

발 간 등 록 번 호

11-1543000-000648-01

농림 폐자원을 이용한 친환경 생초미생물  
혼합액비 산업화

(Development of mixed liquid fertilizer with functional  
microorganisms and agricultural waste material)

자연과사람 주식회사

농 립 축 산 식 품 부

## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업(농림폐자원을 이용한 친환경 생초미생물 혼합액비 산업화)의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업(농림폐자원을 이용한 친환경 생초미생물 혼합액비 산업화)의 연구결과입니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “농림 폐자원을 이용한 친환경 생초미생물 혼합액비 산업화”에 관한 연구의 보고서로 제출합니다.

2014년 10월 31일

주관연구기관명 : 자연과사람(주)

주관연구책임자 : 김 상 준

세부연구책임자 : 김 상 준

연 구 원 : 박 진 희

연 구 원 : 서 상 국

연 구 원 : 전 승 우

연 구 원 : 신 지 훈

협동연구기관명 : 전남대학교

협동연구책임자 : 김 길 용

연 구 원 : 이 용 성

연 구 원 : Kyaw wai naing

연 구 원 : 나 정 행

연 구 원 : 정 민 해

협동연구기관명 : 서울대학교

협동연구책임자 : 노 희 명

연 구 원 : 박 지 속

연 구 원 : 이 서 연

연 구 원 : 이 민 진

연 구 원 : 김 종 성

연 구 원 : 이 태 규

협동연구기관명 : 군산대학교

협동연구책임자 : 정 병 곤

연 구 원 : 이 건 형

연 구 원 : 김 종 대

연 구 원 : 조 성 준

연 구 원 : 조 길 환

연 구 원 : 김 태 훈

연 구 원 : 이 신 우

# 요 약 문

## I. 제 목

농림폐자원을 이용한 친환경 생초미생물 혼합액비 산업화

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

2012년 말 우리나라 골프장 수는 448개(18홀기준)에 농약 사용량은 연간 425.7톤(2012년 전 국골프장 농약사용량 실태조사 결과 :환경부)에 이며, 토양과 지하수 오염 등 환경에 부정적인 영향을 끼칠 것이라는 인식이 보편적이다.

골프장 코스 잔디관리를 위한 주기적 깎기 작업으로 발생하는 잔디예초물의 양은 연간 580,000톤으로 추정되며, 이를 폐기물로 위탁 처리하는 비용은 120억원에 이른다. 대부분의 골프장에서는 발생된 잔디예초물을 일부 수목용퇴비로 사용하거나 농가에 퇴비로 공급하고 있으나 대부분은 임시보관시설에 보관 한 후 위탁처리 되고 있는 실정이며, 보관 중 악취나 유출수의 토양 오염, 비용부담 등 처리에 어려움이 있다.

이렇게 버려지고 있는 잔디예초물은 75~85%가 물로 구성되어 있으며, 15~25%가 유기물과 무기물로 구성되어있고, 그중 질소 (4%), 인산 (2%), 칼륨 (2%), 칼슘, 유황, 마그네슘, 철 및 망간 등 다량의 양분이 포함된 훌륭한 유기성 자원이다.

최근 국제적으로 해양투기가 금지되고 친환경 녹색성장에 대한 인식이 널리 확산 되면서 다양한 유기성 폐기물의 무해성 산업화가 절실히 필요한 실정이며, 이에 맞춰 골프장 잔디 예초물을 부산물비료의 원료로 지정 유기성 폐기물의 자원화를 정책적으로 지원하고 있다.

이러한 추세에 따라 농산업 활동으로 배출되는 유기성 폐기물의 퇴비, 토양 개량제등의 활용 연구가 다방면으로 이루어지고 있으며, 액비화 연구 또한 가축분뇨, SCB 액비 등 농축산 폐기물을 비료로 재활용하는 연구가 활발히 진행되고 있다.

그러나 농림폐자원인 생초(잔디예초물)을 가지고 비료와 농약의 대체재로써의 혼합기능을 가지는 액비화에 대한 연구는 매우 미흡한 실정이다.

유기성 폐기물인 생초의 N, P, K 및 각종 식물 필수 미량요소들에 의한 비료 효과와 기능성 미생물이 생산하는 효소 및 대사물질에 의한 항균활성작용으로 병해방제 효과를 보이는 생초미생물 혼합액비를 연구개발 하여, 농림폐자원인 생초를 이용 유기성 폐기물의 재활용을 통한 자원순환체계에 일조함은 물론, 고부가가치 창출 및 친환경 신소재 개발로 화학비료를 대체하는 비료 기능과 농약을 대체하는 특성을 갖는 친환경 생초미생물 혼합 액비를 산업화 하고자 한다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

#### 1. 연구개발의 최종목표 및 주요내용

##### 가. 연구개발의 최종목표

농림폐자원을 이용한 친환경 생초미생물 혼합액비 산업화

##### 나. 연구개발의 주요내용

- (1) 생초 분쇄기, 생초미생물 혼합액비 제품 및 제조설비 개발
- (2) 셀룰로우스 분해 및 병해방제 기능성 미생물 선발
- (3) 기능성 미생물 특성 연구
- (4) 생초미생물 혼합액비 제조 연구
- (5) 생초미생물 혼합액비 제조 공정 최적화 연구
- (6) 포트, 포장에서 고추와 토마토의 생초미생물 혼합액비 시용에 따른 병해방제 및 성장 평가
- (7) 포트, 포장에서 생초미생물 혼합액비 시용에 따른 고추와 토마토의 토양 영양 평가
- (8) 포트, 포장에서 생초미생물 혼합액비 시용에 따른 한지형 잔디 성장 및 병 회복 평가

#### 2. 과제별(세부·협동) 연구개발의 목표 및 내용

##### 가. 제1세부과제 연구개발의 목표 및 내용

##### (1) 연구개발의 목표

생초미생물 혼합액비 산업화 연구

##### (2) 연구개발의 내용

##### (가) 생초분쇄기 개발

- ① 기계장치 변화에 따른 분쇄율 측정
- ② 생초분쇄기 시제품 제작도면 작성 및 제작

##### (나) 제조설비 개발

- ① 기능성미생물 배양 설비 시제품 제작
- ② 생초미생물 혼합액비 제조 설비 시제품 제작

##### (다) 제품 개발

- ① 원재료(생초)에 대한 농약 잔류량 시험
- ② 시제품 이화학분석
- ③ 시제품 비해·비효 조사

##### (마) 포트에서 한지형 잔디 생육 및 병 회복 평가

- ① 생육조사
- ② 엽록소 지수 및 병 발병정도 조사
- ③ Brown patch에 대한 잔디 회복정도 조사

(바) 포장에서 한지형 잔디 생육 및 병 회복 평가

- ① 생육조사
- ② Brown patch에 대한 잔디 회복정도 조사
- ③ Brown patch에 대한 병원균 동정

나. 제1협동과제 연구개발의 목표 및 내용

(1) 연구개발의 목표

- 기능성 미생물 및 생초미생물 혼합액비 제조 특성 연구
- 포트, 포장에서 생초미생물 혼합액비 시용에 따른 고추와 토마토의 병해방제, 성장 영향 평가

(2) 연구개발의 내용

(가) 기능성 미생물(*Paenibacillus ehimensis* KWN38) 특성 연구

- ① 효소활성조사
  - ㉠ cellulase 활성
  - ㉡ chitinase 활성
  - ㉢  $\beta$ -1,3-glucanase 활성
  - ㉣ protease 활성
  
- ② 식물생장호르몬조사
  - ㉠ TLC chromatogram 결과
  - ㉡ HPLC chromatogram 결과
  
- ③ 식물성곰팡이병원균에 대한 군사 파괴 및 포자 저해능력 조사
  - ㉠ KWN38과 배양액에 의한 군사 파괴
  - ㉡ 조효소 추출물에 의한 군사 파괴
  - ㉢ butanol 추출물에 의한 군사 파괴
  - ㉣ KWN38과 배양액에 의한 포자 저해
  - ㉤ 조효소 추출물에 의한 포자 저해
  - ㉥ butanol 추출물 의한 포자 저해
  
- ④ 효소(chitinase) 분리 및 정제
  - ㉠ 배양상등액의 chitinase 활성
  - ㉡ DEAE-Sepharose column chromatography 결과
  - ㉢ Sephadex G-100 column chromatography 결과
  - ㉣ CM-Sephadex C-50 column chromatography 결과
  - ㉤ chitinase 정제 요약
  - ㉥ 정제된 chitinase 특성 조사

- ⑤ 항생물질 정제
  - ㉠ 항생물질 추출 및 동정
  - ㉡ methyl palmitate에 의한 항균활성

(나) 기능성 미생물(*Streptomyces griseus* H7602) 특성 연구

- ① 효소 및 항균활성 조사
  - ㉠ Lipase and Protease 분비 및 항균활성 조사
  - ㉡ *Phytophthora capsici* 군사체 이용 활성조사
  - ㉢ 배양상등액의 항균활성
- ② 항생물질 정제
  - ㉠ ethyl acetate 추출물의 항균활성
  - ㉡ 항생물질 분리 및 정제
  - ㉢ <sup>1</sup>H-pyrrole-2-carboxylic acid 항균활성
- ③ 고추작물 포트 실험
  - ㉠ Root mortality 조사
  - ㉡ 병심각도 조사
  - ㉢ 뿌리와 상층부 생체 및 건물중 조사
  - ㉣ 잎의 chitinase and glucanase 활성조사
  - ㉤ 뿌리의 chitinase and glucanase 활성조사
  - ㉥ 토양 내 chitinase and glucanase 활성조사

(다) 생초미생물 혼합액비 제조 연구

- ① 생초(부숙하지 않은)와 보충양분을 이용한 생초미생물 혼합액비 제조 및 효과
  - ㉠ 생초량과 cellulase 활성에 따른 배지선택
  - ㉡ 배지조성에 따른 부탄올 추출물 항균활성 조사
  - ㉢ 배지조성에 따른 효소활성 조사
  - ㉣ 배지조성에 따른 IAA 측정
  - ㉤ 배지조성에 따른 양분 및 생초분해율 측정
- ② 생초(부숙된)와 보충양분을 이용한 생초미생물 혼합액비 제조 및 효과
  - ㉠ 배지조성에 따른 cellulase 활성 조사
  - ㉡ 배지조성에 따른 부탄올 추출물 항균활성 조사
  - ㉢ 배지조성에 따른 효소활성 조사
  - ㉣ 배지조성에 따른 IAA 측정
  - ㉤ 배지조성에 따른 양분 및 생초분해율 측정
  - ㉥ 온도별 cellulase 활성 조사
  - ㉦ 온도별 부탄올 추출물 항균활성 조사
  - ㉧ 온도별 IAA 측정

㉔ 온도별 양분 및 생초분해율 측정

(라) 포트에서 고추, 토마토의 생초미생물 혼합액비 시용에 따른 병해방제 및 성장 평가

① 포트에서 고추역병 병해방제 및 성장평가

㉔ 실험의 설계

㉕ Root mortality 조사

㉖ 생초미생물 혼합액비에 의해 유도되는 병해방제 효소 조사

㉗ 뿌리와 줄기의 생체 및 건물중 조사

② 포트에서 토마토 시들음병 병해방제 및 성장평가

㉔ 실험의 설계

㉕ 발병률 및 심각도

㉖ Root mortality 조사

㉗ 생초미생물 혼합액비에 의해 유도되는 항산화 효소 조사

㉘ 뿌리와 줄기의 생체 및 건물중 조사

(마) 포장에서 고추, 토마토의 생초미생물 혼합액비 시용에 따른 병해방제 및 성장 평가

① 포장에서 고추역병 병해방제 및 성장평가

㉔ 포장 설계 및 처리량 산정

㉕ Root mortality 조사

㉖ 뿌리와 줄기의 생체 및 건물중 조사

㉗ 수확량 조사

㉘ 토양 내 병해방제 효소 활성 조사

㉙ 토양 내 미생물 상 조사

② 포장에서 토마토 시들음병 병해방제 및 성장평가

㉔ 발병률 및 심각도

㉕ Root mortality 조사

㉖ 뿌리와 줄기의 생체 및 건물중 조사

㉗ 수확량 조사

㉘ 토양 내 병해방제 효소 활성 조사

㉙ 토양 내 미생물 상 조사

다. 제2협동과제 연구개발의 목표 및 내용

(1) 연구개발의 목표

포트, 포장에서 생초미생물 혼합액비 시용에 따른 고추와 토마토의 토양 영향 평가

(2) 연구개발의 내용

(가) 생초발효 액비 시용에 따른 토양 이화학성 변화와 작물의 생육에 미치는 영향평가

① 생초발효액비의 양분수준 분석

- ㉠ 생초발효액비
- ㉡ 생초발효액비 양분수준 분석
- ㉢ 생초발효액비의 처리수준설정

② 항온배양실험을 통한 생초발효액비의 양분성분의 토양 내 무기화율 평가

- ㉠ 항온배양실험 설계
- ㉡ 토양물리화학적 분석

③ Pot에서 생초발효액비 시용에 따른 토양과 작물에 대한 영향 평가

- ㉠ Pot 실험 설계
- ㉡ 생초발효액비 처리량 산정
- ㉢ Pot실험 토양 및 식물체 분석

(나) 생초미생물 혼합액비 시용에 따른 토양 이화학적 변화와 작물 생육 반응 및 무기화율 및 액비 처리효과 구명

① 생초미생물 혼합액비의 양분성분 분석

- ㉠ 생초미생물 혼합액비
- ㉡ 생초미생물 혼합액비 분석

② 항온배양실험을 통한 생초미생물 혼합액비의 토양화학적 영향평가

- ㉠ 항온배양실험 설계
- ㉡ 항온배양을 통한 토양화학적 변화 분석

③ Pot실험을 이용한 생초미생물 혼합액비의 토양 및 작물 생육 영향평가

- ㉠ Pot실험 설계
- ㉡ 생초미생물 혼합액비 처리량 산정
- ㉢ Pot실험 토양 및 식물체 분석

④ 컬럼 실험을 통한 생초미생물 혼합액비의 양분수지 분석

- ㉠ 컬럼 실험 설계
- ㉡ 컬럼 실험 결과 분석

(다) 중질소(<sup>15</sup>N)을 표지한 생초미생물 혼합액비 시용에 따른 토양 이화학적 변화, 작물 생육 반응 및 액비 처리효과 구명

① 생초미생물 혼합액비의 중질소(<sup>15</sup>N) 표지

- ㉠ 중질소(<sup>15</sup>N) 표지 생초미생물 혼합액비 실험의 필요성
- ㉡ 중질소(<sup>15</sup>N) 표지 잔디 분석

② 중질소(<sup>15</sup>N) 표지 생초미생물 혼합액비의 양분 성분 분석

㉠ 중질소(<sup>15</sup>N) 표지 생초미생물 혼합액비 제조

㉡ 중질소(<sup>15</sup>N) 표지 생초미생물 혼합액비 분석

③ 포장실험을 통한 중질소(<sup>15</sup>N) 표지 생초미생물 혼합액비의 토양 및 작물 생육 영향 평가

㉠ 포장실험 설계

㉡ 작물별 중질소(<sup>15</sup>N) 표지 생초미생물 혼합액비 처리량 산정

㉢ 포장 실험 토양 및 식물체 분석

㉣ 중질소(<sup>15</sup>N) 표지 생초미생물 혼합액비의 토양 및 작물에서의 회수율

라. 제3협동과제 연구개발의 목표 및 내용

(1) 연구개발의 목표

- Cellulose 분해 및 병해방제 기능성 미생물 선발

- 생초미생물 혼합액비 제조 공정 최적화 연구

(2) 연구개발의 내용

(가) Cellulose 분해 및 병해방제 기능성 미생물 선발

① Cellulose 분해균주 분리

㉠ 호기성 종속영양세균의 균체수 측정

㉡ Cellulose 분해균주 분리

㉢ Cellulose 분해능 측정

② 분리된 분해균주 동정

㉠ 균주의 탄소원 이용도 측정

㉡ 식물성 곰팡이균에 대한 항균활성조사

㉢ 16S rDNA 염기서열 분석을 통한 계통학적 분류

(나) 실험실 규모 제조공정 최적화 연구

① 부숙조건 최적화 평가

② 전처리조건 최적화 평가

③ 공기주입량 최적화 평가

④ 미생물주입량 최적화 평가

⑤ 운전온도 및 부숙기간 최적화 평가

⑥ 부숙전 멸균 적용 평가

⑦ 운전조절인자로써 ORP 적용 평가

(다) 소규모 현장 제조공정 최적화 연구

① 공기주입량 최적화 평가

- ② 실험실 규모 및 소규모 액비화 효율 비교 평가
- ③ 미생물주입량 최적화 평가
- ④ 운전온도 및 부숙기간 최적화 평가
- ⑤ 부숙전 멸균 적용 평가
- ⑥ 운전조절인자로써 ORP 적용 평가
- ⑦ 생초미생물 혼합액비 제조공정 산업화 가능성 평가

3. 연차별 연구개발의 목표 및 내용

구분 (연도)	연구목표	연구개발 내용
1차 년도 (2011)	생초분쇄기 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 기계장치 변화에 따른 분쇄율 측정</li> <li>- 생초분쇄기 시제품 제작도면 작성 및 제작</li> <li>- 원재료(생초)에 대한 농약 잔류량 시험</li> </ul>
	Cellulose 분해 및 병해방제 기능성 미생물 선발	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 호기성 종속영양세균의 균체수 측정</li> <li>- Cellulose 분해균주 분리</li> <li>- Cellulose 분해능 측정</li> <li>- 균주의 탄소원 이용도 측정</li> <li>- 식물성 곰팡이균에 대한 항균활성조사</li> <li>- 16S rDNA 염기서열 분석을 통한 계통학적 분류</li> </ul>
	기능성 미생물( <i>Paenibacillus ehimensis</i> KWN38) 특성 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>- cellulase 활성</li> <li>- chitinase 활성</li> <li>- <math>\beta</math>-1,3-glucanase 활성</li> <li>- protease 활성</li> <li>- TLC chromatogram 결과</li> <li>- HPLC chromatogram 결과</li> <li>- KWN38과 배양액에 의한 균사 파괴</li> <li>- 조효소 추출물에 의한 균사 파괴</li> <li>- butanol 추출물에 의한 균사 파괴</li> <li>- KWN38과 배양액에 의한 포자 저해</li> <li>- 조효소 추출물에 의한 포자 저해</li> <li>- butanol 추출물 의한 포자 저해</li> </ul>
	생초미생물 혼합액비 제조 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 생초(부숙하지 않은)와 보충양분을 이용한 생초미생물 혼합액비 제조 및 효과               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 생초량과 cellulase 활성에 따른 배지선택</li> <li>- 배지조성에 따른 부탄올 추출물 항균활성 조사</li> <li>- 배지조성에 따른 효소활성 조사</li> <li>- 배지조성에 따른 IAA 측정</li> <li>- 배지조성에 따른 양분 및 생초분해율 측정</li> </ul> </li> <li>○ 생초(부숙된)와 보충양분을 이용한 생초미생물 혼합액비 제조 및 효과               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 배지조성에 따른 cellulase 활성 조사</li> <li>- 배지조성에 따른 부탄올 추출물 항균활성 조사</li> <li>- 배지조성에 따른 효소활성 조사</li> <li>- 배지조성에 따른 IAA 측정</li> <li>- 배지조성에 따른 양분 및 생초분해율 측정</li> </ul> </li> <li>- 온도별 cellulase 활성 조사</li> <li>- 온도별 부탄올 추출물 항균활성 조사</li> <li>- 온도별 IAA 측정</li> <li>- 온도별 양분 및 생초분해율 측정</li> </ul>
	포트에서 고추, 토마토의 생초발효액비 시용에 따른 토양영향 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 항온배양실험을 통한 무기화율 평가</li> <li>- 포트토양 분석</li> <li>- 고추 작물 토양 영향평가</li> <li>- 토마토 작물 토양 영향평가</li> <li>- 식물체 분석 평가</li> </ul>

구분 (연도)	연구목표	연구개발 내용
2차 년도 (2012 )	제조설비 개발	- 기능성미생물 배양 설비 시제품 제작
	기능성 미생물 ( <i>Paenibacillus ehimensis</i> KWN38) 특성 연구	○ 효소(chitinase) 분리 및 정제 - 배양상등액의 chitinase 활성 - DEAE-Sepharose column chromatography 결과 - Sephadex G-100 column chromatography 결과 - CM-Sephadex C-50 column chromatography 결과 - 정제된 chitinase 특성 조사 ○ 항생물질 정제 - 항생물질 추출 및 동정 - methyl palmitate에 의한 항균활성
	기능성 미생물 ( <i>Streptomyces griseus</i> H7602) 특성 연구	○ 효소 및 항균활성 조사 - Lipase and Protease 분비 및 항균활성 조사 - Phytophthora capsici 균사체 이용 활성조사 - 배양상등액의 항균활성 ○ 항생물질 정제 - ethyl acetate 추출물의 항균활성 - 항생물질 분리 및 정제 - 1H-pyrrole-2-carboxylic acid 항균활성 ○ 고추작물 포트 실험 - Root mortality 조사 - 병심각도 조사 - 뿌리와 상층부 생체 및 건물중 조사 - 잎의 chitinase and glucanase 활성조사 - 뿌리의 chitinase and glucanase 활성조사 - 토양 내 chitinase and glucanase 활성조사
	포트에서 고추,토마 토의 생초미생물 혼 합액비 시용에 따른 병해방제 및 성장 평 가	○ 포트에서 고추역병 병해방제 및 성장평가 - 실험의 설계 - Root mortality 조사 - 생초미생물 혼합액비에 의해 유도되는 병해방제 효소 조사 - 뿌리와 줄기의 생체 및 건물중 조사 ○ 포트에서 토마토 시들음병 병해방제 및 성장평가 - 실험의 설계 - 발병률 및 심각도 - Root mortality 조사 - 생초미생물 혼합액비에 의해 유도되는 항산화 효소 조사 - 뿌리와 줄기의 생체 및 건물중 조사
	포트에서 고추,토마 토의 생초미생물 혼 합액비 시용에 따른 토양영향 평가	- 항온배양실험을 통한 무기화율 평가 - 컬럼실험을 통한 토양 내 양분거동 특성 조사 - 포트토양 분석 - 고추 작물 토양 영향평가 - 토마토 작물 토양 영향평가 - 식물체 분석 평가
	실험실 규모 제조공 정 최적화 연구	- 부숙조건 최적화 평가 - 전처리조건 최적화 평가 - 공기주입량 최적화 평가 - 미생물주입량 최적화 평가 - 운전온도 및 부숙기간 최적화 평가 - 부숙전 멸균 적용 평가 - 운전조절인자로써 ORP 적용 평가

구분 (연도)	연구목표	연구개발 내용
3차 년도 (2013 )	제조설비 개발	생초미생물 혼합액비 제조 설비 시제품 제작
	제품 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 시제품 이화학분석</li> <li>- 시제품 비해.비효 조사</li> </ul>
	포트 및 포장에서 한지형 잔디 생육 및 병 회복 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 생육조사</li> <li>- 엽록소 지수 및 병 발병정도 조사</li> <li>- Brown patch에 대한 잔디 회복정도 조사</li> </ul>
	포장에서 고추,토마토의 생초미생물 혼합액비 시용에 따른 병해방제 및 성장 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 고추역병 병해방제 및 성장평가</li> <li>- Root mortality 조사</li> <li>- 뿌리와 줄기의 생체 및 건물중 조사</li> <li>- 수확량 조사</li> <li>- 토양 내 병해방제 효소 활성 조사</li> <li>- 토양 내 미생물 상 조사</li> <li>○ 토마토 시들음병 병해방제 및 성장평가</li> <li>- 발병률 및 심각도</li> <li>- Root mortality 조사</li> <li>- 뿌리와 줄기의 생체 및 건물중 조사</li> <li>- 수확량 조사</li> <li>- 토양 내 병해방제 효소 활성 조사</li> <li>- 토양 내 미생물 상 조사</li> </ul>
	포장에서 고추,토마토의 생초미생물 혼합액비 시용에 따른 토양영향 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 생초미생물 혼합액비의 중질소(<sup>15</sup>N)표지</li> <li>- 중질소(<sup>15</sup>N)표지 생초미생물 혼합액비 양분 분석</li> <li>- 포트토양 분석</li> <li>- 고추 작물 토양 영향평가</li> <li>- 토마토 작물 토양 영향평가</li> <li>- 식물체 분석 평가</li> <li>- 중질소(<sup>15</sup>N)표지 생초미생물 혼합액비의 토양 및 작물에서의 회수율 조사</li> </ul>
	소규모 현장 제조공정 최적화 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 공기주입량 최적화 평가</li> <li>- 실험실 규모 및 소규모 액비화 효율 비교 평가</li> <li>- 미생물주입량 최적화 평가</li> <li>- 운전온도 및 부숙기간 최적화 평가</li> <li>- 부숙전 멸균 적용 평가</li> <li>- 운전조절인자로써 ORP 적용 평가</li> <li>- 생초미생물 혼합액비 제조공정 산업화 가능성 평가</li> </ul>

## IV. 연구개발결과

### 제 1 절 기능성 미생물 선발 및 특성 연구

#### 1. Cellulose 분해 및 병해방제 기능성 미생물 선발

##### 가. Cellulose 분해균주 분리

###### (1) 호기성 종속영양세균의 균체수 측정

잔디예초물 내 종속영양세균의 분포는,  $3.5 \pm 0.2 \times 10^6 \sim 1.8 \pm 0.7 \times 10^7$  cfu g<sup>-1</sup>d.wt.의 범주에서 변화하였고, 이를 각 실험기간별로 살펴보면, 2011년 8월에서는  $3.5 \pm 0.2 \times 10^6 \sim 1.8$  cfu g<sup>-1</sup>d.wt.를 나타냈으며, 10월에는  $1.8 \pm 0.7 \times 10^7$ cfu g<sup>-1</sup>d.wt.로 나

타나, 2011년 10월의 균체수가 2011년 8월에 측정된 균체수보다 약 19배 정도 높게 나타났다.

###### (2) Cellulose 분해균주 분리

균산 CC의 토양 및 잔디예초물로부터 분리된 균체들 중에서 chitin/cellulose 분해 미생물을 선별하기 위해 유일한 탄소원으로 colloidal chitin이 포함된 chitin 배지에서 chitin/cellulose를 분해할 수 있는 균 집락을 선별하여 cellulose분해 능력이 뛰어난 6개의 균주를 선별하였다.

###### (3) Cellulose 분해능 측정

6개의 균주 중 *Pseudomonas fluorescens*가 가장 높은 활성도를 보였고, 그 다음으로 *Bacillus circulans*와 *Paenibacillus ehimensis*가 높은 활성도를 나타냈다.

##### 나. 분리된 분해균주 동정

###### (1) 균주의 탄소원 이용도 측정

BIOLOG에 의한 탄소이용도 측정 결과, 선발된 6균주들이 모두 이용하는 기질로는 D-cellobiose, D-Fructose, D-Galactose, D-Mannose, D-Melibiose, D- Psicose, Gentiobiose, Lactulose, L-Arabinose, L-Fucose, Turanose, α-D-Glucose, α-D-lactose로 나타났다. 그리고 80% 이상 이용된 기질은 3-Methyl-D-Glucose, Dextrin, D-Fructose-6-Phosphate, D-Galacturonic Acid, D-Glucose-6-Phosphate, D-Ribose, D-Xylose, L-Rhamnose, N-Acetyl-D-Glucosamine, N-Acetyl-β-D-Mannosamine, Palatinose로 나타났다.

###### (2) 식물성 곰팡이균에 대한 항균활성조사

선발된 우수 chitin/cellulose 분해균주들의 잔디병원성 균류(fungi)에 대한 항균활성 실험 결과, 측정대상으로 사용된 잔디병원성 균류 *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum*에 대하여 모두 항균활성을 나타낸 균주는 *Paenibacillus ehimensis*로 나타났다.

###### (3) 16S rDNA 염기서열 분석을 통한 계통학적 분류

선발된 chitin/cellulose 우수분해균주들을 동정하기 위하여 이 균주들의 염색체 DNA를 추출하여 16S rRNA 유전자를 분리하였다.

## 2. 기능성 미생물(*Paenibacillus ehimensis* KWN38) 특성 연구

### 가. 효소활성조사

#### (1) cellulase 활성

cellulose의 분해활성은 배양시작 4일까지 증가하다가 이 후로 급격히 감소하였다.

#### (2) chitinase 활성

chitinase 활성은 5일째까지 점차적으로 증가하다가 이후 점진적으로 활성이 감소하였다.

#### (3) $\beta$ -1,3-glucanase 활성

$\beta$ -1,3-glucanase 활성은 3일째까지 서서히 증가하다가 5일째에 최고의 활성을 나타낸 후 6일째까지 서서히 감소한 후 7일째에 급격히 감소하였다.

#### (4) protease 활성

protease 활성은 4일째까지 서서히 증가하다가 5일째에 급격히 증가하여 8일째에 최고의 활성을 나타낸 후 감소하였다.

### 나. 식물생장호르몬조사

#### (1) TLC chromatogram 결과

TLC와 HPLC 크로마토그램 확인결과 KWN38은 auxin류의 IAA을 분비하는 것으로 확인되었다.

#### (2) HPLC chromatogram 결과

HPLC 크로마토그램을 통하여 IAA 표준물질과 KWN38 추출물의  $t_R$ 값이 모두 16.2분으로 측정되어 KWN38이 auxin류의 물질을 생산하는 것으로 판단되었다.

### 다. 식물성곰팡이병원균에 대한 균사 파괴 및 포자 저해능력 조사

#### (1) KWN38과 배양액에 의한 균사 파괴

KWN38과 식물병원성 곰팡이의 plate상에서의 대치배양 결과, 미생물 접종 반대편 균사(a)와 기능성 미생물 접종 편 균사(b)의 모습을 비교해보면 실험한 병원성 곰팡이 3종류 모두 미생물 접종 반대편 균사(a)의 모습은 정상적인데 반해 기능성 미생물 접종 편 균사(b)의 모습은 파괴되어 있음을 확인하였다.

#### (2) 조효소 추출물에 의한 균사 파괴

KWN38을 접종한 후 7일간 배양하여 Ammonium sulfate(80%)로 효소를 추출한 후 50mM sodium phosphate buffer(pH 7)로 녹여 병원성 곰팡이에 처리하여 효소에 의한

병원성 곰팡이 균사 파괴 효과를 측정된 결과 대조구의 병원성 곰팡이 균사는 파괴되지 않은데 비해, 조효소(500과 1000 $\mu$ g/ml)를 처리한 시험구의 균사는 파괴되었다.

(3) butanol 추출물에 의한 균사 파괴

KWN38을 접종 후 7일간 배양하여 butanol(BtOH)로 항생물질을 추출한 후 병원성 곰팡이에 처리하여 항생물질에 의한 병원성 곰팡이 균사 파괴 효과를 측정된 결과, 대조구의 병원성 곰팡이 균사는 파괴되지 않은데 비해 butanol(500ppm) 추출물을 처리한 시험구의 균사는 파괴되었다.

(4) KWN38과 배양액에 의한 포자 저해

기능성미생물(KWN38)에 의한 병원성 곰팡이 포자 저해 능력을 조사한 결과를 보면 *R. solani* AG-1 (IA)에 처리한 결과 대조구는 정상적으로 Sclerotium(균핵)을 형성하는데 비해 KWN38 배양액 처리구의 Sclerotium(균핵)은 발아되면서 모양이 변형되었고 *F. oxysporum*와 *P. capsici* 에 처리한 결과 대조구에서는 포자가 발아되는데 비해 KWN38 배양액 처리구에서는 포자 형성이 억제되었다.

(5) 조효소 추출물에 의한 포자 저해

KWN38을 접종 후 7일간 배양하여 Ammonium sulfate(80%)로 효소를 추출한 후 50mM sodium phosphate buffer(pH7)로 녹여 병원성 곰팡이에 처리하여 효소에 의한 병원성 곰팡이 포자 저해 능력을 측정된 결과 대조구를 처리한 병원성 곰팡이 포자는 형성되는데 비해 KWN38의 조효소 1000 $\mu$ g/ml를 처리한 시험구의 포자는 형성되지 않았다.

(6) butanol 추출물 의한 포자 저해

KWN38을 접종한 후 7일간 배양하여 butanol로 항생물질을 추출한 후 병원성 곰팡이에 처리하여 항생물질에 의한 병원성 곰팡이 포자 저해 능력을 측정된 결과 대조구의 병원성 곰팡이 포자는 형성되는데 비해 butanol 추출물(250과 500ppm)을 처리한 시험구의 포자 형성은 억제되었다.

라. 효소(chitinase) 분리 및 정제

(1) 배양상등액의 chitinase 활성

0.01% glycol chitin이 첨가된 SDS-PAGE running gel에 *Paenibacillus ehimensis* KWN38의 배양상등액 시료를 넣고 전기영동을 한 후 1% Triton X-100과 1% skim milk가 포함된 100mM sodium acetate buffer (pH 5.0) 완충액에 2시간 처리한 다음, 반응용 완충용액 1% Triton X-100이 포함된 100mM sodium acetate buffer (pH 5.0)에서 24시간 반응 시켰다. 반응 후 0.01% Calcofluor white M2R 염색액으로 염색하여 키틴분해효소 활성을 확인 하였다. 조사 결과 35, 50, 82, 107 및 138 kDa 정도의 분자량을 가진 chitinase를 *Paenibacillus ehimensis* KWN38이 생산함을 알 수 있었다.

(2) DEAE-Sephrose column chromatography 결과

80% ammonium sulfate를 통하여 얻은 조효소액을 DEAE-sepharose 컬럼에 NaCl을

이용하여 0-0.6M까지 농도 구배를 주면서 단백질을 용출시켰다. 모든 분획의 chitinase 활성을 측정한 뒤 활성이 있는 분획을 회수하여 농축시켰다.

(3) Sephadex G-100 column chromatography 결과

DEAE-sepharose 컬럼 크로마토그래피의 활성을 측정한 뒤 회수한 분획을 Sephadex G-100 컬럼에 Loading하여 용출하였다. 용출 후 회수한 분획을 단백질 정량 및 chitinase 활성을 측정하였다. 모든 분획의 chitinase 활성을 측정한 뒤 활성이 높은 있는 분획을 회수하여 농축시켰다.

(4) CM-Sephadex C-50 column chromatography 결과

CM-Sephadex C-50 column chromatography를 실시한 후 효소활성이 가장 강한 분획을 농축한 후 pH, 온도, 금속이온의 영향에 대하여 조사하였다.

(5) chitinase 정제 요약

최종 CM-Sephadex C50 컬럼 크로마토그래피를 실행 후 효소 고유활동도(specific activity)는 12.9 Unit/mg이었고, 정제배율(Purification folds)는 12.34로 나타났다.

(6) 정제된 chitinase 특성 조사

정제된 효소(34번 분획)의 금속이온에 대한 특성을 조사하기 위해 10mM의  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ , EDTA,  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{MgCl}_2$  및  $\text{MnCl}_2$  등을 처리한 후 조사결과 모든 금속 이온 처리구에서 처리하지 않은 무처리구 보다 활성이 낮아졌다. 이 중에서  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$  및  $\text{HgCl}_2$ 에서 각각 86%, 91%와 100%의 효소 억제 활성이 조사되었다.

마. 항생물질 정제

(1) 항생물질 추출 및 동정

기능성미생물(*Paenibacillus ehimensis* KWN38)을 5일동안 배양한 후 배양액을 원심분리(8000 rpm, 20 min at 4°C)하여 Butanol을 이용하여 추출하였다. 이 후 유기용매 추출물을 농축하고 *P. capsici*, *R. solani* 및 *F. oxysporum* 에 대하여 항균활성을 측정한 결과 항균 활성을 보인 Butanol 추출물을 가지고 1차년도에 이어서 Silica gel 및 Sephadex LH20 column chromatography를 이용해 항균물질을 정제한 뒤 HPLC를 이용해 정제된 물질을 분획하고 NMR등을 이용하여 정제된 물질을 동정을 실시하였다.

(2) methyl palmitate에 의한 항균활성

Paper disc법을 이용한 methyl palmitate의 *Rhizoctonia solani* AG-1(IA)에 대한 항균 활성 조사를 각각 methyl palmitate 0, 1, 2, 4, 8, 16, 32 mg ml<sup>-1</sup> 농도로 실시하였다.

3. 기능성 미생물 특성 연구(*Streptomyces griseus* H7602)

가. 효소 및 항균활성 조사

(1) Lipase and Protease 분비 및 항균활성 조사

Lipase 및 Protease를 생산하였다.

(2) *Phytophthora capsici* 균사체 이용 활성조사

*Streptomyces griseus* H7602의 *Phytophthora capsici* 균사체 이용 가능성 조사를 위하여 *Phytophthora capsici*를 PDB배지에 키운 후 균사체를 모아 chitinase 및 glucanase 활성을 7일간 각각 측정 하였다. 조사결과 *Streptomyces griseus* H7602는 *Phytophthora capsici* 균사체를 에너지원으로 이용가능 하였고, 기질인 균사체의 농도가 감소함으로써 chitinase 및 glucanase의 활성이 감소되어지는 것으로 사료되었다.

(3) 배양상등액의 항균활성

*Streptomyces griseus* H7602 배양 상등액에 담겨진 *Phytophthora capsici*의 균사는 성장하지 못하였지만, 멸균수에 담겨진 *P. capsici*의 균사는 정상 적으로 성장하였다.

나. 항생물질 정제

(1) ethyl acetate 추출물의 항균활성

각각의 병원성 곰팡이에 대하여 억제율은 *P. capsici* 74.34%, *F. oxysporum* 74.99%, *R. solani* 49.63%로 조사되었다.

(2) 항생물질 분리 및 정제

미생물(*Streptomyces griseus* H7602) 배양액 12L를 원심분리 한 후 에틸아세테이트 12L로 항생물질을 추출하였다. 에틸아세테이트 추출로 얻은 조추출물 2g을 silica gel 컬럼 크로마토그래피를 이용해 정제 하였다. 이동상 80:20 (Etyl acetate:Methanol) 용출 분획에서 항균활성물질 647 mg을 얻었고, 이를 ODS 컬럼 크로마토그래피에 적용해 다시 정제를 실시하였다. 이동상 60:40 (Distilled water:Methanol) 용출 분획에서 항균활성물질 292 mg을 얻었고, 이를 Sephadex LH-20 컬럼 크로마토그래피에 적용해 다시 정제를 실시하였다. 각각의 분획을 5ml씩 얻었고, 항균활성을 조사한 후 활성을 가진 분획을 순상 Thin layer chromatography (TLC)를 실시하였다. TLC 후 분리된 물질을 회수 하여 항균 활성 조사를 하여 활성을 보이는 물질 25mg을 HPLC를 통해 순도를 확인 하였다.

(3) 1H-pyrrole-2-carboxylic acid 항균활성

분리 정제된 <sup>1</sup>H-pyrrole-2-carboxylic acid를 *P. capsici* 균사에 200 ppm 농도로 처리한 결과 무처리구에 비해 균사가 파괴 되어진 것이 관찰 되었다.

다. 고추작물 포트 실험

(1) Root mortality 조사

고추작물의 뿌리 치사율 (root mortality)을 조사하기위해 병원균(*Phytophthora capsici* zoospore) 감염 직후부터 12일까지 측정 하였다. 조사결과 GC+H7062 처리구가 가장 낮았으며, Fungicide, GC media, Control 순으로 조사되었다. 결과적으로 GC+H7062가 뿌리 치사를 억제 하는데 상당한 효과가 있는 것으로 사료되었다.

(2) 병심각도 조사

조사 결과 GC+H7062와 Control 및 GC media간의 병 심각도의 차이는 대략 2% 정도 차이가 있는 것으로 조사되어졌다. 결과적으로 GC+H7062가 Fungicide와 통계적 차이가 없을 정도로 병 발생을 억제하는데 효과가 있는 것으로 사료되었다.

(3) 뿌리와 상층부 생체 및 건물중 조사

고추작물의 줄기 무게는 병원균(*Phytophthora capsici* zoospore) 감염 직후부터 12일까지 측정 하였다. 12일째에 줄기 생체중은 모든 처리구 중 GC+H7062 처리구가 가장높았을뿐만아니라 통계적 유의성도 보였다.

(4) 잎의 chitinase and glucanase 활성조사

고추작물체 잎에서의 병해방제효소인 chitinase 활성은 GC media를 제외한 나머지 처리구에서 초기 감염부터 12일째까지 증가하였다.

(5) 뿌리의 chitinase and glucanase 활성조사

고추작물체 뿌리에서의 병해방제효소인 chitinase 활성은 초기 감염부터 3일째까지 모든 처리구간 큰 변동 변화가 없었으며, GC+H7062를 제외한 나머지 처리구에서 3일째 이후 활성이 낮아지다가 12일째에 초기 감염시보다 낮게 나타났다.

(6) 토양 내 chitinase and glucanase 활성조사

토양 내에서의 병해방제효소인 chitinase 활성은 초기 감염부터 6일째까지 모든 처리구간 완만한 변동폭을 가졌으며, 모든 처리구에서 12일째에 초기 감염시보다 낮은 활성을 보였다.

## 제 2 절 생초미생물 혼합액비 산업화 연구

### 1. 생초미생물 혼합액비 제조 연구

가. 생초(부숙하지 않은)와 보충양분을 이용한 생초미생물 혼합액비 제조 및 효과

(1) 생초량과 cellulase 활성에 따른 배지선택

cellulase 활성이 가장 높은 T5 처리구 조성에 보충양분으로 미량요소(몰리브덴, 아연), 키틴분말 및 젤라틴 분말을 각 처리구별로 그 양을 다르게 추가하여 처리구를 구성한 생초미생물혼합액비로 추후 실험을 수행하였다.

(2) 배지조성에 따른 부탄올 추출물 항균활성 조사

*R. solani* AG-1(IA), *P. capsici*, *F. oxysporum* 를 대상으로 항균활성을 측정한 결과 대조구 C(butanol)에 비해 생초미생물혼합액비의 부탄올추출물 처리구인 S 방향으로 병원균의 균사가 더 자라지 못하였다.

(3) 배지조성에 따른 효소활성 조사

보충양분 양에 따른 다양한 효소의 활성을 측정한 결과 chitinase와  $\beta$ -1,3-glucanase의

경우는 처리구간 거의 차이가 나타나지 않았다

(4) 배지조성에 따른 IAA 측정

보충양분 양에 따른 생초미생물혼합액비 I의 식물생장호르몬을 HPLC를 이용하여 측정  
한 결과 각 처리구에서 IAA의 전구체인 IAM(Idole-3-acetamide)을 소량 분비함을 확  
인할 수 있었다.

(5) 배지조성에 따른 양분 및 생초분해율 측정

보충양분 양에 따른 양분특성을 조사한 결과 각 처리구별로 큰 차이가 나타나진 않았  
다.

나. 생초(부숙된)와 보충양분을 이용한 생초미생물 혼합액비 제조 및 효과

(1) 배지조성에 따른 cellulase 활성 조사

보충양분 양에 따른 생초미생물혼합액비의 cellulase 활성 변화를 측정한 결과 T5처리  
구의 활성이 T4의 활성에 비해 높았으며 T5의 cellulase 활성은 대부분 3일째에 활성이  
가장 높고(T5-d를 제외) 급격히 감소하였다.

(2) 배지조성에 따른 부탄올 추출물 항균활성 조사

*R. solani* AG-1(IA), *P. capsici*, *F. oxysporum* 를 대상으로 항균활성을 측정한 결과 대  
조구 C(butanol)에 비해 생초미생물혼합액비의 부탄올추출물 처리구인 S 방향으로 병원  
균의 군사가 더 자라지 못하였다.

(3) 배지조성에 따른 효소활성 조사

보충양분 양에 따른 다양한 효소의 활성을 측정한 결과 chitinase 활성은 각 처리구내  
에 큰 차이를 보이지 않았고,  $\beta$ -1,3-glucanase 활성 또한 처리구간 거의 차이가 나타나  
지 않았으며, protease의 활성은 5일째까지 처리구간 활성이 거의 비슷하다가 5일 이후에  
T5-e, T4-a 처리구의 활성이 급격히 증가하였다.

(4) 배지조성에 따른 IAA 측정

보충양분 양에 따른 생초미생물혼합액비의 IAA를 HPLC를 이용하여 측정한 결과 모든  
처리구에서 IAA를 생성하지 않았다.

(5) 배지조성에 따른 양분 및 생초분해율 측정

보충양분 양에 따른 생초 분해율을 측정한 결과 첨가한 생초 양에 따른 T4와 T5의 차  
이 외에 각 처리구내에 큰 차이를 보이지 않았다.

(6) 온도별 cellulase 활성 조사

cellulase 활성은 온도에 따른 차이를 보이지 않았다.

(7) 온도별 부탄올 추출물 항균활성 조사

*R. solani* AG-1(IA), *P. capsici*, *F. oxysporum*를 대상으로 항균활성을 측정된 결과 기능성미생물을 접종하지 않은 control에 비해 기능성미생물(KWN38)을 접종한 처리구에서 항균활성을 보였으며 특히 기능성미생물을 접종하여 30℃에서 배양한 처리구에서 뛰어난 항균활성을 보였다.

(8) 온도별 IAA 측정

온도에 따른 IAA 생성 여부를 HPLC를 이용하여 측정된 결과 모든 처리구에서 IAA를 생성하지 않았다.

(9) 온도별 양분 및 생초분해율 측정

온도에 따른 생초 분해율을 측정된 결과 기능성미생물(KWN38)을 접종하여 30℃에서 배양한 처리구에서 가장 낮은 유기물함량을 보여 30℃에서 배양하는 것이 생초 분해율 측면에서 효과적이라고 판단되었다.

2. 생초미생물 혼합액비 제조공정 최적화 연구

가. 실험실 규모 제조공정 최적화 연구

(1) 부숙조건 최적화 평가

기능성미생물(KWN38)을 이용한 실험실 규모 생초미생물 혼합액비 제조에 있어 부숙 조건별 액비화 효율을 비교하여 본 결과 액비 제조에 있어 Anoxic 상태의 부숙조건 보다는 Oxic 상태의 부숙조건이 액비화 효율에 있어 더 높은 효율을 나타내었다. 따라서 Oxic 상태가 액비 제조에 있어 최적 부숙조건인 것으로 판단된다.

(2) 전처리조건 최적화 평가

기능성미생물(KWN38)을 이용한 실험실 규모 생초미생물 혼합액비 제조에 있어서 전처리조건별 액비화 효율을 비교하여 본 결과 부숙전 오존처리 보다는 멸균을 실시하여 부숙하는 것이 액비화 효율에 있어 더 높은 효율을 나타내었다. 따라서 액비제조에 있어서 부숙전 멸균을 실시하는 것이 최적 전처리조건인 것으로 판단된다.

(3) 공기주입량 최적화 평가

기능성미생물(KWN38)을 이용한 실험실 규모 생초미생물 혼합액비 제조에 있어 공기 주입량을 2배로 증가시켜 실험해본 결과 C/N비 등에 기초할 때 효율 변화는 그리 크지 않았으나 공기주입량 0.4L/min·L 이상에서 공기량 증가에 따라 액비의 혼합력이 증가되어 반응효율 면에서 좀 더 나은 결과를 나타낸 것으로 판단된다. 그래서 액비의 혼합력 및 반응효율 면에서 기능성미생물을 이용한 실험실 규모 생초미생물 혼합액비 제조의 최적 공기주입량은 최소 0.4L/min·L에서 최대 0.8L/min·L으로 주입하여야 할 것으로 보여진다.

(4) 미생물주입량 최적화 평가

기능성미생물(KWN38)을 이용한 실험실 규모 생초미생물 혼합액비 제조에 있어 기능

성미생물 주입량별 액비화 효율을 비교하여 본 결과 혼합액비 1L 기준으로 기능성미생물을 1mL 주입하는 것이 가장 높은 효율을 보여 생초미생물 혼합액비 제조에 있어 최적의 기능성미생물 주입량인 것으로 나타났다.

(5) 운전온도 및 부숙기간 최적화 평가

기능성미생물(KWN38)을 이용한 실험실 규모 생초미생물 혼합액비 제조에 있어 운전온도별 액비화 효율을 비교하여 본 결과 20℃ 보다는 30℃의 운전온도가 액비화 효율에 있어 더 높은 효율을 나타내는 것을 알 수 있었으며, 20℃의 운전온도에서는 최적 부숙기간이 약 10일이었으나 30℃의 운전온도에서는 약 5일로 약 1/2 정도로 부숙기간을 단축시킬 수 있다는 결과를 얻을 수 있었다. 이를 통하여 허용 온도 범위 내에서 온도가 10℃ 증가함에 따라 반응속도가 2배정도 빨라진다는 사실을 확인할 수 있었다.

(6) 부숙전 멸균 적용 평가

기능성미생물(KWN38)을 이용한 실험실 규모 생초미생물 혼합액비 제조에 있어 부숙전 멸균 적용가능성 평가를 액비화 효율 비교를 통하여 살펴본 결과 부숙전 멸균을 실시하는 것이 액비화 효율에 있어 더 높은 효율을 보이는 것으로 나타났다.

(7) 운전조절인자로써 ORP 적용 평가

운전조절인자로서 C/N비와 폭기를 일시적으로 정지시킨 상태에서 ORP가 높은 상관관계를 나타냄에 따라 C/N비를 대체할 수 있는 운전조절인자로서 ORP가 적용 가능한 것으로 나타났다. 또한 생초미생물 혼합액비 제조시 ORP를 이용하여 부숙도를 판별할 수 있을 것으로 보여 진다.

나. 소규모 현장 제조공정 최적화 연구

(1) 공기주입량 최적화 평가

생초미생물 혼합액의 처리대상량 증가에 따라 최적 공기주입량을 조사해본 결과 처리대상 액비량 1 ~ 20L 까지는 액비의 단위부피당 최적 공기주입량이 증가하나 그 정도는 완만한 것으로 나타났으며, 생초미생물 혼합액비량 20L와 두 배로 증가시킨 40L에서는 최적 공기주입량이 0.8L/min · L로 일정한 수준으로 유지되는 결과를 나타내었다. 따라서 본 실험 결과에 따를 때 혼합액비 용량이 40L 이상인 경우에도 최적 공기주입량은 0.8L/min · L 일 것으로 보여 진다

(2) 실험실 규모 및 소규모 액비화 효율 비교 평가

소규모의 생초미생물 혼합액비 부숙결과 액비화 효율에 있어서 실험실 규모에서의 C/N비 등 모든 항목에서 거의 동일한 결과 값을 나타내는 것을 알 수 있었다. 이는 생초미생물 혼합액비 제조에 있어서 실험실 규모 실험을 통하여 구한 설계인자들은 혼합액비 제조량이 증가하더라도 그대로 적용가능하다는 것을 나타내었다.

(3) 미생물주입량 최적화 평가

실험실 규모 생초미생물 혼합액비 기능성미생물 주입량별 액비화 효율과 소규모 현장

제조공정을 이용한 생초미생물 혼합액비의 기능성미생물 주입량별 액비화 효율 결과와 동일한 결론을 얻을 수 있었으며, 생초미생물 혼합액비 1L 기준 기능성미생물(KWN38)을 1mL 주입하는 것이 소규모 현장 제조공정을 이용한 생초미생물 혼합액비 제조에 있어서 기능성미생물(KWN38) 최적 주입량인 것으로 나타났다.

#### (4) 운전온도 및 부숙기간 최적화 평가

실험실 규모의 부숙기간 최적화 평가에서도 부숙온도 20℃에서는 약 10일 이었으나 30℃에서는 약 5일로 부숙기간을 1/2 정도로 단축시킬 수 있다는 결론을 나타내었다. 이번 소규모 현장 제조공정을 이용한 생초미생물 혼합액비 실험에서 약 1/2 정도로 부숙기간을 단축시킬 수 있다는 같은 결론을 얻을 수 있었으며, 더 높은 액비화 효율을 보이는 것으로 나타났다. 또한 허용 온도 범위 내에서 온도가 10℃ 증가함에 따라 반응속도가 2배정도 빨라진다는 결과를 확인할 수 있었다.

#### (5) 부숙전 멸균 적용 평가

실험실 규모 생초미생물 혼합액비 제조에 있어서 부숙전 멸균 적용가능성 평가의 액비 효율과 비교하여 본 결과 소규모 현장 제조공정을 이용한 생초미생물 혼합액비의 연구결과와 비슷한 결과를 보여주는 것으로 나타났다. 그래서 생초미생물 혼합액비 제조에 있어서 부숙전 멸균을 적용하는 것이 옳다고 보여 진다.

#### (6) 운전조절인자로서 ORP 적용 평가

소규모 현장 제조공정을 이용한 생초미생물 혼합액비 연구결과 운전조절인자로서 C/N 비와 폭기를 일시적으로 정지시킨 상태에서 ORP가 높은 상관관계를 나타냄에 따라 C/N 비를 대체할 수 있는 운전조절인자로서 ORP가 실험실 규모 생초미생물 혼합액비와 동일하게 적용가능한 것으로 나타났다.

#### (7) 생초미생물 혼합액비 제조공정 산업화 가능성 평가

생초미생물 혼합액비 산업화 중 제조설비를 포함한 현장에서 자가로 액비화 할 경우 최적조건은 공기주입량은 Scale-up에 따라 단위부피당 최적 공기주입량이 증가하는 경향으로 나타났지만 최대값은 0.8L/min · L로 나타나 현장에서 자가 액비화 할 경우에도 적용될 수 있을것으로 사료되며, 다른 운전인자별 최적화 조건으로 기능성미생물 주입량은 1L 기준 1mL를 주입 운전온도는 30℃에서 5일정도 액비화 기간이 필요하고, 액비화 전 멸균 적용이 액비화 효율이 높고 무엇보다 선발된 기능성 미생물(*Paenibacillus ehimensis* KWN38)의 배양 시 다른 미생물의 오염을 차단키 위한 무균상태에서의 제조방법이 필요하고, 제조공정의 산업화를 위한 생초미생물 혼합액비의 액비화 효율 판단 기준으로 손쉽게 판별 할 수 있는 ORP가 적용이 가능할 것으로 사료된다.

### 3. 생초미생물 혼합액비 제품 및 제조설비 개발

#### 가. 생초분쇄기 개발

##### (1) 기계장치 변화에 따른 분쇄율 측정

2단으로 제작한 기어식 분쇄기의 분쇄입도는 25 $\mu$ m이하가 4.1%로 나타났으며, 분쇄결과 나타난 개선사항을 반영하여 최종적으로 완성한 3단 기어식 분쇄기의 분쇄율은 25 $\mu$ m이하가 64.3%로 나타남.

(2) 생초분쇄기 시제품 제작도면 작성 및 제작

3단 기어식 분쇄기의 구성은 1단은 평로올러 2,3단은 맞물림 기어방식으로 제작하였고, 제작도면을 완성 하여 생초분쇄기의 제작 표준화를 이룸

나. 제조설비 개발

(1) 기능성미생물 배양 설비 시제품 제작

생초미생물혼합액비 산업화를 위한 기능성미생물(*Paenibacillus ehimensis* KWN38)의 배양시설 시제품 제작을 위한 배지의 조성은 일반적으로 판매되는 배지가 대량 배양 시 경제성이 떨어져 1년차의 연구결과를 바탕으로 비용을 고려하여 게겍질 분말 1g/l, 젤라틴 분말 1g/l, 복합비료(21:17:17) 3g/l, Yeast extract 0.03g/l, FeCl<sub>3</sub>-6H<sub>2</sub>O 0.03g/l, 설탕 3g/l 으로 결정하고, 배양온도는 30 $^{\circ}$ C, 배양일은 3일로 하고, 미생물(*Paenibacillus ehimensis* KWN38)의 접종량은 1L당 1ml로 결정 후 전문제작업체에 의뢰하여 시제품을 제작 하였다.

(2) 생초미생물 혼합액비 제조 설비 시제품 제작

최종 결정된 생초미생물 혼합액비 제조설비의 제원은 용량은 1m<sup>3</sup> 살균온도는 85~90 $^{\circ}$ C, 교반속도는 60~180rpm으로 인버터로 제어, 배양온도 30 $^{\circ}$ C(편차:  $\pm$  3 $^{\circ}$ C), 냉각방식은 자동 제어 수냉식, 공기량 주입은 60 l/min-l, 공기 주입 시 항균필터를 채용하기로 하고 제조설비의 시제품 제작은 전문 제작업체의 기술적 자문을 토대로 주문 제작을 하였다.

다. 제품 개발

(1) 원재료(생초)에 대한 농약 잔류량 시험

원재료인 생초의 발생장소가 골프장인 관계로 잔디관리를 위해 농약을 사용하고, 이 부분에 대한 안전성 검토를 위해 환경부 고시로 지정된 골프장 농약잔류량 검사 40개 항목에 대한 생초의 잔류농약 분석을 지정기관에 분석의뢰하여 Tetradifon등 40개 항목에 대해 분석을 실시한 결과 불검출 되었으며, 생초의 농약에 대한 안전성을 확인 하였다.

(2) 시제품 이화학분석

생초미생물 혼합액비의 제품화의 일환으로 제4종 복합비료 엽면시비용과 미량요소 복합비료의 등록을 위해 비료시험지정기관으로 고시된 연구소에 시제품의 이화학 분석을 의뢰하여 보증성분 및 유해성분에 대하여 적합 판정을 받았다.

(3) 시제품 비해.비효 조사

생초미생물 혼합액비의 미량요소 복합비료 등록을 위해 비료시험지정기관 고시된 연구기관에 시제품의 비해.비효 및 토양의 이화학분석을 의뢰하여 양호 및 비해가 없음을 확인 하였다.

#### 4. 생초미생물 혼합액비 시용에 따른 한지형 잔디 생육 및 병회복 평가

##### 가. 포트에서 한지형 잔디 생육 및 병 회복 평가

###### (1) 생육조사

생초 미생물 혼합 액비 시용에 따른 한지형 잔디 생육 조사 결과 병원성곰팡이 (*Rhizoctonia solani* AG-1) 접종 후 60일째 엽 무게는 WP 처리구가 가장 높게 조사되었지만, SP 처리구와의 유의성은 없었다. 또한 엽 길이는 WP 처리구가 가장 높게 조사되었다. 이러한 결과를 종합해 볼 때 잔디 생육에 있어서 WP 처리구 즉, 한지형 잔디를 액비의 재료로 사용했을 때 잔디의 생육이 좋은 것으로 나타났다.

###### (2) 엽록소 지수 및 병 발병정도 조사

잔디 지하부 생육에 관하여 병원성곰팡이(*Rhizoctonia solani* AG-1 IA) 접종 후 60일째 조사 결과 WP 처리구가 뿌리무게에서 가장 높게 나타났지만, 생체중에서 SP 처리구와의 유의성은 없었다. 결론적으로 잔디의 지상부 생육과 지하부 생육에 대하여 WP 처리구 즉, 한지형 잔디를 액비의 재료로 사용했을 때 잔디의 생육이 좋은 것으로 나타났다. 잔디 뿌리 치사율 조사결과 모든 처리구간의 유의성이 나타나지 않았다.

###### (3) Brown patch에 대한 잔디 회복정도 조사

생초 미생물 혼합액비 시용에 따른 잔디 치사 후 회복 조사 결과 생초 미생물 혼합 액비 시용구가 잔디 치사 후 회복력이 가장 높은 것으로 사료되었다.

##### 나. 포장에서 한지형 잔디 생육 및 병 회복 평가

###### (1) 생육조사

생초 미생물 혼합 액비 시용에 따른 한지형 잔디 생육 조사 결과 조사 25일째 지상부 무게(엽 무게)에서는 생체중 및 전체중에서 처리구간의 유의성이 나타나지 않았다. 하지만 조사 35일째에서는 GP 처리구에서 가장 높은 지상부 생체중과 전체중을 보였다. 이러한 결과를 종합해 볼 때 잔디 생육에 있어서 GP 처리구 즉, 생초미생물 혼합액비 처리가 한지형 잔디 생육에 가장 효과적인 것으로 보여지며, 이는 생초미생물혼합액비 제조시 미생물이 생산한 대사산물에 의한 작용으로 사료되었다.

###### (2) Brown patch에 대한 잔디 회복정도 조사

잔디 회복 실험 조사결과 생초미생물 혼합액비 처리가 병원성곰팡이(*Rhizoctonia solani* AG-1 IA)에 의해 생성된 병반을 감소시키는데 효과가 있는 것으로 사료되었다.

###### (3) Brown patch에 대한 병원균 동정

포장 실험 병반으로부터 병원체 분리를 분리하여 실험실에서 배양한 후 18S rRNA분석을 통하여 동정한 결과 *Rhizoctonia solani* AG-1 IA로 동정 되었다.

### 제 3 절 생초미생물 혼합액비 시용에 따른 토양영향평가

## 1. 생초발효 액비 시용에 따른 토양 이화학성 변화와 작물의 생육에 미치는 영향평가

### 가. 생초발효액비의 양분수준 분석

#### (1) 생초발효액비 분석 결과

생초발효액비의 pH는 5.00으로 약산성을 나타내었으며, 총질소는  $4.30 \text{ g L}^{-1}$ , 총인은  $0.25 \text{ g L}^{-1}$ , 유기물은  $22.2 \text{ g L}^{-1}$ 의 함량을 나타내었다. 일반적인 액비에 비하여 총질소 함량이 높은 것은 생초발효액비 제조시 첨가되는 잔디예초물에 들어있는 잔디 자체의 질소 함량 때문이라고 판단된다.

### 나. 항온배양실험을 통한 생초발효액비 토양 내 무기화율 평가

#### (1) 생초발효액비의 토양 내 무기화율 평가

생초발효액비를 처리한 토양에서의 산도의 증가는 생초발효액비의 pH가 5.00으로 비교적 약산성이었으며, 무기태 질소의 경우 일차가 증가함에 따라 암모니아태 질소는 감소하고, 질산태 질소의 양이 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. 이는 암모니아태 질소가 질산화 작용을 통해 질산태 질소로 전환 된 것이라 판단되며, 이는 생초발효액비가 식물에게 질소 공급원으로서의 기능을 할 수 있을 것이라 판단된다.

### 다. Pot에서 생초발효액비 시용에 따른 토양과 작물에 대한 영향 평가

#### (1) 생초발효액비 처리량 산정

방울토마토와 고추 두 개의 작물별 생초발효액비 처리량은 작물별 화학비료 질소 요구량과 동일하게 처리하였으며, 작물별로 1수준, 2수준으로 재배기간 동안 영양성분 변화를 추적하면서 처리수준에 맞추어 1주 분량의 액비를 물 600ml에 희석하여 시비하였다.

#### (2) Pot 실험 토양 분석 결과

양토에서 생초발효액비 처리구의 총 질소는 방울토마토와 고추 모두 화학비료 처리구에 비하여 유의적인 차이는 없었으나, 식양토에서는 생초발효액비 처리구가 초반에 화학비료보다 낮은 수준이었으나, 실험 종료시점에는 유의적인 차이가 없었다. 무기태질소의 경우 토성과 작물의 종류에 따라 차이가 있었다. 방울토마토의 경우 실험 종료시점에 식양토보다 양토에서 무기태질소 함량이 더 높았으며, 고추의 경우 양토보다 식양토에서 무기태 질소 함량이 더 높았다.

## 2. 생초미생물 혼합액비 시용에 따른 토양 이화학성 변화와 작물 생육 반응 및 무기화율 및 액비 처리효과 구명

### 가. 생초미생물 혼합액비의 양분성분 분석

#### (1) 생초미생물 혼합액비 분석 결과

생초미생물 혼합액비의 pH는 8.48로 약염기를 나타내었으며, 전 질소는  $1.37 \text{ g L}^{-1}$ , 인산은  $0.28 \text{ g L}^{-1}$ 의 함량을 나타내었다.

### 나. 항온배양실험을 통한 생초미생물 혼합액비 토양 내 무기화율 평가

(1) 생초미생물 혼합액비의 토양 내 무기화율 평가

향온배양 실험 결과 암모늄태질소는 일차가 증가함에 따라 감소한 반면, 질산태 질소는 그에 반해 증가하는 양상을 보였다(생초발효액비와 동일한 양상). 1차년도와 마찬가지로 이는 토양 내 암모늄태 질소의 질산화 작용에 의한 것이라 판단된다.

다. Pot실험을 이용한 생초미생물 혼합액비의 토양 및 작물 생육 영향평가

(1) 생초미생물 혼합액비 처리량 산정

방울토마토와 고추 두 개의 작물별 생초발효액비 처리량은 작물별 화학비료 질소 요구량과 동일하게 처리하였으며, 작물별로 1수준, 2수준으로 재배기간 동안 영양성분 변화를 추적하면서 처리수준에 맞추어 1주 분량의 액비를 물 600ml에 희석하여 시비하였다.

(2) Pot 실험 토양 분석 결과

총 81일간의 실험 결과 생초미생물혼합액비 처리구는 화학비료에 상응하는 질소 효과를 확인할 수 있었다. 방울토마토와 고추 모두에게서 실험 종료시점인 81일에 총질소 함량이 화학비료 처리구에 비하여 유의적으로 높은 것을 확인할 수 있었으며, 고추 토양의 무기태 질소함량도 화학비료에 비하여 높았다.

(3) Pot 실험 식물체 분석 결과

생초미생물혼합액비 시용은 방울토마토와 고추 두 작물에서 다른 특성을 나타냈다. 방울토마토의 경우 열매 개수가 액비 처리구에서 높은 수준을 보였던 반면, 전반적으로 고추는 화학비료와 큰 차이가 나타나지 않았다.

라. 컬럼 실험을 통한 생초미생물 혼합액비의 양분수지 분석

(1) 컬럼 실험 결과 분석

컬럼 실험 결과 넣어준 생초 미생물 혼합액비에 존재하는 무기태 질소의 80 %정도가 회수되었으며, 토양 내 16 cm 깊이까지의 암모늄태 질소의 이동이 있었으며, 질산태 질소의 경우 12 cm 까지 이동하였다. 이는 토양 내 생초미생물혼합액비를 투입하였을 때 액비가 바로 용출되지 않고, 어느 정도 토양에 머물러 식물에게 양분으로서의 기능을 할 수 있을 것이라 판단된다.

3. 중질소(<sup>15</sup>N)을 표지한 생초미생물 혼합액비 시용에 따른 토양 이화학성 변화, 작물 생육 반응 및 액비 처리효과 구명

가. 생초미생물 혼합액비의 중질소(<sup>15</sup>N) 표지

(1) 중질소(<sup>15</sup>N) 표지 잔디 재배

중질소 잔디는 5 ATOM %짜리 <sup>15</sup>N UREA를 사용하여 서울대학교 수원 시험농장서 잔디를 재배하였으며, 잔디 품명은 켄터키블루글라스와 벤트글라스를 사용하였다. 총 60 일 동안 잔디를 재배하였으며, 약 5.6kg (basis of fresh weight)의 잔디를 수확하였다. 잔디에 표지된 <sup>15</sup>N atom % 는 0.51% 였으며, 이를 잔디 건중량 1.51kg에 표지된 양으로

환산하여 투입된 중질소( $^{15}\text{N}$ ) 대비 회수율(%)을 구하였다.

(2) 중질소( $^{15}\text{N}$ ) 표지 잔디 분석 결과

본 실험에서 표지한 잔디의 중질소( $^{15}\text{N}$ ) 회수율은 5% 정도로 선행연구의 표지 효율에 크게 미치지 못하였다. 이는 잔디의 포트 재배시, 배수력이 높고 보비력이 낮은 모래를 이용하였기 때문에 용탈에 의한 중질소( $^{15}\text{N}$ )의 손실에서 비롯된 것으로 판단된다. 그러나 자연에 존재하는 중질소( $^{15}\text{N}$ ) 함량(0.37  $^{15}\text{N}$  atom %)보다는 높은 함량으로 표지되었으므로 일정 수준의 추적이 가능하다고 판단되어 이를 이용한 후속 실험을 진행하였다.

나. 중질소( $^{15}\text{N}$ ) 표지 생초미생물 혼합액비의 양분 성분 분석

(1) 중질소( $^{15}\text{N}$ ) 표지 생초미생물 혼합액비 분석 결과

중질소( $^{15}\text{N}$ ) 표지 생초 미생물 혼합 액비 총질소의 약 45%가 무기태 질소의 형태로 존재하였으며, 액비 분석결과  $^{15}\text{N}$  atom %가 0.84% 로 중질소( $^{15}\text{N}$ )를 표지한 잔디(0.51%) 보다 높은 함량으로 분석되었는데, 이는 액비화 과정에서  $^{15}\text{N}$  atom(%)가 자연존재비의 1.64배로 농축됨으로서 중질소( $^{15}\text{N}$ ) 표지 생초 미생물 혼합 액비를 질소 추적을 위한 추적자로서 이용하는데 가치가 높아졌으며, 실험을 하는데 있어서 더욱더 긍정적인 결과를 나타내었다.

다. 포장실험을 통한 중질소( $^{15}\text{N}$ ) 표지 생초미생물 혼합액비의 토양 및 작물 생육 영향 평가

(1) 작물별 중질소( $^{15}\text{N}$ ) 표지 생초미생물 혼합액비 처리량 산정

방울토마토와 고추 두 개의 작물별 생초발효액비 처리량은 작물별 화학비료 질소 요구량과 동일하게 처리하였으며, 작물별로 재배기간 동안 영양성분 변화를 추적하면서 처리 수준에 맞추어 1주 분량의 액비를 물에 희석하여 시비하였다.

(2) 포장 실험 토양 분석 결과

토양 총질소의 경우 고추와 방울토마토 모두에게서 처리구간의 유의적인 차이는 없었으며, 무기태 질소의 경우 방울토마토에서 생초미생물혼합액비의 무기태질소함량이 화학비료처리구에 비하여 낮은 것을 확인 할 수 있었으나, 고추의 경우 비슷한 수준을 유지하였다.

(3) 포장 실험 식물체 분석 결과

고추와 방울토마토 모두에서 화학비료 처리구에 비하여 열매의 초장길기와 건중량 그리고 열매 개수가 높았다. 방울토마토의 경우 산도와 당도를 측정하였으며, 화학비료 처리구에 비하여 생초미생물혼합액비 처리구에서 당도는 높고 산도는 낮았다.

(4) 중질소( $^{15}\text{N}$ ) 표지 생초미생물 혼합액비의 토양 및 작물에서의 회수율

고추와 방울토마토 각각의 식물과 토양 총 회수율은 각각 31.20, 50.09%였다. 이와같은 결과를 통해 중질소 표지 생초미생물혼합액비 유래 질소가 토양에서 식물에게로 이용이 이루어진 것을 확인 할 수 있었으며, 이를 통하여 생초미생물혼합액비를 작물의 특성에 따라 적절하게 시용한다면 질소질 화학비료를 대체할 수 있을 것으로 사료된다는 결론을

얻었다.

## 제 4 절 생초미생물 혼합액비 시용에 따른 작물 병해방제 및 성장 평가

### 1. 포트에서 고추, 토마토의 생초미생물 혼합액비 시용에 따른 병해방제 및 성장 평가

#### 가. 포트에서 고추역병 병해방제 및 성장평가

##### (1) 실험의 설계

처리구 1 (G): 생초액 (Grass media)

처리구 2 (GM): 생초미생물 혼합액비(Grass media + Microorganism)

처리구 3 (F): 복합비료 (Fertilizer, 21:17:17, 3 g/L)

처리구 4 (FF): 합성농약(Fungicide, 캐스팅, (주)동방아그로, 1 g/L) + 복합비료,  
(Fertilizer + Fungicide)

##### (2) Root mortality 조사

조사결과 15일째에서 FF 처리구가 가장 뿌리 치사율이 낮았으나, GM 처리구와 통계적 유의성을 보이지 않았고, 그 다음으로 F와 G 처리구 순으로 나타났다. GM 처리구는 FF 리구와 통계적 유의성을 보이지 않았을 뿐만아니라, F와 G 처리구의 치사율을 비교했을 때 상당한 차이가 있음이 조사되었다. 이는 GM 처리구가 병원균을 억제하는데 효과적인 작용을 했을 것으로 사료되었다.

##### (3) 생초미생물 혼합액비에 의해 유도되는 병해방제 효소 조사

고추작물체 내의 병해방제효소 chitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase, cellulase를 조사하기위해 병원균(*Phytophthora capsici* zoospore) 감염 직후부터 15일까지 측정 하였다. chitinase 활성은 조사일 15일째 G, GM, F 처리구간 통계적 유의성이 보이지 않았고, FF 처리구와의 유의성만 조사되었다. glucanase 활성은 초기 병원균 감염 후 G와 F 처리구에서는 2일까지 증가하다 감소하였고, GM 및 FF 처리구에서는 0일째부터 15일째 까지 계속 감소하였다. Cellulase에 대한 활성은 조사 15일째 FF 처리구가 가장 높았고, GM 처리구가 가장 낮은 활성을 나타내었다.

##### (4) 뿌리와 줄기의 생체 및 건물중 조사

생초미생물 혼합액비의 고추작물에 대한 효과를 조사하기위하여 G(생초액), GM(생초미생물 혼합액비), F(복합비료), FF(합성농약+복합비료)를 각각 포트에 처리하였다. 처리 6주째 GM 처리구가 가장 높았다. 이는 GM 처리구가 병원균 감염(*Phytophthora capsici* zoospore)을 효과적으로 막았을 뿐만아니라, 작물의 영양 공급에서도 효과가 있는 것으로 판단되었다.

#### 나. 포트에서 토마토 시들음병 병해방제 및 성장평가

##### (1) 실험의 설계

처리구 1 (F): 비료액 (Fertilizer, 21:17:17, 3 g/L)

처리구 2 (G): 생초액 (Grass media)

처리구 3 (GP): 생초미생물 혼합액비 (Grass media + *P. ehimensis* KWN38)

처리구 4 (GSF): 생초액+합성농약

(Grass medium + Synthetic fungicide; 리도참, 정보화학주식회사, 1 g/L)

(2) 발병률 및 심각도

토마토작물의 발병율은 병원균(*Fusarium oxysporum* conidia) 감염 10째부터 24일까지 2일간격으로 측정 하여 총 7번의 조사를 하였다. 조사결과 생초미생물 혼합액비 처리구가 농약 처리구보다 병발병율 및 심각도에서 높았지만, 다른 대조구에 비해 낮게 나타났다.

(3) Root mortality 조사

토마토작물의 뿌리 치사율은 병원균(*Fusarium oxysporum* conidia) 감염 15째부터 25일까지 조사 하였다. 조사 결과 GP 처리구가 비록 GSF 처리구보다 뿌리 치사율이 높았지만 F와 G 처리구보다 낮게 나온 것으로 보아 GP의 처리로 뿌리 치사율을 상당히 억제 할 수 있는 것으로 사료되었다. 이는 생초미생물 혼합액비(GP)의 배양과정에서 미생물에 의해 만들어지 대사산물과 미생물의 직접적인 영향인 것으로 판단되어졌다.

(4) 생초미생물 혼합액비에 의해 유도되는 항산화 효소 조사

병해방제효소인 Peroxidase 활성 및 Polyphenol oxidase 활성의 조사는 병원균(*Fusarium oxysporum* conidia) 감염 15째부터 25일까지 3번에 걸쳐 토마토작물의 잎을 채취하여 조사하였다. Peroxidase 활성 및 Polyphenol oxidase 활성 모두 F, G, GP, GSF 순으로 높게 나타났다.

(5) 뿌리와 줄기의 생체 및 건물중 조사

토마토작물의 잎 및 뿌리 무게는 병원균(*Fusarium oxysporum* conidia) 감염 직후부터 25일까지 측정 하였다. 25일째에 잎 생체중은 모든 처리구 중 F, GP, GSF 세 처리구 가운데 GP 처리구가 가장 높았지만, 세 처리구간 통계적 유의성은 나타나지 않았다. 뿌리 생체중 및 전체중에서는 조사 25일째 GP 처리구가 다른 처리구에 비해 가장 높은 값을 나타냈지만, 생체중에서는 GSF 처리구와만 유의적 차이를 보였고, 전체중에서는 G와 GSF 처리구에서 각각 유의성을 보였다.

2. 포장에서 고추, 토마토의 생초미생물 혼합액비 시용에 따른 병해방제 및 성장 평가

가. 포장에서 고추역병 병해방제 및 성장평가

(1) 포장 설계 및 처리량 산정

T1 (F): Fertilizer (비료처리)

T2 (FF): Fertilizer + Synthetic Fungicide (비료 + 살균제 처리)

T3 (G): Grass culture (생초미생물 혼합액비; *Paenibacillus ehimensis* KWN38 첨가 생초 배양액 처리)

T4 (GF): 1/3 Grass culture + 2/3 Fertilizer (KWN38 첨가 생초 배양액 1/3 + 비료)

## 2/3 처리)

### (2) Root mortality 조사

생초미생물 혼합액비의 고추작물의 병방제에 대한 효과를 조사하기 위하여 G(생초미생물 혼합액비), GF(초미생물혼합 액비1/3+복합비료2/3), F(복합비료), FF(합성농약+복합비료)를 각각 처리하였고, 고추작물의 뿌리 치사율을 조사하기 위해 작물 정식 후 90일째 시료를 채취하여 측정 하였다. 조사결과 생초 미생물 혼합 액비 1배액 처리구인 G는 FF 처리구와 통계적 유의성을 보이지 않았을 뿐만 아니라, F와 G 처리구의 치사율을 비교했을 때 상당한 차이가 있음이 조사됐다. 이는 G 처리구가 뿌리 치사율을 유발하는 병원균을 억제하는데 효과적인 작용을 했을 것으로 판단되었다.

### (3) 뿌리와 줄기의 생체 및 건물중 조사

조사결과 뿌리 및 줄기의 생체중 및 건체중에서 조사 30일, 60일 및 90일째까지 처리구간 통계적 유의성은 보이지 않았다.

### (4) 수확량 조사

생초미생물 혼합액비의 고추작물의 수확량에 미치는 영향에 대하여 조사한 결과 정식 30일 후의 합성농약+복합비료 처리구인 FF와 생초미생물혼합 액비1/3+복합비료2/3 처리구인 GF와의 통계적 유의성이 나타난 것을 제외하고, 정식 60일째와 90일째의 처리간의 차이는 조사되지 않았다.

### (5) 토양 내 병해방제 효소 활성 조사

chitinase 활성은 조사 60일째와 90일째 생초미생물 혼합액비 처리구인 G가 다른 처리구에 비해 가장 높게 조사되었다. 하지만 다른 처리구와의 통계적 유의성은 없었다.  $\beta$ -1,3-glucanase 활성 또한 90일째 G 처리구가 다른 처리구에 비해 가장 높게 조사되었지만 다른 처리구와의 통계적 유의성은 없었다. Cellulase 활성은 조사 90일째 G 처리구와 GF 처리구가 F 처리구와 FF 처리구보다 높게 나타났다. D dehydrogenase 활성이 비록 통계적 유의성이 나타나지 않았지만 G 처리구에서의 dehydrogenase 활성이 가장 높게 나타난 것은 생초 미생물 혼합 액비의 처리로 인해 토양에서 토양미생물군집의 활성과 대사활동이 가장 활발하다는 근거를 보여주었다.

### (6) 토양 내 미생물 상 조사

토양 내 세균상을 조사한 결과 조사 30, 60 및 90일째 생초미생물 혼합액비 처리구인 G와 GF처리구가 F처리구와 FF처리구에 비해 세균상이 높게 조사된 것으로 보아 생초미생물 혼합액비 처리가 토양 내 세균상의 증가를 가져온 것으로 사료되었다. 토양내 곰팡이 상을 조사한 결과 F처리구가 다른 처리구에 비해 가장 높게 나타났다. 하지만 방사선균 개체수 차이는 각 처리구간에 나타나지 않았다.

## 나. 포장에서 토마토 시들음병 병해방제 및 성장평가

### (1) 발병률 및 심각도

토마토 잎 및 줄기에서의 병해 조사는 토마토 정식 후 조사하였다. 조사 결과 정식 90 일째 병해를 조사한 결과 F 처리구에서 가장 높은 피해를 보였고, 그 다음으로 GF, G 및 FF 순으로 나타났다. 생초 미생물 처리구인 G는 FF 처리구에 비해 높게 나타났지만, F 처리구에 비해 낮은 것으로 보아 토마토 작물의 잎 및 줄기에서의 병해를 어느 정도 예방한 것으로 사료 되어졌다.

#### (2) Root mortality 조사

조사결과 복합비료 처리구인 F에서 뿌리치사율이 가장 높게 조사 되었고, 그 다음으로 GF로 조사되었다. 가장 낮은 뿌리 치사율은 FF 처리구로 조사되어졌지만 G 처리구와 통계적 유의성을 보이지 않았다. 이러한 결과는 생초 미생물 혼합 액비 처리가(G 처리 구)가 뿌리 치사율을 유발하는 병원균을 억제하는데 효과적인 작용을 했을 것으로 사료 되었다.

#### (3) 뿌리와 줄기의 생체 및 건물중 조사

토마토 작물의 생육 조사결과 정식 90일째 조사 결과 지상부 길이 에서는 각 처리구간 차 이가 없었으며, 지상부 생체중, 전체중 및 지하부 생체중, 전체중은 F 처리구가 가장 낮게 조 사되었고, G, GF 및 FF 처리구간의 생육 차이는 없는 것으로 조사되었다.

#### (4) 수확량 조사

토마토 작물 수확량 조사결과 90일째는 생초 미생물 혼합 액비 처리구인 G에서 과수와 과 중이 가장 높게 나타났지만 GF 처리구와의 통계적 유의성은 나타나지 않았다.

#### (5) 토양 내 병해방제 효소 활성 조사

Chitinase 활성은 조사 90일째 생초 미생물 혼합 액비 처리구인 G가 다른 처리구에 비 해 가장 높게 조사되었다. 하지만 다른 처리구와의 통계적 유의성은 없었다.  $\beta$ -1,3-glucanase 활성 또한 90일째 G 처리구가 다른 처리구에 비해 가장 높게 조사되었지 만 다른 처리구와의 통계적 유의성은 없었다. Cellulase 활성은 조사 90일째 G 처리구와 GF 처리구가 F 처리구와 FF 처리구보다 높게 나타났다. 이는 생초에 포함된 cellulose에 의해 토양내 cellulase 활성이 G와 GF 처리구에 높게 나타난 것으로 사료되어진다. Dehydrogenase 활성 이 비록 통계적 유의성이 나타나지 않았지만 정식 후 30일, 60일 및 90 일째의 G 처리구에서 dehydrogenase 활성이 가장 높게 나타난 것은 생초 미생물 혼합 액비 의 처리로 인해 토양에서 토양미생물군집의 활성과 대사활동이 가장 활발하다는 근거를 보여 주었다.

#### (6) 토양 내 미생물 상 조사

토양내 세균상을 조사한 결과 정식 30일, 60일 및 90일째 생초 미생물 혼합 액비 처리구인 G에서 가장 높게 나타났지만, 90일째는 GF 처리구와의 유의성은 나타나지 않았다. 토양내 곰팡이 상을 조사한 결과 F처리구가 다른 처리구에 비해 가장 높게 나타났다. 이러한 결과는 고추 작물 실험과 일치한다. 방사선균 개체수는 정식 30일째 G 처리구에서 가장 높게 나타났 다. 하지만 정식 60일 및 90일째는 모든 처리구간 유의성이 나타나지 않았다.

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

본 연구과제의 수행성으로 생초의 미분쇄연구 연구결과 기어식 분쇄기(등록번호 : 10-1313334호)의 특허 등록 하였으며, 최종 개발된 3단식 기어를 이용한 생초분쇄기(출원번호 : 10-2012-0027740)의 특허 출원을 완료하였다. 또한 셀룰로스 분해와 병해방제 기능을 동시에 갖는 *Paenibacillus ehimensis* KWN38와 잔디예초물을 이용한 생초미생물 혼합액비 제조기술을 잔디를 이용한 액체비료 및 제조방법(출원번호 : 10-2014-0136727)에 대한 특허 출원도 완료 하였다.

본 연구개발결과인 생초미생물 혼합액비의 산업화중 상품화는 제4종 복합비료와 미량요소 복합비료로 추진할 계획으로 이화학 분석 및 비해·비효 시험을 완료 하였으며, 원자재인 생초(잔디예초물)의 확보가 용이한 골프장 및 골프장 잔디관리 용역업체를 대상으로 완제품보다는 생초미생물 혼합액비 제조기술의 보급을 통한 자체 생산쪽으로서의 산업화를 추진할 계획이며, 이를 위한 연구를 지속적으로 추진 할 계획이다.

## SUMMARY

For making mixed liquid fertilizer, antagonistic strain was isolated from soil and was identified as *Paenibacillus ehimensis* KWN38 (NCBI accession number: JN050969) based on the 16S rRNA sequence analysis. Another strain was also isolated and identified as *Streptomyces griseus* H7602 (NCBI accession number: JN827310) which produced antifungal compound, 1H-pyrrole-2-carboxylic acid identified by instrumental analysis. Decomposition efficiency of grass in culture medium was higher by *P. ehimensis* KWN38 inoculation in compared to non-inoculated ones using measurement of organic matter content. Chitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase and cellulase activities produced by *P. ehimensis* KWN38 were the highest at 5, 8 and 4 days, respectively. Production of IAA by *P. ehimensis* KWN38 was confirmed by TLC and HPLC when tryptophan was added to the grass medium. 34 kDa of chitinase and methyl pamate showing antifungal activity were purified and identified from *P. ehimensis* KWN38. *P. ehimensis* KWN38 showed antifungal activity against *Rhizoctonia solani* AG-1, *R. solani* AG-2-2 and *Pythium aphanidermatum*. Best composition of media was decided as grass 17.8 %, Sodium Molybdate 0.005 %, Zinc sulfate 0.006 %, Chitin powder 0.08 %, and Gelatin powder 0.02 %. Various enzyme activities were not having a gap, antifungal activity and grass decomposition efficiency were the highest at 30°C, and no production of IAA was found in treatments exposed to different temperatures. In addition, no change of nutrient characteristic by treatment of temperature was observed. Crude enzyme (1000µg/mL) and butanol(500ppm) extracted from *P. ehimensis* KWN38 destroyed hyphae of plant fungal pathogens, and inhibited spore germinations. In pot experiments for both pepper and tomato, plant growth by treatment of mixed liquid fertilizer was higher than treatment of fertilizer and only media, while root mortality was lower than treatment of fertilizer and only media. In addition, chitinase and glucanase activities in soil and root of the pepper experiment were the highest in mixed liquid fertilizer. In tomato experiment, however, the peroxidase and polyphenol oxidase activities of leaf and root were the highest in only medium treatment. In greenhouse experiments for both pepper and tomato, plant growth by treatment of mixed liquid fertilizer was no different to all treatments, while disease control was higher than treatment of fertilizer and only media. Soil chitinase and glucanase activities were not different in all treatments. But, cellulase and dehydrogenase activities were slightly different among treatments. For soil microbial community, population of bacteria and fungi increased at 30, 60 and 90 days of treatments, but no increase of actinomycetes.

To investigate the growth of bentgrass, it was treated with winter grass medium (W), W plus *P. ehimensis* KWN38 inoculation (WP), summer grass medium (S), S plus *P. ehimensis* KWN38 inoculation (SP), Fertilizer (F), and F plus fungicide (FF). As results,

the leaves of bentgrass in all control treatments (W, S and F) showed high levels of infection, with significantly higher values than those of WP, SP and FF. The leaf fresh and dry weights of bentgrass treated with *P. ehimensis* KWN38 were all greater than the control treatments W, S and F. Similarly, both fresh and dry weights of the roots and the chlorophyll contents of bentgrass in WP and SP were significantly higher than those of W, S, F and FF. Moreover, bentgrass treated with *P. ehimensis* KWN38 grew faster and showed greater growth performance compared to the other treatments in the second pot trial with infected bentgrass. Another field experiment was also conducted on Kentucky blue grass lawn by treating with W, WP, F and FF. The leaf and root weights of grass treated with *P. ehimensis* KWN38 was also consistently higher compared to the control treatments.

This study was conducted for evaluation of mixed liquid fertilizer (MLF) as nitrogen supplier. First year, to assess fertilizer value of an quasi-aerobically fermented liquid clipped-grass fertilizer, aerobic incubation experiment using two texturally contrasting loam (L) and sandy loam (SL) soils was conducted for 60 days to investigate temporal variations in N mineralization pattern of the liquid fertilizer applied. To do so, variation patterns in concentration of inorganic nitrogen were analyzed from mixed liquid fertilizer during aerobic incubation.

In the second year, this study was conducted to evaluate the effect of mixed liquid fertilizer on some growth responses of plants and soil chemical properties. To do so, a pot experiment with pepper and tomato using loam soil was conducted for 81 days in a temperature-controlled glasshouse, and four N fertilization treatments were laid out in a completely randomized design with three replicate: control, chemical fertilizer, two rates of MLF treatment. Soil were periodically sampled and analyzed for pH, EC, total N, inorganic N and total C, and some growth characteristics of pepper and tomato were measured. This result conclude that application of MLF as nitrogen supplier might replace the chemical fertilizer when nitrification rate and addition of MLF increased.

During the last year, field experiment was performed to evaluate the effect of the applied  $^{15}\text{N}$  labelled MLF. To do so, a field experiment with pepper and tomato using loam soil was conducted in a temperature-controlled house, and two N fertilization treatments were laid out in a completely randomized design with three replicate: chemical fertilizer, MLF treatment. Soil were periodically sampled and analyzed for pH, EC, total N, inorganic N and total C, and some growth characteristics of pepper and tomato were measured. Consequently, mixed liquid fertilizer might replace the chemical fertilizer.

Optimization of laboratory scale manufacturing process for making digested liquid grass fertilizer using functional microorganism(KWN38). It can be concluded that more favorable condition can be obtained by maintaining oxic condition through aeration when comparing process performance between oxic and anoxic state. It can be concluded that sterilization is

more efficient pre-treatment method than ozone treatment. As a results of experiment with increasing aeration rate it can be concluded that optimum aeration rate is 0.4~0.8L/min·L. It can be conclude that optimum dosage of functional microorganism is 1mL on the basis of 1L of composite liquid fertilizer. Optimum decay period is 10 day at operating temperature of 20<sup>°C</sup> and 5 day at operating temperature of 30<sup>°C</sup>. Better performance in making digested liquid grass fertilizer can be obtained at 30<sup>°C</sup> of operating temperature rather than 20<sup>°C</sup>. As a result of evaluation of pre-treatment(sterilization) applicability before decay, pre-treatment before decay is recommended to make favorable condition in making liquid fertilizer. ORP can be applied as operational control parameter instead of C/N ratio because of good correlation between C/N ratio and ORP operational control parameter. It should be noted that aeration should be stopped temporary before measuring ORP.

Optimization evaluation of digested liquid grass fertilizer manufacturing process using small scale on-site plant. In previous study using lab-scale reactor, optimum aeration rate was 0.4~0.8L/min·L. However, in this scale-up study, optimum aeration rate was greater than the results obtained from previous study. In this study using 40L reactor, optimum aeration rate is 0.8L/min·L. Almost same results can be obtained regardless of reactor scale. This means that design factors obtained from laboratory scale experiment can be applied to full scale reactor. However, optimum aeration rate per unit reactor volume is increased as the reactor volume is increased. Optimum dosage of functional microorganism is 1mL/L in small scale on-site reactor. 5 days decay at the operating of 30<sup>°C</sup> is more favorable condition in making liquid fertilizer using small scale on-site reactor rather than 10 days decay at the operating temperature of 20<sup>°C</sup>. In this experiment, reaction rate is increased up to 2 times as the reaction temperature is increased 10<sup>°C</sup>. Applying pre-treatment(sterilization) before decay is more efficient way in enhancing overall performance of liquid fertilizer manufacturing process when conducting comparison between with and without applying pre-treatment. It can be concluded that ORP can be applied as operational control parameter instead of C/N ratio and ORP. Accordingly, degree of decay can be estimated by the ORP value when making digested liquid grass fertilizer.

## CONTENTS

Chapter 1. Outline of research development project -----	53
Chapter 2. Current situation of related technology development -----	60
Chapter 3. Result of research development -----	61
제 1 절 Study for characteristics and isolation of functional microorganism -----	61
1. Study for isolation of cellulose-degrading and disease control-microorganism	61
가. Isolation of cellulase degrading microorganism -----	61
(1) Measurement for number of aerobic heterotrophic microorganism -----	61
(2) Isolation of cellulase degrading microorganism -----	61
(3) Measurement for cellulase activity -----	62
나. Identification of the selected microorganism -----	63
(1) Measurement for activity of carbon use -----	63
(2) Measurement for antifungal activity of the selected microorganism ---	66
(3) Phylogenetic and 16S rDNA analysis -----	67
2. Study for characteristics of cellulose-degrading and disease control-microorganism -----	69
가. Measurement of various enzymes -----	69
(1) Activity of cellulase -----	69
(2) Activity of chitinase -----	69
(3) Activity of $\beta$ -1,3-glucanase -----	69

(4) Activity of protease -----	70
나. Measurement for IAA produced by the functional microorganism -----	70
(1) Result of TLC chromatogram -----	70
(2) Result of HPLC chromatogram -----	71
다. Study on ability of spore germination inhibition and hyphae destroy of plant pathogenic fungi by the functional microorganism -----	71
(1) Measurement for hyphae destroy of plant pathogenic fungi by KWN38 and its culture broth -----	71
(2) Measurement for hyphae destroy of plant pathogenic fungi by crude enzyme -----	73
(3) Measurement for hyphae destroy of plant pathogenic fungi by crude butanol extract -----	74
(4) Measurement for sporangium inhibition of plant pathogenic fungi by KWN38 and its culture broth -----	74
(5) Measurement for sporangium inhibition of plant pathogenic fungi by crude enzyme -----	74
(6) Measurement for sporangium inhibition of plant pathogenic fungi by crude butanol extract -----	75
라. Separation and purification of enzyme -----	76
(1) Measurement for enzyme activity of culture filtrate of the mixed liquid fertilizer -----	76
(2) DEAE-Sepharose column chromatography -----	76
(3) Sephadex G-100 column chromatography -----	77
(4) CM-Sephadex C-50 column chromatography -----	78
(5) Summery of chitinase purification -----	79
(6) Investigation of characteristics of purified chitinase -----	79
마. Purification of antibiotics -----	81
(1) Purification and identification of antibiotics -----	81
(2) Measurement for antifungal activity of methyl pamitate -----	83
3. Study on characteristics of <i>Streptomyces griseus</i> H7602 -----	84
가. Investigation of antifungal and enzyme activities of <i>Streptomyces griseus</i>	84

H7602 -----	
(1) Antifungal and enzyme activities -----	84
(2) Degradation activity on <i>Phytophthora capsici</i> hyphae -----	86
(3) Antifungal activity of culture filtrate of <i>Streptomyces griseus</i> H7602 --	87
나. Purification of antibiotics -----	87
(1) Antifungal activity of ethyl acetate extract -----	87
(2) Purification of antibiotics produced by <i>Streptomyces griseus</i> H7602 ---	88
(3) Antifungal activity of <sup>1</sup> H-pyrrole-2-carboxylic acid -----	90
다. Experiment of pepper plant in the pot -----	91
(1) Investigation into root mortality of pepper plant -----	91
(2) Investigation of disease severity -----	92
(3) Investigation of fresh and dry weight of plant roots and stems -----	93
(4) Measurement for disease resistance-enzymes in leaves of pepper plant	94
(5) Measurement for disease resistance-enzymes in roots of pepper plant -	95
(6) Measurement for disease resistance-enzymes in soil -----	96
제 2 절 Study on industrialization of the mixed liquid fertilizer -----	97
1. Study on preparation of the mixed liquid fertilizer -----	97
가. Study on effect and preparation of mixed liquid fertilizer I (not decomposed) adjusted by grass and supplement nutrient -----	97
(1) Measurement for cellulase activity on different amount of grass and supplement nutrient -----	97
(2) Measurement for antifungal activity of butanol extract on different amount of grass and supplement nutrient -----	98
(3) Measurement for various enzyme activities on different amount of grass and supplement nutrient -----	100
(4) Measurement for IAA on different amount of grass and supplement nutrient -----	101
(5) Measurement for nutrient characteristic decomposition efficiency on different amount of grass and supplement nutrient -----	102
나. Study on effect and preparation of mixed liquid fertilizer II (decomposed) adjusted by grass and supplement nutrient -----	102
(1) Measurement for cellulase activity on different amount of grass and	103

supplement nutrient -----	
(2) Measurement for antifungal activity of butanol extract on different amount of grass and supplement nutrient -----	103
(3) Measurement for various enzyme activities on different amount of grass and supplement nutrient -----	105
(4) Measurement for IAA on different amount of grass and supplement nutrient -----	106
(5) Measurement for nutrient characteristic decomposition efficiency on different amount of grass and supplement nutrient -----	106
(6) Measurement for cellulase activity on different temperature -----	107
(7) Measurement for antifungal activity of butanol extract on different temperature -----	108
(8) Measurement for IAA on different temperature -----	110
(9) Measurement for nutrient characteristic decomposition efficiency on different temperature -----	110
2. Optimization of digested mixed liquefied fertilizer manufacturing process ---	113
가. Optimization of laboratory scale manufacturing process -----	113
(1) Evaluating optimization of decay condition -----	114
(2) Evaluating optimization of pre-treatment condition -----	119
(3) Evaluating optimization of aeration condition -----	124
(4) Evaluating optimization of microorganism dosage -----	128
(5) Evaluating optimization of operating temperature and decay period ----	134
(6) Evaluation of applying sterilization before decay -----	140
(7) Evaluation of applying ORP as operational control parameter -----	146
나. Optimization of small scale on-site manufacturing process -----	147
(1) Evaluating optimization of aeration rate -----	148
(2) Comparison of manufacturing performance between lab. scale and on-site process -----	149
(3) Evaluating optimization of microorganism dosage -----	150
(4) Evaluating optimization of operating temperature and decay period ----	150
(5) Evaluation of applying sterilization before decay -----	151
(6) Evaluation of applying ORP as operational control parameter -----	152
(7) Evaluation on industrialization of mixed liquid fertilizer manufacturing	153

process -----	
3. Development of product and manufacturing facilities to the mixed liquid fertilizer -----	154
가. Grinder development -----	154
(1) Measurement for crushing rate on different machinery -----	154
(2) Manufacture and drawing concerning grass-grinder -----	157
나. Development of manufacturing facility -----	157
(1) Prototype manufacture of facility for cultureing the KWN38 -----	157
(2) Prototype manufacture of facility for making mixed liquid fertilizer ---	159
다. Product development -----	160
(1) Pesticide residues analysis of grass -----	160
(2) Chemical analysis of the mixed liquid fertilizer-prototype -----	160
(3) Analysis of fertilizer effect of the mixed liquid fertilizer-prototype ----	160
4. Study on growth and recovery of winter grass by treatment of mixed liquid fertilizer -----	161
가. Study on growth and recovery of winter grass in pot experiments -----	161
(1) Investigation of winter grass growth -----	162
(2) Investigation of chlorophyll content and disease severity -----	162
(3) Investigation on recovery of winter grass from brown patch -----	165
나. Study on growth and recovery of winter grass in field experiments ----	166
(1) Investigation of winter grass growth -----	169
(2) Investigation on recovery of winter grass from brown patch -----	172
(3) Isolation and identifaction of brown patch disease from field -----	172
제 3 절 Studies on soil and plant by treatment of microbial mixed liquid fertilizer- 173	
1. Evaluation of soil chemical properties and plant growth applied mixed liquid fertilizer. -----	173
가. Chemical properties of mixed liquid fertilizer -----	173
(1) Mixed liquid fertilizer -----	173

(2) Analysis of Mixed liquid fertilizer -----	173
(3) Result of mixed liquid fertilizer -----	174
(4) Treatment level settings of mixed liquid fertilizer -----	174
나. Variation patterns in concentration of inorganic nitrogen from mixed liquid fertilizer during aerobic incubation -----	175
(1) Experimental Design for laboratory incubation -----	175
(2) Chemical properties of soil -----	176
(3) Results of incubation soil -----	177
다. Effect of mixed liquid fertilizer on soil chemical properties and growth responses of plant in pot experiment -----	180
(1) Experimental Design for pot -----	180
(2) Treatment level settings of mixed liquid fertilizer (MLF) -----	182
(3) Analysis of pot experiment soil -----	183
(4) Analysis of pot experiment plant -----	183
(5) Results of pot experiment -----	184
2. Evaluation of soil chemical properties, plant growth and treatment effect applied microbial mixed liquid fertilizer -----	191
가. Chemical properties of microbial mixed liquid fertilizer -----	191
(1) Microbial mixed liquid fertilizer -----	191
(2) Analysis of microbial mixed liquid fertilizer -----	192
(3) Result of microbial mixed liquid fertilizer -----	193
나. Variation patterns in concentration of inorganic nitrogen from microbial mixed liquid fertilizer during aerobic incubation -----	193
(1) Experimental Design for laboratory incubation -----	193
(2) Chemical properties of soil -----	194
(3) Results of incubation soil -----	195
다. Effect of microbial mixed liquid fertilizer on soil chemical properties and growth responses of plant in pot experiment -----	197
(1) Experimental Design for pot -----	197

(2) Treatment level settings of mixed liquid fertilizer (MLF) -----	198
(3) Analysis of pot experiment soil -----	199
(4) Analysis of pot experiment plant -----	200
(5) Results of pot experiment -----	201
라. Analyze of microbial mixed liquid fertilizer nitrogen balance in incubation experiment -----	205
(1) Concepts of column experiment -----	205
(2) Design for incubation experiment -----	205
(3) Result of incubation experiment -----	207
3. Evaluation of soil chemical properties, plant growth and treatment effect applied <sup>15</sup> N labelled microbial mixed liquid fertilizer -----	208
가. Labelled with <sup>15</sup> N of microbial mixed liquid fertilizer -----	208
(1) Concepts of microbial mixed liquid fertilizer labelled with <sup>15</sup> N -----	208
(2) Cultivate for grass labelled with <sup>15</sup> N -----	208
(3) Analysis of <sup>15</sup> N grass -----	208
(4) Result of <sup>15</sup> N grass -----	209
나. Chemical properties of <sup>15</sup> N microbial mixed liquid fertilizer -----	209
(1) Manufactured of <sup>15</sup> N microbial mixed liquid fertilizer -----	209
(2) Analysis of <sup>15</sup> N microbial mixed liquid fertilizer -----	210
(3) Result of <sup>15</sup> N microbial mixed liquid fertilizer -----	211
다. Effect of <sup>15</sup> N microbial mixed liquid fertilizer on soil chemical properties and growth responses of plant in field experiment -----	212
(1) Design for field experiment -----	212
(2) Treatment level settings of <sup>15</sup> N microbial mixed liquid fertilizer -----	213
(3) Analysis of field experiment soil -----	215
(4) Analysis of field experiment plant -----	216
(5) Results of field experiment soil -----	216
(6) Results of field experiment plant -----	222
(7) <sup>15</sup> N microbial mixed liquid fertilizer recovery -----	225

제 4 절 Study on plant growth and disease control by treatment of mixed liquid fertilizer -----	228
1. Study on plant growth and disease control by treatment of mixed liquid fertilizer in pot experiments -----	228
가. Experiment of pepper plant in the pot -----	228
(1) Experimental design -----	228
(2) Investigation into root mortality of pepper plant -----	229
(3) Measurement for disease resistance-enzymes in pepper plant -----	231
(4) Investigation of fresh and dry weight of plant roots and stems -----	235
나. Experiment of tomato plant in the pot -----	236
(1) Experimental design -----	237
(2) Investigation of disease severity -----	238
(3) Investigation into root mortality of pepper plant -----	239
(4) Measurement for antioxidant enzymes in tomato plant -----	240
(5) Investigation of fresh and dry weight of plant roots and stems -----	241
2. Study on plant growth and disease control by treatment of mixed liquid fertilizer in field experiments -----	242
가. Experiment of pepper plant in the field -----	242
(1) Experimental design -----	244
(2) Investigation of root mortality -----	245
(3) Investigation of fresh and dry weight of plant roots and stems -----	246
(4) Investigation of crop yield -----	246
(5) Investigation of soil enzyme activity -----	247
(6) Investigation of soil microbial community -----	249
나. Experiment of pepper plant in the field -----	250
(1) Investigation of disease severity in plants -----	250
(2) Investigation of root mortality -----	251
(3) Investigation of fresh and dry weight of plant roots and stems -----	252
(4) Investigation of crop yield -----	252

(5) Investigation of soil enzyme activity -----	253
(6) Investigation of soil microbial community -----	255
Chapter 4. Level of achievement for objectives and contribution at related areas -	256
제 1 절 Level of achievement for objectives -----	256
제 2 절 Contribution at related areas-----	259
Chapter 5. Accomplishment of research development and plan for utilization -----	262
Chapter 6. Reference -----	263

# 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 -----	53
제 2 장 국내외 기술개발 현황 -----	60
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 -----	61
제 1 절 기능성 미생물 선발 및 특성 연구 -----	61
1. Cellulose 분해 및 병해방제 기능성 미생물 선발 -----	61
가. Cellulose 분해균주 분리 -----	61
(1) 호기성 종속영양세균의 균체수 측정 -----	61
(2) Cellulose 분해균주 분리 -----	61
(3) Cellulose 분해능 측정 -----	62
나. 분리된 분해균주 동정 -----	63
(1) 균주의 탄소원 이용도측정 -----	63
(2) 식물성 곰팡이균에 대한 항균활성조사 -----	66
(3) 16S rDNA 염기서열 분석을 통한 계통학적 분류 -----	67
2. 기능성 미생물( <i>Paenibacillus ehimensis</i> KWN38) 특성 연구 -----	69
가. 효소활성조사 -----	69
(1) cellulase 활성 -----	69
(2) chitinase 활성 -----	69
(3) $\beta$ -1,3-glucanase 활성 -----	69
(4) protease 활성 -----	70
나. 식물생장호르몬조사 -----	70
(1) TLC chromatogram 결과 -----	70
(2) HPLC chromatogram 결과 -----	71

다. 식물성곰팡이병원균에 대한 군사 파괴 및 포자 저해능력 조사 -----	71
(1) KWN38과 배양액에 의한 군사 파괴 -----	71
(2) 조효소 추출물에 의한 군사 파괴 -----	73
(3) butanol 추출물에 의한 군사 파괴 -----	74
(4) KWN38과 배양액에 의한 포자 저해 -----	74
(5) 조효소 추출물에 의한 포자 저해 -----	74
(6) butanol 추출물 의한 포자 저해 -----	75
라. 효소(chitinase) 분리 및 정제 -----	76
(1) 배양상등액의 chitinase 활성 -----	76
(2) DEAE-Sepharose column chromatography 결과 -----	76
(3) Sephadex G-100 column chromatography 결과 -----	77
(4) CM-Sephadex C-50 column chromatography 결과 -----	78
(5) chitinase 정제 요약 -----	79
(6) 정제된 chitinase 특성 조사 -----	79
마. 항생물질 정제 -----	81
(1) 항생물질 추출 및 동정 -----	81
(2) methyl palmitate에 의한 항균활성 -----	83
3. 기능성 미생물( <i>Streptomyces griseus</i> H7602) 특성 연구 -----	84
가. 효소 및 항균활성 조사 -----	84
(1) Lipase and Protease 분비 및 항균활성 조사 -----	84
(2) <i>Phytophthora capsici</i> 군사체 이용 활성조사 -----	86
(3) 배양상등액의 항균활성 -----	87
나. 항생물질 정제 -----	87
(1) ethyl acetate 추출물의 항균활성 -----	87
(2) 항생물질 분리 및 정제 -----	88
(3) <sup>1</sup> H-pyrrole-2-carboxylic acid 항균활성 -----	90
다. 고추작물 포트 실험 -----	91
(1) Root mortality 조사 -----	91
(2) 병심각도 조사 -----	92
(3) 뿌리와 상층부 생체 및 건물중 조사 -----	93

(4) 잎의 chitinase and glucanase 활성조사 -----	94
(5) 뿌리의 chitinase and glucanase 활성조사 -----	95
(6) 토양 내 chitinase and glucanase 활성조사 -----	96
제 2 절 생초미생물 혼합액비 산업화 연구 -----	97
1. 생초미생물 혼합액비 제조 연구 -----	97
가. 생초(부숙하지 않은)와 보충양분을 이용한 생초미생물 혼합액비 제조 및 효과 -----	97
(1) 생초량과 cellulase 활성에 따른 배지선택 -----	97
(2) 배지조성에 따른 부탄올 추출물 항균활성 조사 -----	98
(3) 배지조성에 따른 효소활성 조사 -----	100
(4) 배지조성에 따른 IAA 측정 -----	101
(5) 배지조성에 따른 양분 및 생초분해율 측정 -----	102
나. 생초(부숙된)와 보충양분을 이용한 생초미생물 혼합액비 제조 및 효과 -----	102
(1) 배지조성에 따른 cellulase 활성 조사 -----	103
(2) 배지조성에 따른 부탄올 추출물 항균활성 조사 -----	103
(3) 배지조성에 따른 효소활성 조사 -----	105
(4) 배지조성에 따른 IAA 측정 -----	106
(5) 배지조성에 따른 양분 및 생초분해율 측정 -----	106
(6) 온도별 cellulase 활성 조사 -----	107
(7) 온도별 부탄올 추출물 항균활성 조사 -----	108
(8) 온도별 IAA 측정 -----	110
(9) 온도별 양분 및 생초분해율 측정 -----	110
2. 생초미생물 혼합액비 제조공정 최적화 연구 -----	113
가. 실험실 규모 제조공정 최적화 연구 -----	113
(1) 부숙조건 최적화 평가 -----	114
(2) 전처리조건 최적화 평가 -----	119
(3) 공기주입량 최적화 평가 -----	124
(4) 미생물주입량 최적화 평가 -----	128
(5) 운전온도 및 부숙기간 최적화 평가 -----	134
(6) 부숙전 멸균 적용 평가 -----	140
(7) 운전조절인자로서 ORP 적용 평가 -----	146
나. 소규모 현장 제조공정 최적화 연구 -----	147

(1) 공기주입량 최적화 평가 -----	148
(2) 실험실 규모 및 소규모 액비화 효율 비교 평가 -----	149
(3) 미생물주입량 최적화 평가 -----	150
(4) 운전온도 및 부숙기간 최적화 평가 -----	150
(5) 부숙전 멸균 적용 평가 -----	151
(6) 운전조절인자로서 ORP 적용 평가 -----	152
(7) 생초미생물 혼합액비 제조공정 산업화 가능성 평가 -----	153
3. 생초미생물 혼합액비 제품 및 제조설비 개발 -----	154
가. 생초분쇄기 개발 -----	154
(1) 기계장치 변화에 따른 분쇄율 측정 -----	154
(2) 생초분쇄기 시제품 제작도면 작성 및 제작 -----	157
나. 제조설비 개발 -----	157
(1) 기능성미생물 배양 설비 시제품 제작 -----	157
(2) 생초미생물 혼합액비 제조 설비 시제품 제작 -----	159
다. 제품 개발 -----	160
(1) 원재료(생초)에 대한 농약 잔류량 시험 -----	160
(2) 시제품 이화학분석 -----	160
(3) 시제품 비해.비효 조사 -----	160
4. 생초미생물 혼합액비 시용에 따른 한지형 잔디 생육 및 병회복 평가 -----	161
가. 포트에서 한지형 잔디 생육 및 병 회복 평가 -----	161
(1) 생육조사 -----	162
(2) 엽록소 지수 및 병 발병정도 조사 -----	162
(3) Brown patch에 대한 잔디 회복정도 조사 -----	165
나. 포장에서 한지형 잔디 생육 및 병 회복 평가 -----	166
(1) 생육조사 -----	169
(2) Brown patch에 대한 잔디 회복정도 조사 -----	172
(3) Brown patch에 대한 병원균 동정 -----	172
제 3 절 생초미생물 혼합액비 시용에 따른 토양영향평가 -----	173
1. 생초발효 액비 시용에 따른 토양 이화학성 변화와 작물의 생육에 미치는 영향평가 -----	173

가. 생초발효액비의 양분수준 분석 -----	173
(1) 생초발효액비 -----	173
(2) 생초발효액비 양분수준 분석 -----	173
(3) 생초발효액비 분석 결과 -----	174
(4) 생초발효액비의 처리수준설정 -----	174
나. 향온배양실험을 통한 생초발효액비 토양 내 무기화율 평가 -----	175
(1) 향온배양실험 설계 -----	175
(2) 토양화학성 분석 -----	176
(3) 향온배양 실험 토양 분석 결과 -----	177
다. Pot에서 생초발효액비 시용에 따른 토양과 작물에 대한 영향 평가 -----	180
(1) Pot 실험 설계 -----	180
(2) 생초발효액비 처리량 산정 -----	182
(3) Pot실험 토양 분석 -----	183
(4) Pot실험 식물체 분석 -----	183
(5) Pot 실험 분석 결과 -----	184
2. 생초미생물 혼합액비 시용에 따른 토양 이화학성 변화와 작물 생육 반응 및 무기화 율 및 액비 처리효과 구명 -----	191
가. 생초미생물 혼합액비의 양분성분 분석 -----	191
(1) 생초미생물 혼합액비 -----	191
(2) 생초미생물 혼합액비 분석 -----	192
(3) 생초미생물 혼합액비 분석 결과 -----	193
나. 향온배양실험을 통한 생초미생물 혼합액비 토양 내 무기화율 평가 -----	193
(1) 향온배양실험 설계 -----	193
(2) 토양화학성 분석 -----	194
(3) 향온배양 실험 토양 분석 결과 -----	195
다. Pot실험을 이용한 생초미생물 혼합액비의 토양 및 작물 생육 영향평가 -----	197
(1) Pot실험 설계 -----	197
(2) 생초미생물 혼합액비 처리량 산정 -----	198
(3) Pot실험 토양 분석 -----	199
(4) Pot실험 식물체 분석 -----	200
(5) Pot실험 분석 결과 -----	201

라. 컬럼 실험을 통한 생초미생물 혼합액비의 양분수지 분석 -----	205
(1) 컬럼 실험의 필요성 -----	205
(2) 컬럼 실험 설계 -----	205
(3) 컬럼 실험 결과 분석 -----	207
3. 중질소( <sup>15</sup> N)을 표지한 생초미생물 혼합액비 시용에 따른 토양 이화학성 변화, 작물 생육 반응 및 액비 처리효과 구명 -----	208
가. 생초미생물 혼합액비의 중질소( <sup>15</sup> N) 표지 -----	208
(1) 중질소( <sup>15</sup> N) 표지 생초미생물 혼합액비 실험의 필요성 -----	208
(2) 중질소( <sup>15</sup> N) 표지 잔디 재배 계획 -----	208
(3) 중질소( <sup>15</sup> N) 표지 잔디 분석 -----	208
(4) 중질소( <sup>15</sup> N) 표지 잔디 분석 결과 -----	209
나. 중질소( <sup>15</sup> N) 표지 생초미생물 혼합액비의 양분 성분 분석 -----	209
(1) 중질소( <sup>15</sup> N) 표지 생초미생물 혼합액비 제조 -----	209
(2) 중질소( <sup>15</sup> N) 표지 생초미생물 혼합액비 분석 -----	210
(3) 중질소( <sup>15</sup> N) 표지 생초미생물 혼합액비 분석 결과 -----	211
다. 포장실험을 통한 중질소( <sup>15</sup> N) 표지 생초미생물 혼합액비의 토양 및 작물 생육 영 향 평가 -----	212
(1) 포장 실험 설계 -----	212
(2) 작물별 중질소( <sup>15</sup> N) 표지 생초미생물 혼합액비 처리량 산정 -----	213
(3) 포장 실험 토양 분석 -----	215
(4) 포장 실험 식물체 분석 -----	216
(5) 포장 실험 토양 분석 결과 -----	216
(6) 포장 실험 식물체 분석 결과 -----	222
(7) 중질소( <sup>15</sup> N) 표지 생초미생물 혼합액비의 토양 및 작물에서의 회수율 -----	225
제 4 절 생초미생물 혼합액비 시용에 따른 작물 병해방제 및 성장 평가 -----	228
1. 포트에서 고추,토마토의 생초미생물 혼합액비 시용에 따른 병해방제 및 성장 평가 ----	228
가. 포트에서 고추역병 병해방제 및 성장평가 -----	228
(1) 실험의 설계 -----	228
(2) Root mortality 조사 -----	229
(3) 생초미생물 혼합액비에 의해 유도되는 병해방제 효소 조사 -----	231
(4) 뿌리와 줄기의 생체 및 건물중 조사 -----	235

나. 포트에서 토마토 시들음병 병해방제 및 성장평가 -----	236
(1) 실험의 설계 -----	237
(2) 발병률 및 심각도 -----	238
(3) Root mortality 조사 -----	239
(4) 생초미생물 혼합액비에 의해 유도되는 항산화 효소 조사 -----	240
(5) 뿌리와 줄기의 생체 및 건물중 조사 -----	241
2. 포장에서 고추,토마토의 생초미생물 혼합액비 시용에 따른 병해방제 및 성장 평가 -----	242
가. 포장에서 고추역병 병해방제 및 성장평가 -----	242
(1) 포장 설계 및 처리량 산정 -----	244
(2) Root mortality 조사 -----	245
(3) 뿌리와 줄기의 생체 및 건물중 조사 -----	246
(4) 수확량 조사 -----	246
(5) 토양 내 병해방제 효소 활성 조사 -----	247
(6) 토양 내 미생물 상 조사 -----	249
나. 포장에서 토마토 시들음병 병해방제 및 성장평가 -----	250
(1) 발병률 및 심각도 -----	250
(2) Root mortality 조사 -----	251
(3) 뿌리와 줄기의 생체 및 건물중 조사 -----	252
(4) 수확량 조사 -----	252
(5) 토양 내 병해방제 효소 활성 조사 -----	253
(6) 토양 내 미생물 상 조사 -----	255
제 4 장   목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	256
제 1 절   목표달성도 -----	256
제 2 절   관련분야에의 기여도 -----	259
제 5 장   연구개발 성과 및 성과활용 계획 -----	262
제 6 장   참 고 문 헌 -----	263

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

2012년 말 우리나라 골프장 수는 448개(18홀기준)에 농약 사용량은 연간 425.7톤(2012년 전국골프장 농약사용량 실태조사 결과 :환경부)에 이며, 토양과 지하수 오염 등 환경에 부정적인 영향을 끼칠 것이라는 인식이 보편적이다.

골프장 코스 잔디관리를 위한 주기적 깎기 작업으로 발생하는 잔디예초물의 양은 연간 580,000톤으로 추정되며, 이를 폐기물로 위탁 처리하는 비용은 120억원에 이른다. 대부분의 골프장에서는 발생된 잔디 예초물을 일부 수목용퇴비로 사용하거나 농가에 퇴비로 공급하고 있으나 대부분은 임시보관시설에 보관 한 후 위탁처리 되고 있는 실정이며, 보관 중 악취나 유출수의 토양 오염, 비용부담 등 처리에 어려움이 있다.

이렇게 버려지고 있는 잔디예초물은 75~85%가 물로 구성되어 있으며, 15~25%가 유기물과 무기물로 구성되어있고, 그중 질소 (4%), 인산 (2%), 칼륨 (2%), 칼슘, 유황, 마그네슘, 철 및 망간 등 다량의 양분이 포함된 훌륭한 유기성 자원이다.

최근 국제적으로 해양투기가 금지되고 친환경 녹색성장에 대한 인식이 널리 확산 되면서 다양한 유기성 폐기물의 무해성 산업화가 절실히 필요한 실정이며, 이에 맞춰 골프장 잔디예초물을 부산물비료의 원료로 지정 유기성 폐기물의 자원화를 정책적으로 지원하고 있다.

이러한 추세에 따라 농산업 활동으로 배출되는 유기성 폐기물의 퇴비, 토양 개량제등의 활용 연구가 다방면으로 이루어지고 있으며, 액비화 연구 또한 가축분뇨, SCB 액비 등 농축산 폐기물을 비료로 재활용하는 연구가 활발히 진행되고 있다.

그러나 농립폐자원인 생초(잔디예초물)을 가지고 비료와 농약의 대체재로서의 혼합기능을 가지는 액비화에 대한 연구는 매우 미흡한 실정이다.

본 연구과제에서는 유기성 폐기물인 생초가 가지고 있는 N, P, K 및 각종 식물 필수 미량요소들의 양분 효과 극대화를 위해 생초 분해율을 높이기 위한 미세화 분쇄기술 개발과 효소 및 대사물질 등의 항균활성작용으로 병해방제 효과를 보이는 기능성 미생물을 선발하고 이 기능성 미생물의 특성을 연구하여 생초 분해를 촉진키 위해 투입되는 미생물에 적용코자 한다. 또한 액비의 형태로 연구개발 되어질 생초미생물 혼합액비의 배지 조성에 대한 연구와 더불어 선택된 배지조성하의 액비 제조공정에 대한 최적 조건을 연구 할 계획이다. 그리고 농작물중 고추와 토마토에 대해 생초미생물 혼합액비 시용에 따른 작물 생육 및 토양에 대한 영향평가와 고추역병균과 토마토 시들음병에 대한 병해방제 정도를 각각 포트실험과 포장검증을 통하여 생초미생물 혼합액비의 효과를 검증 할 계획이며, 한지형 잔디 포트 및 포장에서 잔디의 생육과 병해방제정도를 조사 할 계획이다. 이러한 연구결과를 바탕

으로 생초미생물 혼합액비의 제조설비 및 제품을 개발하여 산업화 하고자 한다.

본 연구개발과제의 연구범위는 다음과 같다.

## 1. 생초 분쇄기, 생초미생물 혼합액비 제품 및 제조설비 개발

### 가. 생초분쇄기 개발

- (1) 기계장치 변화에 따른 분쇄율 측정
- (2) 생초분쇄기 시제품 제작도면 작성 및 제작

### 나. 제조설비 개발

- (1) 기능성미생물 배양 설비 시제품 제작
- (2) 생초미생물 혼합액비 제조 설비 시제품 제작

### 다. 제품 개발

- (1) 원재료(생초)에 대한 농약 잔류량 시험
- (2) 시제품 이화학분석
- (3) 시제품 비해.비효 조사

## 2. 셀룰로우스 분해 및 병해방제 기능성 미생물 선발

### 가. Cellulose 분해 및 병해방제 기능성 미생물 선발

- (1) Cellulose 분해균주 분리
  - (가) 호기성 종속영양세균의 균체수 측정
  - (나) Cellulose 분해균주 분리
  - (다) Cellulose 분해능 측정
- (2) 분리된 분해균주 동정
  - (가) 균주의 탄소원 이용도 측정
  - (나) 식물성 곰팡이균에 대한 항균활성조사
  - (다) 16S rDNA 염기서열 분석을 통한 계통학적 분류

## 3. 기능성 미생물 특성 연구

### 가. 기능성 미생물(*Paenibacillus ehimensis* KWN38) 특성 연구

- (1) 효소활성조사
  - (가) cellulase 활성
  - (나) chitinase 활성
  - (다)  $\beta$ -1,3-glucanase 활성
  - (라) protease 활성
- (2) 식물생장호르몬조사
  - (가) TLC chromatogram 결과

(나) HPLC chromatogram 결과

(3) 식물성곰팡이병원균에 대한 군사 파괴 및 포자 저해능력 조사

(가) KWN38과 배양액에 의한 군사 파괴

(나) 조효소 추출물에 의한 군사 파괴

(다) butanol 추출물에 의한 군사 파괴

(라) KWN38과 배양액에 의한 포자 저해

(마) 조효소 추출물에 의한 포자 저해

(바) butanol 추출물 의한 포자 저해

(4) 효소(chitinase) 분리 및 정제

(가) 배양상등액의 chitinase 활성

(나) DEAE-Sephrose column chromatography 결과

(다) Sephadex G-100 column chromatography 결과

(라) CM-Sephadex C-50 column chromatography 결과

(마)chitinase 정제 요약

(바) 정제된 chitinase 특성 조사

(5) 항생물질 정제

(가) 항생물질 추출 및 동정

(나) methyl palmitate에 의한 항균활성

나. 기능성 미생물(*Streptomyces griseus* H7602) 특성 연구

(1) 효소 및 항균활성 조사

(가) Lipase and Protease 분비 및 항균활성 조사

(나) Phytophthora capsici 군사체 이용 활성조사

(다) 배양상등액의 항균활성

(2) 항생물질 정제

(가) ethyl acetate 추출물의 항균활성

(나) 항생물질 분리 및 정제

(다) 1H-pyrrole-2-carboxylic acid 항균활성

(3) 고추작물 포트 실험

(가) Root mortality 조사

(나) 병심각도 조사

(다) 뿌리와 상층부 생체 및 건물중 조사

(라) 잎의 chitinase and glucanase 활성조사

(마)뿌리의 chitinase and glucanase 활성조사

(바) 토양 내 chitinase and glucanase 활성조사

#### 4. 생초미생물 혼합액비 제조 연구

##### 가. 생초미생물 혼합액비 제조 연구

(1) 생초(부숙하지 않은)와 보충양분을 이용한 생초미생물 혼합액비 제조 및 효과

- (가) 생초량과 cellulase 활성에 따른 배지선택
- (나) 배지조성에 따른 부탄올 추출물 항균활성 조사
- (다) 배지조성에 따른 효소활성 조사
- (라) 배지조성에 따른 IAA 측정
- (마) 배지조성에 따른 양분 및 생초분해율 측정

(2) 생초(부숙된)와 보충양분을 이용한 생초미생물 혼합액비 제조 및 효과

- (가) 배지조성에 따른 cellulase 활성 조사
- (나) 배지조성에 따른 부탄올 추출물 항균활성 조사
- (다) 배지조성에 따른 효소활성 조사
- (라) 배지조성에 따른 IAA 측정
- (마) 배지조성에 따른 양분 및 생초분해율 측정
- (바) 온도별 cellulase 활성 조사
- (사) 온도별 부탄올 추출물 항균활성 조사
- (아) 온도별 IAA 측정
- (자) 온도별 양분 및 생초분해율 측정

#### 5. 생초미생물 혼합액비 제조 공정 최적화 연구

##### 가. 실험실 규모 제조공정 최적화 연구

- (1) 부숙조건 최적화 평가
- (2) 전처리조건 최적화 평가
- (3) 공기주입량 최적화 평가
- (4) 미생물주입량 최적화 평가
- (5) 운전온도 및 부숙기간 최적화 평가
- (6) 부숙전 멸균 적용 평가
- (7) 운전조절인자로써 ORP 적용 평가

(다) 소규모 현장 제조공정 최적화 연구

- (1) 공기주입량 최적화 평가
- (2) 실험실 규모 및 소규모 액비화 효율 비교 평가
- (3) 미생물주입량 최적화 평가
- (4) 운전온도 및 부숙기간 최적화 평가
- (5) 부숙전 멸균 적용 평가
- (6) 운전조절인자로써 ORP 적용 평가
- (7) 생초미생물 혼합액비 제조공정 산업화 가능성 평가

6. 포트, 포장에서 고추와 토마토의 생초미생물 혼합액비 시용에 따른 병해방제 및 성장 평가  
가. 포트에서 고추, 토마토의 생초미생물 혼합액비 시용에 따른 병해방제 및 성장 평가

(1) 포트에서 고추역병 병해방제 및 성장평가

(가) 실험의 설계

(나) Root mortality 조사

(다) 생초미생물 혼합액비에 의해 유도되는 병해방제 효소 조사

(라) 뿌리와 줄기의 생체 및 건물중 조사

(2) 포트에서 토마토 시들음병 병해방제 및 성장평가

(가) 실험의 설계

(나) 발병률 및 심각도

(다) Root mortality 조사

(라) 생초미생물 혼합액비에 의해 유도되는 항산화 효소 조사

(마) 뿌리와 줄기의 생체 및 건물중 조사

나. 포장에서 고추, 토마토의 생초미생물 혼합액비 시용에 따른 병해방제 및 성장 평가

(1) 포장에서 고추역병 병해방제 및 성장평가

(가) 포장 설계 및 처리량 산정

(나) Root mortality 조사

(다) 뿌리와 줄기의 생체 및 건물중 조사

(라) 수확량 조사

(마) 토양 내 병해방제 효소 활성 조사

(바) 토양 내 미생물 상 조사

(2) 포장에서 토마토 시들음병 병해방제 및 성장평가

(가) 발병률 및 심각도

(나) Root mortality 조사

(다) 뿌리와 줄기의 생체 및 건물중 조사

(라) 수확량 조사

(마) 토양 내 병해방제 효소 활성 조사

(바) 토양 내 미생물 상 조사

7. 포트, 포장에서 생초미생물 혼합액비 시용에 따른 고추와 토마토의 토양 영향 평가  
가. 생초발효액비 시용에 따른 토양 이화학성 변화와 작물의 생육에 미치는 영향평가

(1) 생초발효액비의 양분수준 분석

(가) 생초발효액비

(나) 생초발효액비 양분수준 분석

(다) 생초발효액비의 처리수준설정

(2) 항온배양실험을 통한 생초발효액비의 양분성분의 토양 내 무기화율 평가

- (가) 항온배양실험 설계
- (나) 토양물리화학적 분석

(3) Pot에서 생초발효액비 시용에 따른 토양과 작물에 대한 영향 평가

- (가) Pot 실험 설계
- (나) 생초발효액비 처리량 산정
- (다) Pot실험 토양 및 식물체 분석

나. 생초미생물 혼합액비 시용에 따른 토양 이화학적 변화와 작물 생육 반응 및 무기화율 및 액비 처리효과 구명

(1) 생초미생물 혼합액비의 양분성분 분석

- (가) 생초미생물 혼합액비
- (나) 생초미생물 혼합액비 분석

(2) 항온배양실험을 통한 생초미생물 혼합액비의 토양화학적 영향평가

- (가) 항온배양실험 설계
- (나) 항온배양을 통한 토양화학적 변화 분석

(3) Pot실험을 이용한 생초미생물 혼합액비의 토양 및 작물 생육 영향평가

- (가) Pot실험 설계
- (나) 생초미생물 혼합액비 처리량 산정
- (다) Pot실험 토양 및 식물체 분석

(4) 컬럼 실험을 통한 생초미생물 혼합액비의 양분수지 분석

- (가) 컬럼 실험 설계
- (나) 컬럼 실험 결과 분석

다. 중질소( $^{15}\text{N}$ )을 표지한 생초미생물 혼합액비 시용에 따른 토양 이화학적 변화, 작물 생육 반응 및 액비 처리효과 구명

(1) 생초미생물 혼합액비의 중질소( $^{15}\text{N}$ ) 표지

- (가) 중질소( $^{15}\text{N}$ ) 표지 생초미생물 혼합액비 실험의 필요성
- (나) 중질소( $^{15}\text{N}$ ) 표지 잔디 분석

(2) 중질소( $^{15}\text{N}$ ) 표지 생초미생물 혼합액비의 양분 성분 분석

- (가) 중질소( $^{15}\text{N}$ ) 표지 생초미생물 혼합액비 제조
- (나) 중질소( $^{15}\text{N}$ ) 표지 생초미생물 혼합액비 분석

(3) 포장실험을 통한 중질소( $^{15}\text{N}$ ) 표지 생초미생물 혼합액비의 토양 및 작물 생육 영향 평가

- (가) 포장실험 설계
- (나) 작물별 중질소( $^{15}\text{N}$ ) 표지 생초미생물 혼합액비 처리량 산정

(다) 포장 실험 토양 및 식물체 분석

(라) 중질소(15N) 표지 생초미생물 혼합액비의 토양 및 작물에서의 회수율

8. 포트, 포장에서 생초미생물 혼합액비 시용에 따른 한지형 잔디 생장 및 병 회복 평가  
가. 포트에서 한지형 잔디 생육 및 병 회복 평가

(1) 생육조사

(2) 엽록소 지수 및 병 발병정도 조사

(3) Brown patch에 대한 잔디 회복정도 조사

나. 포장에서 한지형 잔디 생육 및 병 회복 평가

(1) 생육조사

(2) Brown patch에 대한 잔디 회복정도 조사

(3) Brown patch에 대한 병원균 동정

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

환경문제 등을 이유로 최근 여러 산업에서 발생하는 유기성 폐기물에 미생물을 활용하여 비료를 만드는 기술들에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 특히 축산폐기물, 식품가공 부산물, 수산계 폐자원 등의 산업폐기물에 미생물을 접종하여 액체 비료를 제조하는 기술들이 다수 개발되고 있다. 선행 특허를 통해 유기성폐기물과 미생물을 이용하여 비료로써 재활용하는 기술들을 살펴보면 다음과 같다.

먼저 미생물을 이용한 퇴비의 제조에 대한 특허를 살펴보면 퇴비 제조용 미생물 제제 및 그 제조방법(등록특허공보 제0252469호 : 1999년11월5일, 공개)으로써 기탁번호 제 KCTC 0407BP 호로 기탁된, *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus macerans* 및 *Rhodopseudomonas sp.*로 이루어진 미생물 제제 YC-5를 이용하여 축산 폐기물을 발효시켜 퇴비를 제조하는 방법에 대한 특허로 액비가 아닌 퇴비 제조기술이며, 토착미생물을 이용한 유기질 발효퇴비 제조방법(공개특허공보 제2005-0074679호 : 2005년7월19일, 공개)으로 자연에서 배양한 토착미생물 배양체를 이용한 유기질 발효퇴비 제조방법에 관한 것으로, 고두밥을 증숙 시킨 후 특정처리를 통하여 해당 지역 환경에 맞는 미생물을 배양하는 기술이다. 다음으로 미생물을 이용한 액비의 제조에 대한 특허는 다음과 같다. 호기성 발효를 이용한 액비의 제조방법 및 액비를 이용한 작물 재배방법(공개특허공보 제2011-0129613호 : 2011년12월2일, 공개)으로 호기성 미생물인 *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus*의 혼합균주를 이용하여 축산 분뇨에 접종 후 발효시켜 액체비료를 만드는 기술이며, 식물생장촉진 액비 및 그 제조방법(공개특허공보 제2013-0107406호 : 2013년10월2일, 공개)으로써, 식품가공 부산물로 제조한 아미노산 액비, 수산계 폐자원인 계껍질, 골분, 팜에쉬 등을 혼합하여 *Lysobacter antibioticus*, *Bacillus thuringiensis*, *Paenibacillus ehimensis*를 포함하는 미생물 배양액을 접종하여 식물에 유용한 물질의 생산을 유도하는 식물생장촉진 액비와 그 제조방법에 관한 특허이고, 미생물 배양체를 포함하는 유기질비료 조성물 및 이의 제조방법(공개특허공보 제2014-0019996호 : 2014년2월18일, 공개)으로 기탁번호 제 KCTC 12238BP 호로 기탁된, *Burkholderia sp.* HSB1201으로 이루어진 미생물 배양체를 포함하는 유기질 비료 조성물과 그 제조방법에 관한 기술이다.

상기 선행특허들에서 확인할 수 있듯이 여러 가지 유기성폐기물과 미생물을 이용하여 퇴비 및 액비화에 관한 특허들은 많이 등록되어 있으나, 골프장 등에서 버려지는 잔디 예초물과 같은 유기성 폐기물을 액체 비료로 활용하는 방안에 대한 연구, 특히 미생물에 의한 효소활성으로 병원성균에 대한 항균활성 작용과 식물 성장호르몬등의 분비효과로 기존 화학비료와 농약을 대체 할 수 있는 연구는 미흡한 실정이었다.

# 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

## 제 1 절 기능성 미생물 선발 및 특성 연구

### 1. Cellulose 분해 및 병해방제 기능성 미생물 선발

#### 가. Cellulose 분해균주 분리

##### (1) 호기성 종속영양세균의 균체수 측정

토양 및 잔디예초물에 존재하는 균체수의 측정은 2011년 8월과 2011년 10월 2회에 걸쳐 군산 CC 내 토양 및 잔디예초물을 대상으로 연구를 진행하였다. 조사기간 중 도말평판법으로 측정된 잔디예초물 내 종속영양세균의 분포를 살펴보면,  $3.5 \pm 0.2 \times 10^6 \sim 1.8 \pm 0.7 \times 10^7$  cfu g-1d.wt.의 범주에서 변화하였고, 이를 각 실험기간별로 살펴보면, 2011년 8월에서는  $3.5 \pm 0.2 \times 10^6 \sim 1.8$  cfu g-1d.wt.를 나타냈으며, 10월에는  $1.8 \pm 0.7 \times 10^7$ cfu g-1d.wt.로 나타나, 2011년 10월의 균체수가 2011년 8월에 측정된 균체수보다 약 19배 정도 높게 나타났다(Fig. 1). 이는 2011년 8월의 여름 집중호우의 영향이 큰 것으로 사료된다.

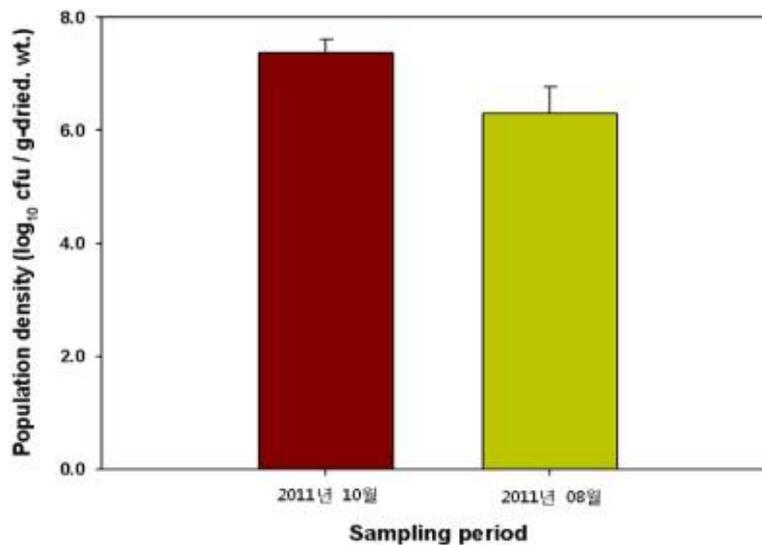


Fig. 1. 군산CC 내 토양 및 잔디예초물 속에서 측정된 호기성 종속영양세균의 총균수.

##### (2) Cellulose 분해균주 분리

군산 CC의 토양 및 잔디예초물로부터 분리된 균체들 중에서 chitin/cellulose 분해 미생물을 선별하기 위해 유일한 탄소원으로 colloidal chitin이 포함된 chitin 배지에서 chitin/cellulose를 분해할 수 있는 균 집락을 선별하여 96개 균주들을 순수분리하였다. 그 후 chitin media배지에서 나타난 균체에 iodine 용액을 첨가한 후 투명환의 크기를 비교하여 이 중 cellulose분해 능력이 뛰어난 6개의 균주를 선별하였다.

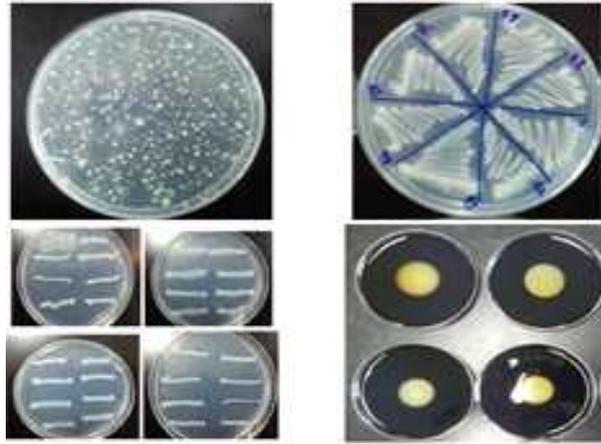


Fig. 2. Cellulose 분해세균의 분해능 실험사진.

### (3) Cellulose 분해능 측정

선발된 chitin/cellulose 우수 분해균주들의 Cellulase 활성은 CMC를 기질로 하여 효소 반응 후에 유리된 환원당은 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS) 방법을 이용하여 측정하였다.

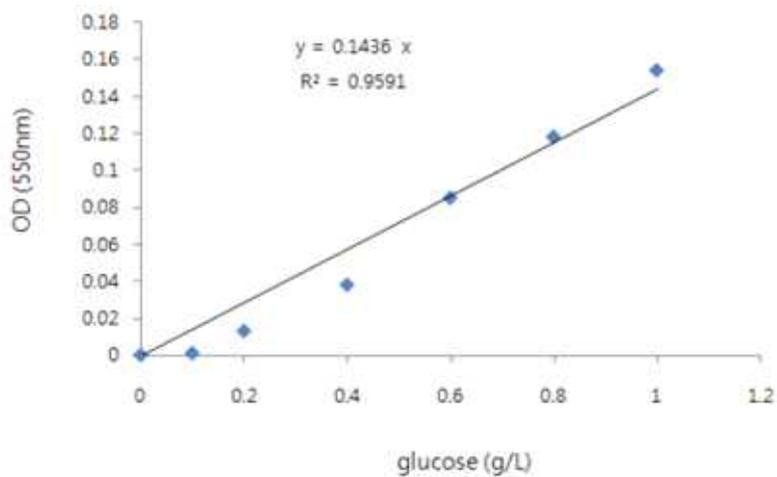


Fig.3. Glucose standard curve.

측정결과, Table 1에서 보는 바와 같이, 6개의 균주 중 *Pseudomonas fluorescens*가 가장 높은 활성도를 보였고, 그 다음으로 *Bacillus circulans*와 *Paenibacillus ehimensis*가 높은 활성도를 나타냈다.

Table 1. 균주별 cellulase 분해능 측정

균주명	OD(550nm)	환원당의 양(g/L)	unit (u mol/min)
<i>Bacillus circulans</i>	0.014	0.17	0.14
<i>Bacillus licheniformis</i>	0.008	0.1	0.08
<i>Bacillus mycooides</i>	0.003	0.1	0.08
<i>Paenibacillus ehimensis</i>	0.014	0.17	0.14
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0.020	0.2	0.16
<i>Streptomyces griseus</i>	0.016	0.18	0.15

나. 분리된 분해균주 동정

(1) 균주의 탄소원 이용도 측정

BIOLOG MicroPlate를 이용한 세균의 탄소원 이용능 분석은 미생물 군집의 대사적 다양성의 비교분석과 환경 요인의 변화에 따른 미생물 군집의 생리적 대사적 변화양상을 분석하는데 유용한 방법이다(Garland and Mills, 1994). 이 방법을 통하여 미생물 군집의 특성을 파악하는데 이용할 수 있다(Winding, 1994).

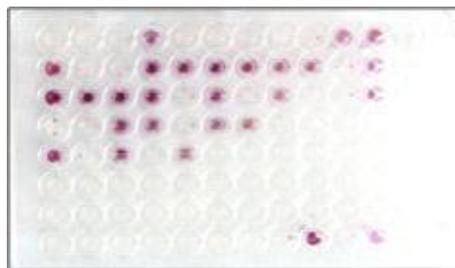
BIOLOG에 의한 탄소이용도 측정 결과, 선발된 6균주들이 모두 이용하는 기질로는 D-cellobiose, D-Fructose, D-Galactose, D-Mannose, D-Melibiose, D-Psicose, Gentiobiose, Lactulose, L-Arabinose, L-Fucose, Turanose, α-D-Glucose, α-D-lactose로 나타났다. 그리고 80% 이상 이용된 기질은 3-Methyl-D-Glucose, Dextrin, D-Fructose-6-Phosphate, D-Galacturonic Acid, D-Glucose-6-Phosphate, D-Ribose, D-Xylose, L-Rhamnose, N-Acetyl-D-Glucosamine, N-Acetyl-β-D-Mannosamine, Palatinose로 나타났다.

Table2. Chitin/cellulose 우수 분해균주들의 탄소원 이용도

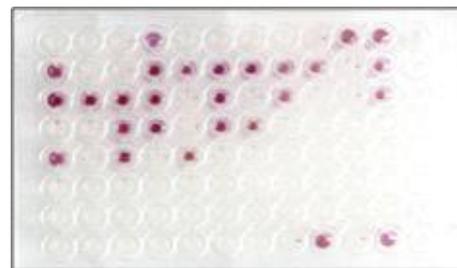
Carbon source	<i>Bacillus circulans</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus mycooides</i>	<i>Paenibacillus ehimensis</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Streptomyces griseus</i>
2,3-Butanediol	-	-	-	-	-	-
2-Deoxy Adenosine	-	-	-	-	-	-
3-Methyl-D-Glucose	+	+	+	+	+	-
Acetic Acid	-	-	-	-	-	-
Adenosine	-	-	-	-	-	-
Adenosine-5-Monophosphate	-	-	-	-	-	-
Amygdalin	-	-	-	-	-	-
Arbutin	-	-	-	-	-	-
D-Alanine	-	-	-	-	-	-
D-Arabitol	-	-	-	-	-	-
D-cellobiose	+	+	+	+	+	+
Dextrin	+	+	+	+	-	-
D-Fructose	+	+	+	+	+	+
D-Fructose-6-Phosphate	+	+	+	+	+	-
D-Galactose	+	+	+	+	+	+
D-Galacturonic Acid	+	+	+	+	+	-
D-Galacturonic Acid	-	-	-	-	-	+
D-Gluconic Acid	-	-	-	-	-	-
D-Glucose-6-Phosphate	+	+	+	+	-	-
D-Lactic Acid Methy Ester	-	-	-	-	-	-
D-L-α-Glycerol Phosphate	-	-	-	-	-	-
D-Malic Acid	-	-	-	-	-	-
D-Mannitol	-	-	-	-	-	-
D-Mannose	+	+	+	+	+	+
D-Melezitose	-	-	-	-	-	-
D-Melibiose	+	+	+	+	+	+
D-psicose	+	+	+	+	+	+
D-Raffinose	-	-	-	-	-	-
D-Ribose	+	+	+	+	+	-

D-Sorbitol	-	-	-	-	-	-
D-Tagatose	+	+	+	+	+	-
D-Trehalose	-	-	-	-	-	-
D-Xylose	+	+	+	+	+	-
Gentiobiose	+	+	+	+	+	+
Glucuronamide	-	-	-	-	-	+
Glycerol	-	-	-	-	-	-
Glycogen	-	-	-	-	-	-
Glycyl-L-Glutamic Acid	-	-	-	-	-	-
Hydrixy-L-Proline	-	-	-	-	-	-
Inosine	-	-	-	-	-	-
Inulin	-	-	-	-	-	-
Lactamide	-	-	-	-	-	-
Lactulose	+	+	+	+	+	+
L-Alaninamide	-	-	-	-	-	-
L-Alanine	-	-	-	-	-	-
L-Alanyl-Glycine	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	+	+	+	+	+	+
L-Asparagine	-	-	-	-	-	-
L-Fucose	+	+	+	+	+	+
L-Glutamic Acid	-	-	-	-	-	-
L-Lactic Acid	-	-	-	-	-	-
L-Malic Acid	-	-	-	-	-	-
L-Pyroglutamic Acid	-	-	-	-	-	-
L-Rhamnose	-	-	-	-	-	+
L-Rhamnose	+	+	+	+	+	-
L-Serine	-	-	-	-	-	-
Maltortiose	+	+	+	+	+	-
Maltose	+	+	+	+	+	-
Mannan	-	-	-	-	-	-
m-Inositol	-	+	-	-	-	-
N-Acetyl-D-Glucosamine	+	+	+	+	-	+
N-Acetyl-L-Glutamic Acid	-	-	-	-	-	-
N-Acetyl- $\beta$ -D-Mannosamine	+	+	+	+	-	+
Palatinose	+	+	+	+	+	-
Phenylethylamine	-	-	-	-	-	-
p-Hydroxy-Phenylacetic Acid	-	-	-	-	-	-
Propionic Acid	-	-	-	-	-	-
Putrescine	-	-	-	-	-	-
Pyruvic Acid	-	-	-	-	-	-
Pyruvic Acid Methyl Ester	-	-	-	-	-	-
Salicin	-	-	-	-	-	-
Sedoheptulosan	-	-	-	-	-	-
Stachyose	-	-	-	-	-	-
Succinamic Acid	-	-	-	-	-	-
Succinic Acid	-	-	-	-	-	-
Succinic Acid Mono-Methyl Ester	-	-	-	-	-	-
Surose	-	-	-	-	-	-
Thymidine	-	-	-	-	-	-
Thymidine-5-Monophosphate	-	-	-	-	-	-

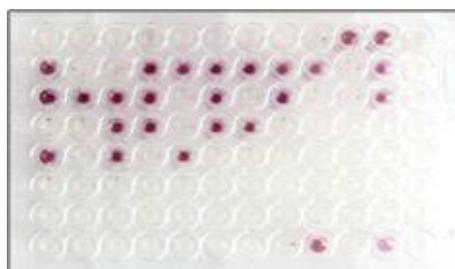
Turanose	+	+	+	+	+	+
Tween 40	-	-	-	-	-	-
Tween 80	-	-	-	-	-	-
Uridine	-	-	-	-	-	-
Uridine-5-Monophosphate	-	-	-	-	-	-
Xylitol	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -Cyclodextrin	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -D-Glucose	+	+	+	+	+	+
$\alpha$ -D-Glucose-1-Phosphate	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -D-lactose	+	+	+	+	+	+
$\alpha$ -Hydroxybutyric Acid	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -ketoglutaric Acid	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -ketovaleric Acid	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -methyl-D-Galactoside	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -methyl-D-Glucoside	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -Methyl-D-Mannosid	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -Cyclodextrin	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -Hydroxybutyric Acid	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -Methyl-D-Galactoside	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -Methyl-D-Glucosid	-	-	-	-	-	-
$\gamma$ -Aminobutyric Acid	-	-	-	-	-	-
$\gamma$ -Hydroxybutyric Acid	-	-	-	-	-	-



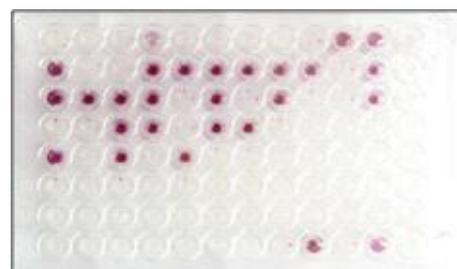
*Bacillus circulans*



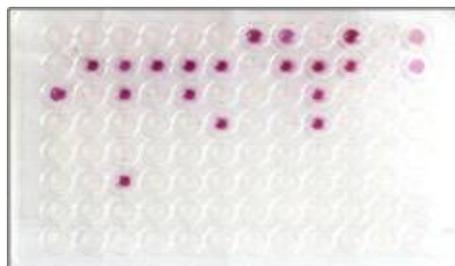
*Bacillus licheniformis*



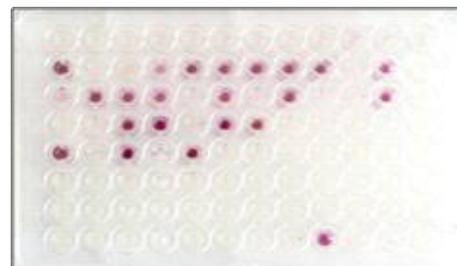
*Bacillus mycoides*



*Paenibacillus ehimensis*



*Pseudomonas fluorescens*



*Streptomyces griseus*

Fig4. 균주별 BIOLOG Plate 결과

(2) 식물성 곰팡이균에 대한 항균활성조사

선발된 우수 chitin/cellulose 분해균주들의 잔디병원성 균류(fungi)에 대한 항균활성 실험 결과, 측정대상으로 사용된 잔디병원성 균류 *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum*에 대하여 모두 항균활성을 나타낸 균주는 *Streptomyces griseus*로 나타났다. 그리고 *Bacillus mycooides*, *Pseudomonas fluorescens*, *Streptomyces cavourensis*는 균류 *Rhizoctonia solani*와 *Fusarium oxysporum*에 대하여 항균활성을 나타냈으며, *Bacillus circulans*과 *Bacillus licheniformis*는 균류 *Fusarium oxysporum*에 대하여만 항균활성을 나타냈다.

Table 3. PDA배지에서 기능성 세균의 여러 식물 병원균류들에 대한 성장 억제

	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Phytophthora capsici</i>	<i>Fusarium oxyporum</i>
<i>Bacillus circulans</i>	-	-	+
<i>Bacillus licheniformis</i>	-	+	++
<i>Bacillus mycooides</i>	-	+++	+++
<i>Paenibacillus ehimensis</i>	-	+++	+++
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	+++	+++
<i>Streptomyces griseus</i>	+++	+++	+++

(-: no inhibition, +:0.5mm, ++:5~10mm, +++:>10mm inhibition of mycelial growth)

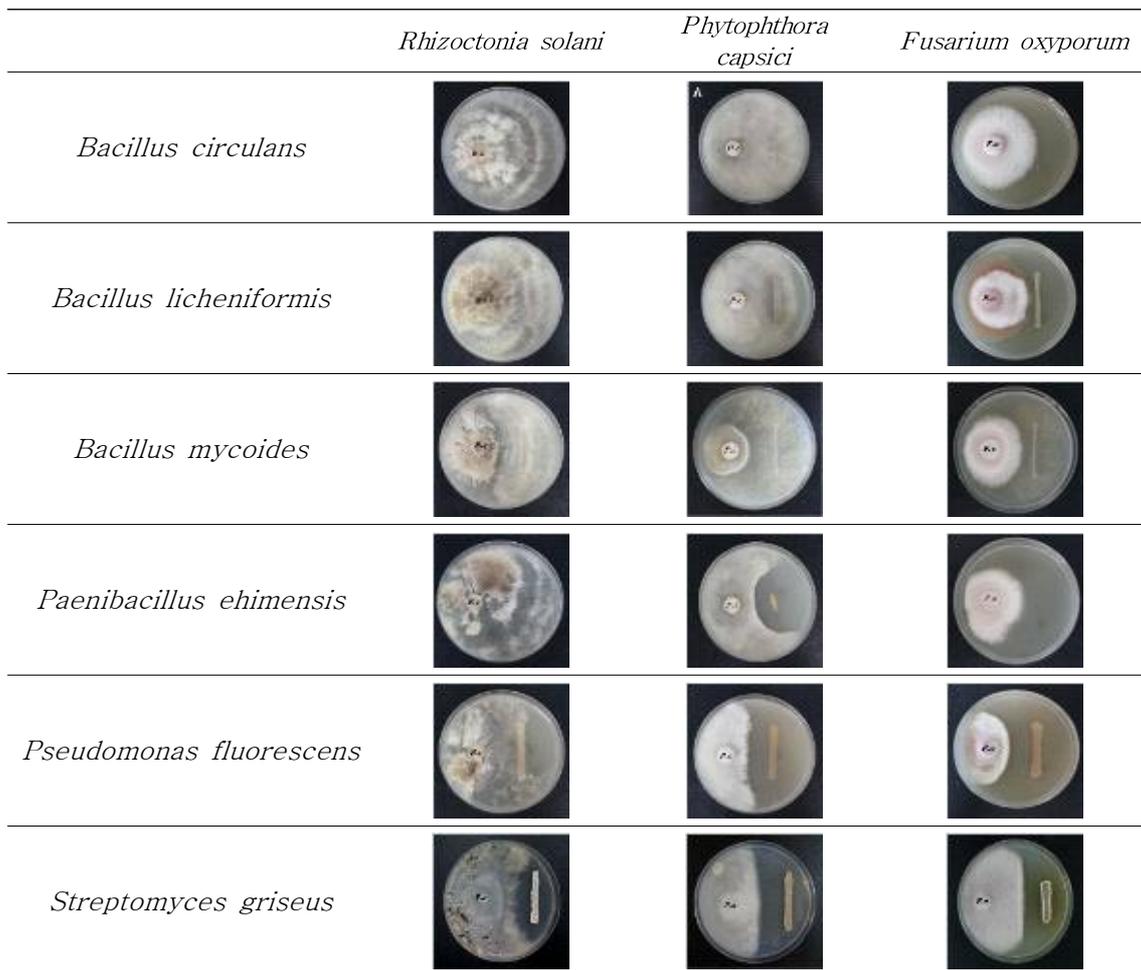


Fig 5. 기능성 세균의 여러 식물 병원균류들에 대한 성장 억제 실험

(3) 16S rDNA 염기서열 분석을 통한 계통학적 분류

(가) 염색체 DNA 분리

선발된 chitin/cellulose 우수분해균주들을 동정하기 위하여 이 균주들의 염색체 DNA를 추출하여 16S rRNA 유전자를 분리하였다(Fig. 6).

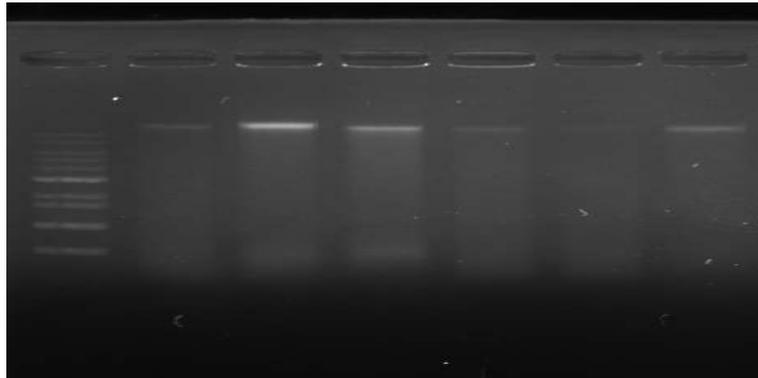


Fig. 6. Cellulose 분해균주의 DNA 전기영동 사진.

(나) 16S rDNA의 증폭

분리균주들의 염색체 DNA를 추출하여 전기영동으로 확인한 후, 약 1.5 kb의 16S rRNA를 PCR로 증폭하였다(Fig. 7).

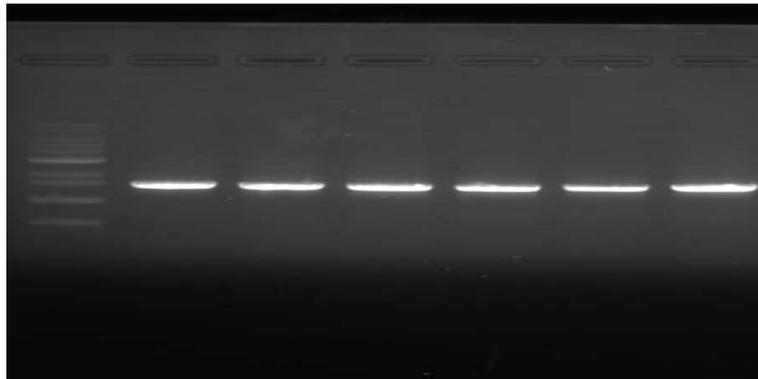


Fig7. Cellulose 분해균주의 PCR 전기영동 사진.

Table4. 군산 CC 잔디예초물로부터 분리된 cellulose 분해 균주 목록

No.	NCBI Accession Number	class	Species	Similarity
kc13	JN644554.1	<i>Firmicute</i>	<i>Bacillus circulans</i>	1398/1431(98%), Gaps = 12/1435(1%)
kc82	GQ375243.1	<i>Firmicute</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	1433/1436(99%), Gaps = 2/1436(1%)
kc21	AB679996.1	<i>Firmicute</i>	<i>Bacillus mycoides</i>	1432/1438(99%), Gaps = 5/1438(1%)
kc31	FN582329.1	<i>Firmicute</i>	<i>Paenibacillus ehimensis</i>	1452/1468(99%), Gaps = 3/1468(1%)
kc84	HM854217.1	Gamma-proteobacteria	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1415/1417(99%), Gaps = 2/1417(1%)
kc69	JN827310	Actinobacteria	<i>Streptomyces griseus</i>	1480/1478(99%), Gaps = 2/1482(1%)

조사기간 중 분리된 7균주를 계통분류학적으로 분석한 결과, Low G+C Gram-positive bacteria 그룹으로 알려진 Firmicute 그룹에 속하는 4균주와 생리적 특성이 다양한 화학 유기영양생물 그룹으로 알려진  $\gamma$ -Proteobacteria 그룹, high G+C Gram-positive bacteria 그룹인 Actinobacteria 그룹에 속하는 균주가 각각 1균주씩 분리, 동정되었다(조, 2008). kc13, kc82, kc21은 물, 공기, 토양 및 수질환경 등 여러 환경에서 발견되며, 각종 체외효소, 항생물질, 아미노산, 핵산, 비타민 등의 유용물질을 생산하며 유전공학 실험시 위험성이 적어 널리 이용되는 *Bacillus* 속에 속하는 것으로 나타났다(이, 1985). 그 중 kc13은 곰팡이 및 효모 세포벽의 주요 구성분이며 해양 거대조류의 구조, 저장 다당체 (laminarin)의  $\beta$ -1,3-glucosidic linkage의 가수분해촉매 효소를 생산하는 *Bacillus circulans*와 염기서열 유사도 값이 98%로 높게 나타났다(고, 2003). 그리고 kc82는 cellulase 및 amylase를 생산하는 균으로 알려져 있는 *Bacillus licheniformis* 와 염기서열 유사도 값이 99%로 높게 나타났다(우 등, 2007). 또한 kc69는 펙틴, 리그닌, 키틴, 케라틴 등의 방향복합물질을 분해하며, 다양한 종류의 항생제를 합성하는 능력으로 잘 알려진 *Streptomyces*에 속하는 *Streptomyces griseus*로 동정되었다. kc31은 여러 온도 및 pH의 환경에서도 안정한 항생물질을 분비하는 *Paenibacillus ehimensis*와 유사도 값이 99%로 높게 나타났다(조, 2002).

마지막으로 kc84은 *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*, *Fusarium oxysporum* 등 여러 가지 작물의 모잘록병을 방제하는 항·진균물질을 분비하는 종으로 알려진 *Pseudomonas fluorescens*와 유사도 값이 99%로 높게 나타났다(김, 1998)

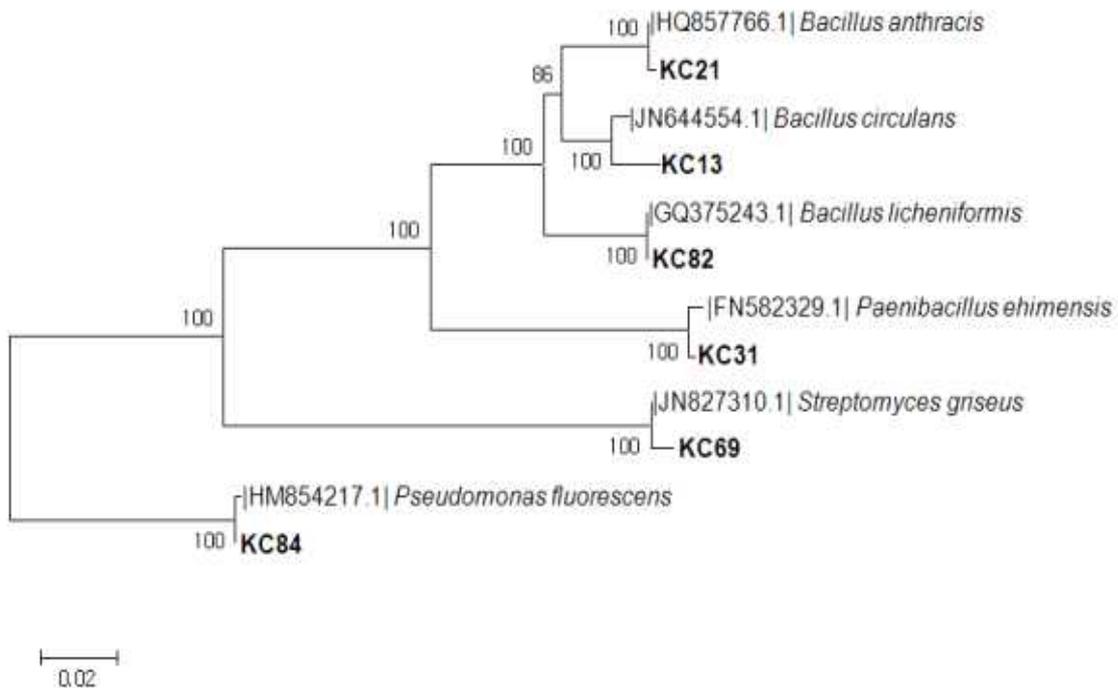


Fig8. 잔디예초물에서의 분리된 섬유소 분해세균의 분류학적 계통수

## 2. 기능성 미생물(*Paenibacillus ehimensis* KWN38) 특성 연구

### 가. 효소활성조사

KWN38을 7일간 배양하면서 하루 단위로 샘플을 채취하여 다양한 효소의 활성을 측정하였다. 단, protease 경우 10일간 측정하였다.

#### (1) cellulase 활성

cellulose의 분해활성은 배양시작 4일까지 증가하다가 이 후로 급격히 감소하였다 (Fig. 9).

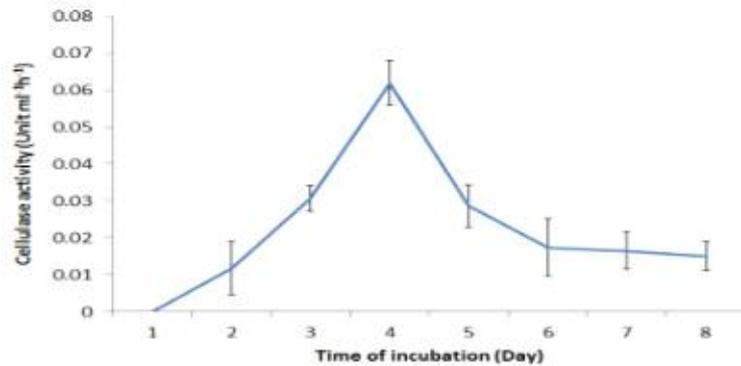


Fig. 9. KWN38의 배양시간에 따른 cellulase 활성

#### (2) chitinase 활성

chitinase 활성은 5일째까지 점차적으로 증가하다가 이후 점진적으로 활성이 감소하였다 (Fig. 10).

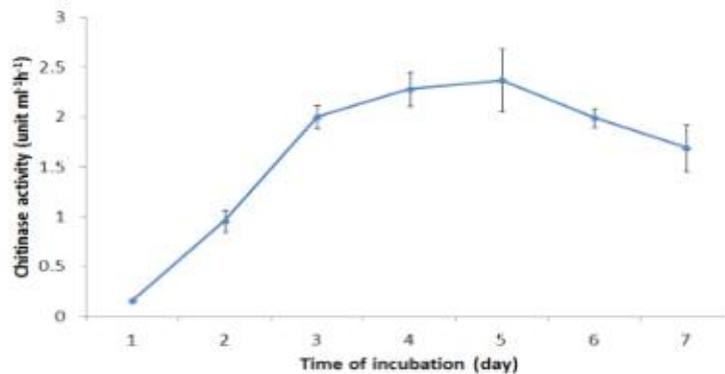


Fig. 10. KWN38의 배양시간에 따른 Chitinase 활성

#### (3) $\beta$ -1,3-glucanase 활성

$\beta$ -1,3-glucanase 활성은 3일째까지 서서히 증가하다가 5일째에 최고의 활성을 나타낸 후 6일째까지 서서히 감소한 후 7일째에 급격히 감소하였다(Fig. 11).

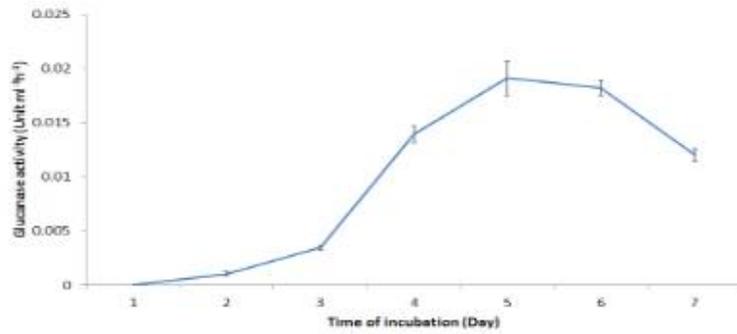


Fig. 11. KWN38의 배양시간에 따른 β-1,3-glucanase 활성

(4) protease 활성

protease 활성은 4일째까지 서서히 증가하다가 5일째에 급격히 증가하여 8일째에 최고의 활성을 나타낸 후 감소하였다(Fig. 12).

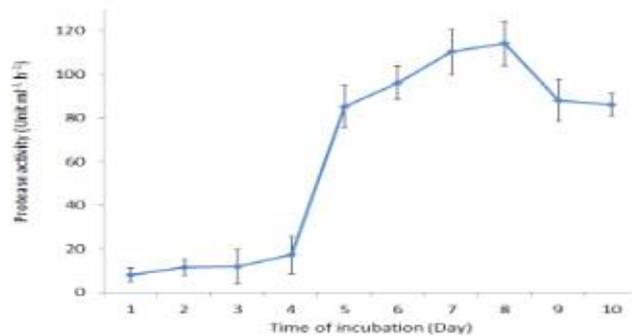


Fig. 12. KWN38의 배양시간에 따른 protease 활성

나. 식물생장호르몬조사

(1) TLC chromatogram 결과

TLC와 HPLC 크로마토그램 확인결과 KWN38은 auxin류의 IAA을 분비하는 것으로 확인되었다.

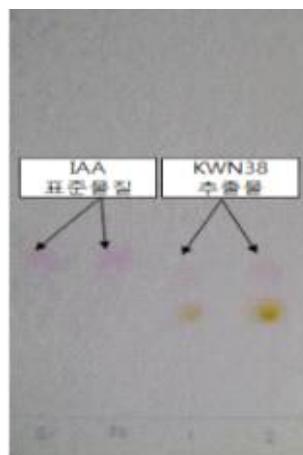


Fig. 13. TLC 크로마토그램을 이용한 KWN38의 auxin분비 활성 확인

TLC 크로마토그램을 실시한 결과 식물 성장 호르몬인 auxin의 표준물질인 IAA와 KWN38 배양 상등액을 ethyl acetate로 추출한 물질의 이동 거리가 유사 하였고, 발색시약에 대한 반응에서 모두 분홍색을 나타내었다(Fig. 13). 이는 Indole acetic acid 표준물질의 Rf값은 0.33, KWN38 추출물은 0.31로써 약간의 차이는 있었으나 이 결과로써 KWN38이 분비한 물질은 IAA와 분자구조가 유사한 auxin의 종류인 것으로 판단되었다.

(2) HPLC chromatogram 결과

HPLC 크로마토그램을 통하여 IAA 표준물질과 KWN38 추출물의 tR값이 모두 16.2분으로 측정되어 KWN38이 auxin류의 물질을 생산하는 것으로 판단되었다(Fig. 14).

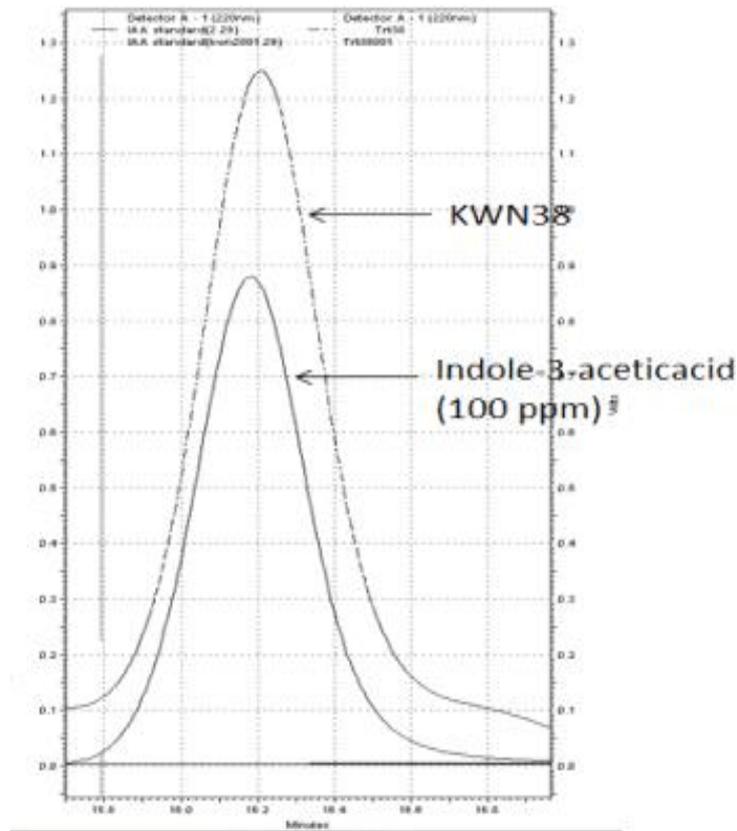


Fig. 14. HPLC 크로마토그램을 이용한 KWN38의 auxin분비 활성 확인

다. 식물성곰팡이병원균에 대한 균사 파괴 및 포자 저해능력 조사

(1) KWN38과 배양액에 의한 균사 파괴

KWN38과 식물병원성 곰팡이의 plate상에서의 대치배양 결과, 미생물 접종 반대편 균사(a)와 기능성 미생물 접종 편 균사(b)의 모습을 비교해보면 실험한 병원성 곰팡이 3종류 모두 미생물 접종 반대편 균사(a)의 모습은 정상적인데 반해 기능성 미생물 접종 편 균사(b)의 모습은 파괴되어 있음을 확인하였다(Fig. 15, 16, 17). 또한 대조구(기능성미생물을 접종하지 않은 PDB배지)와 KWN38 배양액 처리구의 식물병원성 곰팡이 균사 파괴 정도를 비교한 결과 대조구의 경우는 곰팡이의 균사가 정상적으로 자라고 있는데 비해 KWN38 배양액을 처리한 시험구에서는 식물병원성 곰팡이의 균사가 파괴되어 잘 자라지 못하였다(Fig. 18).

(가) 기능성미생물에 의한 *Rhizoctonia solani* AG-I (IA) 균사 변화

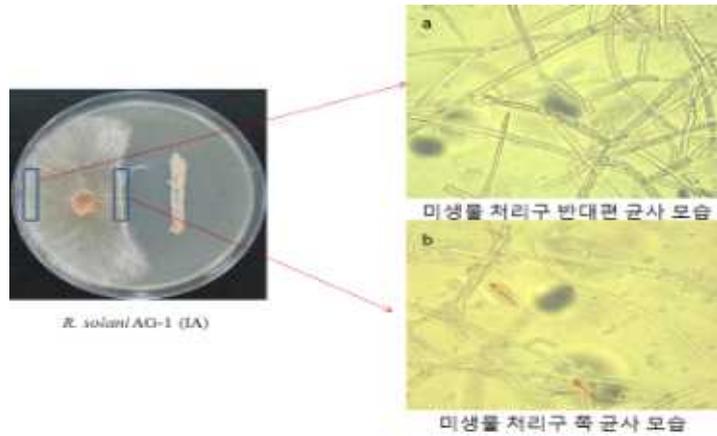


Fig. 15. KWN38에 의한 *Rhizoctonia solani* AG-I (IA) 균사 파괴

(나) 기능성미생물에 의한 *Fusarium oxysporum* f.sp. *Lycopersici* 균사 변화

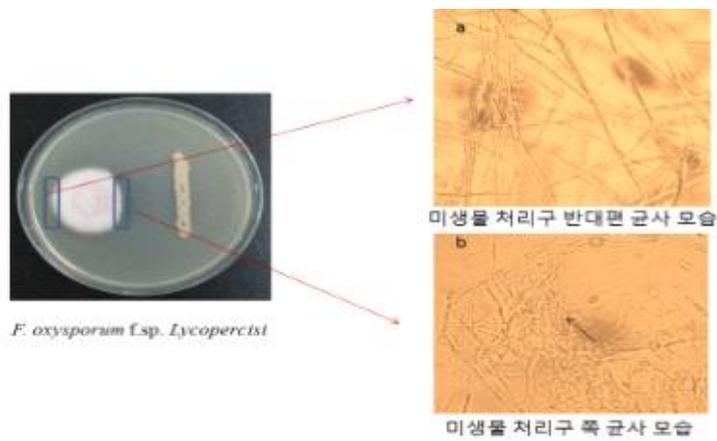


Fig. 16. KWN38에 의한 *Fusarium oxysporum* f.sp. *Lycopersici* 균사 파괴

(다) 기능성미생물에 의한 *Phytophthora capsici* 균사 변화

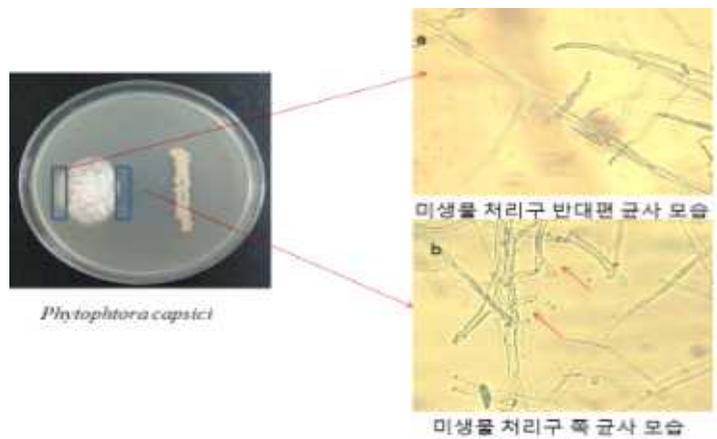


Fig. 17. KWN38에 의한 *Phytophthora capsici* 균사 파괴

(라) 기능성미생물(KWN38)배양액이 균사 파괴에 미치는 영향

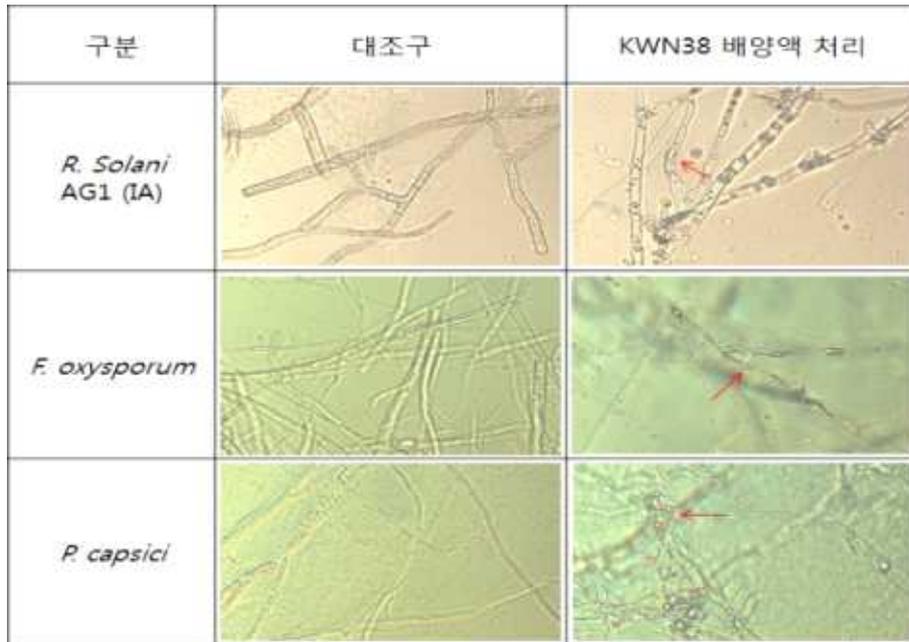


Fig. 18. KWN38 배양액 처리에 의한 균사 파괴

(2) 조효소 추출물에 의한 균사 파괴

KWN38을 접종한 후 7일간 배양하여 Ammonium sulfate(80%)로 효소를 추출한 후 50mM sodium phosphate buffer(pH 7)로 녹여 병원성 곰팡이에 처리하여 효소에 의한 병원성 곰팡이 균사 파괴 효과를 측정 한 결과 대조구의 병원성 곰팡이 균사는 파괴되지 않은데 비해, 조효소(500과 1000 $\mu$ g/ml)를 처리한 시험구의 균사는 파괴되었다(Fig. 19).

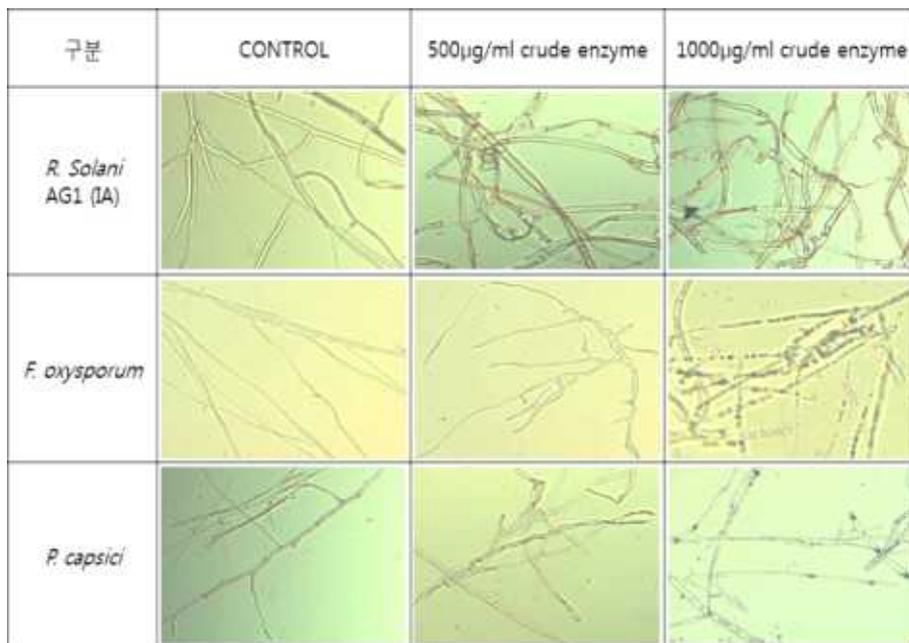


Fig. 19. KWN38 조효소 추출물 처리에 의한 병원성 곰팡이 저해 효과

(3) butanol 추출물에 의한 균사 파괴

KWN38을 접종 후 7일간 배양하여 butanol(BtOH)로 향생물질을 추출한 후 병원성 곰팡이에 처리하여 향생물질에 의한 병원성 곰팡이 균사 파괴 효과를 측정된 결과, 대조구의 병원성 곰팡이 균사는 파괴되지 않은데 비해 butanol(500ppm) 추출물을 처리한 시험구의 균사는 파괴되었다(Fig. 20).

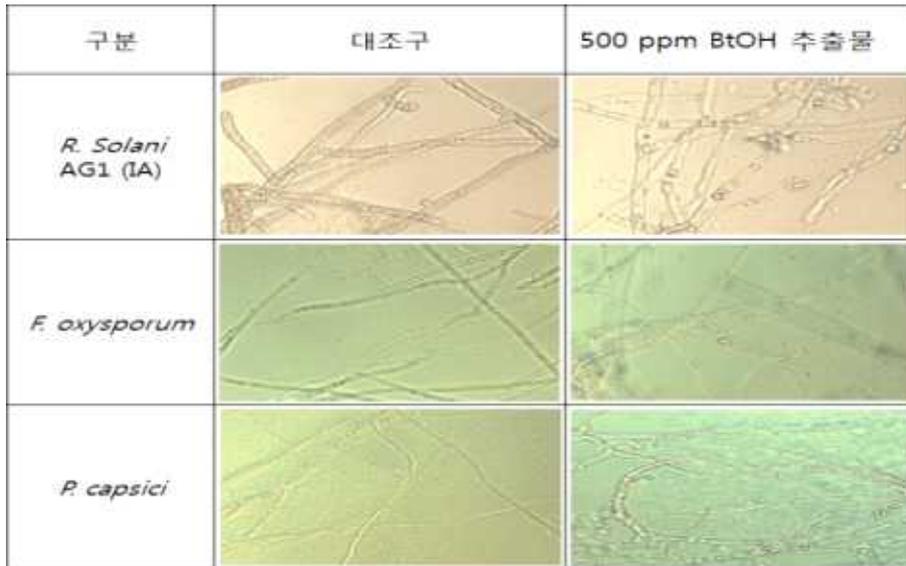


Fig. 20. KWN38 배양액 부탄올추출물(향생물질)에 의한 균사 파괴

(4) KWN38과 배양액에 의한 포자 저해

기능성미생물(KWN38)에 의한 병원성 곰팡이 포자 저해 능력을 조사한 결과를 보면 *R. solani* AG-1 (IA)에 처리한 결과 대조구는 정상적으로 Sclerotium(균핵)을 형성하는데 비해 KWN38 배양액 처리구의 Sclerotium(균핵)은 발아되면서 모양이 변형되었고 *F. oxysporum* 와 *P. capsici* 에 처리한 결과 대조구에서는 포자가 발아되는데 비해 KWN38 배양액 처리구에서는 포자 형성이 억제되었다(Fig. 21).

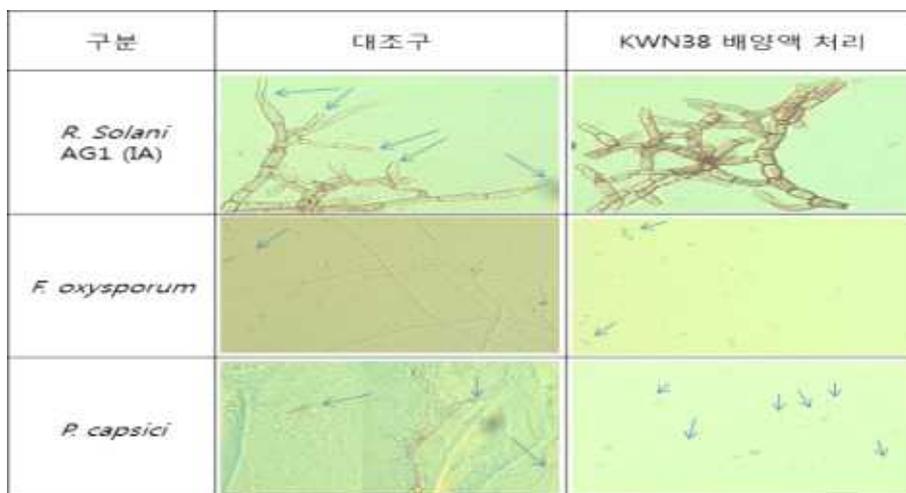


Fig. 21. KWN38 배양액 처리에 의한 포자 형성 저해 효과

(5) 조효소 추출물에 의한 포자 저해

KWN38을 접종 후 7일간 배양하여 Ammonium sulfate(80%)로 효소를 추출한 후 50mM sodium phosphate buffer(pH7)로 녹여 병원성 곰팡이에 처리하여 효소에 의한 병원성 곰팡이 포자 저해 능력을 측정한 결과 대조구를 처리한 병원성 곰팡이 포자는 형성되는데 비해 KWN38의 조효소 1000 $\mu$ g/ml를 처리한 시험구의 포자는 형성되지 않았다(Fig. 22).

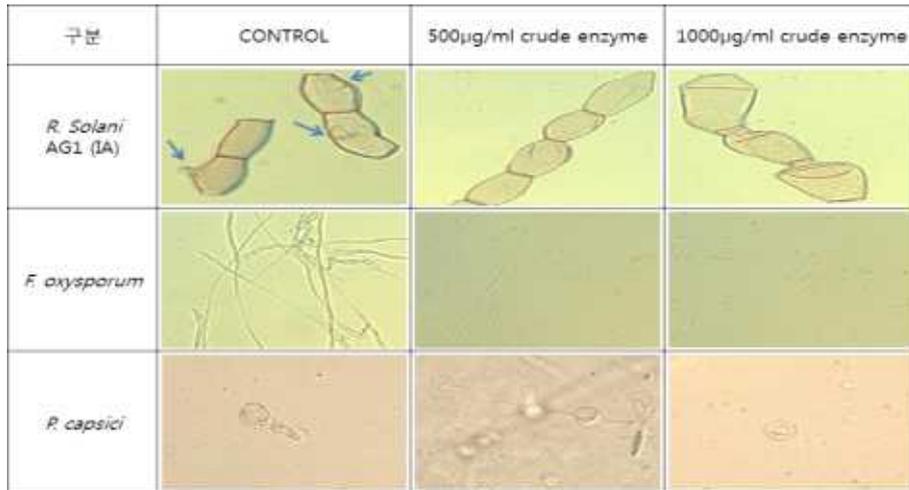


Fig. 22. KWN38 효소 추출물 처리에 의한 포자 형성 억제 효과

#### (6) butanol 추출물 의한 포자 저해

KWN38을 접종한 후 7일간 배양하여 butanol로 항생물질을 추출한 후 병원성 곰팡이에 처리하여 항생물질에 의한 병원성 곰팡이 포자 저해 능력을 측정한 결과 대조구의 병원성 곰팡이 포자는 형성되는데 비해 butanol 추출물(250과 500ppm)을 처리한 시험구의 포자 형성은 억제되었다(Fig. 23). 병원성 곰팡이 종류 별로 저해 효과를 보면 *R. solani* AG-1(IA)에 처리한 결과 butanol 추출물 250과 500ppm 모두에서 Sclerotium(균핵)이 발아되면서 모양이 변형되었고 *F. oxysporum*과 *P.capsici*에 처리한 결과 butanol 추출물 250ppm에서는 무처리구와 같이 발아억제 효과가 나타나지 않는데 비해 500ppm을 처리했을 때 발아억제 효과가 나타났다.

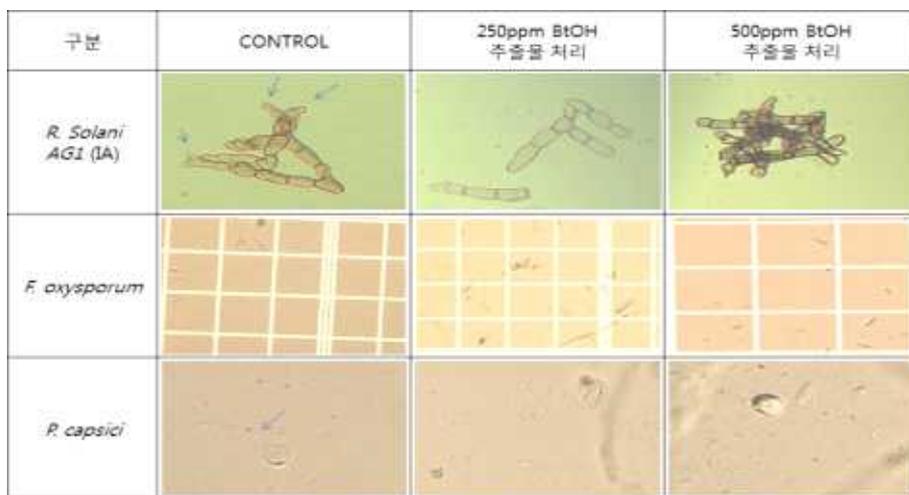


Fig 23. KWN38 배양액 부탄올추출물(항생물질)에 의한 포자 형성 억제 효과

라. 효소(chitinase) 분리 및 정제

(1) 배양상등액의 chitinase 활성

0.01% glycol chitin이 첨가된 SDS-PAGE running gel (12% polyacrylamide gel)에 *Paenibacillus ehimensis* KWN38의 배양상등액 시료를 넣고 전기영동을 한 후 1% Triton X-100과 1% skim milk가 포함된 100mM sodium acetate buffer (pH 5.0) 완충액에 2시간 처리한 다음, 반응용 완충용액 1% Triton X-100이 포함된 100mM sodium acetate buffer (pH 5.0)에서 24시간 반응 시켰다. 반응 후 0.01% Calcofluor white M2R 염색액으로 염색하여 키틴분해효소 활성을 확인 하였다. Fig. 24와 같이 조사 결과 35, 50, 82, 107 및 138 kDa 정도의 분자량을 가진 chitinase를 *Paenibacillus ehimensis* KWN38이 생산함을 알 수 있었다.

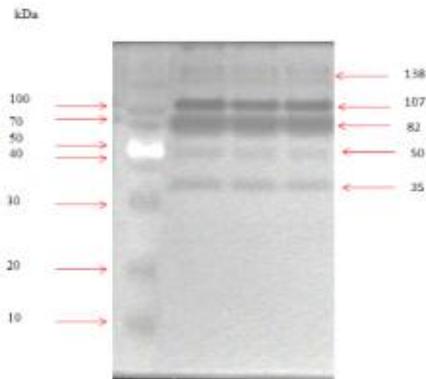


Fig. 24. Active staining(SDS-PAGE)을 통한 chitinase 활성 확인

(2) DEAE-Sephrose column chromatography 결과

*Paenibacillus ehimensis* KWN38를 배양한 후 원심분리 하여 상등액을 80% ammonium sulfate로 효소를 침전시켰다. 침전물을 투석하여 ammonium sulfate를 제거 한 후 DEAE-sepharose 컬럼 크로마토그래피를 통해 1차 정제하였다. Fig. 25에서 보는 바와 같이 80% ammonium sulfate를 통하여 얻은 조효소액을 DEAE-sepharose 컬럼에 NaCl을 이용하여 0-0.6M까지 농도 구배를 주면서 단백질을 용출시켰다. 모든 분획의 chitinase 활성을 측정 한 뒤 활성이 있는 11-22번 분획을 회수하여 농축시켰다.

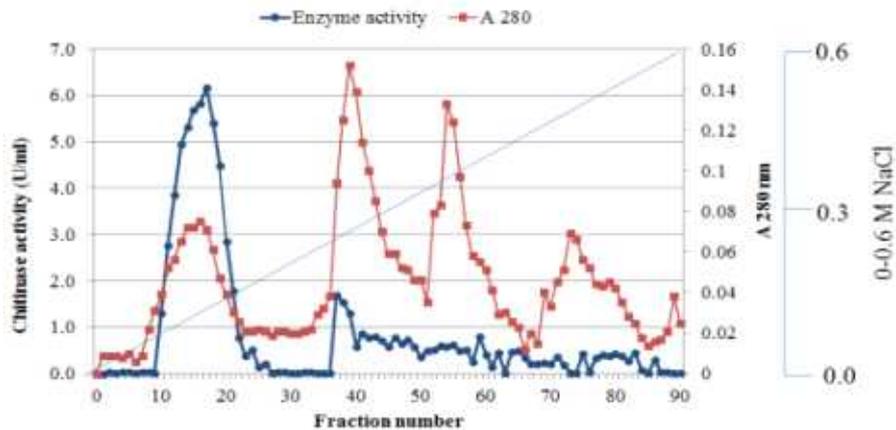


Fig. 25. DEAE-Sephrose column chromatography

Chitinase active staining을 통해 DEAE-Sepharose 컬럼 분획 11번부터 22번까지 chitinase 활성 및 종류를 조사하였다. 조사 결과 11번부터 22번까지 chitinase 종류와 활성이 다르게 나타났다 (Fig. 26).

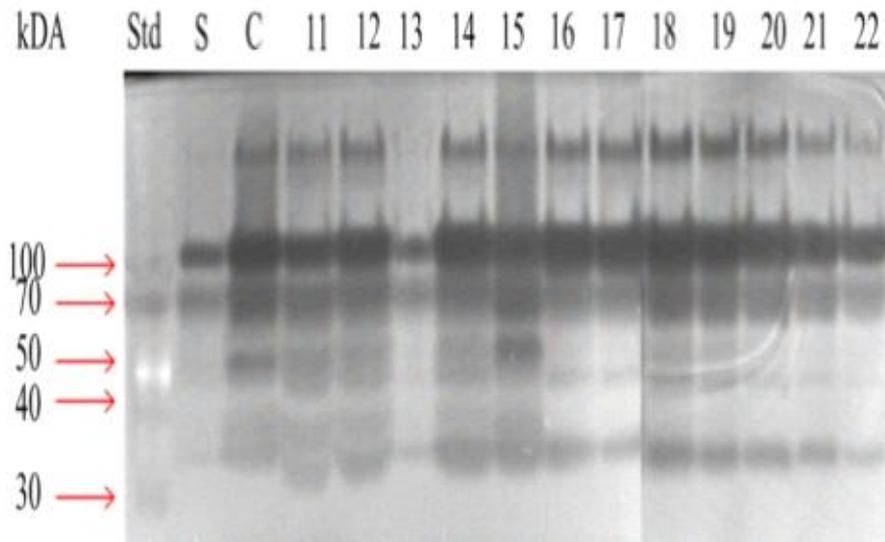


Fig. 26. SDS-PAGE를 이용한 DEAE-Sepharose column chromatography 분획별 chitinase 활성 조사

### (3) Sephadex G-100 column chromatography 결과

DEAE-sepharose 컬럼 크로마토그래피의 활성을 측정한 뒤 회수한 분획을 Sephadex G-100 컬럼에 Loading하여 용출하였다 (Fig. 27). 용출 후 회수한 분획을 단백질 정량 및 chitinase 활성을 측정하였다. 모든 분획의 chitinase 활성을 측정한 뒤 활성이 높은 있는 23-45번 분획을 회수하여 농축시켰다.

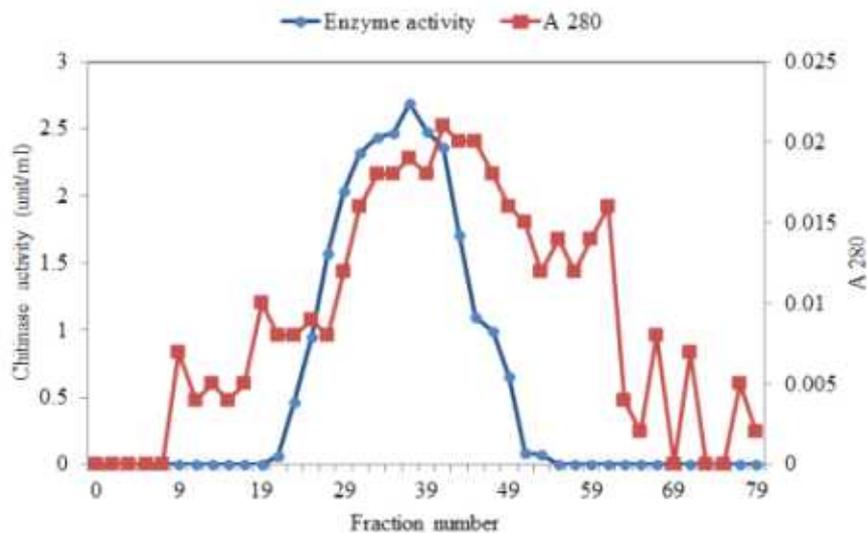


Fig. 27. Sephadex G-100 column chromatography

Chitinase active staining을 통해 Sephadex G-100 column 분획 23번부터 45번까지 chitinase 활성 및 종류를 조사하였다. 조사 결과 23번부터 30번까지는 50 kDa 보다 작은 분자량을 가진 chitinase 종류는 미량 존재하거나 보이지 않았다. 또한 37번부터 45번까지는 100 kDa 보다 큰 분자량을 가진 chitinase 종류는 미량 존재하거나 보이지 않았다 (Fig. 28).

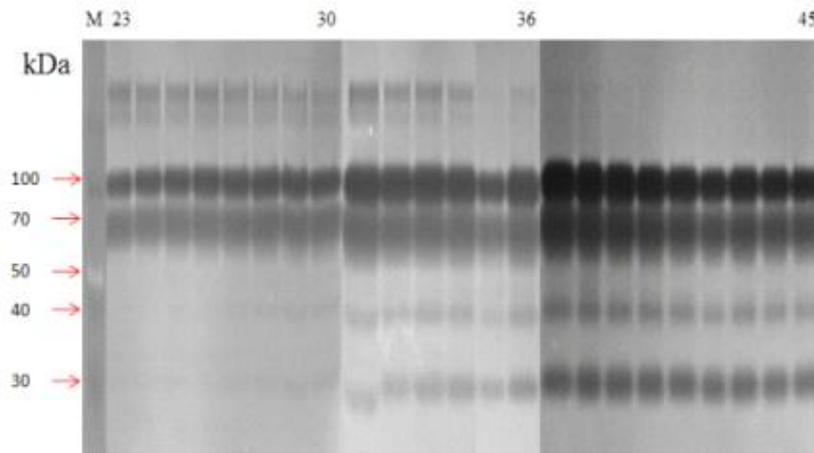
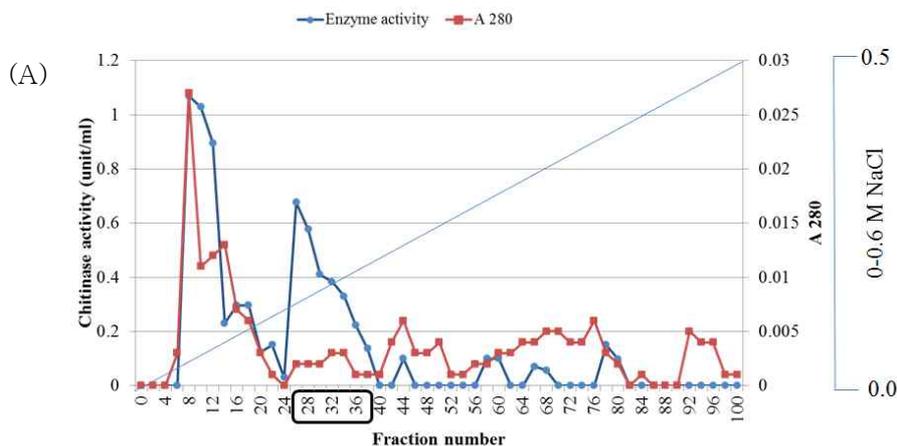


Fig. 28. SDS-PAGE를 이용한 Sephadex G-100 column chromatography 분획별 chitinase 활성 조사

#### (4) CM-Sephadex C-50 column chromatography 결과

Sephadex G-100 컬럼 크로마토그래피의 활성 측정 및 chitinase active staining을 한 결과 23번부터 30번까지 회수한 분획을 CM-Sephadex C-50 컬럼에 Loading하여 용출하였다 (Fig. 29A). 용출 후 회수한 분획을 단백질 정량 및 chitinase 활성을 측정하였다. 조사결과 6번부터 10번, 12번, 14번부터 22번, 25번부터 27번, 28번부터 33번, 34등의 활성이 다르게 조사되었다. 그러므로 이러한 분획을 모아 chitinase active staining을 실시하였다 (Fig. 29B). 그 결과 6번부터 10번에서는 4종류의 효소가, 12번은 2종류의 활성 강한 효소 나타났고, 14번부터 22번은 12번에서 나타난 것과 유사한 패턴이었다. 25번부터 27번은 약한 2종류의 효소가 나타났다. 28번부터 33번 및 34에서 단일 효소 종류를 나타냈다. 하지만 34번 단일 효소가 28번부터 33번에 나타난 효소 보다 활성이 강하므로 34번 분획의 효소를 농축한 후 pH, 온도, 금속이온의 영향에 대하여 조사하였다.



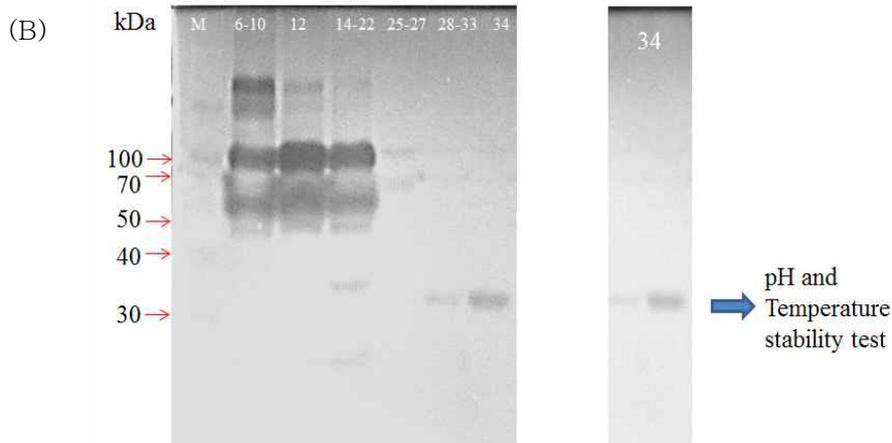


Fig. 29. SDS-PAGE를 이용한 CM-Sephadex C50 column chromatography 분획별 chitinase 활성 조사

(5) chitinase 정제 요약

*Paenibacillus ehimensis* KWN38를 5일간 배양한 후 원심분리 하여 상등액을 80% ammonium sulfate로 효소를 침전시켰다. 침전물을 투석하여 ammonium sulfate를 제거 한 후 DEAE-sepharose 컬럼 크로마토그래피를 통해 1차 정제하였고, 1차 정제된 효소를 Sephadex G-100 컬럼 크로마토그래피를 통해 2차 정제 한 후 CM-Sephadex C50 컬럼 크로마토그래피를 통해 3차 정제 하였다. Table 5에서 보는바와 같이 최종 CM-Sephadex C50 컬럼 크로마토그래피를 실행 후 효소 고유활동도(specific activity)는 12.9 Unit/mg이었고, 정제배율(Purification folds)는 12.34로 나타났다.

Table 5. 키틴분해효소 정제 요약

Step	Total proetin (mg)	Total activity (Unit)	Specific activity (Unit/mg)	Purification fold
Ammonium sulfate	73.63	76.98	1.05	1.00
DEAE sepharose	10.38	50.39	4.85	4.64
Separdex G-100	7.52	46.33	6.16	5.89
CM sephadex C-50	0.69	8.90	12.90	12.34

(6) 정제된 chitinase 특성 조사

정제된 효소(34번 분획)의 금속이온에 대한 특성을 조사하기 위해 10mM의 CaCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, EDTA, FeCl<sub>3</sub>, HgCl<sub>2</sub>, KCl, MgCl<sub>2</sub> 및 MnCl<sub>2</sub> 등을 처리한 후 조사결과 모든 금속 이온 처리구에서 처리하지 않은 무처리구 보다 활성이 낮아졌다. 이중에서 MnCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> 및 HgCl<sub>2</sub>에서 각각 86%, 91%와 100%의 효소 억제 활성이 조사되었다 (Table 6).

Table 6. 금속이온이 효소활성에 미치는 영향 조사

Material	Relative activity (%)
None	100
CaCl <sub>2</sub>	66
CoCl <sub>2</sub>	61
CuSO <sub>4</sub>	92
EDTA	92
FeCl <sub>3</sub>	34
HgCl <sub>2</sub>	0
KCl	66
MgCl <sub>2</sub>	9
MnCl <sub>2</sub>	14

정제된 효소(34번 분획)의 최적 온도에 따른 최적 활성을 조사한 결과 30°C에서 최적 활성을 보였다. 하지만 50, 60 및 70°C에서는 상당히 낮은 활성을 보였다. (Fig. 30).

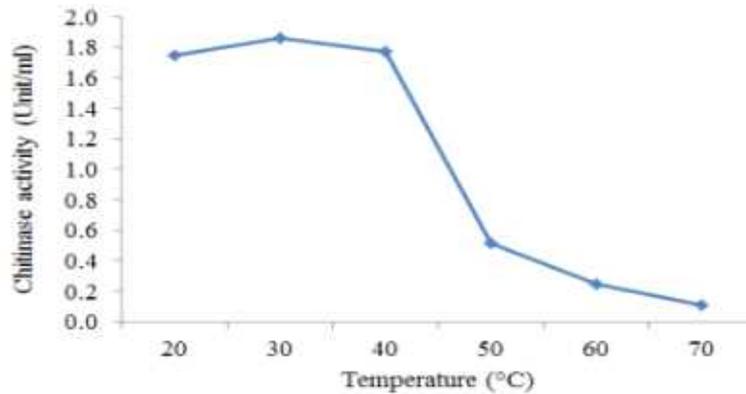


Fig. 30. 온도가 효소활성에 미치는 영향 조사

정제된 효소(34번 분획)의 최적 pH를 측정된 결과 pH 4에서 최적의 활성(relative activity)을 보였고, 안정성(residual activity) 측정에서도 pH 4에서 가장 좋았다. 하지만 pH가 1이 변할때마다 급격히 활성이 떨어지는 것을 알 수 있었다 (Fig. 31).

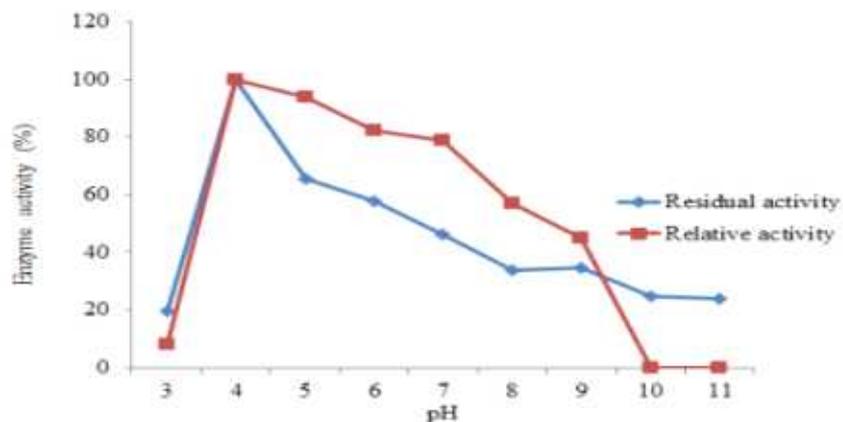


Fig. 31. pH가 효소활성에 미치는 영향 조사.

정제된 효소(34번 분획)가 *Fusarium oxysporum* 포자 발아에 미치는 영향 조사에 미치는 영향을 조사하기 위해 PDA 배지에 *Fusarium oxysporum* 포자를 도포 한 후 Paper disc를 올린 후 각각 a: DEAE-spharose 컬럼 정제 효소, b: Sphadex G-100 컬럼 정제 효소, c: CM sephadex C50 컬럼 정제 효소, d-e: 20mM Tris HCl buffer 및 f: 20 mM sodium acetate buffer를 처리하였다. 처리 3일 후 조사한 결과 정제된 효소 처리구인 a, b, c에서 포자 발아 및 생장 억제 활성을 관찰 할 수 있다. 하지만 buffer 처리구인 d, e, f 에서는 포자의 발아 및 생장이 관찰 되었다 (Fig. 32). 이러한 결과는 *Fusarium oxysporum* 포자의 외벽 구성물질인 키틴(chitin)성분을 정제된 효소(34번 분획, chitinase)가 파괴 함으로써 포자의 발아가 억제 된 것으로 보였다.

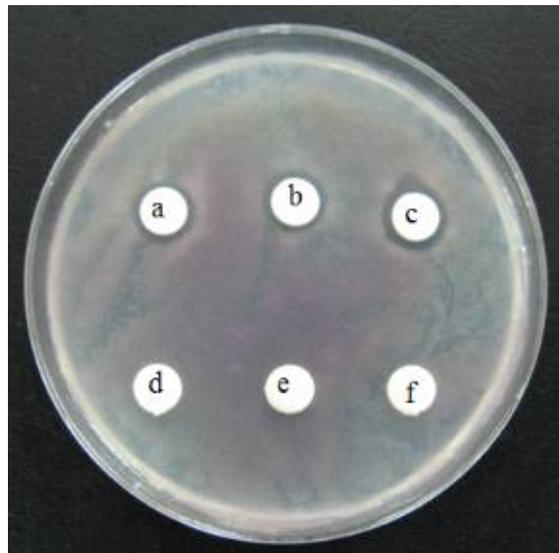


Fig. 32. 정제된 효소가 분생포자 발아(*Fusarium oxysporum* conidia)에 미치는 영향 조사. a: DEAE-spharose 컬럼 정제 효소, b: Sphadex G-100 컬럼 정제 효소, c: CM sephadex C50 컬럼 정제 효소, d-e: 20mM Tris HCl buffer 및 f: 20 mM sodium acetate buffer.

#### 마. 항생물질 정제

##### (1) 항생물질 추출 및 동정

기능성미생물(*Paenibacillus ehimensis* KWN38)을 5일동안 배양한 후 배양액을 원심분리 (8000 rpm, 20 min at 4°C)하여 Butanol을 이용하여 추출하였다. 이 후 유기용매 추출물을 농축하고 *P. capsici*, *R. solani* 및 *F. oxysporum* 에 대하여 항균활성을 측정한 결과 항균 활성을 보인 Butanol 추출물을 가지고 1차년도에 이어서 Silica gel 및 Sephadex LH20 column chromatography를 이용해 항균물질을 정제한 뒤 HPLC를 이용해 정제된 물질을 분획하고 NMR등을 이용하여 정제된 물질을 동정을 실시하였다.

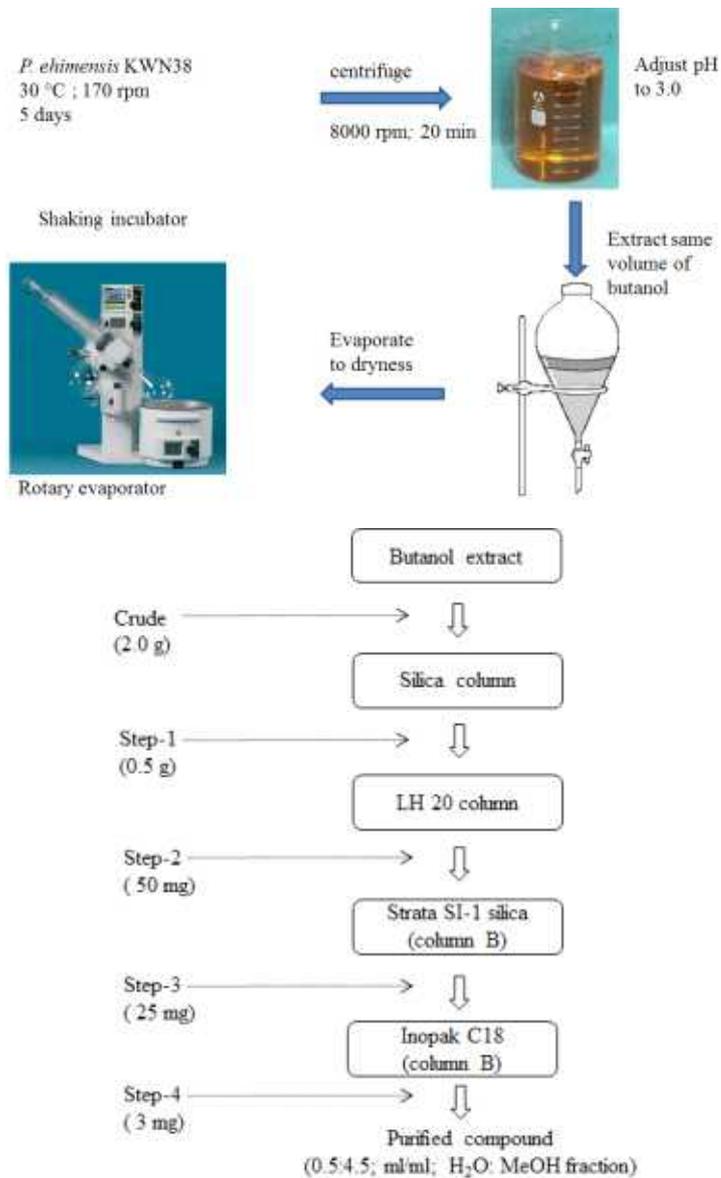


Fig. 33. 향생물질 추출 과정 모습

Fig. 34에서 보는바와 같이 부탄올(butanol) 추출물에서 향균 활성을 나타냈다. 그러므로 부탄올 추출물을 대량 추출 농축하여 향생물질 정제를 진행하였다. 향균 물질 동정 결과 methyl palmitate로 동정 되었고, Fig. 36-37에서 보는바와 같이 각각의 농도에 따라 향균활성을 나타내었다.



Fig. 34. 부탄올(Butanol) 추출물의 향균 활성. MeOH: 메탄올 처리, BtOH: 부탄올 처리

(2) methyl palmitate에 의한 항균활성

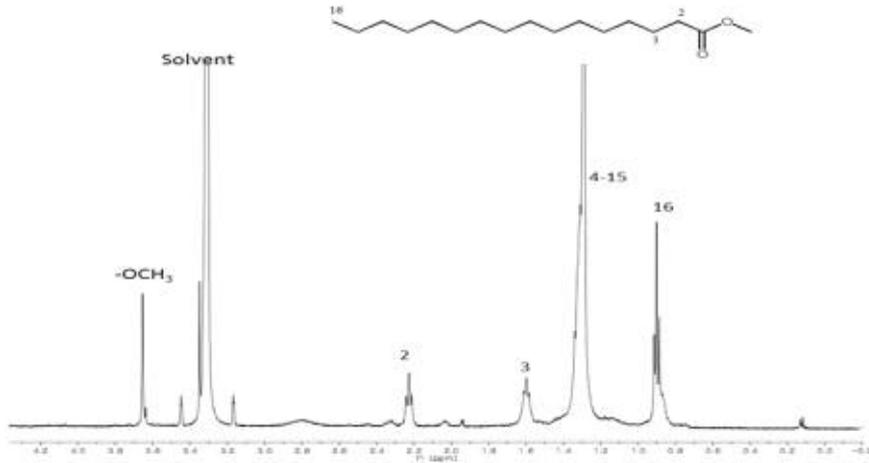


Fig 35. methyl palmitate의 H-NMR 결과

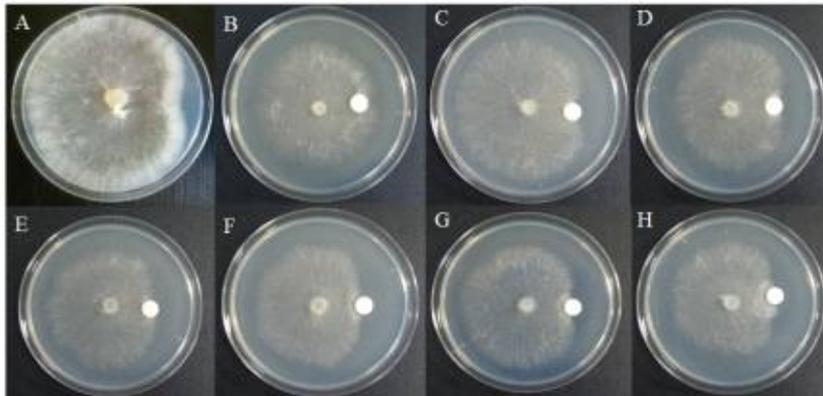
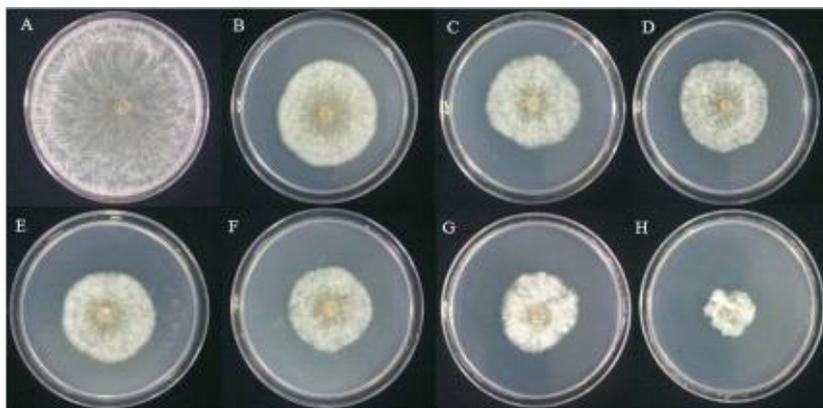


Fig 36. Paper disc법을 이용한 methyl palmitate의 *Rhizoctonia solani* AG-1(IA)에 대한 항균 활성 조사. A: 대조구, B-H: methyl palmitate (0, 1, 2, 4, 8, 16, 32 mg ml<sup>-1</sup>) 처리구.



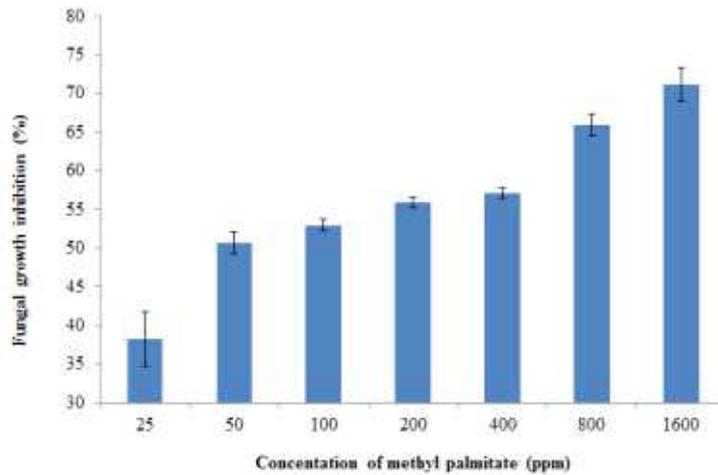


Fig 37. 배지 첨가에 따른 methyl palmitate의 *Rhizoctonia solani* AG-1(IA)에 대한 항균 활성. A-H: methyl palmitate (0, 25, 50, 100, 200, 400, 800 and 1600 ppm) 처리구.

### 3. 기능성 미생물 특성 연구(*Streptomyces griseus* H7602)

1차년도에 *Paenibacillus ehimensis* KWN38과 함께 생초미생물 혼합액비 제조시에 사용 후보 로써 토양에서 분리된 또 하나의 미생물인 *Streptomyces griseus* H7602를 이용하여 다음 과 같은 실험을 진행하였다. 이는 본 과제 1차년도 수행의 결과물로서 (주)자연과사람들 회사의 보유균주 확보 차원 및 그의 특성을 연구함으로써 미생물제제 생산을 실행하기 위한 기초연구의 일환으로 실시하였다.

#### 가. 효소 및 항균활성 조사

##### (1) Lipase and Protease 분비 및 항균활성 조사

Fig. 38에서 보는바와 같이 Lipase 및 Protease를 생산하였고, 16S rRNA의 염기서열을 바탕으로 한 미생물의 동정 결과 *Streptomyces griseus*와 99% 이상 일치하여 *Streptomyces griseus* H7602 (NCBI accession number : JN827310)로 명명하였다 (Fig. 40). Lipase 측정은 1% Tween 80 포함 nutrient agar 배지에서 생육 활성으로 판단하였고, protease 분비능은 10% skim milk agar 배지에 도말 후 투명환 형성 유무로 판단하였다. *Streptomyces griseus* H7602는 농업 병원성 곰팡이인 *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*에 대하여 강한 성장 억제 능력을 가졌다 (Fig. 39, Table 7).

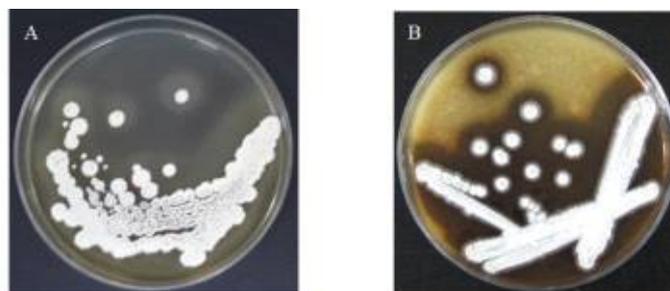


Fig. 38. *Streptomyces griseus* H7602이 분비한 lipase(A) 및 protease(B)의 확인.

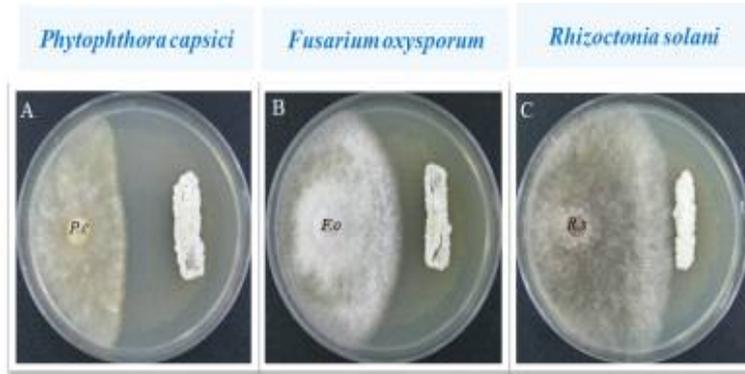


Fig. 39. *Streptomyces griseus* H7602의 항균 작용 모습.  
*P.c.*: *Phytophthora capsici*, *F.o.*: *Fusarium oxysporum*, *R.s.*: *Rhizoctonia solani*.  
 키틴+PDA배지에서 7일째 측정.

Table 7. *Streptomyces griseus* H7602의 항균 활성 능력 조사

Fungi	Inhibition (%)	Antifungal activity
<i>Phytophthora capsici</i> KACC 40483	53.33 ± 1.44	+++++
<i>Fusariumoxysporum f sp lycopesici</i> KACC 40032	41.67 ± 3.82	++++
<i>Rhizotonia solani</i> AG-2-2 (IV) KACC 40132	30.00 ± 2.50	+++

\*활성 계산은 다음과 같은 방법으로 하였다.  $\% \text{ Inhibition} = \left[ \frac{(R-r)}{R} \times 100 \right]$  where, r is the radius of the fungal colony opposite the bacterial colony and, R is the maximum radius of the fungal colony away from the bacterial colony. Antifungal activity (inhibition zone): - no inhibition zone; + (very weak), 0-5 mm; ++ (weak), >5-10 mm; +++ (moderate), >10-15mm; ++++ (strong), >15-20 mm; +++++ (very strong), > 20mm as the distance between the fungal pathogen and the area of antagonist growth after 7 days.

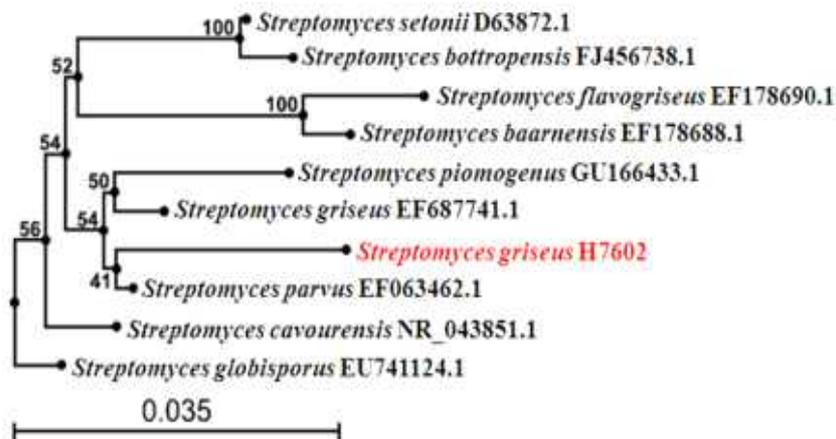


Fig. 40. *Streptomyces griseus* H7602의 유전적 계통도

(2) *Phytophthora capsici* 균사체 이용 활성조사

*Streptomyces griseus* H7602의 *Phytophthora capsici* 균사체 이용 가능성 조사를 위하여 *Phytophthora capsici*를 PDB배지에 키운 후 균사체를 모아서 Table 8에 나타난 배지에 1% 농도로 첨가하여 chitinase 및 glucanase 활성을 7일간 각각 측정 하였다. 조사결과 Fig. 41에서 보는바와 같이 접종 2일째부터 chitinase 및 glucanase 활성이 급격히 증가하였고, 4일째 최고 활성을 보이며 그 후 급격히 활성이 감소하였다. 결과적으로 *Streptomyces griseus* H7602는 *Phytophthora capsici* 균사체를 에너지원으로서 이용가능 하였고, 기질인 균사체의 농도가 감소함으로써 chitinase 및 glucanase의 활성이 감소되어지는 것으로 사료되었다.

Table 8. *Phytophthora capsici* 균사체를 이용한 chitinase 및  $\beta$ -1,3-glucanase 활성 조사

배지 조성 (%)	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1
NaCl	0.05
NH <sub>4</sub> Cl	0.1
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.05
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.05
Yeast extract	0.01

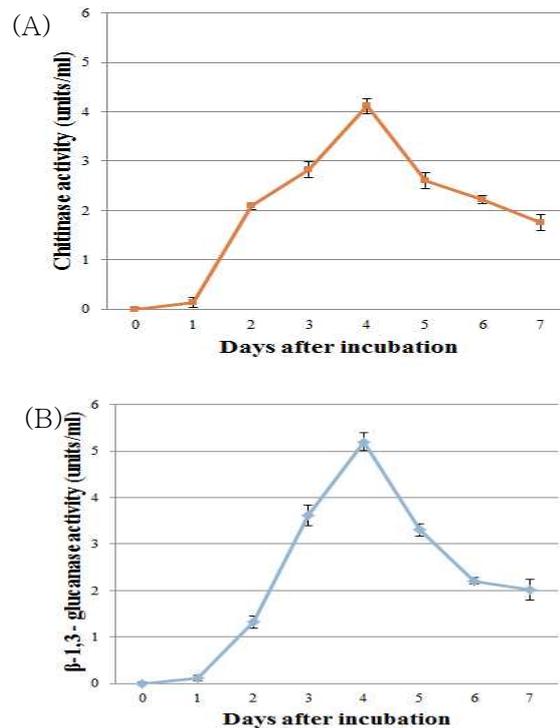


Fig. 41. 키틴 및 글루칸 분해 효소 (chitinase and glucanase) 활성

### (3) 배양상등액의 항균활성

*Streptomyces griseus* H7602 배양 상등액의 항균 활성을 조사하기 위해 *Streptomyces griseus* H7602를 GC 배지에서 5일간 배양한 후 원심분리하여 상등액을 취하여 멸균 시켜 사용 하였다. Fig. 42A와C 에서 보는 바와 같이 *S. griseus* H7602 배양 상등액에 담겨진 *Phytophthora capsici*의 균사는 성장하지 못하였지만, Fig. 42B와 D에서 보는 바와 같이 멸균수에 담겨진 *P. capsici*의 균사는 정상 적으로 성장하였다. 이는 *S. griseus* H7602가 생성한 대사산물에 의해 *P. capsici*의 균사 생장이 억제 된 것으로 사료되었다.

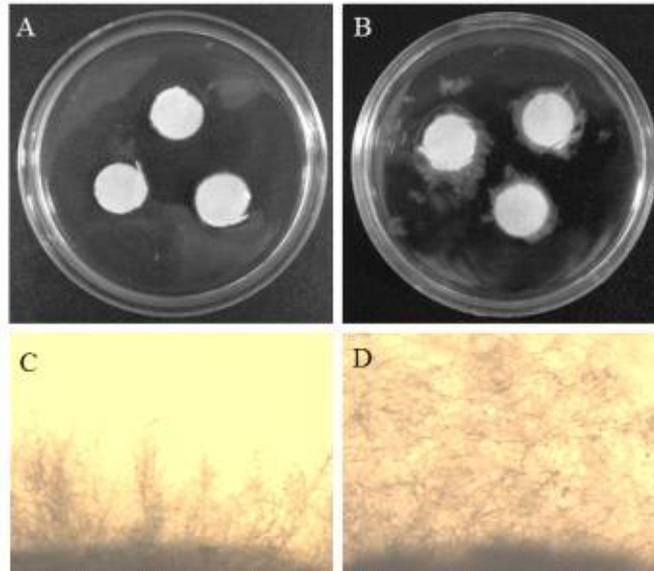


Fig. 42. *Streptomyces griseus* H7602의 멸균배양액이 *P. capsici*의 유주자낭 형성과 균사 성장에 미치는 영향. (A와 C) *Streptomyces griseus* H7602의 멸균배양액, (B와 D) 멸균수.

### 나. 항생물질 정제

기능성미생물(*Streptomyces griseus* H7602)을 5일동안 GC배지(젤라틴 0.05%; 계겉질 0.05%; 복합비료 0.3% (21-17-17; N 0.063%; P2O5 0.051%; K2O 0.051%; Dongbu Hitek company, Korea); 생초 0.6%; rice bran 0.05%; yeast extract 0.003%)에서 배양한 후 배양액을 원심분리(8000 rpm, 20 min at 4°C)하여 Chloroform, Butanol, n-Hexane 및 ethyl acetate을 이용하여 추출하였다. 이 후 유기용매 추출물을 농축하고 *P. capsici*, *R. solani* 및 *F. oxysporum* 에 대하여 항균활성을 측정하고 항균 활성을 보인 n-hexan과 ethyl acetate 추출물을 가지고 다음 실험을 실시하였다.

#### (1) ethyl acetate 추출물의 항균활성

Ethyl acetate 추출물의 항균 활성 조사를 위해 PDA배지를 만든 후 1% 농도의 Ethyl acetate 추출물 100  $\mu$ l첨가 한 후 *P. capsici*, *R. solani* 및 *F. oxysporum* 조각을 페트리 디쉬 중앙에 올려 놓은 후 항균 활성을 조사하였다. Ethyl acetate 추출물 처리구인 Fig. 43A, B, C에서 보듯이 무처리구인 D, E, F에 비하여 *P. capsici*, *R. solani* 및 *F. oxysporum* 등의 각각의 곰팡이가 잘 자라지 못함을 볼 수 있다. 각각의 병원성 곰팡이에 대하여 억제율은 *P. capsici* 74.34%, *F. oxysporum* 74.99%, *R. solani* 49.63%로 조사되었다.

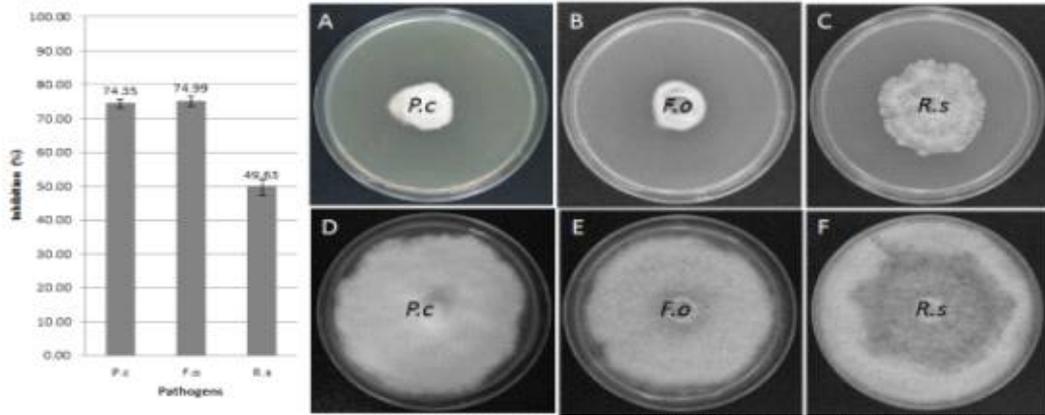


Fig. 43. 조추출물(ethyl acetate 추출물)의 항균 활성 조사.

P.c: *Phytophthora capsici*, F.o: *Fusarium oxysporum*, R.s: *Rhizoctonia solani*.

Fig. 44는 Potato dextrose broth (PDB)에서 키운 *Phytophthora capsici* 배양액 1ml를 작은 tube에 5일 동안 배양한다. 여기에 헥산(hexane) 추출물 500 및 1000 ppm 농도로 처리한 다음 72시간 후에 균사 형태를 관찰하였다. 관찰 결과 메탄올 처리구에서의 균사 생장은 정상적이었으나, 헥산(hexane) 추출물 500 및 1000 ppm 농도 처리구에서의 균사는 파괴되거나 기형인 상태로 조사됐다. 이렇게 헥산(hexane) 추출물의 항균활성이 강력하였지만, 추출량이 많지 않아 에틸아세테이트(ethyl acetate) 추출물을 이용하여 항균 물질을 분리 정제 하였다.



Fig. 44. 조추출물(ethyl acetate 추출물)의 병원균 균사 파괴 조사.

A: 메탄올처리구, B: 500ppm처리구, C:1000 ppm 처리구

(2) 향생물질 분리 및 정제

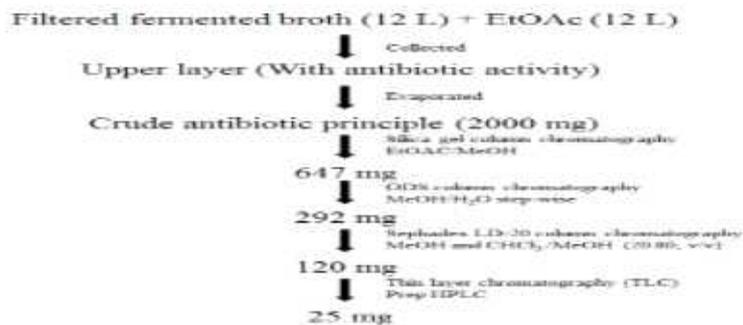


Fig. 45. 2차 정제 과정 모식도.

미생물(*Streptomyces griseus* H7602) 배양액 12L를 원심분리 한 후 에틸아세테이트 12L로 항생물질을 추출하였다. 에틸아세테이트 추출로 얻은 조추출물 2g을 silica gel 컬럼 크로마토그래피를 이용해 정제 하였다. 이동상은 Etyl acetate:Methanol (100:0, 80:20, 60:40, 40:60, 80:20 and 100:0;v/v) 조성으로 단계별로 진행하였다. 이동상 80:20 (Etyl acetate:Methanol) 용출 분획에서 항균활성물질 647 mg을 얻었고, 이를 ODS 컬럼 크로마토그래피에 적용해 다시 정제를 실시하였다. 이동상은 Distilled water:Methanol (100:0, 80:20, 60:40, 40:60, 80:20 and 100:0;v/v)조성으로 단계별로 진행하였다. 이동상 60:40 (Distilled water:Methanol) 용출 분획에서 항균활성물질 292 mg을 얻었고, 이를 Sephadex LH-20 컬럼 크로마토그래피에 적용해 다시 정제를 실시하였다. 이동상은 Methanol:Chloroform (80:20, v/v)조성으로 단일 용출 조건으로 실시하였다. 각각의 분획을 5ml씩 얻었고, 항균활성을 조사한 후 활성을 가진 분획을 순상 Thin layer chromatography (TLC)를 실시하였다. 이동상 조건은 ethyl acetate:chloroform:formic acid (7:3:0.5 v/v/v)조성으로 실시하였다. TLC 후 분리된 물질을 회수 하여 항균 활성 조사를 하여 활성을 보이는 물질 25mg을 HPLC를 통해 순도를 확인 하였다. 순도를 확인 한 결과 Fig. 46과 같이 머무름 시간이 3.06분인 단일 피크를 확인 할 수 있었다.

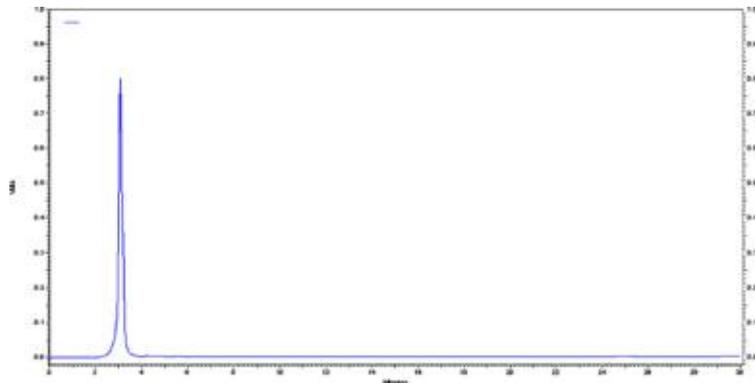


Fig. 46. TLC 후 compound의 HPLC 결과.

HPLC로 확인한 단일 물질을  $^1\text{H-NMR}$  (Fig. 114A) 및  $^{13}\text{C-NMR}$  (Fig. 114B) 및 GC-Mass 분석한 결과 세 개의 분석 결과가 일치하였으며, 1H-pyrrole-2-carboxylic acid로 동정 되었다 (Fig. 47).

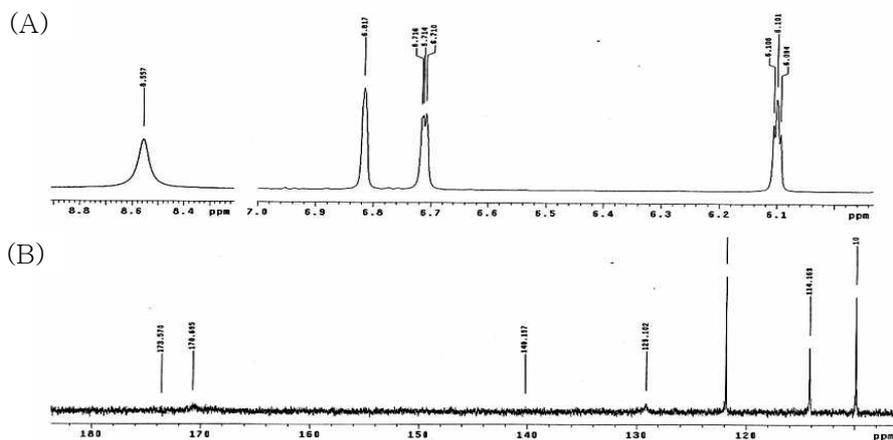


Fig. 47. 분리 및 정제된 compound의  $^1\text{H}$ NMR (A) 및  $^{13}\text{C}$ NMR (B) 결과

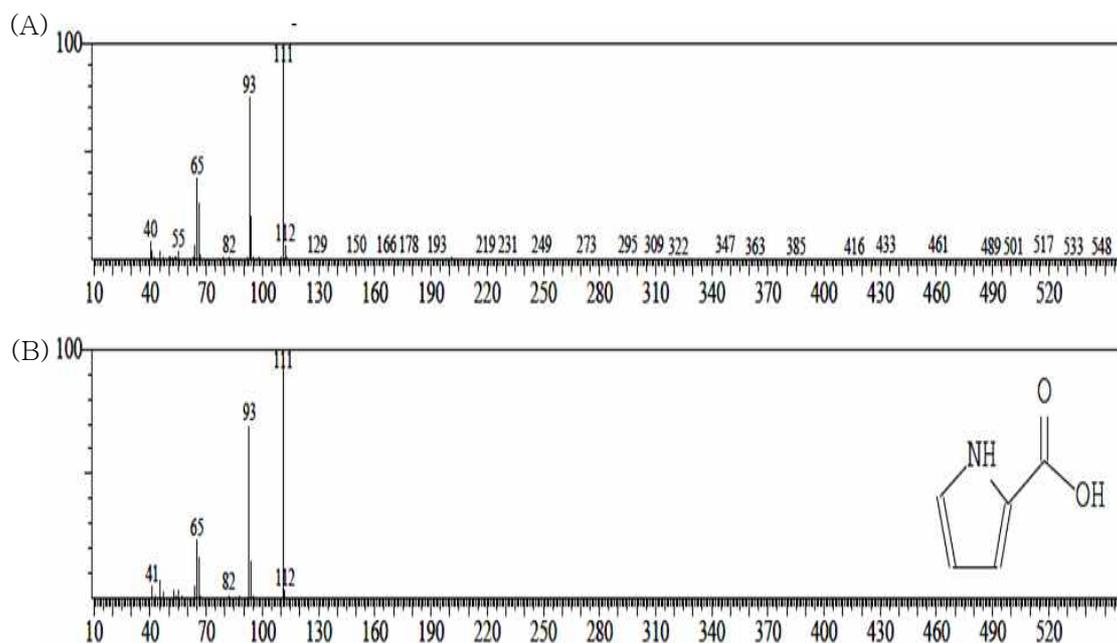


Fig. 48. 분리 및 정제된 compound의 GC-Mass 결과.

*Streptomyces griseus* H7602로부터 분리한 compound (A) and  $^1\text{H}$ -pyrrole-2-carboxylic acid (B).

### (3) $^1\text{H}$ -pyrrole-2-carboxylic acid 항균활성

분리 정제된  $^1\text{H}$ -pyrrole-2-carboxylic acid를 *P. capsici* 균사에 200 ppm 농도로 처리한 결과로 Fig. 49과 같이 무처리구에 비해 균사가 파괴 되어진 것이 관찰 되었다.

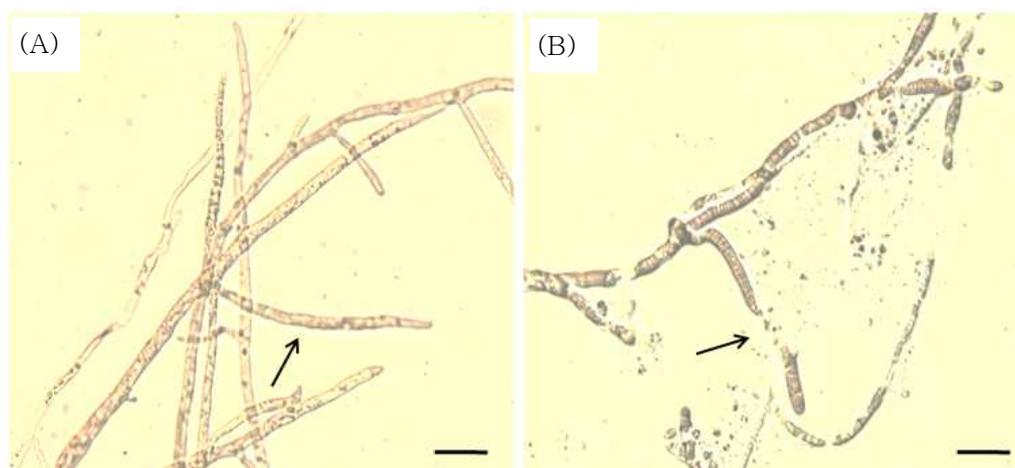


Fig. 49. 분리 및 정제된  $^1\text{H}$ -pyrrole-2-carboxylic acid 의 항균 활성.

(A) 무처리, (B) 200ppm 처리. Magnification bar is 10  $\mu\text{m}$ .

다. 고추작물 포트 실험

*Streptomyces griseus* H7602를 이용한 고추작물 실험을 위해 포트(600 cm<sup>3</sup>)에 600g의 혼합토(soil: vermiculite; 2:1%, v:v)를 넣은 후 4주된 고추를 옮겨 심은 후 2, 3, 4, 5주째에 설계된 각각의 처리구 별로 포트당 50 ml씩 처리하였다. 처리 6주째에 고추역병(*Phytophthora capsici*)균의 유주자(1.0 x 10<sup>6</sup> 유주자/ml) 50ml를 접종하였다. 병원균 접종 후 0, 3, 6, 9, 12 일 실험기간 동안 생체 및 건체중, 뿌리치사율(root mortality), 병해방제 효소(chitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase) 등을 조사하였다. 본 실험의 결과의 통계처리는 SAS 프로그램 9.1 버전 (2006)을 사용하여 5% 수준에서 Turkey's Studentized Range Test를 실시하였다.

○ 고추작물 포트 실험 처리구 설계

처리구 1 (Control): 물

처리구 2 (GC media): 젤라틴/키틴 배지

처리구 3 (Fungicide): 합성농약, 캐스팅, (주)동방아그로, 1 g/L

처리구 4 (GC+H7062): 젤라틴/키틴 배지 + 미생물(*Streptomyces griseus* H7602)

\* GC media 조성: 계겉질분말: 0.1%, 젤라틴: 0.1%, 복합비료: 0.3%, 설탕: 0.3%, FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.003%, Yeast extract: 0.003%.



Fig. 50. 포트 실험 모습

(1) Root mortality 조사

고추작물의 뿌리 치사율 (root mortality)을 조사하기위해 병원균(*Phytophthora capsici* zoospore) 감염 직후부터 12일까지 측정 하였다. 조사결과 병원균 감염 후 시간이 지남에 따라 모든 처리구에서 뿌리 치사율은 증가하였으나, 처리구간 차이를 보였다. 마지막 12일

째에서 보는바와 같이 GC+H7062 처리구가 가장 낮았으며, Fungicide, GC media, Control 순으로 조사되었다. 결과적으로 GC+H7062가 뿌리 치사를 억제 하는데 상당한 효과가 있는 것으로 사료되었다 (Fig. 51).

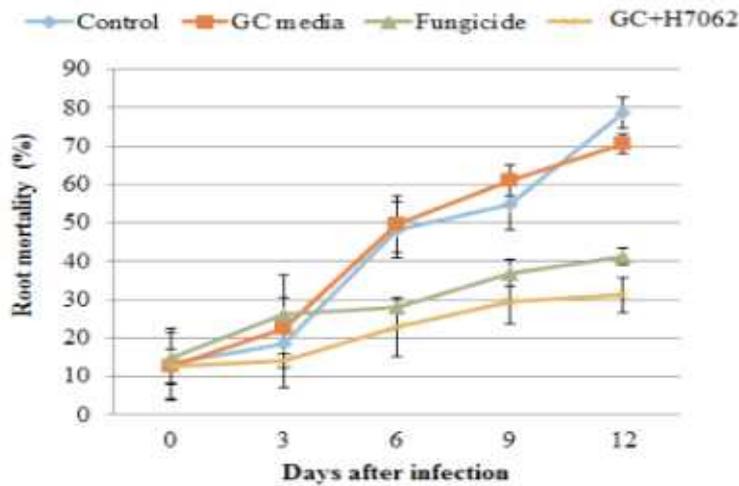


Fig. 51. 날짜에 따른 처리구별 고추 뿌리 치사율.

Control: 물, GC media: 젤라틴/키틴 배지, Fungicide: 합성농약, GC+H7062: 젤라틴/키틴 배지+미생물.

(2) 병심각도 조사

조사 결과 Fig. 52에서 보는 바와 같이 3일째까지는 모든 처리구간 통계적 유의성이 없었지만, 9일째부터 12일째까지 Control 및 GC media와 Fungicide 및 GC+H7062 간의 유의성을 보였다. Fungicide와 GC+H7062 간의 유의성은 없었다. GC+H7062와 Control 및 GC media간의 병 심각도의 차이는 대략 2% 정도 차이가 있는 것으로 조사되어졌다. 결과적으로 GC+H7062가 Fungicide와 통계적 차이가 없을 정도로 병 발생을 억제하는데 효과가 있는 것으로 사료되었다.

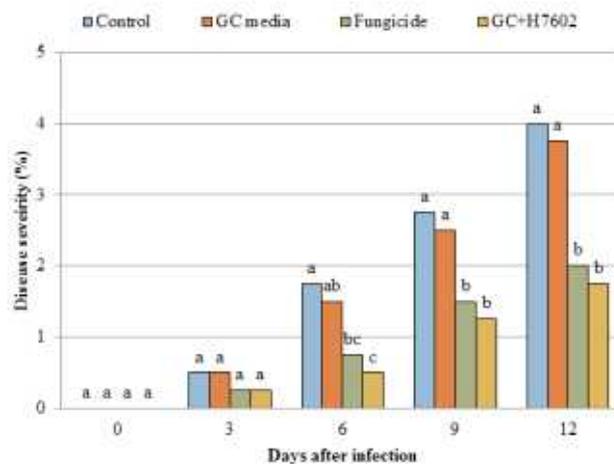


Fig. 52. 날짜에 따른 처리구별 병 심각도 조사.

Control: 물, GC media: 젤라틴/키틴 배지, Fungicide: 합성농약, GC+H7062: 젤라틴/키틴 배지+미생물.

(3) 뿌리와 상층부 생체 및 건물중 조사

고추작물의 줄기 무게는 병원균(*Phytophthora capsici zoospore*) 감염 직후부터 12일까지 측정 하였다. Fig. 53A와 B에서 보는 바와같이 12일째에 줄기 생체중은 모든 처리구 중 GC+H7062 처리구가 가장높았을뿐만아니라 통계적 유의성도 보였다. GC+H7062 처리구를 제외한 줄기 생체중은 GC media, Control, Fungicide 순으로 나타났다. 이러한 결과는 GC media 또한 양분으로서 가치가 있었을것으로 사료되며, Fungicide 처리구는 약해에 의한 영향이 있었을것으로 사료된다. 줄기 전체중에서도 생체중에서와 같은 경향을 나타내었다. 결과적으로 GC+H7062가 병을 억제하는데 효과적일 뿐만아니라 양분으로써의 가치가 있는 것으로 사료되었다.

(A) 지상부 생체중 (g)						(B) 지상부 전체중 (g)					
Treatments	Days after infection					Treatments	Days after infection				
	0	3	6	9	12		0	3	6	9	12
Control	28.39 <sup>a</sup>	28.83 <sup>b</sup>	34.13 <sup>a</sup>	33.99 <sup>ab</sup>	32.70 <sup>bc</sup>	Control	2.75 <sup>a</sup>	3.24 <sup>a</sup>	4.33 <sup>a</sup>	3.81 <sup>b</sup>	3.59 <sup>bc</sup>
GC media	30.75 <sup>a</sup>	32.85 <sup>a</sup>	35.76 <sup>a</sup>	35.62 <sup>a</sup>	34.72 <sup>b</sup>	GC media	2.98 <sup>a</sup>	3.78 <sup>a</sup>	4.45 <sup>a</sup>	4.20 <sup>ab</sup>	4.12 <sup>b</sup>
Fungicide	28.37 <sup>a</sup>	29.42 <sup>ab</sup>	31.18 <sup>a</sup>	31.25 <sup>b</sup>	30.86 <sup>c</sup>	Fungicide	2.60 <sup>a</sup>	2.77 <sup>a</sup>	3.76 <sup>a</sup>	3.51 <sup>b</sup>	3.19 <sup>c</sup>
GC+H7062	31.55 <sup>a</sup>	32.97 <sup>a</sup>	35.02 <sup>a</sup>	37.72 <sup>a</sup>	38.31 <sup>a</sup>	GC+H7062	3.14 <sup>a</sup>	3.73 <sup>a</sup>	4.88 <sup>a</sup>	5.18 <sup>a</sup>	5.38 <sup>a</sup>
LSD (0.05)	4.95	3.78	4.86	3.89	3.16	LSD (0.05)	1.03	1.43	1.43	1.04	0.89

\*Means with the same letter are not significantly different at P<0.05 when compared by LSD. Treatment means are the average of three replicates.

Fig. 53. 지상부 생체중 및 전체중. Control: 물, GC media: 젤라틴/키틴 배지, Fungicide: 합성농약, GC+H7062: 젤라틴/키틴 배지+미생물.

고추작물의 뿌리 무게는 병원균(*Phytophthora capsici zoospore*) 감염 직후부터 12일까지 측정 하였다. Fig. 54A와 B에서 보는 바와같이 12일째에 뿌리 생체중은 모든 처리구 중 GC+H7062 처리구가 가장높았을뿐만아니라 통계적 유의성도 보였다. GC+H7062 처리구를 제외한 줄기 생체중은 Fungicide, GC media, Control 순으로 나타났다. 뿌리 전체중에서도 생체중에서와 같은 경향을 나타냈다. 결과적으로 GC+H7062가 병을 억제하는데 효과적일 뿐만아니라 양분으로써의 가치가 있는 것으로 사료되었다.

(A) 뿌리 생체중 (g)						(B) 뿌리 전체중 (g)					
Treatments	Days after infection					Treatments	Days after infection				
	0	3	6	9	12		0	3	6	9	12
Control	3.43 <sup>a</sup>	3.93 <sup>b</sup>	5.02 <sup>b</sup>	4.51 <sup>c</sup>	4.08 <sup>c</sup>	Control	0.36 <sup>a</sup>	0.41 <sup>b</sup>	0.63 <sup>b</sup>	0.62 <sup>c</sup>	0.52 <sup>c</sup>
GC media	4.21 <sup>a</sup>	4.42 <sup>ab</sup>	5.63 <sup>ab</sup>	5.23 <sup>b</sup>	4.69 <sup>bc</sup>	GC media	0.54 <sup>a</sup>	0.58 <sup>ab</sup>	0.87 <sup>ab</sup>	0.73 <sup>bc</sup>	0.68 <sup>b</sup>
Fungicide	3.40 <sup>a</sup>	3.97 <sup>b</sup>	5.66 <sup>ab</sup>	5.33 <sup>b</sup>	5.23 <sup>b</sup>	Fungicide	0.38 <sup>a</sup>	0.50 <sup>ab</sup>	0.83 <sup>ab</sup>	0.78 <sup>b</sup>	0.76 <sup>b</sup>
GC+H7062	4.23 <sup>a</sup>	4.92 <sup>a</sup>	6.01 <sup>a</sup>	6.31 <sup>a</sup>	6.38 <sup>a</sup>	GC+H7062	0.55 <sup>a</sup>	0.67 <sup>a</sup>	0.92 <sup>a</sup>	0.92 <sup>a</sup>	0.93 <sup>a</sup>
LSD (0.05)	1.09	0.87	0.66	0.65	0.77	LSD (0.05)	1.20	0.21	0.27	0.13	0.12

Fig. 54. 뿌리 생체중 및 건조중.

Control: 물, GC media: 젤라틴/키틴 배지, Fungicide: 합성농약, GC+H7062: 젤라틴/키틴 배지+미생물.

(4) 잎의 chitinase and glucanase 활성조사

고추작물체 잎에서의 병해방제효소인 chitinase 활성은 GC media를 제외한 나머지 처리구에서 초기 감염부터 12일째까지 증가하였다 (Fig. 55A). 12일째 chitinase 활성은 Control, Fungicide, GC media, GC+H7062 순으로 높게 나타났다. 또한 병해방제효소인 glucanase 활성은 GC+H7062를 제외한 나머지 처리구에서 초기 감염부터 6일째까지 증가하였다가, 9일째 감소 후 12일째 최고 활성을 나타냈다. 12일째 glucanase 활성은 Control, GC media, Fungicide, GC+H7062 순으로 나타났다 (Fig. 55B).

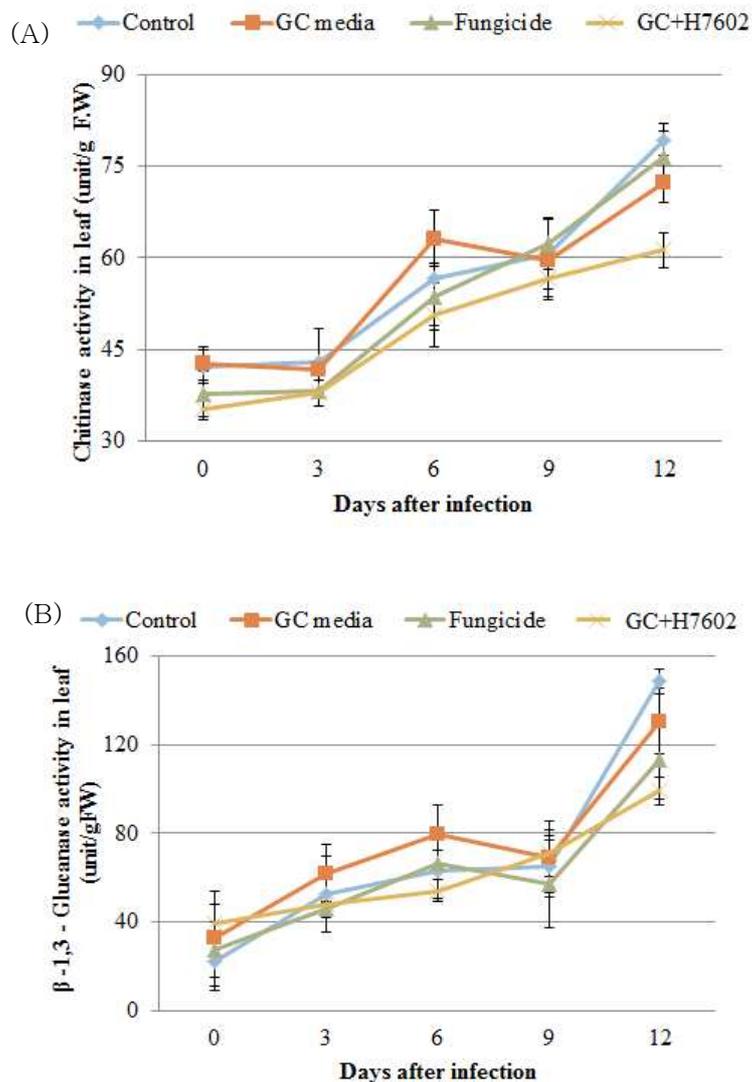


Fig. 55. 고추작물 잎의 병해방제효소(chitinase and glucanase) 활성 조사

Control: 물, GC media: 젤라틴/키틴 배지, Fungicide: 합성농약, GC+H7062: 젤라틴/키틴 배지+미생물.

(5) 뿌리의 chitinase and glucanase 활성조사

Fig. 56A에서 보는바와 같이 고추작물체 뿌리에서의 병해방제효소인 chitinase 활성은 초기 감염부터 3일째까지 모든 처리구간 큰 변동 변화가 없었으며, GC+H7062를 제외한 나머지 처리구에서 3일째 이후 활성이 낮아지다가 12일째에 초기 감염시보다 낮게 나타났다. 12일째 chitinase 활성은 GC+H7062, GC media, Fungicide, Control 순으로 높게 나타났다. 또한 뿌리에서 병해방제효소인 glucanase 활성은 Fig. 56B에서와 같이 Control과 Fungicide 처리구에서 감염시 보다 12일째 효소 활성이 낮게 나타났다. 12일째 glucanase 활성은 GC+H7062, GC media, Fungicide, Control 순으로 높게 나타났다. 결과적으로 뿌리에서의 chitinase 및 glucanase 활성이 GC+H7062 처리구에서 가장 높게 나타났고, Fig. 51과 52에서와 같이 뿌리 치사율, 병 심각도에서 다른 처리구에 비해 낮게 나타난 것으로 보아 이러한 병방제 효소의 발현이 영향을 미친 것으로 사료되었다.

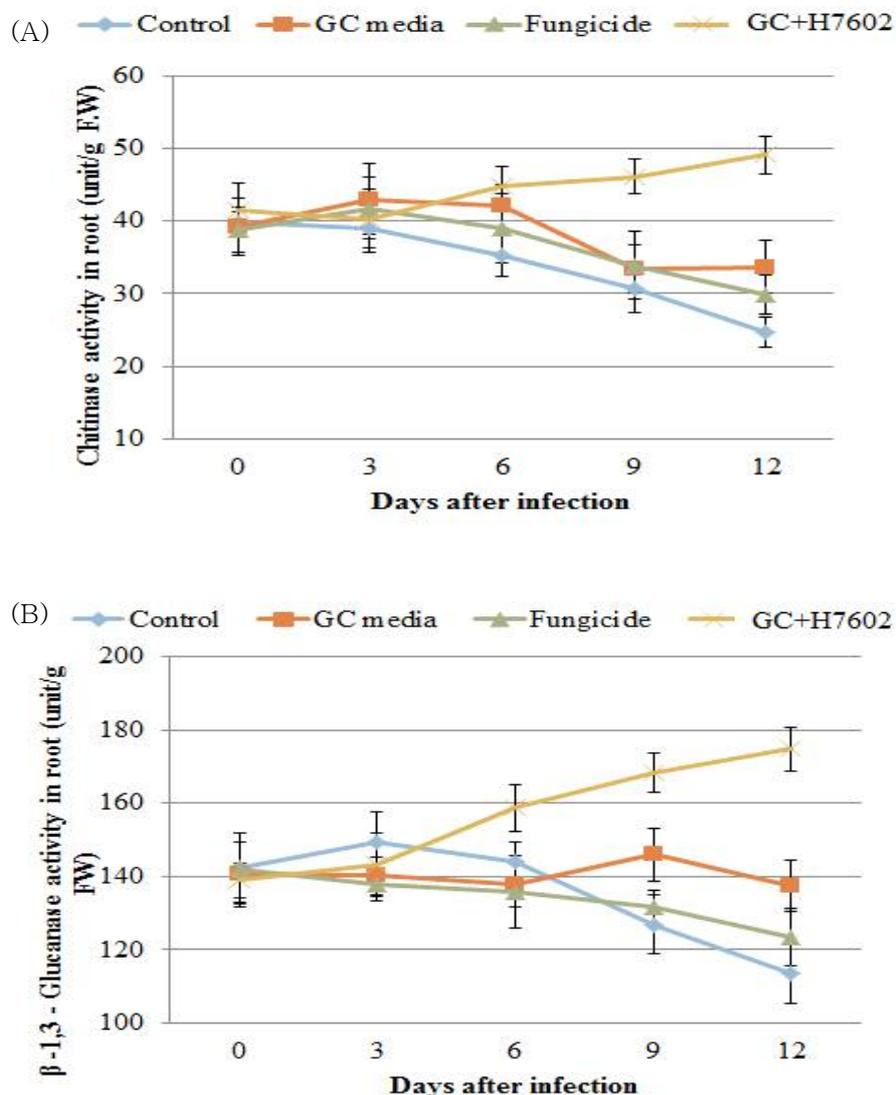


Fig. 56. 고추작물 뿌리의 병해방제 효소(chitinase and glucanase) 활성 조사

Control: 물, GC media: 젤라틴/키틴 배지, Fungicide: 합성농약, GC+H7062: 젤라틴/키틴 배지+미생물.

(6) 토양 내 chitinase and glucanase 활성조사

토양 내에서의 병해방제효소인 chitinase 활성은 초기 감염부터 6일째까지 모든 처리구간 완만한 변동폭을 가졌으며, 모든 처리구에서 12일째에 초기 감염시보다 낮은 활성을 보였다 (Fig. 57A). 12일째 chitinase 활성은 GC+H7062, GC media, Control, Fungicide 순으로 높게 나타났다. glucanase 활성 또한 초기 감염부터 9일째까지 모든 처리구간 완만한 변동폭을 가졌으며, 12일째 glucanase 활성이 초기 감염시보다 모든 처리구에서 낮았으며, GC+H7062, GC media, Fungicide, Control 순으로 높게 나타났다 (Fig. 57B). 결과적으로 토양에서의 chitinase 및 glucanase 활성이 GC+H7062 처리구에서 가장 높게 나타났고, Fig. 51과 52에서 와 같이 뿌리 치사율, 병 심각도에서 다른 처리구에 비해 낮게 나타난 것으로 보아 이러한 토양에서의 병방제 효소의 높은 활성이 영향을 미친 것으로 사료되었다.

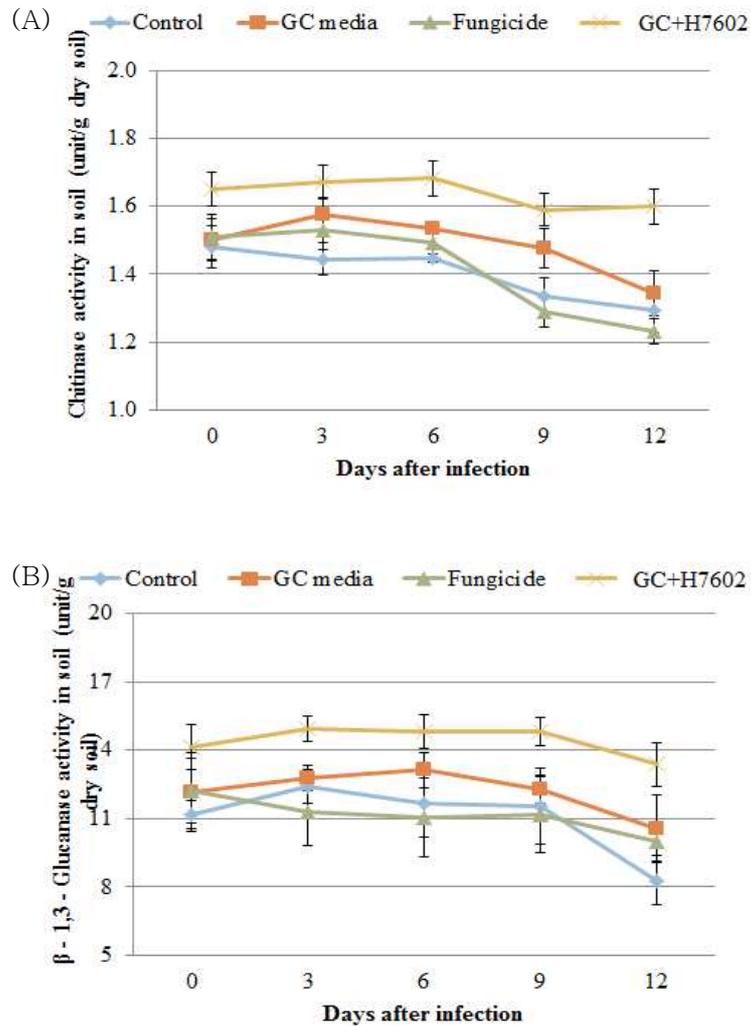


Fig. 57. 토양내 병해방제 효소 chitinase(A) 및 glucanase(B) 활성 조사

Control: 물, GC media: 젤라틴/키틴 배지, Fungicide: 합성농약, GC+H7062: 젤라틴/키틴 배지+미생물.

## 제 2 절 생초미생물 혼합액비 산업화 연구

### 1. 생초미생물 혼합액비 제조 연구

가. 생초(부숙하지 않은)와 보충양분을 이용한 생초미생물 혼합액비 제조 및 효과  
 부숙하지 않은 생초를 Table. 9와 같은 조성으로 6개의 처리구를 구성하여 기능성 미생물 (KWN38)을 접종한 후 7일간 배양(Fig. 58)하여 cellulase 활성을 조사하였다.

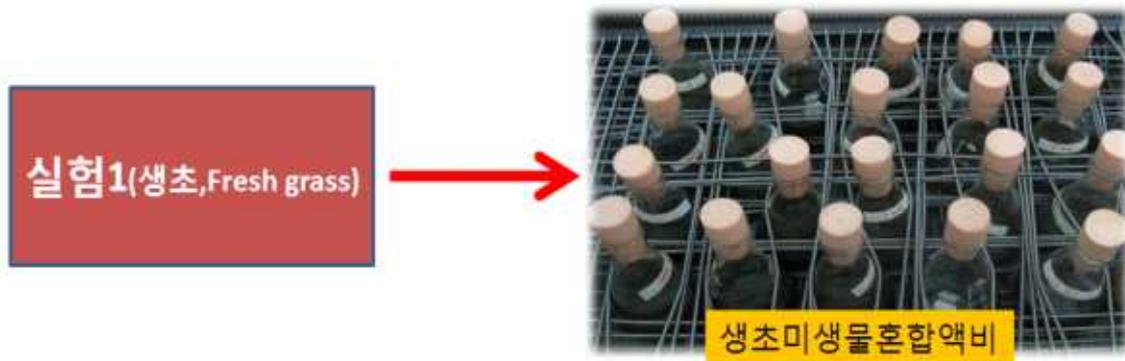


Fig. 58. 생초미생물 혼합액비 배양 모습

Table 9. 생초미생물 혼합액비 조성표

구성	처리구																	
	T1			T2			T3			T4			T5			T6		
Fertilizer recommendation (N:P:K,21:17:17, g)	Urea (N)	20% P	60% K	Urea (N)	20% P	60% K	Urea (N)	20% P	60% K	Urea (N)	20% P	60% K	Urea (N)	20% P	60% K	Urea (N)	20% P	60% K
	0.035	0.11	0.02	0.07	0.22	0.04	0.14	0.44	0.08	0.14	0.44	0.08	0.28	0.88	0.16	0.28	0.88	0.16
Grass dry wt	0.375			0.75			1.5			3			6			12		
Grass fresh wt	1.115			2.23			4.46			8.92			17.8			35.6		
Mg SO <sub>4</sub>	0.10%			0.10%			0.10%			0.10%			0.10%			0.10%		
CaCl <sub>2</sub>	0.10%			0.10%			0.10%			0.10%			0.10%			0.10%		
Yeast	0.01%			0.01%			0.01%			0.01%			0.01%			0.01%		
Distilled water	100 ml																	

(1) 생초량과 cellulase 활성에 따른 배지선택

cellulase 활성이 가장 높은 T5 처리구 조성에 Table 10과 같이 보충양분으로 미량요소 (몰리브덴, 아연), 키틴분말 및 젤라틴 분말을 각 처리구별로 그 양을 다르게 추가하여 처리구를 구성한 생초미생물혼합액비로 추후 실험을 수행하였다.

Table 10. 보충양분 추가에 따른 생초미생물혼합액비 조성표

T5배지조성표		Culture components						
Culture components	T5	Unit	T5-1	T5-2	T5-3	T5-4	T5-5	T5-6
Fertilizer recommendation (N:P:K=21:17:17)	Urea (N) 0.28, 20% P 0.88, 60% K 0.16	g	17.8	17.8	17.8	17.8	17.8	17.8
Grass dry wt	6	g						
Grass fresh wt	17.8	g						
Mg SO <sub>4</sub>	0.10%	g		0.28	0.28	0.28	0.28	0.28
CaCl <sub>2</sub>	0.10%	g		0.88	0.88	0.88	0.88	0.88
Yeast	0.01%	g		0.16	0.16	0.16	0.16	0.16
Distilled water	100 ml	g		0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
		g		0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
		g		0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
		g			0.005	0.005	0.005	0.005
		g			0.006	0.006	0.006	0.006
		g				0.1	0.09	0.08
		g					0.01	0.02
		ml	100	100	100	100	100	100

(2) 배지조성에 따른 부탄올 추출물 항균활성 조사

생초미생물혼합액비 I 를 7일간 배양한 후 상등액을 부탄올로 추출하여 감압 농축하고 paper disc법으로 *R. solani* AG-1(IA), *F. oxysporum*, *P. capsici*와 같은 식물성 병원균을 대상으로 항균활성을 측정하였다.

(가) *R. solani* AG-1(IA)에 대한 부탄올추출물의 항균활성 측정

*R. solani* AG-1(IA)를 대상으로 항균활성을 측정한 결과 대조구 C(butanol)에 비해 생초미생물혼합액비 I 의 부탄올추출물 처리구인 S 방향으로 병원균의 균사가 더 자라지 못하였다(Fig. 59).

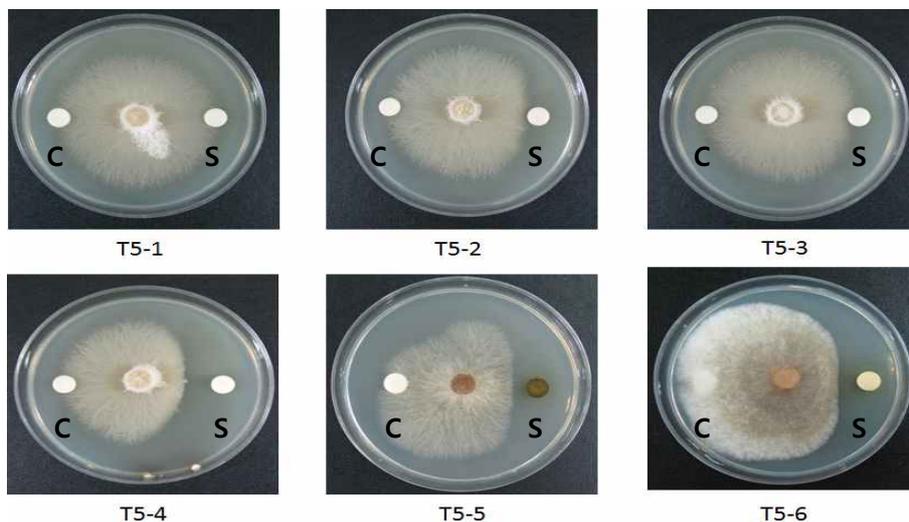


Fig. 59. *R. solani* AG-1(IA)에 대한 부탄올추출물의 항균 활성 ( C : 대조구(부탄올), S : 생초미생물혼합액비 I 부탄올 추출물 )

(나) *F. oxysporum* 에 대한 부탄올추출물의 항균활성 측정

*F. oxysporum*를 대상으로 항균활성을 측정한 결과 대조구 C(butanol 처리)에 비해 생초미생물혼합액비 I의 부탄올추출물 처리구인 S 방향으로 병원균의 균사가 조금 더 자라지 못하였다(Fig. 60).

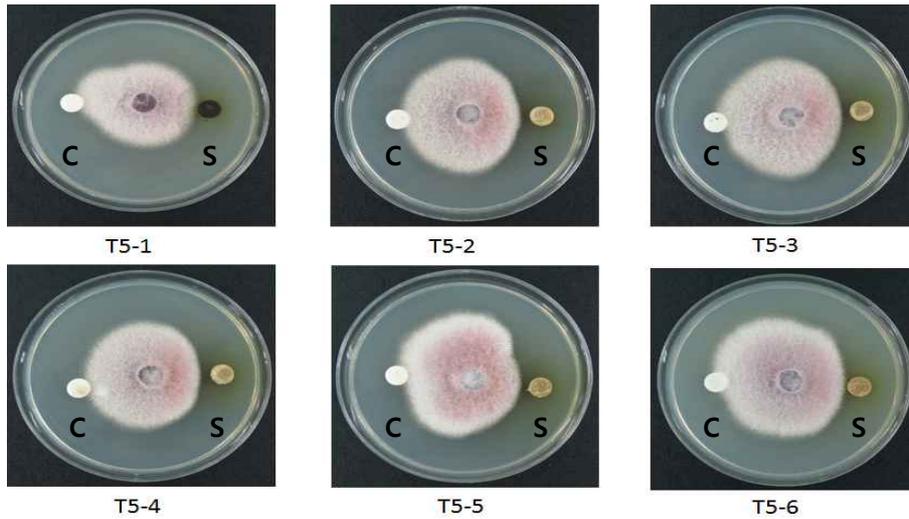


Fig. 60. *F. oxysporum* 에 대한 부탄올추출물의 항균 활성  
( C : 대조구(부탄올), S : 생초미생물혼합액비 I 부탄올 추출물 )

(다) *P. capsici* 에 대한 부탄올추출물의 항균활성 측정

*P. capsici*를 대상으로 대상으로 항균활성을 측정한 결과 대조구 C(butanol)에 비해 생초미생물혼합액비 I의 부탄올추출물 처리구인 S 방향으로 병원균의 균사가 자라지 못하였다(Fig. 61).

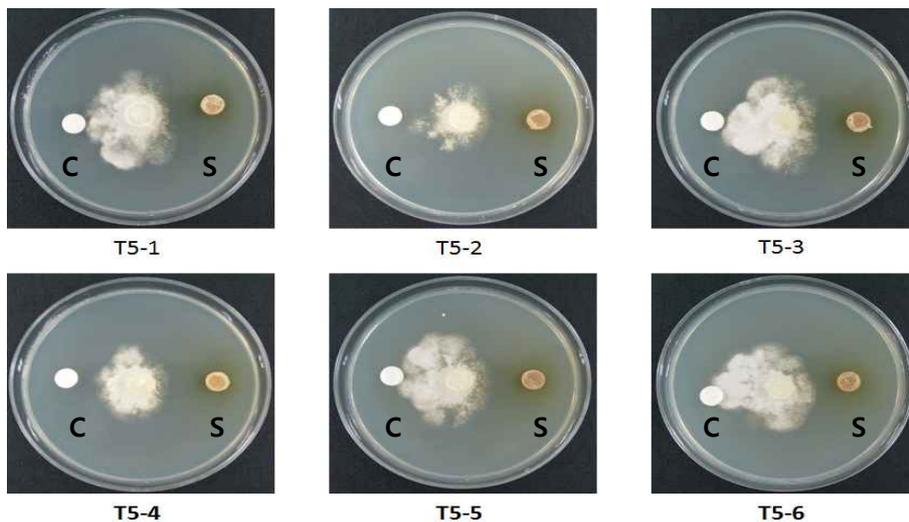


Fig 61. *P. capsici* 에 대한 부탄올추출물의 항균 활성  
( C : 대조구(부탄올), S : 생초미생물혼합액비 I 부탄올 추출물 )

(라) 부탄올추출물의 항균 능력 조사 결과

생초미생물혼합액비 I 를 7일간 배양한 후 원심분리하고 상등액을 부탄올로 추출하여 감압 농축하고 paper disc법으로 *R. solani* AG-1(IA), *F. oxysporum*, *P. capsici* 식물성 병원균을 대상으로 각 병원균의 균사생장 억제율에 따른 항균활성을 측정된 결과는 Fig. 62과 같았다.

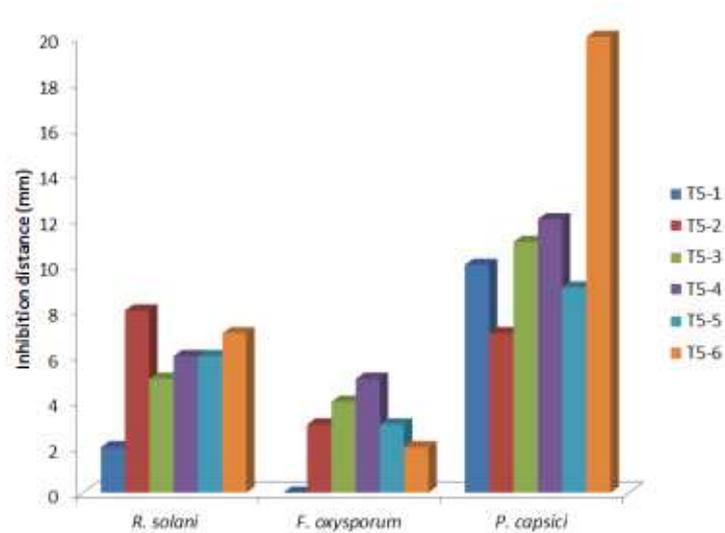


Fig 62. butanol 추출물의 병원성 곰팡이 생장억제

(3) 배지조성에 따른 효소활성 조사

보충양분 양에 따른 다양한 효소의 활성을 측정된 결과 chitinase와  $\beta$ -1,3-glucanase의 경우는 처리구간 거의 차이가 나타나지 않았으며(Fig. 63, 64), protease의 경우는 T5-6처리구에서 배양 3일째에 다른 처리구에 비해 높은 활성을 나타낸 후 감소하였고 다른 처리구들은 비슷한 결과를 나타내었다(Fig. 65).

□ chitinase 활성측정

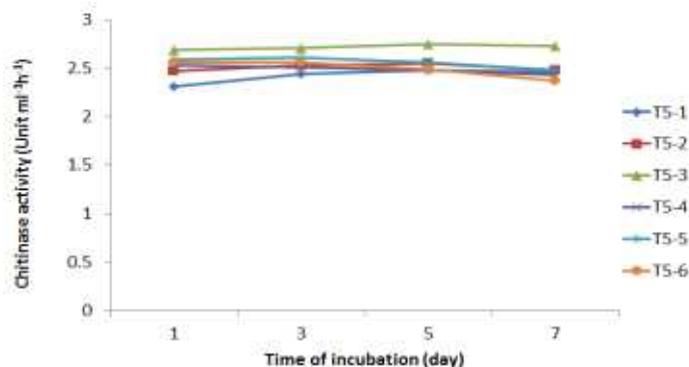


Fig. 63. 생초와 보충양분 양에 따른 chitinase 활성

□  $\beta$ -1,3-glucanase 활성측정

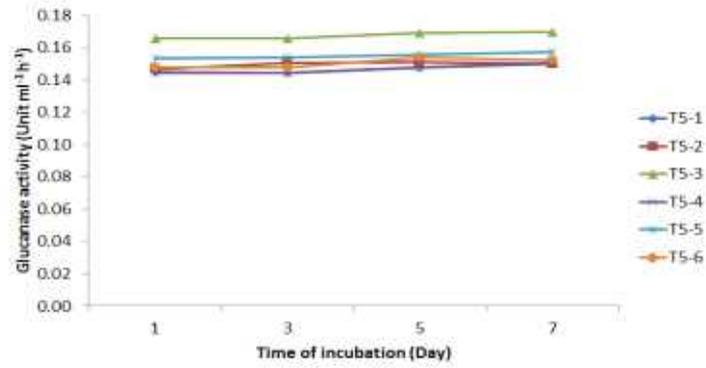


Fig. 64. 생초와 보충양분 양에 따른  $\beta$ -1,3-glucanase 활성

□ protease 활성 측정

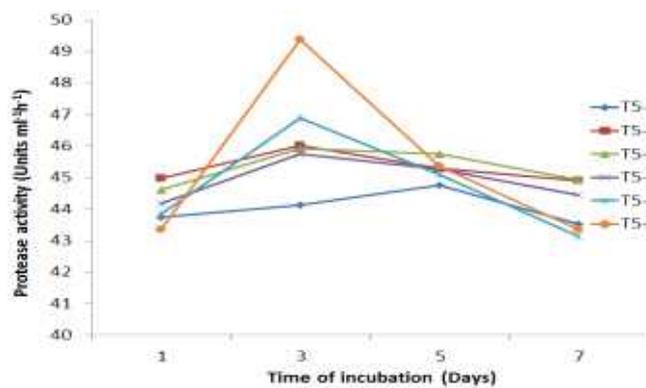


Fig. 65. 생초와 보충양분 양에 따른 protease 활성

(4) 배지조성에 따른 IAA 측정

보충양분 양에 따른 생초미생물혼합액비 I의 식물생장호르몬을 HPLC를 이용하여 측정한 결과 각 처리구에서 IAA의 전구체인 IAM(Indole-3-acetamide)을 소량 분비함을 확인할 수 있었다(Fig. 66).

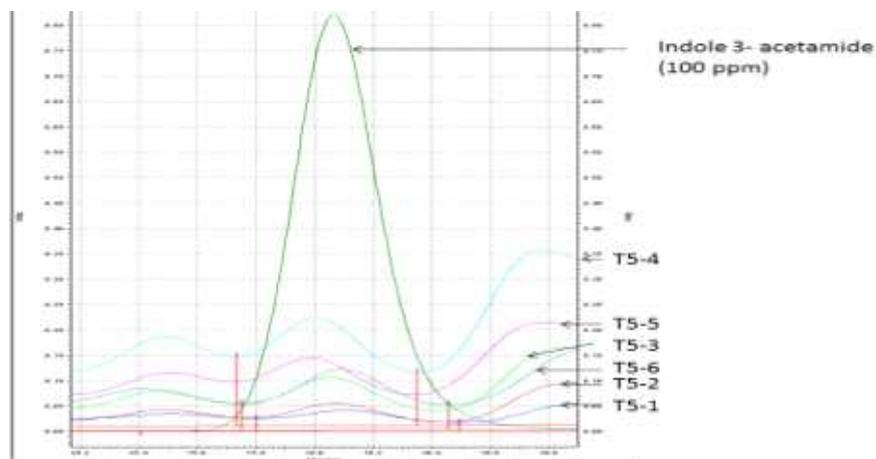


Fig. 66. HPLC 크로마토그램을 이용한 생초미생물혼합액비 I 내의 IAM 확인

(5) 배지조성에 따른 양분 및 생초분해율 측정

보충양분 양에 따른 양분특성을 조사한 결과 각 처리구별로 큰 차이가 나타나진 않았다 (Table. 11).

Table 11. 보충양분 양에 따른 양분특성 조사 결과

처리구	T-N	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	K <sub>2</sub> O	CaO	MgO	B <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	MnO	Zn	Mo	Cu	Fe
(단위)	%						ppm				
T5-1	0.1	0.05	0.15	0.02	0.02	0.02	5.8	2.0	0.7	9.2	143.3
T5-2	0.2	0.16	0.24	0.13	0.06	0.03	7.7	8.5	0.3	12.1	223.9
T5-3	0.3	0.16	0.21	0.12	0.04	0.06	6.6	15.9	16.5	8.2	116.9
T5-4	0.4	0.25	0.24	0.23	0.08	0.05	10.6	18.0	18.1	7.1	239.5
T5-5	0.4	0.15	0.21	0.13	0.05	0.05	5.8	17.2	16.9	9.4	148.6
T5-6	0.3	0.16	0.21	0.13	0.05	0.04	7.0	17.4	17.0	6.4	165.2

나. 생초(부숙된)와 보충양분을 이용한 생초미생물 혼합액비 제조 및 효과

생초미생물혼합액비과 같은 조성의 시료를 2개월간 부숙시킨 후(부숙일시 : 2011년 11월 02부터 2012년 01월 02일) 그 중 퇴비 4(COM T4)와 퇴비 5(COM T5)에 Table. 12와 같이 보충양분으로 미량요소(몰리브덴, 아연), 키틴분말 및 젤라틴 분말을 각 처리구별로 그 양을 다르게 추가하여 처리구를 구성한 후 기능성 미생물(KWN38)을 접종한 생초미생물혼합액비 II를 대상으로 각 특성을 조사하였다.

Table 12. 보충양분 추가에 따른 생초미생물혼합액비 II 조성표

Name	Unit	T4-a	T4-b	생초미생물퇴비						Name	Unit	T5-a	T5-b	T5-c	T5-d	T5-e			
				COM T4			COM T5												
				Urea (N)	20% P	60% K	Urea (N)	20% P	60% K										
Grass (FW)	g	8.9	8.9	0.14	0.44	0.08	0.28	0.88	0.16	Grass (FW)	g	17.8	17.8	17.8	17.8	17.8			
Sodium Molybdate	g	0.005	0.005	Grass dry wt			3			6			Sodium Molybdate	g	0.005	0.005	0.005	0.005	
Zinc Sulfate	g	0.006	0.006	Grass fresh wt			8.92			17.8			Zinc Sulfate	g	0.006	0.006	0.006	0.006	
Chitin powder	g	0.09	0.08	Mg SO <sub>4</sub>			0.10%			0.10%			Chitin powder	g			0.1	0.09	0.08
Gelatin powder	g	0.01	0.02	CaCl <sub>2</sub>			0.10%			0.10%			Gelatin powder	g				0.01	0.02
Distilled water	ml	100	100	Yeast			0.01%			0.01%			Distilled water	ml	100	100	100	100	100

(1) 배지조성에 따른 cellulase 활성 조사

보충양분 양에 따른 생초미생물혼합액비II의 cellulase 활성 변화를 측정한 결과 T5처리구의 활성이 T4의 활성에 비해 높았으며 T5의 cellulase 활성은 대부분 3일째에 활성이 가장 높고(T5-d를 제외) 급격히 감소하였다(Fig. 67).

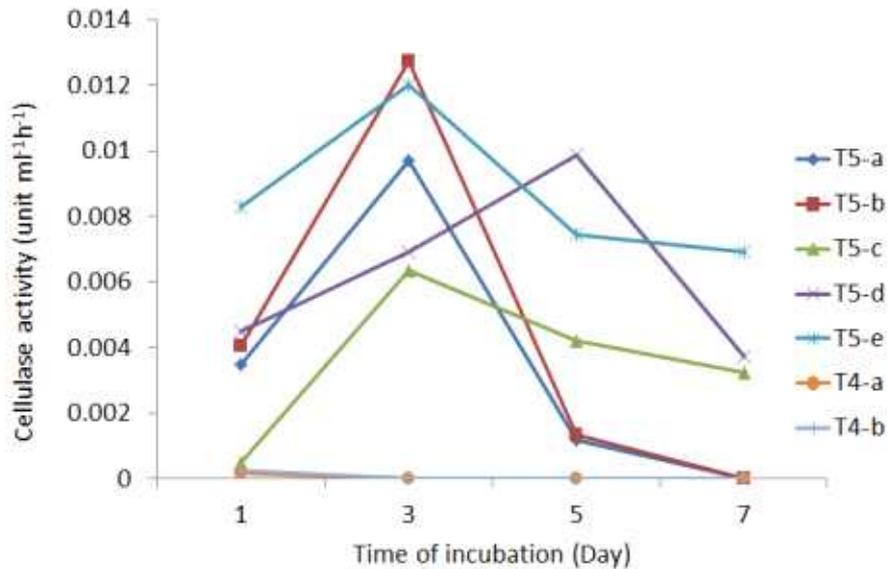


Fig. 67. 보충양분 양에 따른 생초미생물혼합액비II cellulase 활성 변화

(2) 배지조성에 따른 부탄올 추출물 항균활성 조사

생초미생물혼합액비II를 7일간 배양한 후 상등액을 부탄올로 추출하여 감압 농축하고 paper disc법으로 *R. solani* AG-1(IA), *F. oxysporum*, *P. capsici* 식물성 병원균을 대상으로 항균활성을 측정하였다.

□ *R. solani* AG-1(IA)에 대한 부탄올추출물의 항균활성 측정

*R. solani* AG-1(IA)를 대상으로 항균활성을 측정한 결과 처리구간 억제율에 약간의 차이는 있었지만 전체적으로 대조구(부탄올 처리)인 C에 비해 생초미생물혼합액비II의 부탄올추출물 처리구(S) 방향으로 병원균의 균사가 자라지 못하고 생장이 억제됨을 확인하였다(Fig. 68).

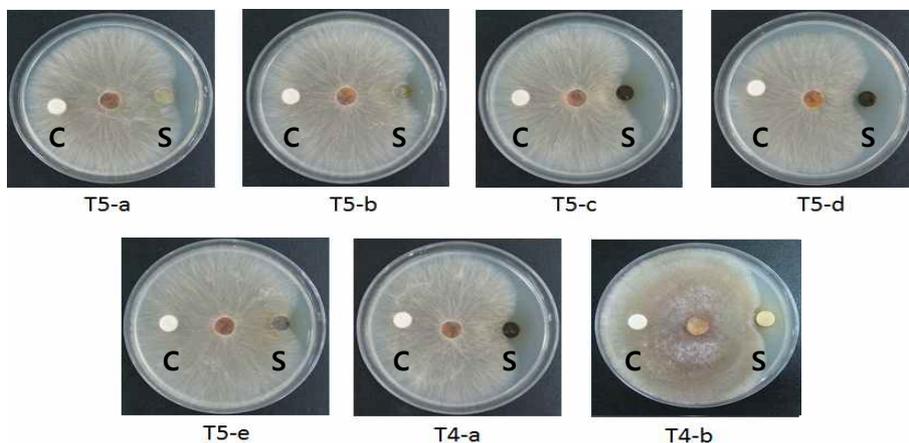


Fig. 68. *R. solani* AG-1(IA)에 대한 부탄올추출물의 항균 활성. ( C : 대조구(부탄올처리), S : 생초미생물혼합액비Ⅱ 부탄올 추출물 )

□ *F. oxysporum* 에 대한 부탄올추출물의 항균활성 측정

*F. oxysporum* 를 대상으로 항균활성을 측정한 결과 T5-a,c,e와 T4-b처리구에서 대조구인 C에 비해 생초미생물혼합액비Ⅱ의 부탄올추출물 처리구(S) 방향으로 병원균의 균사가 자라지 못하고 생장이 억제됨을 확인하였다(Fig. 69).

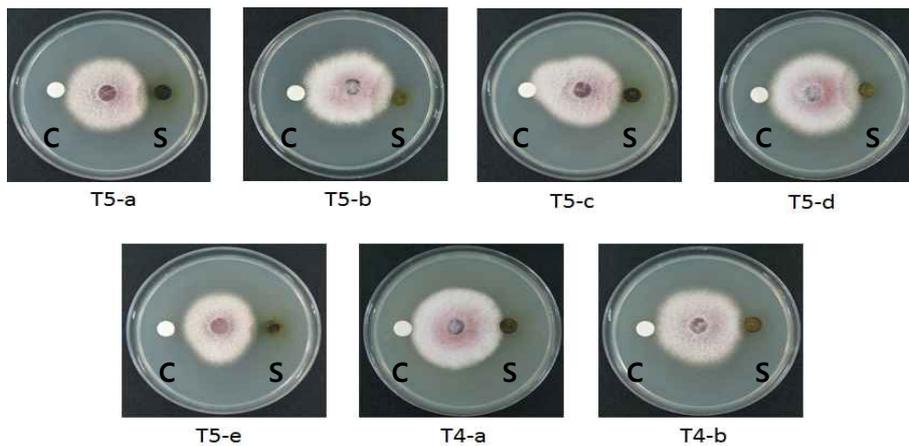


Fig. 69. *F. oxysporum* 에 대한 부탄올추출물의 항균 활성 ( C : 대조구(부탄올), S : 생초미생물혼합액비Ⅱ 부탄올 추출물 )

□ *P. capsici* 에 대한 부탄올추출물의 항균활성 측정

*P. capsici*를 대상으로 항균활성을 측정한 결과 대조구(C)에 비해 생초미생물혼합액비Ⅱ의 부탄올추출물 처리구(S)방향으로 병원균의 균사가 자라지 못하였다(Fig. 70).

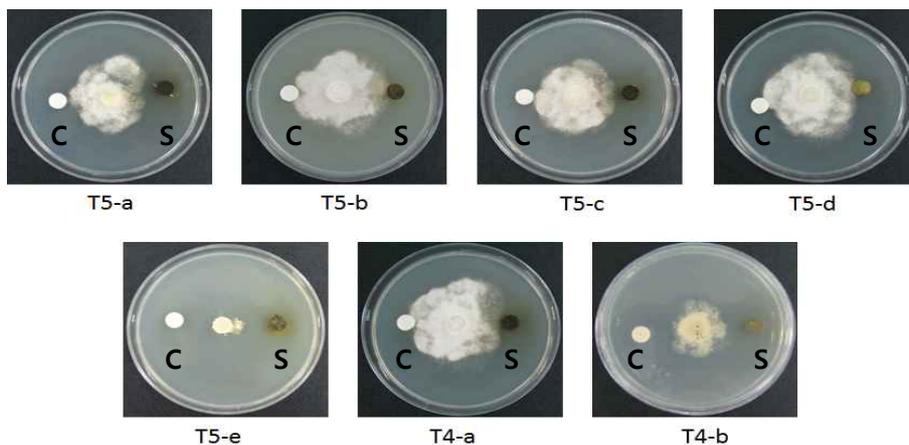


Fig. 70. *P. capsici* 에 대한 부탄올추출물의 항균 활성 ( C : 대조구(부탄올), S : 생초미생물혼합액비Ⅱ 부탄올 추출물 )

□ 부탄올추출물의 항균 능력 조사 결과

생초미생물혼합액비Ⅱ에 기능성 미생물을 접종하여 7일간 배양한 후 상등액을 부탄올

로 추출하여 감압 농축하고 paper disc법으로 식물성 병원균(*R. solani* AG-1(IA), *F. oxysporum*, *P. capsici*)을 대상으로 균사생장 억제율을 통한 항균활성을 측정한 결과는 Fig. 71와 같다. 다른 병원균에 비해 *P. capsici*에 대한 억제 활성이 높았으며 처리구 중 T5-e처리구가 항균활성 면에서 다른 처리구에 비해 나은 결과를 보였다.

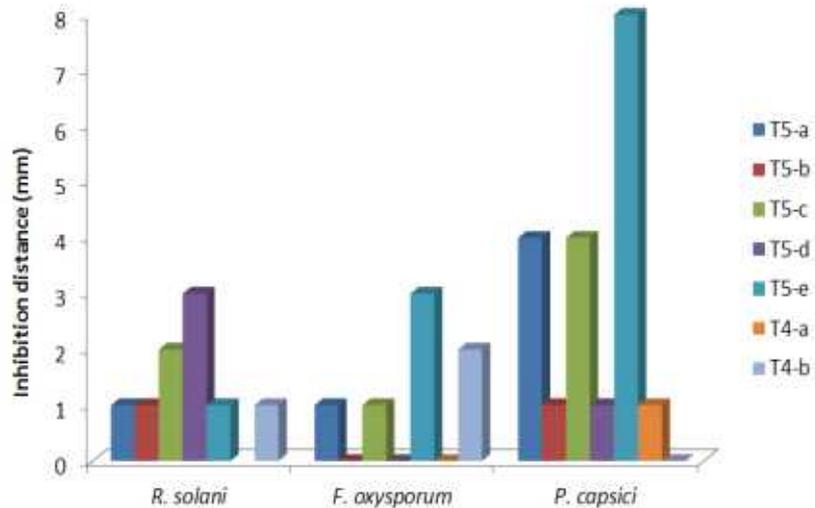


Fig. 71. butanol 추출물의 병원성 곰팡이 생장억제

### (3) 배지조성에 따른 효소활성 조사

보충양분 양에 따른 다양한 효소의 활성을 측정된 결과 chitinase 활성은 T4와 T5의 차이 외에 각 처리구내에 큰 차이를 보이진 않았고(Fig. 72)  $\beta$ -1,3-glucanase 활성은 T4의 활성은 시간이 지날수록 점진적으로 계속 증가하는데 비해 T5처리구는 5일째까지 증가하다가 이후로 감소하는 경향을 보이긴했으나 처리구간 거의 차이가 나타나지 않았으며(Fig. 73) protease의 활성은 5일째까지 처리구간 활성이 거의 비슷하다가 5일 이후에 T5-e, T4-a 처리구의 활성이 급격히 증가하였다(Fig. 74).

#### □ chitinase 활성측정

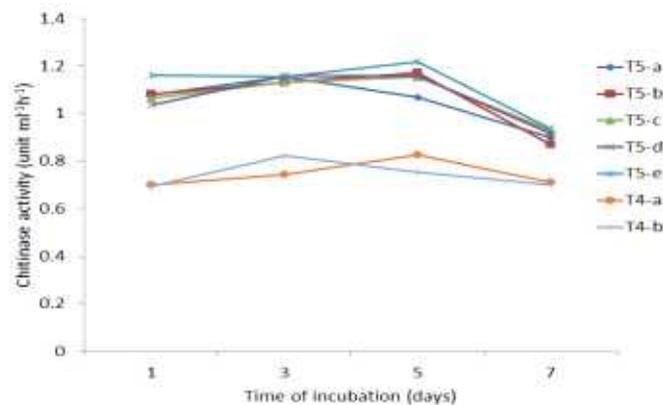


Fig. 72. 생초미생물혼합액비II와 보충양분 양에 따른 chitinase 활성

□  $\beta$ -1,3-glucanase 활성측정

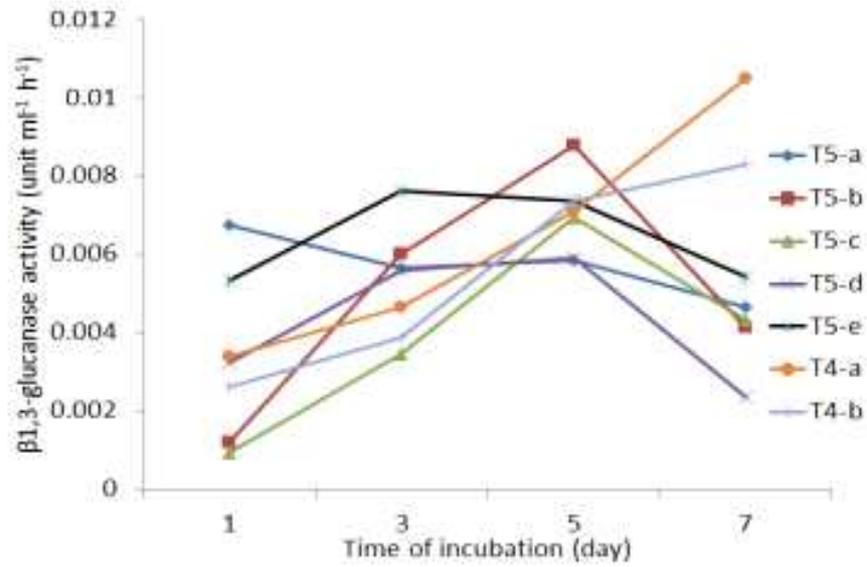


Fig. 73. 생초미생물혼합액비II와 보충양분 양에 따른  $\beta$ -1,3-glucanase 활성

□ protease 활성측정

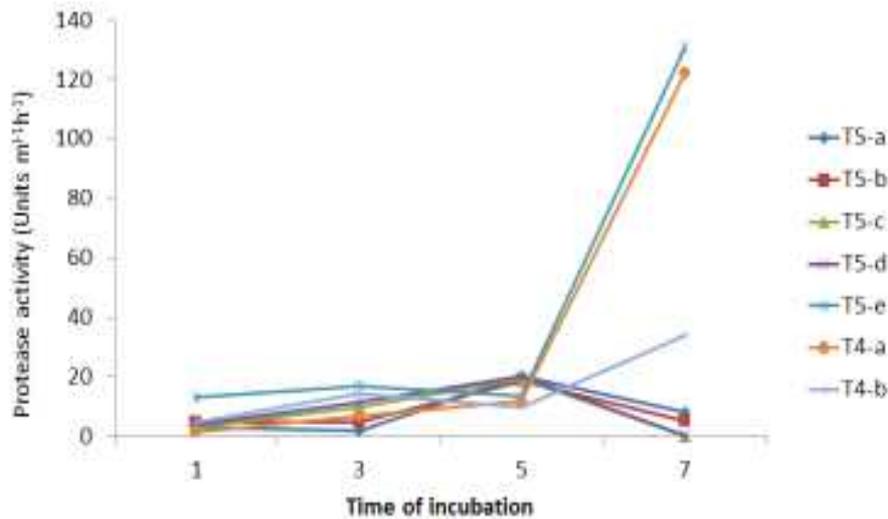


Fig. 74. 생초미생물혼합액비II와 보충양분 양에 따른 protease 활성

(4) 배지조성에 따른 IAA 측정

보충양분 양에 따른 생초미생물혼합액비II의 IAA를 HPLC를 이용하여 측정한 결과 모든 처리구에서 IAA를 생성하지 않았다.

(5) 배지조성에 따른 양분 및 생초분해율 측정

보충양분 양에 따른 생초 분해율을 측정한 결과 첨가한 생초 양에 따른 T4와 T5의 차이 외에 각 처리구내에 큰 차이를 보이지 않았다 (Table. 13).

Table 13. 보충양분 양에 따른 생초분해율 측정 결과

처리구	유기물함량 (현물중%)
T5-대조구	2.2%
T5-a	2.0%
T5-b	2.0%
T5-c	2.3%
T5-d	2.2%
T5-e	2.5%
T4-대조구	1.2%
T4-a	1.2%
T4-b	1.0%

보충양분 양에 따른 양분특성을 조사한 결과 각 처리구별로 큰 차이를 나타내지 않았다 (Table. 14).

Table 14. 보충양분 양에 따른 양분특성 조사 결과

처리구	T-N	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	K <sub>2</sub> O	CaO	MgO	B <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	MnO	Zn	Mo	Cu	Fe
(단위)	%						ppm				
T5-a	0.2	0.16	0.24	0.08	0.07	0.02	4.6	1.2	0.5	9.8	98.3
T5-b	0.2	0.14	0.26	0.07	0.06	0.04	4.8	18.8	17.4	9.0	73.0
T5-c	0.2	0.16	0.23	0.10	0.07	0.02	5.0	14.8	17.5	7.1	121.1
T5-d	0.2	0.17	0.26	0.12	0.08	0.03	5.5	16.3	18.1	7.8	103.2
T5-e	0.2	0.15	0.25	0.09	0.07	0.05	9.5	16.9	19.5	7.5	93.6
T4-a	0.1	0.11	0.17	0.10	0.05	0.02	3.4	16.1	18.9	9.1	59.0
T4-b	0.1	0.09	0.16	0.07	0.04	0.05	4.8	15.9	19.5	10.6	100.5

(6) 온도별 cellulase 활성 조사

cellulase 활성은 온도에 따른 차이를 보이지 않았다(Fig. 75).

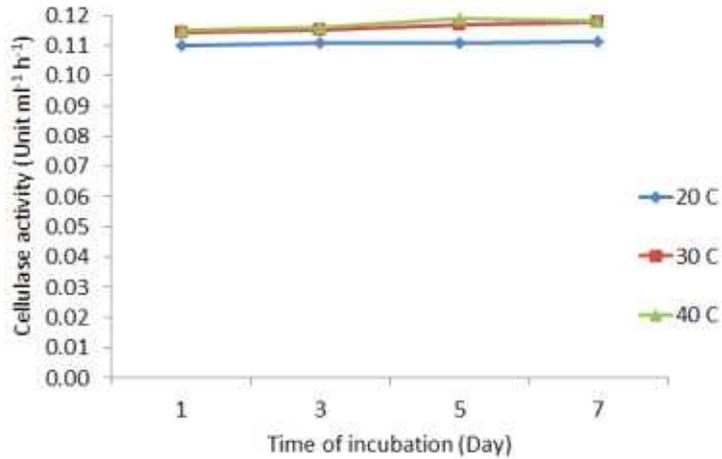


Fig. 75. 온도에 따른 cellulase 활성 변화

(7) 온도별 부탄올 추출물 항균활성 조사

생초미생물혼합액비II(T5-e)에 기능성 미생물을 접종하여 배양온도를 20°C, 30°C, 40°C로 다르게 7일간 배양한 후 상등액을 부탄올로 추출하여 감압 농축하고 paper disc법으로 *R. solani* AG-1(IA), *F. oxysporum*, *P. capsici* 와 같은 식물성 병원균을 대상으로 항균활성을 측정하였다.

□ *R. solani* AG-1(IA)에 대한 부탄올추출물의 항균활성 측정

*R. solani* AG-1(IA)를 대상으로 항균활성을 측정한 결과 기능성미생물을 접종하지 않은 control에 비해 기능성미생물(KWN38)을 접종한 처리구에서 항균활성을 보였으며 특히 기능성미생물을 접종하여 30°C에서 배양한 처리구에서 뛰어난 항균활성을 보였다 (Fig. 76).

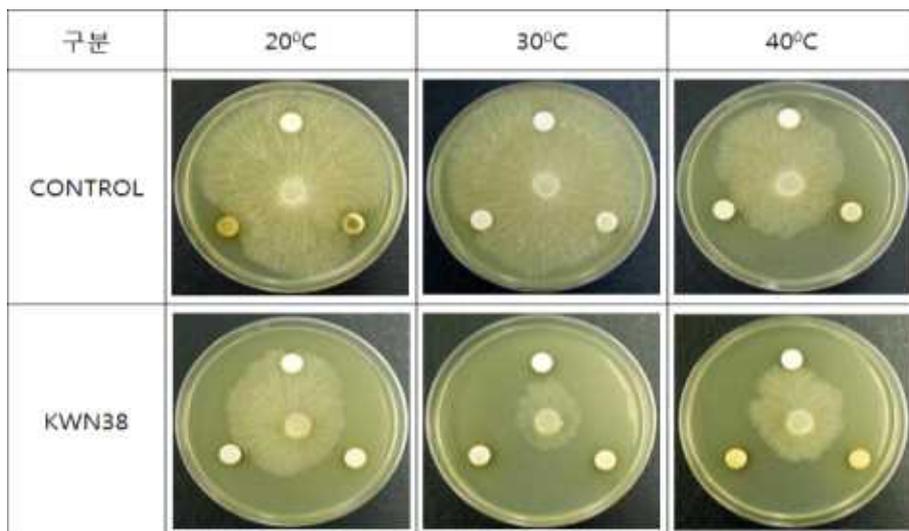


Fig.76. *R. solani* AG-1(IA)에 대한 부탄올추출물의 항균 활성

□ *F. oxysporum* 에 대한 부탄올추출물의 항균활성 측정

*F. oxysporum*를 대상으로 항균활성을 측정한 결과 전체적으로 기능성미생물을 접종하

지 않은 control에 비해 기능성미생물(KWN38)을 접종한 처리구에서 항균활성을 보였으며 배양온도에 따른 차이는 보이지 않았다(Fig. 77).

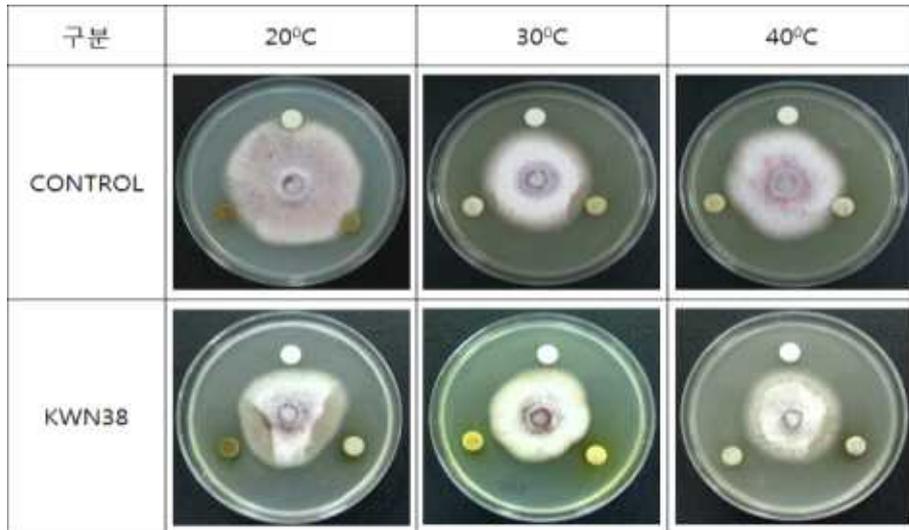


Fig. 77. *F. oxysporum*에 대한 부탄올추출물의 항균 활성

□ *P. capsici* 에 대한 부탄올추출물의 항균활성 측정

*P. capsici*를 대상으로 항균활성을 측정한 결과 기능성미생물을 접종하지 않은 control에 비해 기능성미생물(KWN38)을 접종한 처리구에서 항균활성을 보였으며 특히 기능성미생물을 접종하여 30°C에서 배양한 처리구에서 뛰어난 항균활성을 보였다(Fig. 78).

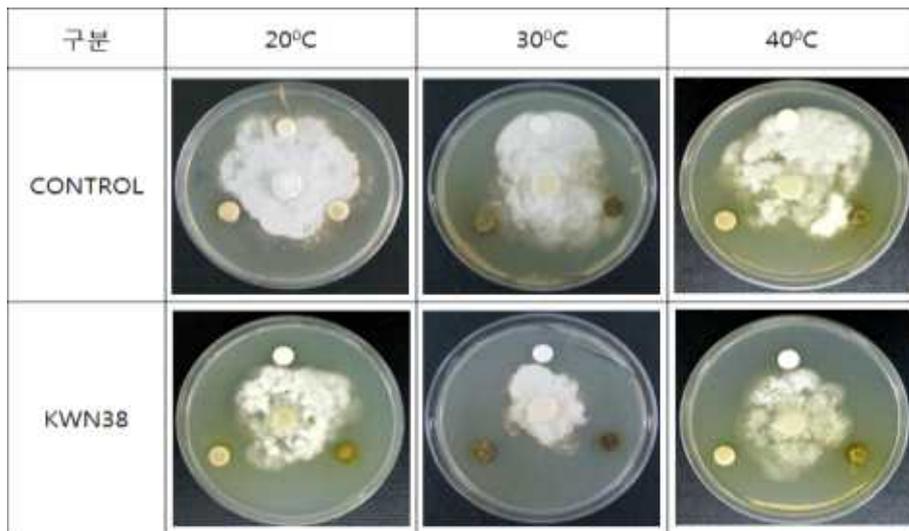


Fig. 78. *P. capsici*에 대한 부탄올추출물의 항균 활성

□ 부탄올추출물의 항균 능력 조사 결과

생초미생물혼합액비II(T5-e)에 기능성 미생물을 접종하여 배양온도를 20°C, 30°C, 40°C로 다르게 7일간 배양한 후 상등액을 부탄올로 추출하여 감압 농축하고 paper disc법으로 식물성 병원균(*R. solani* AG-1(IA), *F. oxysporum*, *P. capsici*)을 대상으로 균사생장 억제율을 통한 항균활성을 측정한 결과는 Fig. 38과 같다. *R. solani* AG-1(IA)와 *P. capsici*에 처리한 결과 30°C에서 배양한 처리구가 가장 좋은 억제율을 보였고 *F.*

*oxysporum*의 경우 또한 온도에 따른 뚜렷한 차이를 나타내지 않았지만 30℃에서 배양한 처리구가 가장 좋은 억제율을 보였다.

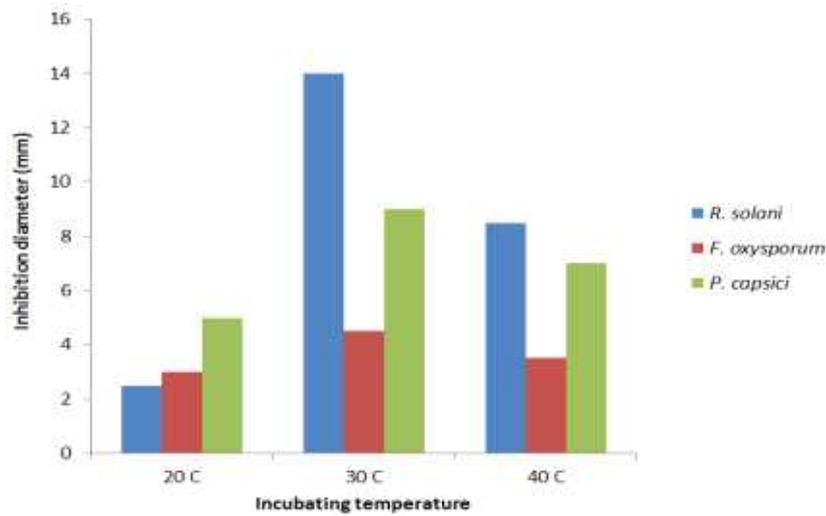


Fig. 79. 배양온도 차이에 따른 butanol 추출물의 병원성 곰팡이 성장억제 효과

(8) 온도별 IAA 측정

온도에 따른 IAA 생성 여부를 HPLC를 이용하여 측정한 결과 모든 처리구에서 IAA를 생성하지 않았다.

(9) 온도별 양분 및 생초분해율 측정

온도에 따른 생초 분해율을 측정한 결과 기능성미생물(KWN38)을 접종하여 30℃에서 배양한 처리구에서 가장 낮은 유기물함량을 보여 30℃에서 배양하는 것이 생초 분해율 측면에서 효과적이라고 판단되었다(Table. 15).

Table 15. 온도에 따른 생초분해율 측정 결과

처리구		유기물함량 (현물중%)
20℃	생초미생물혼합액비	1.1%
	생초미생물혼합액비+KWN38	0.8%
30℃	생초미생물혼합액비	0.6%
	생초미생물혼합액비+KWN38	0.5%
40℃	생초미생물혼합액비	1.6%
	생초미생물혼합액비+KWN38	1.1%

온도에 따른 양분특성을 조사한 결과 각 배양 온도별로 큰 차이를 나타내지 않았다

(Table. 16).

Table 16. 온도에 따른 양분특성 조사 결과

처리구		T-N	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	K <sub>2</sub> O	CaO	MgO	B <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	MnO	Zn	Mo	Cu	Fe	
(단위)		%						ppm					
20 <sup>°</sup> C	생초미생물 혼합액비	0.2	0.06	0.28	0.03	0.02	0.01	3.1	13.3	18.0	4.6	62.9	
	생초미생물 혼합액비 +KWN38	0.2	0.03	0.28	0.01	0.00	0.03	1.0	9.7	18.9	2.9	13.8	
30 <sup>°</sup> C	생초미생물 혼합액비	0.2	0.09	0.27	0.06	0.03	0.01	3.5	15.2	17.9	4.7	41.6	
	생초미생물 혼합액비 +KWN38	0.2	0.09	0.28	0.05	0.03	0.01	3.0	15.0	18.4	3.7	31.7	
40 <sup>°</sup> C	생초미생물 혼합액비	0.3	0.15	0.31	0.10	0.06	0.01	4.8	15.3	17.9	2.9	74.4	
	생초미생물 혼합액비 +KWN38	0.3	0.11	0.29	0.07	0.04	0.01	3.7	14.6	18.4	3.5	78.6	

(10) 온도별 효소활성 측정

온도에 따른 다양한 효소의 활성을 측정한 결과 chitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase, protease 활성 모두 온도에 따른 차이를 나타내지 않았다(Fig. 80, 81, 82)

□ chitinase 활성측정

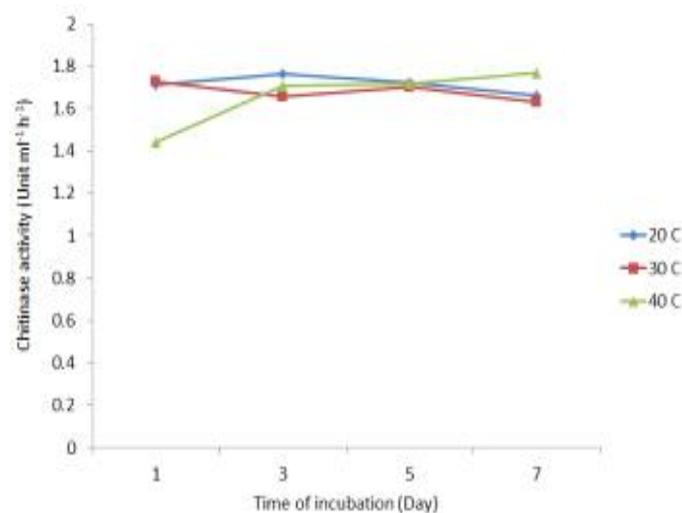


Fig. 80. 온도에 따른 chitinase 활성

□  $\beta$ -1,3-glucanase 활성측정

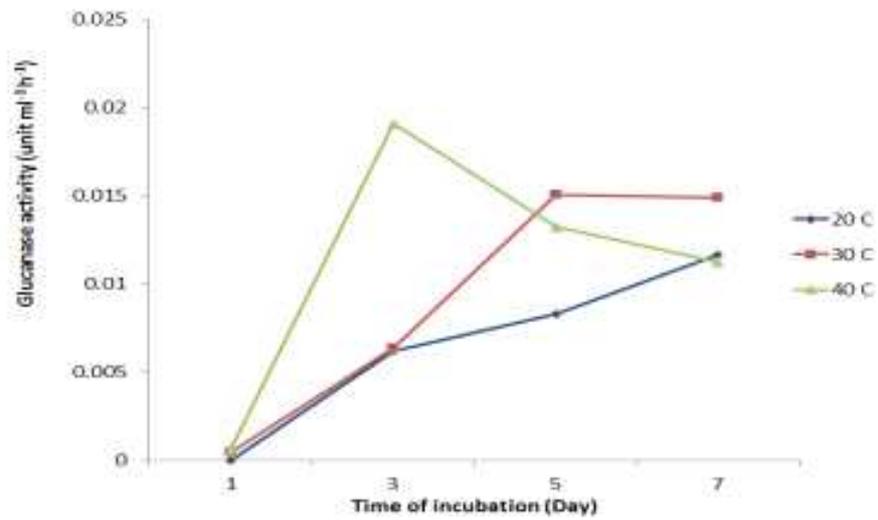


Fig 81. 온도에 따른  $\beta$ -1,3-glucanase 활성측정

□ protease 활성측정

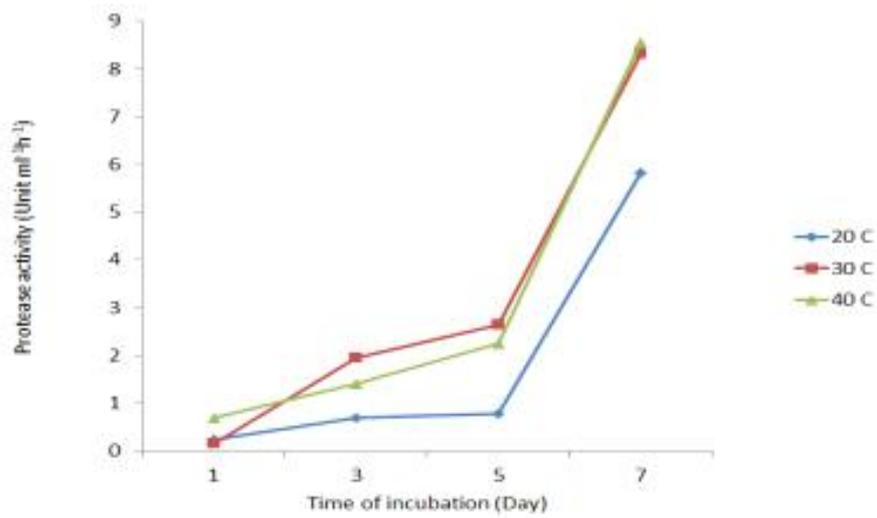


Fig. 82. 온도에 따른 protease 활성측정

## 2. 생초미생물 혼합액비 제조공정 최적화 연구

### 가. 실험실 규모 제조공정 최적화 연구

기능성미생물(KWN38)을 이용한 실험실 규모 생초미생물 혼합액비 제조 조성은 Table 17과 같다. 각각의 원료의 혼합량에 따라 제조 하였으며, 기능성미생물(KWN38)은 1L 기준으로 1mL를 혼합하여 액비를 제조 하였다. 또한 혼합액비 제조에 있어 잔디예지물 및 모든 실험재료에 대하여 무균조작을 실시하여 사용하였다.

Table 17. 생초미생물 혼합액비 제조 조성

Ingredient	Amount(g/L)
Grass FW	178
Urea	2.8
20% P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	8.8
60% K <sub>2</sub> O	1.6
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1
Yeast	0.1
Sodium Molybdate (Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O)	0.05
Zinc Sulfate (ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O)	0.06
Chitin Powder	0.8
Gelatin Powder	0.2

기능성미생물(KWN38)을 이용한 실험실 규모 생초미생물 혼합액비의 액비화 평가는 화학적 분석을 통한 부숙도 판정을 하였다. 화학적 분석 항목으로는 pH, 전기전도도(EC), 산화환원전위(ORP), 총탄소함량(T-C), 총질소함량(T-N), C/N비, 인산(P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), 칼륨(K<sub>2</sub>O), 암모니아태질소(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N), 질산태질소(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N), 클로로필 a(Chlorophyll-a)를 통한 부숙도를 판정하였으며, 모든 실험은 농업환경 액비 분석방법에 준하여 실험하였다(Table 1-1-2).

Table 18. 생초미생물 혼합액비 분석방법.

Parameter	Method	Materials
Temperature	-	Thermometer
pH	pH meter	pH meter(Orion 920A)
EC	EC meter	EC meter(Orion 170)
ORP	ORP meter	ORP meter(Orion 920A)
T-N	Kjeldahl distillation	Kjeldahl Analysis(Velp DK20)
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Vanadate	UV Spectrophotometer(Carey 100)
K <sub>2</sub> O	Atomic absorption analysis	Atomic Absorption Spectrophotometer(AA280FS)
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	Indophenol	UV Spectrophotometer(Carey 100)
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N	Brucine	UV Spectrophotometer(Carey 100)
Chlorophyll-a	Absorption photometry	UV Spectrophotometer(Carey 100)

(1) 부숙조건 최적화 평가

위의 Table 1-1-1과 같이 생초미생물 혼합액비 조성별 혼합 후 부숙조건을 달리하여 부숙조건에 따른 액비화 효율을 살펴보고자 하였다. 부숙조건은 Anoxic와 Oxic 상태로 두 조건을 달리하여 부숙기간 동안 액비화 효율을 비교하여 액비화에 있어 최적의 부숙조건을 도출하고자 한다. Anoxic와 Oxic 상태에서 혼합액비와 대조구(잔디와 물만 혼합)를 준비하여 액비화 실험을 실시하였으며, Anoxic 상태의 부숙조건은 혼합액비내 공기가 주입되지 못하도록 완전 밀폐하였다(Fig. 83). Oxic 상태의 부숙조건은 에어펌프(DK-8000, 대광전자)를 이용하여 0.4L/min · L로 공기를 연속적으로 주입하였으며, 혼합액비 반응조에 공기 주입을 위하여 연결한 호스 끝에는 Air stone(직경 3cm)을 연결하여 연속폭기가 되도록 하였다(Fig. 84). 그리고 혼합액비의 부숙은 부숙기간 동안 20℃가 유지되는 항온항습실에서 실험을 진행하였으며, 진탕기(SK-760M, JEIO TECH)를 이용하여 40rpm으로 연속적으로 진탕을 실시하여 충분히 혼합 되어 지게 하였다.

부숙조건별 액비화 효율을 살펴보기 위한 실험 결과는 Table 19에 나타내었다.

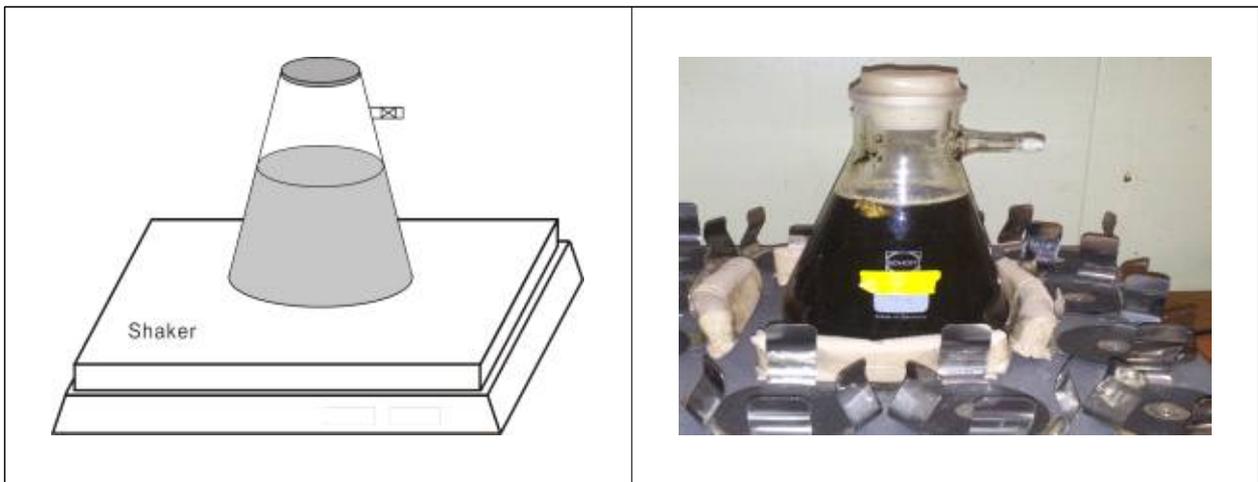


Fig. 83. Anoxic 상태의 부숙조건

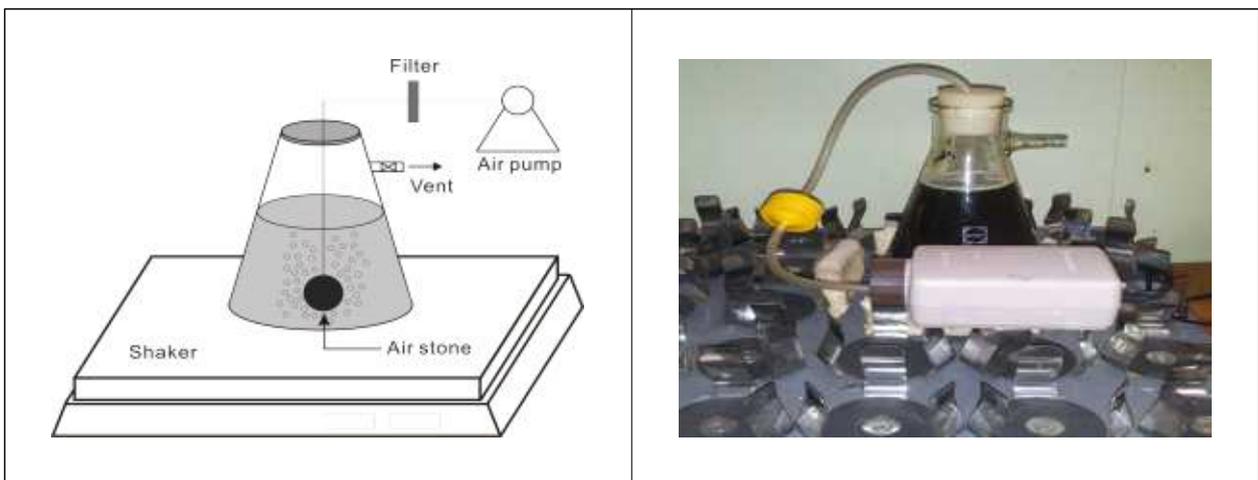


Fig. 84. Oxic 상태의 부숙조건

Table 19. 부숙조건별 액비화 효율 비교

Condition		Decomposition periods(day)	pH	EC (dS/m)	ORP (mV)	T-C (%)	T-N (%)	C/N ratio	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (%)	K <sub>2</sub> O (%)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg/L)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg/L)	Chl-a (mg/m <sup>3</sup> )
Anoxic	대조구	0	6.706	3.3	313.6	1.61	0.06	26.8	0.01	0.08	88	19.2	2,995
		5	6.101	9.7	-224.8	1.61	0.06	26.8	0.01	0.08	111	16.3	7,590
		10	6.004	11.8	-235.6	1.60	0.06	26.7	0.01	0.08	152	11.7	8,024
		15	5.776	11.9	-262.5	1.58	0.06	26.3	0.01	0.08	244	10.0	8,922
	혼합액비	0	7.102	9.4	330.0	2.19	0.22	10.0	0.04	0.19	447	20.4	3,634
		5	6.921	14.8	-171.8	2.19	0.22	10.0	0.05	0.20	557	18.6	88,89
		10	6.552	17.5	-203.4	2.08	0.21	9.9	0.06	0.20	680	16.7	9,708
		15	6.272	18.1	-218.0	1.97	0.21	9.4	0.06	0.19	1,063	15.3	10,468
Oxic	대조구	0	6.706	3.3	313.6	1.61	0.06	26.8	0.02	0.08	88	19.2	2,995
		5	6.910	5.5	171.6	1.56	0.06	26.0	0.02	0.09	291	16.3	23,008
		10	8.069	7.1	91.4	1.41	0.06	23.5	0.02	0.09	436	12.2	10,100
		15	7.529	8.5	44.8	1.38	0.06	23.0	0.02	0.08	512	11.0	6,219
	혼합액비	0	7.102	9.4	330.0	2.19	0.22	10.0	0.04	0.19	447	20.4	3,634
		5	7.561	11.4	141.9	2.07	0.22	9.4	0.03	0.20	893	20.5	29,552
		10	8.110	12.4	48.1	1.28	0.19	6.7	0.03	0.19	1,048	20.9	14,546
		15	7.614	13.6	15.6	1.08	0.18	6.0	0.03	0.18	1,090	21.8	6,607

(가) 부숙조건별 pH 결과

부숙조건별 혼합액비의 pH를 측정한 결과 Anoxic 상태에서는 혼합액비 및 대조구 모두 부숙기간이 늘어날수록 pH는 점점 낮아져 산성 상태로 변하였으나 Oxic 상태에서는 혼합액비 및 대조구 모두 알칼리성 상태로 부숙기간이 늘어날수록 pH가 높아지다 10일 이후부터는 점점 낮아지는 결과를 나타내었다(Fig. 85).

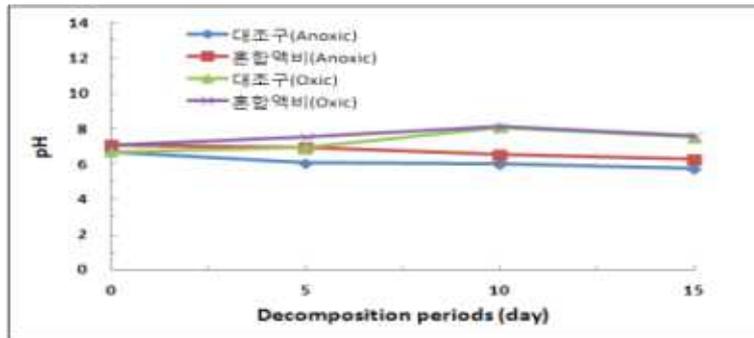


Fig. 85. 부숙조건별 pH 비교

(나) 부숙조건별 EC 결과

부숙조건별 EC 분석결과 두 부숙조건인 대조구 및 혼합액비 모두 부숙기간이 늘어날수록 EC는 증가하였으며, Oxic 조건보다는 Anoxic 조건에서 EC가 더 크게 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 86).

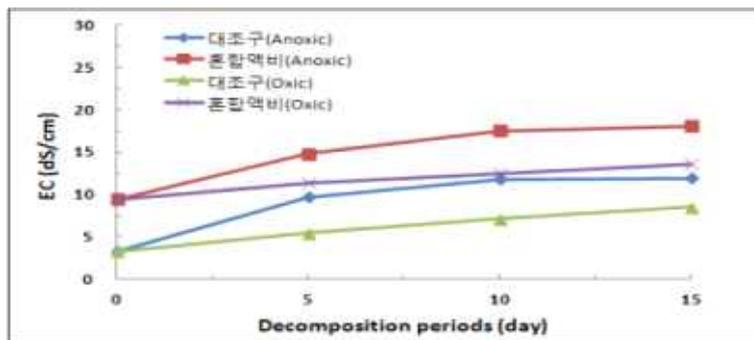


Fig. 86. 부숙조건별 EC 비교

(다) 부숙조건별 ORP 결과

부숙조건별 ORP 분석결과 부숙기간 동안 부숙조건별 혼합액비 및 대조구들은 Anoxic 및 Oxic 조건의 부숙상태를 나타내었으며, Oxic 상태의 부숙조건에서도 부숙기간이 늘어날수록 ORP는 점점 낮아지는 결과를 나타내었다(Fig. 87).

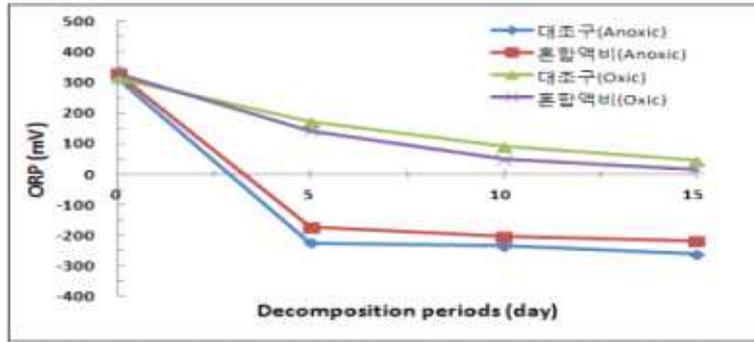


Fig. 87. 부숙조건별 ORP 비교

(라) 부숙조건별 C/N비 결과

부숙조건별 C/N비 분석결과는 부숙조건별 대조구는 높은 C/N비 값을 나타내었으나 Oxic 상태에서의 대조구는 약간의 C/N비 감소를 나타내었다. 혼합액비 중 Anoxic 상태의 혼합액비는 부숙기간동안 C/N비의 감소는 나타나지 않았으며, Oxic 상태로 부숙한 혼합액비는 15일후 C/N비가 약 40% 정도 감소하는 결과를 나타내었다. 부숙조건별 C/N비 비교를 통하여 액비화 효율을 살펴본 결과 Oxic 상태로 부숙한 혼합액비가 가장 높은 효율을 보였다(Fig. 88).

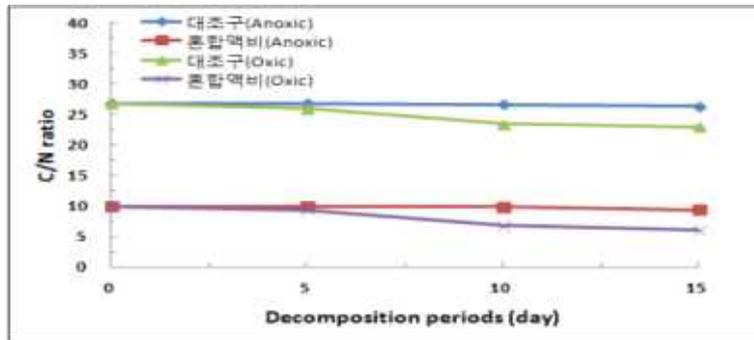


Fig. 88. 부숙조건별 C/N비 비교

(마) 부숙조건별 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 결과

부숙조건별 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 분석결과 부숙후 Anoxic 상태의 혼합액비에서만 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>가 약간 증가를 하였으나, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>의 차이가 크지 않아 부숙조건에 따른 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>의 효율 차이는 미미한 것으로 나타났다(Fig. 89).

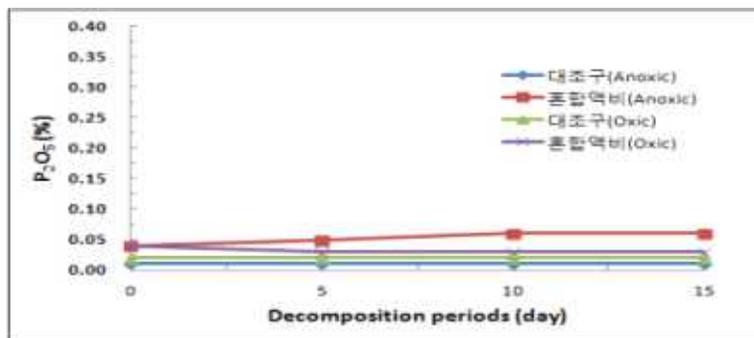


Fig. 89. 부숙조건별 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 비교

(바) 부숙조건별 K<sub>2</sub>O 결과

부숙조건별 K<sub>2</sub>O 분석결과 부숙조건별 혼합액비의 K<sub>2</sub>O의 차이는 미미하였으며, 부숙기간에 따른 K<sub>2</sub>O의 변화 또한 거의 없이 일정한 수준으로 유지되는 것으로 나타났다(Fig. 90).

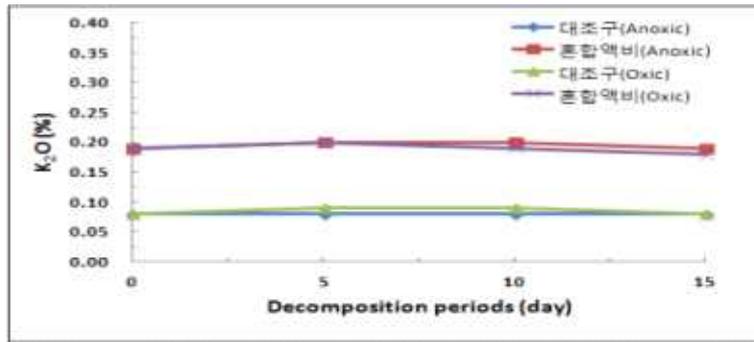


Fig. 90. 부숙조건별 K<sub>2</sub>O 비교

(사) 부숙조건별 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 결과

부숙조건별 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 분석결과 Anoxic 상태 보다는 Oxic 상태에서 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N가 더 높게 발생되었으며, 이는 액비내 공기주입에 따른 결과로 보여 진다. 부숙조건별 혼합액비 및 대조구는 부숙기간이 늘어날수록 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N가 높게 발생되었으나 Oxic 상태의 혼합액비에 서는 부숙 10일 이후부터 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 농도가 거의 일정하게 유지되는 결과를 나타내었다 (Fig. 91).

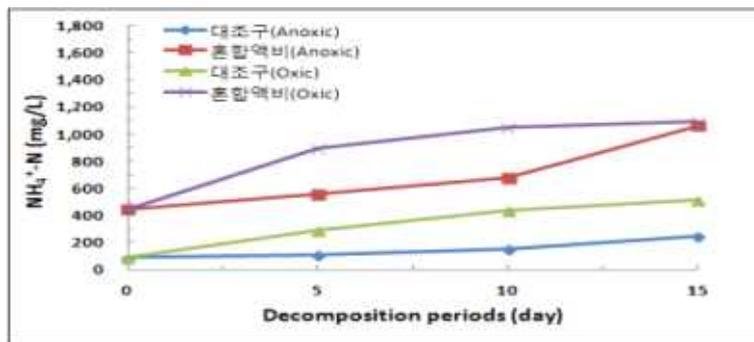


Fig. 91. 부숙조건별 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 비교

(아) 부숙조건별 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 결과

부숙조건별 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 분석결과 Oxic 상태의 혼합액비에서만 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N가 부숙기간이 늘어날수록 약간씩 증가하는 하나 질산화는 거의 일어나지 않는 것으로 판단된다(Fig. 92).

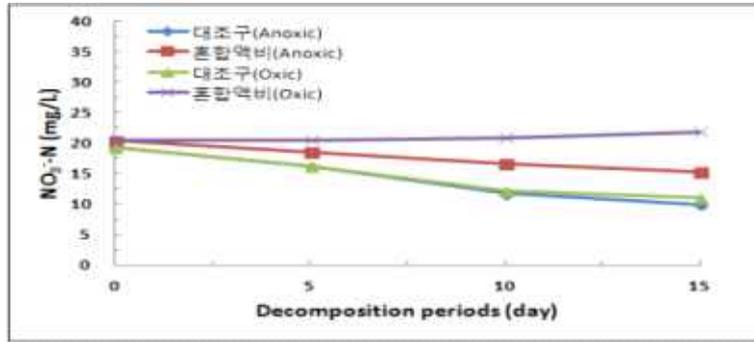


Fig. 92. 부숙조건별 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 비교

(자) 부숙조건별 Chlorophyll-a 결과

부숙조건별 Chlorophyll-a 분석결과 Anoxic 상태의 부숙조건에서는 부숙기간이 늘어날수록 Chlorophyll-a가 조금씩 증가하는 하지만 Oxic 상태의 부숙조건과는 차이가 많이 났다. 그리고 Oxic 상태의 부숙조건에서는 부숙 초반에 Chlorophyll-a의 농도가 가장 높게 나타났으며, 부숙 5일 이후부터는 점점 낮아지는 결과를 나타내었다(Fig. 93).

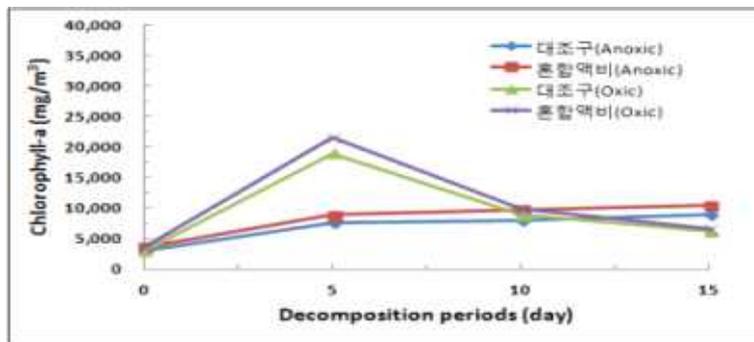


Fig. 93. 부숙조건별 Chlorophyll-a 비교

(차) 부숙조건 최적화 결론

기능성미생물(KWN38)을 이용한 실험실 규모 생초미생물 혼합액비 제조에 있어 부숙조건별 액비화 효율을 비교하여 본 결과 액비 제조에 있어 Anoxic 상태의 부숙조건 보다는 Oxic 상태의 부숙조건이 액비화 효율에 있어 더 높은 효율을 나타내었다. 따라서 Oxic 상태가 액비 제조에 있어 최적 부숙조건인 것으로 판단된다.

(2) 전처리조건 최적화 평가

기능성미생물(KWN38)을 이용한 실험실 규모 생초미생물 혼합액비 제조에 있어 기능성미생물(KWN38)외에 다른 미생물의 간섭을 줄이고자 부숙전 전처리를 실시하였다. 혼합액비의 전처리는 기능성미생물(KWN38)을 제외한 잔디예지물 및 모든 실험재료에 대하여 멸균(120°C, 20min)을 실시한 혼합액비와 멸균을 실시하지 않은 혼합액비에 오존을 주입하여 혼합액비의 전처리조건별 액비화 효율을 살펴보고자 하였다. 전처리 조건 중 멸균은 기능성미생물(KWN38)을 제외한 잔디예지물 및 실험재료에 대하여 고압증기멸균기(MLS-3000, SANYO)를 이용하여 120°C에서 20분간 멸균하였다. 그리고 오존 주입은 기능성미생물을 제

외한 혼합액비에 12.875O<sub>3</sub> g/Nm<sup>3</sup> · Air로 발생되는 오존발생기(IN-2000, 세명테크론(주))를 이용하여 유량 40LPM으로 5분간 오존을 주입하였다. 부숙전 전처리를 실시한 혼합액비에 대하여 생균수를 측정된 결과 오존을 주입한 혼합액비는 2.1 × 10<sup>7</sup>CFU/g 이었으며, 멸균을 한 혼합액비는 4.4 × 10<sup>4</sup>CFU/g로 멸균을 한 혼합액비 보다 오존을 주입한 혼합액비에서 더 많은 균이 생존하고 있는 것으로 나타났다.

전처리조건별 혼합액비의 부숙화 실험은 부숙온도 20℃, 공기량 0.4L/min · L, 진탕 40rpm 및 연속폭기가 항상 유지되도록 실시하였으며, 전처리조건별 액비화 효율을 살펴보기 위한 실험결과는 Table 20에 나타내었다.

Table 20. 전처리조건별 액비화 효율 비교

Condition	Decomposition periods(day)	pH	EC (dS/m)	ORP (mV)	T-C (%)	T-N (%)	C/N ratio	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (%)	K <sub>2</sub> O (%)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg/L)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg/L)	Chl-a (mg/m <sup>3</sup> )
Ozone	0	6.271	9.5	325.5	2.11	0.18	11.7	0.05	0.19	439	22.8	5,236
	5	7.085	13.1	135.6	2.05	0.18	11.4	0.06	0.19	872	22.6	22,379
	10	8.102	13.5	41.5	1.45	0.17	8.5	0.05	0.18	1,011	23.5	12,891
	15	7.713	14.1	13.1	1.21	0.15	8.1	0.04	0.18	1,042	23.9	6,589
Sterilization	0	7.102	9.4	330.0	2.19	0.22	10.0	0.04	0.19	447	20.4	3,634
	5	7.561	11.4	141.9	2.07	0.22	9.4	0.03	0.20	893	20.5	29,552
	10	8.110	12.4	48.1	1.28	0.19	6.7	0.03	0.19	1,048	20.9	14,546
	15	7.614	13.6	15.6	1.08	0.18	6.0	0.03	0.18	1,090	21.8	6,607

(가) 전처리조건별 pH 결과

전처리조건별 혼합액비의 pH를 측정된 결과 부숙기간동안 두 조건 모두 약 알칼리성 상태로 나타났으며, 부숙기간이 늘어날수록 pH가 높아지다 10일 이후부터는 pH가 점점 낮아지는 결과를 나타냈었다(Fig. 94).

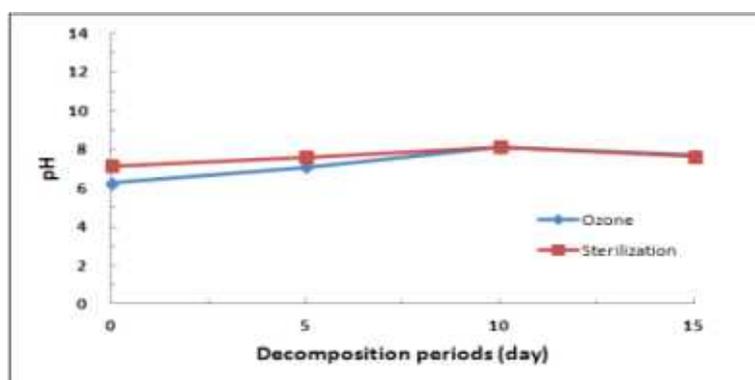


Fig. 94. 전처리 조건별 pH 비교

(나) 전처리조건별 EC 결과

전처리조건별 EC 분석결과 전처리조건별 혼합액비 모두 부숙기간이 늘어날수록 EC는 증가 하였으나 평균을 한 혼합액비는 오존 처리한 혼합액비 보다 조금 낮게 증가하는 것으로 나타났다(Fig 94-1).

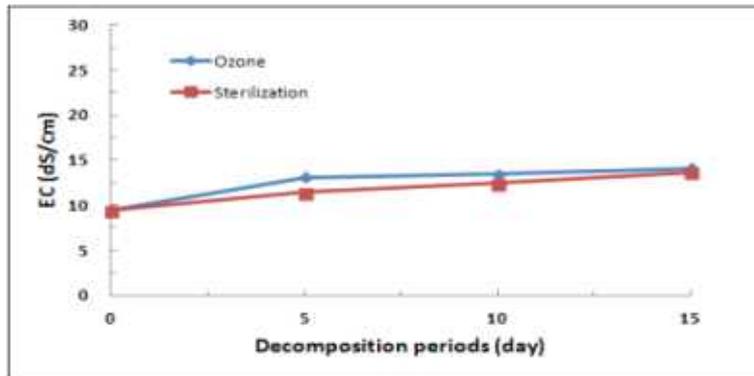


Fig. 94-1. 전처리 조건별 EC 비교

(다) 전처리조건별 ORP 결과

전처리조건별 ORP 분석결과 전처리조건별 혼합액비 모두 부숙기간동안 Oxic 조건의 부숙상태를 보였다. 그리고 전처리조건에 따른 ORP 차이는 거의 없었으며, 부숙기간이 늘어날수록 ORP가 점점 낮아지는 결과를 나타내었다(Fig. 95).

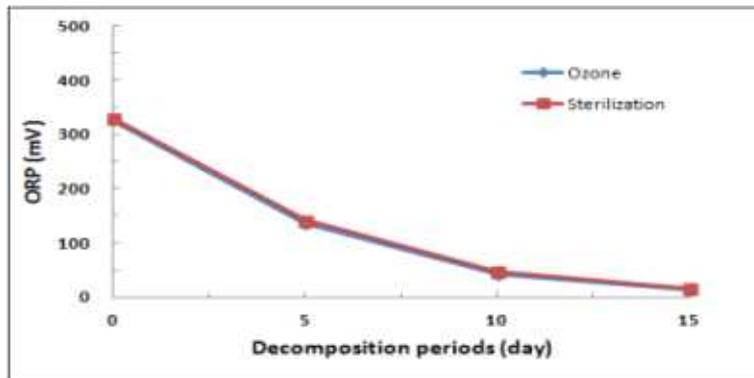


Fig. 95. 전처리 조건별 ORP 비교

(라) 전처리조건별 C/N비 결과

전처리조건별 C/N비 분석결과 오존 처리한 혼합액비는 부숙후 C/N비가 약 30% 정도 감소하였으나 평균한 혼합액비에서는 C/N비가 약 40% 정도로 감소해 오존 처리한 혼합액비 보다 약 10% 정도 높은 감소율을 보였으며, 혼합액비의 C/N비 값 또한 오존처리 혼합액비 보다 낮게 나타났다. 이는 혼합액비 제조전 평균을 실시하면 생초미생물 혼합액비를 제조함에 있어 탄소함량을 줄여 C/N비 감소에도 영향을 주는 것으로 나타났다. 전처리조건별 C/N비 비교를 통하여 액비화 효율을 살펴본 결과 부숙전 혼합액비에 오존 처리 하는 것 보다 평균을 실시하는 것이 액비화에 있어 더 높은 효율을 보이는 것으로 나타났다(Fig. 96).

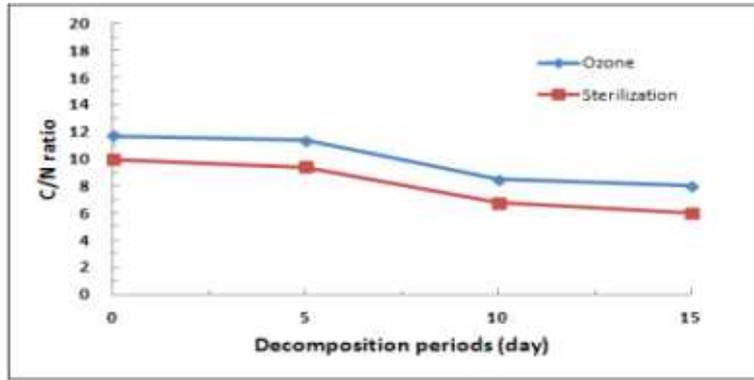


Fig. 96. 전처리 조건별 C/N비 비교

(마) 전처리조건별 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 결과

전처리조건별 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 분석결과 전처리조건별 혼합액비의 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 차이는 크지 않았으며, 부숙기간에 따른 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>의 변화도 거의 없는 것으로 나타났다(Fig. 97).

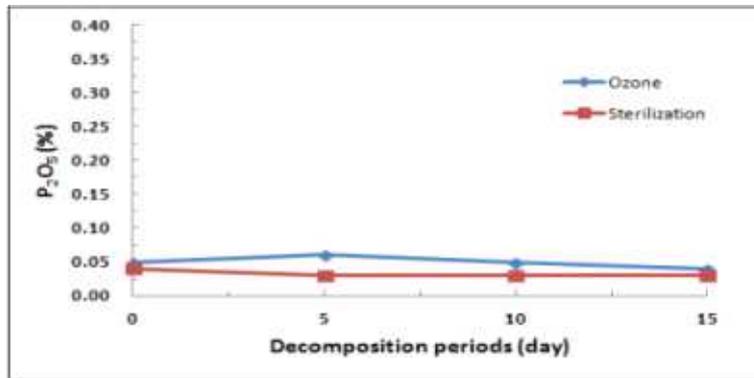


Fig. 97. 전처리 조건별 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 비교

(바) 전처리조건별 K<sub>2</sub>O 결과

전처리조건별 K<sub>2</sub>O 분석결과 전처리조건별 혼합액비의 K<sub>2</sub>O 차이는 거의 없었으며, 부숙기간에 따른 K<sub>2</sub>O도 거의 변화 없이 일정하게 나타났다(Fig. 98).

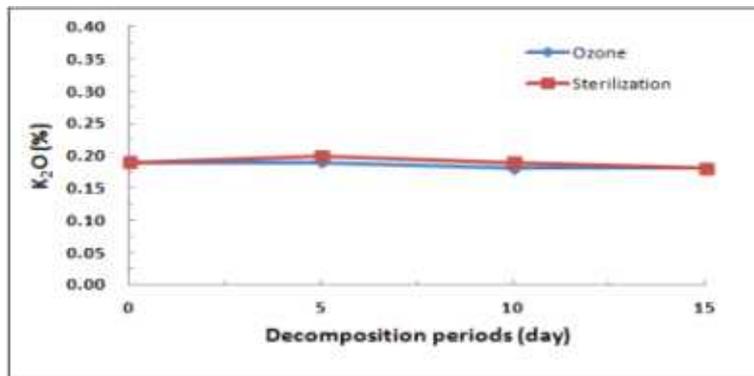


Fig. 98. 전처리 조건별 K<sub>2</sub>O 비교

(사) 전처리조건별  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  결과

전처리조건별  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  분석결과 전처리조건별 혼합액비의  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  농도 차이는 거의 없었으나 부숙기간이 늘어날수록  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 도 증가를 하였다. 그러나 10일 이후부터는  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 가 거의 일정한 수준으로 유지되는 결과를 나타내었다(Fig. 99).

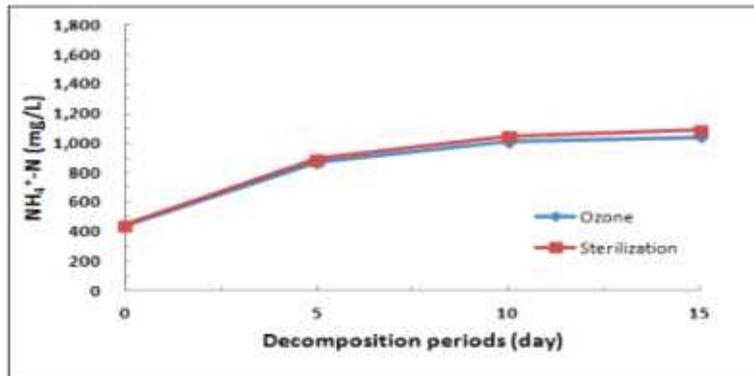


Fig. 99. 전처리 조건별  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  비교

(아) 전처리조건별  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  결과

전처리 조건별  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  분석결과 전처리조건별 혼합액비 모두 부숙기간이 늘어날수록  $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 가 약간 증가하는 하나 질산화는 거의 일어나지 않는 것으로 나타났다(Fig. 100).

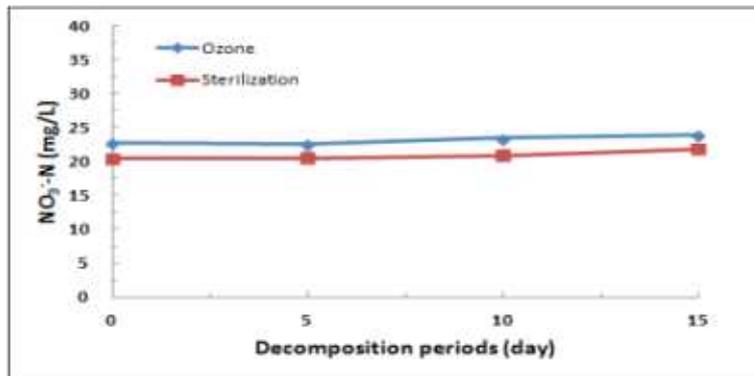


Fig. 100. 전처리 조건별  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  비교

(자) 전처리조건별 Chlorophyll-a 결과

전처리조건별 Chlorophyll-a 분석결과 전처리조건별 혼합액비의 Chlorophyll-a 차이는 크지 않았으며, 모든 전처리조건에서 부숙 초반에 Chlorophyll-a의 농도가 가장 높게 나타났다가 점차 감소하는 결과를 나타내었다(Fig. 101).

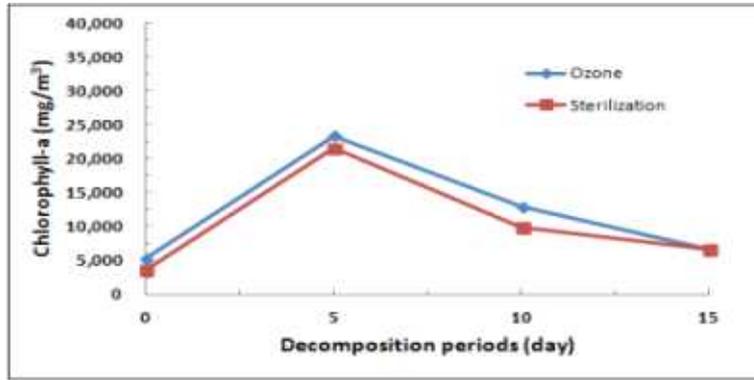


Fig. 101. 전처리 조건별 Chlorophyll-a 비교

(차) 전처리조건 최적화 결론

기능성미생물(KWN38)을 이용한 실험실 규모 생초미생물 혼합액비 제조에 있어서 전처리조건별 액비화 효율을 비교하여 본 결과 부숙전 오존처리 보다는 멸균을 실시하여 부숙하는 것이 액비화 효율에 있어 더 높은 효율을 나타내었다. 따라서 액비제조에 있어서 부숙전 멸균을 실시하는 것이 최적 전처리조건인 것으로 판단된다.

(3) 공기주입량 최적화 평가

공기주입량 최적화 실험에서는 기능성미생물(KWN38)을 이용한 실험실 규모 생초미생물 혼합액비의 Oxid 상태에서 공기주입량 증가에 따른 액비화 효율을 살펴보고자 하였으며, 혼합액비 제조에 있어 운전인자로서 공기주입량을 최적화하기 위하여 앞서 실험한 0.4L/min · L의 공기주입량을 2배로 늘려 0.8L/min · L로 주입하여 최적의 공기주입량을 산출하고자 하였다. 공기주입량별 혼합액비의 부숙화 실험은 혼합전 멸균(120℃, 20min)을 실시하여 운전되어졌으며, 운전조건으로는 온도 20℃, 진탕 40rpm 및 연속폭기가 항상 유지되도록 하였다.

기능성미생물(KWN38)을 이용한 실험실 규모 생초미생물 혼합액비의 공기주입량별 액비화 효율을 살펴보기 위한 결과는 Table 21에 나타내었다.

Table 21. 공기주입량별 액비화 효율 비교

Condition (L/min · L)	Decomposition periods(day)	pH	EC (dS/m)	ORP (mV)	T-C (%)	T-N (%)	C/N ratio	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (%)	K <sub>2</sub> O (%)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg/L)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg/L)	Chl-a (mg/m <sup>3</sup> )
0.4	0	7.102	9.4	330.0	2.19	0.22	10.0	0.04	0.19	447	20.4	3,634
	5	7.561	11.4	141.9	2.07	0.22	9.4	0.03	0.20	893	20.5	29,552
	10	8.110	12.4	48.1	1.28	0.19	6.7	0.03	0.19	1,048	20.9	14,546
	15	7.614	13.6	15.6	1.08	0.18	6.0	0.03	0.18	1,090	21.8	6,607
0.8	0	7.102	9.4	330.0	2.19	0.22	10.0	0.04	0.19	447	20.4	3,634
	5	8.244	11.7	167.1	1.83	0.22	8.3	0.04	0.19	1,095	21.7	25,425
	10	7.550	13.7	57.7	1.01	0.20	5.1	0.04	0.18	1,204	22.3	12,379
	15	7.187	14.5	18.4	0.80	0.17	4.7	0.03	0.17	1,235	24.2	11,390

(가) 공기주입량별 pH 결과

공기주입량별 혼합액비의 pH 분석결과 부속기간동안 두 조건 모두 약 알칼리성 상태로 나타났으며, 공기주입량을 0.8L/min·L로 주입한 혼합액비에서는 0.4L/min·L로 주입한 혼합액비보다 약 5일 정도 빠르게 pH가 낮아지는 결과를 나타내었다(Fig. 102).

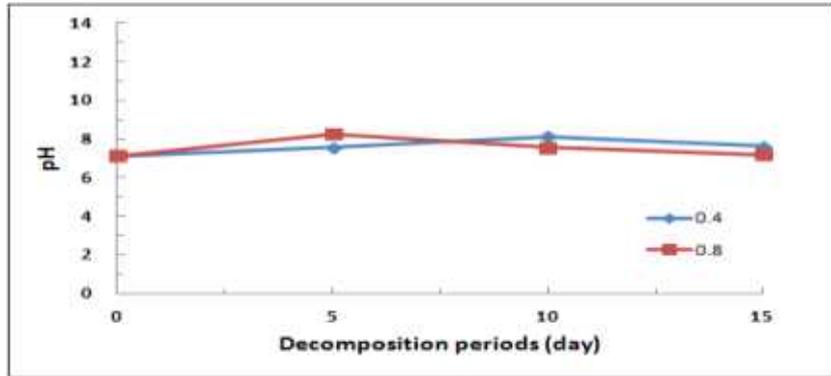


Fig. 102. 공기 주입량별 pH 비교

(나) 공기주입량별 EC 결과

공기주입량별 EC 분석결과 공기주입량별 혼합액비 모두 부속기간이 늘어날수록 EC는 증가하였으며, 공기주입량 2배 증가에 따른 EC는 약간 증가 하는 것으로 나타났다 (Fig. 103).

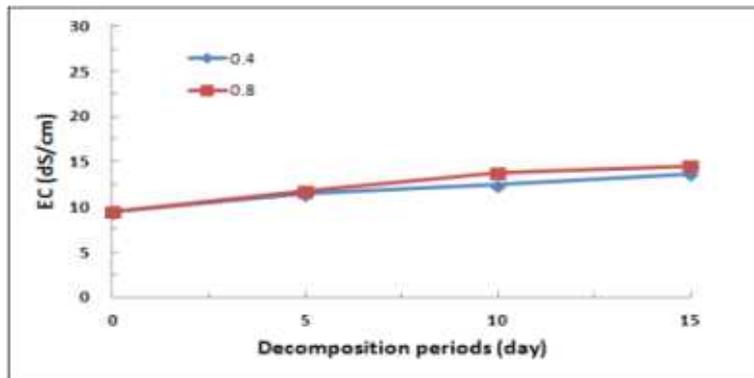


Fig. 103. 공기 주입량별 EC 비교

(다) 공기주입량별 ORP 결과

공기주입량별 ORP 분석결과 공기주입량별 혼합액비 모두 부속기간동안 Oxic 조건의 부속상태를 나타내었다. 공기주입량 0.4L/min·L와 0.8L/min·L로 주입한 혼합액비의 ORP 변화는 비슷한 경향을 보였으며, 공기주입량 두 배 증가에 따른 ORP 변화의 차이는 있었으나 그 차이는 공기주입량 증가만큼 높게 나타나지는 않았다(Fig. 104).

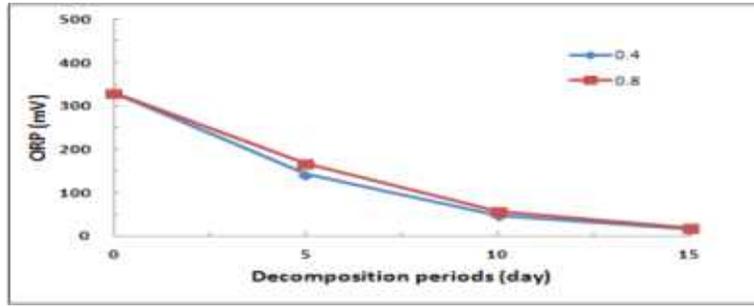


Fig. 104. 공기 주입량별 ORP 비교

(라) 공기주입량별 C/N비 결과

공기주입량별 C/N비 분석결과 공기주입량 0.4L/min·L로 주입한 혼합액비는 부숙기간 동안 C/N비가 약 40% 감소하였으며, 공기주입량을 2배로 증가시켜 0.8L/min·L로 주입한 혼합액비는 C/N비가 약 53%로 나타나 공기주입량 2배 증가에 따른 C/N비 감소율은 약 13% 증가로 그리 크지 않는 효율을 보였다. 그러나 C/N비 감소율의 증가는 효율적인 측면보다는 공기주입량 증가에 따른 액비의 혼합력이 증가되어 반응효율 면에서 좀 더 나은 결과를 나타낸 것으로 판단된다(Fig. 105).

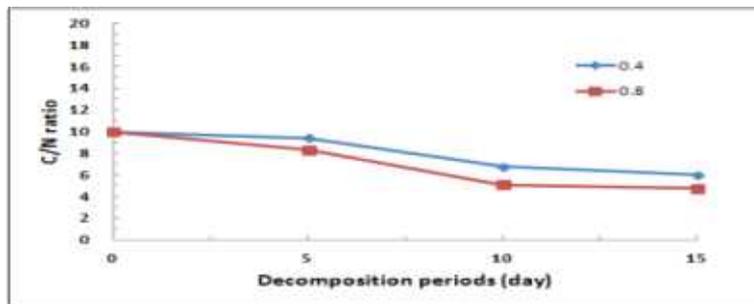


Fig. 105. 공기 주입량별 C/N비 비교

(마) 공기주입량별 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 결과

공기주입량별 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 분석결과 공기주입량별 혼합액비의 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>의 차이는 거의 없는 것으로 나타났다(Fig. 106).

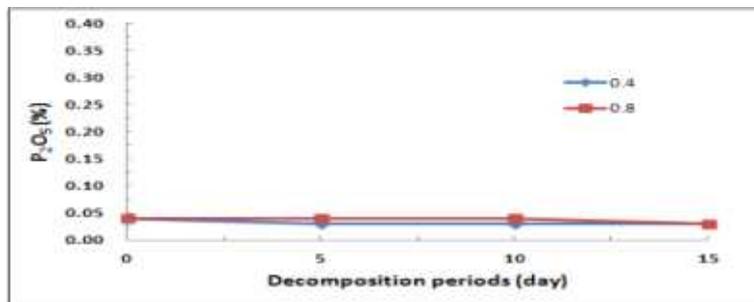


Fig. 106. 공기 주입량별 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 비교

(바) 공기주입량별 K<sub>2</sub>O 결과

공기주입량별 K<sub>2</sub>O 분석결과 공기주입량별 혼합액비의 K<sub>2</sub>O의 차이는 거의 없는 것으로 나타났다(Fig. 107).

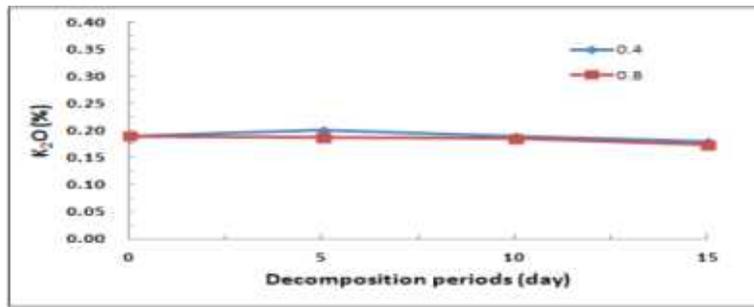


Fig. 107. 공기 주입량별 K<sub>2</sub>O 비교

(사) 공기주입량별 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 결과

공기주입량별 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 분석결과 공기주입량별 혼합액비 모두 부숙기간이 늘어날수록 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N의 농도도 증가하였으며, 공기주입량의 증가는 액비내 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N의 농도를 증가시키는 결과를 나타내었다. 그리고 공기주입량별 혼합액비 모두 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 농도가 10일 이후부터는 거의 일정한 수준으로 유지되는 결과를 나타내었다(Fig. 108).

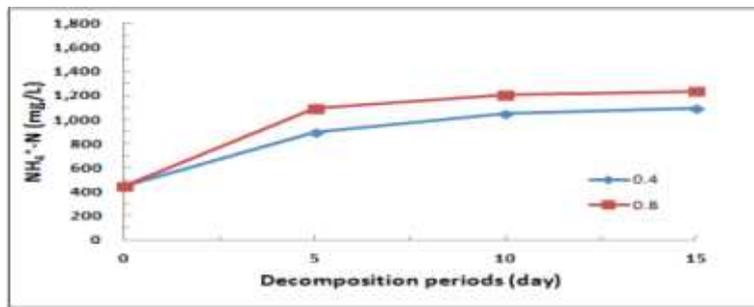


Fig. 108. 공기 주입량별 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 비교

(아) 공기주입량별 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 결과

공기주입량별 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 분석결과 공기주입량별 혼합액비 모두 부숙기간이 늘어날수록 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N가 약간씩 증가하는 하나 질산화는 거의 일어나지 않는 것으로 나타났다(Fig. 109).

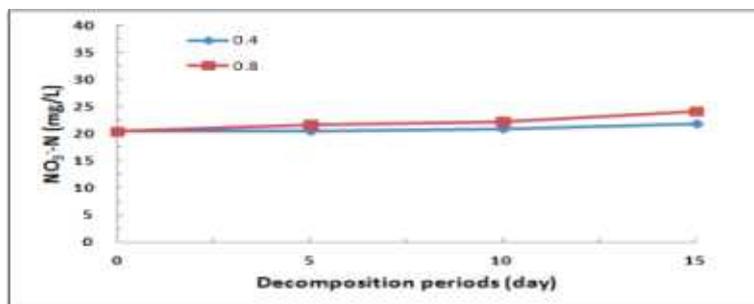


Fig. 109. 공기 주입량별 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 비교

(자) 공기주입량별 Chlorophyll-a 결과

공기주입량별 Chlorophyll-a 분석결과 공기주입량별 혼합액비의 Chlorophyll-a 농도는 부숙 초반에 가장 높게 나타났다가 그 이후부터는 점차 감소하는 것으로 나타났다. 그리고 공기주입량 2배 증가에 따른 Chlorophyll-a의 효율 차이는 크게 나타나지 않았지만 0.8L/min·L로 주입한 혼합액비가 0.4L/min·L로 주입한 혼합액비 보다는 Chlorophyll-a의 농도가 좀 더 높은 것으로 나타났다(Fig. 110).

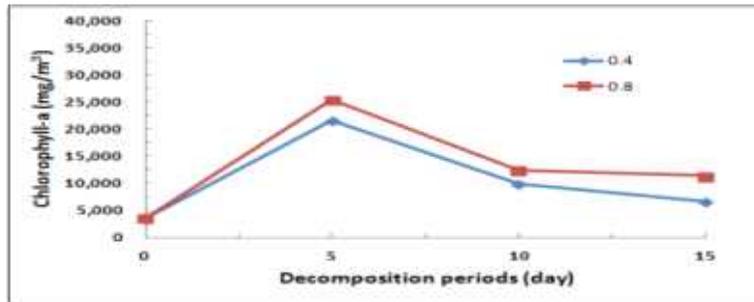


Fig. 110. 공기주입량별 Chlorophyll-a 비교

#### (차) 공기주입량 최적화 결론

기능성미생물(KWN38)을 이용한 실험실규모 생초미생물 혼합액비 제조에 있어 공기주입량을 2배로 증가시켜 실험해본 결과 C/N비 등에 기초할 때 효율 변화는 그리 크지 않았으나 공기주입량 0.4L/min·L 이상에서 공기량 증가에 따라 액비의 혼합력이 증가되어 반응효율 면에서 좀 더 나은 결과를 나타낸 것으로 판단된다. 그래서 액비의 혼합력 및 반응효율 면에서 기능성미생물을 이용한 실험실규모 생초미생물 혼합액비 제조의 최적 공기주입량은 최소 0.4L/min·L에서 최대 0.8L/min·L으로 주입하여야 할 것으로 보여 진다.

#### (4) 미생물주입량 최적화 평가

미생물 최적 주입량 산정 실험은 기능성미생물(KWN38)을 이용하여 주입량에 따른 액비화 효율을 살펴보았으며, 기능성미생물 주입량은 1L에 0.5, 1, 2, 4mL를 주입하여 주입량별 액비화 효율을 비교하여 보았다. 제조한 혼합액비는 부숙후 분석결과를 바탕으로 기능성미생물 주입량을 최적화 하려고 한다. 기능성미생물 주입량별 혼합액비의 부숙화 실험은 혼합전 멸균(120℃, 20min)을 실시하였으며, 운전조건으로는 온도 20℃, 공기량 0.8L/min·L, 진탕 40rpm 및 연속폭기가 항상 유지되도록 하였다.

생초미생물 혼합액비의 기능성미생물 주입량별 액비화 효율 결과는 Table 22에 나타내었다.

Table 22. 기능성미생물(KWN38) 주입량별 액비화 효율 비교

Condition (mL/L)	Decomposition periods(day)	pH	EC (dS/m)	ORP (mV)	T-C (%)	T-N (%)	C/N ratio	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (%)	K <sub>2</sub> O (%)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg/L)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg/L)	Chl-a (mg/m <sup>3</sup> )
0.5	0	7.102	9.4	330.0	2.19	0.22	10.0	0.04	0.19	447	20.4	3,634
	5	8.561	10.5	161.4	2.02	0.22	9.2	0.04	0.19	997	20.8	24,633
	10	7.900	13.1	60.8	1.19	0.19	6.3	0.03	0.18	1,146	22.0	12070
	15	7.043	14.3	35.6	0.99	0.17	5.8	0.02	0.18	1,196	23.7	11,094
1	0	7.102	9.4	330.0	2.19	0.22	10.0	0.04	0.19	447	20.4	3,634
	5	8.244	11.7	167.1	1.83	0.22	8.3	0.04	0.19	1,095	21.7	25,425
	10	7.550	13.7	57.7	1.01	0.20	5.1	0.04	0.18	1,204	22.3	12,379
	15	7.187	14.5	18.4	0.80	0.17	4.7	0.03	0.17	1,235	24.2	11,390
2	0	7.102	9.4	330.0	2.19	0.22	10.0	0.04	0.19	447	20.4	3,634
	5	8.486	11.9	146.4	1.86	0.22	8.5	0.04	0.19	1,052	21.5	25,725
	10	7.834	13.8	51.8	1.04	0.19	5.5	0.03	0.19	1,235	22.8	12,383
	15	7.007	14.9	17.6	0.94	0.18	5.2	0.02	0.18	1,270	24.3	11,739
4	0	7.102	9.4	330.0	2.19	0.22	10.0	0.04	0.19	447	20.4	3,634
	5	8.153	12.3	138.2	1.90	0.22	8.6	0.04	0.18	1,053	21.7	25,394
	10	7.163	14.2	41.7	1.05	0.19	5.5	0.03	0.18	1,272	23.6	12,862
	15	7.244	15.1	19.4	0.95	0.18	5.3	0.02	0.18	1,250	25.0	11,767

(가) 기능성미생물(KWN38) 주입량별 pH 결과

기능성미생물(KWN38) 주입량별 혼합액비의 pH 분석결과 부숙기간동안 모든 조건에서 약 알칼리성 상태를 나타내었으며, 부숙기간 초반에는 pH가 높아지다 약 8일 이후부터는 점점 낮아지는 결과를 나타내었다(Fig. 1-2-30).

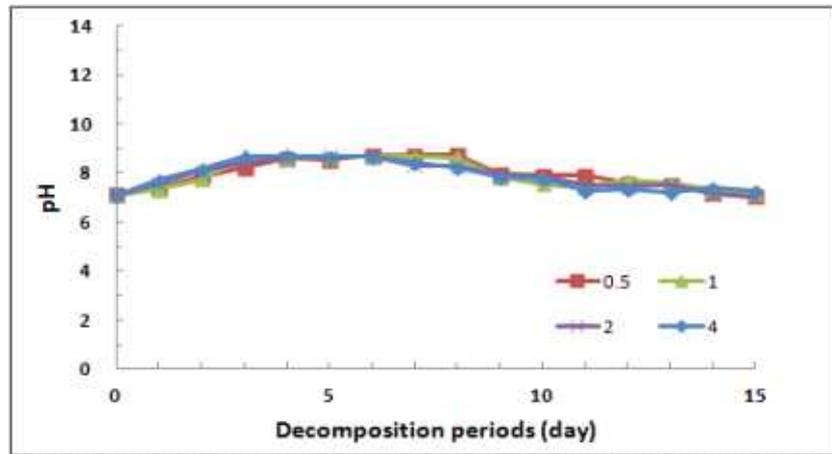


Fig. 111. 기능성미생물 주입량별 pH 비교

(나) 기능성미생물(KWN38) 주입량별 EC 결과

기능성미생물(KWN38) 주입량별 EC 분석결과 기능성 미생물 주입량별 혼합액비 모두 부숙기간이 늘어날수록 EC가 높아지는 것으로 나타났으며, 기능성미생물 주입량에 따른 차이는 크지 않았다(Fig. 112).

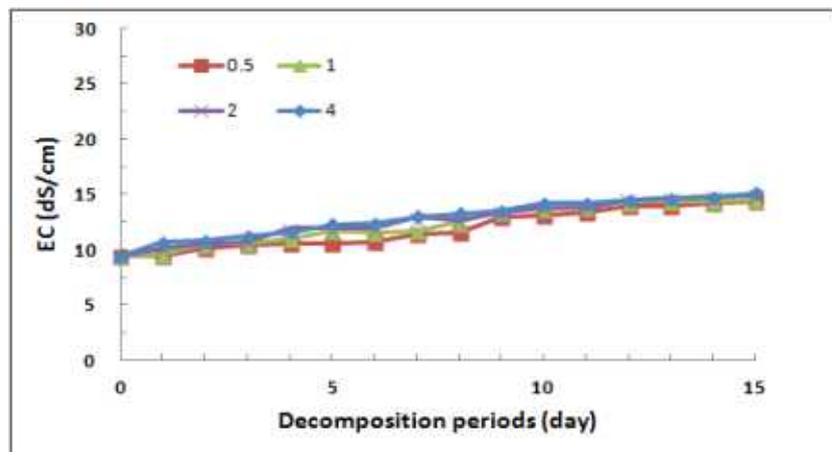


Fig. 112. 기능성미생물 주입량별 EC 비교

(다) 기능성미생물(KWN38) 주입량별 ORP 결과

기능성미생물(KWN38) 주입량별 ORP 분석결과 기능성 미생물 주입량별 혼합액비 모두 부숙기간동안 Oxic 조건의 부숙상태를 나타내었다. 모든 미생물 주입량 조건에서 부숙기간에 따른 ORP 변화는 비슷하게 나타났으며, 미생물 주입량별 ORP 차이도 크게 나타나지 않았다(Fig. 113).

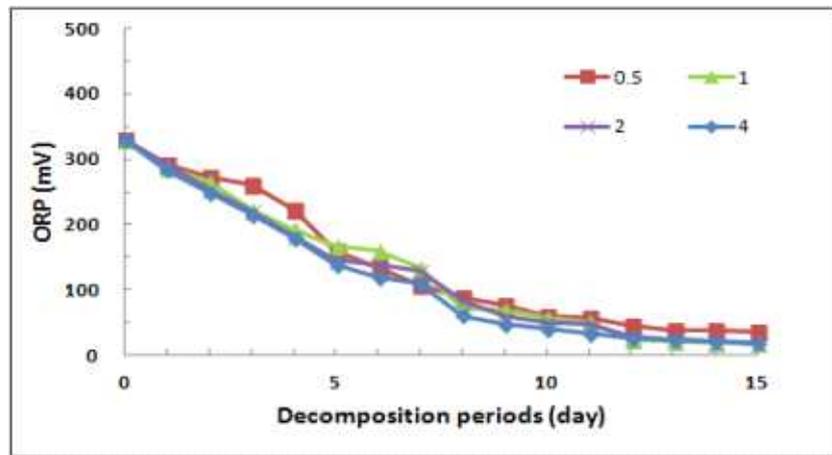


Fig. 113. 기능성미생물 주입량별 ORP 비교

(라) 기능성미생물(KWN38) 주입량별 C/N비 결과

기능성미생물(KWN38) 주입량별 C/N비 분석결과 기능성미생물 0.5, 1, 2, 4mL로 주입한 혼합액비의 C/N비 감소율은 42, 53, 48, 47%로 나타났다. 기능성미생물(KWN38) 주입량별 액비화 효율을 살펴본 결과 1mL/L로 주입한 혼합액비가 다른 주입량들에 비해 더 높은 효율을 나타내었으며, 부숙 10일 이후부터는 미생물 주입량별 혼합액비들 모두 C/N비가 일정하게 유지되는 것으로 나타났다(Fig. 114).

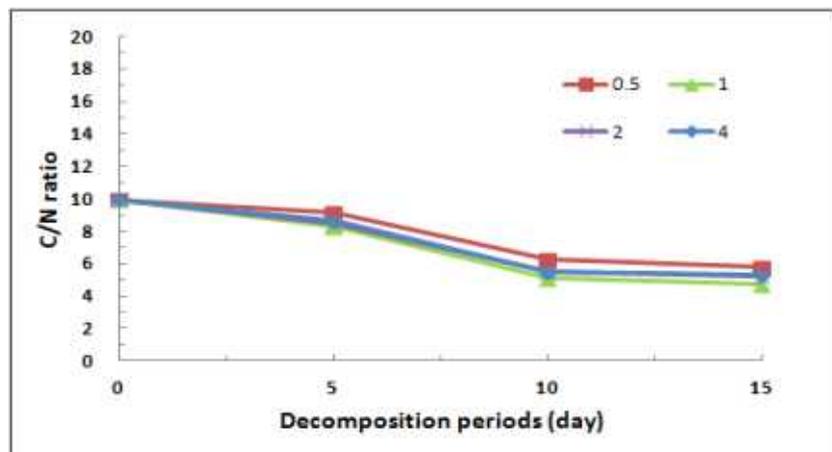


Fig. 114. 기능성미생물 주입량별 C/N비 비교

(마) 기능성미생물(KWN38) 주입량별 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 결과

기능성미생물(KWN38) 주입량별 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 분석결과 기능성미생물 주입량별 혼합액비의 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>의 차이는 크게 나타나지 않았으나 1mL/L로 주입한 혼합액비가 약간 높게 나타났다. 그리고 혼합액비 부숙기간에 따른 변화는 크지 않았으며, 거의 일정하게 유지되는 것으로 나타났다(Fig. 115).

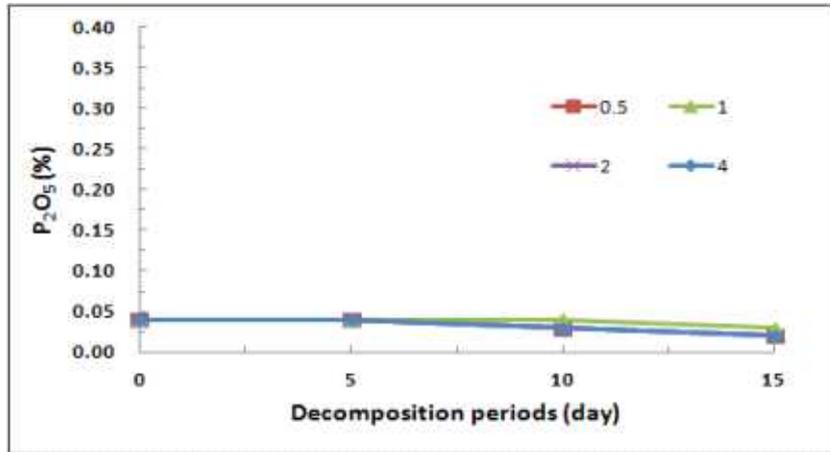


Fig. 115. 기능성 미생물 주입량별 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 비교

(바) 기능성미생물(KWN38) 주입량별 K<sub>2</sub>O 결과

기능성미생물(KWN38) 주입량별 K<sub>2</sub>O 분석결과 기능성미생물 주입량별 혼합액비의 K<sub>2</sub>O 차이는 거의 없으며, 부숙에 따른 K<sub>2</sub>O도 변화 없이 거의 일정하게 나타났다(Fig. 116).

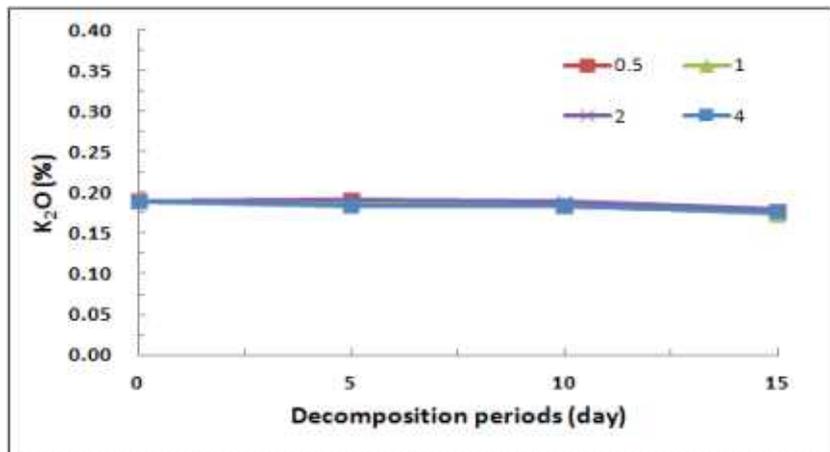


Fig. 116. 기능성미생물 주입량별 K<sub>2</sub>O 비교

(사) 기능성미생물(KWN38) 주입량별 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 결과

기능성미생물(KWN38) 주입량별 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 분석결과 기능성미생물 주입량별 혼합액비 모두 부숙기간이 늘어날수록 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N의 농도도 증가하였으며, 10일 이후부터는 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 농도가 거의 일정한 수준으로 유지되는 결과를 나타내었다. 또한 1, 2, 3mL로 주입한 혼합액비의 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N는 비슷하였으며, 0.5mL 주입한 혼합액비는 조금 낮게 나타났지만 주입량에 따른 변화는 크게 찾아볼 수 없었다(Fig. 117).

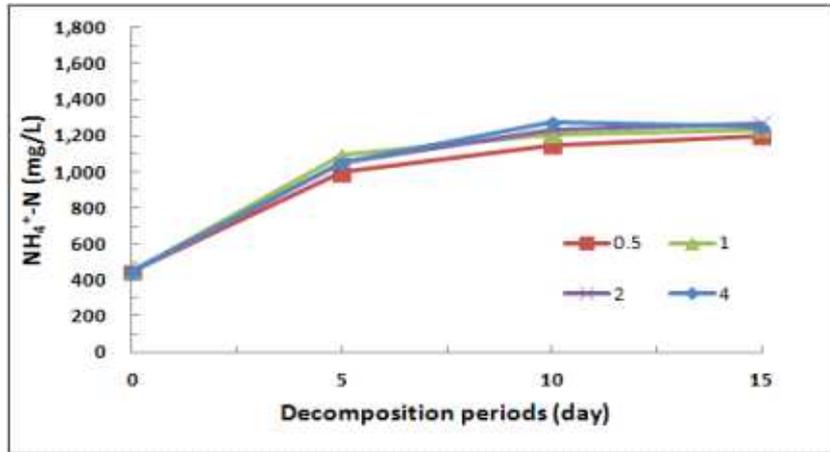


Fig. 117. 기능성미생물 주입량별 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 비교

(아) 기능성미생물(KWN38) 주입량별 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 결과

기능성미생물(KWN38) 주입량별 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 분석결과 기능성미생물 주입량별 혼합액비 모두 부숙기간이 늘어날수록 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N가 약간씩 증가하는 하나 질산화는 거의 일어나지 않는 것으로 나타났다(Fig. 118).

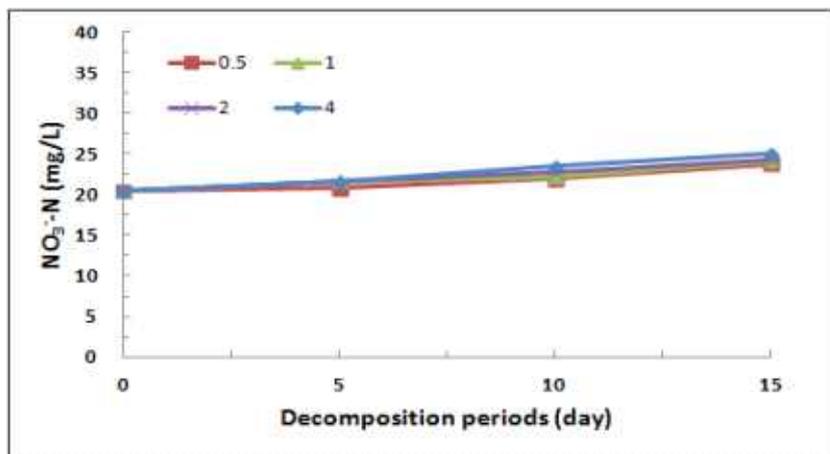


Fig. 118. 기능성미생물 주입량별 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 비교

(자) 기능성미생물(KWN38) 주입량별 Chlorophyll-a 결과

기능성미생물(KWN38) 주입량별 Chlorophyll-a 분석결과 기능성미생물 주입량별 혼합액비 모두 Chlorophyll-a 농도는 부숙 초반에 급격히 증가하였으며, 5일 이후부터는 점차 감소하다 10일 부터는 거의 일정하게 유지되었다. 주입량별 Chlorophyll-a의 차이는 거의 없이 비슷하게 나타났다(Fig. 119).

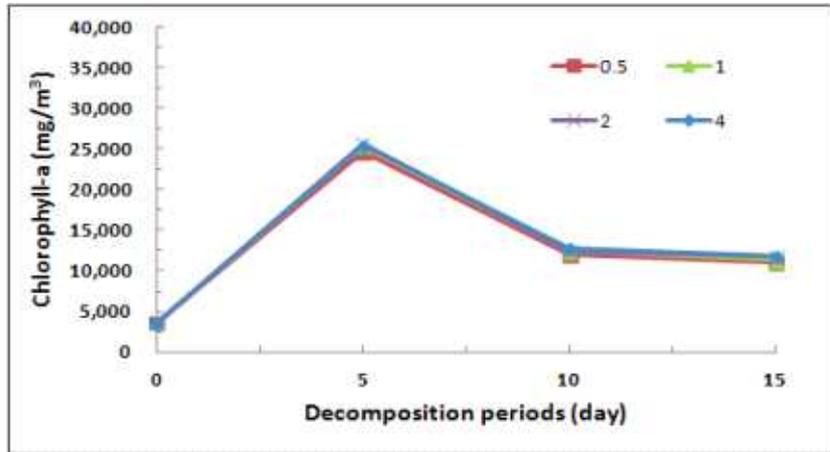


Fig. 119. 기능성미생물 주입량별 Chlorophyll-a 비교

(차) 기능성미생물(KWN38) 주입량 최적화 결론

기능성미생물(KWN38)을 이용한 실험실 규모 생초미생물 혼합액비 제조에 있어 기능성미생물 주입량별 액비화 효율을 비교하여 본 결과 혼합액비 1L 기준으로 기능성미생물을 1mL 주입하는 것이 가장 높은 효율을 보여 생초미생물 혼합액비 제조에 있어 최적의 기능성미생물 주입량인 것으로 나타났다.

(5) 운전온도 및 부숙기간 최적화 평가

혼합액비의 운전온도 및 부숙기간 최적화 평가는 20, 30℃의 온도 조건에서 운전 되어졌으며, 혼합액비 부숙후 운전온도별 액비화 효율을 비교하여 액비제조에 있어 최적의 운전온도 및 부숙기간을 도출하고자 한다. 운전온도별 혼합액비 부숙화 실험은 혼합전 멸균(120℃, 20min)을 실시하여 운전되어졌으며, 운전조건으로는 기능성미생물 1mL/L, 공기량 0.8L/min·L, 진탕 40rpm 및 연속폭기가 항상 유지되도록 하였다. 또한 부숙화 실험은 운전온도가 항상 유지되도록 항온항습실에서 실시하였다.

생초미생물 혼합액비의 운전온도별 액비화 효율을 살펴본 결과는 Table 23에 나타내었다.

Table 23. 운전온도별 액비화 효율 비교

Condition (°C)	Decomposition periods(day)	pH	EC (dS/m)	ORP (mV)	T-C (%)	T-N (%)	C/N ratio	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (%)	K <sub>2</sub> O (%)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg/L)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg/L)	Chl-a (mg/m <sup>3</sup> )
20	0	7.102	9.4	330.0	2.19	0.22	10.0	0.04	0.19	447	20.4	3,634
	5	8.644	11.7	167.1	1.83	0.22	8.3	0.04	0.19	1,095	21.7	25,425
	10	7.550	13.7	57.7	1.01	0.20	5.1	0.04	0.18	1,204	22.3	12,379
	15	7.187	14.5	18.4	0.80	0.17	4.7	0.03	0.17	1,235	24.2	11,390
30	0	7.102	9.4	330.0	2.19	0.22	10.0	0.04	0.19	447	20.4	3634
	5	7.941	14.9	103.7	1.14	0.22	5.2	0.04	0.19	1,249	23.5	26,379
	10	6.981	12.3	95.6	1.00	0.20	5.0	0.03	0.19	1,297	24.3	18,435
	15	6.881	10.0	74.3	0.83	0.18	4.6	0.02	0.18	1,306	25.0	12,876

(가) 운전온도별 pH 결과

운전온도별 혼합액비의 pH 분석결과 부숙기간동안 두 조건 모두 약 알칼리성 상태를 나타내었으며, 운전온도 30°C의 혼합액비는 pH가 부숙 초반에 급격히 증가다 점점 낮아지는 것으로 나타났다. 그러나 20°C의 운전조건에서 부숙기간동안 보여주었던 pH 변화가 30°C에서는 부숙 초반에 나타나는 것으로 보아 부숙이 좀 더 빠르게 진행되어 지는 것으로 나타났다(Fig. 120).

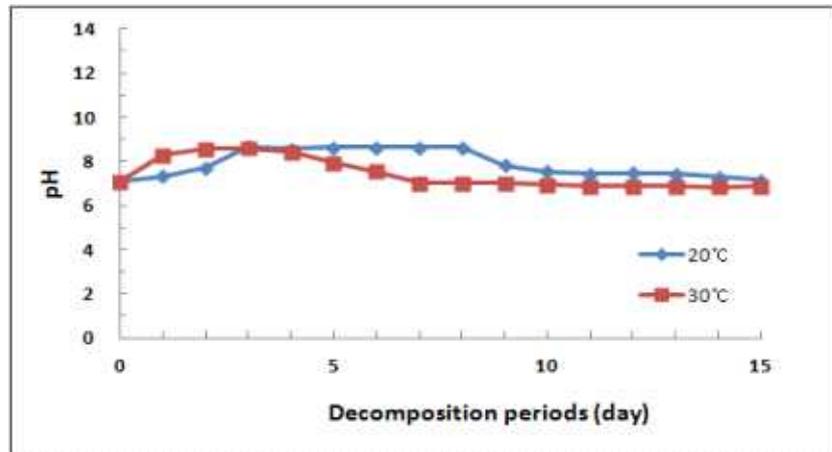


Fig. 120. 운전온도별 pH 비교

(나) 운전온도별 EC 결과

운전온도별 EC 분석결과 20°C에서의 혼합액비는 부숙기간 동안 EC가 일정하게 높아지는 반면 30°C에서는 EC가 부숙 초반부터 급격히 증가하다 점점 낮아지는 것으로 나타났다. 그러나 30°C의 혼합액비는 15일간 부숙후 EC가 부숙 초반의 EC와 같이 지는 결과를 나타내었다(Fig. 121).

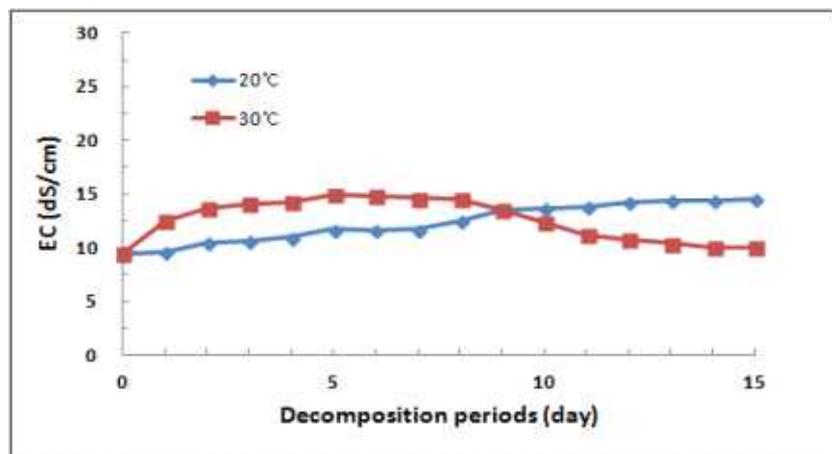


Fig. 121. 운전온도별 EC 비교

(다) 운전온도별 ORP 결과

운전온도별 ORP 분석결과 20°C, 30°C의 혼합액비는 부숙기간동안 Oxidic 조건의 부숙

상태를 나타내었으며, 30℃의 혼합액비는 ORP가 부숙 초반에 급격히 낮아졌다가 부숙 5일 부터는 일정한 수준으로 유지되는 것으로 나타났다. 그리고 30℃의 혼합액비는 8일 이후부터 20℃의 혼합액비 보다 ORP가 높게 나타나는 결과를 보여주었다(Fig. 122).

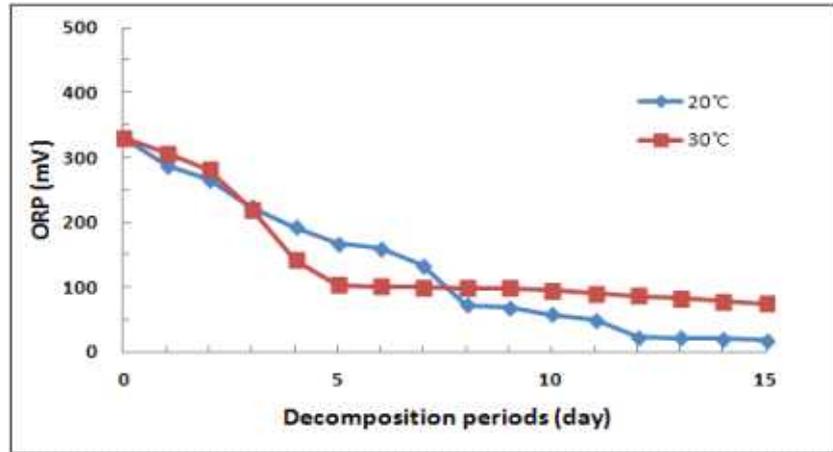


Fig. 122. 운전온도별 ORP 비교

(라) 운전온도별 C/N비 결과

운전온도별 C/N비 분석결과 20℃, 30℃의 혼합액비의 최종 C/N비 감소율을 같았으나 30℃에서는 부숙 5일째에 최대 효율을 나타낸 후 일정하게 유지되었다. 20℃에서 혼합액비의 최적 부숙기간은 10일 정도 이었으나 30℃에서는 5일 정도로 액비의 부숙 속도가 약 2배 정도 빨라진다는 결과를 얻을 수 있었다(Fig. 123).

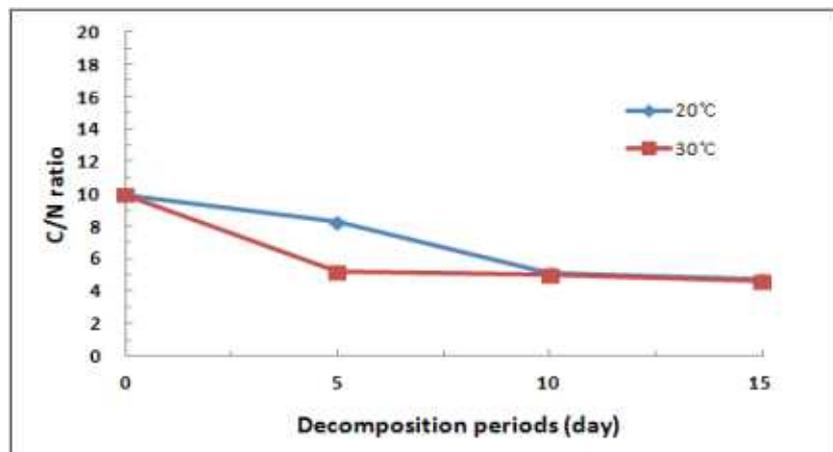


Fig. 123. 운전온도별 C/N비 비교

(마) 운전온도별 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 결과

운전온도별 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 분석결과 운전온도별 혼합액비의 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 차이는 크지 않았으며, 부숙 기간별 혼합액비의 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>도 거의 일정하게 나타났다(Fig. 124).

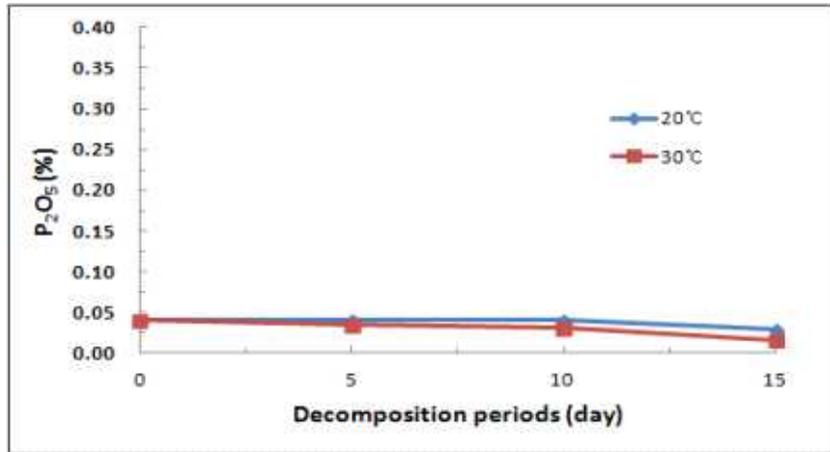


Fig. 124. 운전온도별 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 비교

(바) 운전온도별 K<sub>2</sub>O 결과

운전온도별 K<sub>2</sub>O 분석결과 20°C, 30°C의 운전온도별 혼합액비의 K<sub>2</sub>O 차이는 크게 나타나지 않았으며, 부숙기간별 혼합액비의 K<sub>2</sub>O도 변화 없이 거의 일정하였다(Fig. 125).

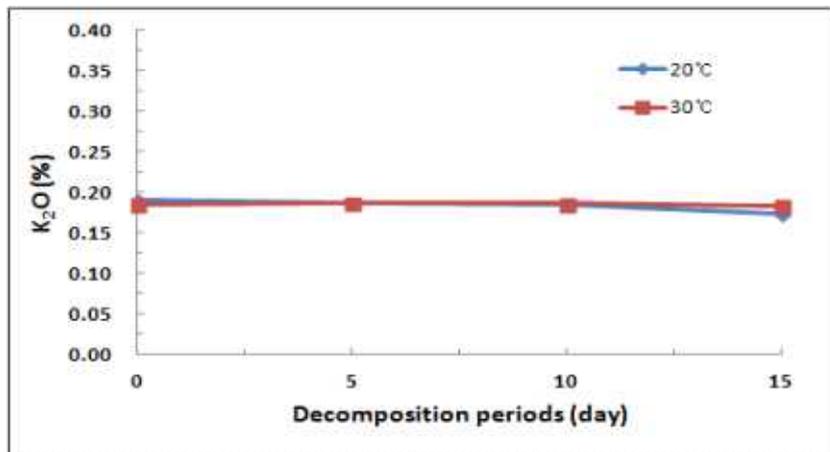


Fig. 125. 운전온도별 K<sub>2</sub>O 비교

(사) 운전온도별 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 결과

운전온도별 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 분석결과 운전온도별 혼합액비 모두 부숙기간이 늘어날수록 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N의 농도가 증가하였으며, 30°C에서는 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N의 농도가 20°C 혼합액비 보다는 약간 높아지는 결과를 나타내었다(Fig. 126).

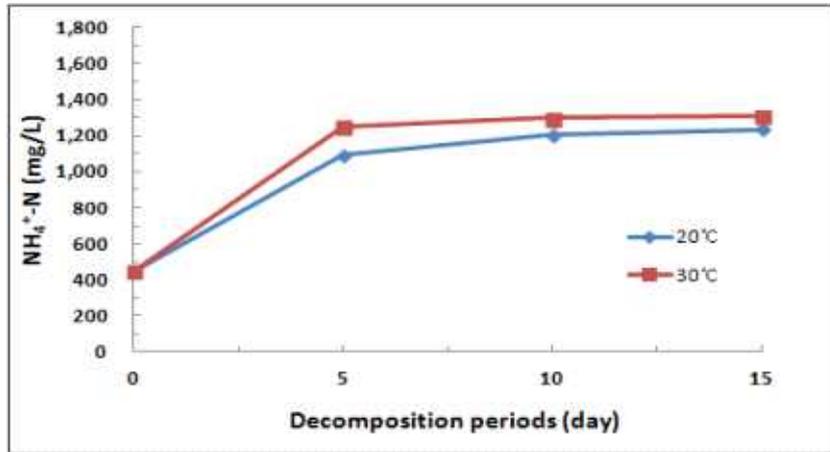


Fig. 126. 운전온도별 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 비교

(아) 운전온도별 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 결과

운전온도별 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 분석결과 운전온도별 혼합액비 모두 부숙기간이 늘어날수록 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N가 약간씩 증가 하였으며, 30°C가 20°C보다는 좀 더 높게 나타나기는 하지만 두 조건 모두 질산화는 거의 일어나지 않는 것으로 나타났다(Fig. 127).

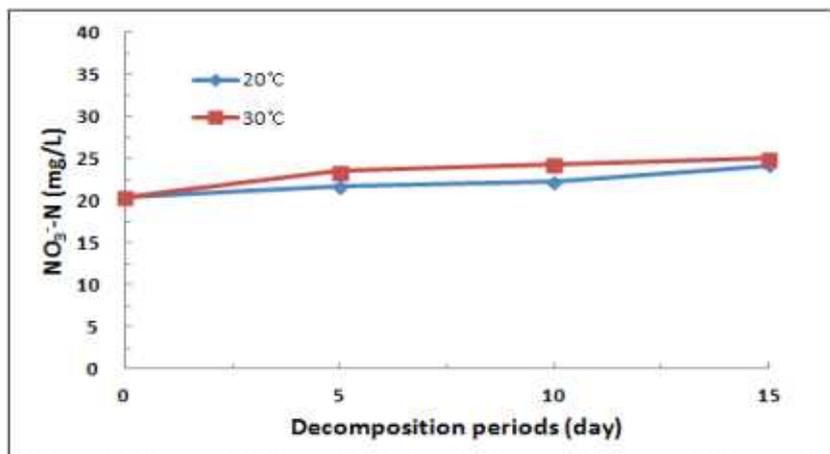


Fig. 127

. 운전온도별 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 비교

(자) 운전온도별 Chlorophyll-a 결과

운전온도별 Chlorophyll-a 분석결과 운전온도별 혼합액비 모두 Chlorophyll-a 농도는 부숙 초반에 가장 높게 나타났으며, 5일 이후부터는 점차 감소하는 것으로 나타났다. 그리고 30°C가 20°C의 혼합액비 보다는 Chlorophyll-a의 농도가 좀 더 높게 발생되었다(Fig. 128).

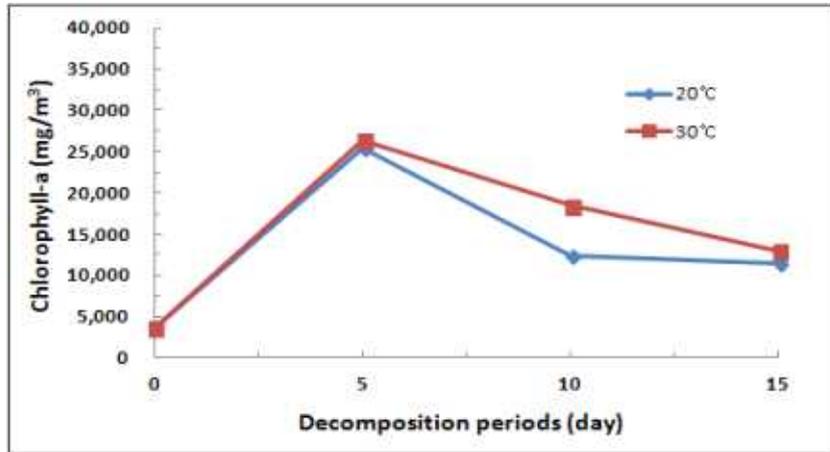


Fig. 128. 운전온도별 Chlorophyll-a 비교

(차) 운전온도 및 부숙기간 최적화 결론

기능성미생물(KWN38)을 이용한 실험실 규모 생초미생물 혼합액비 제조에 있어 운전온도별 액비화 효율을 비교하여 본 결과 20°C 보다는 30°C의 운전온도가 액비화 효율에 있어 더 높은 효율을 나타내는 것을 알 수 있었으며, 20°C의 운전온도에서는 최적 부숙기간이 약 10일이었으나 30°C의 운전온도에서는 약 5일로 약 1/2 정도로 부숙기간을 단축시킬 수 있다는 결과를 얻을 수 있었다. 이를 통하여 허용 온도 범위 내에서 온도가 10°C 증가함에 따라 반응속도가 2배정도 빨라진다는 사실을 확인할 수 있었다.

(6) 부숙전 멸균 적용 평가

부숙전 멸균 적용가능성 평가는 혼합액비의 부숙전 전처리 적용이 기능성미생물(KWN38)을 이용한 실험실 규모 생초 미생물 혼합액비 제조에 있어 액비화 효율에 미치는 영향을 살펴보고자 한다. 멸균 적용가능성 평가 실험은 앞서 실험한 멸균을 실시한 혼합액비와 멸균을 실시하지 않은 혼합액비를 동일한 부숙조건으로 실험을 실시하여 액비 제조에 있어 전처리의 적용가능성을 평가하여 최적의 운전인자를 도출하고자 한다. 또한 부숙전 제조한 혼합액비에 대하여 생균수를 측정한 결과 멸균을 실시하지 않은 혼합액비는  $1.9 \times 10^7$ CFU/g 이었으나 멸균을 실시한 혼합액비는  $4.4 \times 10^4$ CFU/g로 멸균을 실시한 혼합액비 보다 멸균을 실시하지 않은 혼합액비에서 더 많이 균이 생존하고 있는 것으로 나타났다.

부숙전 멸균 적용에 따른 액비화 효율을 살펴본 결과는 Table 24에 나타내었다.

Table 24. 부숙전 멀균 적용에 따른 액비화 효율 비교

Condition	Decomposition periods(day)	pH	EC (dS/m)	ORP (mV)	T-C (%)	T-N (%)	C/N ratio	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (%)	K <sub>2</sub> O (%)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg/L)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg/L)	Chl-a (mg/m <sup>3</sup> )
Sterilization(X)	0	8.846	11.0	325.3	2.58	0.23	11.2	0.04	0.19	1,054	18.4	7,924
	5	8.170	13.3	149.3	2.32	0.23	10.1	0.04	0.19	1,357	20.0	32,091
	10	7.679	14.3	121.5	1.38	0.19	7.3	0.04	0.19	1,509	21.5	32,932
	15	7.215	15.7	56.3	1.16	0.17	6.8	0.03	0.18	1,644	22.3	26,304
Sterilization(O)	0	7.102	9.4	330.0	2.19	0.22	10.0	0.04	0.19	447	20.4	3,634
	5	8.244	11.7	167.1	1.83	0.22	8.3	0.04	0.19	1,095	21.7	25,425
	10	7.550	13.7	57.7	1.01	0.20	5.1	0.04	0.18	1,204	22.3	12,379
	15	7.187	14.5	18.4	0.80	0.17	4.7	0.03	0.17	1,235	24.2	11,390

(가) 부숙전 멸균 적용에 따른 pH 결과

부숙전 멸균 적용에 따른 pH 분석결과 멸균을 실시한 혼합액비와 멸균을 실시하지 않은 혼합액비 모두 약 알칼리성 상태로 나타났으며, 부숙기간에 따른 pH는 부숙 초반 외에는 비슷한 경향을 나타내었다(Fig. 129).

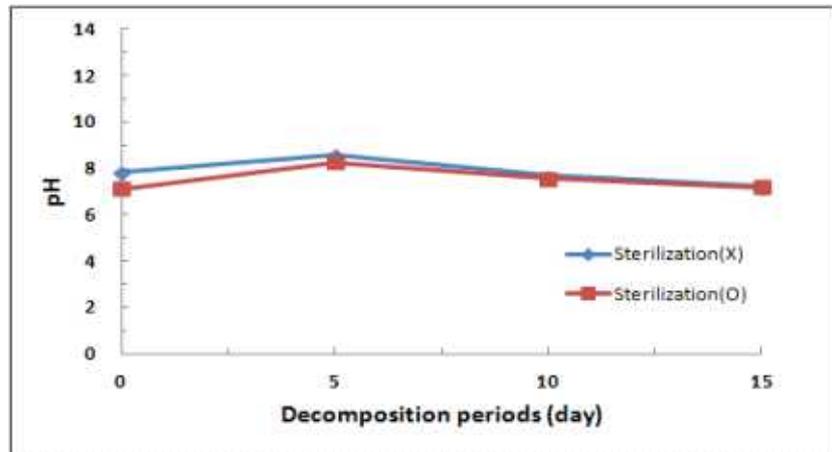


Fig. 129. 부숙전 멸균 적용에 따른 pH 비교

(나) 부숙전 멸균 적용에 따른 EC 결과

부숙전 멸균 적용에 따른 EC 분석결과 멸균을 실시한 혼합액비와 멸균을 실시하지 않은 혼합액비 모두 부숙기간이 늘어날수록 EC가 높아졌다. 그러나 멸균을 실시하지 않은 혼합액비는 멸균을 실시한 혼합액비 보다 EC가 더 높아지는 것으로 나타났다(Fig. 130).

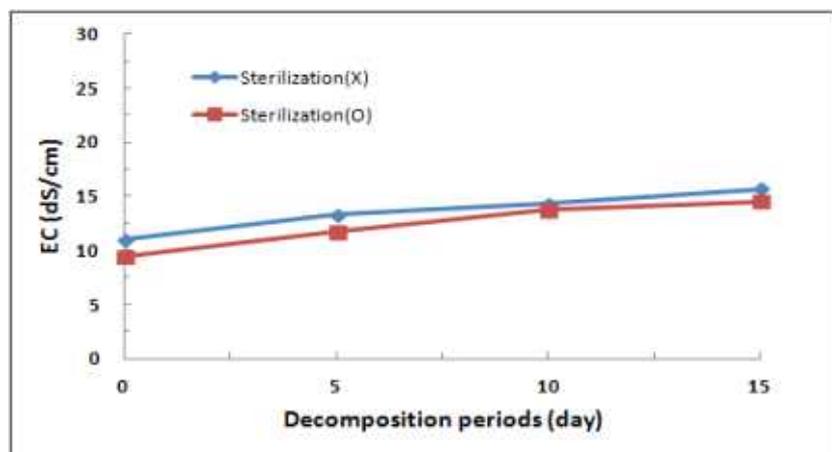


Fig. 130. 부숙전 멸균 적용에 따른 EC 비교

(다) 부숙전 멸균 적용에 따른 ORP 결과

부숙전 멸균 적용에 따른 ORP 분석결과 멸균을 실시한 혼합액비와 멸균을 실시하지 않은 혼합액비 모두 부숙기간 동안 Oxic 조건의 부숙상태를 나타내었으며, 멸균을 실시한 혼합액비에서는 ORP가 일정하게 부숙기간동안 낮아지는 반면 멸균을 실시하지

얇은 혼합액비에서는 ORP가 다소 불안정하게 낮아지는 결과를 나타내었다(Fig. 131).

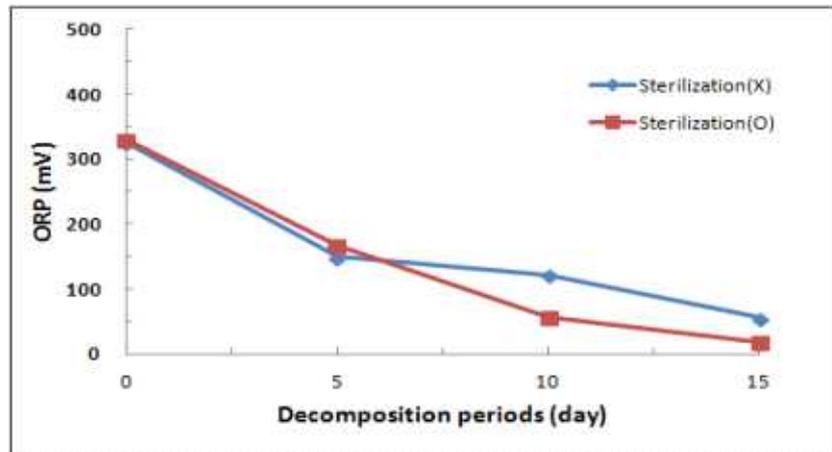


Fig. 131. 부숙전 멸균 적용에 따른 ORP 비교

(라) 부숙전 멸균 적용에 따른 C/N비 결과

부숙전 멸균 적용에 따른 C/N비 분석결과 멸균을 실시한 혼합액비는 약 53%의 C/N비 감소율을 보인 반면 멸균을 실시하지 않은 혼합액비는 약 39%로 나타나 C/N비 감소율에서 다소 큰 차이를 보였으며, 혼합액비내 C/N비 비율 또한 멸균을 실시하지 않은 혼합액비 보다 낮게 나타났다. 그래서 부숙전 멸균을 실시하는 것이 액비 제조에 있어 더 효율적이라는 결과를 얻을 수 있었다(Fig. 132).

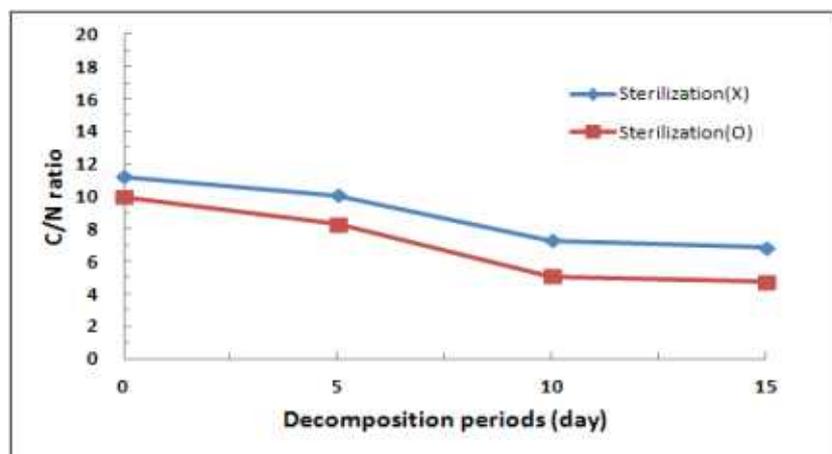


Fig. 132. 부숙전 멸균 적용에 따른 C/N비 비교

(마) 부숙전 멸균 적용에 따른 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 결과

부숙전 멸균 적용에 따른 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 분석결과 두 조건에서 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>의 차이가 전혀 없었으며, 부숙기간별 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 또한 서로 같게 나타났다(Fig. 133).

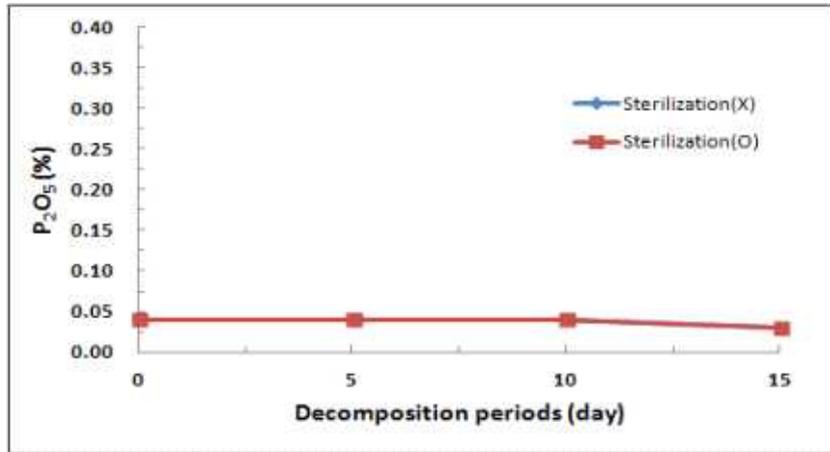


Fig. 133. 부숙전 멸균 적용에 따른 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 비교

(바) 부숙전 멸균 적용에 따른 K<sub>2</sub>O 결과

부숙전 멸균 적용에 따른 K<sub>2</sub>O 분석결과 부숙전 전처리 적용에 따른 K<sub>2</sub>O의 차이가 거의 없었으며, 부숙기간에 따른 변화도 거의 비슷하게 나타났다(Fig. 134).

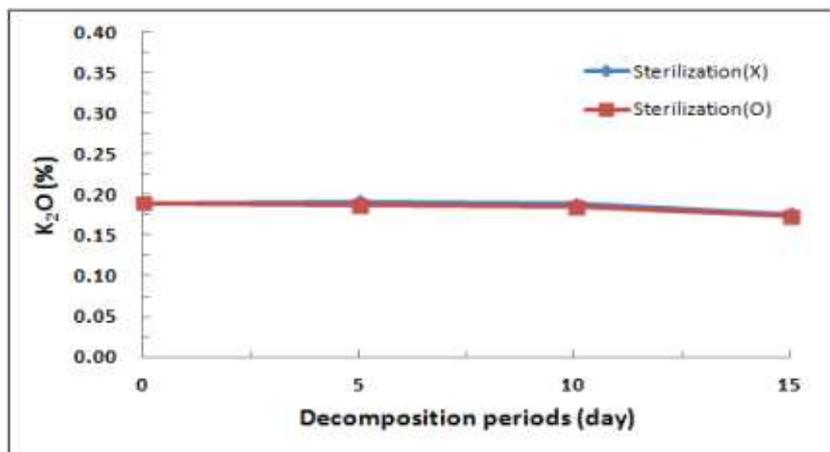


Fig. 134. 부숙전 멸균 적용에 따른 K<sub>2</sub>O 비교

(사) 부숙전 멸균 적용에 따른 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-NN 결과

부숙전 멸균 적용에 따른 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 분석결과 전처리를 실시하지 않은 혼합액비가 전처리 실시한 혼합액비 보다 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N가 훨씬 높게 발생되었다. 전처리를 실시한 혼합액비는 5일 후부터 거의 일정하게 유지되는 반면 전처리를 실시하지 않은 혼합액비는 부숙기간이 늘어날수록 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N도 계속 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 135).

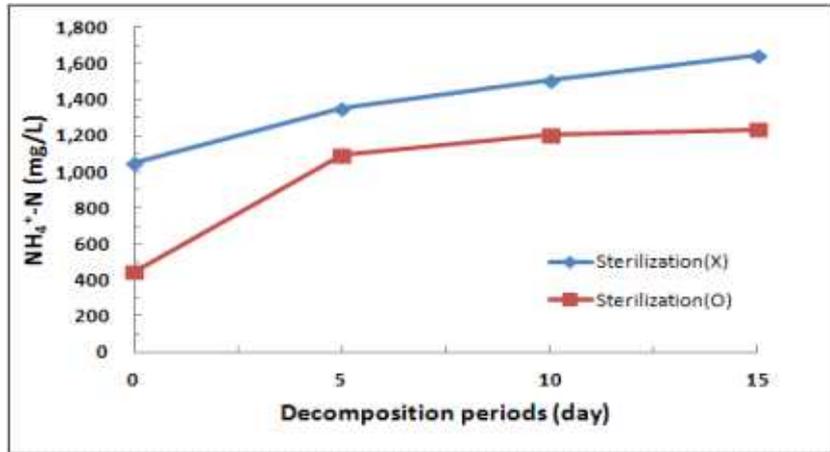


Fig. 135. 부숙전 멸균 적용에 따른  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  비교

(아) 부숙전 멸균 적용에 따른  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  결과

부숙전 멸균 적용에 따른  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  분석결과 혼합액비 모두 부숙기간이 늘어날수록  $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 가 약간씩 증가하는 하나 질산화는 거의 일어나지 않는 것으로 나타났다(Fig. 136).

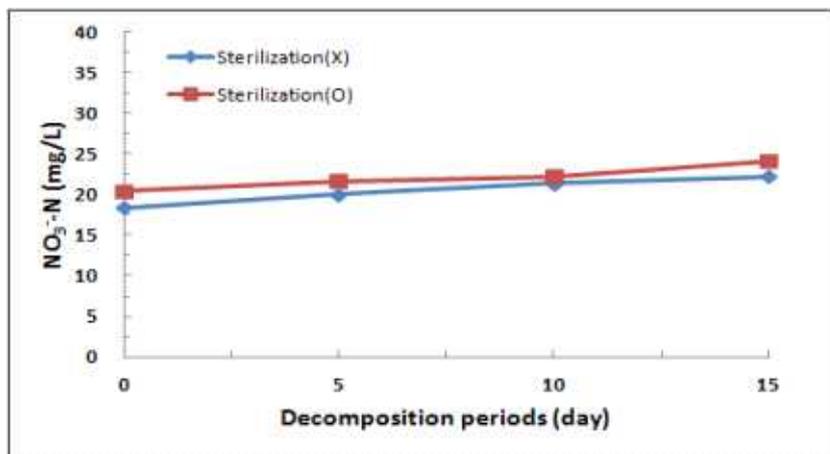


Fig. 136. 부숙전 멸균 적용에 따른  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  비교

(자) 부숙전 멸균 적용에 따른 Chlorophyll-a 결과

부숙전 멸균 적용에 따른 Chlorophyll-a 분석결과 혼합액비 모두 Chlorophyll-a 농도는 부숙 초반에 가장 높게 나타났다. 그러나 멸균을 실시한 혼합액비는 5일 이후부터는 점차 감소하였으나 전처리를 실시하지 않은 혼합액비는 5일 이후 조금 높아지다 10일부터는 낮아지것으로 나타났다. 이는 멸균시 Chlorophyll-a가 다소 많이 빠져 나와 멸균을 적용하지 않은 혼합액비보다는 다소 낮은 결과를 나타낸 것으로 판단된다(Fig. 137).

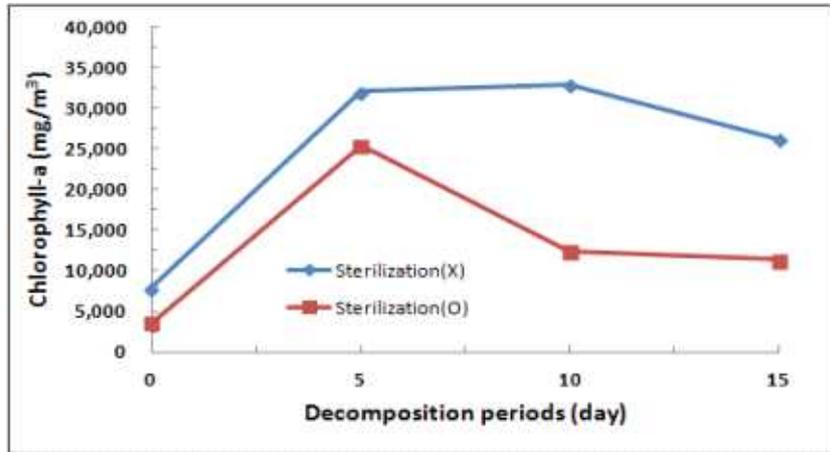


Fig. 137. 부숙전 멸균 적용에 따른 Chlorophyll-a 비교

(차) 부숙전 멸균 적용가능성 평가 결론

기능성미생물(KWN38)을 이용한 실험실 규모 생조미생물 혼합액비 제조에 있어 부숙전 멸균 적용가능성 평가를 액비화 효율 비교를 통하여 살펴본 결과 부숙전 멸균을 실시하는 것이 액비화 효율에 있어 더 높은 효율을 보이는 것으로 나타났다.

(7) 운전조절인자로써 ORP 적용 평가

액비는 보통 C/N비를 이용하여 부숙도를 판정하지만 C/N비 결과도출에 많은 시간이 소요됨에 따라 액비 제조에 있어 운전조절인자로서 ORP가 적용 가능한지 평가 해보려 하며, 운전조절인자로서 ORP 외에도 DO가 적용 가능한지를 살펴보려 한다.

운전조절인자로서 ORP 적용가능성 평가는 기능성미생물 최적 주입량인 1mL/L의 C/N비와 ORP 및 DO를 이용하였으며, ORP와 DO는 반응조내 폭기를 실시하고 있는 상태와 폭기를 일시적으로 정지시킨 상태에서 측정된 값을 사용하였다. 부숙기간별 C/N비 값과 ORP 및 DO의 값을 이용하여 상관관계수( $R^2$ )를 나타내어 본 결과 폭기를 실시하고 있는 상태에서 혼합액비의 ORP는 폭기로 인하여 다소 불안정한 값을 나타내었으며, 상관관계수( $R^2$ ) 또한 0.6598로 낮은 상관관계를 나타내었다. 그러나 폭기를 일시적으로 정지하고 혼합액비의 ORP를 측정된 결과 안정적인 변화를 나타내었다. 또한 상관관계수가 0.9481로 C/N비와 높은 상관관계를 나타내었다. 그러나 운전인자로서 DO의 적용가능성 평가를 하여본 결과 반응조내 폭기를 실시하고 있는 상태와 폭기를 일시적으로 정지시킨 상태에서 상관관계수는 0.4324, 0.6050으로 낮은 상관관계를 나타내었다. 그래서 운전인자로서 DO는 적용 불가능 할 것으로 보여 진다.

운전조절인자로서 C/N비와 폭기를 일시적으로 정지시킨 상태에서 ORP가 높은 상관관계를 나타냄에 따라 C/N비를 대체할 수 있는 운전조절인자로서 폭기를 일시적으로 정지시킨 상태에서의 ORP가 적용 가능하며, 또한 혼합액비 제조시 ORP를 이용하여 부숙도를 판별 할 수 있을 것으로 보여 진다(Fig. 138).

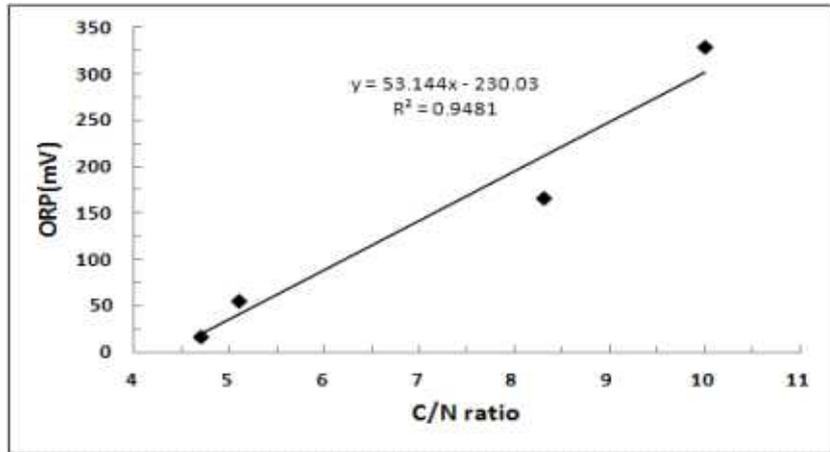


Fig. 138. 운전조절인자로서 C/N비 및 ORP 상관관계

#### 나. 소규모 현장 제조공정 최적화 연구

소규모 현장 제조공정을 이용한 생초미생물 혼합액비 제조 조성은 기능성미생물을 이용한 실험실 규모 생초미생물 혼합액비 조성과 동일하게 진행하였다. 각각의 원료의 혼합량에 따라 제조 하였으며, 기능성미생물(KWN38)은 1L 기준으로 1mL를 혼합하여 액비를 제조 하였으며, 소규모 현장 제조공정을 이용한 생초미생물 혼합액비의 혼합액량은 총 40L로 제조하여 연구를 진행하였다. 또한 혼합액비 제조에 있어 잔디예지물 및 모든 실험재료에 대하여 무균조작을 실시하여 사용하였다. 소규모 현장 제조공정을 이용한 생초미생물 혼합액비 액비화 평가는 기능성미생물을 이용한 실험실 규모 생초미생물 혼합액비의 화학적 분석방법과 동일하게 실시하였으며, 그 결과를 바탕으로 부숙도를 판정하였다.

소규모 현장 제조공정을 이용한 생초미생물 혼합액 제조 총 계획량인 40L 기준으로 부숙화 실험을 진행하기 위하여 기능성 미생물을 이용한 실험실 규모 생초미생물 혼합액비 제조공정을 바탕으로 소규모 현장 제조공정을 설계하였다. 소규모 현장 제조공정은 생초미생물 혼합액량이 실험실 규모 생초미생물 혼합액비에 비하여 크게 증가하였으므로 원활한 공기주입을 위하여 더 큰 용량의 에어펌프(PD-40, PHILGREEN)를 이용하여 공기를 연속적으로 주입하였으며, 생초미생물 혼합액비 반응조에 공기 주입을 위하여 연결한 호스 끝에는 Air stone(직경 3.4cm, 길이 11cm)을 연결하여 연속폭기가 되도록 하였다. 또한 회전식 진탕기(BL2003D, MTOPS)를 이용하여 100rpm으로 연속적으로 진탕을 실시하여 충분히 혼합 되어 지게 하였다(Fig. 139). 그리고 생초미생물 혼합액비 부숙에 있어서 운전온도를 일정하게 유지를 위하여 실험실 규모와 동일하게 항온항습실에서 실험을 진행하였다.

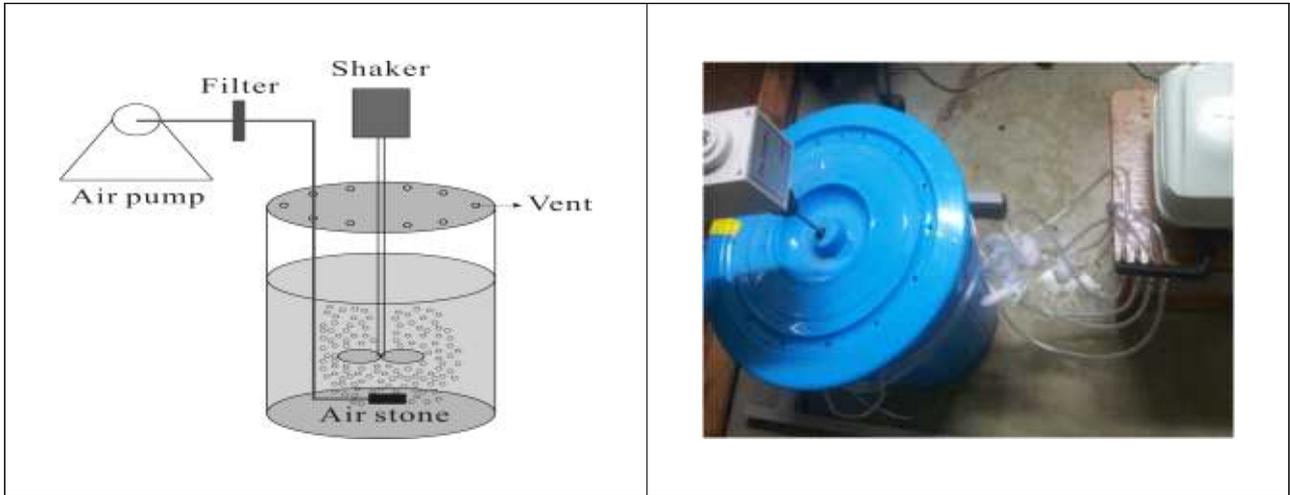


Fig. 139. 소규모 현장 제조공정을 이용한 Oxic 상태의 부숙조건

소규모 현장 제조공정을 이용한 생초미생물 혼합액비 최적화 평가는 기능성미생물을 이용한 실험실규모 생초미생물 혼합액비 제조공정 최적화 평가의 액비화 효율과 비교하여 평가하였다. 제조공정 최적화 평가 연구는 공기주입량, 기능성미생물 주입량, 운전온도 및 부숙기간에 따른 액비화 효율을 살펴보았으며, 그에 따른 최적의 운전인자를 도출하고자 하였다.

(1) 공기주입량 최적화 평가

소규모 현장 제조공정을 이용한 생초미생물 혼합액비 공기주입량 최적화를 실시하여 위하여 생초미생물 혼합액의 처리대상량 증가에 따라 최적 공기주입량을 살펴보았다. 살펴본 결과 처리대상 액비량 1 ~ 20L 까지는 액비의 단위부피당 최적 공기주입량이 증가하나 그 정도는 완만한 것으로 나타났으며, 생초미생물 혼합액비량 20L와 두 배로 증가시킨 40L에서는 최적 공기주입량이 0.8L/min · L로 일정한 수준으로 유지되는 결과를 나타내었다. 따라서 본 실험 결과에 따를 때 혼합액비 용량이 40L 이상인 경우에도 최적 공기주입량은 0.8L/min · L 일 것으로 보여 진다(Fig. 140).

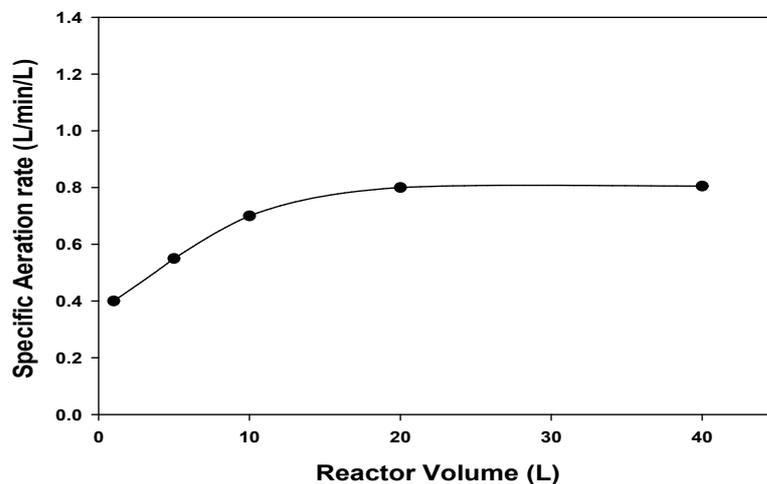


Fig. 140. 생초미생물 혼합액 단위부피당 공기주입량

(2) 실험실 규모 및 소규모 액비화 효율 비교 평가

실험실 규모 생초미생물 혼합액비 제조공정에서 실시하였던 부숙조건 운전온도 30℃, 부숙기간 5일, 부숙전 멸균 실시, 공기주입량 0.8L/min · L, 혼합액비 1L기준으로 기능성 미생물 1mL 주입하였던 결과를 바탕으로 소규모 현장제조공정을 이용한 생초미생물 혼합액비의 부숙조건을 실험실 규모와 동일하게 하여 부숙화를 진행 하였다.

소규모 현장 제조공정을 이용한 생초미생물 혼합액비 부숙후 액비화 효율을 실험실 규모의 액비화 효율과 비교하여 Table 25에 나타내었다. Table 25에서 나타난 바와 같이 소규모의 생초미생물 혼합액비 부숙결과 액비화 효율에 있어서 실험실 규모에서의 C/N 비 등 모든 항목에서 거의 동일한 결과 값을 나타내는 것을 알 수 있었다. 이는 생초미생물 혼합액비 제조에 있어서 실험실 규모 실험을 통하여 구한 설계인자들은 혼합액비 제조량이 증가하더라도 그대로 적용가능하다는 뜻이다.

Table 25. 실험실 규모 및 소규모 현장 제조공정을 이용한 생초미생물 혼합액비 액비화 효율 비교

Condition	Decomposition periods(day)	pH	EC (dS/m)	ORP (mV)	T-C (%)	T-N (%)	C/N ratio	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (%)	K <sub>2</sub> O (%)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg/L)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg/L)	Chl-a (mg/m <sup>3</sup> )
Laboratory scale	0	7.102	9.4	330.0	2.19	0.22	10.0	0.04	0.19	447	20.4	3,634
	5	7.941	14.9	103.7	1.14	0.22	5.2	0.04	0.19	1,249	23.5	26,379
Small scale	0	7.423	9.8	303.3	2.22	0.21	10.5	0.05	0.20	523	21.0	3,831
	5	7.907	15.2	95.9	1.18	0.20	5.8	0.05	0.20	1,304	24.4	28,655

### (3) 미생물주입량 최적화 평가

소규모 현장 제조공정을 이용한 생초미생물 혼합액비 기능성미생물 최적 주입량 산정 실험은 기능성미생물(KWN38) 주입량에 따른 액비화 효율을 살펴보았으며, 기능성미생물 주입량은 1L 기준 0.5, 1mL를 주입하여 주입량 변화에 따른 액비화 효율을 비교하여 최적 주입량을 결정하였다. 제조한 생초미생물 혼합액비는 부숙후 0, 5일에 샘플을 채취하여 분석하였으며, 분석결과를 바탕으로 기능성미생물 최적 주입량을 산정하려고 한다. 기능성미생물(KWN38) 주입량별 혼합액비의 부숙화 실험은 부숙전 멸균을 실시하여 운전되어졌으며, 운전조건으로는 운전온도 30℃, 공기량 0.8L/min·L, 진탕 100rpm 및 연속 폭기가 항상 유지되도록 하였다.

소규모 현장 제조공정을 이용한 생초미생물 혼합액비의 기능성미생물(KWN38) 주입량별 액비화 효율 비교는 Table 26에 나타내었으며, 동일한 운전조건으로 실시하였던 실험실 규모 생초미생물 혼합액비 기능성미생물(KWN38) 주입량별 액비화 효율 결과와 비교하여 보았다.

그 결과 기능성미생물(KWN38) 주입량은 1L 기준 1mL를 주입하는 것이 액비화 효율에 있어 더 높은 효율을 보이는 것으로 나타났다. 또한 실험실 규모 생초미생물 혼합액비 기능성미생물 주입량별 액비화 효율과 소규모 생초미생물 혼합액비의 기능성미생물 주입량별 액비화 효율 결과와 동일한 결론을 얻을 수 있었으며, 생초미생물 혼합액비 1L 기준 기능성미생물(KWN38)을 1mL 주입하는 것이 소규모 현장 제조공정을 이용한 생초미생물 혼합액비 제조에 있어서 기능성미생물(KWN38) 최적 주입량인 것으로 나타났다.

Table 26. 기능성미생물(KWN38) 주입량별 액비화 효율 비교

Condition (mL/L)	Decomposition periods(day)	pH	EC (dS/m)	ORP (mV)	T-C (%)	T-N (%)	C/N ratio	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (%)	K <sub>2</sub> O (%)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg/L)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg/L)	Chl-a (mg/m <sup>3</sup> )
0.5	0	6.982	8.7	300.6	2.22	0.21	10.5	0.05	0.19	510	20.8	3,803
	5	7.903	14.1	92.8	1.70	0.20	8.5	0.05	0.19	1,071	23.2	27,232
1	0	7.423	9.8	303.3	2.22	0.21	10.5	0.05	0.20	523	21.0	3,831
	5	7.907	15.2	95.9	1.18	0.20	5.8	0.05	0.20	1,304	24.4	28,655

### (4) 운전온도 및 부숙기간 최적화 평가

소규모 현장 제조공정을 이용한 생초미생물 혼합액비의 운전온도 및 부숙기간 최적화 실험은 20℃ 10일 및 30℃ 5일의 운전온도 조건에서 운전 되어졌으며, 혼합액비 부숙 후 운전온도 및 부숙기간에 따른 액비화 효율을 비교하여 액비제조에 있어 운전온도에 따른 부숙기간을 최적화 하고자 한다. 운전온도 및 부숙기간에 따른 혼합액비 부숙화 실험은 부숙전 멸균을 실시하여 운전되어졌으며, 기능성미생물 1mL/L, 공기량 0.8L/min·L,

진탕 100rpm 및 연속폭기가 항상 유지되도록 하였다. 또한 부숙화 실험은 운전온도가 항상 유지되는 항온항습실에서 실시하였다.

소규모 현장 제조공정을 이용한 생초미생물 혼합액비의 운전온도 및 부숙기간에 따른 액비화 효율을 살펴본 결과는 Table 27에 나타내었다. Table 27에서 나타난 바와 같이 소규모 현장 제조공정을 이용한 생초미생물 혼합액비는 20℃ 10일 부숙된 생초미생물 혼합액비 보다 30℃ 5일에서 부숙되어진 혼합액비가 액비화 효율에 있어 더 높은 효율을 나타내는 것을 알 수 있었다. 또한 실험실 규모의 부숙기간 최적화 연구결과에서도 부숙 온도 20℃에서는 약 10일 이었으나 30℃에서는 약 5일로 부숙기간을 1/2 정도로 단축시킬 수 있다는 결론을 나타내었다. 이번 소규모 현장 제조공정을 이용한 생초미생물 혼합액비 실험에서도 약 1/2 정도로 부숙기간을 단축시킬 수 있다는 같은 결론을 얻을 수 있었으며, 더 높은 액비화 효율을 보이는 것으로 나타났다. 또한 허용 온도 범위 내에서 온도가 10℃ 증가함에 따라 반응속도가 2배정도 빨라진다는 같은 결론을 확인할 수 있었다.

Table 27. 운전온도 및 부숙기간별 액비화 효율 비교

Condition (°C)	Decomposition periods(day)	pH	EC (dS/m)	ORP (mV)	T-C (%)	T-N (%)	C/N ratio	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (%)	K <sub>2</sub> O (%)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg/L)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg/L)	Chl-a (mg/m <sup>3</sup> )
20	0	7.423	9.8	303.3	2.22	0.21	10.5	0.05	0.20	523	21.0	3,831
	5	8.082	12.3	149.1	1.89	0.21	9.0	0.04	0.20	1,133	22.9	24,425
	10	8.012	14.5	33.6	1.25	0.20	6.3	0.04	0.19	1,299	23.6	15,352
30	0	7.423	9.8	303.3	2.22	0.21	10.5	0.05	0.20	523	21.0	3,831
	5	7.907	15.2	95.9	1.18	0.20	5.8	0.05	0.20	1,304	24.4	28,655

#### (5) 부숙전 멸균 적용 평가

부숙전 멸균 적용가능성 평가는 혼합액비 부숙전 멸균 적용이 소규모 현장 제조공정을 이용한 생초미생물 제조에 있어서 액비화 효율에 미치는 영향을 살펴보고자 한다. 앞의 생초미생물 혼합액비의 부숙전 멸균 적용은 골프장에서 발생하는 잔디예지물을 멸균을 실시하여 생초미생물 혼합액비를 제조하는 것을 말한다. 부숙전 멸균 적용 가능성 평가는 부숙전 멸균을 실시한 혼합액비와 부숙전 멸균을 실시하지 않은 혼합액비를 부숙후 결과 값을 바탕으로 액비화 효율을 비교하여 평가를 실시하였다. 또한 실험실 규모 생초미생물 혼합액비의 부숙전 멸균 적용가능성 평가에서 나타내었던 액비화 효율과 소규모 생초미생물 혼합액비 부숙전 멸균 적용가능성 평가의 액비화 효율과 비교하여 최종 부숙전 멸균 적용가능성을 평가하여 보았다. 부숙전 멸균 적용가능성 평가는 동일한 부숙조건으로 실험을 실시하였으며, 부숙화 운전조건으로는 운전온도 30℃, 부숙기간 5일, 기능성미생물 1L 기준 1mL 주입, 공기주입량 0.8L/min·L, 진탕 100rpm 및 연속폭기가 항상 유지되도록 하였다. 그리고 부숙전 전처리를 적용한 혼합액비의 잔디예지물은 혼합전 멸균(120℃, 20min)을 실시하여 운전되어졌다.

소규모 현장 제조공정을 이용한 생초미생물 혼합액비 부숙전 멸균 적용에 따른 액비화 효율을 살펴본 결과는 Table 28에 나타내었다. Table 28에 나타난 바와 같이 부숙전 멸균 적용과 미적용에서의 액비화 효율을 비교하여 살펴본 결과 부숙전 멸균을 실시하는 것이 C/N비 등 액비화 효율에 있어 더 높은 효율을 보이는 것으로 나타났다. 이 결과를 바탕으로 실험실 규모 생초미생물 혼합액비 제조에 있어서 부숙전 멸균 적용가능성 평가의 액비 효율과 비교하여 본 결과 소규모 현장 제조공정을 이용한 생초미생물 혼합액비의 연구결과와 비슷한 결과를 보여주는 것으로 나타났다. 그래서 생초미생물 혼합액비 제조에 있어서 부숙전 멸균을 적용하는 것이 옳다고 보여 진다.

Table 28. 부숙전 멸균 적용에 따른 액비화 효율 비교

Condition	Decomposition periods(day)	pH	EC (dS/m)	ORP (mV)	T-C (%)	T-N (%)	C/N ratio	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (%)	K <sub>2</sub> O (%)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg/L)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg/L)	Chl-a (mg/m <sup>3</sup> )
Sterilization (X)	0	8.165	9.6	323.3	2.52	0.22	11.5	0.05	0.19	1,161	19.8	7,051
	5	7.761	14.5	113.2	1.58	0.21	7.5	0.05	0.19	1,431	21.2	40,713
Sterilization (O)	0	7.423	9.8	303.3	2.22	0.21	10.5	0.05	0.20	523	21.0	3,831
	5	7.907	15.2	95.9	1.18	0.20	5.8	0.05	0.20	1,304	24.4	28,655

(6) 운전조절인자로써 ORP 적용 평가

소규모 현장 제조공정을 이용한 생초미생물 혼합액비 제조에 있어 운전조절인자로써 ORP가 적용 가능한지 평가 하려한다. 운전조절인자로서 ORP 적용가능성 평가는 20℃에서 10일간 부숙하여 얻은 부숙기간별 C/N비 값과 ORP 값을 이용하여 평가하였으며, ORP 측정은 실험실 규모 ORP 적용가능성 평가와 동일하게 폭기를 일시적으로 정지시킨 상태에서 측정하였다.

실험실 규모 생초미생물 혼합액비 운전조절인자로서 ORP 적용가능성 평가는 상관계수 (R<sup>2</sup>)가 0.9481로 나타나 운전조절인자로서 C/N비와 ORP가 높은 상관관계를 나타 내었다

. 소규모 현장 제조공정을 이용한 생초미생물 혼합액비 결과에서도 부숙기간별 C/N비 값과 ORP 값을 이용하여 상관계수를 구하여 본 결과 0.9406으로 C/N비와 ORP가 높은 상관관계를 나타냄에 따라 C/N비를 대체할 수 있는 운전조절인자로서 ORP가 적용 가능한 것으로 확인되었다(Fig. 141)실험실 규모 생초미생물 혼합액비 운전조절인자로서 ORP 적용가능성 평가와 동일하게 ORP 측정은 폭기를 일시적으로 정지시킨 상태에서 측정하여야 하는 것으로 나타났다.

소규모 현장 제조공정을 이용한 생초미생물 혼합액비 연구결과 운전조절인자로서 C/N비와 폭기를 일시적으로 정지시킨 상태에서 ORP가 높은 상관관계를 나타냄에 따라 C/N

비를 대체할 수 있는 운전조절인자로서 ORP가 실험실 규모 생초미생물 혼합액비와 동일하게 적용 가능한 것으로 나타났다. 또한 생초미생물 혼합액비 제조시 ORP를 이용하여 부속도를 판별 할 수 있을 것으로 보여 진다.

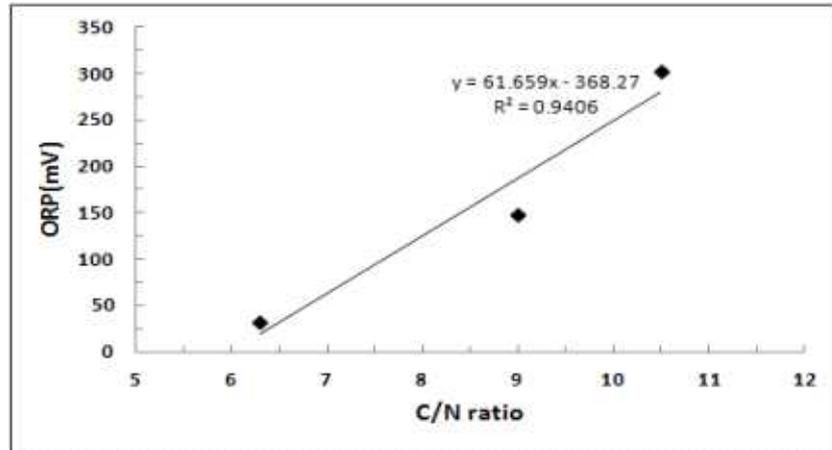


Fig. 141. 운전조절인자로서 C/N비 및 ORP 상관관계

(7) 생초미생물 혼합액비 제조공정 산업화 가능성 평가

생초미생물 혼합액비 산업화 중 제조설비를 포함한 현장에서 자가로 액비화하여 사용하는 것이 골프장에서 발생하는 잔디예초물의 재활용 효율과 경제성 측면에서 타당하다고 판단되어 실험실 규모 및 현장 소규모 생초미생물 혼합액비 제조공정 최적화 연구결과를 바탕으로 산업화 가능성을 평가하고자 한다. 이를 위해 제조공정 운전인자별 최적화 결과별로 살펴보고 종합적으로 자가 액비화 및 실용화의 가능성과 개선방향을 살펴보고자 한다. 먼저 실험실규모에서 구한 생초미생물 혼합액 단위부피당 최적 공기주입량은 0.4L/min · L이었으나, Scale-up을 하게 되면 오히려 그 값이 증가하여 소규모 현장설비를 이용한 생초미생물 혼합액비 40L 기준 최적 공기주입량은 0.8L/min · L로 주입되어야 하는 것으로 나타났다. 따라서 공기주입량은 Scale-up에 따라 단위부피당 최적 공기주입량이 증가하는 경향으로 나타났지만 최대값은 0.8L/min · L로 나타나 현장에서 자가 액비화 할 경우에도 적용될 수 있을것으로 사료된다.

다른 운전인자별 최적화 조건으로 기능성미생물 주입량은 1L 기준 1mL를 주입 운전온도는 30℃에서 5일정도 액비화 기간이 필요하고, 액비화 전 멸균 적용이 액비화 효율이 높고 무엇보다 선발된 기능성 미생물(*Paenibacillus ehimensis* KWN38)의 배양 시 다른 미생물의 오염을 차단키 위한 무균상태에서의 제조방법이 필요하다. 하지만 현장에서 자가 액비화의 경우 경제성 측면을 고려할 때 무균상태를 유지하는 제조공정으로 산업화의 가능성이 없으며, 이를 해결키 위한 액비화전 살균적용 검토, 선택된 기능성 미생물 우점 또는 다른 미생물(*Streptomyces griseus* H7602)과 혼합 배양, 건조된 잔디예초물 적용 여부 등 다양한 조건들에 대한 연구가 절실히 필요하다.

제조공정의 산업화를 위한 생초미생물 혼합액비의 액비화 효율 판단 기준으로 손쉽게 판별 할 수 있는 ORP가 적용이 가능할 것으로 사료된다.

### 3. 생초미생물 혼합액비 제품 및 제조설비 개발

#### 가. 생초분쇄기 개발

선발된 기능성 미생물(*Paenibacillus ehimensis* KWN38)을 효율적으로 적용하기 위해 생초의 물리적 분쇄율을 향상시키기 위한 생초의 형태적 특성을 파악해보았다. 생초의 크기가 확대될수록 미생물의 접촉비율이 낮아 미생물의 분해율이 저하되며 혐기성세균의 부패에 따라 악취의 요인이 된다. 이에 따라 원활한 미생물적 이용에 따른 생초조직의 효율적 분해를 위하여 세균과 생초의 접촉면적을 확대시켜주고 미생물의 접근성을 높이기 위하여 생초물의 분쇄가 실질적으로 필요한 것으로 인정된다. 이에 따라 예지재료의 분해 효율성을 높이기 위하여 분쇄기를 기어식으로 고안하여 기계장치 변화에 따른 분쇄입도를 파악하고자 분쇄기 규격, 재질 및 제작도면 작성 등을 실시한 후 시제품을 제작하였다. 그 후 제작된 예초기에 대한 시간당 분쇄율(kg/hr) 및 분쇄입도(%)을 평가하였다.

#### (1) 기계장치 변화에 따른 분쇄율 측정

##### - 자체 기어식 분쇄기 분쇄율 측정

주관연구기관과 참여기업인 군산레저산업 주식회사는 제작도면 없이 자체 기술력으로 기어식 분쇄기(Fig. 142)를 만들어 생초물을 분쇄한 후 분말도 측정법으로 공시품 50~100g을 비료 공정규격에 의한 표준체에 넣어 부드러운 솔로 문질러 주면서 깨끗한 물로 씻어 흘러 내리는 물이 투명하게 된 다음 110℃이하의 온도로 건조하고 그 잔량을 백분율로 환산하여 분쇄 입도별 크기를 측정된 결과 Table 29와 같은 결과를 얻었으며, 25 $\mu$ m 이하 크기의 생초분쇄물이 54.9%로 매우 우수한 결과를 얻음으로써 기어식 분쇄기 제작의 가능성을 확인하였다.



Fig. 142. 자체 기어식 분쇄기 제작

Table 29. 자체제작 기어식 분쇄기 생초물 분쇄입도 분포표

크 기	함 량(%)
300 $\mu$ m이상	7.7
100~300 $\mu$ m	17.6
45~100 $\mu$ m	14.2
25~35 $\mu$ m	5.6
25 $\mu$ m이하	54.9
합 계	100

자체 기어식 분쇄기의 대용량화를 위해 도면을 작성하여 대용량 기어식 분쇄기(Fig. 143)를 자체 제작한 후 생초의 분쇄를 실시한 결과, 약한 몸체구성, 기어 맞물림의 불안정으로 분쇄기 운전불규칙 및 원하는 분쇄입도(%)도출할 수 없었으며, 초기실험용과 다르게 기어홈이 없는 평로울러식 분쇄는 효율성이 없고, 자체 기술력 부족을 인식하게 되었다.



Fig. 143. 자체 대용량 기어식 분쇄기 제작

- 2단 기어식 분쇄기

전라북도 군산의 군장 산업단지 소재하고 있는 정밀기계 가공 전문업체인 진일테크(주)와 협력으로 2단 기어식 분쇄기(Fig. 144)를 제작 하였다.

먼저 제작 도면을 작성하고 분쇄기의 분쇄입도와 맞물림 기어의 내구성 향상을 위하여 기어의 재질은 SCM440으로 하고 고주파 열처리를 하였다.

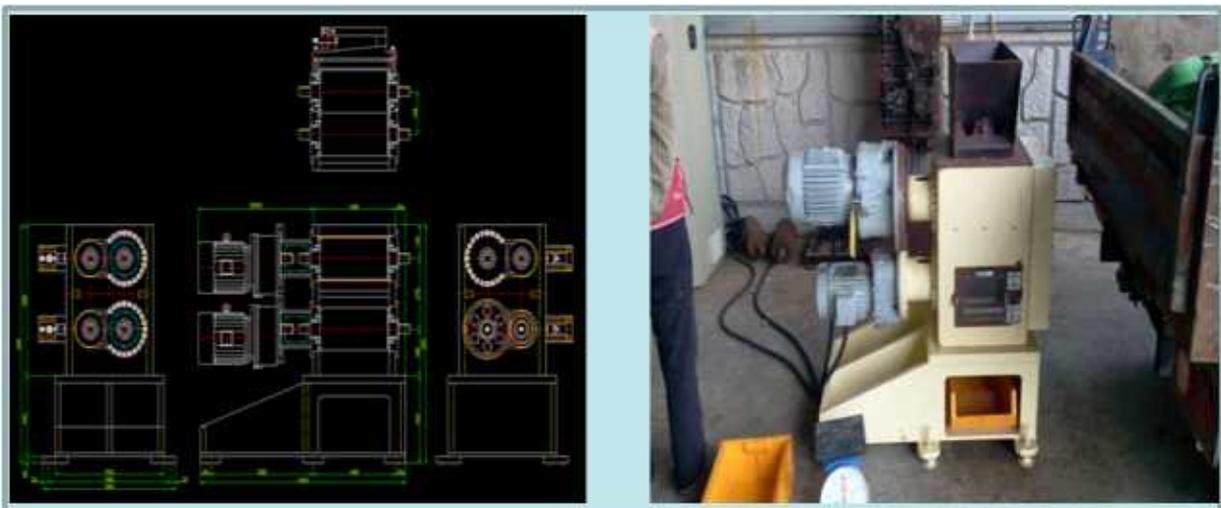


Fig. 144. 2단 기어식 분쇄기 제작

2단 기어식 분쇄기의 생초 분쇄율 측정(Table 30)에서 기어의 문제점 발견(양쪽밀림현상 발생하여 예지물이 분쇄되지 않는 현상)하고, 기어에 홈이 없던 것을 홈을 주어 생초가 양쪽으로 분쇄되지 않고 빠지는 현상을 방지하도록 개선하였다.(Fig. 145)

Table 30. 2단 기어식 분쇄기 생초물 분쇄입도 분포표

크 기	함 량(%)
300 $\mu$ m이상	13.7
100~300 $\mu$ m	45.7
45~100 $\mu$ m	25.7
25~35 $\mu$ m	10.8
25 $\mu$ m이하	4.1
합 계	100

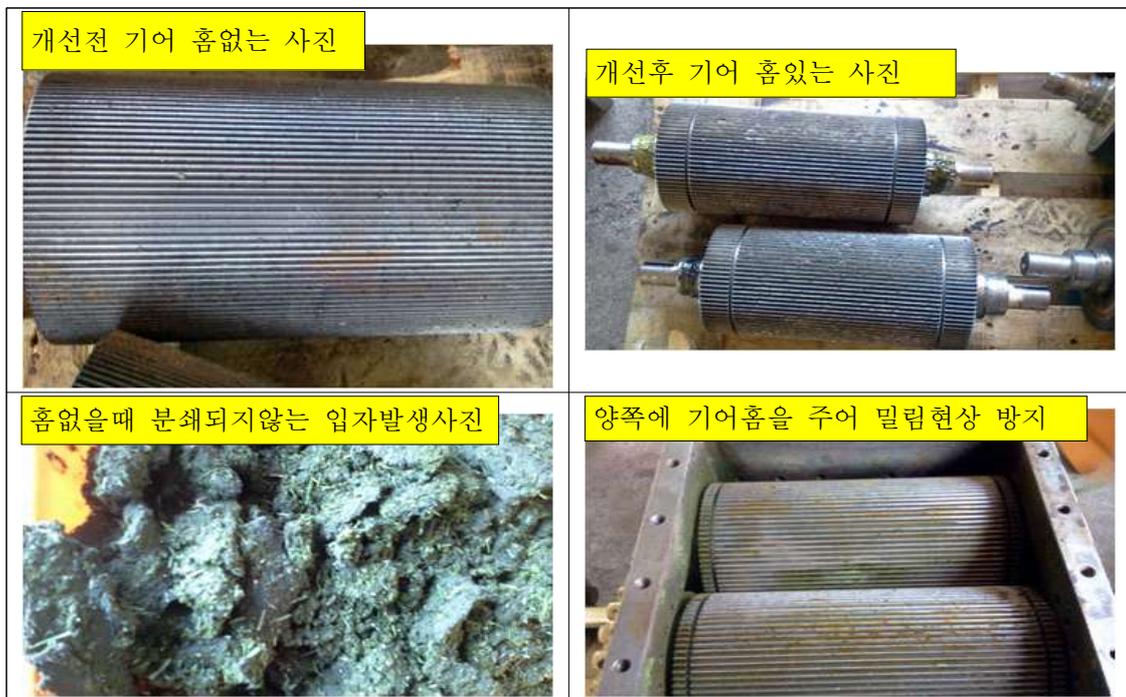


Fig. 145. 2단 기어식 분쇄기 맞물림 기어 개선

기어 개선함으로써 분쇄되지 않은 입자가 발생하는 것은 방지할 수 있었으나 2단 기어식 분쇄기의 많은 문제점 발생되어 개선이 필요하였다.

□ 문제점

- 1단기어 분쇄시 생초를 과하게 투입할시 모터 멈춤
- 전처리 필요성 확인 (전처리 미흡으로 기어파손 심함 이물질 모래 쇠조각 등 고려못함)
- 구동모터 효율향상(구동모터 효율이 낮음으로써 잔디투입시 부하발생)

□ 개선점

- 향후 콘베이서 설치로 feeding 균일화
- 모래, 자갈 쇠조각 분리시스템 기능 추가로 기어파손 방지
- 분쇄입도 향상 요구 기어 맞물림 개선으로 분쇄입도 향상
- 구동모터 마력수 증대로 부하 시 기어 멈춤 현상 방지 및 분쇄입도 향상

(2) 생초분쇄기 시제품 제작도면 작성 및 제작

2단 기어식 분쇄기를 바탕으로 1단은 홈이있는 평로울러 2단은 맞물림기어 3단은 미세 맞물림기어를 채택하고 제작도면을 작성 후 생초분쇄기 시제품(Fig. 145)을 제작 하고 2단 기어식 분쇄기와 분쇄기 입도분포를 비교 한 결과는 Table 31과 같다.

Table .31 2단에서 2단 분쇄기 입도분포 비교

크기	함량(%)	크기	함량(%)
300 $\mu$ m 이상	13.7	300 $\mu$ m 이상	5.1
100 ~ 300 $\mu$ m	45.7	100 ~ 300 $\mu$ m	17.1
45 ~ 100 $\mu$ m	25.7	45 ~ 100 $\mu$ m	9.5
25 ~ 45 $\mu$ m	10.8	25 ~ 45 $\mu$ m	4.0
25 $\mu$ m 이하	4.1	25 $\mu$ m 이하	84.3
합 계	100	합 계	100

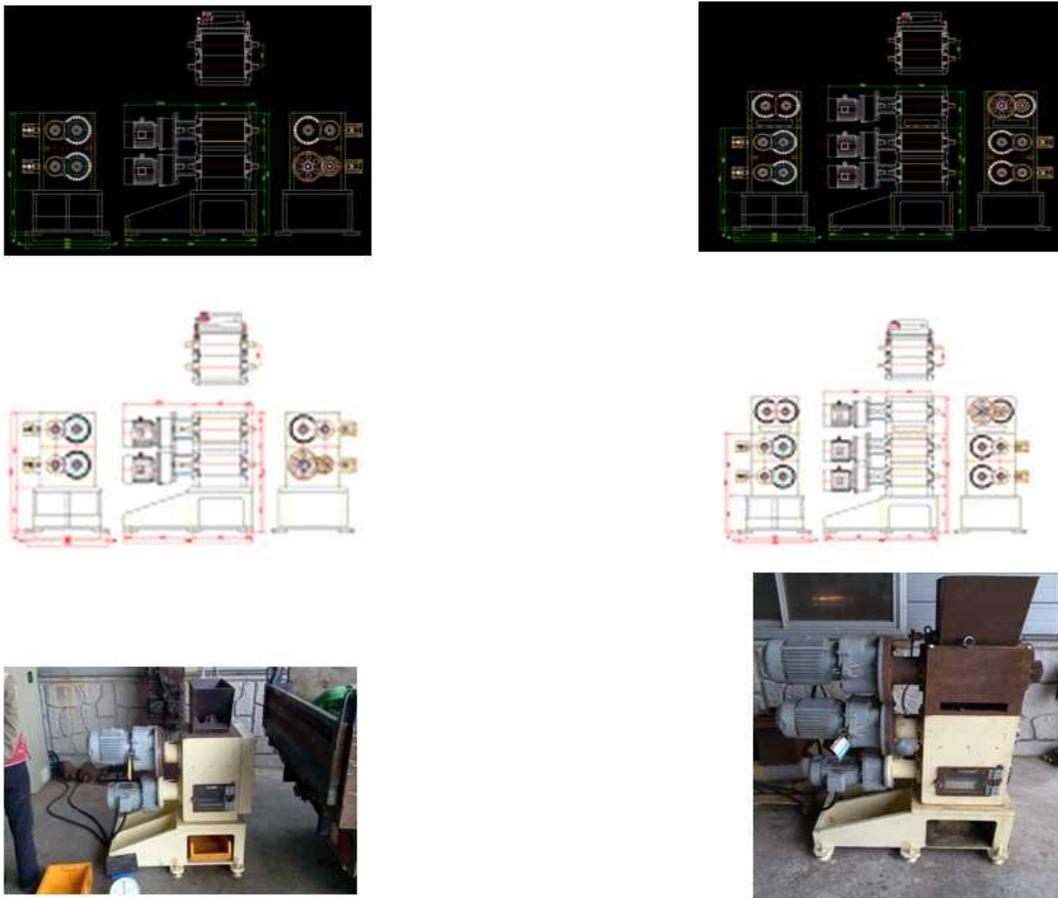


Fig. 145. 2단기어식 분쇄기와 생초분쇄기 시제품 제작 비교

나. 제조설비 개발

(1) 기능성미생물 배양 설비 시제품 제작

생초미생물혼합액비 산업화를 위한 기능성미생물(*Paenibacillus ehimensis* KWN38)의 배양시설 시제품 제작을 위한 배지의 조성은 일반적으로 판매되는 배지가 대량 배양 시 경제성이 떨어져 1년차에 선발된 미생물(*Paenibacillus ehimensis* KWN38)의 연구결과를 바탕으로 비용을 고려 Table 31과 같이 산정하였다. 또한 미생물(*Paenibacillus ehimensis* KWN38)의 배양온도는 30 $^{\circ}$ C, 배양일은 3일로 하고, 미생물(*Paenibacillus ehimensis*

KWN38)의 접종량은 1L당 1ml로 결정하였다.

Table 31. *Paenibacillus ehimensis* KWN38 시제품 배양용 배지 조성표

성분	사용량(g/L)
계집질 분말	1
젤라틴 분말	1
복합비료(21:17:17)	3
Yeast extract	0.03
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.03
설탕	3

재질은 오염여부와 관리편의성, 경제성을 고려하여 스테인레스 재질중 SUS304로 결정하고, 배지의 멸균방법은 경제성을 고려하여 100℃로 끓여서 멸균 처리 결정하고 배지를 멸균한 후 미생물을 접종하기 위한 냉각방식은 효율을 고려 수냉식으로 검토되었다. 본격적인 미생물 배양기 시제품 제작을 위해 Fig. 146, Fig. 147과 같이 제작도면을 작성 후 Fig. 148과 같이 시제품을 제작하였다.

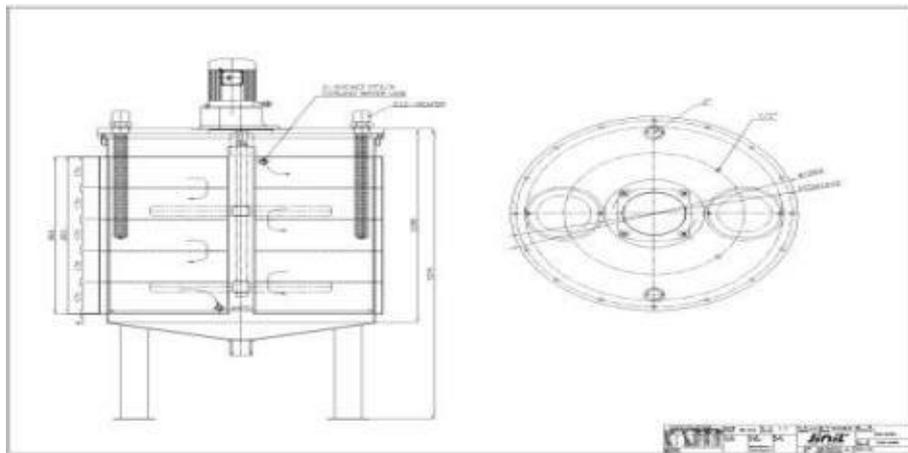


Fig. 146. 미생물 배양조 단면 상세도

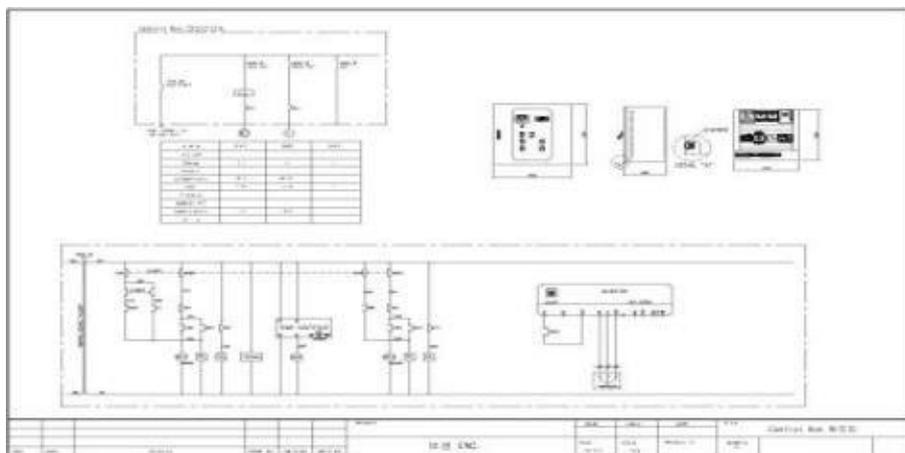


Fig. 147. 미생물 배양조 제어판넬 회로도



Fig. 148. 미생물 배양조 시제품

(2) 생초미생물 혼합액비 제조 설비 시제품 제작

기 개발된 생초분쇄기 및 미생물 배양조와 더불어 생초미생물 혼합액비 제품 생산 제조 설비의 시제품을 제작하기 위한 액비 제조 조건은 제3협동기관의 연구결과인 실험실과 현장 소규모에서 도출된 운전인자별 최적화 결과를 반영하였다. 제조설비의 시제품 제작은 광주광역시 소재 자동화장치, 실험용 기자재 전문 제작업체인 브이엠텍의 기술적 자문을 토대로 주문 제작을 의뢰하였다. 최종 결정된 생초미생물 혼합액비 제조설비의 제원은 용량은 1m<sup>3</sup> 살균온도는 85~90℃, 교반속도는 60~180rpm으로 인버터로 제어, 배양온도 30℃ (편차: ± 3℃), 냉각방식은 자동제어 수냉식, 공기량 주입은 60ℓ/min-ℓ, 공기 주입 시 항균필터를 채용하기로 하고 Fig. 149와 같이 시제품을 제작 하였다.



Fig. 149. 생초미생물 혼합액비 제조설비 시제품



4. 생초미생물 혼합액비 시용에 따른 한지형 잔디 생육 및 병회복 평가

가. 포트에서 한지형 잔디 생육 및 병 회복 평가

■ 잔디 생육조사: 채취한 시료를 지상부위 및 뿌리로 나누어 지상부 생초장, 생체중량, 전체중량 및 지하부 생체 및 전체중량을 측정한다. 건조중량은 60℃ 오븐(oven)에서 2일 동안 말린 후 측정을 한다. 생체중량은 열매를 제거한 후 순수 줄기와 잎의 무게로 한다.

■ 잔디 품질 조사: 시료를 채취한 후 잔디 잎을 일정량 취하여 Chlorophyll meter (Konica nimolt, SPAD-502 plus)를 이용하여 엽록소 지수를 측정한다.

■ 브라운 패치에 대한 회복 정도 조사: *Rhizoctonia solani*를 접종한 후 잔디가 병해에 의해 죽은 뒤 일정한 크기로 잔디 시료를 뿌리채 채취하여 포트에 옮김 후 생초 미생물 혼합 액비를 처리하여 회복정도를 조사한다.

■ 잔디 회복정도에 따른 생육 조사: 잔디 회복 실험중 회복된 상태의 잔디를 채취하여 뿌리길이, 지상부 길이, 생체중 및 건물중등을 조사한다.

■ 잔디 회복정도에 따른 품질 조사: 병해에서 회복된 잔디 시료를 채취하여 Chlorophyll meter (Konica nimolt, SPAD-502 plus)를 이용하여 엽록소 지수를 측정한다.



Fig 151. 실험 모습

Table 32. 실험 처리구 내용

Treatment	Composition of treatment	Volume
S	0.22 L 난지형 잔디 medium	220 ml
SP	0.22 L 난지형잔디 medium + <i>P. ehimensis</i> KWN38	220 ml
W	0.22 L 한지형잔디 medium	220 ml
WP	0.22 L 한지형잔디 medium + <i>P. ehimensis</i> KWN38	220 ml
F	1.43 g 복합비료	220 ml
FF	1.44 g 복합비료+ Fungicide (Tebuconazol) 0.11ml	220 ml

(1) 생육조사

생초 미생물 혼합 액비 시용에 따른 한지형 잔디 생육 조사 결과 Table 33에서 보는바와 같이 병원성곰팡이(*Rhizoctonia solani* AG-1) 접종 후 20일째 엽 무게는 한지형잔디 medium+*P. ehimensis* KWN38W 처리구인 WP가 가장 높게 조사되었고, 엽 길이에서는 난지형 잔디 medium 처리구인 S가 가장 높게 조사되었다. 가장 낮은 엽 무게 및 엽 길이는 F 처리구로 조사되어졌다. 40일째 엽 무게는 WP 처리구가 가장 높게 조사되었지만, 엽 길이에서는 모든 처리구간 유의성이 나타나지 않았다. 60일째 엽 무게는 WP 처리구가 가장 높게 조사되었지만, SP 처리구와의 유의성은 없었다. 또한 엽 길이는 WP 처리구가 가장 높게 조사되었다. 이러한 결과를 종합해 볼 때 잔디 생육에 있어서 WP 처리구 즉, 한지형 잔디를 액비의 재료로 사용했을 때 잔디의 생육이 좋은 것으로 나타났다.

Table 33. 잔디 지상부 길이 및 무게 조사

Days after fungal infection	Treatment	Leaf weight (g)		Leaf length (cm)
		Fresh	Dry	
0	W	33.9AB	5.2AB	7.2A
	WP	30.7AB	4.9AB	7.6A
	S	33.8AB	5.0AB	8.5A
	SP	34.7A	5.2A	7.6A
	F	23.7B	3.6B	5.7A
	FF	26.0AB	4.1AB	6.5A
20	W	52.6AB	10.5AB	8.4AB
	WP	59.0A	11.7A	9.5AB
	S	50.7AB	9.0BCD	10.5A
	SP	46.2AB	9.5BCD	9.3AB
	F	34.0B	6.8D	6.8B
	FF	40.2AB	7.4C	7.8AB
40	W	76.2AB	13.5A	9.1A
	WP	78.9A	13.7A	10.2A
	S	71.1AB	11.9AB	10.8A
	SP	76.7AB	13.0AB	9.8A
	F	60.2B	10.4B	7.8A
	FF	69.6AB	11.9AB	8.6A
60	W	97.8AB	21.8BC	19.0B
	WP	109.8A	26.9A	22.1A
	S	91.0AB	21.7BC	19.8AB
	SP	116.7A	28.7A	19.9AB
	F	80.0B	16.7C	18.4B
	FF	100.5AB	19.7C	20.4AB

\*S: 난지형 잔디 medium 처리구, SP: 난지형잔디 medium+*P. ehimensis* KWN38 처리구, W: 한지형잔디 medium 처리구, WP: 한지형잔디 medium+*P. ehimensis* KWN38 처리구, F: 복합비료 처리구, FF: 복합비료+ Fungicide (Tebuconazol) 처리구.

(2) 엽록소 지수 및 병 발병정도 조사

잔디 지하부 생육에 관하여 병원성곰팡이(*Rhizoctonia solani* AG-1 IA) 접종 후 20일째 및 40일째 조사한 결과 Table 34에서 보는바와 같이 한지형잔디 medium+*P. ehimensis* KWN38 처리구인 WP가 뿌리무게에서 가장 높게 나타났다. 하지만 W, S, SP 처리구와의 유의성은 없었다. 또한 60일째 조사 결과 WP 처리구가 뿌리무게에서 가장 높게 나타났지

만, 생체중에서 SP 처리구와의 유의성은 없었다. 결론적으로 잔디의 지상부 생육과 지하부 생육에 대하여 WP 처리구 즉, 한지형 잔디를 액비의 재료로 사용했을 때 잔디의 생육이 좋은 것으로 나타났다. 잔디 뿌리 치사율 조사결과 모든 처리구간의 유의성이 나타나지 않았다.

Table 34. 잔디 지하부 생육 및 병해 조사

Days after fungal infection	Treatment	Root weight (g)		Root length (cm)	Root mortality (%)
		Fresh	Dry		
0	W	311.5A	114.6A	6.8A	16.5A
	WP	304.3A	118.1A	7.0A	7.8A
	S	329.4A	125.3A	6.9A	17.5A
	SP	315.0A	121.7A	7.0A	8.7A
	F	286.4A	107.4A	6.8A	7.4A
	FF	281.3A	103.8A	6.8A	10.3A
20	W	329.4AB	132.5AB	8A	20.3A
	WP	361.6A	168.3A	7.9A	18.7A
	S	336.5AB	146.8A	8A	22.5A
	SP	329.4AB	139.6A	8.1A	18.6A
	F	293.6B	118.1B	8A	24.1A
	FF	300.7B	114.6B	7.8A	15.7A
40	W	272.8AB	121.7AB	8A	24.1A
	WP	282.5A	139.6A	8.1A	20.9A
	S	254.2AB	114.6AB	8.1A	27.9A
	SP	274.9A	128.9A	8.3A	21.9A
	F	214.8B	111.0B	8A	20.7A
	FF	249.2AB	121.7AB	8.1A	22.8A
60	W	236.3B	114.6B	7.8A	25A
	WP	293.6A	139.6A	7.9A	20.9A
	S	282.8AB	132.5AB	8.1A	27.9A
	SP	297.1A	143.2A	8.2A	24A
	F	264.9B	125.3B	8A	22A
	FF	239.9B	114.6B	7.8A	21A

\*S: 난지형 잔디 medium 처리구, SP: 난지형잔디 medium+*P. ehimensis* KWN38 처리구, W: 한지형잔디 medium 처리구, WP: 한지형잔디 medium+*P. ehimensis* KWN38 처리구, F: 복합비료 처리구, FF: 복합비료+ Fungicide (Tebuconazol) 처리구.

잔디 품질 조사에 따른 엽록소 지수 조사 결과 Fig 152에서 보는바와 같이 병원균 접종 후 20, 40 및 60일째 WP 처리구에서 가장높은 엽록소 함량을 나타내었다. 하지만 20일째에서는 S 및 SP 처리구와의 유의성이 없었고, 40일째는 W, S, SP 및 FF 처리구와 유의성이 나타나지 않았고, 60일째는 SP 및 FF 처리구와의 유의성이 없었다. 가장 낮은 엽록소 함량으로는 F처리구로 조사되었다. 이러한 결과를 볼 때 한지형 잔디 및 난지형 잔디로 만든 생초 미생물 혼합 액비 처리가 잔디의 엽록소 함량을 높이는데 영향을 주었을 것으로 사료되며, 난지형 잔디를 액비의 원료로 사용하는 것보다 한지형잔디를 생초의 원료로 사

용했을 때 더 좋을 것으로 사료되어진다. 또한 병발생 정도에 있어서도 WP 처리구가 가장 낮은 것으로 조사되었으므로 한지형 잔디를 원료로 만든 생초 미생물 혼합 액비가 가장 좋은 액비인 것으로 사료 되어진다 (Fig 153).

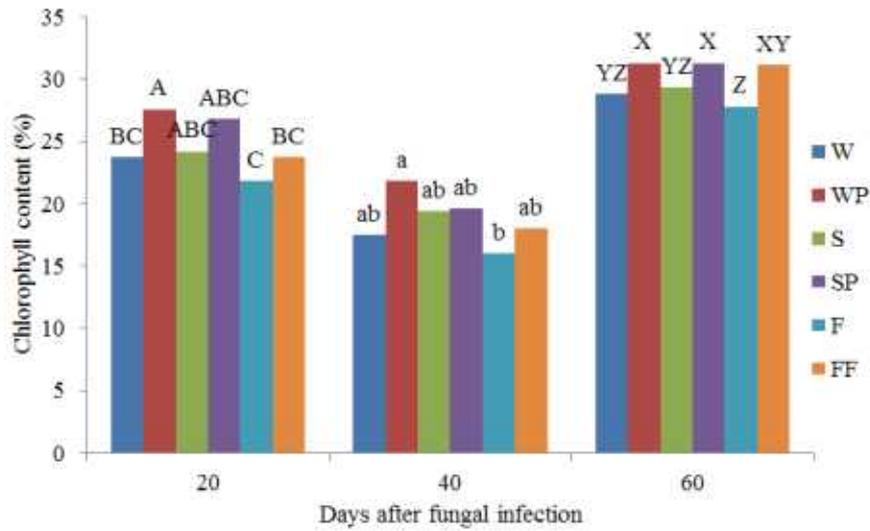


Fig 152. 엽록소 함량 조사.

S: 난지형 잔디 medium 처리구, SP: 난지형잔디 medium+*P. ehimensis* KWN38 처리구, W: 한지형잔디 medium 처리구, WP: 한지형잔디 medium+*P. ehimensis* KWN38 처리구, F: 복합비료 처리구, FF: 복합비료+ Fungicide (Tebuconazol) 처리구.

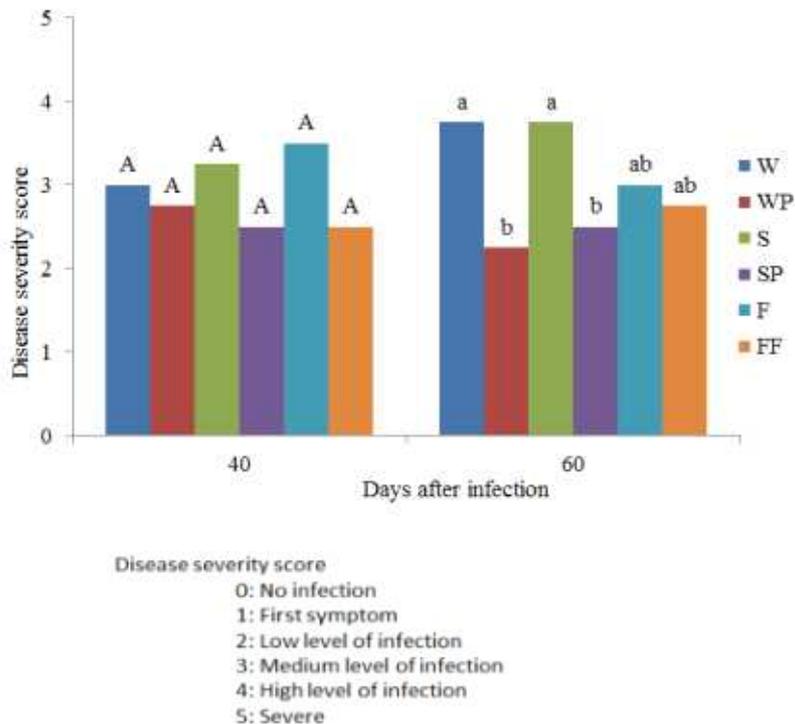


Fig 153. 잔디 병해 발병 정도 조사

S: 난지형 잔디 medium 처리구, SP: 난지형잔디 medium+*P. ehimensis* KWN38 처리구, W: 한지형잔디 medium 처리구, WP: 한지형잔디 medium+*P. ehimensis* KWN38 처리구, F: 복합비료 처리구, FF: 복합비료+ Fungicide (Tebuconazol) 처리구.

### (3) Brown patch에 대한 잔디 회복정도 조사

생초 미생물 혼합액비 시용에 따른 잔디(bent grass)의 생육 및 병해 방제 정도 조사를 위해 전라북도 군산시 소재 군산컨트리클럽 묘포장에서 잔디 시료를 채취하여 포트에 옮긴 후 병원성곰팡이(*Rhizoctonia solani* AG-1 IA) 접종하여 잔디를 죽게 한 다음 시료를 16cm x 14cm 크기로 취여 원형 포트에 옮겨 회복실험을 실시하였다 (Fig 154, 155).



Fig 154. 잔디 회복 실험 준비



Fig 155. 잔디 회복 실험 모습

처리구 내용:

G: 잔디 medium, GP: 잔디 medium+*P. ehimensis* KWN38, F: 복합비료. FF: 복합비료 +Fungicide

생초 미생물 혼합액비 시용에 따른 잔디 치사 후 회복 조사 결과 Table 35와 36에서 보는바와 같이 잔디의 지상부 길이 생체중 및 건체중에서 잔디 medium+*P. ehimensis* KWN38 처리구인 GP가 각각 14.1cm, 15.9g 및 2.6g으로 가장 높게 조사되었다. 하지만 chlorophyll 함량에서는 FF처리구가 33.1%로 가장 높게 나타났지만, GP 처리구와의 유의성은 없었다. 또한 지하부의 생육 조사결과에서 GP처리구가 뿌리 길이, 뿌리생체중 및 뿌리건체중에서 각각 9.5cm, 115.6g 및 36.4g으로 가장 높게 나타났다. 하지만 뿌리생체중은 G처리구와의 유의성은 없었다. 뿌리치사율 조사결과 G처리구 19.0%, F처리구 17.2%, GP 처리구 15.0%, FF처리구 14.5%로 순으로 조사되었지만 각 처리구간 유의성은 없었다. 이러한 결과를 볼 때 생초 미생물 혼합 액비 시용구인 GP 처리구에서 잔디 치사 후 회복력

이 가장 높은 것으로 사료된다.

Table 34. 잔디 회복정도따른 지상부 생육 및 엽록소 조사

Treatment	Length (cm)	Fresh weight (g)	Dry weight (g)	Chlorophyll content (%)
G	10.6B	9.4B	1.8B	29.1BC
GP	14.1A	15.9A	2.6A	31.4AB
F	11.9AB	11.8B	2.1B	28.7C
FF	10.3B	9.9B	1.8B	33.1A

\*G: 잔디 medium, GP: 잔디 medium+*P. ehimensis* KWN38, F: 복합비료. FF: 복합비료 +Fungicide

Table 35. 잔디 회복정도따른 지하부 생육 및 치사율 조사

Treatment	Length (cm)	Fresh weight (g)	Dry weight (g)	Mortality (%)
G	8.5B	107.2A	33.2B	19.0 A
GP	9.5A	115.6A	36.4A	15.0 A
F	8.6B	94.8B	26.4C	17.2 A
FF	8.3B	91.2B	25.2C	14.5 A

\*G: 잔디 medium, GP: 잔디 medium+*P. ehimensis* KWN38, F: 복합비료. FF: 복합비료 +Fungicide

나. 포장에서 한지형 잔디 생육 및 병 회복 평가

■ 잔디 생육조사: 채취한 시료를 지상부위 및 뿌리로 나누어 지상부 생초장, 생체중량, 건체중량 및 지하부 생체 및 건체중량을 측정한다. 건초중량은 60℃ 오븐(oven)에서 2일 동안 말린 후 측정을 한다. 생체중량은 열매를 제거한 후 순수 줄기와 잎의 무게로 한다.

■ 잔디 품질 조사: 시료를 채취한 후 잔디 잎을 일정량 취하여 Chlorophyll meter (Konica nimolt, SPAD-502 plus)를 이용하여 엽록소 지수를 측정한다.

■ 브라운 패치에 대한 회복 정도 조사: *Rhizoctonia solani*를 접종한 후 잔디가 병해에 의해 죽은 뒤 일정한 크기로 잔디 시료를 뿌리체 채취하여 포트에 옮김 후 생초 미생물 혼합 액비를 처리하여 회복정도를 조사한다.

■ 잔디 회복정도에 따른 생육 조사: 잔디 회복 실험중 회복된 상태의 잔디를 채취하여 뿌리길이, 지상부 길이, 생체중 및 건물중등을 조사한다.

■ 잔디 회복정도에 따른 품질 조사: 병해에서 회복된 잔디 시료를 채취하여 Chlorophyll meter (Konica nimolt, SPAD-502 plus)를 이용하여 엽록소 지수를 측정한다.

실험구 면적 : 각처리구별 1m x 1m = 2m<sup>2</sup>

- 4처리구 3반복 실험

- 완전확률화설계 실험구 배치



Fig 156. 포장 시험 모습

Table 36. 실험 처리구 내용

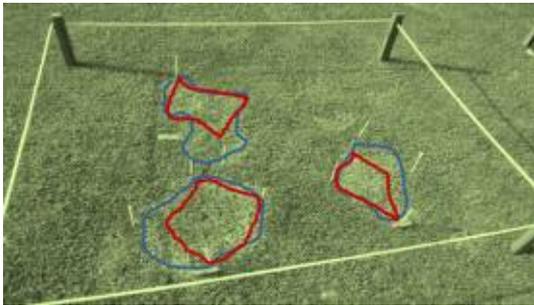
Treatment	Composition of treatment
F	Fertilizer (4.76 g/1.6 L), 비료
FF	0.8 ml Fungicide in 1.6 L of F, 비료+살균제
G	0.73 L Grass medium + 0.87 L water, 한지형잔디액비
GP	0.73 L Grass culture + 0.87 L of water, 한지형잔디액비+ <i>P. ehimensis</i> KWN38 (생초미생물혼합액비)

\*처리방법 : 1,2,3회 처리 후 시료채취, 4회째 처리 후 시료채취 함.

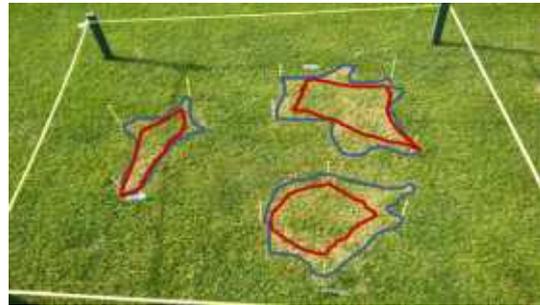
생초 미생물 혼합액비 시용에 따른 잔디(bent grass)의 질병 발병 후 회복실험을 전라북도 군산시 소재 군산컨트리클럽 field에서 실시하였다. 실험구는 자연상태에서 발생한 병원성곰팡이(*Rhizoctonia solani* AG-1 IA) 피해 지역에서 G: 잔디 medium, GP: 잔디 medium+*P. ehimensis* KWN38, F: 복합비료, FF: 복합비료+Fungicide 및 N:무처리구를 설정 하였다. 실험구 처리는 처리구 설정 직후 1회 및 10일 후 1회 각각 처리 후 잔디 회복 정도를 조사하였다.



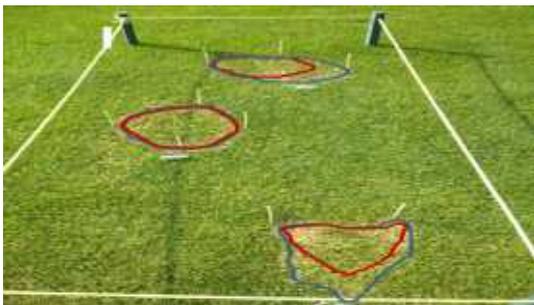
Fig 157. 실험 전경



GP 처리구



G 처리구



F 처리구



FF 처리구



N 무처리구

Fig 158. 처리구 모습

(1) 생육조사

생초 미생물 혼합 액비 시용에 따른 한지형 잔디 생육 조사 결과 Fig 159에서 보는바와 같이 조사 25일째 GP (생초미생물혼합액비) 처리구가 가장 높게 나타났으며, FF 처리구와 통계적으로도 유의하였으나, F 처리구와 G 처리구와의 통계적 유의성은 나타나지 않았다. 조사 35일째에서도 GP 처리구가 가장 엽 길이가 높게 나타났으며, 다른 처리구와의 통계적 유의성도 나타났다.

조사 25일째 지상부 무게(엽 무게)에서는 생체중 및 건체중에서 처리구간의 유의성이 나타나지 않았다. 하진만 조사 35일째에서는 GP 처리구에서 가장 높은 지상부 생체중과 건체중을 보였다. 이러한 결과를 종합해 볼 때 잔디 생육에 있어서 GP 처리구 즉, 생초미생물 혼합액비 처리가 한지형 잔디 생육에 가장 효과적인 것으로 보여지며, 이는 생초미생물혼합액비 제조시 미생물이 생산한 대사산물에 의한 작용으로 사료된다. (Fig 160)

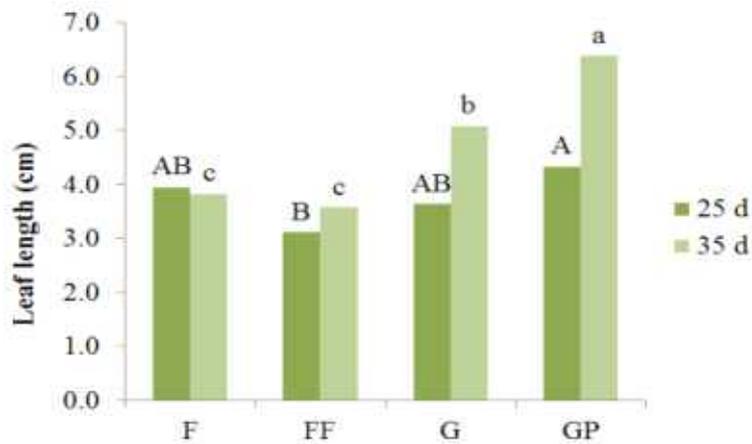


Fig 159. 지상부 길이 조사.

F: 비료 처리구, FF: 비료+농약처리구, G:한지형잔디액비 처리구,  
GP: 생초미생물혼합액비 처리구

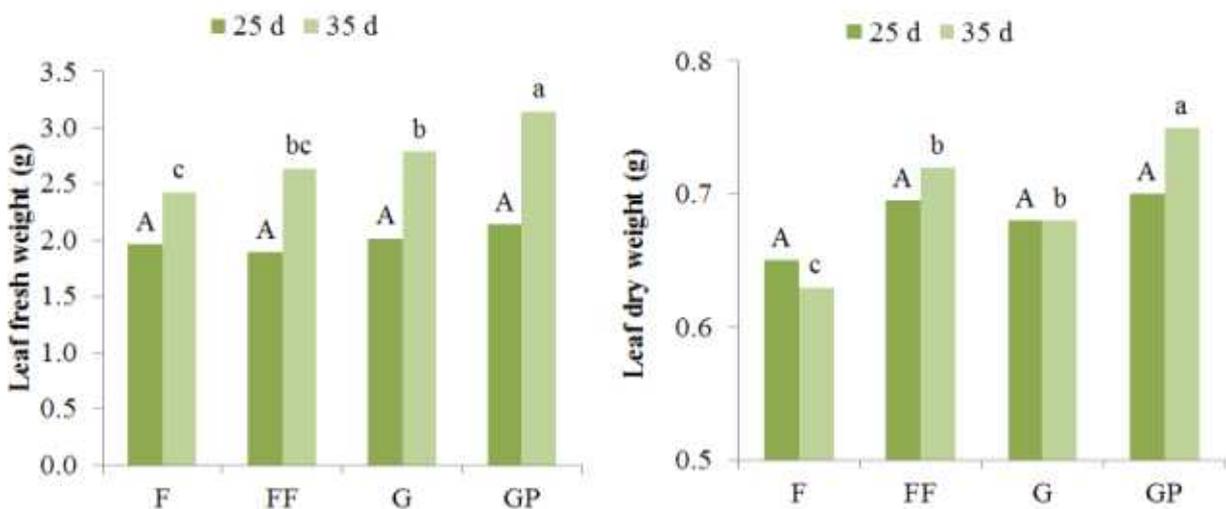


Fig 160. 지상부 생체중 및 건체중 조사.

F: 비료 처리구, FF: 비료+농약처리구, G:한지형잔디액비 처리구,  
GP: 생초미생물혼합액비 처리구

잔디 품질 조사에 따른 엽록소 지수 조사 결과 Fig 161에서 보는바와 같이 조사 25일째에 서는 처리구간의 유의성이 나타나지 않았다. 조사 35일째에는 GP처리구가 가장 높았으나, FF 처리구와 유의성이 없었다. G와 F 처리구간의 엽록소 함량차이는 나타나지 않았다. 조사결과 비록 GP 처리구인 생초미생물혼합액비 처리구와 FF 처리구와의 유의성은 없었지만, 전반적인 경향에서 생초미생물혼합액비 처리가 한지형 잔디의 엽록소 함량을 증가시키는데 있어서 다른 처리구에 비해 우수한 것으로 사료 된다.

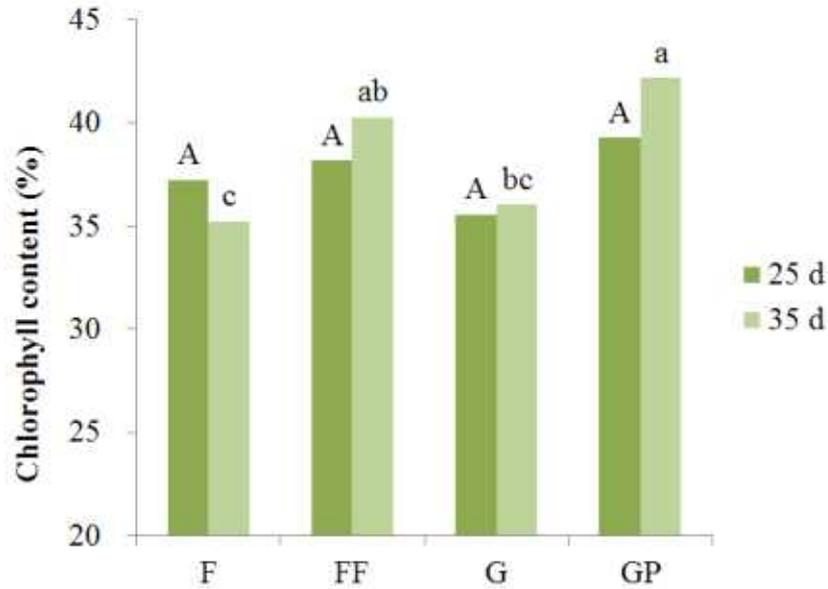


Fig 161. 엽록소 함량 조사.

F: 비료 처리구, FF: 비료+농약처리구, G:한지형잔디액비 처리구,  
GP: 생초미생물혼합액비 처리구

생초 미생물 혼합 액비 사용에 따른 한지형 잔디 지하부 (뿌리) 생육 조사 결과 Fig 162에서 보는바와 같이 조사 25일째는 모든 처리구간의 차이를 보이지 않았다. 조사 35일째 GP (생초미생물혼합액비) 처리구가 가장 높게 나타났다. 하지만, FF와 G 처리구와의 유의성은 보이지 않았으나, F 처리구와의 유의성은 타나났다. 지하부 무게를 조사한결과 지하부 생체중은 조사 25일째 GP, G, FF, F 순으로 조사 되었으며, GP 처리구가 가장 높게 나타났다. 하지만 G와 FF와의 유의성은 없었다. 조사 35일째는 GP 처리구가 다른 처리구에 비해 가장 높게 나타났으며, G, FF, F 처리구와의 통계적 유의성도 나타났다. 또한 지하부 건체중은 조사 25일째 및 35일째 GP 처리구가 가장 높게 나타났으나, 조사 25일째는 G와 FF와의 통계적 유의성은 없었다. 이러한 결과를 종합해 볼 때 생초미생물혼합액비 사용이 한지형 잔디 지하부 (뿌리) 생육에 가장 효과적인 것으로 사료 된다.(Fig 163, Fig 164)

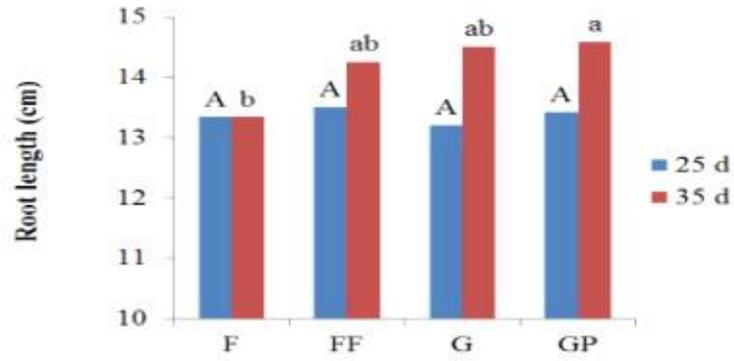


Fig 162. 뿌리 길이 조사.

F: 비료 처리구, FF: 비료+농약처리구, G:한지형잔디액비 처리구,  
GP: 생초미생물혼합액비 처리구

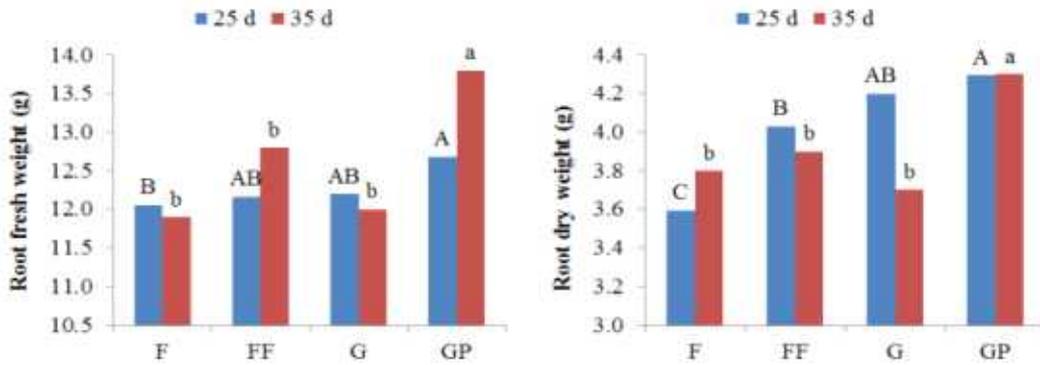


Fig 163. 뿌리 생체중 및 건체중 조사.

F: 비료 처리구, FF: 비료+농약처리구, G:한지형잔디액비 처리구,  
GP: 생초미생물혼합액비 처리구



Fig 164. 뿌리 사진.

F: 비료 처리구, FF: 비료+농약처리구, G:한지형잔디액비 처리구,  
GP: 생초미생물혼합액비 처리구

(2) Brown patch에 대한 잔디 회복정도 조사

잔디 회복 실험 조사결과 Fig 165에서 보는 바와 같이 GP 처리구에서의 병반 감소율이 19.8%로 가장 높았고, N 처리구가 8.6%로 가장 낮게 조사되었다. 또한, FF 처리구 18.6%, G 처리구 16.9, F 처리구 16.7%로 조사되었다. 이러한 결과를 볼 때 생초미생물 혼합액비 처리가 병원성곰팡이(*Rhizoctonia solani* AG-1 IA)에 의해 생성된 병반을 감소시키는데 효과가 있는 것으로 사료된다.

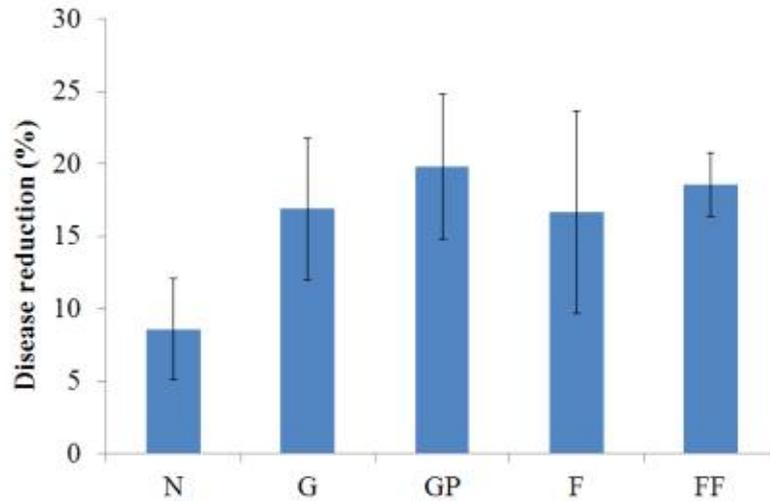
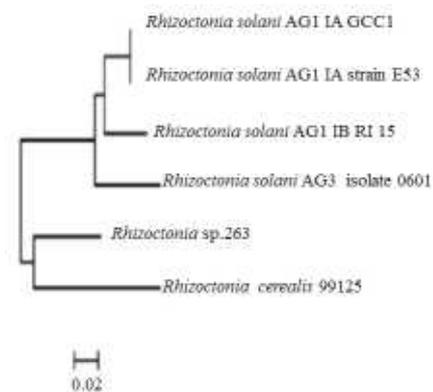
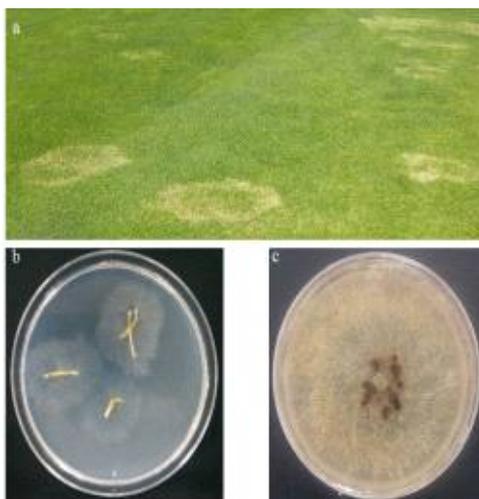


Fig 165. 처리구 모습

(3) Brown patch에 대한 병원균 동정

포장 실험 병반으로부터 병원체 분리를 분리하여 실험실에서 배양한 후 18S rRNA분석을 통하여 동정한 결과 *Rhizoctonia solani* AG-1 IA로 동정 되었다.(Fig 166)



Neighbor-joining tree showing the position of *Rhizoctonia solani* AG1 IA strain GCC1 compared to related species in a 18S rRNA gene tree

Fig 166. 포장 실험 병반으로부터 병원체 분리 및 동정

## 제 3 절 생초미생물 혼합액비 시용에 따른 토양영향평가

### 1. 생초발효 액비 시용에 따른 토양 이화학성 변화와 작물의 생육에 미치는 영향평가

#### 가. 생초발효액비의 양분수준 분석

##### (1) 생초발효액비

전라북도 군산컨트리 클럽에서 잔디 예초물과 EM 활성액, 폐당밀을 넣어 호기 발효하여 생초발효액비를 만들었다.

##### (2) 생초발효액비 양분수준 분석

###### (가) pH

생초발효액비 5 mL를 증류수 25 mL(1:5의 비율)로 희석하여 1 시간동안 Shaking 후, pH 측정기(Orion 3 star, Thermo Scientific, Singapore)로 측정하였다.

###### (나) 총질소 (Total Nitrogen, TN) - Kjeldahl 분해법

생초발효액비의 총질소는 Permanganated reduced Fe modification 방법으로 분석하였다. 100mL 켈달(Kjeldahl) 분해관에 생초 미생물 혼합액비 3mL와 진한 황산 8mL를 넣고 혼합했다. 분해관을 분해대에 놓고 낮은 온도에서 점차 고온으로 가열하였고, 하얀 연기가 생성될 때부터 5분간 더 가열하였다. 분해관을 분해대에서 내려 냉각한 후 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 약 0.5mL를 넣었다. 다시 가열을 시작하여 분해액이 백색 투명하게 될 때까지 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 넣으며 분해하는 과정을 반복하였다. 분해가 끝나면 냉각시키고 100mL volumetric flask에 옮겨 증류수로 부피를 맞췄다. 분해액 10mL에 10N NaOH를 넣고 증류장치(K-314, BUCHI, Switzerland)를 이용하여 증류했다. 포집된 총질소는 pH 적정 장치(702 SM Titrino, Metrohm, Switzerland)를 이용하여 적정하고, 총질소 함량을 계산하였다.

###### (다) 무기태 질소 (Inorganic nitrogen)

생초발효액비 10 mL에 2 M KCl 100 mL (1:10 비율)를 가하고, 1 시간동안 Shaking 하여 Whatman No.42 filter paper로 거렸다. 거른 여액에 산화마그네슘(MgO) 0.5g을 넣고 증류장치(K-314, BUCHI, Switzerland)로 증류하여 암모니아태 질소(NH<sub>4</sub>-N)를 포집하였다. 암모니아태 질소(NH<sub>4</sub>-N)를 포집한 후, Devarda's Alloy 0.5g을 넣고 증류장치(K-314, BUCHI, Switzerland)로 증류하여 질산태 질소(NO<sub>3</sub>-N)를 포집하였다. 각각 포집된 암모니아태 질소(NH<sub>4</sub>-N)와 질산태 질소(NO<sub>3</sub>-N)는 pH 적정 장치(702 SM Titrino, Metrohm, Switzerland)를 이용하여 적정하고, 함량을 계산하였다.

###### (라) 유기물 (Organic matter)

Walkley-Black method를 통하여 유기물 함량을 측정하였다.

###### (마) 총인 (Total Phosphate, TP) - Vanadate 법

생초발효액비 3 mL를 Kjeldahl 분해관에 담고, 진한 황산 8 mL를 가한다. Digestion

tube를 분해대에 올려 온도를 차츰 올리며 가열하고 하얀 연기가 생기면 100 °C에서 5분 동안 분해한다. 1시간 간격으로 130 °C, 180 °C, 250 °C로 온도를 높이며 가열하였다. 분해관을 분해대에서 내려 방냉한 후, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3 mL를 넣고 250 °C에서 계속 가열하였다. 분해액이 백색 투명하지 않으면 방냉 후 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 더 첨가하고 가열하였다. 분해된 시료를 50 mL Volumetric flask에 유리 깔대기를 꽂아 Whatman No.42 filter paper로 거렸다. 여액 5 mL를 Ammonium paramolybdate vanadate 용액 10 mL를 넣고 30분간 발색 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### (3) 생초발효액비 분석 결과

생초발효액비의 화학적 특성은 Table 37에 나타내었다. 생초발효액비의 pH는 5.00으로 약산성을 나타내었으며, 총질소는 4.30 g L<sup>-1</sup>, 총인은 0.25 g L<sup>-1</sup>, 유기물은 22.2 g L<sup>-1</sup>의 함량을 나타내었다. 일반적인 액비에 비하여 총질소 함량이 높은 것은 생초발효액비 제조시 첨가되는 잔디예초물에 들어있는 잔디 자체의 질소 함량 때문이라고 생각된다. 그해 반해 총인의 함량은 낮은 것을 확인 할 수 있는데, 따라서 생초발효액비를 연용 하였을 때 토양 중 총인의 부족으로 인한 결핍증이 발생할 것이라 예상된다.

Table 37. Chemical properties of Mixed Liquid Fertilizer (MLF).

	pH (1:5)	TN (g L <sup>-1</sup> )	Inorganic Nitrogen		Organic matter (g L <sup>-1</sup> )	TP (g L <sup>-1</sup> )
			NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (g L <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (g L <sup>-1</sup> )		
MLF	5.00	4.30	3.32	N.D.*	22.2	0.25

### (4) 생초발효액비의 처리수준설정

(가) 농진청에서 공시한 작물별 화학비료 요구량 (kg 10a<sup>-1</sup>)

농진청에서 공시한 작물별 화학비료 요구량은 Table 38와 같다.

Table 38. Chemical fertilizer requirement of pepper and tomato.

Fertilizer	Total (kg 10a <sup>-1</sup> )	Base (kg 10a <sup>-1</sup> )	Additional (kg 10a <sup>-1</sup> )		
			First	Second	Third
Pepper					
Nitrogen (Urea)	19.0	10.2	2.8	3.2	2.8
Phosphorus (Fused phosphate)	11.2	11.2	-	-	-
Potassium (Potassium Oxide)	15.0	9.0	1.8	1.8	2.4
Tomato					
Nitrogen (Urea)	24.0	14	3	4	3
Phosphorus (Fused phosphate)	16.0	16	-	-	-
Potassium (Potassium Oxide)	24.0	8	5	6	5

농진청에서 공시한 작물별 질소 비료 투입량을 생초발효액비의 질소 함량으로 환산한 요구량은 Table 39과 같다.

Table 39. Mixed liquid fertilizer (MLF) requirement of pepper and tomato.

Species	Total (L 10a <sup>-1</sup> )	Base (L 10a <sup>-1</sup> )	Additional (L 10a <sup>-1</sup> )		
			1	2	3
Pepper	4419	2372	651	744	651
Tomato	5581	3356	698	930	698

나. 항온배양실험을 통한 생초발효액비의 양분성분의 토양 내 무기화율 평가

(1) 항온배양실험 설계

생초발효액비가 화학비료의 대체제로서의 활용가능성을 확인하기 위하여, 생초발효액비를 사용한 토양의 무기화율 평가를 위해 항온배양실험을 진행하였다. 항온배양실험을 진행하기 위해 우리나라 밭토양 대표토성인 양토와 사양토를 경기도 남양주에 위치한 농가에서 토양 20 cm 깊이까지 채취하여, 풍건한 뒤 2 mm 체를 이용하여 체질하였으며 토양의 물리 화학성은 Table 3-4와 같다. 항온배양실험은 각각의 토양을 생초발효액비 처리구, 무처리구로 설계하였으며, 250 mL polyethylene 병에 각각의 토양을 100 g 씩 넣고, 포장용수량(-30 kPa)으로 수분함량을 맞춰준 후 작물의 평균 생육온도인 25 °C 에서 각각 일주일간 전 배양(pre-incubation)하였다(Fig 3-1). 전 배양 후 생초발효액비 처리구는 질소비료(20 kg N 10a<sup>-1</sup>)를 기준으로 액비 2.33 mL를 각각 토양에 처리하였다. 이후 25 °C에서 각각의 토양은 포장용수량을 유지하며 총 60일 간 배양하였다. 액비 처리 후 0일, 1일, 5일, 7일, 10일, 20일, 40일, 60일에 차례대로 시료를 채취한 뒤, 바로 무기태 질소를 측정하였고, 나머지는 풍건하여 pH, EC, 총질소(Total Nitrogen, TN), 총탄소(Total Carbon, TC)를 분석하였다.



Fig 167. Incubation experiment of soils.

Table 40. Chemical properties of loam, sandy loam soil.

	Soil texture			Field capacity	pH (1:5)	EC (dS m <sup>-1</sup> )	TC (g kg <sup>-1</sup> )
	sand (g kg <sup>-1</sup> )	silt (g kg <sup>-1</sup> )	clay (g kg <sup>-1</sup> )				
Loam	250.8	489.1	260.1	24.7	7.8	0.14	15.9
Sandy loam	655.7	255	89.3	13.7	6.1	0.05	4.8

(2) 토양화학성 분석

(가) pH

토양 5g을 증류수 25 mL(1:5 의 비율)로 희석하여 1 시간동안 Shaking 후, pH측정기 (Orion 3 star, Thermo Scientific, Singapore)로 측정하였다.

(나) EC

토양 5 g를 증류수 25 mL(1:5 의 비율)로 희석하여 1 시간동안 Shaking 후, Whatman No.42 filter paper로 거른다. 거른 여액은 전기전도도(Electrical Conductivity, EC) 측정기(PET-2000 Kombi, stelzner GMBH, Germany)를 이용하여 측정하였다.

(다) 총질소(Total Nitrogen, TN) - Kjeldahl 분해법

막자사발에 갈아서 0.5 mm 체질한 시료 0.5 g을 분해관에 넣고 약간의 증류수로 면을 씻어준 후, 1 mL KMnO<sub>4</sub> 용액을 넣고 30초간 혼든다. 45도로 기울인 상태에서 Dilute H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(1:1)을 2 mL씩 넣는다. 5분간 방치 후 octyl alcohol 1방울(수 방울)을 넣는다. 환원철 0.5 g을 넣는다. 이때 가능하면 기벽에 묻지 않도록 한다. 거품이 없어질 때까지 잘 흔들어준다. 약 45분간 약하게 가열한다(약 85 °C 정도). 상온냉각 1.1 g K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-catalyst 혼합물과 3 mL의 진한 황산을 넣은 후, 조심스럽게 가열한다(시간당 150 °C 정도씩 증가). 거품이 없어지고 수분이 제거될 때까지 분해한 후 혼합물이 연녹색을 띠 때까지 300 °C로 높여 다시 1 시간 분해한 후 360 °C에서 5시간 가열하여 분해한다. 이때 플라스크 안은 연두색 또는 회색을 띄게 된다. 0.01 N 황산 20 mL를 250 mL 비이커에 담아 증류액을 담을 수 있게 준비한다. 분해시료초자에 증류수를 적당량 넣고 초자 교반기 이용하여 교반한다. 이때 유리 벽면에 붙어있는 시료까지 유리막대를 이용하여 긁어서 완전 교반되도록 한다. 교반된 시료-증류수 액을 킬달증류관 속에 붓고 10 N NaOH약 25 mL를 붓고 재빨리 증류기에 장착하여 3분 10초간 증류한다. 포집한 질소용액을 pH 적정 장치(702 SM Titrino, Metrohm, Switzerland)를 이용하여 농도를 측정하였다.

(라) 총탄소 (Total Carbon, TC)

2 mm 체로 체질한 토양을 균질화시켜 일부를 채취하고, 막자사발로 곱게 갈아 0.5 mm체로 체질하였다. 0.5 mm체로 체질한 토양 10 mg을 원소분석기(Elemental Analyzer,Flash 2000, Thermo Scientific, Cambridge, UK)를 이용하여 분석하였다.

(마) 무기태질소 (Inorganic Nitrogen)

토양 15g에 2M KCl 60mL (1:4 비율)를 가하고, 1 시간동안 Shaking 하여 Whatman No.42 filter paper로 걸렀다. 거른 여액 10mL에 산화마그네슘(MgO) 0.5g을 넣고 증류장치(K-314, BUCHI, Switzerland)로 증류하여 암모니아태 질소(NH<sub>4</sub>-N)를 포집하였다. 암모니아태 질소(NH<sub>4</sub>-N)를 포집한 후, Devarda's Alloy 0.5g을 넣고 증류장치(K-314, BUCHI, Switzerland)로 증류하여 질산태 질소(NO<sub>3</sub>-N)를 포집하였다. 각각 포집된 암모니아태 질소(NH<sub>4</sub>-N)와 질산태 질소(NO<sub>3</sub>-N)는 pH 적정 장치(702 SM Titrino, Metrohm, Switzerland)를 이용하여 적정하고, 함량을 계산하였다.

(3) 향온배양 실험 토양 분석 결과

향온배양 60일 후의 토양의 pH와 EC는 Table 41와 Fig 168과 같았다. pH와 EC의 경우 액비 무처리구의 경우 사양토와 양토 둘 다 향온배양 기간 동안 유의적인 변화가 없었다. 반면 액비 처리구의 경우 사양토는 초기 pH가 6.25에서 향온배양 60일 후는 5.11로 pH가 낮아졌다. 양토 역시 초기 pH가 7.50에서 7.22로 약간 떨어진 것을 확인 할 수 있었다. 이처럼 생초발효액비를 처리한 토양에서의 산도의 증가는 생초발효액비의 pH가 5.00으로 비교적 약산성을 띠고 있으며, 생초발효액비에 포함된 유기물이 토양에서 반응하여 유기산을 형성하여 토양 산도를 증가시켰다 판단된다. 토성별로 pH 감소의 차이는 토양 유기물의 완충력 차이에서 기인한 것이라 생각되는데, 초기 양토와 사양토의 향온배양실험 전 유기물 함량을 보면 각각 15.9 g kg<sup>-1</sup>, 4.8 g kg<sup>-1</sup>로 차이가 나며, 사양토에 비해 양토의 pH 변화가 적은 것을 알 수 있다. 이는 토양 유기물이 가지고 있는 음이온은 알루미늄과 강한 킬레이트 결합을 하면서 간접적으로 수소이온 완충력에 영향을 주기 때문이다. 생초발효액비 처리구에서의 EC 변화 역시 생초발효액비와 pH의 변화로 인해 기인한 것이라 판단되며, 최고 농도가 사양토, 양토에서 각각 0.50 dS m<sup>-1</sup> 0.65 dS m<sup>-1</sup> 로 약간 높지만, 발토양 허용범위인 0.50 ~ 1.00 dS m<sup>-1</sup> 사이이므로 생초발효액비 시용으로 인한 큰 문제는 없을 것으로 생각된다.

Table 41. pH, EC of sandy loam, loam soil.

Day	Sandy loam		Control		Loam		Control	
	Treatment	EC	pH	EC	Treatment	EC	pH	EC
	(1:5)	(dS m <sup>-1</sup> )	(1:5)	(dS m <sup>-1</sup> )	(1:5)	(dS m <sup>-1</sup> )	(1:5)	(dS m <sup>-1</sup> )
0	6.25	0.29	6.71	0.05	7.50	0.45	7.65	0.22
1	6.37	0.29	6.55	0.04	7.56	0.43	7.69	0.20
5	6.64	0.25	6.69	0.05	7.21	0.53	7.64	0.22
7	6.59	0.25	6.64	0.05	7.24	0.55	7.68	0.22
10	6.39	0.26	6.58	0.05	7.26	0.50	7.68	0.23
20	5.39	0.35	6.44	0.07	7.31	0.52	7.65	0.24
40	5.02	0.41	6.48	0.07	7.32	0.54	7.68	0.25
60	5.11	0.50	6.45	0.09	7.22	0.65	7.56	0.32

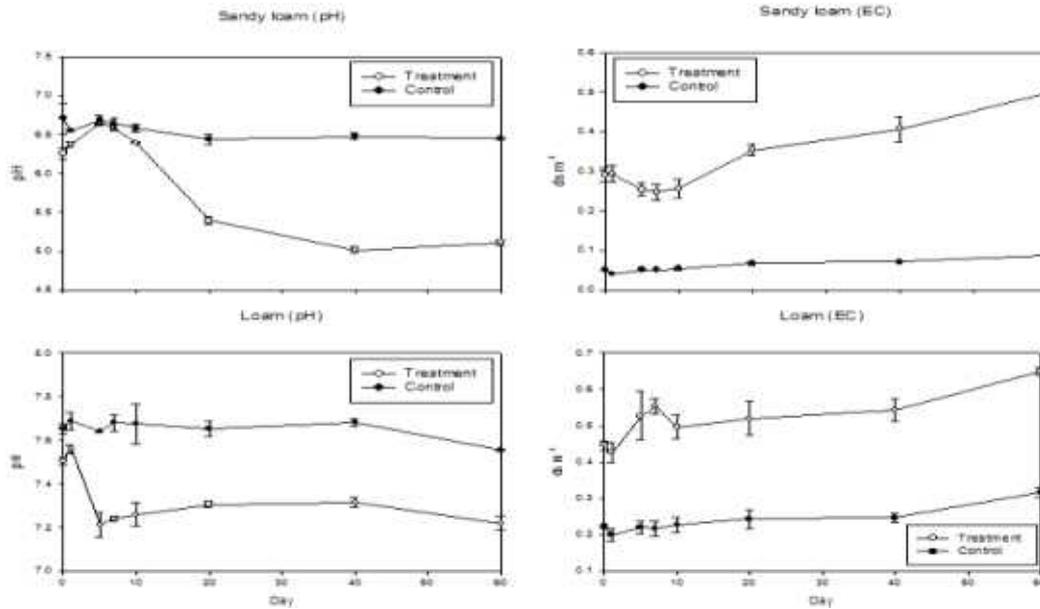


Fig 168. pH, EC of sandy loam, loam soil.

항온배양 60일 후의 사양토와 양토의 총질소와 총탄소는 Table 42과 Fig 169와 같았다. 생초발효액비 처리구는 무처리구에 비하여 총질소의 함량이 증가하였으며, 생초발효액비 처리구의 경우 사양토와 양토 모두 액비로 인해 증가한 총질소량이 일차별로 무처리구와 비슷한 양상을 보였다. 반면 총탄소는 생초발효액비의 총탄소 함량이  $22.2 \text{ g L}^{-1}$  임에도 불구하고 처리구 무처리구의 사양토와 양토 둘 다 초기 토양이 가지고 있는 총탄소의 수치를 나타내었다.

Table 42. Total nitrogen and carbon of sandy loam, loam soil. The values in parentheses indicate standard error (n=3).

Day	Sandy loam		Control		Loam		Control	
	Treatment	TC	TN	TC	Treatment	TC	TN	TC
	(g kg <sup>-1</sup> )							
0	0.62 (0.04)	6.43 (0.57)	0.45 (0.02)	5.52 (0.32)	1.79 (0.05)	16.21 (0.73)	1.64 (0.04)	15.84 (0.55)
1	0.87 (0.09)	5.94 (0.64)	0.60 (0.02)	5.55 (0.20)	2.08 (0.14)	16.22 (0.73)	1.81 (0.02)	15.86 (0.77)
5	0.68 (0.01)	5.76 (0.28)	0.54 (0.02)	5.89 (0.46)	1.99 (0.07)	16.00 (0.66)	1.86 (0.02)	16.30 (0.40)
7	0.71 (0.02)	5.88 (0.34)	0.56 (0.01)	5.76 (0.33)	2.01 (0.01)	16.00 (0.46)	1.87 (0.08)	15.86 (0.19)
10	0.76 (0.02)	5.64 (0.55)	0.62 (0.03)	5.41 (0.09)	2.15 (0.12)	16.30 (0.75)	1.75 (0.03)	15.95 (0.27)
20	0.66 (0.01)	5.61 (0.29)	0.52 (0.02)	5.68 (0.25)	1.82 (0.02)	15.55 (0.13)	1.67 (0.03)	15.62 (0.56)
40	0.62 (0.02)	5.82 (0.38)	0.45 (0.01)	5.33 (0.29)	1.83 (0.08)	16.32 (0.45)	1.90 (0.05)	15.70 (0.94)
60	0.88 (0.12)	5.88 (0.25)	0.66 (0.06)	5.48 (0.20)	2.32 (0.11)	15.99 (0.31)	1.95 (0.10)	15.51 (0.30)

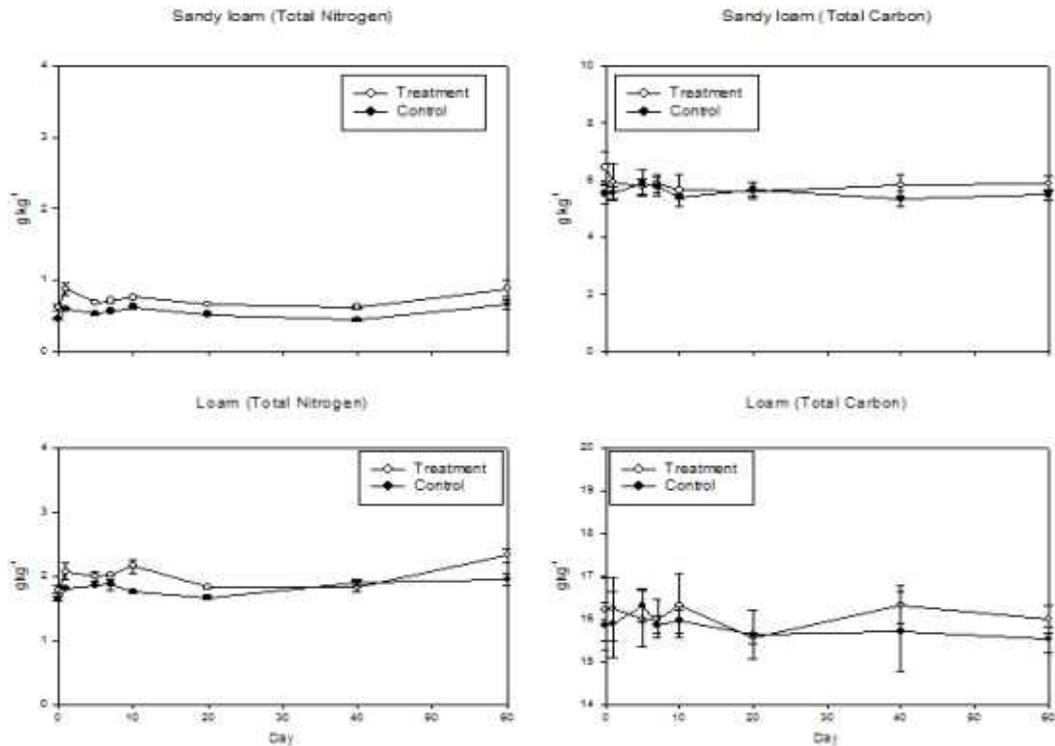


Fig 169. Total nitrogen and carbon of sandy loam, loam soil.

항온배양 60일 후의 사양토와 양토의 무기태 질소는 Table 43과 Fig 170와 같았다. 초기 생초발효액비 처리 즉시 토양의 암모니아태 질소 함량은 사양토와 양토 각각  $134.1 \text{ mg kg}^{-1}$   $145.5 \text{ mg kg}^{-1}$  로 무처리구에 비해 증가되었다. 반면 질산태 질소의 함량은 큰 차이를 보이지 않았다. 생초발효액비 처리구 토양의 항온배양 일차가 증가함에 따라 사양토와 양토의 암모니아태 질소의 함량이 점진적으로 감소하였고, 그와 반대로 질산태 질소의 함량은 증가하였다. 이는 토양 내 암모니아태 질소의 질산화 작용이 진행되었기 때문이다. 생초발효액비 무처리구 사양토 역시 일차가 증가함에 따라 암모니아태 질소가 감소하고 질산태 질소의 함량이 증가하는 추세를 보였으나, 양토에서는 일차가 증가함에 따라 암모니아태 질소와 질산태 질소가 증가하였다. 암모니아태 질소의 질산화 작용의 속도는 토성별로 차이가 났는데, 사양토보다 양토에서 초기 암모니아태 질소가 급격히 감소됨과 동시에 질산태 질소가 증가하였다. 일반적으로 무기화 효율은 온도와 수분함량이 높을수록, 토양 내 통기성이 양호한 경우 특정균의 활성이 촉진되어 증가하게 된다. 본 실험에서의 온도는  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 로 항온이었으며, 양토와 사양토의 포장용수량의 차이로 인한 수분함량의 차이가 토성별의 질산화 작용 속도의 차이를 나타냈다고 판단된다. 또한 암모니아태 질소에서 전환된 질산태 질소의 양이 일차가 증가함에 관계없이 일정하게 유지되었는데, 이는 생초발효액비가 비료로서 식물에게 안정적인 질소를 제공할 수 있을 것이라 판단된다.

Table 43. Inorganic nitrogen of sandy loam, loam soil. The values in parentheses indicate standard error (n=3).

Day	Sandy loam				Loam			
	Treatment		Control		Treatment		Control	
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg kg <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg kg <sup>-1</sup> )	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg kg <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg kg <sup>-1</sup> )	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg kg <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg kg <sup>-1</sup> )	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg kg <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg kg <sup>-1</sup> )
0	134.1 (2.5)	1.2 (0.5)	11.2 (2.3)	0.5 (0.7)	145.5 (4.7)	51.5 (3.0)	0.7 (0.9)	49.6 (3.1)
1	141.2 (14.0)	N.D*	8.5 (0.3)	0.5 (0.6)	122.5 (6.5)	49.5 (6.4)	0.4 (0.7)	47.1 (16.7)
5	128.9 (10.5)	6.0 (6.8)	7.6 (1.7)	2.7 (1.3)	16.3 (10.3)	128.9 (34.7)	N.D*	54.3 (4.6)
7	125.9 (0.9)	3.7 (0.3)	6.2 (0.1)	3.1 (0.7)	0.2 (0.4)	157.7 (13.8)	0.5 (0.9)	55.3 (11.0)
10	113.9 (7.0)	8.9 (0.5)	5.9 (0.7)	5.2 (2.2)	0.2 (0.4)	45.9 (26.2)	N.D*	34.3 (23.4)
20	43.1 (1.5)	86.4 (5.1)	0.2 (0.4)	14.1 (0.7)	N.D*	152.5 (18.4)	3.8 (3.3)	65.3 (6.1)
40	3.0 (2.5)	131.6 (4.6)	0.1 (0.2)	17.4 (1.4)	0.9 (1.1)	174.9 (7.2)	3.8 (0.0)	78.2 (4.4)
60	8.1 (3.5)	130.1 (0.9)	2.2 (1.4)	19.9 (1.5)	5.8 (2.9)	185.6 (4.0)	2.1 (3.7)	91.7 (6.6)

\* Not Detected

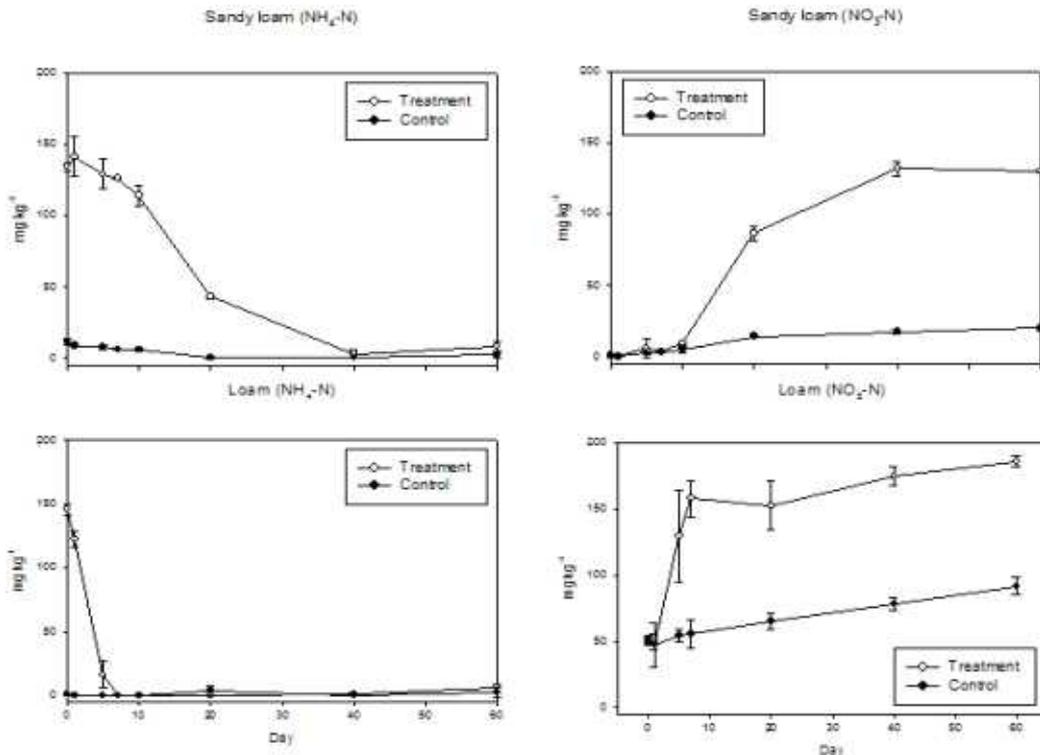


Fig 170. Inorganic nitrogen of sandy loam, loam soil.

다. pot에서 생초발효액비 시용에 따른 토양과 작물에 대한 영향 평가

(1) Pot 실험 설계

작물별로 화학비료와 생초발효액비의 효과를 비교하기 위하여 pot실험을 실시하였다. 작물별(고추, 방울토마토), 토성별(Loam, Clay Loam), 비료별(무처리, 화학비료, 생초발효액비

1 수준, 2 수준)로 설정하여 각각 pot를 설치하였다. 방울토마토와 고추는 모종장이 열리는 시기인 4~5 월 사이에 구입하였으며, pot에 정식 시 고추와 방울토마토의 초장을 적당히 맞추어 배치하였다. 토양은 경기도 수원에 위치한 경기도 농업기술원 내의 밭 포장 두 곳에서 채취하였다. 화학비료는 질소 공급원으로 요소 $[(\text{NH}_2)_2\text{CO}]$ , 인 공급원으로 용성인비 $(\text{P}_2\text{O}_5)$ , 칼륨 공급원으로 칼리 $(\text{K}_2\text{O})$ 를 사용하였으며, 생초발효액비는 영양 성분을 분석하여 질소성분을 기준으로 시비하였다. 비료의 시비는 2012년 05월 18일 모종을 정식하고 7 일 이 지난 후에 기비를 실시하였으며 그 후 2 주 간격으로 총 4 번 진행하였다. 토양 채취는 비료를 준 날로부터 7 일 후에 실시하였으며 마지막 채취는 식물체가 충분히 자라고 난 후 2012년 08월 10일 식물체와 함께 샘플링을 진행하였다. 식물체 분석은 마지막 샘플링 때 함께 샘플링 한 식물체의 뿌리를 제외한 줄기의 길이측정과 과실 수량, 건조한 과실의 미량원소분석을 통해 생육되어 증가된 양과 양분함량을 측정하였다.



Fig 171. Pot experiment.

(가) Pot 실험 토양

경기도 수원에 위치한 경기도 농업 기술원 내의 밭 포장 두 곳에서 채취한 토양 Sand 31.6 %, Silt 46.3 %, Clay 22.1 %의 Loam과 Sand 24.1 %, Silt 48.3 %, Clay 27.6 %의 Clay Loam을 사용하였다.

Table 44. Chemical properties of the soil used in the experiment. The values in parentheses indicate standard error (n=3).

	pH	EC	Inorganic Nitrogen			
			$\text{NH}_4^+-\text{N}$	$\text{NO}_3^--\text{N}$	TN	TC
	(1:5)	( $\text{dS m}^{-1}$ )	( $\text{mg kg}^{-1}$ )	( $\text{mg kg}^{-1}$ )	( $\text{g kg}^{-1}$ )	( $\text{g kg}^{-1}$ )
Loam	7.00	0.17	2.55	23.77	0.76	8.99
	(0.08)	(0.02)	(0.69)	(4.81)	(0.08)	(0.64)
Clay loam	6.86	0.27	0.73	93.25	1.06	12.30
	(0.08)	(0.03)	(1.04)	(5.40)	(0.08)	(1.31)

(2) 생초발효액비 처리량 산정

(가) 농진청에서 공시한 작물별 화학비료 요구량 (kg 10a<sup>-1</sup>)

Table 45. Chemical fertilizer requirement of pepper and tomato.

Fertilizer	Total (kg 10a <sup>-1</sup> )	Base (kg 10a <sup>-1</sup> )	Additional (kg 10a <sup>-1</sup> )		
			First	Second	Third
Pepper					
Nitrogen (Urea)	19.0	10.2	2.8	3.2	2.8
Phosphorus (Fused phosphate)	11.2	11.2	-	-	-
Potassium (Potassium Oxide)	15.0	9.0	1.8	1.8	2.4
Tomato					
Nitrogen (Urea)	24.0	14	3	4	3
Phosphorus (Fused phosphate)	16.0	16	-	-	-
Potassium (Potassium Oxide)	24.0	8	5	6	5

(나) Pot(지름: 31cm, 단면적: 754.77 cm<sup>2</sup>)당 작물별 화학비료 요구량 (g pot<sup>-1</sup>)

Table 46. Chemical fertilizer requirement conversion of pepper and tomato.

Fertilizer	Pepper	Tomato
	(g plot <sup>-1</sup> )	(g plot <sup>-1</sup> )
Nitrogen (Urea)	28.25	25.5
Phosphorus (Fused phosphate)	8.0	12.88
Potassium (Potassium Oxide)	12.63	15.25

(다) 생초발효액비 처리량 (mL pot<sup>-1</sup>)

작물별 화학비료 질소 요구량과 동일하게 생초발효액비 투입량을 산정하였다.

Table 47. Mixed liquid fertilizer (MLF) requirement of pepper and tomato.

Species	Treatment	MLF
		(mL 600mL <sup>-1</sup> )
Pepper	1.0x	35.2
	2.0x	70.6
Tomato	1.0x	44.4
	2.0x	85.8

### (3) Pot 실험 토양 분석

#### (가) pH

토양 5g을 증류수 25 mL(1:5 의 비율)로 희석하여 1 시간동안 Shaking 후, pH측정기 (Orion 3 star, Thermo Scientific, Singapore)로 측정하였다.

#### (나) EC

토양 5 g를 증류수 25 mL(1:5 의 비율)로 희석하여 1 시간동안 Shaking 후, Whatman No.42 filter paper로 걸렸다. 거른 여액은 전기전도도(Electrical Conductivity, EC) 측정기(PET-2000 Kombi, stelzner GMBH, Germany)를 이용하여 측정하였다.

#### (다) 총질소 (Total Nitrogen, TN)

2 mm 체로 체질한 토양을 균질화시켜 일부를 채취하고, 막자사발로 곱게 갈아 0.5 mm체로 체질하였다. 0.5 mm체로 체질한 토양 10 mg을 원소분석기(Elmetal Analyzer,Flash 2000, Thermo Scientific, Cambridge, UK)를 이용하여 분석하였다.

#### (라) 총탄소 (Total Carbon, TC)

2 mm 체로 체질한 토양을 균질화시켜 일부를 채취하고, 막자사발로 곱게 갈아 0.5 mm체로 체질하였다. 0.5 mm체로 체질한 토양 10 mg을 원소분석기(Elmetal Analyzer,Flash 2000, Thermo Scientific, Cambridge, UK)를 이용하여 분석하였다.

#### (마) 무기태 질소 (Inorganic Nitrogen, IN)

토양 15g에 2M KCl 60mL (1:4 비율)를 가하고, 1 시간동안 Shaking 하여 Whatman No.42 filter paper로 걸렸다. 거른 여액 10mL에 산화마그네슘(MgO) 0.5g을 넣고 증류장치(K-314, BUCHI, Switzerland)로 증류하여 암모니아태 질소(NH<sub>4</sub>-N)를 포집하였다. 암모니아태 질소(NH<sub>4</sub>-N)를 포집한 후, Devarda's Alloy 0.5g을 넣고 증류장치(K-314, BUCHI, Switzerland)로 증류하여 질산태 질소(NO<sub>3</sub>-N)를 포집하였다. 각각 포집된 암모니아태 질소(NH<sub>4</sub>-N)와 질산태 질소(NO<sub>3</sub>-N)는 pH 적정 장치(702 SM Titrino, Metrohm, Switzerland)를 이용하여 적정하고, 함량을 계산하였다.

### (4) Pot실험 식물체 분석

#### (가) 양이온 분석 (ICP)

건조한 식물체를 분쇄기(MM301, Reisch GmbH & Co., Haan, Germany)로 곱게 갈아 균질화 시켰다. 곱게 갈아 균질화 한 식물체는 각 부위별로 일부를 취해 켈달(Kjeldahl) 분해관에 넣고 증류수로 습윤시켰다. 습윤시킨 시료에 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-HNO<sub>3</sub>-HClO<sub>4</sub>(1:8:1)를 10mL를 가한 뒤, 방치하였다. 저온에서 가열을 시작하여 점차 온도를 높여 분해액이 투명해질 때까지 분해하였다. 분해액이 투명해지면 켈달(Kjeldahl) 분해관을 냉각한 후 10% HCl 20mL을 가하여 다시 가열하였다. 분해가 완료된 켈달(Kjeldahl) 분해관은 방치한 뒤, 100mL volume flask에 여과하였다. 여과액은 서울대학교 농생명과학공동기기원(NICEM)에 있는 유도결합플라즈마 발광광도기(Inductively Coupled Plasma Emission Spectrometer)를 이용하여 Ca, Mg, Na, K을 분석하였다.

(5) Pot 실험 분석 결과

(가) Pot실험 토양 분석 결과

① 고추를 식재한 pot 토양 분석 결과

Table 48. Soil pH and EC of pepper cultivated clay loam and loam. The values in parentheses indicate standard errors (n=3).

Day	Control		Chemical fertilizer		MLF 1.0x		MLF 2.0x	
	pH (1:5)	EC (dS m <sup>-1</sup> )	pH (1:5)	EC (dS m <sup>-1</sup> )	pH (1:5)	EC (dS m <sup>-1</sup> )	pH (1:5)	EC (dS m <sup>-1</sup> )
Clay loam								
14	6.78 (0.12)	0.16 (0.04)	6.04 (0.04)	0.62 (0.12)	6.37 (0.03)	0.37 (0.04)	5.97 (0.08)	0.50 (0.03)
28	6.89 (0.02)	0.28 (0.00)	6.11 (0.14)	0.54 (0.09)	5.81 (0.07)	0.63 (0.10)	5.46 (0.03)	0.88 (0.06)
42	7.05 (0.24)	0.21 (0.06)	6.28 (0.07)	0.51 (0.06)	6.13 (0.09)	0.60 (0.21)	5.45 (0.12)	0.82 (0.25)
84	7.33 (0.13)	0.07 (0.03)	7.10 (0.14)	0.29 (0.15)	6.69 (0.05)	0.31 (0.03)	6.14 (0.17)	0.79 (0.12)
Loam								
14	6.97 (0.01)	0.08 (0.01)	6.65 (0.20)	0.42 (0.09)	6.31 (0.17)	0.33 (0.03)	5.70 (0.23)	0.45 (0.10)
28	7.05 (0.04)	0.09 (0.02)	6.29 (0.15)	0.20 (0.05)	5.66 (0.20)	0.35 (0.03)	5.94 (0.06)	0.44 (0.10)
42	7.14 (0.03)	0.06 (0.01)	6.43 (0.12)	0.16 (0.03)	5.78 (0.15)	0.38 (0.04)	5.76 (0.20)	0.40 (0.16)
84	7.07 (0.03)	0.15 (0.03)	6.83 (0.03)	0.16 (0.01)	6.81 (0.13)	0.31 (0.09)	5.64 (0.38)	0.76 (0.10)

Table 48은 pot에 Clay loam과 Loam을 채우고 고추를 재배했을 때, 토양에서의 pH와 EC의 변화를 나타내었다. pH의 경우 무처리구에서는 토성간의 차이는 나타나지 않았으며, 대체적으로 pH 7 정도의 중성을 유지하였다. 그러나 액비를 처리했을 경우 pH가 급격히 감소하였으며, 특히 생초발효액비 2.0x 처리구의 pH가 가장 낮게 분석되었다. EC의 경우 생초발효액비를 처리하였을 때 감소되는 경향이 가장 크게 나타났다.

Table 49. Total nitrogen (TN) and total carbon(TC) contents of pepper cultivated clay loam and loam soils. The values in parentheses indicate standard errors (n=3).

Day	Control		Chemical Fertilizer		MLF 1.0x		MLF 2.0x	
	TN	TC	TN	TC	TN	TC	TN	TC
	(g kg <sup>-1</sup> )							
Clay Loam								
14	0.96 (0.22)	11.71 (0.81)	1.37 (0.13)	11.94 (0.77)	1.09 (0.09)	12.43 (1.36)	1.15 (0.12)	13.05 (0.44)
28	0.92 (0.06)	12.18 (1.02)	1.13 (0.20)	12.77 (2.71)	1.06 (0.07)	11.53 (0.25)	0.88 (0.05)	10.24 (0.54)
42	1.05 (0.40)	11.68 (1.30)	0.55 (0.05)	8.44 (0.57)	0.62 (0.00)	8.80 (0.37)	0.70 (0.07)	8.86 (0.22)
84	0.76 (0.02)	13.34 (1.20)	0.85 (0.12)	11.50 (0.32)	0.74 (0.06)	11.26 (0.87)	0.85 (0.02)	11.47 (0.57)
Loam								
14	0.67 (0.03)	9.42 (0.49)	0.83 (0.16)	8.60 (0.48)	0.68 (0.12)	8.36 (0.76)	0.73 (0.05)	8.47 (0.22)
28	0.53 (0.06)	7.62 (0.26)	0.63 (0.09)	8.91 (1.10)	0.63 (0.05)	8.25 (0.30)	0.60 (0.10)	7.70 (0.66)
42	0.63 (0.36)	8.70 (2.00)	0.86 (0.05)	7.45 (0.19)	0.72 (0.15)	8.37 (0.76)	0.87 (0.13)	8.88 (0.44)
84	0.53 (0.02)	8.26 (0.35)	0.56 (0.35)	8.78 (0.52)	0.62 (0.08)	8.80 (1.00)	0.68 (0.10)	9.40 (0.80)

총질소의 경우 Clay loam과 Loam에서 각 처리구에 대하여 유의미한 결과를 보이지 않았다. 그러나 무처리구에 비하여 화학처리구와 생초발효액비 처리구에서 약간 높은 함량을 나타내었으며, 화학비료 처리구가 액비처리구보다 높게 분석되었다.

총탄소의 경우 Clay loam과 Loam에서 각각의 처리구에서 변화한 것을 확인할 수 있었다. Clay loam에서 화학비료 처리구와 생초발효액비 2.0x 처리구에서 감소하였으며, Loam에서는 화학비료 처리구에서 증가하다가 감소하는 경향을 나타내었다.

Table 50. Inorganic nitrogen contents of pepper cultivated clay loam and loam soils. The values in parentheses indicate standard errors (n=3).

Day	Control		Chemical Fertilizer		Mixed Liquid Fertilizer 1.0x		Mixed Liquid Fertilizer 2.0x	
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg kg <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg kg <sup>-1</sup> )	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg kg <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg kg <sup>-1</sup> )	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg kg <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg kg <sup>-1</sup> )	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg kg <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg kg <sup>-1</sup> )
Clay Loam								
14	0.44 (0.56)	58.47 (33.70)	95.19 (56.12)	269.09 (60.50)	1.48 (2.56)	164.18 (40.55)	1.94 (2.96)	216.65 (22.96)
28	4.79 (2.04)	92.18 (10.19)	3.41 (1.49)	199.76 (66.89)	11.80 (13.19)	164.15 (63.27)	14.81 (0.74)	247.81 (82.70)
42	N.D*	106.96 (66.91)	31.65 (28.58)	289.43 (61.53)	0.89 (1.55)	171.48 (58.58)	0.73 (1.27)	244.86 (151.01)
84	N.D*	7.78 (8.79)	N.D*	63.22 (96.67)	N.D*	19.48 (21.53)	0.85 (1.46)	208.51 (97.51)
Loam								
14	0.73 (0.74)	8.38 (2.34)	134.66 (95.72)	111.51 (64.11)	0.96 (1.65)	99.18 (29.04)	1.83 (2.88)	120.58 (14.83)
28	1.64 (0.40)	0.28 (0.48)	2.20 (1.13)	44.70 (24.29)	8.04 (4.00)	77.69 (12.17)	17.05 (14.69)	81.16 (36.35)
42	N.D*	1.88 (0.48)	N.D*	44.63 (10.04)	N.D*	44.85 (20.60)	12.11 (16.78)	84.66 (32.92)
84	N.D*	N.D*	N.D*	10.86 (6.28)	7.11 (6.17)	3.86 (4.03)	8.37 (14.08)	80.22 (21.37)

\* Not Detected

무기태질소의 경우 토성과 작물의 종류에 따라 차이를 보였다. 무처리구에서 초반에 Clay loam에 비하여 Loam 토양에서 암모니아태 질소의 함량이 높았으나, 질산태 질소의 경우는 낮은 값을 보였다. 시간이 지날수록 무처리구의 암모니아태 질소와 질산태 질소의 함량이 줄어들었으며, 이는 식물의 질소 이용으로 인해 변화한 것이라 생각된다. 화학비료의 경우 역시 Clay loam에 비하여 Loam 토양에서 암모니아태 질소의 함량이 높았으며, 반대로 질산태 질소의 경우에는 Clay loam 토양에서 더 높은 값을 나타내었다. 이 역시 식물 성장에 따라 질산태와 암모니아태 질소가 감소하는 경향을 나타내었다. 생초발효액비 처리구에서는 암모니아태 질소가 액비를 넣어준 시점에 무처리구에 비하여 잠시 증가하다 다시 감소하는 경향을 보였다. 반면 질산태 질소의 경우 생초발효액비 2.0x 처리구에서 높은 함량을 나타내었으며, 이 역시 일차가 지남에 따라 감소한 것을 확인할 수 있었다.

② 방울토마토를 식재한 pot 토양 분석 결과

Table 51. Soil pH and EC of tomato cultivated clay loam and loam. The values in parentheses indicate standard errors (n=3).

Day	Control		Chemical Fertilizer		MLF 1.0x		MLF 2.0x	
	pH (1:5)	EC (dS m <sup>-1</sup> )	pH (1:5)	EC (dS m <sup>-1</sup> )	pH (1:5)	EC (dS m <sup>-1</sup> )	pH (1:5)	EC (dS m <sup>-1</sup> )
Clay loam								
14	6.82 (0.05)	0.13 (0.02)	6.40 (0.21)	0.52 (0.04)	6.25 (0.07)	0.33 (0.03)	5.97 (0.09)	0.46 (0.04)
28	6.97 (0.09)	0.11 (0.03)	6.24 (0.21)	0.33 (0.09)	5.38 (0.07)	0.67 (0.15)	5.27 (0.27)	0.84 (0.11)
42	7.19 (0.03)	0.07 (0.01)	6.21 (0.07)	0.28 (0.05)	5.39 (0.10)	0.74 (0.05)	5.40 (0.11)	0.45 (0.07)
84	7.35 (0.07)	0.10 (0.03)	7.11 (0.05)	0.20 (0.03)	6.27 (0.10)	0.59 (0.02)	5.75 (0.23)	0.44 (0.07)
Loam								
14	6.96 (0.00)	0.10 (0.00)	6.74 (0.00)	0.22 (0.03)	6.06 (0.07)	0.42 (0.03)	5.76 (0.14)	0.53 (0.04)
28	7.07 (0.02)	0.08 (0.01)	6.10 (0.12)	0.28 (0.02)	5.21 (0.13)	0.45 (0.01)	5.48 (0.04)	0.73 (0.09)
42	7.20 (0.03)	0.05 (0.00)	6.45 (0.23)	0.11 (0.03)	5.58 (0.13)	0.21 (0.04)	5.43 (0.06)	0.55 (0.12)
84	7.23 (0.04)	0.09 (0.01)	6.70 (0.11)	0.22 (0.03)	6.67 (0.18)	0.24 (0.02)	5.85 (0.31)	0.53 (0.13)

Table 51는 pot에서 방울토마토를 재배했을 때, clay loam과 loam에서의 pH와 EC의 변화를 나타내었다. pH의 경우 무처리구에서는 식물체, 토성과 무관하게 대체적으로 pH 7 정도를 유지하였으나, 화학비료와 생초발효액비를 처리했을 경우 pH가 급격히 감소하였는데, 생초발효액비 2.0x 처리구에서 가장 낮게 나타났다. EC의 경우도 pH와 마찬가지로 생초발효액비를 처리하였을 때 영향이 가장 크게 나타났다. Clay loam에서 기른 방울토마토의 84일 후 분석값을 보면, 생초발효액비 1.0x 처리구가 2.0x 처리구보다 염의 농도가 더 높게 나타났으나 그 외의 경우에는 생초발효액비 2.0x 처리구가 가장 높은 염 농도를 보였으며 무처리구에서 가장 낮은 염 농도를 나타내었다.

Table 52. Total nitrogen and carbon contents of tomato cultivated clay loam and loam soils. The values in parentheses indicate standard errors (n=3).

Day	Control		Chemical Fertilizer		MLF 1.0x		MLF 2.0x	
	TN (g kg <sup>-1</sup> )	TC (g kg <sup>-1</sup> )	TN (g kg <sup>-1</sup> )	TC (g kg <sup>-1</sup> )	TN (g kg <sup>-1</sup> )	TC (g kg <sup>-1</sup> )	TN (g kg <sup>-1</sup> )	TC (g kg <sup>-1</sup> )
Clay Loam								
14	0.81 (0.04)	11.86 (1.14)	1.25 (0.20)	11.48 (0.78)	0.93 (0.13)	13.87 (4.71)	0.89 (0.09)	12.07 (1.16)
28	0.81 (0.03)	11.65 (0.94)	0.94 (0.05)	11.54 (0.30)	0.98 (0.18)	9.73 (1.51)	1.09 (0.18)	12.17 (2.11)
42	0.90 (0.19)	13.48 (2.74)	0.87 (0.18)	11.23 (1.13)	1.08 (0.21)	15.46 (3.79)	0.95 (0.05)	12.09 (2.27)
84	0.73 (0.01)	11.48 (1.43)	0.79 (0.11)	11.52 (1.45)	0.95 (0.09)	12.82 (1.55)	0.76 (0.08)	11.93 (1.41)
Loam								
14	0.75 (0.09)	9.35 (0.50)	0.82 (0.09)	9.33 (0.94)	0.82 (0.01)	9.74 (0.20)	0.74 (0.11)	8.65 (1.55)
28	0.51 (0.02)	7.86 (0.69)	0.84 (0.20)	7.34 (0.57)	1.18 (0.11)	9.99 (3.67)	0.69 (0.53)	8.53 (0.81)
42	0.52 (0.06)	8.26 (0.58)	0.55 (0.05)	8.44 (0.57)	0.62 (0.00)	8.80 (0.37)	0.70 (0.07)	8.86 (0.22)
84	0.53 (0.03)	8.69 (0.38)	0.57 (0.03)	8.22 (0.15)	0.54 (0.06)	8.79 (0.32)	0.67 (0.16)	8.56 (0.76)

pot 토양의 총질소는 Clay loam과 Loam에서 처리구에 대한 특별한 변화가 나타나지 않았다. 고추를 식재한 토양에서와 마찬가지로 무처리구에 비하여 화학처리구와 생초발효액비 처리구에서 약간 높은 함량을 나타내었으며, 화학비료 처리구가 생초발효액비처리구보다 높게 분석되었다. 또한 방울토마토 보다 고추의 총질소 함량이 높았으며, Loam에 비하여 Clay loam에서 총질소 함량이 약간 높은 것을 확인 할 수 있었다. 총탄소의 경우 토성별 차이에서 clay loam과 loam에서 각각의 처리구마다 변화한 것을 확인할 수 있었다. Clay loam에서 화학비료 처리구와 생초발효액비 2.0x 처리구에서 감소하였으며, Loam에서는 생초발효액비 처리구 1.0x 처리구에서 증가하는 경향을 보였다.

Table. 53. Inorganic nitrogen contents of tomato cultivated clay loam and loam soils. The values in parentheses indicate standard error (n=3).

Day	Control		Chemical Fertilizer		MLF 1.0x		MLF 2.0x	
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N
	(mg kg <sup>-1</sup> )							
Clay Loam								
14	0.65 (1.13)	47.17 (11.99)	147.83 (106.99)	231.97 (23.02)	N.D*	136.54 (23.69)	13.41 (12.95)	187.50 (19.93)
28	N.D*	16.88 (26.39)	15.61 (27.03)	136.44 (103.64)	18.90 (13.64)	197.54 (82.73)	105.45 (73.83)	243.17 (161.39)
42	4.13 (5.50)	11.13 (5.14)	10.67 (12.94)	120.83 (60.66)	0.91 (0.89)	149.15 (57.53)	29.68 (42.83)	239.64 (60.18)
84	N.D*	7.60 (11.15)	N.D*	25.27 (13.01)	N.D*	144.24 (22.37)	13.11 (12.34)	39.58 (10.29)
Loam								
14	1.54 (0.81)	16.30 (3.47)	62.03 (38.98)	86.61 (25.86)	N.D*	135.48 (17.57)	46.29 (37.13)	145.86 (47.84)
28	2.44 (2.58)	1.07 (1.86)	20.14 (27.26)	84.09 (17.40)	19.60 (11.11)	125.39 (16.77)	129.15 (97.56)	111.67 (21.98)
42	N.D*	3.79 (3.11)	N.D*	38.47 (25.10)	0.16 (0.28)	44.08 (16.35)	45.03 (44.96)	90.70 (20.63)
84	0.63 (1.09)	1.82 (0.75)	N.D*	53.21 (12.81)	2.29 (1.99)	1.82 (3.15)	79.83 (116.97)	63.74 (45.12)

\* Not Detected

무기태질소는 토성과 작물의 종류에 따라 차이를 보였다. 방울토마토의 무처리구 토양에서는 고추와 마찬가지로 초반에 Clay loam에 비하여 Loam 토양에서 암모니아태 질소의 함량이 높았으나, 질산태 질소의 경우는 낮은 값을 보였다. 시간이 지날수록 무처리구의 암모니아태 질소와 질산태 질소의 함량이 줄어들었으며, 이는 식물의 질소 이용으로 인해 변화한 것이라 생각된다. 화학비료 처리구에서는 Loam에 비하여 Clay loam에서 좀 더 높은 암모니아태 질소와 질산태 질소함량을 확인 할 수 있었다. 생초 발효액비 처리구에서는 Clay loam, Loam 에서 무처리구에 비하여 암모니아태 질소와 질산태 질소 함량의 증가를 확인할 수 있었으나, 이 역시 화학비료에 비하면 낮은 수준을 나타내었다.

(나) Pot실험 식물체 분석 결과

Table 54.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  of fruits in clay loam soil. The values in parentheses indicate standard error (n=3)

Clay Loam	Control	Chemical Fertilizer	MLF 1.0x	MLF 2.0x
$\text{Ca}^{2+}$ (g kg <sup>-1</sup> )				
Pepper	N.D*	11.2 (-)	12.9 (-)	21.2 (-)
Tomato	12.7 (0.6)	13.1 (4.1)	18.0 (5.2)	13.1 (1.5)
$\text{Mg}^{2+}$ (g kg <sup>-1</sup> )				
Pepper	N.D*	12.5 (-)	12.3 (-)	18.3 (-)
Tomato	12.3 (1.0)	11.3 (1.0)	13.2 (2.2)	14.3 (2.4)
$\text{Na}^+$ (g kg <sup>-1</sup> )				
Pepper	N.D*	1.2 (-)	1.3 (-)	4.5 (-)
Tomato	2.0 (0.6)	2.1 (0.4)	2.4 (0.3)	6.4 (3.5)
$\text{K}^+$ (g kg <sup>-1</sup> )				
Pepper	N.D*	27.9 (-)	28.0 (-)	37.5 (-)
Tomato	35.0 (11.3)	26.9 (2.3)	28.5 (1.2)	36.1 (15.0)

Table 55.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  of fruits in loam soil. The values in parentheses indicate standard error (n=3).

Loam	Control	Chemical Fertilizer	MLF 1.0x	MLF 2.0x
$\text{Ca}^{2+}$ (g kg <sup>-1</sup> )				
Pepper	9.3 (4.4)	6.2 (2.2)	13.5 (0.6)	N.D*
Tomato	18.0 (0.7)	22.3 (4.9)	13.6 (6.2)	N.D*
$\text{Mg}^{2+}$ (g kg <sup>-1</sup> )				
Pepper	15.5 (1.9)	11.7 (0.5)	17.9 (2.2)	N.D*
Tomato	11.5 (1.0)	11.4 (0.9)	14.4 (0.7)	N.D*
$\text{Na}^+$ (g kg <sup>-1</sup> )				
Pepper	0.3 (0.0)	0.3 (0.0)	0.7 (0.2)	N.D*
Tomato	2.2 (0.3)	2.0 (0.4)	3.0 (0.7)	N.D*
$\text{K}^+$ (g kg <sup>-1</sup> )				
Pepper	22.7 (1.4)	20.6 (2.6)	25.9 (4.5)	N.D*
Tomato	21.7 (0.9)	25.7 (2.8)	27.0 (2.0)	N.D*

\* Not Detected

pot실험에서 각 토성과 수종의 열매의 미량원소를 분석하였다. Loam의 경우 고추와 방울토마토에서 무처리와 화학비료에 비하여 생초발효액비 1.0x 처리구가  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ 의 함량이 높게 나온 것을 확인 할 수 있었다. Clay loam의 경우 역시 대부분 무처리구에 비하여 화학비료처리구와 생초발효액비 처리구에서 높은 함량을 나타내었다. 이는 생초발효액비를 처리함에 따라 토양 내 양분의 순환이 높아져 열매에도 영향을 끼친 것으로 생각된다. 이를 좀 더 명확하게 알아보기 위하여 액비의 미량원소를 분석해보고, 분석되지 않은 데이터는 추가로 실험을 다시 진행하여 차년도 보고서에 첨부하도록 할 예정이다.

## 2. 생초미생물 혼합액비 시용에 따른 토양 이화학성 변화와 작물 생육 반응 및 무기화율 및 액비 처리효과 구명

### 가. 생초미생물 혼합액비의 양분성분 분석

#### (1) 생초미생물 혼합액비

생초미생물 혼합액비는 제 1협동 팀에서 만든 것을 두 번에 걸쳐 받아 사용하였다. 잔디 예지물(생초)의 cellulose 분해를 가장 효율적으로 하는 균주 *Paenibacillus ehimensis* KWN38와 생초(fresh weed)를 일정시간 동안 함께 배양하였고, 여기에 미생물이 초기에 활성을 나타낼 수 있도록 영양 배지를 조성해 주었다. 배지 조성은 Table. 56과 같으며, 생초미생물 액비는 다음과 같은 방법으로 만들었다. 생초를 넣은 배지를 준비하고, 배지를 고온고압(autoclave)에서 멸균시켰다. *Paenibacillus ehimensis* KWN38를 접종한 후, 30 °C에서 170 rpm으로 5 일간 배양 후 바로 사용하였다.

Table 56. Chemical composition of mixed liquid fertilizer.

Ingredient	Amount (g L <sup>-1</sup> )
Grass (based by fresh weight)	178.0
46.6% N (Urea)	2.8
20% P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (용과린)	8.8
60% K <sub>2</sub> O	1.6
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.0
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1.0
yeast	0.1
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.05
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.06
Chitin powder	0.8
Gelatin powder	0.2

생초미생물 혼합액비는 미생물이 생초를 분해하면서 각종 비료성분(N, P, K)이 추가로 나오기 때문에 제1협동에서 보내온 액비를 액체질소를 사용하여 급랭하였다. 1 회 처리 시 필요한 액비의 용량에 맞춰 각각 급냉한 액비는 사용하기 하루 전에 해동하여 사용하였다.

## (2) 생초미생물 혼합액비 분석

### (가) pH

생초미생물 혼합액비 5 mL를 증류수 25 mL(1:5의 비율)로 희석하여 1 시간동안 Shaking 후, pH 측정기(Orion 3 star, Thermo Scientific, Singapore)로 측정하였다.

### (나) EC

생초미생물 혼합액비 5 mL를 증류수 25 mL(1:5의 비율)로 희석하여 1시간동안 Shaking 후, Whatman No.42 filter paper로 걸렀다. 거른 여액은 전기전도도(Electrical Conductivity, EC) 측정기(PET-2000 Kombi, stelnzer GMBH, Germany)를 이용하여 측정하였다.

### (다) 총탄소 (Total Carbon, TC)

생초미생물 혼합액비 10 mL를 동결건조 시켜 수분을 제거하였다. 동결 건조된 액비 2 mg을 원소분석기(Elemental Analyzer, Flash 2000, Thermo Scientific, Cambridge, UK)를 이용하여 분석하였다.

### (라) 총 질소 (Total Nitrogen, TN) - Kjeldahl 분해법

생초미생물 혼합액비의 총질소는 Permanganated reduced Fe modification 방법으로 분석하였다. 100mL 켈달(Kjeldahl) 분해관에 생초 미생물 혼합액비 3mL와 진한 황산 8mL를 넣고 혼합했다. 분해관을 분해대에 놓고 낮은 온도에서 점차 고온으로 가열하였고, 하얀 연기가 생성될 때부터 5분간 더 가열하였다. 분해관을 분해대에서 내려 냉각 한 후 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 약 0.5mL를 넣었다. 다시 가열을 시작하여 분해액이 백색 투명하게 될 때까지 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 넣으며 분해하는 과정을 반복하였다. 분해가 끝나면 냉각시키고 100mL volumetric flask에 옮겨 증류수로 부피를 맞췄다. 분해액 10mL에 10N NaOH를 넣고 증류장치(K-314, BUCHI, Switzerland)를 이용하여 증류했다. 포집된 총질소는 pH 적정 장치(702 SM Titrimo, Metrohm, Switzerland)를 이용하여

적정하고, 총질소 함량을 계산하였다.

### (마) 무기태 질소 (Inorganic Nitrogen)

생초미생물 혼합액비 10 mL에 2 M KCl 100 mL (1:10 비율)를 가하고, 1 시간동안 Shaking 하여 Whatman No.42 filter paper로 거렸다. 거른 여액에 산화마그네슘(MgO) 0.5g을 넣고 증류장치(K-314, BUCHI, Switzerland)로 증류하여 암모니아태 질소(NH<sub>4</sub>-N)를 포집하였다. 암모니아태 질소(NH<sub>4</sub>-N)를 포집한 후, Devarda's Alloy 0.5g을 넣고 증류장치(K-314, BUCHI, Switzerland)로 증류하여 질산태 질소(NO<sub>3</sub>-N)를 포집하였다. 각각 포집된 암모니아태 질소(NH<sub>4</sub>-N)와 질산태 질소(NO<sub>3</sub>-N)는 pH 적정 장치(702

SM Titrino, Metrohm, Switzerland)를 이용하여 적정하고, 함량을 계산하였다.

(바) 총인 (Total Phosphate, TP) - Vanadate법

생초미생물 혼합액비 3 mL를 Kjeldahl 분해관에 담고, 진한 황산 8 mL를 가한다. Digestion tube를 분해대에 올려 온도를 차츰 올리며 가열하고 하얀 연기가 생기면 100 °C에서 5 분 동안 분해한다. 1 시간 간격으로 130 °C, 180 °C, 250 °C로 온도를 높이며 가열하였다. 분해관을 분해대에서 내려 방냉한 후, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3 mL를 넣고 250 °C에서 계속 가열하였다. 분해액이 백색 투명하지 않으면 방냉 후 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 더 첨가하고 가열하였다. 분해된 시료를 50 mL Volumetric flask에 유리 깔대기를 꽂아 Whatman No.42 filter paper로 거렸다. 여액 5 mL를 Ammonium paramolybdate vanadate 용액 10 mL를 넣고 30 분간 발색 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(3) 생초미생물 혼합액비 분석 결과

생초미생물 혼합액비의 화학적 특성은 Table 57과 같다. 생초미생물 혼합액비의 pH는 8.48로 약염기를 나타내었으며, 전 질소는 1.37 g L<sup>-1</sup>, 인산은 0.28 g L<sup>-1</sup>의 함량을 나타내었다.

Table 57. Chemical Properties of Mixed Liquid Fertilizer (MLF). The values in parentheses indicate standard errors (n=12).

	pH	EC (dS m <sup>-1</sup> )	TC (g L <sup>-1</sup> )	TN (g L <sup>-1</sup> )	Inorganic Nitrogen		TP (g L <sup>-1</sup> )
					NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (g L <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (g L <sup>-1</sup> )	
MLF	8.48 (0.01)	2.08 (0.14)	3.98 (0.13)	1.37 (1.3)	1.00 (12.21)	N.D*	0.28 (4.59)

\* Not Detected

나. 항온배양실험을 통한 생초미생물 혼합액비 토양 내 무기화율 평가

(1) 항온배양 실험 설계

생초미생물 혼합액비의 화학비료의 대체제로 활용가능성을 확인하기 위하여 생초미생물 혼합액비를 시용한 토양의 항온배양실험을 진행하였다(Fig 172). 실험에 사용된 토양은 경기도 남양주에 위치한 농가의 양토를 사용하였다. 항온배양실험은 각각의 토양을 무처리구, 액비 처리구로 설계하였으며, 250 mL polyethylene병에 각각의 토양을 100 g씩 넣고, 포장용수량(30 kPa)으로 수분함량을 맞춰준 후 작물의 평균 생육온도인 25 °C에서 각각 일주일 간 전 배양(pre-incubation)하였다. 전 배양 후 액비 처리구는 질소비료(200 kg N ha<sup>-1</sup>)를 기준으로 액비 2.33 mL를 각각 토양에 처리하였다. 이후 25 °C에서 각각의 토양은 포장용수량을 유지하며 총 60 일간 배양하였다. 액비 처리 후 0 일, 3 일, 5 일, 7 일, 14 일, 21

일, 42 일, 63 일에 차례대로 시료를 채취한 뒤, 바로 무기태 질소와 수분함량을 측정하였으며, 나머지 분석 항목 pH, EC, 총탄소(Total Carbon, TC), 총질소(Total Nitrogen, TN)를 분석하였다.



Fig 172. Incubation experiment of soils.

(가) 항온배양 실험에 사용한 토양

우리나라 밭 토양의 대표토성인 양토를 경기도 남양주에 위치한 농가에서 채취하였다. Sand 25.1 %, Silt 48.9 %, Clay 26 %의 성분비율을 갖는 Loam이며, 풍건한 뒤 2 mm체를 사용하여 체질하여 사용하였다. 토양의 물리화학적 성은 Table 58과 같다.

Table 58. Chemical properties of soil. The values in parentheses indicate standard errors (n=3).

	pH (1:5)	EC (dS m <sup>-1</sup> )	TC (g kg <sup>-1</sup> )	TN (g kg <sup>-1</sup> )	Inorganic Nitrogen	
					NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg kg <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg kg <sup>-1</sup> )
Soil	7.80	0.14	15.50	1.78	4.0	7.5

(2) 토양화학성 분석

(가) pH

토양 5 g을 증류수 25 mL(1:5의 비율)로 희석하여 1 시간동안 Shaking 후, pH 측정기(Orion 3 star, Thermo Scientific, Singapore)로 측정하였다.

(나) EC

토양 5 g를 증류수 25 mL(1:5의 비율)로 희석하여 1 시간동안 Shaking 후, Whatman No.42 filter paper로 걸렀다. 거른 여액은 전기전도도(Electrical Conductivity, EC) 측정기(PET-2000 Kombi, stelzner GMBH, Germany)를 이용하여 측정하였다.

(다) 총질소 (Total Nitrogen, TN)

2 mm 체로 체질한 토양을 균질화시켜 일부를 채취한다. 채취한 토양을 막자사발로 곱

계 같아 0.5 mm체로 체질한다. 0.5 mm체로 체질한 토양 10 mg을 원소분석기(Elmetal Analyzer,Flash 2000, Thermo Scientific, Cambridge, UK)를 이용하여 분석하였다.

(라) 총탄소 (Total Carbon, TC)

2 mm 체로 체질한 토양을 균질화시켜 일부를 채취한다. 채취한 토양을 막자사발로 곱게 갈아 0.5 mm체로 체질한다. 0.5 mm체로 체질한 토양 10 mg을 원소분석기(Elmetal Analyzer,Flash 2000, Thermo Scientific, Cambridge, UK)를 이용하여 분석하였다.

(마) 무기태 질소 (Inorganic Nitrogen)

토양 10 g에 2 M KCl 60 mL (1:4 비율)를 가하고, 1 시간동안 Shaking 하여 Whatman No.42 filter paper로 걸렀다. 거른 여액에 산화마그네슘(MgO) 0.5g을 넣고 증류장치(K-314, BUCHI, Switzerland)로 증류하여 암모니아태 질소(NH<sub>4</sub>-N)를 포집하였다. 암모니아태 질소(NH<sub>4</sub>-N)를 포집한 후, Devarda's Alloy 0.5g을 넣고 증류장치(K-314, BUCHI, Switzerland)로 증류하여 질산태 질소(NO<sub>3</sub>-N)를 포집하였다. 각각 포집된 암모니아태 질소(NH<sub>4</sub>-N)와 질산태 질소(NO<sub>3</sub>-N)는 pH 적정 장치(702 SM Titrino, Metrohm, Switzerland)를 이용하여 적정하고, 함량을 계산하였다.

(3) 향온배양 실험 토양 분석 결과

Table 59. pH, EC of soil. The values in parentheses indicate standard error (n=3).

Day	Control		Treatment	
	pH (1:5)	EC (dS m <sup>-1</sup> )	pH (1:5)	EC (dS m <sup>-1</sup> )
0	7.58 (0.02)	0.29 (0.01)	7.56 (0.02)	0.38 (0.02)
3	7.64 (0.02)	0.26 (0.01)	7.57 (0.18)	0.35 (0.07)
5	7.65 (0.01)	0.27 (0.01)	7.45 (0.02)	0.41 (0.01)
7	7.68 (0.02)	0.25 (0.01)	7.52 (0.05)	0.38 (0.05)
14	7.74 (0.02)	0.24 (0.01)	7.49 (0.04)	0.41 (0.03)
21	7.80 (0.01)	0.21 (0.01)	7.53 (0.03)	0.38 (0.01)
42	7.87 (0.01)	0.18 (0.02)	7.63 (0.05)	0.34 (0.03)
63	7.34 (0.04)	0.21 (0.02)	7.61 (0.20)	0.33 (0.02)

향온배양 60 일 후의 토양의 pH와 EC는 Table 59와 같다. pH의 경우 생초 미생물 혼합

액비 처리구에서 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 무처리구의 경우 초기 사용한 토양의 pH를 유지하며 통계적이 유의차가 나타나지 않았다. 생초 미생물 혼합액비 처리구에서 산도 증가의 이유는 생초 미생물 혼합액비에 포함된 유기물이 토양에서 반응하여 유기산을 형성하여 토양 산도를 증가시켰다 판단되었다. 반면 액비 처리구 EC 경우 무처리구에 비하여 초기 증가하였다가 유지되는 것을 확인할 수 있었다. 생초미생물 혼합액비 처리구에서의 EC 변화 역시 생초미생물 혼합액비와 pH의 변화로 인해 기인한 것이라 판단되었다.

Table 60. Total nitrogen (TN) and carbon (TC) contents of the soil. The values in parentheses indicate standard errors (n=3).

Day	Control		Treatment	
	TN (g kg <sup>-1</sup> )	TC (g kg <sup>-1</sup> )	TN (g kg <sup>-1</sup> )	TC (g kg <sup>-1</sup> )
0	1.51 (0.07)	15.77 (0.59)	1.68 (0.05)	17.12 (0.46)
3	1.60 (0.07)	16.40 (0.69)	1.57 (0.06)	16.15 (0.64)
5	1.53 (0.00)	16.23 (0.73)	1.47 (0.07)	15.82 (0.52)
7	1.66 (0.10)	16.31 (0.78)	1.58 (0.07)	16.29 (0.66)
14	1.46 (0.09)	16.76 (0.70)	1.53 (0.15)	17.46 (1.11)
21	1.45 (0.00)	16.63 (0.71)	1.50 (0.06)	16.95 (0.40)
42	1.41 (0.03)	16.08 (0.20)	1.53 (0.04)	16.98 (0.10)
63	1.39 (0.05)	16.30 (0.16)	1.47 (0.05)	16.43 (0.44)

항온배양 60 일 후의 토양의 총질소와 총탄소는 Table 3-24와 같다. 항온배양 실험기간동안 총질소의 경우 생초 미생물 혼합액비 처리구와 무처리구는 모두 변화 없이 비슷한 양상을 보였으며, 무처리구에 비하여 생초 미생물 혼합액비 처리구에서 총질소 함량이 약간 증가한 것을 확인할 수 있었다. 총탄소의 경우 무처리에 비하여 생초 미생물 혼합액비 처리구에서 증가하였으며, 시간이 지남에 따라 생초 미생물 혼합액비 처리구에서 약간의 감소 경향이 나타났다. 총질소와 총탄소의 증가는 생초 미생물 혼합액비의 총질소 함량(1.37 g L<sup>-1</sup>)과 총탄소 함량 (3.98 g L<sup>-1</sup>)으로 증가한 것으로 보인다.

Table 61. Inorganic nitrogen of soil. The values in parentheses indicate standard errors (n=3).

Day	Control		Treatment	
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg kg <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg kg <sup>-1</sup> )	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg kg <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg kg <sup>-1</sup> )
0	1.42 (1.56)	62.83 (11.93)	31.11 (3.34)	67.97 (1.57)
3	0.54 (0.30)	53.81 (3.63)	25.63 (12.92)	105.79 (3.17)
5	0.35 (0.47)	68.01 (9.26)	1.22 (1.77)	118.54 (4.43)
7	1.41 (2.45)	24.74 (4.71)	4.20 (3.22)	30.95 (6.76)
14	1.86 (0.01)	40.95 (5.12)	0.06 (1.28)	112.38 (10.78)
21	0.00 (3.51)	19.60 (3.34)	0.71 (3.57)	91.45 (0.51)
42	0.94 (1.78)	8.19 (2.52)	1.04 (0.79)	78.75 (19.77)
63	1.98 (1.22)	44.69 (9.68)	N.D*	93.44 (12.63)

\* Not Detected

항온배양 60일 후의 무기태 질소는 Table 61와 같다. 초기 생초 미생물 혼합액비 처리 즉 시 토양의 암모니아태 질소 함량은 31.11 mg kg<sup>-1</sup> 로 무처리구에 비해 증가되었다. 반면 질산태 질소의 함량은 큰 차이를 보이지 않았다. 생초 미생물 혼합액비 처리구 토양의 항온배양 일차가 증가함에 따라 암모니아태 질소의 함량이 점진적으로 감소하였고, 그와 반대로 질산태 질소의 함량은 증가하였다. 이는 토양 내 암모니아태 질소의 질산화 작용이 진행되었기 때문이다. 생초미생물 혼합액비 무처리구는 일차가 증가함에 따라 질산태 질소의 함량이 감소하는 추세를 보였다.

다. Pot실험을 이용한 생초미생물 혼합액비의 토양 및 작물 생육 영향평가

(1) Pot실험 설계

작물별로 화학비료와 생초 미생물 혼합액비의 효과를 비교하기 위하여 pot실험을 실시하였다. 작물별(고추, 방울토마토), 비료별(무처리, 화학비료, 생초 미생물 혼합액비 1수준, 2수준)으로 설정하여 각각 pot를 설치하였다. 토양은 경기도 농업기술원에서 받은 Sandy Loam을 사용하였으며, 고추와 방울토마토는 3월 말경에 구입하여 사용하였다. 화학비료는 질소 공급원으로서 요소[(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO], 인 공급원으로서 용성인비(P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), 칼륨 공급원으로서 칼리(K<sub>2</sub>O)를 사용하였으며, 생초 미생물 혼합액비는 영양 성분을 분석하여 질소성분을 기준으로 관비하였다. 2013년 04월 05일 모종을 정식하고 화학비료는 총 4번에 나누어 주고, 액비는 매주 정량에 맞추어 pot에 주었다.

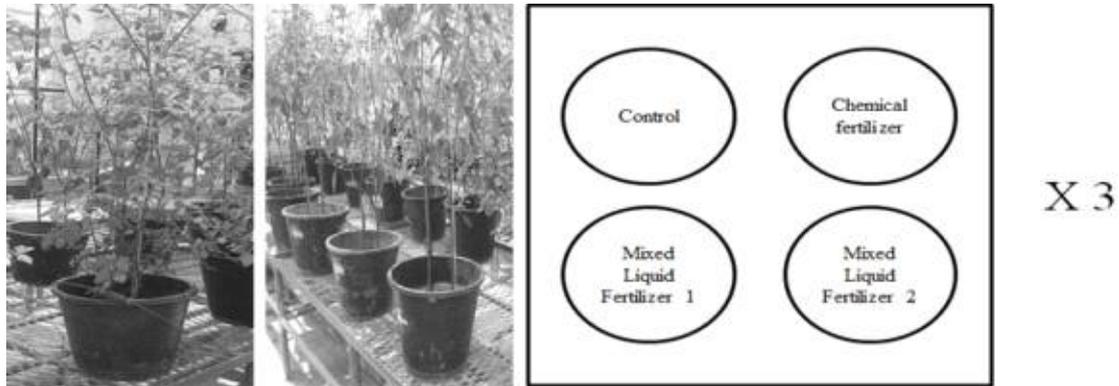


Fig 173. Pot experiment.

(가) Pot 실험 토양

경기도 농업기술원에서 받은 토양으로 Sand 49.7 %, Silt 49.8 %, Clay 0.5 %의 구성 비율을 보이는 Loam을 사용하였다.

Table 62. Chemical properties of the soil used in the experiment. The values in parentheses indicate standard errors (n=3).

	pH (1:5)	EC (dS m <sup>-1</sup> )	TC (g kg <sup>-1</sup> )	TN (g kg <sup>-1</sup> )	Inorganic Nitrogen		TP (g kg <sup>-1</sup> )
					NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg kg <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg kg <sup>-1</sup> )	
Loam	7.71 (0.05)	0.17 (0.03)	2.9 (0.55)	0.15 (0.00)	1.28 (1.83)	3.9 (0.34)	0.14 14.98

(2) 생초미생물 혼합액비 처리량 산정

(가) 농진청에서 공시한 작물별 화학비료 요구량 (kg 10a<sup>-1</sup>)

Table 63. Chemical fertilizer requirement of pepper and tomato.

Fertilizer	Total (kg 10a <sup>-1</sup> )	Base (kg 10a <sup>-1</sup> )	Additional (kg 10a <sup>-1</sup> )		
			First	Second	Third
Pepper					
Nitrogen (Urea)	19.0	10.2	2.8	3.2	2.8
Phosphorus (Fused phosphate)	11.2	11.2	-	-	-
Potassium (Potassium Oxide)	15.0	9.0	1.8	1.8	2.4
Tomato					
Nitrogen (Urea)	24.0	14	3	4	3
Phosphorus (Fused phosphate)	16.0	16	-	-	-
Potassium (Potassium Oxide)	24.0	8	5	6	5

(나) Pot(지름: 31cm, 단면적: 754.77 cm<sup>2</sup>)당 작물별 화학비료 요구량 (g pot<sup>-1</sup>)

Table 64. Chemical fertilizer requirement conversion of pepper and tomato.

Fertilizer	Pepper (g plot <sup>-1</sup> )	Tomato (g plot <sup>-1</sup> )
Nitrogen (Urea)	28.25	25.5
Phosphorus (Fused phosphate)	8.0	12.88
Potassium (Potassium Oxide)	12.63	15.25

(다) 생초 미생물 혼합액비 처리량 (mL pot<sup>-1</sup>)

작물별 화학비료 질소 요구량과 동일하게 생초 미생물 혼합액비 투입량을 산정하였다.

Table 65. Mixed liquid fertilizer (MLF) requirement of pepper and tomato.

Species	Treatment	MLF (mL 600mL <sup>-1</sup> )
Pepper	0.5x	26
	1.0x	52
Tomato	0.5x	33
	1.0x	66

(3) Pot실험 토양 분석

(가) pH

토양 5g을 증류수 25 mL(1:5 의 비율)로 희석하여 1 시간동안 Shaking 후, pH측정기 (Orion 3 star, Thermo Scientific, Singapore)로 측정하였다.

(나) EC

토양 5 g를 증류수 25 mL(1:5 의 비율)로 희석하여 1 시간동안 Shaking 후, Whatman No.42 filter paper로 거른다. 거른 여액은 전기전도도(Electrical Conductivity, EC) 측정기(PET-2000 Kombi, stelzner GMBH, Germany)를 이용하여 측정하였다.

(다) 총질소 (Total Nitrogen, TN)

2 mm 체로 체질한 토양을 균질화시켜 일부를 채취하고, 막자사발로 곱게 갈아 0.5 mm체로 체질하였다. 0.5 mm체로 체질한 토양 10 mg을 원소분석기(Elemental Analyzer,Flash 2000, Thermo Scientific, Cambridge, UK)를 이용하여 분석하였다.

(라) 총탄소 (Total Carbon, TC)

2 mm 체로 체질한 토양을 균질화시켜 일부를 채취하고, 막자사발로 곱게 갈아 0.5 mm체로 체질하였다. 0.5 mm체로 체질한 토양 10 mg을 원소분석기(Elemental Analyzer, Flash 2000, Thermo Scientific, Cambridge, UK)를 이용하여 분석하였다.

(마) 무기태 질소 (Inorganic Nitrogen, IN)

토양 15g에 2M KCl 60mL (1:4 비율)를 가하고, 1 시간동안 Shaking 하여 Whatman No.42 filter paper로 걸렀다. 거른 여액 10mL에 산화마그네슘(MgO) 0.5g을 넣고 증류장치(K-314, BUCHI, Switzerland)로 증류하여 암모니아태 질소(NH<sub>4</sub>-N)를 포집하였다. 암모니아태 질소(NH<sub>4</sub>-N)를 포집한 후, Devarda's Alloy 0.5g을 넣고 증류장치(K-314, BUCHI, Switzerland)로 증류하여 질산태 질소(NO<sub>3</sub>-N)를 포집하였다. 각각 포집된 암모니아태 질소(NH<sub>4</sub>-N)와 질산태 질소(NO<sub>3</sub>-N)는 pH 적정 장치(702 SM Titrimo, Metrohm, Switzerland)를 이용하여 적정하고, 함량을 계산하였다.

(4) Pot실험 식물체 분석

(가) 줄기 길이 (Height)

채취한 식물체 뿌리 부분을 제외한 전체 높이를 측정하였다.

(나) 열매 개수

각 pot마다 열매의 수를 세었다.

(다) 건중량 (Dry mass)

식물체를 65°C 오븐에서 건조시킨 후, 식물체를 손실 없이 무게를 측정하였다.

(라) 총탄소 (Total Carbon, TC)

건조한 식물체는 분쇄기(MM301, Reisch GmbH & Co., Haan, Germany)로 곱게 갈아 균질화시켜 일부를 채취하였다. 곱게 갈아 균질화한 시료 2mg을 원소분석기(Elemental Analyzer, Flash 2000, Thermo Scientific, Cambridge, UK)를 이용하여 총탄소를 분석하였다.

(마) 총질소 (Total Nitrogen, TN)

건조한 식물체는 분쇄기(MM301, Reisch GmbH & Co., Haan, Germany)로 곱게 갈아 균질화시켜 일부를 채취하였다. 곱게 갈아 균질화한 시료 2mg을 원소분석기(Elemental Analyzer, Flash 2000, Thermo Scientific, Cambridge, UK)를 이용하여 총질소를 분석하였다.

(바) 양이온 분석 (ICP)

건조한 식물체를 분쇄기(MM301, Reisch GmbH & Co., Haan, Germany)로 곱게 갈아 균질화 시켰다. 곱게 갈아 균질화 한 식물체는 각 부위별로 일부를 취해 켈달(Kjeldahl) 분해관에 넣고 증류수로 습윤시켰다. 습윤시킨 시료에 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-HNO<sub>3</sub>-HClO<sub>4</sub>(1:8:1)를

10mL를 가한 뒤, 방치하였다. 저온에서 가열을 시작하여 점차 온도를 높여 분해액이 투명해질 때까지 분해하였다. 분해액이 투명해지면 켈달(Kjeldahl) 분해관을 냉각한 후 10% HCl 20mL을 가하여 다시 가열하였다. 분해가 완료된 켈달(Kjeldahl) 분해관은 방치한 뒤, 100mL volume flask에 여과하였다. 여과액은 서울대학교 농생명과학공동기기원(NICEM)에 있는 유도결합플라즈마 발광광도기(Inductively Coupled Plasma Emission Spectrometer)를 이용하여 Ca, Mg, Na, K을 분석하였다.

(5) Pot실험 분석 결과

(가) Pot 토양 분석 결과

① 고추를 식재한 pot 토양 분석 결과

Table 66. pH and EC of pepper cultivated loam soils. The values in parentheses indicate standard errors (n=3).

Day	Control		Chemical Fertilizer		MLF 0.5x		MLF 1.0x	
	pH	EC	pH	EC	pH	EC	pH	EC
	(1:5)	(dS m <sup>-1</sup> )	(1:5)	(dS m <sup>-1</sup> )	(1:5)	(dS m <sup>-1</sup> )	(1:5)	(dS m <sup>-1</sup> )
7	7.92 (0.09)	0.12 (0.02)	7.74 (0.05)	0.27 (0.08)	7.91 (0.09)	0.13 (0.01)	7.68 (0.26)	0.18 (0.06)
21	8.02 (0.10)	0.11 (0.01)	7.60 (0.20)	0.11 (0.03)	7.93 (0.05)	0.10 (0.02)	7.80 (0.12)	0.13 (0.01)
35	8.19 (0.09)	0.08 (0.01)	7.64 (0.15)	0.09 (0.02)	7.88 (0.11)	0.10 (0.02)	7.87 (0.04)	0.13 (0.04)
63	8.07 (0.08)	0.09 (0.03)	7.90 (0.10)	0.11 (0.03)	8.06 (0.02)	0.11 (0.03)	7.94 (0.08)	0.22 (0.05)

고추의 pH는 무처리구와 화학비료 처리구는 감소하는 경향을 나타내었으나, 생초 미생물 혼합액비 처리구에서는 일정한 수치를 나타내었다. 무처리구와 화학비료에서 pH의 변화가 나타난 것은 무처리구의 경우 물과 식물로 인한 양분손실로 산도가 증가한 것으로 생각되며, 화학비료의 경우 화학비료의 pH에 영향을 받았기 때문으로 생각되었다. 생초 미생물 혼합액비 처리구에서의 pH의 변화는 토양의 pH와 액비의 pH (8.48)가 거의 근접하였기 때문에 변하지 않은 것으로 생각된다. EC의 경우 화학비료 처리구에서 급격하게 증가하였으며, 21일 차에 다시 무처리구와 생초 미생물 혼합액비 처리구와 비슷해지는 것을 확인 할 수 있었다. 생초 미생물 혼합액비 처리구의 경우 액비의 EC 함량이 높은데 비해 토양 내 EC의 변화가 거의 없는 것을 확인할 수 있었는데, 이는 식물을 주기위한 물과 토양의 완충작용으로 인한 것으로 보여졌다.

Table 67. Soil total nitrogen (TN) and carbon (TC) contents of pepper cultivated loam. The values in parentheses indicate standard errors (n=3).

Day	Control		Chemical Fertilizer		MLF 0.5x		MLF 1.0x	
	TN (g kg <sup>-1</sup> )	TC (g kg <sup>-1</sup> )	TN (g kg <sup>-1</sup> )	TC (g kg <sup>-1</sup> )	TN (g kg <sup>-1</sup> )	TC (g kg <sup>-1</sup> )	TN (g kg <sup>-1</sup> )	TC (g kg <sup>-1</sup> )
7	0.16 (0.05)	2.83 (0.10)	0.20 (0.03)	2.38 (0.25)	0.13 (0.02)	2.48 (0.24)	0.24 (0.09)	2.99 (0.49)
21	0.13 (0.01)	2.42 (0.09)	0.15 (0.03)	2.10 (0.34)	0.17 (0.03)	2.60 (0.19)	0.21 (0.03)	2.58 (0.39)
35	0.13 (0.00)	2.38 (0.35)	0.14 (0.02)	2.03 (0.39)	0.23 (0.11)	2.97 (1.03)	0.19 (0.03)	2.73 (0.16)
63	0.13 (0.01)	2.69 (0.23)	0.13 (0.01)	2.08 (0.04)	0.14 (0.03)	2.33 (0.26)	0.18 (0.02)	2.59 (0.33)

총질소의 경우 화학비료와 생초 미생물 혼합액비 처리구 1.0x 처리구에서 약간의 증가가 있었고, 무처리구와 생초 미생물 혼합액비 처리구 0.5x에서는 유의한 변화가 나타나지 않았다. 총탄소의 경우 생초 미생물 혼합액비 처리구 모두에게서 함량이 증가되었으며, 시간이 지남에 따라 약간 증가하는 경향을 나타냈다.

Table 68. Inorganic nitrogen contents of pepper cultivated loam soils. The values in parentheses indicate standard error (n=3).

Day	Control		Chemical Fertilizer		MLF 0.5x		MLF 1.0x	
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg kg <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg kg <sup>-1</sup> )	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg kg <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg kg <sup>-1</sup> )	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg kg <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg kg <sup>-1</sup> )	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg kg <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg kg <sup>-1</sup> )
7	0.01 (0.01)	5.91 (2.68)	19.77 (21.71)	30.48 (14.27)	0.13 (0.22)	9.55 (3.57)	2.22 (3.52)	25.63 (14.92)
21	0.00 (0.00)	0.75 (0.43)	0.00 (0.00)	13.90 (10.34)	0.00 (0.00)	0.99 (0.08)	0.00 (0.00)	2.13 (1.12)
35	0.43 (0.37)	0.00 (0.00)	1.60 (1.64)	0.62 (1.07)	0.66 (0.57)	0.15 (0.27)	0.00 (0.00)	0.71 (1.23)
63	0.14 (0.00)	0.05 (0.08)	1.58 (2.21)	0.09 (0.08)	1.11 (1.64)	0.57 (0.52)	2.49 (3.62)	0.49 (0.27)

암모늄태 질소의 변화량의 경우 무처리구 생초 미생물 혼합액비 처리구 모두에게서 유의한 변화는 거의 없었다. 반면 화학비료 처리구에서는 7일차에 급격하게 상승했다가 다시 감소하는 경향을 나타내었다. 반면 질산태 질소의 경우는 암모늄태 질소와 다르게 모든 처리구에서 7일차에 증가하는 경향을 나타내었다가 21일차에 다시 감소하는 경향을 나타내었다. 실험에 사용된 토양의 초기 무기태 질소 양이 많지 않았기 때문에, 초반 생초 미생물 혼합액비 처리구에서의 암모늄태 질소의 함량은 모두 질산태질소로

이동한 것이라 생각되며, 이는 화학비료 역시 마찬가지라 생각된다.

② 방울토마토를 식재한 pot 토양 분석 결과

Table 69. pH and EC of tomato cultivated loam. The values in parentheses indicate standard errors (n=3).

Day	Control		Chemical Fertilizer		MLF 0.5x		MLF 1.0x	
	pH (1:5)	EC (dS m <sup>-1</sup> )	pH (1:5)	EC (dS m <sup>-1</sup> )	pH (1:5)	EC (dS m <sup>-1</sup> )	pH (1:5)	EC (dS m <sup>-1</sup> )
7	8.02 (0.06)	0.10 (0.03)	7.78 (0.10)	0.23 (0.06)	7.84 (0.13)	0.15 (0.06)	7.81 (0.18)	0.15 (0.04)
21	8.07 (0.06)	0.08 (0.02)	7.39 (0.17)	0.11 (0.02)	7.80 (0.04)	0.06 (0.01)	7.41 (0.25)	0.11 (0.04)
35	8.07 (0.05)	0.07 (0.01)	6.86 (0.71)	0.08 (0.02)	7.83 (0.06)	0.06 (0.01)	7.45 (0.14)	0.12 (0.01)
63	8.10 (0.03)	0.08 (0.02)	7.30 (0.19)	0.07 (0.01)	8.00 (0.16)	0.12 (0.04)	7.77 (0.15)	0.28 (0.03)

pot실험에서의 고추에서의 pH와 마찬가지로 경우 무처리구과 화학비료 처리구는 감소하는 경향을 나타내었으나, 생초 미생물 혼합액비 처리구에서는 일정한 수치를 나타내었다. 무처리구와 화학비료에서 pH의 변화가 나타난 것은 무처리구의 경우 물과 식물로 인한 양분손실로 산도가 증가한 것으로 생각되며, 화학비료의 경우 화학비료의 pH에 영향을 받았기 때문이라 생각되었다. 생초 미생물 혼합액비 처리구에서의 pH의 변화는 토양의 pH와 액비의 pH에 근접하였기 때문에 변하지 않았다고 생각되었다. 반면 EC의 경우 화학비료 처리구에서 급격하게 증가하였으며, 21일 차에 다시 무처리구와 액비 처리구와 비슷해지는 것을 확인 할 수 있었다. 액비처리구의 경우 액비의 EC 함량이 높은데 비해 토양 내 EC의 변화가 거의 없는 것을 확인할 수 있었는데, 이는 식물을 주기위한 물과 토양의 완충작용으로 인한 것으로 보여졌다.

Table 70. Soil total nitrogen (TN) and carbon (TC) contents of tomato cultivated loam. The values in parentheses indicate standard errors (n=3).

Day	Control		Chemical Fertilizer		MLF 0.5x		MLF 1.0x	
	TN (g kg <sup>-1</sup> )	TC (g kg <sup>-1</sup> )						
7	0.13 (0.03)	2.49 (0.16)	0.28 (0.12)	2.87 (1.32)	0.15 (0.03)	2.49 (0.18)	0.20 (0.04)	2.53 (0.58)
21	0.12 (0.01)	2.11 (0.09)	0.17 (0.06)	3.86 (2.99)	0.13 (0.01)	2.58 (0.42)	0.19 (0.06)	2.65 (0.23)
35	0.12 (0.02)	2.03 (0.21)	0.18 (0.06)	2.66 (0.79)	0.15 (0.03)	2.25 (0.41)	0.20 (0.03)	3.08 (0.32)
63	0.13 (0.01)	2.21 (0.22)	0.16 (0.01)	2.43 (0.22)	0.17 (0.01)	2.47 (0.05)	0.20 (0.02)	3.00 (0.21)

방울토마토의 총질소는 화학비료와 생초 미생물 혼합액비 처리구 모두에게서 질소 함량의 증가가 보였으며 질소 함량의 증가는 모두 생초 미생물 혼합액비와 화학비료 처리에 의함이라 생각된다. 총탄소의 경우 무처리구와 화학비료 처리구, 생초 미생물 혼합액비 처리구에 상관없이 비슷한 경향을 보였고, 화학 비료구에서 좀 더 많은 총탄소 감소 경향이 나타나는 것을 확인 할 수 있었다.

Table 71. Inorganic nitrogen contents of tomato cultivated loam. The values in parentheses indicate standard errors (n=3).

Day	Control		Chemical Fertilizer		MLF 0.5x		MLF 1.0x	
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg kg <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg kg <sup>-1</sup> )	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg kg <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg kg <sup>-1</sup> )	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg kg <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg kg <sup>-1</sup> )	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg kg <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg kg <sup>-1</sup> )
7	0.19 (0.32)	3.97 (3.56)	25.41 (20.72)	39.43 (0.82)	0.39 (0.19)	13.65 (13.42)	0.90 (0.89)	13.28 (7.99)
21	0.00 (0.00)	0.14 (0.24)	0.00 (0.00)	6.00 (2.36)	0.00 (0.00)	0.68 (0.08)	0.00 (0.00)	1.17 (0.43)
35	1.79 (1.62)	0.00 (0.00)	0.93 (1.01)	0.21 (0.37)	3.80 (1.73)	0.36 (0.32)	1.36 (2.11)	0.53 (0.48)
63	2.06 (0.63)	0.35 (0.03)	2.24 (3.49)	0.16 (0.16)	3.31 (2.47)	0.36 (0.38)	0.56 (0.59)	0.11 (0.10)

방울토마토의 암모늄태 질소는 화학비료 처리구에서 급격한 증가가 있었으나 다시 감소하였고, 질산태 질소의 경우 역시 모든 처리구에서 증가하다 다시 감소하는 것을 확인 할 수 있었다. 실험에 사용된 토양의 초기 무기태 질소 양이 많지 않았기 때문에, 초반 생초 미생물 혼합액비 처리구에서의 암모늄태 질소의 함량은 모두 질산태질소로 이동한 것이라 생각되며, 이는 화학비료 역시 마찬가지라 생각되었다.

2차년도 pot실험 결과 생초 미생물 혼합액비의 질소함량이 1.37 g L<sup>-1</sup> 의 경우 비료로서 시용해줄 수 있는 생초 미생물 혼합액비의 양은 모종별 질소비료 처리량에 맞추어 고추의 액비 총량은 13868 L 10a<sup>-1</sup> (액비에 들어있는 질소량 : 19 kg N L<sup>-1</sup>)이며, 방울토마토의 총량은 17518 L 10a<sup>-1</sup>(액비에 들어있는 질소량 : 24 kg N L<sup>-1</sup>)였다. 생초 미생물 혼합액비를 고추에 관비형식으로 줄 경우 68.9 L ha<sup>-1</sup>(액비에 들어있는 질소량 : 0.09 kg N L<sup>-1</sup>), 방울토마토는 87.4 L ha<sup>-1</sup>(액비에 들어있는 질소량 : 0.12 kg N L<sup>-1</sup>)를 일주일 간격으로 총 12주 시비하는 것이 식물체의 생육에 적합하다고 판단되었다. 생초 발효 액비를 적정량 시비한다면 질소질 화학비료를 대체하여 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

(나) Pot 식물체 분석 결과

Table 72. Height, fresh mass, dry mass, total nitrogen (TN) and total carbon (TC) of shoot. The values in parentheses indicate standard errors (n=3).

Shoot	Height (cm)	Fresh mass (g)	Dry mass (g)	TN (g kg <sup>-1</sup> )	TC (g kg <sup>-1</sup> )
Pepper	15.5 (0.3)	2.2 (0.1)	0.3 (0.0)	29.0 (2.6)	398.1 (9.2)
Tomato	10.9 (2.2)	4.8 (1.4)	0.6 (0.1)	30.2 (4.2)	388.1 (8.8)

Table 73. Dry mass, total nitrogen (TN) and total carbon (TC) of root. The values in parentheses indicate standard errors (n=3).

Root	Dry mass (g)	TN (g kg <sup>-1</sup> )	TC (g kg <sup>-1</sup> )
Pepper	0.1 (0.0)	26.2 (0.6)	409.0 (17.3)
Tomato	0.1 (0.0)	17.8 (3.2)	402.0 (1.7)

라. 컬럼 실험을 통한 생초미생물 혼합액비의 양분수지 분석

(1) 컬럼 실험의 필요성

생초 미생물 혼합액비는 액상의 형태로 토양(농경지)에 투입되므로 고형분보다 유동적으로 토양 내에서 이동하며, 상대적으로 수분도 많이 투입됨에 따라 토양이 과습 상태로 있을 확률이 높다. 이에 따라 생초 미생물 혼합액비의 토양 내 행동경로(양분거동 특성)를 분석하기 위한 컬럼 실험이 진행되어야 한다.

(2) 컬럼 실험 설계

생초 미생물 혼합액비의 토양 내 물리적 이동성을 확인하기 위하여 컬럼 실험을 진행하였다. 높이 2 cm, 지름 5 cm의 부피 39.25 cm<sup>3</sup>의 코어에 토양을 전용적 밀도(1.3 g cm<sup>-3</sup>)에 맞추어 총 612.3 g의 토양을 충전 하였다. 각 코어를 7개씩을 쌓아 이어 총 길이 26 cm의 컬럼을 생초 미생물 혼합액비 처리구(3개) 무처리구(3개) 총 6 개 만들었다. 컬럼 아래에는 토양이 빠져나가지 않고 토양 용액만 빠져나갈 수 있도록, Whatman No.42 filter paper와 nylon천을 이용하여 막아주었다. 그 후 토양의 공극을 자연 상태와 비슷하게 만들기 위하여, 컬럼 내 토양을 1 주일 정도 포화시켰으며, 컬럼 내 수분을 포화상태로 유지하기 위하여 컬럼 토양 표면으로부터 위로 0.5cm 정도까지 물을 유지하여주면서, 24℃의 incubator에 1 주일동안 전 배양 (pre-incubation)을 진행하였다. 전 배양 후 액비 처리구는 질소비료(24 kg N 10a<sup>-1</sup>)의 2 배를 기준으로 컬럼마다 액비 50.6 ml (액비에 포함된 총질소의 양 : 122.45 mg kg<sup>-1</sup>)를 처리하였다. 이후 24 ℃에서 각 각의 토양은 포화상태를 유지하며 총 7 일간 배양하였다. 7일 이후 시료를 채취한 뒤, 바로 무기태 질소와 수분함량을 측정하였으

며, 나머지 분석 항목 pH, EC 분석을 수행하였다.

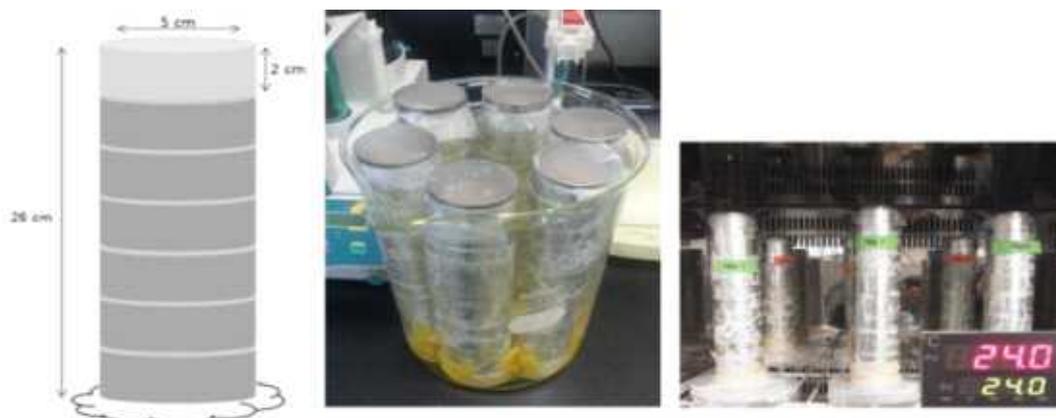


Fig 174. Incubation experiment of column soils.

(가) 컬럼 실험에 사용된 토양

pot실험을 진행했던 토양과 동일한 토양으로 경기도 농업기술원에서 받은 Sand가 49.7 %, Silt가 49.8 %, Clay는 0.5 %의 구성 비율을 보이는 Loam을 사용하였다.

Table 74. Chemical properties of soil. The values in parentheses indicate standard errors (n=3).

	pH (1:5)	EC (dS m <sup>-1</sup> )	TN (g kg <sup>-1</sup> )	Inorganic Nitrogen		Bulk Density (Mg m <sup>-3</sup> )
				NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg kg <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg kg <sup>-1</sup> )	
Column soil	7.71 (0.05)	0.17 (0.03)	0.15 (0.00)	1.28 (1.83)	3.9 (0.34)	1.3

(나) 컬럼 실험에 투입하는 액비량 산정

본 실험에 사용된 액비는 2013년 4월에 제 1협동에서 만든 것을 사용하였다. 생초 미생물 혼합액비 처리구는 고추와 방울토마토의 질소비료 요구량 중에서 더 많은 요구량을 필요로 하는 방울토마토 질소비료 요구량 (24 kg N 10a<sup>-1</sup>)을 기준으로 하였다. 액비의 총질소 2.42 (g L<sup>-1</sup>) 을 방울토마토 질소비료 요구량에 상응하게 계산한 25.3 mL를 토양 내 액비 이동성을 좀 더 명확하게 보기위하여 질소비료의 기준량의 2 배량인 50.6 mL를 컬럼에 처리하였다.

Table 75. Chemical properties of mixed liquid fertilizer. The value in parentheses indicate standard errors (n=3).

	pH (1:5)	EC (dS m <sup>-1</sup> )	TN (g L <sup>-1</sup> )	Inorganic Nitrogen	
				NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (g L <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (g L <sup>-1</sup> )
MLF	8.48 (0.01)	2.08 (0.14)	2.42 (0.03)	1.00 (0.01)	N.D*

\* Not Detected

(3) 컬럼 실험 결과 분석

Table 76. Soil Inorganic Nitrogen and Mass balance of column soil. The values in parentheses indicate standard errors (n=3).

Depth (cm)	Control		MLF	
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg kg <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg kg <sup>-1</sup> )	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg kg <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg kg <sup>-1</sup> )
0-4	2.2 (0.4)	4.3 (1.0)	156.3 (23.0)	15.5 (5.2)
4-8	5.2 (4.6)	4.7 (1.2)	118.0 (16.5)	14.1 (5.6)
8-12	2.9 (3.2)	5.7 (1.9)	69.7 (3.6)	11.0 (1.7)
12-16	5.0 (4.6)	4.3 (2.0)	32.5 (14.0)	4.5 (1.8)
16-20	4.6 (3.8)	2.8 (2.3)	16.6 (5.0)	3.2 (1.9)
20-24	6.1 (2.4)	1.2 (1.3)	3.0 (0.3)	2.1 (0.9)

컬럼 실험 결과 넣어준 생초 미생물 혼합액비에 존재하는 무기태 질소의 80 %정도가 회수되었다. 구조가 발달하지 않고, 다짐이 잘 된 토양의 경우 어느 정도 편차가 존재하나 대략 4.3 cm day<sup>-1</sup> 정도의 포화 수리 전도도를 보이는 것으로 알려져 있다(Brady & Weil, 2008). 이론적으로는 6일 후부터 leachate에서 무기태 질소가 검출이 되어야 하지만, 본 실험의 결과로 보았을 때 leachate에서는 검출이 되지 않았다. 이는 포화상태를 유지하면서 수분을 공급하여 주었으나, 실제로 건조한 조건의 incubator 안에서 토양의 표층위에 있는 물이 증발함에 따라 수리전도도가 감소하여 컬럼 내 무기태질소의 용탈에 영향을 미친 것으로 생각된다. 그로 인하여 토양 내 16 cm 깊이까지의 암모늄태 질소의 이동이 있었으며, 질산태 질소의 경우 12 cm 까지 이동한 것으로 나타났다. 무기태 질소의 이동성을 좀 더 파악하기 위하여, 추후 배양기간을 좀 더 늘려 실험을 다시 진행하여 액비의 토양 내 동태를 확인해 볼 필요가 있다.

### 3. 중질소( $^{15}\text{N}$ )을 표지한 생초미생물 혼합액비 시용에 따른 토양 이화학성 변화, 작물 생육 반응 및 액비 처리효과 구명

#### 가. 생초미생물 혼합액비의 중질소( $^{15}\text{N}$ ) 표지

##### (1) 중질소( $^{15}\text{N}$ ) 표지 생초미생물 혼합액비 실험의 필요성

시비한 비료에서 흡수한 양분을 측정하는 직접적인 수단으로 안정성동위원소를 이용하는 방법이 있다(isotopic method). 이 방법은 중질소( $^{15}\text{N}$ )의 자연 존재비인 0.37 %보다 높은 함량을 갖는 비료를 사용하여 작물이 흡수하는 중질소( $^{15}\text{N}$ )를 추적함으로써 시용한 비료의 이용효율을 평가할 수 있다. 이를 통해 작물뿐만 아니라 토양에 남아 있는 양도 평가되어 질소의 이동을 추적하는 데 가장 정확한 방법이라고 볼 수 있다. 따라서 생초미생물 혼합액비를 중질소( $^{15}\text{N}$ )가 표지된 잔디로 만들고, 이를 작물에 시용하여 질소의 이동을 추적함과 동시에 액비의 질소질 비료로서의 가치를 평가하는데 활용하고자 한다.

##### (2) 중질소( $^{15}\text{N}$ ) 표지 잔디 재배 계획

중질소( $^{15}\text{N}$ )가 표지된 잔디를 재배하기 위하여 경기도 수원에 소재한 서울대학교 농업생명과학대학 시험농장 온실에서 pot(가로 60cm × 세로 38.5cm × 높이 14cm) 40개에 잔디를 키웠다. 잔디는 골프장에서 주로 재배되고 있는 양잔디(Kentucky bluegrass, Bent grass)를 재배하였다. 잔디에 중질소( $^{15}\text{N}$ )를 표지하기 위하여 pot당 0.6 g의  $^{15}\text{N}$  5% atom urea를 2주간격으로 3번 물에 녹여주었다. 총 60일 동안 잔디를 재배하였으며, 약 5.6kg (basis of fresh weight)의 잔디를 수확하였다.



Fig 175. Cultivation of  $^{15}\text{N}$  labeled grass

##### (3) 중질소( $^{15}\text{N}$ ) 표지 잔디 분석

###### (가) 총질소(Total Nitrogen, TN), $^{15}\text{N}$ atom (%)

중질소( $^{15}\text{N}$ ) 표지 잔디를 건조오븐에서 65°C, 48시간동안 건조하여 수분을 제거하였다. 수분이 제거된 잔디를 분쇄기(MM301, Retsch GmbH & Co., Haan, Germany)로 곱게 갈아 안정성 동위원소비 질량분석기(Stable Isotope Ratio Mass Spectrometer, IsoPrime-EA, Micromass Ltd, UK)를 이용하여 분석하였다.

(4) 중질소(<sup>15</sup>N) 표지 잔디 분석 결과

중질소(<sup>15</sup>N) 표지 잔디의 분석 결과는 Table 3-41과 같다. 잔디에 표지된 <sup>15</sup>N atom % 는 0.51% 였다. 이를 잔디 건중량 1.51kg에 표지된 양으로 환산하여 투입된 중질소(<sup>15</sup>N) 대비 회수율(%)을 구하였다. 여러 선행연구에 따르면 질소 추적을 위한 중질소(<sup>15</sup>N) 표지실험에 사용되는 중질소(<sup>15</sup>N) 회수율은 20~30% 정도이다. 본 실험에서 표지한 잔디의 중질소(<sup>15</sup>N) 회수율은 5% 정도로 선행연구의 표지 효율에 크게 미치지 못하였다. 이는 잔디의 pot 재배 시, 배수력이 높고 보비력이 낮은 모래를 이용하였기 때문에 용탈에 의한 중질소(<sup>15</sup>N)의 손실에서 비롯된 것으로 생각된다. 그러나 자연에 존재하는 중질소(<sup>15</sup>N) 함량(0.37 <sup>15</sup>N atom %)보다는 높은 함량으로 표지되었으므로 일정 수준의 추적이 가능하다고 판단되어 이를 이용한 후속 실험을 진행하였다.

Table 77. Total nitrogen (TN) and <sup>15</sup>N concentration in <sup>15</sup>N labeled grass. The values in parentheses indicate standard deviation (n=3).

	TN (g kg <sup>-1</sup> )	<sup>15</sup> N atom (%)	<sup>15</sup> N Recovery (%)
<sup>15</sup> N labeled grass	36.71 (0.66)	0.51 (0.01)	5.00

나. 중질소(<sup>15</sup>N) 표지 생초미생물 혼합액비의 양분 성분 분석

(1) 중질소(<sup>15</sup>N) 표지 생초미생물 혼합액비 제조

생초미생물 혼합액비는 제 1협동 팀에서 만든 것을 두 번에 걸쳐 받아 사용하였다. 잔디 예지물(생초)의 cellulose 분해를 가장 효율적으로 하는 균주 *Paenibacillus ehimensis* KWN38와 생초(fresh weed)를 일정시간 동안 함께 배양하였고, 여기에 미생물이 초기에 활성을 나타낼 수 있도록 영양 배지를 조성해 주었다. 배지 조성은 Table 3-20과 같으며, 생초 미생물 액비는 다음과 같은 방법으로 만들었다. 생초를 넣은 배지를 준비하고, 배지를 고온고압(autoclave)에서 멸균시켰다. *Paenibacillus ehimensis* KWN38를 접종한 후, 30 °C 에서 170 rpm으로 5 일간 배양 후 바로 사용하였다.

Table 78. Chemical composition of mixed liquid fertilizer.

Ingredient	Amount (g L <sup>-1</sup> )
Grass (based by fresh weight)	178.0
46.6% N (Urea)	2.8
20% P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (용과린)	8.8
60% K <sub>2</sub> O	1.6
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.0
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1.0
yeast	0.1
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.05
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.06
Chitin powder	0.8
Gelatin powder	0.2

중질소(<sup>15</sup>N) 표지 생초미생물 혼합액비는 상온은 물론 냉장보관에서도 미생물의 생초 분해로 각종 비료성분(N, P, K)의 가용성(Availability)이 달라진다. 따라서 제-1협동에서 제조한 액비를 액체질소를 사용하여 급랭하였고, 1회 처리 시 필요한 액비는 시용량에 맞춰 해동하여 사용하였다.

## (2) 중질소(<sup>15</sup>N) 표지 생초미생물 혼합액비 분석

### (가) 밀도(Density)

중질소(<sup>15</sup>N) 표지 생초 미생물 혼합액비 5mL를 Conical tube에 넣고 질량을 측정한 후 동결건조 하였다. 동결 건조하여 수분이 제거된 중질소(<sup>15</sup>N) 표지 생초 미생물 혼합액비의 질량을 측정하여 밀도를 계산하였다.

### (나) pH

중질소(<sup>15</sup>N) 표지 생초 미생물 혼합액비를 pH 측정기(Orion 3 star, Thermo Scientific, Singapore)로 측정하였다.

### (다) EC (Electrical Conductivity)

중질소(<sup>15</sup>N) 표지 생초 미생물 혼합액비를 전기전도도(Electrical Conductivity, EC) 측정기(PET-2000 Kombi, stelzner GMBH, Germany)를 이용하여 측정하였다.

### (라) 총유기탄소(Total Organic Carbon, Toc)

중질소(<sup>15</sup>N) 표지 생초 미생물 혼합액비의 총유기탄소는 Walkly-black Method를 이용하여 분석하였다. 중질소(<sup>15</sup>N) 표지 생초미생물 혼합액비를 균질화하고 일부를 취해 1N K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 10mL과 반응시켰다. 반응하는 중질소(<sup>15</sup>N) 표지 생초미생물 혼합액비와 1N K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>에 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20mL을 넣고, 30분간 방치하였다. 0.025M o-Phenanthroline-ferrous complex를 4~5 방울 넣고, 0.5N FeSO<sub>4</sub>를 이용하여 붉은색에서 녹색 그리고 청록색으로 변한 뒤 적자색으로 바뀌는 지점에서 적정을 멈췄다. 적정된 0.5N FeSO<sub>4</sub>를 바탕으로 총유기탄소(%)를 계산하였다.

### (마) 총질소(Total Nitrogen, TN)

중질소(<sup>15</sup>N) 표지 생초 미생물 혼합액비의 총질소는 Permanganated reduced Fe modification 방법으로 분석하였다. 100mL 켈달(Kjeldahl) 분해관에 중질소(<sup>15</sup>N) 표지 생초 미생물 혼합액비 3mL와 진한 황산 8mL를 넣고 혼합했다. 분해관을 분해대에 놓고 낮은 온도에서 점차 고온으로 가열하였고, 하얀 연기가 생성될 때부터 5분간 더 가열하였다. 분해관을 분해대에서 내려 냉각 한 후 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 약 0.5mL를 넣었다. 다시 가열을 시작하여 분해액이 백색 투명하게 될 때까지 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 넣으며 분해하는 과정을 반복하였다. 분해가 끝나면 냉각시키고 100mL volumetric flask에 옮겨 증류수로 부피를 맞췄다. 분해액 10mL에 10N NaOH를 넣고 증류장치(K-314, BUCHI, Switzerland)를 이용하여 증류했다. 포집된 총질소는 pH 적정 장치(702 SM Titrino, Metrohm, Switzerland)를 이용하여 적정하고, 총질소 함량을 계산하였다.

(바) 무기태 질소(Inorganic Nitrogen)

중질소( $^{15}\text{N}$ ) 표지 생초 미생물 혼합액비 3mL에 2M KCl 27mL (1:10 비율)를 가하고 1 시간동안 진탕하여 Whatman No.42 filter paper로 걸렸다. 거른 여액 10mL에 산화마그네슘(MgO) 0.5g을 넣고 증류장치(K-314, BUCHI, Switzerland)로 증류하여 암모니아태 질소( $\text{NH}_4\text{-N}$ )를 포집하였다. 암모니아태 질소( $\text{NH}_4\text{-N}$ )를 포집한 후, Devarda's Alloy 0.5g을 넣고 증류장치(K-314, BUCHI, Switzerland)로 증류하여 질산태 질소( $\text{NO}_3\text{-N}$ )를 포집하였다. 각각 포집된 암모니아태 질소( $\text{NH}_4\text{-N}$ )와 질산태 질소( $\text{NO}_3\text{-N}$ )는 pH 적정 장치(702 SM Titrino, Metrohm, Switzerland)를 이용하여 적정하고, 함량을 계산하였다. 포집된 암모니아태 질소( $\text{NH}_4\text{-N}$ )와 질산태 질소( $\text{NO}_3\text{-N}$ )는 0.1N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 를 사용하여 pH 3.1 이하로 조정하고, 이 여액을 오븐에 건조시켜 농축하였다. 농축시킨 시료는 계산된 질소량에서 0.4mg를 취해 무기태 질소의 중질소( $^{15}\text{N}$ ) 함량을 안정성 동위원소비 질량분석기(Stable Isotope Ratio Mass Spectrometer, IsoPrime-EA, Micromass Ltd, UK)로 분석하였다.

(사)  $^{15}\text{N}$  atom (%)

중질소( $^{15}\text{N}$ ) 표지 생초 미생물 혼합액비를 동결 건조시켜 수분을 제거했다. 수분이 제거된 액비를 분쇄기(MM301, Retsch GmbH & Co., Haan, Germany)로 곱게 갈아 안정성 동위원소비 질량분석기(Stable Isotope Ratio Mass Spectrometer, IsoPrime-EA, Micromass Ltd, UK)를 이용하여 분석하였다.

(3) 중질소( $^{15}\text{N}$ ) 표지 생초미생물 혼합액비 분석 결과

중질소( $^{15}\text{N}$ ) 표지 생초 미생물 혼합액비의 화학적 특성은 Table 79과 같다. 중질소( $^{15}\text{N}$ ) 표지 생초미생물 혼합액비의 전기전도도는 염류집적을 우려할 정도로 높게 분석되었다. 하지만 중질소( $^{15}\text{N}$ ) 표지 생초미생물 혼합액비를 토양에 시용할 때에는 관비 형태로 공급하기 때문에, 토양염류의 가능성은 크지 않을 것으로 생각된다. 중질소( $^{15}\text{N}$ ) 표지 생초미생물 혼합액비 총질소의 약 45%가 무기태 질소의 형태로 존재했다. 이는 중질소( $^{15}\text{N}$ ) 표지 생초미생물 혼합액비의 질소 무기화율이 높아 속효성 시료로서의 가능성을 시사한다. 중질소( $^{15}\text{N}$ )를 표지한 생초미생물 혼합액비의 총질소( $46.16\text{g kg}^{-1}$ )는 중질소( $^{15}\text{N}$ ) 표지 잔디( $36.71\text{g kg}^{-1}$ )의 값보다 높은 함량을 보였다. 마찬가지로 중질소( $^{15}\text{N}$ ) 표지 생초미생물 혼합액비의  $^{15}\text{N}$  atom %는 0.84%로 중질소( $^{15}\text{N}$ )를 표지한 잔디(0.51%)보다 높은 함량으로 분석되었다. 이러한 결과는 액비를 제조하는 과정에서 미생물의 대사 작용에 의해 총질소 함량뿐만 아니라 중질소( $^{15}\text{N}$ )도 농축된 것으로 사료된다. 본 실험에서 중질소( $^{15}\text{N}$ ) 표지 잔디를 사용하여 생초미생물 혼합액비의 질소 이동을 추적하여 비료로서의 효율을 평가하기 위해 중질소( $^{15}\text{N}$ ) 표지 생초미생물 혼합액비를 제조하였다. 이 과정에서  $^{15}\text{N}$  atom(%)가 자연존재비의 2배로 농축됨으로서 중질소( $^{15}\text{N}$ ) 표지 생초미생물 혼합액비를 질소 추적을 위한 추적자로서 이용하는데 가치가 높아진 것을 확인하였다.

Table 79. Chemical properties of mixed liquid fertilizer. The values in parentheses indicate standard deviation (n=3).

	Density (g mL <sup>-1</sup> )	pH	EC (dS m <sup>-1</sup> )	Toc (g L <sup>-1</sup> )	TN (g L <sup>-1</sup> )	Inorganic nitrogen		<sup>15</sup> N atom (%)
						NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (g L <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (g L <sup>-1</sup> )	
MLF	0.06 (0.00)	6.89 (0.03)	11.47 (0.16)	15.01 (2.45)	2.88 (0.04)	1.30 (0.02)	0.02 (0.02)	0.84 (0.00)

다. 포장실험을 통한 중질소(<sup>15</sup>N) 표지 생초미생물 혼합액비의 토양 및 작물 생육 영향 평가

(1) 포장 실험 설계

(가) 포장 실험 설계

작물별로 중질소(<sup>15</sup>N) 표지 생초 미생물 혼합액비의 효과를 평가하기 위해 전남대학교 실험포장(비닐하우스)에서 실험하였다. 실험포장(비닐하우스) 토양의 화학적 특성은 Table 81와 같다. 작물은 고추(*Capsicum annuum L*, Obuja)와 방울토마토(*Solanum lycopersicum*, Younghwa)를 사용하였다. 중질소(<sup>15</sup>N) 표지 생초 미생물 혼합액비의 효용성을 비교/대조하기 위하여 화학비료를 대조군으로 두었다. 각각의 처리구는 가로 2.5m, 세로 1m 로 구획을 설정하였고, 중질소(<sup>15</sup>N) 표지 생초 미생물 혼합액비 처리구는 중질소(<sup>15</sup>N)의 오염을 방지하기 위해 각 구획에 컬럼(내경 30cm, 높이 50cm)을 30cm 깊이로 설치하였다(Fig 10). 각 처리구는 난피법으로 구획을 설정하였다. 화학비료 처리구는 요소[(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO], 용성인비[P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>], 칼리[K<sub>2</sub>O]를 사용하였다. 화학비료는 작물별로 공시된 현행 비료 양을 구획에 맞게 산정하여 정식하기 전, 정식 후 1달, 2달 총 3번에 나누어 주었다. 고추의 화학비료 시비 총량은 요소 28.25g, 용성인비 8.0g, 칼리 12.63g이며, 방울토마토의 화학비료 시비 총량은 요소 25.5g, 용성인비 12.88g, 칼리 15.25g를 시비하였다. 비료의 시비는 작물 정식 전 기비를 주었으며, 작물 정식 후 추비를 총 두 번에 걸쳐 시비하였다. 중질소(<sup>15</sup>N) 표지 생초미생물 혼합액비 처리구는 액비의 질소 성분을 현행 질소 비료 시비수준으로 산정하여 주 1회 컬럼 내에 관비하였다. 토양의 샘플 채취는 작물별로 표토(0cm-15cm)와 심토(15cm-30cm)에서 하였다. 포장실험 일정은 Table 3-44와 같다. 첫 번째 토양(2013년 8월 28일)은 식물체 정식(2014년 8월 21일) 후 작물의 토양 적응기를 가진 뒤 채취하였다. 이 후 재배 기간 동안 4주 간격으로, 총 네 차례 토양을 채취하였다. 식물체는 정식(2014년 8월 21일) 후 108일 동안 재배하였고, 실험 종료일(2013년 12월 18일)에 뿌리와 열매, 초장 모두 채취하였다. 토양 분석은 토성, pH, EC, 총탄소, 총질소, 무기태 질소, <sup>15</sup>N atom (%)를 분석하였다. 식물체는 뿌리, 초장, 열매로 구분하여, 초장의 길이, 과실의 수량과 당도, 산도를 측정하였다. 각각의 부위별로 구분한 식물체는 생중량, 건중량, 총탄소, 총질소, 양이온(Ca, Na, Mg, K), <sup>15</sup>N atom (%)를 분석하였다.



Fig 176. Experimental field.

Table 80. Field experimental schedule.

Date	Process
2013.08.21	Planting Tomato & Pepper
2013.08.28	1st soil sampling
2013.10.04	2nd soil sampling
2013.11.08	3rd soil sampling
2013.12.13	4th soil sampling, plant sampling

(나) 포장 실험 토양

전남대학교 비닐하우스 실험포장 토양의 화학적 특성을 Table 81에 나타내었다. 토성은 silt clay loam으로 분석되었다.

Table 81. Chemical properties of experimental field soil. The values in parentheses indicate standard deviation(n=3).

Particle size distribution ( $\text{g kg}^{-1}$ )	sil clay loam	
Sand	69.6	
Silt	584.7	
Clay	345.7	
pH (1:5)	7.21	(0.21)
EC (1:5) ( $\text{dS m}^{-1}$ )	1.01	(0.44)
Total Carbon ( $\text{g kg}^{-1}$ )	9.53	(1.21)
Total Nitrogen ( $\text{g kg}^{-1}$ )	1.17	(0.30)
Inorganic nitrogen ( $\text{mg kg}^{-1}$ )		
$\text{NH}_4\text{-N}$	7.96	(2.34)
$\text{NO}_3\text{-N}$	90.71	(36.15)

(2) 작물별 화학비료와 중질소( $^{15}\text{N}$ ) 표지 생초 미생물 혼합액비 처리량 산정

(가) 농진청에서 공시한 작물별 화학비료 요구량 ( $\text{kg } 10\text{a}^{-1}$ )

Table 82. Chemical fertilizer requirement of pepper and tomato.

Fertilizer	Total (kg 10a <sup>-1</sup> )	Base (kg 10a <sup>-1</sup> )	Additional (kg 10a <sup>-1</sup> )		
			First	Second	Third
Pepper					
Nitrogen (Urea)	19.0	10.2	2.8	3.2	2.8
Phosphorus (Fused phosphate)	11.2	11.2	-	-	-
Potassium (Potassium Oxide)	15.0	9.0	1.8	1.8	2.4
Tomato					
Nitrogen (Urea)	24.0	14	3	4	3
Phosphorus (Fused phosphate)	16.0	16	-	-	-
Potassium (Potassium Oxide)	24.0	8	5	6	5

(나) Plot( 가로 2.5m, 세로 1m) 당 작물별 화학비료 요구량 (g plot<sup>-1</sup>)

Table 83. Chemical fertilizer requirement conversion of pepper and tomato.

Fertilizer	Pepper (g plot <sup>-1</sup> )	Tomato (g plot <sup>-1</sup> )
Nitrogen (Urea)	28.25	25.5
Phosphorus (Fused phosphate)	8.0	12.88
Potassium (Potassium Oxide)	12.63	15.25

(다) 중질소(<sup>15</sup>N) 표지 생초 미생물 혼합액비 처리량 (mL plot<sup>-1</sup>)

중질소(<sup>15</sup>N) 표지 생초 미생물 혼합액비의 관비량은 농진청에서 공시한 고추와 방울토마토의 현행 비료 수준을 질소기준으로 산정하였다(Table 84). 산정된 중질소(<sup>15</sup>N) 표지 생초미생물 혼합액비는 컬럼 당 주 1회 관비하였으며, 108일의 실험 기간 동안 15회에 나누어 관비 하였다.

Table 84. Mixed liquid fertilizer (MLF) requirement of pepper and tomato.

Species	Treatment	MLF (mL/600mL)
Pepper	1.0x	399
Tomato	1.0x	362

### (3) 포장 실험 토양 분석

#### (가) 토성(Soil texture)

토성은 wet sieving/pipette method으로 분석하였다. 풍건한 토양 10g에 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 가해 유기물을 분해하였다. 분산제인 5% Na-HMP(Sodium hexametaphosphate) 10mL를 넣고 현탁한 후, 0.05mm체로 모래를 걸러냈다. 나머지 여액은 1L 실린더로 옮겨 증류수로 눈금을 맞추고 잘 섞어 방치하였다. 이를 계산된 깊이에서 20mL을 취해 오븐에서 건조시킨 후, 점토의 중량을 재어 모래, 실트, 점토의 비율을 계산하였다. 계산된 결과를 바탕으로 미국 농무성법에 따라 토성을 구하였다.

#### (나) pH, EC (Electrical Conductivity)

토양 5g을 증류수 25mL(1:5 의 비율)로 희석하여 1 시간동안 Shaking 후, pH측정기(Orion 3 star, Thermo Scientific, Singapore)로 측정하였다. pH를 측정하고 Whatman No.42 filter paper로 걸렸다. 거른 여액은 전기전도도(Electrical Conductivity, EC) 측정기(PET-2000 Kombi, stelzner GMBH, Germany)를 이용하여 측정하였다.

#### (다) 총탄소(Total Carbon, TC), 총질소(Total Nitrogen, TN)

2mm 체로 체질한 토양을 균질화시켜 일부를 채취했다. 채취한 토양을 막자사발로 곱게 갈아 0.5mm체로 체질한 뒤, 체질한 토양 10mg을 원소분석기(Elemental Analyzer, Flash 2000, Thermo Scientific, Cambridge, UK)를 이용하여 총탄소와 총질소를 분석하였다.

#### (라) 무기태 질소(Inorganic Nitrogen)

토양 15g에 2M KCl 60mL (1:4 비율)를 가하고, 1 시간동안 Shaking 하여 Whatman No.42 filter paper로 걸렸다. 거른 여액 10mL에 산화마그네슘(MgO) 0.5g을 넣고 증류장치(K-314, BUCHI, Switzerland)로 증류하여 암모니아태 질소(NH<sub>4</sub>-N)를 포집하였다. 암모니아태 질소(NH<sub>4</sub>-N)를 포집한 후, Devarda's Alloy 0.5g을 넣고 증류장치(K-314, BUCHI, Switzerland)로 증류하여 질산태 질소(NO<sub>3</sub>-N)를 포집하였다. 각각 포집된 암모니아태 질소(NH<sub>4</sub>-N)와 질산태 질소(NO<sub>3</sub>-N)는 pH 적정 장치(702 SM Titrino, Metrohm, Switzerland)를 이용하여 적정하고, 함량을 계산하였다. 포집된 암모니아태 질소(NH<sub>4</sub>-N)와 질산태 질소(NO<sub>3</sub>-N)는 0.1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 사용하여 pH 3.1 이하로 조정하고, 이 여액을 오븐에 건조시켜 농축하였다. 농축시킨 시료는 계산된 질소량에서 0.4mg를 취해 무기태 질소(NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N)의 중질소(<sup>15</sup>N) 함량을 안정성 동위원소비 질량분석기(Stable Isotope Ratio Mass Spectrometer, IsoPrime-EA, Micromass Ltd, UK)로 분석하였다.

#### (마) <sup>15</sup>N atom (%)

2mm 체로 체질한 토양을 균질화시켜 일부를 채취하였다. 채취한 토양은 막자사발로 곱게 갈아 0.5mm체로 체질하였다. 0.5mm체로 체질한 토양 10mg을 안정성 동위원소비 질량분석기(Stable Isotope Ratio Mass Spectrometer, IsoPrime-EA, Micromass Ltd, UK)를 이용하여 분석하였다.

#### (4) 포장 실험 식물체 분석

##### (가) 줄기 길이 (Height)

채취한 식물체의 뿌리 부분을 제외한 전체 높이를 측정하였다.

##### (나) 열매 개수

각 처리구마다 작물별 열매의 수를 세었다.

##### (다) 생중량(Fresh mass), 건중량(Dry mass)

채취한 식물체의 생중량을 측정하였다. 생중량을 측정한 식물체는 65°C의 건조오븐에서 약 1주일 간 건조시켰다. 건조시킨 식물체는 손실이 없도록 무게를 측정하였다.

##### (라) 총탄소(Total Carbon, TC), 총질소(Total Nitrogen, TN)

건조한 식물체는 분쇄기(MM301, Reisch GmbH & Co., Haan, Germany)로 곱게 갈아 균질화시켜 일부를 채취하였다. 곱게 갈아 균질화한 시료 2mg을 원소분석기(Elemental Analyzer, Flash 2000, Thermo Scientific, Cambridge, UK)를 이용하여 총탄소와 총질소를 분석하였다.

##### (마) 양이온 분석

건조한 식물체를 분쇄기(MM301, Reisch GmbH & Co., Haan, Germany)로 곱게 갈아 균질화 시켰다. 곱게 갈아 균질화 한 식물체는 각 부위별로 일부를 취해 켈달(Kjeldahl) 분해관에 넣고 증류수로 습윤시켰다. 습윤시킨 시료에 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-HNO<sub>3</sub>-HClO<sub>4</sub>(1:8:1)를 10mL를 가한 뒤, 방치하였다. 저온에서 가열을 시작하여 점차 온도를 높여 분해액이 투명해질 때까지 분해하였다. 분해액이 투명해지면 켈달(Kjeldahl) 분해관을 냉각한 후 10% HCl 20mL을 가하여 다시 가열하였다. 분해가 완료된 켈달(Kjeldahl) 분해관은 방치한 뒤, 100mL volume flask에 여과하였다. 여과액은 서울대학교 농생명과학공동기기원(NICEM)에 있는 유도결합플라즈마 발광광도기(Inductively Coupled Plasma Emission Spectrometer)를 이용하여 Ca, Mg, Na, K을 분석하였다.

##### (바) <sup>15</sup>N atom (%)

채취한 식물체를 65°C의 건조 오븐에서 약 1주일 간 건조시켜 수분을 제거하였다. 수분이 제거된 식물체는 분쇄기(MM301, Reisch GmbH & Co., Haan, Germany)로 곱게 갈아 균질화시켰다. 균질화한 시료 1.5mg을 채취하여 안정성 동위원소비 질량분석기(Stable Isotope Ratio Mass Spectrometer, IsoPrime-EA, Micromass Ltd, UK)를 이용하여 분석하였다.

#### (5) 포장 실험 토양 분석 결과

화학비료 처리구와 중질소(<sup>15</sup>N) 표지 생초 미생물 혼합액비 처리구에서의 토양 pH는 처리구간에 따른 유의적인 차이는 볼 수 없었다(Table 85). 화학비료 처리구와 중질소(<sup>15</sup>N) 표지 생초 미생물 혼합액비 처리구 토양 모두에서 실험 전 비닐하우스 실험포장 토양의 pH 7.21

보다 증감이 유의적이지 않았다. 하지만 중질소(<sup>15</sup>N) 표지 생초 미생물 혼합액비 처리구 토양의 표토와 심토간의 pH 변화폭은 화학비료 처리구의 변화폭보다 크게 나타났다. 이러한 결과는 pH 6.89의 중질소(<sup>15</sup>N) 표지 생초 미생물 혼합액비의 주기적인 관비의 영향으로 사료된다.

토양의 전기전도도는 중질소(15N) 표지 생초 미생물 혼합액비의 높은 전기전도도의 영향으로 염류집적이 우려되었으나 실험 전 비닐하우스 실험포장 토양보다 낮은 값으로 유지되었다. 이는 중질소(15N) 표지 생초 미생물 혼합액비를 관비형태로 사용하여 그 영향이 크지 않았던 것으로 판단된다.

Table 85. pH and EC of pepper and tomato cultivated silt clay loam. The values in parentheses indicate standard deviation (n=3).

	Pepper				Tomato			
	Chemical Fertilizer		MLF 1.0x		Chemical Fertilizer		MLF 1.0x	
	pH (1:5)	EC (dS m <sup>-1</sup> )	pH (1:5)	EC (dS m <sup>-1</sup> )	pH (1:5)	EC (dS m <sup>-1</sup> )	pH (1:5)	EC (dS m <sup>-1</sup> )
----- 1st -----								
Surface soil	7.39 (0.21)	0.47 (0.28)	7.31 (0.20)	0.66 (0.08)	7.17 (0.23)	1.10 (0.51)	7.24 (0.13)	0.85 (0.48)
Subsoil	7.37 (0.32)	0.29 (0.12)	7.19 (0.14)	0.65 (0.18)	6.96 (0.12)	0.58 (0.34)	7.18 (0.23)	0.81 (0.43)
----- 2nd -----								
Surface soil	7.25 (0.20)	0.61 (0.31)	7.46 (0.35)	0.77 (0.23)	7.35 (0.33)	1.03 (0.77)	7.48 (0.12)	0.44 (0.31)
Subsoil	7.12 (0.16)	0.58 (0.19)	7.37 (0.37)	0.61 (0.17)	7.37 (0.14)	0.68 (0.47)	7.19 (0.12)	0.72 (0.49)
----- 3rd -----								
Surface soil	7.34 (0.23)	0.60 (0.18)	7.30 (0.22)	0.59 (0.15)	7.52 (0.48)	1.03 (0.76)	7.37 (0.09)	0.41 (0.28)
Subsoil	7.20 (0.23)	0.42 (0.19)	7.19 (0.23)	0.57 (0.27)	7.25 (0.41)	0.94 (0.75)	7.28 (0.15)	0.67 (0.53)
----- 4th -----								
Surface soil	7.10 (0.18)	1.01 (0.04)	7.17 (0.15)	1.10 (0.15)	7.35 (0.34)	0.99 (0.73)	7.35 (0.19)	0.73 (0.46)
Subsoil	7.27 (0.15)	0.79 (0.09)	7.29 (0.14)	0.76 (0.04)	7.40 (0.36)	0.78 (0.50)	7.41 (0.18)	0.56 (0.27)

두 작물에서의 총질소와 총탄소는 표토에서 높고 심토에서 낮은 함량을 보였다(Table

86). 고추의 총질소는 화학비료를 시용한 토양에서는 2차 샘플(2013년 10월 4일, 식물 재식 38일 후)과 4차 샘플(2013년 12월 13일, 식물 재식 후 108일)에서 실험 전의 비닐하우스 실험포장의 값보다 높은 함량으로 분석되었다. 이는 화학비료 처리구의 질소가 상당량 무기화 되었음에도 작물의 성장 시기에 따라 필요로 하는 요구량이 적어 상당량 토양에 잔류된 것으로 사료된다. 생초 미생물 혼합액비 처리구에서의 총질소는 4차 샘플(2013년 12월 13일, 식물 재식 후 108일)에서만 실험 전 비닐하우스 실험포장의 값보다 높았다. 시용한 생초 미생물 혼합액비의 총질소 값이  $2.88\text{g L}^{-1}$ 였음에도 토양의 총질소 함량 변화폭은 유의미하지 않았다. 이러한 결과는 시용한 생초 미생물 혼합액비의 총질소가 무기태 질소 형태로 존재하는 비율이 45% 임을 고려하였을 때, 작물의 생육 단계에 따른 필요 요구량이 적절하게 충족되었기 때문으로 사료된다. 4차 샘플(2013년 12월 13일, 식물 재식 후 108일)에서 화학비료와 생초 미생물 혼합액비의 총질소 함량이 모두 높게 분석되었다. 이는 고추가 열매를 맺을 때까지는 많은 양분을 필요로 하지만, 그 이후에는 필요로 하는 양분이 상대적으로 적게 요구되기 때문에 두 처리구 토양에서 총질소 함량이 높게 분석된 것으로 사료된다. 방울토마토 화학비료 처리구의 총질소는 모든 샘플에서 실험 전의 비닐하우스 실험포장 토양보다 높은 값으로 분석되었다. 이러한 결과는 고추의 2차 샘플(2013년 10월 4일, 식물 재식 38일 후)과 4차 샘플(2013년 12월 13일, 식물 재식 후 108일)에서 보인 결과와 마찬가지로 시용된 화학비료의 질소가 작물의 성장 시기에 따라 필요로 하는 무기태 질소의 요구량보다 많아 상당량이 토양에 잔류된 것으로 사료된다. 이에 반해 방울토마토 생초 미생물 혼합액비 처리구에서 총질소는 1차 샘플(2013년 8월 28일, 식물 재식 1일 후)과 4차 샘플(2013년 12월 13일, 식물 재식 108일 후)에서 실험 전의 비닐하우스 실험포장 토양 값보다 높게 나타났다. 고추와는 다른 경향을 보이는 것은 작물의 특성에 기인한 것으로 사료된다. 따라서 생초 미생물 혼합액비를 화학비료 대체제로서 시용할 경우 작물의 특성을 고려한 시용량이 요구된다.

고추의 화학비료 처리구 총탄소 함량은 3차 샘플(2013년 11월 8일, 식물 재식 72일 후)에서만 실험 전 비닐하우스 실험포장 토양 함량보다 낮게 분석되었다. 생초 미생물 혼합액비 처리구는 시용한 생초 미생물 혼합액비의 총탄소가  $15.01\text{g L}^{-1}$ 로 많은 양이 시용되었으나, 토양의 총탄소 함량변화는 실험 전 비닐하우스 실험포장 토양과 비슷한 수준을 유지하였다. 이는 생초 미생물 혼합액비를 제조할 때 배양된 미생물과 더불어 토양 내 다양한 미생물들의 에너지원으로 사용된 결과로 사료된다. 방울토마토의 총탄소 함량은 고추와는 다르게 화학비료와 생초 미생물 혼합액비 처리구에서 실험 전 비닐하우스 실험포장 토양 함량보다  $1\sim 2\text{g kg}^{-1}$  높은 함량으로 유지되었다. 이는 총질소 함량의 분석결과와 마찬가지로 작물의 특성에 기인한 결과로 사료된다.

Table 86. Total Nitrogen (TN) and Carbon (TC) of pepper and tomato cultivated silt clay loam. The values in parentheses indicate standard deviation (n=3).

	Pepper				Tomato			
	Chemical Fertilizer		MLF 1.0x		Chemical Fertilizer		MLF 1.0x	
	TN	TC	TN	TC	TN	TC	TN	TC
	(g kg <sup>-1</sup> )							
	----- 1st -----							
Surface soil	1.05 (0.31)	9.84 (2.00)	1.07 (0.08)	11.98 (2.16)	1.35 (0.43)	11.07 (1.14)	1.19 (0.44)	10.61 (2.31)
Subsoil	0.67 (0.14)	6.76 (2.03)	1.00 (0.18)	9.46 (1.96)	0.82 (0.39)	8.44 (2.92)	1.06 (0.39)	9.61 (2.16)
	----- 2nd -----							
Surface soil	1.37 (0.07)	10.39 (1.34)	0.92 (0.15)	8.25 (1.14)	1.51 (0.61)	11.46 (3.00)	1.08 (0.38)	10.00 (1.88)
Subsoil	1.08 (0.05)	9.40 (0.63)	1.01 (0.04)	8.82 (0.43)	1.05 (0.58)	8.25 (3.52)	1.09 (0.57)	9.16 (3.55)
	----- 3rd -----							
Surface soil	0.98 (0.14)	8.39 (0.94)	1.04 (0.01)	9.23 (0.07)	1.44 (0.42)	9.91 (1.01)	1.06 (0.17)	9.89 (0.17)
Subsoil	0.77 (0.24)	6.98 (1.31)	0.89 (0.22)	7.71 (1.07)	1.33 (0.34)	10.31 (4.17)	1.09 (0.50)	9.83 (2.66)
	----- 4th -----							
Surface soil	1.37 (0.22)	10.16 (3.16)	1.36 (0.07)	10.23 (0.56)	1.31 (0.43)	9.44 (0.54)	1.42 (0.43)	11.83 (2.11)
Subsoil	1.22 (0.05)	9.33 (0.68)	1.24 (0.18)	10.52 (1.41)	1.23 (0.21)	9.62 (0.65)	1.18 (0.25)	9.98 (1.42)

Table 87. Ammonium nitrogen ( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ) and Nitrate nitrogen ( $\text{NO}_3^-\text{-N}$ ) of pepper and tomato cultivated silt clay loam. The values in parentheses indicate standard deviation (n=3).

	Pepper				Tomato			
	Chemical Fertilizer		MLF 1.0x		Chemical Fertilizer		MLF 1.0x	
	$\text{NH}_4^+\text{-N}$ (mg kg <sup>-1</sup> )	$\text{NO}_3^-\text{-N}$ (mg kg <sup>-1</sup> )	$\text{NH}_4^+\text{-N}$ (mg kg <sup>-1</sup> )	$\text{NO}_3^-\text{-N}$ (mg kg <sup>-1</sup> )	$\text{NH}_4^+\text{-N}$ (mg kg <sup>-1</sup> )	$\text{NO}_3^-\text{-N}$ (mg kg <sup>-1</sup> )	$\text{NH}_4^+\text{-N}$ (mg kg <sup>-1</sup> )	$\text{NO}_3^-\text{-N}$ (mg kg <sup>-1</sup> )
	----- 1st -----							
Surface soil	3.16 (2.52)	69.25 (44.12)	1.06 (1.14)	172.07 (30.48)	13.50 (15.40)	74.36 (41.35)	4.30 (5.67)	62.48 (16.91)
Subsoil	1.50 (1.26)	44.89 (23.18)	3.00 (2.84)	81.33 (49.13)	2.86 (1.17)	36.12 (17.54)	5.96 (6.88)	80.66 (28.19)
	----- 2nd -----							
Surface soil	34.67 (30.15)	40.08 (12.80)	0.34 (0.59)	48.81 (4.94)	34.25 (44.67)	28.16 (24.94)	3.12 (4.22)	76.84 (99.13)
Subsoil	15.22 (16.71)	88.95 (67.54)	0.99 (1.72)	56.22 (18.90)	9.61 (3.35)	29.25 (24.36)	1.03 (0.89)	40.18 (30.42)
	----- 3rd -----							
Surface soil	0.28 (0.48)	104.41 (67.40)	0.21 (0.36)	100.72 (54.97)	85.15 (147.49)	261.37 (217.96)	0.42 (0.73)	59.38 (66.95)
Subsoil	0.00 (0.00)	75.63 (53.51)	0.00 (0.00)	99.61 (73.73)	13.22 (22.89)	111.55 (152.33)	0.20 (0.34)	137.73 (173.87)
	----- 4th -----							
Surface soil	0.00 (0.00)	301.83 (70.78)	31.34 (18.28)	295.53 (35.56)	0.00 (0.00)	314.78 (285.91)	0.00 (0.00)	164.58 (204.61)
Subsoil	0.00 (0.00)	211.64 (28.88)	28.19 (18.62)	195.42 (44.45)	0.00 (0.00)	184.96 (124.45)	0.00 (0.00)	84.42 (94.74)

무기태 질소( $\text{NH}_4^+-\text{N}$ ,  $\text{NO}_3^--\text{N}$ )의 경우 두 작물 모두에서 깊이에 따라 값이 감소하는 경향을 보였다(Table 87). 고추의 화학비료 처리구 암모니아태 질소( $\text{NH}_4^+-\text{N}$ )는 2차 샘플(2013년 10월 4일, 식물 재식 후 38일 후)에서만 실험 전 비닐하우스 실험포장보다 높은 함량을 나타냈고, 다른 샘플에서는 낮은 함량을 보였다. 이는 2차 샘플(2013년 10월 4일, 식물 재식 후 38일 후)이 작물을 키운지 38일 째로 암모니아태 질소( $\text{NH}_4^+-\text{N}$ )가 생육단계에 필요 요구량보다 많은 양이 무기화되어 토양에 잔류된 것으로 보인다. 반면, 다른 샘플에서의 낮은 암모니아태 질소( $\text{NH}_4^+-\text{N}$ )함량은 질산화 작용과 식물 성장에 따른 요구량의 차이 때문으로 사료된다. 고추의 화학비료 처리구 질산태 질소( $\text{NO}_3^--\text{N}$ )는 초기에는 실험 전 비닐하우스 실험 포장의 질산태 질소( $\text{NO}_3^--\text{N}$ ) 함량보다 적었으나, 3차 샘플(2013년 11월 8일, 식물 재식 후 72일 후)부터는 증가하였다. 이는 작물의 생육 초기에는 기존 토양의 질산태 질소( $\text{NO}_3^--\text{N}$ )를 이용하여 성장 하였으나, 시간이 지나고 작물이 성장하면서 암모니아태 질소( $\text{NH}_4^+-\text{N}$ )의 질산화 작용과 작물의 요구량 감소 때문인 것으로 생각된다. 고추의 생초 미생물 혼합액비 처리구 암모니아태 질소( $\text{NH}_4^+-\text{N}$ )는 4차 샘플(2013년 12월 13일, 식물 재식 후 108일)을 제외하고 실험 전 비닐하우스 실험포장의 함량보다 낮게 분석되었다. 이에 반해 질산태 질소( $\text{NO}_3^--\text{N}$ )는 2차 샘플(2013년 10월 4일, 식물 재식 후 38일 후)만이 실험 전 비닐하우스 실험포장 함량보다 낮았고, 다른 샘플에서는 높은 함량을 보였다. 이는 생초 미생물 혼합액비로 투입된 암모니아태 질소( $\text{NH}_4^+-\text{N}$ )가 중성 환경 조건에서 질산태 질소( $\text{NO}_3^--\text{N}$ )로 전환된 것으로 보인다.

방울토마토의 무기태 질소( $\text{NH}_4^+-\text{N}$ ,  $\text{NO}_3^--\text{N}$ )는 고추와는 다른 경향을 보였다. 화학비료 처리구의 암모니아태 질소( $\text{NH}_4^+-\text{N}$ )는 4차 샘플(2013년 12월 13일, 식물 재식 후 108일 후)을 제외한 샘플들에서 실험 전 비닐하우스 실험포장보다 높은 함량을 보였다. 이는 전환된 화학비료의 무기태질소( $\text{NH}_4^+-\text{N}$ ,  $\text{NO}_3^--\text{N}$ )가 작물의 요구량보다 많아 토양에 잔류된 것으로 보인다. 초기에 질산태 질소( $\text{NO}_3^--\text{N}$ )의 함량은 실험 전 비닐하우스 실험포장 토양보다 적은 함량으로 분석되었으나 작물의 생육할수록, 질산태 질소( $\text{NO}_3^--\text{N}$ )의 함량이 높았다. 이는 질산화 과정으로 인해 암모니아태( $\text{NH}_4^+-\text{N}$ ) 질소가 질산태 질소( $\text{NO}_3^--\text{N}$ )로 되었기 때문이라 생각된다. 따라서 고추와 마찬가지로 화학비료 처리구의 방울토마토도 생육 초기에는 많은 양의 질산태 질소( $\text{NO}_3^--\text{N}$ )를 요구하였으나 성장할수록 그 요구량이 줄고, 암모니아태 질소( $\text{NH}_4^+-\text{N}$ )의 질산화 작용과 더불어 질산태 질소( $\text{NO}_3^--\text{N}$ )가 증가한 것으로 사료된다. 방울토마토 액비 처리구의 암모니아태 질소( $\text{NH}_4^+-\text{N}$ )는 화학비료 처리구와는 달리 실험 전 비닐하우스 실험포장의 함량보다 적게 분석되었다. 이는 고추에서와 마찬가지로 액비로 투입된 암모니아태 질소( $\text{NH}_4^+-\text{N}$ )가 중성 환경 조건에서 질산화 과정으로 인해 질산태 질소( $\text{NO}_3^--\text{N}$ )로 전환되었기 때문으로 사료된다. 질산태 질소( $\text{NO}_3^--\text{N}$ )도 암모니아태 질소( $\text{NH}_4^+-\text{N}$ )와 마찬가지로 비슷한 경향을 보였다. 그러나 4차 샘플(2013년 12월 13일, 식물 재식 후 108일 후)에서는 그 함량이 증가하는 것을 볼 수 있었다. 이는 암모니아태 질소( $\text{NH}_4^+-\text{N}$ )의 질산화 과정과 작물이 요구하는 무기태 질소( $\text{NH}_4^+-\text{N}$ ,  $\text{NO}_3^--\text{N}$ )의 생육시기에 따른 차이 때문으로 보인다. 따라서 생초 미생물 혼합액비를 화학비료 대체제로 사용할 때에, 비료 시비 수준에 맞는 총질소 함량뿐만 아니라 작물이 필요로 하는 무기태 질소( $\text{NH}_4^+-\text{N}$ ,  $\text{NO}_3^--\text{N}$ )함량도 고려하여 적절한 양을 사용해야 할 것으로 생각된다.

(6) 포장 실험 식물체 분석 결과

Table 88. Growth of pepper and tomato. The values in parentheses indicate standard deviation (n=3).

	Chemical Fertilizer			MLF 1.0x		
	Height (cm)	Fresh mass (g plant <sup>-1</sup> )	Dry mass (g plant <sup>-1</sup> )	Height (cm)	Fresh mass (g plant <sup>-1</sup> )	Dry mass (g plant <sup>-1</sup> )
Pepper						
Shoot	84 (2.65)	102.79 (22.86)	18.32 (3.31)	89 (7.21)	116 (27.01)	23 (2.74)
Fruit		153.78 (55.16)	127.82 (24.49)		432 (139.74)	184 (19.82)
Root		21.22 (4.70)	3.57 (1.33)		19.97 (3.93)	3.38 (0.97)
Tomato						
Shoot	240 (29.54)	608.54 (280.25)	96.04 (53.38)	252 (15.14)	605 (139.25)	106 (7.68)
Fruit		528.55 (310.28)	93.80 (15.26)		582 (202.87)	92 (14.33)
Root		46.84 (15.54)	8.54 (3.63)		35.46 (1.00)	5.55 (0.63)

고추와 방울토마토의 생육 특성은 Table 88와 같다. 고추는 초장 길이와 생중량, 건중량 그리고 열매의 생중량 건중량이 생초 미생물 혼합액비 처리구가 화학비료 처리구보다 높게 조사되었다. 비록 뿌리의 생중량, 건중량이 화학비료 처리구에서 높았지만, 과실 작물에서는 궁극적으로 열매의 생산량이 중요하다. 따라서 이를 통해 생초 미생물 혼합액비의 질소질 화학비료 대체제로서의 가능성을 확인 할 수 있었다. 방울토마토도 고추와 마찬가지로 화학비료 처리구보다 액비 처리구의 생육이 좋은 것으로 나타났다.

Table 89. Fruits characteristics of pepper. The values in parentheses indicate standard deviation (n=3).

Pepper						
	Chemical Fertilizer			MLF 1.0x		
	Number of fruits per plant (ea)	Diamete r (mm)	Length (cm)	Number of fruits per plant (ea)	Diamete r (mm)	Length (cm)
Fruit	17 (6.43)	16.00 (1.41)	12.63 (0.85)	32 (8.77)	17.08 (1.12)	12.07 (0.32)

Table 90. Fruits characteristics of tomato. The values in parentheses indicate standard deviation (n=3).

Tomato						
Chemical Fertilizer			MLF (1X)			
	Number of fruits per plant (ea)	Sugar contents (Brix)	Acidity (%)	Number of fruits per plant (ea)	Sugar contents (Brix)	Acidity (%)
Fruit	59 (22.00)	6.24 (0.71)	1.19 (0.30)	66 (3.02)	6.62 (0.92)	1.14 (0.26)

고추와 방울토마토 열매의 특성은 Table 89, Table 90와 같다. 고추는 수량과 직경, 길이를 조사하였다. 작물의 생육 특성의 결과에서 본 것처럼 열매의 수량과 길이가 화학비료 처리구보다 생초 미생물 혼합액비 처리구에서 높게 조사되었다. 방울토마토의 수량과 당도, 산도는 화학비료 처리구와 생초 미생물 혼합액비 처리구가 유의미한 차이를 보이지 않았다. 따라서 고추와 방울토마토에 생초 미생물 혼합액비를 사용하였을 때, 화학비료에서 산출되는 것과 대등한 품질의 열매를 수확할 수 있을 것으로 생각된다.

고추와 방울토마토를 초장, 뿌리, 열매로 구분하여 각각 총질소와 총탄소를 분석한 결과는 Table 91와 같다. 작물의 생산성을 결정하는 열매는 고추와 방울토마토 모두에서 총탄소와 총질소 함량이 화학비료 처리구보다 높았다. 투입된 화학비료와 생초 미생물 혼합액비의 질소가 흡수되어 작물의 구성성분이 되는 정도에 따라 비료의 효율이 검증된다. 이는 식물체 내의 질소는 단백질의 구성원소로 핵산, 성장조절물질, 비타민 등과 같은 필수화합물의 구성원소이기 때문이다. 따라서 액비 처리구 작물의 총질소 함량이 화학비료 처리구보다 높은 것으로 보아 중질소(<sup>15</sup>N) 표지 생초 미생물 혼합액비가 질소질 화학비료 대체제로서 가능성이 있음을 시사했다.

Table 91. Total Nitrogen (TN) and Carbon (TC) contents of pepper and tomato. The values in parentheses indicate standard deviation (n=3).

Day	Pepper				Tomato			
	Chemical Fertilizer		MLF 1.0x		Chemical Fertilizer		MLF 1.0x	
	TN	TC	TN	TC	TN	TC	TN	TC
	(gplant-1)	(g plant-1)	(g plant-1)	(g plant-1)	(g plant-1)	(g plant-1)	(g plant-1)	(g plant-1)
Shoot	0.60 (0.15)	0.24 (0.06)	0.59 (0.07)	0.24 (0.03)	2.11 (0.99)	0.80 (0.39)	2.26 (0.21)	0.90 (0.05)
Root	0.08 (0.03)	0.03 (0.01)	0.08 (0.01)	0.03 (0.01)	0.14 (0.06)	0.06 (0.02)	0.10 (0.01)	0.04 (0.00)
Fruits	3.53 (0.22)	1.72 (0.11)	4.31 (0.76)	2.14 (0.39)	1.60 (0.09)	0.73 (0.04)	1.93 (0.85)	1.15 (0.86)

Table 92. Ca, Mg, Na, and K of pepper. The values in parentheses indicate standard deviation(n=3).

		Pepper							
Day	Chemical Fertilizer				MLF 1.0x				
	Ca	Mg	Na	K	Ca	Mg	Na	K	
	(g plant <sup>-1</sup> )								
Shoot	0.01 (0.00)	0.20 (0.03)	0.39 (0.06)	0.52 (0.06)	0.01 (0.00)	0.25 (0.05)	0.51 (0.05)	0.63 (0.08)	
Root	0.04 (0.01)	0.01 (0.00)	0.02 (0.00)	0.10 (0.04)	0.04 (0.02)	0.01 (0.00)	0.02 (0.01)	0.07 (0.04)	
Fruits	0.00 (0.00)	0.23 (0.04)	0.16 (0.05)	3.27 (0.70)	0.00 (0.00)	0.34 (0.02)	0.32 (0.16)	4.48 (0.18)	

고추의 초장, 뿌리, 열매의 미량원소 분석 결과를 Table 92에 나타냈다. Ca 의 경우 화학비료 처리구와 생초 미생물 혼합액비 처리구에서 차이가 유의미하지 않았다. 미량원소의 양이 생초 미생물 혼합액비 처리구에서 높은 함량을 보이고 있으며, 특히 열매에서의 함량이 화학비료 처리구보다 약 2배 차이가 났다. 이러한 결과는 고추의 총질소 총탄소 함량과 비슷한 경향을 보이고 있는데, 생초 미생물 혼합액비의 영양성분이 작물의 성장, 특히 열매에 영향을 미치고 있음을 알 수 있었다.

Table 93. Ca, Mg, Na, and K of tomato. The values in parentheses indicate standard deviation(n=3).

		Tomato							
Day	Chemical Fertilizer				MLF 1.0x				
	Ca	Mg	Na	K	Ca	Mg	Na	K	
	(g plant <sup>-1</sup> )								
Shoot	0.07 (0.04)	0.77 (0.53)	2.71 (1.76)	2.49 (1.64)	0.07 (0.02)	0.80 (0.14)	3.05 (0.33)	2.37 (0.34)	
Root	0.12 (0.05)	0.01 (0.01)	0.03 (0.01)	0.18 (0.09)	0.09 (0.01)	0.01 (0.00)	0.02 (0.00)	0.11 (0.01)	
Fruits	0.02 (0.01)	0.12 (0.03)	0.03 (0.03)	2.36 (0.61)	0.01 (0.01)	0.04 (0.07)	0.10 (0.04)	1.96 (0.32)	

방울토마토의 초장, 뿌리, 열매의 미량원소 분석결과는 Table 93에 나타내었다. 방울토마토는 생초 미생물 혼합액비 처리구와 화학비료 처리구가 비슷한 함량으로 분석되었다. 이러한 결과는 방울토마토의 작물 생육 특성을 나타낸 Table 88과 열매의 특성 결과의 Table 90에서 보여준 결과와 같은 양상이었다. 생초 미생물 혼합액비를 질소질 비료로서 방울토마

토를 재배에 사용할 경우 화학비료와 대등한 미량원소 함량 가지는 것을 확인할 수 있었다.

(7) 중질소(<sup>15</sup>N) 표지 생초미생물 혼합액비의 토양 및 작물에서의 회수율

안정성 동위원소를 이용한 실험에서는 표지된 비료를 시비 후, 식물체가 흡수하거나 토양에 남아 있는 양을 측정하게 된다. 이때 먼저 비료에서 유래한 질소의 비율(NDFP, Nitrogen Derived from Fertilizer)을 계산해야 한다. 이 비율은 보통 퍼센트(%)로 나타내며, 자연 존재비로 존재할 경우 다음과 같은 식을 통해서 구한다.

$$NDFP(\%) = \frac{{}^{15}\text{N atom}(\%) \text{ excess of sample}}{{}^{15}\text{N atom}(\%) \text{ excess of fertilizer}}$$

그리고 작물이 흡수한 질소 또는 토양에 잔류하는 질소의 양은 다음과 같이 구한다.

$$NDFP(g N \text{ plant}^{-1}) = NDFP(\%) \times TN(g N \text{ plant}^{-1})$$

$$NDFP(g N \text{ kg}^{-1} \text{ soil}) = NDFP(\%) \times TN(g N \text{ kg}^{-1} \text{ soil})$$

따라서 처리한 비료에 대한 회수율은 다음과 같이 구한다.

$$\text{Recovery} (\%) = \frac{NDFP (g N)}{\text{Nitrogen fertilizer} (g N)}$$

중질소(<sup>15</sup>N) 표지 생초 미생물 혼합액비의 투입량에 따른 고추와 방울토마토의 회수율(%) 과 토양에서의 회수율(%)를 <sup>15</sup>N atom (%) 분석결과를 바탕으로 계산하였다. 결과는 Table 94과 Table 95, Fig 177에 나타내었다.

Table 94. <sup>15</sup>N atom (%) and <sup>15</sup>N recovery of pepper and tomato. The values in parentheses indicate standard deviation (n=3).

Day	Pepper		Tomato	
	<sup>15</sup> N atom (%)	Recovery (%)	<sup>15</sup> N atom (%)	Recovery (%)
Shoot	0.39	2.51	0.39	18.76
	(0.01)	(1.49)	(0.01)	(8.15)
Root	0.39	0.44	0.39	1.04
	(0.01)	(0.21)	(0.00)	(0.38)
Fruits	0.40	15.02	0.40	7.57
	(0.00)	(6.09)	(0.01)	(1.96)
Total	1.18	17.97	1.18	27.37
	(0.02)	(7.79)	(0.02)	(10.49)

고추의 각 부위별 회수율(%)은 초장에서 2.51, 뿌리에서 0.44, 열매에서 15.02로 분석되었다. 따라서 중질소( $^{15}\text{N}$ ) 표지 생초미생물 혼합액비의 고추의 식물체 내 회수율(%)은 약 17.8였다. 이는 작물의 성장에 따라 질소 양분이 열매에 집중된다는 다른 연구 결과와 동일하였다. 또한, 고추를 재식한 컬럼 내 토양의 중질소( $^{15}\text{N}$ ) 표지 생초미생물 혼합액비 유래의 무기태 질소는 암모늄태 질소( $\text{NH}_4^+-\text{N}$ )가 표토에서 0.08%, 심토에서 0.06%였으며, 질산태 질소( $\text{NO}_3^--\text{N}$ )는 표토에서 2.28%, 심토에서 1.40%로 분석되었다. 토양 내의 중질소( $^{15}\text{N}$ ) 표지 생초미생물 혼합액비 유래의 유기질소는 표토에서 7.15%, 심토에서 6.08%의 함량을 나타냈다. 이와 같은 결과를 통해 중질소( $^{15}\text{N}$ ) 표지 생초미생물 혼합액비의 유기질소가 토양에 상당량 잔류하고 있음을 알 수 있었다.

방울토마토 중질소( $^{15}\text{N}$ ) 회수율은 고추와는 다른 경향을 보였다(Table 94). 작물의 각 부위별 회수율(%)이 초장에서 18.76, 뿌리에서 1.04 열매에서 7.57로 열매보다는 초장에서 높은 함량을 보였다. 보통 농가에서 열매의 개수 혹은 부피를 증가시키기 위해 초장을 일정한 길이로 자르며 관리한다. 하지만 본 실험에서는 액비에서 유래된 중질소( $^{15}\text{N}$ )를 식물의 생육에 반영하여 추적하기 위해 초장을 자르지 않고, 그대로 생육하였다. 따라서 본 실험에서 초장에서 질소 회수율이 열매보다 더 높게 나온 이유는 식물이 열매 증가보다 길이생장을 하였기 때문이라 생각된다.

Table 95.  $^{15}\text{N}$  concentration and recovery of pepper cultivated silt clay loam. The values in parentheses indicate standard deviation (n=3).

	Total Nitrogen		Ammonium nitrogen ( $\text{NH}_4^+-\text{N}$ )		Nitrate nitrogen ( $\text{NO}_3^--\text{N}$ )	
	$^{15}\text{N}$ atom (%)	Recovery (%)	$^{15}\text{N}$ atom (%)	Recovery (%)	$^{15}\text{N}$ atom (%)	Recovery (%)
Pepper						
Surface soil	0.41 (0.03)	7.15 (5.54)	0.40 (0.06)	0.08 (0.10)	0.42 (0.03)	2.28 (1.09)
Subsoil	0.41 (0.01)	6.08 (2.50)	0.38 (0.01)	0.06 (0.06)	0.42 (0.02)	1.40 (0.19)
Total	0.82 (0.04)	13.23 (6.32)	0.79 (0.07)	0.12 (0.16)	0.83 (0.05)	3.67 (1.28)
Tomato						
Surface soil	0.45 (0.02)	16.22 (4.96)	N.D*	N.D*	0.48 (0.05)	1.92 (1.49)
Subsoil	0.41 (0.02)	6.49 (1.72)	N.D*	N.D*	0.49 (0.11)	0.70 (0.91)
Total	0.86 (0.01)	22.72 (3.92)	N.D*	N.D*	0.97 (0.16)	2.62 (2.40)

방울토마토를 식재한 컬럼의 토양에서 중질소( $^{15}\text{N}$ ) 표지 생초미생물 혼합액비 유래 암모늄태 질소( $\text{NH}_4^+-\text{N}$ )는 검출되지 않았다(Table 95). 이는 토양의 무기태 질소( $\text{NH}_4^+-\text{N}$ ,

NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 함량을 나타낸 결과와 마찬가지로 작물의 생육 시기에 따른 요구량과 질산화 과정의 결과로 사료된다. 방울토마토를 식재한 컬럼 내의 중질소(<sup>15</sup>N)의 표지 생초미생물 혼합액비 유래 유기 질소는 표토에서 16%, 심토에서 6.5% 함량으로 고추를 재배한 토양의 함량보다 높았다. 이를 통해 방울토마토를 식재한 토양에서는 관비된 액비가 무기태 질소(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N)로 전환되는 비율이 고추보다 높지 않음을 알 수 있었다. 따라서 생초미생물 혼합액비를 사용할 경우 작물의 특성을 고려한 사용량이 요구됨을 알 수 있었다.

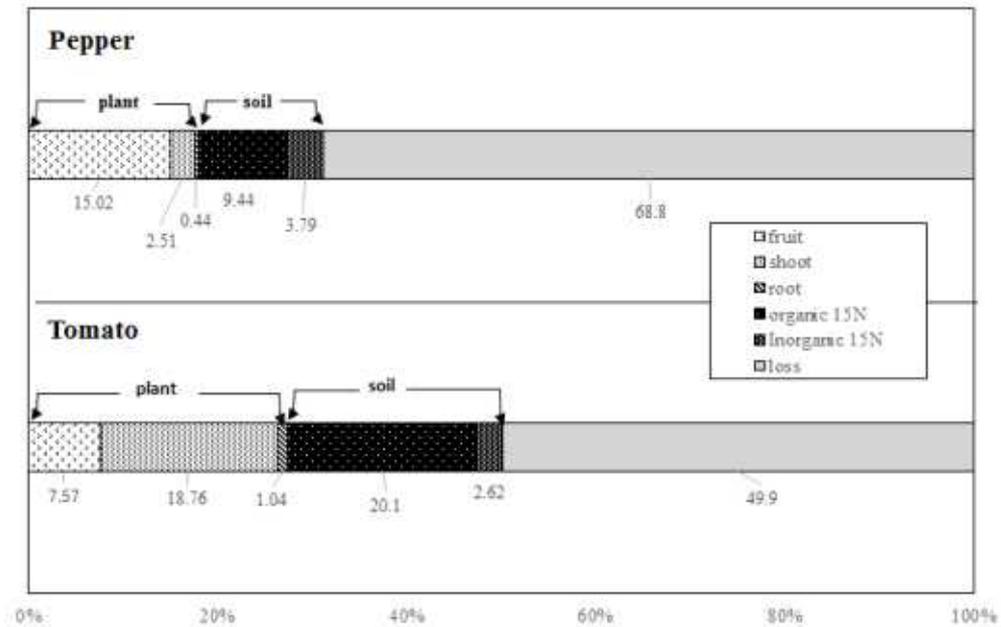


Fig 177. <sup>15</sup>N recovery of pepper and tomato.

본 연구는 <sup>15</sup>N atom (%)를 잔디에 표지하여 생초 미생물 혼합액비로부터 유래되는 질소를 추적하여 질소질 비료 대체제로서의 가능성을 확인하고자 하였다. 잔디의 중질소(<sup>15</sup>N) 표지 비율이 낮아 중질소(<sup>15</sup>N) 표지 생초미생물 혼합액비의 질소질 성분의 식물체 흡수량을 파악하는데 어려움이 있었다. 하지만 잔디(생초)를 이용한 미생물 혼합 액비 사용으로 작물에서의 생장을 평가하였을 때, 화학비료 처리구와 대등한 결과를 볼 수 있었다. 또한, 액비의 총질소 대부분이 무기태 질소(NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N)로 존재하는 것으로 보아 액비의 질소비료 대체제로서 가능성을 기대할 수 있었다. 따라서 생초미생물 혼합액비를 작물의 특성에 따라 적절하게 사용한다면 질소질 화학비료를 대체할 수 있을 것으로 사료된다.

## 제 4 절 생초미생물 혼합액비 시용에 따른 작물 병해방제 및 성장 평가

### 1. 포트에서 고추, 토마토의 생초미생물 혼합액비 시용에 따른 병해방제 및 성장 평가 가. 포트에서 고추역병 병해방제 및 성장평가

고추작물 실험을 위해 포트(600 cm<sup>3</sup>)에 600g의 혼합토(soil: vermiculite: compost; 2:1:1%, v:v:v)를 넣은 후 4주된 고추를 옮겨 심고 1, 2, 3, 4주째에 생초미생물 혼합액비, 생초액, 복합비료, 복합비료+합성농약을 각각 포트당 50 ml씩 처리하였다. 처리 5주째에 고추역병 (*Phytophthora capsici* (KACC no. 40483))균의 유주자(5 x 10<sup>5</sup> 유주자/ml) 5ml를 접종하였다. 병원균 접종 후 0, 2, 6, 10, 15일 실험기간 동안 생체 및 견체중, 뿌리치사율, 병해방제 효소, 항산화효소등을 조사하였다. 실험 온도 조건은 24°C, 광 조건은 12,000 lux 및 광 주기는 16시간 간격으로 하였다. 본 실험의 결과의 통계처리는 SAS 프로그램 9.1 버전 (2006)을 사용하여 5% 수준에서 Turkey's Studentized Range Test를 실시하였다.

#### (1) 실험의 설계

처리구 1 (G): 생초액 (Grass media)

처리구 2 (GM): 생초미생물 혼합액비(Grass media + Microorganism)

처리구 3 (F): 복합비료 (Fertilizer, 21:17:17, 3 g/L)

처리구 4 (FF): 합성농약(Fungicide, 캐스팅, (주)동방아그로, 1 g/L) + 복합비료, (Fertilizer + Fungicide)



Fig 178. 고추작물 포트 실험 모습

Table 96. 생초미생물 혼합액비 조성 표

항목	사용량 (g/L)
생초(Grass)	178
요소(46% 질소)	2.8
인산(20% P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	8.8
염화칼륨(60% K <sub>2</sub> O)	1.6
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1
Yeast extract	0.1
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.05
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.06
게껍질 분말(Chitin powder)	0.8
젤라틴 분말(Gelatin powder)	0.2

위 Table 96의 생초액 조성에 *Paenibabillus ehimensis* KWN38를 접종하여 5일 동안 30°C에서 생초미생물 혼합액비를 배양한 뒤 실험에 사용하였다.

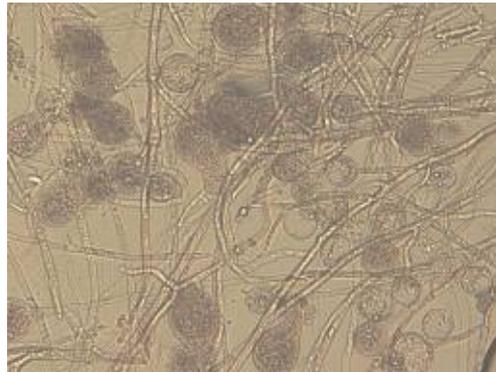


Fig. 179. *Phytophthora capsici* 유주자(zospore) 모습.  
위상차현미경 (BX 41, Olympus) 150배.

(2) Root mortality 조사

조사결과 Fig. 101에서 보는바와 같이 병원균 감염 후 시간이 지남에 따라 처리구간 뿌리 치사율이 차이를 보였다. 마지막 15일째에서 FF 처리구가 가장 뿌리 치사율이 낮았으나, GM 처리구와 통계적 유의성을 보이지 않았고, 그 다음으로 F와 G 처리구 순으로 나타났다. GM 처리구는 FF 리구와 통계적 유의성을 보이지 않았을 뿐만아니라, F와 G 처리구의 치사율을 비교 했을 때 상당한 차이가 있음이 조사되었다. 이는 GM 처리구가 병원균을 억제하는데 효과적인 작용을 했을 것으로 사료되었다 (Fig. 180-182). 또한 Fig. 183에서 보는 바와같이 병원균 감염 15일째 G 와 F 처리구에서 고추 잎이 시드는 병징이 많이 나타났다. 하지만 GM에서는 거의 병징이 나타나지 않았다.

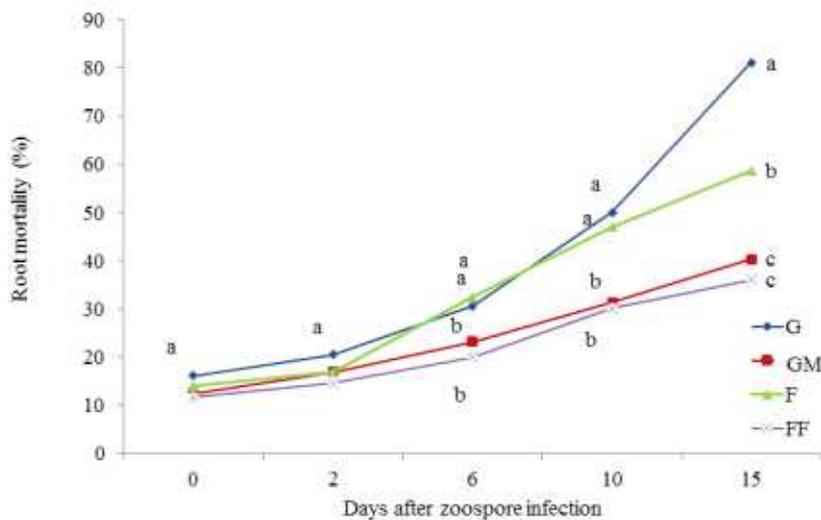


Fig. 180. 날짜에 따른 고추 뿌리 치사율.  
G: 생초액, GM: 생초미생물혼합 액비, F: 복합비료, FF: 합성농약+복합비료.

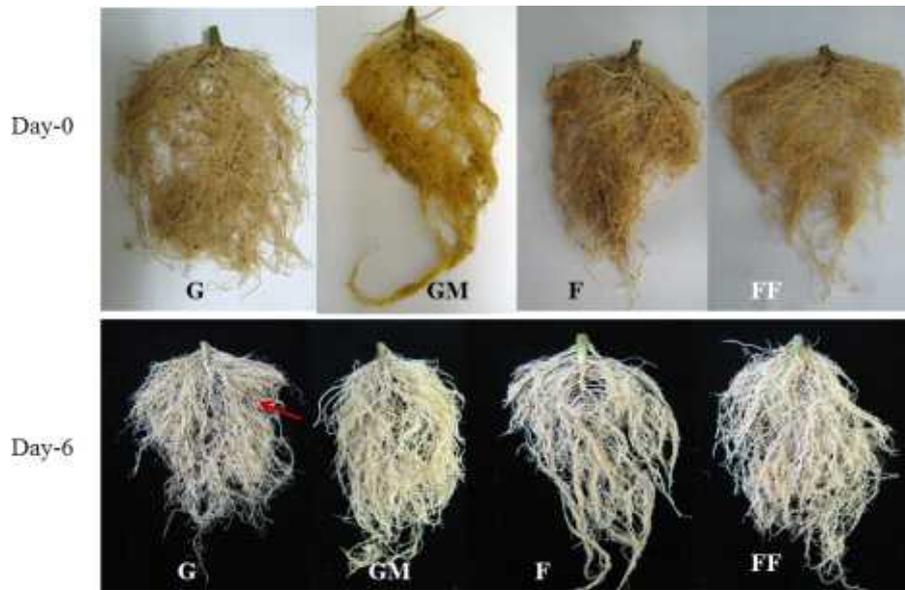


Fig. 181. 유주자(Zoospore of *P. capsici*) 접종 0, 6일째 고추작물의 뿌리 치사 모습. G: 생초액, GM: 생초미생물혼합 액비, F: 복합비료, FF: 합성농약+복합비료.



Fig. 182. 유주자(Zoospore of *P. capsici*) 접종 15주째 고추작물 뿌리 치사 모습. G: 생초액, GM: 생초미생물혼합 액비, F: 복합비료, FF: 합성농약+복합비료. G 및 F 처리구에 검은 화살표로 표시된 부분이 고추 역병균의 감염으로 인한 뿌리 괴사 모습.

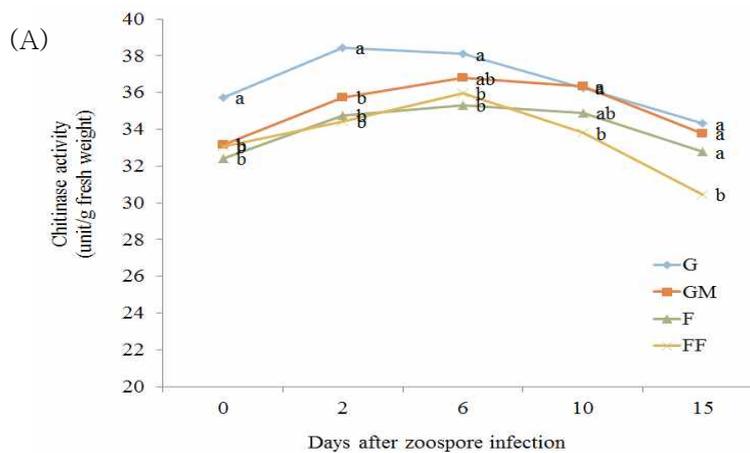


Fig. 183. 유주자(Zoospore of *P. capsici*) 접종 15일째 고추작물의 모습.  
 G: 생초액, GM: 생초미생물혼합 액비, F: 복합비료, FF: 합성농약+복합비료

(3) 생초미생물 혼합액비에 의해 유도되는 병해방제 효소 조사

(가) 고추작물체 내의 병해방제효소 측정

고추작물체 내의 병해방제효소 chitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase, cellulase를 조사하기위해 병원균(*Phytophthora capsici* zoospore) 감염 직후부터 15일까지 측정 하였다. Fig.184(A)에서 보는바와 같이 chitinase 활성은 초기 병원균 감염 후 G 처리구에서는 2일까지, GM, F, FF 처리구는 6일까지 증가 하였으며, 그 후 감소하는 것으로 조사되었다. 마지막 조사일 인 15일째는 G, GM, F 처리구간 통계적 유의성이 보이지 않았고, FF 처리구와의 유의성만 조사되었다. Fig. 184(B)에서 보는바와 같이 glucanase 활성은 초기 병원균 감염 후 G와 F 처리구에서는 2일까지 증가하다 감소하였고, GM 및 FF 처리구에서는 0일째부터 15일째 까지 계속 감소하였다. Cellulase에 대한 활성은 Fig.184(C)에서 보는바와 같이 조사 15일째 FF 처리구가 가장 높았고, GM 처리구가 가장 낮은 활성을 나타내었다.



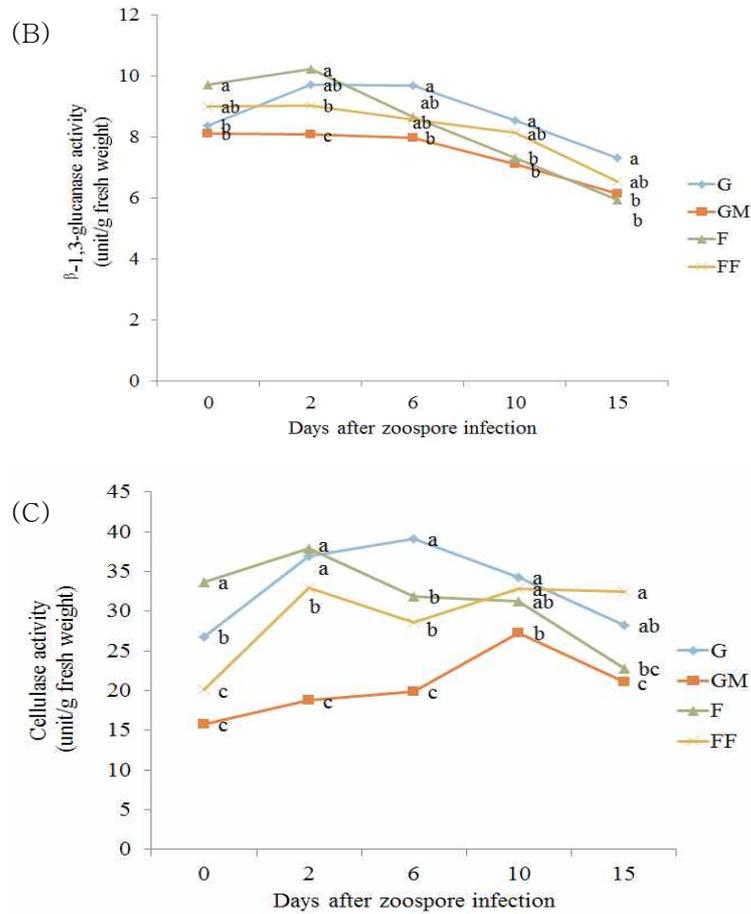


Fig. 184. 고추작물 잎의 병해방제효소 chitinase (A),  $\beta$ -1,3-glucanase(B) 및 cellulase(C) 활성. G: 생초액, GM: 생초미생물혼합 액비, F: 복합비료, FF: 합성농약+복합비료.

(나) 고추 뿌리의 병해방제효소 측정

고추 뿌리에서의 병해방제효소 chitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase, cellulase를 조사하기 위해 병원균(*Phytophthora capsici* zoospore) 감염 직후부터 15일까지 측정 하였다. Fig. 185(A)에서 보는바와 같이 chitinase 활성은 초기 병원균 감염 후 모든 처리구에서 6일까지 증가하였다. 그 후 처리구간 차이를 보였다. 마지막 조사일 인 15일째는 GM 처리구에서 통계적 유의성이 나타났고, 가장 높은 활성이 보였다. 하지만 F와 FF간의 유의성은 없었고, G 처리구에서 가장 낮은 활성을 보였다. Glucanase 활성은 Fig. 185(B)에서 보는바와 같이 초기 병원균 감염 후 증가하다 감소하였고, 15일째에 FF 처리구가 다른 처리구에 비하여 가장 낮은 활성을 나타냈고, 통계적 유의성을 보였다. Cellulase에 대한 활성은 Fig. 185(C)에서 보는바와 같이 감염 초기부터 지속적으로 활성이 낮아 졌으며 조사 15일째에 모든 처리구가 초기 감염 처리구 보다 낮은 활성을 나타내었다. 결과적으로 chitinase 및 glucanase 활성이 GM 처리구가 다른 처리구에 비해 높은 것으로 보아 생초미생물 혼합액비 처리가 뿌리에서 이러한 효소 발현을 증가 시키므로 병발생 억제에 영향을 미친 것으로 판단되었다.

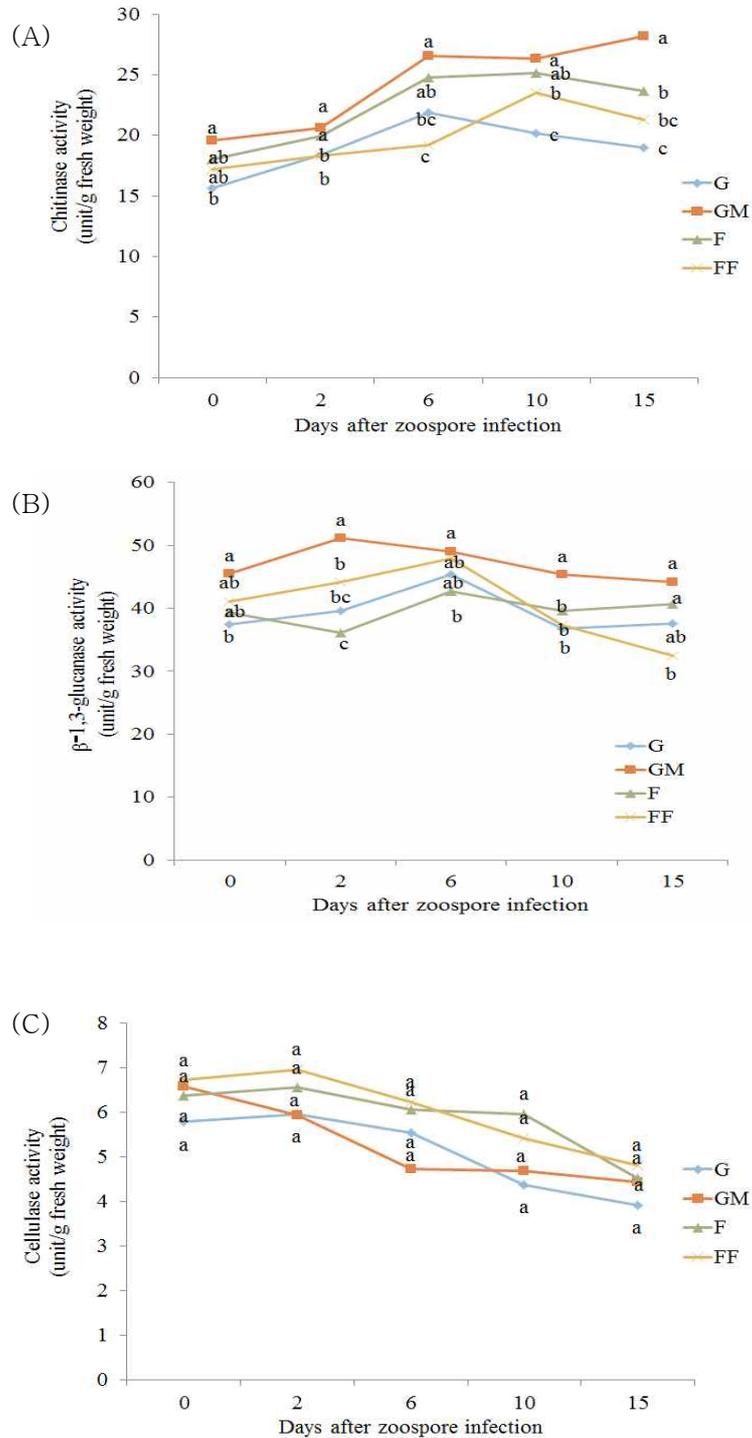


Fig. 185. 고추작물 뿌리의 병해방제효소 chitinase(A), glucanase (B) 및 cellulase(C) 활성.

G: 생초액, GM: 생초미생물혼합 액비, F: 복합비료, FF: 합성농약+복합비료.

(다) 토양 내에서의 병해방제효소 활성 조사

토양 내에서의 병해방제효소 chitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase, cellulase를 조사하기위해 병원균(*Phytophthora capsici* zoospore) 감염 직후부터 15일까지 측정 하였다. Fig. 186(A)에서 보는바와 같이 chitinase 활성은 초기 병원균 감염 후 모든 처리구에서 10일째 가장

높은 활성을 보였고, 15일째는 모든 처리구가 10일째 보다 낮은 활성을 보였다. Glucanase 활성은 Fig. 186(B)에서 보는바와 같이 GM 및 FF 처리구는 6일째까지 증가하다 10일째까지 급격히 감소하여 15일째까지 완만히 감소함을 보였다. F와 G 처리구는 2일째까지 증가하여 최고의 활성을 보였고, 그 후 감소하였다. Cellulase에 대한 활성은 Fig. 186(C)에서 보는바와 같이 감염 초기부터 모든 처리구가 15일째까지 큰 변동폭없는 효소 활성을 보였다. 결과적으로 chitinase, glucanase 및 cellulase 활성이 GM 처리구가 다른 처리구에 비해 높은 것으로 보아 생초미생물 혼합액비 처리로 인해 토양에서의 이러한 효소 발현을 증가 시킨 것으로 사료되며 병발생 억제에 영향을 미친 것으로 판단되었다.

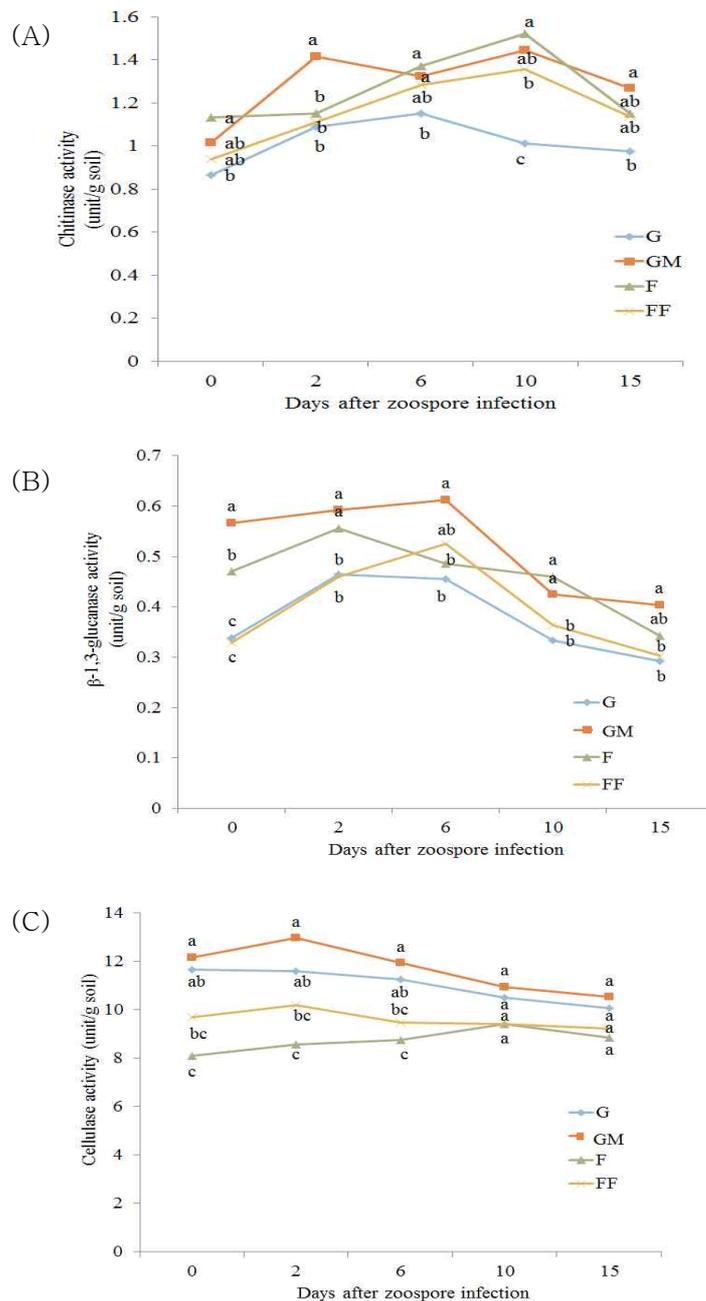


Fig. 186. 토양 내 효소 chitinase(A), glucanase (B) 및 cellulase(C) 활성. G: 생초액, GM: 생초미생물혼합액비, F: 복합비료, FF: 합성농약+복합비료.

(4) 뿌리와 줄기의 생체 및 건물중 조사

생초미생물 혼합액비의 고추작물에 대한 효과를 조사하기 위하여 G(생초액), GM(생초미생물 혼합액비), F(복합비료), FF(합성농약+복합비료)를 각각 포트에 처리하였다. 처리한 결과 Fig. 187에서 보는바와 같이 조사 1주부터 4주까지 처리구간 통계적 유의성은 보이지 않았다. 하지만 5주 및 6주째에 G 처리구와 GM 처리구간의 유의적 차이를 보였다. 또한 G 처리구를 제외한 GM, F 및 FF와 통계적 유의성은 나타나지 않았지만, 6주째 GM 처리구가 가장 높았다. 이는 GM 처리구가 병원균 감염(*Phytophthora capsici* zoospore)을 효과적으로 막았을 뿐만아니라, 작물의 영양 공급에서도 효과가 있는 것으로 판단되었다 (Fig. 188).

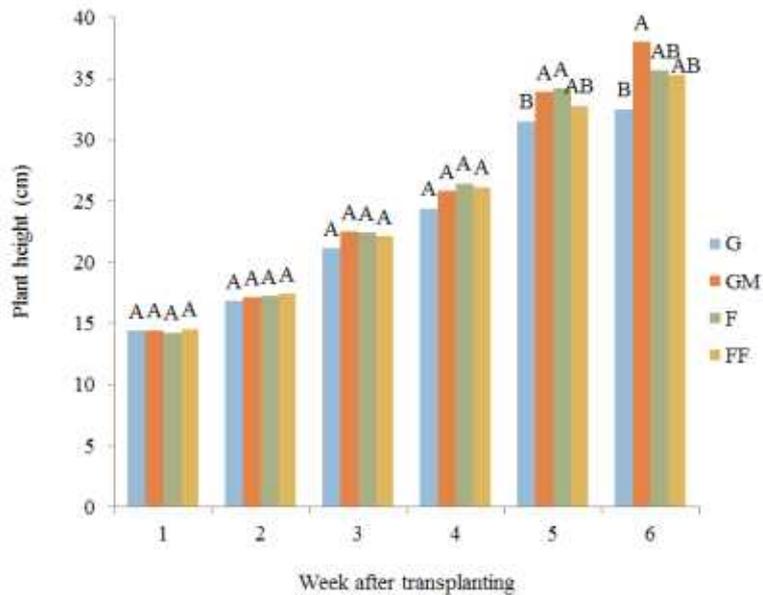


Fig. 187. 생초미생물 혼합액비의 고추작물 생육 영향 조사.

G: 생초액, GM: 생초미생물 혼합액비, F: 복합비료, FF: 합성농약+복합비료



Fig. 188. 고추작물 생육 4주 및 5주째 모습.

G: 생초액, GM: 생초미생물 혼합액비, F: 복합비료, FF: 합성농약+복합비료

□ 고추작물의 뿌리 및 줄기 중량 조사

고추작물의 뿌리 및 줄기 무게는 병원균(*Phytophthora capsici* zoospore) 감염 직후부터 15일까지 측정 하였다. Table 97에서 보는 바와같이 15일째에 줄기 생체중은 모든 처리구 중 GM 처리구가 가장 높았다. 하지만 F 및 FF 처리구와는 통계적 유의성은 없었다. 줄기 전체중에서는 G와 GM간의 유의성이 없었고, GM이 F 및 FF 처리구와 유의성을 보였다. 뿌리 생체중과 전체중의 결과는 줄기 생체중 및 전체중의 결과와 유사하게 조사되었다. 이러한 결과를 볼 때 GM 처리구에서 작물체내 영양분 축적이 더 많이 일어난 것으로 판단되어졌다.

Table 97. 고추작물의 뿌리 및 줄기의 생체중 및 전체중.

Day after zoospore infection	Treatment	Shoot weight (g)		Root weight (g)	
		Fresh	Dry	Fresh	Dry
0	G	21.33	2.46	5.21	0.58
	GM	22.17	2.66	5.79	0.66
	F	20.84	2.44	5.85	0.64
	FF	21.28	2.52	6.21	0.76
	LSD				
2	G	20.16 B	2.28 B	5.24	0.57
	GM	21.84 AB	2.56 AB	5.78	0.66
	F	21.93 AB	2.49 AB	5.52	0.56
	FF	23.7 A	2.7 A	6.22	0.63
	LSD	3.37	0.317		
6	G	23.67 B	2.77 B	6.18	0.6
	GM	26.99 A	3.19 A	6.96	0.82
	F	25.22 AB	2.98 AB	6.27	0.67
	FF	25.54 AB	3.13 AB	6.5	0.63
	LSD	2.76	0.385		
10	G	28.68 B	3.50 B	8.21 B	0.78
	GM	32.94 A	4.15 A	8.77 A	0.88
	F	30.26 AB	3.92 AB	8.22 AB	0.8
	FF	30.05 AB	3.89 AB	8.28 AB	0.76
	LSD	4.15	0.55	0.55	
15	G	17.44 B	4.38 AB	7.02 B	0.71 AB
	GM	38.46 A	4.82 A	9.18 A	0.93 A
	F	28.88 AB	4.00 B	7.29 AB	0.68 B
	FF	32.56 AB	4.10 B	7.85 AB	0.74 AB
	LSD	18.12	0.55	2.07	0.18

\*Calculated mean values are from three replicates. Means with the same letter are not significantly different at P=0.05 when compared by LSD. G: 생초액, GM: 생초미생물혼합 액비, F: 복합비료, FF: 합성농약+복합비료.

나. 포트에서 토마토 시들음병 병해방제 및 성장평가

생초미생물 혼합액비의 토마토 작물체에 대한 병해 방제 및 생육 영향에 대한 실험을 위해 *Fusarium oxysporum* (KACC no. 40038)의 분생포자(conidia)는 *F. oxysporum*을 potato dextrose agar (PDA) 배지에 접종 후 26°C에서 7일간 배양한 다음 멸균 칼로 적당히 자른 후 Whatman No. 2 필터 옮겨 물을 부어주며 포자를 모은 다음 사용하였다. 토마토 작물의 병원균 감염은 토마토 묘목 뿌리를 1cm정도 자른 후 앞서 모은 포자( $2 \times 10^5$  포자/ml)에 2분동안 담궈 감염시켰다. 이 후 포자 감염된 토마토 묘목을 포트 (600 cm<sup>3</sup>; soil: vermiculite: compost; 2:1:1%, v:v:v)로 옮겨 심어 실험을 실시하였다. 토마토 묘목을 옮겨심기 전 준비된 포트 토양에 각각의 처리구를 1회 처리하였다. 또한 정식 후 1주, 2주째에 각각의 처리구 별로 처리하였다. 본 실험의 결과의 통계처리는 SAS 프로그램 9.1 버

전 (2006)을 사용하여 5% 수준에서 Turkey's Studentized Range Test를 실시하였다. 실험은 4반복구에 4번 시료를 채취하여 결과를 도출 하였다.



Fig. 189. 병원체(*Fusarium oxysporum conidia*) 감염 모식도

(1) 실험의 설계

처리구 1 (F): 비료액 (Fertilizer, 21:17:17, 3 g/L)

처리구 2 (G): 생초액 (Grass media)

처리구 3 (GP): 생초미생물 혼합액비 (Grass media + *P. ehimensis* KWN38)

처리구 4 (GSF): 생초액+합성농약

(Grass medium + Synthetic fungicide; 리도참, 정보화학주식회사, 1 g/L)



Fig. 190. 병원체 감염 진행 상태



Fig. 191. 실험구 모습.

G: 생초액, GP: 생초미생물 혼합액비, GSF: 생초액+합성농약, F: 비료.

(2) 발병률 및 심각도

토마토작물의 발병율은 병원균(*Fusarium oxysporum* conidia) 감염 10째부터 24일까지 2일간격으로 측정 하여 총 7번의 조사를 하였다. 조사 방법은 총 9개 포트를 대상으로 최초 잎이 노랗게 변한 것을 병징의 출현으로 보고, 병징이 발견된 작물의 수를 조사 후 백분율로 환산하였다. Fig. 192(A)와 같이 조사 결과 F와 G 처리구는 조사 12일째부터 24일까지 지속적으로 발병율이 증가하였다. 하지만 GP 처리구에서는 18일째까지 발병을 하지 않았고 20일부터 24일째 까지 발병하여 40%정도의 발병율을 보였다. GSF 처리구에서는 22일째까지 발병을 하지 않았고 24일째 발병하여 20%정도의 발병율을 보였다. 하지만 GP와 GSF 처리구간의 통계적 유의성은 나타나지 않았으므로 생초미생물혼합액비의 병발생 억제 효과가 효과적인 것을 판단되었다. 토마토작물의 병 발생 심각도는 잎이 노랗게 변한 것을 병징의 발생으로 보고 발병 잎의 수를 조사 후 백분율로 환산하였다. Fig. 192(B)와 같이 조사 결과 12일째까지 모든 처리구에서 병 발생 심각도는 보이지 않았다. 하지만 F와 G 처리구는 조사 14일째부터 24일까지 지속적으로 병 발생 심각도가 증가하였다. GP 처리구와 GSF 처리구에서의 병 발생 심각도는 발병율과 유사한 패턴을 보였다. GP 처리구에서는 18일째까지 병 심각도는 보이지 않았고 20일부터 24일째 까지 증가하여 15%정도의 심각도를 보였다. GSF 처리구에서는 22일 이 후부터 시작하여 24일째까지의 심각도는 5%정도 미만으로 조사되었다.

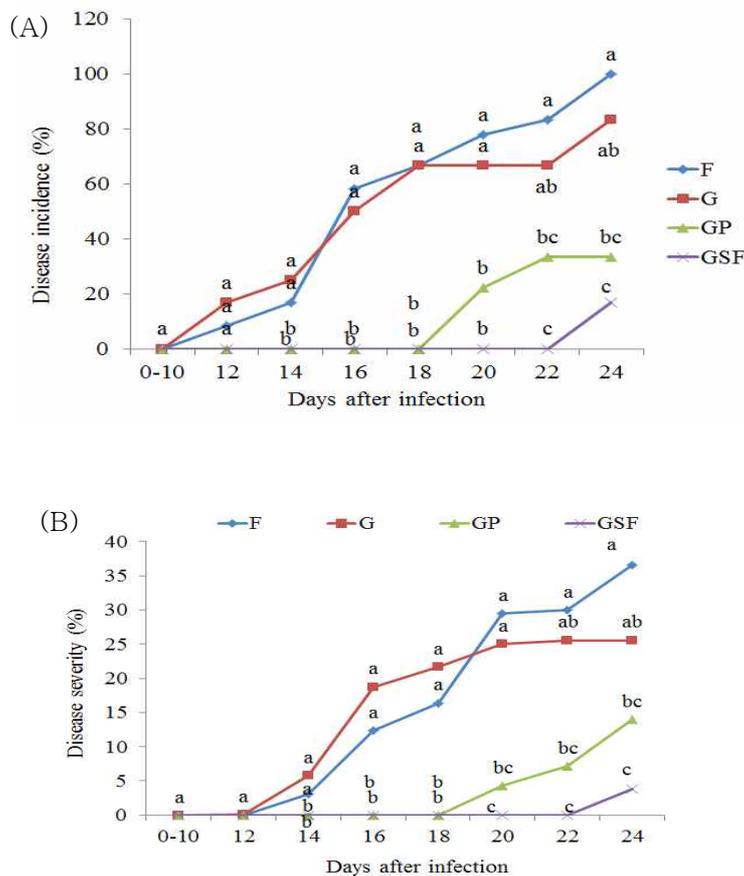


Fig.192. 시들음병 발병율 및 심각도.

G: 생초액, GP: 생초미생물 혼합액비, GSF: 생초액+합성농약, F: 비료.



Fig. 193. 토마토 줄기 감염 상태 모습.

G: 생초액, GP: 생초미생물 혼합액비, GSF: 생초액+합성농약, F: 비료.

\*GP와 GSF 처리구의 토마토 내부는 하얀색대두리가 있는 건강한 상태이지만, G와 F 처리구는 까맣게 세포가 죽어 있는 것을 볼 수 있음.

### (3) Root mortality 조사

토마토작물의 뿌리 치사율은 병원균(*Fusarium oxysporum* conidia) 감염 15일부터 25일까지 조사 하였다. Fig. 194과 같이 조사 결과 조사 15일째부터 25일째까지 모든 처리구에서 뿌리 치사율이 증가함을 보였지만, F 및 G 처리가 GP 및 GSF 처리구보다 뿌리 치사율이 높게 나타났다. 뿌리 치사율은 F, G, GP, GSF 순으로 나타났다. 결과적으로 GP 처리구가 비록 GSF 처리구보다 뿌리 치사율이 높았지만 F와 G 처리구보다 낮게 나온 것으로 보아 GP의 처리로 뿌리 치사율을 상당히 억제 할 수 있는 것으로 사료된다. 이는 생초미생물 혼합액비(GP)의 배양과정에서 미생물에 의해 만들어지 대사산물과 미생물의 직접적인 영향인 것으로 판단되어졌다.

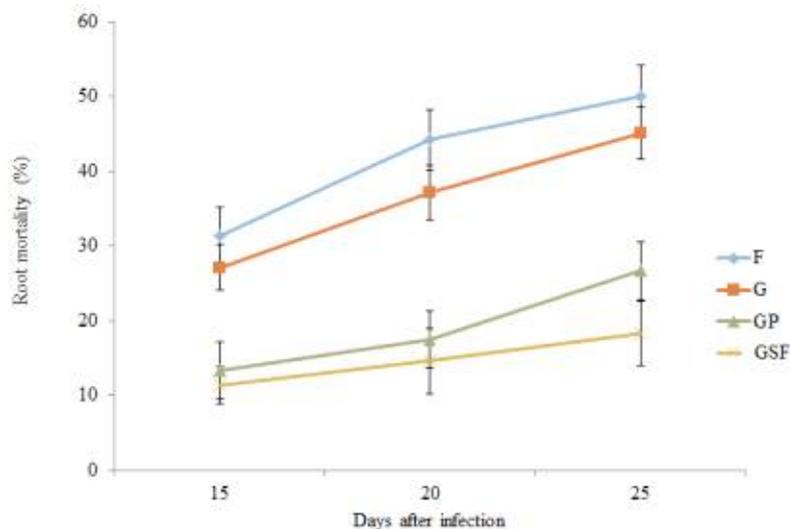


Fig. 194. 토마토 뿌리 치사율.

G: 생초액, GP: 생초미생물 혼합액비, GSF: 생초액+합성농약, F: 비료.

(4) 생초미생물 혼합액비에 의해 유도되는 항산화 효소 조사

(가) 토마토 작물 잎에서의 Peroxidase 활성 및 Polyphenol oxidase 활성

병해방제효소인 Peroxidase 활성 및 Polyphenol oxidase 활성의 조사는 병원균 (*Fusarium oxysporum* conidia) 감염 15일부터 25일까지 3번에 걸쳐 토마토작물의 잎을 채취하여 조사하였다. Fig. 195에서 보는바와 같이 조사 결과 Peroxidase 활성 및 Polyphenol oxidase 활성은 조사 25일째 F와 G 처리구간이 유사한 결과를 보였고, GP와 GSF 처리구간이 유사한 값을 나타냈다. Peroxidase 활성 및 Polyphenol oxidase 활성 모두 F, G, GP, GSF 순으로 높게 나타났다.

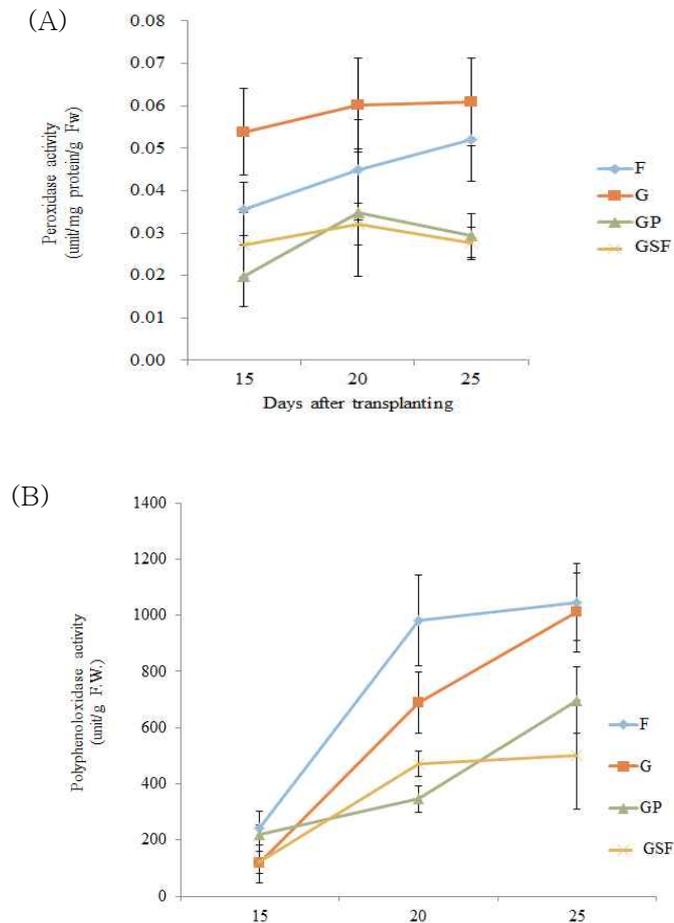


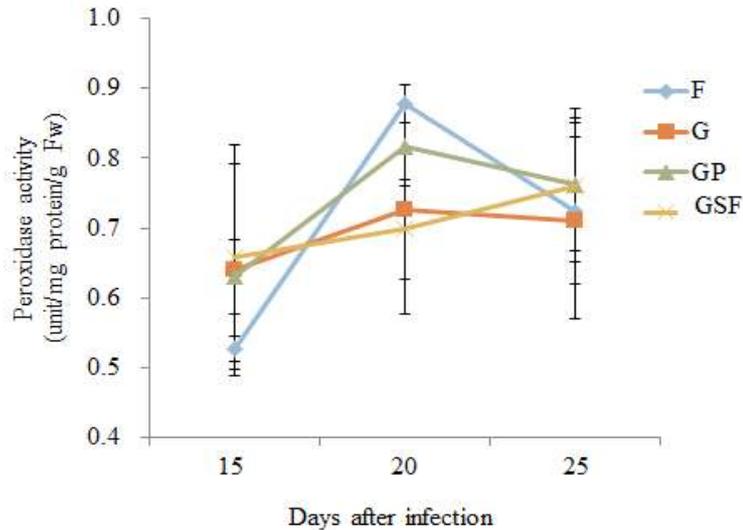
Fig. 195. 토마토 잎의 peroxidase activity 및 polyphenol oxidase activity. G: 생초액, GP: 생초미생물 혼합액비, GSF: 생초액+합성농약, F: 비료.

(나) 토마토작물 뿌리에서의 Peroxidase 활성 및 Polyphenol oxidase 활성

병해방제효소인 Peroxidase 활성 및 Polyphenol oxidase 활성의 조사는 병원균 (*Fusarium oxysporum* conidia) 감염 15일부터 25일까지 3번에 걸쳐 토마토작물의 뿌리를 채취하여 조사하였다. Fig. 196에서 보는바와 같이 조사 결과 Peroxidase 활성은 GSF 처리구를 제외한 나머지 처리구에서 조사 15일째부터 20일째까지 증가하다 감소하는 경향을 보였다. 비슷하게 모든 처리에서 Polyphenol oxidase 활성이 조사 15일째부터 20일째까지 증가하다 감소하는 경향을 보였다. Peroxidase 활성은 25일째 모두 처리구가

근사한 값을 보였다. Polyphenol oxidase 활성은 GSF 처리구가 다른 처리구에 비해 상당히 낮게 나타났다.

(A)



(B)

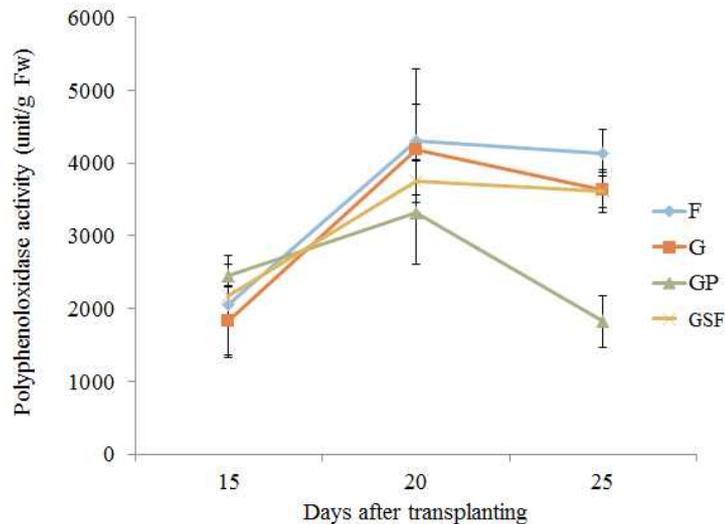


Fig. 196. 토마토 뿌리의 Peroxidase activity 및 Polyphenol oxidase activity. G: 생초액, GP: 생초미생물 혼합액비, GSF: 생초액+합성농약, F: 비료.

#### (5) 뿌리와 줄기의 생체 및 건물중 조사

토마토작물의 잎 및 뿌리 무게는 병원균(*Fusarium oxysporum* conidia) 감염 직후부터 25일까지 측정 하였다. Tabel 98에서 보는 바와 같이 25일째에 잎 생체중은 모든 처리구 중 F, GP, GSF 세 처리구 가운데 GP 처리구가 가장 높았지만, 세 처리구간 통계적 유의성은 나타나지 않았다. 잎 건체중에서는 조사 15일째에 모든 처리구에서 유의성을 보이지 않았다. 또한 조사 25일째 GP 처리구가 다른 처리구에 비해 가장 높은 값을 나타냈다. 하지만 처리구간 유의성은 보이지 않았다. 뿌리 생체중 및 건체중에서는 조사25일째 GP 처리구가 다른 처리구에 비해 가장 높은 값을 나타냈지만, 생체중에서는 GSF 처리구와만 유의적 차이를 보였고, 건체중에서는 G와 GSF 처리구에서 각각 유의성을 보였다.

Table 98. 토마토 생체중 및 건체중

Days after infection	Treatment	Leaf fresh weight (g)	Leaf dry weight (g)	Root fresh weight (g)	Root dry weight (g)
15	F	5.34 b	0.37 a	0.86 b	0.07 b
	G	4.17 b	0.29 a	0.76 b	0.07 b
	GP	6.65 a	0.42 a	0.95 a	0.10 a
	GSF	5.75 a	0.34 a	0.59 c	0.04 c
	LSD	1.46	0.21	0.09	0.02
20	F	7.18 ab	0.59 ab	1.08 ab	0.10 a
	G	4.98 b	0.42 c	0.93 b	0.10 a
	GP	9.98 a	0.66 a	1.26 a	0.11 a
	GSF	7.82 ab	0.49bc	1.02 b	0.09 a
	LSD	2.83	0.16	0.19	0.025
25	F	11.44 a	0.94ab	1.45ab	0.14ab
	G	7.51 b	0.68 c	1.46 ab	0.12 b
	GP	13.27 a	1.03 a	1.86 a	0.17 a
	GSF	11.75 a	0.83bc	1.26 b	0.11 b
	LSD	2.66	0.15	0.44	0.042

\*G: 생초액, GP: 생초미생물 혼합액비, GSF: 생초액+합성농약, F: 비료.

2. 포장에서 고추, 토마토의 생초미생물 혼합액비 시용에 따른 병해방제 및 성장 평가

가. 포장에서 고추역병 병해방제 및 성장평가

작물별로 생초 미생물 혼합 액비의 효과와 화학비료 처리구와의 비교를 위해 전남대학교 실험포장에서 실험하였다. 포장 실험의 작물은 고추와 토마토를 사용하였으며, 화학비료 처리구와 생초 미생물 혼합 액비 1배 처리구로 구획을 설정하였다(Fig. 117와 118). 화학비료 처리구(T1)는 질소 공급원으로서 요소[(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO], 인 공급원으로는 용성인비(P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), 칼륨 공급원으로 칼리(K<sub>2</sub>O)를 사용하였으며, 정식 1개월 전 및 정식 후 1개월째 및 2개월째에 각각 처리하였다. 화학농약 처리구(T2)는 화학비료와 함께 정식 1개월 전 및 정식 후 1개월째 및 2개월째에 각각 처리하였다. 액비 1배 처리구(T3)는 16주간 매주 1회 관비 하였고 처리량은 처리 구획 당 토마토는 액비 1.16L, 고추는 액비 1.28L로 하였다. 액비 1/3배+화학비료 2/3 처리구(T4)는 정식 1개월 전 및 정식 후 1개월째 및 2개월째에 각각 처리하였고, 처리량은 토마토는 액비 0.38L, 고추는 액비 0.42L를 처리하였고 화학비료 2/3 수준으로 처리하였다. 정식 3개월 후에는 모든 처리구에 대하여 각 처리별로 2회 옆면 시비 하였다. 질소 성분을 기준으로 산정한 생초 미생물 혼합 액비의 성분함량은 Table 99과 같다. 모종별 화학비료와 액비 처리량 산정 고추와 토마토의 현행 비료 시비수준을 포장 실험 구획 면적 2.5 m x 1.0m plot에 해당되는 양으로 산정한 결과를 Table 100와 Table 101에 나타내었다.

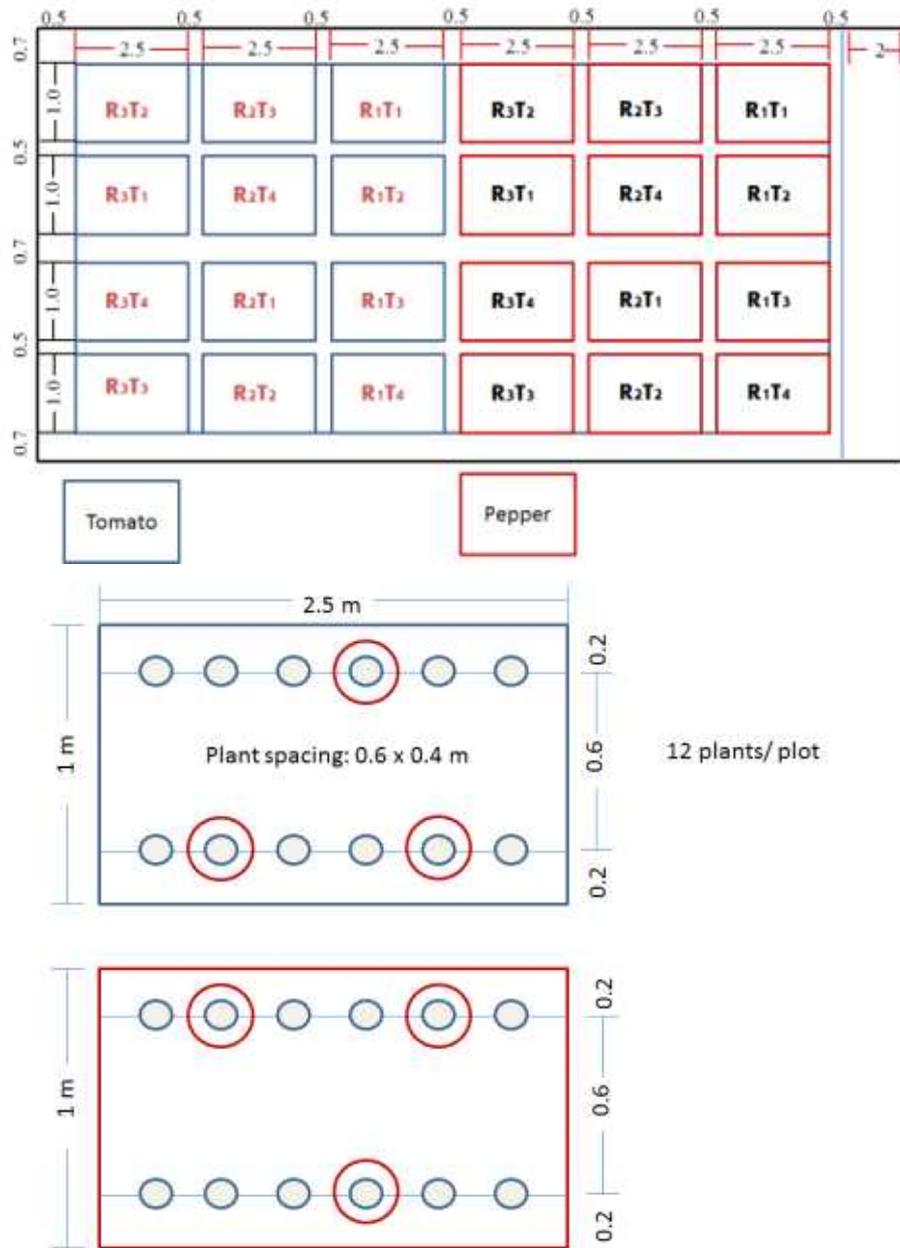


Fig. 197. 시험 포장 설계도.

(T=처리구, R=반복구)



Fig. 198. 시험포장 모습

(1) 포장 설계 및 처리량 산정

고추 품종은 (주)대농에서 생산하는 ‘오부자’로 하였고, 화학비료와 생초 미생물 혼합 액비 처리량 산정을 고추의 현행 비료 시비수준을 기준으로 하여 포장 실험 구획 면적 2.5 m x 1.0 m plot에 해당되는 양으로 산정한 결과를 Table 100에 나타내었다. 화학비료 처리구(T1)는 질소 공급원으로서 요소[(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO], 인 공급원으로는 용성인비(P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), 칼륨 공급원으로 칼리(K<sub>2</sub>O)를 사용하였으며, 정식 1개월 전 및 정식 후 1개월째 및 2개월째에 각각 처리하였다. 화학농약 처리구(T2)는 화학비료와 함께 정식 1개월 전 및 정식 후 1개월째 및 2개월째에 각각 처리하였다. 액비 1배 처리구(T3)는 16주간 매주 1회 관비 하였고 처리량은 처리 구획 당 액비 1.28 L로 하였다. 액비 1/3배+화학비료 2/3 처리구(T4)는 정식 1개월 전 및 정식 후 1개월째 및 2개월째에 각각 처리하였고, 처리량은 고추는 액비 0.42 L와 화학비료 2/3 수준을 처리하였다. 정식 3개월 후에는 모든 처리구에 대하여 각각의 처리별로 2회 옆면 시비 하였다. 실험 분석은 1) 병해방제 정도조사 2) 지하/지상부 생체 및 건물중 조사, 3) 토양내 효소활성 측정 및 4) 토양내 미생물 상 조사 등을 실시하였다.

실험포장 크기: 21.5 m x 7 m (150.5 m<sup>2</sup>)

Plot 크기: 2.5 m x 1 m (2.5 m<sup>2</sup>)

처리구 수 : 4

반복구 수 : 3

처리구: T1 (F): Fertilizer (비료처리)

T2 (FF): Fertilizer + Synthetic Fungicide (비료 + 살균제 처리)

T3 (G): Grass culture (생초미생물 혼합액비; *Paenibacillus ehimensis* KWN38 첨가 생초 배양액 처리)

T4 (GF): 1/3 Grass culture + 2/3 Fertilizer (KWN38 첨가 생초 배양액 1/3 + 비료 2/3 처리)

실험구 배치법: Randomized complete block

(가) 생초 미생물 혼합 액비 조성

Table 99. Chemical composition of mixed liquid fertilizer.

Ingredient	Amount (g L <sup>-1</sup> )
Grass (based by fresh weight)	178
46.6% N (Urea)	2.8
20% P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (용과린)	8.8
60% K <sub>2</sub> O	1.6
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1
yeast	0.1
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.05
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.06
Chitin powder	0.8
Gelatin powder	0.2

(나) 고추의 화학비료 처리량

Table 100. Fertilizer requirement of pepper

	Urea (g)	Mono super phosphate (g)	Potassium chloride (g)
Before planting	30.57	20	10.52
After 1 month	15.29	10	5.26
After 2 month	15.29	10	5.26

(다) 토마토의 화학비료 처리량

Table 101. Fertilizer requirement of tomato

	Urea (g)	Mono super phosphate (g)	Potassium chloride (g)
Before planting	27.71	32.19	12.71
After 1 month	13.85	16.10	6.35
After 2 month	13.85	16.10	6.35

(2) Root mortality 조사

생초미생물 혼합액비의 고추작물의 병방제에 대한 효과를 조사하기 위하여 G(생초미생물 혼합액비), GF(초미생물혼합 액비1/3+복합비료2/3), F(복합비료), FF(합성농약+복합비료)를 각각 처리하였고, 고추작물의 뿌리 치사율을 조사하기 위해 작물 정식 후 90일째 시료를 채취하여 측정 하였다. 조사결과 Fig. 199에서 보는바와 같이 복합비료 처리구인 F에서 뿌리 치사율이 가장 높게 조사 되었고, 그 다음으로 생초미생물혼합 액비1/3+복합비료2/3 처리구인 GF로 조사되어졌다. 생초 미생물 혼합 액비 1배액 처리구인 G는 FF 처리구와 통계적 유의성을 보이지 않았을 뿐만 아니라, F와 G 처리구의 치사율을 비교 했을 때 상당한 차이가 있음이 조사됐다. 이는 G 처리구가 뿌리 치사율을 유발하는 병원균을 억제하는데 효과적인 작용을 했을 것으로 판단되었다.

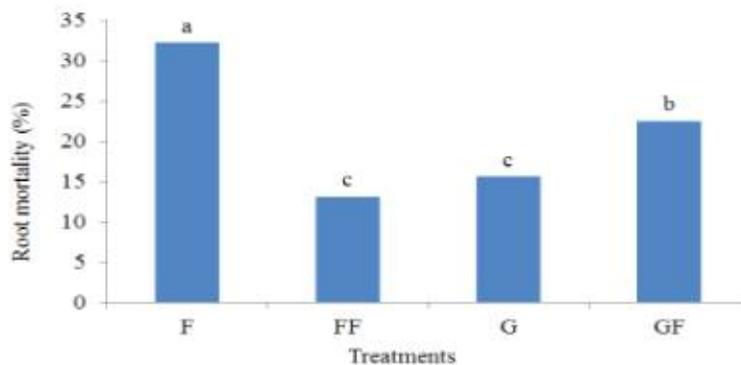


Fig. 199. 뿌리치사율.

F: 복합비료, FF: 합성농약+복합비료, G: 생초미생물 혼합액비,  
GF: 생초미생물혼합 액비1/3+복합비료2/3.

(3) 뿌리와 줄기의 생체 및 건물중 조사

생초미생물 혼합액비의 고추작물에 대한 효과를 조사하기 위하여 G(생초미생물 혼합액비), GF(초미생물혼합 액비1/3+복합비료2/3), F(복합비료), FF(합성농약+복합비료)를 각각 처리하였다. 처리한 결과 Table 102에서 보는바와 같이 뿌리 및 줄기의 생체중 및 건물중에서 조사 30일, 60일 및 90일째까지 처리구간 통계적 유의성은 보이지 않았다.

Table 102. 고추작물의 뿌리 및 줄기의 생체중 및 건물중

Days after transplanting	Treatment	Shoot fresh weight (g)	Shoot dry weight (g)	Root fresh weight (g)	Root dry weight (g)
30	F	276.8 A	41.3 A	18.4 A	3.4 A
	FF	281.0 A	43.8 A	26.2 A	4.0 A
	G	268.0 A	37.9 A	20.8 A	3.6 A
	GF	258.0 A	34.0 A	15.4 A	3.2 A
	LSD	64.9	10.7	11.6	1.2
60	F	259.7 a	37.6 a	19.8 a	4.3 a
	FF	255.2 a	36.3 a	22.2 a	5.2 a
	G	226.5 a	33.2 a	20.8 a	5.3 a
	GF	221.7 a	32.4 a	20.5 a	4.5 a
	LSD	73.7	6.5	5.7	1.8
90	F	144.0 Z	24.5 Z	37.5 Z	6.8 Z
	FF	133.5 Z	22.5 Z	36.9 Z	6.3 Z
	G	141.0 Z	25.0 Z	39.6 Z	7.1 Z
	GF	147.0 Z	23.4 Z	37.4 Z	6.8 Z
	LSD	25.0	3.5	5.0	2.1

\*F: 복합비료, FF: 합성농약+복합비료, G: 생초미생물 혼합액비, GF: 생초미생물혼합 액비1/3+복합비료2/3.

(4) 수확량 조사

생초미생물 혼합액비의 고추작물의 수확량에 미치는 영향에 대하여 조사한 결과 Table 103에서 보는바와 같이 정식 30일 후의 합성농약+복합비료 처리구인 FF와 생초미생물혼합액비1/3+복합비료2/3 처리구인 GF와의 통계적 유의성이 나타난 것을 제외하고, 정식 60일째와 90일째의 처리간의 차이는 조사되지 않았다.

Table 103. 고추작물의 수확량 조사.

Days after transplanting	Treatment	Fruit number	Fruit weight (g)
30	F	23.3 A	297.3 AB
	FF	25.5 A	301.0 A
	G	21.3 A	285.6 AB
	GF	18.2 A	229.0 B
	LSD	9.7	59.8
60	F	38.8 a	536.5 a
	FF	38.3 a	547.5 a
	G	34.3 a	514.9 a
	GF	42.4 a	570.5 a
	LSD	14.0	100.5
90	F	38.8 a	536.5 a
	FF	38.3 a	547.5 a
	G	34.3 a	514.9 a
	GF	42.4 a	570.5 a
	LSD	14.0	100.5

\*F: 복합비료, FF: 합성농약+복합비료, G: 생초미생물 혼합액비, GF: 생초미생물혼합 액비1/3+복합비료2/3.

(5) 토양 내 병해방제 효소 활성 조사

Fig. 200에서 보는바와 같이 chitinase 활성은 조사 60일째와 90일째 생초미생물 혼합액비 처리구인 G가 다른 처리구에 비해 가장 높게 조사되었다. 하지만 다른 처리구와의 통계적 유의성은 없었다.  $\beta$ -1,3-glucanase 활성 또한 90일째 G 처리구가 다른 처리구에 비해 가장 높게 조사되었지만 다른 처리구와의 통계적 유의성은 없었다(Fig. 201). Chitinase 및 glucanase 활성은 병원체의 작물 감염을 방제하는 효소로써 활성이 높게 나타날수록 토양의 병방제 능력이 증가한 것으로 볼 수 있다. 그러므로, 비록 통계적 유의성은 나타나지 않았지만 G 처리구에서의 토양 내 chitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase 활성이 높은 것은 고추 뿌리치사율이 낮게 조사된 결과와 상관성이 있을 것으로 사료된다. Cellulase 활성은 Fig. 202에서 보는바와 같이 조사 90일째 G 처리구와 GF 처리구가 F 처리구와 FF 처리구보다 높게 나타났다. Cellulase는 식물체 및 역병균(*Phytophthora capsici*)의 균사벽을 구성하는 탄소화합물인 cellulose를 분해하는 효소로써 식물 잔류물의 분해와 역병균의 방제에 중요한 역할을 한다. 따라서 생초 미생물 혼합 액비의 처리에 의해 토양내 cellulase 활성이 높아진 것은 토양 내 식물 잔류물의 분해속도 양을 증가시켜 토양의 건전성에 영향을 끼쳤다고 볼 수 있으며, 역병균을 방제함으로써 작물의 뿌리썩음을 방지하는데 영향을 미쳤다고 판단되어졌

다. Dehydrogenase 활성 측정은 토양 미생물군집의 활성과 토양미생물의 대사활동 수준을 나타내준다. Fig. 203에서 보는바와 같이 dehydrogenase 활성이 비록 통계적 유의성이 나타나지 않았지만 G 처리구에서의 dehydrogenase 활성이 가장 높게 나타난 것은 생초 미생물 혼합 액비의 처리로 인해 토양에서 토양미생물군집의 활성과 대사활동이 가장 활발하다는 근거를 보여주었다.

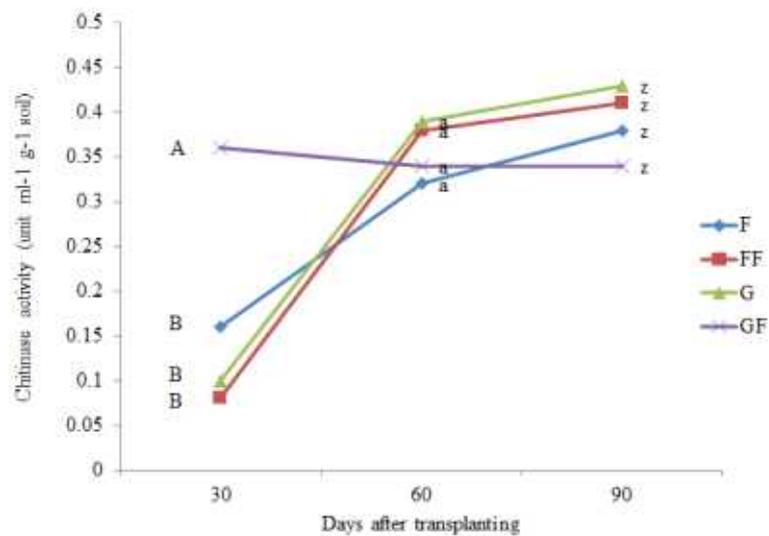


Fig. 200. chitinase 활성 조사.

F: 복합비료, FF: 합성농약+복합비료, G: 생초미생물 혼합액비, GF: 생초미생물혼합 액비1/3+복합비료2/3.

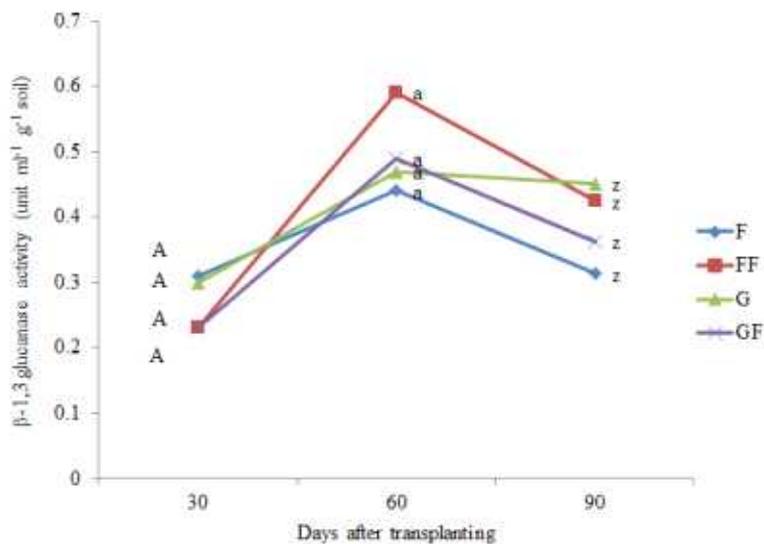


Fig. 201. β-1,3-glucanase 활성 조사

F: 복합비료, FF: 합성농약+복합비료, G: 생초미생물 혼합액비, GF: 생초미생물혼합 액비1/3+복합비료2/3.

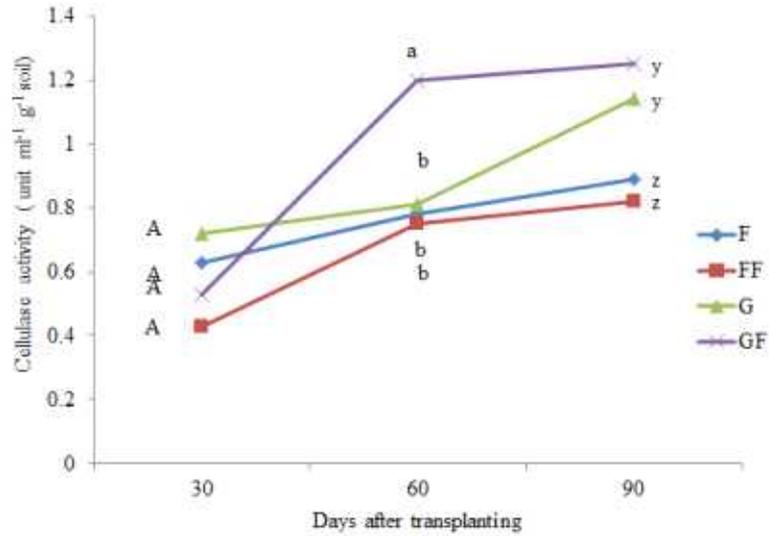


Fig. 202. cellulase 활성 조사.

F: 복합비료, FF: 합성농약+복합비료, G: 생초미생물 혼합액비, GF: 생초미생물혼합 액비1/3+복합비료2/3.

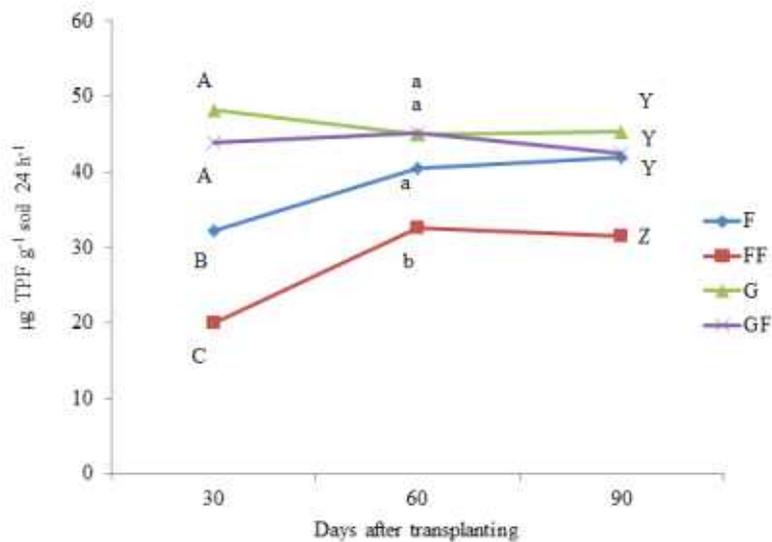


Fig. 203. dehydrogenase 활성 조사

F: 복합비료, FF: 합성농약+복합비료, G: 생초미생물 혼합액비, GF: 생초미생물혼합 액비1/3+복합비료2/3.

(6) 토양 내 미생물 상 조사

토양 내 세균상을 조사한 결과 조사 30, 60 및 90일째 생초미생물 혼합액비 처리구인 G와 GF처리구가 F처리구와 FF처리구에 비해 세균상이 높게 조사된 것으로 보아 생초미생물 혼합액비 처리가 토양 내 세균상의 증가를 가져온 것으로 사료되었다 (Table. 104). 토양내 곰팡이 상을 조사한 결과 F처리구가 다른 처리구에 비해 가장 높게 나타났다. 하지만 방사선 균 개체수 차이는 각 처리구간에 나타나지 않았다.

Table 104 곰팡이, 세균, 방사선균 개체수 변화 조사

Days after transplanting	Treatment	Bacteria (x10 <sup>7</sup> )	Fungi (x 10 <sup>5</sup> )	Streptomycetes (x10 <sup>6</sup> )
30	F	17.2 B	12.9 A	4.5 A
	FF	6.7 C	7.3 B	3.6 A
	G	28.3 A	5.2 B	5.5 A
	GF	20.8 B	6.9 B	4.2 A
	LSD	3.5	4.0	1.5
60	F	5.27 b	3.5 a	3.6 a
	FF	4.4 b	2.4 b	3.9 a
	G	19.3 a	2.3 b	4.3 a
	GF	15.5 a	2.1 b	4.0 a
	LSD	7.5	1.2	0.9
90	F	18.2 Y	13.2 Y	5.6 Z
	FF	11.6 Z	8.8 Z	6.3 Z
	G	27.8 X	9.3 Z	6.4 Z
	GF	23.3 X	10.2 Z	5.9 Z
	LSD	4.1	2.5	1.3

\*F: 복합비료, FF: 합성농약+복합비료, G: 생초미생물 혼합액비, GF: 생초미생물혼합 액비1/3+복합비료2/3.

나. 포장에서 토마토 시들음병 병해방제 및 성장평가

토마토 품종은 (주)다농에서 생산하는 ‘영화’로 하였고, 화학비료와 액비 처리량 산정 고추의 현행 비료 시비수준을 포장 실험 구획 면적 2.5 m x 1.0 m plot에 해당되는 양으로 산정한 결과를 Table 101에 나타내었다. 화학비료 처리구(T1)는 질소 공급원으로서 요소 [(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO], 인 공급원으로는 용성인비(P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), 칼륨 공급원으로 칼리(K<sub>2</sub>O)를 사용하였으며, 정식 1개월 전 및 정식 후 1개월째 및 2개월째에 각각 처리하였다. 화학농약 처리구(T2)는 화학비료와 함께 정식 1개월 전 및 정식 후 1개월째 및 2개월째에 각각 처리하였다. 액비 1배 처리구(T3)는 16주간 매주 1회 관비 하였고 처리량은 처리 구획 당 토마토는 액비 1.16L로 하였다. 액비 1/3배+화학비료 2/3 처리구(T4)는 정식 1개월 전 및 정식 후 1개월째 및 2개월째에 각각 처리하였고, 처리량은 고추는 액비 0.42L와 화학비료 2/3 수준으로 처리하였다. 정식 3개월 후에는 모든 처리구에 대하여 각각의 처리별로 2회 옆면 시비 하였다. 실험 분석은 1) 병해방제 정도조사 2) 지하/지상부 생체 및 건물중 조사, 3) 토양내 효소활성 측정 및 4) 토양내 미생물 상 조사 등을 실시하였다.

(1) 발병률 및 심각도

토마토 잎 및 줄기에서의 병해 조사는 토마토 정식 후 60일째 및 90일째 조사하였다. 조사 결과 Tabel 105에서 보는바와 같이 60일째 복합비료 처리구인 F에서 잎 및 줄기에서 병해 피해가 가장 높게 나타났다. 그 다음으로 GF, G 및 FF 처리구 순으로 조사되었다. 하지만 GF, G 및 FF 간의 통계적 유의성은 나타나지 않았다. 정식 90일째 병해를 조사한 결과 F 처리구에서 가장 높은 피해를 보였고, 그 다음으로 GF, G 및 FF 순으로 나타났다. 생초미생물 처리구인 G는 FF 처리구에 비해 높게 나타났지만, F 처리구에 비해 낮은 것으로 보

아 토마토 작물의 잎 및 줄기에서의 병해를 어느 정도 예방한 것으로 사료 되어졌다.

Table 105. 토마토 옆 및 줄기에서의 병해 조사

Days after transplanting	Treatment	Leaf infection (%)	Stem infection (%)
60	F	18.3 A	20.5 A
	FF	5.5 B	7.8 B
	G	7.8 B	11.2 B
	GF	9.5 B	12.6 B
	LSD	5.0	7.1
90	F	35.5 A	39.4 A
	FF	18.3 C	15.2 C
	G	22.6 BC	17.3 BC
	GF	24.3 B	25.5 B
	LSD	4.9	8.9

\*F: 복합비료, FF: 합성농약+복합비료, G: 생초미생물 혼합액비, GF: 생초미생물혼합 액비1/3+복합비료2/3.

(2) Root mortality 조사

생초미생물 혼합액비의 토마토작물의 병방제에 대한 효과를 조사하기 위하여 G(생초미생물 혼합액비), GF(초미생물혼합 액비1/3+복합비료2/3), F(복합비료), FF(합성농약+복합비료)를 각각 처리하였고, 토마토작물의 뿌리 치사율을 조사하기 위해 작물 정식 후 90일째 시료를 채취하여 측정 하였다. 조사결과 Fig. 204에서 보는바와 같이 복합비료 처리구인 F에서 뿌리치사율이 가장 높게 조사 되었고, 그 다음으로 GF로 조사되었다. 가장 낮은 뿌리 치사율은 FF 처리구로 조사되어졌지만 G 처리구와 통계적 유의성을 보이지 않았다. 이러한 결과는 생초 미생물 혼합 액비 처리가(G 처리구)가 뿌리 치사율을 유발하는 병원균을 억제하는데 효과적인 작용을 했을 것으로 사료되었다.

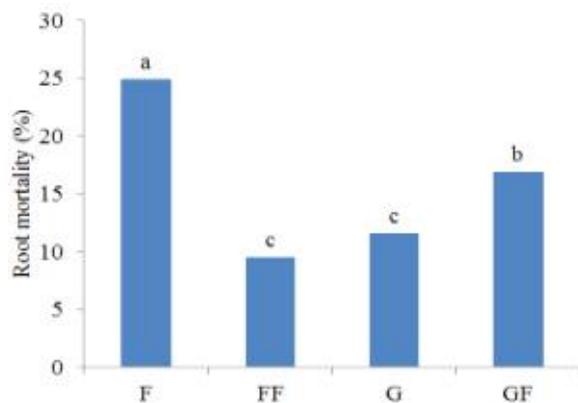


Fig. 204. 뿌리 치사율 조사.

F: 복합비료, FF: 합성농약+복합비료, G: 생초미생물 혼합액비, GF: 생초미생물혼합 액비1/3+복합비료2/3.

(3) 뿌리와 줄기의 생체 및 건물중 조사

토마토 작물의 생육 조사결과 Table 106에서 보는바와 같이 정식 후 30일째 지상부 길이, 생체중, 전체중 및 지하부 생체중, 전체중에서 각각 모든 처리구간 차이가 나타나지 않았다. 정식 60일째 조사 결과 지상부 길이 에서는 각 처리구간 차이가 없었으며, 지상부 생체중 및 전체중에서는 GF 처리구가 가장 높게 조사 되었고, 지하부 생체중 및 전체중에서는 G 처리구가 가장 높게 조사되었다. 정식 90일째 조사 결과 지상부 길이 에서는 각 처리구간 차이가 없었으며, 지상부 생체중, 전체중 및 지하부 생체중, 전체중은 F 처리구가 가장 낮게 조사되었고, G, GF 및 FF 처리구간의 생육 차이는 없는 것으로 조사되었다.

Table 106. 토마토 작물의 생육 조사

Days after transplanting	Treatment	Shoot length (cm)	Shoot fresh weight (g)	Shoot dry weight (g)	Root fresh weight (g)	Root dry weight (g)
30	F	193.3 A	364.0 A	48.6 A	18.5 A	3.8 A
	FF	207.7 A	461.0 A	58.3 A	20.5 A	4.0 A
	G	198.5 A	492.0 A	65.6 A	20.6 A	4.3 A
	GF	193.0 A	437.0 A	60.3 A	18.6 A	4.2 A
	LSD	51.0	237.5	24.5	4.5	0.9
60	F	264.0 a	555.4 b	81.8 b	19.9 b	4.3 b
	FF	260.0 a	718.7 ab	99.4 ab	24.2 ab	4.7 ab
	G	263.0 a	675.5 ab	100.4 ab	25 a	5.2 a
	GF	246.0 a	735.3 a	103.9 a	21.8 ab	4.9 ab
	LSD	42.4	178.0	21.1	4.8	0.9
90	F	270.0 Z	571.0 Z	78.3 Z	24.2 Z	7.4 Z
	FF	288.0 Z	721.0 Y	114.3 Y	27.9 YZ	9.4 Y
	G	294.0 Z	751.0 Y	119.4 Y	31.2 Y	10.6 Y
	GF	277.0 Z	679.0 Y	107.7 Y	29.1 YZ	9.5 Y
	LSD	45.6	100.8	25.2	6.9	1.8

\*F: 복합비료, FF: 합성농약+복합비료, G: 생초미생물 혼합액비, GF: 생초미생물혼합 액비1/3+복합비료2/3.

(4) 수확량 조사

토마토 작물 수확량 조사결과 Table 107에서 보는바와 같이 정식 30일째는 과수와 과중에서 각 처리구간 차이가 없었다. 정식 60일째 및 90일째는 생초 미생물 혼합 액비 처리구인 G에서 과수와 과중이 가장 높게 나타났지만 GF 처리구와의 통계적 유의성은 나타나지 않았다.

Table 107. 토마토 작물 수확량 조사

Days after transplanting	Treatment	Fruit number	Fruit weight (g)
30	F	24.8 A	228 A
	FF	22.0 A	246 A
	G	24.6 A	257 A
	GF	24.7 A	230 A
	LSD	15.0	196
60	F	26.8 b	475 b
	FF	27.2 b	435 b
	G	39.1 a	618 a
	GF	39.2 a	517 ab
	LSD	10.5	138
90	F	21.2 Z	442 Z
	FF	22.5 Z	456 YZ
	G	29.0 Y	536 Y
	GF	27.7 Y	484 YZ
	LSD	5	90.2

\*F: 복합비료, FF: 합성농약+복합비료, G: 생초미생물 혼합액비, GF: 생초미생물혼합 액비1/3+복합비료2/3.

(5) 토양 내 병해방제 효소 활성 조사

토양 내에서의 chitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase, cellulase 및 dehydrogenase를 조사하기위해 토마토 정식 후 조사 30일, 60일 및 90일째 효소활성을 측정 하였다. Fig. 205에서 보는바와 같이 chitinase 활성은 조사 90일째 생초 미생물 혼합 액비 처리구인 G가 다른 처리구에 비해 가장 높게 조사되었다. 하지만 다른 처리구와의 통계적 유의성은 없었다.  $\beta$ -1,3-glucanase 활성 또한 90일째 G 처리구가 다른 처리구에 비해 가장 높게 조사되었지만 다른 처리구와의 통계적 유의성은 없었다(Fig. 206). Chitinase 및 glucanase 활성은 병원체의 작물 감염을 방제하는 효소로써 활성이 높게 나타날수록 토양의 병방제 능력이 증가한 것으로 볼 수 있다. 즉 G 처리구에서의 토양내 chitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase 활성이 높은 것은 토마토 뿌리치사율이 낮게 조사된 결과와 상관성이 있는것으로 사료된다. Cellulase 활성은 Fig. 207에서 보는바와 같이 조사 90일째 G 처리구와 GF 처리구가 F 처리구와 FF 처리구보다 높게 나타났다. 이는 생초에 포함된 cellulose에 의해 토양내 cellulase 활성이 G와 GF 처리구에 높게 나타난 것으로 사료되어진다. 이러한 토양내 cellulase 활성 증가 또한 토마토 뿌리 병해를 억제하는데 영향을 미친 것으로 사료되었다. Dehydrogenase 활성 측정은 토양 미생물군집의 활성과 토양미생물의 대사활동 수준을 나타내준다. Fig. 208에서 보는바와 같이 dehydrogenase 활성이 비록 통계적 유의성이 나타나지 않았지만 정식 후 30일, 60일 및 90일째의 G 처리구에서 dehydrogenase 활성이 가장 높게 나타난 것은 생초 미생물 혼합 액비의 처리로 인해 토양에서 토양미생물군집의 활성과 대사활동이 가장 활발하다는 근거를 보여주었다.

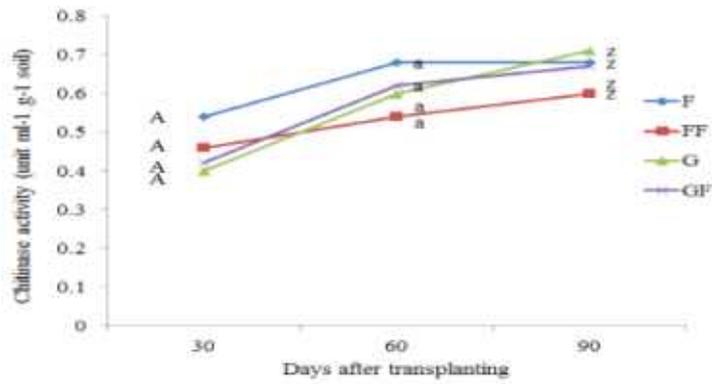


Fig. 205. chitinase 활성 조사.

F: 복합비료, FF: 합성농약+복합비료, G: 생초미생물 혼합액비,  
GF: 생초미생물혼합 액비1/3+복합비료2/3.

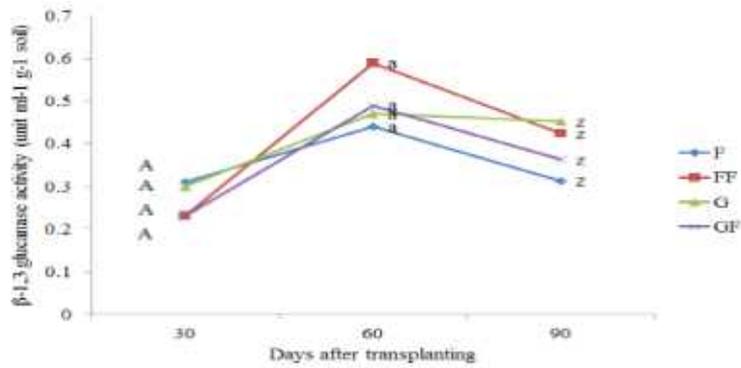


Fig. 206. beta-1,3-glucanase 활성 조사.

F: 복합비료, FF: 합성농약+복합비료, G: 생초미생물 혼합액비,  
GF: 생초미생물혼합 액비1/3+복합비료2/3.

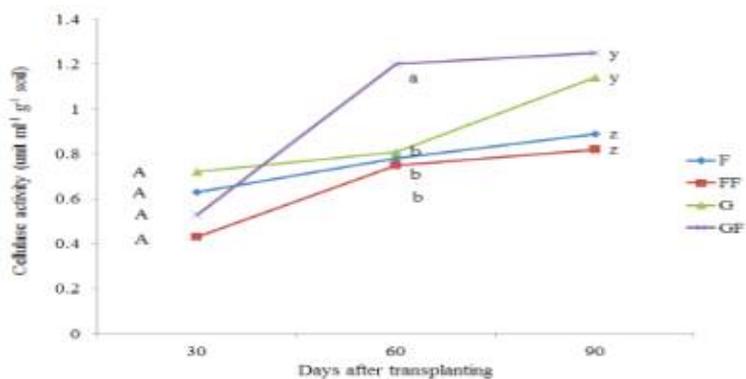


Fig. 207. cellulase 활성 조사.

F: 복합비료, FF: 합성농약+복합비료, G: 생초미생물 혼합액비,  
GF: 생초미생물혼합 액비1/3+복합비료2/3.

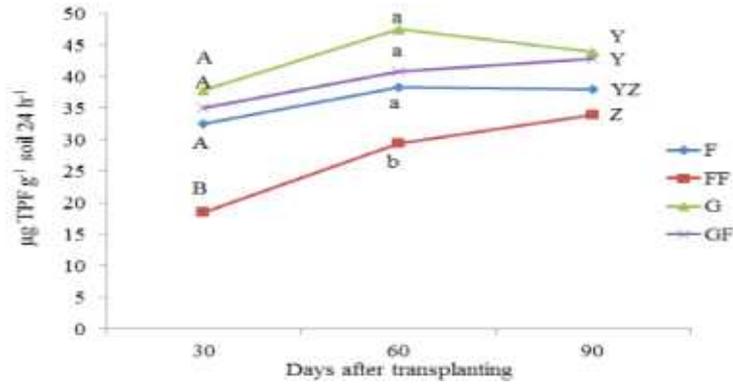


Fig. 208. dehydrogenase 활성 조사.

F: 복합비료, FF: 합성농약+복합비료, G: 생초미생물 혼합액비, GF: 생초미생물혼합 액비1/3+복합비료2/3.

(6) 토양 내 미생물 상 조사

토양 내 세균상을 조사한 결과 Table 108에서 보는 바와 같이 정식 30일, 60일 및 90일째 생초 미생물 혼합 액비 처리구인 G에서 가장 높게 나타났지만, 90일째는 GF 처리구와의 유의성은 나타나지 않았다. 토양내 곰팡이 상을 조사한 결과 F처리구가 다른 처리구에 비해 가장 높게 나타났다. 이러한 결과는 고추 작물 실험과 일치한다. 방사선균 개체수는 정식 30일째 G 처리구에서 가장 높게 나타났다. 하지만 정식 60일 및 90일째는 모든 처리구간 유의성이 나타나지 않았다.

Table 108. 곰팡이, 세균, 방사선균 개체수 변화 조사

Days after transplanting	Treatment	Bacteria (x10 <sup>7</sup> )	Fungi (x 10 <sup>5</sup> )	Streptomycetes (x10 <sup>6</sup> )
30	F	7.3 AB	11.4 A	9.2 A
	FF	5.8 B	4.3 B	3.8 AB
	G	12.4 A	6 B	3.2 B
	GF	9.9 AB	6.9 B	4.8 AB
	LSD	5.6	3.2	5.6
60	F	3.5 b	5.5 a	5.4 a
	FF	3.6 b	3.4 b	4.9 a
	G	7.8 a	2.1 b	5.1 a
	GF	5.7 ab	2.8 b	5.6 a
	LSD	3.8	2.4	1.9
90	F	2.3 Z	6.9 X	4.7 Z
	FF	2.1 Z	2.9 Z	3.9 Z
	G	5.2 Y	3.1 Z	5.1 Z
	GF	4.5 Y	4.3 Y	4.2 Z
	LSD	2	1.1	1.2

\*F: 복합비료, FF: 합성농약+복합비료, G: 생초미생물 혼합액비, GF: 생초미생물혼합 액비1/3+복합비료2/3.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 목표 달성도

연차별 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 목표 달성도를 아래와 같이 나타냈다. 연차별 연구개발 목표들은 대체적으로 연구 계획서의 진도와 일치하게 달성 되었으며, 연구의 최종 목표 달성도 역시 계획서의 최종 목표를 충분히 달성 하였다고 판단된다.

#### 1. 제1차년도 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 달성도

연구개발목표	평 가		목 표 달성도 (%)	참조부문
	평가의 착안점	평가의 척도(%)		
1. 생초분쇄기 개발	1) 기계장치 변화에 따른 분쇄율 측정 2) 생초분쇄기 시제품 제작도면 작성 및 제작 3) 원재료(생초)에 대한 농약 잔류량 시험	40	100	제2절 3. 가. 다.
2. Cellulose 분해 및 병해방제 기능성 미생물 선발	1) Cellulose 분해 우수 균주 선발 2) 식물성 곰팡이균에 대한 항균활성평가 3) 16S rDNA염기서열 분석을 통한 계통학적 분류	20	100	제1절 1. 가.
3. 기능성미생물 ( <i>Paenibacillus ehimensis</i> KWN38) 특성 연구	1) cellulase, chitinase, $\beta$ -1,3-glucanase, protease 활성 측정 2) KWN38과 배양액, 조효소 추출물, butanol 추출물에 의한 균사 파괴 3) KWN38과 배양액, 조효소 추출물, butanol 추출물 의한 포자 저해	10	100	제1절 2. 가. 나. 다.
4. 생초미생물 혼합 액비 제조 연구	1) 생초(부숙하지 않은)와 보충양분을 이용한 생초미생물 혼합액비 제조 및 효과 2) 생초(부숙된)와 보충양분을 이용한 생초미생물 혼합액비 제조 및 효과	15	100	제2절 1. 가. 나
5. 포트에서고추, 토마토의생초발효 액비 시용에 따른 토양영향 평가	1) 항온배양실험을 통한 무기화율 평가 2) 고추 작물 토양 영향평가 3) 토마토 작물 토양 영향평가	15	100	제3절 1. 가. 나. 다.

2. 제2차년도 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 달성도

연구개발목표	평 가		목 표 달성도 (%)	참조부문
	평가의 착안점	평가의 척도(%)		
1. 실험실 규모 제조 공정 최적화 연구 및 미생물 배양설비 개발	1) 실험실 규모 제조공정 운전인자 최적화 평가 2) 미생물 배양 설비 개발	25	100	제2절 2. 가. 3. 나
2. 기능성 미생물 ( <i>Paenibacillus ehimensis</i> KWN38) 특성 연구	1) 효소(chitinase) 분리 및 정제 2) 항생물질 정제	15	100	제1절 2. 라. 마.
3. 기능성 미생물 ( <i>Streptomyces griseus</i> H7602) 특성 연구	1) 효소 및 항균활성 조사 2) 항생물질 정제 3) 고추작물 포트 실험	20	100	제1절 3. 가. 나. 다.
4. 포트에서 고추, 토마토의 생초 미생물 혼합액비 시용에 따른 병해 방제 및 성장 평가	1) 포트에서 고추역병 병해방제 및 성장평가 2) 포트에서 토마토 시들음병 병해방제 및 성장평가	20	100	제4절 1. 가. 나
5. 포트에서 고추, 토마토의 생초 미생물 혼합액비 시용에 따른 토양영향 평가	1) 컬럼실험을 통한 토양 내 양분거동 특성 조사 2) 고추 작물 토양 영향평가 3) 토마토 작물 토양 영향평가	20	100	제3절 1. 2. 3.

3. 제3차년도 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 달성도

연구개발목표	평 가		목 표 달성도 (%)	참조부문
	평가의 착안점	평가의 척도(%)		
1. 소규모 현장 제조 공정 최적화 연구 및 제품개발	1) 생초미생물 혼합액비 제조 설비 시제품 제작 2) 포트 및 포장에서 한지형 잔디 생육 및 병 회복 평가 3) 소규모 생초미생물 혼합액비 제조공정 최적화 평가 4) 시제품 개발	40	100	제2절 2. 나. 3. 나. 다 4. 가. 나
2. 포장에서 고추, 토마토의 생초 미생물 혼합액비 시용에 따른 병해 방제 및 성장 평가	1) 고추역병 병해방제 및 성장평가 2) 토마토 시들음병 병해방제 및 성장평가 3) 토양 내 미생물 상 조사	30	100	제4절 2. 가. 나
3. 포장에서 고추, 토마토의 생초 미생물 혼합액비 시용에 따른 토양영향 평가	1) 생초미생물 혼합액비의 중질소( <sup>15</sup> N)표지 2) 고추 작물 토양 영향평가 3) 토마토 작물 토양 영향평가 4) 중질소( <sup>15</sup> N)표지 생초미생물 혼합액비의 토양 및 작물에서의 회수율 조사	30	100	제3절 3. 가. 나. 다.

## 제 2 절 관련분야에의 기여도

### 1. 산업적 측면에서의 기여도

본 연구과제를 통해 개발된 생초미생물 혼합액비는 양분적 기능과 병해방제 기능을 갖고 있는 액비이며, 골프장에서 정기적으로 발생되고 있는 잔디예초물을 이용함으로써 잔디예초물을 폐기물로 처리하는 비용의 절감은 물론, 잔디관리를 위해 매년 골프장에서 사용하고 있는 화학비료와 농약사용량의 10%를 생초미생물 혼합액비로 대체할 경우 연간 135억원의 관리비 절감이 되는 것으로 추정 된다. 또한 시대적 요구에 부응하여 골프장의 친환경적인 잔디관리를 마케팅에 접목하여 활용 할 경우 쾌적한 여가 활동 제공은 물론 골프장의 부정적인 이미지 제고에 기여 할 것으로 기대된다. 다만 연구개발된 생초미생물 혼합액비가 실제 골프장에서 사용하는 경우 생초미생물 혼합액비의 적용 방법 및 잔디 생육과 골프장 토양에 미치는 영향에 대한 연구가 필요 하다.

### 2. 기술적 측면에서의 기여도

본 연구과제를 통해 선발된 *Paenibacillus ehimensis* KWN38과 *Streptomyces griseus* H7602의 특성을 연구한 결과로, 골프장 잔디예초물(셀룰로스)의 분해 능력과 병해방제 기능을 검증함으로써 향후 활용할 수 있는 미생물의 자원 확보함은 물론 기어식 분쇄기를 이용하여 수분이 함유된 생초(잔디예초물)의 미 분쇄화하는 기술은 유사 기술의 선도적 기술이 될 것으로 기대 된다. 최근 유기성폐기물의 친환경적인 재활용을 통해 오염을 방지하고 자원을 순환시키는 방면으로 많은 노력을 기울이고 있지만, 이를 자원으로써 사용하기 위한 기술개발과 유해농약 잔류 등의 우려에 따른 일반인들의 인식 등으로 재활용 방법과 기술개발에 많은 어려움이 있었다. 중질소(<sup>15</sup>N)를 표지한 생초미생물 혼합액비를 포장에 직접 시용하고 회수율을 연구조사한 결과 실제로 토양에 시용하였을 때 식물이 이용할 수 있는 형태로 영양분이 얼마나 공급되는지에 대한 종합적인 검토를 통해 생초의 재활용 방안으로 비료로서의 적합성이 일정부분 입증 되었다고 판단된다. 더불어 버려지고 있는 생초(잔디예초물)와 기능적인 특성을 가진 미생물을 이용하여 액비로 재활용 하는 기술은 유기성폐기물의 자원재순환 기술의 선도적인 기술이 될 것으로 기대된다.

### 3. 학문 발전에의 기여도

본 연구과제를 통해 *Paenibacillus ehimensis* KWN38과 *Streptomyces griseus* H7602의 미생물 특성과 생초미생물 혼합액비 효과에 대한 다양한 정보가 제공되었다. 이러한 성과들은 이후 유사기술개발에 다양하게 활용이 가능하리라 판단된다. 또한 본 연구과제에서 수행되었던

결과는 학술지나 학술대회에 발표되었으며, 과제 수행 기간에 연구전문인력을 양성하는 성과를 이루었으며, 세부적인 내용은 다음과 같다.

가. 학술지 및 학술대회 발표

(1) Xuan-Hoa Nguyen; Kyaw-Wai Naing; Young-Seong Lee; Hamisi Tindwa; Geon-Hyoung Lee; Byoung-Kon Jeong; Hee-Myeong Ro; Sang-Jun Kim; Woo-Jin Jung and Kil-Yong Kim. 2012. Biocontrol Potential of *Streptomyces griseus* H7602 Against Root Rot Disease (*Phytophthora capsici*) in Pepper. *the plant pathology journal*

(2) Lee, So Youn; Hamisi Tindwa; Yong Seong Lee; Kyaw Wai Naing; Seong Hyun Hong and Yi Nam. 2012. Biocontrol of Anthracnose in Pepper Using Chitinase,  $\beta$ -1,3 Glucanase, and 2-Furancarboxaldehyde Produced by *Streptomyces cavourensis* SY224. *journal of microbiology and biotechnology*

(3) 조성준; 이용성; 김상준; 김길용; 정병곤; 노희명 and 이건형. 2012. 16S rDNA 분석에 의한 잔디생초에 분포하는 셀룰로스 분해세균의 동정. *한국자연보호학회지*

(4) 이태규; 노희명; 박지숙; 이민진; 김종성; 김상준; 전승우; 서상국; 김길용; 이건형 and 정병곤. 2012. 향온 호기 배양 조건에서 잔디 예초물 액비로부터 무기화된 질소의 농도 변화. *한국토양비료학회*

(5) Kyaw Wai Naing; Muhammad Anees; Sang Jun Kim; Yi Nam; Young Cheol Kim and Kil Yong Kim. 2013. Characterization of antifungal activity of *Paenibacillus ehimensis* KWN38 against soilborne phytopathogenic fungi belonging to various taxonomic groups. *Annals of Microbiology*

(6) 김종대; 정병곤; 권병훈; 노희명; 김상준; 전승우; 서상국; 김길용 and 이건형. 2013. 골프장 잔디예지물을 이용한 액비제조. *한국폐기물자원순환학회지*

(7) Xuan Hoa Nguyen; Kyaw Wai Naing; Young Seong Lee; Yong Hwan Kim and Kil Yong Kim. 2014. Antagonism of antifungal metabolites from *Streptomyces griseus* H7602 against *Phytophthora capsici*. *Journal of Basic Microbiology*

(8) 노희명; 윤석인; 이민진; 이상모; 박진면 and 박지숙. 2014. Partitioning of N-uptake from 1-year of fertigation with  $^{15}\text{N}$ -urea in pot-lysimeter-grown M.9-grafted apple trees after 3 years of fertigation with unlabelled urea at three rates of N. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*

(9) Kyaw W. Naing; Muhammad Anees; Xuan H. Nguyen; Yong S. Lee; Seung W. Jeon; Sang J. Kim; Myung H. Kim and Kil Y. Kim. 2014. Biocontrol of Late Blight

Disease (*Phytophthora capsici*) of Pepper and the Plant Growth Promotion by *Paenibacillus ehimensis* KWN38. *Journal of Phytopathology*

(10) 박지숙. 2012. 생초혼합 액비 시용이 토양의 화학성에 미치는 영향. 2012 한국토양비료학회 춘계학술발표회

(11) 정병곤. 2013. 농림폐자원 및 기능성미생물을 이용한 생초미생물 혼합액비 제조 가능성 평가. 2013년 대한환경공학회 국내학술대회

(12) 정병곤. 2013. 농림폐자원을 이용한 친환경 액비 제조 가능성 평가. 2013 대한환경공학회 국내학술대회

(13) 이서연. 2013. 생초미생물액비 시용이 토양 및 작물의 생육에 미치는 영향. 2013 한국토양비료학회 추계학술발표회

(14) 김종대. 2014. 기능성미생물을 이용한 실험실 규모 생초미생물 혼합액비 제조공정 최적화. 2014년도 한국폐기물자원순환학회 춘계학술연구발표회

#### 나. 연구인력양성

(1) 박사. Kyaw Wai Naing. 2014. The biocontrol of plant fungal diseases by *Paenibacillus ehimensis* KWN38.

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

본 연구과제의 수행성으로 생초의 미분쇄연구 연구결과 기어식 분쇄기(등록번호 : 10-1313334호)의 특허 등록 하였으며, 최종 개발된 3단식 기어를 이용한 생초분쇄기(출원번호 : 10-2012-0027740)의 특허 출원을 완료하였다. 또한 셀룰로스 분해와 병해방제 기능을 동시에 갖는 *Paenibacillus ehimensis* KWN38와 잔디예초물을 이용한 생초미생물 혼합액비 제조기술을 잔디를 이용한 액체비료 및 제조방법(출원번호 : 10-2014-0136727)에 대한 특허 출원도 완료 하였다.

본 연구개발결과인 생초미생물 혼합액비의 산업화중 상품화는 제4종 복합비료와 미량요소 복합비료로 추진할 계획으로 이화학 분석 및 비해·비효 시험을 완료 하였으며, 원자재인 생초(잔디예초물)의 확보가 용이한 골프장 및 골프장 잔디관리 용역업체를 대상으로 완제품보다는 생초미생물 혼합액비 제조기술의 보급을 통한 자체 생산쪽으로서의 산업화를 추진할 계획이며, 이를 위한 연구를 지속적으로 추진 할 계획이다.

## 제 6 장   참고문헌

Goeschl, R. and H.K. Lee. 1998. Recent tendency to organic waste treatment in Europe. Korea Organic. Resource. Recycling. Assn. 2:4-14.

Yamada K. and H. L. Xu. 2001. Properties and applications of an organic fertilizer inoculated with effective microorganisms. Journal of Crop Production. 3(1):255-268.

Ha S. M., K. W. Chang, J. H. Han, and J. J. Lee. 2005. Changes of physic-chemical properties and maturity assessment during composting of turfgrass clipping types from the golf courses. Korea Organ. Rcsour. Recyl. Assoc. 3(4):89-99.

Lee, S. K. 2012. Effects of liquid fertilizer produced from fermented clippings for kentucky bluegrass. Asian J. Turfgrass Sci. 26(1):67-71.

Lee T. K., J. S. Park, M. J. Lee, J. S. Kim, H. M. Ro, S. J. Kim, S. W. Jeon, S. G Seo, K. Y Kim, G. H. Lee, and B. G. Jeong. 2012. Variation patterns in concentration of inorganic nitrogen from liquid grass fertilizer during aerobic incubation. Korean Journal of Soil Sci. Fert. 45(6):1120-1125.

Ministry of environment. 2010. White paper of environment, Gwacheon, Republic of Korea.

Ro H.M., L.S. Kim, M.J. Lee, H.J. Choi, and C.H. Park. 2008. Soil moisture regime affects variation patterns in concentration of inorganic nitrogen from liquid swine manure during aerobic incubation. Korean Journal Soil. Sci. Fert. 41(1):34-37.

Verkleij, F. N. 1992. Seaweed extracts in agriculture and horticulture: a review. Biol. Agric. Hort. 8(4):309-324.

Warbrick, C, D. McGoldrick and E. A. Kirk. 1997. The 1996 protocol to the London dumping convention and the brent spart. Intl and comparative law quarterly. 46(4):957-964.

Westerman, P.W. and J. R. Bicudo. 2005. Management considerations for organic waste use in agriculture. Bioresource. Technol. 96(2):215-221.

- Beard, J.B. 1973. *Turfgrass science and culture*. Prentice-Hall, Inc.
- Ham, S.G., S.T. Kim, and S.K. Lee. 1997. *Effect of IBDU complex and organic fertilizers for creeping bentgrass in golf course*. Kor. Turfgrass Sci. 11(3):167-172.
- Hwang, Y.S., and J.S. Choi. 1999. *Effect of mowing interval aeration and fertility level on the turf quality and growth of zoysiagrass(Zoysia japonica Steud.)*. Kor. Turfgrass Sci. 13(2):79-90.
- Hwang, Y.S., Y.B. Lee, and D.W. Han. 1991. *Effects of nitrate and potassium source on the growth and quality of Zoysia japonica Steud.* Kor. Turfgrass Sci. 5(1):1-10.
- Kim Y.S., K.S. Lee, and S.G. Ham. 2003. *The effect of liquid fertilizer contained amino acids on the growth of bentgrass(Agrostis palustris Huds) and the chemical characteristics of soil*. Kor. Turfgrass Sic. 17(4):147-154.
- Metcalf and Eddy, Inc. 1979. *Wastewater Engineering, Treatment, Disposal and Reuse*. New York:McGraw-Hill.