

118029
-02

고사리 및
신규 친환경
마름병의 방제제
병원균 개발
규명

최종
보고서

2020

농림식품기술기획평가원
농림축산식품부

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개() 발간등록번호(O)
농생명산업기술개발사업 2020년도 최종 보고서

발간등록번호

11-1543000-003151-01

고사리 신규 마름병의 병원균 규명 및 친환경 방제제 개발 최종보고서

2020. 7. 10.

주관연구기관 / (주)제일그린산업

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

<제 출 문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “고사리 신규 마름병의 병원균 규명 및 친환경 방제제 개발”(개발기간 : 2018. 4. 26 ~ 2019. 12. 31) 과제의 최종보고서 10부를 제출합니다.

2020. 7. 10.

주관연구기관명 : (주)제일그린산업 정 영 훈 (인)



주관연구책임자 : 이 정 은

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	118029-02	해 당 단 계 연 구 기 간	2019.1.31. ~2019.12.31	단 계 구 분	2년차/ 총 2년차
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	농생명산업기술사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	고사리 신규 마름병의 병원균 규명 및 친환경 방제제 개발			
연구책임자	해당단계 참여연구원 수	총: 5명 내부: 5명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부: 65,000천원 민간: 25,000천원 계: 90,000천원	
	총 연구기간 참여연구원 수	총: 6명 내부: 6명 외부: 명	총 연구개발비	정부:115,000천원 민간: 42,000천원 계:157,000천원	
연구기관명 및 소속부서명	(주)제일그린산업 기술개발연구실			참여기업명	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	일반
-------------------------	----

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설· 장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호	Res. Plant Dis. 25:143-1 48(2019)	10-2019- 0161789						KACC 48792 KACC 92271P			

국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비 현황

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

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)

보고서 면수: 46

- 최근 남해군 창선면 고사리 재배 농가에 많이 발생된 고사리 마름병의 원인 규명을 위하여 병든 조직으로부터 병원균을 분리·동정한 결과 병원균이 *Didymella* sp.인 신규 병으로 밝혀냄
- 고사리 마름병은 기온이 20~25℃ 정도 되는 초여름부터 발생하여, 잎 끝에서부터 낙엽이 지듯 전체가 누렇게 변하면서 줄기까지 말라 검게 고사하는 증상을 나타냄
- 병원균 *Didymella* sp.의 균사 최적 생장은 25℃, pH 4~8 범위에서 생장이 가능한 것으로 확인됨
- 근권 토양 및 식물 조직에서 분리한 650여 종의 길항 미생물 중 병원균에 대한 억제 효과가 가장 좋은 1종을 선발, 동정하여 *Bacillus subtilis* JG46이라 명명함
- *B. subtilis* JG46 균주는 고사리 병원균 *Didymella* sp.의 억제 효과뿐만 아니라 수박, 딸기, 바나나, 인삼의 주요 식물 병원 진균 및 세균의 생장도 억제 하였음
- *B. subtilis* JG46 균주의 대량 배양 및 제제화 최적화로 미생물 시제품 생산
- *B. subtilis* JG46 균주를 이용한 미생물제제의 고사리 신규 마름병에 대한 예방 및 치료 효과 검증 결과 60% 이상의 방제가를 나타냄
- 개발된 미생물 제제는 오이, 배추, 들깨, 상추 작물에 대한 식물 생육 촉진 효과를 가짐
- 개발된 미생물 제제는 유기농업자재로 공시 등록 (2-4-153) 되었음

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 남해군 창선면에서 발생된 고사리 신규 병해의 원인 규명 - 미생물을 이용한 친환경 병 방제제 개발 				
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 남해군 창선면 고사리 재배 농가에 많이 발생된 고사리 신규 마름병의 이병조직으로부터 병원균을 분리·동정하여 병원균이 <i>Didymella</i> sp.임을 밝혀냄 (KACC48792) - 고사리 마름병은 기온이 20~25℃ 정도 되는 초여름부터 발생하여, 잎 끝에서부터 낙엽이 지듯 전체가 누렇게 변하면서 줄기까지 말라 검게 고사하는 증상을 나타냄 - 병원균 <i>Didymella</i> sp.의 균사 최적 생장은 25℃, pH 4~8 범위에서 생장이 가능한 것으로 확인됨 - 근권 토양 및 식물 조직으로 부터 길항 미생물 650여 개의 균주 중 병원균 <i>Didymella</i> sp.에 대한 억제 효과가 갖아 좋은 균주 1종을 선발, 동정한 결과 <i>Bacillus subtilis</i> JG46이라 명명함 (KACC92271P) - <i>B. subtilis</i> JG46 균주는 고사리 신규 마름병에 대한 효과뿐만 아니라 주요 식물 병원 진균 <i>Didymella bryoniae</i> (수박 줄기마름병), <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (인삼 탄저병), <i>Sclerotinia minor</i> (인삼 균핵병), <i>Alternaria panax</i> (인삼 반점병), <i>Fusarium oxysporum</i> (딸기 시들음병) 및 세균 <i>Xanthomonas campestris</i> (바나나 시들음병), <i>Xanthomonas fragariae</i> (딸기 세균모무늬병)의 생장에 대한 억제 효과도 나타냄 - <i>B. subtilis</i> JG46을 대량 배양, 제제화하여 미생물제 시제품을 생산함 - <i>B. subtilis</i> JG46 균주를 이용한 미생물 제제의 고사리 신규 마름병 (<i>Didymella</i> sp.)에 대한 예방 및 치료 효과 검증 결과 60% 이상의 방제가를 나타냄 - <i>B. subtilis</i> JG46 균주를 이용한 미생물 제제는 오이, 배추, 들깨, 상추 작물에서 아무런 약해 증상도 없으며 식물 생육 촉진 효과를 나타냄 - 개발된 미생물 제제는 유기농업자재로 공시 등록됨 (2-4-153) 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 고사리 신규 마름병 발생 농가에 시급한 병 방제 기술 보급 - 전국 고사리 농가의 신규 병 방제법 교육으로 재배 농가의 생산 손실 예방 및 수익 증대 - 고사리뿐만 아니라 타 작물 (인삼, 딸기 등)의 병해 관리를 위해 적용 작물 확대 - PLS법 시행으로 농약 사용이 어려운 농가 및 농약으로 방제가 어려운 병해에 친환경 방제법 보급으로 농산물의 안전성 확보 - 효과적인 친환경 방제제 보급으로 분사 매출 증대 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	고사리	마름병	길항미생물	생물학적 방제	
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	bracken	leaf blight	antagonistic microorganism	biological control	<i>Didymella</i> sp.

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

〈 목 차 〉

제 1 장 연구개발 과제의 개요	7
제 1 절 연구개발 목적 및 필요성	7
1. 연구개발 목적	7
2. 연구개발의 필요성	7
제 2 절 연구개발 내용 및 범위	10
제 2 장 연구수행 내용 및 결과	11
제 1 절 연구수행 내용	11
1. 고사리 신규 마름병의 원인 규명	11
2. 병 방제를 위한 길항 미생물 선발 및 동정	12
3. 선발된 길항 미생물의 제제화	13
4. 유기농업자재 등록을 위한 시험	14
제 2 절 연구수행 결과	14
1. 고사리 신규 마름병의 원인 규명	14
2. 병 방제를 위한 길항 미생물 선발 및 동정	21
3. 선발 미생물 균주의 주요 식물 병원균 억제 효과 검증	25
4. 선발 길항 미생물의 제제화 및 효과 검증	27
5. 유기농업자재 등록을 위한 시험	31
제 3 절 연구개발 성과	34
1. 기술적 성과	34
2. 경제적 성과	35
3. 사업화 성과	35
제 3 장 연구개발 목표	36
제 1 절 최종 목표 및 달성도	36
1. 연구개발의 최종 목표	36
2. 정성적 연구목표 대비 달성도	36
3. 정량적 연구목표 대비 달성도	37
4. 목표달성에 따른 기대 효과	37

제 4 장 연구 결과의 활용 계획	38
제 1 절 활용 분야 및 방안	38
1. 연구결과의 활용 분야	38
2. 추가연구 및 타 연구의 필요성	38
3. 사업화 추진방안	38
붙임. 참고 문헌	38
부록. 유기농업자재 공시 등록을 위한 시험 성적서	41

제 1 장 연구개발 과제의 개요

제 1 절 연구개발 목적 및 필요성

1. 연구개발 목적

남해군 창선면에서 대대적으로 발생된 고사리 신규 병해의 원인을 규명하고 친환경적인 생물학적 방제제를 개발하고자 하였다.

2. 연구개발의 필요성

(1) 개요

- 최근 성인병 예방뿐만 아니라 건강한 삶을 유지하기 위한 웰빙 열풍이 불면서 산채를 주재료로 한식 위주의 식단이 주목 받고 있다. 그 중 고사리 (*Pteridium aquilinum* Kuhn)는 우리 민족이 즐겨 먹던 산채 중 하나로 무기물이 풍부하고 asparagine, glutamic acid와 같은 필수 아미노산과 비타민 및 식이섬유를 다량 함유하고 있고 여러 가지 기능이 알려지면서 건강식품으로 그 수요가 급격히 늘어나고 있다.
- 고사리는 배수가 잘 되고 다소 그늘지며 비옥한 곳이면 어디든지 잘 자라는 특성을 가지고 있어 우리나라 전국 산야에서 재배가 되고 있다. 전국 고사리 재배면적은 2,196ha, 생산량은 9,244톤 (생산액 524억 원, 2015년)으로 경남 남해군이 국내에서 가장 큰 주산지로서 전국 생산량의 20%를 차지하고 있다. 특히 남해군은 창선면을 고사리 대표 브랜드로 육성시키고 수집, 판매까지 농협에서 일괄 책임지고 있다.
- 최근 몇 년간 남해군 창선면의 고사리 재배 농가에서 잎과 줄기가 붉게 말라 죽는 증상이 대대적으로 발생 되어 생산에 심한 피해를 일으키고 있다. 그러나 그 원인을 알 수 없고 방제법이 알려지지 않아 앞으로 남해군 농가뿐만 아니라 다른 지역의 고사리 재배 농가에도 급속히 발병이 증가되어 전국적으로 피해가 늘어날 것으로 우려된다.
- 고사리의 생산 농가 및 재배 면적이 증가함에 따라 고사리의 다양한 생리활성 물질 (Lee et al., 2010; Park et al., 2014), 항산화 활성 (Sim et al., 2015)이나 식물체 (Lee et al., 2010) 및 재배 토양의 이화학적 특성, 독성물질 제거법 (Lee et al., 2017) 등에 관한 연구가 진행되고 있다. 그러나 병해충 발생 및 방제와 같이 실질적인 생산에 관련된 재배 기술에 관한 연구 보고는 거의 없는 실정이다.
- 벼, 잔디와 같이 잎이 말라 죽는 이병 식물로부터 병원균을 분리·동정한 많은 연구들이 발표 되었으며, 길항균을 이용한 생물학적 방제법에 대한 연구 결과가 발표된 바 있다 (Noh et al., 2012; Chang and Lee, 2013; Chung et al., 2015; Hossain et al., 2016). 특히 벼 뿌리에서 분리된 새로운 신규 세균을 이용하여 대량 배양, 포장 시험, 제제화에 대한 연구 (특허 10-1569737)를 통해 유기농업자재가 상용화 되어 있다.

(2) 발병 상황

- 경남 남해군 창선면 오용리 소재 고사리 재배 농가의 발병 상황을 확인하였다 (Fig. 1).
- 9~10월경 낙엽이 지듯 잎의 색이 갈색으로 변하면서 며칠 만에 말라 죽는 증상이 나타나고 다음 해에 정상적인 생육이 되지 않는다.
- 2014년부터 2017년까지 남해군 창선면 창선농협 자료에 의하면 재배면적은 거의 변화가 없지만 2017년 생산량은 2014년에 비해 49.7% 감소하였고, 생산액도 64.5% 감소되었다 (Table 1).



Fig. 1. 경남 남해군 창선면 오용리 소재 고사리 재배 농가의 고사리 발병 상황 (2017년 9월 8일)

Table 1. 남해군 창선면 고사리 재배면적, 생산량, 생산액 현황 (2014년~2017년)

구분	2014년	2015년	2016년	2017년
재배면적(ha)	460	500	500	500
생산량(kg)	167,000	110,000	128,000	84,000
생산액(백만원)	8,851	4,730	4,582	3,142

(제공 : 창선농협)

(3) 예비 조사

- 2017년 9월 이병 조직으로부터 분리된 균의 16s rDNA와 ITS region sequencing 결과, *Diaporthe* sp. 또는 *Phomopsis* sp.로 의심되었다 (Fig. 2). 이 두 종은 콩, 가지, 사과나무 등 식물을 말라 고사시키는 전염 병원균으로 알려져 있다 (Udayanga et al., 2014; Park et al., 2017).

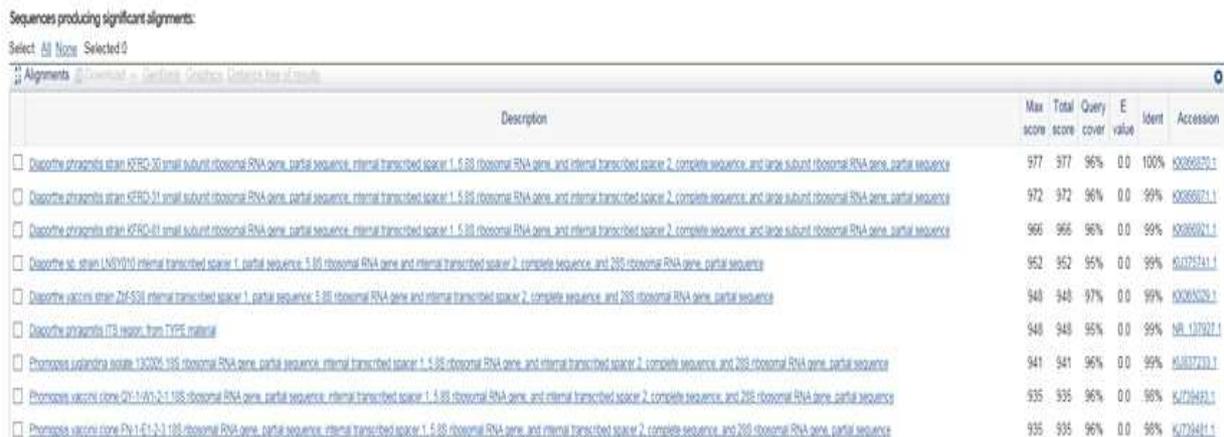


Fig. 2. 이병 조직으로부터 분리한 병원균의 ITS region sequences 분석 결과

(4) 필요성

- 현재까지 국내에서 보고된 고사리의 병·해충은 뿌리썩음병 (*Pythium* sp.), 줄기마름병 (*Rhizoctonia* sp.), 선충 및 진딧물에 의한 피해만이 간략히 소개되어 있고, 그 외 병해충이나 방제법에 대한 구체적인 연구는 아직 보고된 바 없다.
- 따라서 본 연구를 통하여 고사리 재배 시 발생한 신규 병에 대한 원인균을 분리·동정하고 병 발생을 친환경적으로 방제할 수 있는 방제제 개발이 시급히 요구되었다. 이 연구결과는 증가되고 있는 고사리 재배 농가의 병해 진단에 활용되어 농가 소득향상에 도움이 될 수 있을 것이다.

제 2 절 연구개발 내용 및 범위

연구년도	연구개발 목표	개발 내용 및 범위
1차 년도	<ul style="list-style-type: none"> - 신규 병해의 발생 조건, 토양의 이화학적 특성 분석 및 병원균 분리·동정을 통한 고사리 신규 마름병의 원인 규명 - 병 방제를 위한 길항 미생물 선발 및 동정 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 남해군 고사리 재배지에 발생된 신규 병해의 증상 (잎, 줄기, 뿌리), 발생시기 및 발생 조건 조사 ○ 신규 병해 발생지 토양의 미생물 분석 (세균 및 방선균의 밀도 조사) 및 이화학적 성분 분석 (전문기관 의뢰) ○ 이병 조직으로부터 병원균의 분리 · 동정 (ITS region sequencing 분석), 생리적 특성 조사 (온도, pH 등 조사) 및 코호 가설 검증 ○ 병원균에 대한 길항미생물 균주 선발 및 병균 억제 효과 조사 (보유 미생물 및 고사리 근권, 토양의 미생물에 대한 활성테스트를 통해 병균 억제 효과를 확인한 후 선발) ○ 선발 미생물의 대량 배양 조건 확립 (배지조성, 배양온도, pH 등에 따른 조건 최적화)
2차 년도	<ul style="list-style-type: none"> - 선발된 길항 미생물의 제제화 - 미생물 제제의 농가 실증 시험을 통해 효과적인 사용방법 확립 - 유기농업자재 등록 신청 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 미생물 제제화 (선발 미생물 배양액 분말화) 및 품질 관리 방법 확립 (원재 및 제품의 미생물 밀도 및 BOX-PCR을 이용한 유전자 분석) ○ 농가실증시험을 통해 미생물 제제의 효과적인 사용방법 확립 (미생물 제제의 처리 시기 및 처리 방법 실증 시험) ○ 미생물제의 약해·약효 검증 (농진청 인증 시험연구기관 의뢰) ○ 미생물제의 인축 및 환경 독성 시험 (농진청 인증 시험연구기관 의뢰) - 유기농업자재 등록 신청 (1건)

제 2 장 연구수행 내용 및 결과

제 1 절 연구수행 내용

1. 고사리 신규 마름병의 원인 규명

(1) 신규 병해 발생 조사 및 병원균 분리

2018년 5월, 7월, 10월 3차례의 농가 방문을 통해 고사리 마름병의 발생 시기 및 특징 등 정보를 수집하였다. 샘플 채취 시기는 고사리 마름병 발생 농가에서 병 발생을 확인하고 방문하여 채취하였으며 각 채취한 이병조직(잎, 줄기, 뿌리)을 1% NaOCl 용액에 30초, 70% 에탄올에 30초 동안 침지하여 표면 살균하였다. 이후 시료를 멸균수로 다시 세척하고 멸균 여과지로 남은 수분을 제거한 후 1-2mm 크기로 잘라 PDA(Potato dextrose agar, Difco™) 배지 위에 올려 25℃에서 3일간 배양하였다. 이병 시료에서 자라 나온 곰팡이 균사체를 다시 분리하여 PDA배지에서 20일 동안 순수 분리하였다. 이와 같은 방법으로 2018년 채취 이병 시료로부터 총 92종의 곰팡이를 분리하였다.

(2) 병원성 검정(코호가설 검증)

이병 조직으로부터 분리된 92종의 곰팡이 균주들의 병원성 검정을 위하여 남해군 창선면 고사리 재배 농가로부터 정상 고사리 잎을 채취해 왔으며, 7-8cm 길이의 정상 고사리 잎이 달려 있는 줄기를 표면 살균하여 습실 처리된 Petri dish에 넣고 잎 표면에 PDA에서 순수 배양된 곰팡이 균사체(직경 0.8cm 크기 agar disc)를 올려 놓았다. 이 후 25℃에서 7~10일 동안 배양하여 고사리 잎의 마름병 증상 발생 여부를 관찰하였다. 코호가설을 바탕으로 정상 고사리 잎에 동일한 병징을 나타내는 병원균 중 5월 시료에서 4종, 7월 시료에서 18종을 구분하였다.

(3) 병원균의 동정

최종 분리된 22종의 병원균 동정을 위하여 각각의 병원균 배양액으로부터 DNA를 추출하였고, ITS(internal transcribed region) 부위(primer 조합: ITS1: 5' - TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' , ITS4: 5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')와 18S rRNA 부위(NS1: 5' -GTAGTCATATGCTTGCTC-3' , NS4: 5' -CTTCCGTCAATTCCTTTAAG-3')를 증폭하여 염기서열을 1차 해독하여 유전자의 염기서열 상동성 분석을 시행하였다. 특히 7월 시료 분석 결과 *Phoma*속 곰팡이의 경우, 일반적으로 *Phoma* sp.와 연관된 곰팡이의 계통발생학적 분석(Chen et al., 2015)에 자주 사용되는 ITS부위(primer 조합: ITS1과 ITS4, 532bp)(White et al., 1990), rRNA의 large subunit 부위(LSU, primer 조합: LR0R과 LR5, 900bp) (Vilgalys and Hester, 1990), β -tubulin 유전자 부위(BTU, primer 조합: Btub3Fd와 BTub4Rd, 380bp) (Woudenberg et al., 2009)를 720-4와 720-12 균주의 계놈 DNA로부터 각각 증폭하여 염기서열을 2차 해독하였다. 이렇게 증폭된 ITS부위와 LSU 유전자, BTU 유전자의 염기서열을 합쳐서 정렬한 후 MEGA 6.0 프로그램의 neighbor joining, maximum parsimony, unweighted pair group method with arithmetic mean 방법 등을 사용하여 계통수를 작성하였다.

(4) 병원균의 생리적 특성 조사

분리한 병원균의 생리적 특성을 조사하기 위하여 20°C, 25°C, 30°C의 배양 온도별로 일주일간 PDA 배지에서 배양하였고, pH 변화에 따른 배양 정도를 알아보기 위하여 McIlvaine buffer를 이용하여 pH 3 ~ 8 범위의 배지에 병원균을 접종하여 25°C에서 일주일간 배양한 후 각 병원균의 성장 길이를 측정하였다.

(5) 병원균의 균학적 특성 조사

병원균의 포자 형태를 관찰하기 위하여 각 균주의 균사체를 PDA, TSA(Tryptic Soy Agar), MA(Malt Extract Agar), OA(Oatmeal Agar) 배지 위에서 접종한 후 2주일 동안 25°C 조건에서 배양하여 포자형성을 유도하였다. 슬라이드에 멸균증류수 한방울을 올리고 병원균의 배양체를 백금으로 분리하여 슬라이드 글라스에 골고루 펴서 건조 후 커버글라스를 덮어 현미경(confocal laser scanning Microscope, FV1000) 하에서 관찰하였다.

(6) 신규 병해 발생지 토양의 미생물 및 성분 분석

고사리 신규 마름병의 발생이 토양의 특성 차이인지를 알아보기 위하여 병 발생이 안 된 정상 재배지 토양과 병 발생 재배지의 토양을 채취하여 세균 및 방선균 밀도와 토양 성분 분석을 하였다. 세균은 0.1TSA 배지에서, 방선균은 Actinomycetes agar 배지에서 3~5일간 28°C에서 배양하였다. 토양 성분 분석은 한두레 토양진단센터에 의뢰하여 결과를 얻었다.

2. 병 방제를 위한 길항 미생물 선발 및 동정

(1) 길항 미생물의 선발

근권 토양 및 식물 조직에서 분리된 650종의 미생물 균주들과 병원균과의 억제 효과를 시험하기 위하여 PDA 배지와 0.1TSA 배지 위에 분리한 병원균을 올리고 2~3일간 25°C에서 배양한 후 650종의 미생물 배양액을 병원균 주변에 일정한 간격을 두고 접종하였다. 병원균과 미생물을 함께 접종한 플레이트는 25°C에서 1주일동안 배양하면서 억제 효과를 관찰하였다. 650종의 보유 길항 미생물 균주 중 병원균의 성장을 억제하는 미생물 균주 56종을 1차 선발하였으며, 이 균주들의 배양체로부터 DNA를 추출하여 16s rDNA sequencing을 분석하였다.

(2) 선발된 길항 미생물 JG46 균주의 동정

선발된 길항 미생물 JG46 균주 배양액으로부터 DNA를 추출하여 16S rRNA 유전자의 염기서열을 분석한 후 GenBank/EMBL/DBJ의 데이터베이스와 상동성 검색을 수행하여 계통학적 위치를 검토하여 계통수를 나타냈다.

(3) JG46 균주의 유전자 분석(BOX-PCR)

JG46 균주와 근연종과의 상이성을 확인하기 위하여 유전자 분석(BOX-PCR)을 이용하여 근연종 균주 대비 유전자 비교 분석을 수행하였다. 유전자 분석을 위한 폴리머라제(polymerase)는 GoTaq Green Mater Mix(Promega), 프라이머(primer)는 BOXAR1(5'-CATCGCAAGGCGACGCTGACG-3')을 사용하였다. PCR 조건은 초기 변성(initial denaturation)은 95°C에서 7분, 35회 반복되는 과정인 변성(denaturation), 어닐링(annealing), 연

장(extension)은 각각 90℃에서 30초, 40℃에서 1분, 72℃에서 3분, 최종 연장(final extension)은 72℃에서 10분간 반응시켜 증폭시켰다. 이러한 과정을 거쳐 얻은 PCR 산물에 대해 1% LE agarose gel(Seakem)을 이용하여 증폭 유무를 확인하였다.

(4) JG46 균주의 주요 식물 병원균에 대한 억제 효과 검정

JG46 균주가 고사리 마름병 외에 타 작물 병원균에 대한 억제 효능을 나타내는지 검정하고자 식물 병원성 진균 5종(*Didymella bryoniae*(수박 줄기 마름병), *Colletorichum gloeosporododes*(인삼 탄저병), *Sclerotinia minor*(인삼 균핵병), *Alternaria panax*(인삼 반점병), *Fusarium oxysporum*(딸기 시들음병))은 PDA 배지에서 2주간 배양하였고 병원성 세균 2종(*Xanthomonas campestris*(바나나 시들음병), *Xanthomonas fragariae*(딸기 시들음병))은 0.1TSB 배지에서, JG46 균주는 0.1TSB와 0.5TSB 배지에서 28℃, 48시간 동안 진탕 배양하였다.

식물 병원성 진균에 대한 억제 효과를 검정하기 위하여 배양한 균사체 디스크를 PDA와 0.1TSA 배지의 중앙에 놓은 후, 균사체 디스크로부터 3cm 떨어진 곳에 0.1TSB 배지에서 28℃, 48시간 동안 진탕배양(120rpm) 한 JG46 균주 배양액 100ul를 떨어뜨렸다. 병원균에 따라 24~28℃에서 2~4일간 배양 후 균사 성장 억제 정도를 조사하였다.

식물 병원성 세균에 대한 억제 효과를 검정하기 위하여 배양된 병원성 세균을 0.1TSA 배지에 도말하고 배지에 작은 구멍을 2군데 뚫어 0.1TSB와 0.5TSB 배지에서 배양된 각각의 JG46 균주 배양액을 100ul씩을 떨어뜨린 후 28℃에서 24~48시간 동안 배양한 후 억제 정도를 조사하였다.

(5) JG46 균주의 배추 무사마귀병에 대한 억제 효과

JG46 균주가 배추 무사마귀병에 대한 억제 효과를 나타내는지 조사하기 위하여 열갈이 배추 종자를 표면 살균하고 멸균수로 세척한 후 플라스틱 배양기에 넣어 습도를 유지하면서 생육상에서 5일간 발아시켰다. 진주 인근에서 배추 무사마귀병이 심하게 발생한 토양을 채취하여 포트에 담고 발아된 열갈이 배추 종자를 심은 후 유효기가 될 때까지 실온에서 재배하였다. 각 처리구는 3반복으로 하였고 처리구 당 3주씩 심어서 준비하였다. 무처리구는 멸균된 0.1TSB 배양액 5ml를 관주 처리하였고 처리구는 JG46 균주를 0.1TSB 배지에서 3일간 배양한 배양액 (2×10^8 cfu/g) 5ml를 관주 처리한 후 매일 물을 주었다. 처리 한 달 후 재배하여 뿌리의 흑형성 정도를 관찰하였다.

3. 선발된 길항 미생물의 제제화

(1) 대량배양 최적 조건 조사 및 제제화

주관기관이 보유한 *Bacillus* sp.의 기본 배양 조건으로 선발 미생물 JG46을 대량 배양한 후 배양액을 분말 건조하는 과정으로 생균수를 계수하며 최적조건을 조사하였다. 대량 배양 및 분말화 과정을 최적화 한 후 증량제와 보조제를 혼합하여 제제화 하였다.

(2) 미생물제제의 약효 검증

JG46 균주를 이용한 미생물 제제가 고사리 신규 마름병에 대한 억제 효과가 있는지 검증하기 위하여 예방 효과와 치료 효과를 조사하였다. 고사리 마름병 병원균을 PDA 배지에 접종하고 25℃에서 10일간 배양하여 형성된 포자를 긁어 수확하고 포자 농도가 2×10^6 cfu/ml가 되도록 멸균수를 첨가하여 포자 현탁액을 준비하였고 모든 처리구는 3반복으로 진행되었다.

① 병 예방 효과 조사

병 예방 효과를 조사하기 위하여 미생물 제제를 1,000배와 2,000배로 희석하여 정상 고사리 잎에 흘러 내리도록 분무한 후 1일 동안 항온항습실(25℃, 75% RH)에 둔 후, 병균 포자 현탁액을 분무 접종한 후 처리 5일과 10일에 발병 정도를 조사하였다.

② 병 치료 효과 조사

미생물 제제의 병 치료 효과를 조사하기 위하여 병균 포자 현탁액(2×10^6 cfu/ml)을 정상 고사리 잎에 분무접종하고 이를 습실상에 넣고 1일 동안 항온항습실에서 발병시킨 후 미생물 제제 1,000배와 2,000배 희석액을 분무한 후 처리 5일과 10일에 발병 정도를 조사하였다.

고사리 신규 마름병의 발병 조사는 5단계 발병도(0: 정상, 1: 10~25%, 2: 26~50%, 3: 51~75%, 4: 76~100%)로 병이 들어 검게 변하는 정도로 구분하였으며 방제가는 아래와 같이 계산하여 산출하였다.

$$\text{방제가(\%)} = \{ (\text{무처리구 병 발병도} - \text{처리구 병 발병도}) / \text{무처리구 병 발병도} \} \times 100$$

(3) 미생물 제제에 의한 식물 생육 촉진 효과

미생물 제제 처리에 의한 식물 생육 촉진 효과를 검정하기 위하여 오이, 상추, 배추 및 들깨 종자를 표면 살균하고 멸균수로 세척하여 발아시킨 후 발아된 종자들을 10일간 작물 재배용 상토에서 키워 미생물 제제 희석액(2,000배)을 일주일 간격으로 4번 근권 토양에 관주 처리하여 무처리구와 비교하였다. 각 작물별 무처리구와 처리구는 3반복으로 하였고 관주 처리 한 달 후 각 작물의 생체중을 측정하였다.

4. 유기농업자재 등록을 위한 시험

JG46을 이용한 미생물제제를 유기농업자재 공시 등록하기 위하여 약해시험, 인축 및 환경 독성시험, 잔류농약시험, 미생물 동정 및 병원성 미생물 시험을 공인인증시험기관에서 시행하였다.

제 2 절 연구수행 결과

1. 고사리 신규 마름병의 원인 규명

고사리 신규 마름병 발생 농가를 방문하여 이병조직과 토양을 채취하였고 병원균 및 토양 분석을 통하여 고사리 마름병의 원인을 규명하고자 하였다.

(1) 병해의 발생 시기 및 특징

2018년 5월, 7월, 10월 3차례에 걸쳐 경남 남해군 창선면의 농가를 방문하여 고사리 마름병의 발생 시기 및 특징을 조사한 결과 일반적으로 고사리는 봄 시기에 새순이 나오기 시작하면서 5월~6월 중 새순을 수확하고 6월말부터 채취가 중단된다. 잎이 무성해 지고 10월 하순부터 전

차 갈변이 되면서 낙엽이 지고 다시 다음해 봄 새순이 나오면 채취를 시작한다. 고사리 마름병은 기온이 20~25℃ 정도 되는 초여름부터 발생하여, 잎 끝에서부터 낙엽이 지듯 전체가 누렇게 변하면서 줄기까지 말라 검게 고사하는 증상을 나타낸다 (Fig. 1). 이 병으로 인하여 고사리는 정상적인 낙엽시기보다 훨씬 빠른 8월경부터 말라 죽기 때문에 지하부 생육이 불량해지고 다음 해 고사리 새순 형성이 잘 안되어 새순 생산량이 감소하는 것으로 조사되었다.



Fig. 1. 2018년 5월(A~D)과 7월(E~G) 고사리 마름병 증상을 나타내는 병 발생지 및 시료

(2) 병원균 분리

고사리 마름병 발생 농가로 부터 5월, 7월, 10월 채취한 이병엽 샘플로부터 약 90여 가지의 곰팡이를 분리하였고, 분리된 균주들을 병원성 검정(코호가설 검증)을 통하여 병징을 보이지 않는 72종은 제외시켰으며, 병징 발현 시간의 차이는 있으나 포장에서 발생된 마름병 병징과 유사한 병징을 나타내는 22종의 곰팡이 균주를 분리하였다. 이 중 5월 채취 시료에서 분리된 4개 균주와 7월 채취 시료에서 분리된 18개 균주는 PDA에서 각각 비슷한 양상으로 배양되었다. 실제 고사리 성체에서의 병원성 검정은 재배 시기와 자연 상태에서 나타나는 다른 요인들이 영향을 주므로 실험실에서만 진행하였다 (Fig 2, 3). 그러나 이 병원균의 좀 더 정확한 발병기작 등 연구를 위하여 성체 식물을 이용한 병원성 조사가 필요하다고 사료된다.

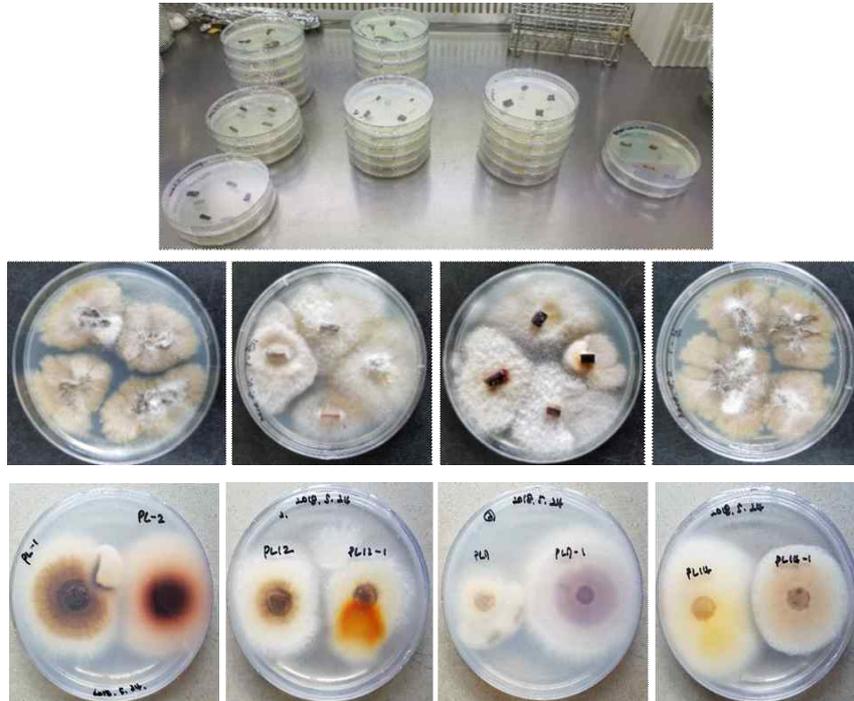


Fig. 2. 이병엽 샘플로부터 병원균 분리 과정



Fig. 3. 분리된 병원균들의 병원성 검정(코호가설 검증)

(3) 병원균의 동정

5월 시료에서 부터 분리된 병원균 균주 4종의 DNA로부터 ITS region sequencing을 분석한 결과 *Fusarium* 속 균주(*F. oxysporum*, *F. fujikuroi*, *F. tricinctum*)와 99% 수준의 상동성을 보였으며, 7월과 10월 시료에서 분리된 병원균은 모두 *Phoma* sp.와 98~99% 수준의 상동성을 보였다 (Table 1, 2).

Table 1. 5월 채취 샘플로부터 분리한 병원균의 ITS region sequencing 분석 결과

균주	유사종	유사도 (%)
PL2	<i>Fusarium oxysporum</i>	99
PL7-1	<i>Fusarium fujikuroi</i>	99
PL12	<i>Fusarium tricinctum</i>	99
PL14-1	<i>Fusarium fujikuroi</i>	99

Table 2. 7월 및 10월 채취 샘플로부터 분리한 병원균의 ITS region 및 18s rDNA sequencing 분석 결과

균주	유사종	유사도 (%)
720-3	<i>Phoma herbarum</i> strain BZYB-1	99
720-4	<i>Phoma herbarum</i> strain BZYB-1	99
720-6	<i>Phoma</i> sp.	99
720-7	<i>Phoma herbarum</i> strain BZYB-1	99
720-8	<i>Phoma</i> sp.	99
720-12	<i>Phoma</i> sp.	99

병원균의 계통 발생학적 분석을 위하여 분리된 병원균 중 병원성이 높은 7월 시료 분리 균주를 대상으로 수행한 3종의 유전자(ITS부위, rRNA의 large subunit 부위, β -tubulin 유전자 부위) 염기서열이 모두 동일하여 추후 진행되는 계통 발생학적 연구에는 720-4 균주를 이용하여 진행하였다. 계통수 작성 결과, 720-4 균주는 *Didymella*속 곰팡이의 clade에 포함됨을 확인하였고 비교 분석에 사용된 대부분의 *Didymella*속 곰팡이는 기존 연구 결과(Chen et al., 2015)와 마찬가지로 중 수준의 subclade에 명확히 존재하는 반면, 720-4 균주는 이들 곰팡이종의 subclade에 유의한 수준으로 포함되지 못하였다(Fig. 4) 또한 720-4 균주는 *D. rumicicola*와 *D. acetosellae*의 subclade가 포함된 중 수준을 넘는 큰 범위의 subclade에 포함되었으나 통계적 유의성은 상대적으로 낮았다(bootstrap value=41%).

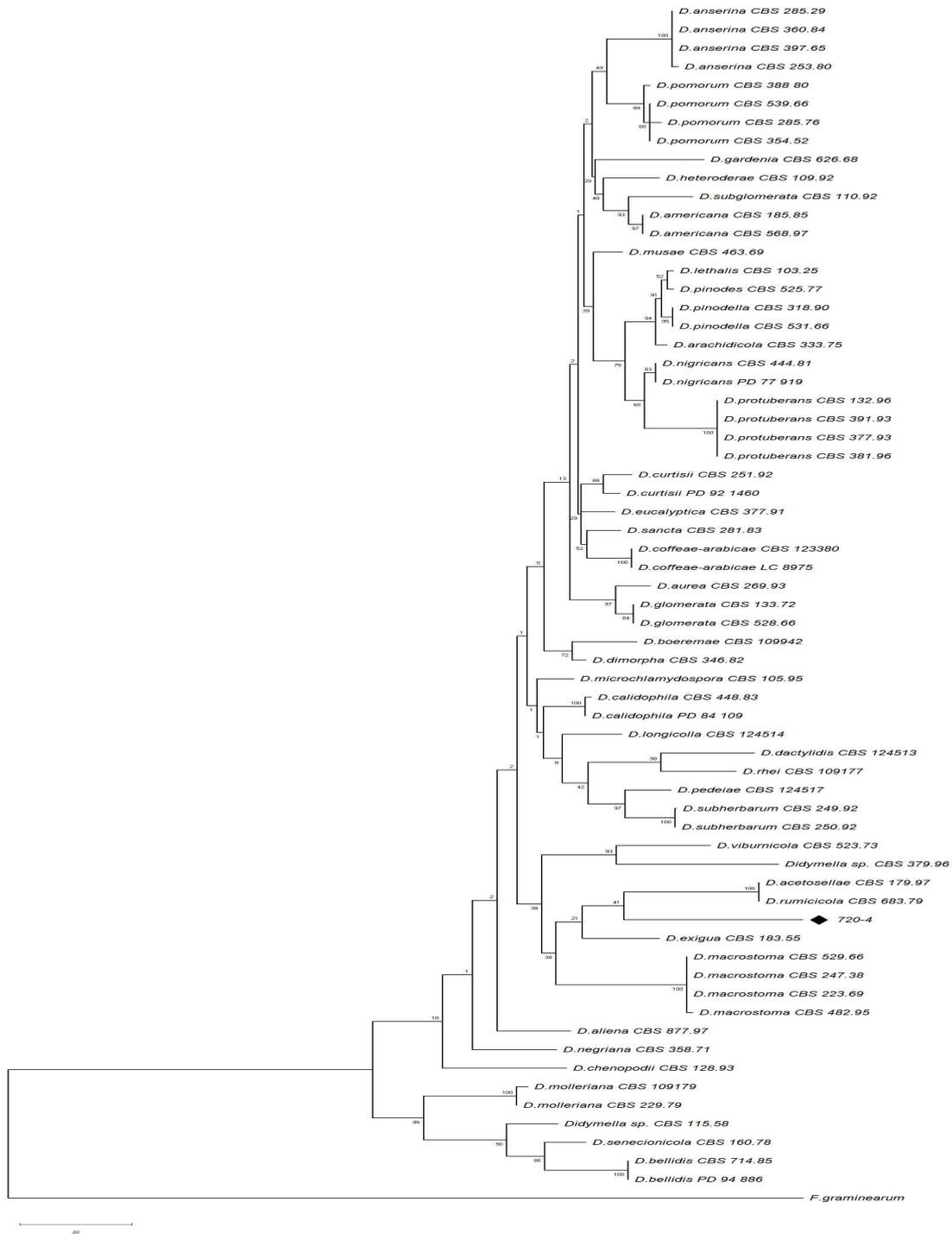


Fig. 4. 720-4 균주를 대상으로 수행한 3종 유전자(ITS부위, rRNA의 large subunit 부위, β -tubulin 유전자 부위) 염기서열을 정렬하여 분석한 계통수

*Didymella*속은 2009년 새롭게 분류학적으로 정립된 *Didymellaceae*(*Didymella*과)에 속하며, 이 그룹에는 *Didymella*속 외 *Aschochyta*속과 *Phoma*속 곰팡이도 함께 포함되어 있다(Chen et al., 2015). 하지만 이들 속에 속하는 곰팡이 종은 형태적으로 구분이 어렵기 때문에 다양한 유전자의 염기서열을 활용한 계통발생학적 분석(multi-locus phylogenetic analysis)을 통한 종 구분이 널리 이용되고 있다. 이와 같은 결과를 통하여 720-4 균주는 *Didymella*속에 속하지만 기존

NCBI GeneBank database에 기탁된 *Didymella*속 곰팡이 종과는 다른 종일 가능성이 있다. 또한 720-4 균주의 분생포자 형태와 균사 배양체의 특성(Fig. 7)이 병자각 미형성을 제외하고 일반적인 *Didymella*속 곰팡이와 크게 다르지 않은 결과도 이를 뒷받침한다. 따라서 본 실험 결과를 종합해 볼 때 경남 남해군 창선면에서 발생된 고사리 신규 마름병은 고사리에 병원균으로 존재하는 *Didymella*속 곰팡이에 의해 발병된 것으로 추정된다. *Didymella*속 곰팡이는 최근에 분류학적으로 재정립되어 현재 유전학적 분석 연구가 진행되고 있어 정확한 종 동정을 위해 더 연구가 필요할 것으로 사료된다.

(4) 병원균의 생리적 특성 조사

분리한 병원균의 생리적 특성을 확인하기 위하여 배양 온도와 적정 pH를 확인한 결과, 병원균 *Didymella* sp.의 균사 최적 생장은 PDA와 TSA 배지 위에서 25°C 조건에서 관찰되었으며, pH에 대한 영향은 병원균 균주에 따라 성장 정도의 차이가 나지만 pH 3~8 범위에서 생장이 가능한 것으로 확인되었다(Fig. 5, 6).

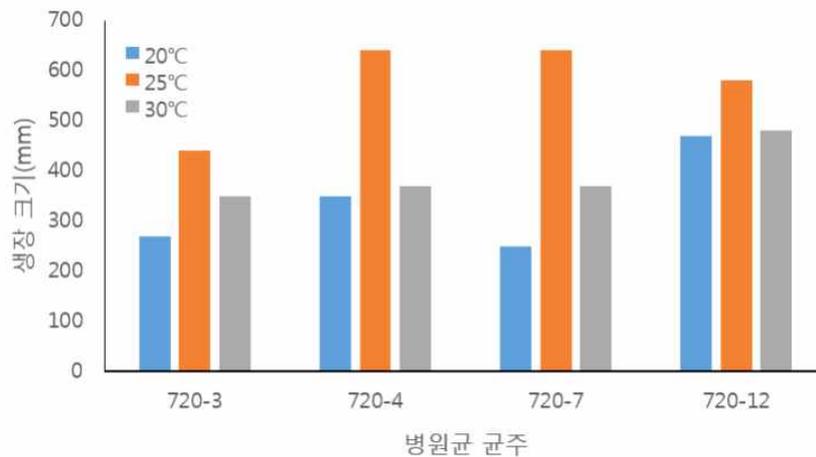


Fig. 5. 배양 온도별 병원균의 성장 정도

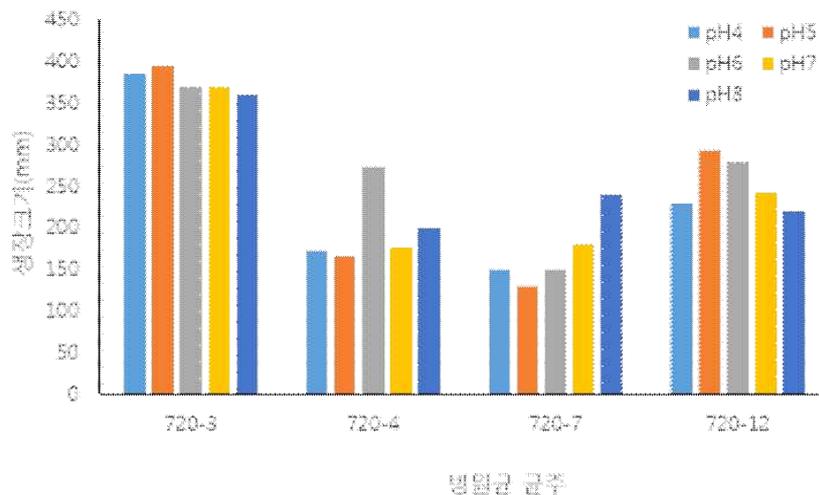


Fig. 6. pH에 따른 병원균의 성장 정도

(5) 병원균의 균학적 특성 조사

이병 시료에서 분리된 마름병 증상 유발 균주 중 병원성이 높은 7월 시료 유래 2개 균주 (720-4, 720-12)에 대한 균학적 특징을 조사하기 위하여 PDA, TSA, MA(malt extract agar), OA(oatmeal agar) 배지 위에서 배양하였다. MA와 OA 배지에서 모든 균주는 2주일 후 2cm의 페트리 디쉬를 가득 채웠고 MA배지에서는 배양 7일까지 갈색의 균사를 형성하다가 이후 잿빛이나 암회색으로 변하였다. OA배지에서는 배양 기간 동안 암회색의 균사를 형성하였다 (Fig. 7A). 균사체 위에 병자각과 같은 구조는 형성되지 않았으며 분생포자 형성은 OA배지에서 5일 부터 관찰되었고 MA배지에서는 12일 이후부터 관찰되었다. 분생포자는 투명하였으며, 모양은 타원형이었으며 크기는 (7.9~14.9)~(2.7~5.0)um의 범위로 변이가 심하였다. 분생포자 내 격막은 주로 1개가 관찰되었으나 격막이 없는 분생포자도 다수 관찰되었다(Fig. 7B, C, E, F).

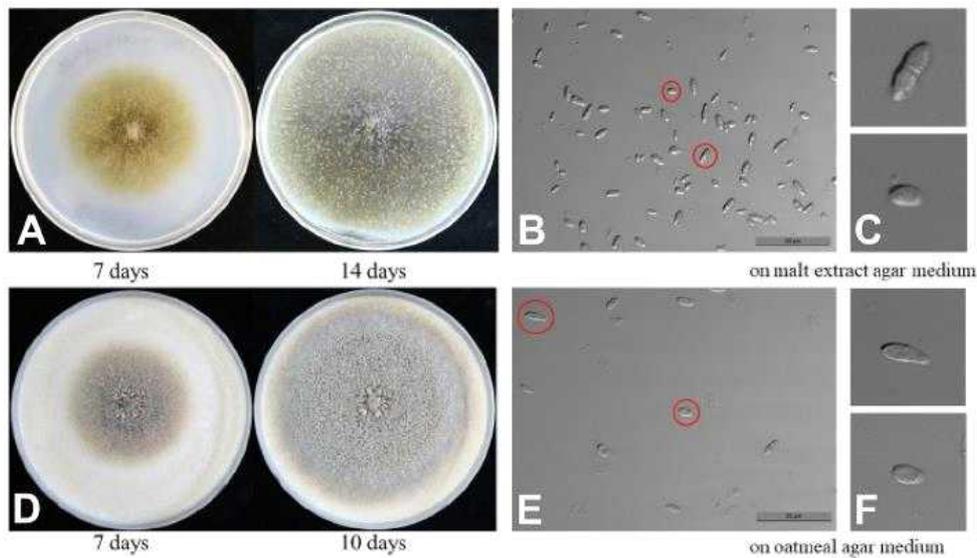


Fig. 7. 고사리 마름병 병원균 *Didymella* sp.의 MA 배지(A~C)와 OA배지(D~F)에서의 균사체 성장(A, D)과 분생포자(B, C, E, F) 모습

(6) 신규 병해 발생지 토양의 미생물 및 성분 분석

고사리 마름병의 원인이 토양에서 기인할 수 있다는 가정으로 고사리 마름병이 발생한 재배지의 토양과 병이 발생하지 않은 재배지 토양의 세균과 방선균 밀도를 분석하였다. 3반복으로 밀도를 확인한 결과, 병 발생 재배지와 정상 재배지의 토양 미생물 밀도는 유의성 있는 차이를 발견하지 못하였다(Table 3). 한두레 토양진단센터에 의뢰하여 얻은 토양 성분 분석에서도 병 발생 재배지와 정상 재배지 토양의 성분에 유의성 있는 차이는 없었다(Table 4). 따라서 고사리 마름병의 원인을 토양에서 찾아보기는 어려울 것으로 판단된다.

Table 3. 고사리 마름병 발생 재배지와 정상 재배지의 토양 미생물 밀도

구분		미생물 밀도 (cfu/g 토양 건중량)	
		세균	방선균
병 발생 재배지	토양 1	4.3x10 ⁶	4.6x10 ⁴
	토양 2	8.0x10 ⁶	4.0x10 ⁴
정상 재배지	토양 3	6.5x10 ⁶	9.6x10 ⁵
	토양 4	2.7x10 ⁶	5.8x10 ⁵

Table 4. 고사리 마름병 발생 재배지와 정상 재배지의 토양 성분 분석

구분		산도	EC (dS/m)	유기물 (%)	유효인산 (mg/kg)	치환성(Cmol+/kg)			유효규산 (mg/kg)	CEC (Cmol+/kg)	질산태 질소 (mg/kg)
						칼리	칼슘	마그네슘			
병 발생 재배지	토양 1	5.28	0.97	12.76	367.44	0.50	10.08	0.76	159.96	18.92	44.10
	토양 2	5.15	0.40	8.05	50.18	0.23	7.52	0.45	120.08	16.28	25.09
정상 재배지	토양 3	4.29	0.66	11.06	439.28	0.41	10.02	0.79	231.18	18.26	26.70
	토양 4	6.13	0.35	11.65	447.88	0.50	6.13	0.61	167.92	18.70	22.66

2. 병 방제를 위한 길항 미생물 선발 및 동정

(1) 병원균에 대한 길항미생물 균주 선발 및 동정

본 연구를 통하여 분리한 고사리 마름병 병원균 *Didymella* sp.를 대상으로 650종의 미생물 균주와 억제테스트를 시행하였고, 병원균의 생장을 억제하는 균과 2주 이상 방치했을 때 억제 효과가 크지 않더라도 병원균이 미생물을 덮지 못하는 길항 미생물 56개의 미생물 균주를 1차 선발하였다 (Fig. 8, Table 5(No.8)). 병원균에 대한 억제 효과와 미생물 제제화에 용이한 조건을 모두 만족하는 균주 1종을 선발하였고 *Bacillus subtilis*와 99.93%의 높은 유사성을 나타내어 *Bacillus subtilis* JG46이라 명명하였다(Fig. 9).

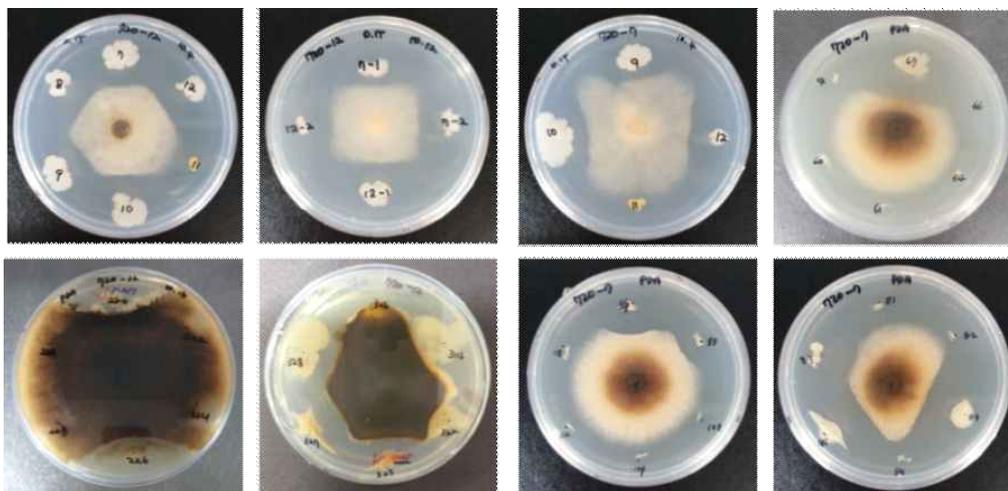


Fig. 8. 분리한 병원균과 길항 미생물과의 억제 테스트

Table 5. 분리한 병원균 *Didymella* sp.와 1차 선발된 길항 미생물과 억제 정도

(단위:mm)

No.	0.1T		PDA		No.	0.1T		PDA	
	720-7	720-12	720-7	720-12		720-7	720-12	720-7	720-12
1	15	7	10	4	29	3	-	4	-
2	14	7	-	3	30	12	12	6	7
3	-	-	-	3	31	9	9	8	3
4	14	6	11	-	32	12	9	-	-
5	12	7	10	-	33	4	-	4	5
6	10	8	3	3	34	-	-	-	5
7	-	-	5	6	35	13	8	5	8
8	9	8	5	6	36	7	-	-	5
9	-	-	3	-	37	-	-	6	6
10	6	10	-	5	38	10	10	6	5
11	7	9	4	5	39	13	13	-	6
12	5	-	1	-	40	9	7	3	6
13	4	-	2	-	41	10	10	-	-
14	-	9	-	4	42	11	11	5	-
15	6	-	-	-	43	11	10	-	6
16	7	9	3	-	44	-	-	5	6
17	8	7	4	-	45	-	-	-	-
18	8	7	-	-	46	10	12	5	5
19	-	7	-	7	47	14	-	-	5
20	9	9	3	3	48	5	8	4	-
21	8	10	-	3	49	7	4	-	5
22	8	9	4	3	50	5	5	-	4
23	10	7	7	-	51	4	-	-	6
24	7	7	8	-	52	7	5	-	-
25	8	9	-	-	53	12	10	-	-
26	-	-	3	6	54	15	10	-	-
27	7	8	7	5	55	5	10	-	-
28	9	-	9	-	56	8	8	4	-

Table 6. 길항 미생물 균주의 16s rDNA sequencing 결과

No.	유사종	유사도(%)
8	<i>Bacillus subtilis</i>	99
17	<i>Lysobacter capsici</i>	100
20	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	99
21	<i>Paenibacillus jamilae</i>	100
22	<i>Bacillus oryzicola</i>	99
23	<i>Bacillus atrophaeus</i>	99
24	<i>Bacillus methylophilus</i>	99
25	<i>Bacillus methylophilus</i>	99
30	<i>Bacillus siamensis</i>	99
31	<i>Bacillus siamensis</i>	99
32	<i>Bacillus siamensis</i>	99
39	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	100
40	<i>Bacillus tequilensis</i>	99
41	<i>Bacillus tequilensis</i>	99
42	<i>Bacillus siamensis</i>	99
43	<i>Streptomyces albidoflavus</i>	100
46	<i>Bacillus siamensis</i>	99
55	<i>Bacillus velezensis</i>	99
56	<i>Bacillus methylophilus</i>	99

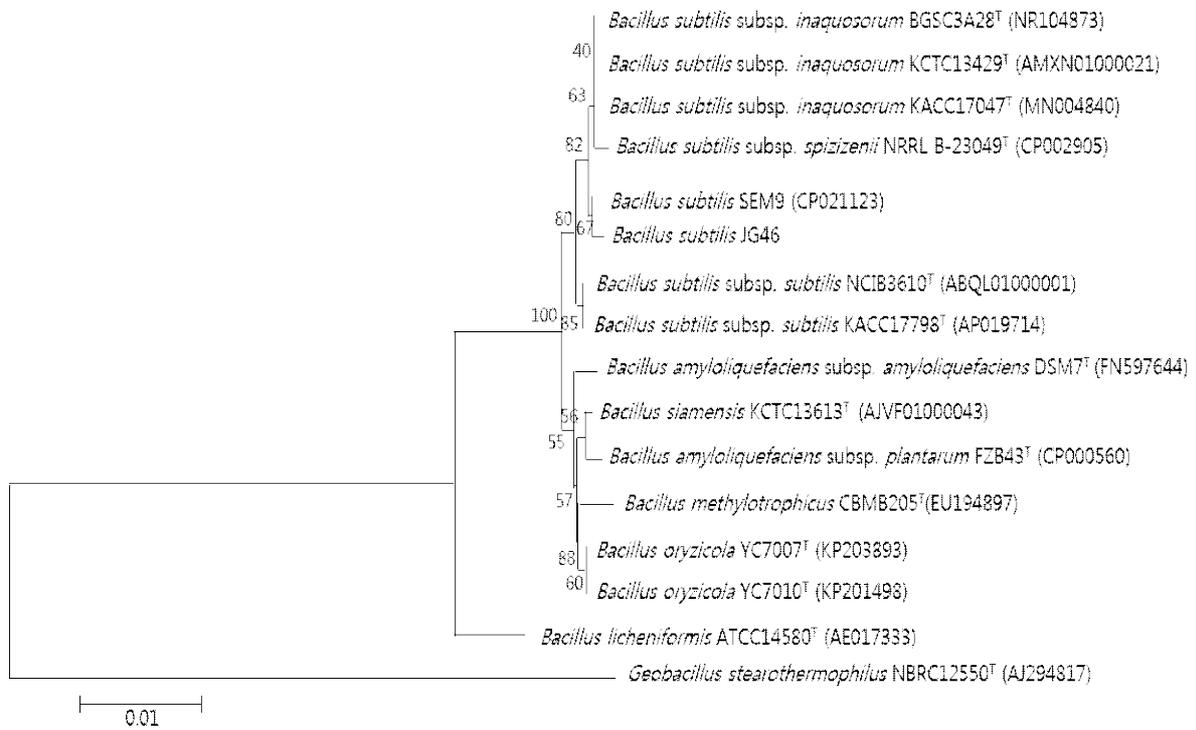


Fig. 9. *Bacillus subtilis* JG46 균주의 계통수

(2) 선발된 *B. subtilis* JG46 균주의 유전자 분석(BOX-PCR)

B. subtilis JG46 균주와 학명이 같은 표준 균주에 대하여 보다 세부적인 비교를 위하여 유전자 분석 (Box-PCR)을 수행한 결과, JG46 균주는 표준 균주들과 다른 밴드 패턴을 보였다(Fig. 10).

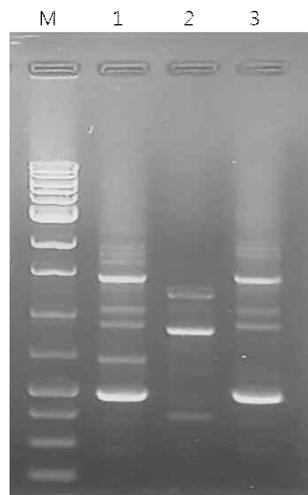


Fig. 10. JG46 균주와 표준 균주와의 유전자 분석(Box-PCR) 비교 (M. 1Kb marker, 1. *Bacillus subtilis* JG46, 2. *B. subtilis* subsp. *subtilis* KACC17798, 3. *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* KACC17047)

3. 선발 미생물 균주의 주요 식물 병원균 억제 효과 검증

(1) JG46 균주의 식물 병원균에 대한 억제 효과

JG46 균주가 고사리 신규 마름병 병원균 외에 다른 식물 병원균에 대한 억제 효과를 나타내는지 검증하기 위하여 진균 5종(*Didymella bryoniae*(수박 줄기 마름병), *Colletotrichum gloeosporioides*(인삼 탄저병), *Sclerotinia minor*(인삼 균핵병), *Alternaria panax*(인삼 반점병), *Fusarium oxysporum*(딸기 시들음병))과 세균 2종(*Xanthomonas campestris*(바나나 시들음병), *Xanthomonas fragariae*(딸기 세균성 모무늬병))에 대한 항균 활성을 조사하였다.

JG46 균주의 식물 병원성 진균에 대한 항균 활성은 배지에 따라 약간 다르지만 6~12mm 정도 균사 성장 억제 효과를 나타내었고(Fig. 11), 병원성 세균에 대한 항균 활성은 0.1TSA 배지에서 배양한 배양액에서 각각 4mm와 6mm의 성장 억제 효과를 나타내었다(Fig. 12, Table 7). 특히 인삼 탄저병, 균핵병, 반점병 병원균에 억제 효과가 있는 것으로 확인되어 좀 더 연구해 볼 필요가 있을 것으로 보인다.

Table 7. *B. subtilis* JG46 균주의 주요 식물 병원균에 대한 억제 효과

(단위: mm)

병원 진균 (병명)	KACC No.	병원균배지	
		PDA	1/2 TSA
<i>Didymella bryoniae</i> (수박 줄기마름병)	40669	6	10
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (인삼 탄저병)	40003	8	8
<i>Sclerotinia minor</i> (인삼 균핵병)	41066	8	12
<i>Alternaria panax</i> (인삼 반점병)	42461	12	10
<i>Fusarium oxysporum</i> (딸기 시들음병)	-	6	7
병원 세균 (병명)	KACC No.	JG46 배양 배지	
		1/10 TSB	1/2 TSB
<i>Xanthomonas campestris</i> (바나나 시들음병)	10377	4	6
* <i>Xanthomonas fragariae</i> (딸기 세균성 모무늬병)	-	4	6

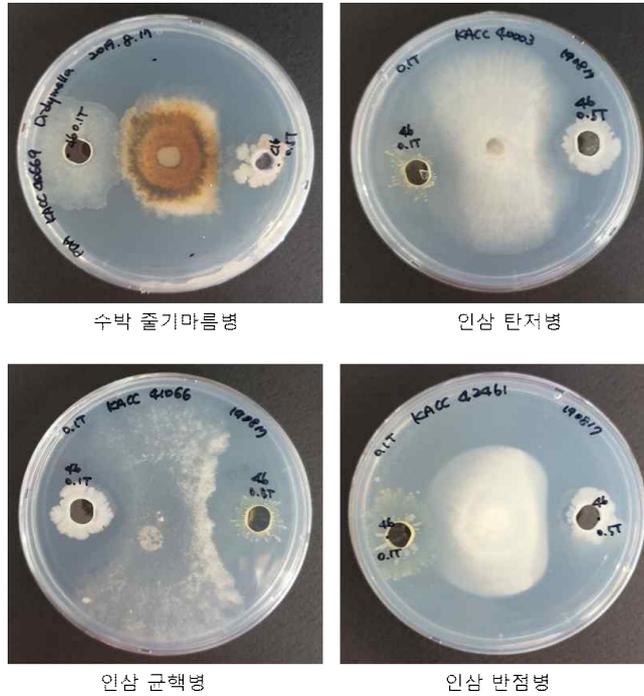


Fig. 11. *B. subtilis* JG46 균주의 주요 식물 병원 진균에 대한 억제 효과

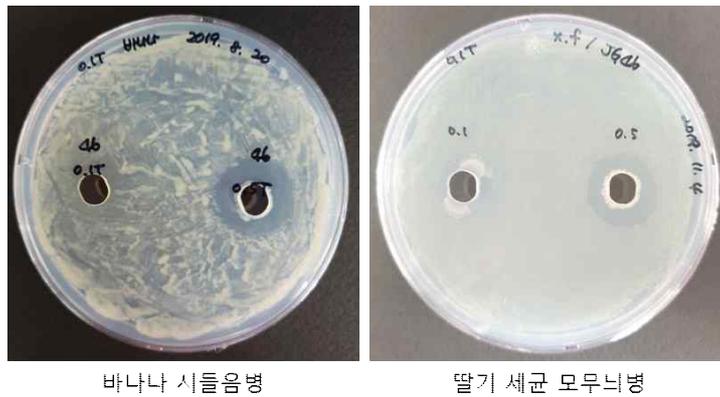


Fig. 12. *B. subtilis* JG46 균주의 주요 식물 병원 세균에 대한 억제 효과

(2) JG46 균주의 배추 무사마귀병에 대한 억제 효과

배추 무사마귀병이 심하게 발생한 토양에서 일갈이 배추 종자를 유묘기까지 키운 후 JG46 균주 배양액(2×10^8 cfu/g) 5ml을 뿌리 근처에 관주하고 한 달 후 뿌리를 관찰한 결과 멸균된 배양액만 처리한 무처리구에서는 뿌리혹이 발생되었지만 JG46 균주 배양액을 처리한 처리구에서는 뿌리혹이 발생되지 않았다(Fig. 13).



Fig. 13. 배추 무사마귀병에 대한 억제 효과 (A. 무처리구, B. JG46 균주 배양액 처리구)

4. 선발 길항 미생물의 제제화 및 효과 검증

(1) 대량 배양 최적 조건 조사 및 제제화

선발된 미생물 *B. subtilis* JG46의 제제화를 위해 주관기관이 보유한 *Bacillus* sp.의 기본 배양 조건으로 배양하면서 최적의 대량 배양 및 제제화 조건을 확립하였다. 대량 배양을 위하여 50L fermenter에서 30℃, 24시간동안 배양하여 1차 배양 후 500L fermenter에 접종하여 2차 배양하였고(Table 8, 9) 배양 중 pH와 밀도(O.D) 변화를 조사하였다(Fig 14). 최종 배양액을 분무 건조하여 분말화 하였으며, 원제 밀도를 조사한 결과 4.4×10^{10} cfu/g으로 확인하였다. 제제화를 위하여 원제와 증량제를 혼합하여 1차 시제품의 균 밀도를 2×10^9 cfu/g으로 생산하였다. 이 시제품을 500, 1,000, 2,000배로 희석하여 고사리 마름병 병원균에 대한 억제 효과를 확인하였다(Fig. 14).

Table 8. *Bacillus subtilis* JG46의 50L 배양 조건

항 목	배양 조건
온도(Temp.)	30 °C ± 0.5°C
시간(h)	24
교반속도(RPM)	120 ~ 150 rpm
내압(Inner pressure)	0.4 kg/cm ²
통기량(Aeration rate)	0.5vvm
중균 접종량	1.0L/40L(2.5%)

Table 9. *Bacillus subtilis* JG46의 500L 배양 조건

항 목	배양 조건
온도(Temp.)	30 °C ± 0.5°C
시간(h)	48
교반속도(RPM)	90 ~ 120 rpm
내압(Inner pressure)	0.4 kg/cm ²
통기량(Aeration rate)	0.5 ~ 0.6 vvm
종균 접종량	5L/500L(1.0%)

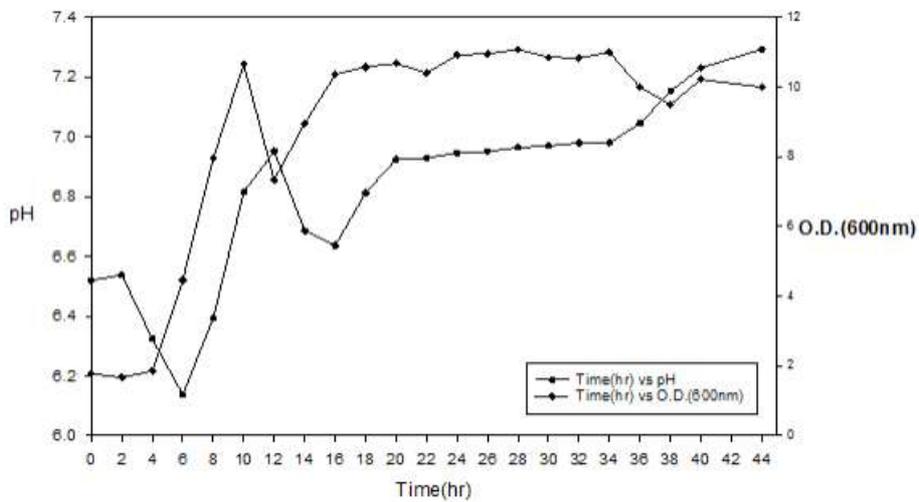


Fig. 14. *B. subtilis* JG46 균주의 대량배양 시 시간별 pH와 밀도 변화

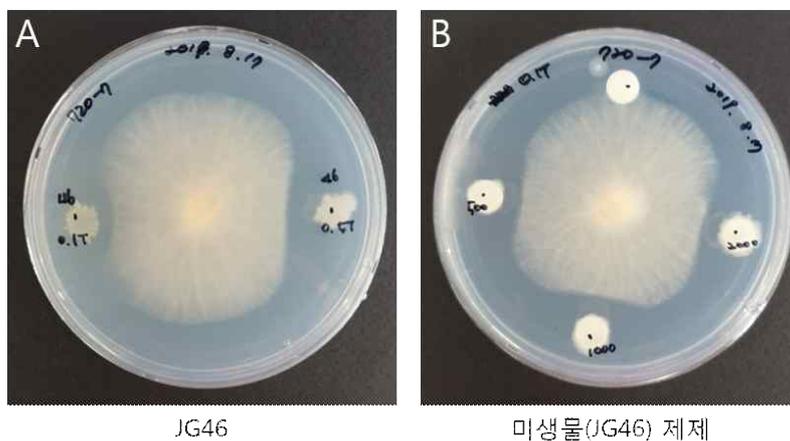


Fig. 15. JG46 균주 배양액(A)과 미생물 제제(B)의 고사리 마름병 병원균에 대한 억제 효과

(2) 미생물 제제의 고사리 신규 마름병에 대한 억제 효과 검증

JG46 균주를 이용한 미생물 제제가 고사리 신규 마름병에 대한 억제 효과가 있는지 검증하고자 하였다. 예방 효과를 확인하기 위하여 건전한 고사리 잎에 미생물 제제 1,000배 또는 2,000배로 희석하여 처리한 후 병원균을 접종 하였고, 치료효과를 확인하기 위하여 병원균을 접종한 후 미생물 제제 1,000배 또는 2,000배로 희석하여 처리하였다. 각각 처리한지 5일과 10일 후 발병 정도를 조사한 결과, 예방 및 치료 효과 검증 모두 60% 이상의 방제 효과를 나타내었다. 미생물 제제를 1,000배로 희석하여 처리하였을 때 2,000배 희석하였을 때 보다 방제가가 좀 더 높게 나타났고, 처리 10일 후에는 처리 5일 후보다 방제가가 다소 낮아지는 것으로 보아 5~7일 간격으로 미생물 제제를 처리함으로써 효과적인 방제 결과를 얻을 수 있을 것으로 판단된다 (Table 10, 11).

Table 10. JG46 균주를 이용한 미생물 제제의 고사리 마름병에 대한 예방 효과

미생물 (JG46) 제제 처리	5일후		10일후	
	발병도	방제가(%)	발병도	방제가(%)
무처리*	3.00±0.0	-	3.80±0.2	-
x1,000*	0.20±0.2	93.3	1.20±0.2	68.4
x2,000*	0.80±0.2	73.3	1.40±0.8	63.2

1) 3반복 평균
2) 유의수준: *P<0.001

Table 11. JG46 균주를 이용한 미생물 제제의 고사리 마름병에 대한 치료 효과

미생물 (JG46) 제제 처리	5일후		10일후	
	발병도	방제가(%)	발병도	방제가(%)
무처리*	2.80±0.2	-	4.00±0.0	-
x1,000*	0.20±0.2	92.9	1.40±0.3	65.0
x2,000*	0.80±0.2	71.4	1.40±0.3	65.0

1) 3반복 평균
2) 유의수준: *P<0.001

(3) 미생물 제제의 식물 생육 촉진 효과

오이, 상추, 배추 및 들깨 작물에 대한 JG46 균주를 이용한 미생물 제제의 식물 생육 촉진 효과를 확인하고자 각 작물의 근권 토양에 미생물 제제를 관주 처리하고 한 달 후 생중량을 측정하였다. 그 결과 4가지 작물 모두 미생물 제제를 처리한 처리구에서 무처리구보다 생중량이 유의성 있게 증가하였음을 확인하였다(Table 12).

Table 12. JG46 균주를 이용한 미생물 제제의 식물 생육 촉진 효과

작물	생중량(g/주)		증가율(%)
	무처리	처리	
오이*	8.31±0.05	11.24±1.39	35.3
배추**	2.06±0.02	3.80±0.19	84.5
들깨*	2.10±0.03	2.80±0.07	33.3
상추*	0.54±0.02	0.93±0.03	72.2

1) 3반복 평균

2) 유의수준: *P<0.05, **P<0.01

(4) 농가 실증 시험

고사리 마름병 발생 농가에 미생물 제제를 이용한 효과적인 병 방제를 위하여 농가 실증 시험을 고사리 채취가 끝난 6월 초부터 7월까지 무처리구와 미생물 제제 처리구로 나누어 집중 방제를 시작하였다. 미생물 제제에 대한 예방 및 치료 효과 검증 결과, 미생물 제제를 1,000배로 희석하여 5~7일 간격으로 엽면 살포를 시행하는 것이 효과적인 방제 방법일 것으로 보여 4회에 걸쳐 처리하였다 (Table 13). 병 방제를 위한 미생물 제제 처리가 끝난 후 낙엽이 형성되는 10월 경에 무처리구와 처리구를 비교한 결과 무처리구보다는 처리구에서 잎이 마르는 현상(병징)이 현저히 낮음을 확인하였고 다시 2차 병 방제를 위하여 미생물 제제를 한 번 더 처리하도록 하였다(Fig. 16). 농가실증시험의 정확한 결과는 다음 해 고사리의 새순이 나오는 양상으로 비교해야 할 것으로 판단된다. 또한 고사리 재배의 특성과 고사리 채취 후 병원균의 유입 경로 등을 고려하여 방제 효과를 높이기 위한 농가와와의 긴밀한 협력을 지속할 것이다.

Table 13. 고사리 마름병 발생 농가의 미생물 제제를 이용한 병 방제 처방

살포시기	살포 약제	살포량	살포방법	비고
2019.6.10	영양제	500ml/500L	엽면살포	
2019.6.15~20	미생물제제	200g/200L	↙	1차
2019.6.25.~30	미생물제제	200g/200L	↙	2차
2019.7.15~20	미생물제제	200g/200L	↙	3차
2019.7.25.~30	미생물제제	200g/200L	↙	4차
2019.10.10	미생물제제	200g/200L	↙	5차



Fig. 16. 고사리 마름병 발생지에 미생물 제제를 처리한 처리구와 무처리구 비교

5. 유기농업자재 등록을 위한 시험

유기농업자재 공시 등록을 위하여 농진청 인증 시험연구기관을 통하여 미생물 검사, 인축 및 환경 독성 시험, 잔류농약 시험, 약해 시험을 실시하였다. 개발 미생물제제의 유기농업자재 공시 등록에 필요한 유효기간에 대해 인증된 평가방법은 없으나 실온에서의 시험이 현실적으로 어렵고 비경제적이므로 농약의 약효보증기간 설정시 일반적으로 실시하는 가열안전성 시험방법으로 확인하였다. 실온보다 가혹한 조건(54℃)의 고온조건하에서 2주, 4주, 6주 후의 주성분 밀도를 조사한 결과 6주 후에도 유효성분이 안정적인 것으로 판단되어 3년으로 결정하였다 (Table 14). 실온에서 매년 제품의 주성분 및 품질 검사를 시행할 계획이다.

제품명은 ‘노고지리’로 하였으며 병해관리용 유기농업자재로 공시 등록(공시-2-4-153) 되었다(Table 15, Fig. 17, 18).

Table 14. 개발 미생물 제제의 저장 안전성 시험

시험일시	시험조건	주성분 평균 밀도	비고
2019. 8. 26	실온	2.5x10 ⁹	
2019. 9. 10	54℃	2.5x10 ⁹	2주경과
2019. 9. 24	54℃	2.8x10 ⁹	4주경과
2019. 10. 8	54℃	2.6x10 ⁹	6주경과

Table 15. 유기농업자재 공시 등록을 위한 시험

시험일자 (인증일자)	시험기관 (인증기관)	시험내용 (인증내용)	시험결과 (인증결과)
2019. 3. 25	강원대학교 (주)친환경농산물안전성센터	미생물 균수	<i>Bacillus subtilis</i> 2.0x10 ⁹ cfu/g
2019. 4. 2		미생물 동정 및 병원성 미생물 검사	<i>Bacillus subtilis</i> 99% 병원성 미생물 불검출
2019. 7. 4	(주)한국생물안전성연구소	급성경피독성시험	무독성
		급성경구독성/병원성 시험	무독성
		피부자극시험	무자극
		안점막자극시험	무자극
		어류급성독성	무독성
		꿀벌영향시험	무영향
2019. 7. 12	(주)한국식물환경연구소	약해시험	약해없음
2019. 9. 9	강원대학교 (주)친환경농산물안전성센터	잔류농약검사	불검출
2019. 11. 27	강원대학교 산학협력단	유기농업자재 공시	등록 (공시-2-4-153)

Fig. 17 . ‘노고지리’ 유기농업자재 공시서 (공시-2-4-153)

(일부)

유기농업자재 공시서

공시번호: 제 공시-2-4-153 호

1. 업체명: ㈜제일그린산업
2. 대표자 성명: 정 영 톨
3. 주소(사업장): 경상남도 진주시 문산읍 월아산로950번길 25-3
4. 자재의 명칭: 미생물
5. 자재의 구분: 병해관리용
6. 상표명: 노고지리
7. 주성분(원료)의 종류 및 함량(%):
 - 주성분의 종류 및 함량: *Bacillus subtilis*
 - 원료의 종류 및 함량: 미생물배양물(*Bacillus subtilis*) 20%, 보조제 80%
8. 유효기간: 2019. 11. 27. ~ 2022. 11. 26.
9. 제조장 주소 또는 수입원산지(국가, 제조사):
 - 경상남도 진주시 문산읍 월아산로950번길 25-3
10. 최초 공고일: 2019. 11. 27.
11. 최초 공시기관: 강원대학교 산학협력단

2019년 11월 27일

강원대학교 산학협력단

(인)

210mm×297mm(단자) : 20g/㎡

유기농업자재 공시 사항

○ 포장개량 및 작물생육

연월일	사용방법				비료등록 사항	원료중류별 투입비율	비고
	사용대상 (작물명)	사용시기	사용량	처리방법			
2019. 11. 27.	고사리 배추 상추 모듬 고추 인삼	생묘기	2,000여 백씩	경엽처리	-	미생물배양물 20% (<i>Bacillus subtilis</i>) 보조제 80%	-

○ 병해충관리

연월일	사용방법				농약 등록사항	원료중류별 투입비율	비고
	사용대상 (작물명)	적 용 병해충	사용시기 (휴수)	사용량			
2019. 11. 27.	고사리 배추 상추 모듬 고추 인삼	-	생묘기	2,000여 백씩	경엽처리	-	미생물배양물 20% (<i>Bacillus subtilis</i>) 보조제 80%

※ 적용 유효충: 효능·효과 표시 공시불만 경우에만 해당합니다.

Fig. 18. 유기농업자재 ‘노고지리’



제 3 절 연구개발 성과

1. 기술적 성과

○ 논문 발표

게재 연도	논문명	저자명	학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI 구분
2019	<i>Didymella</i> sp.에 의한 고사리 신규 마름병 발생 보고	이정은 외 6명	Res. Plant Dis.	25(3): 143-148	국내	비SCI급

○ 특허출원

구분	출원일	발명의 명칭	출원번호	출원인	출원국
특허 출원	2019. 12. 6	고사리 신규 마름병균의 길항 미생물을 이용한 천연 미생물 방제제 개발	10-2019-0161789	(주)제일그린 산업	대한민국

○ 생명정보

연도	생명정보명	등록일	등록·기탁기관	등록·기탁번호
2019	<i>Didymella</i> sp.	2019. 12. 03	농업미생물은행	KACC48792
2019	<i>Bacillus subtilis</i> JG46	2019. 08. 22	농업미생물은행	KACC92271P

○ 유기농업자재 공시

연도	제품명	공시일	공시기관	공시번호
2019	노고지리	2019. 11. 27	강원대학교 산학협력단	공시-2-4-153

- 토착 미생물을 자체적으로 개발하여 대량배양조건을 확립하고, 배양 건조체의 생균수 10^{10} cfu/g 이상의 효율로 사업화 가능한 수준의 원제 확보
- 미생물 원제의 최적 제형에 대한 안정성을 확보하여 제제화 확립, 유기농업자재 공시 등록 완료
- 고사리 신규 마름병에 대한 국내 첫 연구 보고
- 현재까지 보고되지 않은 고사리 병해에 대한 친환경 방제 기술 확립
- 타 미생물제에 비하여 방제 대상이 세균, 진균 등 광범위함

2. 경제적 성과

- 연구과제 개발을 위한 신규 채용을 통한 2명 고용 창출
- 고사리 병해 해결이 시급한 재배 농가에 현장 애로 사항 해결
- 남해안 창선면 고사리 재배 농가의 생산 손실 해결 및 수익 증대 기여 예상
- 개발 제품 ‘노고지리’의 판매로 본 사 매출 증대
- 개발 제품의 타작물 병해 해결에 적용 범위 확대 (인삼, 딸기 등)

3. 사업화 성과

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	1년			
	소요예산(백만원)				
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		0	0.5	0.8	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	0		
국외		0			
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획	본 사업에서 얻어진 미생물 분리, 제제화 기술을 살충제 제품 개발에 활용할 예정임			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)				
	수 출				

제 3 장 연구개발 목표

제 1 절 최종 목표 및 달성도

1. 연구개발의 최종 목표

남해군 창선면에서 대대적으로 발생된 고사리 신규 병해의 원인을 정확히 규명하고, 미생물을 이용한 친환경적인 생물학적 방제제를 개발하고자 함.

2. 정성적 연구목표 대비 달성도

연구 년도	연구개발 목표	연구개발 내용	달성도 (%)
1차 년도	- 신규 병해의 발생 조건, 토양의 이화학적 특성 분석 및 병원균 분리·동정을 통한 고사리 신규 마름병의 원인 규명	- 남해군 고사리 재배지에 발생된 신규 병해 증상, 발생시기 및 발생 조건 조사 - 신규 병해 발생지 토양의 미생물 분석 및 이화학 성분 분석 - 이병조직으로부터 병원균 분리·동정, 생리적 특성 조사 및 코호가설 검증	100
	- 병 방제를 위한 길항 미생물 선발 및 동정	- 병원균에 대한 길항 미생물 균주 선발 및 동정 - 병원균에 대한 억제 효과 조사 - 주요 식물 병원 진균 및 세균에 대한 억제 효과 조사	100
2차 년도	- 선발된 길항 미생물의 제제화	- 선발 미생물의 대량 배양 및 제제화 (분말화) 조건 확립 - 미생물 제제의 품질 관리 방법 확립 - 미생물 제제의 고사리 신규 마름병에 대한 억제 효과 검증 - 미생물 제제의 식물 생육 촉진 효과 검증	100
	- 미생물 제제의 농가 실증 시험을 통해 효과적인 사용방법 확립	- 고사리 수확이 끝난 농가에 병 방제를 위한 미생물 제제 사용법 교육	100
	- 유기농업자재 등록 신청	- 시제품 완성 - 유기농업자재를 위한 미생물 검사, 인축독성 및 환경 독성, 약해 시험 - 유기농업자재 공시 등록	100

3. 정량적 연구목표 대비 달성도

성과목표	사업화 지표										연구기반 지표								
	지식 재산권			기술 실시(이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책활용·홍보		기타
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책활용	홍보전시	
												SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건		건	명	건	건		
가중치	20					20			10					20	10				20
1차년도									1										
2차년도	1					1						1	1	1					1
소계	1					1			1			1	1	1					1
달성도 (%)	100					100			100			100	100	100					100

4. 목표 달성에 따른 기대 효과

- 농가의 현장 애로 사항 해결
- 화학농약으로도 방제하기 어려운 병에 대한 친환경 병 방제
- 고사리 농가의 신규 병에 대한 예방 및 방제로 인한 생산 손실 예방
- 친환경 방제로 인한 농산물 안전성 확보
- 타 작물의 병 방제로 시장 확대
- 토착 미생물을 이용한 천연식물보호 소재 개발 기술 확보

제 4 장 연구 결과의 활용 계획

제 1 절 활용 분야 및 방안

1. 연구결과 활용 분야

- 전국 고사리 마름병 발생 농가에 개발 제품 및 친환경 방제법 교육
- 고사리 농가뿐만 아니라 인삼 및 딸기 농가의 병 방제에 활용
- PLS법 시행으로 농약을 대체할 수 있는 유기농업자재 공급
- 토착 미생물을 이용한 천연식물 보호 소재 개발 기술 활용

2. 추가 연구 및 타 연구의 필요성

- 고사리 마름병의 병원균인 *Didymella* sp.의 추가 종의 정확한 동정 필요
- 고사리 외 타 작물의 진균 및 세균에 대한 억제 효과가 뛰어나므로 관련 작물의 포트 및 포장 시험을 통하여 적용 작물에 대한 효과 검증 필요

3. 사업화 추진 방안

- 신규 병으로 인해 피해가 심한 남해안의 고사리 농가를 중심으로 효과적인 방제 방법 교육
- 전국 고사리 농가에 유기농업자재 ‘노고지리’의 마름병 방제 효과 홍보 및 방제 기술 보급
- 타작물의 병 방제용 미생물제로 시장 확대

참고문헌

- Chang Y.H. and Lee Y.S. 2013. Occurrence of Pythium blight caused by *Pythium aphanidermatum* on chewing fescue. *Weed Turf. Sci.* 2(3):306-311.
- Chen Q., Jiang J.R., Zhang G.Z., Cai L. and Crous P.W. 2015. Resolving the *Phoma* enigma. *Stud. Mycol.* 82: 137-217.
- Chung E.J., Hossain M.T., Khan A., Kim K.H., Jeon C.O. and Chung Y.R. 2015. *Bacillus oryzicola* sp. nov., an endophytic bacterium isolated from the roots of rice with antimicrobial, plant growth promoting, and systemic resistance including activities in rice. *Plant Pathol. J.* 31(2):152-164.
- Hossain M.D., Khan A., Chung E.J., Rashid M.H., and Chung Y.R. 2016. Biological control of rice bakanae by an endophytic *Bacillus oryzicola* YC7007. *Plant Pathol. J.* 32: 228-241.
- Lee H.H., Kim A.G., Lee M.G., Choi S.Y., Seo J.J., Kim E.S., Seo K.W. and Cho B.S. 2017. Study on processing methods to remove toxic ptaquiloside from bracken fern. *J. Food Hyg. Saf.* 32(3):217-221.
- Lee S.Y., Park K.Y. and Park Y.H. 2010. Nutrient contents of bracken(*Pteridium aquilinum* L.) and soil chemical properties of Its habitat in the coastal area. *Korean J Soil Sci Fert* 43(5):631-636.
- Noh T.H., Kang M.H., Shim H.K., Pail C.H., Choi M.Y. and Kim H.M. 2012. Simple isolation and identification of *Burkholderia glumae* from diseased rice seeds. *J. Agriculture & Life Sciences.* 43(2):25-27.
- Park C.H., Kim K.H. and Yook H.S. 2014. Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of bracken (*Pteridium aquilinum* Kuhn) according to cooking methods. *Korean J Food Nutr.* 27(3):348-357.
- Park S.K., Lee S.Y., Lee J.J., Back C.G. and Lee. H.B. 2017. First report of *Diaporthe tectonae* isolated from soil in Korea. *Kor. J. Mycol.* 45(1):83-89.
- Sim H.J., Hwang C.R., Kang J.R., Kanf,K.M. and Sin J.H. 2015. Physicochemical characteristics and antioxidant activity of bracken (*Pteridium aquilinum* Kuhn) in Namhae. *Korean J. Food Cook Sci.* 31:288-295.
- Udayanga D., Castlebury L.A., Rossman A.Y. and Hyde K.D. 2014. Species limits in *Diaporthe*: molecular re-assessment of *D. citri*, *D. cytospora*, *D. foeniculina* and *D. rudis*. *Persoonia.* 32:81-101.
- Vilgalys R. and Hester M. 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *J. Bacteriol.* 172:4239-4246.
- White T.J., Bruns T., Lee S. and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal

ribosomal RNA genes for phylogenetics. Academic Press, Inc. pp. 315-322.

Woudenberg J., Aveskamp M., De Gruyter J., Spiers A. and Crous P. 2009. Multiple *Didymella* teleomorphs are linked to the *Phoma clematidina* morphotype. *Persoonia* 22:56-62.

<부록> 유기농업자재 등록을 위한 시험 성적서

1-1. 약해 시험(고사리, 배추, 상추, 오이, 고추)

시험결과보고서

과제명: 유기농업자재 공시를 위한 작물약해시험
(상표명: 노고지리)

시험의뢰자

회사명: (주)제일그린산업
소재지: 경남 진주시 문산읍 월아산로 950번길 25-3
대표자: 정영륜

발행일

2019년 7월 12일

시험기관

(주)한국식물환경연구소

시험번호



KPER-19-0-78

Korea Plants Environmental Research Station

마. 공시자재처리 및 시험구 배치 사진



3. 조사방법

구분	조사항목	작물명	조사횟수	조사일자	조사방법
약해시험	외관상 약해유무	고사리, 배추, 상추, 오이, 고추	3회	6/17, 6/19, 6/21	정식 후 유효기 경엽처리하여 3, 5, 7일차 외관상 약해 유무 확인조사

4. 시험성적

○ 약해시험 결과

시험작물 (품종)	처리내용	약해정도(0-4)			최종결과
		처리 후 3일차	처리 후 5일차	처리 후 7일차	
고사리 (제레종)	기준량	0	0	0	약해없음
	배양	0	0	0	약해없음
배추 (불암플리스)	기준량	0	0	0	약해없음
	배양	0	0	0	약해없음
상추 (그린로베인)	기준량	0	0	0	약해없음
	배양	0	0	0	약해없음
오이 (조은백다다기)	기준량	0	0	0	약해없음
	배양	0	0	0	약해없음
고추 (빅스타)	기준량	0	0	0	약해없음
	배양	0	0	0	약해없음

Korea Plants Environmental Research Station

시험명: 유기농업자재 공시를 위한 작물 약해시험



1. 시험개요

가. 목적:
공시자재(상표명: 노고지리)의 사용에 따른 작물(고사리, 배추, 상추, 오이, 고추) 이식 후 유식물에 미치는 약해를 검증하여 유기농업자재 공시자료로 활용하고자 함.
나. 시험년도: 2019년
다. 시험장소: 경기 수원시 권선구 당수동(사설)
라. 시험담당자: 윤현원, 조충환, 오세훈
마. 실험계시일: 6월 12일
바. 실험종료일: 6월 21일

2. 시험방법

가. 시험작물(품종): 고사리(제레종), 배추(불암플리스), 상추(그린로베인), 오이(조은백다다기), 고추(빅스타)

나. 처리내용

상표명	약해시험		시험작물명	처리방법 (처리일)	의뢰회사
	기준량	배양			
노고지리	2,000배	1,000배	고사리, 배추, 상추, 오이, 고추	유효기 경엽처리 (6/14)	(주)제일그린산업
무처리	-	-	-	-	-

다. 경종개요

- 정식시기: 고사리, 배추, 상추, 오이, 고추 - 6월 12일
- 포드규격: $\phi 11$ cm
- 토양: 양토+상토(비율 - 5 : 5)
- 온도: 하우스 내 평균온도 23.9℃

라. 시험구배치 및 소요면적: 원관일의배치법 3반복

구분	작물수	처리수	반복수	총구수	구당pot수	총소요pot수
약해시험	5	3	3	9	5포트	225포트

Korea Plants Environmental Research Station

5. 시험담당자 의견

- 본 시험은 유기농업자재 공시를 위하여 시험의뢰회사(의뢰인:그린산업)의 요청에 따라 국립작물농산물관리지원 지정 시험연구기관에서 "농림축산식품부 소관 친환경농업 유망 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률 시행규칙"에 준하여 시험을 실시하였다.
- 시험작물(고사리, 배추, 상추, 오이, 고추)을 이식하고, 공시자재(상표명: 노고지리)의 기준량, 배양을 유효기 경엽처리 한 후 3, 5, 7일차에 유식물에 나타나는 외관상 약해 유무를 단판 조사한 결과 5종의 시험작물 모두에서 기준량 및 배양에 대하여 약해(약해 판정기준결과: 0)는 나타나지 않았다.
- 따라서 본 시험결과 공시자재(상표명: 노고지리)는 고사리, 배추, 상추, 오이, 고추에 대하여 약해가 없이 유기농업자재 공시용으로 적합한 것으로 판단된다.

한국식물환경연구소 대표이사 (인)

위 결과는 시험의뢰자가 임의로 제출한 시료로 수행한 시험결과로서 소송 및 광고, 기타 구속력이 있는 자료로 사용할 수 있으며 자재보편 및 동류기판 제출용으로만 사용이 가능합니다.

Korea Plants Environmental Research Station

1-2. 약해 시험(인삼)

시험결과보고서

과제명: 유기농업자재 공시를 위한 작물약해시험
(상표명: 노고지리)

시험의뢰자

회사명: (주)제일그린산업
소재지: 경남 진주시 문산읍 월아산로 950번길 25-3
대표자: 정영환

발행일

2019년 7월 12일

시험기관

(주)한국식물환경연구소

시험번호



KPER-19-O-78

Korea Plants Environmental Research Station



3. 조사방법

구분	조사항목	작물명	조사횟수	조사일자	조사방법
약해시험	외관상 약해유무	삼	3회	10/14, 10/16, 10/18	정식 후 경엽처리하여 3, 5, 7일차 외관상 약해 유무 달관조사

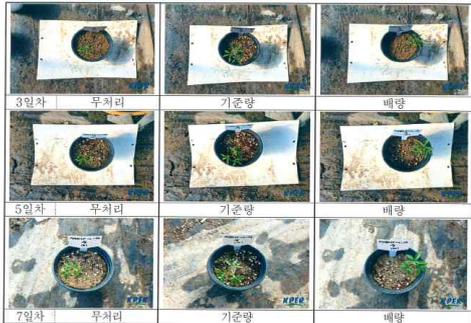
4. 시험성적

○ 약해시험 결과

시험작물(품종)	처리내용	약해경도(0-4)			최종결과
		처리 후 3일차	처리 후 5일차	처리 후 7일차	
삼 (재래종)	기준량	0	0	0	약해없음
	배양	0	0	0	약해없음

5. 시험 사진

○ 삼



5. 시험담당자 의견

○ 본 시험은 유기농업자재 공시를 위하여 시험의뢰회사(㈜제일그린산업)의 요청에 따라 국립농산물품질관리원 지정 시험연구기관에서 "농림축산식품부 소관 친환경농업인 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률 시행규칙"에 준하여 시험을 실시하였다.

Korea Plants Environmental Research Station



KPER-19-O-110

시험명: 유기농업자재 공시를 위한 작물 약해시험

1. 시험개요

가. 목적:

공시자재(상표명: 노고지리)의 시용에 따른 작물(삼) 이식 후 유식물에 미치는 약해를 검정하여 유기농업자재 공시자료로 활용하고자 함.

나. 시험년도: 2019년

다. 시험장소: 경기 수원시 권선구 임북동(시설)

라. 시험담당자: 조용준, 윤현원

마. 실험개시일: 10월 8일

바. 실험종료일: 10월 18일

2. 시험방법

가. 시험작물(품종): 삼(재래종)

나. 처리내용

상표명	약해 시험		시험작물명	처리방법(처리일)	의뢰회사
	기준량	배양			
노고지리	2,000배	1,000배	삼	유묘기 경엽처리(10/11)	(주)제일그린산업
무처리	-	-	-	-	-

다. 경중개요

- 정식시기: 삼 - 10월 8일
- 포트규격: ø15 cm
- 토양: 양토+상토(비율 - 5 : 5)
- 온도: 하우스 내 평균온도 21.2℃

라. 시험구배치 및 조오면적: 완전임의배치법 3반복

구분	작물 수	처리 수	반복 수	총구 수	구당pot 수	총소요pot 수
약해시험	1	3	3	9	5포트	45포트

마. 공시자재처리 및 시험구 배치 사진



Korea Plants Environmental Research Station



KPER-19-O-110

○ 시험작물(삼)을 이식하고, 공시자재(상표명: 노고지리)의 기준량, 배양을 유묘기 경엽 처리 한 후 3, 5, 7일차에 유식물에 나타나는 외관상 약해 유무를 달관 조사한 결과 1종의 시험작물에서 기준량 및 배양에 대하여 약해(약해 판정기준결과: 0)는 나타나지 않았다.

○ 따라서 본 시험결과 공시자재(상표명: 노고지리)는 삼에 대하여 약해가 없어 유기농업자재 공시용으로 적합할 것으로 판단된다.

(주)한국식물환경연구소 대표이사 (인)

Korea Plants Environmental Research Station



2. 미생물 검사 성적서

제 EFAP-19-0215-1-M-1호			
미생물제제 분석 성적서			
위탁자	① 성명 (법인명)	㈜제일그린산업	② 주민등록번호 (법인등록번호)
	③ 주소	경상남도 진주시 문산읍 월아산로 950번길 25-3	
공시품	④ 성상	분상	
	⑤ 상표명 (유효미생물)	노고지리 (<i>Bacillus subtilis</i>)	
	⑥ 제조회사	㈜제일그린산업	
	⑦ 검사방법	미생물균수측정 : 희석 평판법 (Standard plate count)	
	⑧ 용도	등록/인증용(신규)	
⑨ 분석항목	유효균수	분석회수	분석지 [cfu/mL(g)]
		1	2.0×10^9
		2	2.0×10^9
		3	2.1×10^9
		평균	2.0×10^9
	표준편차	8.5×10^7	
	물리성	-	
1) 본 성적서는 시료를 3반복 분석한 후의 평균값임. 2) 본 성적서는 고객이 제공한 시료를 시험한 결과로서 전체제품에 대한 품질을 보증하지는 않음. 3) 본 성적서의 결과는 광고, 진단, 홍보 및 소송 등의 수단으로 사용하실 수 없음.			
시험책임자	2019년 3월 25일		최은화 (서명)
(주)친환경농산물안전성센터 			



제 EFAP-19-0215-2-M-1호			
미생물제제 분석성적서			
위탁자	① 성명 (법인명)	㈜제일그린산업	② 주민등록번호 (법인등록번호)
	③ 주소	경상남도 진주시 문산읍 월아산로 950번길 25-3	
공시품	④ 성상	분상	
	⑤ 상표명 (유효미생물)	노고지리 (<i>Bacillus subtilis</i>)	
	⑥ 제조회사	㈜제일그린산업	
	⑦ 검사방법	1. 유전자 염기서열 상동성 검사를 통한 균주 확인	
	⑧ 용도	등록/인증용(신규)	
⑨ 분석항목	유효미생물	상동성(%)	
		<i>Bacillus subtilis</i>	
		99%	
1) 본 성적서는 시료를 3반복 분석한 후의 평균값임. 2) 본 성적서는 고객이 제공한 시료를 시험한 결과로서 전체제품에 대한 품질을 보증하지는 않음. 3) 본 성적서의 결과는 광고, 진단, 홍보 및 소송 등의 수단으로 사용하실 수 없음.			
시험책임자	2019년 4월 2일		최은화 (서명)
(주)친환경농산물안전성센터 			



제 EFAP-19-0215-2-M-2호			
병원성미생물 검사성적서			
위탁자	① 성명 (법인명)	㈜제일그린산업	② 주민등록번호 (법인등록번호)
	③ 주소	경상남도 진주시 문산읍 월아산로 950번길 25-3	
공시품	④ 성상	분상	
	⑤ 상표명	노고지리	
	⑥ 제조회사	㈜제일그린산업	
	⑦ 검사방법	o 병원성미생물 선택배지들 이용한 검정	
	⑧ 용도	등록/인증용(신규)	
⑨ 검사항목	병원성 미생물		검사결과
	병원성 대장균(<i>Escherichia coli</i> O157:H7)		불검출
	병원성 살모넬라(<i>Salmonella</i> spp.)		불검출
	황색포도상구균(<i>Staphylococcus aureus</i>)		불검출
	리스테리아 모노사이토게네스(<i>Listeria monocytogenes</i>)		불검출
	바실러스 세레우스(<i>Bacillus cereus</i>)		불검출
1) 본 성적서는 시료를 3반복 분석한 후의 결과 값임. 2) 본 성적서는 고객이 제공한 시료를 시험한 결과로서 전체제품에 대한 품질을 보증하지는 않음. 3) 본 성적서의 결과는 광고, 진단, 홍보 및 소송 등의 수단으로 사용하실 수 없음.			
시험책임자	2019년 4월 2일		최은화 (서명)
(주)친환경농산물안전성센터 			

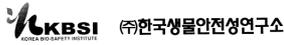


3. 인축 및 환경 독성 시험 성적서

Study No. : ETO-19017 Final Report

최종보고서

노고지리의
랫드에 대한 급성경구독성/병원성시험
ETO-19017



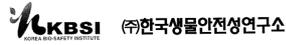
KBSI

1 page of 28

Study No. : ETP-19016 Final Report

최종보고서

랫드에 대한 노고지리의 급성경피독성시험
ETP-19016



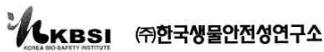
KBSI

1 page of 17

Study No. : ETD-19024 Final Report

최종보고서

New Zealand White계 토끼에 대한 노고지리의
피부자극성시험
ETD-19024



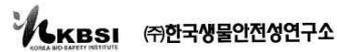
KBSI

1 page of 18

Study No. : ETE-19015 Final Report

최종보고서

New Zealand White계 토끼에 대한 노고지리의
안점막자극성시험
ETE-19015



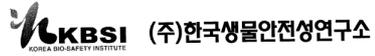
KBSI

1 page of 19

최종보고서

노고지리의 꿀벌 (*Apis mellifera*)에 대한
영향시험

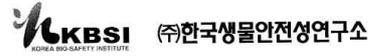
ETBE-19001



최종보고서

노고지리의 담수어류 (잉어, *Cyprinus carpio*)에 대한
영향시험

ETF-19014



4. 잔류농약 시험 성적서

잔류농약 시험(검사)성적서

1. 검사자료

발급번호	제 EFAP-19-0756-P 호	발급일	2019. 09. 09.	
		시험책임자	허성진 <i>허성진</i>	
의뢰인	성명	(주)제일그린산업	사업자등록번호	615-81-09229
	주소	경상남도 진주시 문산읍 울마산로 950번길 25-3		
의뢰내용	대상품목명	노고치리	Lot. No.	2019. 3. 19
	시험과목	잔류농약검사 (Abamectin B1 톤 322종)		
	용도	유기농업치재관시용		

2. 검사결과

No.	검출성분명 (Pesticide Name)	검출치 (mg kg ⁻¹)
1	불검출	-

* 불검출은 검출한계 미만으로 검출이 되지 않은 것을 의미함.

** 본 성적서는 고객이 제공한 시료를 시험한 결과로써 잔재특성에 대한 품질을 보증하지는 않음.

*** 본 실적서와 결과는 광고, 판매, 홍보 및 소송 등의 수단으로 사용하지할 수 없음.

㈜친환경농산물안전성센터



EFAP

EFAP-19-0756-P (주)제일그린산업, 노고치리, 잔류농약.hwp

주 의

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