

발 간 등 록 번 호

11-1543000-000849-01

뿌리혹선충 방제를 위한 항선충 미생물
대량배양복합체 개발

(Study on Mass Cultivation of Microorganism
for Control of Root-Knot Nematode)

(주) 푸르네

농 립 축 산 식 품 부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “뿌리혹선충 방제를 위한 항선충 미생물 제품 및 대량배양복합체 개발”에 관한 연구의 보고서로 제출합니다.

2015년 3월 17일

주관연구기관명 : (주)푸르네

주관연구책임자 : 박 윤 석

세부연구책임자 : 박 윤 석

연 구 원 : 최 기 정

연 구 원 : 이 미 영

연 구 원 : 나 정 행

협동연구기관명 : 전남대학교

협동연구책임자 : 김 길 용

연 구 원 : 이 용 성

연 구 원 : Kyaw wai naing

연 구 원 : Nguyen Xuan Hoa

연 구 원 : 정 민 해

연 구 원 : 양 서 영

협동연구기관명 : 담양군 농업기술센터

협동연구책임자 : 김 선 배

연 구 원 : 김 동 현

연 구 원 : 이 미 정

연 구 원 : 김 경 란

연 구 원 : 김 효 정

연 구 원 : 정 은 아

연 구 원 : 박 수 진

요 약 문

I. 제 목

뿌리혹선충 방제를 위한 항선충 미생물 제품 및 대량배양복합체 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

○ 농작물의 연작장해

토양 내 미생물이나 해충들은 숙주 또는 먹이에 대한 특이성을 가지고 있다. 작물을 연작 하게 되면 특정 병원균이나 해충에게 먹이를 계속해서 공급해 주게 되는 결과, 식물 병원균과 해충, 특히 선충의 밀도는 반드시 증가한다. 현재 우리나라의 농업은 연작을 채택 할 수밖에 없는 현실로써 그 피해는 점점 더 증가하고 있다. 토양 선충의 피해는 세계적으로 90-100조원에 이르는 것으로 추정되며 (2004년), 선충 방제를 위해 대량의 화학농약이 살포되고 있다. 하지만 선충은 퇴치되지 않았고 오히려 화학농약에 대한 내성을 키우는 결과를 가져왔다. 결과적으로 농약살포 횟수와 양이 증가 함에도 선충의 감염은 증가하고 있는 실정이다. 뿌리혹 선충은 알로부터 부화하여 토양으로 나온다. 이렇게 나온 부화유충을 2기 유충이라 하며, 주변 뿌리의 선단부에 침입하여 암컷으로 탈피 한 후 알집(난낭)을 만들어 500-600개의 알을 낳는다. 선충 알의 난각은 외부 환경으로부터 자신을 보호하는 매우 단단한 구조 물질인 키틴(chitin)으로 주로 구성되어 있으며 알은 젤라틴 성분인 난낭이 감싸고 있다. 따라서 알은 외부의 환경으로부터 매우 안전하게 보호되어 부화한다. 한편 알로부터 부화된 유충의 표피는 주로 젤라틴과 콜라겐으로 구성되어 있다. 만약 알의 난각, 난낭, 및 유충의 표피가 키틴, 젤라틴 및 콜라겐분해효소에 의해 손상을 입는다면, 알의 부화 및 유충의 활동성과 운동성에 제약이 따를 것이다. 이러한 이유 때문에 키틴, 젤라틴, 및 콜라겐의 성분이 선충 제어의 표적이 되고 있다. 그러므로, 키틴, 젤라틴 특정 성분을 이용하여 선충을 방제하는 것이 필요하다.

○ 기존 생물학적 방제 (Bio-control)의 실패 원인

현재까지 많은 학자들이 기능성미생물을 이용하여 병원균 또는 해충을 방제하려고 시도하였다. 그러나 이러한 연구의 대부분은 실내에서 단일 또는 몇 종류의 기능성 미생물을 혼합 배양하여 어린 묘목에 접종한 후 그 효과를 보고 하는 수준이다. 이를 실제 포장에 적용할 경우 그 효과가 없거나 아주 미약한 것으로 보고되고 있다. 포장 적용 실패의 가장 큰 원인은 접종균의 개체수가 토착미생물에 비해서 매우 적다는 것이다. 토양 속에는 토양 1 g당 최소 1억-100억 개체수의 토착미생물 (autochthonous microorganism)이 서식하고 있다. 현재 농가에서는 시중에 판매되고 있는 1L용 미생물제제를 구입하여 물로 희석해 사용하고 있는 실정이다. 따라서 시용된 미생물이 토착 미생물과 경쟁하여 생존 및 활성을 갖는다는 것은 불가능에 가깝다. 그러므로 미생물을 대량으로 배양하여 살포하는 것이 필요한 실정이다.

○ 항선충 미생물의 경제적 대량배양과 토양내 활성화

항선충 미생물의 생육을 위한 특정한 기질을 이용하면 경제적인 대량배양이 가능하다. 키틴과 젤라틴은 특수한 구조로 되어있어서 이를 미생물이 에너지원과 탄소원으로 이용하기 위해서는 반드시 키틴분해 및 젤라틴분해효소를 생성하여야 가능하다. 즉, 키틴 및 젤라틴분해효소를 생성하지 못한 균은 키틴과 젤라틴을 이용하여 생육할 수 없다는 것이다. 따라서 농가는 물론 희석하지 않고 대량으로 배양된 항선충 미생물을 매우 경제적인 가격으로 살포할 수 있다. 앞서 언급한 항선충 미생물의 기질 (키틴, 젤라틴) 특이성을 이용하고, 본 연구진이 개발하고자하는 배양 조건을 적용한다면 비 멸균 상태 즉, 노출된 환경에서 특정 미생물의 농가 직접 대량배양이 가능하다.

그러므로, 본 과제를 통하여 항선충 미생물, 젤라틴/키틴배양체 및 미생물 보조영양원 (액비)으로 구성된 항선충 미생물 대량배양복합체를 개발 하고자 하는 것이다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 연구개발의 최종목표 및 주요내용

가. 연구개발의 최종목표

뿌리혹선충 방제를 위한 항선충 미생물 제품 및 대량배양복합체 개발

나. 연구개발의 주요내용

- (1) 항선충 미생물 특성연구 및 미생물제제 연구
- (2) 항선충 미생물제제 대량배양배지 및 미생물보조영양원 (액비) 연구
- (3) 포트에서 항선충 미생물 대량배양복합체 시용에 따른 효능 연구
- (4) 포장에서 항선충 미생물 대량배양복합체 시용에 따른 효능 연구
- (5) 항선충 미생물 대량배양복합체 제품화 및 판매

2. 과제별(세부·협동) 연구개발의 목표 및 내용

가. 제1세부과제 연구개발의 목표 및 내용

(1) 연구개발의 목표

항선충 미생물의 선충 억제 활성조사와 제품화

(2) 연구개발의 내용

(가) 뿌리혹선충 분리 및 선발 미생물 항선충 활성 연구

① 미생물 처리에 따른 항선충 활성 조사

㉠ 미생물의 선충알 기질사용에 따른 키틴분해효소 조사

㉡ 미생물의 선충알 기질사용에 따른 분해산물 조사

㉢ 미생물의 선충유충 기질사용에 따른 젤라틴분해효소 조사

㉣ 미생물의 선충유충 기질사용에 따른 분해산물 조사

(나) 선발된 미생물의 알 파괴효소 및 선충 표피 파괴효소 특성 연구

① 알 파괴 효소

㉠ chitinase 활성 측정

- ㉠ chitinase 정제 및 알 파괴 조사
- ② 선충 표피 파괴 효소
 - ㉡ gelatinase 활성 측정
 - ㉢ gelatinase 정제 및 유충 파괴 조사
- (다) 미생물 보조영양원(액비) 확립실험
 - ① 비료 등록을 위한 작물 생육 실험 및 성분 조사
- (라) 항선충 미생물의 작물 실험
 - ① 포트에서 작물 생육 및 선충억제 조사
 - ㉡ 항선충 미생물의 작물생육 효과 실험
 - ㉢ 항선충 미생물의 선충억제 실험
 - ② 미생물제제 유통기한 실험
 - ㉡ 첨가제 종류에 따른 유통기한 영향 조사
- (마) 식물체 및 토양 내 효소 활성 측정
 - ① 포트실험에서 식물체 항산화효소 측정
 - ㉡ peroxidase 및 polyphenol oxidase
 - ② 포트실험에서 식물체 내 병 저항 효소 측정
 - ㉡ β -1,3-glucanase 및 chitinase
 - ③ 포장실험에서 토양 내 효소 활성 조사
 - ㉡ chitinase 및 gelatinase 활성 측정
- (바) 대량배양복합체 개발 관련기술의 특허, 시제품 및 마케팅 전략 수립
 - ① 작물별 희석배율 및 사용 매뉴얼 작성
 - ② 항선충 미생물 대량배양복합체 상표 및 특허 출원
 - ③ 시장 분석을 통한 마케팅 전략 수립 및 수행
 - ④ 시제품을 통한 실제 시범포 운영, 검증
- (사) 항선충 미생물 대량배양복합체의 제조공정 설계 및 품질관리 계획 설정

나. 제1협동과제 연구개발의 목표 및 내용

(1) 연구개발의 목표

항선충 미생물 대량배양 배양체와 미생물 보조영양원 개발 및 포트 실증

(2) 연구개발의 내용

(가) 항선충 미생물 배양 최적조건 확립

- ① 키틴과 젤라틴 비율에 따른 활성 검증
 - ㉡ 미생물 개체 수 측정
 - ㉢ 알 부화 억제율 측정
 - ㉣ 유충 치사율 측정
- ② 성장인자 첨가에 따른 활성 검증
 - ㉡ 미생물 개체 수 측정
 - ㉢ 알 부화 억제율 측정
 - ㉣ 유충 치사율 측정

- ③ 미량요소 첨가에 따른 활성 검증
 - ㉠ 미생물 개체 수 측정
 - ㉡ 알 부화 억제율 측정
 - ㉢ 유충 치사율 측정
- (나) 개발된 미생물제제, 액비 및 배양체 등록시험
 - ① 미생물 보조영양원(액비) 등록시험
 - ㉠ 비해시험 1건, 작물재배시험 1건, 보증성분 및 유해성분 분석 시험
 - ② 토양미생물제제 등록시험
 - ㉠ 작물재배시험 1건, 약해시험 1건
 - ③ 젤라틴/키틴 배양체 등록시험
 - ㉠ 작물재배시험 1건, 보증성분 및 유해성분 분석 시험
- (다) 항선충 미생물 대량배양복합체 시제품 제작
 - ① 젤라틴/키틴배양체, 미생물 보조영양원 및 미생물 적정 비율 조합 조사
 - ② 온도와 기타 환경에 따른 영향 조사
- (라) 포트에서 항선충 미생물 대량배양복합체의 선충 억제 활성 조사
 - ① 뿌리혹선충 난양 수
 - ② 뿌리혹 수 측정
 - ③ 토양내 뿌리혹선충의 유충 수
- (마) 포트에서 항선충 미생물 대량배양복합체의 작물생장 효과 조사
 - ① 지상부 생초장
 - ② 작물의 지상부 생체중 및 건조중

다. 제2협동과제 연구개발의 목표 및 내용

(1) 연구개발의 목표

살선충 활성물질 분리 및 항선충 미생물 대량배양복합체의 실제 포장 실증

(2) 연구개발의 내용

- (가) 항선충 미생물이 생산하는 살선충 활성물질의 분리 및 활성 연구
 - ① 살선충 활성물질의 추출 및 정제
 - ② 분리한 살선충 활성물질의 선충 억제 활성 조사
 - ㉠ 알 부화 억제율 측정
 - ㉡ 유충 치사율 측정
- (나) 포장에서 항선충 미생물 대량배양복합체의 작물 생장 및 생리적 영향 조사
 - ① 지상부 생초장, 생체중 및 건물중 측정
 - ② 뿌리무게
 - ③ 수확량
 - ④ 과실 당도
- (다) 항선충 미생물 대량배양복합체의 선충 억제 활성 검증
 - ① 뿌리혹선충 난양 수 조사
 - ② 뿌리혹 수 측정

- ③ 뿌리혹선충의 알 수 조사
- ④ 토양내 뿌리혹선충의 유충 수 조사
- (라) 항선충 미생물 대량배양복합체의 토양 내 미생물상 영향 조사
 - ① 토양 내 gelatin 분해균 조사
 - ② 토양 내 chitin 분해균 조사

3. 연차별 연구개발의 목표 및 내용

구분 (연도)	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도 (2012)	항선충 미생물 특성 연구 및 미생물 보조 영양원(액비) 확립 실험	<ul style="list-style-type: none"> ○ 선발된 미생물의 항선충 활성 연구 <ul style="list-style-type: none"> - 미생물의 선충알 기질사용에 따른 키틴분해효소 조사 - 미생물의 선충알 기질사용에 따른 분해산물 조사 - 미생물의 선충유충 기질사용에 따른 젤라틴분해효소 조사 - 미생물의 선충유충 기질사용에 따른 분해산물 조사 ○ 효소 특성 조사 <ul style="list-style-type: none"> - 알 파괴 효소 chitinase 정제 및 알 파괴 조사 - 유충 파괴 효소 gelatinase 또는 protease 정제 및 유충 파괴 조사 ○ 미생물 보조영양원(액비) 확립 ○ 효소활성 조사 <ul style="list-style-type: none"> - chitinase - gelatinase
	항선충 미생물의 작물 실험	<ul style="list-style-type: none"> ○ 포트에서 작물 생육 및 선충억제 조사 <ul style="list-style-type: none"> - 항선충 미생물의 작물생육 효과 실험 - 항선충 미생물의 선충억제 실험 ○ 미생물제제 유통기한 실험 <ul style="list-style-type: none"> - 첨가제 종류에 따른 유통기한 영향 조사
	항선충 미생물 대량 배양체 조건 확립 실험	<ul style="list-style-type: none"> ○ 젤라/키틴 비율에 따른 미생물 활성 조사 <ul style="list-style-type: none"> - 미생물 개체 수 조사 - 알 부화 억제율 측정 - 유충 치사율 측정 ○ 미량요소 첨가에 따른 미생물 활성 조사 <ul style="list-style-type: none"> - 미생물 개체 수 조사 - 알 부화 억제율 측정 - 유충 치사율 측정 ○ 생장인자 첨가에 따른 미생물 활성 조사 <ul style="list-style-type: none"> - 미생물 개체 수 조사 - 알 부화 억제율 측정 - 유충 치사율 측정
	항선충 미생물의 특성연구	<ul style="list-style-type: none"> ○ 살선충 활성물질 분리 및 특성조사 <ul style="list-style-type: none"> - 살선충 물질의 추출 및 정제 - 분리한 살선충 물질의 알부화 억제 및 유충 치사율 측정

구분 (연도)	연구개발의 목표	연구개발의 내용
2차년도 (2013)	항선충 미생물의 생산 효소 정제 및 항선충 활성 검증	<ul style="list-style-type: none"> ○ 1차년도에 이어 효소 활성 조사 <ul style="list-style-type: none"> - 알 파괴 효소 chitinase 정제 및 알 파괴 조사 - 유충 파괴 효소 gelatinase 정제 및 유충 파괴 조사
	항선충 미생물 대량배 양복합체 시용시 효소 변화 조사	<ul style="list-style-type: none"> ○ 식물체 활성 측정 <ul style="list-style-type: none"> - 포트실험에서 식물체 향산화효소 측정 - 포트실험에서 식물체 내 병 저항 효소 측정 ○ 토양 내 효소 활성조사 <ul style="list-style-type: none"> - 포장실험에서 토양 내 chitinase 및 gelatinase 활성 측정
	항선충 미생물 대량배 양복합체 시제품 제작 및 포트 실험	<ul style="list-style-type: none"> ○ 항선충 미생물 대량배양복합체 시제품 제작 <ul style="list-style-type: none"> - 젤라틴/키틴배양체, 미생물 보조영양원(액비) 및 미생물 적정 비율 조합 조사 - 온도와 기타 환경에 따른 영향 조사 ○ 작물의 성장 및 생리적인 양상 조사 <ul style="list-style-type: none"> - 지상부 생 초장, 생체중, 건조중 ○ 작물의 선충병해 방제 정도 조사 <ul style="list-style-type: none"> - 난낭 수, 후지수 및 알 개수 조사 - 토양내 유충 조사 ○ 미생물 보조영양원(액비) 등록시험 ○ 토양미생물제제 등록시험 ○ 젤라틴/키틴 배양체 등록시험
	포장에서 항선충 미 생물 대량배양복합체 의 선충 억제 및 작물 성장 평가 (대상 작물 멜론, 토마토)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 작물의 성장 및 생리적인 양상 조사 <ul style="list-style-type: none"> - 지상부 생 초장, 생 체중, 건 체중 및 수확량 조사 - 과일 당도 조사 ○ 작물의 선충병해 방제 정도 조사 <ul style="list-style-type: none"> - 난낭 수, 후지수 및 알 개수 조사 - 토양 내 유충 조사
	포장에서 항선충 미생 물 대량배양복합체 시 용에 따른 미생물상 변화 조사	<ul style="list-style-type: none"> ○ 토양내 세균상 조사 <ul style="list-style-type: none"> - gelatin 및 chitin 분해균 수 조사
	항선충 미생물의 특성 연구	<ul style="list-style-type: none"> ○ 1차년도에 이어 살선충 활성물질 분리 및 특성조사 <ul style="list-style-type: none"> - 살선충 물질의 추출 및 정제 - 분리한 살선충 물질의 알부화 억제 및 유충 치사율 측정

구분 (연도)	연구개발의 목표	연구개발의 내용
3차년도 (2014)	경제성 분석, 농가보급, 기술이전과 제품 생산 및 판매	<ul style="list-style-type: none"> ○ 향선충 미생물 대량배양복합체의 포장에서 사용 타당성 및 경제성 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 개발된 기술의 산업체로의 기술이전 - 향선충 미생물 대량배양복합체의 제품화 - 자동화 시설을 통한 제품생산 및 포장 - 농가 보급 및 전국적 판매망 확충
	향선충 미생물 대량배양복합체 사용시 효소 변화 조사	<ul style="list-style-type: none"> ○ 식물체 활성 측정 <ul style="list-style-type: none"> - 포트실험에서 식물체 향산화효소 측정 (peroxidase 및 polyphenol oxidase) - 포트실험에서 식물체 내 병 저항 효소 측정 (β-1,3-glucanase 및 chitinase) ○ 토양 내 효소 활성조사 <ul style="list-style-type: none"> - 포장실험에서 토양 내 chitinase 및 gelatinase 활성 측정
	포트에서 향선충 미생물 대량배양복합체의 선충 억제 및 식물 성장 효과 조사	<ul style="list-style-type: none"> ○ 작물의 성장 및 생리적인 양상 조사 <ul style="list-style-type: none"> - 지상부 생 초장, 생체중, 건조중 및 수확량 ○ 작물의 선충병해 방제 정도 조사 <ul style="list-style-type: none"> - 난낭 수, 흑 지수 및 알 개수 조사 - 토양내 유충 조사
	포장에서 향선충 미생물 대량배양복합체의 선충 억제 및 작물 성장 평가	<ul style="list-style-type: none"> ○ 작물의 성장 및 생리적인 양상 조사 <ul style="list-style-type: none"> - 지상부 식물체 생 초장, 생 체중, 건 체중 및 수확량 조사 - 과일 당도 조사 ○ 작물의 선충병해 방제 정도 조사 <ul style="list-style-type: none"> - 난낭 수, 흑지수 및 알 개수 조사 - 토양내 유충 조사 (대상 작물: 방울토마토, 수박)
	포장에서 향선충 미생물 대량배양복합체의 토양 미생물상 변화 조사	<ul style="list-style-type: none"> ○ 토양내 세균상 조사 <ul style="list-style-type: none"> - gelatin 및 chitin 분해균 수 조사

IV. 연구개발결과

제 1 절 항선충 미생물 특성연구 및 미생물제제 연구

1. 항선충 미생물 선행 연구 결과

가. 항선충 미생물 분리 및 특성 조사

전남 해안가 일대에서 게껍질이 풍부한 토양을 채취한 후 토양으로부터 키틴/젤라틴 분해 미생물을 분리하였다. 분리한 미생물 중에 항선충 활성이 강한 미생물을 선발하여 동정한 결과 *Lysobacter capsici*로 동정되었고, YS1215로 명명하고 NCBI genebank에 등록하였다(등록번호는 HQ610445번). 이 미생물은 키틴분해효소(chitinase) 및 젤라틴분해효소(gelatinase), 셀룰로오스분해효소(cellulase), 옥신 및 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG)를 생산함을 확인하였다

나. 미생물 처리에 따른 항선충 활성 조사

Lysobacter capsici YS1215를 5일 동안 30°C에서 배양한 후 원심분리하여 상등액을 취하여 항선충 활성을 조사한결과 50% 배양액 처리구에서 90%의 유충치사율을 보였고 알부화율은 조사 5일째 10%로 확인되었다.

2. 뿌리혹선충 분리 및 선발 미생물 항선충 활성 연구

가. 미생물의 선충알 기질사용에 따른 키틴분해효소 조사

선충알을 모은 후 멸균하고 *L. capsici* YS1215를 접종하여 날짜별로 키틴분해효소 활성(chitinase activity)을 조사한 결과 키틴분말(crab shell powder) 기질과 선충알(nematode egg) 기질 사용 모두 1일부터 3일째 까지 증가하다, 3일째 가장 높은 활성을 보였고, 그 후에는 5일째 까지 점차 감소하였다.

나. 미생물의 선충알 기질사용에 따른 분해산물 조사

L. capsici YS1215의 선충 알 분해 산물인 키토 올리고당 (N-acetyl-D-glucosamine)을 HPLC를 이용하여 조사하였다. 조사 결과 표준물질과 시료물질의 머무름 시간(retention time)이 4.99로 같게 조사되었다. 이는 미생물이 선충 알을 분해하여 배양액에 키토 올리고 1당 표준물질인 N-acetyl-D-glucosamine이 존재 하는 것을 사료된다. 대조구로 사용된 미생물을 접종하지 않은 처리구에서는 N-acetyl-D-glucosamine이 검출되지 않았다.

다. 미생물의 선충유충 기질사용에 따른 젤라틴분해효소 조사

선충 유충을 모은 후 멸균하고 *L. capsici* YS1215를 접종하여 날짜별로 젤라틴분해효소 활성(gelatinase activity)을 조사한 결과 젤라틴분말(gelatin) 기질을 사용한 것은 젤라틴분해효소 활성이 1일부터 4일째까지 증가하고 4일째 최고의 활성을 보였다. 또한 선충유충(nematode juvenile) 기질 사용 젤라틴분해효소 활성은 3일째 까지 증가하다, 그 후에는 5일째 까지 점

차 감소하였다.

라. 미생물의 선충유충 기질사용에 따른 분해산물 조사

뿌리혹선충 유충을 모은 후 멸균하고 *L. capsici* YS1215를 접종, 배양하고 3일째 배양액을 원심분리한 후 상등액을 회수 하여 분해산물인 아미노산을 조사한 결과 유충 분해 산물에서 proline이 348.905 pg/ μ l이 검출 되었다. 또한 valine 및 isoleucine 등이 검출 됐다

3. 선발된 미생물의 알 파괴효소 및 선충 표피 파괴효소 특성 연구

가. 알 파괴 효소

(1) chitinase 활성 측정

Chitinase활성을 조사한 결과 배양 3일째 최고 활성을 나타내었으며, 3일 이후에는 점차 감소하는 경향을 보였다.

(2) chitinase 정제 및 알 파괴 조사

Chitinase 정제를 통하여 43.6 kDa 분자량을 가진 chitinase를 정제하였고, 정제된 chitinase를 이용하여 알 파괴 조사 결과 정제된 chitinase가 뿌리혹선충의 알을 파괴하는 것으로 조사되었다.

나. 선충 표피 파괴 효소

(1) gelatinase 활성 측정

Gelatinase활성을 조사한 결과 1일째부터 점차 증가하여 배양 6일째 최고 활성을 나타내었고, 6일 이후에는 감소하는 경향을 보였다.

(2) gelatinase 정제 및 유충 파괴 조사

Gelatinase 정제를 통하여 255.7, 232.1 및 146.4 kDa 분자량을 가진 gelatinase를 정제하였고, 정제된 gelatinase를 이용하여 유충치사를 조사 결과 정제된 gelatinase가 뿌리혹선충의 유충의 치사에 영향을 주는 것으로 조사되었다.

4. 항선충 미생물이 생산하는 살선충 활성물질의 분리 및 활성 연구

가. 살선충 활성물질의 추출 및 정제

배양 여액을 에틸아세테이트(ethylacetate)로 추출하여 HPLC, GC-MS, LC-MS 및 NMR 등을 통하여 항선충활성을 지닌 2-hydroxypropanoic acid를 분리 동정 하였다.

나. 분리한 살선충 활성물질의 선충 억제 활성 조사

(1) 알 부화 억제율 측정

2-hydroxypropanoic acid의 뿌리혹선충 알부화율에 관하여 조사한 결과 조사 5일째 250 mM에서 36.4%의 알 부화율로, 물 처리구 44.5% 보다 8.1%의 알 부화율이 낮게 조사되었다.

(2) 유충 치사율 측정

2-hydroxypropanoic acid의 유충 치사율에서는 조사 3일째 물 처리구 6.5% 보다 250 mM 에서 10.1%로 3.5% 높게 조사되었다.

5. 미생물제제 유통기한 실험

가. 첨가제 종류에 따른 유통기한 영향

L. capsici YS1215의 유통 기한 실험을 위해 보관 1개월 후에 1차 시료채취 하여 조사한 결과 표준 배지 조성의 미생물 개체 수가 가장 높았고, 2차 및 3차 조사결과 표준 1/2 조성이 가장 좋았다. 하지만 TSB 1/2 조성에는 3차부터 6차까지 조사 결과 미생물이 검출 되지 않았다. 또한 4차, 5차 및 6차 실험결과 표준 배지 조성에서 미생물 개체 수가 가장 많이 검출되었다. 표준 배지조성(계껍질 분말사용)이 TSB 조성보다 유통기한을 길게 하는데 좋은 배지 성분임을 알 수 있다.

나. 시간경과에 따른 유통기한 영향

유통기한 조사 결과 모든 처리의 미생물 처리는 시간이 지남에 따라 점차적으로 감소하는 추이를 나타냈다. 대부분 미생물제제의 유통기한이 6개월임을 감안하면 전량 키티배지 및 키티를 1/2, 1/5, 1/10수준으로 줄인 배지를 사용 하는 것이 제품의 품질 유지에 가장 적당한 것으로 사료 되며 생산원가를 등의 여러 가지 요소를 고려했을 시 키티1/2배지를 사용하여 산업화생 산에 활용하는 것이 제일 적합하다고 판단되었다.

6. 항선충 미생물의 작물 실험

가. 항선충 미생물의 작물생육 효과

L. capsici YS1215의 작물 생육 효과 실험결과 지상부 생체중 및 건물중에서 대조구가 가장 높았고, 지상부 길이에서는 반량구 처리구가 대조구보다 높았다

나. 항선충 미생물의 선충억제 효과

L. capsici YS1215의 선충 억제 효과 실험결과 뿌리혹 수 및 뿌리혹난랑 수에서 무처리가 가장 높았고 다음으로 대조구, 반량구, 추천구, 농약 순으로 나타났다. 또한 토양선충 수에서도 뿌리혹 수와 난랑 수 결과와 같이 나타났다.

다. 토양내 키티 분해 미생물 밀도 조사

L. capsici YS1215의 선충 억제 효과 실험에서 토양내의 키티분해 미생물 수는 9주차에 대조구가 가장 높았고, 추천구, 반량구, 무처리구, 농약 처리구 순서로 나타났다. 젤라틴분해 미생물 수는 9주차에 반량구가 가장 높게 나타났고, 추천구, 대조구, 농약구, 무처리구 순서로 나타났다

제 2 절 항선충 미생물제제 대량배양배지 및 미생물보조영양원 연구

1. 항선충 미생물 배양 최적조건 확립

가. 키티와 젤라틴 비율에 따른 활성 검증

(1) 미생물 개체 수 측정

젤라틴/키틴 분말 비율에 따른 *L. capsici* YS1215 특성을 조사한 결과 미생물 개체 수에서는 젤라틴분말 1.0g과 키틴분말 2.0g에서 가장 높게 나타났다.

(2) 알 부화 억제율 측정

젤라틴/키틴분말 비율에 따른 선충 알 부화율은 젤라틴분말 2.0g과 키틴분말 1.0g 조합에서 가장 낮게 나타났다.

(3) 유충 치사율 측정

유충 치사율은 조사 1일째 젤라틴분말 2.0g과 키틴분말 1.0g 조합에서 가장 낮게 나타났다.

나. 생장인자 첨가에 따른 활성 검증

(1) 미생물 개체 수 측정

젤라틴/키틴 최적 조합인 젤라틴 2.0g과 키틴 1.0g 조합배지에 생장인자인 yeast extract와 peptone을 각각 첨가한 후 *L. capsici* YS1215 개체 수를 측정한 결과 peptone 첨가 처리구가 yeast extract 처리구보다 높게 나타났다.

(2) 알 부화 억제율 측정

생장인자 첨가에 따른 선충 알 부화율은 yeast extract 배양액 50% 처리구에서 가장 낮게 나타났다.

(3) 유충 치사율 측정 유충

치사율은 yeast extract 배양액 50% 처리구에서 가장 높게 나타났다.

다. 미량요소 첨가에 따른 활성 검증

(1) 미생물 개체 수 측정

젤라틴/키틴 최적 조합인 젤라틴 2.0g과 키틴 1.0g 조합배지에 생장인자 첨가 실험 후 yeast extract첨가 시 선충 알 부화율이 peptone 첨가 처리구 보다 낮게 나타났고, 유충 치사율에서는 높게 나타났으므로, yeast extract 첨가 배지를 최적 배지로 선정한 후 다음 실험을 진행하였다. yeast extract 첨가 최적배지에 미량요소(1L 기준 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.03g, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.02g, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02g, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.03g)를 첨가한 후 배지를 만들고 배양한 후 *L. capsici* YS1215 개체 수를 측정한 결과 미량요소를 넣지 않은 배지보다 높게 나타났다.

(2) 알 부화 억제율 측정

미량요소 첨가에 따른 선충 알 부화율은 yeast extract 배양액 50% 처리구에서 가장 낮게 나타났다.

(3) 유충 치사율 측정

유충 치사율은 yeast extract 배양액 50% 처리구에서 가장 높게 나타났다. 이러한 결과는

앞선 성장인자 첨가 실험 결과에 비추어 볼 때 미량요소를 첨가한 배양액 처리구가 미량요소를 첨가하지 않은 처리구보다 선충 알 부화율은 낮고, 유충 치사율은 더 높게 나타났음을 의미한다.

라. 최적 배지 확립을 위한 추가 실험

(1) 미생물 개체 수 측정

최적배지 확립에 따른 *L. capsici* YS1215 생균 수 조사 결과 Nutrient broth 1.0g, Yeast extract 1.0g, 키틴분말 0.8g, 젤라틴분말 0.2g 조합 에서 가장 생육이 좋았다. 이러한 결과는 미생물이 성장하는데 보조영양원의 영향이 있는 것으로 사료된다.

(2) 알 부화 억제율 측정

배지조성에 따른 선충 알 부화율은 실험 3일째 배지조성 3번에서 가장 낮게 나왔고, 배지 조성 1번이 가장 높게 나타났다. 7일째는 배지조성 6번이 가장 낮게 나타났으며, 배지조성 1번에서 7일째 가장 높게 나타났다.

(3) 유충 치사율 측정

배지조성에 따른 유충 치사율은 실험 1일째 배지조성 1번에서 가장 낮게 나타났고, 배지조성 9번에서 가장 높게 나타났다.

2. 항선충 미생물 대량배양복합체 시제품 제작

가. 젤라틴/키틴배양체, 미생물 보조영양원 및 미생물 적정 비율 조합 조사

1차년도에 결정된 기본 배지에 젤라틴/키틴배양체, 미생물 보조영양원 및 미생물 접종량을 조절하여 최적의 대량배양복합체를 만들기 위하여 미생물 보조영양원(액비)를 추가하여 새로운 조합을 작성 실험하였다.

나. 온도와 기타 환경에 따른 영향 조사

온도와 기타 환경에 따른 영향 조사 결과 뿌리혹선충 유충 치사율에서는 조사 3일째 30°C 9번 조합 (30_9)에서 72.0%로 가장 높게 나타났고, 40°C 5번 조합(40_5)에서 38.4%의 치사율로 가장 낮게 조사되었다. 40°C에서의 유충 치사율은 20°C 및 30°C에 비해 상대적으로 낮게 나타났다. 알 부화율에서는 조사 5일째 30°C 9번 조합 (30_9)에서 11.7%로 가장 낮게 나타났고, 40°C 5번 조합(40_5)에서 24.5%의 부화율로 가장 높게 조사되었다. 40°C에서의 알 부화율은 유충 치사율과 유사하게 20°C 및 30°C에 비해 상대적으로 높게 나타났다.

다. 미량요소 또는 첨가물질에 대한 효과 및 영향 조사

조사결과 H₃BO₃ 처리구에서 80.9%의 가장 높은 유충치사율을 보였고, MnSO₄ 처리구에서 64.8%로 가장 낮은 치사율을 보였다. Organic sulfur 처리구는 66.6%, Na₂HPO₄ 처리구는 79.2%, Na₂MoO₄ 처리구는 78.7%의 치사율을 보였다. 알 부화율 조사결과 H₃BO₃ 처리구에서 11.0%의 가장 낮은 알 부화율을 보였고, 유황 처리구에서 19.0%로 가장 높은 부화율을 보였다.

라. 미량요소 및 물질 조합에 따른 영향 조사

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{Na}_2\text{MoO}_4 + \text{H}_3\text{BO}_3$ 처리구에서 81.9%의 가장 높은 유충치사율을 보였고, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 + \text{H}_3\text{BO}_3$ 처리구에서 74.9%로 가장 낮은 치사율을 보였다. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{Na}_2\text{MoO}_4$ 처리구는 76.4%, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{H}_3\text{BO}_3$ 처리구는 75.6%의 치사율을 보였다. 알 부화율에 관하여 조사한결과 조사 5일째 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{Na}_2\text{MoO}_4 + \text{H}_3\text{BO}_3$ 처리구에서 18.4%의 가장 낮은 알 부화율을 보였고, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{Na}_2\text{MoO}_4$ 처리구에서 22.3%로 가장 높은 알 부화율을 보였다.

3. 미생물 보조영양원 (액비) 확립실험

가. 비료 등록을 위한 작물 생육 실험 및 성분 조사

(1) 상추 작물

상추를 이용한 액비 확립 실험결과 조사 12주차 생체중 및 건물중에서 액비 1000배 희석 처리구가 가장 높았다.

(2) 고추 작물

고추를 이용한 액비 확립 실험결과 조사 10주차 지상부생체중 및 건물중에서 액비 1000배 희석 처리구가 가장 높았다. 또한 지상부 길이에서도 1000배 처리구가 가장 좋았다.

제 3 절 포트에서 항선충 미생물 대량배양복합체 시용에 따른 효능 연구

1. 토마토 작물

1-1. 토마토 작물에서의 선충 억제 활성 및 작물 성장 효과 조사 (1차실험)

가. 작물체 선충 억제 활성

(1) 토양내 선충 밀도 억제 효과

토양내 유충 2차 조사에서 토양비멸균+비료(NSF) 처리구에서 가장 피해가 심한 것으로 조사 되었고, 토양비멸균+농약+미생물(NSMP) 처리가 가장 피해가 적은것으로 조사되었다. 가장 낮은 토양내 유충 수는 토양비멸균+농약+비료 (NSMF) 처리구로 나타났다.

(2) 작물체 선충감염 억제효과

미생물 배양액 처리구인 토양멸균+미생물+계껍질(SMC), 토양비멸균+미생물+계껍질(NSMC) 처리구가 비료 처리구인 토양비멸균+비료(NSF) 처리구 보다 난당의 수가 상당히 낮게 조사된 것으로 보아 미생물 배양액이 선충의 피해를 줄인것으로 보여진다. 하지만 뿌리혹 수 결과와 마찬가지로 약재(선충탄)와 미생물 혼합 처리구에 비해서는 다소 약한 것으로 조사되었다.

나. 작물체 성장 효과

(1) 지상부 생초장

토마토 생초장에서 1차 조사에서 토양비멸균+미생물+계껍질(NSMC) 처리구가 가장 높게

나타났고, 토양멸균+미생물+계껍질(SMC) 처리구가 가장 낮게 나타났다. 2차 조사에서는 SMC 처리구가 가장 높게 나타났다.

(2) 지상부 생체중 및 건조중

토마토 생체중에서 1차 조사에서 토양비멸균+미생물+계껍질(NSMC) 처리구가 가장 높게 나타났고, 그 다음으로 토양비멸균+미생물+계껍질(SMC) 처리구, 토양비멸균+비료(NSF) 처리구, 토양비멸균+농약+미생물(NSMP) 처리구 및 토양비멸균+농약+비료(NSMF) 처리구 순으로 나타났다. 2차 결과 SMC 처리구, NSMC 및 NSMP 처리구가, NSF 처리구와 NSMF 처리구 보다 생육정도가 좋았다. 토마토 전체중 조사 결과 1차 조사와 2차 조사에서 토마토 생체중의 결과와 유사한 경향을 보였다.

다. 토양 내 및 작물체 효소 활성 및 토양 미생물 측정

(1) 토양내 chitinase 및 gelatinase 활성 측정

Chitinase 활성 1차 조사에서 토양비멸균+미생물+계껍질(SMC) 처리구가 가장 높게 나타났다. 2차 조사에서 SMC 처리구가 가장 높게 나타났고, 토양비멸균+농약+비료(NSMF) 처리구에서 가장 낮게 나타났다. 젤라틴분해효소(gelatinase) 활성을 조사한 결과 1차 및 2차 조사에서 SMC 처리구가 가장 높게 나타났다.

(2) 작물체 peroxidase 및 polyphenol oxidase

Peroxidase (POD) 활성을 조사한 결과 1차 조사에서 토양비멸균+비료(NSF) 처리구에서 가장 높게 나타났다. 2차 조사 결과는 1차 조사의 효소 활성 결과 값보다 낮게 조사되었다. Polyphenol oxidase (PPO) 활성을 조사한 결과 1차 조사 결과와 2차 조사 결과가 상반되고, 일관성이 보이지 않았다.

(3) 작물체 β -1,3-glucanase 및 chitinase

키틴분해효소(chitinase) 활성을 조사한 결과 1차 조사에서 토양비멸균+미생물+계껍질(NSMC) 처리구가 가장 높게 나타났다. 2차 조사 결과 NSMC 처리구가 가장 높게 나타났다. 글루칸 효소(glucanase) 활성을 조사한 결과 2차 조사에서 NSMC 처리구가 252.54 Unit/g FW로 가장 높게 나타났다.

(4) 토양 키틴분해미생물 및 젤라틴분해미생물 수

2차 조사 결과 토양내 키틴분해 미생물 수는 토양비멸균+미생물+계껍질(SMC) 처리구에서 140×10^5 CFU/g soil 개체수로 가장 높게 나타났다. 가장 낮은 키틴분해 미생물 수로는 토양비멸균+농약+미생물(NSMP) 처리구로 나타났다. 2차 조사 젤라틴분해 미생물 개체수는 키틴분해 미생물 개체수와 유사한 경향을 보였다.

1-2. 토마토 작물에서의 선충 억제 활성 및 작물 성장 효과 조사 (2차실험)

가. 작물체 선충 억제 활성

(1) 토양내 선충 밀도 억제 효과

L. capsici YS1215 배양액 처리가 토양 내 선충 유충에 미치는 영향을 조사한 결과 5주째

비료(F) 처리구와 물(W) 처리구에서 681.3 개, 621.3 개로 각각 조사되었다. YS1215 배양액을 포함하는 미생물+유기층제500(M+500), M+1,000, M 처리구에서 410.7 개, 483.6 개, 494.7 개를 각각 나타냈다. 8주째에도 비슷한 결과를 보였으며 F 처리구에서는 525.3 개로 가장 높게 조사되었다.

(2) 작물체 선충감염 억제효과

난당수를 측정한 결과 5주째 1차 조사에서 M+500 처리구에서 가장 낮은 난당수를 나타내었고 M+1,000, M, F 처리구의 순으로 측정되었다. 8주째에는 M+500 처리구가 가장 낮았고 F 처리구가 가장 많은 난당수를 보였다.

나. 작물체 성장 효과

(1) 지상부 생초장

5주째 토마토 지상부 길이는 M 처리구가 가장 높았다. 8주째 2차 측정에는 역시 M 처리구가 52.5 cm로 가장 높았으며 W 처리구가 초장이 가장 낮았다.

(2) 지상부 생체중 및 건조중

토마토 작물의 생체중을 측정한 결과 5주째에는 M 처리구가 가장 높았고, 그 다음으로 F 처리구, M+500 처리구 순으로 나타났다. W 처리구는 가장 낮은 것으로 조사되었다. 8주째에는 M 처리구가 가장 높았고, W 처리구가 가장 낮은 것으로 조사되었다.

다. 토양 내 및 작물체 효소 활성 및 토양 미생물 측정

(1) 토양내 chitinase 및 gelatinase 활성 측정

Chitinase activity 결과는 M 처리구에서 가장 높은 수치를 보였고 F, W 처리구가 낮은 수치를 나타냈다. Gelatinase activity 결과도 8주째에 1.28 Unit/g soil로 M 처리구에서 가장 높은 수치를 보였고 F, W 처리구가 낮은 수치를 나타냈다.

(2) 작물체 peroxidase 및 polyphenol oxidase

POD 활성은 5주차 및 8주차에 F 처리구가 가장 높았으며, M 처리구가 가장 낮은 수치를 보였다. PPO 활성은 5주차에 M 처리구가 가장 낮았으며 W 처리구가 가장 높은 수치를 나타냈고 F 처리구가 두 번째로 높았으며, 8주차에는 M+500 처리구가 가장 낮았고 W와 F 처리구가 가장 높았다.

(3) 작물체 β -1,3-glucanase 및 chitinase

Chitinase 활성은 5주차에 M+500 처리구가 가장 높았으며, 그 다음은 M 처리구였으며, M+1,000 처리구가 가장 낮은 수치를 보였다. 8주차에는 5주차에서 가장 높았던 M+500 처리구가 가장 낮은 수치를 보였다. β -1,3-glucanase 활성은 5주, 8주 모두 W 처리구가 가장 높은 수치를 나타냈고 5주차에 비해 8주차때 수치가 증가하였다. 그리고 가장 낮은 수치는 5주, 8주차 모두 M 처리구로 나타났다.

(4) 토양 키틴분해미생물 및 젤라틴분해미생물 수

Chitinolytic bacteria의 경우 5주차에 M 처리구에서 6.0×10^4 CFU/g soil로 다른 처리구에 비해 높은 수치를 보였고 W 처리구는 M 처리구에 비해 낮은 것으로 조사되었다. 8주차에도 M 처리구가 가장 높게 조사되었다. Gelatinolytic bacteria의 경우 8주차에 M 처리구가 가장 많았고, F 와 W 처리구가 가장 낮았다.

2. 멜론 작물

2-1. 멜론 작물에서의 선충 억제 활성 및 작물 성장 효과 조사 (1차실험)

가. 작물체 선충 억제 활성

(1) 토양내 선충 밀도 억제 효과

토양내 유충 2차 조사에서 토양비멸균+비료(NSF) 처리구가 토양멸균+미생물+계껍질(SMC) 처리구 및 토양비멸균+미생물+계껍질(NSMC) 처리구 보다 낮게 조사되었다.

(2) 작물체 선충감염 억제효과

2차 조사 NSMC 처리구의 난낭수가 같은 미생물 배양액 처리구인 SMC 처리구 보다 상당히 낮은 것으로 조사되었다.

나. 작물체 성장 효과

(1) 지상부 생초장

조사 결과 멜론 생초장에서 1차 조사에서 NSMC 처리구가 가장 높게 나타났고, 토양비멸균+농약+비료(NSMF) 처리구가 가장 낮게 나타났다. 2차 조사에서는 SMC 처리구가 86.9 cm로 NSMC 처리구가 86.8cm, 토양비멸균+농약+미생물(NSMP) 처리구가 86.8cm로 같거나 차이가 나지 않았다.

(2) 지상부 생체중 및 건조중

조사 결과 멜론 1차 조사에서 생체중은 SMC 처리구가 가장 좋았다. 하지만 농약 처리구인 NSMP 및 NSMF 처리구는 생체중이 매우 낮았다. 2차 조사에서는 NSMC 처리구가 가장 높았고, 1차 조사시 생육 상태가 매우 불량하였던 NSMP 처리구가 생체중에서 많은 증가를 보였다.

다. 토양 내 및 작물체 효소 활성 및 토양 미생물 측정

(1) 토양내 chitinase 및 gelatinase 활성 측정

키틴분해효소(chitinase) 활성을 조사한 결과 1차 조사에서 NSMC 처리구가 0.18 Unit/g soil로 가장 높게 나타났다. 2차 조사 결과 NSMC 처리구가 1차 조사와 다르게 키틴분해효소활성이 가장 낮게 나타났다. 젤라틴분해효소(gelatinase) 활성을 조사한 결과 1차 조사에서 SMC, 처리구가 1.32 Unit/g soil로 가장 높게 나타났고, 2차 조사 결과는 1차 결과와 유사한 경향을 보였다.

(2) 작물체 peroxidase 및 polyphenol oxidase

Peroxidase(POD) 활성을 조사한 결과 1차 조사에서 NSMC 처리구에서 0.82 Unit/g FW로 가장 높게 나타났다. 2차 조사 결과 1차조사 결과 보다 낮은 효소 활성을 보였다. 병방제 효소인

polyphenol oxidase(PPO) 활성을 조사한 결과 2차 조사 결과 NSF 처리구에서 가장 높게 나타났다.

(3) 작물체 β -1,3-glucanase 및 chitinase

키틴틴분해효소(chitinase) 활성을 조사한 결과 NSMF 처리구가 가장 높게 나타났고, NSMC 처리구가 가장 낮게 나타났다. 글루칸분해효소(glucanase) 활성을 2차 조사 결과 NSF 처리구에서 79.08 Unit/g FW로 가장 높게 나타났다.

(4) 토양 키틴분해미생물 및 젤라틴분해미생물 수

토양내 키틴분해 미생물 수는 SMC 처리구에서 가장 높게 나타났고, 젤라틴분해 미생물 수 또한 가장 높게 나타났다.

2-2. 멜론 작물에서의 선충 억제 활성 및 작물 성장 효과 조사 (2차실험)

가. 작물체 선충 억제 활성

(1) 토양내 선충 밀도 억제 효과

1차 조사와 2차 조사의 뿌리혹 수 결과 및 난낭 수의 결과와 유사한 경향을 보였다. 하지만 뿌리혹 수 및 난낭 수가 미생물+농약(M+P) 및 농약(P) 처리구에서 검출이 되지 않았지만, 토양내 유충은 1차 및 2차 조사 모두에서 검출이 되었다.

(2) 작물체 선충감염 억제효과

뿌리혹 수 1차 조사 결과 물(W) 처리구에서 가장 높은 혹 개수를 보였고 M+P 및 P 처리구에서는 뿌리혹 수가 조사되지 않았다. 2차 조사결과 1차 조사 결과와 유사한 경향을 보였다. 또한 뿌리혹 수 결과와 난낭 수의 결과는 유사한 경향을 보였다.

나. 작물체 성장 효과

(1) 지상부 생초장

조사 결과 멜론 생초장에서 1차 조사에서 M+P 처리구에서 가장 높은 생초장을 보였고 W 처리구가 가장 낮게 조사되었다. 2차 조사에서는 미생물(M) 처리구 71.0 cm, 미생물+계겹질(M+C) 처리구 63.7 cm, M+P 처리구 88.3 cm, P 처리 82.9 cm 및 W 처리구 58.0 cm로 조사되었으며, M+P 처리구에서 가장 높은 생초장을 보였고 W 처리구가 가장 낮게 조사되었다.

(2) 지상부 생체중 및 건조중

생체중 및 건조중에서 1차 및 2차 조사에서 M 처리구에서 가장 높은 생체중을 보였고 P 처리구가 가장 낮게 조사되었다.

다. 토양 내 및 작물체 효소 활성 및 토양 미생물 측정

(1) 토양내 chitinase 및 gelatinase 활성 측정

키틴틴분해효소(chitinase) 활성을 조사한 결과 1차 조사에서 M+C 처리구가 가장 높게 나타났다. 2차 조사 결과 M 처리구 1.42, M+C 처리구 1.42, M+P 처리구 1.42, P 처리 1.17 및 W 처

리구 1.14 Unit/g soil로 W 처리구가 가장 낮게 조사 되었다. 젤라틴분해효소 (gelatinase) 활성을 조사한 결과 1차 조사에서 M+C 처리구가 가장 높게 나타났다. 2차 조사 결과 M 처리구 1.18, M+C 처리구 1.26, M+P 처리구 1.25, P 처리 1.24 및 W 처리구 1.18 Unit/g soil로 W 처리구가 가장 낮게 조사 되었다.

(2) 작물체 peroxidase 및 polyphenol oxidase

Peroxidase(POD) 활성을 조사한 결과 2차 조사 결과 M 처리구 0.31, M+C 처리구 0.23, M+P 처리구 0.24, P 처리 0.21 및 W 처리구 0.21 Unit/g FW로 W 처리구가 가장 낮게 조사 되었다. Polyphenol oxidase(PPO) 활성을 2차 조사 결과 M 처리구 2651.1, M+C 처리구 3312.0, M+P 처리구 3137.8, P 처리 2874.3 및 W 처리구 3211.1 Unit/g FW로 M 처리구가 가장 낮게 조사 되었다.

(3) 작물체 β -1,3-glucanase 및 chitinase

키틴분해효소(chitinase) 활성을 조사한 결과 1차 조사에서는 처리구간 활성 차이가 거의 나타나지 않았다. 하지만 2차 조사 결과 M 처리구 3.26, M+C 처리구 3.15, M+P 처리구 4.46, P 처리 4.56 및 W 처리구 2.84 Unit/g FW로 W 처리구가 가장 낮게 조사 되었다. 글루칸분해효소 (glucanase) 활성을 2차 조사 결과는 W 처리구에서 가장 높게 나타났고, 그 다음으로 M+P, M, P, M+C 순으로 조사되었다.

(4) 토양 키틴분해미생물 및 젤라틴분해미생물 수

1차 조사 결과 향선충 미생물 배양액을 주기적으로 관주한 M처리구는 키틴분해미생물의 개체수가 M 처리구 5×10^6 CFU/g soil, M+C 처리구 5×10^6 CFU/g soil, M+P 처리구 3×10^6 CFU/g soil, P 처리구 2×10^6 CFU/g soil 및 W 처리구 0×10^6 CFU/g soil로 조사되었고, 2차 조사는 M 처리구 11.7×10^6 CFU/g soil, M+C 처리구 7.7×10^6 CFU/g soil, M+P 처리구 10.3×10^6 CFU/g soil, P 처리구 2.3×10^6 CFU/g soil 및 W 처리구 3.3×10^6 CFU/g soil로 M 처리구에서 가장 높게 나타났다. 젤라틴분해미생물 개체수는 1차 및 2차 조사 모두 M 처리구가 가장 높게 나타났으며, W 처리구가 가장 낮게 조사되었다.

제 4 절 포장에서 향선충 미생물 대량배양복합체 시용에 따른 효능 연구

1. 토마토 작물

1-1. 토마토 작물에서의 선충 억제 활성 및 작물 성장 효과 조사 (1차실험)

가. 작물체 선충 억제 활성

(1) 토양내 선충 밀도 억제 효과

조사 결과 초기 선충의 피해 정도를 알 수 있는 1차조사 결과에서는, 배지를 처리한 대조구(C)의 유충밀도가 가장높았고, 정식 후 2개월이 경과한 2차조사 결과에서는 합성농약을 처리한 P(농약) 처리구에서 유충밀도가 가장높았다. 그리고 토마토 수확기인 정식 후 3차 조사에서는 주기적으로 물을 처리한 NT(물) 처리구의 토양내 선충 유충밀도가 가장 높은 것으로 조사되었다. 더불어, 3차조사 결과 가장 낮은 선충 유충의 밀도를 보인 처리구로는

MP(항선충미생물 대량배양복합체 배양액+농약) 처리구였다.

(2) 작물체 선충감염 억제효과

뿌리혹 수는 3차조사에서 MP 처리구가 가장 낮았다. 난낭 수에서는 M(항선충미생물 대량 배양복합체 배양액), MP 및 P 처리구에서 각각 1.7개, 1.3개, 1.7개로 조사된 반면에 C 처리구 및 NT 처리구에서의 난낭 수는 4.7개 및 3.8개를 나타냈다. 뿌리혹선충 알 수에 있어서도 뿌리혹수 및 난낭 수의 조사 결과에 같은 경향을 보였다.

나. 작물체 성장 효과

(1) 지상부 생초장

정식 후 8주차 2차조사에서 M처리구의 초장이 가장 높은 초장을 보이며 생육이 양호하였다. 그러나 포장 실증시험의 특성 상 편차범위가 넓어 처리구간의 통계적 유의성은 없었다. 하지만, 항선충 미생물의 주기적 살포로 인한 작물체 생육은 양호한 것으로 판단된다.

(2) 지상부 생체중 및 건조중

정식 후 8주차 생체중을 조사한 결과에서는 배지처리구인 대조구 및 미생물을 주기적으로 관주처리한 M처리구의 생체중이 가장 높았다.

(3) 수확량 및 품질조사

실험구 별 주당 평균수량을 조사한 결과 화학약제 방제 후 항선충미생물 대량배양복합체 현장배양액을 주기적으로 처리한 MP에서 주당 수량이 가장 높았고, C 처리구 및 화학약제 방제후 물을 주기적으로 처리한 P 처리구에서 상대적으로 낮았다.

다. 토양 내 및 작물체 효소 활성 및 토양 미생물 측정

(1) 토양내 chitinase 및 gelatinase 활성 측정

조사 결과 M 처리구가 chitinase 및 gelatinase 활성이 가장 높게 나타났다.

(2) 토양 키틴분해미생물 및 젤라틴분해미생물 개체수 변화

M 처리구에서 키틴분해미생물 및 젤라틴분해미생물 개체 수가 가장 높게 나타났다.

라. 토양의 이화학적 특성 변화

(1) 토양산도 및 전기전도도 변화

실험 전 토양에 비해 토마토 정식 후 토양 pH는 전체적으로 감소하는 경향을 보였다. 반면에, 토마토 생육과정별 토양의 전기전도도(E.C) 변화는 M 처리구 및 C 처리구의 전기전도도 값이 NT 처리구에 비해 높았으나 그 값은 실험 전 토양에 비해 낮은 수치였다.

(2) 토양유기물 및 유효인산 함량의 변화

M 처리구에서 토양 유기물 함량은 실험전 정식 60일까지 낮아지다가 정식 90부터 상승

하는 경향을 보였다. 토양 유효인산 함량은 P 처리구와 NT 처리구를 제외하고, 수확 후 유효인산 함량이 실험 전 유효인산 함량보다 높게 나타났다.

마. 농가 현장 배양액내 미생물 개체수 조사

항선충 미생물 대량배양복합체 배양액 내의 키틴분해미생물(chitinolytic bacteria) 밀도변화를 조사한 결과 1.0에서 1.8×10^6 CFU/ml의 개체수를 보였다.

1-2. 토마토 작물에서의 선충 억제 활성 및 작물 성장 효과 조사 (2차실험)

가. 작물체 선충 억제 활성

(1) 토양내 선충 밀도 억제 효과

토양내 유충밀도는 항선충 미생물 대량배양복합체 배양액(M) 처리구가 관행 처리구인 대조구(C)에 비해 낮게 조사되었다. 또한 수확 후에도 대조구에 비해 낮은 밀도의 유충 수를 유지하는 것으로 조사되었다.

(2) 작물체 선충감염 억제효과

항선충 미생물 대량배양복합체 처리에 따른 토마토 뿌리에 생성된 뿌리혹 수, 난낭 수 및 알 수를 검정한 결과, 항선충미생물 대량배양복합체 처리로 인한 뿌리혹선충의 피해 예방은 효과적인 것으로 사료된다.

나. 작물체 성장 효과

(1) 지상부 생초장

토마토의 초장이 M 처리구에서 67.6 cm, 145.2 cm로 조사 되었으며, C 처리구에서 62.2 cm, 135.9 cm로 항선충 미생물 대량배양복합체 배양액을 주기적으로 처리한 실험구의 생육이 다소 우세하였다.

(2) 지상부 생체중 및 건조중

생체중을 조사한 결과에서 M 처리구가 110.4 g, 507.3 g으로 C 처리구에 102.9 g, 502.2 g에 비해 높게 나타났다. 정식후 8주차 전체중 조사에서는 M 처리구의 건조중이 77.6 g으로 대조구(C)의 76.6 g에 비해 높았다.

(3) 수확량 및 품질조사

항선충 미생물을 농가현장에서 대량배양 후 배양미생물을 주기적으로 관주처리 한 후 처리구 별 주당 수량을 비교한 결과, M 처리구의 수량이 농가관행 대비 89.2%로 다소 낮았다.

다. 토양 내 및 작물체 효소 활성 및 토양 미생물 측정

(1) 토양내 chitinase 및 gelatinase 활성 측정

M 처리구에서 chitinase 및 gelatinase 활성이 다른 처리구에 비해 높게 나타났다.

(2) 토양 키틴분해미생물 및 젤라틴분해미생물 개체수 변화

M 처리구가 대조구인 C 처리구 보다 토양내 키틴분해 미생물 및 젤라틴분해 미생물 개체

수가 높은 것으로 나타났다.

라. 토양의 이화학적 특성 변화

(1) 토양산도 및 전기전도도 변화

토양 pH는 M 처리구 및 C 처리구에서 각각 정식 45일까지 증가하다가 감소하였고, 전기전도도(EC)는 정식 15일까지 증가하다 감소하였다. 하지만 C 처리구에서 수확후 전기전도도는 약간 증가 되었다.

(2) 토양유기물 및 유효인산 함량의 변화

유효인산은 정식전 토양에 비해 증가의 경향을 보였고, 유기물 함량도 시험 전 토양에 비해 증가하였으나, 토양의 염류축적은 없었다.

마. 농가 현장 배양액내 미생물 개체수 조사

항선충 미생물 대량배양복합체 배양액(M) 내의 키틴분해미생물(chitinolytic bacteria) 밀도변화를 조사한 결과 1.5에서 2.3×10^6 CFU/ml의 개체수를 보였다.

2. 멜론 작물

2-1. 멜론 작물에서의 선충 억제 활성 및 작물 성장 효과 조사 (1차실험)

가. 작물체 선충 억제 활성

(1) 토양내 선충 밀도 억제 효과

토양내 유충밀도에서 항선충 미생물 대량배양복합체 배양액(M) 처리구가 관행 처리구인 대조구(C)에 비해 낮게 조사되었다.

(2) 작물체 선충감염 억제효과

토양내 유충밀도에서 M 처리구가 관행 처리구인 C에 비해 낮게 조사되었다.

나. 작물체 성장 효과

(1) 지상부 생초장

생체중을 조사한 결과 항선충 미생물 대량배양복합체 처리구가 관행 처리에 비해 상당히 높게 나타났다.

(2) 지상부 생체중 및 건조중

정식후 8주차 견체중 조사에서는 M 처리구의 건조중이 687g으로 대조구의 66.6g에 비해 높았다.

(3) 수확량 및 품질조사

항선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리구의 건조중이 4,210 g으로 대조구의 3,245 g에 비해 높았다.

다. 토양 내 및 작물체 효소 활성 및 토양 미생물 측정

(1) 토양내 chitinase 및 gelatinase 활성 측정

토양 내 키틴분해효소(chitinase) 활성을 조사한 결과 M 처리구가 다른처리구에 비해 높게 났고, gelatinase 활성 또한 높게 나타났다.

(2) 토양 키틴분해미생물 및 젤라틴분해미생물 개체수 변화

항선충 미생물 배양액을 주기적으로 관주한 M처리구는 키틴분해미생물의 개체수가 1차: 16.3 ($\times 10^6$ CFU/g soil), 2차: 20 ($\times 10^6$ CFU/g soil)로 조사되었고, 젤라틴분해 미생물 수는 1차: 32.4 ($\times 10^6$ CFU/g soil), 2차: 33.4 ($\times 10^6$ CFU/g soil)로 조사되었다.

라. 토양의 이화학적 특성 변화

(1) 토양산도 및 전기전도도 변화

pH와 EC에서 거의 변화가 없었다. 하지만 평균적으로 M 처리구가 C 처리구보다 pH와 EC에서 높게 나타났다.

(2) 토양유기물 및 유효인산 함량의 변화

M 처리구에서 토양 유기물 함량과 유효인산 함량이 C 처리구 대비 다소 증가한 결과를 보였다.

마. 농가 현장 배양액내 미생물 개체수 조사

항선충 미생물 대량배양복합체 배양액 내의 키틴분해미생물(chitinolytic bacteria) 밀도변화를 조사한 결과 1.0에서 1.3×10^6 CFU/ml의 개체수를 보였다.

2-2. 멜론 작물에서의 선충 억제 활성 및 작물 성장 효과 조사 (2차실험)

가. 작물체 선충 억제 활성

(1) 토양내 선충 밀도 억제 효과

토양내 유충밀도에서 10주차 조사 결과 항선충미생물 대량배양복합체 처리구(M) 25.7개, 미생물 대량배양복합체 배양액+농약 처리구(M+P) 27.7개, 농약 처리(P) 105.3개, 물 처리 (NT) 88.0개,로 M 처리구가 가장 낮게 조사되었으며, NT 처리구가 가장 높게 조사되었다.

(2) 작물체 선충감염 억제효과

조사 결과 M+P 처리구가 가장 낮게 조사되었으며, NT 처리구가 가장 높게 조사되었다. 난낭 수를 조사한 결과에서는 항선충 미생물 대량배양복합체 배양액을 주기적으로 처리구가 가장 낮은 난낭 수를 보였다.

나. 작물체 성장 효과

(1) 지상부 생초장

M 처리구 165.0 cm, M+P 처리구 177.0 cm, P 처리구 147.0 cm, NT 처리구 140.0 cm로 M+P 처리구가 가장 높게 조사되었으며, NT 처리구가 가장 낮게 조사되었다.

(2) 지상부 생체중 및 건조중

생체중 및 전체중에서 M+P가 가장 높게 조사되었으며, NT 처리구가 가장 낮게 조사되었다.

(3) 수확량 및 품질조사

다. 토양 내 및 작물체 효소 활성 및 토양 미생물 측정

(1) 토양내 chitinase 및 gelatinase 활성 측정

조사결과 chitinase 및 gelatinase 활성에서 미생물 처리구인 M과 M+P 처리구의 효소 활성이 다른 처리구에 비해 높게 나타났다.

(2) 토양 키틴분해미생물 및 젤라틴분해미생물 개체수 변화

10주차 조사 결과 키틴분해미생물 수에서 M 처리구가 가장 높았고, 그 다음으로 M+P, NT 및 P 처리구 순으로 나타났다. 젤라틴분해미생물 수에서는 M 처리구가 가장 높았고, 그 다음으로 M+P로 나타났고, NT 및 P 처리구는 같게 조사되었다.

라. 토양의 이화학적 특성 변화

(1) 토양산도 및 전기전도도 변화

토양의 화학성 변화를 조사한 결과, 시험 전 토양에 비해 pH는 감소한 반면, 전기전도 값은 증가하였다.

(2) 토양유기물 및 유효인산 함량의 변화

시험 전 토양에 비해 유기물이 증가하였고, 또한 유효인산, 치환성 양이온 값도 증가하였다.

마. 농가 현장 배양액내 미생물 개체수 조사

항선충 미생물 대량배양복합체 배양액 내의 키틴분해미생물(chitinolytic bacteria) 밀도변화를 조사한 결과 1.8에서 2.3×10^6 CFU/ml의 개체수를 보였다.

제 5 절 항선충 미생물 대량배양복합체 제품화 및 판매

1. 개발된 미생물제제, 액비 및 배양체 등록시험

가. 미생물 보조영양원 (액비) 등록시험

(1) 비해시험 1건, 작물재배시험 1건, 보증성분 및 유해성분 분석 시험

■ 재배시험 의뢰 : 재배시험 결과 ‘양호함’의 결과가 나왔다.

■ 분석시험 의뢰 : 시험결과 수용성붕소는 0.07%, 수용성몰리브덴은 0.0014%로 기준치 보다 많은 양이 검출 되었다.

나. 토양미생물제제 등록시험

(1) 작물재배시험 1건, 약해시험 1건 (가) 유기농업자재 등록시험

① 미생물 동정 및 균수 측정

동 정 결 과 : *Lysobacter capsici* 생균수 밀도 : $2.0 * 10^8$ cfu/ml

- ② 병원성미생물 시험 : 병원성대장균을 포함한 5개의 병원성 미생물이 불검출 되었다.
- ③ 인축독성시험 : 급성경구, 급성경피 시험 결과 중독 증상 및 치사가 없었으며 안점막자극성, 피부자극성역시 자극지수가 0이 었다.
- ④ 환경독성시험 : 급성어류독성시험 결과 ‘시험 동물 치사 없음’의 결과가 나왔다.
- ⑤ 작물재배시험의뢰 : 작물재배 시험을 지역을 달리하여 2회 실시 하였고 ‘양호함’의 결과가 나왔다.
- ⑥ 비해시험 : 비해시험 결과 ‘비해 없음’의 결과가 나왔다.
- ⑦ 약해시험 : 약해시험 결과 ‘약해 없음’의 결과가 나왔다.

다. 젤라틴/키틴 배양체 등록시험

(1) 작물재배시험 1건, 보증성분 및 유해성분 분석 시험

■ 재배시험 의뢰 : 재배시험 결과 ‘양호함’의 결과가 나왔다.

■ 분석시험 의뢰 : 시험결과 수용성분소는 0.10%, 수용성몰리브덴은 0.00082%로 기준치 보다 많은 양이 검출 되었다.

2. 대량배양복합체 개발 관련기술의 특허, 시제품 및 마케팅 전략 수립

가. 작물별 희석배율 및 사용 매뉴얼 작성

나. 항선충 미생물 대량배양복합체 상표 및 특허 출원

- (1) 특허출원 - 게껍질이 포함된 토양으로부터 분리한 *Lysobacter capsici* YS 1 2 1 5를 이용한 식물 성장 촉진제 및 선충 방제제와 그 제조방법
- (2) 특허출원 - 항선충 미생물 대량배양 복합체
- (3) 특허출원 - 리소박터 캡시시 배양 분획물을 유효성분으로 포함하는 향균 및 선충 방제용 조성물

다. 시장 분석을 통한 마케팅 전략 수립 및 수행

마케팅 전략을 수행하기 위해 먼저 광주 인근 농협들의 주요 재배 작물을 파악하고, 대상의 환경에 맞는 홍보 및 교육 프로그램을 제작하여 마케팅을 실행 하였다.

라. 시제품을 통한 실제 시범포 운영, 검증

전남 나주시, 담양군 등등의 농가 현장에서 시제품을 사용하여 작물을 재배하고 효능을 검증하였다.

3. 항선충 미생물 대량배양복합체의 제조공정 설계 및 품질관리 계획 설정

제품의 제조 공정 및 품질 관리 계획서를 작성하여 공장에 비치하고 공정따라 생산하고 제품의 품질을 관리 한다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

본 연구개발 사업을 통하여 과제제반 연구내용에 대한 실험을 완성하였으며 기존의 목표를 달성하였다. 본 연구과제의 수행성으로 항선충 미생물 대량배양복합체의 포장에서 시용 타당성 및 경제성 분석을 통해 유기농업자재(병해충관리용) 1건, 미량요소복합비료 2건을 개발하여 총 3건(등록번호 : 제 공시-3-6-1호, 전남 장성21-가-10804호(2건))의 제품을 출시하였으며 관련특허도 총 3건(10-2013-0032401, 10-2014-0128328, 10-2014-0144795)을 출원 하였다.

본 연구팀은 현재까지의 성과 및 결과에서 나온 보완사항의 추가 연구를 계속해서 진행 할 것이며, 국내외 여러 지역의 시범포 사업을 통하여 효과검증 및 제품보완에도 힘쓰고, 대량생산 및 적극적인 마케팅전략으로 연구 성과를 보급할 예정이다.

SUMMARY

For fulfillment of this project, anti-nematode microorganism was isolated from soil and identified as *Lysobacter capsici* YS1215 (NCBI accession number: HQ610445) based on the 16S rRNA sequence analysis. *L. capsici* YS1215 produced chitinase, gelatinase, cellulase, indol-acetic acid (IAA) and 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG). Egg hatch inhibition and juvenile mortality of root-knot nematode occurred with 50% culture filtrate of *L. capsici* YS1215 after 5 days incubation. The chitinase and gelatinase activities were induced by each supplement of root-knot nematode eggs or juveniles into growth media. These results were confirmed by analysis of N-acetyl-D-glucosamine and amino acid contents in culture broth by HPLC or amino acid analyzer. Chitinase, purified with column chromatography, having 43.6 kDa of molecular mass was found to inhibit egg hatch of root-knot nematode. Juvenile mortality of root-knot nematode occurred with Gelatinase having 255.7, 232.1 and 146.4 purified with column chromatography. Purified, and identified 2-hydroxypropanoic acid (lactic acid) using HPLC, GC-MS, LC-MS and NMR was extracted with ethylacetate from culture broth of *L. capsici* YS1215 was found to cause egg hatch inhibition and juvenile mortality of root-knot nematode. Optimum shelf life for *L. capsici* YS1215 was obtained with the use of crab shell powder instead of TSB media. The basic medium composition for making a prototype consists of L-monosodiumglutamate(MSG) 1.0g/L, Yeast extract 1.0g/L, Sucrose 30.g/L, KH₂PO₄ 1.4g, (NH₄)₂SO₄ 1.0g, CaCO₃ 1.0g, MgSO₄ 0.3g, CuSO₄ 0.02g, ZnSO₄ 0.02g, FeCl₃ 0.03g, crab shell powder 0.8g, gelatin 0.2g, microbial secondary nutrients (liquid fertilizer) 4ml, and 1ml stock solution of *L. capsici* YS1215 with growth temperature of 30°C.

In pot experiment of second year, height and fresh weight of tomato plant was highest in treatment of anti-nematode-mass culture complex+ crab shell powder (SMC) while nematicide treatment was lowest to damage root-knot nematode infection as compare to SMC and fertilizer treatment. Highest number of chitin and gelatin decomposing microorganisms was found in SMC treatment. In addition, results of plant growth and damage of root-knot nematode infection were found similar in both melon pot experiment and tomato pot experiment. In pot experiment of third year, height and fresh weight of tomato plant was the highest in treatment of anti-nematode-mass culture complex (M), while as to damage of root-knot nematode infection, M+organic pesticide 500 (M+P500) treatment was lower than other treatment. In pot experiment of third year, height of melon plant was highest in treatment of M+ pesticide (M+P), and fresh weight of melon plant was highest in M treatment, while as to damage of root-knot nematode infection, M+P treatment was the lowest.

In the field experiment of second year, height and fresh weight of tomato plant was highest in treatment of anti-nematode-mass culture complex (M), while as to damage root-knot nematode infection, M treatment was lower than fertilizer and water treatments,

but higher than nematicide treatment. The result of productivity research showed that tomato yield in M+P treatment was the highest, while high quality of fruits was found in M treatment along with highest number of chitin and gelatin decomposing microorganisms. Soil physiochemical properties like pH and EC values in M treatment were lower than before each application, while organic matter and available phosphorus were higher than before treatment. In field experiment of third year, growth of tomato plant was higher in M treatment than fertilizer treatment, while as to reduce damage of root-knot nematode infection; M treatment was lower than fertilizer treatment. In field experiment of second years, growth of melon plant was higher in anti-nematode-mass culture complex (M) treatment than fertilizer treatment, while as to reduce root-knot nematode infection; M treatment was lower than fertilizer treatment. Results in field experiment of second year were similar to the field experiment of third year.

In pot experiments, as results of peroxidase and polyphenol oxidase activities, the relationship between their activities and nematode infection was not only difficult to find out, particularly, but also as antioxidant enzymes and disease resistance enzyme such as chitinase and β -1,3-glucanase, and in field experiments. In pot experiments, enzyme activities and nematode infection was found to relate with soil chitinase and gelatinase activities.

In conclusion, for management of root-knot nematode, anti-nematode-mass culture complex was applied on the nematode site infection and damage could be reduced if it continues to use.

CONTENTS

Chapter 1. Outline of research development project -----	46
제 1 절 Studies on characteristics in relation to microorganism and microbial agent -----	46
Chapter 2. Current situation of related technology development -----	49
Chapter 3. Result of research development -----	50
제 1 절 Functional microbial selection and studies on characteristics -----	50
1. Result of previous research of anti-nematode microorganism -----	50
가. Research on isolation and characteristics of anti-nematode microorganism ----	50
나. Research on anti-nematode activity by treatment of microorganism -----	53
2. Isolation of root knot nematode and study on anti-nematode activity isolated microorganism -----	54
가. Research on chitinase activity of microorganism by using nematode eggs as substrate -----	54
나. Research on degradation product by using nematode eggs as substrate -----	55
다. Research on gelatinase activity of microorganism by using nematode juveniles as substrate -----	58
라. Research on degradation product by using nematode juveniles as substrate ---	58
3. Study on characteristics in relation to enzymes of isolated microorganism -----	59
가. Egg destroying enzyme -----	59
(1) Chitinase activity -----	59
(2) Purification of chitinase and research on egg destruction -----	60
나. Juvenile destroying enzyme -----	65
(1) Gelatinase activity -----	65
(2) Purification of gelatinase and research on juvenile destruction -----	66
4. Study on isolation of nematicidal compound produced by anti-nematode microorganism -----	71
가. Purification and identification of nematicidal compound -----	71
나. Research on inhibition activity of root knot nematode egg and juveniles by nematicidal compound -----	76

(1) inhibition rate of root knot nematode egg hatch and Mortality of root knot nematode juveniles -----	76
5. Research on shelf life of microbial agent -----	77
가. Effect on shelf life of microbial agent by additive type -----	77
나. Effect on shelf life of microbial agent by time -----	79
6. Plant experiment by treatment of anti-nematode microorganism -----	81
가. Effect on plant growth by treatment of anti-nematode microorganism -----	81
나. Effect on inhibition of root knot nematode infection by treatment of anti-nematode microorganism -----	82
다. Density of soil microorganism -----	83
제 2 절 Study on microbial secondary nutrients and media for growing anti-nematode microorganism -----	85
1. Establishment of growth optimal condition of anti-nematode microorganism -----	85
가. Estimation of activity by rate of chitin and gelatin powder -----	85
(1) Microbial populations -----	85
(2) Inhibition rate of root knot nematode egg hatch -----	85
(3) Mortality of root knot nematode juveniles -----	86
나. Estimation of activity by addition of growth factors -----	87
(1) Microbial populations -----	87
(2) Inhibition rate of root knot nematode egg hatch -----	87
(3) Mortality of root knot nematode juveniles -----	88
다. Estimation of activity by addition of trace elements -----	88
(1) Microbial populations -----	88
(2) Inhibition rate of root knot nematode egg hatch -----	89
(3) Mortality of root knot nematode juveniles -----	89
라. Additional experiments to establishment for the optimal medium -----	90
(1) Microbial populations -----	90
(2) Inhibition rate of root knot nematode egg hatch -----	91
(3) Mortality of root knot nematode juveniles -----	92
(3) Measure of enzyme activity -----	93

2. Prototyping of mass cultivation of microorganism for control of root-knot nematode -----	94
가. Research on ratio of microorganism, chitin/gelatin media and secondary nutrients -----	94
나. Research on effect of temperature and environment -----	96
다. Research on effect of micronutrient and additive -----	101
라. Research on effect of micronutrient and combination of nutrient -----	103
3. Establishment of microbial secondary nutrients -----	106
가. Research on crop growth experiments for fertilizer registration and analysis of product -----	106
(1) Lettuce experiment -----	106
(2) Pepper experiment -----	108
제 3 절 Study on effect of mass culture complex in pot experiment -----	111
1. Tomato experiment -----	111
1-1. Research on effect of mass culture complex on root knot nematode inhibition and tomato growth(1st experiment) -----	111
가. Effect on root knot nematode inhibition in plant experiment -----	112
(1) Nematode density inhibitory effect -----	112
(2) Nematode infection inhibitory effect -----	113
나. Effect on plant growth -----	115
(1) Length of plant -----	115
(2) Fresh and dry weight -----	116
다. Measurement of soil microorganisms and plant enzyme activity -----	118
(1) Chitinase and gelatinase activities in soil -----	118
(2) Peroxidase and polyphenol oxidase activities in plant -----	119
(3) β -1,3-glucanase and chitinase activities in plant -----	122
(4) The number of gelatin decomposing microorganisms -----	124
1-2. Research on effect of mass culture complex on root knot nematode inhibition and tomato growth (second experiment) -----	125
가. Effect on root knot nematode inhibition in plant experiment -----	126

(1) Nematode density inhibitory effect -----	126
(2) Nematode infection inhibitory effect -----	127
나. Effect on plant growth -----	128
(1) Length of plant -----	128
(2) Fresh and dry weight -----	129
다. Measurement of soil microorganisms and plant enzyme activity -----	131
(1) Chitinase and gelatinase activities in soil -----	131
(2) Peroxidase an polyphenol oxidase activities in plant -----	131
(3) β -1,3-glucanase and chitinase activities in plant -----	132
(4) The number of gelatin decomposing microorganisms -----	133
2. Melon experiment -----	135
2-1. Research on effect of mass culture complex on root knot nematode inhibition and melon growth (1st experiment) -----	135
가. Effect on root knot nematode inhibition in plant experiment -----	136
(1) Nematode density inhibitory effect -----	136
(2) Nematode infection inhibitory effect -----	137
나. Effect on plant growth -----	139
(1) Length of plant -----	139
(2) Fresh and dry weight -----	140
다. Measurement of soil microorganisms and plant enzyme activity -----	142
(1) Chitinase and gelatinase activities in soil -----	142
(2) Peroxidase an polyphenol oxidase activities in plant -----	143
(3) β -1,3-glucanase and chitinase activities in plant -----	144
(4) The number of gelatin decomposing microorganisms -----	146
2-2. Research on effect of mass culture complex on root knot nematode inhibition and melon growth (second experiment) -----	147
가. Effect on root knot nematode inhibition in plant experiment -----	148
(1) Nematode density inhibitory effect -----	148
(2) Nematode infection inhibitory effect -----	149
나. Effect on plant growth -----	150
(1) Length of plant -----	150

(2) Fresh and dry weight -----	151
다. Measurement of soil microorganisms and plant enzyme activity -----	153
(1) Chitinase and gelatinase activities in soil -----	153
(2) Peroxidase and polyphenol oxidase activities in plant -----	154
(3) β -1,3-glucanase and chitinase activities in plant -----	155
(4) The number of gelatin decomposing microorganisms -----	157
제 4 절 Study on effect of anti-nematode-mass culture complex in field experiment -----	158
1. Tomato experiment -----	158
1-1. Research on effect of mass culture complex on root knot nematode inhibition and tomato growth (1st experiment) -----	158
가. Effect on root knot nematode inhibition in plant experiment -----	161
(1) Nematode density inhibitory effect -----	161
(2) Nematode infection inhibitory effect -----	163
나. Effect on plant growth -----	164
(1) Length of plant -----	164
(2) Fresh and dry weight -----	165
(3) Yield and quality -----	167
다. Measurement of soil microorganisms and plant enzyme activity -----	168
(1) Chitinase and gelatinase activities in soil -----	168
(2) The number of gelatin decomposing microorganisms -----	170
라. Research on soil chemical property -----	172
(1) pH and EC -----	173
(2) Available phosphorus and soil organic matter -----	174
마. The number of microorganisms in mass culture -----	175
1-2. Research on effect of mass culture complex on root knot nematode inhibition and tomato growth (second experiment) -----	177
가. Effect on root knot nematode inhibition in plant experiment -----	177
(1) Nematode density inhibitory effect -----	177
(2) Nematode infection inhibitory effect -----	178

나. Effect on plant growth -----	179
(1) Length of plant -----	180
(2) Fresh and dry weight -----	180
(3) Yield and quality -----	182
다. Measurement of soil microorganisms and plant enzyme activity -----	182
(1) Chitinase and gelatinase activities in soil -----	182
(2) The number of gelatin decomposing microorganisms -----	183
라. Research on soil chemical property -----	184
(1) pH and EC -----	184
(2) Available phosphorus and soil organic matter -----	185
마. The number of microorganisms in mass culture -----	185
2. Melon experiment -----	187
2-1. Research on effect of mass culture complex on root knot nematode inhibition and melon growth (1st experiment) -----	187
가. Effect on root knot nematode inhibition in plant experiment -----	188
(1) Nematode density inhibitory effect -----	188
(2) Nematode infection inhibitory effect -----	189
나. Effect on plant growth -----	190
(1) Length of plant -----	190
(2) Fresh and dry weight -----	190
(3) Yield and quality -----	192
다. Measurement of soil microorganisms and plant enzyme activity -----	192
(1) Chitinase and gelatinase activities in soil -----	192
(2) The number of gelatin decomposing microorganisms -----	194
라. Research on soil chemical property -----	195
(1) pH and EC -----	195
(2) Available phosphorus and soil organic matter -----	195
마. The number of microorganisms in mass culture -----	196
2-2. Research on effect of mass culture complex on root knot nematode inhibition and melon growth (second experiment) -----	197
가. Effect on root knot nematode inhibition in plant experiment -----	198

(1) Nematode density inhibitory effect -----	198
(2) Nematode infection inhibitory effect -----	199
나. Effect on plant growth -----	200
(1) Length of plant -----	200
(2) Fresh and dry weight -----	201
(3) Yield and quality -----	202
다. Measurement of soil microorganisms and plant enzyme activity -----	203
(1) Chitinase and gelatinase activities in soil -----	203
(2) The number of gelatin decomposing microorganisms -----	205
라. Research on soil chemical property -----	206
(1) pH and EC -----	206
(2) Available phosphorus and soil organic matter -----	207
마. The number of microorganisms in mass culture -----	207
제 5 절 Sale and commercialization of anti-nematode-mass culture complex -----	209
1. Registration test of microbial agent and liquid fertilizer -----	209
가. Registration test of liquid fertilizer -----	209
(1) Analysis of hazardous component, crop cultivation and warranty ingredients --	209
(2) Analytical testing request -----	209
나. Registration test of microbial agent -----	210
(1) Analysis of crop cultivation and damage -----	210
다. Registration test of chitin/gelatin media -----	217
(1) Analysis of hazardous component, crop cultivation and warranty ingredients --	218
(2) Analytical testing request -----	218
2. Establishment of marketing strategy, prototyping and patent of chitin/gelatin media -----	218
가. Manual written by crops -----	218
나. Trademark and patent of mass culture complex -----	219
다. Establishment and execution of marketing strategy by market analysis -----	221
라. Management and validation of prototype in field test -----	223

3. Establishment of manufacturing process design and quality management plan for anti-nematode-mess culture complex -----	224
Chapter 4. Goal attainment and contribution to relevant areas -----	228
Chapter 5. Research and development results and future plan -----	234
Chapter 6. Reference -----	235

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 -----	46
제 1 절 항선충 미생물 특성연구 및 미생물제제 연구-----	46
제 2 장 국내외 기술개발 현황 -----	49
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과 -----	50
제 1 절 기능성미생물 선발 및 특성연구 -----	50
1. 항선충 미생물 선행 연구 결과 -----	50
가. 항선충 미생물 분리 및 특성 조사 -----	50
나. 미생물 처리에 따른 항선충 활성 조사 -----	53
2. 뿌리혹선충 분리 및 선발 미생물 항선충 활성 연구 -----	54
가. 미생물의 선충알 기질사용에 따른 키틴분해효소 조사 -----	54
나. 미생물의 선충알 기질사용에 따른 분해산물 조사 -----	55
다.미생물의선충유충기질사용에따른젤라틴분해효소조사 -----	58
라. 미생물의 선충유충 기질사용에 따른 분해산물 조사 -----	58
3. 선발된 미생물의 알 파괴효소 및 선충 표피 파괴효소 특성 연구 -----	59
가. 알 파괴효소 -----	59
(1) chitinase 활성 측정 -----	59
(2) chitinase 정제 및 알 파괴 조사 -----	60
나. 선충 표피 파괴 효소 -----	65
(1) gelatinase 활성 측정 -----	65
(2) gelatinase 정제 및 유충 파괴 조사 -----	66
4. 항선충 미생물이 생산하는 살선충 활성물질의 분리 및 활성 연구 -----	71
가. 살선충 활성물질의 추출 및 정제 -----	71
나. 분리한 살선충 활성물질의 선충 억제 활성 조사 -----	76
(1) 알 부화 억제를 측정 및 유충 치사율 측정 -----	76
5. 미생물제제 유통기한 실험 -----	77

가. 첨가제 종류에 따른 유통기한 영향 -----	77
나. 시간경과에 따른 유통기한 영향 -----	79
6. 항선충 미생물의 작물 실험 -----	81
가. 항선충 미생물의 작물생육 효과 실험-----	81
나. 항선충 미생물의 선충억제 효과 -----	82
다. 토양 내 키틴 분해 미생물 밀도 조사 -----	83
제 2 절 항선충 미생물제제 대량배양배지 및 미생물보조영양원 연구 -----	85
1. 항선충 미생물 배양 최적조건 확립 -----	85
가. 키틴과 젤라틴 비율에 따른 활성 검증 -----	85
(1) 미생물 개체 수 측정 -----	85
(2) 알 부화 억제율 측정 -----	85
(3) 유충 치사율 측정 -----	86
나. 생장인자 첨가에 따른 활성 검증 -----	87
(1) 미생물 개체 수 측정 -----	87
(2) 알 부화 억제율 측정 -----	87
(3) 유충 치사율 측정 -----	88
다. 미량요소첨가에 따른 활성검증 -----	88
(1) 미생물 개체 수 측정 -----	88
(2) 알 부화 억제율 측정 -----	89
(3) 유충 치사율 측정 -----	89
라. 최적 배지 확립을 위한 추가 실험 -----	90
(1) 미생물 개체 수 측정 -----	90
(2) 알 부화 억제율 측정 -----	91
(3) 유충 치사율 측정 -----	92
(4) 효소 활성 측정 -----	93
2. 항선충 미생물 대량배양복합체 시제품 제작 -----	94
가. 젤라틴/키틴 배양제, 미생물 보조영양원 및 미생물 적정 비율 조합 조사 -----	94
나. 온도와 기타 환경에 따른 영향 조사 -----	98
다. 미량요소 또는 첨가물질에 대한 효과 및 영향조사 -----	101

라. 미량요소 및 물질 조합에 따른 영향 조사 -----	105
3. 미생물 보조영양원 (액비) 확립실험 -----	108
가. 비료 등록을 위한 작물 생육 실험 및 성분 조사 -----	108
(1) 상추 작물 -----	108
(2) 고추 작물 -----	110
제 3 절 포트에서 항선충 미생물 대량배양복합체 시용에 따른 효능 연구 -----	113
1. 토마토 작물 -----	113
1-1. 토마토 작물에서의 선충 억제 활성 및 작물 성장 효과 조사 (1차실험) -----	113
가. 작물체 선충 억제 활성 -----	114
(1) 토양 내 선충 밀도 억제 효과 -----	114
(2) 작물체 선충 감염 억제효과 -----	115
나. 작물체 성장 효과 -----	117
(1) 지상부 생초장 -----	117
(2) 지상부 생체중 및 건조중 -----	118
다. 토양 내 및 작물체 효소 활성 및 토양 미생물 측정 -----	120
(1) 토양 내 chitinase 및 gelatinase 활성 측정 -----	120
(2) 작물체 peroxidase 및 polyphenol oxidase -----	121
(3) 작물체 β -1,3-glucanase 및 chitinase -----	122
(4) 토양 키틴분해미생물 및 젤라틴분해미생물 수 -----	125
1-2. 토마토 작물에서의 선충 억제 활성 및 작물 성장 효과 조사 (2차실험) -----	126
가. 작물체 선충 억제 활성 -----	126
(1) 토양 내 선충 밀도 억제 효과 -----	126
(2) 작물체 선충감염 억제효과 -----	127
나. 작물체 성장 효과 -----	128
(1) 지상부 생초장 -----	128
(2) 지상부 생체중 및 건조중 -----	129
다. 토양 내 및 작물체 효소 활성 및 토양 미생물 측정 -----	131
(1) 토양 내 chitinase 및 gelatinase 활성 측정 -----	131
(2) 작물체 peroxidase 및 polyphenol oxidase -----	131

(3) 작물체 β -1,3-glucanase 및 chitinase -----	132
(4) 토양 키틴분해미생물 및 젤라틴 분해 미생물 수 -----	133
2. 멜론 작물 -----	135
2-1. 멜론 작물에서의 선충 억제 활성 및 작물 성장 효과 조사 (1차실험) -----	135
가. 작물체 선충 억제 활성 -----	136
(1) 토양 내 선충 밀도 억제효과 -----	136
(2) 작물체 선충 감염 억제효과 -----	137
나. 작물체 성장효과 -----	139
(1) 지상부 생초장 -----	139
(2) 지상부 생체중 및 건조중 -----	140
다. 토양 내 및 작물체 효소 활성 및 토양 미생물 측정 -----	142
(1) 토양 내 chitinase 및 gelatinase 활성 측정 -----	142
(2) 작물체 peroxidase 및 polyphenol oxidase -----	143
(3) 작물체 β -1,3-glucanase 및 chitinase -----	144
(4) 토양 키틴분해미생물 및 젤라틴분해미생물 수 -----	146
2-2. 멜론 작물에서의 선충 억제 활성 및 작물 성장 효과 조사 (2차실험) -----	147
가. 작물체 선충 억제 활성 -----	148
(1) 토양 내 선충 밀도 억제 효과 -----	148
(2) 작물체 선충감염 억제효과 -----	149
나. 작물체 성장 효과 -----	150
(1) 지상부 생초장 -----	150
(2) 지상부 생체중 및 건조중 -----	151
다. 토양 내 및 작물체 효소 활성 및 토양 미생물 측정 -----	153
(1) 토양 내 chitinase 및 gelatinase 활성 측정 -----	153
(2) 작물체 peroxidase 및 polyphenol oxidase -----	154
(3) 작물체 β -1,3-glucanase 및 chitinase -----	155
(4) 토양 키틴분해미생물 및 젤라틴분해미생물 수 -----	157
제 4 절 포장에서 향선충 미생물 대량배양복합체 시용에 따른 효능 연구 -----	158

1. 토마토 작물 -----	158
1-1. 토마토 작물에서의 선충 억제 활성 및 작물 성장 효과 조사 (1차실험) -----	158
가. 작물체 선충 억제 활성 -----	161
(1) 토양 내 선충 밀도 억제 효과 -----	161
(2) 작물체 선충감염 억제 효과 -----	163
나. 작물체 성장 효과 -----	164
(1) 지상부 생초장 -----	164
(2) 지상부 생체중 및 건조중 -----	165
(3) 수확량 및 품질조사 -----	167
다. 토양 내 및 작물체 효소 활성 및 토양 미생물 측정 -----	168
(1) 토양 내 chitinase 및 gelatinase 활성 측정 -----	168
(2) 토양 키틴분해미생물 및 젤라틴분해미생물 개체 수 변화 -----	170
라. 토양의 이화학적 특성 변화 -----	172
(1) 토양산도 및 전기전도도 변화 -----	173
(2) 토양유기물 및 유효인산 함량의 변화 -----	174
마. 농가 현장 배양액 내 미생물 개체 수 조사 -----	175
1-2. 토마토 작물에서의 선충 억제 활성 및 작물 성장 효과 조사 (2차실험) -----	177
가. 작물체 선충 억제 활성 -----	177
(1) 토양 내 선충 밀도 억제 효과 -----	177
(2) 작물체 선충감염 억제효과 -----	178
나. 작물체 성장 효과 -----	179
(1) 지상부 생초장 -----	180
(2) 지상부 생체중 및 건조중 -----	180
(3) 수확량 및 품질조사 -----	182
다. 토양 내 및 작물체 효소 활성 및 토양 미생물 측정 -----	182
(1) 토양 내 chitinase 및 gelatinase 활성 측정 -----	182
(2) 토양 키틴분해미생물 및 젤라틴분해미생물 개체 수 변화 -----	183
라. 토양의 이화학적 특성 변화 -----	184
(1) 토양산도 및 전기전도도 변화 -----	184
(2) 토양유기물 및 유효인산 함량의 변화 -----	185
마. 농가 현장 배양액 내 미생물 개체 수 조사 -----	185

2. 멜론 작물 -----	187
2-1. 멜론 작물에서의 선충 억제 활성 및 작물 성장 효과 조사 (1차실험) -----	187
가. 작물체 선충 억제 활성 -----	188
(1) 토양내 선충 밀도 억제 효과 -----	188
(2) 작물체 선충감염 억제효과 -----	189
나. 작물체 성장 효과 -----	190
(1) 지상부 생초장 -----	190
(2) 지상부 생체중 및 건조중 -----	190
(3) 수확량 및 품질조사 -----	191
다. 토양 내 및 작물체 효소 활성 및 토양 미생물 측정 -----	192
(1) 토양 내 chitinase 및 gelatinase 활성 측정 -----	192
(2) 토양 키틴분해미생물 및 젤라틴분해미생물 개체 수 변화 -----	194
라. 토양의 이화학적 특성 변화 -----	195
(1) 토양산도 및 전기전도도 변화 -----	195
(2) 토양유기물 및 유효인산 함량의 변화 -----	195
마. 농가 현장 배양액내 미생물 개체 수 조사 -----	196
2-2. 멜론 작물에서의 선충 억제 활성 및 작물 성장 효과 조사 (2차실험) -----	197
가. 작물체 선충 억제 활성 -----	198
(1) 토양 내 선충 밀도 억제 효과 -----	198
(2) 작물체 선충감염 억제 효과 -----	199
나. 작물체 성장 효과 -----	200
(1) 지상부 생초장 -----	200
(2) 지상부 생체중 및 건조중 -----	201
(3) 수확량 및 품질조사 -----	202
다. 토양 내 및 작물체 효소 활성 및 토양 미생물 측정 -----	203
(1) 토양 내 chitinase 및 gelatinase 활성 측정 -----	203
(2) 토양 키틴분해미생물 및 젤라틴분해미생물 개체 수 변화 -----	205
라. 토양의 이화학적 특성 변화 -----	206
(1) 토양산도 및 전기전도도 변화 -----	206
(2) 토양유기물 및 유효인산 함량의 변화 -----	207
마. 농가 현장 배양액 내 미생물 개체 수 조사 -----	207

제 5 절 항선충 미생물 대량배양복합체 제품화 및 판매 -----	209
1. 개발된 미생물제제, 액비 및 배양체 등록시험 -----	209
가. 미생물 보조영양원 (액비) 등록시험 -----	209
(1) 비해시험 1건, 작물재배시험 1건, 보증 성분 및 유해성분 분석 시험 -----	209
(2) 분석시험의뢰 -----	209
나. 토양미생물제제 등록시험 -----	210
(1) 작물재배시험 1건, 약해시험 1건 -----	210
다. 젤라틴/키틴 배양체 등록시험 -----	217
(1) 작물재배시험 1건, 보증 성분 및 유해성분 분석 시험 -----	217
(2) 분석시험의뢰 -----	218
2. 대량배양복합체 개발 관련기술의 특허, 시제품 및 마케팅 전략 수립 -----	218
가. 작물별 희석배율 및 사용 매뉴얼 작성 -----	218
나. 항선충 미생물 대량배양복합체 상표 및 특허 출원 -----	219
다. 시장 분석을 통한 마케팅 전략 수립 및 수행 -----	221
라. 시제품을 통한 실제 시범포 운영, 검증 -----	223
3. 항선충 미생물 대량배양복합체의 제조공정 설계 및 품질관리 계획 설정 -----	224
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	228
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 -----	234
제 6 장 참고문헌-----	235

제 1 장 연구개발과제의 개요

현재 우리나라에서는 선충 피해를 막고자 작물을 심기 전 농가에서 무분별한 합성농약을 사용하고 있다. 하지만 농약의 효과가 거의 없을 뿐 아니라 이마저도 농작기 중에는 선충을 방제하기 위해 사용할 수 없는 실정이다. 본 연구진이 개발하고자하는 항선충 미생물 대량배양복합체는 항선충 미생물, 젤라틴/키틴기질배양체 및 미생물 보조영양원(액비)으로 구성될 것이다. 이러한 제품구성은 농작기 전 및 농작기 중에도 선충방제용으로 사용할 수 있어 선충피해로 인한 수확량 감소가 일어나지 않아 소득 보전 및 증대로 이어질 것으로 기대된다. 또한 화학농약의 과도한 사용에 따른 환경파괴 및 생태계 변화 등의 부작용을 최소화 할 수 있다. 본 연구진은 이 항선충 미생물 대량배양복합체의 적정 살포 수준을 설정하여 사용 매뉴얼을 작성하고 이를 바탕으로 규격 상품화된 제품을 생산 보급함으로써 친환경 농산물 생산에 필수적인 자재로 이용 될 수 있을 것으로 기대한다. 2004년 농림부(현 농수산식품부)발표에 따르면 우리나라는 2013년까지 2004년 대비 비료와 합성농약의 사용량을 60%이상 감소시켜 친환경농산물의 생산량을 10%이상 증가시키는 것을 목표로 하고 있고, 농민과 소비자의 인식이 친환경 농사와 농산물을 원하고 있어 시장성은 충분하다고 보여진다.

그러므로 본 과제에서는 젤라틴과 키틴을 기질로 이용하여 농가가 직접 손쉽게 기능성 미생물을 배양하여 농작물에 시용함으로써 식물기생선충을 방제할 수 있도록 하는 것이다. 이를 위해 본 연구팀은 농작물의 선충 피해 경감과 농약 사용 감소를 이끌어 낼 수 있는 친환경 생물소재 개발의 일환으로 항선충 미생물, 젤라틴/키틴배양체 및 미생물 보조영양원(액비)으로 구성된 항선충 미생물 대량배양복합체를 개발 하고자 하는 것이다.

본 연구개발과제의 연구범위는 다음과 같다.

제 1 절 항선충 미생물 특성연구 및 미생물제제 연구

1. 뿌리혹선충 분리 및 선발 미생물 항선충 활성 연구
 - 가. 미생물의 선충알 기질사용에 따른 키틴분해효소 조사
 - 나. 미생물의 선충알 기질사용에 따른 분해산물 조사
 - 다. 미생물의 선충유충 기질사용에 따른 젤라틴분해효소 조사
 - 라. 미생물의 선충유충 기질사용에 따른 분해산물 조사
2. 선발된 미생물의 알 파괴효소 및 선충 표피 파괴효소 특성 연구
 - 가. 알 파괴 효소
 - 나. 선충 표피 파괴 효소
3. 항선충 미생물이 생산하는 살선충 활성물질의 분리 및 활성 연구
 - 가. 살선충 활성물질의 추출 및 정제
 - 나. 분리한 살선충 활성물질의 선충 억제 활성 조사

4. 미생물제제 유통기한 실험
 - 가. 첨가제 종류에 따른 유통기한 영향
 - 나. 시간경과에 따른 유통기한 영향

5. 항선충 미생물의 작물 실험
 - 가. 항선충 미생물의 작물생육 효과
 - 나. 항선충 미생물의 선충억제 효과
 - 다. 토양내 키틴 분해 미생물 밀도 조사

6. 항선충 미생물 배양 최적조건 확립
 - 가. 키틴과 젤라틴 비율에 따른 활성 검증
 - 나. 생장인자 첨가에 따른 활성 검증
 - 다. 미량요소 첨가에 따른 활성 검증
 - 라. 최적 배지 확립을 위한 추가 실험

7. 항선충 미생물 대량배양복합체 시제품 제작
 - 가. 젤라틴/키틴배양체, 미생물 보조영양원 및 미생물 적정 비율 조합 조사
 - 나. 온도와 기타 환경에 따른 영향 조사
 - 다. 미량요소 또는 첨가물질에 대한 효과 및 영향 조사
 - 라. 미량요소 및 물질 조합에 따른 영향 조사

8. 미생물 보조영양원 (액비) 확립실험
 - 가. 비료 등록을 위한 작물 생육 실험 및 성분 조사

9. 포트에서 토마토 및 멜론 작물을 이용한 항선충 미생물 대량배양복합체의 선충 억제 활성 및 작물 성장 효과 조사
 - 가. 작물체 선충 억제 활성
 - 나. 작물체 성장 효과
 - 다. 토양 내 및 작물체 효소 활성 및 토양 미생물 측정

10. 포장에서 토마토 및 멜론 작물을 이용한 항선충 미생물 대량배양복합체의 선충 억제 활성 및 작물 성장 효과 조사
 - 가. 작물체 선충 억제 활성
 - 나. 작물체 성장 효과
 - 다. 토양 내 및 작물체 효소 활성 및 토양 미생물 측정
 - 라. 토양의 이화학적 특성 변화
 - 마. 농가 현장 배양액내 미생물 개체수 조사

11. 개발된 미생물제제, 액비 및 배양체 등록시험
 - 가. 미생물 보조영양원 (액비) 등록시험

나. 미생물제제 등록시험

다. 젤라틴/키틴 배양체 등록시험

12. 대량배양복합체 개발 관련기술의 특허, 시제품 및 마케팅 전략 수립

가. 작물별 희석배율 및 사용 매뉴얼 작성

나. 항선충 미생물 대량배양복합체 상표 및 특허 출원

다. 시장 분석을 통한 마케팅 전략 수립 및 수행

라. 시제품을 통한 실제 시범포 운영, 검증

13. 항선충 미생물 대량배양복합체의 제조공정 설계 및 품질관리 계획 설정

제 2 장 국내외 기술개발 현황

전 세계적으로 식물기생선충에 의해 해마다 발작물은 에이커 당 \$4.14, 채소류는 \$53.65, 과일류는 \$71.45의 손실을 보고 있다. 우리나라에서도 그동안 등한시 했던 선충에 의한 피해가 점차 심각하게 나타나고 있다. 1982년 철원 인삼포에 감자 썩이 선충의 피해가 심하게 발생하였으며, 1984년에는 벼 잎 선충의 피해로 인하여 흑점미가 전국적으로 발생하였다. 이러한 국내외 여건의 변화로 인하여 앞으로 항선충제 시장의 확대가 예상되고 있다. 지금까지는 항선충제 시장에서는 훈증제가 주로 사용되었다. 그러나 2005년부터 심각한 오염문제로 훈증제의 사용이 금지됨에 따라 8 종류의 항선충제가 등록되어 있으며 전체 미생물제제 시장에서 13.3%의 비중을 차지하고 있다. 하지만 예전의 훈증제의 선충방제 효과를 대체할 항선충제의 개발이 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구팀은 식물기생선충방제를 목적으로 하는 젤라/키틴분해 미생물 대량배양복합제제를 개발하여 제품화한다면 충분한 시장성과 농가의 호응이 예상되고 있다.

또한 앞으로 친환경 유기 농산물 생산에 필요한 생물농약 및 미생물제제에 대한 수요가 꾸준히 증가될 것으로 사료된다. 최근 미국의 organic trade association (OTA)의 보고서에 의하면 친환경 유기 농산물의 생산과 소비량이 선진국을 중심으로 년 20 - 30 %의 고도 성장세를 보이고 있고, 영국의 경우 이미 10%이상의 경작되는 작물이 친환경 인증을 받은 작물이 유통되고 있다. 따라서 선진국을 중심으로 이들 친환경 유기 농산물을 생산하기 위한 필수적인 요소인 미생물제제 및 미생물농약 수요가 급증하고 있으므로, 친환경 농산물을 생산하기 위해 반드시 필요한 미생물제제 분야에서 항선충 미생물 대량복합체 제품도 친환경 유기 농산물 생산에 큰 수요가 있을 것으로 기대된다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 기능성 미생물 선발 및 특성 연구

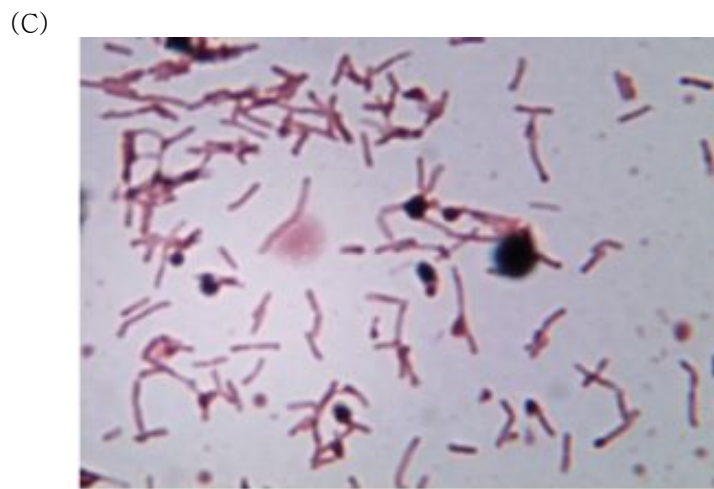
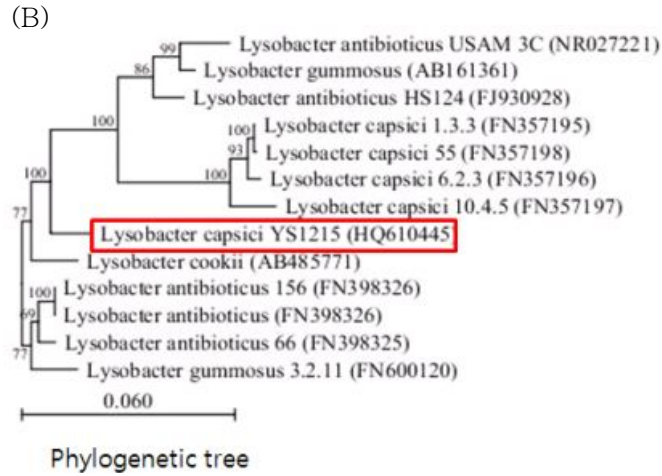
1. 항선충 미생물 선형 연구 결과

가. 항선충 미생물 분리 및 특성 조사

전남 해안가 일대를 돌며 게껍질이 풍부한 토양을 채취한 후 토양으로부터 키틴, 젤라틴 분해 미생물을 분리하였다. 분리한 미생물 중에 항선충 활성이 강한 미생물을 선발하였고, 동정하였다. 동정한 결과 *Lysobacter capsici*로 동정되었고, YS1215로 명명하고 NCBI genebank에 등록하였다(등록번호는 HQ610445번). *Lysobacter capsici*는 그람음성균이다 (그림 1).

(A)

```
g g c g g a g g g g g c t a c c t g c a g t c g a c g g c a g c a c a g a g g a g c t t g c t c c t
t g g t g g c g a g t g g c g g a c g g t g a g g A A T A C G T C G G A A T C T G C C T A T T T G T G G G G G A T A A C G T A G
G G A A A C T T A C G C T A A T A C C G C A T A C G A C C T A C G G G T G A A A G C G G A G G A C C T T C G G G C T
T C G C G C A G A T A G A T G A G C C G A C G T C G G A T T A G C T A G T T G G C G G G T A A A G G C C C A C C A
A G G C G A C G A T C C G T A G C T G G T C T G A G A G G A T G A T C A G C C A C A C T G G A A C T G A G A C A C G
G T C C A G A C T C C T A C G G G A G G C A G C A G T G G G G A A T A T T G G A C A A T G G G C G C A A G C C T G A
T C C A G C C A T G C C G C G T G T G T G A A G A A G G C C T T C G G G T T G T A A A G C A C T T T T G T C C G G A
A A G A A A A G C C T T G G G T T A A T A C C C T G A G G T C A T G A C G G T A C C G G A A G A A T A A G C A C C G
G C T A A C T T C G T G C C A G C A G C C G C G T A A T A C G A A G G G T G C A A G C G T T A C T C G G A A T T A
C T G G G C G T A A A G C G T G C G T A G G T G G T T T G T T A A G T C T G A T G T G A A A G C C C T G G G C T C A
A C C T G G G A A T G G C A T T G G A A A C T G G C T G A C T A G A G T G C G G T A G A G G G T A G T G G A A T T C
C C G G T G T A G C A G T G A A A T G C G T A G A T A T C G G G A G G A A C A T C T G T G G C G A A G G C G A C T A
C C T G G A C C A G C A C T G A C A C T G A G G C A C G A A A G C G T G G G G A G C A A A C A G G A T T A G A T A C
C C T G G T A G T C C A C G C C T A A A C G A T G C G A A C T G G A T G T T G G G A G C A A C T T G G C T C T C A
G T A T C G A A G C T A A C G C G T T A A G T T C G C C G C C T G G G A A G T A C G G T C G C A A G A C T G A A A C
T C A A A G G A A T T G A C G G G G C C C G C A C A A G C G G T G G A G T A T G T G G T T T A A T T C G A T G C A
A C G C G A A G A A C C T T A C C T G G C C T T G A C A T C C A C G G A A C T T T C T A G A G A T A G A T T G G T G
C C T T C G G G A A C C G T G A G A C A G G T G C T G C A T G G C T G T C G T C A G C T C G T G C G T G A G A T G
T T G G G T T A A G T C C C G C A A C G A G C G C A A C C C T T G T C C T T A G T T G C C A G C A C G T A A T G
```



Gram staining :

그림 1. 젤라틴/키틴분해 미생물의 동정(A) 및 특성(B).

A: *Lysobacter capsici* YS1215 16S rRNA 유전자 서열, B: 미생물 계통도, C: 그람염색

본 연구팀이 토양으로부터 분리한 미생물(*L. capsici* YS1215)의 여러 가지 효소 생성을 조사하였다. 이 미생물은 특정 기질을 사용한 agar 배지에 접종했을 때 키틴분해효소(chitinase) 및 젤라틴분해효소(gelatinase)를 생산하였고, 그 외 셀룰로오스분해효소(cellulase)등을 생산하였다. 또한 식물생장호르몬인 옥신과 항선충 물질로 알려진 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG)를 생산함을 확인하였다 (그림 2).



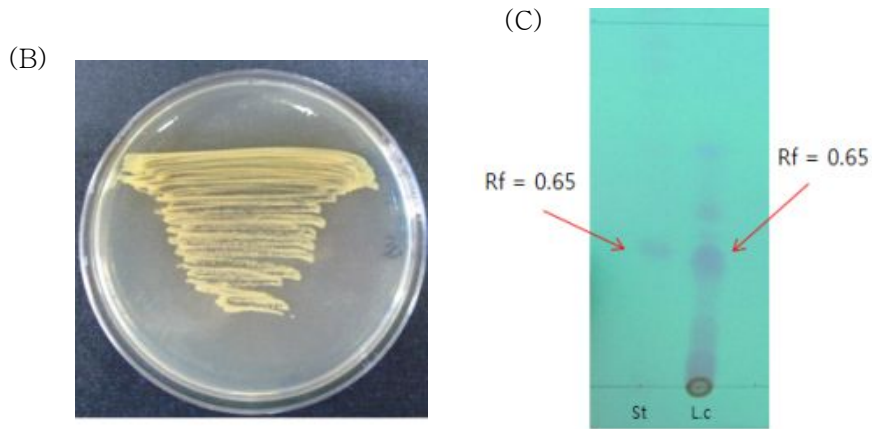
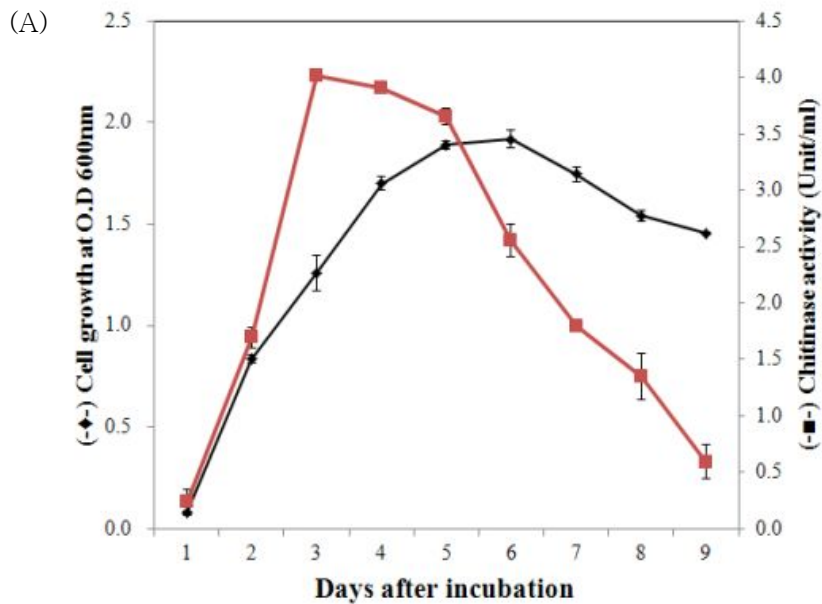


그림 2. *L. capsici* 의 다양한 효소 및 2차대사물질 생산 측정.

A: 키틴분해효소(chitinase), 젤라틴분해효소(gelatinase), 셀룰로우스분해효소(cellulase)활성, B: indolacetic acid (IAA), C: St; 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) Standard compound, L.c; *Lysobacter capsici* YS1215

본 연구팀이 날짜에 따른 *L. capsici* YS1215의 생육곡선과 키틴분해효소활성을 조사한 결과 생육은 6일째 가장 높았고, 효소활성은 3일째 까지 증가하다 서서히 감소하였다. 또한 단백질 분해효소, 콜라겐분해효소 및 젤라틴분해효소 활성은 5-6일째 가장 높게 나타났다 (그림 3).



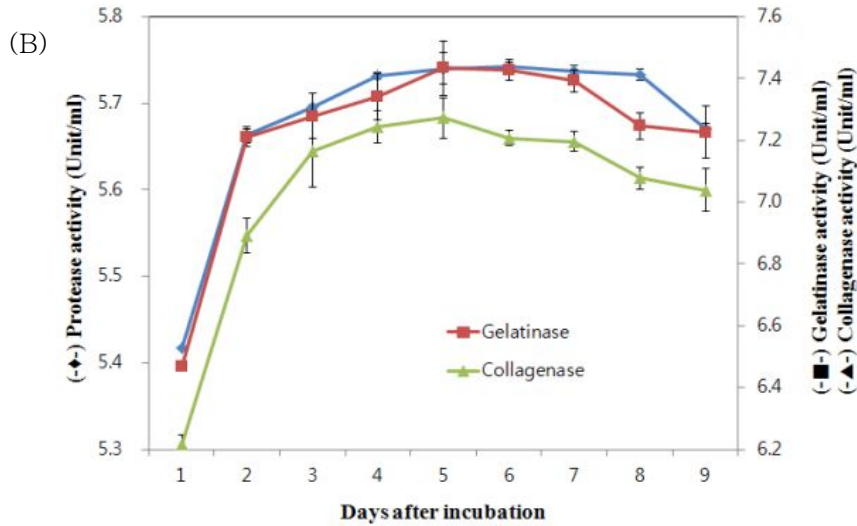


그림 3. *L. capsici* 의 생육곡선 및 다양한효소활성.

A: (-◆-) 미생물 생육곡선, (-■-) 날짜별 키틴분해효소(chitinase) 활성. B: (-◆-) 날짜별 단백질분해효소(protease) 활성, (-■-) 날짜별 젤라틴분해효소(gelatinase) 활성, (-▲-) 날짜별 콜라겐분해효소(collagenase) 활성.

나. 미생물 처리에 따른 향선충 활성 조사

본 연구팀은 토양으로부터 분리한 *Lysobacter capsici* YS1215를 5일 동안 30℃에서 배양한 후 원심분리하여 상등액을 취하였다. 24 well-plate에 알 500개, 유충 300마리를 넣고 상등액을 50% (상등액50:물50), 30%, 20%, 10% 농도로 하여 처리하였고, 대조구는 배지처리와 물처리로 하였다. 접종 1~5일까지 농도 별 알 부화율과 유충 치사율을 조사한 결과, 물 처리구는 선충 알 부화가 5일째 86%였으나 50% 배양액 처리구는 10%에 불과하였다. 하지만 배양액 10% 농도 처리구는 알 부화율이 65%로써 50% 처리구와 비교 하였을 때 알 부화 억제율이 현저히 떨어짐을 볼 수 있었다 (그림 4).

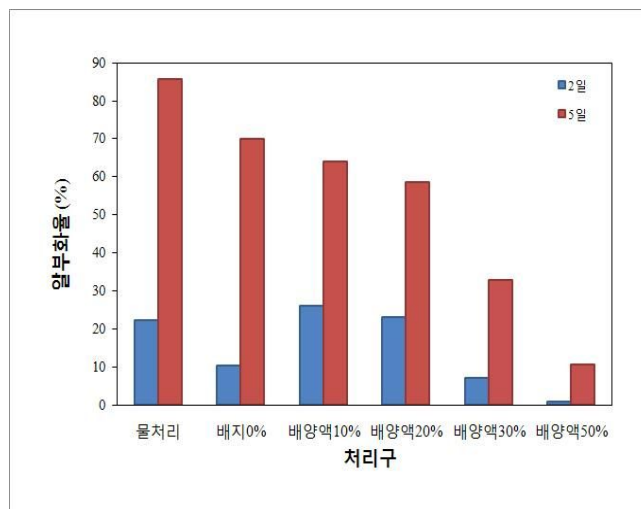
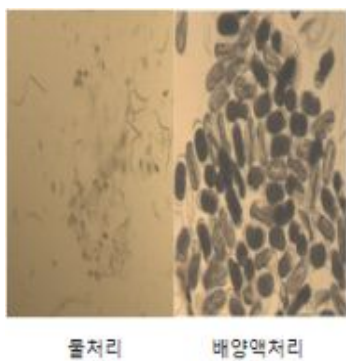


그림 4. *L. capsici* 처리가 알 부화에 미치는 영향.

L. capsici 미생물 배양액 처리농도가 높을수록 알부화율이 감소함.

물처리: 멸균수 처리, 배지0%: 배지만 처리, 배양액10%~50%: *L. capsici* 배양액 10%~50%

처리.

그림 5에서 보는바와 같이 유충 치사율은 물 처리구에서 배양액 처리 3일째는 10% 미만이지만, 배양액 10% 처리구에서는 22% 정도의 치사율을 보였다. 반면에 배양액 50% 처리구의 유충 치사율은 90%에 가까웠다. 결과적으로 배양액 처리농도가 높을수록 유충의 치사율은 높아졌다. 따라서 미생물 배양액을 많은 양의 물로 희석 한다면 그 효과가 현저히 떨어지는 것을 알 수 있다.

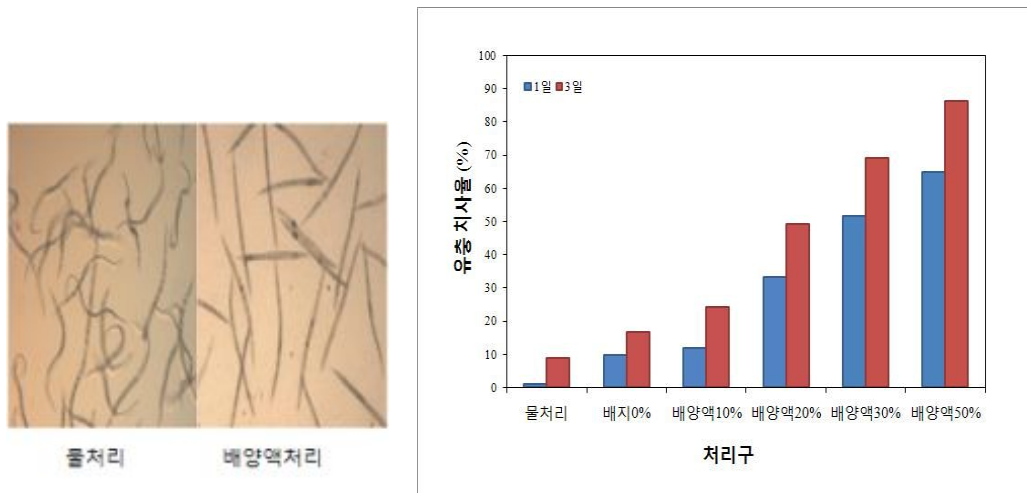


그림 5. *L. capsici* 처리가 유충치사에 미치는 영향.

L. capsici 미생물 배양액 처리농도가 높을수록 유충 치사율이 증가함.

물처리: 멸균수 처리, 배지0%: 배지만 처리, 배양액10%~50%: *L. capsici* 배양액 10%~50% 처리.

2. 뿌리혹선충 분리 및 선발 미생물 항선충 활성 연구

가. 미생물의 선충알 기질사용에 따른 키틴분해효소 조사

- 선충알을 모은 후 멸균하고 미생물(*L. capsici* YS1215)을 접종하여 날짜별로 키틴분해효소 활성(chitinase activity)을 조사한 결과 그림 6(a)에서 보는 바와 같이 키틴분말(crabshell powder) 기질과 선충알(nematode egg) 기질 사용 모두 1일부터 3일째 까지 증가하다, 3일째 가장 높은 활성을 보였고, 그 후에는 5일째 까지 점차 감소하였다. 그림 6(b)에서 보는 바와 같이 전기영동(chitinase active staining)을 통한 키틴분해 효소 활성을 조사하기 위해 그림 6(a)에 나타난 키틴분해효소 활성 1일, 3일, 5일째를 사용하였다. 조사 결과 그림 6(b)에서 보는바와 같이 1일째 키틴분해효소 활성인 1, 2 line에서는 1에서는 활성이 보이지 않았고, 2에서는 0.5 kDa정도의 분자량을 가진 효소가 나타났다. 하지만 2에서 나타난 효소 밴드는 3, 4 및 5, 6에서는 나타나지 않았다. 또한 3, 4 line 및 5, 6 line에서는 78 kDa정도의 분자량을 가진 효소 밴드가 동일하게 나타났다.

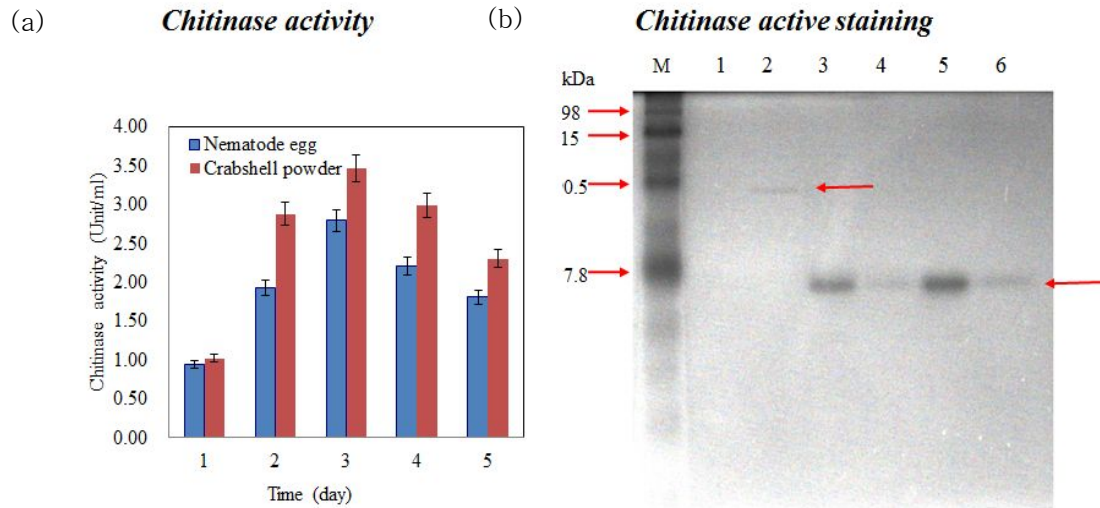


그림 6. 미생물(*L. capsici* YS1215)의 선충 알 기질사용에 따른 키틴분해효소 조사 및 전기영동(chitinase active staining).

(a) 날짜별 키틴분해효소(chitinase) 활성: 선충 알 기질 사용에 따른 chitinase 활성은 3일째 가장 높음. (b) 전기영동을 통한 키틴분해효소 활성 측정 (1, 3, 5: 선충 알 기질 사용(nematode egg); 2, 4, 6: 키틴분말 기질 사용(crab shell powder)).

나. 미생물의 선충알 기질사용에 따른 분해산물 조사

미생물(*Lysobacter capsici* YS1215)의 선충 알 기질 사용에 따른 분해 산물 조사를 위해 표 1과 같은 배지조성을 이용하였다. 표 1의 배지 조성에 미생물을 접종한 후 25°C에서 5일 동안 배양한 후 분해 산물에 대하여 얇은 막 크로마토그래피(Thin layer chromatography; TLC) 및 고성능 액체 크로마토 그래피(High-performance liquid chromatography; HPLC)를 이용하여 분석 하였다. TLC 및 HPLC 분석시 0.45 μm의 필터를 이용하여 부유물질을 제거한 후 분석하였다. TLC 조사 결과 그림 26에서 보는 바와 같이 키토 올리고 1당 표준물질인 N-acetyl-D-glucosamine의 Rf 값 0.46과 분해 산물의 Rf 값이 일치함을 보였다. 선충의 알은 단단한 키틴층을 둘러 싸여 있다. 그러므로 만약 알이 분해되었을 때 키틴 성분이 검출 될 수 있다. 본 실험 결과는 미생물이 선충 알을 분해함으로써 분해산물에 키틴 성분인 N-acetyl-D-glucosamine이 포함 되어 TLC 분석에 검출 된 것으로 사료된다.

표 1. 미생물의 선충알 기질 사용에 따른 분해 산물 조사를 위한 배지 조성

선충 알 (Nematode eggs)	1,000,000개/mL
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0 g/L
KH ₂ PO ₄	1.4 g/L
MgSO ₄	0.2 g/L
CaCl ₂	0.2 g/L
FeCl ₃	0.003 g/L

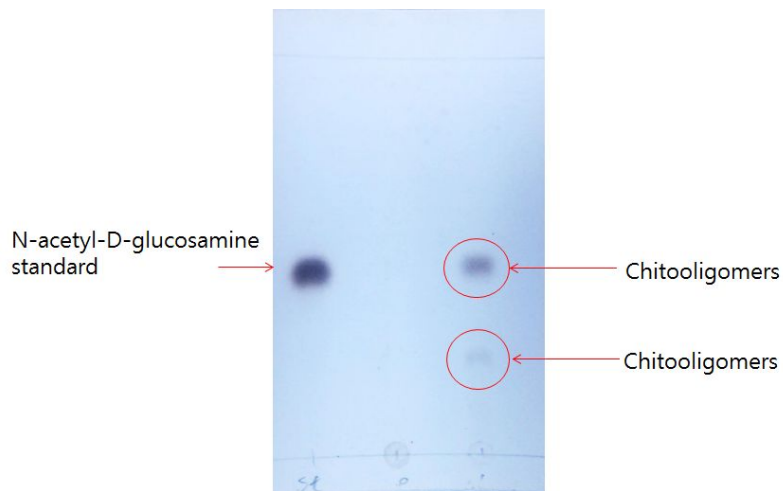


그림 7. TLC를 이용하여 선충 알 분해 산물 조사.

키토 올리고 1당 표준물질인 N-acetyl-D-glucosamine의 Rf 값 0.46과 선충 알 분해 산물의 Rf 값이 일치 함을 보임

St: 1당 N-acetyl-D-glucosamine 표준 물질, 0: 용매, 1: 알 분해산물 (chitooligomers)

미생물(*L. capsici* YS1215)의 선충 알 분해 산물인 키토 올리고당 (N-acetyl-D-glucosamine)을 TLC 를 통하여 확인 한 뒤 HPLC를 이용하여 다시 한 번 미생물에 의한 분해 산물의 생성 여부를 조사하였다. 분석조건은 NH₂P-50 4E(3.900mm, Shodex, Japan) 컬럼을 사용하였고, Acetonitrile:water(70:30,v/v) 로 1 ml/min 유속으로 용출시켜, UV 검출기로 210nm로 하였다. 조사 결과 그림 8와 9에서 보는 바와 같이 표준물질(standard)과 시료물질(treatment)의 머무름 시간(retention time)이 4.99로 같게 조사되었다. 이는 미생물이 선충 알을 분해하여 배양액에 키토 올리고 1당 표준물질인 N-acetyl-D-glucosamine이 존재 하는 것을 사료된다. 대조구로 사용된 미생물을 접종하지 않은 처리구에서는 N-acetyl-D-glucosamine이 검출되지 않았다.

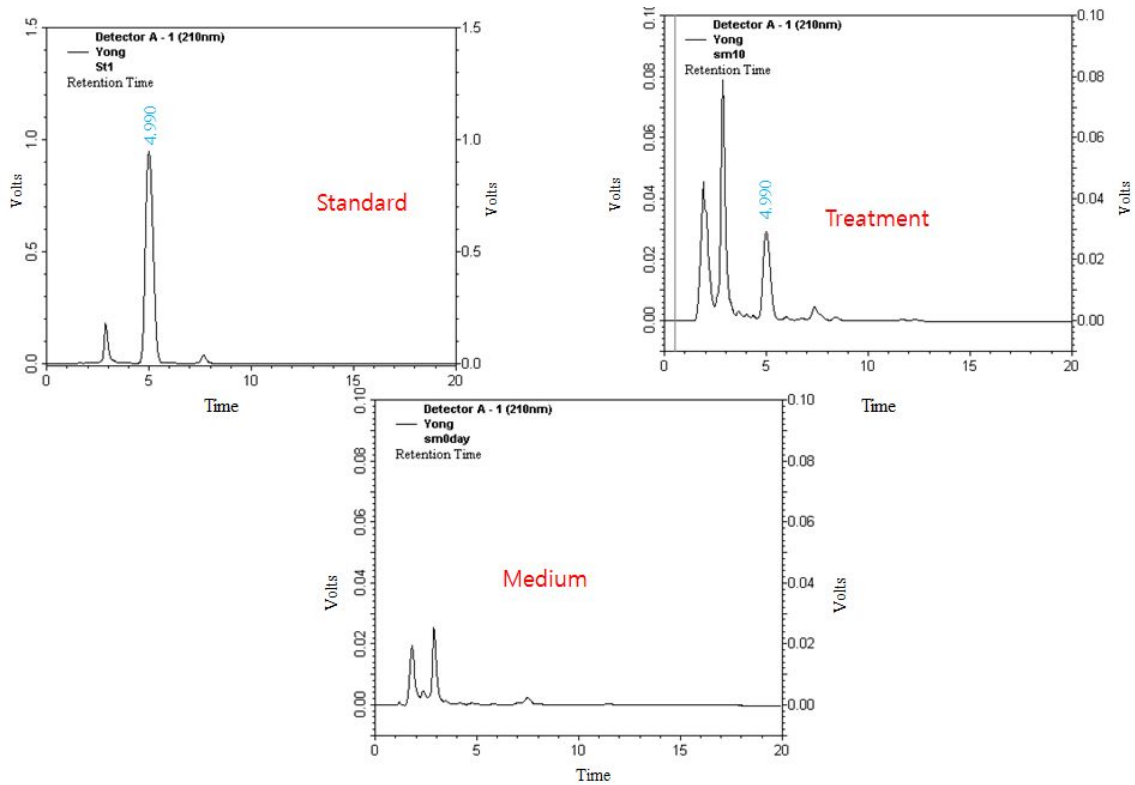


그림 8. HPLC를 이용한 선충 알 분해 산물 조사.

표준물질(standard)과 시료물질(treatment)의 머무름 시간(retention time)이 4.99로 같게 조사됨.

Standard: 표준물질(N-acetyl-D-glucosamine), Treatment: 선충알 분해 산물 시료물질 측정, Medium: 미생물 접종 전 배지 성분 측정.

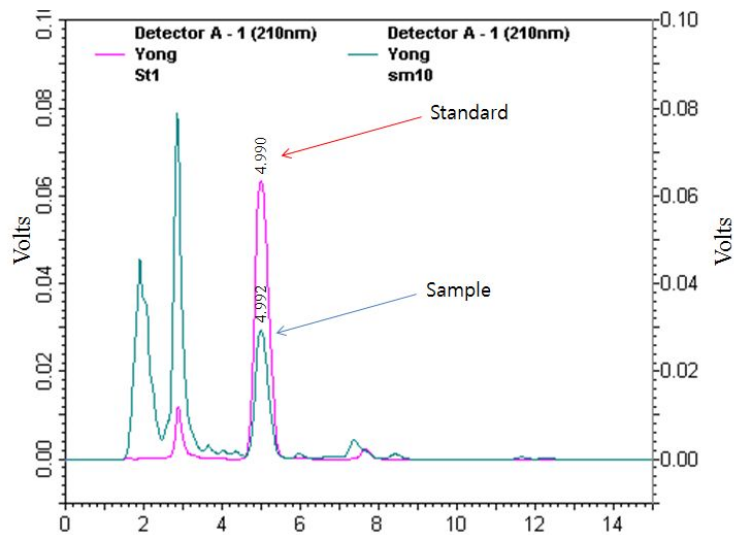


그림 9. HPLC를 이용한 선충 알 분해 산물 조사.

표준물질(standard)과 시료물질(treatment)의 머무름 시간(retention time)이 4.99로 같게 조사됨.

Standard: 표준물질(N-acetyl-D-glucosamine), Sample: 선충알 분해 산물 시료물질.

다. 미생물의 선충유충 기질사용에 따른 젤라틴분해효소 조사

- 선충 유충을 모은 후 멸균하고 미생물(*L. capsici* YS1215)을 접종하여 날짜별로 젤라틴분해 효소 활성(gelatinase activity)을 조사한 결과 그림 10(a)에서 보는 바와 같이 젤라틴분말 (gelatin) 기질을 사용한 것은 젤라틴분해효소 활성이 1일부터 4일째까지 증가하고 4일째 최고의 활성을 보였다. 또한 선충유충(nematode juvenile) 기질 사용 젤라틴분해효소 활성은 3일째 까지 증가하다, 그 후에는 5일째 까지 점차 감소하였다. 그림 10(b)에서 보는바와 같이 전기영동(gelatinase zymography)을 통한 젤라틴분해 효소 활성을 조사하기 위해 그림 10(a)에 나타난 젤라틴분해효소 활성 1일, 3일, 5일째를 사용하였다. 조사 결과 그림 10(b)에서 보는바와 같이 1일째 젤라틴분해효소 활성인 1, 2 line에서는 1에서는 활성이 보이지 않았고, 2에서는 232 kDa정도의 분자량을 가진 효소 및 여러 효소 활성이 나타났다. 또한 3, 5 line인 유충 기질 사용 때의 효소활성 결과가 4, 6 line에서의 활성 결과 보다 높게 나타났다.

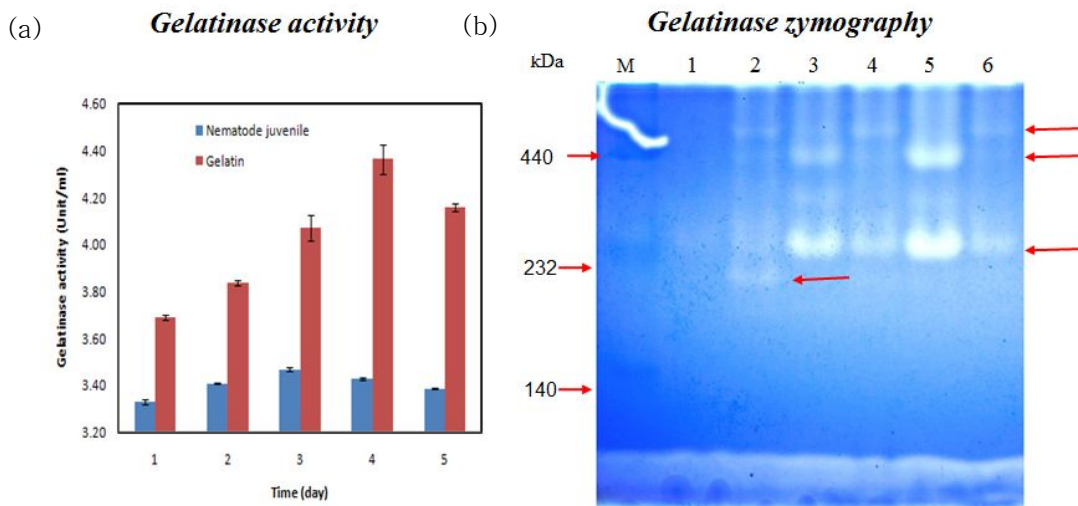


그림 10. 미생물(*L. capsici* YS1215)의 유충 기질사용에 따른 젤라틴분해효소 조사 및 기영동(gelatinase zymography).

- (a) 날짜별 젤라틴분해효소(gelatinase) 활성: 선충 유충 기질 사용에 따른 gelatinase 활성은 4일째 가장높음. (b) 전기영동을 통한 젤라틴분해효소 활성측정 (1, 3, 5: 유충 기질 사용(gelatinase activity); 2, 4, 6: 젤라틴분말 기질 사용(gelatinase zymography)).

라. 미생물의 선충유충 기질사용에 따른 분해산물 조사

- 뿌리혹선충 유충을 모은 후 멸균하고 미생물(*L. capsici* YS1215)을 접종, 배양하고 3일째 배양액을 원심분리한 후 상등액을 회수 하여 한국기초과학지원연구원(www.kbsi.re.kr)에 의뢰하여 분해산물인 아미노산을 조사한 결과 유충 분해 산물에서 proline이 348.905 pg/ μ l 이 검출 되었다. 또한 valine 및 isoleucine 등이 검출 됐다 (그림 11).

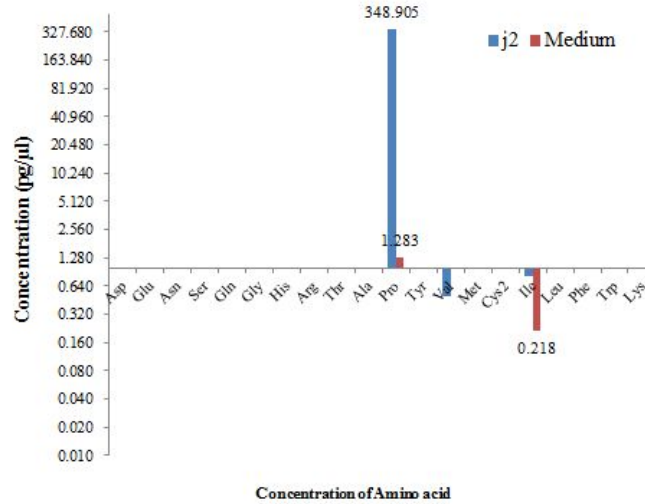


그림 11. 미생물(*L. capsici* YS1215)의 유충 기질사용에 따른 분해산물 조사. 선충 유충 분해 산물인 아미노산을 조사한 결과 유충 분해 산물에서 proline이 348.905 pg/μl 이 검출됨.

J2 : 선충 유충 분해 산물 시료물질, Medium : 미생물 접종 전 배지 성분 측정.

3. 선발된 미생물의 알 파괴효소 및 선충 표피 파괴효소 특성 연구

가. 알 파괴 효소

(1) chitinase 활성 측정

Chitinase활성을 조사한 결과 배양 3일째 최고 활성을 나타내었으며, 3일 이후에는 점차 감소하는 경향을 보였다 (그림 12).

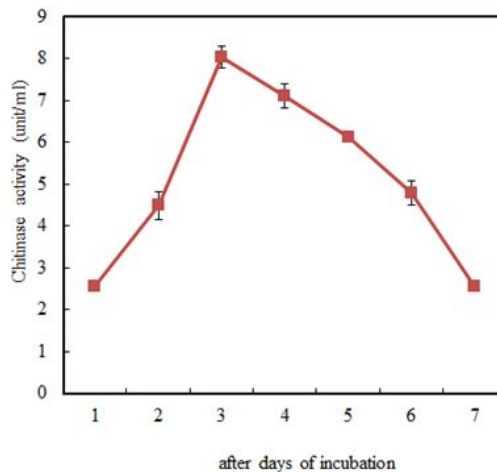


그림 12. 날짜에 따른 키틴분해효소(chitinase) 활성 조사. 30°C에서 7일간 측정. Chitinase 활성이 3일째 가장 높은 것으로 조사됨.

(2) chitinase 정제 및 알 파괴 조사

미생물(*L. capsici* YS1215)을 3일간 배양한 후 원심분리 하여 상등액을 80% ammonium sulfate로 효소를 침전시켰다. 침전물을 투석하여 ammonium sulfate를 제거 한 후 DEAE-cellulose 컬럼 크로마토그래피를 통해 1차 정제하였다. 1차 정제된 효소를 Sephadex G-100 컬럼 크로마토그래피를 통해 2차 정제 하였다. 그림 13에서 보는 바와 같이 80% ammonium sulfate를 통하여 얻은 조효소액을 DEAE-cellulose 컬럼에 NaCl을 이용하여 0-0.5M까지 농도 구배를 주면서 단백질을 용출시켰다. DEAE-cellulose은 이온 크로마토그래피로서 이온의 세기에 따라 단백질을 분리 할 수 있다. DEAE-cellulose를 이용하여 단백질을 정제 한 뒤 키틴분해효소(chitinase) 활성을 측정한 결과 17번 분획에서 4.93 unit/ml 활성으로 최고를 나타냈고, 효소의 양은 280 nm 파장 조사에서 0.33 정도의 흡광 파장을 보였다. 이러한 결과를 바탕으로 chitinase의 높은 활성을 보인 13-33번 분획을 회수하여 농축시키고, 2차 정제를 실시하였다.

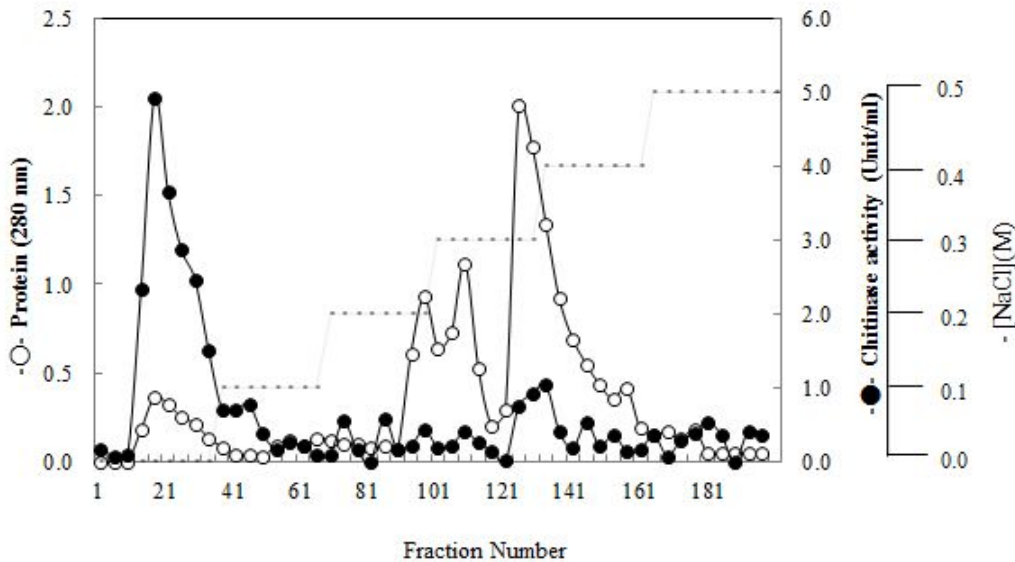


그림 13. DEAE-cellulose 컬럼 크로마토그래피를 통한 chitinase 정제 및 효소 활성 측정. Chitinase의 높은 활성을 보인 13-33번 분획을 회수하여 농축함.
 -○- : 단백질 함량(protein), -●- : chitinase 활성.

DEAE-cellulose 컬럼 크로마토그래피에서 높은 chitinase 활성을 보인 분획을 농축한 뒤 추가적인 정제를 하기 위하여 크기 배제 크로마토그래피인 Sephadex G-100 컬럼을 이용하였다 (그림 14). 시료를 용출 한 후 회수한 분획을 단백질 정량 및 chitinase 활성을 측정하였다. chitinase 활성을 측정한 결과 36번 분획에서 6.73 unit/ml 활성으로 최고를 나타냈고, 효소의 양은 280 nm 파장 조사에서 0.34 정도의 흡광 파장을 보였다. 이러한 결과를 바탕으로 chitinase의 높은 활성을 보인 35-37번 분획을 회수하여 농축시키고, 효소 특성 조사, 알 파괴 조사 및 정제도 확인 등을 실시하였다.

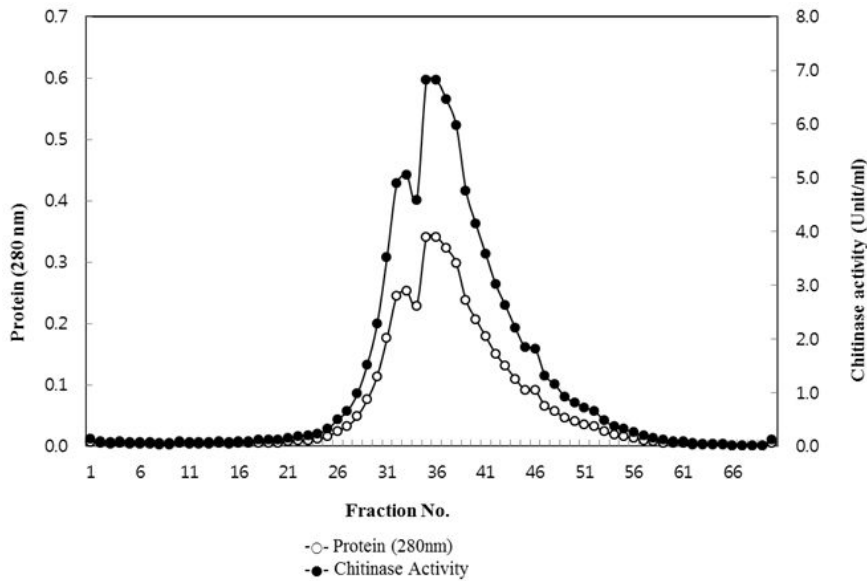


그림 14. Sephadex G-100 컬럼 크로마토그래피를 통한 정제 및 효소 활성 측정. Chitinase의 높은 활성을 보인 35-37번 분획을 회수하여 농축함.
 -○- : 단백질 함량(protein), -●- : chitinase 활성.

그림 15에서 보는바와 같이 정제된 효소의 정제도를 조사 하기 위해 12% 전기영동 (SDS-PAGE)겔에 glycochitin인 키틴기질을 넣고 키틴분해효소활성 전기영동 (chitinase active staining)을 실시하였다. 조사결과 배양상등액 및 ammonium sulfate 침전 단백질에서는 여러 개의 키틴분해 활성 밴드가 보였다. 하지만, sephadex G-100 정제 단백질에서는 한 개의 키틴 분해 활성 밴드가 나타났다. 이 결과를 볼 때 최종적으로 정제된 키틴분해 효소는 불순물이 제거된 단일 효소로서 선충 알 파괴 및 부화 억제 활성 실험에 적절할 것으로 판단하였다.

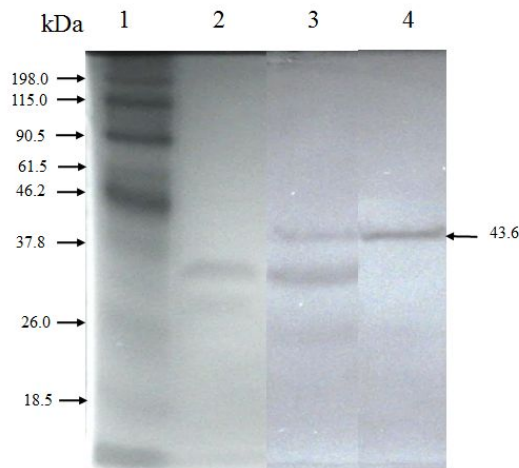


그림 15. 전기영동(chitinase active staining)을 통한 정제된 chitinase 효소 활성 조사. Chitinase 정제 후 43.6 kDa의 단일 밴드가 확인됨.

1: 표준마커(Marker), 2: *L. capsici* YS1215 배양상등액, 3: ammonium sulfate 침전 단백질, 4: Sephadex G-100 정제 단백질.

정제된 효소의 특성 조사로써 분리된 효소의 최적 pH를 pH3부터 pH11까지 측정된 결과 pH8에서 최적의 활성 (relative activity)을 보였지만 pH5와 6과의 활성 차이는 거의 나타나지 않았다. 또한 pH 안정성(residual activity) 측정은 pH 5와 6에서 가장 좋게 나타났다. 하지만 pH3, 10 및 11에서는 최적 pH 활성 및 pH 안정성에 있어서 50%이하로 조사되었다. 온도에 따른 분리된 효소의 최적 활성 및 최적 안정성을 조사한 결과 40°C에서 최적 활성을 보였고, 안정성 또한 40°C에서 가장 안정한 것으로 조사되었다 (그림 16). 20°C, 30°C 및 50°C에서의 최적 활성 및 안정성은 50%이상을 나타냈다. 하지만 60°C, 70°C 및 80°C에서의 효소 안정성은 50% 이하로 조사되었다. 70°C 및 80°C에서의 최적 온도 활성이 50%이상으로 조사되었지만 실험 오차로 보여 진다.

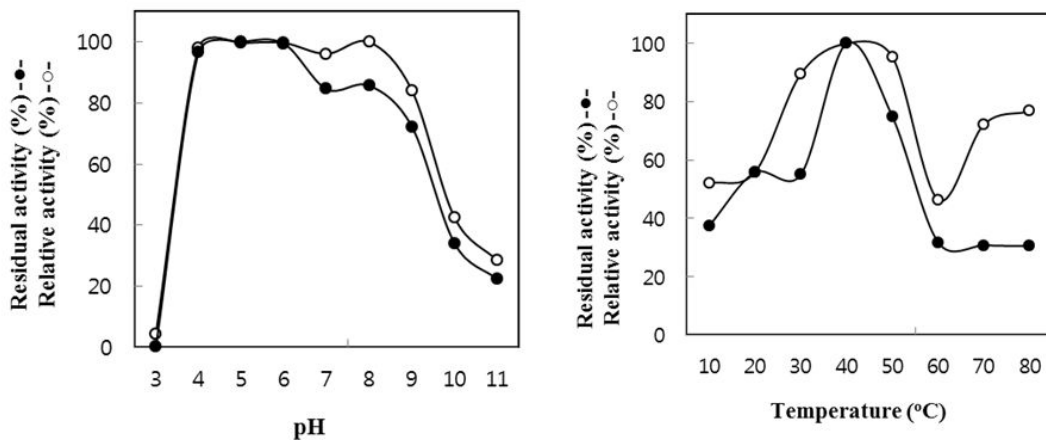


그림 16. 정제된 효소의 최적 pH 및 온도 활성 조사.

Chitinase의 최적 pH는 4, 5, 6으로 조사됨 및 안정 pH는 4, 5, 6, 8로 조사됨. Chitinase의 최적 및 안정 온도는 40°C로 조사됨.

●-; pH 및 온도 안정성 조사 (residual activity), ○-; 최적 pH 및 온도 조사 (relative activity)

정제된 효소(chitinase)의 이온(ion)에 대한 특성을 조사하기 위해 5 mM의 $MnCl_2$, $ZnCl_2$ 및 10mM의 $CaCl_2$, $CoCl_2$, $CuSO_4$, $MgCl_2$, $FeCl_3$, $FeCl_2$, EDTA, $AgCl_2$, 및 $AgNO_3$ 를 처리한 후 조사결과 EDTA 처리시 chitinase 활성이 106%로 6%의 활성 증가를 보였다. 하지만 $AgCl_2$, 및 $AgNO_3$ 를 처리하였을 때 chitinase 활성은 강하게 억제 되었다. 이 외 $CuSO_4$, $MgCl_2$, $MnCl_2$ 및 $CaCl_2$ 는 약간의 chitinase 억제 활성을 보였다. $CoCl_2$, $FeCl_2$ 및 $FeCl_3$ 는 각각 78%, 60%의 chitinase 활성을 보여 효소 활성을 억제하는 이온으로 조사되었다 (표 2).

표 2. 정제된 chitinase 효소의 이온(ion) 영향 조사.

Meterial	Relative activity (%)	Meterial	Relative activity (%)
None	100	CaCl ₂	94
FeCl ₂	60	ZnCl ₂	100
CuSO ₄	90	FeCl ₃	60
MgCl ₂	97	EDTA	106
MnCl ₂	94	AgCl ₂	28
CoCl ₂	78	AgNO ₃	42

*EDTA : ethylenediamine tetraacetic acid.

표 3에서 보는바와 같이 정제된 효소를 다양한 기질과 함께 반응 시켜 효소의 기질 분해 여부를 조사하였다. 조사 결과 키틴을 골격으로 하고있는 glycol chitin, glycol chitosan, 및 chitin powder와 반응 시켰을 때 각각 84%, 48%, 24%의 상대적 활성(relative activity)을 보였다. 하지만 키틴 골격이 없는 다당체인 Carboxymethyl cellulose는 전혀 이용하지 못하였다.

표 3. 정제된 chitinase 효소의 다양한 기질 사용 조사.

기질 (Substrate)	Relative chitinase activity (%)
Swollen chitin	100
Glycol chitin	84
Glycol chitosan	48
Chitin powder	24
Carboxymethyl cellulose	0

정제과정에서 정제효소의 회수율 및 정제배율에 관하여 표4에서 보는바와 같이 Sephadex G-100 컬럼 크로마토그래피 정제 후 조사된 최종 효소 고유활동도(specific activity)는 21.1 Unit/mg이었고, 정제배율(Purification folds)는 3.7, 회수율(recovery)은 28%로 나타났다. 정제된 효소의 최종 회수 양은 8.0 mg으로 조사되었다. 즉, 4 L의 배양액에서 8.0 mg의 키틴분해효소를 얻을 수 있었다.

표 4. *L. capsici* YS1215 배양액으로부터 분리한 chitinase 정제율.

Purification step	Total Volume (ml)	Activity (U/ml)	Total Protein (mg)	Total activity (Units)	Specific Activity (U/mg)	Purification (folds)	Recovery (%)
Crude enzyme	4000.0	0.2	105.5	600.0	5.7	1.0	100
Ammonium sulfate 80%	10.0	27.1	44.0	271.0	6.2	1.1	45.2
Ion exchange	4.0	52.9	23.0	211.6	9.2	1.6	35.3
Gel filtration	1.0	168.7	8.0	168.7	21.1	3.7	28.1

정제된 효소(chitinase)의 선충 알 부화 억제와 알 파괴에 대하여 조사하였다 (그림 17). 선충 알 대략 100개 정도를 1.5 ml 튜브에 넣고 chitinase를 0.05 ml (6.8 Unit/ml) 처리 하고 7일 후에 알 부화를 측정 하였다. 측정된 결과, 그림 5에서 보는바와 같이 물처리(SDW)구 및 100°C에서 10분간 처리한 chitinase 처리구에서 각각 34%와 30%의 부화율을 보인 반면에 chitinase 처리구에서는 16%의 부화율을 보여 다른 두 처리구에 비해 18% 및 14%의 부화율 차이를 보였다. 이는 처리된 chitinase가 선충 알 부화 억제 활성을 보인 것을 사료된다. 또한 정제된 chitinase 처리 및 100°C에서 10분간 처리한 chitinase 처리구의 선충 알 표피의 상태를 분광현미경(18A와 18B)과 형광 현미경 (18C와 18D)으로 조사한 결과 그림 18A와 18C에서와 같이 100°C에서 열처리한 chitinase를 처리한 선충 알의 표피는 손상되지 않았다. 하지만, 18B와 18D에서와 보는 바와 같이 선충의 알이 파괴 되고 표피에 구멍이 생긴 것을 볼 수 있다. 선충 알은 단백질 및 키틴을 함유하고 있으므로, 정제된 chitinase 가 선충의 알의 키틴 층을 파괴함으로써 알의 부화를 억제 한 것을 사료된다.

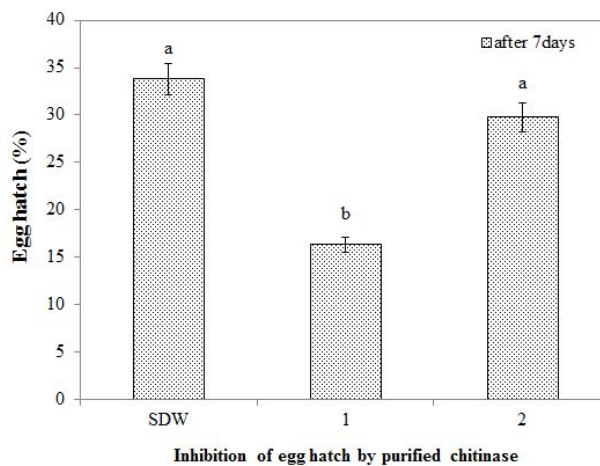


그림 17. 정제된 chitinase 효소의 알 부화 억제에 미치는 영향 조사.

정제된 chitinase 효소에 의해 선충 알 부화가 억제 되었음.

SDW: 물처리, 1: 100°C에서 10분간 처리한 chitinase, 2: chitinase 처리.

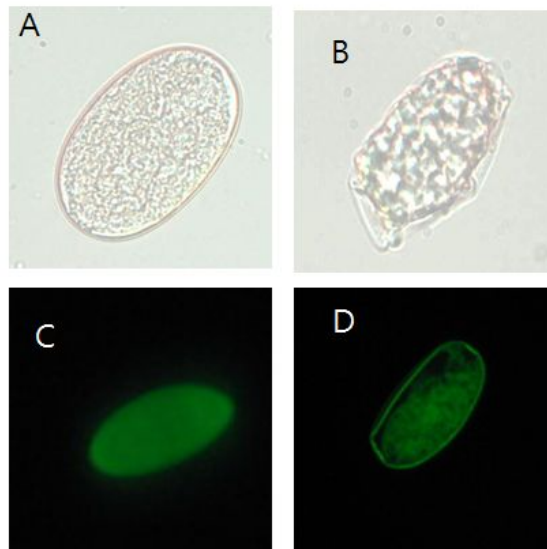


그림 18. 정제된 효소의 알 부화 억제에 미치는 영향 조사.
정제된 chitinase 효소에 의해 선충 알 표피가 파괴 되었음.

A : heated chitinase treatment under light microscope

B : non-heated chitinase treatment under light microscope

C : heated chitinase treatment stained by 0.01% Fluorescent Brightener 28,

D : non-heated chitinase treatment stained by 0.01% Fluorescent Brightener 28

나. 선충 표피 파괴 효소

(1) 젤라틴분해효소(gelatinase) 활성 측정

Gelatinase 활성을 조사한 결과 1일째부터 점차 증가하여 배양 6일째 최고 활성을 나타내었고, 6일 이후에는 감소하는 경향을 보였다 (그림 19).

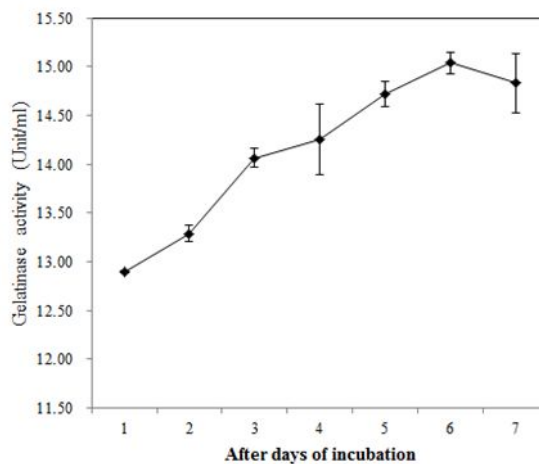


그림 19. 날짜에 따른 젤라틴분해효소(gelatinase) 활성 조사.

L. capsici YS1215 배양 6일째 최고의 활성을 보였음.

(2) gelatinase 정제 및 유충 파괴 조사

미생물(*L. capsici* YS1215)을 배양한 후 원심분리 하여 상등액을 80% ammonium sulfate 로 효소를 침전시켰다. 침전물을 투석하여 ammonium sulfate를 제거 한 후 DEAE-sepharose 컬럼 크로마토그래피를 통해 1차 정제하였다. 1차 정제된 효소를 Sephadex G-100 컬럼 크로마토그래피를 통해 2차 정제 하였다. 그림 20에서 보는 바와 같이 80% ammonium sulfate를 통하여 얻은 조효소액을 DEAE-sepharose 컬럼에 NaCl을 이용하여 0-0.5M까지 농도 구배를 주면서 단백질을 용출시켰다. 젤라틴분해효소 활성을 측정 한 뒤 활성이 있는 10-15번 분획을 회수하여 농축시켰다.

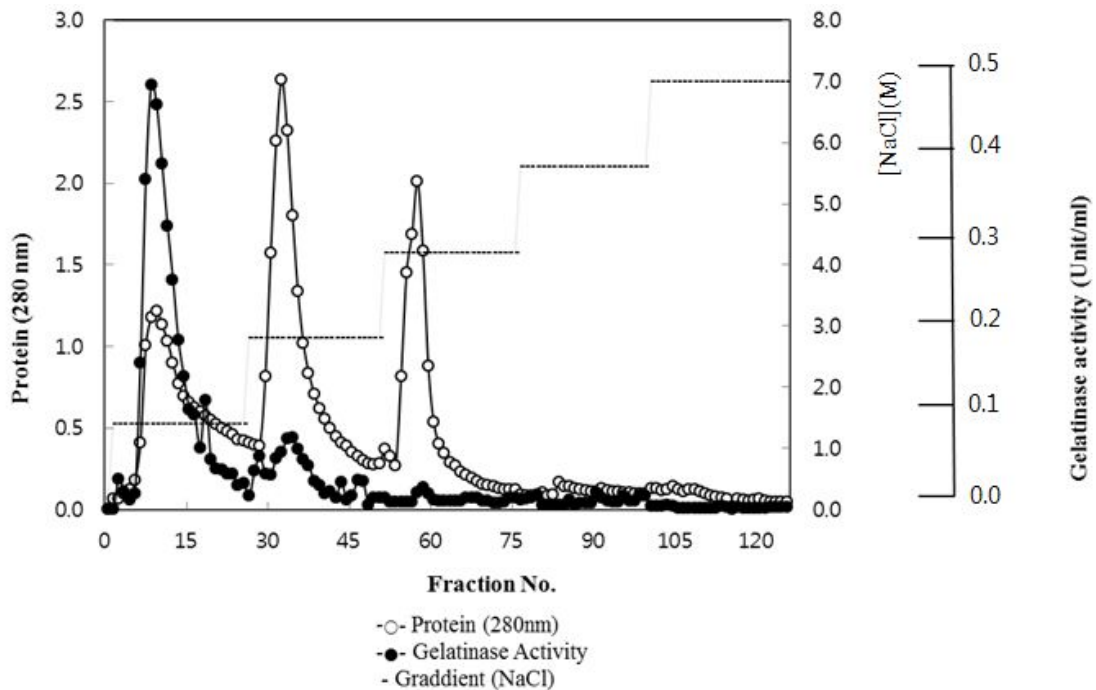


그림 20. DEAE-sepharose 컬럼 크로마토그래피를 통한 gelatinase 정제 및 효소 활성 측정. 젤라틴분해효소 활성이 높은 10-15번 분획을 회수하여 농축함.

-○- : 단백질 함량(protein), -●- : chitinase 활성.

DEAE-sepharose 컬럼크로마토그래피의 활성을 측정한 뒤 회수한 분획을 Sephadex G-100 컬럼에 Loading하여 용출하였다 (그림 21). 용출 후 회수한 분획을 단백질 정량 및 젤라틴분해효소활성을 측정하였다. 젤라틴분해효소 활성을 측정한 뒤 활성이 있는 11-14번 분획을 회수하여 농축시켰다.

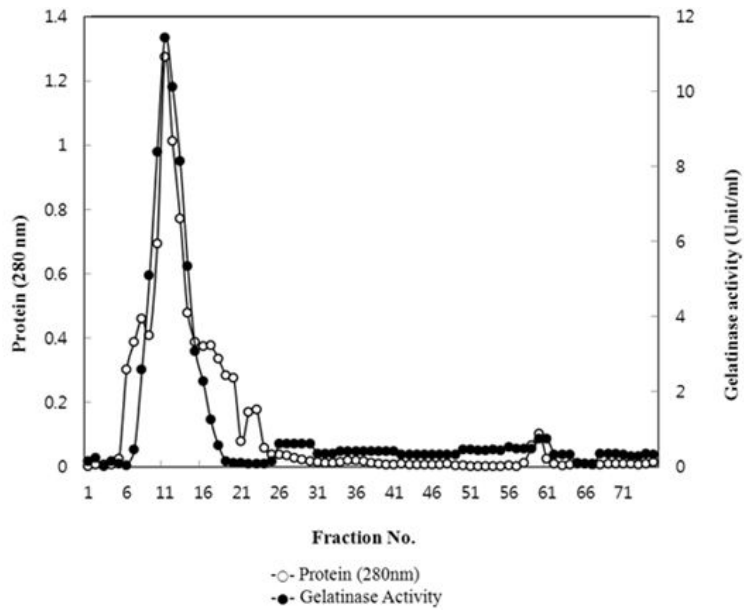


그림 21. Sephadex G-100 컬럼 크로마토그래피를 통한 gelatinase 정제 및 효소 활성 측정. 젤라틴분해효소 활성이 높은 11-14번 분획을 회수하여 농축함.
 -○- : 단백질 함량(protein), -●- : chitinase 활성.

- 정제된 효소의 최적 pH를 측정한 결과 pH 8에서 최적의 활성(relative activity)을 보였고, 안정성(residual activity) 측정에서도 pH 8에서 가장 좋았다. 또한 온도에 따른 최적 활성 및 최적 안정성을 조사한 결과 40°C에서 최적 활성을 보였고, 안정성은 30°C에서 가장 안정한 것으로 조사 되었다 (그림 22).

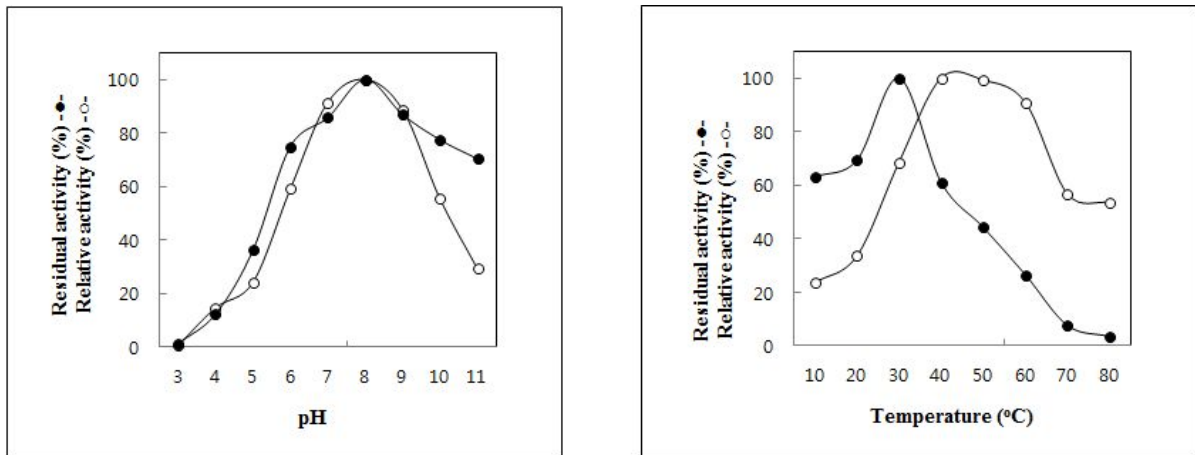


그림 22. 정제된 효소의 최적 pH 및 온도 활성 조사. Gelatinase의 최적 및 안정 pH는 8로 조사됨. Gelatinase의 최적 온도는 40°C 및 안정 온도는 40°C로 조사됨.

-●-; pH 및 온도 안정성 조사 (residual activity), -○-; 최적 pH 및 온도 조사 (relative activity)

표 5에서 보는바와 같이 정제된 효소의 다양한 기질 사용 여부 조사(relative activity) 결과 skimmed milk를 가장 잘 이용하였고, 다음으로 collagen을 잘 이용하였다. Denatured casein은 기질로서 이용하지 못하였다.

표 5. 정제된 gelatinase 효소의 다양한 기질 사용 조사.

Substrate	Relative activity (%)
Denatured casein	0
Skimmed milk	100
Gelatin	78
Collagen	99
Bovine serum albumin (BSA)	77

정제된 효소의 ion에 대한 특성을 조사하기 위해 5 mM의 MnCl₂, ZnCl₂ 및 10mM의 CaCl₂, CoCl₂, MgCl₂, FeCl₃, EDTA 및 1,10-phenanthroline를 처리한 후 조사결과 Mn²⁺ 존재하에서는 140%정도 효소 활성을 증가를 보였고, EDTA는 84%, 1,10-phenanthroline는 71% 효소 활성을 억제시킨 것으로 조사됐다. (표 6). 전기영동(gelatinase zymography)을 통한 정제된 효소 활성 조사는 그림 23과 같이 효소가 농축 될수록 적은 양에서도 효소 활성이 강하게 나타났다.

표 6. 정제된 gelatinase 효소의 ion영향 조사.

Meterial	Relative activity (%)	Meterial	Relative activity (%)
None	100	CoCl ₂	82
CaCl ₂	62	FeCl ₃	25
MgCl ₂	48	EDTA	16
MnCl ₂	240	Phen	29
ZnCl ₂	58		

*Phen : 1,10-phenanthroline, EDTA : ethylenediamine tetraacetic acid.

Gelatinase Zymography

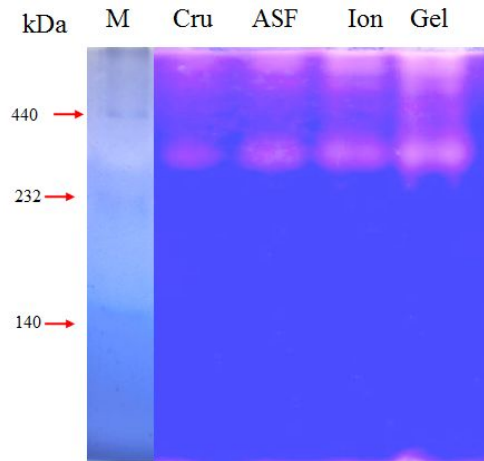


그림 23. 전기영동(gelatin zymography)을 통한 정제된 chitinase 효소 활성 조사.

M: 표준마커, Cru: 배양상등액, ASF: ammonium sulfate 침전 효소,
 Ion: DEAE-sepharose 정제 효소, Gel: sephadex G-100 정제 효소.

- 정제된 효소의 유충 치사에 미치는 영향 조사결과, 처리된 효소에 의해 유충이 1일째 10%, 5일째 75% 정도의 치사율을 보였다 (표 7).

표 7. 정제된 효소의 유충 치사에 미치는 영향 조사.

Extracts	효소		유충 치사율(%)		
	$\mu\text{g/ml}$	Units/ml	1 day	3 days	5 days
정제 효소 처리	718 $\mu\text{g/ml}$	34	10	40	75
물 처리	-	-	0	5	10

● 젤라틴분해효소(Gelatinase) 정제율 표.

L. capsici YS1215를 4일간 배양한 후 원심분리 하여 상등액을 80% ammonium sulfate로 효소를 침전시켰다. 침전물을 투석하여 ammonium sulfate를 제거 한 후 DEAE-sepharose 컬럼 크로마토그래피를 통해 1 차 정제하였고, 1차 정제된 효소를 Sephadex G-100 컬럼 크로마토그래피를 통해 2차 정제 하였다. 표8에서 보는바와 같이 효소 고유활동도(specific activity)는 27.2 Unit/mg이었고, 정제배율(Purification folds)는 2.2, 회수율(recovery)은 0.1%로 나타났다 (표 8).

표 8. *L. capsici* YS1215 배양액으로부터 분리한 gelatinase 정제율.

Purification step	Total Volume (ml)	Total Protein (mg)	Total activity (Units)	Specific activity (U/mg)	Purification (folds)	Recovery (%)
crude enzyme (supernatant)	8000	239	56000	234.3	1.00	100
80% Ammonium sulfate precipitation	20	26.5	312	11.8	0.1	0.6
DEAE-Sepharose Fast flow	10	20.7	250	12.1	1.0	0.4
Sephadex G-100	2	2.5	68	27.2	2.2	0.1

그림 24는 DEAE-sepharose 및 sephadex-G100 컬럼을 통하여 정제한 gelatinase (gelatinolytic proteins)를 선충 유충에 처리하여 3일 후에 전자현미경 (Scanning electron micrograph; SEM) 관찰 하였다. 그 결과 물 처리구인 7A 및 7C의 유충 표피는 파괴 되거나 손상 되지 않았음이 관찰 되었지만, gelatinase 처리구인 7B 및 7D의 선충 유충 표피는 파괴 되거나 심한 손상을 입었다. 이러한 결과를 볼 때 정제된 gealtinase가 선충 유충 표피를 파괴 하거나 손상을 주는 하나의 요인인 것으로 확인되었다.

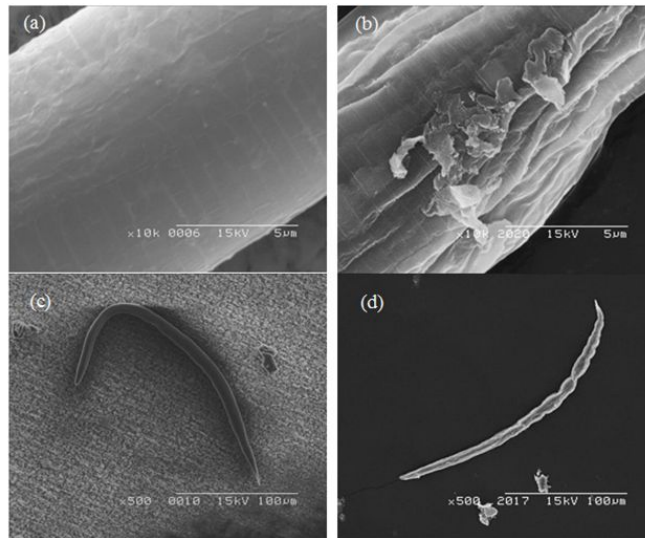


그림 24. 1차년도 gelatinase 정제 결과에따른 선충 분해 실험.

Gelatinase 처리구인 그림 7B 및 7D의 선충 유충 표피는 파괴 되거나 심한 손상이 확인됨.

a와 c: 물처리구, b와 d: gelatinase (gelatinolytic protein) 처리구. Scanning electron micrographs (SEM) of cuticle morphology of *Meloidogyne incognita* juveniles inoculated with gelatinolytic proteins from *Lysobacter capsici* YS1215 for 3 days. (a) and (c) control-native juvenile cuticle (no gelatinolytic protein treatment), (b) and (d) juvenile cuticle (gelatinolytic protein treatment). The cuticle of the nematode in the control was intact and smooth after 3 days. The nematode cuticle was degraded and their bodies destroyed after 3 days in the gelatinolytic protein treatment.

4. 항선충 미생물이 생산하는 살선충 활성물질의 분리 및 활성 연구

가. 살선충 활성물질의 추출 및 정제

1차년도에 살선충 활성물질을 분리하기 위해 항선충 미생물(*Lysobacter capsici* YS1215)을 최적 배지에서 30°C에서 5일간 배양한 후, 원심분리(6,000 rpm, 15 min)하여 균체와 배양여액으로 분리하였고, 배양 여액을 에틸아세테이트(ethylacetate)로 추출하여 항균 활성 조사 및 선충 알 부화율 및 유충 치사율 조사를 거쳐 활성이 있는 분획을 모아 Silica gel column chromatography, ODS column chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography를 거쳐 정제를 하였다. 정제 후 항균활성 및 알 부화억제 및 유충치사에 대하여 활성이 있는 분획은 HPLC (LC-10AVP, SHIMADZU corporation, Japan)에 의해 단일 물질로 정제되고 구조분석을 위해 H-NMR, C-NMR등을 이용하여 분석을 1차년도에 이어 2차년도까지 계속 실시하였다.

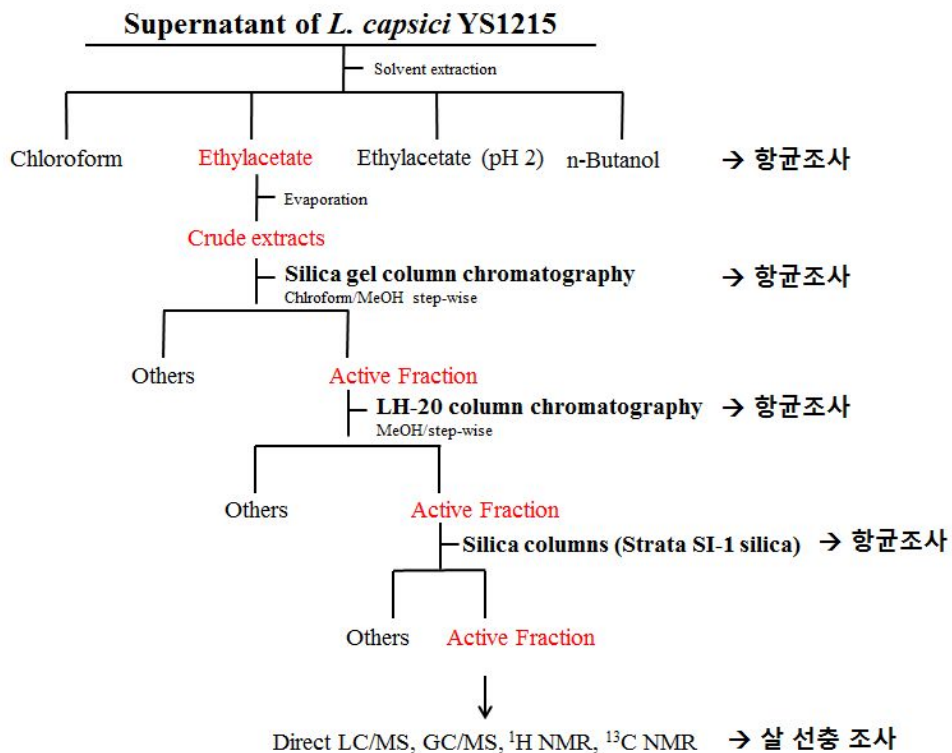


그림 25. 살선충 활성 물질 정제과정의 모식도.

살 선충 물질을 분리하기 위해 항선충 미생물(*L. capsici* YS1215)을 최적 배지에서 30°C에서 5일간 배양한 후, 원심분리(6,000 rpm, 15 min)하여 균체와 배양여액에 에틸아세테이트(ethylacetate) 살 선충 물질을 추출하였다. Ethylacetate 추출물을 이용해 살 선충 물질 정제를 계속하였다. 실리카겔 컬럼크로마토그래피(silica gel column chromatography)를 통해 ethylacetate 추출물을 1차 정제 하였다. 살 선충물질 용출은 CHCl₃-MeOH (100:0, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80, 0:100, v/v) 비율을 이용하였다. 각 분획의 살 선충 활성 물질 분리를 위한 활성 조사는 식물병원성 곰팡이(*Rhizoctonia solani*)를 이용하였다. 왜냐하면, *Rhizoctonia solani*의 성장속도가 빨라 빠른 결과를 얻을 수 있고, 대부분의 항균 물질이 항선충 활성도

동시에 나타내기 때문이다. 30% 클로로포름(chloroform) 분획에서 항균활성을 보여 Sephadex LH-20 column chromatography (1.5×30cm, 25-100mesh; Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)를 이용하여 계속 정제를 실시하였다. Sephadex LH-20 column chromatography 실시 후 항균활성이 있는 분획을 모아 500mg silica column (StrataSI-1 silica, 55µm, Phenomenex, Torrance, CA)을 이용하여 CHCl₃-MeOH (100:0, 80:20, 60:40, 40:60, 0:100, v/v) 용출 조건으로 정제하였다. 500mg silica column 정제 후 항균활성이 있는 분획을 HPLC system 으로 정제도를 확인하고, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, direct GC-MS 및 LC-MS 등을 이용하여 동정을 실시하였다.

실리카겔 컬럼크로마토그래피(silica gel column chromatography)를 통해 B, D 및 E 분획의 항균활성 분획을 얻었다 (그림 26, 27).

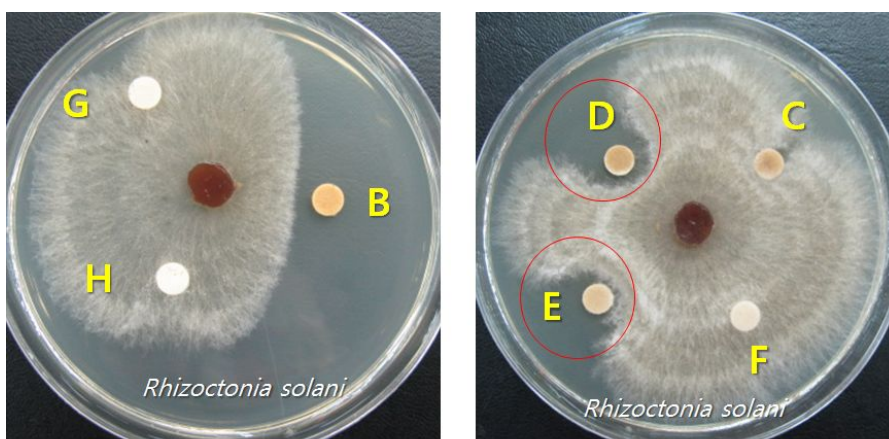
Fraction	Chloroform (ml)	Methanol (ml)
A	100	0
B	90	10
C	80	20
D	70	30
E	60	40
F	50	50
G	40	60
H	0	100



Silica gel fraction → 항균조사 → B(약), D(강), E(강)

그림 26. 실리카겔 컬럼크로마토그래피(silica gel column chromatography).

B, D 및 E 분획에서 *Rhizoctonia solani*에 대하여 항균활성을 보임.



각각의 분획별로 0.1% 농도 50µL를 처리 후 항균활성 조사

그림 27. 실리카겔 컬럼크로마토그래피(silica gel column chromatography) 후 항균활성 조사. B, D 및 E 분획에서 항균활성을 보임.

Sephadex LH-20 컬럼크로마토그래피(Sephadex LH-20 column chromatography)를 통해 B 및 C 분획의 항균활성 분획을 얻었다 (그림 28).

Sephadex LH-20 column chromatography

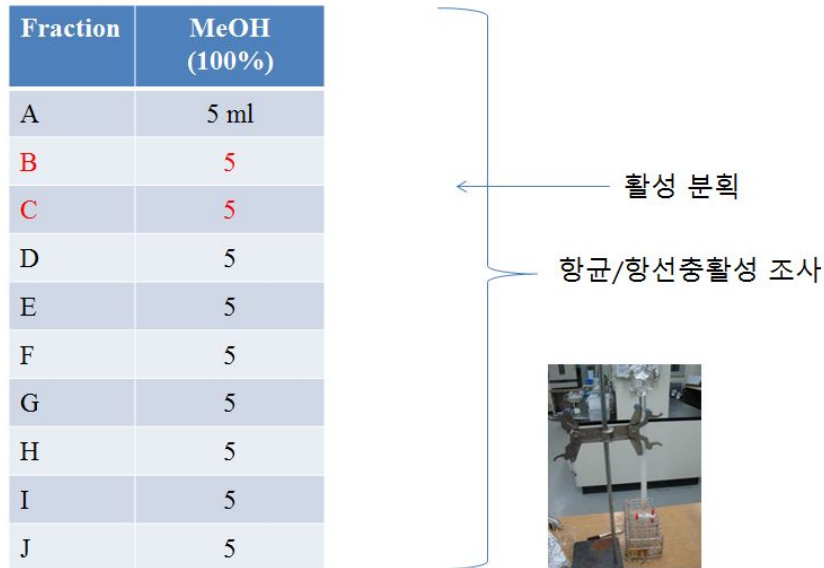
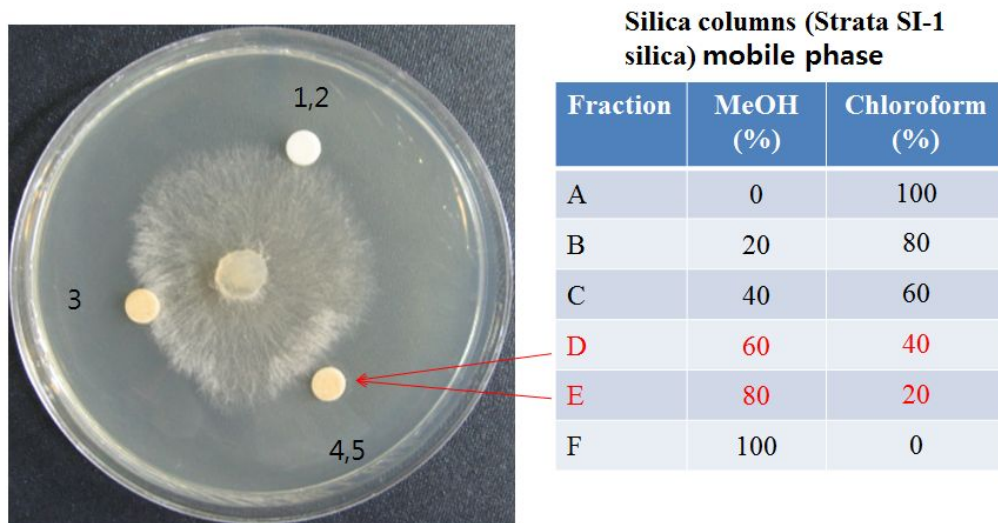


그림 28. Sephadex LH-20 컬럼크로마토그래피 (Sephadex LH-20 column chromatography). B 및 C 분획에서 항균활성을 보임.

Sephadex LH-20 컬럼크로마토그래피 후 항균 활성이 있는 분획을 Silica (Strata SI-1 silica) 컬럼크로마토그래피(Silica column chromatography)로 정제하여 D 및 E 분획의 항균활성 분획을 얻었고, 두 분획의 물질이 같은 것으로 판단하여 합친 다음 HPLC분석을 실시하였다 (그림 29).



각각의 분획별로 0.0001% (0.1 mg) 농도 20 μ L를 처리 후 항균활성 확인

그림 29. Silica (Strata SI-1 silica) 컬럼크로마토그래피(Silica column chromatography). D 및 E 분획에서 항균활성을 보임.

Silica (Strata SI-1 silica) 컬럼크로마토그래피(Silica column chromatography)로 정제하여 얻은 D 및 E 분획의 혼합 물질을 HPLC로 분석한결과 단일 피크를 얻었고 단일 물질로 판단하여 물질 동정을 위해 $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 을 실시하였다 (그림 30-33).

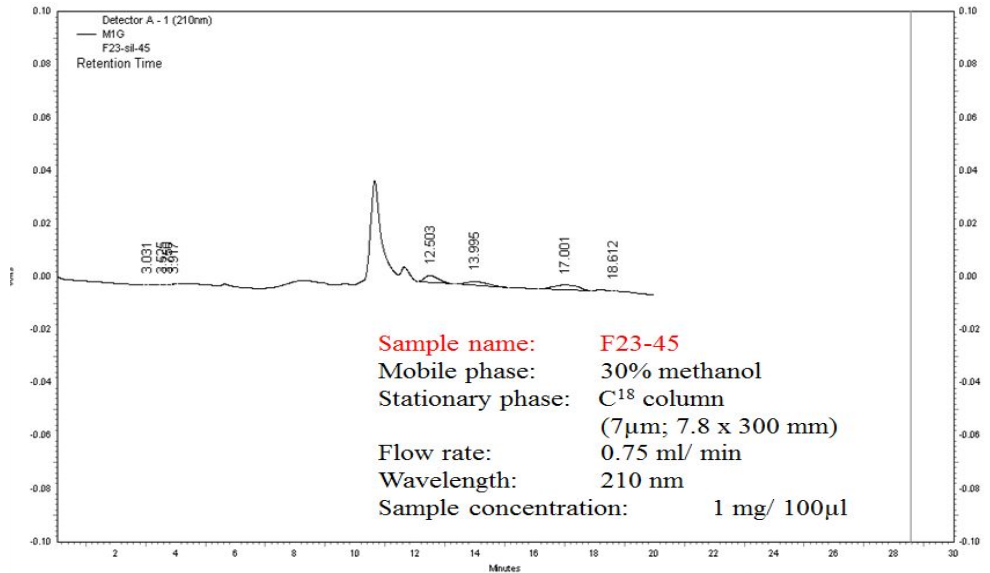
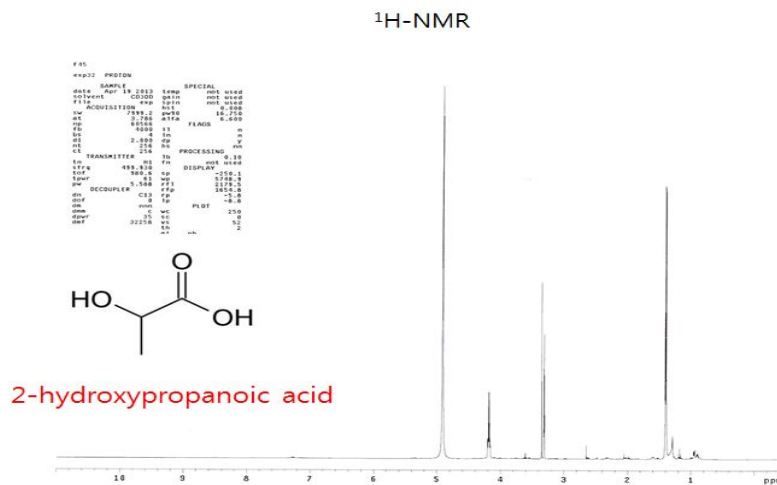


그림 30. LH-20 항균활성 분획의 HPLC 분석.

Sample 정제 과정: Silica column chromatography (MeOH/CHCl₃, 30:70), LH-20 sephadex (MeOH), Strata SI-1 silica column (MeOH/CHCl₃, 60:40).

HPLC 분석결과 단일 물질로 판단된 물질을 $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 을 통해 동정을 실시하였다. $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ 및 GC-MS 분석 결과 2-hydroxypropanoic acid (lactic acid)를 동정 되었다 (그림 31).



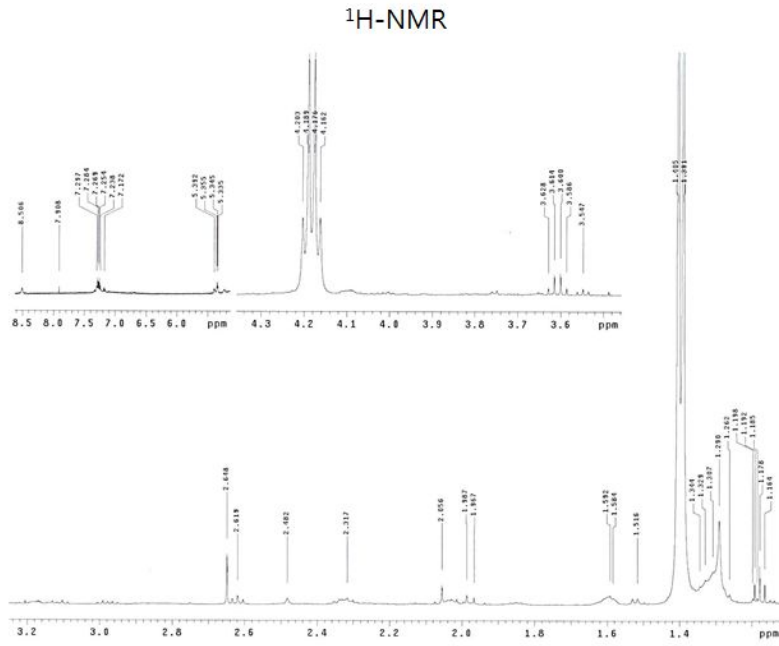


그림 31. 항균활성 물질의 $^1\text{H-NMR}$ 분석 결과.

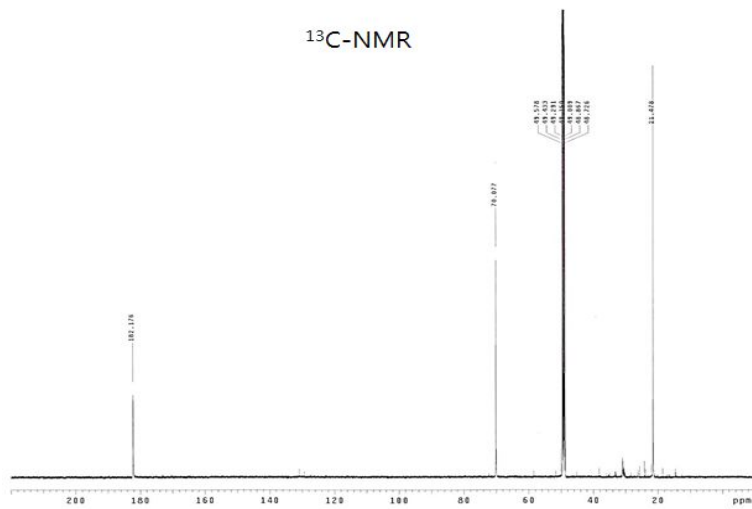
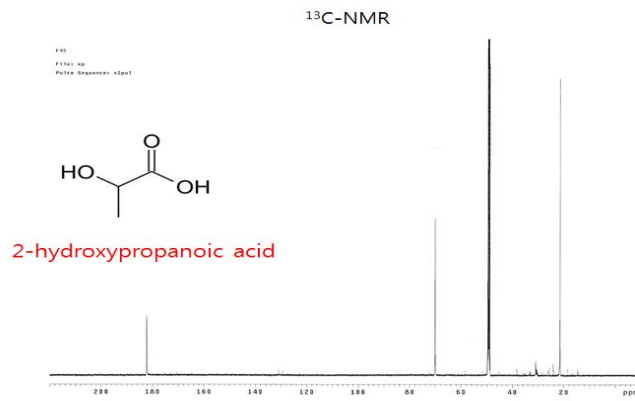


그림 32. 항균활성 물질의 $^{13}\text{C-NMR}$ 분석 결과.

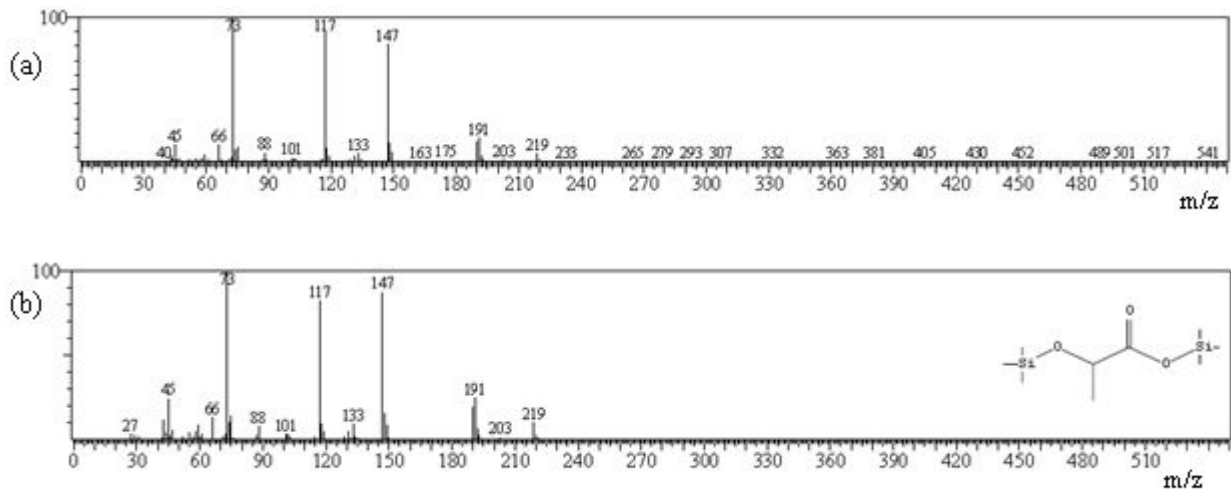


그림 33. 항균활성 물질의 GC-MS 분석 결과.

나. 분리한 살선충 활성물질의 선충 억제 활성 조사

(1) 알 부화 억제율 및 유충 치사율

2-hydroxypropanoic acid (lactic acid)의 항선충 활성을 조사하기 위해 250, 500, 750, 1000, 1250 mM 농도로 선충 알 및 유충에 처리하였다. 처리 결과 조사 5일째 250 mM에서 36.4%의 알 부화율로, 물 처리구 44.5% 보다 8.1%의 알 부화율이 낮게 조사되었다. 또한 유충 치사율에서는 조사 3일째 물 처리구 6.5% 보다 250 mM에서 10.1%로 3.5% 높게 조사되었다. 2-hydroxypropanoic acid (lactic acid)의 알 부화율 및 유충 치사율에서 2-hydroxypropanoic acid의 농도가 높을수록 알 부화율은 억제 되었고, 유충 치사율은 높게 나타났다 (그림 34, 35).

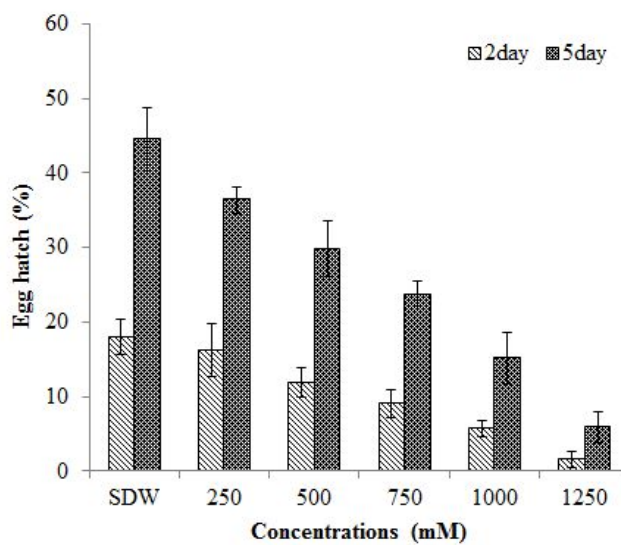


그림 34. 2-hydroxypropanoic acid (Lactic acid) 농도에 따른 선충 알 부화율. 2-hydroxypropanoic acid 농도가 높을수록 알부화율이 감소함.

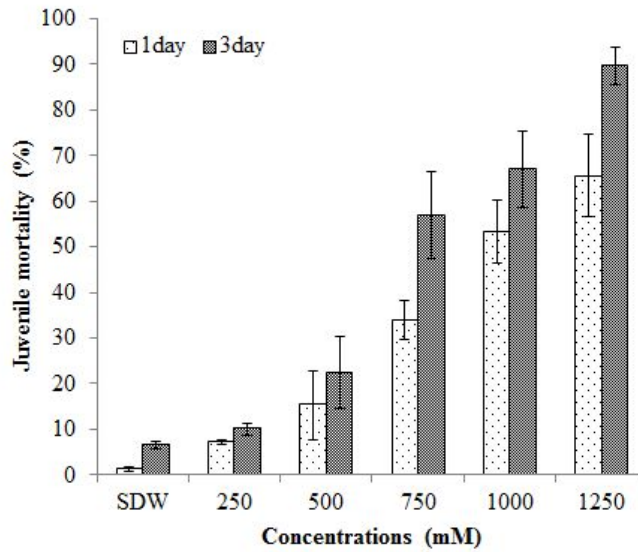


그림 35. 2-hydroxypropanoic acid (Lactic acid) 농도에 따른 선충 유충 치사율. 2-hydroxypropanoic acid 농도가 높을수록 유충 치사율이 증가함.

5. 미생물제제 유통기한 실험

가. 첨가제 종류에 따른 유통기한 영향

▶ 대상 기간 : 2012년 6월 13일 - 2014년 5월 13일



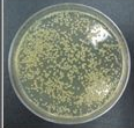





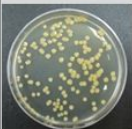

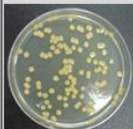
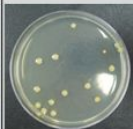
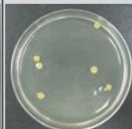
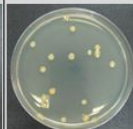
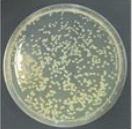






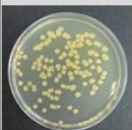
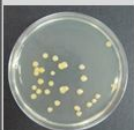
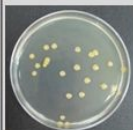


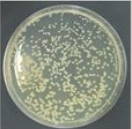
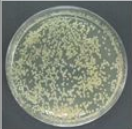




▶ 각 조건별로 150ml 제조한 배지에 *Lysobacter capsici* YS1215를 접종 후 5일간 배양하여 8ml씩 분주, 0~12~24개월까지 매월 시료를 채취하고 Tryptic soy agar(TSA)배지에 도말하여 균수 측정.

표 9. 유통기한 영향 실험을 위해 조건 및 배지 조성

배지종류	표준	표준 1/2	표준 1/5	표준 1/10	TSB1/2	TSB 1/5	TSB 1/10
게겍질	0.8kg/ton	0.4kg/ton	0.16kg/ton	0.08kg/ton	1.5kg/ton	0.6kg/ton	0.3kg/ton
젤라틴	0.2kg/ton	0.1kg/ton	0.04kg/ton	0.02kg/ton			
복합비료	3kg/ton	1.5kg/ton	0.6kg/ton	0.3kg/ton			
설탕	3kg/ton	1.5kg/ton	0.6kg/ton	0.3kg/ton			
액비	4L/ton	2 L/ton	0.8 L/ton	0.4 L/ton			
FeCl ₃ · 6H ₂ O	13.5 g/ton	13.5 g/ton	13.5 g/ton	13.5 g/ton			
Yeast extract	15 g/ton	7.5 g/ton	3 g/ton	1.5 g/ton			

- 미생물(*L. capsici* YS1215) 유통 기한 실험을 위해 보관 1개월 후에 1차 시료채취 하

여 조사한 결과 표준 배지 조성의 미생물 개체 수가 가장 높았고, 2차 및 3차 조사결과 표준 1/2 조성이 가장 좋았음. 하지만 TSB 1/2 조성에는 3차부터 6차까지 조사 결과 미생물이 검출 되지 않았다. 또한 4차, 5차 및 6차 실험결과 표준 배지 조성에서 미생물 개체 수가 가장 많이 검출되었음. 표준 배지 조성(계꺾질 분말사용)이 TSB 조성보다 유통기한을 길게 하는데 좋은 배지 성분임을 알 수 있다 (그림 36).

배지조성	표준	표준 1/2	표준 1/5	표준 1/10	TSB 1/2	TSB 1/5	TSB 1/10
1차							
	2.9×10^{16}	2.5×10^{16}	2.4×10^{16}	6.1×10^{14}	4.6×10^{15}	9.1×10^{12}	2.6×10^{12}
2차							
	2.2×10^{13}	2.4×10^{13}	1.6×10^{12}	1.5×10^{12}	4.3×10^{10}	7.0×10^8	1.3×10^8
3차							
	9.8×10^{12}	1.1×10^{13}	6.1×10^{12}	2.8×10^{12}		1.4×10^7	6.9×10^6
4차							
	4.0×10^{10}	1.1×10^{10}	4.7×10^9	2.8×10^8		2.8×10^7	6.3×10^6
5차							
	1.6×10^{10}	5.5×10^9	9.0×10^8	5.8×10^8		3.1×10^6	2.6×10^6

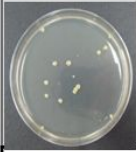
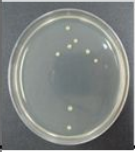
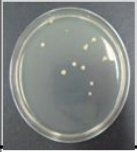
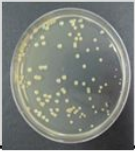
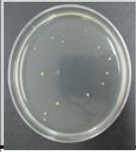

6차							
	9.6×10^9	1.4×10^9	1.0×10^8	1.3×10^8		7×10^5	4.8×10^5

그림 36. 유통기한 영향 실험 결과

나. 시간경과에 따른 유통기한 영향

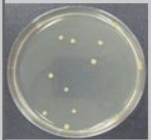
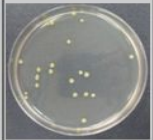
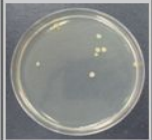
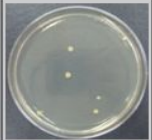

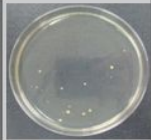
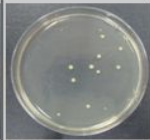
표 10. 유통기한 영향 실험을 위해 조건 및 배지 조성

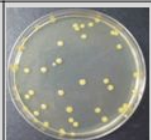


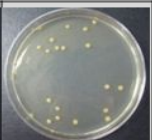
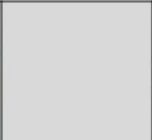
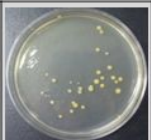
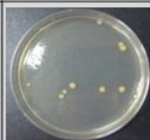
배지종류	표준	표준 1/2	표준 1/5	표준 1/10	TSB1/2	TSB 1/5	TSB 1/10
계꺽질	0.8kg/ton	0.4kg/ton	0.16kg/ton	0.08kg/ton	1.5kg/ton	0.6kg/ton	0.3kg/ton
젤라틴	0.2kg/ton	0.1kg/ton	0.04kg/ton	0.02kg/ton			
복합비료	3kg/ton	1.5kg/ton	0.6kg/ton	0.3kg/ton			
설탕	3kg/ton	1.5kg/ton	0.6kg/ton	0.3kg/ton			
미생물보조영양원	4L/ton	2 L/ton	0.8 L/ton	0.4 L/ton			
FeCl ₃ · 6H ₂ O	13.5 g/ton	13.5 g/ton	13.5 g/ton	13.5 g/ton			
Yeast extract	15 g/ton	7.5 g/ton	3 g/ton	1.5 g/ton			

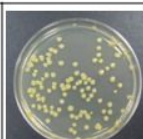
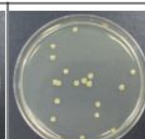
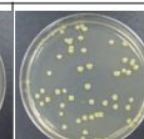
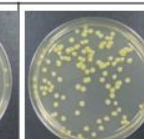
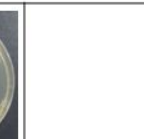

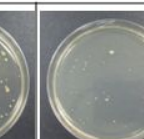
유통단계 중 본 미생물제제의 유효균주 밀도 유지 최적화 방안을 모색하고자 표 10의 조성 과 같이 배지를 조성하여 기간별 제품 중의 미생물의 밀도를 조사하였다. 아래 표 11과 그림 37의 결과와 같이 모든 처리의 미생물 처리는 시간이 지남에 따라 점차적으로 감소하는 추이를 나타냈다. 대부분 미생물제제의 유통기한이 6개월임을 감안하면 전량 키틴배지 및 키틴을 1/2, 1/5, 1/10수준으로 줄인 배지를 사용 하는 것이 제품의 품질 유지에 가장 적당한 것으로 사료되며 생산원가를 등의 여러 가지 요소를 고려했을 시 키틴1/2배지를 사용하여 산업화생산에 활용하는 것이 제일 적합하다고 판단된다.

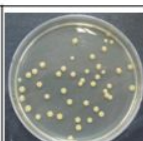
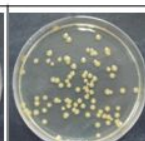
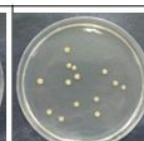
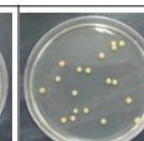


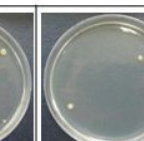
표 11. 시간 경과에 미생물 개체수 변화

		키티	키티1/2	키티1/5	키티1/10	TSB 1/2	TSB 1/5	TSB 1/10
	개월	LOG10 CFU/ml						
1차년도	1	14.46	16.40	16.38	14.79	15.66	12.96	12.41
	2	13.34	13.38	12.20	12.18	10.63	8.85	8.11
	3	12.99	13.04	12.79	12.45		7.15	6.84
	4	10.60	10.04	9.67	8.45		7.45	6.80
	5	10.20	9.74	8.95	8.76		6.49	6.41
	6	9.98	9.15	8.00	8.11		5.85	5.68
2차년도	7	8.52	7.48	6.70	6.63		4.97	4.82
	8	7.95	7.41	7.15	6.45		5.49	5.20
	9	7.98	7.15	6.91	6.86		5.82	5.65
	10	6.73	6.65	6.28	6.08		5.49	5.11
	11	6.41	5.90	6.32	6.18		5.20	5.08
	12	5.90	5.99	5.65	5.57		5.00	4.80

배지조성	키티	키티 1/2	키티 1/5	키티 1/10	TSB 1/2	TSB 1/5	TSB 1/10
7차							
	3.3×10^8	3.0×10^7	5.0×10^6	4.3×10^6	X	9.3×10^4	6.6×10^4

8차							
	9.0×10^7	2.6×10^7	1.4×10^7	2.8×10^6	X	3.1×10^5	1.6×10^5

9차							
	9.6×10^7	1.4×10^7	8.2×10^6	7.3×10^6	X	6.6×10^5	4.5×10^5

10차							
	5.4×10^6	4.5×10^6	1.9×10^6	1.2×10^6	X	3.1×10^5	1.3×10^5

11차							
	2.6×10^6	8.0×10^5	2.1×10^6	1.5×10^6	X	1.6×10^5	1.2×10^5
12차							
	8.0×10^5	9.8×10^5	4.5×10^5	3.7×10^5	X	9.9×10^4	6.3×10^4

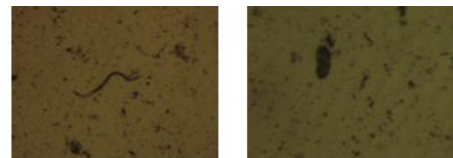
그림 37. 시간 경과에 미생물 개체수 변화

6. 항선충 미생물의 작물 실험

- ▶ 대상 작물 : 토마토
- ▶ 시험 기간 : 2012년 7월 3일 정식, 정식 후 1주 간격으로 처리
- ▶ 샘플링 : 5주, 9주차
- ▶ 처리구 : 무처리, 대조구, 배양액+물(1:1) 처리구, 배양액 처리구, 농약 처리구 (테라노바)
- ▶ 배양액 : Tryptic soy broth(TSB) 배지에 배양한 *Lysobacter capsici* YS1215 4.0×10^{15} CFU/ml



정식 후 시험구 배치



1ml 당 - 선충수 :253
- 선충알 수 : 199

포트당 10ml 씩 접종

가. 항선충 미생물의 작물생육 효과 실험.

항선충 미생물(*L. capsici* YS1215)의 작물 생육 효과 실험결과 지상부 생체중 및 건물중에서 대조구가 가장 높았고, 지상부 길이에서는 반량구 처리구가 대조구보다 높았다 (그림 38).

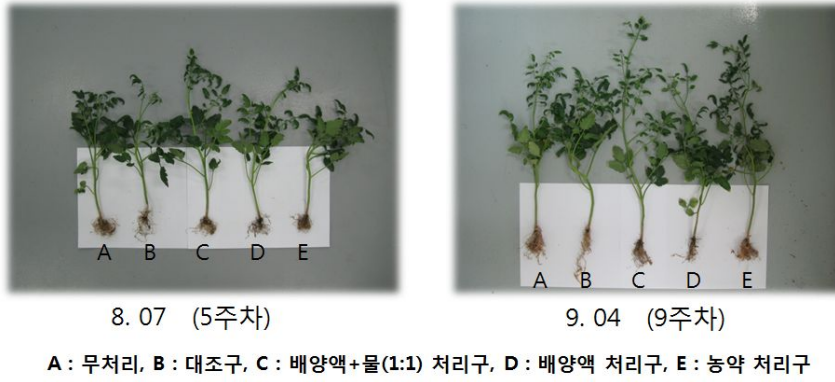


그림 38. 토마토 실험 모습.

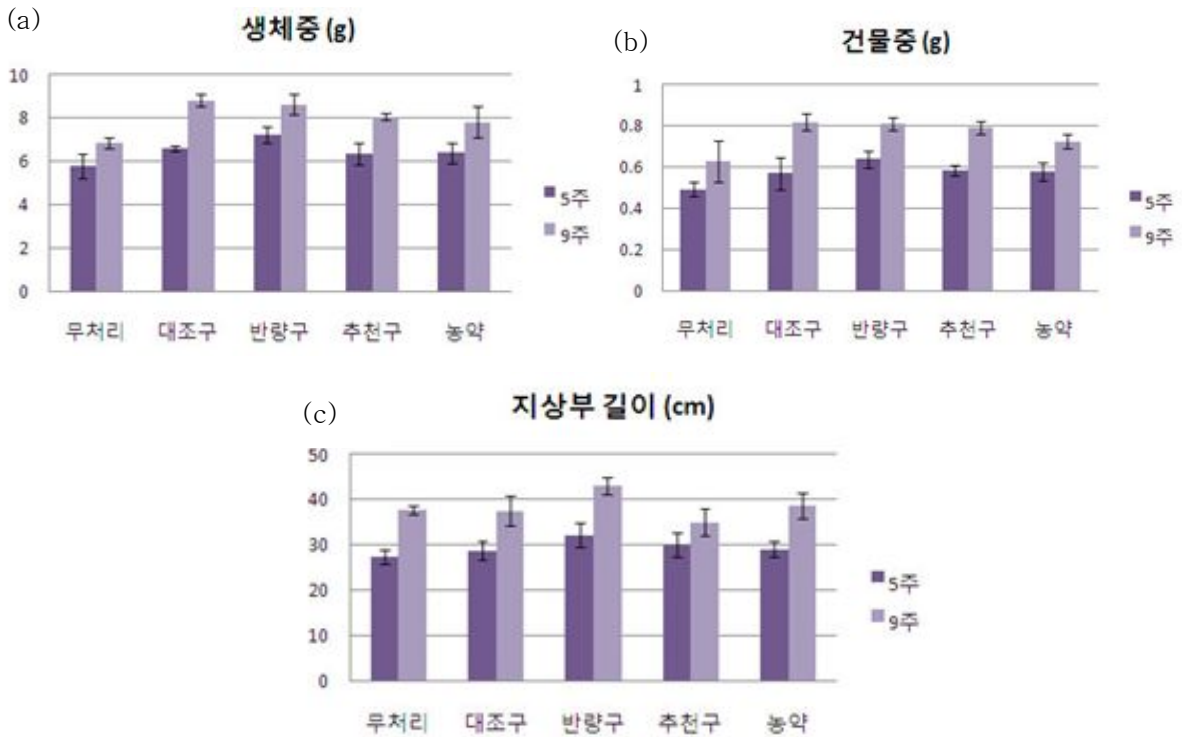


그림 39. 토마토 실험 지상부 생체중, 건물중 및 지상부 길이 조사.

무처리: 물 처리, 대조구: 배지만 처리, 반량구: 추천구의 반량 처리, 추천구: 원액 처리, 농약: 테라노바.

나. 향선충 미생물의 선충억제 효과

향선충 미생물(*L. capsici* YS1215)의 선충 억제 효과 실험결과 뿌리혹 수 및 뿌리혹난방 수에서 무처리가 가장 높았고 다음으로 대조구, 반량구, 추천구, 농약 순으로 나타났음. 이는 선충 피해가 심할수록 뿌리혹 수 및 난방 수가 많음을 의미한다. 또한 토양선충 수에서도 뿌리혹수와 뿌리난방수 결과와 같이 나타났다 (그림 40).

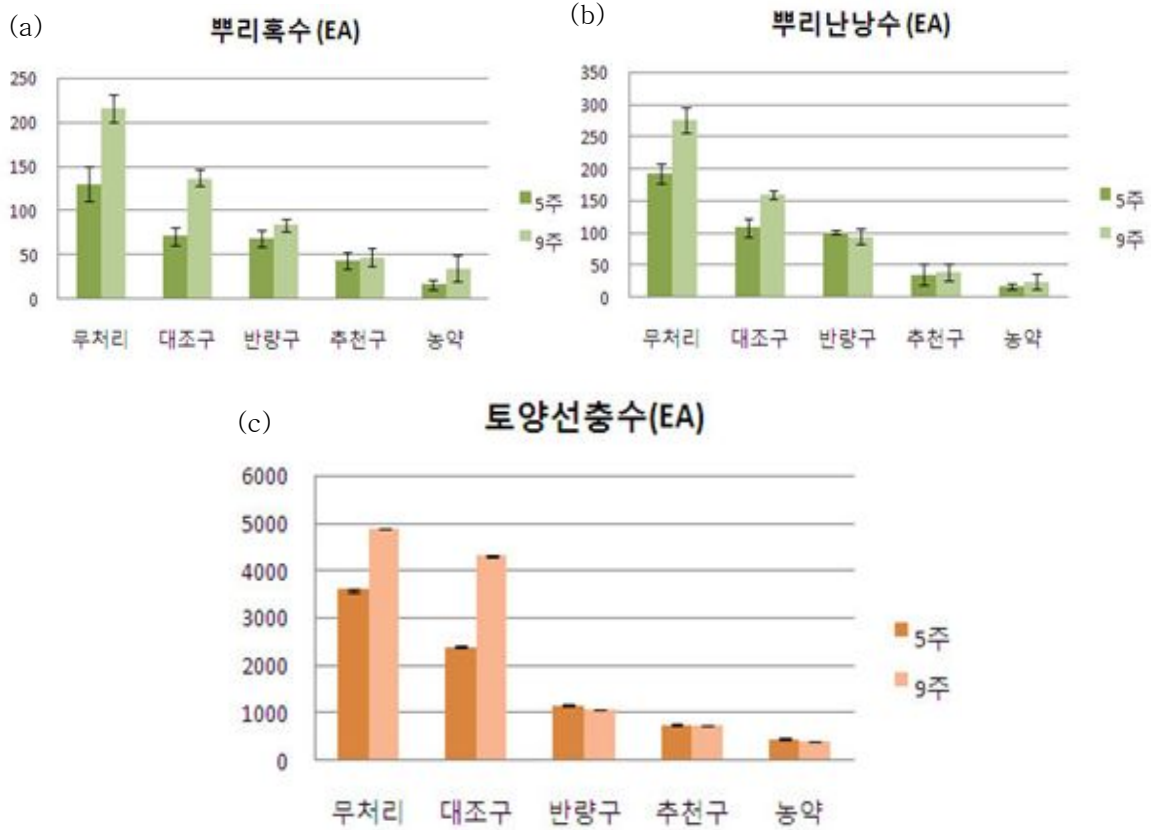


그림 40. 뿌리혹 수, 뿌리난랑 수 및 토양선충 수 조사.

선충 피해 조사 결과 무처리구 및 대조구에 비해 미생물처리구(반량구, 추천구)에 선충 피해가 적게 일어난다.

다. 토양내 키틴분해 미생물 밀도 조사

항선충 미생물(*L. capsici* YS1215)의 선충 억제 효과 실험에서 토양내의 키틴분해 미생물 수는 9주차에 대조구가 가장 높았고, 추천구, 반량구, 무처리구, 농약 처리구 순서로 나타났다. 젤라틴분해 미생물 수는 9주차에 반량구가 가장 높게 나타났고, 추천구, 대조구, 농약구, 무처리구 순서로 나타났다 (그림 41).

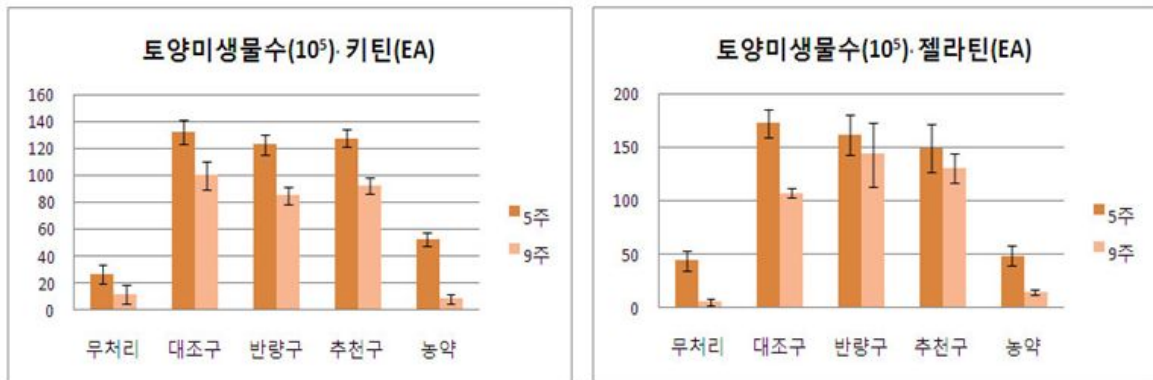
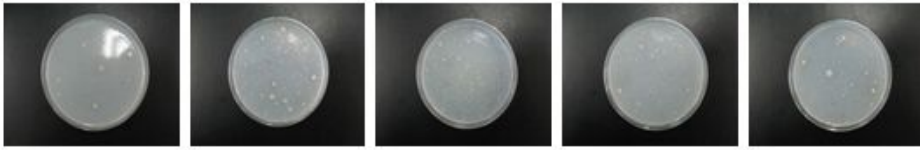


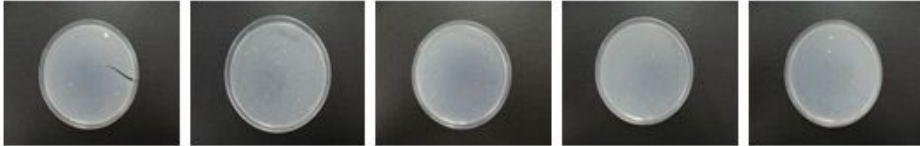
그림 41. 토양내 키틴분해 미생물 및 젤라틴분해 미생물 수 조사.

- 토양 미생물 (키틴)

5주



9주



- 토양 미생물 (젤라틴)

5주



9주



그림 42. 토양내 키틴분해 미생물 및 젤라틴분해 미생물 수 조사 모습.

제 2 절 항선충 미생물제제 대량배양배지 및 미생물보조영양원 연구

1. 항선충 미생물 배양 최적조건 확립

가. 키틴과 젤라틴 비율에 따른 활성 검증

(1) 미생물 개체 수 측정

- 젤라틴/키틴 분말 비율에 따른 미생물(*L. capsici* YS1215) 특성을 조사하기 위해 표 12와 같은 조성을 만든 다음 미생물 생균수와 알 부화율 및 유충 치사율을 조사했다. 조사결과 미생물 개체 수에서는 젤라틴분말 1.0g과 키틴분말 2.0g에서 가장 높게 나타났다 (그림 43).

표 12. 젤라틴 및 키틴 비율

번호	젤라틴분말(g)	키틴분말(g)
1	2.5	0.5
2	2.0	1.0
3	1.5	1.5
4	1.0	2.0
5	0.5	2.5

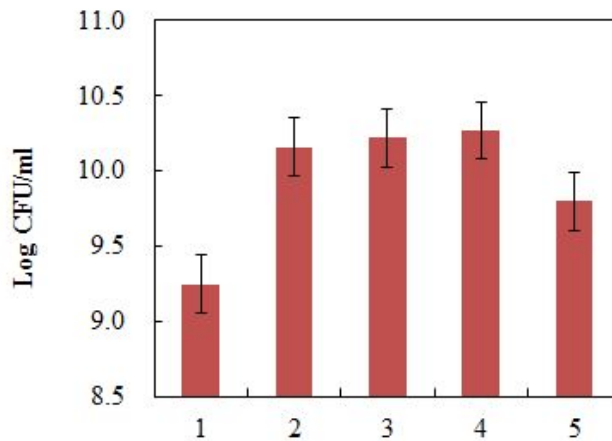


그림 43. 젤라틴/키틴 분말을 다른 비율에 따른 미생물(*L. capsici* YS1215) 개체 수. 미생물 개체 수에서는 젤라틴분말 1.0g과 키틴분말 2.0g에서 가장 높게 나타남. 1~5: 표 1에 나타낸 젤라틴/키틴 비율.

(2) 알 부화 억제율 측정

- 젤라틴/키틴분말 비율에 따른 선충 알 부화율은 조사 5일째 그림 44에서 보는바와 같이 젤라틴/키틴 조합인 2번(젤라틴분말 2.0g과 키틴분말 1.0g)에서 가장 낮게 나타났다.

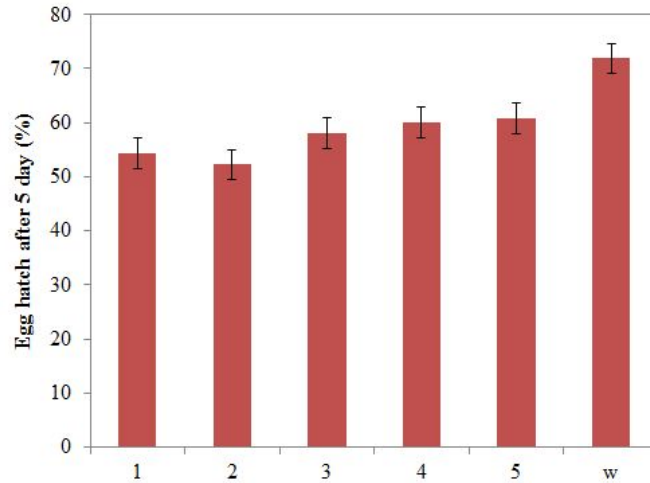


그림 44. 젤라틴/키틴 분말을 다른 비율에 따른 선충 알 부화율.

젤라틴/키틴 조합인 2번(젤라틴분말 2.0g과 키틴분말 1.0g)에서 알 부화율이 가장 낮게 나타남.

1~5: 표 1에 나타낸 젤라틴/키틴 비율. w: 물 처리구.

(3) 유충 치사율 측정

또한 유충 치사율은 조사 1일째 젤라틴/키틴 조합 2번에서 가장 높게 나타났다. 이러한 결과로 비추어 볼 때 비록 미생물 개체 수에서는 젤라틴/키틴 조합인 4번에서 가장 높게 나타났다지만, 알 부화율과 유충 치사율에서 선충에 미치는 영향이 가장 큰 2번 조합으로 선택한 후 다음 실험을 진행하였다 (그림 45).

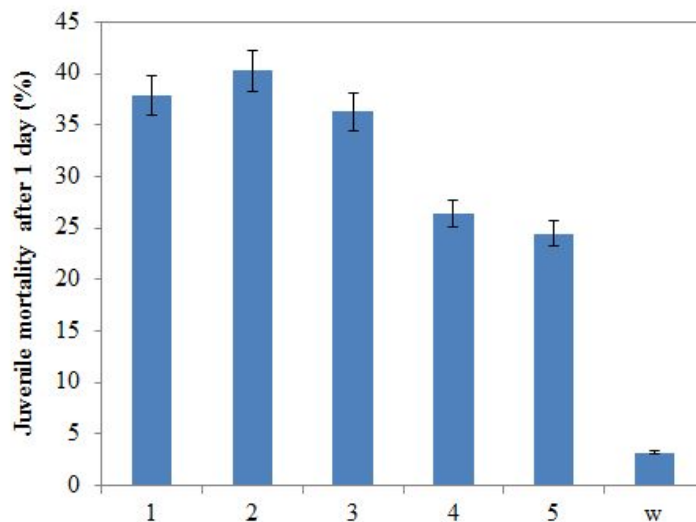


그림 45. 젤라틴/키틴 분말을 다른 비율에 따른 유충 치사율.

젤라틴/키틴 조합인 2번(젤라틴분말 2.0g과 키틴분말 1.0g)에서 유충 치사율이 가장 낮게 나타남.

1~5: 표 1에 나타낸 젤라틴/키틴 비율. w: 물처리구.

나. 생장인자 첨가에 따른 활성 검증

(1) 미생물 개체 수 측정

젤라틴/키틴 최적 조합인 젤라틴 2.0g과 키틴 1.0g 조합배지에 생장인자인 yeast extract와 peptone을 각각 첨가한 후 미생물(*L. capsici* YS1215) 개체 수를 측정한 결과 peptone 첨가 처리구가 yeast extract 처리구보다 높게 나타났다 (그림 46).

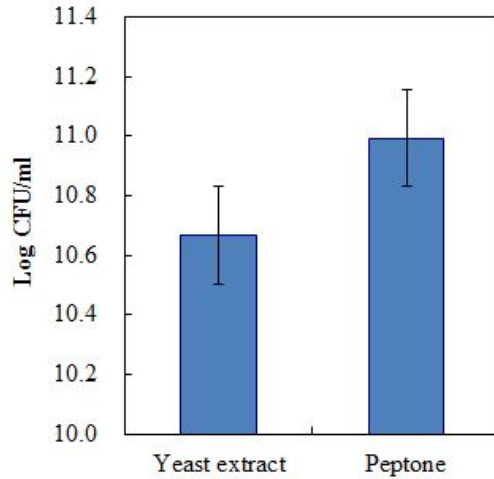


그림 46. 생장인자 첨가에 따른 미생물(*L. capsici* YS1215) 개체 수. 개체 수를 측정한 결과 peptone 첨가 처리구가 yeast extract 처리구보다 높게 나타났다.

(2) 알 부화 억제율 측정

- 생장인자 첨가에 따른 선충 알 부화율은 조사 5일째 그림 47에서 보는바와 같이 yeast extract 배양액 50% 처리구에서 가장 낮게 나타났다.

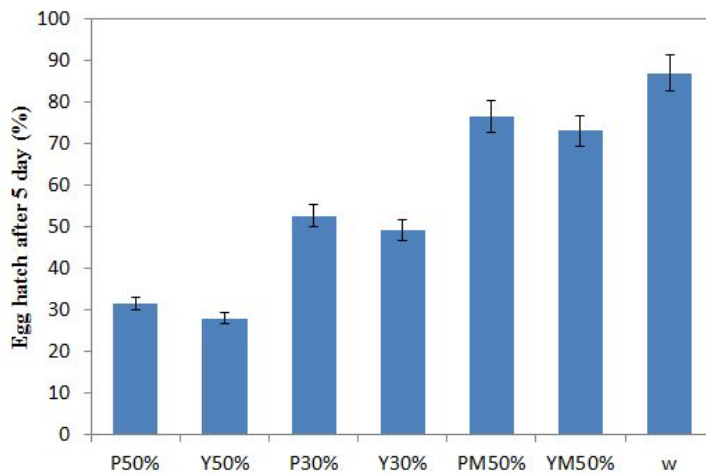


그림 47. 생장인자 첨가에 따른 선충 알 부화율.

선충 알 부화율은 yeast extract 배양액 50% 처리구에서 가장 낮게 나타남.

P50%: Peptone 배양액 50% 처리구. Y50%: Yeast extract 배양액 50% 처리구. w: 물처리구.

(3) 유충 치사율 측정

유충 치사율은 조사 3일째 yeast extract 배양액 50% 처리구에서 가장 높게 나타났다.

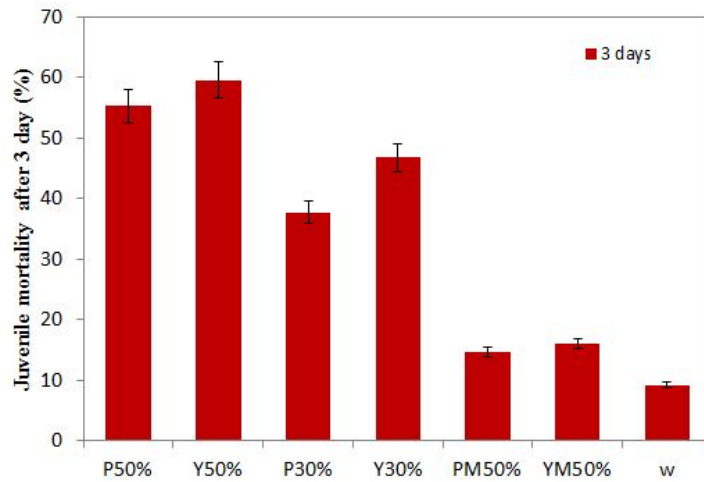


그림 48. 성장인자 첨가에 따른 유충 치사율.

유충 치사율은 yeast extract 배양액 50% 처리구에서 가장 낮게 나타남.

P50%: Peptone 배양액 50% 처리구. Y50%: Yeast extract 배양액 50% 처리구. w: 물처리구.

다. 미량요소 첨가에 따른 활성 검증

(1) 미생물 개체 수 측정

젤라틴/키틴 최적 조합인 젤라틴 2.0g과 키틴 1.0g 조합배지에 성장인자 첨가 실험 후 yeast extract 첨가 시 선충 알 부화율이 peptone 첨가 처리구 보다 낮게 나타났고, 유충 치사율에서는 높게 나타났으므로, yeast extract 첨가 배지를 최적 배지로 선택한 후 다음 실험을 진행하였다. yeast extract 첨가 최적배지에 미량요소(1L 기준 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.03g, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.02g, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02g, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.03g)를 첨가한 후 배지를 만들고 배양한 후 미생물(*L. capsici* YS1215) 개체 수를 측정한 결과 그림 49과 같이 미량요소를 넣지 않은 배지보다 높게 나타났다.

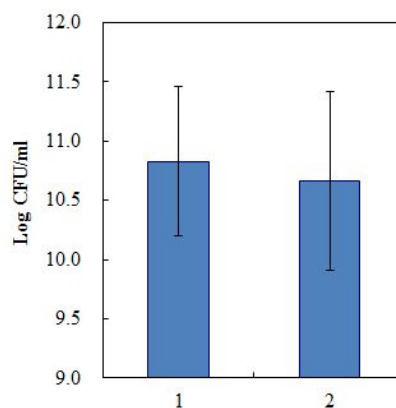


그림 49. 미량요소 첨가에 따른 미생물(*L. capsici* YS1215) 개체 수.

미량요소 첨가 배지가 미량요소를 넣지 않은 배지보다 미생물 개체 수가 높게 나타남.

1: 미량요소 첨가, 2: 미량요소 무 첨가.

(2) 알 부화 억제율 측정

미량요소 첨가에 따른 선충 알 부화율은 그림 50에서 보는바와 같이 yeast extract 배양액 50% 처리구에서 가장 낮게 나타났다.

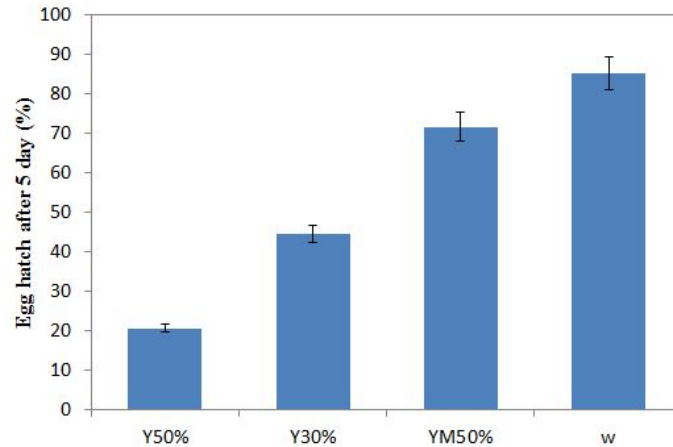


그림 50. 미량요소 첨가에 따른 알 부화율.

Yeast extract 배양액 50% 처리구에서 알 부화율이 가장 낮게 나타남.

Y50%: yeast extract 배양액 50% 처리구. Y30%:

yeast extract 배양액 30% 처리구. YM50%: 배지액 50% 처리구 w: 물처리구.

(3) 유충 치사율 측정

유충 치사율은 yeast extract 배양액 50% 처리구에서 가장 높게 나타났다. 이러한 결과는 앞선 성장인자 첨가 실험 결과에 비추어 볼 때 미량요소를 첨가한 배양액 처리구가 미량요소를 첨가하지 않은 처리구보다 선충 알 부화율은 낮고, 유충 치사율은 더 높게 나타났음을 의미한다 (그림 51).

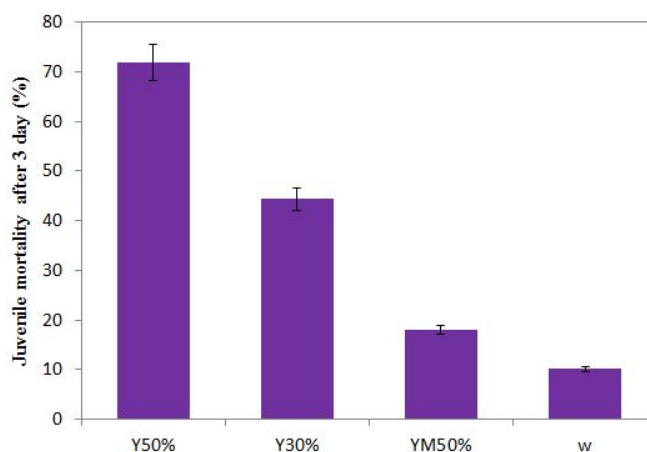


그림 51. 미량요소 첨가에 따른 유충 치사율.

Yeast extract 배양액 50% 처리구에서 유충 치사율이 가장 높게 나타남.

Y50%: yeast extract 배양액 50% 처리구. Y30%:

yeast extract 배양액 30% 처리구. YM50%: 배지액 50% 처리구 w: 물처리구.

라. 최적 배지 확립을 위한 추가 실험

젤라틴/키틴 비율, 성장인자 첨가 및 미량요소 첨가에 따른 미생물(*L. capsici* YS1215) 개체 수, 알 부화율 및 유충 치사율에 미치는 영향을 조사한 결과, 젤라틴 사용량이 많아 산업화 시 경제적 타당성이 맞지 않고, 농가 배양 시 어려움이 예상됐다. 그러므로 젤라틴/키틴 비율 확립 및 성장인자와 미량요소 첨가 최적 배지 확립 실험을 추가로 실시함. 이러한 최적배지 조성확립 실험을 위해 표 13에서와 같은 기본배지조성에 젤라틴/키틴분말, 미량요소, 성장인자등을 첨가하여 실험을 진행하였다. 또한 최적 배지 조성확립을 위한 실험 설계는 JMP (SAS institute Inc, 2012.)프로그램을 이용하여 실험을 설계하였고, 설계된 배지 조성은 표 14과 같았다.

표 13. 기본배지 조성

항목	중량(g/L)
복합비료(21:17:17, N:P:K)	3.0
설탕	3.0
NaOOCCH ₂ CH ₂ CH(NH ₂)COOH·H ₂ O	1.0
CaCO ₃	1.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.3
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.02
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.02
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.03

(1) 미생물 개체 수 측정

표 14. 최적배지 확립을 위한 배지 조성

배지조성	Nutrient Broth(g)	Yeast Extract(g)	키틴분말(g)	젤라틴분말(g)
1	0	0	0.2	0.2
2	0	0	0.8	0.8
3	0	1.0	0.2	0.8
4	0	1.0	0.8	0.2
5	0.5	0.5	0.5	0.5
6	1.0	0	0.2	0.8
7	1.0	0	0.8	0.2
8	1.0	1.0	0.2	0.2
9	1.0	1.0	0.8	0.8

그림 52에서 보는바와 같이 최적배지 확립에 따른 미생물(*L. capsici* YS1215) 생균 수 조사 결과 배지조성 7번(Nutrient broth 1.0g, Yeast extract 1.0g, 키틴분말 0.8g, 젤라틴분말 0.2g) 조합 에서 가장 생육이 좋았고, 배지조성 1번(키틴분말 0.2g, 젤라틴분말 0.2g)에서 가장 낮은 개체 수를 나타냄. 이러한 결과는 미생물이 성장하는데 보조영양원의 영향이 있는 것으로 사료된다.

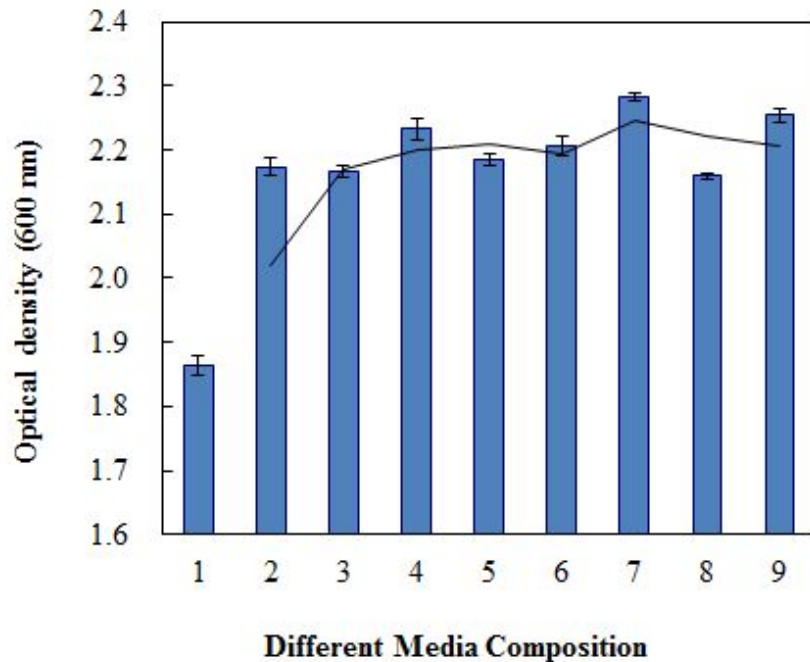


그림 52. 배지 조성에 따른 미생물(*L. capsici* YS1215) 생육 정도 조사.

생균 수 조사 결과 배지조성 7번(Nutrient broth 1.0g, Yeast extract 1.0g, 키틴분말 0.8g, 젤라틴분말 0.2g) 조합 에서 가장 생육이 높았음.

1~9 : 표 2에서 나타내는바와 같음

(2) 알 부화 억제율 측정

배지조성에 따른 선충 알 부화율은 실험 3일째 배지조성 3번에서 가장 낮게 나왔고, 배지 조성 1번이 가장 높게 나타났음. 7일째는 배지조성 6번이 가장 낮게 나타났으며, 배지조성 1번에서 7일째 가장 높게 나타났다 (그림 53).

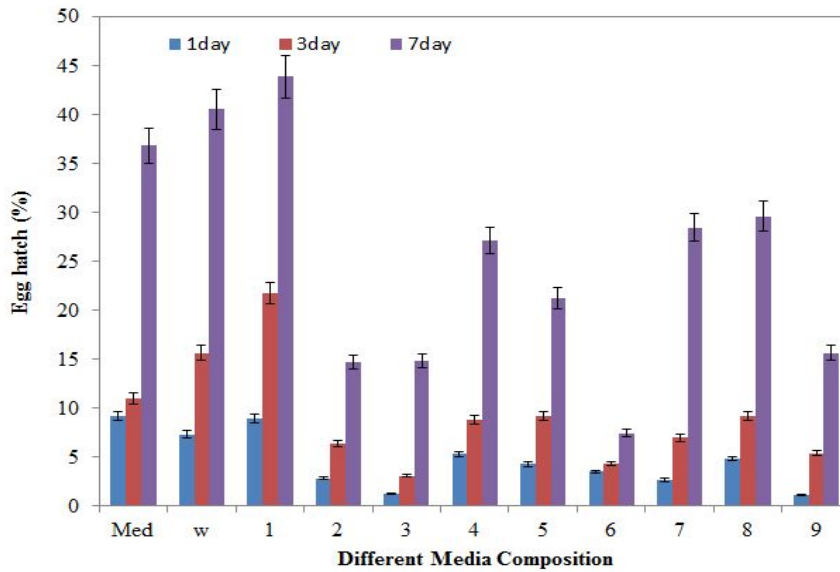


그림 53. 배지 조성에 따른 선충 알 부화율 조사.
 선충 알 부화율이 7일째 배지조성 6번이 가장 낮게 나타났음.
 (Med: 배지만 처리구, w: 물처리구)

(3) 유충 치사율 측정

배지조성에 따른 유충 치사율은 실험 1일째 배지조성 1번에서 가장 낮게 나타났고, 배지 조성 9번에서 가장 높게 나타났음. 2일째 배지조성 9번에서 가장 높은 유충 치사율을 보였음 (그림 54). 앞선 결과인 미생물(*L. capsici* YS1215) 개체 수와 효소 활성에서 배지조성 9번이 최고 결과 값은 아니었지만, 가장 중요한 알 부화율 결과와 유충 치사율의 결과를 비추어 볼 때, 배지조성 9번이 알 부화율이 낮고, 유충 치사율이 가장 높게 나타났으므로 9번을 최적의 배지조성으로 선택하여 다음 실험을 진행하였다.

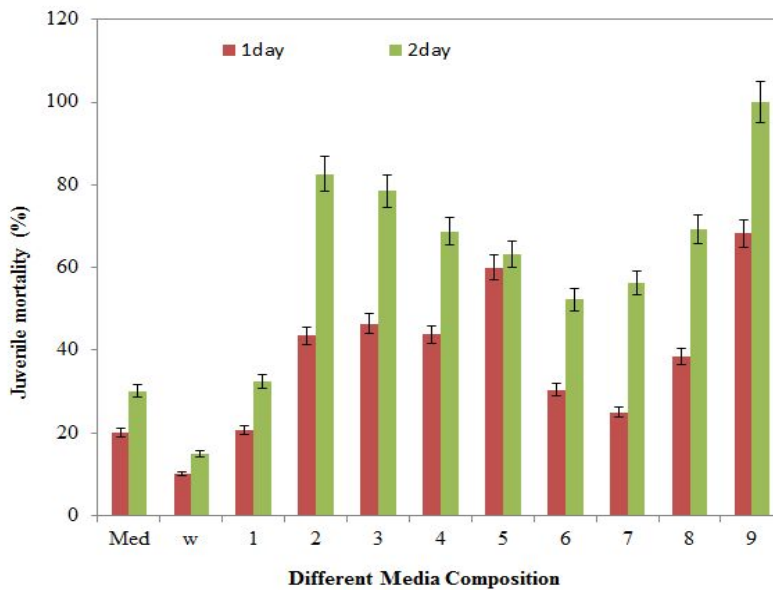


그림 54. 배지 조성에 따른 선충 유충 치사율 조사.
 선충 유충 치사율이 2일째 배지조성 9번이 가장 낮게 나타났음.
 (Med: 배지만 처리구, w: 물처리구)

(4) 효소 활성 측정

배지 조성에 따른 키틴분해효소의 활성은 배지조성 8번에서 가장 높았고, 젤라틴분해효소 활성은 배지조성 7번에서 가장 높게 나타났음, 반면에 키틴분해효소 및 젤라틴분해효소의 최저 활성은 각각 배지조성 1번과 4번에서 나타났다 (그림 55와 56).

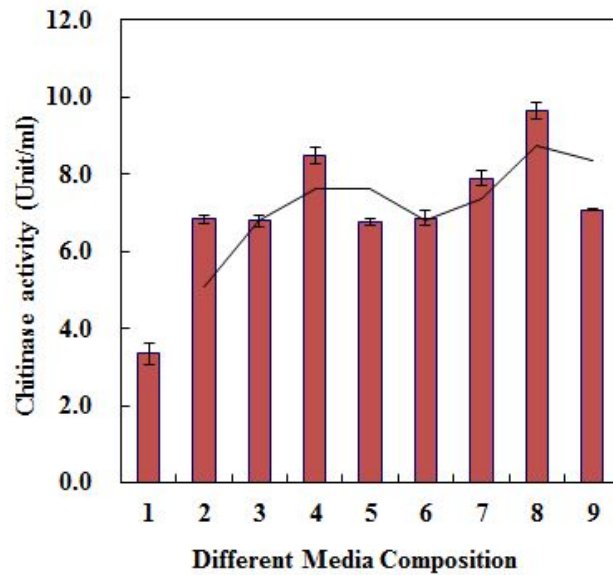


그림 55. 배지 조성에 따른 키틴분해효소 활성 조사.
 키틴분해효소의 활성은 배지조성 8번에서 가장 높았음.
 1~9 : 표 14에서 나타내는바와 같음

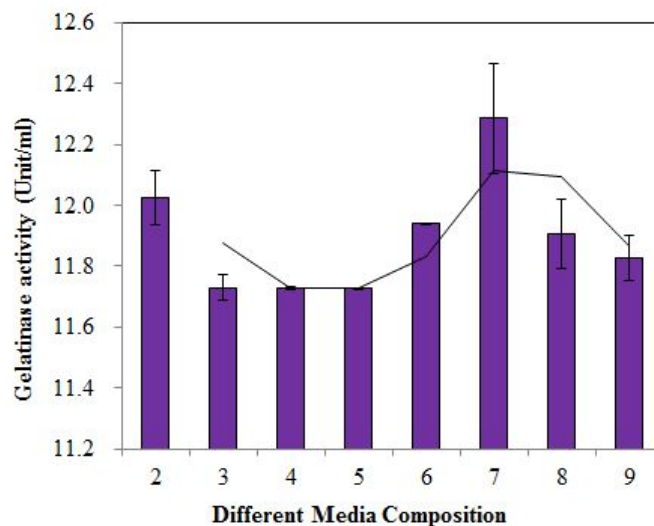


그림 56. 배지 조성에 따른 젤라틴 분해효소 활성 조사.
 젤라틴분해효소 활성은 배지조성 7번에서 가장 높게 나타남.
 1~9 : 표 14에서 나타내는바와 같음

2. 향선충 미생물 대량배양복합체 시제품 제작

가. 젤라틴/키틴배양체, 미생물 보조영양원 및 미생물 적정 비율 조합 조사

1차년도에 결정된 기본 배지(표 15)에 젤라틴/키틴배양체, 미생물 보조영양원(표 16) 및 미생물 접종량을 조절하여 최적의 대량배양복합체를 만들기 위하여 표 3와 같은 조합을 작성하였다.

표 15. 기본 배지 조성 (1차년도에 확립)

성분	용량(g/L)
L-monosodiumglutamate(MSG)	1.0g
Yeast extract	1.0g
Sucrose	3.0g
KH ₂ PO ₄	1.4g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0g
CaCO ₃	1.0g
MgSO ₄	0.3g
CuSO ₄	0.02g
ZnSO ₄	0.02g
FeCl ₃	0.03g

표 16. 미생물 보조 영양원 조성

성분	함량(%)
아미노산 액비	88.5
제1인산가리	2.5
미분쇄 계껍질(200mesh 이상)	2
쌀겨	2
골분	2
팜애쉬	2
미량요소 및 기타	1
총계	100

표 17. 젤라틴/키티탄배양체, 미생물 보조영양원 및 미생물 적정 비율 조합

번호	성분 조합 (g 또는 ml/L)
1	키티탄0.4g 젤라틴 0.1g + 미생물 보조영양원 2ml + 미생물적정비율 0.5ml
2	키티탄0.4g 젤라틴 0.1g + 미생물 보조영양원 4ml + 미생물적정비율 1ml
3	키티탄0.4g 젤라틴 0.2g + 미생물 보조영양원 2ml + 미생물적정비율 1ml
4	키티탄0.4g 젤라틴 0.2g + 미생물 보조영양원 4ml + 미생물적정비율 0.5ml
5	키티탄0.6g 젤라틴 0.15g + 미생물 보조영양원 3ml +미생물적정비율 0.75ml
6	키티탄0.8g 젤라틴 0.1g + 미생물 보조영양원 2ml + 미생물적정비율 1ml
7	키티탄0.8g 젤라틴 0.1g + 미생물 보조영양원 4ml + 미생물적정비율 0.5ml
8	키티탄0.8g 젤라틴 0.2g + 미생물 보조영양원 2ml + 미생물적정비율 0.5ml
9	키티탄0.8g 젤라틴 0.2g + 미생물 보조영양원 4ml + 미생물적정비율 1ml

*키티탄성분은 계껍질 분말을 사용하였다. 접종미생물 수는 7×10^9 CFU/ml로 하였다.

젤라틴/키티탄배양체, 미생물 보조영양원 및 미생물접종 비율 조합에 따른 최적의 향선충 미생물 대량배양복합체를 만들기 위해 9개의 조합을 만든 후 5일간 배양하여 실험에 사용하였다 (표 17). 실험에 사용한 접종미생물의 개체수는 7×10^9 CFU/ml 농도였다. 9개의 조합에 따른 뿌리혹선충 유충의 치사율을 조사한결과 2번 조합에서 조사 2일째 84.8%로 가장 높은 유충 치사율을 나타냈다 (그림 57). 50%이상의 유충 치사율을 나타내는 조합으로는 1, 4, 5, 6, 7 및 9번으로 각각 72.9%, 75.0%, 60.5%, 66.0%, 57.1% 및 56.2%로 조사되었다. 50% 미만의 치사율을 보인 3번 및 8번 조합은 각각 34.9% 및 38.3%로 조사되었다.

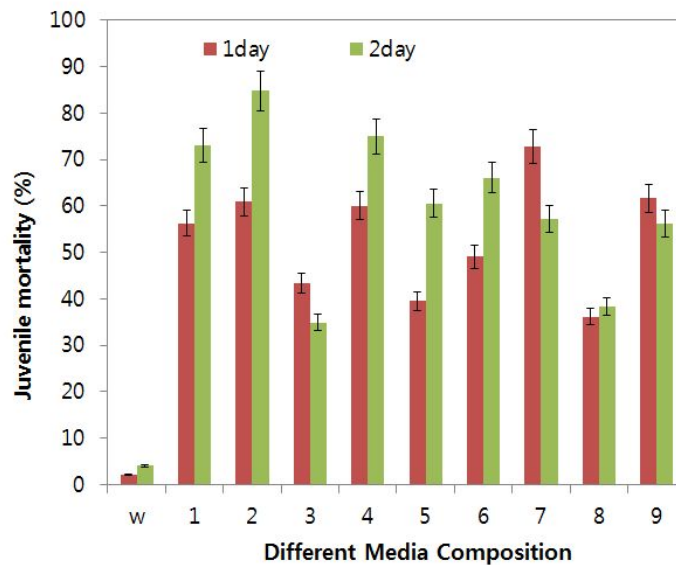


그림 57. 젤라틴/키티탄배양체, 미생물 보조영양원 및 미생물 비율에 따른 선충 유충 치사율. 유충의 치사율은 2번 조합에서 조사 2일째 가장 높게 조사됨.

젤라틴/키틴배양체, 미생물 보조영양원 및 미생물접종 비율 조합에 따른 뿌리혹선충 알 부화율에 미치는 영향에 대하여 조사한결과 5번 조합에서 조사 5일째 10.4%로 물처리구 60% 부화율에 비해 50% 정도 부화율이 억제 되는 것으로 조사 되었다 (그림 58). 20%이하의 알 부화율을 나타내는 조합으로는 3번, 4번 및 9번으로 각각 19.4%, 14.2% 및 16.3%로 조사되었다. 또한 20% 이상의 알 부화율을 보인 조합으로는 1번, 2번, 6번, 7번 및 8번 조합으로 각각 24.5%, 24.8%, 21.7%, 22.8% 및 25%로 조사되었다. 이러한 결과는 물 처리구에 비해 1번부터 9번 조합 모두 40%이상의 알 부화억제 효과가 있는 것으로 나타났다.

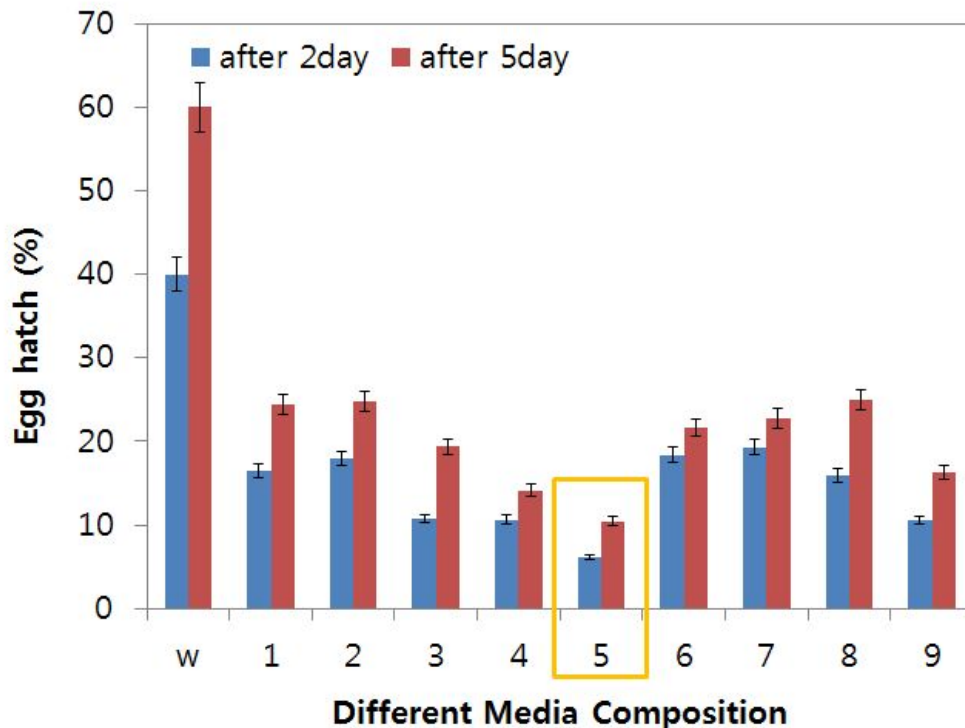


그림 58. 젤라틴/키틴배양체, 미생물 보조영양원 및 미생물 비율에 따른 선충 알 부화율. 선충 알 부화율은 5번 조합에서 가장 낮게 나타남.

젤라틴/키틴배양체, 미생물 보조영양원 및 미생물접종 비율조합에 따른 미생물(*Lysobacter capsici* YS1215) 생육 정도를 조사한 결과를 그림 59에 나타내었다. UV 흡광도 측정기로 600nm 흡광도로 미생물 생육(optical density, OD600)을 조사한 결과 2번 조합이 2.12로 가장 높게 나타났고, 6번 조합이 6.04로 가장 낮게 나타났다. 1번부터 9번 조합으로 만든 미생물 배양액을 이용하여 영양배지(LB media)에 도말하여 미생물 생육 지수인 Log10 CFU/ml을 조사한 결과 1번 조합에서 1.0 Log10 CFU/ml로 가장 높게 나타났고, 7번 배지 조합에서 0.5 Log10 CFU/ml로 가장 낮게 나타났다. 조사결과 OD600값과 Log10 CFU/ml 값이 정확히 일치하지는 않았다.

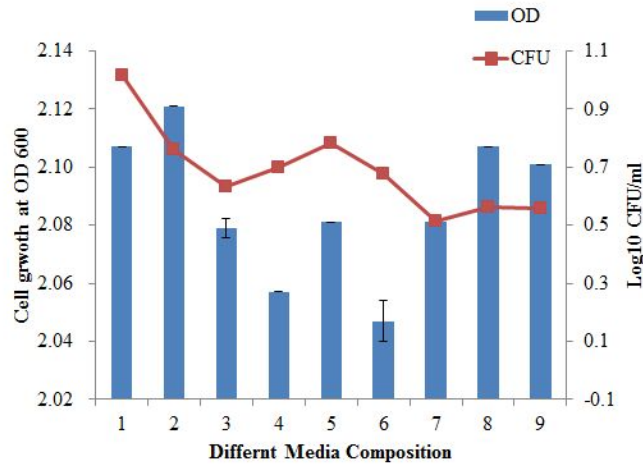


그림 59. 젤라틴/키틴배양체, 미생물 보조영양원 및 미생물 비율에 따른 미생물(*L. capsici* YS1215) 개체 수.

미생물 개체 수는 2번 조합이 2.12로 가장 높게 나타난다.

젤라틴/키틴배양체, 미생물 보조영양원 및 미생물접종 비율 조합에 따른 미생물 배양액의 효소활성을 그림 60와 61에 나타내었다. 키틴분해효소(chitinase) 및 젤라틴분해효소(gelatinase)의 활성은 미생물을 1-9번 조합에 5일간 배양 후 각각의 측정방법에 따라 실시하였다. 키틴분해효소 활성 조사 결과 1번 조합에서 1.36 Unit/ml로 가장 높게 나타났고, 3번 조합에서 0.74 Unit/ml로 가장 낮게 나타났다. 1.0 Unit/ml 이상의 활성을 보인 조합으로는 5번, 6번, 7번, 8번 및 9번로 조사 되었고 각각 1.09, 1.00, 1.25, 1.16 및 1.17 Unit/ml로 조사되었다. 이러한 결과는 키틴 양이 많은 5번, 6번, 7번, 8번 및 9번에서 키틴분해효소 활성이 높게 난 것으로 보아 키틴의 양에 따라 키틴분해효소 활성이 영향을 받은 것으로 보여진다. 단, 1번 조합의 경우는 이러한 경향과 맞지 않은 결과를 보였다.

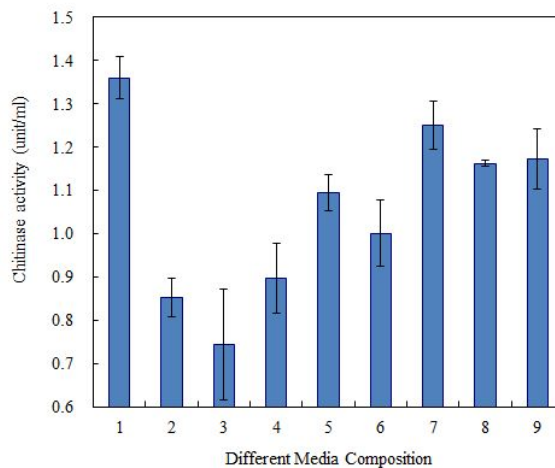


그림 60. 젤라틴/키틴배양체, 미생물 보조영양원 및 미생물 비율에 따른 키틴분해효소(chitinase) 활성.

키틴분해효소 활성 조사 결과 1번 조합에서 가장 높게 나타났음.

젤라틴분해효소(gelatinase) 활성 조사 결과 8번 조합에서 15.82 Unit/ml로 가장 높게 나타났지만, 9번 조합 15.80 Unit/ml 활성 차이에서 오차범위 내에 있었다. 가장 낮은 활성을 보인 조합으로는 2번 조합으로 14.53 Unit/ml로 나타났다. 3번, 4번 및 5번에서의 젤라틴분해효소활성은 오차범위 내에서 각각 15.21, 15.34, 15.36 Unit/ml로 비슷한 결과를 보였다. 1번, 6번 및 7번에서의 젤라틴분해효소활성은 각각 15.02, 15.08 및 15.26 Unit/ml로 조사되었다. 조사 결과 젤라틴분해효소 활성은 배지내의 젤라틴 함량이 상대적으로 높은 3번, 4번, 8번 및 9번에서 높게 나타나는 것으로 보아 젤라틴 함량의 차이로 인해 젤라틴분해효소활성의 차이도 나타나는 것으로 보여 진다.

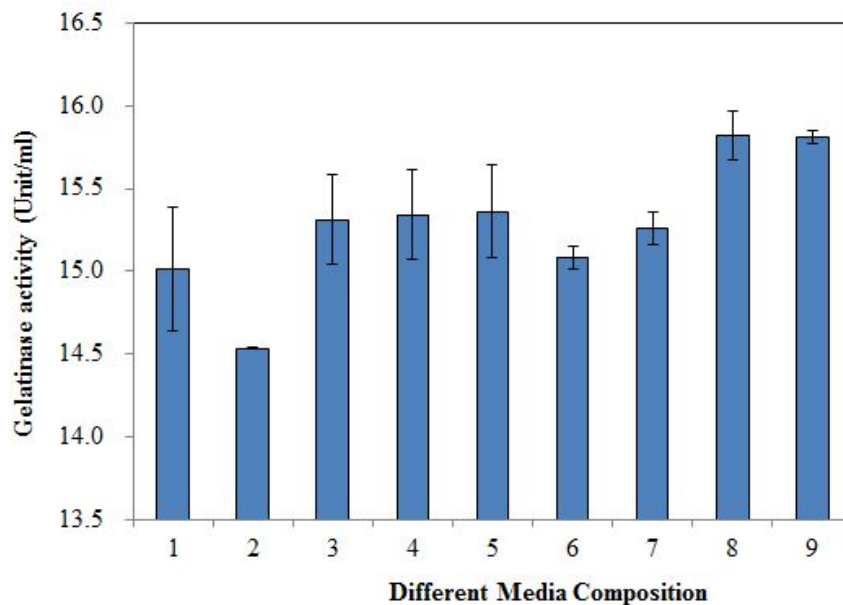


그림 61. 젤라틴/키틴배양체, 미생물 보조영양원 및 미생물 비율에 따른 젤라틴분해효소 (gelatinase)활성.

젤라틴분해효소(gelatinase) 활성 조사 결과 8번 조합에서 가장 높게 나타났음.

나. 온도와 기타 환경에 따른 영향 조사

젤라틴/키틴배양체, 미생물 보조영양원 및 미생물집중 비율 조합에 따른 최적의 조합을 조사한 결과를 종합하여 조합 5번과 9번을 선택하여 온도 영향 조사를 하였다. 실험 온도는 20°C, 30°C 및 40°C로 하였다. 조사 결과 뿌리혹선충 유충 치사율에서는 조사 3일째 30°C 9번 조합 (30_9)에서 72.0%로 가장 높게 나타났고, 40°C 5번 조합(40_5)에서 38.4%의 치사율로 가장 낮게 조사되었다. 40°C에서의 유충 치사율은 20°C 및 30°C에 비해 상대적으로 낮게 나타났다. 이는 미생물(*Lysobacter capsici* YS1215)의 생육이 매우 낮아 유충 치사에 영향을 주는 2차대사산물의 생산이 적은 것 때문으로 사료된다. 20°C에서의 유충 치사율은 각각 5번 조합 62.9% 및 9번 조합 63.5%로 조사됐고, 30°C의 유충 치사율보다 약간 낮게 나타났다 (그림 62).

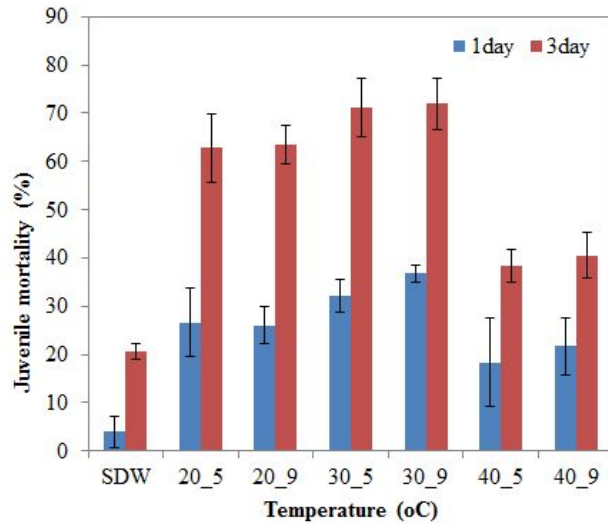


그림 62. 미생물배양체 조합 및 온도에 따른 선충 유충 치사율.
유충 치사율 조사결과 3일째 30°C 9번 조합에서 가장 높게 나타났음.

젤라틴/키틴배양체, 미생물 보조영양원 및 미생물접종 비율 조합에 따른 최적의 조합을 조사한 결과를 종합하여 조합 5번과 9번을 선택하여 온도 영향 조사를 하였다. 조사 결과 뿌리혹선충 알 부화율에서는 조사 5일째 30°C 9번 조합 (30_9)에서 11.7%로 가장 낮게 나타났고, 40°C 5번 조합(40_5)에서 24.5%의 부화율로 가장 높게 조사되었다. 40°C에서의 알 부화율은 유충 치사율과 유사하게 20°C 및 30°C에 비해 상대적으로 높게 나타났다. 이는 미생물(*Lysobacter capsici* YS1215)의 생육이 매우 낮아 유충 치사에 영향을 주는 2차대사산물의 생산이 적은 것 때문으로 사료된다. 20°C에서의 유충 치사율은 각각 5번 조합 17.8% 및 9번 조합 17.2%로 조사됐고, 30°C의 유충 치사율보다 약간 높게 나타났다 (그림 63).

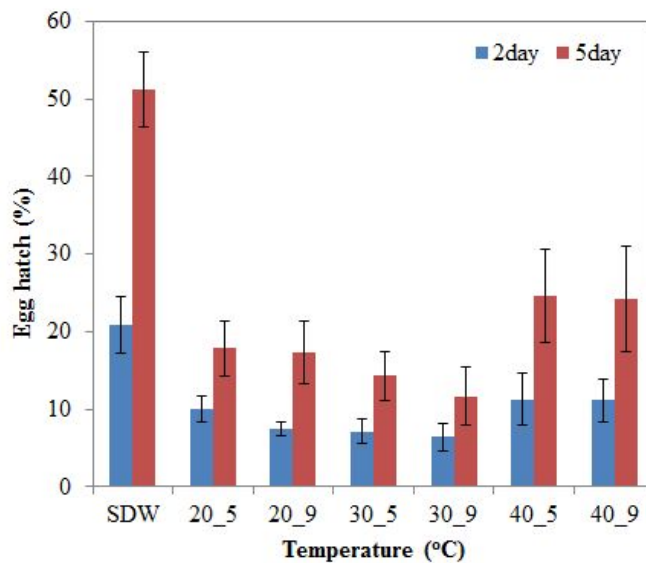


그림 63. 미생물배양체 조합 및 온도에 따른 선충 알 부화율.
알 부화율 조사결과 조사 5일째 30°C 9번 조합에서 가장 낮게 나타났음.

젤라틴/키틴배양체, 미생물 보조영양원 및 미생물접종 비율 조합에 따른 최적의 조합을 조사한 결과를 종합하여 조합 5번과 9번을 선택하여 온도 영향 조사를 하였다. 조사 결과 접종 미생물 개체수는 40°C에서는 거의 조사 되지 않았다. 가장 높은 Log10 CFU 값은 30°C 9번 조합으로 4.04를 나타냈다. 30°C와 20°C의 미생물 개체수 비교에서는 30°C에서 더 높게 나타났다 (그림 64).

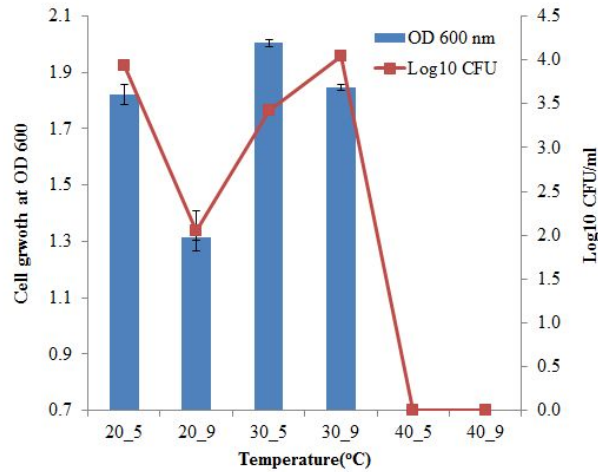


그림 64. 미생물배양체 조합 및 온도에 따른 미생물 개체수. 가장 높은 Log10 CFU 값은 30°C 9번 조합으로 조사됨.

키틴분해효소(chitinase) 및 젤라틴분해효소(gelatinase)의 활성은 미생물을 20°C, 30°C 및 40°C에서 실시하였다. 키틴분해효소 활성 조사 결과 20°C 9번과 30°C 9번 조합에서 10.9 Unit/ml로 가장 높게 나타났고, 40°C 5번 조합에서 7.9 Unit/ml로 가장 낮게 나타났다. 20°C 5번, 30°C 5번 및 40°C 9번은 각각 10.7, 10.4, 및 7.9 Unit/ml로 조사되었다. 조사결과 비교적 고온인 40°C에서의 키틴분해효소 활성은 상당히 낮게 나타났다 (그림 65).

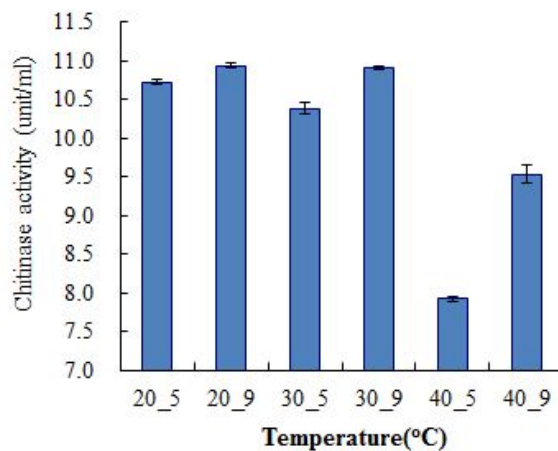


그림 65. 미생물배양체 조합 및 온도에 따른 키틴분해효소 (chitinase) 활성. 키틴분해효소 활성 조사 결과 30°C 9번 조합에서 가장 높게 나타났음.

젤라틴분해효소(gelatinase) 활성 조사 결과 30°C 9번 조합에서 14.8 Unit/ml로 가장 높게 나타났다. 20°C 5번, 20°C 9번, 30°C 5번 및 40°C 9번 조합에서 각각 14.0, 13.9, 14.4 및 13.3 Unit/ml 활성으로 조사되었다. 가장 낮은 활성을 보인 조합으로는 40°C 5번 조합으로 12.8 Unit/ml로 나타났다 (그림 66).

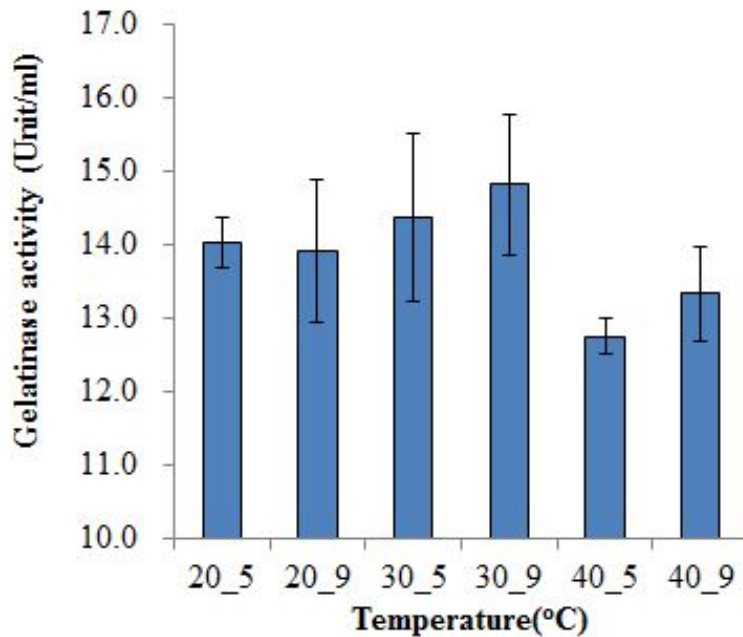


그림 66. 미생물배양체 조합 및 온도에 따른 젤라틴분해효소 (gelatinase) 활성. 젤라틴분해효소 활성 조사 결과 30°C 9번 조합에서 가장 높게 나타남.

다. 미량요소 또는 첨가물질에 대한 효과 및 영향 조사

젤라틴/키틴배양체, 미생물 보조영양원 및 미생물접종 비율 조합에 따른 최적의 조합을 조사한 결과를 종합하여 조합 5번과 9번을 선택하여 온도 영향 조사를 하였다. 온도 영향 조사 결과 30°C 9번에서 선충 유충 치사율과 알 부화 억제율에서 높은 활성을 보임에 따라 9번 조합에 배양온도를 30°C로 결정하여 미량요소 첨가 실험을 실시하였다. 실험에 사용된 미량요소 및 물질은 MnSO₄, Organic sulfur (유황), Na₂HPO₄, Na₂MoO₄ 및 H₃BO₃ 등으로 0.001g/L 농도로 각각 사용하였다. 조사결과 조사 3일째 H₃BO₃ 처리구에서 80.9%의 가장 높은 유충치사율을 보였고, MnSO₄ 처리구에서 64.8%로 가장 낮은 치사율을 보였다. Organic sulfur 처리구는 66.6%, Na₂HPO₄ 처리구는 79.2%, Na₂MoO₄ 처리구는 78.7%의 치사율을 보였다. 하지만 Na₂HPO₄, Na₂MoO₄ 및 H₃BO₃ 의 처리구간 큰 차이는 보이지 않았고, MnSO₄와 Organic sulfur (유황) 처리구간에도 큰 차이는 보이지 않았다 (그림 67).

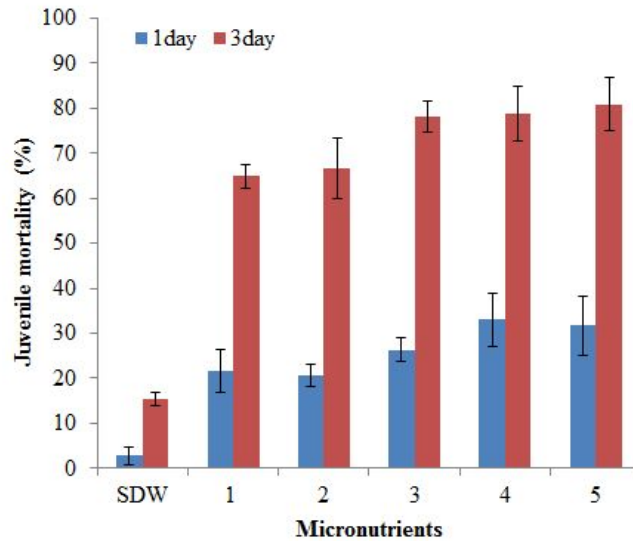


그림 67. 미량요소 첨가에 따른 유충 치사율.

H₃BO₃ 처리구에서 가장 높은 유충치사율이 나타남.

1: MnSO₄, 2: Organic sulfur, 3: Na₂HPO₄, 4: Na₂MoO₄, 5: H₃BO₃.

미량요소 (MnSO₄, Organic sulfur (유황), Na₂HPO₄, Na₂MoO₄ 및 H₃BO₃) 첨가에 따른 뿌리혹선충 알 부화율 조사결과 조사 5일째 H₃BO₃ 처리구에서 11.0%의 가장 낮은 알 부화율을 보였고, 유황 처리구에서 19.0%로 가장 높은 부화율을 보였다. MnSO₄, Na₂HPO₄, 및 Na₂MoO₄ 처리구는 각각 18.8%, 14.0% 및 11.5%의 부화율을 보였다. Na₂MoO₄ 처리구와 H₃BO₃ 처리구는 0.5%의 근소한 알 부화율 차이를 보였다 (그림 68).

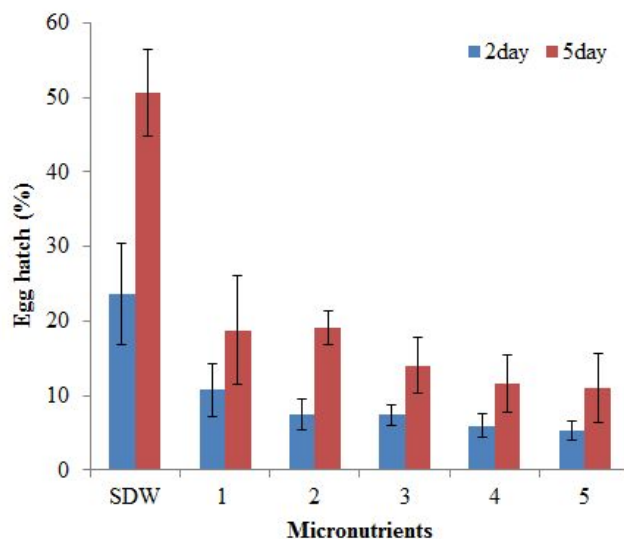


그림 68. 미량요소 첨가에 따른 알 부화율.

알 부화율 조사결과 H₃BO₃ 처리구에서 가장 낮은 알 부화율을 보였음.

1: MnSO₄, 2: Organic sulfur, 3: Na₂HPO₄, 4: Na₂MoO₄, 5: H₃BO₃.

미량요소 ($MnSO_4$, Organic sulfur (유황), Na_2HPO_4 , Na_2MoO_4 및 H_3BO_3) 첨가에 따른 미생물 개체수 영향을 조사한 결과 유황 처리구가 3.40 Log10 CFU/ml로 가장 생육이 좋은 것으로 조사되었고, $MnSO_4$ 처리구가 2.48 Log10 CFU/ml로 가장 생육이 낮은 것으로 조사되었다. Na_2HPO_4 처리구는 3.26 Log10 CFU/ml, Na_2MoO_4 처리구는 2.87 Log10 CFU/ml 및 H_3BO_3 3.05 Log10 CFU/ml로 조사 되었다. Log10 CFU와 OD600의 미생물 생육 정도에 관한 결과는 일치 하지 않는 경향으로 조사되었다 (그림 69).

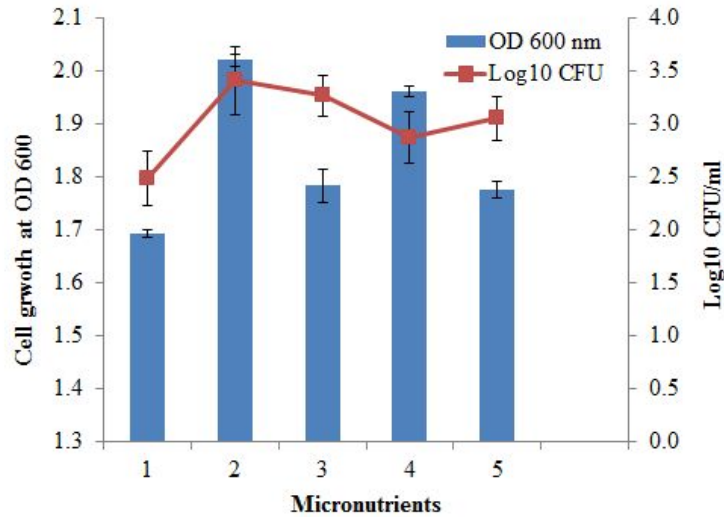


그림 69. 미량요소 첨가에 따른 미생물 개체수.

미생물 개체수 영향을 조사한 결과 Organic sulfur 처리구가 가장 생육이 좋은 것으로 조사 됨.

1: $MnSO_4$, 2: Organic sulfur, 3: Na_2HPO_4 , 4: Na_2MoO_4 , 5: H_3BO_3 .

미량요소 ($MnSO_4$, Organic sulfur (유황), Na_2HPO_4 , Na_2MoO_4 및 H_3BO_3) 첨가가 키틴분해효소(chitinase)의 활성에 미치는 영향을 조사한 결과 H_3BO_3 처리구가 9.0 Unit/ml로 가장 높게 나타났고, $MnSO_4$ 및 Organic sulfur (유황)에서 각각 8.0 Unit/ml의 활성을 보임으로 가장 낮게 나타났다. Na_2HPO_4 및 Na_2MoO_4 첨가에 따른 키틴분해효소 활성은 8.4 Unit/ml 및 8.3 Unit/ml로 각각 조사되었다 (그림 70).

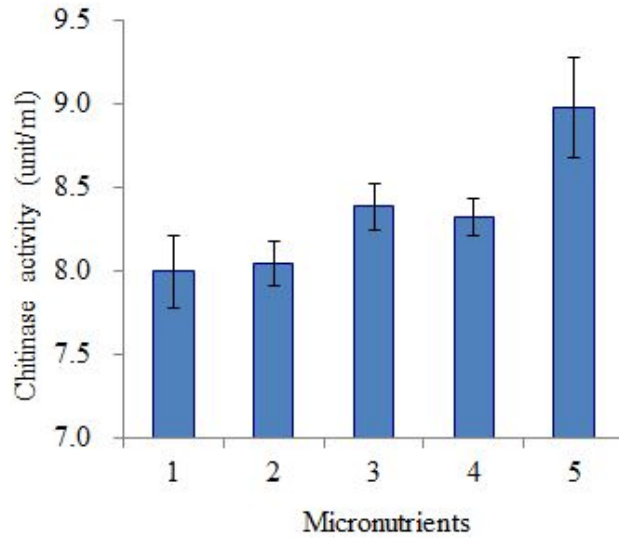


그림 70. 미량요소 첨가에 따른 키틴분해효소 활성.
 키틴분해효소 활성에 미치는 영향을 조사한 결과 H_3BO_3 처리구가 가장 높게 나타남.
 1: $MnSO_4$, 2: Organic sulfur, 3: Na_2HPO_4 , 4: Na_2MoO_4 , 5: H_3BO_3 .

미량요소 ($MnSO_4$, Organic sulfur (유황), Na_2HPO_4 , Na_2MoO_4 및 H_3BO_3) 첨가가 젤라틴 분해효소(gelatinase)의 활성에 미치는 영향을 조사한 결과 Organic sulfur 처리구가 16.3 Unit/ml로 가장 높게 나타났고, H_3BO_3 에서 16.0 Unit/ml의 활성을 보임으로 가장 낮게 나타났다. $MnSO_4$ 및 Na_2HPO_4 첨가에 따른 젤라틴분해효소 활성은 16.2 Unit/ml로 같은 값의 활성을 보였다 (그림 71).

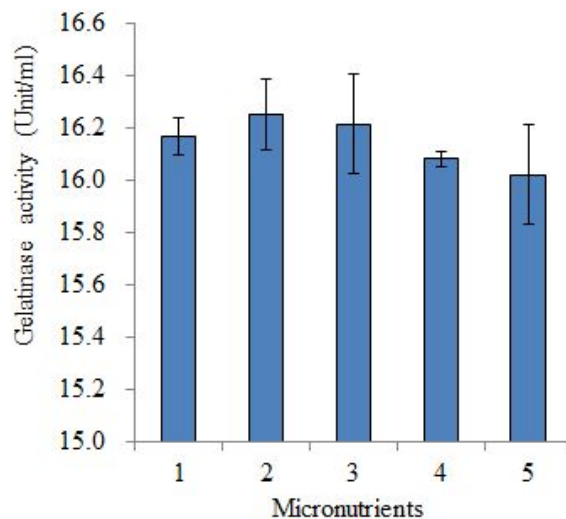


그림 71. 미량요소 첨가에 따른 젤라틴분해효소 활성.
 젤라틴분해효소의 활성에 미치는 영향을 조사한 결과 Organic sulfur 처리구가 가장 높게 나타남.
 1: $MnSO_4$, 2: Organic sulfur, 3: Na_2HPO_4 , 4: Na_2MoO_4 , 5: H_3BO_3

라. 미량요소 및 물질 조합에 따른 영향 조사

1차 미량요소 첨가에 따른 뿌리혹선충 유충 치사율, 알 부화율, 미생물 개체수, 키틴분해효소 활성 및 젤라틴분해효소 활성을 조사한 후 종합 분석한 결과 Na_2HPO_4 , Na_2MoO_4 , H_3BO_3 에서 뿌리혹선충 억제에 효과가 있는 것으로 판단하였다. 이러한 결과를 토대로 이 3가지의 요소들을 상호 조합하여 선충 억제 효과를 분석하였다. 조사결과 조사 3일째 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{Na}_2\text{MoO}_4 + \text{H}_3\text{BO}_3$ 처리구에서 81.9%의 가장 높은 유충치사율을 보였고, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 + \text{H}_3\text{BO}_3$ 처리구에서 74.9%로 가장 낮은 치사율을 보였다. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{Na}_2\text{MoO}_4$ 처리구는 76.4%, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{H}_3\text{BO}_3$ 처리구는 75.6%의 치사율을 보였다. 하지만 4개의 조합 처리구간 큰 차이는 보이지 않았다 (그림 72).

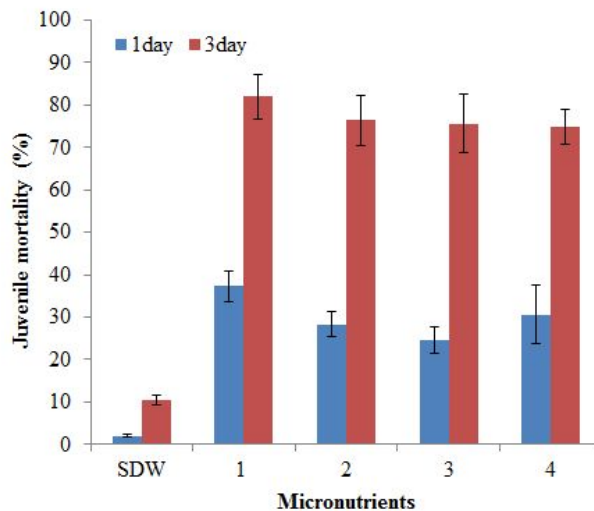


그림 72. 미량요소 조합 첨가에 따른 선충 유충 치사율.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{Na}_2\text{MoO}_4 + \text{H}_3\text{BO}_3$ 처리구에서 가장 높은 유충치사율을 나타냄.

1: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{Na}_2\text{MoO}_4 + \text{H}_3\text{BO}_3$, 2: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{Na}_2\text{MoO}_4$,

3: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{H}_3\text{BO}_3$, 4: $\text{Na}_2\text{MoO}_4 + \text{H}_3\text{BO}_3$.

Na_2HPO_4 , Na_2MoO_4 , H_3BO_3 를 조합하여 미생물 배양 배지에 첨가하고 5일간 배양한 후 뿌리혹선충 알 부화율에 관하여 조사한결과 조사 5일째 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{Na}_2\text{MoO}_4 + \text{H}_3\text{BO}_3$ 처리구에서 18.4%의 가장 낮은 알 부화율을 보였고, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{Na}_2\text{MoO}_4$ 처리구에서 22.3%로 가장 높은 알 부화율을 보였다. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{H}_3\text{BO}_3$ 처리구는 18.7%, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 + \text{H}_3\text{BO}_3$ 처리구는 19.9%의 치사율을 보였다. 하지만 4개의 조합 처리구간 큰 차이는 보이지 않았다 (그림 73).

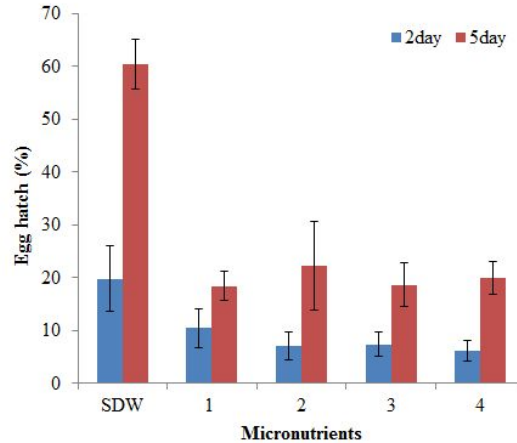


그림 73. 미량요소 조합 첨가에 따른 선충 알 부화율.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{Na}_2\text{MoO}_4 + \text{H}_3\text{BO}_3$ 처리구에서 가장 낮은 알 부화율을 보였음.

1: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{Na}_2\text{MoO}_4 + \text{H}_3\text{BO}_3$, 2: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{Na}_2\text{MoO}_4$,

3: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{H}_3\text{BO}_3$, 4: $\text{Na}_2\text{MoO}_4 + \text{H}_3\text{BO}_3$.

Na_2HPO_4 , Na_2MoO_4 , H_3BO_3 를 조합하여 미생물 배양 배지에 첨가하고 5일간 배양한 후 미생물 (*Lysobacter capsici* YS1215) 개체수 변화에 관하여 조사한 결과 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{H}_3\text{BO}_3$ 처리구에서 3.75 Log10 CFU/ml로 가장 높은 미생물 개체수 증가를 보였고, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{Na}_2\text{MoO}_4$ 처리구에서 2.41 Log10 CFU/ml로 가장 낮은 미생물 개체수 증가를 보였다. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{Na}_2\text{MoO}_4$ 처리구는 3.32 Log10 CFU/ml, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 + \text{H}_3\text{BO}_3$ 처리구는 2.85 Log10 CFU/ml의 미생물 개체수를 보였다. 미생물 개체수 증가에 관한 조사결과 OD600값과 Log10 CFU/ml 값의 변화 경향성이 거의 일치 한 것으로 조사 되었다 (그림 74).

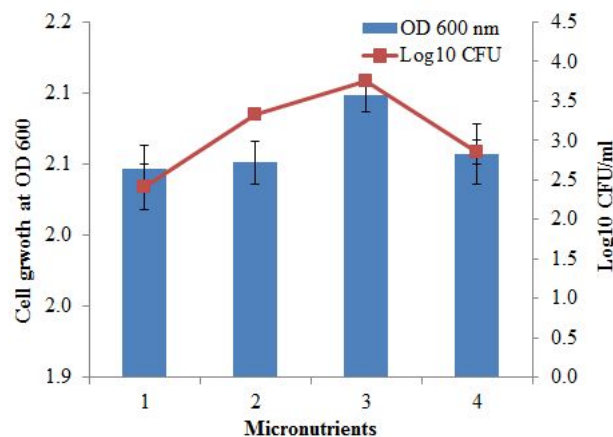


그림 74. 미량요소 조합 첨가에 따른 미생물 개체수.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{H}_3\text{BO}_3$ 처리구에서 가장 높은 미생물 개체수 증가를 보였음.

1: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{Na}_2\text{MoO}_4 + \text{H}_3\text{BO}_3$, 2: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{Na}_2\text{MoO}_4$,

3: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{H}_3\text{BO}_3$, 4: $\text{Na}_2\text{MoO}_4 + \text{H}_3\text{BO}_3$.

Na_2HPO_4 , Na_2MoO_4 , H_3BO_3 를 조합하여 미생물 배양 배지에 첨가하고 5일간 배양한 후 키틴분해효소 활성 변화에 관하여 조사한결과 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{Na}_2\text{MoO}_4$ 처리구에서 10.1 Unit/ml로 가장 높게 나타났고, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{Na}_2\text{MoO}_4$ 처리구에서 7.9 Unit/ml로 가장 낮은 활성을 보였다. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{H}_3\text{BO}_3$ 처리구는 8.4 Unit/ml, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 + \text{H}_3\text{BO}_3$ 처리구 8.4 Unit/ml로 같은 활성을 보였다 (그림 75).

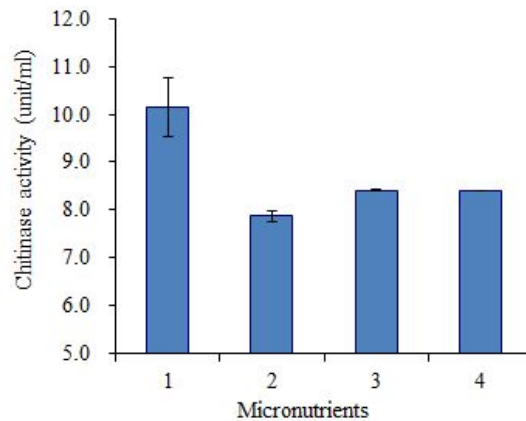


그림 75. 미량요소 조합 첨가에 따른 키틴분해효소 (chitinase) 활성.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{Na}_2\text{MoO}_4$ 처리구에서 가장 높은 키틴분해효소 활성이 나타남.

1: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{Na}_2\text{MoO}_4 + \text{H}_3\text{BO}_3$, 2: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{Na}_2\text{MoO}_4$,

3: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{H}_3\text{BO}_3$, 4: $\text{Na}_2\text{MoO}_4 + \text{H}_3\text{BO}_3$.

Na_2HPO_4 , Na_2MoO_4 , H_3BO_3 를 조합하여 미생물 배양 배지에 첨가하고 5일간 배양한 후 젤라틴분해효소 활성 변화에 관하여 조사한 결과 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{Na}_2\text{MoO}_4$ 처리구에서 28.6 Unit/ml로 가장 높게 나타났고, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 + \text{H}_3\text{BO}_3$ 처리구에서 27.5 Unit/ml로 가장 낮은 활성을 보였다. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{Na}_2\text{MoO}_4$ 처리구는 27.6 Unit/ml, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{H}_3\text{BO}_3$ 처리구 28.3 Unit/ml로 같은 활성을 보였다 (그림 76).

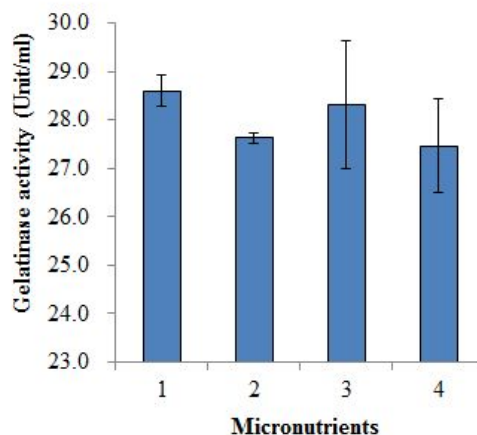


그림 76. 미량요소 조합 첨가에 따른 젤라틴분해효소 (gelatinase) 활성.

젤라틴분해효소 활성 변화 조사한 결과 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{Na}_2\text{MoO}_4$ 처리구에서 가장 높게 나타남.

1: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{Na}_2\text{MoO}_4 + \text{H}_3\text{BO}_3$, 2: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{Na}_2\text{MoO}_4$,

3: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{H}_3\text{BO}_3$, 4: $\text{Na}_2\text{MoO}_4 + \text{H}_3\text{BO}_3$.

3. 미생물 보조영양원 (액비) 확립실험

가. 비료 등록을 위한 작물 생육 실험 및 성분 조사

(1) 상추 작물

▶ 시험 기간 : 2012년1월21일 정식, 3월 10일 1차 처리 (7주차), 3월 17일 2차 처리 (8주차)

▶ 샘플링 : 9주, 12주차

▶ 처리구 배치도 :

액비 500배 희석	무처리	액비 250배 희석	액비 1500배 희석
무처리	액비 1500배 희석	액비 500배 희석	액비 1000배 희석
액비 1500배 희석	액비 1000배 희석	액비 250배 희석	무처리
액비 250배 희석	액비 500배 희석	무처리	액비 1000배 희석



1. 21 정식 시

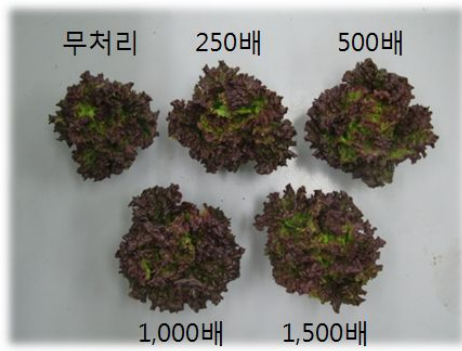


정식 후 시험구 배치

▶ 액비의 조성

원료	주요성분	함량
아미노산 액비	질소 : 6.8%	93%
MKP (제1인산가리)	인산 : 52% 가리 : 34%	4.5%
계껍질	키틴 함량 : 19%	2%
기타 (미량요소 등등)	붕소, 몰리브덴, 철, 망간 등등	0.5%

위의 조성으로 6개월 이상 교반 및 부숙 과정을 거쳐 제조됨



3. 24 (9주차)



4. 12 (12주차)

그림 77. 상추 실험 모습 (처리구별 사진)

- 상추를 이용한 액비 확립 실험결과 조사 12주차 생체중 및 건물중에서 액비 1000배 희석 처리구가 가장 높았다 (그림 78). 또한 엽수에서도 1000배 처리구가 가장 좋았다. (그림 79).

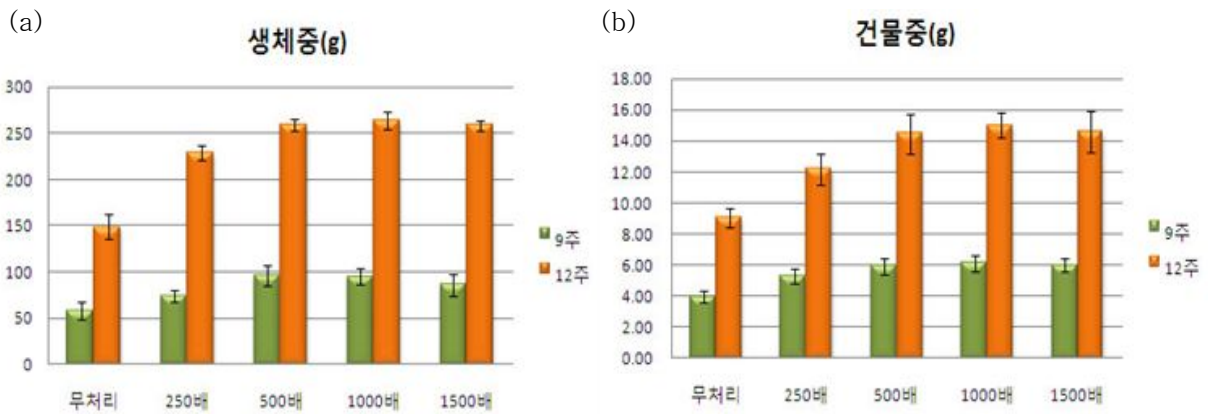


그림 78. 생체중 및 건물중 조사 결과.

생체중 및 건물중에서 액비 1000배 희석 처리구가 가장 높게 나타남.

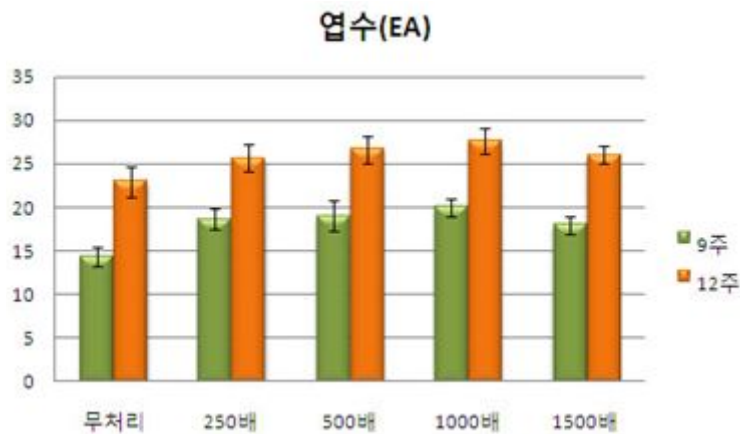


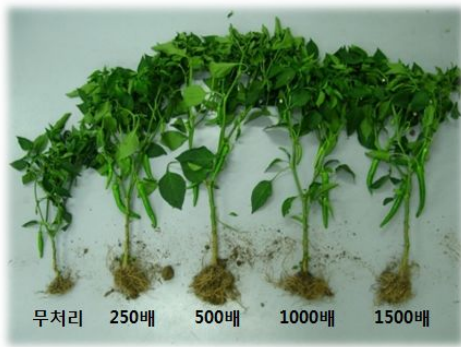
그림 79. 엽수 조사결과.

엽수 조사결과 1000배 처리구가 가장 높게 나타남.

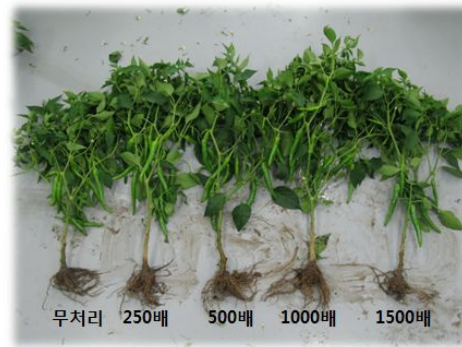
(2) 고추 작물

- ▶ 시험 기간 : 2012년 5월 1일 정식, 정식 후 1주 간격으로 7번 처리
- ▶ 샘플링 : 8주, 10주차
- ▶ 처리구 배치도 :

액비 500배 희석	무처리	액비 250배 희석	액비 1500배 희석
무처리	액비 1500배 희석	액비 500배 희석	액비 1000배 희석
액비 1500배 희석	액비원 1000배 희석	액비 250배 희석	무처리
액비 250배 희석	액비 500배 희석	무처리	액비 1000배 희석



6. 26 (8주차)



7. 09 (10주차)

그림 80. 고추 실험 모습

- 고추를 이용한 액비 확립 실험결과 조사 10주차 지상부생체중 및 건물중에서 액비 1000배 희석 처리구가 가장 높았다 (그림 81). 또한 지상부 길이에서도 1000배 처리구가 가장 좋았다 (그림 82).

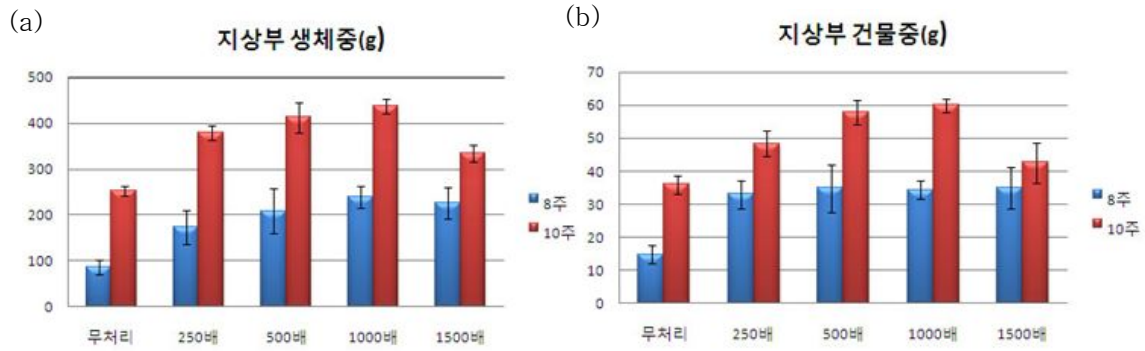


그림 81. 지상부 생체중 및 건물중 조사.
 지상부생체중 및 건물중에서 액비 1000배 희석 처리구가 가장 높게 나타남.

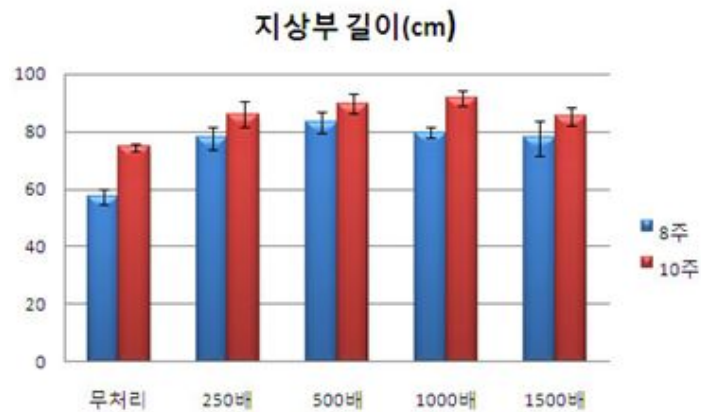


그림 82. 지상부 길이 조사.
 지상부 길이 조사결과 1000배 처리구가 가장 높게 나타남.

- 고추를 이용한 액비 확립 실험결과 조사 10주차 열매수, 지하부 건물중 및 지하부 길이에서 액비 1000배 희석 처리구가 가장 높았다 (그림 83(a), 83(c), 83(d)). 지하부 생체중에서는 500배 처리구가 가장 좋았다. (그림 83(b)).

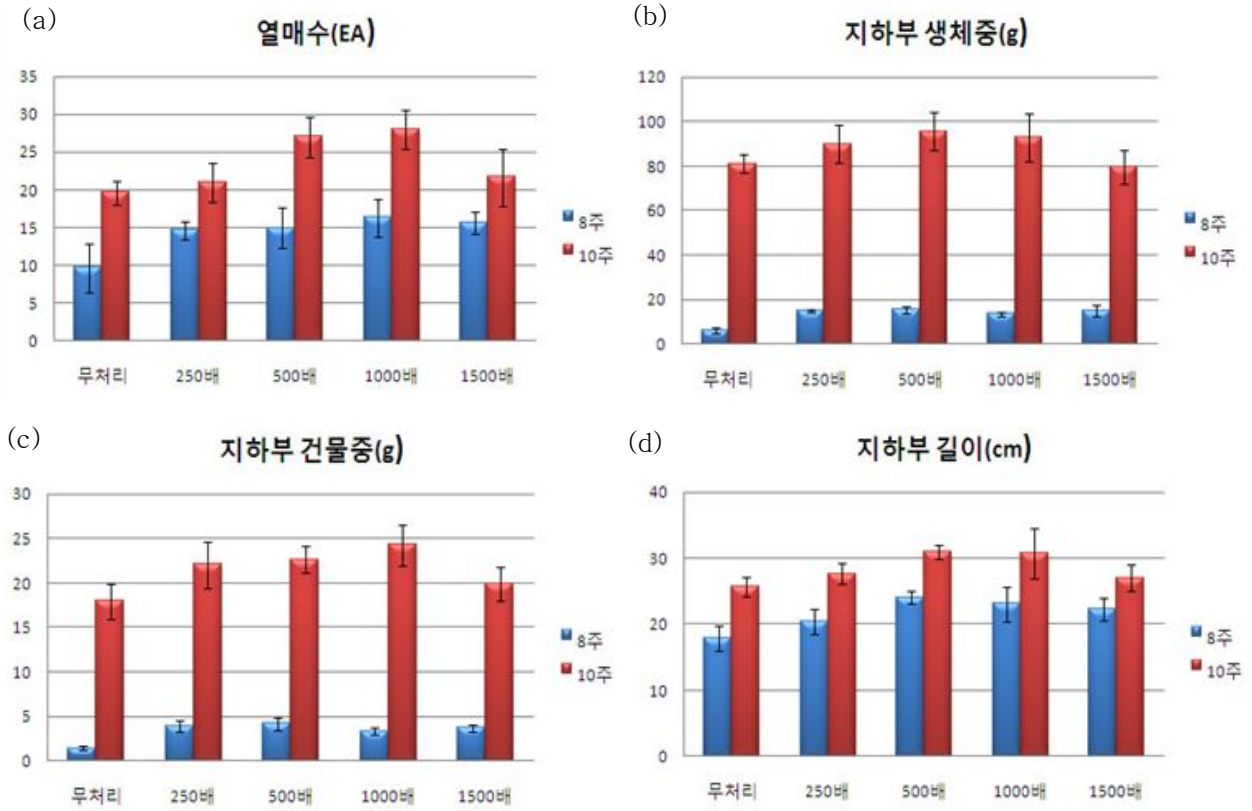


그림 83. 열매수, 지하부 생체중, 지하부 건물중, 지하부 길이 조사.
 열매수, 지하부 건물중 및 지하부 길이에서 액비 1000배 희석 처리구가 가장 높게 나타남.

제 3 절 포트에서 항선충 미생물 대량배양복합체 시용에 따른 효능 연구

1. 토마토 작물

1-1. 토마토 작물에서의 선충 억제 활성 및 작물 성장 효과 조사 (1차 실험)

항선충 미생물 대량배양복합체 시제품의 효과를 토마토 포트(pot) 실험을 통하여 검증 하였다. 포트 재배 실험을 위해서 4주된 토마토 모종을 900 g의 토양이 들어있는 포트에 옮겨 심고, 1, 2, 3, 4주 후에 아래와 같이 각각의 처리구 별로 처리하였다. 상업적으로 판매하는 농약은 1주 후에 한번만 처리하였다. 모든 처리구는 1 주 후에 포트 당 대략 1,000 마리 유충과 5,000개의 알을 접종한다. 포트 실험 기간 동안에 생초장, 생체중, 건물중, 뿌리 무게, 토양 내 유충 수, 토마토 뿌리의 난상 수와 흑 등을 조사한다.

■ 처리구

- 1 : SMC; 토양멸균+항선충 미생물 대량배양복합체배양액+게겍질 --> 토양을 포트에 옮기기 전 토양과 게겍질을 멸균한 뒤 포트에 옮기고, 토마토 정식 후 항선충 미생물 대량배양복합체 배양액을 주기적으로 처리하였다.
- 2 : NSMC; 토양비멸균+항선충 미생물 대량배양복합체 배양액+게겍질 --> 토양을 멸균하지 않고 토양에 게겍질을 처리한 뒤 포트에 옮기고, 토마토 정식 후 항선충 미생물 대량배양복합체 배양액을 주기적으로 처리하였다.
- 3 : NSF; 토양비멸균+비료 --> 멸균하지 않은 토양을 사용하였고, 토마토 정식 후 복합비료를 주기적으로 처리하였다.
- 4 : NSMP; 토양비멸균+농약+항선충 미생물 대량배양복합체 배양액 --> 멸균하지 않은 토양을 사용하였으며, 농약(선충탄)을 1회 처리한 후 항선충 미생물 대량배양복합체 배양액을 주기적으로 처리하였다.
- 5 : NSMF; 토양비멸균+농약+비료 --> 멸균하지 않은 토양을 사용하였으며, 농약(선충탄)을 1회 처리한 후 복합비료를 주기적으로 처리하였다.



- 1 : 토양멸균+미생물+게겍질
 2 : 토양비멸균+미생물+게겍질
 3 : 토양비멸균+비료
 4 : 토양비멸균+농약+미생물
 5 : 토양비멸균+농약+비료
- 농약-선충탄-1회처리
 미생물배양액 및 비료- 1주간격 처리

그림 84. 토마토 포트 실험 1차 조사 생육 모습.



- 1 : 토양멸균+미생물+게겍질, 2 : 토양비멸균+미생물+게겍질
 3 : 토양비멸균+비료, 4 : 토양비멸균+농약+미생물, 5 : 토양비멸균+농약+비료

그림 85. 토마토 포트 실험 뿌리 모습.

가. 작물체 선충 억제 활성

(1) 토양내 선충 밀도 억제 효과

작물체 뿌리에 형성되는 뿌리혹과 난낭의 형성 여부로 선충 피해를 검정하는 것 외에 토양내 존재하는 뿌리혹선충 유충으로 선충 피해를 검정할 수 있다. 토양내 존재하는 유충을 조사하기 위해 토양10g을 사용하였다. 1차 조사 (5주차)와 2차 조사 (7주차)의 뿌리혹 수 결과 및 난낭 수의 결과와 유사한 경향을 보였다. 토양내 유충 2차 조사에서 토양비멸균+비료 (NSF) 처리구에서 193.0 마리로 가장 피해가 심한 것으로 조사 되었고, 토양멸균+미생물+게겍질 (SMC) 처리구 107.0 마리, 토양비멸균+미생물+게겍질 (NSMC) 처리구 118.0 마리, 토양비멸균

+농약+미생물 (NSMP) 처리구 84.0마리로 각각 조사되었다. SMC, NSMC 및 NSMP는 통계적 유의성이 없었다. 가장 낮은 토양내 유충 수는 토양비멸균+농약+비료 (NSMF) 처리구로 26.0마리로 나타났다 (그림 86).

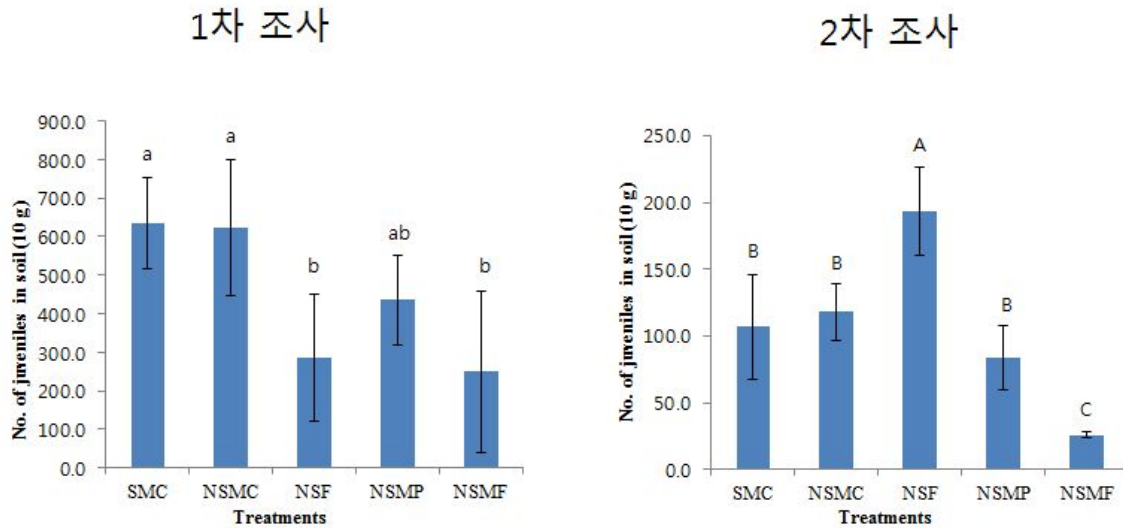


그림 86. 포트실험에서 토양 내 선충 유충 수.

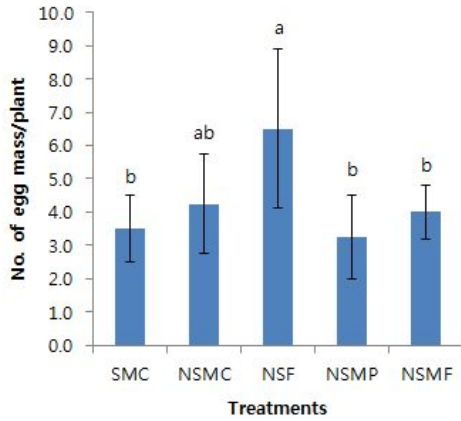
토양멸균+미생물+게껍질 (SMC) 및 토양비멸균+미생물+게껍질 (NSMC) 처리구가 토양비멸균+비료 (NSF) 처리구에 비해 선충 유충 수가 낮게 나타남.

1: 토양멸균+미생물+게껍질 (SMC), 2: 토양비멸균+미생물+게껍질 (NSMC), 3: 토양비멸균+비료 (NSF), 4: 토양비멸균+농약+미생물 (NSMP), 5 : 토양비멸균+농약+비료 (NSMF).

(2) 작물체 선충 감염 억제 효과

포트 실험에서 토마토 뿌리에 선충 침입에 의해 형성된 난낭의 수는 Ploxine B를 이용하여 난낭을 염색한 후 육안으로 조사하였다. 1차 조사 (5주차)와 2차 조사 (7주차)의 뿌리혹 수 결과와 난낭 수의 결과는 유사한 경향을 보였다. 또한 미생물 배양액 처리구인 토양멸균+미생물+게껍질 (SMC), 토양비멸균+미생물+게껍질 (NSMC) 처리구가 비료 처리구인 토양비멸균+비료 (NSF) 처리구 보다 난낭의 수가 상당히 낮게 조사된 것으로 보아 미생물 배양액이 선충의 피해를 줄인것으로 보여진다. 하지만 뿌리혹 수 결과와 마찬가지로 약재(선충탄)와 미생물 혼합 처리구에 비해서는 다소 약한 것으로 조사되었다 (그림 87).

1차 조사



2차 조사

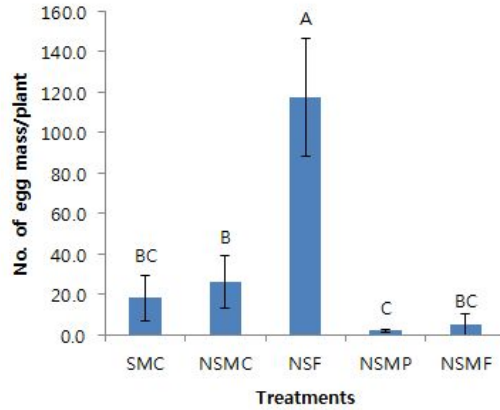


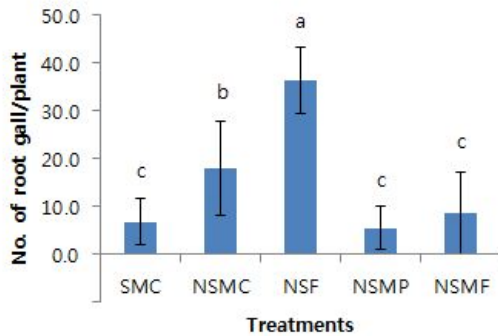
그림 87. 포트실험에서 선충 난양 수.

토양멸균+미생물+계껍질 (SMC) 및 토양비멸균+미생물+계껍질 (NSMC) 처리구가 토양비멸균+비료 (NSF) 처리구에 비해 난양 수가 낮게 나타남.

1: 토양멸균+미생물+계껍질 (SMC), 2: 토양비멸균+미생물+계껍질 (NSMC), 3: 토양비멸균+비료 (NSF), 4: 토양비멸균+농약+미생물 (NSMP), 5 : 토양비멸균+농약+비료 (NSMF).

항선충 미생물 대량배양복합체 시제품의 뿌리혹선충 방제 효과를 조사하기 위하여 토마토 포트(pot) 실험을 실시 하였다. 토마토 정식 후 5주차 및 7주차에서 각각 선충 피해 정도를 조사하였다. 토마토 뿌리에 선충 침입에 의해 형성된 뿌리혹의 수는 선충의 피해 정도를 나타내는 지표로써, 선충 피해가 심할수록 높게 나타난다. 뿌리혹 수 1차 조사 결과 토양멸균+미생물+계껍질 (SMC) 처리구에서 토마토 뿌리 1개당 6.8개로 가장 낮게 나타났고, 가장 피해가 심한 처리구는 36.3개로 토양비멸균+비료 (NSF) 처리구로 나타났다. 이러한 결과는 미생물 배양액 처리구인 토양멸균+미생물+계껍질 (SMC), 토양비멸균+미생물+계껍질 (NSMC) 처리구가 선충의 피해를 억제하는 상당한 역할을 한 것으로 보여진다. 하지만 약재(선충탄)와 미생물 혼합 처리구에 비해서는 다소 약한 것으로 조사되었다 (그림 88).

1차 조사



2차 조사

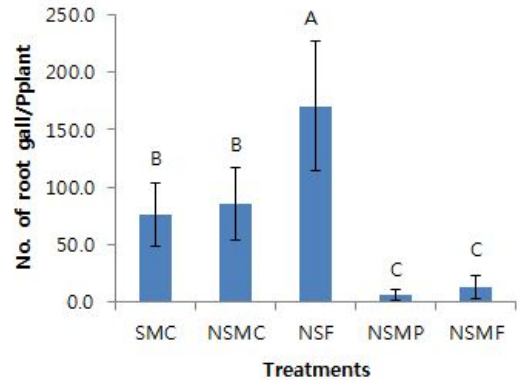


그림 88. 포트실험에서 뿌리혹 수.

토양멸균+미생물+계껍질 (SMC) 및 토양비멸균+미생물+계껍질 (NSMC) 처리구가 토양비멸균+비료 (NSF) 처리구에 비해 뿌리혹 수가 낮게 나타남.

1: 토양멸균+미생물+계껍질 (SMC), 2: 토양비멸균+미생물+계껍질 (NSMC), 3: 토양비멸균+비료 (NSF), 4: 토양비멸균+농약+미생물 (NSMP), 5 : 토양비멸균+농약+비료 (NSMF).

나. 작물체 성장 효과

(1) 지상부 생초장

항선충 미생물 대량배양복합체 시제품의 효과를 토마토 포트(pot) 실험을 통하여 검정 하였다. 토마토 정식 후 5주차 및 7주차에서 각각 토마토 생육 정도를 조사하였다. 조사 결과 토마토 생초장에서 1차 조사에서 토양비멸균+미생물+계껍질 (NSMC) 처구가 28.0 cm로 가장 높게 나타났고, 토양멸균+미생물+계껍질 (SMC) 처리구가 25.8 cm로 가장 낮게 나타났다. 하지만 1차 조사 결과의 통계적 유의성은 없었다. 2차 조사에서는 토양멸균+미생물+계껍질 (SMC) 처리구가 44.5 cm로 가장 높게 나타났다. 하지만 토양비멸균+미생물+계껍질 (NSMC)와의 통계적 유의성은 없었다. 2차 결과에서 농약 처리구인 토양비멸균+농약+미생물 (NSMP)와 토양비멸균+농약+비료 (NSMF)에서의 토마토 생육상태는 좋지 않은 것으로 보아 농약에 의한 약해 때문인 것으로 사료된다. 하지만 토양비멸균+농약+미생물 (NSMP) 처리구에 약재(선충탄) 처리에 의한 생육 지연 현상 극복을 토양비멸균+농약+비료 (NSMF) 처리구 보다 더 빠르게 하는 것으로 조사 되었다. 이는 약재 처리후 미생물 처리의 영향인 것으로 사료된다 (그림 89).

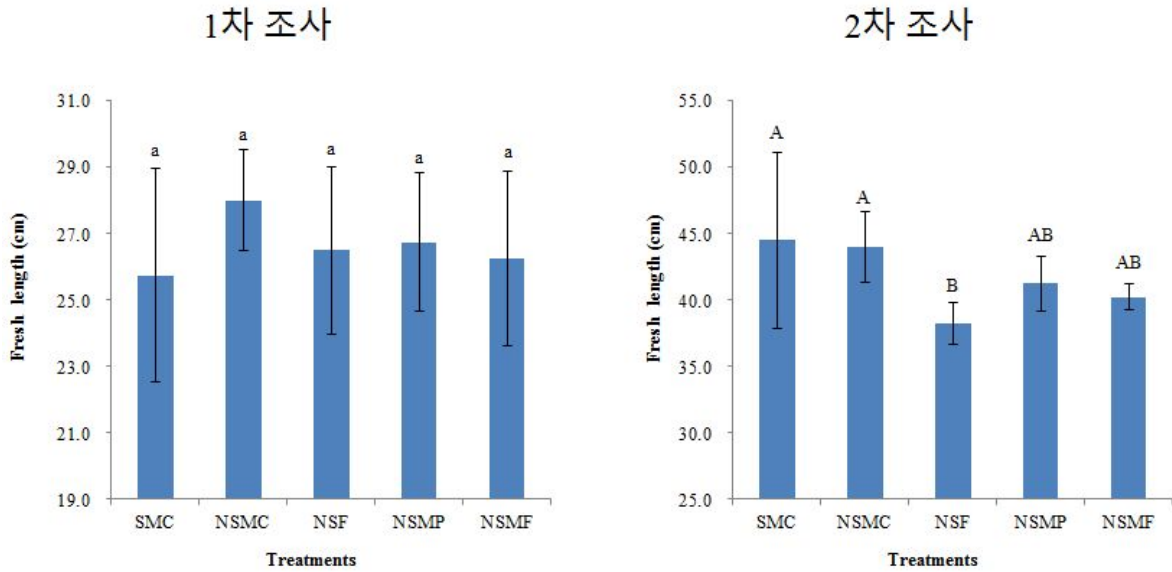


그림 89. 포트실험에서 토마토 생초장.

토양멸균+미생물+계껍질 (SMC) 및 토양비멸균+미생물+계껍질 (NSMC) 처리구가 토양비멸균+비료 (NSF) 처리구에 비해 생초장이 높게 나타남.

토양멸균+미생물+계껍질 (SMC), 토양비멸균+미생물+계껍질 (NSMC), 토양비멸균+비료 (NSF), 토양비멸균+농약+미생물 (NSMP), 토양비멸균+농약+비료 (NSMF).

(2) 지상부 생체중 및 건조중

항선충 미생물 대량배양복합체 시제품의 효과를 토마토 포트(pot) 실험을 통하여 검증 하였다. 토마토 정식 후 5주차 및 7주차에서 각각 토마토 생육 정도를 조사하였다. 조사 결과 토마토 생초장에서 1차 조사에서 토양비멸균+미생물+계껍질 (NSMC) 처리구가 12.1g으로 가장 높게 나타났고, 그 다음으로 토양멸균+미생물+계껍질 (SMC) 처리구, 토양비멸균+비료 (NSF) 처리구, 토양비멸균+농약+미생물 (NSMP) 처리구 및 토양비멸균+농약+비료 (NSMF) 처리구 순으로 나타났다. 2차 결과 토양멸균+미생물+계껍질 (SMC) 처리구, 토양비멸균+미생물+계껍질 (NSMC) 및 토양비멸균+농약+미생물 (NSMP) 처리구간 통계적 유의성이 없었으며, 토양비멸균+비료 (NSF) 처리구와 토양비멸균+농약+비료 (NSMF) 처리구 보다 생육정도가 좋았다 (그림 90).

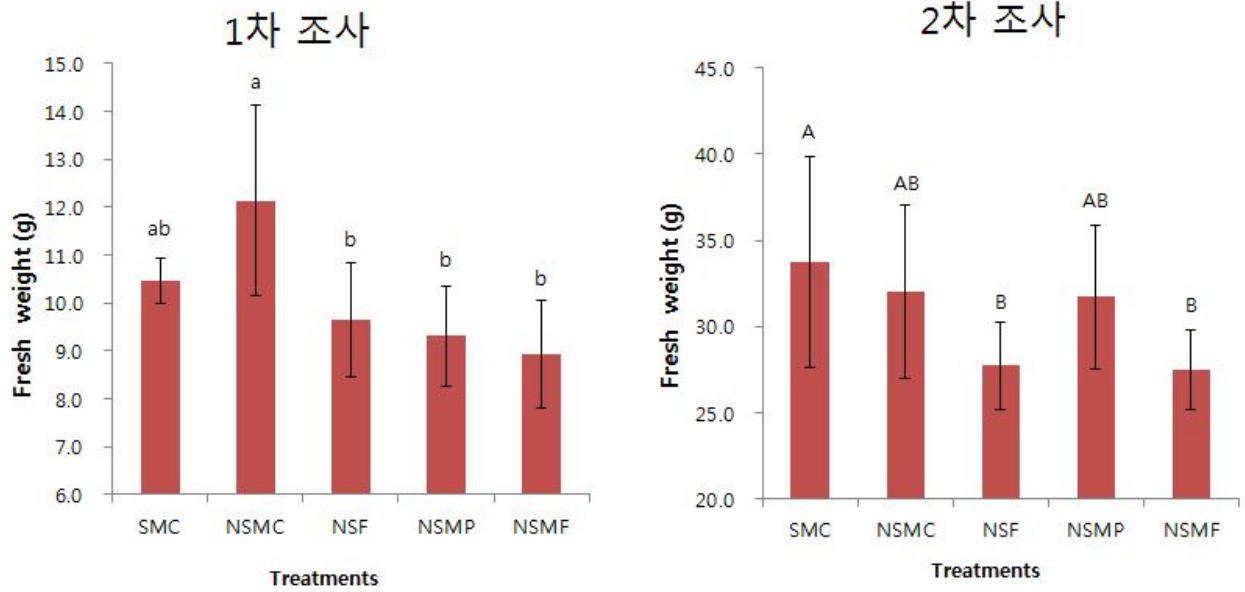


그림 90. 포트실험에서 토마토 생체중.

토양멸균+미생물+계껍질 (SMC) 처리구가 토양비멸균+비료 (NSF) 처리구에 비해 생체중이 높게 나타남.

토양멸균+미생물+계껍질 (SMC), 토양비멸균+미생물+계껍질 (NSMC), 토양비멸균+비료 (NSF), 토양비멸균+농약+미생물 (NSMP), 토양비멸균+농약+비료 (NSMF).

토마토 건체중 조사 결과 1차 조사와 2차 조사에서 토마토 생체중의 결과와 유사한 경향을 보였다. 2차 조사 결과 토양멸균+미생물+계껍질 (SMC) 처리구 3.8g, 토양비멸균+미생물+계껍질 (NSMC) 처리구 4.0g으로 나머지 다른 처리구에 비하여 높게 나타났다. 이러한 결과는 작물체 정식전 처리한 계껍질의 양분화와 미생물 배양액에 의한 영향으로 보인다 (그림 91).

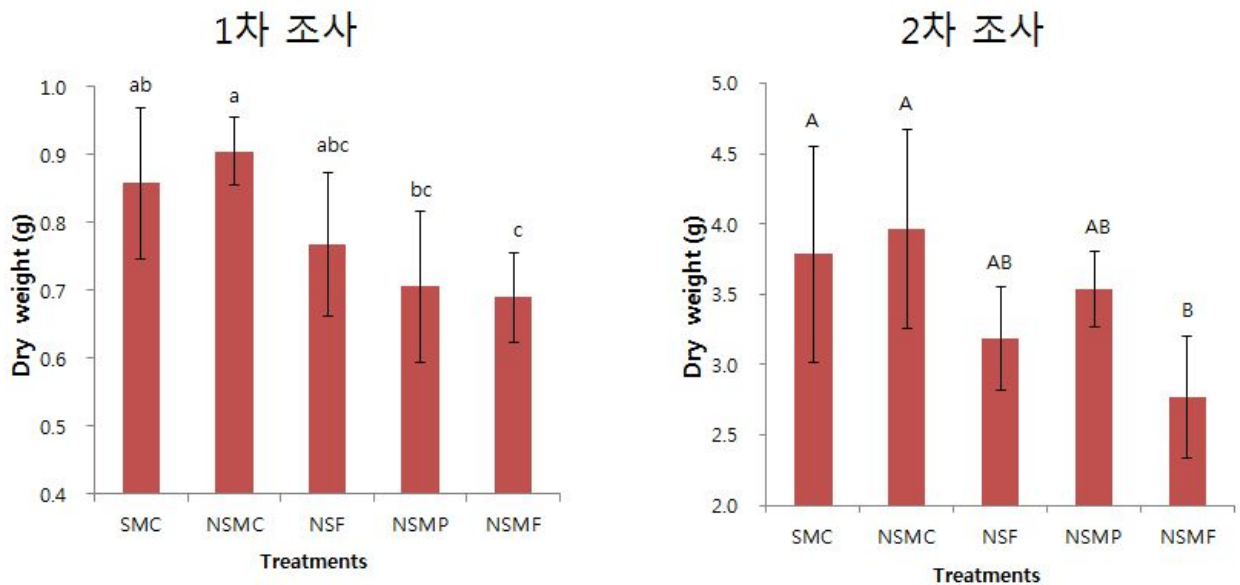


그림 91. 포트실험에서 토마토 건체중.

2차 조사 결과 처리구간 통계적 유의성이 나타나지 않음.

토양멸균+미생물+계껍질 (SMC), 토양비멸균+미생물+계껍질 (NSMC), 토양비멸균+비료 (NSF), 토양비멸균+농약+미생물 (NSMP), 토양비멸균+농약+비료 (NSMF).

다. 토양 내 및 작물체 효소 활성 및 토양 미생물 측정

(1) 토양내 chitinase 및 gelatinase 활성 측정

포트 실험에서 뿌리혹선충 방제 기작 규명을 위한 토양 키틴분해효소 (chitinase) 활성을 조사한 결과 1차 조사 (토마토 정식 5주 후)에서 토양멸균+미생물+계껍질 (SMC) 처리구가 0.50 Unit/g soil로 가장 높게 나타났지만, 토양비멸균+미생물+계껍질 (NSMC) 처리구와 통계적 유의성이 보이지 않았다. 2차 조사(토마토 정식 7주 후)에서는 토양멸균+미생물+계껍질 (SMC) 처리구와 토양비멸균+미생물+계껍질 (NSMC) 처리구간의 통계적 유의성이 나타났다. 2차 조사에서 토양멸균+미생물+계껍질 (SMC) 처리구가 0.80 Unit/g soil로 가장 높게 나타났고, 토양비멸균+농약+비료 (NSMF) 처리구에서 0.61 Unit/g soil로 가장 낮게 나타났다 (그림 92). 이 결과를 토대로한 토양 키틴분해효소 활성을 이용한 뿌리혹선충 억제와의 상관관계 규명은 어려웠다.

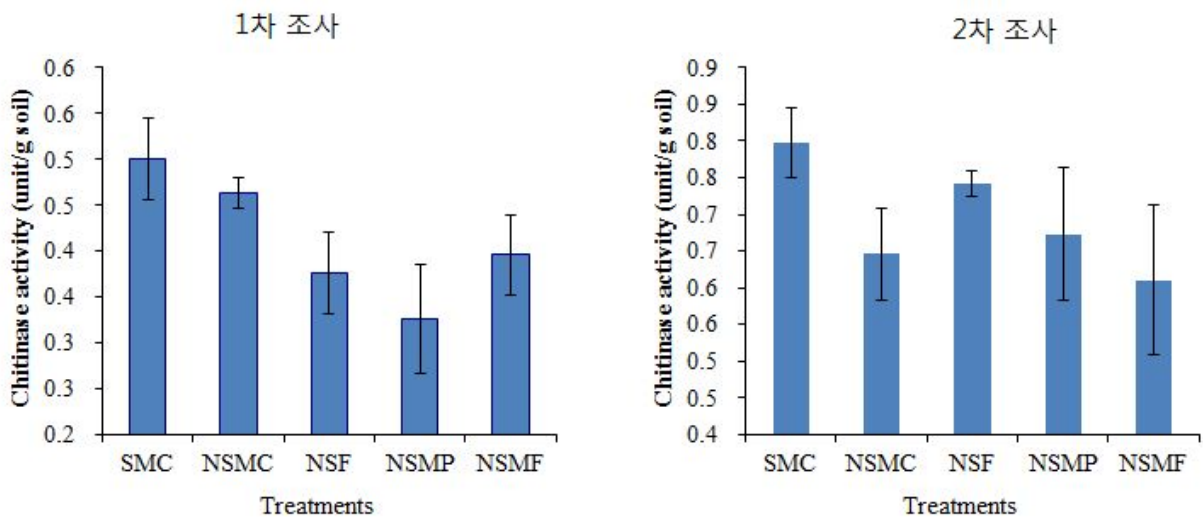


그림 92. 포트 실험에서의 토양 키틴분해효소 활성.

토양멸균+미생물+계껍질 (SMC), 토양비멸균+미생물+계껍질 (NSMC), 토양비멸균+비료 (NSF), 토양비멸균+농약+미생물 (NSMP), 토양비멸균+농약+비료 (NSMF).

포트 실험에서 뿌리혹선충 방제 기작 규명을 위한 토양 젤라틴분해효소 (gelatinase) 활성을 조사한 결과 1차 조사 (토마토 정식 5주 후)에서 토양멸균+미생물+계껍질 (SMC) 처리구가 1.18 Unit/g soil로 가장 높게 나타났다. 또한 토양비멸균+미생물+계껍질 (NSMC) 처리구는 1.17 Unit/g soil로 나타났다. 1차 조사 결과 토양멸균+미생물+계껍질 (SMC) 처리구와 토양비멸균+미생물+계껍질 (NSMC) 처리구가 토양에 계껍질이 처리되지 않은 토양비멸균+비료 (NSF), 토양비멸균+농약+미생물 (NSMP), 토양비멸균+농약+비료 (NSMF) 보다 젤라틴분해효소 활성이 높게 나타났다. 2차 조사 결과 또한 1차 조사 결과와 유사한 경향을 보였다 (그림 93).

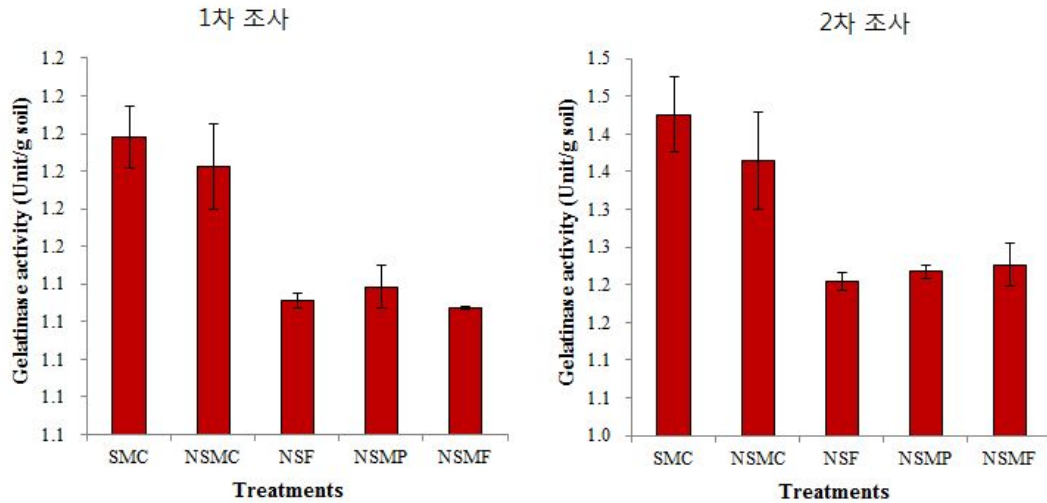


그림 93. 포트 실험에서의 토양 젤라틴분해효소 활성

토양미생물+미생물+계껍질 (SMC), 토양비미생물+미생물+계껍질 (NSMC), 토양비미생물+비료 (NSF), 토양비미생물+농약+미생물 (NSMP), 토양비미생물+농약+비료 (NSMF).

(2) 작물체 peroxidase 및 polyphenol oxidase

포트 실험에서 뿌리혹선충 방제 기작 규명을 위한 작물체(토마토) 항산화 효소인 peroxidase (POD) 활성을 조사한 결과 1차 조사 (토마토 정식 5주 후)에서 토양비미생물+비료 (NSF) 처리구에서 0.098 Unit/g FW로 가장 높게 나타났다. 하지만 토양비미생물+농약+비료 (NSMF)와의 통계적 유의성은 나타나지 않았다. 2차 조사 결과 (토마토 정식 7주 후)는 1차 조사의 효소 활성 결과 값보다 낮게 조사되었다. 이러한 결과를 종합해 볼 때 peroxidase 활성을 통하여 뿌리혹선충 억제 상관성은 판단하기 어려웠다 (그림 94).

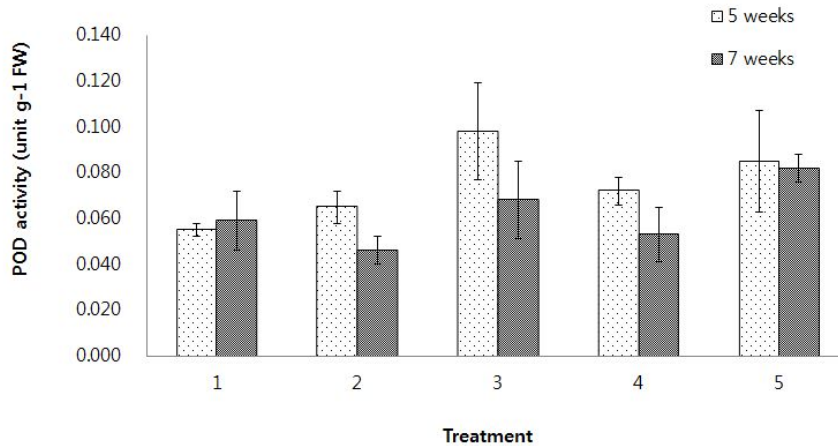


그림 94. 포트 실험에서의 작물체 peroxidase (POD) 활성.

1: 토양미생물+미생물+계껍질 (SMC), 2: 토양비미생물+미생물+계껍질 (NSMC), 3: 토양비미생물+비료 (NSF), 4: 토양비미생물+농약+미생물 (NSMP), 5 : 토양비미생물+농약+비료 (NSMF).

포트 실험에서 뿌리혹선충 방제 기작 규명을 위한 작물체(토마토) 항산화 효소인 polyphenol oxidase (PPO) 활성을 조사한 결과 1차 조사 (토마토 정식 5주 후) 결과와 2차 조사 결과 (토마토 정식 7주

후)가 상반되고, 일관성이 보이지 않았다. 이러한 결과를 볼 때 polyphenol oxidase 활성을 통하여 뿌리혹선충 억제 상관성은 판단하기 어려웠다 (그림 95).

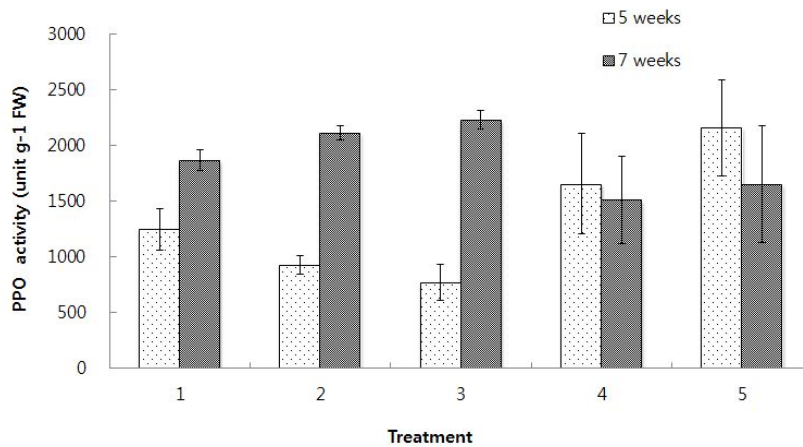


그림 95. 포트 실험에서의 작물체 polyphenol oxidase (PPO) 활성.

1: 토양벌균+미생물+계껍질 (SMC), 2: 토양비벌균+미생물+계껍질 (NSMC), 3: 토양비벌균+비료 (NSF), 4: 토양비벌균+농약+미생물 (NSMP), 5 : 토양비벌균+농약+비료 (NSMF).

(3) 작물체 β -1,3-glucanase 및 chitinase

포트 실험에서 뿌리혹선충 방제 기작 규명을 위한 작물체(토마토) 병방제 효소인 키틴분해효소 (chitinase) 활성을 조사한 결과 1차 조사 (토마토 정식 5주 후)에서 토양비벌균+미생물+계껍질 (NSMC) 처리구가 49.41 Unit/g FW로 가장 높게 나타났다. 하지만 다른 처리구간 통계적 유의성은 보이지 않았다. 2차 조사 결과 (토마토 정식 7주 후) 토양비벌균+미생물+계껍질 (NSMC) 처리구가 116.33 Unit/g FW로 가장 높게 나타났다. 2차 조사 결과 1차 조사 보다 키틴분해효소 활성이 2배 이상 증가 하였다. 토양비벌균+농약+비료 (NSMF) 처리구에서 73.12 Unit/g FW로 가장 낮게 나타났다. 키틴분해효소는 작물체 병방제 효소로써 높은 활성을 보일 수록 병방제 효과가 있는 것으로 알려져있다 (그림 96).

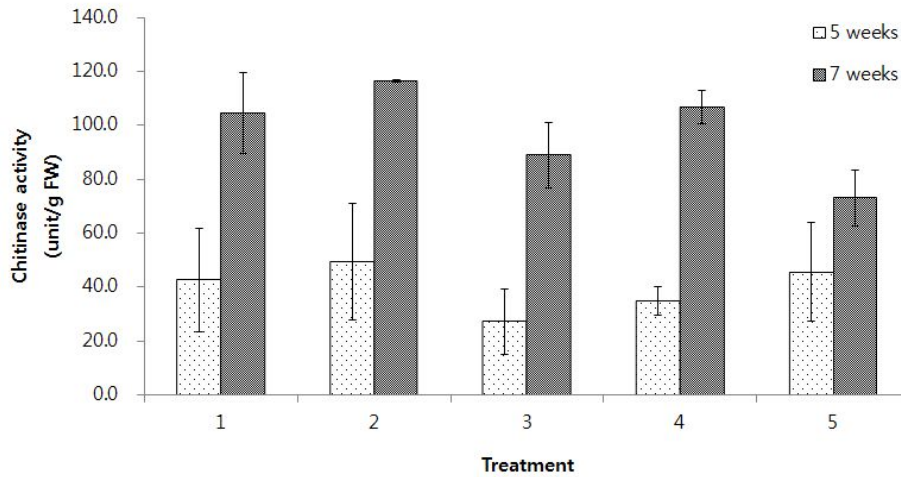


그림 96. 포트 실험에서의 작물체 키틴분해효소 활성.

1: 토양벌균+미생물+계껍질 (SMC), 2: 토양비벌균+미생물+계껍질 (NSMC), 3: 토양비벌균+비료 (NSF), 4: 토양비벌균+농약+미생물 (NSMP), 5 : 토양비벌균+농약+비료 (NSMF)

포트 실험에서 뿌리혹선충 방제 기작 규명을 위한 작물체(토마토) 병방제 효소인 글루칸효소 (glucanase) 활성을 조사한 결과 1차 조사 (토마토 정식 5주 후)에서 모든 처리구간 통계적 유의성은 보이지 않았다. 2차 조사 결과 (토마토 정식 7주 후) 토양비벌균+미생물+계껍질 (NSMC) 처리구가 252.54 Unit/g FW로 가장 높게 나타났다. 글루칸효소는 작물체 병방제 효소로서 높은 활성을 보일수록 병방제 효과가 있는 것으로 알려져있다 (그림 97).

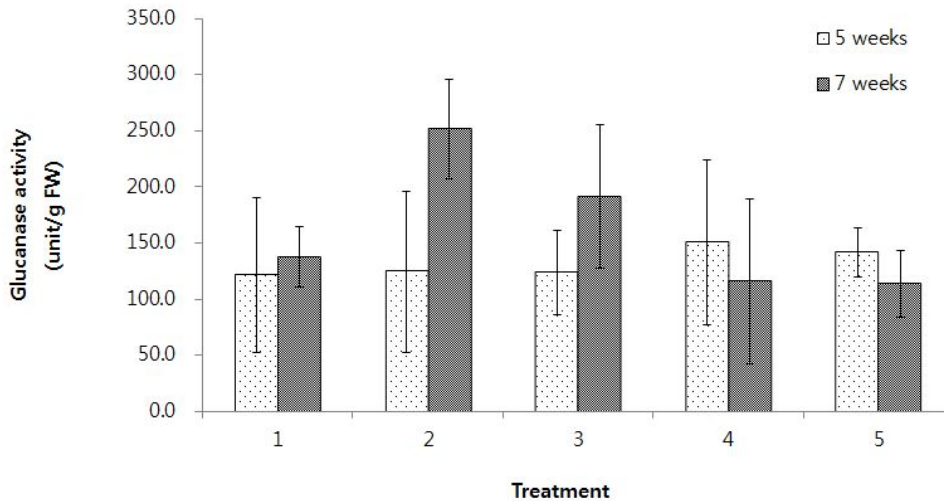


그림 97. 포트 실험에서의 작물체 글루칸분해효소 (glucanase) 활성.

1: 토양벌균+미생물+계껍질 (SMC), 2: 토양비벌균+미생물+계껍질 (NSMC), 3: 토양비벌균+비료 (NSF), 4: 토양비벌균+농약+미생물 (NSMP), 5 : 토양비벌균+농약+비료 (NSMF).

(4) 토양 키틴분해미생물 및 젤라틴분해미생물 수

작물체 포트 실험에서 뿌리혹선충 방제에 관한 기작을 찾기 위해 토양내 키틴분해미생물 및 젤라틴분해 미생물 수를 조사하였다. 각각의 미생물 조사는 키틴배지 아가배지와 젤라틴 아가 배지를 이용하였다. 조사 결과 1차 조사 (5주차)와 2차 조사 (7주차) 결과가 유사한 경향을 보였다. 2차 조사 결과 토양내 키틴분해 미생물 수는 토양멸균+미생물+계껍질 (SMC) 처리구에서 140 ($\times 10^5$ CFU/g soil) 개체수로 가장 높게 나타났다. 가장 낮은 키틴분해 미생물 수로는 토양비멸균+농약+미생물 (NSMP) 처리구로 27.5 ($\times 10^5$ CFU/g soil) 개체수로 나타났다. 2차 조사 젤라틴분해 미생물 개체수는 키틴분해 미생물 개체수와 유사한 경향을 보였다. 토양에 계껍질이 첨가되고 미생물 배양액을 처리한 토양멸균+미생물+계껍질 (SMC), 토양비멸균+미생물+계껍질 (NSMC) 처리구가 상대적으로 농약 및 비료 처리구에 비해 높은 토양내 키틴분해 및 젤라틴 미생물 밀도를 보였다 (그림 98).

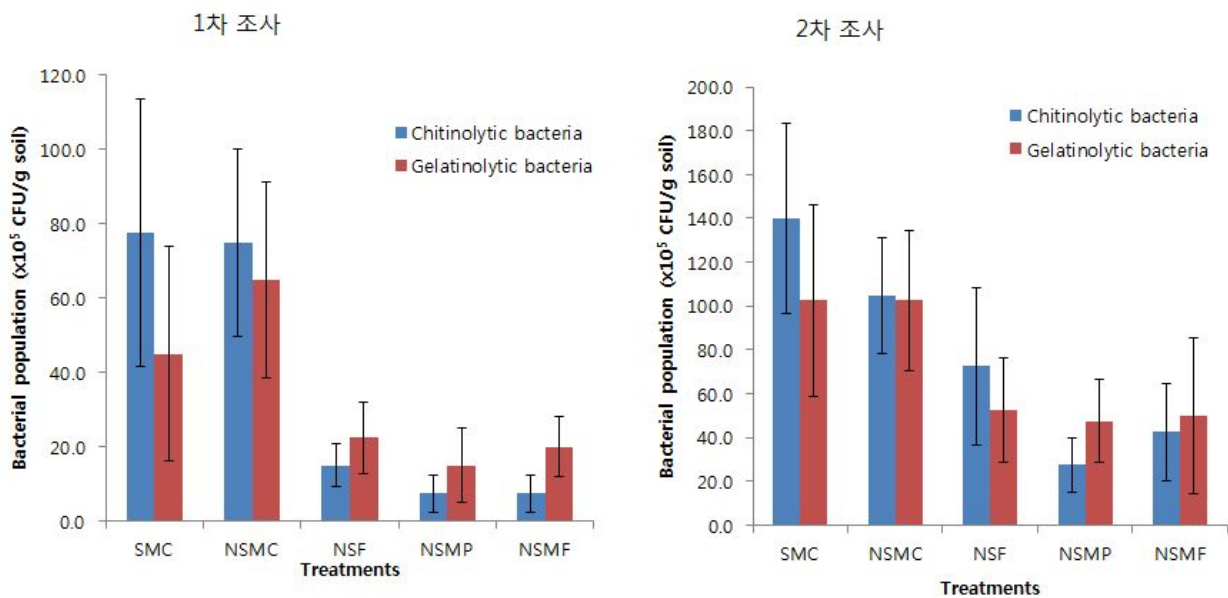


그림 98. 포트실험에서 토양 키틴분해미생물 및 젤라틴분해 미생물 수. 토양멸균+미생물+계껍질 (SMC), 토양비멸균+미생물+계껍질 (NSMC), 토양비멸균+비료 (NSF), 토양비멸균+농약+미생물 (NSMP), 토양비멸균+농약+비료 (NSMF).

1-2. 토마토 작물에서의 선충 억제 활성 및 작물 성장 효과 조사 (2차 실험)

미생물 배양액 (*L. casici* YS1215) 처리가 식물성장 및 뿌리혹선충 방제에 미치는 영향을 알아보기 위해 토마토(*Lycopersicon esculentum*) 씨앗을 상토 (바이오 베스트; 홍농종묘)와 함께 0.54 × 0.45 cm 트레이에 심었다. 발아 후 4주된 토마토를 900 g의 토양 (흙/모래/버미큘라이트, 2:1:1)이 들어있는 포트 (10 × 15 cm)에 옮겨 심은 후 pipette를 이용하여 100 마리의 선충 유충과 500 개 정도의 알을 접종하였다. 총 5 개의 처리구를 만들어 실험을 수행하였다. 미생물 처리구 (이하 M 처리구)는 선충 접종 후 10 일마다 YS1215 배양액을 50 ml 처리하였다. 그 외 처리구는 미생물 배양액과 유기충제 ECOⅡ((주)푸르네) 500배액을 함께 처리한 M+500 처리구, 미생물 배양액과 유기충제 ECOⅡ((주)푸르네) 1,000배액을 처리한 M+1,000 처리구, 복합비료 (N:P:K; 21:17:17; 남해화학, 한국) 3 g/L를 물에 녹여서 처리한 비료 처리구 (이하 F 처리구), 물 처리구 (이하 W 처리구)가 있으며 이들 또한 각각 50 ml씩 처리하였다. 처리 5주와 8주 후 각 처리구별로 식물 성장 조사항목인 지상부 길이, 지상부 무게, 건물중 무게를 측정하였고, 선충 피해 조사항목인 뿌리혹수, 난낭수, 토양내 유충수를 측정하였다. 또한 토양내 키틴분해 및 젤라틴분해 미생물수, 토양내 효소활성 등을 조사하였다 (그림 99).



그림99. 토마토 포트 실험 2차 모습.



M : 항선충미생물 대량배양복합체 배양액, M+ 500 : 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 + 친환경 증제(ECOII) 500배액, M+ 1000 : 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 + 친환경 증제(ECOII) 1000배액, F : 복합비료 처리, W : 물처리.

그림 100. 토마토 포트 실험 뿌리 모습.

가. 작물체 선충 억제 활성

(1) 토양내 선충 밀도 억제 효과

L. capsici YS1215 배양액 처리가 토양 내 선충 유충에 미치는 영향을 조사한 결과 5주째 F 처리구와 W 처리구에서 681.3 개, 621.3 개로 각각 조사되었다. YS1215 배양액을 포함하는 M+500, M+1,000, M 처리구에서 410.7 개, 483.6 개, 494.7 개를 각각 나타냈다. 8주째에도 비슷한 결과를 보였으며 F 처리구에서는 525.3 개로 가장 높게 조사되었다. 통계적으로 조사 8주째 M, M+500 및 M+1000 처리구가 F 처리구와 유의성이 있었다 (그림 101).

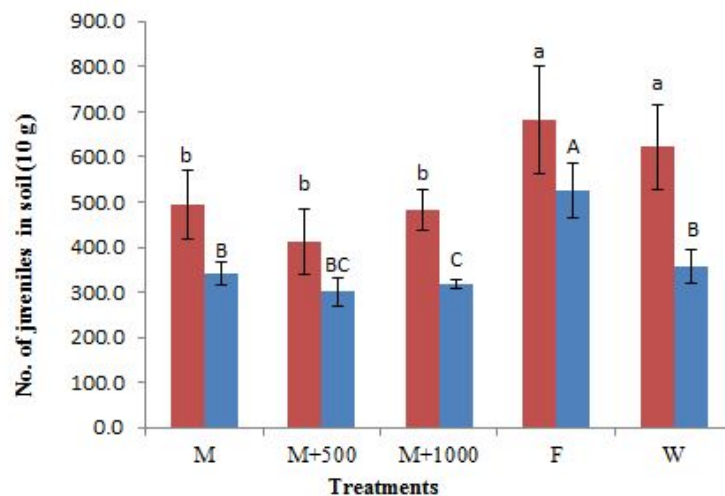


그림101. 토양내 뿌리혹선충 유충 수.

M, M+500 및 M+1000 처리구가 F 및 W 처리구보다 선충 유충수가 낮게 조사되었음.
M : 항선충미생물 대량배양복합체 배양액, M+500 : 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 +친환경 증제(ECOII) 500배액, M+1000 : 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 +친환경 증제(ECOII) 1000배액, F : 복합비료 처리, W : 물처리.

(2) 작물체 선충감염 억제효과

난낭수를 측정된 결과 5주째 1차 조사에서 M+500 처리구에서 가장 낮은 1.56 개의 난낭수를 나타내었고 M+1,000, M, F 처리구의 순으로 2.0 개, 2.4 개, 3.3 개로 측정되었다. 8주째에는 M+500 처리구가 15.2 개로 가장 낮았고 F 처리구가 31.6 개로 가장 많은 난낭수를 보였다. 통계적으로 조사 8주째 M, M+500 및 M+1000 처리구가 F 처리구와 유의성이 있었다 (그림 102).

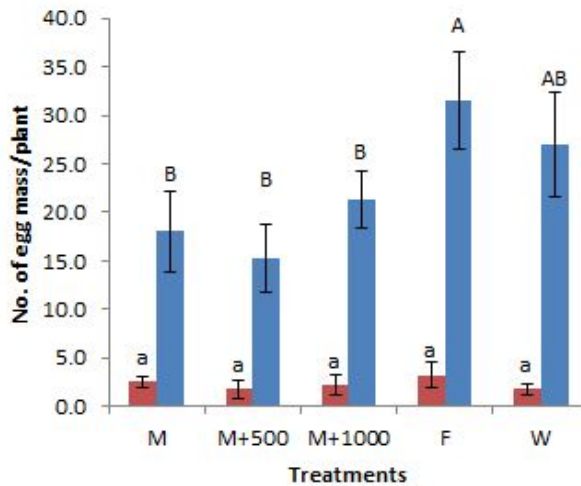


그림102. 작물체 감염 난낭 수.

M, M+500 및 M+1000 처리구가 F 및 W 처리구보다 난낭수가 낮게 조사되었음.
M : 항선충 미생물 대량배양복합체 배양액, M+500 : 항선충 미생물 대량배양복합체 배양액 +친환경 증제(ECOII) 500배액, M+1000 : 항선충 미생물 대량배양복합체 배양액 +친환경 증제(ECOII) 1000배액, F : 복합비료 처리, W : 물처리.

L. capsici YS1215 배양액 처리가 뿌리혹선충에 의해 형성되는 토마토 뿌리혹수와 난낭수에 미치는 영향을 조사하기 위해 포트실험에서 선충 접종 5주 후와 8주 후 각 처리구별 토마토 뿌리혹수와 난낭의 수를 조사하였다. 조사결과 Fig. 6에서 보는바와 같이 조사 5주째 1차 조사에서는 F 처리구에서 28.4 개로 가장 많은 뿌리혹수를 보였다. M 처리구, M+1,000 처리구, W 처리구, M+500 처리구가 각각 17.6 개, 16.4 개, 15.8 개, 15.4 개의 뿌리혹수로 조사되었다. 8주째에는 F 처리구가 59.6 개로 가장 많았고 YS1215 배양액이 포함된 M, M+1,000, M+500 처리구는 평균 34개 정도로 조사되었다. M+500 처리구의 경우 1, 2차 모두 가장 낮은 뿌리혹수를 보였고 W 처리구에는 42.6으로 비록 F 처리구에 비해서는 적었지만 다른 처리구에 비해서는 많은 혹수를 보였다. 또한 조사 8주째 통계적으로 M, M+500 및 M+1000 처리구가 F 처리구와 유의성이 있었다 (그림 103).

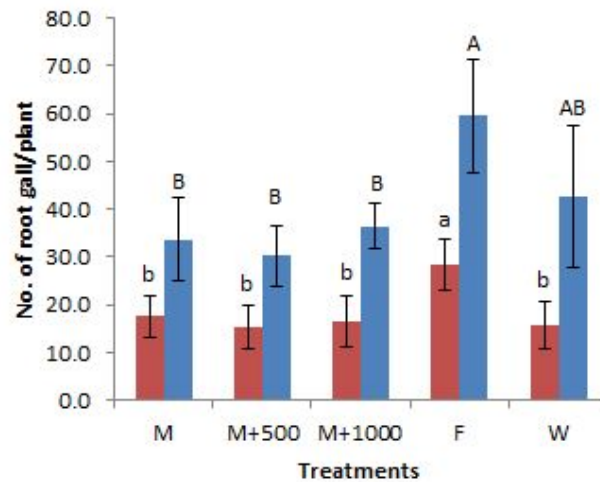


그림 103. 작물체 감염 뿌리혹 수.

M, M+500 및 M+1000 처리구가 F 및 W 처리구보다 뿌리혹 수가 낮게 조사되었음.

M : 항선충 미생물 대량배양복합체 배양액, M+500 : 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 +친환경 충제(ECOII) 500배액, M+1000 : 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 +친환경 충제(ECOII) 1000배액, F : 복합비료 처리, W : 물처리.

나. 작물체 성장 효과

(1) 지상부 생초장

가. 지상부 생초장

L. capsici YS1215 배양액 처리가 식물생장에 미치는 영향을 조사하기 위해 포트 실험에서 선충 접종 5주 후와 8주 후 각 처리구별 토마토 지상부 길이와 무게를 측정하였다. Fig. 3에서 보는바와 같이 5주째 토마토 지상부 길이는 M 처리구가 41.5 cm로 가장 높았고, M+1,000 처리구와 F 처리구가 40.0 cm의 초장을 보이며 M 처리구와 큰 차이를 보이지 않았다. M+500 처리구는 38.5 cm로 조사되었으며 W 처리구는 35.4 cm로 가장 낮은 키를 나타냈다. 8주째 2차 측정에는 역시 M 처리구가 52.5 cm로 가장 높았으며, M+1,000 처리구, M+500 처리구, F 처리구가 각각 48.8, 48.7, 47.0 cm로 비슷한 크기를 보였으며 W 처리구가 39.4 cm로 초장이 가장 낮았다. 또한 통계적으로 M 처리구가 F 처리구와 유의성이 있었다 (그림 104).

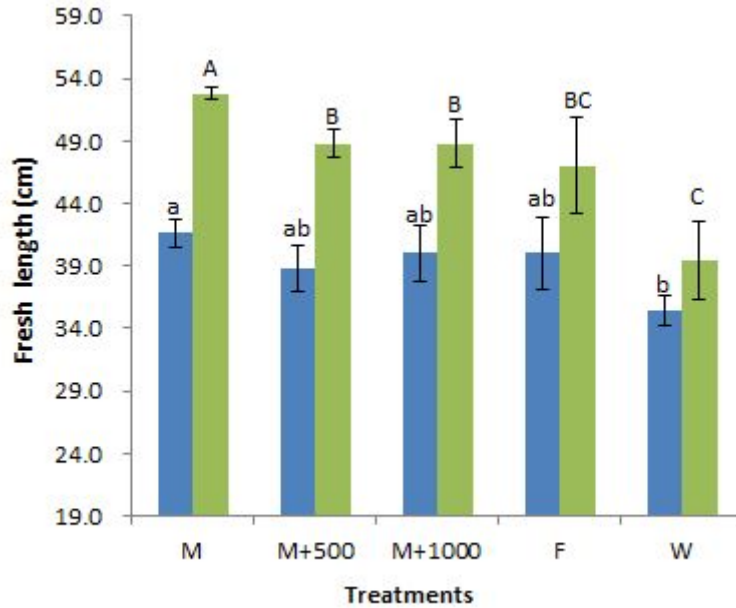


그림 104. 토마토 작물체 생초장.

M처리구가 생초장이 가장 높았음.

M : 항선충미생물 대량배양복합체 배양액, M+500 : 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 +친환경 증제(ECOII) 500배액, M+1000 : 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 +친환경 증제(ECOII) 1000배액, F : 복합비료 처리, W : 물처리.

(2) 지상부 생체중 및 건조중

Fig. 4에서 보는바와 같이 토마토 작물의 생체중을 측정한 결과 5주째에는 M 처리구가 19.2 g으로 가장 높았고, 그 다음으로 F 처리구 19.1 g, M+1,000처리구 17.7 g, M+500 처리구가 17.4 g 순으로 나타났다. W 처리구는 10.6 g으로 처리구 가운데 가장 낮은 것으로 조사되었다. 8주째에는 M 처리구가 27.6 g으로 가장 높았고 M+1,000, F, M+500 처리구가 25.8, 25.0, 23.9 g 순으로 조사되었으며 2차 조사에서도 마찬가지로 W 처리구가 가장 낮은 것으로 조사되었다 하지만 통계적으로 M 처리구가 F 처리구와 유의성이 없었다(그림 105).

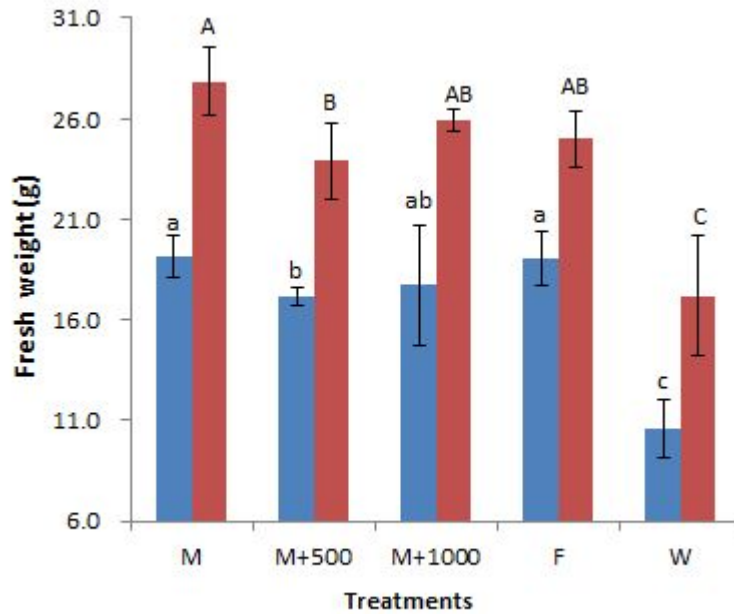


그림 105. 토마토 작물체 생체중.

M처리구가 생체중이 가장 높았음.

M : 항선충미생물 대량배양복합체 배양액, M+500 : 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 +친환경 증제(ECOII) 500배액, M+1000 : 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 +친환경 증제(ECOII) 1000배액, F : 복합비료 처리, W : 물처리.

토마토 건물중 조사결과는 그림 107에서 보는바와 같이 조사 1차, 2차 모두 M 처리구가 가장 높게 나타났지만 각각의 처리구간 차이가 0.5g 정도로 모두 비슷한 값을 보였다. 또한 조사 8 주째 모든 처리구간 통계적 유의성이 없었다 (그림 106).

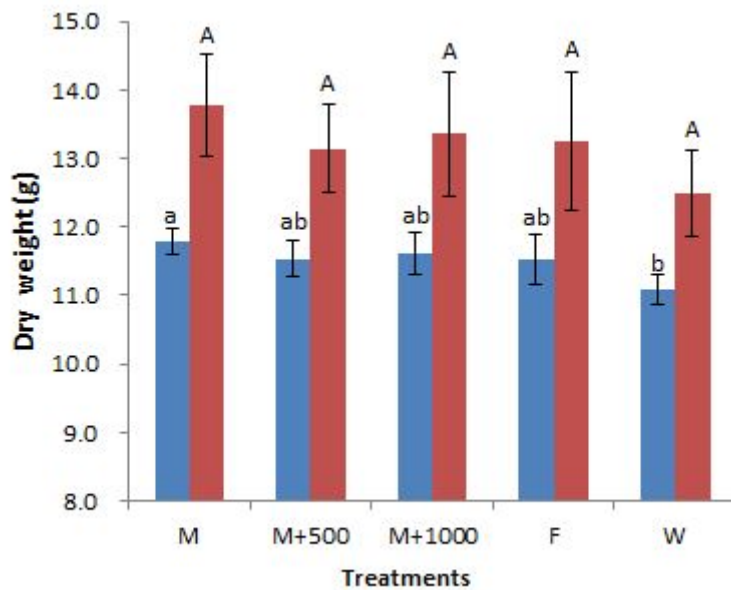


그림 106. 토마토 작물체 건체중.

건체중은 모든 처리구가 통계적 차이가 없었음.

M : 항선충미생물 대량배양복합체 배양액, M+500 : 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 +친환경 증제(ECOII) 500배액, M+1000 : 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 +친환경 증제(ECOII) 1000배액, F : 복합비료 처리, W : 물처리.

다. 토양 내 및 작물체 효소 활성 및 토양 미생물 측정

(1) 토양내 chitinase 및 gelatinase 활성 측정

Chitinase activity 결과도 5주째 1.84 Unit/g soil, 8주째에 1.81 Unit/g soil로 M 처리구에서 가장 높은 수치를 보였고 F, W 처리구가 낮은 수치를 나타냈다. 이는 Chitinolytic bacteria의 결과에서 보여주는 경향과 일치한다. Gelatinase activity 결과도 5주째 1.29 Unit/g soil, 8주째에 1.28 Unit/g soil로 M 처리구에서 가장 높은 수치를 보였고 F, W 처리구가 낮은 수치를 나타냈다. 이는 gelatinolytic bacteria의 결과에서 보여주는 경향과 일치한다 (표 18).

표 18. 토양내 키틴분해효소(chitinase) 및 젤라틴분해효소(gelatinase)활성 변화.

Treatments	Chitinase activity (Unit/ g soil)	Gelatinase activity (Unit /g soil)
5 weeks		
M	1.84±0.21	1.29±0.02
M+ 500	1.80±0.09	1.26±0.01
M+ 1,000	1.72±0.14	1.26±0.02
F	1.69±0.07	1.26±0.01
W	1.60±0.05	1.22
8 weeks		
M	1.81±0.21	1.28
M+ 500	1.62±0.03	1.26
M+ 1,000	1.64±0.14	1.25
F	1.49±0.06	1.24
W	1.32±0.02	1.23

*M : 항선충미생물 대량배양복합체 배양액, M+ 500 : 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 +친환경 증제(ECOII) 500배액, M+ 1000 : 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 +친환경 증제(ECOII) 1000배액, F : 복합비료 처리, W : 물처리.

(2) 작물체 peroxidase 및 polyphenol oxidase

뿌리혹선충 억제 기작과 상관관계가 있는 식물체내 과산화효소 (Peroxidase, POD) 및 폴리페놀 산화효소(polyphenol oxidase, PPO) 활성을 조사하였다. POD 활성은 5주차에 0.41 unit g/ FW 로 F 처리구가 가장 높았으며, M 처리구가 0.13 unit g/ FW으로 가장 낮은 수치를 보였다. 8주차에는 F 처리구가 0.75 unit g/ FW로 가장 높은 수치였고 M 처리구가 0.61 unit g/ FW으로 가장 낮았다.(그림 107(a)). PPO 활성은 5주차에 M 처리구가 1969.3 unit g/ FW로 가장 낮았으며 W 처리구가 3856.7 unit g/ FW로 가장 높은 수치를 나타냈고 F 처리구가 3650.7 unit g/ FW로 두 번째로 높았으며, 8주차에는 M+500 처리구가 3378.7 unit g/ FW로 가장 낮았고 W와 F 처리구가 5039.7, 4974.7 unit g/ FW로 가장 높았다 (그림 107(b)).

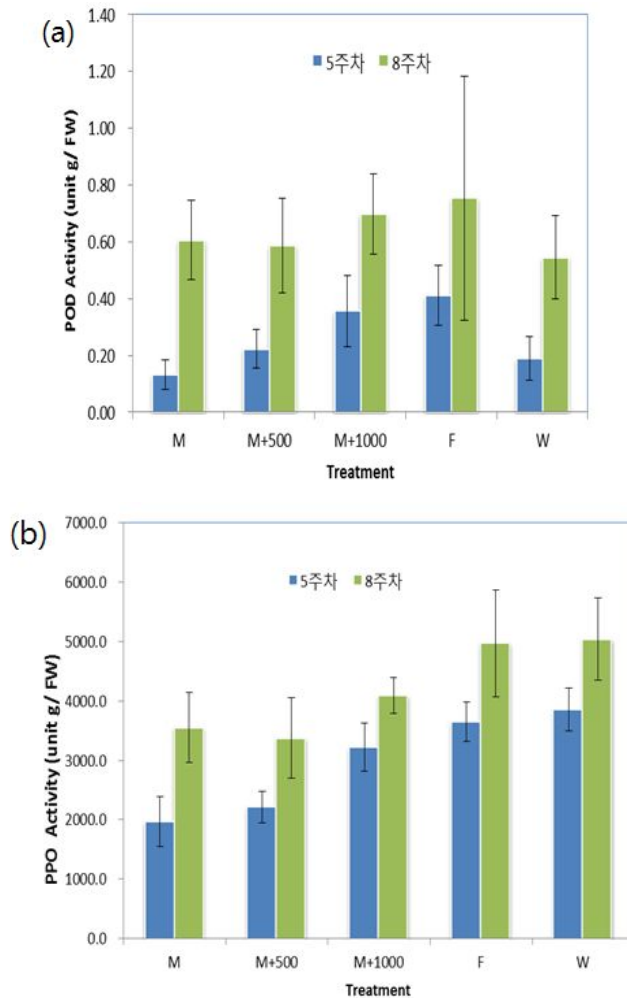


그림 107. 작물체 peroxidase (POD, a) 및 polyphenol oxidase(PPO, b) 활성.

M : 항선충미생물 대량배양복합체 배양액, M+500 : 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 +친환경 증제(ECOII) 500배액, M+1000 : 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 +친환경 증제(ECOII) 1000배액, F : 복합비료 처리, W : 물처리.

(3) 작물체 β -1,3-glucanase 및 chitinase

뿌리혹선충 억제 기작과 상관관계가 있는 식물체내 키틴분해효소(chitinase), 글루칸분해 효소 (glucanase) 활성을 조사하였다. Chitinase 활성은 5주차에 M+500 처리구가 27.95 unit g/ FW의 수치로 가장 높았으며, 그 다음은 M 처리구가 26.71 unit g/ FW 였으며, M+1,000 처리구가 23.13 unit g/ FW으로 가장 낮은 수치를 보였다. 8주차에는 5주차에서 가장 높았던 M+500 처리구가 23.20 unit g/ FW로 가장 낮은 수치를 보였고, W 처리구가 28.19 unit g/ FW로 수치가 높아졌다 (그림 108(a)). β -1,3-glucanase 활성은 5주, 8주 모두 W 처리구가 가장 높은 수치를 나타냈고 5주차에 비해 8주차때 수치가 증가하였다. 그리고 가장 낮은 수치는 5주, 8주차 모두 M 처리구로 나타났다 (그림 108(b)).

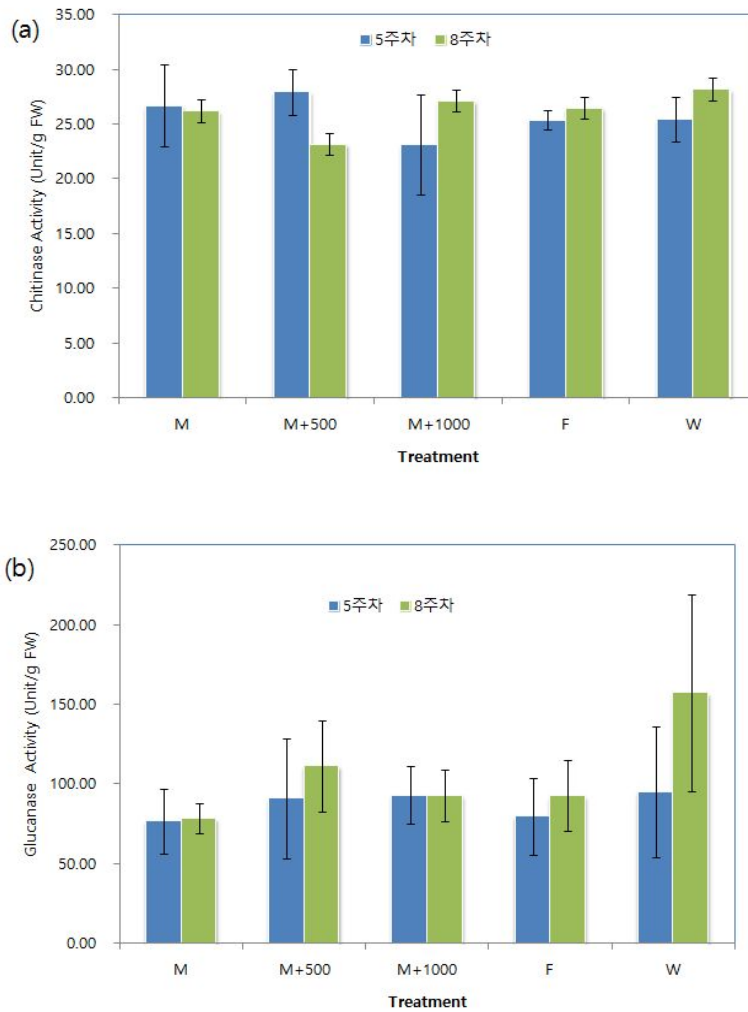


그림 108. 작물체 chitinase (a) 및 glucanase (b) 활성.

M : 항선충미생물 대량배양복합체 배양액, M+500 : 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 +친환경 충제(ECOII) 500배액, M+1000 : 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 +친환경 충제(ECOII) 1000배액, F : 복합비료 처리, W : 물처리.

(4) 토양 키틴분해미생물 및 젤라틴분해미생물 수

Chitinolytic bacteria의 경우 5주차에 M 처리구에서 6.0×10^4 CFU/g soil로 다른 처리구에 비해 높은 수치를 보였고 F 처리구에서 2.0×10^4 CFU/g soil, W 처리구에 1.0×10^4 CFU/g soil로 M 처리구에 비해 낮은 것으로 조사되었다(표 19). 8주차에도 M 처리구가 14.0×10^4 CFU/g soil로 가장 높았고, M+500, M+1,000 처리구가 12.0×10^4 CFU/g soil, F 처리구가 6.0×10^4 CFU/g soil, W 처리구가 3.0×10^4 CFU/g soil로 각각 조사되었다. Gelatinolytic bacteria의 경우 5주차에 M 처리구에서 25.0×10^4 CFU/g soil로 다른 처리구에 비해 높은 수치를 보였고 F 처리구에서 13.0×10^4 CFU/g soil, W 처리구는 11.0×10^4 CFU/g soil로 낮은 수치를 보였다 (표 19). 8주차에도 M 처리구가 10.0×10^4 CFU/g soil로 가장 많았고, M+1,000 처리구에서 9.0×10^4 CFU/g soil, M+500 처리구가 8.0×10^4 CFU/g soil의 결과를, F 와 W 처리구가 5.0×10^4 CFU/g soil로 가장 낮았다.

표 19. 토양내 키틴분해미생물(chitinolytic bacteria) 및 젤라틴분해미생물 (gelatinolytic bacteria) 변화.

Treatments	Chitinolytic bacteria (CFU/ g soil, x 10 ⁴)	Gelatinolytic bacteria (CFU/ g soil, x 10 ⁴)
5 weeks		
M	6±2	25±5
M+ 500	5±1	21±6
M+ 1,000	4±1	20±7
F	2±1	13±4
W	1	11±2
8 weeks		
M	14±3	10±3
M+ 500	12±3	8±2
M+ 1,000	12±3	9±2
F	6±3	5±2
W	4±2	5±2

*M : 향선중미생물 대량배양복합체 배양액, M+ 500 : 향선중미생물 대량배양복합체 배양액 + 친환경 충제(ECOII) 500배액, M+ 1000 : 향선중미생물 대량배양복합체 배양액 + 친환경 충제(ECOII) 1000배액, F : 복합비료 처리, W : 물처리.

2. 멜론 작물

2-1. 멜론 작물에서의 선충 억제 활성 및 작물 성장 효과 조사 (1차실험)

항선충 미생물 대량배양복합체 시제품의 효과를 멜론 포트(pot) 실험을 통하여 검증 하였다. 포트 재배 실험을 위해서 4주된 멜론 모종을 900 g의 토양이 들어있는 포트에 옮겨 심고, 1, 2, 3, 4주 후에 아래와 같이 각각의 처리구 별로 처리하였다. 상업적으로 판매하는 농약은 1주 후에 한번만 처리하였다. 모든 처리구는 1 주 후에 포트 당 대략 1,000 마리 유충과 5,000개의 알을 접종한다. 포트 실험 기간 동안에 생초장, 생체중, 건물중, 뿌리 무게, 토양 내 유충 수, 토마토 뿌리의 난상 수와 흑 등을 조사한다.

■ 처리구

- 1 : SMC; 토양멸균+항선충 미생물 대량배양복합체배양액+게껍질 --> 토양을 포트에 옮기기 전 토양과 게껍질을 멸균한 뒤 포트에 옮기고, 토마토 정식 후 항선충 미생물 대량배양복합체 배양액을 주기적으로 처리하였다.
- 2 : NSMC; 토양비멸균+항선충 미생물 대량배양복합체 배양액+게껍질 --> 토양을 멸균하지 않고 토양에 게껍질을 처리한 뒤 포트에 옮기고, 토마토 정식 후 항선충 미생물 대량배양복합체 배양액을 주기적으로 처리하였다.
- 3 : NSF; 토양비멸균+비료 --> 멸균하지 않은 토양을 사용하였고, 토마토 정식 후 복합비료를 주기적으로 처리하였다.
- 4 : NSMP; 토양비멸균+농약+항선충 미생물 대량배양복합체 배양액 --> 멸균하지 않은 토양을 사용하였으며, 농약(선충탄)을 1회 처리한 후 항선충 미생물 대량배양복합체 배양액을 주기적으로 처리하였다.
- 5 : NSMF; 토양비멸균+농약+비료 --> 멸균하지 않은 토양을 사용하였으며, 농약(선충탄)을 1회 처리한 후 복합비료를 주기적으로 처리하였다.



1 2 3 4 5

- 1 : 토양멸균+미생물+계껍질
- 2 : 토양비멸균+미생물+계껍질
- 3 : 토양비멸균+비료
- 4 : 토양비멸균+농약+미생물
- 5 : 토양비멸균+농약+비료

→ 농약-선충탄-1회처리
미생물배양액 및 비료- 1주간격 처리

그림 109. 포트 실험 멜론 시료 생육 모습.

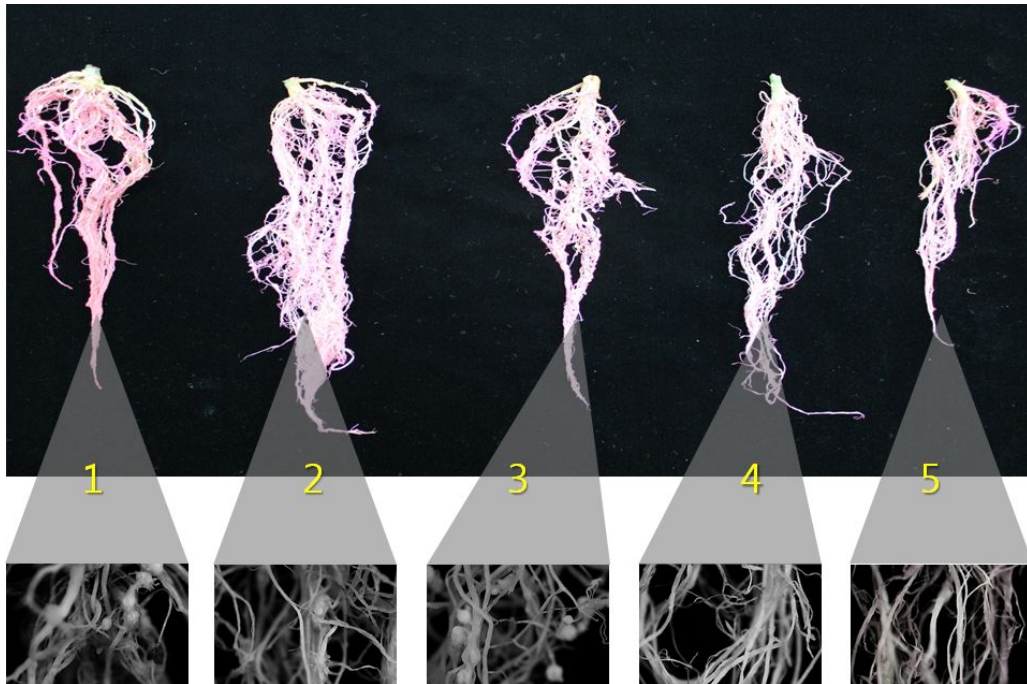


그림 110. 포트 실험 멜론 시료 뿌리 모습.

가. 작물체 선충 억제 활성

(1) 토양내 선충 밀도 억제 효과

토양내 존재하는 유충을 조사하기 위해 토양 10g을 사용하였다. 1차 조사 (5주차)와 2차 조사 (7주차)의 뿌리혹 수 결과 및 난낭 수의 결과와 유사한 경향을 보였다. 하지만 토양내 유

중 2차 조사에서 토양비멸균+비료 (NSF) 처리구에서 287.0 마리로 토양비멸균+미생물+계껍질 (SMC) 처리구 및 토양비멸균+미생물+계껍질 (NSMC) 처리구 보다 낮게 조사되었다. 이는 토양내 유충이 멜론 뿌리에 침입함으로써 일시적으로 토양내 유충 수가 적게 조사된 것으로 사료된다. 이러한 것은 선충 세대 기간이 20일에서 25일 정도인 것을 감안하면 충분히 일어날 수 있는 일이라고 보여진다 (그림 111).

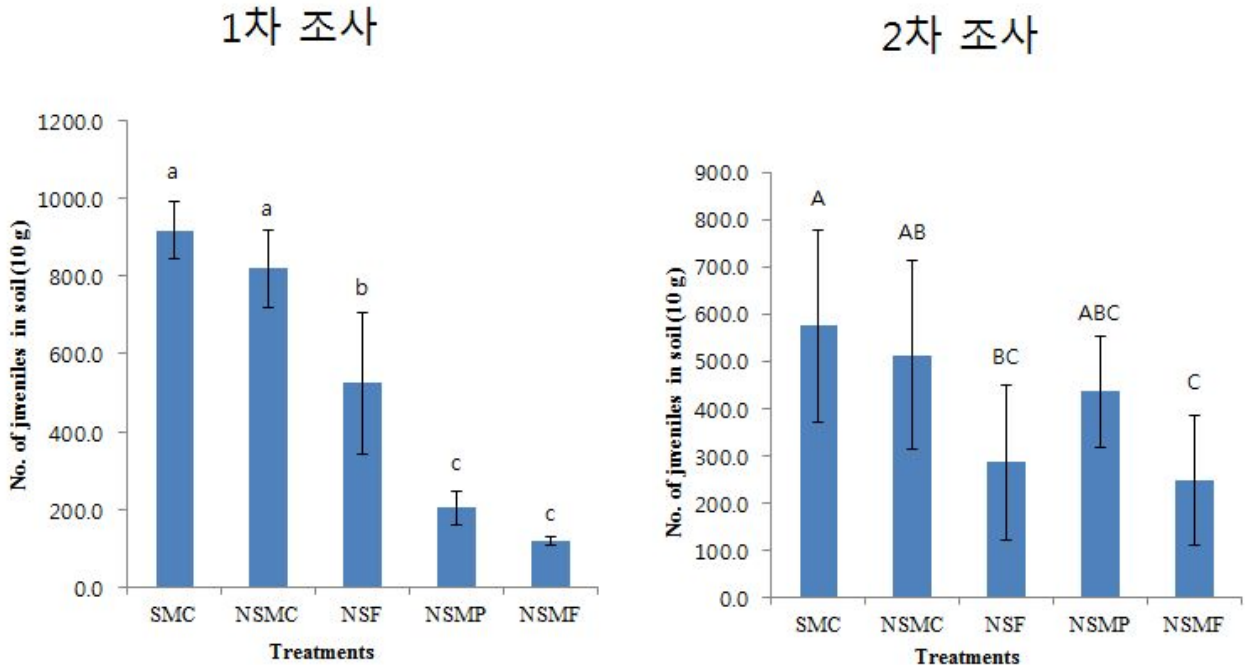


그림 111. 포트실험에서 토양내 선충 유충 수.

SMC 및 NSMC에서 가장 많은 유충수가 조사됨.

토양비멸균+미생물+계껍질 (SMC), 토양비멸균+미생물+계껍질 (NSMC), 토양비멸균+비료 (NSF), 토양비멸균+농약+미생물 (NSMP), 토양비멸균+농약+비료 (NSMF).

(2) 작물체 선충감염 억제효과

포트 실험에서 멜론 뿌리에 선충 침입에 의해 형성된 난낭의 수는 Ploxine B를 이용하여 난낭을 염색한 후 육안으로 조사하였다. 1차 조사 (5주차)와 2차 조사 (7주차)의 뿌리혹 수 결과와 난낭 수의 결과는 유사한 경향을 보였다. 하지만 2차 조사 토양비멸균+미생물+계껍질 (NSMC) 처리구의 난낭수가 같은 미생물 배양액 처리구인 토양비멸균+미생물+계껍질 (SMC) 처리구 보다 상당히 낮은 것으로 조사되었다 (그림 112).

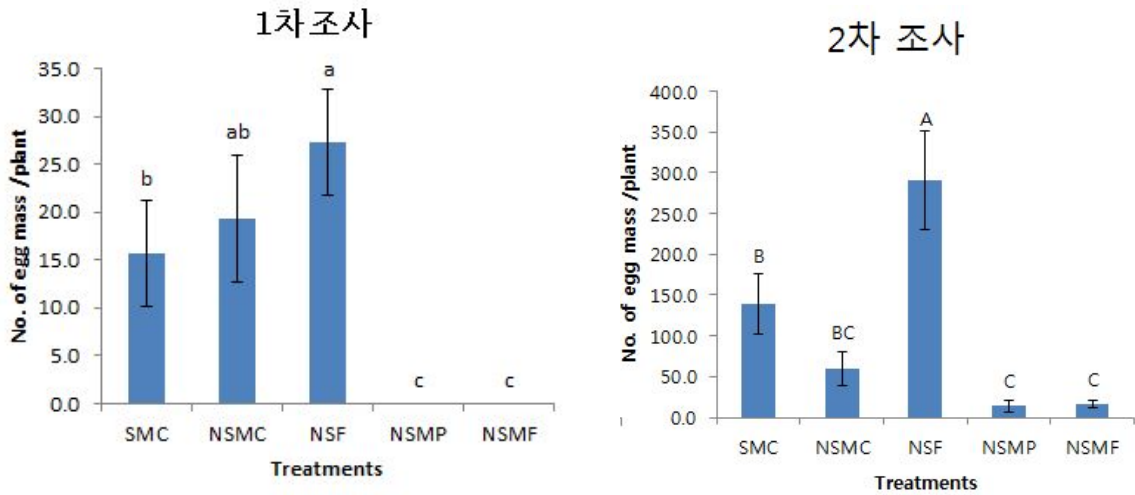


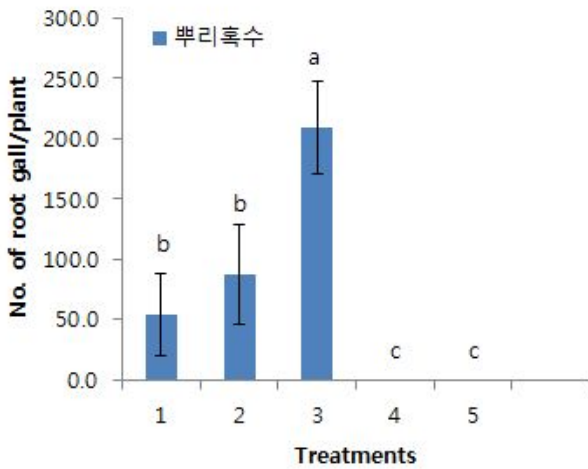
그림 112. 포트실험에서 멜론 뿌리에서의 난낭 수.

토양비멸균+비료 (NSF) 처리구에서 가장 많은 난낭수가 조사됨.

토양비멸균+미생물+게겍질 (SMC), 토양비멸균+미생물+게겍질 (NSMC), 토양비멸균+비료 (NSF), 토양비멸균+농약+미생물 (NSMP), 토양비멸균+농약+비료 (NSMF).

항선충 미생물 대량배양복합체 시제품의 뿌리혹선충 방제 효과를 조사하기 위하여 멜론 포트(pot) 실험을 실시하였다. 토마토 뿌리에 선충 침입에 의해 형성된 뿌리혹의 수는 선충의 피해 정도를 나타내는 지표로서, 선충 피해가 심할수록 높게 나타난다. 뿌리혹 수 1차 조사(멜론 정식 5주후) 결과 농약 처리구인 토양 비멸균+농약+미생물 (NSMP), 토양비멸균+농약+비료 (NSMF) 처리구에서는 뿌리혹 피해가 거의 나타나지 않았다. 하지만 비료 처리구인 토양비멸균+비료 (NSF) 처리구에서 가장 높게 나타났다. 미생물 처리구인 토양비멸균+미생물+게겍질 (SMC) 처리구에서는 54개, 토양비멸균+미생물+게겍질 (NSMC) 처리구에서는 87개로 각각 조사 되었다. 2차 조사결과는 1차 조사 결과와 유사한 경향을 보였다. 이러한 결과 미생물 배양액 처리가 약제 처리보다 선충 피해 경감을 덜 하였지만, 비료 처리구에 비해 높은 것으로 보아 미생물 배양액 처리가 선충 피해 감소에 효과적인 것으로 보여진다. (그림 113).

1차 조사



2차 조사

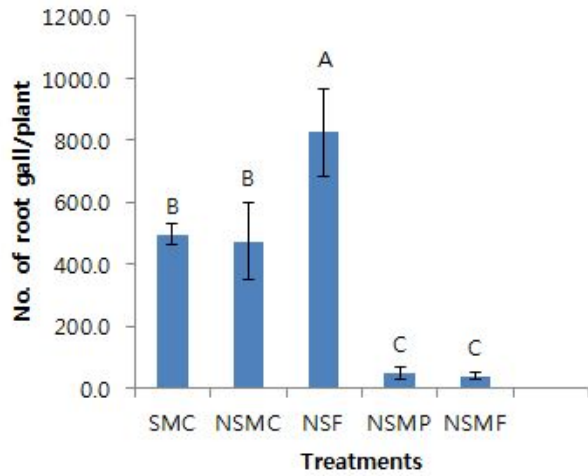


그림 113. 포트실험에서 멜론 뿌리혹 수.

토양비멸균+비료 (NSF) 처리구에서 가장 많은 뿌리혹 수가 조사되었음.

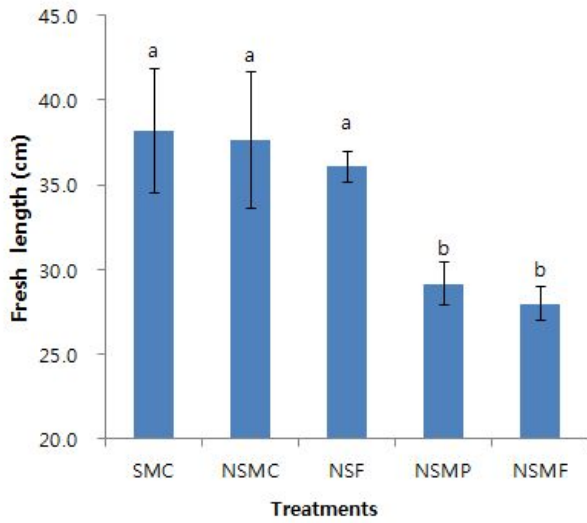
토양비멸균+미생물+계껍질 (SMC), 토양비멸균+미생물+계껍질 (NSMC), 토양비멸균+비료 (NSF), 토양비멸균+농약+미생물 (NSMP), 토양비멸균+농약+비료 (NSMF).

나. 작물체 성장 효과

(1) 지상부 생초장

항선충 미생물 대량배양복합체 시제품의 효과를 멜론 포트(pot) 실험을 통하여 검증 하였다. 멜론 정식 후 5주차 및 7주차에서 각각 멜론 생육 정도를 조사하였다. 조사 결과 멜론 생초장에서 1차 조사 (멜론 정식 5주차)에서 토양비멸균+미생물+계껍질 (NSMC) 처리구가 38.2 cm로 가장 높게 나타났고, 토양비멸균+농약+비료 (NSMF) 처리구가 28.0 cm로 가장 낮게 나타났다. 하지만 1차 조사 결과 토양비멸균+미생물+계껍질 (SMC), 토양비멸균+미생물+계껍질 (NSMC), 토양비멸균+비료 (NSF) 처리구간의 통계적 유의성은 없었다. 토양비멸균+농약+미생물 (NSMP) 처리구 및 토양비멸균+농약+비료 (NSMF) 처리구는 생육 상태가 다른 처리구에 비해 현저하게 낮았다. 2차 조사(멜론 정식 7주차)에서는 토양비멸균+미생물+계껍질 (SMC) 처리구가 86.9 cm로 토양비멸균+미생물+계껍질 (NSMC) 처리구가 86.8cm, 토양비멸균+농약+미생물 (NSMP) 처리구가 86.8cm로 같거나 차이가 나지 않았다. 1차 조사에서 현저하게 생육이 불량했던 토양비멸균+농약+미생물 (NSMP) 처리구는 2차 조사시 생육이 많이 회복되었다. 이는 초기 약재(선충탄) 처리로 인하여 약해를 입었지만, 미생물 배양액 처리로 생육 상태가 좋아진 것을 사료된다. 하지만 비료를 처리한 토양비멸균+농약+비료 (NSMF) 처리구는 2차 조사시에도 생육이 불량하였다 (그림 114).

1차 조사



2차 조사

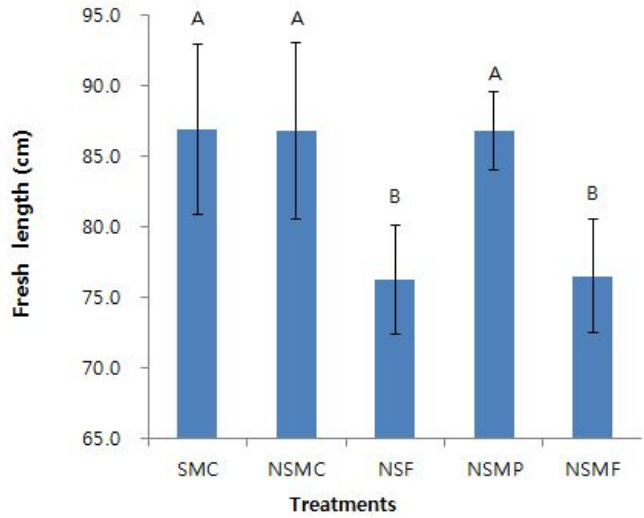


그림 114. 포트실험에서 멜론 생초장.

SMC, NSMC 및 NSMP 처리구가 NSF 및 NSMF 처리구보다 생초장이 높게 조사되었음.

토양멸균+미생물+계껍질 (SMC), 토양비멸균+미생물+계껍질 (NSMC), 토양비멸균+비료 (NSF), 토양비멸균+농약+미생물 (NSMP), 토양비멸균+농약+비료 (NSMF).

(2) 지상부 생체중 및 건조중

항선충 미생물 대량배양복합체 시제품의 효과를 멜론 포트(pot) 실험을 통하여 검증 하였다. 조사 결과 멜론 1차 조사에서 생체중은 23.1g으로 토양멸균+미생물+계껍질 (SMC) 처리구가 가장 좋았고, 다음으로 토양비멸균+미생물+계껍질 (NSMC) 처리구로 22.8g으로 조사되었다. 하지만 농약 처리구인 토양비멸균+농약+미생물 (NSMP) 및 토양비멸균+농약+비료 (NSMF) 처리구는 생체중이 매우 낮았다. 2차 조사 에서는 토양비멸균+미생물+계껍질 (NSMC) 처리구가 가장 높았고, 1차 조사시 생육 상태가 매우 불량하였던 토양비멸균+농약+미생물 (NSMP) 처리구가 생체중에서 많은 증가를 보였다. 반면에 토양비멸균+농약+비료 (NSMF) 처리구는 여전히 약해에 의한 생육 저하에서 회복되지 못한 것으로 조사되었다. (그림 115).

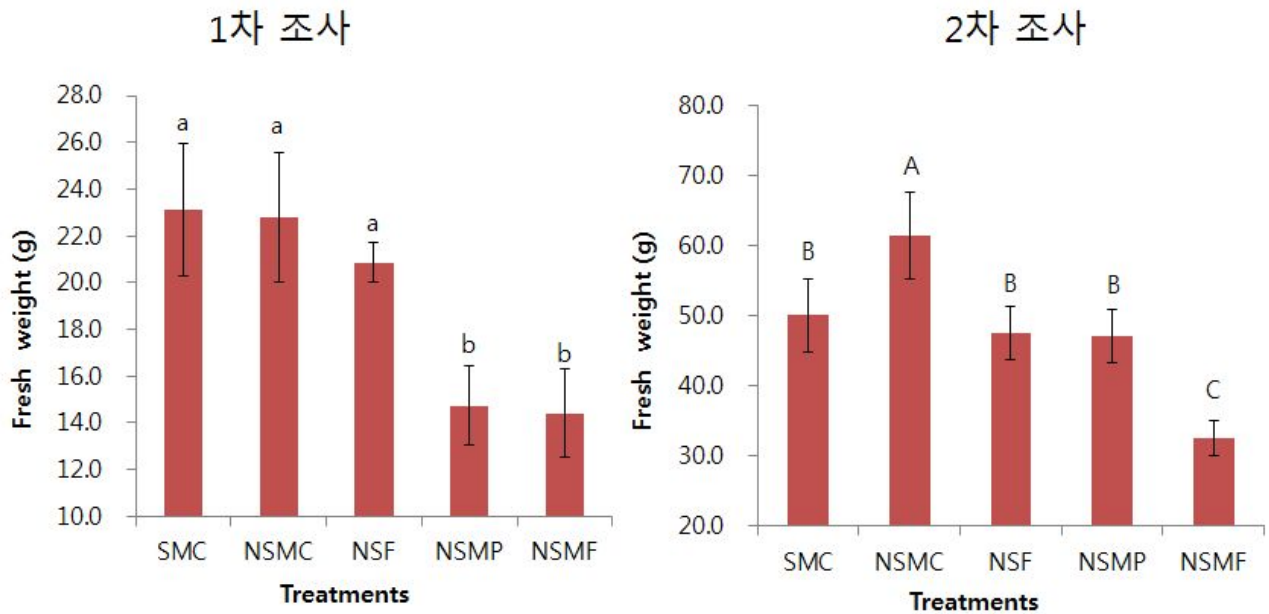


그림 115. 포트실험에서 멜론 생체중.

2차조사에서 NSMC 처리구가 생체중이 가장 높게 조사됐음.

토양멸균+미생물+계껍질 (SMC), 토양비멸균+미생물+계껍질 (NSMC), 토양비멸균+비료 (NSF), 토양비멸균+농약+미생물 (NSMP), 토양비멸균+농약+비료 (NSMF).

멜론 건체중 조사 결과 1차 조사와 2차 조사에서 토마토 생체중의 결과와 유사한 경향을 보였다. 2차 조사 결과 토양멸균+미생물+계껍질 (SMC) 처리구 4.5g으로 가장 높게 나타났고, 토양비멸균+농약+비료 (NSMF) 처리구가 가장 낮게 조사되었다. 이러한 결과는 약해에 의한 피해는 비료 처리에 의한 회복은 어려운 것으로 사료된다. (그림 116).

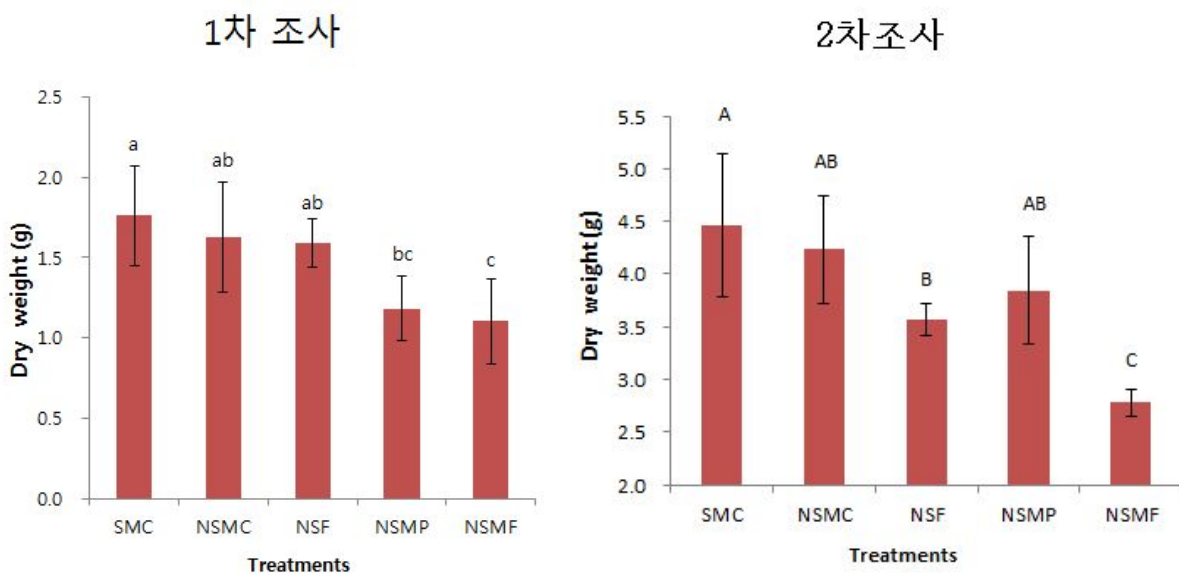


그림 116. 포트실험에서 멜론 건체중.

2차조사에서 SMC 처리구가 건체중이 가장 높게 조사됐음.

토양멸균+미생물+계껍질 (SMC), 토양비멸균+미생물+계껍질 (NSMC), 토양비멸균+비료 (NSF), 토양비멸균+농약+미생물 (NSMP), 토양비멸균+농약+비료 (NSMF).

토양비멸균+농약+미생물 (NSMP), 토양비멸균+농약+비료 (NSMF).

다. 토양 내 및 작물체 효소 활성 및 토양 미생물 측정

(1) 토양내 chitinase 및 gelatinase 활성 측정

작물체(멜론) 포트 실험에서 뿌리혹선충 방제 기작 규명을 위한 토양 효소인 키틴분해효소 (chitinase) 활성을 조사한 결과 1차 조사 (토마토 정식 5주 후)에서 토양비멸균+미생물+계껍질 (NSMC) 처리구가 0.18 Unit/g soil로 가장 높게 나타났다. 하지만 다른 처리구간 통계적 유의성은 보이지 않았다. 2차 조사 결과 (토마토 정식 7주 후) 토양비멸균+미생물+계껍질 (NSMC) 처리구가 1차 조사와 다르게 키틴분해효소활성이 가장 낮게 나타났다. 또한 2차 조사 결과 다른 처리구간 통계적 유의성은 보이지 않았다 (그림 117).

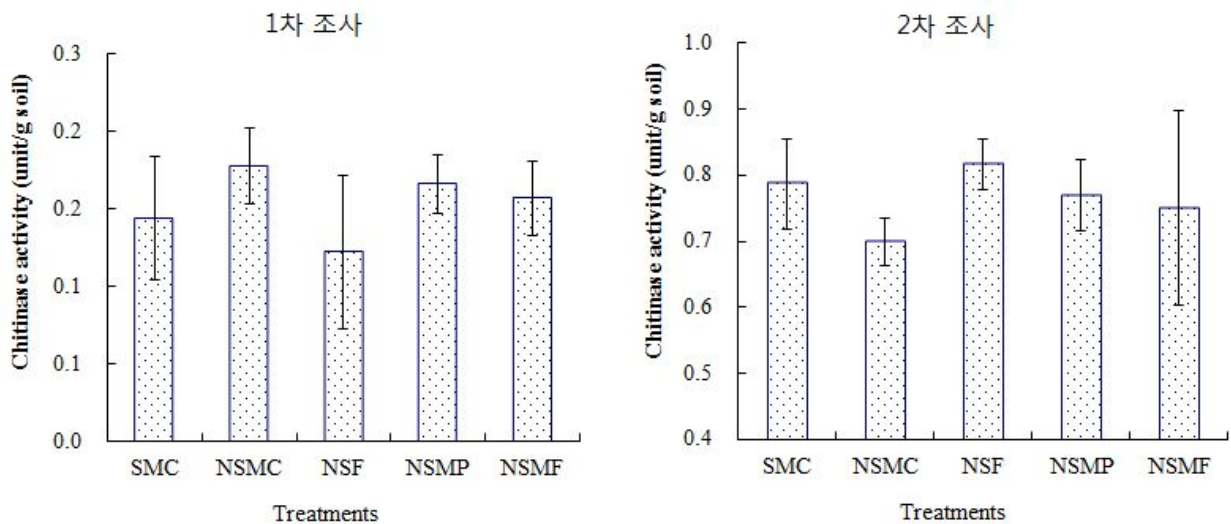


그림 117. 포트 실험에서의 토양 키틴분해효소(chitinase) 활성.

토양비멸균+미생물+계껍질 (SMC), 토양비멸균+미생물+계껍질 (NSMC), 토양비멸균+비료 (NSF), 토양비멸균+농약+미생물 (NSMP), 토양비멸균+농약+비료 (NSMF).

작물체(멜론) 포트 실험에서 뿌리혹선충 방제 기작 규명을 위한 토양 효소인 젤라틴분해효소 (gelatinase) 활성을 조사한 결과 1차 조사 (토마토 정식 5주 후)에서 토양비멸균+미생물+계껍질 (SMC) 처리구가 1.32 Unit/g soil로 가장 높게 나타났고, 토양비멸균+미생물+계껍질 (NSMC) 1.31 Unit/g soil로 NSMC 처리구와 통계적 유의성이 없었다. 2차 조사 결과 (토마토 정식 7주 후)는 1차 결과와 유사한 경향을 보였다. 토양에 계껍질을 처리한 토양비멸균+미생물+계껍질 (SMC) 처리구와 토양비멸균+미생물+계껍질 (NSMC) 처리구가 다른 처리구 보다 젤라틴분해효소 활성이 높게 나타났다. 이는 계껍질의 토양 처리가 젤라틴분해효소 활성에 영향을 주는 것으로 사료된다 (그림 118).

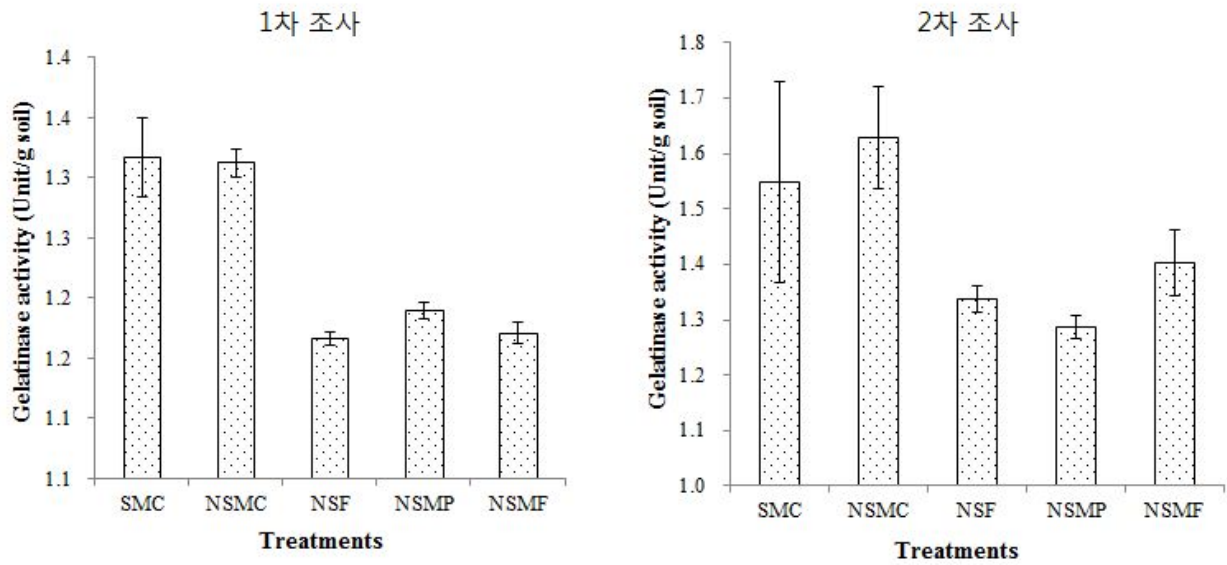


그림 118. 포트 실험에서의 토양 젤라틴분해효소(gelatinase) 활성.
 토양멸균+미생물+계껍질 (SMC), 토양비멸균+미생물+계껍질 (NSMC), 토양비멸균+비료 (NSF), 토양비멸균+농약+미생물 (NSMP), 토양비멸균+농약+비료 (NSMF).

(2) 작물체 peroxidase 및 polyphenol oxidase

작물체(멜론) 포트 실험에서 뿌리혹선충 방제 기작 규명을 위한 작물체 내 병방제 효소인 peroxidase (POD) 활성을 조사한 결과 1차 조사 (토마토 정식 5주 후)에서 토양비멸균+미생물+계껍질 (NSMC) 처리구에서 0.82 Unit/g FW로 가장 높게 나타났지만, 다른 처리구간과의 통계적 유의성은 보이지 않았다. 2차 조사 결과 (토마토 정식 7주 후) 1차조사 결과 보다 낮은 효소 활성을 보였고, 모든 처리구간과의 통계적 유의성은 보이지 않았다 (그림 119).

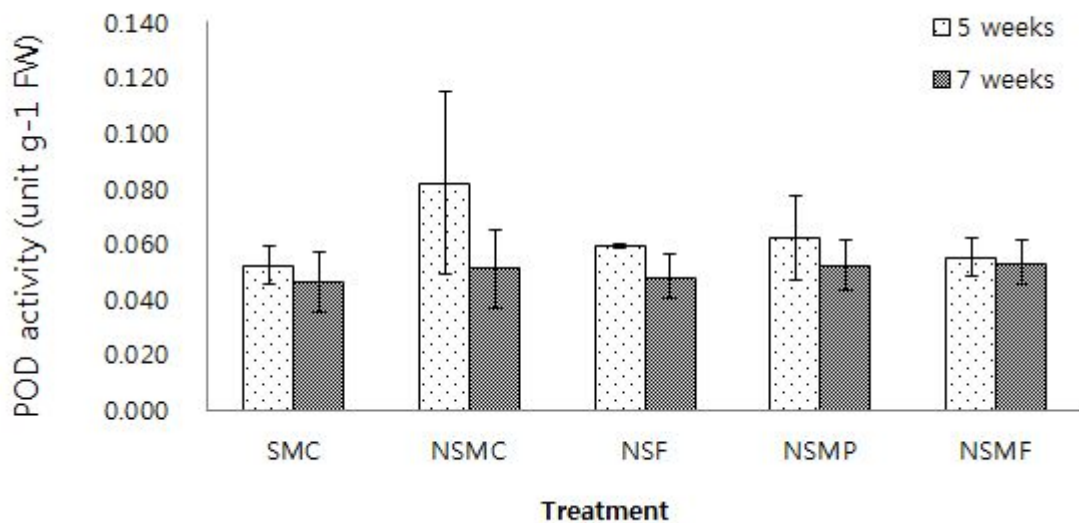


그림 119. 포트 실험에서의 작물체 peroxidase (POD) 활성.

토양멸균+미생물+계껍질 (SMC), 토양비멸균+미생물+계껍질 (NSMC), 토양비멸균+비료 (NSF), 토양비멸균+농약+미생물 (NSMP), 토양비멸균+농약+비료 (NSMF).

작물체(멜론) 포트 실험에서 뿌리혹선충 방제 기작 규명을 위한 작물체 내 병방제 효소인 polyphenol oxidase (PPO) 활성을 조사한 결과 1차 조사 (토마토 정식 5주 후)에서 모든 처리구간과의 통계적 유의성은 보이지 않았다. 2차 조사 결과 (토마토 정식 7주 후) 토양비멸균+비료 (NSF) 처리구에서 2545.0 Unit/g FW 효소 활성을 보여 가장 높게 나타났고, 토양비멸균+미생물+계껍질 (NSMC) 처리구 및 토양비멸균+농약+미생물 (NSMP) 처리구와 NSF 처리구간의 관계에서 통계적 유의성은 보였다 (그림 120).

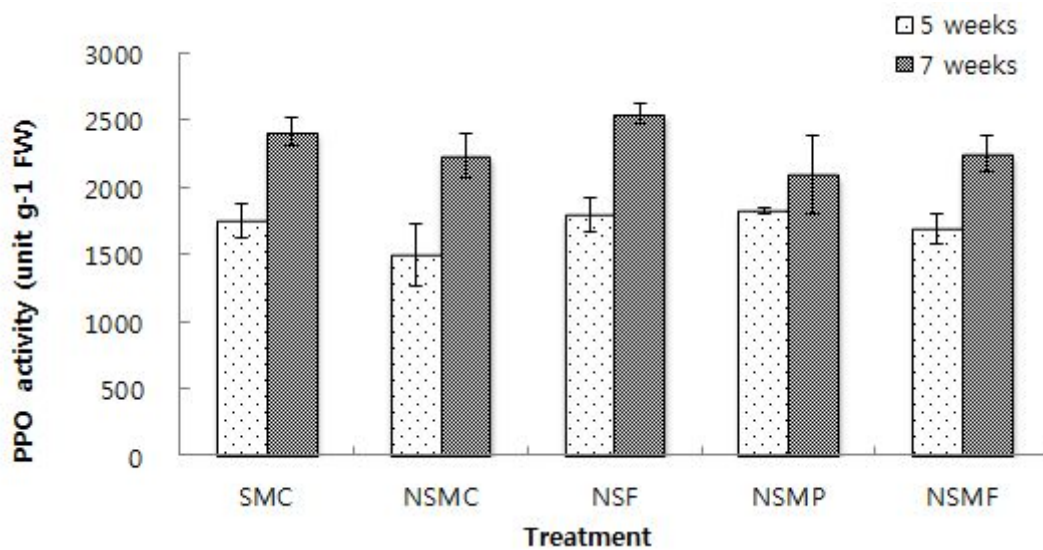


그림 120. 포트 실험에서의 작물체 polyphenol oxidase (PPO) 활성.

토양멸균+미생물+계껍질 (SMC), 토양비멸균+미생물+계껍질 (NSMC), 토양비멸균+비료 (NSF), 토양비멸균+농약+미생물 (NSMP), 토양비멸균+농약+비료 (NSMF).

(3) 작물체 β -1,3-glucanase 및 chitinase

작물체(멜론) 포트 실험에서 뿌리혹선충 방제 기작 규명을 위한 작물체 내 병방제 효소인 키틴틴분해효소 (chitinase) 활성을 조사한 결과 1차 조사 (토마토 정식 5주 후)에서 토양비멸균+농약+비료 (NSMF) 처리구가 83.84 Unit/g FW로 가장 높게 나타났고, 토양비멸균+미생물+계껍질 (NSMC) 처리구가 36.10 Unit/g FW로 가장 낮게 나타났다. 2차 조사 결과 (토마토 정식 7주 후) 모든 처리구간 통계적 유의성은 보이지 않았다 (그림 121).

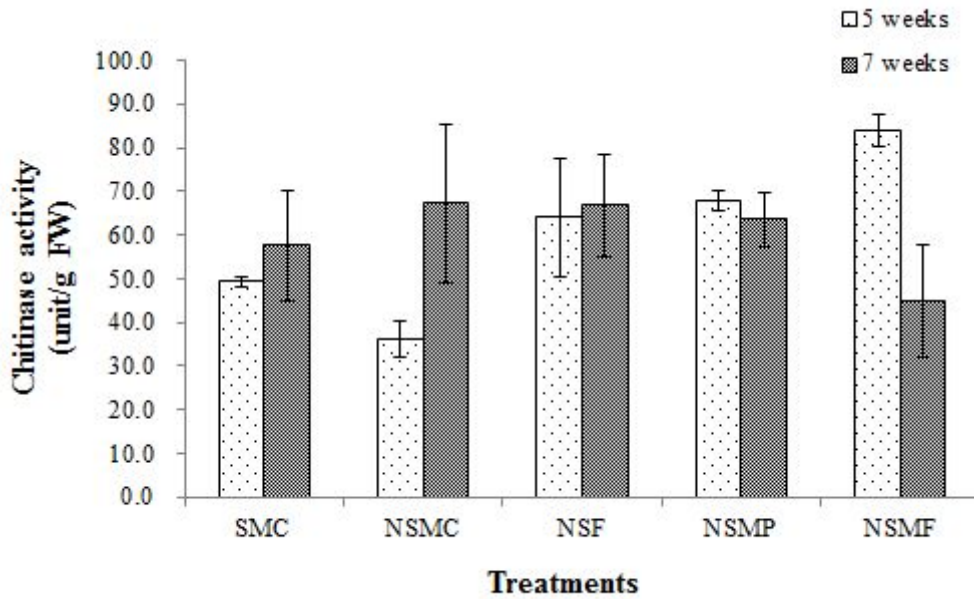


그림 121. 포트 실험에서의 작물체 키틴분해효소(chitinase) 활성. 토양미생균+미생물+계껍질 (SMC), 토양비밀균+미생물+계껍질 (NSMC), 토양비밀균+비료 (NSF), 토양비밀균+농약+미생물 (NSMP), 토양비밀균+농약+비료 (NSMF).

작물체(멜론) 포트 실험에서 뿌리혹선충 방제 기작 규명을 위한 작물체 내 병방제 효소인 글루칸분해효소 (glucanase) 활성을 조사한 결과 1차 조사 (토마토 정식 5주 후)에서 모든 처리구간 통계적 유의성은 보이지 않았다. 2차 조사 결과 (토마토 정식 7주 후) 토양비밀균+비료 (NSF) 처리구에서 79.08 Unit/g FW로 가장 높게 나타났다 (그림 122).

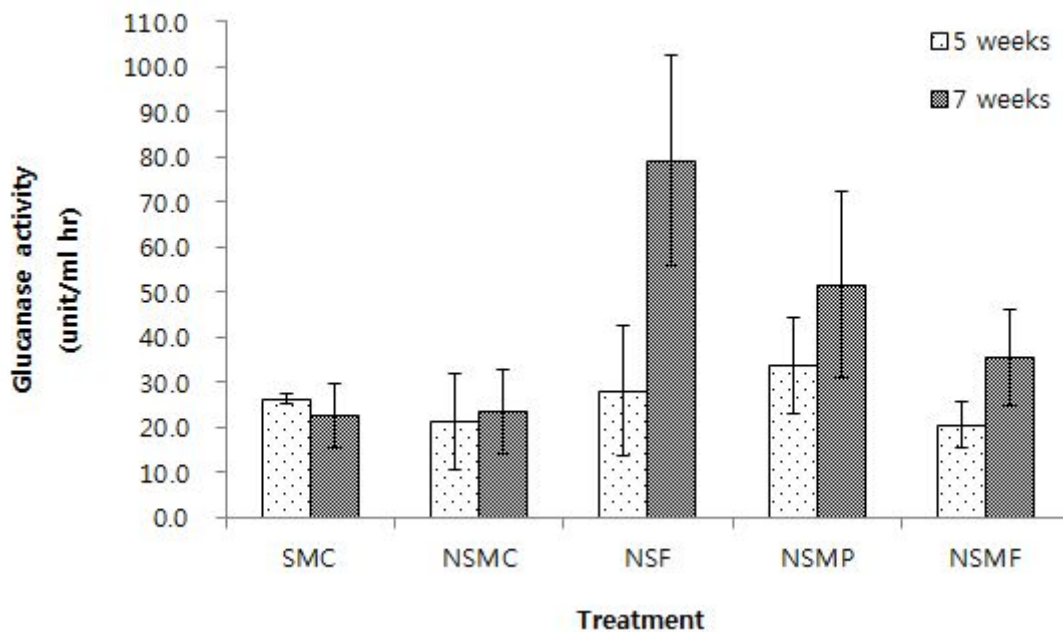


그림 122. 포트 실험에서의 작물체 글루칸분해효소(glucanase) 활성.

토양멸균+미생물+계껍질 (SMC), 토양비멸균+미생물+계껍질 (NSMC), 토양비멸균+비료 (NSF), 토양비멸균+농약+미생물 (NSMP), 토양비멸균+농약+비료 (NSMF).

(4) 토양 키틴분해미생물 및 젤라틴분해미생물 수

멜론 포트 실험에서 뿌리혹선충 방제에 관한 기작을 찾기 위해 토양 내 키틴분해미생물 및 젤라틴분해 미생물 수를 조사하였다. 각각의 미생물 조사는 키틴배지 아가배지와 젤라틴 아가배지를 이용하였다. 조사 결과 1차 조사 (5주차)와 2차 조사 (7주차) 결과가 상이하게 나타났다. 1차 조사 결과 토양 내 키틴분해 미생물 수는 토양멸균+미생물+계껍질 (SMC) 처리구에서 $16.7 (x10^5 \text{ CFU/g soil})$ 개체수로 가장 높게 나타났고, 젤라틴분해 미생물 수 또한 $46.7 (x10^5 \text{ CFU/g soil})$ 개체수로 가장 높게 나타났다. 2차 조사 결과 키틴분해 미생물 수가 토양멸균+미생물+계껍질 (SMC) 처리구가 가장 높게 나타난 반면에, 젤라틴분해 미생물 수에서는 토양멸균+미생물+계껍질 (SMC) 처리구가 가장 낮게 나타났다. 하지만 토양비멸균+농약+미생물 (NSMP) 처리구를 제외하고는 SMC 처리구에서의 젤라틴분해 미생물 수는 다른 처리구와 통계적 유의성은 없었다. 이러한 토양미생물이 토양 내 다수 존재할 때 항선충 활성이 있는 것으로 보고되어지고 있다. (그림 123).

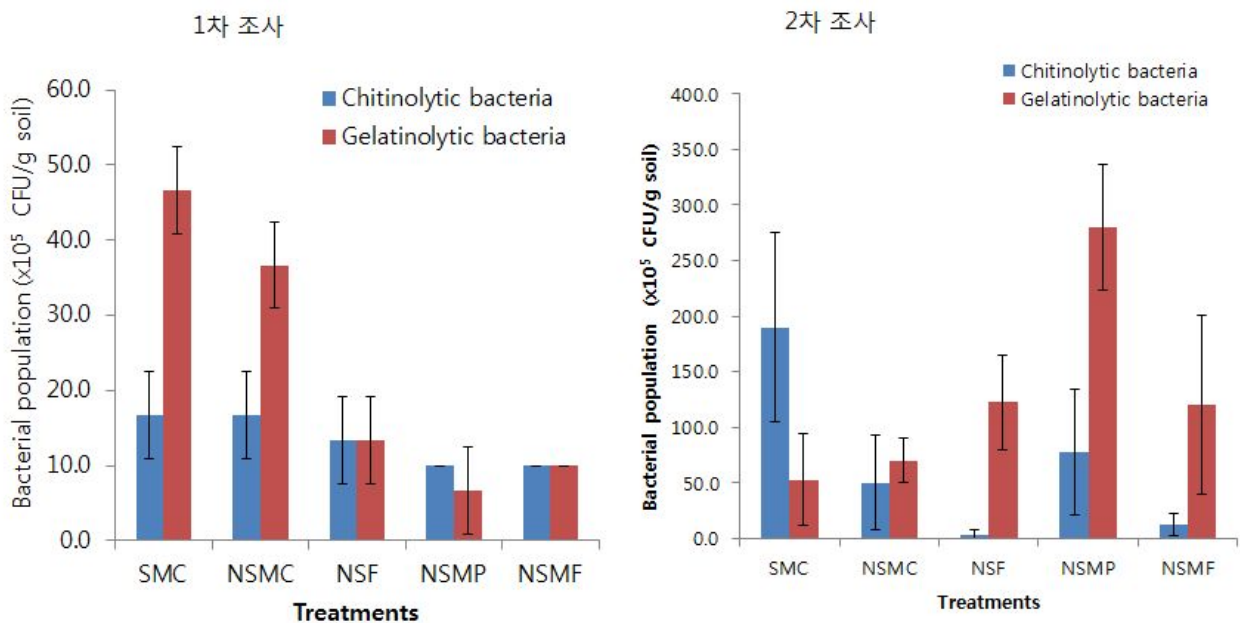


그림 123. 포트실험에서 토양 내 키틴분해 및 젤라틴분해 미생물 수. 토양멸균+미생물+계껍질 (SMC), 토양비멸균+미생물+계껍질 (NSMC), 토양비멸균+비료 (NSF), 토양비멸균+농약+미생물 (NSMP), 토양비멸균+농약+비료 (NSMF).

2-2. 멜론 작물에서의 선충 억제 활성 및 작물 성장 효과 조사 (2차 실험)

항선충 미생물 대량배양복합체 시제품의 효과를 멜론 포트(pot) 2차 실험을 통하여 검증하였다. 포트 재배 실험을 위해서 4주된 멜론 모종을 900 g의 토양이 들어있는 포트에 옮겨 심고, 1, 2, 3, 4주 후에 아래와 같이 각각의 처리구 별로 처리하였다. 상업적으로 판매하는 농약은 1주 후에 한번만 처리하였다. 모든 처리구는 1 주 후에 포트 당 대략 300 마리 유충과 900개의 알을 접종한다. 포트 실험 기간 동안에 생초장, 생체중, 건물중, 뿌리 무게, 토양 내 유충 수, 토마토 뿌리의 난낭 수와 혹 등을 조사하였다.

■ 처리구

- 1 : 미생물(M) : 항선충 미생물 대량배양복합체 배양액 처리
- 2 : 미생물+게껍질 (M+C) : 항선충 미생물 대량배양복합체 배양액 + 멜론 정식 전 토양에 게껍질 분말 혼합 처리
- 3 : 미생물+농약 (M+P) : 항선충 미생물 대량배양복합체 시제품 + 농약(테라노바)을 1회 처리
- 4 : 농약(P) : 농약(테라노바)을 1회 처리
- 5 : 물(W) : 수돗물 처리



그림 124. 포트 실험 멜론 시료 생육 모습.

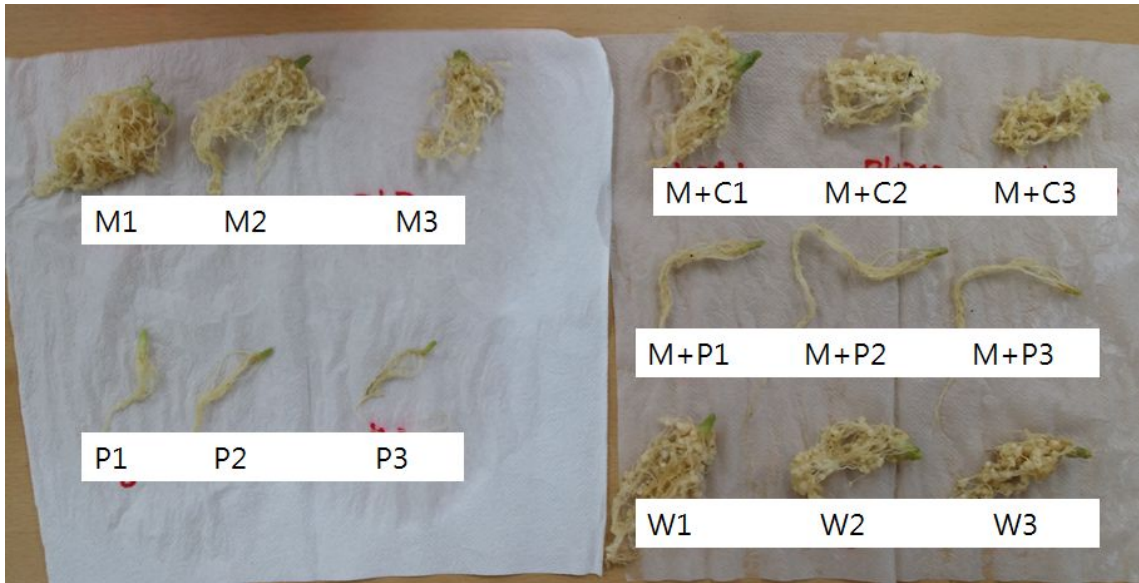


그림 125. 포트 실험 멜론 시료 뿌리 모습.

가. 작물체 선충 억제 활성

(1) 토양내 선충 밀도 억제 효과

토양내 존재하는 유충을 조사하기 위해 토양 10g을 사용하였다. 1차 조사 (5주차)와 2차 조사 (7주차)의 뿌리혹 수 결과 및 난낭 수의 결과와 유사한 경향을 보였다. 하지만 뿌리혹 수 및 난낭 수가 M+P 및 P 처리구에서 검출이 되지 않았지만, 토양내 유충은 1차 및 2차 조사 모두에서 검출이 되었다. 이러한 조사결과는 통계적으로 유의하였다 (그림 126).

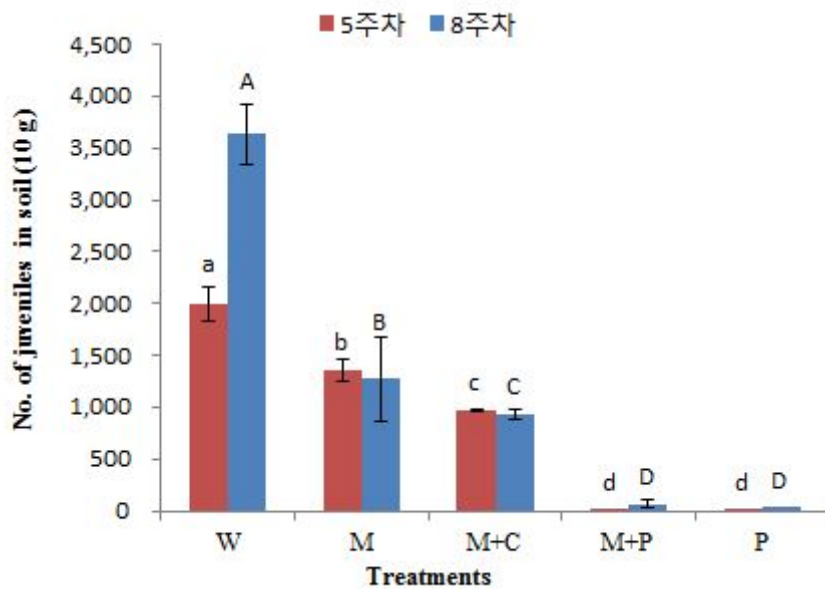


그림 126. 포트실험에서 토양내 선충 유충 수.

조사 8주차 M+P 및 P 처리구가 가장 낮은 유충 수를 나타냄.

M : 미생물 대량배양복합체 배양액 처리, M+C : 미생물 대량배양복합체 배양액 + 계깍질 분말 처리, M+P : 미생물 대량배양복합체 배양액 + 농약 처리, P : 농약 처리, W : 물 처리

(2) 작물체 선충감염 억제효과

항선충 미생물 대량배양복합체 시제품의 뿌리혹선충 방제 효과를 조사하기 위하여 멜론 포트(pot) 실험을 실시하였다. 멜론 뿌리에 선충 침입에 의해 형성된 뿌리혹의 수는 선충의 피해 정도를 나타내는 지표로서, 선충 피해가 심할수록 높게 나타난다. 뿌리혹 수 1차 조사(멜론 정식 5주후) 결과 W 처리구 248.0개, M 처리구 166.0개, M+C 처리구 121.0개, M+P 처리 및 P 처리구 각각 0.0개로 조사되었으며, W 처리구에서 가장 높은 혹 개수를 보였고 M+P 및 P 처리구에서는 뿌리혹 수가 조사되지 않았다. 2차 조사결과는 1차 조사 결과와 유사한 경향을 보였다. 또한 모든 처리구간 통계적으로 유의 하였다. 이러한 결과 미생물 배양액 처리가 약재 처리보다 선충 피해 경감은 덜 하였지만, 물 처리구에 비해 높은 것으로 보아 미생물 배양액 처리가 선충 피해 감소에 효과적인 것으로 사료된다. (그림 127).

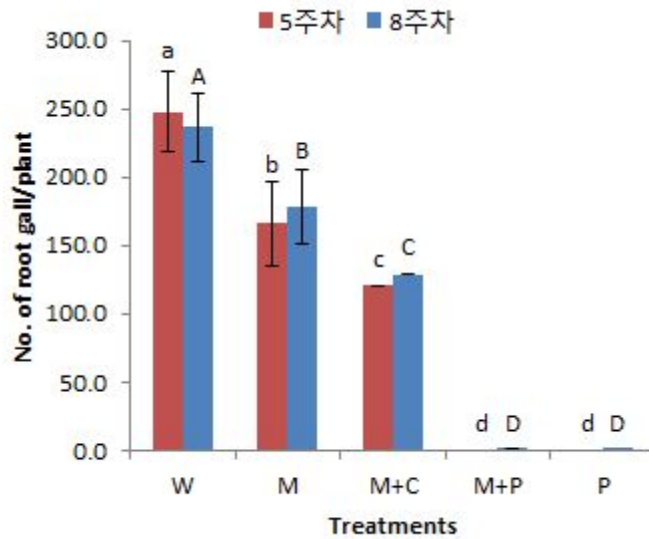


그림 127. 포트실험에서 멜론 뿌리혹 수.

조사 8주차 M+P 및 P 처리구가 가장 낮은 뿌리혹 수를 나타냄.

M : 미생물 대량배양복합체 배양액 처리, M+C : 미생물 대량배양복합체 배양액 + 계깍질 분말 처리, M+P : 미생물 대량배양복합체 배양액 + 농약 처리, P : 농약 처리, W : 물 처리

포트 실험에서 멜론 뿌리에 선충 침입에 의해 형성된 난낭의 수는 Ploxine B를 이용하여 난낭을 염색한 후 육안으로 조사하였다. 1차 조사 (5주차)와 2차 조사 (8주차)의 뿌리혹 수 결과와 난낭 수의 결과는 유사한 경향을 보였다. 또한 모든 처리구간 통계적으로 유의 하였다 (그림 128).

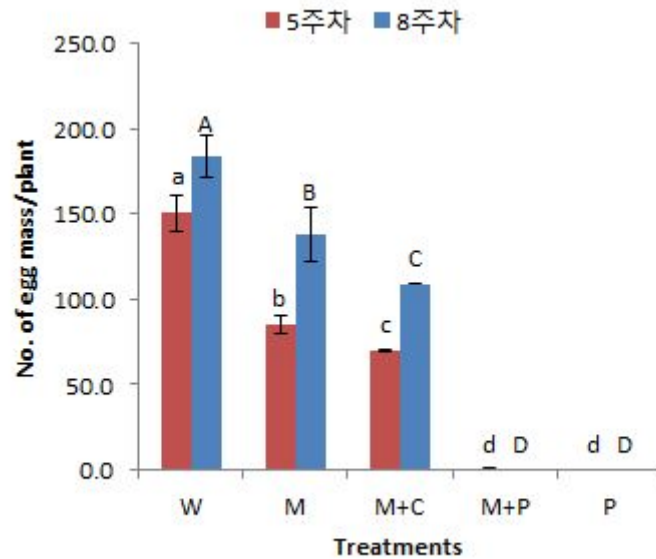


그림 128. 포트실험에서 멜론 뿌리에서의 난낭 수.

조사 8주차 M+P 및 P 처리구가 가장 낮은 난낭 수를 나타냄.

M : 미생물 대량배양복합체 배양액 처리, M+C : 미생물 대량배양복합체 배양액 + 계껍질 분말 처리, M+P : 미생물 대량배양복합체 배양액 + 농약 처리, P : 농약 처리, W : 물 처리

나. 작물체 성장 효과

(1) 지상부 생초장

항선충 미생물 대량배양복합체 시제품의 효과를 멜론 포트(pot) 실험을 통하여 검증 하였다. 멜론 정식 후 5주차 및 8주차에서 각각 멜론 생육 정도를 조사하였다. 조사 결과 멜론 생초장에서 1차 조사 (멜론 정식 5주후)에서 M 처리구 56.0 cm, M+C 처리구 51.0 cm, M+P 처리구 61.3 cm, P 처리 48.8 cm 및 W 처리구 45.7 cm로 조사되었으며, M+P 처리구에서 가장 높은 생초장을 보였고 W 처리구가 가장 낮게 조사되었다. 2차 조사(멜론 정식 8주후)에서는 M 처리구 71.0 cm, M+C 처리구 63.7 cm, M+P 처리구 88.3 cm, P 처리 82.9 cm 및 W 처리구 58.0 cm로 조사되었으며, M+P 처리구에서 가장 높은 생초장을 보였고 W 처리구가 가장 낮게 조사되었다. 조사 8주차 P와 M처리구가 M, M+C 및 W처리구와 통계적 유의성을 보였다. 이러한 결과는 농약 처리 및 항선충 미생물 대량배양복합체 처리로 인해 선충 방제에 상승 작용이 나타났을 뿐만 아니라, 미생물 배양액 처리로 생육 상태가 좋아진 것으로 사료되어진다 (그림 129).

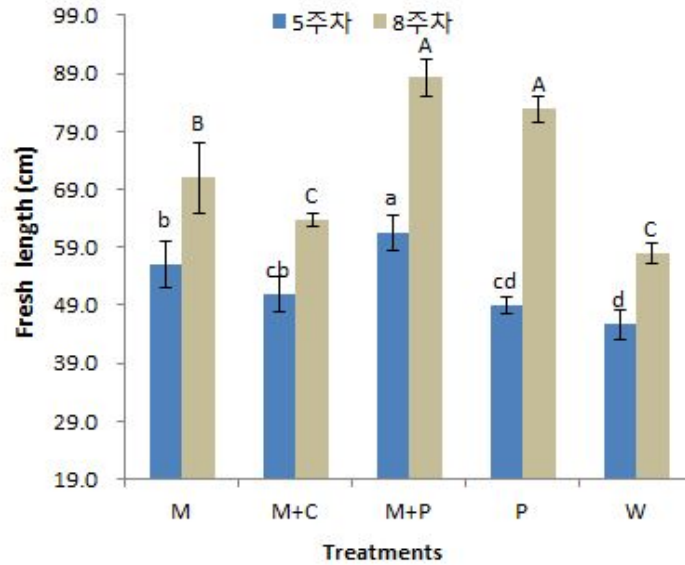


그림 129. 포트실험에서 멜론 생초장.

조사 8주차 M+P 및 P 처리구가 가장 높은 생초장을 나타냄.

M : 미생물 대량배양복합체 배양액 처리, M+C : 미생물 대량배양복합체 배양액 + 게껍질 분말 처리, M+P : 미생물 대량배양복합체 배양액 + 농약 처리, P : 농약 처리, W : 물 처리

(2) 지상부 생체중 및 건조중

항선충 미생물 대량배양복합체 시제품의 효과를 멜론 포트(pot) 실험을 통하여 검증 하였다. 멜론 정식 후 5주차 및 8주차에서 각각 멜론 생육 정도를 조사하였다. 조사 결과 멜론 생체중에서 1차 조사 (멜론 정식 5주후)에서 M 처리구 15.3 g, M+C 처리구 14.9 g, M+P 처리구 12.2 g, P 처리 6.2 g 및 W 처리구 10.2 g로 조사되었으며, M 처리구에서 가장 높은 생체중을 보였고 P 처리구가 가장 낮게 조사되었다. 2차 조사(멜론 정식 8주후)에서는 M 처리구 22.3 g, M+C 처리구 17.8 g, M+P 처리구 14.9 g, P 처리 14.3 g 및 W 처리구 15.6 g로 조사되었으며, M 처리구에서 가장 높은 생체중을 보였고 P 처리구가 가장 낮게 조사되었다. 조사 8주차 M 처리구가 M+C, M+P, P 및 W 처리구와 통계적 유의성을 보였다 (그림 130).

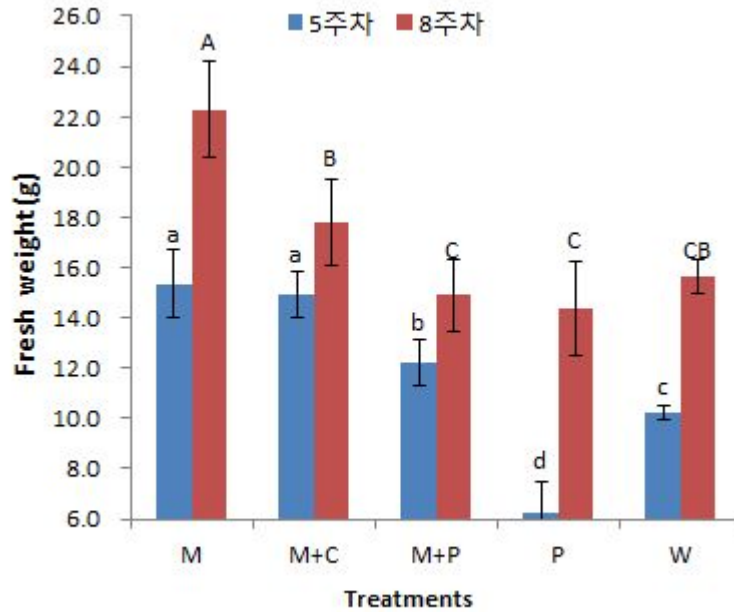


그림 130. 포트실험에서 멜론 생체중.

조사 8주차 M 처리구가 가장 높은 생체중을 나타냄.

M : 미생물 대량배양복합체 배양액 처리, M+C : 미생물 대량배양복합체 배양액 + 게껍질 분말 처리, M+P : 미생물 대량배양복합체 배양액 + 농약 처리, P : 농약 처리, W : 물 처리

멜론 전체중에서 1차 조사 (멜론 정식 5주후)에서 M 처리구 12.8 g, M+C 처리구 11.5 g, M+P 처리구 11.5 g, P 처리 10.9 g 및 W 처리구 11.4 g로 조사되었으며, M 처리구에서 가장 높은 전체중을 보였고 P 처리구가 가장 낮게 조사되었다. 2차 조사(멜론 정식 8주후)에서는 M 처리구 22.3 g, M+C 처리구 17.8 g, M+P 처리구 14.9 g, P 처리 14.3 g 및 W 처리구 15.6 g로 조사되었으며, M 처리구에서 가장 높은 전체중을 보였고 P 처리구가 가장 낮게 조사되었다. 조사 8주차 M, M+C 및 M+P 처리구간의 통계적 유의성이 없었다 (그림 131).

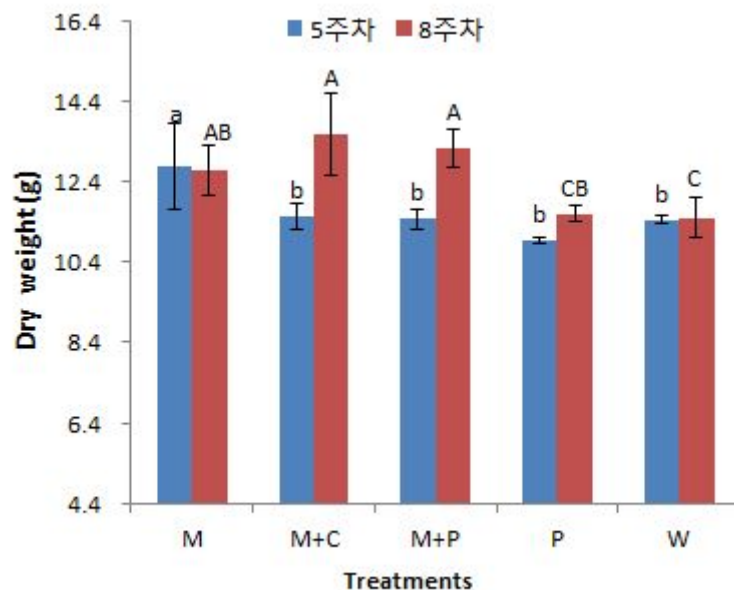


그림 131. 포트실험에서 멜론 건체중.

M+C와 M+P 처리구가 높은 건체중을 나타냄.

M : 미생물 대량배양복합체 배양액 처리, M+C : 미생물 대량배양복합체 배양액 + 게껍질 분말 처리, M+P : 미생물 대량배양복합체 배양액 + 농약 처리, P : 농약 처리, W : 물 처리.

다. 토양 내 및 작물체 효소 활성 및 토양 미생물 측정

(1) 토양내 chitinase 및 gelatinase 활성 측정

작물체(멜론) 포트 실험에서 뿌리혹선충 방제 기작 규명을 위한 토양 효소인 키틴분해효소 (chitinase) 활성을 조사한 결과 1차 조사 (토마토 정식 5주 후)에서 M 처리구 1.67, M+C 처리구 1.80, M+P 처리구 1.57, P 처리구 1.04 및 W 처리구 1.42 Unit/g soil로 M+C 처리구가 가장 높게 나타났다. 2차 조사 결과 (토마토 정식 8주 후) M 처리구 1.42, M+C 처리구 1.42, M+P 처리구 1.42, P 처리 1.17 및 W 처리구 1.14 Unit/g soil로 W 처리구가 가장 낮게 조사 되었다. 조사결과 게껍질 또는 미생물이 처리된 곳에서 chitinase 효소 활성이 높게 나타났다. (그림 132).

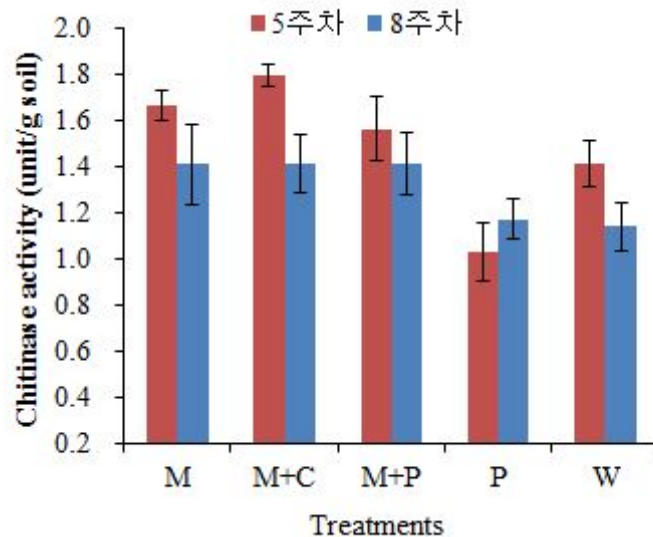


그림 132. 포트 실험에서의 토양 키틴분해효소(chitinase) 활성.

M : 미생물 대량배양복합체 배양액 처리, M+C : 미생물 대량배양복합체 배양액 + 게껍질 분말 처리, M+P : 미생물 대량배양복합체 배양액 + 농약 처리, P : 농약 처리, W : 물 처리

작물체(멜론) 포트 실험에서 뿌리혹선충 방제 기작 규명을 위한 토양 효소인 젤라틴분해효소 (gelatinase) 활성을 조사한 결과 1차 조사 (토마토 정식 5주 후)에서 M 처리구 1.18, M+C 처리구 1.26, M+P 처리구 1.25, P 처리구 1.24 및 W 처리구 1.17 Unit/g soil로 M+C 처리구가 가장 높게 나타났다. 2차 조사 결과 (토마토 정식 8주 후) M 처리구 1.18, M+C 처리구 1.26, M+P 처리구 1.25, P 처리 1.24 및 W 처리구 1.18 Unit/g soil로 W 처리구가 가장 낮게 조사되었다 (그림 133).

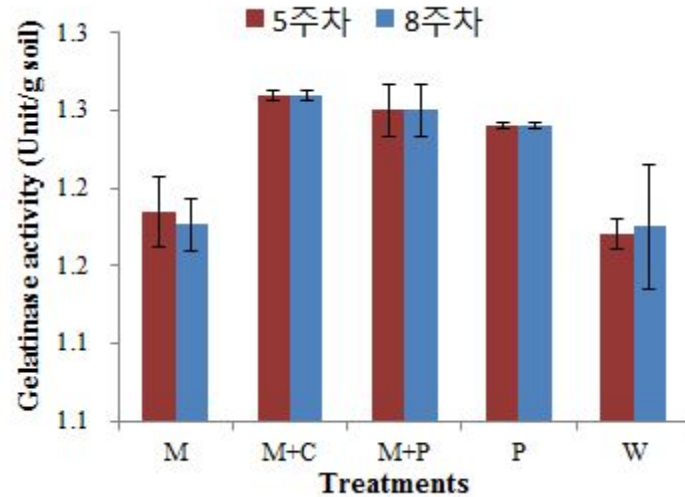


그림 133. 포트 실험에서의 토양 젤라틴분해효소(gelatinase) 활성.

M : 미생물 대량배양복합체 배양액 처리, M+C : 미생물 대량배양복합체 배양액 + 계껍질 분말 처리, M+P : 미생물 대량배양복합체 배양액 + 농약 처리, P : 농약 처리, W : 물 처리

(2) 작물체 peroxidase 및 polyphenol oxidase

작물체(멜론) 포트 실험에서 뿌리혹선충 방제 기작 규명을 위한 작물체 내 병방제 효소인 peroxidase (POD) 활성을 조사한 결과 1차 조사 (토마토 정식 5주 후)에서 M 처리구 0.18, M+C 처리구 0.18, M+P 처리구 0.16, P 처리 0.18 및 W 처리구 0.19 Unit/g FW로 M+P 처리구가 가장 낮은 것으로 조사되었다. 2차 조사 결과 (토마토 정식 8주 후) M 처리구 0.31, M+C 처리구 0.23, M+P 처리구 0.24, P 처리 0.21 및 W 처리구 0.21 Unit/g FW로 W 처리구가 가장 낮게 조사되었다 (그림 134).

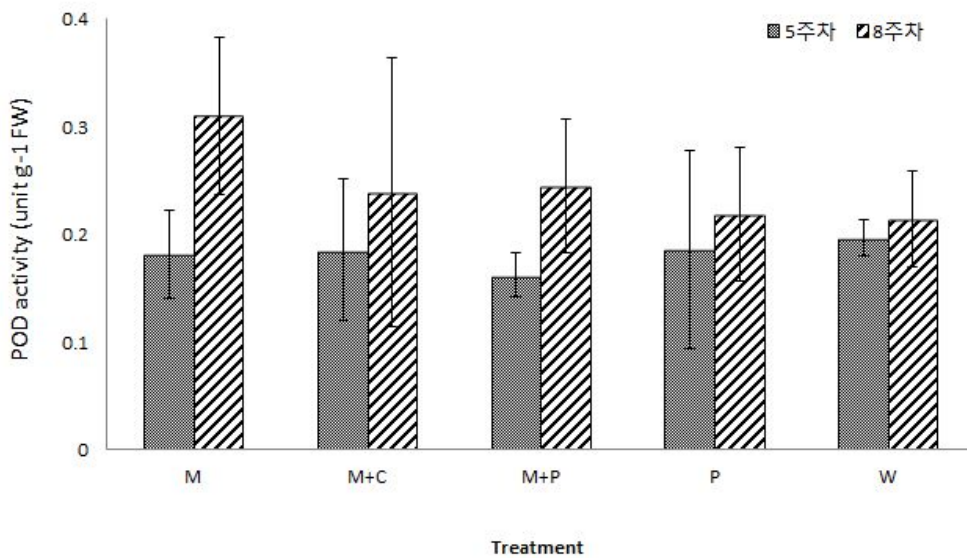


그림 134. 포트 실험에서의 작물체 peroxidase (POD) 활성.

M : 미생물 대량배양복합체 배양액 처리, M+C : 미생물 대량배양복합체 배양액 + 게껍질 분말 처리, M+P : 미생물 대량배양복합체 배양액 + 농약 처리, P : 농약 처리, W : 물 처리

작물체(멜론) 포트 실험에서 뿌리혹선충 방제 기작 규명을 위한 작물체 내 병방제 효소인 polyphenol oxidase (PPO) 활성을 조사한 결과 1차 조사 (토마토 정식 5주 후)에서 M 처리구 2660.0, M+C 처리구 2411.1, M+P 처리구 2311.1, P 처리 2969.6 및 W 처리구 2564.4 Unit/g FW로 M+P 처리구가 가장 낮은 것으로 조사되었다. 2차 조사 결과 (토마토 정식 8주 후) M 처리구 2651.1, M+C 처리구 3312.0, M+P 처리구 3137.8, P 처리 2874.3 및 W 처리구 3211.1 Unit/g FW로 M 처리구가 가장 낮게 조사되었다 (그림 135).

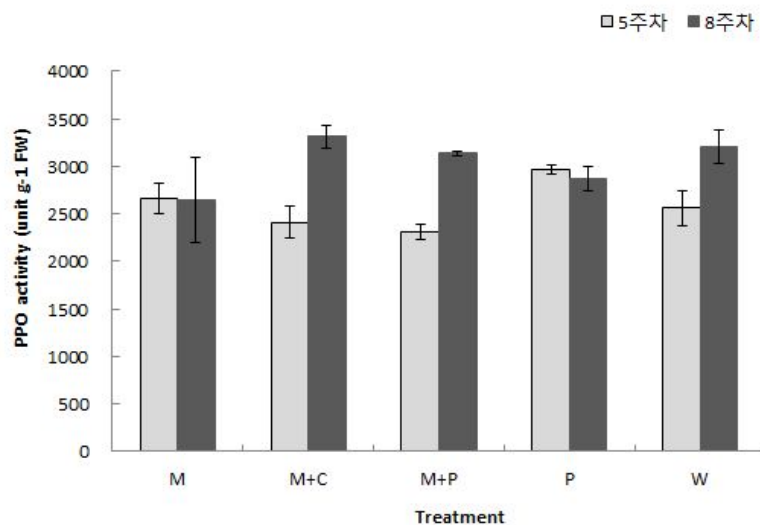


그림 135. 포트 실험에서의 작물체 polyphenol oxidase (PPO) 활성.

M : 미생물 대량배양복합체 배양액 처리, M+C : 미생물 대량배양복합체 배양액 + 게껍질 분말 처리, M+P : 미생물 대량배양복합체 배양액 + 농약 처리, P : 농약 처리, W : 물 처리

(3) 작물체 β -1,3-glucanase 및 chitinase

작물체(멜론) 포트 실험에서 뿌리혹선충 방제 기작 규명을 위한 작물체 내 병방제 효소인 키틴분해효소 (chitinase) 활성을 조사한 결과 1차 조사 (토마토 정식 5주 후)에서는 처리구간 활성 차이가 거의 나타나지 않았다. 하지만 2차 조사 결과 (토마토 정식 8주 후) M 처리구 3.26, M+C 처리구 3.15, M+P 처리구 4.46, P 처리 4.56 및 W 처리구 2.84 Unit/g FW로 W 처리구가 가장 낮게 조사되었다 (그림 136).

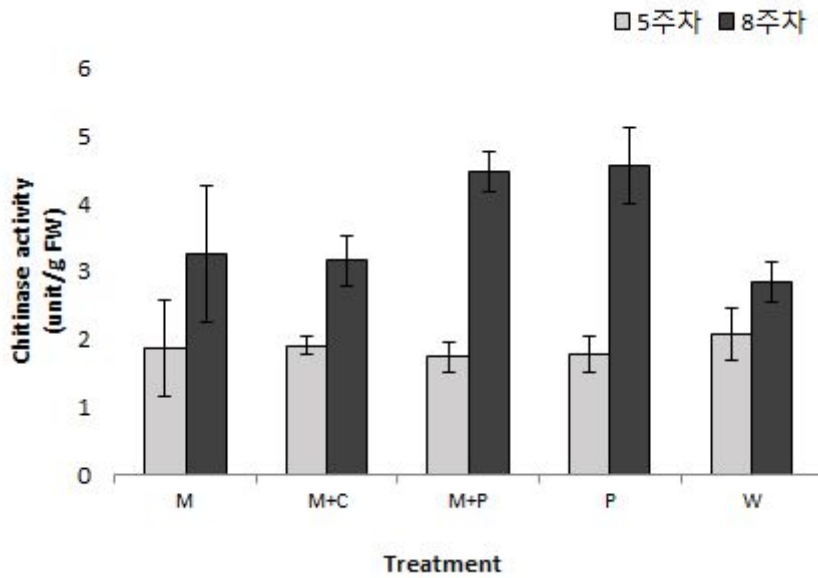


그림 136. 포트 실험에서의 작물체 키틴분해효소(chitinase) 활성.

M : 미생물 대량배양복합체 배양액 처리, M+C : 미생물 대량배양복합체 배양액 + 게껍질 분말 처리, M+P : 미생물 대량배양복합체 배양액 + 농약 처리, P : 농약 처리, W : 물 처리

작물체(멜론) 포트 실험에서 뿌리혹선충 방제 기작 규명을 위한 작물체 내 병방제 효소인 글루칸분해효소 (glucanase) 활성을 조사한 결과 1차 조사 (토마토 정식 5주 후)에서 각각 M 처리구 25.3, M+C 처리구 36.0, M+P 처리구 42.9, P 처리구 34.8 및 W 처리구 33.5 Unit/g FW로 조사되었다. 2차 조사 결과 (토마토 정식 8주 후)는 W 처리구에서 가장 높게 나타났고, 그 다음으로 M+P, M, P, M+C 순으로 조사되었다 (그림 137).

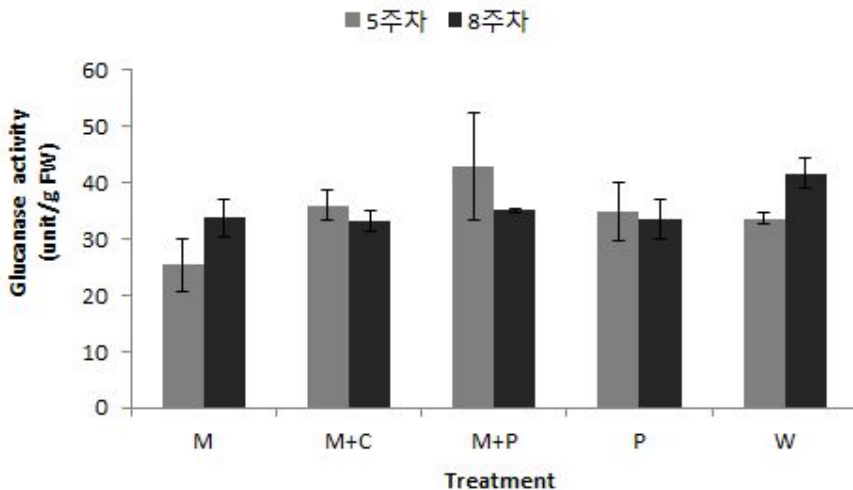


그림 137. 포트 실험에서의 작물체 글루칸분해효소(glucanase) 활성.

M : 미생물 대량배양복합체 배양액 처리, M+C : 미생물 대량배양복합체 배양액 + 게껍질 분말 처리, M+P : 미생물 대량배양복합체 배양액 + 농약 처리, P : 농약 처리, W : 물 처리

(4) 토양 키틴분해미생물 및 젤라틴분해미생물 수

멜론 포트 실험에서 뿌리혹선충 방제에 관한 기작을 찾기위해 토양내 키틴분해미생물 및 젤라틴분해 미생물 수를 조사하였다. 각각의 미생물 조사는 키틴배지 아가배지와 젤라틴 아가배지를 이용하였다. 1차 조사 결과 항선충 미생물 배양액을 주기적으로 관주한 M처리구는 키틴분해미생물의 개체수가 M 처리구 5×10^6 CFU/g soil, M+C 처리구 5×10^6 CFU/g soil, M+P 처리구 3×10^6 CFU/g soil, P 처리구 2×10^6 CFU/g soil 및 W 처리구 0×10^6 CFU/g soil로 조사되었고, 2차 조사는 M 처리구 11.7×10^6 CFU/g soil, M+C 처리구 7.7×10^6 CFU/g soil, M+P 처리구 10.3×10^6 CFU/g soil, P 처리구 2.3×10^6 CFU/g soil 및 W 처리구 3.3×10^6 CFU/g soil로 M 처리구에서 가장 높게 나타났다. 이러한 결과는 대조구인 물 처리구 보다 토양내 키틴분해 미생물 개체수가 높은 것으로 나타났다. 이는 토양에 처리된 게깍질분말의 영향과 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리 때문인 것으로 사료된다. 이러한 토양미생물이 토양내 다수 존재할 때 항선충 활성이 있는 것으로 보고 되어지고 있다 (그림 42). 젤라틴분해미생물 개체수는 1차 및 2차 조사 모두 M 처리구가 가장 높게 나타났으며, 물 처리구가 가장 낮게 조사되었다 (그림 138).

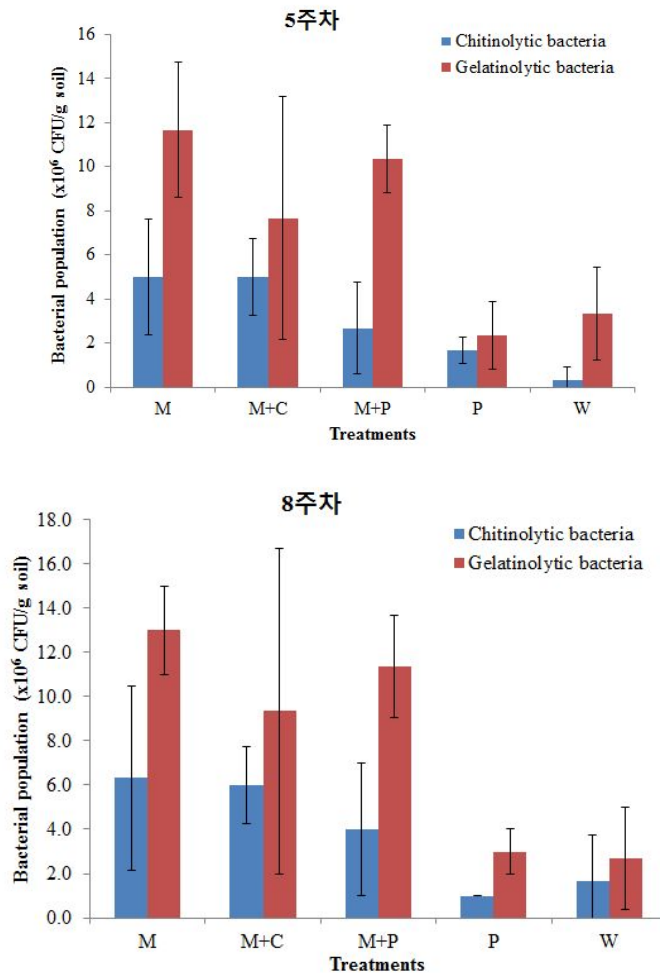


그림 138. 포트실험에서 토양내 키틴분해 및 젤라틴분해 미생물 수.

M : 미생물 대량배양복합체 배양액 처리, M+C : 미생물 대량배양복합체 배양액 + 게깍질 분말 처리, M+P : 미생물 대량배양복합체 배양액 + 농약 처리, P : 농약 처리, W : 물 처리

제 4 절 포장에서 항선충 미생물 대량배양복합체 시용에 따른 효능 연구

1. 토마토 작물

1-1. 토마토 작물에서의 선충 억제 활성 및 작물 성장 효과 조사 (1차실험)

항선충미생물 대량배양복합체 포장 실증 실험을 위해 (담양군 농업기술센터)에서 주관으로 담양군에 위치한 토마토 재배 농가를 선정하여 아래와 같이 처리구를 설정하고 각각의 처리구별로 처리하였다. 작물체를 대상으로 현장실증시험(16주간)을 추진하면서 작물체 생육특성(초장, 생체중, 건물중, 수확량)과 토양 및 식물체의 선충밀도 및 감염률(난낭 및 후수)등을 조사하였다. 또한 미생물 대량배양액의 주기적 살포로 인한 토양의 이화학적특성 변화 조사를 위해 정식전, 정식후 30, 60, 90, 수확 후로 구분하여 시험포장의 토양시료를 채취·분석하였다.

가. 시험기간 : 2013. 1 ~ 6(5개월)

나. 대상작물 : 토마토

다. 대상균주 : *Lysobacter capsici* YS1215 (젤라틴/키틴분해 미생물)

라. 배양방법 : 농가포장의 배양통에 대량배양액+미생물을 첨가후 3~4일 배양 후
미생물보조영양원 및 영양액을 첨가하여 3일간 추가배양

마. 시험구세분 : 5처리 2반복(난괴법)

바. 처리방법 : 2주일 간격으로 미생물 배양액 3배 희석액 0.6리터/주 관주

사. 작물보호제(농약) : 선충탄

■ 처리구

M : 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리 --> 토마토 정식 후 배양액을 주기적으로 처리하였다.

MP : 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 + 농약 처리--> 토마토 정식전 농약을 1회 처리 후, 토마토 정식 후 배양액을 주기적으로 처리하였다.

P : 농약 처리 --> 토마토 정식전 농약을 1회 처리 후, 토마토 정식 후 주기적 관수 처리만 하였다.

C : 비료 처리 --> 토마토 정식 후 비료(미생물 배양시 들어가는 NPK 양을 계산 후 복합비료를 사용함)를 주기적으로 처리하였다.

NT : 물 처리 --> 토마토 정식 후 관수만 주기적으로 처리하였다.



그림 139. 작물체 실증시험포장 실험구 실측 (담양군 수북면 소재) 및 작물 정식전 시험구별 배양액 처리



그림 140. 향선충미생물 대량배양복합체 농가 자가배양 모습 (담양군 토마토 농가).



그림 141. 실험구 처리별 향선충미생물 대량배양복합체 배양액 관주 및 시료채취.

○ 시험 전 토양의 뿌리혹선충 밀도 조사

토마토 정식 전 및 실험구별 처리 전 토양내 유충 수 조사를 위해 처리구별 실험구를 구

회화 한 후 토양을 채취하여 선충밀도를 조사하였다. 정식전 실험구 별 선충밀도는 M(항선충미생물 대량배양복합체 배양액)처리구에서 468마리/g soil, MP(농약 + 항선충미생물 대량배양복합체 배양액) 처리구에서 266마리/g soil, P(합성농약) 처리구에서 94마리/g soil, C(배지) 처리구에서 399마리/g soil, NT(무처리) 처리구에서 272마리/g soil로 각각 조사되었다. (그림 142).

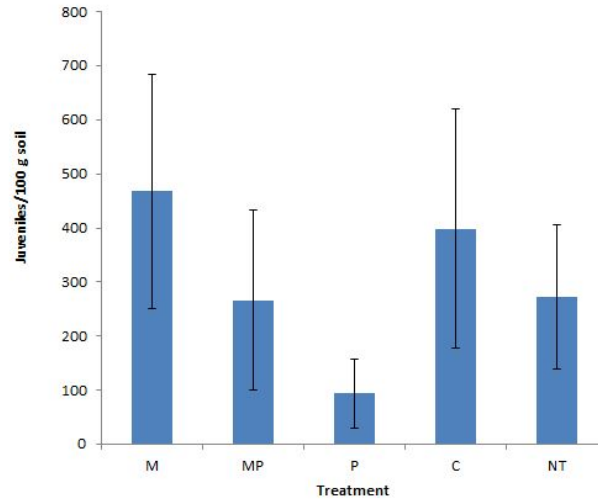


그림 142. 작물 정식 전 토양내 유충 밀도조사 결과.

M: 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리구, **MP:** 농약 + 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리구, **P:** 농약 처리구, **C:** 비료 처리구, **NT:** 물 처리구

○ 시험 전 토양의 효소활성

토마토 정식 전 및 실험구별 키틴분해효소(chitinase) 활성을 조사한 결과 M: 0.15 unit/g soil, MP: 0.18 unit/g soil, P: 0.13 unit/g soil, C: 0.23 unit/g soil, NT: 0.19 unit/g soil 이었고, 젤라틴분해효소(gelatinase) 활성은 M: 0.88 unit/g soil, MP: 0.97 unit/g soil, P: 0.95 unit/g soil, C: 0.90 unit/g soil, NT: 0.87 unit/g soil로 조사 되었다 (그림 143).

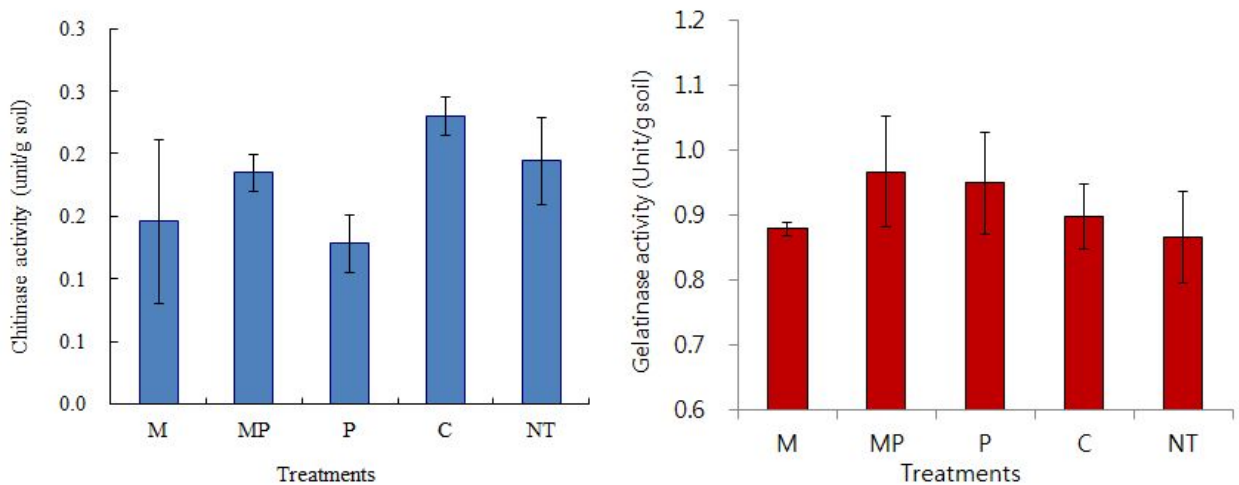


그림 143. 정식전 키틴분해효소(chitinase) 및 젤라틴분해효소(gelatinase) 활성 조사.

M: 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리구, **MP:** 농약 + 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리구,

P: 농약 처리구, C: 비료 처리구, NT: 물 처리구

○ 시험 전 토양의 세균밀도

토마토 정식 전 및 실험구별 키틴분해미생물(chitinolytic bacteria) 개체수를 조사한 결과 M: 15 ($\times 10^5$ CFU/g soil), MP: 17.5 ($\times 10^5$ CFU/g soil), P: 17.5 ($\times 10^5$ CFU/g soil), C: 10.0 ($\times 10^5$ CFU/g soil), NT: 7.5 ($\times 10^5$ CFU/g soil)이었고, 젤라틴분해미생물(gelatinolytic bacteria)의 개체수는 M 처리구에서 323 ($\times 10^5$ CFU/g soil), MP: 310 ($\times 10^5$ CFU/g soil), P: 50 ($\times 10^5$ CFU/g soil), C: 70 ($\times 10^5$ CFU/g soil), NT: 158 ($\times 10^5$ CFU/g soil)의 밀도를 보였다 (그림 144).

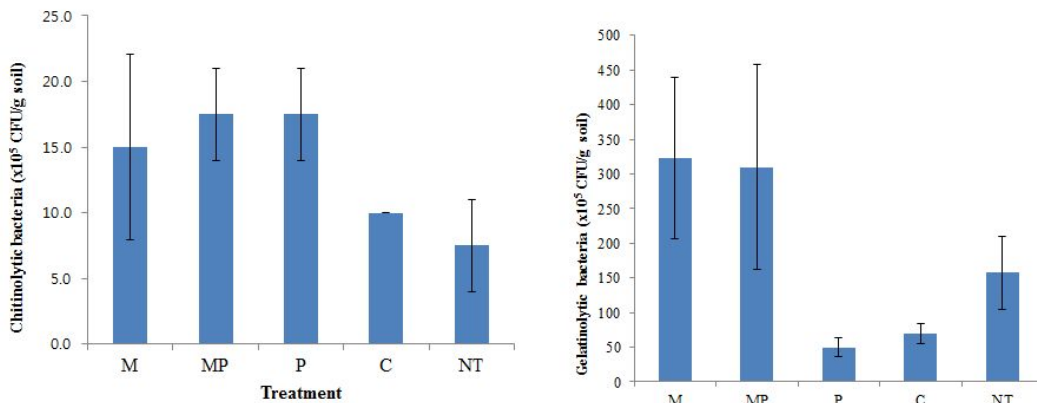


그림 144. 정식 전 토양의 세균(chitinolytic bacteria, gelatinolytic bacteria) 밀도.

M: 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리구, MP: 농약 + 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리구, P: 농약 처리구, C: 비료 처리구, NT: 물 처리구

가. 작물체 선충 억제 활성

(1) 토양내 선충 밀도 억제 효과

뿌리혹선충 밀도가 높은 시설재배지 농가포장에서 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리가 토마토 뿌리혹선충 방제에 미치는 영향을 조사하기 위해 정식 후 1개월(1차조사), 2개월(2차조사) 및 4개월(3차조사)로 구분하여 총 3회에 걸쳐 조사시료를 채취하여 토양내 유충밀도, 뿌리혹수 및 난낭수를 조사하였다. 조사 결과 초기 선충의 피해 정도를 알 수 있는 1차조사 결과에서는, 배지를 처리한 대조구(C)의 유충밀도가 가장높았고, 정식 후 2개월이 경과한 2차조사 결과에서는 합성농약을 처리한 P처리구에서 유충밀도가 가장높았다. 그리고 토마토 수확기인 정식 후 3차조사에서는 주기적으로 물을 처리한 NT구의 토양내 선충 유충밀도가 가장 높은 것으로 조사되었다. 이러한 결과는 농약의 처리가 초기 토양내 선충의 밀도를 감소 시켰지만, 토양내에 남아 있는 선충의 감염 및 재생산으로 인해 2차조사에서는 피해가 가장 심하게 나타난 것으로 보여진다. 더불어, 3차조사 결과 대조구(C) 및 NT(무처리)구의 토양내 선충 유충 밀도가 가장 높게 나타난 것은 비료의 처리와 및 물 처리로는 선충을 방제 할 수 없음을 보여준 결과로 판단된다. 반면에 M: 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리구는 정식 초기(1차)에서는 높은 선충 유충 밀도를 보였지만, 2차 및 3차 조사에서 대조구인 대조구(C) 및

NT(무처리)구에 비해 토양내 유충의 밀도가 상당히 낮은 것으로 조사되었다. 가장 낮은 선충 유충의 밀도를 보인 처리구로는 MP(항선충미생물 대량배양복합체 배양액+농약) 처리구였다. 이러한 결과는 초기 토양에 있는 선충의 밀도가 합성농약 처리에 의해 줄어든 후, 항선충미생물 대량배양복합체 처리로 인해 지속적으로 토마토의 선충억제 효과로 생각된다 (그림 145).

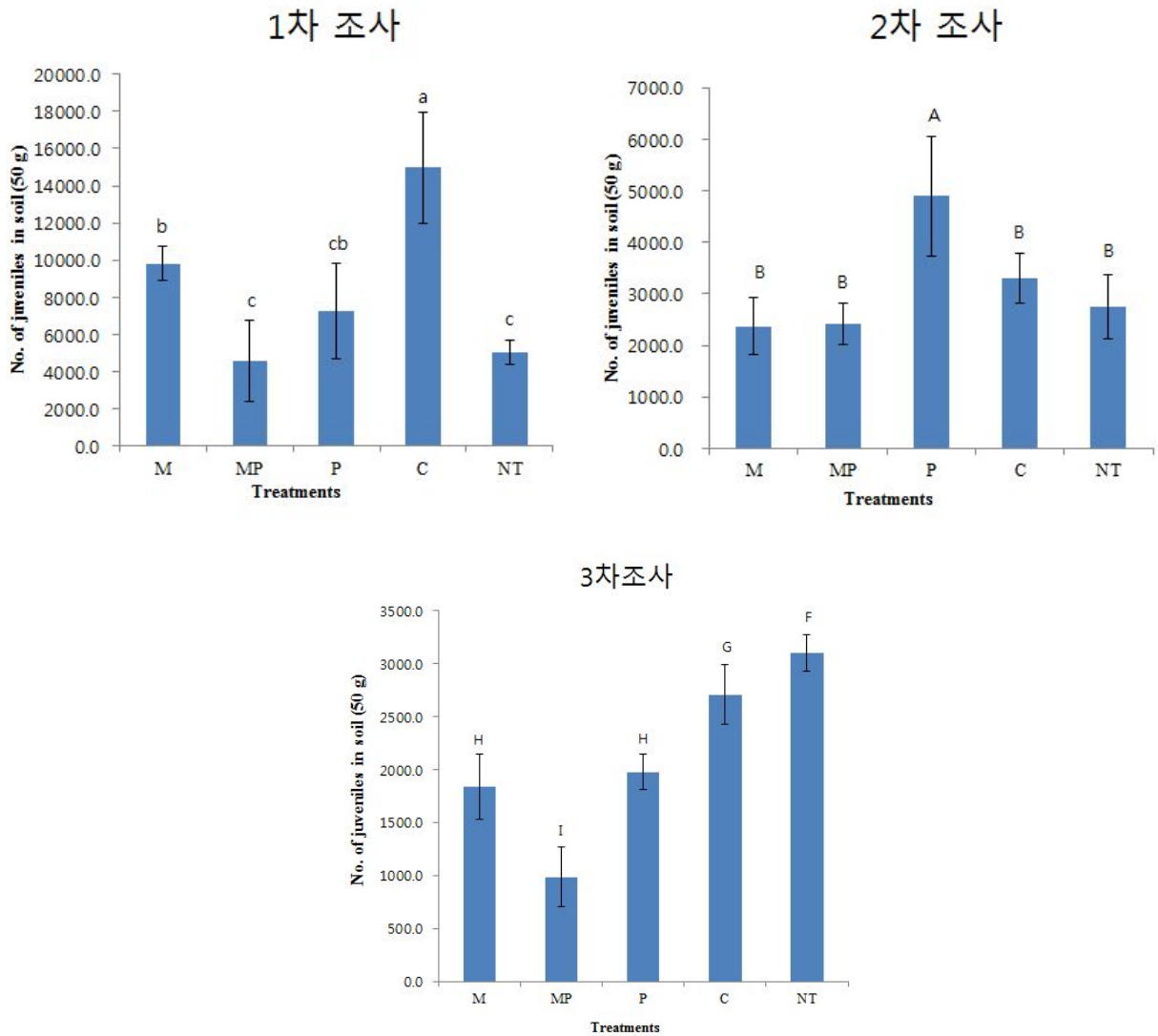


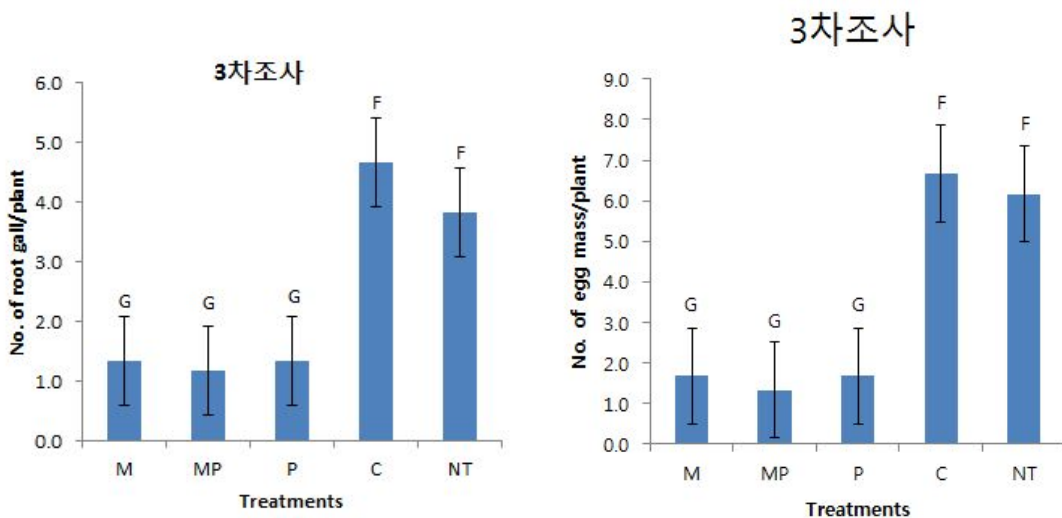
그림 145. 작물체 생육시기별 토양 내 선충(유충)밀도 변화.

3차조사에서 농약 + 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리구 (MP)가 가장 낮은 유충 밀도를 나타냄.

M: 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리구, MP: 농약 + 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리구, P: 농약 처리구, C: 비료 처리구, NT: 물 처리구

(2) 작물체 선충감염 억제효과

농가 포장 실증을 통해 항선충 미생물 현장배양액의 주기적 관주를 통한 작물체 뿌리혹선충 감염 억제효과를 조사코자 토마토에 시험작물로 항선충미생물 대량배양복합체 배양액의 주기적 관주처리가 토마토 뿌리의 뿌리혹선충 감염억제에 미치는 영향을 조사하기 위해 2주일 간격으로 항선충 미생물 배양액을 관주처리한 후 1개월(1차), 2개월(2차), 4개월(3차)에 걸쳐 작물체(토마토)를 채취한 후 뿌리혹 수, 난낭 수, 및 알 수를 조사하였다. 그 결과 1차 및 2차 조사에서는 작물체 뿌리가 선충에 감염되지 않아 뿌리혹 수, 난낭 수, 및 알 수가 검출되지 않았다. 그러나, 정식 후 4개월이 경과한 3차조사에서는 M(항선충미생물 대량배양복합체 배양액) 처리구, MP(농약 + 항선충미생물 대량배양복합체 배양액) 처리구, P(합성농약) 처리구의 뿌리혹 수가 각각 1.3개, 1.2개 및 1.3개로 대조구 및 무처리구에 비해 낮았다. 난낭 수에서는 M, MP 및 P 처리구에서 각각 1.7개, 1.3개, 1.7개로 조사된 반면에 C: 비료 처리구 및 NT: 물 처리구에서의 난낭 수는 4.7개 및 3.8개를 나타냈다. 이러한 결과를 종합해 볼 때 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리의 처리가 농약처리구에 비하여 유사한 결과를 나타낸 것으로 보아 뿌리혹 선충을 방제 하는데 효과적인 것으로 사료되며, 비료 처리구 및 물 처리구에 비하여서도 혹 수에서는 3.6배 및 2.9배, 난낭 수에서는 3.9배 및 3.6배의 뿌리혹선충 방제 효과가 있는 것으로 조사되었다. 뿌리혹선충 알 수에있어서도 뿌리혹수 및 난낭 수의 조사 결과에 같은 경향을 보였다. 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리구(M)의 알 수가 C(대조구) 및 NT(무처리)구에 비하여 상당히 낮게 조사되었다. 더불어 합성농약 처리구(P)와 비교하였을 때에도 거의 차이가 나타나지 않았다 (그림 146).



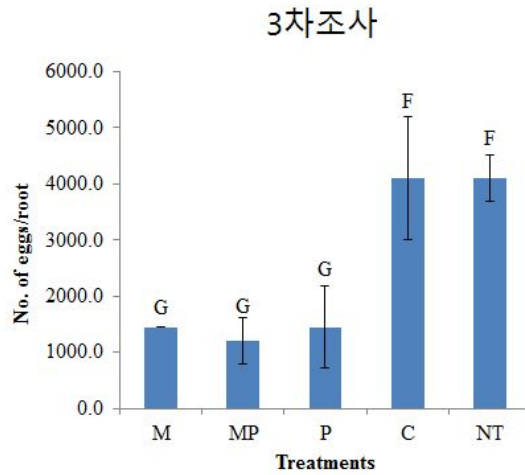


그림 146. 작물체 뿌리혹 선충 감염률 조사결과

3차 조사결과 M, MP 및 P 처리구가 C 및 NT 처리구보다 뿌리혹수, 난낭수 및 알 수에서 낮게 나타남.

M: 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리구, **MP:** 농약 + 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리구, **P:** 농약 처리구, **C:** 비료 처리구, **NT:** 물 처리구

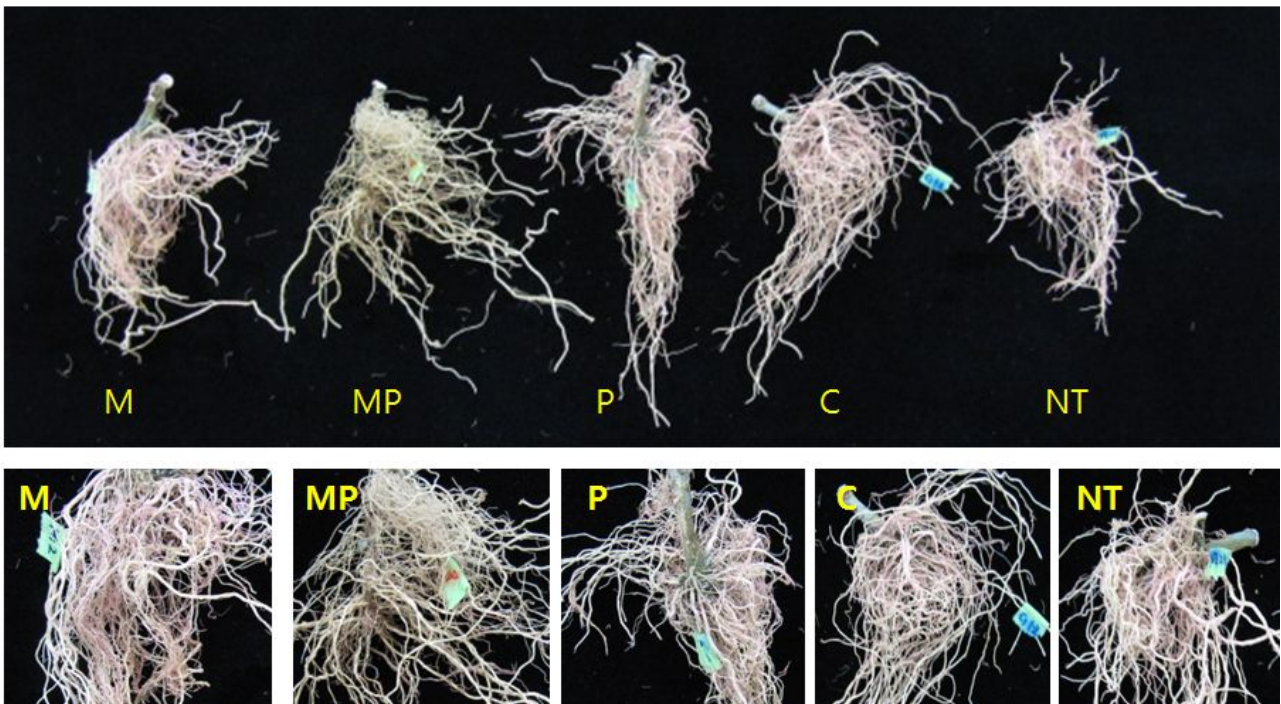


그림 147. 정식 후 8주차 토마토 뿌리 모습.

M: 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리구, **MP:** 농약 + 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리구, **P:** 농약 처리구, **C:** 비료 처리구, **NT:** 물 처리구

나. 작물체 성장 효과

(1) 지상부 생초장

항선충미생물 대량배양복합체 포장실증은 전라남도 담양군 수북면에 소재한 토마토 재배농가

시설하우스에서 실시하였으며, 항선충 미생물의 배양은 농가포장에서 직접 대량배양한 후 2주일 간격으로 시험구에 주당 0.6리터를 관주 처리하였다. 항선충 미생물 대량배양액 처리에 따른 토마토의 생육특성은 정식 후 4주, 8주, 16주로 나누어 뿌리의 생체중 및 건조중, 지상부의 생체중 및 건조중을 조사하였다. 정식 후 4주째(1차조사) 각 실험구 별 작물체 초장을 조사한 결과 배지를 처리한 대조구에서 54.3cm로 초장이 가장 높았으나 다른 처리구간의 통계적 유의성은 나타나지 않았고, 항선충 미생물 배양액을 주기적으로 살포한 M처리구의 생장 우수성은 관찰되지 않았다. 하지만, 정식 후 8주차가 경과한 2차 조사에서는 M처리구의 초장이 125.3cm로 가장 높은 초장을 보이며 생육이 양호하였다. 그러나 포장 실증시험의 특성 상 편차범위가 넓어 처리구간의 통계적 유의성은 없었다. 하지만, 항선충 미생물의 주기적 살포로 인한 작물체 생육은 양호한 것으로 판단된다. (그림 148).

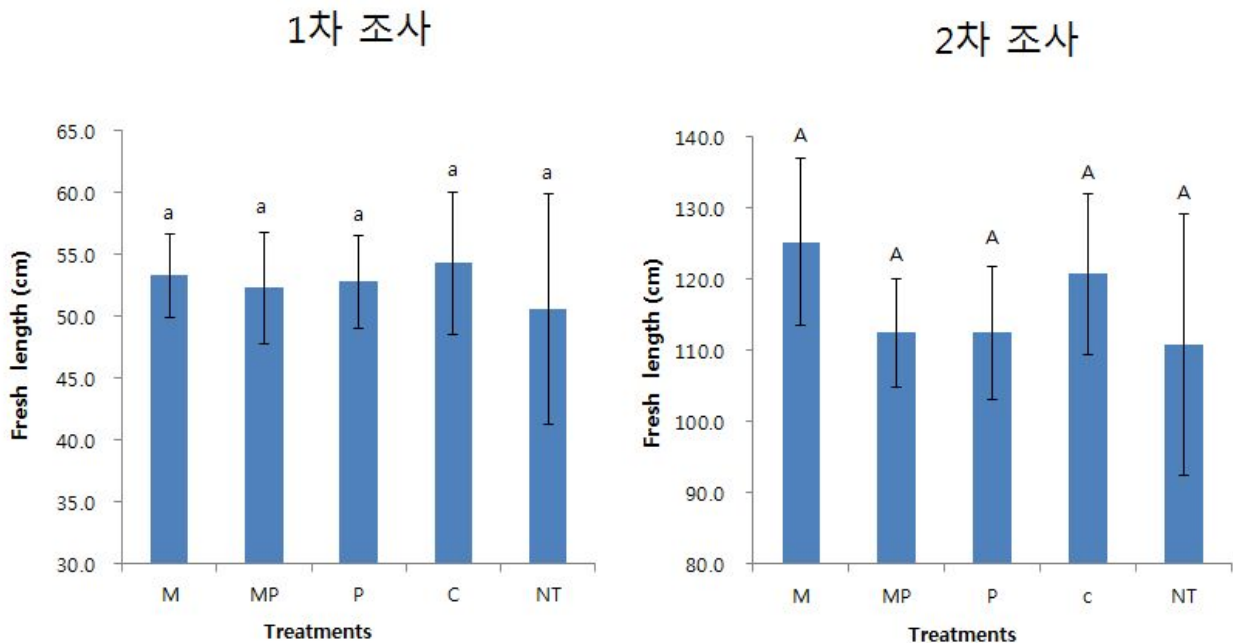


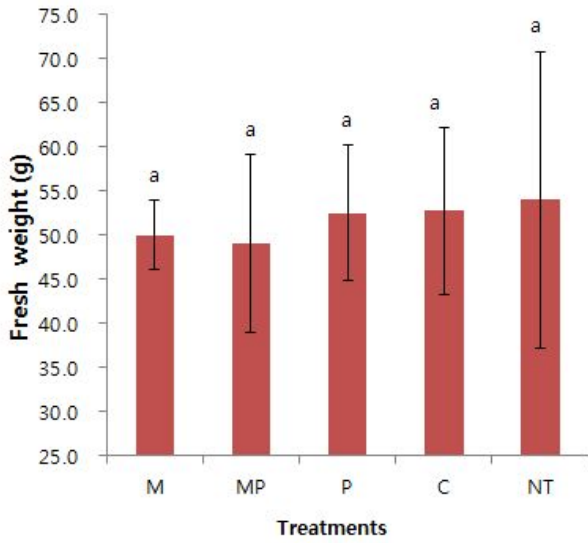
그림 148. 정식 후 토마토 생육에 따른 초장 변화
생초장 변화는 1차 및 2차 조사에서 처리구간 차이를 보이지 않음.

M: 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리구, **MP:** 농약 + 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리구, **P:** 농약 처리구, **C:** 비료 처리구, **NT:** 물 처리구

(2) 지상부 생체중 및 건조중

정식 후 4주차 및 8주차 토마토 생체중을 조사한 결과를 살펴보면 정식 후 4주차에서는 NT(무처리구)의 생체중이 다른 처리구에 비해 근소하게 높았다. 이러한 원인은 초기 배양액의 농도장해로 처리구의 활착이 지연된 영향으로 생각된다. 다만, 정식 후 8주차 생체중을 조사한 결과에서는 배지처리구인 대조구 및 미생물을 주기적으로 관주처리한 M처리구의 생체중이 각각 423g과 415g으로 가장 높았다 (그림 149).

1차 조사



2차 조사

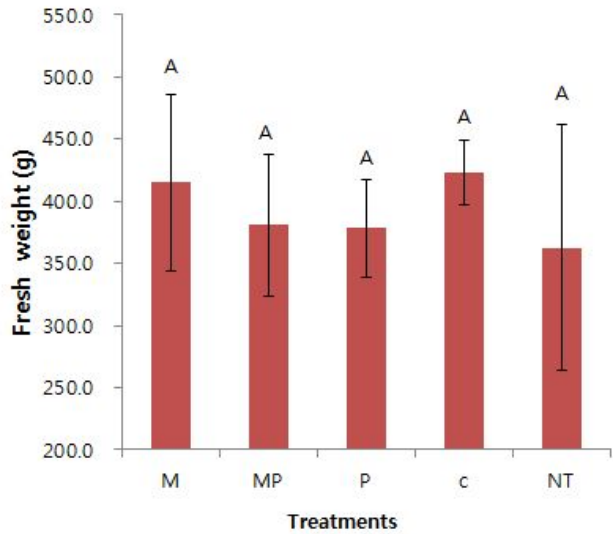


그림 149. 정식 후 토마토 생육에 따른 생체중 변화.

생초장 변화는 1차 및 2차 조사에서 처리구간 차이를 보이지 않음.

M: 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리구, **MP:** 농약 + 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리구, **P:** 농약 처리구, **C:** 비료 처리구, **NT:** 물 처리구

토마토 작물체 전체중을 정식후 4주차와 8주차로 구분하여 조사한 결과, 4주차에서는 배지 처리구인 대조구에서 가장 높게 조사되었다. 하지만 다른 처리구간의 통계적 유의성은 나타나지 않았다. 정식후 8주차인 2차 조사에서는 M(항선충미생물 대량배양복합체 배양액) 처리구의 건조중이 67.4g으로 대조구의 66.3g에 비해 높았다. 이러한 결과는 항선충미생물 대량배양복합체 처리구가 작물체의 유기물 및 무기물의 함량이 높인다는 것으로, 항선충미생물 대량배양복합체 처리가 작물체에 좋은 영향을 미친 것으로 판단된다 (그림 150).

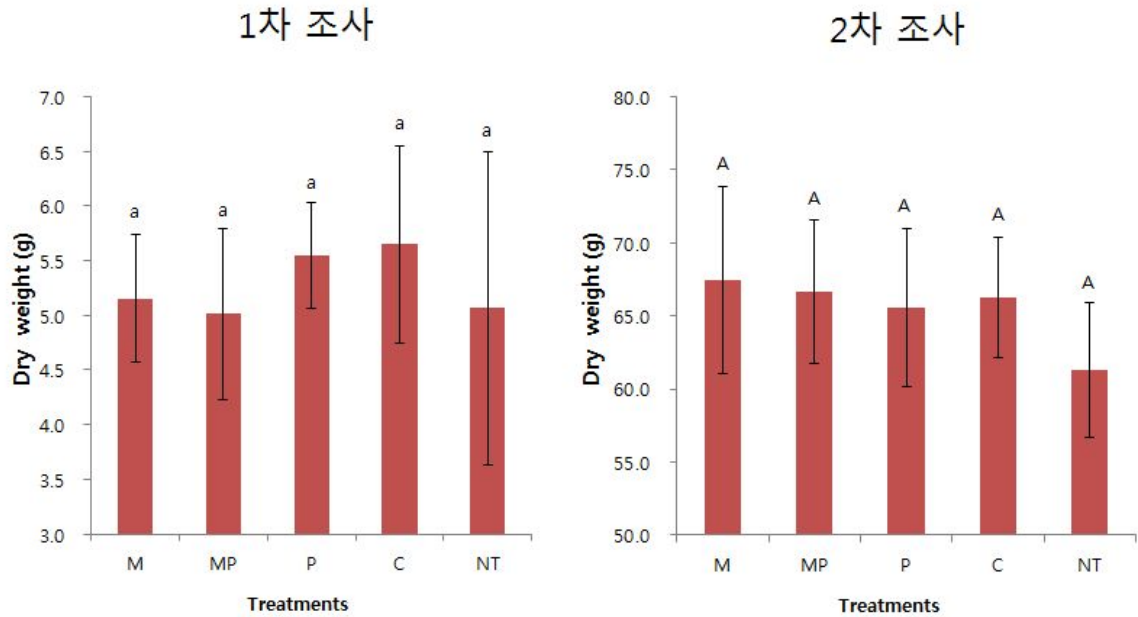


그림 150. 정식 후 토마토 생육에 따른 작물체 건조무게 변화.

생초장 변화는 1차 및 2차 조사에서 처리구간 차이를 보이지 않음.

M: 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리구, **MP:** 농약 + 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리구, **P:** 농약 처리구, **C:** 비료 처리구, **NT:** 물 처리구

(3) 수확량 및 품질조사

항선충미생물 대량배양복합체 현장배양액의 주기적 살포 후 수확량 조사를 위해 4화방에서 적심하였고, 실험구 별 수확된 과실의 무게를 측정하여 주당 평균수량을 표 20에 나타내었다. 실험구 별 주당 평균수량을 조사한 결과 화학약제 방제후 항선충미생물 대량배양복합체 현장배양액을 주기적으로 처리한 실험구(MP)에서 주당 수량이 가장 높았고, C(비료) 처리구 및 화학약제 방제후 물을 주기적으로 처리한 P(농약) 처리구에서 상대적으로 낮았다.

표 20. 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리에 따른 토마토 수확량(g/주)

구 분	합계	1화방	2화방	3화방	4화방
M	3,091.0	772.4	866.0	956.1	497.5
C	2,976.4	756.3	948.5	730.9	554.0
MP	3,185.9	704.0	914.7	850.2	717.1
P	2,989.6	633.5	885.5	881.6	575.8
NT	3,036.2	719.4	929.6	821.6	565.6

* **M:** 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리구, **MP:** 농약 + 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리구, **P:** 농약 처리구, **C:** 비료 처리구, **NT:** 물 처리구

수확된 과일의 상품성을 과일의 외관상 크기를 기준으로 특품, 상품, 중품으로 구분하여 상품성을 조사한 결과를 표 21에 나타내었다. 수확된 과일의 특품비율은 69.3%로 MP: 농약 + 향선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리구에서 가장 높았다. M: 향선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리구의 특품비율은 63.0%로 NT: 물 처리구보다 다소 높게 나타났다. 특품, 상품, 중품의 합계는 31,651g으로 M: 향선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리구가 다른 처리구에 비해 가장 높게 조사되었다.

표 21. 향선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리에 따른 토마토 과실의 상품성 조사결과(g/10주)

구 분	합계	Index (%)	특품과	Index (%)	상품과	Index (%)	중품과	Index (%)
M	31,651	100.0	19,927	63.0	9,063	28.6	2,661	8.4
C	31,323	100.0	20,744	66.2	8,326	26.6	2,253	7.2
MP	30,976	100.0	21,476	69.3	8,617	27.8	883	2.9
P	31,505	100.0	20,834	66.1	9,209	29.2	1,462	4.6
NT	31,311	100.0	19,672	62.8	9,200	29.4	2,439	7.8

* M: 향선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리구, MP: 농약 + 향선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리구, P: 농약 처리구, C: 비료 처리구, NT: 물 처리구

다. 토양 내 및 작물체 효소 활성 및 토양 미생물 측정

(1) 토양내 chitinase 및 gelatinase 활성 측정

향선충미생물 대량배양복합체 포장 실증 실험에서 뿌리혹선충 억제 기작과 상관관계가 있는 토양 내 키틴분해효소(chitinase) 활성을 조사하기위해, 토마토 정식 후 4주째(1차 조사), 8주째(2차 조사) 및 16주째(3차 조사) 토양 시료를 채취하여 (주)푸르네 실험실에 분석하였다. 조사 결과 토양에 게겍질과 향선충미생물 대량배양복합체 배양액(*Lysobacter capsici* YS1215)을 처리한 향선충미생물 대량배양복합체 배양액(M) 처리구에서 각각 0.13 Unit/g soil, 0.34 Unit/g soil 및 0.27 Unit/g soil 로 다른 처리구에 가장 높게 나타났다. 하지만 1차 조사에서부터 3차 조사 때까지 토양 내 키틴분해효소 활성이 점진적으로 증가하지 않았고, 다른 처리구와의 통계적 유의성도 나타나지 않았다. 이는 포장 실증의 특성 및 조사기간과 시기의 문제인 것으로 사료된다. 그러나 토양 내 키틴분해효소 활성증가는 토양에 게겍질과 미생물을 처리한 효과인 것으로 보여 진다 (그림 151).

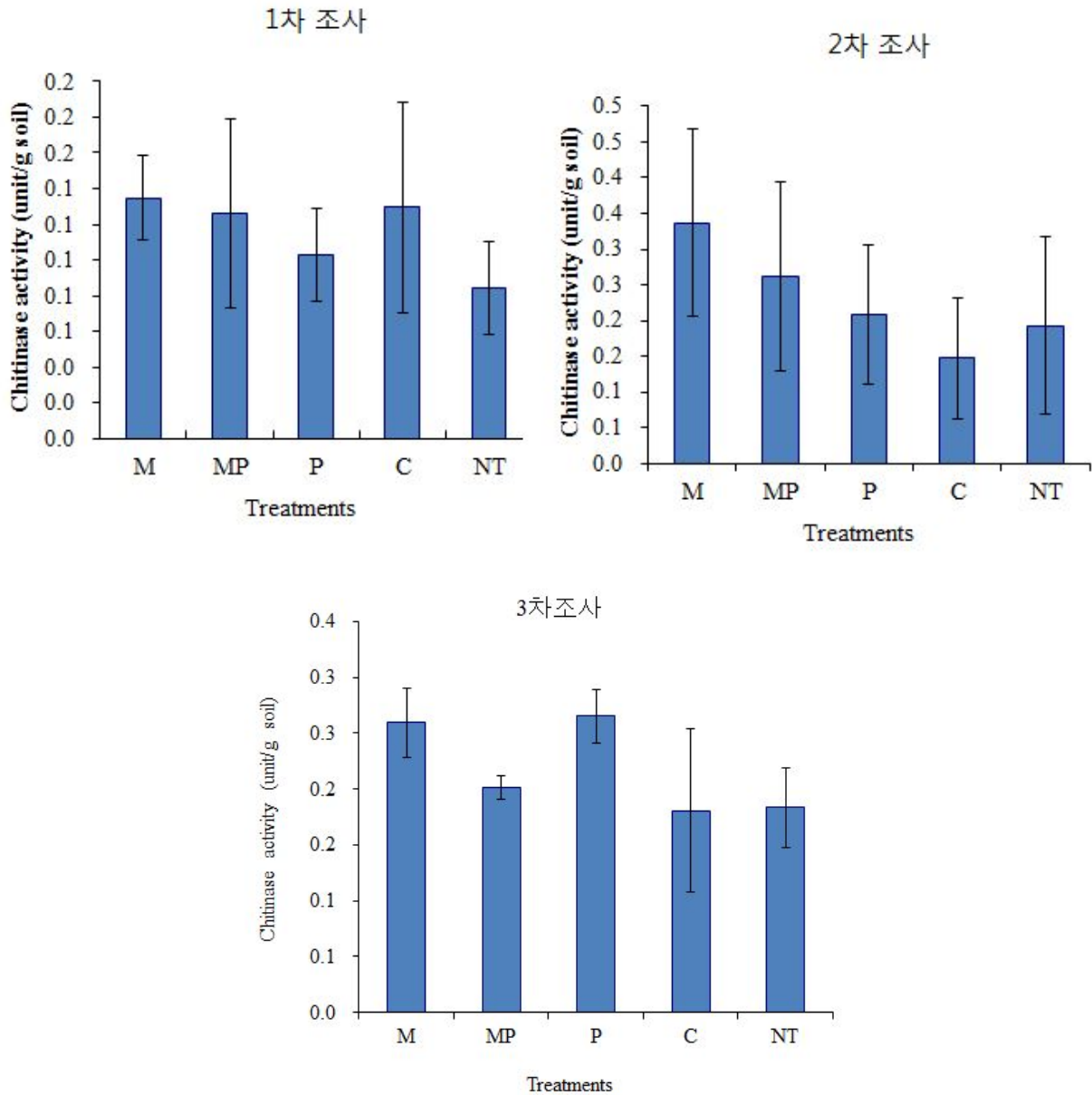


그림 151. 포장 실증에서 토양 내 키틴분해효소(chitinase) 활성 조사.

M: 향선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리구, **MP:** 농약 + 향선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리구, **P:** 농약 처리구, **C:** 비료 처리구, **NT:** 물 처리구

토양 내 젤라틴분해효소(gelatinase) 활성을 조사하기 위해, 토마토 정식 후 4주째(1차 조사), 8주째(2차 조사) 및 16주째(3차 조사) 토양 시료를 채취하여 ㈜푸르네 실험실에 분석하였다. 조사 결과 1차 조사, 3차 조사에서 토양 내 키틴분해효소 활성 조사와 유사한 경향을 보였다. 토양에 계겹질과 향선충미생물 대량배양복합체를 처리한 향선충미생물 대량배양복합체 배양액(M) 처리구에서 각각 1.17 Unit/g soil, 1.64 Unit/g soil 및 1.36 Unit/g soil 로 다른 처리구에 가장 높게 나타났다. 하지만 키틴분해효소 활성과 마찬가지로 1차 조사에서부터 3차 조사 때 까지 토양 내 키틴분해효소 활성이 점진적으로 증가하지 않았고, 다른 처리구와의 통계적 유의성도 나타나지 않았다. 그러나 M 처리구에서 토양 내 젤라틴분해효소 활성이 가장 높은

이유는 토양에 게겍질과 미생물을 처리한 효과인 것으로 보여 진다. 토양에 처리된 게겍질에는 많은 단백질이 함유되어 있어 젤라틴분해효소 활성을 증가 시킬 수 있고, 미생물 배양액 내에도 미생물이 생성한 젤라틴분해효소가 포함되어있다 (그림 152).

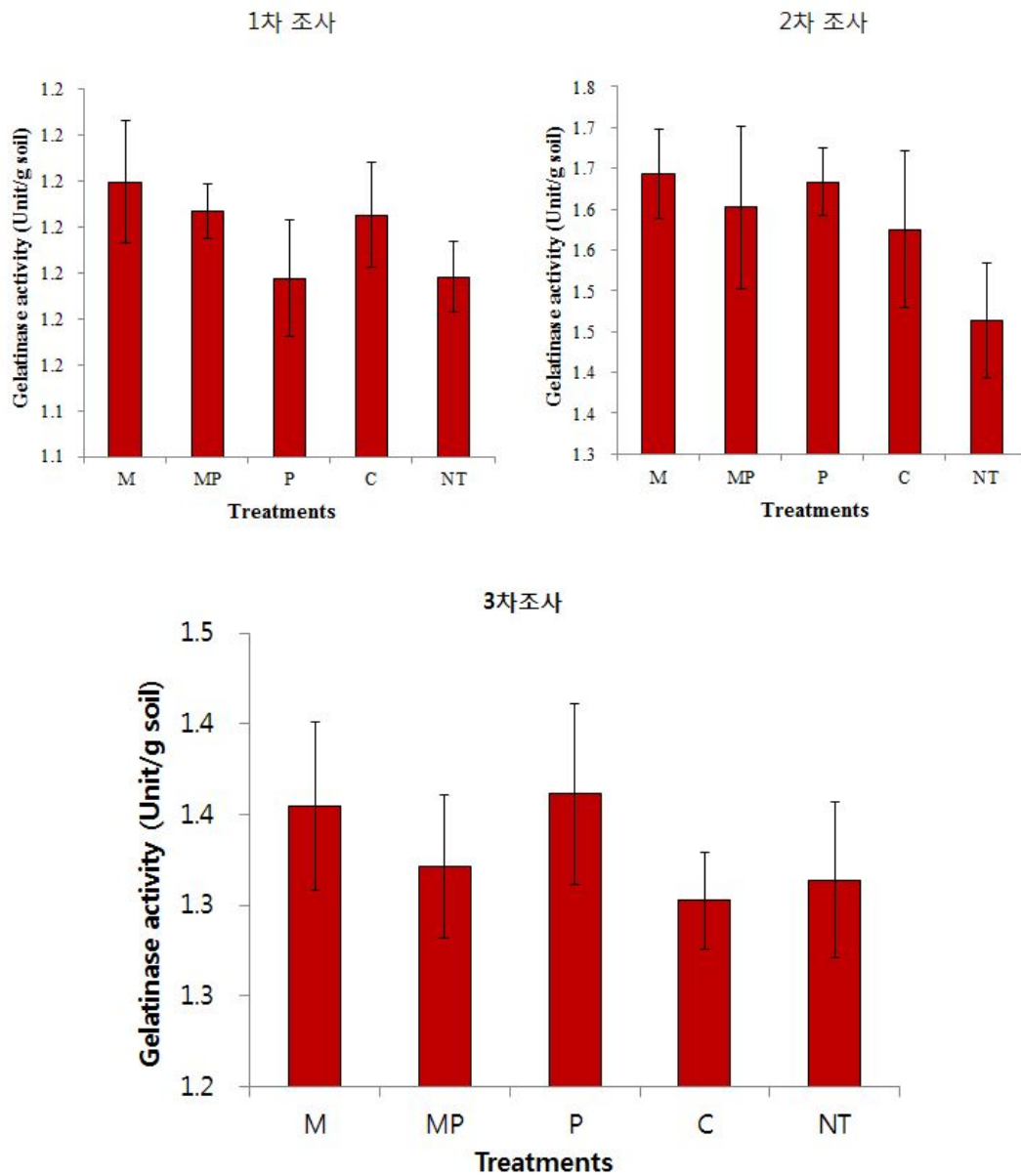


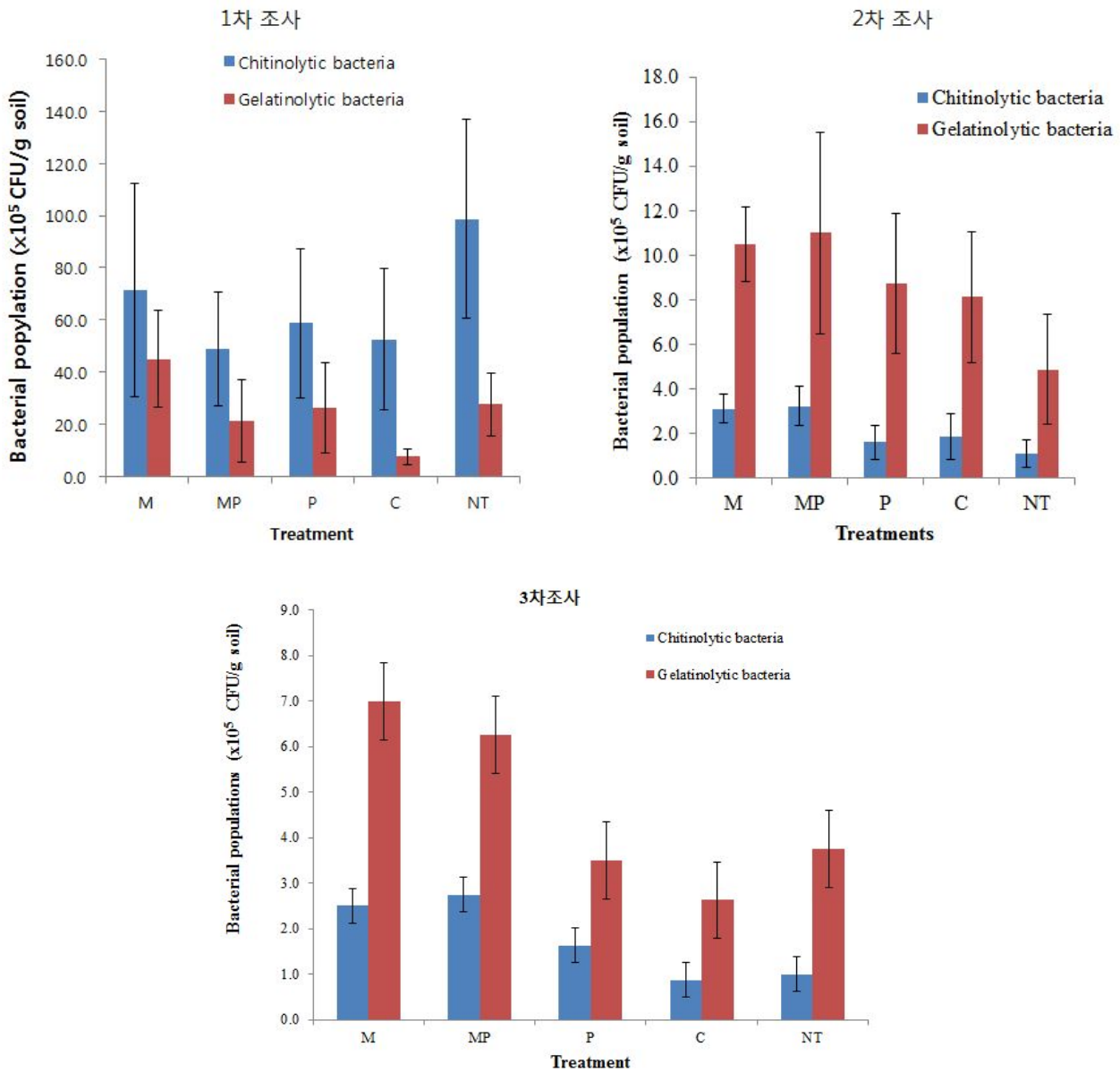
그림 152. 포장 실증에서 토양 내 젤라틴분해효소(gelatinase) 활성 조사.

M: 향선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리구, **MP:** 농약 + 향선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리구, **P:** 농약 처리구, **C:** 비료 처리구, **NT:** 물 처리구

(2) 토양 키틴분해미생물 및 젤라틴분해미생물 개체수 변화

향선충미생물 대량배양복합체 배양액의 주기적 관주에 따른 뿌리혹선충 억제효과를 조사코자 정식 후 1개월, 2개월, 4개월 등 3회에 걸쳐 토양시료를 채취한 후 토양내 키틴분해미생물(chitinolytic bacteria) 및 젤라틴분해미생물(gelatinolytic bacteria) 수를 조사하였다. 조사결과 향선충 미생물 배양액을 주기적으로 관주한 M처리구는 키틴분해미생물의 개체수가 1차: 71.3

($\times 10^5$ CFU/g soil), 2차: 3.1 ($\times 10^5$ CFU/g soil), 3차: 2.5 ($\times 10^5$ CFU/g soil)로 시간이 경과할 수록 감소하는 경향을 보였다. 처리구간의 미생물상 차이를 조사한 결과 1차를 제외하고 2차 및 3차 조사시료에서는 M처리구 및 MP처리구의 키틴분해미생물(chitinolytic bacteria) 및 젤라틴분해미생물(gelatinolytic bacteria) 수가 다른 처리구에 비해 높게 나타났다. 이러한 것은 토양에 처리된 계겹질의 영향과 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리 때문인 것으로 사료된다.(그림 153).



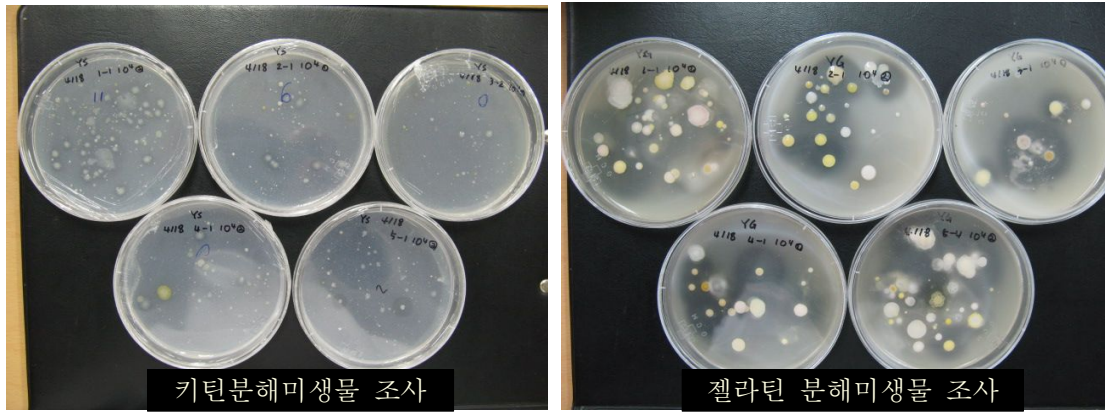


그림 153. 토양 내 키틴분해미생물(chitinolytic bacteria) 및 젤라틴분해미생물(gelatinolytic bacteria) 수.
M: 향선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리구, **MP:** 농약 + 향선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리구,
P: 농약 처리구, **C:** 비료 처리구, **NT:** 물 처리구

라. 토양의 이화학적 특성 변화

향선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리에 따른 토양의 이화학적특성변화를 조사코자 토마토 실험전, 정식전, 정식후 30, 60, 90, 수확후로 구분하여 총 6회 표토(0~15cm)시료를 분석하였고, 그 결과를 표 22에 제시하였다.

표 22. 항선충미생물 대량배양복합체 처리에 따른 토양의 이화학적 특성변화 종합

구 분	pH	O.M	Av.P ₂ O ₅	Exc. Cation(cmol ⁺ /kg)			E.C	L.R	
	1:5 H ₂ O	g kg ⁻¹	mg kg ⁻¹	K	Ca	Mg	dS/m	kg/10a	
실험전(01.24)	7.09	27	733	0.48	8.9	3.9	2.50	0	
정식전 (1. 31)	M	7.54	25.0	683.0	0.33	8.40	3.55	2.02	0
	C	7.33	27.5	716.0	0.37	8.40	3.80	1.90	0
	MP	7.30	26.5	701.5	0.36	7.95	3.65	2.11	0
	P	7.31	28.0	649.0	0.28	8.00	3.55	1.57	0
	NT	7.38	25.0	622.5	0.29	7.55	3.15	1.37	0
정식후 30 (3.04)	M	6.88	25.0	601.0	0.27	8.18	3.23	2.28	0
	C	6.74	29.0	668.0	0.45	8.10	3.73	3.31	0
	MP	6.74	27.3	712.0	0.47	8.25	3.68	2.75	0
	P	6.85	27.5	615.0	0.37	8.30	3.73	2.99	0
	NT	7.09	25.8	620.3	0.28	7.70	3.30	2.05	0
정식후 60 (4.01)	M	6.67	27.0	663.0	0.40	8.50	3.10	2.49	0
	C	6.77	30.0	756.8	0.51	8.38	3.90	3.25	0
	MP	6.79	31.0	796.3	0.45	7.70	3.33	1.96	0
	P	7.06	31.3	729.3	0.48	8.65	5.00	2.77	0
	NT	6.88	26.5	655.0	0.32	7.95	3.60	2.78	0
정식후 90 (4.29)	M	6.96	29.5	692.0	0.32	8.25	3.10	1.23	0
	C	7.05	29.0	688.0	0.34	8.10	3.15	0.96	0
	MP	6.84	27.5	756.5	0.39	8.40	3.35	1.46	0
	P	7.10	22.5	647.0	0.29	8.25	3.30	0.91	0
	NT	7.00	26.5	685.5	0.32	7.80	3.10	1.01	0
수확후 (6.17)	M	7.05	28.5	769.5	0.27	9.20	3.45	1.65	0
	C	6.80	28.0	736.0	0.38	8.50	3.30	1.45	0
	MP	6.90	26.5	751.5	0.35	8.15	3.25	1.17	0
	P	7.20	26.0	715.0	0.29	8.40	3.60	1.04	0
	NT	7.15	24.0	699.5	0.27	7.95	3.35	1.04	0

(1) 토양산도 및 전기전도도 변화

항선충미생물 대량배양복합체 배양액 주기적 처리에 따른 토양 pH 변화를 조사한 결과, 실험전 토양에 비해 토마토 정식 후 토양 pH는 전체적으로 감소하는 경향을 보였다. 실험구별 차이에서는 NT: 물 처리구에 비해 M: 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리구 및 C: 비료 처리구의 토양 pH가 다소 낮았다. 반면에, 토마토 생육과정별 토양의 전기전도도(E.C) 변화는 M: 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리구 및 C: 비료 처리구의 전기전도도 값이 NT: 물 처리구에 비해 높았으나 그 값은 실험전 토양에 비해 낮은 수치였다 (그림 154).

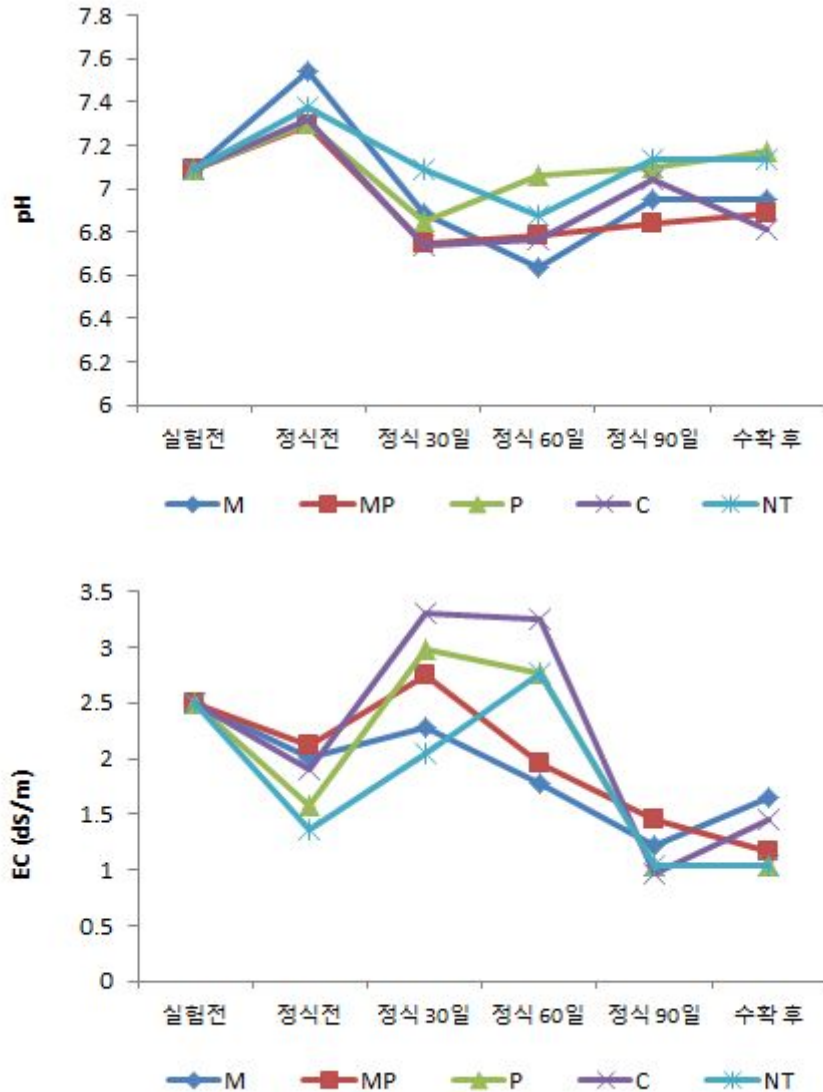


그림 154. 토마토 생육과정 별 토양 pH 및 EC의 변화.

M: 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리구, **MP:** 농약 + 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리구, **P:** 농약 처리구, **C:** 비료 처리구, **NT:** 물 처리구

(2) 토양유기물 및 유효인산 함량의 변화

항선충미생물 대량배양복합체 배양액 주기적 처리에 따른 토양 유기물 변화를 조사한 결과, M: 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리구에서 토양 유기물 함량은 실험전 정식 60일까지 낮아지다가 정식 90일부터 상승하는 경향을 보였다. NT: 물 처리구에서의 유기물 함량은 정식전부터 수확 후까지 지속적으로 낮아지는 경향을 보였다. 토양 유효인산 함량은 P: 농약 처리구와 NT: 물 처리구를 제외하고, 수확후 유효인산 함량이 실험전 유효인산 함량보다 높게 나타났다 (그림 155).

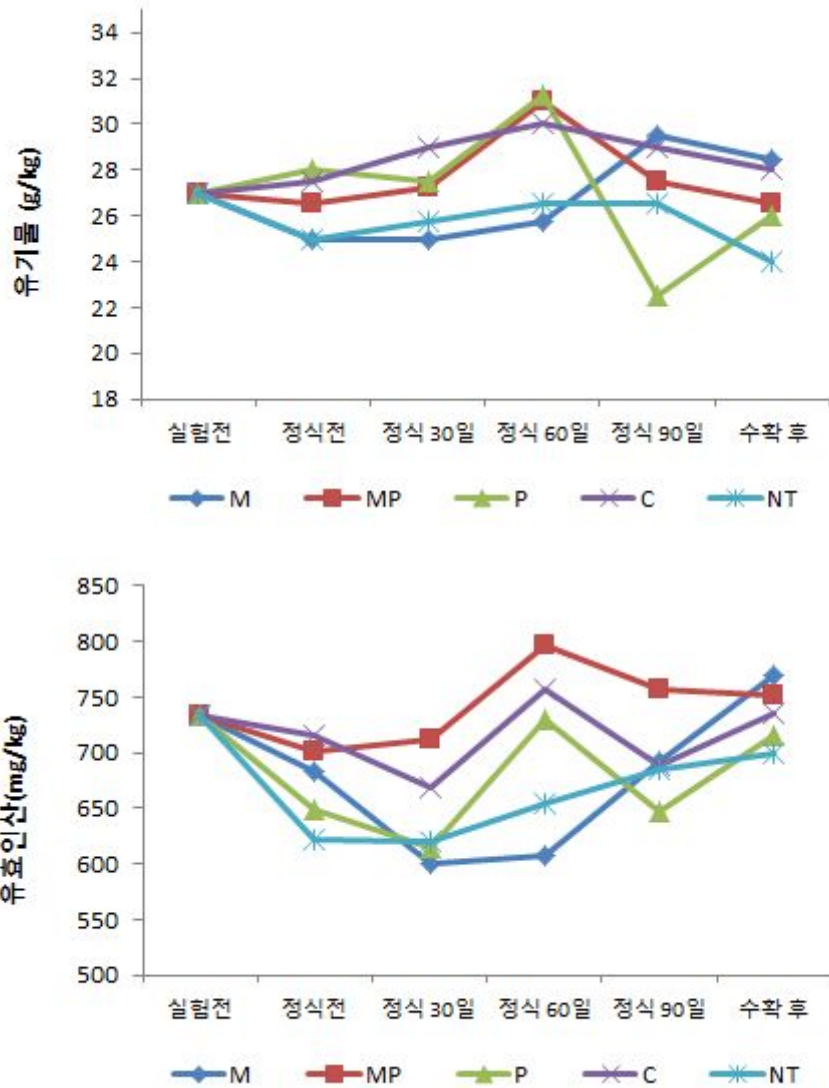


그림 155. 토마토 생육과정 별 토양 유기물 및 유효인산 함량의 변화.

M: 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리구, MP: 농약 + 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리구, P: 농약 처리구, C: 비료 처리구, NT: 물 처리구

마. 농가 현장 배양액내 미생물 개체수 조사

항선충미생물 대량배양복합체 포장실증시험 수행과정동안 농가포장에서 직접 배양한 항선충 미생물 대량배양복합체 배양액 내의 키틴분해미생물(chitinolytic bacteria) 밀도변화를 조사한 결과 1.0에서 1.8×10^6 CFU/ml의 개체수를 보였고, 그 결과를 그림 156에 나타내었다.

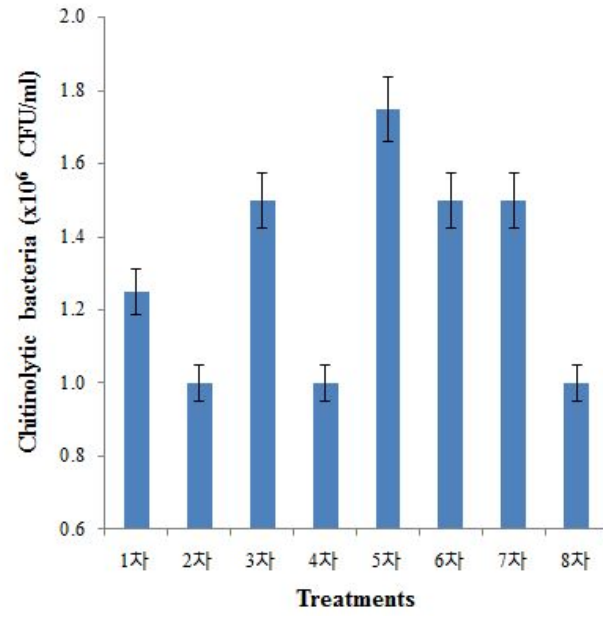


그림 156. 농가배양액의 키틴분해미생물(chitinolytic bacteria) 밀도.

1-2. 토마토 작물에서의 선충 억제 활성 및 작물 성장 효과 조사 (2차 실험)

항선충미생물 대량배양복합체 포장 실증 실험을 위해 (담양군 농업기술센터)에서 주관으로 담양군에 위치한 토마토 재배 농가를 선정하여 아래와 같이 처리구를 설정하고 각각의 처리구별로 처리하였다. 작물체를 대상으로 현장실증시험을 추진하면서 작물체 생육특성(초장, 생체중, 건물중, 수확량)과 토양 및 식물체의 선충밀도 및 감염률(난낭 및 후수)등을 조사하였다. 또한 미생물 대량배양액의 주기적 살포로 인한 토양의 이화학적특성 변화 조사를 위해 정식후 5주, 10주, 수확 후로 구분하여 시험포장의 토양시료를 채취·분석하였다.

■ 처리구

M : 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리 --> 토마토 정식 후 배양액을 주기적으로 처리하였다.

C : 농가관행 비료 처리 --> 멜론 정식 후 농가 관행 농법으로 처리하였다.



그림 157. 토마토 정식 및 생육 모습



그림 158. 토마토 뿌리 시료.

가. 작물체 선충 억제 활성

(1) 토양내 선충 밀도 억제 효과

뿌리혹선충 밀도가 높은 시설재배지 농가포장에서 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리

가 토마토 뿌리혹선충 방제에 미치는 영향을 조사하기 위해 정식 후 2회 및 수확 후에 조사시료를 채취하여 토양내 유충밀도, 뿌리혹수 및 난낭수를 조사하였다. 조사 결과 토양내 유충밀도에서 항선충 미생물 대량배양복합체 배양액 처리구가 관행 처리구인 대조구(C)에 비해 낮게 조사되었다. 이는 통계적으로 유의하였다. 또한 수확 후에도 대조구에 비해 낮은 밀도의 유충수를 유지하는 것으로 조사되었다. 이러한 결과는 비록 토마토에 대한 선충 피해가 없어지지 않는 않았지만, 항선충 미생물 대량배양복합체 배양액을 시용함으로써 토양내 선충의 밀도가 감소한 것으로 판단된다 (그림 159).

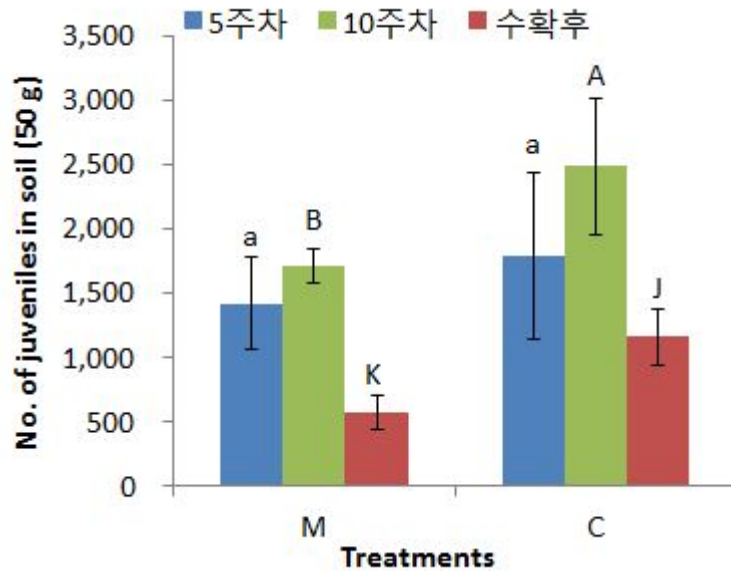


그림 159. 작물체 생육시기별 토양 내 유충밀도 변화.

유충 밀도 조사 결과 5주, 10주 및 수확 후 결과에서 M 처리구가 C처리구보다 낮게 나타남.

M : 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리, C : 농가관행 비료 처리

(2) 작물체 선충감염 억제효과

항선충 미생물 대량배양복합체 처리에 따른 토마토 뿌리에 생성된 뿌리혹 수를 검정한 결과, 항선충 미생물 대량배양복합체 처리구의 뿌리혹 수가 각각 5주차 및 10주차에 12 및 49개로 나타났고, 관행(C) 처리구가 39 및 199개로 나타났다. 또한 수확 후에는 미생물 처리구 29 및 대조구 66개로 조사되었다. 난낭 수를 조사한 결과에서는 M(항선충미생물 대량배양복합체) 처리구의 난낭 수가 1 및 71개인 반면에 농가관행(C) 처리구에서는 난낭수가 2 및 286개로 조사되었고, 또한 수확 후에는 미생물 처리구 15 및 대조구 59개로 미생물 처리구가 대조구보다 선충 감염 피해가 적은 것으로 조사되었다. 이러한 결과는 항선충미생물 대량배양복합체 처리로 인한 뿌리혹선충의 피해 예방은 효과적인 것으로 사료된다. 하지만 통계적으로는 유의하지 않았다 (그림 160).

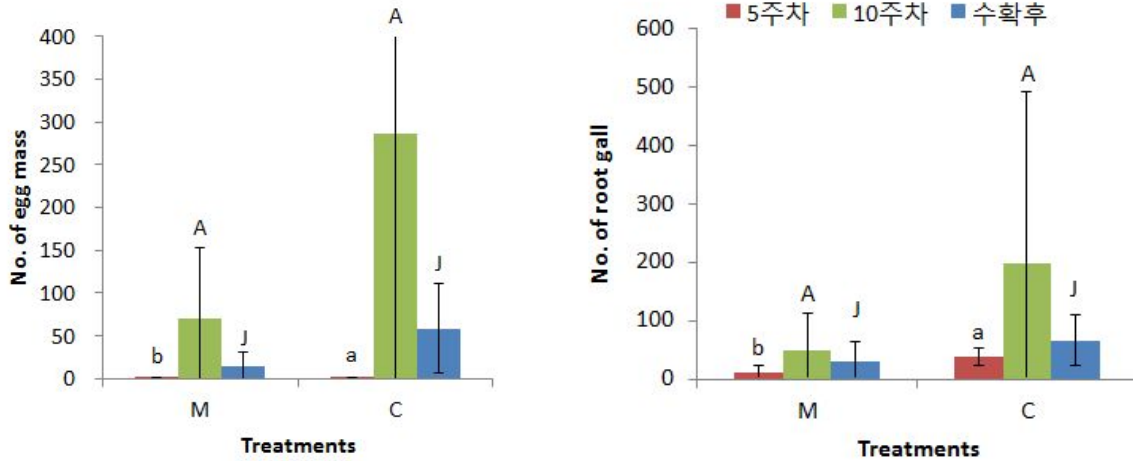


그림 160. 작물체 뿌리혹 선충 감염률 조사결과.

M처리구가 C 처리구보다 난낭 수와 뿌리혹 수에서 낮게 나타남, 하지만, 통계적 유의성은 없음.

M : 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리, C : 농가관행 비료 처리

알 수를 조사한 결과에서는 M(항선충미생물 대량배양복합체) 처리구의 알 수가 203 및 9,314 개인 반면에 농가관행(C) 처리구에서는 알 수가 613 및 67,598개로 조사되었고, 또한 수확 후에는 미생물 처리구 1,514 및 대조구 14,709개로 미생물 처리구가 대조구보다 선충 감염 피해가 적은 것으로 조사되었다. 또한 통계적으로는 유의하게 나타났다 (그림 161).

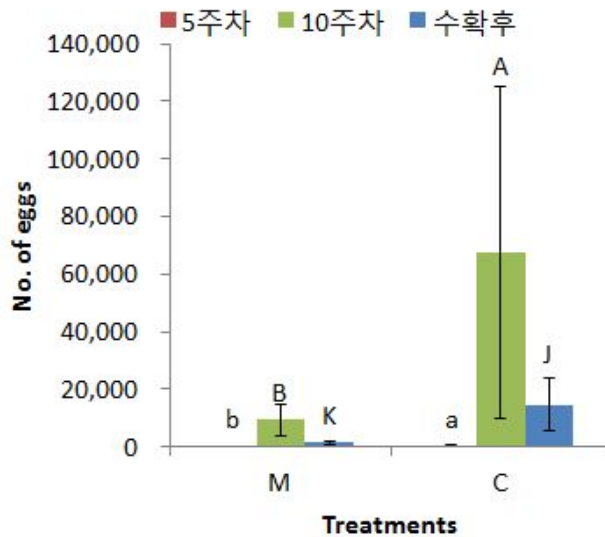


그림 161. 작물체 내 선충 알 수

M처리구가 C 처리구보다 알 수에서 낮게 나타남.

M : 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리, C : 농가 관행 비료 처리

나. 작물체 성장 효과

(1) 지상부 생초장

항선충 미생물 대량배양복합체 시제품의 효과를 구명코자 선충피해에 노출된 시설재배농가 포장을 선정후 토마토를 대상으로 실증시험을 수행하였다. 토마토 정식 후 5주 및 10주차 각 처리구별 토마토의 초기생육 정도를 조사하였다. 조사결과, 토마토의 초장이 항선충미생물 대량배양복합체 처리구에서 67.6 cm, 145.2 cm로 조사 되었으며, 농가관행 처리구인 대조구(C)에서 62.2 cm, 135.9 cm로 항선충 미생물 대량배양복합체 배양액을 주기적으로 처리한 실험구의 생육이 다소 우세하였고, 통계적으로 유의하였다 (그림 162).

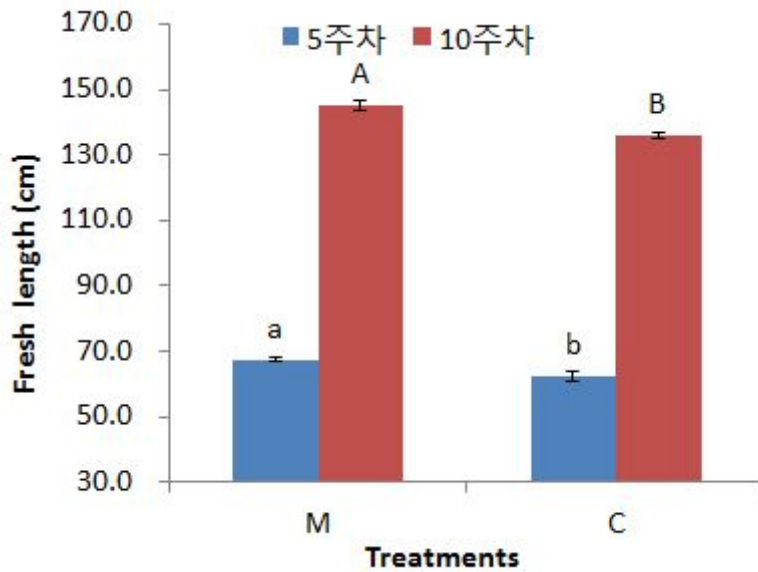


그림 162. 정식 후 토마토 생육에 따른 초장 변화.

M처리구가 C 처리구보다 생초장에서 높게 나타남.

M : 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리, C : 농가관행 비료 처리

(2) 지상부 생체중 및 건조중

생체중을 조사한 결과에서도 항선충 미생물 대량배양복합체 처리구가 110.4 g, 507.3 g으로 관행 처리에 102.9 g, 502.2 g에 비해 높게 나타났고, 통계적으로도 유의 하였다 (그림 163).

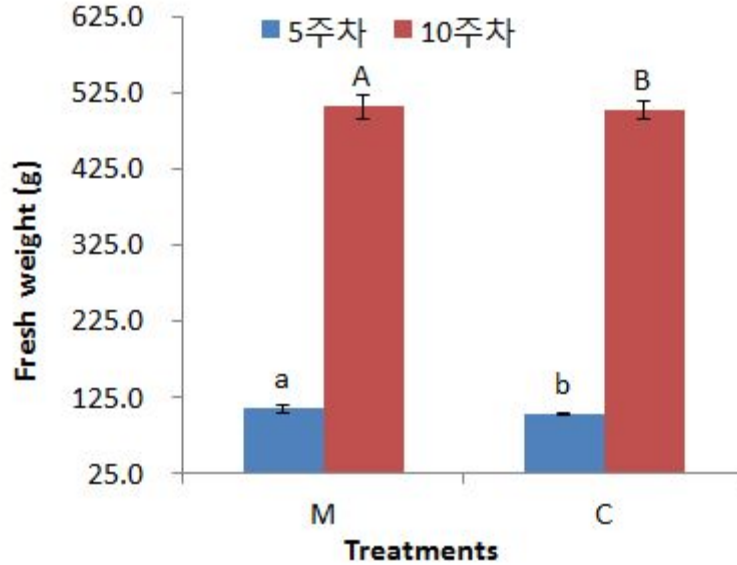


그림 163. 정식 후 토마토 생육에 따른 생체중 변화.

M처리구가 C 처리구보다 생체중에서 높게 나타남.

M : 향선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리, C : 농가관행 비료 처리

정식후 5주차 건조중 조사에서는 M(향선충미생물 대량배양복합체 배양액) 처리구의 건조중이 21.5 g으로 대조구의 30.8g에 비해 높았다. 또한 정식후 5주차 건조중 조사에서는 M(향선충미생물 대량배양복합체 배양액) 처리구의 건조중이 77.6 g으로 대조구의 76.6 g에 비해 높았다. 하지만, 통계적으로 유의하지 않았다. 이러한 결과는 향선충미생물 대량배양복합체 처리구가 작물체의 유기물 및 무기물의 함량이 높인다는 것으로, 향선충미생물 대량배양복합체 처리가 작물체에 좋은 영향을 미친 것으로 판단된다. (그림 164).

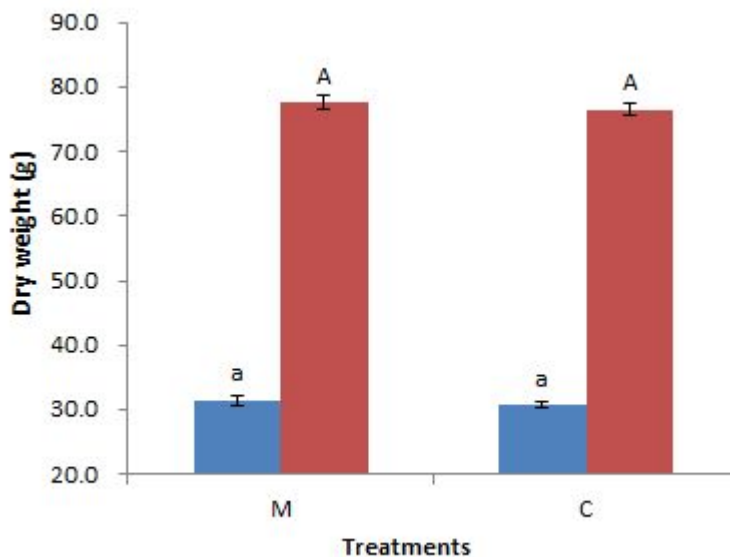


그림 164. 정식 후 토마토 생육에 따른 작물체 건조무게 변화.

M처리구와 C 처리구에서 건조무게의 차이는 보이지 않음.

M : 향선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리, C : 농가관행 비료 처리

(3) 수확량 및 품질조사

향선충 미생물을 농가현장에서 대량배양 후 배양미생물을 주기적으로 관주처리 한 후 처리구 별 주당 수량을 비교한 결과, 미생물 배양액 처리구(M)의 수량이 농가관행 대비 89.2%로 다소 낮았다 (표 23).

[표 23] *L. capsici* YS1215 배양액 관주에 따른 토마토 주당 수확량

Treatment	합계	1화방	2화방	3화방	4화방
미생물처리구(M)	2,232.6	562.8	773.2	533.2	363.4
농가관행구(N)	2,503.0	501.6	926.6	794.8	280.0

다. 토양 내 및 작물체 효소 활성 및 토양 미생물 측정

(1) 토양내 chitinase 및 gelatinase 활성 측정

향선충미생물 대량배양복합체 포장 실증 실험에서 뿌리혹선충 억제 기작과 상관관계가 있는 토양 내 키틴분해효소(chitinase) 활성을 조사하기위해, 토양 시료를 채취하여 분석하였다. 조사 결과 토양에 게껍질과 향선충미생물 대량배양복합체 배양액(*Lysobacter capsici* YS1215)을 처리한 향선충미생물 대량배양복합체 배양액(M) 처리구에서 각각 0.3 Unit/g soil, 0.28 Unit/g soil로 나타났고, 관행비료 처리구에서는 0.28 Unit/g soil, 0.25 Unit/g soil로 나타났다 (그림 165).

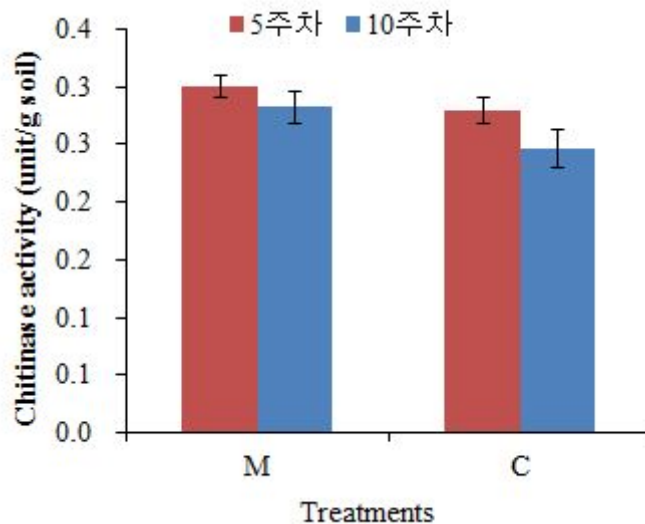


그림 165. 포장 실증에서 토양 내 키틴분해효소(chitinase) 활성 조사.

M : 향선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리, C : 농가관행 비료 처리

향선충미생물 대량배양복합체 포장 실증 실험에서 뿌리혹선충 억제 기작과 상관관계가

있는 토양 내 젤라틴분해효소(gelatinase) 활성을 조사하기 위해, 토양 시료를 채취하여 분석하였다. 조사 결과 항선충미생물 대량배양복합체 배양액(M) 처리구에서 각각 1.24 Unit/g soil, 1.25 Unit/g soil로 나타났고, 관행비료 처리구에서는 1.24 Unit/g soil, 1.23 Unit/g soil로 나타났다 (그림 166).

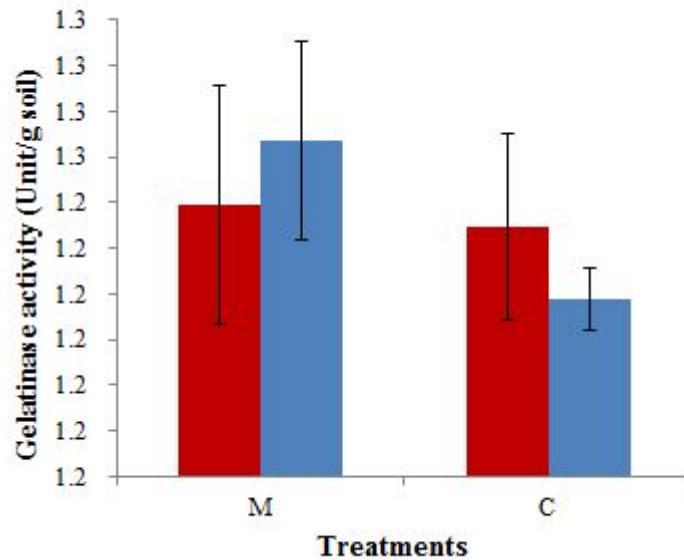


그림 166. 포장 실증에서 토양 내 젤라틴분해효소(gelatinase) 활성 조사.
M : 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리, C : 농가관행 비료 처리

(2) 토양 키틴분해미생물 및 젤라틴분해미생물 개체수 변화

항선충미생물 대량배양복합체 배양액의 주기적 관주에 따른 뿌리혹선충 억제효과를 조사코자 정식 후 2회에 걸쳐 토양시료를 채취한 후 토양내 키틴분해미생물(chitinolytic bacteria) 및 젤라틴분해미생물(gelatinolytic bacteria) 수를 조사하였다. 조사결과 항선충 미생물 배양액을 주기적으로 관주한 M처리구는 키틴분해미생물의 개체수가 1차: 12.6×10^6 CFU/g soil, 2차: 13.2×10^6 CFU/g soil로 조사되었고, 젤라틴분해 미생물 수는 1차: 11.9×10^6 CFU/g soil, 2차: 10.8×10^6 CFU/g soil로 조사되었다. 또한 10주차 결과도 5주차 결과와 유사하게 미생물 처리구가 대조구인 관행비료 처리구 보다 토양내 키틴분해 미생물 및 젤라틴분해 미생물 개체수가 높은 것으로 나타났다. 이는 토양에 처리된 계껍질분말의 영향과 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리 때문인 것으로 사료된다 (그림 167).

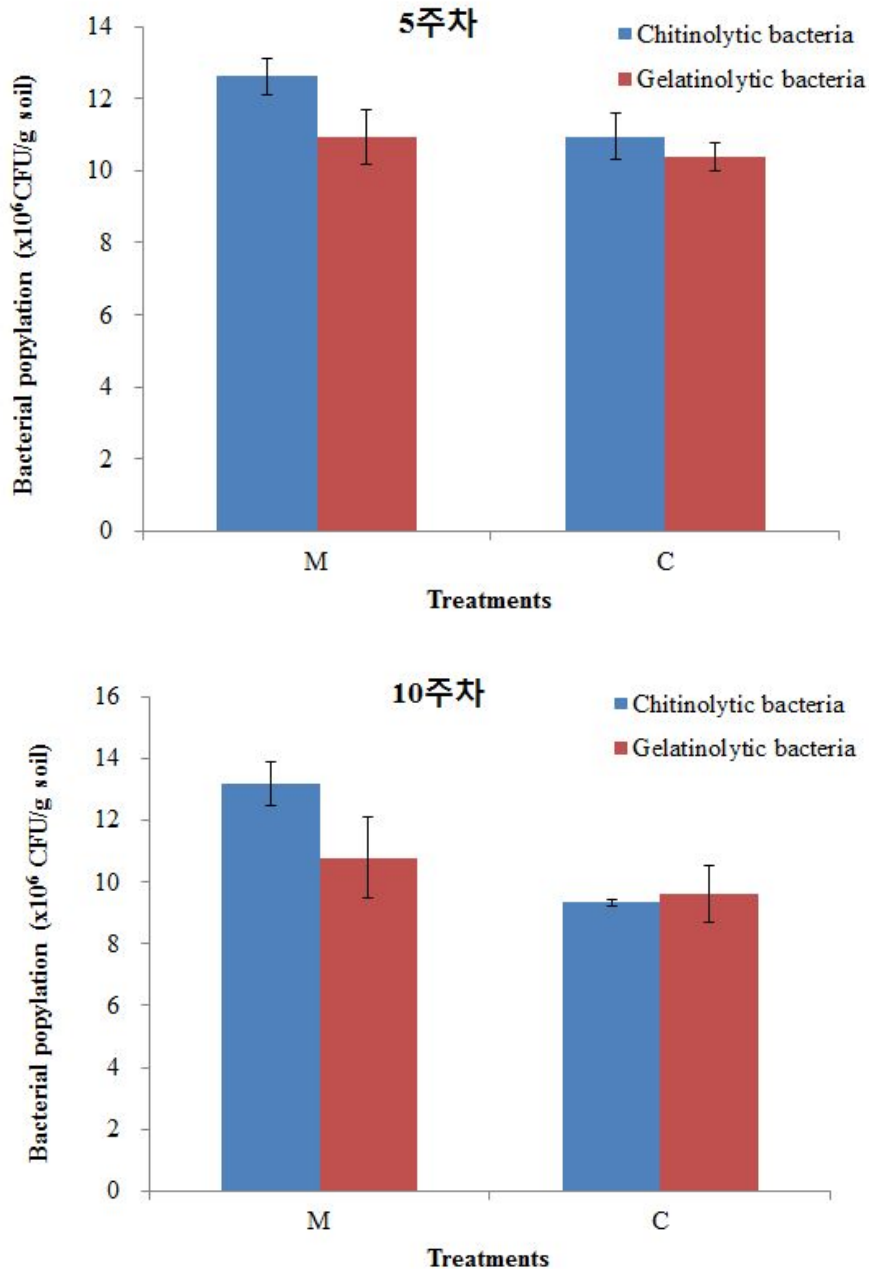


그림 167. 토양 내 키틴분해미생물(chitinolytic bacteria) 및 젤라틴분해미생물(gelatinolytic bacteria) 수. M : 향선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리, C : 농가관행 비료 처리

라. 토양의 이화학적 특성 변화

(1) 토양산도 및 전기전도도 변화

농가포장에서 향선충 미생물 배양액을 배양한 후 2주일 간격으로 근권에 관주한 후 토양의 화학성 변화를 조사한 결과, 토양 pH는 미생물처리구 및 관행처리구에서 각각 정식 45일까지 증가하다가 감소하였고, 전기전도도(EC)는 정식 15일까지 증가하다 감소하였다. 하지만 농가관행구에서 수확후 전기전도도는 약간 증가 되었다 (표 24).

(표 24) *L. capsici* YS1215 배양액 관주에 따른 토마토 재배토양의 산도 및 EC 변화

구 분		pH	E.C
		1:5 H ₂ O	dS m ⁻¹
미생물	정식 전	6.86	1.32
	정식후 15일	6.99	1.84
	정식후 45일	6.99	1.12
	수확 후	6.95	1.08
농가관행	정식전	6.95	1.23
	정식후 15일	6.96	2.48
	정식후 45일	7.10	1.04
	수확 후	7.02	1.23

(2) 토양유기물 및 유효인산 함량의 변화

농가포장에서 항선충 미생물 배양액을 배양한 후 2주일 간격으로 근권에 관주한 후 토양의 화학성 변화를 조사한 결과, 토양 pH 및 유효인산은 정식전 토양에 비해 증가의 경향을 보였고, 유기물 함량도 시험 전 토양에 비해 증가하였으나, 토양의 염류축적은 없었다. 유기물 및 인산함량의 증가는 미생물 배양액의 주기적 관주에 의한 영향으로 판단된다 (표 25).

(표 25) *L. capsici* YS1215 배양액 관주에 따른 토마토 재배토양의 유효인산 함량의 변화

구 분		O.M	Av.P ₂ O ₅	Exc. Cation(cmol ⁺ kg ⁻¹)			L.R
		g kg ⁻¹	mg kg ⁻¹	K	Ca	Mg	kg 10 _a ⁻¹
미생물	정식 전	21	624	0.23	8.4	3.2	0
	정식후 15일	25	611	0.24	8.3	3.2	0
	정식후 45일	21	660	0.22	7.9	3.0	0
	수확 후	27	639	0.18	8.0	2.9	0
농가관행	정식전	26	600	0.27	7.9	3.0	0
	정식후 15일	24	614	0.26	8.6	3.4	0
	정식후 45일	19	609	0.27	8.2	3.0	0
	수확 후	24	634	0.19	8.2	3.0	0

마. 농가 현장 배양액내 미생물 개체수 조사

항선충미생물 대량배양복합체 포장실증시험 수행과정동안 농가포장에서 직접 배양한 항선충 미생물 대량배양복합체 배양액 내의 키틴분해미생물(chitinolytic bacteria) 밀도변화를 조사한 결과 1.5에서 2.3 x 10⁶ CFU/ml의 개체수를 보였고, 그 결과를 그림 168에 나타내었다.

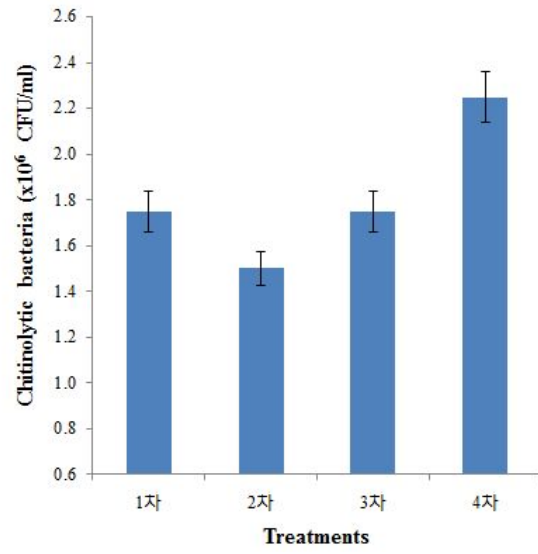


그림 168. 농가배양액의 키틴분해미생물(chitinolytic bacteria) 밀도.

2. 멜론 작물

2-1. 멜론 작물에서의 선충 억제 활성 및 작물 성장 효과 조사 (1차 실험)

항선충미생물 대량배양복합체 포장 실증 실험을 위해 제2협동(담양군 농업기술센터) 주관으로 담양군 수북면에 위치한 멜론 재배 농가를 선정하여 아래와 같이 처리구를 설정하고 각 처리구별 처리구별로 처리하였다. 포장 실증 실험 기간 동안에 생초장, 생체중, 건물중, 수확량등과 토양 내 유충 수, 뿌리의 난상 수와 후 수 등을 조사를 하였다.

가. 시험기간 : 2013. 9 ~ 2013. 12(4개월)

나. 대상작물 : 멜론

다. 대상균주 : *Lysobacter capsici* YS1215 (젤라틴/키틴분해 미생물)

라. 배양방법 : 농가포장의 배양통에 대량배양체+미생물을 첨가후 3~4일 배양 후 미생물보조영양원 및 영양액을 첨가하여 3일간 추가배양하여 살포

마. 시험구세분 : 2처리

바. 처리방법 : 2주일 간격으로 미생물 배양액 3배 희석액 0.75리터/주 관주

■ 처리구

M : 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리 --> 멜론 정식 후 배양액을 주기적으로 관주처리하였다.

C : 농가관행 비료 처리 --> 멜론 정식 후 농가 관행 농법으로 처리하였다.



그림 169. 멜론 정식 모습



그림 170. 멜론의 뿌리혹선충 감염현황

가. 작물체 선충 억제 활성

(1) 토양내 선충 밀도 억제 효과

뿌리혹선충 밀도가 높은 시설재배지 농가포장에서 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리가 멜론 뿌리혹선충 방제에 미치는 영향을 조사하기 위해 정식 후 2회에 걸쳐 조사시료를 채취하여 토양내 유충밀도, 뿌리혹수 및 난낭수를 조사하였다. 조사 결과 토양내 유충밀도에서 항선충 미생물 대량배양복합체 배양액 처리구가 관행 처리구인 대조구(C)에 비해 통계적으로 유의하게 낮게 조사되었다. 통계적이지 못한 결과는 비록 멜론에 대한 선충 피해가 없어지지 않았지만, 항선충 미생물 대량배양복합체 배양액을 시용함으로써 토양내 선충의 밀도가 감소한 것으로 판단된다. (그림 171).

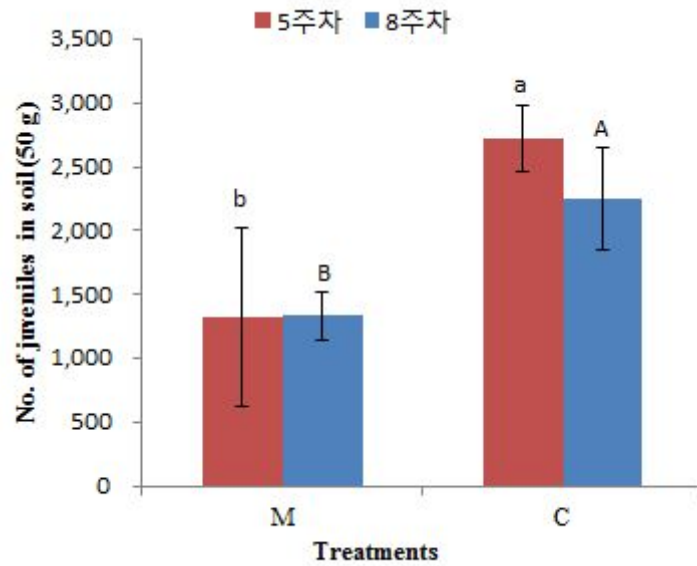


그림 171. 작물체 생육시기별 토양 내 선충(유충)밀도 변화.
 M 처리구가 C 처리구보다 유충 밀도가 낮게 나타남.
 M : 향선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리, C : 농가관행 비료 처리

(2) 작물체 선충감염 억제효과

향선충 미생물 대량배양복합체 처리에 따른 멜론 뿌리에 생성된 뿌리혹 수를 검정한 결과, 향선충 미생물 대량배양복합체 처리구의 뿌리혹 수가 각각 5주차 및 8주차에 137 및 14개로 나타났고, 관행(C) 처리구가 402 및 134개로 나타났다. 더불어, 난낭 수를 조사한 결과에서는 M(향선충미생물 대량배양복합체) 처리구의 뿌리혹 수가 86 및 4개인 반면에 농가관행(C) 처리구에서는 난낭수가 313 및 31개로 향선충미생물 대량배양복합체 처리로 인한 뿌리혹선충의 피해 예방은 효과적인 것으로 사료된다. 또한 통계적으로 뿌리혹 수 및 난낭 수에서 유의하게 나타났다 (그림172).

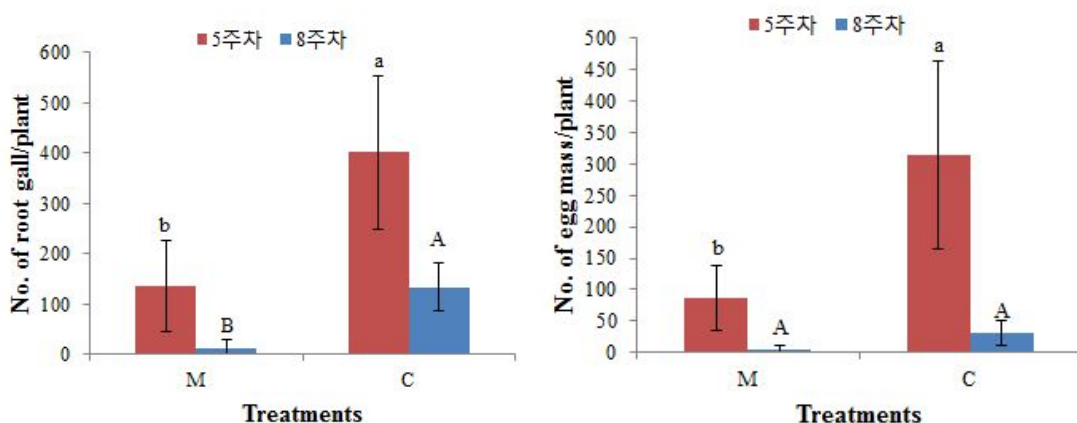


그림 172. 작물체 뿌리혹 선충 감염률 조사결과
 M 처리구가 C 처리구보다 뿌리혹 수에서 낮게 나타남.
 M : 향선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리, C : 농가관행 비료 처리

나. 작물체 성장 효과

(1) 지상부 생초장

항선충 미생물 대량배양복합체 시제품의 효과를 규명코자 선충피해에 노출된 시설재배농가 포장을 선정후 멜론을 대상으로 실증시험을 수행하였다. 멜론 정식 후 5주 및 8주차 각 처리구별 멜론의 초기생육 정도를 조사하였다. 조사결과, 멜론의 초장이 항선충미생물 대량배양복합체 처리구에서 186.5 cm, 192.8 cm로 조사 되었으며, 농가관행 처리구인 대조구(C)에서 166.0 cm, 190.5 cm로 항선충 미생물 대량배양복합체 배양액을 주기적으로 처리한 실험구의 생육이 다소 우세하였다. 하지만 8주차에는 통계적으로는 유의하지 않았다 (그림 173).

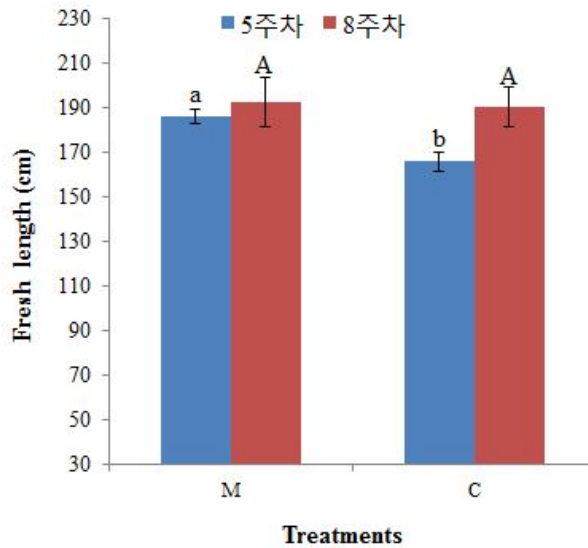


그림 173. 정식 후 멜론 생육에 따른 초장 변화.

조사 8주차에서 M처리구와 C처리구에서 생초장의 통계적 차이는 보이지 않음.

M : 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리, C : 농가관행 비료 처리

(2) 지상부 생체중 및 건조중

생체중을 조사한 결과에서도 항선충 미생물 대량배양복합체 처리구가 714.0 g, 704.3 g으로 관행 처리에 437.5 g, 589.3 g에 비해 상당히 높게 나타났다. 하지만 5주차는 통계적으로 유의하였지만, 8주차는 유의성이 없었다 (그림 174).

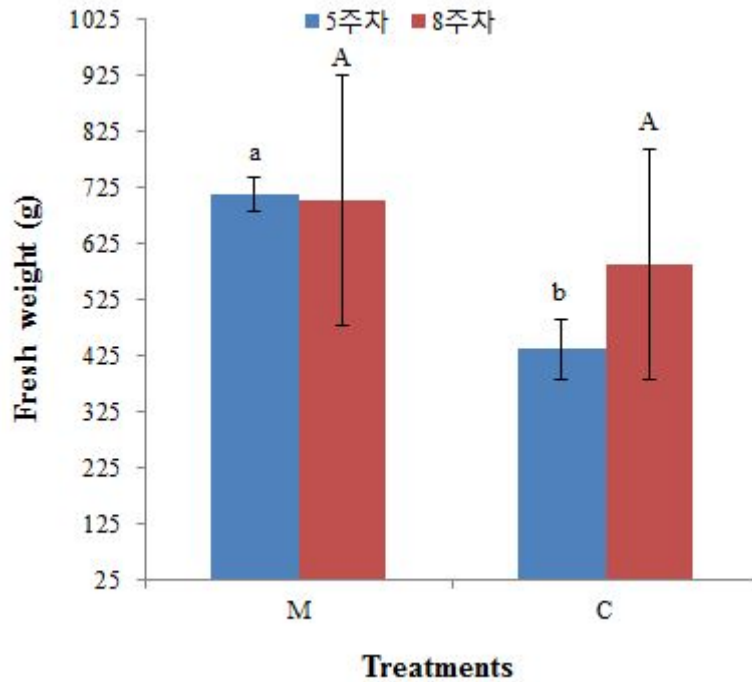


그림 174. 정식 후 멜론 생육에 따른 생체중 변화.

조사 8주차에서 M처리구가 C처리구보다 생체중에서 높게 나타남, 하지만 통계적 차이는 보이지 않음.

M : 향선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리, C : 농가관행 비료 처리

정식후 8주차 건조중 조사에서는 M(향선충미생물 대량배양복합체 배양액) 처리구의 건조중이 687g으로 대조구의 66.6g에 비해 높았다. 하지만 통계적 유의성은 없었다. 이러한 결과는 향선충미생물 대량배양복합체 처리구가 작물체의 유기물 및 무기물의 함량이 높인다는 것으로, 향선충미생물 대량배양복합체 처리가 작물체에 좋은 영향을 미친 것으로 판단된다. (그림 175).

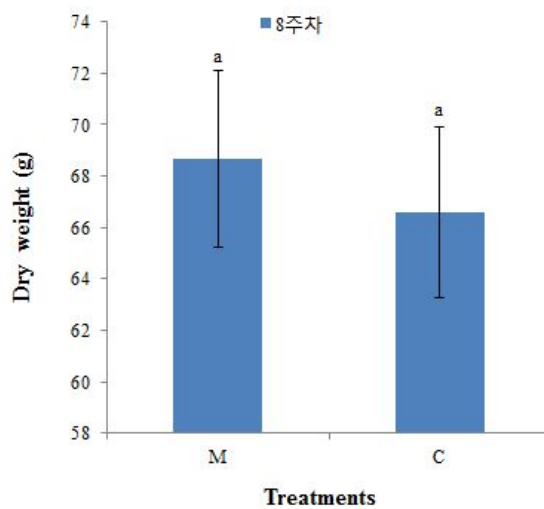


그림 175. 정식 후 멜론 생육에 따른 작물체 건조무게 변화.

조사 8주차에서 M처리구가 C처리구보다 건조무게에서 높게 나타남, 하지만 통계적 차이는

보이지 않음.

M : 향선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리, C : 농가관행 비료 처리.

(3) 수확량 및 품질조사

수확량 조사를 위해 8주차 과체중을 조사한 결과 M(향선충미생물 대량배양복합체 배양액) 처리구의 건조중이 4,210 g으로 대조구의 3,245 g에 비해 높았다. 또한 통계적 유의성도 나타났다. 이러한 결과는 향선충미생물 대량배양복합체 처리구가 작물체의 유기물 및 무기물의 함량이 높은 것으로 사료된다. (그림 176).

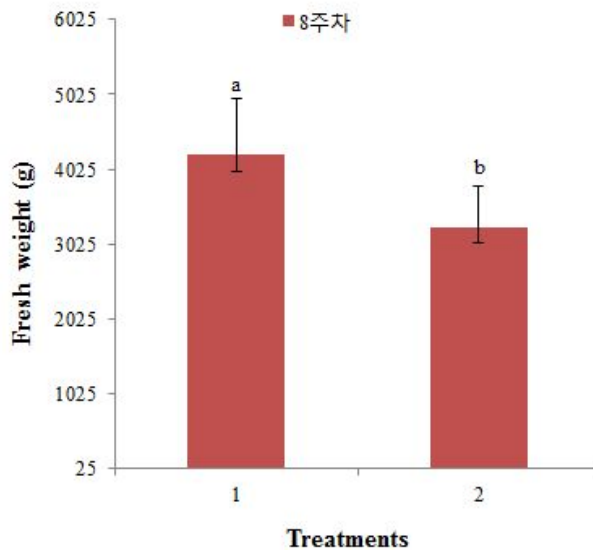


그림 176. 정식 후 멜론 생육에 따른 과체중 변화.

조사 8주차에서 M처리구가 C처리구보다 과체중에서 높게 나타남.

M : 향선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리, C : 농가관행 비료 처리

다. 토양 내 및 작물체 효소 활성 및 토양 미생물 측정

(1) 토양내 chitinase 및 gelatinase 활성 측정

향선충미생물 대량배양복합체 포장 실증 실험에서 뿌리혹선충 억제 기작과 상관관계가 있는 토양 내 키틴분해효소(chitinase) 활성을 조사하기 위해, 토양 시료를 채취하여 분석하였다. 조사 결과 토양에 계집질과 향선충미생물 대량배양복합체 배양액(*Lysobacter capsici* YS1215)을 처리한 향선충미생물 대량배양복합체 배양액(M) 처리구에서 각각 0.49 Unit/g soil, 0.57 Unit/g soil로 나타났고, 관행비료 처리구에서는 0.24 Unit/g soil, 0.59 Unit/g soil로 나타났다 (그림 177).

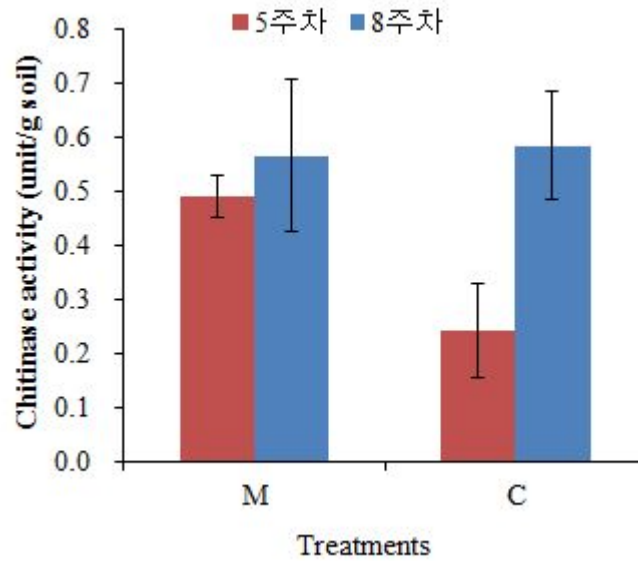


그림 177. 포장 실증에서 토양 내 키틴분해효소(chitinase) 활성 조사.
 M : 향선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리, C : 농가관행 비료 처리

향선충미생물 대량배양복합체 포장 실증 실험에서 뿌리혹선충 억제 기작과 상관관계가 있는 토양 내 젤라틴분해효소(gelatinase) 활성을 조사하기위해, 토양 시료를 채취하여 분석하였다. 조사 결과 토양에 게껍질과 향선충미생물 대량배양복합체 배양액(*Lysobacter capsici* YS1215)을 처리한 향선충미생물 대량배양복합체 배양액(M) 처리구에서 각각 1.27 Unit/g soil, 1.28 Unit/g soil로 나타났고, 관행비료 처리구에서는 1.31 Unit/g soil, 1.31 Unit/g soil로 나타났다 (그림 178).

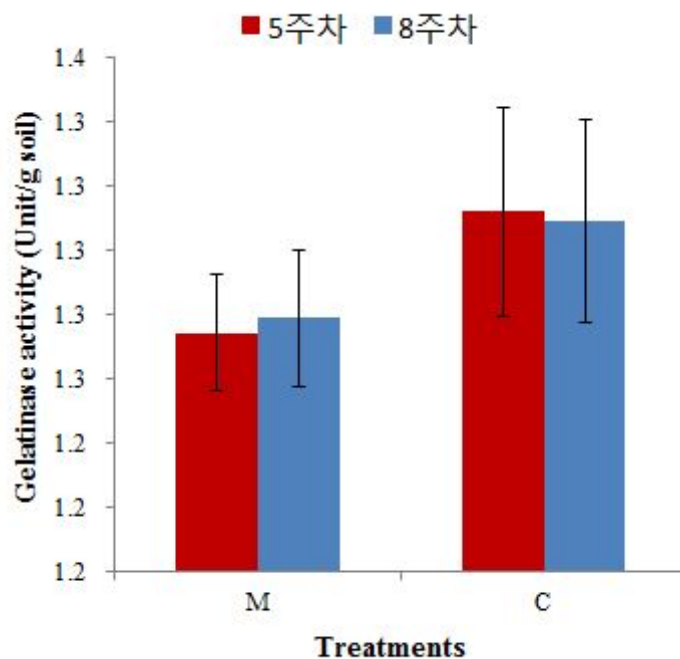


그림 178. 포장 실증에서 토양 내 젤라틴분해효소(gelatinase) 활성 조사.

M : 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리, C : 농가관행 비료 처리

(2) 토양 키틴분해미생물 및 젤라틴분해미생물 개체수 변화

항선충미생물 대량배양복합체 배양액의 주기적 관주에 따른 뿌리혹선충 억제효과를 조사코자 정식 후 2회에 걸쳐 토양시료를 채취한 후 토양내 키틴분해미생물(chitinolytic bacteria) 및 젤라틴분해미생물(gelatinolytic bacteria) 수를 조사하였다. 조사결과 항선충 미생물 배양액을 주기적으로 관주한 M처리구는 키틴분해미생물의 개체수가 1차: 16.3 ($\times 10^6$ CFU/g soil), 2차: 20 ($\times 10^6$ CFU/g soil)로 조사되었고, 젤라틴분해 미생물 수는 1차: 32.4 ($\times 10^6$ CFU/g soil), 2차: 33.4 ($\times 10^6$ CFU/g soil)로 조사되었다. 이러한 결과는 대조구인 관행비료 처리구 보다 토양내 키틴분해 미생물 및 젤라틴분해 미생물 개체수가 높은 것으로 나타났다. 이는 토양에 처리된 게겍질분말의 영향과 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리 때문인 것으로 사료된다(그림 179).

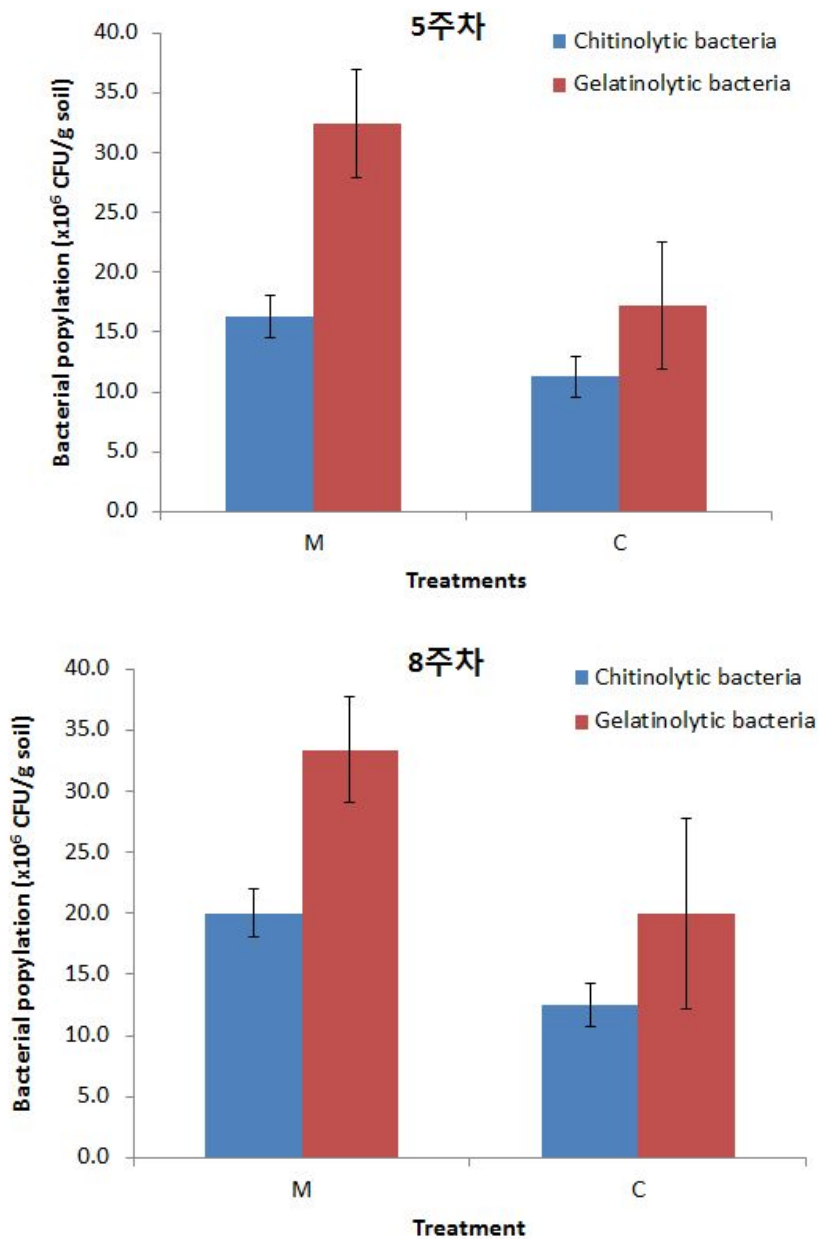


그림 179. 토양 내 키틴분해미생물(chitinolytic bacteria) 및 젤라틴분해미생물(gelatinolytic bacteria) 수.
 M : 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리, C : 농가관행 비료 처리

라. 토양의 이화학적 특성 변화

(1) 토양산도 및 전기전도도 변화

항선충 미생물을 농가현장에서 대량배양하여 멜론 근권에 주기적으로 관주 한 후 미생물 배양액 처리가 토양환경에 미치는 영향을 조사한 결과, pH와 EC에서 거의 변화가 없었다. 하지만 평균적으로 미생물 처리구가 관행처리구보다 pH와 EC에서 높게 나타났다 (표26).

(2) 토양유기물 및 유효인산 함량의 변화

항선충 미생물을 농가현장에서 대량배양하여 멜론 근권에 주기적으로 관주 한 후 미생물 배양액 처리가 토양환경에 미치는 영향을 조사한 결과, 미생물 배양액 처리구에서 토양 유기물 함량과 유효인산 함량이 무처리구 대비 다소 증가한 결과를 보였다. 이러한 결과는 미생물 배양을 위해 공급된 탄소원과 인산 공급원의 영향으로 판단된다. 더불어, 미생물 배양액 주기적 관주로 치환성 칼슘 및 마그네슘 함량이 다소 증가하였다 (표 26).

표 26. 멜론 시험포장 토양의 화학적특성 변화

날짜	시험구	pH	OM	유효인산	K	Ca	Mg	EC	석회
10월1일 (정식후 5주)	미생물	6.8	29	688	0.31	9.2	3.5	1.61	0
		6.8	29	624	0.24	7.9	3.2	0.74	0
		7.1	28	762	0.32	8.9	3.6	0.12	0
		6.9	26	627	0.27	8.8	3.5	1.20	0
	평 균	6.90	28.00	675.25	0.28	8.70	3.45	0.92	0.00
	무처리 (적색제 외)	5.7	22	579	0.29	8.4	3.5	1.73	0
		6.4	23	608	0.25	7.8	3.1	1.53	0
		6.6	25	637	0.25	8.5	3.1	1.65	0
		7.1	24	682	0.28	8.1	2.9	0.48	0
	평 균	6.70	24.00	642.33	0.26	8.13	3.03	1.22	0.00
11월5일 (정식후 10주)	미생물	6.7	26	625	0.42	7.8	3.1	1.61	0
		6.6	26	638	0.42	7.9	3.1	1.61	0
		7.1	22	657	0.16	7.9	3.3	1.23	0
		7.1	24	623	0.21	8.6	3.7	1.38	0
	평 균	6.88	24.50	635.75	0.30	8.05	3.30	1.46	0.00
	무처리	6.8	21	548	0.31	7.5	3.1	1.22	0
		6.7	22	546	0.32	8.1	3.2	1.93	0
		6.9	23	519	0.43	7.3	3.0	1.53	0
		6.8	18	532	0.28	7.1	2.8	1.16	0
	평 균	6.80	21.00	536.25	0.34	7.50	3.03	1.46	0.00

마. 농가 현장 배양액내 미생물 개체수 조사

항선충미생물 대량배양복합체 포장실증시험 수행과정동안 농가포장에서 직접 배양한 항선충 미생물 대량배양복합체 배양액 내의 키틴분해미생물(chitinolytic bacteria) 밀도변화를 조사한 결과 1.0에서 1.3×10^6 CFU/ml의 개체수를 보였고, 그 결과를 그림 180에 나타내었다.

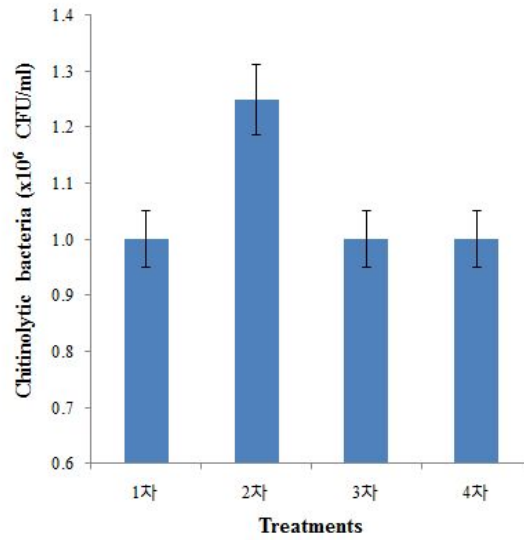


그림 180. 농가배양액의 키틴분해미생물(chitinolytic bacteria) 밀도.

2-2. 멜론 작물에서의 선충 억제 활성 및 작물 성장 효과 조사 (2차 실험)

항선충미생물 대량배양복합체 포장 실증 실험을 위해 제2협동(담양군 농업기술센터) 주관으로 담양군 수북면에 위치한 멜론 재배 농가를 선정하여 아래와 같이 처리구를 설정하고 각 처리구별 처리구별로 처리하였다. 포장 실증 실험 기간 동안에 생초장, 생체중, 건물중, 수확량등과 토양 내 유충 수, 뿌리의 난낭 수와 혹 수 등을 조사를 하였다.

■ 처리구

M : 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리 --> 멜론 정식 후 배양액을 주기적으로 관주처리하였다.

M+P : 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리+농약처리 --> 멜론 정식 후 배양액을 주기적으로 관주처리하였다. 농약은 정식 전 1회 처리하였다.

P : 농가관행 농약 처리 --> 농약은 정식 전 1회 처리하였다.

NT : 물 처리 --> 멜론 정식 후 물만 관주 처리하였다.



그림 181. 정식 및 생육 모습

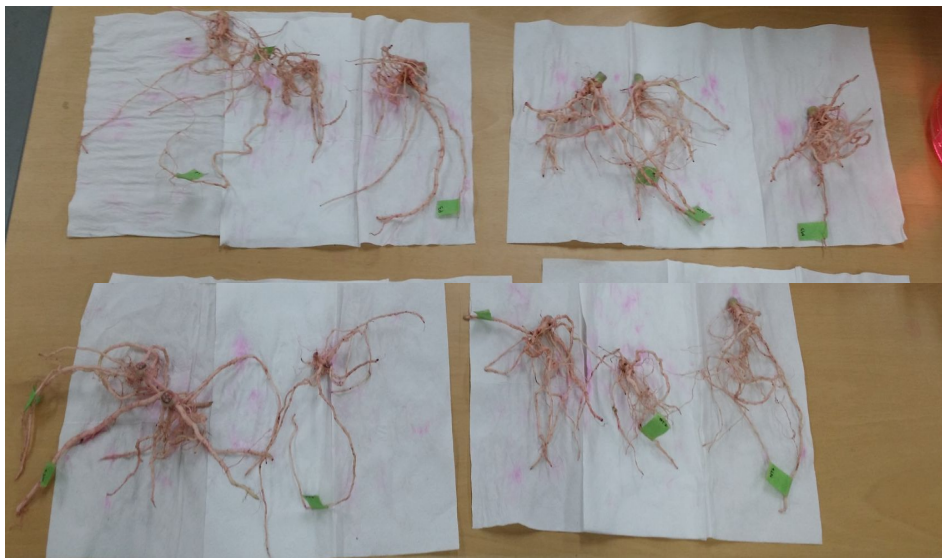


그림 182. 멜론의 뿌리혹선충 감염현황.

가. 작물체 선충 억제 활성

(1) 토양내 선충 밀도 억제 효과

뿌리혹선충 밀도가 높은 시설재배지 농가포장에서 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리가 멜론 뿌리혹선충 방제에 미치는 영향을 조사하기 위해 정식 후 2회 및 수확 후에 조사시료를 채취하여 토양내 유충밀도, 뿌리혹수 및 난낭수를 조사하였다. 조사 결과 토양내 유충밀도에서 항선충미생물 대량배양복합체 처리구(M) 15.3개, 미생물 대량배양복합체 배양액+농약 처리구(M+P) 23.3개, 농약 처리(P) 86.0개, 물 처리(NT) 63.0개로 항선충 미생물 대량배양복합체 배양액을 주기적으로 처리구가 가장 낮은 선충 밀도를 보였다. 또한 10주차 조사 결과 항선충미생물 대량배양복합체 처리구(M) 25.7개, 미생물 대량배양복합체 배양액+농약 처리구(M+P) 27.7개, 농약 처리(P) 105.3개, 물 처리(NT) 88.0개로 M 처리구가 가장 낮게 조사되었으며, NT 처리구가 가장 높게 조사되었다. 하지만 쫓 5주차 및 10주차 결과의 통계적 유의성은 갖지 못하였다. 수확 후 조사 결과는 M+P 처리구가 가장 낮았고, 다음으로 M, P 및 NT 처리구 순으로 조사되었다. 이러한 결과는 비록 토마토에 대한 선충 피해가 없어지지 않는 않지만, 항선충 미생물 대량배양복합체 배양액을 사용함으로써 토양내 선충의 밀도가 감소한 것으로 판단된다. (그림 183).

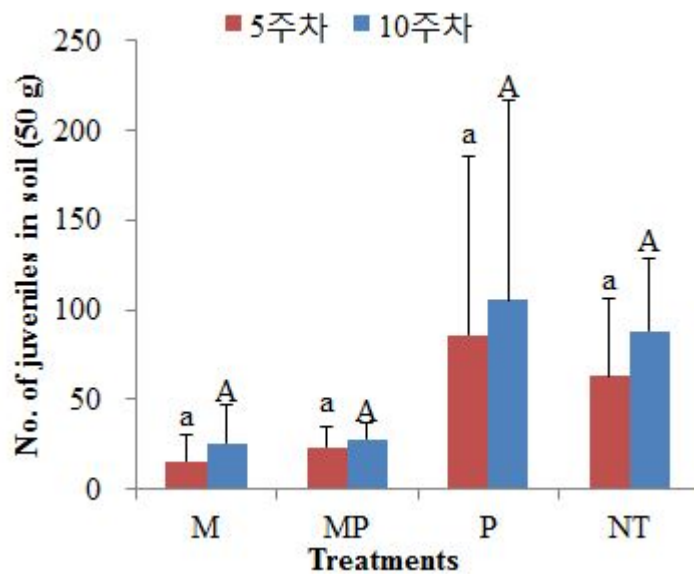


그림 183. 작물체 생육시기별 토양 내 선충(유충)밀도 변화.

M : 미생물 대량배양복합체 배양액 처리, M+P : 미생물 대량배양복합체 배양액 + 농약 처리, P : 농약 처리, NT : 물 처리

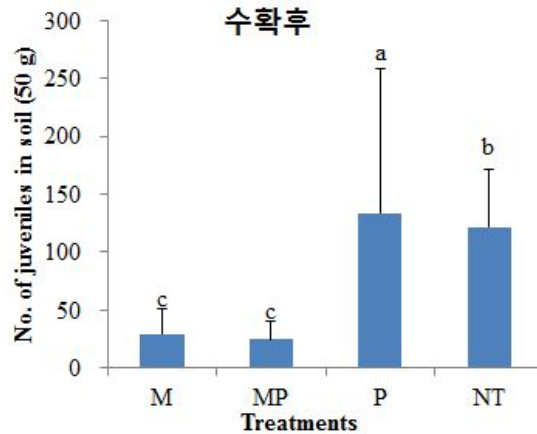


그림 184. 작물체 수확 후 토양 내 선충(유충)밀도 변화.

M : 미생물 대량배양복합체 배양액 처리, M+P : 미생물 대량배양복합체 배양액 + 농약 처리, P : 농약 처리, NT : 물 처리

(2) 작물체 선충감염 억제효과

항선충 미생물 대량배양복합체 처리에 따른 멜론 뿌리에 생성된 뿌리혹 수를 검정한 결과, 항선충 미생물 대량배양복합체 처리구의 뿌리혹 수가 항선충미생물 대량배양복합체 처리구(M) 2개, 미생물 대량배양복합체 배양액+농약 처리구(M+P) 3개, 농약 처리(P) 4개, 물 처리(NT) 4 개로 항선충 미생물 대량배양복합체 배양액을 주기적으로 처리구가 가장 낮은 혹 수를 보였다. 또한 10주차 조사 결과 항선충미생물 대량배양복합체 처리구(M) 1개, 미생물 대량배양복합체 배양액+농약 처리구(M+P) 1개, 농약 처리(P) 3개, 물 처리(NT) 12개로 M 및 M+P처리구가 가장 낮게 조사되었으며, NT 처리구가 가장 높게 조사되었다. 통계적으로는 M 및 MP처리구와 NT처리구와 유의성이 나타났다. 난낭 수를 조사한 결과에서는 항선충미생물 대량배양복합체 처리구(M) 1개, 미생물 대량배양복합체 배양액+농약 처리구(M+P) 1개, 농약 처리(P) 8개, 물 처리(NT) 9개로 항선충 미생물 대량배양복합체 배양액을 주기적으로 처리구가 가장 낮은 난낭 수를 보였다. 또한 10주차 조사 결과 항선충미생물 대량배양복합체 처리구(M) 0개, 미생물 대량배양복합체 배양액+농약 처리구(M+P) 0개, 농약 처리(P) 1개, 물 처리(NT) 2개로 M 및 M+P처리구가 가장 낮게 조사되었으며, NT 처리구가 가장 높게 조사되었다. 통계적으로는 M 및 MP처리구와 P 및 NT처리구와 유의성이 나타났다 (그림 185, 186).

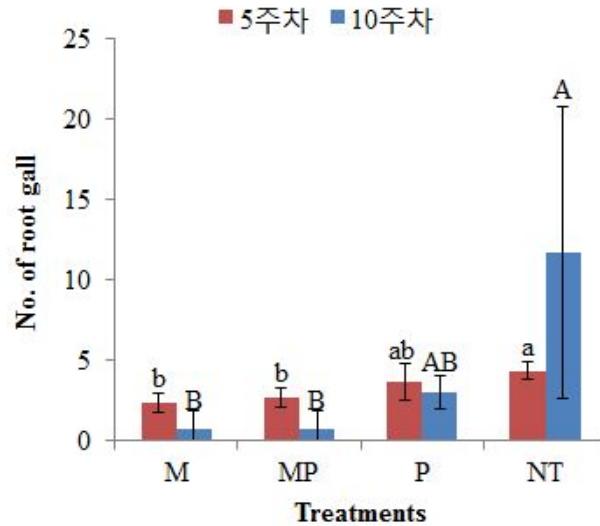


그림 185. 작물체 감염 뿌리혹 수

M : 미생물 대량배양복합체 배양액 처리, M+P : 미생물 대량배양복합체 배양액 + 농약 처리, P : 농약 처리, NT : 물 처리

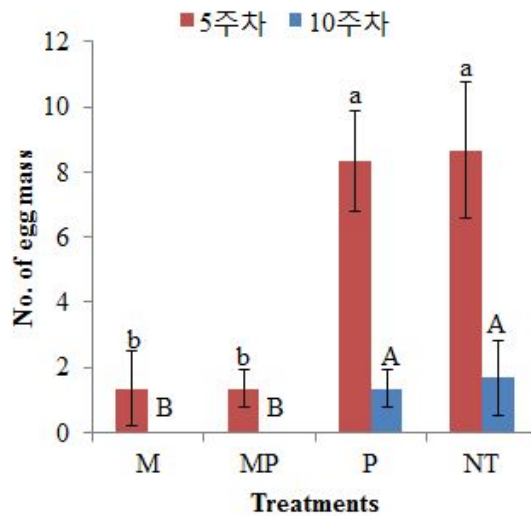


그림 186. 작물체 감염 난낭 수

M : 미생물 대량배양복합체 배양액 처리, M+P : 미생물 대량배양복합체 배양액 + 농약 처리, P : 농약 처리, NT : 물 처리

나. 작물체 성장 효과

(1) 지상부 생초장

항선충 미생물 대량배양복합체 시제품의 효과를 구명코자 선충피해에 노출된 시설재배농가 포장을 선정후 멜론 대상으로 실증시험을 수행하였다. 멜론 정식 후 5주차 각 처리구별 멜론의 초기생육 정도를 조사하였다. 조사결과, 멜론의 초장이 항선충미생물 대량배양복합체 처리구 (M) 140.3 cm, 미생물 대량배양복합체 배양액+농약 처리구(M+P) 140.3 cm, 농약 처리(P)

118.0 cm, 물 처리(NT) 111.7 cm로 향선충 미생물 대량배양복합체 배양액을 주기적으로 처리한 실험구의 생육이 다소 우수하였다. 또한 10주차 조사 결과 향선충미생물 대량배양복합체 처리구(M) 165.0 cm, 미생물 대량배양복합체 배양액+농약 처리구(M+P) 177.0 cm, 농약 처리(P) 147.0 cm, 물 처리(NT) 140.0 cm로 M+P처리구가 가장 높게 조사되었으며, NT 처리구가 가장 낮게 조사되었다. 통계적으로는 10주차 조사결과에서 M 및 MP처리구와 P 및 NT처리구와 유의성이 나타났다 (그림 187).

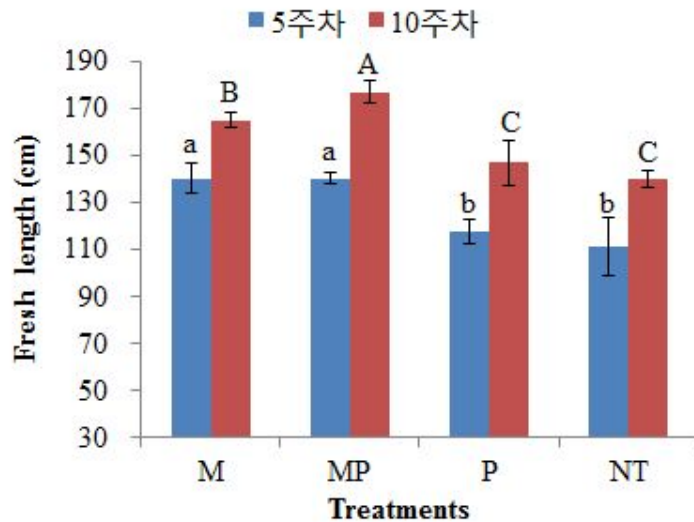


그림 187. 정식 후 멜론 생육에 따른 초장 변화

M : 미생물 대량배양복합체 배양액 처리, M+P : 미생물 대량배양복합체 배양액 + 농약 처리, P : 농약 처리, NT : 물 처리

(2) 지상부 생체중 및 건조중

생체중 조사한 결과 5주차 각 처리구로 향선충미생물 대량배양복합체 처리구(M) 388.7 cm, 미생물 대량배양복합체 배양액+농약 처리(M+P) 443.3 g, 농약 처리(P) 298.0 g, 물 처리(NT) 270.0 g로 M+P처리구가 가장 높게 조사되었으며, 10주차 조사 결과 M 처리구 539.3 g, M+P 처리구 814.0 g, P 처리구 470.0 g, NT 처리구 378.7 g로 M+P처리구가 가장 높게 조사되었으며, NT 처리구가 가장 낮게 조사되었다. 통계적으로는 10주차 조사결과 M, P 및 NT처리구 간에 유의성이 나타나지 않았다 (그림 188).

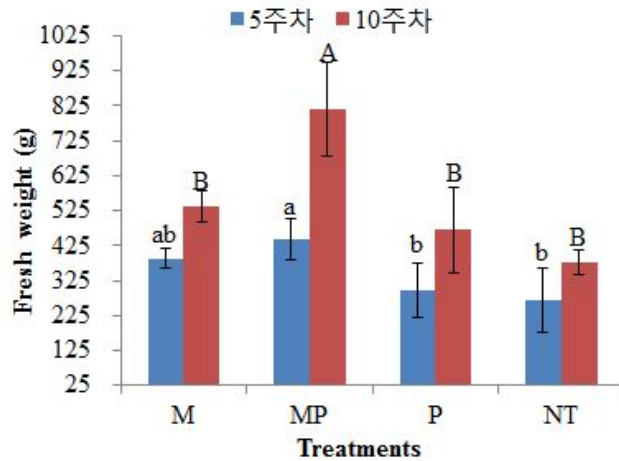


그림 188. 정식 후 멜론 생육에 따른 생체중 변화.

M : 미생물 대량배양복합체 배양액 처리, M+P : 미생물 대량배양복합체 배양액 + 농약 처리, P : 농약 처리, NT : 물 처리

건체중 조사한 결과 5주차 각 처리구로 향선충미생물 대량배양복합체 처리구(M) 51.9 cm, 미생물 대량배양복합체 배양액+농약 처리(M+P) 54.7 g, 농약 처리(P) 45.0 g, 물 처리(NT) 43.7 g로 M+P처리구가 가장 높게 조사되었으며, 10주차 조사 결과 M 처리구 72.9 g, M+P 처리구 90.8 g, P 처리구 64.7 g, NT 처리구 58.2 g로 M+P처리구가 가장 높게 조사되었으며, NT 처리구가 가장 낮게 조사되었다. 통계적으로는 M 및 MP처리구와 유의성이 없었고, MP처리구와 P 및 NT처리구와 유의성이 나타났다 (그림 189).

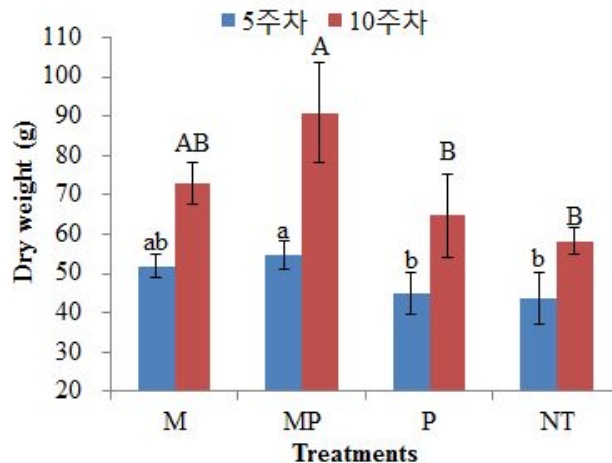


그림 189. 정식 후 멜론 생육에 따른 작물체 건조무게 변화.

M : 미생물 대량배양복합체 배양액 처리, M+P : 미생물 대량배양복합체 배양액 + 농약 처리, P : 농약 처리, NT : 물 처리

(3) 수확량 및 품질조사

향선충미생물 대량배양복합체 포장 실증 실험에서 과중을 조사한 결과 향선충미생물 대량

배양복합체 처리구(M) 1230g, 미생물 대량배양복합체 배양액+농약 처리(M+P) 1548g, 농약 처리(P) 1042g, 물 처리(NT) 910g으로 조사되었다 통계적으로는 MP처리구와 M, P 및 NT처리구와 유의성이 나타났다(그림 190).

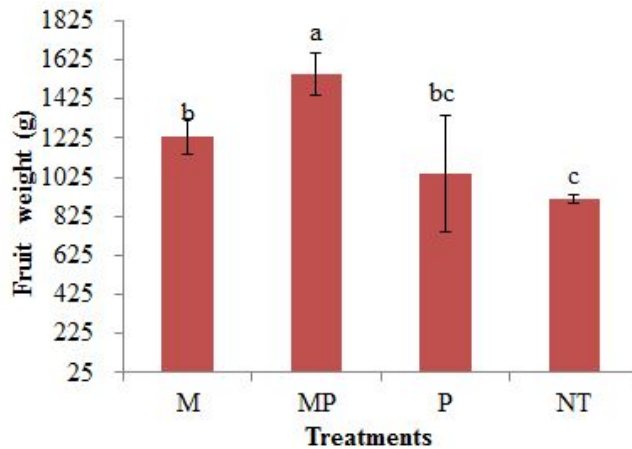


그림 190. 멜론 수확 후 무게 조사.

M : 미생물 대량배양복합체 배양액 처리, M+P : 미생물 대량배양복합체 배양액 + 농약 처리, P : 농약 처리, NT : 물 처리

다. 토양 내 및 작물체 효소 활성 및 토양 미생물 측정

(1) 토양내 chitinase 및 gelatinase 활성 측정

항선충미생물 대량배양복합체 포장 실증 실험에서 뿌리혹선충 억제 기작과 상관관계가 있는 토양 내 키틴분해효소(chitinase) 활성을 조사하기 위해, 토양 시료를 채취하여 분석하였다. 5주차 조사 결과 항선충 미생물 배양액을 주기적으로 관주한 항선충미생물 대량배양복합체 처리구(M) 0.12 Unit/g soil, 미생물 대량배양복합체 배양액+농약 처리(M+P) 0.13 Unit/g soil, 농약 처리(P) 0.11 Unit/g soil, 물 처리(NT) 0.04 Unit/g soil로 조사되었고, 10주차에서는 항선충 미생물 대량배양복합체 처리구(M) 0.3 Unit/g soil, 미생물 대량배양복합체 배양액+농약 처리(M+P) 0.29 Unit/g soil, 농약 처리(P) 0.17 Unit/g soil, 물 처리(NT) 0.15 Unit/g soil로 조사되었다. 조사결과 미생물 처리구인 M과 M+P 처리구의 효소 활성이 다른 처리구에 비해 높게 나타났다 (그림 191).

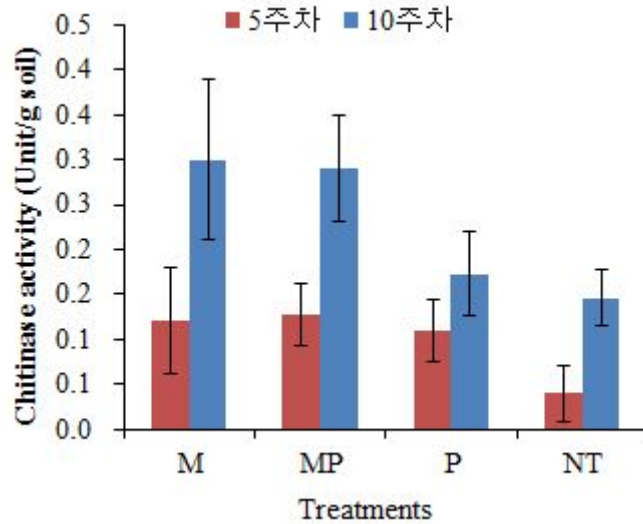


그림 191. 포장 실증에서 토양 내 키틴분해효소(chitinase) 활성 조사.

M : 미생물 대량배양복합체 배양액 처리, M+P : 미생물 대량배양복합체 배양액 + 농약 처리, P : 농약 처리, NT : 물 처리

항선충미생물 대량배양복합체 포장 실증 실험에서 뿌리혹선충 억제 기작과 상관관계가 있는 토양 내 젤라틴분해효소(gelatinase) 활성을 조사하기 위해, 토양 시료를 채취하여 분석하였다. 5주차 조사 결과 항선충 미생물 배양액을 주기적으로 관주한 항선충미생물 대량배양복합체 처리구(M) 1.22 Unit/g soil, 미생물 대량배양복합체 배양액+농약 처리(M+P) 1.19 Unit/g soil, 농약 처리(P) 0.18 Unit/g soil, 물 처리(NT) 0.18 Unit/g soil로 조사되었고, 10주차에서는 항선충 미생물 대량배양복합체 처리구(M) 1.46 Unit/g soil, 미생물 대량배양복합체 배양액+농약 처리(M+P) 1.35 Unit/g soil, 농약 처리(P) 1.21 Unit/g soil, 물 처리(NT) 1.20 Unit/g soil로 조사되었다. 조사결과 미생물 처리구인 M과 M+P 처리구의 효소 활성이 다른 처리구에 비해 높게 나타났다 (그림 192).

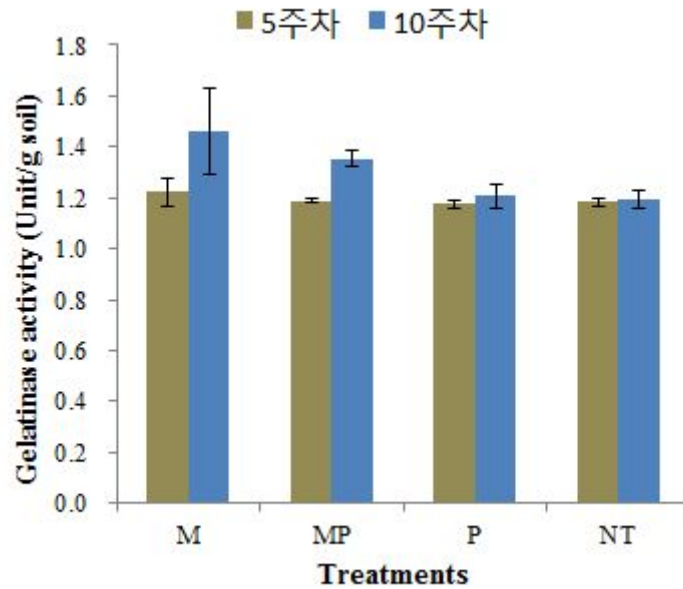


그림 192. 포장 실증에서 토양 내 젤라틴분해효소(gelatinase) 활성 조사.

M : 미생물 대량배양복합체 배양액 처리, M+P : 미생물 대량배양복합체 배양액 + 농약 처리, P : 농약 처리, NT : 물 처리

(2) 토양 키틴분해미생물 및 젤라틴분해미생물 개체수 변화

항선충미생물 대량배양복합체 배양액의 주기적 관주에 따른 뿌리혹선충 억제효과를 조사코자 정식 후 2회에 걸쳐 토양시료를 채취한 후 토양내 키틴분해미생물(chitinolytic bacteria) 및 젤라틴분해미생물(gelatinolytic bacteria) 수를 조사하였다. 조사결과 항선충 미생물 배양액을 주기적으로 관주한 항선충미생물 대량배양복합체 처리구(M) 21.3×10^6 CFU/g soil, 미생물 대량배양복합체 배양액+농약 처리(M+P) 6.7×10^6 CFU/g soil, 농약 처리(P) 2.0×10^6 CFU/g soil, 물 처리(NT) 3.3×10^6 CFU/g soil로 조사되었고, 젤라틴분해 미생물 수는 선충 미생물 배양액을 주기적으로 관주한 항선충미생물 대량배양복합체 처리구(M) 7.7×10^6 CFU/g soil, 미생물 대량배양복합체 배양액+농약 처리(M+P) 5.7×10^6 CFU/g soil, 농약 처리(P) 2.0×10^6 CFU/g soil, 물 처리(NT) 2.0×10^6 CFU/g soil로 조사되었다.

또한 10주차 결과는 키틴분해미생물 수에서 M 처리구가 가장 높았고, 그 다음으로 M+P, NT 및 P 처리구 순으로 나타났다. 젤라틴분해미생물 수에서는 M 처리구가 가장 높았고, 그 다음으로 M+P로 나타났고, NT 및 P 처리구는 같게 조사되었다. 이는 토양에 처리된 게겍질분말의 영향과 항선충미생물 대량배양복합체 배양액 처리 때문인 것으로 사료된다 (그림 193).

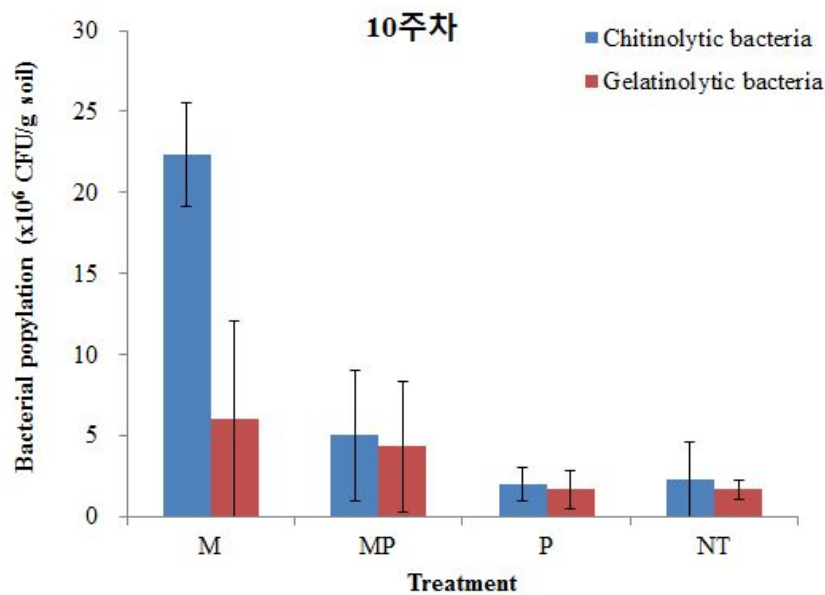
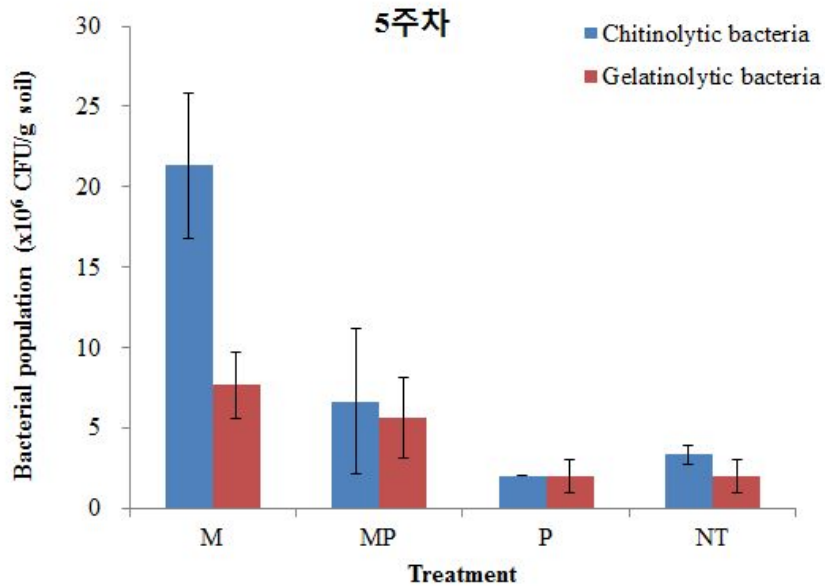


그림 193. 토양 내 키틴분해미생물(chitinolytic bacteria) 및 젤라틴분해미생물(gelatinolytic bacteria) 수. M : 미생물 대량배양복합체 배양액 처리, M+P : 미생물 대량배양복합체 배양액 + 농약 처리, P : 농약 처리, NT : 물 처리

라. 토양의 이화학적 특성 변화

(1) 토양산도 및 전기전도도 변화

농가포장에서 향선충 미생물 배양액을 배양한 후 2주일 간격으로 근권에 관주한 후 토양의 화학성 변화를 조사한 결과, 시험 전 토양에 비해 pH는 감소한 반면, 전기전도 값은 증가하였다. 따라서, 현장배양액 주기적 처리를 위해서는 배지양분 조성의 조정이 필요할 것으로 판단

되었다 (표 27).

표 27. *L. capsici* YS1215 배양액 관주에 따른 토마토 재배토양의 이화학성변화

구 분		pH 1:5 H ₂ O	E.C dS m ⁻¹
M	정식전	7.22	0.43
	수확후	7.09	1.49
MP	정식전	6.98	0.36
	수확후	7.22	0.61
P	정식전	7.00	0.28
	수확후	6.94	0.53
NT	정식전	7.11	0.36
	수확후	6.73	1.21

M: 미생물배양액, **MP:** 농약 + 미생물배양액, **P:** 합성농약, **NT:** 무처리

(2) 토양유기물 및 유효인산 함량의 변화

농가포장에서 항선충 미생물 배양액을 배양한 후 2주일 간격으로 근권에 관주한 후 토양의 화학성 변화를 조사한 결과, 시험 전 토양에 비해 유기물이 증가하였고, 또한 유효인산, 치환성 양이온 값도 증가하였다. 따라서, 현장배양액 주기적 처리를 위해서는 배지양분 조성의 조정이 필요할 것으로 판단되었다 (표 28).

표 28. *L. capsici* YS1215 배양액 관주에 따른 토마토 재배토양의 이화학성변화

구 분		O.M g kg ⁻¹	Av.P ₂ O ₅ mg kg ⁻¹	Exc. Cation(cmol ⁺ kg ⁻¹)			L.R kg 10 _a ⁻¹
				K	Ca	Mg	
M	정식전	29	399	0.70	11.9	6.3	0
	수확후	29	563	0.75	12.5	6.6	0
MP	정식전	16	372	0.47	5.7	2.6	0
	수확후	19	417	0.42	7.1	3.0	0
P	정식전	13	325	0.41	4.5	2.2	0
	수확후	14	334	0.33	5.3	2.5	0
NT	정식전	17	369	0.66	10.7	6.1	0
	수확후	23	413	0.59	11.2	6.0	0

M: 미생물배양액, **MP:** 농약 + 미생물배양액, **P:** 합성농약, **NT:** 무처리

마. 농가 현장 배양액내 미생물 개체수 조사

항선충미생물 대량배양복합체 포장실증시험 수행과정동안 농가포장에서 직접 배양한 항선충 미생물 대량배양복합체 배양액 내의 키틴분해미생물(chitinolytic bacteria) 밀도변화를 조사

한 결과 1.8에서 2.3×10^6 CFU/ml의 개체수를 보였고, 그 결과를 그림 194에 나타내었다.

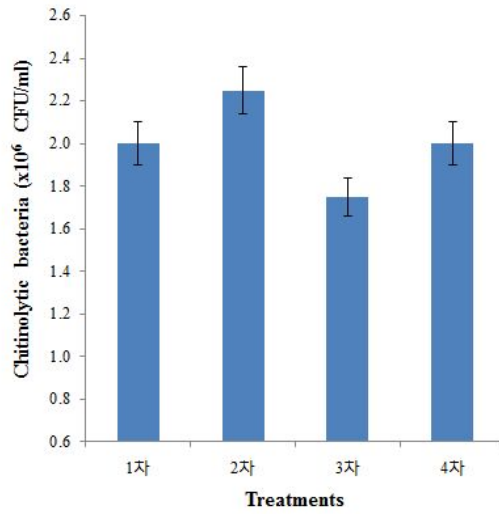


그림 194. 농가배양액의 키틴분해미생물(chitinolytic bacteria) 밀도.

제 5 절 항선충 미생물 대량배양복합체 제품화 및 판매

1. 개발된 미생물제제, 액비 및 배양체 등록시험

가. 미생물 보조영양원 (액비) 등록시험

(1) 비해서험 1건, 작물재배시험 1건, 보증성분 및 유해성분 분석 시험

■ 재배시험 의뢰

재배시험 결과 ‘양호함’의 결과가 나왔다.

관리번호 제13-078호

재배시험(비효) 성적서				
신청인	성명	박준석	업체명	㈜부르네
	주소	광주광역시 북구 왕봉동 전남대학교 친환경농업연구소 211호		
	전화	062-530-0434	FAX	062-530-0433
공시품	명칭	Cofactor		
	형태	액상		
조사항목	공시비료 처리에 의한 상추의 생육 조사			
제출용도	관공서 제출용			
재 배 시 험 결 과				
비효시험	■ 공시비료 처리에 의한 상추의 생육 양호함.			
2013년 10월 16일				
농촌진흥청지정 농약 시험연구기관 농촌진흥청지정 비료 시험연구기관				
목원대학교 미생물생태자원연구소장				
* 본 시험성적서의 내용은 신청인이 의뢰한 약제에 대한 시험-결과물자 등도 이외의 목적으로 사용함에 따라 발생하는 모든 사항에 대해서, 본 연구소는 그(들)에 대한 법적 책임을 지지 않습니다.				

농촌진흥청지정 시험연구기관 비료·농약 유기농업자재

INER institute
목원대학교 미생물생태자원연구소

대전시 사구로 98
Tel. 042)829-7598
Fax. 042)829-7599
http://home.mokwon.ac.kr/~iner

시험명 : 공시비료(Cofactor)의 작물재배시험

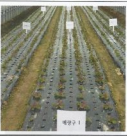
1. 시험기간 : 2013년 8월 9일 ~ 2013년 9월 24일(46일간)
2. 재료 및 방법

가. 시험지역 : 세종특별자치시 권동면 송곡리 308-13
나. 공시토양 : 사양토
다. 공시작물/품종 : 상추(*Lactuca sativa* L.)/선종 3호(권농종묘)
라. 공시비료 : Cofactor(액상)

공시 비료



마. 시험규모
(1) 처리구당 면적 : 15㎡(1.5m×10m)
(2) 비닐하우스에서 난파법 3반복으로 수행

시험구 면적	시험구 배치	시험포장 환경
15㎡		

□ C-1, 2, 3 : 무처리구 1, 2, 3 / S-1, 2, 3 : 기준양구 1, 2, 3 / D-1, 2, 3 : 배양구 1, 2, 3

2) 분석시험 의뢰

시험결과 수용성분소는 0.07%, 수용성몰리브덴은 0.0014%로 기준치 보다 많은 양이 검출 되었다.

발급번호 : 13-FER-1-00077

분석 성적서

① 의뢰인	성명	(주)푸르네	사업자등록번호	412-81-36660
	주소	515-881 전남 장성군 삼서면 유산리 294-16		
② 의뢰내용	대상물품명	cfactor		
	시험개요	9항목:수용성분소(0.08), 수용성폴리브렌(0.0005), 비소, 니켈, 크롬, 티탄, 아질산, 아황산, 카드뮴		
	용도	생산업등록을 위한 미량요소복합비료 유효, 유해성분 분석		

③ 분석(시험) 성적 :

항목	성적(단위)	비고
수용성분소(0.08%)	0.070 %	비표관리법 시행규칙 별표1
수용성폴리브렌(0.0005%)	0.0014 %	기준에 적합
비소	흔적	
니켈	흔적	
크롬	0.00013 %	
티탄	흔적	
아질산	흔적	
아황산	흔적	
카드뮴	흔적	
	이하 미검	

「농업기술실용화재단 분석검정 의뢰 및 처리규정」 제4조의 규정에 의하여 2013년 08월 01일자로 의뢰한 시료에 대한 분석(시험) 성적입니다.

이 성적은 신청인이 제출한 시료를 분석한 것으로, 관련사항 이외의 선전·소송 등 증거자료로 사용하실 수 없습니다.

2013년 08월 16일

농업기술실용화재단 이사

1 / 1 13-FER-1-00077

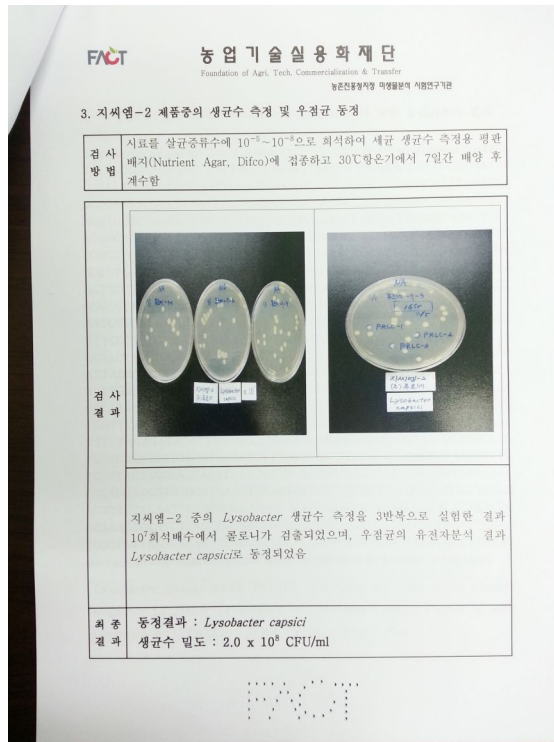
나. 토양미생물제제 등록시험

(1) 작물재배시험 1건, 약해시험 1건

(가) 유기농업자재 등록시험

① 미생물 동정 및 균수 측정

동정 결과 : *Lysobacter capsici* 생균수 밀도 : 2.0×10^8 cfu/ml



② 병원성미생물 시험

병원성대장균을 포함한 5개의 병원성 미생물이 불검출 되었다.

병원성미생물 시험결과

구분	시험 년월	시험 기관	시험항목 (속, 증명)	시험결과
오염미생물	2012.	농업기술실용 화재단	병원성대장균	불검출
			살모넬라	불검출
			황색포도상구균	불검출
			리스테리아 모노사이토제네스	불검출
			바실러스 세레우스	불검출

③ 인축독성시험

급성경구, 급성경피 시험 결과 중독 증상 및 치사가 없었으며 안점막자극성, 피부자극성역시 자극 지수가 0이 었다.

인축독성 시험 성적

시험 년도	시험 기관	시험 항목	시험결과	독성구분
2013	(주)한국생물안 전성연구소	급성경구	LD50> mg/kg 중독증상 및 치사가 없음	급 (기준:Ⅲ급/Ⅳ급)
		급성경피	LD50> mg/kg 중독증상 및 치사가 없음	급 (기준:Ⅲ급/Ⅳ급)
		안점막자극성	안점막자극지수(A.O.I)= 0	0 (기준AQI 10이하)
		피부자극성	피부자극지수(P.I.I)= 0	0 (기준P.I.I 1이하)



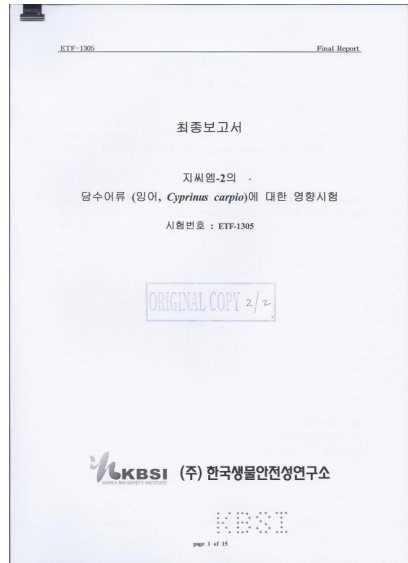
인축독성시험 최종보고서

④ 환경독성시험

급성어류독성시험 결과 '시험 동물 치사 없음'의 결과가 나왔다.(표 9, 그림 33)

환경독성 시험결과

시험 년도	시험 기관	시험 항목	시험결과	독성구분
		급성어류독성	독성노출비(TER) > 100이상 LC50 > 4.03 * 10 ⁵ cfu/ml 시험동물 치사 없음	급 (기준: III급 TER 100이상)
		물벼룩 급성유영저해	해당없음	(기준: TER 20이상)
		꿀벌접촉독성	해당없음	표시문구 및 그림문자



환경독성시험 최종보고서

⑤ 작물재배시험의뢰

작물재배 시험을 지역을 달리하여 2회 실시 하였고 '양호함'의 결과가 나왔다.
 ㄱ. 충남 예산군 봉산면 효교리 1구 251-2(상추)

관리번호 제13-010호

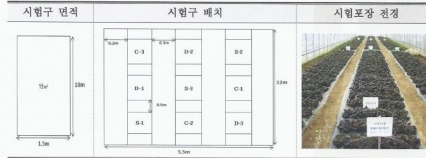
재배시험(비효) 성적서 I				
신청인	성명	박윤석	업체명	㈜투르네
	주소	광주광역시 북구 용봉동 전남대학교 친환경농업연구소 211호		
	전화	062-530-0434	FAX	062-530-0433
공시종	명칭	GCM-생		
	형태	액상		
조사항목	공시비료 처리에 의한 상추의 생육 및 수확량 조사			
시험지역	충청남도 예산군 봉산면 효교리 1구 251-2			
재배시험결과				
비효시험	■ 공시비료 처리에 의한 상추의 생육 양상 양호함. ■ 공시비료 처리에 의한 상추의 수확량 양호함.			
2013년 5월 9일				
농촌진흥청지정 농약 시험연구기관 농촌진흥청지정 비료 시험연구기관				
독원대학교 미생물생태자원연구소장				
<small>* 본 시험성적서의 내용은 신청인이 의뢰한 약제에 대한 시험 결과로서 용도이외의 목적으로 사용함에 따라 발생하는 모든 사항에 대해서, 본 연구소는 그 어떠한 법적책임을 지지 않습니다.</small>				

시험명 : 공시비료(GCM-生)의 작물재배시험

1. 시험기간 : 2013년 3월 11일 ~ 2013년 4월 24일(45일간)
2. 재료 및 방법
 - 가. 시험지역 : 충청남도 예산군 봉산면 효교리 1구 251-2
 - 나. 공시토양 : 식양토
 - 다. 공시작물/품종 : 상추(Lactuca sativa L.)/열풍(권농종묘)
 - 라. 공시비료 : GCM-生(액상)



- 마. 시험규모
- (1) 처리구당 면적 : 15㎡(1.5m×10m)
 - (2) 비닐하우스에서 난괴법 3반복으로 수행



C-1, 2, 3 : 무처리구 1, 2, 3 / S-1, 2, 3 : 기준양구 1, 2, 3 / D-1, 2, 3 : 배양구 1, 2, 3

나. 대전광역시 서구 평촌동 434-4(상추)

관리번호 제13-010-1호

재배시험(비료) 성적서 II

신청인	성명	박윤석	업체명	㈜푸르네
	주소	광주광역시 북구 용봉동 전남대학교 친환경농업연구소 211호		
	전화	062-530-0434	FAX	062-530-0433
공시품	명칭	GCM-生		
	형태	액상		
시험지역	대전광역시 서구 평촌동 434-4번지			
조사항목	공시품에 대한 상추의 생육 및 수확량 조사			
용도	관공서 제출용			

재배시험결과

- 비효시험
- 공시비료 처리에 의한 상추의 생육 양상 양호함.
 - 공시비료 처리에 의한 상추의 수확량은 다소 증가하는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었음.

2013년 5월 9일

농촌진흥청지정 농약 시험연구기관
농촌진흥청지정 비료 시험연구기관

목원대학교 미생물생태자원연구소장

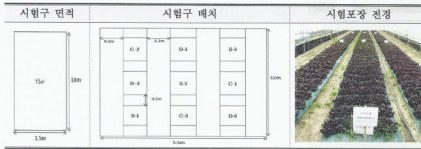
※ 본 시험성적서의 내용은 신청인이 의뢰한 약제에 대한 시험 결과로서 용도이외의 목적으로 사용함에 따라 발생하는 모든 사항에 대해서, 본 연구소는 그 어떠한 법적 책임을 지지 않습니다.

시험명 : 공시비료(GCM-生)의 작물재배시험

1. 시험기간 : 2013년 3월 8일 ~ 2013년 4월 29일(56일간)
2. 재료 및 방법
 - 가. 시험지역 : 대전광역시 서구 평촌동 434-4
 - 나. 공시토양 : 식양토
 - 다. 공시작물/품종 : 상추(*Lactuca sativa* L.)/열풍(민농종묘)
 - 라. 공시비료 : GCM-生(액상)



- 다. 시험규모
- (1) 처리구당 면적 : 15㎡(1.5m×10m)
 - (2) 비닐하우스에서 난괴법, 3반복으로 수행




*C-1, 2, 3 : 무처리구 1, 2, 3/ S-1, 2, 3 : 기준양구 1, 2, 3/ D-1, 2, 3 : 배양구 1, 2, 3

⑥ 비해서험

비해서험 결과 ‘비해 없음’의 결과가 나왔다.

관리번호 제13-008호

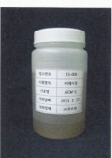
비해시험 성적서				
신청인	성명	박윤석	업체명	㈜푸르네
	주소	광주광역시 북구 용봉동 전남대학교 친환경농업연구소 211호		
	전화	062-530-0434	FAX	062-530-0433
공시품	명칭	GCM-생		
	형태	액상		
검사항목	비해시험	공시비료(GCM-생) 처리에 의한 5 작물의 약해조사 • 유식물체 달관조사 • 생육조사 : 초장(엽장), 엽록소 함량, 잎수(경경)		
	용도	관공서 제출용		
비해시험 결과				
	가지			비해 없음
	고추			비해 없음
	배추			비해 없음
	상추			비해 없음
	오이			비해 없음
2013년 4월 25일				
농촌진흥청 지경 비료 시험연구기관 농촌진흥청 지경 농업 시험연구기관				
목원대학교 미생물생태자원연구소장				
* 본 시험성적서의 내용은 신청인이 의뢰한 약제에 대한 시험 결과로서, 용도이외의 목적으로 사용함에 따라 발생하는 모든 사항에 대해서, 본 연구소는 어떠한 법적 책임을 지지 않습니다.				



 농촌진흥청 지경 비료 시험 연구 기관
 농약 시험 연구 기관
 목원대학교 미생물생태자원연구소
<http://home.nokwon.ac.kr/~iner>
 대전시 서구 도인북로 88
 Tel. 042) 829-7598
 Fax. 042) 829-7599

시험명 : 공시비료(GCM-생)의 작물 비해시험

1. 시험기간 : 2013년 3월 7일 ~ 2013년 4월 1일(26일간)
2. 재료 및 방법
 - 가. 시험장소 : 대전광역시 서구 평촌동 434-4번지
 - 나. 공시토양 : (9)신성미네랄(비료무침가상토 : 일애용상토) = 1 : 1
 - 다. 공시작물(용종, 화사형) : 가지(천하대장, 한국다끼이), 고추(유리건고추, 삼성종요), 배추(춘광, 사카타코리아), 상추(얼봉, 권농종요), 오이(백다다기, 세미니스)
 - 라. 공시비료 및 시비처리량 : GCM-생(100배액)

	작물명	추천 시비량
	기준량구	100배액으로 희석
	배양구	50배액으로 희석

마. 경중개요

- (1) 종자 파종 : 105공 프리그 트레이에 각각의 종자를 파종함.
- (2) 유묘이식 : 공시토양을 채운 시험포트(57cm×18cm)에 일정 크기의 유식물체를 10주를 3반복으로 이식함.
- (3) 시료처리 : 유묘 이식 5일 후 각각의 유식물체에 일주일 간격으로 공시비료를 3회 처리함.
- (4) 유식물체 달관조사 : 공시비료 처리 후 일주일 간격으로 유식물체 생육양상을 3회 달관조사 함.
- (5) 생육조사 : 3차 달관조사 후 각 처리구별로 유식물체의 초장(엽장), 엽록소 함량, 엽록(경경)을 조사하여 비해평가 함.

⑦ 약해시험

약해시험 결과 '약해 없음'의 결과가 나왔다.

관리번호 제13-144호

약해시험 성적서				
신청인	성명	박윤석	업체명	㈜푸르네
	주소	광주광역시 북구 용봉로 77 전남대학교 친환경농업연구소 211호		
	전화	062-530-0434	FAX	062-530-0433
공시품	명칭	지씨염 PE		
	형태	액상		
검사항목	약해시험	공시약제(지씨염 PE) 처리에 의한 5 작물의 약해조사 • 유식물체 달관조사		
	용도	관공서 제출용		
약해시험 결과				
	배추			약해 없음
	파			약해 없음
	무			약해 없음
	상추			약해 없음
	호박			약해 없음
2013년 11월 20일				
농촌진흥청 지경 비료 시험연구기관 농촌진흥청 지경 농업 시험연구기관				
목원대학교 미생물생태자원연구소장				
* 본 시험성적서의 내용은 신청인이 의뢰한 약제에 대한 시험 결과로서, 용도이외의 목적으로 사용함에 따라 발생하는 모든 사항에 대해서, 본 연구소는 어떠한 법적 책임을 지지 않습니다.				

시험명 : 공시약제(지씨엠 PE)의 작물 약해시험

1. 재료 및 방법

- 가. 시험기간 : 2013년 10월 15일 ~ 11월 12일
- 나. 시험장소 : 대전광역시 서구 평촌동 434-4번지
- 다. 공시토양 : ㈜신성미네랄 원예용 상토 2호
- 라. 공시작물(품종, 회사명) : 배추(노랑쌈배추, 사가다), 파(흑금장, 아시아종묘), 무(강호무, 농협), 상추(열풍, 관농종묘), 호박(남강주키니, 농우)
- 마. 공시약제 및 시비처리량 : 지씨엠 PE



처리구	추정분 함량	사용량
무처리구	-	-
기준량구		50메력으로 희석하여 관주처리
배양구		25메력으로 희석하여 관주처리

바. 경중개요

- (1) 종자 파종 : 검은 프리그 트레이에 각각의 종자를 파종함.
- (2) 유도 이식 : 준비된 공시토양에 각각의 유식물체(배추, 파, 무, 상추, 호박) 처리구별로 3주씩 3번복으로 이식함.
- (3) 공시약제 처리 : 이식된 각각의 유식물체에 공시약제를 기준량과 배양으로 조제하여 식물체 주변에 관주처리함.
- (4) 유식물체 달관조사 : 공시약제 처리 후 3일, 7일, 14일째 3회에 걸쳐 유식물체 생육 양상을 3회 달관조사 함.

다. 젤라틴/키틴 배양체 등록시험

(1) 작물재배시험 1건, 보증성분 및 유해성분 분석 시험

■ 재배시험 의뢰

재배시험 결과 '양호함'의 결과가 나왔다.

관리번호 제 13-079호

재배시험 성적서

신청인	성명	박윤석	업체명	㈜푸르네
	주소	광주광역시 북구 용봉동 전남대학교 친환경농업연구소 211호		
	전화	062-530-0434	FAX	062-530-0433
공시품	명칭	GC+ME		
	형태	분말		
조사항목		공시비료 처리에 의한 상추의 생육 조사		
재출용도		관공서 재출용		
재 배 시 험 결 과				
비교시험	■ 공시비료 처리에 의한 상추의 생육 양호함.			


2013년 10월 16일

농촌진흥청지정 농약 시험연구기관
농촌진흥청지정 비료 시험연구기관

목원대학교 미생물생태자원연구소장

※ 본 시험성적서의 내용은 신청인이 의뢰한 약제에 대한 시험 결과로서 용도이외의 목적으로 사용함에 따라 발생하는 모든 사항에 대해서, 본 연구소는 그 어떠한 법적책임을 지지 않습니다.

농촌진흥청 지정
시험연구기관
비료·농약
유기농업자재



INER
Institute
목원대학교 미생물생태자원연구소

대전시 서구 도안북로 88
Tel. 042)829-7598
Fax. 042)829-7599
http://home.mokwon.ac.kr/~iner

시험명 : 공시비료(GC+ME) 작물재배시험

1. 시험기간 : 2013년 8월 9일 ~ 2013년 9월 24일(46일간)
2. 재료 및 방법
 - 가. 시험지역 : 세종특별자치시 권동면 송곡리 308-13
 - 나. 공시토양 : 사양토
 - 다. 공시작물/품종 : 상추(*Lactuca sativa* L./)선종 3호(권농종묘)
 - 라. 공시비료 : GC+ME(분말)



다. 시험규모

- (1) 처리구당 면적 : 15㎡(1.5m×10m)
- (2) 비닐하우스에서 난괴법 3반복으로 수행

시험구 면적	시험구 배치	시험포장 환경
		

*C-1, 2, 3 : 무처리구 1, 2, 3 / S-1, 2, 3 : 기준양구 1, 2, 3 / D-1, 2, 3 : 배양구 1, 2, 3

2) 분석시험 의뢰

시험결과 수용성붕소는 0.10%, 수용성몰리브덴은 0.00082%로 기준치 보다 많은 양이 검출 되었다.

발급번호 : 13-FER-1-00078


분석 성적서

① 의뢰인	성명	(주)푸르네	사업자등록번호	412-81-36960
	주소	515-881 전남 장성군 삼서면 읍산리 294-16		
② 의뢰내용	대상물품명	GC+ME		
	시험개요	9항목·수용성붕소(0.05), 수용성몰리브덴(0.0005), 비소, 니켈, 크롬, 티탄, 아질산, 아황산, 카드뮴		
	용도	생산업동작을 위한 미량요소복합비료 유효, 유효성분 분석		
③ 분석(시험) 성적 :				
항목	성적(단위)	비고		
수용성붕소(0.05%)	0.10 %	비표관리법 시험규격 별표1		
수용성몰리브덴(0.0005%)	0.00082 %	기준에 적합		
비소	흔적			
니켈	0.0050 %			
크롬	0.0053 %			
티탄	0.0050 %			
아질산	흔적			
아황산	흔적			
카드뮴	흔적			
	이하 이백			


2. 대량배양복합체 개발 관련기술의 특허, 시제품 및 마케팅 전략 수립
- 가. 작물별 희석배율 및 사용 매뉴얼 작성

(1) 토마토

젤라틴/키틴분해 미생물을 이용한 고품질 토마토 재배력



	11월		12월		1월		2월		3월		4월		5월		6월		7월		8월		9월		10월	
	상	중	하	상	중	하	상	중	하	상	중	하	상	중	하	상	중	하	상	중	하	상	중	하
생육과정	하우스설치																							
	상토수득																							
	정식																							
	수확기																							
기상재해	시설의 폭설, 혹한, 동파																							
	시설 내 저온, 동해, 고습																							
	육묘불량, 초기 생육불량, 과실 비대 불량																							
	생리장애 다발: 낙과, 낙과, 열과, 공동과, 기형과																							
병해충방제	11월 ~ 10월																							
	모질목병, 앞금광이병, 운문병, 청고병, 배꼽썩음병																							



▶젤라틴/키틴분해 미생물을 이용한 토마토재배


생육단계	사용자재	사용량	사용횟수	효능
토양처리 (정식 10일전)	젤라틴/키틴분해미생물 미세분말 개 갑질	일액살포 : 500L/10a 개 갑질분말 : 6kg/10a	1회 살포	병해충 밀도감소 및 유용미생물 밀도증가
육묘기	젤라틴/키틴분해미생물	엽면살포 : 10배 희석액	2회 ~ 3회 살포	건전한 육묘 형성
정식 후 15~40일	젤라틴/키틴분해미생물	엽면살포 : 1(배양액)3(물) 관수 시 : 300L/10a	10일 간격	화아분화 촉진 착과 증진 비대 촉진 병해충 예방 내병성 증진
정식 후 50일 이후	젤라틴/키틴분해미생물	엽면살포 : 1(배양액)2(물) 관수 시 : 300L/10a	10일 간격	

▶사용시 주의사항


- 작물상태 또는 온도, 기후에 따라 사용량이나 농도를 조절하세요.
- 희석배수를 준수하시고 배양 시작 후 15일을 넘기지 마세요.
- 강 알칼리성제제, 황, 동등의 약제와 혼용을 금하며 타농자재 혼용 시 문의바랍니다.
- 미생물 사용 시 만나질 전에 기포기를 꺼서 잔재물을 가라앉힌 다음에 사용하십시오.

(2) 멜론

젤라틴/키틴분해 미생물을 이용한 고품질 멜론 재배력



	12월		1월		2월		3월		4월		5월		6월		7월		8월		9월		10월		11월	
	상	중	하	상	중	하	상	중	하	상	중	하	상	중	하	상	중	하	상	중	하	상	중	하
생육과정	봄재배																							
	파종, 육묘																							
	정식																							
	유연, 측지제거, 교배, 적과																							
기상재해	시설의 폭설, 혹한, 동파																							
	일조부족, 저온, 가뭄																							
	육묘기 생육불량, 정식지연, 병해충 다발생																							
	착과불량, 과실비대 불량 병해충 다발생																							
병해충방제	12월 ~ 11월																							
	헨가루병, 당굴마름병, 검은점무늬썩음병, 진딧물, 충체벌레, MNSV																							



▶젤라틴/키틴분해 미생물을 이용한 멜론재배

생육단계	사용자재	사용량	사용횟수	효능
토양처리 (정식 전)	젤라틴/키틴분해미생물 개 갑질	일액살포 : 500L/10a 개 갑질분말 : 6kg/10a	1회 살포	병해충 밀도감소 및 유용미생물 밀도증가
육묘기	젤라틴/키틴분해미생물	엽면살포 : 10배 희석액	2회 ~ 3회 살포	건전한 육묘 형성
정식 후 20~40일	젤라틴/키틴분해미생물	엽면살포 : 1(배양액)3(물) 관수 시 : 300L/10a	10일 간격	화아분화 촉진 착과 증진 비대 촉진 병해충 예방 내병성 증진
정식 후 50일 이후	젤라틴/키틴분해미생물	엽면살포 : 1(배양액)2(물) 관수 시 : 300L/10a	10일 간격	

▶사용시 주의사항

- 작물상태 또는 온도, 기후에 따라 사용량이나 농도를 조절하세요.
- 희석배수를 준수하시고 배양 시작 후 15일을 넘기지 마세요.
- 강 알칼리성제제, 황, 동등의 약제와 혼용을 금하며 타농자재 혼용 시 문의바랍니다.
- 미생물 사용 시 만나질 전에 기포기를 꺼서 잔재물을 가라앉힌 다음에 사용하십시오.

나. 향선충 미생물 대량배양복합체 상표 및 특허 출원

(1) 특허출원 - 게겍질이 포함된 토양으로부터 분리한 *Lysobacter capsici* YS1215를 이용한 식물 성장 촉진제 및 선충 방제제와 그 제조방법

출원번호통지서 페이지 1 / 3

관 인 생 략

출원번호통지서

출원 일자 2013.03.26
 특 기 사 항 심사청구(유) 공개신청(유)
 출원 번호 10-2013-0032401 (접수번호 1-1-2013-0262233-40)
 출원인 명칭 주식회사 푸르네(1-2012-008701-6)
 발명자 성명 박원석 김달용 이용성 김선배
 발명의 명칭 게겍질이 포함된 토양으로부터 분리한 *Lysobacter capsici* YS1215를 이용한 식물 성장 촉진제 및 선충 방제제와 그 제조방법

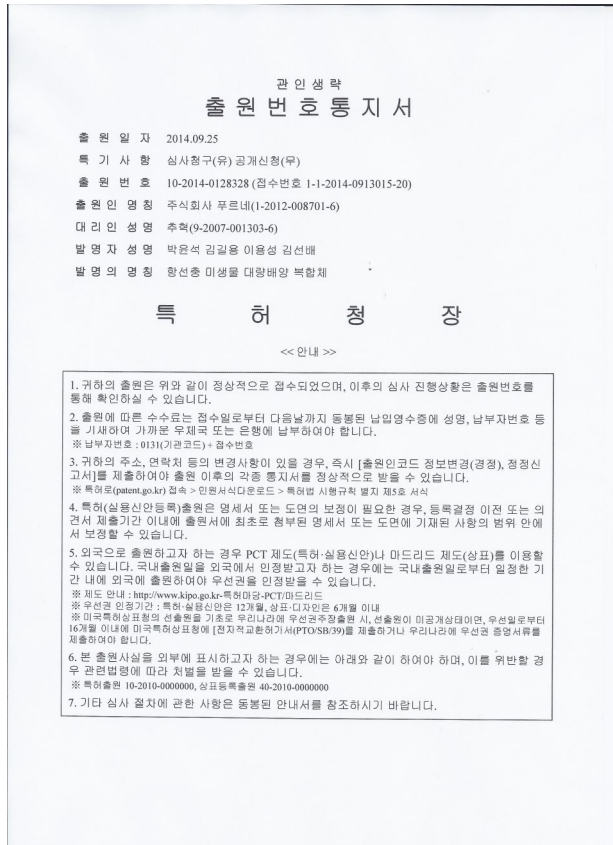
특 허 청 장

<< 안내 >>

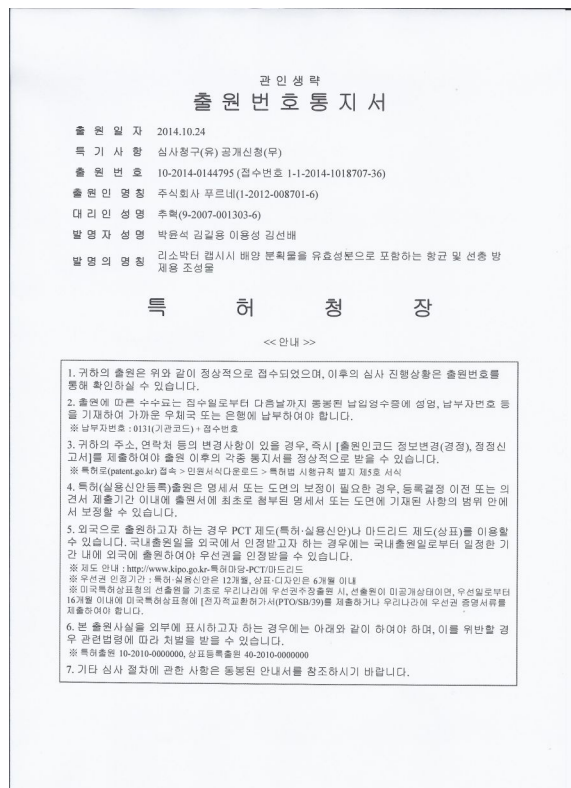
1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 013(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
※ 특허료(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr-특허이담-PCT/마드리드>
 ※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내
 ※ 미국특허상표청의 선출원할 기초로 우리나라에 우선권우송출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적고환허가서(PTOSB39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실들 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

<http://www.patent.go.kr/jsp/kiponet/ir/receipt/online/appInoOffAct.so> 2013-03-26

(2) 특허출원 - 항선충 미생물 대량배양 복합체



(3) 특허출원 - 리소박터 캡시시 배양 분획물을 유효성분으로 포함하는 항균 및 선충 방제용 조성물



다. 시장 분석을 통한 마케팅 전략 수립 및 수행
 마케팅 전략을 수행하기 위해 먼저 광주 인근 농협들의 주요 재배 작물을 파악하고, 대상의 환경에 맞는 홍보 및 교육 프로그램을 제작하여 마케팅을 실행 하였다.

광주 지역 농협

(2014년 03월 기준)

지역농협	주소	전화번호	재배작물 및 특산물
광주농협	광주시 북구 동문대로 161	062-250-5000	주말농장(및밭, 포도농장)
남광주농협	광주시 남구 대남대로 169	062-600-3300	쌀, 잡곡
대촌농협	광주시 남구 포충로 581	062-374-6021	콩, 풋고추, 애호박
동곡농협	광주시 광산구 동곡로 161-21	062-943-3019	애호박, 흑토마토, 미나리, 고추, 장미
본량농협	광주시 광산구 용진로 391	062-943-9780	쌀, 오디
북광주농협	광주시 북구 하서로 522	062-571-0481	딸기, 풋고추, 토마토
비아농협	광주시 광산구 장신로 153	062-953-9085	.
삼도농협	광주시 광산구 삼도로 335	062-943-6000	파리고추, 가지
서광주농협	광주시 서구 죽병대로 107	062-362-8400	김장김치
서창농협	광주시 서구 급화로 92	062-373-6970	멜론, 가지, 피망, 애호박, 방울토마토, 쌀
송정농협	광주시 광산구 내상로 3	062-942-1452	합ffel, 팽이버섯
임곡농협	광주시 광산구 고봉로 807	062-952-8005	수박, 단감, 딸기, 배추, 무
평동농협	광주시 광산구 평동로 800월길 16	062-943-4063	방울토마토, 애호박
하남농협	광주시 광산구 사일로 280	062-951-8595	배, 단감, 수박, 참외

광주 관내 지역농협 현황

전남 지역 농·축협

(2014년 03월 기준)

전남 농·축협	주소	전화번호	재배작물 및 특산물
곡성농협	전남 곡성군 곡성읍 중앙로 142	061-835-0531	멜론, 딸기, 블루베리, 흑알옥수수, 특산물, 시랑옥수수, 석류
석곡농협	전남 곡성군 석곡면 감벌로 5	061-363-2021	쌀, 팥, 콩, 감
옥곡농협	전남 곡성군 옥곡면 대항로 142	061-363-3615	사과, 단감, 포도, 등푸, 쌀
일면농협	전남 곡성군 일면 일면로 683	061-362-3042	쌀, 배, 사과, 파프리카
광산농협	전라남도 나주시 공산면 공산로 130	061-335-3007	쌀, 잡곡
금천농협	전라남도 나주시 금천면 금천로 975	061-331-7241	배
나주농협	전라남도 나주시 나주로 101	061-334-2513	배
남평농협	전라남도 나주시 남평읍 남평1로 29	061-331-2007	쌀, 친환경농산물
노안농협	전라남도 나주시 노안면 금산로 23	061-335-8191	배, 쌀
다시농협	전라남도 나주시 다시면 다시로 177	061-335-4007	쌀, 참외, 배, 단감, 토마토, 수박, 현미
동광농협	전라남도 나주시 동광면 동광로 585	061-335-7531	쌀
백양농협	전라남도 나주시 백양면 고봉로 604	061-336-2211	쌀, 배, 멜론, 참외
문평농협	전라남도 나주시 문평면 제양로 303	061-336-5007	쌀
봉황농협	전라남도 나주시 봉황면 봉황로 715	061-331-4431	쌀
산포농협	전라남도 나주시 산포면 산포로 421	061-337-1005	친환경농산물, 참양, 피망, 애호박
세지농협	전라남도 나주시 세지면 통창로 130-2	061-331-5080	쌀, 멜론, 배
영산포농협	전라남도 나주시 영산포 3811	061-330-5300	쌀, 멜론, 배
고서농협	전라남도 담양군 고서면 가사문화로 327	061-382-3601	쌀, 잡곡, 포도, 딸기, 토마토, 멜론, 마늘, 단감
금성농협	전라남도 담양군 금성면 석현길 9	061-382-4501	쌀
담양농협	전라남도 담양군 담양읍 주성로 1315	061-383-6671	쌀, 딸기, 토마토, 멜론, 블루베리
대전농협	전라남도 담양군 대전면 주성1로 208	061-383-6791	딸기

무정농협	전라남도 담양군 무정면 무정로 519	061-382-2244	딸기, 멜론, 방울토마토
봉산농협	전라남도 담양군 봉산면 신학길 20	061-382-6782	딸기, 수박, 멜론, 풋고추, 마늘
수북농협	전라남도 담양군 수북면 주성1로 725	061-382-7771	쌀, 딸기, 멜론, 토마토
월산농협	전라남도 담양군 월산면 도개안길 69-15	061-383-4614	딸기, 멜론
장평농협	전라남도 담양군 장평면 의평로 128	061-382-8901	단감, 딸기, 멜론
남양농협	전라남도 담양군 장성읍 단풍로 273	061-392-4008	쌀, 토마토, 단감
백암사농협	전라남도 장성군 백암면 백암로 22	061-392-8008	새송이버섯, 복분자, 오디, 감
상계농협	전라남도 장성군 상계면 사창리 492	061-394-1081	쌀, 잡곡, 사과, 단감, 배, 양파, 당근
상서농협	전라남도 장성군 상서면 해성로 1141	061-394-2008	쌀, 말아현미
황성농협	전라남도 장성군 황성읍 정문2길 18	061-393-4731	쌀, 배추, 감, 양파
진황농협	전라남도 장성군 진황면 노사로 503	061-393-5034	쌀
황룡농협	전라남도 장성군 황룡면 뱃다리로 165	061-393-2517	쌀, 단감, 대봉, 포도
봉주농협	전라남도 화순군 봉주면 죽수길 68	061-372-1181	쌀, 복숭아, 토마토, 방울토마토
도곡농협	전라남도 화순군 도곡면 호지1길 13	061-372-4077	쌀, 파프리카, 토마토, 딸기
동곡농협	전라남도 화순군 동곡면 오지로로 293	061-372-2082	물미나리, 인진쑥, 쌀
이양정농협	전라남도 화순군 이양면 황포로 558	061-373-3014	쌀, 돼지감자, 파프리카, 느타리버섯, 더덕
천운농협	전라남도 화순군 남면 사호로 223	061-372-6089	쌀, 느타리버섯, 새송이버섯
화순농협	전라남도 화순군 화순읍 황포로 118	061-374-2356	쌀, 토마토, 복숭아
나주배양농협	전라남도 나주시 정동길 32	061-334-2365	배
나주축산농협	전라남도 나주시 대호길 19	061-334-8001	배

광주 인근 지역농협 현황

라. 시제품을 통한 실제 시범포 운영, 검증

전남 나주시, 담양군 등등의 농가 현장에서 시제품을 사용하여 작물을 재배하고 효능을 검증하였다.



전남 나주시 남평읍 안기철 농가





전남 나주시 남평읍 송방교 농가



전남 담양군 봉산면 김용봉 농가

3. 향선충 미생물 대량배양복합체의 제조공정 설계 및 품질관리 계획 설정
제품의 제조 공정 및 품질 관리 계획서를 작성하여 공장에 비치하고 공정에 따라 생산하고 제품의 품

질을 관리 한다.



실험실 (미생물 접종 및 배양)



미생물 배양을 위한 배지의 양과

지씨엠2 (G.C.M2)	
실험실 (지씨엠2 : L. capsici)	▶ 156 배지 (1L 기준) • Tryptone 504 Broth 30g • Distilled water 1L ▶ Autoclave (122°C, 15min) 멸균이 끝나면 깨끗한 clean bench로 이동 ▶ clean bench 멸균된 156 배지를 용량이 식힌 후 동결된 원고 stock(L. capsici) 1ml 접종 ▶ 플라스틱 입자를 잘 섞고 Shaking Incubator(130rpm, 30°C)에 보관
공장 (400L 배양 시)	• Tryptone 504 Broth 500g

지씨엠2 제조공정도

 미생물 배양기	작업방법 (제조공정) ① 스팀보일러를 이용하여 배양기를 120°C로 1차 멸균한다. ② 배양기에 400L의 물과 156배지를 넣고 100°C로 30분 정도 2차 멸균한다. (배지의 용량 당 배양하려는 미생물의 양에 따라 다르다.) ③ 수온을 30~35°C로 낮추어 미려를 사용하여 유지한 후 실험실에서 배양한 미생물 (Lysobacter capsici)을 접종한다. ④ 배양기 내에 기포식과 교반기를 이용하여 상시 공기를 주입하고 교반한다. ⑤ 3일간 30~35°C로 미려를 사용하여 유지하며 배양한다. ⑥ 제품 용기에 담아 포장한다.
 스티밍 보이러	작업조건 직사광선을 피한 세늘한 곳
	작업상의 유의사항 • 증배 정비 및 청소를 하여 항상 청결을 유지한다. • 지나친 습기로 인한 곰팡이와 배설물 악취 위해 완기를 소독 한다. • 작업 및 보관 시 직사광선을 피한다.

향선충 미생물제제(지씨엠-2) 제조공정 및 품질관리

G.C+M 제조공정도



*** 제조방법**

1. 계 가짓 원분말 100kg 분쇄기를 이용하여 미세 분쇄(200mesh 이상)한다.

2. 잔여분말에 대응하는 제품의 스티커를 붙인다.

3. 젤라틴 및 미량요소, 미세칼 등을 넣고 계 가짓과 함께 교환한다.

-젤라틴 : 3%

*** 6.C+M (250g)생산 시 미량요소 및 미세칼 함량**

- 미량요소
-> 알리판대 : 붕소 첨가(첨가 비율 : 붕소 0.15%, 알리판대 0.025%)

- 미세칼 : 10g

4. 인분의 혼합여부를 확인하고 분말 충전기를 이용하여 제품의 용량에 맞추어 소분 충전한다.

5. 실패기별 분율을 명명한다.

6. 각 제품별 보관장소로 이동시킨다.

*** 보관상 유의사항**

- 날카로운 물건이나 뜨거운 것은 피한다.

- 습기가 많고 직사광선이 강한 곳은 피한다.

- 무거운 물건의 적재는 자제한다.

젤라틴/키틴미생물 배양체(GC+M) 제조공정 및 품질 관리

파워키틴+M 제조공정도



*** 제조방법**

1. 액상원료를 10t 대량 숙성조에서 1년 이상 숙성시킨다.
2. 1t 숙성조(근차 외부 숙성조)로 이동 후 분수 1.5kg, 폴리비덴 25g, 미량요소 및 미네랄을 넣는다.
- 투입 비율 : 분수 0.15%, 폴리비덴 0.025%
*** 파워키틴 +M 생산 시 미량요소 및 미네랄 함량**
- 미량요소 → 총 미량요소 10g
- 미량요소 : 구리, 철, 망간, 아연
3. 1t 숙성조에서 7일 정도 교반 및 숙성시킨다.
4. 산중 숙성조 이동 후 액상 추진기를 이용하여 플라스틱 용에 충전한다.
5. 각 제품의 스티커를 부착한 후 제품보관장으로 이동시킨다.

*** 보관상 유의사항**

- 직사광선에 장기간 노출되지 않도록 주의한다.
- 지나치게 온도가 높거나 낮은 곳은 피한다.
- 습기가 많은 곳은 피한다.

미생물 보조 영양원(파워키틴+M) 제조공정 및 품질 관리

푸르네GOLD 제조공정

- ◆ 표지 교체**
1. 박스(상)를 적는다.
 2. 파워키틴+M을 넣는다.
 3. 상용색면서(GDI농분)를 넣는다.
 4. GDI+와 GDI+M을 넣는다.
 5. 박스를 접어 레이블로 밀봉하고 6개일 박스에 제품을 넣어 적재함으로써 이동시킨다.

- ◆ 유의사항**
- 서늘하고 건조한 곳에 보관한다.
 - 눅눅해 보거나 냄새가 나지 않는다.
 - 지나치게 높게 적재하지 않는다.



항선충미생물 대량배양 복합체(푸르네GOLD) 제조공정 및 품질 관리

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 목표 달성도

연차별 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 목표 달성도를 아래와 같이 나타냈다. 연차별 연구개발 목표들은 대체적으로 연구 계획서의 진도와 일치하게 달성 되었으며, 연구의 최종 목표 달성도 역시 계획서의 최종 목표를 충분히 달성 하였다고 판단된다.

1. 제1차년도 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 달성도

연구개발목표	평 가		목 표 달성도 (%)	참조부문
	평가의 착안점	평가의 척도(%)		
항선충 미생물 특성 연구 및 미생물 보조영양원(액비) 확립실험	<ul style="list-style-type: none"> ○ 선발된 미생물의 항선충 활성 연구 <ul style="list-style-type: none"> -선충알 이용 키틴분해효소 및 분해산물 조사 -선충유충 이용 젤라틴분해효소 및 분해산물 조사 ○ 효소 특성 조사 <ul style="list-style-type: none"> -chitinase 정제 및 알 파괴 조사 -gelatinase 정제 및 유충 파괴 조사 ○ 미생물 보조영양원(액비) 확립 ○ 효소활성 조사 <ul style="list-style-type: none"> - chitinase, gelatinase 	30	100	제1절 1. 2. 3. 5. 제2절 3.
항선충 미생물의 작물 실험	<ul style="list-style-type: none"> ○ 포트에서 작물 생육 및 선충억제 조사 <ul style="list-style-type: none"> -항선충미생물의 작물생육 효과 및 선충억제 실험 ○ 미생물제제 유통기한 실험 <ul style="list-style-type: none"> - 첨가제 종류에 따른 유통기한 영향 조사 	30	100	제1절 5. 6.
항선충 미생물 대량배양체 조건 확립 실험	<ul style="list-style-type: none"> ○ 젤라/키틴 비율에 따른 미생물 활성 조사 <ul style="list-style-type: none"> - 미생물 개체 수 조사 - 알 부화 억제율 및 유충 치사율 측정 ○ 미량요소 첨가에 따른 미생물 활성 조사 <ul style="list-style-type: none"> - 미생물 개체 수 조사 - 알 부화 억제율 및 유충 치사율 측정 ○ 성장인자 첨가에 따른 미생물 활성 조사 <ul style="list-style-type: none"> - 미생물 개체 수 조사 - 알 부화 억제율 및 유충 치사율 측정 	20	100	제2절 1. 2.
항선충 미생물의 특성연구	<ul style="list-style-type: none"> ○ 살선충 활성물질 분리 및 특성조사 <ul style="list-style-type: none"> - 살선충 물질의 추출 및 정제 - 알부화 억제 및 유충 치사율 측정 	20	100	제1절 4.

2. 제2차년도 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 달성도

연구개발목표	평 가		목 표 달성도 (%)	참조부문
	평가의 착안점	평가의 척도(%)		
항선충 미생물의 생산 효소 정제 및 항선충 활성 검증	<ul style="list-style-type: none"> ○ 1차년도에 이어 효소 활성 조사 <ul style="list-style-type: none"> - chitinase 정제 및 알 파괴 조사 - gelatinase 정제 및 유충 파괴 조사 	15	100	제1절 3.
항선충 미생물 대량배양복합체 시용시 효소 변화 조사	<ul style="list-style-type: none"> ○ 식물체 활성 측정 <ul style="list-style-type: none"> -포트실험에서 식물체 향산화효소 측정 -포트실험에서 식물체 내 병 저항 효소 측정 ○ 토양 내 효소 활성조사 <ul style="list-style-type: none"> -chitinase 및 gelatinase 측정 	15	100	제3절 1.
항선충 미생물 대량배양복합체 시제품 제작 및 포트 실험	<ul style="list-style-type: none"> ○ 항선충 미생물 대량배양복합체 시제품 제작 <ul style="list-style-type: none"> -젤라틴/키틴배양체, 미생물 보조영양원 액비 및 미생물 적정 비율 조합 조사 -온도와 기타 환경에 따른 영향 조사 ○ 작물의 생장 및 생리적인 양상 조사 <ul style="list-style-type: none"> -지상부 생 초장, 생체중, 건조중 ○ 작물의 선충병해 방제 정도 조사 <ul style="list-style-type: none"> -난낭 수, 흑 지수 및 알 개수 조사 -토양내 유충 조사 ○ 미생물 보조영양원(액비) 등록시험 ○ 미생물제제 등록시험 ○ 젤라틴/키틴 배양체 등록시험 	30	100	제2절 1. 2.
포장에서 항선충 미생물 대량배양 복합체의 선충 억제 및 작물 생장 평가 (대상 작물: 멜론, 토마토)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 작물의 생장 및 생리적인 양상 조사 <ul style="list-style-type: none"> -생 초장, 생 체중, 건 체중 및 수확량 조사 -과실 당도 조사 ○ 작물의 선충병해 방제 정도 조사 <ul style="list-style-type: none"> -난낭 수, 흑지수 및 알 개수 조사 -토양 내 유충 조사 	20	100	제4절 1.
포장에서 항선충 미생물 대량배양 복합체 시용에 따른 미생물상 변화 조사	<ul style="list-style-type: none"> ○ 토양내 세균상 조사 <ul style="list-style-type: none"> -gelatin 및 chitin 분해균 수 조사 	10	100	제4절 1.
항선충 미생물의 특성연구	<ul style="list-style-type: none"> ○ 1차년도에 이어 살선충 활성물질 분리 <ul style="list-style-type: none"> -살선충 물질의 추출 및 정제 -알부화 억제 및 유충 치사율 측정 	10	100	제1절 4.

3. 제3차년도 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 달성도

연구개발목표	평 가		목 표 달성도 (%)	참조부문
	평가의 착안점	평가의 척도(%)		
경제성 분석, 농가 보급, 기술이전과 제품 생산 및 판매	<ul style="list-style-type: none"> ○ 항선충 미생물 대량배양복합체의 포장에서 사용 타당성 및 경제성 분석 -개발된 기술의 산업체로의 기술이전 -항선충 미생물 대량배양복합체의 제품화 -제품생산 및 포장 -농가 보급 및 전국적 판매망 확충 	30	100	제5절 1. 2. 3.
항선충 미생물 대량배양복합체 사용 시 효소 변화 조사	<ul style="list-style-type: none"> ○ 식물체 활성 측정 -포트실험에서 식물체 항산화효소 측정 (peroxidase 및 polyphenol oxidase) -포트실험에서 식물체 내 병 저항 효소 측정 (β-1,3-glucanase 및 chitinase) ○ 토양 내 효소 활성조사 -포장실험에서 chitinase 및 gelatinase 측정 	20	100	제3절 2.
포트에서 항선충 미생물 대량배양복합체의 선충 억제 및 식물 성장 효과 조사	<ul style="list-style-type: none"> ○ 작물의 성장 및 생리적인 양상 조사 -지상부 생 초장, 생체중, 건조중 및 수확량 ○ 작물의 선충병해 방제 정도 조사 -난낭 수, 흑 지수 및 알 개수 조사 -토양내 유충 조사 	20	100	제3절 2.
포장에서 항선충 미생물 대량배양복합체의 선충 억제 및 작물 성장 평가	<ul style="list-style-type: none"> ○ 작물의 성장 및 생리적인 양상 조사 -지상부 식물체 생 초장, 생 체중, 건 체중 및 수확량 조사 -과실 당도 조사 ○ 작물의 선충병해 방제 정도 조사 -난낭 수, 흑지수 및 알 개수 조사 -토양내 유충 조사 	20	100	제4절 2.
포장에서 항선충 미생물 대량배양복합체의 토양 미생물상 변화 조사	<ul style="list-style-type: none"> ○ 토양내 세균상 조사 -gelatin 및 chitin 분해균 수 조사 	10	100	제4절 2.

제 2 절 관련분야에의 기여도

1. 산업적 측면에서의 기여도

본 과제의 핵심인 항선충미생물 대량복합체는 어떤 특정기질만을 분해 하는 미생물의 특성과 이를 이용한 대량배양의 가능성에서 힌트를 얻어 연구 개발된 기술로써 뿌리혹선충의 증식에 필요한 알 및 알집을 파괴하는데 필요한 chitinase 및 gelatinase 를 대량 함유한 배양체를 농가에서 저렴한 비용으로 손쉽게 대량으로 배양하여 근권에 살포함으로써 작물 및 환경에 피해를 주지 않고 뿌리혹선충 밀도를 빠르게 감소시키는 수단이다. 현재의 농업생산기술의 확립은 화학농약의 보급과 갈라 놓을수 없지만 화학농약의 사용에 따른 부정적인 면은 모두가 공인하는 바이다. 이에 부응하여 국내외로 생물학적 방제 기술이 개발되어 사용되고 있지만 그 비용과 효과는 현재 우리나라의 현재 농업생산구도에서 농가의 인정을 받기는 어려운 실정이다. 본 과제를 통해 개발된 기술은 선충방제 기능뿐만 아니라 토양 내 양분 균형을 조절하여 식물의 건강상태를 증대 시켜주며 비료사용절감 효과도 기대하고 있다. 과제 종료 후에도 지속적인 연구개발을 통한 제품 보완 및 제품의 농가 보급은 농산물 품질 및 수확량 향상과 더불어 지역 농산물 이미지 및 농가 수익증대에 큰 기여를 할 것으로 전망된다.

2. 기술적 측면에서의 기여도

현재의 집약농업은 고품질, 다수확 등 방면에서는 큰 성과를 이루었으나 이로 인해 생태계 파괴라는 엄청난 대가를 치르고 있다. 화학농약의 지속적인 사용으로 내성을 키우고 있으며 대체 산물인 기존의 희석해서 사용하는 미생물제제는 접종균의 토착미생물과의 경쟁에서 수량, 적응성면에서 필연적인 열세를 보임으로 그 효과를 기대하기가 어렵다. 본 연구과제를 통해 선발된 항선충 미생물은 특정한 기질을 이용함으로써 농가 현지에서 비멸균 노출된 환경에서도 특정 배양수단으로 손쉽게 특정미생물을 대량 배양할 수 있다. 이러한 수단의 보급으로 기존의 미생물제제를 생산하기 위한 장비에 대한 투자비용을 절감할수 있으며 대량배양으로 인한 저렴한 생산비용과 항 선충 효과는 현행 타 기술에 비해서 획기적인 발전이라고 판단된다. 또한 본 과제 수행과정에서 이루어진 실내에서의 선충알, 알집에 대한 파괴효과 싯트 및 농가 싯험의 검증효과는 가히 화학합성 농약의 사용을 대폭 감소시킬 수 있다고 사료된다.

3. 학문 발전에의 기여도

본 연구과제를 통해 *Lysobacter capsici* YS1215의 미생물 특성과 항선충 활성 효과에 대한 다양한 정보가 제공되었다. 이러한 성과들은 이후 유사기술개발에 다양하게 활용이 가능하리라 판단된다. 또한 본 연구과제에서 수행되었던 결과는 학술지나 학술대회에 발표되었으며, 과제

수행 기간에 연구전문인력을 양성하는 성과를 이루었으며, 세부적인 내용은 다음과 같다.

가. 학술지 및 학술대회 발표

- (1) Yong Seong Lee, Yun Serk Park, Muhammad Anees, Young Cheol Kim, Yong Hwan Kime & Kil Yong Kim. 2013. Nematicidal activity of *Lysobacter capsici* YS1215 and the role of gelatinolytic proteins against root-knot nematodes. *Biocontrol Science and Technology*.
- (2) 이용성, 박윤석, 김선배, 김길용. 2013. *Lysobacter capsici* YS1215를 이용한 뿌리혹선충 (Root-knot nematode)의 생물학적 방제. 한국토양비료학회지.
- (3) Yong Seong Lee, Kyaw Wai Naning, Xuan Hoa Nguyen, Sun Bae Kim, Jae Hak Moon, and Kil Yong Kim. 2014. Ovicidal Activity of Lactic Acid Produced by *Lysobacter capsici* YS1215 on Eggs of Root-Knot Nematode, *Meloidogyne incognita*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*.
- (4) Yong Seong LEE, Muhammad ANEES, Yun Serk PARK, Sun Bae KIM, Woo Jin JUNG and Kil Yong KIM. 2014. Purification and properties of a *Meloidogyne*-antagonistic chitinase from *Lysobacter capsici* YS1215. *Nematology*.
- (5) Yong Seong Lee, Xuan Hoa Nguyen, Kyaw Wai Naing, Yun Suk Park, Kil Yong Kim. 2015. Role of Lytic Enzymes Secreted by *Lysobacter capsici* YS1215 in the Control of Root-Knot Nematode of Tomato Plants. *Indian journal of microbiology*.
- (6) Yun Ser Park, Young Seong Lee, Muhammad Anees, Sun Bae Kim and Kil Yong Kim. 2013. Characterization and role of gelatinolytic proteins secreted by *Lysobacter capsici* YS1215 in biocontrol of root-knot nematodes. 2013 한국토양비료학회 춘계학술발표회.
- (7) Young Seong Lee, Muhammad Anees, Yun Ser Park, Sun Bae Kim, Woo Jin Jung and Kil Yong Kim. 2013. Role of purified chitinase produced by *Lysobacter capsici* YS1215 in biocontrol of root-knot nematodes. 2013 한국토양비료학회 춘계학술발표회.
- (8) Young Seong Lee, Xuan Hoa Nguyen, Kyaw Wai Naing, and Kil Yong Kim. 2014. The role of lytic enzymes produced by *Lysobacter capsici* YS1215 in biocontrol of root-knot nematode in tomato. 2014 한국응용생명공학회 국제학술대회.
- (9) Yong Seong Lee and Kil Yong Kim. 2014. Nematicidal activity of lactic acid produced by *Lysobacter capsici* YS1215 on root-knot nematodes. 2014. 20th World

Congress of Soil Science 국제학술대회.

- (10) Yong Seong Lee, Min Hae Jung and Kil Yong Kim. 2014. Statistical optimization of medium components for chitinase production by *Pseudomonas fluorescens* strain HN1205; role of chitinase on egg hatching inhibition of root-knot nematode. 2014. 20th World Congress of Soil Science 국제학술대회.

나. 연구인력양성

- (1) 박사. 이용성. 2014. Biological control of root-knot nematode by *Lysobacter capsici* YS1215.
- (2) 박사. Nguyen Xuan Hoa. 2014. Biological control of plant pathogens using microbial antagonists.
- (3) 학사. 정민해. 2013. Biocontrol potential of *Paenibacillus elgii* HOA73 against root rot disease (*Phytophthora capsici*) in pepper.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

본 연구개발 사업을 통하여 과제제반 연구내용에 대한 실험을 완성하였으며 기존의 목표를 달성하였다. 본 연구과제의 수행성파로 항선충 미생물 대량배양복합체의 포장에서 시용 타당성 및 경제성 분석을 통해 유기농업자재(병해충관리용) 1건, 미량요소복합비료 2건을 개발하여 총 3건(등록번호 : 제 공시-3-6-1호, 전남 장성21-가-10804호(2건))의 제품을 출시하였으며 관련특허도 총 3건(10-2013-0032401, 10-2014-0128328, 10-2014-0144795)을 출원 하였다.

본 연구팀은 현재까지의 성과 및 결과에서 나온 보완사항의 추가 연구를 계속해서 진행 할 것이며, 국내외 여러 지역의 시범포 사업을 통하여 효과검증 및 제품보완에도 힘쓰고, 대량생산 및 적극적인 마케팅전략으로 연구 성과를 보급할 예정이다.

제 6 장 참고문헌

- Abdel-Rahman FH, Clark S, Saleh MA. 2008. Natural organic compounds as alternative to methyl bromide for nematodes control. *J. Environ. Sci. Health B* 43: 680-685 .
- Blackburn K, Alm SR, Yeh TS. 1996. Avermectin B1, isazofos, and fenamiphos for control of *Hoplolaimus galeatus* and *Tylenchorhynchus dubius* infesting *Poa annua*. *J. Nematol.*28: 687-694.
- Chen ZX, Dickson DW. 2004. Biological control of nematodes with bacterial antagonists, pp. 1041-1082. In Chen ZX, Chen SY, Dickson DW (eds.). *Nematology-Advances and Perspectives; Nematode Management and Utilization*. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Jayakumar J. 2009. Bio-efficacy of *Streptomyces avermitilis* culture filtrates against root knot nematode, *Meloidogyne incognita* and reniform nematodes, *Rotylenchulus reniformis*. *Karnataka J. Agric. Sci.* 22: 567-571.
- Kavitha PG, Jonathan EI, Nakkeeran S. 2012. Effects of crude antibiotic of *Bacillus subtilis* on hatching of eggs and mortality of juveniles of *Meloidogyne incognita*. *Nematol. Mediterr.* 40: 203-206.
- Oka Y, Koltai H, Bar-Eyal M, Mor M, Sharon E, Chet I, Spiegel Y. 2000. New strategies for the control of plant parasitic nematodes. *Pest Manag. Sci.* 56: 983-988.
- Oliveira DF, Carvalho HWP, Nunes AS, Silva GH, Campos VP, Junior HMS, Cavaleiro AJ. 2009. The activity of amino acids produced by *Paenibacillus macerans* and from commercial sources against the root-knot nematode *Meloidogyne exigua*. *Eur. J. Plant Pathol.* 124: 57-63.
- Siddiqui IA, Shaikat SS, Sheikh IH, Khan A. 2006. Role of cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in the suppression of root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* in tomato. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22: 641-650.
- Sullivan RF, Holtman MA, Zylstra GJ, White JF, Kobayashi DY. 2003. Taxonomic positioning of two biological control agents for plant diseases as *Lysobacter enzymogenes* based on phylogenetic analysis of 16S rDNA, fatty acid composition and phenotypic characteristics. *J. Appl. Microbiol.* 94: 1079-1086.
- Sun MH, Gao L, Shi YX, Li BJ, Liu XZ. 2006. Fungi and actinomycetes associated with *Meloidogyne* spp. eggs and females in China and their biocontrol potential. *J. Invertebr. Pathol.* 93: 22-28.
- Yoon GY, Lee YS, Lee SY, Park RD, Hyun HN, Nam Y, Kim KY. 2012. Effects on *Meloidogyne incognita* of chitinase, glucanase and a secondary metabolite from *Streptomyces cacaoi* GY525. *Nematology* 14: 175-184.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업(뿌리혹선충방제를 위한 항선충 미생물 대량배양복합체 개발)의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업(뿌리혹선충방제를 위한 항선충 미생물 대량배양복합체 개발)의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.