

GOVP1200609765

최 종
연구보고서

키틴분해 미생물을 다량 함유한
생물기능성 퇴비의 개발

Development of a functional compost containing
multitude chitinase producing bacteria

연구기관 : 전남대학교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “기타분해 미생물을 다량 함유한 생물기능성 퇴비의 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005 년 11 월 15 일

주관연구기관명 : 전남대학교

총괄연구책임자 : 김길용

세부연구책임자 : 김길용

세부연구책임자 : 박노동

세부연구책임자 : 김용웅

요 약 문

I. 제 목

키틴분해 미생물을 다량 함유한 생물기능성 퇴비의 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

게, 새우 껍질 등의 천연 부산물은 우리 나라 동해안을 비롯하여 미국의 알라스카주, 메인주, 캐나다 등 전 세계적으로 분포되어 연간 약 1.5×10^8 톤 정도 생산되고 있다. 이러한 부산물들은 수산물 가공공장을 거쳐 생산량의 일부는 키토산을 제조하는데 사용되고 있으나 대부분은 폐기되고 있는 실정이다. 이렇게 폐기된 천연부산물들을 기존의 방식으로 처리하려면 상당한 비용이 필요하며 기술력 또한 미비한 단계이다. 하지만 주성분의 대부분이 키틴으로 이루어져 있는 이러한 부산물들은 미생물학, 생물학적으로 응용한다고 하면 하나의 크나큰 천연자원으로 활용할 수 있다. 키틴을 생물학적으로 분해하려면 반드시 chitinase를 생산하는 키틴분해 미생물이 관여해야만 한다. 최근 생물학적 방제가 주요한 이슈로 되면서 키틴 및 키틴분해 미생물을 이용한 병해충 방제가 주요한 연구 과제로 떠오르고 있다. 시설재배 주요 채소류의 양묘는 육묘에 의존하는 것이 보편화되어 있다. 육묘용 상토에 성장촉진 및 병충해방제의 2중의 효과가 정식 후 포장에서도 지속된다면 매우 고무적인 일이 될 것이다. 시설재배지의 병원성 곰팡이에 의한 연작장해가 빈번히 일어나는 곳이나 선충의 피해가 자주 발생한 채소류 및 두과작물의 재배지에 기능성 키틴퇴비를 개발 사용함으로써 연작장애의 피해를 줄임과 동시에 시설채소류의 고품질화 증산을 꾀하고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

가) 우리나라에 부존 폐기자원을 활용한 원예용 기능성 키틴퇴비개발

- 나) 키틴퇴비의 기능성 강화 및 지속성 유지를 위한 배지의 적정 환경조성
- 다) 키틴퇴비의 육묘, 고품배지, 포장에서 생장촉진, 병해, 충해에 대한 기능성 검증
- 라) 키틴퇴비의 광범위한 적용성 (육묘, 분화, 양액재배) 검토를 통한 산업화 기술 확립
- 마) 키틴퇴비의 대량생산 제조법 확립
- 바) 관련기술 [i) 부존 폐기자원으로 부터의 키틴분해 미생물의 분리, 동정 기술 ii) 작물의 생장, 병해, 충해에 관련된 기능성 키틴퇴비 개발 iii) 키틴퇴비의 대량 생산]의 특허 및 제품화

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구실에서는 3년간의 연구를 거쳐서 키틴분해 미생물의 분리, 동정 및 기내실험을 통한 특성 파악을 거쳐서 키틴분해 미생물을 다량 함유한 기능성 퇴비의 개발에 성공하였으며 개발된 퇴비를 이용하여서 포트, 소규모포장 및 대규모 포장에서 키틴분해 미생물을 다량 함유한 기능성 퇴비의 식물병 방제 효과 및 식물생장 촉진 효과를 확인하였다. 또한 기술을 주식회사 흙사랑에 이전하였으며 제품화 시키는데 주력하였으며 농가에 보급하는데 적극적인 노력을 기울여 왔다. 앞으로 키틴분해 미생물을 다량 함유한 기능성 퇴비의 연구 결과를 적극 활용하여서 더욱더 새롭고 효과적인 연구 산물을 농가에 보급하고자 한다.

SUMMARY

(영문 요약문)

The chitin compost containing multitude chitinase producing bacteria (Chitin Compost) was manufactured. The enzyme chitinase released from the chitinase producing bacteria which isolated from the coast soil inhibited not only the growth of the soil-boron pathogens but also the egg hatch of *Meloidogyne incognita*. Furthermore, hyphae of pathogens were found destructed by the enzymes and antibiotics produced from the chitinase producing bacteria *via* the light microscopy and scanning electro microscopy study. Chitin Compost showed respectable effect in the biological control of late blight caused by *Phytophthora capsici* in pepper, clubroot in chinese cabbage and root-knot nematode in tomato. The technology in the chitin compost containing multitude chitinase was transferred to the Limited Company LOVE SOIL and in mass production.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Part I Summary of the investigation	9
Chapter 1 Object of the investigation	9
Chapter 2 Requirement and scope of the investigation	9
Part II The present state of the technology in the interior and the outside	11
Chapter 1 Interior	11
Chapter 2 Outside	11
Part III The contents and results of the investigation	13
Chapter 1 Methods in the investigation	13
1. Identification and assay of the chitinase activity in the chitinolytic bacteria	13
2. Preparation of chitin compost	14
3. Possibility of the chitin compost as biological control agent	16
4. Development of bed soil with chitin compost	17
5. Adaptability of chitin compost in the field	18
Chapter 2 Results	22
1. Isolation of chitinolytic microorganisms	22
2. Prepare of the chitin compost with crab shell and agricultural by-product	37
3. Mass product of chitin compost containing multitude chitinolytic bacteria	41
4. Biological control efficacy of chitinolytic bacteria isolated	

from chitin compost	45
5. Effect of chitin compost in the control of plant disease in the pot	46
6. Effect of chitin compost in the control of plant disease in the small scale	61
7. Effect of chitin compost in the control of plant disease in large scale ...	62
Part IV Attain rate the object and contribution in the field	71
Part V Application of the results	74
Part VI References	75

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	9
제1절 연구개발의 목적	9
제2절 연구개발의 필요성 및 범위	9
제 2 장 국내외 기술개발 현황	11
제1절 국내	11
제2절 국외	11
제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과	13
제1절 연구수행 방법	13
1. 게겍질을 이용한 키틴 퇴비개발 및 키틴 분해균의 활성 측정 및 동정	13
2. 키틴퇴비의 조제 및 부숙도 조사	14
3. 키틴퇴비의 생물농약으로서 in vivo 가능성 검토	16
4. 키틴분해균을 이용한 육묘용 상토개발	17
5. 키틴퇴비의 포장 적용성 검토	18
제2절 연구수행 내용 및 결과	22
가. 우수한 키틴분해균의 확보	22
나. 우수한 키틴분해균과 게겍질 및 농업 부산물을 혼합한 실험용 키틴퇴비 조제	37
다. 우수한 키틴분해균을 다량 함유한 키틴퇴비의 대량생산	41
라. 키틴퇴비로부터 직접 분리된 chitinase 생성균의 생물학적 제어능력 조사	45
마. 콧트내에서의 키틴퇴비의 활성 검증	46
바. 키틴퇴비의 소규모 포장에서의 적용 가능성 검토	61
사. 키틴퇴비의 대규모 포장에서의 적용 가능성 검토	62

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	71
제 5 장 연구개발결과의 활용 계획	74
제 6 장 참고문헌	75

제1장 연구개발과제의 개요

제1절 연구개발의 목적

동해안에서 버려지고 있는 게껍질(특히 게의 등 부위, 발부위는 키토산 조제용으로 사용되고 있음)과 농업에서 생산되는 부산물(볏짚, 밀짚 등등)을 이용해서 강력한 키틴분해 미생물이 다량 서식할 수 있는 키틴퇴비를 생산하여 육묘나 포장에 직접 사용해서 병원균의 발병을 줄임으로서 육묘용 상토의 국산화와 키틴분해미생물을 이용한 기능성 부여로 육묘에서 수확까지 성장촉진과 더불어 친환경적인 생물학적 방제의 기반을 마련하고자 한다.

- ① 키틴분해 미생물이 다량 서식하고 있는 키틴퇴비 생산.
- ② 연작장해가 빈번히 일어나는 곳에 기능성 키틴퇴비를 개발 사용함으로써 연작장애의 피해 경감 작물의 고품질화.
- ③ 육묘나 포장에 직접 사용해서 병원균의 발병을 줄임으로서 육묘용 상토의 국산화..
- ④ 기능성 부여로 육묘에서 수확까지 성장촉진과 더불어 친환경적인 생물학적 방제의 기반을 마련.

제2절 연구개발의 필요성 및 범위

1. 필요성

경제가 성장함에 따라 소득이 증가하여 식생활의 개선이 촉진되고 축산물이나 채소류의 수요가 급증하고 있다. 따라서 농업 경영면에서도 소득이 높고 연중 재배가 가능한 시설재배가 증가하고 있다. 시설재배의 특성은 수익성이 높은 특정작물을 전문적으로 재배하게 되어 연작을 하게 된다. 또한 농민들은 생산성을 조금이라도 높이기 위해서 과량의 비료와 농약을 투입하고 있는 실정이다. 이러한 이유로 인하여 대

부분의 시설토양은 과량의 염류가 집적되어있고, 병해가 만연되어 있어 연작장해가 심각하다. 한편, 과다하게 시용된 비료의 일부는 하천이나 호수로 흘러 들어가 부영양화 (eutrophication)를 일으켜 식수원을 오염시키는 원인이 되기도 하며, 또한 자주 살포되고 있는 농약은 환경 생태계를 상당히 파괴시키는 주요 오염원이다. 또한 2004년 농림부에서 발표한 친환경농업육성과 농산물 안전 확보 대책에 따르면 2014년까지 2004년 대비 비료와 합성농약의 사용량을 60%이상 감소하여 친환경농산물의 생산량을 10%이상 증가시키는 것은 목표로 하고 있다.

2. 범위

가. 부존 폐기자원을 활용한 생물 기능성 키틴퇴비 개발

나. 키틴퇴비의 기능성 강화 및 지속성 유지를 위한 배지의 적정 환경조성

다. 키틴퇴비의 육묘, 포장(시설원예 토양 및 노지)에서 성장촉진, 병충해에 대한 기능성 검증

라. 키틴퇴비의 광범위한 적용성 검토를 통한 산업화 기술 확립

마. 키틴퇴비의 대량생산 제조법 확립

- 바. 관련기술 : 1) 부존 폐기자원으로 부터의 키틴분해 미생물의 분리, 동정 기술
2) 작물의 생장, 병해, 충해에 관련된 기능성 퇴비개발
3) 키틴퇴비의 대량생산의 특허 및 제품화

제2장 국내외 기술개발 현황

제1절 국내

국내에서는 최근 십여 년간 근권 미생물의 이용연구와 토양전염성 병해의 생물학적 방제에 관하여 활발히 연구해 오고 있으며 전남대학에서도 유용한 토양미생물을 육묘용 상토와 양액재배에서의 활용에 관한 검토 결과 오이, 멜론 등에 효과가 약간 있으며, 현재로서도 이와 관련된 일련의 연구를 수행하고 있다. 그 이외에 민간회사나 유기농업관련 단체들에 의해서도 기능성 미생물을 함유한 퇴비개발과 관련된 연구를 일부 수행하고 있으나 주목할 만한 결과는 매우 제한적인 상태에 있다.

- 대부분의 연구는 Plant Growth Promoting Regulator의 기능이 있는 미생물이나 Antifungal 효과가 있는 미생물을 토양으로부터 분리 동정하여 이를 실험실에서 액체 배양하여 육묘에 직접 접종하여 식물의 초기생장을 조사하였다. 대부분의 배지(또는 토양)은 멸균된 상태여서 접종된 균이 상당기간 육묘의 근권 주위에서 서식하면서 식물의 생장을 돕거나 병의 발생을 억제하였다.
- 실제로 양액 재배 시 유효균을 다량 배양하여 토마토, 상추, 오이 등의 배양액에 희석하여 접종하였을 때 상당한 수확량과 품질이 향상되었다. 그러나 배양액이 최소한 일주일 간격으로 투입되어야 효과를 보였으므로 경제적으로 매우 불리하였다.
- 그러나, 유효균을 대량 배양하여 비닐하우스 내 토양에 접종하였을 때 그 효과는 매우 미미하거나 없었다. 또한 실제 몇몇 회사에서 생산한 배양액(주로 *Bacillus* sp., *Pseudomonas*, 광합성 세균 등을 포함) 또는 고형 제제(주로 *Bacillus* sp.의 spore, *Pseudomonas*, 광합성 세균, 등을 포함)를 비닐하우스내 토양에 접종하였을 때도 마찬가지로 거의 효과가 없었다.

제 2 절 국외

대부분의 접종제로 시판되고 있는 미생물 제제들의 단점은 외국에서도 마찬가지로 토양내서 효과가 미미하다는 점이다. 1960년대 초 러시아에서 인산용해 미생물을 근권토양으로부터 분리하여 *Bicillus megatherium* var. *phosphaterium*이란 상품명으로 시판하였다. 이 제제를 이집트와 미국에서 도입하여 포장에서 식물에 접종효

과를 관찰하였을 때 효과는 거의 없었다. 미국의 유명한 토양미생물학자인 Alexander에 따르면 외부로부터 도입된 균주는 짧은 기간동안은 성장이 가능하나 시간이 지남에 따라 균집의 감소와 함께 활동도가 현저히 떨어진다고 했다. 왜냐하면 토양에는 수많은 토착미생물이 서식하기 때문이다.

- 한편, PGPR균인 균근균의 경우 미국의 Tree of Life Nursery사의 VAM 80, Reforestation Technologies International의 Myco-Paks 및 Bio-Organics 사의 접종제제가 시판중에 있고, 캐나다의 Premier Tech사는 PRO-MIX 'BX' 라는 상표로 *Glomus intraradices*라는 내생균근균을 육묘용 상토에 배합한 제품을 개발하여 시판하고 있다.
- 영국에서는 MicroBio라는 회사가 10년전부터 know-how를 축적하여 Vaminoc[®]과 Vaminoc[®]-T라는 상표의 입자상의 제품을 소채작물 수경재배 접종용으로 시판하고 있을 뿐더러 이웃 일본에까지 이 회사와 제휴한 "Dr Kinkon"이라는 상표의 제품이 공급되고 있는 실정에 있다. 그러나 실제 이들 제품도 제한된 환경하 (환경조절실 등)에서는 그 효과가 인정되나 포장에서는 아직도 미미한 상태다.
- *Bacillus* sp.의 경우에도 많은 연구자나 회사의 관심의 대상이었다. 이 균을 액체 배양하거나 고형배지에 대량 배양하여 포자상태로 포장하여 시판하고 있으나 포장에서의 효과는 미미하다고 알려져 있다.
- ARBICO Pro-Biotica[™] 라는 상표로 최근 들어서 ARBICO 라는 회사에서 퇴비 첨가제를 개발하여 시판하고 있으며 그 효과는 검증 중이다.

제3장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 연구수행방법

1. 게겍질을 이용한 키틴 퇴비개발 및 키틴 분해균의 활성 측정 및 동정

가. Chitinase 활성이 강력한 미생물의 확보

전남 일대의 해안가를 중심으로 게겍질 및 키틴질을 다량 포함하고 있는 정원의 흙, 발효 및 해안토양을 채취하여 적절히 증류수로 희석한 후 0.1% colloidal chitin이 포함된 agar 배지에 접종하여 콜로니 주위에 투명대(halo zone)를 형성하는 균을 선발한다.

나. 배지상에서 병원균에 대한 chitinase 생성균의 저해효과

각각의 병원성 미생물에 대하여 선발된 chitinase 생성균의 항진균성 저해효과를 알아보기 위하여 *Fusarium oxysporum* (시들음병균), *Rhizoctonia solani* (모잘록병) 등을 chitinase 생성균과 paper disc method 등에 의해 plate에 대치배양하여 저해거리를 측정하고, 뿌리혹선충 (Root-knot nematode)에 대한 저해효과는 광학, 전자현미경 상에서 실제적인 변화를 관찰한다.

다. 우수한 chitinase 생성균의 동정

병원성 미생물에 대한 저해능력이 강한 chitinase 생성균을 선발하여 분리, 동정한다. 동정된 미생물은 키틴퇴비를 대량 생산 하는데 있어 중요한 생물학적 접종제(inoculant)로 사용된다.

1) 16S rRNA 유전자 염기서열 : 총 DNA를 각각의 미생물로부터 분리한다. 순수하게 분리된 각각의 DNA는 두 개의 primers (Y1, 5'-tggtcagaacgaacgctggcggc-3' ; Y2, 5'-cccactgctgcctcccgtaggag t-3')와 함께 polymerase chain reaction 방법을 이용해서 DNA를 증폭시킨다. Y1 과 Y2는 *E. coli* 16S rRNA gene의 20-43bp 와 361-338bp에 상응하는 서열로써 대부분의 bacteria는 이 서열들을 16S rRNA gene에 가지고(highly conserved)있다. 증폭된 DNA는 TA cloning vector에 ligation 하여 *E. coli*에 transformation 한 후 single colony를 찾는다. 이 single colony를 LB broth에

서 배양한 후 plasmid extraction method에 의해서 다량의 plasmid를 얻는다. 이 plasmid로부터 삽입된 부위를 전기영동을 통해서 gel 상에서 확인한 후 삽입된 DNA 서열을 automatic DNA sequencing machine 사용하여 결정한다. Sequence 된 DNA는 Gene Bank인 NCBI에서 저장된 자료의 모든 서열과 Computer Blast Program을 이용해서 비교한 후 homology 정도를 확인하고 동정한다.

2) Scanning Electron Microscope (SEM) : LB 배지상 항온(30°C) 하에서 1 일간 자란 각각의 균주를 20 ml vial에 넣고 여기에 10 ml의 4% glutaraldehyde (in cacodylate buffer)로 고정한다. 하룻밤 동안 4°C에서 보관한 후 cacodylate buffer로 3회 세척한다. 그 후 50, 75, 90, 100% ethanol로 각각 dehydration 한 후 t-butyl alcohol로 3회 세척한다. 그 후 -20°C에서 freezing 한 후 동결건조법으로 건조하여 보관한다. 보관된 시료를 필요에 따라서 Scanning electron microscope 하에서 균의 크기, 형태, 포자, 편모 등을 관찰한다.

2. 키틴퇴비의 조제 및 부숙도 조사

키틴상토에 들어가는 재료는 계껍질 5~30%, Vermiculite 10~20%, 벚짖 30~40%, 쌀겨 5~15%, 질소비료 0.5~2%, Rock phosphate 1~3%, 규산비료 0.05%, 칼륨비료 0.1~0.5%, 우수한 키틴분해균포함 접종제(Inoculant) 0.01~1%로 혼합후 수분함량은 50% 전후로 유지하여 10~100ℓ의 소규모와 5,000~20,000ℓ의 대규모로 제조하여 약 6개월 동안 부숙시킨다. 부숙도는 4주 단위로 시료를 채취하여 각 항목을 측정한다. 유기물 농도는 회화법에 의하여 결정하고, 총질소는 Kjeldahl법에 의해, 토양 pH는 1:10 부피비로 증류수와 혼합한 후 유리전극법으로 측정하고 EC는 EC meter로 측정한다. 양이온(Ca^{2+} , Mg^{2+} 등)은 침출시킨 후 ICP(Inductively Coupled Plasma)에 의해 측정한다. 가용성 인산은 Lancaster법에 의해 추출하고 UV spectrophotometer를 사용하여 660nm에서 측정한다. 또한 효소활성과 부숙도를 추적함으로써 부숙 정도를 알아낸다.

가. 키틴퇴비의 활성 및 생물학적 제어력 측정

1) 키틴퇴비에서 미생물상 조사

키틴퇴비는 멸균하지 않은 게겍질, Vermiculite, 벚짚, 쌀겨 등에 우수한 키틴분해균을 포함한 inoculant 0.1~1.0%로 혼합하여 만든 것이다. 처음 혼합했을 때에는 일부 병원성 fungi, 박테리아, 소수의 chitinase 생성균이 포함되었으리라 생각된다. 그러나 키틴퇴비가 부숙 되어감에 따라 세포벽이 chitin으로 구성되어 있는 사상균의 개체수는 현저히 줄어드는 반면, chitinase 생성균은 기하급수적으로 늘어날 것으로 예상된다. 따라서 사상균, 세균, chitinase 생성균의 개체수를 비교함으로써 용토내 유용미생물의 활성을 예측할 수 있다. 세균은 yeast extract agar(yeast extract 3g, glucose 1g, K_2HPO_4 0.3g, KH_2PO_4 0.2g, cyclohexamide 0.05g, agar 15g, 증류수 1ℓ)에 접종하여 7일이 경과한 후에 사상균은 Rose bengal agar(KH_2PO_4 1g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g, peptone 5g, glucose 10g, rose bengal 0.033g, streptomycin sulfate 0.033g, agar 20g, 증류수 1ℓ)에 접종하여 4일이 경과한 후에 계수한다. 한편 접종제에 포함되어 있었던 우수한 chitinase 생성균이 얼마나 증식되었고, 또한 키틴퇴비내에 어느 정도 우점하는가를 알아보기 위해서 colloidal chitin이 포함된 배지에서 배양하여 개체수를 측정하고 이어서 16S rRNA sequence, GC-FAME, Scanning Electron Microscope 방법을 이용하여 동정한다.

2) 키틴퇴비로부터 분리·동정된 미생물의 효소활성 검정

키틴용토로부터 분리 동정된 chitinase 생성균의 Chitinase를 측정하고자 한다.

- **Chitinase** : 0.15% colloidal chitin을 기질로 하여 배지내 미생물의 분해산물인 N-acetyl-glucosamine이 유리되는 양으로 측정한다.

3) 키틴퇴비에 서식하고 있는 전체 미생물의 효소활성 검정

토양으로부터 효소추출액을 제조하기 위하여 키틴용토 1g당 증류수 2.5ml 비율로 혼합하여 30분간 진탕한 후 10,000 rpm에서 15분 동안 원심분리하여 상등액을 얻는다. 여액 100ml당 황산암모늄 56g을 가하여 4℃에서 12시간동안 방치한 후 10,000rpm에서 15분간 원심분리하여 얻은 침전물을 소량의 냉증류수로 녹인 후 투석하여 동결건조후 냉동보관한다. 이것을 적당한 농도로 희석시킨 것을 조추출

효소액으로 하여 chitinase를 측정한다.

4) 키틴퇴비로부터 분리 동정된 미생물의 병원성 미생물에 대한 저해효과

실제로 키틴퇴비 생산과정중 기하급수적으로 증식한 chitinase 생성균이 각각의 병원성 미생물에 대한 저해능력이 있는지를 알아보기 위하여 배지상에 *Fusarium oxysporum*(시들음병균), 및 *Rhizoctonia solani*(모잘록병) 등을 chitinase 생성균과 paper disc method등에 의해 plate에 대치 배양하여 저해거리를 측정하고, 뿌리혹선충 (Root-knot nematode)에 대한 저해효과는 광학, 전자현미경 상에서 실제적인 변화를 관찰한다.

5) 키틴퇴비 추출물이 병원성 미생물에 대한 저해효과

키틴퇴비 20g을 증류수 100 ml에 넣고 30분 동안 진탕한 후 8,000 rpm에서 15분 동안 원심분리 한 후 상등액을 취하여 동결건조 한 후 일정량을 배지상에 접종하여 병원균의 저해능력을 측정한다.

3. 키틴퇴비의 생물농약으로서 *in vivo* 가능성 검토

키틴퇴비 50, 100, 300, 500g 이 들어 있는 포트나 트레이에 고추, 토마토, 알팔파 등을 과종하고 여기에 병원성 미생물인 *Fusarium oxysporum* (시들음병균), *Rhizoctonia solani* (모잘록병균) 및 Root-knot Nematode (뿌리혹 선충) 등을 접종하여 작물의 성장 및 발병률을 조사한다. 이는 키틴퇴비가 생물학적 제어능력이 있는지 알아보기 위한 실험으로 여러 가지 대조구와 비교함으로써 키틴퇴비의 활성을 직접적으로 측정하는 것이다. 조사항목은 질병 발생률과 함께 토양미생물 밀도(chitinase) 및 병원균의 밀도(*R. solani*, *F. oxysporum*)를 희석평판법에 의하여 계수한다.

- ① **Chitin 분해균** : Colloidal chitin 2%, Na₂HPO₄ 2g, KH₂PO₄ 1g, NaCl 0.5g, NH₄Cl 1g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5g, CaCl₂ · H₂O 0.5g, agar 20g, cyclohexamide 50mg/ℓ, Distilled water 1ℓ
- ② ***Fusarium spp.*** : D-galactose 20g, K₂HPO₄ 1g, KCl 0.5g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5g, Fe-EDTA 0.01g, L-asparagine 2g, agar 15g, PCNB 1g, cholic acid(sodium salt) 0.5g, Na₂B₄O₇ · 10H₂O 1g, streptomycin sulfate 0.3g,

Distilled water 1 ℓ

- ③ **Root-knot Nematode (뿌리혹선충) 분리법** : 일정량의 토양을 증류수로 희석하여 325, 250, 50 mesh를 상하로 끼운 체에 붓는다. 이와 같은 동작을 3회 이상 반복하여 50 mesh에 모인 이물질 등은 제거하고, 250 mesh에 걸린 흙을 325 mesh에 모으고, 그 모인 흙을 비이커에 모아둔다. 한편, 직경이 10 cm, 눈금이 50 mesh 되는 체에 킴와이프 2장을 겹쳐서 깔고, 이체를 물이 담긴 얇은 접시에 놓은후 시계접시를 올려놓고 여기에 분리해둔 선충이 포함된 물을 붓고 다음날 체를 들어내고 물에 모여 있는 선충을 분리한다.
- ④ **뿌리혹선충 알 분리법** : 흙이 형성된 뿌리를 물로 씻어서 1 cm 정도 크기로 잘라서 0.5 % sodium hypochloride를 뿌리가 잠길 정도로 붓고, 고무마개로 두껍을 닫고, 4분간 세게 흔든다. 500 mesh 체에 200 mesh의 체를 끼운 것에 붓고 빨리 NaOCl을 제거한 다음 비이커에 모은다. 이와 같은 동작을 2회 이상 반복하여 더 많은 알을 분리하도록 한다.
- ⑤ **뿌리혹선충의 난낭 염색법** : 선충이 감염된 뿌리를 깨끗이 씻은후 0.15 % Phloxine B (Sigma) 용액에 담근후 15분 정도 정치한다. 염색이 된 부분은 붉게 나타나며, 육안으로도 counting 한다.

4. 키틴분해균을 이용한 육묘용 상토개발

가. 육묘용 기능성 퇴비 구비조건 충족 및 작물생육 측정

- ① 육묘에서 재배까지 번거로운 소독작업을 없애고 병해방제를 위한 농약사용을 줄일 수 있는 키틴퇴비의 활성을 여러 종류의 대조구와 비교하면서 측정한다.
- ② 작물별 전용상토의 개발영역의 확대는 물론 부수첨가제의 적절한 혼합으로 새로운 기능성 유효 상토 개발을 목적으로 식물의 건강상태를 기초로 여러 종류의 대조구와 비교하면서 조사한다.
- ③ 육묘의 뿌리활력 : root mass, root dynamic
- ④ 육묘의 생육상태 및 영양진단 : 생초량, 엽면적, 광합성 능력, 엽록소 측정 (SPAD)
- ⑤ chitinase 생산균수 및 활력 : <상기 기술한 내용과 동일>

5. 키틴퇴비의 포장 적응성 검정

포트 크기는 뿌리의 발육에 영향을 미칠 뿐 만 아니라 정식시 포장으로 들어가는 chitinase 생성균의 숫자와도 바로 연결된다. 따라서 적정 포트 size는 매우 중요하다. 포트 size에 유묘의 건강성과 포장에서의 적응성, 발병률 등을 기초로 조사한다.

1) 육묘용 포트에 정식후 작물생육 및 생물학적 활력조사

Size를 달리한 육묘용 포트에서 육묘의 정식후 육묘의 뿌리 활력과 육묘의 생육상태 및 영양진단을 조사하고 Chitinase 생산균의 수 및 활력을 분석하고자 한다.

2) 키틴분해 미생물이 종자의 발아율에 미치는 영향 조사

- ① 발아율 (germination rate) : 직경 9cm의 페트리디쉬에 키틴분해 미생물을 5 ml씩 접종한 다음 살균된 작물종자 100립씩을 파종하여 30℃에서 배양하여 일차간 작물의 발아율을 조사하였다.

3) 포트 및 포장에서 식물근권의 우점미생물 동정 및 효소활성검정

키틴퇴비 g당 10^8 개체수의 키틴분해 미생물이 서식한다면 식물체당 250 g의 키틴퇴비를 이용해서 육묘 했을 경우 2.5×10^{10} 개체수가 식물체 뿌리 주위에 서식해서 토양환경 속으로 들어간다고 가정할때 과연 포장에서도 뿌리주위에서 그 개체수와 효소활성이 유지되고 있는가를 면밀히 조사 분석한다.

4) 시설재배지 및 노지에 직접 시용한 키틴퇴비가 작물의 생육에 미치는 영향

시설재배지의 연작장애가 빈번히 일어나는 곳이나 선충의 피해가 자주 발생한 두과작물의 재배지에 키틴퇴비를 직접 시용함으로써 연작장애의 경감 및 선충의 피해를 줄임과 동시에 고품질의 작물을 생산하고자 한다.

가) 식물의 생장 및 생리적인 양상 조사

- ① 생초 및 건조수량 측정 : 수확한 시료를 지상부위 및 뿌리로 나누어 생초량 및 건물량을 측정한다.
- ② 토양내 주요 무기 영양소 분석 : 이온크로마토그래피(IC)를 이용하여 주요 무기영양소 양이온(cation : K, NH_4 , Ca, Mg, Na,)과 음이온(anion : PO_4^- , NO_3^- , NO_2^- , Cl^- , SO_4^-)농도를 분석하여 무기 영양소함량을 구한다.

- ③ 비구조성 비탄수화물의 **fractionation**과 **정량분석** : 당 (sugar)은 92% 에탄올로 추출한 후 Anthrone reagent를 사용하여 반응 시킨후 UV spectrophotometer 625 nm에서 총 글루코오스 함량을 측정한다. 다음 0.9를 곱함으로써 sugar함량을 구한다(Koehler, 1950). 전분의 함량은 에탄올 추출후 residues fraction을 건조 후 amyloglucosidase와 α -amylase 효소로서 가수분해 한 후 유리된 glucose 함량을 적정한다. **Fraction**은 sugar 추출후 에탄올 불용성 상태인 pellet을 가지고 gelatin을 형성시킨후 200 mM acetate buffer(pH 5.1)에 amyloglucosidase와 α -amylase를 이용하여 glucose로 유도하여 starch 함량을 구한다. 여기에 1N H₂SO₄로 Fructan을 가수분해 시킨후 농염산과 0.05% Resorcinol과 반응시킨후 UV spectrophotometer를 사용하여 fructose 함량을 측정한다(Davis 와 Gander, 1967).
- ④ **질소화합물 fractionation 및 분석**: 총 질소 (total nitrogen) 분석은 시료를 salicylic acid에 의해 nitrate를 환원시키고(Estin, 1978) 시료 약 200mg을 5% salicylic acid-H₂SO₄에 의해 nitrate를 환원시킨후 무기질화 시킨다. 무기화된 용액시료를 Conway dish에서 미세확산 후 UV spectrophotometer를 사용하여 410nm에서 암모니움 함량을 측정한다. 질소화합물의 추출은 약 200mg의 분말시료를 25mL 의 80% 에탄올 (v/v)로 추출한다. **질산태 질소**의 추출은 에탄올 가용성 액상을Dowex 50 H⁺ column을 통과시켜 시료를 준비한다. Dowex 50 H⁺ column으로부터 25mL의 0.5N의 HCl 로써 elution 시켜 수거한다. **아미노산** 분석용 시료는 Dowex 50 H⁺ column을 0.5N HCl로 elution 시켜 수거한다. 에탄올 비가용성 잔여물은 60℃에서 24시간 건조시킨후 수거하여 **단백질태 질소**의 분석용 시료로서 준비한다.
- ⑤ **단백질(protein) 분석** : 시료를 100 mM NaPO₄ buffer를 사용하여 단백질을 추출하여 protein dye-binding reagent와 반응시킨후 UV spectrophotometer를 사용하여 595 nm에서 단백질 함량을 측정한다 (Bradford, 1976). 전기영동 (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)에 의해 P, K 영양에 따른 저장조직(뿌리, 그루터기)내의 저장단백질 패턴을 분석하고, 예취후 재생기간 동안 저장단백질의 이용성을 특성화한다.

나) 병원성 미생물에 대한 저항력의 지표로서 **항산화 효소의 활성분석**

항산화 효소의 활성을 추출하기 위하여, 생초의 잎과 뿌리를 각각 500mg

을 3ml의 100mM K-PO₄ buffer (pH 7.0)에 2mM EDTA, 1% PVP (MW 40,000), 1mM Phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF, C₇H₇FO₂S)와 함께 막 자사발에서 분쇄되었고, 원심분리기에서 14,000 g로 20분간 4°C에서 원심분리되었다. 상등액은 효소의 활성을 측정하기 위하여 사용한다.

- ① **Peroxidase (POD) 활성측정** : 3ml의 10mM K-PO₄ buffer(pH 7.0)에 20mM guaiacol, 40mM H₂O₂와 10ul 에서 50ul 효소 추출물이 470nm 흡광도에서 1분 동안 ΔA (흡광도의 변화)를 측정한다 (Reuveni, 1995).
- ② **Catalase (CAT) 활성측정** : 240nm에서 60초동안 H₂O₂의 반응에 의한 변화를 spectrophotometer에서 측정하였다. 반응용액은 50mM phosphate buffer(pH 7.0), 15mM H₂O₂에 20 to 50 ul 효소 추출물이 포함되도록 하였다. CAT이 1 unit는 분당 0.01 흡광도의 변화로 정의한다. (Chance and Maehly 1955).
- ③ **Superoxide dismutase (SOD) 활성측정** : 50μM nitro blue tetrazolium(NBT), 1.3μM riboflavin, 13mM methionine, 75nM EDTA, 50nM phosphate buffer(pH 7.8)에 20 to 50 ul 효소 추출물을 3ml로 하여 test tube 를 25°C, 78μmol m⁻²s⁻¹의 반응실에서 15분 동안 반응하여 빛에 의해 반응된 흡광도와 반응하지 않은 용액의 흡광도를 spectrophotometer 560nm에서 측정되었다. SOD 활성 1 unit는 NBT 광반응의 50% 저해되는 효소의 양으로 정의한다 (Giannoplitis and Ries, 1977). 각 효소의 활성은 단백질 단위로 표시한다.
- ④ **Polyphenol oxidase (PPO) 활성측정** : 1 ml의 50mM Citrate-phosphate (pH 6.4)에 30ug 단백질, 5 mM L-proline을 넣고 기질로서 20 mM의 pyrocatechol (1,2- dihydroxybenzene)을 추가후 2분간 흔든 후 515nm 흡광도에서 1분 동안 ΔA (흡광도의 변화)를 측정한다 (Mohammadi 와 Kazemi, 2002).

다) 저항성 호르몬 조절에 관한 분석

- ① **Cytokinin 분석** : 신선한 뿌리 5g을 증류수로 씻은 다음 0.1N NaOH 넣고 간다. 한시간 동안 정치한 후 1500rpm에서 15분간 원심분리 시킨다. ethyl ether 용매를 사용해서 2-3번 정도 추출한다. 추출된 용액은 회전농축기에 농축시킨후 1ml의 메탄올로 회수한다. 추출용액 중 20μl를 취해서 HPLC의 C18

(ODS) column을 이용해 분석한다 (Challice G.D. 1975).

- ② **Proline 분석** : Proline 함량은 ninhydrin 방법 (Bates 등, 1973)에 의해 측정된다. 단백질 추출물 2 mL은 acetic acid 3mL과 ninhydrin reagent 3 mL과 함께 반응 후 100℃에서 1시간 동안 반응 후 식힌다. Toluene 5mL과 함께 골고루 섞은 후 유기층을 520 nm에서 측정하였다.

5) 시설재배지 및 노지에 직접 시용한 키틴퇴비에 대한 작물의 발병을 조사

키틴퇴비에 의한 채소류나 두과작물의 식물병에 대한 생물학적 방제 가능성을 알아보기 위하여 일반 원예용 상토 및 키틴퇴비와 비교실험으로 병원균의 포자 및 선충을 키틴퇴비와 혼합하여 실시한다. 각각의 시험구에 대상작물의 유묘로부터 병원균의 포자체를 토양에 처리하여 성장시키면서 식물생장기간별로 잎수, 신장, 잎면적, 줄기상태 등 식물의 생육상태 및 식물병 발생정도를 주기적으로 관찰한다.

가) 병원성 곰팡이의 발병조사

식물의 질병 발생률은 병원균의 밀도(*R. solani*, *F. oxysporum*)를 희석평판법에 의하여 계수한다.

나) 뿌리혹선충의 발병정도 조사

- ① **뿌리혹선충의 난량(Egg mass) 조사** : 접종 4-6주 후 토마토 뿌리를 씻고 0.15%의 Phloxine B 용액에 15-20분간 담가두면 난량이 붉게 변함으로 쉽게 난량의 숫자를 헤아릴 수 있다.
- ② **뿌리혹선충의 흑지수(Gall index) 판정법^a**

Gall Index system	뿌리에 흑이 생긴 정도 ^b										
	0%	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	100%
0-10	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1-6	1	2	3		4		5			6	
0-5	0	1	2		3			4			5

^a 뿌리혹선충의 흑지수(Gall Index)와 난량지수(Eggmass Index)는 서로 일치하지 않을 수도 있는데, 그 이유는 뿌리혹선충의 종에 따라, 기주에 따라 차이가 있기 때문이다. 즉, *M. hapla*는 흑 1개에 1마리의 선충이 있고 *M. incognita*나 *M. arenaria*는 흑이 크고 한 개의 흑에 여러 마리의 선충이 들어있다. 또 고추 뿌리에는 흑이 작게 생기나 오이, 참외 등 박과류에는 흑이 크게 생긴

다.

^b 뿌리 전체의 25% 이하로 흙이 생겼으면 다시 시험해야 한다.

③ **뿌리혹선충의 알(Egg) 조사** : 접종 4-6주 후 뿌리의 흙을 씻고 0.5% sodium hydrochlorite (NaOCl)를 이용하여 10분간 알을 분리한 다음 알수를 조사한다.

④ **뿌리속의 선충 염색** : Acid-fuchin-lactophenol이나 cotton blue-lactophenol은 뿌리보다 선충을 먼저 염색하므로 이 용액에 담가두면 뿌리속의 선충이 붉게(푸르게) 염색되어 뿌리 속의 선충을 쉽게 헤아릴 수 있다. 과도하게 염색되었을 때는 lactophenol을 이용하여 탈색시킨다.

⑤ **뿌리의 썩은 정도 판정법**

$$[1\text{등급 식물체} \times 1] + [2\text{등급} \times 2] + \dots + [5\text{등급} \times 5]$$

$$\text{썩음지수} = \frac{\text{처리구의 전체 식물체 수} \times 5}{\text{처리구의 전체 식물체 수} \times 5} \times 100$$

안썩음 = 0, <10% = 1, 11-25% = 2, 25-50% = 3, 51-75% = 4, 76-100% = 5

실험 결과는 SAS의 GLM을 이용하여 분석하고 Duncan's multiple range test 혹은 Probit analysis를 이용하여 상호비교한다.

제2절 연구수행 내용 및 연구결과

가. 우수한 키틴분해균의 확보

1) 균의 분리 및 동정

1년차 및 2년차의 실험을 거쳐서 1% colloidal chitin 배지내에서 colony 주위에 투명대를 형성하는 균주를 선별하는 방식으로 키틴분해 능력이 강한 미생물을(그림 1) 대량 분리 하였으며 기내 실험을 통하여 그 미생물들의 항 병원성 곰팡이 및 항 선충 활성을 확인하고 동정을 실시하였다. 동정된 키틴분해미생물을 병원균 (*Rhizoctonia solani*와 *Fusarium oxysporum*)과 대치배양하여 저지대를 형성하는 균주 및 선충 난당파괴 능력이 강한 균주 8종을 최종 선발하여 키틴퇴비 제조에 사용하였다.



그림 1. 키틴분해미생물의 투명대형성

분리된 균주들은 세포벽이 키틴질로 알려져 있는 병원균 *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* 및 *Fusarium solani* 등을 대상으로 하여 항병원성 곰팡이 활성을 chitin : PDA= 1 : 1 배지에서 확인하였다 (그림 2).

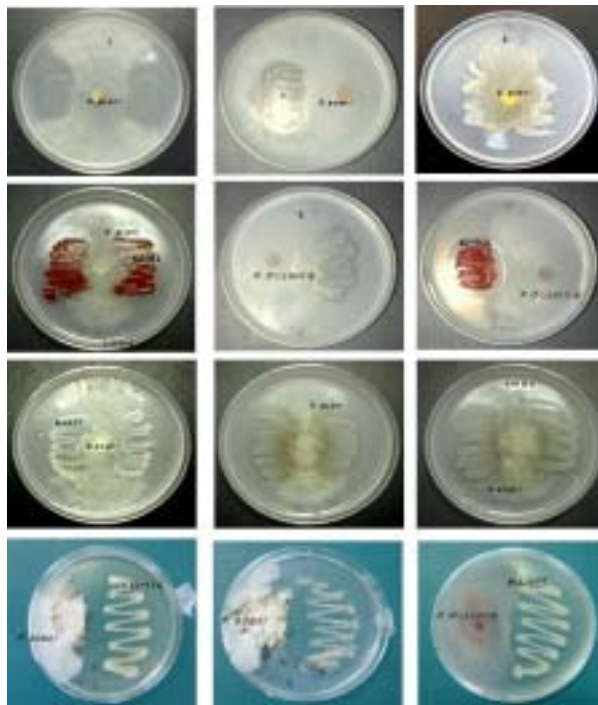


그림 2. *R. solani*에 대한 각 균주의 항균 활성

분리된 키틴분해미생물의 배지내에서의 곰팡이 저해력을 기초로 *R. solani*에 대한 제어력을 SEM(Scanning Electron Microscopic) 사진을 통하여 곰팡이 균사가 파괴되는 것을 확인하였다 (그림. 3, 4 및 5).

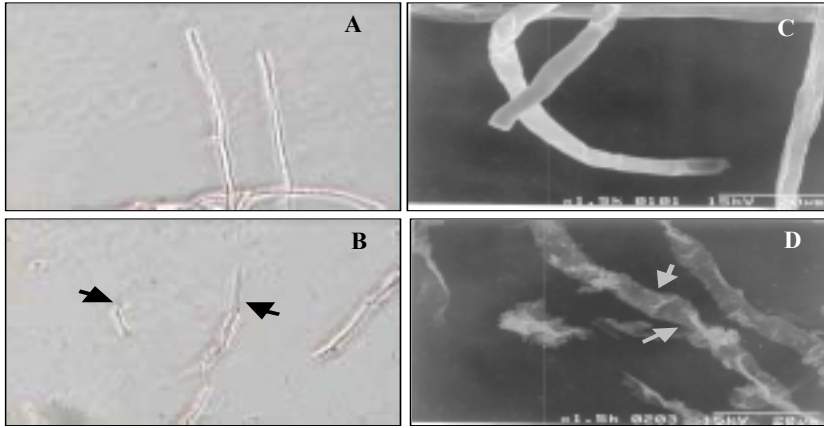


그림 3. KJA-424가 *R. solani* hyphae에 끼치는 영향. A: *R. solani*의 정상적인 모양, B: KJA-424에 의해 모양에 변형된 *R. solani*, (In light microscope), C: *R. solani*의 정상적인 모양, D: KJA-424에 의해 모양에 변형된 *R. solani* (In scanning electron microscopic)

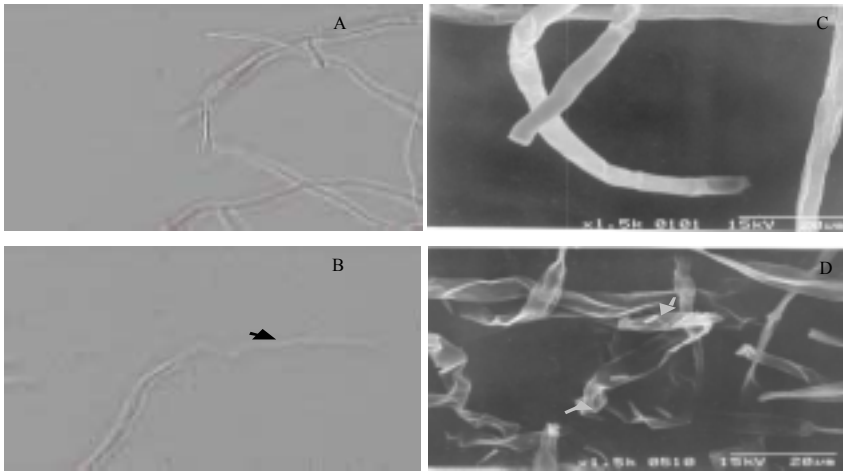


그림 4. KJA-118이 *R. solani*의 균사성장에 끼치는 영향 A: *R. solani*의 정상적인 모양, B: KJA-118에 의해 모양에 변형된 *R. solani* (In light microscope) C: *R. solani*의 정상적인 모양, D: KJA-118에 의해 모양에 변형된 *R. solani* (In scanning electron microscopic)

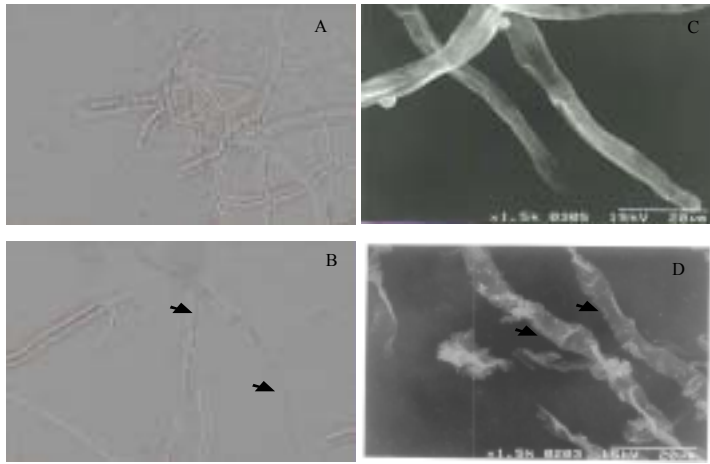


그림 5. HJ-928이 *R. solani*의 균사성장에 끼치는 영향 A: *R. solani*의 정상적인 모양, B: HJ-928에 의해 모양에 변형된 *R. solani* (In light microscope) C: *R. solani*의 정상적인 모양, D: HJ-928에 의해 모양에 변형된 *R. solani* (In scanning electron microscopic)

분리된 키틴분해미생물은 병원성곰팡이의 균사생장을 저해할 뿐만 아니라 주요한 뿌리혹선충의 하나인 *Meloidogyne incognita* 의 난낭의 부화를 저해 하는 것으로 확인되었다(그림 6, 7).

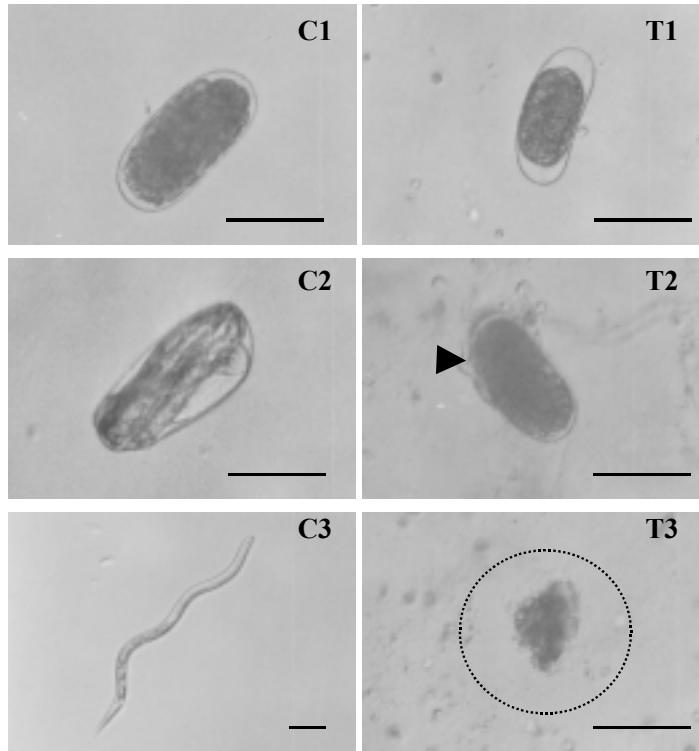


그림 6. KJA-424가 선충 *Meloidogyne incognita* eggs의 morphology에 끼치는 영향.

C1: 0일째의 *M. incognita* eggs, C2: 4일째의 *M. incognita* eggs (1차 juvenile), C3: 7일째의 *M. incognita* eggs (2차 juvenile) (C: control로 water에서 배양한 것). T1: 0일째의 *M. incognita* eggs, T2: 4일째의 *M. incognita* eggs, T3: 7일째의 *M. incognita* eggs (T: KJA-424 배양액에서 배양한 것). The scale bar is 50 μ m.

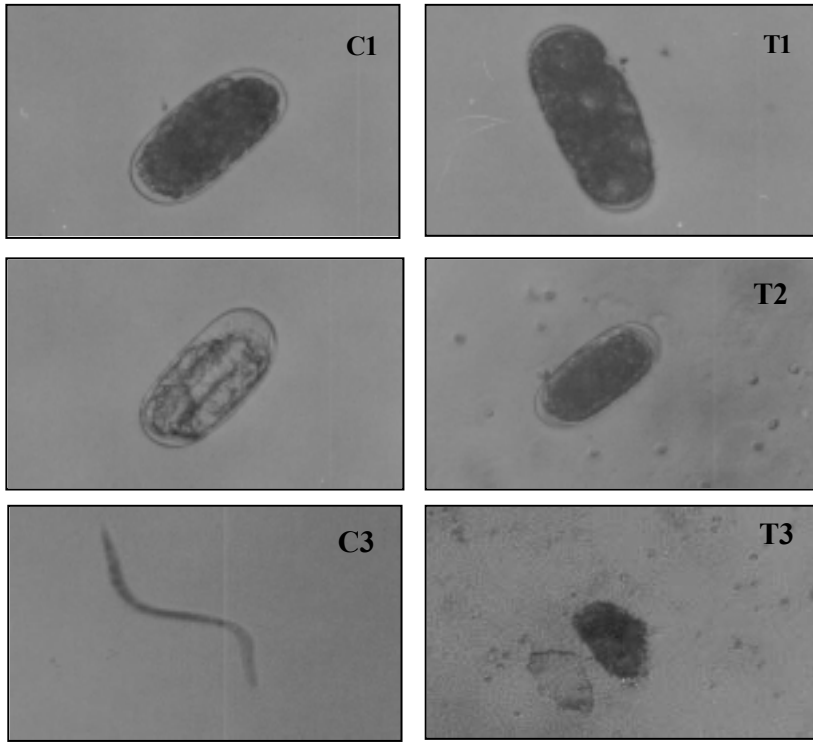


그림 7. KJA-118이 선충 *Meloidogyne incognita* eggs의 morphology에 끼치는 영향.

C1: 0일째의 *M. incognita* eggs, C2:4일째의 *M. incognita* eggs (1차 juvenile), C3: 7일째의 *M. incognita* eggs (2차 juvenile) (C: control로 water에서 배양한 것). T1: 0일째의 *M. incognita* eggs, T2:4일째의 *M. incognita* eggs, T3: 7일째의 *M. incognita* eggs (T: KJA-118배양액에서 배양한 것). The scale bar is 50 μ m.

그림 6 및 7에서 보는 것과 같이 물에서 배양된 선충은 시간이 경과함에 따라 단계 별로 큰 유충을 형성하지만 KJA-424와 KJA-118함께 자란 선충은 그 성장이 control에 비해 크게 저해된 것을 볼 수 있었다. 그리고 4일째 되는 날은 화살표에서 보여주듯이 부분적인 eggshell 모양의 변형을 관찰할 수 있었다. 7일째 되는 날 선충은 더 이상의 성장을 보이지 못하고 eggshell이 완전히 파괴되었다.

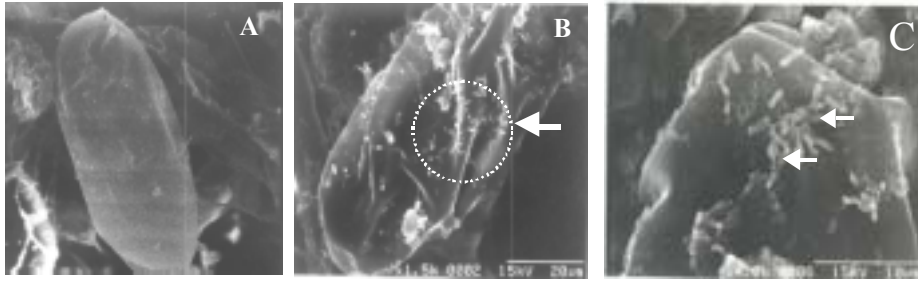


그림 8. KJA-424와 KJA-118과 함께 배양시킨 선충, *Meloidogyne incognita* eggs의 Morphology 변화. A: *M. incognita* egg의 정상적인 모양, B: KJA-424와 함께 배양된 *M. incognita* egg C: KJA-118와 함께 배양된 *M. incognita* egg (in scanning electron microscopic). The scale bar is 20 μ m.

그림 8은 1.6×10^7 cfu/ml의 KJA-424와 KJA-118를 *Meloidogyne incognita* eggs와 함께 배양시켰을 때 선충의 형태가 변화하는 과정을 SEM을 통해 찍은 것이다. 사진에서 보듯이 KJA-424와 KJA-118는 *M. incognita* eggs에 강하게 부착하여 정상적인 모양을 잃게 함으로서 피해를 일으키는 것으로 확인되었다.

또한 균 배양액 내의 효소 활성 측정을 근거로 KJA-424, HJ-928,와 KJA-118을 SDS-PAGE후 Active staining 한 결과 다음과 같은 chitinase 활성 band를 확인할 수 있었다 (그림. 9).

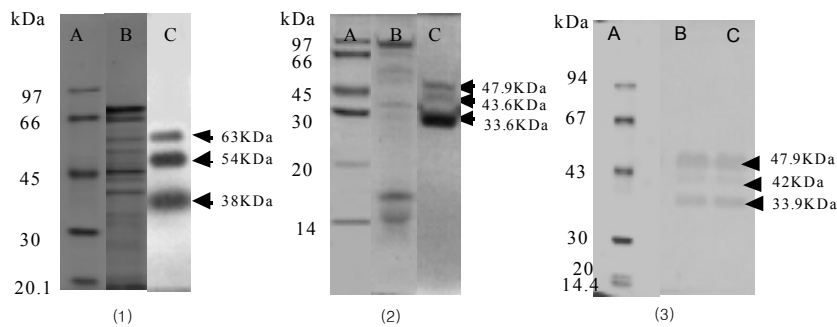


그림 9. KJA-424 (1)와 HJ-928(2), KJA-118 (3)의 균배양액 조효소액을 SDS-PAGE후 chitinase active staining 한 결과 A: maker, B: SDS-PAGE, C: Active staining

KJA-424는 63, 54, 38kDa, HJ-928은 47.9, 43.6, 33.6kDa, KJA-118는 47.9, 42, 34.8kDa의 isoform을 각각 보여주었다.

분리된 키틴분해 미생물들은 다량의 chitinase 효소를 생성함으로써 병원성 곰팡이나 선충의 난당을 파괴할 뿐만 아니라 향생물질도 생성함을 확인하였다. 2년에 거친 실험에서 아래와 같은 물질들이 생성됨을 확인하였다(그림 10 및 11).

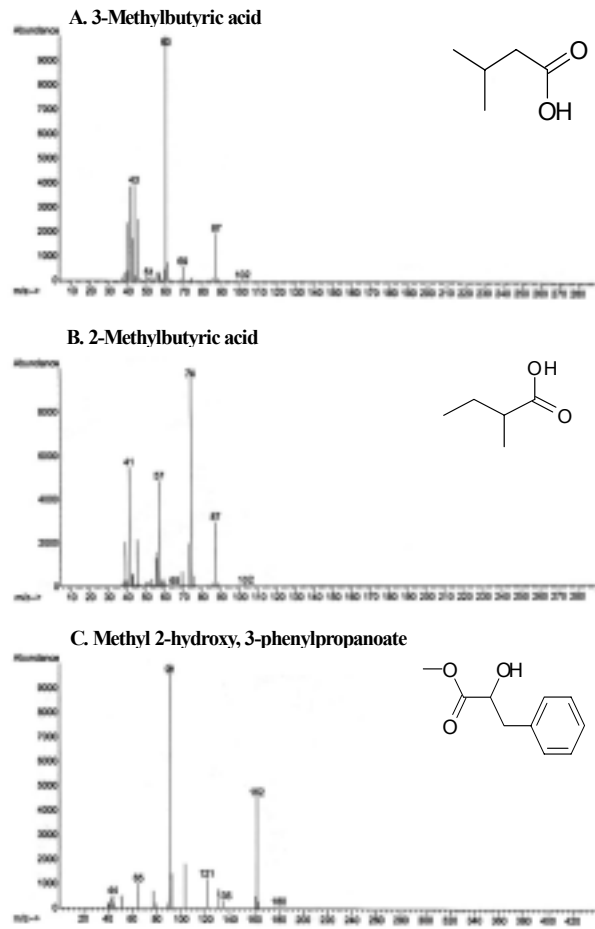


그림 10. HJ-927로부터 분리되는 세가지 향균물질의 Mass spectrum

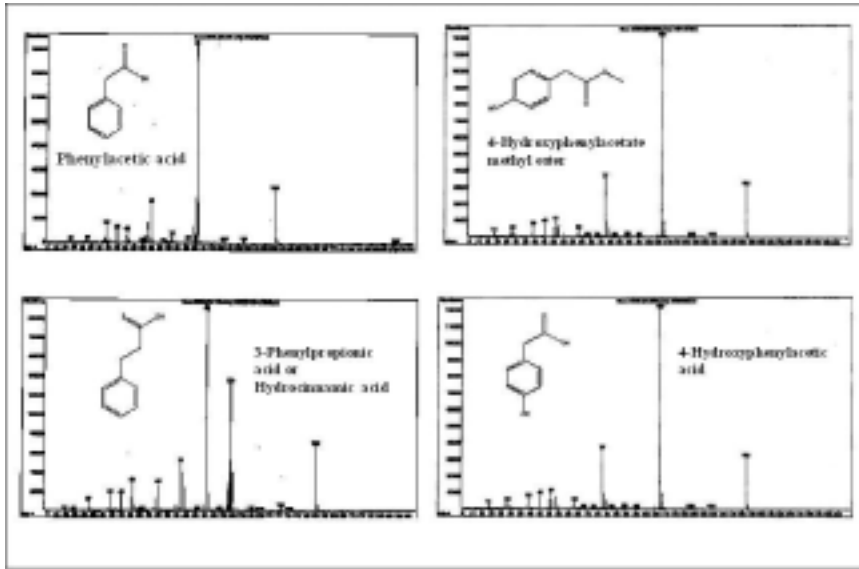


그림 11. GC-MS를 이용하여 *Burkholderia* sp. MP-1이 위의 4가지 향균물질을 분비함을 확인. 생성된 향균물질은 paper disc법과 광학현미경 촬영을 통해서 병원성 곰팡이의 생장 제어를 확인하였다(그림 12 및 13).

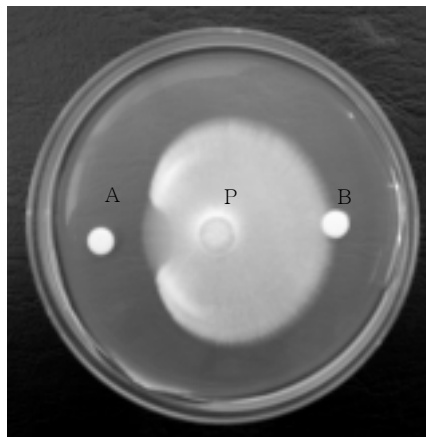


그림 12. HJ-927 균배양액을 silica gel column chromatography와 shepadex LH-20 column chromatography를 통해 정제한 물질을 Paper에 올려 *Phytophthora capsici*와 대치배양시킨 결과. A: 분리된 향균물질 1mg, B: control (methanol), P: *Phytophthora capsici*

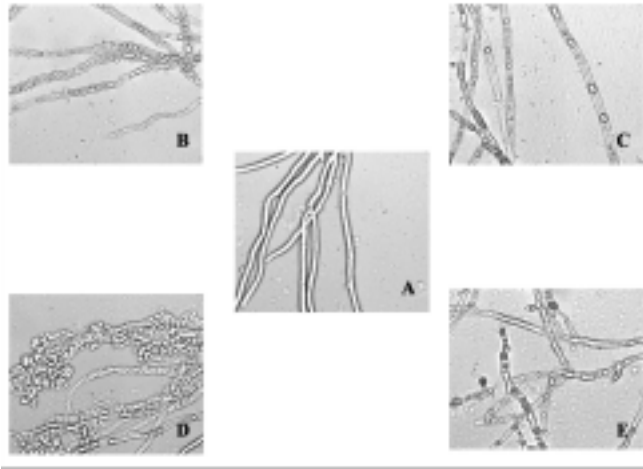


그림 13. Chitinase 생성 미생물인 *Burkholderia* sp. MP-1이 분비하는 항생물질의 처리가 고추역병균 *P. capsici*의 균사의 성장에 미치는 영향. A: PDA (Potato Dextrose Broth)배지에서 배양한 정상적인 균사. B: PDA + Phenylacetic acid 0.36 mg C: PDA + Hydrocinnamic acid 0.01 mg. D: PDA + 4-hydroxyphenylacetic acid 0.58 mg. E: PDA + 4-hydroxyphenylacetate methyl ester 0.05 mg.

설명한 바와 같이 기내 실험을 거쳐 항 병원성 또는 항 선충 활성이 확인된 키틴분해 미생물들은 16s rRNA법을 이용하여 동정하였다. 그림 14-21은 분리된 미생물들의 16s rRNA법을 이용한 동정 결과이다.

KJA-118 : 4 actgctgcctcccgtaggagtctgggccgtgtctcagtcaccagtgaggccgatcacccctc 63
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
B. cereus: 356 actgctgcctcccgtaggagtctgggccgtgtctcagtcaccagtgaggccgatcacccctc 297

KJA-118 : 64 tcaggtcggctacgcatcgttgccttggtagccgttacctcaccaactagctaatagcga 123
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
B. cereus: 296 tcaggtcggctacgcatcgttgccttggtagccgttacctcaccaactagctaatagcga 237

KJA-118 : 124 cgcgggtccatccataaagtgacagccgaagccgcctttcaatttcgaaccatgcggttca 183
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
B. cereus: 236 cgcgggtccatccataaagtgacagccgaagccgcctttcaatttcgaaccatgcggttca 177

KJA-118 : 184 aaatgttatccggtattagccccggtttcccggagttatcccagttctatgggcaggtta 243
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
B. cereus: 176 aaatgttatccggtattagccccggtttcccggagttatcccagttctatgggcaggtta 117

KJA-118 : 244 cccacgtgttactcaccgctccgcccgttaacttcataagagcaagctcttaatccattcg 303
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
B. cereus: 116 cccacgtgttactcaccgctccgcccgttaacttcataagagcaagctcttaatccattcg 57

KJA-118 : 304 ctcgacttgcattgatttaggcacgcccagcgttcggttctgagcca 350
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| | ||||||||
B. cereus: 56 ctcgacttgcattgatttaggcacgcccagcgttcattcctgagcca 10

그림 14. KJA-118은 16s rRNA gene sequence를 이용해 *Bacillus cereus*로 동정.

Query: 11 tggctcagaacgaacgctggcggcaggcttaacacatgcaagtcgagcggtagcacgggg 70
 |||||||| | |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| | |||
 Sbjct: 14 tggctcagattgaacgctggcggcaggcttaacacatgcaagtcgagcggtagcacaggg 73

Query: 71 gagcttgctccctgggtgacgagcggcggacgggtgagtaatgtctgggaaactgcctga 130
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct: 74 gagcttgctccctgggtgacgagcggcggacgggtgagtaatgtctgggaaactgcctga 133

Query: 131 tggagggggataactactggaaacggtagctaataccgcataacgtcgcaagaccaaaga 190
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct: 134 tggagggggataactactggaaacggtagctaataccgcataacgtcgcaagaccaaaga 193

Query: 191 gggggaccttcgggcctcttgccatcagatgtgccagatgggattagtagtagtggg 250
|||||
Sbjct: 194 gggggaccttcgggcctcttgccatcagatgtgccagatgggattagtagtagtggg 253

Query: 251 gtaatggctcacctaggcgacgatcccta 279
|||||
Sbjct: 254 gtaatggctcacctaggcgacgatcccta 282

그림 15. HJ-928은 16s rRNA gene sequence를 이용해 *Serratia marcescens* 로 동정.

Query: 1 tggctcagaacgaacgctggcggcatgcctaatacatgcaagtcgagcggactgaagag 60
|||||
Sbjct: 14 tggctcaggacgaacgctggcggcgtgcctaatacatgcaagtcgagcggactgatgag 73

Query: 61 aagcttgcttctctgatggttagcggcggacgggtgagtaaacacgtaggcaacctgcct 120
|||||
Sbjct: 74 aagcttgcttctctgatggttagcggcggacgggtgagtaaacacgtaggcaacctgcct 133

Query: 121 caagcttgggacaactaccggaacggtagctaataccgaatactgcttctcgctg 180
|||||
Sbjct: 134 caagcttgggacaactaccggaacggtagctaataccgaatactgcttctcgctg 193

Query: 181 aagggagctggaagacggagcaatctgtcactgaggatgggcctgcggcgattagct 240
||||
Sbjct: 194 aaggaagctggaagacggagcaatctgtcactgaggatgggcctgcggcgattagct 253

Query: 241 agctggtgaggtaacggctcaccaaggcgacgatgcgtagccgacctgagagggatgatcg 300
||
Sbjct: 254 agtgggtgaggtaacggctcaccaaggcgacgatgcgtagccgacctgagagggatgatcg 313

Query: 301 gctgcactgggactgagacacggcccagactcctacgggaggcagcagt 349
||
Sbjct: 314 gccacactgggactgagacacggcccagactcctacgggaggcagcagt 362

그림 16. KJA-424는 16s rRNA gene sequence를 이용해 *Paenibacillus illinoisensis*로 동정.

Query: 15 ctgcctcccgaaggagtctgggccgtgtctcagtcaccagtgggccgatcacctctca 74
|||||
Sbjct: 349 ctgcctcccga-ggagtctgggccgtgtctcagtcaccagtgggccgatcacctctca 291

Query: 75 ggtcggctacgcatcgttgccttggtgagccgttacctaccaactagctaatacgccgc 134
|||||
Sbjct: 290 ggtcggctacgcatcgttgccttggtgagccgttacctaccaactagctaatacgccgc 231

Query: 135 ggtccatctgtaagtggtagccgaagccacctttatgttgaacctgcggttcaaac 194
|||||
Sbjct: 230 ggtccatctgtaagtggtagccgaagccacctttatgttgaacctgcggttcaaac 171

Query: 195 aacctccggtattagccccggttcccgagttatccagcttacaggcaggttacc 254
|||||
Sbjct: 170 aacctccggtattagccccggttcccgagttatccagcttacaggcaggttacc 111

Query: 255 acgtgttactcaccgctccgccgtaacatcagggagcaagctcccatctgtccgctca 314
|||||
Sbjct: 110 acgtgttactcaccgctccgccgtaacatcagggagcaagctcccatctgtccgctca 51

Query: 315 ctgcatgtattaggcacgccagcgttcgtc 348
|||||
Sbjct: 50 ctgcatgtattaggcacgccagcgttcgtc 17

그림 17. HJ-927는 16s rRNA gene sequence를 이용해 *Bacillus subtilis*로 동정.

Query: 13 gtcagaacgaacgctggcggcatgccttacacatgcaagtgaacggcagcacgggggc 72
|||||
Sbjct: 1 gtcagattgaacgctggcggcatgccttacacatgcaagtgaacggcagcacgggggc 60

Query: 73 aaccctggtggcgagtggcgaacgggtgagtaatacatcggaacgtgtcctggagtggg 132
|||||
Sbjct: 61 aaccctggtggcgagtggcgaacgggtgagtaatacatcggaacgtgtcctggagtggg 120

Query: 133 gatagcccggcgaaagccggattaataccgcatacgtctacggaggaaagcgggggatc 192
|||||

Sbjct: 121 gatagcccggcgaaagccggattaataccgcatacgtctatggaggaaagcgggggatc 180

Query: 193 ttcggacctcgcgctcaagggcgccgatggcggattagctagttgtagggtaaaggc 252
|||||

Sbjct: 181 ttcggacctcgcgctcaagggcgccgatggcggattagctagttgtagggtaaaggc 240

Query: 253 ctaccaaggcgacgatccgtagctggtctgagaggacgaccagccacactgggactgaga 312
|||||

Sbjct: 241 ctaccaaggcgacgatccgtagctggtctgagaggacgaccagccacactgggactgaga 300

Query: 313 cacggcccagactccttacgggaggcag 340
|||||

Sbjct: 301 cacggcccagactcc-tacgggaggcag 327

그림 18. 16s rRNA gene sequence를 이용해 *Burkholderia* sp.로 동정

Query: 57 tggctcagaacgaacgctggcggcaggcctaacacatgcaagtcgagcggcagcacgggt 116
|||||

Sbjct: 12 tggctcagattgaacgctggcggcaggcctaacacatgcaagtcgagcggcagcacgggt 71

Query: 117 acttgtaacctggtggcgagcggcgacgggtgagtaatgcctaggaatctgcctgtagt 176
|||||

Sbjct: 72 acttgtaacctggtggcgagcggcgacgggtgagtaatgcctaggaatctgcctgtagt 131

Query: 177 ggggataacgctcggaaacggacgctaataccgcatacgtcctacgggagaaagcaggg 236
|||||

Sbjct: 132 ggggataacgctcggaaacggacgctaataccgcatacgtcctacgggagaaagcaggg 191

Query: 237 gaccttcgggccttgcgctatcagatgagcctaggtcggattagctagttggtgaggtaa 296
|||||

Sbjct: 192 gaccttcgggccttgcgctatcagatgagcctaggtcggattagctagttggtgaggtaa 251

Query: 297 tggctaccaaggcgacgatccgtaactggtctgagaggatgatcagtcacactggaact 356

|||||
Sbjct: 252 tgctcaccaaggcgacgatccgtaactggtctgagaggatgatcagtcacactggaact 311

Query: 357 gagacacgggtccagactcctacgggaggcag 387

|||||
Sbjct: 312 gagacacgggtccagactcctacgggaggcag 342

그림 19. 16s rRNA gene sequence를 이용해 *Pseudomonas syringae*로 동정.

Query: 15 ctgcctcccgaaggagtctggaccgtgtctcagttccagtggtgatcatcctctca 74

|||||
Sbjct: 345 ctgcctcccga-ggagtctggaccgtgtctcagttccagtggtgatcatcctctca 287

Query: 75 gaccagctagggatcgctgccttggtagccattacctaccaactagctaatcccacct 134

|||||
Sbjct: 286 gaccagctagggatcgctgccttggtagccattacctaccaactagctaatcccacct 227

Query: 135 gggcatatccaatcgcgcaaggcccgaaggtcccctgctttccccgtagggcgatgcg 194

|||||
Sbjct: 226 gggcatatccaatcgcgcaaggcccgaaggtcccctgctttccccgtagggcgatgcg 167

Query: 195 gtattagcagtcgtttccaactgttatccccctcgactgggcaattcccaggattact 254

|||||
Sbjct: 166 gtattagcagtcgtttccaactgttatccccctcgactgggcaattcccaggattact 107

Query: 255 caccgctccgctcgccggcaaaagtagcaagctactttcccgctgccgctcgacttg 314

|||||
Sbjct: 106 caccgctccgctcgccggcaaaagtagcaagctactttcccgctgccgctcgacttg 47

Query: 315 catgtgtaggcctgccgcccagcgttcgttctgagcca 352

|||||
Sbjct: 46 catgtgtaggcctgccgcccagcgttcattctgagcca 9

그림 20. 16s rRNA gene sequence를 이용해 *Aeromonas* sp. 로 동정

Query: 15 ctgcctcccgtaaggagtctggaccgtgtctcagttccagtgactgatcatcctctca 74
 |||
 Sbjct: 341 ctgcctcccgta-ggagctctggaccgtgtctcagttccagtgactgatcatcctctca 283

Query: 75 gaccagttacggatcgtcgcctaggtgagccattacctcacctactagctaaccgacct 134
 |||
 Sbjct: 282 gaccagttacggatcgtcgcctaggtgagccattacctcacctactagctaaccgacct 223

Query: 135 aggctcatctgatagcgcaaggcccgaaggctcccctgctttctcccgtaggacgatgcg 194
 |||
 Sbjct: 222 aggctcatctgatagcgcaaggcccgaaggctcccctgctttctcccgtaggacgatgcg 163

Query: 195 gtattagcgttccttcgaaacggtgtccccactaccaggcagattcctaggcattact 254
 |||
 Sbjct: 162 gtattagcgttccttcgaaacggtgtccccactaccaggcagattcctaggcattact 103

Query: 255 caccgctccgccgctgaatcatggagcaagctccactcatccgctcgacttgcattgtt 314
 |||
 Sbjct: 102 caccgctccgccgctgaatcatggagcaagctccactcatccgctcgacttgcattgtt 43

Query: 315 aggcctgccgcccagcgttcggtctgagcca 344
 |||
 Sbjct: 42 aggcctgccgcccagcgttcggtctgagcca 13

그림 21. 16s rRNA gene sequence를 이용해 *Proteobacterium* strain BHI80-88 로 동정

나. 우수한 키티분해균과 게겍질 및 농업 부산물을 혼합한 실험용 키티퇴비 조제

1) 소규모 조제

가) 시간경과에 따른 용토 부숙도 및 무기원소 분석 조사

표 2. 시간경과에 따른 퇴비 성분 분석 및 부숙도 지수

	수분	유기물	C/N	T-N	P ₂ O ₅	Ca	K	Mg	부숙도 지수
	함량	함량	ratio	(%)					
4월 30일	57.20	28.57	16.57	0.52	1.82	3.44	0.72	1.05	4
5월 10일	50.58	28.24	23.65	0.65	1.91	3.53	0.72	1.29	4
5월 23일	53.01	28.49	27.51	0.61	2.03	3.91	1.07	1.88	4
6월 7일	49.65	28.30	24.87	0.66	2.49	3.85	0.92	1.79	3
6월 21일	48.83	27.58	23.07	0.69	2.01	3.90	0.74	1.78	3
7월 5일	49.29	27.15	21.01	0.76	2.40	4.26	0.73	1.90	3
7월 19일	49.76	27.26	24.01	0.66	2.10	4.36	0.76	1.80	2
8월 2일	45.54	28.89	20.28	0.83	2.81	4.42	0.78	1.76	2

부숙도 지수 (Maturity index)

Kit B \ Kit A	1	2	3	4	5	6
1	1	1	2	3	3	3
2	2	2	2	3	3	3
3	2	2	2	3	3	3
4	3	3	3	4	4	4
5	5	5	5	5	5	5

부숙도 지수	부숙 상태	퇴비 특성
1	부숙 완료	흙냄새
2	부숙중	부숙 거의 완료
3	부숙중	현재 부숙 진행 중
4	부숙활발	오랜 기간 부숙 필요
5	미부숙	Fresh

부숙도 간이 판정 Kit는 강원대학교 자원생물환경학부 농업환경화학 연구실 양재의 교수의 도움으로 사용하였다.

2) 퇴비 내 효소

가) Chitinase activity

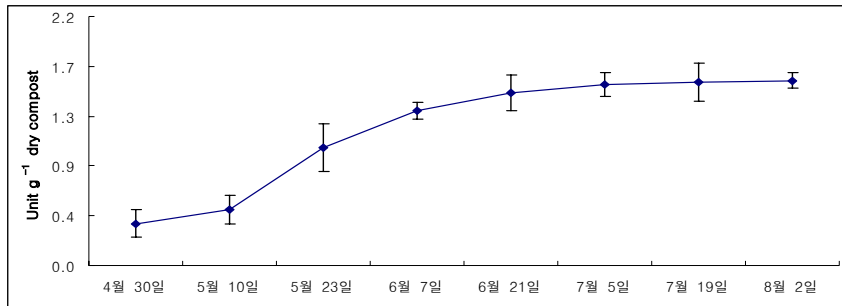


그림 22. 퇴비 부숙 과정에 따른 퇴비 내 chitinase activity의 변화. Chitinase activity는 퇴비화 과정 중 초기에는 증가하다가 부숙이 어느 정도 진행이 되어가는 7월 5일부터는 일정하게 유지되었다.

나) β -1,3-glucanase activity

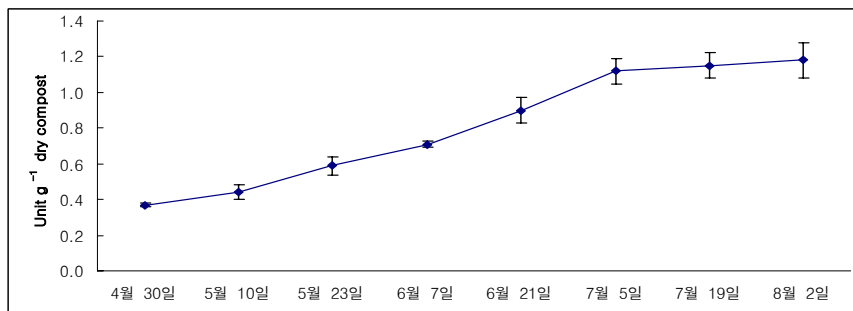


그림 23. 퇴비 부숙 과정에 따른 퇴비 내 β -1,3-Glucanase activity의 변화. β -1,3-glucanase activity는 퇴비화 과정 중 초기부터 중기까지는 일정하게 증가하다가 부숙이 어느정도 진행이 되어가는 7월 5일부터는 일정하게 유지되었다.

다) Dehydrogenase activity

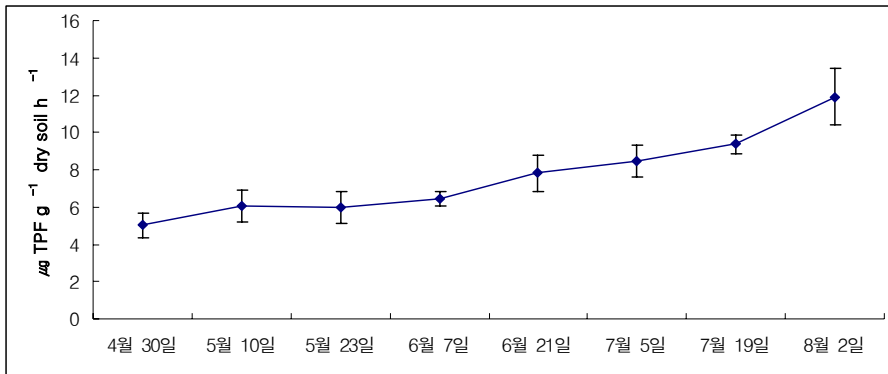


그림 24. 퇴비 부숙 과정에 따른 퇴비 내 dehydrogenase activity의 변화. Dehydrogenase activity는 퇴비화 과정 중 초기부터 말기까지는 일정하게 증가하였다.

라) Acid phosphatase activity

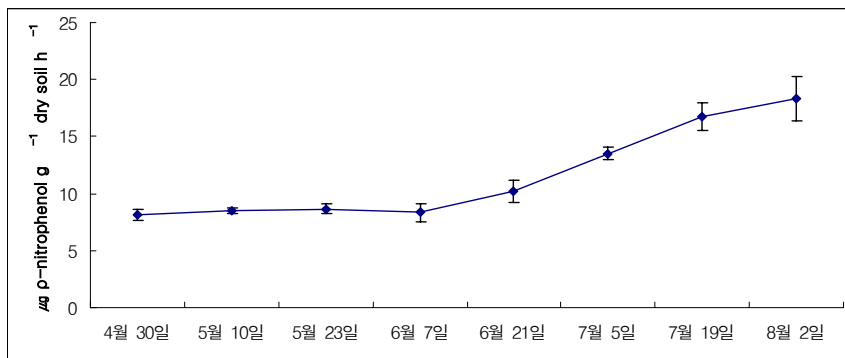


그림 25. 퇴비 부숙 과정에 따른 퇴비 내 acid phosphatase activity의 변화. Acid phosphatase activity는 퇴비화 과정 중 초기에는 일정하게 유지되다가 중반 이후부터는 급격하게 증가하였다.

마) Alkaline phosphatase activity

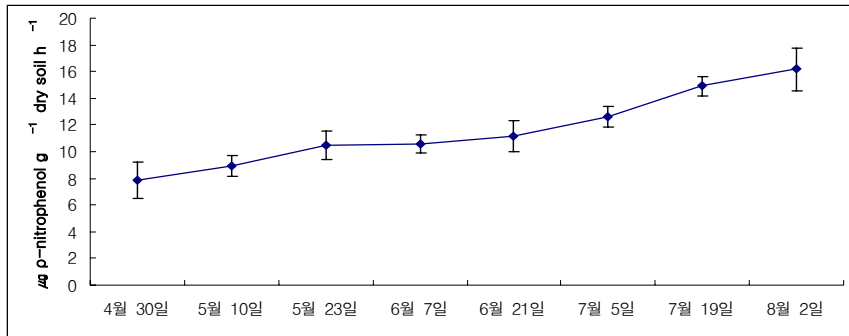


그림 26. 퇴비 부숙 과정에 따른 퇴비 내 alkaline phosphatase activity의 변화. Alkaline phosphatase activity는 퇴비화 과정 중 초기부터 말기까지 일정하게 유지되었다.

다. 우수한 키틴분해균을 다량 함유한 키틴퇴비의 대량생산



그림27. 키틴퇴비의 대량생산.

1) 키티퇴비의 대량생산에서 시간경과에 따른 용토 부숙도 및 무기원소 분석 조사

표 3. 시간경과에 따른 퇴비 성분 분석 및 부숙도 지수

	수분 함량	유기물 함량	C/N ratio	T-N	P ₂ O ₅	Ca	K	Mg	부숙도 지수
	(%)								
4월 2일	59.50	27.91	18.92	0.63	1.99	4.44	0.89	1.38	4
4월 9일	56.71	28.01	25.66	0.57	2.01	3.89	0.76	1.66	4
4월 16일	51.11	28.42	26.58	0.69	2.17	4.23	1.01	1.65	4
4월 23일	50.66	26.99	25.91	0.65	2.33	4.56	0.99	1.97	3
4월 30일	47.71	28.61	22.78	0.55	2.81	3.22	0.83	1.64	3
5월 7일	48.84	27.32	20.83	0.80	2.20	4.13	0.91	1.85	3
5월 14일	53.22	27.58	23.61	0.71	2.62	4.21	0.88	1.83	2
5월 21일	55.55	26.11	21.35	0.78	2.37	4.99	0.93	1.79	2

부숙도 지수 (Maturity index)

Kit B \ Kit A	1	2	3	4	5	6
1	1	1	2	3	3	3
2	2	2	2	3	3	3
3	2	2	2	3	3	3
4	3	3	3	4	4	4
5	5	5	5	5	5	5

부숙도 지수	부숙 상태	퇴비 특성
1	부숙 완료	흙냄새
2	부숙중	부숙 거의 완료
3	부숙중	현재 부숙 진행 중
4	부숙활발	오랜 기간 부숙 필요
5	미부숙	Fresh

부숙도 간이 판정 Kit는 강원대학교 자원생물환경학부 농업환경화학 연구실 양재의 교수의 도움으로 사용하였다.

2) 시간경과에 따른 미생물상 조사

표 4. 시간경과에 따른 fungi, bacteria, 그리고 chitinase producing bacteria colony 수의 변화

	fungi	bacteria	chitinase producing bacteria
	(Log10 CFU)		
4월 2일	6.33	10.11	4.22
4월 9일	6.21	10.11	5.16
4월 16일	5.55	10.27	7.11
4월 23일	5.38	10.19	7.26
4월 30일	5.29	10.44	7.26
5월 7일	5.26	10.38	7.78
5월 14일	5.03	10.39	8.66
5월 21일	5.13	10.56	8.82

3) 퇴비 내 효소

가) Chitinase activity

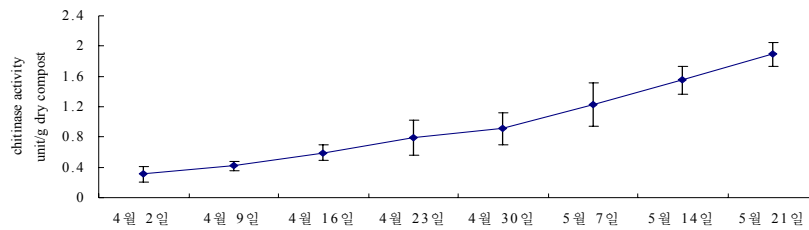


그림 28. 퇴비 부숙 과정에 따른 퇴비 내 chitinase activity의 변화.

나) β

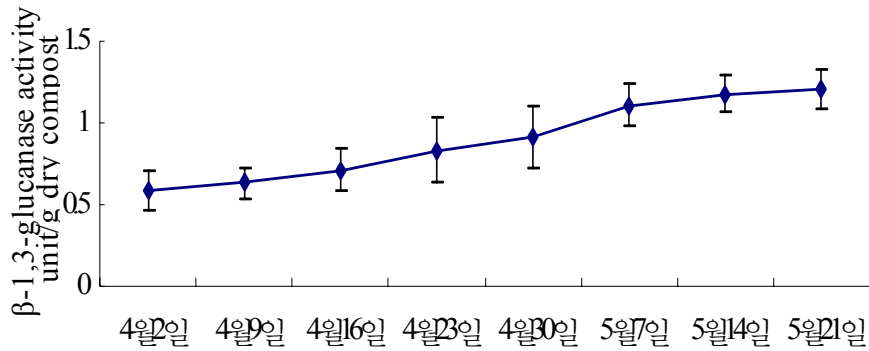


그림 29. 퇴비 부숙 과정에 따른 퇴비 내 β -1,3-glucanase activity의 변화.

4) 시간경과에 따른 미생물상 조사

표 3. 시간경과에 따른 fungi, bacteria, 그리고 chitinase producing bacteria colony 수의 변화

	fungi	bacteria	chitinase producing bacteria
	(Log10 CFU)		
4월 30일	6.41	10.21	4.83
5월 10일	6.07	10.21	5.41
5월 23일	5.53	10.17	7.07
6월 7일	5.39	10.09	7.26
6월 21일	5.33	10.01	7.39
7월 5일	5.26	10.07	7.60
7월 19일	5.37	10.44	8.42
8월 2일	5.22	10.41	8.39

퇴비 부숙 시간 경과에 따른 퇴비 내 미생물상의 변화는 fungi의 경우 시간 경과에 따른 미생물의 colony 수는 감소하는 반면 chitinase producing bacteria의 colony는 증가하였다. 이것은 아마도 시간 경과에 따라 chitinase producing bacteria의 수가 증가함에 따라 세포벽이 chitin으로 이루어져 있는 fungi의 세포벽을 분해하였기에 fungi의 colony 수가 감소하였을 것이라고 사료되어진다.

라. 키틴퇴비로부터 직접 분리된 chitinase 생성균의 생물학적 제어능력 조사

1) Chitinase 생성 균주가 식물체 생장에 대한 효과

1) 오이

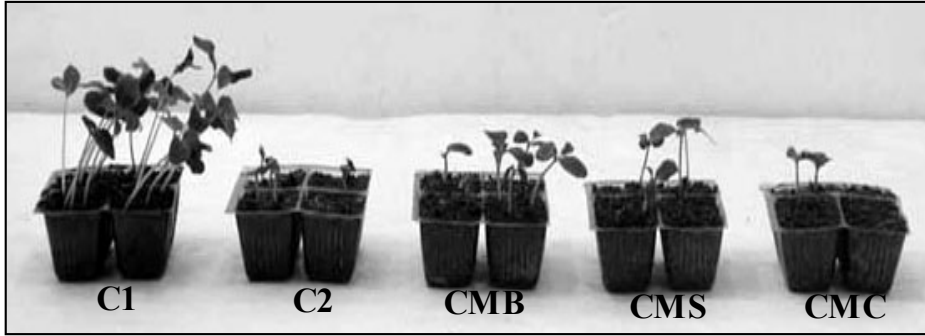


그림 30. 병원균 (*R. solani*) 접종과 HJ-928를 동시 접종시 작물의 성장 조사. 병원균만이 접종된 처리구 (C2)에서는 작물의 생존력이 거의 제로였지만 균주를 배양한 처리구 + 병원균(CMB), 균주를 배양한 후 상등액을 처리한 처리구 + 병원균(CMS) 그리고 균주를 배양한 후 세포를 처리한 처리구 + 병원균(CMC)에서는 작물이 생장이 나타났다. 작물의 성장률은 CMB > CMS > CMC 순이었다. C1은 control.

2) 상추



그림 31. 뿌리혹선충에 오염된 토양에 처리한 chitinase 생성 미생물이 상추의 초기 생육에 미치는 영향.
A: 무처리구; B: 키틴퇴비처리구.

3) 고추

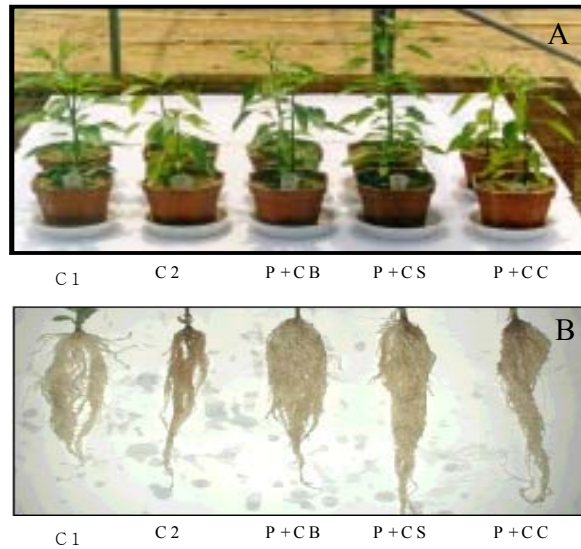


그림 32. 병원균, *P. capsici*와 KJA-118를 동시 접종시 작물의 생장 조사. 병원균만이 접종된 처리구(C2)에서는 작물이 생장하였지만 뿌리(B) 부분을 보면 뿌리가 상당히 죽어 있는 것을 볼 수 있다. 균주를 배양한 처리구 + 병원균 (CB), 균주를 배양한 후 상등액을 처리한 처리구 + 병원균 (CS), 그리고 균주를 배양한 후 세포를 처리한 처리구 + 병원균 (CC)에서는 작물이 생장 뿐만 아니라 뿌리 생육 역시 병원균만 처리한 구보다 훨씬 좋았다. 작물의 생장률은 MS > CB = CC 순이었다. C1은 control.

마. 포트내에서 키틴퇴비의 활성검증

1) 키틴퇴비의 선충증식억제 효과 및 작물과의 상호작용 조사

실험 설명 : 각각의 포트에 키틴퇴비 3%, 상업용 퇴비 3%를 처리하였으며 대조구는 무처리구이다. 토마토를 정식한 후 선충 접종 4주, 6주, 8주후에 시료를 채취 하여 키틴퇴비의 처리가 선충감염억제 및 식물체와의 상호 작용 등을 조사하였다.

표 4. 키틴퇴비, 일반퇴비 및 대조구가 토마토의 뿌리혹지수에 미치는 영향

	4 week	6 week	8 week
키틴퇴비	1	1.2	1.8
일반퇴비	4.2	4.2	4.5
대조구	4.5	4.5	4.7

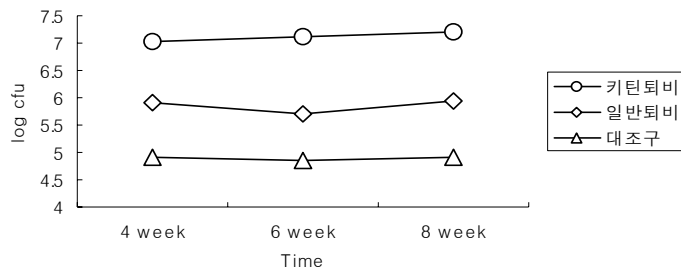


그림 33. 키틴퇴비, 일반퇴비 및 대조구가 토마토 근권토양의 chitinase 생성 미생물의 밀도에 미치는 영향

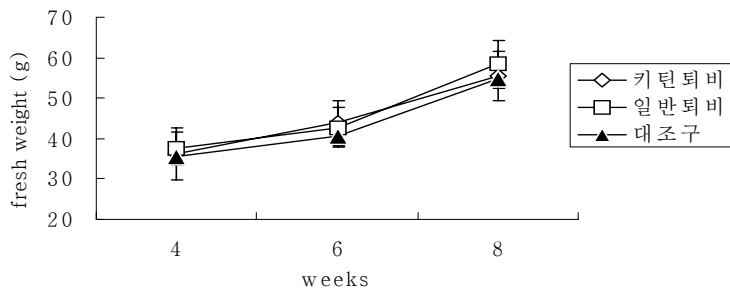


그림 34. 키틴퇴비, 일반퇴비 및 대조구가 토마토의 생체중에 미치는 영향

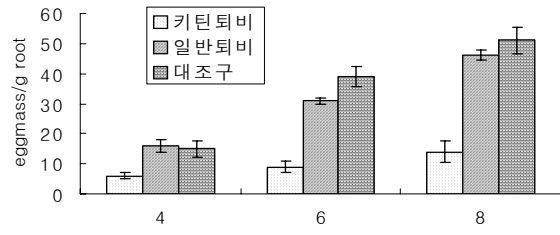


그림 35. 키틴퇴비, 일반퇴비 및 대조구가 토마토 뿌리의 난낭수에 미치는 영향

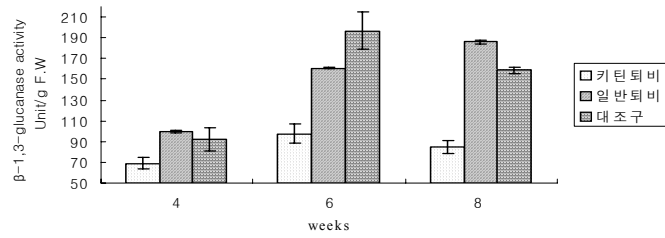


그림 36. 키틴퇴비, 일반퇴비 및 대조구가 토마토 뿌리의 chitinase 활성에 미치는 영향

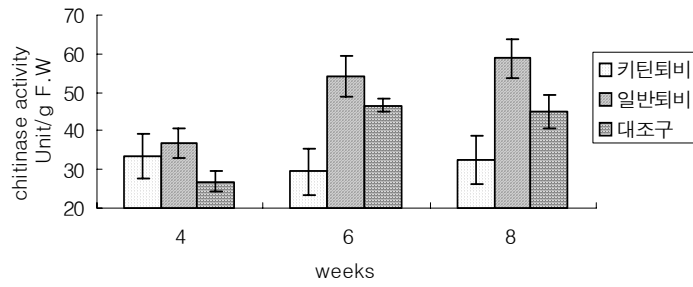


그림 37. 키틴퇴비, 일반퇴비 및 대조구가 식물체 β-1,3-glucanase 활성에 미치는 영향

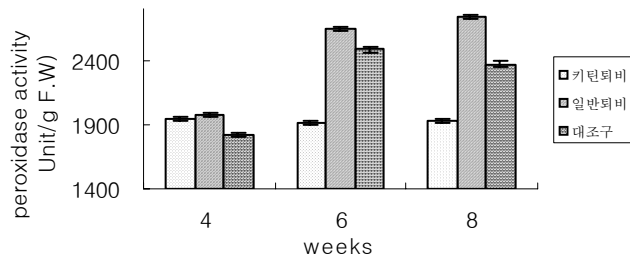


그림 38. 키틴퇴비, 일반퇴비 및 대조구가 식물체 peroxidase 활성에 미치는 영향

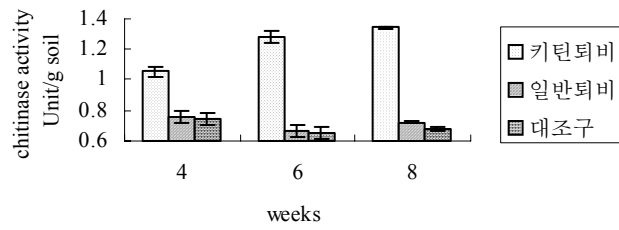


그림 39. 키틴퇴비, 일반퇴비 및 대조구가 근권토양의 chitinase 활성에 미치는 영향

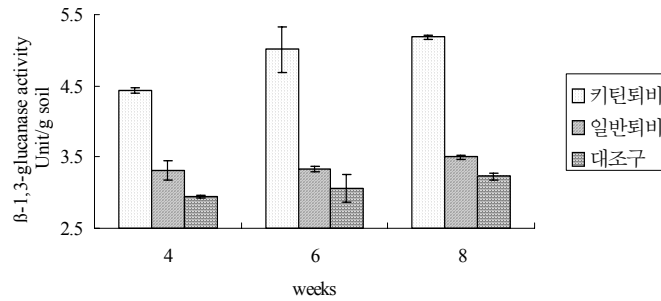


그림 40. 키틴퇴비, 일반퇴비 및 대조구가 근권토양의 β-1,3-glucanase 활성에 미치는 영향

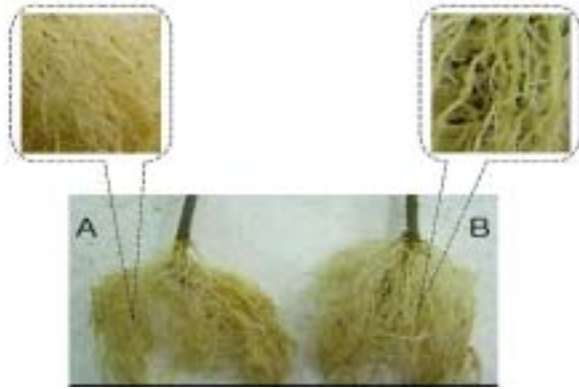


그림 41. 키틴퇴비의 처리는 토마토 (A)를 효과적으로 선충으로부터 억제하였지만 무처리구 (B)의 토마토 뿌리는 선충의 침입을 받아 많은 뿌리혹을 생성함을 볼 수 있다.

2) 키틴퇴비의 고추역병균 방제효과 검증-1

실험 설명 : 700g의 토양이 담겨져 있는 포트에 키틴퇴비 또는 일반퇴비 3%씩 처리 하였으며 고추역병균 *P. capsici* 접종후 9 일간에 걸쳐 시료를 채취하여 식물체의 생장 및 병 억제효과 식물과의 상호작용 그리고 토양환경에 미치는 영향 등을 조사하였다.

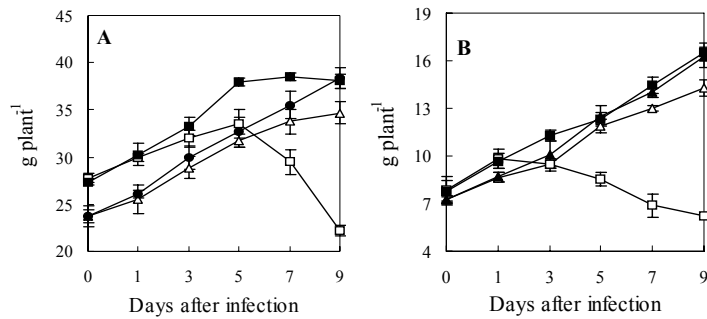


그림 42. 잎(A)과 뿌리(B)의 생체중의 변화. Chitin 퇴비(Ccom)(-▲-), Chitin 퇴비 +*P. capsici*. (Ccom + Phy)(-△-), 일반 퇴비(Com)(-■-), 일반 퇴비 + *P. capsici*.(Com + Phy)(-□-), 3반복의 값이며, 바는 표준 오차값이다.

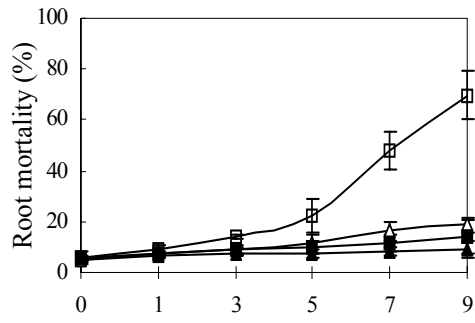


그림 43. Root mortality의 변화. Chitin 퇴비(Ccom)(-▲-), Chitin 퇴비 +*P. capsici.* (Ccom + Phy) (-△-), 일반 퇴비(Com)(-■-), 일반 퇴비 + *P. capsici.*(Com + Phy)(-□-), 3반복의 값이며, 바는 표준 오차 값이다.

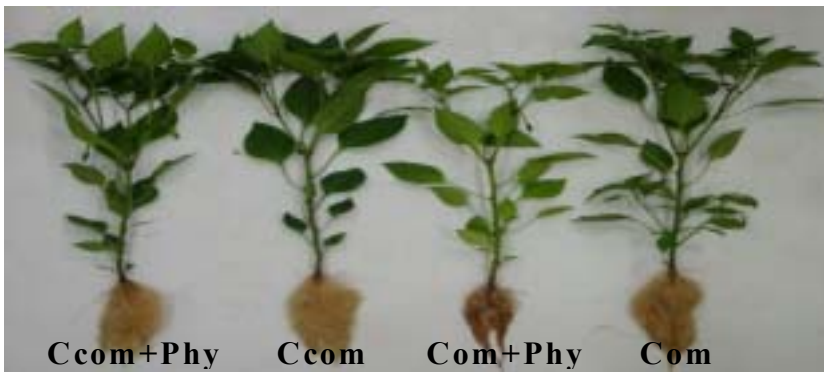


그림 44. 고추 작물의 생장 Chitin 퇴비(Ccom), Chitin 퇴비 +*P. capsici.* (Ccom + Phy), 일반 퇴비(Com), 일반 퇴비 + *P. capsici.*(Com + Phy)

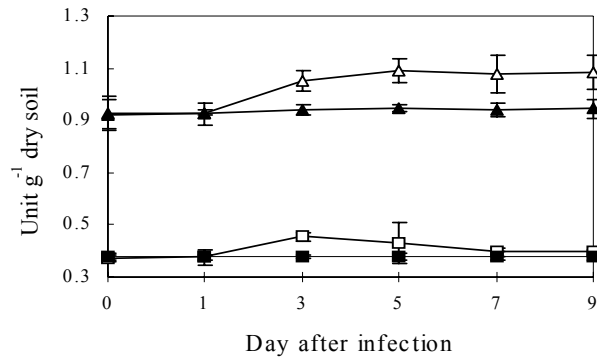


그림 45. 토양 안의 chitinase의 활성의 변화. Chitin 퇴비(Ccom)(-▲-), Chitin 퇴비 +*P. capsici*. (Ccom + Phy)(-△-), 일반 퇴비(Com)(-■-), 일반 퇴비 + *P. capsici*.(Com + Phy)(-□-), 3반복의 값이며, 바는 표준 오차값이다.

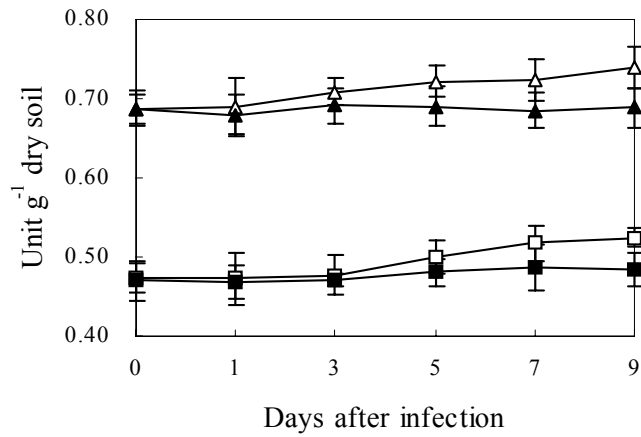


그림 46. 토양 안의 β-1,3-glucanase의 활성의 변화. Chitin 퇴비 (Ccom) (-▲-), Chitin 퇴비 +*P. capsici*. (Ccom + Phy) (-△-), 일반 퇴비 (Com) (-■-), 일반 퇴비 + *P. capsici*. (Com + Phy) (-□-), 3반복의 값이며, 바는 표준 오차 값이다.

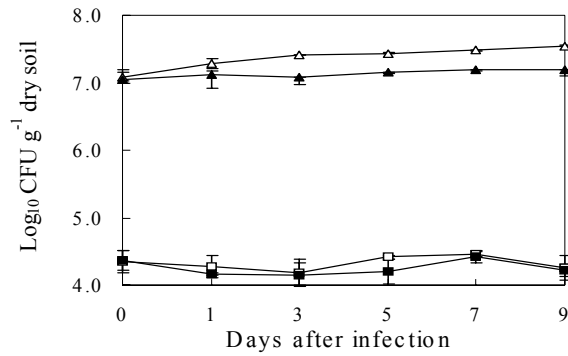


그림 47. 토양 안의 chitinase producing bacteria의 colony 수. Chitin 퇴비 (Ccom) (-▲-), Chitin 퇴비 + *P. capsici*. (Ccom + Phy) (-△-), 일반 퇴비 (Com) (-■-), 일반 퇴비 + *P. capsici*. (Com + Phy) (-□-), 3반복의 값이며, 바는 표준 오차 값이다.

3) 키틴퇴비의 고추 역병균에 대한 억제효과 및 작물과의 상호작용-2

실험 설명 : 멸균한 토양이 담겨져 있는 각각의 포트에 키틴퇴비 3%, 상업용 퇴비 3%를 처리한 후 고추씨를 파종하였으며 파종 8주후 고추역병균을 포트당 10^5 수준으로 접종하였다. 접종일로부터 시작하여 0, 1, 3, 5, 7, 9일째에 6번에 걸쳐 시료를 채취하여 실험을 실시하였다.

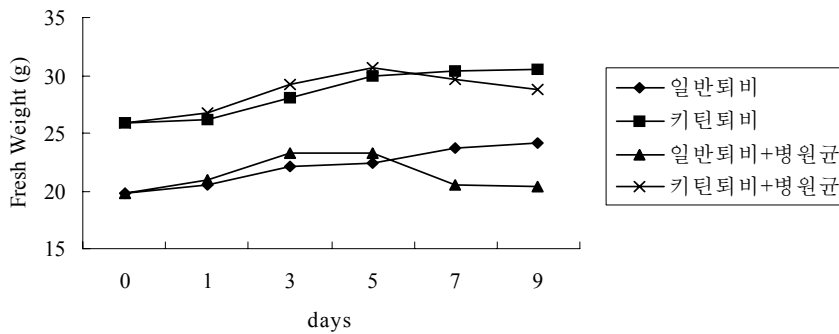


그림 48. 처리구별 시간에 따른 고추생체중의 변화.

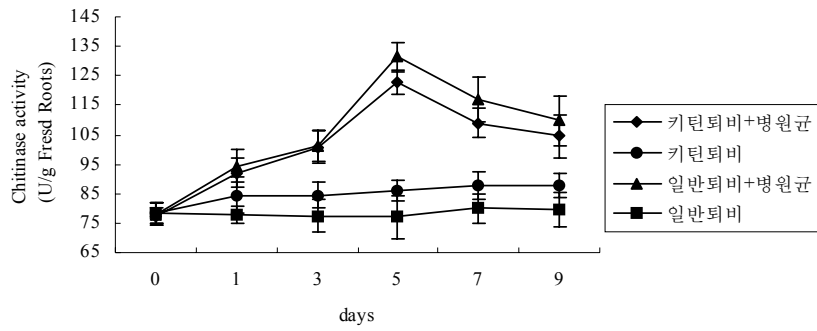


그림 49. 처리구별 시간에 따른 고추 뿌리의 chitinase 활성의 변화.

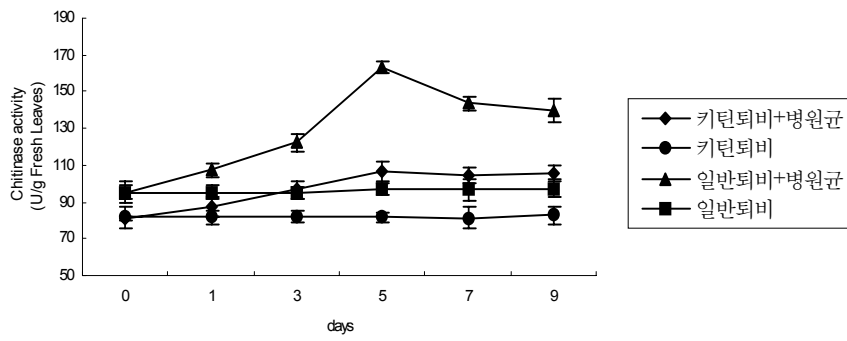


그림 50. 처리구별 시간에 따른 고추 잎의 chitinase 활성의 변화

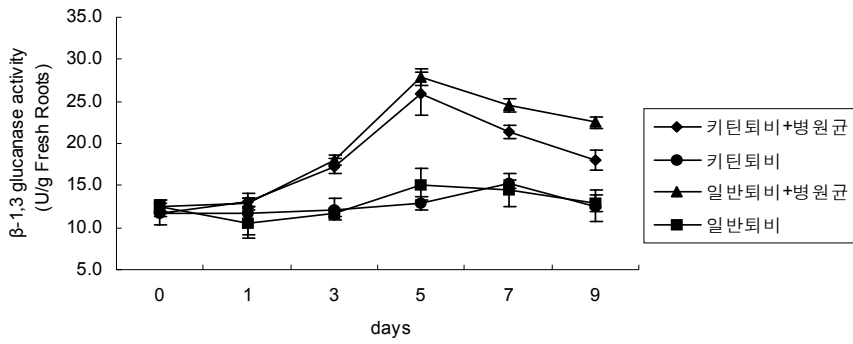


그림 51. 처리구별 시간에 따른 고추 뿌리의 β -1,3-glucanase 활성의 변화

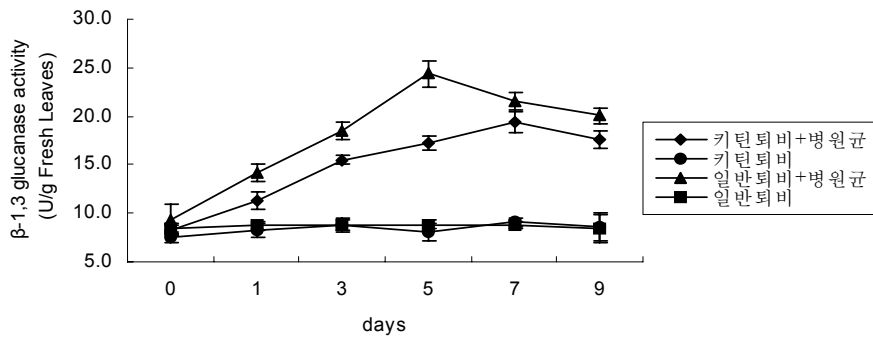


그림 52. 처리구별 시간에 따른 고추 잎의 β -1,3-glucanase 활성의 변화

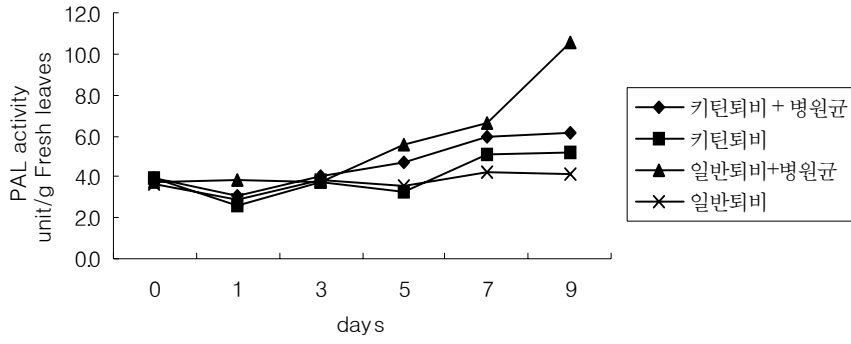


그림 53. 처리구별 시간에 따른 고추 잎의 PAL 활성의 변화.

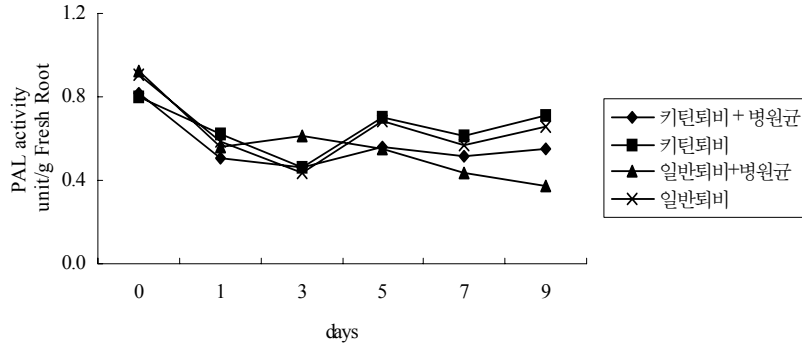


그림 54. 처리구별 시간에 따른 고추 뿌리의 PAL 활성의 변화.

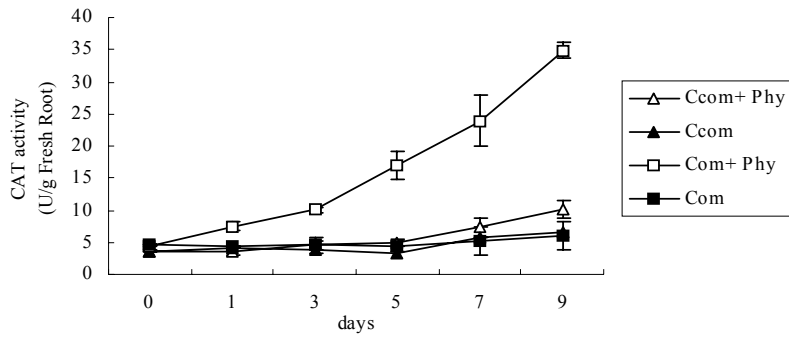


그림 55. 처리구별 시간에 따른 고추 뿌리의 CAT 활성의 변화.
Ccom은 키턴퇴비, Phy는 *P. capsici*, Com은 상업용퇴비를 나타낸다.

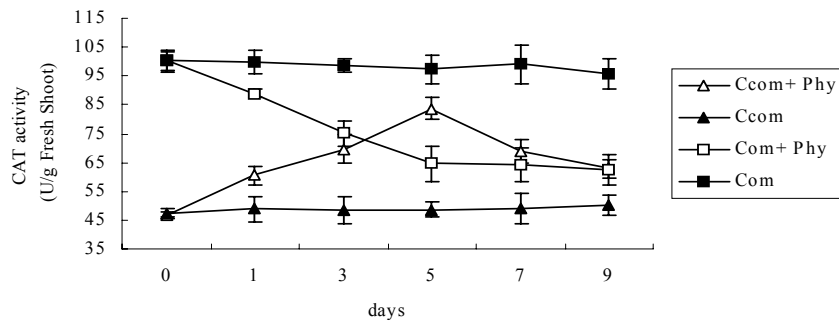


그림 56. 처리구별 시간에 따른 고추 잎의 CAT 활성의 변화.
Ccom은 키턴퇴비, Phy는 *P. capsici*, Com은 상업용퇴비를 나타낸다.

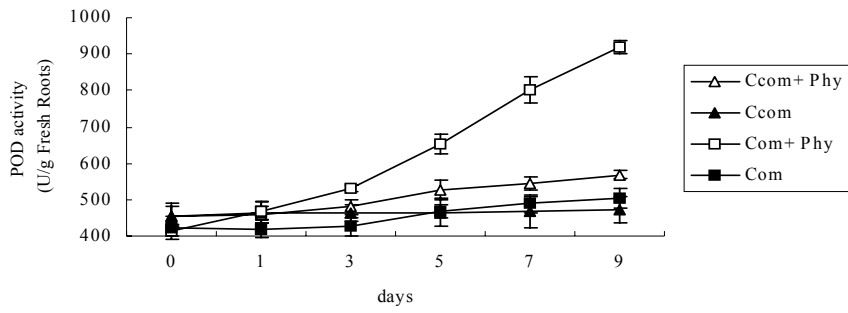


그림 57. 처리구별 시간에 따른 고추 뿌리의 POD 활성의 변화.
Ccom은 키턴퇴비, Phy는 *P. capsici*, Com은 상업용퇴비를 나타낸다.

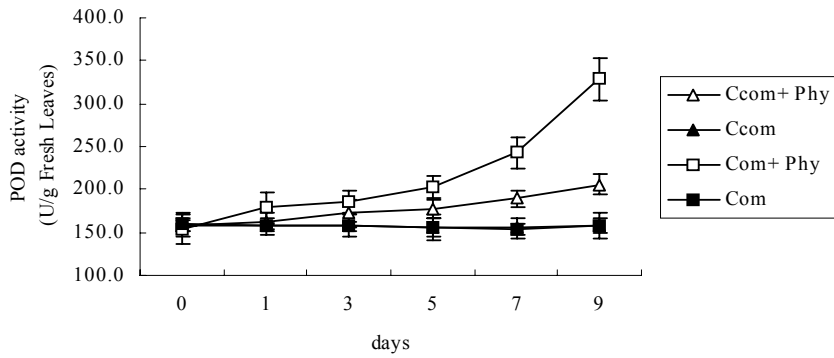


그림 58. 처리구별 시간에 따른 고추 잎의 POD 활성의 변화.
Ccom은 키턴퇴비, Phy는 *P. capsici*, Com은 상업용퇴비를 나타낸다.

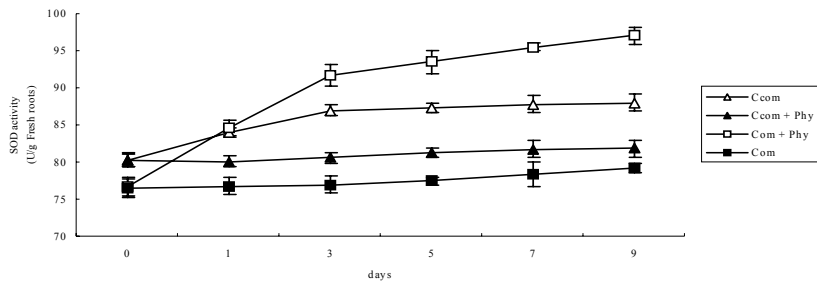


그림 59. 처리구별 시간에 따른 고추 뿌리의 SOD 활성의 변화.
Ccom은 키턴퇴비, Phy는 *P. capsici*, Com은 상업용퇴비를 나타낸다.

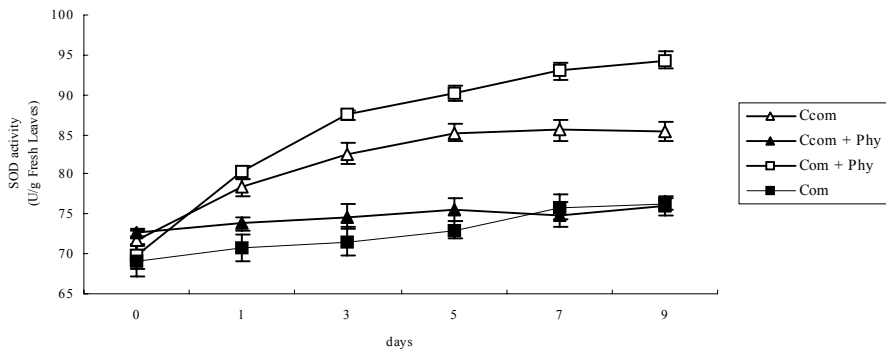


그림 60. 처리구별 시간에 따른 고추 잎의 SOD 활성의 변화.
Ccom은 키턴퇴비, Phy는 *P. capsici*, Com은 상업용퇴비를 나타낸다.



그림 61. 고추역병균 *P. capsici* 접종 7일후 고추 지상부와 뿌리의 양상. A. 일반퇴비; B. 키틴퇴비+병원균; C. 일반퇴비+병원균; D. 키틴퇴비.

4) 키틴퇴비의 처리가 백합 및 케일에 대한 성장촉진효과



그림 62. 마늘구근선충에 오염된 토양에 처리한 chitinase 생성 미생물이 백합의 성장에 미치는 영향. A: 무처리구; B: 처리구..



그림 63. Chitinase 생성 미생물의 처리가 케일의 생육에 미치는 영향.
A: 처리구 B: 무처리구.

바. 키틴퇴비의 소규모 포장에서의 적용 가능성 검토



그림 64. 포장에서 키틴퇴비로 처리한 고추는 일반퇴비로 처리한 고추보다 생육면에서 우수하다.



그림 65. 키틴퇴비의 처리는 토마토 시들음병원균 *F. xysporum* 에 감염된 포장에서 토마토를 병으로부터 효과적으로 보호하고 있다.

사. 키틴퇴비의 대규모 포장에서의 적용 가능성 검토

1) 토마토 시들음병의 방제효과

실험설명: 지난 10여년간 토마토 시들음병으로 인하여 피해를 많이 본 포장을 선택하여 키틴퇴비처리구 및 일반퇴비처리구로 나누어 실험을 실시하였다. 각 처리구마다 토마토 묘종 정식 일주일전에 10kg의 키틴퇴비 또는 일반퇴비를 시용하였다. 각개의 이랑의 길이는 15m 이고 폭은 0.5m 이다. 각개의 이랑에는 75개의 토마토를 정식하였다. 정식후 66일 후, 일반퇴비처리구에서 병이 발생하기 시작한 날을 기점으로 하여 1, 3, 5, 7에 걸쳐서 시료를 채취하여서 토양의 효소 활성 및 식물체 효소변화량 등을 측정하였으며 30일동안 병 발생률을 조사하였다. CC는 일반퇴비처리구이며 CTC는 키틴퇴비처리구 이다.

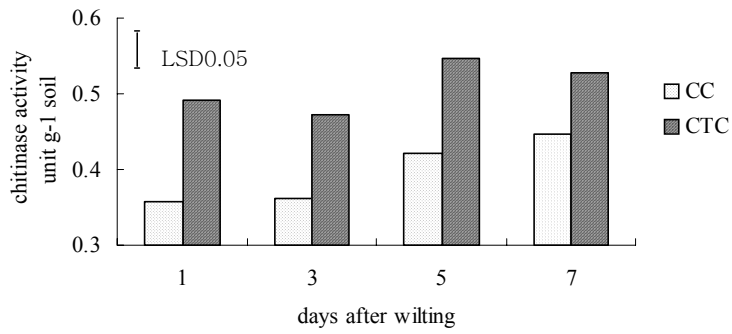


그림 66. 처리구별 시간변화에 따른 토양 chitinase 활성의 변화.

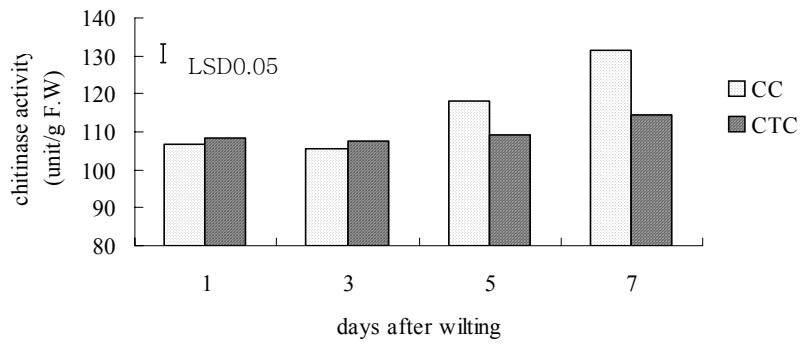


그림 67. 처리구별 시간변화에 따른 식물체 chitinase 활성의 변화.

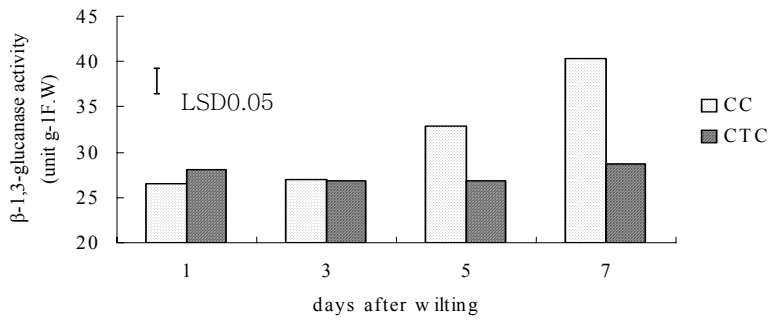


그림 68. 처리구별 시간변화에 따른 식물체 β -1,3-glucanase 활성의 변화.

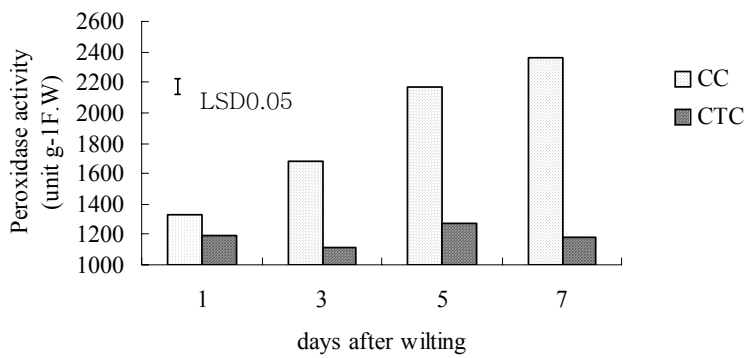


그림 69. 처리구별 시간 변화에 따른 식물체 peroxidase 활성의 변화.

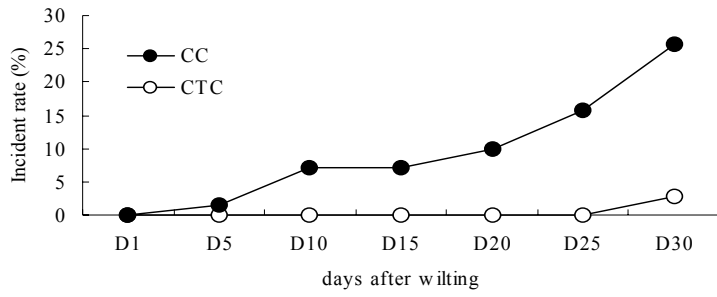


그림 70. 처리구별 병 발생률의 곡선그래프.



그림 71. 연작장해가 심한 토마토 포장에서 키턴퇴비를 처리했을 때 작물의 *Fusarium* 시들음병에 의한 피해를 효과적으로 줄일 수 있다 (정식 후 96일).

2) 배추 무사마귀 병의 방제효과

실험설명: 배추 주 생산지인 전라남도 해남군에서 배추무사마귀병에 의한 피해가 심한 포장을선택하여 키틴퇴비처리구 및 일반퇴비처리구로 나누어 실험을 실시하였다. 정식후 6주, 7주 및 8주에 시료를 채취하여서 토양의 효소 활성, 병발생 지수, 식물생장촉진효과 등을 조사하였다. T1은 키틴퇴비 처리구 이며 T2는 일반퇴비 처리구이다.

표 5. 처리구별 시간 변화에 따른 토양 chitinase 활성의 변화.

Treatment	6 week	7 week	8 week
	chitinase activity Unit/g dry soil		
T1	1.76±0.12a	1.81±0.08a	1.90±0.09a
T2	0.72±0.18b	0.79±0.11b	0.68±0.05b

표 6. 처리구별 시간 변화에 따른 토양내 미생물 밀도의 변화.

Treatment	6 week	7 week	8 week
	chitinase producing bacteria log (CFU g ⁻¹ dry soil)		
T1	7.99±0.11a	7.91±0.09ab	7.50±0.23a
T2	6.30±0.42b	6.00±0.37b	6.33±0.16b

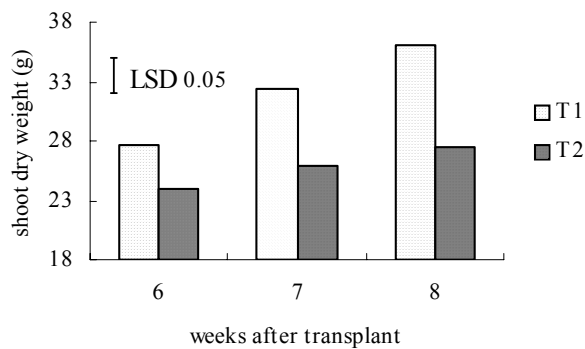


그림 72. 처리구별 시간 변화에 따른 배추 지상부 무게의 변화.

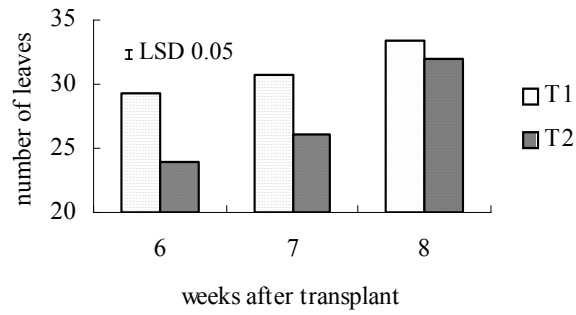


그림 73. 처리구별 시간 변화에 따른 배추 엽수의 변화.

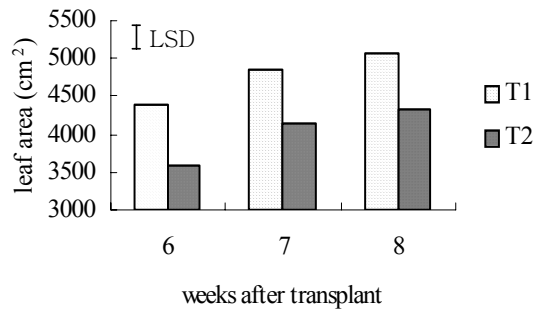


그림 74. 처리구별 시간 변화에 따른 배추 엽 면적의 변화.

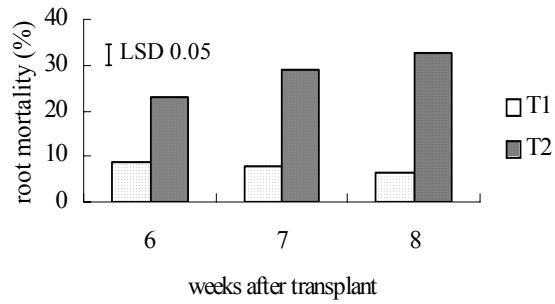


그림 75. 처리구별 시간 변화에 따른 배추 뿌리 치사율의 변화.

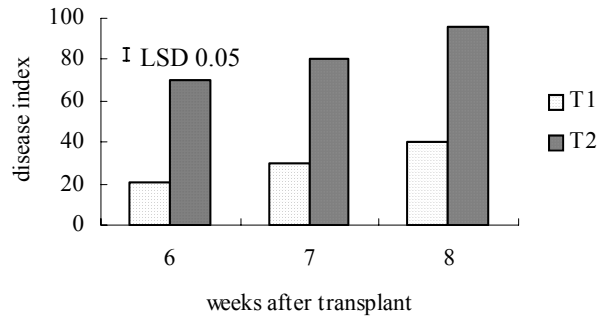


그림 76. 처리구별 시간 변화에 따른 배추 무사마귀병 발생지수의 변화.



그림 77. 정식 8주후 키틴퇴비 및 일반퇴비 처리구에서의 배추뿌리의 양상.
 키틴퇴비는 무사마귀병을 효과적으로 억제함을 알수 있다.

3) 키턴퇴비의 기타 작물에 대한 병 억제 및 성장촉진효과



그림 78. 키턴퇴비의 처리는 가지의 시들음병을 효과적으로 방제한다.



그림 79. 키턴퇴비의 처리는 고추역병을 효과적으로 방제한다.



그림 80. 키턴퇴비의 처리가 딸기 육묘의 초기 생육에 미치는 영향.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 1차년도

1) 우수한 chitinase 생성균주 선발 및 동정이다. 따라서 게껍질이 많이 함유된 해안가 토양으로부터 키틴분해미생물을 분리하여 16S rRNA gene sequence, Biolog 및 GC-FAME을 이용하여 동정 하였다. 선발된 미생물의 생리활성 조사는 기내실험에서 다음과 같이 이루어졌다. 첫째, 0.2% colloidal chitin이 함유된 액체배지상에서 chitinase 활성을 시간경과에 따라 보았다. 둘째, 병원성 곰팡이 및 선충제어 능력을 (*in vitro*)를 고체배지에서 뿐만 아니라 SEM을 이용하여 측정하였다. 셋째, 키틴유도물질에 대한 효소활성 및 항균성 정도를 측정하였다.

2) 우수한 키틴분해균과 게껍질 및 농업 부산물을 혼합한 실험용 키틴퇴비의 용량이 500L 정도 되게 제조하였다. 그리고 키틴퇴비의 부숙과정동안 시간경과에 따라 C/N 비, 전질소, 미량원소 및 키틴퇴비부숙도를 측정하였다. 부숙과정에 따른 미생물상 조사로서 키틴분해균, 곰팡이, 박테리아의 분포를 측정하였다. 또한 부숙중 시간경과에 따라 chitinase, β -1,3-glucanase, dehydrogenase, Acid phosphatase, Alkaline phosphate 등의 효소의 활성 측정하였다.

3) 분리된 키틴분해미생물의 식물에 대한 *in vitro* test로써 작물에 대한 성장반응조사, 종자의 발아율 조사, 기본 성장조사 및 생리적 대사 등을 수행하였다. 발아율 조사시에는 오이를 대상 작물로 사용하였다. 그리고 조제된 키틴퇴비의 식물에 대한 성장 촉진 효과는 병원균, *Rhizoctonia solani* (모잘록병균), *Fusarium oxysporum* (시들음병균), *Phytophthora capsici* (역병균)등에 대한 제어와 식물 발병률을 오이, 토마토, 고추에서 각각 확인하였다. 대조구로는 상업용퇴비를 사용하였다.

2. 2차년도

1) 우수한 키틴분해균이 다량 함유한 키틴퇴비의 대량생산. 분해균과 게껍질 및 농업 부산물을 혼합한 5,000-20,000ℓ 규모의 퇴비를 조제하였으며 키틴퇴비의 부숙과정동안 시간경과에 따른 퇴비의 C/N 비, 전질소, 미량원소, 토양효소 및 부숙도를 조사하였다. 부숙과정에 따른 미생물상 조사로서 키틴분해균, 곰팡이, 박테리아의 분

포를 측정하였다. 또한 부숙중 시간경과에 따라 chitinase, β -1,3-glucanase, 등 효소의 활성을 측정하였다.

2) 키틴퇴비로부터 직접 분리된 chitinase 생성균의 생물학적 제어능력의 조사. 2% colloidal chitin이 함유된 고체배제상에서 그 활성이 확인, 선발된 키틴미생물은 16S rRNA gene sequence, Biolog 및 GC-FAME을 이용하여 동정하였다. 또한 병원성 곰팡이인 *R. solani*, *P. capsici*을 확보하였고 뿌리혹선충인 *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. halpa*를 확보하여 실험에 사용하였다.

3) 키틴퇴비의 포트내에서의 활성검증. 첫째로 조제된 키틴퇴비의 병원성 곰팡이 제어능력측정으로 고추역병균 *P. capsici* 을 식물체에 처리하여 억제 효과를 확인하였으며 둘째로 선충증식 억제효과 측정으로 고구마 뿌리혹선충(*Meloidogyne incognita*) 을 분리하여 접종하였다. 대조구로는 상업용퇴비 (일반퇴비) 를 사용하였다.

4) 키틴퇴비와 작물간의 상호작용 조사. 병원성 곰팡이와 뿌리혹 선충을 접종한 식물체에 키틴퇴비를 처리한 후 작물의 성장촉진효과 및 PR-protein (chitinase, β -1,3-glucanase, Peroxidase) 을 조사하였다. 그리고 병원성 인자에 대한 저항력의 지표로써 항산화효소 (SOD, CAT, PPO)를 조사하였다.

3. 3차년도

1) 키틴퇴비 및 다른 식물성장 촉진 인자들을 적당히 혼합하여 육묘용 상토를 개발하였으며 상추를 이용하여서 그 효과를 검증하였다. 또한 육묘용 상토가 발아 후 생육에 약해가 없는지를 달관 조사를 통하여 확인하였다.

2) 농가에서의 다양한 실험을 거쳐서 주요 시설재배 채소인 쌈채 등에서의 사용방법 및 사용량을 확립하였으며 실용화 기술을 병방제 효과와 함께 확인하였다.

3) 개발된 기술은 주식회사 흙사랑에 이전하여서 제품화에 성공 하였으며 농가에 대한 교육을 통하여 농가 보급에 주력하였다.

4. 최종평가

1) 부존 폐기자원을 활용하여서 원예용 키틴퇴비를 개발하는데 성공하였다.

2) 육묘 및 포장에서 키틴퇴비의 식물에 대한 성장촉진효과, 병해, 충해 에 대한 가능성을 검토 하였다.

3) 광범위한 적응성 검토를 통하여 산업화 기술을 확립하였으며 제품화에 성공하였다.

4) 키틴분해 미생물을 다량 함유한 기능성 퇴비 개발 기술로 특허를 취득하였다.

5. 관련분야에서의 기여도

1) 키틴퇴비의 기능성 부여로 육묘에서 수확까지 생장촉진과 생물학적 방제의 기반을 마련함.

2) 키틴퇴비의 대량생산으로 수입 상토 대체 효과를 가져옴.

3) 화학적 방제제인 농약의 사용이 상당히 줄어들 것으로 예상됨.

4) 농가의 지출의 감소로 소득이 큰 폭으로 증가함.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 키틴분해 미생물을 다량 함유한 기능성 퇴비는 특허를 취득하였으며 주식회사 흙사랑으로 기술이전을 끝내고 제품으로 대량 생산되어 유통되고 있다.
2. 농가에 대한 교육을 통하여 농약 및 각종 미생물 제제의 무분별한 사용을 최소화함으로써 환경오염을 줄이고 농가의 소득을 증대하는데 힘쓸 것이다.
3. 농가에 대한 기술 지도를 통하여 농업인의 기술을 향상시켜서 고품질의 채소, 과일, 벼 등의 생산함으로써 고품질 브랜드 이미지를 확립하는데 힘쓸 것이다.
4. 기 개발된 기술을 바탕으로 더욱 효과적이고 보급이 쉬운 생물학적 방제제 개발에 힘쓸 것이다.

제 6 장 참고문헌

Ali, M, T. Horiuchi and S. Miyagawa. 1997. Nodulation, nitrogen fixation and growth of soybean plants (*Glycine max* Merr.) in soil supplemented with chitin or chitosan. *Jpn. J. Crop Sci.* 66(1):100-107.

Akhtar, M. & Malik, A. 2000. Roles of organic soil amendment and soil organisms in the biological control of plant-parasitic nematode: a review. *Bioresource Technology* 74: 35-47.

Becker, J.O., Zavaleta-Mejia, E., Colbert, S.F., Schroth, M.N., Weinhold, A.R., Hancock, J.G. & Van Gundy, S. D. 1988. Effect of Rhizobacteria on Root-knot nematode and Gall Formation. *Techniques* 78(11): 1466-1469.

Bhaskara Reddy, M. V., J. Arul, P. Angers and L. Couture. 1999. Chitosan treatment of wheat seeds induces resistance to *Fusarium graminearum* and improves seed quality. *J. Agric. Food Chem.* 47:1208-1216.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 17:248-254.

Broekaert, W. F., V. Parijs, A. Allen and W. J. Peumans. 1988. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 33:319.

Brown, J. A., F. J. Neville, S. U. Sarathchandra, R. N. Watson and N. R. Cox. 1995. Effects of chitin amendment on plant growth, microbial populations and nematodes in soil. *N. Z. J. Agric. Res. Proceedings* 48ths Conf.

Burgwyn, B., Nagel, B., Ryerse, J. & Bolla, R.I. 2003. *Heterodera glycines*: eggshell ultrastructure and histochemical localization of chitinous components. *Experimental Parasitology* 104: 47-53.

Caruso, C., Chilosi, G., Caporale, C., Leonardi, L., Bertini, L., Magro, P. & Buonocore, V. 1999. Induction of pathogenesis-related proteins in germinating wheat seeds infected with *Fusarium culmorum*. *Plant Science* 140:107-120.

Chance, B. & Maehly, A.C. 1955. Assay of catalases and peroxidases. *Meth Enzymol* 2: 764-775.

Chen, J., Abawi, G.S. & Zuckerman, B. M. 1999. Suppression of *Meloidogyne hapla* and Its Damage to Lettuce Grown in a Mineral Soil Amended with Chitin and Biocontrol Organisms. *Supplement to the Journal of Nematology* 31(4S):719-725.

Choi, D.R. 1999. *The 2nd Symposium on nematode Classification and control: Nematode damage to the crops and their control*. Institute of Agricultural Science & Technology, Kyongbuk National University. 46 pp.

Copper, K. M. and G. S. Grandison. 1986. *Annals of Applied Biology*, in press.

Cronin, D., Y. Moenne-Loccoz, C. Dunne and F. O'Gara. 1997. Inhibition of egg hatch of the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* by chitinase-producing bacteria. *European J. of Plant Pathology*. 103:433-440.

Davis, J. S., and Gander. 1967. A re-evaluation of the Roe procedure for the determination of fructose. *Anal. Biochem.* 19:72-79.

Eastin, E. F. 1978. Total nitrogen determination for plant material containing

nitrate. *Analy. Biochem.* 85 : 591-594.

Grandison, G. S. and K. M. Cooper. 1986. *Journal of Nematology* 18(2): 141-149.

Hallmann, J., Rodriguez-Kbana, R. & Kloepper, J.W. 1999. Chitin-mediated changes in bacterial communities of the soil, rhizosphere and within roots of cotton in relation to nematode control. *Soil Biology and Biochemistry*. 31:551-560.

Hardy, R. W. F., Holsten, R. D., Jackson, E. K. and Burns, R. C. 1968. The acetylene-ethylene assay for N₂-fixation : laboratory and field evaluation. *Plant Physiology*. 43 : 1185-1207.

Huynh, G. K., C. M. Hironaka, E. B. Levine, C. E. Smith, J. R. Borgmeyer and D. M. Shah. 1992. *J. Biol. Chem.* 267:6635.

Jacobsen, S., J. D. Mikkelsen and J. Heigaard. 1990. *Physiol. Plantarum*. 79:554.

Koehler, L. H. 1952. *Anal. Chem.* 24:1576.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nat. New Biol.* 227:680-685.

Mankau, R and S. Das. 1969. *Journal of Nematology* 1(1):15-16.

Mankau, R and S. Das, 1974. Effects of organic materials on nematode bionomics in citrus and root-knot nematode infested soil. *Indian J. Nematol.* 4:138-151.

Mauch, F., L. A. Hadwiger and T. Boller. 1988. *Plant Physiol.* 87:325.

Matthieu, H.A.J.J. & Pierre, J.G.M.D.W. 1989. Identification of Several

Pathogenesis-Related Proteins in Tomato Leaves Inoculated with *Cladosporium fulvum*(*Syn. Fulvia fulva*) as 1,3--Glucanase and chitinase. *Plant Physiology* 89:945-951.

Maurhofer, M., Hase, C., Meuwly, P., Metraux, J.P. & Ddfago, G. 1994. Induction of systemic resistance of tobacco to necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0: Influence of the *gacA* gene and of pyoverdine production. *Phytopathology* 84: 139-146.

Metraxux, J. P., W. Burkhart, M. Moyer, S. Dincher, W. Middlesteadt, S. Willias, S., G. Payne, M. Carnes and J. Ryals. 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86:896.

Mian, I. H., G. Godoy, R. A. Shelby, R. Rodriguez-Kabana and G. Morgan-Jones. 1982. Chintin amendments for control of *Meloidogyne arenaria* in infected soil. *Nematropica*. 12:71-84.

Oh S. K, D. Choi and S. H. Yu. 1998. Development of integrated pest management techniques using biomass for organic farming (I). Suppression of late blight and fusarium wilt of tomato by chitosan involving both antifungal and plant activities. *Korea J. Plant Pathol.* 14(3):278-285.

Rodriguez-Kabana, R., G. Morgan-Jones and B. Ownley Gintis. 1984. Effects on chitin amendments to soil on *Heterodera glycines*, microbial populations and colonization of cysts by fungi. *Nematropica*. 14:10-25.

Rodriguez-Kabana, R. 1986. Organic and inorganic nitrogen amendments to soil as nematode suppressants. *J. of Nematology*. 18(2):129-135.

Sarathchandra, S. U., R. N. Watson, N. R. Cox, M. E. di Menna, J. A. Brown, G. Burch and F. J. Neville. 1996. Effects of chitin amendment of soil on

microorganisms, nematodes, and growth of white clover (*Trifolium repens* L.) and perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). Biol. Fertil. Soils. 22:221-226.

Spiegel, Y., I. Chet and E. Cohn. 1987. Use of chitin for controlling plant-parasitic nematodes. II. Mode of action. Plant and Soil. 98:337-345.

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.