은 상등액의 경우 EtOAc 층에서 약 0.36%로 0.1434g을 얻을 수 있었으며, BuOH층에서는 1.0569g으로 약 2.71%의 수율을 얻을 수 있었다. 그 중 96.93%를 포함하는 aqueous 층에서 37.90g의 수율을 얻을 수 있었다.

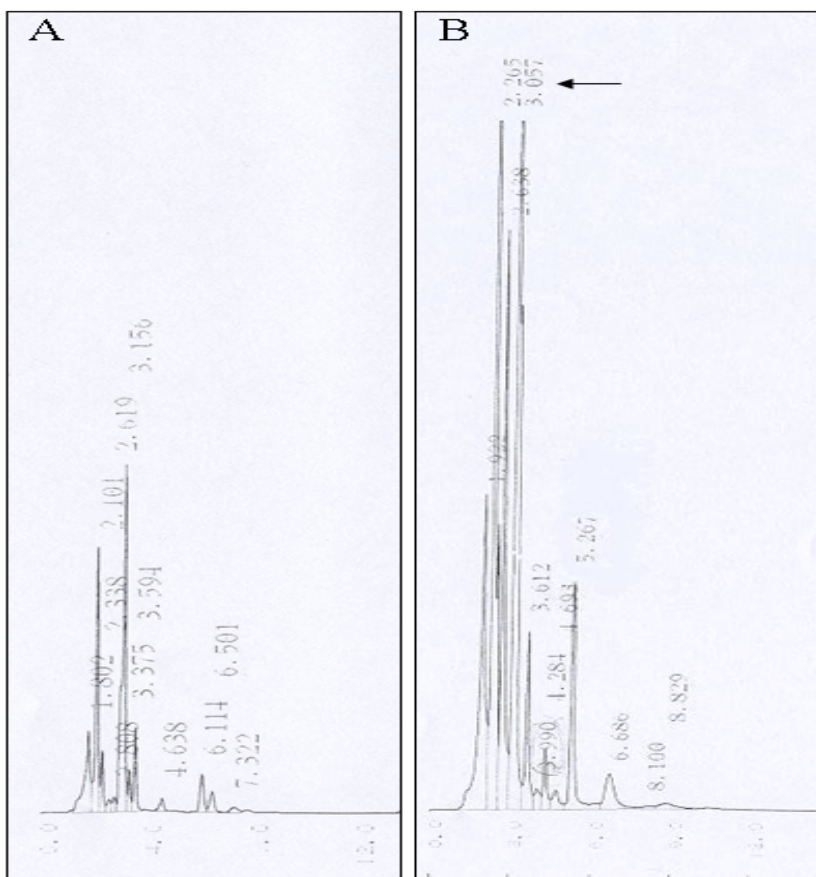


Fig. 9-11. HPLC spectrum of culture media and aqueous layer *Pseudomonas fluorescens* K95009. A; HPLC spectrum of culture media, B; HPLC spectrum of aqueous layer.

Table 9-3. HPLC caculation report

Time	Area	Height	Concentration	activity(%)†
2.265	884,629	107,174	26.6555	89
3.057	881,561	104,767	26.563	93
5.267	223,991	20,920	6.7493	86
6.686	88,883	3,308	2.6782	72

† activity: concentration of 10ppm

4) Amberlite XAD-2 resin column chromatography

Fig. 9-12는 *Pseudomonas fluorescens*의 상등액 농축액과 amberlite XAD-2 resin 으로 분리하여 9번째 얻은 추출물간의 HPLC로 분석한 spectrum이다. amberlite XAD-2 resin으로 20개의 fraction을 얻었고 모두 HPLC로 분석한 결과 우리가 분리하고자 하는 3.057과 유사한 3.041분대의 피크가 존재하는 9번째 fraction만을 확인하였다. 확인한 결과 Fig. 9-12의 C번과 같이 나타났다. A는 *Pseudomonas fluorescens*의 aqueous layer를 새롭게 10,000ppm으로 희석하여 injection volume을 $3\mu\text{l}$ 로 분석한 spectrum이고, B는 Fig. 9-12에서 사용된 10,000ppm의 aqueous layer 희석액을 나타낸다. A와 B는 똑같은 농축액을 가지고 희석한 것으로 시간의 경과에 따라 물질의 변화가 있는 것으로 추정되어 진다. amberlite XAD-2 resin으로 순차분리하여 50ml씩 총 20개의 fraction을 얻었으며, 그 중 fr. P 9번에서 확인된 3.041분에서 검출된 물질을 분리하기 위하여 전개용매인 BuOH : EtOH : H₂O = 4 : 3 : 2의 비율로 silicagel plate로 chamber 안에서 전개시켜 확인한 결과 Rf value 0.4~0.8에서 존재하는 spot들을 확인할 수 있었다.

Amberlite XAD-2 resin으로 순차 분리한 20개의 fraction을 가지고 10ppm의 농도로 상추와 양파에 처리한 후 발아율 및 유묘 길이를 조사하였다. 상추의 경우 발아율은 2일 후 조사하였으며, 유묘길이는 배양 일주일 후 조사하였다. 양파의 경우 발아율 및 유묘길이는 25℃로 조정된 growth chamber에서 일주일간 발아시킨 후 조사하였다. 상추의 경우 대조구로서 물을 처리하였을 경우 약 91%의 발아율을 보였으며, 각각의 용출물을 가지고 발아율을 조사한 결과 E9에서만 95%의 발아율을 보였으나, 다른 용출물들에서는 대조구에 비하여 발아율이 저조한 것으로 확인되었다. 유묘의 길이는 대조구 42mm의 길이에 비하여 Pr. P 9(E9)에서는 45mm로 유묘의 신장률 또한 좋은 것으로 확인되었다. 그러나 양파의 경우 Pr. P 9(E9)와 Pr. P 11(E11)에서만 대조구에 비하여 발아율이 71, 70%로 조금 높게 나타났으나, 유묘길이는 거의 차이가 없는 것으로 나타났다. 따라서 우리는 Fr. No. 9(E9)에 활성물질 성분이 포함된 것으로 추정하고 실험을 진행하였다(Table 9-4).

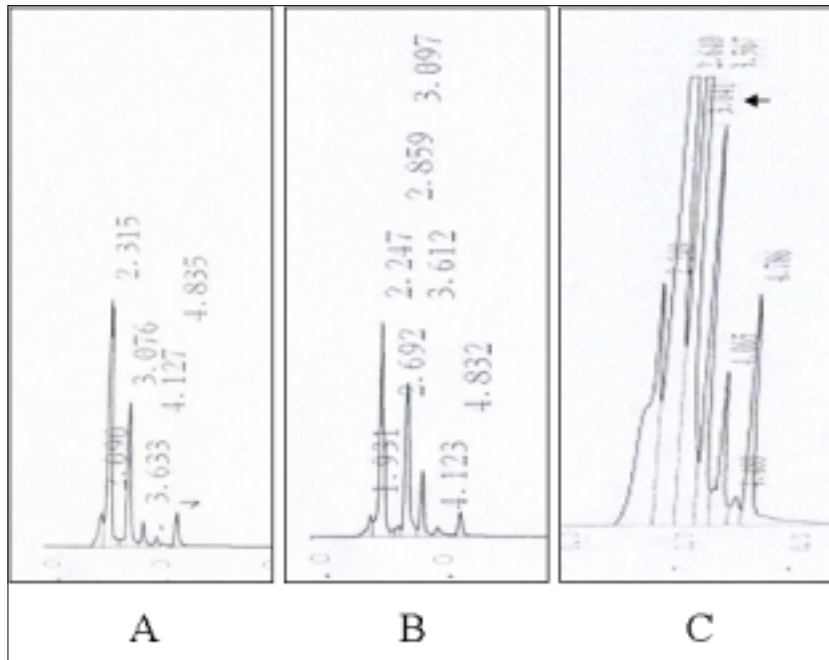


Fig. 9-12. HPLC spectrum of Fraction No.9 separated with amberlite XAD-2 resin. A; control aqueous layer, B; aqueous layer used for Fig. 9-12, C; Fraction No. 9 (arrow: bioactivity was tested)

5) Thin Layer Chromatography

Pseudomonas fluorescens aqueous 분획으로부터 amberlite XAD-2 resin column chromatography에서 분리된 활성물질의 순도를 확인하고자 MeOH 용매계를 이용하여 UV 265nm에서 HPLC로 Fig. 9-13과 같이 분리된 peak를 BuOH: EtOH: H₂O(4:3:2, v/v/v), 용매계로 TLC한 결과 Rf value 0.4~0.8 위치에 spot들을 확인하고 silicagel로 재분리하여 얻은 20개의 용출물 중 1번(Fr. Pf 1)에서 확인하였다

6) silica gel column chromatography

우리는 다시 Fr. P(E9)을 가지고 silica gel(7734, MERCK, Germany)로 open column chromatography를 동일한 용매조건으로 하여 순차분리하였고, 50ml씩 총 20개의 용출물을 얻을 수 있었다. 그 중 Fr. Pf 1에서 1개의 spot을 확인할 수 있었다. 이를 HPLC를 이용하여 분석한 결과 Fig. 9-13과 같은 spectrum을 확인할 수 있었다. 이 Fr. Pf 1을 분석한 결과 우리가 분리하고자 하는 시간대와 유

사하게 3.049분에서 피크를 확인할 수 있었다(Fig. 9-13).

Table 9-4. Measurement of seed germination rates and seedling root lengths in tests with culture broth separated with amberlite XAD-2 resin

Fr.	Lactuca sativa L.		Allium cepa	
	Germination rate(%)	Seedling length(mm)	Germination rate(%)	Seedling length(mm)
E1	83	37	64	41
E2	79	40	63	47
E3	80	35	61	49
E4	82	38	65	46
E5	84	41	69	43
E6	83	40	67	47
E7	90	39	66	44
E8	89	43	69	48
E9	95	45	71	54
E10	90	43	68	51
E11	90	42	70	49
E12	87	39	66	50
E13	85	32	64	47
E14	88	36	68	42
E15	83	38	63	45
E16	80	41	65	49
E17	82	39	69	43
E18	80	33	62	44
E19	83	37	67	46
E20	81	41	64	48
Control	91	42	69	51

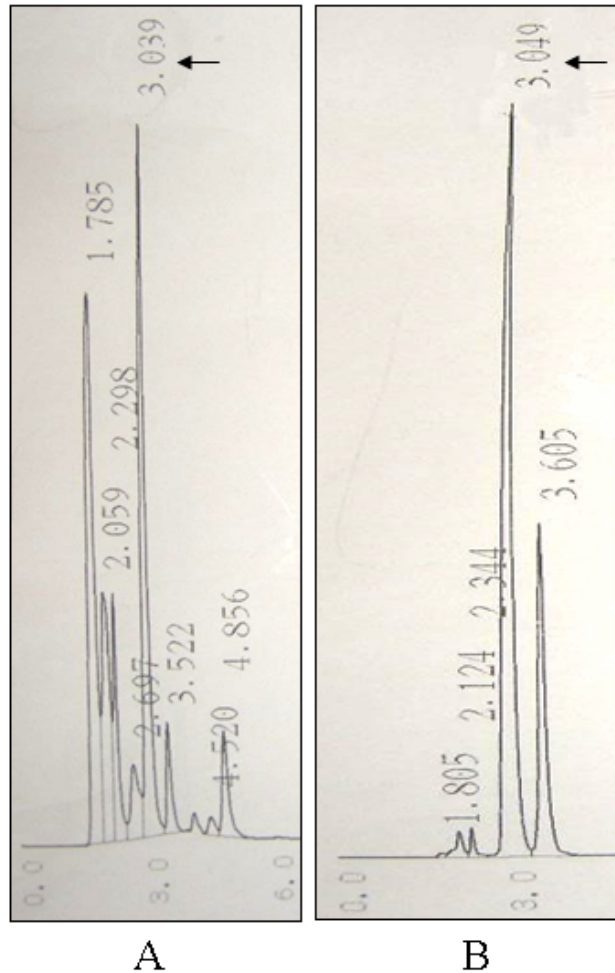


Fig. 9-13. HPLC spectrum of Fr. P 9 and Fr. Pf 1 separated silicagel(7734).

A: Fr. P9 (E9, *Pseudomonas fluorescens* fraction separated with amberlite XAD-2), B: Fr. Pf. 1 (E9 separated with silicagel)

7) Mass 및 NMR 분석

Mass(m/z)로 분석한 결과 Fig. 9-14에서 나타난 바와 같이 m/z 256에 base peak로 나타났으나, 동일한 시료를 이용하여 3반복으로 수행한 결과 256 base peak와 293base peak를 나타냈다. 이를 재분석을 위하여 다시 GC-MS로 spectrum을 확인하여 NIST library 검색을 실시한 결과, 7.20분대의 확인 되어지지 않는 물질과 9.10분에서 확인된 물질은 C₁₆H₂₂O₄로 분자량 278의 1,2-Benzenedicarboxylic acid, Butyl 2-methylpropyl ester, pthalic acid, butyl

isobutyl로 확인되었다(Fig. 9-15). 그러나 이는 GC-MS column에서 용출된 물질인 것으로 예상되어 진다. 또한 d-DMSO 용매계를 사용하여 $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ 을 실시한 결과 Fig. 9-16에서와 같이 확인되었다. 그러나 NMR에서 확인되어진 spectrum의 결과는 탄소2개로 이루어진 물질로 추정되어지나 Mass에서 확인되어진 1,2-Benzenedicarboxylic acid, Butyl 2-methylpropyl ester, phthalic acid, butyl isobutyl의 구조는 벤젠환이 포함된 물질로 NMR의 분석결과와 Mass의 분석결과가 일치하지 않아 일관된 실험결과를 얻을 수 없었다. 이는 Fig. 9-12에서 나타난 바와 같이 물질이 변화된 것으로 이루어진 것으로 미루어 짐작할 수 있고, 실험을 진행하면서 실험초기에 예상하였던 활성물질로 추정된 물질 또한 변성되어지거나 그 구조가 변화된 것으로 추정되어지며, 우리가 예상한 결과를 얻을 수 없었다. 따라서 이 물질에 대해서는 추가적인 연구수행이 필요할 것으로 사료된다.

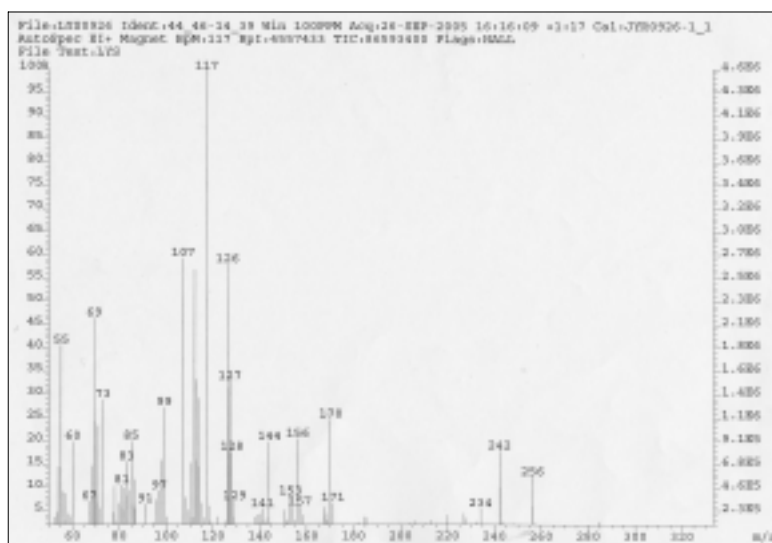


Fig. 9-14. Results of Experiment No.1 of EI-MS spectrum.

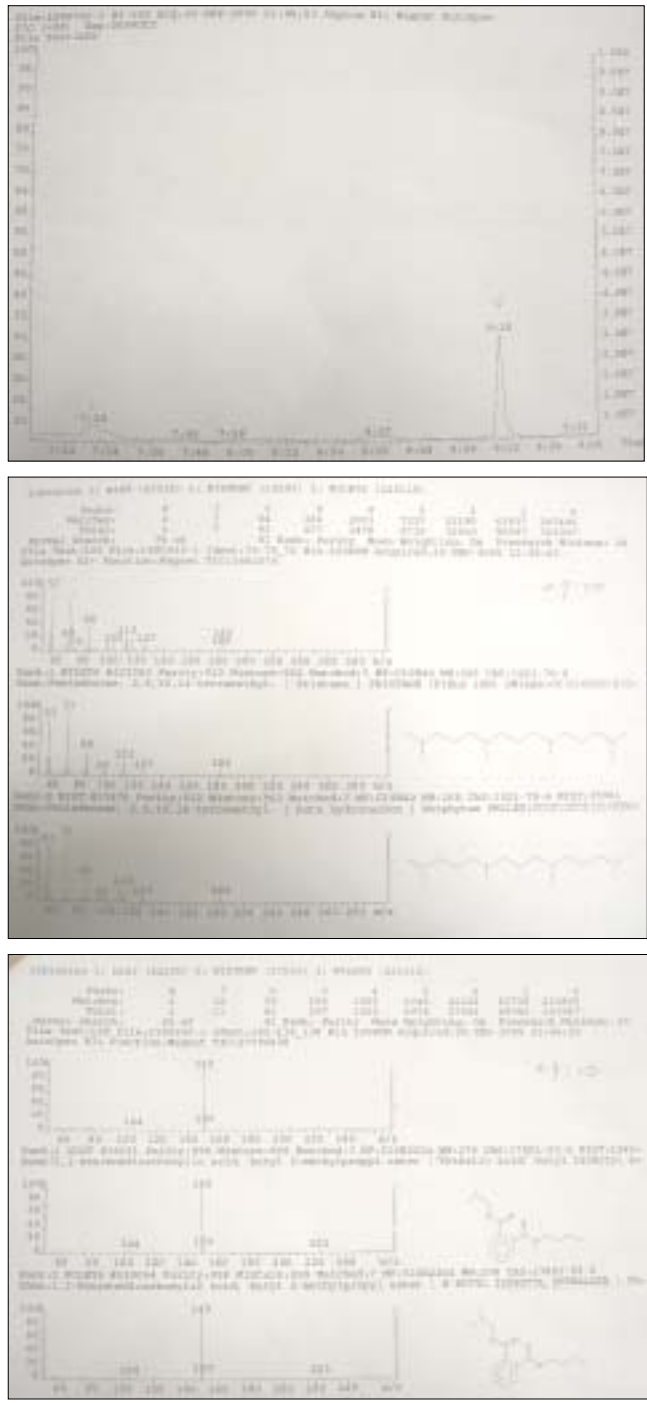


Fig. 9-15. GC-MS spectrum of Fr. Pf 1.

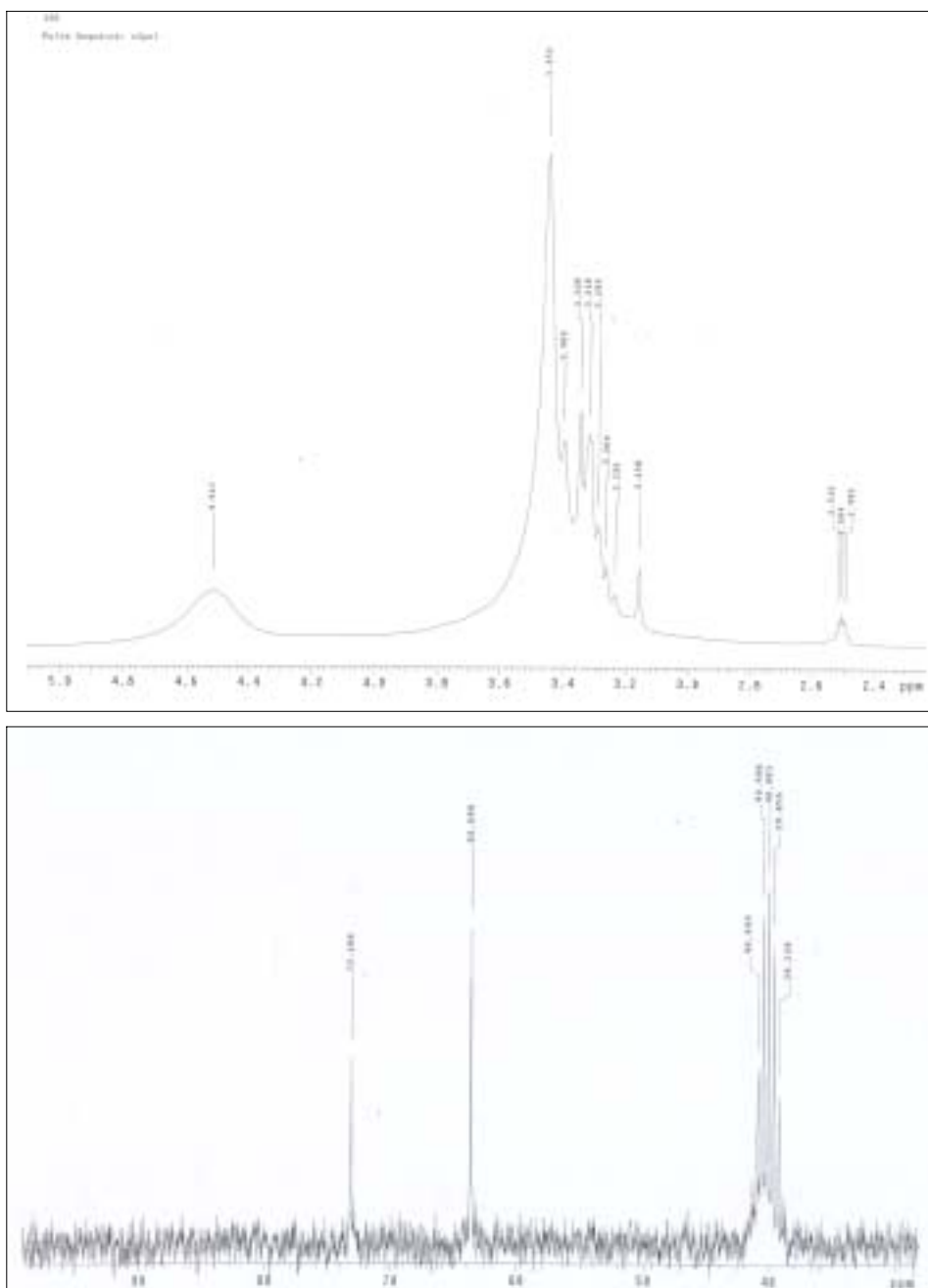


Fig. 9-16. ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectrum of Fr. Pf 1 from *Pseudomonas fluorescens* K95009.

* up: ¹H-NMR, down: ¹³C-NMR

8) crystal을 이용한 생장촉진 실험

본 실험을 진행하는 과정 중 분획을 한 배양액을 농축하는 시간동안 4°C에 저장하거나 농축을 하는 사이에 crystal이 생성되었다. 이는 배지의 성분으로 예상되어 K.B 배지의 성분인 K_2HPO_4 와 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 물에 용해시켜 발아테스트를 수행한 결과이다. 그림에서와 같이 물을 처리한 경우는 종자가 모두 완전히 성장하는데 반하여, 배지성분을 처리한 종자에서는 발아를 하지 못하거나 발아를 하더라도 유근이 조금 성장하다 멈추거나, 잎은 생성이 되나, 뿌리로 성장을 못하는 이상발아를 하는 것으로 확인되었다. 따라서 우리는 crystal을 10,000ppm으로 조제하고, 배지를 처리하거나 배지성분 중 K_2HPO_4 와 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 혼합한 용액을 10,000ppm으로, aqueous layer를 10,000ppm으로 조제하여 동일한 농도에서 발아실험을 수행하였다.

Fig. 9-17에서 살펴보면, 물을 처리한 경우 완전히 성장하기는 하나 뿌리가 이상 발아하거나, 누렇게 변색되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 배지를 처리한 경우에는 발아를 하지 않거나 발아를 하더라도 잎만 성장하는 것을 확인할 수 있었다. 배지성분 중 KH_2PO_4 와 $MgSO_4$ 를 혼합한 용액을 처리한 경우는 잎만 성장하는 것을 확인하였다. 그러나 crystal을 처리한 경우 처음 유근의 출현속도가 물을 처리한 경우보다 확연히 빨랐으며, 일정시간 배양 후 확인한 결과 유묘신장률이나 잎의 크기, 유묘의 건실한 정도가 눈에 띄게 물과 비교되었다. Fig. 9-18은 물층과 Crystal, 배지를 처리한 경우를 control로 물을 처리한 경우와 비교한 그림이다. 배양 1일 후 물과 물층과의 발아된 유근의 길이를 비교한 결과 거의 비슷한 길이로 성장하는 것을 확인할 수 있고, 물과 crystal을 처리한 경우를 비교한 결과 crystal을 처리한 경우 매우 발아가 활발한 것으로 보여 졌다. 배지를 처리한 경우는 Fig. 9-17, 18에서와 마찬가지로 발아하지 못하는 것을 확인할 수 있었다. 양파를 처리한 경우도 이와 유사한 결과를 확인할 수 있었다(Fig. 9-19, 20). Table 9-5에서 볼 때 상추에 여러 가지 조건으로 발아양상을 확인한 결과, 물을 처리하였을 경우 85%의 발아율을 보였으며, aqueous layer 추출물을 처리한 경우 89%의 발아율을 보였다. 또한 crystal을 처리한 경우 93%로 가장 좋은 효과를 보였으며, 배지를 처리한 경우에는 가장 낮은 61%의 발아율을 보였다. 일정시간이 지난 후 확인한 결과 또한 이와 유사한 양상을 띠는 것으로 확인되었다.

Fig. 9-21는 분획 후 냉장고에 보관한 미생물 배양액에 형성된 crystal의 모양을 나타낸 그림이다. 플라스크 내에 형성된 crystal의 모양 및 crystal을 광학 현미경 200배로 확인한 crystal의 모양을 확인한 결과 배지 성분의 일종이거나 당 성분인 것으로 생각되어 진다. 따라서 RI 분석결과 crystal은 단일물질인 것으로 나타났으며, D-glucose와 TLC로 확인한 결과 crystal은 당성분은 아닌 것으로 확인

되었다(Fig. 9-22, 23). 그러나 배지성분일 경우 물에 쉽게 용해되어야하지만, crystal의 경우 물에 쉽게 용해되지 않고 산을 제외한 다른 용매에서는 쉽게 용해되지 않는 것으로 미루어 볼 때 crystal은 세균의 분비물과 배지 성분의 화학 반응 등으로 재조합 된 것으로 추정된다. 따라서 종자 별로 약간의 차이가 있으나 crystal이 종자의 발아에 영향을 미치는 것으로 생각되어지며, 이를 좀더 연구해 볼 가치가 있을 것으로 예상되어진다.

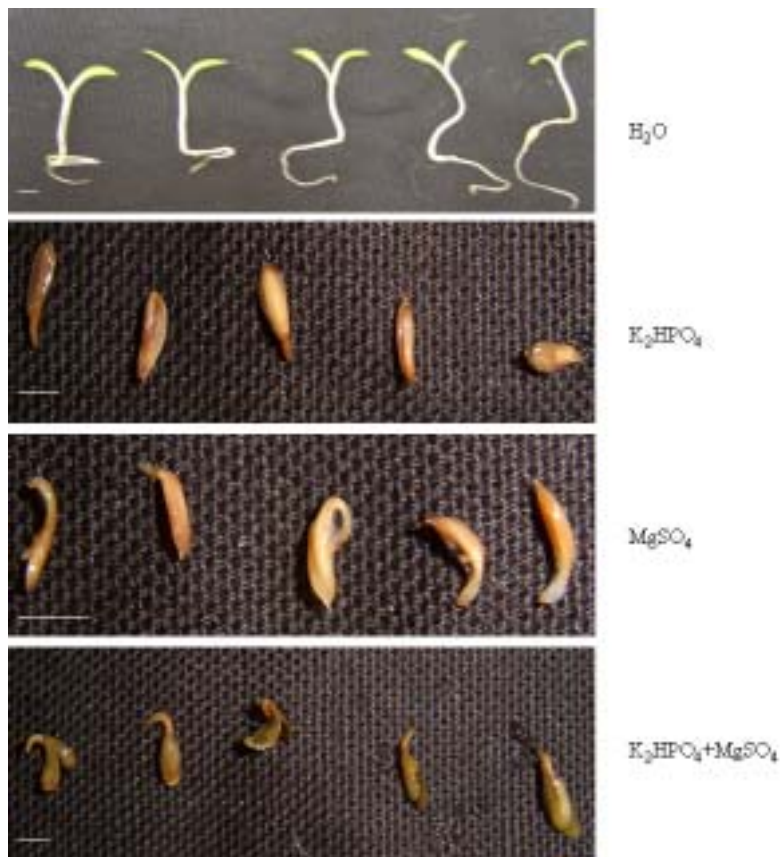


Fig. 9-17. Lettuce seed germination tests with crystal and various compound of culture media.

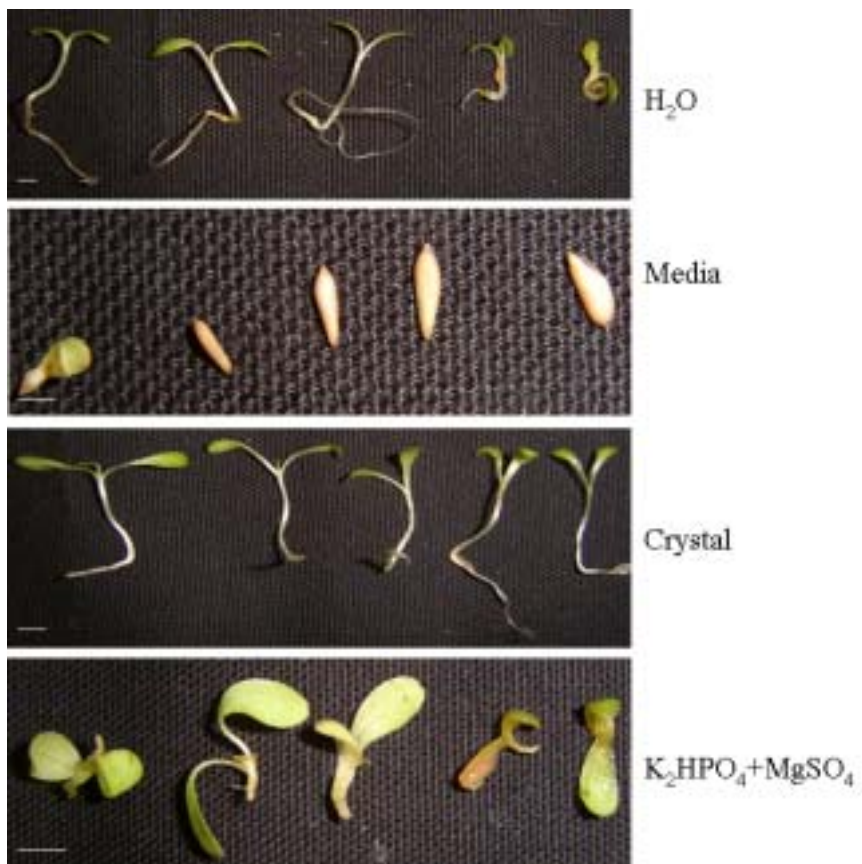


Fig. 9-18. Lettuce seed germination tests with H₂O, media, crystal, and K₂HPO₄+MgSO₄.

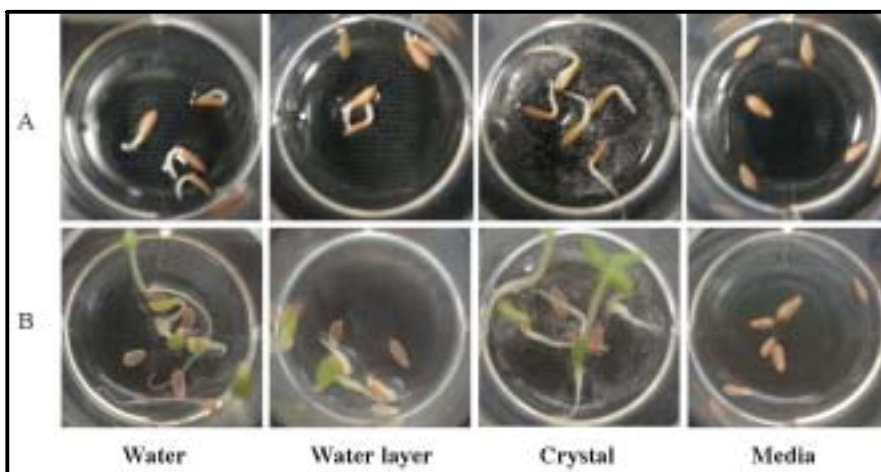


Fig. 9-19. Lettuce seed germination tests with water, aqueous layer of culture broth, media and crystal at various time intervals. (A: 24hrs after treatment, B: 7 days after treatment).

Table 9-5. Germination of lettuce seeds under various condition

Treatment time	Germination rate(%)			
	water	water layer	crystal	media
24hrs	85	89	93	61
7 days later	87	90	94	65

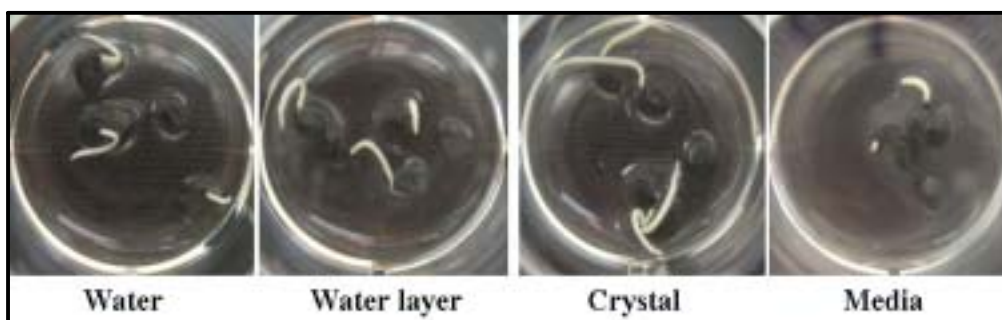


Fig. 9-20. Onion seed germination tests with water, aqueous layer of culture broth, media and crystal.(48hrs after treatment)

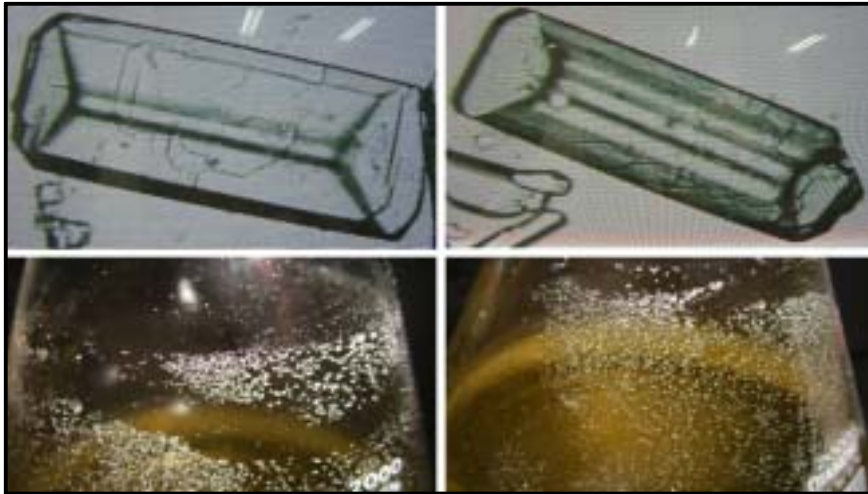


Fig. 9-21. Crystal formed under refrigeration after the BuOH fraction of the culture broth of *Pseudomonas fluorescens* K95009. ($\times 200$)

9) RI 분석

분석 결과 약간의 불순물이 섞인 것으로 보여지나, 30 min 부근에서 큰 peak를 나타내었다. 이는 단일 물질로 추정되어진다.

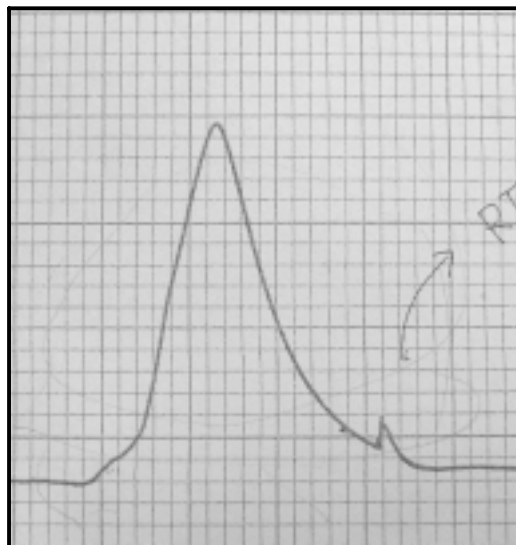


Fig. 9-22. RI analysis.

10) 당 추정 분석

시료와 대조구인 glucose를 TLC plate에 전개시킨 후 확인한 그림으로 glucose에서는 확연히 spot을 형성하였으나 crystal을 용해시킨 용액에서는 반응이 없는 것으로 나타났다. 이 crystal은 불을 붙여보았으나 불에도 타지 않는 것으로 확인되었다. 이 crystal은 세균 배양시 세균에서 분출되는 2차 산물과 배지 성분의 조성 중 일부가 화학적 결합반응으로 형성된 것으로 생각되어진다.

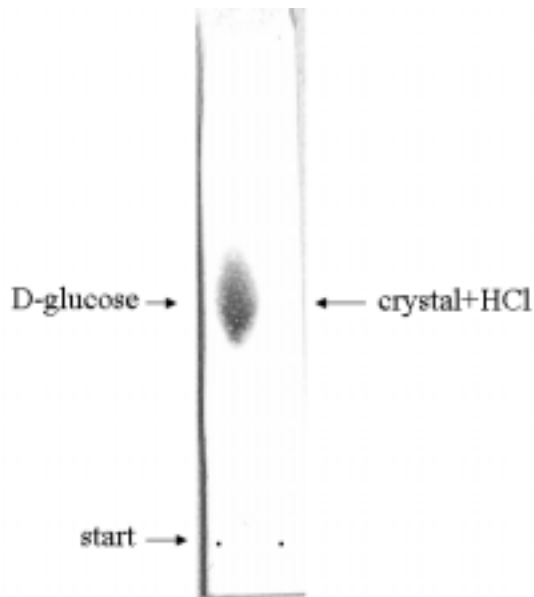


Fig. 9-23. Solution of crystal separated on a silicagel plate.

10절 시제품 개발

1. 서언

종자 pelleting은 종자 크기 및 무게를 증가시킴으로써 농촌 노동력 부족을 해결하기 위한 기계화 과종을 할 때 유리하고, pelleting시 식물 성장조절제 공급, 미량원소의 공급을 할 수 있고 종자를 보호하고 수분흡수력을 좋게하여 발아를 촉진하는 등 여러 가지 장점이 있다. 그러나 우리나라에서는 아직까지 종자에 착색하는 coating 정도일 뿐 여러 작물에 널리 이용될 수 있는 효율적인 pelleting 방법이 개발되지 않은 실정이다. 또한 육묘사업이 중요시 되고 있는 최근에는 기계화 과종을 위한 종자의 균일성, 미세종자의 대립화, 종자의 약제 공급등이 더욱 중요시 되고 있는데 pelleting 처리를 통해 일정한 형태와 경도를 유지하는 양질의 종자를 생산하고 균일한 초기육묘를 기대 할 수 있다. 본 연구에서는 미세종자이면서 부정형의 종자이기 때문에 과종시 애로가 많은 상추와 양파종자를 pelleting 실험의 재료로 이용하였으며 개발된 pelleting 기술을 적용하여 종자를 대량처리할 경우 발생할 수 있는 문제점을 파악하고 이의 개선 및 산업화 가능성 여부를 모색하고자 하였다. 특히 종자의 대량처리시 pelleting 종자를 실용화하기 위해서는 pelleting 최적 조건이 설정되어야 한다. 이를 위하여 pelleting기술의 표준화가 절실히 요구된다. 또한 본 연구에서 선발된 병역제 길항균과 생장촉진 균의 투입에 따른 pellet 종자의 종자 활력 감소를 최소화하고 유용미생물의 효과적인 발현을 위한 최적화 조건을 구명하고자 하였다.

2. 시제품 제조

가. 재료 및 방법

미생물 종자 pelleting을 위해 피복물질 Pyrophyllite+Illite+diatomite를 1:1:1로 혼합하여 사용하였다. 접착물질은 PVP 1%를 dH₂O에 용해한 후 사용하였다.

상추의 공시품종은 선풍, 센세이션, 루벨라, 선그린, 화홍이며 양파의 공시품종은 파워볼, 카타마루, 케논볼, 터보, 선파원 이었다.

Powder형태로 제제화된 *Bacillus sp.* BIG21003과 slurry형태로 제제화된 *Pseudomonas fluorescens* K95009(siderophore 최대 생성배지에서 배양됨)를 제제화 하여 미생물 pellet 종자를 완성하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 상추 미생물 pelleting 종자 제조

상추의 품종별 pelleting 처리를 하여 제조 효율 및 그에 따른 피복물질과 접착 물질의 소요량을 산정하였다. 1리터의 상추 나종자를 제조할 경우 피복물질은 평균 10kg정도 소요되었으며 접착물질은 4.2ℓ 소요되었다. 제조하는데 걸리는 시간은 3.3시간정도 소요되며 공정수율은 97%정도로 나종자의 손실량을 최소화 할 수 있었다. 화홍품종의 경우 종자내에 혐잡물이 많이 포함되어 있어 리터당 종량이 타 품종에 비해 립수가 작았으며 공정수율 또한 평균에 못미치는 94.1%를 나타냈다.

Table 10-1. Manufacturing of lettuce pelleting seed by raw seed about 1 liter volumn

C.V	PV(kg)	SV(ℓ)	T(hr)	APS(rpm)	NRS	NPS	RS/PS(%)	SPS(mm)
Seon-poong	10.3	4.3	3	55	380,000	369,000	97.10	2.8
Sen-sation	11	4.6	3.4	53	400,000	398,500	99.62	2.8
Ru-bella	10.5	4.3	3.3	55	370,000	364,000	98.37	2.8
Seon-green	10.3	4	3.3	55	360,000	346,000	96.11	2.8
Hwa-hong	8.3	3.6	3.5	50	340,000	320,000	94.11	2.8
Mean	10.1	4.2	3.3	53.6	370,000	359,500	97.16	2.8

PV: Powder volume, SV: Slurry volume, T: the necessary time, APS: Average of pan speed, NRS: Number of Raw seed(In put) NPS: Number of pelleting seed(Out put), RS/PS: $(PS \div RS) \times 100$ SP S: Sizes of pelleting seed.

상추의 용량에 따른 pellet 종자의 제조 최적화 조건에 따른 공정 수율은 Table 10-1과 같다.

상추 1리터를 제조할 경우 97.1%의 공정 수율이 나왔으며 20리터를 제조할 경우 96.3%로 약 1% 정도 감소하는 경향이였다. 상추 1말(20리터기준)을 pelleting 할 경우 피복물질이 약 210kg, 접착물질은 86.4ℓ 소요되었다. 공정량이 증가할 수록 소요 시간은 증가하는데 제조용량이 20배 증가할 경우 공정 시간은 3배 증가하여 제조용량의 증가폭에 비해 공정시간이 정비례로 증가하지는 않았다.

Table 5-2. Manufacturing of lettuce pelleting seed by raw seed about different liter volumn

Vol.	PV(kg)	SV(ℓ)	T(hr)	APS(rpm)	NRS	NPS	RS/PS(%)	SPS(mm)
1L	10.1	4.3	3	55	380,000	369,000	97.10	2.8
5L	53.6	21.3	5.4	53	1,900,000	1,831,000	96.36	2.8
10L	100.7	40.9	6.9	50	3,800,000	3,660,000	96.31	2.8
15L	162.2	63.4	8.3	47	5,700,000	5,480,000	96.14	2.8
20L	210.8	86.4	8.9	47	7,600,000	7,299,000	96.03	2.8

2) 양파 pelleting 종자 제조

양파의 품종별 미생물 pellet 종자 제조에 따른 공정 수율은 Table 10-3과 같다. 양파의 리터당 나종자의 립수는 약122,000립 정도이며 pellet 종자 제조시 120,000립 정도가 제조되어 약 98.1%의 공정수율로 상추보다 약간 높았다.

나종자 1리터 제조하는데 피복물질은 16.6kg, 접착물질은 5.4ℓ가 소요되며 제조 소요시간은 평균 3.6시간이었다. pellet 종자 크기는 3.5mm로 상추 2.8mm보다 컸다.

Table 10-3. Manufacturing of onion pelleting seed by raw seed about 1 liter volumn

C.V	PV(kg)	SV(ℓ)	T(hr)	APS(rpm)	NRS	NPS	RS/PS(%)	SPS(mm)
Power -ball	17.1	5.3	3.5	47	123,000	120,000	97.56	3.5
Kata- maroo	16.9	5.4	3.9	45	122,500	121,000	98.77	3.5
Canon -ball	16.3	5.3	3.6	44	122,000	120,000	98.36	3.5
Turbo Sun- power	16.5	5.4	3.5	44	123,000	120,800	98.21	3.5
	16.1	5.4	3.6	46	121,600	119,000	97.86	3.5
Mean	16.6	5.4	3.6	45	122,420	120,160	98.15	3.5

양파의 용량에 따른 pellet 종자의 제조 최적화 조건에 따른 공정 수율은 Table 10-4와 같다.

양파 1리터를 제조할 경우 98.1%의 공정 수율이 나왔으며 20리터를 제조할 경우

97.8%로 약 0.3% 정도 감소하는 경향이었는데 상추보다 공정수율이 높았다. 양과 1말(20리터기준)을 pelleting 할 경우 피복물질이 약 341kg, 접착물질은 112ℓ가 소요되었다.

Table 10-4. Manufacturing of onion pelleting seed by raw seed about different liter volumn

vol.	PV(kg)	SV(ℓ)	T(hr)	APS(rpm)	NRS	NPS	RS/PS(%)	SPS(mm)
1L	16.6	5.4	3.6	45	122,420	120,160	98.15	3.5
5L	84.2	28.6	4.2	43	612,100	601,000	98.18	3.5
10L	168.2	50.8	6.0	42	1,214,000	1,188,000	97.85	3.5
15L	253.6	76.3	6.8	42	1,833,600	1,780,000	97.07	3.5
20L	341.5	112.5	8.2	42	2,448,400	2,395,000	97.81	3.5

3. 미생물 펠렛종자 시제품

가. Pellet 종자와 나종자 비교

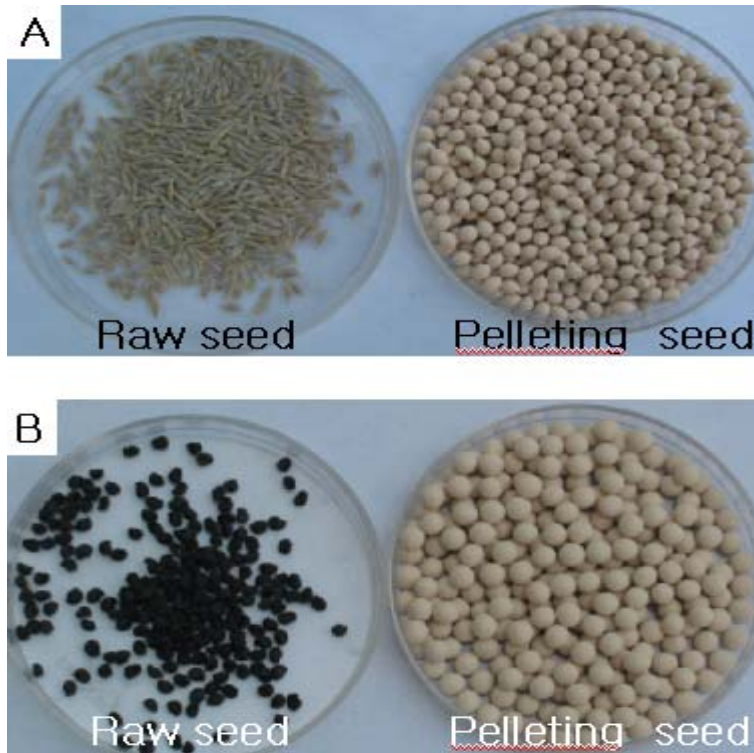


Fig. 10-1. Photo of raw seed and pelleting seed.

나. 시제품 바이오캡스(BioCaps)

Bacillus sp. BIG21003과 *Pseudomonas fluorescens* K95009균이 첨가된 미생물 pelleting 종자의 보급을 위해 바이오캡스(BioCaps)로 시제품을 출시하였다. 상추의 경우 1작, 1홉, 5홉 단위로 양파는 1홉, 5홉, 10홉 단위로 포장을 하였다. 상추의 경우 1작은 약 8,000립, 양파의 경우 1홉은 2,500립의 pelleting 종자가 들어있다.



Fig. 10-2. Photograph of test products.

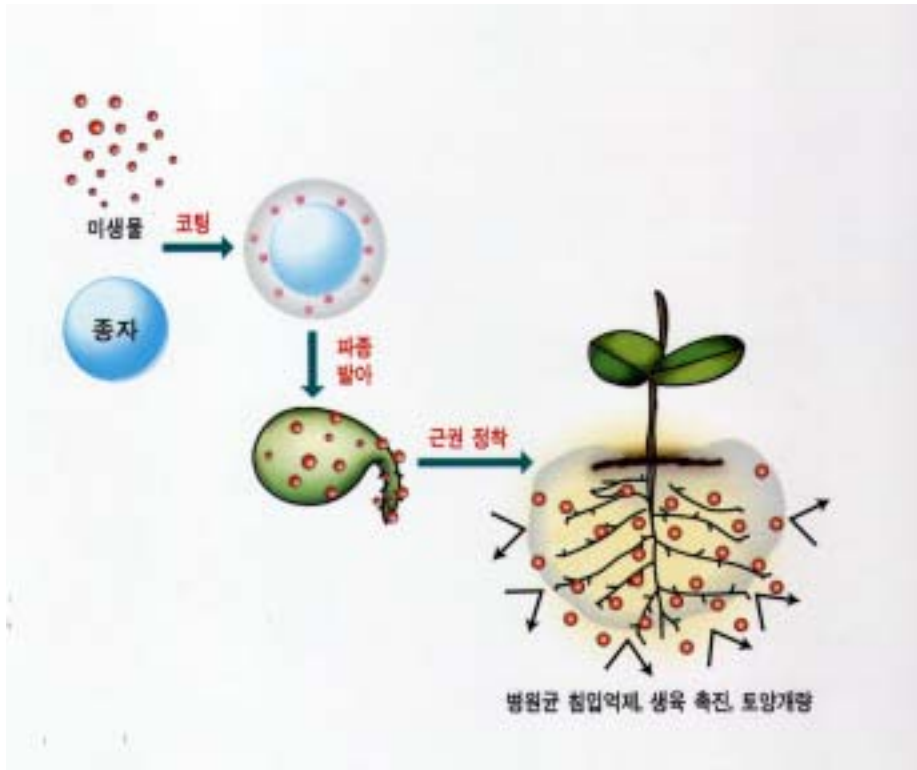


Fig. 10-3. Processing of rooting by pelleting seed.

4장. 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 목표 달성도

<비아이지>

수행기관(년도)	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위	달성도
(주) 비아이지 1차년도	길항균주의 배양 공정의 최적화	1. 균주의 배지 최적화 확립	>100
		2. 소용량 발효조 배양공정 최적화 확립	>100
	균주의 제제화 연 구	1. 제제화 관련 문헌조사 및 안정 성 시험	>100
	주요작물의 생리 적 특성 연구	1. 주요작물의 종자 발아 관련 생 리적 특성 연구	>100
(주)비아이지 2차년도	미생물의 안정적 제제 및 종자 처 리기술	1. 미생물의 안정적 제제화	>100
		2. 종자 pelleting 공정기술 확립	>100
		3. 미생물 pelleting 종자 제조공정 확립	>100
		4. 미생물 pelleting 종자 종자 활성 검정	>100
	미생물 대량 배양 기술의 확립	1. <i>Bacillus sp.</i> BIG21003의 대형 발효 공정확립 - 300, 2500 liter pilot plant scale culture	>100
		2. <i>Pseudomonas fluorescens</i> 의 대 형 발효 공정 확립 - 300, 2500 liter pilot plant scale culture	>100
길항균의 선발과 활성 검정	1. 길항균의 선발	>100	
	2. 길항균의 동정	>100	
(주) 비아이지 3차년도	미생물 pelleting 종자 시제품 개발	1. 시제품을 이용한 미생물 pelleting 종자의 활성 검정	>100
		2. 길항균의 근권칭착능력 검정	>100
	농가 실증 포장 시험	1. 미생물 pelleting 효과를 이용한 생육 촉진 효과 검정	>100
		2. 미생물 pelleting 종자를 이용한 병 억제 효과 검정	>100

<강원대학교>

수행기관(년도)	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위	달성도
강원대학교 1차년도	생장촉진 및 길항성 균주의 기내 선발 및 기내 활성 검정	1. 생장촉진 및 길항력을 갖는 미생물 선발	>100
		1. 생장촉진 및 길항력을 갖는 미생물 동정	>100
강원대학교 2차년도	생육촉진 및 길항균의 선발과 활성 검정	1. 기내 길항성 실험	>100
		2. 선발균을 이용한 발아촉진 실험	>100
		3. 포장 생장촉진 실험	>100
강원대학교 3차년도	생장촉진 및 길항성균의 활성기작	1. 미생물 pelleting 종자를 이용한 포장실험	>100
		2. 생장촉진 물질의 성분분석 및 성분구명	>100

제 5장 연구개발결과의 활용계획

본 연구를 통하여 일반적으로 *Pseudomonas fluorescens*의 적정 배지로 알려진 KB배지 보다 새로이 찾아낸 siderophore 대량 생성 배지를 이용하여 siderophore 생성량을 극대화 할 수 있어 기존의 *Pseudomonas fluorescens*의 mutant를 이용한 방법보다 경제적 이점을 최대화 할 수 있고 효과적으로 PGPR 및 병억제를 동시에 제어할 수 있을것으로 기대된다. 또한 물질 분리 과정에서 생성된 crystal에 대한 보다 정밀한 분석이 요구되어 향후 추진할 계획이다.

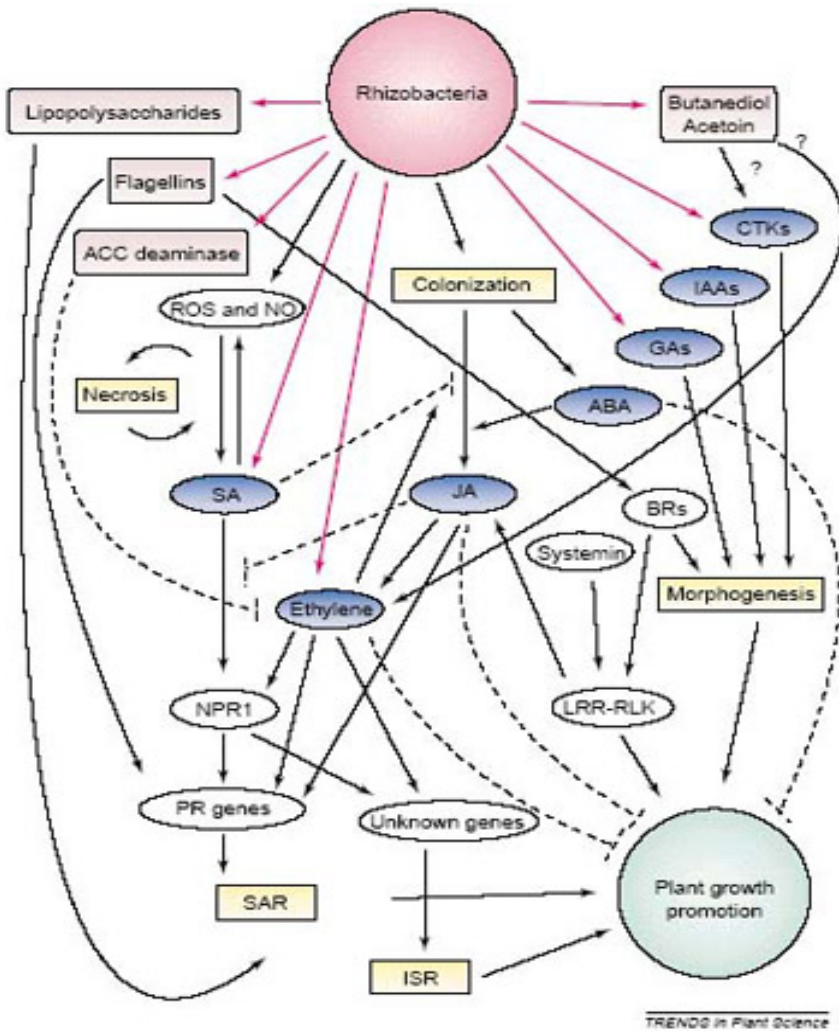
최근 종자산업에서 활발히 응용되고 있는 종자 priming 처리방법과 연관지어 유용미생물을 종자에 biopriming하여 미생물의 활력유지에 가장 적절한 pelleting 피복물질과 접착물질의 선발 및 적용을 통한 최적의 미생물 종자 pelleting 방법을 개발하였다. 따라서 미생물 pelleting 종자는 종묘회사에서 상업적 대량생산을 통하여 채소병 방제 수단으로 활용될 것이며, 다양한 작물종자에 접목을 통한 농자재 산업의 동반 성장이 예상되어 진다. 또한 대형 육묘장 및 일반 농가로의 pelleting 종자 사용을 대중화 시켜, 외국으로부터 종자 pelleting에 대한 로열티를 지불하지 않고 보다 생산성 있는 작물 재배 방식으로 전환될 것이다.

한편, 선발된 유용 균주 *Bacillus sp.* BIG21003의 장기간 저장에 안정한 제제화 개발로 상토 및 미생물 pellet 비료로의 접목이 가능할 것으로 생각되며 2006년 캐나다 Berger社에 미생물 원제를 송부하여 육묘초기 토양병 발생을 억제하는 전용 상토를 생산할 예정이다.

제 6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학 기술정보

1. 근권세균의 냄새가 식물성장 촉진(독일)

독일 막스플랑크 화학생태학 연구소의 Wilhelm Boland가 이끄는 연구진은 식물 뿌리에 공생하는 세균의 냄새가 식물의 성장을 촉진한다는 내용의 총설 논문을 발표했다.



[사진설명] 뿌리세균에 의한 식물성장촉진에 관여하는 복잡한 신호전달망

식물성장을 촉진하는 식물성장촉진 근권세균(Plant-growth-promoting rhizobacteria, PGPR)은 식물의 뿌리 주위에 살면서 영양분 공급의 증진, 식물호르몬에 의한 대사활동 유도, 식물호르몬 균형 유지, 전신헌득저항성(SAR)과 유도전신저항성(ISR)과 같은 식물의 방어기작의 유도, 식물병원균 억제 등을 조절하는 역할을 한다. 또한 식물성장촉진과 ISR 유도기작에 대해 최근 밝혀진 바에 따르면, 특정 미생물로부터 나오는 휘발성 냄새물질(butanediol, acetoin)이 이를 촉진한다고 한다.

PGPR은 크게 두 가지 그룹으로 나눌 수 있는데, 식물병원균을 억제하여 간접적으로 식물에 도움을 주는 소위 바이오컨트롤-PGPR과 식물성장을 늘리거나 종자발아 촉진, 작물생산성 증대 등을 가져오도록 식물대사에 직접적인 영향을 미치는 PGPR이 그것이다.

1) 생물비료로서의 역할에는 질소고정세균이 질소원을 제공하고 콩과식물이 탄소원을 제공하는 공생관계가 이미 잘 알려져 있다. 2) 생물적방제로서의 역할에는 ISR, SAR, 항균물질 방출 등을 들 수 있다. 3) 식물로 하여금 식물호르몬 합성 및 방출을 직접 유도하여 식물성장을 촉진하는 역할도 한다. 게다가 PGPR에서 나오는 휘발성 물질도 식물에 작용한다는 것을 강조하고 있다.

한편 휘발성 물질은 식물 성장 촉진뿐만 아니라 ISR을 활성화시키는 사실이 밝혀졌는데, 기존에 에틸렌 신호 전달 과정과는 전혀 무관한 것으로 나타나 PGPR과 ISR과의 새로운 관계 정립이 필요하게 되었다고 말한다. 앞으로 휘발성 물질을 보다 많이 만들어내는 탁월한 PGPR 균주를 선발하고, 유전자변형하여 적용한다면 농업에 새로운 전략을 제공할 것으로 연구진은 전망하고 있다.

○ 정보출처

Trends in Plant Science 9: 263-266 (2004년 6월호)

2. 제지 부산물로 토양병 방제(미국)

미국 오레곤 주립대학의 A. G. Stone 이 이끄는

연구팀은 사양토에서 자라는 오이와 스냅빈(snap bean; 꼬투리채 먹는 콩류)의 토양전염병 및 지상부전염병에 제지부산물의 효과를 조사하였다.

제지 부산물은 세 가지 종류를 시험하였는데 생 제지부산물, 증량제를 넣지 않고 발효시킨 제지부산물, 그리고 수피와 함께 발효시킨 제지부산물을 감자-스냅빈-피클오이로 3년 윤작하면서 매년 살포하였다. 연구진은 자연적으로 발생하는 모든 병을 밭에서 평가하였고, 또 포장에서 생물검정도 함께 진행하였다.

시험결과 위 세 가지 부산물 모두 오이 잘록병과 스냅빈의 피시움마름병과 잎갈 색반점병을 억제하였다. 발효 부산물 모두 오이의 세균성점무늬병의 발생률을 감소시켰다. 2년 연속 스냅빈을 심은 별도 포장시험에서 부산물 모두 2차 년도에서 뿌리썩음병 발병도를 감소시켰다. 온실실험에서 수피와 함께 발효시킨 제지 부산물을 높은 비율로 투입하였을 때 스냅빈의 탄저병을 억제시키는 것으로 나타났다. 연구진은 연구 결과에 따라 사질토양에 제지부산물을 생으로 또는 발효시켜 처리하였을 때 여러 가지 토양전염병과 지상부 병을 억제하는 능력이 있는 것 같다고 밝혔다.

유기물이 지상부 병에 어떤 영향을 발휘하는지에 대한 연구는 별로 없다. 이러한 상황에서 지상부 병 억제 효과에 대한 보고라는 점에서 의미 있는 연구 결과라 할 수 있다.

출처 : Plant Disease 87:1037-1042, 9월호

3. 천연물 유래의 환경친화적 식물성장조절제 개발(일본)

일본 과학 기술진흥사업단이 일본 제논에 위탁했던 천연물계 식물성장 조절제의 개발에 성공했음을 발표했다. 자스민에 함유된 자스몬산에서 새로운 유도체를 발견, 농약등록에 성공한 것이다.

자스몬산은 열대, 아열대산 목서과 식물인 자스민에 함유된 천연 화합물로서, 최근 다양한 식물생리작용에 대한 연구가 진행 중에 있으며, 새로운 식물 호르몬으로서 널리 알려지고 있다. 최근의 연구결과에서는 자스몬산의 사용 농도를 조절하면 성장촉진 작용이나 억제작용을 선택할 수 있어 자스몬산 유도체를 식물성장 조절제로서 활용 가능한 것으로 나타났다.

이번 개발에서는 분자구조를 부분적으로 바꾼 각종 자스몬산 유도체를 합성해 실제 농장에서 유효한 물질을 탐색한 결과, 식물에 대한 강한 성장촉진 작용 등을 유지하면서 농장에서 실용적으로 사용할 수 있는 신규 자스몬산 유도체(프로히드로자스몬)를 발견했다. 또한 약효-약해시험과 안전성시험, 환경에 대한 영향평가, 잔류성시험 등을 실시해 프로히드로자스몬을 농약 등록하는 데 이르렀다. 프로히드로자스몬은 저농도에서 그 효과를 발휘하며, 환경친화적인 안전한 농약이므로, 앞으로 과실의 수확시기 억제, 착색촉진에 대한 활용, 과수, 다엽, 곡류, 감자류, 야채류 등으로의 폭넓은 사용이 기대된다.

출처 : <http://www.jst.go.jp/pr/report/report355/index.html>

4. Siderophore 분비 미생물 비료(인도)

슈도모나스 종(*Pseudomonas sp.*)이 생성하는 시데로포어(siderophores)는 그 세균이 이용하거나 식물 영양에 영향을 미칠 수 있다. 석회질 토양에서는 특히 철 불용성 문제를 시데로포어를 생성하는 형광성 슈도모나드 계통 세균을 도입함으로써 극복될 수도 있다.

인도 G.B. 판드농업기술대학(G.B. Pant University of Agriculture and Technology)의 B. N. Johria 연구팀은 시데로포어를 생성하는 슈도모나스 계통의 GRP3 세균을 사용하여 포트시험으로 미생물 시데로포어가 콩 종류의 하나인 명빈(mung bean) *Vigna radiata* L. Wilzeck의 철 영양에서의 역할을 조사하였다. 이들은 호글랜드 용액에 Fe-citrate, Fe-EDTA, Fe(OH)₃를 여러 농도로 처리하여 포트시험에 사용하였다.

45일 후 식물은 위황 증상이 줄어들었고, GRP3 세균을 처리한 식물에서는 엽록소 함량이 증가하였다. GRP3 세균처리로 뿌리에서 퍼옥시다제(peroxidase) 활성이 증가하였고 카탈라제 활성이 감소하였다.

Fe-citrate를 GRP3와 함께 처리했을 때 엽록소 a, b, 총 엽록소 함량이 대조와 비교해서 각각 34, 48, 39% 크게 증가하였다. 같은 처리에서 퍼옥시다제 활성은 82% 증가했으나 반면 카탈라제 활성은 33% 감소했다. 또한 총 철과 생리적 가용 철이 크게 증가하였다.

엽록소 함량과 퍼옥시다제에서 관찰되는 이러한 경향은 카탈라제의 예외를 제외하고 Fe-EDTA와 Fe(OH)₃를 처리한 식물에서도 매우 비슷하게 관찰되었다.

이 시험 자료로 볼 때 명빈에 GRP3가 있으면 세균이 분비한 시데로포어를 식물이 이용하는 것으로 판단된다고 연구자들은 기술하였다. 시데로포어 생성 체계는 식물에 철 이용성을 개선하는 잠재력을 가지고 있으며, 비료 사용량을 줄여줄 수 있을 것으로 연구자들은 기대하고 있다.

철은 중요한 생화학적 반응을 촉매하는 약 140개 효소들의 조요소로서 식물의 성장과 발달에서 핵심적인 역할을 하며, 생합성 경로의 여러 단계에서 필요하다. 엽록소 생합성은 식물의 철의 순생리이용성 지표로서 생각되고 있다. 카탈라제와 퍼옥시다제는 중요한 전(前) 헴 효소로서 철 흡수 연구에서 표식자로 사용될 수 있다.

5) *Pseudomonas putida*의 게놈 완전 해독(독일)

Rockville의 TIGER(the institute for genomic research)의 연구진들과 독일의 4개 연구 센터의 연구진에 의해 미생물 *Pseudomonas putida*의 genom 전체가 완벽하게 해독되었다. 이 미생물은 식물의 성장을 촉진하며, 식물의 질병을 치료하는데 유용할 뿐만 아니라 토양속의 유기성 오염물질의 치료개선에도 유용가능성이 있는 미생물로 알려져 있다. 게놈의 완전 분석 즉 해독결과는 *Pseudomonas putida*의 복잡하고 다재 다능한 대사과정의 이해를 명백하게 밝혀주는 것이며, 이는 또한 토양 미생물에 관한 실험실 수준의 실험에서 매우 중요한 역할을 수행할 수 있도록 해주고 생물학적 치료 개선(biomediation) 및 다른 용도의 이용을 위해서도 매우 큰 잠재 가능성을 부여하는 것이다.

*Pseudomonas putida*는 산소가 있는 온대성 기후의 토양과 물에서 발견되는 fast growing 미생물중의 하나이다. 최근까지 작물의 뿌리 영역에서 콜로니를 형성할 수 있기 때문에 과학자들은 생물-살충제(biopesticides)의 개발과 식물의 성장촉진제의 개발을 위한 미생물 공학적 연구에 이용하고자 노력하여 왔다. 또한 지방성 화합물(aliphatic) 또는 방향성 탄화수소(hydrocarbon)와 같은 독성이 강한 유기성 오염물질을 치료, 개선할 수 있는 다재 다능한 대사 기작을 가지고 있기 때문에 매우 광범위하게 연구되어 왔다.

게놈 해독결과 *Pseudomonas putida*는 거의 6.2백만 DNA 염기쌍으로 이루어진 단일 환상 염색체를 가지고 있으며 Penylalkanoates, ferulate, vanilate 및 conlferyl등을 포함하는 방향성 화합물들을 alcohols, aldehydes와 acid으로 전환시키는 대사 기작을 가지고 있다는 것도 발견되었다.

이번 게놈 해독 연구는 천연물질의 생산, 오염된 서식처의 개선, 식물병의 치료 및 생물공학 등 여러 가지 다양한 분야에서 활용되리라고 기대된다.

출처 : <http://www.eurekalert.org>

References

Aguilar, C.A. and J.M. Barea, 1997. Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture : significance and potentials. 1997. *Scientia Horticulture* 68:1-24.

Barber, D.A. 1978. Nutrient uptake. In interactions between nonpathogenic soil microorganisms and plants (Dommergues Y.R. and S.V. Krupa, Eds.). Elsevier, Amsterdam, pp. 131-162.

Brown, M.E. 1974. Seed and root bacterization. *Annu. Rev. Phytopathol.* 12:181-197

Callan, N.W., Mathre, D.E., Miller, J.B., and Vavrina, C.S. 1997. Biological seed treatments: factors affecting their efficacy. *Hort Science.* 32:179-183

Cho, S.K., Seo, H.Y., Oh, Y.B., Lee, E.T., Choi, I.H., Jang, Y.S., Song, Y.S., Min, T.G. 2000. Selection of coating materials and binders for pelleting onion (*Allium cepa* L.) seed.. *Korean Society for Horticultural Science, J.* vol. 41(6):593-597.

Glick, B.R., C.P. Liv., S. Ghosh and E.B. Dumbroff. 1997. Early development of canola seedlings in the presence of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* Gliz-z. *Soil Biology and Biochemistry* 29(8):1233-1239.

Dashti, N., F. Zhang., R. Hynes and D.L. Smith. 1997. Application of plant growth-promoting rhizobacteria to soybean (*Glycine max* (L) Merr.) increases protein and dry matter yield under short-season conditions. *Plant and Soil* 188(1):33-41.

Defreitas, J.R. Banerjee and J.J. Germida. 1997. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Biol. Fertility of soils* 24(4):358-364.

Duffy B.K., Defago. G. 1999. Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2429–2438.

Grellier P., Riviere L.M., Renault. 1999. Transfer and water retention properties of seed pelleting materials. *European Journal of agronomy*, 10 : 57–65.

Khan, A.A., Maguire, J.D., Abawi, G.S. and Ilyas, S. 1992. Matricconditioning of vegetable seeds to improve stand establishment in early field plantings. *J. American Society for Horticultural Science.* 117:41–47.

Kim, W.G. 1996. Pathogenicity of anastomosis Groups and cultural types of *Rhizoctonia solani* on crops. *Korean J. Plant Pathol.* 12(1): 21–32.

Kloepper, J.W., and M.N. Schroth. 1978. Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. In *processing of the 4th international conference on plant pathogenic bacteria*, Vol. 2., Station de pathologie vegetale et Phytobacteriology, Angers, France, p. 879.

Klopper, J.W. and Schroth, M.N.(1981). Relationship of *in vitro* antibiosis of plant growth-promoting rhizobacteria to plant growth and the displacement of root microflora. *Phytopathology* 71:1020–1024.

Kaufman, G. 1991. Seed coating: a tool, for stand establishment; a stimulus to seed quality. *HortTechnology* 1(4):98–102.

Kobayashi, M. 1972. Utilization of photosynthetic bacteria. 4th Int. Symp. of Fermentation Technology at Kyoto, Japan (March 19th–25th).

Koedam, N., E. Wittouck, A. Gaballa, A. Gillis, M. Hofte, and P. Cornelies. 1994. Detection and differentiation of microbial siderophores by isoelectric focusing and chrome azurol S overlay. *Biometals* 7:287–294.

Kommedahl, T. and MEW, I.C.(1975). Biocontrol of corn root infection in the field by seed treatment with antagonists. *Phytopathology* 65:296-300.

Lazarovits, G. and J. Nowak. 1997. Rhizobacteria for improvement of plant growth and establishment. *HortScience* 32(2): 188-192.

Lewis, M.W., Hebbard, J.A., and Lumsden, R.D. 1997. Seed treatment with a fungal or a bacterial antagonist for reducing corn damping-off caused by species *Pythium* and *Fusarium*. *Plant Dis.* 81:450-454.

Lifshitz, R., J.W. Kloepper., M. Kozlowski., C. Simonson., J. Carlson., E.M. Tipping. and I. Zaleska. 1987. Growth promotion of canola (rapeseed) seedling by a strain of *Pseudomonas putida* under gnotobiotic conditions. *Can. J. Microbiol.* 33:390-395.

Linget, C., P. Azadi, J. K. Macleod, A. Dell, and M. A. Abdallah. 1992. Bacterial siderophores: the structures of the pyoverdins of *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525. *Tetrahedron Lett.* 33:1737-1740.

Lugtenberg, B.J.J. and De kkers, L.C. 1999b. What makes pseudomonas bacteria rhizosphere-competent. *Environ. Microbiol.* 1: 9-13.

McDonald, M.B. 1998. Seed quality assessment. *Seed Science Research.* 8:265-275.

McDonald, M.B. 1995b. Standardization of seed vigour tests. pp 88-97 in H. A. van de venter (Ed.) *ISTA seed vigour testing seminar*. Copenhagen, ISTA.

O'Callaghan, M., Gerard, E.M. and Johnson, V.W. 2001. Effect of soil moisture and temperature on survival of microbial control agents. *Plant protection New Zealand.* 54:128-135.

Orlikowski, L. 1987. Biological control of fusarium wilt of carnation. *Acta Hort.* 216:101-104.

Rooney, Kelly, Joel Canestrino and John Walsh. 1999. Establishment and Yield of Coated Alfalfa Seed in Commercial Fields. American Forage and Grassland Council Abstracts Vol. 8:69-70.

Sarig, S., Y. Kapulnik. and Y. Okon. 1988. Improvement of the water status and yield of field-grown grain sorghum(*Sorghum bicolor*) by inoculation with *Azospirillum brasilense*. J. Agric. Sc I.(Can tab.) 110:271-277.

Shah-Smith, D.A., and R.G. Burns. 1997. Shelf-life of a biocontrol *Pseudomonas putida* applied to sugar beet seeds using commercial coatings. Biocontrol Sci. Technol. 7:65-74.

Tonkin, J.H.B. 1984. Pelleting and other presowing treatments. Adv. Res. Technol. Seeds 9:94-127.

Wade, R. H., C. S. Hoveland and A. E. Hiltbold. 1972. Inoculum Rate and Pelleting of Arrowleaf Clover Seed. Agron. J. 64:481-483.

Wei, G., Kloepper, J.W., and Tuzun, S. 1996. Induced systemic resistance to cucumber diseases and increased plant growth by plant growth-promoting rhizobacteria under field conditions. Phytopathology 86:221-224.

Wei, G., Kloepper, J. W., and Tuzun, S. 1996. Evaluation of induced systemic resistance and plant growth promotion with mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria strains in the field. In: W. Tang, R.J. Cook, and A. Rovira, eds. Advances in Biological Control of Plant Diseases. China Agricultural University Press, Beijing. pp. 223-226.

Whiteraw, M.A., T.J. Harden. and G.L. Bender. 1997. Plant growth promotion of wheat inoculated with *penicillium badicum* Sp-Nov. Australian J. Soil Research 35(2):291-300.

Whipps, J.M. 1997. Development in the biological control of soil-borne plant pathogens. Advances in Botanical Research Incorporating Advances in Plant Pathology 26:1-134.

Willy, L., Y. Okon. and R.W.F. Hardy. 1983. Enhanced mineral uptake by *Zea mays* and *Sorghum bicolor* roots inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45(6):1775-1779.

Zehnder, G., J. Kloepper., C.B. Yao. and G. Wei. 1997. Induction of systemic resistance in cucumber against cucumber beetles. *J. Economic Entomology* 90(2):391-396.

Zhang, F., N. Dashti., R.K. Hynes and D.L. Smith. 1997. Plant growth-promoting rhizobacteria and soybean(*Glycine max* L. Merr.) growth physiology at suboptimal root-zone temperature. *Ann. Bot.* 79(3):243-249.

Zhang, S., Reddy, M. S., Kokalis-Burelle, N., Wells, L. W. Nightengale, S. P., Kloepper, J. W. 2001. Lack of Induced Systemic Resistance in Peanut to Late Leaf Spot Disease by Plant Growth-Promoting Rhizobacteria and Chemical Elicitors. *Plant Dis.* 85:879-884.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.