

발 간 등 록 번 호

11-1543000-000808-01

보안과제(), 일반과제(○)

과제번호 111155-3

식물 및 미생물을 활용한 친환경 유기농 자재 개발 연구
(Development of High-efficiency Bio-organic Agricultural
Materials from Plant and Microbial Resources)

강원대학교

농 립 축 산 식 품 부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “식물 및 미생물을 활용한 친환경 유기농 자재 개발 연구” 과제(1 세부과제 “식물생장촉진 및 토양전염성 병해 방제용 미생물제 개발 및 활용 연구”, 1 협동과제 “선충억제 퇴비 개발”, 2 협동과제 “토양병해 방제 미생물제제 개발 및 산업화”)의 보고서로 제출합니다.

2015년 01월 26일

주관연구기관명 : 강원대학교

주관연구책임자 : 이 윤 수

세부연구책임자 : 이 윤 수

연 구 원 : 김 상 우

연 구 원 : 거 비 르

연 구 원 : 정 진 희

협동연구기관명 : 유기농업연구소

협동연구책임자 : 김동근

협동연구기관명 : (주)오상킨섹트

협동연구책임자 : 이 준 석

요 약 문

I. 제 목

식물 및 미생물을 활용한 친환경 유기농 자재 개발 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

가. 연구개발의 목적

- (1) 지금까지의 생산성 위주의 고투입 농업에서 경제·사회 발전의 기본 패러다임의 변화에 따른 지속가능한 농업, 환경보전에 기여하는 농업으로 전환 필요
- (2) 정부의 저탄소 녹색성장 정책기조에 따라 농식품의 핵심 전략분야로 ‘친환경농식품 및 연관 산업’이 대두되고, ‘친환경농식품’ 분야가 녹색산업으로의 가치가 증대
- 녹색인증 10대 분야(저탄소 녹색성장법 근거)에 선정
- (3) 친환경, 웰빙, 식품안전 등 안전·안심 먹을거리에 대한 국민적 요구 증대

나. 연구개발의 필요성

- (1) 기술적 측면
 - (가) 유용미생물을 활용한 작물의 성장촉진과 병 방제는 화학비료나 합성농약의 과다 사용으로 각종 부작용을 없애고, 생태계보호와 환경농업을 실천하는 중요한 기술임
 - (나) 최근 들어 길항미생물을 식물체 근권에 선택적으로 적용하여 토양병해를 효율적으로 방제하기 위한 방법 중의 하나로 길항 미생물을 제제화 하여 유기농산물 생산을 위한 친환경·고효율 생물자재를 개발 할 필요가 있고, 유용 미생물 자원의 확보가 요구됨
 - (다) 채소 등 각종 작물의 재배에서 미생물에 의한 성장촉진 및 병해 발생 억제는 전체적으로 생산요소 일수를 단축시키거나 묘 소질 향상은 물론 상품성 있는 농산물생산 크게 기여할 수 있음
 - (라) 토양의 물리·화학·생물학적 특성이 불량하여 생산성이 낮은 경우가 많음. 따라서 토양 개량제는 비료 등 인위적으로 토양의 특성이 악화된 경우와 천연 비옥도가 낮은 토양의 특성을 동시에 개량할 수 있는 복합적인 기능을 보여주어야 하며, 또한 토양에 부담을 주지 않고 토양에서 일어나는 자연적인 현상을 최대한 활용할 수 있는 친환경적인 특성을 지녀야 함
 - (마) 시중에 유통되는 각종 미생물이 첨가된 토양개량 효과를 나타내는 생물제제의 보급량이 크게 증가하는 추세이며, 친환경농업의 육성 정책으로 인해 사용은 증가될 추세이므로 단순 기능의 개량제 보다는 복합기능을 가진 토양의 질 개선을 위한 토양 개량제 제제를 개발하여 이의 수요에 대비할 필요가 있음

(바) 현재 국내의 친환경유기농자재는 총 1,154개의 품목이 등록되어 있다.

Table. 친환경유기농자재(총 1,154)중 미생물 및 식물(천연물)추출물 제제 목록

	병해 방제용	충해 방제용	병해충 방제용	작물 생육용	토양 개량용	토양개량 및 작물생육용
(토양)미생물제제	44	17	-	54	8	82

(사) 최근 다양한 친환경 바이오농약 및 작물생육촉진제가 개발되어 보급되고 있으나 활성성분에 관한 규명은 대부분 밝혀져 있지 않음

(2) 제적·산업적 측면

(가) 세계적 경기 침체에도 불구하고 고가인 유기농식품의 시장 규모가 매년 20% 내외의 지속적인 성장세를 보임

(나) 최근 들어 각종 화학비료 및 농약의 사용량이 급증함에 따라 발생하는 많은 문제점 때문에 화학비료와 농약을 대체할 수 있는 토양에 존재하는 주요 작물의 생육 촉진, 수확 증가와 유해 병원균에 대한 길항력을 갖는 유용 미생물 자원의 확보가 요구됨

(다) 현대의 도시 소비자들은 안전한 농산물에 관한 관심과 소비욕구가 매우 증가하였으며, 안전한 농산물의 생산은 깨끗하고 안전한 토양에서 가능하게 됨. 따라서 근래의 집약적인 농업행태로 인해 훼손된 토양을 개량하고 보전하는 일은 도시 소비자와 농촌 생산자 간의 신뢰회복에 이바지 할 수 있으며, 국민들에게 문화적, 사회적으로 매우 중요한 의미를 지님.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

[제 1세부]

(과제명: 식물생장촉진 및 토양전염성 병해 방제용 미생물제제 개발 및 활용연구)

1) 연구개발의 최종목표

○ 유기농산물 생산을 위한 성장촉진 및 토양전염성 병해 방제 미생물제제 개발 및 생물소재의 활용 연구

2) 연구개발의 주요 내용

가) 유용미생물을 활용한 각종 채소 작물재배지의 토질 개선과 각종 채소작물의 생산 촉진용 미생물제제 개발 및 산업화

내생균, 그리고 작물재배 토양 및 초탄에서 분리한 *Pseudomonas* spp., *Lactobacillus* sp. 와 유용광물질인 토탄 및 초탄에서 분리한 *Bacillus aryabhatai* B8W22, *Bacillus aryabhatai* B8W22, *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* GTC 1228, 내생균 및 *Burkholderia* spp. 등을 사용하여 토질 개선과 식물생산 촉진 효과를 검증하여 토질 개선과 식물생산 촉진용 미생물제제를 개발하고 산업화 하고자 함

나) 식물병원성 토양전염 균류의 성장을 억제 하는 미생물제제 개발 및 산업화

식물병원성 토양전염 균류의 억제 미생물제제 개발 및 산업화, 토질 개선과 식물성장 촉진을 위하여 식물병원성 토양전염 균류의 성장을 억제하는 미생물을 이용한 생물농약기술 연구개발, 병원성 토양전염 균류의 성장을 억제하는 토양 미생물의 생리활성 규명 및 산업화기술 개발을 위하여 제1 세부과제 책임자가 보유하고 있는 *Paenibacillus peoriae* p222, *Paenibacillus polymyxa* E681, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* CICC 10078, *Bacillus* sp. S1-13, *Bacillus subtilis* strain MZA75, *Bacillus subtilis* strain SIO1, *Bacillus subtilis* strain MZA75, *Bacillus* sp. S1-13, *Bacillus amyloliquefaciens* GH28, *Bacillus* sp. S1-13, *Bacillus subtilis* AsK18, *Bacillus subtilis* SMF7, *Bacillus subtilis* MZA75, *Bacillus* sp. S1-13, 내생균, *Burkholderia* spp. 등을 사용하여 토양전염성 병원균을 억제하는 미생물 농약, 토질개선과 식물성장 촉진을 위한 토양균류의 성장을 억제하는 미생물을 제어하는 미생물농약의 개발, 길항미생물의 생리활성 규명 및 산업화 기술을 개발하고자 함

다) <제 2세부과제>에서 개발된 ‘선충억제퇴비’의 토양전염성 병해 억제 효과 및 상호작용 검토

<제 2 세부과제>에서 개발된 선충억제 퇴비의 토양병해 억제 효과 및 병해발생에 미치는 상호작용 검토를 위하여, (1) 선발된 각종 길항미생물을 선충억제 퇴비와 혼용하여 토양병해 억제 효과를 나타내는 조합을 선정하고, (2) 선충억제 퇴비와 길항미생물의 혼용이 토양병해 발생에 미치는 상호 작용에 대하여 검토 하여 종합적인 친환경 토양 병해충 방제 체계를 수립하고자 함.

[제 1 협동]

(과제명: 선충억제퇴비 개발)

1) 연구개발의 최종목표

가) 각종 채소작물 재배지에서 발생하는 선충을 억제하는 선충억제퇴비 개발

2) 연구개발의 주요 내용

- 가) 본 연구는 한방 구충용 식물을 중심으로 뿌리혹선충 억제 식물을 선발하고 이를 선충억제퇴비로 개발한다. 아울러 선충억제퇴비와 선충천적을 적절히 혼용하고 이들의 토양 내 활성화 조건을 설정한다.
- 나) <제1세부과제>에서 개발된 토양전염 병해 방제 미생물제제의 선충억제 효과 및 상호작용을 검토함으로써 친환경적인 종합적 토양전염성 병해 방제체계를 이루고자 한다.

[제 2협동]

(과제명: 토양병해 방제 미생물제제 개발 및 산업화)

1) 연구개발의 최종목표

- 가) 각종 채소작물을 대상으로 식물병원성 토양균류 억제 미생물제제 개발 및 산업화

2) 연구개발의 주요 내용

가) 고효율 친환경 자재 개발 및 산업화

- *Trichoderma* sp.의 생리, 배양학적 특성 조사
- *Trichoderma* sp.의 효과 검증
- *Trichoderma* sp.의 처리방법 다양화
- *Trichoderma* sp.를 이용한 농가 실증 평가
- 다른 미생물과의 상호관계 규명
- *Trichoderma* sp.의 후막포자 생성, *Trichoderma* sp. 제품화
- 제품 등록 및 제품 출시

나) 제1, 제2 세부과제의 제품에 대한 품질 안정화

- 제품의 기간별 균밀도 측정
- 제품의 내구성 실험

다) 제1, 제2 세부과제에서 개발된 제품의 산업화, 농가보급

- 제1, 제2 세부과제에서 개발된 제품의 산업화
- 개발된 제품을 이용한 종합적인 친환경 재배 실증 평가
- 제품 등록 및 제품 출시

IV. 연구 개발 결과

[제 1세부]

본 연구는 유용미생물을 활용한 친환경 유기농자재 개발을 목적으로 수행되었으며, 각종 채소 작물들의 병방제 및 성장촉진 미생물 제제를 개발하고 산업화에 목적을 두고 있다. 초탄 및 토양에서 분리한 21개의 미생물을 이용하여 식물병원성 곰팡이병인 *Phytophthora* spp., *Colletotrichum* spp., *B. cinerea*, *R. solani*, *S. minor*의 8개 곰팡이병을 대상으로 실험을 실시한 결과, 5개의 균주에서 높은 균사 성장 억제 효과를 확인 할 수 있었다. 선발된 균주를 대상으로 식물 성장 촉진 검정을 위하여 상추, 청경채, 배추, 고추, 토마토를 이용하여 실험하였다. 5개의 균주 중에서 B10-2 청경채, 상추, 배추 모두에서 높은 성장촉진 결과를 보여주었으며, AB 15의 경우 토마토와 고추에 대해서 높은 성장 촉진 효과를 확인 하였다. 길항능력과 성장촉진에 효과가 있는 5개 균주를 동정한 결과 4개의 *Bacillus* 종과 1개의 *Paenibacillus* 종으로 동정되었다. 선발된 균 중에서 다양한 곰팡이병에 효과가 있으며, 성장촉진 효과도 있는 AB 15 균주를 대상으로 소배양(4L) 및 대량 배양(1.5t)을 실시하였다. 배양 결과, 소용량 배양(4L)의 경우 44h부터 포자가 형성되기 시작하였으며, 중용량 배양(140L)의 경우 66h부터 포자가 형성되는 것을 확인 하였다. 또한 포자 형성은 pH 6.7에서 형성되기 시작하여 pH 6.9에서 포자 형성이 완료 되는 것으로 확인 되었다. 1.5톤 대량배양에서는 54h 부터 포자가 형성되기 시작하는 것을 확인 하였다. 최종 배양조건은 대용량(1.5t)에서 28°C/ 150rpm/ 54h 배양이 조건이 최적임을 확인 하였다. 농자재 개발을 위한 안전제는 계면활성제 WP-280B를 이용하여 수화제를 만들어 안정성을 확인 하였으며, 입제의 경우 고령토 등을 이용하여 제형화 하였다. 제형화된 수화제와 입제를 이용하여 포장 실증실험을 수행하였으며, 고추와 토마토를 대상으로 500배 처리에서 효과가 있는 것으로 확인 되었다.

본 연구는 생물학적 방제를 위하여 무독성의 환경친화형 생물 소재를 개발하고자 수행되었다. 딸기에서 분리한 118여 균주를 탄저병균과 대치배양을 실시하여 가장 강한 항균활성을 보이는 CP1 균주를 분리하였다. CP1 균주는 간상형의 그람 양성세균으로 내생포자를 형성하였다. 형태학적 특성과 API kit test, 16S rDNA 및 gyrase A gene sequencing 분석 결과를 종합하여 *Bacillus amyloliquefaciens*로 동정되었다. 대량배양을 위한 최적 배양조건을 탐색한 결과, 배지는 Molasses, 온도는 30°C, pH는 6, 교반속도는 150rpm 이었다. 이 조건으로 대량배양을 실시하였을 때 배양 3일째 균체수가 최고밀도로 5.7×10^{10} 였으며 4일째에 항균활성이 가장 강했다. *B. amyloliquefaciens*로 동정된 CP1은 딸기 탄저병에 대한 생물학적 방제제로 유용할 것으로 판단된다.

SR1, SR2와 GS1 균주는 11개의 식물 병원균(*Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*, *Cylindrocarpon destructans*, *Fusarium solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Stemphylium lycopersici*, *Fusarium oxysporum*, *Stromatinia gladioli*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici*, *Collectotrichum gloeosporioides*)에 대하여 항균활성을 나타냈다. 이들 균주들은 16S rDNA sequencing 데이터를 기초로 *Bacillus velezensis* (SR1), *B. subtilis* (SR2), *Paenibacillus brasilensis* (GS1)로 동정이 되었다.

차아염소산을 포함하는 pH 5.0~6.5를 보이는 미산성수(SAEW)는 *Alternaria panax*의 포자 발아를 PDA 상에서 24시간 후에 100% 저해한다. 인삼포장에서 인삼 점무늬병을 일으키는 *A. panax*에 대한 방제효과를 보기 위해 SAEW를 처리하였다. SAEW를 처리하지 않은 무처리구에

서는 95% 이상이 인삼 점무늬병이 발생하였으나, SAEW를 처리한 처리구에서는 30%의 병 발생이 나타나 인삼 점무늬병에 대한 강한 방제제로의 가능성을 확인하였다.

한천배지확산법과 essential oil을 PDA배지에 혼합하는 방법, 휘산법에 의한 *in vitro* 검정에서 cavacrol, thymol, eugenol의 항균활성은 매우 뛰어났다. 그러나 methyl eugenol의 항균활성은 cavacrol, thymol, eugenol의 항균활성에 비해 상대적으로 낮았다. 반면에 *in vivo* 검정에서는 methyl eugenol의 딸기 잣빛곰팡이병 억제율이 82%로 다른 essential oil보다 뛰어났으며 이러한 결과는 *in vitro* 검정과는 상반되는 것이었다.

각종 antifungal isolates나 essential oil의 제형화를 통해 많은 식물병원균에 대한 유효 항균활성 농도가 분석되고 다양한 활용법이 개발된다면 친환경적 식물병의 방제도 충분히 가능할 것으로 생각된다.

[제 1협동]

식물 기원의 살선충 물질 탐색 연구의 일환으로, 178과, 1,677종 식물의 부위별 조추출물 2,714종을 이용하여 이들이 선충의 활성에 미치는 영향을 검토하였다. 선충억제 활성 검정은 96-well microplate를 이용하였으며 부식성선충 20마리를 조추출물 5,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에 침지하고 7일간 매일 관찰하였다. 시험결과 2,362종(87.0%)의 조추출물은 부식성선충에 전혀 영향을 미치지 않았고, 187종(6.9%)의 조추출물은 부식성선충의 활성을 50% 정도 억제하였고, 95종(3.5%)의 조추출물은 90% 이상 억제를 보였으며, 70종(2.6%)의 조추출물에서는 오히려 부식성선충이 번식되었다. 1차 검정에서 50% 이상 선충억제 활성을 보인 추출물중에서, 25개의 추출물을 임의로 선택하여 2, 3차(부식성선충), 4차(고구마뿌리혹선충 유충) 반복 시험을 수행한 결과, 약 44%의 시료는 지속적인 선충억제 활성을 보였다. 이번 시험에서 선충억제 활성을 나타낸 282개의 식물 조추출물은 앞으로 식물 기원의 살선충 물질 연구시 참고 자료로 활용될 수 있을 것이다.

천적곰팡이를 제제화하고 실내, 온실 및 포장 시험을 실시하였다. 천적성곰팡이 F4의 싸라기 제제를 토양무게 0.5%, 1.0%로 처리할 경우 약 50-80%의 뿌리혹선충 밀도 억제효과를 보였다. 이 제제를 이용한 포장 시험에서도 F4 곰팡이 처리는 무처리에 비하여 수량은 179% 증수되었으며 뿌리혹선충의 유충 밀도는 참외 정식 150일후인 6월 17일까지 94% 낮게 유지되었다. 이상의 결과를 요약한다면, 참외 재배지에서 포식성곰팡이 제제를 처리함으로써 수량은 70% 이상 증수가 가능하다. 그 이유로는 포식성곰팡이 제제처리가 뿌리혹선충의 초기 밀도를 억제하여 작물이 초기에 뿌리혹선충의 피해를 회피하였으며 150일 이후까지 지속적으로 선충을 억제하기 때문으로 생각된다.

[제 2협동]

본 연구에서는 *Trichoderma* sp.를 활용하여 토양병해 식물병원균을 방제할 수 있는 미생물 제제를 개발하고자 한다. *Trichoderma* sp.를 활용한 미생물제제는 다양한 식물병원균에 효과를 나타내고 있으며, 특히, 균핵병과 잎마름병에 90%이상의 방제가를 보이는 것으로 조사되었다. 또한, 종자의 발아력을 촉진시키는 것으로 조사되었으며, 포장실험에서는 식물 성장 효율과 식물병 억제율이 좋게 나타났다.

전국 5개지역으로부터 토양을 채취하여 *Trichoderma* 33종을 분리하였으며, 이들 중 가장 항균력이 우수한 *Trichoderma* OK-1 균주를 최종선발하였으며, 선발된 균주는 ITS rDNA

sequencing 을 이용하여 동정한 결과 *Trichoderma* sp. OK-1으로 명명하였다.

Trichoderma sp. OK-1의 대량배양을 위하여 탄소원, 질소원 별도 성장효율을 조사하여 다음과 같은 *Trichoderma* 배양용 GMYP(Glucose 1%, Malt 0.5%, Yeast 0.5%, Peptone 0.5%, KH₂PO₄ 0.5%, Water 1L)배지를 선택하였다. 또한, 후막포자 형성 배지(Sucrose 1%, KNO₃ 0.5%, water 1L)로 선택하였다.

Trichoderma sp. 균주를 이용하여 300L에 배양 최적화를 실시하였다. 배양조건은 26℃로 배양하여 Aeration은 180L/min로 조절하고, 발효조 내의 용존산소(DO)는 aeration과 agitation을 이용하여 30% 이상으로 유지하였다. 배양 중 발효조 내 압력은 0.3bar로 유지하였다. 그 결과, 당의 함량은 배양 48시간 후에는 2.5 g/L, 54시간후에는 1.5g/L 70시간 이후에 0 g/L로 되었다. 따라서, 배양 후 70시간 이후에 후막포자 형성을 배지를 넣고, 192시간 동안 포자의 농도를 관찰한 결과, 그림 와 같은 결과를 얻었다. 후막포자의 경우에는 168시간 이후부터 2.2X10⁶ cfu/ml을 유지하고 있었으며, 분생포자의 경우에도 168시간 이후부터 3.1X10⁷ cfu/ml을 유지하고 있었다. 따라서, 최적의 배양시간은 168시간 이후로 조사되었다.

*Trichoderma*의 최적의 제형화를 위하여, 보호제 및 분산제, 보습제를 선별하였으며, 제형화하기 위한 배양액의 건조과정에서 온도 변화 및 탈수 과정에서의 포자의 damage를 줄이기 위해 당 성분의 보호제가 필요하며, 실험한 결과 동결건조 방식 보다는 열풍건조 방식으로 진행시 포자가 더 안전하다는 사실을 알 수 있었다. 또한, 3가지 보호제 중 Celite가 건조 시 보호제로 적합한 것으로 나타났다. 보호제 없이 배양액을 건조 시켰을 경우 99% 이상의 감소율을 보였다. Celite 20%를 혼합하여 건조 시킬 경우 포자의 감소율이 20% 이하로 조사되었다. 또한, 동결건조 방식에서는 Glucose가 안전한 것으로 조사되었다. 분산제의 경우에는 본 시험에서는 미생물 제품을 물에 희석할 때 포자의 분산성을 높여주고, 병원균이나 작물 표면에 포자가 효율적으로 묻을 수 있도록 하기 위해 분산제 선별 실험을 진행하였다. 실험 결과 WP-280B 10% 이상에서 포자의 분산성이 가장 좋은 것으로 조사 되었으며, 보습력도 가장 좋은 것으로 조사 되었다. 보습제의 경우에는 일반적으로 잎의 표면은 길항미생물이 발아하기 위한 습도 조건이 아니기 때문에 포자의 발아율이 높지 않은 것으로 알려져 있다. 병원균이나 작물의 잎에 분사된 포자 주위의 습도를 높여줌으로써 포자발아를 촉진시킬 수 있는 보습제 선별 실험을 진행 하였다. 실험 결과 Sodium PCA 0.5% 이상부터 포자 발아효과가 좋은 것으로 조사되었다.

Trichoderma sp.의 제형화별 조건을 알아본 결과, 수화제(wettable powder)의 경우에는 액상에 비해 비교적 안정성을 유지하고 있으며, 특히, 40℃에서 12주가 지난 후에도 20% 이하의 감소율을 보이고 있다. 또한, 상온 및 -10℃에서도 지속적으로 안정성을 보이고 있다. 따라서, 앞으로 *Trichoderma*의 제형형태는 수화제(Powder type)으로 선정하는 것이 좋을 듯 하다.

길항미생물인 *Trichoderma* sp.의 식물병원성 균에 대한 길항력을 테스트 하였다. 평균 60%이상의 억제율을 갖는 것으로 조사되었다. 특히, 균핵병(*Sclerotinia sclerotiorum*) 및 마늘잎마름병(*Pleospora herbarum*)에 대해서는 90% 정도의 억제율을 보였으며, 잔디의 주요병 중에 하나인 *Pythium* spp. 의 경우에도 81.43%의 높은 억제율을 보였다.

종자발아에 미치는 영향에서는 *Trichoderma* sp.의 침지에 따른 발아력은 처리구에서 무처리구와 비교하여 발아일 수와 발아율에 있어서 월등히 우수한 조건을 확인 할 수 있었다.

Trichoderma sp.를 이용한 상추 생육촉진에 미치는 효과 실험 확인한 결과, 엽장의 경우, 최저 2.8%(논산, 500배 처리구), 최고 17.8%(부여, 250배 처리구)의 증가효과를 나타내었으며, 엽폭의 경우에는 최저 14.9%(부여, 500배 처리구), 최고 28.4%(부여, 250배 처리구)의 증가효과를

나타내었다. 또한, 엽수는 최저 9.6%(부여, 500배 처리구), 최고 51.2%(논산, 250배 처리구)의 증가효과를 나타내었으며, 엽록소 함량의 경우, 최저 15.4%(논산, 500배 처리구), 최고 31.3%(부여, 250배 처리구)의 증가효과를 나타내었다. 생체중의 경우에는 지상부중에서 최저 45.3%(논산, 500배 처리구), 최고 94.9%(부여, 250배 처리구)의 증가효과를 나타내었고, 지하부중의 경우에는 최저 3.9%(논산, 500배 처리구), 최고 31.0%(부여, 250배 처리구) 증가효과를 보였다. 뿌리 길이는 최저 7.4%(논산, 500배 처리구), 최고 21.5%(부여, 250배 처리구)의 증가효과를 보이고 있었다. 비해서험 결과에서는 250배, 500배 처리구에서 대상작물인 상추에 대하여 비해 증상이 나타나지 않는 것으로 조사되었다. 토양의 유해성을 알아보기 위해, 크름, 낱 등의 총 8개 항목을 대상으로 실시하였으며, 결과는 안전하다는 결론을 얻었다. *Trichoderma* sp.를 이용하여 Large patch 병 방제 결과를 보면, *Trichoderma* sp.의 살포 후 무처리구와 비교해 볼 때, 대조(농약)구와 처리구는 발병율의 거의 없는 것으로 조사되었다. 처리구 2의 경우에는 1주일 간격으로 2회 처리 시에는 농약처리구와 거의 비슷한 효과를 보이는 것으로 조사되었으며, 전체적으로 무처리 대비 처리구에서는 Large patch 병에 대한 효과가 있는 것으로 조사되었다. 만약, 살포 기간을 2회 이상으로 할 경우에는 화학농약 만큼의 효과가 발생할 것으로 보인다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

[제1세부]

특허 출원된 “신균주 페니바실러스 폴리믹사 AB-15 균주 및 이의 용도“은 현재 특허를 등록을 추진하고자 한다.

[제1협동]

특허 등록된 “흰가루병 방제용 조성물“은 산업체에 기술이전하고, 선충억제퇴비 제조법에 대해서는 특허를 등록을 추진하고자 한다.

[제2협동]

토양미생물제제로 비료등록 2건(*Trichoderma* sp. 와 *Paenibacillus polymyxa*) 추진을 완료하였음.

SUMMARY

This study was carried out to develop environmental friendly agricultural products with beneficial microorganisms. The main objectives of the study include the development of bio-pesticides and fertilizers for various vegetable crops. Twenty one microbes from peat moss and various soils were tested against eight plant pathogens in *Phytophthora* spp., *Colletotrichum* spp., *B. cinerea*, *R. solani*, and *S. minor*. In the antagonistic tests, five beneficial microbes, were selected. Plant growth promotion test with these five beneficial microbes were also tested for their plant growth promotion effects. Among these five microbes, B10-2 showed plant growth promotion effects on bakchoy, lettuce and Chinese cabbage, and AB 15 showed plant growth promotion effects on tomato and pepper. These five microbes which showed antagonism and plant growth promotion effects were identified as *Bacillus* species (4 isolates) and *Paenibacillus* species 1 isolate). These selected microbes showed antagonism against various plant pathogenic fungi. Isolate AB15 were selected for production test in a small scale and large scale. In a small scale production test, isolate AB15 produced spores 44 hours after the start of fermentation. In a medium scale production test, it produced spores 66 hours after the start of fermentation. In a medium scale production test, spore production were started at pH 6.7 and completed at pH 6.9. In a large scale test at 1.5 ton fermenter, spore formation was started after 54 hours after the start of fermentation. The best conditions for large scale production were 28°C, and 150rpm for 54 hours. A surfactant WP-280B was found to be a good stabilizer for the water dispersible powder formulation. Kaolin was used as a main ingredient for granule formulation. Field tests were performed with water dispersible powder formulation and granule formulation. In the field tests with tomato and pepper, 500 times dilution was found to be the most effective.

This study which would attempt to develop non-toxic and environmentally friendly biological control agents. CP1 isolate was selected among 118 isolates originated in strawberry through opposite culture with anthracnose pathogen, *Colletotrichum gloeosporioides* and reproducibility, durability in time. And CP1 isolate was rod-shaped and gram-positive, which formed endospores. CP1 was identified as *Bacillus amyloliquefaciens* based on the morphological characteristics, API kit test, and 16S rDNA and gyrase A gene sequencing data. For maximizing the cultural condition, it was employed for CP1 to culture under conditions of molasses broth medium, 30 °C, pH 6 and 150 rpm at shaking incubator, which propagated CP1 to attain a concentration of 5.7×10^{10} cell/ml four days after culture. *Bacillus amyloliquefaciens* CP1 isolate was so proper as a biological control agent against strawberry anthracnose.

SR1, SR2 and GS1 isolates were antifungal activity of eleven major plant pathogens (*Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*, *Cylindrocarpon destructans*, *Fusarium solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Stemphylium lycopersici*, *Fusarium oxysporum*, *Stromatinia gladioli*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici*, *Colletotrichum gloeosporioides*). These isolates were identified as *Bacillus velezensis* (SR1), *B. subtilis* (SR2) and *Paenibacillus brasilensis* (GS1) based on 16S rDNA sequencing data.

Slightly acidic electrolyzed water (SAEW), with a pH of 5.0–6.5 and containing hypochlorous

acid (about 95% HOCl, 25 mg/l available chlorine concentration), was generated by electrolysis of dilute hydrochloric acid (4 to 6% HCl) in a chamber of a non-membrane electrolytic cell. Spores of *Alternaria panax* suspended in distilled water combined with SAEW showed 100% of germination inhibition rate on PDA after 24h. To survey control effect against *Alternaria* blight by *A. panax* on ginseng field naturally, SAEW was applied by using foliar spray. Disease incidence at non-treatments with SAEW were over 95% in ginseng field, but that of treatments with SAEW were below 30% and proved to exhibit strong fungicidal activity for *A. panax*.

All the essential oils tested, carvacrol, thymol and eugenol were effective than methyl eugenol *in vitro* bioassay, while *in vivo* bioassay, control value of methyl eugenol was the highest as 82% at 100ppm concentration. These results represented that two results *in vivo* and *in vitro* bioassay should be contrary. It should be possible to control several plant diseases environmental friendly, throughout formulation which enhancing control efficacy of antifungal isolates, throughout essential oils for agricultural application based on determining available concentration, and developing various application methods practically.

To develop biological control agents for the control of root-knot nematodes, the project investigated two main research subjects. They were 1) iselection of nematicidal plants, 2) evaluation of predatory fungi formulations in greenhouse and field for the control of root-knot nematodes. A total of 2,714 methanol extracts of 1,677 plant species in 178 families were screened for nemastatical activity against *Rhabditis* sp. by 96-well microplate bioassay. The plant extracts with a concentration of 5,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ were mixed with aqueous nematode solution containing about 20 *Rhabditis* sp. and their activity was examined daily for 7 days. Out of 2,714 plant extracts examined in this test, 2,362 (87.0%) showed no negative influence on the nematode activity, while 187 (6.9%) inhibited nematode activity of about 50%, 95 (3.5%) inhibited nematode activity over 90%, and 70 (2.6%) rather enhanced nematode activity. Twenty five extracts showing over 50% nemastatic activity were randomly selected and subjected to another screening, 2nd and 3rd with *Rhabditis* sp. and 4th with juveniles of *Meloidogyne incognita*; among them 11 extracts (44%) were nemastatic consistently. This study would help for future investigation on nematicidal plants.

When formulations of *Isolate F4* *Isolate AA* were tested in microplot and in field with oriental melon, the treatment significantly increased yield. Especially, yields increased over 80% in F4 treated plot and population of root-knot nematode under controlled until 150 days after treatment. The possible reason is that fungi formulation killed nematodes in soil so plant escaped nematode infection in an early growing season, and grew better.

During the three years of study in greenhouses and in fields, selected predatory fungi, *Isolate F4* increased plant growth and fruit yield over 80%. In future, improved mass production techniques, irrigation formulations for use during crop growing season, test the formulation against other plant-parasitic nematodes such as *Aphelenchoides*, *Pratylenchus*, *Heterodera*, and evaluate the effects of mixed application with nematicides, could make predatory fungi valuable biocontrol agent.

In this research, developed microbial pesticide using *Trichoderma* sp. showing antimicrobial effects

to control soil phytopathogenic microorganism. This microbial pesticide using *Trichoderma* sp. showed continued effectiveness to many plantpathogenic microorganism. especially, in the *Sclerotinia sclerotiorum* & *Pleospora herbarum*, we found out *Trichoderma* sp. had more than 90% of control efficacy. and we found out *Trichoderma* sp. had promoted germination of seeds. Furthermore, field trial was to determine the Plant growth and control efficacy of the product using *Trichoderma* sp. In order to select the best *Trichoderma* sp. with powerful antimicrobial activity against phytopathogenic microbial, 33 species of *Trichoderma* was collected from 5 different areas. The selected *Trichoderma* OK-1 was named *Trichoderma* sp. OK-1 based on the phylogenetic analysis of ITS rDNA. In order to mass production of *Trichoderma* sp., we were investigated optimal cultural conditions. and we were made GMYP(Glucose 1%, Malt 0.5%, Yeast 0.5%, Peptone 0.5%, KH₂PO₄ 0.5%, Water 1L) for *Trichoderma* cultural media. and selected the media(Sucrose 1%, KNO₃ 0.5%, water 1L) for Chlamydo spores formation. We were cultured under optimal condition using 300L fermentor. The cultural condition can be summarized as follows. The cultural temperature was 26°C, Aeration was 180L/min, the Dissolved Oxygen in the fermentor was maintained above 30% using the aeration and agitation. we found out the Glucose content was 0 g/L after 70 hours. and the chlamydo spores of *Trichoderma* sp. were formed 2.2×10^6 cfu/ml and the conidia of *richoderma* sp. were formed 3.1×10^7 cfu/ml after 168 hours. In order to make the optimal formulation using *Trichoderm* sp., we were selected protective agent to prevent damage of spores during freeze drying or Hot-air drying, and dispersing agent, humectant agent. The best protective agent investigated Celite 20% during Hot-air drying, in freeze drying, was investigated Glucose. In the dispersing agent, we were selected the WP-280B 10%. and in the dispersing agent, we were checked over 0.5% of Sodium PCA. We were performed antipathogen test against many plantpathogen *in vitro*. We were checked above 60% of inhibition rate against 12 species plantpathogen. Especially, in the *Sclerotinia sclerotiorum* & *Pleospora herbarum*, we found out *Trichoderma* sp. had more than 90% of control efficacy. and we found out *Trichoderma* sp. had promoted germination of seeds. In the field test, we were investigated that *Trichoderm* sp. was promoted lettuce growth. In the leaf length, this was increased 2.8% (Nosan, 500 times) ~17.8% (Buyeo, 250 times), in the leaf width, was increased 14.9% (Buyeo, 500 times) ~ 28.4% (Buyeo, 250 times), in the number of leaf, was increased 9.6%(Buyeo, 500 times) ~ 51.2% (Buyeo, 250 times), in the content of chloropyll, 15.4% (Nosan, 500 times) ~31.3%(Buyeo, 250 times), in the fresh weight, 45.3%~94.9% (ground part), 3.9% ~ 31.0% (underground part). In order to safety of Soil after treatment of product (*Trichoderm* sp.), we were analysed soil safety test of 8 items include Cr etc. The result was checked very safety. In order to antipathogen efficacy against Large Patch disease in the field, we were conducted to compare the chemical pesticide. In the treatment of *Trichoderma* sp. (2 times treatment), we were checked that the treatment of *Trichoderma* sp. was suppressed occurrence of the Large Patch as the chemical pesticide.

Contents

Chapter 1. Outline of research project	27
Section 1. Purpose of research project	27
Section 2. Changes and prospects for agriculture and rural environment	27
Section 2. Necessity of research project	31
Chapter 2. Domestic and Foreign Status of Technical Development	36
Section 1. Production and Market status	36
Section 2. Domestic status of bio-pesticide production	37
Section 3. Foreign status of bio-pesticide production	39
Chapter 3. Research Contents and Results	42
Section 1. [Project 1] Development and use of bio-pesticides for the promotion of plant growth and management of soil-borne pathogens	42
1. Development and use of beneficial bio-pesticides for the promotion of plant growth and improvement of soil conditions in vegetable cultivations	42
a. Research contents	42
b. Materials and methods	43
(1) Test for antagonisms of selected microbes	43
(2) Test for plant growth promotion and improvement of soil conditions	44
(3) Characterization of siderophore produced by microbes	49
(4) Identification of plant growth promoting beneficial microbes	49
(5) Tests for antagonism with selected beneficial microbes	50
(a) In vitro antagonism tests with selected microbes isolated from peat moss	50
(b) In vitro antagonism tests with selected microbes against various soil-born plant pathogens	51
(c) Selection of antagonists	51
(d) Antagonism tests against <i>Phytoththora</i> spp.	52
(e) Antagonism tests against <i>Colletotrichum</i> spp.	53
(f) Antagonism tests against <i>B. cinerea</i> , <i>R. solani</i> , and <i>S. minor</i>	55
(6) Identification of antagonistic beneficial microbes	57
(7) Tests for antagonism with volatile compounds	58
(a) In vitro antagonism tests with volatile compounds from beneficial microbes against plant pathogens	58
(8) Optimization of growth conditions at small scale (4L) fermentor	59
(9) Optimization of growth conditions at large scale fermentor	60
(a) Optimization of growth conditions at 140L fermentor	60
(b) Optimization of growth conditions at 1,500L fermentor	62
(10) Selection of stabilizer	64

(11) Field tests for antagonists	65
(12) Field tests for soil improvement	65
(13) Development of trial bio-pesticides	66
2. Development and use of beneficial bio-pesticides for the management of soil-borne plant pathogens	66
a. Research contents	66
(1) Selection of endophytic bacteria and antagonism test (CP1 Isolate)	66
(2) Identification of selected microbes	67
(a) Classification	67
(b) Morphology	67
1) Gram staining	67
2) Electron Microscopy	67
(c) Analysis with API Kit	67
(d) Molecular analysis	68
1) DNA extraction and PCR amplification	68
2) Sequencing and statistic analysis	68
(e) Analysis of activities for similar isolates	68
(f) Inhibition tests for spore germination and mycelial growth	69
1) Inhibition tests for mycelial growth	69
2) Inhibition tests for spore germination	69
(g) Studies on the growth conditions for CP1 isolate	69
1) Studies on the mycelial growth conditions	69
2) Studies on the mass productions	70
(3) Studies with Isolates SR1, SR2 and GS1	71
(a) Isolation of endophytic bacteria	71
(b) Identification of endophytic bacteria	71
1) Molecular analysis	71
(c) Antagonism test	72
(d) Test for volatile compounds from endophytic bacteria	72
(e) Test for antagonism against pepper anthracnose	72
(f) Test for antagonism against strawberry anthracnose	72
(4) Tests with slightly acidic electrolyzed water, SAEW	73
(a) Test for <i>Alternaria panax</i> spore germination inhibition <i>in vitro</i>	73
(b) Test for <i>Alternaria panax</i> mycelial inhibition <i>in vitro</i>	73
(5) Tests with essential oil	73
(a) <i>In vitro</i> agar diffusion method test	73
(b) Test for antagonism with essential oil <i>in vitro</i> agar test	73
(c) Volatility of essential oil	74
(6) Antimicrobial activity test with essential oil	74
(a) Antagonistic test against strawberry grey mold	74
b. Result and Discussion	74
(1) CP1 isolate	74

- (a) Selection of endophytic bacteria 74
 - 1) Isolation and characterization of endophytic bacteria 74
 - 2) Antagonistic test with endophytic bacteria 75
- (b) Identification and classification of CP1 isolate 76
 - 1) Morphology 76
- (c) API kit analysis 77
- (d) Molecular analysis 77
 - 1) 16S rDNA 77
 - 2) gyr A 77
- (e) Comparison of activities among the similar isolates 79
- (f) *In vitro* antagonistic tests with CP1 80
 - 1) Antagonistic activities of culture broth 80
 - 2) Inhibitory activities against spore germination 82
- (g) Cultural characteristics 83
 - 1) Studies on the growth conditions of CP1 isolate 83
 - 2) Mass production 86
- (2) Isolates SR1, SR2 and GS1 86
 - (a) Identification of beneficial microbes 86
 - (b) Antagonism test 89
 - (c) Mechanisms of activities 93
 - (d) Volatility test of endophytic bacteria 96
 - (e) Antagonistic test against pepper anthracnose 98
 - (f) Antagonistic test against strawberry grey mold 99
- (3) Tests with slightly acidic electrolyzed water, SAEW 99
 - (a) Test for *Alternaria panax* spore germination inhibition *in vitro* 99
 - (b) Test for *Alternaria panax* mycelial inhibition *in vitro* 100
- (4) Antimicrobial activity test with essential oil 101
 - (a) Test for inhibition of mycelial growth 101
 - 1) *Botrytis cinerea* 101
 - 2) *Pseudomonas panacis* 103
 - 3) *Serratia liquefaciens* 104
 - (b) Test for antagonism with essential oil *in vitro* agar test 104
 - 1) *Pseudomonas panacis* 104
 - 2) *Serratia liquefaciens* 105
 - (c) Volatility of essential oil 106
 - (d) Antimicrobial activity test with essential oil 108
 - 1) Antagonistic test against strawberry grey mold 108
- (5) Field tests 109
 - (a) Antagonistic test against strawberry grey mold 109

Section 2. [Project 2] Development of nematode inhibitory compost 111

- 1. Inhibitory test of plant extracts against nematodes 111
 - a. Materials and methods 111
 - (1) Isolation of crude extracts 111

(2) Isolation and culture of decay nematodes	111
(3) Isolation of root gall nematodes larvae	111
(4) Selection of plant extracts with 96-well microplate	111
b. Results and discussion	112
2. Tests for the management of nematodes with environmental friendly agricultural materials	130
a. Materials and methods	130
b. Results and discussion	132
3. Test for the management of root gall nematode with antagonist	132
a. Materials and methods	132
(1) Formulation of antagonistic fungi	132
(2) <i>In vitro</i> test with antagonistic fungi	133
(3) Pot test with antagonistic fungi in greenhouse	133
(4) Field test with antagonistic fungi	133
b. Results and discussion	134
(1) Formulation of antagonistic fungi	134
(2) <i>In vitro</i> test with antagonistic fungi	135
(3) Pot test with antagonistic fungi in greenhouse	135
(4) Field test with antagonistic fungi	136
(5) Suggestions for effective use of antagonistic fungi	136

Section 3. [Project 3] Development and use of beneficial microbes against soil-borne plant pathogens

plant pathogens	142
1. Studies on the cultural characteristics of <i>Trichoderma</i> sp.	142
a. Materials and methods	142
(1) Isolation of <i>Trichoderma</i> sp.	142
(2) <i>In vitro</i> tests for the selection of beneficial microbes	142
(3) Identification of <i>Trichoderma</i> sp.	142
(4) Studies on the physiological and cultural characteristics of <i>Trichoderma</i> sp.	143
(a) Temperature for growth	143
(b) pH	143
(c) Carbon source	143
(d) Nitrogen source	144
(e) Inorganic salts	144
(f) Changes of spore concentration with agitation speed	144
b. Results and discussion	145
(1) Isolation of <i>Trichoderma</i> sp.	145
(2) <i>In vitro</i> tests for the selection of beneficial microbes	145
(3) Identification of <i>Trichoderma</i> sp.	146
(4) Studies on the physiological and cultural characteristics of <i>Trichoderma</i> sp.	146
(a) Temperature for growth	146
(b) pH	146

(c) Carbon source	146
(d) Nitrogen source	146
(e) Inorganic salts	146
(f) Changes of spore concentration with agitation speed	146
2. Studies on the establishment of mass production process	149
a. Materials and methods	149
(1) Conditions for the formation of chlamydospores of <i>Trichoderma</i> sp.	149
(a) Culture with various carbon sources	149
(b) Culture with various nitrogen sources	150
(c) Conditions for the formation of chlamydospores	150
(d) Optimization of growth conditions for the mass production of <i>Trichoderma</i> sp.	150
b. Results and discussion	151
(1) Conditions for the formation of chlamydospores of <i>Trichoderma</i> sp.	151
(a) Culture with various carbon sources	151
(b) Culture with various nitrogen sources	152
(c) Conditions for the formation of chlamydospores	153
(d) Optimization of growth conditions for the mass production of <i>Trichoderma</i> sp.	153
3. Formulation	155
a. Materials and methods	155
(1) Establishment of conditions for the formulation of <i>Trichoderma</i> sp.	155
(a) Selection of protectant	155
(b) Selection of dispersant	156
(c) Selection of moistener	156
(d) Test for stabilization for pass the time	156
(e) Interactions with other microbes and survival rate in the soil	157
(f) Compatibilities with microbial culture fluids, plant extracts and pesticides	157
(g) Survival rate in the soil	157
(2) Production of test product and fertilizer registration	158
b. Results and discussion	158
(1) Establishment of conditions for the formulation of <i>Trichoderma</i> sp.	158
(a) Selection of protectant	158
(b) Selection of dispersant	159
(c) Selection of moistener	159
(d) Test for stabilization for pass the time	160
(e) Interactions with other microbes and survival rate in the soil	161
(f) Compatibilities with microbial culture fluids, plant extracts and pesticides	161
(g) Survival rate in the soil	162
(2) Production of test product and fertilizer registration	163
4. Effectiveness verification of <i>Trichoderma</i> sp.	164
a. Materials and methods	164

(1) <i>In vitro</i> test with <i>Trichoderma</i> sp.	164
(a) Antagonistic test against the <i>Trichoderma</i> sp.	164
(b) Growth promotion test with various plants	164
1) Evaluation on the effect of seed germination	164
2) Evaluation on the effect of lettuce growth	164
3) Evaluation on the effect of grass growth	165
4) Evaluation on the effect of potato and young radish growth	165
(2) Field test with <i>Trichoderma</i> sp.	165
(a) Evaluation on the effect of lettuce growth	165
(b) Evaluation on the effect of ginseng growth	166
(c) Evaluation on the effect of grass growth	166
1) <i>In vitro</i> test	167
2) Field test for the management of large patch on warm-season grass	167
b. Results and discussion	168
(1) <i>In vitro</i> test with <i>Trichoderma</i> sp.	168
(a) Antagonistic test against the <i>Trichoderma</i> sp.	168
(b) Growth promotion test with various plants	169
1) Evaluation on the effect of seed germination	169
2) Evaluation on the effect of lettuce growth	170
3) Evaluation on the effect of grass growth	170
4) Evaluation on the effect of potato and young radish growth	171
(2) Field test with <i>Trichoderma</i> sp.	172
(a) Evaluation on the effect of lettuce growth	172
(b) Evaluation on the effect of ginseng growth	174
(c) Evaluation on the effect of grass growth	174
1) <i>In vitro</i> test	174
2) Field test for the management of large patch on warm-season grass	176
Chapter 4. Accomplishments and contributions to the related research fields	178
Section 1. Yearly objectives	178
Section 2. Points and criteria and for evaluations	182
Section 3. Research work performance and level of achievements	185
Section 4. Level of contribution in the related field	187
Chapter 5. Research results and the applications of research results	188
Section 1. Level of achievements	188
1. Publications	188
2. Education, advisory, and distribution of technic etc.	189
3. Patents, variety developed, and abstracts etc.	189
4. Manpower training	189

Chapter 6. Foreign technical informations collected on the course of research development	190
Chapter 7. Current status of research facilities	191
Chapter 8. References	192

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	27
제 1 절	연구개발의 목적	27
제 2 절	농업·농촌의 여건 변화 및 전망	27
제 3 절	식물 및 미생물을 활용한 친환경 유기농 자재 개발 연구의 필요성	31
제 2 장	국내외 기술개발 현황	36
제 1 절	생산 및 시장현황	36
제 2 절	국내 생물농약 현황	37
제 3 절	국외 생물농약 현황	39
제 3 장	연구개발 수행 내용 및 결과	42
제 1 절	[제1세부] 식물생장촉진 및 토양전염성 병해 방제용 미생물제 개발 및 활용 연구 ...	42
1.	유용미생물을 활용한 각종 채소 작물재배지의 토질 개선과 각종 채소작물의 생산 촉진용 미생물제 개발 및 산업화	42
가.	연구내용	42
나.	연구 방법 및 결과	43
(1)	유용 미생물 길항성 검정(길항 및 생육촉진)	44
(2)	유용 미생물 작물생장촉진 효과 및 토양 개량효과 검정(생육촉진)	44
(3)	생장촉진균이 생산하는 siderophore의 특성 규명(생육촉진)	49
(4)	유용 미생물의 동정(생육촉진)	49
(5)	유용미생물의 선발에 따른 길항성 검정(길항성)	50
(가)	초탄 분리균의 식물병원성 곰팡이에 대한 생장억제 효과 기내검정	50
(나)	각종 토양 전염성 식물병원균에 대한 유용성 균의 길항성 기내 검정	51
(다)	길항미생물 선발	51
(라)	<i>Phytoththora</i> spp. 에 대한 길항성 검정	52
(마)	<i>Colletotrichum</i> spp.에 대한 길항성 검정	53
(바)	<i>B. cinerea</i> , <i>R. solani</i> , 그리고 <i>S. minor</i> 에 대한 길항성 검정	55
(6)	유용 미생물의 동정(길항성)	57
(7)	Volatile 화합물의 효과 검정 (길항성)	58
(가)	유용미생물의 Volatile 화합물을 활용한 식물병원균에 대한 길항성 기내 검정	58
(8)	소용량 배양기 (4 L)에서의 최적화 연구	59

(9) 대용량 배양기(1.5 t)에서의 최적화 연구	60
(가) 140 L에서의 배양 조건 탐색	60
(나) 1,500 L에서의 배양 조건 탐색	62
(10) 미생물 안정제 개발	64
(11) 농가 실증 포장 실험	65
(12) 토양개량효과 포장 검정 실험	65
(13) 시제품 제작	66
2. 식물병원성 토양전염 균류의 성장을 억제 하는 미생물제제 개발 및 산업화	66
가. 연구내용	66
(1) 식물내생세균의 분리 및 항균활성 조사 (CP1 균주)	66
(2) 유용미생물의 동정	67
(가) 분류학적 분석	67
(나) 형태적 분석	67
1) 그람염색 관찰	67
2) 전자 현미경 관찰	67
(다) API Kit을 이용한 분석	67
(라) 분자생물학적 분석	68
1) DNA extraction 및 PCR 증폭	68
2) Sequencing 및 계통분석	68
(마) 유사균주와의 활성 비교	68
(바) 포자 발아 및 균사생장 억제활성 조사	69
1) 균사생장 억제활성조사	69
2) 포자발아 억제 활성 조사	69
(사) CP1 균주의 배양적 특성 조사	69
1) 배양조건에 따른 균생장 조사	69
2) 대량배양	70
(3) SR1, SR2 및 GS1 균주	71
(가) 식물내생세균의 분리	71
(나) 유용미생물의 동정	71
1) 분자생물학적 분석	71
(다) 항균활성 특성 조사	72
(라) 내생균의 휘발성 검정	72
(마) 고추 탄저병에 대한 내생세균의 항균효과 검정	72
(바) 딸기 탄저병에 대한 내생세균의 항균효과 검정	72
(4) 전해수(Slightly acidic electrolyzed water, SAEW)의 효과검정	73
(가) 배지상 <i>Alternaria panax</i> 포자에 대한 발아 억제력	73
(나) 인삼 점무늬병에 대한 전해수의 효과검정	73

(5) Essential oil의 효과검정	73
(가) 한천배지확산법	73
(나) Essential oil 함유 배지에서의 항균활성능 검정	73
(다) 휘발성	74
(6) Essential oil의 활성 검정	74
(가) 딸기 잿빛곰팡이병 방제 효과	74
나. 연구 결과	74
(1) CP1 균주	74
(가) 내생세균의 선발	74
1) 내생세균의 분리 및 형태적 특성	74
2) 내생세균의 길항력 검정	75
(나) CP1 균주의 분류 및 동정	76
1) 형태적 특성	76
(다) API kit 분석	77
(라) 분자생물학적 분석	77
1) 16S rDNA	77
2) gyr A	77
(마) 유사균주와의 활성 비교	79
(바) CP1 균주의 <i>in vitro</i> 상에서의 항균활성 검정	80
1) 배지별 배양여액의 항균활성	80
2) 포자발아 억제 활성	82
(사) 배양적 특성	83
1) 배양조건에 따른 CP1 균주의 성장	83
2) 대량배양	86
(2) SR1, SR2 및 GS1 균주	86
(가) 유용 미생물의 동정	86
(나) 항균활성 특성조사	89
(다) 항균활성 기작	93
(라) 내생균의 휘발성 검정	96
(마) 고추 탄저병에 대한 내생세균의 항균효과검정	98
(바) 딸기 탄저병에 대한 내생세균의 항균효과 검정	99
(3) 전해수 (Slightly acidic electrolyzed water, SAEW)의 효과검정	99
(가) 배지상 전해수의 <i>A. panax</i> 포자에 대한 발아 억제력	99
(나) 인삼 점무늬병에 대한 전해수의 효과 검정	100
(4) Essential oil의 항균활성능 검정	101
(가) 배지상 균 생육 억제	101

1) <i>Botrytis cinerea</i>	101
2) <i>Pseudomonas panacis</i>	103
3) <i>Serratia liquefaciens</i>	104
(나) Essential oil 함유 배지에서의 항균활성능	104
1) <i>Pseudomonas panacis</i>	104
2) <i>Serratia liquefaciens</i>	105
(다) 휘발성 검정	106
(라) Essential oil의 활성 검정	108
1) 딸기 잿빛곰팡이병 방제 효과	108
(5) 포장시험 적용	109
(가) SR2, GS1균주의 딸기 잿빛곰팡이병 방제 효과	109
(나) Essential oil의 딸기 잿빛곰팡이병 방제 효과	110
제 2 절 [제1협동] 선충억제 퇴비 개발	111
1. 식물추출물의 선충 억제효과 검토	111
가. 연구 방법	111
(1) 조추출물 분리 및 확보	111
(2) 부식선충 배양 및 분리	111
(3) 뿌리혹선충 유충 분리	111
(4) 96-well microplate를 이용한 식물 조추출물 선발	111
(5) 선발된 조추출물을 이용한 재확인 시험	112
나. 연구 결과	112
2. 친환경농자재의 선충방제 효과 검증	130
가. 연구 방법	130
나. 연구 결과	132
3. 천적제제를 이용한 뿌리혹선충 방제 시험	132
가. 연구 방법	132
(1) 천적곰팡이 제제화	132
(2) 천적곰팡이 제제의 실내 검정	133
(3) 천적곰팡이 제제의 풋드 검정	133
(4) 천적곰팡이 제제의 포장 시험	133
나. 연구결과	134
(1) 천적곰팡이 제제화	134
(2) 천적곰팡이 제제의 실내 검정	135
(3) 천적곰팡이 제제의 풋드 검정	135
(4) 천적곰팡이 제제의 포장 시험	136

(5) 포식성곰팡이 제제의 효율적 이용방법 제안	136
제 3 절 [제2협동] 토양병해 방제 미생물제제 개발 및 산업화	142
1. <i>Trichoderma</i> sp.의 배양학적 특성 조사	142
가. 연구 내용	142
(1) <i>Trichoderma</i> sp. 균주의 분리	142
(2) 우수균주 선발실험하기 위한 병원균과의 대치배양	142
(3) <i>Trichoderma</i> sp. 의 균주의 동정	142
(4) <i>Trichoderma</i> sp.의 생리, 배양적 특성조사	143
(가) 배양온도	143
(나) pH	143
(다) 탄소원 조사	143
(라) 질소원 조사	144
(마) 무기염류 조사	144
(바) 교반속도(RPM)별 포자농도 조사	144
나. 연구 결과	145
(1) <i>Trichoderma</i> sp. 균주의 분리	145
(2) 우수균주 선발 실험하기 위한 병원균과의 대치배양	145
(3) 균주의 동정	146
(4) <i>Trichoderma</i> sp.의 생리, 배양적 특성조사	146
(가) 배양온도	146
(나) pH	146
(다) 탄소원 조사	146
(라) 질소원 조사	146
(마) 무기염류 조사	146
(바) 교반속도(RPM)별 포자농도 조사	146
2. <i>Trichoderma</i> sp.의 대량생산 공정 확립	149
가. 연구 내용	149
(1) <i>Trichoderma</i> sp. 의 후막포자 생성조건	149
(가) 탄소원별 첨가배지 배양	149
(나) 질소원별 첨가배지 배양	150
(다) 후막포자 2차배지 첨가 후 후막포자형성 유무	150
(라) <i>Trichoderma</i> sp. 의 대량 배양 최적화 연구	150
나. 연구 결과	151
(1) <i>Trichoderma</i> sp. 의 후막포자 생성조건	151

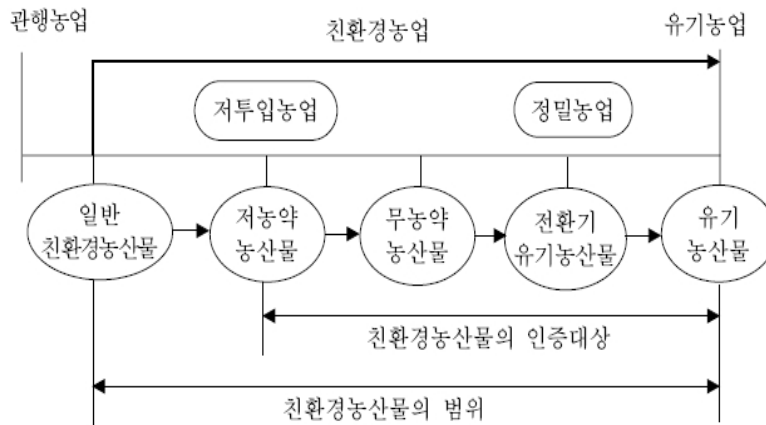
(가) 탄소원별 첨가배지 배양	151
(나) 질소원별 첨가배지 배양	151
(다) 후막포자 2차 배지 첨가 후 후막포자 형성 유무 확인	153
(라) <i>Trichoderma</i> sp. 의 대량배양 최적화 연구	153
3. 개발된 제품의 제형화 확립	155
가. 연구 내용	155
(1) <i>Trichoderma</i> sp. 의 제형화 조건 확립	155
(가) 보호제 선발	155
(나) 분산제 선발	156
(다) 보습제 선발	156
(라) <i>Trichoderma</i> sp. 의 경시 안정성 검정	156
(마) 다른 미생물과의 상호관계 규명 및 토양내 생존율 측정	157
(바) 다른 미생물과 추출물, 농약과 혼용사용 여부 확인	157
(사) 토양내 생존율 측정	157
(2) <i>Trichoderma</i> sp. 의 시제품 제조 및 비료등록 추진	158
나. 연구 결과	158
(1) <i>Trichoderma</i> sp. 의 제형화 조건 확립	158
(가) 보호제 선발	158
(나) 분산제 선발	159
(다) 보습제 선발	159
(라) <i>Trichoderma</i> sp. 의 경시 안정성 검정	160
(마) 다른 미생물과의 상호관계 규명 및 토양내 생존율 측정	161
1) 다른 미생물과 추출물, 농약과 혼용사용 여부 확인	161
2) 토양 내 생존율 확인 실험	162
(2) <i>Trichoderma</i> sp. 의 시제품 제조 및 비료등록 추진	163
4. <i>Trichoderma</i> sp.의 효과 검증	164
가. 연구 내용	164
(1) <i>Trichoderma</i> sp. 의 실내 효과 실험	164
(가) <i>Trichoderma</i> sp.의 식물병원균에 대한 길항력 Test	164
(나) 각 작물별 식물생장촉진 Test	164
1) 종자발아에 미치는 영향평가	164
2) 상추 생육 실험	164
3) 잔디 생육 실험	165
4) 열무/감자 생육 실험	165
(2) <i>Trichoderma</i> sp. 의 포장 효과 실험	165
(가) <i>Trichoderma</i> sp.를 이용한 상추 생육촉진에 미치는 효과 실험	165

(나) <i>Trichoderma</i> sp.를 이용한 인삼 생육촉진에 미치는 효과 실험	166
(다) <i>Trichoderma</i> sp.를 이용한 잔디에 미치는 효과 실험	166
1) Inhibition Zone(저지원) 시험 (실내배양시험)	167
2) 난지형잔디의 Large patch 방제 시험(포장시험)	167
나. 연구 결과	168
(1) <i>Trichoderma</i> sp. 의 실내 효과 실험	168
(가) <i>Trichoderma</i> sp.의 식물병원균에 대한 길항력 Test	168
(나) 각 작물별 식물생장촉진 Test	169
1) 종자발아에 미치는 영향평가	169
2) 상추 생육 실험	170
3) 잔디 생육 실험	170
4) 열무/감자 생육 실험	171
(2) <i>Trichoderma</i> sp. 의 포장 효과 실험	172
(가) <i>Trichoderma</i> sp.를 이용한 상추 생육촉진에 미치는 효과 실험	172
(나) <i>Trichoderma</i> sp.를 이용한 인삼 생육촉진에 미치는 효과 실험	174
(다) <i>Trichoderma</i> sp.를 이용한 잔디에 미치는 효과 실험	174
1) Inhibition Zone(저지원) 시험 (실내배양시험)	174
2) 난지형잔디의 생육조사 및 Large patch 방제 시험(포장시험)	176
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	178
제 1 절 연도별 연구개발 목표	178
제 2 절 평가의 착안점 및 기준	182
제 3 절 연구개발 수행내용 및 목표달성도	185
제 4 절 관련분야의 기여도	187
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	188
제 1 절 연구개발 성과	188
1. 논문게재 성과	188
2. 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등	189
3. 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등	189
4. 인력지원 성과.....	189
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	190
제 7 장 연구시설·장비 현황	191
제 8 장 참고문헌	192

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

1. 지금까지의 생산성 위주의 고투입 농업에서 경제·사회 발전의 기본 패러다임의 변화에 따른 지속가능한 농업, 환경보전에 기여하는 농업으로 전환 필요
2. 정부의 저탄소 녹색성장 정책기조에 따라 농식품의 핵심 전략분야로 ‘친환경농식품 및 연관 산업’이 대두되고, ‘친환경농식품’ 분야가 녹색산업으로의 가치가 증대
 - 녹색인증 10대 분야(저탄소 녹색성장법 근거)에 선정
3. 친환경, 웰빙, 식품안전 등 안전·안심 먹을거리에 대한 국민적 요구 증대



< 『친환경농업육성법』에서의 친환경 농업의 범위>

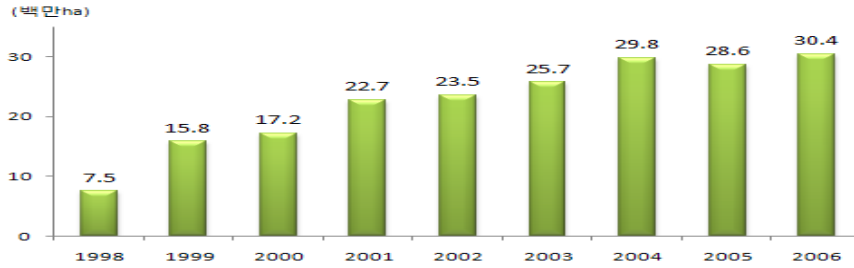
(인용: 『환경친화적 농업자원관리를 위한 농업환경 분석과 정책 개발』 연구자료 D194, 한국농촌경제연구원. 2004. 12. 김창길 외 2인)

제 2절 농업·농촌의 여건 변화 및 전망

1. 농업 농촌의 여건 변화

가. 대외적 여건

- (1) DDA·FTA로 관세장벽이 사라지고 범세계적 시장 통합 가속화
- (2) 세계 인구 증가, 신흥경제국의 고도성장으로 인한 농식품 수요 확대



< 세계의 친환경 농업 면적 >

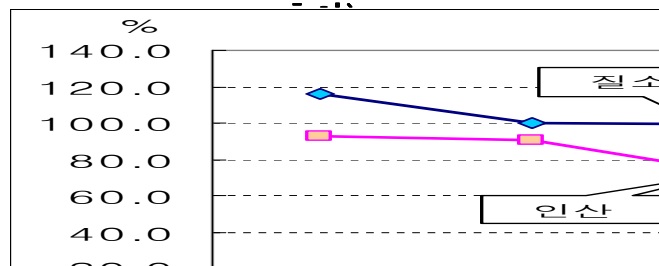
자료: <http://www.organic-world.net>

- (3) 지구온난화로 인한 기후변화와 자원·환경 제약 심화
- (4) IT·BT·NT 등 산업·기술간 융복합화 가속

나. 대내적 여건

- (1) 소비패턴의 다양화·고급화, 식품안전, 환경 등에 대한 소비자의 관심 증가 등 유통 환경이 급변
- (2) 정부의 「저탄소 녹색성장」 정책을 견인하는 신성장동력 사업으로 친환경농업과 녹색기술 개발 등의 중요성 크게 부각
- (3) 고투입·고산출의 농법 확산 및 식생활의 다양화·고급화에 따른 환경부하 증대로 지속 가능한 농업 위협

<우리나라 농경지의 양분초과율 변화>



< 주요 국가의 질소 수지 비교('00~'02) >

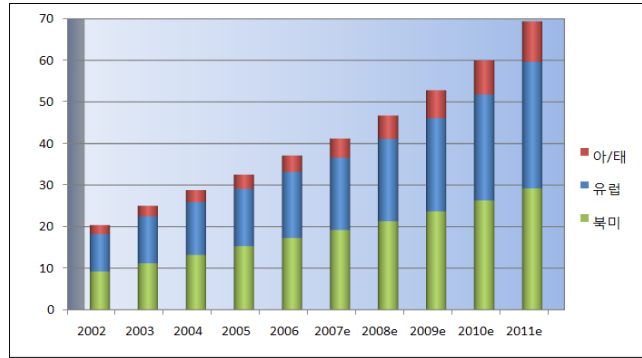
	한국	네덜란드	룩셈부르크	일본	독일
질소수지 (kg N/ha)	240 (1위)	229 (2위)	199 (3위)	166	120

< 주요 국가의 인산 수지 비교('00~'02) >

	룩셈부르크	일본	한국	벨기에
인산수지 (kg P/ha)	57 (1위)	52 (2위)	48 (3위)	20 (4위)

다. 잠재력과 전망

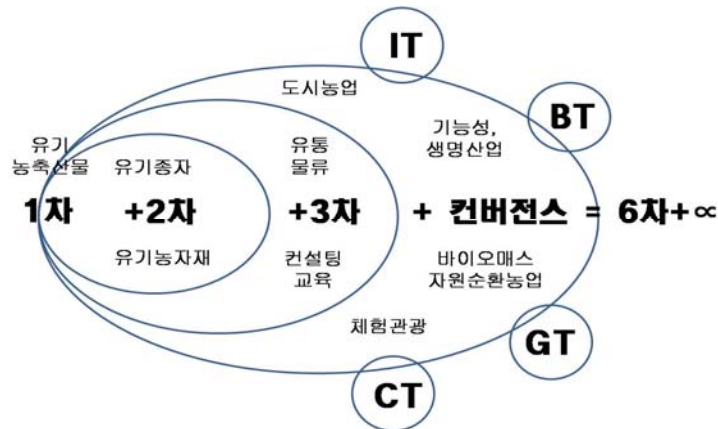
- (1) (농식품 시장 확대) 세계 농식품 시장규모는 연평균 3.9% 증가하며, 특히 유기농 식품 시장 규모는 연 20% 내외 성장



(단위 : 10억\$)

< 세계 유기농식품 시장규모 및 전망 >

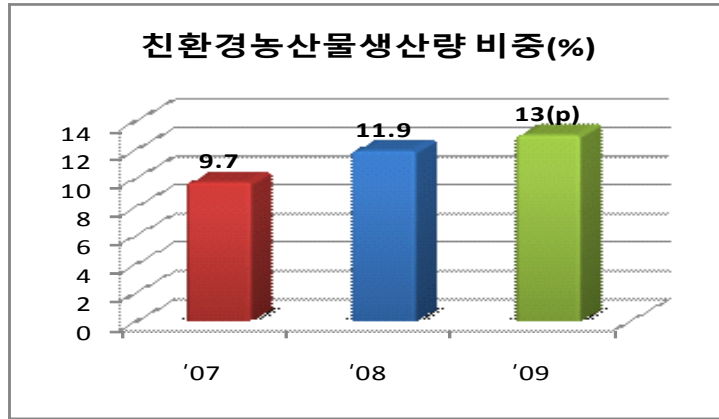
- (2) (소비자 선택 기준 변화) 소득 수준 향상 등으로 인해 가격과 양에서 건강과 영양·안전 등 가치로 변화
- (3) (기후변화 능동적 대응) 기후변화를 새로운 농식품 산업 성장을 창출하는 기회 요인으로 활용
- (4) (타분야와의 유기적 연계) 전후방 산업의 연계 발전을 통해 신성장동력 창출



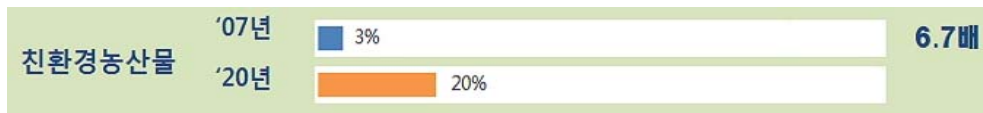
< 유기농식품의 전후방 연관 산업(예시) >

라. 현황과 전망

- (1) 친환경농산물 품목별 출하량은 채소류가 전체의 30%로 가장 많은 비중을 차지
○ 채소류(29.4%) > 과실류(25.2) > 곡류(18) > 과채류(14.7) > 서류(3.5)
- (2) 일반농산물 대비 친환경농산물의 가격프리미엄은 1.2~2.0배 정도이며, 점차 감소되는 추세
- (3) 최근 친환경농산물의 유통 경로는 직거래와 소비자단체를 연계한 유통비중은 감소, 대형 마트 및 전문유통업체 비중 증가
- (4) 소비자가 원하는 안전 농식품의 안정적 공급을 위해 필요한 친환경 농산물의 생산량 비중은 2007년 9.7%, 2008년 11.9%, 2009년 13%, 그리고 이후 계속 증가할 것으로 예상됨.



(5) 2009년 국내 친환경농산물 시장 규모는 약 3조 7,355억원이며, 향후 지속적으로 확대될 전망. 다만, '10년부터 저농약 인증이 신규 폐지됨에 따라 일부 감소할 수 있으나, 점차 회복되어 2020년에는 전체의 약 20% 차지 예상



(6) 국내 유기농식품의 시장규모는 4,043억원 수준('08)이며, 연평균 26%의 성장세로 향후 지속적으로 확대될 전망

구분	2006년	2007년	2008년	연평균 성장률
유기 농산물	1,114(44.0%)	1,427(45.4%)	1,885(46.6%)	30.1%
유기 가공식품	1,419(56.0%)	1,719(54.6%)	2,158(53.4%)	23.3%
계	2,533	3,146	4,043	26.3%

주: 소비자가격 기준, ()안은 구성비(%)

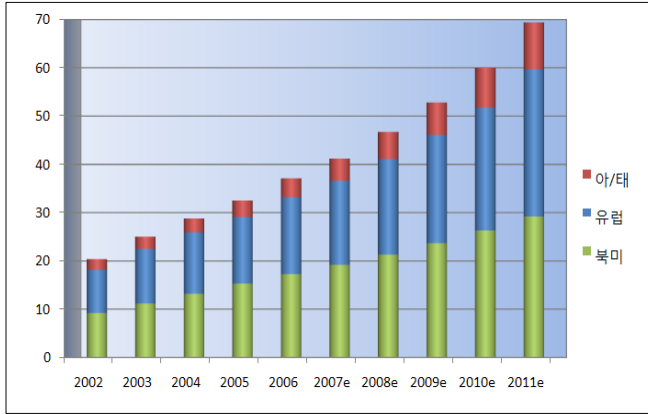
(7) 세계 120개국에서 3,523만ha에서 유기농업 실천
 - 오세아니아(38%) > 유럽(24%) > 남미(20%) > 아시아(9%) > 북미(7%) > 아프리카(2%)

(8) 주요 OECD 국가들은 유기농업을 크게 확대하는 추세

구분	호주	네덜란드	이탈리아	미국	영국	독일	스페인	프랑스	캐나다	오스트리아	스웨덴	일본	중국	한국	전체
재배면적(천ha)	12,023	50	1,002	1,949	737	908	1,130	581	628	492	336	9	1,853	13	35,243
총재배면적 대비비율(%)	2.8	2.6	7.9	0.6	4.6	5.4	4.5	2.1	0.9	17.4	10.8	0.2	0.3	0.8	0.8

* 자료 : IFOAM(2010)

- (9) 2008년 세계 유기농식품 시장 거래액은 약 468억 달러
 - (전체) 시장 유통규모는 2002년(219억 달러)의 두 배 이상 증가
 * 특히, 일본의 연평균 성장률이 약 30%로 가장 상승세



	2007	2008	CAGR (연평균성장률) ('02~'06)	CAGR ('07~'11)
세계	41.5	46.8	13.8%	12.8%
북미	19.2	21.3	17.1%	11.1%
유럽	17.4	19.8	15.3%	15.1%
아/태	4.6	5.6	15.4%	20.5%
미국	17.7	19.6	16.6%	10.4%
독일	4.8	5.4	11.3%	12.2%
영국	3.2	3.6	17.9%	11.8%
일본	0.89	1.19	22.1%	29.8%

* 자료 : World organic foods and beverage report, RNCOS(2007), IFOAM(2009)

(단위:10억USD)

<주요 국가의 유기식품 시장 규모 및 전망>

제 3 절 식물 및 미생물을 활용한 친환경 유기농 자재 개발 연구의 필요성

1. 식물생장촉진 및 토양전염성 병해 방제용 미생물제 개발 및 활용 연구의 필요성

가) 기술적 측면

- (1) 유용미생물을 활용한 작물의 성장촉진과 병 방제는 화학비료나 합성농약의 과다 사용으로 각종 부작용을 없애고, 생태계보호와 환경농업을 실천하는 중요한 기술임
- (2) 최근 들어 길항미생물을 식물체 근권에 선택적으로 적용하여 토양병해를 효율적으로 방제 하기 위한 방법 중의 하나로 길항 미생물을 제제화 하여 유기농산물 생산을 위한 친환경·고 효율 생물자재를 개발 할 필요가 있고, 유용 미생물 자원의 확보가 요구됨
- (3) 채소 등 각종 작물의 재배에서 미생물에 의한 성장촉진 및 병해 발생 억제는 전체적으로 생산소요 일수를 단축시키거나 묘 소질 향상은 물론 상품성 있는 농산물생산 크게 기여 할 수 있음
- (4) 토양의 물리·화학·생물학적 특성이 불량하여 생산성이 낮은 경우가 많음. 따라서 토양 개량제는 비료 등 인위적으로 토양의 특성이 악화된 경우와 천연 비옥도가 낮은 토양의 특성을 동시에 개량할 수 있는 복합적인 기능을 보여주어야 하며, 또한 토양에 부담을 주지 않고 토양에서 일어나는 자연적인 현상을 최대한 활용할 수 있는 친환경적인 특성을 지녀야 함
- (5) 시중에 유통되는 각종 미생물이 첨가된 토양개량 효과를 나타내는 생물체제의 보급량이 크게 증가하는 추세이며, 친환경농업의 육성 정책으로 인해 사용은 증가될 추세이므로 단

순 기능의 개량제 보다는 복합기능을 가진 토양의 질 개선을 위한 토양개량 제제를 개발하여 이의 수요에 대비할 필요가 있음

(6) 현재 국내의 친환경유기농자재는 총 1,154개의 품목이 등록되어 있다.

표. 친환경유기농자재(총 1,154)중 미생물 및 식물(천연물)추출물 제제 목록

	병해 방제용	충해 방제용	병해충 방제용	작물 생육용	토양 개량용	토양개량 및 작물생육용
(토양)미생물제제	44	17	-	54	8	82

(7) 최근 다양한 친환경 바이오농약 및 작물생육촉진제가 개발되어 보급되고 있으나 활성성분에 관한 규명은 대부분 밝혀져 있지 않음

나) 경제적 · 산업적 측면

- (1) 세계적 경기 침체에도 불구하고 고가인 유기농식품의 시장 규모가 매년 20% 내외의 지속적인 성장세를 보임
- (2) 최근 들어 각종 화학비료 및 농약의 사용량이 급증함에 따라 발생하는 많은 문제점 때문에 화학비료와 농약을 대체할 수 있는 토양에 존재하는 주요 작물의 생육 촉진, 수확 증가와 유해 병원균에 대한 길항력을 갖는 유용 미생물 자원의 확보가 요구됨
- (3) 현대의 도시 소비자들은 안전한 농산물에 관한 관심과 소비욕구가 매우 증가하였으며, 안전한 농산물의 생산은 깨끗하고 안전한 토양에서 가능하게 됨. 따라서 근래의 집약적인 농업행태로 인해 훼손된 토양을 개량하고 보전하는 일은 도시 소비자와 농촌 생산자 간의 신뢰회복에 이바지 할 수 있으며, 국민들에게 문화적, 사회적으로 매우 중요한 의미를 지님.

2. 천연 식물기생선충 방제제 개발의 필요성

가. 기술적 측면

- (1) 선충(線蟲, Nematoda)은 선형동물에 속하는 소동물로 환경 적응성이 넓어 지구상 거의 모든 생태계에 분포하고 있다. 선충은 크게 해양선충, 토양선충으로 나누며, 토양선충은 자유생활 선충과 기생성선충으로 나눈다.
- (2) 기생성선충은 기주에 따라 동물기생성선충, 곤충기생성선충, 식물기생성선충으로 나누는데 대표적인 식물기생성 선충은 씨스트선충(*Heterodera* 속), 뿌리혹선충(*Meloidogyne* 속), 뿌리썩이선충(*Pratylenchus* 속)이다.
- (3) 뿌리혹선충(*Meloidogyne* spp.)은 1850년대 영국에서 처음 기록되었고 세계적으로는 78종이 있으며, 국내에는 모두 6종의 뿌리혹선충이 서식하고 있다.
- (4) 국내 재배지에서 가장 문제가 되는 뿌리혹선충은 *M. arenaria* (땅콩뿌리혹선충), *M. hapla* (당근뿌리혹선충), *M. incognita* (고구마뿌리혹선충)등 3종이고, 기주 식물은 가지, 감자, 고추, 담배, 당근, 딸기, 땅콩, 무, 배, 상추, 수박, 시금치, 양파, 오이, 우엉, 인삼, 작약, 참깨, 참외,

콩, 토마토, 포도, 호박 등으로 기주범위가 넓다.

- (5) 국내의 선충 생물적방제 연구역사는 30년 정도이며 총 6종의 *Arthrobotrys*, 5종의 *Monacrosporium* 등 총 11종의 포식성곰팡이가 있으며 약 40여편의 관련 논문이 있다.
- (6) 국내 선충 포식성 곰팡이 검출률은 임야가 38%이고, 밭과 시설재배지에서는 100% 검출되었다. 우점종은 *Arthrobotrys oligospora*이었고, 끈끈이그물(Adhesive nets)을 이용하는 종류가 전체의 72.5%로 가장 많았다.
- (7) 선충잡이곰팡이의 분포는 서식 지역에 따라 다른데, 토양이 비옥한 시설재배지 토양에서 선충잡이곰팡이의 밀도가 높았고 토성 중에서는 pH가 선충잡이곰팡이의 서식에 가장 중요하였다.
- (8) 토양에 유기물을 넣으면 초기에는 유기물의 첨가로 인해 부식성선충의 밀도가 매우 높게 증가하고, 그 후 이 선충들을 포식하기 위해 포식성곰팡이의 밀도가 증가하며, 증가된 포식성곰팡이들은 부식성선충뿐 아니라 기생성 선충까지도 포식하여, 결과적으로 시험구내 기생성 선충의 밀도가 원래보다 더 낮아진다.
- (9) 그러나 일반적으로 포식성곰팡이의 토양내 경쟁력은 낮으며 또 토양의 fungistasis에 의하여 포식성곰팡이의 포자를 토양에 넣었을 경우에는 발아가 되지 않아 거의 효과가 없고, 많은 양의 유기물이나 녹비를 같이 넣었을 경우에는 효과가 있다.
- (10) 살선충제로 개발된 생물적방제제로는 Abbot에서 *Myrothecium verrucaria* 배양액을 이용한 항생물질을 DiTera라는 상표로 제품화하였고, 미국 플로리다에서는 순환물기생균으로서 지금까지 인공배양이 불가능하였던 *Pasteuria penetrans*를 토양 세균인 *Enterobacter cloacae*와 동시에 배양함으로써 대량증식에 성공하였으며, 중국에서는 *Paecilomyces linacinus*를 이용하여 'Soybean Root Bio-Protectant'를 생산하고 있다.
- (11) 선진국에서는 1950년경부터 효과적인 살선충제들이 개발되어 사용되었으나, 최근 이들의 환경과 인체에 대한 고독성이 알려짐으로(aldicarb; 지하수 오염, 불임성 유발 등) 인하여 이들 고독성 살선충제들이 폐기되고 있음으로, 천연물질 등을 이용한 친환경적인 선충 방제법의 개발이 절실하게 필요한 시점임
- (12) 퇴비, 녹비, 유기물, 식물 추출물 등에 의한 선충 억제 효과는 매우 잘 알려져 있고 선충의 천적으로 100여종의 미생물이 알려져 있으나, 아직 친환경적 선충 방제는 요원한 실정임

나. 경제적 · 산업적 측면

- (1) 식물기생성선충은 전 세계적으로 연간 78조 달러의 감수를 가져오며 국내에서는 특히 시설원예 재배지에서 선충의 피해가 많으며 약 30-40%의 수량감소가 발생하는 것으로 추정되고 있으며, 예를 들어, 참외 시설재배지대는 뿌리혹선충의 감염률이 50% 이상이고 수십년간의 연작으로 뿌리혹선충의 밀도도 높아, 수량 감수 정도, 농약 처리 비용 등을 모두 합하면 연간 약 540억원 이상의 손실이 발생하는 것으로 추정됨
- (2) 시설과채류 재배농가에서 현실적으로 가장 문제가 되는 것은 연작에 의한 토양 병해충이다. 우리나라 주요 시설 과채류 재배지의 대부분에서 토양 병해충이 발생하고 있는데, 작물별 주요 병해충은 박과류는 덩굴쪄김병과 뿌리혹선충(*Meloidogyne* sp.), 가지과 작물에는 세균성 풋마름병과 *Fusarium*에 의한 시들음병, 뿌리혹선충(*Meloidogyne* sp.), 국화 시설재배지에는 뿌리썩이선충(*Pratylenchus* sp.) 등이 피해를 미치고, 과수류 육묘지에는

*Agrobacterium*에 의한 뿌리혹병이 심하게 발생된다.

- (3) 토마토와 가지 연작시 시들음병(*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*), 풋마름병, 뿌리혹선충(*Meloidogyne* spp.) 등에 의하여 수확 과실수는 60-80%, 과실무게는 60-85% 감소한다.
- (4) 식물 기생성 선충에 의한 농작물의 손실은 밭작물 16종에서 6%의 생산량 감소, 과일류 23종에서 12% 감소, 채소류 24종에서 11% 감소, 관상식물 전체에서 10%가 감소되었으며 전 세계적으로는 해마다 78조 달러의 감수를 가져오고 있는 것으로 추정되고 있다. 그리고 채소 종류별 선충에 의한 피해율을 보면 당근, 양배추, 메론류, 호박 등이 20%의 피해를 받으며, 다음으로 고추, 옥수수, 토마토가 15%의 피해, 다음으로 감자, 고구마, 셀러리, 양배추, 완두콩 등이 10%의 피해를 받는 것으로 나타나 전체적으로는 평균 11%의 피해율을 나타낸다.

표. 식물 기생 선충에 의한 작물별 생산량 감소 추정치(1970 미국)

작물	감소율(%)	피해 금액(\$/ha)
밭작물(16종)	6	10.1
과일류(23종)	12	175.1
채소류(24종)	11	131.5
관상식물(전체)	10	690.7

표. 채소 종류별 선충에 의한 감소율(1970, 미국)

작물명	피해율(%)	작물명	피해율(%)	작물명	피해율(%)
감자	10	양배추(짜)	20	셀러리	10
고구마	10	아스파라거스	0.1	수박	5
고추	15	양배추	10	토마토	15
꽃양배추	2	양파	2	Melon	20
당근	20	오크라	5	호박	5
마늘	1	옥수수	15	시금치	2
브로콜리	2	완두	10		
상치	1	Cantaloupe	20	전체 평균	11

- (5) 국내의 시설원에 재배지에는 뿌리혹선충의 감염으로 연간 약 30-40%의 수량감소를 가져오는데, 이 뿌리혹선충은 우리나라의 거의 모든 시설원예작물(오이, 수박, 참외, 토마토 등)에 피해를 주고 있으며 참외에서만 연간 약 540억원의 손실이 발생하는 것으로 추정되었다.



그림. 선충의 피해 증상

- (6) 기타 선충 피해로는, 시설 딸기를 재배하는 광양, 고령 등지에서는 아엽선충류(Bud and leaf nematodes), 마늘과 감자에는 줄기구근선충류(Stem and bulb Nematode), 구미 등 국화 재배지에서는 뿌리썩이선충류(Root lesion nematode)이 문제 선충이다.
- (7) 선충 피해를 감소시키는 관리 방법으로는 윤작, 객토, 태양열 소독, 담수처리, 토양 훈증, 살선충제 처리 등이다. 선충 방제는 지금까지 쉽게 구할 수 있는 유기합성제 농약이 주로 사용되어왔었는데, 최근 유기합성농약들의 인체 및 자연 환경에 미치는 악영향이 밝혀지면서 Aldicarb, Fenamiphos, Methyl bromide, DBCP, EDB 등 효과 좋은 살선충제들의 등록이 취소되면, 이러한 농약들을 대신할 수 있는 선충방제법의 개발이 절실히 요구되고 있는 실정이다.
- (8) 효과적인 식물기생성선충 방제를 위해서는 방제효과가 지속적이고 환경에 안정적이어야 한다.
- (9) 2011년 국내 품목고시된 친환경농자재는 총 1,154종으로 해충용 129종, 병해방지용 140종, 천적류 143종, 작물생육용 자재 338종, 토양개량용 408종이다.

품목별	해충용	천적류	병해용	병해충용	작물생육용	토양개량용	총 계
점수	129	134	140	5	338	408	1,154

- (10) 목록공시된 해충용 농자재 129종중에서 선충방제와 관련 있는 것으로 생각되는 제품은 땅거미(미생물제제), 뿌리삼(차나무+계피추출물), 토충잡(고삼추출물), 바이선(천연추출물), 페스탈메리골드(식물추출물), 선그린(계피추출물), 선충뚝(고삼추출물), 네마킬(미생물제), 선충에(미생물제), 나마플러스(식물추출물), 스파이더(식물추출물), 토충탄(동백나무추출물), 네마큐(식물추출물) 등 13종이다.
- (11) 목록공시된 토양개량용 농자재는 총 408종인데 그 중, 광물질 유래 50종, 미생물제 90종, 유기질비료 69종, 퇴비 93종, 식물성 유래(추출물 등) 51종, 키토산 4종, 해조류 8종, 부식산 13종, 피트모스 8종, 기타 22종이다. 이들 제품중 유기질비료, 퇴비, 식물성 유래 및 미생물 유래 제품중에는 토양 선충 억제와 관련된 제품이 있을 수도 있다.
- (12) 미국 OMRI에는 BioStart(미생물제), Desert King Chile(Quillaja Extract), Nema-Q, AzaMax(Neem Extract), EcoGarden(Neem Extract and Derivatives), Dragonfire-CPP, Ontrol 등 7종이 선충 방제용 친환경자재로 등록되어있다(2010년).

3. 식물 및 미생물을 활용한 친환경 유기농 자재 개발 연구의 필요성

- 가. 친환경 농산물을 생산하기 위해 친환경 자재 사용이 늘어가고 있지만, 효과 미흡 및 토양 개선, 병해충, 식물기생성선충 중 일부 방제 실패로 비료 및 농약을 사용하고 있음.
- 나. 유기농산물 생산을 위한 토양개선, 병해충 및 식물기생성선충 방제를 위한 종합적인 친환경 작물재배 기술이 아직 미흡한 단계임. 따라서, 이를 해결하기 위한 고효율, 고품질의 친환경 자재 개발이 절실하게 필요한 실정이며, 또한, 유기농산물 생산을 위해 토양개량제 및 병해충 방제제, 식물기생성선충 방제제등을 이용한 종합적인 친환경 작물재배를 위한 생물자재의 개발이 필요함.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1절 생산 및 시장현황

세계적으로 생물농약의 시장은 도입단계를 지나 성장초기 단계로서 전 세계적으로 친환경정책 및 안전한 농산물에 대한 관심이 증가함에 따라 폭발적으로 시장이 신장하리라 기대된다. Santander Investment(1998)에 의하면 매년 약 10%씩 시장이 신장할 것으로 추정된다.

2004년 현재 국내의 경우 생물농약처럼 위장되어 4종 복합비료로 판매되는 미생물제제를 포함한 국내 생물농약 시장은 약 400억원정도로 추정되며, 2010년에는 전체 농약 시장의 10% 규모인 1,200억원(근거: 친환경농업 정책에 의거하여, 2010년에 유기농산물의 비중이 전체 농산물의 10%를 차지한다고 가정할 때), 그리고 2015년에는 전체 농약 시장의 15% 정도인 1,800억원 정도에 이를 것으로 추정된다(그림). 생물농약이 개발되면 농약 수입대체 효과도 크리라 기대되며, 국내에서 판매되고 있는 농약의 대부분은 수입되고 있는 실정인데, 2002년도 현재 수입은 3억 4천만불(원제 2억 7천만불, 원제 3천 6백만불, 합성원료 3천만불)로서 수입의존도는 78.3%에 이르고 있는 실정이다.

한편, 우리나라의 경우 2009년부터 생물농약 보조 사업을 실시하고 있는 바, 그 동안 친환경 유기농자재나 4종 복합비료에 의하여 시장이 잠식되어 확대되지 않았던 생물농약 시장이 급속하게 신장할 것으로 판단된다. 이에 따라 현재 국내에서 판매되고 있는 제품들 중에서는 품목당 매출액이 10억원이상이 되는 제품은 없으나 시장이 팽창하고 또한 우수한 미생물농약 및 생화학농약의 등록이 활발하게 진행된다면 2010년도에는 품목당 30억원대 제품이 등장할 것으로 기대된다.

세계 생물농약은 2001년 현재 세계 농약 시장의 약 2%인 5.8억불이었으나 (아래 표), OECD 국가를 중심으로 한 친환경농업정책으로 인하여 그 시장규모가 2013년에는 세계 농약시장의 약 15%인 45억불에 달할 것으로 추정된다(Santander Investment, 1998)(아래 그림).

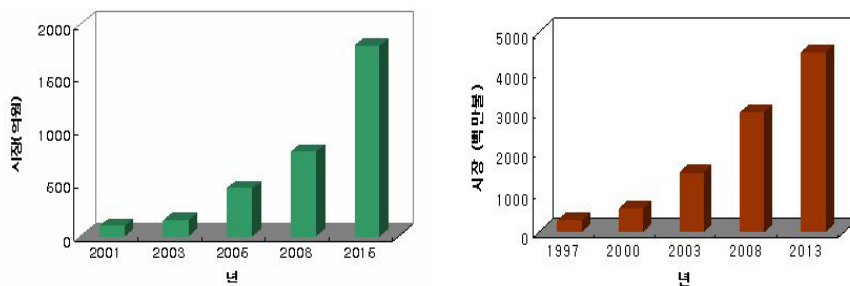


그림. 생물농약의 국내시장(왼쪽) 및 세계시장(오른쪽)전망
(참조 : 생리활성로드맵 작성사업보고서, 2001; Santander Investment, 1998)

표. 2001년 지역별 세계 생물농약 시장

(million US \$)

	Europe	NAFTA	Latin america	Africa	Asia	Oceania	Total
Macrobiales	60	80	10	5	20	15	190
Microbiales							
- Bacteria	20	90	10	5	15	30	170
- Virus	6	4	5	1	3	2	21
- Fungi	5	15	10	1	7	6	44
Subtotal	31	109	25	7	25	38	235
Others							
- Natural products	20	42	10	3	12	10	97
- Semiochemicals	6	25	4	3	15	3	56
Subtotal	26	67	14	6	27	13	153
Total	117	256	49	18	72	66	578

(참조: Michel Guillon, International Biocontrol Manufacturer's Association, France, 2001)

제 2 절 국내 생물농약 현황

국내에서 미생물농약과 생화학농약에 대한 연구는 1980년대에 태동하여 1987년에는 인삼 뿌리썩음병 방제용 바이코나의 개발로 시작되었다. 본격적인 생물농약 연구개발은 1990년대 후반부터 이루어졌으며, 한국화학연구원과 생명공학연구원, 농업과학기술원 등의 연구소, 강원대학교, 충남대학교, 경상대학교, 순천대학교, 서울대학교 등의 대학교, 그리고 (주)동부한농화학, (주)그린바이오텍, (주)비아이지, 고려바이오 등의 기업체에서 개별적으로 연구를 진행해왔다. 미생물농약과 생화학농약 등록규정이 각각 2001년과 2005년에 정해졌으며, 현재까지 미생물농약으로 살균제 15개와 살충제 13개 등 총 28개 품목이 등록되어 시판되고 있다(표 2). 15개의 미생물 살균제 중에서 11개의 제품은 국내에서 개발되었고, 4개의 제품은 수입되었다. 미생물 살충제의 경우에는 6개의 제품이 국내에서 개발되었고, 7개의 제품이 수입된 제품이다. 미생물 제초제 제품으로는 아직 등록된 제품이 없다. 생화학 농약의 경우 현재까지 두 개의 제품이 등록되어 있다. 아자디락틴 입제(제품명: 단독)는 생화학 살충제로 등록되어 있고, 펠라르곤산 유제(제품명: 싸이티)는 생화학 제초제로서 등록되어 시판되고 있다. 아직 생화학 살균제로 등록되어 있는 제품은 없으나, 현재 한국화학연구원, 국립 농업과학기술원, 경농 등을 중심으로 생화학 살균제 후보물을 도출한 다음 생화학 살균제로 등록하기 위한 연구를 진행하고 있다.

생물농약 등록현황

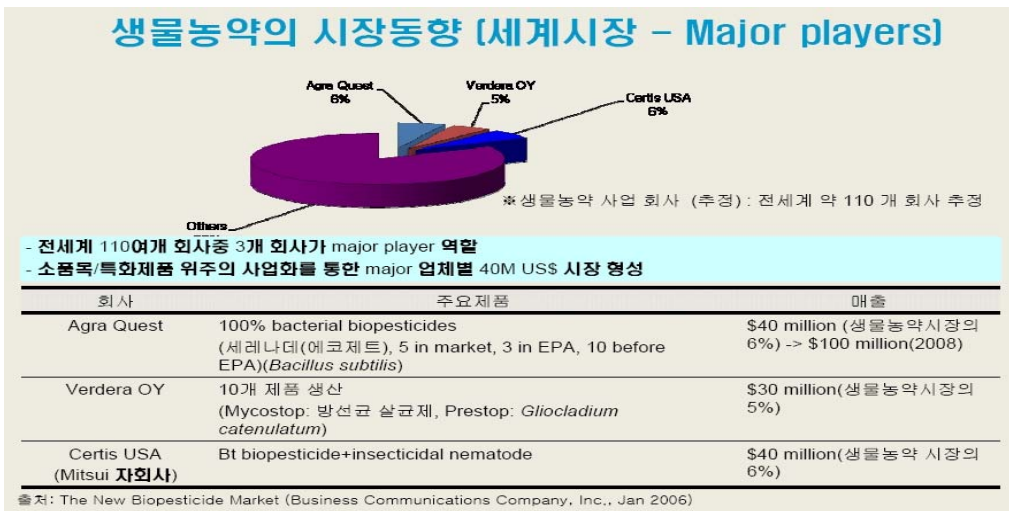
(2010년 6월 30일 현재)

번호	용도	제조수입	취급분야	품목명	등록규격(%)
1	살균	수입	미생물	바실루스서브틸리스와이1336 수화제	1.0×10 ⁹ cfu/g
2				바실루스서브틸리스큐에스티713 수화제	5.0×10 ⁹ cfu/g
3				바실루스서브틸리스큐에스티713 액상수화제	1.0×10 ⁹ cfu/g
4				바실루스푸밀루스큐에스티2808 액상수화제	1.0×10 ⁹ cfu/g
5		제조	미생물	바실루스서브틸리스이더블유42-1 액상현탁제	1.0×10 ⁷ cfu/ml
6				바실루스서브틸리스디비비1501 수화제	1.0×10 ⁹ cfu/g
7				바실루스서브틸리스디비비1501 입제	1.0×10 ⁶ cfu/g
8				바실루스서브틸리스시제이-9 액상현탁제	1.0×10 ⁷ cfu/ml
9				바실루스서브틸리스제이케이케이238 액상제	5.0×10 ⁷ cfu/ml
10				바실루스서브틸리스지비365 수화제	3.0×10 ⁷ cfu/g
11				바실루스서브틸리스지비365 액상수화제	1.0×10 ⁷ cfu/ml
12				바실루스서브틸리스케이비401 유상현탁제	2.0×10 ⁷ cfu/ml
13				바실루스서브틸리스케이비시1010 수화제	1.0×10 ⁵ cfu/g
14				바실루스아밀로리퀴파시엔스케이비시	1.0×10 ⁶ cfu/g
15				바실루스아밀로리퀴파시엔스케이비시1121 수화제	1.0×10 ⁶ cfu/g
16				스트렙토마이세스고시키엔시스더블유와이이324 액제	1.0×10 ⁵ cfu/ml
17				스트렙토마이세스콜롬비엔시스더블유와이이20 액제	1.0×10 ⁴ cfu/ml
18				암펠로마이세스스퀼리스에이큐94013 수화제	1.0×10 ⁷ cfu/g
19				패니바실루스폴리믹사에이시-1 액상수화제	5.0×10 ⁶ cfu/ml
20	살충	수입	미생물	뷰베리아바시아나지에이치에이 유상현탁제	1.0×10 ⁸ cfu/ml
21				뷰베리아바시아나티비아아-1 액상제	1.0×10 ⁶ cfu/ml
22				비티아이자와이 액상수화제	8.5 BIU/kg
23				비티아이자와이 입상수화제	35,000 DBMU/mg
24				비티쿠르스타키 액상수화제	10%
25				비티쿠르스타키 입상수화제	64 BIU/kg
26		생화학	아자디락틴 입제	0.15%	
27		제조	미생물	모나크로스포르툼타우마습케이비시3017 고상제	1.0×10 ⁴ cfu/g
28				비티아이자와이엔티423 수화제	1.0×10 ⁹ cfu/g
29				비티아이자와이엔티423 액상수화제	1.0×10 ⁸ cfu/ml
30				비티아이자와이지비413 액상수화제	1.0×10 ⁷ cfu/ml
31				비티쿠르스타키 수화제	16 BIU/kg
32				패실로마이세스스푸모소로세우스디비비-2032 수화제	5.0×10 ⁷ cfu/g
33		제조	수입	생화학	펠라르곤산 유제

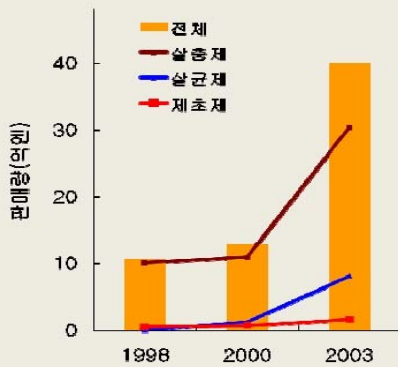
* 품목별 세부 등록내역은 농촌진흥청 홈페이지(기술정보-농자재정보-농약등록현황및사용기준-농약품목등록내역 검색서비스 바로가기)에서 확인 가능함

제 3 절 국외 생물농약 현황

생물농약의 경우에는 대기업보다는 주로 벤처기업이나 중소기업들이 주도적으로 시장을 선도하고 있다. 전 세계적으로 약 110여개의 회사들이 생물농약을 주요 사업으로 펼치고 있는 것으로 알려져 있다. 이들 중에서 연간 3천만불 이상 매출의 비교적 큰 규모의 미생물농약 회사로는 Verdera OY사(미생물농약 시장의 5%), Certis USA사(미생물농약 시장의 6%), AgraQuest사(미생물 농약 시장의 6%) 등이 있고, 작지만 성공적인 회사로 평가받고 있는 회사로는 BioWorks사와 E-nema사가 있으며, 혁신적인 기술로서 이제 막 시작하는 회사로는 Pasteuria BioSciecnes사와 Exosect사 등이 알려져 있다(참조: The Biopesticide market, Business Communications Co., Inc., 2006). 이들 회사들은 각국 정부의 친환경농업정책의 일환으로 정부로부터 정책적 후원을 받으면서, 독자적으로 미생물과 천연물을 선별하거나 대학 및 연구소로부터 아웃소싱을 통하여 우수한 후보물을 확보하여 생물농약을 개발하고 있다.



생물농약의 시장동향 (일본시장)



● 생물농약 시장(일본) 단위:억엔

연도	계	살충제			살균제	제초제
		Bt제	기타	소계		
1998	10.7	7.9	2.2	10.1	0.05	0.5
2000	12.8	7.6	3.3	10.9	1.2	0.7
2003	40.0	21.0	9.3	30.3	8.1	1.6

출처: 일본 생물농약 전문회사 셀테이스ジャパン, 2004

● 생물농약 등록 품목수(일본, 2003)

구분	계	살충제			살균제	제초제
		Bt제	천적	기타		
등록 품목 수	60	16	25	10	8	1

출처: 일본 생물농약 전문회사 셀테이스ジャパン, 2004

천적과 Bt제 위주의 제품화를 통한 생물농약 시장의 급속한 증가

2002년 현재 미국 EPA에는 76개의 미생물농약과 113개의 생화학농약이 등록되어 있다. 미국의 경우 작물에 해를 끼치는 병해충 및 잡초 방제제 외에도 anthraquinone과 같은 조류를 쫓는 물질이라든지 bergamot oil과 같이 개나 고양이를 쫓아 버리는 물질 등도 포함되어 있기 때문에 우리나라에서와 같이 엄격한 의미의 생물농약이라 할 수 없는 물질들도 포함되어 있어 정확한 현황을 파악하는데 어려움이 있다. 이에 비하여 유전물질을 제외한 모든 항목이 거의 우리나라와 일치하는 영국의 BCPC(British Crop Protection Council)에서 출판한 "The Bipesticide Manual"과 "The Manual of Biocontrol Agents, 3rd edition"을 살펴보면 생물농약의 개발 동향과 현황을 알 수 있다(그림).

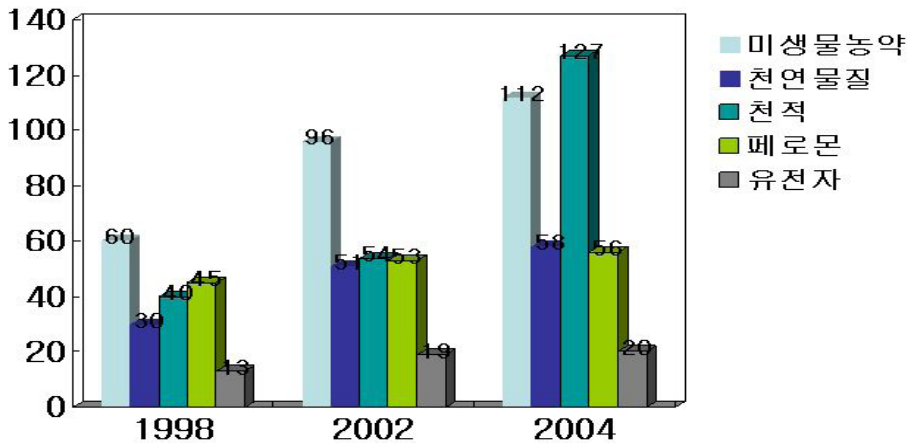


그림. 영국에서 등록된 생물농약

위 그림에서 보는 바와 같이 전체적으로 미생물농약의 수는 꾸준히 증가하였으며, 2002년과 2004년을 비교하였을 때에는 천적의 수가 급격히 증가하는 것으로 나타났다. 2004년 현재 등록되어 있는 생물농약들에는 살충제가 62%, 살균제가 18%, 살선충제가 1.4%, 제초제가 6%, 식물생장조절제가 5%, 그리고 기타가 7.6%를 차지하고 있다.

생화학농약(천연물질과 신호물질)을 제외한 생물학적 농약(미생물농약, 선충, 천적)의 전 세계 시장을 정리하면 아래 표와 같다.

표. 생물학적 농약의 세계시장 (생화학농약 제외)(단위: 백만불)

분류	2003	2004	2005	2010	성장율
<i>Bacillus thuringiensis</i>	242.2	290.4	347.8	611	11.9
<i>Bacillus subtilis</i>	51.9	62.3	74.6	94	4.7
<i>Pseudomonas fluorescences</i>	34.6	41.5	49.7	62	4.5
기타	17.3	20.8	24.9	29	3.1
총계	346	415	397	796	9.9

(참조: The New Biopesticide market, Business Communications Co., Inc., 2006. 1)

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절

[제1세부] 식물생장촉진 및 토양전염성 병해 방제용 미생물제 개발 및 활용 연구

1. 유용미생물을 활용한 각종 채소 작물재배지의 토질 개선과 각종 채소작물의 생장 촉진용 미생물제 개발 및 산업화

가. 연구내용

(1) 유용미생물을 활용한 각종 채소 작물재배지의 토질 개선과 각종 채소작물의 생산 촉진용 미생물제 개발 및 산업화

토양 및 유용광물질에서 분리한 유용균을 활용해 토질 개선 및 식물생산 촉진용 미생물제제를 개발하기 위하여 제1 세부과제 책임자가 보유하고 있는 근권에서 분리한 *Pseudomonas* spp., *Lactobacillus* sp.와 토탄 및 초탄에서 분리한 *Bacillus aryabhatai* B8W22, *Bacillus aryabhatai* B8W22, *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* GTC 1228, 내생균, *Burkholderia* spp. 등을 사용하여 토질 개선과 식물생산 촉진 효과를 활용한 미생물제 개발 및 산업화

제 1 단계 : 유용미생물의 선발 및 효과검정

1. 유용 미생물의 선발에 따른 길항성 검정
 - 1) 유용 미생물의 선발 및 길항성 검정
2. 유용 미생물의 작물생장촉진효과 검정
 - 1) 발아촉진 효과 검정
 - 2) 작물 생장촉진 효과 검정
3. 유용 미생물의 토양개량 효과 검정
 - 1) 작물의 지상부 생육효과 비교
 - 2) 처리별 질소고정수지 비교 등
4. 유용 미생물의 동정
 - 1) 유용 미생물의 동정
5. 생장촉진균이 생산하는 siderophore의 특성 구명

제 2 단계 배지 최적화 및 제제화 연구

1. 소용량 발효조에서의 최적화 연구
 - 1) 당농도의 분석
 - 2) 균체농도 측정
 - 3) 생균수 측정
 - 4) 플라스크 최적 배양 조건

- 5) 소용량 발효조(5L) 에서의 최적화 연구
- 6) siderophore 생성량 측정
- 2. 대용량 발효조에서의 최적화 연구
 - 1) 균체농도 측정
 - 2) 포도당 농도 측정
 - 3) 300L 및 2,500L 발효조에서의 최적화 연구

제 3 단계 : 미생물 안정제 개발

제 4 단계 : 농가 실증 포장실험

- 1. 작물 생육촉진 효과 포장 검증

제 5 단계 : 시제품 개발

- 1. 시제품 제조

나. 연구결과

(1) 유용 미생물 길항성 검증(길항 및 생육촉진)

중국에서 채취한 초탄을 희석 방법을 이용하여 균을 분리한 결과 5개의 균을 분리하였다. 분리한 균을 다음 5개의 병원균과 대치배양 결과 B10-2, B10-4 2개의 균이 최종 선발되었다. B10-2의 경우 탄저병을 일으키는 *C. coccodes*에서는 효과를 나타내지 않았으며, B10-4는 잣빛 곰팡이병을 일으키는 *B. cinerea*에서 효과를 나타내지 않았다(Table 1).

Table 1. Inhibition effects of the bacterial isolates against different plant pathogenic fungi.

Bacterial isolates	Inhibition rate (%)				
	<i>B. cinerea</i>	<i>R. solani</i>	<i>S. minor</i>	<i>C. coccodes</i>	<i>P. drechsleri</i>
B10-2	37.23	30.58	24.11	-	23.05
B10-4	-	36.94	22.82	12.94	23.52
Control	0	0	0	0	0

강원도 지역에서 채취한 토양으로부터 희석방법을 이용하여 균을 분리한 결과 7개의 균을 분리하였으며, 분리한 균을 이용하여 7개의 병원성 곰팡이와 대치배양 결과 AB15 균주가 7가지 병원성 곰팡이 균에 대하여 높은 효과를 나타내었다(Table 2).

Table 2. Inhibition effects of the bacterial isolates against different plant pathogenic fungi.

Bacterial isolates	Inhibition zone (mm)						
	<i>C. acutatum</i>	<i>C. concolor</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>P. infestans</i>	<i>R. solani</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>S. minor</i>
AB05	8.5 ± 0.5	11.4 ± 1.1	9.3 ± 2.2	18.3 ± 1.5	2.0 ± 0.5	3.7 ± 0.4	-
AB15	15.0 ± 0.6	16.2 ± 0.8	17.6 ± 2.5	23.0 ± 1.0	8.6 ± 0.2	12.1 ± 0.6	6.8 ± 1.2
AB17	6.8 ± 1.0	8.6 ± 2.0	5.0 ± 1.0	17.6 ± 2.0	-	2.6 ± 0.4	-
Control	-	-	-	-	-	-	-

(2) 유용 미생물 작물생장촉진 효과 및 토양 개량효과 검정(생육촉진)

분리한 균주에 대하여 작물 생육촉진 및 토양개량 효과를 알아보기 위하여 초탄에서 분리한 균주는 상추, 배추, 청경채를 이용하여 실험을 실시하였다. 효과 검정 실험 결과 2가지 균주 모두 무처리군에 비하여 생체중, 건물중에서 높은 촉진 효과를 나타내었으며, 엽면적 역시 높은 작물생육촉진 효과를 보여주었다(Table 4, 5, 6; Fig. 1, 2, 3). 하지만 지하부인 뿌리 부분의 경우 무처리군과 큰 차이를 보이지 않았다.

Table 3. Growth promotion of lettuce treated with various bacterial isolates.

Bacterial isolates	Leaf area (cm ²)	Fresh weight (g)		Dry weight (g)	
		Leaf	Root	Leaf	Root
B10-2	105.00 ^c	20.01 ^d	8.52 ^{ab}	8.94 ^c	5.15 ^b
B10-4	169.17 ^a	40.29 ^a	8.80 ^a	11.24 ^b	4.17 ^c
Control	81.22 ^c	12.39 ^c	5.79 ^c	5.33 ^d	3.45 ^d

* Means followed by same letter in the columns are not significantly different according to Duncan's Multiple Rang Test(DMRT) at P≤ 0.005.

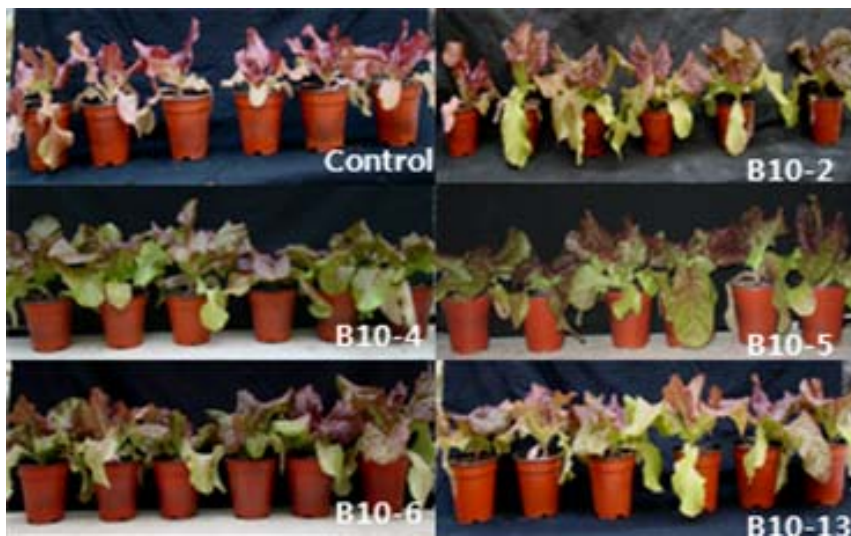


Fig. 1. Growth promotion of lettuce by five bacterial isolates B10-2, B10-4, B10-5, B10-6 and B10-13 on pot tests in the greenhouse.

Table 4. Growth promotion of pak-choi treated with various bacterial isolates.

Bacterial isolates	Leaf area (cm ²)	Fresh weight (g)		Dry weight (g)	
		Leaf	Root	Leaf	Root
B10-2	112.87 ^a	60.70 ^a	3.37 ^a	14.34 ^a	1.90 ^a
B10-4	89.61 ^b	43.29 ^b	3.42 ^a	13.48 ^a	1.67 ^a
Control	57.44 ^c	22.67 ^c	3.25 ^a	9.72 ^c	1.82 ^a

* Means followed by same letter in the columns are not significantly different according to Duncan's Multiple Rang Test(DMRT) at P≤ 0.005.



Fig. 2. Growth promotion of Pak-choi by five bacterial isolates B10-2, B10-4, B10-5, B10-6 and B10-13 on pot tests in the greenhouse.

Table 5. Growth promotion of Chinese cabbage treated with various bacterial isolates.

Bacterial isolates	Leaf area (cm ²)	Fresh weight (g)		Dry weight (g)	
		Leaf	Root	Leaf	Root
B10-2	203.44 ^c	79.63 ^{abc}	2.20 ^a	4.70 ^a	0.53 ^a
B10-4	187.94 ^c	64.30 ^{bc}	2.23 ^a	4.40 ^a	0.53 ^a
Control	157.05 ^d	48.90 ^c	2.30 ^a	3.67 ^a	0.56 ^a

* Means followed by same letter in the columns are not significantly different according to Duncan's Multiple Rang Test(DMRT) at $P \leq 0.005$.



Fig. 3. Growth promotion of Chinese cabbage by five bacterial isolates B10-2, B10-4, B10-5, B10-6 and B10-13 on pot tests in the greenhouse.

강원도 지역 토양에서 분리한 균주에 대하여 발아 테스트 결과 7개 균주 중에서 AB15, AB17 가발아 촉진 및 초기 생육 촉진에 효과를 나타내었다(Fig. 4).



Fig. 4. Germination test of seeds with bacterial treatments and control (SDW). A, Tomato; B, Pepper.

또한, 7균주에 대하여 토마토, 고추, 가지, 딸기, 상추를 대상으로 생육촉진 실험을 위하여 온실에서 각각의 작물을 이용하여 생육 초기부터 분리균을 액체 배양하여 관주 처리하면서 총 7가지 항목에 대해서 실험을 실시한 결과, 토마토의 경우 지하부의 경우 큰 차이를 보이지 않았으나 지상부에서 약간의 차이를 보였으며, 클로로필 함량은 처리구가 무처리구 보다 높았으므로 조사되었다(Table 6). 고추의 경우 클로필 함량에서 무처리의 경우 19.2에 비해 3가지 균주 모두 34이상의 클로로필 함량을 보여주었으며, 3가지 균주 모두 무처리군에 비하여 높은 지상부에서 높은 효과를 나타내었다(Table 7).

Table 6. Effect of PGPR strains on different growth parameters in tomato under greenhouse pot trials. Means obtained from an individual trial, with six replicates per treatment. Each replicate consisted of a single pot with one plant per pot.

Bacterial isolates	Shoot length (cm)	Root length (cm)	Shoot fresh weight (g)	Root fresh weight (g)	Shoot dry weight (g)	Root dry weight (g)	Chlorophyll (spad units)
AB05	59.26dc*	27.30cb	46.50ba	9.83b	8.16ba	2.16bac	36.83a
AB15	67.16ba	28.23b	53.0ba	13.66ba	8.66ba	2.50a	36.20a
AB17	61.13bdc	27.90b	55.16a	20.16a	9.33a	2.50a	37.50a
Control	57.10d	24.93c	40.50b	10.83b	6.33b	1.33c	30.56b

*Means followed by the same letter(s) in each column are not significantly different based on DMRT at $P \leq 0.05$

Table 7. Effect of PGPR strains on different growth parameters in pepper under greenhouse pot trials. Means obtained from an individual trial, with six replicates per treatment. Each replicate consisted of a single pot with one plant per pot.

Bacterial isolates	Shoot length (cm)	Root length (cm)	Shoot fresh weight (g)	Root fresh weight (g)	Shoot dry weight (g)	Root dry weight (g)	Chlorophyll (spad units)
AB05	35.80bc*	21.60d	17.33bc	19.0a	2.50bc	2.0ba	36.46ba
AB15	40.90a	28.66b	19.50a	16.0ba	3.0ba	1.66bc	34.0b
AB17	41.40a	32.46a	19.66a	18.66a	3.33a	2.33a	34.03b
Control	25.06d	19.33d	11.33d	9.83c	2.30c	1.33c	19.20c

*Means followed by the same letter(s) in each column are not significantly different based on DMRT at $P \leq 0.05$.

가지의 경우 고추, 토마토와는 다르게 무처리군에 비하여 지하부의 길이 및 무게에서 높은 효과를 나타내었으며, 지상부, 클로로필 함량 모두 AB05가 2가지 군주보다 7가지 항목에 대하여 높은 효과를 나타내었다(Table 8). 딸기의 경우 AB17이 높은 효과를 나타내었으나, 클로로필 함량에서는 큰 차이점을 나타내지 못하였다(Table 9). 상추의 경우에는 AB15가 가장 높은 생육 촉진 효과를 보이는 것으로 나타났다(Table 10).

Table 8. Effect of PGPR strains on different growth parameters in eggplant under greenhouse pot trials. Means obtained from an individual trial, with six replicates per treatment. Each replicate consisted of a single pot with one plant per pot.

Bacterial isolates	Shoot length (cm)	Root length (cm)	Shoot fresh weight (g)	Root fresh weight (g)	Shoot dry weight (g)	Root dry weight (g)	Chlorophyll (spad units)
AB05	30.26cb	28.90bac*	38.16b	28.33b	8.0b	4.66ba	35.16a
AB15	29.30cb	28.33bc	38.16b	21.50b	7.50b	3.50b	36.63a
AB17	35.50a	32.80a	63.66a	42.0a	11.16a	6.33a	36.30a
Control	22.30d	19.04e	18.33c	17.83b	4.0c	3.0b	30.83b

*Means followed by the same letter(s) in each column are not significantly different based on DMRT at $P \leq 0.05$.

Table 9. Effect of PGPR strains on different growth parameters in strawberry under greenhouse pot trials. Means obtained from an individual trial, with six replicates per treatment. Each replicate consisted of a single pot with one plant per pot.

Bacterial isolates	Shoot length (cm)	Root length (cm)	Shoot fresh weight (g)	Root fresh weight (g)	Shoot dry weight (g)	Root dry weight (g)	Chlorophyll (spad units)
AB05	19.96ba*	16.53bc	17.16ba	3.33bc	4.50a	1.33ba	45.40a
AB15	20.20ba	15.43dc	19.0ba	4.50ba	5.16a	1.50a	46.37a
AB17	24.0a	18.70ba	23.33a	4.33ba	6.0a	1.66a	48.16a
Control	16.20b	14.80d	10.33b	2.0c	2.16b	0.66b	44.50a

*Means followed by the same letter(s) in each column are not significantly different based on DMRT at $P \leq 0.05$.

Table 10. Effect of PGPR strains on different growth parameters in lettuce under greenhouse pot trials. Means obtained from an individual trial, with six replicates per treatment. Each replicate consisted of a single pot with one plant per pot.

Bacterial isolates	Shoot length (cm)	Root length (cm)	Shoot fresh weight (g)	Root fresh weight (g)	Shoot dry weight (g)	Root dry weight (g)	Chlorophyll (spad units)
AB05	26.97ba*	20.03a	80.83b	17.56ed	6.73bc	2.16ba	28.83a
AB15	29.30a	20.53a	94.60a	23.43a	8.03a	3.16a	27.66bac
AB17	26.40ba	19.30ba	82.10b	19.73bcd	7.30ba	2.66a	28.0ba
Control	17.43c	14.26d	62.20d	13.20f	4.13d	1.33b	17.63e

*Means followed by the same letter(s) in each column are not significantly different based on DMRT at $P \leq 0.05$.

Table 11. Effect of PGPR strains on different growth parameters in greenhouse.

Bacterial isolates	Number of leaves (unit)	Chlorophyll (SPAD)	Number of fruits (unit)	Chlorophyll (SPAD)
	Chinese cabbage		Eggplant	
B10-2	38	31.8	15	35.5
B10-4	36	34.5	13	36.9
AB05	41	32.7	18	35.2
AB15	39	32.9	15	36.5
AB17	45	33.8	21	36.8
Control	35	28.4	13	30.8

(3) 생장촉진균이 생산하는 siderophore의 특성 규명(생육촉진)

분리한 균주에 대하여 생육촉진 및 병저항성에 영향을 주는 siderophore의 생성 여부를 확인하기 위하여 Chrome auzorol S (CAS)배지를 이용하여 초탄 및 강원도 지역 토양에서 분리한 균주 5가지를 대상으로 생산 여부를 확인 한 결과 AB15에서 siderophore를 생산 하는 것으로 나타났다. 생성여부는 Chrome auzorol S (CAS)배지에 분리균을 접종하여 오렌지색의 halo zone의 생성 여부를 보고 판단 할 수 있으며, halo zone의 생성 환이 크면 클수록 많은 siderophore를 생산 한다고 할 수 있다(Fig. 5).

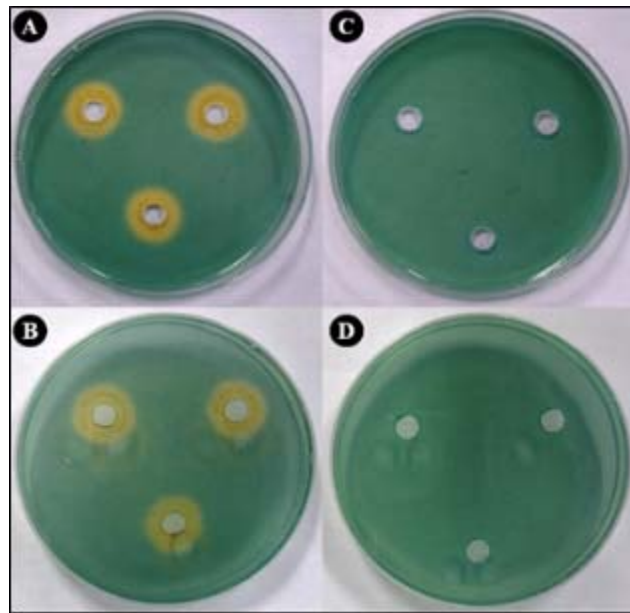


Fig. 5. Siderophore production by *Paenibacillus polymyxa* (AB15) as shown by the yellow halo zone on Chrome auzorol S (CAS) agar plates with the control inoculated with sterile broth only. (A) and (C), front view; (B) and (D), bottom view.

(4) 유용 미생물의 동정(생육촉진)

초탄과 강원도 지역 토양에서 분리한 균주에 대하여 위의 실험을 실시한 결과 5가지 균주 모두 높은 생육 촉진 효과를 보여주었으며, 최종적으로 균주에 대한 동정을 위하여 16s rDNA를 이용하여 동정을 실시하였다. 동정을 위하여 순수 분리된 각 선발 균주를 (주) 마크로젠의 동정 서비스를 이용하여 확인 하였으며, PCR primer는 universal primer를 사용하여 sequencing 결과를 NCBI Blast를 이용하여 확인 결과, 4가지의 *Bacillus* sp.와 1종의 *Paenibacillus* sp.로 확인 되었다 (Table 12).

Table 12. Identification of bacterial isolates to species level by means of 16s rDNA sequencing.

Bacterial isolates	Gen Bank accession no.	Closest Gen Bank library strain	Gram reaction	Similarity (%)
B10-2	-	<i>Bacillaceae bacterium</i>	+	99
B10-4	-	<i>Bacillus</i> sp.	+	99
AB05	AB301002.1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	+	99
AB15	CP000154.1	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	+	99
AB17	GQ375229.1	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	+	98

(5) 유용미생물의 선발에 따른 길항성 검정(길항성)

(가) 초탄 분리균의 식물병원성 곰팡이에 대한 생장억제 효과 기내검정

초탄에서 분리한 세균을 이용하여 병원성 곰팡이 3종에 대하여 길항성 검정을 실시하였다. 실험 결과 B10-2, B10-3, B10-4, B10-5, B10-6, B10-13 균주가 3가지 병원성 곰팡이 균에 대하여 높은 길항성을 보이는 것으로 확인되다(Fig 6, Table 13).

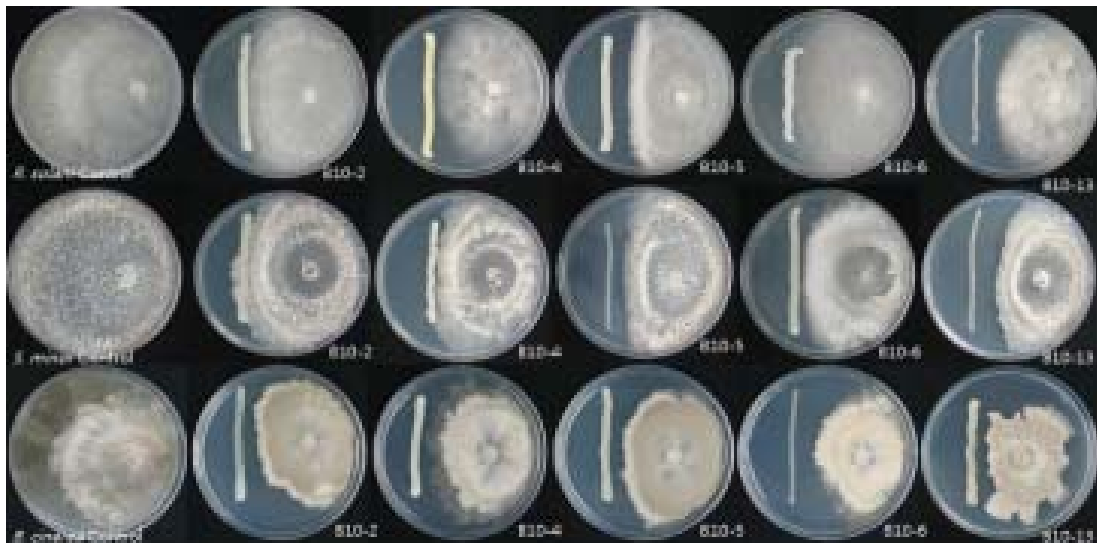


Fig. 6. *In vitro* inhibition of *R. solani*, *S. minor* and *B. cinerea* by bacterial isolates B10-2, B10-4, B10-5, B10-6 and B10-13 on PDA media.

Table 13. Inhibition rate (%) of the bacterial isolates against three fungal pathogens.

Pathogens	Control	B10-1	B10-2	B10-3	B10-4	B10-5	B10-6	B10-7
<i>R. s^a</i>	0	0	30.58	31.41	36.94	37.41	36.11	0
<i>S. m^b</i>	0	18.58	24.11	20.58	22.82	28.11	27.05	0
<i>B. c^c</i>	0	26.70	30.58	33.29	27.05	35.05	43.29	0
Pathogens	B10-8	B10-9	B10-10	B10-11	B10-12	B10-13	B10-14	
<i>R. s^a</i>	0	0	0	0	0	32.11	0	
<i>S. m^b</i>	0	0	18.23	0	7.64	40.47	0	
<i>B. c^c</i>	0	32.94	38.07	0	32.00	37.29	0	

a; *Rhizotonia solani*, b; *Sclerotinia minor*, c; *Botrytis cinerea*

(나) 각종 토양 전염성 식물병원균에 대한 유용성 균의 길항성 기내 검정

강원도 지역에서 채취한 토양으로 부터 7개의 균주를 분리하였으며, 다음의 5종의 *Phytoththora* spp., *Colletotrichum* spp., *B. cinerea*, *R. solani*, *S. minor* 병원성 곰팡이를 대상으로 길항성 능력을 검정한 결과 모두의 균에서 길항능력을 확인 하였다 (Fig. 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18).

(다) 길항미생물 선발

강원도 지역 토양을 수집하여 총 25개의 세균을 분리하였으며, 여러 검정 실험을 거쳐 7개의 균주를 선발하였다(Fig. 7).

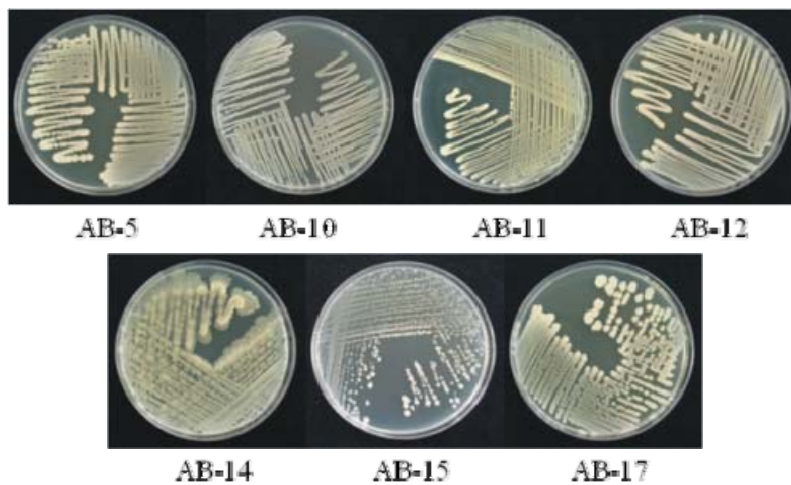


Fig. 7. Different isolates of antagonistic bacteria used in this study.

(라) *Phytophthora* spp. 에 대한 길항성 검정

강원도 지역에서 채취한 토양으로 부터 7개의 균주를 분리하였으며, 다음의 2종의 *Phytophthora* spp. 병원성 곰팡이를 대상으로 길항성 능력을 검정한 결과 모두의 균에서 길항능력을 확인 하였다(Fig. 8, 9, 10).

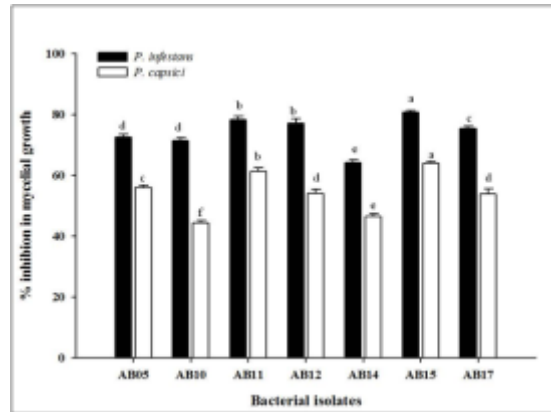


Fig. 8. Inhibition effect of rhizobacterial isolates against the mycelial growth of *Phytophthora* spp. in *in vitro* dual culture assay. Error bars represent the mean standard deviations of three replicates. Bars headed by different letters are significantly different ($P \geq 0.05$) according to Duncan's multiple range tests (DMRT).

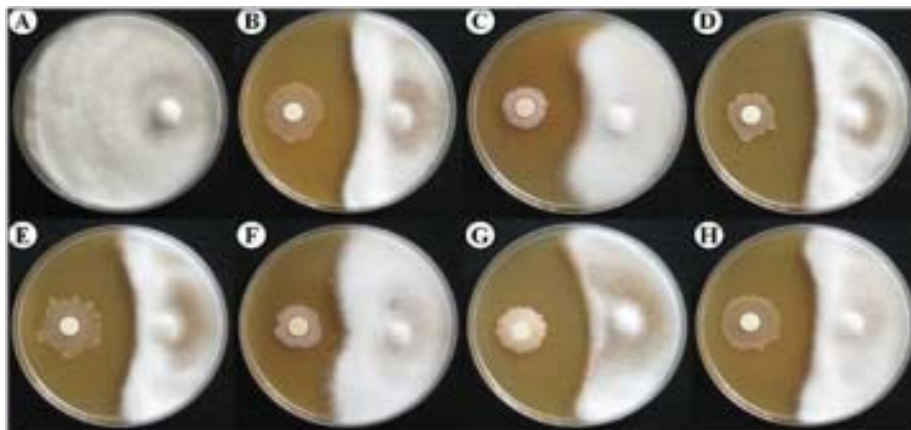


Fig. 9. Dual culture assay for *in vitro* inhibition of mycelial growth of *P. infestans* by selected bacterial isolates. (A) Control (B) AB05 (C) AB10 (D) AB11 (E) AB12 (F) AB14 (G) AB15 and (H) AB17.

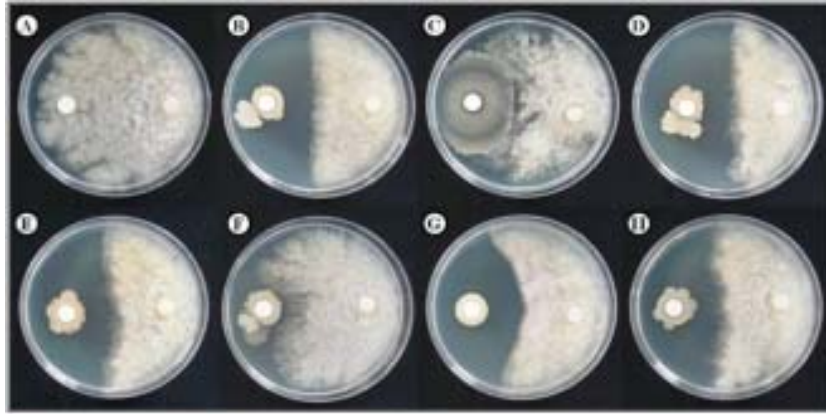
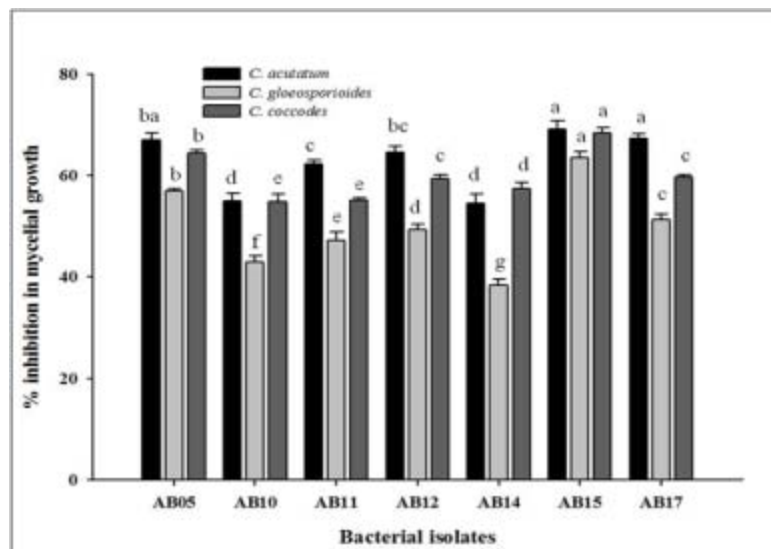


Fig. 10. Dual culture assay for in vitro inhibition of mycelial growth of *P. capsici* by selected bacterial isolates. (A) Control (B) AB05 (C) AB10 (D) AB11 (E) AB12 (F) AB14 (G) AB15 and (H) AB17.

(마) *Colletotrichum* spp.에 대한 길항성 검정

강원도 지역에서 채취한 토양으로부터 7개의 균주를 분리하였으며, 다음의 3종의 *Colletotrichum* spp. 병원성 곰팡이를 대상으로 길항성 능력을 검정한 결과 모두의 균에서 길항 능력을 확인 하였다(Fig. 11, 12, 13, 14).



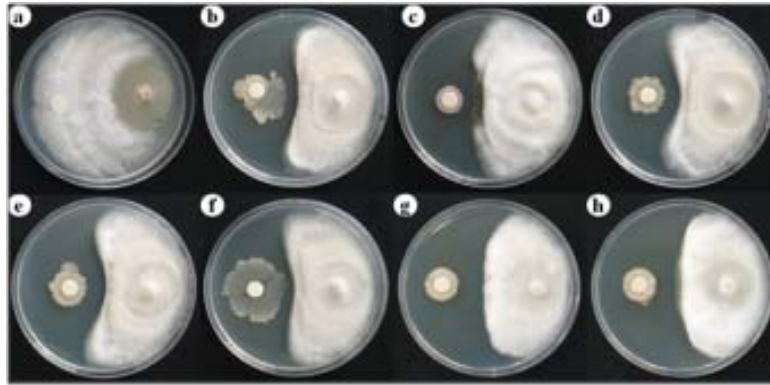


Fig. 11. Dual culture assay for in vitro inhibition of mycelial growth of *C.acutatum* by selected bacterial isolates. (a) Control (b) AB05 (c) AB10 (d) AB11 (e) AB12 (f) AB14 (g) AB15 and (h) AB17.

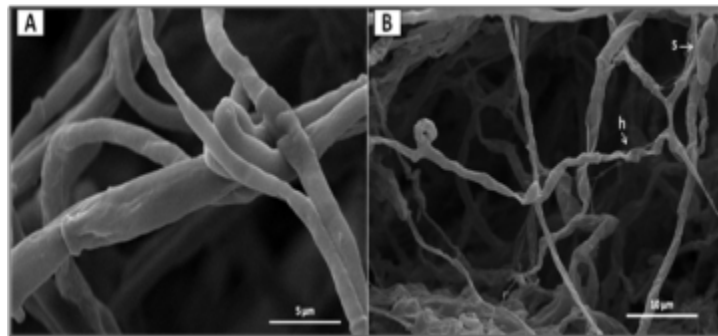


Fig. 12. Scanning electron micrographs of mycelium of *C. acutatum* in dual culture plate. Dual culture plate was incubated with isolate AB 15 for 15 days and morphological changes were investigated. (A) Control with water treated(un-inoculated), (B) Mycelia treated with AB 15 in dual culture plate. h=hyphae, s=spore.



Fig. 13. Dual culture assay for in vitro inhibition of mycelial growth of *C. gloeosporioides* by selected bacterial isolates. (A) Control (B) AB05 (C) AB10 (D) AB11 (E) AB12 (F) AB14 (G) AB 15 and (H) AB17

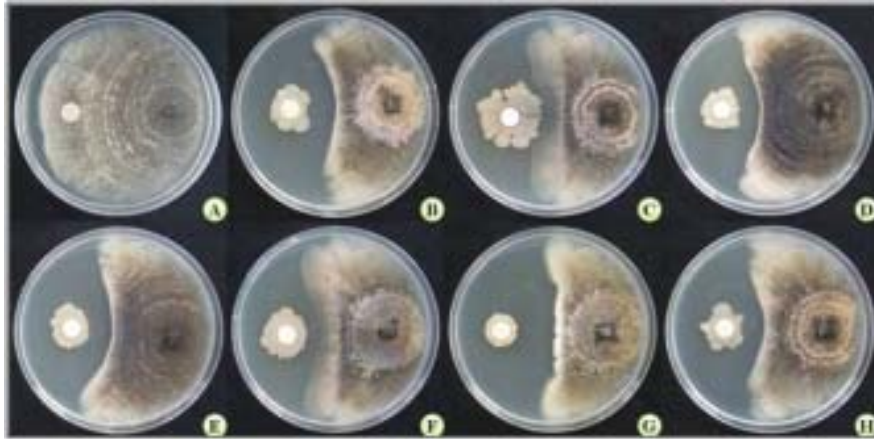


Fig. 14. Dual culture assay for in vitro inhibition of mycelial growth of *C. coccodes* by selected bacterial isolates. (A) Control (B) AB05 (C) AB10 (D) AB11 (E) AB12 (F) AB14 (G) AB15 and (H) AB17.

(바) *B. cinerea*, *R. solani*, 그리고 *S. minor*에 대한 길항성 검정

강원도 지역에서 채취한 토양으로 부터 7개의 균주를 분리하였으며, 다음의 3종의 *B. cinerea*, *R. solani*, *S. minor* 병원성 곰팡이를 대상으로 길항성 능력을 검정한 결과 모두의 균에서 길항능력을 확인 하였다(Fig. 15, 16, 17, 18).

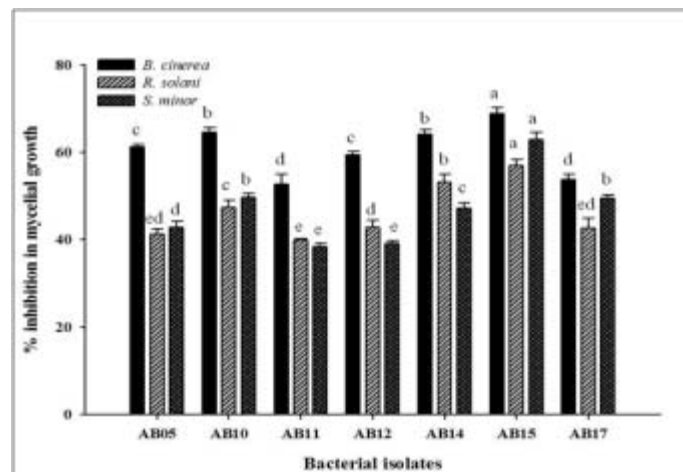


Fig. 15. Inhibition effect of rhizobacterial isolates against the mycelial growth of *B.cinerea*, *R.solani* and *S.minor* in in vitro dual culture assay. Error bars represent the mean standard deviations of three replicates. Bars headed by different letters are significantly different ($P \geq 0.05$) according to Duncan's multiple range tests (DMRT).

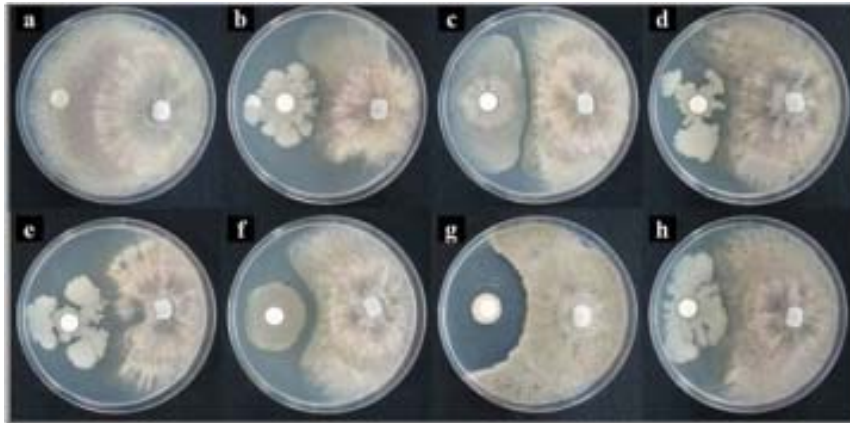


Fig. 16. Dual culture assay for in vitro inhibition of mycelial growth of *B. cinerea* by selected bacterial isolates. (a)Control (b)AB05 (c)AB10 (d)AB11 (e)AB12 (f)AB14 (g)AB15 and (h)AB17.

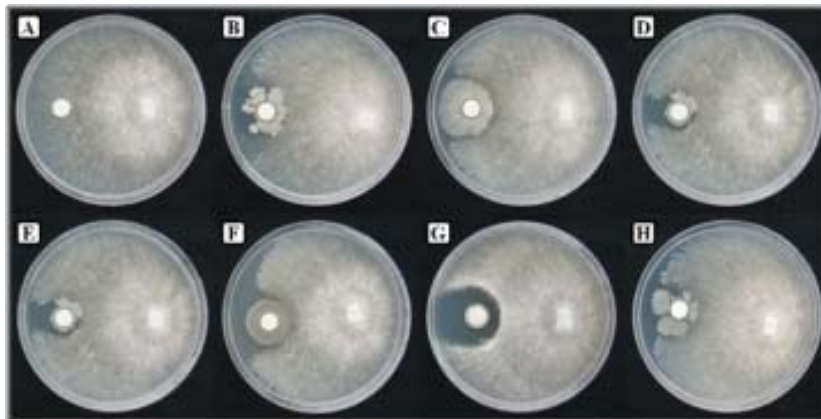


Fig. 17. Dual culture assay for in vitro inhibition of mycelial growth of *R. solani* by selected bacterial isolates. (A)Control (B)AB05 (C)AB10 (D)AB11 (E)AB12 (F)AB14 (G)AB15 and (H)AB17.

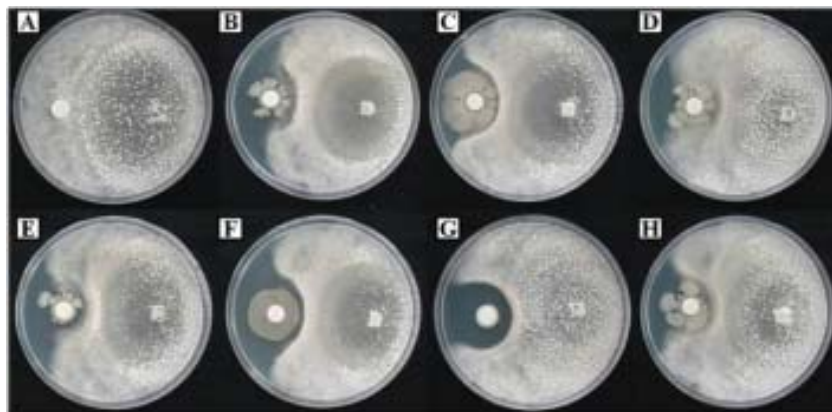


Fig. 18. Dual culture assay for in vitro inhibition of mycelial growth of *S. minor* by selected bacterial isolates. (A)Control (B)AB05 (C)AB10 (D)AB11 (E)AB12 (F)AB14 (G)AB15 and (H)AB17.

(6) 유용 미생물의 동정(길항성)

초탄과 강원도 지역 토양에서 분리한 균주에 대하여 위의 실험을 실시한 결과 11가지 균주 모두 높은 길항 효과를 보여주었으며, 최종적으로 균주에 대한 동정을 위하여 16s rDNA를 이용하여 동정을 실시하였다. 동정을 위하여 순수 분리된 각 선발 균주를 (주) 마크로젠의 동정 서비스를 이용하여 확인 하였으며, PCR primer는 universal primer를 사용하여 sequencing 결과를 NCBI Blast를 이용하여 확인 결과, 9가지의 *Bacillus* sp.과 1종의 *Bacillaceae bacterium*, *Paenibacillus* sp.로 확인 되었다(Table 14, 15).

Table 14. Identification of bacterial isolates to species level by means of 16s rDNA sequencing.

Bacterial Isolates	Closest Gen Bank Library Strain	Gram Reaction
B10-2	<i>Bacillaceae bacterium</i>	+
B10-4	<i>Bacillus</i> sp.	+
B10-5	<i>Bacillus cereus</i>	+
B10-6	<i>Bacillus</i> sp.	+

Table 15. Identification of bacterial isolates to species level by means of 16s rDNA sequencing.

Bacterial Isolates	Gen Bank Accession No.	Closest Gen Bank Library Strain	Gram Reaction
AB05	AB301002.1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	+
AB10	HM101166.1	<i>Bacillus subtilis</i>	+
AB11	HM032893.1	<i>Bacillus</i> sp.	+
AB12	HM101166.1	<i>Bacillus subtilis</i>	+
AB14	AJ880761.1	<i>Bacillus subtilis</i>	+
AB15	CP000154.1	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	+
AB17	GQ375229.1	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	+

(7) Volatile 화합물의 효과 검정 (길항성)

(가) 유용미생물의 Volatile 화합물을 활용한 식물병원균에 대한 길항성 기내 검정

분리한 미생물을 대상으로 휘발성 물질의 여부를 확인하기 위하여 강원도 지역에서 분리한 7개 균주를 대상으로 휘발성 물질 검정하기 위하여 병원성 곰팡이를 I-plate를 이용하여 휘발성 물질의 확산법을 이용하여 대치배양 하였다. 그 결과 AB14균주에서 높은 휘발성 물질을 확인할 수 있었다(Fig. 19, 20).

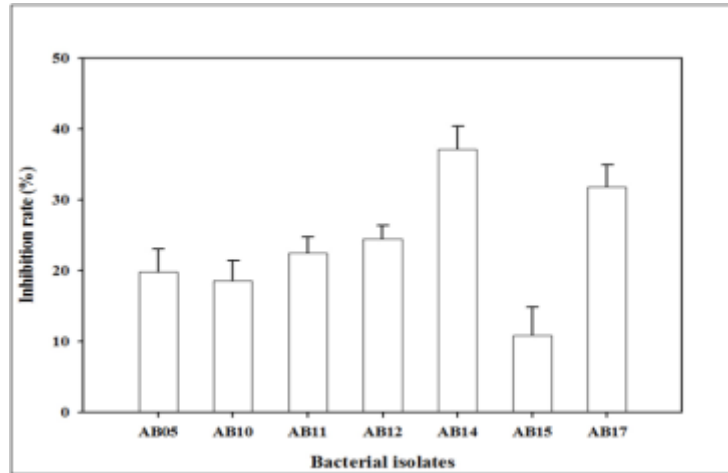


Fig. 19. Effect of volatile compounds produced by bacterial isolates against the mycelial growth of *C. acutatum* in dual culture assay. Rhizobacterial isolates were co-cultivated with *C. acutatum* in a two-chamber Petri-dish for 14 days at 30 °C. Error bars indicate \pm SD.

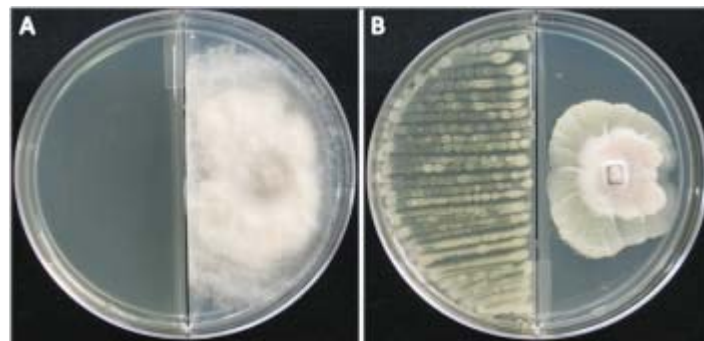


Fig. 20. Inhibition in radial growth of *C. acutatum* caused by the volatile compounds produced from *Bacillus subtilis* AB14. (A) Control plate without bacteria, (B) Plate with co-cultivation of bacterial isolate AB14.

(8) 소용량 배양기 (4 L)에서의 최적화 연구

선발된 *Paenibacillus polymyxa*를 이용하여 소용량 배양기 (4 L)를 이용하여 대량 배양을 위한 최적조건을 탐색하기 위하여 실시하였으며, 먼저 seed culture는 전체 볼륨의 1 % (40 ml)를 배양하였으며, 1차 배양은 28 °C에서 12 h, 새로운 배지에서 2차 배양을 12 h동안 120 rpm에서 배양하여 접종원을 준비하였다. 사용된 배지는 LBS배지를 사용하였다. 접종원을 준비하고, 본 배양을 위하여 4 L의 배지를 준비하여 121 °C에서 40분 멸균하여, Ph는 최종적으로 10 % NaOH용액을 이용하여 7.0으로 조절하여 사용하였다. 배양 조건은 온도 28 °C, 용존산소량 0.5 ~ 0.7 vvm 유지, 교반속도 150 ~ 400 rpm 조건으로 72 h 동안 배양하면서 샘플을 채취 하여 배양정도, 포자 형성시기, 포자형성 완료기, pH변화 등을 확인 하였다.

본 배양을 시작 후, 6 h ~ 30 h 동안은 유도기를 거쳐 대수기에 양상을 보였으며, 32 h에는 포자 형성을 위하여 cell의 모양이 간균의 모양에서 불링핀 모양으로 변하다가 44 h부터는 포자 성숙기로 들어가는 것을 확인 하였으며, 최종적으로 65 h에서는 cell의 모양이 동그란 모양으로 변하여 포자 형성이 완료됨을 확인 하였다(그림 21). 포자 형성 시작시 불링핀 모양과 흡사한 모양을 갖추는 시기(32 h)에 pH는 6.4에서 시작되어 36 h 최고 정점에 도달한 후, 포자 성숙기에서는 점점 떨어지다가 포자 형성 완료기에는 6.6정도에서 머무는 것으로 확인 되었다(그림 22, 23).

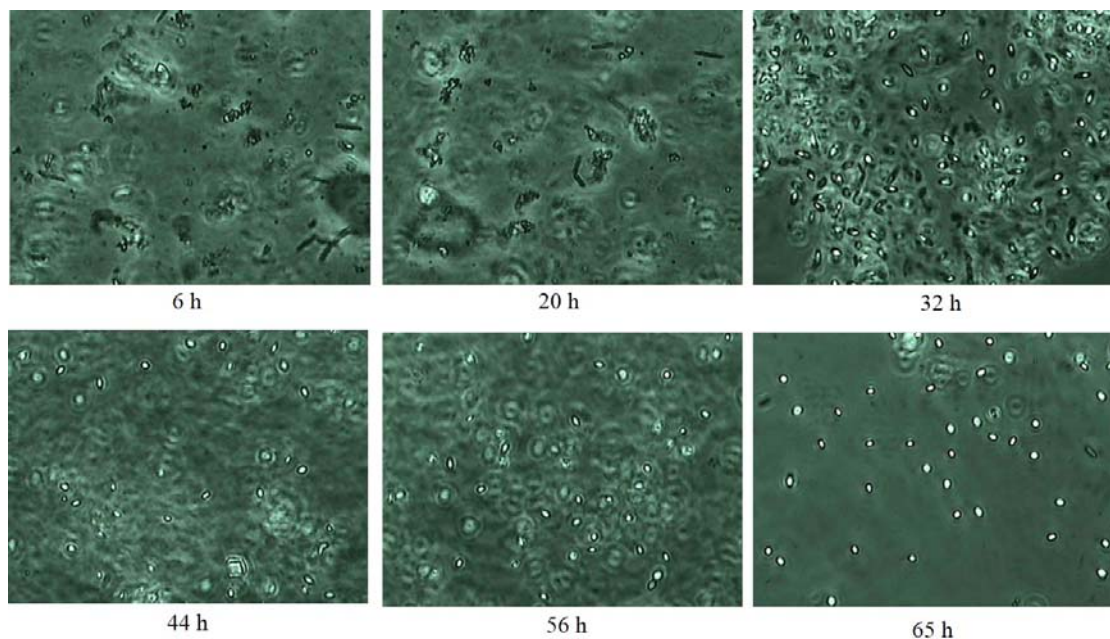


Fig. 21. 소용량 배양기 (4 L)에서 배양하면서 시간별 샘플 채취 후, 현미경 확인

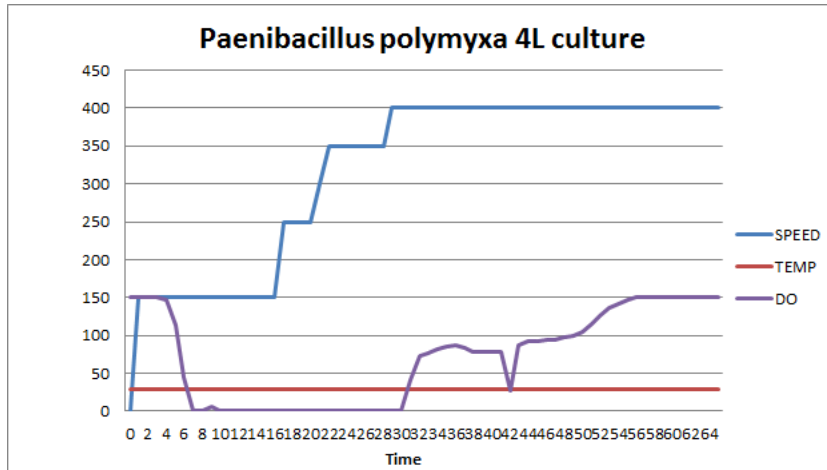


Fig. 22. 소용량 배양시 (4 L) vessel의 배양 환경 변화 모니터링

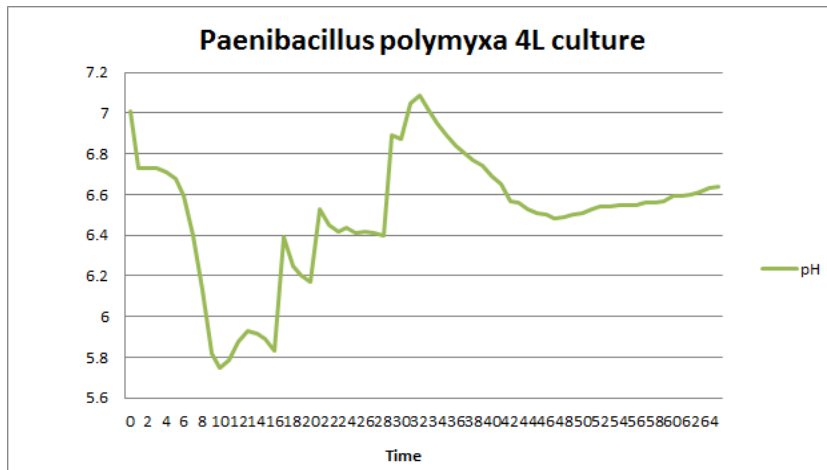


Fig. 23. 소용량 배양시 (4 L) 배양액의 pH 농도 변화 모니터링

(9) 대용량 배양기에서의 최적화 연구

가) 140 L에서의 배양 조건 탐색

소용량 배양기에서 얻어진 결과를 바탕으로 대용량 배양 조건을 탐색하기 위하여 실시하였으며, 먼저 seed culture는 전체 볼륨의 1 % (1400 ml)를 배양하였으며, 1차 배양은 28 °C에서 12 h, 새로운 배지에서 2차 배양을 12 h동안 150 rpm에서 배양하여 접종원을 준비하였다. 사용된 배지는 LB배지를 사용하였다. 접종원을 준비하고, 본 배양을 위하여 100 L의 배지를 준비하여 121 °C에서 40분간 멸균하여, Ph는 최종적으로 10 % NaOH용액을 이용하여 7.0으로 조절하여 사용하였다. 배양조건은 온도 28°C, 용존산소량 0.5 vvm 유지, 교반속도 150 rpm, 내부 압력 0.4 Kg/cm² 조건으로 72 h 동안 배양하면서 샘플을 채취 하여 배양정도, 포자 형성시기, 포자형성 완료기, pH변화 등을 확인 하였다.

본 배양을 시작 후, 6 h ~ 18 h 동안은 유도기를 거쳐 대수기에 양상을 보였으며, 30 h에는 포자 형성을 위하여 cell의 모양이 간균의 모양에서 불링핀 모양으로 변하다가 42 h ~ 54 h부터는 포자 성숙기로 들어가는 것을 확인 하였으며, 최종적으로 66 h에서는 cell의 모양이 동그란 모양으로 변하여 포자 형성이 완료됨을 확인 하였다(그림 24). pH의 변화는 유도기부터 대수기에는 7.2 ~ 6.4, 포자 형성시기 6.7, 포자 성숙기 6.6~6.5, 포자 형성 완료기 6.9도에서 머무는 것으로 확인 되었다(그림 26). 용존 산소량은 대수기에는 포자 형성 시기에 급격하게 떨어지다가 포자 성숙 단계에서는 점점 증가하다가 포자 형성 완료시에는 유도기와 같은 수준으로 올라가는 것을 확인 하였다(그림 25).

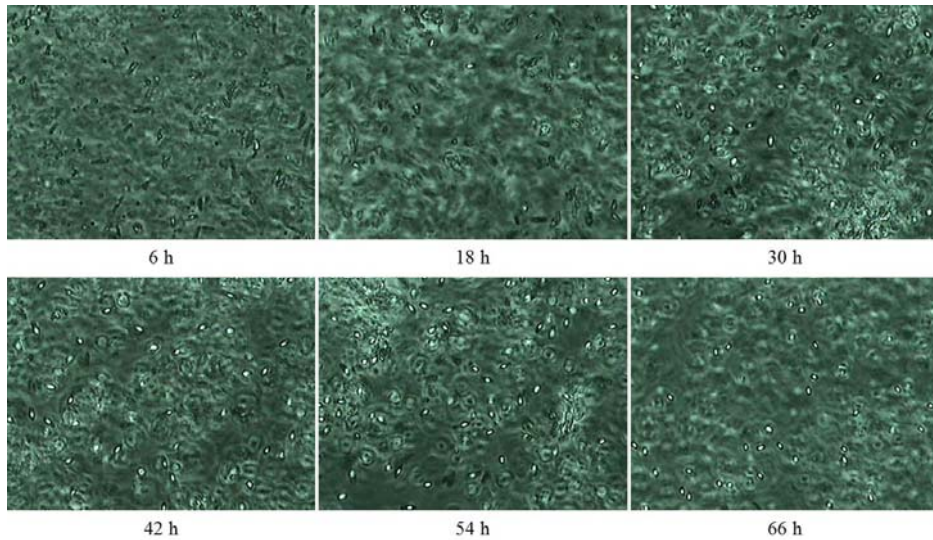


Fig. 24. 대용량 배양기 (140 L)에서 배양하면서 시간별 샘플 채취 후, 현미경 확인

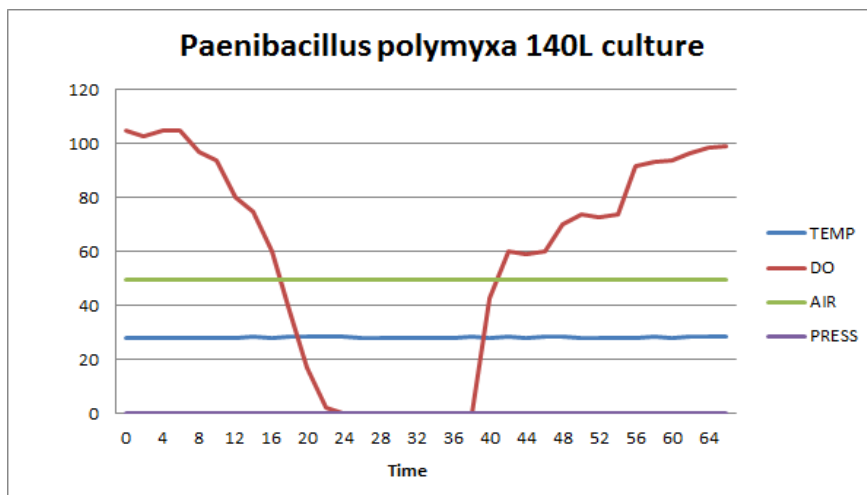


Fig. 25. 대용량 배양시 (140 L) vessel의 배양 환경 변화 모니터링

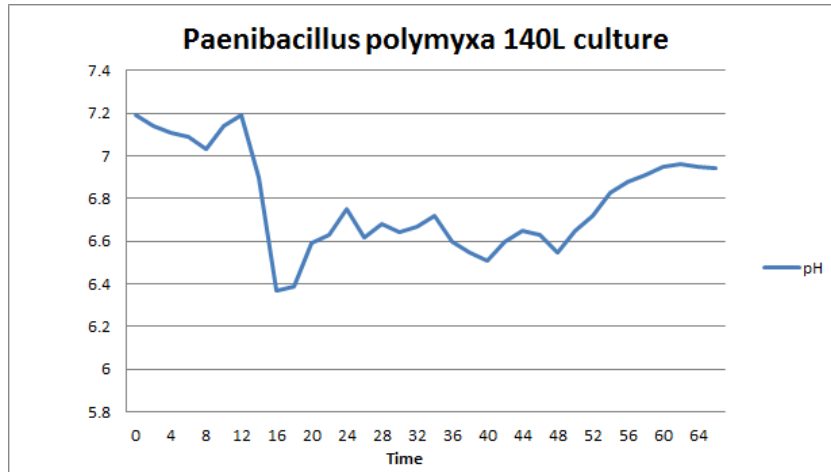


Fig. 26. 대용량 배양시 (140 L) 배양액의 pH 농도 변화 모니터링

2) 대용량(1,500 L)에서의 배양 조건 탐색

140 L 용량에서 얻어진 조건을 바탕으로 실용화 단계에서 사용하는 1톤 이상의 대용량 배양 조건을 탐색하기 위하여 실시하였으며, 먼저 seed culture는 전체 볼륨의 1% (150 L)를 배양하였으며, 24 h 동안 150 rpm, 내부 압력 0.4kg/cm² 배양하여 접종원을 준비하였다. 톤(ton) 배양시 seed culture는 140 L 조건에서 얻어진 조건을 바탕으로 배양하여 Auto Inoculation System을 사용하여 본 배양에 사용하였다. 배지는 LB 배지를 사용하였다. 접종원을 준비하고, 본 배양을 위하여 1500 L의 배지를 준비하여 121 °C에서 40분간 멸균하여, Ph는 최종적으로 10% NaOH 용액을 이용하여 7.0으로 조절하여 사용하였다. 배양조건은 온도 28°C, 용존산소량 0.5 vvm 유지, 교반속도 150 rpm, 내부 압력 0.4 Kg/cm² 조건으로 72 h 동안 배양하면서 샘플을 채취하여 배양정도, 포자 형성시기, 포자형성 완료기, pH변화 등을 확인하였다.

본 배양을 시작 후, 6 h ~ 18 h 동안은 유도기로 보였으며, 30 h ~ 42 h에는 대수기 단계로 DO(용존산소량)가 급격하게 줄어들며, 포자가 간헐적으로 보이는 것을 확인하였다. 42 h ~ 54 h 포자형성과 세포성장기가 같이 공유하는 것으로 확인되었으며, 이시기 DO값이 점점 상승하는 것을 확인하였다. 66 h 배양시에는 다른 용량 배양과 다르게 포자형성, 성숙, 완료기가 같이 공유하는 것으로 확인되었다(그림 27, 28). pH의 변화는 유도기에는 7.0, 대수기에서 포자형성시기에는 6.3 ~ 6.7, 포자성숙 및 포자형성 완료기에는 6.8 ~ 6.9를 유지하는 것으로 확인되었다(그림 29).

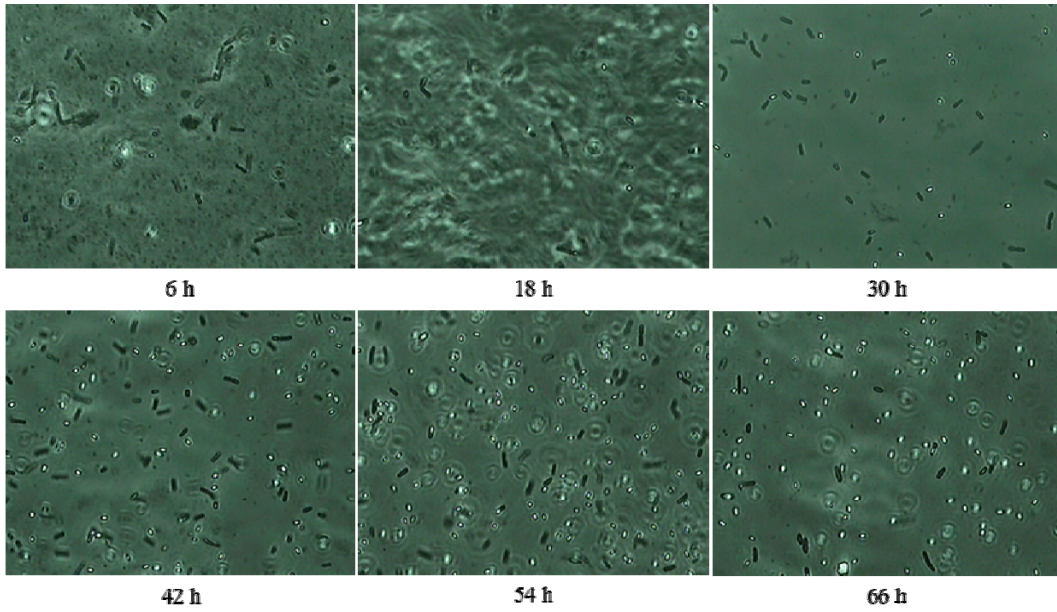


Fig. 17. 대용량 배양기 (1.5 ton)에서 배양하면서 시간별 샘플 채취 후, 현미경 확인

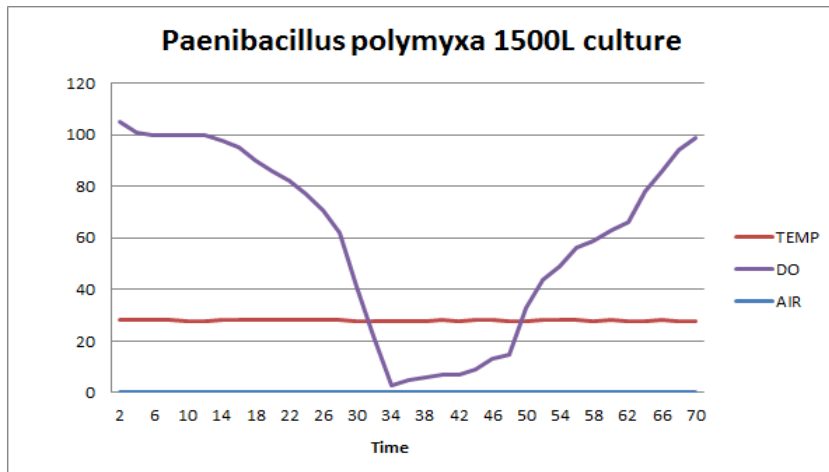


그림 28. 대용량 배양시 (1.5 ton) vessel의 배양 환경 변화 모니터링

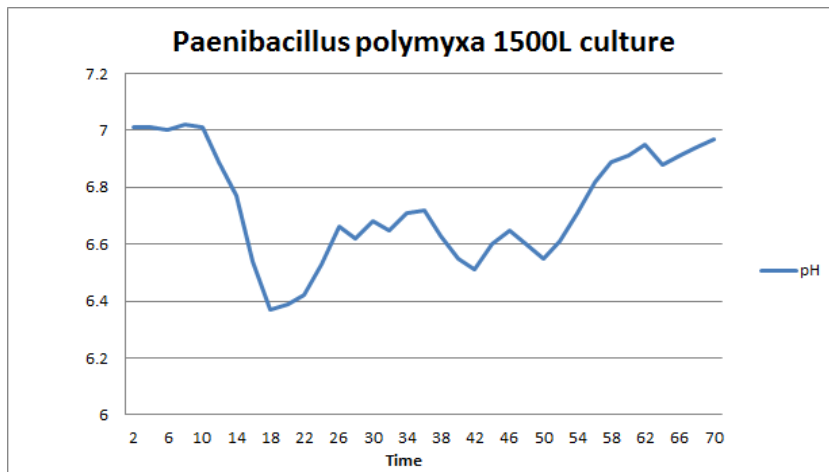


그림 29. 대용량 배양시 (1.5 ton) 배양액의 pH 농도 변화 모니터링

(10) 미생물 안정제 개발

배양된 유용 미생물의 제형화를 위하여 1차로 선발된 안정제를 이용하여 제형화를 실시하였다. 제형화시 선발 미생물의 안정성 및 계속성을 유지할 수 있는지를 확인하기 위하여 분산제로 이용되는 계면활성제 WP-280B를 이용하여 수화제를 만들어 안정성을 확인 하였다. 1차 실험으로 발아 테스트를 위하여 채소 작물 9종을 대상으로 발아 촉진 및 발아 후, 생육촉진 검정을 실시한 결과 양파, 썩갓, 고추, 무, 상추에서 발아 촉진 및 발아 후, shoot, root에서 모두 생육 촉진을 확인 하였고, 대부분 50배 희석 보다는 500배 희석한 경우, 더 높은 생육을 촉진 효과를 확인 하였다. 4가지 작물에서도 root 또는 shoot에서 생육촉진 효과를 확인 하였다(표 15, 16, 17).

표 15. 1차 선발된 안정제를 이용한 제형(수화제)에 대한 발아 실험

Treatments	Pumpkin (호박)		Cucumber (오이)		Orion (양파)	
	Shoot length (cm)	Root length (cm)	Shoot length (cm)	Root length (cm)	Shoot length (cm)	Root length (cm)
AB15 (50×)	4.38	13.50	5.56	7.56	4.94	3.48
AB15 (100×)	4.54	14.60	6.02	8.60	4.80	2.80
AB15 (200×)	4.38	12.70	7.10	10.08	7.20	3.98
AB15 (500×)	4.78	16.14	7.84	11.9	8.44	3.38
Control	4.62	12.50	5.88	11.6	3.04	1.18

표 16. 1차 선발된 안정제를 이용한 제형(수화제)에 대한 발아 실험

Treatments	Crown Daisy (썩갓)		Tomato (토마토)		Pepper (고추)	
	Shoot length (cm)	Root length (cm)	Shoot length (cm)	Root length (cm)	Shoot length (cm)	Root length (cm)
AB15 (50×)	2.18	1.10	2.16	1.00	2.56	1.40
AB15 (100×)	2.66	1.16	2.74	2.82	2.46	1.08
AB15 (200×)	3.42	1.38	3.76	1.66	3.70	2.98
AB15 (500×)	3.52	1.82	4.94	8.02	4.80	6.08
Control	2.22	0.90	3.96	7.38	2.52	2.20

표 17. 1차 선발된 안정제를 이용한 제형(수화제)에 대한 발아 실험

Treatments	Radish (무)		Curled mallow (아욱)		lettuce (상추)	
	Shoot length (cm)	Root length (cm)	Shoot length (cm)	Root length (cm)	Shoot length (cm)	Root length (cm)
AB15 (50×)	3.34	1.40	3.82	4.46	2.24	1.40
AB15 (100×)	3.36	1.76	4.08	7.04	2.36	1.42
AB15 (200×)	6.12	13.10	3.34	6.5	3.52	2.94
AB15 (500×)	7.68	14.92	3.94	6.12	3.94	2.86
Control	3.62	2.02	3.40	3.88	2.34	1.42

(11) 농가 실증 포장 실험

선발된 유용미생물의 제형화에 따른 포장에서의 생육 촉진 효과 검정 및 처리 적정 농도를 확인하기 위하여 실험을 실시하였으며, 1차로 2가지 작물(고추, 토마토)에 대해서 실험을 실시하였다. 고추의 경우 200배, 500배 희석에서 무처리 보다 30 % 정도의 생육촉진 결과를 확인하였으며, 50 ~ 500배 희석 평균 25 %의 생육 촉진 효과를 확인 할 수 있었다(표 18). 토마토의 경우 무처리군 보다 낮은 효과를 확인 하였으며, 토마토에 대해서는 기내에서 효과가 확인된 바, 2차 검정실험을 실시 할 예정이며, 기내실험에서 이용된 작물 7종에 대해서도 포장 실증 실험을 실시할 예정이다.

표 18. 1차 선발된 안정제를 이용한 제형에 대한 포장 효과 검정 결과

Treatments	Plant height (cm)	
	Pepper (고추)	Tomato (토마토)
AB15 (50×)	28.6	27.2
AB15 (100×)	28.0	28.2
AB15 (200×)	32.2	27.4
AB15 (500×)	31.8	28.6
Control	22.4	29.2

(12) 토양개량효과 포장 검정 실험

선발된 유용 미생물을 토양에 처리하였을 때 토양의 성분 및 토양 내 미생물에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실시하였으며, 포장은 강원대학교 농장의 고추, 토마토 시험포, 논산, 부여의 토마토 재배 농가에 선발된 균주를 액체 배양하여 7일 간격으로 3회 처리 후 7일이 경과 후, 토양 샘플을 수집하였다. 현재 실험을 위한 전처리 과정에 있으며, 전처리 준비가 끝나는 대로 실험을 실시할 예정이다(표 19, 그림 30).

표 19. 선발 균주 처리 후, 토양 검정을 위한 토양 샘플

수집 지역 (장 소)	재배 작물	수집 점수 (개)
강원도 (강원대학교 시험포장)	고추, 토마토	20
충청남도 부여 (농가)	토마토	30
충청남도 논산 (농가)	토마토	30



그림 30. 토양 성분 분석기기(진구과학)

(13) 시제품 제작

최종 시제품은 AB 15균주인 *Paenibacillus polymyxa*를 이용하여 2가지 형태의 시제품을 제작하였다. 위에서 개발한 안정제와 분산제, 고령토 등을 이용하여 대량배양에서 나온 수확물을 동결건조 과정을 거쳐 수화제와 입제를 제작하였다. 제작된 수화제는 물에 섞어서 보면 물속에서 잘 분산되는 것을 확인 하였으며, 주로 경엽 처리에 이용할수 있으며, 입제의 경우에는 토양 또는 상토 등에 섞어서 사용 할수 있도록 제작하였다. 입제의 경우 실험결과 1주일 동안 2 ~ 3회 관수해주면 녹아서 토양으로 스며들어가는 것을 확인 하였다(그림 31).



그림 31. 시제품으로 제작된 수화제와 입제

2. 식물병원성 토양전염 균류의 성장을 억제 하는 미생물제제 개발 및 산업화

가. 연구내용

(1) 식물내생세균의 분리 및 항균활성 조사 (CP1 균주)

딸기의 주요 병해인 탄저병 방제용 유용 미생물을 선별하기 위해 충남대학교 농업생명과학 대학의 유리온실과 논산 딸기시험장에서 재배중인 건전한 딸기 식물체를 구해 잎, 줄기, 뿌리 세 부위로 나누어 표면소독을 실시하였다. 표면소독한 부위를 Nutrient agar (NA, Difco), DRBC agar (DRBC, Difco), Kings'B agar, V8 juice agar, Potato Dextrose agar 배지에 각각 3개씩 절편을 올렸으며 30 °C 항온기에서 24~48시간 배양한 후 분리되는 순서대로 배지의 알파벳 첫 자와 식물체의 3가지 부위를 표시하기 위해 잎 (L), 줄기 (S), 뿌리 (R)를 붙이고 나오는 순서대로 번호를 부여하였다.

배지에서 나온 세균의 단일 콜로니를 다시 Nutrient agar에 계대한 후 갯빛곰팡이병원균과 탄저병균에 대치배양을 실시하고 길항작용에 의한 저지원을 형성하는 세균을 재분리 하였다. 재분리한 세균은 20 % glycerol 용액에 현탁하여 deep-freezer (-70 °C)에 보관하였다.

(2) 유용미생물의 동정

(가) 분류학적 분석

젓빛곰팡이병원균과 탄저병균에 대하여 길항력을 보이는 균주들을 Bergey's manual of systematic bacteriology 및 Manual of methods for general bacteriology의 방법과 Methods for Soil Microbiology and Biochemistry를 이용하여 형태적인 특성인 color, form, elevation margin, surface, opacity, texture, motility, cell morphology, size, Gram-reaction and spore formation 여부 등을 분석하였다.

(나) 형태적 분석

1) 그람염색 관찰

그람염색법은 세포벽 구조의 차이에 따라 세균을 분류하며 음성과 양성으로 구분할 수 있다. 먼저 슬라이드 글라스에 백금이를 이용하여 세균을 건조 및 고정을 하였다. Crystal violet을 떨어뜨리고, 1분 동안 말린 후, 슬라이드 글라스의 뒷면을 흐르는 수돗물로 1분간 세척 후, Iodine 으로 1분 동안 방치한 후 알코올로 20초 동안 씻었다. 마지막으로 대조시약인 Safranin으로 20초 처리한 다음 염색한 면의 뒷면을 흐르는 물로 세척한 후 현미경으로 관찰하였다.

2) 전자 현미경 관찰

세균의 미세구조와 형태를 관찰하기 위해 0.2 μm membrane filter와 배지표면, 두 종류의 시료를 만들어 관찰하였다. 세포의 구조와 내용물을 최대한 살아있을 때의 상태로 보존하기 위해 5% glutaraldehyde와 5% paraformaldehyde을 이용하여 1차 고정을 하였다. 이후 D.W로 2회, 5분씩 세척한 다음, ethanol series를 이용하여 조직 내에 있는 모든 수분을 제거하였다. 30%, 50%, 70%, 80%, 100%의 농도로 각 step당 10분씩 탈수과정을 거치는데, 100%는 2회 실시한다. 이후 isoamyl acetate를 이용하여 2회, 10분씩 치환한 후, 건조시킬 때의 형태를 최소한으로 줄이기 위해 CO_2 를 이용하여 임계점 건조를 (critical point drying) 하였다. 건조된 시료는 Aluminum stub에 carbon tape을 이용해 부착시키고, Osmium coating (K850, Emitech, Japan)을 한 후 주사전자현미경 (S-4800, Hitachi, Japan)으로 세균의 입체적인 모습을 관찰하였다.

(다) API Kit을 이용한 분석

최근 형태가 유사한 세균의 분류에 많이 쓰이는 API 50CHB kit (BioMerieux Co. Marcy L'Etoile, France)를 이용하여 49개의 탄소원에 대한 이용성을 24, 48시간 각각 분석하여 API 홈페이지 (<http://apiweb.biomerieux.com>)에서 확인하였다.

(라) 분자생물학적 분석

1) DNA extraction 및 PCR 증폭

선발된 내생세균의 DNA를 추출하기 위해 CP1균주를 LB 배지에 접종하여 배양균체를 Effendorf tube에 1 ml 넣고 13,000 rpm으로 원심분리하여 순수한 균체를 획득한 후 DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Cat. No. 69504)를 이용하여 DNA를 얻었고 -20 °C에서 보관하면서 사용하였다. 16S rDNA의 클로닝을 위해, Primer 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' (Forward) 와 5'-ACGGGCGGGTGTGTRC-3' (Reverse)를 이용하여 PCR 증폭을 시행하였다. PCR 증폭은 100 ng의 template DNA, 0.5 μM의 primer, 0.2 mM dNTPs, 10X Taq buffer (20 mM magnesium이 포함된 10X Ex Taq buffer, Takara Co. Japan) 10 μl, Taq polymerase는 0.025 U/μl 을 사용하여 95 °C에서 30초, 55 °C에서 30초의 annealing, 72 °C에서 1분 30초의 신장으로 35cycle반응하여 Biometra thermocycler (Tampa, Florida, USA)로 증폭시켰다. PCR 산물을 1 % agarose gel 전기영동을 하여 확인하였다. 확인 된 PCR 산물을 PCR Purification kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 정제한 후, 정제된 PCR 산물을 T4 ligase를 이용하여 pGEM T-easy vector (Promega, Madison, WI, USA)에 ligation 하였으며 16s rDNA sequencing 통해 OK1-4와 OK1-6의 full sequence의 자료를 얻었다(Dong Xu and Jean-Charles Côté., 2003).

gyr A primer는 10 pmol의 p-gyrA-f 와 p-gyrA-r primer, 10XTaq buffer, 10 mM dNTP-Mix, 50 Unit Taq 및 50 ng의 template DNA를 첨가하여 최종 volume을 50 μl로 조정하였다. DNA 증폭은 initial denaturation을 94 °C에서 5분간 실시하고 denaturation 40초 (94 °C), annealing 40초 (55 °C), extention 1분 (72 °C)으로 30 cycle을 실시한 뒤 final extension 72 °C에서 15분간 실시하였다.

2) Sequencing 및 계통분석

PCR산물은 Wizard PCR prep kit (promega, Madison, WI, USA)으로 정제하고, (주)마크로젠에 의뢰하였다. 염기서열은 ribosomal gene bank인 NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov)에서 DNA의 상동성을 조사하여 동정에 참고하였으며 CLUSTAL X와 PHYDIT program version 3.0 으로 정렬하였고, 애매하게 정렬된 부분은 분석에서 제외하였다. Neighbor-joining tree는 PHYLIP 3.57c package를 사용하여 Kimura's 2-parameter distance model에 의해 작성되었다. Tree의 topology를 조사하기 위하여 1000반복의 bootstrap 분석을 실시하였다.

(마) 유사균주와의 활성 비교

균 동정 결과 CP1균과 계통수에서 유연관계에 있는 균주들의 딸기 주요 병원균인 *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora cactorum* 에 대한 길항력을 비교하기 위해 KACC에서 *Bacillus amyloliquefaciens* ATCC 23843, *Bacillus velezensis* CCUG 50740균주를 분양받아 동일 조건에서 배양 후 항균활성을 비교 검토하였다(Table 1).

Table 1. Important four pathogen of strawberry used for antifungal activities against CP1 in this study

Pathogen	Identifier	Source	Characteristics
<i>Botrytis cinerea</i> 40573	Kim W. G.	Rose	Gray mold
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> 40695	Kim W. G.	Strawberry	Anthracnose
<i>Fusarium oxysporum</i> sp. 40050	Lee Y. S.	Strawberry	-
<i>Phytophthora cactorum</i> 40183	Im Y. S.	Strawberry	Crown rot

(바) 포자 발아 및 균사생장 억제활성 조사

1) 균사생장 억제활성조사

PDA 평판배지를 멸균하여 식히고 (50 °C), 여기에 배양여액을 각각의 희석배수별(10, 20, 40, 60, 80, 100, 1,000, 2,000배) 첨가하여 약제평판배지를 만들었다. 약제평판배지의 중앙에 7 일 동안 배양한 4가지의 병원균의 균사 선단부로부터 떼어낸 직경 8 mm의 균사조각을 올려놓고 25 °C에서 배양한 후 균총의 직경을 조사하였다. 균사생장 억제율은 다음의 식으로 계산하였다.

$$\text{억제율 (\%)} = \frac{\text{무처리구 균총직경 (mm)} - \text{처리구의 균총직경 (mm)}}{\text{무처리구의 균총직경 (mm)}} \times 100$$

2) 포자발아 억제 활성 조사

탄저병균의 포자를 멸균수에 현탁하여 최종 포자농도가 1×10^6 /ml이 되도록 조제하였다. 1.5 ml tube에 PDB에 배양여액을 희석배수별로 넣었고 포자현탁액을 100 μ l씩 첨가한 후 28 °C 항온기에 배양하면서 3, 8, 12시간별로 시료를 채취한 후 광학현미경 ($\times 400$)으로 포자발아 억제율 및 발아관의 길이를 조사하였다.

(사) CP1 균주의 배양적 특성 조사

1) 배양조건에 따른 균생장 조사

① 배지 종류

세균배양에 일반적으로 사용되는 Nutrient broth, Kings'B broth 이 두 가지와 최근 연구동향에 기재되어있는 Trypton soy broth, R2A broth 그리고 상업적으로 많이 쓰며 값이 싼 Molasses broth 등 총 5가지의 배지를 선택하였다. 500 ml 삼각 flask를 이용하였으며 배지 200 ml에 CP1

균주를 2 ml을 접종하고 진탕배양기 (150rpm / 30 °C)에서 5일간 본 배양하며 시간대별로 균체량을 Spectrophotometer (BIO-RAD, SmartSpec™ plus)를 이용해 측정하여 (OD값 600nm) 생육정도를 조사하였다. 한편 원심분리와 Syringae filter (0.2 μm membrane filter)를 이용해 균이 완전히 제거된 배양여액을 paper disc에 50 μl씩 점적하여 풍건 후 딸기의 4가지 주요 병원균에 대치배양하여 25 °C 배양기에서 7일 배양한 다음 항균활성 정도에 따라 최적의 배지를 선발하였다.

② 배양 온도

균 생육시 최적 배양온도를 알아보기 위하여 Molasses broth 200 ml에 CP1 균주를 2 ml 접종하고 10~50 °C까지 10 °C 단위로 구분하여 진탕배양 (150 rpm, 5일)한 후 시간대별로 생육정도 (OD값 600 nm)를 측정하여 최적의 배양온도를 조사하였다.

③ 초기 pH의 영향

Molasses broth 200 ml에 pH 3~8까지 각각 재조정하여 구분하고 CP1 균주를 2 ml 접종한 후 30 °C, 150 rpm 조건으로 진탕배양을 실시하였으며 4일간 시간대별로 생육정도 (OD값 600nm)를 조사하여 최적의 pH를 찾았다.

④ 교반속도

CP1 균주의 배양에 적합한 교반속도를 조사하기 위해 Molasses broth 200 ml에 CP1 균주를 2 ml 접종 (1,000 ml 삼각 flask)한 후 0~200 rpm으로 50 rpm단위로 교반속도를 달리하여 진탕배양하면서 시간대별로 생육정도 (OD값 600 nm)를 조사하여 최적의 교반속도를 조사하였다.

2) 대량배양

CP1 균주의 대량배양을 위해 최적의 배양조건 (배지 : Molasses broth, 교반속도 : 150 rpm, 배양온도 : 30°C, pH : 6)으로 배양을 실시하고 4일간 매일 각각의 배양액을 추출하여 paper disc에 50μl 점적하여 PDA 배지 상에서 딸기의 주요 4가지 병원균 *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Phytophthora cactorum*, *Fusarium oxysporum*의 직경 8 mm agar plug를 접종하고 25 °C 배양기에서 7일 동안 배양한 후 항균활성을 조사하였다. 대량배양을 실시할 때 오염여부를 판단하기 위해 Gram염색법과 현미경으로 관찰을 실시하였고 내생포자 형성여부를 관찰하였다.

(3) SR1, SR2 및 GS1 균주

(가) 식물내생세균의 분리

SR1, SR2 내생균은 충남대학교 농업생명과학대학 주변 및 논산 딸기 재배지에서 채집된 딸기의 뿌리로부터 분리하였다. 또한 GS1 균주는 충주 일대에서 재배중인 인삼의 줄기로부터 분리하였다. 채집한 식물체의 표면을 tap water로 씻어낸 후, 단편을 만들어 NaOCl 1 %에 1분 표면 소독 한 다음 2차례 멸균수로 씻어내고 풍건을 실시하였다. 분리는 Nutrient agar (NA, Difco) 배지에 단편을 바로 치상한 다음 배지에서 누출되는 세균을 다시 NA 배지에 계대하여 단일 콜로니를 분리하는 방법과 멸균수 5 ml에 단편을 30분간 침지한 용출액을 NA 배지에 도말 후, 배양된 세균을 분리하는 두 가지 방법을 통해 내생균을 분리하고 20 % glycerol 용액에 현탁하여 deep-freezer (-70 °C)에 보관하였다.

(나) 유용미생물의 동정

1) 분자생물학적 분석

분자생물학적 분석을 위해서 16S rDNA 유전자의 염기서열 분석을 수행하였다. 선발된 길항세균의 DNA를 추출하기 위해 LB 배지에 접종하여 2일간 배양한 배양균체를 Genomic DNA Extraction Kit (Intron Biotechnology, Korea)을 이용하여 추출하였고 이를 -20 °C에 보관하면서 분석에 사용하였다.

PCR 증폭은 genomic DNA와 각각의 0.5 pmol primer, 0.2 mM dNTP, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 2.5 unit의 taq DNA polymerase에 멸균수를 첨가하여, 최종 volume을 20 μ l로 하였다.

SR1 균주의 16S rDNA 유전자는 universal primer set인 27F/1492R primer를 이용하여 증폭하였다. 16S rDNA 유전자 증폭은 initial denaturation 94 °C에서 5분간 실시하고 denaturation 94 °C/40초, annealing 55 °C/40초, extension 72 °C/1분의 조건으로 35 cycles 반응시킨 후 final extension을 72 °C/10분간 수행하였다. recA 유전자 증폭을 위해 initial denaturation을 94 °C에서 5분간하고 denaturation 94 °C/30초, annealing 60 °C/30초, extension 72 °C/45초의 조건으로 30 cycles 반응시킨 다음 final extension 72 °C/5분간 실시하였다. gyrA 유전자 증폭을 위해 initial denaturation을 94 °C에서 5분간하고 denaturation 95 °C/40초, annealing 55 °C/40초, extension 72 °C/1분의 조건으로 30 cycles 반응시킨 다음 final extension을 72 °C/15분간하였다.

PCR 산물은 (주)마크로젠에 sequencing을 의뢰한 후, National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 Basic Local Alignment Search tool (BLAST)를 이용하여 DNA 데이터 베이스와 유사한 염기서열을 비교하였다. 염기서열은 PHYDIT program version 3.2를 이용하여 정렬하였고 불분명하게 정렬된 부분은 분석에서 제외시켰다. Neighbor-joining tree는 PHYLIP 3.57c Package를 사용하여 Kimura's 2-parameter model에 의해 작성하였으며 1,000회의 bootstrap 분석을 통해 신뢰도를 평가하였다.

(다) 항균활성 특성 조사

선발 길항 내생세균의 식물 병원균에 대한 항균 길항세균의 항균 spectrum 조사를 위해 대표적인 식물 병원균 *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*, *Collectotrichum gloeosporioides*, *Cylindrocarpon destructans*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Stemphylium lycopersis*, *Stromatinia gladioli* 등 11균주를 사용하였다. 이들 검정균을 PDA에 접종하고 25 °C 배양기에서 1주일간 배양하였다. 11개 병원균의 선단부를 7 mm cork borer로 떼어낸 뒤, NA 배지(30 °C, 2일)에서 배양된 길항세균과 3 cm간격으로 PDA에 대치 접종하였다. 이들을 25 °C에서 병원균의 성장 속도에 따라 4~18일간 배양한 뒤 길항세균에 의한 식물병원균의 inhibition zone의 길이를 측정하였다.

(라) 내생균의 휘발성 검정

휘발성 유무를 확인하고자 *Botrytis cinerea*, *Collectotrichum gloeosporioides*, *Phytophthora capsici*, *Sclerotinia sclerotiorum*을 PDA 배지에 접종한 후, 25 °C에서 7일간 배양시킨 균주를 검정균으로 사용하였다. PDA 배지 중앙 부위의 배지를 10 mm 제거한 다음, 7 mm cork borer를 이용하여 검정균의 균사 선단부를 떼어 접종하고 8 cm 거리를 두어 길항세균 또한 접종하였다. 7일 후 검정균의 inhibition zone 형성 여부를 관찰하여 휘발성 유무를 조사하였다.

(마) 고추 탄저병에 대한 내생세균의 항균효과 검정

고추 탄저병에 대한 SR1, SR2 및 GS1 내생균의 효과를 검정하기 위하여 시중에서 생산하는 고추를 표면소독 후 *Collectotrichum gloeosporioides*의 포자를 5×10^5 의 농도로 분무접종을 하였다. 1일 동안 방치하여 고추 탄저병의 포자를 정착시키고, 딸기 뿌리에서 분리한 SR1, SR2 내생세균과 인삼 줄기에서 분리한 RS1 내생세균을 10^6 cfu/ml을 분무 처리하여 14일 후 이들 내생세균에 대한 항균효과를 검정하였다.

(바) 딸기 탄저병에 대한 내생세균의 항균효과 검정

딸기 탄저병에 대한 SR1, SR2 및 GS1 내생균의 효과를 검정하기 위하여 논산 딸기시험장에서 분양받은 딸기를 새로운 포트에 옮기고 2주 동안 생육하였다. 생육한 딸기잎면에 *Collectotrichum gloeosporioides*의 포자를 1.4×10^6 의 농도로 분무접종을 하였다. 1일 동안 방치하여 탄저병의 포자를 정착시키고, 딸기 뿌리에서 분리한 SR1, SR2 내생세균과 인삼 줄기에서 분리한 RS1 내생세균을 10^6 cfu/ml을 분무처리하여 7일간 3번 처리하고 최종 처리 후 내생세균에 대한 항균효과를 검정하였다.

(4) 전해수(Slightly acidic electrolyzed water, SAEW)의 효과검정

(가) 배지상 *Alternaria panax* 포자에 대한 발아 억제력

Alternaria panax 포자에 대한 전해수의 포자 억제력을 확인하고자 하였다. 1×10^4 의 *A. panax*의 포자를 PDA에 도말하였다. 24시간 후, 전해수 10, 50, 100 %의 전해수를 처리하여 포자 발아 억제력을 평가하였다.

(나) 인삼 점무늬병에 대한 전해수의 효과검정

인삼 점무늬병에 대한 전해수의 효과를 검정하기 위하여, 충남 금산 인삼약초시험장의 시험포에서 7일 간격으로 5회 처리하였다. 최종약제처리 7일 후 발병도를 조사하였다.

(5) Essential oil의 효과검정

(가) 한천배지 확산법

PDA 배지에서 자란 *Botrytis cinerea*의 균사선단부를 직경 5mm cork borer로 잘라내 새로운 PDA배지에 접종한 후 25 °C 항온기에서 하루 배양하고, methyl eugenol, thymol, carvacrol을 paper disk에 각각 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm 농도로 조정된 것을 100 μ l씩 점적하여 균과 3cm 간격을 두었다. 이를 항온기에서 4일 배양한 다음 저지원의 크기로 균의 생육저지정도를 조사하였다.

한편 세균은 KBA 배지와 NA 배지에 각각 *Pseudomonas panacis*와 *Serratia liquefaciens*를 도말 평판한 후 methyl eugenol, eugenol, thymol, carvacrol을 paper disk에 각각 100ppm, 200ppm, 500 ppm 농도로 조정된 것을 100 μ l를 점적하여 배지 중앙에 올려두었다. *Pseudomonas panacis*는 30 °C, *Serratia liquefaciens*는 25 °C 항온기에서 2일 배양한 후 저지원의 크기를 측정하였다.

(나) Essential oil 함유 배지에서의 항균활성능 검정

KBA 배지에 methyl eugenol, eugenol, thymol, carvacrol을 100 ppm, 200 ppm, 500 ppm이 되게 혼합한 후 계면활성제인 tween 20을 Essential oil과 6 : 4의 비율로 혼합, 고압멸균하여 Essential oil 함유 배지를 만들어 실험에 사용하였다.

*Serratia liquefaciens*는 *Pseudomonas panacis*와 같은 농도로 실험해 본 결과 100 ppm의 농도에서 100%의 방제효과를 보여서 Essential oils의 *Serratia liquefaciens*에 대한 최적농도를 알아보기 위하여 함유농도를 더 낮춰 다음과 같이 실험을 수행하였다.

NA 배지에 methyl eugenol, eugenol, thymol, carvacrol을 10 ppm, 20 ppm, 50 ppm이 되게 혼합한 후 계면활성제인 tween 20을 Essential oil : tween 20을 6 : 4의 비율로 함께 혼합하여 고압 멸균하여 Essential oil 함유 배지를 만들어 실험에 사용하였다.

(다) 휘발성

식물유래의 천연 정유물질은 대개 휘발하는 성질을 가지고 있을 뿐 아니라 휘발에 의해서도 높은 항균활성을 나타낸다. 따라서 이들 정유물질이 병원균에 직접 접촉이 아닌 휘발에 의해서도 항균효과가 있는지 여부를 알기 위해 다음과 같은 실험을 실시하였다.

PDA 배지 한쪽 끝에 *B. cinerea*의 균사 선단부를 직경 5 mm cork borer로 잘라 접종한 후 25 °C 항온장치에 하루 동안 배양하였다. 그리고 methyl eugenol, thymol, carvacrol을 각각 paper disk에 1,000 ppm, 5,000 ppm, 10,000 ppm 농도로 조정된 것을 100 μ l씩 점적하여 균과 0 cm, 3 cm, 6 cm 간격이 되도록 petri dish의 뚜껑에 놓고 배지는 뒤집어서 항온장치에 4일 더 배양한 다음 균의 생육저지정도를 비교하였다.

세균은 KBA 배지와 NA 배지에 각각 평판도말한 후 Methyl eugenol, Thymol, Carvacrol을 각각 paper disk에 1,000 ppm, 5,000 ppm, 10,000 ppm 농도로 조정된 것을 100 μ l씩 점적하여 petri dish의 뚜껑에 놓고 배지는 뒤집어서 *Pseudomonas panacis*는 30 °C 항온기에 *Serratia liquefaciens*는 25 °C 항온기에 각각 2일 배양한 다음 균의 생육저지정도를 확인하였다.

(6) Essential oil의 활성 검정

(가) 딸기 잿빛곰팡이병 방제 효과

딸기 잿빛곰팡이병 방제 효과를 검정하기 위해 딸기를 70 % ethanol로 표면소독한 후 멸균수로 3회 씻고 tray에 넣어 준비하고, *B. cinerea*의 포자를 6 \times 10⁴ spores/ml의 농도로 20 μ l를 딸기에 분무 접종하였다. 그 후 eugenol, thymol, methyl eugenol을 100, 1,000 ppm의 농도로 멸균수에 섞고 살포 직전에 결렬히 흔들어 분무기를 이용하여 딸기에 분무하였다. 딸기에 essential oil을 분무 처리한 후 뚜껑을 덮고 22 °C 항온기에서 7일간 둔 후 딸기의 잿빛곰팡이병 이병률을 조사하였다.

나. 연구 결과

(1) CP1 균주

(가) 내생세균의 선발

1) 내생세균의 분리 및 형태적 특성

건전한 딸기 식물체를 뿌리, 줄기, 잎으로 나누어 내생세균을 분리한 결과 뿌리로부터 66균주, 줄기에서 35균주, 잎에서 17균주의 내생세균을 확보하였다. 이들 내생세균의 동정을 위해 콜로니의 색깔, 투명정도, 높이, 형태, 운동성, 그람염색 및 크기 등의 특징을 관찰하여 Bergey's Manual (1984)에 의거하여 *Bacillus* 그룹에 속하는 몇 균주와 *Pseudomonas* 그룹에 잠정 추정하였다(Table 2).

Table 2. The character of antagonistic endophytic bacteria.

Genus	Group	Color	Form	Margin	Elevation	Opacity	Surface of colony	Motility	Size	Gram reaction	현미 관찰 형태	포자성 유무
<i>Bacillus</i>	Group1	cream	punctiform	entire	flat	opacity	round	o	0.5~1.0μm	양성	rod	o
	Group2	cream	punctiform	lobate	raised	opacity	irregular and spreading	o	0.5~1.0μm	양성	rod	o
	Group3	cream	filamentous	undulate	raised	opacity	round with scalloped margin	o	0.5~1.0μm	양성	rod	o
<i>Pseudomonas</i>	Group4	white	spindlo	erose	flat	transparent	irregular and spreading	o	0.2~0.5μm	음성	sphere	x
	Group5	brown	spindlo	entire	flat	transparent	round	o	0.2~0.4μm	음성	sphere	x

2) 내생세균의 길항력 검정

분리된 118개의 내생세균의 길항력을 검정하기 위하여 딸기 잭빛곰팡이병원균 및 탄저병균과 대치배양하고 7~10일 후 저지원의 크기가 20 mm 이상인 것을 선발하였다. 그 결과 뿌리에서 분리된 세 균주 (NR32, NR81, NR83), 줄기에서 선발된 균주는 한 균주 (VS25), 잎에서 분리된 한 균주 (KL78) 이들을 모두 형태적 특성에 의해 *Bacillus* 그룹으로 잠정 확인된 균주들이다. 이들 5개의 균주 중 KL78균주는 최대 2개월 까지 저지원을 유지할 정도로 강한 항균활성을 유지하였고 병원균의 항균물질에 대한 저항성을 유도하지 않았으므로 이 균주를 최종적으로 선발하였다(Table 3). 그리고 이 균주를 CP1이라 명명하였다.

Table 3. Antifungal activity of five endophytic bacteria against *Botrytis cinerea* and *Colletotrichum gloeosporioides* on PDA medium

Isolate	Isolated point	Genus	Pathogens			
			<i>B. cinerea</i>		<i>C. gloeosporioides</i>	
			inhibition zone (mm)	Antifungal activity [★]	inhibition zone (mm)	Antifungal activity
NR32		<i>Bacillus</i>	20.9	+++	20.1	+++
NR81	Root		20.1	+++	22.1	+++
NR83			21.6	+++	21.3	+++
VS25	Stem		21.4	+++	20.4	+++
KL78	Leaf		20.5	+++	22.8	+++

Length of inhibition zone formed by cell growth around paper disks was measured.

★ Antifungal activity ≤10 mm = +, Antifungal activity >20 mm =++, Antifungal activity < 20 mm = +++.

(나) CP1 균주의 분류 및 동정

1) 형태적 특성

① 그람염색

CP1 균주를 그람염색한 후 광학현미경 ($\times 400$)에서 관찰한 결과 보라색으로 염색되는 것을 확인하였다. 따라서 CP1 균주는 그람 양성균임을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

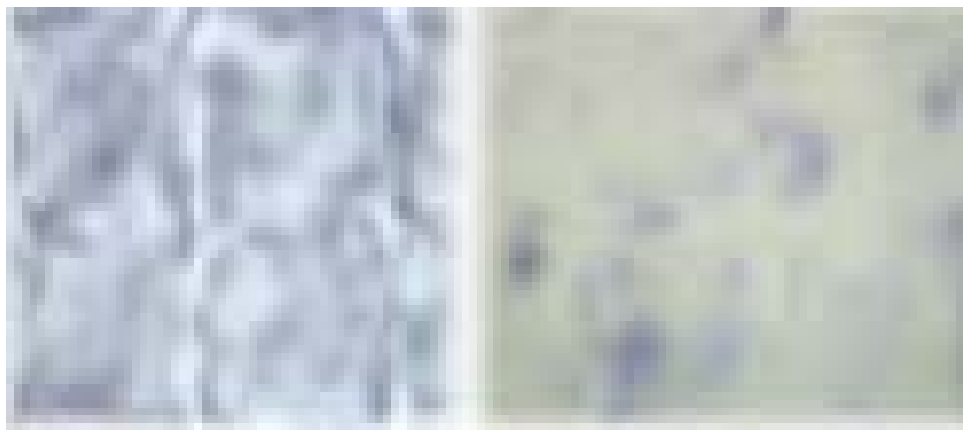


Fig. 1. Microscopic observation of isolate CP1 with Gram-reaction. ($\times 400$)

② 주사전자현미경 (SEM)

배지표면과 $0.2 \mu\text{m}$ membrane filter 상에서 주사전자현미경을 이용하여 CP1 균주를 관찰한 결과 Fig. 2와 같은 $0.5\sim 1.0 \mu\text{m}$ 의 간상형의 형태를 관찰할 수 있었다.

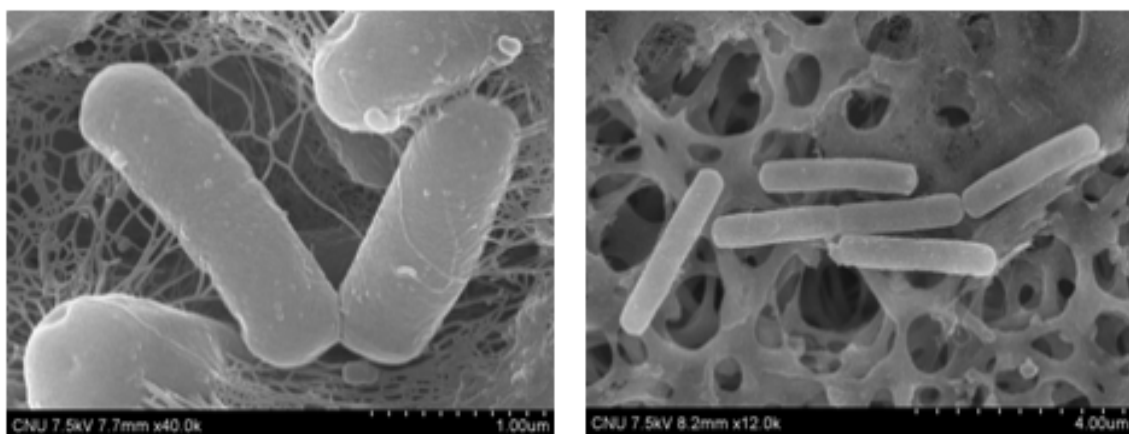


Fig. 2. Observation of isolate CP1 on surface of NA medium (left) and $0.2 \mu\text{m}$ membrane filter (right) by Scanning Electron Microscope (SEM).

(다) API kit 분석

49종류의 당 test를 통하여 *Bacillus* 속을 동정하는 API 50 CHB kit를 사용하여 CP1 균주를 분석한 결과 *Bacillus amyloliquefaciens* 와의 유사도가 99.7 %로 나타났다(Table 4).

Table 4. Isolate CP1 was considered as *Bacillus amyloliquefaciens* by reactions with API 50 CHB as below

GLY	+	GLU	+	MDG	+	SAC	+	LYX	-
ERY	+	FRU	+	NAG	-	TRE	+	TAG	-
DARA	-	MINE	+	AMY	+	INU	-	DFCU	-
LARA	-	SBE	-	ARB	+	MNZ	-	LFUC	-
RIB	+	RHA	-	ESC	+	RAF	+	DARL	-
DXYL	+	DUL	-	SAL	+	AMD	+	LARL	-
LXYL	-	INO	+	CEL	+	GLYG	+	GLT	-
ADO	-	MAN	+	MAL	+	XLT	-	2KG	-
MDX	-	SOR	+	LAC	+	GEN	-	5KG	-
GAL	-	MDM	-	MEL	+	TUR	-		

GLY: GLYcèrol, ERY: ERYthritol, DARA: D-ARABinose, LARA: L-ARABinose, RIB: D-RIBose, DXYL: D-XYLose, LXYL: L-XYLose, ADO: D-ADOnitol, MDX: Mèthyl- β D-XYlopyranoside, GAL: D-GALactose, GLU: D-GLUcose, FRU: D-FRUctose, MNE: D-MaNnosE, SBE: L-SorBosE, RHA: L-RHAMnose, DUL: DULcitol, INO: INOsitol, MAN: D-MANnitol, SOR: D-SORbitol, MDM: Mèthyl- α D-Mannopyranoside, MDG: Mèthyl- α D-Glucopyranoside, NAG: N-AcètylGlucosamine, AMY: AMYgdaline, ARB: ARButine, ESC: ESCuline citrate de fer, SAL: SALicine, CEL: D-CELLobiose, MAL: D-MALtose, LAC: D-LACtose(origine bovine), MEL: D-MELibiose, SAC: D-SACcharose, TRE: D-TREhalose, INU: INUline, MLZ: D-MèLèZitose, RAF: D-RAFFinose, AMD: AmiDon, GLYG: GLYcoGène, XLT: Xylitol, GEN: GENtiobiose, TUR: D-TURanose, LYX: D-LYXose, TAG: D-TAGatose, DFCU: D-FUCose, LFUC: L-FUCose, DARL: D-ARabitoL, LARL: L-ARabitoL, GNT: potassium GlucoNaTe, 2KG: potassium 2-CètoGluconata, 5KG: potassium 5-CètoGluconata.

(라) 분자생물학적 분석

1) 16S rDNA

CP1 균주의 16S rDNA를 분석한 결과 *Bacillus velezensis*와 99 %의 유사도를 보였다(Fig. 3-a). 그러나 *Bacillus subtilis* 그룹에 속하는 여러 세균들의 16S rDNA 영역이 매우 유사하므로 좀 더 정확한 동정을 위해서는 gyr A의 염기서열 분석이 필요하다.

2) gyr A

Gyrase A 유전자의 염기서열을 바탕으로 한 Neighbour-joining tree에서 CP1 균주는 *B. velezensis* 와 100% 유사도를 보이며 한 그룹에 속하였다(Fig. 3-b). 따라서 최근 연구동향에서 *B. velezensis*는 *B. amyloliquefaciens* 와 동종으로 보고된 바 있으므로 CP1를 최종적으로 *B.*

velezensis 또는 *B. amyloliquefaciens* 로 동정하였다(Li-Ting Wang, 2008).

CP1 균주의 형태적 특성, API kit을 이용한 당 이용 패턴 및 16S rDNA 와 gyr A gene sequencing 등의 분석을 통해 최종적으로 *B. amyloliquefaciens* 으로 동정하였다.

(a)



(b)

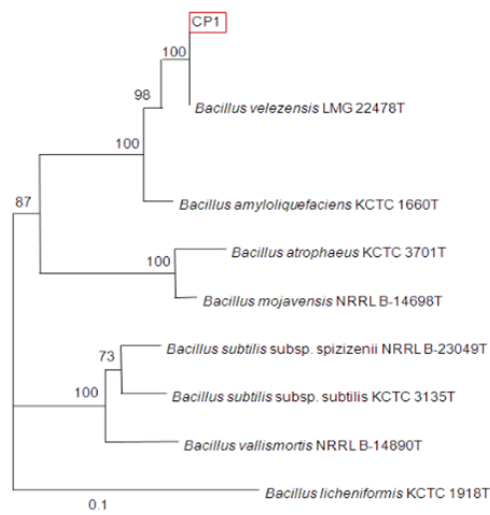


Fig. 3. Neighbour-joining phylogenetic trees based on 16S rDNA (a) and *gyr A* (b) gene sequences of *Bacillus* strains. Genetic distances were computed by Kimura's two-parameter model. Only bootstrap percentages above 50 % are shown. Bars, 0.005 (a) or 0.1 (b) substitutions per nucleotide position.

(마) 유사균주와의 활성 비교

CP1 균주와 밀접한 유연관계에 있는 균주들을 동일한 조건에서 배양하여 4가지의 병원균 (*B. cinerea*, *C. gloeosporioides*, *P. cactorum*, *F. oxysporum*) 에 대해 활성을 비교해 본 결과, CP1 균주는 100 %의 유사도를 보인 *B. velzensis* CCUG 50740과 98 %의 유사도를 보이는 *B. amyloliquefaciens* ATCC 23843 두 균주보다 항균력이 월등히 뛰어났다(Fig. 4).

CP1 균주의 항균기작으로는 발아관과 균사체의 이상팽윤증상과 이상비대증식, 용균현상을 나타내었다(Fig. 5). 따라서 CP1균주는 일반적으로 *Bacillus* 속 균들이 주로 생산하는 것으로 보고 되어있는 lipopeptide 계열의 항생물질을 생산하는 것으로 일차 추정되었다.

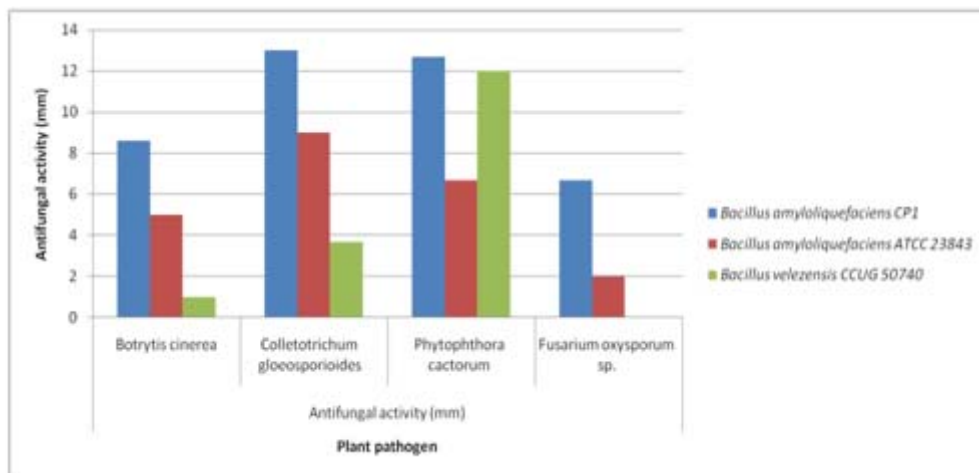


Fig 4. Graph showing antifungal activities of *B. amyloliquefaciens* CP1 and two similar isolates against plant pathogenic fungi.

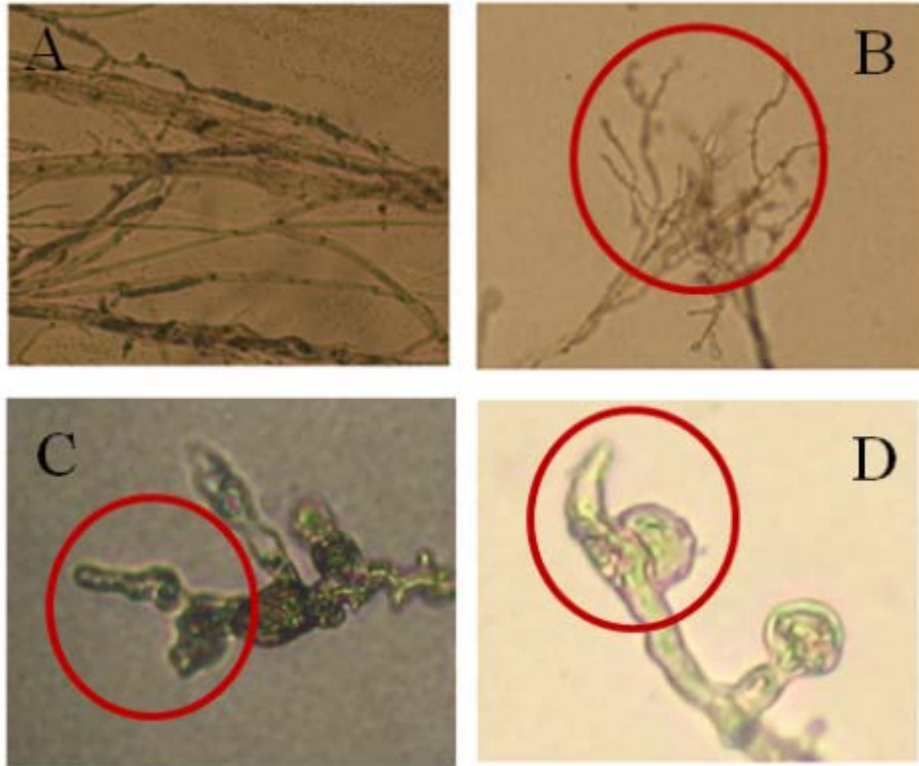


Fig. 5. Shapes of irregular mycelia of plant pathogenic fungi in opposite culture with *B. amyloliquefaciens* CP1 PDA media. A, B: Inhibition mycelia growth, C: Lysis of cell wall, D: Mycelia swelling.

(바) CP1 균주의 *in vitro* 상에서의 항균활성 검정

1) 배지별 배양여액의 항균활성

CP1 균주가 생산하는 2차 대사산물을 이용하여 생물학적 방제를 시도하기 위해 딸기에 발생하는 4가지 병원균(*B. cinerea*, *C. gloeosporioides*, *P. cactorum*, *F. oxysporum*)을 대상으로 배지별 항균활성을 검정하였다. 항균활성이 가장 뛰어난 배지는 molasses broth 배지였고, R2A broth도 비교적 뛰어난 효과를 보였다. 이 두 배지 중 Molasses 배지는 R2A 배지보다 상대적으로 더 뛰어난 뿐만 아니라 경제적으로 저렴하므로 CP1 균주의 최적의 배지로 Molasses 배지를 선택하였다(Fig. 6, 7).

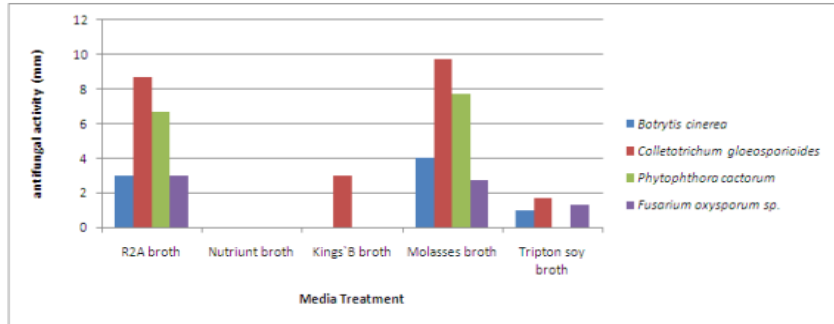


Fig. 6. Antifungal activities of *B. amyloliquefaciens* CP1 with broth culture filtrates against *B. cinerea*, *C. gloeosporioides*, *P. cactorum*, *F. oxysporum* on PDA medium.

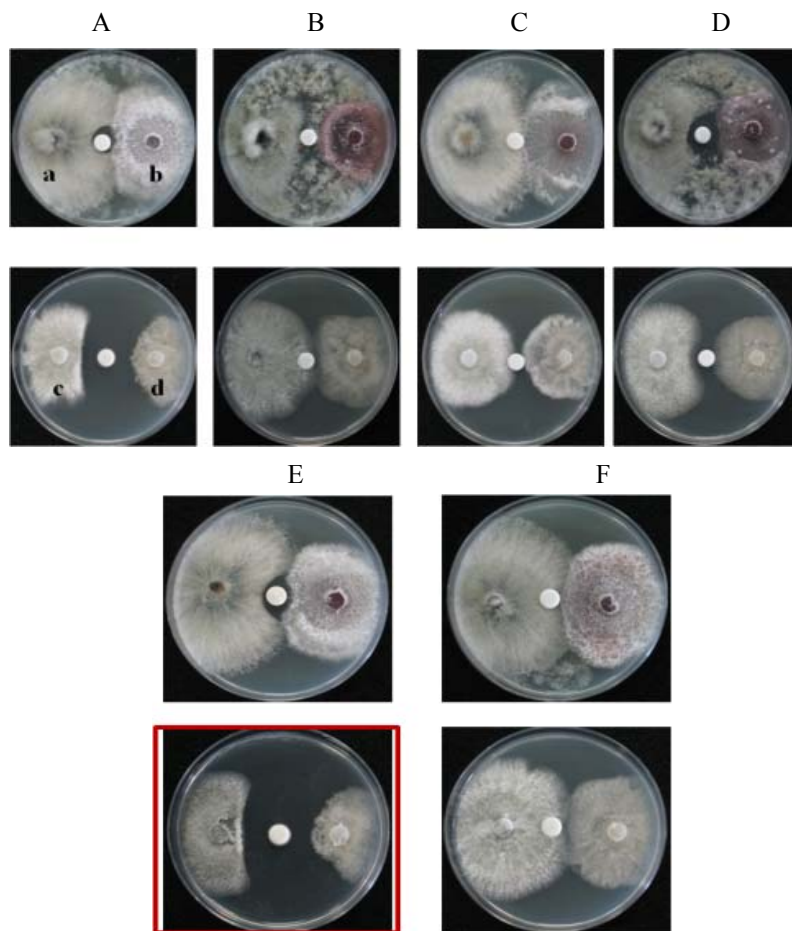


Fig. 7. Antifungal activities with cultures filtrates of *B. amyloliquefaciens* CP1 cultured in five broth media against *B. cinerea* (a), *F. oxysporum* (b), *C. gloeosporioides* (c), *P. cactorum* (d) 10 days after treatment. A: R2A broth, B: Nutrient broth, C: Kings' B broth, D: Trypton soy broth, E: Molasses broth, F: Control.

2) 포자발아 억제 활성

균사생장 억제 효과조사 실험에서 CP1 배양여액이 딸기의 4가지의 주요병원균 중 *B. cinerea*, *C. gloeosporioides*를 가장 크게 억제하였기 때문에 이 배양여액의 발아관 억제와 포자 발아 억제 활성을 조사한 결과 *B. cinerea*에는 억제 효과가 없었으며, *C. gloeosporioides*의 포자발아 억제율은 Control에 비해 발아관 길이와 포자발아율이 매우 낮았다. 10와 20배 희석 시에는 3, 8, 12시간 관찰한 결과 3시간째는 포자의 형태를 유지하며 탄저병의 모양을 그대로 유지한 상태였으며, 이 후 12시간부터는 포자가 거의 관찰되지 않았다. 이는 아마도 포자가 배양 여액의 항균력에 용해되었을 것으로 추정되었다(Table 5, Fig. 8)

Table 5. Antifungal activity of broth culture filtrates of *B. amyloliquefaciens* CP1 on conidial germination of *Colletotrichum gloeosporioides*

Dilution rate of broth culture filtrate	Diameter of mycelia (μm)	Inhibition (%)
1/10	0	100
1/20	0	100
1/50	2.3	96
1/100	5	89
Control	57	

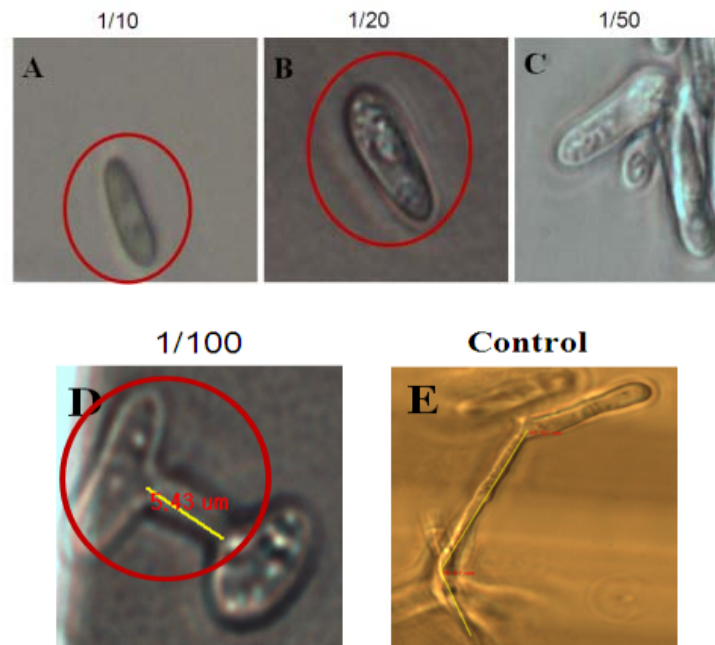


Fig. 8. Effect of broth culture filtrate of *B. amyloliquefaciens* CP1 on spore germination and germ tube against *Colletotrichum gloeosporioides*.

(사) 배양적 특성

1) 배양조건에 따른 CP1 균주의 성장

① 배지

CP1 균주의 대량배양을 위해 Nutrient broth를 포함하여 주로 세균배양에 많이 쓰이고 있는 5가지 종류의 배지에서 *B. amyloliquefaciens* CP1 균주를 동일한 조건으로 배양한 후, 시간대별로 흡광도(OD 600 nm)를 측정, 균체수를 확인하였다(Fig. 9).

앞선 Fig. 6의 결과에서 CP1 균주는 Molasses broth에서 배양하였을 때 가장 높은 항균활성을 보인바 있다. 이 실험에서도 CP1 균주는 Molasses broth 배지에서 증식이 가장 활발하여 CP1 균주의 대량배양에 적당함을 다시 한 번 확인할 수 있었다. 그리고 Molasses는 값이 싸서 균주의 상업적 배양에 더욱 활용성이 크다고 판단된다.

CP1균주는 배양 후 72시간이 지났을 때 최고 균체수를 보인 반면, *B. atrophaeus*는 24시간 때(김 등, 2005), *B. amyloliquefaciens*, *Burkholderia pyrrocinia*는 30시간 때(유 등, 2005) 각각 최고밀도임이 측정되었다. 이렇게 다른 최고밀도의 균체수를 나타내는 것은 균주의 생리적인 특성 뿐 아니라, 균체수를 측정하는 Spectrophotometer와 배양하는 배지의 종류, 접종원의 농도 및 용량 등이 다르기 때문이라 판단된다.

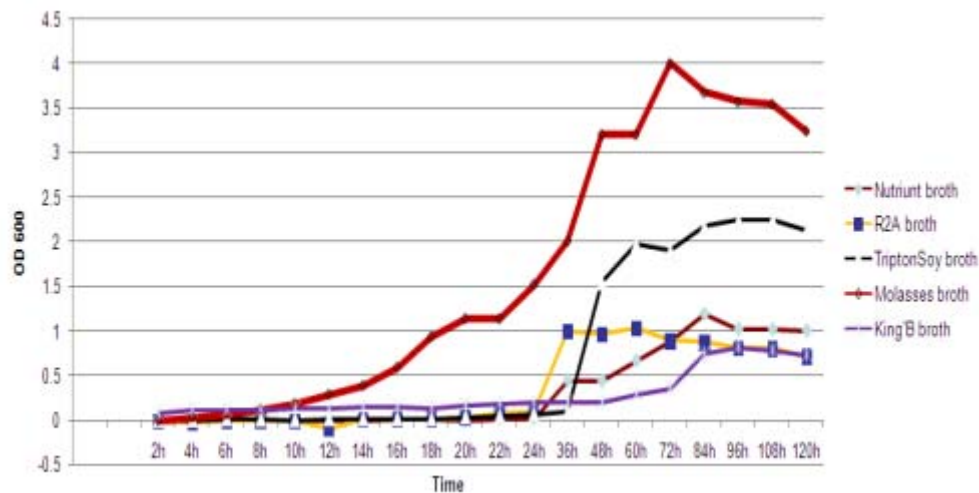


Fig. 9. Propagation of *B. amyloliquefaciens* CP1 in five broth media.

② 배양온도

생육 적온의 조건 탐색은 500 ml 삼각플라스크에 CP1 균주를 Molasses broth 배지에 접종하고 온도를 10 °C씩 차이를 둔 Shacking incubator를 이용해 배양하였다. 배양을 실시하는 동안 흡광도(OD값 600 nm)를 사용하여 균체수를 측정하였을 때 30°C에서 생육이 월등히 좋았다(Fig.

10). 하지만 50 °C에서는 30 °C에서 배양하였을 때 보다 내생포자의 비율이 높았다(Fig. 11). 이 점은 내생포자의 생성을 유도하여 생물학적 방제제로서의 이용가능성이 높다고 판단된다.

일반적으로 *Bacillus* 속 균주들이 포자 생성 시 Dipicolinic acid를 생성한다. 내생포자는 생물학적 방제제로 만들기에 매우 유용하지만 지금까지 알려진 *Bacillus* 속 균주의 포자 생성율을 증강시킬 수 있는 배지는 주로 crystal toxin protein의 생성력 증가나 항생물질의 생산 증가 등 2차대사산물의 생산증가를 위한 포자 형성율을 높이기 위한 배지가 대부분이고 건조 포자체를 만들기 위한 배지는 전무한 상태이다. 최근 연구동향은 이러한 내생포자의 형성율과 상관관계를 이루고 있는 연구들이 많이 진행 중에 있다. 특히 내생포자의 양을 정확히 측정하기 위해 Curie-point pyrolysis mass spectrometry (PyMS) 등 각종 첨단 측정 기구를 이용하여 진행 중에 있다

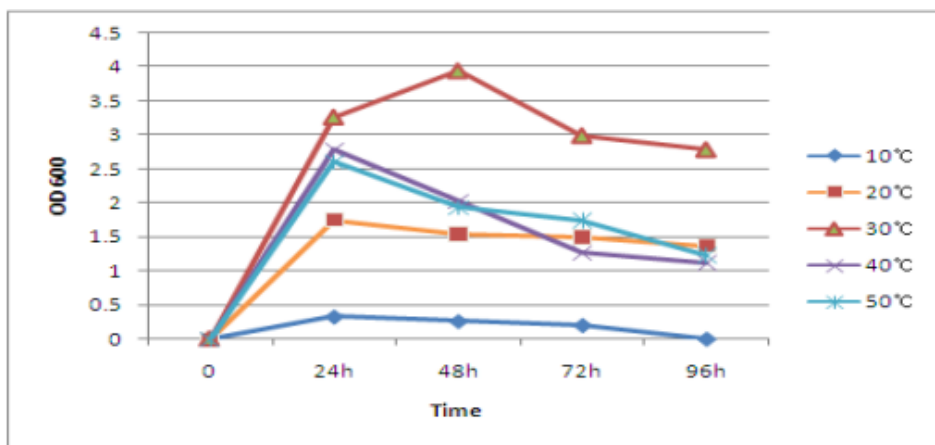


Fig. 10. Propagation of *Bacillus amyloliquefaciens* CP1 according to temperature conditions in Molasses broth media.

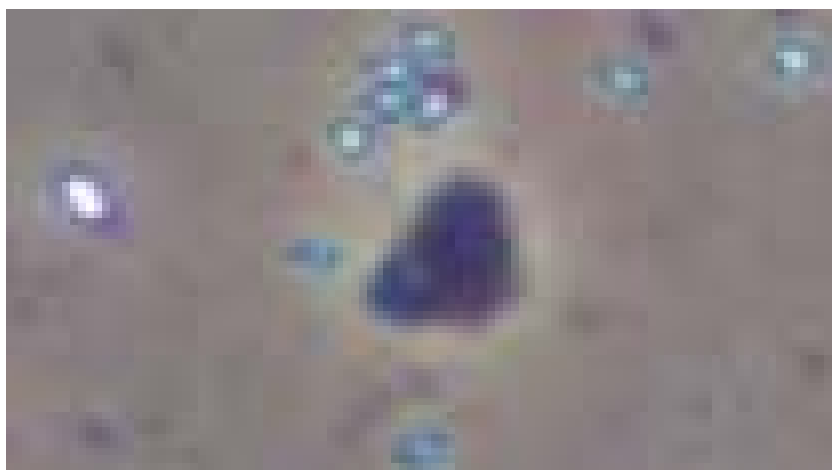


Fig. 11. Endospore formation of *B. amyloliquefaciens* CP1 in Jar-fermenter after cultured for 72 hours.

③ 초기 pH의 영향

최적 배지 Molasses broth에 초기 pH를 달리하여 CP1 균주의 성장을 측정하였을 때 pH 5 ~ pH 8 까지 고루 잘 자랐으며(Fig. 12) 특히 pH 6에서 가장 잘 자랐으며 또한 Generation Time이 가장 짧아 최적의 조건으로 선발하였다.

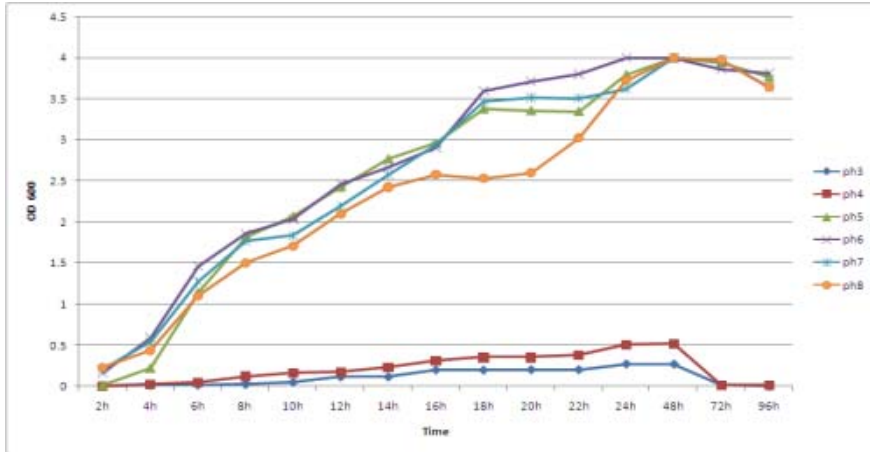


Fig. 12. Change of cell concentration of *B. amyloliquefaciens* CP1 according to the initial pH of Molasses broth media.

④ 교반속도

최적 교반속도 조건을 탐색하기 위해 성장상을 측정한 결과 100 rpm과 150 rpm에서 가장 잘 자랐으며(Fig. 13) Generation Time이 150 rpm이 가장 짧아 최적의 교반속도로 선발하였다. 그리고 200 rpm에서는 더 많은 산소가 공급되어 잘 자랄 것이라 판단했지만 오히려 감소하는 것을 보였다.

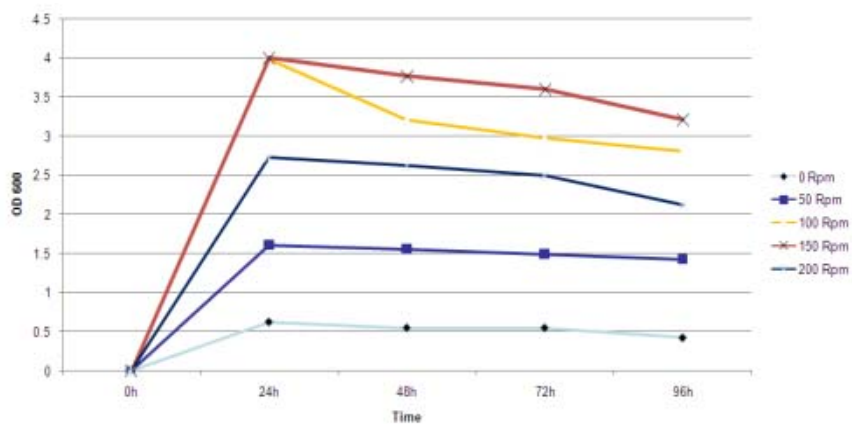


Fig. 13. Change of cell concentration of *B. amyloliquefaciens* CP1 according to the shaking speed.

2) 대량배양

대량배양은 최적화된 대량생산 통해 얻어진 길항미생물 배양액을 제형화할 때 생물학적 방제제로서 제조공정이 간단해지고 사용하기 쉬우며 경제적인 제품을 생산할 수 있는 장점이 있어 위 실험에서 *B. amyloliquefaciens* CP1 균주의 배양 최적 조건 배지: Molasses broth, 온도 30 °C, pH 6 등등의 조건으로 Jar-fermenter (BIOTRON, LiFlis GX, 5L vessel)를 사용하여 4 ℓ 대량배양을 실시한 결과 최종 균체의 농도가 3일 째 되던 날 실 균체수가 최고 밀도가 되었으며 그 이후로 점점 사멸기에 이르렀다. 또한 항균활성은 4일 째 되던 날 가장 강했다(Table 6).

주기적으로 오염여부를 판단하기 위해 그람염색을 실시하여 현미경으로 관찰하였으며 그람양성에 간상형이 관찰되었으며 3일 째 되던 날부터 곤봉형의 내생포자를 생성하기 시작하였다.

한편, Jar-fermenter를 이용하여 *Bacillus* 속, *Pseudomonas* 속 균주 등 유용미생물을 대량배양 실시하는 데 있어 배지의 구성성분인 생장소, 무기염류, 질소원, 탄소원 등의 최적조건을 선별하고 실 균체수의 최고 밀도 및 항균활성 물질을 어떠한 조건에서 가장 많이 생산되는지를 탐색하며 내생포자의 유도를 할 수 있는 기술이 보다 쉽게 된다면 생물학적 방제제 개발에 있어 더 유리한 장점이 될 것이라 생각된다. 본 논문에서는 이러한 최적의 배지 구성성분의 조건을 알아보지 못하여 추후 연구로 진행한다면 더욱더 좋은 연구결과가 나올 것이라 생각한다.

Table 6. Comparison with growth and antifungal activities of *Bacillus amyloliquefaciens* CP1 in Jar-fermenter according to the time.

Culture time	OD 600	pH	Vegetative cell	Antifungal activity (mm)				Gram-reaction	현미경형태
				BC ^a	PC ^b	CG ^c	FO ^d		
0h	0	6.7	0	0	0	0	0		
24h	3.204	6.2	1.3×10 ⁷	3.6	10	8.6	3	+	rod
48h	3.962	5.8	3.7×10 ⁸	5.3	11	11.3	4.6	+	rod
72h	4.02	5.7	5.7×10 ¹⁰	7.6	11.3	11	6	+	rod, clavate
96h	3.804	5.14	1.4×10 ⁹	12	14.3	13	7.3	+	rod, clavate
120h	3.8	5.14	5.7×10 ⁸	11.3	11.3	12	6	+	rod, clavate

^aBC: *Botrytis cinerea*

^bPC: *Phytophthora cactorum*,

^cCG: *Colletotrichum gloeosporioides*, dFO: *Fusarium oxysporum*.

(2) SR1, SR2 및 GS1 균주

(가) 유용 미생물의 동정

딸기 뿌리에서 분리한 내생세균 SR1 균주의 16S rDNA를 분석한 결과 *Bacillus* 속의 *Bacillus velezensis*와 85 %의 유사도를 보였다(Fig. 14). 또한 SR2 균주의 16S rDNA를 분석한 결과

Bacillus 속의 *Bacillus subtilis*와 69 %의 유사도를 보였다(Fig. 15). 그러나 *Bacillus subtilis* 그룹에 속하는 여러 세균들의 16S rDNA 영역이 매우 유사하므로 좀 더 정확한 동정을 위해서는 *gyr A*의 염기서열 분석이 필요하다.

인삼 줄기에서 분리한 GS1 균주는 16S rDNA의 유전자 분석 결과 *Paenibacillus* 속으로 분리되었으며, *Paenibacillus brasiliensis*와 *P. peoriae*와 100 %의 유사도를 보였다(Fig. 16). 그러나 다른 유전자 영역을 이용하여 더욱 정확한 동정을 해야 할 것으로 판단된다.

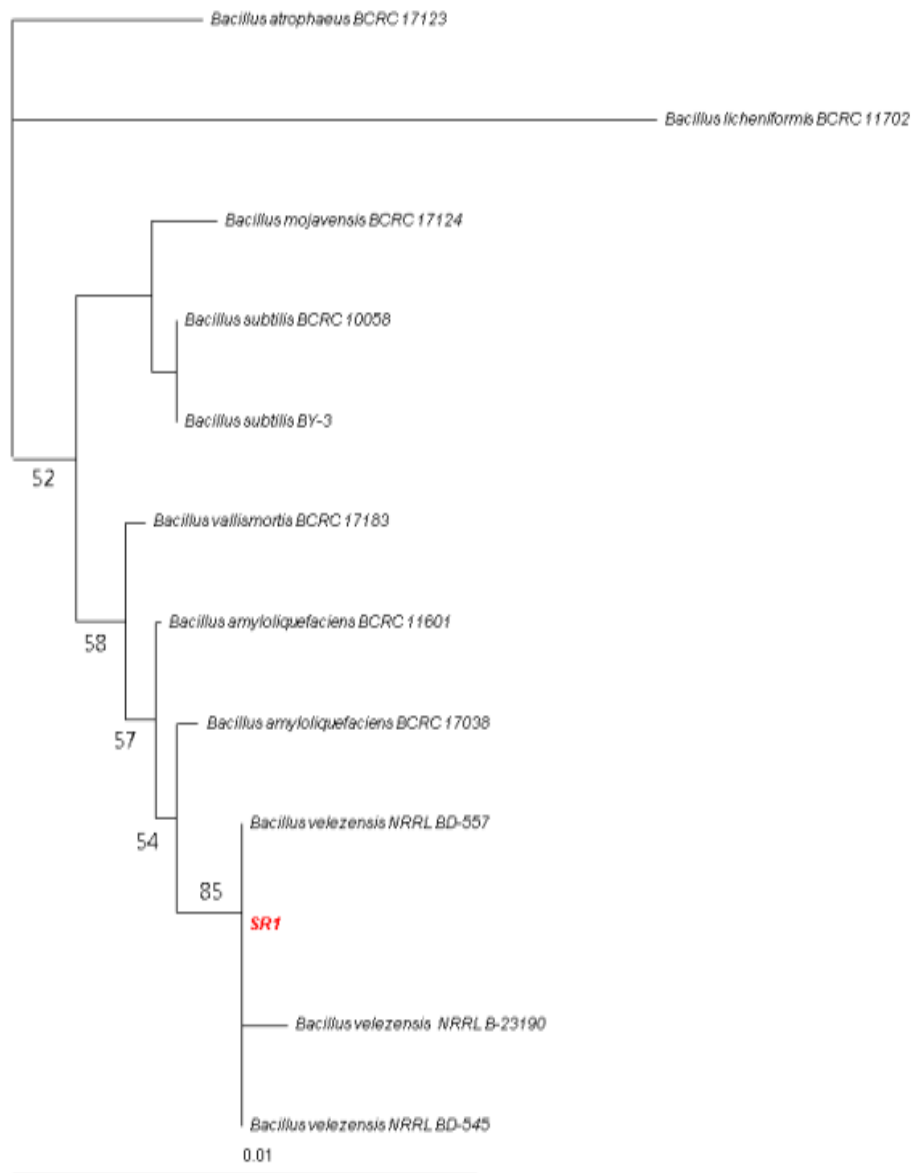


Fig. 14. Phylogenetic tree based on 16S rDNA gene sequence comparison showing the position of SR1 isolate among related species of the genus *Bacillus*.

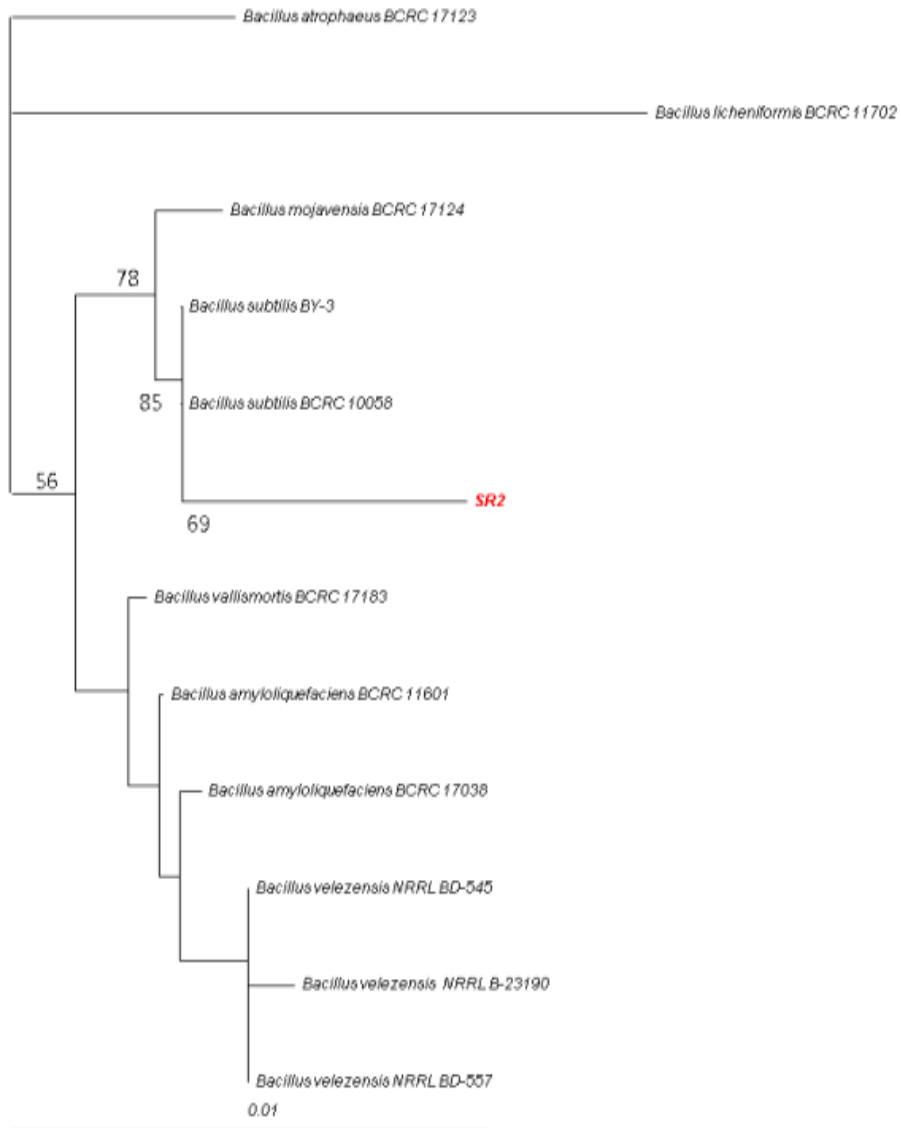


Fig. 15. Phylogenetic tree based on 16S rDNA gene sequence comparison showing the position of SR2 isolate among related species of the genus *Bacillus*.

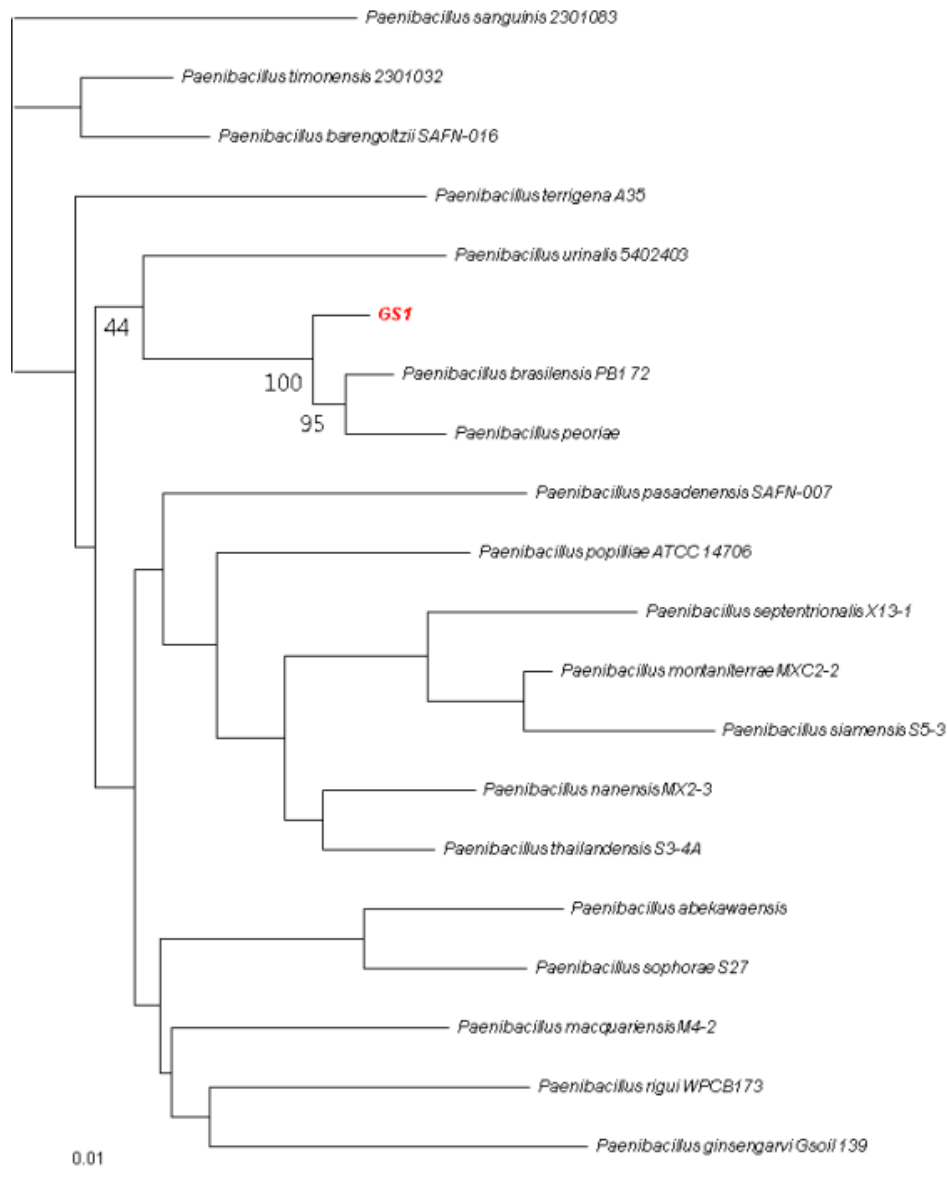


Fig. 16. Phylogenetic tree based on 16S rDNA gene sequence comparison showing the position of GS1 isolate among related species of the genus *Paenibacillus*.

(나) 항균활성 특성조사

딸기에서 분리한 내생세균 SR1, SR2 균주와 인삼 줄기에서 분리한 GS1 균주에 대하여 식물 병원균에 대한 항균 길항세균의 항균 spectrum 조사를 위해 대표적인 식물 병원균 *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*, *Collectotrichum gloeosporioides*, *Cylindrocarpon destructans*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Stemphylium lycopersis*, *Stromatinia gladioli* 등 11균주를 사용하였다.

내생세균 SR1 균주는 11개의 식물병원성 곰팡이에 대하여 모두 활성을 보였으며 *Alternaria solani*, *Collectotrichum gloeosporioides*, *Cylindrocarpon destructans*, *Stemphylium lycopersis*에 대하여 강한 항균활성을 보였다(Fig. 17, Table 7).

Paenibacillus 속의 SR2 균주는 11개의 식물병원성 곰팡이와의 항균활성을 검정한 결과, *Rhizoctonia solani*에서 가장 약한 활성을 보였으나, *Cylindrocarpon destructans*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici*, *Collectotrichum gloeosporioides* 대하여 높은 길항작용을 하는 것을 확인하였다(Fig. 18, Table 8).

또한 인삼의 줄기로부터 분리한 GS1의 경우에는 11개의 식물병원성 곰팡이에 대하여 강한 활성을 보였으며, 특히 *C. destructans*에 대하여 강력한 항균활성을 보였다(Fig. 19, Table 9).



Fig. 17. Antifungal activity of SR1 against eleven plant pathogens on PDA.

Table 7. Antifungal activity of SR1 isolate against eleven major plant pathogens

Plant pathogens	SR1 isolate	
	Inhibition zone (mm)	Antifungal activity ¹
<i>Alternaria solani</i>	18	+++
<i>Botrytis cinerea</i>	12	++
<i>Cylindrocarpon destructans</i>	23	+++
<i>Fusarium solani</i>	13	++
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	6	+
<i>Stemphylium lycopersici</i>	19	+++
<i>Fusarium oxysporum</i>	17	++
<i>Stromatinia gladioli</i>	16	++
<i>Rhizoctonia solani</i>	2	+
<i>Phytophthora capsici</i>	14	++
<i>Collectotrichum gloeosporioides</i>	18	+++

1) - :0mm, +: ≤8 mm, ++: ≤17 mm, +++: ≥18mm



Fig. 18. Antifungal activity of SR2 against eleven plant pathogens on PDA.

Table 8. Antifungal activity of SR2 isolate against eleven major plant pathogens

Plant pathogens	SR2 isolate	
	Inhibition zone (mm)	Antifungal activity
<i>Alternaria solani</i>	15	++
<i>Botrytis cinerea</i>	14	++
<i>Cylindrocarpon destructans</i>	25	+++
<i>Fusarium solani</i>	10	++
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	10	++
<i>Stemphylium lycopersici</i>	16	++
<i>Fusarium oxysporum</i>	19	+++
<i>Stromatinia gladioli</i>	17	++
<i>Rhizoctonia solani</i>	8	+
<i>Phytophthora capsici</i>	18	+++
<i>Collectotrichum gloeosporioides</i>	20	+++

1) -: 0 mm, +: ≤8 mm, ++: ≤17 mm, +++: ≥18 mm



Fig. 19. Antifungal activity of GS1 against eleven plant pathogens on PDA.

Table 9. Antifungal activity of GS1 isolate against eleven major plant pathogens

Plant pathogens	GS1 isolate	
	Inhibition zone (mm)	Antifungal activity
<i>Alternaria solani</i>	14	++
<i>Botrytis cinerea</i>	13	++
<i>Cylindrocarpon destructans</i>	22	+++
<i>Fusarium solani</i>	10	++
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	9	++
<i>Stemphylium lycopersici</i>	12	++
<i>Fusarium oxysporum</i>	10	++
<i>Stromatinia gladioli</i>	16	++
<i>Rhizoctonia solani</i>	10	++
<i>Phytophthora capsici</i>	9	++
<i>Collectotrichum gloeosporioides</i>	12	++

1) -: 0 mm, +: ≤8 mm, ++: ≤17 mm, +++: ≥18 mm

(다) 항균활성 기작

11개의 식물병원성 곰팡이와 SR1, SR2, RS1 균주와의 대치 배양에 의해 항균활성이 나타나는 부위를 현미경 상에서 관찰한 결과 항균활성을 보이는 대부분의 균사에서 생장이상이 나타났으며, 균사 선단부 및 균사체에 이상팽윤 증상과 이상비대 증식을 보이며 용균 현상도 관찰되었다(Fig. 20, 21, 22). 이런 비정상적인 균사가 발생함으로 이들 내생균주가 식물병원성 곰팡이에 대하여 항균활성을 보이는 것으로 확인되었다. 대부분의 길항세균의 항균활성 기작은 균사벽의 분해, 세포막의 분해, 균사 팽윤, 균사 말단의 생육 저해 등의 여러 가지 저해 형태가 관찰되었는데 본 실험의 길항세균 SR1, SR2, RS1 균주에서도 유사한 기작들을 고루 가지고 있음이 밝혀졌다.



Fig. 20. Shapes of irregular mycelia of plant pathogens in opposite culture with SR1 on PDA.



Fig. 21. Shapes of irregular mycelia of plant pathogens in opposite culture with SR2 on PDA.

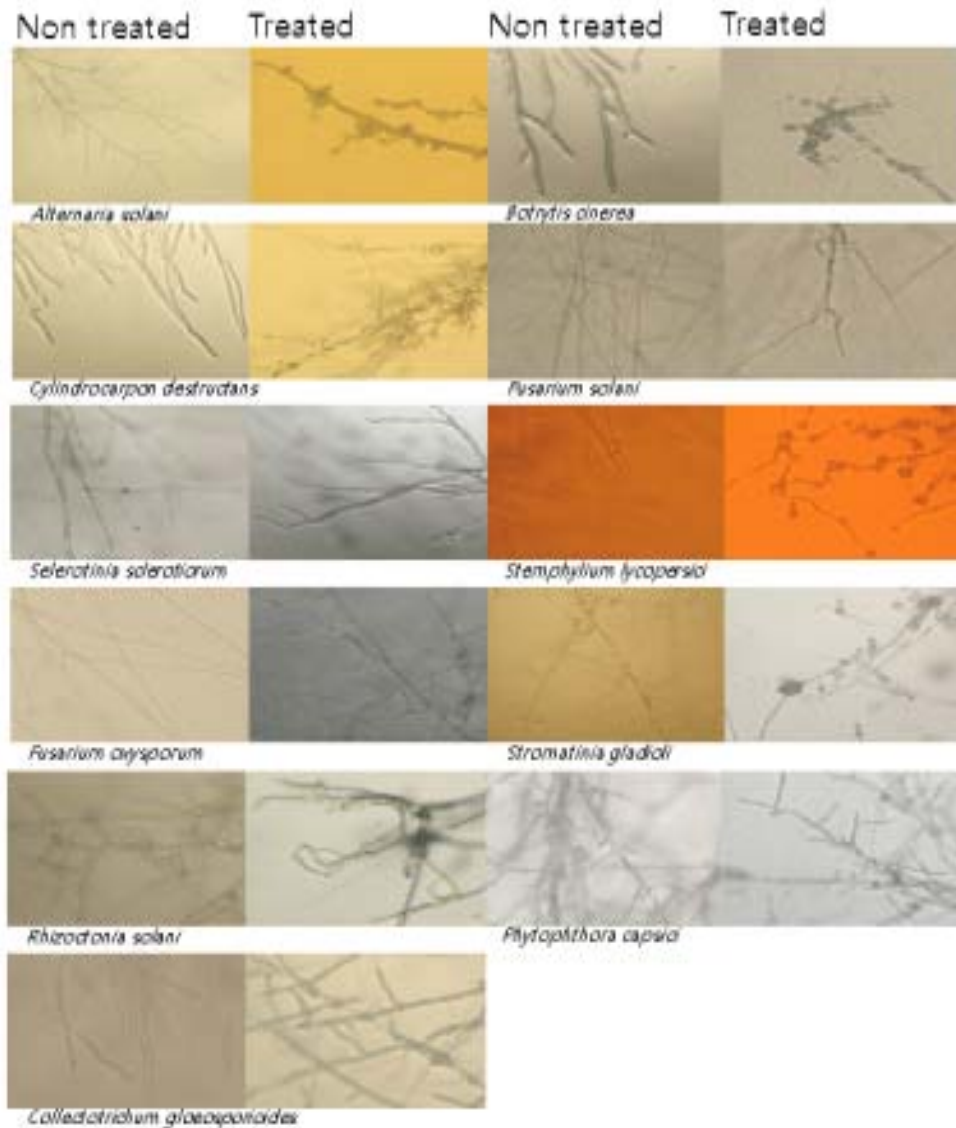


Fig. 22. Shapes of irregular mycelia of plant pathogens in opposite culture with GR1 on PDA.

(라) 내생균의 휘발성 검정

휘발성 유무를 확인하고자 *Botrytis cinerea*, *Collectotrichum gloeosporioides*, *Phytophthora capsici*, *Sclerotinia sclerotiorum*을 PDA 배지에 접종한 후, 25 °C에서 7일간 배양시킨 균주를 검정균으로 사용하였다. PDA 배지 중앙 부위의 배지를 10 mm 제거한 다음, 7 mm cork borer를 이용하여 검정균의 균사 선단부를 떼어 접종하고 8 cm 거리를 두어 길항세균 또한 접종하였다. 7일 후 검정균의 inhibition zone 형성 여부를 관찰하여 휘발성 유무를 조사하였다(Fig. 23, 24, 25).

휘발성 확인 실험에서는 딸기의 뿌리에서 분리한 SR1, SR2 내생균주 뿐만 아니라 인삼 줄기에서 분리한 RS1 균주 모두 항균활성을 보이지 않았으므로 비휘발성의 물질이나 내생균 자체로 항균능력을 갖는 것으로 판단된다.

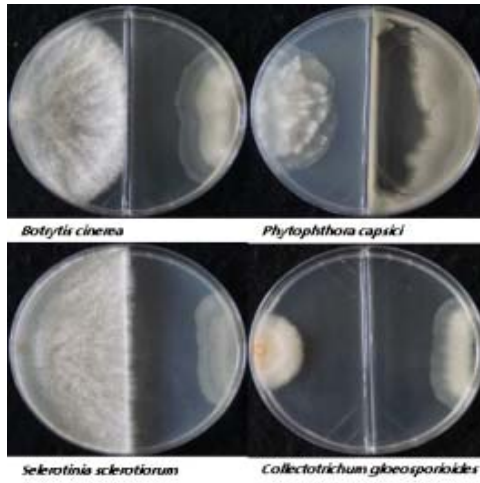


Fig. 23. Volatility of antifungal compounds produced by SR1.

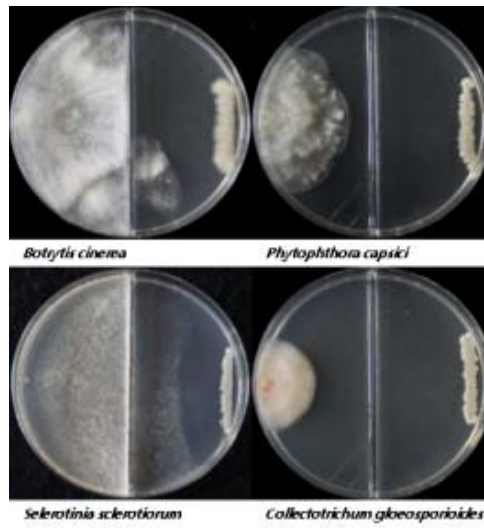


Fig. 24. Volatility of antifungal compounds produced by SR2.

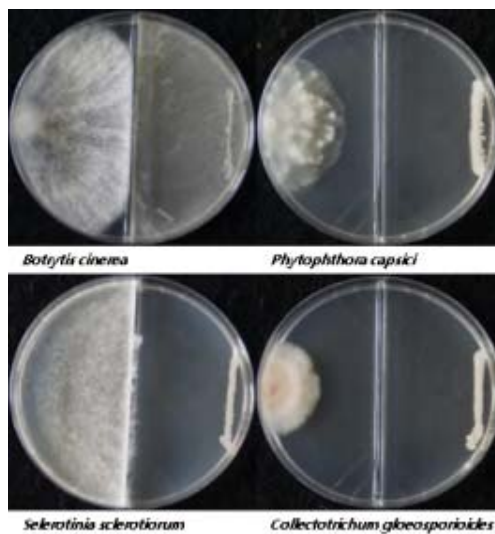


Fig. 25. Volatility of antifungal compounds produced by GS1.

(마) 고추 탄저병에 대한 내생세균의 항균효과검정

고추 탄저병균인 *Collectotrichum gloeosporioides*에 대한 SR1, SR2 및 GS1 내생균의 효과를 검정하기 위하여 시중에서 생산하는 고추를 표면소독 후 *C. gloeosporioides*의 포자를 5×10^5 의 농도로 분무접종을 하였다. 1일 동안 방치하여 고추 탄저병의 포자를 정착시키고, 딸기 뿌리에서 분리한 SR1, SR2 내생세균과 인삼 줄기에서 분리한 RS1 내생세균을 106 cfu/ml을 분무 처리하여 14일 후 이들 내생세균에 대한 항균효과를 검정하였다(Table 10 Fig. 26).

고추 탄저병만을 처리한 처리구의 발병률은 74.3 %였으며, SR2 균주의 발병률이 8.5 %로 가장 낮았고, SR1과 GS1 균주의 발병률이 각각 11.7 %, 19.2 %로 고추 탄저병의 포자에 대하여 항균효과가 있는 것으로 확인되었다.

Table 10. Inhibition rate on *C. gloeosporioides* of SR1, SR2 and GS1

Treatment	Inhibition rate (%)
<i>C. gloeosporioides</i>	74.3
<i>C. gloeosporioides</i> + SR1	11.7
<i>C. gloeosporioides</i> + SR2	8.5
<i>C. gloeosporioides</i> + GS1	19.2



Fig. 26. Control effect of SR1, SR2 and GS1 against *C. gloeosporioides* on pepper at 14 days after artificial inoculation. 1; *C. gloeosporioides*, 2; *C. gloeosporioides* + SR1, 3; *C. gloeosporioides* + SR2, 4; *C. gloeosporioides* + GS1.

(바) 딸기 탄저병에 대한 내생세균의 항균효과 검증

딸기 탄저병에 대한 SR1, SR2 및 GS1 내생균의 효과를 검증하기 위하여 딸기 잎면에 *Collectotrichum gloeosporioides*의 포자를 1.4×10^6 의 농도로 분무접종을 하였다. 1일 동안 방치하여 탄저병의 포자를 정착시키고, 딸기 뿌리에서 분리한 SR1, SR2 내생세균과 인삼 줄기에서 분리한 RS1 내생세균을 10^6 cfu/ml을 분무 처리하여 7일간 3번 처리하고 최종 처리 후 내생세균에 대한 항균효과를 검증하였다(Fig. 27). 현재 내생세균을 2반복 처리하였으며 무처리에서 발병률이 높지 않아 딸기 탄저병에 대한 내생세균의 뚜렷한 항균효과를 보이지 않는다.

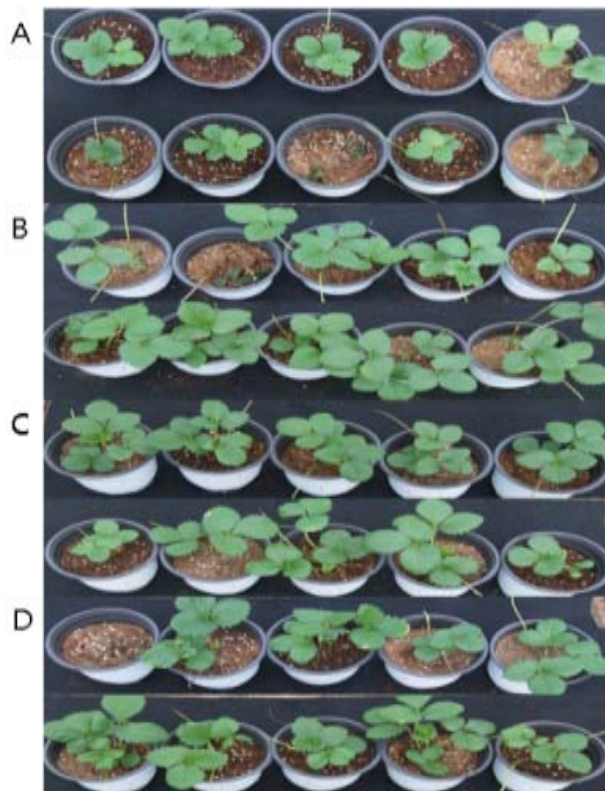


Fig. 27. Control effect of SR1, SR2 and GS1 against *C. gloeosporioides* on strawberry. A; Positive control, B; SR1, C; SR2, D; + GS1.

(3) 전해수 (Slightly acidic electrolyzed water, SAEW)의 효과검정

(가) 배지상 전해수의 *A. panax* 포자에 대한 발아 억제력

전해수의 *A. panax* 포자에 대한 발아 억제력을 알아보려고 PDA 배지에 1×10^4 의 *A. panax*의 포자를 도말하였다. 24시간 후, 전해수 10, 50, 100 %의 전해수를 처리하여 7일 후 포자 발아 억제력을 평가하였다(Table 11, Fig. 28). 전해수 10 %의 포자발아 억제력은 positive control에 반해 37 %에 불과하였지만, 전해수 50 %, 100 %의 경우 *A. panax* 포자에 대하여 100 %의 포자발아 억제력을 확인할 수 있었다.

Table 11. Inhibition rate on *Alternaria panax* spore germination of SAEW

Treatment	Inhibition rate of spore germination (%)
100% SAEW	100
50% SAEW	100
10% SAEW	37
Positive control	0

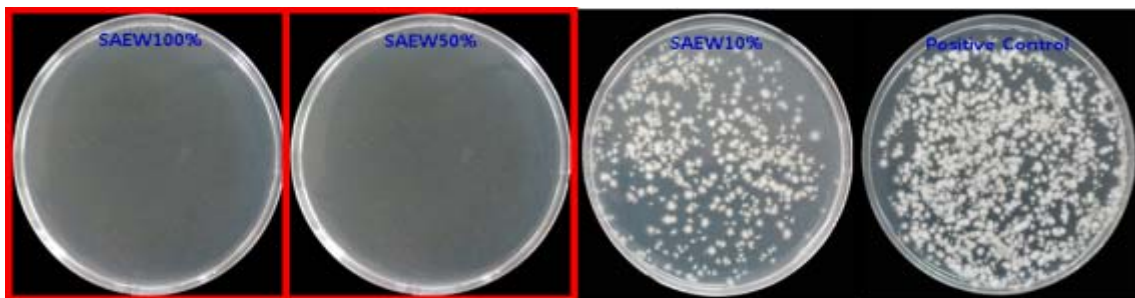


Fig. 28. Effect of SAEW (pH 5.5, 25 ppm) for inactivation of *Alternaria panax* on PDA.

(나) 인삼 점무늬병에 대한 전해수의 효과 검정

인삼 점무늬병에 대한 전해수의 효과 검정을 하기 위하여 금산인삼약초시험장의 시험포에서 7일 간격으로 5회 처리하였다. 최종약제 처리 후 7일 째 인삼 점무늬병에 대한 약제방제 검정을 실시하였다(Fig. 29, Table 12).

무처리의 발병률은 95.3 %로 인삼 점무늬병이 만연하였다. 대조약제로 쓰인 Fluazinam WP의 발병률은 7.5 %였으며, 전해수의 평균 발병률은 25.3 %였다.

무처리에 대한 Fluazinam WP의 방제가는 92.5 %로 높았으며, 전해수의 방제가는 73.5 %로 화학약제인 Fluazinam WP의 방제가보다 낮았지만, 미생물제제의 등록 가능한 방제가인 50 %보다 높은 방제가를 갖기 때문에 추후 친환경제제로의 활용이 가능할 것으로 판단된다.



Fig. 29. Control effect of SAEW against *Alternaria* blight caused by *Alternaria panax* occurred naturally in ginseng field. A; D.W, B; SAEW, C; Fluazinan WP.

Table 12. Infection leaf rate of SAEW against *Alternaria* blight caused by *Alternaria panax* occurred naturally in ginseng field

Treatment	Infection leaf rate(%)			Average of infection leaf late (%)	Control value (%)
	Replication 1	Replication 2	Replication 3		
D.W	97.6	92.3	96.0	95.3	-
SAEW	23.4	31.4	21.1	25.3	73.5
Fluazinam WP.	8.1	9.3	5.2	7.5	92.1

(4) Essential oil의 항균활성능 검정

(가) 배지상 균 생육 억제

1) *Botrytis cinerea*

대치배양을 통한 항균활성 검정에서 carvacrol은 효과가 비교적 떨어졌으나 thymol과 methyl eugenol에서는 만족할만한 항균활성을 확인할 수 있었다. 농도에 따른 활성에서, 100 $\mu\text{g}/\text{disc}$ 에서는 비교적 낮은 생육 저해율을 보였지만, 200 $\mu\text{g}/\text{disc}$, 500 $\mu\text{g}/\text{disc}$ 에서는 carvacrol을 제외한 thymol과 methyl eugenol에서 80 % 이상의 균사 생육 저해율을 나타냈다. Carvacrol의 경우 고농도로 처리한 때에도 그 효과가 만족할 만한 수준으로 나타나지 않아 차후 실험에서는 제외시키기로 했다(Fig. 30, Fig. 31).

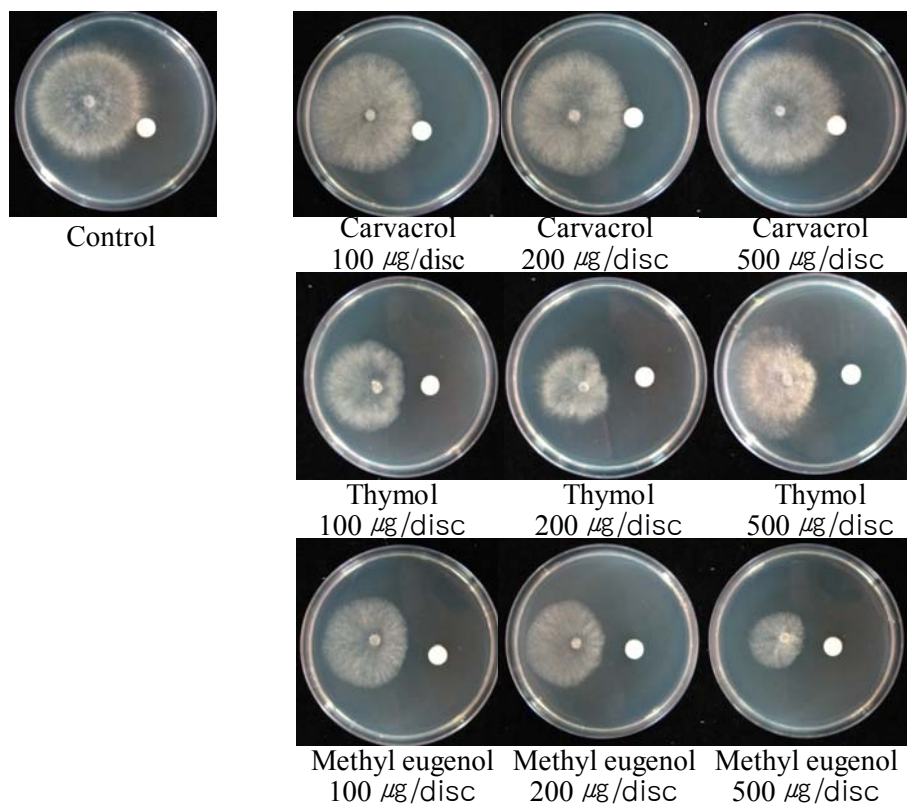


Fig. 30. Culture assay by using three essential oils to test control efficacy against *Botrytis cinerea*.

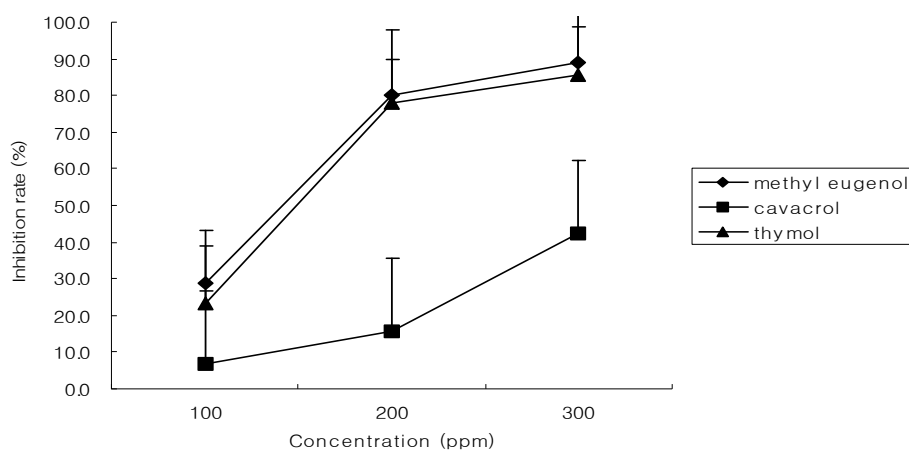
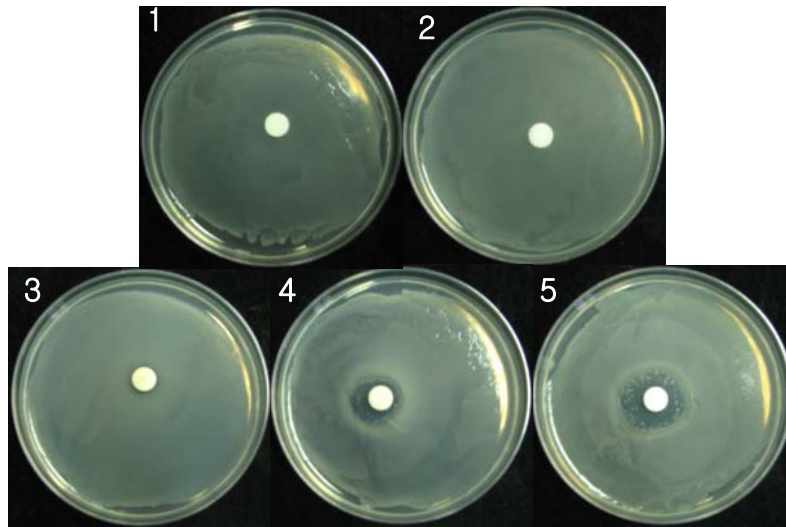


Fig. 31. Inhibition rate against *Botrytis cinerea* of three essential oils.

2) *Pseudomonas panacis*

식물정유성분이 분리한 저장병원 세균에 항균활성능이 있는지 알아보기 위하여 수행한 한천배지확산법의 분석결과 *B. cinerea*에 대해 뛰어난 항균 활성능을 보였던 methyl eugenol은 그 효과가 적었지만 carvacrol과 thymol은 뛰어난 효과를 나타냈다. Carvacrol에서는 생육저지원의 지름이 18 mm를 나타내었고, thymol에서는 지름 24 mm의 생육저지원이 형성되었다(Fig. 32, Fig. 33).



1:Control, 2:Methyl eugenol, 3:Eugenol, 4:Carvacrol, 5:Thymol

Fig. 32. Activity test of essential oils against *Pseudomonas panacis*.

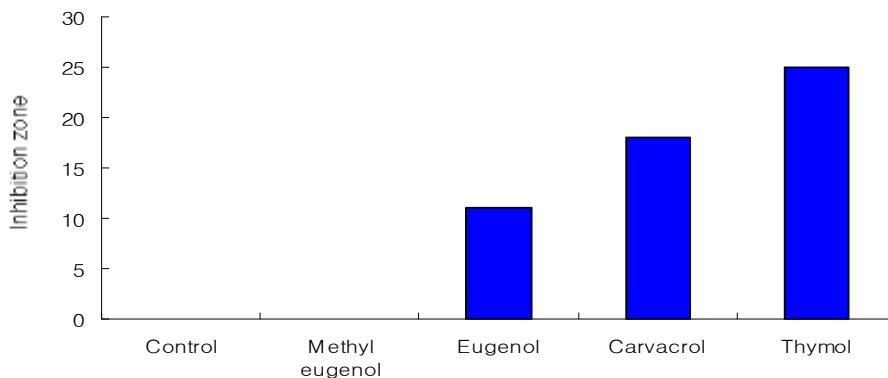


Fig. 33. Inhibition zone (mm) of EOs 500ppm against *Pseudomonas panacis* on KBA 2 days after inoculation.

3) *Serratia liquefaciens*

*Pseudomonas panacis*와 같은 방법으로 수행한 실험결과 *Serratia liquefaciens*에서도 비슷한 결과를 나타내었다. Methyl eugenol에서는 효과가 없고 carvacrol에서는 17 mm, thymol에서는 18 mm 지름의 생육 저지원을 나타내어 식물병원세균에도 뛰어난 항균효과가 있는 것을 확인하였다.

(나) Essential oil 함유 배지에서의 항균활성능

배지상에 물질이 확산되면서 효과를 알아보는 한천배지 확산법을 통해 식물정유성분의 뛰어난 효과를 확인한 후에 식물 정유 성분을 배지에 직접 넣어 식물정유성분이 저장병균에 고르게 직접 닿을 경우 어떠한 결과가 있을지 실험하여 보았다. 실험결과 한천배지확산법과 비슷한 경향을 보였고, 뛰어난 효과를 다시 확인하게 되었다.

1) *Pseudomonas panacis*

식물 정유 성분을 함유한 KBA배지에서 수행한 결과 한천배지확산법과 마찬가지로 methyl eugenol에 의해서는 효과가 전혀 나타나지 않았다. 반면에 carvacrol은 200 ppm에서 20 %의 생육 억제율을 나타내었고, 500 ppm에서는 50 %의 효과를 보였다. 또한, thymol에서는 200 ppm에서 28 %, 500 ppm에서 70 %에 이르는 생육 억제율을 보여 뛰어난 효과를 확인할 수 있었다 (Fig. 34, 35).

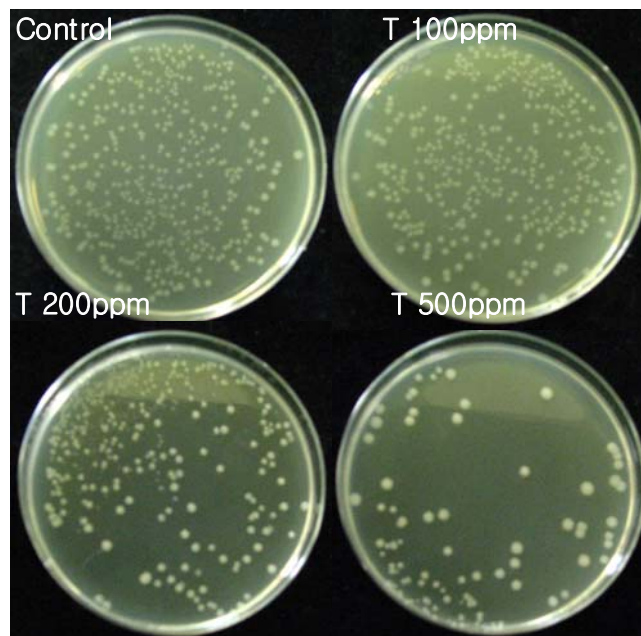


Fig. 34. Activity test against *Pseudomonas panacis* on KBA media mixed with thymol.

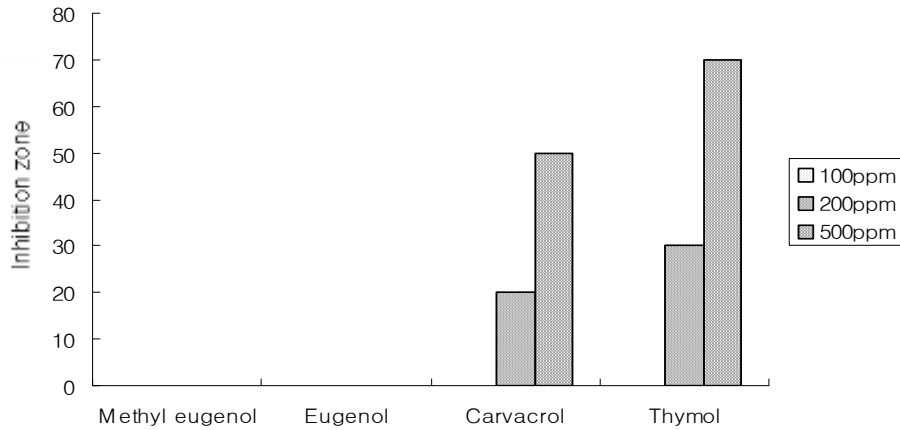


Fig. 35. Inhibition rate against *Pseudomonas panacis* on KBA media mixed with EOs (Based on of *P. panacis* 2×10^3 cfu/ μ l).

2) *Serratia liquefaciens*

억제 효과를 확인할 수가 있었다. Methyl eugenol은 *P. panacis*에서와 같이 효과가 없었고, eugenol과 carvacrol 200 ppm에서 약 50 %의 생육 억제율을 보였다. 특히, thymol의 경우 100 ppm에서의 생육 억제율이 100 %를 보여 최적농도를 알아보기 위하여 농도를 10, 20, 50 ppm으로 조정하여 재실험한 결과 10 ppm에서 60 %, 20 ppm에서 75 %, 50 ppm에서 99 %의 생육 억제율을 보임으로써 *S. liquefaciens*는 thymol에 강한 감수성을 보이는 것을 확인하였다(Fig. 36, 37).

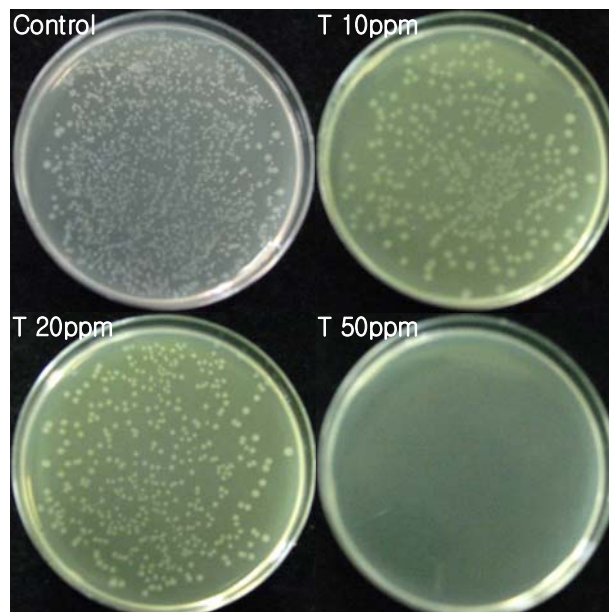


Fig. 36. Activity test of thymol against *Serratia liquefaciens*.

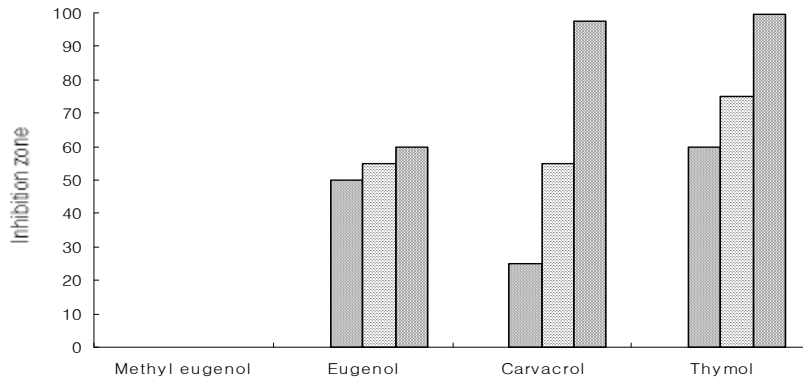


Fig. 37. Inhibition rate against *Serratia liquefaciens* on NA media mixed with essential oils (methyl eugenol, eugenol, carvacrol : control, 100, 200, 500 ppm.; thymol : control, 10, 20, 50 ppm, respectively).

(다) 휘발성 검정

본 실험에 사용한 carvacrol, thymol, methyl eugenol은 모두 휘발성이 있는 것으로 밝혀진 바 있다. 또한 본 연구에서 이들 정유성분의 휘발에 의한 균사 생육 저해율 측정에서도 휘발에 의한 방제효과를 확인할 수 있었다. 거리가 가까울 때는 균이 거의 생육을 하지 못했고 거리가 멀어짐에 따라서 methyl eugenol과 carvacrol에 의한 생육 저해율이 비교적 큰 폭으로 떨어졌지만, thymol만은 거리가 떨어져도 60 % 이상의 생육 억제율을 보였다(Fig. 38, 39).

세균에서는 휘발에 의한 효과는 전혀 나타나지 않았다. 이러한 결과가 나온 이유는 세균의 접액질 성분에 의해 식물정유성분의 효과가 떨어졌기 때문으로 판단된다.

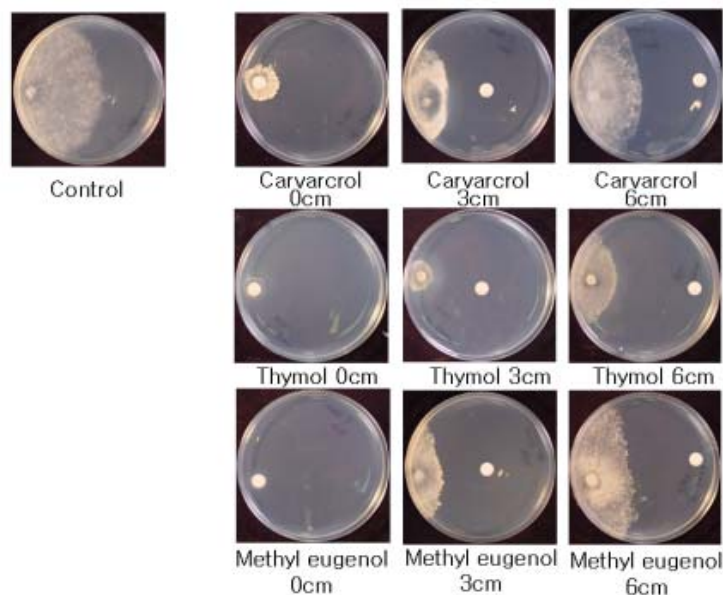


Fig. 38. Volatile effects of three essential oils at a concentration of 500 μ l/disc against *Botrytis cinerea* at different distances.

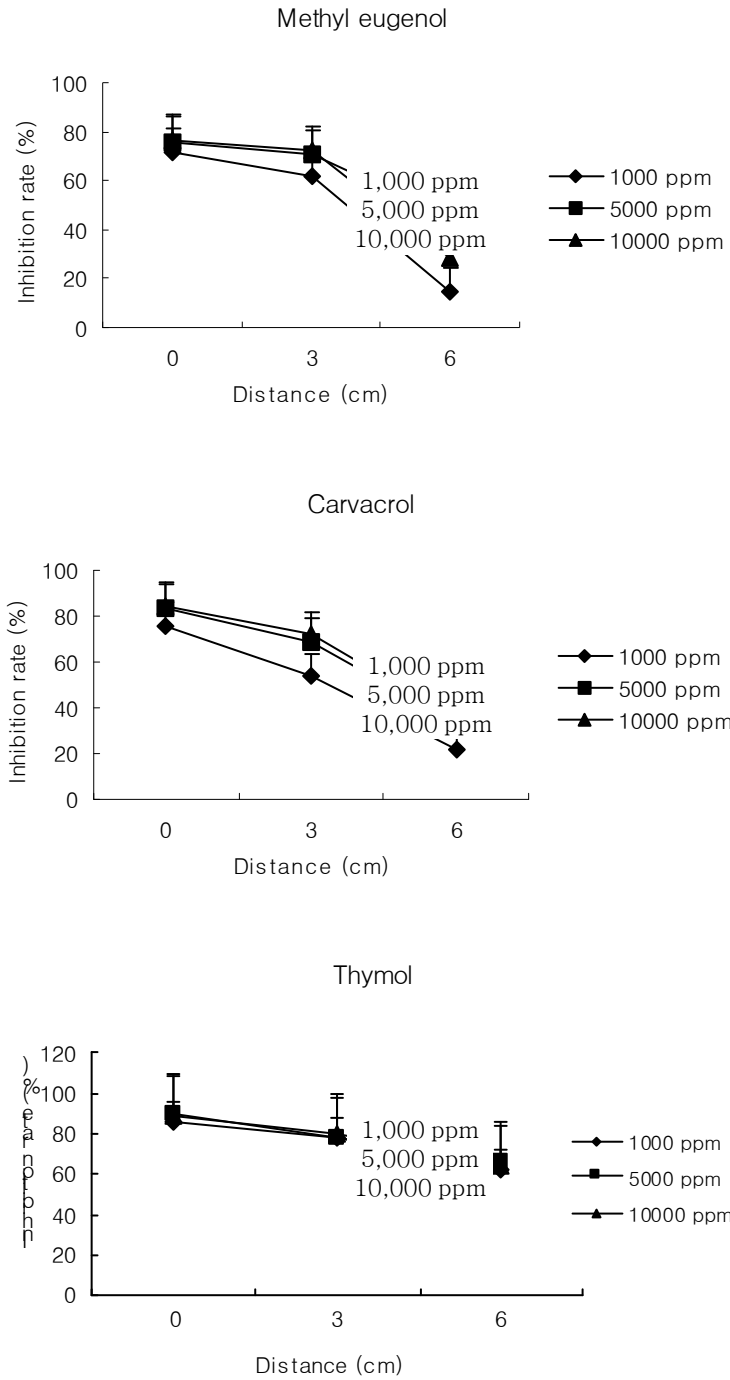


Fig. 39. Inhibition rate of volatilization treated by three essential oils against *Botrytis cinerea*.

(라) Essential oil의 활성 검정

1) 딸기 잿빛곰팡이병 방제 효과

딸기 잿빛곰팡이병 방제 효과를 시험하기 위해 eugenol, thymol, methyl eugenol을 각각 100, 1,000 ppm을 처리하여 essential oil의 효과를 확인하였다(Table 13, Fig. 40). 배지상에서 *B. cinerea*에 가장 효과가 좋았던 methyl eugenol은 1,000 ppm 처리 시 88.5 %의 방제율을 보였고, 100 ppm 처리 시 69.6 %로 eugenol과 thymol의 방제가 보다 더욱 효과가 좋은 것을 확인하였다. 또한 전반적으로 essential oils을 100 ppm 처리한 것 보다 1,000 ppm을 처리하였을 때 더욱 방제 효과를 보였다.

효과가 좋은 methyl eugenol에 대하여 온실하우스에서의 처리와 길항미생물과의 혼용처리를 통해 보다 좋은 활성검정이 필요할 것으로 보인다.

Table 13. Control effects of essential oils for stored strawberry fruits

Treatment	Diseased rate (%)		Control value (%)	
	100 ppm	1,000 ppm	100 ppm	1,000 ppm
Eugenol	33.3	13.3	65.6	86.2
Thymol	37.5	20.0	61.2	79.3
Methyl eugenol	29.4	11.1	69.6	88.5
Control	96.7		-	-

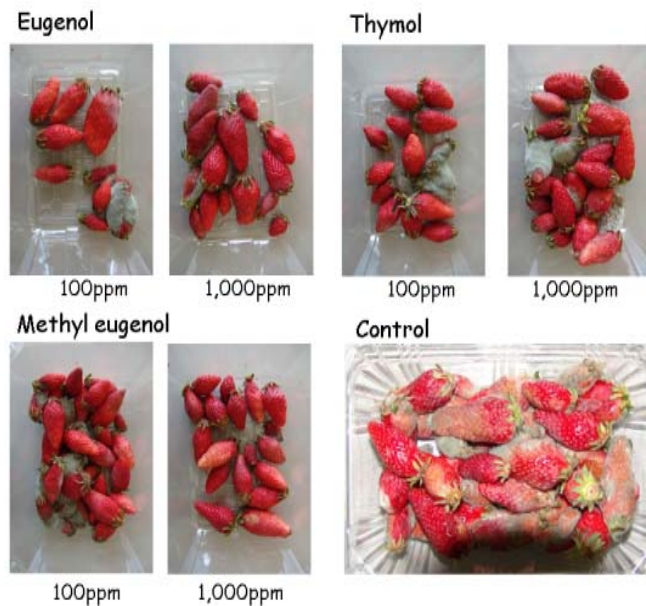


Fig. 40. Control effects of essential oils in storage condition.

(5) 포장시험 적용

(가) SR2, GS1균주의 딸기 잿빛곰팡이병 방제 효과

배지상에서 *B. cinerea*에 효과가 좋았던 SR2와 GS1 균주에 대한 딸기 잿빛 곰팡이병에 대한 방제효과를 시험하기 위해 각 처리구 당 1×10^5 spores/L의 농도를 처리하였다(Table 14, Fig. 41).

SR2의 경우 1×10^5 spores/L의 농도를 처리하였을 때 72.4%의 방제가를 보였고, GS1은 방제가 69.0%로 SR2 균주보다 방제 효과가 낮은 것을 보였다.

또한 SR2와 GS1 균주에 대하여 전착제(2,000배 희석액)을 첨가하였을 때, 각각의 균주를 처리하였을 때보다 높은 방제가를 나타내었다. SR2 균주는 단독으로 처리시 72.4%로 보다 전착제 혼용 처리시 73.2%로 0.8% 높게 방제가가 높았으며, GS1 균주는 단독으로 처리시 69.0%에서 전착제 혼용 처리시 76.2%로 방제가가 7.2% 높은 효과를 보였다. 이는 SR2 균주는 전착제에 대하여 낮은 효율을 보였으나, GS1 균주는 전착제 처리시 딸기 잿빛 곰팡이병에 대하여 높은 방제가를 확인할 수 있었다. 그리고 미생물 농약의 등록 기준인 방제가 50% 이상의 높은 방제가를 확인이 되었으며, 앞으로 딸기 잿빛곰팡이병에 대한 우수한 약제로 생물농약 품목등록이 가능할 것으로 판단된다.

Table 14. Control effects of SR2, GS1 isolate in strawberry field condition

Treatment	Rate of diseased fruits (%)				Control value (%)
	1 repeat	2 repeat	3 repeat	Average	
SR2 (<i>Bacillus subtilis</i>)	7.1	4.5	8.3	6.6	72.4
GS1 (<i>Penibacillus brasiliensis</i>)	6.1	10.4	5.7	7.4	69.0
SR2 + Wetting agent	5.3	7.3	6.8	6.4	73.2
GS1 + Wetting agent	6.4	4.9	5.7	5.7	76.2
Negative Control	18.2	26.3	27.2	23.9	-



Fig. 41. Control effects of SR2, GS1 isolate and essential oils in strawberry field condition.

(나) Essential oil의 딸기 잿빛곰팡이병 방제 효과

Essential oil 중 딸기 잿빛곰팡이병에 대하여 활성이 좋았던 Thymol과 Methyl eugenol에 대한 딸기 잿빛 곰팡이병에 대한 약제 방제 효과 시험을 실시하였다(Table 15, Fig. 41).

Thymol 200ppm을 처리하였을 때, 82.0%의 높은 방제가를 보였다. 또한 배지상에서 *B. cinerea*에 가장 효과가 좋았던 Methyl eugenol을 200ppm 처리시 방제가가 88.7%로 대조약제로 사용된 Fludioxonil FL 2,000배 희석액의 방제가 89.1%와 유사한 효과를 확인 할 수 있었다. 그리고 Thymol 100ppm과 Methyl eugenol 100ppm의 혼합 처리시에도 86.6%의 높은 방제가를 보였다.

Table 15. Control effects of essential oil in strawberry field condition

Treatment	Rate of diseased fruits (%)				Rate of control (%)
	1 repeat	2 repeat	3 repeat	Average	
Thymol 200ppm	4.1	5.0	3.9	4.3	82.0
Methyl eugenol 200ppm	2.3	3.9	1.8	2.7	88.7
Thymol 100ppm + Methyl eugenol 100ppm	4.2	1.8	3.6	3.2	86.6
Fludioxonil FL	3.2	3.5	1.1	2.6	89.1
Negative Control	18.2	26.3	27.2	23.9	-

제 2 절

[제1협동] 선충억제 퇴비 개발

1. 식물추출물의 선충 억제효과 검토

가. 연구 방법

(1) 조추출물 분리 및 확보

건조된 식물체를 0.6 mm이하로 분쇄하여 건조시료를 제조하고, 건조시료 100 g을 5-L 삼각 플라스크에 넣고 MeOH 2 L를 부어 실온에서 24시간 두었다가 Methanol 분획을 2장의 여과지(Whatman #1)를 이용하여 감압 여과하였다. 감압 여과된 Methanol 분획은 회전진공농축기(Buchi R-215)로 감압 농축하여 조추출물을 확보하였다. 한국식물추출물은행으로부터 입수된 조추출물도 위와 유사한 과정을 거쳐 제조되었으며 총 2,714점의 조추출물을 확보하였다(Table 1).

(2) 부식선충 배양 및 분리

부식성선충(*Rhabditis* sp.) 배양은 Kim 등(1997)의 방법을 이용하였다. 250 ml 용량의 삼각 플라스크에 Nutrient broth 75 ml를 넣고 *Escherichia coli*를 2 일 배양한 후, 20 마리/ml의 부식성 선충을 접종하여, 28 °C, 150 rpm에서 6 일간 배양하여 시험에 사용하였다. 필요시 Nutrient agar 배지에 *Escherichia coli*와 부식성선충을 접종하여 선충을 배양하고, 배양된 선충은 Baermann 깔데기법으로 선충을 순수 분리하였다(Southey, 1986). 분리된 부식성선충은 냉장고에 보관하면서 시험에 사용하였다.

(3) 뿌리혹선충 유충 분리

고구마뿌리혹선충(*Meloidogyne incognita*)이 심하게 감염된 참외 뿌리를 채집하고, 뿌리에 생긴 혹과 난랑으로부터 뿌리혹선충 유충을 분리하여 시험에 사용하였다. 뿌리혹선충 유충의 분리는 Taylor와 Sasser(1978)의 방법을 이용하였는데, 뿌리혹선충에 심하게 감염된 뿌리 100 g을 1% NaOCl 500 ml와 같이 넣고 믹서기를 이용하여 40초간 분쇄하였다. 분쇄된 시료는 200 mesh 체에 부어 거친 찌꺼기를 걸어내고, 500 mesh 체에 모았다. 500 mesh 체에 모인 시료는 다시 Baermann 깔데기법으로 선충을 순수 분리하였다. 분리된 뿌리혹선충 유충은 냉장고에 보관하면서 시험에 사용하였다.

(4) 96-well microplate를 이용한 식물 조추출물 선발

먼저 조추출물 0.1 g을 Ethanol 1 ml에 녹이고 이를 다시 증류수로 20배 희석하여(200배 희

석) 시험에 사용하였다. 무처리는 조추출물이 들어있지 않은 Ethanol을 동일 배율로 희석하였다. 선충억제 활성 검정은 96-well microplate를 사용하였는데, 96-well microplate 홀에 조추출물 희석액 60 μ l와 부식성선충 20마리를 접종하였다(조추출물 시험 농도 5,000 μ g/ml). 선충이 접종된 96-well microplate는 건조를 방지하기 위하여 microplate 뚜껑을 덮고 비닐로 밀봉하여 25°C 항온기에 두었다. 접종된 96-well microplate는 해부현미경을 이용하여 1일 간격으로 1주일 간 선충의 운동성을 관찰하였다.

현미경 관찰 결과 조추출물이 부식성선충의 운동성에 전혀 영향을 주지 않는 시료는 -, 선충의 움직임이 약 50% 정도 억제된 시료는 Δ , 선충의 움직임이 90% 이상 억제된 시료는 \bigcirc , 부식성선충의 밀도가 증가된(성장, 산란, 유충 부화) 시료는 +로 표시하였다(-, + 시료 미제시)(Table 2 & 3).

(5) 선발된 조추출물을 이용한 재확인 시험

96-well microplate를 이용한 조추출물 선발 시험이 적절한지를 검토하기 위하여 1차 검정에서 선충의 움직임이 50% 이상 억제된(Δ 혹은 \bigcirc) 시료 중에서 임의로 25개의 추출물을 선택하여 2, 3, 4차 반복 시험을 수행하였다. 재확인 시험은 1차와 동일한 방법으로 4차까지 실시되었는데, 2차, 3차는 부식성선충을 이용하였고, 4차 시험은 식물기생성선충인 뿌리혹선충 유충을 이용하였다.

나. 연구 결과

178과, 1,677종의 식물을 부위별로 나누어 제조된 총 2,714점의 조추출물이 선충에 미치는 영향을 시험한 결과, 부식성선충을 이용한 1차 시험에서 2,362종(87.0%)의 조추출물은 부식성선충에 전혀 영향을 미치지 않았고, 187종(6.9%)의 조추출물은 부식성선충의 활성을 약간 억제하였고, 95종(3.5%)의 조추출물은 현저한 억제를 보였으며, 70종(2.6%)의 조추출물에서는 오히려 부식성선충이 번식되는 것이 관찰되었다(Table 2).

국내 연구에서 Choi 등(2006)은 40종의 식물을 이용하여 소나무재선충을 대상으로 96-well microplate bioassay를 실시하고 석창포(*Acorus gramineus*), 족도리풀(*Asiasarum sieboldi*), 팔각향(*Illicium verum*), 산내자(*Kaempferia galanga*)에서 살선충 작용을 보고하였다. 이번 연구에서도 석창포 지하부, 족도리풀 지하부 조추출물은 강한 선충억제 활성을 보여 Choi 등(2006)의 연구와 동일한 결과를 보였다.

Kim 등(1998)은 만수국(*Tagetes patula*), 잔디(*Zoysia japonica*), 산검양옻나무(*Rhus sylvestris*), 붉나무(*R. chinensis*), 양파(*Allium cepa*) 추출액을 토양에 처리하면 뿌리혹선충(*M. hapla*)의 난량 발생이 억제된다고 하였다. 이번 연구에서는 붉나무(*R. chinensis*) 뿌리, 열매에서 선충억제 활성이 있었다.

반면, Lim 등은(2004) 43종 식물의 Methanol 조추출물을 이용하여 뿌리혹선충(*Meloidogyne incognita*)에 대한 억제 작용을 시험하고, 쇠비름(*Portulaca oleracea*), 쇠별꽃(*Stellaria aquatica*)의 조추출물에서 선충 억제활성이 있다고 하였으나, 이번 연구에서는 모두 억제효과가 나타나지 않았다.

메리골드속(*Tagetes*) 식물은 선충에 면역성으로 알려져 있으며 혼작, 윤작, 식물 잔재물 토양

혼입 등의 방법으로 선충 방제에 이용되고 있다. 이번 시험에서는 천수국(*Tagetes erecta*), 만수국아재비(*T. minuta*), 만수국(*T. patula*) 조추출물이 시험되었는데, 천수국(*T. erecta*)에서만 강한 선충억제 활성이 인정되었다.

소리쟁이속(*Rumex*)에는 약 200종이 있는데 주요 성분은 oxalic acid, tannin으로 수렴작용이 있는 신맛이 나는 식물이다. 이번 시험에서 수영(*Rumex acetosa*), 애기수영(*R. acetosella*), 목발소리쟁이(*R. conglomeratus*), 소리쟁이(*R. crispus*), 참소리쟁이(*R. japonica*), 개대황(*R. longifolius*), 들소리쟁이(*R. obtusifolius*) 등 7종이 시험되었는데, 이들 중 애기수영(*R. acetosella*) 지상부, 목발소리쟁이(*R. conglomeratus*) 뿌리, 소리쟁이(*R. crispus*) 뿌리는 선충 억제 효과가 있었다.

본초강목, 동의보감, 민간에서 사용되는 구충제 중에서 이번 연구에서 선충 억제 작용을 보인 것은 학명 순으로 구릿대(*Angelica dahurica*) 지하부, 당귀(*Angelica sinensis*) 지하부, 족도리풀(*Asarum sieboldii*) 지하부, 담배풀(학슬, *Carpesium abrotanoides*) 꽃, 개오동(노나무, 재백피, *Catalpa ovata*), 개비자(*Cephalotaxus koreana*) 줄기, 산수유(山茱萸, *Cornus officinalis*) 열매, 잎, 줄기, 야광나무(*Crataegus maximowiczii*) 줄기, 팔꽃나무(패화, *Daphne genkwa*), 감(柿, *Diospyros kaki*) 나무 껍질, 담배풀(*Carpesium abrotanoides*) 꽃, 목향(土木香, 황화채, *Inula helenium*) 지하부, 사과(*Malus pumila*) 잎, 줄기, 뽕나무(桑白皮, *Morus alba*) 줄기, 뿌리, 소테나무(고목, 苦木, *Picrasma quassioides*) 줄기, 피마자(*Ricinus communis*) 지하부, 소나무(백송, 반송, 잣나무, *Pinus* spp.) 잎, 석류(금앵근, *Punica granatum*), 마가목(마아목, 馬牙木, *Sorbus commixta*) 줄기, 느릅나무(무이, 蕪荑, *Ulmus davidiana* var. *japonica*) 줄기, 참여로(*Veratrum nigrum*) 지상부, 가막살나무(협미, *Viburnum diatatum*) 잎과 꽃 등이었다. 이들 중 구릿대, 당귀, 족도리풀, 야광나무, 피마자, 마가목, 느릅나무, 참여로, 가막살나무는 Ferris와 Zheng(1999)의 시험에서도 선충억제 효과를 보인 식물이다.

반면, 본초강목, 동의보감, 민간에서 사용되는 구충제 중에서 이번 연구에서 선충 억제 작용이 없었던 것은 학명 순으로 짚신나물(용아초, 龍牙草, *Agrimonia pilosa*), 가죽나무(저근피, *Ailanthus altissima*), 자귀나무(합환피, *Albizia julibrissin*), 파(*Allium fistulosum*), 마늘(대산, *Allium sativum*), 산부추(산비, 山菲, *Allium thumbergii*), 황해쑥(*Artemisia argyi*), 약쑥(*Artemisia princeps*), 천문동(*Asparagus cochinchinensis*), 동백(*Camellia japonica*), 삼잎(*Cannabis sativa*), 명아주(*Chenopodium album*), 귤껍질(진피, *Citrus unshiu*), 녹나무(장뇌향, *Cinnamomum camphora*), 호박(남과, 南瓜, *Cucurbita moschata*), 당근(*Daucus carota*), 술패랭이꽃(*Dianthus superbus*), 관중(貫衆. 면마, 綿馬, 범고비, 호랑고비, *Dryopteris crassirhizoma*), 용담(*Gentiana scabra*), 은행(행인, *Ginkgo biloba*), 약모밀(*Houttuynia cordata*), 산박하(갯잎나물, *Isodon inflexus*), 호두나무(추백피, *Juglans sinensis*), 수염가래꽃(*Lobelia chinensis*), 구기자(*Lycium chinense*), 후박(*Machilus thunbergii*), 털구슬나무 껍질(고련피, 苦皮, *Melia azedarach*), 담배(*Nicotiana tabacum*), 벳짚(*Oryza sativa*), 고비(구척, 狗脊, *Osmunda japonica*), 덩이괘이밥(*Oxalis articulata*), 황벽나무(*Phellodendron amurense*), 대나무 잎(*Phyllostachys bambusoides*), 미국자리공(*Phytolacca americana*), 질경이(*Plantago asiatica*), 쇠비름(*Portulaca oleracea*), 복사나무(*Prunus persica*) 개구리자리(*Ranunculus sceleratus*), 율나무(*Rhus verniciflua*), 소리쟁이(*Rumex crispus*), 참소리쟁이(*R. japonica*), 들소리쟁이(*R. obtusifolius*), 무릇(*Scilla scilloides*), 고삼(너삼, 苦蔘, *Sophora flavescens*), 밀(*Triticum aestivum*), 산앵도(도이, 都李, *Vaccinium koreanum*), 순비기나무(만현, *Vitex rotundifolia*), 산초나무 열매(조피나무, 분디나무, 천초, 川椒, *Zanthoxylum schinifolium*), 생강(새양, 生薑, *Zingiber officinale*) 등이다. 이들 중 개구리자리, 구기자, 담배, 덩이괘이밥, 들소리쟁이, 밀, 복사나무, 소리쟁이, 수염가래꽃,

쇠비름, 슬패랭이꽃, 약모밀, 자귀나무, 질경이, 짚신나물, 용담, 천문동, 파, 황해쭈 등은 Ferris와 Zheng(1999)의 시험에서는 선충억제 작용이 있다고 하였으나, 이번 시험에서는 억제 작용이 나타나지 않았다. 시험재료 준비에서 Ferris와 Zheng(1999)는 물 추출물을 이용하였고, 이번 시험은 Methanol 추출물을 이용한 차이가 있다. 전통의 구충제 중에서 Table 1에 기재되지 않은 백부근, 황련, 비자, 빈랑, 사군자 등은 시험되지 않았다.

국내 선충 방제용 친환경제품 중에 주원료가 고삼인 제품이 있다. 그러나 이번 시험에서 고삼 조추출물은 선충 억제 효과가 없었으며, 고삼과 같은 속의 회화나무(*Sophora japonica*)도 선충 억제 효과가 없었다. 고삼의 주요 성분은 matrine, oxymatrine로 알려져 있는데, matrine, oxymatrine 성분을 이용한 시험에서도 선충 억제 작용은 없었다(Kim, D.G. 미발표결과). 회화나무속(*Sophora*)에는 45종이 있는데, 국내 종은 *Sophora flavescens*(고삼)로 생각되고 중국에는 *Sophora tonkinensis*, *Sophora subprostrata*, *Sophora angustifolia*(Narrowleaf Sophora), *Sophora alopecuroides* 종이 있다. 중국 *Sophora*속에 대한 추가적인 검토가 필요하다.

사람이나 동물에 사용되는 구충제의 작용기작은 1) 근육마비 작용을 일으키는 imidazothiazole levamisole, tetrahydropyrimidines pyrantel, morantel, pyrimidine methyridine, 2) 특히 산소가 부족한 상태에서 선충의 근육마비를 일으키는 piperazine 3) 체강 근육마비 작용을 하는 avermectins, milbemycins, 4) 선충 미세소관 생성 억제작용을 하는 thiabendazole, mebendazole, 5) 선충의 arachidonic acid 대사작용을 방해하는 diethylcarbamazine 등으로 나누는데, 일반적으로 사람이나 동물에 사용되는 구충제를 토양의 식물기생선충 방제에 사용하는 것은 약제의 토양내 분산 및 침투성 문제, 가격 등의 이유로 직접적인 이용은 어렵다고 알려져 있다. 그러나 구충제 식물의 녹비 재배나 식물 잔재물 토양 혼입 등을 통한 선충 방제 효과는 검토가 필요하다. 토양 처리가 아닌 주로 소나무에 처리되는 소나무재선충 방제에는 avermectins이 이용되고 있다.

1차 검정에서 선충억제 활성을 보인 25개의 추출물을 선택하여 2, 3, 4차 반복 시험을 수행한 결과, 계수나무 잎, 히어리 잎 등 12종 시료는 반복 시험에서도 지속적인 선충억제 활성을 보였고, 복자기 등 13종 시료는 반복에 따라 선충억제 활성이 일정하지 않아 재선발 효율은 약 50% 정도였다(Table 3). 이상의 결과로 미루어, 부식성선충과 96-well microplate를 이용한 식물 조추출물의 선충억제 활성 선발시험은 충분히 검토할 가치가 있으며 앞으로 식물 조추출물 선발시험에 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

식물 조추출물의 선충억제 활성은 식물의 생육시기, 추출 용매, 추출물 사용 농도 등에 따라 차이가 있을 수 있다. 이번 시험에서 선충억제 활성이 있는 것으로 선발된 282개의 식물 조추출물들은 앞으로 식물 기원의 살선충 물질 연구에 참고 자료로 활용될 수 있을 것이다.

Table 1. Plant Family and number of species tested in this study

Plant Family	No. of plant species	
	Tested	nemastatic activity ^a
Acanthaceae	1	0
Aceraceae	16	9
Actinidiaceae	4	1
Agavaceae	1	0
Aizoaceae	3	0
Alangiaceae	1	0
Alismataceae	4	0
Amaranthaceae	9	0
Amaryllidaceae	10	0
Anacardiaceae	5	2
Apiaceae	4	1
Apocynaceae	2	0
Aquifoliaceae	8	1
Aracea	17	2
Araliaceae	15	2
Aristolochiaceae	4	1
Asclepiadaceae	3	0
Asparagaceae	1	0
Aspidaceae	25	6
Aspleniaceae	2	0
Asteraceae	9	2
Balsaminaceae	3	0
Begoniaceae	1	0
Berberidaceae	6	1
Betulaceae	15	7
Bignoniaceae	3	2
Boraginaceae	7	0
Brassicaceae	1	0
Buxaceae	2	1

Plant Family	No. of plant species	
	Tested	nemastatic activity ^a
Campanulaceae	11	0
Cannabinaceae	2	0
Cannaceae	1	0
Capparidaceae	1	0
Caprifoliaceae	28	3
Caryophyllaceae	25	0
Celastraceae	13	2
Ceratophyllaceae	1	1
Cercidiphyllaceae	1	0
Chenopodiaceae	14	0
Chloranthaceae	3	0
Commelinaceae	5	0
Compositae	155	6
Convolvulaceae	8	0
Cornaceae	7	5
Crassulaceae	14	5
Cruciferae	30	1
Cucurbitaceae	11	0
Cupressaceae	9	3
Cycadaceae	1	0
Cyperaceae	32	5
Davalliaceae	1	0
Dennstaedtiaceae	1	0
Dioscoreaceae	8	0
Dipsacaceae	1	0
Ebenaceae	2	1
Elaeagnaceae	4	0
Elaeocarpaceae	1	0
Empetraceae	1	1
Equisetaceae	3	0
Ericaceae	10	4
Eriocaulaceae	2	0
Eucommiaceae	1	0

Plant Family	No. of plant species	
	Tested	nemastatic activity ^a
Euphorbiaceae	24	9
Fabaceae	5	1
Fagaceae	14	1
Flacourtiaceae	2	0
Fumariaceae	8	0
Gentianaceae	5	0
Geraniaceae	8	4
Ginkgoaceae	1	1
Gleicheniaceae	2	0
Gramineae	74	1
Guttiferae	5	4
Haloragaceae	3	1
Hamamelidaceae	4	2
Hippocastanaceae	1	1
Hyacinthaceae	1	0
Hydrocaryaceae	2	1
Hydrocharitaceae	2	0
Illiciaceae	1	0
Iridaceae	13	2
Juglandaceae	3	1
Juncaceae	7	0
Labiatae	39	1
Lamiaceae	11	0
Lardizabalaceae	2	0
Lauraceae	13	3
Leguminosae	66	3
Lemnaceae	2	0
Lentibulariaceae	1	0
Liliaceae	69	2
Linaceae	1	0
Lobeliaceae	2	0
Loganiaceae	1	0
Loranthaceae	4	0

Plant Family	No. of plant species	
	Tested	nemastatic activity ^a
Lycopodiaceae	4	0
Lythraceae	5	1
Magnoliaceae	12	3
Malvaceae	11	1
Marsileaceae	1	0
Meliaceae	2	1
Menispermaceae	4	0
Moraceae	13	5
Myricaceae	1	0
Myrsinaceae	3	1
Myrtaceae	1	1
Nyctaginaceae	1	0
Nymphaeaceae	5	2
Oleaceae	19	2
Onagraceae	9	4
Ophioglossaceae	1	0
Opuntiaceae	1	0
Orchidaceae	14	0
Orobanchaceae	2	0
Osmundaceae	1	0
Oxalidaceae	3	0
Paeoniaceae	2	1
Papaveraceae	6	2
Passifloraceae	1	0
Pedalidaceae	1	0
Phytolaccaceae	3	0
Pinaceae	15	7
Piperaceae	1	0
Pittosporaceae	1	0
Plantaginaceae	5	0
Platanaceae	1	0
Plumbaginaceae	1	0
Poaceae	3	0

Plant Family	No. of plant species	
	Tested	nemastatic activity ^a
Podocarpaceae	1	0
Polemoniaceae	2	0
Polygonaceae	41	14
Polypodiaceae	8	0
Pontederiaceae	3	0
Portulacaceae	2	0
Potamogetonaceae	6	1
Primulaceae	11	2
Pteridaceae	9	1
Punicaceae	1	1
Pyrolaceae	1	0
Ranunculaceae	48	0
Rhamnaceae	8	2
Rosaceae	104	33
Rubiaceae	19	1
Rutaceae	17	6
Sabiaceae	2	1
Salicaceae	16	3
Salviniaceae	1	0
Santalaceae	1	0
Sapindaceae	4	2
Saururaceae	1	0
Saxifragaceae	30	7
Scheuchzeriaceae	1	0
Schizaeaceae	1	0
Scrophulariaceae	24	1
Selaginellaceae	3	0
Simaroubaceae	2	1
Solanaceae	19	2
Sparganiaceae	1	0
Staphyleaceae	2	0
Sterculiaceae	3	0
Styracaceae	2	0

Plant Family	No. of plant species	
	Tested	nemastatic activity ^a
Symplocaceae	4	0
Tamaricaceae	1	1
Taxaceae	4	1
Taxodiaceae	4	2
Theaceae	8	0
Thymelaeaceae	5	2
Tiliaceae	8	1
Typhaceae	2	0
Ulmaceae	10	2
Umbelliferae	39	5
Urticaceae	15	1
Valerianaceae	5	0
Verbenaceae	9	0
Violaceae	18	0
Vitaceae	8	3
Zingiberaceae	4	1
Zosteraceae	1	0
Total	1,677	241

^a Nemastatic activity : nematode movement decreased over 50% compared to control.

Table 2. List of plant species showing nemastatic activity^a

Plant name	Plant Family	Plant parts used	Nemastatic activity ^b
<i>Acer buergerianum</i>	Aceraceae	leaf	○
<i>Acer ginnala</i>	Aceraceae	bark	○
<i>Acer mandshuricum</i>	Aceraceae	bark	△
<i>Acer micro-sieboldianum</i>	Aceraceae	leaf	△
<i>Acer pictum</i>	Aceraceae	leaf, branch	○,○
<i>Acer pseudo-sieboldianum</i>	Aceraceae	leaf, branch	△
<i>Acer takesimensense</i>	Aceraceae	leaf	△
<i>Acer triflorum</i>	Aceraceae	leaf, branch	○
<i>Acer tschonoskii</i>	Aceraceae	branch	○
<i>Aconogonum polymorphum</i>	Polygonaceae	top part	△
<i>Acorus gramineus</i>	Araceae	ground part	○
<i>Actinidia arguta</i>	Actinidiaceae	branch	△
<i>Adiantum pedatum</i>	Pteridaceae	ground part	△
<i>Adina rubella</i>	Rubiaceae	bark	△
<i>Aesculus hippocastanum</i>	Sapindaceae	leaf	○
<i>Aesculus trubinata</i>	Hippocastanaceae	bark	△
<i>Allium sacculiferum</i>	Liliaceae	whole plant	△
<i>Alnus firma</i>	Betulaceae	flower, leaf	△
<i>Alnus japonica</i>	Betulaceae	heartwood	△
<i>Alnus pendula</i>	Betulaceae	leaf	△
<i>Amelanchier asiatica</i>	Rosaceae	leaf	△
<i>Amphicarpaea edgeworthii</i>	Leguminosae	whole plant	△
<i>Angelica dahurica</i>	Umbelliferae	ground part	○
<i>Angelica sinensis</i>	Umbelliferae	ground part	△
<i>Angelica tenuissima</i>	Umbelliferae	ground part	○
<i>Ardisia pusilla</i>	Myrsinaceae	whole plant	○
<i>Artemisia japonica</i>	Compositae	whole plant	△
<i>Aruncus dioicus</i>	Rosaceae	ground part	○
<i>Asarum sieboldii</i>	Aristolochiaceae	ground part	○
<i>Astilbe chinensis</i>	Saxifragaceae	ground part	△
<i>Astilbe koreana</i>	Saxifragaceae	whole plant	○
<i>Atractylodes ovata</i>	Asteraceae	ground part	○
<i>Aucuba japonica</i>	Cornaceae	leaf	△
<i>Berberis amurensis</i>	Berberidaceae	leaf	△
<i>Bupleurum falcatum</i>	Umbelliferae	whole plant	△

Plant name	Plant Family	Plant parts used	Nemastatic activity ^b
<i>Callistemon lanceola</i>	Myrtaceae	branch	○
<i>Campsis grandiflora</i>	Bignoniaceae	leaf, branch	△
<i>Campylotropis macrocarpa</i>	Leguminosae	ground part	△
<i>Carex parciflora</i>	Cyperaceae	whole plant	△
<i>Carex pumila</i>	Cyperaceae	whole plant	△
<i>Carpesium abrotanoides</i>	Compositae	flower	△
<i>Carpinus cordata</i>	Betulaceae	leaf, branch	○
<i>Carpinus coreana</i>	Betulaceae	leaf	△
<i>Carpinus laxiflora</i>	Betulaceae	flower	○
<i>Carpinus tschonoskii</i>	Betulaceae	leaf, flower	△
<i>Castanopsis cuspidata</i>	Fagaceae	bark	○
<i>Catalpa ovata</i>	Bignoniaceae	whole plant	○
<i>Cedrela sinensis</i>	Meliaceae	fruit	△
<i>Celastrus orbiculatus</i>	Celastraceae	leaf	△
<i>Celtis choseniana</i>	Ulmaceae	bark	○
<i>Cephalotaxus koreana</i>	Taxaceae	branch	△
<i>Cercidiphyllum japonicum</i>	Ceratophyllaceae	leaf, branch	○, △
<i>Chaenomeles sinensis</i>	Rosaceae	leaf, branch	△, ○
<i>Chamaecyparis pisifera</i>	Cupressaceae	leaf, branch	○
<i>Cornus controversa</i>	Cornaceae	leaf, branch	△
<i>Cornus kousa</i>	Cornaceae	leaf	△
<i>Cornus macrophylla</i>	Cornaceae	leaf	△
<i>Cornus officinalis</i>	Cornaceae	leaf, branch, fruit	○, ○, ○
<i>Corylopsis coreana</i>	Hamamelidaceae	seed	△
<i>Corylopsis gotoana</i>	Hamamelidaceae	branch, leaf	△, ○
<i>Crataegus maximowiczii</i>	Rosaceae	branch	△
<i>Crepidiastrum lanceolatum</i>	Compositae	ground part	○
<i>Curcuma longa</i>	Zingiberaceae	ground part	△
<i>Cyrtomium falcatum</i>	Aspidaceae	whole plant	△
<i>Daphne genkwa</i>	Thymelaeaceae	top part	○
<i>Daphne odora</i>	Thymelaeaceae	leaf, branch	○
<i>Deutzia crenata</i>	Saxifragaceae	leaf, flower	△
<i>Dictamnus dasycarpus</i>	Rutaceae	ground part	○
<i>Diospyros lotus</i>	Ebenaceae	bark	△
<i>Dryopteris bissetiana</i>	Aspidaceae	whole plant	○
<i>Dryopteris pacifica</i>	Aspidaceae	whole plant	△
<i>Eleutherococcus senticosus</i>	Araliaceae	branch	○

Plant name	Plant Family	Plant parts used	Nemastatic activity ^b
<i>Eleutherococcus sessiliflorus</i>	Araliaceae	branch	△
<i>Empetrum nigrum</i>	Empetraceae	branch	△
<i>Euonymus alatus</i>	Celastraceae	leaf	△
<i>Euphorbia ebracteolata</i>	Euphorbiaceae	ground part	△
<i>Euphorbia humifusa</i>	Euphorbiaceae	whole plant	△
<i>Euphorbia lathyris</i>	Euphorbiaceae	ground part	○
<i>Euphorbia supina</i>	Euphorbiaceae	whole plant	△
<i>Exochorda serratifolia</i>	Rosaceae	branch	△
<i>Fallopia ciliinervis</i>	Polygonaceae	top part, ground part	△, ○
<i>Ficus carica</i>	Moraceae	top part	○
<i>Ficus elastica</i>	Moraceae	leaf, branch, root	△
<i>Ficus erecta</i>	Moraceae	heartwood	△
<i>Filipendula palmata</i>	Rosaceae	ground part	△
<i>Fortunella japonica</i>	Rutaceae	leaf, branch, root	○
<i>Geranium eriostemon</i>	Geraniaceae	whole plant	△
<i>Geranium nepalense</i>	Geraniaceae	whole plant	○
<i>Geranium sibiricum</i>	Geraniaceae	top part	○
<i>Geum japonicum</i>	Rosaceae	top part, ground part	△, △
<i>Ginkgo biloba</i>	Ginkgoaceae	leaf, branch	△
<i>Glehnia littoralis</i>	Umbelliferae	whole plant	△
<i>Heracleum moellendorffii</i>	Apiaceae	ground part	△
<i>Hibiscus hamabo</i>	Malvaceae	flower, heartwood	△, △
<i>Hypericum ascyron</i>	Guttiferae	top part	△
<i>Hypericum oliganthum</i>	Guttiferae	top part	△
<i>Hypericum patulum</i>	Guttiferae	top part, ground part	○, ○
<i>Ilex crenata</i>	Aquifoliaceae	leaf	△
<i>Indigofera pseudotinctoria</i>	Leguminosae	whole plant	△
<i>Inula helenium</i>	Compositae	ground part	△
<i>Iris netschinskia</i>	Iridaceae	seed	△
<i>Jasminum nudiflorum</i>	Oleaceae	leaf, branch	△
<i>Juglans mandshurica</i>	Juglandaceae	branch, leaf	△, ○
<i>Juniperus virginiana</i>	Cupressaceae	leaf, branch	△
<i>Kirengeshoma koreana</i>	Saxifragaceae	root	○
<i>Koelreuteria paniculata</i>	Sapindaceae	leaf	○
<i>Lagerstroemia indica</i>	Lythraceae	leaf	○
<i>Largerstroemia indica</i>	Lythraceae	bark, heartwood	△, △
<i>Leibnitzia anandria</i>	Asteraceae	ground part	△

Plant name	Plant Family	Plant parts used	Nemastatic activity ^b
<i>Callistemon lanceola</i>	Myrtaceae	branch	○
<i>Campsis grandiflora</i>	Bignoniaceae	leaf, branch	△
<i>Campylotropis macrocarpa</i>	Leguminosae	ground part	△
<i>Carex parciflora</i>	Cyperaceae	whole plant	△
<i>Carex pumila</i>	Cyperaceae	whole plant	△
<i>Carpesium abrotanoides</i>	Compositae	flower	△
<i>Carpinus cordata</i>	Betulaceae	leaf, branch	○
<i>Carpinus coreana</i>	Betulaceae	leaf	△
<i>Carpinus laxiflora</i>	Betulaceae	flower	○
<i>Carpinus tschonoskii</i>	Betulaceae	leaf, flower	△
<i>Castanopsis cuspidata</i>	Fagaceae	bark	○
<i>Catalpa ovata</i>	Bignoniaceae	whole plant	○
<i>Cedrela sinensis</i>	Meliaceae	fruit	△
<i>Celastrus orbiculatus</i>	Celastraceae	leaf	△
<i>Celtis choseniana</i>	Ulmaceae	bark	○
<i>Cephalotaxus koreana</i>	Taxaceae	branch	△
<i>Cercidiphyllum japonicum</i>	Ceratophyllaceae	leaf, branch	○, △
<i>Chaenomeles sinensis</i>	Rosaceae	leaf, branch	△, ○
<i>Chamaecyparis pisifera</i>	Cupressaceae	leaf, branch	○
<i>Cornus controversa</i>	Cornaceae	leaf, branch	△
<i>Cornus kousa</i>	Cornaceae	leaf	△
<i>Cornus macrophylla</i>	Cornaceae	leaf	△
<i>Cornus officinalis</i>	Cornaceae	leaf, branch, fruit	○, ○, ○
<i>Corylopsis coreana</i>	Hamamelidaceae	seed	△
<i>Corylopsis gotoana</i>	Hamamelidaceae	branch, leaf	△, ○
<i>Crataegus maximowiczii</i>	Rosaceae	branch	△
<i>Crepidiastrum lanceolatum</i>	Compositae	ground part	○
<i>Curcuma longa</i>	Zingiberaceae	ground part	△
<i>Cyrtomium falcatum</i>	Aspidaceae	whole plant	△
<i>Daphne genkwa</i>	Thymelaeaceae	top part	○
<i>Daphne odora</i>	Thymelaeaceae	leaf, branch	○
<i>Deutzia crenata</i>	Saxifragaceae	leaf, flower	△
<i>Dictamnus dasycarpus</i>	Rutaceae	ground part	○
<i>Diospyros lotus</i>	Ebenaceae	bark	△
<i>Dryopteris bissetiana</i>	Aspidaceae	whole plant	○
<i>Dryopteris pacifica</i>	Aspidaceae	whole plant	△
<i>Eleutherococcus senticosus</i>	Araliaceae	branch	○

Plant name	Plant Family	Plant parts used	Nemastatic activity ^b
<i>Eleutherococcus sessiliflorus</i>	Araliaceae	branch	△
<i>Empetrum nigrum</i>	Empetraceae	branch	△
<i>Euonymus alatus</i>	Celastraceae	leaf	△
<i>Euphorbia ebracteolata</i>	Euphorbiaceae	ground part	△
<i>Euphorbia humifusa</i>	Euphorbiaceae	whole plant	△
<i>Euphorbia lathyris</i>	Euphorbiaceae	ground part	○
<i>Euphorbia supina</i>	Euphorbiaceae	whole plant	△
<i>Exochorda serratifolia</i>	Rosaceae	branch	△
<i>Fallopia ciliinervis</i>	Polygonaceae	top part, ground part	△, ○
<i>Ficus carica</i>	Moraceae	top part	○
<i>Ficus elastica</i>	Moraceae	leaf, branch, root	△
<i>Ficus erecta</i>	Moraceae	heartwood	△
<i>Filipendula palmata</i>	Rosaceae	ground part	△
<i>Fortunella japonica</i>	Rutaceae	leaf, branch, root	○
<i>Geranium eriostemon</i>	Geraniaceae	whole plant	△
<i>Geranium nepalense</i>	Geraniaceae	whole plant	○
<i>Geranium sibiricum</i>	Geraniaceae	top part	○
<i>Geum japonicum</i>	Rosaceae	top part, ground part	△, △
<i>Ginkgo biloba</i>	Ginkgoaceae	leaf, branch	△
<i>Glehnia littoralis</i>	Umbelliferae	whole plant	△
<i>Heracleum moellendorffii</i>	Apiaceae	ground part	△
<i>Hibiscus hamabo</i>	Malvaceae	flower, heartwood	△, △
<i>Hypericum ascyron</i>	Guttiferae	top part	△
<i>Hypericum oliganthum</i>	Guttiferae	top part	△
<i>Hypericum patulum</i>	Guttiferae	top part, ground part	○, ○
<i>Ilex crenata</i>	Aquifoliaceae	leaf	△
<i>Indigofera pseudotinctoria</i>	Leguminosae	whole plant	△
<i>Inula helenium</i>	Compositae	ground part	△
<i>Iris netschinskia</i>	Iridaceae	seed	△
<i>Jasminum nudiflorum</i>	Oleaceae	leaf, branch	△
<i>Juglans mandshurica</i>	Juglandaceae	branch, leaf	△, ○
<i>Juniperus virginiana</i>	Cupressaceae	leaf, branch	△
<i>Kirengeshoma koreana</i>	Saxifragaceae	root	○
<i>Koelreuteria paniculata</i>	Sapindaceae	leaf	○
<i>Lagerstroemia indica</i>	Lythraceae	leaf	○
<i>Largerstroemia indica</i>	Lythraceae	bark, heartwood	△, △
<i>Leibnitzia anandria</i>	Asteraceae	ground part	△

Plant name	Plant Family	Plant parts used	Nemastatic activity ^b
<i>Lepidium ruderale</i>	Cruciferae	whole plant	△
<i>Ligustrum quihoui</i>	Oleaceae	leaf	△
<i>Lindera erythrocarpa</i>	Lauraceae	branch	△
<i>Lindera glauca</i>	Lauraceae	leaf	△
<i>Lindera obtusiloba</i>	Lauraceae	flower	○
<i>Liriodendron tulipifera</i>	Magnoliaceae	branch	△
<i>Lonicera coreana</i>	Caprifoliaceae	branch	△
<i>Ludwigia prostrata</i>	Onagraceae	whole plant	△
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Solanaceae	whole plant	△
<i>Lysimachia clethroides</i>	Primulaceae	whole plant	△
<i>Lysimachia vulgaris</i>	Primulaceae	seed	○
<i>Macleaya cordata</i>	Papaveraceae	whole plant	△
<i>Magnolia liliiflora</i>	Magnoliaceae	top part	△
<i>Mallotus japonicus</i>	Euphorbiaceae	fruit, leaf, branch	△, △, △
<i>Malus baccata</i>	Rosaceae	branch	○
<i>Malus pumila</i>	Rosaceae	leaf, branch	△, △
<i>Malus sieboldii</i>	Rosaceae	bark	○
<i>Mazus miquelii</i>	Scrophulariaceae	whole plant	△
<i>Meliosma oldhamii</i>	Sabiaceae	bark	△
<i>Morus alba</i>	Moraceae	branch, ground part	○, ○
<i>Morus bombycis</i>	Moraceae	leaf, branch	△
<i>Mukdenia rossii</i>	Saxifragaceae	top part	○
<i>Myriophyllum verticillatum</i>	Haloragaceae	whole plant	△
<i>Nuphar pumilium</i>	Nymphaeaceae	whole plant	△
<i>Nymphaea tetragona</i>	Nymphaeaceae	ground part	○
<i>Oenothera laciniata</i>	Onagraceae	whole plant	△
<i>Oenothera lamarckiana</i>	Onagraceae	whole plant	○
<i>Oenothera speciosa</i>	Onagraceae	top part	△
<i>Onoclea sensibilis</i>	Aspidaceae	ground part	△
<i>Pachysandra terminalis</i>	Buxaceae	whole plant	△
<i>Paeonia lactiflora</i>	Paeoniaceae	top part	○
<i>Panicum dichotomiflorum</i>	Gramineae	whole plant	△
<i>Papaver coreanum</i>	Papaveraceae	whole plant	○
<i>Pelargonium inquinans</i>	Geraniaceae	whole plant	△
<i>Penthorum chinense</i>	Crassulaceae	top part, ground part	△, ○
<i>Persicaria conspicua</i>	Polygonaceae	whole plant	△
<i>Persicaria japonicum</i>	Polygonaceae	leaf, branch	△

Plant name	Plant Family	Plant parts used	Nemastatic activity ^b
<i>Persicaria nodosa</i>	Polygonaceae	leaf, branch, root	△
<i>Persicaria trigonocarpa</i>	Polygonaceae	whole plant, top part	△, ○
<i>Persicaria vulgaris</i>	Polygonaceae	whole plant	○
<i>Phellodendron insulare</i>	Rutaceae	leaf	△
<i>Picea abies</i>	Pinaceae	leaf, branch, bark	△, △, △
<i>Picea koraiensis</i>	Pinaceae	leaf, branch	○
<i>Picrasma quassioides</i>	Simaroubaceae	branch	○
<i>Pieris japonica</i>	Urticaceae	leaf	△
<i>Pinus bungeana</i>	Pinaceae	branch, leaf	△, ○
<i>Pinus densiflora</i>	Pinaceae	leaf	△
<i>Pinus koraiensis</i>	Pinaceae	root, leaf	△, △
<i>Pinus thunbergii</i>	Pinaceae	root, branch	△, △
<i>Polystichum retroso-paleaceum</i>	Aspidaceae	whole plant	△
<i>Poncirus trifoliata</i>	Rutaceae	fruit, branch, seed	△, △, ○
<i>Potamogeton cristantus</i>	Potamogetonaceae	whole plant	△
<i>Potentilla chinensis</i>	Rosaceae	ground part	○
<i>Potentilla cryptotaeniae</i>	Rosaceae	ground part	○
<i>Potentilla discolor</i>	Rosaceae	ground part	△
<i>Potentilla fragarioides</i>	Rosaceae	whole plant	△
<i>Potentilla paradoxa</i>	Rosaceae	ground part	○
<i>Pourthiaea villosa</i>	Rosaceae	leaf, branch, fruit	△, ○, ○
<i>Prunus leveilleana</i>	Rosaceae	bark	△
<i>Prunus padus</i>	Rosaceae	bark	△
<i>Prunus salicina</i>	Rosaceae	leaf, branch	△, ○
<i>Prunus serrulata</i>	Rosaceae	leaf	△
<i>Prunus triloba</i>	Rosaceae	branch	△
<i>Punica granatum</i>	Punicaceae	leaf, branch, fruit	△
<i>Pyrus calleryana</i>	Rosaceae	leaf, branch	△
<i>Raphiolepis umbellata</i>	Rosaceae	leaf	○
<i>Reynoutria sachalinensis</i>	Polygonaceae	fruit	△
<i>Rhamnus davurica</i>	Rhamnaceae	leaf, branch	○
<i>Rheum palmatum</i>	Polygonaceae	ground part	△
<i>Rheum rhabarbarum</i>	Polygonaceae	top part	△
<i>Rheum tanguticum</i>	Polygonaceae	top part	△
<i>Rhododendron mucronulatum</i>	Ericaceae	top part	△
<i>Rhododendron schlippenbachii</i>	Ericaceae	leaf, branch	△, △

Plant name	Plant Family	Plant parts used	Nemastatic activity ^b
<i>Rhododendron yedoense</i>	Ericaceae	branch	△
<i>Rhus chinensis</i>	Anacardiaceae	root, fruit	△, △
<i>Rhus trichocarpa</i>	Anacardiaceae	leaf, branch	△
<i>Ricinus communis</i>	Euphorbiaceae	ground part	△
<i>Rodgersia podophylla</i>	Saxifragaceae	top part	△
<i>Rodgersia podophylla</i>	Saxifragaceae	ground part	○
<i>Rosa multiflora</i>	Rosaceae	top part, leaf, branch	△, ○, ○
<i>Rosa rugosa</i>	Rosaceae	leaf, branch	○, ○
<i>Rubus corchorifolius</i>	Rosaceae	branch	△
<i>Rubus hongnoensis</i>	Rosaceae	leaf, branch, flower	△
<i>Rubus phoenicolasius</i>	Rosaceae	leaf, branch	○
<i>Rumex acetosella</i>	Polygonaceae	top part	○
<i>Rumex conglomeratus</i>	Polygonaceae	root	△
<i>Rumex crispus</i>	Polygonaceae	ground part	△
<i>Rumohra standishii</i>	Aspidaceae	whole plant	△
<i>Ruta graveolons</i>	Rutaceae	ground part	△
<i>Salix graciliglans</i>	Salicaceae	leaf, branch	○
<i>Salix hultenii</i>	Salicaceae	branch	△
<i>Salix purpurea</i>	Salicaceae	leaf, branch	△
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Labiatae	ground part	△
<i>Sanguisorba hakusanensis</i>	Rosaceae	whole plant	△
<i>Sanguisorba officinalis</i>	Rosaceae	whole plant	○
<i>Sanguisorba tenuifolia</i>	Rosaceae	whole plant	△
<i>Sapium japonicum</i>	Euphorbiaceae	leaf, branch	○, ○
<i>Schisandra chinensis</i>	Magnoliaceae	fruit, ground part	△, △
<i>Sciadopitys verticillata</i>	Taxodiaceae	leaf, branch	△, △
<i>Scirpus radicans</i>	Cyperaceae	ground part	○
<i>Scirpus triangulatus</i>	Cyperaceae	seed	△
<i>Scirpus wichuriae</i>	Cyperaceae	whole plant	△
<i>Securinega suffruticosa</i>	Euphorbiaceae	heartwood	△
<i>Sedum kamtschaticum</i>	Crassulaceae	ground part	○
<i>Sedum middendorffianum</i>	Crassulaceae	top part, ground part	△, △
<i>Sedum takesimense</i>	Crassulaceae	top part	△
<i>Senna tora</i>	Fabaceae	ground part	○
<i>Solanum nigrum</i>	Solanaceae	ground part	△
<i>Sorbus commixta</i>	Rosaceae	branch	△

Plant name	Plant Family	Plant parts used	Nemastatic activity ^b
<i>Spiraea chinensis</i>	Rosaceae	branch	△
<i>Tagetes erecta</i>	Compositae	whole plant	○
<i>Tamarix chinensis</i>	Tamaricaceae	leaf, branch	○
<i>Taxodium distichum</i>	Taxodiaceae	branch	○
<i>Thuja orientalis</i>	Cupressaceae	leaf	○
<i>Thuja orientalis</i>	Cupressaceae	branch	○
<i>Tiarella polyphylla</i>	Saxifragaceae	whole plant	△
<i>Tilia amurensis</i>	Tiliaceae	leaf	△
<i>Trapa japonica</i>	Hydrocaryaceae	whole plant	△
<i>Tritonia crocosmaeflora</i>	Iridaceae	ground part	○
<i>Tsuga sieboldii</i>	Pinaceae	branch, leaf, bark	△, ○, ○
<i>Typhonium giganteum</i>	Araceae	ground part	○
<i>Ulmus davidiana</i>	Ulmaceae	branch	△
<i>Vaccinium oldhami</i>	Ericaceae	branch	△
<i>Veratrum nigrum</i>	Liliaceae	top part	△
<i>Viburnum carlesii</i>	Caprifoliaceae	leaf, branch, flower	△
<i>Viburnum dilatatum</i>	Caprifoliaceae	leaf, flower	○
<i>Vitis coignetiae</i>	Vitaceae	whole plant	○
<i>Vitis thunbergii</i>	Vitaceae	leaf, branch	△
<i>Vitis vinifera</i>	Vitaceae	top part	△
<i>Zanthoxylum ailanthoides</i>	Rutaceae	fruit	△
<i>Zinnia elegans</i>	Compositae	leaf	△
<i>Zizyphus jujuba</i>	Rhamnaceae	branch	△

^a Twenty *Rhabditis* sp. nematodes were inoculated in 96-well microplate containing 5,000 $\mu\text{g/ml}$ of plant extract and observed daily for 7 days for their activity.

^b Nemastatic activity : △ = movement decreased 50%, ○ = movement decreased more than 90%.

Table 3. Nemastatic activity of selected plant extracts^a.

Plant name	Plant parts used for extraction	Nemastatic activity ^b			
		1 st test ^c	2 nd test	3 rd test	4 th test
<i>Acer triflorum</i>	leaf	○	△	-	△
<i>Angelica sinensis</i>	ground part	△	-	△	-
<i>Cedrela sinensis</i>	fruit	△	△	-	-
<i>Cercidiphyllum japonicum</i>	leaf	○	△	△	△
<i>Corylopsis gotoana</i> var. <i>coreana</i>	leaf	○	△	△	△
<i>Dictamnus dasycarpus</i>	ground part	○	-	○	△
<i>Filipendula palmata</i>	ground part	△	-	△	-
<i>Hypericum patulum</i>	top part	○	-	△	△
<i>Hypericum patulum</i>	ground part	○	-	-	-
<i>Koelreuteria paniculata</i>	leaf	○	△	△	△
<i>Lysimachia vulgaris</i> var. <i>davurica</i>	seed	○	-	-	△
<i>Paeonia lactiflora</i>	top part	○	-	△	△
<i>Penthorum chinense</i>	top part	△	△	△	-
<i>Pierisja japonica</i>	leaf	△	-	△	-
<i>Poncirus trifoliata</i>	seed	○	-	○	△
<i>Prunus salicina</i> var. <i>columnalis</i>	leaf, stem	△	△	△	△
<i>Rheum palmatum</i>	top part	△	-	+	△
<i>Rheum rhabarbarum</i>	top part	△	-	△	△
<i>Rheum tanguticum</i>	ground part	△	-	○	-
<i>Rhododendron yedoense</i> var. <i>poukhanense</i>	stem	△	△	-	-
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	ground part	△	-	△	△
<i>Schisandra chinensis</i>	fruit	△	△	+	-
<i>Schisandra chinensis</i>	ground part	△	-	-	△
<i>Scirpus triangulatus</i>	seed	△	△	○	△
<i>Typhonium giganteum</i>	ground part	○	-	△	-

^a Twenty nematodes/species were inoculated in 96-well microplate containing 5,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of plant extract and observed daily for 7 days for their activity.

^b Nemastatic activity : + = nematode numbers are increased, - = movement not influenced at all, Δ = movement decreased 50%, \circ = movement decreased more than 90%.

^c Nematode species : 1st, 2nd, 3rd test = *Rhabditis* sp., 4th test = Juveniles of *Meloidogyne incognita*.

2. 친환경농자재의 선충방제 효과 검증

가. 연구 방법

선충억제 효율을 검토하기 위하여 국내 목록 공시된 농자재중 선충방제와 관련된 제품들을 제품의 처리 기준에 따라 토양에 처리하였다(표 1). 제제를 토양과 잘 섞은 후 1주일간 실내에 둔 후 감수성품종인 Rutger 토마토를 이식하였고 각 처리는 4반복으로하였다.

뿌리혹선충(*M. incognita*)은 경북 군위군 군위읍의 오이 재배포장에서 채집하여 사용하였으며,

뿌리혹선충의 증은 perineal pattern과 excretory pore의 위치를 현미경으로 확인하여 동정하였다 (Kim 등, 2001b). 채집한 흙은 직경이 2 mm인 체로 쳐서 굵은 돌과 식물 뿌리 등은 골라내고, 3번 이상 잘 섞어 선충의 밀도를 균일하게 한 후, 직경 10cm 토화분에 담았다. 시험전 토양의 뿌리혹선충 유충 밀도는 토양을 잘 섞은 후 그 중에서 토양 300 cm³를 취하여 깔데기법 (Southey, 1986)으로 선충을 분리하여 조사하였다. 선충의 밀도가 너무 높을 경우, 깨끗한 강모래와 섞어 시험전 토양의 뿌리혹선충 유충의 밀도를 토양 100 cm³ 당 200 마리로 조정하였다.

토마토 묘는 세계적으로 감수성 표준품종으로 사용되고 있는 토마토 *Lycopersicon esculentum* cv. Rutgers를 원예용상토(부농)에서 8주 간 육묘하였고, 그 중 균일한 묘를 골라 위에서 준비한 선충이 감염된 토양(유충 200마리/토양 100 cm³)이 담긴 직경 10cm 토화분에 1포기씩 이식하였다. 재배는 온실에서 7-8월 사이에 하였으며 시험 기간 중의 온실내 온도는 20-35°C로 이번 시험에 사용된 2종의 뿌리혹선충이 모두 온난지역 적음 선충임을 고려할 때 선충의 발육에 이상적인 온도였다.

토마토 정식 45일 후 토화분을 비우고 뿌리를 물로 조심스럽게 씻어 흙을 제거한 후 키, 식물체 무게, 뿌리 무게를 측정하였다. 뿌리는 Phloxin B 용액(15mg/L)에 15분간 염색하여 흰색 용기에 담고 뿌리에 생긴 붉게 염색된 난랑의 수를 조사하였다(Taylor와 Sasser, 1978).

표 1. 국내 목록공시 농자재중 선충방제와 관련된 제품의 효과 시험(처리 기준)

제품명	원제	처리 기준	희석 배수
땅거미	미생물제제	3kg/10a	-
뿌리삼	차나무+계피추출물	10ml/20리터, 7일간격 3회관주	0.05ml/100ml
토충잡	고삼추출물	10ml/20리터, 300ml/plant	0.05ml/100ml
바이선	천연추출물	20ml/20리터	0.1ml/100ml
페스탈메리골드	식물추출물	1리터/200평	-1
선충뚫	고삼추출물	10ml/20리터, 300ml/plant	0.05ml/100ml
선충에	미생물제	40ml/20리터, 25일 간격	0.2ml/100ml
나마플러스	식물추출물	4kg/100평	-
스파이더	식물추출물	20ml/20리터, 7-10일, /2-3회	0.1ml/100ml
네마큐	식물추출물	500ml/150평	0.1ml/100ml
선충탄	농약	4-6kg/300평	-
유채가루	유채가루		-
마늘퇴비	제조		
무처리		물	
선그린	계피추출물	10ml/20리터, 3kg/150-200평	
네마킬	미생물제	10ml/20리터	
토충탄	동백나무추출물	10ml/20리터	

* 처리당 4반복, 체제를 토양과 잘 섞은 후 1주일간 실내에 둔후 Rutgers 토마토 이식

표 2. 국내 선충방제용 목록공시 농자재의 뿌리혹선충 방제 효과

상품명	키 (cm)	무게 (g)	뿌리무게 (g)	혹수/plant	유충수/pot	비고
선충탄	18.7	4.7	4.1	0.0	0.0	약해
토충캡	31.3	17.7	6.1	0.0	8.0	약해
스파이더	-	-	6.1	0.0	10.0	약해
바이선	31.0	13.3	5.8	1.3	0.0	
선충뚝	38.0	28.8	8.2	1.5	80.0	
네마큐	36.3	17.1	9.6	61.0	28.0	
선그린	32.0	15.1	8.3	75.5	20.0	
선충에	31.0	17.5	6.9	123.3	36.0	
유채가루	28.0	10.7	7.7	140.0	20.0	
나마플러스	34.8	14.2	8.5	183.5	24.0	
땅거미	31.7	17.2	6.4	198.8	200.0	
페스탈메리골드	30.0	12.0	7.9	210.8	8.0	
마늘퇴비	32.7	19.1	8.8	212.7	48.0	
뿌리삼	40.3	17.6	8.5	260.3	28.0	
무처리	26.8	12.0	7.4	286.5	18.0	

나. 연구 결과

뚜렷한 시험 결과를 빠르게 얻으면서 약해 정도도 같이 알기 위하여, 목록공시 농자재의 표준 처리 기준량의 2-5배량을 토양에 처리하였다. 2-5배량 처리에서도 선충에, 유채가루, 나마플러스, 땅거미, 페스탈메리골드, 마늘퇴비, 뿌리삼 등에는 무처리의 혹수 286/plant와 비슷한 123-260개의 혹이 발생하여 선충방제에 전혀 효과가 없었다. 선충탄, 토충캡, 스파이더, 바이선 제품은 뿌리혹선충이 적게 발생되었으나 심한 약해의 발생으로 뿌리생육이 극히 나빠서, 난랑이 생길만한 뿌리가 없었으며 따라서 정상적이 판정이 불가능하였다(표 2). 이들에 대해서는 추후 낮은 농도로 재시험이 필요하다. 선충뚝, 네마큐, 선그린은 약해가 적고 선충 밀도도 낮은 편이었으며, 추후 낮은 농도에서 재확인 시험이 필요한 것으로 생각된다.

3. 천적제제를 이용한 뿌리혹선충 방제 시험

가. 재료 및 방법

(1) 천적곰팡이 제제화

곰팡이 천적의 직면한 큰 제약 가운데 하나는 곰팡이를 증식시키고 이를 건조하여 사용 전 까지 보관 가능한 제형으로 보존하는 것이다. 시험에 사용한 포식성곰팡이는 국내 시설재배지 토양으로부터 분리된 포식성곰팡이 중에서 포식능력이 우수한 2 균주를 선발하여 사용하였다. 이들 곰팡이들의 균주는 -70℃에 cryoperservation 보관하였으며 실험에 사용할 균주는 PDA배지에 한달에 한 번씩 이식하여 25℃ 항온기에 보관하면서 시험에 사용하였다.

고제제화 방법은 1) 싸라기를 물로 씻은 다음, 3시간 동안 물에 담가 두었다. 2) 싸라기를 채에 받혀 물기를 뺀 후 500g의 싸라기에 5g의 미강을 섞었다. 3) 이들을 고압살균용 비닐봉투에 넣고 121℃에서 1시간 고압 살균하였으며, 1일후 2차로 고압 살균하였다. 4) 고압 살균

된 씨라기+미강 혼합체에 5일전 미리 배양 시켜둔 포식성곰팡이 균사를 무균적으로 접종하였다. 5) 접종후 25도에서 보관하면서 1-2일 간격으로 비닐 봉투를 잘 흔들어 섞어주면서 곰팡이를 배양하였다. 6) 약 30일후 곰팡이가 충분히 배양된 후 알루미늄 호일에 배양된 씨라기를 얇게 펴고 clean bench 내에서 3일간 충분히 말렸다. 7) 충분히 마른 후 믹서기(신일, SFM-500DSI)를 이용하여 잘게 갈았으며, 8) 잘게 갈린 제제는 20mesh 체를 이용하여 치고 체를 통과한 균일한 크기의 제제를 시험에 사용하였다.

(2) 천적곰팡이 제제의 실내 검정

선충 감염토양 10g과 제제(0%, 1%, 2%)를 용량 100ml의 비닐봉투에 넣고 잘 섞은 후 실온에 두었다. 접종 10일후 토양 전체를 Baermann 깔데기법을 이용하여 선충을 분리하고 선충의 밀도는 해부현미경하에서 검정하였다. 각 시험은 5반복으로 처리하였다.

(3) 천적곰팡이 제제의 풋드 검정

제제(0.25%, 0.5%, 1%, 2%)과 선충 감염토양을 비닐봉지에 같이 넣고 잘 섞은 후 직경 10cm 토분에 넣었다. 토분에 흠을 담은 후 물이 흐르지 않을 정도로 관수하고 신문지를 덮어 온실에 10일간 두었다. 10일후 멸균된 모래가 담긴 프러그포트(3×3×5cm)에서 미리 육묘 시켜둔 3-4엽기의 토마토 묘 cv. ‘서광’을 풋드당 한 포기씩 이식하였다. 대조구로는 선충이 감염된 토양에 제제를 처리하지 않은 “무처리구”와 살선충제 Fosthiazate를 처리한 대비구를 두었다.

각 처리별 선충의 증식정도는 토마토 이식 60일 후에 뿌리에 만들어진 뿌리혹선충의 난낭(eggmass)의 숫자와 토마토의 뿌리와 줄기 무게를 조사하였다. 난낭조사는 토마토 뿌리를 물에 조심스럽게 잘 씻고 0.15% Phloxin B(Sigma) 용액에 담가, 15분간 염색하였으며, 바닥이 흰색인 용기에서 붉게 염색된 난낭의 숫자를 육안으로 조사하였다. 시험은 5반복으로 처리하였다.

(4) 천적곰팡이 제제의 포장시험

이 시험은 땅콩뿌리혹선충, *M. arenaria* race 2,에 감염된 성주과채류시험장의 온실(400-㎡)에서 2년에 걸쳐 실시되었다. 시험구 토양은 양토로 pH는 7.4, 유기물 함량은 2.52g/Kg, EC는 2.5 dS/m이었다. 시험 포장에는 시험 시작 1년전 참외를 재배하여 선충의 밀도를 균일하게 증가 시킨 후 시험구를 준비하였다. 시험구는 2 x 3m(가로 x 세로)로 나누고 각 시험구는 썬라이트(높이 30cm x 깊이 20cm)를 이용하여 칸막이를 하였다.

천적곰팡이는 위에서 선발된 *Isolate F4*, *Isolate F8*를 이용하여 씨라기제제를 만들고 이 제제를 이용하여 시험하였다. 포식성곰팡이 제제를 토양량의 1.5% (270g/900cm²), 3.0% (540g/900cm²), 포스치아제이트 입제(Fosthiazate 5%)를 0.6g/900cm²(300g a. i./10a)의 비율로 토양 표면에 살포하고 삽으로 토양 깊이 10cm정도로 섞어 주었고 물을 충분히 주었다. 기비는 표준량을 토양과 섞어 정식 전에 사용하였고 추비는 수확이 시작된 후 매주 간격으로 균일하게 사용하였다. 시험구배치는 완전임의배치 3반복으로 하였다.

참외 재배는 ‘신토좌호박’ 대목(*Cucurbit maxima* x *Cu. moschata*)에 접목하여 40일 육묘한 ‘금싸

라기은천참외'(Cucumis melo L. cv. 'Geumssaragi-euncheon')를 2월 4일 40cm 간격으로 본포에 정식 하였다. 정식 전 주지 4마디에서 순을 치고 2개의 아들덩굴을 유인하였으며, 2차 순치기는 17마디에서 하였다. 아들덩굴의 6~10마디 사이에서 나온 손자덩굴 1~2마디에 임의로 주당 6개씩 착과 시켰고, 17마디에서 발생한 손자덩굴은 유인하고 나머지 착과 되지 않은 손자덩굴은 제거하였다. 착과 유도는 암꽃이 개화한 당일 4-CPA(P-chloro phenoxy acetic acid) 75ppm과 GA(gibberellic acid) 50ppm의 혼합액을 자방에 살포하였으며, 결과지는 2절에서 순을 제거하였다. 기타 재배관리는 참외 표준재배법에 준하였다(Anon., 1999). 수확한 참외는 과실의 품질에 따라 상품(300g 이상), 하품(300g 이하), 비상품(발효과, 병과, 열과 등)으로 구분하고 각각의 무게를 측정하였다. 참외의 고사율은 6월 21과 7월 4일 2회에 걸쳐 조사하였다.

선충조사는 각 시험구의 선충의 밀도는 참외를 심기 전인 1월, 참외를 심은 후인 4월과 6월 등 3번에 걸쳐 조사하였다. 토양 채집 방법은 직경 2.5cm의 토양채집도구를 이용하여 각 구당 14번씩 찔러 흙을 채집하고, 채집한 흙은 잘 섞어 300cm³를 취한 후 깔데기법으로 선충을 분리하여 검경하였다(Southey, 1986). 시험성적은 참외의 시기별 수확량, 상품성과 선충밀도를 조사하였고, 모든 시험성적은 SAS GLM procedure와 Duncan's Multiple Range Test를 이용하여 분석하였다(SAS, Institute, Cary, NC).

나. 연구 결과

(1) 천적곰팡이 제제화

1차 시험에서 6종의 포식곰팡이를 액체배양후 싸라기제제로 만들고 이를 토양무게 5% 및 10% 비율로 토양에 처리하여 시험한 결과, 오AO, 오AA, F8 처리는 무처리에 비하여 뿌리혹선충에 대하여 탁월한 방제 효과를 보였다(표 1). 또한 이들 곰팡이들이 처리된 토양에서는 *Helicotylenchus*와 *Rahabditis* 선충의 밀도도 낮은 경향이였다. 반면 대DP, 오MC 처리는 처리농도가 토양무게의 10%로 높으면 효과가 있으나 5%인 낮은 농도에서는 효과가 없었다. 반면 F4곰팡이는 농도가 낮을 경우에도 높은 농도와 비슷한 효과를 보였다.

2차 시험에서 7종의 포식성곰팡이를 싸라기제제화하여 실내에서 포식곰팡이 선발시험을 실시한 결과, *Isolate F4*, *Isolate F8* 균주들이 무처리에 비하여 70-90%의 방제효율을 보였다. *Isolate F8* 균주는 처리량이 높을 때 약간의 효과를 보였다. 나머지 균주들은 방제효과를 보이지 않았으며, 부식성선충의 밀도 억제 효과도 뿌리혹선충의 밀도억제효과와 비슷한 경향이였다.

3차 시험에서 5종의 포식곰팡이를 싸라기제제로 만들고, 이를 이용하여 실내 선발시험을 실시한 결과, 무처리나 선충탄(선충방제 약제)에 비하여 50-70%의 방제 효과를 나타내고 있어 상당한 뿌리혹선충 밀도억제 효과가 인정되었다. 그리고 처리시간이 길어질수록 밀도억제 효과는 더 높았다. 대부분의 포식성곰팡이들이 밀도 억제 효과를 보였는데, 그중에서 특히 2종의 포식성곰팡이가 무처리에 비하여 90% 이상의 방제효율을 보였으며 3차의 시험에서 지속적인 효과를 보였다. 그 외 부식성선충의 밀도 억제 효과도 뿌리혹선충의 밀도억제효과와 비슷한 경향이였다.

(2) 천적곰팡이 제제의 실내 검정

천적곰팡이 균주 2종을 선발하고 이를 싸라기로 제제화하여 조제한 제제의 뿌리혹선충 방제 시험은 뿌리혹선충이 감염된 자연 토양을 이용하여 온실에서 실시되었다.

토마토 이식 1주전에 제제를 토양무게 대비 0.5%, 1%, 3%, 5%, 10%로 처리한 토양에서는 약 현저한 선충 밀도억제 효과를 보여 높은 유의성이 인정되었다($P=0.01$). 포식성곰팡이 제제 0.5%, 1.0% 처리는 각각 50-80%의 밀도 억제효과를 보였으며 3% 이상의 처리에서는 두 곰팡이 모두 80% 이상의 밀도 억제 효과를 보였다(표 2). 그러나 지상부 및 뿌리의 무게는 곰팡이 제제 처리구와 무처리 구간 통계적 유의성이 없었다. 2종의 포식성곰팡이를 싸라기로 제제화하여 콧드시험에서 처리한 결과, 뿌리혹 생성 정도나 난랑 생성 정도를 볼 때 *Isolate F4와 F8* 제제 처리는 살선충인 *fosthiazate* 정도의 효과를 나타내었다(80% 방제가),

이상의 결과를 종합해 볼 때, 배양 균사를 이용한 싸라기제제 1% 처리는 뿌리혹선충 방제가 80% 정도로 대량 제제화의 용이성 등으로 미루어 볼 때 장기보관성 등 좀 더 제제를 개발한다면 포식성곰팡이 균사를 효율적으로 제형에 이용하는 것이 가능할 것으로 보인다.

싸라기제제에서 방제 효과가 높았던 이유는, 더 심도 있는 분석이 필요하겠지만, 현재로서 가능한 추정치는 싸라기가 탄수화물로 이루어져있으므로 이들에 포함된 유기영양원이 부식선충의 발생을 조장하여 2차적으로 포식성곰팡이의 발생을 촉진 시키지 않았을까한다.

(3) 천적곰팡이 제제의 콧드 검정

포장시험중 재배 후기에 노균병이 심하게 발생되었다. 그러나 노균병은 실험이 거의 끝난 시기에 발생되어 이번 실험의 결과 해석에는 영향이 적었다. 이번시험에서 시험구당 수확된 참외 과일수는 25-42개로 충분한 정도로 참외의 성장이 이루어졌고 정상적으로 수확이 되었다고 할 수 있다. 수량은 무처리의 9.0kg/plot에 비하여 11.5-16.1kg/plot으로 128-179% 증수되었다(그림 5). 뿌리혹선충의 유충 밀도는 참외 정식 90일후에는 처리구당 20-79마리/100cm²로 크게 차이가 없었으나 처리 150일후인 6월 17일에는 처리구당 86-1,473마리/100cm²로 처리구당 크게 차이가 있었다(그림 6). 천적곰팡이 F4처리구에서는 86마리/100cm²가 발견되어 무처리의 1,473마리/100cm²에 비하여 선충밀도가 94% 감소되었다.

이러한 결과는 포식성곰팡이 제제 처리에 의하여 초기 뿌리혹선충 밀도가 억제된 것이 아닌가 생각되는데, 작물생육 초기에 뿌리혹선충의 밀도가 낮아짐으로서, 초기에 뿌리로 침입된 선충의 밀도가 낮아 작물이 대체로 건전하게 생육한 것이 아닌가 생각된다. 대부분의 뿌리혹선충 피해는 작물생육 초기에 가장 많은 피해를 받기 때문이다. F4처리구는 후기에도 지속적으로 선충의 밀도가 낮게 유지되었는데, 이는 천적곰팡이가 150일 이후까지 토양에서 선충을 억제하는 것이 아닌가 추정해볼 수 있겠다. 일반적으로 살선충제를 처리한 토양에서는 초기에는 선충의 밀도가 낮지만 후기로 갈수록 뿌리혹선충의 번식력이 더 좋아지는 것을 살선충제를 처리한 외국의 시험에 있어서도 여러 번 인지된 사실이다.

이상의 결과를 요약한다면, 참외 재배지에서 포식성곰팡이 제제를 처리함으로써 수량은 70% 이상 증수가 가능하다. 그 이유로는 포식성곰팡이 제제처리가 뿌리혹선충의 초기 밀도를 억제하여 작물이 초기에 뿌리혹선충의 피해를 회피하였으며 150일 이후까지 지속적으로 선충을 억제하기 때문으로 생각된다.

(4) 천적곰팡이 제제의 포장시험

3년간의 연구를 통하여 포식성곰팡이 제제의 포장 검정 시험을 수행한 결과, 국내의 온실재배지에 감염되어있는 뿌리혹선충에 대하여 *Isolate F4* 균주의 제제를 이용하여 충분히 초기 밀도 억제 및 수량 증수 효과를 볼 수 있을 것으로 평가되었다. 그러나 여전히 개선되거나 해결해야 할 여러 가지 문제점이 있는데, 첫 번째는 대량 액체배양 중 균주의 활성을 높게 유지할 수 있도록 개선이 필요하다. 실용적인 측면에서는 유기물을 이용한 대량 처리법 및 재배 기간 중 뿌리혹선충이 발생했을 때, 관주를 통한 반복처리가 가능할 수 있도록 제제화 하는 연구가 보다 심도있게 진행될 필요가 있다. 또한 다른 작물에 발생하는 *Aphelenchoides*, *Pratylenchus*, *Heterodera* 속의 선충류에 대한 억제효과나 살선충제와의 복합 처리효과 등도 검토할 필요가 있다.

(5) 포식성곰팡이 제제의 효율적 이용방법 제안

포식성곰팡이 제제에 대한 포장 검정시험을 종합하여 정리하면, 성주 참외재배 지역의 작형은 10월경에 포장을 마련하여 12월경에 참외를 정식한다. 그러므로 참외 뿌리혹선충 방제를 위한 포식성곰팡이 제제의 처리시기는 10-12월 사이가 된다. 이 시기는 온도가 낮게 유지되는 시기임으로 저온성 포식성곰팡이 제제를 유기물과 같이 투입하여 토양과 혼화하며, 뿌리혹선충의 피해가 많이 발생하는 4-5월 이후에는 고온성 포식성곰팡이를 관주용으로 개발하여 포장에 처리하는 기법이 필요할 것이다.

표 1. 포식성곰팡이 종류별 식물기생성선충에 대한 방제 효과

Treatment	Inoculum (%)	선충 밀도/100g soil		
		Juveniles of <i>Meloidogyne</i> sp.	<i>Helicotylenchus</i> sp.	<i>Rhabditis</i> sp.
무처리	10	192	256	32
	5	360	152	128
오AO	10	0	12	4
	5	8	208	64
오AA	10	0	0	8
	5	72	160	96
오MC	10	8	32	56
	5	112	48	448
대DP	10	4	44	8
	5	480	448	256
F4	10	32	48	0
	5	12	8	8
F8	10	0	16	0
	5	4	0	32

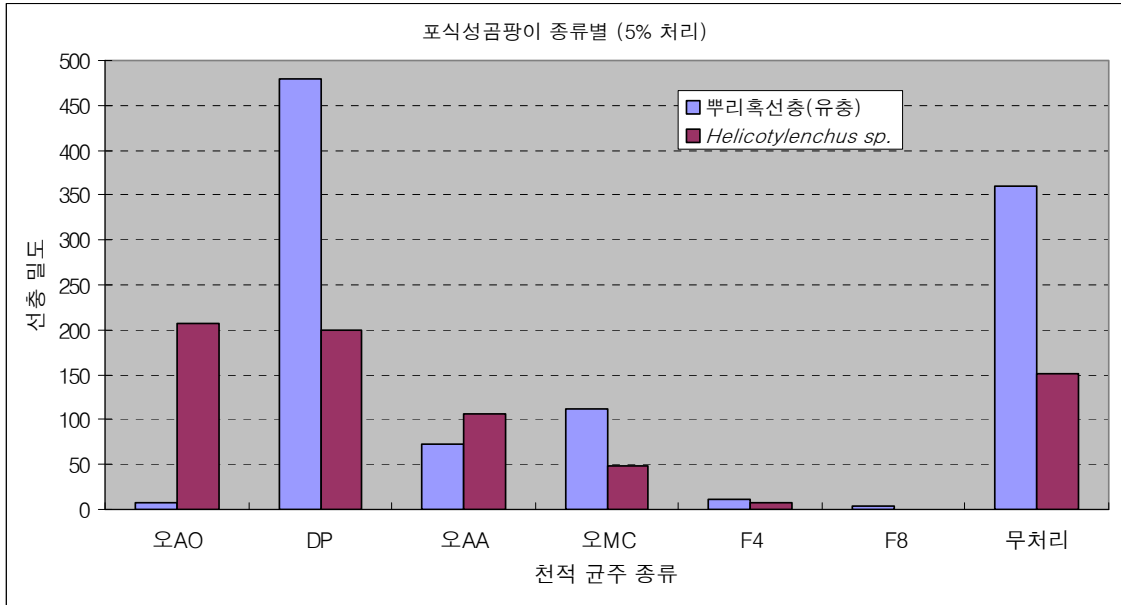


그림 1. 포식성곰팡이 종류별 식물기생성선충에 대한 방제 효과

표 2. 포식성곰팡이 처리량별 방제 효과

Treatment	Inoculum (%)	선충 밀도/100g soil		
		Juveniles of <i>Meloidogyne</i> sp.	<i>Helicotylenchus</i> sp.	<i>Rhabditis</i> sp.
무처리	-	360	152	128
F4	10.0	32	48	0
	5.0	12	8	8
	3.0	24	240	72
	1.0	80	288	384
	0.5	192	208	320
F8	10.0	0	16	0
	5.0	4	0	32
	3.0	56	304	112
	1.0	80	224	48
	0.5	64	200	336

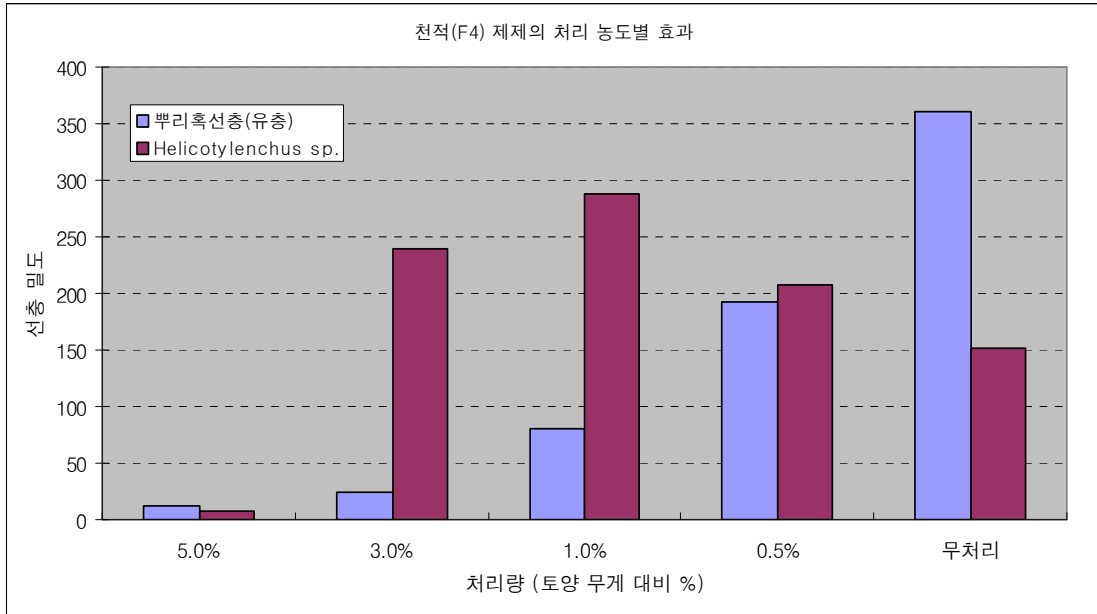


그림 2. 포식성곰팡이 F4 처리량별 방제 효과

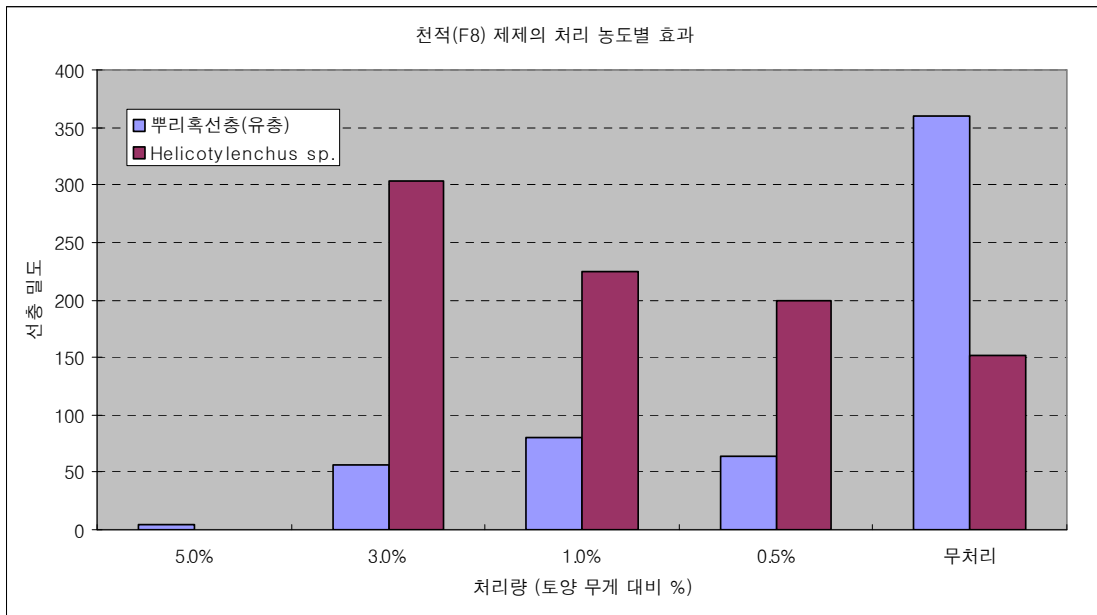


그림 3. 포식성곰팡이 F8 처리량별 방제 효과

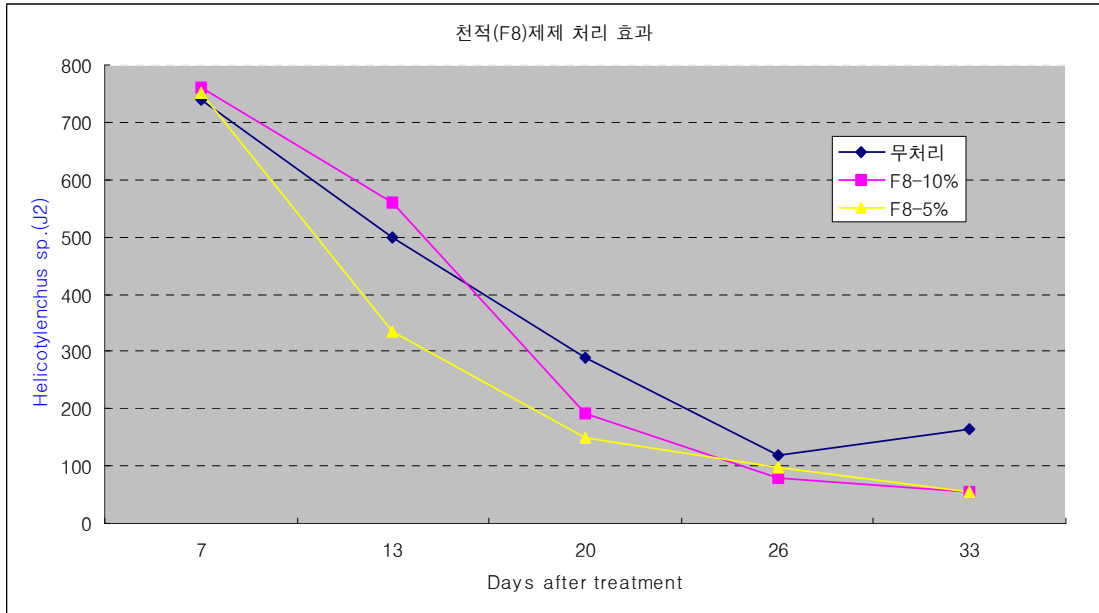
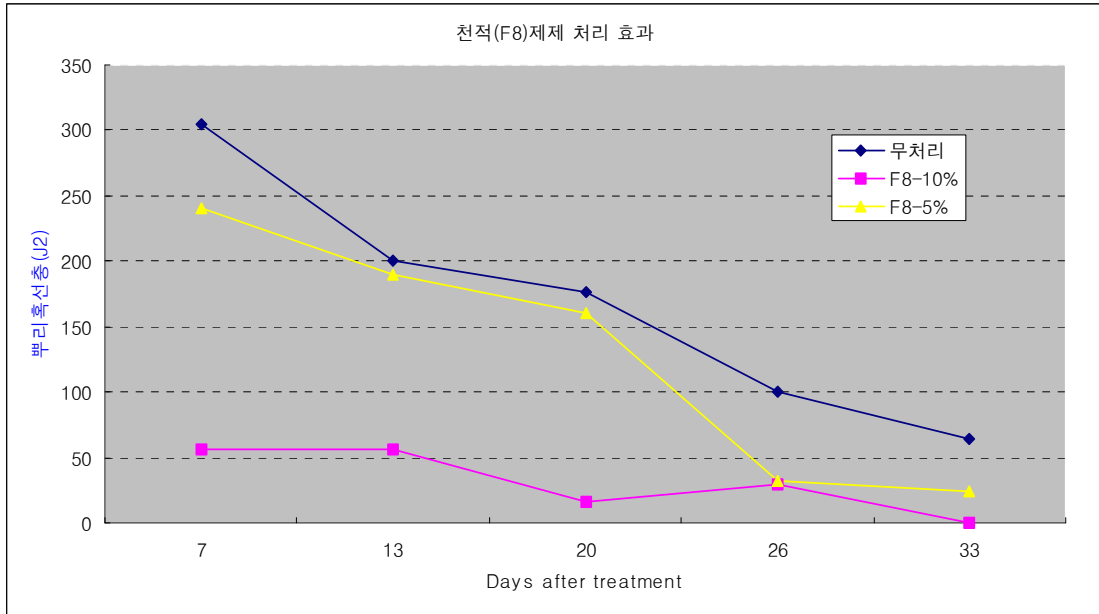


그림 4. 천적 F8제제 처리후 2종 식물기생성선충의 시기별 방제 효과.

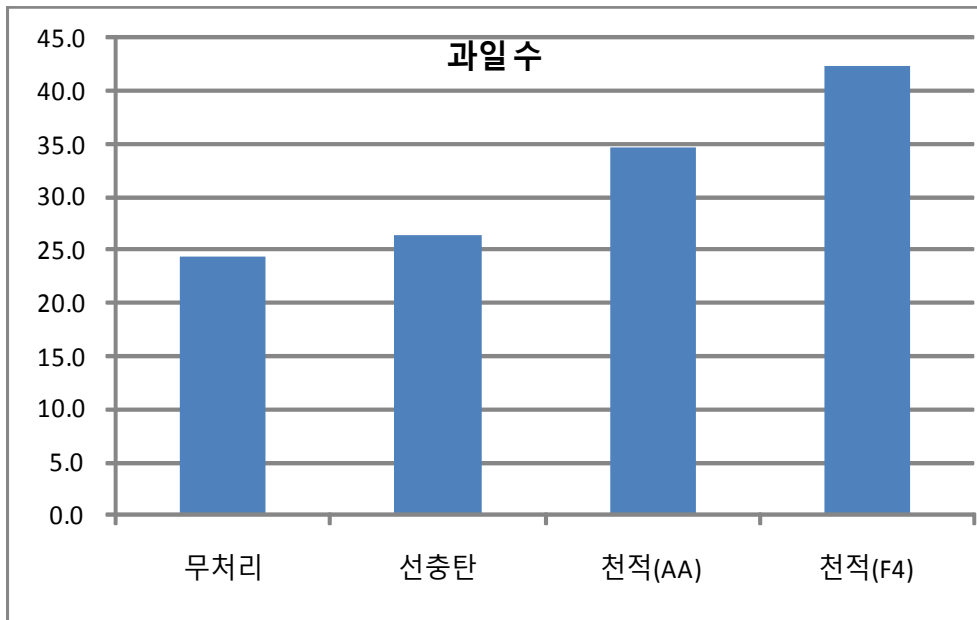
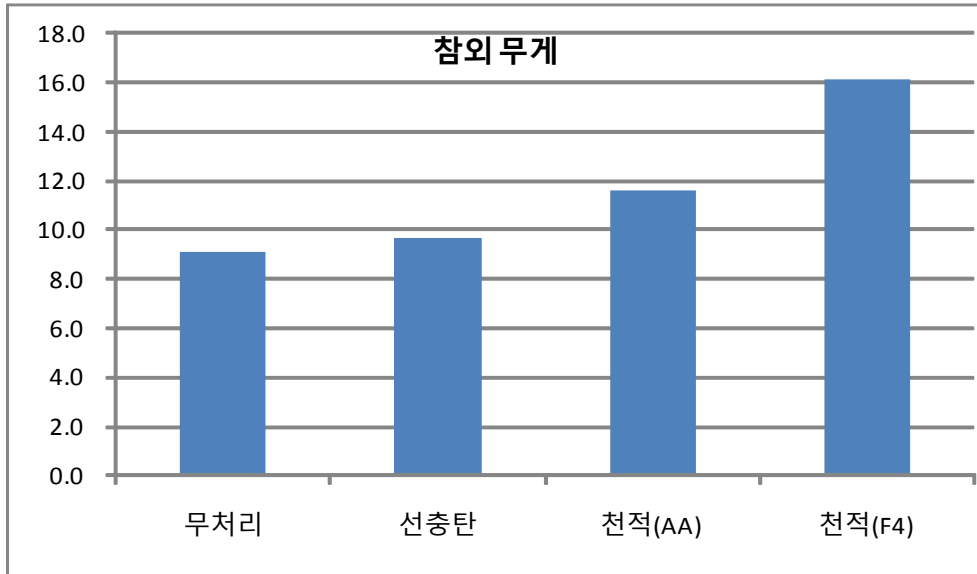


그림 5. 천적곰팡이 제제 처리에 의한 참외 수량(포장시험).

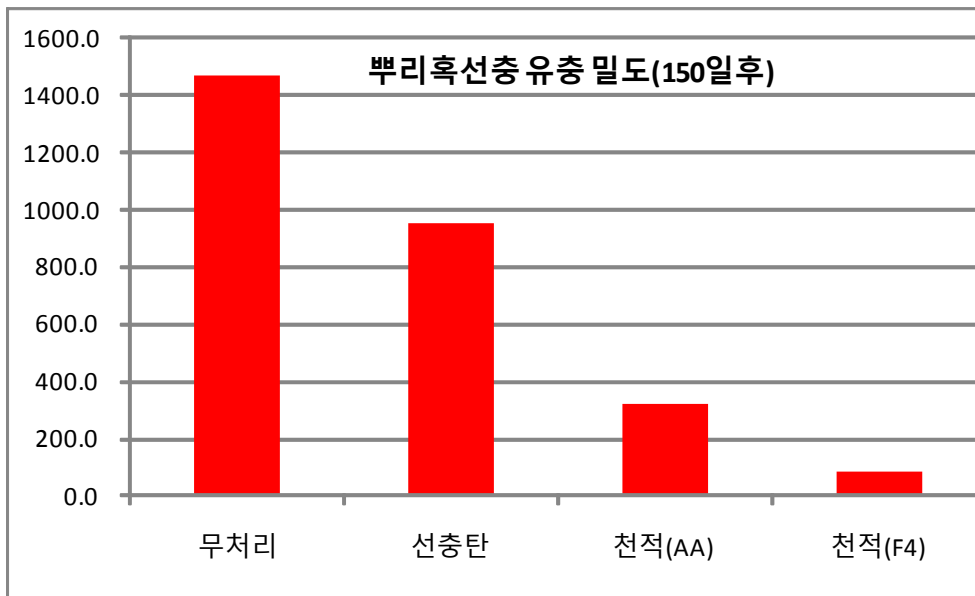
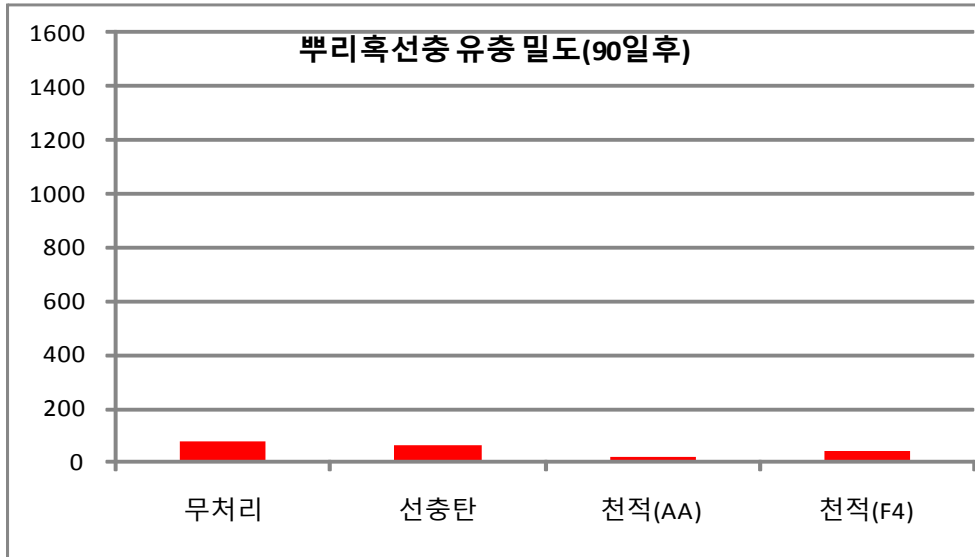


그림 6. 천적곰팡이 제제 처리에 의한 뿌리혹선충 밀도(포장시험).

제 3 절

[제2협동] 토양병해 방제 미생물제제 개발 및 산업화

1. *Trichoderma* sp.의 배양학적 특성 조사

가. 연구 내용

본 연구에서는 *Trichoderma* sp.의 배양학적 특성을 조사하기 위해 토양에서 분리한 균주를 이용하여 길항력 실험을 통해 우수 균주를 선발하고, 각 영양원을 통한 균사 성장도 및 포자농도를 조사하여 최적의 배지 조건을 확립하였다.

(1) *Trichoderma* sp. 균주의 분리

Trichoderma sp. 균주를 분리하기 위하여 경기 가평, 충남 천안, 논산, 전남 곡성, 경북 안동의 지역에서 10개의 토양시료를 채취하였다. 수집한 토양시료를 실온에 1일동안 건조시킨 후 2mm 체로 거른 다음 25ml의 멸균수가 들어 있는 Conical tube(50ml, Falcon)에 토양 3g을 넣고 진탕 배양기에 120rpm으로 10분간 현탁 시켰다.

토양 현탁액을 15분간 정치하고 1ml을 취하여 9ml 멸균수가 들어있는 시험관에 넣고 $10^1 \sim 10^2$ 농도로 희석하여 Williams(Williams et. al., 2003)의 방법으로 *Trichoderma* 선택배지(Glucose 3.0g, KCl 0.15g, MgSO₄·7H₂O 0.2g, NH₄NO₃ 1.0g, K₂HPO₄ 0.9g, Agar 20g, Rose bengal 150mg, Chloramphenicol 25ppm-20mg/ml, Water 1L)에 도말 한 후 25℃ 항온기에 배양하였다. 선택배지에서 4~5일간 배양한 *Trichoderma* 균사를 백금으로 떼어내어 멸균수에 현탁하여 물 한천배지(Agar 20g, Water 1L)에 스트리킹 한 후 25℃ 항온기에 배양하였다. 배양 1~2일 후 현미경을 이용하여 *Trichoderma* 단포자의 균사를 분리한 후 PDA(Potato dextrose agar, Difco) 사면배지에 이식하여 배양하였다. 분리된 *Trichoderma* 균주는 15℃ 항온기에 보관하면서 실험에 사용하였다.

(2) 우수균주 선발실험하기 위한 병원균과의 대치배양

*Rhizoctonia solani*와 대치배양을 통해 방제 효과가 우수한 균주를 선발하기 위해 *R. solani* 균총과 *Trichoderma* 균주를 PDA배지에 직경 5mm 코르크 보러로 punch하여 접종하였다. *Trichoderma* 균주들을 접종한 후 24℃ incubator에서 5일간 대치 배양하여 관찰하였다.

(3) *Trichoderma* sp. 의 균주의 동정

분리된 균주를 pH7.0의 기본 배지에 접종하여 25℃에서 72시간 배양하였다. 균주의 보존은 최종 농도 20%로 글리세롤을 포함하도록 하여 냉동 보관하였다. 상기 배양한 균주의 ITS rDNA 염기서열을 분석하여 균주를 동정하기 위해, 상기 균주로부터 DNA를 추출한 후, ITS rDNA 염기서열 분석에 필요한 단편을 증폭하기 위해 상기 균주의 genomic DNA와 ITS

1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')(서열번호:2)와ITS 4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')(서열번호: 3)를 사용하여 PCR 반응을 수행하였다. PCR 반응은 PCR Thermal cycler TP600(Takara Co. Japan)를 이용하여 95℃에서 2분간 1cycle 수행하고, 94℃에서 30초, 56℃에서 30초, 72℃에서 1분 과정을 총 35 cycle 수행한 뒤, 72℃에서 5분간 1 cycle을 수행하였다. PCR 산물은 QIAquick PCR purification Kit(Qiagen)를 이용하여 정제한 후, Applied Biosystems model 310 automatic DNA sequencer로 염기서열을 분석하였다. 이와 같이 수득한 ITS rDNA의 염기서열(서열번호: 1)을 NCBI의 BLAST 프로그램을 이용하여 상동성을 분석하였고, CLUSTAL X 프로그램(Thompson et al., 1994) 및 PHYLIP 프로그램(Felsenstein, 1993)을 이용하여 계통학적 위치를 확인하였다.

(4) *Trichoderma* sp.의 생리, 배양적 특성조사

(가) 배양온도

선발된 2균주의 배양온도를 10~40℃까지 5℃간격으로 균사 생장을 조사하기 위해 배양된 *Trichoderma* 균총을 직경 5mm 코르크 보러(Cork borer)로 떼어내어 PDA 배지 가운데에 치상하고 각 온도별로 2일 정도 배양한 후 선발균주 균사의 직경을 조사하였다.

(나) pH

선발된 2균주의 pH(4.0~8.0까지 0.5 간격)에 따른 균사 생장을 조사하기 위하여 배양된 *Trichoderma* 균총을 직경 5mm 코르크 보러(Cork borer)로 떼어내어 PDA 배지 가운데에 치상하고 각 온도별로 2일 정도 배양한 후 선발균주 균사의 직경을 조사하였다.

(다) 탄소원 조사

Trichoderma sp. 균사 생장에 적합한 탄소원을 선발하기 위하여 기본배지인 PDA를 기본배지로 하여 dextrose 등 단당류 3종, sucrose 등 이당류 3종류, dextrin 등 다당류 2종 등 총 8종의 탄소원 농도를 dextrose 함량과 동일한 탄소량이 되도록 배지를 조제하였다. 121℃ 1.2psi에서 20분간 고압살균 후 살균된 petri-dish(87×15mm)에 15~20 ml씩 분주하여 조제하였으며, PDA배지에서 7일간 배양된 *Trichoderma* sp.의 균사 선단부분을 직경 5mm cork borer로 잘라 낸 다음 조제한 petri-dish의 중앙에 접종하였다. 접종된 배지는 25℃의 배양실에서 3일간 배양하여 균사의 생장정도 및 밀도를 조사하였다. 또한, 선발된 탄소원의 최적농도를 조사하기 위하여 0~5%(w/v)까지 1%간격으로 최적 탄소원의 농도를 달리하여 조제한 평판배지에서 상기와 동일한 방법으로 3일간 배양하여 균사 생육정도를 조사하였다.

(라) 질소원 조사

Trichoderma sp.의 균사 생장에 적합한 질소원을 선발하기 위하여 기본배지인 PDA를 기본배지로 하여 peptone 등 총 6종의 질소원 농도를 동일한 질소 함량이 되도록 조절하여 배지를 조제한 후 121℃ 1.2psi에서 20분간 고압살균 후 살균된 petri-dish(87ø×15mm)에 15~20 ml씩 분주하여 조제하였으며, PDA배지에서 7일간 배양된 *Trichoderma* sp.의 균사 선단부분을 직경 5mm cork borer로 잘라 낸 다음 조제한 petri-dish의 중앙에 접종하였다. 접종된 배지는 25℃의 배양실에서 3일간 배양하여 균사의 성장정도 및 밀도를 조사하였다. 또한, 선발된 질소원의 최적농도를 조사하기 위하여 0~2.5%(w/v)까지 0.5%간격으로 최적 질소원의 농도를 달리하여 조제한 평판배지에서 상기와 동일한 방법으로 3일간 배양하여 균사 생육정도를 조사하였다.

(마) 무기염류 조사

Trichoderma sp.의 균사 생장에 적합한 질소원을 선발하기 위하여 PDA를 기본배지로 하여 CaCO₃ 외 5종의 무기염류의 농도를 동일한 함량이 되도록 배지를 조제한 후 121℃ 1.2psi에서 20분간 고압살균 후 살균된 petri-dish(87ø×15mm)에 15~20 ml씩 분주하여 조제하였으며, PDA 배지에서 7일간 배양된 *Trichoderma* sp.의 균사 선단부분을 직경 5mm cork borer로 잘라 낸 다음 조제한 petri-dish의 중앙에 접종하였다. 접종된 배지는 25℃의 배양실에서 2일간 배양하여 균사의 성장정도 및 밀도를 조사하였다. 또한, 선발된 무기염류의 최적농도를 조사하기 위하여 0~3%(w/v)까지 0.5%간격으로 최적 무기염류의 농도를 달리하여 조제한 평판배지에서 상기와 동일한 방법으로 2일간 배양하여 균사 생육정도를 조사하였다.

(바) 교반속도(RPM)별 포자농도 조사

Trichoderma sp.의 배양 조건을 조사하기 위하여 250ml 삼각플라스크에 GMYP(Glucose 1%, Malt 0.5%, Yeast 0.5%, Peptone 0.5%, KH₂PO₄ 0.5%, Water 1L) 배지를 100ml씩 분주하여 멸균한 후 *Trichoderma* sp. 균주의 5mm 균총을 25℃에서 RPM을 50~200RPM까지 50RPM 간격으로 Shaking incubator에서 15일간 진탕 배양하였다. 그리고, 각각의 플라스크에서 수거하여 포자 농도를 Hemocytometer로 조사하였다.

나. 연구 결과

(1) *Trichoderma* sp. 균주의 분리

전체 5개 지역의 토양을 *Trichoderma* 선택배지에 도말한 결과, 각각 경기 가평 1균주, 충남 천안 5균주, 논산 5균주, 전남 곡성 10균주, 경북 안동 12균주 등 총 33균주를 분리하였다(Fig. 1).



Fig 1. Mycelial colony of *Trichoderma* sp. grown on *Trichoderma* selective medium for 5days at 25°C.

(2) 우수균주 선발 실험하기 위한 병원균과의 대치배양

*Rhizoctonia solani*와 대치배양 결과, OK-1, 4의 균주가 다른균주에 비해 뛰어난 over growth 및 억제 효과를 보여주었다(Fig. 2).

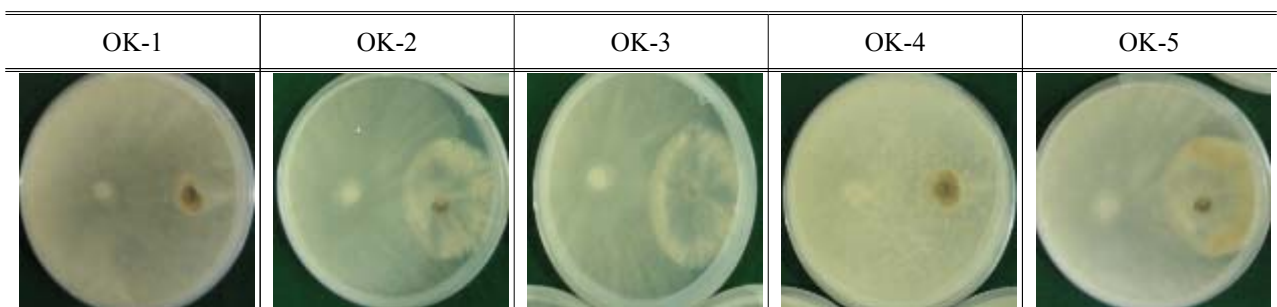


Fig 2. In vitro inhibition of *R. solani* by *Trichoderma* isolates OK-1, OK-2, OK-3, OK-4 and OK-5 on PDA media.

(3) 균주의 동정

균주의 ITS rDNA의 염기서열은 NCBI GenBank에 등록된 미생물과 비교하여 *Trichoderma* sp. 와 100%의 상동성을 나타내어 가장 높은 유사도를 나타냄을 확인함으로써, 분리된 균주를 *Trichoderma* sp. 으로 명명하였다(Table 1).

Table 1. NCBI Analysis Result.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
AB472078.1	<i>Trichoderma</i> sp. GU071002 genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, IT:	1026	1026	100%	0.0	100%	

(4) *Trichoderma* sp.의 생리, 배양적 특성조사

(가) 배양온도

선발된 2균주의 배양온도에 따른 균사생육의 정도를 알아본 결과, 2균주 모두 25~30℃ 범위에서 최적의 균사생육을 보였다(Fig. 3).

(나) pH

선발된 2균주의 pH에 따른 균사생육의 정도를 알아본 결과, pH 5.0~6.0 범위에서 생육이 양호하였다(Fig. 4).

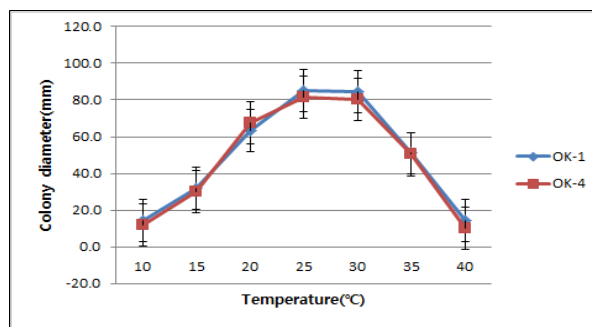


Fig 3. Mycelial Growth of *Trichoderma* sp. cultured with different Temp.

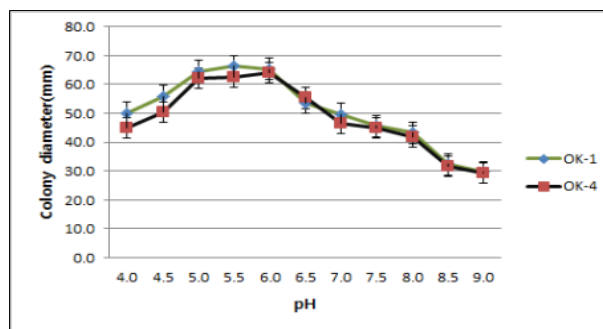


Fig 4. Mycelial Growth of *Trichoderma* sp. cultured with different pH

(다) 탄소원 조사

Trichoderma sp. 의 균사생장에 적합한 탄소원을 선별하기 위하여 Dextrose를 비롯한 8종의 탄소원을 실험한 결과, 균사생장과 밀도면에서 볼 때 단당류인 Dextrose와 이당류인 Sucrose 순으로 적합한 탄소원으로 조사되었다. 또한, 최적 Dextrose의 농도는 1%에서 가장 좋게 나타났다(Table 2, Fig. 5).

(라) 질소원 조사

Trichoderma sp. 의 균사 생장에 적합한 질소원을 선별하기 위하여 peptone등 질소원 총 6종을 각각 첨가하여 실험한 결과, 균사 생장과 밀도에서 볼 때 Peptone, Yeast, Malt가 적합한 질소원으로 나타났다. 또한 peptone의 최적농도는 0.5%로 나타났다(Table 3, Fig. 6).

(마) 무기염류 조사

Trichoderma sp.의 무기염류의 이용성을 선별하고자 6종의 무기염류를 시험한 결과 균사생장과 밀도와와의 관계를 볼 때 KH₂PO₄ 와 MgSO₄ · 7H₂O에서 적합한 무기염류로 나타났으며, 또한 최적 KH₂PO₄의 농도는 0.5%로 나타났다(Table 4, Fig. 7).

(바) 교반속도(RPM)별 포자농도 조사

포자 농도를 Hemocytometer로 조사한 결과, 100rpm부터 1×10⁵ cfu/ml 이상 포자가 형성되는 것을 확인 하였다(Fig. 8).

Table 2. Effect of carbon sources on mycelial growth, *Trichoderma* sp.

	Carbon sources								
	N ^a	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8
Colony diameter(mm/3days)	30.3	80.0	45.7	38.3	78.8	75.0	42.5	42.2	48.0
Density	+ ^b	+++	+++	+	+++	+++	++	+++	+

Na: None, C-1: Dextrose, C-2: Fructose, C-3: Xylose, C-4: Sucrose, C-5: Lactose, C-6: Maltose, C-7: Dextrin, C-8: Starch., +b: thin, ++: moderate, +++: compact.

Table 3. Effect of nitrogen sources on mycelial growth, *Trichoderma* sp.

	Nitrogen sources						
	N ^a	N-1	N-2	N-3	N-4	N-5	N-6
Colony diameter(mm/3days)	34.5	65.1	63.5	64.5	36.7	45.5	39.0
Density	+ ^b	+++	+++	+++	++	++	++

Na: None, N-1: Peptone, N-2: Yeast, N-3: Malt, N-4: Ammonium nitrate, N-5: Sodium nitrate, N-6: Potassium nitrate., +b: thin, ++: moderate, +++: compact.

Table 4. Effect of mineral salts on mycelial growth, *Trichoderma* sp.

	Mineral salts						
	N ^a	M-1	M-2	M-3	M-4	M-5	M-6
Colony diameter (mm/2days)	47.2	49.8	48.2	59.0	58.7	52.3	52.3
Density	++ ^b	++	++	+++	+++	++	++

Na: None, N-1: Peptone, N-2: Yeast, N-3: Malt, N-4: Ammonium nitrate, N-5: Sodium nitrate, N-6: Potassium nitrate., +b: thin, ++: moderate, +++: compact.

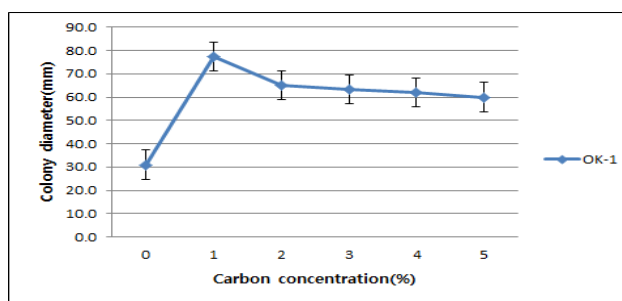


Fig. 5. Effect of dextrose concentration on the mycelial growth

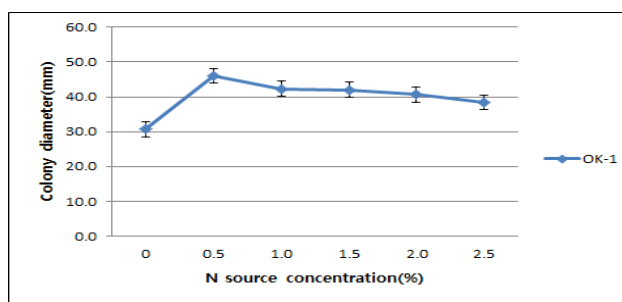


Fig. 6. Effect of peptone concentration on the mycelial growth

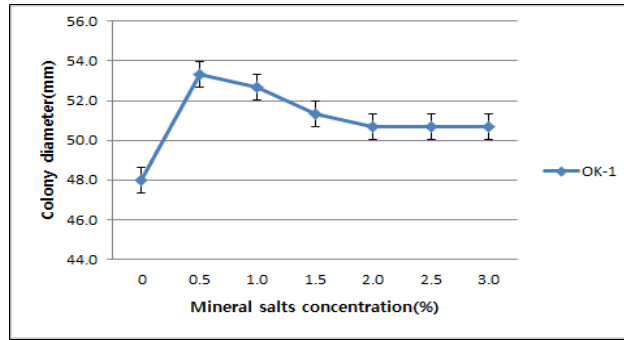


Fig. 7. Effect of K₂HPO₄ concentration on the mycelial growth

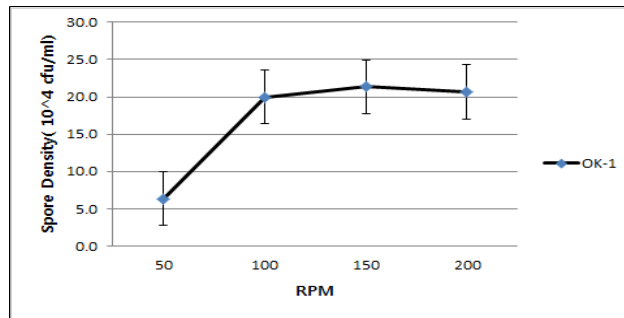


Fig. 8. Effect of RPM on spore density of *Trichoderma* sp.

2. *Trichoderma* sp.의 대량생산 공정 확립

가. 연구 내용

본 연구에서는 플라스크 배양을 통해 *Trichoderma* sp.의 후막포자 생성조건을 확립하고, 공장형 pilot 배양까지 단계별 배양조건을 확립하여 배지단위 부피당 포자농도 포자농도를 조사하여 최적의 배양 조건을 확립하였다.

(1) *Trichoderma* sp. 의 후막포자 생성조건

(가) 탄소원별 첨가배지 배양

탄소원별 균체량 및 포자 생성량을 조사하기 위해, 탄소원이 제외된 Czapek-Dox Broth에 glucose, sucrose, fructose, maltose를 각각 1%(w/v)씩 첨가하여 사용하였다. 배양액은 250ml 삼각 플라스크에 100ml씩 분주하여 멸균한 후 PDA 배지에서 형성된 *Trichoderma* sp. OK-1의 포자를 각각 10³개씩 접종하여 25℃ Shaking incubator에서 150RPM으로 20일간 배양하였다. 균체량은 filter paper(whatman No. 2)로 여과하여 얻은 균사를 75℃에서 8시간 건조하여 측정하였다. 또한 분생포자 및 후막포자 포자수는 배양액을 homogenizer(NIHONSEIKI KAISHA AM-12, RPM : 1,000)로 10초간 homogenization 한 후 Hemocytometer로 조사하였다.

(나) 질소원별 첨가배지 배양

질소원별 균체량 및 포자 생성량을 조사하기 위해, 질소원이 제외된 Czapek-Dox Broth에 malt, yeast, peptone, sodium nitrate를 각각 1% (w/v)씩 첨가하여 사용하였다. 배양액은 250ml 삼각플라스크에 100ml씩 분주하여 멸균한 후 PDA 배지에서 형성된 *Trichoderma* sp. OK-1의 포자를 각각 10^3 개씩 접종하여 25℃ Shaking incubator에서 150RPM으로 20일간 배양하였다. 균체량은 filter paper(whatman No. 2)로 여과하여 얻은 균사를 75℃에서 8시간 건조하여 측정하였다. 또한 분생포자 및 후막포자 포자수는 배양액을 homogenizer(NIHONSEIKI KAISHA AM-12, RPM : 1,000)로 10초간 homogenization 한 후 Hemocytometer로 조사하였다.

(다) 후막포자 2차 배지 첨가 후 후막포자 형성 유무 확인

위에서 조사된 후막포자를 유도하는 배지를 균사배양 후에 2차 접종하는 방식으로 기내에서 실시하였다. *Trichoderma* sp. OK-1 균의 후막포자 형성을 하기 위해 1차배양은 균사배양용 배지인 GMYP(Glucose 1%, Malt 0.5%, Yeast 0.5%, Peptone 0.5%, KH₂PO₄ 0.5%, Water 1L) 배지를 활용하여 25℃ Shaking incubator에서 150RPM으로 20일간 배양시켰다.

배양액은 5,000ml 삼각플라스크에 2,000ml를 분주하여 멸균한 후 PDA 배지에서 형성된 *Trichoderma* sp. OK-1의 포자를 10^3 개 접종하여 균사배양을 실시하였다.

균사배양 20일 후에 당도분석기(Ion chromatograph, Dionex co., Ltd.)로 당함량을 측정한 다음 거의 소량 존재하였을 때, 2차 배지를 추가로 넣고 10일간 더 배양을 실시하였다. 이때 2차 배지는 위의 실험에서 후막포자 유도 탄소원 및 질소원으로 선발된, Sucrose 1%, KNO₃ 0.5%와 무기염류를 다른 배양병에 사전에 멸균해 놓은 상태에서 2차 배지 접종을 실시하였다.

후막포자의 형성유무 및 균수를 조사하였으며, 균수는 배양 종료 후에 homogenizer (NIHONSEIKI KAISHA AM-12, RPM : 1,000)로 10초간 homogenization 한 후 Hemocytometer로 조사하였다. Hemocytometer를 이용하여 조사하였다.

(라) *Trichoderma* sp. 의 대량배양 최적화 연구

본 실험에서는 *Trichoderma* sp.의 대량배양을 위하여, Fermentor에서의 최적화 공정을 위하여 경북바이오산업연구원에 설치된 30L, 300L Fermentor(코바이오텍, 한국)제품을 활용하였다. Seed culture는 본 발효의 10% vol.으로 GMYP(Glucose 1%, Malt 0.5%, Yeast 0.5%, Peptone 0.5%, KH₂PO₄ 0.5%, Water 1L) broth로 준비하고, 25℃에서 배양을 실시하였다. 종균배양은 5L flask에 3L Volume으로 GMYP(Glucose 1%, Malt 0.5%, Yeast 0.5%, Peptone 0.5%, KH₂PO₄ 0.5%, Water 1L) broth를 준비하고 배양온도는 26℃ Shaking incubator에서 150RPM 5일동안 배양한 종균을 활용하였다. 30L 배양에서는 working volume 18L로 실시하여 Seed 배양을 48시간 동안 실시하였으며, 배양온도는 26℃, Aeration은 18L/mim으로 유지하고, Agitation은 150rpm으로 조절하여 배양 중의 용존산소(DO)를 30% 이상 유지하여 배양하였다. 또한, 본 배양인 300L에서는 working volume 180L로, 배양온도는 26℃, Aeration은 180L/mim으로 유지하고, Agitation은 100rpm으로 조절하여 배양 중의 용존산소(DO)를 30% 이상 유지하여 배양하였으며, 72시간 동안 배양하여 당의 함량을 분석하였으며, 0 g/L 이하가 될 때, 후막포자 형성 배지(Sucrose 1%,

KNO₃ 0.5%, water 1L)를 추가하여 192시간 동안 배양하여 분생포자 및 후막포자의 농도를 측정하였다. 배양시 기포의 발생을 방지하기 위하여 소포제(LS-303)를 발효 배지내에 첨가하였다. 또한, 배양된 *Trichoderma* sp. 를 건조하기 전 단계로 하기 위해, 펠렛화된 균사와 포자를 균일화하기 위해 homogenizer (MN400BF, 마이크로녹스, 4000psi)를 이용하여 균질화 시킨 다음, 고형물을 얻기 위해서 원심분리기(J-1250, 한일과학)을 이용하여 고형물을 얻었다. 함수율이 75~80% 정도를 유지하기 위하여 7,500rpm으로 조절하여 실시하였다.



Fig 9. Homogenizer & Centrifuge

나. 연구 결과

(1) *Trichoderma* sp. 의 후막포자 생성조건

(가) 탄소원별 첨가배지 배양

Trichoderma sp. Ok-1의 균사생장에 미치는 탄소원들의 영향을 조사한 결과, Fig. 10과 같이 탄소원에 관계없이 균사 성장에는 일정하게 유지되고 있는 모습을 보여주고 있다. 이는 다른 연구에서 밝힌바와 같이 토양 진균류 대한 탄소원 종류별 생육량 조사에서 종류에 관계없이 비슷한 성장량을 보였다는 것과 일치하는 것으로 보인다. 그리고, 대조구의 경우에는 0.53g의 성장량을 나타내어 다른 탄소원 첨가 배지들의 경우에 비해 약 26%의 낮은 성장량을 나타냈다.

각 탄소원들이 첨가된 배지에서 분생포자 생성량을 측정한 결과, Fig. 11에서 보는 바와 같이, Glucose와 Sucrose에서 가장 많이 생성되는 것으로 조사되었다. 또한, 균사 성장량에 있어서 다른 탄소원 첨가배지에 비해 26% 정도 이하의 균사 성장량이 측정되었던 대조구에서 분생포자가 fructose에 비해 많은 양이 형성되어 균사 생장이 불리한 조건이라도 분생포자가 많이 생성되는 것으로 조사되었다.

또한, 후막포자 생성량을 측정한 결과, Fig. 12에서 보는 바와 같이, 분생포자와 비슷하게 Sucrose와 glucose에서 가장 많이 발생하는 것으로 조사되었다. 대조구의 경우에도 후막포자가 많이 발생하는 것으로 조사되었는데, 이는 균사의 형태 유지와 지속적인 생장이 곤란하게 하는 외부환경을 극복하고자 후막포자 형성이 촉진된 것으로 생각된다.

따라서, 후막포자 배양시 균사성장을 일으키는 배지를 선택하고, 추후에 후막포자 배양을 유도

하기 위해 Glucose 및 Sucrose를 사용할 예정이다.

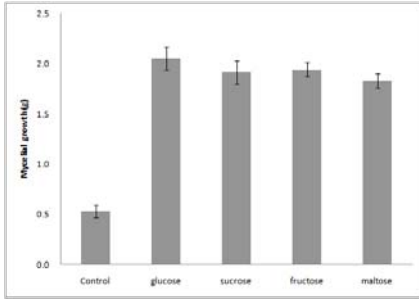


Fig. 10. Effect of carbon sources on mycelial growth.

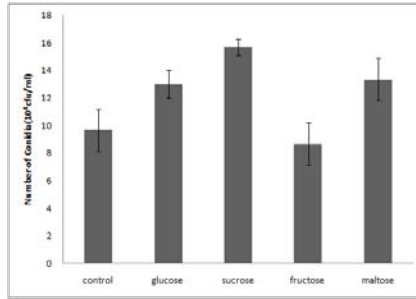


Fig. 11. Effect of carbon sources on number of conidia.

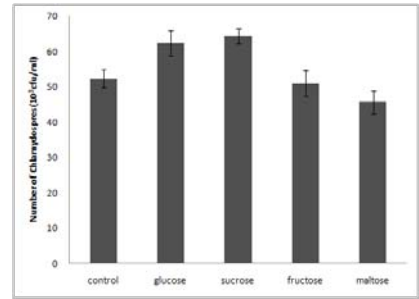


Fig. 12. Effect of carbon sources on chlamydo spores.

(나) 질소원별 첨가배지 배양

Trichoderma sp. Ok-1의 균사생장에 미치는 질소원들의 영향을 조사한 결과, Fig. 13와 같이 malt, peptone, yeast에서 균사의 성장량이 가장 좋게 조사되었으며, 이는 1차년도에 균사생장 실험 결과와 일치하는 것으로 조사되었다. 또한, Control2에서 처럼 탄소원과 질소원이 전혀 없는 경우에는 균사의 생장이 거의 없는 것으로 조사되었다.

또한, 분생포자 생성량을 확인한 결과, Fig. 14에서 보는 바와 같이, malt, yeast, peptone에서 균사의 성장과 유사하게 분생포자가 생성되는 것으로 조사되었으며, 질소원만 뿐 control 1과 질소원 및 탄소원을 제외한 control 2에서는 분생포자가 거의 발생하지 않았다. 이는 분생포자 생성시 질소원이 차지하는 비율이 높음을 알 수 있는 것으로 보인다.

그리고, Fig. 15에서 보는 바와 같이, 후막포자 생성량을 분석할 결과, KNO₃에서 가장 높게 조사되었으며, 분생포자와 후막포자의 생성량은 조금 다르게 조사되었다. 또한, 질소원이 제외 시킨 배지에서 후막포자 생성이 균사 성장량에 비해 많았는데, 이것은 일반 배양으로 성장한 *Fusarium* 균사를 세척하여 영양소가 없는 염용액에 넣음으로서 후막포자가 많이 형성되었다는 보고와 같이 영양소의 결핍에 의한 불리한 환경에서 후막포자가 많이 형성됨을 알 수 있었다. 또한, 후막포자 배양시 균사생장에 적합한 배지를 사용한 후에 후막포자를 형성하는 배지를 따로 넣을 예정이며, 이때에 KNO₃를 활용하여 진행 할 예정이다.

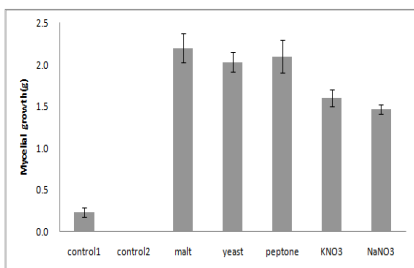


Fig. 13. Effect of nitrogen sources on mycelial growth.

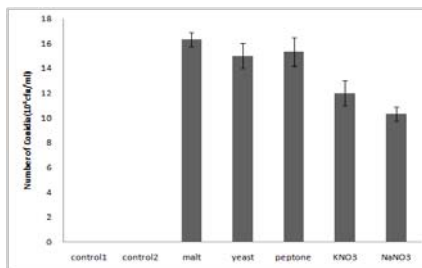


Fig. 14. Effect of carbon sources on number of conidia.

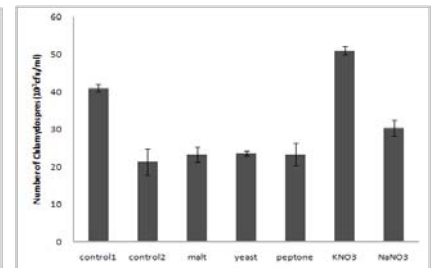


Fig. 15. Effect of carbon sources on chlamydo spores.

(다) 후막포자 2차 배지 첨가 후 후막포자 형성 유무 확인

Fig. 16에서 보는 바와 같이 20일 지난 후에 1차 배양 후에 균사의 생장이 많이 자라고 있는 모습을 보여주고 있다. 이때, 당도 분석기를 이용하여 당함량을 조사한 결과, 0.35g/L 도로 되었으며 이후 2차 배지를 넣고 10일 동안 더 배양을 실시한 결과, Fig. 16(D)에서 보는 바와 같이 후막포자가 형성되어 있는 것을 확인하였다. 이때의 후막포자 균수는 1×10^5 cfu/ml로 조사되었으며, 분생포자의 수는 1×10^6 cfu/ml로 조사되었다.

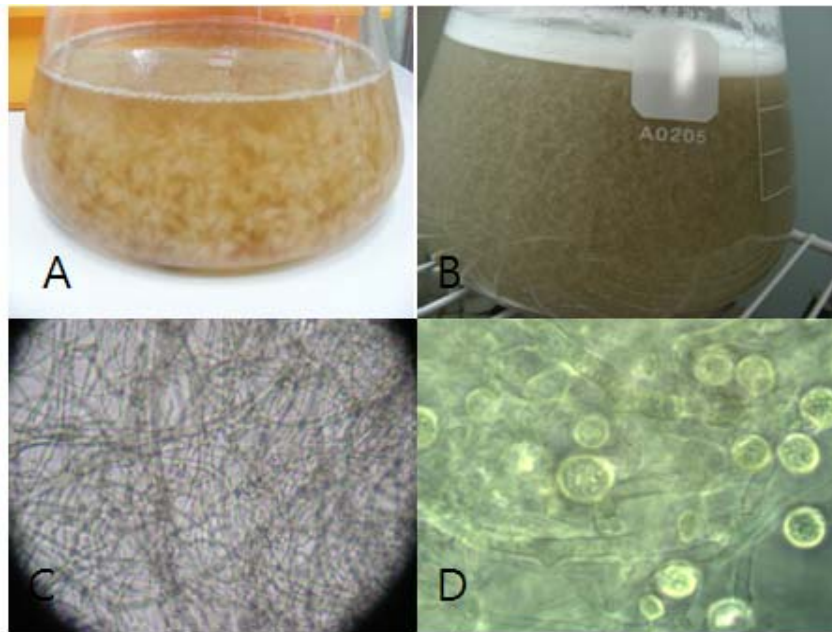


Fig. 16. Flask culture of chlamydospores(*Trichoderma* sp.)

A : 1st culture(mycelium growth), B : 2nd culture(chlamydospore culture)

C : mycelium($\times 100$), D : Chlamydospore($\times 1,000$)

(라) *Trichoderma* sp. 의 대량배양 최적화 연구

Trichoderma sp. 균주를 이용하여 300L에 배양 최적화를 실시하였다. 배양조건은 26℃로 배양하여 Aeration은 180L/min로 조절하고, 발효조 내의 용존산소(DO)는 aeration과 agitation을 이용하여 30% 이상으로 유지하였다. 배양 중 발효조 내 압력은 0.3bar로 유지하였다. 그 결과, 당의 함량은 배양 48시간 후에는 2.5 g/L, 54시간후에는 1.5g/L 70시간 이후에 0 g/L로 되었다. 따라서, 배양 후 70시간 이후에 후막포자 형성용 배지를 넣고, 192시간 동안 포자의 농도를 관찰한 결과, 그림 와 같은 결과를 얻었다. 후막포자의 경우에는 168시간 이후부터 2.2×10^6 cfu/ml을 유지하고 있었으며, 분생포자의 경우에도 168시간 이후부터 3.1×10^7 cfu/ml을 유지하고 있었다. 따라서, 최적의 배양시간은 168시간 이후로 조사되었다.

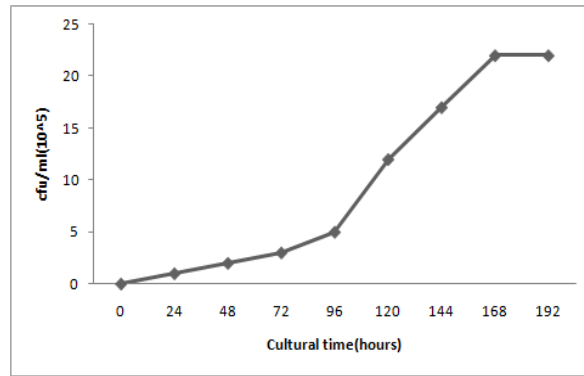


Fig. 17. Change of Chlamydo-spore for cultural time

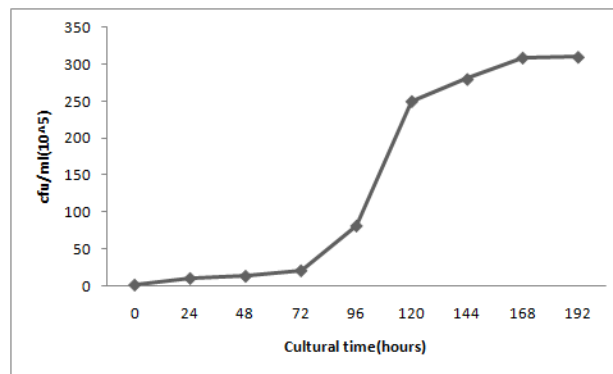


Fig. 18. Change of conidia for cultural time

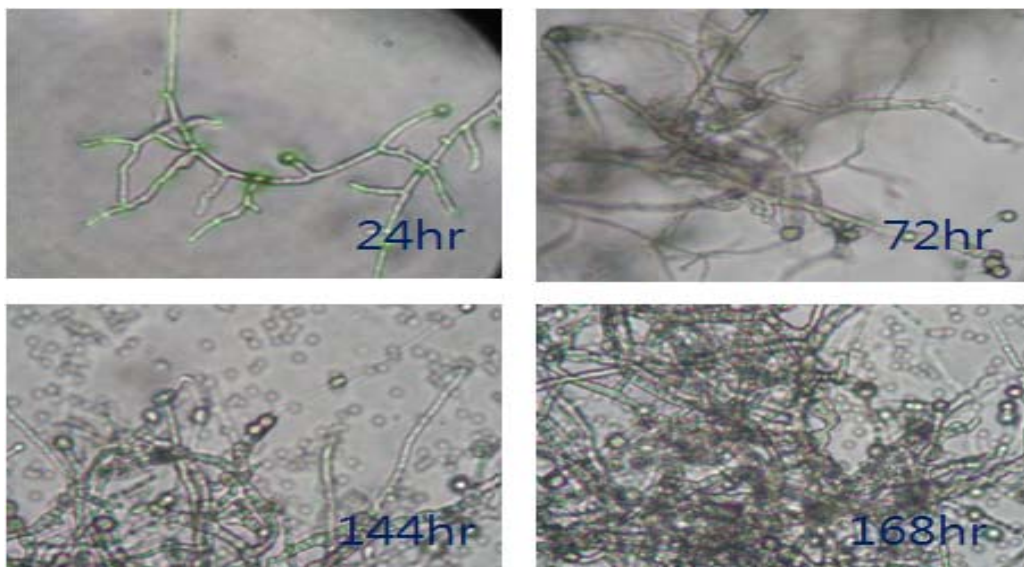


Fig. 19 . Spore of *Trichoderma* sp.

또한, *Trichoderma* sp.의 경우에는 펠렛형태의 균사로 되어 있으므로, 균질화가 필요하다. 따라서, Homogenizer를 이용하여 균질을 하였으며, 균질 후 포자를 수거하기 위해서, 원심분리기를 통해서 포자 수거하였다. 그 결과, 그림에서 보는 바와 같이, 7,500rpm으로 조절하여, 180L 배

양으로 3.2kg의 포자 및 균사를 수거하였다. 후막포자의 농도는 1.8×10^8 cfu/g 으로 조사되었으며, 분생포자의 경우에는 2.1×10^9 cfu/g으로 관찰되었다. 이렇게 수확된 포자를 가지고 건조작업을 실시하여, 제형화에 사용할 예정이다.



Fig. 20. Homogenizer and centrifuge works

3. 개발된 제품의 제형화 확립

가. 연구 내용

본 연구에서는 제품에 대한 효과를 증진시키기 위한 첨가제 선발로서, *Trichoderma* sp.의 포자의 분산성 및 안정성을 증진시킬 목적으로 최적의 보호제와 분산제를 선발하였으며, 포자가 발아되기 위한 발아촉진제를 선발하기 위해 최적의 보습제를 선발하여 유효성분인 길항미생물의 피해를 최소화하며 효과를 증진시키고자 하였다.

(1) *Trichoderma* sp. 의 제형화 조건 확립

(가) 보호제 선발

제형화의 다양성을 확보하기 위해 배양액을 건조하여야 하며, 이때 필요한 보호제를 선발하기 위해 실험을 실시하였다.

Trichoderma sp, 의 최적배지를 이용하여 최적배양 조건으로 생산된 배양액을 이용하여, homogenizer(NIHONSEIKI KAISHA AM-12, RPM : 1,000)로 10초간 homogenization 한 후 미생물 건조 시 많이 사용하는 Celite, 옥수수전분, Glucose를 10 ~ 50%(W/V)를 혼합하여 건조방식을 동결건조방식과 열풍건조 방식으로 진행하였다. 동결건조는 Ilshin Lab용 동결건조기를 사용하였으며, -70℃에서 예비 동결을 한 후 동결건조 시스템에 의해 건조를 수행하였다. 열풍건조는 Hot-air dryer(Jisico J-300M, 2000) 55℃에서 48시간동안 완전히 건조한 후 PDA배지에 희석평판법으로 생균수를 측정하였다.



Fig. 21 Freeze dryer & Hot-air dryer

(나) 분산제 선발

농업용으로 사용되는 여러 종류의 비이온 계면활성제 중 565P(nonylphenol ethoxylated phosphate ester), TDE-7(Polyoxyethylene tridecyl ether), MK-SMO(sorbitan monooleate,) MK-COG15(castor oil ethoxylated), WP280B(Polyoxyethylene octadecyl mono ether)를 농도별로 5, 7.5, 10, 12.5, 15% (w/v)로 처리하였다. 포자액과 혼합한 뒤 포자의 분산정도를 Hemocytometer를 이용하여 현미경 (x400)에서 확인하였다.

(다) 보습제 선발

독성이 없는 다양한 종류의 보습제 중 Collagen, Cellogen, Sodium PCA를 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0%(W/V)를 배양액과 혼합하여 실내선별 시험을 진행하였다. 슬라이드 글라스 위에 얇은 PDA 배지층을 만들고 여기에 서로 다른 농도의 보습제가 들어있는 포자액(3.1×10^7 cfu/ml)을 접종한 뒤 자연건조 시키고 현미경을 이용하여 48시간 동안 포자의 발아수를 확인하였다.

(라) *Trichoderma* sp. 의 경시 안정성 검정

제품의 안정성을 확인하기 위해 총 2종류의 제품으로 경시변화를 확인하였다. 먼저, *Trichoderma* sp.의 최적배지로 이용하여 최적배양 조건으로 만든 액상제품과 위의 실험에서 선발된 부형제(분산제, 보습제 등)를 바탕으로 *Trichoderma* sp. 동결건조와 혼합하여 만든 수화제로 제작하였다.

경시변화 검사는 일반적으로 은박봉투에 시료를 밀봉하여 RT, AT, CT에 각각 보관하여 4주, 8주, 12주 후 검사한다. 여기서 40℃ 4주, 8주, 12주 후의 감소율은 상온 조건하에서 1년, 2년, 3년으로 간주하는 것이 농약 원제 실험에서 통상적인 방법이다. 따라서, 생균수의 감소도 이에 준하여 실험을 하였으나, 40℃에서 4주가 꼭 상온에서 1년을 의미하지는 않는다.

- RT(room temperature) test : 상온에 시료를 보관하여 일정시간 후 검사.

- AT(aging temperature) test : 40℃나 50℃에서 시료를 보관하여 일정 시간 후 검사.
- CT(cooling temperture) test : 영하 10℃로 시료를 냉동고에서 저온 보관하여 일정 시간 후 검사
선발된 *Trichoderma* sp. 제형화의 경시 안정성 검사를 위해 40℃, 25℃와 -10℃에 각각 보관하면서 매달 동일한 날짜에 *Trichoderma* sp. 포자의 생균수를 PDA배지에서 희석평판법으로 조사하였다.

(마) 다른 미생물과의 상호관계 규명 및 토양내 생존율 측정

1) 다른 미생물과 추출물, 농약과 혼용사용 여부 확인

길항미생물인 *Trichoderma* sp.의 효과를 극대화하기 위한 다른 미생물과의 혼용사용 여부를 확인하기 위해 국내에서 주로 사용하고 있는 *Bacillus subtilis* 와의 대치배양을 실시하였다. *Trichoderma* sp. 5mm 균총 disc와 각 세균은 5mm paper disc에 0.1ml을 50mm거리에 PDA 배지에 접종하여 25℃에서 5~7일간 대치 배양하여 Clean zone 생성 여부를 확인하였다.

또한, 국내 농업인들은 대부분 미생물제제를 단독으로 사용하지 않고, 편리성 때문에 다른 추출물과 농약을 혼용하여 사용하고 있는 실정이다. 따라서, Table 5.에 보는 바와 같이 농민이 주로 사용하는 추출물 및 농약을 선별하여 혼용여부를 확인하였다.

Trichoderma sp. 의 포자와 추출물 및 농약을 50%정도 혼합하여 실시하고, 1주~4주까지의 변화상을 관찰하였다. 매주 동일한 일자에 *Trichoderma* sp. 포자의 생균수를 PDA배지에서 희석평판법으로 조사하였다.

Table 5. Several type of chemical (pesticide) & extract agent

구분	제품명	제품형태	유효성분	적용해충
화학농약 (살충제)	팬텀(영일케미컬)	WP	후파니코티닐계	총채벌레, 가루이
	선충탄(동부한농)	Granule	유기인계	뿌리혹선충
	에이팜(신젠타)	EC	Emanectin benzoate	아메리카잎굴파리
	코니도(바이엘크롭사이언스)	WP	클로로니코티닐계	진딧물
	모스피란(경농)	WP	클로로니코티닐계	진딧물
	뉴명가(동부한농) 럭비(아그로텍)	Granule Granule	클로로니코티닐계 유기인계	진딧물 뿌리혹선충
추출물 (농자재)	불가사리(FM애그텍)	Liquid	-	-
	EM바이오(EM바이오)	Liquid	-	-
	식물성 아미노산	Liquid	-	-
	프로폴렉스	WP	-	-
	팜2000	Liquid	-	-

2) 토양내 생존율 측정

Trichoderma sp.의 토양 처리 시 활성을 조사하기 위해 생존율을 측정하였다. GMYP(Glucose 1%, Malt 0.5%, Yeast 0.5%, Peptone 0.5%, KH₂PO₄ 0.5%, Water 1L) 배지에서 25℃ incubator에서 20일간 배양한 배양액을 1.3*10⁶ cfu/ml로 포자 농도를 조절하였다. *Trichoderma* sp.의 토양내 생존율이 작물의 생육에 미치는 영향을 파악하기 위해, 강원도 춘천시 소재 강원대학교의 농업

생명과학대학의 실험농장의 토양을 이용하여 \varnothing 18cm×14.5cm pot에 토양을 증진하고, Tray에서 30일 정도 키운 배추(불암3호, 동부팜농)를 정식하였다. *Trichoderma* sp. 배양액을 250배로 희석하여 정식 전에 뿌리 침지를 실시하고(1분간 침지), 이식 후에 pot 당 50ml씩 1회 표면 살포 처리 하였다. 처리 후 2주 단위로 표면으로부터 10cm 깊이의 pot 토양을 약 10g 채취하여 곰팡이는 PDA 배지, *Trichoderma* sp.는 Malt Extract Agar(MEA)에 항생제로 Chlorotetracyclin을 20 μ g/L 첨가한 배지, 일반세균은 TSA 배지, 방선균은 Actinomycetes Isolation Agar(AIA)배지에 같은 방법으로 토양을 채취하여 평판희석법에 의해 조사하였다. 작물은 엽장, 엽폭을 측정하였다.

(2) *Trichoderma* sp. 의 시제품 제조 및 비료등록 추진

분산제, 보습제를 이용하여 제형화를 위해서는 유효성분의 안정적인 효과와 효과증진용 첨가제가 제대로 효과를 발휘하여야 한다. 즉, 제품 내에서 안정성을 유지하여야 하며, 효과증진용 첨가제와 제품 내에서 물성에 대한 충돌 없이 안정성이 요구되어진다. 따라서, 본 시험에서는 유효성분과 효과증진용 첨가제의 제품 내 안정성을 확보하기 위해 *Trichoderma* sp. 분말과 효과증진용 첨가제인 분산제(WP280B), 보습제(Sodium PCA)를 혼합하고, 안정제 및 물성조정제로서 농업용으로 사용되는 다양한 비이온 계면활성제를 농도별로 혼합하여 온도변화에 따른 물성변화, 침전현상, 층 분리 여부, 점성 등을 관찰하고 최적의 제제화용 첨가제를 선발하였다. 또한, 비료 등록을 하기 위해서, *Trichoderma* sp.와 제 1 세부과제에서 *Paenibacillus polymyxa*를 가지고 제작한 시제품을 가지고 비료등록을 추진하였다.

나. 연구 결과

(1) *Trichoderma* sp. 의 제형화 조건 확립

(가) 보호제 선발

제형화하기 위한 배양액의 건조과정에서 온도 변화 및 탈수 과정에서의 포자의 damage를 줄이기 위해 당 성분의 보호제 종류별 건조 실험을 진행하였다. 포자 수는 2.1×10^9 cfu/g 을 이용하여 보호제와 혼합하여, 실험한 결과 동결건조 방식 보다는 열풍건조 방식으로 진행시 포자가 더 안전하다는 사실을 알 수 있었다. 또한, 3가지 보호제 중 Celite가 건조 시 보호제로 적합한 것으로 나타났다. 보호제 없이 배양액을 건조 시켰을 경우 99% 이상의 감소율을 보였다. Celite 20%를 혼합하여 건조 시킬 경우 포자의 감소율이 20% 이하 였으며, Corn starch와 glucose의 경우 50%의 감소율을 보여 건조 간의 포자 보호에 적절치 않은 것으로 나타났다. 또한, 동결건조 방식에서는 Glucose가 안전한 것으로 조사되었다.

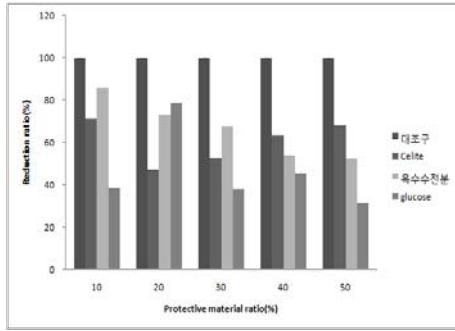


Fig. 22. Reduction ratio of spore using Freeze dryer.

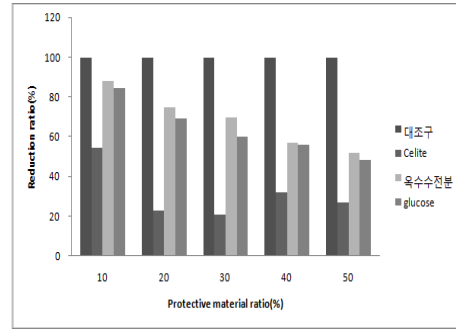


Fig. 23. Reduction ratio of spore using Hot-air dryer.

(나) 분산제 선발

미생물 등을 이용한 제품 제조 시 길항미생물 포자는 여러 개가 뭉쳐 있게 되며, 이 상태로 대상 병원균에 처리할 경우, 포자가 병원균이나 작물 표면에 고르게 접촉하지 못하여 방제가가 낮아질 수 있다. 따라서, 본 시험에서는 미생물 농약을 물에 희석할 때 포자의 분산성을 높여 주고, 포자의 wetting력을 증진시켜 소수성을 갖고 있는 병원균 표면에 포자가 효율적으로 묻을 수 있도록 하기 위한 분산제를 선발하고자 하였다.

본 시험에서는 미생물 제품을 물에 희석할 때 포자의 분산성을 높여주고, 병원균이나 작물 표면에 포자가 효율적으로 묻을 수 있도록 하기 위해 분산제 선발 실험을 진행하였다. 실험 결과 Table 6.에서 보는 바와 같이, WP-280B 10% 이상에서 포자의 분산성이 가장 좋은 것으로 조사 되었으며, 보습력도 가장 좋은 것으로 조사되었다. 이는 *Bacillus subtilis*를 이용한 다른 연구에 나와 있는 결과와 비슷한 양상을 보이고 있었으나, *Trichoderma*에는 WP280B가 가장 우수한 분산제로 조사되었다.

Table 6. Dispersibility of dispersing agent type & concentration

Type	Number of spores					Wetting	Dispering degree
	5%	7.5%	10%	12.5%	15%		
565P	10.33±0.58	9.33±0.58	8.00±1.00	7.33±1.53	6.67±1.53	++	++
TDE-7	7.33±1.55	5.33±0.58	4.67±1.55	2.67±0.58	2.33±1.15	+++	+++
MK-SMO	24.33±3.51	21.00±1.00	16.67±1.53	14.00±1.00	12.00±2.00	+	+
MK-COG15	17.00±1.00	15.33±0.58	14.33±2.08	14.00±1.00	13.33±1.53	+	+
WP280B	6.33±0.58	4.67±0.58	2.33±0.58	2.00±1.00	1.67±1.15	+++	+++

* +++ : 매우우수, ++ : 우수, + : 양호

(다) 보습제 선발

일반적으로 잎의 표면은 길항미생물이 발아하기 위한 습도 조건이 아니기 때문에 포자의 발아율이 높지 않은 것으로 알려져 있다. 병원균이나 작물의 잎에 분사된 포자 주위의 습도를 높여줌으로써 포자발아를 촉진시킬 수 있는 보습제 선발 실험을 진행하였다. 실험 결과 Sodium

PCA 0.5% 이상부터 포자 발아효과가 좋은 것으로 확인 되었으며, 또한, *Bacillus subtilis*를 이용한 다른 연구에 나와 있는 결과와 비슷한 양상을 보이고 있으며, 보습제로써 Sodium PCA가 우수한 것으로 조사되었다.

Table 7. Number of spore by humectant type & Ratio

Type	Ratio (%)	Number of Spores (10 ⁵ cfu/g)
Control	-	1.1±0.2
Collagen	0.1	24.00±3.61
	0.2	27.33±1.53
	0.5	29.67±1.53
	1.0	30.67±2.08
	2.0	32.33±2.52
	5.0	31.33±2.89
Cellogen	0.1	13.67±2.52
	0.2	14.33±2.08
	0.5	15.33±2.08
	1.0	16.67±1.53
	2.0	18.33±0.58
	5.0	19.33±2.08
Sodium PCA	0.1	73.33±1.53
	0.2	79.00±1.73
	0.5	100.67±1.15
	1.0	99.67±1.53
	2.0	100.00±1.73
	5.0	100.67±1.15

(라) *Trichoderma* sp. 의 경시 안정성 검정

Trichoderma sp. 2가지 제품의 경시변화를 알아본 결과, 액상(liquid)의 경우에는 4주 후에 50%로 감소되는 현상을 보였으나, 이는 액상포장 시 외부 공기로부터 완전히 차단된 장소에서 포장을 하지 않아 외부의 오염균(세균)이 발생하여 *Trichoderma* 원균의 성장을 방해한 것으로 추정된다.

이런 문제점을 해결할 필요성이 있으며, 또한, 외부로부터 차단된 장소에서 제품을 포장해야 안정성이 높아지는 것으로 보인다.

수화제(wettable powder)의 경우에는 액상에 비해 비교적 안정성을 유지하고 있으며, 특히, 40℃에서 12주가 지난 후에도 20% 이하의 감소율을 보이고 있다. 또한, 상온 및 -10℃에서도 지속적으로 안정성을 보이고 있다. 따라서, 앞으로 *Trichoderma*의 제형형태는 수화제(Powder type)으로 선정하는 것이 좋을 듯하다.

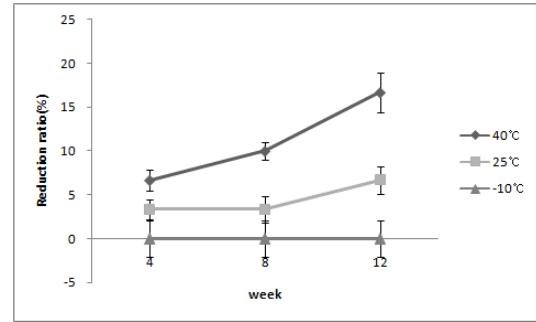
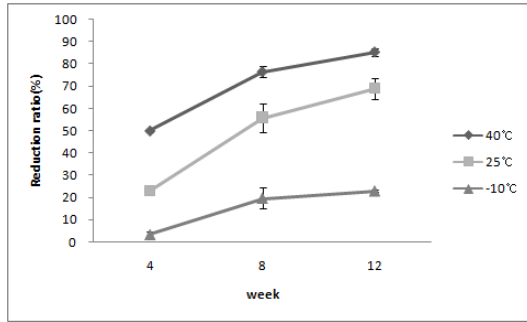


Fig. 24. Reduction ratio of Liquid agent. Fig. 25. Reduction ratio of wet table powder.

(마) 다른 미생물과의 상호관계 규명 및 토양내 생존율 측정

1) 다른 미생물과 추출물, 농약과 혼용사용 여부 확인

국내에서 판매되고 있는 미생물제제를 조사하여 가장 많이 사용하는 *Bacillus subtilis*와의 대치배양 결과, Fig. 26에서 보는 바와 같이, *Trichoderma* sp.의 균주가 생장에 방해를 받는 것으로 조사되었다. 또한 다른 연구에서도 *Bacillus* sp.의 경우에는 *Trichoderma* sp.의 생장을 방해한다는 결과도 보고된 바 있다. 따라서, *Trichoderma*의 경우에는 *Bacillus subtilis*와의 혼용이 불가능 할 것으로 보인다.

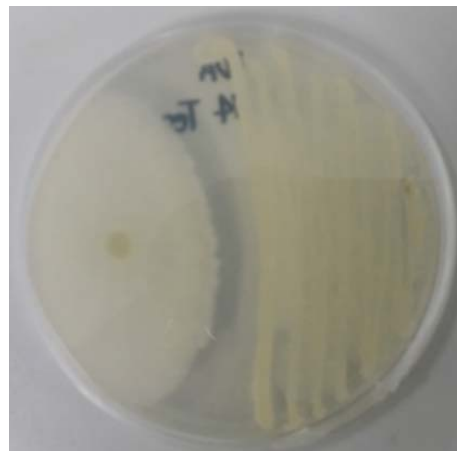


Fig. 26. In vitro inhibition of *Bacillus subtilis* by *Trichoderma* sp. on PDA media.

그리고, 추출물과 화학농약(살충제)와의 혼용결과에서는 Fig. 27에서 보는 바와 같이, 에이팜(WP)의 경우에는 100% *Trichoderma*의 포자가 사멸하는 것으로 조사되었으며, 팸텡(WP), 선충탄(Gr)의 경우에는 *Trichoderma*에 큰 영향을 미치는 것으로 조사되었다. 이는 살충제로 사용하고 있으며, *Trichoderma*의 경우에는 토양미생물로서, 선충탄과 같이 혼용시 미생물의 성장이 저해 될 것으로 조사 되었다. 제일 안전한 화학농약의 경우에는 뉴명가(GR)로 동부한농에서 나온 제품으로 유효성분은 clothianidin계의 약제로 진딧물 등을 방제하는데 쓰이는 약제이다. 이는 20% 이하의 감소율을 보였다. 또한, 추출물(농자재)의 경우에는 Fig. 28에서 보는 바와 같이,

대부분 20% 이하의 감소율을 보이고 있으며, 프로플렉스(WP)와 EM바이오(Liquid)의 경우에는 4주차 이후부터 20% 이상의 감소율을 보이고 있다, 특히, 프로플렉스(WP)의 경우에는 2주차부터 20% 이상의 감소율을 보이고 있다.

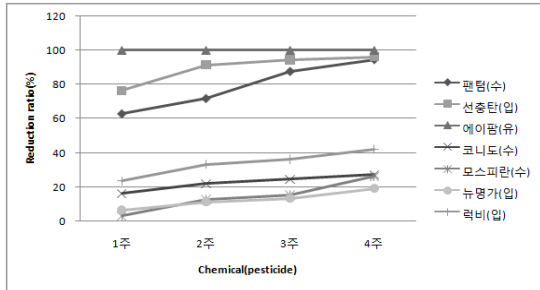


Fig. 27. Effect of chemicals(pesticide) on *Trichoderam* sp.

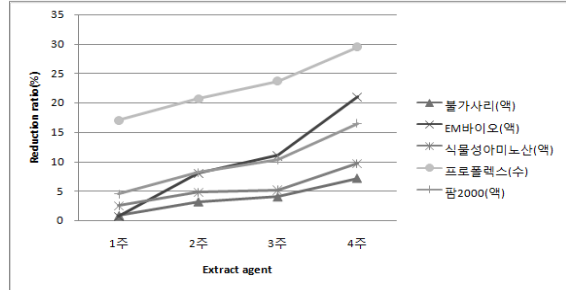


Fig. 28. Effect of extract agents on *Trichoderam* sp.

2) 토양 내 생존율 확인 실험

Trichoderma sp.가 배추에 미치는 영향과 토양내의 생존율을 알아보기 위해 토양에 존재하는 총균수와 균종 별 밀도를 조사하여 수적인 변화 및 배추의 생육 정도를 측정된 결과는 Fig. 29 과 Table 8.에서 나타났다. *Trichoderma* sp.를 처리하지 않은 토양에서는 미생물이 감소하는 것을 볼 수 있었으며, 처리구에서는 Bacteria 및 Fungi가 증가하는 것으로 조사 되었다. 또한, *Trichoderma*의 경우에는 대조구에 비해, 6주 경과 후에 34배 정도가 증가하는 것으로 조사되었습니다. 또한, *Trichoderma* 수와 비교하였을 때, 작물의 생육이 엽장은 125%, 엽폭은 114% 정도 증가하는 것으로 보아, *Trichoderma* 와 작물의 생육에 밀접한 관계가 있는 것으로 조사되었다.

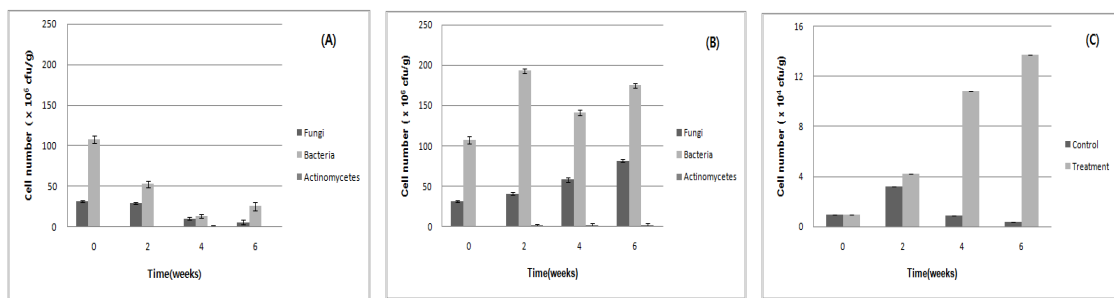


Fig. 29. Change in number microorganisms in the soil after (A) Control, (B) Treatment, (C) *Trichoderma* sp.

Table 8. Change in cabbage growth test

	Leaf length(cm)	Leaf width(cm)
Control	19.07±0.7	12.07±1.6
Treatment	23.87±1.3	13.80±1.1
Ratio(%)	125	114

(2) *Trichoderma* sp. 의 시제품 제조 및 비료등록 추진

제품의 물성을 양호하게 하는 증량제로써, 카오린을 사용하였으며, 유효성분의 침전, 층 분리 등 물성에 변화가 없는 것으로 나타났다. 또한, 유성성분의 안정화를 위한 제제로는 분산제(WP280B), 보습제(sodium PCA)를 각각 10%와 0.5%를 혼합하였을 때, 물성의 변화 없이 안정적인 물성을 보이는 것으로 나타났다. 이렇게 하여 선발된 첨가제와 유효성분 등을 이용하여 시제품을 제조하였으며, 배합비율은 Table 9.과 같다.

Table 9. Formulation of *Trichoderma* sp.

구분	원료명	투입비율
유효성분	<i>Trichoderma</i> sp. 분말	10
효과증진용 첨가제	분산제(WP280B)	10
	보습제(Sodium PCA)	0.5
제제화용 첨가제	카오린	79.5

또한, *Trichoderma* sp. 와 제 1세부과제에서 제작한 *Paenibacillus polymyxa*를 이용한 시제품을 토양미생물제제로 비료 등록 완료하였으며, 제 강원 춘천 21-가-20301 호를 부여받았다.



4. *Trichoderma* sp.의 효과 검증

가. 연구 내용

본 연구에서는 개발하고자 하는 *Trichoderma* sp.의 효과를 알아보기 위해, 원균에 대한 식물병원균과 대치배양을 통해서 길항력 실험을 실시하였으며, *Trichoderma* sp.의 종자에 미치는 영향을 알아보기 위해 기내 발아율 실험을 확인하였다. 또한, 작물에 미치는 영향을 알아보기 위해서, 다양한 작물을 통해서 실내실험 및 포장실험으로 효과를 확인하였다.

(1) *Trichoderma* sp. 의 실내 효과 실험

(가) *Trichoderma* sp.의 식물병원균에 대한 길항력 Test

Trichoderma sp.가 항균활성 있는지를 조사하기 위하여 식물병원균인 *Botrytis cineria* 등 13종을 농촌진흥청 농업미생물과 및 KCCM(한국미생물보존센터)에서 분양받아 사용하였다. *Trichoderma* sp. 와 식물병원균을 동시에 각각 5mm 균총 disc를 50mm거리에 PDA배지에 접종하여 25℃에서 5~7일간 대치 배양하여 항균력을 조사하였다.

(나) 각 작물별 식물생장촉진 Test

1) 종자발아에 미치는 영향평가

최종 선발된 *Trichoderma* sp. OK-1 균주의 액체배양액을 숙주 및 콩나물 종자에 처리하여 종자발아율에 대한 영향을 평가하였다. 즉 GMYP 배지에서 15일간 배양한 배양액을 500배 희석하여 희석된 배양액 100ml에 숙주 및 콩나물 종자 각 100개씩에 숙주는 4시간 정도, 콩나물은 20시간 정도 침지한 후 25℃에서 5일간 발아된 종자수를 조사하였다. 대조구로는 일반물을 사용하여 위의 방법과 동일하게 처리하였다.

2) 상추 생육 실험

작물의 생육에 미치는 영향을 알아보기 위해 \varnothing 31cm × 27cm 이식에 흥농바이오 상토를 충진하고, Tray에서 20일 정도 키운 상추(적치마) 육묘를 포트에 정식하였다. GMYP 배지에서 배양된 *Trichoderma* sp. OK-1 배양액을 250배, 500배, 1,000배 희석하여 정식 전에 뿌리 침지를 실시하고(1분간 침지), 이식 후에 포트 당 100ml씩을 1회 관주처리 하였다. 처리 후 1달 정도 후에 엽장, 엽폭, 엽수, 뿌리길이, 생중량(지상부)을 측정하였다.

3) 잔디 생육 실험

잔디의 생육에 미치는 영향을 알아보기 위해 15cm × 20cm Tray에 홍농바이오 상토를 충전하고, 각 tray에 건국대학교 잔디연구소에서 분양받은 잔디종자(켄터키블루그라스)를 50개 정도 파종하였다. GMYP 배지에서 배양된 *Trichoderma* sp. OK-1 배양액을 500배, 희석하여 종자를 1분 정도 침지 후에 파종 하고나서 Tray 당 25ml씩 1회 표면 살포처리 하였다. 1주일 단위로 2달 정도 성장길이를 측정하였다.

4) 열무/감자 생육 실험

열무의 생육에 미치는 영향을 알아보기 위해 Ø 31cm × 27cm 이식에 홍농바이오 상토를 충전하고, Tray에서 30일 정도 키운 열무(홍농종묘) 육묘를 포트에 정식하였다. GMYP 배지에서 배양된 *Trichoderma* sp. OK-1 배양액을 500배 희석하여 정식 전에 뿌리 침지를 실시하고(1분간 침지), 이식 후에 포트 당 100ml씩을 1회 관주처리 하였다. 처리 후 1달 정도 후에 생체중을 측정하였다.

감자의 경우에는 Ø 31cm × 27cm 이식에 홍농바이오 상토를 충전하고, 강원도 고령지농업연구소에서 분양받은 씨감자를 활용하였다. 위의 열무의 실험과 동일하게 처리하였으며, 처리 후 4개월 정도 후에 생체중을 측정하였다.

(2) *Trichoderma* sp. 의 포장 효과 실험

상기에서 개발된 제형 최적의 formulation을 이용하여 포장에서 실증시험을 실시하였다. 시작품의 최종밀도는 후막포자 3.0×10^6 cfu/g과 분생포자 2.0×10^8 cfu/g이 되도록 제조하였다.

(가) *Trichoderma* sp.를 이용한 상추 생육촉진에 미치는 효과 실험

본 연구에서는 *Trichoderma* sp.의 작물에 미치는 영향을 알아보기 위해, 250배, 500배로 희석하여 엽채류인 상추(적치마)를 대상으로 실험을 실시하였다. 시험기간은 1달정도 실시하였으며, 시험장소는 충남 부여군 농가 하우스 및 논산시 농가 하우스에서 실시하였다. 실험은 총 300m²에 난괴법 3반복으로 실시하였으며, 정식직전 각 희석배율로 상추작물 100주 정도 뿌리부분을 3분 정도 침지한 후 정식하여 1L/m²로 토양에 1회 관주처리 하였다. 조사항목은 엽장, 엽폭, 엽수, 엽록소 함량(SPAD), 뿌리길이, 생중량(지상부, 지하부)을 측정하여 생육효과를 확인하였다. 조사방법은 농진청 발간 “농사시험연구조사기준”에 준하여 조사하였다. 또한, 식물체의 비해유무 달관조사 방법으로 비해시험을 실시하여 비해유무를 확인하였다. 마지막으로 토양에 대한 안전성을 확보하기 위해, 농촌진흥청 비료의 품질검사 방법에 준하여 토양의 유해성 검사를 실시하였다.

(나) *Trichoderma* sp.를 이용한 인삼 생육촉진에 미치는 효과 실험

본 연구에서는 *Trichoderma* sp.의 작물에 미치는 영향을 알아보기 위해, 250배로 희석하여 2년근 인삼(재래종)을 대상으로 실험을 실시하였다. 시험기간은 3개월 정도 실시하였으며, 시험장소는 충남 금산군 인삼포 및 대전시 유성구 세동 인삼포에서 실시하였다. 실험은 총 180m²에 난괴법 3반복으로, 1년근 묘삼을 공주 묘삼 재배농가에서 구입하여 칸당 7행 10열 70본을 20cm 재식거리로 이식하여 재배하였고, 관행재배에 준하여 실험을 실시하였으며, 처리방법은 묘삼 완전 개엽 후 7일 간격으로 5회, 1m² 당 본제 4g을 1L의 물에 녹여 경엽 살포하였다. 조사항목은 지상부와 지하부를 측정하였으며, 농진청 발간 “인삼 GAP 표준재배 지침서-농사시험 연구조사기준” 준하여 실시하였다.

(다) *Trichoderma* sp.를 이용한 잔디에 미치는 효과 실험

잔디에 발생하는 병해의 종류는 유해생물에 의한 전염성 병해와 물리적, 화학적 원인에 의한 비전염성 병해로 크게 나눌 수 있다. 식물의 전염성 병해에는 사상균에 의한 곰팡이병이 가장 많고, 그 외에 바이러스병, 세균병 등이 다소 있다. 골프장의 잔디에는 한국잔디류(*zoysiagrass*), 한지형 잔디류(*cool-season grass*) 모두에 사상균(곰팡이)에 의한 병이 압도적으로 많으며 그 외에 세균성 위조병과 바이러스에 의한 병해가 간혹 발생하는 것에 불과하다. Couch에 의하면 세계적으로 잔디에 발생하는 병해의 종류는 64종에 달하며 이에 관여하는 병원균은 90여종이 있는 것으로 보고하고 있다. 이들 중 세균에 의한 세균성 위조병(*Bacterial wilt*)과 바이러스병(*Virus*)을 제외하고 나머지는 모두 사상균(*Fungus*)에 의한 병해이다.

우리나라 골프장에 발생하는 중요한 병해는 약 20여종이 있으며 여기에 관련된 병원균은 *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Sclerotinia*, *Agaricus*, *Typhula*, *Colletotrichum*, *Puccinia*, *Curvularia*, *Helminthosporium* 등이 있다(표1). 이처럼 우리나라 골프장에 발생하는 병해의 종류가 외국에 비하여 적은 것은 대부분의 골프장이 잔디병해에 저항성이 매우 강한 한국잔디로 구성되어 있기 때문이다. 반면에 한지형 잔디를 위주로 조성된 외국의 골프장에 약 60여종의 다양한 병해가 발생하는 것은 한지형 잔디가 병해에 대한 내성이 매우 약하기 때문이다.

비전염성 병해로는 생물적인 요인으로 조류, 이끼류 등이 있고, 화학적 요인으로 농약에 의한 약해, 비료에 의한 비해, 동물의 배설물에 의한 장애, 영양결핍, 대기오염, 기름유출 등이 있고, 물리적 요인으로 온도장애(고온, 저온 장애), 물과 얼음에 의한 장애, 낮은 토심에 의한 건조해, 답압장애, 대취축적, 조경수에 의한 장애 등이 있으며, 기계적인 장애로는 잔디깎기 장애, 스켈핑 등이 있다.

따라서, *Trichoderma* sp.의 잔디재배에서 발생하는 주요 병 방제효과를 검증하기 위하여 실내 배양시험과 포장시험을 동시에 실시하였으며, 포장시험은 한국잔디에서 가장 문제시 되는 라지패취병의 발생억제여부를 검증하기 위해 병발생이 빈번한 충남 계룡시 소재 계룡대체력단련장(골프장)의 증식포장에서 실시하였다.

1) Inhibition Zone(저지원) 시험 (실내배양시험)

Trichoderma sp.와 각각의 약제를 고시농도로 맞춘 후 디스크페이퍼에 충분히 적시고 PDA배지에 십자로(+) 치상한 후, 5일간 배양한 주요 잔디병원균인 *Sclerotinia homoeocarpa* (Dollar spot), *Rhizoctonia solani* AG1-1 (Brown patch), *Rhizoctonia solani* AG2-2(IV) (Large patch) 및 *Pythium* sp. (Pythium)을 각각 접종하여 25℃ Incubator에서 2~7일간 배양하여 균사성장량(억제정도)을 조사하였다. 대조약제(약제명, 유효성분량)로는 달라스팻(터부코나졸유제, 25%), 피시움블라이트(옥사프로수화제, 64%), 브라운패취 (지오판수화제, 70%), 라지패취(펜시쿠론수화제, 25%)를 각각 사용하였다.

2) 난지형잔디의 Large patch 방제 시험(포장시험)

잔디병에서 가장 문제시 되고 있는 Large patch는 잔디가 휴면에 들어가는 늦은 가을과 휴면에서 깨어나는 이른봄에 발생하는 것이 가장 일반적이다. 그러나 한 여름에도 장마기, 습한 지역, 음지 등에서 가끔 발생되기도 한다. 패취의 크기는 직경 약 60cm에서부터 6m에 이르기까지 매우 다양하게 나타나며 잔디밭에 발생하는 패취병 중에서 가장 크게 형성된다.

가을패취는 원형으로 병반의 가장자리가 밝은 오렌지색으로 변한다. 대취층에 함입되어 있는 엽신의 지제부에 적갈색 내지는 암갈색의 병반을 형성한다. 감염된 잔디의 줄기는 쉽게 뽑히고 엽신의 지제부가 하얗게 쭈그러져 고사하며 줄기의 표면에 갈색의 균사매트가 형성된다. 병반은 일반적으로 대취층 위의 지상부 잎 조직에는 발생하지 않는다. 병원균은 관부를 통하여 침입하고 지제부를 파괴시켜 영양과 물의 상부이동을 저해하여 결국 잎은 밝은 오렌지색으로 변하기 시작하여 고사한다. 발병에 좋은 환경조건이 지속되면 병세는 점점 악화되어 더 많은 줄기를 고사시키고 패취의 가장자리가 오렌지색으로 변하면서 점점 대형패취가 형성된다.

봄패취는 가을패취가 나타났던 지역과 동일한 지역에 다시 나타난다. 전년의 가을에 발생한 병반은 봄에 맹아가 되지 않거나 매우 늦으며, 4, 5월에 토양온도와 지상온도가 증가하고 이 시기에 강우가 있으면 패취의 가장자리에서부터 밝은 갈색으로 변하면서 확대된다. 활성중인 패취는 5월, 6월 내내 계속되다가 여름의 고온기(30℃이상)에는 억제되고 손상된 지역(패취)이 서서히 회복된다.

따라서, 포장에서의 *Trichoderma* sp.의 Large patch에 대한 효과를 알아보기 위해서, 한국잔디(들잔디)를 활용하여 실험을 실시하였다. 시험장소는 충남 계룡시 소재 계룡대체력단련장에서 실시하였으며, 2014년 6월~10월까지 4개월 정도 실험을 실시하였다. 대상 병원균으로는 Large patch(*Rhizoctonia solani* AG2-2(IV))를 활용하였으며, 각 골프장에서의 일반적인 관리방법(시비, 살수, 예초, 갱신 등)과 동일하게 실시하였고, *Trichoderma* sp. 처리구는 살균제를 살포하지 않고 자연적인 병 발생정도(억제정도)를 측정하였다. *Trichoderma* sp. 살포는 라지패취 방제처리는 7일 간격으로 처리구별 1 또는 2회씩 살포하였다. 처리면적은 2m×2m 면적에 난괴법 3반복 배치를 실시하였으며, 발병조사는 각 시험포장별 자연적으로 발병된 시기에 처리구별 발병율을 조사하였고, 잔디생육 조사는 건물중으로 측정하였다.

Table 10. Treatment for Large patch control test(Korean lawn)

처리구	<i>Trichoderma</i> sp.	살균제 Pencycuron 25%	처리횟수
무처리구	-	-	
처리구 1	250배	-	1회 처리
처리구 2	250배	-	2회 처리 (7일 간격)
대조 농약구	-	1,000배(1g/ℓ)	

주 1) 대조약제(살균제) : Pencycuron(라지패취 고시농약)

나. 연구 결과

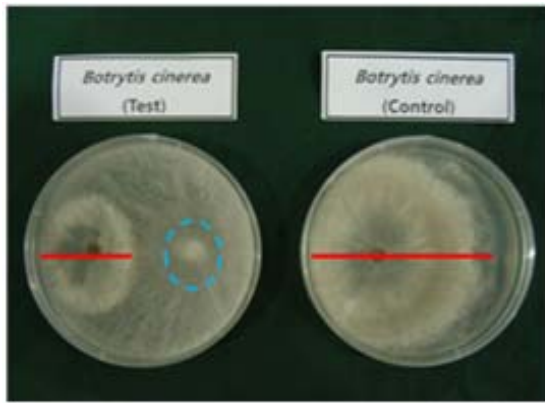
(1) *Trichoderma* sp. 의 실내 효과 실험

(가) *Trichoderma* sp.의 식물병원균에 대한 길항력 Test

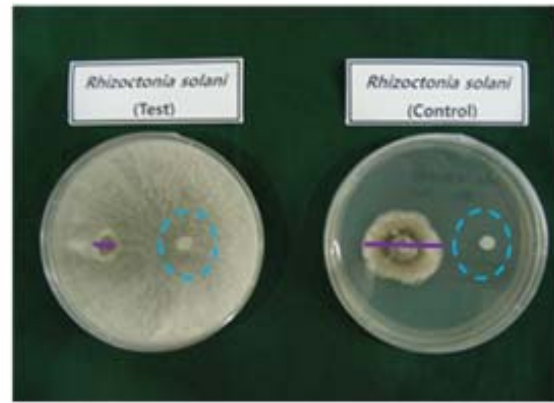
길항미생물인 *Trichoderma* sp.의 식물병원성 균에 대한 길항력을 테스트 하였다. Table 11.에 서 보는 바와 같이 평균 60%이상의 억제율을 갖는 것으로 조사되었다. 특히, 균핵병(*Sclerotinia sclerotiorum*) 및 마늘잎마름병(*Pleospora herbarum*)에 대해서는 90% 정도의 억제율을 보였으며, 잔디의 주요병 중에 하나인 *Pythium* spp. 의 경우에도 81.43%의 높은 억제율을 보였다.

Table 11. *In vitro* inhibition of Plant pathogen by *Trichoderma* isolates OK-1 on PDA media.

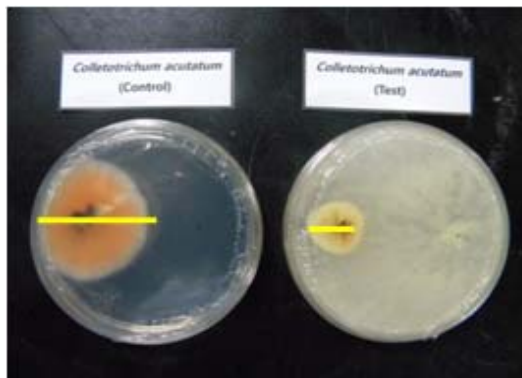
Plant Pathogen	Inhibition ratio(%)
<i>Botrytis cinerea</i> (젓빛곰팡이병)	73.6
<i>Rhizoctonia solani</i> (입고병 혹은 잘록병)	82.0
<i>Collectotrichum acutatum</i> (탄저병)	81.5
<i>Fusarium oxysporum</i> (시들음병)	73.3
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (균핵병)	90.0
<i>Fusarium graminearum</i> (밀붉은곰팡이병)	65.0
<i>Phytophthora cactorum</i> (역병)	87.9
<i>Phytophthora cambivora</i> (역병)	68.5
<i>Cylindrocarpon destructans</i> (뿌리썩음병)	78.0
<i>Pleospora herbarum</i> (마늘잎마름병)	95.3
<i>Pythium</i> spp.(Pythium 병)	81.4
<i>Fusarium fujikuroi</i> (키다리병)	66.67



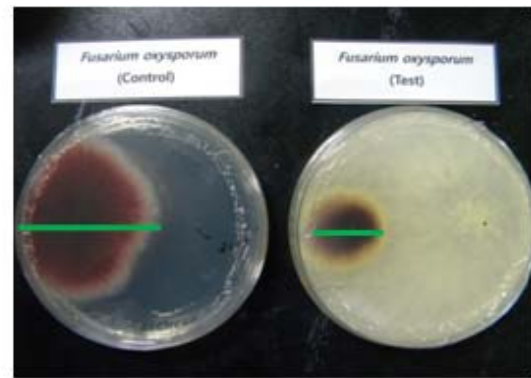
(A) *Botrytis cinerea*: Inhibition ratio 73.6%



(B) *Rhizoctonia solani* : Inhibition ratio 82.0%



(C) *Collectotrichum acutatum*: Inhibition ratio 81.5%



(D) *Fusarium oxysporum*: Inhibition ratio 73.3%

Fig. 30. Inhibition effect of Plant pathogen by *Trichoderma* sp.

(나) 각 작물별 식물생장촉진 Test

1) 종자발아에 미치는 영향평가

Trichoderma sp.의 침지에 따른 발아력은 (Table. 12)에서 보는 바와 같이 처리구에서 무처리구와 비교하여 발아일 수와 발아율에 있어서 월등히 우수한 조건을 확인 할 수 있었다. 또한, (Fig. 31)에서 보는 바와 같이 숙주와 콩나물의 경우 종자 자체에 붙어있는 세균등에 의해 발아 초기 부패가 일어나는 원인들을 발견할 수 있는데, *Trichoderma* sp. 접종 군에서는 부패균에 의한 종자의 훼손이 거의 없는 것으로 나타나 초기 발육 및 성장에 있어서 효과가 우수한 것으로 판단되었다.

Table 12. Germination test of Lentil sprouts and Soybean sprouts by *Trichoderma* sp.

		2days	3days	4days	5days	Final
Lentil	Control	23%	90%	94%	94%	94%
	Treat	40%	100%	100%	100%	100%
Soybean	Control	32%	90%	95%	100%	100%
	Treat	50%	100%	100%	100%	100%



Fig. 31. Germination promotion effect of Lentil sprouts and Soybean sprouts by *Trichoderma* sp. (Left : Lentil sprouts, Right : Soybean sprouts)

2) 상추 생육 실험

배양액을 250배, 500배, 1,000배 희석하여 상추의 생육 상태를 조사한 결과, 전체적으로 무처리구에 비해 생육촉진효과를 보이는 것으로 조사되었으며, 특히, 500배 희석액에서 지상부 및 지하부의 생장에 있어서 가장 우수한 것으로 조사되었다. 또한, 지상부중의 경우에는 무처리 대비 194% 증수효과를 보이는 것으로 조사되었다(Table 13).

Table 13. Plant promotion growth effect by isolates OK-1(*Trichoderma* sp.) on lettuce in greenhouse.

Treat method	Dilution ratio (times)	Leaf length (cm)	Leaf wide (cm)	Number of leaves (ea)	Root length (cm)	Shoot weight (g)	Root weight (g)
Soaking & Soil drench	1000	15.1b ¹⁾	7.9b	12.1a	8.7a	11.4b	4.7a
	500	15.9b	8.6b	13.9b	9.6b	14.0b	5.5b
	250	15.2b	7.7b	12.5a	8.5a	11.3b	4.8a
Control		13.5a	6.7a	11.4a	7.9a	7.2a	4.2a

1) Mean values indicated by the same letter in a column did not differ significantly at the 5% level by DMRT.

3) 잔디 생육 실험

잔디의 생육에 미치는 영향을 조사한 결과, 파종 후 2주차 이후부터 생육이 시작되었으며, 3주차 이후부터 Control에 비해 생육의 차이를 보이기 시작하였다. 최종 10주 정도 후에는 129% 정도의 생육 촉진율을 보였으며, Fig. 32에서 보는 바와 같이 발아율에서도 대조구에 비해 매우 우수한 결과를 보이고 있다.

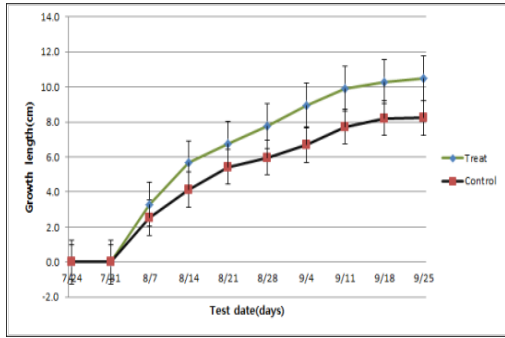


Fig. 32. Growth promotion effect of lawn (Kentucky bluegrass)



Fig. 33. Growth promotion effect of Lawn by *Trichoderma* sp.(Left : Control, Right : Treat)

4) 열무/감자 생육 실험

열무의 생육 상태를 조사한 결과, 무처리구에 비해 생육촉진효과를 보이는 것으로 조사되었으며, 생체중을 조사한 결과, 무처리 대비 122% 증수효과를 보이는 것으로 조사되었다(Table 14., Fig. 34). 또한, 감자의 경우에도 포트 당 평균 무게를 확인한 결과, 147%의 증수효과를 보이는 것으로 조사되었다(Table 15, Fig. 35).

Table 14. Young radish growth effect.

	Average fresh-weight(g/ea)	Index(%)
Treat	97.3	122
Control	79.7	-

Table 15. Potato growth effect.

	Average fresh-weight(g/pot)	Index(%)
Treat	345	147
Control	234	-



Fig. 34. Young radish test (Left : control, Right : Treat)



Fig. 35. Potato test (Left : control, Right : Treat)

(2) *Trichoderma* sp. 의 포장 효과 실험

(가) *Trichoderma* sp.를 이용한 상추 생육촉진에 미치는 효과 실험

상추의 생육증진 효과를 조사한 결과, 엽장의 경우, 최저 2.8%(논산, 500배 처리구), 최고 17.8%(부여, 250배 처리구)의 증가효과를 나타내었으며, 엽폭의 경우에는 최저 14.9%(부여, 500배 처리구), 최고 28.4%(부여, 250배 처리구)의 증가효과를 나타내었다. 또한, 엽수는 최저 9.6%(부여, 500배 처리구), 최고 51.2%(논산, 250배 처리구)의 증가효과를 나타내었으며, 엽록소 함량의 경우, 최저 15.4%(논산, 500배 처리구), 최고 31.3%(부여, 250배 처리구)의 증가효과를 나타내었다. 생체중의 경우에는 지상부중에서 최저 45.3%(논산, 500배 처리구), 최고 94.9%(부여, 250배 처리구)의 증가효과를 나타내었고, 지하부중의 경우에는 최저 3.9%(논산, 500배 처리구), 최고 31.0%(부여, 250배 처리구) 증가효과를 보였다. 뿌리길이는 최저 7.4%(논산, 500배 처리구), 최고 21.5%(부여, 250배 처리구)의 증가효과를 보이고 있었다. 비해시험 결과에서는 250배, 500배 처리구에서 대상작물인 상추에 대하여 비해 증상이 나타나지 않는 것으로 조사되었다. 토양의 유해성을 알아보기 위해, 크롬, 납 등의 총 8개 항목을 대상으로 실시하였으며, 결과는 안전하다는 결론을 얻었다.

Table 16. Effect of Leaf length on lettuce

구분	부여		논산	
	엽장(cm)	지수(%)	엽장(cm)	지수(%)
500배	15.2b ¹⁾	112.6	14.7a	102.8
250배	15.9b	117.8	16.5b	115.4
무처리구	13.5a	100.0	14.3a	100.0

주 1) 같은 문자끼리는 5%유의수준에서 DMRT 결과 유의차 없음.

Table 17. Effect of Leaf width on lettuce.

구분	부여		논산	
	엽폭(cm)	지수(%)	엽폭(cm)	지수(%)
500배	7.7b ¹⁾	114.9	7.4b	117.5
250배	8.6b	128.4	7.6b	120.6
무처리구	6.7a	100.0	6.3a	100.0

주 1) 같은 문자끼리는 5%유의수준에서 DMRT 결과 유의차 없음.

Table 18. Effect of Leaf Number on lettuce.

구분	부여		논산	
	엽수(개)	지수(%)	엽수(개)	지수(%)
500배	12.5a ¹⁾	109.6	10.9a	132.9
250배	13.9b	121.9	12.4b	151.2
무처리구	11.4a	100.0	8.2a	100.0

주 1) 같은 문자끼리는 5%유의수준에서 DMRT 결과 유의차 없음.

Table 19. Effect of chlorophyll content on lettuce.

구분	부여		논산	
	엽록소 함량 (SPDA)	지수(%)	엽록소 함량 (SPDA)	지수(%)
500배	19.0b ¹⁾	126.7	18.0b	115.4
250배	19.7b	131.3	19.7b	126.3
무처리구	15.0a	100.0	15.6a	100.0

주 1) 같은 문자끼리는 5%유의수준에서 DMRT 결과 유의차 없음.

Table 20. Effect of ground part weight on lettuce.

구분	부여		논산	
	지상부중(g)	지수(%)	지상부중(g)	지수(%)
500배	11.3b ¹⁾	156.9	10.9b	145.3
250배	14.0b	194.4	13.1b	174.7
무처리구	7.2a	100.0	7.5a	100.0

주 1) 같은 문자끼리는 5%유의수준에서 DMRT 결과 유의차 없음.

Table 21. Effect of underground part weight on lettuce.

구분	부여		논산	
	지하부중(g)	지수(%)	지하부중(g)	지수(%)
500배	4.8a ¹⁾	114.3	5.3a	103.9
250배	5.5b	131.0	6.4a	125.5
무처리구	4.2a	100.0	5.1a	100.0

주 1) 같은 문자끼리는 5%유의수준에서 DMRT 결과 유의차 없음.

Table 22. Effect of Root length on lettuce.

구분	부여		논산	
	뿌리길이(cm)	지수(%)	뿌리길이(cm)	지수(%)
500배	8.5a ¹⁾	107.6	8.7a	107.4
250배	9.6b	121.5	9.4b	116.0
무처리구	7.9a	100.0	8.1a	100.0

주 1) 같은 문자끼리는 5%유의수준에서 DMRT 결과 유의차 없음.

Table 23. Damage grade

구분	비해정도(0~5)		비고
	500배	250배	
<i>Trichoderma</i> sp.	0	0	비해없음

Table 24. Soil harmful analysis

	크롬	납	카드뮴	니켈	수은	아연	비소	구리
결과	ND	ND	ND	ND	ND	<0.1	ND	ND
기준치	<300	<150	<5	<50	<2	<50	<5	<50

(나) *Trichoderma* sp.를 이용한 인삼 생육촉진에 미치는 효과 실험

Trichoderma sp.를 처리하여 인삼의 생육촉진 효과를 조사한 결과, 인삼의 지상부 생육은 무처리에 비하여 경장 27.5%(금산), 경직경 46%(금산)~50%(대전), 지상부중 60%(대전)~75%(금산) 증가하였다. 인삼의 지하부 생육은 무처리에 비하여 근장 15%(금산)~16%(대전), 근직경 19.6%(대전)~20.7%(금산), 근중 12.5%(대전)~15.9%(금산) 증가하였다. 인삼의 수량에서는 무처리구에 비하여 칸당 8.7%(대전)~13.8%(금산) 증가하는 것으로 조사되었다. 위의 조사 결과, 지상부에서 효과가 있는 이유는 경엽처리를 하여 지상부에 생육효과가 발생한 것으로 유추되며, 인삼의 경우에는 뿌리의 생육이 우수해야 상품가치가 높은 작물이므로, 침지하는 방법으로 접근하는 것이 좋을 것으로 사려 된다.

Table 25. Effect of ground part weight on Ginseng

시험장소	구분	경장(cm)	경직경(mm)	지상부중(g/개체)
금산	처리구	5.1b	1.9b	0.8b
	무처리구	4.0a ¹⁾	1.3a	0.5a
대전	처리구	4.7b	1.8b	0.7b
	무처리구	3.9a	1.2a	0.4a

주 1) 같은 문자끼리는 5%유의수준에서 DMRT 결과 유의차 없음.

Table 26. Effect of underground part weight on Ginseng

시험장소	구분	근장(cm)	근직경(mm)	지하부중(g/개체)
금산	처리구	17.9b	5.5b	4.5b
	무처리구	15.5a	4.6a	4.0a
대전	처리구	19.9b	6.4b	5.1b
	무처리구	17.1a ¹⁾	5.3a	4.4a

주 1) 같은 문자끼리는 5%유의수준에서 DMRT 결과 유의차 없음.

Table 27. Effect of yield on Ginseng

시험장소	구분	수량(g/칸) ²⁾	수량지수(%)
금산	처리구	365.1b	113.8
	무처리구	320.8a	100.0
대전	처리구	379.1b	108.7
	무처리구	348.7a ¹⁾	100.0

주 1) 같은 문자끼리는 5%유의수준에서 DMRT 결과 유의차 없음.

주 2) 칸당 수확개체에 대한 수량.

(다) *Trichoderma* sp.를 이용한 잔디에 미치는 효과 실험

1) Inhibition Zone(저지원) 시험 (실내배양시험)

Inhibition Zone 시험결과, *Trichoderma* sp. 처리구에서의 균사생장억제효과는 *Rhizoctonia solani* AG2-2(IV) (Large patch), *Sclerotinia homoeocarpa* (Dollar spot)와 *Pythium* spp.(Pythium)에 대하여 무처리대비 각각 79.23%, 65.10%와 81.43%로 높았으나 *Rhizoctonia solani* AG1-1(Brown patch)에

서는 38.04%로 낮게 나타났다(Fig. 36, Table 28).

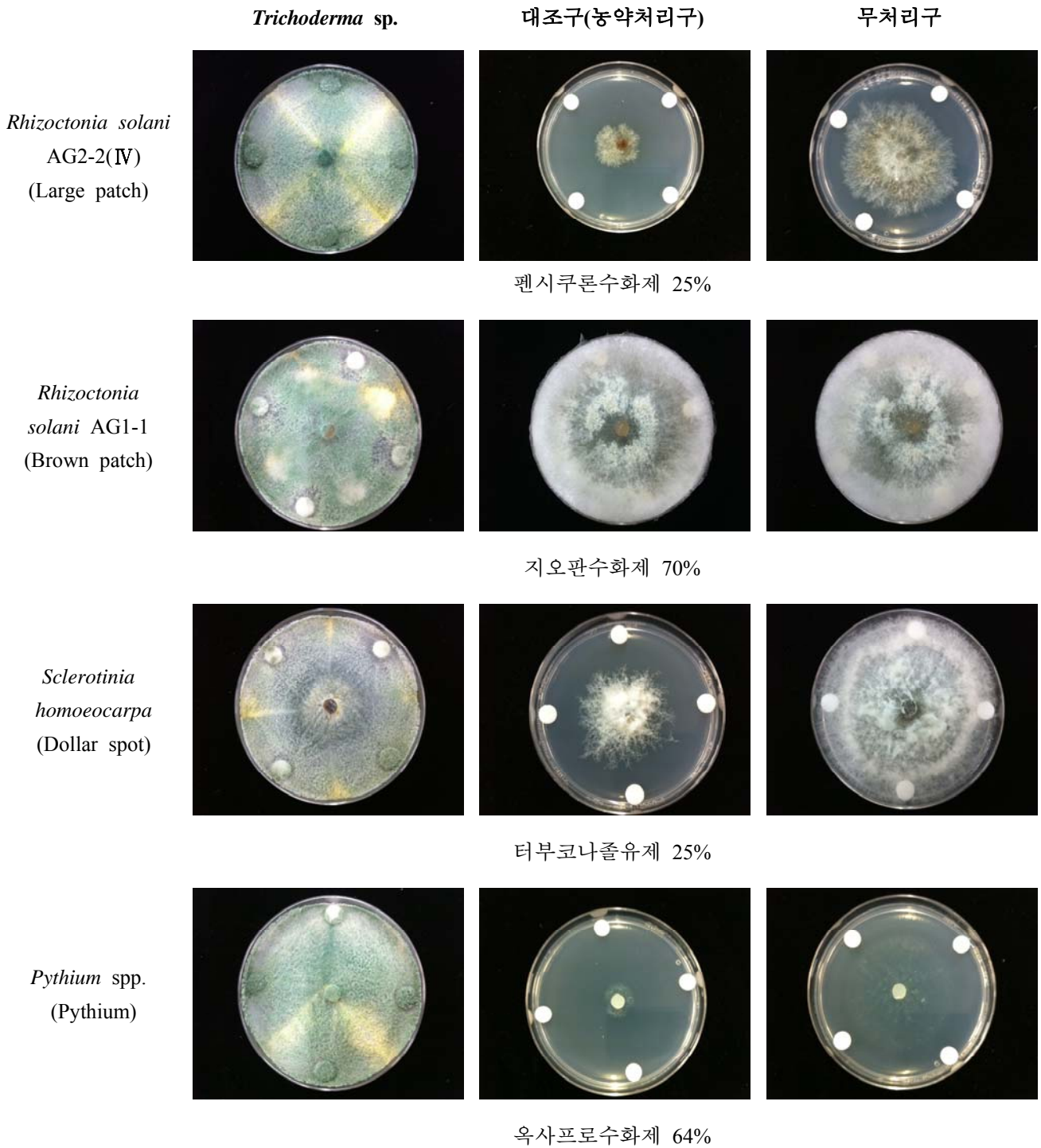


Fig. 36. Inhibition Zone

Table 28. Inhibition effect of Lawn Plant pathogen by *Trichoderma* sp

(Inhibition rate : %)

병원균 \ 처리	<i>Trichoderma</i> sp.	대조구(농약처리구)
<i>Rhizoctonia solani</i> AG2-2(IV) (Large patch) mean	87.70 ¹⁾	51.76 ¹⁾
	70.00	40.00
	80.00	31.43
	59.43	41.06
<i>Rhizoctonia solani</i> AG1-1 (Brown patch) mean	34.12	0.00
	41.18	0.00
	38.82	0.00
	38.04	0.00
<i>Sclerotinia homoeocarpa</i> (Dollar spot) mean	63.53	38.82
	65.89	49.41
	65.89	45.88
	65.10	44.70
<i>Pythium</i> spp. (Pythium) mean	82.86	72.86
	81.43	75.71
	80.00	70.00
	81.43	72.86

주 1) 무처리구의 발병율이 100%일 때 공시제제와 대조구의 발병억제율로 환산됨

2) 난지형잔디의 생육조사 및 Large patch 방제 시험(포장시험)

잔디 생육량은 지상부(shoot)와 지하부(runner, root)로 나누어 건물중을 조사한 결과, 처리구 2에서 총생육량이 633g/m²로 가장 많았고, 또한, 런너의 경우에도 처리구 2에서 363g/m²로 가장 높았다. 뿌리량은 처리구 1과 처리구 2에서 각각 87, 88g/m²로 높았다(Table 29, Fig. 37). 전체적으로 보았을 때, 무처리구 대비 처리구 1의 경우에는 30% 이상의 증수효과가 발생하였으며, 처리구 2의 경우에는 61%의 증수 효과를 보이는 것으로 조사되었다.

Table 29. Lawn ground and underground part dry weight

(단위 : g/m²)

	무처리구	처리구 1	처리구 2	대조농약구
Shoot	162	179	183	172
Runner	198	244	363	196
Root	32	87	88	22
Total	392	511	633	390

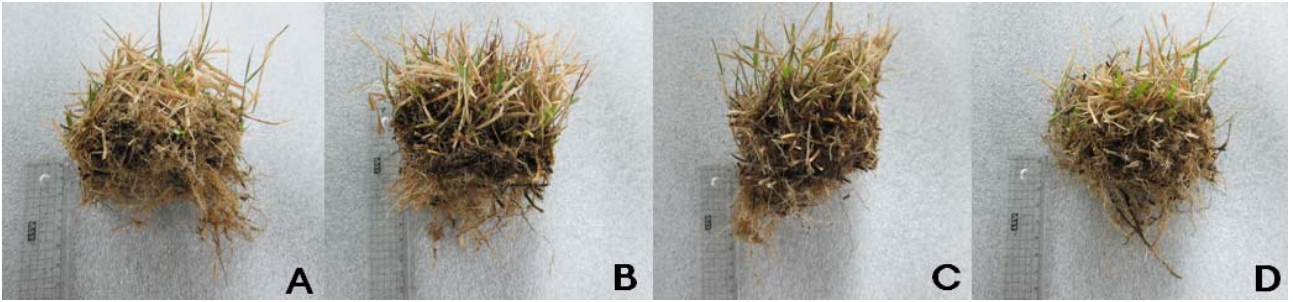


Fig. 37. Lawn(A: 무처리구, B: 처리구 1, C: 처리구 2, D:대조농약구)

평소 Large patch 병이 만연하였던 한국잔디의 증식포장에서의 *Trichoderma* sp.의 살포 후 무처리구와 대조(농약)구를 비교한 결과, 처리구는 발병율의 거의 없는 것으로 조사되었다. 처리구 2의 경우에는 1주일 간격으로 2회 처리 시에는 농약처리구와 거의 비슷한 효과를 보이는 것으로 조사되었으며, 전체적으로 무처리 대비 처리구에서는 Large patch 병에 대한 효과가 있는 것으로 조사되었다. 만약, 살포 기간을 2회 이상으로 할 경우에는 화학농약 만큼의 효과가 발생할 것으로 보인다.

Table 30. Occur rate of Large patch

(단위 : %)

구분	무처리	처리구 1	처리구 2	대조농약구
1차	32.23a ¹⁾	15.86b	10.50b	8.55b
2차	52.40a	8.28b	5.89b	0.00c
3차	80.20a	2.73b	0.80c	0.00c

주 1) 같은 문자끼리는 5%유의수준에서 DMRT 결과 유의차 없음.

※ 발병율 : 각 처리구 면적에 발병된 면적을 백분율로 산출

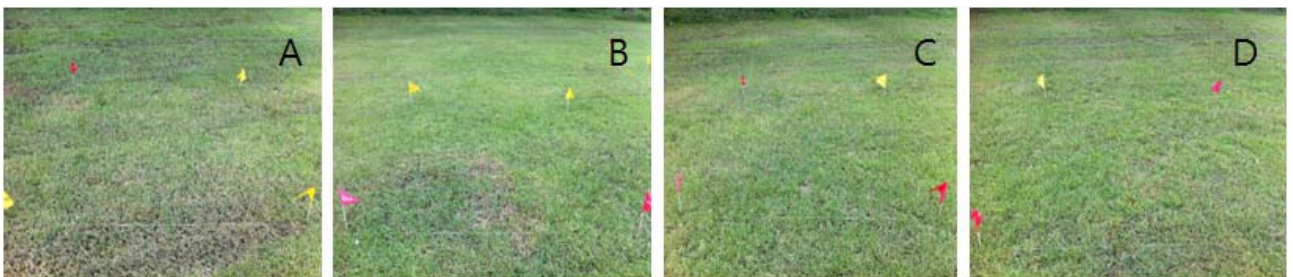


Fig. 38. Test result of Large patch control

(A : 무처리구, B : 처리구 1, C : 처리구 2, D : 대조농약구)

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연도별 연구개발 목표

[1차년도]

<제1세부과제> (과제명: 식물생장촉진 및 토양전염성 병해 방제용 미생물제 개발 및 활용 연구)

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차 년도	2012	유용미생물을 활용한 각종 채소 작물재배지의 토질 개선과 각종 채소작물의 생산 촉진용 미생물 제제 개발 및 산업화	
		제 1단계 : 유용미생물의 선발 및 효과검정	
		1. 유용 미생물 길항성 검정	○ 유용 미생물의 선발 및 길항성 검정 - 토양에서 분리후 대치배양하여 길항력검정
		2. 유용 미생물 작물생장촉진 효과 검정	○ 발아촉진 효과 검정 - 표면 살균 후 치상하여 발아율 조사 ○ 작물 생장촉진 효과 검정 - 유묘기 작물에 배양액 관주 처리
		3. 유용 미생물의 토양개량 효과 검정	○ 작물의 지상부 생육효과 비교 - 배양액처리 후 초장, 분얼수, 과실수 등 조사 ○ 처리별 질소고정수지 비교 등
		4. 생장촉진균이 생산하는 siderophore의 특성 규명	○ 생장촉진균이 생산하는 siderophore의 특성 규명 - CAS배지를 이용하여 halo zone생성 확인
		5. 유용 미생물의 동정	○ 유용 미생물의 동정 - 16s rDNA 동정 하여 NCBI 비교 동정
		식물병원성 토양전염 균류의 성장을 억제 하는 미생물제제 개발 및 산업화	
		제1단계 : 유용 미생물의 선발 및 생리활성 규명	
		1. 유용미생물의 선발에 따른 길항성 검정	○ 1차 유용 미생물의 선발 및 길항성 검정 ○ 2차 유용 미생물의 선발 및 길항성 검정 - 병원성 미생물과 대치배양하여 길항성 검정
		2. 유용 미생물의 동정	○ 유용 미생물의 동정 - 16s rDNA 동정 하여 NCBI 비교 동정
		3. Essential oil의 효과 검정	○ Essential oil의 효과 검정
		제2단계 : 배지 최적화 및 제제화 연구	
1. 소용량 발효조에서의 최적화 연구	○ 당농도의 분석 ○ 균체농도 측정 ○ 생균수 측정 - 분광 광계도를 이용한 균체농도 측정 ○ 플라스크 최적 배양 조건 - 탄소원, 질소원, 온도, Ph등을 달리하여 배양 ○ 소용량 발효조(5L)에서의 최적화 연구 - 플라스크 배양조건과 같음 ○ Siderophore 생성량 측정연구 - CAS배지를 이용하여 halo zone생성 확인		

<제2세부과제> (과제명: 선충억제 퇴비 개발)

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차 년도	2012	1. 한방 구충제 식물의 선발	○ 한방 구충제 추출물의 뿌리혹선충 살충효과 검토 - Microplate well 추출물혼합배양 및 성장억제, 살충 효과 검정
		2. 선발된 선충 천적의 활성화 조건 및 활용 방법 설정	○ 선발된 포식성곰팡이의 선충기생효율, 천적곰팡이의 생육 활성화 토양조건 검토 및 설정

<제3세부과제> (과제명: 토양병해 방제 미생물제제 개발 및 산업화)

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차 년도	2012	1. <i>Trichoderma</i> sp.의 생리, 배양학적 특성 조사 2. <i>Trichoderma</i> sp.의 효과 검증	○ 생리적(포자농도 10 ⁵ cfu/ml이상 조건) 특성조사 ○ 다양한 영양원(탄소원, 질소원 등)에 따른 성장도 조사 ○ 대치배양을 통하여, 식물병원균에 대한 길항력 (60% 이상) 조사 ○ 식물생육촉진(지상, 지하부 생장길이) 여부 측정

[2차년도]

<제 1세부과제> (과제명: 식물생장촉진 및 토양전염성 병해 방제용 미생물제 개발 및 활용 연구)

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
2차 년도	2013	유용미생물을 활용한 각종 채소 작물재배지의 토질 개선과 각종 채소작물의 생산 촉진용 미생물제제 개발 및 산업화	
		제 2단계 : 배지 최적화 및 제제화 연구	
		1. 소용량 발효조에서의 최적화 연구	○ 당농도의 분석 ○ 균체농도 측정 ○ 생균수 측정 ○ 플라스크 최적 배양 조건 ○ 소용량 발효조(5L)에서의 최적화 연구 ○ Siderophore 생성량 측정 - 1차 년도 방법과 동일한 방법으로 실시
		2. 대용량 발효조에서의 최적화 연구	○ 균체농도 측정 ○ 포도당 농도 측정 ○ 300L 및 2500L 발효조에서의 최적화연구
		제 3단계 : 미생물 안정제 개발	○ 미생물 안정제 개발
		제 4단계 : 농가 실증 포장실험	
		1. 작물 생육촉진 효과 포장 검정	○ 작물 생육촉진 효과 포장 검정 - 선발균주의 배양액을 관주 처리하여 생육 촉진 효과 검정
		2. 토양개량효과 포장검정	○ 토양개량 효과 포장검정 - 선발균주의 배양액 처리 하여 시간별 채취 하여 토양분석
		식물병원성 토양전염 균류의 성장을 억제 하는 미생물제제 개발 및 산업화	
		제 2 단계 : 배지 최적화 및 제제화 연구	
		1. 대용량 발효조에서의 최적화 연구	○ 균체농도 측정 ○ 포도당 농도 측정 ○ 300L/2,500L 발효조에서의 최적화 연구
		제3단계 : 미생물 안정적 제제 개발	
		1. 미생물 안정적 제제 개발	
		Essential oil과 유용균의 혼용 효과검정	Essential oil과 유용균의 혼용 효과검정
		<제 2 세부과제>에서 개발된 '선충억제 퇴비'의 토양전염성 병해 억제 효과 및 상호작용 검토	

<제2세부과제> (과제명: 선충억제 퇴비 개발)

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
2차 년도	2013	1. 선발된 한방 구충제 식물의 선충억제퇴비화	○ 선발된 선충억제 식물체의 제제화 (분말화, 퇴비화, Vermicompost제조)
		2. 선발된 선충 천적의 제제화	○ 토양 환경 조절 등을 통한 선발된 포식성 곰팡이의 활성화 토양조건 조사 - 토양pH, 토양氣象상태조사 ○ 배양 선충기생미생물의 제제화 - 톱밥 등 증진제를 이용한 분말제제 제조
		3. 2가지 제제의 혼합 비율	○ 제제화된 살충식물과 포식성곰팡이 혼합 시기, 방법 및 비율 조정 - 선충억제퇴비, 선충천적미생물제 혼합비율 (30-70%) 및 증진제비율별 혼합조제 실시
		4. 혼합제제를 이용한 방제시험	○ 개발 제제를 이용한 토양 시험 - 선충감염토양을 이용한 40×60cm Microplot 방제효과 시험
		5. <제 1 세부과제>에서 개발된 토양전염성 병해 방제 미생물 제제의 선충억제 효과 및 상호작용 검토	○ <제1세부과제>에서 개발된 토양전염성 병해 방제 미생물 제제의 선충억제 효과 및 상호작용 검토 - 토양전염병해 방제미생물제와 선충억제퇴비 간의 길항·상승·중립 효과검정

<제3세부과제> (과제명: 토양병해 방제 미생물제제 개발 및 산업화)

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
2차 년도	2013	1. <i>Trichoderma</i> sp.의 후막포자 생성, <i>Trichoderma</i> sp.의 제품화 2. 다른 미생물과의 상호관계 규명	○ 후막포자 형성 조건, 배양조건 규명 ○ 제품의 조성 확정 및 제형 결정 (보관성, 편리성 등) ○ 다른 미생물과 혼용사용으로 여부 실험

[3차년도]

<제 1세부과제> (과제명: 식물생장촉진 및 토양병해 방제용 미생물제 개발 및 활용 연구)

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
		유용미생물을 활용한 각종 채소 작물재배지의 토질 개선과 각종 채소작물의 생산 촉진용 미생물제 개발 및 산업화	
3차 년도	2014	제 5단계 : 시제품 개발	
		1. 시제품 제조	○ 시제품 제조 - 참여기업에서 실시
		식물병원성 토양전염 균류의 성장을 억제 하는 미생물제 개발 및 산업화	
		제 4단계 : 농가 실증 포장실험	
		1. 토양병 억제 효과 농기실증 포장 검정	○ 토양전염 병해 억제 효과 농기실증 포장 검정 - 선발균주 배양액을 분무(관주)처리하여 억제 정도 조사
		제 5단계 : 시제품 개발	
		1. 시제품 제조	○ 시제품 제조 - 참여기업에서 실시
		<제 2 세부과제>에서 개발된 '선충억제 퇴비'의 토양전염성 병해 억제효과 및 상호작용 검토	

<제2세부과제> (과제명: 선충억제 퇴비 개발)

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
3차 년도	2014	1. 개발된 제제의 포장적용시험	○ 개발된 제제를 이용한 농가형 재배포장에서의 뿌리혹선충 방제시험(박과류: 오이, 참외 등)
		2. 종합적인 토양 병해충 방제기법 개발	○ <제1세부과제>에서 개발된 토양전염 병해 방제 미생물제제의 선충억제 효과 및 선충억제퇴비와의 선충방제효과의 상승 등 상호작용 검토
		3. 개발된 제제의 상품화	○ 개발된 제제의 포장처리, 보관온도 처리 및 활성검토
		4. <제 1 세부 과제>에서 개발된 토양전염성 병해 방제 미생물 제제의 선충억제 효과 및 상호작용 검토	

<제3세부과제> (과제명: 토양병해 방제 미생물제 개발 및 산업화)

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
3차 년도	2014	1. <i>Trichoderma</i> sp.를 이용한 농가 실증 평가 2. 개발된 제품의 제형화 확립 3. 제품의 품질 안정화 4. 개발된 제품을 이용한 종합적인 친환경 재배 실증 평가 5. 각 제품을 이용한 종합적인 친환경제품 등록 및 제품 출시	○ 처리방법 및 길항력 조사 ○ 제품의 조성 확정 및 제형 결정(보관성, 편리성 등) ○ 제품 기간별 균밀도 조사 ○ 토양에서의 생육촉진, 토양개량, 길항력 조사 ○ 제품등록(비료 및 친환경유기농자재) 추진 (재배성적서 등)

제 2 절 평가의 착안점 및 기준

[1차년도]

구분	연도	세부 연구개발 목표	가중치	평가의 착안점 및 기준
1차 년도	2011	1. 유용 미생물 길항성 검정	5%	○ 유용 미생물의 선발 및 길항성 검정 - 방제가 30% 이상 되는 균주 선발
		2. 유용 미생물 작물생장촉진 효과 검정	10%	○ 발아촉진 효과 검정 - 발아 촉진율이 80% 이상 되는 균주 선발 ○ 작물 생장촉진 효과 검정 - 생장 촉진율이 50% 이상 되는 균주 검정
		3. 유용 미생물의 토양개량 효과 검정	5%	○ 작물의 지상부 생육효과 비교 - 초장, 분얼수, 과실수 및 엽록체함량 증진 효과 비교 ○ 처리별 질소고정수치 비교 등 - 아세틸렌 환원법 인덱스를 이용하여 비교
		4. 생산된 Siderophore 의 특성 구명	10%	○ 생산된 Siderophore 특성 구명 - CAS배지를 이용하여 halo zone 크기 확인
		5. 유용 미생물의 동정	5%	○ 유용 미생물의 동정
		6. 유용미생물의 선발에 따른 길항성검정	10%	○ 1차 유용 미생물의 선발 및 길항성 검정 ○ 2차 유용 미생물의 선발 및 길항성 검정
		7. 유용 미생물의 동정	5%	○ 유용 미생물의 동정
		8. Essential oil의 효과 구명	5%	○ Essential oil의 효과 구명
		9. 소용량 발효조에서의 최적화 연구	10%	○ 당농도의 분석 ○ 균체농도 측정 ○ 생균수 측정 ○ 플라스크 최적 배양 조건 ○ 소용량 발효조(5L)에서의 최적화 연구 ○ Siderophore 생성량 측정연구
		10. 선충방제 효과 있는 한방 구충식물 선발	5%	○ Microplate well내 식물추출물 혼합 및 살충·억제효과 조사
		11. 선발된 식물의 활용 조건 및 방법 설정	10%	○ 선충억제효과 선발식물체를 이용한 vermicompost 제조, 건조분말화, 퇴비화조제 실시
		12. 선충 천적 선발	5%	○ 인공배지(NA배지)상에서 균사체 배양량 및 포자형성을 조사
		13. 선발된 선충 천적의 활성화 조건	5%	○ 천적미생물 자생 토양의 pH, 토양 氣相(O ₂ , CO ₂) 조건조사
		14. <i>Trichoderma</i> sp.의 생리, 배양학적 특성 조사	5%	○ 적합 배지 및 생리적 특징 검증
		15. <i>Trichoderma</i> sp.의 효과 검증	10%	○ 길항 효과 도출 ○ 생육촉진 및 수량 차이점 도출
최종평가		1. 시제품 제조	12%	○ 시제품 제조 - 생균수 비교 및 배양조건 확립
		2. 개발된 제제의 상품화	13%	○ 농촌진흥청 친환경자재 목록공시 등록
		3. <i>Trichoderma</i> sp.의 생리, 배양학적 특성 조사 및 효과 검증	15%	○ 적합 배지 및 생리적 특징 검증 ○ 효과 도출
		4. <i>Trichoderma</i> sp.의 후막포자 생성 및 제품화	15%	○ 후막포자 형성 조건 규명 여부 ○ 대량 생산을 위한 공정개발 및 제형화 여부
		5. 개발된 제품의 제형화 확립 (토양개량, 미생물제제, 선충방제제)	15%	○ 대량 생산을 위한 조건 및 공정개발, 제형화 여부
		6. 개발된 제품을 이용한 종합적인 친환경 재배 실증 평가(유기농생산 가능 여부)	15%	○ 길항력 및 생육촉진, 수량 차이점
		7. 제품 등록 및 제품 출시	15%	○ 비료 및 친환경유기농자재 등록 여부 도출

[2차년도]

구분	연도	세부 연구개발 목표	가중치	평가의 착안점 및 기준
2차 년도	2012	1. 소용량 발효조에서의 최적화 연구	5%	○ 당농도의 분석 ○ 균체농도 측정 ○ 생균수 측정 ○ 소용량 발효조(5L)에서의 최적화 연구 ○ siderophore 생성량 측정
		2. 대용량 발효조에서의 최적화 연구	10%	○ 균체농도 측정 ○ 포도당 농도 측정 ○ 300L / 2500L 발효조에서의 최적화 연구
		3. 작물 생육촉진 효과 포장 검증	5%	○ 작물 생육촉진 효과 포장 검증 - 초장, 분얼수, 과실수 및 엽록체 함량 증진 효과 조사
		4. 토양개량효과 포장검정	10%	○ 토양개량 효과 포장검정 - 토양분석 비교
		5. 대용량 발효조에서의 최적화 연구	5%	○ 균체농도 측정 ○ 포도당 농도 측정 ○ 300L / 2,500L 발효조에서의 최적화 연구
		6. 미생물 안정적 제제 개발	10%	○ 미생물 안정적 제제 개발
		7. Essential oil과 유용균의 혼용효과검정	5%	○ Essential oil과 유용 균의 혼용효과검정
		8. <제2세부과제>에서 개발된 '선충억제 퇴비'의 토양전염 병해 억제 효과 및 상호작용 검토	5%	○ <제2세부과제>에서 개발된 '선충억제퇴비'의 토양전염성 병해 억제 효과 및 상호작용 검토
		9. 선발된 한방 구충제 식물의 제제화	10%	○ 선충억제효과 식물체의 vermicompost조제, 건조 분말화, 퇴비화 실시
		10. 선발된 선충 천적의 제제화	5%	○ 선충천적미생물 배양체의 분말제제화 및 선충방제효율별 제제의 경제성 조사
		11. 2가지 제제의 혼합 비율	10%	○ 선충억제퇴비와 선충기생미생물제의 혼합 조제실시
		12. 혼합제제를 이용한 방제시험	5%	○ 선충감염토양을 이용 40-60cm microplot상에서 방제효과조사(방제가 >70%)
		13. <i>Trichoderma</i> sp.의 후막포자 생성, <i>Trichoderma</i> sp.의 제품화	5%	○ 후막포자 형성 조건 규명 여부 ○ 대량 생산을 위한 공정개발 및 제형화 여부
		14. <i>Trichoderma</i> sp.의 처리방법 다양화	5%	○ 처리방법 최적화 확립 여부
		15. 다른 미생물과의 상호관계 규명	10%	○ 다른 미생물과의 상호관계 규명 여부
최종평가		1. 시제품 제조	12%	○ 시제품 제조 - 생균수 비교 및 배양조건 확립
		2. 개발된 제제의 상품화	13%	○ 농촌진흥청 친환경자재 목록공시 등록
		3. <i>Trichoderma</i> sp.의 생리, 배양학적 특성 조사 및 효과 검증	15%	○ 적합 배지 및 생리적 특징 검증 ○ 효과 도출
		4. <i>Trichoderma</i> sp.의 후막포자 생성 및 제품화	15%	○ 후막포자 형성 조건 규명 여부 ○ 대량 생산을 위한 공정개발 및 제형화 여부
		5. 개발된 제품의 제형화 확립 (토양개량, 미생물제제, 선충방제제)	15%	○ 대량 생산을 위한 조건 및 공정개발, 제형화 여부
		6. 개발된 제품을 이용한 종합적인 친환경 재배 실증 평가(유기농생산 가능 여부)	15%	○ 길항력 및 생육촉진, 수량 차이점
		7. 제품 등록 및 제품 출시	15%	○ 비료 및 친환경유기농자재 등록 여부 도출

[3차년도]

구분	연도	세부 연구개발 목표	가중치	평가의 착안점 및 기준
3차 년도	2013	1. 작물 생육촉진 효과 포장 검정	5%	○ 작물 생육촉진 효과 포장 검정 - 초장, 분얼수, 과실수 및 염록체함량 증진 효과 조사
		2. 토양개량효과 포장검정	10%	○ 토양개량 효과 포장검정 - 토양분석 비교
		3. 시제품 제조	5%	○ 시제품 제조 - 생균수 비교 및 배양조건 확립
		4. 토양전염병 억제 효과 농기실증 포장 검정	10%	○ 토양전염병 억제 효과 농기실증 포장 검정
		5. <제2세부과제>에서 개발된 ‘선충억제퇴비’의 토양전염성 병해 억제 효과 및 상호작용 검토	5%	○ <제2세부과제>에서 개발된 ‘선충억제퇴비’의 토양전염성 병해 억제 효과 및 상호작용 검토
		6. 시제품 제조	10%	○ 시제품 제조
		7. 개발된 제제의 포장적용시험(오이)	5%	○ 선충발생 농가형 miniplot포장에서 뿌리혹선충 억제효과시험(방제가 >70%)
		8. 개발된 제제의 포장적용시험(참외)	5%	○ 선충발생 농가형 miniplot포장에서 뿌리혹선충 억제효과시험(방제가 >70%)
		9. 개발된 제제의 포장적용시험(딸기)	10%	○ 선충발생 농가형 miniplot포장에서 기생선충 억제효과시험(방제가 >70%)
		10. <제1세부과제>에서 개발된 토양전염병해 방제 미생물제제의 선충억제 효과 및 상호작용 검토	5%	○ <제1세부과제>에서 개발된 토양방제미생물제의 선충증식억제(방제가)조사 및 “선충억제퇴비”와의 길항, 상승, 중립효과 검정
		12. 개발된 제제의 상품화	5%	○ 농촌진흥청 친환경자재 목록공시 등록 추진
		13. <i>Trichoderma</i> sp.를 이용한 농가 실증 평가	5%	○ 길항력 및 생육촉진, 수량 차이점 도출
		14. 개발된 제품의 제형화 확립	5%	○ 대량 생산을 위한 배지조건 및 공정개발, 제형화 여부
		15. 개발된 제품을 이용한 종합적인 친환경재배 실증 평가	5%	○ 길항력 및 생육촉진, 수량 차이점 도출
		16. 효과적인 이용방법 규명 및 보급	10%	○ 적합한 이용방법 규명 여부
		17. 제품 등록 및 제품 출시	5%	○ 비료 및 친환경유기농자재 등록 여부
		최종평가		1. 시제품 제조
2. 개발된 제제의 상품화	13%			○ 농촌진흥청 친환경자재 목록공시 등록
3. <i>Trichoderma</i> sp.의 생리, 배양학적 특성 조사 및 효과 검증	15%			○ 적합 배지 및 생리적 특징 검증 ○ 효과 도출
4. <i>Trichoderma</i> sp.의 후막포자 생성 및 제품화	15%			○ 후막포자 형성 조건 규명 여부 ○ 대량 생산을 위한 공정개발 및 제형화 여부
5. 개발된 제품의 제형화 확립 (토양개량, 미생물제제, 선충방제제)	15%			○ 대량 생산을 위한 조건 및 공정개발, 제형화 여부
6. 개발된 제품을 이용한 종합적인 친환경재배 실증 평가(유기농생산 가능 여부)	15%			○ 길항력 및 생육촉진, 수량 차이점
7. 제품 등록 및 제품 출시	15%			○ 비료 및 친환경유기농자재 등록 여부 도출

제 3 절 연구개발 수행내용 및 목표달성도

[1차년도]

구분 (연도)	세부 과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용	
1차 년도 (2012)	제1세부 과제	유용미생물을 활용한 각종 채소 작물재배지의 토질 개선과 각종 채소작물의 생산 촉진용 미생물제제 개발 및 산업화			
		1. 유용 미생물 길항성 검정	100	○ 유용 미생물의 선발 및 길항성 검정	
		2. 유용 미생물 작물생장촉진 효과 검정	100	○ 발아촉진 효과 검정 ○ 작물 성장촉진 효과 검정	
		3. 유용 미생물의 토양개량 효과 검정	95	○ 작물의 지상부 생육효과 비교 ○ 처리별 질소고정수지 비교 등	
		4. 성장촉진균이 생산하는 siderophore의 특성 규명	100	○ 성장촉진균이 생산하는 siderophore의 특성 규명	
		5. 유용 미생물의 동정	100	○ 유용 미생물의 동정	
		식물병원성 토양전염 균류의 성장을 억제 하는 미생물제제 개발 및 산업화			
		1. 유용미생물의 선발에 따른 길항성 검정	100	○ 1차 유용 미생물의 선발 및 길항성 검정 ○ 2차 유용 미생물의 선발 및 길항성 검정	
		2. 유용 미생물의 동정	100	○ 유용 미생물의 동정	
		3. Essential oil의 효과 검정	90	○ Essential oil의 효과 검정	
	4. 소용량 발효조에서의 최적화 연구	95	○ 당농도의 분석 ○ 균체농도 측정 ○ 생균수 측정 ○ 플라스크 최적 배양 조건 ○ 소용량 발효조(5L) 에서의 최적화 연구 ○ siderophore 생성량 측정연구		
	제1협동 과제	1. 한방 구충제 식물의 선발	100	○ 한방 구충제 추출물의 뿌리혹선충 증효과 검토	
		2. 선발된 선충 천적의 활성화 조건 및 활용 방법 설정	100	○ 선발된 포식성곰팡이의 방제효율, 활성화 토양조건 검토 및 설정	
	제2협동 과제	1. <i>Trichoderma</i> sp.의 생리, 배양학적 특성 조사	100	○ 생리적(포자농도 10 ⁵ cfu/ml이상 조건) 특성조사 ○ 다양한 영양원(탄소원, 질소원 등)에 따른 성장도 조사	
2. <i>Trichoderma</i> sp.의 효과 검증		100	○ 대치배양을 통하여, 식물병원균에 대한 길항력(60%이상) 조사 ○ 식물생육촉진(지상,지하부 생장길이) 여부 측정		

[2차년도]

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 년도 (2013)	제 1세부 과제	유용미생물을 활용한 각종 채소 작물재배지의 토질 개선과 각종 채소작물의 생산 촉진미생물제제 개발 및 산업화		
		제 2단계 : 배지 최적화 및 제제화 연구		
		1. 소용량 발효조에서의 최적화연구	100	○ 소용량 (5L) 에서의 최적화 연구 ○ siderophore 생성량 측정
		2. 대용량 발효조에서의 최적화연구	100	○ 균체농도 측정 ○ 1,500L에서의 최적화연구
		제 3단계 : 미생물 안정제 개발		
		제 4단계 : 농가 실증 포장실험		
		1. 작물 생육촉진 효과 포장 검정	100	○ 작물 생육촉진 효과 포장 검정
		2. 미생물 세포의 효소 활성도 측정	100	○ 토양개량 효과 포장검정
		식물병원성 토양전염 균류의 성장을 억제 하는 미생물제제 개발 및 산업화		
		제 2 단계 : 배지 최적화 및 제제화 연구		
		1. 대용량 발효조에서의 최적화연구	100	○ 300L/2,500L에서의 최적화 연구
		제3단계 : 미생물 안정적 제제 개발		
		1. 미생물 안정적 제제 개발	100	○ 미생물 안정제 개발
		2. Essential oil과 유용균의 혼용 효과검정	100	○ Essential oil과 유용균의 혼용 효과 검정
	제1협동 과제	1. 선발된 한방 구충제 식물의 선충억제퇴비화	100	○ 제제화 가능성 검토
		2. 선발된 선충 천적의 제제화	100	○ 토양 조건에 따른 포식성곰팡이의 활성
		3. 2가지 제제의 혼합 비율	100	○ 살충식물 제제와 포식성곰팡이 혼합 효과 검토
		4. 혼합제제를 이용한 방제시험	100	○ 선발된 제제를 이용한 포장시험
		5. 선발된 자생식물과 대상 작물(참외 등) 상호간 타감작용 존재 여부 확인	100	○ 작물간 상호 타감작용 검토
		6. <제1세부과제>에서 개발된 토양전염성 병해 방제 미생물 제제의 선충억제 효과 및 상호 작용 검토	100	○ 병해방제 미생물과 선충방제용 제제의 상호 효과 검토
	제2협동 과제	1. <i>Trichoderma</i> sp.의 후막포자 생성	100	○ 후막포자 형성조건, 배양조건 규명
		2. <i>Trichoderma</i> sp.의 제품화	100	○ 제품의 조성 확정 및 제형결정
		3. 다른 미생물과의 상호관계 규명 및 토양내 생존율 측정	100	○ 다른 미생물과 혼용사용 여부 실험
100			○ 토양내 생존율 측정	
		100	○ 키다리병 길항력 실험	

[3차년도]

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용	
3차 년도 (2014)	제 1세부 과제	유용미생물을 활용한 각종 채소 작물재배지의 토질 개선과 각종 채소작물의 생산 촉진미생물제제 개발 및 산업화			
		제 5단계 : 시제품 개발			
		1. 시제품 제조	100	○ 시제품 제조	
		식물병원성 토양전염 균류의 성장을 억제 하는 미생물제제 개발 및 산업화			
		제 4단계 : 농가 실증 포장실험			
		1. 토양병 억제 효과 농가 실증 포장 검정	100	○ 토양전염 병해 억제 효과 농가 실증 포장 검정	
	제 1협동 과제	제 5단계 : 시제품 개발			
		1. 시제품 제조	100	○ 시제품 제조	
		1. 개발된 제제의 포장 적용시험(오이, 참외, 딸기)	100	○ 참외, 딸기 농가 현지 포장에서 방제 효과 검토	
		2. 종합적인 병해충 방제기법 개발	100	○ 재배 품종, 토성, 선충의 밀도 및 재배 작형에 따른 종합적 방제법 검토	
	제 2협동 과제	3. <제1세부과제>에서 개발된 토양전염성 병해 방제 미생물 제제의 선충억제 효과 및 상호 작용 검토	100	○ 토양병해 방제용 미생물과 선충 방제용 제제의 복합효과 검토	
		4. 개발된 제제의 상품화	100	○ 개발 제제의 상품화 검토	
		1. 개발된 제품의 제형화 확립	100	○ 대량 생산을 위한 배지조건 및 공정개발, 제형화 여부	
		2. 제품의 품질 안정화	100	○ 제품 기간별 균밀도 조사	
		3. <i>Trichoderma</i> sp.를 이용한 농가 실증 평가	100	○ 길항력 및 생육촉진, 수량 차이 점 도출	
4. 개발된 제품을 이용한 종합적인 친환경 재배 실증 평가	100	○ 길항력 및 생육촉진, 수량 차이 점 도출			
5. 친환경 제품 등록 및 제품 출시	100	○ 제품 (비료 및 친환경유기농자재) 등록 여부			

제 4 절 관련분야의 기여도

- 농약의 수입대체 및 수출을 통한 국내 생물농약 산업의 활성화
- "친환경농업육성책"의 준수를 위한 병해충의 효과적인 방제수단의 도출 및 산업화
- 친환경 및 지속가능한 농업을 통한 농업생태계 보호 및 환경오염 방지
- 개발된 친환경자재(토양개량제, 미생물제제, 선충방제제)을 이용한 효과적인 농가보급으로 유기농 농산물 생산에 활용

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구개발 성과

가. 논문게재 성과

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI 구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2012	Application of rhizobacteria for biological control of late blight and growth promoting activities on tomato(Abstract)	이윤수	이윤수	거비르, 김상우, 김윤석	The 2nd Korea-Japan Joint Symposium	p. 96-97	국외	SCIE
	Study of rhizobacteria for the control of various phytopathogenic and plant growth promotion effect(Abstract)	이윤수	이윤수	거비르, 김상우, 김윤석	The 2nd Korea-Japan Joint Symposium	p. 99	국외	SCIE
	Isolation and evaluation of antagonistic bacteria for the biological control of grey mold disease in eggplant(Abstract)	이윤수	이윤수	거비르, 김상우, 김윤석	The 2nd Korea-Japan Joint Symposium	p. 107	국외	SCIE
	Studies of rhizobacteria for the biological control of <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Sclerotinia minor</i> , and <i>Fusarium</i> sp. and their plant growth promotion effect(Abstract)	이윤수	이윤수	거비르, 김상우, 김윤석	한국균학회 2012년도 춘계학술대회 및 임시총회	p. 61	국내	SCOPUS
2013	Biocontrol of Late Blight and Plant Growth Promotion in Tomato Using Rhizobacterial Isolates	거비르	이윤수	김상우, 김윤석	Journal of Microbiology and Biotechnology	23권 7호	국내	SCI
	유용 미생물을 활용한 식물 병원 곰팡이의 억제와 식물 성장촉진 효과	정진희	이윤수	김상우, 김윤석, 거비르	한국균학회지	41권 2호	국내	비SCI
	Application of rhizobacteria for plant growth promotion effect and biocontrol of anthracnose caused by <i>Colletotrichum acutatum</i> on pepper	거비르	이윤수	김상우, 김윤석	Mycobiology	40권 4호	국내	SCIE, SCOPUS
	Phylogenetic analyses of <i>Trichoderma</i> strains from paddy fields based on tef1 α sequences	샤람	이윤수	-	Asian Mycological Congress 2013	초록집 p. 167-168	국외	비SCI
	Evaluation of Spore Formation in <i>Paenibacillus polymyxa</i> AB15 during Bioreactor Fermentation	거비르	이윤수	김상우 외 4명	2013 한국균학회 춘계학술대회	초록집 p. 63	국내	SCOPUS
	In Vitro Evaluation of Rhizobacteria for the Inhibition of Various Phytopathogenic Fungi	마헤시	이윤수	거비르 외 4명	2013 한국균학회 춘계학술대회	초록집 p. 93	국내	SCOPUS
	새로운 채소류의 고구마뿌리혹선충과 땅콩뿌리혹선충에 대한 저항성	김동근	김동근	이윤수	한국식물병리학회	19권 4호	국내	비SCI
	국내 콩 기생선충의 중요도 등급	김동근	김동근	이윤수	한국응용곤충학회	52권 3호	국내	비SCI
	국내 콩 장러품종의 콩씨스트선충 HG type 2.5에 대한 저항성	김동근	김동근	이윤수	한국식물병리학회	19권 3호	국내	비SCIE
새로운 채소류의 뿌리혹선충에 대한 저항성	김동근	김동근	이윤수	한국유기농업학회 춘계학술회	초록집 p. 98	국내	비SCI	
2014	선충 억제 활성 식물 추출물의 선발	김동근	김동근	류영현, 이윤수, 최인수, 허창석	식물병연구	20(1): 37-49	국내	비SCI
	나선선충 집중 밀도가 토마토 생육에 미치는 영향.	김동근	김동근	류영현, 허창석, 류정아, 권연이, 이윤수	식물병연구	20(2): 107-111	국내	비SCI

나. 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등

구분	세부구분	논문명	행사명	주최기관	개최일자
강연·초청 인사	국내-특강	원예작물의 생산성 향상을 위한 병해충관리(이운수)	개도국 공무원 초청연수	아태협력아카데미	2012-10-25 ~ 2012-10-25
강연·초청 인사	국내-특강	한국의 선진농업기술 현황과 그 시사점(이운수)	아카데미 수단 연수	아태협력아카데미	2012-10-23 ~ 2012-10-23
강연·초청 인사	국내-특강	개도국을 위한 환경농업전략(이운수)	개도국 공무원 초청연수	아태협력아카데미	2012-10-16 ~ 2012-10-16
강연·초청 인사	국내-특강	식물병 방제의 이론과 실제(김홍기)	귀농 귀촌반 교육	충남농업기술원	2013-08-28 ~ 2013-08-28
강연·초청 인사	국내-특강	식물병 방제 이론편(김홍기)	농업인 강의	부여 굿뜨래 농업대학	2013-08-22 ~ 2013-08-22
강연·초청 인사	국내-특강	식물병 방제 실용편(김홍기)	농업인 강의	부여 굿뜨래 농업대학	2013-08-01 ~ 2013-08-01

다. 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2012	신균주 페니바실러스 폴리믹사 AB-15 균주 및 이의 용도	이운수 외 3인	대한 민국	10-2012- 0139154					
2012	트라이코데마 sp. OK-1균주를 후막포자형성 기술 및 이를 이용한 미생물 제제	오상진 섹트	대한 민국	10-2012- 0151981					
2013	흰가루병 방제용 조성물	김동근	대한 민국	10-2013- 0131299					

라. 인력지원 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
11	4	3	4	0	9	2	0	5	6

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장 연구시설·장비 현황 : 해당사항 없음

제 8 장 참고문헌

- 김호산, 노종열, 이대원, 장진희, 제연호, 우수동, 김주경, 유용만, 강석권. 1998. 새로운 *Bacillus thuriniensis* NT0423 균주의 제제화. 한국 응용생물학회. 26(4), pp. 358-364.
- 오승환, 박창석, 정영륜. 1980. 인삼 경작지 미생물 생태 및 생물학적 방제연구. 한국인삼연초연구원 인삼연구보고서, pp. 22-46.
- 유연현, 오승환, 김기황, 조대휘. 1993. 인삼 토양 병해충의 방제 및 농약개발 연구. 한국인삼연초연구원 인삼연구보고서(재배분야). pp. 93-154.
- 조대휘, 유연현, 오승환, 이호자. 1997. 인삼 뿌리썩음병균 *Cylindrocarpon destructans*의 균사생육과 포자형성에 미치는 탄소원과 질소원의 영향. 한국식물병리학회지 13(1), pp. 30-36.
- 조대휘, 유연현. 2001. 인삼 뿌리썩음병균 *Cylindrocarpon destructans*의 후막포자 발아에 미치는 배양온도 및 pH의 효과. 인삼학회지 25(3), pp. 136-140.
- Ahmed, A. S., Sanchez, C. P. Candela, M. E. 2000. Evaluation of induction of systemic resistance in pepper plants (*Capsicum annuum*) to *Phytophthora capsici* using *Trichoderma harzianum* and its relation with capsidiol accumulation. Eur. J. Plant Pathol. 106, 817-824.
- Altomare, C., Norvell, W. A., Björkman, T. Harman, G. E. 1999. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. Appl. Environ. Microbiol. 65, 2926-2933.
- Anderson, R. D. et al. 1993. In Cellular and Molecular Aspects of the Plant Hormone Ethylene (eds Pech, J. C., Latché, A. & Balague, C.) 197-204. (Kluwer, Dordrecht, 1993).
- Bailey, B. A., Taylor, R., Dean, J. F. D. Anderson, J. D. 1991. Ethylene biosynthesis-inducing endoxylanase is translocated through the xylem of *Nicotiana tabacum* cv. *xanthi* plants. Plant Physiol. 97, 1181-1186.
- Baker, B., Zambryski, P., Staskawicz, B. Dinesh-Kumar, S. P. 1997. Signaling in plant-microbe interactions. Science 276, 726-733.
- Bigirimana, J, De Meyer, G, Poppe, J, Elad, Y and Hofte, M. 1997. Induction of systemic resistance on bean (*Phaseolus vulgaris*) by *Trichoderma harzianum*. Med. Fac. Landbouww. Univ.

Gent 62, 1001–1007.

Chang, Y.-C., Chang, Y.-C., Baker, R., Kleifeld, O. Chet, I. 1986. Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. Plant Dis. 70, 145–148.

Chatterjee, A., Sukul, N. C., Laskar, S. and Ghoshmajumdar, S. 1982. Nematicidal principles from two species of Lamiaceae. *J. Nematol.* 14: 118-120.

Cho, H. J. S. C. Han. 1986. Survey of plant parasitic nematodes on economic crops. Korean J. Plant Protec. 25:175-182.

Cho, M. R., B. C. Lee, D. S. Kim, H. Y. Jeon, M. S. Yiem and J. O. Lee. 2000. Distribution of plant-parasitic nematodes in fruit vegetable production areas in Korea and identification of root-knot nematodes by enzyme phenotypes. Korean J. Appl. Entomol. 39:123-129.

Choi, D. R. and Y. E. Choi. 1982. Survey on plant parasitic nematodes in cropping by controlled horticulture. Korean J. Plant Protec. 21:8-14.

Choi, I. H., Park, J. Y., Shin, S. C. and Park, I. K. 2006. Nematicidal activity of medicinal plant extracts and two cinnamates isolated from *Kaempferia galanga* L. (Proh Hom) against the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Nematol.* 8: 359-365.

Choi, Y. E. 1978. Differential host responses to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). Res. Rev. of Kyungpook Nat. Univ. 26:611-615.

Choi, Y. E. and H. Y. Choo. 1978. A study on the root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) affecting economic crops in Korea. Korean J. Plant Protec. 17:89-98.

Choo, H. Y., H. K. Kim, J. C. Park, S. M. Lee, and J. I. Lee. 1987. Studies on the patterns of plastic film house, their growing conditions, and diseases and pests occurrence on horticultural crops in southern part of Korea. Insects and nematodes associated with horticultural crops and effect of nursery soil conditions on the infection of root-knot nematode. Korean J. Plant Protec. 26:195-201.

Commandon, J., and P. de Fonbrune. 1939. De la formation et du fonctionnement des pièges des champignons prédateurs des nématodes. Recherches effectuées à l'aide de la micromanipulation et de la cinématographie. C. R. Acad. Sci. Paris 207:304-305. (in Barron, 1977)

Couch, J. N. 1937. The formation and operation of the traps in the nematode-catching fungus, *Dactylella bembicodes* Drechsler. Jour. Elisha Mitchell Sci. Soc. 53:301-309.

De Meyer, G., Bigirimana, J., Elad, Y. Hofte, M. 1998. Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*. Eur. J. Plant Pathol. 104, 279–286 .

De Wit, P. J. G. M. et al. 2002. The molecular basis of co-evolution between *Cladosporium fulvum* and tomato. Antonie van Leeuwenhoek 81, 409–412.

Dowds BCA and Peters A. 2001. Virulence mechanisms. pp. 79-98. in Entomopathogenic nematode. Ed. Gaugler R. CABI Publishing, UK.

Drechsler, C. 1933a. Morphological diversity among fungi capturing and destroying nematodes. Jour. Wash. Acad. Sci. 23:138-141.

Drechsler, C. 1933b. Morphological features of some more fungi that capture and kill nematodes. Jour. Wash. Acad. Sci. 23:267-270.

Drechsler, C. 1937. Some hyphomycetes that prey on free-living terricolous nematodes. Mycologia 29:447-552.

Drechsler, C. 1944. Three hyphomycetes that capture nematodes in adhesive networks. Mycologia 36:138-171.

Drechsler, C. 1946. A nematode-destroying Phycomycete forming immotile spores in aerial evacuation tubes. Bull. Torrey Bot. Cl. 72:1-17.

Elbadri, G. A., Lee, D. W., Park, J. C., Yu, H. B. and Choo, H. Y. 2008. Evaluation of various plant extracts for their nematicidal efficacies against juveniles of *Meloidogyne incognita*. J. Asia-Pacific Entomol. 11: 99–102.

Ferris, H. and Zheng, L. 1999. Plant sources of Chinese herbal remedies. J. Nematol. 31 : 241-263.

Forst S, Dowds B, Boemare N, Stackebrandt E. 1993. *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: bugs that kill bugs. Annu. Rev. Microbiol. 51:47-72.

Germani, G., Reversat, G. and Luc. M. 1983. Effect of *Sesbania rostrata* on *Hirschmanniella oryzae* in flooded rice. J. Nematol. 15: 269-271.

Gillespie JP, Kanost MR, Trenczek T. 1997. Biological mediators of insect immunity. Annu. Rev. Entomol. 42: 611-643.

- Grewal, P. S. 1989. Nematicidal effects of some plant extracts to *Aphelenchoides composticola* (Nematoda) infesting mushroom, *Agaricus bisporus*. *Revue de Nematol.* 12: 317-322.
- Hanson, L. E., Howell, C. R. 2004. Elicitors of plant defense responses from biological control strains of *Trichoderma virens*. *Phytopathology*. Volume 94, 2 Pages 171-176.
- Harman, G. E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T22. *Plant Dis.* 84, 377-393.
- Harman, G. E. Donzelli, B. G. G. 2001. In *Enhancing Biocontrol Agents and Handling Risks* (eds Vurro, M. et al.) 114-125.
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat Review Microbiol.* 2 (1): 43-56.
- Harman, G.E., Latorre, B.A. Agosín, E., San, Martín, R. Riegel, D.G. Nielsen, P.A., Tronsmo, A., Pearson. R.C. 1996. Biological and integrated control of *Botrytis* bunch rot of grape using *Trichoderma* spp. *Biol. Control* 7, 259-266.
- Harman, G.E., Jin, X., Stasz, T.E., Peruzzotti, G., Leopold, A.C., Taylor, A.G., 1991. Production of conidial biomass of *Trichoderma harzianum* for biological control. *Biological control* 1, 23-28.
- Heo, J. 1610. *Dongeuibogam*. CD-ROM. Yeogang Press, 1994. Seoul, Korea.
- Howell, C. R., Hanson, L. E., Stipanovic, R. D. Puckhaber, L. S. 2000. Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology* 90, 248-252.
- Huang, K. C. 1993. *The pharmacology of Chinese herbs*. Ann Arbor, MI: CRC Press.
- Jangyul K., Kathleen E. 1996. Bald Mutants of *Streptomyces griseus* That Prematurely Undergo Key Events of Sporulation. *J. Bacteriology*, Aug. p.4643-4650.
- Jiang H., Kathleen K., 1998. Visualization of Penicillin-Binding Proteins during Sporulation of

Streptomyces griseus. J. Bacteriology, Apr. p. 2125-2132.

Johnson, A. W., Golden, A. M., Auld, D. L. and Sumner, D. R. 1992. Effects of rapeseed and vetch as green manure crops and fallow on nematodes and soil-borne pathogens. *J. Nematol.* 24: 117-126.

Kim, D. G. and H. Ferris. 2002. Relationship between crop losses and initial population densities of *Meloidogyne arenaria*. *J. Nematol.* 34:43-49.

Kim, D. G. and I. K. Yeon. 2001. Development of *Meloidogyne arenaria* on oriental melon (*Cucumis melo* L.) in relation to degree-day accumulation under greenhouse conditions. *Plant Pathol.* 17:159-163.

Kim, D. G. and R. D. Riggs. 1995. Efficacy of the nematophagous fungus ART18 in alginate-clay pellet formulations against *Heterodera glycines*. *J. of Nematology* 27:602-608.

Kim, D. G., and R. D. Riggs. 1991. Characteristics and efficacy of a sterile Hyphomycete (ARF18), a new biocontrol agent for *Heterodera glycines* and other nematodes. *J. Nematol.* 23:275-282.

Kim, D. G., and R. D. Riggs. 1992. Biological control. Pp.133-142 in R. D. Riggs and J. A. Wrather, eds. *Biology and management of the soybean cyst nematode*. St. Paul, Minnesota: APS Press.

Kim, D. G., D. R. Choi, and S. B. Lee. 2001. Effects of control methods on yields of oriental melon in fields infested with *Meloidogyne arenaria*. *Res. Plant Dis.* 7:49-55.

Kim, D. G., J. K. Lee, Y. K. Lee, Y. C. Choi, and Y. K. Kim. 1997. Description on five species of *Arthrobotrys* (Corda) Schenck, Kendrick & Pramer in Korea and their key. *RDA. J. Crop Protection* 39:33-41.

Kim, D. G., Lee, Y. K., Lee, J. K., Choi, Y. C. 1997. Simple cultivation of a *Rhabditis* sp. in nutrient broth. *RDA. J. Crop Protec.* 39: 42-46.

Kim, D. G., S. G. Bae and Y. S. Shin. 2001. Distribution of nematophagous fungi under different habitats. *Korean J. Mycol.* 29:123-126.

Kim, D. G., Y. H. Ryu, and H. G. Hwang. 2006. First report of two nematode-trapping fungi, *Monacrosporium ullum* sp. nov. and *Arthrobotrys amerospora*, from Korea. *Plant Pathol. J.* 22:174-178.

- Kim, H. J., Choo, H. Y., Park, C. G., Lee, S. M. and Kim, J. B. 1998. Biological control of northern root-knot nematodes, *Meloidogyne hapla* with plant extract. *Korean J. Appl. Entomol.* 37: 199-206.
- Kinloch, R. A. and K. Hinson. 1972. The Florida program for evaluating soybean (*Glycine max* L. Merr.) genotypes for susceptibility to root-knot nematode disease. *Proc. Soil Crop Sci. Soc. Florida* 32:173-176.
- Kuhajek, J. M., Jeffers, S. N., Slattery, M. and Wedge, D. E. 2003. A rapid microbioassay for discovery of novel fungicides for *Phytophthora* spp. *Phytopathology* 93: 46-53.
- Lanzuise, S. et al. 2002. Cloning of ABC transporter-encoding genes in *Trichoderma* spp. to determine their involvement in biocontrol. *J. Plant Pathol.* 84, 184.
- Lindsey, D. L. Baker, R. 1967. Effect of certain fungi on dwarf tomatoes grown under gnotobiotic conditions. *Phytopathology* 57, 1262-1263.
- Lim, S. H., Zhu, Y. Z. Kim, M. S., Lee, Y. S., Son, J. S., Park, D. S., Hur, J. H., Kim, H. Y. and Choi, H. J. 2004. Nematicidal activity of Korean native plants against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Korean J. Pesticide Sci.* 8: 353-357.
- Linford, M. B. 1937. Stimulated activity of natural enemies of nematodes. *Science* 85(2196):123-124.
- Linford, M. B. and F. Yap. 1939. Root-knot nematode injury restricted by a fungus. *Phytopathology* 29:596-609.
- Linford, M. B., F. Yab, and J. M. Oliveira. 1937. Reduction of soil populations of the root-knot nematode during decomposition of organic matter. *Soil sci.* 45:127-141.
- Lo, C.-T., Liao, T. F. & Deng, T. C. 2000. Induction of systemic resistance of cucumber to cucumber green mosaic virus by the root-colonizing *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 90 (Suppl.), S47.
- MacGuidwin, A. E. and Layne, T. L. 1995. Response of nematode communities to sudangrass and sorghum-sudangrass hybrids grown as green manure crops. *J. Nematol.* 27: 609-616.
- McGaw, L. J., Van der Merwe, D. and Eloff, J. N. 2007. In vitro anthelmintic, antibacterial and

cytotoxic effects of extracts from plants used in South African ethnoveterinary medicine. *The Veterinary J.* 173 : 366–372.

McGaw, L. J., Van der Merwe, D. and Eloff, J. N. 2007. In vitro anthelmintic, antibacterial and cytotoxic effects of extracts from plants used in South African ethnoveterinary medicine. *The Veterinary J.* 173 : 366–372.

Miao, S. D. 1993. Zhon ghua yao hai. (The expanse of Chinese herbal medicines). Haerbin, China: Haerbin Publisher.

Mojtahedi, H., Santo, G. S. and Ingham, R. E. 1993. Suppression of *Meloidogyne chitwoodi* with sudangrass cultivars as greenmanure. *J. Nematol.* 25: 303-311.

Moriarty, Y. 1964. The efficacy of chrysoidin, new blue R and phloxine B for determining the viability of beet eelworm, *Heterodera schachtii* Schm. *Nematologica* 10: 644-646.

Oka, Y., Ben-Daniel, B. and Cohen, Y. 2012. Nematicidal activity of the leaf powder and extracts of *Myrtus communis* against the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Plant Pathol.* 61: 1012–1020.

Oostenbrink, M. 1960. Population dynamics in relation to croppings, manuring and soil disinfection. In *Nematology*, Sasser, J. N. and W. R. Jenkins, Univ. of North Carolina.

Papavizas, G.C., 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology, and potential for biocontrol. *Annual Review of Phytopathology* 23, 23–54.

Pavaraj, M., Bakavathiappan, G. and Baskaran, S. 2012. Evaluation of some plant extracts for their nematicidal properties against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *J. Biopest.* 5(S): 106-110.

Perry, L. M. 1980. Medicinal plants of east and southeast Asia. Cambridge, MA: Massachusetts Institute of Technology.

Preiser, F. A. 1962. Study and development of comparative laboratory testing of nematicides. PhD. Thesis. MacDonald College, McGill University, Montreal, Canada.

Prot., J. C., Soriano, I. R. S., Mantias, D. M. and Savary, S. 1992. Use of green manure crops in control of *Hirschmanniella mucronata* and *H. oryzae* in irrigated rice. *J. Nematol.* 24: 127-132.

Ruocco, M. et al. 2002 .ABC transporters in *Trichoderma harzianum*. The 7th International

Mycological Congress, Book of Abstracts, Oslo, Norway, 11–17 August 2002, 354.

SAS, 1990. *SAS/STAT User's Guide*. Version 6. SAS Institute Inc., Cary, NC.

Satoshi T., Sawada, J. and Moromizato, Z. 2008. Nematicidal activity of Okinawa Island plants on the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood. *Plant Soil* 303: 207–216.

Siddiqui, M. A. and Alam, M. M. 1990. Toxicity of different plant parts of *Tagetes lucida* to plant-parasitic nematodes. *Indian J. Nematol.* 18: 181-185.

Soprunov, F. F. 1958. (Predacious fungi - Hyphomycetes and their application in the control of pathogenic nematodes. Academy of Sciences of the Turkmen SSR, 1958, Translated from Russian). 292 p.

Southey, J. F. 1986. Laboratory methods for work with plant and soil nematodes. London: Her Majesty's Stationery Office.

Tarjan, A. C. 1955. Evaluation of various nematodes for use in contact nematicide tests. *Proc. Helm. Soc. Wash.* 22: 33-37.

Taylor A. L. and Sasser, J. N. 1978. Biology, Identification and Control of Root-knot Nematodes (*Meloidogyne* Species). North Carolina State Univ. Graphics, North Carolina.

Verma, B. S., Verma, K. K., Sangwan, N. K. and Dhindsa, K. S. 1989. Toxicity of some indigenous plant extracts to root-knot, seedgall, and citrus nematodes. *Pesticides(Bombay)* 23: 25-57.

Viterbo, Monero, M., Ramot, O. 2002. Expression regulation of the endochitinase chit36 from *Trichoderma asperellum* (T. harzianum T-203). *Curr.Genet.* 42, 114–122.

Whapham, C. A., Jenkins, T., Blunden, G. and Hankins, S. D. 1994. The role of seaweed extracts, *Acophyllum nodosum*, in the reduction in fecundity of *Meloidogyne javanica*. *Fund. & Appl. Nematol.* 17: 181-183.

Wiratno D. T., Van den Bergb, H., Riksend, J. A. G., Rietjensb, I. M. C. M., Djiwantia, S. R., Kammengad, J. E. and Murkb, A. J. 2009. Nematicidal activity of plant extracts against the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *The Open Nat. Prod. J.* 2: 77-85.

Yedidia, I., Benhamou, N. Chet, I. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumissativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1061–1070.

Yedidia, I., Benhamou, N., Kapulnik, Y. Chet, I. 2000. Induction and accumulation of PR protein activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. *Plant Physiol. Biochem.* 38, 863–873

Zeilinger, S., Galhaup, C., Payer, K., Woo, S.L., Mach, R. L., Fekete, C., Lorito, M., Kubicek, C. P. 1999. Chitinase gene expression during mycoparasitic interaction of *Trichoderma harzianum* with its host. *Fungal Genet. Biol.* 26, 131–140.

Zhang, G. and Xia, G. 1996. Color pictorial handbook of toxic Chinese herbs. Tiangzing, China: Xinhao Bookstore.