

보안 과제( ), 일반 과제( O ) / 공개( O ), 비공개( )발간등록번호( O )

작물바이러스 및 병해충 대응 산업화 기술개발사업 2022년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004368-01

# 엽채류 주요 병해충 친환경방제기술 개발 및 산업화 기술 개발

2023.06.13

주관연구기관 / (주)오상킨섹트  
공동연구기관 / (주)중부바이오텍  
강원대학교

농 립 축 산 식 품 부  
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제출문

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “엽채류 주요 병해충 친환경방제기술 개발 및 산업화 기술 개발”(개발기간 : 2021. 04. 01 ~ 2022. 12. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2023. 06. 13.

주관연구기관명 : (주)오상킨섹트 (대표자) 이 준 석 (인)  
공동연구기관명 : (주)중부바이오텍(대표자) 손 효 석 (인)  
공동연구기관명 : 강원대학교 (대표자) 장 철 성 (인)

주관연구책임자 : 박 장 우  
공동연구책임자 : 박 기 병  
공동연구책임자 : 조 세 열, 이 윤 수



국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<b>최종보고서</b>							보안등급			
							일반[O], 보안[ ]			
중앙행정기관명	농림축산식품부			사업명	사업명		작물바이러스 및 병해충 대응 산업화 기술개발사업			
전문기관명 (해당 시 작성)	농림식품기술기획평가원			내역사업명 (해당 시 작성)	내역사업명		방제기술 개발			
공고번호	농림축산식품부 공고 제 농축2021-55호			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)		연구개발과제번호		121052-2		
기술분류	국가과학기술 표준분류	1순위 LA0908	40%	2순위 LB0403	35%	3순위 LB0304	35%			
	농림식품과학기술분류	1순위 RA0303	40%	2순위 RA0202	35%	3순위 RA0305	35%			
총괄연구개발명 (해당 시 작성)	국문	엽채류 주요 병해충 친환경방제기술 개발 및 산업화 기술 개발								
	영문	Development and commercialization of eco-friendly control technology of major diseases and insect pest on leafy vegetables								
연구개발과제명	국문	엽채류 주요 병해충 친환경방제기술 개발 및 산업화 기술 개발								
	영문	Development and commercialization of eco-friendly control technology of major diseases and insect pest on leafy vegetables								
주관연구개발기관	기관명	농업회사법인(주)오상킨섹트			사업자등록번호		221-81-20204			
	주소	(11921) 경기도 구리시 건원대로 34번길 27, 805호			법인등록번호		140111-0020450			
연구책임자	성명	박 장 우			직위		연구소장			
	연락처	직장전화 전자우편			휴대전화		국가연구자번호 1088 6628			
연구개발기간	전체	2021. 04. 01 - 2022. 12. 31(1년 9개월)								
	단계 (해당 시 작성)	1년차	2021. 04. 01 - 2021. 12. 31(9개월)							
	2년차	2022. 01. 01 - 2022. 12. 31(1년)								
연구개발비 (단위: 천원)	정부지원 연구개발비	기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금 지방자치단체 기타( )				합계		연구개발비 외 지원금
	현금	현금	현물	현금	현물	현금	현물	현금	현물	
총계	730,000	6,000	90,000					736,000	90,000	826,000
1단계	1년차	313,000	-	41,000				313,000	41,000	354,000
	2년차	417,000	6,000	49,000				423,000	49,000	472,000
n단계	1년차									
	n년차									
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)	기관명	책임자		직위	휴대전화	전자우편	비고			
		역할	기관유형							
공동연구개발기관	강원대학교	조세열		교수			공동	대학		
	(주)중부바이오텍	박기병		부장			수요	중소기업		
위탁연구개발기관										
연구개발기관 외 기관										
연구개발담당자 실무담당자	성명	김 미 혜			직위		연구원			
	연락처	직장전화 전자우편			휴대전화		국가연구자번호 1152 4360			

이 최종보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 제재처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

2023년 6월 13일

연구책임자: 박 장 우

주관연구개발기관의 장: 농업회사법인(주)오상킨섹트  
 공동연구개발기관의 장: 강원대학교 산학협력단  
 공동연구개발기관의 장: 농업회사법인(주)중부바이오텍



농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

**< 요약 문 >**

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명		작물바이러스 및 병해충대응 산업화기술개발 사업			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)		
내역사업명 (해당 시 작성)		방제기술 개발			연구개발과제번호		121052-2
기술 분류	국가과학기술 표준분류	1순위 LB0304	40%	2순위 LB0306	35%	3순위 LB0403	35%
	농림식품 과학기술분류	1순위 RA0306	40%	2순위 RA0305	35%	3순위 RA0202	35%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		엽채류 주요 병해충 친환경방제기술 개발 및 산업화 기술개발					
연구개발과제명		엽채류 주요 병해충 친환경방제기술 개발 및 산업화 기술 개발					
전체 연구개발기간		2021년 4월 1일~2022년 12월 31일					
총 연구개발비		총 826,000 천원 (정부지원연구개발비: 730,000 천원, 기관부담연구개발비: 96,000 천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원 금: 천원)					
연구개발단계		기초[ ] 응용[ ] 개발[ V ] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[ ]		기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준(3단계) 종료시점 목표(8단계)	
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)							
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)							
연구개발 목표 및 내용	최종 목표	주요 엽채류에 문제가 되고있는 진딧물과 온실가루이 등의 해충과 세균성 무름병 등의 주요 병해를 친환경적으로 방제하고 유용미생물을 활용하여 식물의 저항성을 향상을 통한 엽채류 주요 병해충 종합 방제제의 산업화 기술을 개발하고자 함.					
	전체 내용	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 엽채류의 주요 해충인 진딧물과 온실가루이를 효과적으로 방제할 수 있는 방제력이 검증된 토착 광포식성 천적의 선발 및 제품화를 통해 (자생)천적 자원 개발</li> <li>○ 곤충의 면역기능을 규명하여 무름병 유발 세균에 대항하는 항생 펩티드 발굴과 곤충내/외 항생 펩티드 대량 발현조건 개발, 현장 적용 가능성 탐색 및 대량생산시스템 구축, 제품화</li> <li>○ 엽채류 재배 토양내 Microbiome 분석을 통해 식물병원균 분석 및 길항미생물 탐색을 통해 토양병해 방제 미생물을 개발하고 최적 처리조건 확립 기술 개발</li> <li>○ 토양내 유용미생물과 유기성 자원(축분 등)을 활용한 엽채류의 병원균에 대한 저항성을 갖는 복합유기질 비료 개발 및 산업화</li> </ul>					

연구개발 목표 및 내용	1단계 (해당 시 작성)	목표	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 광포식성 천적 『담배장님노린재』대체 종 선발 및 제품화</li> <li>○ 곤충유래 항생/항균 펩티드의 선발 및 대량 생산 기술 개발</li> <li>○ 식물 병원성 길항미생물을 활용한 토양병 방제 기술 개발</li> <li>○ 유용미생물을 활용한 복합유기질 비료 개발</li> </ul>
		내용	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 진딧물, 온실가루이 방제(토착) 광포식성 천적의 제품화                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 토착 천적 선발 및 선발된 천적의 방제효과 실험</li> <li>- 선발된 천적의 동애등에를 대체먹이로 활용한 대량 생산 시스템 개발 및 방사 기법 개발</li> <li>- 신규 천적방사기법 개발을 통한 엽채류 주요 해충에 대한 방제효과 현장 검증 및 개발된 천적 및 방사 모델의 제품화 기술 개발</li> <li>- 동애등에를 활용한 항생/항균 펩티드 대량 생산 기술 개발 및 제품화</li> </ul> </li> <li>■ 곤충유래 항생/항균 펩티드를 활용한 엽채류 세균병 방제 기술 개발                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 곤충 면역기작연구(세포성/체액성 면역반응 연구) 및 저분자 항생/항균 펩티드 발굴</li> <li>- 전체 단백질 중 항생/항균 단백질 분리 및 아미노산 서열 분석 및 항생력 기능 분석</li> <li>- 곤충 대상 면역유도방법을 통한 항생/항균 펩티드 과발현 기술 개발</li> <li>- 항생/항균 펩티드의 엽채류 무름병에 대한 살균력 테스트 및 안전성 확인</li> </ul> </li> <li>■ 식물 성장촉진 미생물을 활용한 복합유기질 비료 개발                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 식물 성장촉진 미생물 선발 및 산업화를 위한 길항미생물과의 상호관계 규명</li> <li>- 선발된 미생물 혼합조건에 따른 복합 유기질 비료 안정적 발효를 위한 공정 시스템 개발</li> <li>- 부속 유기질비료 제품의 제형화 기술 확립</li> <li>- 제품 품질 안정화 및 제품화 추진</li> </ul> </li> <li>■ 유용미생물을 활용한 토양병 방제 기술 개발                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 엽채류 재배지 토양환경으로부터 마이크로바이옴 분석</li> <li>- 토양 미생물 분리, 동정 및 기내 작물 실험을 통한 길항력 검정 실험</li> <li>- 선발된 길항미생물의 대량생산을 위한 조건 개발</li> <li>- 길항미생물의 처리조건 확립 및 농가 실증 실험</li> </ul> </li> </ul>
	목표		
	내용		

연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 제품화 2건, 특허출원 2건, 특허등록 1건, 고용창출 1명, 기술이전 2건.</li> <li>○ 논문 2편, 학술발표 5건, 홍보전시 2건</li> </ul>
연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<p>1) 연구개발성과의 활용방안</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 참여기업체의 경쟁력 강화 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 신규 토착 천적의 생산 기술의 참여 산업체로의 기술 이전을 통한 신규 제품 개발</li> <li>- 연구 결과의 대내외 홍보를 통한 제품의 인지도를 상승시키고 수요 확대 유도</li> </ul> </li> <li>○ 해충방제 분야 활용 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 수입 천적 대신 신규 토착천적자원의 활용</li> <li>- 담배장님노린재 대체천적으로 활용: 담배장님노린재는 해충방제효과는 뛰어나나 포장 적용에 위험이 따르는 천적으로 포장 내 천적의 밀도가 높아지면 살충제를 사용해서 천적의 밀도를 낮춰야 하는, 전문가의 컨설팅이 반드시 필요한 종으로 농가 적용이 쉽지 않음</li> <li>- 농민 자가 관리시스템 구축 가능: 다양한 천적의 경제적인 대량생산/관리 시스템이 구축되어 매뉴얼화 되면 수요자(농민) 주도로 천적이용이 가능해짐</li> <li>- 농가주도형 적극적인 해충 관리 가능: 업그레이드 현장적용기법에 의한 천적 방제 모델 적용으로 천적활용 농산물로서의 가격 차별화 가능</li> </ul> </li> <li>○ 유기작물재배 분야 활용 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 유기작물 재배 과정에 발생하는 각종 병해의 관리 방법 개발 및 활용</li> <li>- 유기작물 재배과정에 발생하는 각종 병해 관리용 친환경 유기농자재 선발 활용</li> <li>- 유기작물 재배 과정에 발생하는 각종 병해 관리를 위한 매뉴얼 발간</li> <li>- 유기작물 재배를 위한 지역별 적합품종의 선발, 파종 및 유기 육묘기술 개발, 토양 및 시비관리, 잡초방제, 생리 및 연작장해 방지, 환경관리, 수확 전후 관리기술 개발 활용</li> <li>- 친환경 미생물제제 공급을 통한 화학 합성농약의 대체</li> <li>- 농약의 수입대체 및 수출을 통한 국내 생물농약 산업의 활성화</li> <li>- 친환경 및 지속가능한 농업을 통한 농업생태계 보호 및 환경오염 방지</li> <li>- 기후변화와 친환경 요구에 신속히 대응 가능하여 무농약 친환경 조성에 도움</li> <li>- 친환경 농산물 생산을 위한 종합적인 친환경 재배 Program을 이용한 친환경 재배 단지 형성 및 농산물 수출, 2차 가공품 사용으로 소비자에게 안전한 농산물을 제공할 수 있으리라 전망됨</li> </ul> </li> <li>○ 친환경농업활성화를 위한 핵심 기술 이전 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 생산 및 유통, 현장적용시스템 → 국내 친환경농업 산업, 친환경농업의 기반 구축</li> </ul> </li> </ul>

연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<p>2) 연구개발성과의 기대효과</p> <p>○ 기술적 측면</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 국내 최초 신규 광포식성 토착 천적자원의 제품화로 생물학적 방제효과 극대화</li> <li>- 세계 최초 신규 기생성 토착 천적자원의 제품화로 수출포도 등의 위험분석과정에서 요구하고 있는 해충관리방안 충족 → 천적이용기술 체계화로 방제효과 극대화</li> <li>- 신규 및 기존 천적자원의 산업화 기술 개발로 다양한 작물 및 지역으로 친환경농법 적용 확대 가능</li> <li>- 토양에 존재하는 주요 작물의 생장 촉진과 유해 병원균에 대한 길항력을 갖는 유용 미생물 자원을 확보</li> <li>- 환경 친화적인 토양개량제 개발 연구는 농경지 토양에서 집적된 인산에 의한 문제를 해결하고, 토양의 물리, 화학, 생물적 기능을 회복시키며, 지속적인 토양관리와 안전한 농산물 생산을 가능케 할 것으로 기대됨</li> <li>- "친환경농업육성책"의 준수를 위한 병해충의 효과적인 방제수단의 도출 및 산업</li> <li>- 고효율 친환경 자재 개발과 더불어 종합적인 친환경 재배 Program 확립으로 정형화된 안전한 농산물 생산에 기여</li> </ul> <p>○ 사회적 측면</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 화학비료와 농약 사용 저감에 따른 친환경 농산물 생산 및 농약중독 감소</li> <li>- 화학비료와 농약 사용 저감에 따른 토양 및 수환경의 오염 감소</li> <li>- 안전한 먹거리 생산에 기여</li> <li>- 환경친화적인 유기농산물 다량생산에 기여</li> <li>- 무농약/화학비료 친환경 농산물 생산 보급으로 국민건강 증대에 기여</li> </ul> <p>○ 경제·산업적 측면</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 신규 광포식성 토착 천적자원의 제품화로 국내 천적 시장에 경쟁력 확보 전망</li> <li>※ 2017년 기준으로 약 20% 시장을 점유할 경우 안정적으로 10억 원의 시장 창출이 가능</li> <li>※ 2022년 천적 시장규모가 200억 원으로 예측되고 있으므로, 과제 종료 후 2년 안에 40억 원의 시장 창출이 가능할 것으로 기대</li> <li>- 미생물 자원을 활용하여 작물의 재배에 이용하여 기존의 유기합성 농약이나 화학비료의 사용을 줄이고 농산물을 생산가능</li> <li>- 친환경적 병해 관리 기술 개발을 통한 환경오염 경감</li> <li>- 친환경 생물농약 개발을 통한 국내 바이오산업의 경제적 활성화</li> <li>- 지적재산권 확보, 논문 투고 및 원천기술 개발을 통한 국가 과학기술 경쟁력 제고</li> <li>- 종합적인 친환경 재배로 인한 안전 농산물 내수 확대 및 수출촉진에 기여할 것으로 전망</li> </ul>
---------------------------	---

연구개발성과의 비공개여부 및 사유					
연구개발성과의 등록 ·기탁 건수					
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황					
국문핵심어 (5개 이내)	엽채류	천적	항균, 항생 펩티드	미생물	유기질비료
영문핵심어 (5개 이내)	Leaf vegetables	Natural enemy insect	Antibiotic, antifungal peptides	Microbes	Organic Fertilizer

---

---

# 목 차

---

---

<b>제1장 개발과제의 개요</b> .....	1
1. 연구개발의 개요 .....	1
2. 연구개발의 핵심내용 .....	2
3. 연구개발 과제 필요성 .....	3
가. 국내 친환경농산물 생산 현황 .....	3
나. 해외 친환경농산물 생산 현황 .....	4
다. 엽채류의 생산 현황 .....	5
라. 엽채류 병해충 방제제의 당면과제 .....	6
4. 연구개발 세부목표 .....	10
<b>제2장 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용</b> .....	12
1. 엽채류 주요 해충방제를 위한 (토착)광포식성 천적의 제품화 .....	12
가. 연구개발 목표 .....	12
나. 연구개발 내용 .....	12
1) 토착천적 선발 및 선발된 천적의 방제효과 실험 .....	12
2) 대상 공시충 확보 및 기초생태 규명 .....	21
3) 천적공충 유지식물에 관한 자료 수집 및 분석 .....	24
4) 동애등을 대체먹이로 활용한 대량 생산 시스템 개발 및 방사 기법 개발 ..	26
5) 신규 천적방사기법 개발을 통한 엽채류 주요 해충에 대한 방제 효과 검증 ..	41
6) 동애등을 활용한 항균/항생펩티드 대량 생산 기술 확립 및 제품화 .....	76
2. 곤충유래 항생/항균 펩티드를 활용한 엽채류 세균병 방제 기술 개발 .....	86
가. 연구개발 목표 .....	86
나. 연구개발 내용 .....	86
1) 곤충 면역기작 연구 및 저분자 항생/항균 펩티드 발굴 .....	86
2) 동애등에 대상 항생/항균 단백질 발굴과 함께 면역유도 기술 개발 .....	94
3) 곤충 면역유도 방법을 통한 항생/항균 펩티드 과발현 기술 개발 .....	102
4) 항생/항균 펩티드의 엽채류 무름병에 대한 살균력 검증 및 현장 적용 .....	130
3. 식물 성장촉진 미생물을 활용한 부숙 유기질비료 개발 .....	152
가. 연구개발 목표 .....	152
나. 연구개발 내용 .....	152
1) 식물성장촉진 미생물 선발 및 산업화를 위한 길항미생물과의 상관관계규명 ·	152
2) 미생물 혼합조건에 따른 부숙 유기질비료 발효공정 시스템 개발 .....	158
3) 부숙 유기질비료 제품의 제형화 기술 확립 .....	176
4) 부숙 유기질비료 제품의 식물 성장촉진 효과 규명 .....	199
5) 부숙 유기질비료 제품 및 수출 진행 .....	202
4. 유용미생물을 활용한 토양병 방제 기술 개발 .....	204

가. 연구개발 목표 .....	204
나. 연구개발 내용 .....	204
1) 업체류 재배지 토양환경으로부터 마이크로바이옴 분석 .....	204
2) 토양 미생물 분리, 동정 및 기내 작물 실험을 통한 길항성 검정 실험 .....	218
3) 상추 포트 실험을 통한 상추균핵병 방제 효과 검정 .....	247
4) 포장 실증 실험을 통한 처리조건 규명 .....	281

**제3장 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도 ..... 306**

1. 연구개발성과 .....	306
가. 정성적 연구개발성과 .....	306
1) 업체류 주요 해충방제를 위한 (토착)광포식성 천적의 제품화 .....	306
2) 곤충유래 항생/항균 펩티드를 활용한 업체류 세균병 방제 기술 개발 .....	308
3) 식물 생장촉진 미생물을 활용한 부숙 유기질비료 개발 .....	308
4) 유용미생물을 활용한 토양병 방제 기술 개발 .....	312
나. 정량적 연구개발성과 .....	314
다. 세부 정량적 연구개발성과 .....	315
2. 목표 달성 수준 .....	321

**제4장 목표 미달 시 원인 분석 ..... 322**

**제5장 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도 ..... 330**

**제6장 연구개발성과의 관리 및 활용 계획 ..... 331**

**참고문헌 ..... 332**

## 제1장. 연구개발과제의 개요

### 1. 연구개발의 개요

○ 소비자의 소득증가와 먹거리 안전성에 대한 소비자 요구에 따라 우리나라의 친환경농산물 생산은 크게 증가하였으나, 저농약인증의 폐지에 영향을 받아 2009년을 정점으로 생산량, 인증면적, 농가수 등 모든 지표가 감소추세에 있었으나, 전체농산물 대비 유기농 인증 농산물의 생산지표는 2012년을 정점으로 감소되다가 2014년부터 다시 증가추세에 있음.

○ 건강 및 기능성이 강조되면서 소비자들의 쌈채소에 대한 수요와 더불어 재배면적 또한 꾸준한 증가를 보여 2012년 엽채류 재배면적은 52,357ha로 연간 생산량이 3,129톤('12, '13 농림부)임. 그 중 시설재배면적이 13,226ha로 25.3%를 차지하고 있음. 그러나 대부분의 엽채류는 생식을 하기 때문에 신선도와 안전성이 요구되고 있어, 소비자는 유기농 엽채소에 대한 관심의 증가와 재배면적도 증가하고 있음.

○ 유기농 재배 시 현장에서 가장 시급히 해결해야 할 문제는 병해충 관리로 주요 작물별로 문제시 되는 병해충을 살펴보면, 유기농 고추재배에는 역병, 탄저병, 흰가루병, 진딧물, 담배가루이 등이며, 유기농 배추재배에는 뿌리혹병, 흰가루병, 노균병, 무름병, 배추좀나방, 진딧물류이며, 유기농 엽채류 재배에는 뿌리혹병, 무름병, 균핵병, 진딧물, 온실가루이 등이 문제시 되고 있음.

○ 우리나라는 좁은 국토면적과 높은 인구 밀도 등의 원인으로 인하여 집약적인 농산물 생산이 필요하며, 이러한 결과 국내 농약사용량은 '90년대 중반 km<sup>2</sup>당 1,205kg으로 OECD회원국 중 일본에 이어 2위이며, OECD 평균 사용량 263kg의 4.6배, 농약 최소 사용국인 뉴질랜드(25kg)의 48배에 달하는 농약과다 사용국이 되었음. 이로 인해 생태계 파괴, 지하수 오염, 농작물의 잔류 독성 및 해충의 저항성 출현 등 심각한 부작용이 야기되고 있음.

○ 국내의 경우 병·해충·잡초방제에 사용하는 작물보호제 점유율은 합성농약(96.5%), 친환경농자재(3.0%), 생물농약(0.5%)로 나타났고, 합성농약의 경우 친환경농산물생산에 사용될 수 없을 뿐만 아니라 환경 파괴라는 문제가 있음. 친환경농산물생산에 사용할 수 있는 식물 등에서 추출한 친환경농자재의 경우, 약효성분 및 약효 발현정도가 명확하지 않을 뿐만 아니라, 효과도 일정하지 않다는 단점이 존재함.

○ 이에, 본 연구에서는 주요 엽채류에 문제가 되고 있는 진딧물과 온실가루이 등의 해충과 세균성 무름병 등의 주요 병해를 친환경적으로 방제하고 토양에서 분리한 유용미생물을 활용하여 식물의 저항성 향상 및 토양병 방제를 통한 엽채류 주요 병해충 종합 방제제의 산업화 기술을 개발하고자 함.

## 2. 연구개발의 핵심기술

### < 엽채류 주요 해충 방제를 위한 (토착) 광포식성 천적의 제품화 >

- 엽채류의 주요 해충인 진딧물과 온실가루이 등을 효과적으로 방제할 수 있는 방제력이 검증된 토착 광포식성 천적의 선발 및 제품화를 통해 (자생)천적 자원 개발의 활성화(수입 천적의 환경유해성 우려의 해소 방안)

### <곤충유래 항생/항균 펩티드를 활용한 엽채류 세균병 방제 기술 개발>

- 곤충의 면역기능을 규명하여 세균성 무름병 유발 세균에 대항하는 항생 펩티드 발굴과 곤충내/외 항생 펩티드 대량 발현조건 개발 및 현장 적용 가능성 탐색

### < 식물 성장촉진 미생물 활용한 복합유기질 비료 개발>

- 토양내 식물 성장촉진 미생물과 유기성 자원을 활용한 엽채류의 병원균에 대한 저항성을 갖는 복합유기질 비료 개발을 통해 국내·외 시장 개척

### < 유용미생물을 활용한 토양병 방제 기술 개발 >

- 엽채류 재배 토양내 Microbiome 분석을 통해 식물병원균 분석 및 길항미생물 탐색을 통해 토양내 병해 방제 미생물을 개발하고 최적 처리조건 확립 기술 개발



### < 최종 목표 >

**엽채류 주요 병해충 친환경방제기술 개발 및 산업화 기술 개발**

### 3. 연구개발 과제 필요성

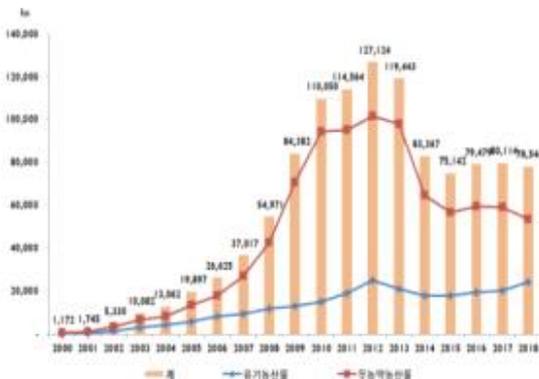
#### 가. 국내 친환경농산물 생산 현황

○ 2016년~2018년 유기농산물 인증면적은 연평균 11.3%증가하였고 인증 농가 수는 9.7%증가하였다. 2018년 국내 친환경농산물 인증면적은 전년 대비 1.9%감소한 78.5 ha이며, 출하량은 전년대비 9.2%감소한 450.9톤임(한국농촌연구원, 2019).

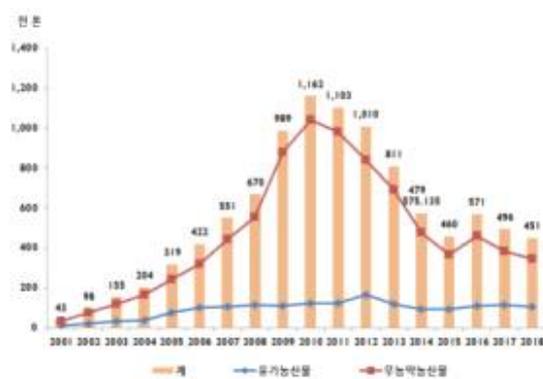
**【연도별 유기·친환경농산물 인증실적 변화 추이】**

구분		2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2016~18년 연평균 증감율(%)	전년 대비 증감율(%)
유기	농가수(천 호)	16.7	13.9	11.6	11.6	12.9	13.4	15.5	9.7	15.9
	면적(천 ha)	25.5	21.1	18.3	18.1	19.9	20.7	24.7	11.3	19.2
	호당 면적	1.5	1.5	1.6	1.6	1.5	1.5	1.6	2.9	5.9
	비중(%)	1.47	1.23	1.08	1.08	1.21	1.28	1.55	13.0	20.7
	출하량(천 톤)	168.3	117.0	95.7	94.4	110.1	113.5	105.1	-2.3	-7.4
	ha당 출하량(톤)	6.6	5.5	5.2	5.2	5.5	5.5	4.3	-12.0	-22.3
친환경	농가수(천 호)	107.0	103.5	68.4	60.0	61.9	59.4	57.3	-3.8	-3.6
	면적(천 ha)	127.1	119.1	83.4	75.1	79.5	80.1	78.5	-0.6	-1.9
	호당 면적	1.2	1.2	1.2	1.3	1.3	1.3	1.4	2.7	5.5
	비중(%)	7.34	6.96	4.93	4.47	4.84	4.94	4.92	0.8	-0.4
	출하량(천 톤)	1,009.8	810.3	575.1	460.1	571.2	496.4	450.9	-11.2	-9.2
	ha당 출하량(톤)	7.9	6.8	6.9	6.1	7.2	6.2	5.7	-10.7	-7.4

<출처:2019 국내외 친환경농산물 시장 현황과 과제>



**【친환경농산물 인증면적 변화추이】**



**【친환경농산물 출하량 변화추이】**

<출처: 2019 국내외 친환경농산물 시장 현황과 과제>

○ 2018년 기준 친환경농산물 출하 현황은 전년 대비 9.2% 감소율을 보였으며, 품목별로는 곡류 157,458톤 (34.9%), 채소류 121,914톤 (27.0%), 과실류 23,218톤 (5.1%), 서류17,148톤 (3.8%), 특용작물 118,493톤 (26.3%), 기타 12,655톤 (2.8%)의 출하량 비중을 차지하고 있다. 서류를 제외하고는 모두 감소한 것으로 나타났음.

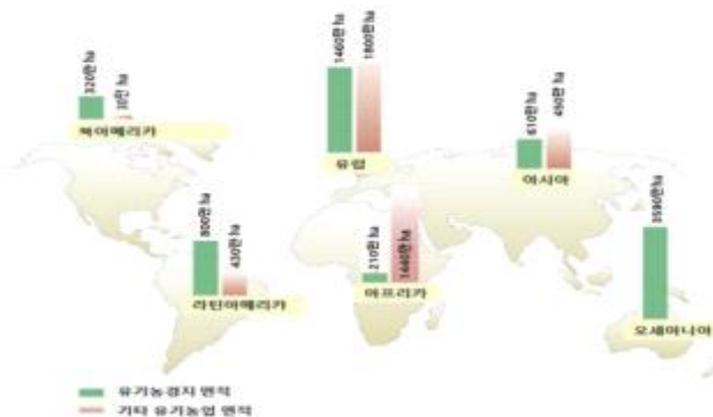
**【친환경농산물 품목별·인증단계별 출하 현황(2018)】**

품목별	유기 (비중, %)	무농약 (비중, %)	계 (비중, %)	전년 대비 증감율		
				유기	무농약	계
곡류	56,784 (54.0)	100,674 (29.1)	157,458 (34.9)	14.0	-14.8	-6.3
채소류	31,471 (30.0)	90,442 (26.2)	121,914 (27.0)	-15.5	-11.0	-12.2
과실류	7,283 (6.9)	15,935 (4.6)	23,218 (5.1)	-17.8	-13.4	-14.9
서류	3,594 (3.4)	13,553 (3.9)	17,148 (3.8)	19.7	2.6	5.8
특용작물	2,476 (2.4)	116,016 (33.5)	118,493 (26.3)	-74.1	-5.8	-10.7
기타	3,4643 (3.3)	9,191 (2.7)	12,655 (2.8)	-31.0	11.3	-4.7
합 계	105,072 (100.0)	345,811 (100.0)	450,886 (100.0)	-7.4	-9.7	-9.2

<출처:국립농산물품질관리원 친환경인증통계정보>

**나. 국외 친환경농산물 생산 현황**

○ 2017년 전 세계 농경지의 약 1.4%, 총 면적 6,980만 ha에서 유기농업을 실천하였고 유기농경지 면적은 1999년 대비 6배, 전년 대비 약 20%증가하였다. 세계 유기농경지 면적의 50%는 오세아니아, 21%는 유럽에 위치하여 전 세계 유기농경지 면적의 70%가 두 대륙에 집중되었고 오세아니아의 유기농경지 비중은 8.5%, 유럽은 2.9%(유럽연합 7.2%)이며, 다른 대륙의 비중은 1% 미만임(한국농촌연구원, 2019).



**【2017년 세계 유기농업 실천면적 분포】**

<출처:2019 국내외 친환경농산물 시장 현황과 과제>

**【2017년 세계 유기농업 현황 주요 지표】**

지 표	총 규모	주요 국가
유기농업 시행 국가	178개국(2016) → 181개국(2017)	
유기농경지	1,100만 ha(1999) → 5,780(2016) → 6,980(2017)	호주: 3,560만 ha 아르헨티나: 340만 ha 중국: 300만 ha
농경지 중 유기농경지 비중	1.2%(2016) → 1.4(2017)	리히텐슈타인: 37.9% 사모아: 37.6% 오스트리아: 24.0%
기타 유기농업지역 (주로 야생채집)	4,100만 ha(1999) → 3,990(2016) → 4,240(2017)	핀란드: 1,160만 ha 감비아: 600만 ha 탄자니아: 240만 ha
생산자 수	240만 명(2015) → 270(2016) → 290(2017)	인도: 835,000명 우간다: 210,352명 멕시코: 210,000명
유기농 시장규모	179억 달러(2000) → 897(2016) → 970(2017)	미국: 452억 달러(400억 유로) 독일: 113억 달러(100억 유로) 프랑스: 89억 달러(79억 유로)
일인당 소비액	11.1달러(2015) → 12.1(2016) → 12.8(2017)	스위스: 325달러(288유로) 덴마크: 315달러(278유로) 스웨덴: 268달러(237유로)
유기농업 규정 보유국	87개국(2016) → 93(2017)	

<출처:2019 국내외 친환경농산물 시장 현황과 과제>

**다. 엽채류의 생산 현황**

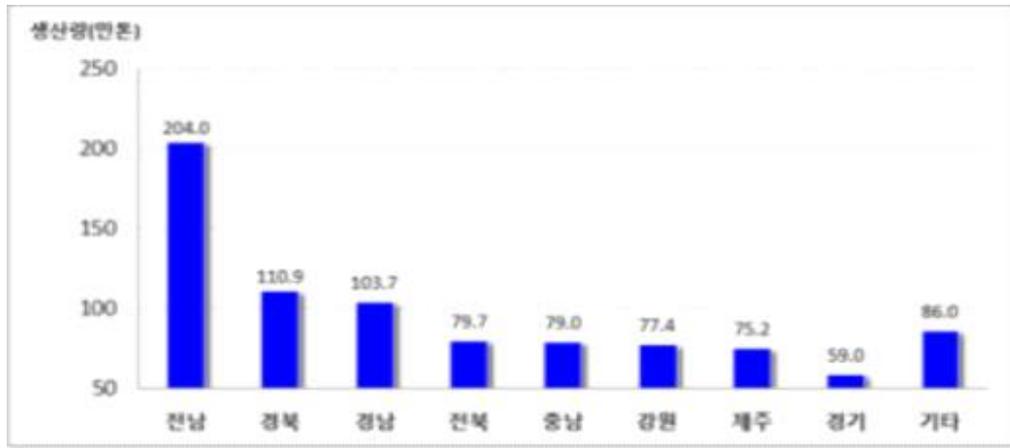
2016년 엽채류 생산량은 226만톤으로 전년대비 12% 감소하였으나, 2017년 288만톤(25.7%), 2018년 293만톤(1.7%)으로 연도별로 증가하고 있음. 2018년도 과채류를 제외한 엽채류, 근채류, 조미채소의 생산량이 증가하였고 이에 따라 채소류 생산량은 전년대비 6.4% 증가함. 생산량과 마찬가지로 2016년 엽채류의 국내재배면적은 전년대비 감소하였지만, 2017년부터 47,352ha로 전년대비 17.8% 증가하여 2018년에는 47,906ha로 재배면적이 꾸준히 증가하는 추세임.

**【연도별 채소류 생산량(톤) 및 국내재배면적(ha)】**

구분	2015년		2016년		2017년		2018년	
	재배면적 (ha)	생산량 (톤)						
엽채류	42,752	2,569,250	39,530	2,261,771	47,352	2,880,828	47,906	2,930,379
과채류	48,784	2,082,403	44,661	1,940,733	41,943	1,890,612	42,078	1,880,890
근채류	23,220	1,367,921	21,485	1,085,223	24,935	1,233,006	25,559	1,307,704
조미채소	95,708	2,072,280	96,584	2,297,756	97,918	2,216,280	109,304	2,629,133
채소류	210,464	8,091,854	202,260	7,585,483	212,148	8,220,726	224,847	8,748,106

<출처:KOSIS>

2018년 기준 지역별 채소류 생산량은 전남이 204만톤으로 가장 많았고 경북이 110.9만톤, 경남이 110만톤, 전북 79.7만톤 순으로 나타났으며, 경기 지역이 59만톤으로 가장 적게 나타났음. 기타 지역으로는 충북, 대구, 부산, 인천, 광주, 울산, 세종, 대전, 서울 지역이 포함됨.



【지역별 채소류 생산량】

<출처:KOSIS>

### 라. 업체류 병해충 방제제의 당면과제

소비자의 소득증가와 먹거리 안전성에 대한 소비자 요구에 따라 우리나라의 친환경농산물 생산은 크게 증가하였으나, 저농약인증의 폐지에 영향을 받아 2009년을 정점으로 생산량, 인증면적, 농가수 등 모든 지표가 감소추세에 있었으나, 전체농산물 대비 유기농 인증 농산물의 생산지표는 2012년을 정점으로 감소되다가 2014년부터 다시 증가추세에 있음.

연도별 전체 채소류의 친환경농산물인증 중 유기농인증 채소류의 비율은 인증 최초연도인 1998년 28.8%에 달하였으나 그 비중이 점점 낮아지다가 2009년 이후 지속적으로 증가하여 2016년에는 25.0%에 달하고 있어 유기농인증에서 채소류의 비중이 높아지고 있음을 알 수 있음.

### 【전체 친환경인증 채소류 생산량 대비 유기농인증 채소류 생산량의 연도별 변화】

년도	친환경농산물-채소류	유기농산물-채소류	
	생산량(톤)	생산량(톤)	비율(%)
1999	21,610	6,216	28.8
2000	25,470	5,489	21.6
2001	56,095	9,014	16.1
2002	104,205	17,165	16.5
2003	174,514	23,484	13.5
2004	199,159	25,076	12.6
2005	326,020	42,902	13.2
2006	423,568	59,213	14.0
2007	729,405	66,577	9.1
2008	978,221	62,577	6.4
2009	1,030,875	54,068	5.2
2010	997,462	58,113	5.8
2011	753,524	55,685	7.4
2012	585,004	74,750	12.8
2013	342,396	40,623	11.9
2014	249,935	35,219	14.1
2015	149,883	31,278	20.9
2016	145,851	36,458	25.0

자료 : 국립농산물품질관리원, 친환경인증관리정보시스템

건강 및 기능성이 강조되면서 소비자들의 쌈채소에 대한 수요와 더불어 재배면적 또한 꾸준한 증가를 보여 2012년 엽채류 재배면적은 52,357ha로 연간 생산량이 3,129톤('12, '13 농림부)임. 그 중 시설재배면적이 13,226ha로 25.3%를 차지하고 있음. 그러나 대부분의 엽채류는 생식을 하기 때문에 신선도와 안전성이 요구되고 있어, 소비자는 유기농 엽채소에 대한 관심의 증가와 재배면적도 증가하고 있음. 그러나, 유기농 재배시 현장에서 가장 시급히 해결해야 할 문제는 병해충 관리로 주요 작물별로 문제시 되는 병해충을 살펴보면, 유기농 고추재배에는 역병, 탄저병, 흰가루병, 진딧물, 담배가루이 등이며, 유기농 배추재배에는 뿌리혹병, 흰가루병, 노균병, 무름병, 배추좀나방, 진딧물류이며, 유기농 엽채류 재배에는 뿌리혹병, 무름병, 균핵병, 진딧물, 온실가루이 등이 문제시 되고 있음.

채소류 유기재배에서 공기교반장치로 실내 온도와 습도를 조절해주면 잿빛곰팡이병, 무름병이 감소하고 수량이 30% 증수되었고, 진딧물의 밀도는 무당벌레와 콜레마니진딧벌을 방사하고, 파좀나방은 잎굴파리고치벌에 의해 23% 감소한다고 알려졌으며, 난황유와BT제를 혼합하여 살포하면 배추좀나방, 파밤나방의 밀도가 현저히 감소하고, 파의 노균병은 Neem 추출물을 철하면 무처리 대비 60%의 이상 낮출 수 있다고 하였음. 또한 상추재배시 공기순환팬을 6m 간격으로 설치하면 흰가루병의 발생을 줄여 수량이 57% 증가와 정식묘 고사율을 71.4% 줄이고, 난황유 0.3% 액을 처리할 경우 89.6~96.3%의 방제효과가 있다고 하였음.

시설원예작물 중요해충인 진딧물, 총채벌레, 온실가루이, 아메리카잎굴파리, 응애류에 대한 천적인 진디벌, 흑파리류, 애꽃노린재, 온실가루이좀벌, 굴파리좀벌, 칠레이리응애, 긴털이리응애의 연구와 이용사례에 비하여 엽채류 해충에 대한 연구는 매우 빈약한 실정으로 화훼류에 비하여 상대적으로 농약잔류가 문제되는 청정 채소류 재배에 생물적 방제의 도입은 절실한 시대적 요구임.

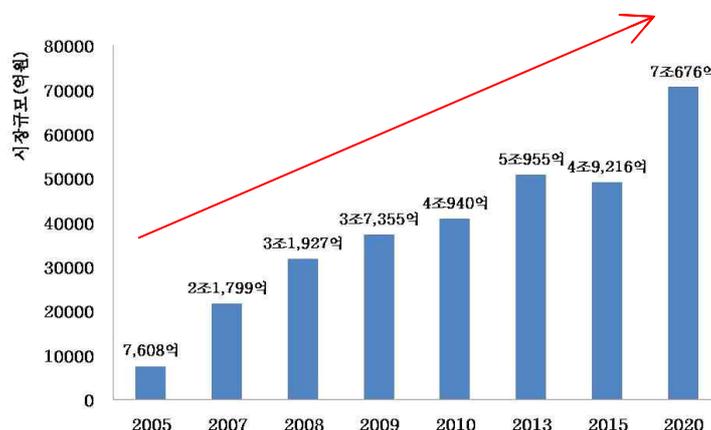
우리나라는 좁은 국토면적과 높은 인구 밀도 등의 원인으로 인하여 집약적인 농산물 생산이 필요하며, 이러한 결과 국내 농약사용량은 '90년대 중반 km<sup>2</sup>당 1,205kg으로 OECD회원국 중 일본에 이어 2위이며, OECD 평균 사용량 263kg의 4.6배, 농약 최소 사용국인 뉴질랜드(25kg)의 48배에 달하는 농약과다 사용국이 되었음. 이로 인해 생태계 파괴, 지하수 오염, 농작물의 잔류독성 및 해충의 저항성 출현 등 심각한 부작용이 야기되고 있으며, 이러한 문제 해결을 위해 '92 Rio 환경회의에서는 유기합성 농약의 사용량을 2004년까지 50% 감소하자는 국가간의 협약을 체결하였고, 각국에서는 유기합성농약의 대체 수단으로 미생물농약의 개발에 박차를 가하고 있음.

미국 농무성에 따르면 '미국에서는 기존 유기합성살충제 사용의 46%, 특히 채소 및 과수재배에서 68%가 대체 농약(alternative pesticides)으로 전환하였으며, 이중 과수 재배지의 14%와 채소 재배지의 6%를 천적곤충을 이용하여 해충 방제를 실시하고 있음. 특히 천적을 이용한 해충 방제는 환경친화적인 방제 수단으로 농생태계에서 지속적으로 해충밀도 억제효과를 발휘할 수 있으므로 외국에서는 범국가적인 차원에서 많은 연구가 수행 중이며, 주요 해충에 대해서는 자국의 환경에 맞는 천적 개발을 완료하여 시판 중에 있음.

1980년부터 화학합성농약에 대해 환경과 인체에 문제가 대두되기 시작하면서 정책입안자, 과학자들은 화학농약을 대체 할 수 있는 분야로 눈을 돌리기 시작하였으며, 농산물에 대한 소비자들의 인식도 변화되어 양보다 질을 선택하는 추세로 변화하고 있음. 어떻게 하면 화학합성 농약을 대체 할 수 있는가에 대한 연구가 진행되면서 1980년 초반 미국 등 선진국 중심으로 미생물농약인 BT제(*Bacillus thuringiensis*)등이 상용화되기 시작하였으며, 우리나라도 그 추세에 발맞추어 BT제를 상용화 하였으며 미생물농약을 중심으로 발전하고 있음. 생물농약 시장부분은 상단부분 미생물농약이 주를 이루고 있으나 저항성 문제가 대두되면서 다양한 분야로 생물농약을 개발해야 한다는 인식이 팽배하고 있음.

세계적으로 환경과 인체에 안전성에 관심이 많아지면서 친환경농산물에 대한 소비자의 수요가 급격히 증가하고 있는 추세임. OECD국가를 중심으로 생물농약 시장규모는 2013년에는 세계농약 시장의 15%인 5조 9000억에 달할 것으로 추정 되고, 2020년에는 무려 7조600억까지 성장된다는 보고가 있음(Santander Investment, 1998). 소비자들의 웰빙 및 식품안전성에 대한 요구가 급격히 증대되는 시점에서 정부는 2013년까지 화학합성농약의 사용량을 40%까지 감축하고 친환경농업을 육성 추진하기로 하였음.

친환경재배 농산물은 매년 급증하고 있으며 유기농 가공식품매출도 급증하고 있음(2008년 친환경농산물 시장규모; 3조 2천억원)(2008 농민신문, 한국경제신문).



【친환경농산물에 대한 세계 생물농약시장 규모】

농민들의 설문조사시 친환경농산물의 생산시 가장 어려운 애로점을 조사한 경우 병해충 방제가 가장 애로사항으로 나타났으며 이는 적합한 작물보호제의 부재로 기인 된 것으로 파악되고 있음.

국내의 경우 병·해충·잡초방제에 사용하는 작물보호제 점유율은 합성농약(96.5%), 친환경농자재(3.0%), 생물농약(0.5%)로 나타났고, 합성농약의 경우 친환경농산물생산에 사용될 수 없을 뿐만 아니라 환경 파괴라는 문제가 있음. 친환경농산물생산에 사용할 수 있는 식물 등에서 추출한 친환경농자재의 경우, 약효성분 및 약효 발현정도가 명확하지 않을 뿐만 아니라, 효과도 일정하지 않다는 단점이 존재함.



**【우리나라 친환경재배시 애로사항】**

이에, 본 연구에서는 주요 업체류에 문제가 되고있는 진딧물과 온실가루이 등의 해충과 세균성 무름병 등의 주요 병해를 친환경적으로 방제하고 토양에서 분리한 유용미생물을 활용하여 식물의 저항성을 향상 및 토양병 방제를 통한 업체류 주요 병해충 종합 방제제의 산업화 기술을 개발하고자 함.

#### 4. 연구개발 세부목표

##### < 엽채류 주요 해충 방제를 위한 (토착) 광포식성 천적의 제품화 >

### 뛰어난 방제효과에도 불구하고 활용에 어려움이 있는 광포식성 천적 『담배장님노린재』 대체 종 선발

- 담배장님노린재 농가 적용 → 천적의 밀도가 높아지면 바이러스매개와 순멋이 등을 유발할 수 있음 → 천적의 밀도를 낮추기 위해 약제를 살포해야하는 아이러니한 상황이 발생함(Kim, 2008)
- 기존 보고된 문헌자료, 농업 주요 해충에 대한 포식 범위 선행 테스트
- 선행연구를 통해 참멋애꽃노린재(세계최초)의 광포식성 확인 및 인공사육 기술 확보
- 진딧물류, 가루이류, 방패벌레류, 나방류, 매미충류 등 → 광포식성
- 생산원가 절감과 높은 수율을 얻는 방향 ▶ 대체먹이(동애등에 유충) 적용 ▶ 생산에 투입되는 노동력 및 생산원가 절감 추진
- 수입 천적 대체효과 → 국내천적산업/친환경 농업 활성화

##### <곤충유래 항생/항균 펩타이드를 활용한 엽채류 무름병 방제 기술 개발>

### 엽채류에 심각한 피해를 주는 세균성 무름병 방제를 위한 곤충유래 항생/항균 펩티드의 선발 및 대량 생산 기술 개발

- 기후변화 등으로 인한 이상 고온다습, 연작장해, 과도한 화학비료 사용 등에 의해 엽채류 재배 농가마다 다양한 생리장해와 무름병 발생 등이 나타나서 연간 많게는 50% 이상, 작게는 30%의 생산량 감량
- 기존 관행적 방제의 방법으로 옥솔린산, 발리다마이신, 스트렙토마이신 등 항생제 위주의 농약이 사용되고 있으나, 항생제에 저항성을 갖는 다제 내성균의 출현으로 방제에 어려움을 겪고 있음.
- 항생/항균 펩타이드는 곤충들이 세대에 걸쳐 체내, 체외의 미생물들과 싸워가며 생성된 면역 물질로 세균, 곰팡이 등에 대한 항생/살균효과가 이미 검증되었음.
- 본 연구진은 식물병원성 미생물인 *Basillus subtilis*와 *Pseudomonas cichori*에 대한 항생 효과가 선행 연구를 통해 검증함.
- 엽채류를 포함한 파프리카, 토마토, 참외, 고추 등 다양한 원예작물에 적용가능
- 기존의 저항성 세균병에 대한 방제 효과 → 신규 방제약제로 수출 가능

## < 식물 성장촉진 미생물을 활용한 복합유기질 비료 개발 >

### 식물 성장촉진 미생물과 유기성자원을 활용한 친환경농업의 활성화를 위한 식물 성장촉진용 복합유기질 비료 개발

- 본 연구는 식물 성장촉진 미생물에 관한 각종 선행연구를 통해 축적한 know-how를 바탕으로 유용한 유기성자원을 활용해 식물 성장촉진용 복합유기질 비료를 개발하고자 하는 목표를 가지고 추진 계획됨
- 선행연구로 분리 확보한 *Trichoderma* sp.가 분비하는 각종 효소를 활용한 식물체의 근권 성장 효과 및 생육효과에 대한 검증
- 식물 성장촉진 미생물제제 개발을 위해 유용미생물과 유기성자원의 식물 성장촉진효과를 실내 및 포장에서 검정하고, 제형(Granule/Pellet 첨가/피복) 개발, 제조공정 개발을 통해 토양 등에서 오래지속가능하고, 경제적인 절감효과를 위해 농가실증실험을 통해 효과 규명할 계획임
- 식물 성장촉진 미생물 분리 및 배양 → 유기성자원과 혼합배양 기술개발 → 포장테스트 실시 → 농가 실증실험을 통한 제품화 추진 → 유기질비료 등록 및 해외시장개척

## <유용미생물을 활용한 토양병 방제 기술 개발 >

### 주요 엽채류 재배지의 토양 Microbiome 분석을 통한 유용미생물을 활용한 토양병 방제 기술 개발

- 엽채류 재배 토양의 미생물상을 분석을 통한 식물병원균을 포함한 Microbiome 분석
- 주요 식물병원성균에 대한 길항미생물을 분리 및 길항능력을 검정
- 본 연구진은 선행연구로 신규 *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus cereus*, *Paenibacillus* 속의 길항미생물을 분리 모잘록 병원균과 균핵병에 대한 길항력을 검정하였음.
- 선발된 길항미생물 대상으로 소용량 발효조(5L)에서의 최적화 연구를 통한 대체 배지 개발 및 배양 기술 개발 → 경제적인 대량생산 시스템 구축 가능
- (업그레이드 부분) 생산원가 절감과 높은 수율을 얻는 방향 ▶ 균체농도, 포도당 측정 등 생산효율성 극대화 ▶ 2,500L 대용량 생산에 따른 생산원가 절감 검토

## 제2장. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

### 1. 엽채류 주요 해충 방제를 위한 (토착)광포식성 천적의 제품화

#### 가. 연구개발 목표

엽채류의 주요 해충인 진딧물과 온실가루이를 효과적으로 방제할 수 있는 방제력이 검증된 토착 광포식성 천적의 선발 및 제품화를 통해 (자생)천적 자원 개발의 활성화를 통한 수입 천적의 환경유해성 우려의 해소 방안

#### 나. 연구개발 내용

##### 1) 토착천적 선발 및 선발된 천적의 방제효과 실험

###### 가) 토착천적 선발

담배장님노린재(*Nexidiocoris tenuis*)는 시설재배에서 쉽게 이용되는 천적으로 온실가루이, 총채벌레, 굴파리류, 응애류 등을 방제하는데 유용한 천적으로 알려져있음(Arzone et al., 1990; Calvo and Urbaneja, 2003; Carnero et al., 2000; Torreno, 1994; Vacante and Benuzzi, 2002).

담배장님노린재는 지중해를 비롯한 온대지역에서 토마토 재배 시 주로 발생하는 천적이고(Sanchez et al., 2003; Sanchez et al., 2009) 필리핀에서는 담배의 담배거세미나방을 방제하는 유용한 천적으로도 알려져 있지만(Torreno, 1994), 해충과 식물을 모두 먹는 광식성이기 때문에 포식성 천적으로도 구분되어 해충으로도 분류되는 종임(Sanchez et al., 2006; Calvo et al., 2009; Arno et al., 2010). 그러나, 밀도 증가시 친환경자재를 이용하여 밀도를 낮추는 작업이 필요함.

꽃노린재과(Anthocoridae)는 전세계적으로 400 ~ 600종이 분포하며, 크기는 1.4 ~ 4.5 mm까지 매우 다양한 것으로 알려져 있음(Lattin, 1999). 꽃노린재과에 속하는 애꽃노린재류는 먹이와 만나면 구침을 찔러 먹이 곤충의 체액을 흡즙하고 사냥하는 습성으로 방제효과가 뛰어나 세계적으로 널리 이용되고 있는 천적임(Kwon et al., 2019).



이리응애류



애꽃노린재류



풀잠자리류

[그림1-1] 적용 대상 광포식성 천적류

광식성인 애꽃노린재류(*Orius* spp.) (Hemiptera: Anthocoridae)는 1985년 숨이애꽃노린재(*Orius insidiosus*) 사용을 시작으로 1993년 미끌애꽃노린재(*O. laevigatus*), 2000년 으뜸애꽃노린재(*Orius strigicollis*) 등 다양한 제품군이 개발되어 사용되고 있으며(van Lenteren, 2012), 국내에는 으뜸애꽃노린재, 애꽃노린재(*Orius sauteri*)와 참멋애꽃노린재(*O. minutus*) 등이 분포하고 있음.[표 1-1]

참멋애꽃노린재는 1974년 인도에서 총채벌레 방제용으로 처음 사용되었으며(Viswanathan and Ananthkrishnan, 1974), 국내에서는 2016년 메타세쿼이아에 대발생한 전나무잎응애의 유력 천적으로 확인되면서 관련 연구가 재개되었음(Kwon et al., 2019).

[표1-1] 애꽃노린재류(*Orius* spp.)의 세계분포 조사 (Source: De clerq et al., 2014)

Species	Korean name	Main Targets*	Area**
<i>Orius albidipennis</i>	-	Thrips	Europe and Africa
<i>Orius insidiosus</i>	숨이애꽃노린재	Thrips	North America, Latin America and Europe
<i>Orius laevigatus</i>	미끌애꽃노린재	Thrips	Europe, North Africa and Asia
<i>Orius majusculus</i>	-	Thrips	Europe
<i>Orius sauteri</i>	애꽃노린재	Thrips	Asia
<i>Orius strigicollis</i>	으뜸애꽃노린재	Thrips	Asia
<i>Orius tristicolor</i>	-	Thrips	North America and Europe
<i>Orius minutus</i>	참멋애꽃노린재	Thrips	Asia
<i>Orius nagaii</i>	꼭지애꽃노린재	Thrips	Asia
<i>Orius laticollis</i>	멋애꽃노린재	Thrips	Asia

\* Listed for primary target pests and may have additional targets..

\*\* Both commercial and experimental releases are included.

이에 본 연구는 선행 연구를 통해 엽채류에 가장 많이 피해를 주는 진딧물과 온실가루이에 적용 가능한 토착천적 후보종을 동정한 결과 참멋애꽃노린재(*Orius minutus*)를 확인하였고 참멋애꽃노린재의 생태특성과 포식능력을 구명하여 주요 병해를 친환경적으로 방제하는데 활용하고자함.

본 연구과제에서 선발한 참멋애꽃노린재와 상업화된 해외도입종인 미끌애꽃노린재의 해충별 밀도 억제 효과를 비교하기 위해 실내 검증을 진행하였음.

줄알락명나방(*Ephesiea cautella*) 알에 대한 참멋애꽃노린재의 온도별 포식량 확인은 각기 다른 온도(15°C, 20°C, 25°C와 30°C)와 습도 70 ± 5%, 광주기 16L : 8D로 설정된 인큐베이터에서 진행하였으며, 뚜껑에 지름 1 cm의 환기구가 있는 사육 용기(5 D × 1.5 H cm)에 우화 후 2일이 지나지 않은 참멋애꽃노린재 성충을 접종하고 줄알락명나방 알 먹이카드를 1장씩 공급하였음.

먹이카드는 직경 0.6 cm로 흰 종이를 펀칭한 후 테이프를 부착하고 접착 면에 명나방 알을 약 170개 부착해서 사용했으며, 먹이 공급 24시간 후 현미경하에서 포식량을 확인하였음.

각 실험조건은 25°C 조건에서 줄알락명나방 알에 대한 포식량을 해외 도입종인 미끌애꽃노린재와 비교하였으며, 실험에 사용된 미끌애꽃노린재는 본 연구팀에서 제품으로 판매하고 있는 것을 이용하였음.

줄알락명나방 알에 대한 참멋애꽃노린재의 온도별 포식량은 [표1-2]와 같이 모든 온도에서 수컷에 비해 암컷의 포식량이 2배 이상 많았으며, 또한 온도가 높아질수록 포식량은 증가하여 암컷은 30°C에서 12.5개로 15°C에 비해 3.8배, 수컷은 25, 30 °C에서 5.6, 5.3개를 포식해 15°C에 비해 각 3.5배, 3.3배 높은 포식률을 확인할 수 있었음.

[표1-2] 온도 조건에 따른 참멋애꽃노린재(*Orius minutus*)의 줄알락명나방 알 포식량 비교

Temp.	N	♀ (± SD)	♂ (± SD)
30°C	15	12.5 ± 1.4	5.3 ± 1.3
25°C	15	8.5 ± 0.9	5.6 ± 0.9
20°C	16	6.0 ± 1.7	1.7 ± 0.3
15°C	15	3.3 ± 0.6	1.6 ± 0.6

또한 25°C에서 줄알락명나방 알에 대한 신규토착 천적인 참멋애꽃노린재와 기존 천적인 미끌애꽃노린재의 포식량 비교 결과 두 종의 암컷과 수컷의 포식량에 대한 통계적 유의차는 확인할 수 없었으나 참멋애꽃노린재 성충의 포식수는 미끌애꽃노린재보다 20% 정도 높게 나타나는 것을 확인할 수 있었음.[표1-3]

[표1-3] 25℃ 조건에서 두 종의 애꽃노린재의 줄알락명나방 알 섭식량 비교

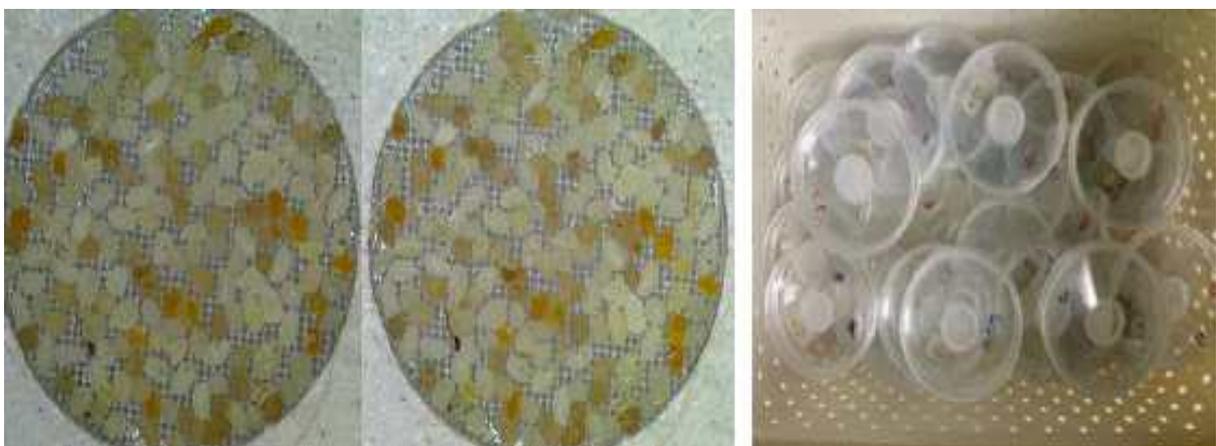
Species	N	♀ (± SD)	♂ (± SD)
미끌애꽃노린재 ( <i>Orius laevigatus</i> )	15	6.2 ± 1.2	5.1 ± 1.6
참멋애꽃노린재 ( <i>Orius minutus</i> )	18	8.5 ± 0.9	5.6 ± 0.9

#### 나) 방제효과 실험

본 연구과제에서 선발한 참멋애꽃노린재와 상업화된 해외도입종인 미끌애꽃노린재의 해충별 밀도 억제 효과를 비교하기 위해 실내 검증을 진행하였음.

##### ① 나방류

줄알락명나방(*Ephesiea cautella*) 알에 대한 참멋애꽃노린재의 온도별 포식량 확인은 각기 다른 온도(15℃, 20℃, 25℃와 30℃)와 습도 70 ± 5%, 광주기 16L : 8D로 설정된 인큐베이터에서 진행하였으며, 뚜껑에 지름 1 cm의 환기구가 있는 사육 용기(5 D × 1.5 H cm)에 우화 후 2일이 지나지 않은 참멋애꽃노린재 성충을 접종하고 줄알락명나방 알 먹이카드를 1장씩 공급하였으며, 먹이카드는 직경 0.6 cm로 흰 종이를 펀칭한 후 테이프를 부착하고 접착 면에 명나방 알을 약 170개 부착해서 사용했으며, 먹이 공급 24시간 후 현미경하에서 포식량을 확인하였음(그림 1-4). 25℃ 조건에서 줄알락명나방 알에 대한 포식량을 해외 도입종인 미끌애꽃노린재와 비교하였고 실험에 사용된 미끌애꽃노린재는 본 연구팀에서 보유하고 있는 제품을 이용하였음.



[그림1-2] 줄알락명나방(*Ephesiea cautella*) 알 먹이카드와 사육용기

줄알락명나방 알에 대한 참멋애꽃노린재의 온도별 포식량은 [표1-4]에서 보는 바와 같이 모든 온도에서 수컷에 비해 암컷의 포식량이 2배 이상 많았으며, 온도가 높아질수록 포식량은 증가하여 암컷은 30℃에서 12.5개로 15℃에 비해 3.8배, 수컷은 25, 30℃에서 5.6, 5.3개를 포식해 15℃에 비해 각 3.5배, 3.3배 높은 포식률을 확인할 수 있었음.

[표1-4] 온도조건에 따른 참멋애꽃노린재(*Orius minutus*)의 줄알락명나방(*Ephestia cautella*) 알 섭식량 비교

Temp.	N	♀ (± SD)	♂ (± SD)
30℃	15	12.5 ± 1.4	5.3 ± 1.3
25℃	15	8.5 ± 0.9	5.6 ± 0.9
20℃	16	6.0 ± 1.7	1.7 ± 0.3
15℃	15	3.3 ± 0.6	1.6 ± 0.6

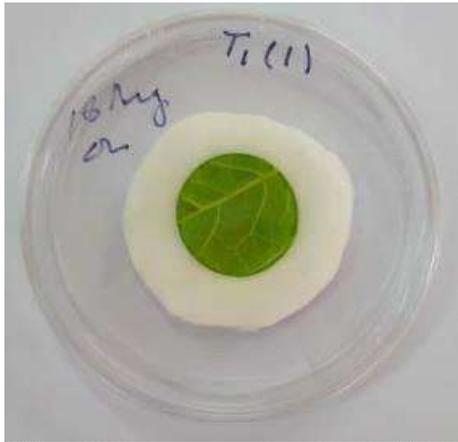
또한 25℃에서 줄알락명나방 알에 대한 신규토착 천적인 참멋애꽃노린재와 기존 천적인 미끌애꽃노린재의 포식량 비교 결과 두 종의 암컷과 수컷의 포식량에 대한 통계적 유의차는 확인할 수 없었으나 참멋애꽃노린재 성충의 포식수는 미끌애꽃노린재보다 20% 정도 높게 나타나는 것을 확인할 수 있었음.[표1-5]

[표1-5] 25℃ 조건에서 두 종의 애꽃노린재 류의 줄알락명나방(*Ephestia cautella*) 알 섭식량 비교

Species	N	♀ (± SD)	♂ (± SD)
미끌애꽃노린재 ( <i>Orius laevigatus</i> )	15	6.2 ± 1.2	5.1 ± 1.6
참멋애꽃노린재 ( <i>Orius minutus</i> )	18	8.5 ± 0.9	5.6 ± 0.9

② 응애류

점박이응애의 알과 성충 단계에 대한 참땃애꽃노린재(*O. minutus*)와 미끌애꽃노린재(*O. laevigatus*)의 포식력을 강낭콩 잎조각(직경 3 cm)에서 비교하였음[그림1-3], [그림1-4].



[그림1-3] 강낭콩 잎 조각을 활용한 애꽃노린재 류의 점박이 응애 섭식량 분석 실험



[그림1-4] 참땃애꽃노린재(*Orius minutus*) 성충의 점박이응애(*T. urticae*) 포식

두 노린재 모두 본 연구진의 제품으로 점박이응애에 감염된 강낭콩 포트에서 꿀과 꽃가루를 같이 공급하면서 사육하였으며[그림1-5], [그림1-6]. 우화 후 5일이 지나지 않은 애꽃노린재 성충 개체를 시험에 사용하였음.



[그림1-5] 점박이 응애와 애꽃노린재 류 사육을 위한 강낭콩 화분 실험



[그림1-6] 점박이 응애와 애꽃노린재 류 사육 및 섭식실험을 위한 강낭콩 화분 실험구

천적 먹이용으로 점박이응애 알을 공급하기 위해 50개체의 성충 점박이응애를 하루 전에 방사하여 산란된 알을 받아 사용하였으며, 천적 먹이용으로 점박이응애 성충은 50개체를 직접 세어 잎조각으로 옮겨 두었음. 점박이응애 알과 성충의 포식량은 모두 12시간과 24시간 후 2회에 걸쳐 조사

하였으며 각각 새로운 잎조각과 먹이를 준비하여 공급하였음.

선발된 천적과 기존 천적의 밀도 억제 효과 비교결과, 선발된 참멋애꽃노린재가 기존 상업화된 천적인 미끌애꽃노린재보다 점박이응애 성충에 대한 포식량이 12시간 후에는 유의한 차이가 없었으나 24시간 후에는 1.4배 많았음[표1-6].

[표1-6] 두 종의 애꽃노린재 류의 점박이 응애(*Tetranychus urticae*) 성충에 대한 포식량 비교

Treatment	Mean no. of <i>T. urticae</i> adults predated on ( $\pm$ SD)		
	12 h	24 h	Total
미끌애꽃노린재 ( <i>Orius laevigatus</i> )	30.7 $\pm$ 2.5	10.2 $\pm$ 2.1	38.4 $\pm$ 2.7
참멋애꽃노린재 ( <i>Orius minutus</i> )	36.9 $\pm$ 1.9	21.2 $\pm$ 1.7	52.4 $\pm$ 2.5
Control	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0

또한, 점박이응애 알의 경우에도 12시간 후에는 유의한 차이가 없었으나 24시간 후에는 참멋애꽃노린재의 포식량이 1.7배 많은 것으로 나타남.[표1-7]

[표1-7] 두 종의 애꽃노린재 류의 점박이 응애(*Tetranychus urticae*) 알에 대한 포식량 비교

Treatment	Mean no. of <i>T. urticae</i> eggs predated on ( $\pm$ SD)		
	12 h	24 h	Total
미끌애꽃노린재 ( <i>Orius laevigatus</i> )	64.4 $\pm$ 6.3	33.5 $\pm$ 7.3	97.9 $\pm$ 11.8
참멋애꽃노린재 ( <i>Orius minutus</i> )	73.6 $\pm$ 9.5	54.7 $\pm$ 5.0	128.3 $\pm$ 11.1
Control	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0

③ 진딧물류

기장테두리진딧물(*Rhopalosiphum padi*) 밀도별 참멋애꽃노린재의 포식량을 확인하기 위해 뚜껑에 지름 1 cm의 환기구가 있는 사육용기(5 D × 1.5 H cm)에 기장테두리진딧물을 밀도별 (5, 10, 15, 20, 25 마리) 접종하였으며, 접종 된 용기에 우화한지 7 ~ 10일 된 참멋애꽃노린재 성충 1마리를 채송화 줄기(2 ~ 3cm)와 같이 넣고, 24시간 후 포식된 진딧물 수를 조사 하였음.[그림1-7]



[그림1-7] 애꽃노린재 류의 기장테두리진딧물(*Rhopalosiphum padi*) 에 대한 포식량 검증을 위한 사육 실험

기장테두리진딧물을 먹이로 공급하여 참멋애꽃노린재의 온도별 포식량을 확인한 결과는 [표 1-8]과 같으며 30℃에서 암컷은 12.7, 수컷은 9.5로 가장 많았으며 15℃에서 암컷은 3.6, 수컷은 3.2로 온도가 높을수록 포식량은 높다는 것을 확인 할 수 있었음.

[표1-8] 온도조건에 따른 참멋애꽃노린재(*Orius minutus*)의 기장테두리진딧물(*Rhopalosiphum padi*) 섭식량 비교

sex	NO. of prey consumed			
	15℃	20℃	25℃	30℃
Female	3.6±1.5	6.2±1.4	10.3±0.8	12.7±1.3
male	3.2±0.8	4.8±0.7	7.5±0.9	9.5±1.1

참멋애꽃노린재의 포식 선호성 실험에서 먹이곤충으로 선호성이 가장 높았던 진딧물을 대상으로 밀도별 포식량을 확인하였으며, 먹이곤충의 사이즈에 상관없이 활발한 포식활동을 확인할 수 있었음.[그림1-8]



egg

1st instar

2nd instar

3rd instar



[그림1-8] 참멋애꽃노린재(*Orius minutus*)의 령기별 기장테두리진딧물(*Rhopalosiphum padi*)에 대한 포식 활동

참멋애꽃노린재의 기장테두리진딧물 성충에 대한 기능반응은 점박이응애 성충에 대한 밀도별 기능반응과 일치하는 S자형임을 확인하였음.

또한 수입종의 대체천적으로 토착천적의 가능성을 확인하기 위해 25℃에서 미끌애꽃노린재와 참멋애꽃노린재의 포식량을 확인한 결과 참멋애꽃노린재의 포식수는 미끌애꽃노린재 포식수와 비슷하거나 다소 높게 나타났음[표1-9].

이를 통해 수입종의 대체천적으로 토착천적인 참멋애꽃노린재의 농가적용을 통해 해충 방제가 가능할 것으로 생각됨.

[표1-9] 25℃ 조건에서 두 종의 애꽃노린재 류의 기장테두리진딧물(*Rhopalosiphum padi*) 섭식량 비교

species	female	male
미끌애꽃노린재 ( <i>Orius laevigatus</i> )	7.3±0.8	5.4±0.9
참멋애꽃노린재 ( <i>Orius minutus</i> )	9.5±0.9	6.0±1.2

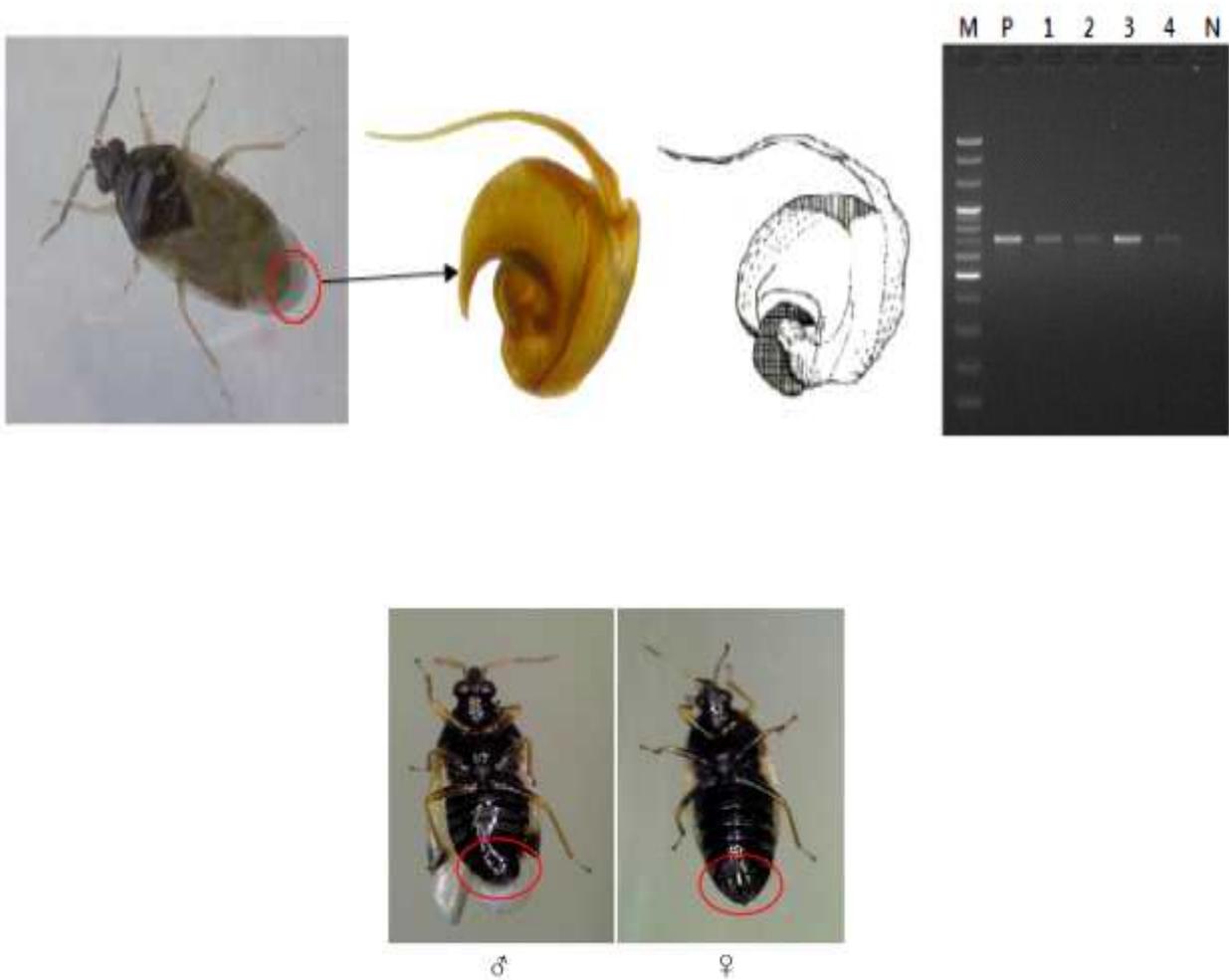
애꽃노린재류는 꽃가루나 감로 등을 먹이로도 건전한 증식이 이루어지므로 해충발생 전 예방적 차원과 더불어 고온기 해충밀도가 올라가는 시점까지 활용할 수 있으므로 천적으로서 효용가치가 클 것으로 사료됨.

## 2) 대상 공시충 확보 및 기초생태 특성 규명

### 가) 대상 공시충 확보

대상 천적은 2020년 경기도 남양주에서 파프리카 농장에 발생한 응애를 포식하는 개체를 채집한 것으로 형태학적인 방법과 분자생물학적 방법으로 동정하여 실험에 사용하였음.

선행연구로 확보된 잎응애류 적용 천적 후보종 *Orius* sp.의 정확한 종을 확인하기 위하여 수컷 생식기와 분자생물학적 방법으로 동정을 실시한 결과, *Orius minutus* (Linnaeus) 참멋애꽃노린재로 확인되었음.



[그림1-9] 참멋애꽃노린재(*Orius minutus*) 동정

대상 천적은 참멋애꽃노린재로 광포식성 해충으로 확인되었으며, 5령의 약충기를 거치고 성충으로 우화하는 특성을 확인하였음.



[그림1-10] 참멋애꽃노린재(*Orius minutus*)의 발육 단계

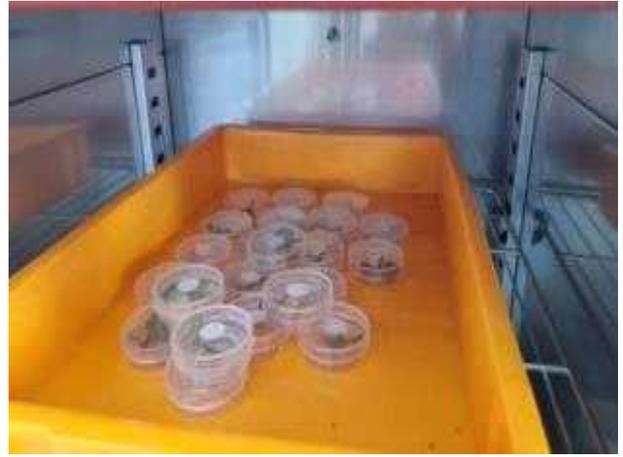
**나) 대상 공시충의 기초생태 특성 구명**

곤충의 증식에 있어 환경조건은 발육기간, 산란수 등에 직접적으로 영향을 미치므로(Alauzet et al., 1994) 대상 종에 대한 최적의 사육조건을 설정하는 것은 대량증식의 기본이라 할 수 있음.

이에 본 실험에서는 참멋애꽃노린재의 적정 사육조건을 설정하기위해 온도별 기초생태특성을 확인하였으며, 기초생태특성 확인은 각기 다른 온도로(30℃, 25℃, 20℃와 15℃) 설정된 인큐베이터에서 진행했으며, 습도는 70 ± 5%로 광주기는 16L : 8D로 설정하였음.

발육기간과 생존율은 뚜껑에 지름 1 cm의 환기구가 있는 사육용기(5 D × 1.5 H cm)에 알을 하나씩 접종해서 각 온도별 인큐베이터에 두고, 격일로 현미경하에서 조사하였음.

참멋애꽃노린재는 동족포식(cannibalism) 습성이 있으며, 특히 약충기에 먹이가 부족할 때 가장 심하게 작용함. 집단 사육 시에는 이를 방지하기 위해 메밀피를 사용하나 생태특성 실험을 위해 개별 사육을 진행하였음. 조사하면서 기장테두리진딧물과 꿀물을 먹이로 공급했으며, 건전한 증식을 위해 채송화 줄기 2 ~ 3 cm도 같이 넣어주었음[그림1-11].



[그림1-11] 참멋애꽃노린재(*Orius minutus*) 기초생태 조사를 위한 개별사육

또한, 본 실험에서는 대량증식을 위해 참멋애꽃노린재의 적정 사육조건을 설정하기 위해 온도별 기초 생태특성을 확인하였으며, 기초생태특성 확인은 각기 다른 온도로(30℃, 25℃, 20℃, 15℃) 설정된 인큐베이터에서 진행했으며, 습도는 70 ± 5%로 광주기는 16L : 8D로 설정하였음.

줄알락명나방의 알을 먹이로 공급하면서 참멋애꽃노린재의 온도별 기초생태특성을 확인한 결과, 약충은 5령까지 발육하는 것을 확인할 수 있었으며[그림1-3]. 온도가 낮아질수록 발육기간이 늘어나는 것을 확인하였으며 특히 온도가 낮을수록 약충의 발육이 지연되어 발육기간이 늘어나는 것을 확인하였음[표1-10].

[표1-10] 온도조건에 따른 참멋애꽃노린재(*Orius minutus*)의 발육 기간 조사

Developmental stage	Developmental time (days)			
	15℃	20℃	25℃	30℃
Egg	13.2±0.8	7.2±0.8	5.4±0.5	2.6±0.5
1 <sup>st</sup> instar	7.6±0.9	4.4±0.5	2.4±0.5	2.4±0.5
2 <sup>st</sup> instar	8.4±0.8	3.8±0.8	3.2±0.8	1.6±0.5
3 <sup>st</sup> instar	8.8±0.8	2.4±0.5	3.0±0.7	1.4±0.5
4 <sup>st</sup> instar	9.6±1.1	3.8±0.4	3.2±0.4	2.5±0.8
5 <sup>st</sup> instar	16.0±0.7	5.4±0.5	4.2±0.4	2.8±0.8

Ding et al.(2016)에서 25℃에서 참멋애꽃노린재의 발육 및 산란률이 우수하다고 보고된바 있는데 본 실험에서도 온도별 생존율에서는 15℃에서 16%로 가장 낮에 나타났고 25℃에서 80%로 가장 높게 나타났음[표1-11]. 이를 종합해 볼 때 25℃에서 가장 효율적으로 사육이 가능함을 확인할 수 있었음.

[표1-11] 온도조건에 따른 참멋애꽃노린재(*Orius minutus*)의 생존율 조사

Developmental stage	Survival rate (%)			
	15℃	20℃	25℃	30℃
Egg	43	83	93	63
nymph	76	92	100	94
Total egg-adult	16	66	80	33

### 3) 천적곤충 유지식물에 관한 자료 수집 및 분석

일반적으로 천적은 기주 특이성이 있어 특정 해충의 방제를 목적으로 사용되기 때문에, 대상 해충에 대한 방제 효율을 높이기 위해서 정확한 방사 타이밍, 방사량과 지속적인 모니터링이 필요함. 그러나, 실제로 천적을 이용하여 농작물을 재배하고 있는 농가들을 대상으로 천적 사용 시 발생하는 애로사항에 관한 설문조사를 한 결과, 높은 가격(48.4%)를 가장 큰 문제점으로 지적했으며, 그 밖에 품질 및 효능 불확실(23.2%), 적용기술(11.4%) 등을 문제점으로 제기하고 있음.

특히 본 연구에서는 포장에서 천적 적용시 해충밀도가 낮은 조건에서 천적의 밀도를 유지하고 품질의 효능과 효과를 유지하기 위한 천적곤충 유지식물에 대한 연구를 수행하였으며, 선발된 토착 천적인 참멋애꽃노린재의 경우 먹이 곤충이 없는 경우 식물의 화분과 꿀을 먹는 것으로 나타나 증식 및 정착을 위한 유지 식물에 관한 기본 정보 확보를 위해 기존 선행연구와 국내·외 자료 분석을 통해 선발된 광포식성 천적의 증식 및 정착에 적합한 유지식물에 관한 자료 수집 및 분석을 통해 3종의 식물에 대한 정보를 토대로 참멋애꽃노린재의 발육기간별 생존율 조사를 통해 가장 적합한 유지식물에 대한 조건을 확인하였음.[그림1-12]



채송화



메밀



메리골드

[그림1-12] 참멋애꽃노린재 유지식물 후보군

[표1-12]에서 보는 바와 같이 참멋애꽃노린재의 알부터 5령 약충까지 생존율을 비교한 결과 채송화가 가장 높은 생존율을 보였으며, 그 다음으로 메리골드와 메밀의 순으로 나타났음.

채송화의 경우 적은 수분 요구량과 꽃이 지속적으로 피는 경우로 참멋애꽃노린재의 대체 먹이원으로서의 역할을 수행할 수 있는 것으로 판단되며, 메밀의 경우 수분 요구도는 낮으나 꽃이 피는 시기가 한정적으로 대체 먹이원으로서의 가능성은 가장 낮은 것으로 확인됨.

[표1-12] 기주식물의 종류에 따른 참멋애꽃노린재의 영기별 생존율

Developmental stage	Survival rate (%)		
	채송화 ( <i>Portulaca grandiflora</i> )	메밀 ( <i>Fagopyrum esculentum</i> )	메리골드 ( <i>Tagetes erecta</i> )
Egg	83.9 ± 10.5	52.4 ± 3.3	87.0 ± 13.8
1 <sup>st</sup> instar	70.1 ± 17.7	54.1 ± 10.9	71.7 ± 19.4
2 <sup>nd</sup> instar	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	91.9 ± 9.2
3 <sup>rd</sup> instar	100.0 ± 0.0	94.4 ± 7.86	97.2 ± 4.8
4 <sup>th</sup> instar	100.0 ± 0.0	93.3 ± 9.43	100.0 ± 0.0
5 <sup>th</sup> instar	100.0 ± 0.0	83.3 ± 11.8	91.0 ± 2.2

#### 4) 동애등에를 대체먹이로 활용한 대량 생산 시스템 개발 및 방사 기법 개발

##### 가) 선발된 천적의 대량생산을 위한 대체먹이 선발

천적의 대량사육을 위해서는 우선 영양성분이 우수하고 가격이 저렴하며 안정적인 먹이공급이 우선시 되어야함.

참뿔애꽃노린재의 대체먹이를 선발하기 위하여, 뚜껑에 지름 4 cm의 환기구가 있는 사육용기(9 D × 4 H cm)에 참뿔애꽃노린재 알 10개와 돌나물 줄기(3 cm)를 넣고 2일 간격으로 꿀물을 묻힌 키친타올 1장과 먹이 0.1 g을 공급하면서 생존율을 확인하였음. 대체먹이는 줄알락명나방 알, 브라인쉬림프와 동애등에 유충을 공급하였고[그림1-13]. 실험에 사용한 개체는 처리구마다 상이했으며 35 ~ 109마리였음.



줄알락명나방 알



브라인쉬림프



동애등에 유충

[그림1-13] 참뿔애꽃노린재의 대체먹이원

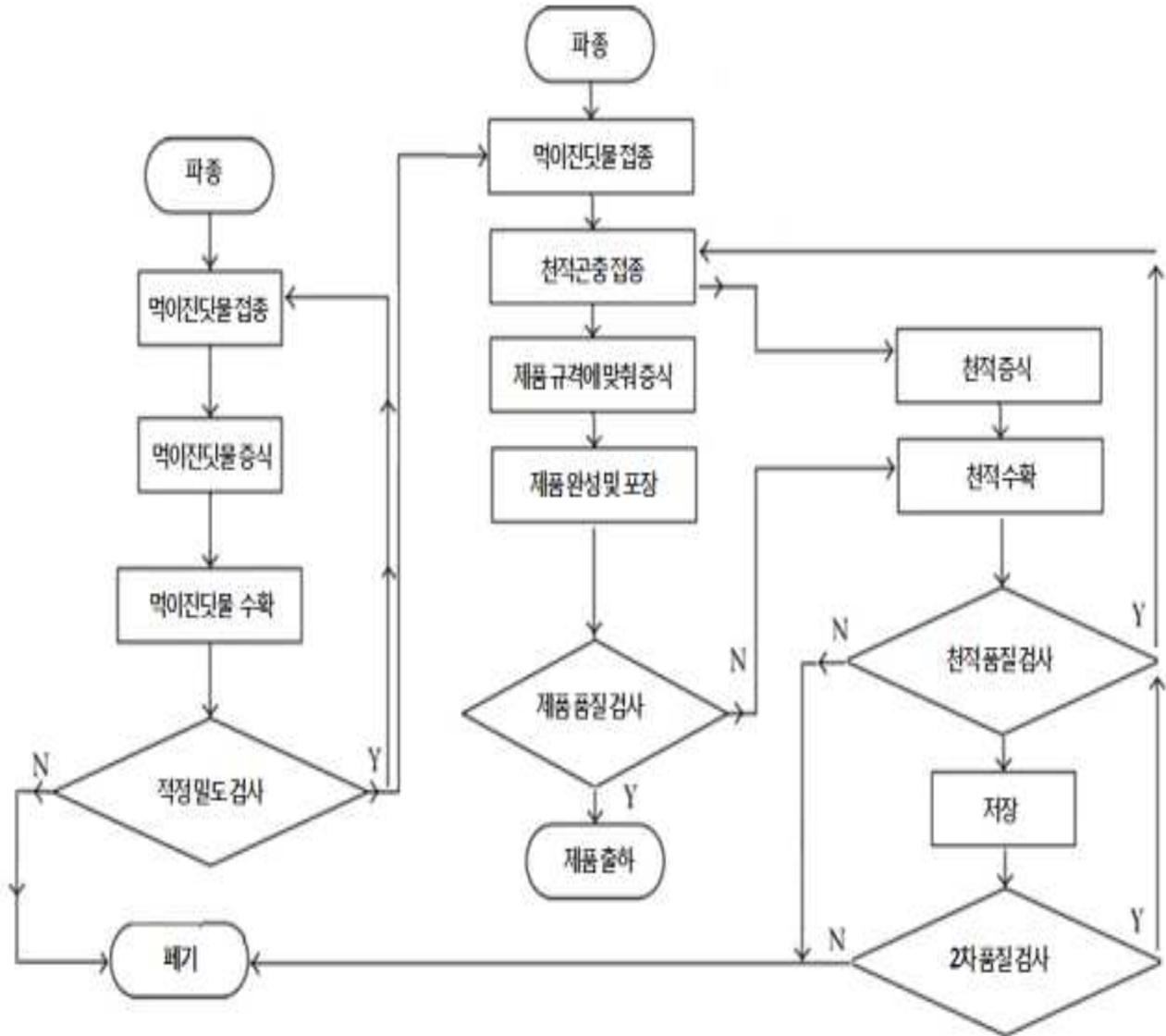
또한 최적의 먹이 조합을 선발하기 위하여 5개 처리구를 설정하였음.

설정된 먹이조합으로 5세대까지 증식시켰으며, 최초 산란 시작 후 10일 동안의 산란수를 대조구와 비교·분석하였음.

각 처리구마다 5L 원형 통에 꿀물을 묻힌 키친타올 3장과 천적 알 150개를 넣고 설정된 먹이조합을 공급하였으며, 2세대부터는 뚜껑에 지름 4 cm의 환기구가 있는 사육 용기(12 D × 8 H cm)에 2일 간격으로 먹이와 꿀물휴지 1장을 공급하면서 증식시켰음.

각 처리구의 산란수는 성충으로 증식된 직후 1쌍씩 분리하여 뚜껑에 지름 1 cm의 환기구가 있는 사육용기에(5 D × 1.5 H cm) 옮겨두고 2일 간격으로 채란식물을 교체·공급하면서 현미경하에서 확인하였음.

실험에 사용한 개체는 처리구마다 상이했으며 22 ~ 126개체였다. 모든 실험은 25 ± 1 °C, 상대습도 60 ~ 75 %, 광주기 16L : 8D로 설정되어 있는 실험실에서 진행하였음.



[그림1-14] 기존 포식성 천적류의 생산 공정

애꽃노린재류 사육 시 먹이로 주로 사용되는 명나방 알은 영양분이 많아 사육에 효과적이거나 알 수거 시 손실이 많고 구입비용이 비싸서 대량사육 시 경제적인 문제가 발생하며 자연먹이인 기장테두리진딧물은 사육을 위해 보리 파종을 하여야 하는 번거로움이 발생함.(그림 1-12)

천적곤충의 먹이특성을 고려한 대체먹이인 동애등에를 활용한 사육방법 개발을 위해 천적곤충의 연중 대량생산을 위한 단계별 시스템 구축을 위해서는 천적곤충의 사료(대체먹이-동애등에 유충 활용), 사육방식 등 경제적인 기술 개발이 필요하며, 생산유통을 위한 생산시스템 구축을 통해 천적 현장적용을 위한 씨드 곤충(진딧물류, 가루이류, 깍지벌레 등) 확보 및 증식을 통해, 기주곤충 및 천적곤충 우량종자 최소 유지 및 증식방법 개발하고 기존 포식성 천적과의 비교를 통한 방제 효과 분석을 실시하여야 함.

이에 대체할 수 있는 대체먹이 선발을 위하여 실험을 진행하였음.

[표1-13] 먹이 조건에 따른 참멋애꽃노린재(*Orius minutus*)의 성장 비교

prey	Developmental time (days)					
	1 <sup>st</sup> instar	2 <sup>st</sup> instar	3 <sup>st</sup> instar	4 <sup>st</sup> instar	5 <sup>st</sup> instar	Total
줄알락명나방 알 ( <i>Ephestia cautella</i> )	2.6±0.5	2.8±0.4	3.2±0.8	3.4±0.5	3.2±0.4	15.2±0.1
브라인쉬림프 ( <i>Granular Brine Shrimp</i> )	2.4±0.5	3.2±0.8	3.0±0.7	3.2±0.4	4.2±0.4	16.0±0.4
동애등에 유충 ( <i>H. illucens</i> )	2.8±0.4	3.6±0.5	3.6±0.5	3.4±0.5	4.0±0.7	17.4±0.3

사육용기에 참멋애꽃노린재 알 10개와 채송화 줄기를 접종하고 꿀물과 먹이를 공급하면서 2일 간격으로 성충 우화시까지 확인하였으며 대체먹이로는 동애등에 유충, 브라인쉬림프 알을 각각 공급하고 대조구로 줄알락명나방 알을 공급해 생존율 및 발육 기간을 확인하였음.

실험은 25℃ 인큐베이터에서 진행하였으며, 습도는 70 ± 5%로 광주기는 16L : 8D로 설정하였으며, 대체먹이별 생육기간은 [표1-13]과 같음.

대조구인 줄알락명나방 알을 급이 하였을 때 령기별 총 생육기간은 15.2일로 가장 짧았으며 대체먹이인 브라인쉬림프 알을 급이시 16일, 동애등에 유충을 급이시 17.4일로 확인되었음.

또한 대체먹이 급이에 따른 생존율은 대조구인 줄알락명나방 알을 급이하였을 때 83%, 실험구인 브라인쉬림프 알을 급이하였을 때 80%, 동애등에 유충을 급이하였을 때 78%로 다소 낮았지만 큰 차이는 없는 것으로 확인되었음[표1-14].

애꽃노린재(*Orius* spp) 류의 경우 먹이 종류에 따라 생육기간에 영향을 미친다고 보고된 바 있으며(Salas-Aguilar and Ehler, 1977), 본 실험을 통해 참멋애꽃노린재의 대량생산을 위한 대체먹이로서 동애등에의 가능성을 확인할 수 있었음.

[표1-14] 먹이 조건에 따른 참멋애꽃노린재(*Orius minutus*)의 생존율 비교

prey	Suvival rate (%)
줄알락명나방 알 ( <i>Ephestia cautella</i> )	83
브라인쉬림프 ( <i>Granular Brine Shrimp</i> )	80
동애등에 유충 ( <i>H. illucens</i> )	78

## 나) 천적의 대량 생산 시스템 개발

### ① 기주식물재배

기주식물로는 채송화(*Portulaca grandiflora*)를 이용하였으며, 환경 조건으로는 온도 22℃~28℃, 상대습도 60~70%, 광조건 16L:8D에서 재배를 실시하였음.

건전한 기주식물을 선별하여 6~7cm 정도 길이로 잘라 꺾꽂이 준비하였고, 포트(지름15cm)에 상토 70%를 채우고 잘라놓은 줄기를 꺾꽂이하였으며, 꺾꽂이 후 10일 정도 지나면 뿌리가 내리고 싹이 돋기 시작함.

토양 표면이 마르면 물급이를 실시하고 고온건조 조건에서 재배하였으며, 식물의 줄기가 10~15cm이상으로 증식하면 천적 사육을 위해 잘라서 사용하였음.[그림1-15]



[그림1-15] 참멋애꽃노린재의 대량 생산

### ② 먹이곤충생산

먹이곤충으로 동애등애를 사용하였으며, 환경조건 - 온도 25℃~30℃, 상대습도 60~70%, 광주기 16L:8D에서 공기순환을 시켜 사육을 실시하였음. 동애등애 유충은 수분이 적당한 유기물질을 섭식하고, 성충은 먹이섭식 활동을 하지 않음.

유기성물질을 먹이로 하기 때문에 사료에 영양 성분 중 단백질 함량이 많으면 발육도 빠르고 개체 크기도 커지므로 산란받을 종령 유충은 가축 사료나 단백질 함량이 높은 먹이를 제공하여 주는 것이 좋으며, 특히 사료제작 시에는 수분함양을 적절하게 조절하여 주는 것 중요함. [그림1-16]



[그림1-16] 동애등에 유충의 먹이 제작

동애등에의 채란을 받기위해서 유기물질이 있는 곳에 산란하는 특성을 활용하여 인공적으로 산란을 유도하기 위해서 가축사료를 물에 불려서 톱밥을 1 :1 로 혼합하여 그 위에 톱밥을 깔아주어 수분함량을 조절하여 옐로우트레이(40×30×10cm)에 넣어 산란을 받으며, 산란을 시작하면 옐로우트레이를 교체하여 계속적으로 산란할 수 있도록 관리함. 동애등에 유충은 약 15~20일간 발육하고 발육초기에는 옐은 색이었다가 번데기 전단계에는 흙갈색으로 변화함. 유충 사육용기는 여러번 사용이 가능한 플라스틱 재질의 사육상자인 옐로우트레이(40×30×10cm)를 사용하였으며, 사육밀도는 약 5000~10,000마리가 적당한 것으로 보고되고 있음.[그림1-17]



[그림1-17] 동애등에의 노숙 유충

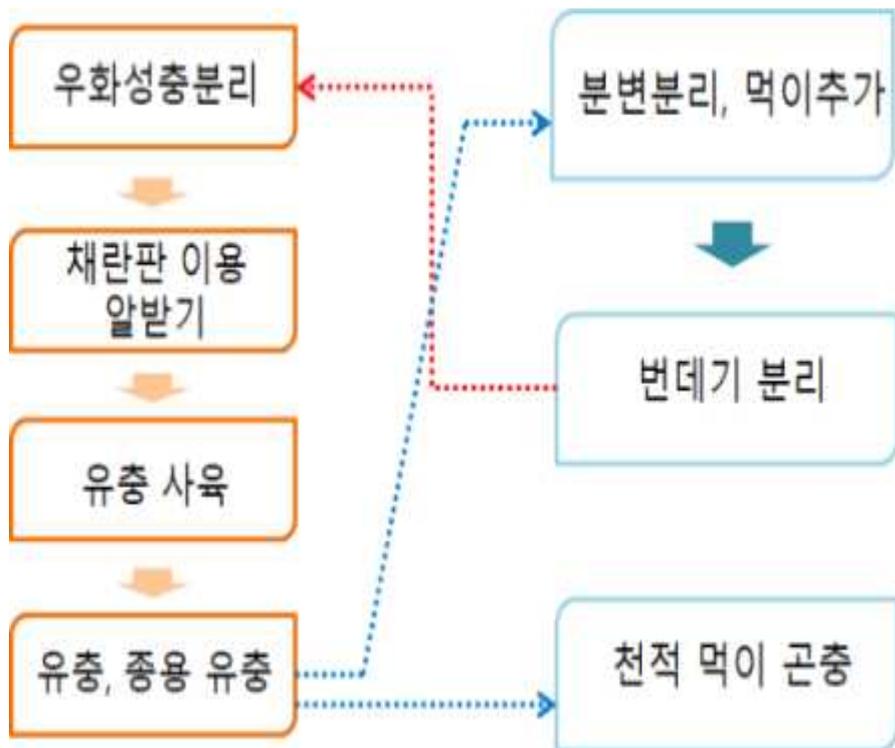
동애등에 유충은 번데기가 되기 전 단계에 이르면 먹이활동을 중단하고 사육상에서 탈출하여 건조한 곳으로 이동함. 번데기 직전 단계에 각도가 30~60° 정도 나무판 재질 사육통에 넣어 수거하고 성충은 일반적인 파리류 곤충과는 달리 먹이활동을 하지 않음.



[그림1-18] 동애등에 번데기 분리 공정

채란을 받기 위해 물을 공급하며 식물을 식재하여 휴식하거나 식물의 증산 작용에 의한 수분을 섭취하도록 하여야 하며, 성충 우화 후 5일 이내 암수가 교미하고 교미후 바로 산란함. 성충 우화 후 10~15일 사이에 1~2회에 걸쳐 집중적으로 산란함. 성충 사육장이 작거나 광량이 부족하면 교미를 하지 못하고 산란행동이 전혀 일어나지 않음.

유충 및 번데기 상태로 월동하는 습성을 이용하여 저온에서 장기 저장이 가능함. 저장의 목적은 필요한 시기 천적의 먹이로 급이하며 또한 성충으로 우화시켜 채란 받기 위함. 저온저장고(0~5°)에서 유충 및 번데기가 건조하게 되면 사망률이 높아지므로 수분을 유지 할 수 있는 톱밥을 함께 넣어 보관함.



[그림1-19] 참멋애꽃노린재 대체먹이인 동애등에 사육 공정

③ 천적곤충 생산

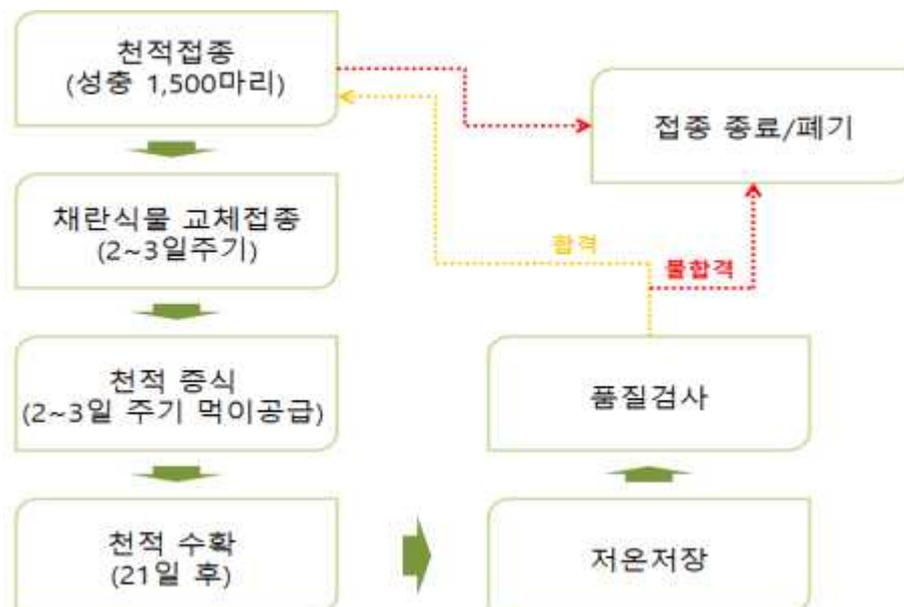
참멋애꽃노린재의 사육 환경 조건은 온도 25℃, 상대습도 60~75%, 광주기 16L:8D에서 천적 접종을 실시하였고, 측면에 환기를 위한 망(15W × 13D cm)이 부착된 10L 원형용기에 성충 1,500마리 접종하였음.[그림1-20]



[그림1-20] 기장테두리 진딧물을 활용한 참멋애꽃노린재 사육

채란식물 10줄기를 넣고 2~3일 간격으로 먹이(분쇄한 동애등에+꿀물)공급하여 사육하였으며, 3주후 참멋애꽃노린재가 성충이 되면 채망을 이용해 수확을 실시함.

참멋애꽃노린재 사육시 동종포식을 예방하기 위해 메밀피를 넣어주어 대량사육을 실시하였음.[그림 1-21]



[그림1-21] 참멋애꽃노린재 대체먹이를 활용한 대량 사육 공정

④ 동애등에 유충을 이용한 참멋애꽃노린재 인공 먹이 개발

㉓ 동애등에 유충을 이용한 인공먹이 개발

참멋애꽃노린재는 다양한 곤충의 몸에 바늘과 같은 구기를 이용하여 찌른 후 몸속에 소화액을 분비하고 곤충의 체액을 녹여 흡즙하고 소화하는 먹이 습성을 가지고 있어 곤충의 혈장을 포함한 내부 기관을 활용한 대체먹이원의 개발에 있어서 키우기 쉬어 생산단가가 낮고 상시로 공급이 가능한 동애등에 유충을 대체 먹이원으로 선택하였음.



기장테두리진딧물 급이



줄알락명나방 알 급이



동애등에 유충 대체먹이 급이

[그림1-22] 참멋애꽃노린재 먹이 종류별 섭식

참멋애꽃노린재의 대체먹이원으로 선택된 동애등에 유충은 증류수에 5분간 담가 몸속에 있는 분변과 찌꺼기를 토해내게 한 후 5회 이상 세척하여 상온에서 건조하였으며, 건조한 동애등에 유충 100마리에 증류수 200ml를 첨가하여 균질기를 이용하여 곱게 마쇄하였음.

마쇄한 용액은 여과지(filter paper NO. 2)를 이용하여 동애등에의 외피 단백질과 남아있는 찌꺼기를 제거하고 분리한 용액은 다시 원심분리기를 이용하여 8,000rpm의 속도로 3분간 상온에서 원심분리를 실시하고 상청액을 수거하여 준비하였으며, 수거된 상청액에 100ml에 10~20ml의 꿀물 또는 올리고당과 같은 다당류를 혼합하여 -18℃ 냉동실에 보관하여 먹이를 공급하기 전 상온에서 녹여 멸균수에 적셔 공급하였고, 하루가 경과한 후 굳어진 먹이는 제거하는 방식으로 참멋애꽃노린재에게 공급하였음.

참멋애꽃노린재의 대체먹이를 개발하기 위해, 뚜껑에 지름 4cm의 환기구가 있는 사육용기(9 D × 4 H cm)에 참멋애꽃노린재 알 10개와 돌나물 줄기(3cm)를 넣고 2일 간격으로 꿀물을 묻힌 키친타올 1장과 먹이 0.1g을 공급하면서 생존율을 확인하였음.

대체먹이는 동애등에 유충을 활용한 먹이를 공급하였고, 대조구로 기장테두리진딧물과 줄알락명나방 알을 공급하여 생존율을 확인하였음.

참멋애꽃노린재의 먹이원에 따른 성장비교에 따르면, 자연상태에서 주먹이원인 기장테두리진딧물을 공급하였을 때 총 발육기간은  $14.4 \pm 0.3$ 로 나타난 반면 동애등에 유충을 활용한 대체먹이를 급이하였을 때는 발육기간이  $10.0 \pm 0.2$ 로 줄어드는 것을 확인할 수 있었음.

이는 참멋애꽃노린재 1령 약충에서는 별 차이가 없었으나 2령 약충부터 섭식의 양이 늘어나면서

소화흡수력이 기존 기장테두리진딧물보다 동애등애 유충을 활용한 대체먹이원이 우수한 것으로 파악되며, 기존 대체먹이원으로 많이 알려진 줄알락명나방 알을 급이했을 때보다 성장속도가 훨씬 빠른 것을 확인할 수 있었음.

[표1-15] 먹이원에 따른 참멋애꽃노린재의 발육기간

성장단계	발육기간(일)		
	기장테두리진딧물	줄알락명나방 알	동애등애 유충
1령 약충	2.2 ± 0.3	3.9 ± 0.4	2.2 ± 0.1
2령 약충	2.3 ± 0.2	3.1 ± 0.8	1.4 ± 0.2
3령 약충	2.4 ± 0.1	2.5 ± 0.6	1.5 ± 0.2
4령 약충	2.9 ± 0.2	3.5 ± 0.8	1.9 ± 0.2
5령 약충	4.6 ± 0.5	5.9 ± 0.7	3.0 ± 0.1
약충 총 발육기간	14.4 ± 0.3	27.3 ± 2.1	10.0 ± 0.2

참멋애꽃노린재의 먹이원에 따른 약충 성장단계별 생존율을 조사한 결과 자연상태에서 주먹이 원인 기장테두리진딧물을 급이한 대조구에서는 약충의 총 생존율은 70%의 생존율을 보인 반면 동애등애 유충을 이용한 대체먹이의 경우 58.9%의 생존율을 보이는 것으로 확인되었음.

이는 1령 단계에서 대체 먹이로 공급된 동애등애 유충의 먹이의 수분함량이 높아 흡즙을 하는 동안 빠져죽는 경우가 발생하여 초기 1령 유충에서 유충의 먹이를 급이시 수분이 적은 형태의 먹이원이 바람직할 것으로 확인되었으며, 이후 령기에서는 치사율이 높지않고 꾸준한 생존율을 확인할 수 있었으나, 다만 기존 대체먹이원인 줄알락명나방 알의 경우 초기 1령 약충에서 치사율이 높게 나타났는데 이는 참멋애꽃노린재 약충의 성장에 필요한 영양소가 부족한 원인으로 판단됨.

[표1-16] 먹이원에 따른 참멋애꽃노린재의 생존율

성장단계	생존율(%)		
	기장테두리진딧물	줄알락명나방 알	동애등애 유충
1령 약충	70.1 ± 17.7	54.5 ± 21.4	71.7 ± 19.4
2령 약충	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	91.9 ± 9.2
3령 약충	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	97.2 ± 4.8
4령 약충	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
5령 약충	100.0 ± 0.0	94.4 ± 7.9	91.0 ± 2.2
약충 총 생존율	70.1 ± 17.7	51.5 ± 4.3	58.9 ± 20.5

이에 동애등에 유충을 활용한 대체먹이원의 경우 발육기간 및 생존율에 있어서 기존 대체먹이원인 줄알락명나방 알과 비교했을 때 매우 높은 수준으로 확인되었으며, 기존 자연 상태에서 주 먹이원인 기장테두리진딧물과 비교했을 때에도 발육기간 및 생존율에 있어서 큰 차이가 나지 않는 것을 확인하여 기존 대체먹이원인 줄알락명나방 알을 대체하는 대체먹이원으로 동애등에 유충을 활용하는 기술이 효과적인 것을 확인할 수 있었음.

④ 동애등에 유충 대체먹이를 활용한 참멋애꽃노린재 대량사육

참멋애꽃노린재의 먹이 조건에 따른 산란수를 확인하기 위해 각 처리구의 산란수는 성충으로 증식된 직후 3쌍씩 분리하여 뚜껑에 지름 1 cm의 환기구가 있는 사육용기에(5 D × 1.5 H cm) 옮겨두고 5일 간격으로 채란식물을 교체·공급하면서 현미경하에서 확인하였음.

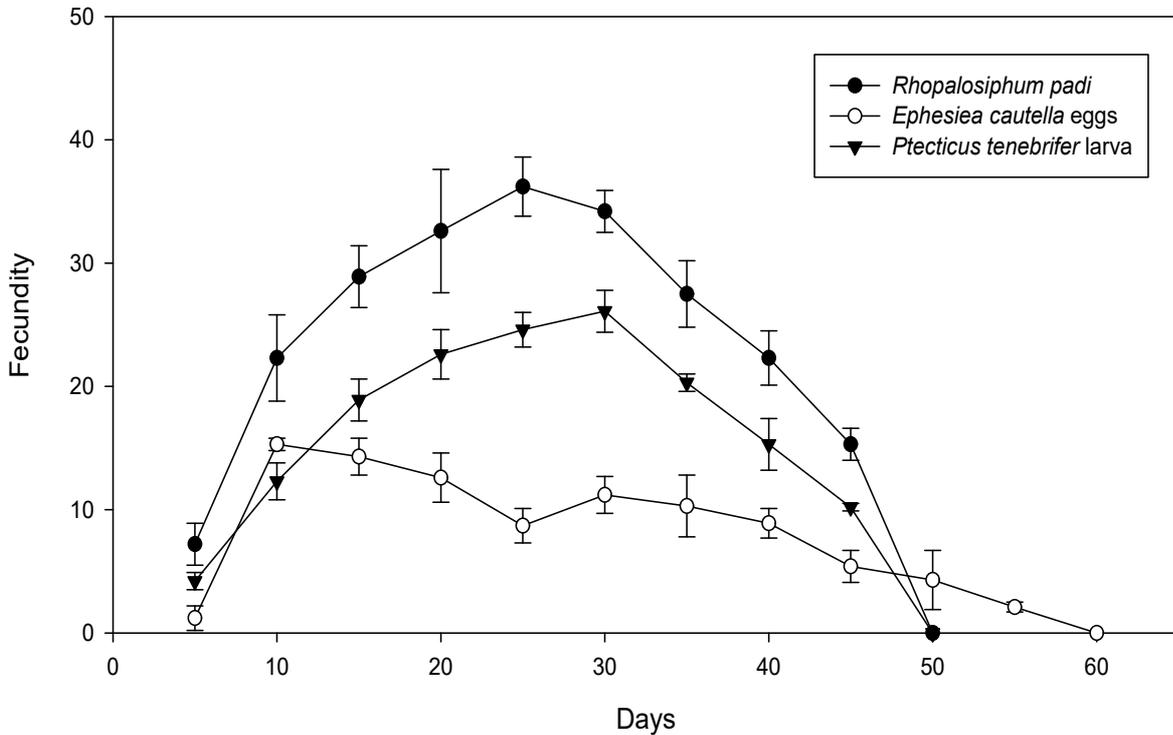
모든 실험은 25 ± 1 °C, 상대습도 60 ~ 75 %, 광주기 16L : 8D로 설정되어 있는 실험실에서 진행하였으며 먹이의 공급은 매일 새로운 먹이로 교체해 주었으며, 각 실험구는 3반복을 하여 평균과 편차를 조사하였음.



[그림1-23] 참멋애꽃노린재의 산란 유도를 위한 개체 사육

먹이조건에 따른 참멋애꽃노린재의 산란수를 비교한 결과 자연상태에서 주먹이원인 기장테두리진딧물을 급이한 대조구에서는 총 226개의 알을 산란하였으며, 암컷 한 마리 당 평균 75.3개의 알을 산란한 것으로 나타났음. 그러나, 기존 대체먹이인 줄알락명나방의 경우 총 94개의 알을 산란하였으며, 암컷 한 마리당 평균 31.4개의 알을 산란한 것으로 나타나 자연상태 먹이인 기장테두리진딧물과 비교해서 41.6%의 산란효율을 나타내는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 산란에 필요한 영양소의 부족 등이 원인으로 판단됨.

그러나, 이번 동애등에 유충을 활용한 대체먹이의 경우 총 155개의 알을 산란하였으며, 암컷 한 마리당 평균 51.5개의 알을 산란한 것으로 나타나 기장테두리진딧물 먹이 대비 68.4%의 산란효율을 나타내는 것을 확인할 수 있었으며, 동애등에 유충 대체먹이의 응고에 따른 치사율 등을 감안할 때 대체먹이로서 기존 천연먹이를 대체할 수 있는 가능성이 높은 것으로 확인되었음.



[그림1-24] 먹이원에 따른 참멋애꽃노린재의 산란수

㉔ 대체먹이원을 활용한 참멋애꽃노린재의 대량 사육 경제성 분석

본 연구로 개발된 참멋애꽃노린재 대체먹이인 동애등에 유충을 활용한 증식시스템의 생산 원가를 비교하여 경제성 분석을 진행하였음.

기존 기장테두리진딧물을 먹이로 활용한 참멋애꽃노린재 증식시스템의 경우 기장테두리진딧물 증식을 위한 기주식물(보리)의 증식과 참멋애꽃노린재 증식과 산란을 위한 망케이지 등을 포함하여 2만마리 사육시 총비용이 2,270,000원으로 참멋애꽃노린재 한 마리 당 사육비용은 113원으로 나왔으며, 대체먹이로 줄알락명나방 알을 이용한 사육의 경우 줄알락명나방 알의 경우 알 1g 당 5,600원으로 2만마리 사육시 300g의 알이 필요하고 총비용은 1,912,000원으로 참멋애꽃노린재 한 마리당 사육비용은 95원으로 기존 기장테두리진딧물을 활용한 사육비용 대비 16%의 원가 절감효과가 있었음.

이번 연구에서 활용된 동애등에 유충을 활용한 대체먹이의 경우 동애등에 유충 1Kg당 2,500원으로 참멋애꽃노린재 2만마리 사육기준 10Kg의 동애등에 유충이 소요되며 총 비용은 287,000원으로 참멋애꽃노린재 한 마리당 14원의 비용이 소요되는 것으로 조사되었으며, 이는 기장테두리진딧물을 활용한 사육비용 대비 88%의 원가 절감 효과가 있었으며, 줄알락명나방 알을 활용한 사육비용 대비 85%의 원가 절감 비용 효과를 확인할 수 있었다.

[표1-17] 먹이원에 따른 참뿔애꽃노린재 사육비용 비교

참뿔애꽃노린재 20,000마리 사육 비용		
기장테두리진딧물 먹이 급이 사육	줄알락명나방 알 먹이 급이 사육	동애등에 유충 대체먹이 급이 사육
- 기주식물(보리) 100포트 x 4,000원 = 400,000원	- 증식상자(49 × 38 × 8 cm) 10개 x 7,200원 = 72,000원	- 증식상자(49 × 38 × 8 cm) 10개 x 7,200원 = 72,000원
- 상토 50L 10개 x 9,800원 = 98,000원	- 망케이지(50 × 47 × 37 cm) 10개 x 16,000원 = 160,000원	- 망케이지(50 × 47 × 37 cm) 10개 x 16,000원 = 160,000원
- 증식상자(49 × 38 × 8 cm) 10개 x 7,200원 = 72,000원	- 줄알락명나방 알 300g x 5,600원 = 1,680,000원	- 동애등에 유충 10Kg x 2,500원 = 25,000원
- 망케이지(50 × 47 × 37 cm) 10개 x 16,000원 = 160,000원		- 꿀 1Kg x 30,000원 = 30,000원
- 기장테두리진딧물 2,000마리 x 50원 = 100,000원		
<b>&lt;총비용&gt; 2,270,000원</b>	<b>&lt;총비용&gt; 1,912,000원</b>	<b>&lt;총비용&gt; 287,000원</b>
2,070,000원/20,000마리=113원/마리	1,912,000원/20,000마리=95원/마리	287,000원/20,000마리=14원/마리

다) 천적 방사 기법 개발

토착 천적인 참뿔애꽃노린재의 효과적인 해충 억제를 위한 조건으로 적합한 천적의 포장 내 방사를 위한 방사기법 개발이 필요함. 천적을 직접 방사하는 방법, 팩을 이용한 방사방법, 기계를 활용한 방사 방법 등 다양한 천적의 방사 방법이 알려져 있으나[그림1-25], 각 천적의 특성과 포장의 조건에 따라 활용성 있는 방사의 방법에 대한 연구가 필요함.



천적 직접 방사



팩을 활용한 간접방사



다양한 기계를 활용한 직접방사

[그림1-25] 천적류의 다양한 방사기법

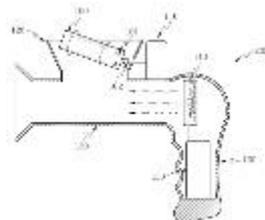
기존 선행연구와 국내·외 자료 분석을 통한 대상 천적에 최적화된 방사기법 개발을 수행하였음.

※ 천적곤충과 보조식물의 효율적인 유통방법 및 현장적용 기술 선행 연구

- (2013) 해충방제효과 극대화를 위한 천적 방사기의 특허 등록(10-1220408)
- (2014) 총채벌레류 해충방제를 위한 트랩식물에 대한 특허 등록(10-1469056)
- (2016) 잎응애류 방제를 위한 천적유지식물에 대한 특허 출원(10-0127199)
- (2017) 포식성 곤충 운송용 멀칭필름에 대한 특허 등록(10-1740128)



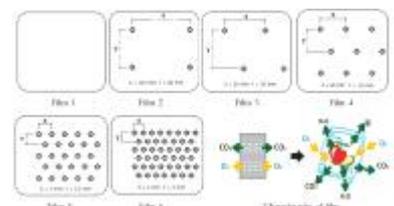
총채벌레 트랩식물



천적방사기 단면도



잎응애류 천적의 서식처



포식성 곤충 운송용 멀칭필름

[그림1-26] 천적과 보조식물의 현장적용 및 유통 방법 선행 연구

본 연구에서 경남 의령군 대의면과 용덕면에 있는 삼채류 농장의 해충방제 효과를 검증하기 위해 기주식물로 활용 가능한 채송화를 이용한 방사 기법과 천적을 직접 포장에 방사하는 방법에 대한 연구를 수행하였음.[그림1-27]



참땃애꽃노린재 직접 방사



채송화를 이용한 참땃애꽃노린재 간접 방사

[그림1-27] 참땃애꽃노린재의 직접방사와 채송화를 이용한 방사 기법

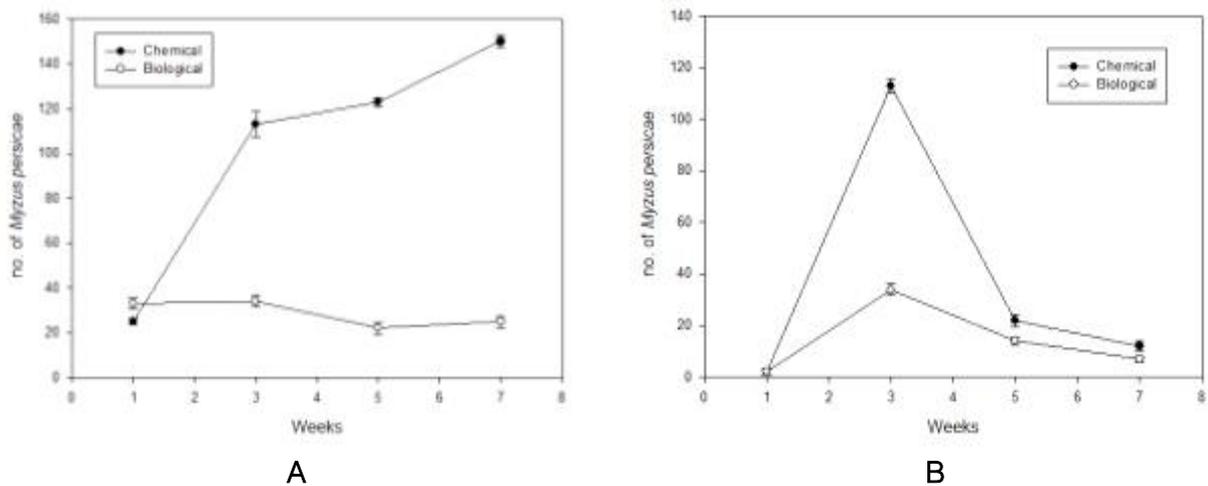
삼채 재배농가에서 참땃애꽃노린재 방사 조건에 따른 복숭아혹진딧물(*Myzus persicae*) 밀도 변화를 조사하였음.

각각의 포장에서 복숭아혹진딧물의 밀도를 2주 간격으로 조사하였고, 복숭아혹진딧물 밀도가 높아지는 시점에 참땃애꽃노린재를 투입하여 해충 밀도를 조절하였고, 관행재배구는 기존의 약제를 처리하는 방식으로 진행하였음.(그림 1-22)



[그림1-28] 복숭아혹진딧물 밀도 조사

각 실험구와 대조구는 총 6개의 지점을 선정하여 3엽당 해충의 밀도를 육안으로 조사하였고, 각각의 데이터는 평균과 편차를 이용하여 조사하였음. 실험 결과 그림 1-22에서 보는 바와 같이 직접 방사 조건과 기주식물을 이용한 간접 방사조건을 비교하면, 기주식물을 활용한 조건에서 복숭아혹진딧물의 밀도가 매우 안정적인 수준을 유지하고 있는 것을 확인할 수 있었으며 천적을 직접 방사하는 조건에서는 천적인 참멋애꽃노린재가 먹이원이 부족함에 따라 포장 밖으로 탈출하거나 죽는 경우 등이 발생하는 것으로 판단되며, 채송화를 활용한 간접 방사의 경우 먹이원이 부족하여도 채송화의 꽃에 있는 화분이나 꿀물을 먹으면서 천적의 밀도가 유지되는 것을 확인할 수 있었음.



[그림1-29] 참멋애꽃노린재의 직접방사와 채송화를 이용한 방사 기법에 따른 해충밀도 변화 (A: 애꽃노린재 직접 방사, B: 채송화를 이용한 간접 방사)

또한, 전체적으로 천적을 활용한 실험구 조건이 복숭아혹진딧물 밀도를 안정적으로 유지하는 것을 확인할 수 있었으며, 화학적 방제의 경우 밀도의 급등이나 약제의 처리 조건에 따라 해충의 밀도가 제어되지 않는 현상을 관찰할 수 있었음. 특히, 복숭아혹진딧물의 경우 약제에 대한 내성이 생겨 기존의 관행적인 방제의 방법이 효과적이지 못하여 천적을 활용한 방제의 방법은 특히 난방제 해충에 대한 방제 방법으로 대안이 될 것으로 판단됨.

## 5) 신규 천적방사기법 개발을 통한 엽채류 주요 해충에 대한 방제효과 검증

### 가) 친환경 방제기법 조성을 위한 천적방사기법의 효과 검증

#### ① 꽃노랑총채벌레 방제 효과 검증

천적 단독적용과 천적의 알이 산란된 식물의 혼합 적용 시 꽃노랑총채벌레 밀도억제 정도를 확인하고자 2022년 9월 3일부터 10월 28일까지 경상남도 의령군에 위치한 시설하우스에서 다음의 시험을 수행하였음.

천적 단독 처리는 해충발생초기에 미끌애꽃노린재 제품 1병(성충 500마리)을 660㎡에 방사한다는 (주)오상킨섹트 천적 방사지침에 따라 설계하였으며, 처리구의 면적은 33㎡로 미끌애꽃노린재는 25마리를 적용하였음.

방사한 천적의 분산능력을 확인하기 위하여 한곳에 집중 방사한 후 7일 간격으로 천적과 해충의 유충 및 성충 밀도를 조사하였음.

밀도 조사는 천적방사지점에서 1, 5, 10 및 15m의 파프리카(약 3줄기)를 지정하여 타락법으로 조사하였으며, Kim et al.(2003)에 의하면 꽃노랑총채벌레 유충과 성충의 밀도가 송이 당 5마리 이하 일 때 적용 약제를 1회 살포하면 쉽게 방제가 가능하다고 보고한 바 있어, 본 시험을 진행한 포장의 천적 방사 전 꽃노랑총채벌레의 밀도는 주당 5마리로 확인되어 천적은 1회만 방사하였음.

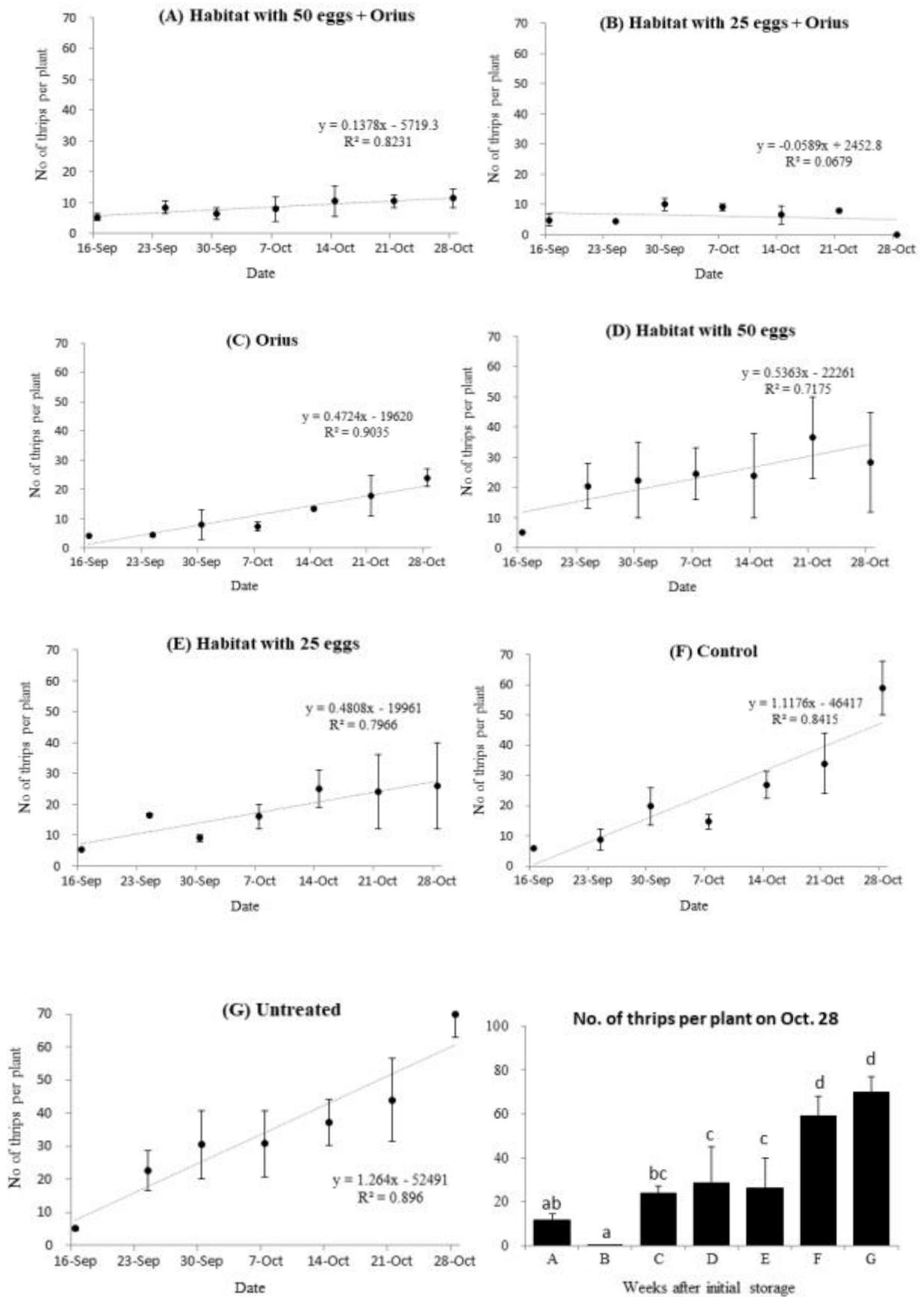
천적 서식처 단독처리는 천적의 방사기준에 준해서 서식처에 적용할 천적의 밀도를 결정하였으며, 또한 적용 즉시 해충의 밀도를 억제할 수 없는 알의 상태로 방사가 되기 때문에 기준량인 25개와 배량인 50개의 알이 산란된 식물을 각각 현장에 적용하였음.

서식처에 적용된 천적의 알은 적용직후부터 부화가 시작하도록 채란일정을 조율했으며, 조사방법은 천적 단독 처리와 동일하게 실시하였음.

연구 결과 천적 성충 단독처리와 천적의 알이 25개 산란된 식물과의 혼합 처리구에서 해충 방제 효과를 확인한 결과, 무처리구에서 해충밀도는 주당 5마리를 시작으로 7주 후에는 70마리까지 증가하였으며, 천적의 알이 산란된 혼합 적용구보다 해충밀도가 700배 이상 높은 것을 확인할 수 있었음[그림1-34].

또한 천적 알이 산란된 식물을 적용한 처리구에서는 91.8%의 높은 꽃노랑총채벌레 밀도억제 효과를 보였으며 천적 단독 처리구에 비해 1.4배의 해충 방제효과를 확인할 수 있었음( $df = 6, F = 30.45, P < 0.0001$ ).

이를 토대로 야외에서 눈, 비, 직사광선 등에 직접적으로 접해도 쉽게 분해가 되지 않는 재질(벚짚, 왕겨)로 만들어진 외형에 천적 알이 산란된 식물을 식재함으로써 애꽃노린재가 부화하여 유충상태에서 작물에 정착할 수 있도록 방사키트를 제작하였음.



[그림1-34] 참땀애꽃노린재 처리방법에 따른 꽃노랑총채벌레 밀도변화

② 진딧물의 방제 효과 검증

참멋애꽃노린재의 포식 선호성 실험에서 먹이곤충으로 선호성이 가장 높았던 진딧물을 대상으로 밀도별 포식량 및 산란수를 확인하였음.

먹이곤충의 사이즈에 상관없이 활발한 포식활동을 확인할 수 있었으며, 참멋애꽃노린재의 기장테두리진딧물 성충에 대한 기능반응은 점박이응애 성충에 대한 밀도별 기능반응과 일치하는 S자형임을 확인하였음[그림1-35].

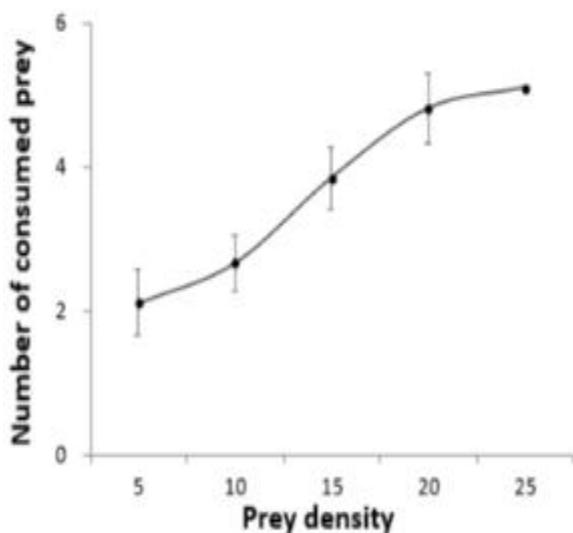
참멋애꽃노린재 성충의 밀도별 포식 증가율은 낮은 밀도인 5마리부터 25마리까지 각 28.6%, 44.4%, 23.1%와 6.3%를 보였음( $df = 4,10; F = 10.47; P < 0.0013$ )[그림1-36].

밀도별 산란수는 처리구 간에 큰 차이 없이 일일 평균 4 ~ 5개로 확인되었음[그림1-37].

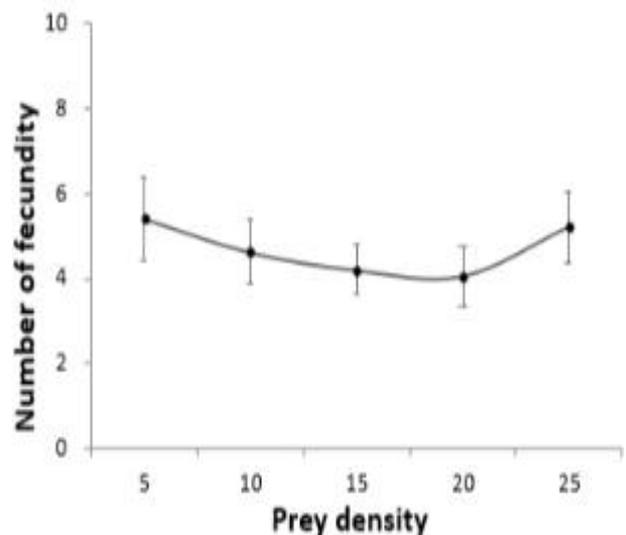
애꽃노린재류는 꽃가루나 감로 등을 먹이로도 건전한 증식이 이루어지므로 해충발생 전 예방적 차원과 더불어 고온기 해충밀도가 올라가는 시점까지 활용할 수 있으므로 천적으로서 효용가치가 클 것으로 사료됨.



[그림1-35] 참멋애꽃노린재의 기장테두리진딧물 성충, 약충 포식

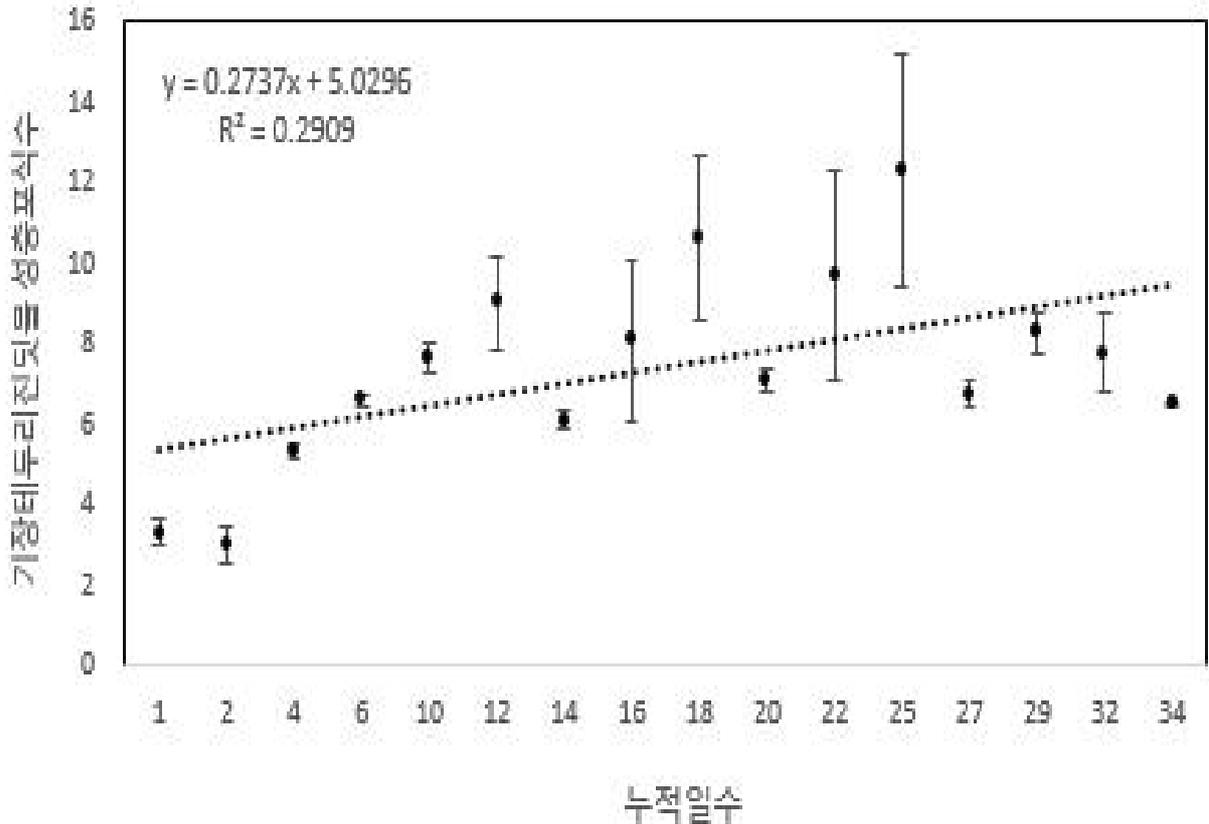


[그림1-36] 먹이 밀도별 참멋애꽃노린재의 섭식능력



[그림1-37] 먹이 밀도별 참멋애꽃노린재의 산란수

기장테두리진딧물 성충에 대한 참멋애꽃노린재 성충의 누적일수별 포식수는 조금씩 늘어나는 양상을 보이므로[그림1-38] 재배 포장 내에 적용해서 초기에 효과적으로 정착만 시킨다면 지속적인 해충 밀도 관리가 가능할 것으로 사료됨.



[그림1-38] 기장테두리진딧물 성충에 대한 참멋애꽃노린재 성충의 누적일수별 포식수

참멋애꽃노린재의 기초생태 특성 및 포식량에 대한 연구는 전무한 실정이나 Samevesht et al. (2018)은 참멋애꽃노린재와 같은 속인 *Anthocoris minki* (Hemiptera: Anthocoridae) 성충의 일일 포식량을 *Agonoscena pistaciae* (Hemiptera: Psyllidae)을 대상으로 확인 한 바 있음.

*A. minki*의 포식량 확인 결과, 온도가 높아질수록 포식량은 늘어나며, 26℃에서 *A. minki* 암컷성충은 39.09마리, 수컷성충은 23.99마리의 *A. pistaciae*를 포식할 수 있다고 보고하였음.

개체 사이즈가 2 mm 이하인 나무이류를 대상으로 한 결과여서 본 실험과 직접적인 비교는 어렵지만, 진딧물류 뿐만 아니라 나무이 등의 미소해충을 방제하기 위한 천적으로서의 활용도 가능할 것으로 사료되며 뿐만 아니라 외국에서 유입되어 최근 문제가 되고 있는 미국선녀벌레, 갈색날개매미충 등의 방제를 위한 인자로 활용할 수 있는지 추가 연구도 진행할 계획임.

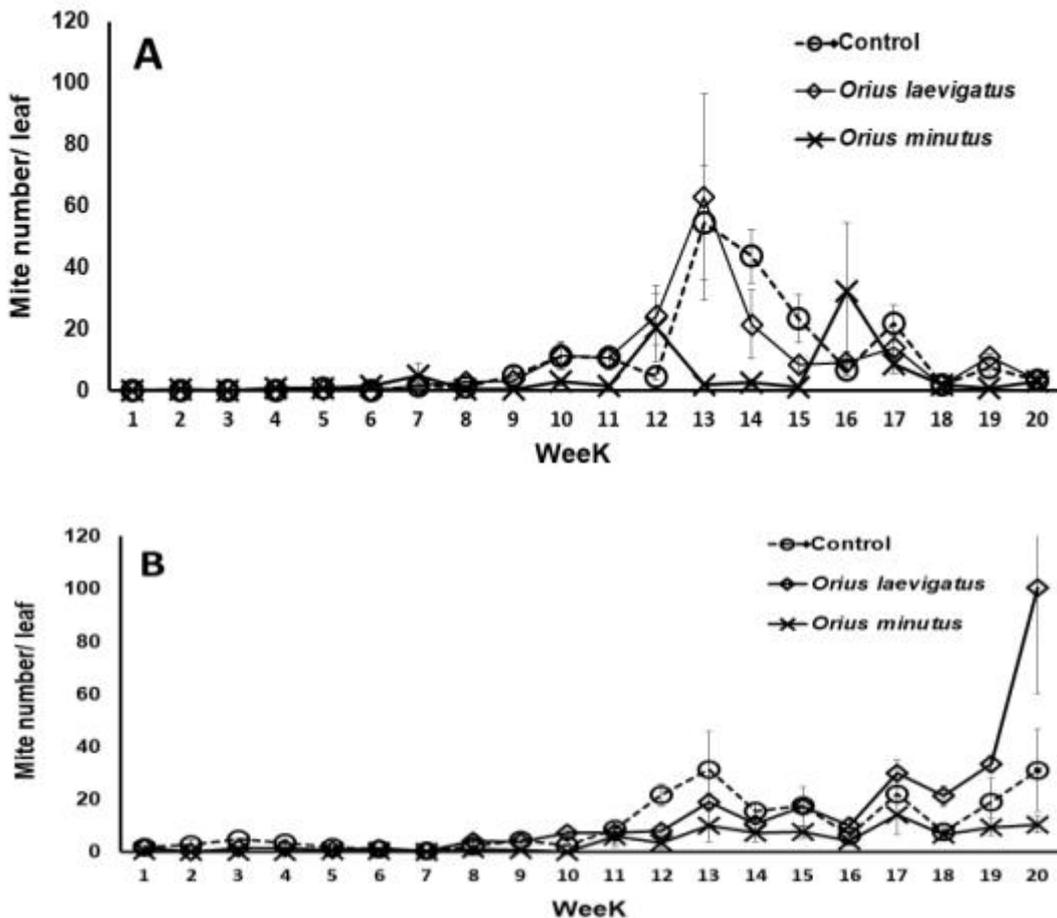
### ③ 점박이응애의 방제 효과 검정

경남 의령군의 삼채재배 농가 2곳과 케일재배 농가 1곳, 시금치 재배농가 2곳의 점박이응애는 5월 초순부터 앞에서 관찰되기 시작하나, 초기 밀도는 매우 낮은 것으로 나타났으며 모든 지역에서 8월 초를 전후하여 점박이응애의 밀도 크게 증가하는 것으로 나타났음.

하지만, 참뿔애꽃노린재 방사키트 설치 후 8월경 점박이응애 밀도가 높아 천적을 이용한 방제 효과를 확인하기 어려웠으나, 기록을 위해 연속적인 조사를 진행하였음.

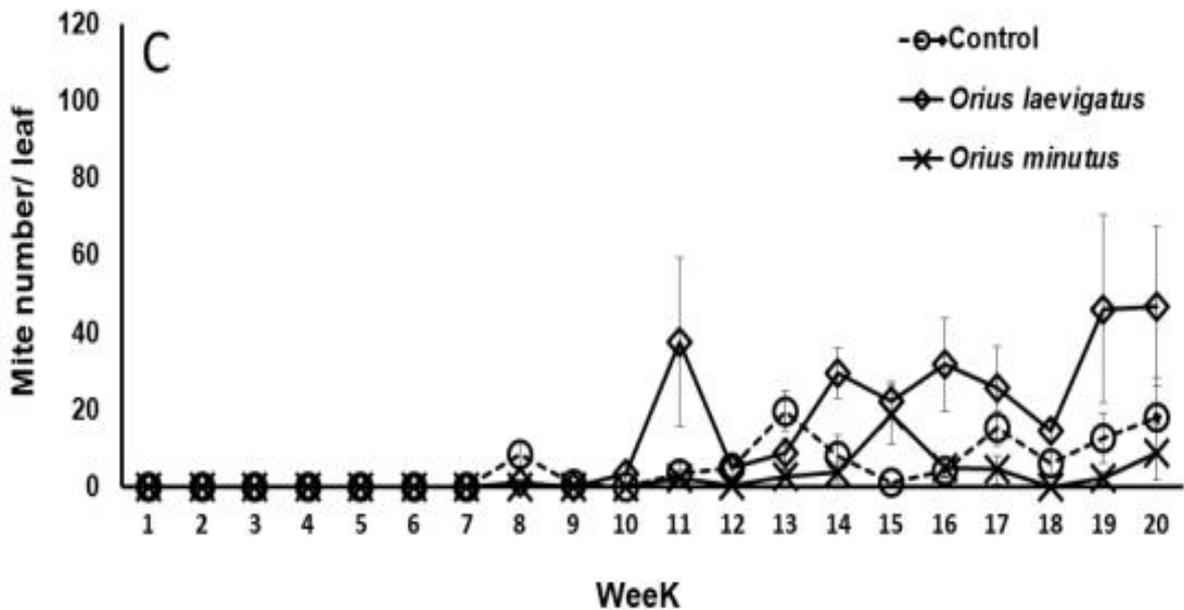
그 결과 관행방제 구간과 비교하여 해충의 밀도 증가 경향은 같았으나, 전체 해충 밀도 조사에서는 현저히 줄어든 수치를 보였음.

A·B지역은 삼채재배 농가로 조사 초기 해충 발생은 있었으나 천적에 의한 밀도억제로 효과로 보기에 무처리 해충밀도와 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 장마 기간이 지난 8월 초(조사 12주차)부터 기온이 상승하면서 전체적으로 점박이응애의 밀도가 대폭 증가하였으며, 참뿔애꽃노린재 방사지역의 경우 점박이응애의 밀도가 일시적으로 소폭 상승하는 경우가 있으나 전체적으로 밀도가 낮게 유지되는 것을 확인할 수 있었음. 반면에 미끌애꽃노린재 방사지역은 대조구와 유사하게 밀도가 증가하거나 대조구 보다 밀도가 더 높아지는 경우가 있는 것으로 나타났음[그림 1-39].



[그림1-39] 애꽃노린재류의 방사에 따른 점박이응애 밀도 변화(삼채 재배 농가)

C지역은 경남 의령군 케일재배 농가로 8월 이후 해충밀도가 증가하면서 10월 말에 가장 많은 개체가 조사되었음. 이 지역의 미끌애꽃노린재 방사지역은 대조구보다 밀도가 매우 높게 유지되는 것으로 나타났으며, 참멋애꽃노린재 방사지역 9월 중순경에 대조구보다 밀도가 높게 조사되기도 하였으나, 대조구에 비해 전체적으로 낮은 밀도가 유지되고 있는 것으로 나타났음[그림 1-40].



[그림1-40] 애꽃노린재류의 방사에 따른 점박이응애 밀도 변화(케일 재배 농가)

D와 E지역은 시금치 재배 농가로 기존 관행재배 농가로 천적곤충과 교차 적용이 가능한 약제를 교차 살포한 영향으로 판단되어 해충의 개체수가 타지역에 비해 적은 것으로 나타났음[그림 1-41]. 그러나, 살충제 살포이후에도 해충 밀도가 낮기는 하지만 밀도가 유지되고 있었으며, 특히 E지역의 경우 참멋애꽃노린재, 미끌애꽃노린재 처리구의 경우 밀도가 지속적으로 변동되고 있었으며, 일부 밀도도 상당히 높아서 살충제와의 교차 적용의 효과가 완벽하지 않는 것으로 판단되었음.

위 결과를 종합하여 볼 때 미끌애꽃노린재는 점박이응애의 밀도조절에 적합하지 않는 것으로 나타났으나, 참멋애꽃노린재는 점박이응애의 밀도가 전체적으로 낮은 것으로 나타나 밀도조절 효과가 있는 것으로 나타났음. 그러므로 향후 여러 가지 현장조건에서 참멋애꽃노린재에 대한 추가적인 검증이 이루어진다면 현장적용을 검토할 가치가 큰 것으로 판단됨.

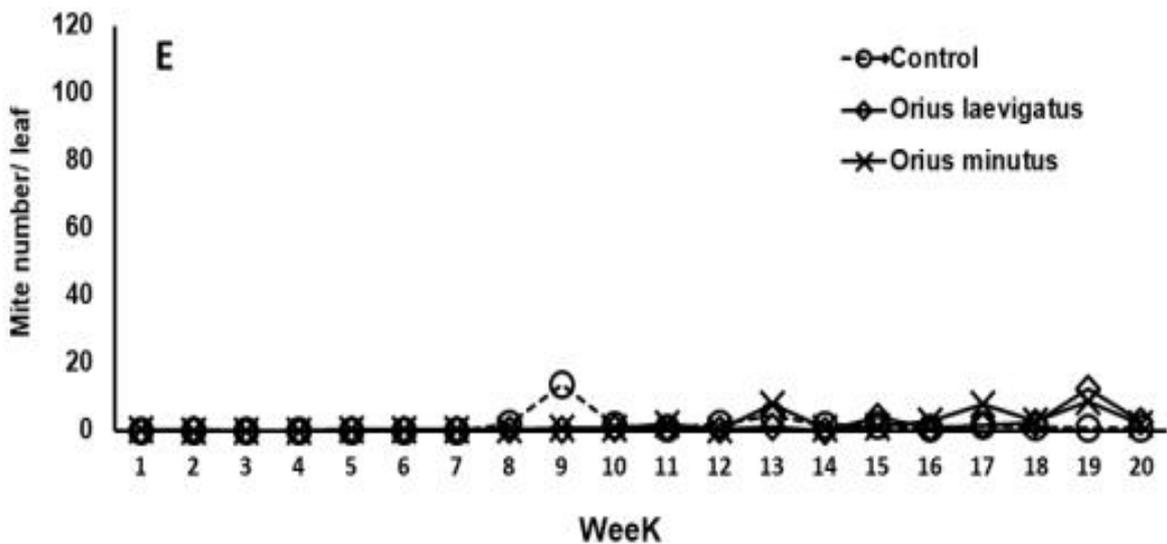
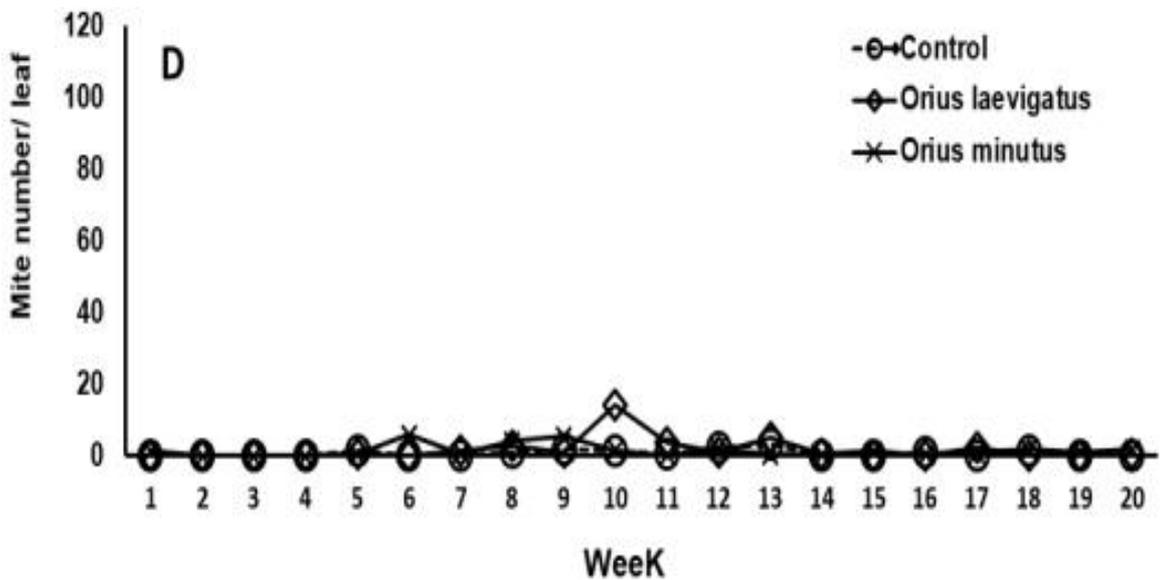
응애류의 밀도는 기온과 강우 등 외부환경요인에 영향을 많이 받는 해충으로 2022년 잦은 강우와 함께 이상기온이 동반된 날씨에 의해 천적과 해충의 생육과 번식의 많은 영향을 받아 금년 적용실험에서 점박이응애의 조사 초기에 해충 밀도가 없거나 적은 개체수가 확인되었음.

또한 방사키트를 설치한 대상지 뿐만 아니라 대조구에서도 초기 밀도는 매우 낮은 것으로 나타났으며 이는 시설재배지에서 발생하는 점박이응애의 경우 6월경부터 밀도가 증가하는 것으로 보

고하였으며(Park et al. 1990),

이는 조사지의 기온, 강수량 등의 금년도 외부환경이 점박이응애의 발생에 적합하지 않기 때문인 것으로 판단되며, 8월 초를 전후하여 점박이응애의 밀도가 크게 증가하는 것으로 나타났음. 이는, 장마가 끝나고 평균기온이 떨어지기 시작하는 시점이 응애류 발생에 유리한 환경이 조성되어 점박이응애의 밀도가 증가한 것으로 분석되었음.

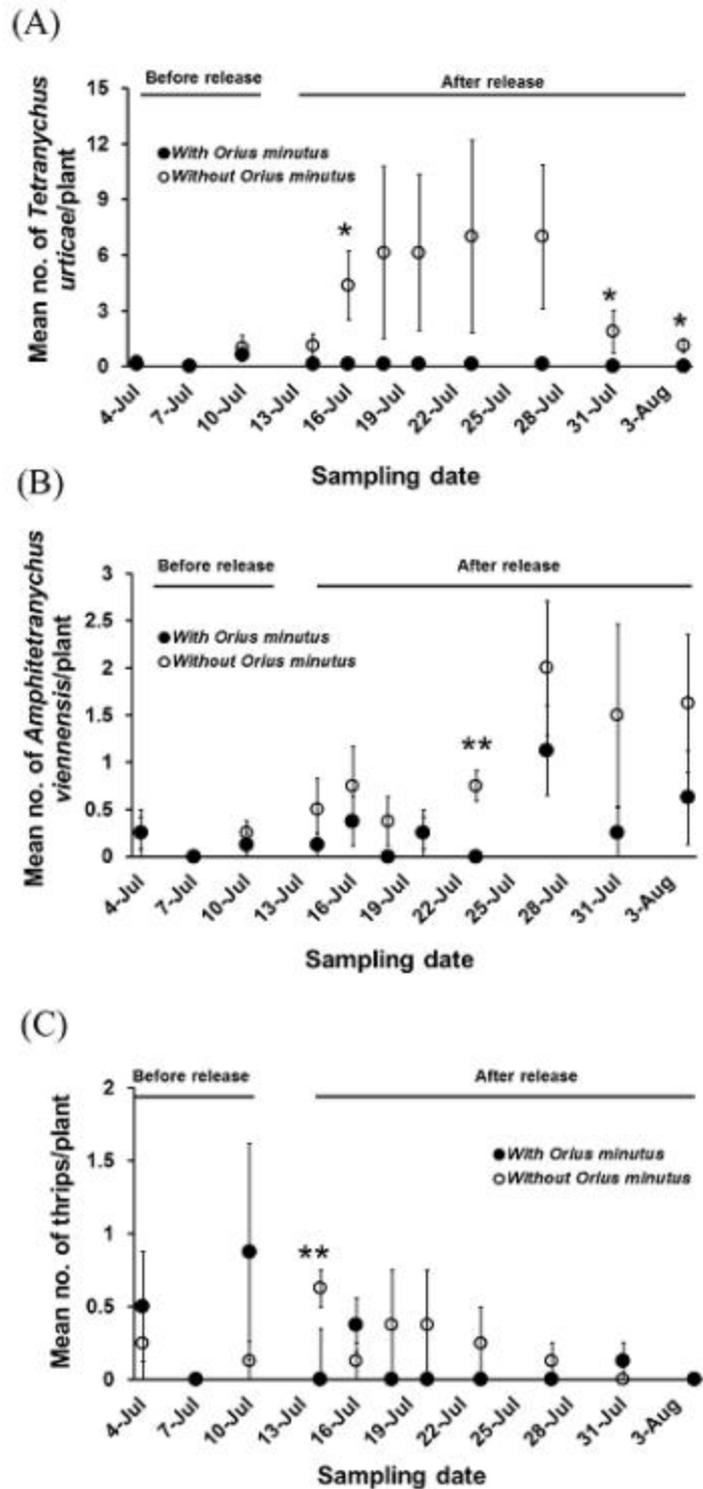
금년도 현장적용 시험의 경우에는 8월 중순경 대조구에서 밀도가 증가하는 이후의 조사결과가 유효할 것으로 판단되었으며, A,B(삼채 재배 농가),C(케일 재배 농가)지역의 경우 참멋애꽃노린재가 대조구에 비하여 상대적으로 낮은 밀도를 유지하고 있어 현장적용 가능성이 충분한 것으로 판단되었음.



[그림1-42] 애꽃노린재류의 방사에 따른 점박이응애 밀도 변화(시금치 재배 농가)

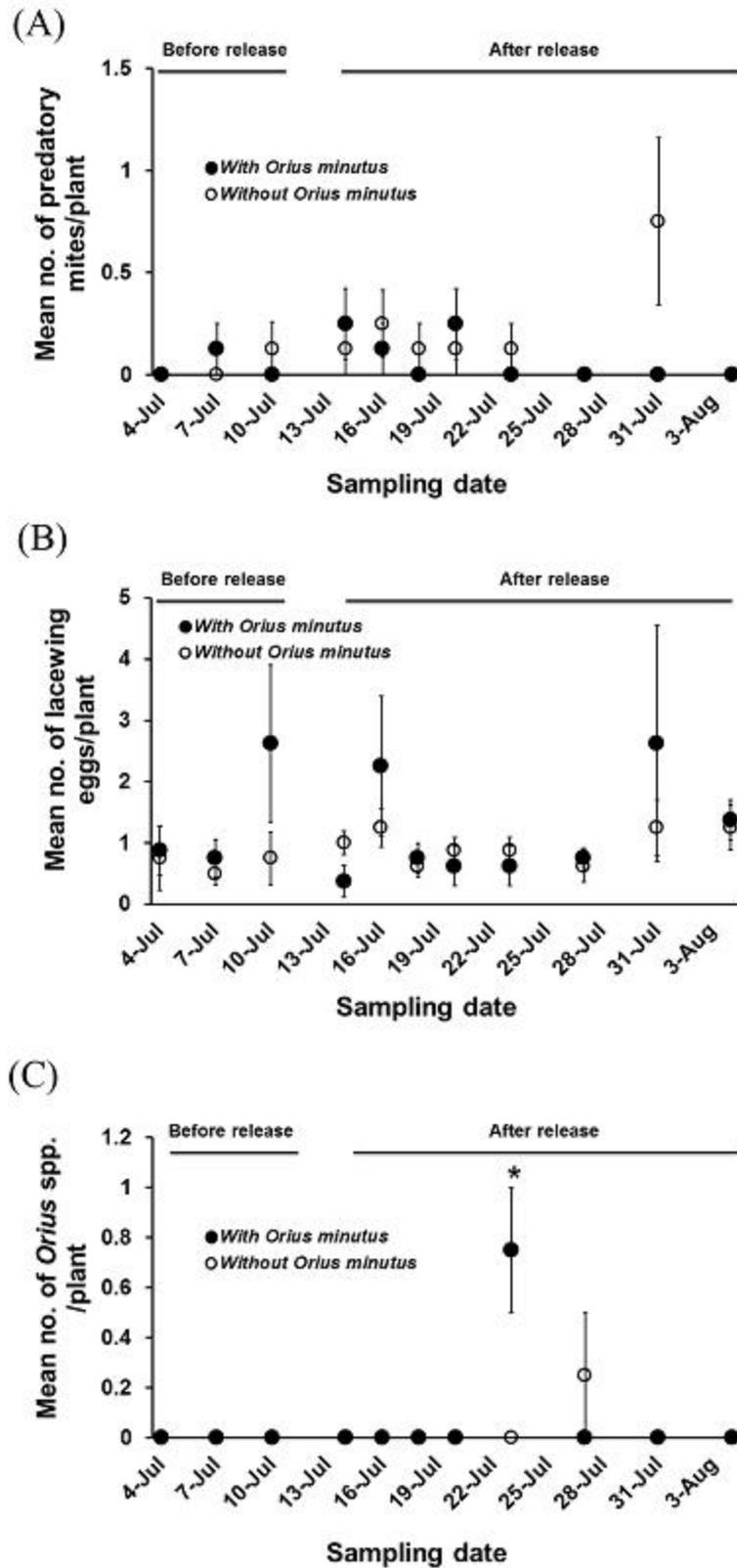
④ 기타 해충에 대한 방제 효과 검정

참뿔애꽃노린재 방사 후 점박이응애의 밀도가 처리구에서 유의하게 감소하여 잔여 조사기간 동안 매우 낮게 유지되었으며 벚나무응애(*Amphitetranychus vienensis*)도 처리구에서 밀도가 감소하였으며 통계적인 유의성은 애꽃노린재 방사 후 5회차 조사에서 확인되었음. 총채벌레류는 1회차 조사에서 유의하게 감소되는 것을 관찰하였으며 잔여 조사에서는 대조구와 처리구 모두에서 밀도가 낮아진 것을 확인할 수 있었음[그림1-43].



[그림1-43] 참뿔애꽃노린재 적용에 따른 (A)점박이응애, (B)벚나무응애, (C)총채벌레 밀도

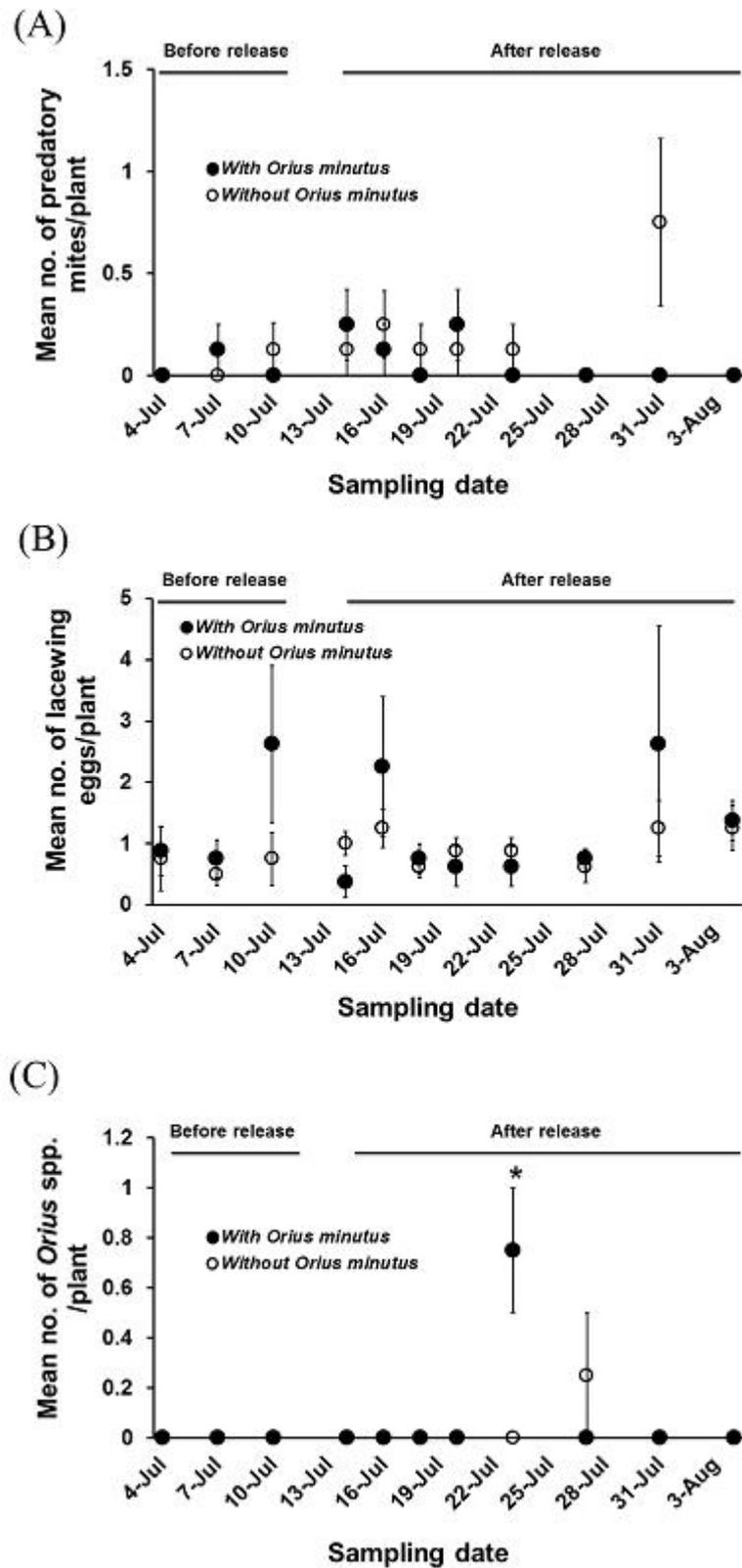
하지만 다른 진딧물류, 나방류 등에서는 처리의 효과를 볼 수 없었음[그림1-44]. 천적 밀도 조사에서는 포식성 응애와 풀잠자리류가 발견되었으나 처리구와 대조구 간의 유의한 차이는 없었음 [그림1-45].



[그림1-44] 타 천적 및 트랩 처리조건에 따른 참땀애꽃노린재의 1회차 밀도 변화

(A)포식성응애 (B)풀잠자리 알 (C)Tanglefoot

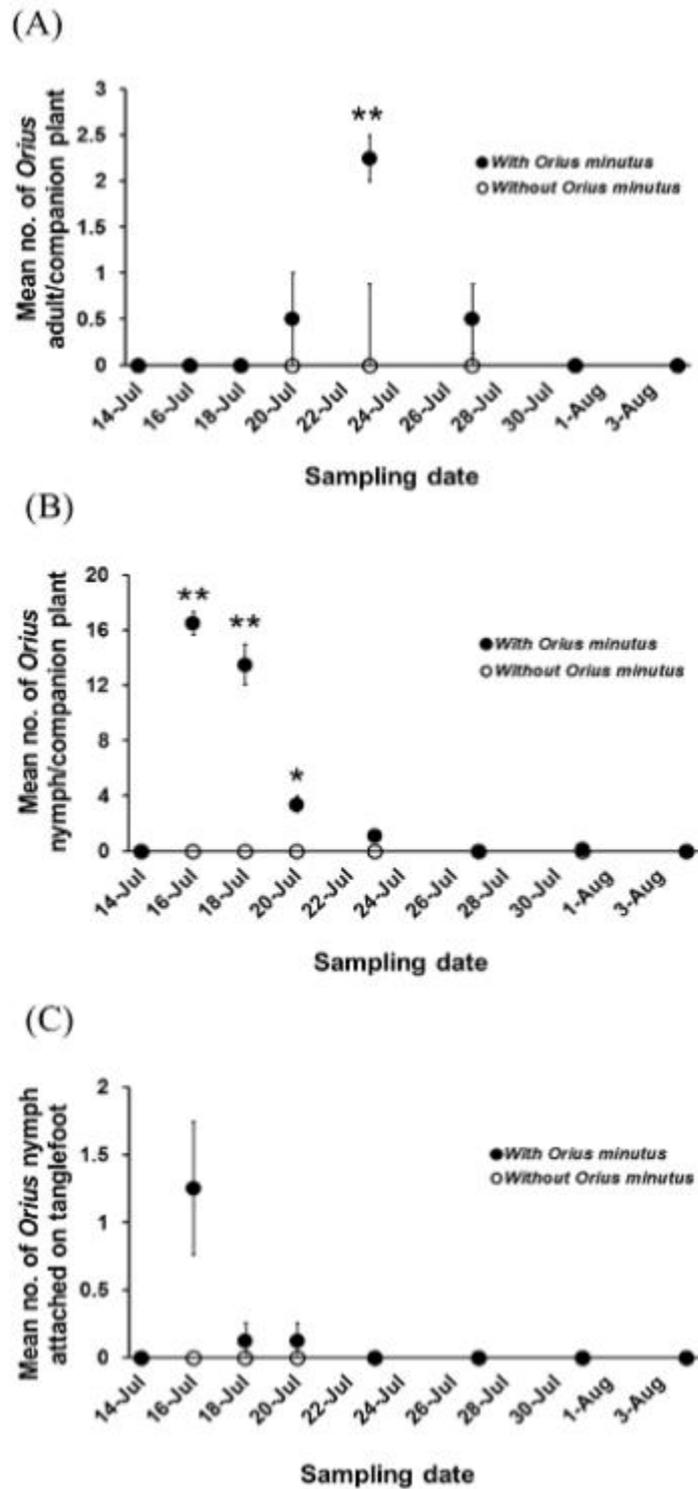
다만, 참멋애꽃노린재의 경우 조사 3회차에서 대조구에 비해 처리구에서 높은 밀도를 발견할 수 있었음[그림1-45].



[그림1-45] 타 천적 및 트랩 처리조건에 따른 참멋애꽃노린재의 3회차 밀도 변화

(A)포식성응애 (B)풀잠자리 알 (C)Tanglefoot

천적의 동반식물인 쇠비름류 식물에서의 방사한 참멋애꽃노린재의 성충의 밀도 변경을 조사한 결과 참멋애꽃노린재 방사 후 5회차 조사에서 유의한 밀도 증가를 관찰할 수 있었으며, 반면 방사한 참멋애꽃노린재의 약충 수는 4회차 조사까지인 13일 후까지 발견되는 것을 알 수 있었음. 시설재배지 내 기둥에 도포한 Tanglefoot에 포획된 참멋애꽃노린재 수는 적었으며 처리구와 대조구 간 유의한 차이가 없었음[그림1-46].



[그림1-46] 타 천적 및 트랩 처리조건에 따른 참멋애꽃노린재의 5회차 밀도 변화

(A)포식성응애 (B)풀잠자리 알 (C)Tanglefoot

⑤ 포장 실험을 통한 참땀애꽃노린재의 방제 효과 검증

※ 4개의 구역으로 나뉜 현장을 난괴법으로 4처리를 4반복으로 배치

기 개발된 천적 단독 적용, 기 개발된 천적이 방사키트로 적용된 경우, 관행 농약을 살포하는 경우, 무처리구로 구성- 처리 후 대상 해충과 천적의 밀도 변동과 작물에 나타난 피해 비교하였음. 추후 사업화를 위한 수요확보 방안으로 개발된 기술의 경제성 분석 및 최적의 현장 적용 모델 개발하고자 하였음.

[표1-18] 최적의 현장 적용 모델(안)

구분	친환경 해충 관리 모델	기대효과
Upgrade 기술	유기농업자재(기준) + 천적 유지시스템	해충에 대한 유기농업자재의 단독효과 극대화
	천적곤충(기준) + 방사 키트 적용	해충에 대한 천적곤충 단독효과 극대화
	천적곤충(기준) + 천적 유지시스템	해충발생 이전에 천적정착으로 해충의 발생을 근본적으로 억제
New 기술	생태기반 방제 모델	1회 적용으로 해충방제효과 극대화

- 경남 의령 대의면 하촌리, 200평 단동 하우스 / 품종: 삼채 (5월 말 정식)
- 경남 의령 용덕면 정동리, 200평 단동 하우스 / 품종: 케일 (9월 초 정식)
- 강원 화천 화천읍 신읍리, 500평 연동 하우스 / 품종: 시금치 (9월 초 정식)



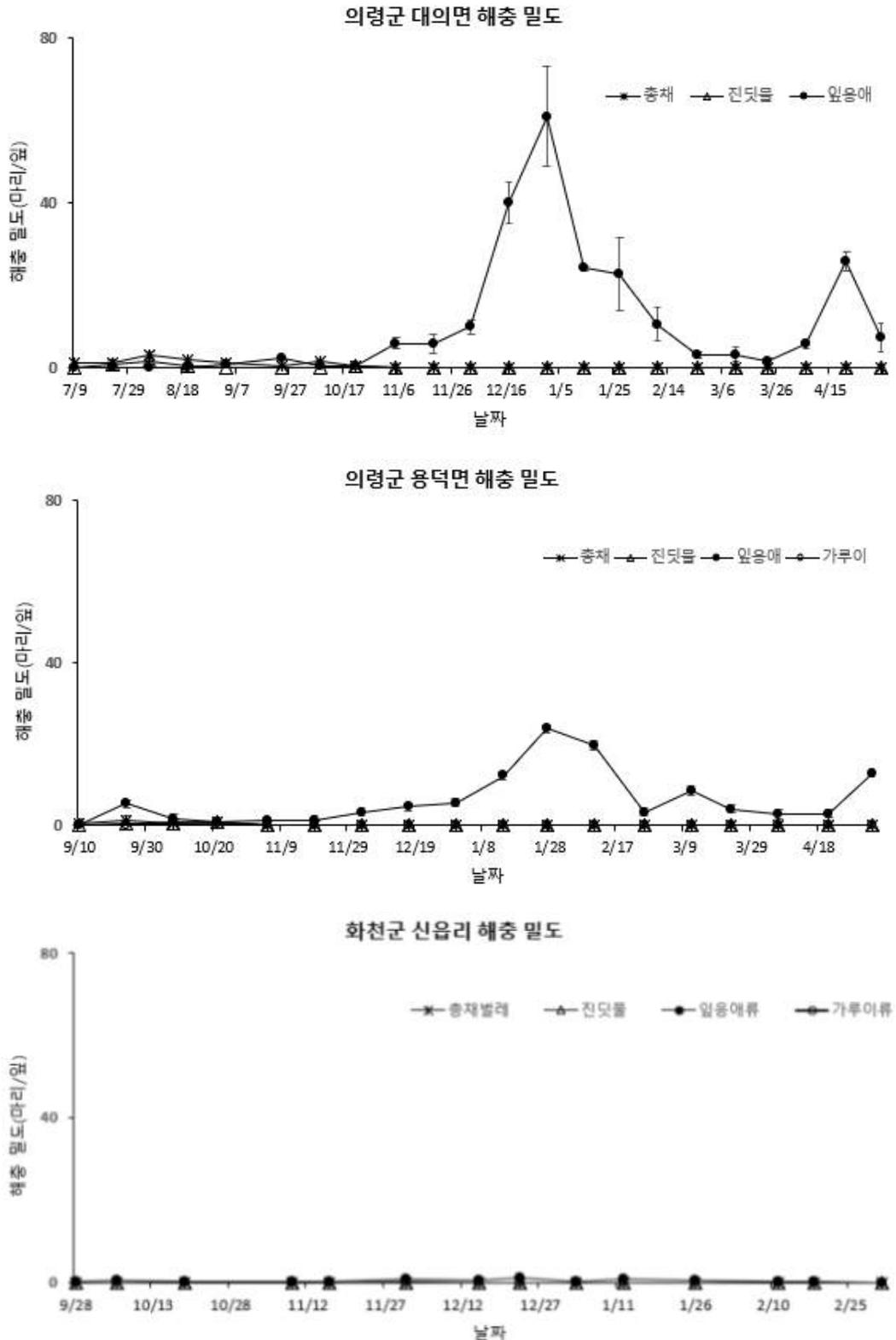
[그림1-47] 포장 해충 밀도 및 천적 방사를 통한 해충방제 효율 검증 포장 실험

작물 재배 전 기간 동안 환경조건 조사를 실시하였음. 팜링크 앱을 통해 온습도 확인하였으며, 온습도 자동 저장 장치가 없는 온실의 경우, 온습도저장장치(U23-001A, Onset®, MacArthur Boulevard, USA)를 온실 중앙에 추가 설치해 데이터 확보하였음.

작물 재배 전 기간 동안 발생 해충 조사를 실시하였음. 점착트랩은 출입구에서 10m 간격으로 지그재그형식으로 각 온실당 총 6장 설치했으며, 1~2주 간격으로 교체하면서 디지털 현미경(Dimis-ME, (주)시원광기술, 한국)으로 해충의 밀도조사하였으며, 육안조사는 10배율 확대경으로

작물의 상중하 지점의 3~5개 잎의 해충밀도 조사하였음.

경남 의령과 강원 화천에서 발생한 해충은 총채벌레, 진딧물, 잎응애, 가루이였으며, 강원지역에서는 잎당 2마리 이하의 낮은 해충밀도를 확인했으며, 경남 지역에서는 지속적인 약제 살포에도 불구하고 잎응애류 관리의 어려움을 확인할 수 있었음.



[그림1-48] 지역별 재배온실(관행방제구)에서 발생한 해충의 밀도변동

천적 활용모형을 활용한 해충 밀도 조절 현장 실증 실험을 실시함.

- 대상 온실 및 작물 품종(정식일)

- 경남 의령 대의면 하촌리 538-5 / 품종: 삼채(5월 말 정식)
- 경남 의령 용덕면 정동리 538-8 / 품종: 케일(9월 초 정식)
- 강원 화천 화천읍 신읍리 1574 / 품종: 케일(9월 초 정식)
- 강원 화천군 간동면 용호리 1218-8 / 품종: 시금치(7월 초~8월 말 정식)

처리구는 관행방제구(약제 처리구), 천적 + 천적 유지/보호 식물 처리구로 나누어 실시하였음.

- 의령 대의면: 관행방제구(200평/1동), 천적 + 유지/보호 식물 처리구(200평/1동)
- 의령 용덕면: 관행방제구(200평/1동), 천적 + 유지/보호 식물 처리구(200평/1동)
- 화천 간동면: 천적 + 유지/보호 식물 처리구(500평/1동)
- 화천 화천읍: 관행방제구(500평/1동)

천적은 온실별 매년 문제시되었던 해충을 대상으로 적용하였으며, 밀도조사: 1~2주 간격으로, 10배율 확대경으로 작물의 상중하 지점의 3~5개 앞의 해충과 천적의 밀도 조사하였음.

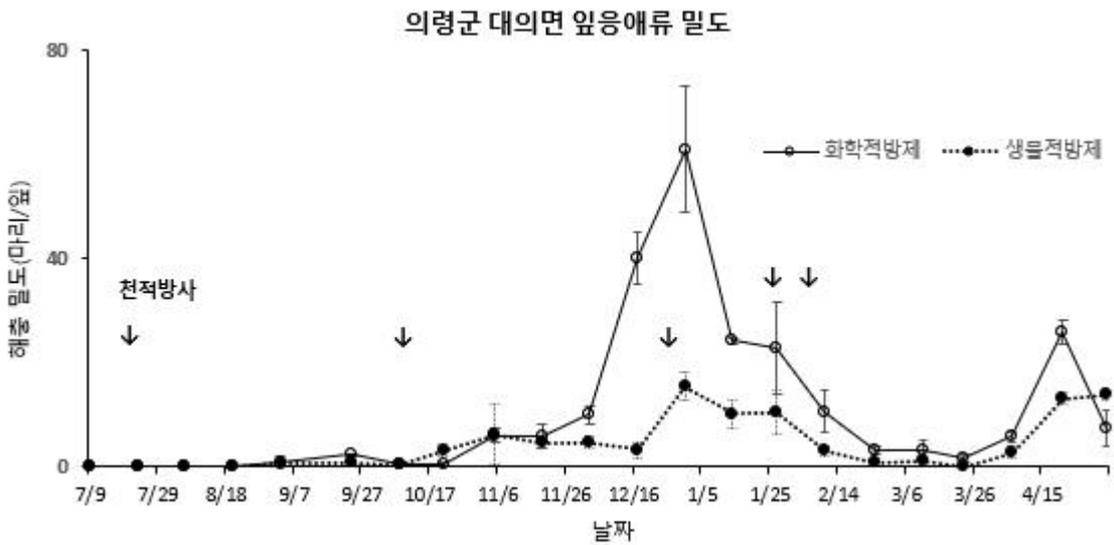
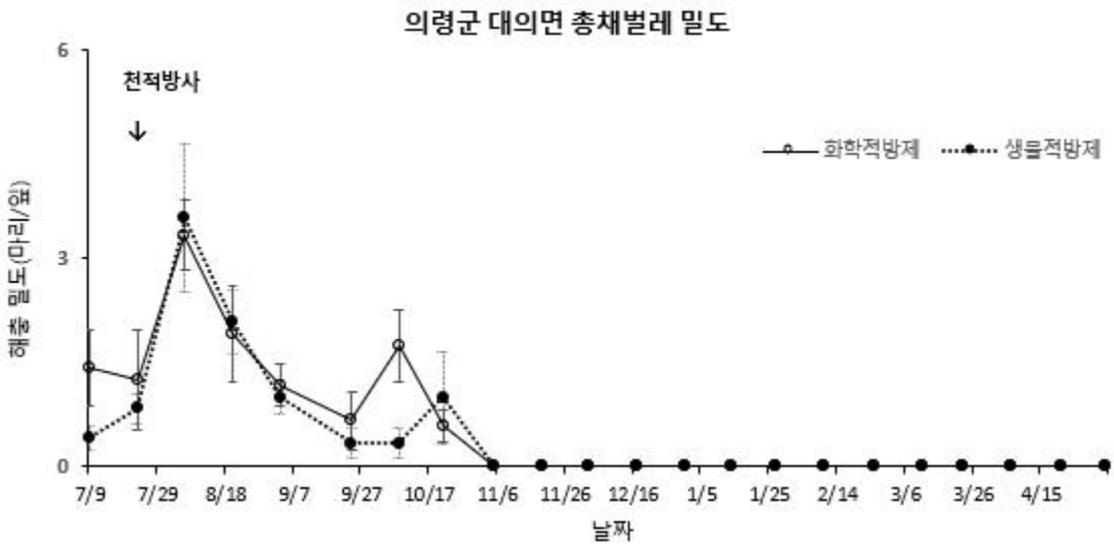
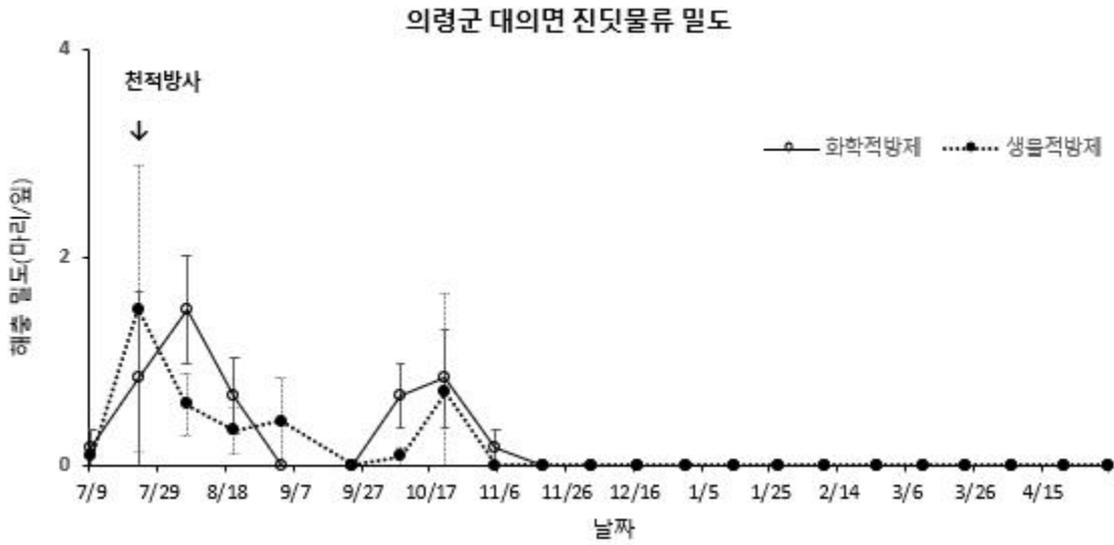
의령 대의면(200평) 천적 적용 및 방제효과를 검토한 결과 문제 해충으로는 총채벌레와 잎응애류가 발생하였으며, 천적 투입은 해충 밀도를 확인한 시점을 기준으로 순차적으로 투입하고 밀도변화를 관찰하였음.

- 7월 22일: 참멋애꽃노린재 500마리(1병), *Portulaca* sp. 2포트
- 10월 8일: 참멋애꽃노린재 1,000마리(2병)
- 12월 31일: 참멋애꽃노린재 1,000마리(2병)
- 1월 27일: 참멋애꽃노린재 1,000마리(2병)
- 2월 10일: 참멋애꽃노린재 500마리(1병)

의령군 대의면 온실의 진딧물류와 총채벌레류의 밀도는 각 처리구간 통계적인 차이는 확인할 수 없었음.

생물적방제 처리구에서 7월 22일 참멋애꽃노린재 1병을 적용하여, 총채벌레와 진딧물의 밀도를 효과적으로 억제할 수 있었으며, 잎응애류의 밀도 관리를 위하여 생물적방제 처리구에는 10월 8일부터 2월 10일까지 4차례에 걸쳐 참멋애꽃노린재 1~2병을 방사하였음.

화학적방제 처리구의 경우 지속적인 약제 살포에도 불구하고 12월 3일경 밀도가 급격히 상승하면서, 12월 31일 잎당 61마리까지 증가하였으며, 같은 시기 생물적방제 처리구의 잎응애류의 밀도는 잎당 15.4마리로 74.8% 낮게 확인되었다(df=1,5, F=14.38, P=0.0192). 이후 두 처리구 모두 잎응애류의 밀도가 낮게 유지되다가, 4월 중순 이후 작기 종료 시점에 다시 잎응애류의 밀도가 증가하는 추세를 확인하였음.



[그림1-49] 의령군 대의면의 해충방제 방법에 따른 해충의 밀도변동

의령 용덕면(200평) 천적 적용 및 방제효과를 실험하였음. 주요 문제 해충으로는 총채벌레, 잎응애류가 문제점으로 나타났으며, 천적 투입은 해충 밀도를 확인한 시점을 기준으로 순차적으로 투입하고 밀도변화를 관찰하였음.

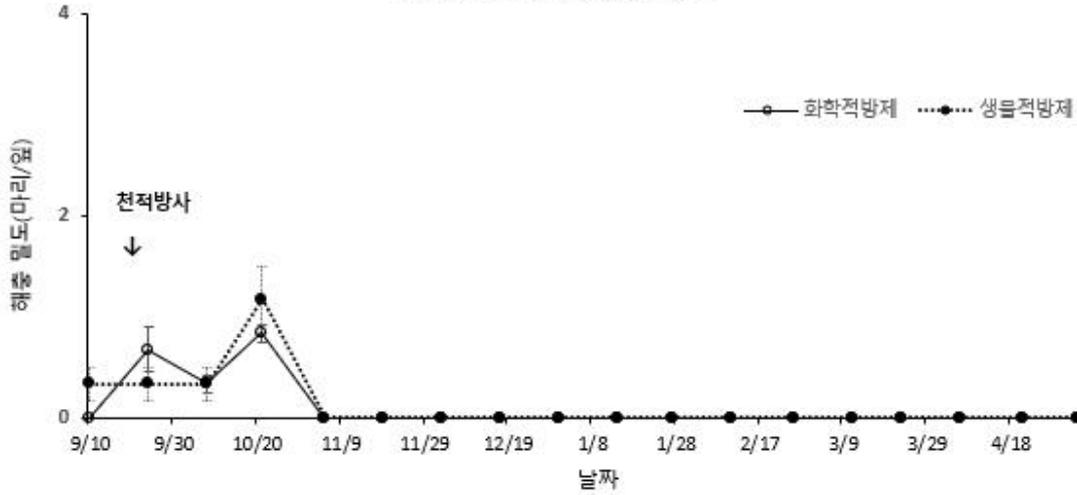
- 9월 17일: 뿌리이리응애 20,000마리(2병)와 칠레이리응애 4,000마리(2병)
- 9월 24일: 참멋애꽃노린재 500마리(1병)와 *Portulaca* sp. 2포트
- 10월 8일: 칠레이리응애 8,000마리(4병)
- 12월 31일: 칠레이리응애 4,000마리(2병)
- 1월 27일: 칠레이리응애 4,000마리(2병)
- 2월 10일: 칠레이리응애 6,000마리(3병)

의령군 용덕면 온실의 진딧물류와 총채벌레류의 밀도는 각 처리구간 통계적인 차이는 확인할 수 없었음. 다만, 잎응애류의 경우 1월 말부터 화학적방제 처리구보다 생물적방제 처리구에서 밀도가 높게 유지되었음. 본 포장에서는 대의면과 달리, 약제 방제로 잎응애류의 밀도를 효과적으로 관리할 수 있었으며, 또한, 생물적방제 처리구의 잎응애류 밀도변동은 같은 지역인 의령군 대의면과 유사한 흐름임을 확인할 수 있었음.

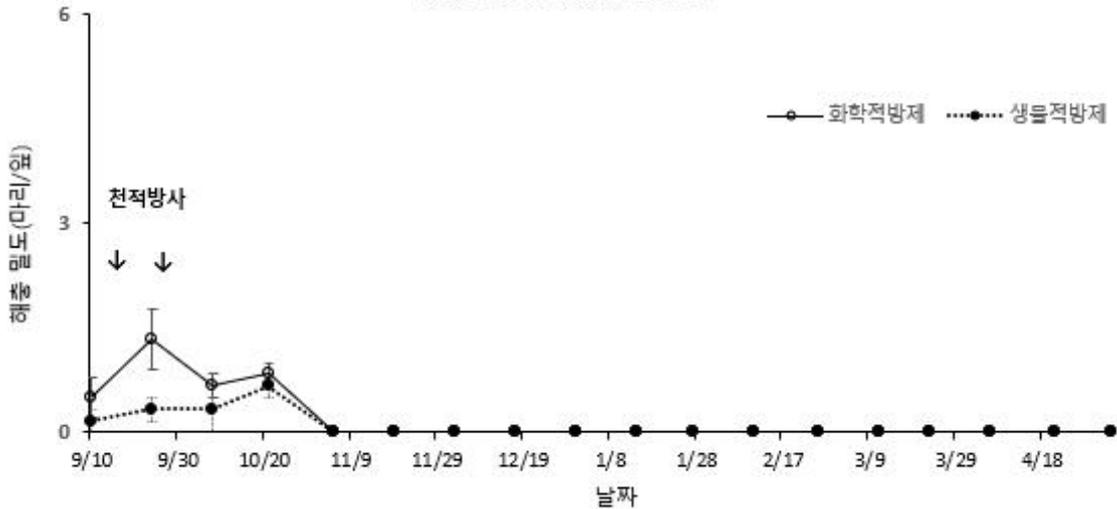


[그림1-50] 의령군 용덕면의 점착트랩 설치 및 해충 예찰

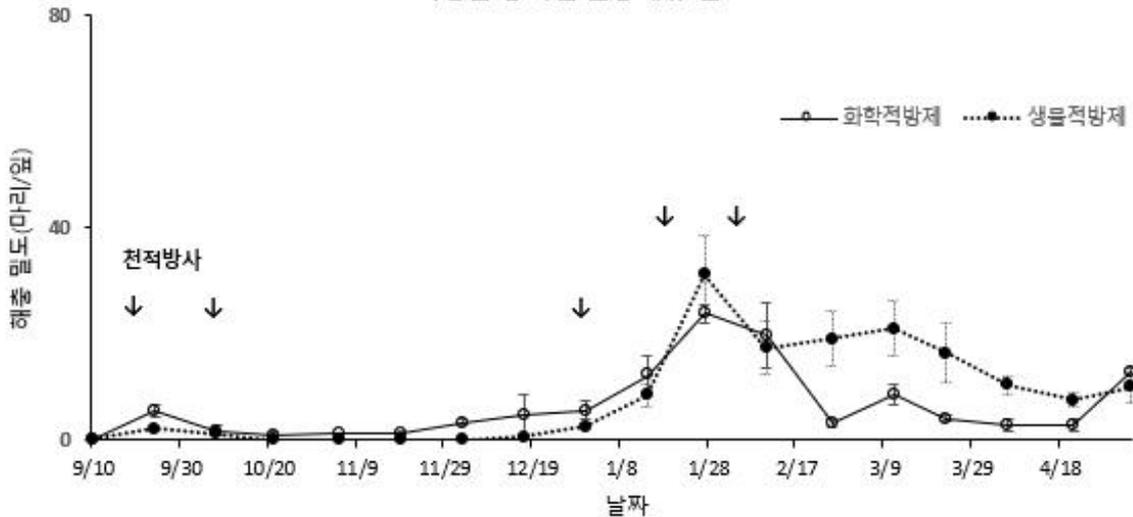
의령군 용덕면 진딧물류 밀도



의령군 용덕면 총채벌레 밀도



의령군 용덕면 잎응애류 밀도



[그림1-51] 의령군 용덕면의 해충방제 방법에 따른 해충의 밀도변동

화천군 간동면(500평) 천적 적용 및 방제효과를 실시하였음. 주요 문제 해충으로 진딧물과 잎응애가 관찰되었으며, 천적 투입은 해충 밀도를 확인한 시점을 기준으로 순차적으로 투입하고 밀도 변화를 관찰하였음.

- 8월 24일: 콜레마니진디벌 500마리(1병), 진디혹파리 1,000마리(1병), 보리 뱅커플랜트 5포트, 사막이리응애 2,000마리(1병), 칠레이리응애 2,000마리(1병), 참땃애꽃노린재 100마리(0.2병)
- 10월 6일: 콜레마니진디벌 1,000마리(2병), 진디혹파리 2,000마리(2병), 사막이리응애 2,000마리(1병), 칠레이리응애 2,000마리(1병)

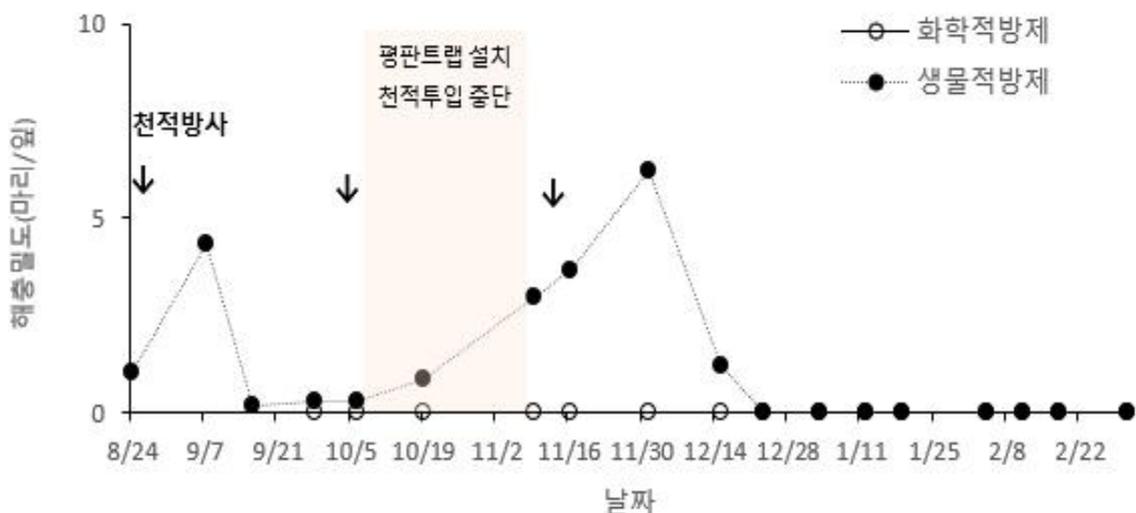
※ 초파리류 대량포획을 위한 판형 점착트랩설치를 위해 10월 6일 이후 천적투입을 잠정 중단하기로 함(농민의 결정)

- 11월 16일: 콜레마니진디벌 2,500마리(5병), 진디혹파리 2,000마리(2병)

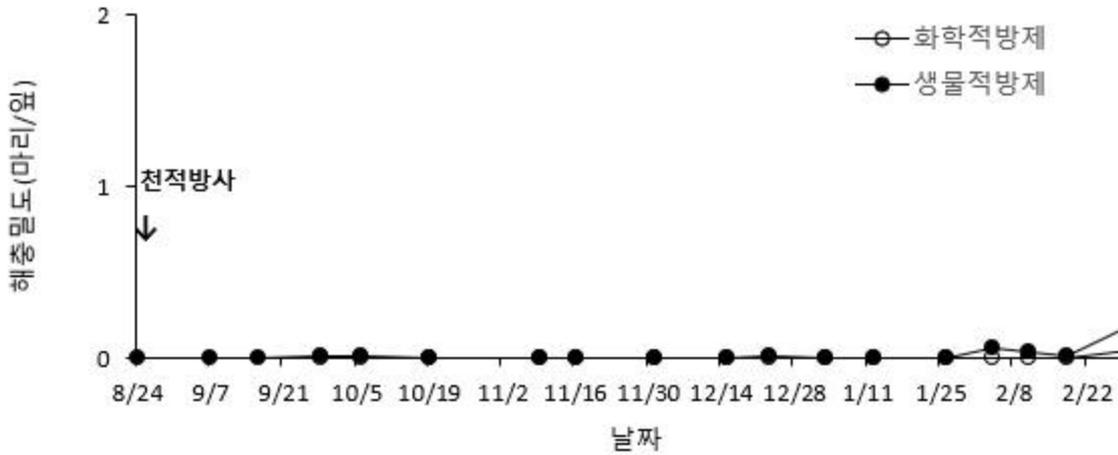
※ 증가하는 진딧물류의 밀도를 억제하기 위해 농민과 협의 후, 진딧물류 대상 천적을 재투입하기로 함

화천군 생물적방제구는 전체 포장의 정식이 완료된 시점인 8월 말부터 진딧물과 잎응애의 밀도를 확인할 수 있었던 포장이었음. 특히 진딧물류의 경우, 화학적방제구에서는 확인되지 않았으나, 생물적방제 처리구에서는 10월 중순쯤부터 초파리류의 대량포획을 위한 판형 점착트랩 설치를 위해 한 달가량 천적의 투입을 중단한 결과 진딧물류의 밀도가 높아져, 11월 16일 기생성 천적과 포식성 천적을 혼합적용 하였고 이후 진딧물류의 밀도를 안정적으로 관리할 수 있었음. 잎응애류의 경우, 화학적방제 처리구에서 생물적방제 처리구보다 높게 나타났으나, 전반적으로 잎당 1마리 이하의 낮은 밀도를 유지하였으며, 총채벌레류와 가루이류의 밀도는 모든 처리구에서 낮게 유지되었음.

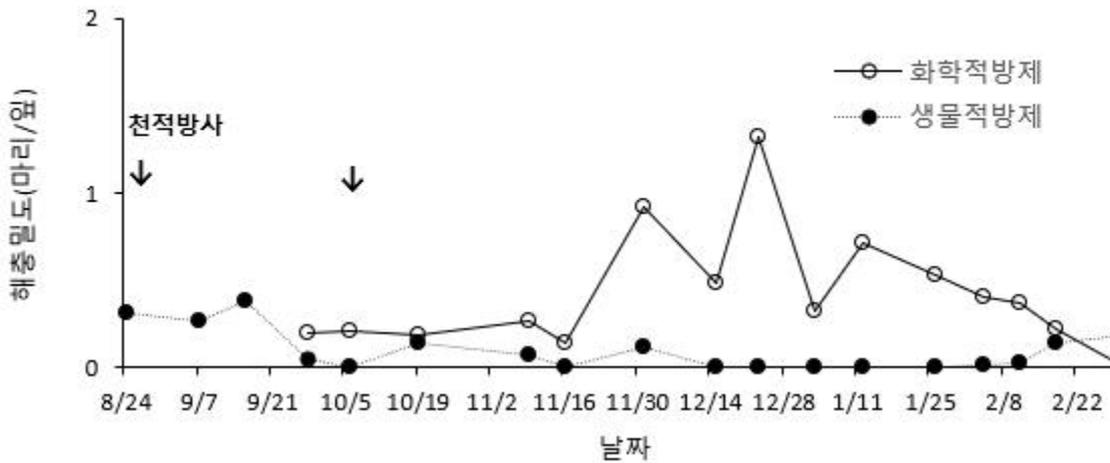
화천군 진딧물류 밀도



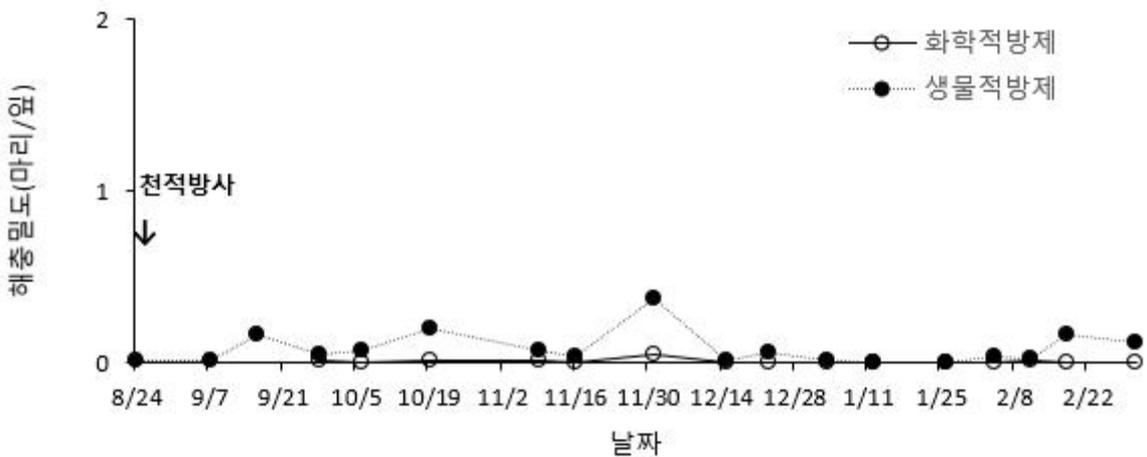
### 화천군 총채벌레 밀도



### 화천군 잎응애류 밀도



### 화천군 가루이류 밀도

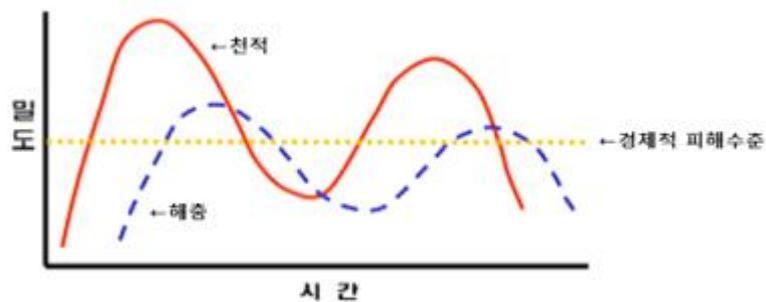


[그림1-52] 화천군의 해충방제 방법에 따른 해충의 밀도변동

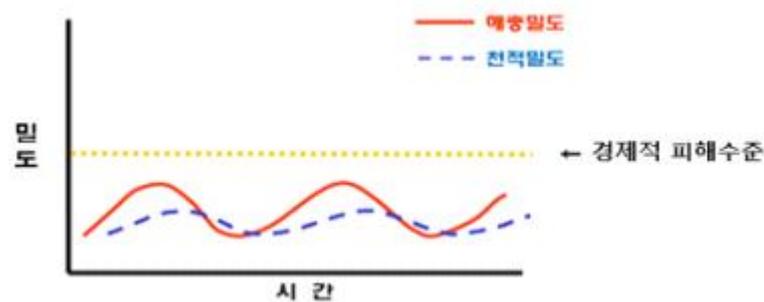
## 나) 개발된 천적 및 방사 모델의 제품화 기술 개발

### ① 개발된 천적의 방사 모델 개발

자연생태계에는 작물, 해충, 천적과 다양한 환경요인들의 복합적인 상호작용을 통해 생물 개체군의 밀도가 변동함[그림1-53]. 그러나 작물을 재배하는 포장의 경우 자연생태계와는 달리 인위적인 요소에 의해 조성되어 지는 특성이 있어, 일부 소수의 생물종이 대발생하게 됨. 이러한 문제를 해결하기 위해 천적을 활용해 생태계 다양성을 유지시켜 지속가능한 해충 방제방법을 구축하기 위한 노력이 경주되고 있음[그림1-54].



[그림1-53] 생태계 내에서의 천적과 해충의 밀도 변화



[그림1-54] 천적 투입으로 인한 해충의 밀도 조절 기능(농촌진흥청, 2009)

천적을 이용한 생물적 방제는 농약 잔류의 위험, 약제 저항성 해충 출현, 약제 살포로 천적이 사라진 해충의 돌발적 발생 등 다양한 약제사용의 부작용을 해결 할 수 있는 지속가능한 해충 방제 수단중 하나로, 특히 야외에서는 천적의 보호이용 방법이 중요시 되고 있음.

천적이용의 선결조건은 예찰(豫察)을 통한 해충 발생 초기의 천적 적용이라고 제시하고 있지만, 해충을 정확히 예찰하는 것은 많은 노력과 시간이 필요하므로 빈번히 현장에서는 해충 발생 초기를 예찰하지 못해 천적 적용에 어려움을 토로하고 있음(함, 2018).

특히 엽채류 재배지에서 가장 많이 발생하는 진딧물의 경우 성충의 몸길이가 0.4 mm내외로 육안으로 확인이 불가능해, 작물의 잎이 변색될 무렵이나 2차 질병의 발생되는 시기에 뒤늦게 발견하게 됨.[그림1-55]. 이러한 문제점을 최소화하기 위하여 엽채류 해충방제를 위한 신개념 천적 적용 모델을 구축하였음.



[그림1-55] 육안관찰을 통한 해충의 발생양상 모니터링

해충방제를 위해 천적의 보호이용 방법인 NEF (Natural Enemy in First) 모델을 구축하였음. NEF 모델은 Markkula and Tiittanen (1976)의 “Pest in First Technique”을 기본 이념으로 하며, 천적의 생존에 긍정적인 작용을 하는데 바탕을 두고 있으며, 기본형 NEF 모델은 천적과 먹이곤충이 접종되어 있는 식물을 농업 현장에 조성하여 관리하면서 주 관리 재배 작물에 해충이 발생하기 전에 천적을 먼저 정착시켜 해충 발생을 원천적으로 차단 또는 즉각 방제하는 저비용 고효율 방제 시스템임. 즉, 천적의 서식처, 피난처, 쉼터가 될 수 있는 식물이나 그 자체로 천적의 대체먹이가 되는 식물 또는 천적의 먹이곤충이 서식할 수 있는 식물들을 선별 조성하여 식물과 생물 다양성을 통해 정원 생태계를 안정시키는 것이라 할 수 있음.[그림1-56].



[그림1-56] 생태계 다양성을 활용한 천적곤충의 정착시스템 (www.flickr.com, Hopwood et al., 2016)

나아가 문제 해충의 천적과 서식처를 해충 발생시기보다 앞당겨 조성하거나, 기 조성된 서식처에 천적을 단독 또는 천적의 먹이곤충과 혼합하여 투입하는 적극적인 모델 구축을 통해 안정적으로 해충 밀도를 관리할 수 있을 것으로 판단됨.

② 천적 제품화를 위한 산업곤충 적용 기준 및 혼용 약제 검토

개발된 모델의 제품화를 위해 ‘산업곤충 사육기준 및 규격’을 참고하여 최종 제품의 QC 항목 및 확인 방법을 제시하였으며. 나아가 포장상태에서 상온에 노출되어도 상품성을 유지할 수 있는 포장기술을 개발하여 적재과정이나 차량 배송 중 노면상태 등에 따라 발생하는 상하좌우의 물리적 충격을 최소화 기술을 개발하였음.

천적의 제품화에 관한 국내외 자료 수집 및 분석을 통한 신기술 적용 지침서 작성/배포 및 매뉴얼 개발 및 천적과 화학적 약제 혼용 시 천적 발육 및 수명에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며, 이에 본 연구에서는 선발된 천적과 혼용 가능한 저독성 약제를 선발 실험을 진행하였음.

㉠ 천적 유지식물 자료 조사 및 목록화

선행연구와 국내외 자료분석을 통해 선발된 광포식성 천적의 증식 및 정착에 적합한 유지식물에 관한 자료를 수집하여 정리한 결과는 [표1-19]와 같으며, 총 85종의 식물을 목록화하였다.

[표1-19] 천적 유지 식물 대상 조사

Year, Authors	Title	Source title	Plant name	Beneficial insects
2017, Oh et al.	A preliminary study of <i>Oxalis corniculata</i> as a new banker plant: Control efficacy against <i>Panonychus citri</i> and feeding ability of two natural enemies on <i>Tetranychina harti</i>	Kor. J. Applied Entomology, 56(3); 267-273	<i>Oxalis corniculata</i>	<i>Phytoseiulus persimilis</i>
2016, Choi et al.	Technical development of application of trap plant and natural enemy to control sweet potato whitefly in tomato greenhouse	Rural development administration, 41pp.	Tomato, Eggplant	<i>Amblyseius swirskii</i>
2016, Uc master gardeners	Uc Creating habitat for beneficial insects.	Uc master gardeners, santa clara county.	<i>Elymus glaucus</i> , <i>Eriogonum fasciculatum foliolosum</i> , <i>Rhamnus californica tomentella</i> , <i>Ceanothus griseus</i> , <i>Melica californica</i> , <i>Baccharis pilularis</i> , <i>Sambucus mexicana</i> , <i>Arctostaphylos</i> sp.	Flies, parasitoid wasps, lady beetles, and solitary wasps
2016, Hopwood et al.	Habitat planning for beneficial insects: Guidelines for conservation biological control	The xerces society for invertebrate conservation, 82pp.	<i>Zizia aurea</i> , <i>Gaillardia</i> spp., <i>Silphium perfoliatum</i>	Lady beetles, Soldier beetles, etc
			<i>Prunus virginiana</i> , <i>Spiraea</i> spp., <i>Tilia americana</i>	Syrphid flies, Flies, Beetles, etc.
			<i>Sambucus</i> spp., <i>Rosa</i> spp.	Small beneficial insects, Solitary wasps, Predatory beetles
			<i>Crataegus</i> spp.,	Many beneficial insects

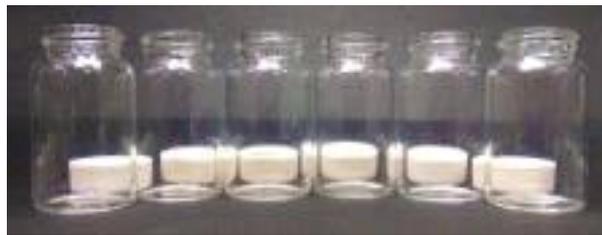
			<i>Ceanothus</i> spp., <i>Shepherdia</i> spp.	
			<i>Elymus glaucus</i> , <i>Pseudoroegneria spicata</i> , <i>Danthonia californica</i> , etc	Beetles, Spiders, Various other beneficial insects
2014, Ham et al.	Biological Control of <i>Frankliniella occidentalis</i> by Banker Plants of <i>Orius laevigatus</i> on Rose Greenhouse	J. Nature conservancy, 8(1); 8-11	<i>Portulaca grandiflora</i>	<i>Orius laevigatus</i>
2014, Skinner et al.	Aphid banker plant system for greenhouse IPM, step by step	Univ. of Vermont & Biobest USA, Inc, 4pp.	Barley, Oat, Wheat	<i>Aphidius colemani</i>
2013, Choi et al.	Control Effects of <i>Frankliniella occidentalis</i> by using Trap Plants and <i>Orius laevigatus</i> in Chrysanthemum PVC House	J. Pesticide Sci. 17(4); 440-447	flowering yellow <i>chrysanthemum</i>	<i>Orius laevigatus</i>
2013, Kumar et al.	Habitat Manipulation for Biological Control of Insect Pests: A Review	Research J. Agriculture & Forestry Sci., 1(10); 27-31	Coriander	<i>Campoletis chloridae</i>
			<i>Erygium</i> sp.	<i>Aphelinus mali</i>
			<i>Euphorbia</i> sp.	<i>Lixophaga sphenophori</i>
2011, Byun et al.	Investigation and Application of Korean Economic Insects	National Institute of Biological Resources, 120pp.	<i>Diospyros kaki</i> , <i>Prunus serrulata</i> var. <i>spontanea</i>	<i>Parena cavipennis</i>
			<i>Citrus unshiu</i>	<i>Cunax</i> sp.
			Chinese cabbage	<i>Cotesia plutellae</i> , <i>Diadegma semiclausum</i>
			<i>Acer palmatum</i>	<i>Stauropoctonus bombycivorus</i>
			<i>Malus asiatica</i>	<i>Cotesia</i> sp., <i>Compsilura concinata</i>
			<i>Buxaceae</i>	<i>Glyptapanteles</i> sp.1
2011, Byun et al.	Investigation and Application of Korean Economic Insects	National Institute of Biological Resources, 120pp.	<i>Rhododendron schlippenbachii</i>	<i>Glyptapanteles</i> sp.2
2009, USDA NRCS	Plants enhancement activity-PLT08-Habitat development for beneficial insects for pest management.	USDA NRCS	Criteria	Many beneficial insects
2008, Biobest	<i>Orius</i> in ornamental crops; a welcome addition for thrips control	Bio-Bulletin, 8pp.	Pepper plants	<i>Orius</i> spp.
2008, Bianchi, Wackers	Effect of flower attractiveness and nectar availability in field margins on biological control by parasitoids	Biological Control. 46(3), 400-408	<i>Anemone canadensis</i> , <i>Zizia aurea</i> , <i>Phacelia tanacetifolia</i> , <i>Coreopsis lanceolata</i> , <i>Angelica atropurpurea</i> , buckwheat, lacy phacelia, and wildflowers	Flies, parasitoid wasps, lady beetles, and solitary wasps :using native plant field borders (alternative foraging sources throught the growing season
2006, Bianchi	Sustainable pest regulation in agricultural landscapes: a	Proceedings of the Royal	sugar beet, brussels sprout, cereals,	aphid predator complex, armworm parasitoids, egg

et al.	review on landscape composition, biodiversity and natural pest control	Society B 273(1595), 1715-1727	rape-seed, legumes, maize, leek, wheat, alfalfa, potato, spinach, winter cereals, spring barley, cotton, winter wheat, oilseed rape	parasitoids carabid beetles, coccinellids, syrphids, cotton natural enemy complex, leaf beetle parasitoids, spiders, rape pollen beetle parasitoids
2005, Logarzo et al.	Plant bugs (Heteroptera: Miridae) associated with roadside habitats in Argentina and Paraguay: host plant, temporal, and geographic range effect	Ann. Entomol. Soc. Am. 98(5); 694-702	<i>Eupatorium, hecatanthum</i>	<i>Tupiocoris cucurbitaceus</i>
			<i>Commelina virginica</i>	<i>Pycnoderes sixeonotoides</i>
			<i>Conyza</i> spp.	<i>Hyaliodocoris insignis</i>
			<i>Physalis pubescens</i>	<i>Orthotylus</i> sp.
			<i>Hyptis fasciculata</i>	<i>Dagbertus phaleratus,</i>
			<i>Mikania cordifolia</i>	<i>Henicocnemis tucumanus</i>
			<i>Gomphrena perennis</i>	<i>Garganus saltensis</i>
			<i>Hypericum</i> sp.	<i>Horcias nobilellus</i>
			<i>Borreria verticillata</i>	<i>Polymerus testaceipes</i>
			<i>Stemodia verticillata</i>	<i>Taedia stigmosa</i>
2003, Matteoni	Economics of banker plant systems in Canadian greenhouse crops	1st International Symposium on Biological Control of Arthropods, 154-155	Rye, <i>Capsicum annum</i>	<i>Aphidius colemani,</i> <i>Aphidius ervi,</i> <i>Aphidoletes aphidimyza</i>
			Mullein	<i>Dicyphus hesperus</i>
			<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Phytoseiulus persimilis</i>
2003, Kim & Kim	Biological Control of Aphids on Cucumber in Plastic Green Houses Using Banker Plants	Kor. J. Applied Entomology, 42(1); 81-84	Barley	<i>Aphidius colemani</i>
2001, Gredler	Encouraging beneficial insects in your garden	Oregon State University, 4pp.	<i>Angelica archangelica, Medicago sativa</i>	Lacewings, lady beetles
			<i>Cosmos bipinnatus</i>	Hover flies, lacewing, minute pirate bugs
			<i>Tagetes tenuifolia, Tithonia rotundifolia</i>	Minute pirate bugs
			<i>Anthemis nobilis, Anthemis tinctoria</i>	lady beetles, wasps
2000, Landis et al.	Habitat management to conserve natural enemies of arthropod pests in agriculture	Annual review of Entomology. 45(1), 175-201	<i>Secale cereale, Brassica</i> spp., <i>Triticum</i> spp, and <i>Avena sativa</i>	Using cover crops for many beneficial insects
-	The dietrick institute, Habitats on Farm.	<a href="http://www.dietrick.org/articles/articles.html">www.dietrick.org/articles/articles.html</a>	<i>Achillea millefolium, Baccharis</i> sp., <i>Ceanothus cuneatus, Salix</i> sp., <i>Prunus ilicifolia, Eriogonum</i> sp., <i>Rhamnus</i> sp., <i>Sambucus mexicana</i>	Wasps, tachinid flies, hoverflies, lady beetle

④ *Orius*속에 대한 저독성 약제의 참멋애꽃노린재에 대한 급성독성(acute toxicity) 검증

문헌 조사를 바탕으로 *Orius*속에 대해 저독성으로 보고된 다섯 가지의 살충제(buprofezin, flonicamid, sulfoxaflor, flupyradifurone, spirotetramat)와 두 가지의 살비제(spiromesifen, emamectin benzoate)에 대해 scintillation 병(20 ml)에서 접촉 독성을 평가하였음.

각각의 농약을 추천 농도로 희석하여 100  $\mu$ l를 scintillation 병[그림1-57]에 도포 및 건조 후에 참멋애꽃노린재(*Orius minutus*)와 미끌애꽃노린재(*Orius laevigatus*) 암컷 성충 1마리씩 방사한 후 항온기(26.4  $\pm$  0.5  $^{\circ}$ C, 53.1  $\pm$  3.0% RH, 16 L: 8 D hour photoperiod)에 두면서 살충률을 조사하였음.



[그림1-57] 농약 독성 측정을 위한 실험 기구

음의 대조구로 증류수를 양의 대조구로는  $\lambda$ -cyhalothrin의 LC<sub>25</sub>를 사용하여 비교하였음, 다섯 가지의 살충제(buprofezin, flonicamid, sulfoxaflor, flupyradifurone, spirotetramat)와 두 가지의 살비제(spiromesifen, emamectin benzoate)에 대해 생물검증을 한 결과 애꽃노린재 두 종에 대해 모두 가장 급성 독성이 적은 것은 buprofezin, flonicamid, spirotetramat, spiromesifen이었다[표1-20],[표1-21].

[표1-20] 참멋애꽃노린재의 농약(살충제, 살균제) 독성에 의한 살충율 조사

Treatment	n	Slope ( $\pm$ SE)	LT50 h	95% C.I	$\chi^2$ (df)
$\lambda$ -cyhalothrin	50	2.56 $\pm$ 0.26	5.14a	3.81-6.51	31.37(14)
Sulfoxaflor	50	3.52 $\pm$ 0.30	13.83b	11.94-15.64	22.65(14)
Flonicamid	50	4.55 $\pm$ 0.67	25.15c	21.09-29.20	74.64(14)
Buprofezin	50	4.22 $\pm$ 0.43	25.43c	22.60-28.23	33.50(14)
Emamectin	50	5.88 $\pm$ 0.52	11.16b	10.22-12.04	3.91(18)
Flupyradifurone	50	5.05 $\pm$ 0.35	15.37c	14.19-16.49	3.18(18)
Spiromesifen	50	5.30 $\pm$ 0.32	37.44e	35.68-39.19	21.54(18)
Spirotetramat	50	4.85 $\pm$ 0.37	39.61e	37.03-42.25	28.12(18)
Water	50	5.30 $\pm$ 0.36	30.30c	28.71-31.89	8.55(14)

[표1-21] 미끌애꽃노린재의 농약(살충제, 살균제) 독성에 의한 살충율 조사

Treatment	n	Slope ( $\pm$ SE)	LT50 h	95% C.I	$\chi^2$ (df)
$\lambda$ -cyhalothrin	50	2.76 $\pm$ 0.65	6.30a	2.80-10.47	34.94 (5)
Sulfoxaflor	50	7.77 $\pm$ 0.80	12.56b	11.73-13.37	7.22 (5)
Buprofezin	50	6.06 $\pm$ 1.76	28.00c	20.65-36.45	157.70 (11)
Flonicamid	50	6.76 $\pm$ 5.91	31.13	-	-
Flupyradifurone	50	3.17 $\pm$ 0.79	6.36a	2.61-10.92	25.90 (4)
Spiromesifen	50	6.78 $\pm$ 0.54	29.06b	27.69-30.45	12.99 (12)
Spirotetramat	50	8.75 $\pm$ 0.69	29.66b	28.45-30.85	6.29 (11)
Emamectin	50	3.91 $\pm$ 2.69	19.13	-	-
Water	50	6.08 $\pm$ 0.40	26.53c	25.15-27.87	5.89 (14)

㉔ 선발된 저독성 약제의 참멋애꽃노린재에 대한 아치사효과(sublethal effect) 조사

선발된 저독성 약제가 참멋애꽃노린재(*Orius minutus*) 암컷 성충의 생식과 수명에 미치는 영향을 조사하였음.

살충제에서는 Spirotetramat을 살비제에서는 Spiromesifen을 선택하였고, 기존 약량을 준비하여 위의 급성독성 실험과 같은 방법으로 12시간 동안 scintillation 병(20 ml)에서 접촉시켰음.

이후 농약에 12시간 동안 노출된 참멋애꽃노린재 암컷을 꺼내어 농약에 노출시키지 않은 수컷과 함께 짝을 만들어 플라스틱 곤충사육용기(72 L  $\times$  72 B  $\times$  100 H mm)에 접박이응애를 공급하면서 산란율, 산란전기간, 산란후기간, 9일 산란수, 산란된 알의 부화율, 수명을 기록하고 분석하였음.

급성 독성 시험에서 가장 독성이 적은 약제 중에서 살충제에서는 spirotetramat을 그리고 살비제에서는 spiromesifen을 선택하여 암컷 성충 참멋애꽃노린재에 대한 아치사효과를 조사한 결과 두 가지 약제 모두 대조구인 물과  $\lambda$ -cyhalothrin (사분위 치사 농도)에 비해 산란총 비율, 산란전기간, 산란후기간, 부화율, 수명에서 차이를 보이지 않았으며 9일 산란 수에서만 물 처리구에 비해 통계적으로 낮은 수치를 기록하여 대체로 참멋애꽃노린재에 대해 영향이 적은 것으로 밝혀졌다[표1-22].

[표1-22] 화학농약 사용에 따른 참멋애꽃노린재의 산란수와 수명에 미치는 영향

Treatment	Rate of oviposition	Pre-oviposition period (± SE, d)	Post-oviposition period (± SE, d)	9-day fecundity (± SE, d)	9-day hatching rate	Longevity (± SE, d)
Water	0.90 (18/20)	2.05±0.26a	6.27±0.36a	29.77±2.44a	0.78 (420/536)a	11.05±1.00a
λ-cyhalothrin (LC <sub>25</sub> )	1.00 (20/20)	2.65±0.31a	5.35±0.47a	17.80±2.06b	0.75 (276/356)a	10.15±1.05a
Spirotetramat	0.80 (16/20)	2.87±0.41a	5.62±0.43a	19.25±2.55b	0.76 (232/306)a	11.37±1.11a
Spiromesifen	0.85 (17/20)	2.70±0.34a	5.64±0.40a	16.35±2.60b	0.77 (214/278)a	10.76±1.12a
F/χ <sup>2</sup>		1.13	0.88	6.68	1.55	0.24
df		3, 67	3, 67	3, 67	3	3, 67
P		0.345	0.456	<0.001	0.671	0.866

㉠ 천적에 대한 독성등급 목록화

대상 천적인 *Orius*속에 대한 살충제 독성평가 문헌을 SCOPUS 데이터베이스를 이용해서 수집한 후 분석하였음. *Orius*, Coccinellidae와 Toxicity라는 키워드를 이용해서 검색하여 Coccinellidae 검색에서는 18개, *Orius* 검색에서는 33개 논문의 목록을 얻었고, 그 중 직접적으로 무관한 논문 5건을 제외하고 나머지 28건에 대해 분석 및 요약하였음[그림1-58].



[그림1-58] *Orius*속에 대한 살충제 독성평가 문헌 조사

국내외 자료 분석을 통해 무당벌레과와 애꽃노린재류에 대한 독성 평가 자료를 확보하기 위하여 Coccinellidae와 *Orius*. spp. Toxicity라는 키워드를 SCOPUS 데이터베이스를 이용해서 검색하여 목록을 얻고 분석 및 요약하였음.

Coccinellidae에 대한 독성자료 18건 확인[표1-23]. 그 중 neem이 3건, pyriproxyfen가 2개, thiamethoxam가 2개의 논문에서 안전한 농약으로 보고되었음.

애꽃노린재류(*Orius* spp.)에 대한 독성자료 28건 확인[표1-24]. 그 중 spinosad가 6개의 논문에서 안전한 살충제로 분류됨. 다음으로 tebufenozide가 3개, chlorantraniliprole가 2개, imidacloprid가 2개, pyriproxyfen이 2개의 논문에서 안전한 농약으로 보고되었다. 하지만 참멋애꽃노린재에 대한 독성평가 보고는 없었음.

[표1-23] Coccinellidae에 대한 독성자료 조사

Year, Author s	Title	Source title	Species tested	Assay method	Test results
2018, Aqsa et al.	Effect of insecticides on <i>Coccinella septempunctata</i> , A review	Asian J Agri & Biol. 6(1); 125-134	<i>Coccinella septempunctata</i>	lab	<p><u>Not toxic</u>: dimethoate, pyriproxyfen, neemix</p> <p><u>Moderate toxic</u>: imidacloprid, hexaflumuron, deltamethrin, lambada-cyhalothrin, spinosad, bifenthrin, acetamiprid</p> <p><u>Toxic</u>: fenazaquin, quinalphos</p>
2017, Lee, et al.	Toxicity of Pesticides to Mycophagous Ladybrid, <i>Illeis koebelei</i> Timberlake	Kor. J. Pestic. Sci. 21(4); 364-372	<i>Illeis koebelei</i>	lab	<p><u>Not toxic</u>: thiamethoxam, spinetoram, bistrifluron, novaluron, pyriproxyfen, spiromesifen</p> <p><u>Moderate toxic</u>: emamectin benzoate, clothianidin, dinotefuran</p> <p><u>Toxic</u>: bifenthrin+imidacloprid, deltamethrin,gamma-cyhalothrin, acetamiprid+indoxacarb, acetamiprid+etofenprox, acetamiprid, pyridaben</p>
2017, Mughal et al.	In vitro comparative toxicity of different insecticides against adults of seven spotted beetle, <i>Coccinella septempunctata</i> L.	J. Entomol. & Zoology Studies. 5(6); 498-502	<i>C. septempunctata</i>	lab	<p><u>Moderate toxic</u>: imidacloprid, leufenoron, ememectin benzoate, acetamiprid, spinosad,</p> <p><u>Toxic</u>: indoacarb, chlorpyrifos</p>
2016, Nikolova .Ivelina	Side effects of two plant insecticide in natural enemies of insects in alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> L.) seed production	Acta entomologica serbica. 21; 133-142	<i>C. septempunctata</i>	lab	<p><u>Not toxic</u>: neemazl, pyrethrum,</p> <p><u>Moderate toxic</u>: nurelle</p>

Year, Author s	Title	Source title	Species tested	Assay method	Test results
2016, Fahimeh et al.	Lethal and sublethal effects of spirotetramat and abamectin on predatory beetles ( <i>Menochilus sexmaculatus</i> ) via prey ( <i>Agonoscena pistaciae</i> ) exposure, important for integrated pest management in pistachio orchard	Belg. J. Zool. 146(2); 113-122.	<i>Menochilus sexmaculatus</i>	lab	<u>Toxic:</u> spirotetramat, abamectin
2013, Almasi et al.	Laboratory evaluation of the toxicity of proteus, pymetrozine, deltamethrin, and pirimicarb on lady beetle <i>Hippodamia variegata</i>	J. Plant Protection Research. 53(2); 143-147	<i>Hippodamia variegata</i>	lab.	<u>Not toxic:</u> pirimicarb <u>Moderate toxic:</u> pymetrozine, deltamethrin, <u>Toxic:</u> proteus,
2013, Alvandy et al.	Study on Side Effects of Diazinon and Imidaclopride on <i>Cryptolaemus montrouzieri</i> Mulsant Under Laboratory Conditions in Indirect Method in First and Second Generation (Prey Treated with Insecticide)	J. Entomol. & Zoology studies. 1(5); 78-80	<i>Cryptolaemus montrouzieri</i>	lab.	<u>Moderate toxic:</u> diazinon <u>Toxic:</u> imidacloprid
2012, Mollah et al.	Toxic Effect of Some Insecticides on Predatory Lady Bird Beetles in Country Bean ( <i>Lablab purpureus</i> L.) Field	World J. Zoology. 7(4); 347-350	Coccinellidae	field	<u>Not toxic:</u> fenitrothion, fenvalerate, emamectin benzoate, deltamethrin, curtap, neem oil <u>Moderate toxic:</u> cypermethrin, esfenvalerate,
2012, Seo et al.	Toxicity Evaluation of 'Bt-Plus' on Parasitoid and Predatory Natural Enemies	Kor. J. Appl. Entomol. 51(1); 47-58	<i>Harmonia axyridis</i>	lab.	<u>Not toxic:</u> xn+bt, ptt+bt, tm+bt
2012, Thomson	Pesticide impacts on beneficial species	Australian Government. 7pp	Coccinellidae	lab.	<u>Not toxic:</u> bacillus thuringiensis, paraffinic oil <u>Moderate toxic:</u> sulphur 3,000-4,000 g ac/ha <u>Toxic:</u> sulphur 4,000-6,000 g ac/ha, buprofezin, carbaryl & methomyl, indoxacarb, organophosphates, pyrethroids
2012, Cloyd	Indirect Effects of Pesticides on Natural Enemies	Creative Commons Attribution License. 24pp	Coccinellidae	lab.	<u>Moderate toxic:</u> azadirachtin <u>Toxic:</u> buprofezin

Year, Author s	Title	Source title	Species tested	Assay method	Test results
2012, Khani et al.	Side effects of imidacloprid and abamectin on the mealy bug destroyer <i>Cryptolaemus montrouzieri</i>	Trakia J. Sci. 10(3); 30-35	<i>C. montrouzieri</i>	lab.	<u>Not toxic:</u> imidacloprid, abamectine
2011, Ahmad et al.	Toxicity of Some Commonly Used Insecticides Against <i>Coccinella undecimpunctata</i>	Pakistan J. Zool. 43(6); 1161-1165.	Coccinellidae	lab(residual film, leaf dip)	<u>Moderate toxic:</u> imidacloprid <u>Toxic:</u> acetamiprid, cypermethrin, deltamethrin, profenofos
2005, IOBC	IOBCwprs Working Group "Pesticides & Beneficial Organisms & IOBCwprs Commission "IP Guidelines and Endorsement"	Pesticide Database	Coccinellidae	lab.	<u>Not toxic:</u> abamectin, azadirachtine, clofentezine, diafenthiuron, etc. <u>Moderate toxic:</u> spiroticlofen, tetradifon, sulphur, etc. <u>Toxic:</u> amitraz, fenitrothion, fenpyroximate, dichlofluanid, triazophos, chinomethionat, etc.
2003, Youn et al.	Toxicity of greenhouse pesticides to multicolored Asian lady beetles, <i>Harmonia axyridis</i>	Biological Control. 28 164-170	<i>H. axyridis</i>	greenhouse	<u>Not toxic:</u> etofenprox, imidacloprid, thiamethoxam, fenazaquin, tebufenpyrad, dichlofluanid, fenconazole, procymidone, <u>Moderate toxic:</u> abamectin, chlorfenapyr, <u>Toxic:</u> acetamiprid, pyrazophos,
2000, Smith & Krischik	Effects of Biorational Pesticides on Four Coccinellid Species having Potential as Biological Control Agents in Interiorscapes	J. Econ. Entomol. 93(3); 732-736	Coccinellidae	lab.	<u>Moderate toxic:</u> carbaryl, horticultural oil, azatin <u>Toxic:</u> botaniGard
2001, Walton & Pringle	Effects of Pesticides and Fungicides Used on Grapevines on the Mealybug Predatory Beetle <i>Nephus 'boschianus'</i>	S. Afr. J. Enol. Vitic. 22(2); 107-110	Coccinellidae	lab.	<u>Not toxic:</u> penconazole, fosetyl-al, mancozeb, insecticidal soap <u>Toxic:</u> chlorpyrifos, endosulfan, cypermethrin, chlorfenapyr, mercaptothion
1999, Kim et al.	Selective toxicity of aphicides to the predator <i>Harmonia axyridis</i> and <i>Myzus persicae</i>	Kor. J. Pesticide Science. 3(1); 84-89	<i>H. axyridis</i>	lab.	<u>Not toxic:</u> primicarb, fenvalerate, imidacloprid, endosulfan <u>Moderate toxic:</u> endosulfan, fenvalerate <u>Toxic:</u> acephate, fenthion, chlorpyrifos-methyl, demeton s-methyl, methidathion, phosphamidon, benfuracarb, furathiocarb, methomyl, bifenthrin, deltamethrin, lambda cyhalothrin, acetamiprid

[표1-24] 애꽃노린재류(*Orius spp.*)에 대한 독성자료 조사

Year, Author s	Title	Source title	<i>Orius</i> species tested	Assay method	Test results
2017, Barbosa et al.	Toxicity of three aphicides to the generalist predators <i>Chrysoperla carnea</i> (Neuroptera: Chrysopidae) and <i>Orius insidiosus</i>	Ecotoxicology 26: 589-599	<i>insidiosus</i>	lab. feeding and residue on sunflower stem	<b>Not toxic:</b> flonicamid, sulfoxaflor, flupyradifurone
2017, Camargo et al.	Thiamethoxam toxicity and effects on consumption behavior in <i>Orius insidiosus</i> on soybean	Environ. Entomol. 46: 693-699	<i>insidiosus</i>	field seed-treatment	-
2016, Kosari & Fazeli-Dinan	Residual effects of four pesticides on the predatory bug, <i>Orius albidipennis</i> Reut.	Arch. Phytopathol. Plant Protect. 49: 252-261	<i>albidipennis</i>	lab. residue on cucumber	-
2015, Kim et al.	Fumigant toxicity of basil oil compounds and related compounds to <i>Thrips palmi</i> and <i>Orius strigicollis</i>	Pest Manag. Sci. 71: 1292-1296	<i>strigicollis</i>	lab. fumigation	<b>Not toxic:</b> basil oil compounds
2015, Gontijo et al.	Non-target effects of two sunflower seed treatments on <i>Orius insidiosus</i>	Pest Manag. Sci. 71: 515-522	<i>insidiosus</i>	lab. seed-treatment	<b>Not toxic:</b> chlorantraniliprole
2014, Broughton et al.	Effect of new and old pesticides on <i>Orius armatus</i> (Gross)-an Australian predator of western flower thrips, <i>Frankliniella occidentalis</i> (Pergande)	Pest Manag. Sci. 70: 389-397	<i>armatus</i>	lab. residue	<b>Moderate toxic:</b> spinosad, spinetoram, pymetrozine <b>Not toxic:</b> pirimicarb, chlorantraniliprole, imidacloprid, spirotetramat
2013, Moscardini et al.	Toxicity and sublethal effects of seven insecticides to eggs of the flower bug <i>Orius insidiosus</i>	Chemosphere 92: 490-496	<i>insidiosus</i>	life table study	<b>Moderate toxic:</b> pymetrozine <b>Not toxic:</b> pyriproxyfen, rynaxypyr
2012, Amor et al.	Selectivity of diacylhydrazine insecticides to the predatory bug <i>Orius laevigatus</i> . In vivo and modelling/docking experiments	Pest Manag. Sci. 68: 1586-1594	<i>laevigatus</i>	lab.	<b>Not toxic:</b> tebufenozide, methoxyfenozide
2012, Biondi et al.	Using organic-certified rather than synthetic pesticides may not be safer for biological control agents: Selectivity and side effects of 14 pesticides on the predator <i>Orius laevigatus</i>	Chemosphere 87: 803-812	<i>laevigatus</i>	lab. residue on tomato sprout	<b>Moderate toxic:</b> spinosad, emamectin, metaflumizone
2009, Dağlı & Bahşi	Topical and residual toxicity of six pesticides to <i>Orius majusculus</i>	Phytoparasitica 37: 399-405	<i>majusculus</i>	lab. topical, residue, & systemic uptake	<b>Not toxic:</b> Fungicides (benomyl, copper salts + mancozeb)

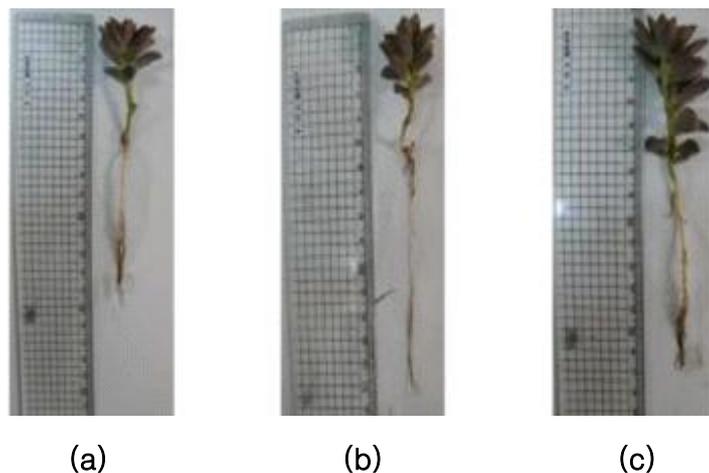
Year, Authors	Title	Source title	<i>Orius</i> species tested	Assay method	Test results
2009, Bielza et al.	Testing for non-target effects of spiromesifen on <i>Eretmocerus mundus</i> and <i>Orius laevigatus</i> under greenhouse conditions	BioControl 54: 229-236	<i>laevigatus</i>	lab. and greenhouse	<b>Not toxic:</b> spiromesifen
2007, Torres et al.	Selectivity of insecticides to <i>Orius insidiosus</i>	Bragantia 66: 433-439	<i>insidiosus</i>	lab. dipping oviposited stem and direct spray on nymph	<b>Moderate toxic:</b> endosulfan, formetanate, spinosad
2006, Yi et al.	Fumigant toxicity of plant essential oils to <i>Thrips palmi</i> (Thysanoptera: Thripidae) and <i>Orius strigicollis</i>	J. Econ. Entomol. 99: 1733-1738	<i>strigicollis</i>	lab. vapor phase toxicity assay	<b>Moderate toxic:</b> 13 essential oils
2006a, Rocha et al.	Pesticide toxicity to adults of <i>Orius insidiosus</i> (Say) (Hemiptera: Anthocoridae)	Bragantia 65: 309-315	<i>insidiosus</i>	lab. direct spray	<b>Not toxic:</b> Fungicides (azoxystrobin, benomyl, imibenconazole, iprodione, metalaxyl + mancozeb, triforine)
2006, Bostanian & Akalach	The effect of indoxacarb and five other insecticides on <i>Phytoseiulus persimilis</i> , <i>Amblyseius fallacis</i> and nymphs of <i>Orius insidiosus</i>	Pest Manag. Sci. 62: 334-339	<i>insidiosus</i>	-	<b>Not toxic:</b> Indoxacarb
2006, Ashley et al.	Toxicity of three acaricides to <i>Tetranychus urticae</i> (Tetranychidae: Acari) and <i>Orius insidiosus</i>	J. Econ. Entomol. 99: 54-59	<i>insidiosus</i>	lab. direct spray and residue	-
2006b, Rocha et al.	Toxicity of pesticides used in chrysanthemum crops to eggs and nymphs of <i>Orius insidiosus</i> (Say) (Hemiptera: Anthocoridae)	Neotrop. Entomol. 35: 83-92	<i>insidiosus</i>	lab. dipping oviposited stem and direct spray on nymph	<b>Not toxic:</b> azoxystrobin, benomyl, imibenconazole, iprodione, metalaxyl + mancozeb, triforine
2005, de Carvalho et al.	Selectivity of insecticides to eggs and nymphs of <i>Orius insidiosus</i>	Neotrop. Entomol. 34: 423-427	<i>insidiosus</i>	lab. direct spray	<b>Not toxic:</b> cartap, cyromazine
2005, Angeli et al.	Side-effects of pesticides on the predatory bug <i>Orius laevigatus</i> (Heteroptera: Anthocoridae) in the laboratory	Biocon. Sci. Technol. 15: 745-754	<i>laevigatus</i>	lab. residue on petri dish and ingestion of contaminated food	<b>Moderate toxic:</b> Buprofezin, teflubenzuron, Imidacloprid (ingestion), diflubenzuron (ingestion), Indoxacarb, methoxyfenozide <b>Not toxic:</b> triflumuron, diflubenzuron

Year, Author s	Title	Source title	<i>Orius</i> specie s tested	Assay method	Test results
2004, Bostanian & Akalach	The contact toxicity of indoxacarb and five other insecticides to <i>Orius insidiosus</i> and <i>Aphidius colemani</i> , beneficials used in the greenhouse industry	Pest Manag. Sci. 60: 1231-1236	<i>insidiosus</i>	-	<b>Not toxic:</b> s-kinoprene
2003, Stuebaker & Kring	Effects of insecticides on <i>Orius insidiosus</i> (Hemiptera: Anthocoridae), measured by field, greenhouse and petri dish bioassays	Fla. Entomol. 86: 178-185	<i>insidiosus</i>	lab. petri dish and field cotton plant	<b>Moderate toxic:</b> imidacloprid (field), indoxacarb (field) <b>Not toxic:</b> spinosad (field)
2001, Elzen	Lethal and sublethal effects of insecticide residues on <i>Orius insidiosus</i> and <i>Geocoris punctipes</i>	J. Econ. Entomol. 94: 55-59	<i>insidiosus</i>	-	<b>Not toxic:</b> imidacloprid, tebufenozide, azinphos-methyl, spinosad
2000, Elzen	Laboratory toxicity of insecticide residues to <i>Orius insidiosus</i> and <i>Geocoris punctipes</i>	Proc. Cotton Confer. 2: 1345-1348	<i>insidiosus</i>	-	<b>Not toxic:</b> spinosad
1999, Stuebaker & Kring	Lethal and sub-lethal effects of selected insecticides on <i>Orius insidiosus</i>	Proc. Beltwide Cotton Confer. p. 1204	<i>insidiosus</i>	-	<b>Not toxic:</b> spinosad
1999, Pietrantoni o & Benedict	Effect of new cotton insecticide chemistries, tebufenozide, spinosad and chlorfenapyr, on <i>Orius insidiosus</i> and two <i>Cotesia</i> species	Southwest. Entomol. 24: 21-29	<i>insidiosus</i>	lab. residue on leave	<b>Moderate toxic:</b> chlorfenapyr <b>Not toxic:</b> tebufenozide, spinosad
1998, Elzen et al.	Laboratory toxicity of insecticide residues to <i>Orius insidiosus</i> , <i>Geocoris punctipes</i> , <i>Hippodamia convergens</i> , and <i>Chrysoperla carnea</i>	Southwest. Entomol. 23: 335-342	<i>insidiosus</i>	-	<b>Not toxic:</b> spinosad
1997, Delbeke et al.	Toxicity of diflubenzuron, pyriproxyfen, imidacloprid and diafenthiuron to the predatory bug <i>Orius laevigatus</i>	Entomophaga 42: 349-358	<i>laevigatus</i>	lab. residue and ingestion	<b>Not toxic:</b> pyriproxyfen, diafenthiuron (ingestion)
1990, Nagai	Effect of insecticides on <i>Orius</i> sp., the natural enemy of <i>Thrips palmi</i> Karny	Jap. J. Appl. Entomol. Zool. 34: 321-324	-	-	<b>Moderate toxic:</b> Oxythioquinox, dichlorvos, pirimicarb <b>Not toxic:</b> buprofezin, phenisobromolate

㉔ 참멋애꽃노린재 천적방사키트 제품출시

일반 식물포트의 경우 고온조건에서 토양 내 수분이 2일내 증발하여 식재된 식물에서 천적의 건전한 증식이 이루어지지 못하였는 문제점이 발생 이에 뿌리성장 및 토양수분을 지속시키는 방사키트 전용 배지를 선별하기 위하여 버섯폐배지(Spent mushroom substrates; SMS)와 고흡수성폴리머(Superabsorbent polymer; SAP)를 활용하였으며, SMS는 느타리버섯 종균을 음식폐기물 퇴비에 접종하여 15일간 배양시킨 후 분쇄기를 이용하여 파쇄한 후 20 mesh 체를 이용하여 음식물폐기물의 이물질을 제거하여 제작하였고, SAP는 시판품인 K-SM 아크릴아마이드계 powder타입을 사용하여 *sedum anacamseros*의 발근력을 측정하였음. 대조구로 펄라이트와 세라소일, 실험구로 SMS와 SAP로 구성된 배양토를 10 × 5 cm (50공)인 트레이에 각각 채운 후 15일 동안 1회 500 ml 관수한 후 뿌리 성장을 확인하였음. 또한 다육식물의 생육에 미치는 효과를 확인하기 위하여 다년생 초본류인 치커리(*Cichorium intybus*)를 상기와 같이 파종한 후 60일 동안 3회에 걸쳐 총 1,500 ml 급수하여 치커리 초장, 엽수와 생체중을 측정하였음.

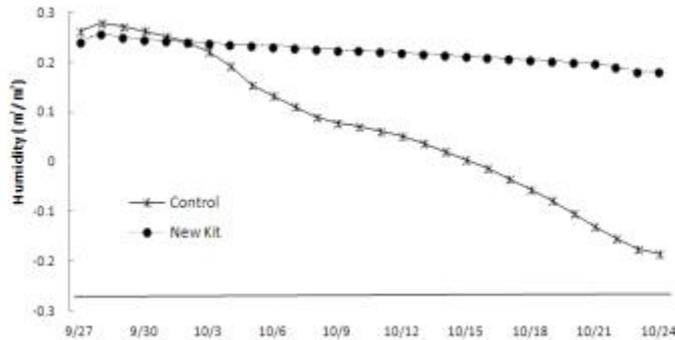
방사키트 전용 배지를 선별하기 위하여, SMS와 SAP를 첨가했을 때 *Sedum anacampseros*의 뿌리성장을 비교한 결과, 배양토 단독으로 재배한 경우 뿌리 길이 생장은 83 mm이었으나, SMS에 SAP 0.5%첨가의 경우 뿌리 길이 104 mm, SMS에 SAP 1% 첨가한 경우 뿌리 길이 92 mm로 SAP를 첨가한 토양에서 10 ~ 25%정도 뿌리 성장이 우수하였음을 확인하였음(Fig. 2-4-8).



[그림1-59] 방사키트 전용배지의 종류에 따른 뿌리성장 효과 분석 ((a) culture soil; (b) spent mushroom substrates (SMS) + superabsorbent polymer (SAP) (0.5%); (c) SMS + SAP (1%))

상기 결과를 바탕으로 새롭게 개발된 천적방사키트에 일반 상토 대신 SMS와 SAP를 첨가한 다면 기주식물의 뿌리성장을 도울 것으로 사료됨.

상기 실험결과로 선발된 배지의 수분 함량 유지를 일반 식물포트와 비교한 결과, 측정 19일째 신규 배지 대비 일반포트 내의 수분함량이 98.2% 감소된 것을 확인할 수 있었으며 신규키트 토양 내 수분함량이 30일 이상 유지되는 것을 확인함으로써 신규키트의 야외 적용 가능성을 확인할 수 있었다[그림1-60].



[그림1-60] 기존 상토와 신규배지의 수분 보유량 비교

상기와 같은 연구결과를 바탕으로 참땃애꽃노린재 적용에 있어서 천적유지식물을 포함하게 되는 제품을 출시하게 되었음[표1-25].

신규 출시한 제품은 먹이 해충의 밀도가 낮은 경우에도 천적의 지속적인 유지가 가능할 뿐만 아니라 농가에서 천적유지식물을 관리하는 어려움이 없는 조건으로 쉽게 천적을 적용하고 활용할 수 있는 기능을 가지고 있어 천적 활용 및 보급에 효과가 클 것으로 판단됨.

[표1-25] 신규 제품출시된 참땃애꽃노린재 미니뱅크

제품명	제품사진	제품용도	제품 출시일	해당 기술의 제품출시 기여율(%)
참땃애꽃노린재 미니뱅크		총채벌레, 온실가루이, 진딧물 등 난방제 해충에 대한 포식성 천적인 참땃애꽃노린재의 포장내 유지관리 및 지속적인 방제 효과달성을 위한 먹이식물과 천적을 혼합한 제품	2022년 10월 3일	60%

## 6) 동애등에를 활용한 항균/항생펩티드 대량 생산 기술 확립 및 제품화

### 가) 농산폐기물을 활용한 동애등에의 대량생산 및 항균/항생 펩티드 과 발현 기술 개발

#### ① 한약재 부산물을 활용한 동애등에 대량생산 및 항균/항생 펩타이드 과 발현 공정 실험

한약재 부산물은 한약방과 한방식품 제조에서 각종 한약과 약제식품을 중탕한 후 발생하는 불용성 물질로 식물성 및 동물성 약제가 혼합되어 100~120℃ 정도에서 24~72시간 중탕 가공한 혼합물을 압착, 추출하고 남은 잔여물로 배출되는 폐기물의 양은 연간 10,000톤 이상일 것으로 추정되고 있으며, 전국의 한의원에서만 매일 최소 30~50톤이 배출될 것이라고 추정하고 있으며, 이렇게 배출되는 한약재 부산물은 일부 사료나 퇴비로 이용되거나 버섯 배지의 원료로 이용되는 것 외에는 대부분이 폐기처분되어 지고 있으나, 한약재 부산물에는 폴리페놀 함량, 플라보노이드 함량, 항산화 활성이 높아 곤충의 사료로서 활용하여 농산폐기물 자원의 활용 및 원가 절감형 사료로서 가능성이 있다고 할 수 있음.

자사의 선행연구결과를 적용하여 기존에 사용되는 동애등에 사료(남은 음식물 부산물)를 사용하지 않고 한약재 부산물과 배양된 목재부후균을 배합하여 안전성(중금속 및 유해물질 제거)이 확립되고 기존의 사육비용 대비 75% 절감이 가능한 대체사료로 개발 및 제작하였음.



[그림1-61] 한약재 부산물을 활용한 동애등에 유충 인공먹이 대량 배양

탕제원에서 보양을 위해 흔하게 사용되는 십전대보탕, 쌍화탕의 주원료인 당귀, 감초, 작약, 숙지황, 황기 등의 후보 한약재를 120℃ 1.2기압에서 중탕을 실시한 후 액상을 제거한 한약재부산물을 70℃에서 12시간 건조 후 50mesh의 핀밀 분쇄기를 사용하여 미세분말 형태로 파쇄 공정을 실시하여 재료를 준비하였음. 한약재 부산물의 발효 조건을 위해 EM발효균과 목재부후균으로 선별된 느타리버섯 종균을 활용하여 파쇄 공정을 거친 한약재부산물의 발효공정을 실시하였음.

EM발효균을 활용하여 발효시킨 한약재 부산물, 미발효시킨 한약재 부산물의 영양성분을 비교한 결과 조섬유를 제외한 조단백, 조지방, 조회분 등에서 미발효, 발효조건 한약재부산물 모두에서 높게 나타났으며, 특히 조단백질의 함량이 매우 높게 나타났음.

[표1-26] 한약재 부산물의 발효에 따른 영양성분 비교

구분	조단백질	조섬유	조지방	조회분
미발효 한약재부산물	11.08%	20.78%	6.12%	3.41%
EM균 발효 한약재부산물	18.47%	24.55%	3.55%	10.06%

이는 단백질의 경우 곤충의 성장과 생체중 증가에 영향을 준다는 기존 보고와 같이 한약재 부산물의 급이에 따라 동애등에 유충의 성장에 있어서 생체중의 증가와 성장기간 단축에 효과가 있을 것으로 판단되며, 또한 한약재 부산물의 발효와 미발효 조건을 비교한 결과 발효 한약재 부산물의 경우 조지방을 제외하고 조단백과 조섬유, 조회분 등이 증가하는 것으로 나타났으며 이는 발효 미생물의 성장에 따라 단백질의 함량 및 조섬유, 조회분의 증가로 판단되며 동애등에 유충의 경우 부숙된 유기물을 먹이로 이용하는 습성이 있어 발효조건에 따른 성장에 큰 영향을 줄 것으로 판단됨.

[표1-27] 한약재 부산물의 급이 조건에 따른 동애등에 유충의 성장 비교

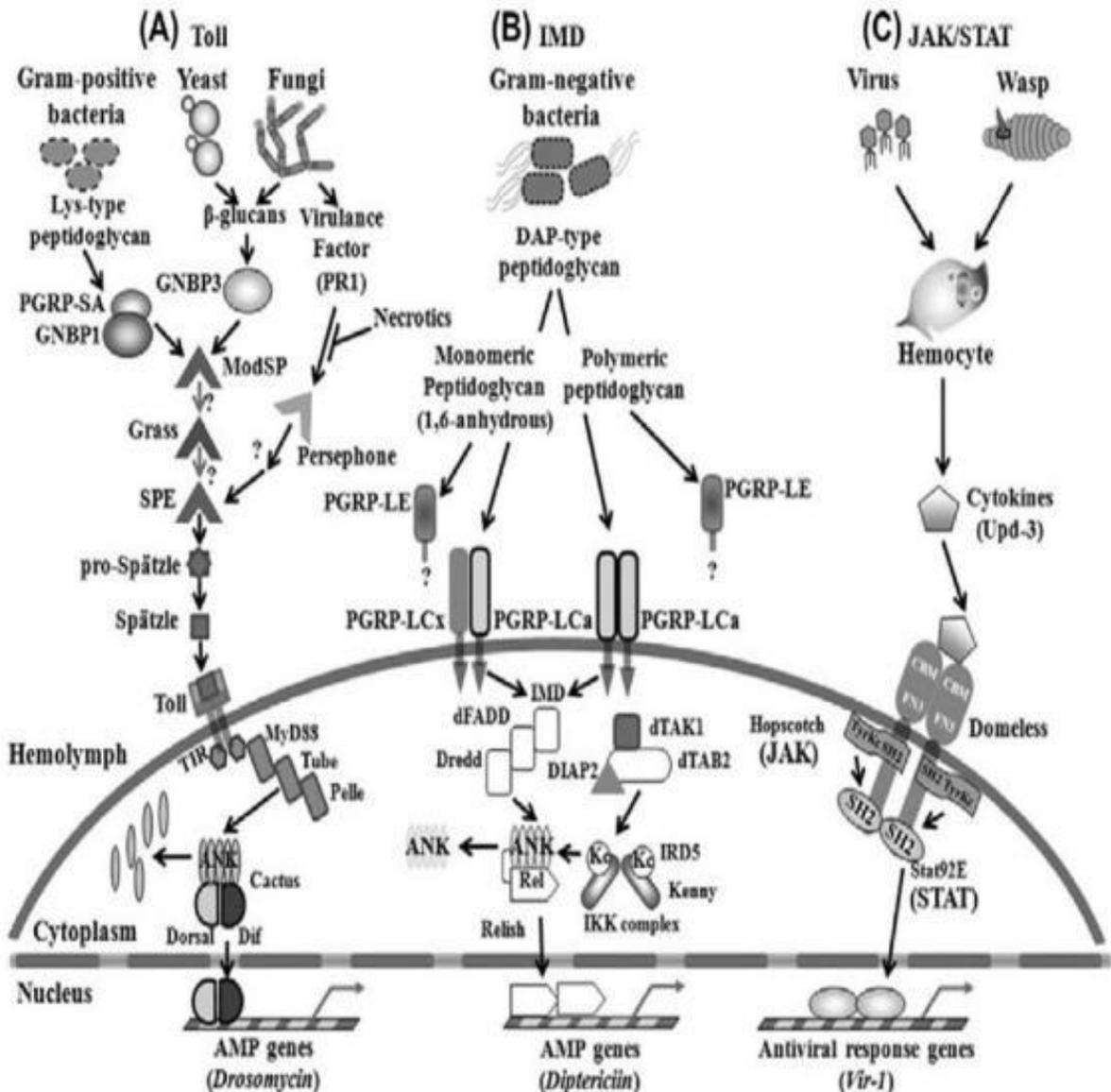
구분	Size(mm)		Emergence rate (%)
	larvae	pupa	
유기물사료 100%	17.9±1.6	17.2±1.3	81.1
유기물사료 80% + 한약재 부산물 20%	18.2±1.6	18.2±1.3	82.5
유기물사료 60% + 한약재 부산물 40%	19.2±1.2	19.1±1.1	76.3
유기물사료 40% + 한약재 부산물 60%	20.7±1.1	19.2±1.1	86.9
유기물사료 20% + 한약재 부산물 80%	17.3±1.4	16.6±1.4	81.1
한약재 부산물 100%	17.8±1.5	17.1±1.4	53.2

동애등에 유충의 한약재 부산물 급여량에 따른 유충의 성장 효과 및 우화율을 조사한 결과 기존 유기물사료(남은 음식물 부산물) 40% + 한약재 부산물 60%를 첨가한 사육구에서 유충 사이즈는 20.7±1.1mm, 번데기 사이즈는 19.2±1.1mm로 가장 우수한 것으로 나타났으며 성충으로 우화하는 비율도 86.9%로 가장 높게 나타났음. 이는 유기물사료로 활용되는 남은 음식물 부산물의 염분 농도드에 원인으로 판단되며 한약재 부산물의 경우 염분의 농도를 제어해주고 또한, 발효를 통해 동애등에 유충이 섭식하는데 있어서 소화 흡수율이 높아 성장에 있어서 효과가 높은 것으로 판단됨.

② 동애등에 유충의 항균펩타이드 과 발현 기술

곤충들의 life cycle이 유충시기에 땅속에서 생활하거나 유충과 성충시기를 땅속에서만 생활하는 곤충은 항상 다양한 미생물에 노출되어 살아갈 것이며 여러 세대를 지내오면서 면역체계가 잘 발달되어 있음.

곤충은 인간과 같이 항원/항체반응에 의존하는 면역체계와는 다른 system을 가지고 있어 항원/항체반응에 의존하는 면역체계가 아닐지라도 미생물 침입시 수많은 유전자들의 복잡한 signaling pathway를 가동 시켜 미생물과 대항하도록 되어있으며, 외부 침입 병원균에 대한 최종적으로 다양한 종류의 항생/항균/항바이러스 펩티드가 발현되는 구조를 가지고 있으며, 현재 까지 곤충에서 아래 그림과 같이 3가지 주요 유전자 pathway가 미생물 침입시 작동되는 것으로 보고되고 있음.



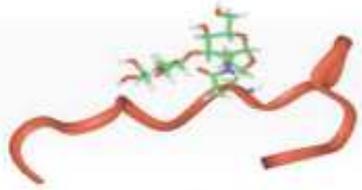
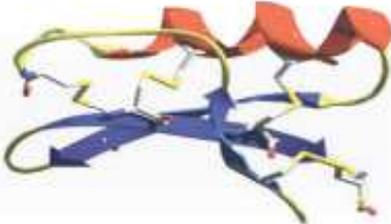
[그림1-62] 곤충 체내에 병원성 미생물 침입시 signaling pathway.

곤충에서 미생물 침입시 가장 최종적으로 발현되어 미생물과 직접 체내에서 대항하는 단백질들을 Anti-microbial peptides라 하며, 처음 개구리의 피부에서 발견된 이래로 20년간 다양한 종류의 항생/항균/항바이러스성 펩티드가 곤충을 비롯하여 여러 생물에서 발견되고 있음.

대부분의 곤충에서 발견되는 항균 펩티드들은 발현되는 시기에 따라 2종류로 구분될 수 있으며, 병원성 미생물이 침입시에만 곤충의 몸에서 발현되는 것과 항시 어느 정도 발현하여 병원성 미생물에 대항하는 종류로 구분됨.

현재까지 곤충과 식물에서 발굴된 펩티드는 약 250종인데 곤충과 식물의 종 수 또는 한 종이 여러 종류의 펩티드를 가지고 있는 것으로 보아 앞으로 연구 개발되어야 할 수는 무궁무진하다고 판단됨.

다양한 병원성 미생물에 대항하는 곤충유래 항생/항균/항바이러스 단백질은 현재 초파리 (*Drosophila Melanogaster*)를 대상으로 많은 연구가 진행되고 있음.

Peptides	# of genes	Main activity	Concentration	3-D structure
Diptericin	2	Gram-negative bacteria	0.5 $\mu$ M	nd
Attacin	4	Gram-negative bacteria	nd	nd
Drosocin	1	Gram-negative bacteria	40 $\mu$ M	
Cecropin	4	Gram-negative bacteria	20 $\mu$ M	
Defensin	1	Gram-positive bacteria	1 $\mu$ M	
Drosomycin	7	Fungi	100 $\mu$ M	
Metchnikowin	1	Fungi	10 $\mu$ M	nd

[그림1-63] 초파리에서 발견되는 항생/항균/항바이러스 펩티드의 활성농도 및 펩티드 3차구조

미생물 침입시 항생/항균/항바이러스 단백질들은 곤충이 병원성 미생물에게 감염시 곤충의 fatbody(척추동물에서 간에 해당)에서 빠르게 합성되어(유전자 발현) 피속으로 퍼져 미생물에게 대항하는 기작을 갖고 있으며 현재 알려진 단백질들의 기작으로는 병원성 미생물의 세포막과 binding하여 구멍을 형성, 세포막의 투과성을 증가시켜 ATP합성을 저해하여 병원성 미생물들을 치사케 하거나 미생물 세포막의 투과성에 영향을 주는 단백질들의 합성을 막아 치사케 하는 것으로 알려져 있음.

현재까지 곤충에서 알려진 항생/항균/항바이러스 단백질 중 Cecropin 계통이 가장 많이 알려진 단백질로서 약 60종에서 아미노산 서열이 밝혀져 있는 상태이고 많은 수의 단백질 아미노산 서열이 특허로 지정되어 있는 상태이며, Cecropin의 경우 Gram-negative bacteria들과 일부 식물성 fungi 병원균에 대해 효과 가 있는 것으로 알려져 있고 나비목, 파리목, 모기목 등에서 발견되고 보고되고 있음.

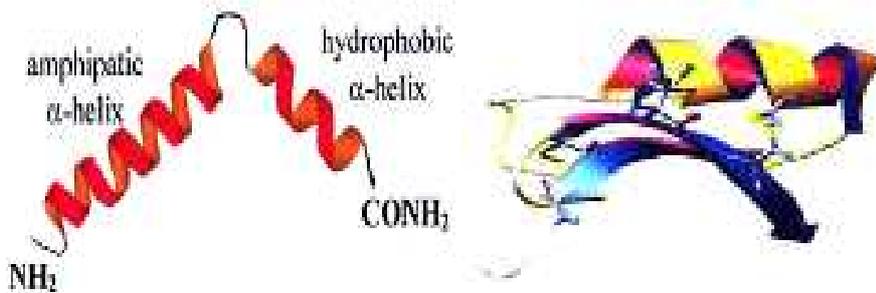
[표1-28] 다양한 곤충에서 발견되는 cecropin 종류 및 아미노산 서열

Insect Species	AMP(cecropin 계통)	중요 아미노산서열
<i>Hyalophora cecropia</i>	Cecropin A	KWKLFEKIEKVGQNRDGIKAGPAVAVVGGATQIAK
<i>Sarcophaga peregrina</i>	Sarcotoxin IA	GWLEKIGKKIERVGGHTRDATIQGLGIAQQAANVAATAR
<i>Drosophila melanogaster</i>	Cecropin A	GWLEKIGKKIERVGGHTRDATIQGLGIAQQAANVAATAR
<i>Aedes aegypti</i>	Cecropin A	GGLKELGKKELEGAGKRVFNAAEKALPVVAGAKALRE
<i>Aedes albopictus</i>	Cecropin A1	GGLKELGKKELEGVGERVFEASEEKALPVAVGKALGE
<i>Anopheles gambiae</i>	Cecropin A	GRLEKLGKKEIEGAGKRVFRAAEKALPVVAGVKAL
<i>Bombyx mori</i>	Cecropin D	GNFFEDLEKMGQRVRDAVISAAPAVDTLAKAKALGQ
<i>Pachycandylus goeltzi</i>	Ponericin G2	GWKDWLKEGKEWLEKAEKPGIVKAALQAATQ
<i>Cerratitis capitata</i>	Ceratotoxin	SIGSAFKEALPVAKKIGKAALPIAKAALP
<i>Stomoxys calcitrans</i>	Stomoxyn	RGFRKHFNKLVEKVEHTISETAHVAKDTAVIAGSGAAVVAAT

또한, Defencin의 경우 파리목, 나비목, 딱정벌레목, 노린재목 등에서 약 60종이 발견되었고 그들 아미노산의 sequence는 발견된 곤충마다 약 25%정도의 차이를 보이고 있으며 Defencin의 경우 bacteria들과 fungi 병원균에 대해 항균효과가 있는 것으로 알려져 있음.

[표1-29] 다양한 곤충에서 발견되는 defencin 종류 및 아미노산 서열

Insect Species	AMP (defencin 계통)	중요 아미노산 서열
<i>Podisus maculiventris</i>	Thanatin	GSKEPVPIIFCNRRTGECQRM
<i>Sarcophaga peregrina</i>	Sapecin	ATCDLLSGTGINHSACAAHCLLRGNRGGYCNGEAVCVCRN
<i>Phormia terranova</i>	Defenin A	ATCDLLSGTGINHSACAAHCLLRGNRGGYCNGEGVVCVRN
<i>Stomoxys calcitrans</i>	SmD1	AAKPMGITCDLLSLWKVGHAAACAHLVLDVGGYCTKEGLCVCKE
<i>Galleria mellonella</i>	Gallerimycin	GV TITVKEPPFGCVFTECIANCRSRGYKNGGCTINGCQCLR
<i>Heliothis virescens</i>	Heliofocin	DKLIGSCVWGA VNYTSDCNGECKERRGYEGGHCGSFANVNCWCET
<i>Pseudacanthothermes spinger</i>	Termicin	ACNPFQSCWATCQAQHSIYFRRAFCDRSQCECVFVRG
<i>Apis mellifera</i>	Royalisin	VTCDLLSFEQQVNDGACAAANCLSLGKAGGHCEKVGVCICRRTSFKDLWDERF
<i>Aeschna cyanea</i>	Defensin	GFGCPLDQMQRHRCQTITGRSGGYCSGPLELCTCYR
<i>Drosophila melanogaster</i>	Drosomycin	DCLSGRYEGPCAVWDNETCRRVCKEEGRSSGHCSPLKWCCEGC



[그림1-64] Cecropin과 Defencin의 단백질 3차구조 비교

이러한 항균/항생 펩타이드의 활용은 항생제 대응 약제, 노화관련 스킨케어 제품, 노화억제 관련 의약품 제조 등의 근간을 이루는 중요한 요소의 제품으로 공급할 수 있으며, 한방항노화 관련 산업의 선도적 역할을 수행할 것으로 판단됨.

본 연구에서는 동애등에 유충의 항생/항균 펩타이드의 분리를 위해 머징 조건에 의한 과 발현조건에 대해 연구를 실시하였음.

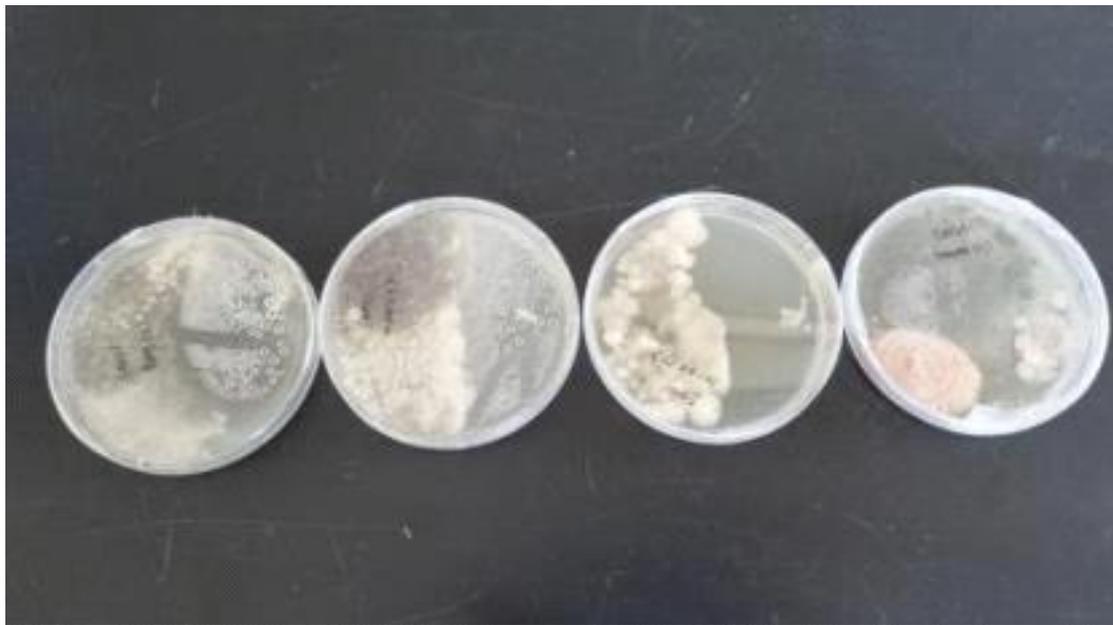
커피박은 사료의 가치로 조단백질과 조지방의 함량이 우수 또한 항산화물질이 풍부하나 다량의 카페인과 탄닌 등의 성분은 사료의 이용에 제한적으로 카페인과 탄닌 등의 성분을 제거할 수 있는 기능적 처리 방법 필요한 것으로 알려져 있음.

이에 본 연구에서는 유기물 사료 40% + 한약재 부산물 60%로 만들어진 사료로 사육중인 동애등

에 유충의 종령 유충에게 커피박을 급이시켜 항생/항균 펩타이드의 발효를 조사하였음.

선발된 동애등에 유충의 면역 시스템 분석 및 항생/항균 단백질 존재 가능성 파악을 위해 사육중인 동애등에 3령 유충 100마리(100g)를 증류수 100ml를 첨가하고 homogenizer를 이용하여 곱게 마쇄한 후 1시간동안 10℃에서 침지시킨 후 상층액을 수거하여 10배씩 증류수에 희석하여 준비하였음.

실험에 사용한 대조군은 PDA배지에서 증식한 *Colletotrichum gloeosporioides*을 접종하였으며, PDA배지의 절반은 동애등에 유충으로부터 분리한 항생/항균 펩타이드의 희석배수별로 평판 도말하였으며 각각의 실험구는 30℃에서 2주간 배양하면서 균에 살균력을 검증하였음.



[그림1-65] 동애등에 항생/항균 펩타이드와 *C. gloeosporioides* 대치 배양

2주간의 균배양 결과 대조구와 비교했을 때 동애등에 유충에서 분리한 항생/항균펩티드 물질의 접종구역은 10배, 100배 희석한 공간에서 항균력이 우수한 것으로 나타났으며 1,000배의 경우 항생력이 많이 약한 것을 확인할 수 있었음.

이러한 결과는 동애등에 유충이 외부적 자극을 통한 항생/항균펩티드의 과 발현 조건에서 더욱 많은 항생/항균펩티드의 발현으로 항균력을 발휘할 수 있을 것으로 판단되며, 이러한 외부적 자극에 대한 실험으로 먹이의 조건과 사육과정에서 곤충 병원성균에 의한 자극 등을 실험을 통해 확인하였음.

1차적으로 동애등에 유충의 항생/항균펩티드 물질에 대한 평판 도말 실험을 통해 확인할 수 있었음. 곤충의 항생/항균펩티드의 경우 외부적 자극과 내부적 자극에 의해 과 발현되는 것으로 보고되고 있으며, 또한 이는 외부자극에 대해 저항성을 크게 갖는 건강한 개체에서 특히 많은 양의 항생/항균 펩티드가 분비된다고 알려져 있음. 이에 본 연구에서는 먹이원별 조건에 따른 항생/항균펩티드의 차이를 분석하기 위해 이전 실험에서 동애등에 유충의 성장이 우수한 먹이원으로 활용되었던 한약재 부산물 먹이에 먹이 자극원의 일환으로 곤충 섭식에 기피 물질로 알려진 카페인, 탄닌 등의 성분이

많은 것으로 알려진 커피박과 산초가공 부산물을 각각 급이하여 가장 우수한 항생/항균펩티드의 과 발현 조건에 대한 분석을 실시하고자 급이 실험을 실시하였음.

급이 조건은 1령부터 2령까지 한약재 부산물을 급이시킨 동애등에 유충을 먹이의 조건을 다르게 하여 3령기간 사육을 실시한 후 각각의 유충에 발현되는 항생/항균펩티드를 평판 도말실험을 통해 효과를 검증하였음.

한약재 부산물을 활용하여 사육중인 동애등에 2령유충 100마리를 각각 커피박, 산초가공 부산물을 기존 사료에 60~80%의 비율로 혼합하여 급이를 실시하였고 각각의 급이 조건에 따른 유충과 번데기의 크기와 우화율을 측정하였음.

[표1-30] 첨가 먹이원의 종류에 따른 동애등에 유충의 성장 및 우화율 비교

구분	Size(mm)		Emergence rate (%)
	larvae	pupa	
혼합사료 100%	20.7±1.1	19.2±1.1	86.9
혼합사료 40% + 커피박 60%	19.2±1.1	19.0±1.2	82.5
혼합사료 20% + 커피박 80%	16.2±1.4	15.1±1.3	76.3
혼합사료 40% + 산초 부산물 60%	20.2±1.4	19.3±1.2	87.9
혼합사료 20% + 산초 부산물 80%	18.3±1.2	17.6±1.2	85.1

각각의 먹이조건별 동애등에 유충의 성장을 비교하였을 때 커피박을 급이한 실험구에서 유충의 성장이 낮게 나타났으며, 성충으로의 우화율 또한 가장 낮은 것으로 확인 되었음. 이는 먹이의 소화율이 급격하게 떨어지는 원인으로 판단되며, 이는 동애등에 유충의 스트레스 원인으로 작용될 것으로 판단됨. 각각의 먹이원별 항균항생 펩티드의 항균활성을 확인하기 위해 먹이원을 달리하여 사육한 동애등에 3령 유충 100마리(100g)를 증류수 100ml를 첨가하고 homogenizer를 이용하여 곱게 마쇄한 후 1시간동안 10℃에서 침지시킨 후 상층액을 수거하여 10배, 100배, 1,000배 증류수에 희석하여 준비하였음.

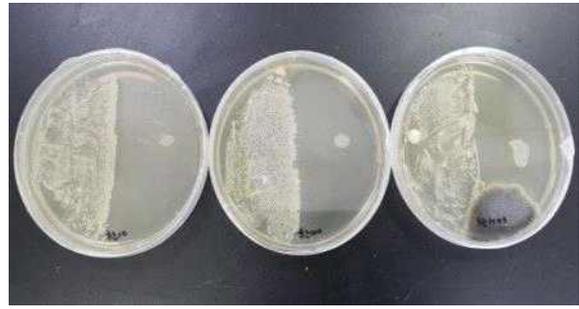
실험에 사용한 대조군은 PDA배지에서 증식한 *Colletotrichum gloeosporioides*을 접종하였으며, PDA배지의 절반은 동애등에 유충으로부터 분리한 항생/항균 펩티드의 희석배수별로 평판 도말하였으며 각각의 실험구는 30℃에서 2주간 배양하면서 균에 살균력을 검증하였음.

각각의 먹이원별 항균/항생 펩타이드의 항균활성을 검토한 결과 실험구 모두 10배, 100배 조건에서 항균활성이 높은 것으로 나타났으나 1,000배 이상 희석한 경우 항균활성이 급격히 감소하여 오염이 발생하는 것을 확인할 수 있었음.

그러나, 커피박의 경우 1,000배에서도 항균활성이 나타나는 것을 확인할 수 있었으며 커피박이 가장 우수한 조건을 나타내는 것으로 확인되어 먹이원에 있어서 자극물질로 카페인의 영향이 아닌가 하는 추측을 할 수 있음.



유기물 사료 급이 (10배, 100배, 1000배)



한약재 부산물 급이 (10배, 100배, 1000배)



커피박 급이 (10배, 100배, 1000배)



산초가공부산물 급이 (10배, 100배, 1000배)

[그림1-66] 먹이원 자극을 통한 항균/항생 펩타이드 발현 실험

나) 동애등에에서 항균/항생 펩티드 대량 추출 기술 개발

곤충의 항균/항생 펩티드는 혈구세포에서 분비되는 물질로 과 발현된 동애등에 유충을 호모게나 이저를 활용하여 분쇄한 후 침강작용을 이용하여 큐티클층과 분리한 후 상청액을 활용하여 살균력을 테스트하고 추출수율을 높이고 이를 통해 기존 살균제와의 경제성 분석을 통해 산업화를 위한 공정을 개발하고 유기농 자재 등록을 위한 기초 자료를 확보하고자 함.



동애등에 유충 washing



동애등에 유충의 수분 건조



호모게나이저를 이용한 마쇄



1차 거름망을 이용한 큐티클 분리

[그림1-67] 동애등에 유충의 항생/항균 펩타이드 분리과정

먹이원별 실험에서 가장 항균/항생효과가 우수한 것으로 나타난 커피박 급이 조건의 동애등에 유충의 항균펩티드의 가공 단계별 항균력을 측정하기 위해 대표적인 식물 병원성 균인 *Colletotrichum gloeosporioides*을 활용하여 항균/항생력을 검증하였음.



동애등에 유충 분쇄액(10배, 100배, 1000배)



동애등에 큐티클층 분리액(10배, 100배, 1000배)



동애등에 유충 상청액(10배, 100배, 1000배)

**[그림1-68] 동애등에 유충 항균/항생 펩타이드의 분리공정에 따른 식물병에 대한 항균 실험**

동애등에 유충의 가공단계별 식물병원성 균에 대해 항균/항생 펩타이드의 항균활성을 검토한 결과 실험구 모두 10배, 100배 조건에서 항균활성이 높은 것으로 나타났으며, 1,000배 희석 조건에서도 항균활성이 있는 것으로 나타났음. 동애등에 유충의 분쇄 후 큐티클 층을 제거한 후 원심분리를 통해 상청액을 수거한 경우 1,000배액에서도 항생력이 높게 나타나는 것을 확인할 수 있어 대량생산 공정에서는 동애등에의 큐티클 층과 이하 물질을 제거하는 공정이 필요하다고 판단됨.

## 2. 곤충유래 항생/항균 펩티드를 활용한 엽채류 세균병 방제 기술 개발

### 가. 연구개발 목표

면역유도 방법을 활용한 항생/항균 펩티드 과발현 기술 개발 및 엽채류 무름병에 대한 살균력 검증 및 곤충 선발

### 나. 연구개발의 내용

#### 1) 곤충 면역기작연구(세포성/체액성 면역반응 연구) 및 저분자 항생/항균 펩티드 발굴

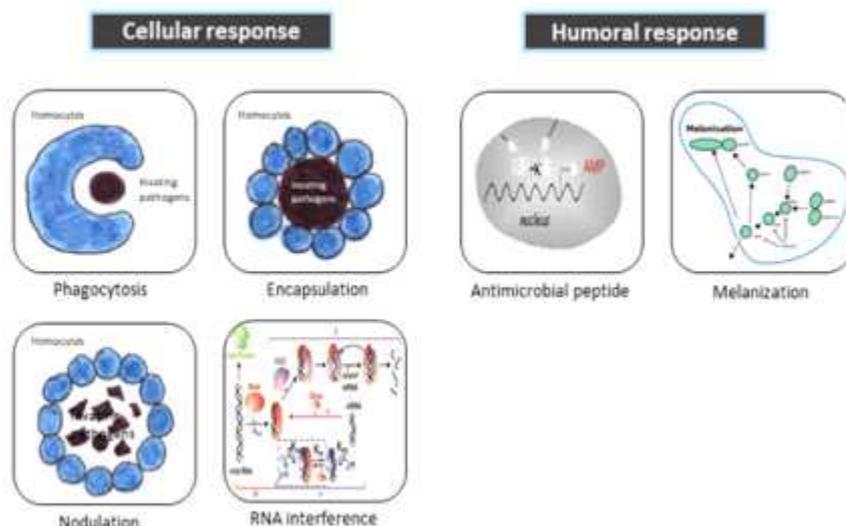
##### 가) 곤충 면역기능 이해

곤충은 세균(Bacteria), 곰팡이(Fungi), 기생자(parasites) 등 병원균 침입 시 포유동물과 같이 활발한 면역반응을 수행함.

그러나, 항원/항체 반응이 주요 면역반응인 포유동물의 획득성 면역(Adaptive Immunity)과 달리 항원/항체 반응은 없는 것으로 알려져 있음.

대신, 생체 내로 침입한 병원균들을 직접 제거하는 선천적 면역반응(Innate Immunity)이 발달되어 있음.

곤충의 선천적 면역반응(Innate Immunity)은 크게 면역 혈구 세포에 의하여 병원균들을 제거하는 세포성 면역반응(Cellular Immune Response)과 다양한 항생/항균 단백질들에 의하여 병원균을 제거하는 체액성 면역반응(Humoral Immune Response)으로 구분되고 있음[그림2-1]. 본 과제의 목표는 다양한 항생/항균 단백질들의 발굴이며 우리는 혈구 세포의 세포성 면역을 면역 활성화 인자로 활용하고 체액성 면역을 통해 발현되는 항생/항균 단백질들을 발굴하는 것을 목표로 함.



[그림2-1] 곤충의 면역체계. 곤충의 선천적 면역(Innate immunity)은 크게 2가지 방법으로 수행되고 있음. A. 체내 침입한 병원균 대상 attacin, cecropin, lysozyme, cellulase, holotricin, defensin, coleopteracin, thaumatin 등 다양한 항생/항균 펩티드들을 발현시켜 대항하는 체액성면역(humoral immune responses). B. 체내 침입한 병원균 대상 다양한 대식 혈구 세포(Phagocytes)들의 활성을 통한 세포성면역(cellular immune response).

## 나) 곤충 항생/항균 단백질 발굴을 위한 곤충 선발

엽채류 무름병 등 다양한 미생물에 대한 가능성이 존재하는 곤충 유래 항생/항균 단백질들의 소스를 발굴하는 것임. 이를 위하여 우리는 실험실 내 사육 가능하며 우리나라에서 산업화 곤충으로 널리 사용되고 있는 쌍별귀뚜라미(*Gryllus bimaculatus*), 동애등에(*Hermetia illucens*), 흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis seulensis*)를 선택하였음.

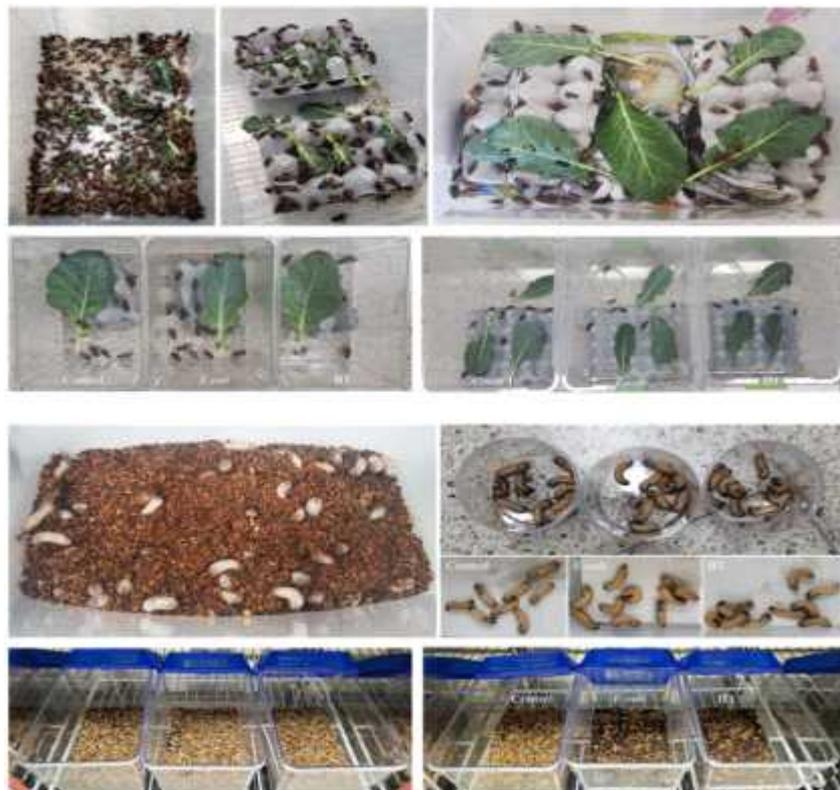
본 과제수행을 위하여 선발된 곤충들의 목적

- ◎ 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*): 항생/항균 단백질 발굴을 위하여 선발.
- ◎ 동애등에(*H. illucens*): 항생/항균 단백질 발굴과 함께 면역유도 기술 개발.
- ◎ 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*): 면역체계 이해 및 기존 발굴된 항생/항균 단백질 정보 확인 및 이용가능성 여부 판단.

[그림 2-2]는 본 과제 성공을 위하여 제1 위탁과제 실험실 내 사육되고 있는 쌍별귀뚜라미(*Gryllus bimaculatus*), 동애등에(*Hermetia illucens*), 흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis seulensis*) 임.

사육되고 있는 곤충들은 매우 청결한 환경과 질 좋은 먹이원을 공급하여 다양한 곤충 병원성 미생물을 포함 오염으로부터 보호하며 실험들이 진행되었음.

사육되는 곤충상에 control, *E. coli*, BT라 표현된 것은 선행 실험들로서 이들 병원균에 노출 시 나타나는 면역반응을 확인 한 것임.



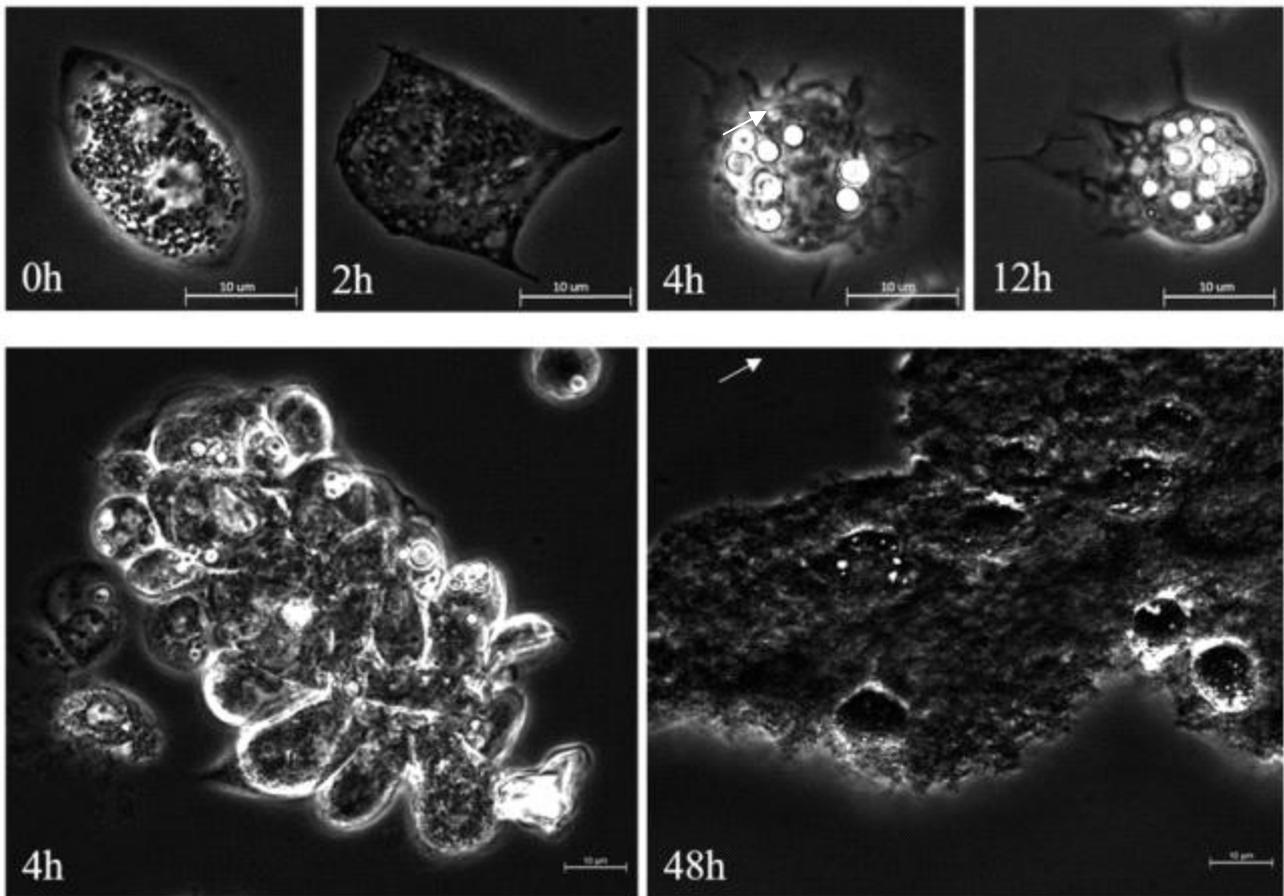
[그림 2-2] 본 과제의 실험을 수행하기 위하여 제1 위탁과제(강원대학교, 조세열) 실험실 내 사육 중인 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*), 동애등에(*H. illucens*), 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*) 성충과 유충.

#### 다) 선발된 곤충 대상 항생/항균 단백질 발굴 및 면역기능 이해

##### ① 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*) 항생/항균 단백질 발굴 최적 면역반응 시간 설정

쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*) 대상 항생/항균 단백질을 발굴을 위하여 면역 활성화 최적 시간을 탐색하였음. 이를 위하여 1차로 우리는 인위적으로 병원균 세포막 성분이 도포된 비드(광학 현미경으로 쉽게 관찰 가능)를 주입한 후 면역 혈구 세포들의 활성화를 탐색하였음.

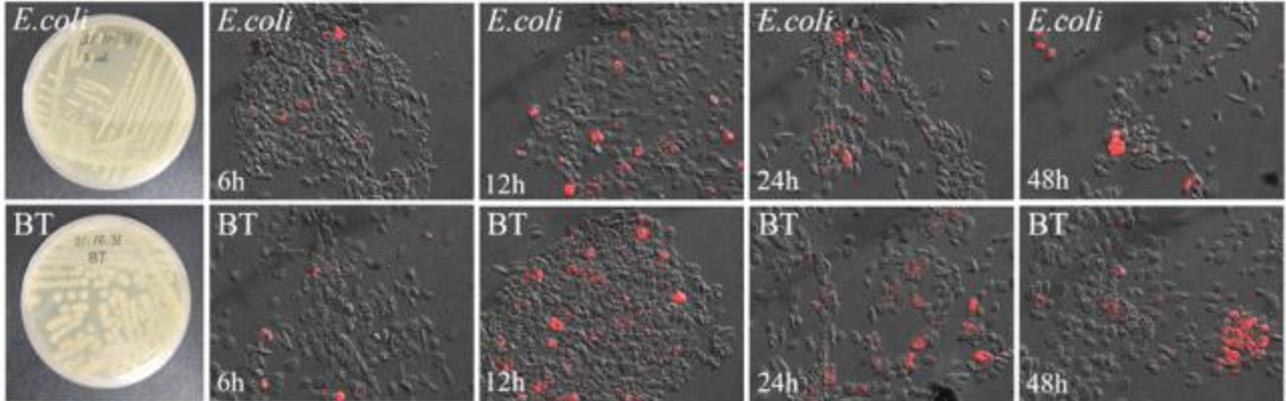
쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*)는 총 6종의 혈구 세포가 관찰되며 그 중 과립혈구세포(Granulocytes)가 면역 활성화 세포라는 것이 보고하였음. 이를 바탕으로 우리는 시간대별 과립혈구세포의 면역 활성화를 관찰하였음[그림2-3].



[그림2-3] 최적 면역 활성화 시점을 파악을 위한 비드 주입 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*).

비드 주입 후 0 ~2시간은 변화가 관찰되지 않았으며 4시간, 12시간에 많은 과립혈구세포들에서 비드(하얀색 화살표)를 포식한 phagocytosis가 관찰됨. 특히 병원균 주입 후 12시간은 최적의 면역 활성화 시점임을 알 수 있었음. 48시간은 면역 활성이 마무리되는 시점으로 판단되었음. [그림2-3]과 같이 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*)의 과립혈구세포는 비드 주입 4시간부터 세포질의 변형(활성화)이 관찰되기 시작했으며 12시간에 가장 많은 변화가 관찰되었음. 특히 과립혈구세포는 생체 내 들어온 비드들을 포식하는 식세포현상(Phagocytosis)을 관찰할 수 있었으며 또한 12시간에 식세포 현상을 가장 많이 관찰할 수 있었음. 이러한 결과는 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*)의 면역 활성화는 12시간에 최고치에 도달한 후 48시간을 지나면서 서서히 낮아지는 것으로 나타났음.

이러한 결과를 재확인하기 위하여 우리는 비드가 아닌 실질적인 병원균인 대장균(*Escherichia coli*)과 BT(*Bacillus thuringiensis*) 균을 대상으로 직접 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*)에 주입 하였음[그림2-4].



[그림2-4] 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*)에 대장균(*Escherichia coli*)과 BT(*Bacillus thuringiensis*)균을 주입 후 혈구세포 Lysosome 염색(적색).

곤충 혈구세포는 침입한 병원균을 식세포(phagocytosis)한 후 세포질 내 제거를 위하여 lysosome이 활성화되며 우리는 활성화된 lysosome을 적색 형광으로 염색하여 확인하였음. 비드 실험과 동일하게 12시간에 활성화된 많은 lysosome을 확인할 수 있었음.

[그림2-4]와 같이 비드 주입과 유사하게 주입 12시간에 매우 활성화된 과립혈구세포들을 관찰할 수 있었음.

결론적으로, 우리는 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*)의 경우 병원균 감염 후 12시간에 최고조의 면역반응이 유도된다는 것을 알 수 있었고 추후 항생/항균 단백질 발굴을 위한 최적의 면역 활성화 시간을 12시간으로 선정할 수 있었음.

② 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*) 항생/항균단백질 발굴을 위한 전체 RNA sequencing.

쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*)의 항생/항균 단백질 발굴을 위하여 매우 건강한 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*)들을 선발하여 멸균된 케이지(40cm X 60cm X 50cm)에 깨끗하게 멸균된 먹이인 당근, 양배추를 함께 넣어 사육하였음.

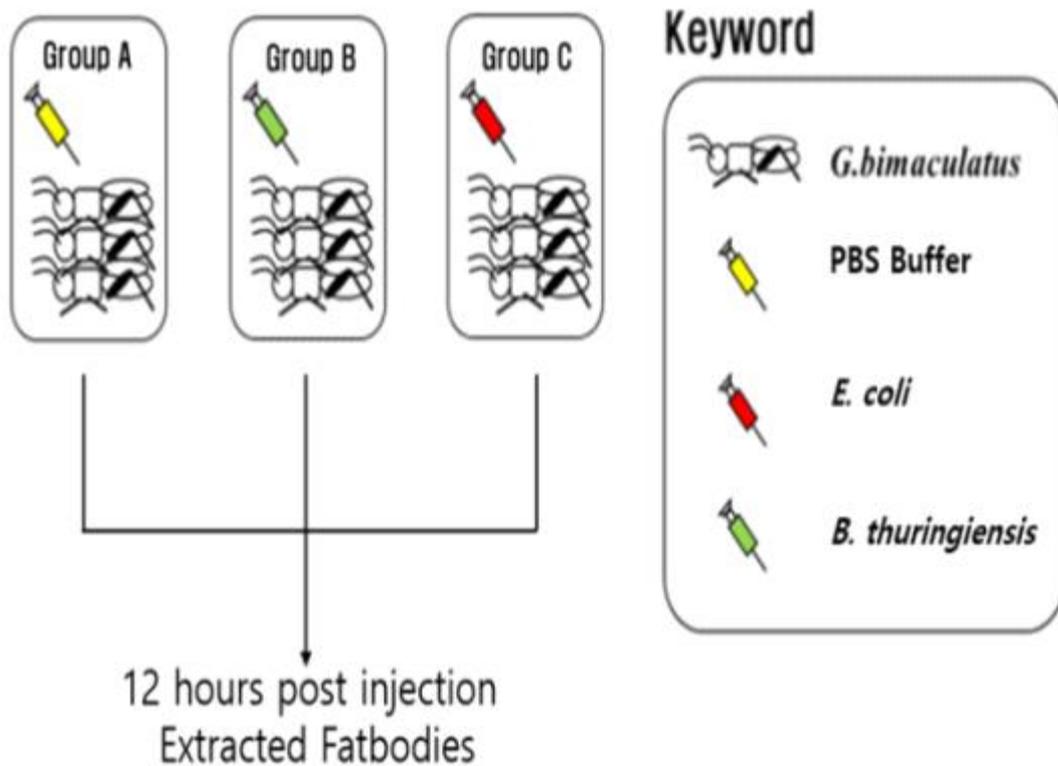
3일간 사육하는 동안 물과 먹이를 충분히 공급하면서 건강 상태를 자세히 관찰하였고 이미 병원균에 감염되어 보이는 개체나 건강하지 못해 보이는 개체는 즉시 제거하면서 최상의 건강 상태를 유지하면서 사육하였음.

3일 후 매우 건강해 보이는 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*) 5개체씩 A, B, C그룹을 만들어 멸균된 케이지(40cm X 60cm X 50cm)에 그룹별로 각각 보관하였음.

A 그룹은 control 그룹으로서 PBS 버퍼를 주입하였고 B와 C 그룹은 항생/항균 단백질 발굴을 위하여 대장균(*E. coli*)과 BT(*B. thuringiensis*)균을 주입하였음 (그림 2-5).

[그림2-5]와 같이 그룹별 해당 병원균을 주입 후 12시간이 지난 후 우리는 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*)를 해부한 후 그룹별로 지방체(Fatbodies)를 적출하였음.

그룹별 지방체에서 SV Total RNA Isolation System kit (Promega Corp., Madison, WI)을 사용하여 각각 ~10ug의 total RNA를 얻게 되었으며 spectrophotometer (Evolution 60S; Thermo Fisher Scientific, Madison, WI)를 사용하여 Total RNA sequencing을 할 수 있는 quality를 점검하였음.



[그림2-5] 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*)에서 항생/항균 단백질 발굴을 위한 병원균 주입 후 지방체 추출(그룹 A; PBS 버퍼 주입, 그룹 B; BT 균 주입, 그룹 C; *E. coli* 주입)

그룹별로 추출된 Total RNA는 Macrogen 회사에 전달하였고 TruSeq Stranded mRNA LT Sample Prep Kit 을 사용하여 그룹별 RNA library 완성되었으며 TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation Guide, Part #15031047 Rev. 기법을 사용하여 그룹별 RNA를 시퀀싱을 수행하였음.

### ③ RNA sequencing을 통한 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*) 항생/항균단백질 발굴

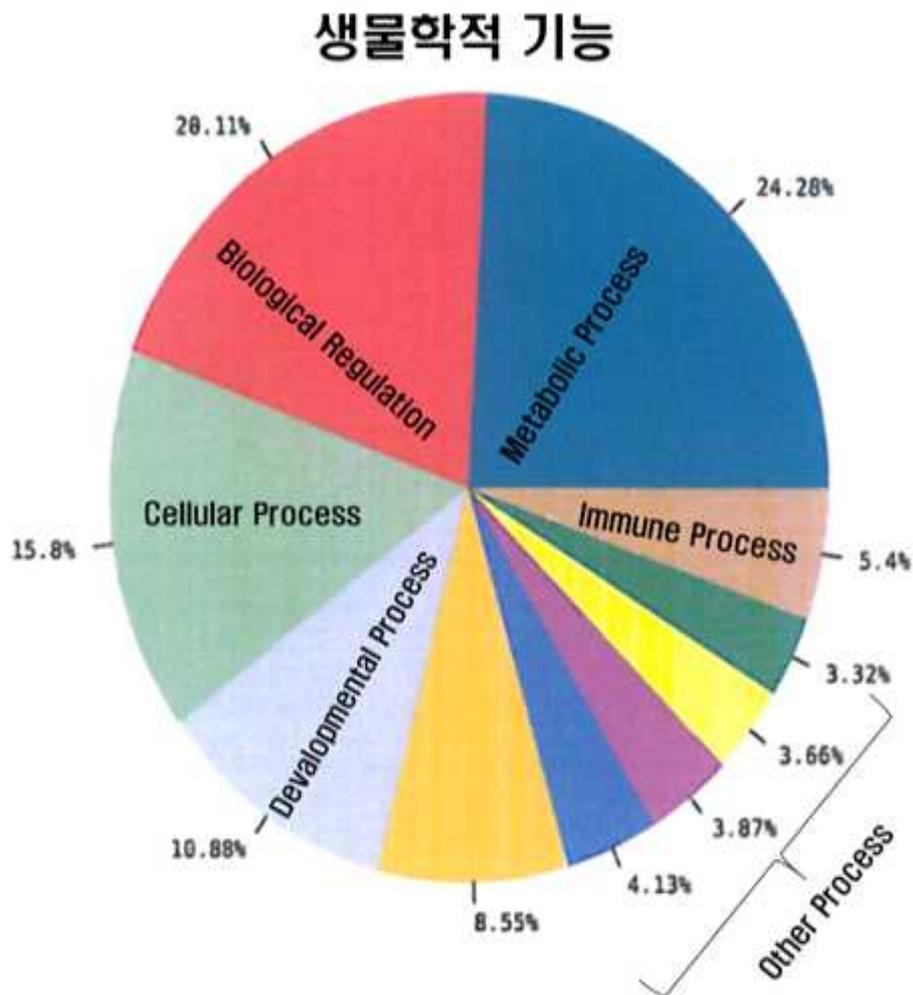
유전자(ORF: Open Reading Frame)들을 특정하기 위하여 CD-HIT-EST program을 사용하여 유전자들을 특정하였고 유전자들은 다양한 유전자 data base인 NCBI Nucleotide (NT), NCBI Non-redundant Protein (NR), Pfam, Gene ontology (GO), UniProt and EggNOG의 데이터들과 BLASTN of NCBI BLAST and BLASTX of DIAMOND software를 사용하여 비교 분석하였음.

[표2-1]과 같이 PBS 버퍼를 주입한 control 그룹은 12,664,195,878 bp를 읽었으며 GC비율은 48.13%임을 알수 있었음.

[표2-1] RNA sequencing Raw data stats

Group	Sample ID	Total Reads	GC(%)
A	PBS	125,388,078	48.13
B	E. coli	132,250,684	49.43
C	BT	119,697,660	47.65

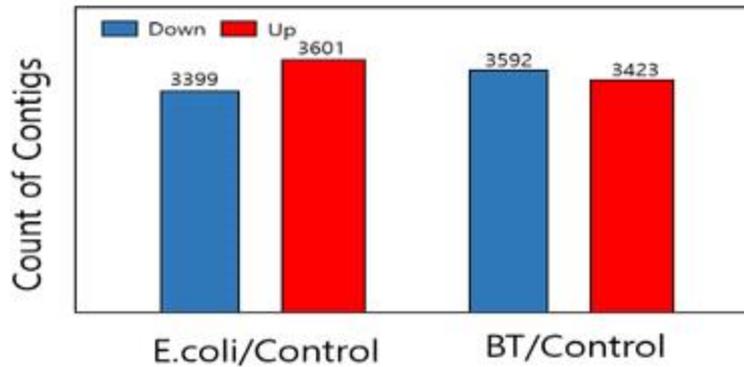
특정된 유전자들의 생물학적 기능은 그림 2-6과 같이 다양한 기능별로 분류되었음.



[그림2-6] RNA sequencing을 통한 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*)에서 특정된 유전자 생물학적 기능

[그림2-6]과 같이 대사작용에 관련된 유전자들은 24.28%, 생물학적 조절에 관련된 유전자는 20.11%, 세포에 관련된 유전자들은 15.8%로 나타났음. 특히, 항생/항균 단백질과 연관된 면역과 관련된 유전자들은 약 5.4%가 있음을 알 수 있었음.

[그림2-7]은 PBS를 주입한 대조군 그룹과 *E.coli* 또는 BT균을 주입한 그룹 간 과발현(Up)과 저발현(Down) 유전자들 전체적인 숫자를 나타낸 것임.



[그림2-7] PBS/*E.coli* 또는 PBS/BT 균 그룹간 유전자들 발현 양상.

PBS/*E.coli* 비교에서는 *E. coli*를 주입한 그룹에서 약 3,399개의 유전자가 과발현되었으며 3,601개의 유전자는 저발현된 것을 알 수 있었음.

PBS/BT 비교에서는 BT를 주입한 그룹에서 약 3,423개의 유전자가 과발현되었으며 3,592개의 유전자는 저발현된 것을 알 수 있었음.

저발현된 유전자도 면역에 관련되며 다양한 생물학적 기능에 참여하는 유전자들이 발견되었지만 우리는 주로 과발현되는 면역 관련 유전자들을 조사하였음. 그 이유는 항생/항균 단백질들의 특성은 주로 병원균 감염시 과발현되어 병원균들을 직접 치사케 하는 단백질로 사용되기 때문임.

#### ④ 항생/항균단백질 포함 면역 관련 주요 유전자 발굴.

Molecular Pattern Recognition Proteins; 본 단백질은 병원균이 곤충 체내에 침입하면 가장 먼저 병원균들을 인지하여 다양한 신호전달을 담당하는 단백질임. 본 단백질의 최종 신호전달 유전자는 항생/항균 단백질들이 될 수 있으므로 우리는 3,000개 이상의 과발현된 유전자 중 MAMPs (microbial peptidoglycan, lipopolysaccharides,  $\beta$ -glucans, lipoproteins, CpG dinucleotides, or flagellin)에 관련된 유전자들을 탐색하였음. 표 2-2에서와 같이 microbial peptidoglycan, lipopolysaccharides,  $\beta$ -glucans등 다양한 종류의 Molecular Pattern Recognition Proteins들이 검출되었고 특히 immunolectin 계열의 단백질들이 병원균 침입 시 활발히 발현되어 면역반응 신호전달을 진행하는 것으로 판단되었음.

[표 2-2] 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*) *E.coli*와 BT균 주입 시 과발현되는 Molecular Pattern Recognition Proteins.

Gene Description	Fold Change	Species top blast
GNBP-1	~ 5	<i>Locusta migratoria</i>
GNBP-3	~ 6	<i>Locusta migratoria</i>
B-1,3-glucan	~ 4	<i>Cryptotermes secundus</i>
PGRP-SC	~ 7	<i>Ooceraea biroi</i>
PGRP-SA	~ 8	<i>Gryllus bimaculatus</i>
PGRP-SC2	~ 5	<i>Ooceraea biroi</i>
lectin	~ 6	<i>Cryptotermes secundus</i>
Immunolectin-5	~ 9	<i>Hepialus xiaojinensis</i>
26-kDa lectin	~ 6	<i>Periplaneta americana</i>
Immunolectin-13	~ 5	<i>Hepialus xiaojinensis</i>
Lectin-related	~ 7	<i>Periplaneta americana</i>
Immunolectin-23	~ 11	<i>Hepialus xiaojinensis</i>
Immunolectin-22	~ 13	<i>Hepialus xiaojinensis</i>
Immunolectin-12	~ 19	<i>Hepialus xiaojinensis</i>
Regenectin	~ 5	<i>Periplaneta americana</i>

Immune-related signal transduction: 곤충에서 Immune related signal transduction에 관련된 유전자들은 매우 연구가 잘 되어 있음. 특히, Toll 유전자에 의한 전달 체계는 곰팡이와 그람양성 세균이 곤충에 침입하면 활성화되는 신호전달이며 IMD 유전자는 주로 그람음성 세균이 체내에 침입하면 활성화되는 신호전달로 알려져 있음. [표2-3]과 같이 약 4종의 Toll 유전자가 발굴되었으며 그 외 신호전달 유전자들은 지속해서 탐색 중임.

[표2-3] 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*) *E.coli*와 BT균 주입 시 과발현되는 Toll 유전자.

Gene Description	Fold Change	Species top blast
Toll (vasorin)	~ 4	<i>Cluex quinquesfasciatus</i>
Toll-like receptor 4	~ 3	<i>Crassostrea virginica</i>
Toll-like receptor	~ 4	<i>Gryllus bimaculatus</i>
Toll-like receptor 7	~ 8	<i>Synechococcus sp.</i>

○ **Antimicrobial peptides**; 본 실험을 통하여 다양한 종류의 항생/항균 단백질들이 발굴되었음. PBS버퍼를 주입한 그룹과 BT 또는 *E.coli*를 주입한 그룹에서 표 2-4와 같이 항생/항균 단백질들이 과발현되는 것을 알 수 있었음. 특히 defensin-family, tenascin family, venom-like, natterin 등의 단백질들은 상당한 과발현이 관찰되었으며 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*)의 경우 이번 연구로 처음 다양한 항생/항균 단백질들이 발굴되었기에 현재까지도 정확한 단백질들의 특성과 이름이 밝혀지지 않은 단백질들이 많이 존재하고 있으며 우리는 현재도 분석 중에 있음(Uncharacterized proteins으로 분류). 밝혀진 단백질들을 대상으로 2차 년도는 cloning, 단백질 expression 등을 통한 특성 파악과 함께 최종적으로 업체류 무름병 포함 미생물에 항생 효과를 가지는 단백질을 분리 정제하여 그 효과를 탐색할 것임.

[표2-4] 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*) *E.coli*와 BT균 주입 시 과발현되는 항생/항균 단백질.

Gene Description	Fold Change	Species top blast
Defensin family	~ 54	<i>Antheraea pernyi</i>
Lysozyme family 1	~12	<i>Aedes aegypti</i>
Lysozyme C-type	~6	<i>Coptotermes formosanus</i>
Lysozyme i-type	~7	<i>Procambarus clarkii</i>
Lysozyme family 2	~4	<i>Archeta domesticus</i>
Tenascin	~63	<i>Cluex pipiens pallens</i>
Mucin-12	~12	<i>Formica exsecta</i>
Mucin-2	~8	<i>Agrilus planipennis</i>
Mucin-16	~12	<i>Sitophilus oryzae</i>
natterin	~80	<i>Cryptotermes secundus</i>
Vitronectin	~6	<i>Sipha flava</i>
Venom-like	~62	<i>Pristhesancus plagipennis</i>
Defense protein	~38	<i>Coptotermes formosanus</i>
Attacin family	~24	uncharacterized
Uncharacterized family	20 ~110	현재 알려진 단백질들과 상동성이 발견되지 않는 다양한 단백질들

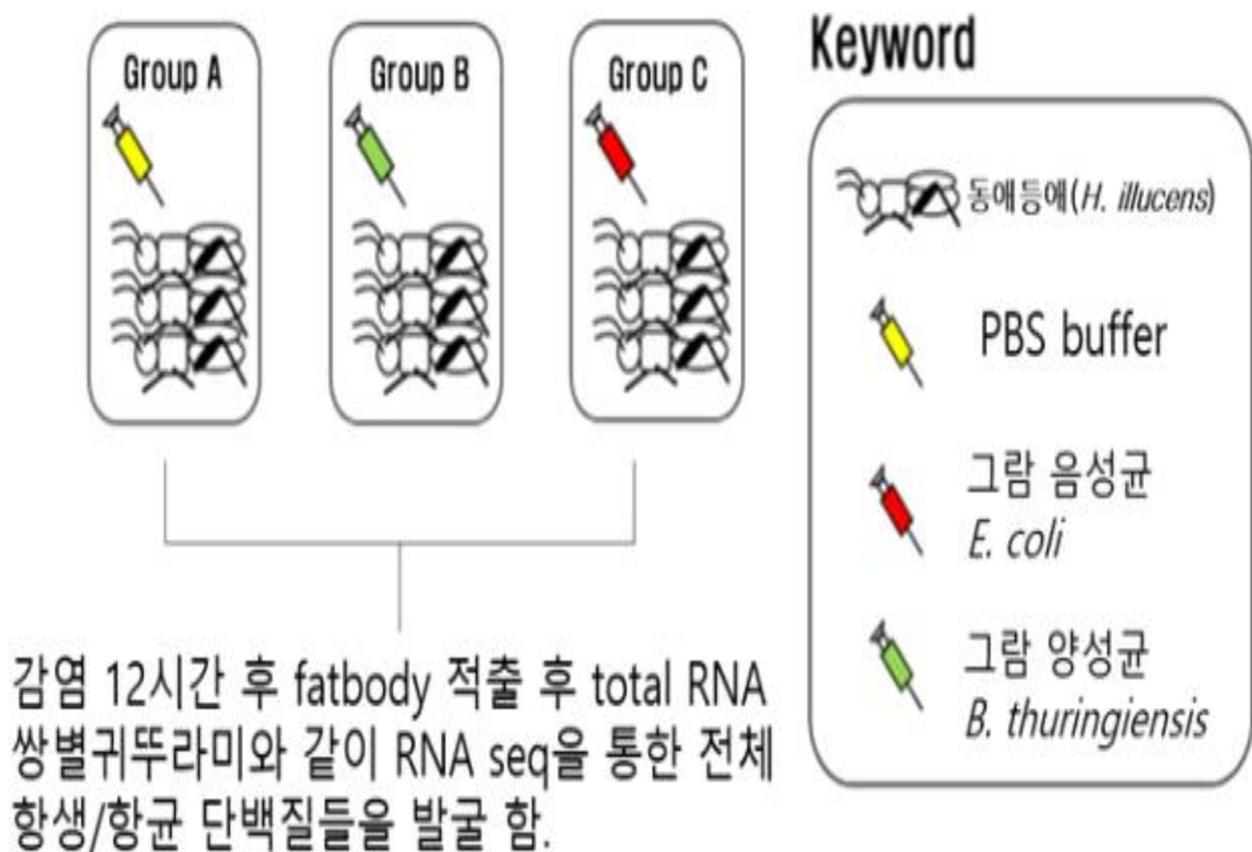
## 2) 동애등애(*H. illucens*) 대상 항생/항균 단백질 발굴과 함께 면역유도 기술 개발

### 가) 동애등애(*H. illucens*)를 이용하여 항생/항균 단백질 발굴

쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*)에서 RNA sequencing을 통한 전체 항생/항균 단백질 발굴과 유사하게 우리는 동애등애(*H. illucens*)에 대조군과 함께 그람음성균(*Escherichia coli* K12)과 그람양성균(*B. thuringiensis*)을 주입한 후 12시간 후 fatbody에서 전체 RNA를 추출하였음[그림2-8].

최적의 면역 반응시간을 선정하기 위하여 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*)의 방법과 같이 수행하였음. 즉, 면역 세포 활성화 시간으로 최적 시간을 선정하였고 이를 바탕으로 병원균 주입 후 Total RNA를 추출하였음.

우리는 RNA seq을 위한 RNA QC후 Macrogen 회사에 전달하였고 TruSeq Stranded mRNA LT Sample Prep Kit 을 사용하여 그룹별 RNA library 완성되었음.



[그림2-8] 동애등애(*H. illucens*)의 RNA seq을 통한 항생/항균단백질 발굴 모식도.

쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*)에서 수행했던 방법과 유사하게 진행하였음.

CD-HIT-EST program을 사용하여 유전자들을 특정하고 유전자 data base를 사용하여 비교 분석 중임.

현재 Attacin, defensin 등을 포함한 다양한 항생/항균 단백질들과 그와 관련한 면역 유전자들을 분석하고 있으며 2차년도 보고서에 포함될 것임.

## 나) 동애등에(*H. illucens*)를 이용한 면역유도 기술 개발

본 연구는 우리나라 산업 곤충 중 하나인 동애등에(*H. illucens*)를 활용하여 사육 시 면역 활성화 인자(Immunostimulants)를 함께 적용하여 사육하면서 면역을 활성화하는 방법을 개발하는 것임.

면역 활성화 인자(Immunostimulants)는 다양한 화학물질을 포함하여 생물의 면역을 활성화하는 물질들로서 포유동물의 경우 항체 반응을 일으키는 항원 외 화합 물질들을 말함. 예를 들면 글리코사이드 결합물질인 다당류(Polysaccharides: Mixture of small amount of galacturonic acid, 4-O-methylglucuronic acid, rhamnose, and glucose), Levamisole, Microemulsions, Neem 추출물 등 다양한 물질이 있음.

포유동물에서 사용하는 이러한 물질들은 가격과 산업화 시 비용 문제 등 여러 가지 단점들이 있음. 동시에, 이러한 고비용 물질들을 동애등에 사육환경에 적용할 수 있는 방법 개발도 따로 필요하며 곤충에서 면역을 활성화할 가능성도 낮을 것으로 판단하였음.

따라서 우리는 가장 쉽고, 저비용 접근할 수 있는 면역활성화인자(Immunostimulants)를 선택 하였음.

동애등에(*H. illucens*)사육 환경에 그람양성균(*B. thuringiensis*), 그람음성균(*Escherichia coli* K12), 곰팡이(*Saccharomyces cerevisiae*)균을 함께 사육하는 경우.

본 실험은 동애등에(*H. illucens*)와 함께 50ml  $7.13 \times 10^8$  그람음성균(*Escherichia coli* K12), 50ml  $6.22 \times 10^6$  그람양성균(*B. thuringiensis*),  $3.33 \times 10^7$  50ml 곰팡이(*Saccharomyces cerevisiae*)을 각각 다른 케이지에 사육하였음.

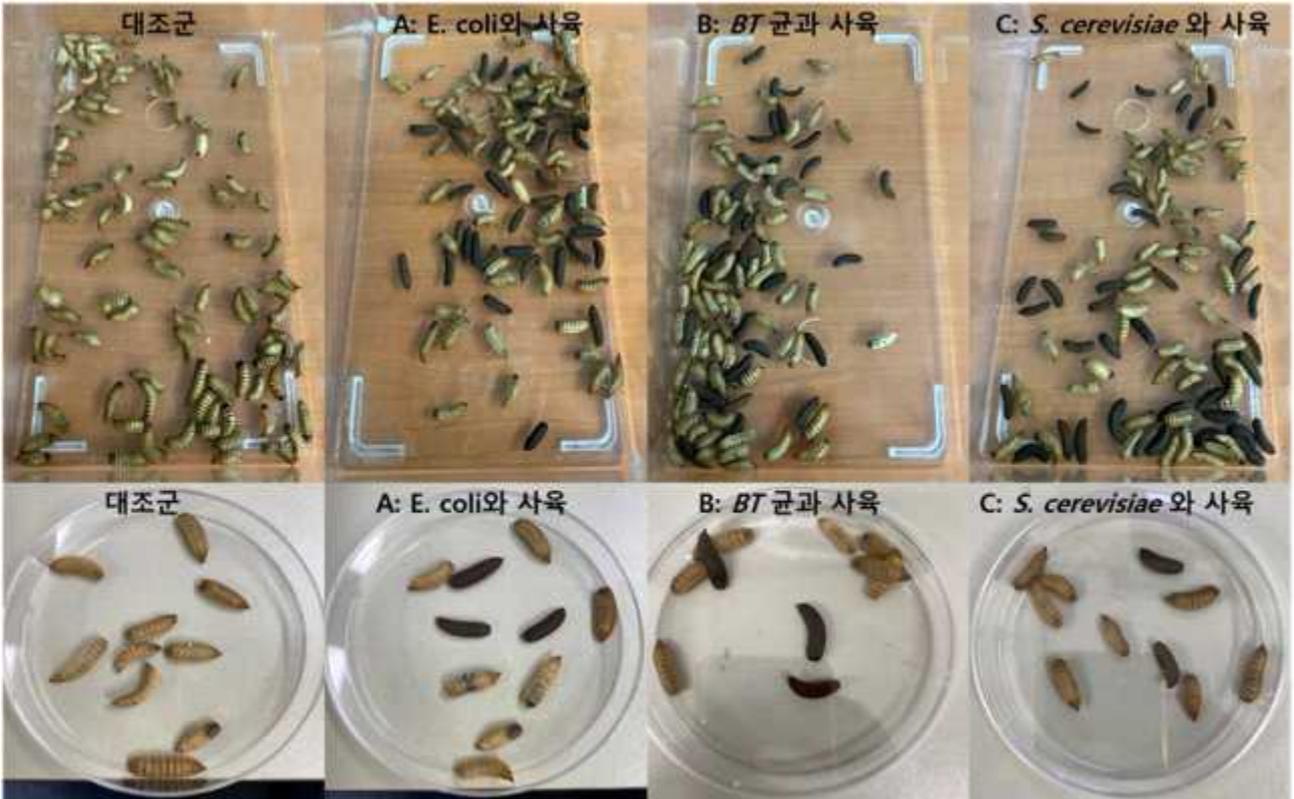
그러나 사육 2일째부터 사육상자는 다양한 균과 곰팡이로 더이상 실험을 진행할 수 없었음.

이러한 오염문제를 해결하기 위하여 우리는 50ml  $5.29 \times 10^5$  그람음성균(*Escherichia coli* K12), 50ml  $4.89 \times 10^8$  그람양성균(*B. cereus*),  $6.21 \times 10^6$  50ml 곰팡이(*Saccharomyces cerevisiae*)균들을 각각 100℃에서 20분간 멸균한 후 동애등에(*H. illucens*)의 톱밥과 함께 사육하였음.

우리는 과거 곤충의 면역유도 실험에서 다양한 면역활성화인자를 사용하여 곤충면역을 활성화 했으며 그 중 어느 정도 농도가 확보된 병원균들에 대하여 높은 온도에서 모두 멸균시킨 용액 만으로도 충분히 곤충의 면역을 활성화된다는 것을 보고하였음. 즉, 100℃ 이상의 온도에서 20~30분간 멸균 시 병원균들은 DNA, 단백질 단편들, 다양한 세포막 성분들로 모두 단편화되는데 이러한 단편화된 물질들은 모두 곤충의 면역 활성화 인자로 활용될 수 있음을 많은 논문을 통하여 보고 하였음.

동시에, 사육을 진행하면서 하루에 1회 100rpm으로 10분간 케이지를 흔들면서 인위적으로 동애등에(*H. illucens*)의 큐티클에 상처를 유도하였음. 즉, 멸균된 각 병원균 성분들을 동애등에(*H. illucens*)가 입으로 섭취하거나 이러한 성분들이 최소한의 큐티클 상처나 기공(spiracles)을 통해 곤충 장내(intestine) 또는 혈강(hemocoel)내 침투되어 면역을 활성화되도록 유도하였음.

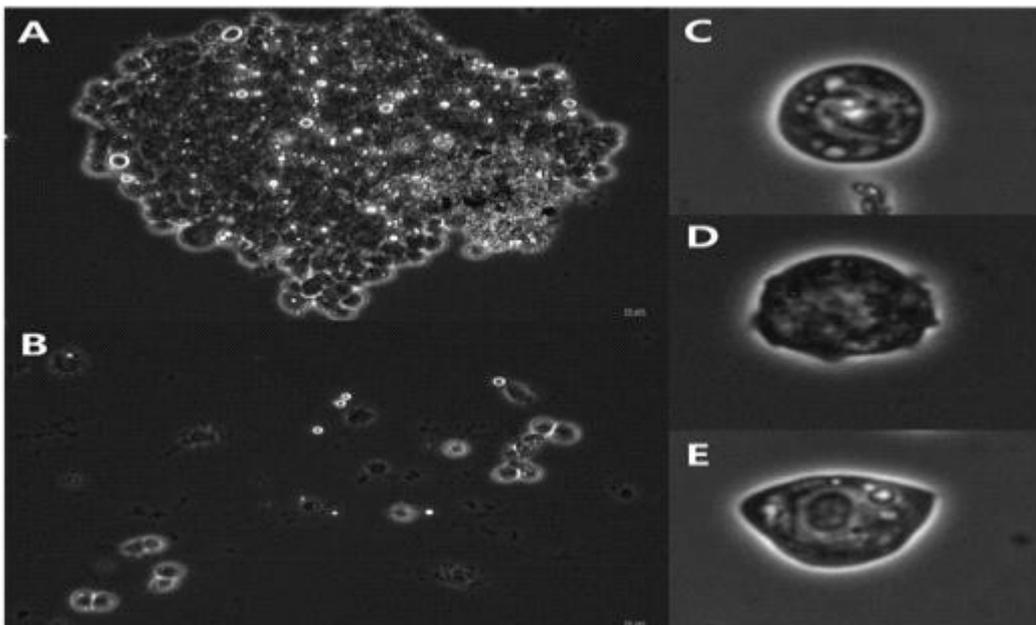
A(50ml  $5.29 \times 10^5$  그람음성균, *Escherichia coli* K12), B(50ml  $4.89 \times 10^8$  그람양성균, *B. thuringiensis*), C( $3.33 \times 10^7$  50ml 곰팡이, *Saccharomyces cerevisiae*) 사육장은 대조군 사육장과 비교하여 큐티클 melanization 현상이 관찰되었으며 면역을 활성화 된 것으로 추측할 수 있었음[그림2-9]



[그림2-9] 면역유도 동애등에(*H. illucens*) 사육 모습.

A(50ml  $5.29 \times 10^5$  그람음성균, *Escherichia coli* K12), B(50ml  $4.89 \times 10^8$  그람양성균, *B. thuringiensis*), C( $3.33 \times 10^7$  50ml 곰팡이, *Saccharomyces cerevisiae*).

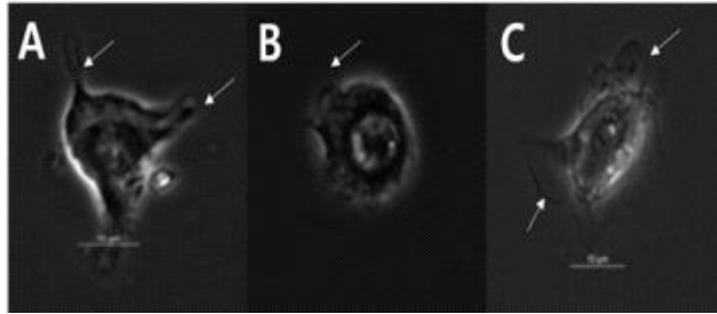
우리는 큐티클의 melanization이 면역 활성화와 연결이 있는지를 확인하기 위하여 A, B, C, D 케이지의 동애등에(*H. illucens*) 혈구세포를 각각 채혈하여 혈구세포의 활성화 여부를 확인하였다. 이를 위하여 동애등에의 혈구세포 종류를 그림 2-10과 같이 파악하였음.



[그림2-10] 동애등에(*H. illucens*) 혈구세포 종류.

A; 전체 혈구세포 모습, B; 혈구세포 분류를 위한 희석한 모습, C; Prohemocytes, D; Granulocytes, E; Adipohemocytes.

동애등애(*H. illucens*) 혈구세포는 그림 2-10 A와 같이 많은 종류의 혈구세포가 존재하는 듯 보였으나 B와 같이 희석하여 관찰한 결과 3종류의 혈구세포만 존재하고 있음을 알 수 있었음. 그림 2-10 B, C, D와 같이 Prohemocytes, Granulocytes, Adipochemocytes가 존재하고 있었으며 이중 세포질의 pseudopod가 관찰되는 Granulocyte이 주요 면역 세포로 판단되었음. 우리는 주요 면역 세포를 특정하고 활성화 여부를 관찰하기 위하여 동애등애(*H. illucens*) 등쪽에 그람 음성균(*Escherichia coli* K12)을 인위적으로 주사한 후 12시간 후 혈림프를 적출하여 혈구 세포들의 활성화를 관찰하였음[그림2-11].



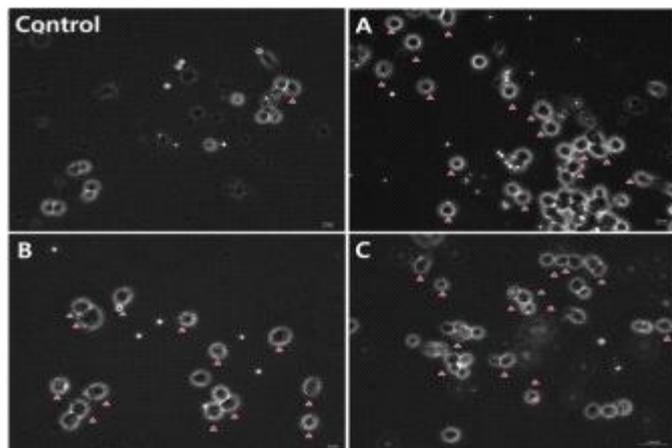
[그림2-11] 동애등애(*H. illucens*)의 면역 활성화된 Granulocytes.

그람음성균(*Escherichia coli* K12)을 인위적으로 주사한 후 12시간 후 활성화된 Granulocytes. 동애등애(*H. illucens*)의 혈림프에는 3종류의 혈구세포가 존재하고 있었으면 그 중 Granulocytes이 주요 면역 세포임을 알 수 있었음. 화살표는 그림 11D(비활성화 상태)와 비교하여 병원균에 노출시 일정 시간 후 pseudopod와 세포막이 확장되어 병원균을 포획하게 변하게 됨.

즉 우리는 이러한 Granulocyte의 세포막 급격한 변화를 케이지별 면역 활성화 확인을 위한 생체 내 면역 활성화 인자로 활용할 수 있을 것으로 판단하였음.

다음으로 우리는 A(50ml  $5.29 \times 10^5$  그람음성균, *Escherichia coli* K12), B(50ml  $4.89 \times 10^8$  그람양성균, *B. thuringiensis*), C( $3.33 \times 10^7$  50ml 곰팡이, *Saccharomyces cerevisiae*)와 대조군 사육장의 동애등애(*H. illucens*)대상 면역 활성화 여부를 확인하였음.

사육 7일 후 A, B, C 사육장과 대조군 사육장에서 사육된 동애등애(*H. illucens*)의 혈림프를 추출하고 Granulocytes의 세포막 활성을 관찰하였음[그림2-12].



[그림2-12] 조건별 사육장에서 사육된 동애등애(*H. illucens*)의 혈림프의 Granulocytes 활성화 검증.

A(50ml  $5.29 \times 10^5$  그람음성균, *Escherichia coli* K12), B(50ml  $4.89 \times 10^8$  그람양성균, *B. thuringiensis*), C( $3.33 \times 10^7$  50ml 곰팡이, *Saccharomyces cerevisiae*)와 대조군 사육장. 빨간색 삼각형은 활성화된 Granulocytes를 나타냄.

[그림2-12]와 같이 대조군과 비교하여 A, B, C 사육장의 동애등에(*H. illucens*)는 매우 활발히 활성화된 Granulocytes들을 많이 관찰할 수 있었음.

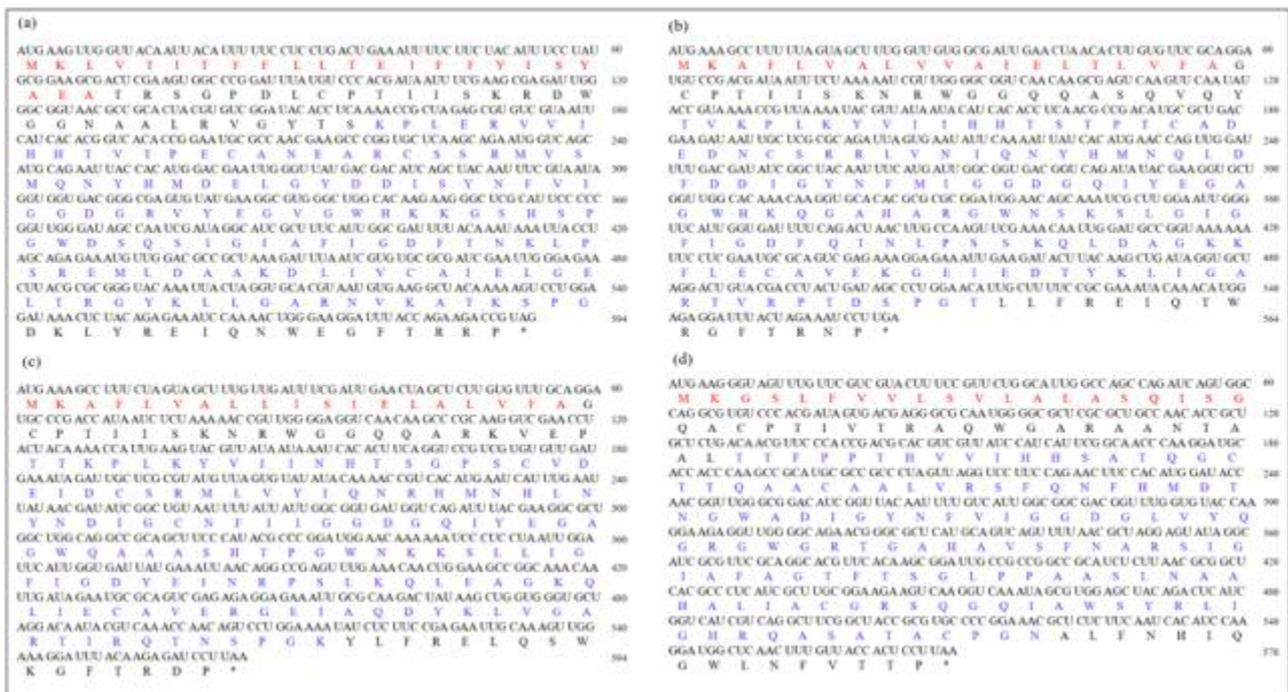
다음으로 면역 활성화를 정량화하기 위하여 우리는 혈구 세포 Lysosome 염색과 FACS, Lysozyme, Cecropin, Diptericin, defensin 등 항생/항균 단백질들의 RT-PCR을 실시하여 정량화할 것임.

**다) 흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis seulensis*) 대상 면역반응 이해**

우리는 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*) 대상 병원균 침입 시 과발현되며 항생/항균단백질을 조절하는 상위 유전자들의 특성을 파악하였음. 특히, 위에서 보고하였듯이 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*)에서 병원균 침입 시 과발현되는 Molecular Pattern Recognition Proteins들의 특성을 파악하였음.

다양한 Molecular Pattern Recognition Proteins 중 Peptidoglycan recognition proteins (PGRPs)는 다양한 항생/항균 단백질의 과발현을 유도하는 대표적 단백질임.

우리는 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)의 4종류의 Peptidoglycan recognition proteins (PGRPs)을 발굴하였고 그들 sequence를 파악하였음[그림2-13].



[그림2-13] 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)의 4종류의 PGRPs cDNA sequences.

(A) PSPGRP-SA(a) (B) PSPGRP-SA(b) (C) PSPGRP-SB1 like (D) PSPGRP-SC like.

흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)의 4종류의 PGRPs는 초파리 시퀀스와 유사한 PGRP-S A(a), PGRP-S A(b), PGRP-SB1, PGRP-SC와 유사하게 나타났으며 우리는 각각의 시퀀스를 PS-PGRP 유전자들로 묘사하였음[그림2-14].

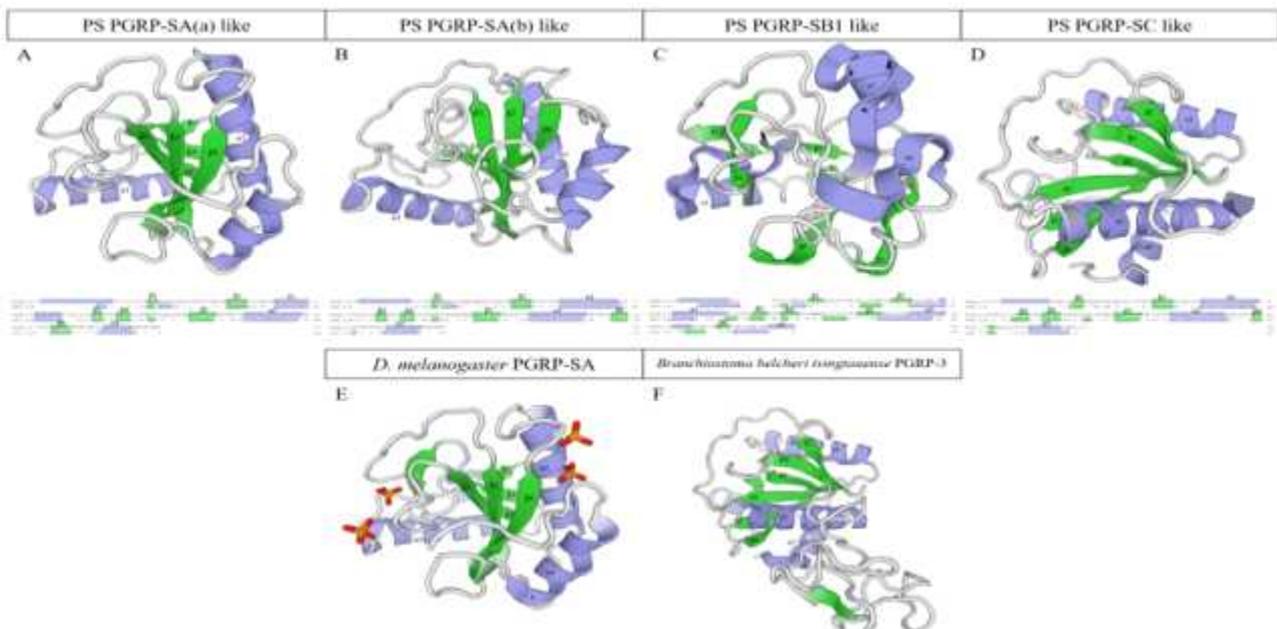
각각의 시퀀스들은 maximum-likelihood method (ML)방법을 통하여 phylogenetic tree를 완성하였음[그림2-14]. PS PGRP-SA(a)는 초파리의 PGRP-SA(a)와 유사(45.74%)하였고 PS

PGRP-SA(b)는 PS PGRP-SB1과 유사(47.93%)하였음. PS PGRP-SC는 초파리의 PGRP-SC1(b)와 44.26% 유사성을 나타냈음[그림2-14].



[그림2-14] 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)의 PGRPs 유전자들의 계통 유사도. (A) PSPGRP-SA(a) (B) PSPGRP-SA(b) (C) PSPGRP-SB1 like (D) PSPGRP-SC like.

다음으로 우리는 각각의 유전자들의 단백질 3D modelling(SWISS-MODEL server (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>))을 통하여 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)의 PGRPs 유전자들이 모두 초파리의 PGRPs 유전자들과 유사하며 그들의 기능을 추측할 수 있었음[그림2-15].



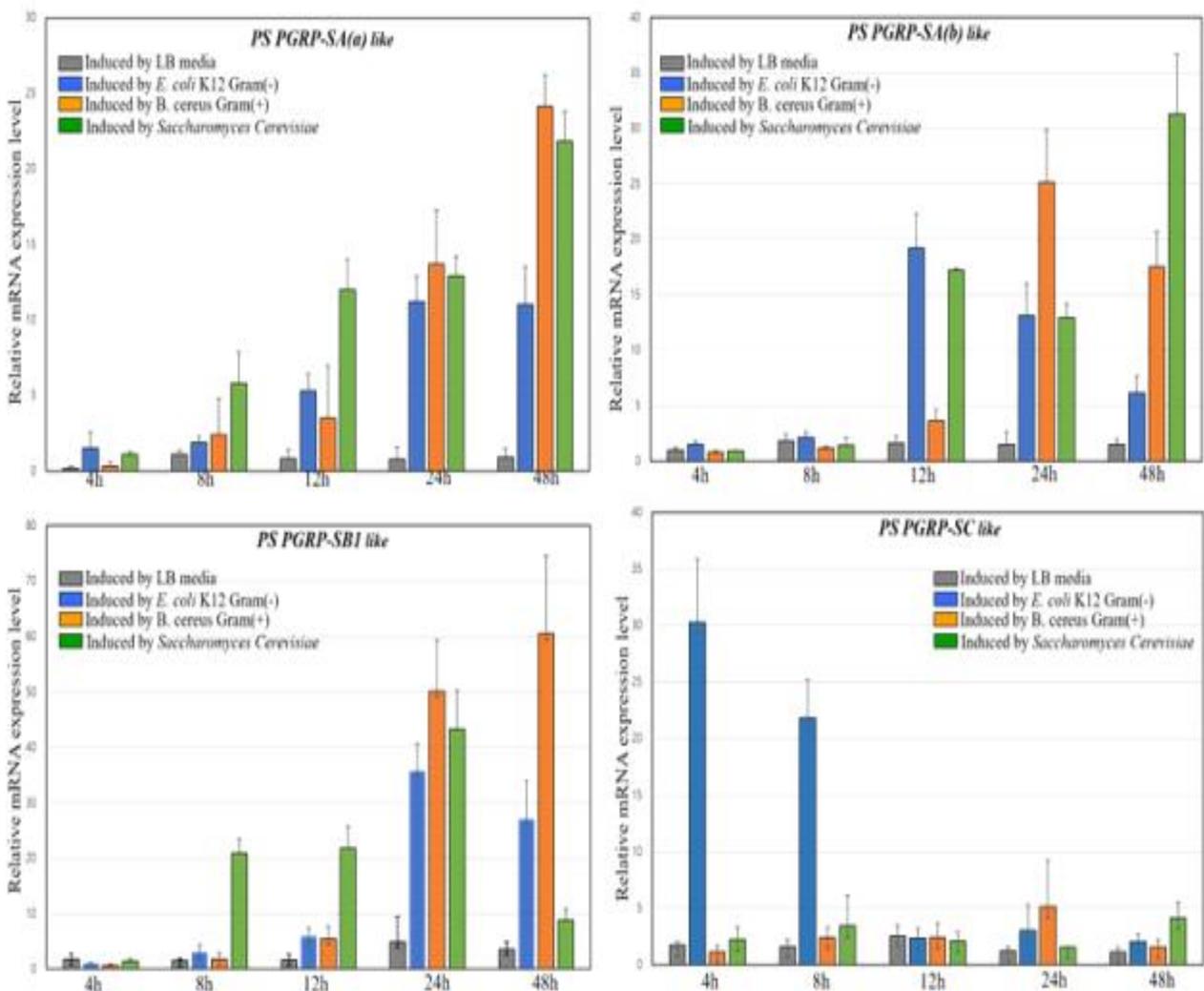
[그림2-15] 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)의 PGRPs 단백질 3D model. (A) PSPGRP-SA(a) (B) PSPGRP-SA(b) (C) PSPGRP-SB1 like (D) PSPGRP-SC like.

PS PGRP-SA(a)와 PS PGRP-SA(b)는 6개의  $\beta$ -strands와 3개의  $\alpha$ -helices 구성되었으며 전체적으로 35%  $\alpha$ -helices, 17%  $\beta$ -strands, 8% transmembrane helix, 12% random coil로 구성되어 있음을 알 수 있었음[그림 2-15 A와 B].

PS PGRP-SC도 6개의  $\beta$ -strands와 3개의  $\alpha$ -helices (34%  $\alpha$ -helices and 15%  $\beta$ -strands) 구성되어 있었으며  $\beta$ -strands는 중앙에  $\alpha$ 1 helix 뒷면에 반면  $\alpha$ 2 and  $\alpha$ 3 helices 전면에서 노출되는 특성을 갖고 있음을 알 수 있었음[그림 2-15 D].

PS PGRP-SB1 like 단백질도 다른 PGRP 단백질과 같이 6개의  $\beta$ -strands와 3개의  $\alpha$ -helices (35%  $\alpha$ -helices and 15%  $\beta$ -strands) 구성되었으나 전체적인 단백질 모양은 전형적인 곤충 PGRPs와는 다른 모양으로 나타났음[그림 2-15 C].

다음으로 우리는 흰점박이꽃무지의 항생/항균단백질 과발현 기작을 이해하기 위하여 PGRPs 단백질을 대상으로 cDNA cloning을 통하여 발현 특성을 파악하였음. 이를 위하여 흰점박이꽃무지를 대상으로 그람양성균(*B. cereus*), 그람음성균(*Escherichia coli* K12), 곰팡이(*Saccharomyces cerevisiae*)를 주입한 후 각각 단백질의 발현을 RT-PCR로 확인하였음[그림 2-16].



[그림 2-16] 병원균 주입에 따른 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)의 PGRPs 단백질유전자들의 과발현 정도. (A) PSPGRP-SA(a) (B) PSPGRP-SA(b) (C) PSPGRP-SB1 like (D) PSPGRP-SC like.

PSPGRP-SA(a)의 경우 그람음성균(*Escherichia coli* K12)주입 그룹에서 24시간에서 48시간 지난 후 10배 이상 과발현되었으며 그람양성균(*B. cereus*)과 곰팡이(*Saccharomyces cerevisiae*)를 주입한 유충에서는 48시간 이후에도 control 그룹과 비교 20배 이상 지속적으로 발현되는 것으로 나타났음. 이는 아마도 PSPGRP-SA(a) 단백질은 흰점박이꽃무지에서 Toll과 IMD 면역 신호전달을 담당하며 Coleopteracin, Attacin 등의 항생/항균 단백질을 조절하는 것으로 판단되었음. PSPGRP-SA(b)의 경우도 24시간 이후 모든 병원균에서 30배 이상 발현되는 것으로 나타났으며 주요 면역 신호전달에 참여하는 단백질로 판단되었음.

*PS PGRP-SB1* 단백질도 유사한 과발현 패턴을 나타냈음. 그러나 *PS PGRP-SC*는 그람음성균(*Escherichia coli* K12)에서만 짧은 시간에 급격히 과발현되는 특성이 있었으며 아마도 IMD 신호전달에만 참여하는 단백질로 판단되었음.

아래 [표2-5]는 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)에서 밝혀진 항생/항균 단백질들임. 특히 Attacin과 coleopteracin family 항생/항균 단백질들은 높은 항균력을 나타냈으며 이들 단백질은 PSPGRP-SA(a), PSPGRP-SA(b), PSPGRP-SC 단백질들이 조절할 것으로 판단됨.

[표2-5] 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)의 항생/항균 단백질 (Cho 등, J Insect Science)

Contig ID	Description	Nucleotide length (nt)	coverage (%)	Fold change	Species Top Blast	e-value
c14491_g2_i1	Attacin family	662	75.2	>100	<i>Microdera dzhungarica</i>	1.00E-43
c20401_g1_i1	Defensin family	1035	22.9	>100	<i>Anomala cuprea</i>	1.00E-28
c20145_g1_i1	Holotricin family (Coleopteracin-like protein)	492	77.4	>100	<i>Holotrichia diomphalia</i>	7.00E-74
c15432_g1_i1	Antimicropeptide Cp1-like protein	634	77.6	>100	<i>Copris tripartitus</i>	1.00E-53
c17932_g1_i1	Antimicropeptide Cp6-like protein	488	78.0	4.4	<i>Copris tripartitus</i>	2.00E-17
c15466_g1_i1	C-type Lysozyme	758	52.4	4.9	<i>Papilio polytes</i>	2.00E-37
c23216_g1_i2	Tenascin-N-like protein	2994	64.5	17.3	<i>Heterocephalus glaber</i>	1E-07
c19523_g1_i1	Chitinase-like protein	1996	71.0	25.9	<i>Holotrichia oblita</i>	0
c6794_g1_i1	Peritrophin	373	64.3	2.7	<i>Popillia japonica</i>	9.00E-10
c17703_g1_i1	Mucin-like protein	300	66	5.9	<i>Holotrichia oblita</i>	4.00E-12

위와 같이 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)의 면역 이해 연구는 최근 European J of Entomology에 투고되어 Revision 중에 있음

### 3) 곤충 면역유도 방법을 통한 항생/항균 펩티드 과발현 기술 개발

#### 가) 곤충의 면역유도방법

곤충들은 침투한 병원균에 대하여 두 가지 방법을 사용하여 병원균을 제거하고 있음. 침투한 병원균을 식세포(Phagocytosis) 하는 세포성 면역반응(Cellular Immune Response)과 다양한 항생/항균 단백질들을 과발현시켜 병원균을 제거하는 체액성 면역반응(Humoral Immune Response)으로 구분되고 있음.

곤충에서 면역 활성화에 따른 면역반응은 외래 물질 자극으로부터 시작되므로 우리는 본 과제를 수행하기 위하여 대상 곤충들에 대하여 인위적으로 면역을 활성화하고 유도하는 적절한 방법들을 개발하는 것이 필요하였음.

우리는 본 과제 1년차 수행에서 선발된 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*), 동애등애(*H. illucens*), 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)를 면역 활성화 곤충으로 선정하였으며 그람 음성 세균인 대장균(*E.coli*)과 그람 양성 세균인 BT(*B. thuringiensis*)를 면역 유도인자로 활용하였음[그림 2-17].



쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*)



흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)



동애등애(*H. illucens*)



대장균(*E.coli*)



BT(*B. thuringiensis*)

#### [그림2-17] 본 과제를 수행하기 위하여 선발된 대상 곤충 및 면역 활성화 유도인자.

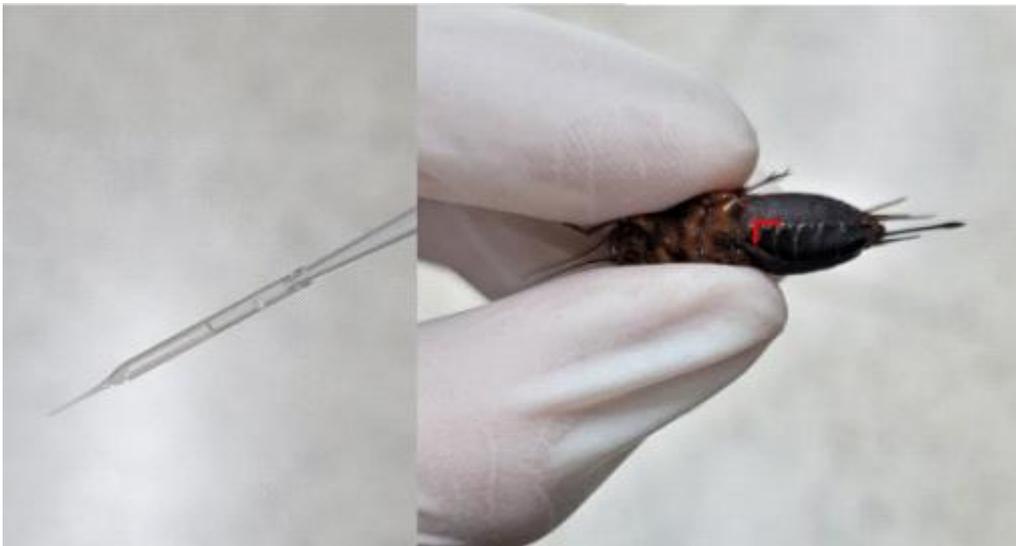
귀뚜라미과에 속하는 쌍별귀뚜라미, 풍뎅이과에 속하는 흰점박이꽃무지, 파리목 동애등애과에 속하는 동애등애는 모두 우리나라에 서식하고 대량사육이 가능한 산업화 곤충으로 본 과제를 수행하는데 적절한 곤충으로 평가됨. 특히, 본 곤충들의 면역반응은 매우 활발하며 다양한 항생/항균 펩티드들을 가지고 있는 것으로 알려져 있음. 일반적으로 이들 곤충의 서식처들은 습하고 항상 다양한 병원균에 노출되는 서식처를 공유하고 있음. 3종의 곤충을 대상으로 면역 활성화를 유도하는 인자로 열처리하여 활성을 제거한 그람 음성 세균인 *E. coli*, 그람 양성 세균인 BT를 사용하

였음. 그람 음성 세균과 그람 양성 세균 침입에 따라 활성화되는 항생/항균 펩티드의 종류가 다르기에 우리는 두 가지 세균을 이용하였음.

#### 나) 대상 곤충 면역 활성화를 위한 직접 주사 방법

직접 주사방법의 가장 큰 장점은 거의 모든 개체에 확실한 면역유도를 할 수 있음. 그러나, 가장 큰 단점은 많은 노동력과 시간이 필요함. 아래 결과는 직접 주사방법에 따른 곤충 체내의 면역 활성화를 조사하고 가능성 유무를 확인한 결과임.

대상 곤충들에 대하여 면역을 활성화하기 위하여 직접 면역 활성화 인자(Immunostimulants; *E.coli* and BT)를 주사하거나 상처만 만드는 방법으로 면역을 활성화하고 각각의 면역 지표를 확인하였음[그림2-18]



[그림2-18] 유리관 바늘을 이용한 곤충 접종

위와 같이 쌍별귀뚜라미의 경우 붉은색으로 표시한 영역 모서리 부분에 주입하는 방법을 사용하였음. 우리는 Thorax 주변 등(dorsal)이나 기공(spiracles) 주변을 주사 지역으로 선정하여 주사하기도 하였음. 그러나, 확실한 이유는 모르겠으나 복부(Abdomen) 표시 주변에 주사하는 것보다 생존율, 면역 활성화 정도가 낮아지는 것으로 나타났음. 따라서, 우리는 직접 주사 방법은 모두 붉은색으로 표시한 영역 모서리 부분에 주사하였음.

주사 유리바늘은 열처리하여 최대한 가늘게 만들며 대상 곤충에 충격을 최소화하였음. 고압 멸균기(AutoClave)를 통해 멸균하고, 곤충은 주입 전 70% 알코올 Paper를 이용해 주입할 곳을 소독하고 클린벤치(Clean Work Station)에서 매우 청결하게 수행하였음.

BT(*B. thuringiensis*)의 경우 5ml의 NA 액체 배지(Beef Extract 3.0g, Peptone 5.0g/1L)가 들어있는 Round bottom tube(15ml, Falcon tube)에 함께 넣고 진탕 배양기에서 200rpm으로 15시간 배양한 후 용액을 100°C에서 20분간 모두 불활성 시킨 후 면역 활성화 유도제로 사용하였음.

대장균(*E.coli*)은 5ml LB 액체 배지(Casein Peptone 10.0g, Yeast Extract 5.0g, Sodium Chloride 5.0g/1L)가 들어있는 Round bottom tube(15ml, Falcon)에 넣고 진탕배양기에서 180rpm으로 overnight 12시간 배양한 후 이를 100℃에서 20분간 불활성 시킨 후 면역 유도제로 사용하였음.

PBS buffer(CaCl<sub>2</sub> 100.0mg, KCl 200.0mg, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100.0mg, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 100.0mg, NaCl 8000.0mg, NaHPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2160.0mg/1L, pH 7.3 ± 0.3)는 위 실험의 negative control로 사용하였음.

#### 다) 직접 주사 후 곤충의 면역 활성화 여부 확인

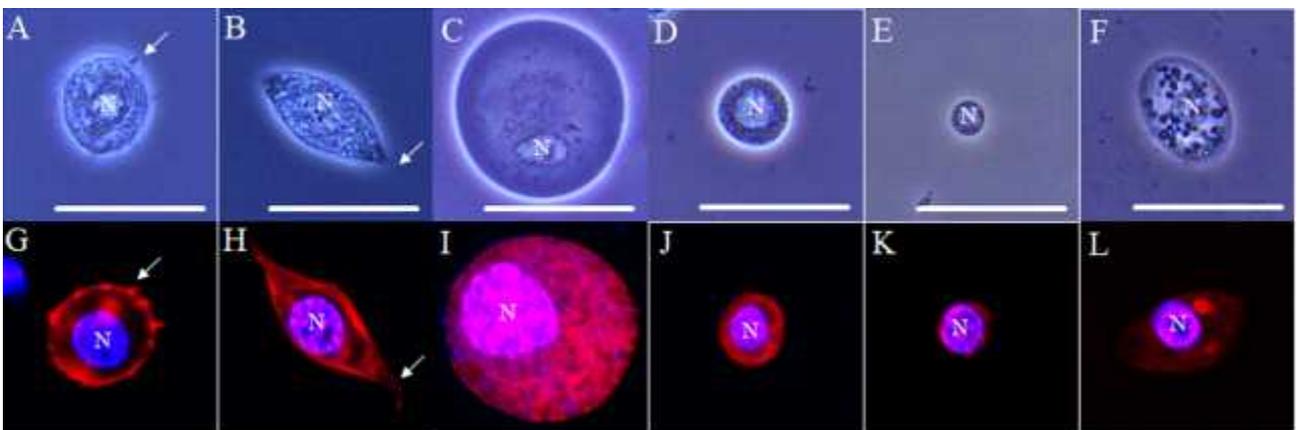
직접 주사를 통한 면역 활성화 탐색은 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*), 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*), 동애등에(*H. illucens*)를 대상으로 진행하였음. 그러나 동애등에(*H. illucens*)의 경우 직접 주사에 의한 상처 발생이 그들의 생존율에 상당한 영향을 주는 것으로 나타났음.

따라서, 우리는 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)와 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*)는 직접 주사 방법을 통한 면역 활성화를 확인하였고 동애등에(*H. illucens*)의 경우는 대량사육을 통한 면역 활성화 방법을 모색하여 과제를 수행하였음.

#### ① 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)의 면역 세포 특징

우리는 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)를 대상으로 직접 주사에 의한 면역 활성화를 확인하였음. [그림2-19]와 같이 우리는 과거 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*) 혈림프(Hemolymph)에 6종의 혈구세포(Hemocytes)가 존재를 확인하였고 형태적 분류를 진행하였음.

과거 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)의 주요 면역 세포는 과립 혈구세포임을 보고하였음. 우리는 본 과제를 통하여 면역 활성화 인자(Immunostimulants; *E.coli* and BT)를 새롭게 조제하고 주입 후 과립 혈구세포의 활성화를 재확인하였음.



[그림2-19] 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)의 혈구 세포 종류. A(G); Granulocytes, B(H); Plasmatocytes, C(I); Oenocytoids, D(J); Spherulocytes, E(K); Prohemocytes, F(L); Adipohemocytes

붉은색은 세포질을 염색한 Actin, 푸른색은 핵을 염색한 DAPI이며, 흰색 화살표는 위족 (Pseudopodia)을 나타냄. 위 6종의 혈구세포 중 면역 활성화는 과립 혈구세포가 담당하는 것으로 보고되었고 우리는 면역 유도제(*E. coli*와 BT) 주입 시 과립 혈구세포의 위족 형성이 면역 활성화 지표 인자로 활용될 수 있음을 확인하였음.

그러나 면역 활성화 인자(Immunostimulants; *E. coli* and BT)에 의한 과립혈구세포의 최적 활성화 농도를 확인하기 최적 적정 농도를 확인하는 실험을 진행하였음.

② 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)의 면역 인자 적정 농도 값 설정

면역 활성화 및 면역 주기를 파악하기 위하여 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)의 첫 번째 기문 윗부분에 그람음성균인 대장균(*E. coli*)을 주사하여 관찰하였음. 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*)는 복부에 주입하는 것이 생존율이 높게 나타났지만, 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*) 유충의 경우는 그림4와 같이 기공 윗부분에 주입하는 것이 생존율과 면역이 높게 활성화되는 것을 확인하였음.

면역 활성화 인자(*E. coli*와 BT 혼합)의 적절한 접종량 및 농도를 설정하기 위하여 LD50 값을 측정하였음. 아래 테이블과 같이 용량( $\mu$ l)별 접종하여 2일간 조사하였음(우리는 다양한 실험을 통하여 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)는 면역 최대 활성화 시기가 2일 이내임을 확인하였음). 우리는 면역 활성화인자(*E. coli*와 BT 혼합)의 O.D.값을 1.0, 1.3, 1.5, 1.8, 2.0으로 설정하고 곤충당 접종량을 10 $\mu$ l, 15 $\mu$ l, 20 $\mu$ l, 25 $\mu$ l, 30 $\mu$ l 순으로 그룹당 50마리씩 접종하였음. 하지만, O.D.값 1.0에 30 $\mu$ l 접종시 1마리, O.D.값 1.8에 25 $\mu$ l 접종시 1마리, O.D.값 2.0에 20 $\mu$ l 접종시 1마리 O.D.값 2.0에 30 $\mu$ l 접종시 1마리가 사망하여 LD50값은 구할 수 없었음. 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)를 총 25그룹 각 50마리씩 총 1,250마리를 3 반복 실험하였고, 그중 평균 3마리가 죽은 것을 나타나 독성은 없는 것으로 판단됨[표2-6].

[표2-6] 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)의 면역활성화인자(*E. coli*와 BT 혼합)에 대한 LD50

O.D. \ $\mu$ l	10	15	20	25	30
1.0	0	0	0	0	1
1.3	0	0	0	0	0
1.5	0	0	0	0	0
1.8	0	0	0	1	0
2.0	0	0	1	0	1
총합	0	0	1	1	2

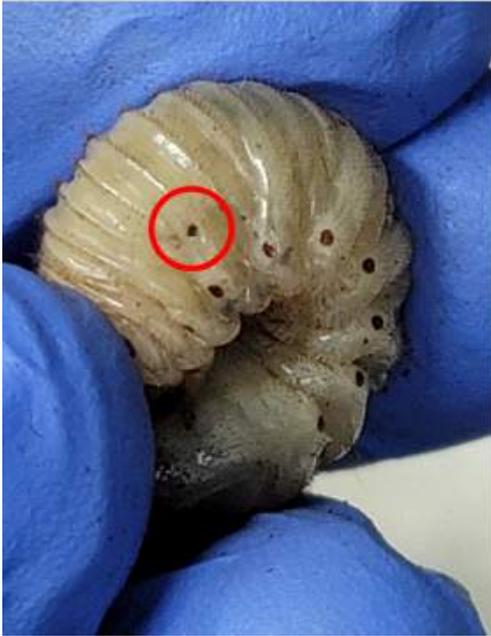
O.D. \ ul	10	15	20	25	30
1.0	0	0	0	0	0
1.3	0	0	0	0	0
1.5	0	0	0	0	1
1.8	0	1	0	1	0
2.0	0	0	0	0	0
총합	0	1	0	1	1

O.D. \ ul	10	15	20	25	30
1.0	0	0	0	0	1
1.3	0	0	0	0	0
1.5	0	0	0	0	0
1.8	0	0	0	0	0
2.0	0	0	1	1	0
총합	0	0	1	1	1

우리는 각 그룹에서 표본 곤충을 3마리씩 선정하여 면역 혈구세포(과립혈구세포)의 활성화를 조사하였음. 그림 3의 A와 G같이 과립 혈구세포가 모두 활성화되어 있음을 확인하였음. 그중 대장균 배양 농도 O.D.값 1.0, 용량  $10\mu\text{l}$  정도의 양이 면역 활성도가 높았으며 주사한 모든 곤충이 매우 활발히 건강한 것으로 판단되어 O.D.값 1.0, 용량  $10\mu\text{l}$ 가 적정 주사량임을 알 수 있었음.

곤충의 상처가 아물고 낫는 것은 일반 포유동물이나 파충류와 같은 척추동물의 회복 (Cure)와는 차이가 있음. 곤충은 피를 흘리는 상처가 발생하면 혈액 응고 현상과 cuticle의 회복이 발생하나 수명과 비교하여 매우 느리게 재생됨, 주사 시 발생 되는 상처는 생존율을 낮추는 주요 원인 중 하나임. 따라서 접종 시 최소한의 구멍만 발생시켜 주입함. 따라서 이러한 주입법으로 면역 활성화를 유도하는 것은 많은 시간과 노력이 필요함.

## Success



## Failure



[그림2-20] 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*) 접종 성공과 실패.

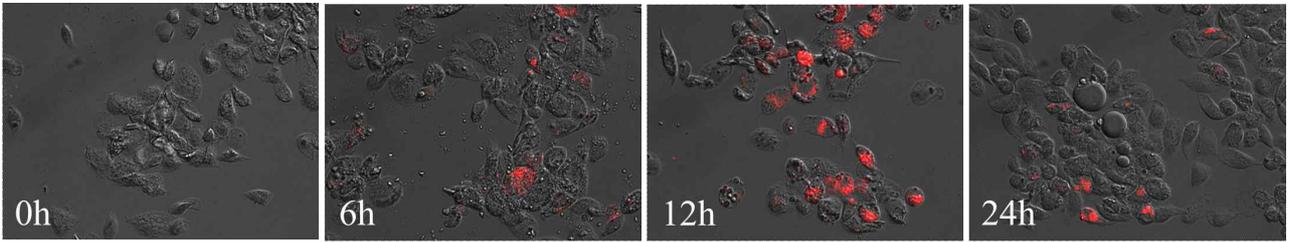
흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)는 너무 강하고 깊게 주입한다면 곤충 장기를 손상시키고 온몸이 전체적으로 melanization이 발생 되어 활동성이 줄고 사망하며 기공 윗부분에 주입하는 것이 생존율과 면역을 높게 발생시키는 것으로 나타남.

예를 들어 [그림2-20]과 같이 주사 바늘 크기의 큐티클 melanization 현상이 관찰되지만, 너무 강하고 깊게 주입한다면 곤충 장기를 손상 시키고 온몸이 전체적으로 melanization이 발생하여 활동성이 줄고 사망하는 것을 확인하였음. 또한, 면역유도제를 주입하는 지역도 중요한데 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*)는 복부(Abdomen)근처 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)는 기공 윗부분에 주입하는 것이 생존율과 면역을 높게 발생시키는 것으로 확인되었음.

### ③ 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)의 최적 면역반응 시간 설정

다음으로 우리는 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)의 세포 면역 활성화 적정시간을 탐색하였음. 면역활성화인자(대장균(*E.coli*)과 BT 혼합)의 O.D.값 1.0, 용량  $10\mu\text{l}$  주사한 후 0h, 6h, 12h, 24h 시간을 선정하여 면역 최대 활성화 시간을 선정하였음.

모든 면역 세포는 주입한 면역 인자를 식균하고 세포질에서 리소좀(lysosome)이 형성되어 제거하는 체계를 가지고 있음. 우리는 리소좀(lysosome)을 염색하는 LysoTracker(Invitrogen™)를 사용하여 염색하였음. 1(염색시약):499(PBS buffer)의 비율로 농도를 조절하여 채혈된 혈구세포들과 암실에 배양하였음. 그 후 원심분리(4500G, 15min, 4℃) 한 뒤, 상층액은 버리고 PBS buffer로 세척하고 원심분리(4500G, 15min, 4℃)를 3번 반복하여 형광현미경으로 관찰하였음.



[그림2-21] 흰점박이꽃무지(*P.brevitarsis seulensis*)의 면역활성화인자(대장균(*E.coli*)과 BT 혼합) 주입 후 Lysosome 염색(RED).

시간에 따른 Red로 염색된 과립혈구세포. 주입 후 12시간에 많은 과립혈구세포들이 염색되는 것을 알 수 있었음.

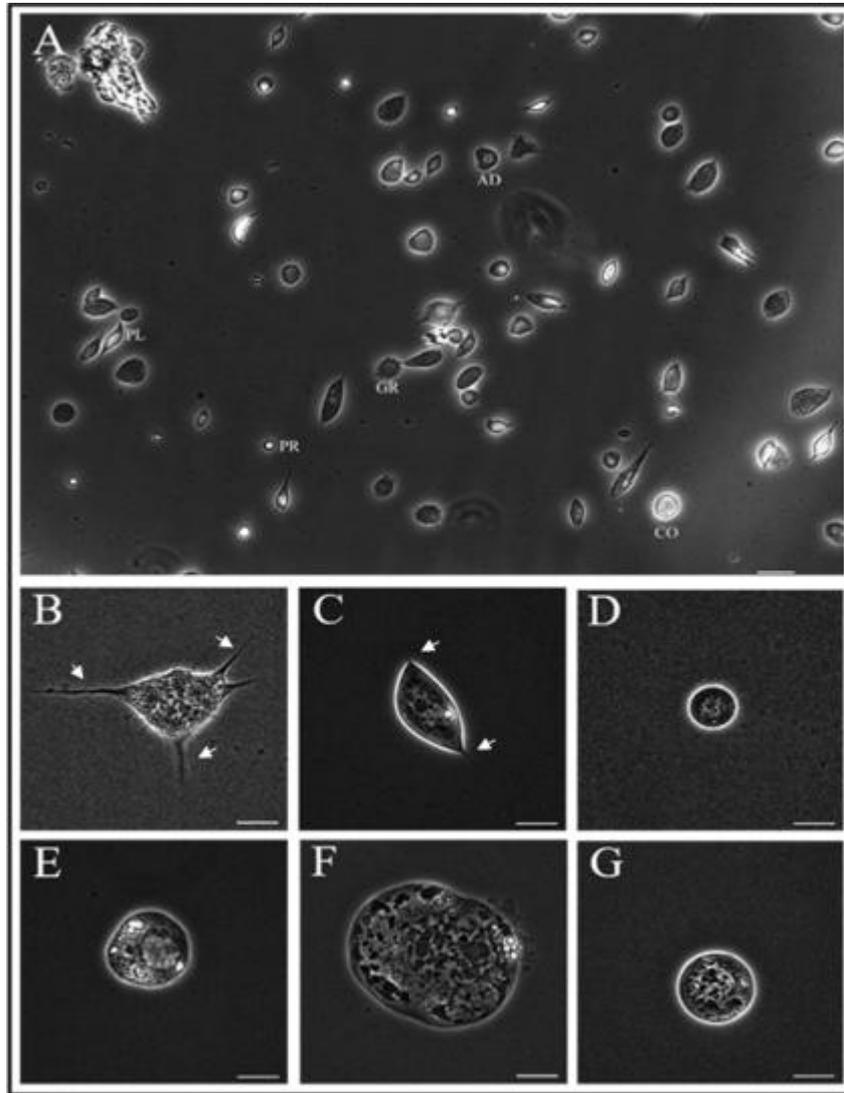
[그림2-21]과 같이 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)의 과립혈구세포(Granulocytes)는 대장균 주입 6시간부터 리소좀(Lysosome)이 활성화되어 붉은색으로 염색된 것이 관찰되었음. 또한, 12시간에 가장 많이 발현된 리소좀(Lysosome)을 관찰할 수 있었으며, 12시간에 최고치에 도달한 후 24시간을 지나면서 감소된 리소좀(Lysosome)을 확인하였음.

위와 같은 실험은 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*)와 동애등애(*H. illucens*)에서도 수행하였으며 모든 곤충이 면역 최대 활성화 시간이 면역 인자 주입 후 12시간 정도가 최적의 시간임을 알 수 있었음.

#### ④ 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*)의 면역 세포 특징

우리는 1차년도에 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*)에 대하여 면역세포를 특징하고 혈구세포 종류를 형태학적으로 분류하였음. 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*)는 6종류의 혈구세포가 존재하며 그 중 과립혈구세포(Granulocytes)와 부정형혈구세포(Plasmatoctyes)가 면역세포임을 알 수 있었음 [그림2-22].

*E. coli* 와 BT를 직접 주사 후 곤충은 일차적으로 면역 혈구 세포들의 활성이 나타남. 모든 생물의 면역세포는 병원균의 침입을 인지한 후 세포막의 급격한 형태적 변이가 나타남. 우리는 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*)의 과립혈구세포(Granulocytes)가 그림 B와 C같이 세포막이 가늘고 길게 나타나는 현상을 관찰하였음[그림2-6 B와 C; 하얀색 화살표]. 그 후 시간이 지나면 면역 혈구세포의 세포막은 크고 끈적한 web과 같은 형태로 변화됨. 초기 면역 혈구세포의 B와 C같이 세포막이 가늘고 길게 나타나는 것을 pods라 하며 면역 혈구세포의 활성화 인자로 사용될 수 있음. 면역세포는 이 pod를 활용하여 곤충의 몸속에 침입한 세균, 곰팡이, 바이러스, 원생동물과 같은 외래 물질들을 포식작용(Phagocytosis)을 통해 제거함. 이러한 곤충 면역세포들은 캡슐화(Encapsulation)와 노듈화(Nodulation)등을 통하여 크거나 다량의 병원균을 제거하기도 함.



[그림2-22] 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*) 혈구세포 종류 (Cho & Cho, Sci rep). A; 전체 혈구 세포 모습, B; Granulocytes, C; Plasmatocytes, D; Prohemocytes, E; Coagulocytes, F; Oenocytoids, G; Spherulocytes.

우리는 직접 주사를 통하여 B와 C같이 면역 활성화되는 과립혈구세포와 부정형 혈구세포들을 확인하였음.

우리는 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*)를 대상으로 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*) 실험과 같이 1. 적절한 접종량 및 농도를 설정, 2. 면역 활성화 시기 설정 실험을 진행하였음. 결과와 절차가 동일 하기에 본 보고서에 유사한 결과들을 생략하였음.

간략하게 결과를 보고하면 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*) 350마리를 대상으로 면역 유도제(*E. coli*와 BT)를 직접 주사하였고 99% 이상 과립혈구세포(Granulocytes)가 면역 활성화되는 것을 확인하였음. 본 결과는 면역 활성화인자(*E. coli*와 BT 혼합)의 O.D.값 1.0, 용량  $10\mu\text{l}$  주사한 후 12h 시간이 지난 후 면역 최대 활성화를 관찰하였음.

하지만, 아래에서 설명하겠지만 직접 주사방법이 아닌 **면역유도 대량사육방법**으로 사육한 쌍별

귀뚜라미(*G. bimaculatus*), 동애등애(*H. illucens*), 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)의 경우 모두 12시간이 최적화 시간이 아닌 것으로 나타남.

즉, 직접 주사하여 면역 활성화를 관찰하면 시간별로 즉각적으로 반응이 나타나지만, 면역유도 대량 사육방법으로 사육하며 간접적으로 면역을 유도하면 유도되는 시간이 오래 걸리며 다시 최적 시간을 설정할 필요가 있었음.

곤충에게 병원균을 주사하여 면역을 유도하는 방법은 확실하지만 숙련된 기술을 요구하며 위험 부담이 큰 작업이며 또한, 2,000마리 이상 작업을 해야 하기에 노동과 시간이 매우 많이 요구함. 따라서 대상 곤충의 면역을 활성화 시키며 최대한 쉽고 효율적인 방법으로 대량사육하는 방법의 필요성이 나타남.

## 라) 면역 활성화를 위한 면역 활성화인자(*E.coli*)와 BT 혼합)와 함께 사육

### ① 선발된 곤충 대상 대량 사육시 면역유도와 항생/항균 펩티드 과발현

곤충 면역유도는 1차연도 과제수행 당시 동애등애(*H. illucens*)를 활용하여 면역 활성화 인자(Immunostimulants)를 같이 사육하였던 방법으로 면역이 활성화되는 것을 확인하였음. 우리는 위와 같은 방법을 활용하여 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*)와 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)에도 적용하여 아래 결과를 도출하였음.

### ② 면역유도 및 곤충 사육환경 조건

쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*)는 멸균된 케이지(31.5cm×44cm×21cm)에서 온도 28±1°C, 습도 30-40%, 광주기 16:8 (L:D)에서 일정하게 사육하였음.

흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)는 멸균된 케이지(31.5cm×44cm×21cm)에서 온도 25±1°C, 습도 40-50%, 광주기 16:8 (L:D)에서 일정하게 사육하였음.

동애등애(*H. illucens*)는 멸균된 케이지(31.5cm×44cm×21cm)에서 온도 25±1°C, 습도 40-60%, 광주기 16:8 (L:D)에서 일정하게 사육하였음.

면역활성화 인자는 50ml 5.29X10<sup>5</sup> 그람음성균(*Escherichia coli* K12), 50ml 4.89X10<sup>8</sup> 그람양성균(BT: *Bacillus Thurengensis*) 균들을 각각 100°C에서 20분간 가열하여 불 활성화 시킴. 우리는 100°C에서 5분~15분간 가열하여 사육환경에 함께 사육한 경우 사육환경에서 *E.coli*나 BT인지는 확인하지 못했으나 시간이 지남에 따라 세균이 함께 자라나기 시작하며 곤충들이 사망하기 시작하였음. 즉, 100°C에서 20분간 확실한 불활성화 단계가 필요한 것으로 판단됨. 대조군으로 LB 또는 NA 배지를 처리하여 사육하였음.

동시에 하루 1회 100rpm으로 10분간 케이지를 흔들(shaking)면서 인위적으로 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*), 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*), 동애등애(*H. illucens*)의 큐티클에 상처를 유도 시키거나 입, 기공(spiracles)을 통해 곤충 내 유입시킴으로써 면역 활성화를 유도하였음.

우리는 하루 3회 100rpm으로 20분간 케이지를 흔들(shaking)는 조건으로 사육하였고 또는 하

루 1회 100rpm으로 5분간 사육도 진행하였음. 그러나 위 조건 모두 생존율이 떨어지거나 면역 활성화도가 최고치에 도달하지 못하는 것으로 나타남.

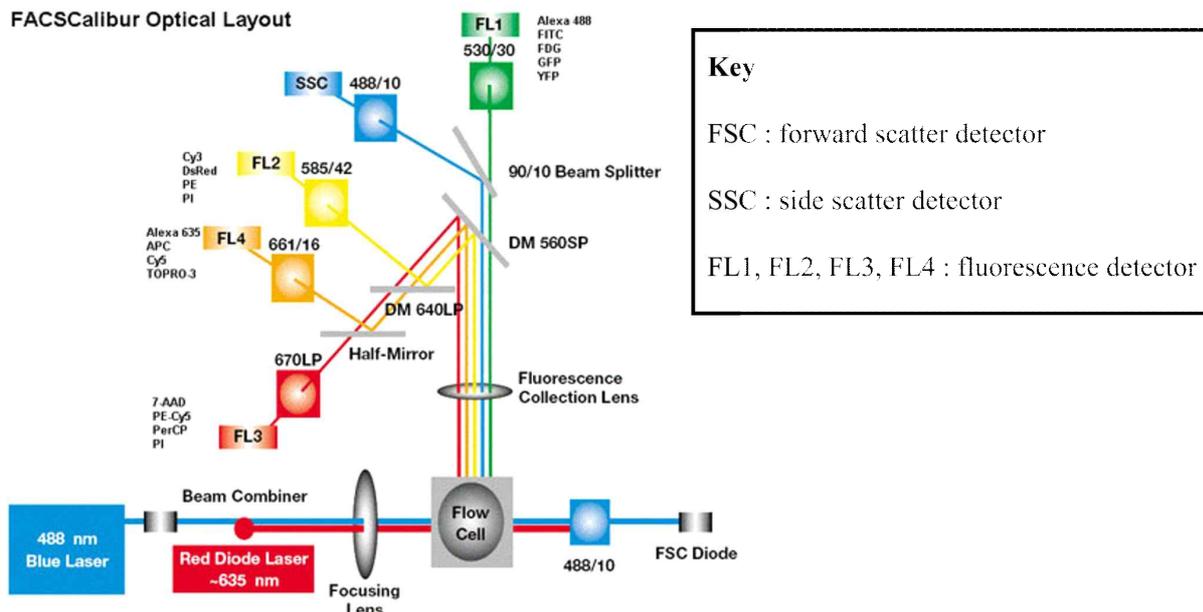
1차년도에 수행하였던 결과에서 동애등에(*H. illucens*)는 큐티클의 melanization 현상을 관찰하여 면역의 활성화 여부를 판단할 수 있었지만, 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*)와 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)는 겉으로 큐티클 melanization 현상과 같은 면역활성화가 형태적으로 관찰되지 않았음. 즉, 우리는 곤충 면역 활성화 여부를 형태적으로 파악할 수 없었음.

따라서 우리는 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*), 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*), 동애등에(*H. illucens*)를 대상으로 위 실험에서 관찰한 면역 혈구세포의 활성화를 확인하는 방법으로 진행하였음.

우리는 빠르고 효율적으로 면역 활성화 여부를 파악하기 위하여 유세포분석기(Flow cytometry, FACS) 분석을 사용하였음. 이 분석은 샘플을 형광 시료를 이용하여 염색한 뒤, 샘플을 흘려보내면 레이저 센서가 특정 형광 신호를 감지하여 기준의 세포 개수 중에서 비율(%)로 형광이 나타났는지를 수치화하는 장비임[그림2-23].



FACSCalibur Optical Layout

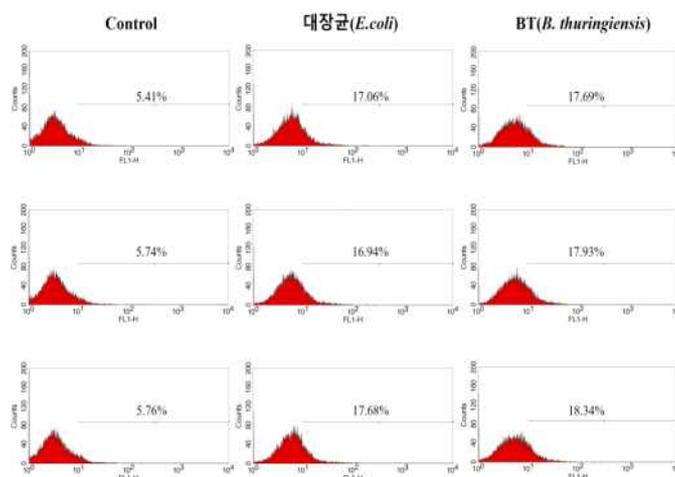


[그림2-23] 유세포분석기(Flow cytometry, FACS, BD사의 FACSCalibur) 장비와 분석원리.

세포가 지나가는 것을 레이저 센서가 감지하고 지나간 세포를 Red, Orange, Blue, Green 최대 4가지 색상의 레이저 센서가 특정 색 영역의 신호를 감지하여 몇 개의 세포가 어떠한 색이 얼마만큼의 비중을 차지하는지 수치화함. 곤충에서 면역 활성화가 진행되면 리소좀(Lysosome)이 발생 되는 원리를 이용하여 집단 면역유도 방법으로 사육된 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*), 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*), 동애등애(*H. illucens*)의 혈구세포를 리소좀(Lysosome)만 특이적으로 염색하는 Lysotracker(Invitrogen™)를 이용하여 유세포분석(Flow cytometry analysis)을 하였음. 우리는 한 마리 곤충당 10,000개의 세포를 읽고 분석하였음. 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*), 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*), 동애등애(*H. illucens*)의 혈림프를 추출하여 1.5ml 튜브에 모아 원심분리(4500G, 15min, 4℃) 한 뒤, 상층액은 버리고 PBS buffer 500  $\mu$ l에 분석 샘플을 만듦. Lysotracker(Invitrogen™) 1  $\mu$ l를 넣고 암실에서 30분 염색한 뒤, 원심분리(4,500G, 15min, 4℃) 하고 PBS buffer 500  $\mu$ l로 세척 하는 과정을 3번 반복하였음. 마지막 볼륨을 1ml로 조절하고 세포만 통과할 만한 크기의 구멍(Pore Size) 40um의 Cell Strainer(SPL)에 필터링(Filtering)하여 불순물을 제거한 뒤 분석하였고, 각 샘플당 3 반복 실험하였음.

### ③ 곤충별 유세포분석(Flow cytometry analysis) 결과

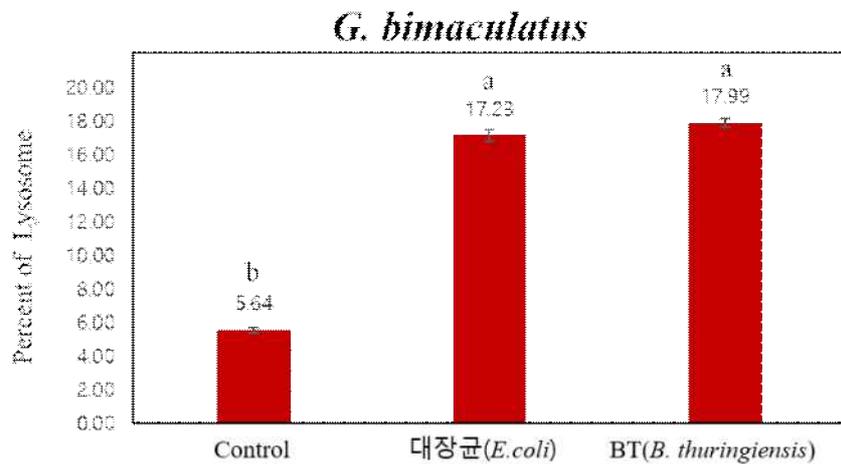
쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*)의 Control에서는 각 5.41%, 5.74%, 5.76%로 평균 5.64%의 매우 적은 리소좀(Lysosome) 활성화가 관찰되었음. 즉, 면역이 활성화는 진행되지 않았음[그림 2-24]. 우리는 집단 사육 시 면역 활성화인자 *E. coli* 와 BT를 혼합하여 사용하였지만 각각에 면역 활성화 여부를 확인하기 위하여 본 실험은 각각 처리하여 확인하였음. 즉, 그람음성균(*E. coli* K12) 처리구에서는 각 17.06%, 16.94%, 17.68%로 평균 17.23%의 리소좀(Lysosome)이 발현되어 면역이 활성화되었음[그림2-24]. 그람 양성균(BT) 처리구에서는 각 17.69%, 17.93% 18.34%로 평균 17.99%의 리소좀(Lysosome)이 발현되어 면역이 활성화되었음을 알 수 있었음 [그림2-24]. 두 균주 처리 간의 면역 활성화 정도는 유의미한 차이가 없는 것으로 확인되었고 면역 활성화인자 *E. coli* 와 BT를 혼합하여 사용하여도 문제가 없는 것으로 판단되었음.



[그림2-24] 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*)의 유세포분석(Flow cytometry analysis) 결과.

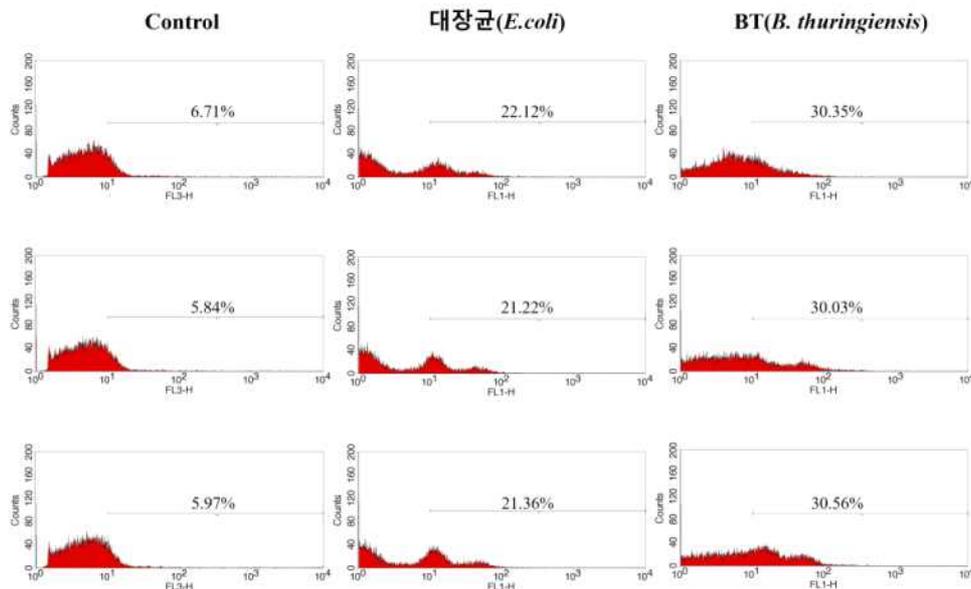
그람음성균(*Escherichia coli* K12) 그람양성균(*Bacillus Thurengensis*) 처리 간의 면역 활성화 정도는 유의미한 차이가 없는 것으로 확인되었고 면역 활성화인자 *E. coli* 와 BT를 혼합하여 사용하여도 문제가 없는 것으로 판단됨. 대조군과 비교 면역 활성화가 진행되는 것을 알 수 있었음.

결과 값을 토대로 Duncan의 중다범위검정(Duncan's multiple range test)을 시행하였고 표준통계 프로그램(IBM SPSS ststistic 22.0)을 사용하여 분석하였음[그림2-25]. 대조군과 비교 면역 활성화가 유도되었음을 확인하였고 그람음성균(*E. coli* K12)과 그람양성균(BT) 처리 간의 면역 활성화 정도는 유의미한 차이가 없음.



[그림2-25] 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*)의 유세포분석(Flow cytometry analysis) 통계검정.

그람음성균(*Escherichia coli* K12)과 그람양성균(*Bacillus Thurengensis*)을 처리한 그룹에서 통계적으로 같은 a그룹으로 두 그룹 간의 유의미한 차이가 없음을 나타냄. Control(PBS buffer)은 b그룹으로 a그룹과 유의미한 차이가 있음.



[그림2-26] 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)의 유세포분석(Flow cytometry analysis).

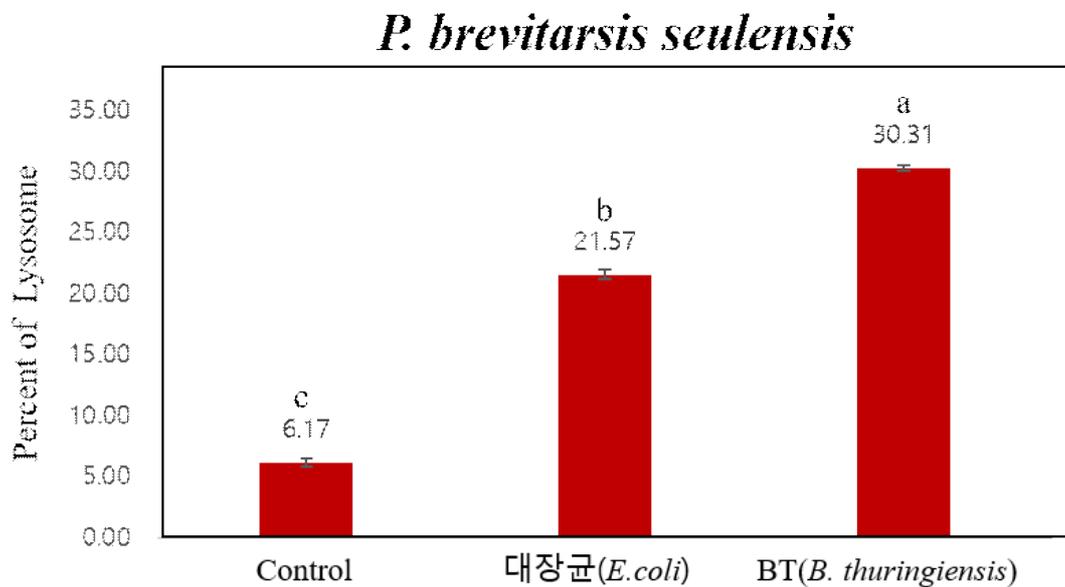
다음으로 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)의 경우 Control 그룹에서는 각 6.71%, 5.84%, 5.97%로 평균 6.17%의 값이 나와 면역이 활성화되지 않았다고 판단됨[그림2-10].

그람음성균(*E. coli* K12) 처리구에서는 각 22.12%, 21.22%, 21.36%로 평균 21.57%의 리소좀(Lysosome)이 발현되어 면역이 활성화된 것으로 판단됨[그림2-26].

그람양성균(BT) 처리구에서는 각 30.35%, 30.03%, 30.56%로 평균 30.31%의 리소좀(Lysosome)이 발현되어 가장 높은 수치로 면역이 활성화된 것으로 나타남[그림2-26].

흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)의 대조군(PBS buffer)은 활성화 리소좀(Lysosome)이 매우 적게 염색되었고 면역 활성이 발생하지 않은 것으로 판단됨[그림2-26].

Duncan의 중다범위검정(Duncan's multiple range test)을 시행하였음[그림2-27].



[그림2-27] 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)의 유세포분석(Flow cytometry analysis) 통계검정.

그람양성균(BT)을 처리한 그룹 리소좀(Lysosome) 발현량이 a으로 가장 높은 서열 관계가 있으며, 그람음성균(*E. coli* K12)을 처리한 그룹의 리소좀(Lysosome) 발현량은 b로 두 번째 서열 관계를 갖고, 유의미한 차이를 갖는 것으로 나타남. 대조군 리소좀(Lysosome) 발현량은 가장 낮은 수치로 면역이 활성화되었음을 알 수 있었음[그림2-27].

면역 활성화 정도는 대조군과 비교 그람양성균(*Bacillus Thurengensis*)을 처리한 그룹, 그람음성균(*Escherichia coli* K12)을 처리한 그룹 순으로 면역 활성화되었음을 알 수 있었음.

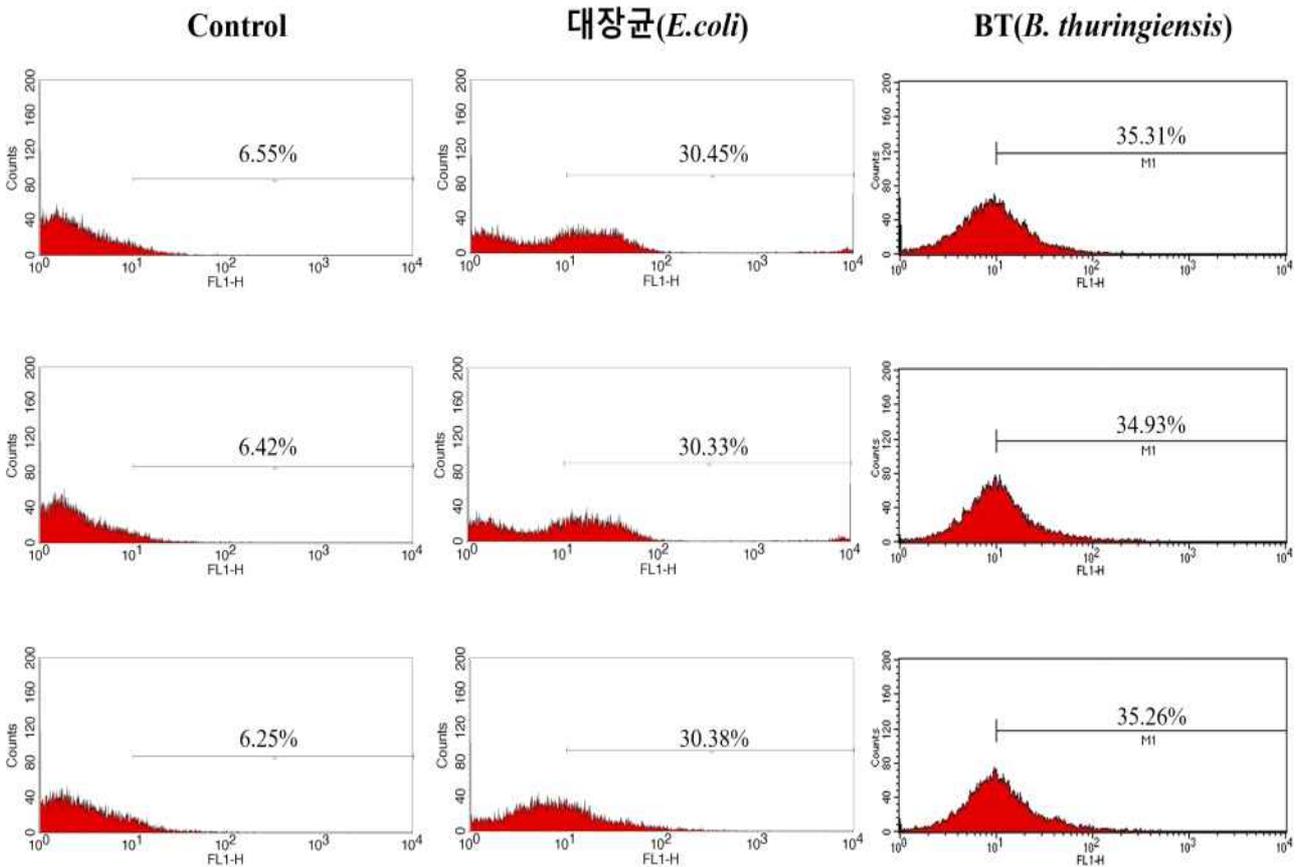
동애등에(*H. illucens*)의 경우도 대조군(PBS buffer)는 각 6.55%, 6.42%, 6.25%의 값으로 평균 6.41%의 매우 적은 리소좀(Lysosome)이 발현되는 것으로 나타남[그림2-28].

그람음성균(*E. coli* K12)을 처리한 그룹에서는 30.45%, 30.33%, 30.38%로 평균 30.39%의 리소좀(Lysosome) 발현량을 나타내며 면역이 활성화된 것을 확인하였음[그림2-28].

그람양성균(BT)을 처리한 그룹에서는 35.31%, 34.93%, 35.26%로 평균 35.17%의 가장 높은

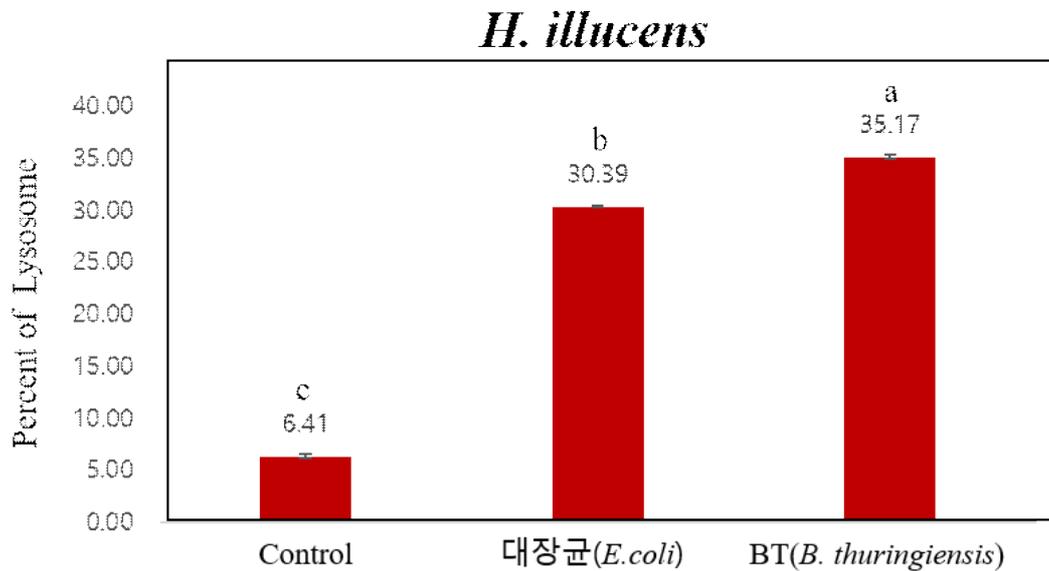
리소좀(Lysosome) 발현량이 확인되었음[그림2-28].

동애등에(*H. illucens*)는 선별된 곤충 그룹 중 가장 높은 수치의 리소좀(Lysosome) 발현량이 확인되었음.



[그림2-28] 동애등에(*H. illucens*)의 유세포분석(Flow cytometry analysis) 결과

Duncan의 중다범위검정(Duncan's multiple range test)을 시행하였음[그림2-29].



[그림2-29] 동애등에(*H. illucens*)의 유세포분석(Flow cytometry analysis) 통계검정

동애등에(*H. illucens*)는 그람양성균(*Bacillus Thurengensis*)을 처리한 그룹의 리소좀(Lysosome) 발현량이 a으로 가장 높았으며 그람음성균(*Escherichia coli* K12)을 처리한 그룹은 유의미한 차이를 가지며 낮게 관찰되었음[그림2-29].

동애등에(*H. illucens*)의 경우 대장균(*E.coli*)과 BT(*B. thuringiensis*)를 함께 사육하는 경우가 다른 곤충 그룹(흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)와 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*))과 비교면역이 높게 활성화되는 것으로 나타났음. 이러한 차이는 아마 곤충들의 면역 활성화 차이가 각기 다르기 때문이라 할 수 있음.

결론적으로, 선별된 곤충은 모두 면역 활성이 잘 유도되는 것으로 나타났고 우리의 대량사육 면역유도 방법이 효과가 있는 것으로 판단하였음.

#### ④ 항생/항균 단백질 발현 확인을 위한 Real-time PCR 분석

다음으로 면역 활성화 집단 사육된 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*), 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*), 동애등에(*H. illucens*)를 대상으로 곤충의 대표적인 항생/항균 물질인 **Attacin-like protein, Defensin-like protein, Tenascin-like protein, Mucin-like protein**의 cDNA cloning을 통하여 발현 시기를 파악하였음. 이를 위하여 PBS buffer를 Control로 사용하였고, 우리는 면역 유도인자 혼합균(그람음성균(*E. coli* K12)과 그람양성균(BT))을 같이 처리하여 사육한 그룹에서 단백질 발현을 Real-Time PCR로 확인하였음.

사육하는 방법은 위에서 설명하였듯이 1일, 3일, 5일, 7일 간격으로 하루 1회 100rpm으로 10분간 케이지를 흔들(shaking)어 사육된 곤충들을 시료로 사용하였음.

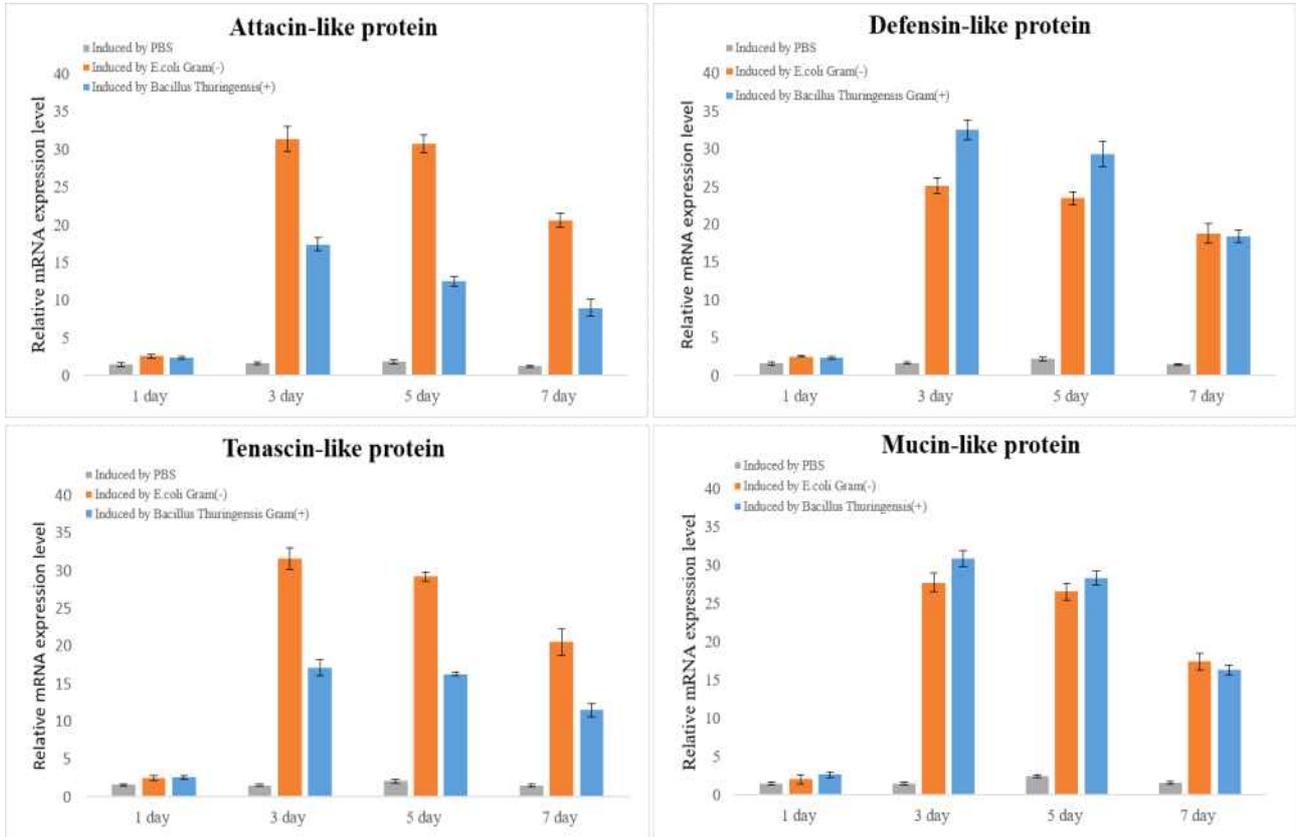
Real-Time PCR(Roto-Gene-Q (Qiagen,USA))은 5 $\mu$ l SYBR Green 마스터 믹스(Elpis-biotech, Korea), cDNA 0.2 $\mu$ l, 각 항생 단백질 유전자 특이적 프라이머 각각 0.4  $\mu$ M를 사용하여 단일 470nm 녹색 형광 측정(30초 동안 94°C, 20초 동안 55°C 및 10초 동안 72°C의 35 Cycles)하였음.

쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*)의 Attacin-like protein에서 3일부터 최소 10배 이상 최대 30배 과발현되는 것을 확인하였음. Attacin-like protein은 그람음성균(*E. coli*) 침입시 발현되는 항생 단백질임. 따라서 그람양성균(BT)을 처리한 그룹일 때 그람음성균(*E. coli*)처리 보다 낮게 발현되는 것을 확인하였음[그림2-30].

Defensin-like protein은 그람음성균과 그람양성균 침입 시 발현되는 항생/항균 단백질로 그람음성균(*E. coli* K12)과 그람양성균(BT)을 처리한 그룹에서 모두 과발현되는 것을 확인하였으며 곤충 병원성을 갖는 BT를 처리한 그룹에서 더 많은 발현량을 확인하였음[그림2-30].

Tenasin-like protein은 그람음성균 침입 시 발현되는 항생/항균 단백질로 그람음성균인 *E. coli* K12를 처리한 그룹이 약 2배 과발현되는 것을 확인하였음[그림2-30].

Mucin-like protein은 그람음성균과 그람양성균 침입 시 발현되는 항생/항균 단백질로 그람음성균(*E. coli* K12)과 그람양성균(BT)을 처리한 그룹에서 3일 이후 모두 과발현되었음.



[그림2-30] 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*)의 항생/항균 단백질 유전자들의 과발현 정도.

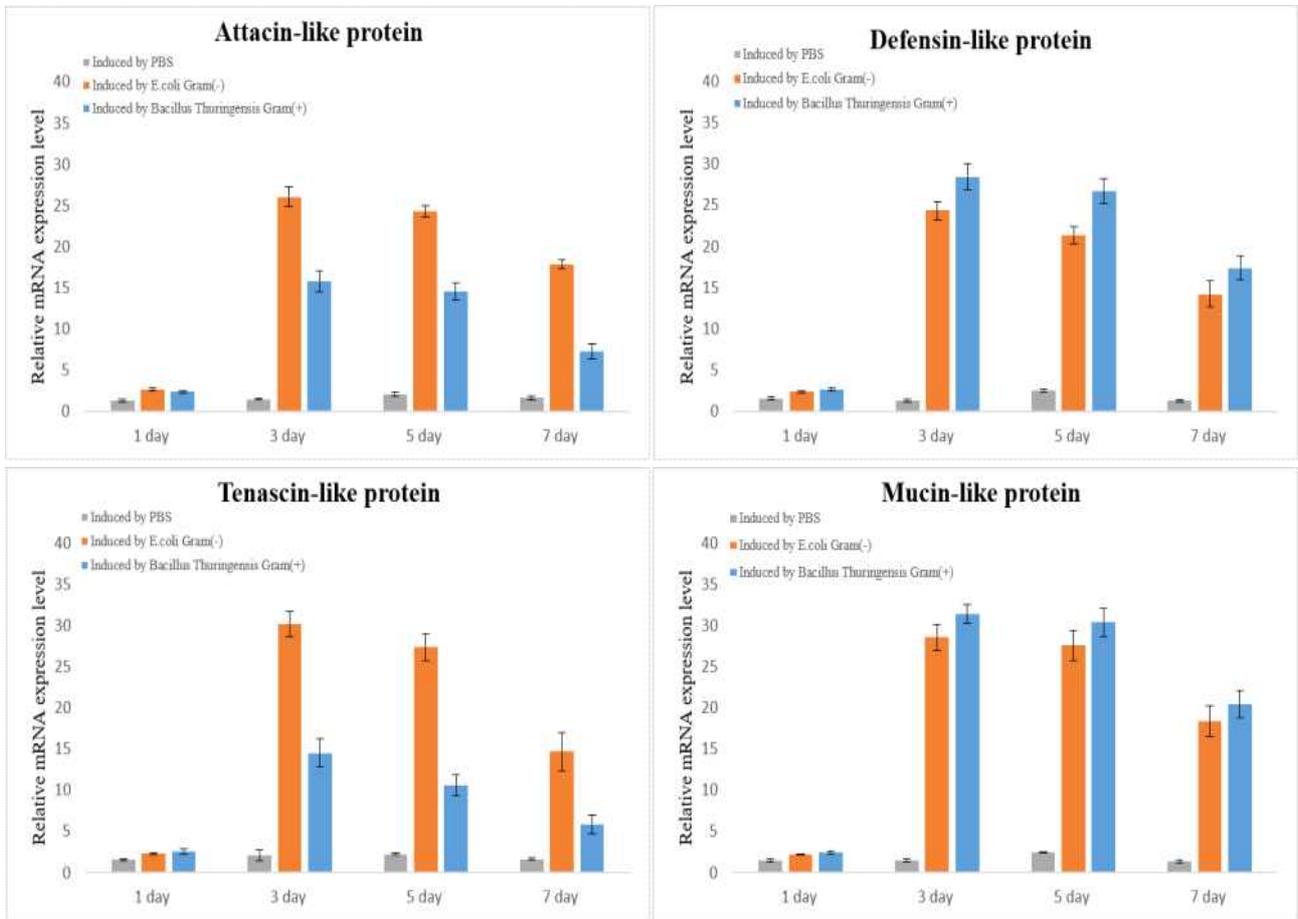
회색은 대조군, 주황색은 그람음성균(*E. coli*) 처리, 파란색은 그람양성균(BT)처리 시 발현되는 양을 나타냄. 3일과 5일 간격으로 하루 1회 100rpm으로 10분간 케이지를 흔들(shaking)어 사육된 곤충의 경우 항생 단백질 발현이 상대적으로 높아지는 것을 확인하였음.

흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)의 경우 Attacin-like protein은 3일부터 최소 5배 이상 최대 30배 과발현되는 것을 확인하였음. Attacin-like protein은 그람음성균 침입 시 발현되는 항생/항균 단백질로 그람음성균인 *E. coli* K12를 처리한 그룹에서 그람양성균인 BT를 처리한 그룹보다 약 1.5배 과 발현되는 것을 확인하였음[그림2-31].

Defensin-like protein은 그람음성균과 그람양성균 침입 시 발현되는 항생/항균 단백질로 그람음성균(*E. coli* K12)과 그람양성균(BT)을 처리한 그룹에서 모두 과 발현되는것을 확인하였음[그림 2-31].

Tenascin-like protein은 그람음성균 침입 시 발현되는 항생/항균 단백질로 그람음성균인 *E. coli* K12를 처리한 그룹의 유전자가 2배 이상 과발현되는 것을 확인하였음[그림2-31].

Mucin-like protein은 그람음성균과 그람양성균 침입시 발현되는 항생/항균 단백질로 그람음성균(*E. coli* K12)과 그람양성균(BT)을 처리한 그룹에서 3일 이후 모두 과발현되었음[그림2-31].



[그림2-31] 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)의 항생/항균 단백질 유전자들의 과발현 정도.

회색은 대조군, 주황색은 그람음성균(*E. coli*) 처리, 파란색은 그람양성균(BT)처리시 발현되는 양을 나타냄. 3일과 5일 간격으로 하루 1회 100rpm으로 10분간 케이지를 흔들(shaking)어 사육된 곤충의 경우 항생 단백질 발현이 상대적으로 높게 나타남.

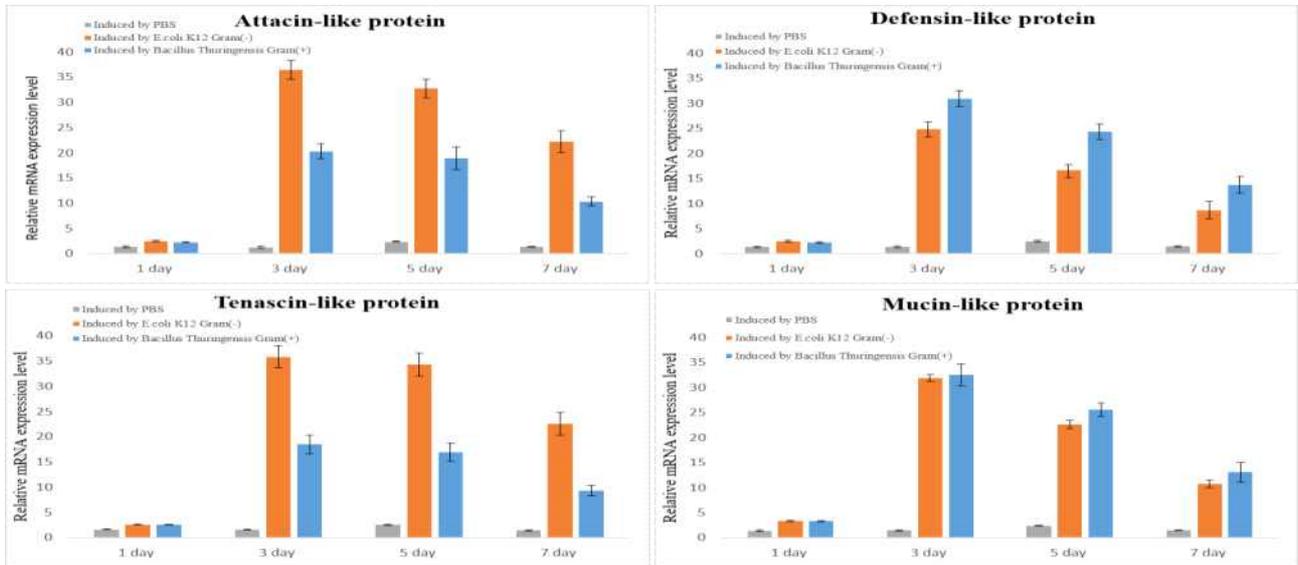
동애등에(*H. illucens*)의 경우도 위 결과와 유사한 결과가 나타났음. Attacin-like protein은 3일부터 최소 10배 이상 최대 35배 과발현되는 것을 확인하였음[그림2-32].

Defensin-like protein은 그람음성균 침입 시 25배, 그람양성균 침입 시 30배 과발현되는 것을 확인하였음[그림2-32].

Tenascin-like protein도 대조군과 비교하여 과발현되었으며 특히 그람음성균인 *E. coli* K12를 처리한 그룹에서 2배 이상 과발현되는 것을 확인하였음[그림2-32].

Mucin-like protein은 그람음성균과 그람양성균 침입시 발현되는 항생/항균 단백질로 그람음성균(*E. coli* K12)과 그람양성균(BT)을 처리한 그룹에서 3일 이후 모두 과발현되었음[그림2-32].

쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*), 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*), 동애등에(*H. illucens*)는 면역유도 3일부터 항생/항균 단백질 유전자가 과발현되는 것을 확인하였으며, 5일에서 3일보다 조금 적은 발현량을 보이고 7일부터 발현량이 낮아지기 시작하는 것으로 나타남.



[그림2-32] 동애등에(*H. illucens*)의 항생/항균 단백질 유전자들의 과발현 정도.

회색은 대조군, 주황색은 그람음성균(*E. coli*) 처리, 파란색은 그람양성균(BT)처리시 발현되는 양을 나타냄. 3일과 5일 간격으로 하루 1회 100rpm으로 10분간 케이지를 흔들(shaking)어 사육된 곤충의 경우 항생단백질 발현이 상대적으로 좋게 나타남.

3종류 곤충 그룹 모두 집단 면역 유도방법을 사용한 후 3일에서 가장 높은 유전자 발현량을 확인하였으며, 직접 주사 방법을 사용한 면역 유도시 시간은 오래 걸리지만, 적정량의 항생/항균단백질이 발생하는 것을 알 수 있었음.

⑤ RNA sequencing을 통한 새로운 항생/항균 단백질 발굴 및 면역 활성화 확인.

우리는 Total RNA sequencing 분석을 통해 전반적인 곤충의 면역발현 상태를 조사하고 발현된 RNA 중에서 항생/항균 단백질들의 종류를 파악하였음.

RNA sequencing을 진행하기 위하여 RNeasy Plus Mini Kit(Qiagen)을 사용하여 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*), 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*), 동애등에(*H. illucens*)각 그룹별의 곤충으로부터 RNA를 추출하였음. 각 곤충을 해부하여 지방체(Fatbody)를 추출한 뒤, 1.2ml(Eppendorf Phase lock gel tube)에 1.2ml Trizol reagent를 넣음. 곤충으로부터 추출한 지방체(Fatbody)를 50~100mg 넣고, 플라스틱 비즈(Beads)를 0.4-0.6mm(DAIHAN AGENT), 2mm(DAIHAN AGENT), 7mm(DAIHAN AGENT)를 넣어 볼텍스 5분-10분 Incubation.

원심분리(14,000RPM, 4°C) 3분 후 상층액 1ml을 1.5ml tube에 옮김. Chloroform 200 $\mu$ l를 넣고, Gently tapping하여 섞어준 뒤, 4°C에 20분 반응시킴(혹은 -70°C, 1시간 반응).

원심분리(14000RPM, 4°C) 15분 후, 맑은 상층액만(약 600 $\mu$ l) gDNA elimination Column으로 이동. 원심분리(14,000RPM, 4°C) 1분. Cold Isopropanol/Ethanol 70%(-20°C 유지보관) 600 $\mu$ l를 넣어 핵산 침전. RNeasy Mini Column에 700 $\mu$ l의 샘플 넣은 뒤 원심분리. 700 $\mu$ l의 RW1 buffer를 넣고, 원심분리(14,000RPM, 4°C) 1분. 500 $\mu$ l RPE buffer를 넣고 원심분리. 멸균된

새로운 RNase-free 1.5 tube에 조립하고, 필터 중앙에 30~50 $\mu$ l RNase-free water 넣고, 1분-5분 대기한 뒤, 원심분리 RNA를 추출함. 우리는 각각의 곤충에서 추출한 Total RNA를 MacroGen 회사에 의뢰 Total RNA sequencing을 진행하였음. 모든 RNA는 Sample QC를 진행하였음.

우리는 RNA Integrity Number(RIN) 값이 7 이상인 Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer(또는 2200 TapeStation)를 사용하여 전체 RNA 무결성을 확인함. DNA 오염 샘플은 제거함.

쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*), 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*), 동애등애(*H. illucens*)의 그룹별로 추출한 RNA의 RIN 값이 모두 7 이상이며, 평균 9.3으로 매우 높은 퀄리티임을 확인하였음[표2-7].

마지막으로 Total RNA sequencing을 진행하기 전 RNA screen tape을 검사하였음. 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*), 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*), 동애등애(*H. illucens*)를 대상으로 RNA quality가 좋은 것을 다시 한번 검증하였음[그림2-33].

**[표2-7] 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*), 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*), 동애등애(*H. illucens*) RNA QC RIN 값.**

면역유도인자로 집단사육한 곤충을 대상으로 RNA 추출한 후 quality 검사. 우리는 면역 유도된 집단 사육 곤충들에 대하여 3일 후 10마리의 곤충 선정. 즉 대조군 10마리, 그람음성균으로 면역 유도된 곤충 10마리, 그람양성균으로 면역 유도된 곤충 10마리에 대하여 Fatbody들을 추출하고 전체 RNA를 추출하였음.

가) 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*) RNA QC 결과

Sample Name	Conc. (ng/ul)	Final Volume (ul)	Total Amount (ug)	RIN	rRNA Ratio	Result*	
BT1	225.279	35	7.885	9.1	0.1	Hold	rRNA ratio
PBS	343.412	36	12.363	10	0.1	Hold	rRNA ratio
E-coli	559.973	22	12.319	9.9	0.1	Hold	rRNA ratio

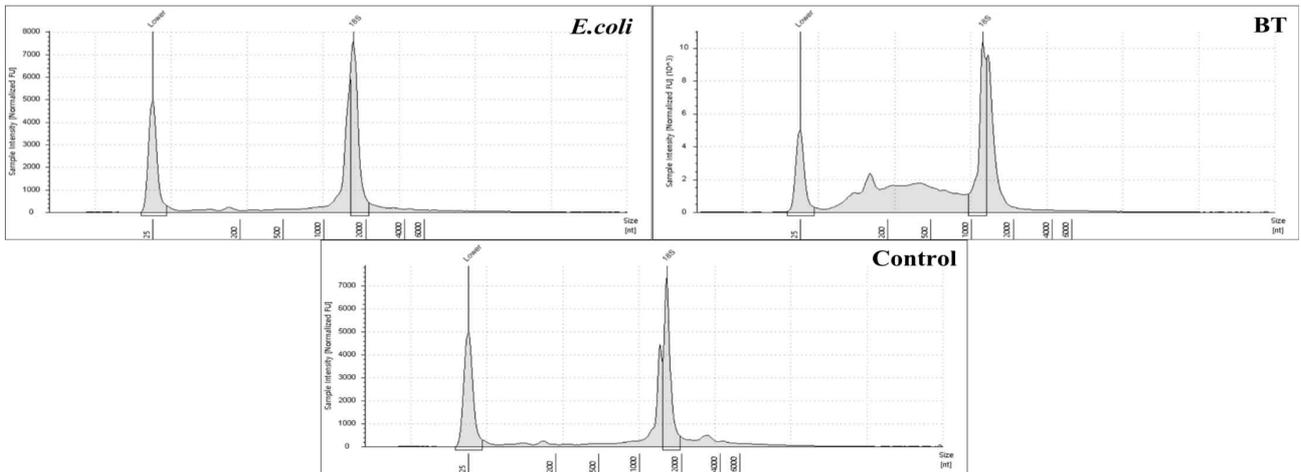
나) 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*) RNA QC 결과

Sample Name	Conc. (ng/ul)	Final Volume (ul)	Total Amount (ug)	RIN	rRNA Ratio	Result*	
B	100.77	42	4.232	8.9	0.1	Hold	rRNA ratio
E	57.733	36	2.078	8	0.1	Hold	rRNA ratio
P	82.712	45	3.722	8.5	0.1	Hold	rRNA ratio

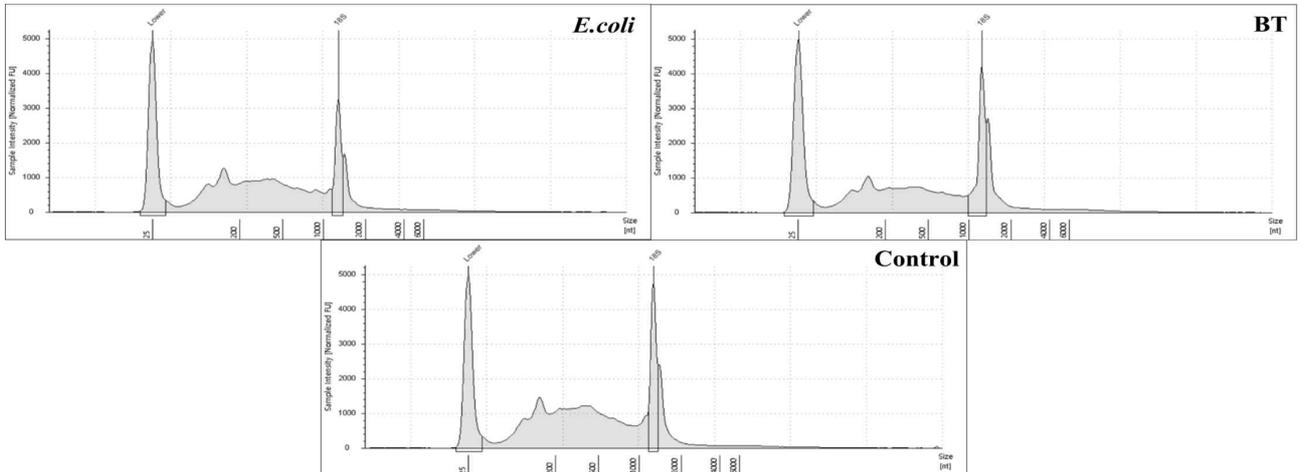
다) 동애등애(*H. illucens*) RNA QC 결과

Sample Name	Conc. (ng/ul)	Final Volume (ul)	Total Amount (ug)	RIN	rRNA Ratio	Result*	
control	363.505	37	13.45	10	0.1	Hold	rRNA ratio, Species specificity suspected
BT	177.691	37	6.575	9.9	0.1	Hold	rRNA ratio, Species specificity suspected
E_coli	202.634	39	7.903	9.8	0.1	Hold	rRNA ratio, Species specificity suspected

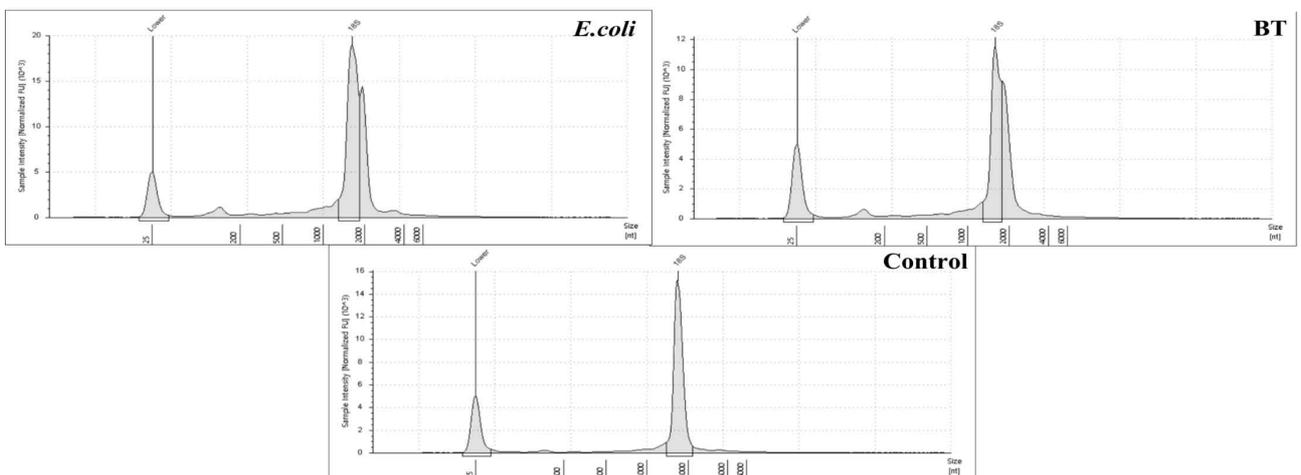
가) 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*) RNA ScreenTape



나) 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*) RNA ScreenTape



다) 동애등에(*H. illucens*) RNA ScreenTape



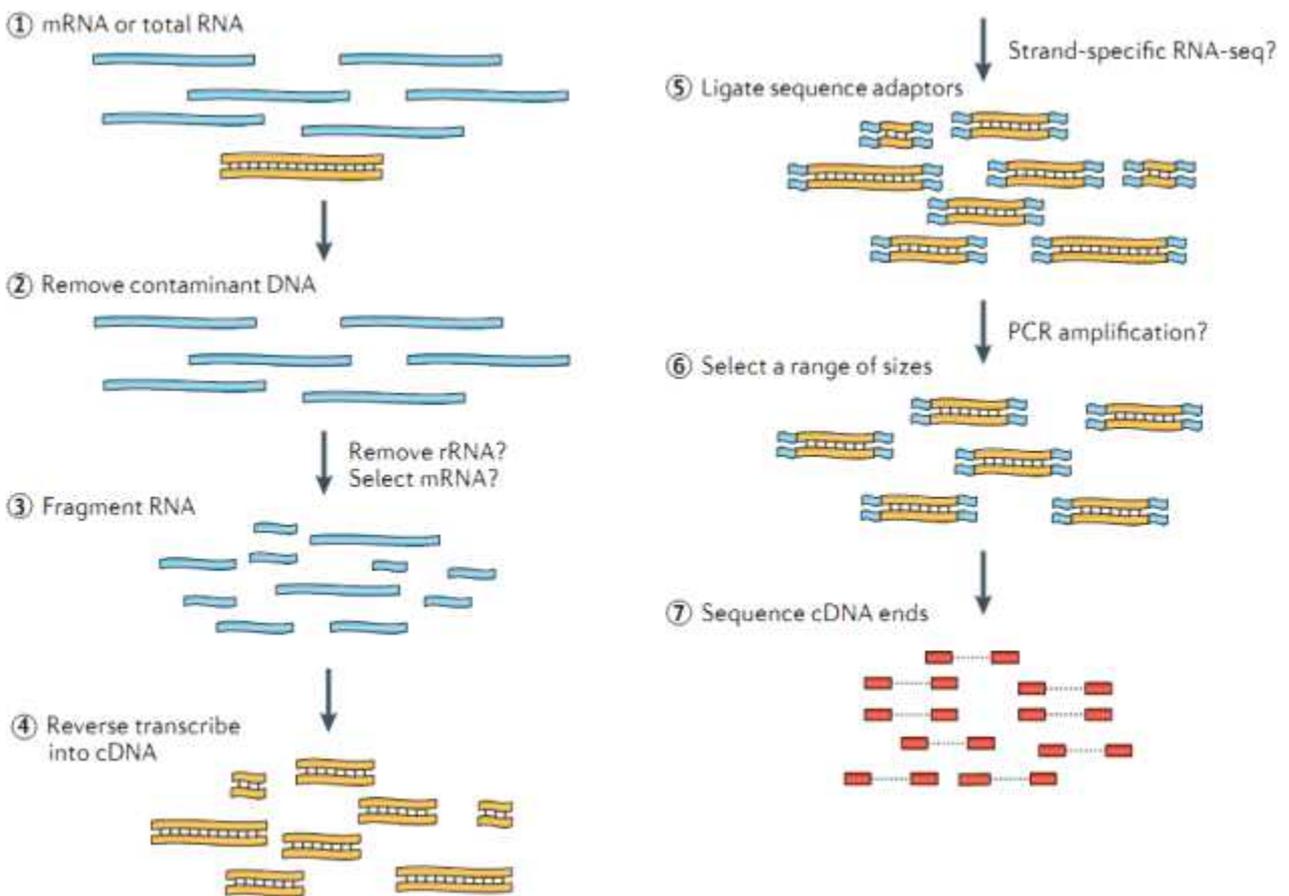
[그림2-33] RNA ScreenTape 분석.

⑥ RNA sequencing Workflow와 RNA sequencing Analysis Methods

쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*), 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*), 동애등에(*H. illucens*) RNA sequencing은 다음과 같은 방법으로 진행되었음.

Target sample(세포 또는 조직)에서 Total RNA를 분리함. DNase를 사용하여 DNA오염을 제거하고 RNA 종류에 따라 library prep 과정에 적합한 kit를 선택, mRNA의 경우 poly-A tail, mRNA 정제키트사용(비코딩 RNA의 경우 ribo-zero RNA 사용). Short read sequencing을 위해 정제된 RNA를 무작위로 단편화함.

단편화된 RNA를 cDNA로 역전사하고 adapter를 cDNA 조각의 양쪽 끝에 붙여줌. PCR을 이용하여 fragment를 증폭한 후, insert size가 200-400bp인 fragment를 선택함. Paired-end sequencing의 경우 cDNA의 양쪽 끝을 read length로 sequencing 함.



[그림2-34] RNA sequencing Workflow. Total RNA sequencing을 위한 전체적인 모식도.

Short read sequencing을 위해 정제된 RNA를 무작위로 단편화함. 단편화된 RNA를 cDNA로 역전사하고 adapter를 cDNA 조각의 양쪽 끝에 붙여주며 PCR을 이용하여 fragment를 증폭. Paired-end sequencing의 경우 cDNA의 양쪽 끝을 read length로 sequencing 함.

Sequencing 된 raw read의 전체 판독 품질, 총 염기, 총 판독, GC(%) 및 기본 통계가 계산되었음. 우리는 분석의 편향을 줄이기 위해 낮은 품질의 read, adapter sequence, 오염 DNA 또는 PCR 증폭과 같은 문제들을 제거하였음.

우리는 서로 비교해야 하는 모든 샘플에 하나의 파일로 병합하였고 병합된 데이터는 일반적으로 transcriptome의 de novo 재구성에 사용되는 Trinity 프로그램을 사용하여 조립하였고 특정 길이의 겹침 읽기 시퀀스를 결합하여 contigs라고 하는 N 간격 없이 더 긴 조각을 형성하였음.

조립된 유전자의 경우, 조립된 contig 중 가장 긴 contig를 필터링하고 CD-HIT-EST 프로그램을 사용하여 non-redundant transcripts로 clustering 하였고 이러한 transcripts를 unigenes로 정의하였음. 획득된 unigenes는 후속 주석, ORF 예측 및 differentially expressed genes (DEG) 분석에 사용되었음.

주석을 위해 NCBI Nucleotide (NT), NCBI Non-redundant Protein (NR), Pfam, Gene ontology (GO), UniProt 및 EggNOG와 같은 다양한 공개 데이터베이스에서 NCBI BLAST의 BLASTN과 DIAMOND software의 BLASTX를 사용하여 unigene을 분석하였음.



[그림2-35] RNA sequencing Analysis Workflow.

쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*), 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*), 동애등에(*H. illucens*) RNA sequencing을 통한 Unigenes들을 찾기 위한 절차.

⑦ RNA sequencing 결과

쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*)에서 BT를 처리한 그룹은 10,968,612,726 bp를 읽었으며 GC 비율은 42.48%, *E.coli*를 처리한 그룹은 11,500,838,286bp를 읽었으며 GC 비율은 41.74%, PBS buffer를 처리한 Control 그룹은 11,267,519,196bp를 읽었으며 GC 비율은 43.04%임을 확인하였음[표2-8].

[표2-8] 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*) RNA sequencing Raw data stats.

Sample id	Total read bases*	Total reads	GC (%)
BT	10,968,612,726	108,600,126	42.48
E_coli	11,500,838,286	113,869,686	41.74
control	11,267,519,196	111,559,596	43.04

흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)에서 BT를 처리한 그룹은 12,089,463,660bp를 읽었으며 GC 비율은 47.65%, *E.coli*를 처리한 그룹은 13,357,319,084bp를 읽었으며 GC 비율은 49.43%, PBS buffer를 처리한 Control 그룹은 12,664,195,878bp를 읽었으며 GC 비율은 43.13%임을 확인하였음[표2-9].

[표2-9] 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*) RNA sequencing Raw data stats

Sample id	Total read bases*	Total reads	GC (%)
BT	12,089,463,660	119,697,660	47.65
E-coli	13,357,319,084	111,559,684	49.43
PBS	12,664,195,878	125,388,078	43.13

동애등에(*H. illucens*)에서 BT를 처리한 그룹은 13,011,257,734bp를 읽었으며 GC 비율은 43.78%, *E.coli*를 처리한 그룹은 12,133,568,340bp를 읽었으며 GC 비율은 43.73%, PBS buffer를 처리한 Control 그룹은 11,879,449,714bp를 읽었으며 GC 비율은 41.85%임을 확인하였음[표2-10].

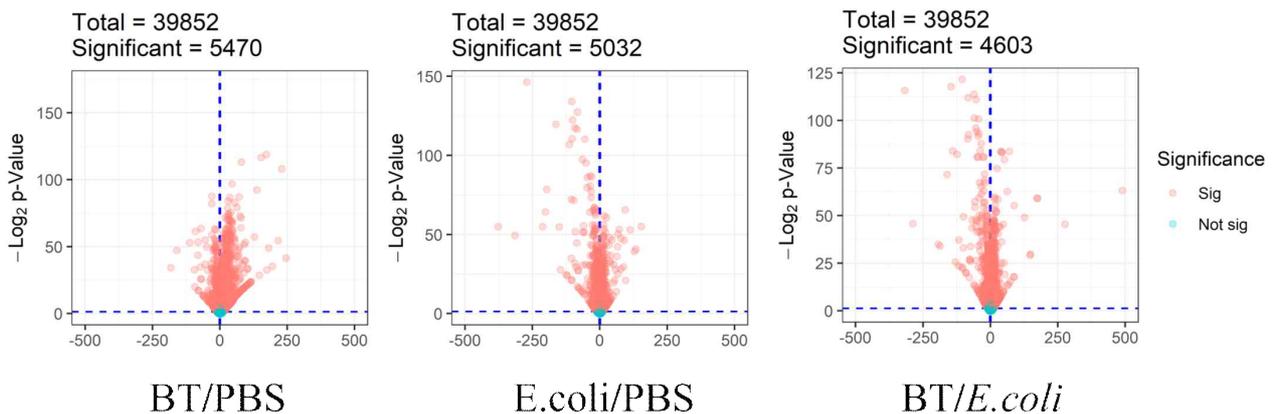
[표2-10] 동애등에(*H. illucens*) RNA sequencing Raw data stats

Sample id	Total read bases*	Total reads	GC (%)
BT	13,011,257,734	128,824,334	43.78
E-coli	12,133,568,340	120,134,340	43.73
PBS	11,879,449,714	117,618,314	41.85

De novo transcriptome assembly 결과로부터 contig 정보들을 추출하여 전체 유전자 발현에 대한 DEG 분석을 수행하여 그 결과를 Volcano plot으로 시각화하였음.

쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*)의 그람양성균인 *Bacillus Thurengensis*와 PBS buffer(control)를 비교하였을 때, Total 39,852개의 contig중에서 Significant한 contig는 **5,470**개, 그람음성균인 *Escherichia coli* K12와 PBS buffer(control)를 비교하였을 때는 Total 39,852개의 contig중에서 Significant한 contig는 **5,032**개로 결과를 확인하였음[그림2-36].

면역이 활성화된 BT와 *E.coli*를 비교하였을 때 Significant한 contig는 4,603개로 확인하였음[그림2-36].



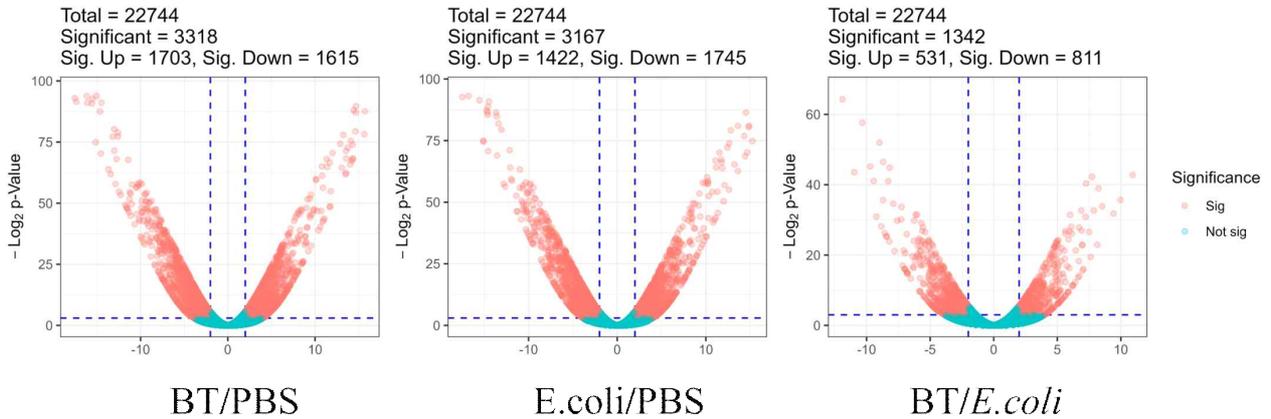
[그림2-36] 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*)의 Volcano plot.

BT와 PBS를 주입한 그룹에서 5,470의 유전자 차이를 확인하였고 *E.coli*와 PBS 비교 그룹에서 5,032개의 유전자 발현 차이를 확인하였음.

흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)의 그람양성균인 *Bacillus Thurengensis*와 PBS buffer(control)를 비교하였을 때, Total 22,744개의 Contig 중에서 Significant 한 contig는 **3,318**개, 그람음성균인 *Escherichia coli* K12와 PBS buffer(control)를 비교하였을 때는 Total 22,744개의 Contig 중에서 Significant 한 contig는 **3,167**개로 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*)의 결과와 유사하게 병원성인 BT가 비병원성인 *E.coli*보다 높은 수치를 보여줌[그림2-37].

면역이 활성화된 BT와 *E.coli*를 비교하였을 때 Significant 한 Contig는 1,342개로 확인하였으며 면역이 활성화되지 않은 PBS buffer(Control)와 비교하였을 때보다 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*)의 결과와 마찬가지로 낮은 수치의 Significant 한 Contig 을 확인하였음.

또한, 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)의 Contig는 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*)와 다르게 저발현(Down)된 유전자의 contig들이 각 수치의 ~50%로 확인되었으며, *E.coli*와 PBS buffer를 비교한 그룹에서 과발현(UP) 유전자들보다 저발현(Down) 유전자들의 수가 더 많은 것으로 확인되었음. BT와 *E.coli*를 비교한 결과에서도 이러한 영향으로 저발현(Down) 유전자가 더 많이 나타난 것으로 판단됨.

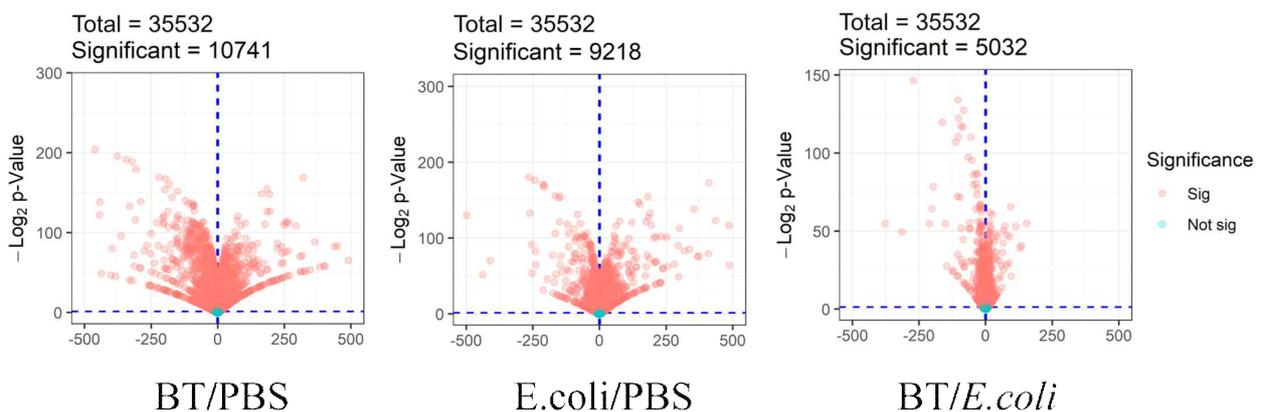


[그림2-37] 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)의 Volcano plot.

BT와 PBS를 주입한 그룹에서 3,318의 유전자 차이를 확인하였고 *E.coli*와 PBS 비교 그룹에서 3,167개의 유전자 발현 차이를 확인하였음.

동애등에(*H. illucens*)의 그람양성균인 BT와 PBS buffer(control)를 비교하였을 때, Total 35,532개의 contig중에서 Significant 한 contig는 10,741개, 그람음성균인 *E. coli* K12와 PBS buffer(control)를 비교하였을 때는 Total 35,532개의 contig중에서 Significant한 contig는 9,218개로 다른 곤충의 결과와 같이 병원성 균을 처리한 그룹에서 더 높은 Significant 한 contig 값을 확인하였음

BT와 *E.coli*를 비교한 그룹은 5,032개로 다른 곤충 그룹은 병원균과 PBS buffer(Control)을 비교한 결과 값의 차이가 크지 않았지만, 동애등에(*H. illucens*)는 약 2배로 큰 차이를 확인하였음. 이는 BT와 *E.coli*의 유전자 발현의 상관관계가 크다는 것을 의미함.



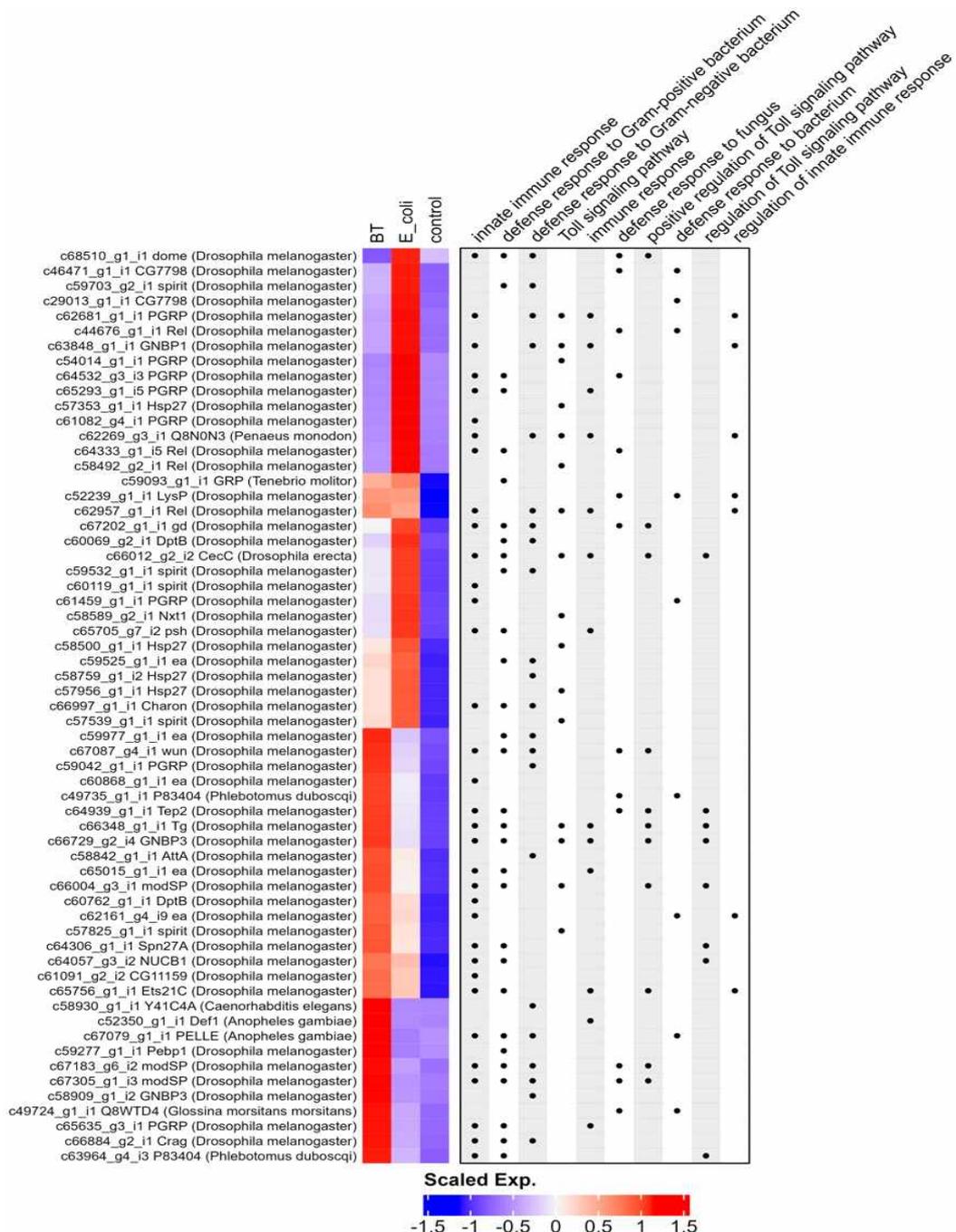
[그림2-38] 동애등에(*H. illucens*)의 Volcano plot.

BT와 PBS를 주입한 그룹에서 10,741의 유전자 차이를 확인하였고 *E.coli*와 PBS 비교 그룹에서 9,218개의 유전자 발현 차이를 확인하였음.

쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*), 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*), 동애등에(*H. illucens*) 그룹 중에서 동애등에(*H. illucens*)의 Significant한 contig 값이 가장 크게 나왔으며 유전자 발현의 차이도 클 것으로 판단하였음.

즉, 우리는 동애등에(*H. illucens*)가 면역유도가 가장 활발하게 발생하였다고 판단하였으며 최종 목표인 다양한 항생/항균 단백질 발굴 가능성도 큰 곤충으로 판단되었음.

모든 곤충의 BT 그룹에서 *E.coli* 그룹보다 Significant한 contig 값이 많이 나온 것이 병원성 때문인지 또는 그람음성균과 양성균의 차이인지를 확인하기 위하여 면역 유전자들 발현에 대하여 Immune system-related 유전자의 Hitmap을 GO 분석하였음[그림2-39].



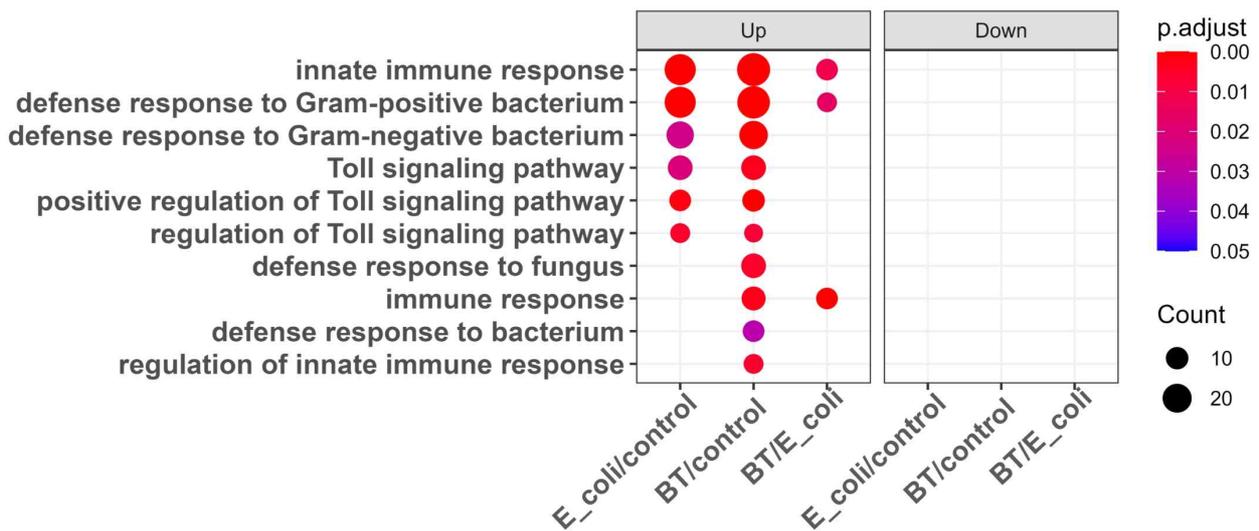
[그림2-39] Immune system-related Heatmap.

동애등에(*H. illucens*)대상 면역 유전자들 발현에 대하여 Immune system-related 유전자들 분석. 왼쪽에 contig는 각 sample에서 얼마나 발현하였는지를 나타내며 오른쪽에는 Blast-search를 통해 각 contig와 가장 유사한 유전자들의 정의를 표시하였음.

분석 항목은 선천적 면역반응, 그람양성균에 대한 방어반응, 그람음성균에 대한 방어반응, 곰팡이에 대한 방어반응, Toll signaling pathway에 대한 반응, 선천적 면역반응 등 곤충 면역에 관련된 항목으로 실질적으로 어떤 변화가 나타났는지를 확인하였음.

특히, 우리는 BT와 *E.coli* 두 그룹에서 대조군과 비교 곤충 면역과 관련 다양한 유전자들의 변화를 확인하였음. 특히, 그람양성균에 대한 방어반응과 그람음성균에 대한 방어반응 등 선천적 면역반응에 대한 유전자들의 유의적 증가를 확인하였음. 우리는 결과의 상관관계를 더욱 명확히 밝히기 위하여 Immune system-related GOs 분석을 통하여 Dotplot을 확인하였음.

BT와 *E.coli* 모두 선천적 면역반응 유전자들이 과 발현하였으며 그람양성균인 BT를 처리한 그룹과 그람음성균인 *E.coli*를 처리한 그룹과 상관없이 PBS 대조군 그룹과 비교하여 다양한 곤충 면역 유전자들이 발현하였으며 동시에 음성균 방어 유전자와 양성균 방어 유전자 비교시 양성균 방어 유전자들이 높게 발현된 것도 확인하였음. 즉, *E.coli*와 BT를 비교한 그룹에서 BT가 그람양성균의 방어반응 유전자들이 매우 활발히 발현되는 것으로 나타났음[그림2-40]. 아마도, BT가 곤충 병원성을 갖는 세균이기에 비병원성인 *E.coli*보다 많은 면역 관련 유전자들이 발현된 것으로 추측할 수 있었음.



[그림2-40] Immune system-related GOs Dotplot.

BT와 *E.coli* 모두 선천적 면역반응 유전자들이 과발현하였으며 그람양성균인 BT를 처리한 그룹과 그람음성균인 *E.coli*를 처리한 그룹과 상관없이 PBS 대조군 그룹과 비교하여 다양한 곤충 면역 유전자들이 발현.

⑧ 항생/항균 단백질

위와 같은 결과를 통해 우리의 면역유도 방법이 면역을 활성화하는 데 효과가 있음을 확인하였고 활성화된 면역으로 인해 과발현되는 항생/항균 단백질을 탐색하였음.

아래 [표2-11]은 동애 등에(*H. illucens*)에서 그람음성세균(*Escherichia coli* K12)과 그람양성세균(*Bacillus Thurengensis*)을 처리한 그룹에서 과발현되는 항생/항균 단백질들임.

[표2-11] 동애 등에(*H. illucens*)의 과발현되는 항생/항균 단백질

Contig ID	Description	length	Species Top Blast	e-value
c57302_g1_i1	Attacin family	1486	<i>Harmonia axyridis</i>	1.00E-08
c17112_g1_i1	Mucin family	3953	<i>Bradysia coprophila</i>	1.00E-50
c28404_g1_i1	Defensin family	203	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	9.00E-09
c16887_g1_i1	Cecropin-C	498	<i>Lucilia cuprina</i>	1.00E-08
c50564_g1_i1	Venom allergen 3	990	<i>Aedes aegypti</i>	3.00E-40
c60069_g2_i1	Diptericin-D	861	<i>Drosophila grimshawi</i>	2.00E-19
c61379_g1_i1	Hexamerin-1.1	2331	<i>Anopheles coluzzii</i>	0
c61829_g1_i1	Phenoloxidase 2	2229	<i>Teleopsis dalmanni</i>	0
c63435_g6_i3	Peritrophin-1	2410	<i>Caerostris darwini</i>	3.00E-29
c63098_g1_i5	Integumentary mucin C.1	2603	<i>Lucilia cuprina</i>	2.00E-13
c68821_g2_i1	Chitinase 6, isoform C	9582	<i>Drosophila melanogaster</i>	1.00E-14
c66960_g4_i8	Tenasin family	2648	<i>Drosophila busckii</i>	0.00E+00
c75503_g1_i1	Phormicin	237	<i>Lucilia cuprina</i>	4.00E-14
c94163_g1_i1	Hemomucin	262	<i>Drosophila simulans</i>	6.00E-13
c40593_g1_i1	Cecropin-A2	356	<i>Drosophila erecta</i>	2.00E-15
c33878_g1_i1	Venom carboxylesterase-6	532	<i>Neodiprion lecontei</i>	4.00E-41
c17492_g1_i1	Serine protease snake	351	<i>Lucilia cuprina</i>	3.00E-36
c50904_g1_i2	Tyrosinase 3	349	<i>Plautia stali</i>	5.00E-08
c56044_g1_i1	Protein obstructor-E	1208	<i>Spodoptera frugiperda</i>	1.00E-98
c59209_g1_i1	Teneurin-a isoform X2	2278	<i>Glossina fuscipes</i>	0

우리는 위와 같이 병원균 침투 시 15배~120배 이상 과발현 22종의 항생/항균 단백질들을 발굴할 수 있었음. 위 단백질들은 Blast search를 통해 각 contig와 가장 유사한 유전자들이 발굴된 것이며 우리는 조금 더 다양한 조건으로 동애등에(*H. illucens*)만이 가지고 있는 새로운 항생/항균 단백질들을 발굴하고 있음.

동시에, 본 과제의 목표와 무관하지만 우리는 각 유전자를 클로닝 하여 In vitro 단백질 발현체계를 구축하고 있음. 예를 들면 *E. coli* system을 사용하여 단백질들을 발현할 때 세균에 해로운 단백질들이기에 발현이 잘 안 되거나 불활성 단백질들이 만들어지며 항생력을 잃어버리는 경우가 발생함. 우리는 이러한 문제점들을 해결하기 위하여 다양한 단백질 발현 system을 개발하고 있음.

여러 항생 단백질 중 Attacin의 경우 곤충의 대표적인 항생 단백질로 보고되고 있지만, 곤충마다 항생력은 모두 다를 것으로 평가되며 이러한 각 단백질을 정확히 항생력을 평가할 수 있는 체계를 구축하는 것도 매우 중요한 것으로 판단됨.

다음으로 우리는 집단 면역 활성이 유도된 곤충들을 대상으로 제형화 하여 업체류 무름병에 대하여 그 항생력이 유지되는지를 확인하였음.

#### 4) 항생/항균 펩티드의 업체류 무름병에 대한 살균력 검정 및 현장 적용

가) 집단 면역 유도된 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*), 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*), 동애등에(*H. illucens*) 대상 제형화

우리는 면역 활성화를 유도한 위 3가지 곤충을 대상으로 제형화 하여 업체류 무름병에 대한 살균 및 억제 효과를 증명하였음.

제형화 초기에는 다양한 방법을 사용하여 추진하였음. 예를 들면, 끓이거나 열을 가하는 방식을 사용하기도 하였으나 이는 곧 항생/항균 단백질들의 기능 상실이 진행되었음.

동시에, 냄새 발생, 환경오염, 복잡한 절차, 다량의 탄소배출 등 여러 가지 문제점들이 발생되어 연구 초기에 개발을 포기하였음.

대신 우리는 단백질 변형 최소화 방법인 동결건조 방법을 사용하였음.

많은 문제점이 해결되었으나 제형화 비용이 상승하는 문제점은 해결해야 할 것으로 판단함.

위 절차를 간단히 설명하면, 집단 면역 유도된 곤충들을 세척하고 다른 유해균들의 제거를 위하여 Autoclave와 같은 고압 멸균기를 사용한다면 면역 유도된 다양한 항생/항균 단백질들의 기능/활성을 상실함. 따라서 우리는 모든 곤충이 동결건조 작업이 진행되기 전 증류수를 사용하여 3회 곤충 표면을 세척하고 70% 에틸알콜을 사용하여 2회 세척 작업을 진행하였음. 최종적으로 95% 에틸알콜을 사용하여 1회 세척하여 분리 포장하였음[그림2-41].

본 작업은 많은 노동력과 시간이 필요하며 자동화되는 system개발도 필요할 것으로 판단됨.



[그림2-41] 곤충 세척 및 분리 포장.

집단 면역 유도된 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*), 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*), 동애등에(*H. illucens*) 대상 세척 및 분리 포장. 제형화 진행 시 본 작업은 많은 노동력과 시간이 필요하며 자동화되는 system개발도 필요할 것으로 판단됨.

분리 포장된 각각의 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*), 동애등에(*H. illucens*), 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)를  $-80^{\circ}\text{C}$  Deep freezer에서 1차 동결을 진행함[그림2-42].



[그림2-42] 1차 동결 공정.

우리는 집단 면역 유도된 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*), 동애등에(*H. illucens*), 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)를 대상으로 동결건조를 진행하기 -80℃ Deep freezer에서 3일간 전 사전 동결을 진행하였음. -80℃ Deep freezer에 보관하기에 활성화된 항생/항균 단백질들은 모두 활성이 유지될 것으로 판단되었음.

동결건조 작업은 냉각시킨 공기를 순환시켜 건조하는 방식임. 우리가 보유하고 있는 적은 용량의 건조기 경우 너무 많은 양을 한 번에 진행한다면 공기 순환이 좋지 않아 완전히 건조되지 않는 경우가 많이 발생하였음.

따라서 여러 번의 시행착오를 거쳐 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*)의 경우 ~2,000마리, 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)의 경우 ~ 1,500마리, 동애등에(*H. illucens*)의 경우 약 ~5,000마리 정도가 한번 건조하는 적정량으로 평가되었음. 본 연구개발의 실용화를 위하여 반듯이 용량이 큰 동결건조기 작업이 필요할 것으로 판단됨.

작물이나 시약, 세균 등 평균 건조일은 약 7일 건조를 진행하지만, 우리는 집단 면역 유도된 곤충들을 대상으로 적절한 동결건조 조건을 찾기 위하여 다양한 실험을 진행하였음.

곤충은 cuticle의 Wax 성분이 몸속 수분의 증발을 막아주기 때문에 작물, 시약, 세균 등 보다 건조일이 더 필요할 것으로 판단하였음.

그러나 너무 오래 건조를 진행한다면 집단 면역 유도로 활성화된 항생/항균 단백질들의 활성을 상실할 수도 있었음[그림2-43].



[그림2-43] 동결건조기 작업 공정.

우리가 보유하고 있는 작은 용량의 건조기 경우 너무 많은 양을 한 번에 진행한다면 공기 순환이 좋지 않아 완전히 건조되지 않는 경우가 많이 발생. 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*)의 경우 ~2,000마리, 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)의 경우 ~ 1,500마리, 동애등에(*H. illucens*)의 경우 약 ~5,000마리 정도가 적정 건조량으로 평가됨.

일단 작물, 시약, 세균 등과 같이 평균 건조일을 7일로 선정하고 진행하였음. 그러나 우리의 예상대로 곤충들 대부분 눅눅하고 습기가 몸 안에 있음을 확인하였고 이를 바탕으로 작물에 처리한 결과 냄새와 세균과 곰팡이의 성장이 관찰되었음.

다음으로 9일 건조시간으로 선정하여 진행하였음. 7일과 비교 건조가 많이 진행된 것으로 판단하였으나 작물 처리 시 7일 건조와 유사하게 냄새, 세균 성장이 관찰되어 적절한 건조시간이 아닌 것으로 판단하였음.

건조시간을 15일로 선정하여 진행하였음. 모든 곤충이 쉽게 부서질 정도로 건조하고 작물 처리 시 냄새, 세균 발생도 되지 않아 적절한 건조시간으로 판단되었으나 무름병 억제 효과가 잘 관찰되지 않았음.

우리는 건조시간을 12일로 선정하여 진행하였음. 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*)와 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)의 경우 매우 건조가 잘 진행된 것으로 나타났음. 그러나 동애등에(*H. illucens*)의 경우 아직 눅눅함 확인됨. 다른 곤충보다 축축할 정도로 수분이 많은 곳에서 생존하기에 동결건조에 더 많은 시간이 필요한 것으로 판단되었음.

따라서 우리는 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*)와 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)의 경우 12일, 동애등에(*H. illucens*)의 경우 13일로 선정하여 완전히 동결 건조화하여 무름병 억제 효과 실험을 수행하였음[그림2-44].



[그림2-44] 동결건조 작업 결과

동결건조 기간은 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*)와 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)의 경우 12일, 동애등에(*H. illucens*)의 경우 13일로 선정.

나) 집단 면역 활성화된 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*), 동애등애(*H. illucens*), 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)의 동결 가루에 대한 엽채류 무름병 억제 실험

주관 연구기관(오상킨섹트)에서 대량사육 및 대량생산을 목표로 할 곤충을 선별하기 위하여 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*), 동애등애(*H. illucens*), 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*) 중에서 엽채류 무름병 억제에 효과가 있는 곤충을 선별하기 위한 실험을 진행함.

상추는 실험실 내 다량 재배가 가능하며 크기가 작고 공간 활용이 용이한 기주 작물로서 우리는 상추를 가해하는 상추무름병(*Pectobacterium carotovorum*)을 선정하였음. 모든 실험에 사용한 병원균은 90mm Petri Dish에 NA agar(Beef Extract 3.0g, Peptone 5.0g, Agar 18.0g/1L)를 평판도말법으로 28℃에서 2일 배양한 뒤, single colony를 분리하여, 진탕배양기에서 Polystyrene Round Bottom Tube(14ml/falcon)에 5ml의 NA water broth, 28℃, 180rpm으로 Overnight 배양한 균을 사용하였음.

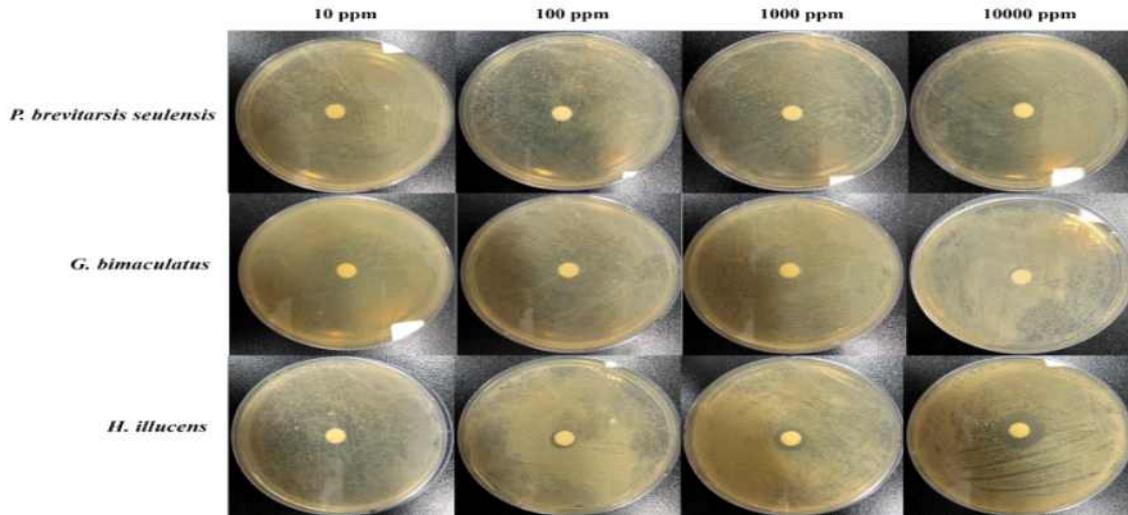
동결건조기 작업이 끝난 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*), 동애등애(*H. illucens*), 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)를 각각 분말기를 사용하여 분쇄하여 분말화하였음.

① 실험실 내 저지원 시험

우리는 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*), 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*), 동애등애(*H. illucens*) 분말을 사용하여 상추무름병(*P. carotovorum*) 대상으로 저지원 시험을 3 반복 하여 통계 처리하여 수행하였음. 상추무름병(*P. carotovorum*)은 NA agar(Beef Extract 3.0g, Peptone 5.0g, Agar 18.0g/1L)가 있는 90mm Petri Dish에 도말평판법(Streaking)으로 28℃에서 2일 배양한 뒤, single colony를 분리하여, 진탕배양기에서 Polystyrene Round Bottom Tube(14ml/falcon)에 5ml의 NA water broth, 28℃, 180rpm으로 Over-Night 배양하여  $1 \times 10^8$  cfu/ml 농도로 준비하였음. 병원균을  $30 \mu\text{l}$  씩 NA agar 90mm Petri Dish에 표면도말법(Spreading)하고, 멸균된 8mm Paper Disc 위에  $20 \mu\text{l}$  씩 접종하여 28℃에 2일간 배양하여 Clear zone의 크기를 측정하였음. 모든 실험은 대조군을 제외한 각각 10ppm, 100ppm, 1,000ppm, 10,000ppm 농도별로 희석하여 처리하였으며, 대조군은 곤충 분말을 희석할 때 사용한 증류수를 사용하였음. 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)의 분말을 희석해 배양한 결과 10ppm, 100ppm, 1000ppm, 10000ppm에서 모두 Clear Zone이 형성되지 않았음[표2-12],[표2-13],[표2-14],[그림2-45],[그림2-46],[그림2-47].

쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*)의 분말을 희석해 배양한 결과 10ppm, 100ppm, 1000ppm에서는 Clear Zone이 형성되지 않았으나 10000pp에서 각 9mm, 8mm, 9mm, 평균 8.67mm 크기의 Clear Zone이 형성되는 것을 확인하였음[표2-12],[표2-13],[표2-14],[그림2-45],[그림2-46],[그림2-47]. 동애등애(*H. illucens*)의 분말을 희석해 배양한 결과 10ppm에서는 저지원이 형성되지 않았으나, 100ppm에서는 각 10mm, 10mm, 11mm, 평균 10.33mm 크기의 Clear

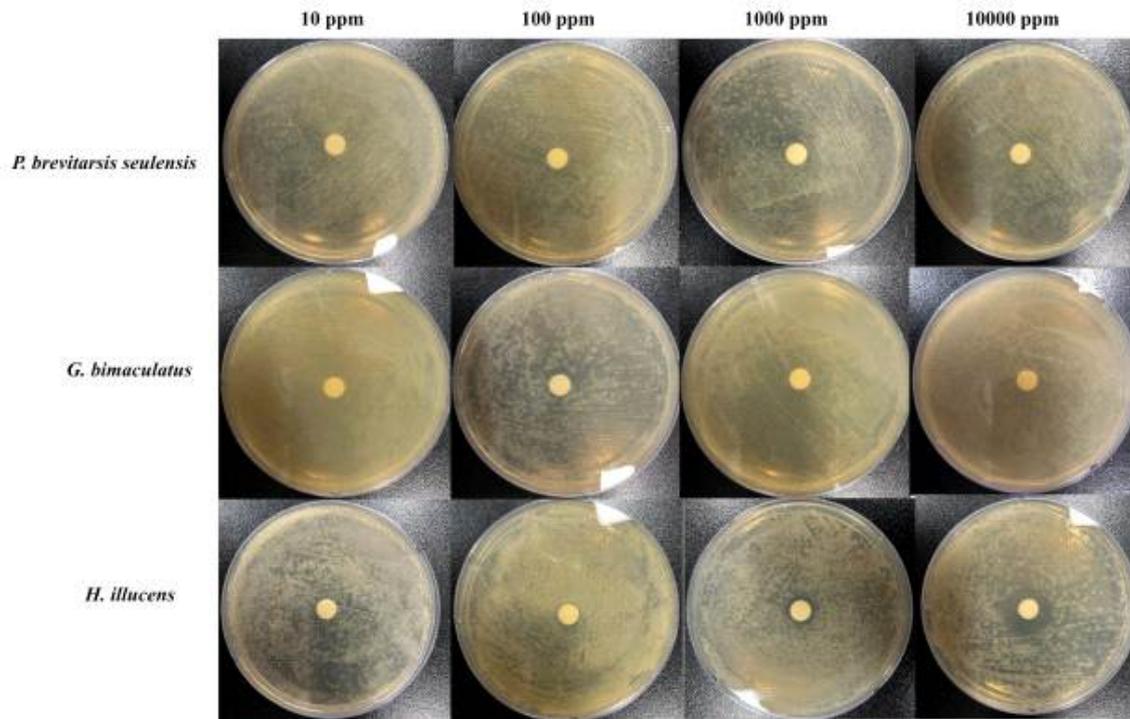
Zone이 형성되었고 1000ppm에서는 각 13mm, 12mm, 13mm, 평균 12.67mm 크기의 Clear Zone이 형성, 10000ppm에서는 22mm, 21mm, 22mm 평균 21.67mm 크기의 Clear Zone이 형성되는 것을 확인하였음[표2-12],[표2-13],[표2-14],[그림2-45],[그림2-46],[그림2-47]. 우리는 집단 면역 활성화된 3종의 분말 중 동애등에(*H. illucens*) 분말이 상추무름병(*P. carotovorum*)에 대해 억제 효과가 있음을 알 수 있었음.



[그림2-45] 집단 면역 활성화된 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*), 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*), 동애등에(*H. illucens*) 분말 사용 상추무름병(*P. carotovorum*) 저지원 1차 시험.

[표2-12] 집단 면역 활성화된 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*), 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*), 동애등에(*H. illucens*) 분말 사용 상추무름병(*P. carotovorum*) Clear Zone 1차 시험.

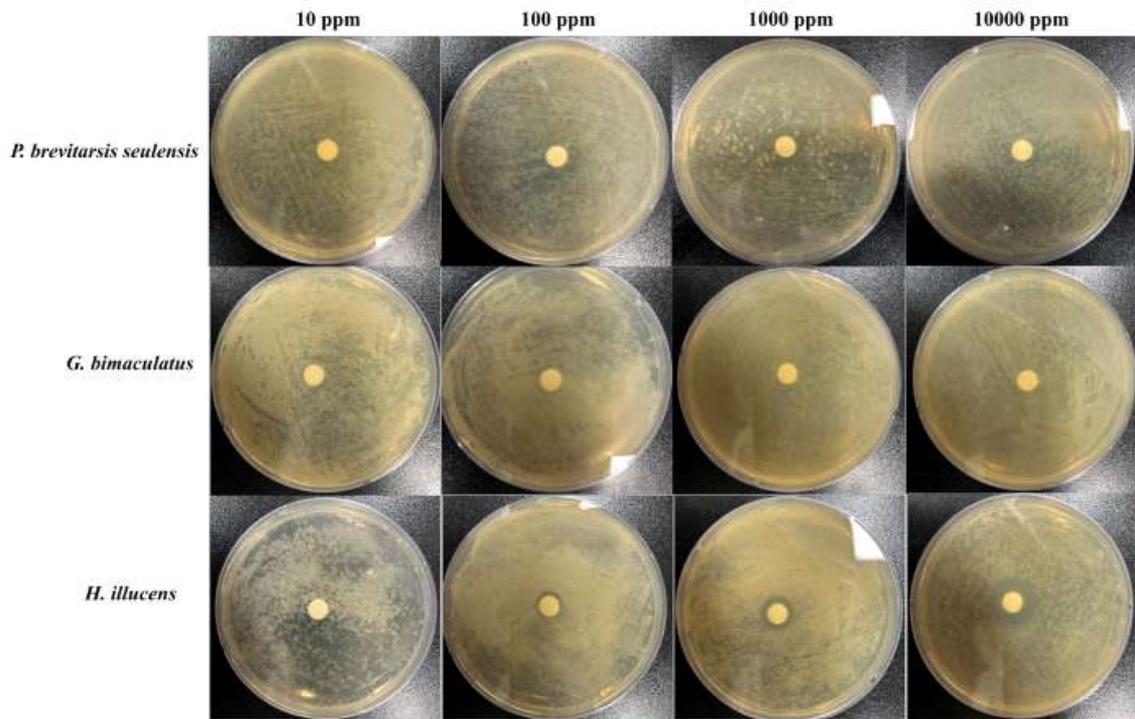
Species	Concentration (ppm)	Clear zone size (mm)
<i>P. brevitarsis seulensis</i>	10	0
	100	0
	1,000	0
	10,000	0
<i>G. bimaculatus</i>	10	0
	100	0
	1,000	0
	10,000	9
<i>H. illucens</i>	10	0
	100	10
	1,000	13
	10,000	22
Control	-	0



[그림2-46] 집단 면역 활성화된 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*), 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*), 동애등에(*H. illucens*) 분말 사용 상추무름병(*P. carotovorum*) 저지원 2차 시험.

[표2-13] 집단 면역 활성화된 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*), 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*), 동애등에(*H. illucens*) 분말 사용 상추무름병(*P. carotovorum*) 저지원 2차 시험.

Species	Concentration (ppm)	Clear zone size (mm)
<i>P. brevitarsis seulensis</i>	10	0
	100	0
	1,000	0
	10,000	0
<i>G. bimaculatus</i>	10	0
	100	0
	1,000	0
	10,000	8
<i>H. illucens</i>	10	0
	100	10
	1,000	12
	10,000	21
Control	-	0



[그림2-47] 집단 면역 활성화된 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*), 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*), 동애등애(*H. illucens*) 분말 사용 상추무름병(*P. carotovorum*) 저지원 3차 시험. Clear Zone 형성 결과

[표2-14] 집단 면역 활성화된 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*), 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*), 동애등애(*H. illucens*) 분말 사용 상추무름병(*P. carotovorum*) 저지원 3차 시험.

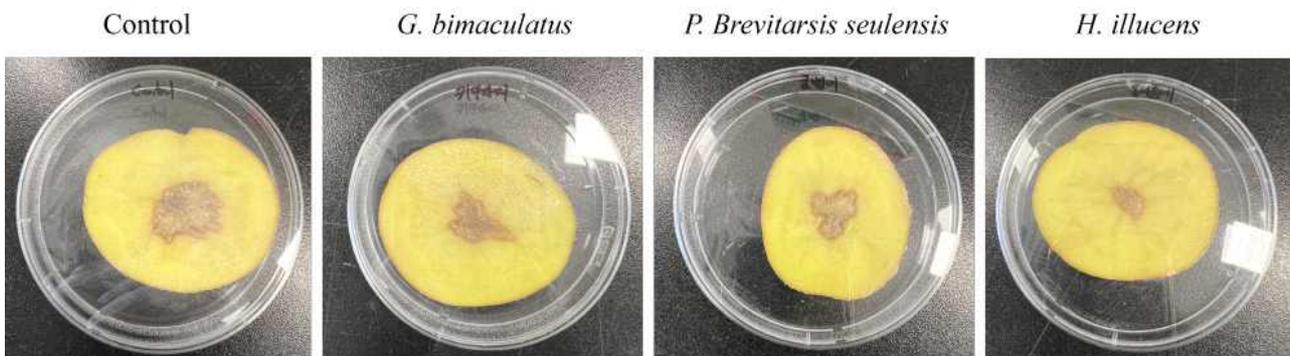
Species	Concentration (ppm)	Clear zone size (mm)
<i>P. brevitarsis seulensis</i>	10	0
	100	0
	1,000	0
	10,000	0
<i>G. bimaculatus</i>	10	0
	100	0
	1,000	0
	10,000	9
<i>H. illucens</i>	10	0
	100	11
	1,000	13
	10,000	22
Control	-	0

② 실험실내 감자 절편 시험.

우리는 집단 면역 활성화된 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*), 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*), 동애등에(*H. illucens*) 분말을 멸균수에 1:1 비율로 희석하였음. 90mm Petri Dish 에 감자 절편을 놓고 상추무름병(*P. carotovorum*) 30 $\mu$ l씩 주입하고 30분 자연건조 시킴. 각 곤충 희석된 분말을 30 $\mu$ l를 주입하고 미생물 배양기에 28 $^{\circ}$ C 동일한 조건으로 3일간 배양하여 병반을 확인하였음. 실험은 모두 3 반복 수행하였음.

90mm Petri Dish에 NA agar(Beef Extract 3.0g, Peptone 5.0g, Agar 18.0g/1L) 도말평판법 (Streaking) 28 $^{\circ}$ C에서 2일 배양한 뒤, single colony를 분리하고 진탕배양기에서 Polystyrene Round Bottom Tube(14ml/falcon)에 5ml의 NA water broth를 28 $^{\circ}$ C 180rpm으로 Over night 배양 후 1X10<sup>8</sup> cfu/ml로 희석한 현탁액을 사용하였음.

[그림2-47]과 같이 대조군은 약 30mm 지름의 원형 병반이 관찰되었고, 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*) 분말 처리구는 길이는 30mm지만 원형이 아닌 더 좁은 모양의 병반이 나타났음. 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*) 분말 처리구는 25mm의 원형의 가까운 병반이 관찰되었으며 동애등에(*H. illucens*) 분말의 경우는 10mm 정도의 억제 병반이 나타남[그림2-48].



[그림2-48] 집단 면역 활성화된 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*), 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*), 동애등에(*H. illucens*) 분말 사용 감자 절편 병반 결과.

다음으로 우리는 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*), 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*), 동애등에(*H. illucens*) 분말의 구체적인 효과를 확인하기 위하여 10ppm, 100ppm, 1,000ppm, 10,000ppm 농도별로 처리하여 감자 절편 무게 감소량을 확인하였음.

정해진 농도로 조절한 곤충 분말 용액에 감자 절편을 1시간 동안 담근 후 꺼내고, 클린벤치 (Clean Work Station)에서 오염되지 않도록 1시간 동안 건조하였음.

상추무름병(*P. carotovorum*) 병원균을 병 발생을 위해 1X10<sup>8</sup> cfu/ml로 희석한 현탁액을 30 $\mu$ l씩 접종하였고 대조군은 멸균수를 처리하였음.

2일 후 감자를 흐르는 물로 부패 부위를 씻어 제거하고 1시간 건조 후 무게를 측정하여 접종 전과의 무게와 비교하였음[표2-15].

[표2-15] 집단 면역 활성화된 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*), 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*), 동애등에(*H. illucens*) 분말 사용 감자 절편 상추무름병(*P. carotovorum*) 감염 후 무게 감소량(3 반복).

	Control	<i>G. bimaculatus</i>	<i>P. brevitarsis seulensis</i>	<i>H. illucens</i>
10ppm	2.12g	2.02g	2.10g	1.82g
100ppm	2.23g	2.08g	2.13g	1.47g
1,000ppm	2.24g	1.82g	1.88g	1.04g
10,000ppm	2.18g	1.46g	1.53g	0.58g

	Control	<i>G. bimaculatus</i>	<i>P. brevitarsis seulensis</i>	<i>H. illucens</i>
10ppm	2.21g	2.09g	2.13g	1.91g
100ppm	2.13g	1.98g	2.05g	1.32g
1,000ppm	2.15g	1.75g	1.81g	0.92g
10,000ppm	2.20g	1.39g	1.57g	0.55g

	Control	<i>G. bimaculatus</i>	<i>P. brevitarsis seulensis</i>	<i>H. illucens</i>
10ppm	2.19g	2.02g	2.10g	1.84g
100ppm	2.17g	1.99g	2.05g	1.34g
1,000ppm	2.22g	1.83g	1.88g	0.97g
10,000ppm	2.11g	1.34g	1.49g	0.53g

[표2-16] 집단 면역 활성화된 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*), 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*), 동애등에(*H. illucens*) 분말 사용 감자 절편 상추무름병(*P. carotovorum*) 감염 후 평균 무게 감소량

	Control	<i>G. bimaculatus</i>	<i>P. brevitarsis seulensis</i>	<i>H. illucens</i>
10ppm	2.17g	2.04g	2.11g	1.86g
100ppm	2.18g	2.02g	2.08g	1.38g
1,000ppm	2.20g	1.80g	1.86g	0.98g
10,000ppm	2.16g	1.40g	1.53g	0.55g

쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*) 분말을 처리한 감자 절편의 무게 감소량은 10ppm에서 평균 2.04g 100ppm에서 평균 2.02g, 1,000ppm에서 평균 1.80g, 10,000ppm에서 평균 1.40g 감소하였음[표2-16].

흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*) 분말을 처리한 감자 절편의 무게 감소량은 10ppm에서 평균 2.11g 100ppm에서 평균 2.08g, 1,000ppm에서 평균 1.86g, 10,000ppm에서 평균 1.53g 감소하였음[표2-16].

동애등에(*H. illucens*) 분말을 처리한 감자 절편의 무게 감소량은 10ppm에서 평균 1.86g 100ppm에서 평균 1.38g, 1,000ppm에서 평균 0.98g, 10,000ppm에서 평균 0.55g 감소하였음 [표2-16].

동애등에(*H. illucens*) 분말을 처리한 감자 절편의 무게 감소량이 가장 적었으며, 다음으로 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*) 분말, 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*) 분말 순으로 무게 감소량을 확인하였음.

다음으로 무게 감소량을 바탕으로 상추무름병(*P. carotovorum*)에 대한 억제력을 측정하였음[표 2-17].

억제력 측정방법은 아래와 같은 방법을 사용하였음(I. Hadizadeh et al., Plant Pathology, 2019). Percentage of disease reduction (PDR) = (disease severity or loss(by weight) in control - disease severity or loss (by weight) in treatment)/disease severity in control × 100.

[표2-17] 집단 면역 활성화된 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*), 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*), 동애등에(*H. illucens*) 분말 사용 상추무름병(*P. carotovorum*) 길항 검정 결과(3반복).

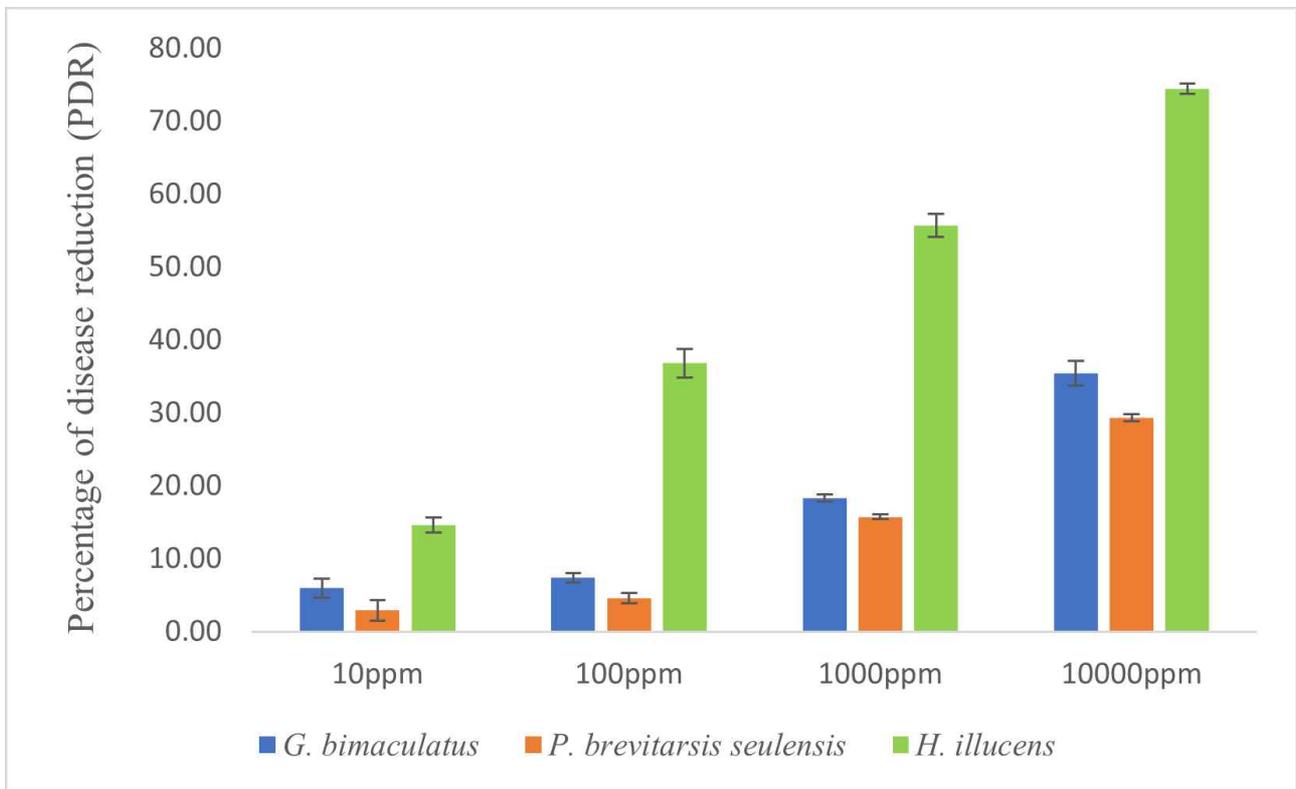
	Control	<i>G. bimaculatus</i>	<i>P. brevitarsis seulensis</i>	<i>H. illucens</i>
10ppm	-	4.72%	0.94%	14.15%
100ppm	-	6.73%	4.48%	34.08%
1,000ppm	-	18.75%	16.07%	53.57%
10,000ppm	-	33.03%	29.82%	73.39%

	Control	<i>G. bimaculatus</i>	<i>P. brevitarsis seulensis</i>	<i>H. illucens</i>
10ppm	-	5.43%	3.62%	13.57%
100ppm	-	7.04%	3.76%	38.03%
1,000ppm	-	18.60%	15.81%	57.21%
10,000ppm	-	36.82%	28.64%	75.00%

	Control	<i>G. bimaculatus</i>	<i>P. brevitarsis seulensis</i>	<i>H. illucens</i>
10ppm	-	7.76%	4.11%	15.98%
100ppm	-	8.29%	5.53%	38.25%
1,000ppm	-	17.57%	15.32%	56.31%
10,000ppm	-	36.49%	29.38%	74.88%

[표2-18] 집단 면역 활성화된 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*), 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*), 동애등에(*H. illucens*) 분말 사용 상추무름병(*P. carotovorum*) 길항 시험 결과 평균.

	Control	<i>G. bimaculatus</i>	<i>P. brevitarsis seulensis</i>	<i>H. illucens</i>
10ppm	-	5.97%	2.89%	14.57%
100ppm	-	7.35%	4.59%	36.79%
1,000ppm	-	18.31%	15.73%	55.70%
10,000ppm	-	35.45%	29.28%	74.43%



[그림2-49] 집단 면역 활성화된 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*), 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*), 동애등에(*H. illucens*) 분말 사용 상추무름병(*P. carotovorum*) 길항 시험 통계 결과.

10ppm에서는 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)의 억제율이 2.89%로 가장 낮았으며, 동애등에(*H. illucens*)는 14.57%로 가장 높은 억제율을 나타내었으며 100ppm에서 또한, 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)의 억제율이 4.59%로 가장 낮으며, 동애등에(*H. illucens*)의 억제율이 36.79%로 가장 높은 수치를 확인하였음[표2-17],[표2-18],[그림2-49].

1000ppm과 10,000ppm에서 모두 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*)와 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)의 억제율은 근소한 차이를 보였고, 동애등애(*H. illucens*)는 2배 이상의 억제율을 확인하였으며 동애등애(*H. illucens*) 추출물의 효과가 가장 높음을 확인하였음[표 2-17],[표2-18],[그림2-49].

③ 집단 면역 활성화된 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*), 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*), 동애등애(*H. illucens*) 분말 엽채류 무름병에 대한 상추 시험.

실험실 검정에서 동애등애(*H. illucens*) 분말이 억제 효과가 있음을 확인하였으며 상추를 재배하며 처리하여 생육에 미치는 영향을 파악하였음.

상추(품종 : 동오적치마, 동오시드)를 75구 모종 트레이에 상토(서울슈퍼바로커)를 사용하여 파종하고 7일 지난 후 육묘를 Pot(지름 7cm × 높이 6.5cm)에 분주하였음. 모든 시험은 3 반복 진행하였음[그림2-50].



[그림2-50] 상추 분주 과정

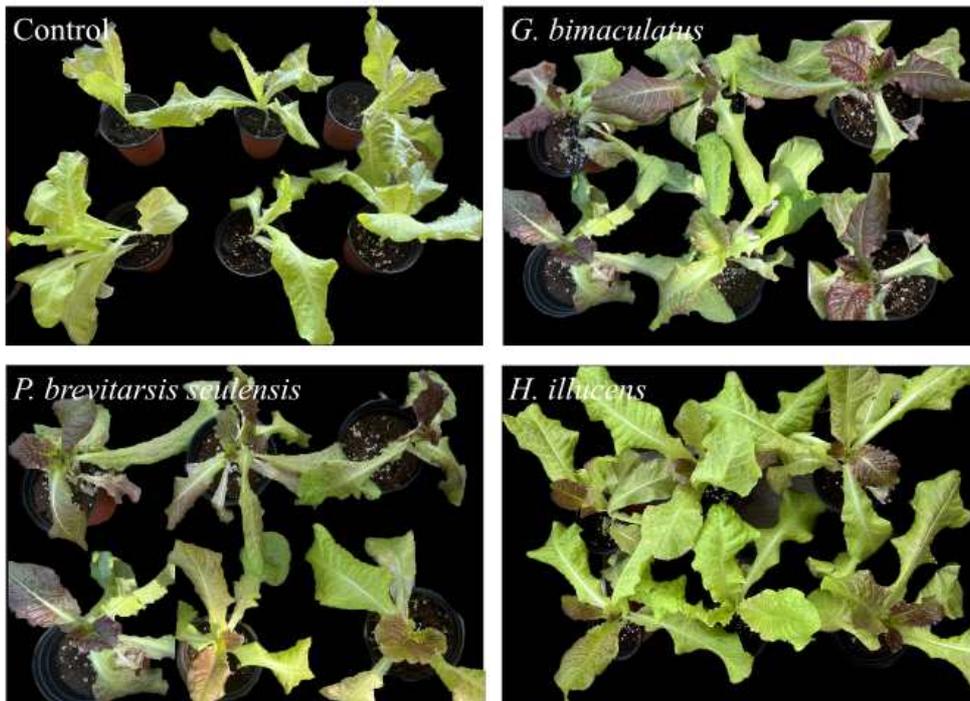
상추무름병(*P. carotovorum*)은 NA agar(Beef Extract 3.0g, Peptone 5.0g, Agar 18.0g/1L)가 있는 90mm Petri Dish에 도말평판법(Streaking)으로 28℃에서 2일 배양한 뒤, single colony를 분리하여, 진탕배양기에서 Polystyrene Round Bottom Tube(14ml/falcon)에 5ml의 NA water broth 28℃ 180rpm으로 Over Night 배양하여  $1 \times 10^8$  cfu/ml 농도로 준비하여 사용하였음.

병원균 처리시 상추의 급격한 폐사를 방지하고 생장을 관찰하기 위해 10ml의 소량을 관주 처리하였음. 대조그룹은 물만 처리하였고, 각 그룹별로 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*), 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*), 동애등애(*H. illucens*)의 분말을 Distilled water에 1:1로 희석하여 10ml 관주 처리하였음. 식물의 생장 상태를 비교하기 위해 생체중, 건조중 및 엽면적을 측정하였음. 생체중은 뿌리의 상토를 제거한 후 지상부와 지하부의 무게를 측정하였으며, 엽면적 측정은 Plant Canopy Analyzer(LI-3100C)를 이용하였고, 건조중은 건조기를 활용하여 60℃ 조건에서 48시간 건조하여 무게를 측정하였음.

생체중의 대조군은 46.18g으로 측정되었으며 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*), 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*) 분말 처리구는 대조군과 큰 차이는 나타나지 않았으나 동애등애(*H. illucens*) 분말 처리구에서 56.84g으로 증가하는 결과를 확인하였음[표2-19],[그림2-51],[그림 2-52].

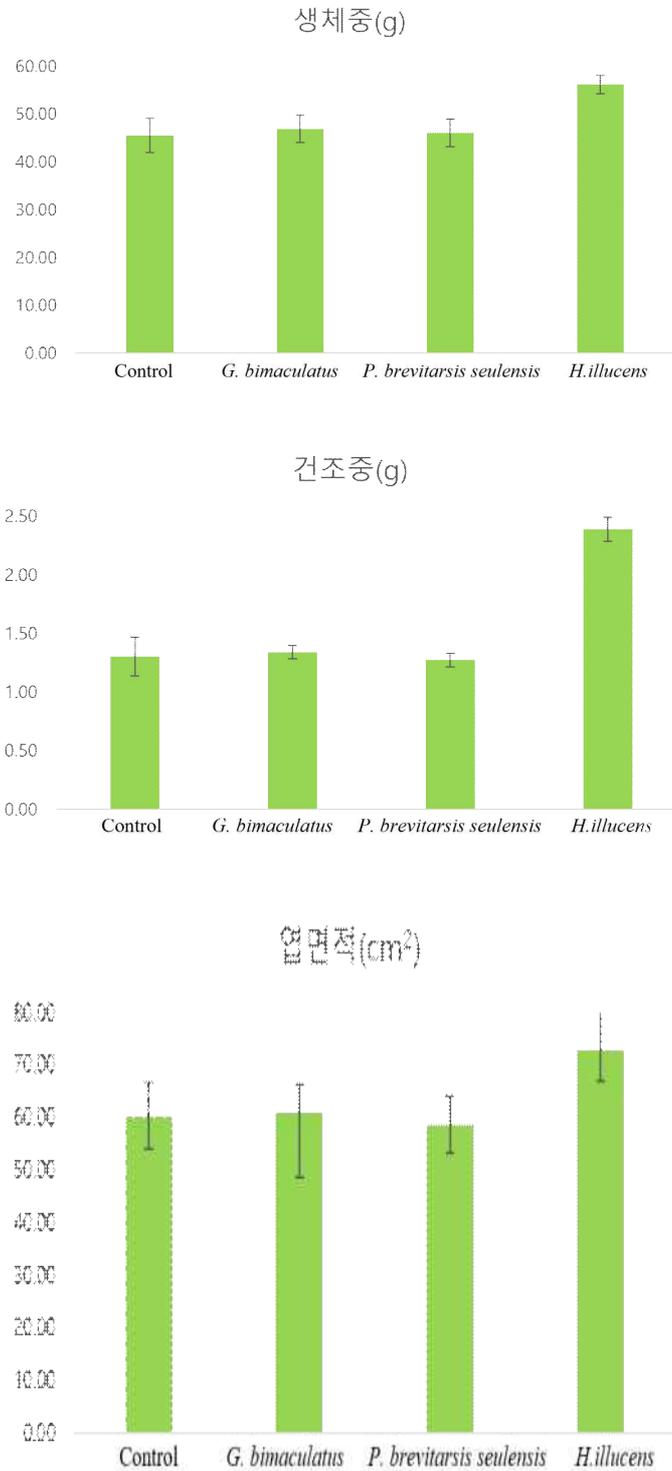
[표2-19] 집단 면역 활성화된 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*), 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*), 동애등에(*H. illucens*) 분말 사용 생육 시험.

처리구	생체중(g)	건조중(g)	엽면적(cm <sup>2</sup> )
Control	45.51	1.30	60.40
<i>G. bimaculatus</i>	46.91	1.34	61.00
<i>P. brevitarsis seulensis</i>	46.06	1.27	58.74
<i>H. illucens</i>	56.17	2.39	72.99



[그림2-51] 집단 면역 활성화된 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*), 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*), 동애등에(*H. illucens*) 분말 사용 상추무름병(*P. carotovorum*) 길항 생육 시험.

동애등에(*H. illucens*) 분말 처리구의 상추가 건강해 보이며 생체중, 건조중, 엽면적 모두 높은 것으로 나타났음.



[그림2-52] 집단 면역 활성화된 흰점박이꽃무지(*P. brevitaris seulensis*), 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*), 동애등에(*H. illucens*) 분말 사용 생육 시험

다음으로 우리는 면역 활성화된 흰점박이꽃무지(*P. brevitaris seulensis*), 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*), 동애등에(*H. illucens*) 분말을 농도별 설정하여(10ppm, 100ppm, 1,000ppm, 10,000ppm) 생육에 미치는 영향을 조사하였음. 병원균과 처리구는 위 실험과 동일하게 10ml을 처리하였으며 대조군으로 증류수를 사용하였고 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*), 흰점박이꽃무지(*P. brevitaris seulensis*), 동애등에(*H. illucens*)의 분말을 희석하여 사용하였음.

[표2-20] 집단 면역 활성화된 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*), 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*), 동애등에(*H. illucens*) 분말 사용 농도별 상추무름병(*P. carotovorum*)의 길항 생육 차이

처리구	농도(ppm)	생체중(g)	건조중(g)	엽면적(cm <sup>2</sup> )
Control	10	45.30	1.26	59.72
	100	45.51	1.23	59.85
	1,000	45.50	1.26	58.64
	10,000	45.24	1.25	59.04
<i>G. bimaculatus</i>	10	46.53	1.32	59.53
	100	46.91	1.30	60.25
	1,000	46.20	1.33	60.57
	10,000	48.33	1.81	66.94
<i>P. brevitarsis seulensis</i>	10	46.01	1.24	59.34
	100	45.73	1.23	59.13
	1,000	46.14	1.22	59.27
	10,000	46.06	1.25	59.12
<i>H. illucens</i>	10	46.21	1.39	59.02
	100	51.01	1.83	67.13
	1,000	53.61	2.02	69.53
	10,000	57.86	2.43	73.90

10ppm의 생체중은 대조군에서 45.30g으로 측정되었으며 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*), 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*), 동애등에(*H. illucens*) 추출물은 각 46.53g, 46.01g, 46.21g으로 대조군과 유의미한 차이를 보이지 않음[표2-20],[그림2-53],[그림2-54].

10ppm의 건조중은 대조군에서 1.26g으로 측정되었으며 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*) 분말은 1.24g으로 대조군과 유사하였으며 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*)와 동애등에(*H. illucens*) 분말은 각 1.32g, 1.39g로 대조군보다 약간 높은 수치를 확인하였음[표2-20],[그림2-53],[그림2-54].

10ppm의 엽면적은 대조군에서 59.72cm<sup>2</sup>으로 측정되었으며 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*), 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*), 동애등에(*H. illucens*) 분말처리구에서 각 59.53cm<sup>2</sup>, 59.34cm<sup>2</sup>, 59.02cm<sup>2</sup>으로 대조군과 유사하게 나타남[표2-20],[그림2-53],[그림2-54].

100ppm의 생체중은 대조군에서 45.51g으로 측정되었으며 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*) 분말은 45.73g으로 대조군과 유사, 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*) 분말은 46.91g으로 약간 높은 수치를 보여주었으며 동애등에(*H. illucens*) 분말은 51.01g으로 10ppm보다 증가함을 확인하였음[표2-20],[그림2-53],[그림2-54].

100ppm의 건조중은 대조군에서 1.23g으로 측정되었으며 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*) 분말 또한 1.24g으로 유사한 수치를 보였음. 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*) 분말은 1.30g으로 유의미한 차이는 나타나지 않았으며, 동애등에(*H. illucens*) 분말은 1.83g으로 가장 높은 수치로 나타났음[표2-20],[그림2-53],[그림2-54].

100ppm의 엽면적은 대조군에서 59.85cm<sup>2</sup>으로 측정되었으며 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)와 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*) 분말 처리구는 각 59.13cm<sup>2</sup>, 60.25cm<sup>2</sup>으로 대조군과 유사하였음. 반면 동애등에(*H. illucens*) 분말 처리구는 67.13cm<sup>2</sup>으로 높은 수치를 나타냈음 [표2-20],[그림2-53],[그림2-54].

1,000ppm의 생체중은 대조군에서 45.50g으로 측정되었으며 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*)와 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)의 분말 처리구는 각 46.20g, 46.14g으로 대조군과 유의미한 차이를 보이지 않았으며, 동애등에(*H. illucens*) 분말 처리구는 53.61g으로 높은 수치를 확인하였음[표2-20],[그림2-53],[그림2-54].

W 1,000ppm의 건조중은 대조군에서 1.26g으로 측정되었으며 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)의 분말 처리구는 1.24g으로 대조군과 유사하였음. 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*)와 동애등에(*H. illucens*) 분말 처리구는 1.33g과 2.02g으로 약간의 차이를 보였음[표2-20],[그림2-53],[그림2-54].

1,000ppm 처리의 엽면적은 대조군에서 58.64cm<sup>2</sup>으로 측정되었으며 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*) 분말 처리구는 59.27cm<sup>2</sup>으로 대조군과 유사. 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*) 분말 처리구는 60.57cm<sup>2</sup>이었으며 동애등에(*H. illucens*) 분말 처리구가 가장 높게 (69.53cm<sup>2</sup>) 나타내었음[표2-20],[그림2-53],[그림2-54].

10,000ppm의 생체중은 대조군에서 45.24g으로 측정되었으며 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*) 분말 처리구는 46.06g으로 대조군과 유사. 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*) 분말 처리구는 48.33g으로 조금 증가하였고 동애등에(*H. illucens*) 추출물은 57.86g으로 수치로 측정되었음[표2-20],[그림2-53],[그림2-54].

10,000ppm의 건조중은 대조군에서 1.25g으로 측정되었으며 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*) 분말 처리구도 1.25g으로 같은 수치를 나타내었음. 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*) 분말 처리구는 1.81g으로 유의미하게 증가한 수치를 보여주었고 동애등에(*H. illucens*) 분말 처리구는 2.43g으로 수치로 증가하였음[표2-20],[그림2-53],[그림2-54].

10,000ppm의 엽면적은 대조군에서 59.04cm<sup>2</sup>으로 측정되었고 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*) 분말 처리구도 59.12cm<sup>2</sup>으로 대조군과 유사. 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*) 분말 처리구는 66.94cm<sup>2</sup>으로 증가하였고 동애등에(*H. illucens*) 분말 처리구는 73.90cm<sup>2</sup>으로 증가하였음[표2-20],[그림2-53],[그림2-54].

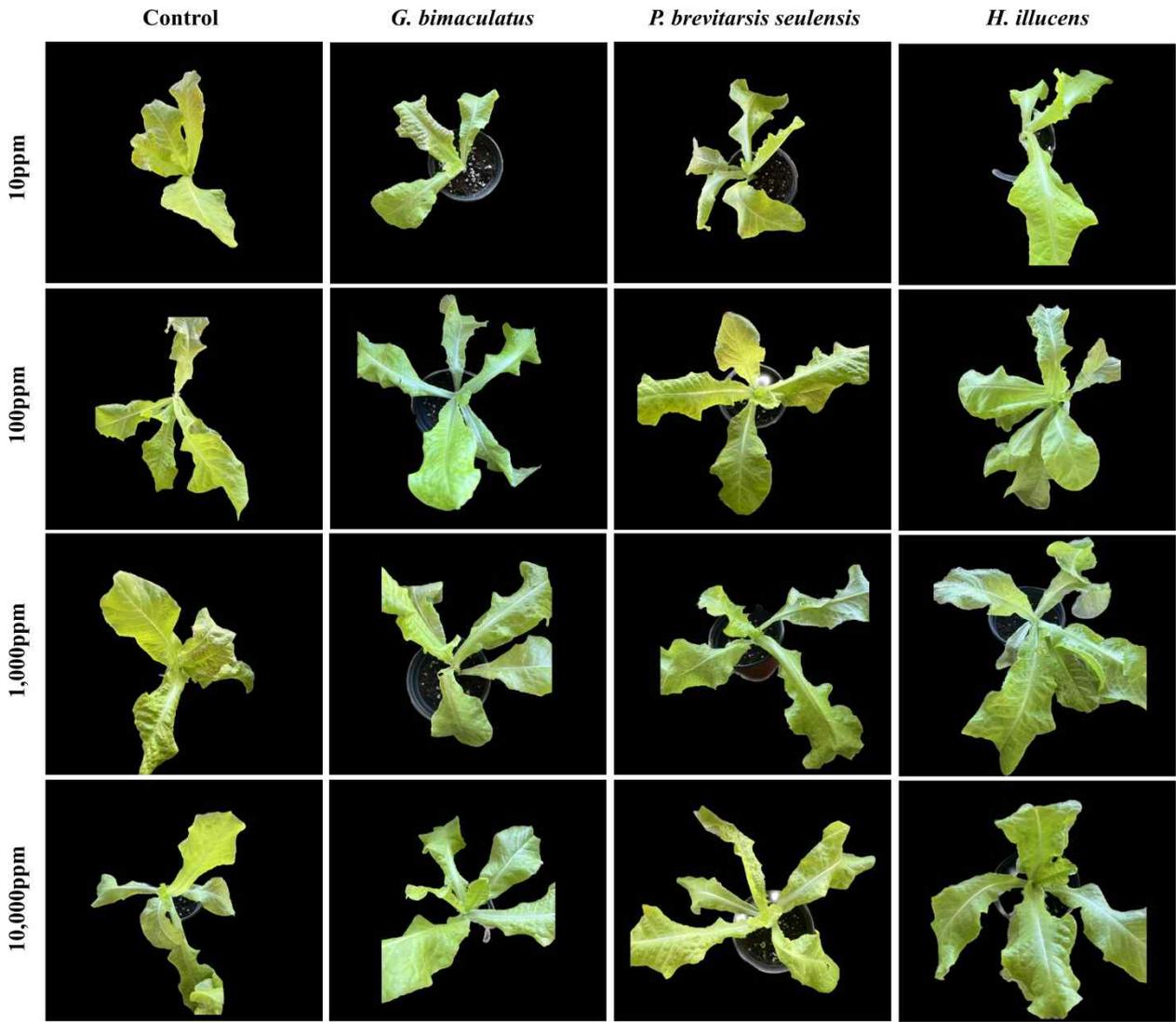
결론적으로, 동애등에(*H. illucens*) 분말 처리구가 생체중, 건조중, 엽면적 수치에서 대조군과 비교 증가하는 것을 알 수 있었음. 또한, 100ppm을 처리하였을 때부터 차이가 발생하였으며

10,000ppm 처리시 상추의 생체중, 건조중, 엽면적의 수치가 증가함을 확인하였음[[표2-20], [그림2-53],[그림2-54].

또한 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*) 분말 처리구도 10,000ppm 처리하였을 때 생체중과 건조중, 엽면적의 수치가 증가함을 확인하였음.



[그림2-53] 집단 면역 활성화된 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*), 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*), 동애등애(*H. illucens*) 분말 사용 농도별 상추무름병(*P. carotovorum*) 길항 생육실험 통계



[그림2-54] 집단 면역 활성화된 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*), 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*), 동애등에(*H. illucens*) 분말 사용 농도별 상추무름병(*P. carotovorum*) 길항 생육실험

다음으로 우리는 상추에서 상추무름병(*P. carotovorum*) 병징이 나타났을 때 차이를 조사하였음. 즉, 길항 효과를 보인 1,000ppm과 10,000ppm의 농도를 처리한 그룹에서 10일을 생육하여 생체중, 건조중, 엽면적을 측정하여 생육 차이를 조사하는 2차 실험을 진행하였음.

1,000ppm의 생체중은 대조군에서 89.48g으로 측정되었으며 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*)와 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)의 분말 처리구는 각 90.87g, 89.48g으로 대조군과 유사. 동애등에(*H. illucens*) 분말 처리구는 106.86g으로 15g이상 높은 값을 나타내었음[표2-21], [그림2-55],[그림2-56].

1,000ppm의 건조중은 대조군에서 2.10g으로 측정되었으며 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*)와 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)의 분말 처리구도 각 2.16g, 2.11g으로 유사한 값이 측정되었음. 동애등에(*H. illucens*) 분말 처리구는 3.78g으로 1.6g이상 높은 값이 측정되었음[표 2-21],[그림2-55],[그림2-56].

1,000ppm의 엽면적은 대조군에서 85.32cm<sup>2</sup>으로 측정되었고 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*)와

흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)의 분말 처리구는 각 90.30cm<sup>2</sup>, 89.58cm<sup>2</sup>으로 약 ~5cm<sup>2</sup> 높은 값을 나타냈음. 동애등에(*H. illucens*) 분말 처리구는 111.97cm<sup>2</sup>로 높은 값을 확인 하였음[표2-21],[그림2-55],[그림2-56].

10,000ppm의 생체중은 대조군에서 89.37g으로 측정되었으며 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)의 분말 처리구는 89.48g으로 유의미한 차이가 나타나지 않았지만, 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*)와 동애등에(*H. illucens*) 분말 처리구에서 각 98.30g, 115.20g으로 증가하였음[표 2-21],[그림2-55],[그림2-56].

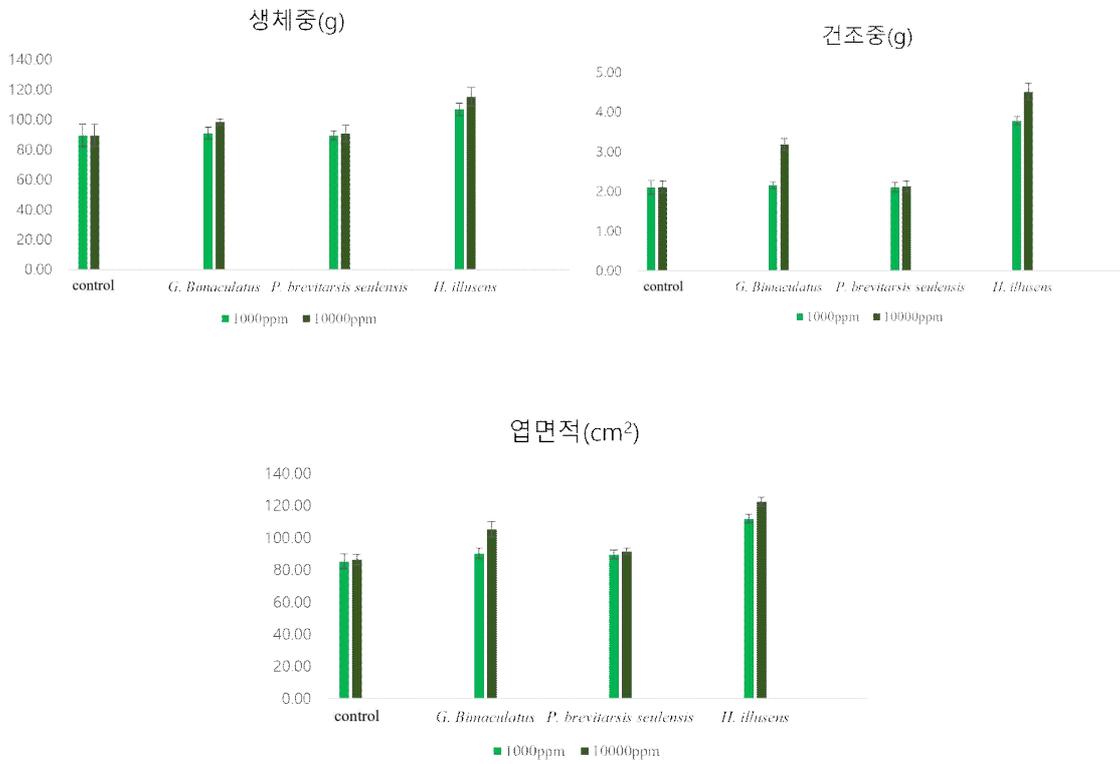
10,000ppm의 건조중은 대조군에서 2.11g으로 관찰되었고 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)의 분말 처리구는 유사하게 나타났음. 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*)는 약간의 차이를, 동애등에(*H. illucens*) 분말 처리구에서 가장 높은 차이를 보여주었음[표2-21],[그림2-55],[그림2-56].

10,000ppm의 엽면적은 대조군에서 86.42cm<sup>2</sup>으로 측정되었으며 동애등에(*H. illucens*) 분말 처리구가 122.37cm<sup>2</sup>으로 가장 높은 크기로 측정되었음[표2-21],[그림2-55],[그림2-56].

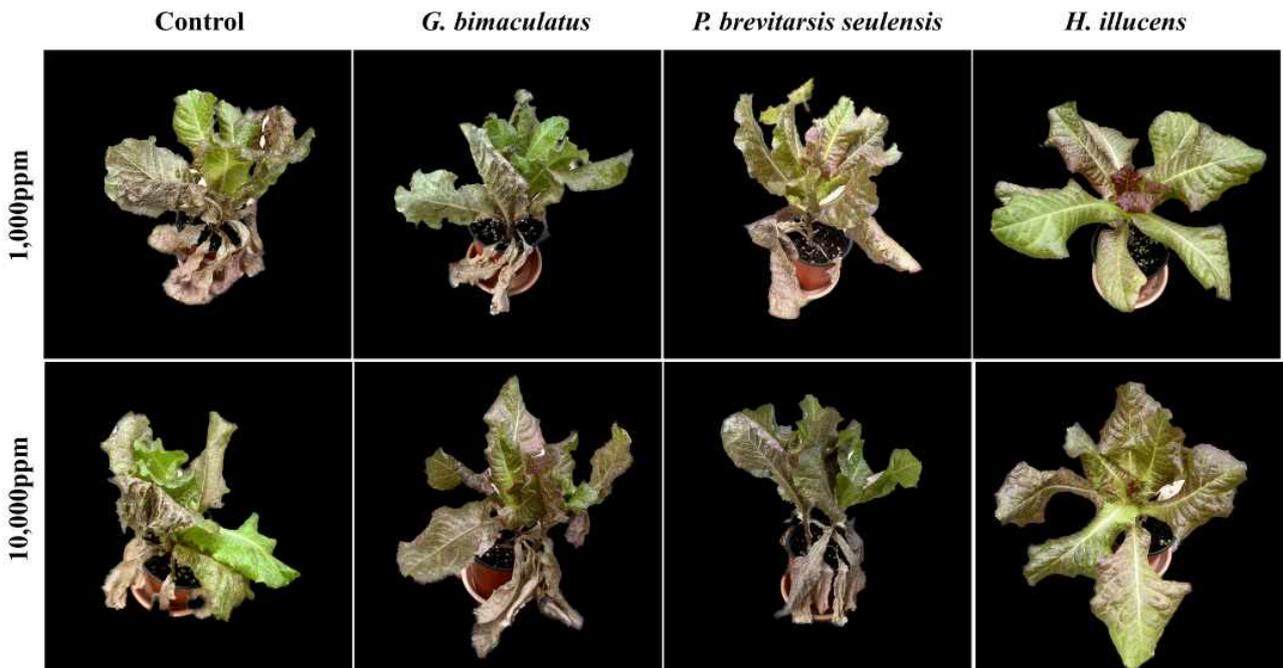
결론적으로 10,000ppm에서도 1차 실험 경향과 유사하게 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*)의 분말 처리구는 약간의 유의미한 차이를 보였음. 1차 시험과 유사하게 생육 10일 후에도 동애등에(*H. illucens*)의 분말 처리구가 가장 유의미한 차이가 나타났음.

[표2-21] 집단 면역 활성화된 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*), 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*), 동애등에(*H. illucens*) 분말 처리 후 10일을 생육하여 측정

처리구	농도(ppm)	생체중(g)	건조중(g)	엽면적(cm <sup>2</sup> )
Control	1,000	89.48	2.10	85.32
	10,000	89.37	2.11	86.42
<i>G. bimaculatus</i>	1,000	90.87	2.16	90.30
	10,000	98.30	3.19	105.29
<i>P. brevitarsis seulensis</i>	1,000	89.48	2.11	89.58
	10,000	90.73	2.13	91.63
<i>H. illucens</i>	1,000	106.86	3.78	111.97
	10,000	115.20	4.51	122.37



[그림2-55] 집단 면역 활성화된 흰점박이꽃무지(*P. brevitaris seulensis*), 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*), 동애등에(*H. illucens*) 분말 처리 후 10일을 생육 후 측정 결과



[그림2-56] 집단 면역 활성화된 흰점박이꽃무지(*P. brevitaris seulensis*), 쌍별귀뚜라미(*G. bimaculatus*), 동애등에(*H. illucens*) 분말 처리 후 10일을 생육 모습. 동애등에(*H. illucens*) 분말 처리구에서 상추무름병(*P. carotovorum*) 억제 관찰되었음.

### 3. 식물 생장촉진 미생물을 활용한 복합유기질 비료 개발

#### 가. 연구개발 목표

식물 생장촉진 미생물 선발 및 유기성 자원을 활용한 유기질 비료 혼합 발효 조건을 통한 복합유기질 비료 기술 개발을 실시하고, 유기성 자원과 1차년도에 선별된 길항미생물과 식물 생장촉진 미생물을 활용하여 복합 유기질 비료의 제품 품질 안정화.

#### 나. 연구개발 내용

##### 1) 식물 생장촉진 미생물 선발 및 산업화를 위한 길항미생물과의 상관관계 규명

###### 가) 상추 종자 발아율 실험을 통한 식물생장촉진 미생물 선발

식물생장촉진미생물을 선발하기 위해, 경북 포장의 엽채류 농가에서 시료를 채취하였음.

수집한 시료를 실온에 1일동안 건조시킨 후 2mm 체로 거른 다음 25ml의 멸균수가 들어 있는 Conical tube(50ml, Falcon)에 시료 3g을 넣고 진탕 배양기에 120rpm으로 10분간 현탁시켰음.

현탁액을 15분간 정치하고 1ml을 취하여 9ml 멸균수가 들어있는 시험관에 넣고  $10^1 \sim 10^2$  농도로 희석하여 Williams(Williams et. al., 2003)의 방법으로 Trichoderma 선택배지(Glucose 3.0g, KCl 0.15g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2g, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1.0g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.9g, Agar 20g, Rose bengal 150mg, Chloramphenicol 25ppm-20mg/ml, Water 1L)에 도말 한 후 25℃ 항온기에 배양하였음.

선택배지에서 4~5일간 배양한 Trichoderma 균사를 백금이로 떼어내어 멸균수에 현탁하여 물한천배지(Agar 20g, Water 1L)에 스트리킹 한 후 25℃ 항온기에 배양하였음.

배양 1~2일 후 현미경을 이용하여 Trichoderma 단포자의 균사를 분리한 후 PDA(Potato dextrose agar, Difco) 사면배지에 이식하여 배양하였음.

분리된 Trichoderma 균주는 15℃ 항온기에 보관하면서 실험에 사용하였음.

또한, 강원도 원주의 (주)중부바이오텍 유기질 비료 공정에서 시료를 채취하여, 시료 1g을 멸균수 9ml에 넣고 15분간 정치한 후, 상등액을 Serial dilution으로 희석한 후 TSA 배지 및 PDA 배지에 30 $\mu$ l씩 접종 도말한 후, 28℃에서 3일간 배양하여 배양된 Colony 중에서 형성 모양 및 색 등의 형태적 특성에 따라 미생물을 분리함.

최종 분리된 미생물들은 20% Glycerol stock을 만들어 -80℃에 보관하면서 실험에 사용함.

총 34개의 세균과 1개의 곰팡이를 분리하였으며, 분리한 균주는 3회 평판법을 이용하여 24시간, 28℃ 조건에서 배양한 뒤 전문분석 기관(마크로젠)에 의뢰하여, 16s rRNA를 기반으로 동정하였음.

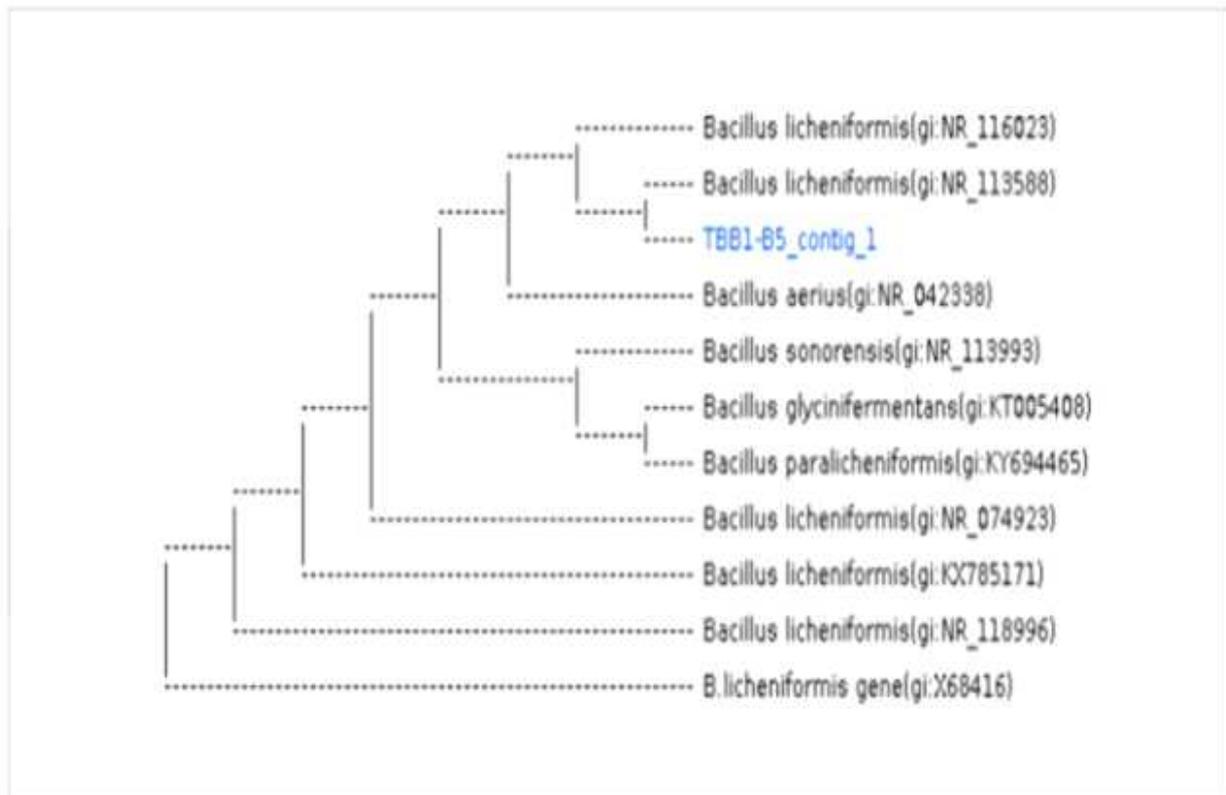
이중 효과가 좋을 것으로 예상되는 *Bacillus lichemiformis*(TB B1-B5)를 활용하여 실험에 사용하였음[그림3-1].

## Primer Information

Sequencing Primer Name Primer Sequences	PCR Primer Name Primer Sequences
785F 5' (GGA TTA GAT ACC CTG GTA) 3'	27F 5' (AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG) 3'
907R 5' (CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT) 3'	1492R 5' (TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T) 3'

Subject						Score		Identities	
Accession	Description	Length	Start	End	Coverage	Bit	E-Value	Match/Total	Pct.(%)
KX785171.1	Bacillus licheniformis	1545	17	1497	95	2706	0.0	1476/1481	99

Kingdom	Family	Genus	Species
Bacteria	Bacillaceae	Bacillus	Bacillus licheniformis



[그림3-1] 마크로젠 동정 분석 결과

나머지 식물생장촉진미생물은 세부연구기관(강원대 이윤수)에서 보유하고 있는 식물생장 미생물인 PA1(*Bacillus subtilis*), PA2(*Bacillus subtilis*), PA12(*Bacillus amyloliquefaciens*), MR3(*Bacillus subtilis*), MR19(*Bacillus subtilis*), B18(*Bacillus siamensis*), B24(*Burkholderia*

*arboris*) 균주를 분양받아 식물 성장촉진 능력을 확인하기 위해 발아 실험을 진행하였음[표3-1].

[표3-1] 실험에 사용한 미생물 균주목록

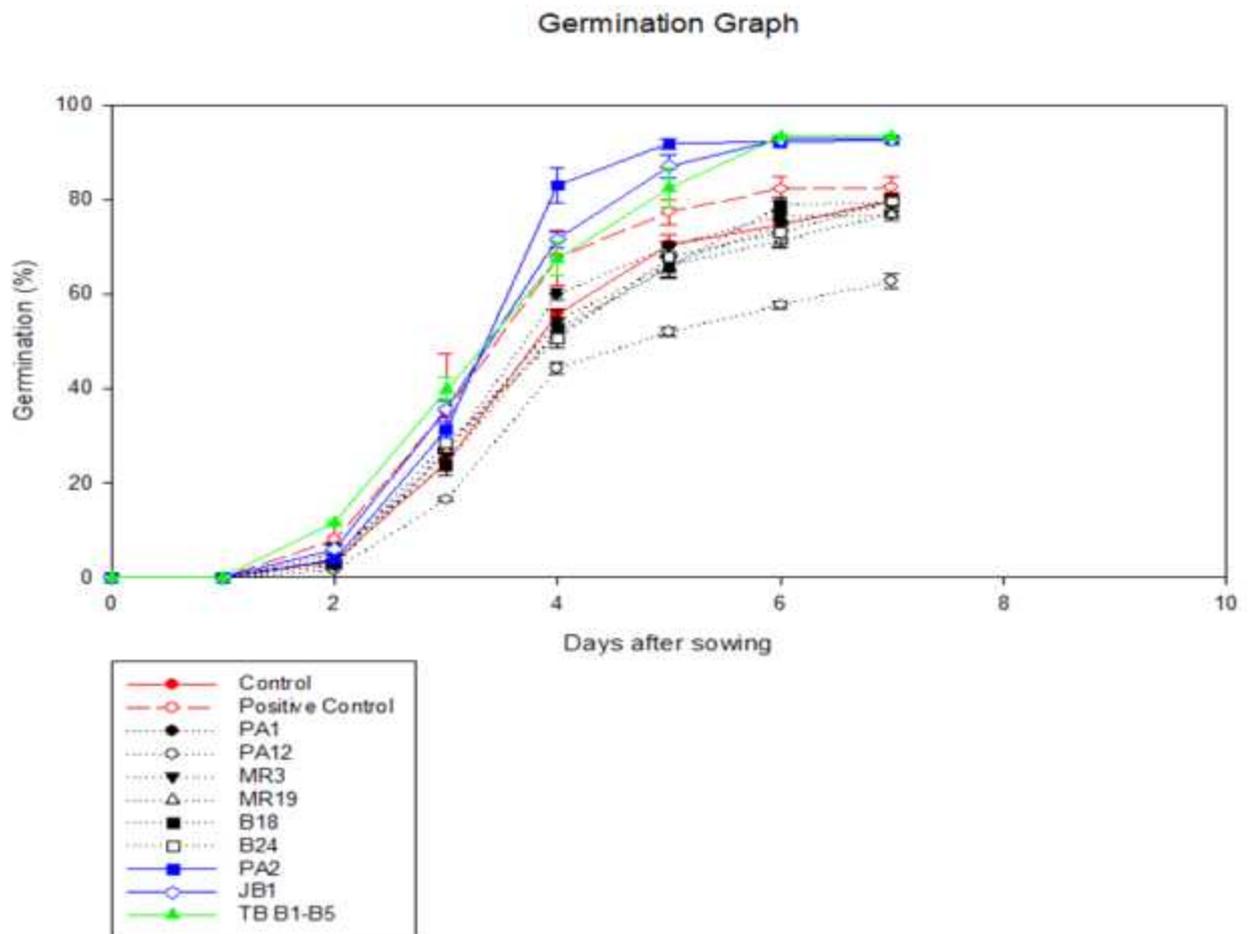
No.	균주번호	균주명	비고
1	PA1	<i>Bacillus subtilis</i>	
2	PA2	<i>Bacillus subtilis</i>	
3	PA12	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	
4	MR3	<i>Bacillus subtilis</i>	
5	MR19	<i>Bacillus subtilis</i>	
6	B18	<i>Bacillus siamensis</i>	
7	B24	<i>Burkholderia arboris</i>	
8	JB-1	<i>Trichoderma sp.</i>	경상북도 포항
9	TB B1-B5	<i>Bacillus licheniformis</i>	강원도 원주

실험에 사용한 종자는 상추(품종 : 동오적치마, 동오시드)를 이용하였고, 종자를 치상하기 전 1% 차염소산나트륨(NaClO)에 10초 동안 담귀 표면 살균을 진행하였음.

그리고 멸균된 beaker에 증류수 200ml를 담아 총 4번의 세척을 진행하였고 Clean bench에 24시간 건조를 진행한 후 각 균주 별  $1 \times 10^7$  cfu/ml로 희석한 현탁액에 1시간 침지 후 다시 1시간을 건조하여 식물 성장촉진 미생물을 종자에 표면 코팅을 시켜주었음.

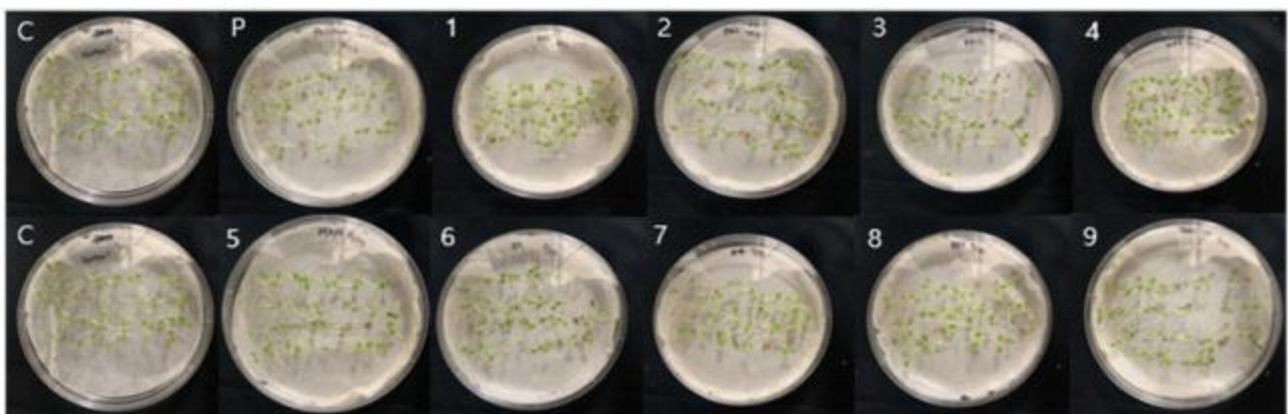
Control은 표면 코팅(미생물 미처리)과정 없이 표면 살균만 진행한 후 멸균수를 주입하여 실험을 진행함. 종자의 파종은 직경 90 x 높이 20mm Petri dish에 여과지(Whatman No. 1)를 2장씩 깔고, 30립의 종자를 완전임의배치법으로 정렬하여 멸균수 7ml 주입을 하였으며, 3반복으로 실시하였음. 3일 주기로 멸균수 7ml씩 주입하며 총 7일 동안 실험을 진행함.

20°C 항온기내에서 실시하였으며, 유근이 2mm 이상 나온 것을 발아한 것으로 간주하여 발아율을 조사하였음. Petri Dish 90mm에서 실험한 결과로는 대조구의 경우에는 80%의 발아율을 보인 반면, PA2(*Bacillus subtilis*), TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*) 와 JB-1(*Trichoderma sp.*)의 경우에는 90% 이상의 발아율을 보이는 것으로 확인되었음[그림3-2],[그림3-3].



[그림3-2] Petri dish 상에서의 일자별 종자 발아 실험 결과

\* Positive Control : 친환경유기농자재 작물생육용(아카디안 29, 한국휴바스) 침지



[그림3-3] 식물 성장촉진 미생물을 이용한 종자 발아 실험 결과

(C: control, P: positive control 1: PA1, 2: PA2, 3: PA12, 4: MR3, 5: MR19, 6: B18, 7: B24, 8: JB-1, 9: TB B1-B5)

50구 트레이에 처리구당 25립씩 파종하여 실험을 진행하였으며, 상토는 '바로커. (주) 서울 바이오'를 사용하였음.

실험에 사용한 종자는 상추(품종 : 동오적치마, 동오시드)를 이용하였고, 종자를 치상하기 전 1% 차염소산나트륨(NaClO)에 10초 동안 담귀 표면 살균을 진행하였음.

그리고 멸균된 beaker에 증류수 200ml를 담아 총 4번의 세척을 진행하였고 Clean bench에 24시간 건조를 진행한 후 각 균주 별  $1 \times 10^7$  cfu/ml로 희석한 현탁액에 1시간 침지 후 다시 1시간을 건조하여 식물 성장촉진 미생물을 종자에 표면 코팅을 시켜주었음.

Control은 표면 코팅(미생물 미처리)과정 없이 표면 살균만 진행한 후 멸균수를 주입하여 실험을 진행함.

실험조건은 상온 20℃, 습도 60% 및 관수처리는 1일 1회로 실시하였으며, 총 10일 동안 발아정도를 확인하였음.

육묘 트레이에서 실험한 발아율 결과로는 Control은 5일차에 64%, 10일차에 76%로 조사되었으며, PA2(*Bacillus subtilis*) 및 JB-1(*Trichoderma sp.*), TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*)의 경우, 5일차 발아율은 80% 이상, 10일차에는 90% 이상으로 가장 좋은 결과를 보였음.[표 3-2].

[표3-2] Tray 상에서의 식물 성장촉진 미생물을 이용한 종자 발아 실험 결과

구분	5일차	10일차
Control	64	76
Positive control*	72	84
PA1	60	68
PA2	82	96
PA12	62	72
MR3	62	64
MR19	63	72
B18	68	84
B24	69	88
JB-1	80	92
TB B1-B5	84	92

\* 친환경유기농자재 작물생육용(아카디안 29, 한국휴바스) 침지 후 파종

#### 나) 선발된 식물 성장촉진 미생물과 세부 연구기관(강원대 이윤수)에서 선발된 길항미생물과의 상호관계 규명

종자발아실험의 결과를 바탕으로하여 선발된 식물 성장촉진 미생물 PA2(*Bacillus subtilis*), TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*), JB-1(*Trichoderma sp.*)과 세부 연구기관(강원대 이윤수)에서 선별된 B18(*Bacillus siamensis*), B24(*Burkholderia arboris*) 균핵병 길항균과의 대치배양을 실시하여 식물 성장촉진 미생물과 균핵병 길항균의 상호관계를 확인하고자함.

Petri Dish 90mm와 멸균된 Paper disk를 사용하였으며, Control 균핵병 길항균 B18(*Bacillus siamensis*), B24(*Burkholderia arboris*) 균주만을 TSA 배지에  $30 \mu\text{l}$ 씩 주입하여 도말을 하였으며,

처리구는 균핵병 길항균 B18, B24(*Burkholderia arboris*) 균주를 TSA배지(Petri Dish 90mm)에 30  $\mu$ l 도말 후 선발된 식물 성장촉진 미생물인 PA2(*Bacillus subtilis*), TB B3-B5(*Bacillus licheniformis*) TSB에 3일 배양 후 Paper disk에 25 $\mu$ l씩 접종하였고 JB-1(*Trichoderma* sp.)는 균총을 8mm Cork borer를 이용하여 절단 한 후 배지 중앙에 치상한 후에 관찰하였음.

미생물 배양기에 30 $^{\circ}$ C 동일한 조건으로 3일간 배양하여 상호관계 여부를 확인하였으며, JB-1의 경우에는 5일 정도 관찰 후 상호관계 여부를 확인하였음.

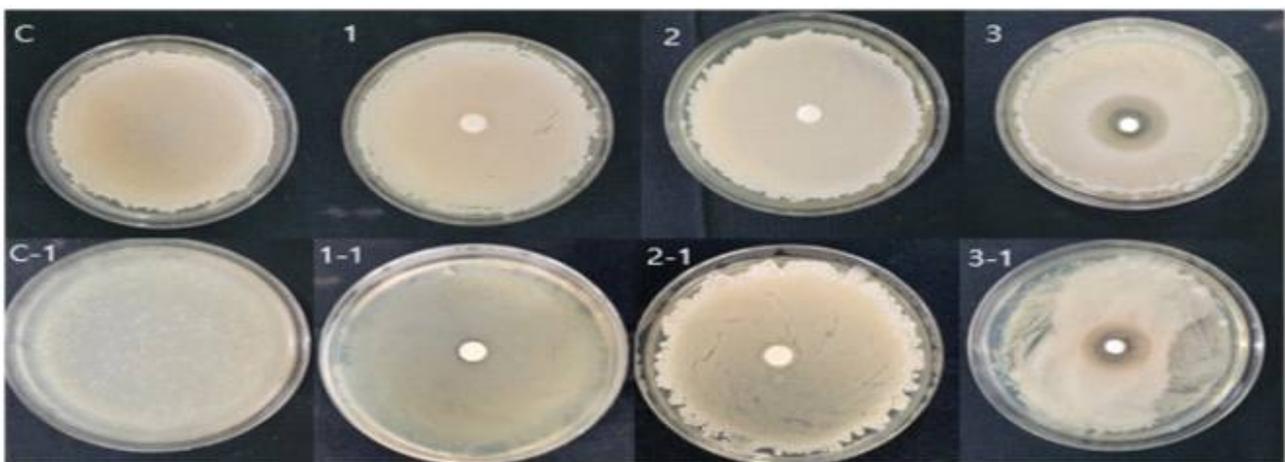
식물 성장촉진 미생물과 균핵병 길항균의 상호관계 결과로는 B18(*Bacillus siamensis*) - JB-1(*Trichoderma* sp.)와 B24(*Burkholderia arboris*) - JB-1(*Trichoderma* sp.)의 상호관계가 있는 것으로 나타남.

다른 미생물에서는 B18과 B24에서는 상호관계가 없음을 확인하였음.[표3-3],[그림3-4].

[표3-3] 균핵병 길항 미생물과 식물 성장촉진 미생물의 상호관계

구분	미생물		
	PA2( <i>Bacillus subtilis</i> )	TB B1-B5( <i>Bacillus licheniformis</i> )	JB-1( <i>Trichoderma</i> sp.)
B18 ( <i>Bacillus siamensis</i> )	-	-	O
B24 ( <i>Burkholderia arboris</i> )	-	-	O

“ - ” 상호관계 없음 , “ O ” 상호관계 있음.



[그림3-4] 식물 성장촉진 미생물과 균핵병 길항균의 상호관계 결과

(C: B18, 1: B18-PA2, 2: B18-TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*) 3: B18-JB-1(*Trichoderma* sp.))

C-1: B24, 1-1: B24-PA2, 2-1: B24-TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*), 3-1: B24-JB-1(*Trichoderma* sp.))

## 2) 미생물 혼합조건에 따른 부숙 유기질비료 발효공정 시스템 개발

### 가) 선발된 식물 성장촉진 미생물의 상추에 미치는 영향 실험

발아율 및 상호관계실험을 통해 선발된 식물 성장촉진 미생물인 PA2(*Bacillus subtilis*), TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*)의 상추에 미치는 영향을 확인하기 위해 실험을 진행함.

-80℃에 보관되어 있는 PA2(*Bacillus subtilis*), TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*) 균주를 30ml TSB배지에 30 $\mu$ l 접종하여 48시간 배양 후 각 균주의 1x10<sup>7</sup> cfu/ml 농도를 맞춰 1, 7, 14일 간격으로 100ml씩 관주처리를 실시하고 실험 시작일부터 21일(3주)경과 후 결과를 측정하였음.

해당 작물은 상추(품종: 동오적치마, 동오시드)를 사용하였으며 3반복, 총 9pot씩(1반복 = 3pot)으로 실험을 진행하였음.

파종 후 10일 정도 지난 육묘를 사용하였으며, Control은 아무 처리하지 않았으며, Positive control은 친환경유기농자재 작물생육용(아카디안 29, 한국휴바스) 100ml/pot, Negative control은 TSB 100ml/pot로 관주처리 하였음.

식물의 성장상태를 비교하기 위해 생체중 및 건조중, 엽면적을 측정하였음.

생체중은 뿌리의 상토를 제거한 후 지상부와 지하부의 무게를 측정하였으며, 엽수는 육안적으로 개수를 측정함.

건조중은 건조기를 활용하여 60℃ 조건에서 48시간 건조하여 무게를 측정하였음.

작물 실험 결과 생체중의 평균은 아무것도 처리하지 않은 Control은 80.42g의 생체중을 기록하였으며, Positive control은 95.80g, Negative control 84.06g, PA2 100.93g, TB B1-B5 103.05g을 기록하였음.

식물 성장촉진 미생물인 PA2(*Bacillus subtilis*), TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*)가 대조구 및 다른 처리구에 비해 높은 지상부 생체중을 기록하였음[표3-4],[그림3-5].

[표3-4] 선발된 식물 성장 촉진 미생물의 상추에 미치는 영향 실험 결과

구분	생체중(g/pot)	건물중(g/pot)	엽수(개/Pot)
Control	80.42±4.86	4.90±0.62	9.1
Positive control	95.80±4.23	7.31±1.22	11.7
Negative control	84.06±3.59	4.99±0.50	8.8
PA2	100.93±4.16	9.96±1.27	12.8
TB B1-B5	103.05±5.03	10.10±0.61	13.2

건물중의 평균은 Control은 4.9g을 기록하였으며, Positive control은 7.31g, Negative

control 4.99g, PA2 9.96g, TB B3-B5 10.10g을 기록하였음. Control이 가장 낮은 건물중을 기록하였고, TB B3-B5(*Bacillus licheniformis*)가 10.10g으로 가장 높은 건물중을 기록하였음 [표3-4].

엽수의 평균은 Control은 9.1개/pot이고, PA2(*Bacillus subtilis*) 12.8개/pot, TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*) 13.2개/pot로 조사되었음.[표3-4].



[그림3-5] 선발된 식물 성장촉진 미생물이 상추에 미치는 영향

(C: control, P: positive control, N: negative control, 1: PA2(*Bacillus subtilis*), 2: TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*))

## 나) 유기질비료의 함량별 상추에 미치는 영향 실험

계분을 Base로 하는 유기질 비료의 비율별 상추에 미치는 영향을 확인하기 위해 실험을 진행하였음.

실험의 작물은 상추(품종 : 동오적치마, 동오시드)를 사용하였고, 파종 후 10일 정도 지난 육묘를 사용하였음. Pot(지름 19cm X 높이 17cm)를 이용하여 실험을 진행하였음.

[표3-5]와 같은 조건으로 혼합하여 실험을 진행함. 이식 후 12일간 실험을 진행하였으며, 식물의 성장상태를 비교하기 위해 생체중 및 건조중, 엽면적을 측정하였음.

생체중은 뿌리의 상토를 제거한 후 지상부와 지하부의 무게를 측정하였으며, 엽면적 측정은 Plant Canopy Analyzer(LI-3100C)를 이용하였음. 또한, 엽수는 육안적으로 개수를 측정함.

건조중은 건조기를 활용하여 60℃ 조건에서 48시간 건조하여 무게를 측정하였음.

[표3-5] 유기질 비료 혼합비율별 실험 조건

구분	상토량 (ml/pot)	유기질비료 (ml/pot)	반복수 (3pot X 2)
Control	3,000		6
1% 혼합	2,970	30	6
5% 혼합	2,850	150	6
10% 혼합	2,700	300	6

유기질비료의 혼합비율별 상추에 미치는 영향 실험 결과, 생체중은 Control 46.81g을 기록하였으며, 1% 혼합 처리구가 66.65g을 기록하여 다른 처리구보다 높은 생체중을 기록하였음 [표3-8],[그림3-6].

건물중 측정 결과, Control은 2.74g을 기록하였으며, 1% 혼합 처리구가 3.28g을 기록하여 다른 처리구보다 높은 건물중을 기록하였음[표3-8],[그림3-6].

엽면적의 평균은 Control은 59.5를 기록하였으며, 1% 혼합 처리구가 엽면적 75.82로 기록하여 다른 처리구보다 높은 엽면적을 기록하였음[표3-8],[그림3-6].

전반적으로 계분을 base로 한 유기질비료는 1% 혼합비율에서 가장 좋았으며, 채소류의 경우, 계분퇴비 시용량이 증가 될수록 양배추, 무 등의 수량이 감소되는 경향을 보이는 것으로 조사됨.(한국토양비료학회지, 1998)

[표3-6] 유기질비료의 혼합비율별 상추에 미치는 영향 실험 결과

구분	생체중(g/pot)	건물중(g/pot)	엽면적(cm <sup>2</sup> /pot)	엽수(개/Pot)
Control	46.81±4.69	2.74±0.40	59.5±7.14	5.4
1% 혼합	66.65±1.07	3.28±0.15	75.82±3.90	6.6
5% 혼합	42.63±9.71	2.25±0.29	55.94±10.15	5.1
10% 혼합	39.50±4.90	2.11±0.07	53.05±3.44	4.6



[그림3-6] 유기질비료의 혼합비율별 실험 결과

(C: Control, 1: 1% 혼합, 2: 5% 혼합, 3: 10% 혼합)

#### 다) 유기질 비료와 선발된 식물 성장촉진 미생물의 혼합비율별 상추에 미치는 영향 실험

계분을 Base로 하는 유기질 비료 1% 혼합 조건을 기본으로, 선발된 식물 성장촉진 미생물인 PA2(*Bacillus subtilis*), TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*), JB-1(*Trichoderma sp.*) 혼합 비율별 상추에 미치는 효과를 확인하기 위해 실험을 진행하였음.

실험의 작물은 상추(품종 : 동오적치마, 동오시드)를 사용하였고, 파종 후 10일 정도 지난 육묘를 사용하였음.

Pot(지름 19cm X 높이 17cm)를 이용하여 실험을 진행하였음. 표 3-7과 같은 조건으로 혼합하여 실험을 진행하였으며, 이식 후 28일간 실험을 진행하였음.

Control은 상토 100%를 투입하였으며, Negative Control은 유기질비료 1% 혼합, Positive Control은 유기질 비료 1% 혼합을 바탕으로 친환경유기농자재 작물생육용(아카디안 29, 한국 휴바스) 2,500배 혼합하여 100ml씩 3회/7일간격으로 처리함.

나머지 처리구에서는 유기질 비료 1% 혼합을 기본으로 선발된 미생물 PA2(*Bacillus subtilis*), TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*), JB-1(*Trichoderma sp.*)을 각각 1%, 5%, 10% 혼합하여 실험을 진행하였음.

선발된 미생물인 PA2와 TB B1-B5는 30ml TSB액체배지에 배양 한 후 3L 플라스크에 3~5일간 배양하여 사용하였으며, JB-1(*Trichoderma sp.*)은 PDB 액체 배지 3L에 7일간 배양하여 실험을 진행하였음.

미생물 밀도는  $1 \times 10^7$  cfu/ml로 조정하여 실험에 활용하였음.

식물의 성장상태를 비교하기 위해 생체중 및 건조중, 엽면적을 측정하였음.

생체중은 뿌리의 상토를 제거한 후 지상부와 지하부의 무게를 측정하였으며, 엽면적 측정은 Plant Canopy Analyzer(LI-3100C)를 이용하였음.

건조중은 건조기를 활용하여 60°C 조건에서 48시간 건조하여 무게를 측정하였음.

미생물 경시변화는 선발된 미생물 혼합 후 1일과 정식 후 28일에 처리구별로 Pot에 각각 3지점을 선정하고, 상토 표층으로부터 3cm, 5cm의 각 깊이에서 Pot 토양 시료를 채취하여 본 실험에 사용하였음.

각 토양 시료를 풍건하고 이로부터 1g씩 채취하여 멸균수로  $10^1 \sim 10^7$ 배까지 희석한 후  $10^3$ ,  $10^5$ ,  $10^7$  배수의 희석시료를 추출하였으며, 세균은 TSA배지(Petri dish 90mm), 곰팡이는 PDA배지(Petri dish 90mm)에 각각 100 $\mu$ l 주입 후 도말 하였고 30°C 배양기에서 TSA는 2일간, PDA 5일간 배양 후 각 배지 상에 나타난 colony 수를 세어 미생물 밀도를 확인하였음.

[표3-7] 유기질 비료와 선발된 미생물의 혼합비율별 실험 조건

구분	상토량 (ml/pot)	유기질비료 (ml/pot)	미생물 (ml/pot)	반복수 (3pot X 3)	비고
Control	3,000			9	
Negative Control	2,970	30		9	
Positive Control	2,970	30		9	친환경유기농 자재 3회처리
PA2 1%	2,940	30	30	9	
PA2 5%	2,820	30	150	9	
PA2 10%	2,670	30	300	9	
TB B1-B5 1%	2,940	30	30	9	
TB B1-B5 5%	2,820	30	150	9	
TB B1-B5 10%	2,670	30	300	9	
JB-1 1%	2,940	30	30	9	
JB-1 5%	2,820	30	150	9	
JB-1 10%	2,670	30	300	9	

계분을 Base로 한 유기질비료 1%를 기본으로 선발된 미생물 혼합 실험 결과 생체중(g)은 Control 78.79g을 기록하였고, TB B1-B5 1%는 139.62g, TB B1-B5 5%는 140.34g, TB B1-B5 10%는 136.87g를 기록하였음[표3-8].

TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*)는 다른 PA2(*Bacillus subtilis*) 및 JB-(*Trichoderma sp.*)보다 생체중이 높게 조사되었음.

건물중(g)은 Control 4.32g, TB B1-B5 1%는 5.22g, TB B1-B5 5%는 6.03g, TB B1-B5 10%는 4.96g를 기록하였음[표3-8].

엽면적(cm)은 Control 124.6cm, TB B1-B5 1%는 139.62g, TB B1-B5 5%는 140.34g, TB B1-B5 10%는 136.87g를 기록하였음[표3-8].

TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*) 1, 5, 10%가 다른 처리구보다 전체적으로 결과 값이 높았으며, 그 중 TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*) 5%가 가장 높은 값을 기록하였음[표3-8].

미생물의 경시변화를 관찰한 결과, Control은 Bacteria의 경우, 28일 후 41% 증가를 보였으

며, Fungi의 경우에는 36% 증가하는 모습을 보인 반면, TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*) 5%의 경우에는 Bacteria의 경우, 268% 증가, Fungi의 경우에는 132% 증가율을 보였음.[표 3-9].

종합적으로 볼 때, TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*) 5%에서 생육이 가장 좋은 이유는 미생물의 활성도와 연관이 있는 것으로 보임.

[표3-8] 유기질 비료와 선발된 미생물의 혼합비율별 실험 결과

구분	생체중(g/pot)	건물중(g/pot)	엽면적(cm <sup>2</sup> /pot)	엽수(개/Pot)
Control	78.79±6.64	4.32±0.59	124.6±0.55	9.8
Negative control	104.36±6.00	4.35±0.41	152.3±0.56	11.2
Positive control	109.79±4.4	4.43±0.31	160.2±0.35	11.8
PA2 1%	119.98±3.82	4.70±0.28	160.7±0.27	12.2
PA2 5%	121.41±4.27	4.65±0.28	162.3±0.73	12.4
PA2 10%	120.31±5.88	4.93±0.29	152.9±0.33	11.6
TB B1-B5 1%	139.62±3.35	5.22±0.19	163.8±0.12	12.7
TB B1-B5 5%	140.34±3.42	6.03±0.21	165.4±0.19	13.2
TB B1-B5 10%	136.87±3.34	4.96±0.21	162.8±0.22	12.9
JB-1 1%	106.35±5.83	4.65±0.23	141.6±0.23	10.8
JB-1 5%	105.99±6.64	4.87±0.26	155.1±0.26	11.4
JB-1 10%	91.58±5.64	3.41±0.20	142.9±0.20	10.1



[그림3-7] 유기질비료와 선발된 식물생장 미생물 혼합비율별 실험 결과

(C: Control, N: Negative control, P: Positive control, 1: PA2 1%, 2: PA2 5%, 3: PA2 10%, 4: TB B1-B5 1%, 5: TB B1-B5 5%, 6: TB B1-B5 10%, 7: JB-1 1%, 8: JB-1 5%, 9: JB-1 10%)

[표3-9] 유기질 비료와 선발된 미생물의 혼합비율별 미생물 경시변화

구분	1일		28일	
	Bactria (X10 <sup>5</sup> cfu/g)	Fungi (X10 <sup>3</sup> cfu/g)	Bactria (X10 <sup>5</sup> cfu/g)	Fungi (X10 <sup>3</sup> cfu/g)
Control	39	22	55	30
Negative control	52	55	100	77
Positive control	80	43.7	160	63
PA2 1%	102	51	240	67
PA2 5%	130	77.5	250	32.3
PA2 10%	201	77	320	42
TB B1-B5 1%	100.5	56.7	390	59.3
TB B1-B5 5%	150	25	552	58
TB B1-B5 10%	230	20	428	29.7
JB-1 1%	89	100	60	210
JB-1 5%	101	150	90	361
JB-1 10%	115	280	97	395

라) 선발된 식물생장 촉진 미생물의 유기질 비료 공정에 미치는 영향 평가

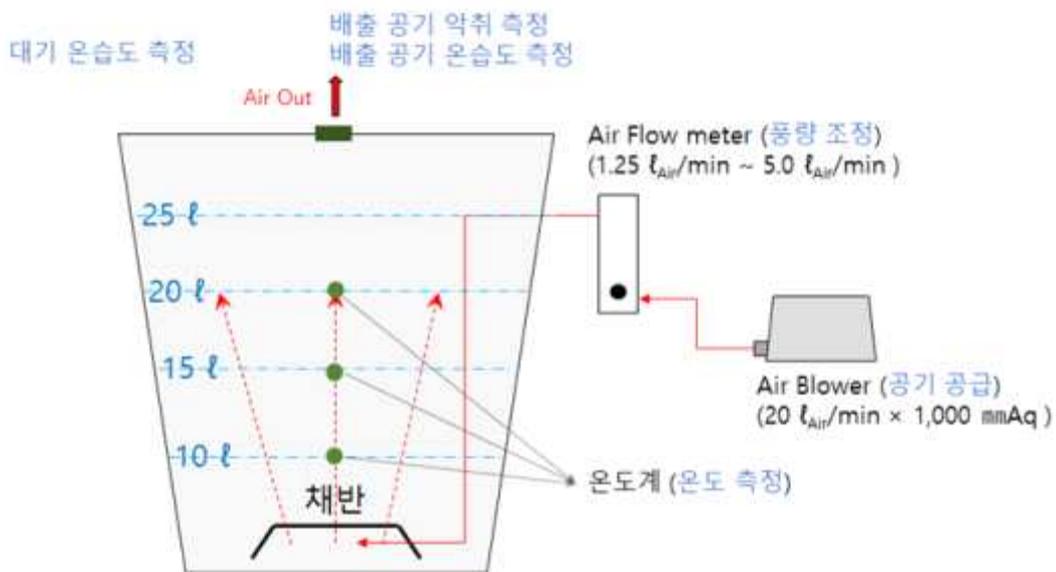
① 실험디자인 및 방법

Pilot 실험을 통해 선발된 식물생장촉진 미생물의 유기질 비료 공정상에 미치는 영향을 알아보기 위해 실험을 진행함.

본 연구에 사용된 pilot plant의 공정도를 그림 3-8에 나타내었으며, 발효조는 투명 리빙박스를 사용하여 유효용적은 25L임.

발효의 조건을 맞추기 위해 공기 공급장치(YLP-20, 영남 브로와)을 활용하여 공기유량을 3L/min으로 유지하였음.

또한, 발효시 온도 측정을 위하여 막대 수는 온도계를 설치하여 일정기간동안 온도의 변화를 측정함.



[그림3-8] Pilot 실험 장치 개략도 및 사진

② 유기질 비료의 조제 및 선발된 미생물 혼합 후 변화상 관찰

유기질비료에 들어가는 재료는 계분 40%, 마분 10%, 돈분 15%, 마분 10%, 톱밥 등을 활용하였으며, 선발된 미생물인 PA2(*Bacillus subtilis*)와 TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*)은  $1 \times 10^7$  cfu/ml로 조정하여 일정비율별로 혼합하여 공정상에 미치는 영향을 조사하였음[표 3-10].

초기 함수량은 59%정도를 유지하였음. 총 20일동안 실험을 진행하면서, 온도변화 및 암모니아 변화상을 조사하였으며, 온도의 측정은 용기 상단 및 하단에 수은온도계를 부착하여 주기적으로 측정하였으며 이와 동일한 시간에 암모니아 측정도 검지관식 기체측정기(GV-100S)를 이용하여 측정하였고, 수분함수율 측정은 수분측정기(ML-50)으로 측정하였음.

미생물 경시변화는 선발된 미생물 혼합 후 초기와 후기에 처리구별로 각각 3지점을 선정하고, 표층으로부터 10~15cm의 각 깊이에서 Pot 토양 시료를 채취하여 본 실험에 사용하였음.

각 시료를 풍건하고 이로부터 1g씩 채취하여 멸균수로  $10^1 \sim 10^7$ 배까지 희석한 후  $10^3$ ,  $10^5$ ,  $10^7$  배수의 희석시료를 추출하였으며, 세균은 TSA배지(Petri dish 90mm), 곰팡이는 PDA배지(Petri dish 90mm)에 각각  $100 \mu\text{l}$  주입 후 도말 하였고  $30^\circ\text{C}$  배양기에서 TSA는 2일간, PDA 5일간 배양 후 각 배지 상에 나타난 colony 수를 세어 미생물 밀도를 확인하였음.

또한, 미생물의 정석분석을 위해서, 분석은 전문분석 기관(마크로젠)에 의뢰하였음.

분석기관은 Roche 454 GS-FLX+ 장비를 사용하며, 정방향 프라이머로는 V1-9F (5'-AC-GAGTTTGATCMTGGGCTCAG-3') adaptor-linker-primer의 순서로 구성되어 있으며, 역방향 프라이머로는 V3-541R (5'-X-AC-WTTACCGCGGCTGCTGG-3)를 이용하였음(그림 3-9).



[그림3-9] NGS를 이용한 microbiome 분석을 위한 workflow

부속도 측정은 다음과 같은 방법으로 종자발아법으로 확인하였음.

실험에 사용될 종자는 무(백운무, 농우바이오)를 이용하였고, 종자를 치상하기 전 1% 차염소산 나트륨(NaClO)에 10초 동안 담귀 표면 살균을 진행하였음. 그리고 멸균된 beaker에 증류수 200ml를 담아 총 4번의 세척을 진행하였고 Clean bench에 24시간 상온 건조를 진행한 후 실험에 사용하였음.

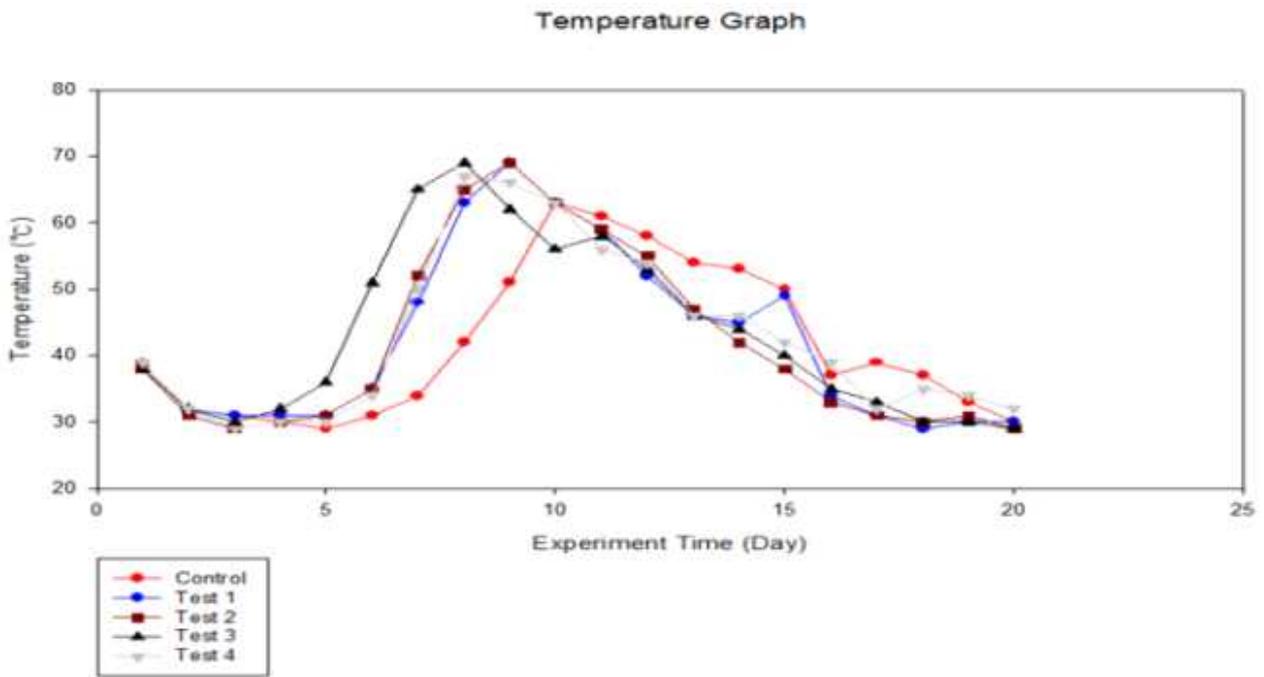
유기질비료와 미생물 혼합 공정한 처리구를 교반하여 각각 10g 시료 채취 후 분액여두를 사용하여 현탁액을 12mL씩 추출하였음.

종자의 이식은 직경 9.0 x 높이 2.0cm, 90mm Petri dish에 여과지를 2장씩 깔 후 20립의 종자를 완전임의배치법으로 정렬하여 각 처리구별 현탁액 4ml씩 주입하였으며, 3일차에 증류수 3ml씩 주입하며 총 5일 동안 발아 실험을 진행하였음.

**[표3-10] 유기질비료와 식물 성장속진 미생물을 혼합 공정 조건**

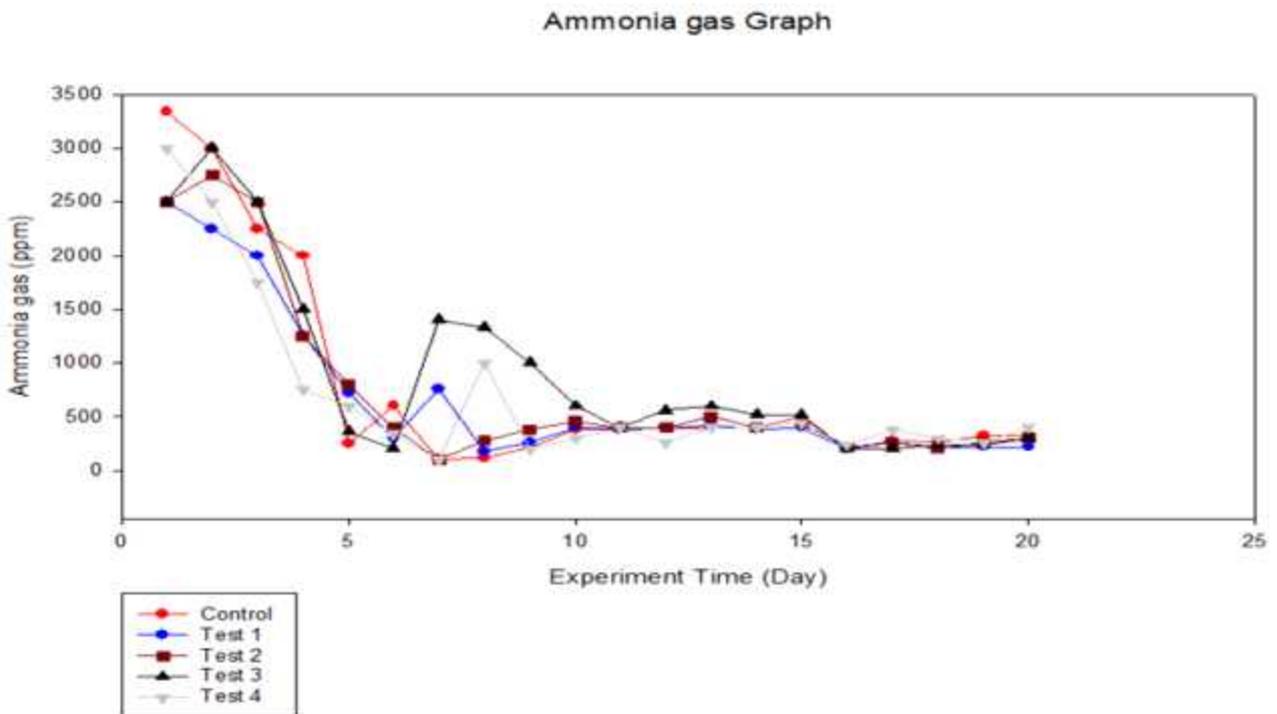
처리구	유기질비료 제작 조건
Control	시료: 18kg(계분, 돈분, 마분, 톱밥) + 물 4L
Test-1	시료: 18kg(계분, 돈분, 마분, 톱밥) + 물 2.9L + TB B1-B5 5%(1.1L)
Test-2	시료: 18kg(계분, 돈분, 마분, 톱밥) + 물 1.8L + TB B1-B5 10%(2.2L)
Test-3	시료: 18kg(계분, 돈분, 마분, 톱밥) + 물 0.7L + TB B1-B5 15%(3.3L)
Test-4	시료: 18kg(계분, 돈분, 마분, 톱밥) + 물 1.8L + PA2 10%(2.2L)

유기질비료 공정 실험 진행 후 20일간 온도의 변화를 관찰한 결과, 가장 먼저 6일차에서 Test 3 처리구가 온도 상승의 증가세를 보였으며, 8일차에서 Test 3 처리구에서 가장 높은 온도 69℃로 가장 빨리 온도 변화가 있는 것으로 조사되었으며, 대조구는 10일만에 60도에 도달한 반면, 다른 처리구에서는 7일~8일사이에 60도 이상의 온도에 도달하는 것으로 조사됨. 이는 Bacillus 속은 고초균으로써 발효에도 영향을 미치는 것으로 조사됨 [그림3-10].



[그림3-10] 기간별 온도 변화 결과

유기질비료 부숙 조건 조성 후 20일간 암모니아의 변화를 관찰한 결과, 1일차에는 모든 처리구가 2,000~3,000ppm을 유지하고 있었으며, Test-4에서 다른 처리구에 비해 암모니아 1일 정도 빨리 수치가 낮아지는 것을 확인하였지만, 점점 수치가 올라가는 현상을 보임. 대조구에 비해 전체 처리구가 감소되는 현상을 보였지만, 변화가 심한 듯하여, 처리된 미생물의 영향이라고는 판단하기 어려울 수 있음[그림3-11].



[그림3-11] 기간별 암모니아 측정 결과

수분함수 측정결과에서는 Control에 비해 처리구에서 큰 변화는 관찰되지 않았음.[표 3-11].

[표3-11] 처리구별 수분함수 분석 결과

구 분	Control	Test-1	Test-2	Test-3	Test-4
초기 시료			59		
1차 교반 후	57.5	58.3	55.0	58.3	58.3
최종	54.6	53.1	53.3	53.9	54.3

미생물의 경시변화를 관찰한 결과, Control은 Bacteria의 경우, 초기보다 53% 증가를 보였으며, Fungi의 경우에는 33% 증가하는 모습을 보인 반면, TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*) 10%의 경우에는 Bacteria의 경우, 162% 증가, Fungi의 경우에는 40% 증가율을 보였음. 또한, 처리구에서 140% 정도 이상 세균수가 증가하는 모습을 보이고 있음[표3-12].

[표3-12] 공정 후 혼합비율별 미생물 경시변화

구분	초기		후기	
	Bactria (X10 <sup>5</sup> cfu/g)	Fungi (X10 <sup>3</sup> cfu/g)	Bactria (X10 <sup>5</sup> cfu/g)	Fungi (X10 <sup>3</sup> cfu/g)
Control	78	10	120	13.3
TB B1-B5 5%	120	12.3	290	18.2
TB B1-B5 10%	210	23	552	32.3
TB B1-B5 15%	230	20	528	38.3
PA2 10%	180	11	320	12.2

마크로젠 분석으로 통해, 혼합된 미생물의 실제 작용 여부를 확인하기 위해, 초기와 후기에 분석 진행한 결과, 세균의 경우에는 Genus level에서 473개로 분류되었으며, 초기에는 Pseudomonas(8.06%), Atopococcus(4.76%), Bacillus(3.6%)로 가장 많이 분류되었으며, 후기에는 Lentibacillus(16.54%), Caldalkalibacillus(12.94%), Pseudomonas(8.6%), Bacillus(2.28%)로 분류되었음.

본 연구진이 처리한 TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*)와 PA2(*Bacillus subtilis*)의 경우에는 초기에 비해 후기에는 밀도가 낮아지는 현상을 보이는 것으로 보아서, 공정상 초기에 넣는 것은 큰 효과를 보지 못하는 것으로 보임.

곰팡이의 경우에는 Genus level에서 32개로 분류되었으며, 초기에는 Aspergillus(0.06%) 이었으며, 나머지는 Unassigned 66.24%로 거의 분류되지 않는 곰팡이가 많은 것으로 조사됨.

후기에는 Diutina(4.48%), Candida(3.28%), Aspergillus(1.24%)이었으며, 분류되지않는 곰팡이가 83% 정도로 매우 높게 나타났음.

부숙도 측정 결과, 전체적으로 부숙을 완료하였으며, 비교구에 비해, 발아지수가 높음을 보이고 있음.[표3-13],[그림3-12].

[표3-13] 유기질비료와 식물 성장촉진 미생물을 혼합 공정 부숙도 측정 결과

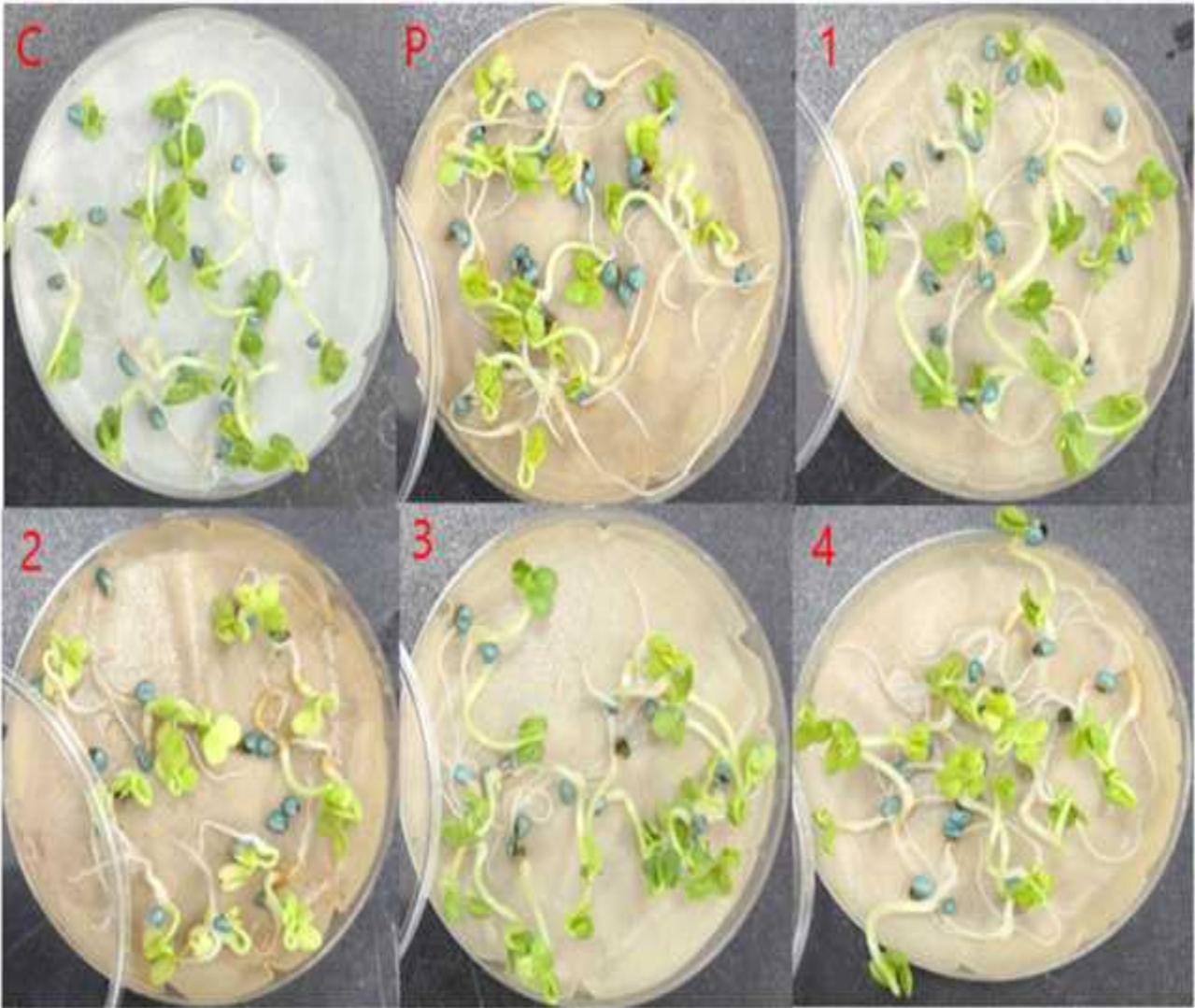
구분	Control	비교구	Test-1	Test-2	Test-3	Test-4
발아율(%)	95	98.3	100	100	100	96.7
발아율 GR		103.47	105.26	105.26	105.26	101.79
뿌리길이율 RE		137.96	224.38	268.52	240.12	261.66
발아지수 GI*		142.76	236.19	282.65	252.76	266.34

\* 발아지수(GI) 계산 : 발아지수 70이상일 때 부숙완료로 판정한다.

$$GR = ( \text{발아율} / \text{Control 발아율} ) \times 100$$

$$RE = ( \text{뿌리길이} / \text{Control 뿌리길이} ) \times 100$$

$$GI = GR \times RE / 100$$



[그림3-12] 유기질비료와 식물 성장촉진 미생물을 혼합 공정 후 종자 발아법을 이용한 부숙도 측정 결과  
(C: 증류수, P: Control 처리구, 1: Test-1, 2: Test - 2, 3: Test - 3, 4: Test - 4)

### ③ 공정 실험 후 조건별 상추에 미치는 영향 실험

비료 공정 과정에 식물 성장촉진 미생물인 PA2(*Bacillus subtilis*)와 TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*)를 혼합하여 제작한 유기질비료의 상추에 미치는 영향을 평가하기 위해 실험을 진행하였음.

50구 트레이에 처리구당 20립씩 파종하여 실험을 진행하였으며, 상토는 '바로커. (주) 서울 바이오'를 실험에 사용한 종자는 상추(동오적치마, 동오시드)를 사용하였으며, 상온 20℃, 습도 60%의 생육조건을 조성 및 관수처리는 1일 1회로 실험하였음.

Control 처리구는 상토 100%를 투입하였으며, Positive control은 미생물 공정 실험의 Control을 1, 5, 10% 비율로 혼합 처리하였으며, 처리구별로 1, 5, 10% 비율로 상토에 혼합하여 7일간 실험을 진행하였음.

혼합 공정 유기질 비료 비율별 상추 발아 실험 결과, 전체적으로 1% 혼합시 발아율이 좋아지는 것으로 조사됨.[표3-14].

[표3-14] 공정 실험 후 혼합 비율별 상추 발아에 미치는 영향.

처리구	4일차*	7일차*
Control	50	85
Positive control-1(Control) 1%	55	89
Positive control-2(Control) 5%	50	75
Positive control-3(Control) 10%	20	65
T-1-1(TB B1-B5 5%) 1%	85	95
T-1-2(TB B1-B5 5%) 5%	55	70
T-1-3(TB B1-B5 5%) 10%	15	45
T-2-1(TB B1-B5 10%) 1%	80	97
T-2-2(TB B1-B5 10%) 5%	15	45
T-2-3(TB B1-B5 10%) 10%	5	25
T-3-1(TB B1-B5 15%) 1%	70	92
T-3-2(TB B1-B5 15%) 5%	35	55
T-3-3(TB B1-B5 15%) 10%	15	45
T-4-1(PA2 10%) 1%	80	91
T-4-2(PA2 10%) 5%	60	80
T-4-3(PA2 10%) 10%	45	85

\* 발아율(발아된 종자 수 / 파종된 종자 수)\* 100

또한, 상추의 생육에 미치는 영향을 파악하기 위해 아래와 같은 실험을 진행하였음.

실험의 작물은 상추(품종 : 동오적치마, 동오시드)를 사용하였고, 파종 후 10일 정도 지난 육묘를 사용하였음.

Pot(지름 19cm X 높이 17cm)를 이용하여 실험을 진행하였음[표3-15]와 같은 조건으로 혼합하여 실험을 진행하였고 정식 후 28일간 실험을 진행하였음.

[표3-15] 공정 실험 후 상추에 미치는 영향 실험 조건

처리구	실험 조건
Control	상토 100%
Positive control	상토 99% + Control 1%
Test-1	상토 99% + TB B1-B5 5% 비료 1%
Test-2	상토 99% + TB B1-B5 10% 비료 1%
Test-3	상토 99% + TB B1-B5 15% 비료 1%
Test-4	상토 99% + PA2 10% 비료 1%

식물의 성장상태를 비교하기 위해 생체중 및 건조중, 엽면적을 측정하였음.

생체중은 뿌리의 상토를 제거한 후 지상부와 지하부의 무게를 측정하였으며, 엽면적 측정은 Plant Canopy Analyzer(LI-3100C)를 이용하였음.

건조중은 건조기를 활용하여 60℃ 조건에서 48시간 건조하여 무게를 측정하였음.

생체중의 경우에는 대조구는 33.06g으로 조사되었으며, Test-3(상토 99% + TB B1-B5 15% 비료 1%)의 경우에 가장 높은 78.91g으로 높게 조사되었음[표3-16].

건물중의 경우에도, Test-3(상토 99% + TB B1-B5 15% 비료 1%)의 경우에 가장 높은 결과를 보였으며, 엽면적 및 엽수에서도 가장 높은 결과를 보이는 것으로 조사됨.

[표3-16] 공정 실험 후 상추에 미치는 영향 실험 결과

구분	생체중(g/pot)	건물중(g/pot)	엽면적(cm <sup>2</sup> /pot)	엽수(개/Pot)
Control	33.06±5.71	1.28±0.27	32.03±2.75	5.89
Positive control	38.91±7.53	1.85±0.32	61.16±8.07	8.5
Test-1	65.03±5.71	3.01±0.46	99.74±5.59	8.7
Test-2	56.50±7.17	2.78±0.45	98.46±8.94	8.2
Test-3	78.91±5.04	4.75±1.69	115.07±6.13	10
Test-4	57.92±7.19	2.90±0.31	88.01±8.67	9



[그림3-13] 공정 실험 후 상추에 미치는 영향 실험

(C: Control, P: positive control, 1: Test-1, 2: Test - 2, 3: Test - 3, 4: Test - 4)

### 3) 부숙 유기질비료 제품의 제형화 기술 확립

#### 가) 세부 연구기관(강원대 이윤수)에서 선발된 균핵병 길항미생물과 식물 성장촉진 미생물의 상호관계 규명

부숙 유기질비료의 첨가될 두 미생물의 대치배양을 진행하여, 두 균주의 혼합 처리 가능여부를 확인하기위해 균핵병 길항균인 HCS-1B(*Bacillus megaterium*)과 식물 성장촉진 미생물 TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*)의 상호관계를 확인하고자함.

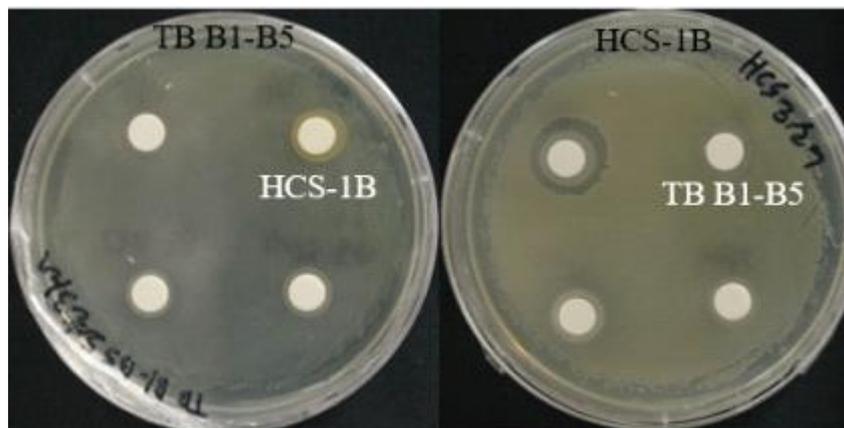
Petri Dish 90mm와 멸균된 Paper disk를 사용하였으며, HCS-1B(*B. megaterium*), TB B1-B5(*B. licheniformis*) 균주는 TSB에 72시간 배양 후, TB B1-B5균주의 도말 후 HCS-1B 균주를 25 $\mu$ l씩 접종과 HCS-1B균주의 도말 후 TB B1-B5 균주 25 $\mu$ l씩 접종하여 실험을 진행하였으며, 배양기에 30 $^{\circ}$ C 조건으로 3일간 배양하여 상호관계 여부를 확인하였음.

균핵병 길항균인 HCS-1B(*B. megaterium*)과 식물 성장촉진 미생물 TB B1-B5(*B. licheniformis*)의 상호관계 결과로는 상호관계가 없는 것으로 나타났으며, 이는 추후 부숙 유기질비료의 혼합 처리가 가능하다고 판단되는 결과임[표3-17],[그림3-14].

[표3-17] 균핵병 길항 미생물과 식물 성장촉진 미생물의 상호관계

구분	미생물	
	HCS-1B( <i>Bacillus megaterium</i> )	TB B1-B5( <i>Bacillus licheniformis</i> )
<b>TB B1-B5</b> ( <i>Bacillus licheniformis</i> )	-	-
<b>HCS-1B</b> ( <i>Bacillus megaterium</i> )	-	-

" - " 상호관계 없음 , " O " 상호관계 있음.



[그림3-14] 식물 성장촉진 미생물과 균핵병 길항균의 상호관계 결과

나) 식물 성장촉진 미생물인 TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*)균주의 대량배양을 위한 탄소원 확립

식물 성장촉진 미생물인 TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*)균주를 기초배지인 Nutrient Broth(NB)배지에 다양한 탄소원을 첨가하고, 균주의 증식을 조사하였음. 탄소원인 Glucose, Starch, Galactose, Inositol, Sorbitol, Fructose, Maltose, Glycerol 0.1%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5% 비율로 실험을 진행하였으며, Flask에 Nutrient Broth(NB) media 30ml, 탄소원을 각각의 비율별로 첨가와 동시에 해당 균주인 TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*)를 300 $\mu$ L (1%) 접종하였음. 배양 조건은 진탕배양기(120 rpm, 30 $^{\circ}$ C) 24, 48, 72시간동안 배양하였으며 균체농도를 측정하였음. 균체농도는 흡광도(Jasco V-530 uv/vis spectrophotometer)를 이용하여, 600nm 기준으로 O.D값을 측정하였음[그림 3-15].

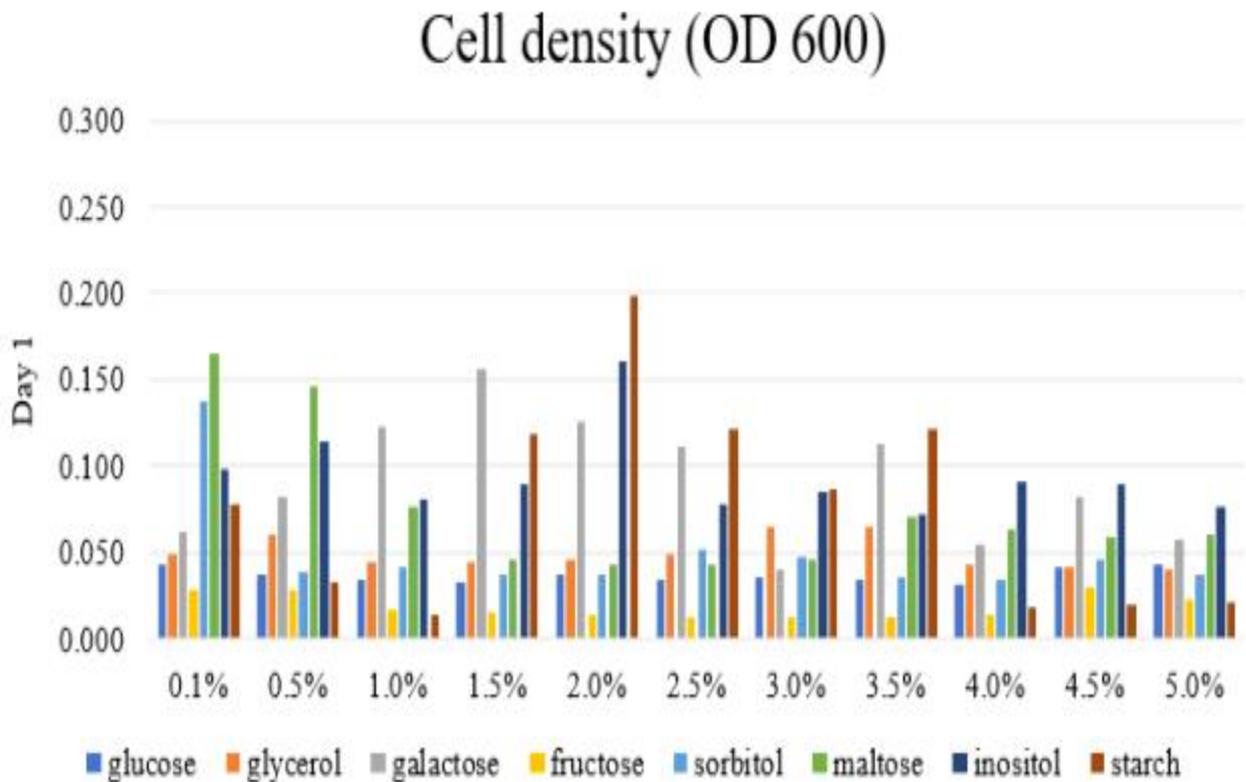
측정 결과, TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*) 균주의 최적 탄소원 종류 및 비율은 탄소원 Stach의 2% 비율이 24, 48, 72시간 조건에서의 증식이 우수하였음. 2.5% 비율은 24, 48시간 후에는 증식 속도가 보통이었으나, 72시간 후 O.D값이 0.275를 측정되어, 두 번째로 증식의 최적 비율을 도출하였음. 반면, 2% 비율에서의 균주 증식은 24시간 후부터 빠른 증식을 시작으로, 72시간까지 우수한 증식을 보였음. 종합적으로 Stach 2% 비율을 대량배양의 탄소원 최적 조건으로 확립되었음[표3-18],[표3-19],[표3-20],[그림3-16],[그림3-17],[그림3-18].



[그림3-15] TB B1-B5(*B. licheniformis*)균주 비율별 탄소원 배양 및 흡광도 기기

[표3-18] TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*)균주의 탄소원 종류 및 비율별 접종 O.D 결과 (24h)

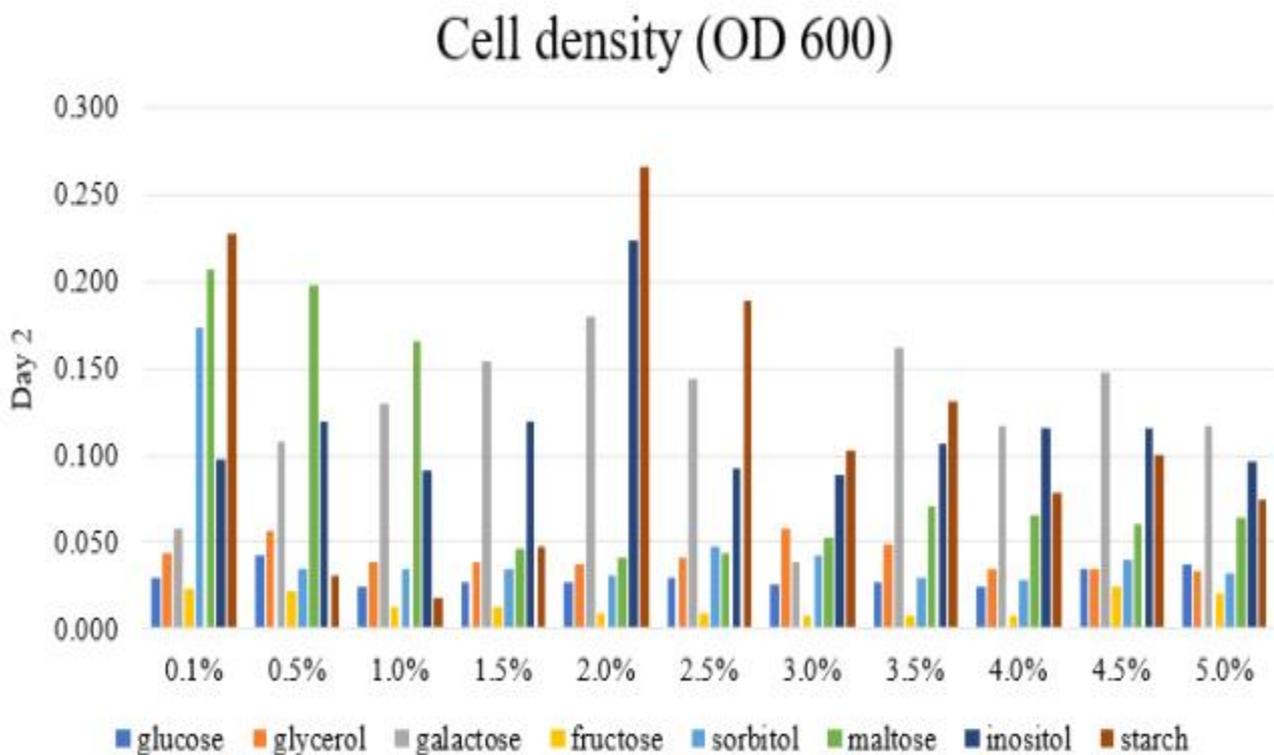
비율(%)	glucose	glycerol	galactose	fructose	sorbitol	maltose	inositol	starch
0.1	0.043	0.049	0.062	0.029	0.137	0.165	0.098	0.078
0.5	0.037	0.061	0.082	0.028	0.039	0.146	0.114	0.033
1	0.034	0.045	0.123	0.017	0.041	0.077	0.081	0.014
1.5	0.033	0.045	0.156	0.016	0.037	0.046	0.090	0.118
2	0.037	0.046	0.126	0.014	0.038	0.043	0.160	0.198
2.5	0.035	0.049	0.111	0.013	0.052	0.043	0.078	0.121
3	0.036	0.065	0.040	0.013	0.047	0.046	0.085	0.087
3.5	0.034	0.065	0.113	0.013	0.036	0.071	0.072	0.121
4	0.031	0.043	0.054	0.014	0.035	0.064	0.091	0.019
4.5	0.041	0.042	0.082	0.030	0.046	0.059	0.089	0.020
5	0.043	0.040	0.058	0.023	0.037	0.060	0.077	0.021



[그림3-16] TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*)균주의 탄소원 종류 및 비율별 접종 O.D 결과 (24h)

[표3-19] TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*)균주의 탄소원 종류 및 비율별 접종 O.D 결과 (48h)

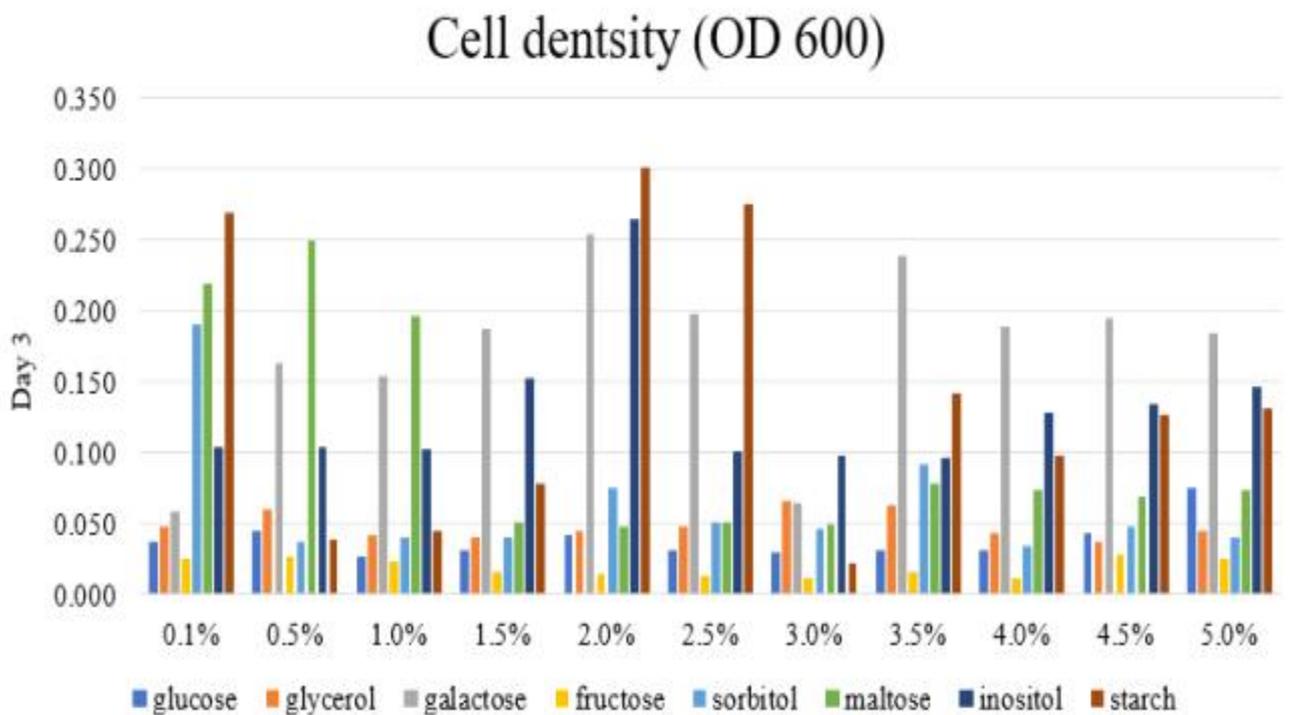
비율(%)	glucose	glycerol	galactose	fructose	sorbitol	maltose	inositol	starch
0.1	0.030	0.044	0.058	0.023	0.173	0.207	0.098	0.227
0.5	0.042	0.056	0.108	0.022	0.035	0.197	0.119	0.031
1	0.024	0.039	0.130	0.013	0.035	0.166	0.091	0.018
1.5	0.027	0.038	0.154	0.013	0.034	0.046	0.119	0.048
2	0.027	0.037	0.179	0.009	0.031	0.041	0.223	0.265
2.5	0.029	0.041	0.144	0.009	0.048	0.043	0.092	0.189
3	0.026	0.058	0.038	0.008	0.042	0.052	0.089	0.103
3.5	0.027	0.049	0.162	0.008	0.029	0.071	0.106	0.131
4	0.024	0.035	0.117	0.008	0.028	0.065	0.115	0.078
4.5	0.034	0.035	0.148	0.024	0.040	0.060	0.115	0.100
5	0.037	0.033	0.117	0.020	0.032	0.064	0.096	0.074



[그림3-17] TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*)균주의 탄소원 종류 및 비율별 접종 O.D 결과 (48h)

[표3-20] TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*)균주의 탄소원 종류 및 비율별 접종 O.D 결과 (72h)

비율(%)	glucose	glycerol	galactose	fructose	sorbitol	maltose	inositol	starch
0.1	0.037	0.048	0.059	0.025	0.190	0.220	0.105	0.270
0.5	0.046	0.060	0.163	0.027	0.038	0.250	0.104	0.039
1	0.027	0.043	0.155	0.024	0.041	0.196	0.103	0.045
1.5	0.032	0.041	0.187	0.017	0.041	0.051	0.153	0.078
2	0.043	0.046	0.254	0.015	0.076	0.048	0.265	0.301
2.5	0.031	0.048	0.199	0.013	0.052	0.051	0.101	0.275
3	0.030	0.067	0.065	0.012	0.047	0.050	0.098	0.023
3.5	0.032	0.064	0.239	0.017	0.093	0.078	0.097	0.142
4	0.032	0.044	0.189	0.012	0.035	0.074	0.128	0.098
4.5	0.044	0.038	0.195	0.028	0.048	0.070	0.135	0.127
5	0.075	0.046	0.184	0.026	0.041	0.074	0.147	0.131



[그림3-18] TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*)균주의 탄소원 종류 및 비율별 접종 O.D 결과 (72h)

다) 식물 성장촉진 미생물인 TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*)균주의 대량배양을 위한 질소원 확립

식물 성장촉진 미생물인 TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*)균주를 기초배지인 Nutrient Broth(NB)배지에 다양한 질소원을 첨가하고, 균주의 증식을 조사하였음. 질소원인 Malt extract, Tryptone, Casein, Yeast extract, Peptone 0.1%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5% 비율로 실험을 진행하였으며, Flask에 Nutrient Broth(NB) media 30ml, 질소원을 각각의 비율별로 첨가와 동시에 해당 균주인 TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*)를 300 $\mu$ L (1%) 접종하였음. 배양 조건은 진탕배양기(120 rpm, 30 $^{\circ}$ C) 24, 48, 72시간동안 배양하였으며 균체농도를 측정하였음. 균체농도는 흡광도(Jasco V-530 uv/vis spectrophotometer)를 이용하여, 600nm 기준으로 O.D값을 측정하였음(그림 3-19).

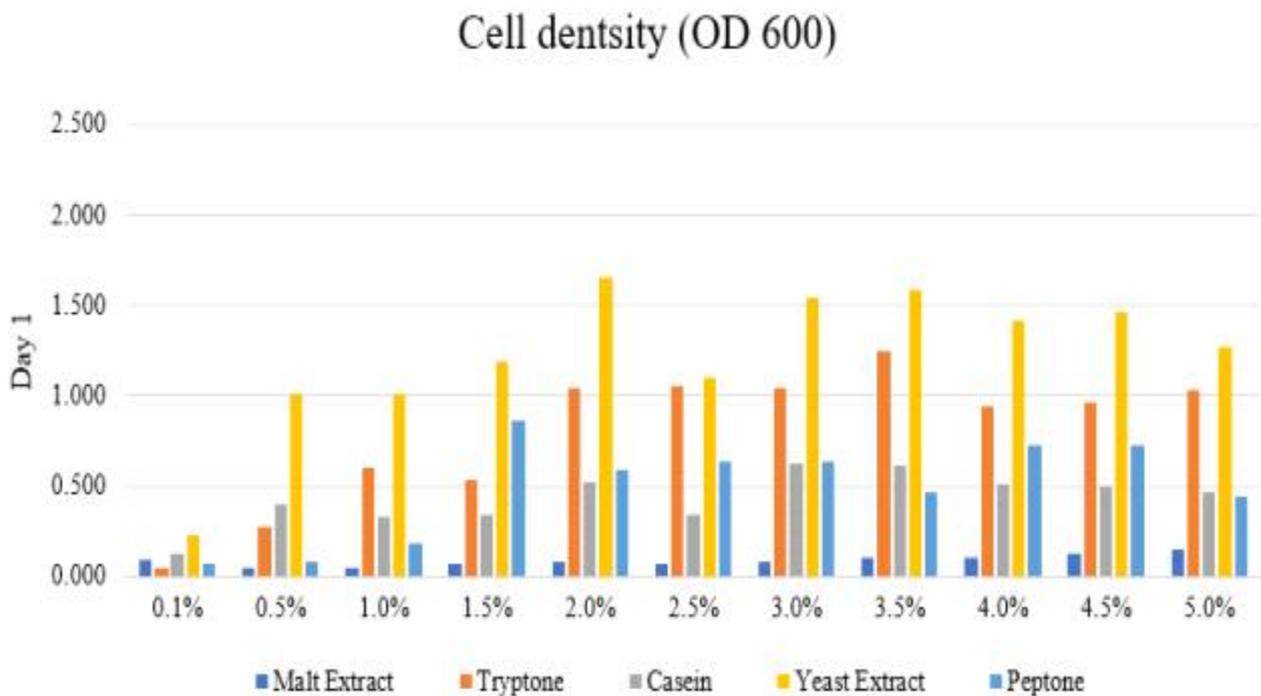


[그림3-19] TB B1-B5(*B. licheniformis*)균주 비율별 질소원 대량배양 및 흡광도 기기

측정 결과, TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*) 균주의 최적 질소원 종류 및 비율은 질소원 Yeast extract의 2% 비율이 24, 48, 72시간 조건에서의 증식이 우수하였음. Yeast extract를 제외한 다른 질소원 중 Tryptone 및 Peptone 첨가한 처리구에서도 균주의 증식이 비교적 우수하였으나, Yeast extract를 첨가한 처리구가 다른 처리구에 비해 보다 좋은 증식을 보였음. 종합적으로 Yeast extract 2% 비율을 대량배양의 질소원 최적 조건으로 확립하였음[표3-21],[표3-22],[표3-23],[그림3-20],[그림3-21],[그림3-22].

[표3-21] TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*)균주의 질소원 종류 및 비율별 접종 O.D 결과 (24h)

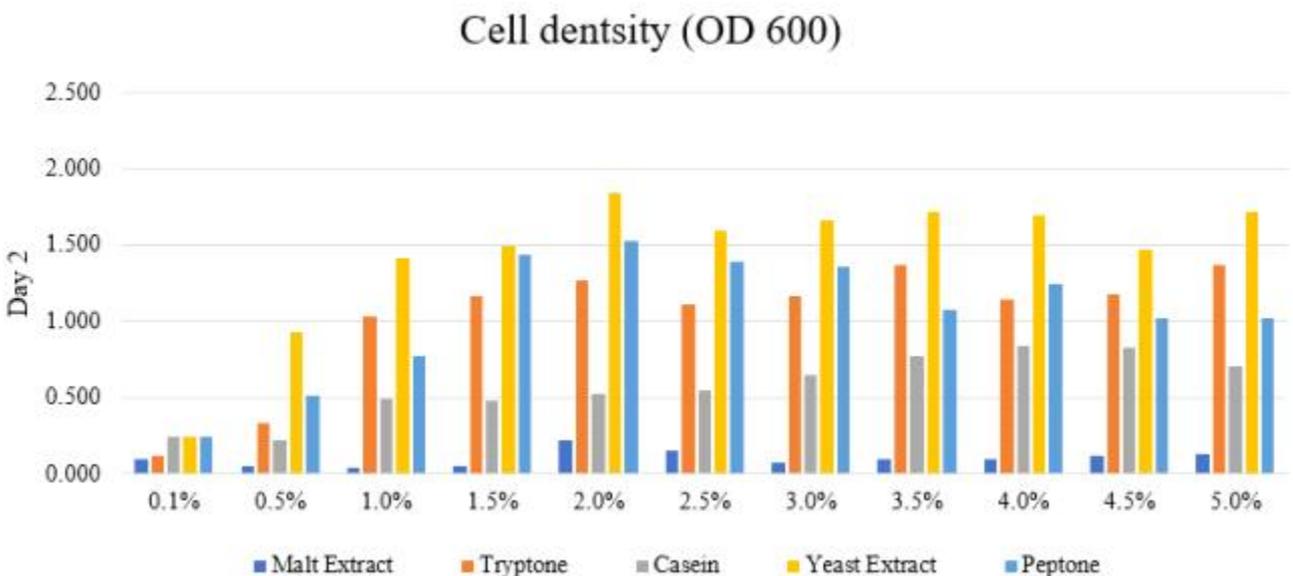
비율(%)	Malt extract	Tryptone	Casein	Yeast extract	Peptone
0.1	0.098	0.046	0.127	0.229	0.072
0.5	0.042	0.278	0.397	1.014	0.082
1	0.046	0.605	0.329	1.015	0.179
1.5	0.074	0.539	0.347	1.191	0.868
2	0.076	1.044	0.527	1.654	0.592
2.5	0.075	1.059	0.347	1.097	0.633
3	0.082	1.045	0.623	1.54	0.638
3.5	0.100	1.250	0.609	1.587	0.468
4	0.104	0.944	0.509	1.422	0.725
4.5	0.121	0.963	0.506	1.467	0.726
5	0.145	1.033	0.471	1.274	0.444



[그림3-20] TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*)균주의 질소원 종류 및 비율별 접종 O.D 결과 (24h)

[표3-22] TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*)균주의 질소원 종류 및 비율별 접종 O.D 결과 (48h)

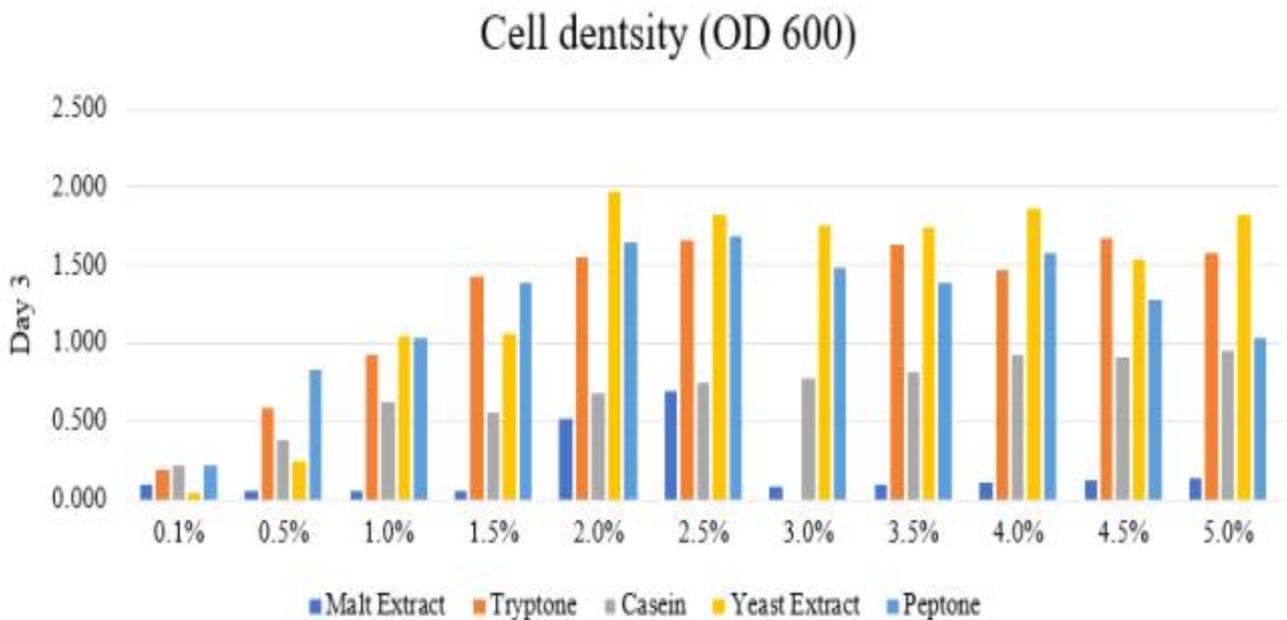
비율(%)	Malt extract	Tryptone	Casein	Yeast extract	Peptone
0.1	0.097	0.120	0.241	0.239	0.249
0.5	0.048	0.332	0.227	0.932	0.511
1	0.046	1.031	0.491	1.413	0.774
1.5	0.053	1.174	0.480	1.494	1.440
2	0.227	1.268	0.528	1.843	1.525
2.5	0.151	1.113	0.545	1.602	1.390
3	0.072	1.174	0.655	1.662	1.361
3.5	0.095	1.374	0.769	1.724	1.079
4	0.100	1.147	0.838	1.700	1.250
4.5	0.120	1.177	0.832	1.475	1.020
5	0.135	1.368	0.706	1.725	1.017



[그림3-21] TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*)균주의 질소원 종류 및 비율별 접종 O.D 결과 (48h)

[표3-23] TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*)균주의 질소원 종류 및 비율별 접종 O.D 결과 (72h)

비율(%)	Malt extract	Tryptone	Casein	Yeast extract	Peptone
0.1	0.100	0.195	0.220	0.048	0.226
0.5	0.060	0.585	0.387	0.243	0.828
1	0.055	0.930	0.621	1.042	1.034
1.5	0.058	1.431	0.554	1.057	1.392
2	0.520	1.545	0.684	1.975	1.642
2.5	0.698	1.660	0.750	1.824	1.684
3	0.079	1.653	0.778	1.759	1.479
3.5	0.099	1.636	0.811	1.748	1.387
4	0.108	1.468	0.932	1.857	1.575
4.5	0.123	1.672	0.916	1.532	1.280
5	0.141	1.582	0.953	1.828	1.031



[그림3-22] TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*)균주의 질소원 종류 및 비율별 접종 O.D 결과 (72h)

라) 식물 성장촉진 미생물인 TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*)균주의 대량배양을 위한 미량요소 확립

식물 성장촉진 미생물인 TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*)균주를 기초배지인 Nutrient Broth(NB)배지에 다양한 미량요소를 첨가하고, 균주의 증식을 조사하였음. 미량요소인 NaCl, KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2% 비율로 실험을 진행하였으며, Flask에 Nutrient Broth(NB) media 30ml, 각각의 미량요소를 비율별로 첨가와 동시에 해당 균주인 TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*)를 300μL (1%) 접종하였음. 배양 조건은 진탕배양기(120 rpm, 30°C) 24, 48, 72시간동안 배양하였으며 균체농도를 측정하였음. 균체농도는 흡광도 (Jasco V-530 uv/vis spectrophotometer)를 이용하여, 600nm 기준으로 O.D값을 측정하였음.

측정 결과, TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*) 균주의 최적 미량요소 종류 및 비율은 KCl의 1% 비율이 24, 48, 72시간 조건에서의 증식이 우수하였음. KCl를 제외한 다른 미량요소 중 NaCl 첨가한 처리구에서도 균주의 증식이 비교적 우수하였으나, KCl 1%를 첨가한 처리구에 비해 보다 낮은 증식을 보였음. 종합적으로 KCl 1% 비율을 대량배양의 미량요소 최적 조건으로 확립하였음 [표3-24],[표3-25],[표3-26],[그림3-23],[그림3-24],[그림3-25].

[표3-24] TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*)균주의 미량요소 종류 및 비율별 접종 O.D 결과(24h)

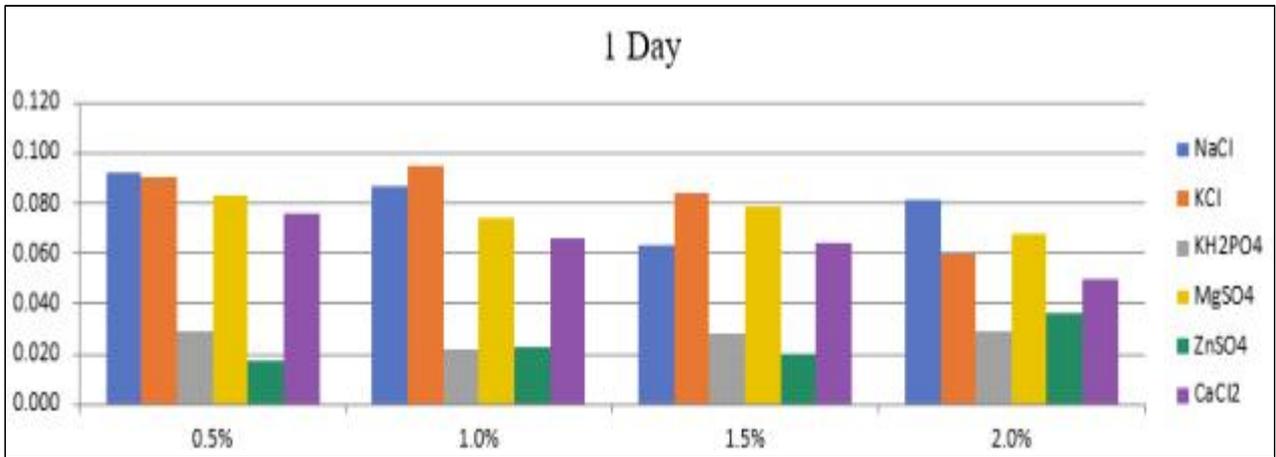
비율(%)	NaCl	KCl	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub>	ZnCl <sub>2</sub>	CaCl <sub>2</sub>
0.5	0.092	0.090	0.029	0.083	0.017	0.076
1.0	0.087	0.095	0.022	0.074	0.023	0.066
1.5	0.063	0.084	0.028	0.079	0.020	0.064
2.0	0.081	0.060	0.029	0.068	0.036	0.050

[표3-25] TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*)균주의 미량요소 종류 및 비율별 접종 O.D 결과(48h)

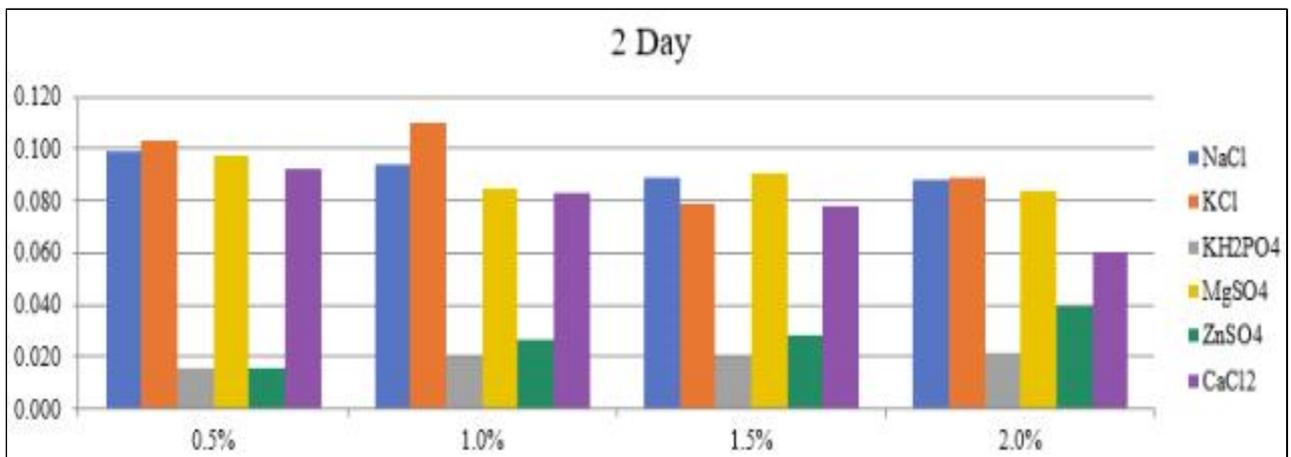
비율(%)	NaCl	KCl	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub>	ZnCl <sub>2</sub>	CaCl <sub>2</sub>
0.5	0.099	0.103	0.016	0.097	0.016	0.092
1.0	0.094	0.110	0.020	0.085	0.027	0.083
1.5	0.089	0.079	0.020	0.091	0.028	0.078
2.0	0.088	0.089	0.022	0.084	0.039	0.060

[표3-26] TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*)균주의 미량요소 종류 및 비율별 접종 O.D 결과(72h)

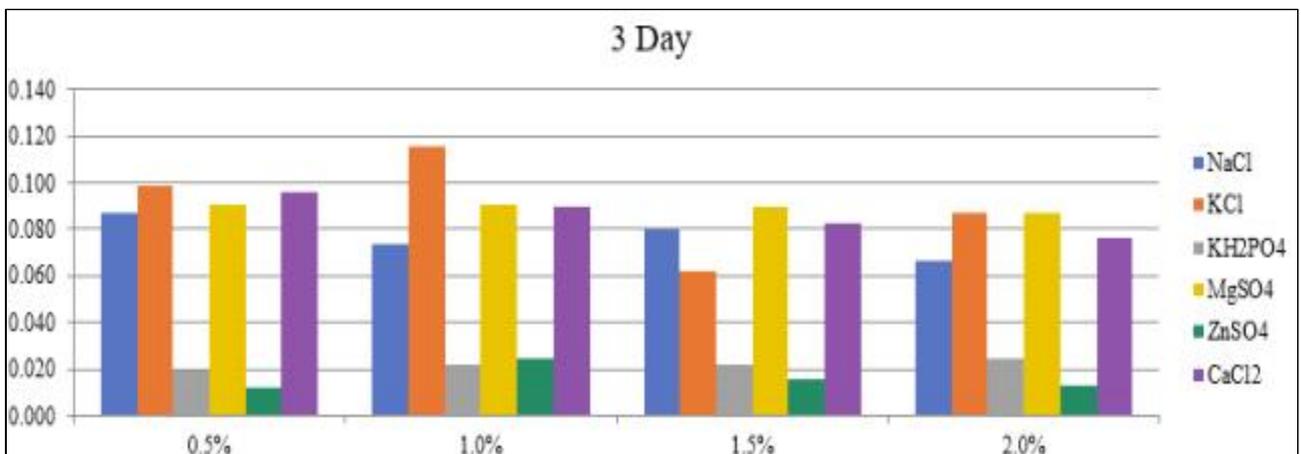
비율(%)	NaCl	KCl	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub>	ZnCl <sub>2</sub>	CaCl <sub>2</sub>
0.5	0.087	0.099	0.019	0.091	0.012	0.096
1.0	0.074	0.116	0.022	0.091	0.025	0.090
1.5	0.080	0.062	0.022	0.090	0.016	0.083
2.0	0.067	0.087	0.025	0.087	0.013	0.076



[그림3-23] TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*)균주의 미량요소 종류 및 비율별 접종 O.D 결과 (24h)



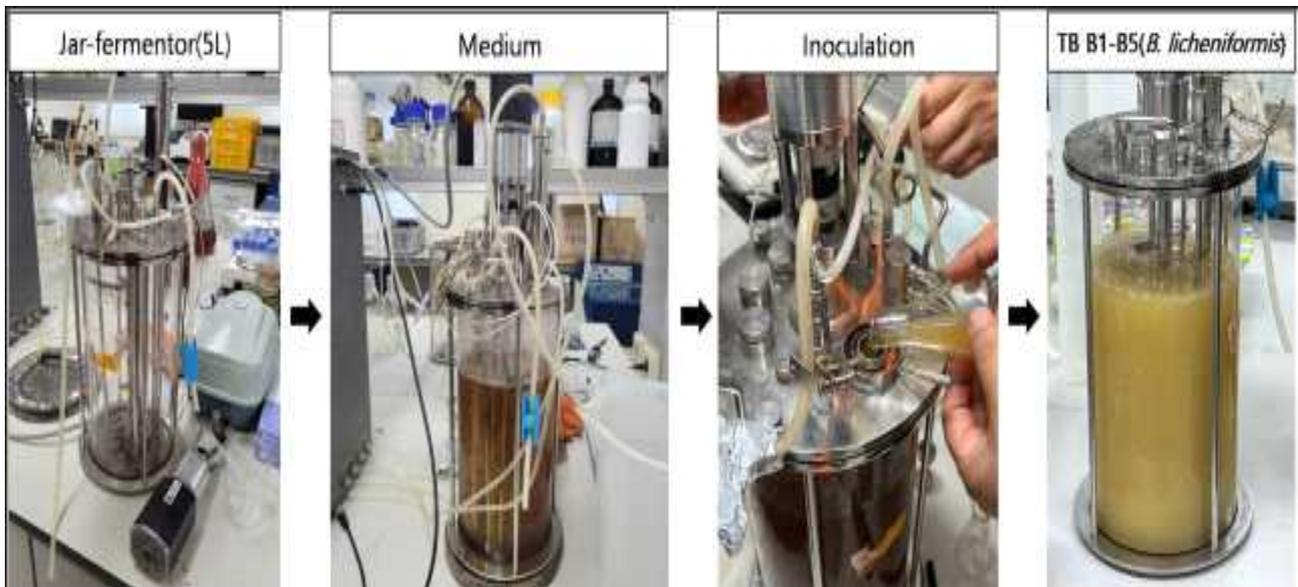
[그림3-24] TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*)균주의 미량요소 종류 및 비율별 접종 O.D 결과 (48h)



[그림3-25] TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*)균주의 미량요소 종류 및 비율별 접종 O.D 결과 (72h)

#### 마) Jar-fermentor(5L) 발효조에서의 식물 성장촉진 균주 증식 연구

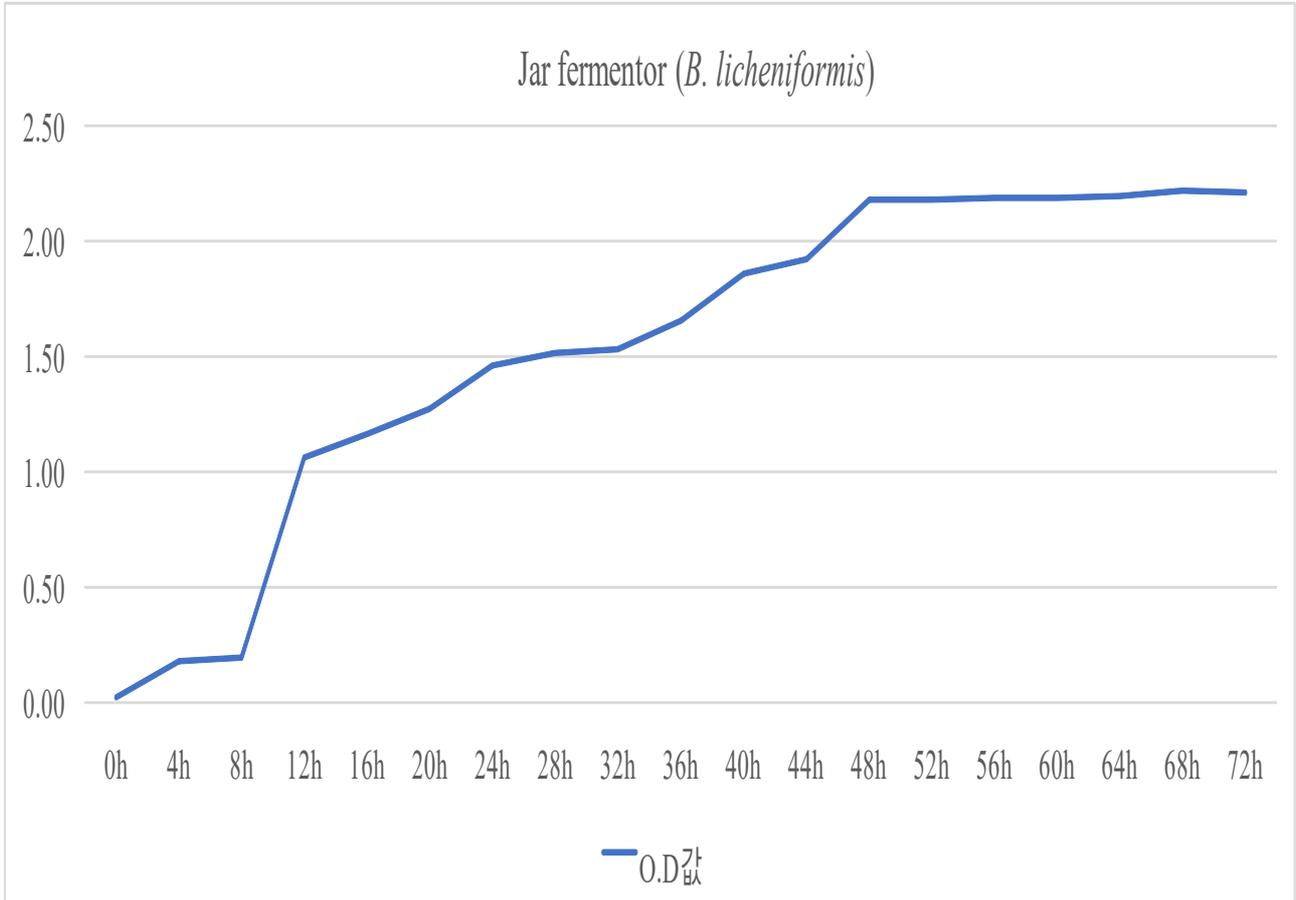
식물 성장촉진 균주인 TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*)의 배지를 확립하기 위해 선별된 탄소원 및 질소원을 첨가하였으며, 균주의 증식을 조사한 결과, 탄소원 Stach 2%와 질소원 Yeast extract 2%, KCl 1%의 비율이 균주 증식이 우수하였으며, 이 결과를 바탕으로 Stach 2% + Yeast extract 2%+ KCl 1%를 혼합 첨가하여 Jar-fermentor(5L) 발효조에서의 균주 증식 실험을 진행하였음. 균주 Seed 배양조건은 기본배지인 NB배지에, TB B1-B5(*B. licheniformis*)를 1%(300 $\mu$ L)접종, 48시간 배양 후 세균의 밀도  $1 \times 10^7$  CFU/ml를 맞추어 준비하였음. Jar-fermentor 배양 조건은 30 $^{\circ}$ C, RPM 350, Air 3vvm, pH 6.0, 72시간동안 진행하였으며 4시간 간격으로 균주의 세균밀도(O.D값)와 pH를 측정하였음. 균체농도는 흡광도(Jasco V-530 uv/vis spectrophotometer)를 이용하여, 600nm 기준으로 O.D값을 측정하였음[그림3-26].



[그림3-26] Jar-fermentor(5L)의 TB B1-B5균주 배양 과정 및 증식

72시간 배양까지의 세균밀도(O.D값)과 pH를 측정한 결과, 배양 12시간부터 O.D값이 급격히 상승하여 1.00 이상 측정이 되었으며, 시간이 지날수록 O.D값은 점차적으로 증가하기 시작하여 48시간 이후에는 O.D값이 2.00 이상이 측정되었음. 최종 배양시간인 72시간 후 O.D값이 2.21로 기록하였으며, 이때의 생균수는  $2.0 \times 10^8$  cfu/ml 로 조사되었음. pH는 세균의 밀도가 증가함에 따라 pH도 증가하는 경향이 나타났음. 탄소원 Stach 및 질소원 Yeast extract 2%, 미량요소 KCl 1% 조건을 첨가한 Jar-fermentor상에서 48시간 이후부터 생균수는  $10^8$  cfu/ml을 유지하는 것으로 조사되었으며, 배양은 균주의 억제없이 꾸준한 증식을 보였으며, pH는 중성을 유지하였음[그림3-27].

최종적으로 Starch 2%와 Yeast extract 2%, KCl 1% 첨가한 조건을 TB B1-B5(*B. licheniformis*)균주의 대양배양 배지 조건으로 선발하였음.



[그림3-27] Jar-fermentor 배양 후 균주의 성장곡선(O.D값)

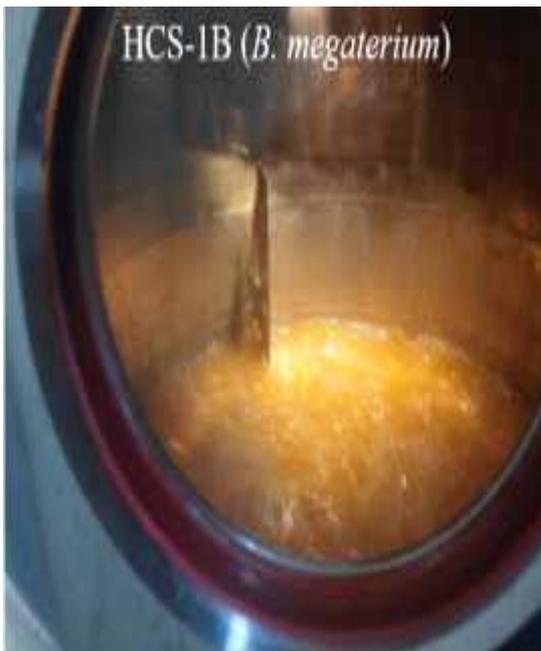
#### 바) 길항 미생물 및 식물 성장촉진 미생물 300L 발효조에서의 대량배양 연구

앞서, 상추 균핵병을 억제하는 길항 미생물인 HCS-1B(*Bacillus megaterium*) 및 식물 성장 촉진 미생물 TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*) 균주를 대상으로 대량배양 조건설정을 위한 최적 배지 조성 연구를 진행 하였으며, 그 결과 배양 최적 조건인 탄소원 및 질소원, 미량요소의 조건이 확립되었음. 이를 이용하여 본 연구에서는 부숙 유기질비료 개발에 첨가되는 미생물을 대량 배양을 하기위해 300L 배양발효조에서 확립된 탄소원 및 질소원을 이용하여 대량 배양 실험을 진행하였음.

강원대학교 친환경농업센터에서 300L 배양발효조에서 실험을 진행하였으며, 배양조건은 Water 180L, 탄소원인 옥수수 전분 3.6kg와 질소원인 효모추출분말 3.6kg, 미량요소 KCl 1.8kg 첨가한 후 온도는 28℃, 150 rpm, pH 6.3 조건에서 총 72시간동안 배양하였으며, 각 종균배양의 준비는 HCS-1B(*B. megaterium*), TB B1-B5(*B. licheniformis*) 균주를 Luria-Bertani(LB)배지, 30℃, 130rpm, 24시간 진탕 배양을 바탕으로 세균의 밀도를  $1 \times 10^7$  CFU/ml 준비하여 1% 종균접종을 하였음. 4시간마다 생균수 측정 및 pH를 측정하였음 [그림3-28],[그림3-29].



[그림3-28] 300L 배양기 및 Seed 균주 접종



[그림3-29] HCS-1B(*B. megaterium*) 및 TB B1-B5(*B. licheniformis*) 300L 대량배양

HCS-1B(*B. megaterium*)균주의 300L fermenter, 72시간 배양 후 4시간 간격으로 생균수, pH를 측정하였음. 배양 44시간 후 세균의  $1.0 \times 10^8$ cfu/ml를 기록하였으며, pH도 6.87로 상승하였음. 배양 48시간 이후부터는  $10^8$ cfu/ml을 유지하는 것으로 조사되었음. 따라서, 최종 배양시간은 48시간으로 측정되었음.[표3-27].

[표3-27] HCS-1B(*B. megaterium*) 배양 결과

Time(h)	CFU/ml	pH	비고
4	$2.0 \times 10^5$	5.63	
8	$5.3 \times 10^5$	5.79	
12	$2.0 \times 10^6$	5.87	
16	$9.0 \times 10^6$	6.24	
20	$2.5 \times 10^7$	6.32	
24	$5.3 \times 10^7$	6.51	
28	$5.6 \times 10^7$	6.68	
32	$5.6 \times 10^7$	6.79	
36	$6.1 \times 10^7$	6.81	
40	$6.3 \times 10^7$	6.83	
44	$1.0 \times 10^8$	6.87	
48	$2.0 \times 10^8$	6.91	
52	$2.0 \times 10^8$	6.92	
56	$2.0 \times 10^8$	6.95	
60	$2.2 \times 10^8$	6.98	
64	$2.1 \times 10^8$	6.98	
68	$2.1 \times 10^8$	6.93	
72	$2.1 \times 10^8$	6.93	

TB B1-B5(*B. licheniformis*)균주의 300L fermenter, 72시간 배양 후 4시간 간격으로 생균수 및 pH를 측정하였으며 대량 배양시 선발 균주의 생균수가 48시간부터 이후로  $10^8$  cfu/ml로 유지된 것을 통하여 탄소원(starch 2%) 및 질소원(yeast extract 2%)의 배지 조성이 주요 배양 요건으로 판단됨. HCS-1B(*B. megaterium*)와 마찬가지로 배양 44시간 이후부터 세균의 밀도  $10^8$  cfu/ml을 유지하는 것으로 조사되었음[표3-28].

HCS-1B(*B. megaterium*) 및 TB B1-B5(*B. licheniformis*) 300L 대량배양 결과, 두 균주 세균의 밀도인 44시간~48시간 내에  $10^8$  cfu/ml을 유지하는 것으로 조사되었으며, pH 경우 6.8~6.9으로 중성 수준의 수치를 나타냈음. 세균의 밀도 증가시, pH도 증가하는 현상을 나타냈으며, pH는 세균 군집 구성에 유의한 상관관계가 있는 것으로 알려져있으며(Congcong Shen, 2019) *Bacillus sp.*의 성장에 가장 적합한 범위는 7 내외인 것으로 알려져있으며, 6.5~7.5범위에서 성장 및 활성이 가장 우수하다고 연구 결과로 알려져있음(Park, 1996). 대량 배양한 배양액을 이용하여, 부숙 유기질비료 제작할 예정임[그림3-30].

[표3-28] TB B1-B5(*B. licheniformis*) 배양 결과

Time(h)	CFU/ml	pH	비고
4	$3.0 \times 10^5$	5.74	
8	$6.0 \times 10^5$	5.89	
12	$2.0 \times 10^6$	5.91	
16	$1.0 \times 10^7$	6.03	
20	$2.1 \times 10^7$	6.12	
24	$2.4 \times 10^7$	6.26	
28	$2.9 \times 10^7$	6.47	
32	$4.3 \times 10^7$	6.53	
36	$5.4 \times 10^7$	6.61	
40	$6.1 \times 10^7$	6.73	
44	$2.1 \times 10^8$	6.85	
48	$2.2 \times 10^8$	6.89	
52	$2.1 \times 10^8$	6.89	
56	$2.2 \times 10^8$	6.80	
60	$2.2 \times 10^8$	6.83	
64	$2.2 \times 10^8$	6.87	
68	$2.3 \times 10^8$	6.91	
72	$2.2 \times 10^8$	6.98	



[그림3-30] TB B1-B5 및 HCS-1B균주의 300L 배양 후 배양액 모습

사) 부숙 유기질비료 제형화를 위한 유기질비료와 유용 미생물 혼합 비율 확립

300L fermenter를 이용하여, 대량배양된 HCS-1B(*Bacillus megaterium*) 및 TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*) 배양액을 이용하고, 부숙 유기질비료로 개발하기 위하여, 부숙 유기질비료의 펠릿 제형화 과정에서의 혼합 비율 확립 실험을 진행하였음.

본 실험에서 부숙 유기질비료의 재료로 사용된 가축분 퇴비는 계분 40%, 톱밥 33%, 돈분 15%, 마분 10% 비율로 혼합한 축분 유기질비료 이용하여, TB B1-B5(*B. licheniformis*)를 활용하여 1차 발효 및 부숙과정을 거친 후 펠릿 제형화 실험을 진행하였음. HCS-1B(*B. megaterium*) 및 TB B1-B5(*B. licheniformis*) 균주의 배양액은 유기질비료 20kg 기준 1%, 2%, 3%로 각각 200mL, 400mL, 600mL을 준비하여 유기질비료와 혼합하였으며, 단일처리 및 두 균주의 혼합처리로 비율별 혼합 후 플렛다이형 펠릿기기(금강eng, SP-75기종, 10마력, 압출기의 직경 6mm)를 사용하여, 펠릿 제형화 공정을 진행하였음[표3-29],[표3-30],[그림 3-31],[그림3-32].

[표3-29] 유기질비료의 길항균주 단일 처리 비율

부숙 후 원료	HCS-1B( <i>B. megaterium</i> ) 및 TB B1-B5( <i>B. licheniformis</i> )	혼합 비율(%)
19.8kg	200ml	1%
19.6kg	400ml	2%
19.4kg	600ml	3%

[표3-30] 유기질비료의 길항균주 혼합 처리 비율

부숙 후 원료	HCS-1B( <i>B. megaterium</i> ) 및 TB B1-B5( <i>B. licheniformis</i> )	혼합 비율(%)
19.8kg	100 : 100 = 200ml	1%
19.6kg	200 : 200 = 400ml	2%
19.4kg	300 : 300 = 600ml	3%



[그림3-31] 유기질비료의 균주 혼합 및 혼합 반죽기



제형화 공정 기기



제형화(펠릿) 제작 모습

[그림3-32] 부숙 유기질비료 제형화 공정 모습

유기질비료에 배양액 1, 2, 3% 비율별 첨가하여 제형화를 진행하였음. 배양액 1%를 첨가하여 제형화한 펠릿은 유기질 비료내의 배양액 첨가량(수분)이 부족하여, 펠릿이 갈라지는 현상이 나타났으며, 배양액 2%를 첨가하여 제형화한 펠릿은 배양액 첨가(수분)량 및 제형 상태가 적합하였음. 배양액 3%를 첨가하여 제형화한 펠릿은 배양액(수분)이 다소 많아 펠릿 제형화가 제대로 되지 않았음. 배양액 비율별 첨가에 따른 펠릿 제형 형태 실험 결과, 배양액 2% 비율로 확립되었음[그림3-33].



[그림3-33] 배양액의 비율별 첨가에 따른 제형화 결과

배양액 비율별 첨가에 따른 펠릿 제형 형태 실험로 확립된 2% 비율을 이용하여, HCS-1B(*B. megaterium*) 및 TB B1-B5(*B. licheniformis*)의 배양액을 첨가한 유기질비료(단일 처리 HCS-1B 및 TB B1-B5, 혼합처리 HCS-1B+TB B1-B5)를 제작하였음[그림3-34].



[그림3-34] 배양액 2% 첨가한 유기질비료

**아) 부숙 유기질비료의 안정성 및 이화학적 분석**

제작된 유기질비료의 현장적용을 하기 앞서, 안정성 및 이화학적 분석 실험을 하였으며, 복합 유기질비료 내의 균체보존율 및 온도별 균체보존율, 제형화된 유기질비료의 용해성 및 비료공정규격 적합성 여부를 진행하였음.

유기질비료의 균체 보존율 분석은 시료 1g을 멸균수 9ml에 넣고 15분간 정치 과정을 진행한 후 Serial diution 방법을 이용하여, 희석 하였으며, TSA 배지에 각각 100 $\mu$ l씩 접종 및 도말 후 28 $^{\circ}$ C에서 48시간 배양하였음. 배양된 배지에서 colony 형성 모양 등의 형태적 특성에 따라 계수하여 균체 보존율을 확인하였으며, 실험은 3반복으로 진행하여 결과값은 평균으로 나타냈음. 실험의 처리구는 HCS-1B(*B. megaterium*) 및 TB B1-B5(*B. licheniformis*)의 단일 첨가 복합 유기질비료와, 혼합 처리(HCS-1B+TB B1-B5)복합 유기질비료를 이용하였으며, 대조군은 무처리 유기질 비료로 하여 실험을 진행하였음.

유기질비료의 균체보존율 확인결과, HCS-1B, TB B1-B5균주의 단일처리 및 혼합처리한 유기질비료에서의 생균수는 대조구인 Control보다 약 4배이상 균수가 많은 것으로 나타났으며, 3개 처리구의 보증 균수는 10<sup>7</sup>cfu/g 이상으로 측정되었음[표3-31].

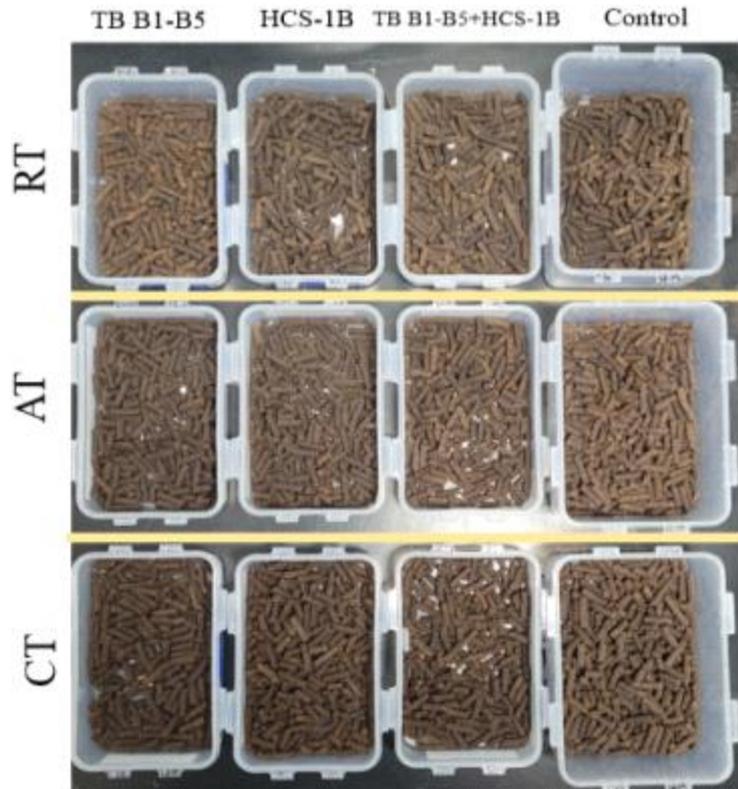
**[표3-31] 부숙 유기질비료의 균체보존율 생균수 계수 결과**

구분	미생물 밀도(X 10 <sup>4</sup> cfu/g)
Control	1,046
HCS-1B( <i>B. megaterium</i> )	2,765
TB B1-B5( <i>B. licheniformis</i> )	3,841
HCS-1B + TB B1-B5	2,886

유기질비료의 온도별 균체보존율을 확인하기위해, 온도 조건별 균체의 경시변화를 실험하였음. 경시변화 검사는 사각플라스틱 상자에 각각의 처리구 시료 500g를 넣고 밀봉하여, RT, AT, CT에 각각 보관하여 8주까지 검사하였음. 50 $^{\circ}$ C 4주, 8주의 감소율은 상온 조건하에서 1년, 2년으로 간주하는 것이 농약 원제 실험에서 통상적인 방법이기에 생균수의 감소도 이에 준하여 실험을 하였으나, 50 $^{\circ}$ C에서 4주가 꼭 상온에서 1년을 의미하지는 않음.

- RT(room temperature) test : 상온에 시료를 보관하여 일정시간 후 검사.
- AT(aging temperature) test : 40 $^{\circ}$ C나 50 $^{\circ}$ C에서 시료를 보관하여 일정 시간 후 검사.
- CT(cooling temperture) test : 영하 10 $^{\circ}$ C로 시료를 냉동고에서 저온 보관하여 일정 시간 후 검사

유기질비료의 온도별 경시변화의 검사를 위해 50℃, 25℃와 -10℃에 각각 보관하면서 매주 동일한 날짜에 생균수를 TSA배지에서 희석평판법 10<sup>-4</sup> 기준으로 생균수를 확인하였음. 각 실험은 3반복으로 진행한 후 평균값으로 나타냈음[그림3-35].



[그림3-35] 부숙 유기질비료의 온도별 균체보존을 실험

CT(-10℃)에서의 전체적으로 생균수 10<sup>7</sup>대를 유지하였으며, 8주차에는 12~18% 정도의 감소하는 추세를 보였음. RT(25℃)에서도 대조구에 비해 처리구에서 높은 증가율을 보였으며, 8주차까지 생균수는 다소 증가하는 추세를 보이고 있었음. 이는 유기물을 활용하여 미생물이 증가하는 조건이 발생된 것으로 판단됨. 모든 처리구에서 30% 이상의 성장률을 보이는 것으로 조사됨. AT(50℃)에서는 점차적 감소하는 경향을 보여주고 있으며, 4주차부터 50%의 급격한 감소를 보였음. 이는 미생물의 성장 및 유지를 위해서는 수분이 중요하데, 초기 함수율은 21%에서 4주차 후 함수율이 6% 정도로 매우 낮았음. AT(50℃) 실험 조건에 사용되는 실험장비인 건조기가 습도가 공급되지않는 장비이므로, 다른 온도별 처리구에 비해 증가폭이 낮고, 5주차부터 급격한 감소를 시작으로, 8주차에는 90%이상 사멸하는 경향을 보여주고 있음. 대부분 *Bacillus* 균으로 조사되었으며, 유기질비료에 첨가한 *Bacillus megaterium*, *Bacillus licheniformis* 균은 45-50℃에서 고온에 대한 내성이 있으며, 두 균주 모두 45℃ 이상에서 내생포자를 생성한다고 연구 보고가 있음(MARIE STRNADOV, 1990). 세균의 내생포자는 주로 영양분이 고갈된 환경이나, 고온 등 생존하기 어려운 상황에서 형성된다고 알려져있음. AT(50℃) 실험에서 생균수가 감소한 원인은 수분 부족으로 판단되며, 원만한 수분 보충시 생균수의 유지가 가능할 것이라 판단됨[표3-32].

[표3-32] 부숙 유기질비료의 온도별 미생물 경시변화 결과(x 10<sup>4</sup> cfu/g)

구분	주차									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	
-10	Control	1,231	1,221	1,222	1,224	1,100	1,110	1,120	1,080	1,010
	HCS-1B	2,974	2,975	2,971	2,871	2,722	2,721	2,621	2,599	2,487
	TB	2,723	2,721	2,698	2,672	2,653	2,521	2,321	2,240	2,210
	B1-B5									
	HCS+TB	2,871	2,862	2,841	2,829	2,810	2,721	2,699	2,611	2,521
25°C	Control	1,674	1,772	1,731	1,752	1,811	1,892	1,922	1,940	2,100
	HCS-1B	2,916	3,100	3,311	3,234	3,521	3,677	3,899	3,900	3,988
	TB	2,812	3,010	3,200	3,411	3,422	3,522	3,599	3,688	3,723
	B1-B5									
	HCS+TB	2,979	3,121	3,123	3,321	3,434	3,522	3,627	3,799	3,925
50°C	Control	1,362	849	714	625	337	132	45	16	7
	HCS-1B	2,822	2,364	2,147	1,884	986	641	389	147	27
	TB	2,636	2,247	1,886	1,736	971	614	375	154	18
	B1-B5									
	HCS+TB	2,738	2,554	2,485	1,961	1,210	647	448	165	35

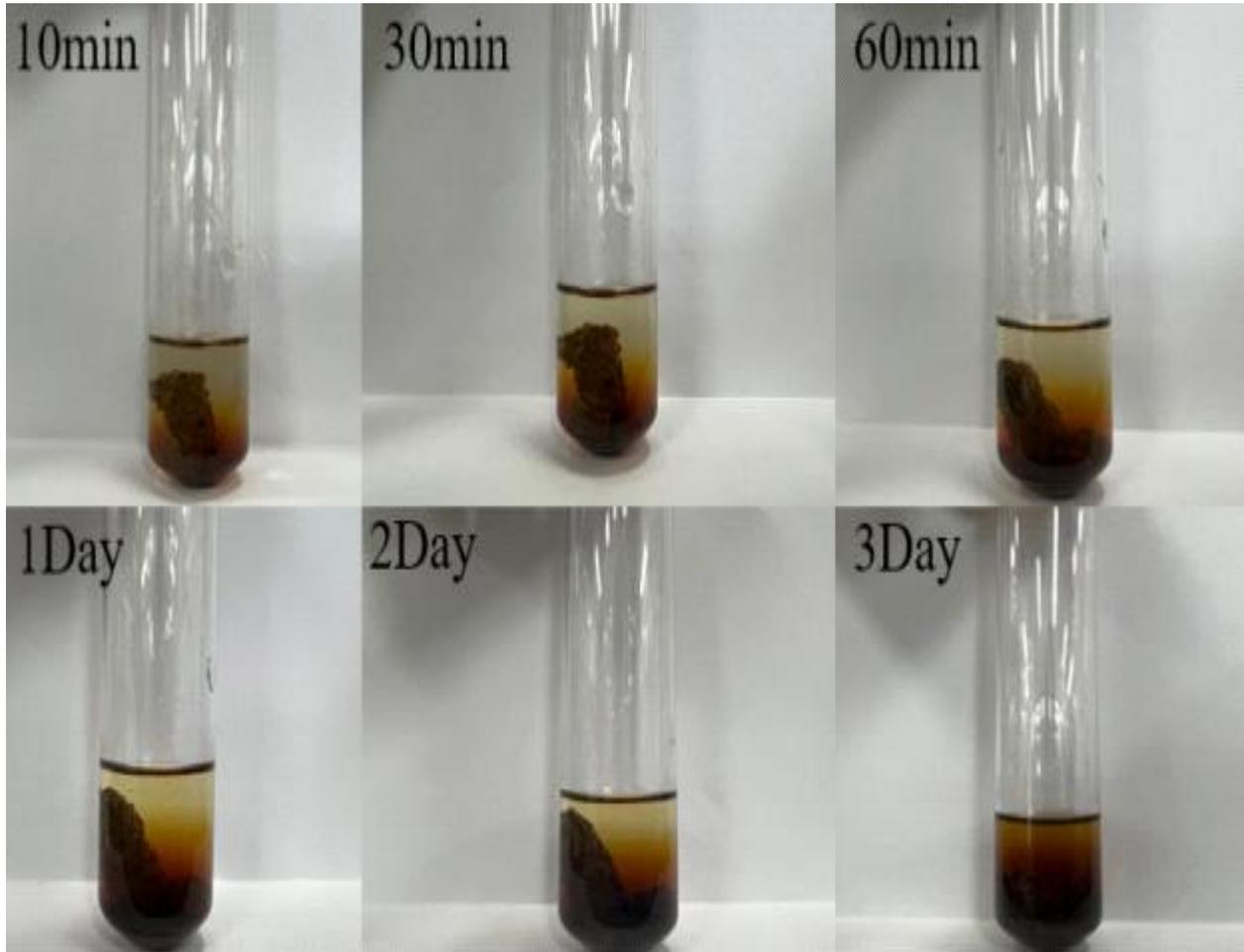
유기질비료의 내구성인 풀림성 및 pH 실험을 통하여, 제형화된 유기질비료의 완성도를 확인하기 위해 실험을 진행하였음. 복합 유기질비료의 펠릿 제형화를 진행한 후 물에 의해서 분해되는 용해성을 측정하기 위해, 실린더에 멸균수 10ml과 시료 1g을 첨가하여, 시간경과에 따른 용해성을 실험을 하였으며, pH는 농촌진흥청 토양분석법에 따라 각각의 처리구별 시료 5g을 증류수 25ml에 넣은 후 1시간 침지 후 pH 측정기(BENCH TOP PROFESSIONAL pH METER BP3001)를 이용하여 측정하였음.

pH 측정 결과, 대조구인 Control은 8.3으로 약알칼리에 가까운 수치로 측정이 되었으며, 미생물 배양액을 첨가한, 처리구에서는 7.1~7.5로 중성에 가까운 수치가 측정되었음. 작물의 발아 및 생장에 적합한 pH는 6~7로 알려져 있으며, 유기질비료의 pH는 작물 생육에 적합한 수치를 나타냈음[표3-33].

[표3-33] 부숙 유기질비료의 pH 측정 결과

처리구	pH
Control	8.3
HCS-1B( <i>B. megaterium</i> )	7.5
TB B1-B5( <i>B. licheniformis</i> )	7.1
HCS-1B + TB B1-B5	7.4

유기질비료의 물에 의한 용해성 실험결과, 침수 후 10분 경과 시부터 미세한 용해현상을 보 이다가 30분 경과 후부터 용해되기 시작하여 60분이 경과 후 45%이상 용해상태에 도달하였 으며, 3일이 경과한 후 완전한 용해상태에 도달하였음. 균주의 단일 첨가로 제형화한 유기질 비료와 두 균주의 혼합 첨가로 제형화한 유기질비료의 용해성 결과가 일치하였으며, 미생물 첨가 유,무에 따른 결과값이 상이하지 않았음[그림3-36]



[그림3-36] 부숙 유기질비료의 용해성 실험 결과

유기질 비료의 기준에 적합한지를 알아보기 위해 (주)수호분석센터에 의뢰하여 화학성분 분석 을 확인하였음. 성분 항목은 비료관리법 규격에 맞춘 시험법으로 유기물 함량, 유기물대 질소 비, 부숙도, 병원성 미생물 2종, 염산불용해물, 중금속분석, 염분, 수분 및 질소, 인산, 칼리 함량을 분석하였음.

유기질 비료의 시료의 화학성분 분석결과는 [표3-34]와 같음. 농촌진흥청 고시에 제시된 비료 공정규격을 같이 표시하여 분석결과와 비교하였음.

모두 공정규격을 만족하였으며, 중금속 함량 분석결과를 보면, 전 항목에 있어서 공정규격에 비해 훨씬 낮은 함량을 포함하는 것으로 분석되었음.

[표3-34] 부숙 유기질 비료 시료 분석 결과

	항목	규격	결과
규격	유기물(%)	30% 이상	40.85
유해성분	비소(mg/kg) [건물중]	45 이하	불검출
	카드뮴(mg/kg) [건물중]	5 이하	불검출
	수은(mg/kg) [건물중]	2 이하	불검출
	납(mg/kg) [건물중]	130 이하	4.83
	크롬(mg/kg) [건물중]	200 이하	21.68
	구리(mg/kg) [건물중]	360 이하	133.36
	니켈(mg/kg) [건물중]	45 이하	5.11
	아연(mg/kg) [건물중]	900 이하	608.13
병원성 미생물	대장균 O157:H7	불검출	불검출
	살모넬라	불검출	불검출
그밖의 규격	유기물대 질소의 비	45 이하	19.87
	염분(%) [건물중]	2.0 이하	1.62
	수분(%)	55 이하	24.55
	부숙도(콤백)	부숙완료 이상	부숙완료
	부숙도(종자발아)	70 이상	89.88
	부숙도(솔비타)	4 이상	5
	염산불용해물(%)	25 이하	1.53
공정 규격 외	질소함량(%)	-	2.06
	인산함량(%)	-	2.99
	칼리함량(%)	-	1.79

#### 4) 부숙 유기질비료 제품의 식물 성장촉진 효과 규명

##### 가) 부숙 유기질비료의 성장촉진 검정을 위한 Pot Test

제작된 유기질비료의 식물 성장촉진 효과 검정을 하기 위하여, Pot 실험을 진행하였으며, 실험 작물은 상추(품종: 동오적치마, 동오시드)를 사용하였고, 3반복으로 실험을 진행하였음. 파종 후 10일 정도 지난 육묘를 사용하였으며, 상토 1L의 1% 비율로 단일처리 HCS-1B(*B. megaterium*), TB B1-B5(*B. licheniformis*) 및 혼합처리(HCS-1B + TB B1-B5) 유기질비료를 첨가 후 3주간 실험을 진행하였음.

식물의 성장 상태를 비교하기 위해 생체중 및 건조중, 엽면적을 측정하였음. 생체중은 뿌리의 상토를 제거한 후 지상부와 지하부의 무게를 측정하였으며, 엽수는 육안적으로 개수를 측정함.

실험 결과, 조사 항목(생체중, 엽면적, 엽수)이 Control에 비하여 유기질비료의 처리구가 성장 촉진의 결과값이 나타났음. Control 생체중의 평균은 13.8g으로 측정되었으며, HCS-1B, TB B1-B5, 혼합(HCS-1B+TB B1-B5)처리구는 14.45g, 15.05g, 16.72g으로 나타났음. 엽면적의 평균은 100.4cm<sup>2</sup>, HCS-1B, TB B1-B5, 혼합(HCS-1B+TB B1-B5)처리구는 110.9cm<sup>2</sup>, 110.9cm<sup>2</sup>, 126.88cm<sup>2</sup>, 147cm<sup>2</sup>으로 나타났으며, 전체적으로 단일처리한 유기질비료보다 혼합 처리한 유기질비료의 생장이 우수하였음[표3-35],[그림3-37].

[표3-35] 부숙 유기질비료의 식물 성장촉진 효과 검정 결과

구분	생체중(g/pot)	엽면적(cm <sup>2</sup> /pot)	엽수(개/Pot)
Control	13.8±5.23	100.4±12.16	6.4
HCS-1B 1%	14.45±1.69	110.9±5.71	7.2
TB B1-B5 1%	15.05±0.64	126.88±16.14	8
HCS-1B + TB B1-B5 1%	16.72±2.89	147±10.41	9



[그림3-37] 부숙 유기질비료의 식물 성장촉진 효과 검정

나) 부숙 유기질비료의 성장촉진 검정을 위한 베트남 현지 포장 실험

본 실험은 유기질비료(계분 40%, 톱밥 33%, 돈분 15%, 마분 10%)에 선발된 미생물 2% 비율로 혼합 후, 제작된 부숙유기질비료를 이용하여 실험을 진행하였음. 수출을 위한 준비단계로 베트남의 Cuchi 지역 상추재배 농가(11.01419, 106.46899)에서 포장 실험을 진행함으로써 유기질비료의 베트남의 상추 미치는 영향을 확인하고자 함.

실험 조건은 베트남 기존 관행방법과 기개발된 유기질비료를 활용하여 성장효과를 확인하였으며, 병원균의 발생유무를 직접적으로 확인하지는 못하였음. 실험기간은 22년 4월 28일~5월 20일까지 약 20일간 진행하였으며, 작물은 베트남에서 재배되는 상추를 활용하였음. 우리나라와는 달리 베트남에서는 1년에 12회 정도를 수확하므로, 정식하고 20일 정도 후에 수확하는 방식으로 진행됨.

베트남 관행적인 방법으로는 그림 3-38과 같은 베트남의 유기질 비료 및 토양개량제를 혼합 사용하였으며, 베트남 유기질 비료의 경우에는 유기물 18%, N 2%, P 2%, Zn 500ppm, Cu 300ppm, B 300ppm, Trichoderma가 포함된 제품이며, 10kg 포장단위로 되어 있음. 금액은 약 5,700원/10kg로 판매되고 있음. 토양개량제의 경우에는 나뭇재 40%, Dolomite 40%, 탄산염 20% 구성된 제품으로 50kg 단위로 포장되어있으며, 약 9,000원/50kg 판매되고 있는 제품임. 베트남 토양이 pH 2 정도로 매우 강산성이므로, 위의 제품을 주로 사용하는 것으로 파악됨. 일반적인 유기질비료 시비량에 따라 3.3m<sup>2</sup>, 6kg를 정량의 기준으로 각 처리구마다 100m<sup>2</sup>로 처리를 진행하였음. 제품 살포 후 경운 한 다음 7일 후에 정식을 진행하였음. 20일 이후에 생육을 지켜 본 후 결과를 측정하였음.



[그림3-38] 베트남 현지 사용 비료(왼:유기질비료, 오:토양개량제)



[그림3-39] 베트남 업체류 농가 모습 및 부숙유기질 비료 처리 모습

실험결과, [그림3-40]과 같이 전체적으로 베트남의 기존 부숙 유기질 비료보다 개발된 부숙 유기질비료의 생장이 우수하였으며, 베트남의 기존 방식보다 개발된 부숙유기질 비료 처리시 2배 정도의 성장 효과가 있는 것으로 조사됨[표3-36].

[표3-36] 개발된 유기질비료 시비에 따른 상추 성장촉진 검정 결과

구분	생체중(g/주)
기존 부숙 유기질 비료	29.03±2.34
개발된 부숙 유기질비료	55.40±3.21



[그림3-40] 베트남 현지 실험결과 모습(위:기존 부숙유기질 비료, 아래: 개발된 부숙유기질비료)

5) 부숙유기질비료 제품 및 수출 진행

국내의 경우에는 비료의 종류 및 명칭에서 가축분퇴비로 등록 진행시 보증성분량 유기물 함량 30%를 기준으로 등록을 진행하며, 기존 등록된 사항 중 미생물 2%에서 미생물 종류만 변경된 사항이므로, 별도의 변경없이 제품의 상표명 및 디자인을 완성하여 “썩썩토”라는 브랜드 명으로 진행을 완료하였음.

단가적인 부분에서는 기존 부숙유기질비료(가축분퇴비)의 경우에는 3,700원/20kg 판매되고 있으며, 개발된 제형화된 부숙유기질비료의 경우에는 7,200원/20kg으로 판매를 진행하였음.

또한, 베트남 수출용 제품으로는 기존의 ”GREENNARAE”브랜드 명으로 진행이 가능하므로, 기존 등록된 인증을 활용하여 수출 판매를 진행하였음[그림3-41],[그림3-42].

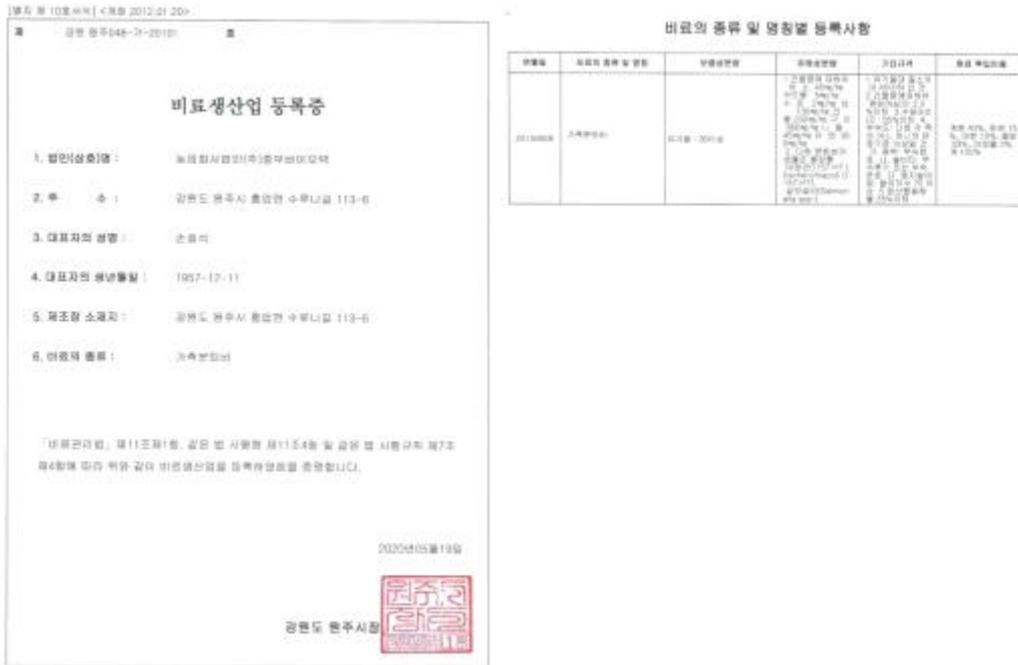


[그림3-41] 부숙유기질비료 디자인(원 : 국내용, 오 : 수출용)

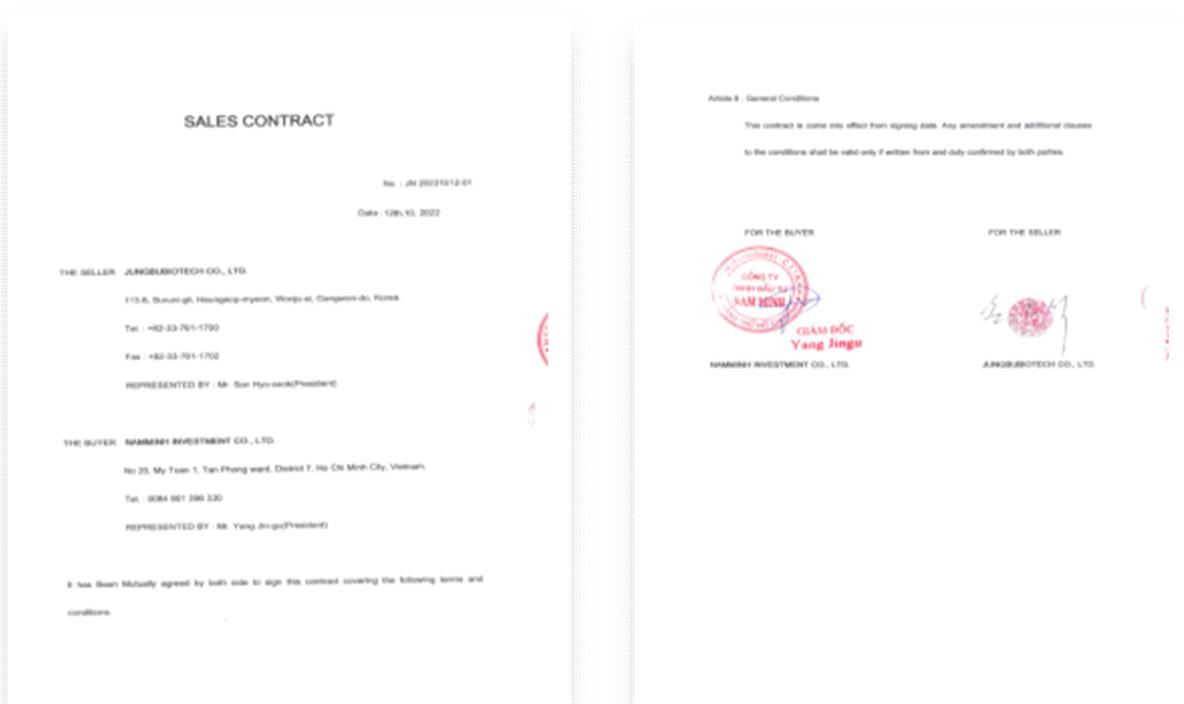


[그림3-42] 베트남 수입허가 및 수출신고필증(2022년)

2022년에 베트남의 현지법인 NAM MINH CO., LTD와 계약을 진행하여 5컨테이너(약 \$12,000) 수출을 완료 하였음. 또한, 지속적인 수출진행을 위해 베트남 현지법인과 2023년에 대한 계약을 체결하여 지속적으로 수출을 진행할 예정임[그림3-42],[그림3-44].



[그림3-43] 비료 생산업 등록증



[그림3-44] 베트남 현지법인과의 판매 계약

## 4. 유용미생물을 활용한 토양병 방제 기술 개발

### 가. 연구개발 목표

주요 엽채류 재배 작물에 대한 식물병원균 분석 및 토양 수집을 통한 토양환경의 마이크로바이옴 분석 및 핵심 미생물군 규명

### 나. 연구개발의 내용

#### 1) 엽채류 재배지 토양환경으로부터 마이크로바이옴 분석

##### 가) 엽채류 재배지 토양환경으로부터 토양 시료 수집

강원도와 경기도의 상추 재배 농가의 토양환경으로부터 토양 시료 및 뿌리를 수집하였음. 채집 지역은 강원도와 경기도 일대였으며, 각 지역은 GPS로 위치를 기록함. 토양 시료는 상추 근권부의 토양을 Auger를 이용하여 지표로부터 15cm 안쪽의 토양을 수집함. 뿌리 시료는 원주와 춘천 두 지역에서 수집하였으며, 병든 상추의 뿌리를 수집함. 수집된 토양 및 뿌리 시료는 아이스박스(ice box)에 담아 신속히 실험실로 옮겨옴. 토양은 잘 섞은 후 2mm 체로 걸러 균질화하여 200g을 eppendorf tube에 나누어 담았음. 걸러진 토양은 미생물 분리에 이용하였으며, 남은 토양 시료는 -80℃ deep freezer에 보존하여 DNA 추출에 사용되었음. 뿌리는 일부분 잘라내어 50ml conical tube에 담아 -80℃ deep freezer에 보존하여 미생물 분리에 사용하였음.

상추 재배지에서 수집한 토양은 강원도(춘천, 홍천, 원주)와 경기도(여주, 이천) 5개의 시·군에서 8개의 토양 시료를 채취하였으며, 원주와 춘천(CC)에서 뿌리 시료를 수집하였음[표4-1]. 상추를 재배하는 농가는 대부분이 하우스를 활용한 시설에서 재배하고 있었으며, 재배되고 있는 품종은 로메인, 꽃상추, 흑치마, 중국상추, 담배상추 등 다양한 품종을 재배하고 있음. 최근의 경향에 맞추어 살충제 및 살균제를 사용하지 않는 유기농으로 상추를 재배하려는 농가도 있었음.

[표4-1] 상추 재배지 토양 시료 수집 지역

No	샘플명	수집지역	GPS
1	CC	강원도 춘천시 동내면 동내로 247-19	37.849552371364744, 127.77953416929984
2	L1	강원도 춘천시 남산면 강춘로 411	37.78490942174836, 127.64908155395752
3	L2	강원도 춘천시 동산면 원창리 275-1	37.795592628694436, 127.76855582881635
4	L3	강원도 춘천시 신북읍 울문리 613	37.933476070351794, 127.76107025765405
5	HC	강원도 홍천군 남면 명동리 309	37.632255013063975, 127.76464949813115
6	WJ	강원도 원주시 신림면 석동구미길 188	37.22257158891775, 128.04604445764107
7	YJ	경기도 여주시 가남읍 양화로 113-141	37.23791267599981, 127.5453904999705
8	IC	경기도 이천시 장호원읍 이황리 447-2	37.1543580449402, 127.58333012695763

## 나) 토양 DNA 추출 및 Illumina sequencing

토양 DNA 추출은 상추의 근권 토양으로부터 얻은 시료를 멸균된 Buffer(NaCl, 4.25 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.15 g; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.3 g; MgSO<sub>4</sub> 0.1 g; 젤라틴, 0.05 g)에 넣어 섞어준 후 10분간 정치하고 5분간 원심분리하여 토양 용액을 제조하였음. 토양 용액은 Fast DNA Spin kit for soil (MP, Biomedicals) 제품을 사용하여 추출 방법에 따라 추출하였음. 추출된 DNA sample은 Illumina sequencing 분석에 이용되었으며, 분석은 전문분석 기관(마크로젠)에 의뢰하였음. 분석기관은 Roche 454 GS-FLX+ 장비를 사용하며, 정방향 프라이머로는 V1-9F (5'-AC-GAGTTTGAT CMTGGGCTCAG-3') adaptor-linker-primer의 순서로 구성되어 있으며, 역방향 프라이머로는 V3-541R (5'-X-AC-WTTACCGCGGCTGCTGG-3)를 이용하였음[그림4-1].



[그림4-1] NGS를 이용한 microbiome 분석을 위한 workflow

## 다) Illumina sequencing 결과 분석

강원도와 경기도에서 수집한 토양 시료 5개의 Illumina sequencing 결과로 얻어진 염기서열들은 Mega(version 1.27.0) 프로그램 및 CLcommunity 프로그램 등을 이용하여 분석하였음. 염기서열 데이터는 고품질의 sequence data를 얻기 위해 길이가 짧거나 프라이머가 일치하지 않는 염기서열을 제거하여 PryoNoise 알고리즘을 이용하여 Illumina sequencing을 통해 발생한 에러를 수정함, Chimera sequence는 UCHIME 프로그램을 사용하여 제거함. Average-neighbor 알고리즘을 이용하여 97% 유사도를 기준으로 Operational Taxonomic (OTU)를 분류함. Good의 Coverage, 종 풍부도 추정치, 다양성 지수 및 Venn diagram은 Mothur 및 CLcommunity 프로그램을 이용하여 계산하여 알파 다양성 분석을 실시함. 시료간의 유사성 기반의 베타 다양성 분석은 Unweighted UniFrac 분석을 이용함[그림4-1].

① OTU (Operational Taxonomic Unit) Picking Method: de novo

㉞ OTU of bacteria

분석에 사용된 5개의 토양 시료들은 16s RNA sequencing에서 read count가 최소 13,866개, 최대 28,344개로 분석되었으며, 평균으로 18,381개가 나타남[표4-2]. 모든 시료에서 최소 10,000개 이상의 read count가 나타났으며, Gamma-diversity는 1,889였음.

㉟ OTU of fungi

분석에 사용된 5개의 토양 시료들은 18s RNA sequencing에서 read count가 최소 75,334개, 최대 112,055개로 분석되었으며, 평균으로 89,099개가 나타남[표4-3]. 모든 시료에서 최소 75,000개 이상의 read count가 나타났으며, Gamma-diversity는 1,135였음.

[표4-2] 수집된 5개의 토양 시료의 16s RNA OTU Picking Method

Result of clustering (cutoff : 97%)		
No.	Sample Name	Read Count
1	CC21S	15,151
2	WJ21S	28,344
3	HC21S	13,866
4	YJ21S	14,100
5	IC21S	20,446

[표4-3] 수집된 5개의 토양 시료의 18s RNA OTU Picking Method

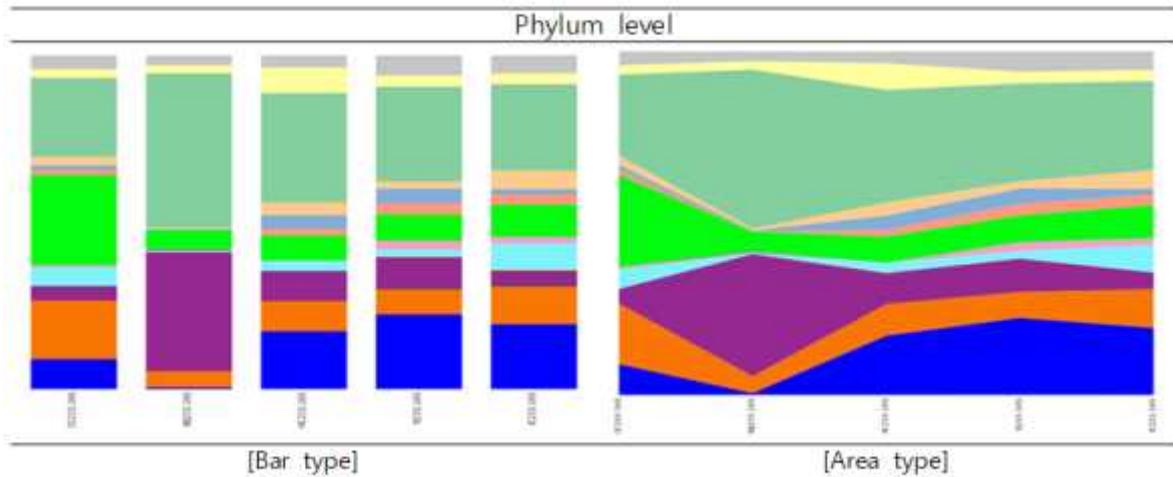
Result of clustering (cutoff : 97%)		
No.	Sample Name	Read Count
1	CC21S	75,334
2	WJ21S	75,765
3	HC21S	112,055
4	YJ21S	96,490
5	IC21S	85,853

② Taxonomic assignment of bacteria

㉞ Phylum level

16s RNA로 분석한 Phylum level은 총 19개로 *Proteobacteria*(31.3%), *Acidobacteria*(13.8%), *Bacteroidetes*(12.7%), *Firmicutes*(11.4%), *Actinobacteria*(10.0%), *Verrucomicrobia*(3.9%), *Chloroflexi* (3.8%), *Planctomycetes* (2.9%), *Nitrospirae*(2.3%), *Gemmatimonadetes*(2.1%), *Cyanobacteria*(1.1%)의 Bacteria가 분류되었음. *Armati monadetes*, *Thermodesulfobacteria*,

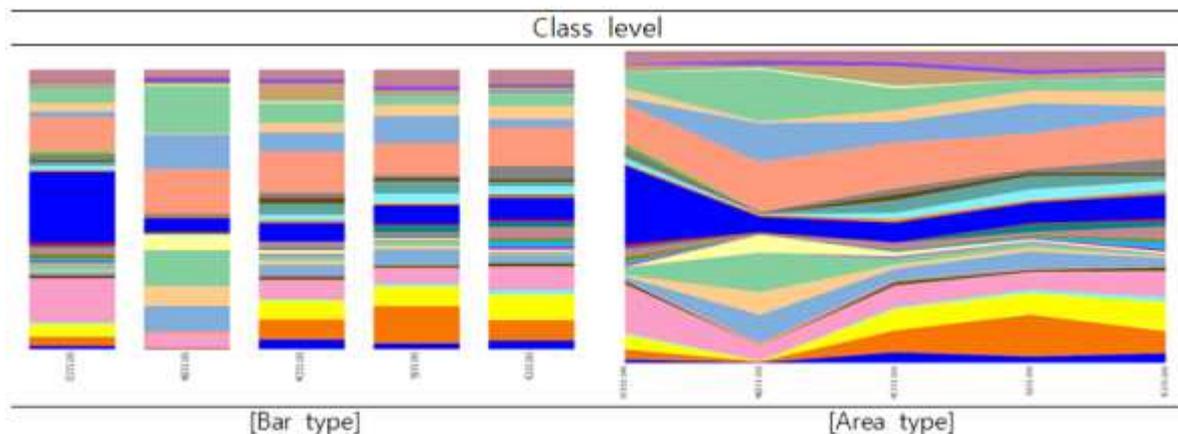
*Deinococcus-Thermus*, *Dictyoglom*는 0.1% 미만으로 분류되었다(그림 2). 19개의 Phylum 중 *Proteobacteria*가 가장 많은 부분을 차지 하였음. *Proteobacteria*는 그람음성 세균의 주요 문으로 *Escherichia*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Helicobacter*, *Yersinia* 및 기타 여러 가지와 같은 다양한 병원성 속을 포함하고 있음.



[그림4-2] 수집된 5개 토양 시료의 16s RNA Phylum level 결과

④ Class level

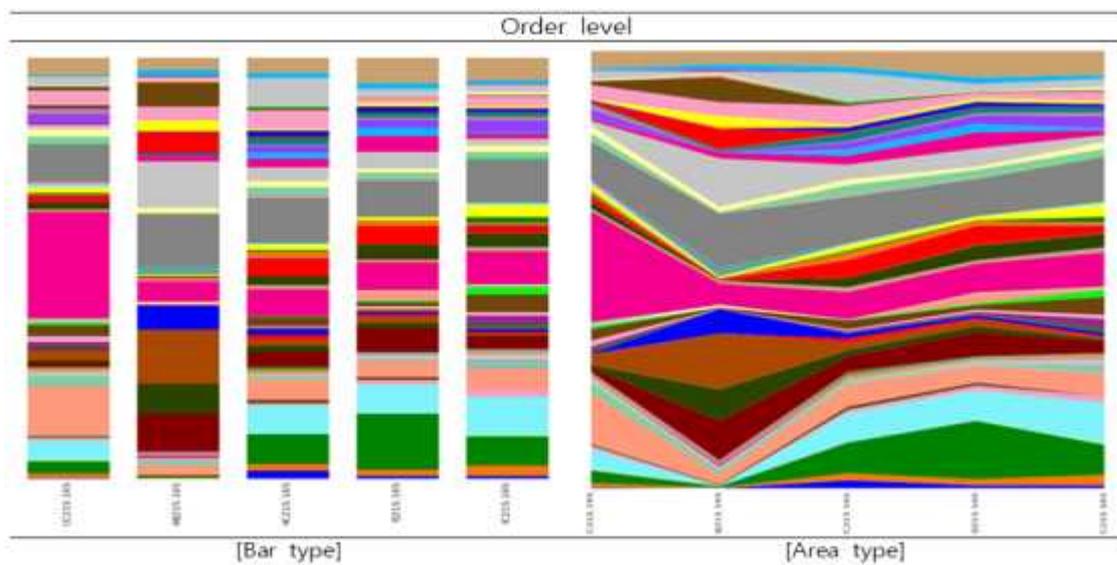
16s RNA로 분석한 Class level은 총 53개로 분류되었고 *Acidobacteria*에서는 *Blastocatellia*(6.1%), *Actinobacteria*에서는 *Actinomycetia*(8.1%), *Bacteroidetes*에서는 *Chitinophagia*(4.4%), *Chloroflex*에서는 *Thermomicrobia* (2.0%), *Firmicutes*에서는 *Bacilli*(10.2%), *Gemmatimonadetes*에서는 *Gemmatimonadetes*(2.0%), *Proteobacteria*에서는 *Alphaproteobacteria*(13.7%), *Verrucomicrobia*에서는 *Opitutae* (2.5%)로 가장 많이 분류되었음(그림 3). *Bacilli*는 녹말가수분해에 사용되는 효소를 생산하는 것으로 알려져 있으며, 일부 종은 lipopeptides, 특히 계면활성제와 mycosubtilins을 합성하고 분비할 수 있음.



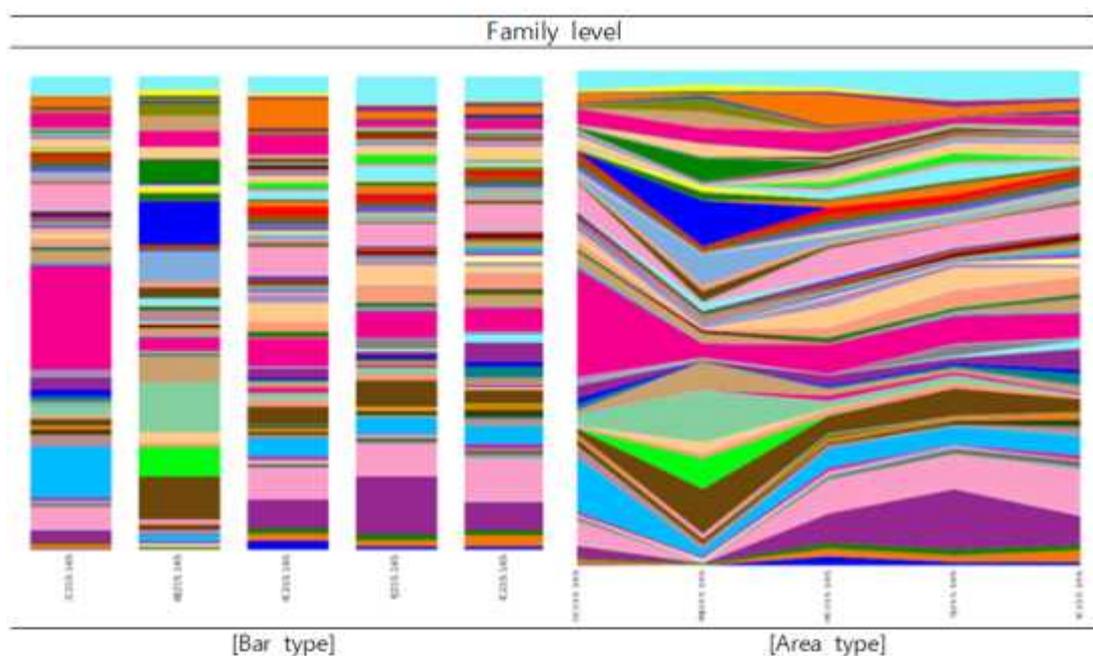
[그림4-3] 수집된 5개 토양 시료의 16s RNA Class level 결과

㉔ Order level

16s RNA로 분석한 Order level은 총 107개로 분류되었고, *Bacillales*(10.2%), *Hyphomicrobiales* (10.1%), *Blastocatellales*(6.1%), *Micrococcales*(5.6%), *Burkholderiales*(4.2%), *Flavobacteriales*(3.7%), *Pseudomonadales*(2.8%)로 가장 많이 분류되었음[그림4-4]. *Hyphomicrobiales* 는 그람음성 세균으로 질소를 고정 시키고 식물 뿌리와 공생하는 것으로 알려져 있음. 일반적으로 다양한 영양소, phytohormons 및 필수 식물 대사물의 전구체를 제공함으로써 숙주에게 유익한 기능을 함. 또한, 식물, 메틸 아민 및 추가적인 C2, C3, C4 화합물에 의해 방출되는 메탄올을 탄소 및 에너지원으로 활용할 수 있는 것으로 알려져 있음.



[그림4-4] 수집된 5개 토양 시료의 16s RNA Order level 결과



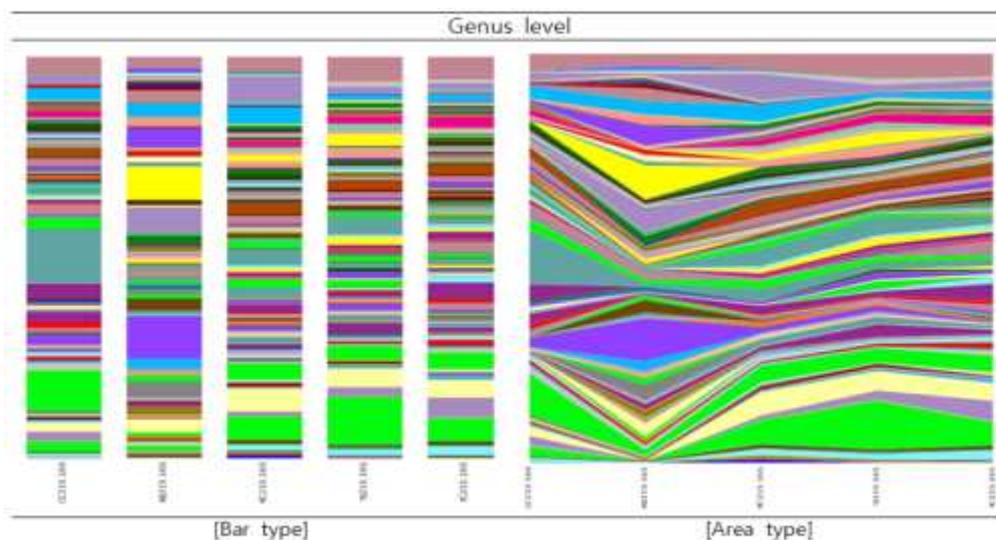
[그림4-5] 수집된 5개 토양 시료의 16s RNA Family level 결과

㉔ Family level

Family level에서는 208개로 분류되었으며, *Micrococcaceae*(4.9%), *Chitinophagaceae*(4.4%), *Flavobacteriaceae*(3.2%), *Sphingobacteriaceae*(1.6%), *Sphaerobacteraceae*(2.0%), *Bacillaceae* (8.2%), *Pseudomonadaceae*(2.7%), *Chthoniobacteraceae*(2.5%)로 가장 많이 분류되었음(그림 5). *Micrococcaceae*는 그람양성 세균으로 사탕수수나 비트, 당밀, 옥수수나 카사바에서 얻은 녹말 가수분해물 또는 타피오카 같은 당분 공급원과 함께 존재함.

㉕ Genus level

Genus level에서는 487개로 분류되었으며, *Brevitalea*(5.2%), *Vicinamibacter*(3.4%), *Pseudarthrobacter*(4.7%), *Flavobacterium*(3.1%), *Sphaerobacter*(2.0%), *Neobacillus*(4.0%), *Priestia*(1.6%), *Paenisporosarcina*(1.5%), *Nitrospira*(2.3%), *Chthoniobacter*(2.5%)가 가장 많이 분류되었음(그림 6). 또한, *Pseudomonas*(2.7%), *Bacillus*(0.7%), *Enterobacter*(0.1%), *Lysinibacillus*(0.1%)가 분류되었음. 이는 상추 재배 토양에서 직접 분리하여 선발한 11종의 길항미생물의 동정 결과와 일치함. *Brevitalea*는 *Pyrinomonadaceae* 속에 속하며, 그람음성 세균으로 환경적 영향은 아직 설명되지 않았음.

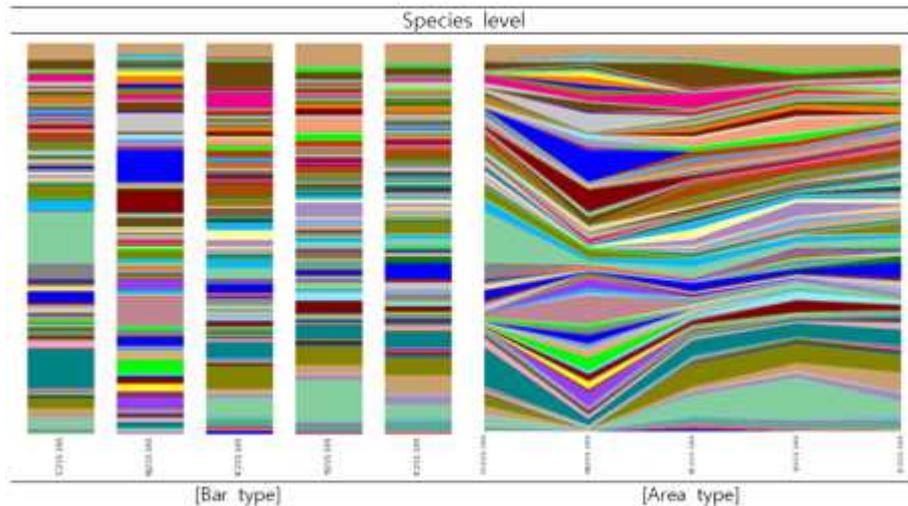


[그림4-6] 수집된 5개 토양 시료의 16s RNA Genus level 결과

㉖ Species level

Species level의 경우 746개로 분류되었으며, *Paludibaculum fermentans*(1.3%), *Brevitalea aridisoli*(4.2%), *Luteitalea pratensis*(2.1%), *Vicinamibacter silvestris*(3.4%), *Pseudarthrobacter scleromae*(4.7%), *Pseudoflavitalea rhizosphaerae*(1.3%), *Flavobacterium spartansii*(1.8%), *Priestia flexa*(1.6%), *Paenisporosarcina macmurdoensis*(1.5%), *Nitrospira japonica*(1.3%), *Methyloceanibacter caenitepidi*(1.4%), *Rhodoplanes piscinae*(1.7%), *Rhizobium azibense*(1.5%), *Achromobacter kerstersii*(1.6%), *Pseudomonas baetica*(1.7%),

*Chthoniobacter flavus*(2.5%)로 가장 많이 분류되었음[그림4-7]. 길항균으로 밝혀진 균주는 속 수준에서 ⑤에서 언급한 바와 같이 낮은 빈도로 확인되었지만, 종 수준에서는 확인되지 않음. *Vicinamibacter silvestris*는 호기성균이며 그람음성 세균임. 강가나 산림의 모래나 아열대 사바나 토양에서 많이 분리됨. 오리풀의 생장에 영향을 주는 것으로 알려져 있으며, 오리풀은 물 정화 능력과 모기 방제에 효능이 있는 것으로 알려져 있음.

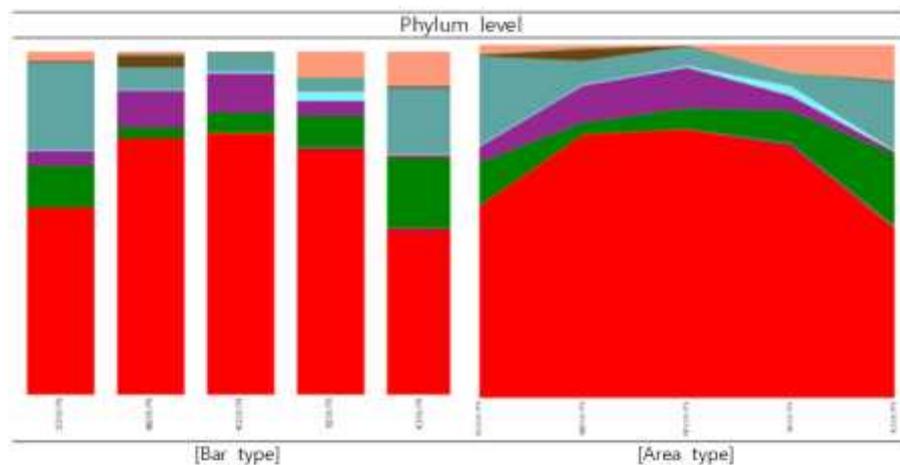


[그림4-7] 수집된 5개 토양 시료의 16s RNA Species level 결과

③ Taxonomic assignment of fungi

㉞ Phylum level

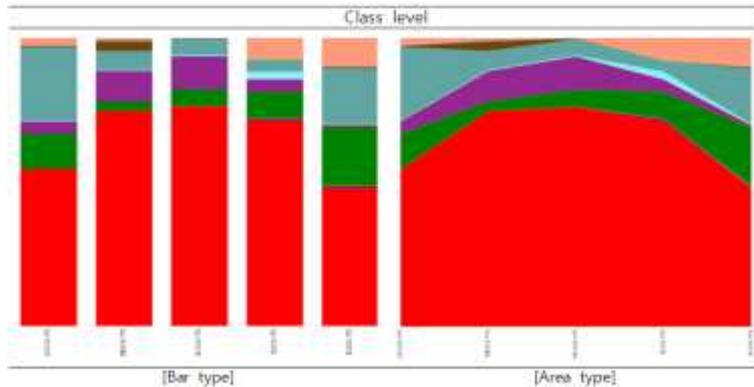
18s RNA로 분석한 Phylum level은 총 13종의 Fungi가 분류 되었으며, *Mortierellomycota*(12.1%), *Ascomycota*(10.2%), *Basidiomycota*(6.3%) 등의 Fungi가 분류되었음. *Aphelidiomycota*, *Blastocladiomycota*, *Chytridiomycota*, *Glomeromycota*, *Mucoromycota*, *Olpidiomycota*, *Rozellomycota*는 1% 미만으로 분류되었음. 특히 Phylum에 포함되지 않고 불확실한 결과가 69.2%를 차지하여 다양한 종류의 Fungi가 분류되지 않음[그림4-8].



[그림4-8] 수집된 5개 토양 시료의 18s RNA Phylum level 결과

㉔ Class level

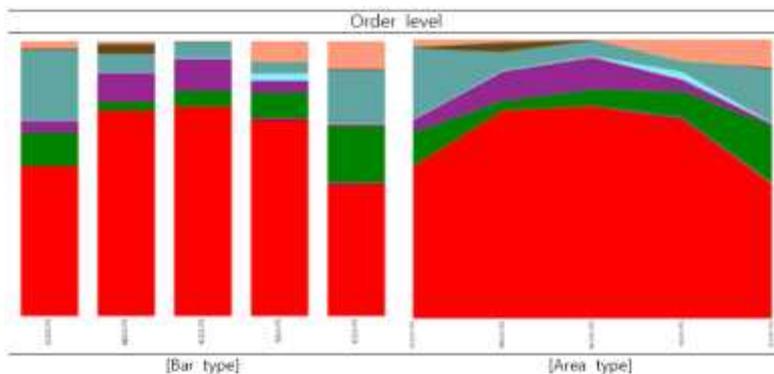
18s RNA로 분석한 Class level은 총 37개로 분류되었고, *Ascomycota*에서는 *Sordariomycetes*(7.4%), *Basidiomycota*에서는 *Tremellomycetes*(5.1%), *Chytridiomycota*에서는 *Spizellomycetes*(0.2%), *Mortierellomycota*에서는 *Mortierellomycetes*(12.1%)로 가장 많이 분류되었음(그림 9). *Sordariomycetes*는 대부분의 분포는 육지 분류군을 포함하지만, 몇몇은 수중에서도 서식하는 것으로 알려져 있음. 진균 기생충 및 Saprobies 뿐만 아니라 포유동물의 분해와 영양순환을 하며, 경제적으로 중요한 생물학적 조절제로 알려져 있음.



[그림4-9] 수집된 5개 토양 시료의 18s RNA Class level 결과

㉕ Order level

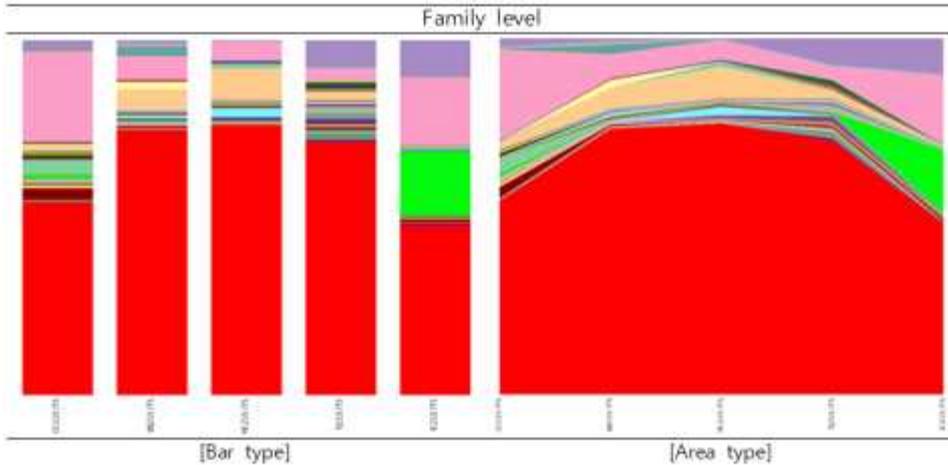
18s RNA로 분석한 Order level은 총 75개로 분류되었고, *Eurotiales*(1.2%), *Eurotiales*(5.7%), *Filobasidiales*(3.9%), *Mortierellales*(12.1%)로 가장 많이 분류되었음[그림4-10]. *Mortierellales*의 대부분의 종은 다른 발효 조건에서 당분 및 기타 탄소원의 과잉을 지질로 전환하여 다불포화 지방산(PUFA)을 생산할 수 있음. 여러 연구에서 일부 *Mortierellales* 종이 균사체에 아라키도닉, 리놀렌, eicosapentaenoic, docosahexaenoic acids를 축적할 수 있다는 것이 밝혀졌음. 이러한 화합물은 농업적으로 중요한 식물의 식물성 동물성균에 대한 내성을 유도하는 데 관여함. 이러한 PUPA는 인간의 면역반응을 향상시키기 위한 식품 보충제나 약물로 널리 사용되고 있으며, 화합물의 대체원료로서 *Mortierellales*를 부여하고 있음.



[그림4-10] 수집된 5개 토양 시료의 18s RNA Order level 결과

㉔ Family level

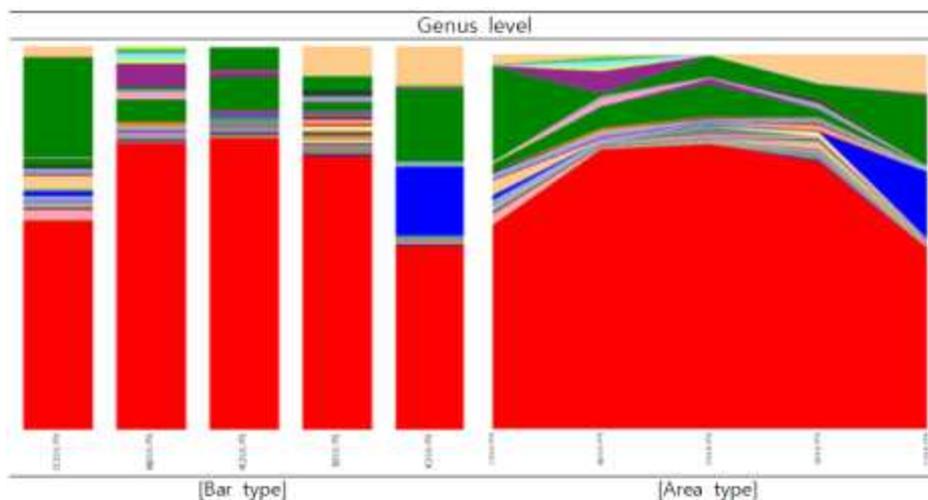
18s RNA로 분석한 Family level은 총 161개로 분류되었고, *Aspergillaceae*(0.9%), *Hypocreaceae* (0.5%), *Stachybotryaceae*(3.9%), *Microascaceae*(1.0%), *Piskurozymaceae*(3.7%), *Mortierellaceae* (12.1%)로 가장 많이 분류되었음[그림4-11]. *Microascaceae*는 saprobic 식물 병원성 종을 포함하며, 균의 형태학적 균질기를 수요함. *Microascaceae*의 일부 종은 인간의 기회감염 병원체이며, 항진균제에 고유한 내성을 보임. *Microascaceae* 속의 계통발생과 분류학은 아직 많이 밝혀져 있지 않음.



[그림4-11] 수집된 5개 토양 시료의 18s RNA Family level 결과

㉕ Genus level

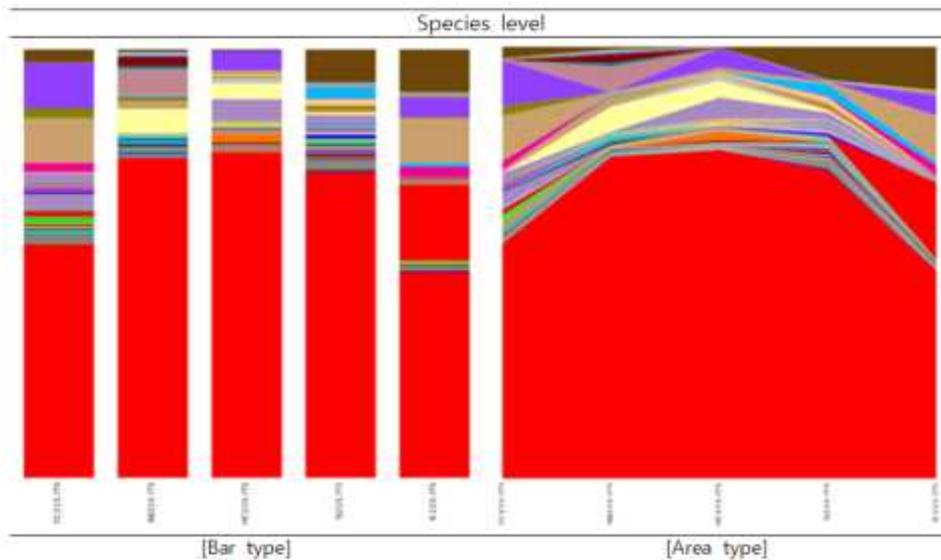
18s RNA로 분석한 Genus level은 총 256개가 분류되었으며, *Aspergillus*(0.5%), *Aspergillus*(0.3%), *Monocillium*(0.4%), *Acremonium*(0.3%), *Bisifusarium*(0.2%), *Sirastachys*(3.8%), *Coprinellus*(0.2%), *Solicoccozyma*(3.7%), *Cryptococcus*(0.4%), *Mortierella*(10.8%), *Mucor*(0.4%)로 가장 많이 분류되었음[그림4-12]. *Sirastachys*의 포함되는 종들은 중요한 식물 병원균과 인간 병원균을 포함하며, 생분해체 및 biocontrol제로서 산업 및 상업용 응용에 사용되는 여러 종을 포함함.



[그림4-12] 수집된 5개 토양 시료의 18s RNA Genus level 결과

㉞ Species level

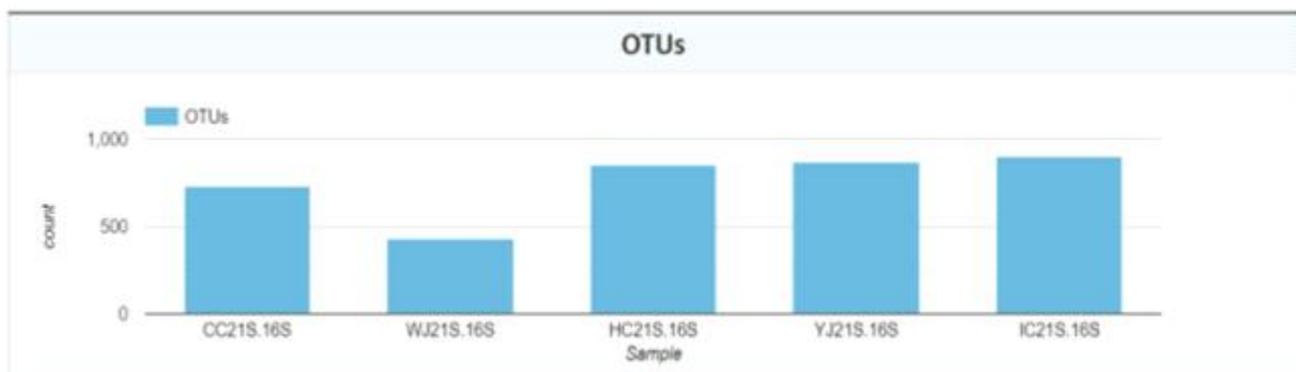
18s RNA로 분석한 Species level은 총 299개가 분류되었으며, *Trichobolus\_zukalii*(0.1%), *Metarhizium\_anisopliae*(0.1%), *Monocillium\_mucidum*(0.4%), *Sirastachys\_castaneda*(3.8%), *Solicocc\_ozyma\_terricola*(1.7%), *Solicoccozyma\_terricola*(2.0%), *Mortierella\_elongata*(4.7%)로 많이 분류되었음[그림4-13]. *Solicoccozyma\_terricola*라는 효모는 온대 기후에 특징적이며, *Solicoccozyma*는 IAA 합성 및 식물의 성장을 촉진하는 것으로 알려져 있음. 토양에서 장기간 잠복하여 생존할 수 있으며, 바이오연료 생산에 유망한 물질인 유지성 효모에 포함됨.

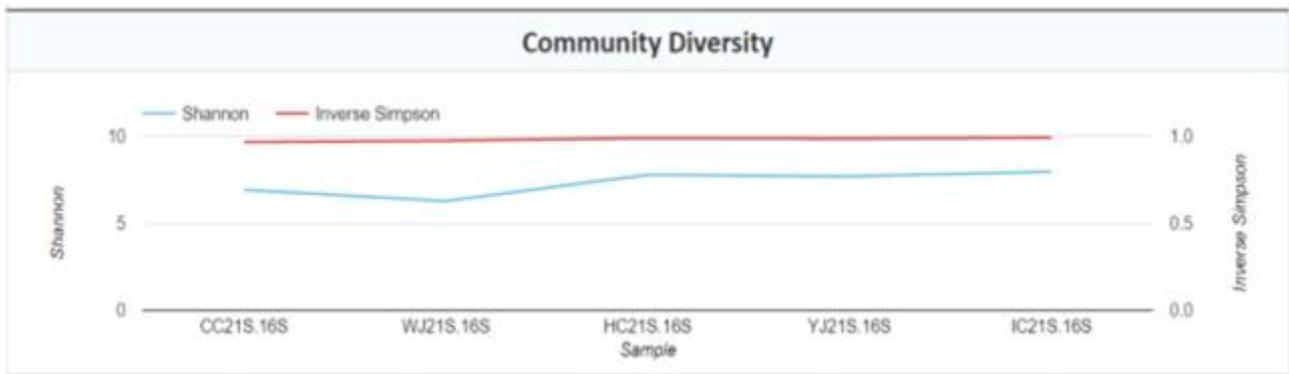


[그림4-13] 수집된 5개 토양 시료의 18s RNA Species level 결과

④ Community richness & diversity of bacteria

토양 시료의 bacteria OTUs는 IC21S가 902종으로 가장 많았고 WJ21S가 433종으로 가장 적은 종으로 다양성이 가장 낮은 것으로 분석되었음. 각각의 시료에서 종의 다양성을 측정하기 위하여 Community Diversity, Shannon, Simpson 지수를 측정하였음. IC21S는 다른 시료들에 비해 OTUs와 Shanon 지수가 높아 다양성이 높은 것으로 판단됨. HC21S는 OTUs가 YJ21S에 비해 낮았지만, Shannon과 Simpson 지수가 높았음[그림4-14].





- \* OTUs : Operational Taxonomic Unit is an operational definition of a species or group of species often used when only DNA sequence data is available
- \* Chao1 : returns the Chao1 richness estimate for an OTU definition
- \* Shannon : The Shannon index takes into account the number and evenness of species.
- \* Inverse Simpson : The Inverse Simpson index represents the probability that two randomly selected individuals in the habitat will belong to the same species.
- \* Good's Coverage : Coverage is calculated as  $C=1-(s/n)$ , where  $s$  is the number of unique OTUs and  $n$  is the number of individuals in the sample. This index gives a relative measure of how well the sample represents the larger environment.

[그림4-14] 수집된 5개의 토양 시료의 bacteria Community richness & diversity 결과

⑤ Community richness & diversity of fungi

토양 시료의 Fungi는 Bacteria와 마찬가지로 종의 다양성을 측정하기 위해 OTUs, Community diversity, Shannon, Simpson 지수를 측정하였음. OTUs는 YJ21S가 594종으로 가장 높았으며, Shannon(6.79), Simpson(0.97) 지수도 다른 시료들과 비교하여 가장 높게 측정되어 다양성이 가장 높은 것으로 분석됨. CC21S의 OTUs는 215종으로 가장 낮은 종의 수를 나타냈으나, Shannon(5.11), Simpson(0.94)를 기록하여 종의 수는 가장 낮았지만, 다양성은 다른 토양 시료들에 비해 높은 것으로 판단됨[그림4-15].

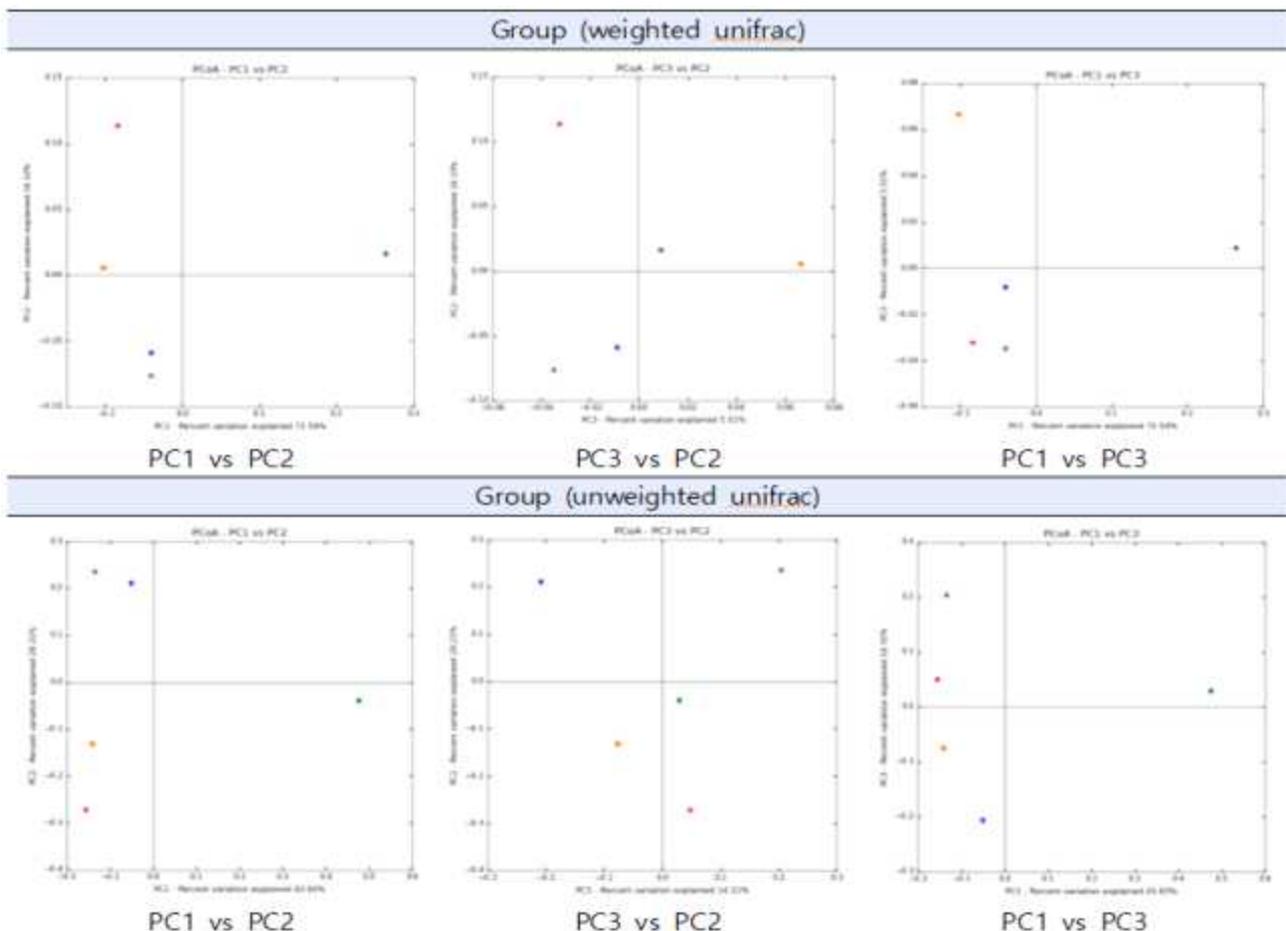


- \* OTUs : Operational Taxonomic Unit is an operational definition of a species or group of species often used when only DNA sequence data is available
- \* Chao1 : returns the Chao1 richness estimate for an OTU definition
- \* Shannon : The Shannon index takes into account the number and evenness of species.
- \* Inverse Simpson : The Inverse Simpson index represents the probability that two randomly selected individuals in the habitat will belong to the same species.
- \* Good's Coverage : Coverage is calculated as  $C=1-(s/n)$ , where  $s$  is the number of unique OTUs and  $n$  is the number of individuals in the sample. This index gives a relative measure of how well the sample represents the larger environment.

[그림4-15] 수집된 5개의 토양 시료의 fungi Community richness & diversity 결과

⑥ PCoA Graph of bacteria

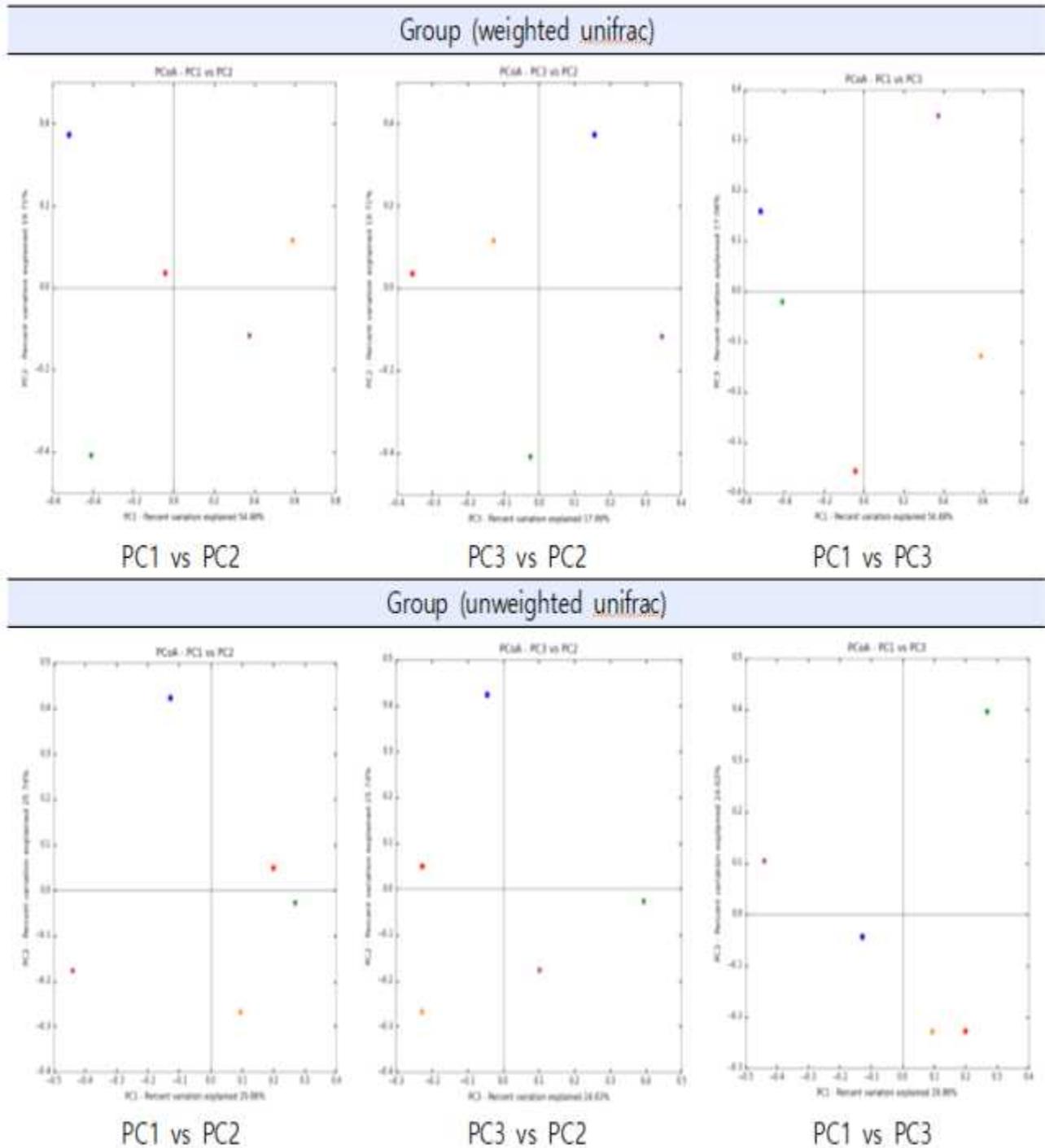
분석한 5개의 토양 시료 간에 bacteria의 다양성이 있는지 확인하기 위하여 토양 시료의 주성분 값을 나타내는 PC value와 UPGMA tree로 나타냄. UniFrac 분석은 계통 발생 정보를 사용하여 환경 샘플을 비교하는 베타-다양성 측정임. 분석 결과 시료 간에 거리가 멀게 측정되어 시료의 다양성이 높은 것으로 판단됨 [그림4-16].



[그림4-16] 수집된 5개의 토양 시료의 bacteria PCoA Graph

⑦ PCoA Graph of fungi

분석한 5개의 토양 시료 간에 fungi의 다양성이 있는지 확인하기 위하여 토양 시료의 주성분 값을 나타내는 PC value와 UPGMA tree로 나타냄. Weighted unifracs은 시료 간에 공유되는 종/분류군의 상대적 풍부도를 Unweighted unifracs은 존재/부재 여부만 고려함. 분석 결과 시료 간에 거리가 멀게 측정되어 다양성이 높은 것으로 판단됨[그림4-17].

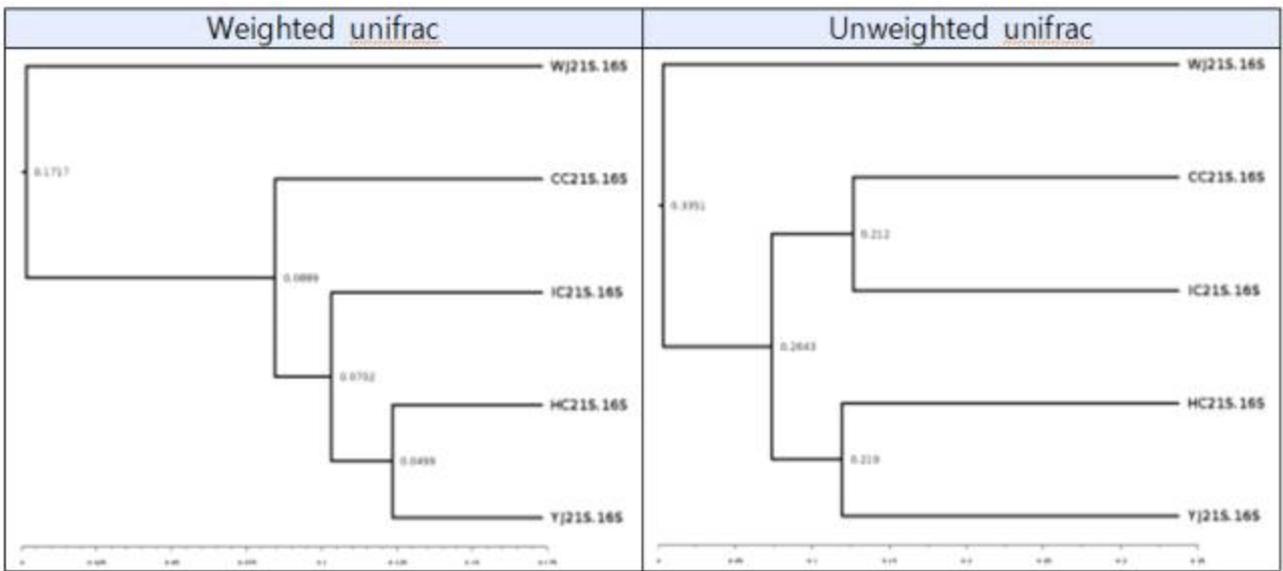


[그림4-17] 수집된 5개의 토양 시료의 fungi PCoA Graph

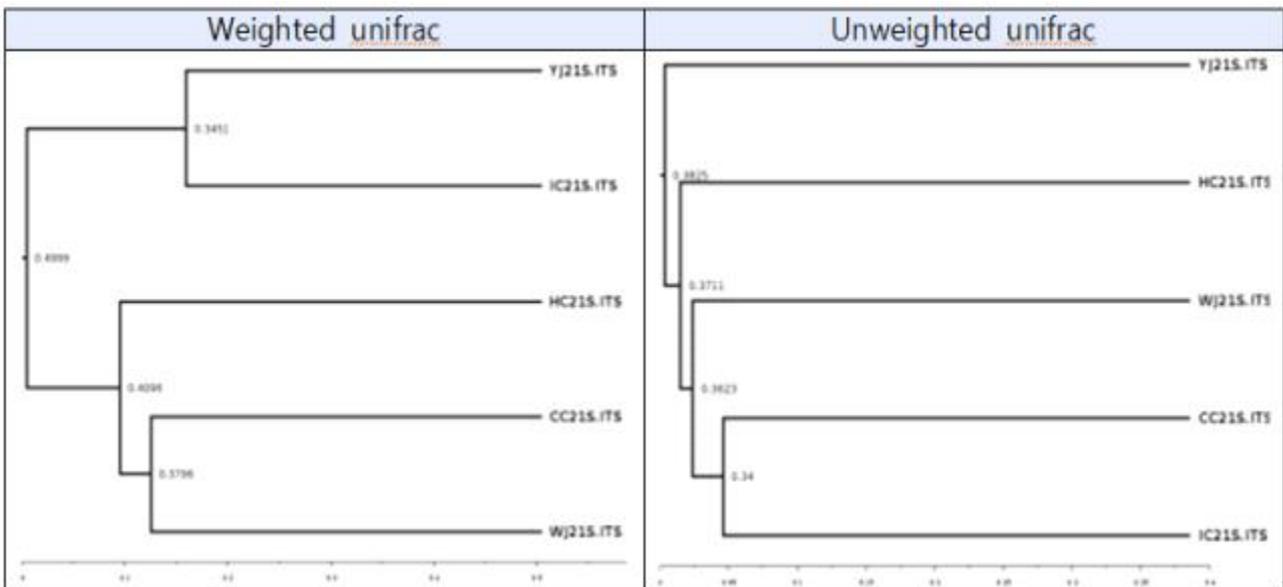
⑧ UPGMA tree comparing samples

Bacteria의 UPGMA tree에서 WJ21S 시료는 다른 시료들과 근연 거리가 멀어 분포하고 있는 미생물의 차이가 있다는 것을 알 수 있으며, 다양성 또한 높은 것으로 분석되었음. HC21S 시료와 YJ21S 시료는 근연 거리가 가장 가까워 두 시료는 미생물 군집상 대체적으로 비슷하게 구성되어 있는 것으로 판단됨[그림4-18].

Fungi의 UPGMA tree에서 HC21S 시료에서 존재하는 미생물은 다른 시료들과 다른 종이 존재 할 것으로 예상됨. YJ21S는 unweighted unifrac 결과를 보았을 때, 다른 시료들과 근연 거리가 멀어 분포하고 있는 미생물 상의 차이가 있는 것을 알 수 있음[그림4-19].



[그림4-18] 수집된 5개의 토양 시료의 bacteria UPGMA tree comparing 결과



[그림4-19] 수집된 5개의 토양 시료의 fungi UPGMA tree comparing 결과

## 2) 토양 미생물 분리, 동정 및 기내 작물 실험을 통한 길항성 검정 실험

### 가) 기존 보유 균주 기내 길항성 검정

실험실에서 기존에 보유하고 있는 길항미생물(B6, B7, B18, B24, B29) 5종을 활용하여 상추에 균핵병(*Sclerotinia rot*)을 유발하는 식물병원성 미생물인 *Sclerotinia sclerotiorum* 와 *Sclerotinia minor*에 대한 길항성 검정을 하였음. 길항성 검정은 Potato Dextrose Agar (PDA) 배지와 PDA와 Tryptic Soy Agar (TSA) 혼합배지(1:1, v/v)를 사용하여 동일 선상에 병원성 미생물과 8mm paperdisk를 위치시켜 paper disk에 Tryptic Soy Broth (TSB)에 액체 배양한 길항미생물 20 $\mu$ l를 접종하여 25 $^{\circ}$ C에 72시간 배양하였음. Control이 90mm plat에 전체로 자랄 때까지 배양 후 식물병원성 미생물과 길항미생물 접종원 간의 거리를 측정하여 억제율을 측정함. 각 실험은 1 plate 씩 3반복 수행하였음. 억제력 측정 방법은 아래의 방법을 사용하였음.

$$\text{Inhibition rate (\%)} = (R - r) / R \times 100$$

\* R : the maximum radius of the fungal colony away from the bacterial colony

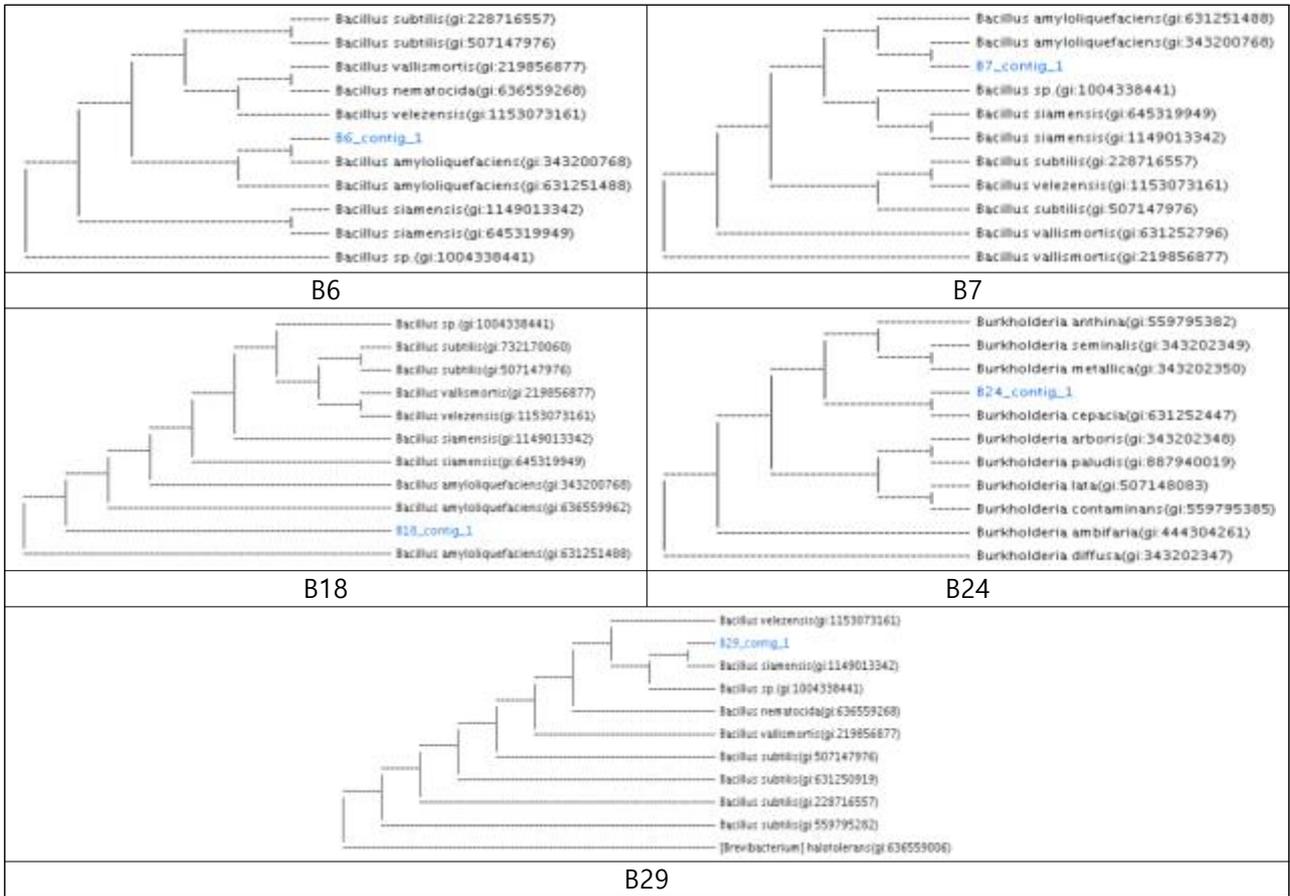
\* r : the of the fungal colony opposite the bacterial colony

실험 결과 기존 보유 길항미생물들은 상추에 균핵병을 유발하는 각각의 균핵병원균 *S. sclerotiorum* 와 *S. minor*에 대하여 PDA 배지에서는 각각 65.0~72.2%, 68.3~71.7%의 억제력을 나타냈으며, PDA와 TSA 혼합배지에서는 각각 70.5~75.0%, 73.3~80.5%의 억제력을 나타냄[표4-4],[그림4-21],[그림4-22],[그림4-23]. 기존 보유 길항균들은 *S. sclerotiorum* 보다 *S. minor*에 더 길항을 가지는 것을 확인하였음. 기존 보유 길항미생물 동정 결과 B6, B7, B18, B29는 *Bacillus siamensis*, B24는 *Burkholderia arbois*로 동정 되었음[그림4-20]. 상추에 균핵병을 유발하는 균핵병원균에 대하여 *Bacillus* 속이 강한 길항을 나타낸다고 판단됨.

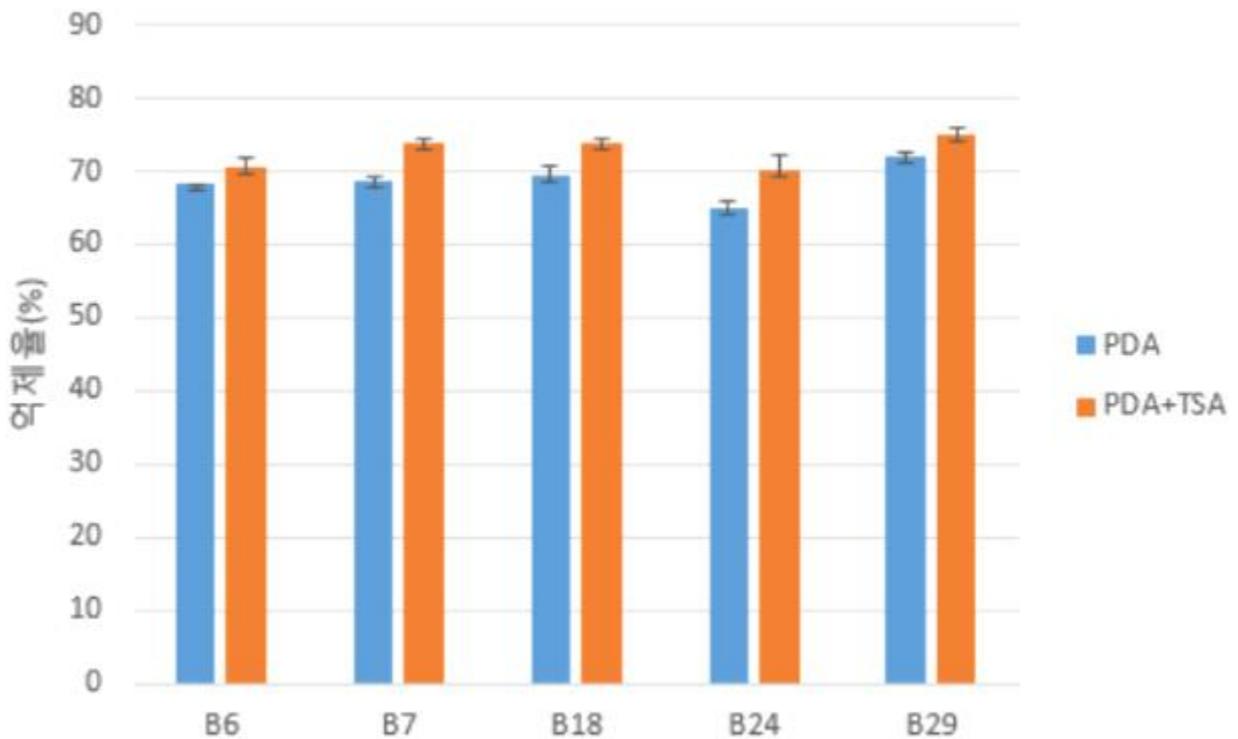
[표4-4] 기존 보유 균주 균핵병 병원균 길항 검정 결과

균핵병원균	사용배지	곰팡이 군사 억제율 (%)				
		B6	B7	B18	B24	B29
<i>S. sclerotiorum</i>	PDA	68.3	68.8	69.5	65.0	72.2
	PDA+TSA	70.5	73.8	73.8	70.1	75.0
<i>S. minor</i>	PDA	68.3	68.3	67.8	71.7	68.8
	PDA+TSA	77.2	76.2	79.5	73.3	80.5

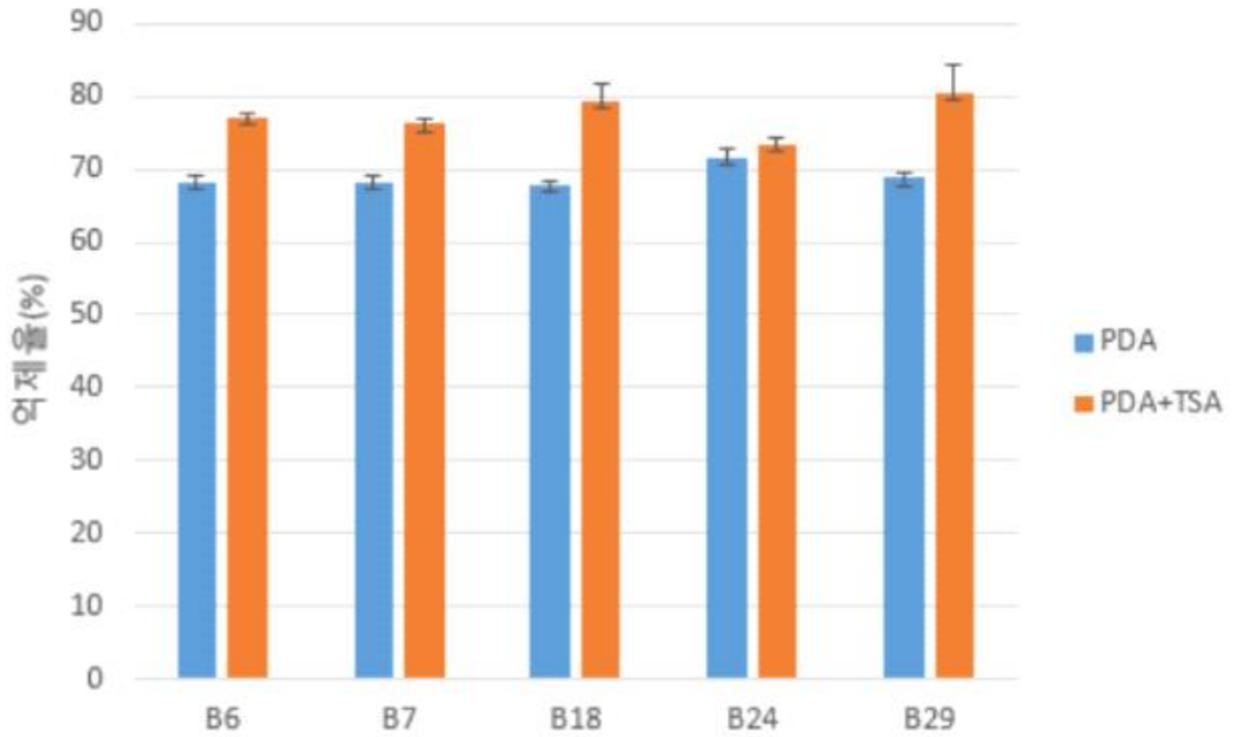
\*각 수치는 3반복의 평균값임.



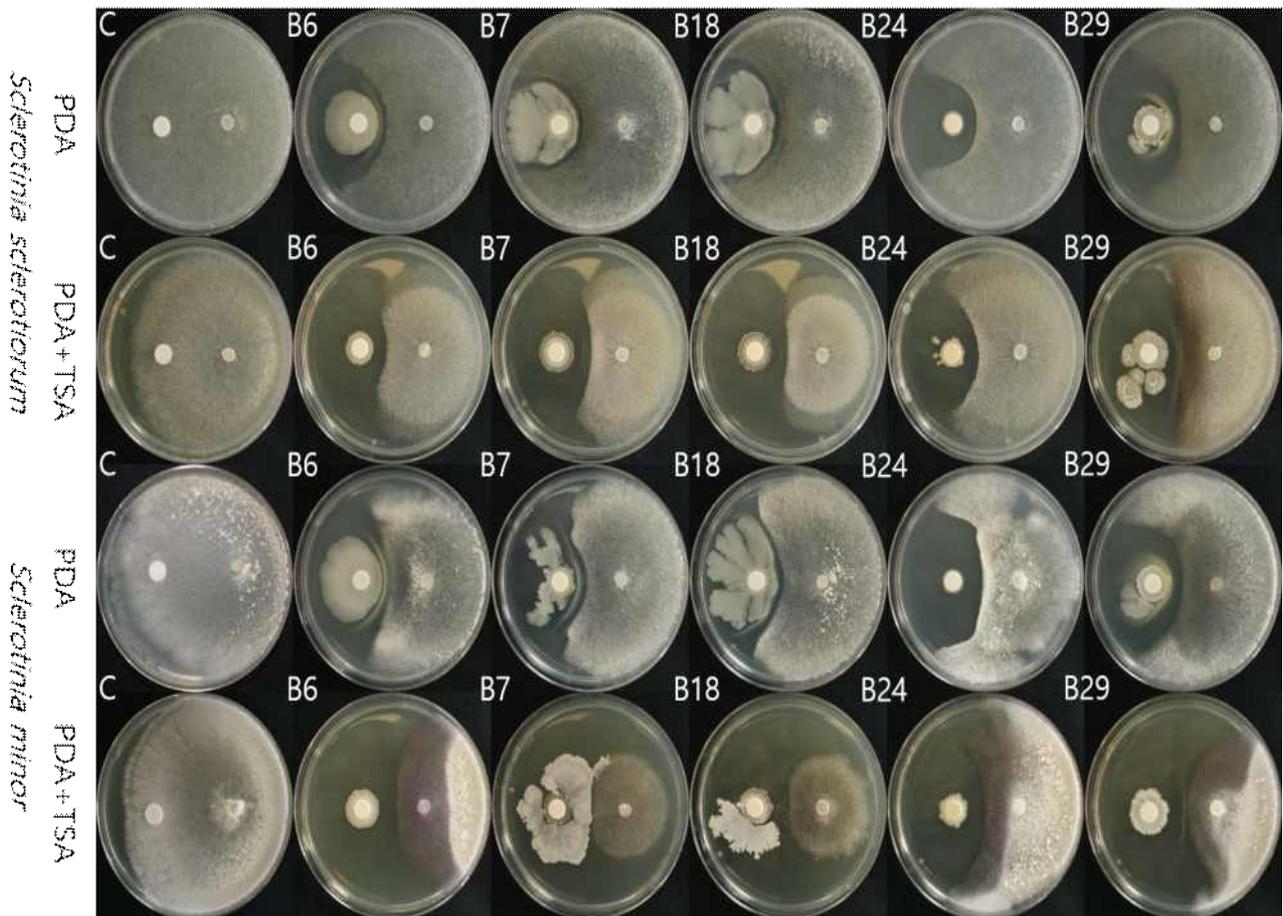
[그림4-20] 기보유 길항균 5종의 Sequencing 동정 결과



[그림4-21] 기존 보유 균주 균핵병 병원균(*S. sclerotiorum*) 길항 검정 결과



[그림4-22] 기존 보유 균주 균핵병 병원균(*S. minor*) 길항 검정 결과



[그림4-23] 기존 보유 균주 균핵병 병원균 길항 검정 결과

## 나) 토양 미생물(세균 및 곰팡이) 분리 및 동정

상추 재배 토양에 서식하는 미생물(세균 및 곰팡이)을 분리하기 위해 8곳의 지역에서 채취한 토양 시료 1g을 멸균수 9ml에 넣고 15분간 정치 과정을 진행함. 뿌리 시료는 멸균수 5ml에 뿌리 2g을 마쇄한 후 1ml을 멸균수 9ml에 넣고 15분간 정치 과정을 진행함. 세균은 혼합액을 Serial dilution 방법을 이용하여  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  기준으로 희석하여 TSA 배지에 각각  $30\mu\text{l}$ 씩 접종 도말 후,  $28^{\circ}\text{C}$ 에서 3일간 배양하였음. 배양된 배지에서 colony 형성 모양 및 색 등의 형태적 특성에 따라 세균을 분리함. 곰팡이는 혼합액을 Serial dilution 방법을 이용하여  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  기준으로 희석하여 PDA 배지에  $30\mu\text{l}$ 씩 접종 도말하여  $25^{\circ}\text{C}$ 에서 7일간 배양함. 균사의 형태, 색깔 및 크기 등의 형태적 특성에 따라 순수분리를 진행함. 최종 분리된 세균 및 곰팡이는 20% Glycerol stock을 만들어  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 보관하면서 실험에 사용함.

토양 시료 내 서식 미생물을 2~3회 순수분리한 결과 TSA 배지에서 123종의 세균과 PDA 배지에서 62종의 곰팡이를 분리하였음[표4-5]. 분리한 세균은 균핵병 길항 검정에 사용하였음. 상추 재배 토양에서 상추에 균핵병을 유발하는 식물병원성 미생물을 선별하기 위해 PDA 배지에 배양된 colony들을 현미경 관찰, 육안 검정 및 sequencing 하였음[표4-6]. L1, L2, L3 시료에서 분리된 미생물은 현미경 관찰 및 육안 검정을 한 후 균핵병을 유발하는 식물병원성 미생물이 없는 것으로 판단하여 sequencing 하지 않았음(no data). 동정 결과 상추에서 균핵병을 유발하는 *S. sclerotiorum* 와 *S. minor*는 분리되지 않았음. 향후 추가적인 토양 시료 수집을 통하여 상추에서 균핵병을 유발하는 식물병원성 미생물을 분리할 예정임.

[표4-5] 상추 재배 토양에서 분리한 미생물 (세균 및 곰팡이) 수

수집 지역	총 분리 미생물			
	세균	곰팡이	합계	
춘천	CC	10	6	16
	L1	48	23	71
	L2	15	8	23
	L3	17	9	26
홍천	HC	7	2	9
원주	WJ	14	6	20
여주	YJ	4	5	9
이천	IC	8	3	11
합계		123	62	185

[표4-6] 상추 재배 토양에서 분리된 22종의 곰팡이 동정 결과

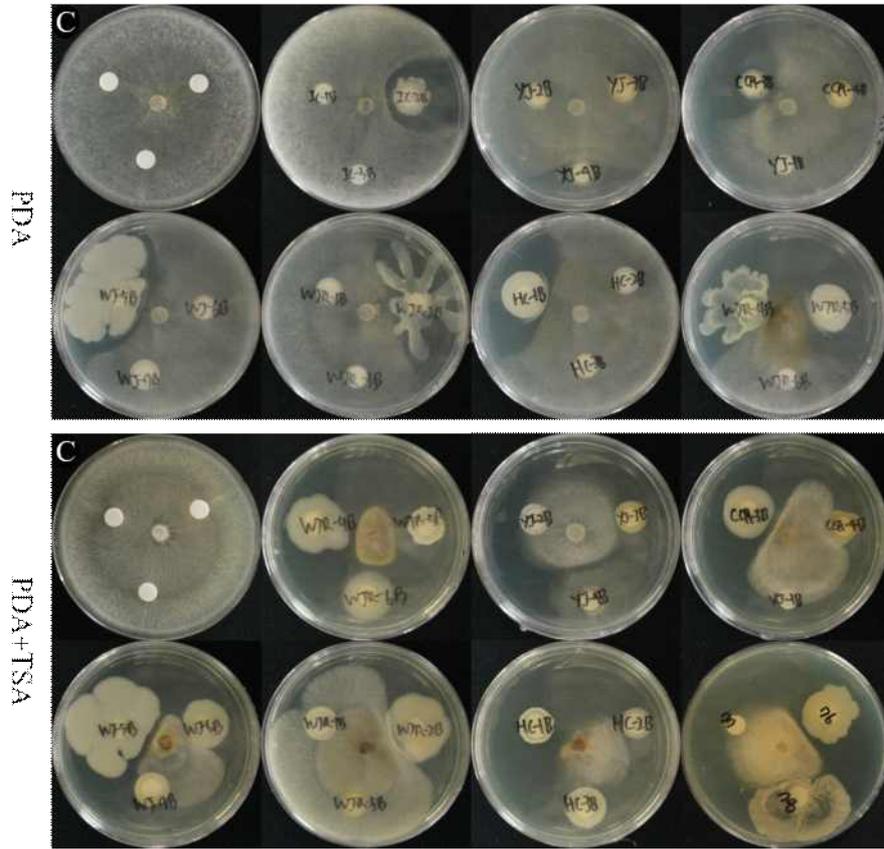
지역	Name	Species	지역	Name	Species
	ICS-1F	<i>Rhizopus oryzae</i>		CCS-1F	<i>Rhizopus oryzae</i>
IC	ICS-2F	<i>Mortierella</i> sp.		CCS-2F	<i>Aspergillus fumigatus</i>
	ICS-3F	<i>Fusarium oxysporum</i>		CCS-3F	<i>Chaetomium globosum</i>
	WJS-1F	<i>Mortierella</i> sp	CC	CCS-4F	<i>Mortierella wolfi</i>
	WJS-2F	<i>Humicola</i> sp.		CCS-5F	<i>Aspergillus</i> sp.
	WJS-3F	<i>Aspergillus fumigatus</i>		CCS-6F	<i>Chaetomium globosum</i>
WJ	WJS-4F	<i>Humicola</i> sp.		YJS-1F	<i>Actinomucor elegans</i>
	WJS-5F	<i>Fusarium</i> sp.		YJS-2F	<i>Mucor racemosus</i>
	WJS-6F	<i>Chaetomium globosum</i>	YJ	YJS-3F	<i>Fungal</i> sp.
	HCS-1F	<i>Fungal</i> sp.		YJS-5F	<i>Actinomucor elegans</i>
HC	HCS-2F	<i>Mucor hiemalis</i>			

\* S: soil, F: fungi

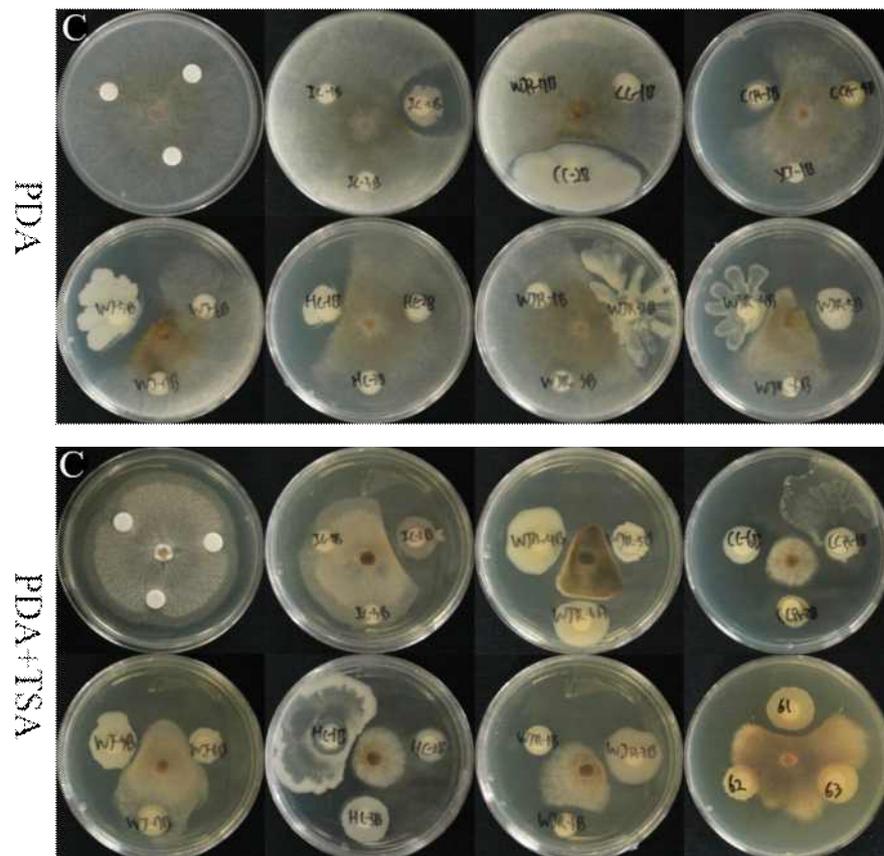
#### 다) 토양 분리 균주 기내 길항성 검정

상추 재배 토양에서 분리한 세균 123종을 대상으로 상추에 균핵병을 유발하는 식물병원성 미생물 *S. sclerotiorum* 와 *S. minor*에 대한 길항 실험을 1차적으로 선발함. 1차 선발 시 PDA 배지와 PDA와 TSA 혼합배지를 사용하여 중앙에 균핵병원균을 접종한 후 분리한 세균 3종을 8mm paper disk 위에 20 $\mu$ l씩 접종하여 25 $^{\circ}$ C에 72시간 배양하여 1차 길항미생물 후보를 선정하였음. 1차 검정에서 선발한 후보 균주를 대상으로 동일한 배지를 사용하여 1:1 대치 배양 실험을 진행함. 곰팡이는 cork borer ( $\Phi$  : 5mm)를 이용하여 agar plug를 치상 하였으며, 동일 선상에 1차 선발한 세균을 paper disk에 20 $\mu$ l씩 접종하여 25 $^{\circ}$ C에서 72시간 배양하였음. Control이 90mm plat에 전체로 자랄 때까지 배양 후 식물병원성 미생물과 길항미생물 접종원 간의 거리를 측정하여 억제율을 측정함. 각 실험은 1 plate 씩 3반복 수행하였음.

상추 재배 토양에서 분리한 세균 123종을 대상으로 상추에서 균핵병을 유발하는 *S. sclerotiorum*, *S. minor*와 PDA 배지와 PDA와 TSA 혼합배지를 사용하여 1차 길항 검정을 실시하였음. 1차 선발 결과 *S. sclerotiorum* 와 *S. minor*에 대해 16종의 길항 후보균(ICS-2B, HCS-1B, HCS-4B, HCS-7B, WJS-5B, WJR-2B, WJR-4B, WJR-5B, WJR-6B, CCS-2B, CCS-6B, CCR-3B, YJS-4B, L2-3S-3B, L3-3S-2B, L3-3S-4B)을 선발하였음[그림4-24],[그림4-25].



[그림4-24] 상추 재배 토양에서 분리한 균주 중 *S. sclerotiorum*에 길항을 보인 후보균



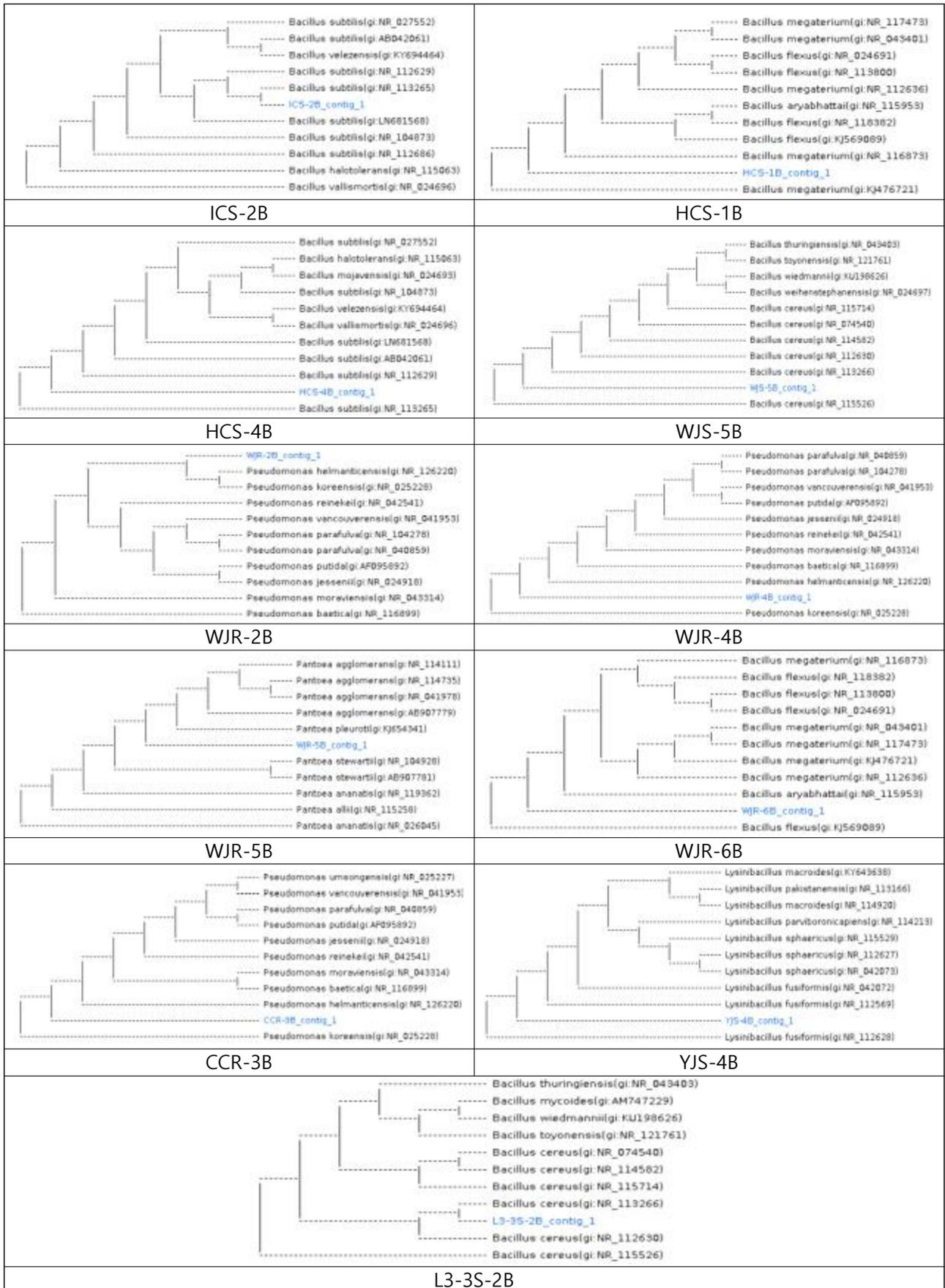
[그림4-25] 상추 재배 토양에서 분리한 균주 중 *S. minor*에 길항을 보인 후보균

16종의 길항 후보균을 *S. sclerotiorum* 와 *S. minor*에 각각 1대1 대치배양을 진행한 결과 총 11종의 길항미생물을 선발하였음(그림 27, 그림 28, 그림 29, 그림 30, 표 8). 선발된 11종의 길항미생물은 상추 재배지 토양 NGS 분석 결과에서 밝혀진 *Pseudomonas*(2.7)%, *Bacillus*(0.7)%, *Enterobacter*(0.1)%, *Lysinibacillus*(0.1%) 속과 동인한 균주임(그림 26). 신규로 상추 재배 토양에서 선발한 길항미생물은 기존에 보유하고 있는 길항미생물과 마찬가지로 11종 중 6종이 *Bacillus* 속에 속하는 결과를 보였음[표4-7],[그림4-26]. 선발된 길항균 중 WJR-6B가 76.7%의 억제력으로 *S. sclerotiorum* 와 *S. minor*에 대해서 가장 길항력이 높았고, HCS-4B, L3-3S-2B가 각각 66.8%, 65.9%의 억제력으로 길항력이 가장 낮았음[그림4-29],[그림 4-30],[표4-8]. 선발된 길항균들의 대부분은 *S. sclerotiorum* 보다 *S. minor*에서 더 높은 길항력을 보였지만, HCS-1B, WJR-6B, YJS-4B, L3-3S-2B는 *S. sclerotiorum*에서 더 높은 길항력을 보였음[그림4-29],[그림4-30],[표4-8]. *Bacillus subtilis*는 대부분 항균활성물질을 생산하며 균주에 따라서는 siderophore 생성, 인산가용화 능력, 질소고정능력, 옥신 생산 능력 및 효소 활성을 나타내며, 작물생육 증진 효과가 있는 것으로 알려져 있음. 또한, 고추 탄저병, 채소류 시들음병, 벼 도열병, 고추 역병균에 대하여 항균 활성을 보인다는 연구결과가 있음. *Bacillus megaterium*은 병원성 미생물을 억제하고 영양물질을 생산하여 식물의 성장을 촉진하는 역할을 함. 최근 *A. thaliana* 및 *P. vulgaris* 묘목의 성장을 촉진한다고 보고됨. 이후 사이토키닌 수용체가 *B. megaterium*에 의한 식물 성장 촉진에 보완적인 역할을 한다는 연구결과가 있음. *Bacillus wiedmannii* 최근에 확인된 그람 양성균으로 용혈성 BL 독소와 비용혈성 장독소를 생성하며, 가수분해 아르기닌 음성은 자당의 발효에서 산을 생성할 수 없음. *Pantoea allii*는 혐기성의 그람 음성균으로 부패 증상을 유발하는 양파에서 분리된 새로운 병원체로 알려져 있음. *Lysinibacillus fusiformis*는 자연적으로 발생하는 박테리아이며, 농업 토양 및 공장 폐수를 포함한 여러 환경으로부터 분리됨. 환원 박테리아로서 토양의 효율적인 생물제재로 사용될 수 있음. HCS-1B는 *S. sclerotiorum*과 *S. minor*에 대하여 평균 75.6%의 억제력을 보여 가장 높은 길항력을 보였으며, 향후 생물제재 개발 시 유용한 균주로 사용될 것으로 판단됨.

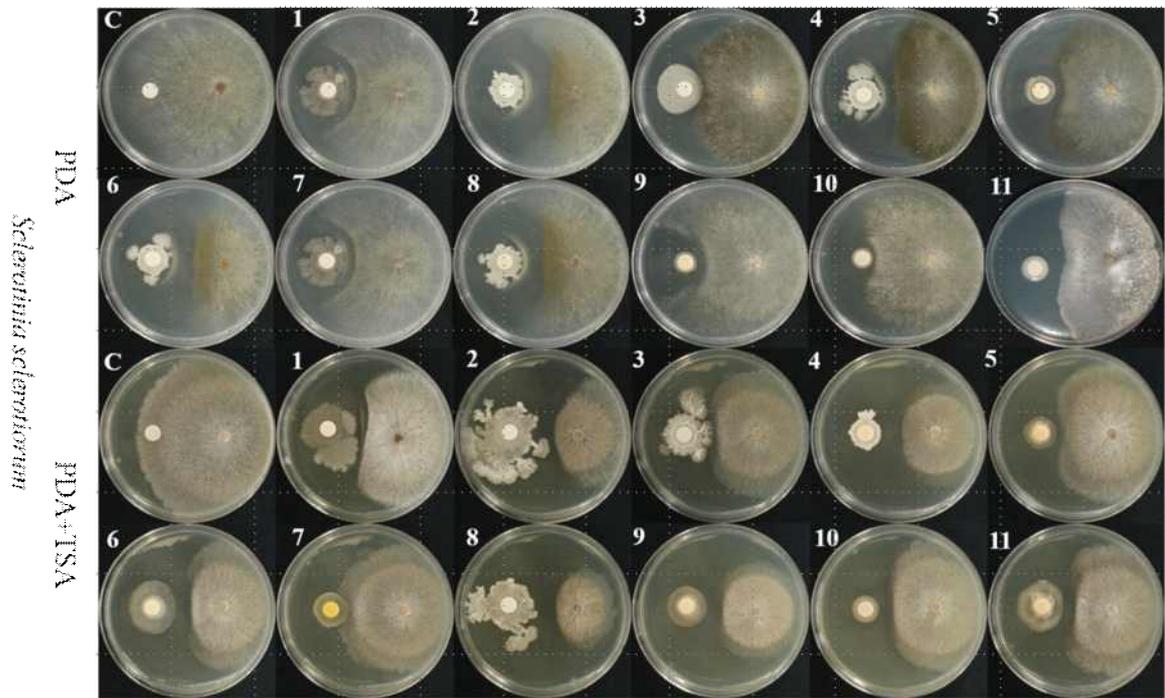
[표4-7] 상추 재배 토양에서 분리한 길항미생물 동정 결과

No.	Source	Name	Species
1	이천	ICS-2B	<i>Bacillus subtilis</i>
2	홍천	HCS-1B	<i>Bacillus megaterium</i>
3		HCS-4B	<i>Bacillus subtilis</i>
4	원주	WJS-5B	<i>Bacillus wiedmannii</i>
5		WJR-2B	<i>Pseudomonas granadensis</i>
6		WJR-4B	<i>Pseudomonas granadensis</i>
7		WJR-5B	<i>Pantoea allii</i>
8		WJR-6B	<i>Bacillus megaterium</i>
9	춘천	CCR-3B	<i>Pseudomonas granadensis</i>
10		L3-3S-2B	<i>Bacillus wiedmannii</i>
11	여주	YJS-4B	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>

\* S: soil, R: root, B: bacteria

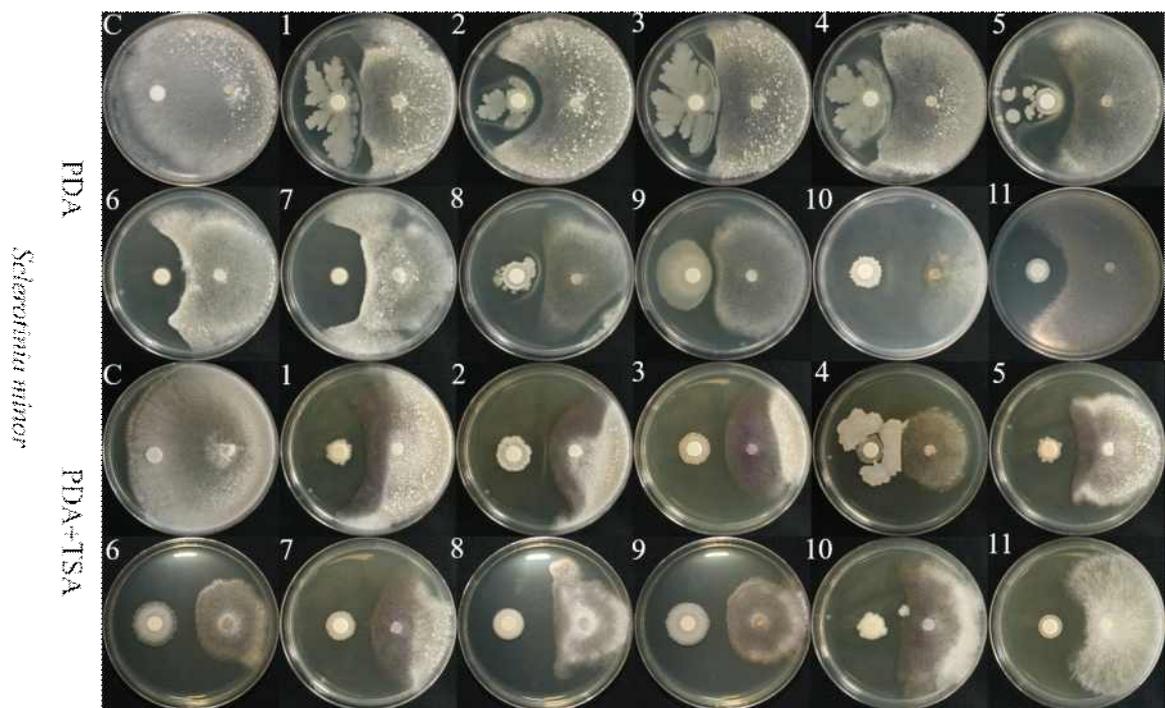


[그림4-26] 상추 재배 토양에서 분리한 길항미생물 Sequencing 동정 결과



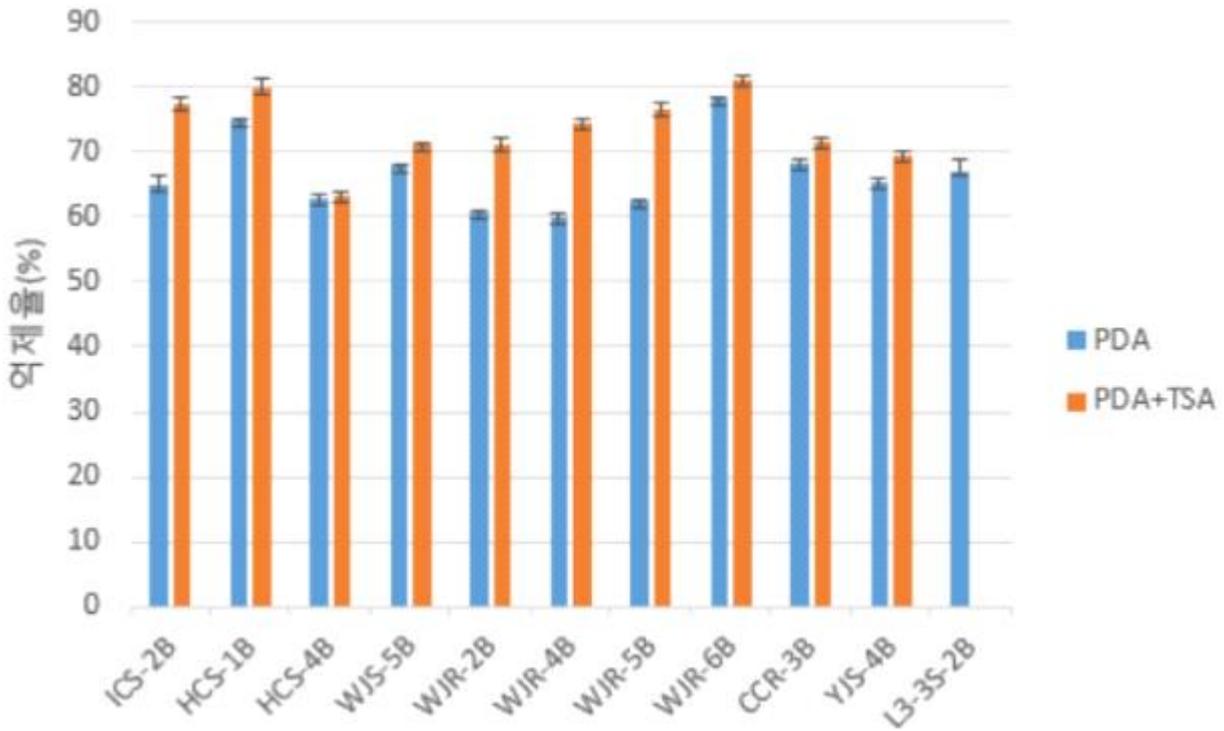
C: control, 1: ICS-2B, 2: HCS-1B, 3: HCS-4B, 4: WJS-5B, 5:WJR-2B, 6: WJR-4B, 7: WJR-5B 8: WJR-6B 9: CCR-3B, 10: YJS-4B, 11: L3-3S-2B

[그림4-27] 상추 재배 토양에서 분리한 미생물과 상추 균핵병 병원성 미생물(*S. sclerotiorum*)에 대한 길항성 실험 결과

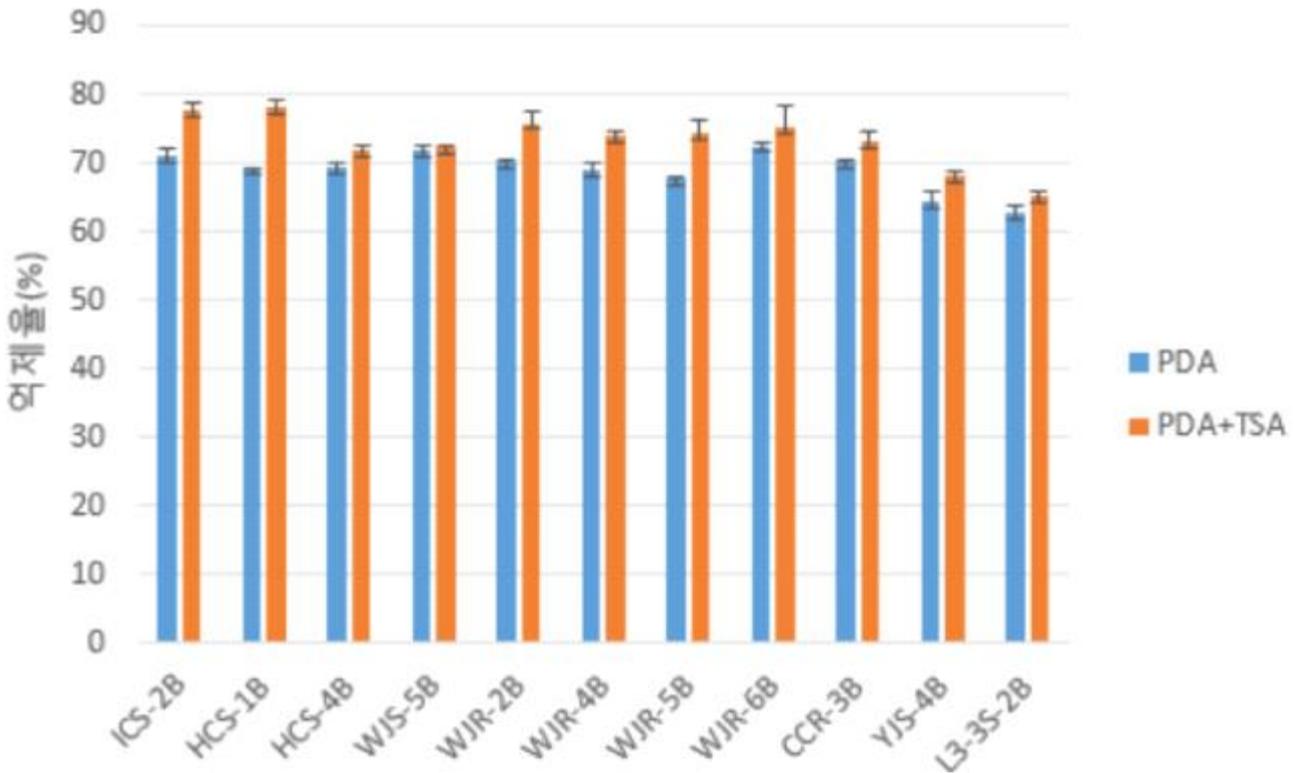


C: control, 1: ICS-2B, 2: HCS-1B, 3: HCS-4B, 4: WJS-5B, 5:WJR-2B, 6: WJR-4B, 7: WJR-5B 8: WJR-6B 9: CCR-3B, 10: YJS-4B, 11: L3-3S-2B

[그림4-28] 상추 재배 토양에서 분리한 미생물과 상추 균핵병 병원성 미생물(*S. minor*)에 대한 길항성 실험 결과



[그림4-29] 상추 재배 토양에서 분리한 미생물의 균핵병 병원성 미생물(*S. sclerotiorum*) 길항성 검정 결과



[그림4-30] 상추 재배 토양에서 분리한 미생물의 균핵병 미생물(*S. minor*) 길항성 검정 결과

[표4-8] 상추 재배 토양에서 분리한 미생물의 균핵병 병원성 미생물 길항성 검정 결과

샘플명	곰팡이 균사 억제율(%)			
	<i>S. sclerotiorum</i>		<i>S. minor</i>	
	PDA	PDA+TSA	PDA	PDA+TSA
ICS-2B	65.0	77.2	71.1	77.8
HCS-1B	75.0	80.0	69.2	78.2
HCS-4B	62.9	63.3	69.4	71.7
WJS-5B	67.8	71.1	71.7	72.2
WJR-2B	60.6	71.1	70.2	75.8
WJR-4B	60.0	74.4	69.1	73.8
WJR-5B	62.5	76.6	67.8	74.2
WJR-6B	78.3	81.1	72.5	75.1
CCR-3B	68.4	71.5	70.1	73.2
YJS-4B	65.2	69.4	64.2	68.3
L3-3S-2B	67.2	68.3	62.8	65.4

\* 각 수치는 3반복의 평균값임.

#### 라) 길항균 침지 및 관주 처리를 통한 상추 균핵병 방제 검정

기존에 보유하고 있던 길항 세균 B18과 B24 균주를 사용하여 *S. sclerotiorum*와 *Sclerotinia minor* 두 식물병원성 미생물을 대상으로 상추에서 균핵병의 병징을 억제 혹은 지연하는지 확인하기 위하여 실험을 진행하였음. 식물병원성 미생물은 PDA 배지에 접종하여 25℃에서 90mm peatri dish에 전체로 자랄 때까지 배양함. 배양한 후 토양에서 병원성 미생물의 양분 공급을 위해 깨끗이 세척 후 3번 121℃에서 15분간 고압 멸균한 귀리와 함께 섞어 귀리 내에 균사가 자랄 때까지 25℃ 배양기에서 배양하여 준비함. 길항 세균을 30ml TSB 배지에 28℃, 24시간 배양한 후 1.5L TSB 배지에 접종하여 48시간 동안 28℃, 130rpm으로 추가 배양하여 길항 세균을 준비하였음. 세균의 농도는  $1 \times 10^7$ 로 하여 준비하였음. 실험에 사용한 상추는 동오시드의 적치마(꽃상추) 품종을 사용하였으며, Pot의 규격은 11호, 토양은 일반 흙과 원예용 상토(바로커)를 2:1 비율로 혼합하여 pot에 2kg씩 담아 사용하였음. 실험 조건은 Control, Positive control, Negative control, 침지 처리구, 관주 처리구로 나누었으며, 각 처리구는 병원균 *S. sclerotiorum*, *S. minor*, *S. sclerotiorum* + *S. minor* 혼합 처리구로 나누어 진행하였음.

실험은 병원균 처리 후 1일차에 1회 관주하는 1차 실험과 병원균 처리 후 1일차, 3일차 2회 관주하는 2차 실험을 진행하였으며, 각 처리구는 모두 3반복으로 진행하였음. 1차 실험 시 Control을 제외한 모든 처리구는 병원균을 상추 이식과 동시에 병원균의 균사가 자란 귀리 10알과 함께 넣어 주었음. Control은 병원균과 길항균 모두 처리하지 않고 물만 처리하였으며, Positive control은 병원균 처리 후 시중에서 판매 중인 생물농약(Acadian 29, Canada)을 병

원균 처리 후 1일차에 200ml씩 1회 관주 하였으며, Negative control은 병원균만 처리하였음.

침지 처리구는 pot에 상추를 이식할 때  $1 \times 10^7$  cfu/ml 농도의 길항균에 상추 모종의 뿌리를 2~3회 적신 후 이식하였으며, 관주 처리구는 상추 이식 후 1일차에  $1 \times 10^7$  농도의 길항균을 각각 처리구에 200ml씩 뿌리 부분에 1회 관주 하였음. 관주 처리 10일 경과 후 생체중, 건물중, 엽면적을 측정하여 병원균에 대한 길항균의 길항력을 검정하였음. 2차 실험 또한 1차 실험과 동일한 조건으로 진행하였으며, Positive control과 관주 처리구에서만 병원균 접종 후 1일차와 3일차에 생물농약과 길항균을 각각 200ml씩 관주 처리하였음. 3일차 관주 처리 10일 경과 후 생체중, 건물중, 엽면적을 측정하여 병원균에 대한 길항균의 길항력을 검정하였음.

#### ① 1차 작물 실험 결과

작물 실험 결과 아무것도 처리하지 않은 Control은 50.9g의 생체중을 기록하였으며, Positive control은 B18 처리, B24 처리, B18과 B24 혼합처리에 대하여 각각 39.5g, 47.2g, 52.3g을 기록하였음. Negative control은 각각 41.1g, 11.3g, 18.0g의 생체중을 기록하여 Control과 Positive control에 비해 낮은 생체중을 기록하였음. 병원균과 길항균을 함께 처리한 처리구를 비교하였을 때, 침지 처리구에서는 B24를 처리하였을 시 가장 높은 생체중을 기록하였음. *S. sclerotiorum*과 *S. minor*를 각각 처리한 처리구에 B24를 관주하였을 때, 다른 처리구 보다 높은 생체중을 기록하였으나, *S. sclerotiorum*과 *S. minor*를 혼합하여 처리한 처리구에서는 가장 낮은 생체중을 기록하였음[표4-9],[표4-10],[그림4-31A],[그림4-33]. 건물중은 Control이 2.6g을 기록하였으며, Positive control은 B18 처리, B24 처리, B18과 B24 혼합처리에 대하여 각각 1.6g, 2.2g, 2.8g을 기록하였음. Negative control은 0.7g, 0.3g, 0.6g을 기록하였으며, S.min을 처리한 Negative control이 가장 낮은 건물중을 기록하였음. 병원균과 길항균을 함께 처리한 처리구를 비교하였을 때, 침지 처리구에서는 B24를 침지하였을 때 각각 1.5g, 0.7g, 1.0g으로 가장 높은 건물중을 기록하였음[표4-9],[표4-10],[그림4-31B],[그림4-33]. 엽면적은 Control이 4.8cm, Positive control이 B18 처리, B24 처리, B18과 B24 혼합처리에 대하여 4.7cm, 4.1cm, 4.6cm를 기록하였으며, Negative control은 각각 0.3cm, 0.9cm, 1.1cm를 기록하였음. 병원균과 길항균을 함께 처리하였을 때, 대부분의 처리구가 Control과 Positive control보다는 적지만 Negative control보다 높은 엽면적 지수를 기록하여 병징을 회복한 것으로 판단됨[표4-9],[표4-10],[그림4-31C],[그림4-32C],[그림4-33].

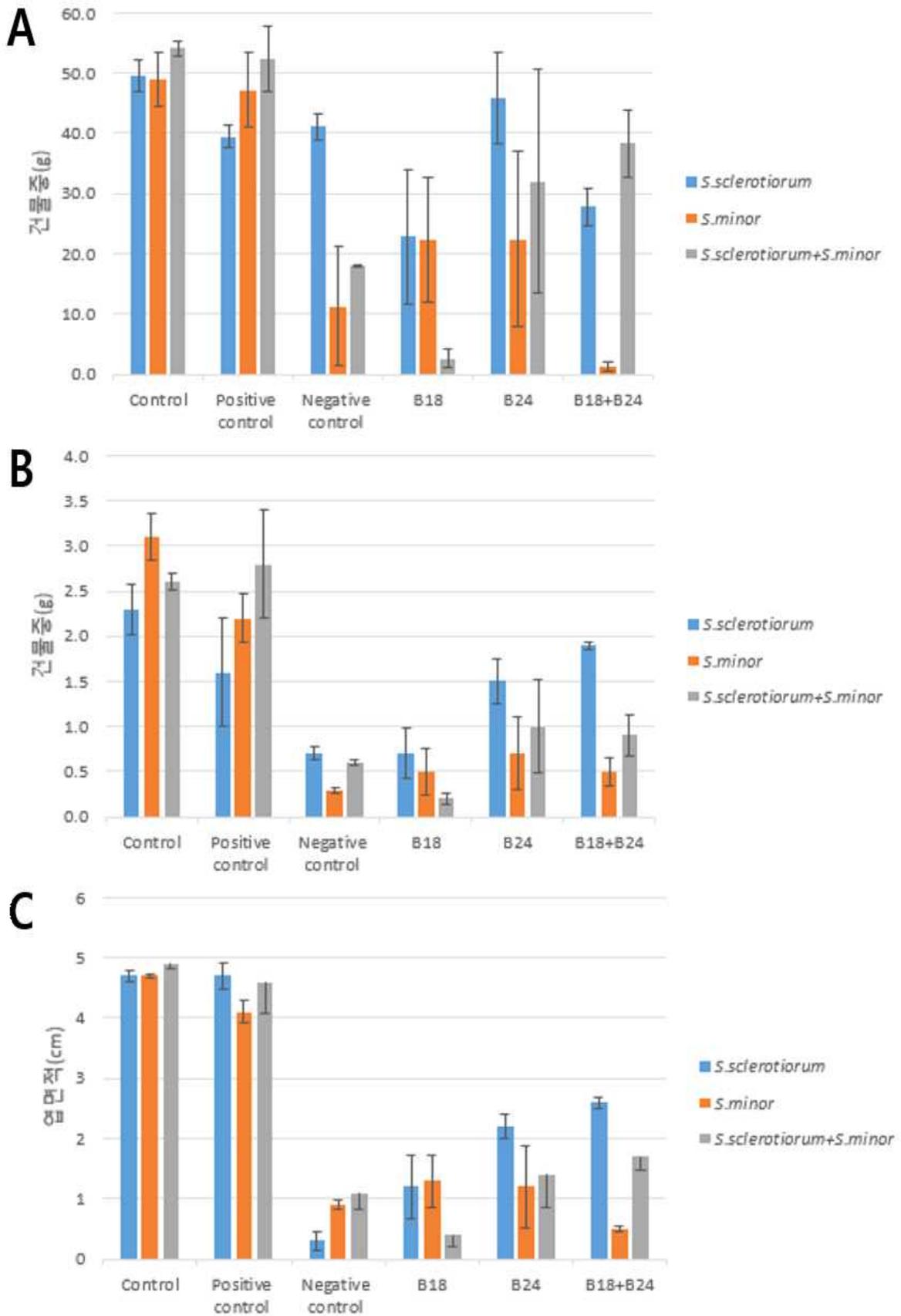
1차 작물 실험 결과 병원균에 길항균을 처리하였을 시, 병징을 억제하는 것으로 판단됨. 병원성은 *S. sclerotiorum*보다 *S. minor*가 상추에 대하여 균핵병을 유발하는 병원성이 더 높은 것으로 판단되며, 길항균을 비교하였을 때, B18보다 B24가 길항력이 더 높은 것으로 판단됨. 하지만, 기내 실험 결과에서 B18이 더 높은 길항력을 보인 결과와 상이한 결과를 보임. 길항균을 침지하였을 때 보다 관주 처리하였을 시 병징을 억제하는 효과가 높았으며, 혼합하여 사용하였을 시, 단독 처리하였을 때 보다 길항력이 낮아지는 결과를 보임[표4-9],[표4-10],[그림4-31],[그림4-32],[그림4-33],[그림4-34].

[표4-9] 기보유 길항균의 상추 균핵병에 대한 1차 작물 길항성 실험 침지처리 결과

길항균	병원균	<i>S. sclerotiorum</i>			<i>S. minor</i>			<i>S. sclerotiorum</i> + <i>S. minor</i>		
		생체중(g)	건물중(g)	엽면적(cm)	생체중(g)	건물중(g)	엽면적(cm)	생체중(g)	건물중(g)	엽면적(cm)
B18		22.9	0.7	1.2	22.4	0.5	1.3	2.6	0.2	0.4
B24		45.9	1.5	2.2	22.4	0.7	1.2	32.0	1.0	1.4
B18+B24		27.8	1.9	2.6	1.3	0.5	0.5	38.3	0.9	1.7
Control		49.6	2.3	4.7	48.9	3.1	4.7	54.2	2.6	4.9
Positive Control		39.5	1.6	4.7	47.2	2.2	4.1	52.4	2.8	4.6
Negative Control		41.1	0.7	0.3	11.3	0.3	0.9	18.0	0.6	1.1

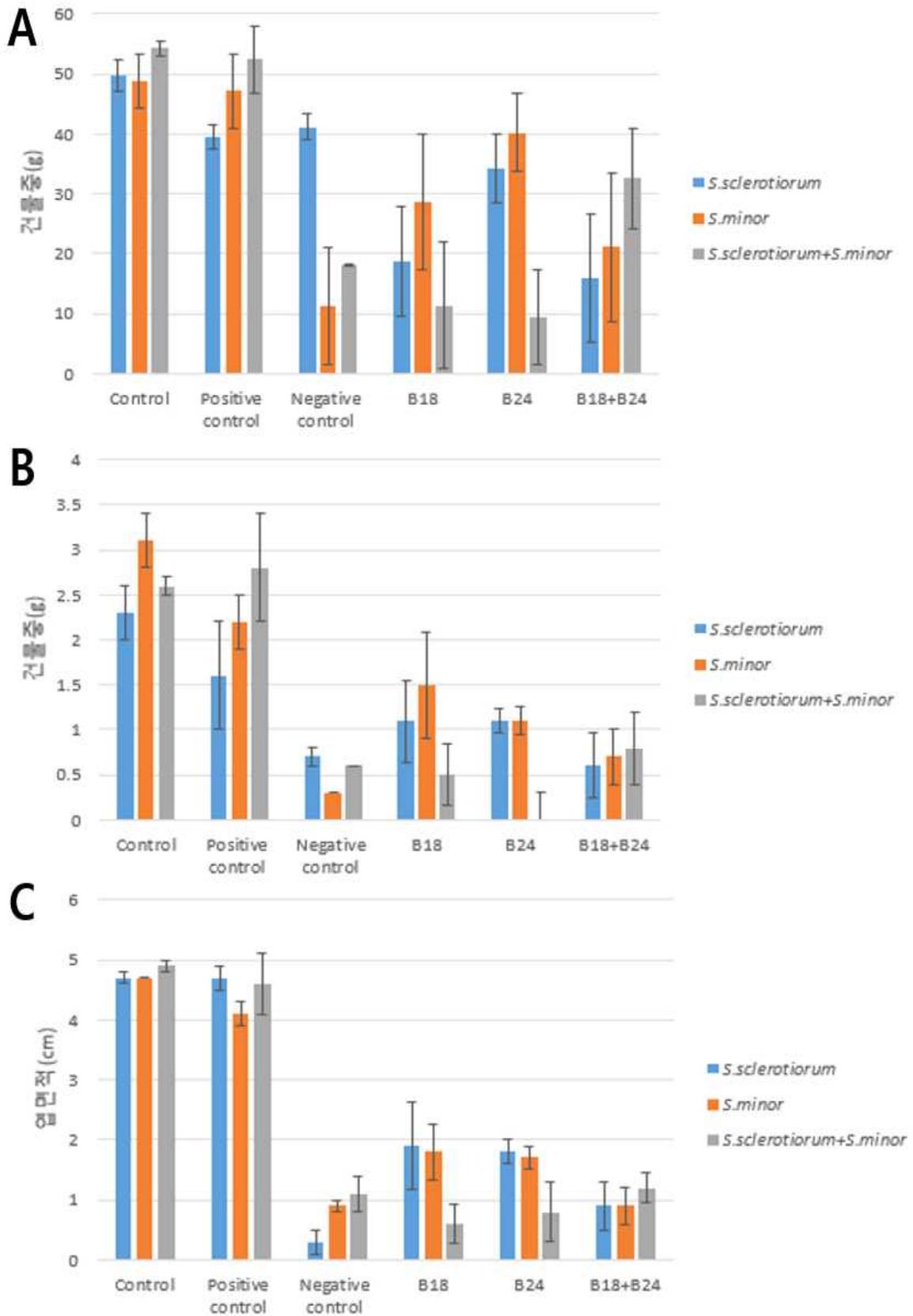
[표4-10] 기보유 길항균의 상추 균핵병에 대한 1차 작물 길항성 실험 관주처리 결과

길항균	병원균	<i>S. sclerotiorum</i>			<i>S. minor</i>			<i>S. sclerotiorum</i> + <i>S. minor</i>		
		생체중(g)	건물중(g)	엽면적(cm)	생체중(g)	건물중(g)	엽면적(cm)	생체중(g)	건물중(g)	엽면적(cm)
B18		18.6	1.1	1.9	28.7	1.5	1.8	11.4	0.5	0.6
B24		34.2	1.1	1.8	40.2	1.1	1.7	9.3	0.5	0.8
B18+B24		15.9	0.6	0.9	21.1	0.7	0.9	32.5	0.8	1.2
Control		49.6	2.3	4.7	48.9	3.1	4.7	54.2	2.6	4.9
Positive Control		39.5	1.6	4.7	47.2	2.2	4.1	52.4	2.8	4.6
Negative Control		41.1	0.7	0.3	11.3	0.3	0.9	18.0	0.6	1.1



\* A : 생체중, B : 건물중, C : 엽면적

[그림4-31] 기보유 길항균의 상추 균핵병에 대한 1차 작물 길항성 실험 침지처리 결과



\* A : 생체중, B : 건물중, C : 엽면적

[그림4-32] 기보유 길항균의 상추 균핵병에 대한 1차 작물 길항성 실험 관주처리 결과



[그림4-33] 기보유 길항균의 상추 균핵병에 대한 1차 작물 길항성 실험 침지 처리 결과



[그림4-34] 기보유 길항균의 상추 균핵병에 대한 1차 작물 길항성 실험 관주 처리 결과

## ② 2차 작물 실험 결과

2차 작물 실험 결과 아무것도 처리하지 않은 Control은 49.6g의 생체중을 기록하였으며, Positive control은 B18 처리, B24 처리, B18과 B24 혼합처리에 대하여 각각 40.3g, 53.1g, 59.8g을 기록하였음. Negative control은 각각 15.5g, 5.3g, 11.1g의 생체중을 기록하여 Control과 Positive control에 비해 낮은 생체중을 기록하였음. 병원균과 길항균을 함께 처리한 처리구를 비교하였을 때, 각각 병원균에 따라 길항균 처리구의 생체중이 상이한 결과를 기록하였음. 관주 처리구의 생체중 또한 각각의 병원균에 따라 길항균 처리구의 생체중이 상이한 결과를 기록하였으나, 혼합관주한 처리구가 가장 높은 평균값의 생체중을 기록하였음. 생체중의 평균을 비교하였을 시 관주 처리구의 생체중이 가장 높은 48.3g을 기록하였음, 이는 1차 작물 실험결과의 침지 처리가 관주 처리 보다 생체중이 높았던 결과와 상이함[표4-11],[표4-12],[그림4-35A],[그림4-36A],[그림4-38]. 건물중은 Control이 1.2g을 기록하였으며, Positive control은 0.9g, 0.9g, 1.2g을 기록하였음. Negative control은 0.6g, 0.4g, 0.6g을 기록하였으며, *S. minor*에 처리한 Negative control이 가장 낮은 건물중을 기록하였음. 침지 처리구 또한 *S. minor*에 길항균을 처리한 처리구가 *S. sclerotiorum*에 길항균을 처리한 처리구 보다 낮은 건물중을 기록하였음. 건물중 또한 생체중과 마찬가지로 침지 처리구 보다 관주 처리가 더 높은 건물중을 기록하였음[표4-10],[표4-11],[그림4-35B],[그림4-36B],[그림4-38]. 엽면적은 Control이 3.2cm, Positive control이 B18 처리, B24 처리, B18과 B24 혼합처리에 대하여 각각 2.3cm, 1.9cm, 2.0cm를 기록하였으며, Negative control이 1.3cm, 1.1cm, 1.3cm를 기록하였음. 대부분의 길항균 처리구는 Negative control 보다 높은 엽면적 지수를 기록하였으며, Positive control과 비교하였을 때도 비슷하거나 높은 엽면적 지수를 기록하였음. 이를 통해 병원균을 상당수 억제했다는 것을 알 수 있음[표4-10],[표4-11],[그림4-35C],[그림4-36C],[그림4-37],[그림4-38].

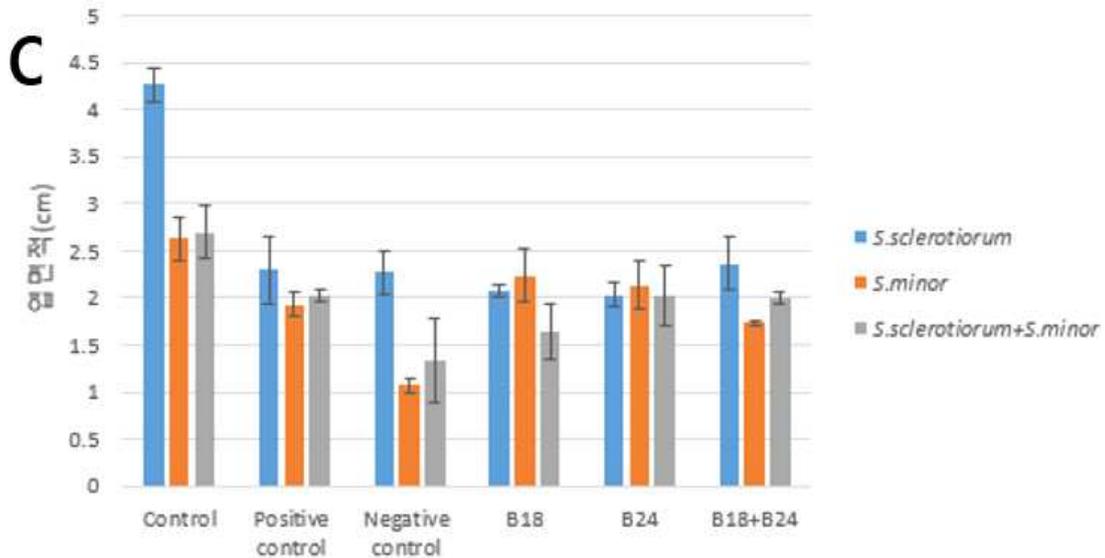
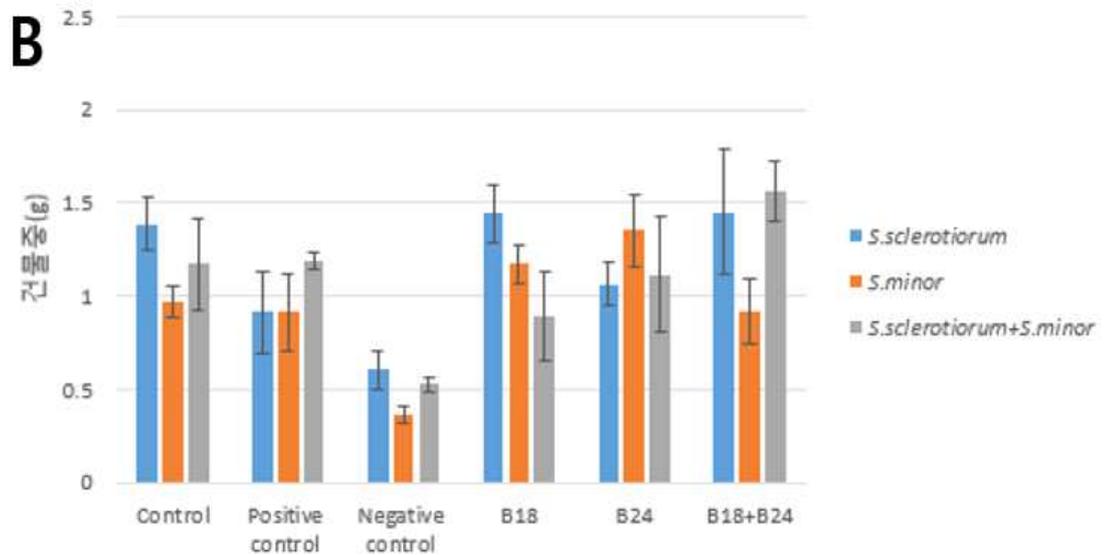
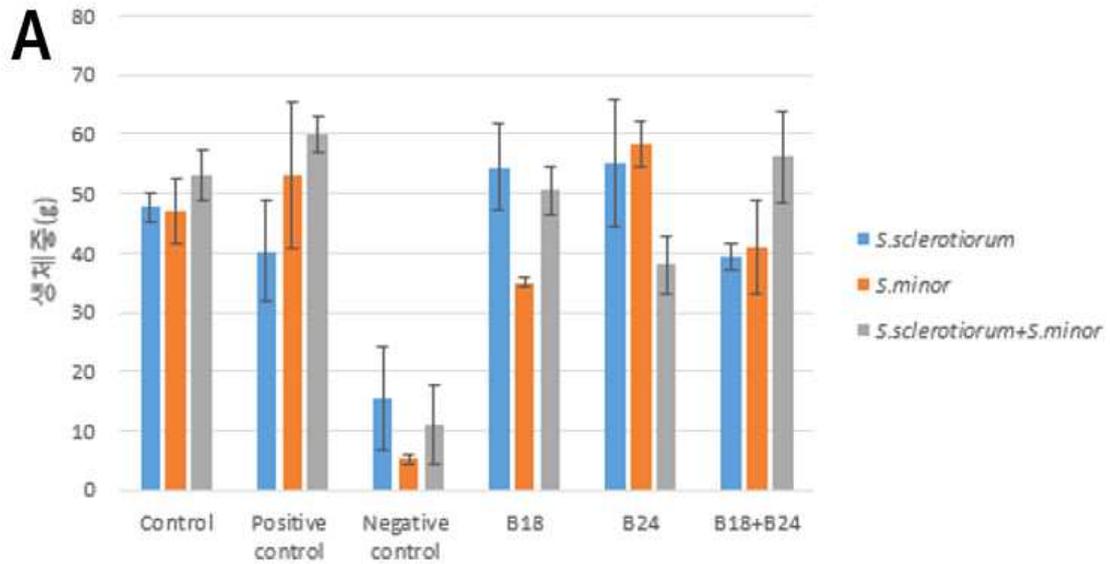
2차 작물 실험 결과 병원균에 길항균을 처리하였을 시, 모두 1차 작물 실험과 동일하게 병징을 억제하는 것으로 판단됨. 병원성 또한 1차 작물 실험과 마찬가지로 *S. sclerotiorum*보다 *S. minor*가 상추에 대하여 균핵병을 유발하는 병원성이 더 높은 것으로 판단되나, 길항균을 비교하였을 때, B18과 B24 처리의 유의한 결과는 보이지 않았음. 마찬가지로 1차 작물 실험에서는 혼합처리 시 길항력이 낮아진 결과를 보였지만, 2차 실험에서는 혼합 처리 시 생체중과 건물중이 유의하게 증가한 것을 확인함[표4-9],[그림4-32],[그림4-33],[그림4-34]. 이러한 1차 실험과 2차 실험 결과가 상이하게 나온 것은 상추의 생육 조건과 실험 장소의 기후, 온도에 따른 생육의 차이와 병원균의 발생조건 차이인 것으로 판단됨. 향후 이러한 실험 조건을 수정하여 1차와 2차 실험의 결과를 보충하며, 확실한 병징 유발을 통해 보유한 길항균의 길항력을 검정할 예정임. 또한, 토양 시료를 추가로 수집하여 분리한 길항균 및 현재 선발한 길항균 11종을 pot실험을 통하여 작물 길항 실험을 진행할 예정임.

[표4-11] 기보유 길항균의 상추 균핵병에 대한 2차 작물 길항성 실험 침지처리 결과

길항균	병원균	<i>S. sclerotiorum</i>			<i>S. minor</i>			<i>S. sclerotiorum</i> + <i>S. minor</i>		
		생체중(g)	건물중(g)	엽면적(cm)	생체중(g)	건물중(g)	엽면적(cm)	생체중(g)	건물중(g)	엽면적(cm)
B18		54.4	1.4	2.1	55.1	1.2	2.2	39.3	0.9	1.6
B24		34.9	1.1	2.0	58.4	1.4	2.1	41.1	1.1	2.0
B18+B24		50.5	1.5	2.4	38.0	0.9	1.7	56.1	1.6	2.0
Control		48.6	1.4	4.3	47.1	1.0	2.6	53.1	1.2	2.7
Positive Control		40.3	0.9	2.3	53.1	0.9	1.9	59.8	1.2	2.0
Negative Control		15.5	0.6	1.3	5.3	0.4	1.1	11.1	0.6	1.3

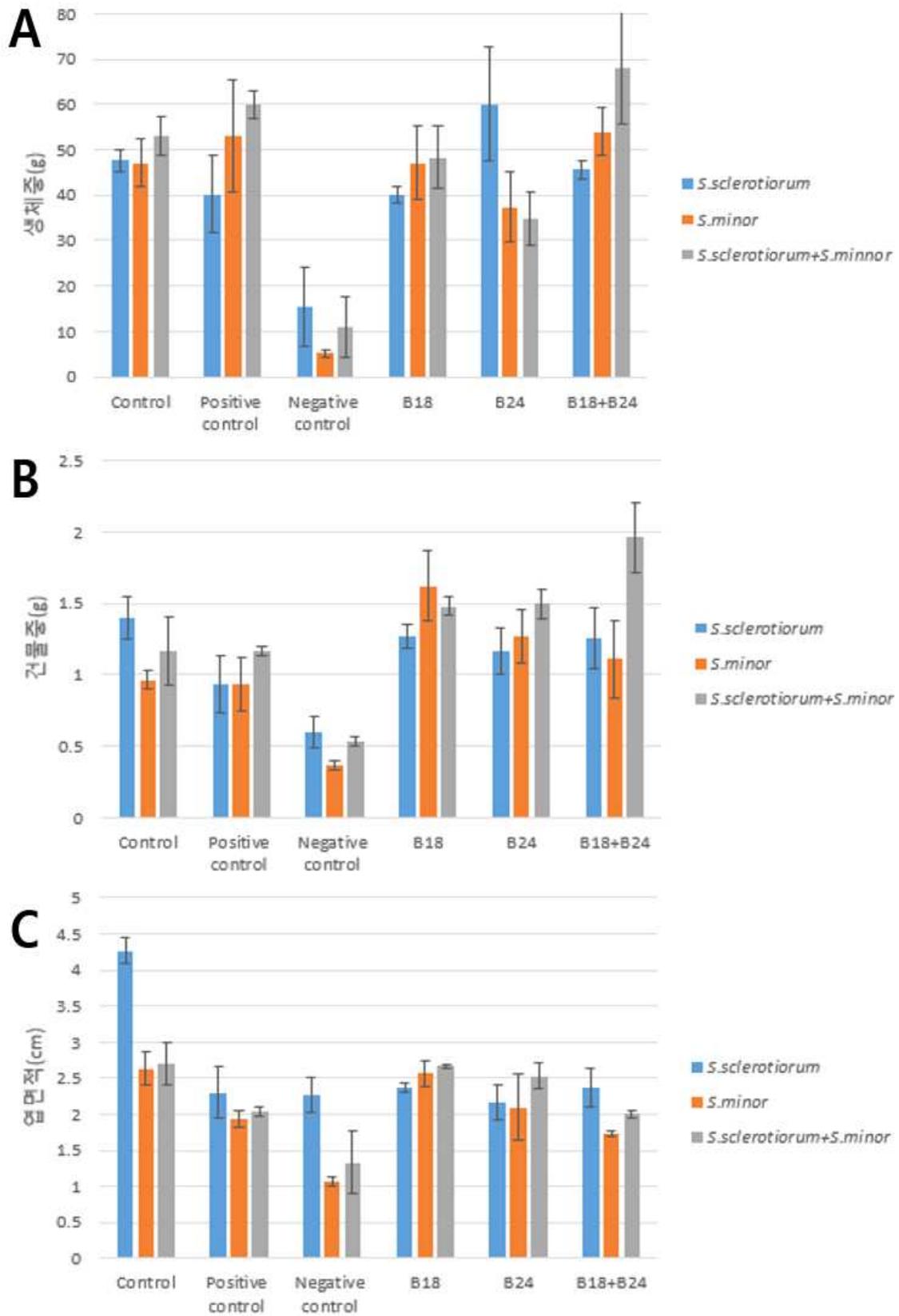
[표4-12] 기보유 길항균의 상추 균핵병에 대한 2차 작물 길항성 실험 관주처리 결과

길항균	병원균	<i>S. sclerotiorum</i>			<i>S. minor</i>			<i>S. sclerotiorum</i> + <i>S. minor</i>		
		생체중(g)	건물중(g)	엽면적(cm)	생체중(g)	건물중(g)	엽면적(cm)	생체중(g)	건물중(g)	엽면적(cm)
B18		40.2	1.3	2.4	60.0	1.6	2.6	45.6	1.5	2.7
B24		47.0	1.2	2.2	37.4	1.3	1.3	53.9	1.5	2.5
B18+B24		48.4	1.3	2.4	34.9	1.1	1.1	68.1	2.0	2.0
Control		48.6	1.4	4.3	47.1	1.0	2.6	53.1	1.2	2.7
Positive Control		40.3	0.9	2.3	53.1	0.9	1.9	59.8	1.2	2.0
Negative Control		15.5	0.6	1.3	5.3	0.4	1.1	11.1	0.6	1.3



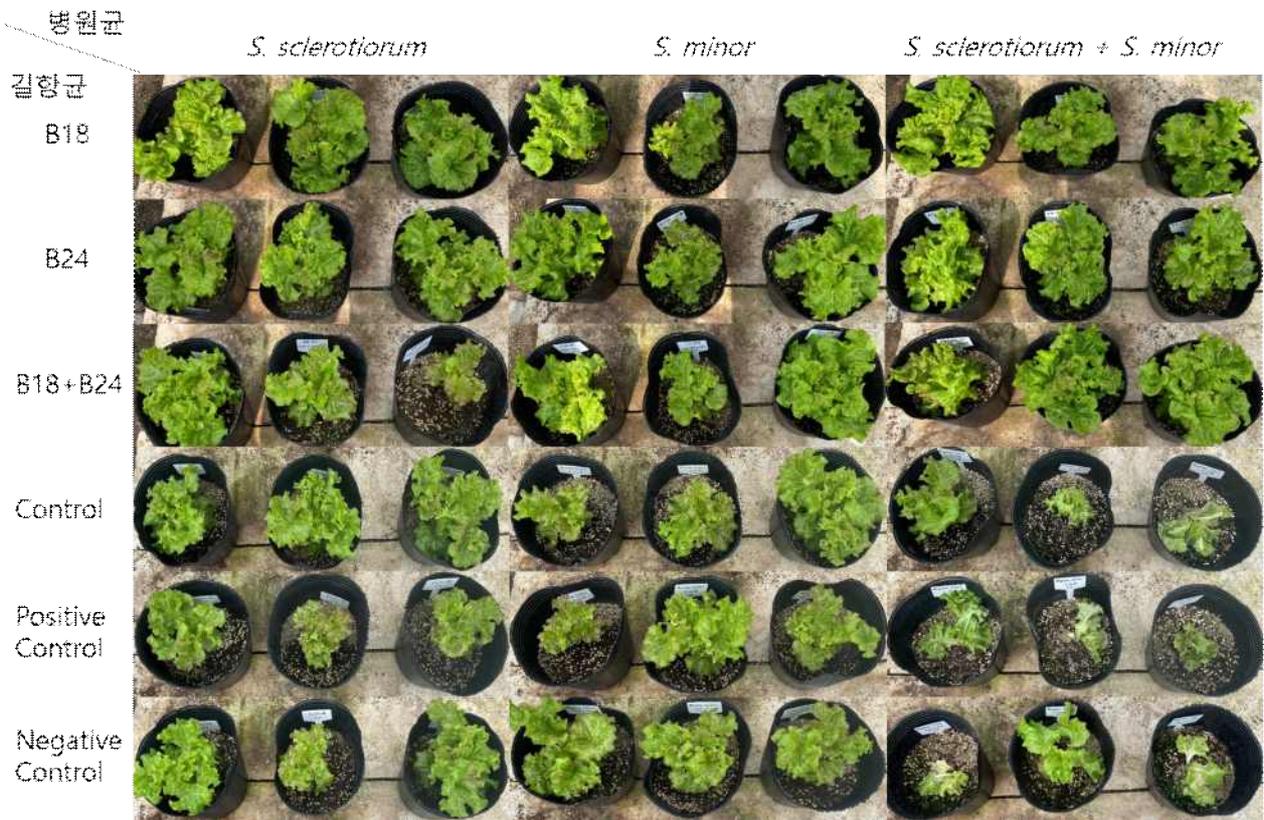
\* A : 생체중, B : 건물중, C : 엽면적

[그림4-35] 기보유 길항균의 상추 균핵병에 대한 2차 작물 길항성 실험 침지처리 결과



\* A : 생체중, B : 건물중, C : 엽면적

[그림4-36] 기보유 길항균의 상추 균핵병에 대한 2차 작물 길항성 실험 관주처리 결과



[그림4-37] 기보유 길항균의 상추 균핵병에 대한 2차 작물 길항 실험 침지 처리 결과



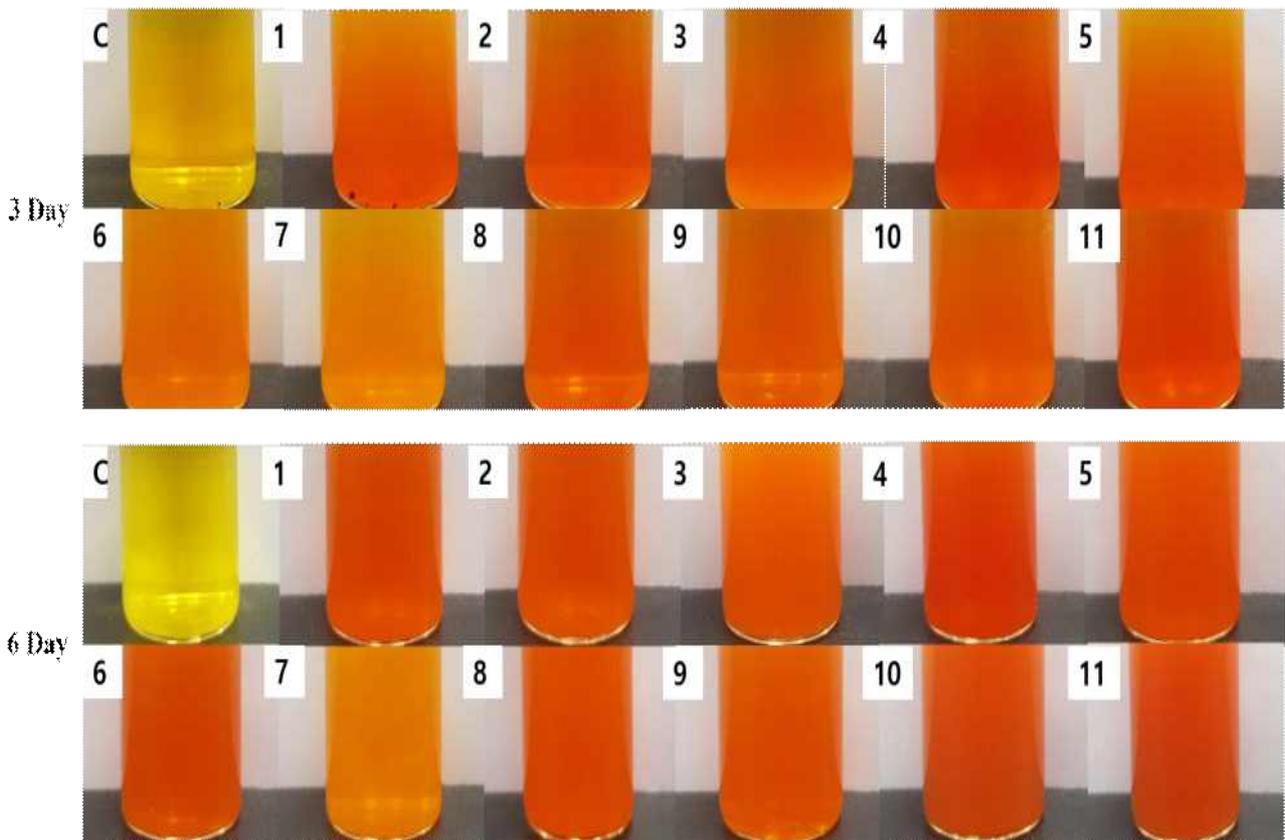
[그림4-38] 기보유 길항균의 상추 균핵병에 대한 2차 작물 길항 실험 관주 처리 결과

마) 선발된 균주의 Biochemical test

① Ammonia production test

선발된 세균을 TSB 배지에 28℃, 130rpm, 24시간 배양한 후 배양한 세균은 각각 30ml의 peptone water broth (4%)에 50 $\mu$ l씩 접종하여 6일 동안 28℃, 130rpm으로 배양하면서 3일 간격으로 2회 조사함. 8.5ml의 증류수에 2ml의 세균 배양액, 1ml의 Nessler's reagent (SAM, KOREA)를 혼합하여 5분 동안 반응시켜 yellow color에서 orange/red color로 변화하는 것으로, ammonia 생성 여부를 확인함.

상추 재배 토양에서 선발된 세균 11종 모두 yellow color에서 orange/red color로 변화하여 Ammonia를 생성하는 것을 확인함[그림4-39],[표4-13]. 일반적으로 토양에서 질소는 미생물에 의해 분해되어 암모니아태 질소로 변화되어 존재함. 질소는 식물 생육에 있어서 필요한 원소 중 하나로, 식물의 신장, 엽면적 확장 및 분얼 촉진에 영향을 주는 것으로 알려져 있어 식물생육에 가장 중요한 필수 원소 중 하나임.



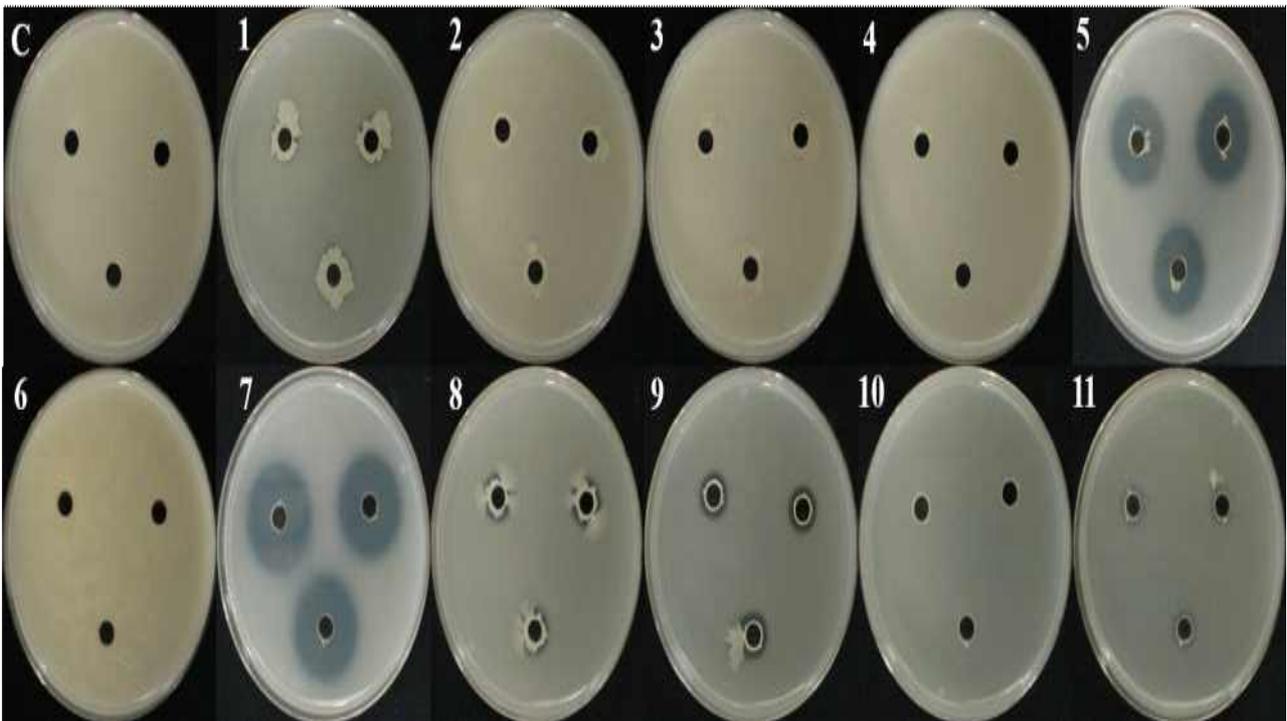
C: control, 1: ICS-2B, 2: HCS-1B, 3: HCS-4B, 4: WJS-5B, 5:WJR-2B, 6: WJR-4B, 7: WJR-5B 8: WJR-6B 9: CCR-3B, 10: YJS-4B, 11: L3-3S-2B

[그림4-39] 선발된 세균의 Ammonia production test 결과

② Phosphate solubilization test

Pikovskaya's agar (Dextrose 10.0g, Calcium phosphate 5.0g, Yeast extract 0.5g, Ammonium sulphate 0.5g, Potassium chloride 0.2g, Magnesium sulphate 0.1g, Manganese sulphate 0.0001g, Ferrous sulphate 0.0001g, Agar 15.0g/1L)에 cork borer (Φ : 5mm)를 이용하여 일정한 크기의 well을 만들었음. 선발된 세균을 각각 TSB 배지에 28℃, 130rpm, 24시간 배양한 후 20μl씩 well에 접종함. 28℃, 72h 배양한 후 well 주변의 clear zone 생성 여부로 불용성 인산 가용화 능력을 확인함.

실험 결과 WJR-2B, WJR-4B, CCR-3B가 각각 1.42cm, 2.24cm, 1.17cm의 clear zone을 형성하는 것으로 나타났으며 인산 가용화 능력을 확인함[그림4-40],[표4-13]. Phosphate는 식물 성장에 필요한 영양소 중에서 질소 다음으로 중요한 영양요소이며 식물의 거의 모든 주요 대사 과정에서 중요한 역할을 담당함. 토양에서 인산은 대부분 흡수할 수 없는 불용성 형태로 존재하기 때문에 식물 생장의 주요 제한 인자로 작용하고 있음. 이러한 불용성 형태의 인산을 가용화하는 것을 인산 가용화 미생물이라고 함. 인산 분해 미생물은 식물의 대표적인 성장 호르몬인 지베렐린과 인돌아세트산을 생성하여 식물 성장을 촉진한다고 보고되고 있음.



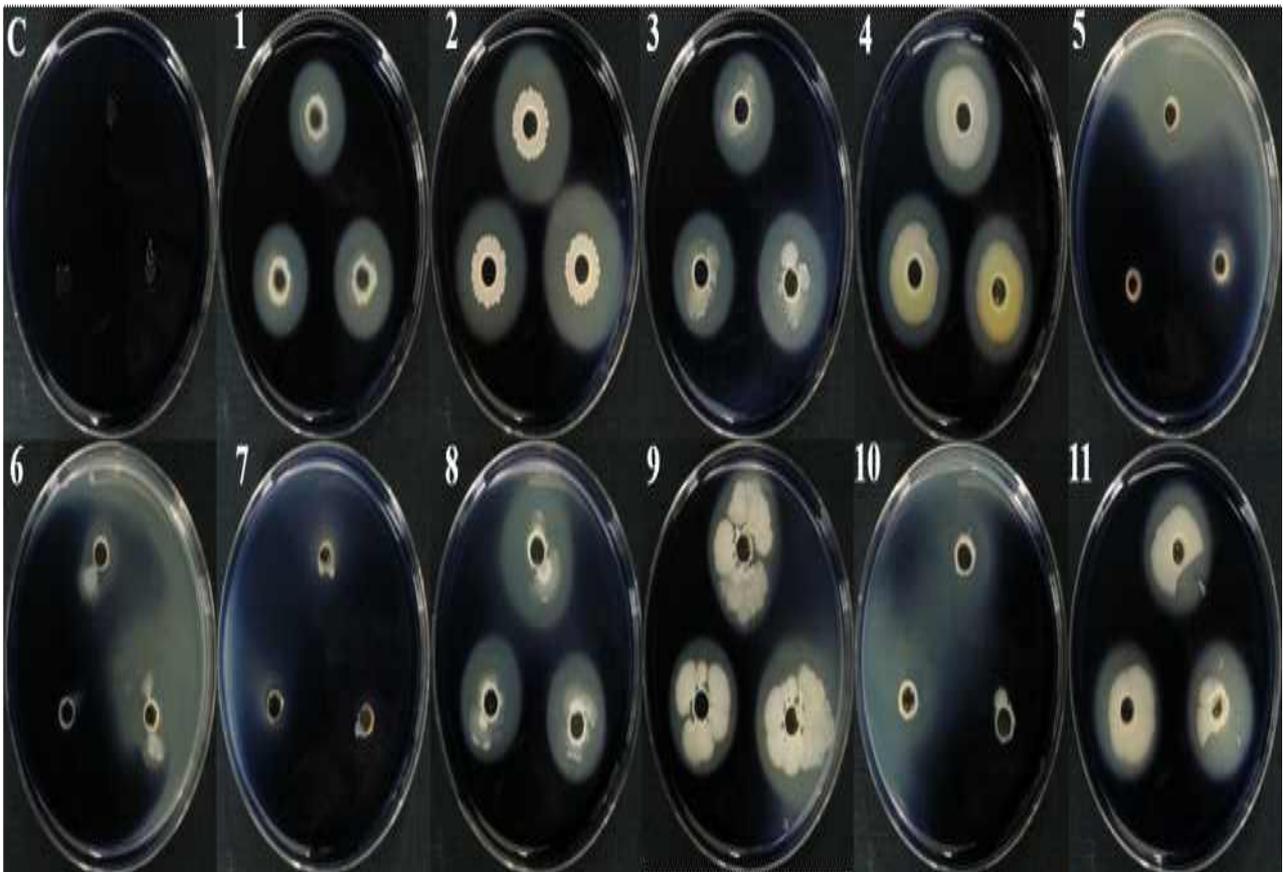
C: control, 1: ICS-2B, 2: HCS-1B, 3: HCS-4B, 4: WJS-5B, 5:WJR-2B, 6: WJR-4B, 7: WJR-5B 8: WJR-6B 9: CCR-3B, 10: YJS-4B, 11: L3-3S-2B

[그림4-40] 선발된 세균의 Phosphate solubilization test 결과

③ Starch hydrolysis test

선발된 세균을 TSB 배지에 28℃, 130rpm, 24시간 액체 배양함. Starch agar (Soluble starch 10.0g, Peptone 5.0g, Beef extract 3.0g, Agar 15.0g/1L)에 cork borer (⌀ : 5mm)를 이용하여 일정한 크기의 well을 만들어 배양된 각각의 세균을 20 $\mu$ l씩 접종하여 28℃에서 72시간 배양함. 배양한 후 3% iodine-potassium iodide를 이용해 plate를 염색하여 clear zone을 확인하여 전분 가수분해 효소의 생성 여부를 확인함.

실험 결과 ICS-2B, HCS-1B, HCS-4B, WJS-5B, WJR-6B, CCR-3B, L3-3S-2B가 각각 2.93cm, 3.12cm, 3.06cm, 3.38cm, 3.03cm, 3.34cm, 2.98cm의 clear zone을 형성하여 전분 가수분해 효소를 생성하는 것을 확인함[그림4-41],[표4-13]. 전분은 식물의 생장 과정에서 중요한 역할을 하며, 에너지 대사를 위해 잎의 엽록체에서 합성되고 성장 단계를 유지하기 위해 줄기, 뿌리, 종자 등의 비광합성기관에서도 합성하는 것으로 알려져 있음.



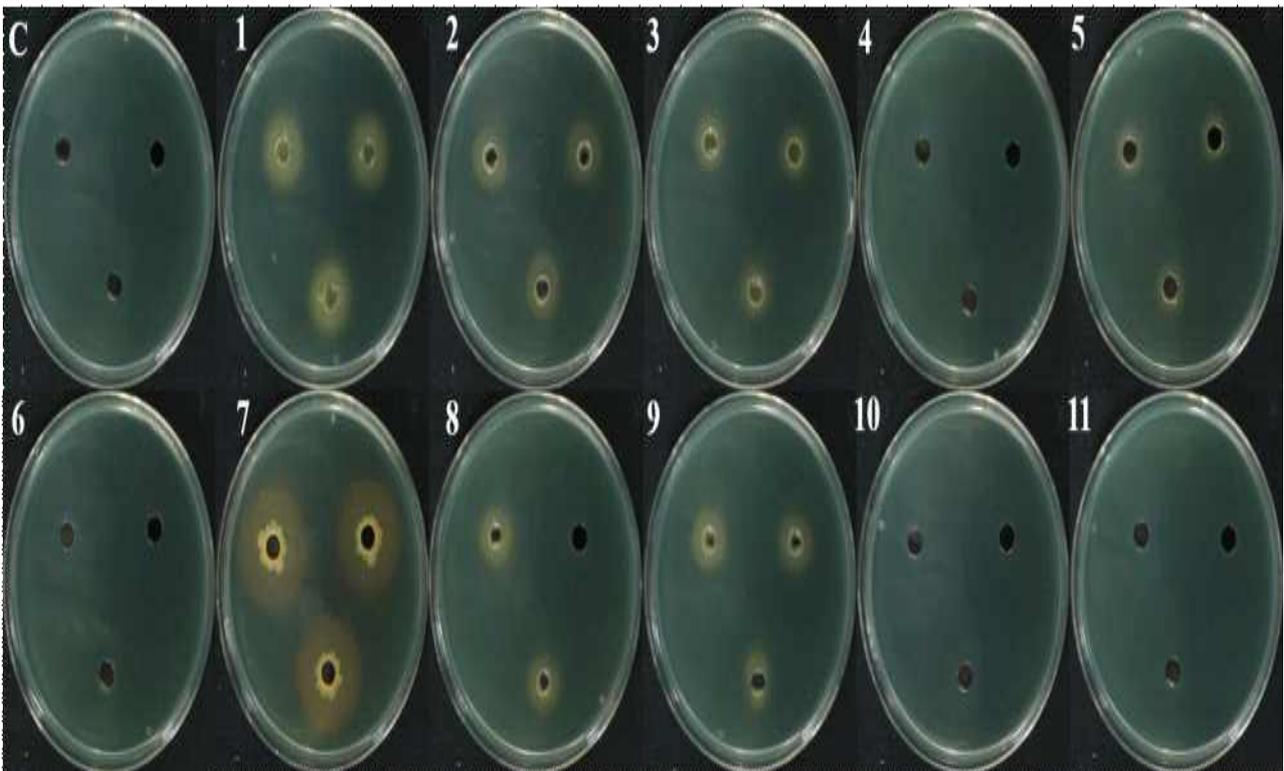
C: control, 1: ICS-2B, 2: HCS-1B, 3: HCS-4B, 4: WJS-5B, 5:WJR-2B, 6: WJR-4B, 7: WJR-5B 8: WJR-6B 9: CCR-3B, 10: YJS-4B, 11: L3-3S-2B

[그림4-41] 선발된 세균의 Starch hydrolysis test 결과

④ Siderophore production test

실험에 사용한 Chrome azurole S (CAS) 배지의 CAS blue solution은 Schwyn and Neilands (1987)이 실험한 방법을 참고하여 준비하였음. CAS blue agar에 cork borer (⊙ : 5mm)를 이용하여 일정한 크기의 well을 만들어 선발한 세균을 각각 20 $\mu$ l씩 접종함. 접종 후 28 $^{\circ}$ C에서 7일간 배양하였음. Blue color의 배지가 yellow/orange color의 clear zone을 생성하는지 확인하여 siderophore의 생성 여부를 확인함.

실험 결과 ICS-2B, HCS-1B, HCS-4B, WJR-2B, WJR-5B, WJR-6B CCR-3B가 각각 1.69cm, 1.53cm, 1.20cm, 1.09cm, 2.89cm, 0.46cm, 1.30cm의 clear zone을 형성하였으며, WJR-5B가 가장 많은 siderophore를 생성하는 것을 확인함[그림4-42],[표4-13]. Siderophore는 미생물이 철을 흡수하기 위해 체외로 분비하는 펩티드성 물질로서 식물 성장 촉진과 상관관계가 있다는 여러 연구결과가 있으며, siderophore의 생성은 식물 성장 촉진 근권박테리아(Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR)의 핵심 요소 중 하나로 알려져 있음. 연구결과에 따르면 완두콩과 대두 종자에 siderophore를 생산하는 pseudomonas를 접종하면 발아, 성장 및 수확량이 증가한다고 보고함.



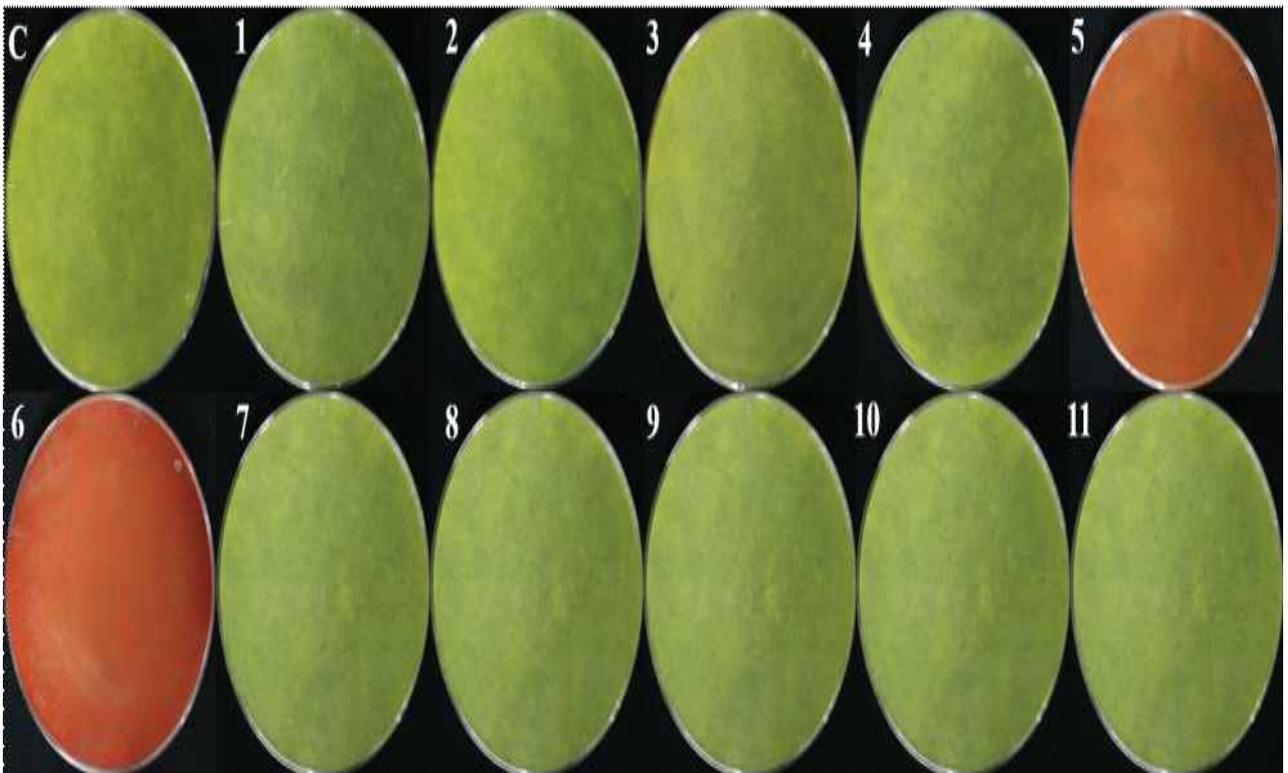
C: control, 1: ICS-2B, 2: HCS-1B, 3: HCS-4B, 4: WJS-5B, 5:WJR-2B, 6: WJR-4B, 7: WJR-5B 8: WJR-6B 9: CCR-3B, 10: YJS-4B, 11: L3-3S-2B

[그림4-42] 선발된 세균의 Siderophore production test 결과

⑤ HCN test

선발된 세균을 glycine (4.4g/1L)이 첨가된 TSA 배지에 각각 30 $\mu$ l씩 도말 하였음. 동시에 0.5% (w/v) picric acid와 1% sodium carbonate를 혼합한 용액에 121 $^{\circ}$ C에서 15분간 멸균한 90 mm filter paper (No.20) 를 침지시킨 후, petri dish 뚜껑에 부착시켜 seeling 함. 그 후 28 $^{\circ}$ C에서 72시간 배양하여 뚜껑에 부착된 filter paper가 yellow color에서 red/brown color로 변화하는 것으로 HCN 생성 여부를 확인함.

Hydrogen cyanide (HCN)을 형성하는지 확인하기 위하여 filter paper 색의 변화를 관찰하였음. 실험 결과 WJR-2B, WJR-4B2개의 균주가 yellow color에서 red/brown color로 변한 것을 확인 하였으며, 이것으로 2개의 균주가 HCN을 생성하는 것을 확인함[그림4-43],[표4-13]. Hydrogen cyanide (HCN)을 생성하는 세균은 식물병원성 세균을 억제하는 것으로 알려져 있으며, 특히, 선충류에 의한 작물 피해가 많은 토양에서 HCN 농축을 사용하면 좋은 효과를 얻을 것으로 기대함.



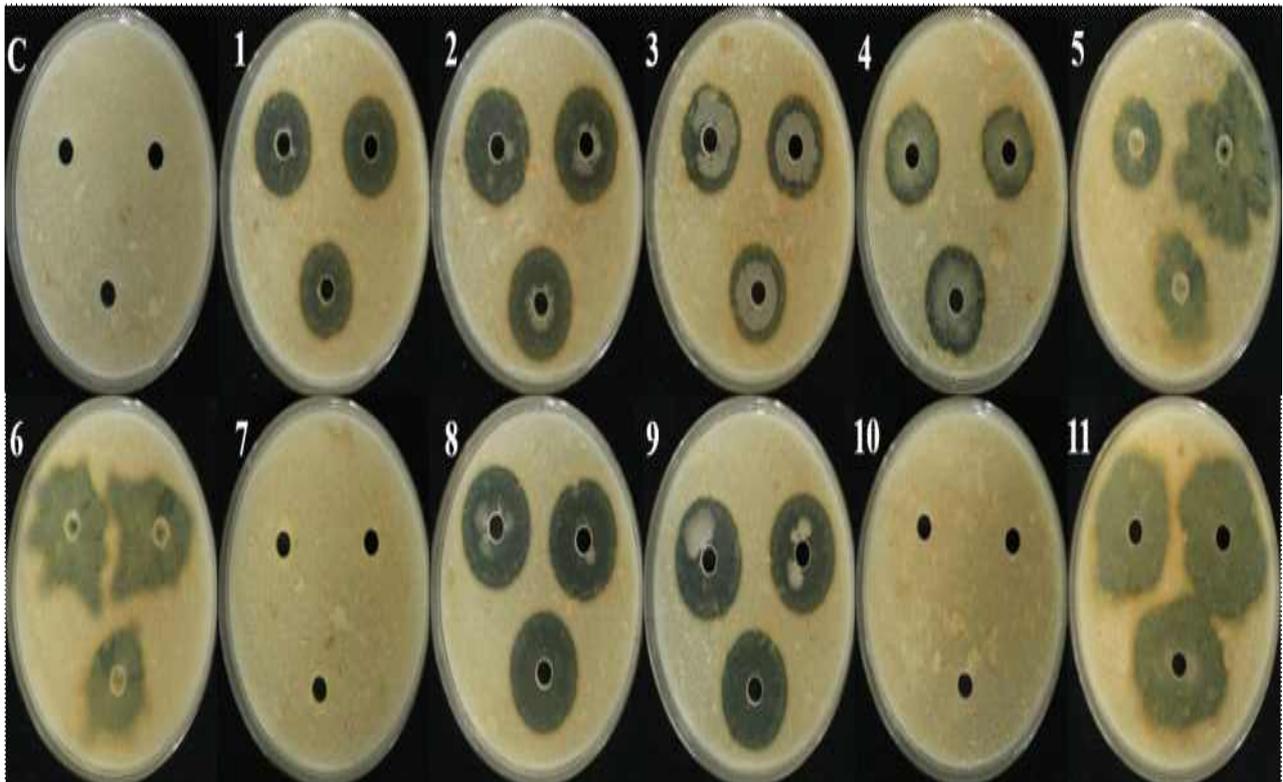
C: control, 1: ICS-2B, 2: HCS-1B, 3: HCS-4B, 4: WJS-5B, 5:WJR-2B, 6: WJR-4B, 7: WJR-5B 8: WJR-6B 9: CCR-3B, 10: YJS-4B, 11: L3-3S-2B

[그림4-43] 선발된 세균의 HCN test 결과

⑥ Protease production test

선발된 세균의 protease 생성 여부를 확인하기 위하여 실험을 진행함. 선발된 세균을 각각 TSB 배지에 28℃, 130rpm, 24시간 액체 배양하여 skim milk agar (skim milk powder 100.0g, peptone 5.0g, agar 15.0g/1L) 배지에 cork borer (⊙ : 5mm)를 이용하여 일정한 크기의 well을 만들어 배양된 각각의 세균을 20 $\mu$ l씩 접종함. 28℃에서 72시간 배양한 후 well 주변의 clear zone을 확인하여, 단백질 분해효소 생성 여부를 확인함.

실험 결과 WJR-5B와 YJS-4B를 제외한 9종 모두 clear zone을 형성하였으며, 평균 2.79cm 크기의 clear zone을 형성하여 단백질 분해효소를 생성하는 것으로 확인함[그림4-44],[표4-13]. WJR-6B가 가장 큰 2.94cm 크기의 clear zone을 형성하여 가장 많은 단백질 분해효소를 생성하는 것을 확인함. 단백질 분해효소는 단백질을 이루고 있는 아미노산간의 펩티드 결합을 가수분해하는 효소임. 단백질 분해효소는 식물의 발달조절이나 광합성에 영향을 주는 것으로 알려져 있으며, bacteria와 fungi의 단백질의 경우 생태계의 탄소와 질소의 순환에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있음. 특히, 식물에서 해충과 병원성균에 대한 방어제 및 억제제로 사용하기 위해 이용되고 있다고 보고되고 있음.



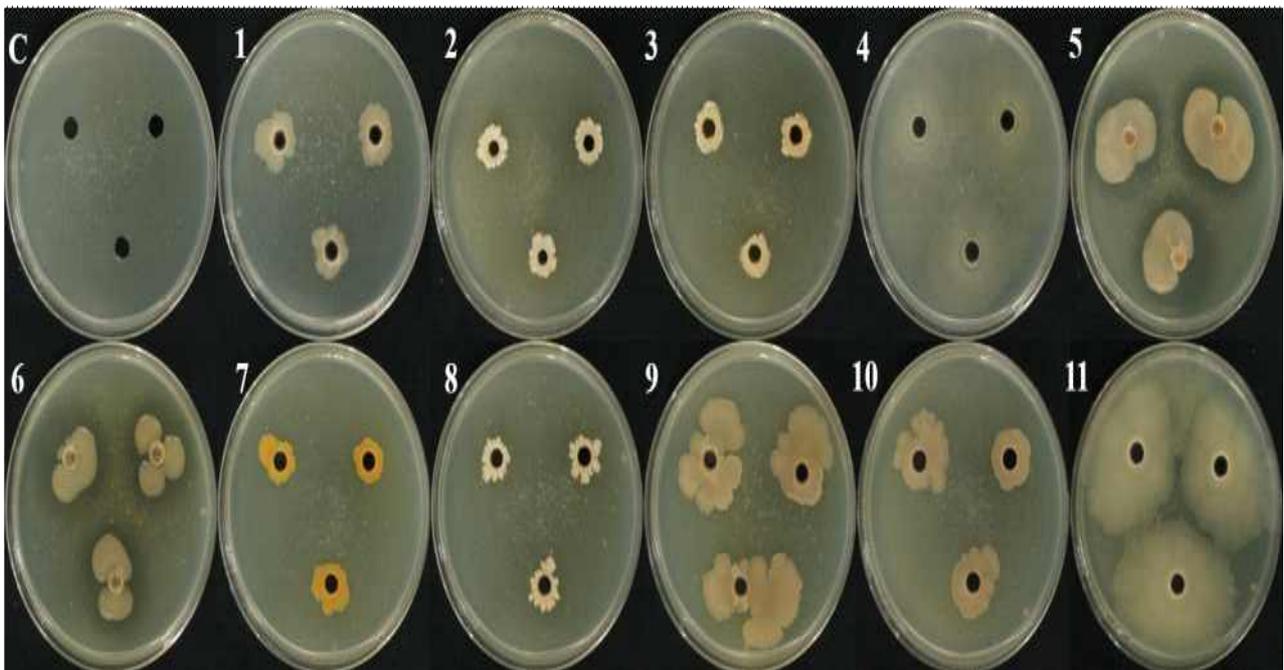
C: control, 1: ICS-2B, 2: HCS-1B, 3: HCS-4B, 4: WJS-5B, 5:WJR-2B, 6: WJR-4B, 7: WJR-5B 8: WJR-6B 9: CCR-3B, 10: YJS-4B, 11: L3-3S-2B

[그림4-44] 선발된 세균의 Protease production test 결과

⑦ Chitinase production test

선발된 세균의 항진균 물질인 chitinase의 생성 여부를 확인하기 위하여 colloidal chitin을 제조하여 사용하였음. 제조 방법은 chitin from shrimps shells (Sigma aldrich) 20g을 HCl 350ml에 완전히 녹여 4℃ 냉장고에서 24시간 정치하였음. 그 후 거즈로 filtering 하여 -20℃에서 보관한 2L의 Ethanol에 빠르게 혼합하였음. Chitin 현탁액을 centrifuse에 10,000rpm, 20분간 원심분리하였음. 원심분리하여 얻어진 상층액은 버리고 pellet은 pH 7.0이 될 때까지 멸균수로 세척하였음. 그 후 얻어진 pellet은 동결건조하여 -20℃에서 보관하였음. Colloidal chitin agar는 TSA 배지에 colloidal chitin 2% (w/v)를 첨가하여 제조하였음. Cork borer (Φ : 5mm)를 이용하여 well을 만들어 선발된 세균을 각각 20 $\mu$ l씩 접종하여 28℃에서 7일간 배양하였음. Chitinase의 분비는 well 주변부의 clear zone을 측정하여 확인하였음.

선발된 세균이 chitinase 효소를 생성하는지 확인하기 위하여 실험을 진행하였음. 선발한 세균 중 WJR-2B와 WJR-4B가 각각 3.69cm와 3.06cm 크기의 clear zone을 형성하여 chitinase 효소 생산 능력을 확인하였음[그림4-45],[표4-13]. Chitinase는 선충의 발생을 억제하며, fungi 세포벽의 주성분인 chitin의 가수분해를 촉매하여 병원성 곰팡이의 성장을 억제하는 것으로 알려져 있음. 최근에는 chitinase 효소를 이용하여 병해충관리나 토양개량 및 작물생육에 도움이 되는 친환경 유기 농자재를 개발하고 있음.



C: control, 1: ICS-2B, 2: HCS-1B, 3: HCS-4B, 4: WJS-5B, 5:WJR-2B, 6: WJR-4B, 7: WJR-5B 8: WJR-6B 9: CCR-3B, 10: YJS-4B, 11: L3-3S-2B

[그림4-45] 선발된 세균의 Chitinase production test 결과

[표4-13] 선발한 길항 세균의 7가지 Biochemical test 결과 요약

Name	Species	PGPR enzyme				Antagonistic enzyme		
		Ammonia production	Phosphate solubilization	Starch hydrolysis	Siderophore production	HCN	Protease	Chitinase production
ICS-2B	<i>Bacillus subtilis</i>	+	-	++	+	-	++	-
HCS-1B	<i>Bacillus megaterium</i>	+	-	+++	+	-	++	-
HCS-4B	<i>Bacillus subtilis</i>	+	-	+++	+	-	++	-
WJS-5B	<i>Bacillus wiedmannii</i>	+	-	+++	-	-	++	-
WJR-2B	<i>Pseudomonas granadensis</i>	+	+	-	+	+	++	+++
WJR-4B	<i>Pseudomonas granadensis</i>	+	-	-	-	+	++	+++
WJR-5B	<i>Pantoea allii</i>	+	++	-	++	-	-	-
WJR-6B	<i>Bacillus megaterium</i>	+	-	+++	+	-	++	-
CCR-3B	<i>Pseudomonas granadensis</i>	+	+	+++	+	-	++	-
YJS-4B	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	+	-	-	-	-	-	-
L3-3S-2B	<i>Bacillus wiedmannii</i>	+	-	++	-	-	+++	-

\* - : inactivity, + : activity(0~2), ++ : activity(2~3), +++ : activity(3~4)

### 3) 상추 포트 실험을 통한 상추균핵병 방제 효과 검정

#### 가) 상추 균핵병 억제 검정을 위한 Pot assay

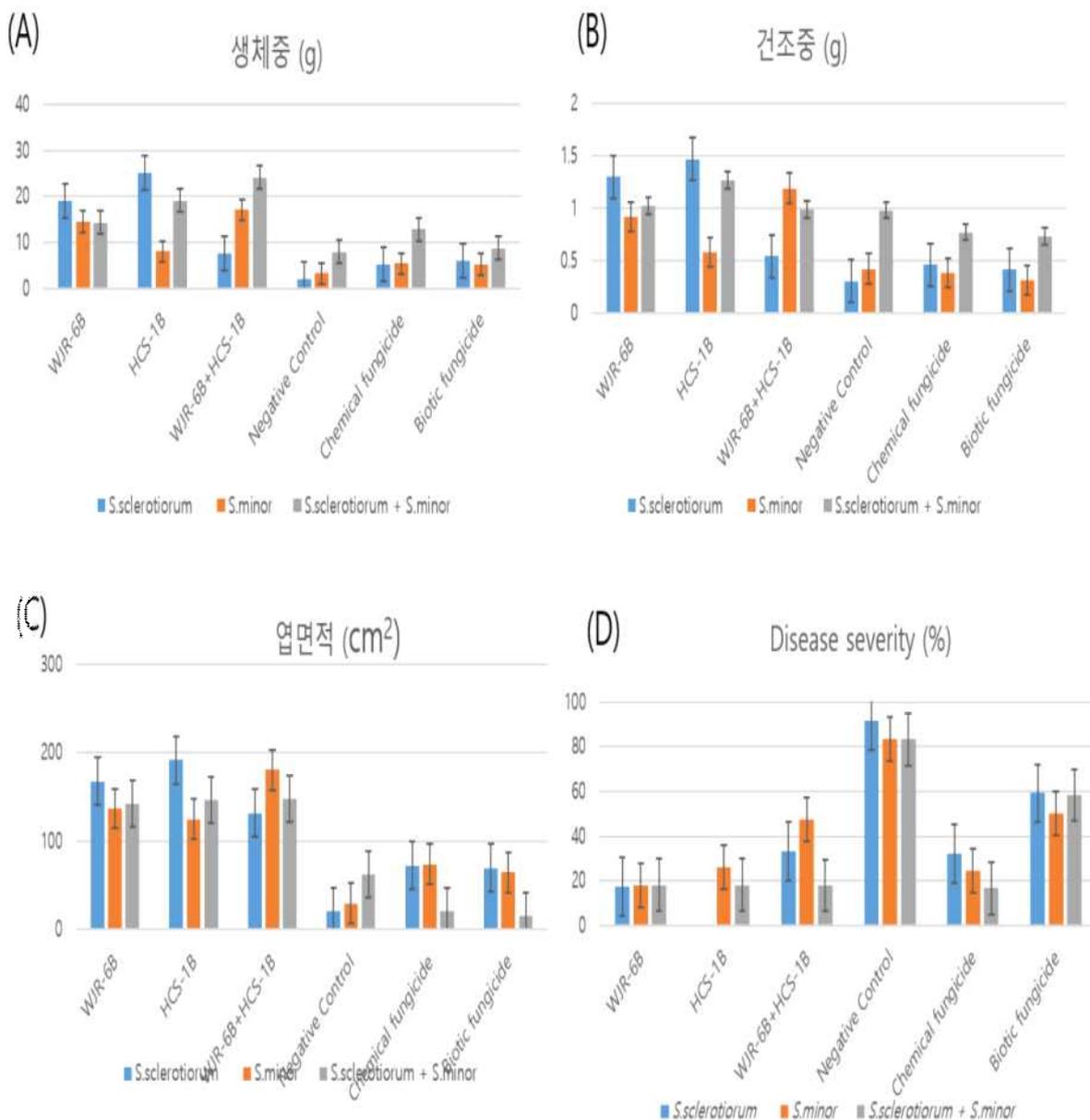
*in vitro* 내의 상추 균핵병과의 길항 검정에서 선발된 세균인 WJR-6B (*Bacillus megaterium*), HCS-1B (*Bacillus megaterium*) 균주를 이용하여 *Sclerotinia sclerotiorum*와 *Sclerotinia minor* 대상으로 상추에서의 균핵병 병징을 억제 또는 지연하는지 확인하기 위하여 Pot 실험을 진행하였음. *S. sclerotiorum* 및 *S. minor*을 Potato Dextrose Agar (PDA) 배지에 접종하여 실험에 사용하였으며 25℃, 7일 동안 배양한 후 멸균수를 이용하여 Stripper로 균사체를 긁어내어 현탁액 1x10<sup>7</sup>spore/ml을 준비하였음. 길항 균주인 WJR-6B (*B. megaterium*), HCS-1B (*B. megaterium*)은 1.5L Tryptic Soy Broth(TSB) 배지에 접종한 후 진탕배양기(130 rpm, 28℃)에서 48시간동안 배양하여 세균의 밀도 1x10<sup>7</sup>cfu/ml로 맞추어 실험에 사용하였으며, 상추는 적치마(동오시드㈜) 품종을 사용하였으며, Pot의 규격은 11호, 토양 조성은 일반 흙과 원예용 상토(바로커)를 2:1 비율로 혼합 후 Pot에 200g씩 담아 사용하였음.

실험 조건은 Control, Positive control, Negative control, 길항균 처리, 길항균 선처리, 길항균 후처리로 나누어 진행하였음. Control(무처리)과 균핵병원균인 *S. sclerotiorum*, *S. minor*, 혼합처리(*S. sclerotiorum*+*S. minor*)구인 Negative control 그리고 *S. sclerotiorum*, *S. minor*, 혼합처리(*S. sclerotiorum*+*S. minor*) 병원균을 접종하고 24시간 후에 시중에서 판매하고 있는 생물농약(Acadian 29, Canada) 및 화학농약(선두주자, 성보화학)을 처리한 Positive control로 구분하여 실험을 진행하였음. 길항균 접종은 WJR-6B, HCS-1B의 단일처리 그리고 혼합처리(WJR-6B+HCS-1B) 접종 처리구로 분류하였으며, 길항균 선처리는 길항균을 접종하고 24시간 후에 병원균을 접종하여 실험을 진행하였음. 길항균 후처리는 병원균을 접종하고 24시간 후에 길항균을 처리하였음. 조건 처리 10일 경과 후 생체중, 건조중, 엽면적, 엽록소 함량, 상추의 균핵병 발병율을 측정하여 균핵병 방제 및 식물생장촉진 효과를 확인하였음.

실험결과, 발병율은 *S. sclerotiorum* 병원균을 접종한 처리구가 91.7%의 높은 발병율로 확인하였고 *S. minor* 및 혼합처리(*S. sclerotiorum*+*S. minor*)가 83.3%의 발병율을 보여주었음. 화학농약 및 생물 농약을 사용한 Positive control은 *S. sclerotiorum*+생물농약, *S. sclerotiorum*+*S. minor*+생물농약 처리구가 58.3%의 높은 발병율을 나타냈으며, *S. sclerotiorum*+*S. minor*+화학농약 처리구가 생물농약 처리구와 비교하였을 때 16.7%로 낮은 발병율을 나타내었음. 화학농약 처리구의 발병율이 평균 25%로 생물농약 처리구의 평균 55.5%보다 병 발생율이 적게 측정됨을 확인하였음[표4-14],[표4-15].

길항균 선처리구 *S. sclerotiorum*의 WJR-6B 및 HCS-1B 단일처리시 발병율은 17.6%, 0%로

길항균주의 혼합처리구 33.2%의 발병율보다 낮은 지수를 나타내었으며, Positive control(화학농약, 생물농약)처리구의 32.3%, 59.2% 발병율보다 우수한 병 억제 양상이 보였다. *S. minor*의 WJR-6B 및 HCS-1B 단일처리시 발병율은 18.1%, 26.2%로 길항균주의 혼합처리구 47.2%의 발병율보다 낮은 지수를 나타냈으며, Positive control(생물농약)의 발병율 50% 보다 나은 효과를 나타냈다. 혼합(*S. sclerotiorum*+*S. minor*)처리의 WJR-6B 및 HCS-1B 단일처리시 발병율은 18.1%로 Positive control(화학농약)의 발병율 16.7%와 비슷한 효과를 나타냈음[표4-14],[그림 4-46],[그림4-47].



\* A : 생체중, B : 건조중, C : 엽면적 D: Disease severity

[그림4-46] 선발 길항균의 선처리 실험 결과

길항균	실험군	<i>S.sclerotiorum</i>			<i>S.minor</i>			<i>S.sclerotiorum</i> + <i>S.minor</i>		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
WJR-6B										
HCS-1B										
WJR-6B+HCS-1B										
Negative control										
Positive control(화학농약)										
Positive control(생물농약)										

[그림4-47] 선발 길항균의 선처리 실험 결과

[표4-14] 선발 길항균의 선처리 실험 결과

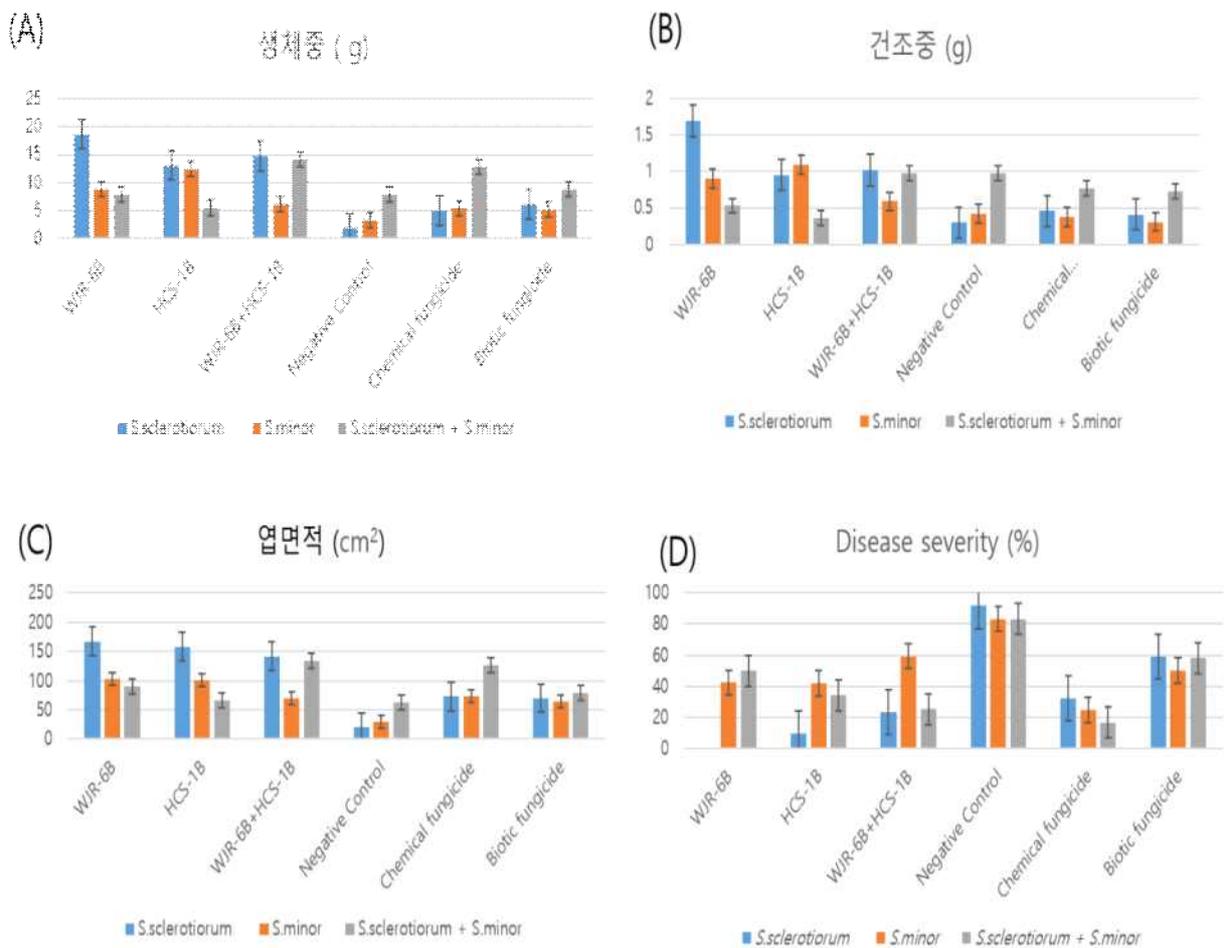
길항균	병원균	<i>S. sclerotiorum</i>					<i>S. minor</i>					<i>S. sclerotiorum</i> + <i>S. minor</i>				
		생체중(g)	건조중(g)	엽면적 (cm <sup>2</sup> )	엽록소 함량 (SPAD value)	Disease severity (%)	생체중(g)	건조중(g)	엽면적 (cm <sup>2</sup> )	엽록소 함량 (SPAD value)	Disease severity (%)	생체중(g)	건조중(g)	엽면적 (cm <sup>2</sup> )	엽록소 함량 (SPAD value)	Disease severity (%)
WJR-6B		19	1.3	168.1	28.4	17.6	14.5	0.92	137.3	28.3	18.1	14.3	1.02	143.1	26.8	18.1
HCS-1B		25.1	1.47	192.0	29.5	0	8.1	0.58	125.4	25.5	26.2	19.1	1.27	147.2	23.3	18.1
WJR-6B+HCS-1B		7.6	0.54	131.8	26	33.2	17.1	1.19	180.7	30	47.2	24.1	0.99	148.2	29.1	18.0
Negative control		1.9	0.3	20.8	6.1	91.7	3.3	0.42	29.9	5.7	83.3	7.9	0.98	63.1	9	83.3
Positive control_ 화학농약		5.1	0.46	72.9	17.1	32.3	5.4	0.38	74	19.4	24.5	12.8	0.77	126.9	21.7	16.7
Positive control_ 생물농약		6.1	0.41	69.9	15.2	59.2	5.2	0.31	65.1	12.2	50	8.8	0.73	79.2	16.3	58.3

[표4-15] 선발 길항균의 후처리 실험 결과

길항균	병원균	<i>S. sclerotiorum</i>					<i>S. minor</i>					<i>S. sclerotiorum</i> + <i>S. minor</i>				
		생체중(g)	건조중(g)	엽면적 (cm <sup>2</sup> )	엽록소 함량 (SPAD value)	Disease severity (%)	생체중(g)	건조중(g)	엽면적 (cm <sup>2</sup> )	엽록소 함량 (SPAD value)	Disease severity (%)	생체중(g)	건조중(g)	엽면적 (cm <sup>2</sup> )	엽록소 함량 (SPAD value)	Disease severity (%)
WJR-6B		18.6	1.69	167.6	31.7	0	8.8	0.9	102.9	28.2	42.2	7.9	0.53	90.3	24.9	50
HCS-1B		13.1	0.95	158.4	28	9.7	12.4	1.09	101.6	19.3	42.0	5.5	0.36	66.8	25	34
WJR-6B+HCS-1B		14.7	1.02	141.8	28.3	23.2	6.2	0.59	70.2	18.1	59.3	14.2	0.98	134.3	33.2	25.3
Negative control		1.9	0.3	20.8	6.1	91.7	3.3	0.42	29.9	5.7	83.3	7.9	0.98	63.1	9	83.3
Positive control_ 화학농약		5.1	0.46	72.9	17.1	32.3	5.4	0.38	74	19.4	24.5	12.8	0.77	126.9	21.7	16.7
Positive control_ 생물농약		6.1	0.41	69.9	15.2	59.2	5.2	0.31	65.1	12.2	50	8.8	0.73	79.2	16.3	58.3

길항균 후처리구는 *S. sclerotiorum*의 WJR-6B 및 HCS-1B 단일처리시 발병율은 0%, 9.7%로 길항균주의 혼합처리구 23.2%의 발병율보다 낮은 지수를 나타내었으며, 길항균 선처리구와 동일하게 Positive control(화학농약, 생물농약)처리구 보다 우수한 병 억제 양상이 보였음. *S. minor*의 WJR-6B 및 HCS-1B 단일처리시 발병율은 42.2%, 42%로 길항균주의 혼합처리구 59.3%의 발병율보다 낮은 지수를 나타냈으며, 혼합(*S. sclerotiorum*+*S. minor*)처리의 WJR-6B 및 HCS-1B 단일처리시 발병율은 50%, 34%로 Positive control(생물농약)의 발병율 58.3%보다 우수한 효과를 나타냈음[표4-15],[그림4-47].

길항균의 선처리와 후처리 모두 동일하게 병징을 억제하는 것으로 판단됨. 평균적으로 길항균을 후처리하는 것보다 선처리하였을 경우 길항력이 더 향상되어 생체중과 건조중이 유의하게 증가한 것을 확인하였음. Positive control의 생물농약과 비교했을 시, 길항균의 단일처리 및 혼합처리구 모두, Positive control(생물농약)보다 낮은 병발생율과 높은 생체중 및 건조중을 나타냈으며, 이는 길항균주인 WJR-6B (*Bacillus megaterium*), HCS-1B (*Bacillus megaterium*)의 균핵병 길항균으로서의 효과를 확인하였음[그림4-48],[그림4-49].



\* A : 생체중, B : 건조중, C : 엽면적 D: Disease severity

[그림4-38] 선발 길항균의 후처리 실험 결과

길항균	실험 구분	<i>S.sclerotiorum</i>			<i>S.minor</i>			<i>S.sclerotiorum</i> + <i>S.minor</i>		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
WJR-68										
HCS-1B										
WJR-68+HCS-1B										
Negative control										
Positive control(화학농약)										
Positive control(생물농약)										

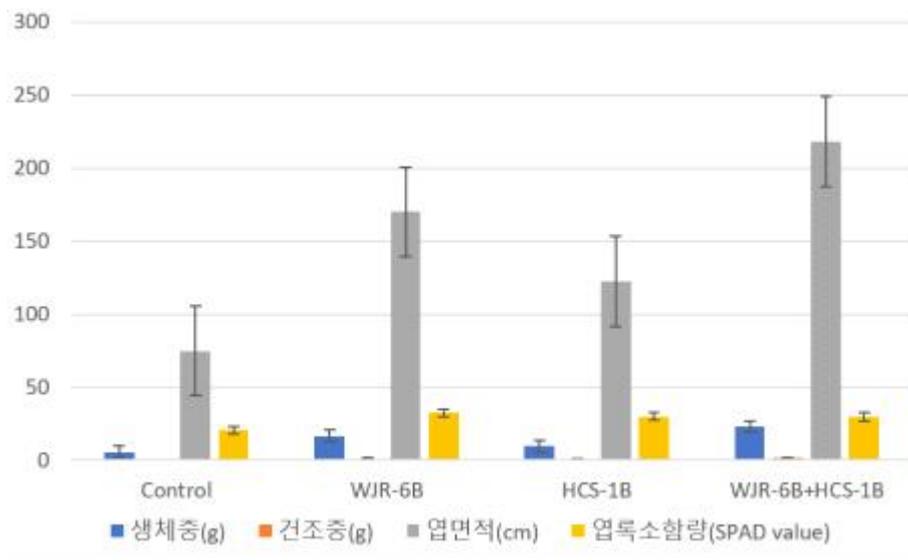
[그림4-49] 선발 길항균의 후처리 실험 결과

나) 상추 성장촉진 효과 검정을 위한 Pot assay

균핵병 길항균인 WJR-6B (*B. megaterium*), HCS-1B (*B. megaterium*) 접종 시 상추 성장에 미치는 영향을 추가로 확인하였음. 접종 10일 후 물만 처리한 Control의 경우 생체중, 건조중, 엽면적, 엽록소 함량이 각각 5.8g, 0.43g, 75cm<sup>2</sup>, 20.6으로 측정되었음. WJR-6B균주의 단일처리구는 생체중, 건조중, 엽면적, 엽록소 함량이 각각 16.9g, 1.22g, 170cm<sup>2</sup>, 32.5로 HCS-1B균주보다 높은 결과값이 도출되었으며, 혼합처리구(WJR-6B+HCS-1B)는 Control처리구의 약 4배 이상, 단일처리구에 비하여 2배 이상의 높은 결과를 나타냈음[표4-16],[그림4-50]. 이는 두 균주 모두 상추 성장촉진의 효과가 있음을 확인함[그림4-51].

[표4-16] 선발 길항균의 상추 성장촉진 실험 결과

처리구	생체중(g)	건조중(g)	엽면적(cm <sup>2</sup> )	엽록소 함량 (SPAD value)
Control	5.8	0.43	75	20.6
WJR-6B	16.9	1.22	170	32.5
HCS-1B	9.7	0.88	122.6	30.1
WJR-6B+HCS-1B	23.2	1.69	218.4	29.8



[그림4-50] 선발 길항균의 상추 성장촉진 실험 결과

처리구	반복수		
	1	2	3
WJR-6B			
HCS-1B			
WJR-6B+HCS-1B			
Control			

[그림4-51] 선발 길항균의 상추 성장촉진 실험 결과

다) 선발된 길항미생물의 대량생산을 위한 조건 개발

① 다양한 종류의 탄소원 첨가로 길항 미생물 증식 최적 조건 확립

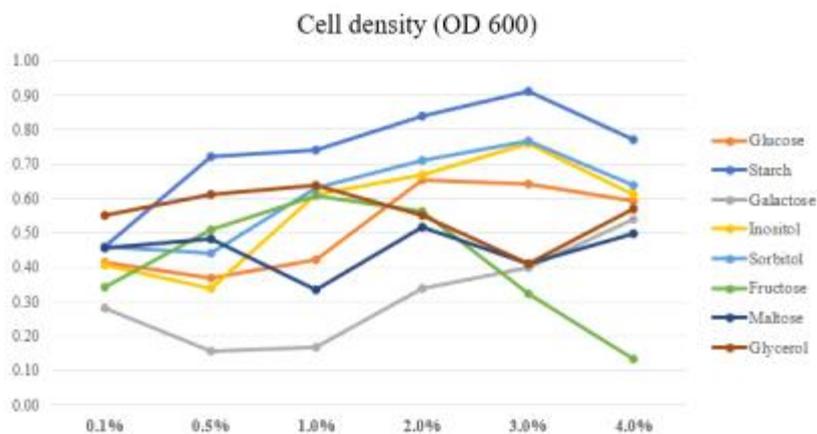
길항미생물인 WJR-6B (*Bacillus megaterium*), HCS-1B (*Bacillus megaterium*)의 대량배양을 위한 탄소원에 따른 생육의 영향을 확인하기 위하여 8가지의 탄소원을 사용하여 실험을 진행함.

선발된 길항미생물인 WJR-6B (*Bacillus megaterium*), HCS-1B (*Bacillus megaterium*) 균주를 기초배지인 Nutrient Broth(NB)배지에 다양한 탄소원을 첨가하고, 길항 균주의 증식을 조사하였음. 탄소원인 Glucose, Starch, Galactose, Inositol, Sorbitol, Fructose, Maltose, Glycerol 0.1%, 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4% 비율로 실험을 진행하였으며, Flask에 Nutrient Broth(NB) media 30ml, 탄소원을 각각의 비율별로 첨가와 동시에 해당 균주인 WJ-R6B, HCS-1B (*Bacillus megaterium*)를 300 $\mu$ L (1%) 접종하였음. 배양 조건은 진탕배양기(120 rpm, 30 $^{\circ}$ C) 24, 48시간동안 배양하였으며 균체농도를 측정하였음. 균체농도는 흡광도(Jasco V-530 uv/vis spectrophotometer)를 이용하여, 600nm 기준으로 OD값을 측정하였음.

측정 결과, WJR-6B (*Bacillus megaterium*), HCS-1B (*Bacillus megaterium*) 균주의 최적 탄소원 종류 및 비율은 탄소원 Stach의 1, 2, 3% 비율이 24시간 및 48시간 조건에서 가장 우수한 배양 최적 조건으로 확립되었음. WJR-6B 및 HCS-1B 균주의 증식 비교시, HCS-1B 균주가 동 시간대 증식량이 많았으며, HCS-1B균주의 증식 조건이 최적임을 나타냄.

[표4-17] WJR-6B (*Bacillus megaterium*)와 탄소원 종류 및 비율별 접종 OD 결과(24시간)

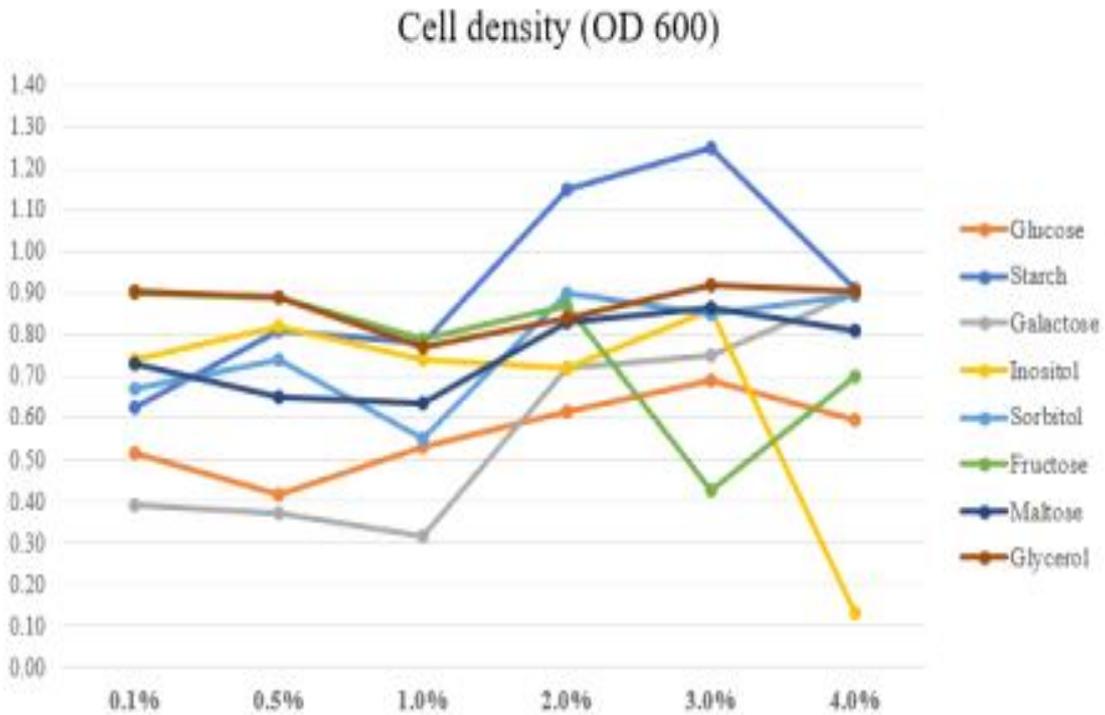
비율(%)	Glucose	Stach	Galactose	Inositol	Sorbitol	Fructose	Maltose	Glycerol
0.1%	0.42	0.46	0.28	0.41	0.46	0.34	0.46	0.55
0.5%	0.37	0.72	0.16	0.34	0.44	0.51	0.48	0.61
1%	0.42	0.74	0.17	0.61	0.63	0.61	0.33	0.64
2%	0.65	0.84	0.34	0.67	0.71	0.56	0.52	0.55
3%	0.64	0.91	0.40	0.76	0.77	0.32	0.41	0.41
4%	0.59	0.77	0.54	0.61	0.64	0.14	0.50	0.57



[그림4-52] WJR-6B (*Bacillus megaterium*)와 탄소원 종류 및 비율별 접종 OD 결과(24시간)

[표4-18] WJR-6B (*Bacillus megaterium*)와 탄소원 종류 및 비율별 접종 OD 결과(48시간)

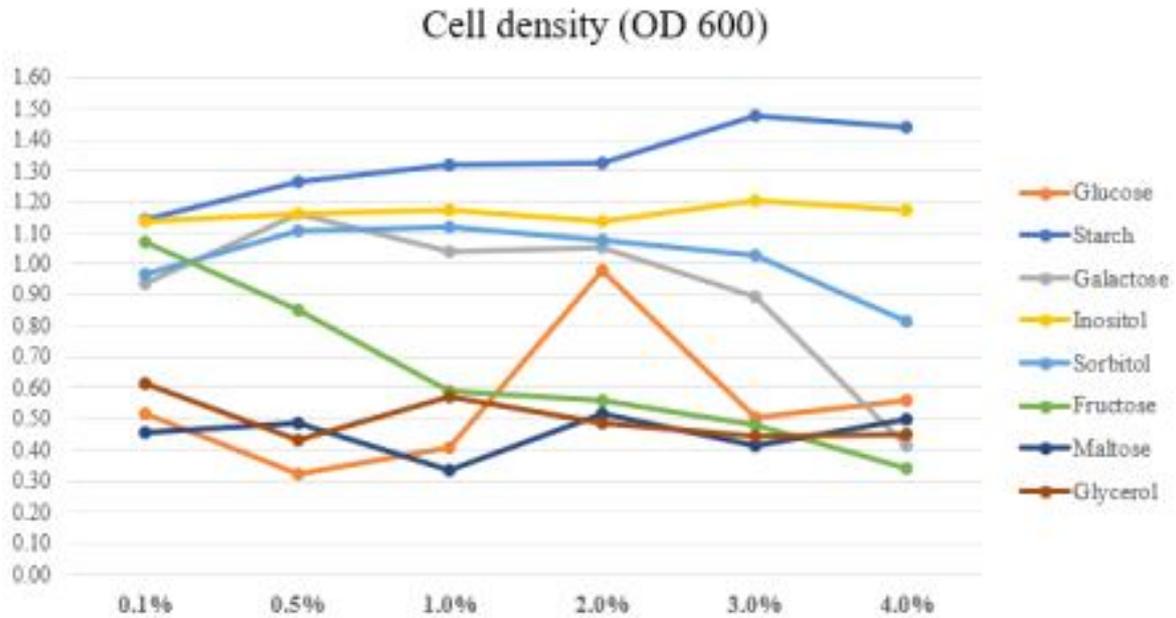
비율(%)	Glucose	Stach	Galactose	Inositol	Sorbitol	Fructose	Maltose	Glycerol
0.1%	0.52	0.62	0.39	0.74	0.67	0.90	0.73	0.91
0.5%	0.41	0.81	0.37	0.82	0.74	0.89	0.65	0.89
1%	0.53	0.78	0.31	0.74	0.55	0.79	0.63	0.77
2%	0.61	1.15	0.72	0.72	0.90	0.87	0.83	0.84
3%	0.69	1.25	0.75	0.86	0.85	0.43	0.86	0.92
4%	0.59	0.91	0.90	0.13	0.89	0.70	0.81	0.91



[그림4-53] WJR-6B (*Bacillus megaterium*)와 탄소원 종류 및 비율별 접종 OD 결과(48시간)

[표4-19] HCS-1B (*Bacillus megaterium*)와 탄소원 종류 및 비율별 접종 OD 결과(24시간)

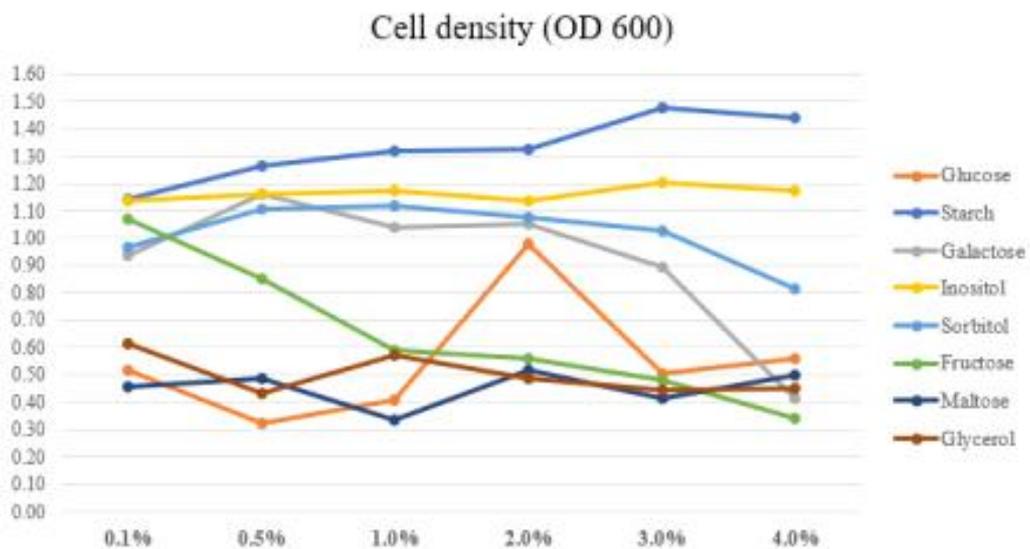
비율(%)	Glucose	Stach	Galactose	Inositol	Sorbitol	Fructose	Maltose	Glycerol
0.1%	0.52	1.14	0.94	1.14	0.97	1.07	0.01	0.62
0.5%	0.32	1.26	1.16	1.16	1.11	0.85	1.13	0.43
1%	0.41	1.32	1.04	1.17	1.12	0.59	1.07	0.57
2%	0.98	1.33	1.05	1.14	1.07	0.56	1.11	0.49
3%	0.50	1.48	0.89	1.20	1.03	0.48	1.02	0.45
4%	0.56	1.44	0.42	1.18	0.82	0.34	1.03	0.45



[그림4-54] HCS-1B(*Bacillus megaterium*)와 탄소원 종류 및 비율별 접종 OD 결과(24시간)

[표4-20] HCS-1B (*Bacillus megaterium*)와 탄소원 종류 및 비율별 접종 OD 결과(48시간)

비율(%)	Glucose	Stach	Galactose	Inositol	Sorbitol	Fructose	Maltose	Glycerol
0.1%	0.94	1.31	1.16	1.34	1.05	1.22	0.01	0.73
0.5%	0.79	1.31	1.25	1.27	1.20	1.13	1.23	0.70
1%	0.88	1.37	1.22	1.14	1.19	1.14	1.21	0.81
2%	1.18	1.44	1.21	1.17	1.19	1.15	1.27	0.74
3%	0.84	1.54	1.09	1.33	1.18	1.10	1.20	0.74
4%	0.79	1.58	0.90	1.31	1.19	0.92	1.19	0.79



[그림4-55] HCS-1B(*Bacillus megaterium*)와 탄소원 종류 및 비율별 접종 OD 결과(24시간)

② 다양한 종류의 질소원 첨가로 길항 미생물 증식 최적 조건 확립

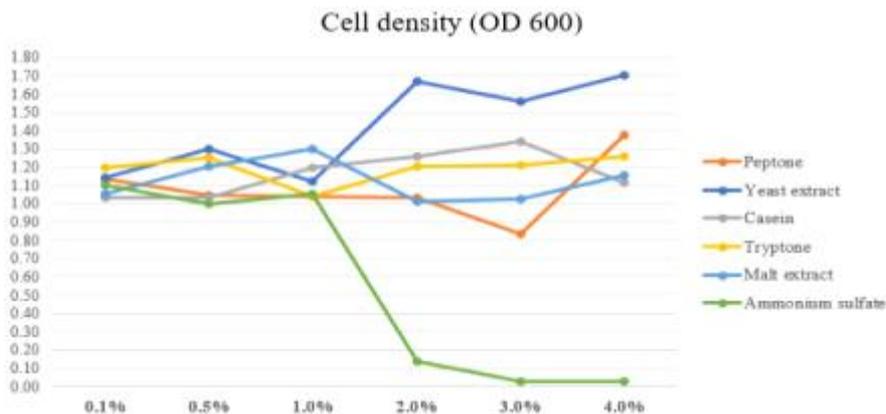
길항미생물인 WJR-6B(*Bacillus megaterium*), HCS-1B(*Bacillus megaterium*)의 대량배양을 위한 질소원에 따른 생육의 영향을 확인하기 위하여 6가지의 탄소원을 사용하여 실험을 진행함.

선발된 길항미생물인 WJR-6B (*Bacillus megaterium*), HCS-1B (*Bacillus megaterium*) 균주를 기초배지인 Nutrient Broth(NB)배지에 다양한 질소원을 첨가하고, 길항 균주의 증식을 조사하였음. 질소원은 Malt extract, Tryptone, Casein, Yeast extract, Peptone, Ammonium sulfate 0.1%, 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4% 비율로 실험을 진행하였으며, Flask에 Nutrient Broth(NB) media 30ml, 질소원을 각각의 비율별로 첨가와 동시에 해당 균주인 WJ-R6B, HCS-1B (*Bacillus megaterium*)를 300 $\mu$ L (1%) 접종하였음. 배양조건은 진탕배양기(120 rpm, 30 $^{\circ}$ C) 24, 48시간동안 배양하였으며 균체농도를 측정하였음. 균체농도는 흡광도(Jasco V-530 uv/vis spectrophotometer)를 이용하여, 600nm 기준으로 OD값을 측정하였음.

최적 질소원 종류 및 비율은 질소원 Yeast extract의 2, 3, 4% 비율이 24시간 및 48시간 조건에서 가장 우수한 배양 최적 조건으로 나타났음. WJR-6B 및 HCS-1B 균주의 증식 비교시, 탄소원과 동일하게 HCS-1B 균주가 동시간대 증식량이 많았으며, HCS-1B균주의 증식 조건이 최적임을 나타냄.

[표4-21] WJR-6B (*Bacillus megaterium*)와 질소원 종류 및 비율별 접종 OD 결과(24시간)

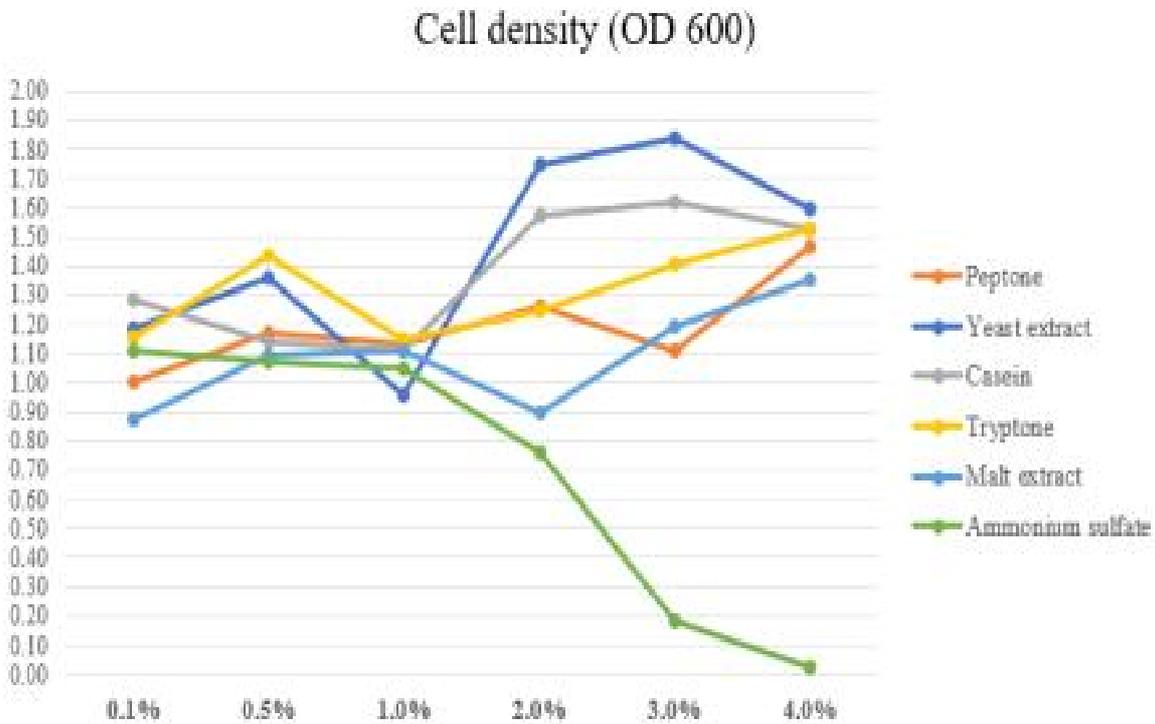
비율(%)	Peptone	Yeast extract	Casein	Tryptone	Malt extract	Ammonium sulfate
0.1%	1.14	1.14	1.03	1.20	1.05	1.10
0.5%	1.05	1.30	1.03	1.25	1.20	1.00
1%	1.04	1.12	1.20	1.04	1.30	1.05
2%	1.03	1.67	1.26	1.20	1.01	0.14
3%	0.83	1.56	1.34	1.21	1.03	0.03
4%	1.38	1.70	1.12	1.26	1.16	0.03



[그림4-56] WJR-6B (*Bacillus megaterium*)와 탄소원 종류 및 비율별 접종 OD 측정값(24시간)

[표4-22] WJR-6B (*Bacillus megaterium*)와 질소원 종류 및 비율별 접종 OD 결과(48시간)

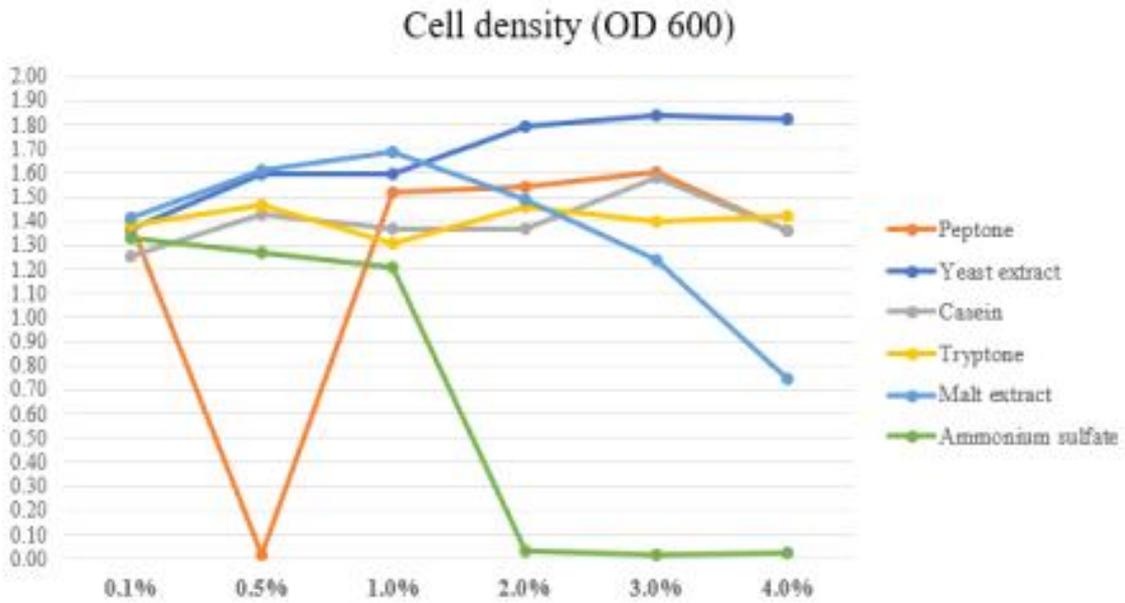
비율(%)	Peptone	Yeast extract	Casein	Tryptone	Malt extract	Ammonium sulfate
0.1%	1.00	1.18	1.28	1.16	0.88	1.11
0.5%	1.17	1.36	1.14	1.44	1.10	1.07
1%	1.13	0.96	1.11	1.15	1.11	1.05
2%	1.26	1.75	1.57	1.24	0.90	0.76
3%	1.11	1.84	1.62	1.41	1.19	0.18
4%	1.46	1.60	1.53	1.53	1.36	0.03



[그림4-57] WJR-6B (*Bacillus megaterium*)와 탄소원 종류 및 비율별 접종 OD 결과(48시간)

[표4-23] HCS-1B (*Bacillus megaterium*)와 질소원 종류 및 비율별 접종 OD 결과(24시간)

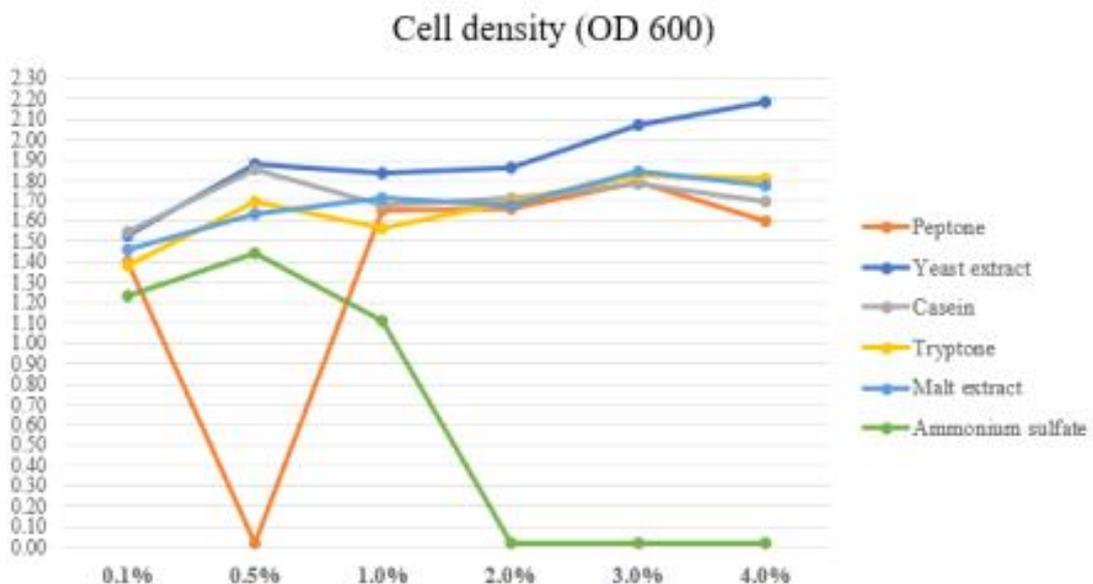
비율(%)	Peptone	Yeast extract	Casein	Tryptone	Malt extract	Ammonium sulfate
0.1%	1.39	1.37	1.26	1.38	1.42	1.33
0.5%	0.02	1.60	1.43	1.47	1.61	1.27
1%	1.52	1.59	1.37	1.30	1.68	1.21
2%	1.54	1.79	1.36	1.46	1.49	0.03
3%	1.60	1.84	1.58	1.40	1.24	0.02
4%	1.36	1.83	1.36	1.42	0.74	0.02



[그림4-58] HCS-1B (*Bacillus megaterium*)와 탄소원 종류 및 비율별 접종 OD 결과(24시간)

[표4-24] HCS-1B (*Bacillus megaterium*)와 질소원 종류 및 비율별 접종 OD 결과(48시간)

비율(%)	Peptone	Yeast extract	Casein	Tryptone	Malt extract	Ammonium sulfate
0.1%	1.40	1.53	1.55	1.38	1.46	1.23
0.5%	0.02	1.87	1.85	1.70	1.64	1.44
1%	1.65	1.83	1.68	1.56	1.72	1.11
2%	1.66	1.86	1.71	1.70	1.68	0.02
3%	1.80	2.07	1.78	1.83	1.84	0.02
4%	1.60	2.19	1.70	1.81	1.77	0.02

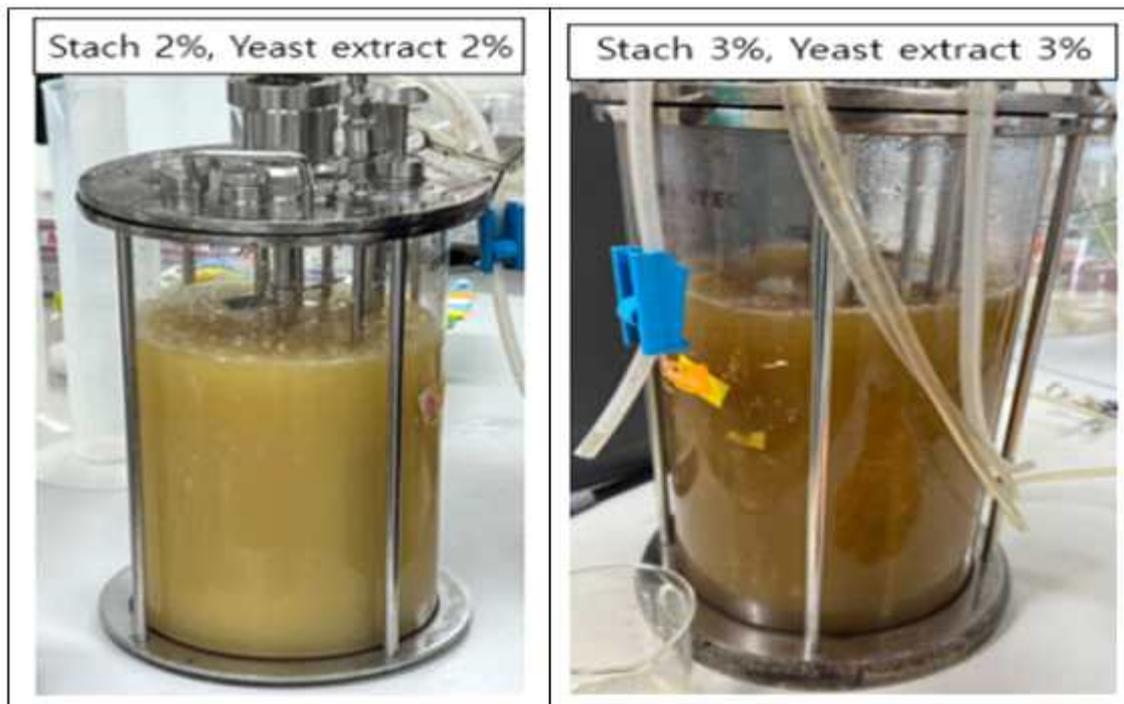


[그림4-59] HCS-1B (*Bacillus megaterium*)와 탄소원 종류 및 비율별 접종 OD 결과(48시간)

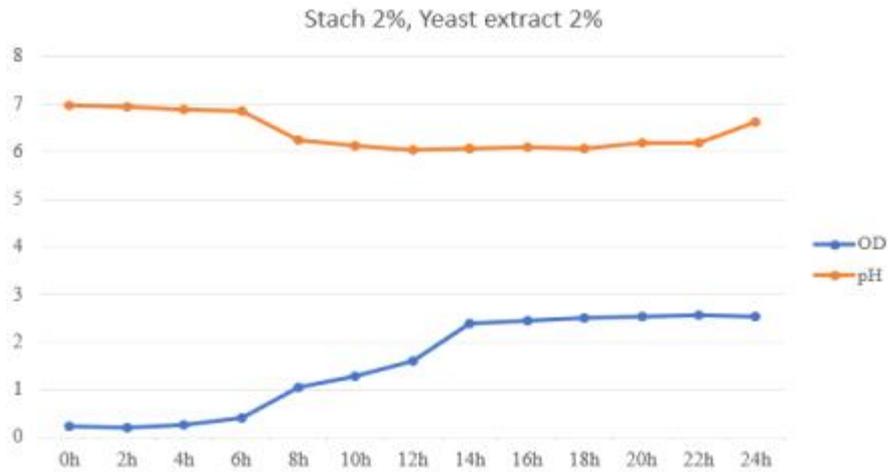
③ 소용량 발효조 Jar-fermentor(5L)에서의 길항 미생물 증식 최적화 연구

WJR-6B (*Bacillus megaterium*), HCS-1B (*Bacillus megaterium*) 균주를 기초배지인 Nutrient Broth(NB)배지에 다양한 탄소원 및 질소원을 첨가하고, 길항 균주의 증식을 조사한 결과, 탄소원 Stach 1, 2, 3%와 질소원 Yeast extract 2, 3, 4%의 비율이 균주 증식이 우수하였으며, 두 균주의 증식을 비교한 결과, 탄소원 및 질소원 최적조건에서의 증식이 HCS-1B (*B. megaterium*)균주가 우수하여, 이 결과를 바탕으로 Stach 2% + Yeast extract 2% 및 Stach 3% + Yeast extract 3%를 혼합 첨가하여 균주 증식의 최적 조건을 선발하기위해 소용량 발효조인 5L Jar-fermentor에서의 실험을 진행하였음. Jar-fermentor 배양 조건은 30℃, RPM 350, Air 3vvm, pH 6.0, 24h으로 진행하였으며, 2시간 간격으로 균주의 세균밀도(OD값)와 pH를 측정하였음[그림4-60]. 12시간 배양까지의 세균밀도(OD값)를 측정한 결과, Stach 2%, Yeast extract 2% 첨가한 조건에서의 세균 증식 밀도는 Stach 3%, Yeast extract 3% 비하여 다소 적은 세균 증식 밀도를 보였으나, 배양 14시간부터 24시간까지의 세균 밀도(OD값)는 Stach 2%, Yeast extract 2%가 Stach 3%, Yeast extract 3%에 비하여 평균 세균밀도(OD값)가 0.47차이를 나타냈으며, pH는 Stach 2%와 Yeast extract 2% 첨가한 균주가 Stach 3%, Yeast extract 3%에 비하여 안정적인 pH값을 나타냈음[표4-25],[표4-26],[그림4-61],[그림4-62].

최종적으로 기초배지인 Nutrient Broth(NB)배지에 Stach 2%와 Yeast extract 2% 첨가한 조건을 HCS-1B (*Bacillus megaterium*) 균주의 대양배양 배지 조건으로 선발하였음.



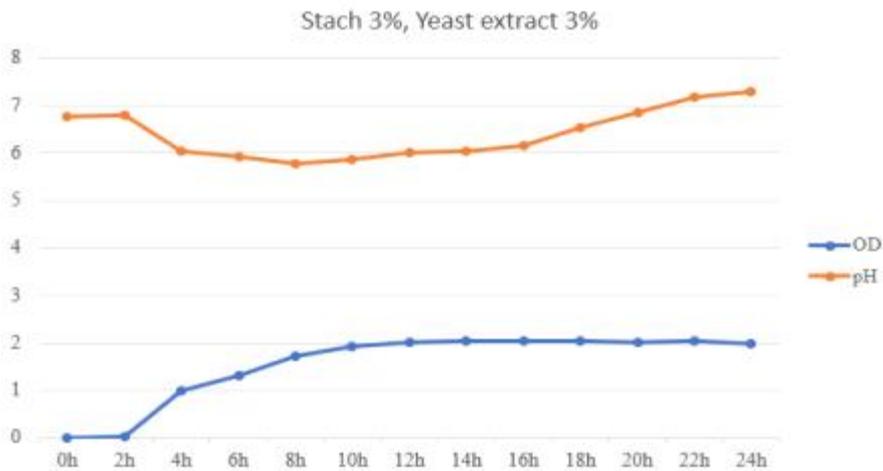
[그림4-60] 비율별 Jar-fermentor(5L) 배양 결과



[그림4-61] Stach, Yeast extract 2% 비율의 Jar-fermentor 배양 결과

[표4-25] Stach, Yeast extract 2% 비율의 Jar-fermentor 배양 결과

	0h	2h	4h	6h	8h	10h	12h	14h	16h	18h	20h	22h	24h
OD	0.23	0.21	0.26	0.41	1.05	1.27	1.60	2.39	2.46	2.52	2.54	2.56	2.55
pH	6.99	6.94	6.89	6.87	6.24	6.12	6.03	6.08	6.09	6.08	6.2	6.2	6.64



[그림4-62] Stach, Yeast extract 3% 비율의 Jar-fermentor 배양 결과

[표4-26] Stach, Yeast extract 3% 비율의 Jar-fermentor 배양 결과

	0h	2h	4h	6h	8h	10h	12h	14h	16h	18h	20h	22h	24h
OD	0	0.02	0.98	1.31	1.74	1.93	2.01	2.05	2.05	2.05	2.03	2.03	1.99
pH	6.77	6.8	6.04	5.92	5.79	5.87	6.02	6.05	6.16	6.54	6.86	7.19	7.31

④ 이화학적 분석을 통한 상추 재배 토양내의 물리적, 화학적 특성 조사

상추생장촉진 실험을 하기 전에 토양의 물리적, 화학적 특성 및 미생물 군집을 확인하기 위하여, 이화학적 토양 분석과 토양 microbiome 분석을 실시하였음. 토양 시료는 비닐하우스 재배 토양과 노지 재배 토양의 표면으로부터 10cm 깊이의 토양을 각 장소의 2개씩(비닐하우스: GH\_A, GH\_B, 노지: NJ1, NJ2) 수집하였으며, 24시간 풍건시킨 후 실험에 사용하였음. 이화학적 토양 분석은 강원대학교 농업생명과학연구원 토양분석전문기관(ASLRI)에 의뢰하였으며 (pH, EC, 토성, T-N, Organic matter(OM), CEC, 중금속(As, Cd, Cu, Ni, Pb, Zn))을 분석하였음.

대부분의 토양 pH는 4.5~8.5사이에 분포하며, 일반적으로 작물은 pH 6.0~7.5사이에 가장 잘 성장하는 것으로 알려져있음. 비닐 하우스의 평균 pH는 7.5, 노지의 평균 pH는 7.4로 2곳 모두 알칼리성 범위를 나타냈음. 전기전도도인 EC 함량은 작물에 대한 염류장애를 판단하는 중요한 화학적 지표이며, 0.25 이하일 때 염류 피해는 낮으며, 0.25~0.75는 중간정도, 0.75 이상은 염류 피해가 높은 것으로 보고있음. 비닐 하우스 및 노지의 EC 평균 함량은 0.3, 0.31으로 중간정도를 나타냈음. 토양내 질소함량은 평균적으로 노지 토양이 높게 측정되었으며, 5종의 중금속 또한 노지 토양이 평균적으로 높게 나타났음[표4-27].

[표4-27] 상추 재배 토양내의 물리적, 화학적 특성 조사 결과

Sample	pH	EC (dS/m)	토성	T-N (g/kg)	OM (%)	CEC	중금속						
							As	Cd	Cu	Ni	Pb	Zn	
비닐하우스	GB 1	7.9	0.4	Sandy Loam	0.39	0.51	7.43	2.4	0.3	9.9	4.3	23.2	118.4
	GB 2	7.1	0.2	Sandy Loam	0.34	0	11.18	2.3	0.2	7.1	4.1	18.7	97.5
노지	NJ 1	7.7	0.37	Sandy Loam	0.9	0.89	13.65	5.95	0.45	13.4	4.5	29.5	163.4
	NJ 2	7.1	0.25	Sandy Loam	0.8	0.74	15.84	8.44	0.53	16.7	5.2	38.7	186.5

**라) 상추 재배지(비닐하우스, 노지) 토양 Microbiome 분석**

① 토양 시료 채취 및 Amplicon sequence 분석

토양 microbiome은 위의 microbiome 분석과 동일한 방법으로 토양 total DNA를 추출하여 얻어진 산물을 (주)마크로젠에 16s RNA 및 ITS region 분석을 진행하였으며, Amplicon sequence 결과에서 얻어진 염기서열은 MEGA 10, Mothur (version 1.27.0) 및 CLcommunity 프로그램 등을 이용하여 분석하였음. 염기서열 데이터는 고품질의 시퀀스 데이터를 얻기 위해 sequencing 과정에서 길이가 짧거나 혹은 프라이머가 일치하지 않는 염기서열을 제거하여 발생할 수 있는 에러를 수정하였음. 키메라 시퀀스는 UCHIME 프로그램을 사용하여 제거하였고 Average-neighbor 알고리즘을 이용하여 97% 유사도를 기준으로 Operational Taxonomic Unit (OTU)를 분류하였음. Good의 Coverage, 종 풍부도 추정치, 다양성지수 및 Venn diagram은 Mothur 및 CLcommunity 프로그램을 이용하여 계산하였으며, 시료간의 유사성 기반의 베타 다양성 분석은 Unweighted UniFrac 분석을 이용하였음.

상추 재배지(비닐하우스, 노지)에서 각각 2개씩 4개의 토양 시료(비닐하우스: GH1, GH2, 노지: NJ1, NJ2)를 수집하여 genomic DNA를 추출한 후 차세대 염기서열 분석을 진행하였음. 16s RNA를 이용한 분석 결과, 비닐하우스 토양시료는 미생물 중 83.3%가 Bacteria로 분류되었으며 16.6%는 기타로 분류되었으며, 노지 토양시료는 미생물 중 79.4%가 Bacteria로 분류되었고 20.5%가 기타로 분류되었다. ITS를 이용한 분석결과에의 경우 비닐하우스 토양시료는 미생물 중 39.1%가 Fungi로 분류되었으며 60.9%는 기타로 분류되었고 노지재배 토양시료의 경우 21.7%가 Fungi로 분류되었으며 78.3%가 기타로 분류되었음.

㉠ Bacteria OTU (Operational Taxonomic Unit)

분석에 사용된 4개(비닐하우스, 노지)의 토양 시료들은 16s RNA sequencing에서 read count가 최소 30,546개에서 최대 46,607개로 분석되었으며, 평균 38,576개로 나타났음. 비닐하우스 토양의 경우 GH1 토양시료의 read count가 46,607개의 비하여 GH2 토양시료의 read count는 16,061로 많은 차이를 나타냈음. 노지 토양의 경우 NJ1 토양시료와 NJ2 토양시료의 read count가 각각 25,207개, 30,870개로 비닐하우스의 토양시료가 노지 토양에 비하여 많은 read count 수를 보여주었음. 세균의 경우 10,000개 이상의 read count가 신뢰성 있는 데이터로 알려져 있으며, 분석에 사용된 4개의 토양 시료들은 모두 그 이상의 수치로 측정되어 신뢰성 있는 데이터로 보여짐[표4-28].

**[표4-28] 수집된 4개의 토양 시료의 세균 OTU read count.**

Results of Clustering (cutoff: 97%)		
수집 장소	Sample Name	Read Count
비닐하우스	GH1	46,607
	GH2	30,546
노지	NJ1	25,207
	NJ2	30,870

④ Taxonomic assignment of bacteria

(1) Phylum level

a. 비닐하우스 토양 분석 결과

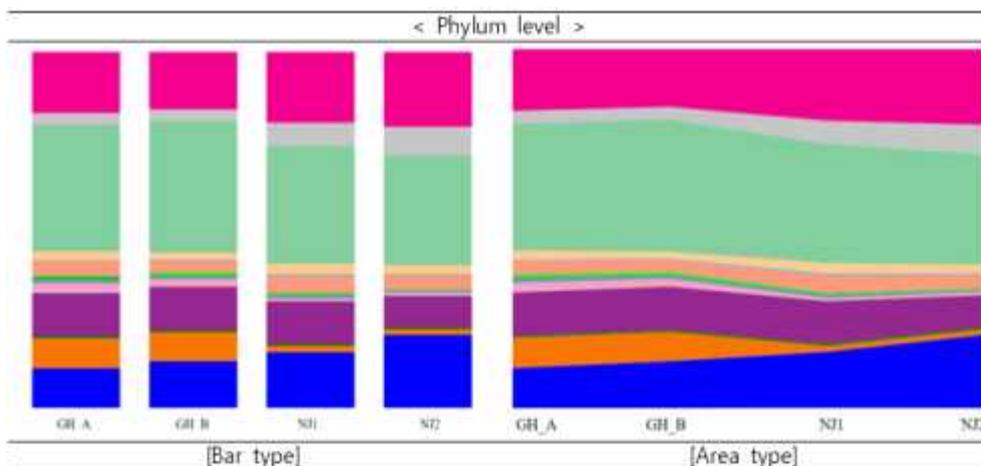
비닐하우스(GH\_A 및 GH\_B) 토양시료는 *Proteobacteria* (36.1%), *Bacteroidetes* (12.1%), *Acidobacteria* (12.1%), *Actinobacteria* (8.3%), *Gemmatimonadetes* (3.7%), *Verrucomicrobia* (3.5%), *Chloroflexi* (2.3%), *Planctomycetes* (2.1%), *Cyanobacteria* (1.2%)로 가장 많이 분류되었음.

b. 노지 토양 분석 결과

노지(NJ1 및 NJ2) 토양시료는 *Proteobacteria* (32.1%), *Acidobacteria* (18%), *Bacteroidetes* (10.3%), *Verrucomicrobia* (7.2%), *Gemmatimonadetes* (4.3%), *Planctomycetes* (2.6%), *Actinobacteria* (1.5%), *Chloroflexi* (0.7%)로 가장 많이 분류되었음[그림4-63].

c. 비닐하우스 vs 노지 토양 분석

4개 토양 시료 Phylum level의 Bacteria는 총 19개로 *Proteobacteria* (34.1%), *Acidobacteria* (15.1%), *Bacteroidetes* (11.3%), *Verrucomicrobia* (5.3%), *Actinobacteria* (4.9%), *Gemmatimonadetes* (4.0%), *Planctomycetes* (2.4%), *Chloroflexi* (1.5%), *Cyanobacteria* (1.0%)로 가장 많이 분류되었음.비닐하우스 및 노지 토양에서 *Proteobacteria*가 많이 분포하고 있는 것을 확인하였으며, 노지 토양의 *Verrucomicrobia*가 비닐하우스 토양보다 2배 이상 많았음. *Proteobacteria*은 식물의 성장을 촉진하는 것으로 알려져있으며, *Verrucomicrobia*은 토양 근권에 주로 존재하는 미생물로서 식물 뿌리권의 Bacteria 군집도 형성에 관여함. 비닐하우스 토양이 노지 토양보다 *Chloroflexi*가 2배이상 많았으며, *Chloroflexi*은 식물의 성장과, 광합성에 관여하고 과일의 성숙을 촉진하는 역할로 알려져있음.



[그림4-63] 수집된 4개 토양 시료의 세균 Phylum level 결과.

(2) Class level

a. 비닐하우스 토양 분석 결과

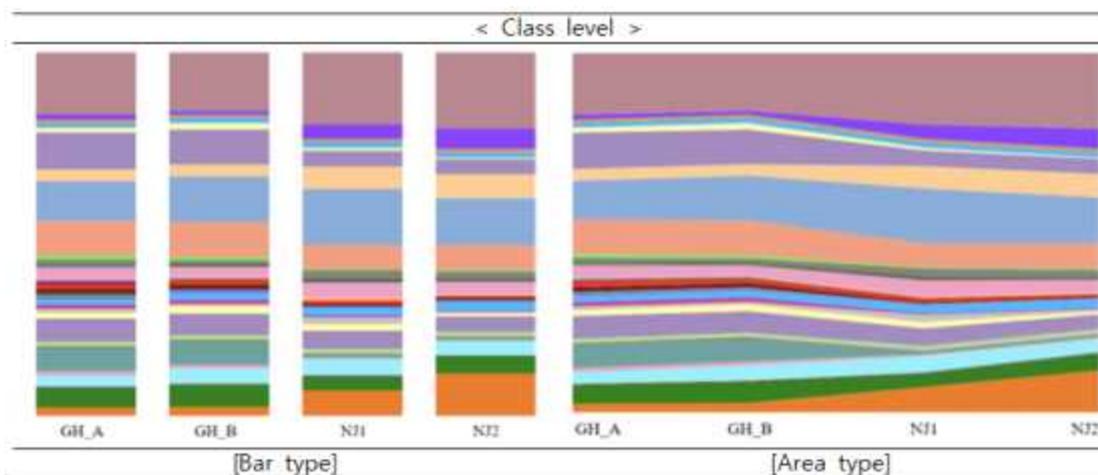
비닐하우스(GH\_A 및 GH\_B) 토양시료는 *Betaproteobacteria* (11.6%), *Gammaproteobacteria* (10%), *Alphaproteobacteria* (9.8%), *Actinomycetia* (6.2%), *Chitinophagia* (6.1%), *Blastocatellia* (5.6%), *Vicinamibacteria* (3.7%), *Gemmatimonadetes* (3.2%), *Deltaproteobacteria* (3.2%)로 많이 분류되었음.

b. 노지 토양 분석 결과

노지(NJ1 및 NJ2) 토양시료는 *Betaproteobacteria* (13.9%), *Acidobacteriia* (9.3%), *Alphaproteobacteria* (7%), *Deltaproteobacteria* (6.4%), *Verrucomicrobiae* (4.7%), *Chitinophagia* (4.3%), *Blastocatellia* (4.2%), *Gammaproteobacteria* (4.2%), *Gemmatimonadetes* (4%)로 많이 분류되었음.

c. 비닐하우스 vs 노지 토양 분석

4개 토양 시료 Class level의 Bacteria는 총 52개로 *Betaproteobacteria* (12.8%), *Alphaproteobacteria* (8.4%), *Gammaproteobacteria* (7.1%), *Acidobacteriia* (5.9%), *Chitinophagia* (5.3%), *Blastocatellia* (4.9%), *Deltaproteobacteria* (4.8%), *Vicinamibacteria* (3.9%), *Actinomycetia* (3.6%), *Gemmatimonadetes* (3.6%), *Verrucomicrobiae* (2.9%), *Springobacteriia* (2.1%), *Phycisphaerae* (1.8%), *Otophagia* (1.5%)로 분류되었음. 비닐하우스 토양시료의 *Gammaproteobacteria*은 노지 토양보다 2배 이상 존재하였는데, *Gammaproteobacteria*이 많이 존재하는 토양은 건강한 토양으로 알려져있으며, 식물 성장을 촉진시키는 것으로 알려져있음. 노지 토양시료의 *Acidobacteriia*은 비닐하우스 토양 시료의 *Acidobacteriia*보다 약 5배 이상 존재하였는데, *Acidobacteriia*은 토양 속 중금속을 개선시키며, 식물체의 중금속 내성을 향상시키는 것으로 알려져 있음[그림4-64].



[그림4-64] 수집된 4개 토양 시료의 세균 Class level 결과.

(3) Order level

a. 비닐하우스 토양 분석 결과

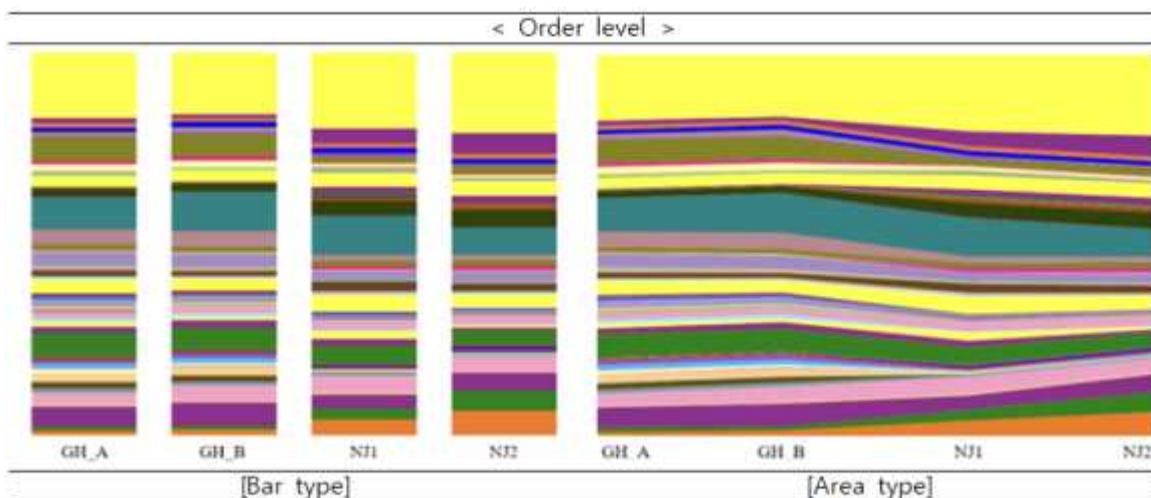
비닐하우스(GH A 및 GH B) 토양시료는 *Burkholderiales* (9.5%), *Chitinophagales* (6.1%), *Xanthomonadales* (6%), *Blastocatellales* (5.6%), *Sphingomonadales* (4.1%), *Hyphomicrobiales* (3.5%), *Gemmatimonadales* (3.2%)로 가장 많이 분류되었음.

b. 노지 토양 분석 결과

노지(NJ1 및 NJ2) 토양시료는 *Burkholderiales* (8.7%), *Acidobacteriales* (5.2%), *Verrucomicrobiales* (4.7%), *Chitinophagales* (4.3%), *Blastocatellales* (4.2%), *Bryobacteriales* (4.1%), *Gemmatimonadales* (4%), *Nitrosomonadales* (3.9%), *Mycococcales* (3.7%)로 가장 많이 분류되었음.

c. 비닐하우스 vs 노지 토양 분석

4개 토양 시료 Order level의 Bacteria는 총 122개로 *Burkholderiales* (9.1%), *Chitinophagales* (5.3%), *Blastocatellales* (4.9%), *Xanthomonadales* (4%), *Gemmatimonadales* (3.6%), *Acidobacteriales* (3%), *Mycococcale* (3.3%), *Hyphomicrobiales* (3%), *Verrucomicrobiales* (2.9%), *Sphingomonadales* (2.8%), *Nitrosomonadales* (2.8%), *Bryobacteriales* (2.6%), *Sphingobacteriales* (2.1%), *Tepidisphaerales* (1.7%), *Cytophagales* (1.5%), *Rhodospirillales* (1.4%), *Flavobacteriales* (1.2%), *Nevskiales* (1.2%), *Opitutales* (1.2%), *Micrococcales* (1.1%), *Chthoniobacteriales* (1.1%)로 가장 많이 분류되었음[그림4-65].



[그림4-65] 수집된 4개 토양 시료의 세균 Order level 결과.

(4) Family level

a. 비닐하우스 토양 분석 결과

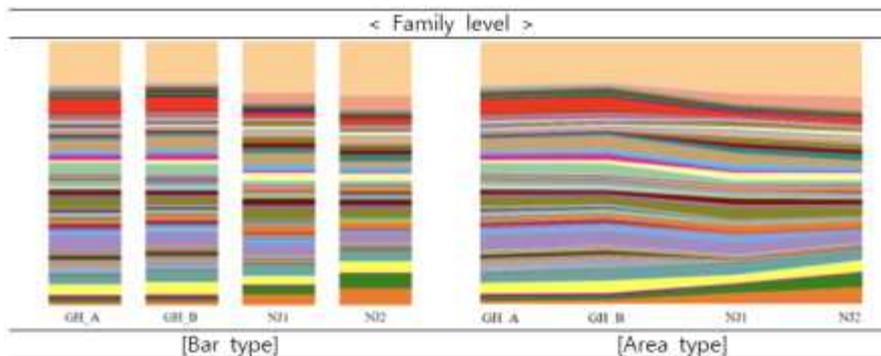
비닐하우스(GH A 및 GH B) 토양시료는 *Chitinophagaceae* (6.29%), *Xanthomonadaceae* (4.93%), *Oxalobacteraceae* (4.26%), *Pyrinomonadaceae* (3.82%), *Sphingomonadaceae* (3.5%), *Gemmatimonadaceae* (3.5%), *Vicinamibacteraceae* (3.18%), *Burkholderiaceae* (2.18%), *Sphingobacteriaceae* (1.76%), *Micrococcaceae* (1.52%), *Blastocatellaceae* (1.49%), *Tepidisphaeraceae* (1.46%), *Nocardiaceae* (1.43%), *Bryobacteraceae* (1.31%), *Comamonadaceae* (1.23%), *Rhodanobacteraceae* (1.17%), *Opitutaceae* (1.09%), *Streptomycetaceae* (1.09%), *Fulvivirgaceae* (1.09%), *Acidobacteriaceae* (1.08%), *Chthoniobacteraceae* (1.06%), *Pseudomonadaceae* (1.04%), *Sinobacteraceae* (1%)로 가장 많이 분류되었음.

b. 노지 토양 분석 결과

노지(NJ1 및 NJ2) 토양시료는 *Acidobacteriaceae* (5.2%), *Verrucomicrobia* (4.6%), *Chitinophagaceae* (4.3%), *Vicinamibacteraceae* (4.2%), *Bryobacteraceae* (4.1%), *Gemmatimonadaceae* (4%), *Pyrinomonadaceae* (3.5%), *Oxalobacteraceae* (3.5%), *Sphingobacteriaceae* (2.4%), *Nitrosomonadaceae* (2.2%), *Tepidisphaeraceae* (2.1%), *Comamonadaceae* (1.7%), *Xanthomonadaceae* (1.6%), *Sterolibacteriaceae* (1.5%), *Sphingomonadaceae* (1.4%), *Opitutaceae* (1.3%), *Mcropepsaceae* (1.1%)로 가장 많이 분류되었음.

c. 비닐하우스 vs 노지 토양 분석

4개 토양 시료 Family level의 Bacteria는 총 246개로 *Oxalobacteraceae* (4.1%), *Vicinamibacteraceae* (3.9%), *Pyrinomonadaceae* (3.8%), *Acidobacteriaceae* (3.3%), *Xanthomonadaceae* (3.2%), *Bryobacteraceae* (2.6%), *Sphingomonadaceae* (2.5%), *Sphingobacteriaceae* (2.1%), *Tepidisphaeraceae* (1.7%), *Comamonadaceae* (1.6%), *Burkholderiaceae* (1.5%), *Opitutaceae* (1.2%), *Fulvivirgaceae* (1.1%), *Chthoniobacteraceae* (1.1%)로 가장 많이 분류되었음[그림4-66].



[그림4-66] 수집된 4개 토양 시료의 세균 Family level 결과.

(5) Genus level

a. 비닐하우스 토양 분석 결과

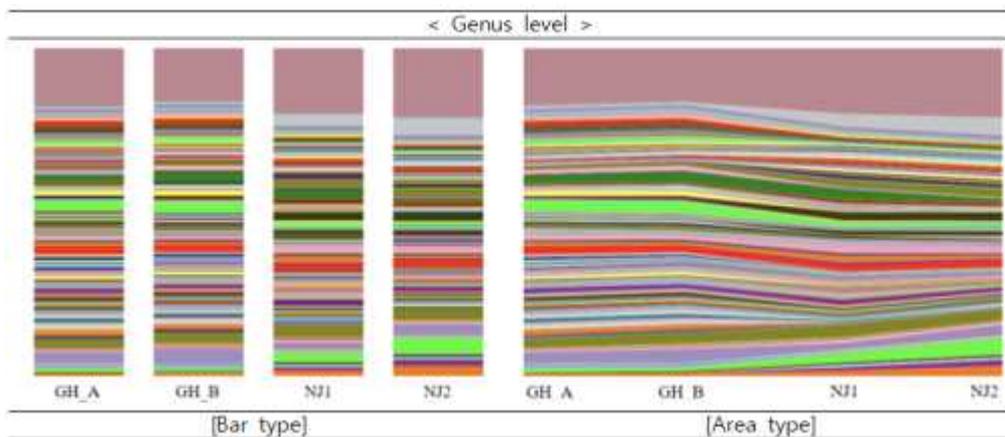
비닐하우스(GH\_A 및 GH\_B) 토양시료는 *Brevitalea* (3.9%), *Sphingomonas* (3.4%), *Massilia* (2.9%), *Vicinamibacter* (2.8%), *Gemmatimonas* (2.3%), *Lysobacter* (1.7%), *Pseudarthrobacter* (1.6%), *Rhodococcus* (1.4%), *Tepidisphaera* (1.4%), *Stenotrophobacter* (1.3%), *Flavitalea* (1.3%), *Terrimonas* (1.3%), *Paludibaculum* (1.2%), *Dehalogenimonas* (1.0%), *Limnobacter* (1.2%), *Bdellovibrio* (1.2%), *Pseudomonas* (1%)로 가장 많이 분류되었음.

b. 노지 토양 분석 결과

노지(NJ1 및 NJ2) 토양시료는 *Limisphaera* (4.6%), *Paludibaculum* (3.9%), *Vicinamibacter* (3.5%), *Brevitalea* (2.9%), *Acidobacterium* (2.5%), *Nitrosospira* (2.3%), *Tepidisphaera* (2.2%), *Gemmatimonas* (2.1%), *Thiobacter* (1.9%), *Massilia* (1.9%), *Roseisolibacter* (1.6%), *Edaphobacter* (1.4%), *Sphingomonas* (1.3%), *Chthoniobacter* (1.3%)로 가장 많이 분류되었음.

c. 비닐하우스 vs 노지 토양 분석

4개 토양 시료 Genus level의 Bacteria는 총 575개로 *Vicinamibacter* (3.1%), *Limisphaera* (2.6%), *Paludibaculum* (2.5%), *Massilia* (2.4%), *Sphingomonas* (2.3%), *Gemmatimonas* (2.2%), *Tepidisphaera* (1.7%), *Acidobacterium* (1.7%), *Roseisolibacter* (1.3%), *Lysobacter* (1.3%), *Chthoniobacter* (1.1%), *Terrimonas* (1.1%), *Thiobacter* (1%)로 가장 많이 분류되었음 [그림4-67].



[그림4-67] 수집된 4개 토양 시료의 세균 Genus level 결과.

(6) Species level

a. 비닐하우스 토양 분석 결과

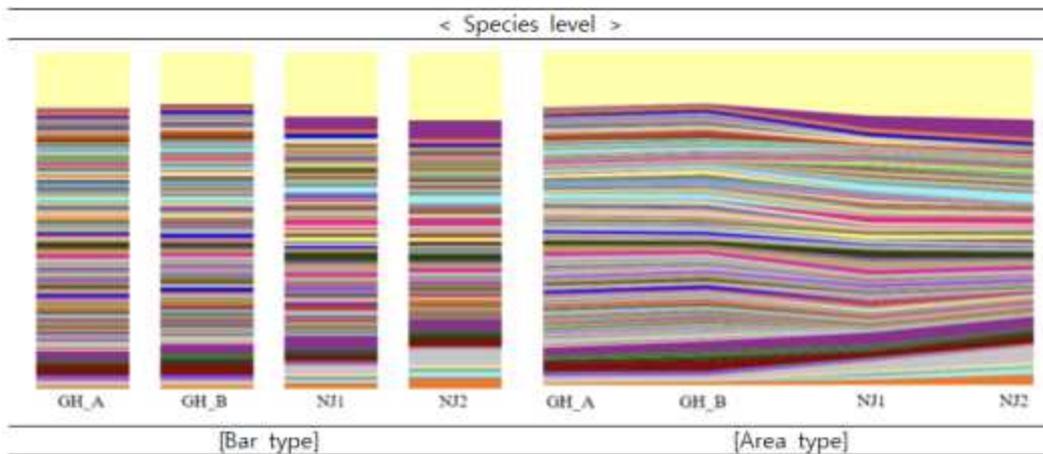
비닐하우스(GH\_A 및 GH\_B) 토양시료는 *Brevitalea aridisoli* (3%), *Vicinamibacter silvestris* (2.7%), *Gemmatimonas phototrophica* (1.3%), *Tepidisphaera mucosa* (1.3%), *Paludibaculum fermentans* (1.2%), *Rhodococcus qingshengii* (1.2%), *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* (1.1%), *Gemmatimonas aurantiaca* (1%) *Sphingomonas limososedminicola* (1%), *Chthoniobacter flavus* (1%)로 가장 많이 분류되었음.

b. 노지 토양 분석 결과

노지(NJ1 및 NJ2) 토양시료는 *Limisphaera ngatamarikiensis* (4.6%), *Paludibaculum fermentans* (3.9%), *Vicinamibacter silvestris* (3.5%), *Tepidisphaera mucosa* (2.1%), *Acidobacterium ailaui* (2.5%), *Brevitalea aridisoli* (1.9%), *Roseisolibacter agri* (1.6%), *Edaphobacter aggregans* (1.4%), *Gemmatimonas phototrophica* (1.3%), *Chthoniobacter flavus* (1.2%)로 가장 많이 분류되었음.

c. 비닐하우스 vs 노지 토양 분석

4개 토양 시료 Species level의 Bacteria는 총 1,061개로 *Limisphaera ngatamarikiensis* (2.6%), *Chthoniobacter flavus* (1.1%), *Nitrosospora multiformis* (1.4%), *Thiobacter subterraneus* (1%), *Tepidisphaera mucosa* (1.7%), *Roseisolibacter agri* (1.3%), *Gemmatimonas phototrophica* (1.3%), *Vicinamibacter silvestris* (3.1%), *Brevitalea deliciosa* (1%), *Brevitalea aridisoli* (2.4%), *Paludibaculum fermentans* (2.5%), *Acidobacterium ailaui* (1.6%)로 가장 많이 분류 되었음. 비닐하우스 토양시료보다 노지 토양시료에서 *Limisphaera ngatamarikiensis* (4.6%)가 4% 이상 존재하고 있는 것을 확인하였음[그림4-68].



[그림4-68] 수집된 4개 토양 시료의 세균 Species level 결과.

③ Fungi OTU (Operational Taxonomic Unit)

분석에 사용된 4개의 토양 시료들은 ITS sequencing에서 read count가 최소 48,841개에서 최대 98,015개로 분석되었으며, 평균 73,935개로 나타났음. 비닐하우스 토양의 경우 GH\_A 토양시료의 read count가 80,172개, GH\_B 토양시료는 98,015개로 read count 수가 비슷하였음. 노지 토양의 경우 NJ1 토양시료와 NJ2 토양시료가 각각 68,712개, 48,841개로 비닐하우스 토양시료가 노지 토양시료보다 많은 read count 수를 보여주었음. 곰팡이의 경우 20,000개 이상의 read count가 신뢰성 있는 데이터로 알려져 있으며, 분석에 사용된 4개의 토양 시료들은 모두 그 이상의 수치로 측정되어 신뢰성 있는 데이터로 보여짐[표4-29].

[표4-29] 수집된 4개 토양 시료의 곰팡이 OTU read count.

Results of Clustering (cutoff: 97%)		
수집 장소	Sample Name	Read Count
비닐하우스	GH_A	80,172
	GH_B	98,015
노지	NJ1	68,712
	NJ2	48,841

④ Taxonomic assignment of Fungi

㉞ Phylum level

a. 비닐하우스 토양 분석 결과

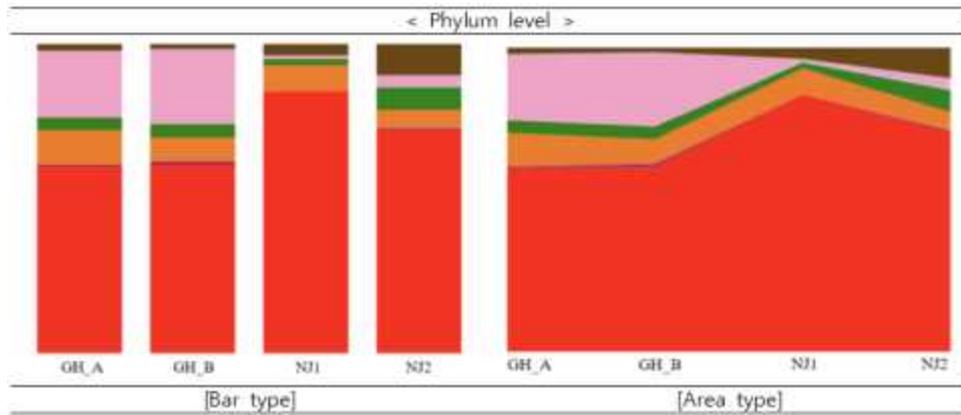
비닐하우스(GH\_A 및 GH\_B) 토양시료는 *Mortierellomycota* (22.9%), *Ascomycota* (9.7%), *Basidiomycota* (4.1%), *Mucoromycota* (0.3%)로 가장 많이 분류 되었음.

b. 노지 토양 분석 결과

노지(NJ1 및 NJ2) 토양시료는 *Ascomycota* (7.4%), *Basidiomycota* (4.7%), *Mortierellomycota* (2.3%), *Glomeromycota* (0.2%)로 가장 많이 분류 되었음.

c. 비닐하우스 vs 노지 토양 분석

4개 토양 시료 Phylum level의 Fungi는 총 7개로 *Mortierellomycota* (12.5%), *Ascomycota* (8.6%), *Basidiomycota* (4.4%), *Mucoromycota* (0.2%), *Glomeromycota* (0.1%), *Chytridiomycota* (0.01%), *Calcarisporiellomycota* (0.01%)로 분류 되었음[그림4-69].



[그림4-69] 수집된 4개 토양 시료의 곰팡이 Phylum level 결과.

④ Class level

a. 비닐하우스 토양 분석 결과

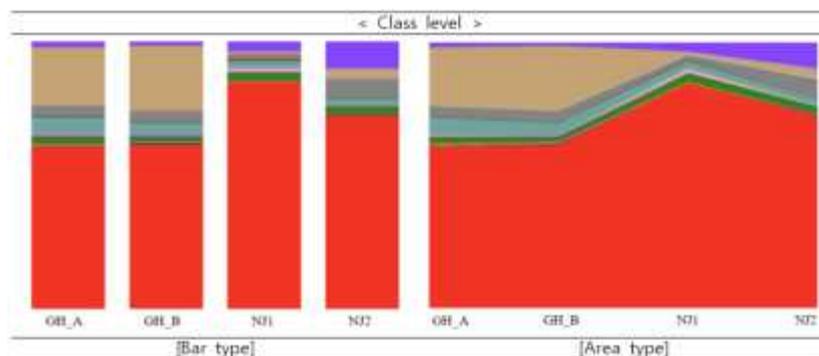
비닐하우스(GH\_A 및 GH\_B) 토양시료는 *Mortierellomyces* (22.9%), *Sordariomyces* (5.7%), *Agaricomycetes* (4%), *Dothideomycetes* (2.3%), *Eurotiomyces* (0.4%), *Mucoromycetes* (0.3%)로 가장 많이 분류되었음.

b. 노지 토양 분석 결과

노지(NJ1 및 NJ2) 토양시료는 *Agaricomycetes* (4.6%), *Sordariomyces* (2.7%), *Dothideomycetes* (3.2%), *Mortierellomyces* (2.3%)로 가장 많이 분류되었음.

c. 비닐하우스 vs 노지 토양 분석

4개 토양 시료 Class level의 Fungi는 총 21개로 *Mortierellomyces* (12.5%), *Agaricomycetes* (4.3%), *Sordariomyces* (4.2%), *Dothideomycetes* (2.7%), *Pezizomycetes* (0.4%), *Eurotiomyces* (0.3%), *Mucoromycetes* (0.2%)로 가장 많이 분류되었음[그림4-70].



[그림4-70] 수집된 4개 토양 시료의 곰팡이 Class level 결과.

㉔ Order level

a. 비닐하우스 토양 분석 결과

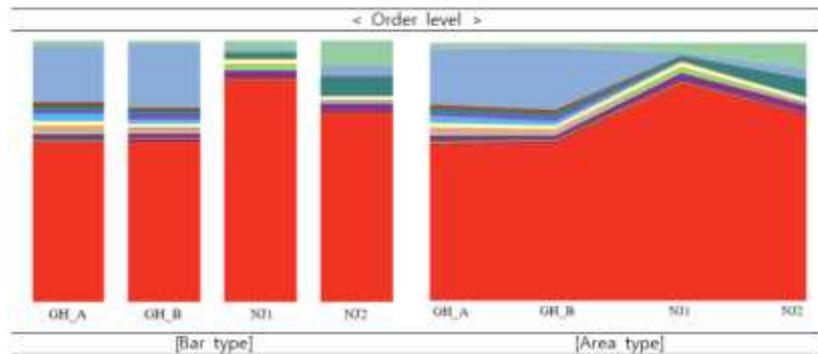
비닐하우스(GH\_A 및 GH\_B) 토양시료는 *Mortierellales* (23%), *Pleosporales* (1.7%), *Hypocreales* (1.6%), *Sordariales* (2.1%), *Agaricales* (1.1%), *Cantharellales* (1.7%), *Thelephorales* (1.2%)로 가장 많이 분류 되었음.

b. 노지 토양 분석 결과

노지(NJ1 및 NJ2) 토양시료는 *Cantharellales* (4.5%), *Pleosporales* (2.9%), *Mortierellales* (2.3%), *Hypocreales* (1.4%)로 가장 많이 분류되었음.

c. 비닐하우스 vs 노지 토양 분석

4개 토양 시료 Order level의 Fungi는 총 42개로 *Mortierellales* (12.5%), *Cantharellales* (3.1%), *Pleosporales* (2.3%), *Hypocreales* (1.6%), *Sordariales* (1.1%), *Sordariales* (1.1%), *Agaricales* (0.6%), *Glomerellales* (0.4%)로 가장 많이 분류 되었음[그림4-71].



[그림4-71] 수집된 4개 토양 시료의 곰팡이 Order level 결과.

㉕ Family level

a. 비닐하우스 토양 분석 결과

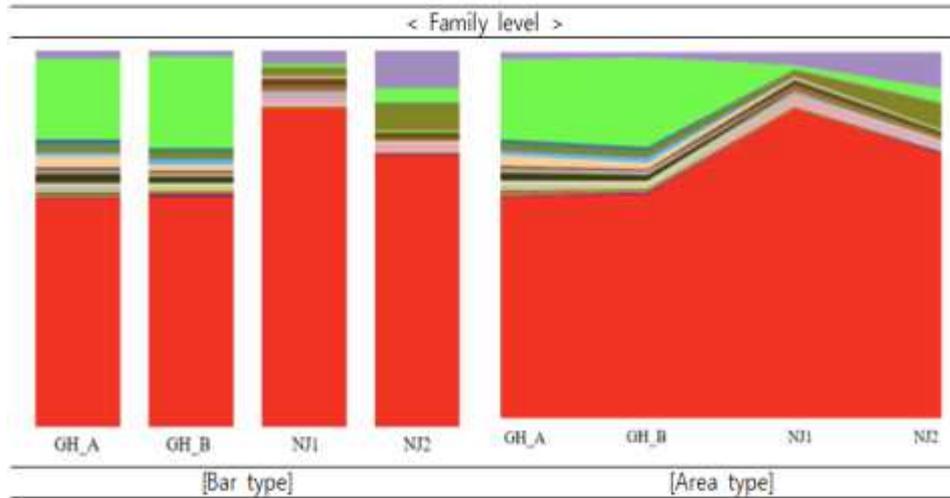
비닐하우스(GH\_A 및 GH\_B) 토양시료는 *Mortierellaceae* (22.8%), *Chaetomiaceae* (2.1%), *Ceratobasidiaceae* (1.7%), *Thelephoraceae* (1.2%)로 가장 많이 분류되었음.

b. 노지 토양 분석 결과

노지(NJ1 및 NJ2) 토양시료는 *Ceratobasidiaceae* (4.5%), *Mortierellaceae* (2.3%), *Didymellaceae* (2.1%), *Nectriaceae* (1.5%)로 가장 많이 분류되었음.

c. 비닐하우스 vs 노지 토양 분석

4개 토양 시료 Family level의 Fungi는 총 72개 *Mortierellaceae* (12.5%), *Ceratobasidiaceae* (3.1%), *Didymellaceae* (1.2%), *Chaetomiaceae* (1.1%), *Psathyrellaceae* (0.6%), *Ascobolaceae* (0.4%), *Hypocreaceae* (0.3%)로 가장 많이 분류 되었음[그림4-72].



[그림4-72] 수집된 4개 토양 시료의 곰팡이 Family level 결과.

㉔ Genus level

a. 비닐하우스 토양 분석 결과

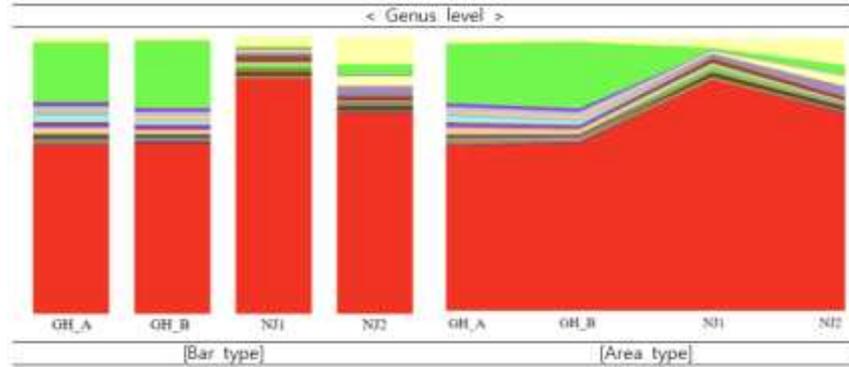
비닐하우스(GH\_A 및 GH\_B) 토양시료는 *Mortierella* (23%), *Chaetomium* (2.1%), *Thanatephorus* (1.6%), *Tomentella* (1.2%), *Trichoderma* (0.6%)로 가장 많이 분류되었음.

b. 노지 토양 분석 결과

노지(NJ1 및 NJ2) 토양시료는 *Rhizoctonia* (2.1%), *Colletotrichum* (0.3%), *Trichobolus* (0.3%)로 가장 많이 분류되었음.

c. 비닐하우스 vs 노지 토양 분석

4개 토양 시료 Genus level의 Fungi는 총 101개 *Mortierella* (12.5%), *Chaetomium* (1.1%), *Rhizoctonia* (1.1%), *Thanatephorus* (0.9%), *Tomentella* (0.6%), *Trichoderma* (0.3%), *Alternaria* (0.2%), *Epicoccum* (0.2%), *Colletotrichum* (0.2%), *Plectosphaerella* (0.2%)로 가장 많이 분류 되었음[그림4-73].



[그림4-73] 수집된 4개 토양 시료의 곰팡이 Genus level 결과.

㉞ Species level

a. 비닐하우스 토양 분석 결과

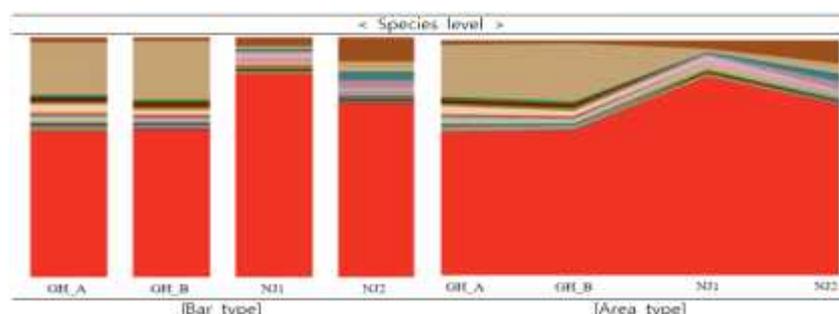
비닐하우스(GH\_A 및 GH\_B) 토양시료는 *Mortierella sclerotiella* (22.7%), *Chaetomium sp* (2.1%), *Thanatephorus cucumeris* (1.6%), *Tomentella sp.* (1.2%), *Psathyrellaceae sp.* (1%), *Trichoderma hamatum* (0.6%)로 가장 많이 분류되었음.

b. 노지 토양 분석 결과

노지(NJ1 및 NJ2) 토양시료는 *Mortierella sclerotiella* (2.3%), *Ceratobasidiaceae sp.* (2.2%), *Didymellaceae sp.* (1.7%), *Nectriaceae sp.* (1.2%)로 가장 많이 분류되었음.

c. 비닐하우스 vs 노지 토양 분석

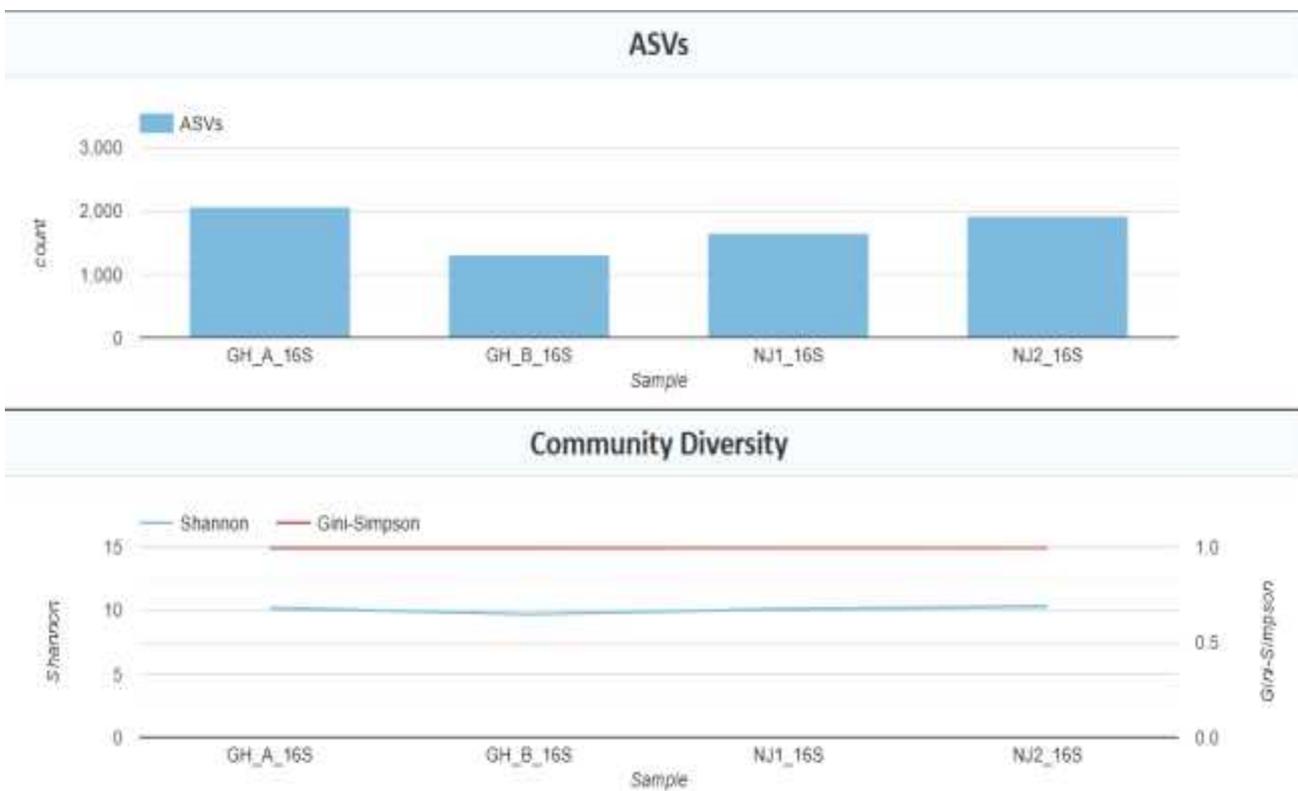
4개 토양 시료 Genus level의 Fungi는 총 116개 *Mortierella sclerotiella* (12.5%), *Rhizoctonia sp.* (1.1%), *Chaetomium* (1.1%), *Sordariomycetes* (1.0%), *Didymellaceae sp.* (1.0%)로 가장 많이 분류 되었음. *Mortierella sp.* 는 많은 토양에서 널리 존재하는 곰팡이로 비병원성이며, 비닐 하우스 토양보다 노지 토양에서 병원성 곰팡이인 *Rhizoctonia sp.* 가 더 많이 존재하는 것을 확인하였음[그림4-74].



[그림4-74] 수집된 4개 토양 시료의 곰팡이 Species level 결과.

⑤ Community richness & diversity of bacteria

4개의 토양 시료에서 세균의 다양성을 확인하기 위하여 alpha-diversity를 확인하였음. Community Diversity, Shnnon, Gini-simpson을 측정하였음. Community diversity는 종의 수 및 분포도가 다양성의 기준이 되며 OTU, Cho1 그리고 Gini-simpson을 종합한 shannon 점수를 통하여 각 샘플의 다양성을 나타냄. 비닐하우스 토양인 GH\_A 및 GH\_B의 경우 shanon 점수가 각각 10.2, 9.7이었으며, 노지재배 토양인 NJ1 및 NJ2는 10.2, 10.3로 노지재배 토양이 세균의 다양성이 높은 것으로 확인되었음[그림4-75].



- \* ASVs : Amplicon sequence variant (ASV) is a term used to refer to single DNA sequences recovered from a high-throughput marker gene analysis.
- \* Chao1 : returns the Chao1 richness estimate for an ASV definition
- \* Shannon : The Shannon index takes into account the number and evenness of species.
- \* Gini-Simpson : The Gini-Simpson index represents the probability that two randomly selected individuals in the habitat will belong to the same species.
- \* Good's Coverage : Coverage is calculated as  $C=1-(s/n)$ ,  
 where s is the number of unique ASVs and n is the number of individuals in the sample.  
 This index gives a relative measure of how well the sample represents the larger environment.

[그림4-75] 수집된 4개 토양 시료의 세균 community richness & diversity 결과.

⑥ Community richness & diversity of fungi

4개의 토양 시료에서 곰팡이의 다양성을 확인하기 위하여 alpha-diversity를 확인하였음. 비닐 하우스 토양(GH\_A, GN\_B)은 각각 6.1, 5.9의 shanon 점수였으며, 노지재배 토양(NJ1, NJ2)은 7.2, 7.6으로 확인되었음. 세균과 동일하게 곰팡이의 다양성은 노지재배 토양에서 더 높은 것으로 확인되었음[그림4-76].



\* ASVs : Amplicon sequence variant (ASV) is a term used to refer to single DNA sequences recovered from a high-throughput marker gene analysis.

\* Chao1 : returns the Chao1 richness estimate for an ASV definition

\* Shannon : The Shannon index takes into account the number and evenness of species.

\* Gini-Simpson : The Gini-Simpson index represents the probability that two randomly selected individuals in the habitat will belong to the same species.

\* Good's Coverage : Coverage is calculated as  $C=1-(s/n)$ ,

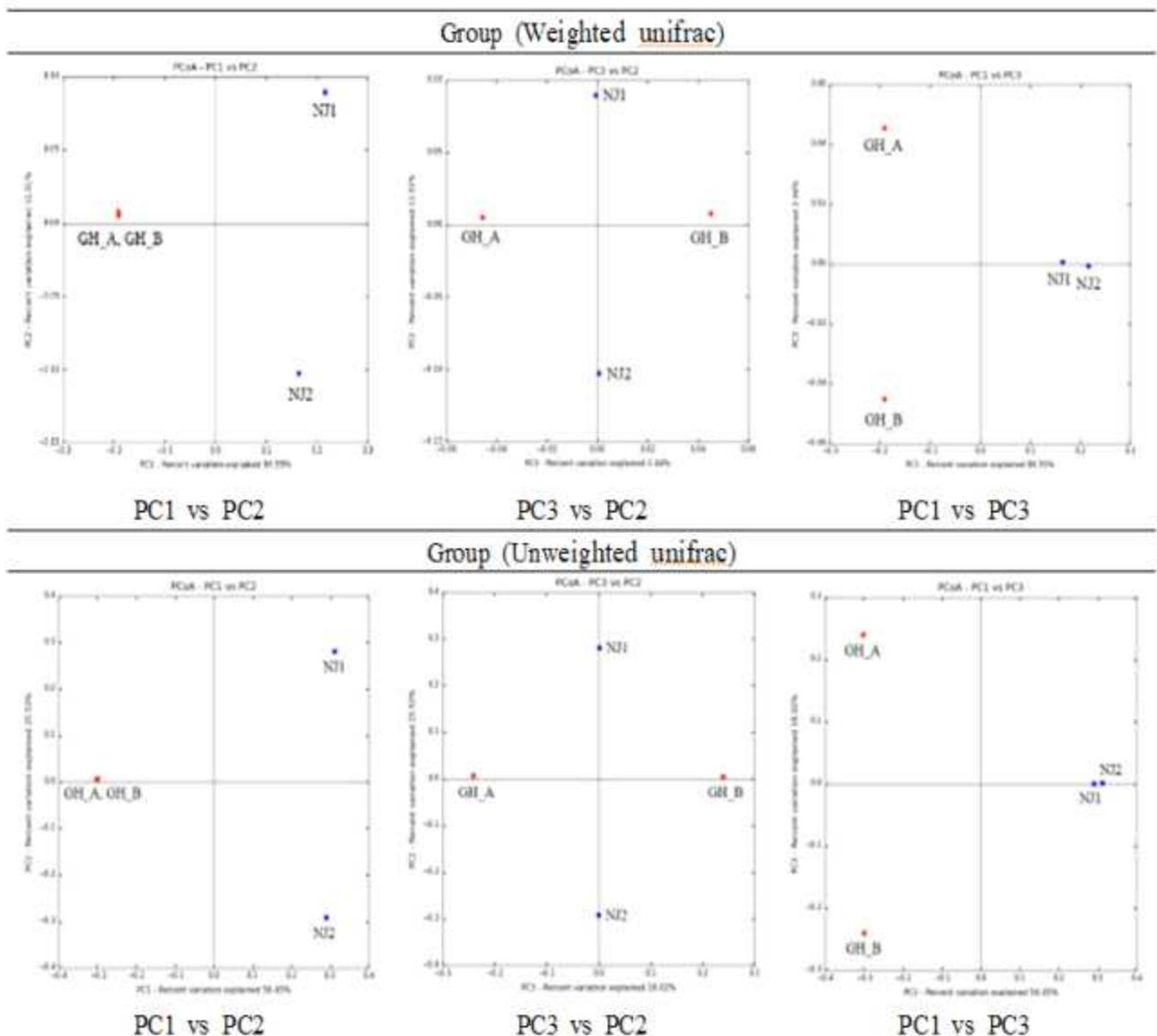
where  $s$  is the number of unique ASVs and  $n$  is the number of individuals in the sample.

This index gives a relative measure of how well the sample represents the larger environment.

[그림4-76] 수집된 4개 토양 시료의 곰팡이 community richness & diversity 결과.

⑦ PCoA Graph of bacteria

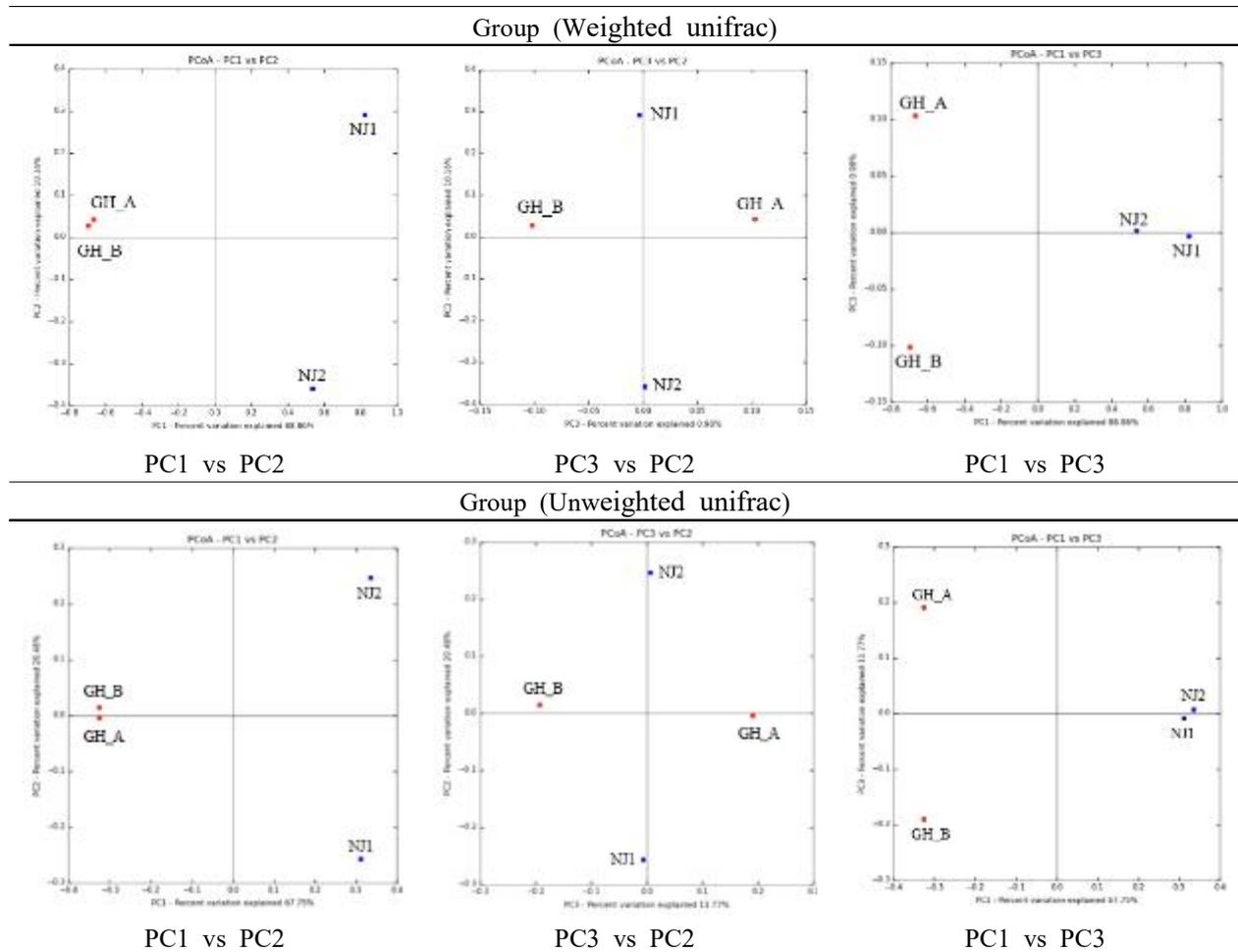
분석한 4개의 토양 시료 간에 세균의 다양성이 있는지 확인하기 위하여 토양 시료의 주성분 값을 나타내는 PCoA 분석을 실시하였음. GH\_A, GH\_B, NJ1, NJ2 토양 시료는 주성분 분석에서 시료간의 거리가 넓게 측정되었으나 비닐하우스 및 노지에서 수집한 각각의 토양은 서로 비슷한 다양성을 나타내었음. 이러한 결과는 동일한 장소의 토양이더라도 샘플간의 다양성은 근소하게 차이가 나는 것으로 확인되었음[그림4-77].



[그림4-77] 수집된 4개 토양 시료의 세균 PCoA Graph.

⑧ PCoA Graph of fungi

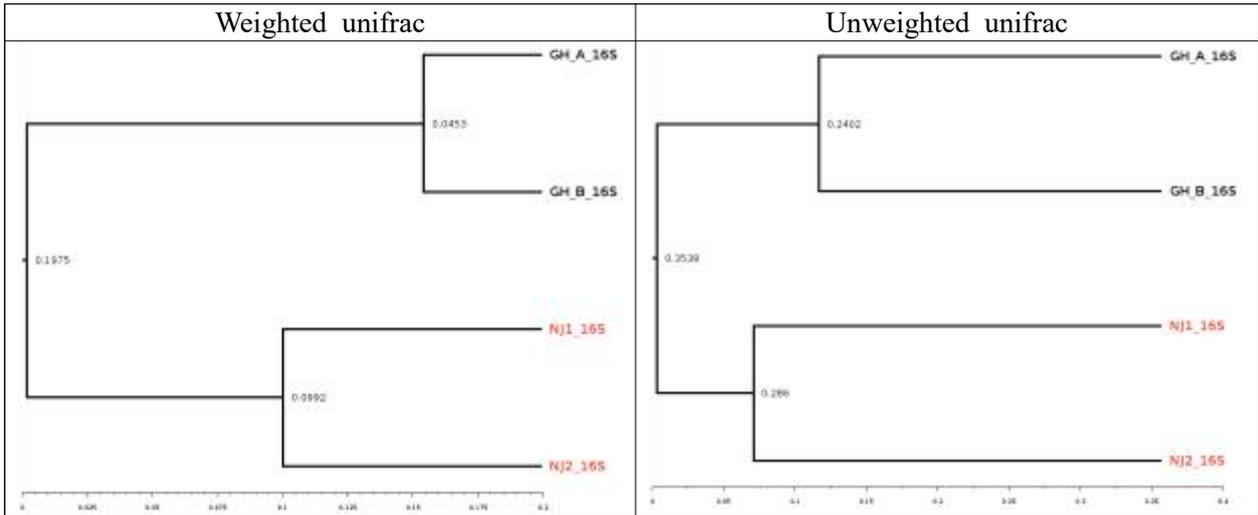
분석한 4개의 토양 시료 간에 곰팡이의 다양성이 있는지 확인하기 위하여 토양 시료의 주성분 값을 나타내는 PCoA 분석을 실시하였음. 세균의 주성분 분석과 비슷하게 곰팡이의 주성분 분석은 각각의 토양 시료의 거리가 먼 것으로 측정되었으며, 이는 샘플 간에 다양성이 높다는 것을 의미함. 또한 한 장소에서 수집한 토양간의 다양성 또한 근소하게 차이가 나는 것으로 확인되었으며, 노지 토양시료가 비닐하우스 토양시료보다 거리가 더 먼 것으로 보여 비닐하우스 토양시료보다 곰팡이 다양성이 더 높은 것을 확인하였음[그림4-78].



[그림4-78] 수집된 4개 토양 시료의 곰팡이 PCoA Graph.

⑨ UPGMA tree comparing samples of bacteria

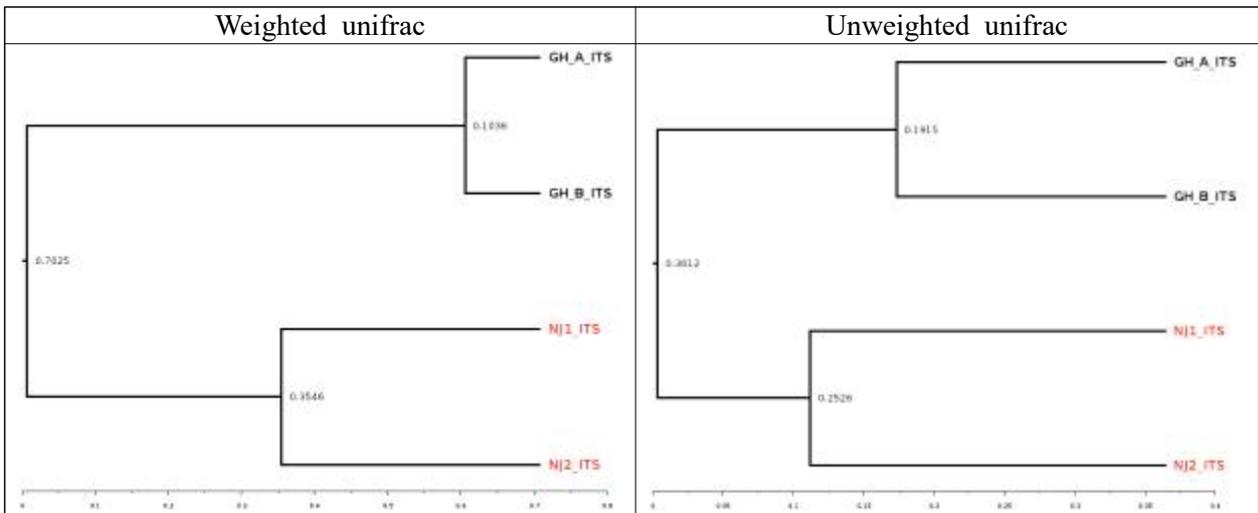
UPGMA tree를 통하여 비닐하우스 토양과 노지 토양의 근연 거리가 멀게 분포하고 있는 것을 확인하였으며, 토양을 수집한 장소 비닐하우스, 토지 토양간의 세균 다양성에 차이가 있다는 것을 추정할 수 있음[그림4-79].



[그림4-79] 수집된 4개 토양 시료의 세균 UPGMA tree comparing 결과.

⑩ UPGMA tree comparing samples of fungi

곰팡이 또한 세균과 마찬가지로 토양 수집장소에 따라 근연 거리가 멀게 분포하고 있었으며, 토양을 수집한 장소 비닐하우스, 토지 토양간의 곰팡이 다양성에 차이가 있다는 것을 확인할 수 있었음[그림4-80].



[그림4-80] 수집된 4개 토양 시료의 곰팡이 UPGMA tree comparing 결과.

#### 4) 포장 실증 실험을 통한 처리조건 규명

##### 가) 다양화를 통한 최적의 시비 방법 규명

선발된 HCS-1B(*Bacillus megaterium*)균주를 (주)중부바이오텍 유기질비료에 각각의 비율로 혼합과 펠릿 제형화 후 포장 실증 실험을 진행함으로써 상추 균핵병 병원균인 *Sclerotinia sclerotiorum*와 *Sclerotinia minor* 대하여 병원성 억제 비율 확립 및 성장촉진 확인하기 위해 실험을 진행하였음. B.L(*Bacillus licheniformis*)균주는 (주)중부바이오텍의 유기질비료에서 분리된 균주로서, 분양을 받아 실험에 사용하였으며, HCS-1B 단일 처리를 포함한, HCS-1B균주와 혼합시 발생하는 성장촉진 및 병억제능력을 확인하고자 (주)중부바이오텍과 공동 실험을 진행하였음. HCS-1B(*B. megaterium*) 및 B.L(*B. licheniformis*)균주는 최적 탄소원 및 질소원을 확립했던 Stach, Yeast extract의 2%를 이용하여 300L 대량배양을 진행 후 세균의 밀도  $1 \times 10^7$ cfu/ml로 맞추어 유기질 비료 혼합에 사용하였으며, 유기질 비료와의 최종적인 혼합 비율은 2%로 혼합하였음. (주)중부바이오텍에서 유기질비료와 길항균을 혼합한 부숙 유기질비료를 펠릿으로 제형화하였으며, 본 실험에서는 길항균이 혼합되어 있는 복합 유기질비료 펠릿을 제공받아 실험을 진행하였음.[표4-30],[표4-31],[그림4-81].

[표4-30] 유기질비료의 길항균주 단일 혼합 비율

(주)중부바이오텍 유기질비료	HCS-1B( <i>B. megaterium</i> ) 및 B.L( <i>B. licheniformis</i> )	혼합 비율(%)
20kg	400ml	2.0

[표4-31] 유기질비료의 길항균주 및 식물 성장촉진균주 혼합 처리 비율

(주)중부바이오텍 유기질비료	HCS-1B( <i>B. megaterium</i> ) + B.L( <i>B. licheniformis</i> )	혼합 비율(%)
20kg	200 : 200 = 400ml	2.0



[그림4-81] 유기질비료의 균주 혼합 및 제공받은 부숙 유기질비료

## 나) 포장 실증 실험을 통한 토양병 방제효과 분석

선발된 길항 균주인 HCS-1B(*Bacillus megaterium*)균주 및 식물 성장촉진 미생물인 TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*)균주를 (주)중부바이오텍 유기질비료에 2% 비율로 혼합 후, 펠릿 제형화 과정을 거쳐, 최종적으로 제작된 유기질비료를 이용하여, 포장 실증 실험을 진행함으로써 유기질비료의 시비 비율별 상추 균핵병원균인 *S. sclerotiorum* 및 *S. minor* 병 억제 능력과 길항 균주(*B. megaterium*)와 식물 성장촉진 균주(*B. licheniformis*)의 상호작용 여부를 확인하기 위해 (주)중부바이오텍과 공동 실험을 진행하였음.

실험 조건은 Control, Positive control(뿌리조은, 팜한농), Negative control①(토토유박, 엔피코), Negative control②(병원균 처리)을 사용하여 실험을 진행하였으며, 유기질비료의 처리는 일반적인 유기질비료 시비량에 따라 3.3m<sup>2</sup>, 6kg를 정량의 기준으로 3kg, 6kg, 12kg를 시비하여 상추 균핵병 억제를 확인하였음. 유기질비료(HCS-1B) 3kg, 6kg, 12kg와 유기질비료(TB B1-B5) 3kg, 6kg, 12kg 그리고 유기질비료(HCS-1B+TB B1-B5) 3kg, 6kg, 12kg씩 비율의 조건으로 시비하였음. 유기질비료를 시비한 후 토양과 섞어 실험을 진행하였으며, 상추(동오적치마, 동오시드)육묘를 정식하여, 3주간 생육을 지켜 본 후 결과를 측정하였음.

상추 균핵병원균은 상추 정식 후 7일 후 Potato Dextrose Agar (PDA)에 배양한 균핵병 병원균 (*S. sclerotiorum*, *S. minor*)을 cork borer를 이용하여 agar 조각들을 상추 근권 토양에 심어 감염시켰으며, 상추 생체중은 각각의 개체들의 무게를 현장에서 측정하였음. 건조중은 60℃ 건조기에서 24시간동안 건조한 후 건조중을 측정하였으며, 상추 감염 측정은 Disease index 0부터 4로 나누어 상추의 성장정도와 병징을 5단계로 나누어 육안으로 판단하였음.

작물 재배 실험 결과 무처리 대조군인 Control의 생체중, 건조중은 평균값이 7.86g, 0.36g으로 측정되었음. Positive control은 *S.sclerotiorum*, *S.minor*, *S.sclerotiorum+S.minor* 별로 생체중은 5.08g, 5.16g, 5.73g이며 건조중은 0.43g, 0.45g, 0.44g측정되었음. Negative control①(타사 유기질비료)은 *S.sclerotiorum*, *S.minor*, *S.sclerotiorum+S.minor* 별로 생체중은 8.69g, 10.48g, 11.01g이며 건조중은 0.55g, 0.69g, 0.83g으로 Control, Positive Control보다 높은 측정값을 기록하였음. 병원균만 처리한 Negative Control②은 *S.sclerotiorum*, *S.minor*, *S.sclerotiorum+S.minor* 순서로 생체중은 4.41g, 2.55g, 4.57g이었으며 건조중은 0.33g, 0.17g, 0.25g으로 모든 처리구와 비교했을 때 현저히 낮은 측정값이 기록되었음[표4-32],[그림 4-82].

유기질비료 처리구는 병원균 감염조건별로 차이를 보였으며 *S.sclerotiorum* 접종에서Control과 비교하였을 때 Negative control①, 유기질비료(HCS-1B) 3kg, 유기질비료(TB B1-B5) 3kg 순으로 생체중이 높았으며, 건조중 또한 유사한 결과를 보였으나 유기질비료(HCS-1B+TB) 6kg, 12kg를 시비한 처리구는 0.57g, 0.60g으로 Negative control①(0.55g)보다 높은 건조중이 측정

되었음.

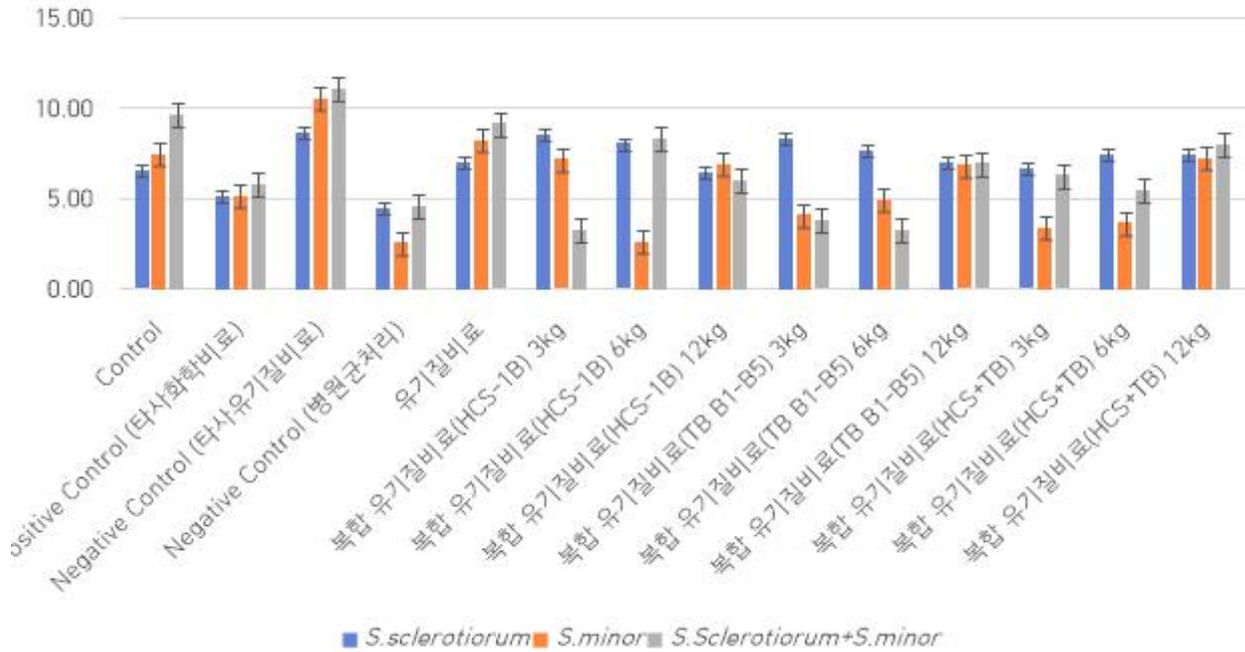
*S. minor* 접종에서는 타사 유기질비료 처리구가 생체중 10.48g으로 가장 높았으며 다음으로 유기질비료 처리구가 8.23g으로 두 번째로 높았음. 건조중 또한 Negative control①이 0.69g으로 가장 높았음. disease index의 경우 *S. sclerotiorum*보다 병원성이 강하여 대부분의 처리구에서 병징이 나타났지만 Negative control①에서는 병징이 나타나지 않았음. Positive control과 더불어 유기질비료(HCS-1B), 유기질비료(TB B1-B5)처리구들은 대부분 *S. minor*에 대하여 disease index가 1~4까지 모든 처리구가 병징을 보였음. 두가지 병원균을 모두 혼합한 *S. sclerotiorum+S. minor* 조건에서는 *S. minor*와 마찬가지로 Negative control①은 생체중, 건조중 순서로 11.01g, 0.83g으로 가장 높은 측정값을 기록하였으며 병징 또한 나타나지 않았음. 더불어 유기질비료 처리구의 경우 또한 병징이 나타나지 않았으며 유기질비료(HCS-1B)를 시비한 처리구는 6kg 조건의 경우 병징을 나타내지 않았지만 3kg, 12kg 조건의 경우 disease index가 3~4으로 다소 높은 병징도를 보였음. 복합 유기질비료(TB B1-B5) 12kg 조건의 disease index는 1로 적은 병징을 보였지만 유기질비료(TB B1-B5) 3kg, 6kg 조건의 처리구는 3~4정도의 높은 disease index를 기록하였음. 유기질비료(HCS-1B+TB) 시비한 처리구는 *S. sclerotiorum+S. minor* 조건하에서 병징이 없거나 1정도로 균일한 병징도를 보였음.

결과를 종합해보면 유기질비료(HCS-1B)를 시비한 처리구의 경우 *S. sclerotiorum*에 대한 길항작용이 높은 것으로 관찰되었음. 더불어 *S. sclerotiorum*에 대하여 유기질비료(HCS-1B+TB) 처리구 또한 disease index가 1로 균일하였기 때문에 길항 균주인 *B. megaterium* 와 식물 생장촉진 균주인 *B. licheniformis* 두 균주를 혼합하였을 시 HCS-1B 균주의 길항력이 유지되는 것을 확인할 수 있었음.

[표4-32] 상추 균핵병에 대한 병원성 실험 결과

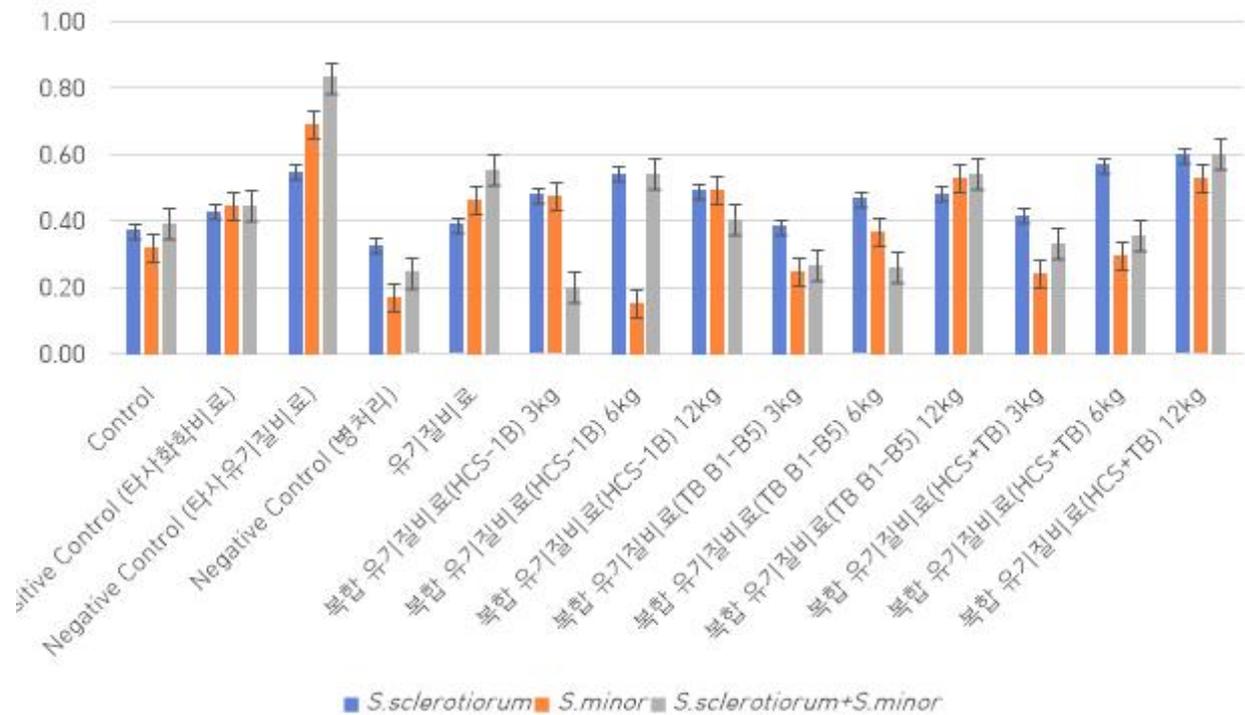
처리구	병원균	<i>S. sclerotiorum</i>			<i>S. minor</i>			<i>S. sclerotiorum</i> + <i>S. minor</i>		
		생체중 (g)	건물중 (g)	Disease Index (0~4)	생체중 (g)	건물중 (g)	Disease Index (0~4)	생체중 (g)	건물중 (g)	Disease Index (0~4)
Control		6.49	0.37	0	7.44	0.32	0	9.64	0.39	0
Positive Control (타사화학비료)		5.08	0.43	2	5.16	0.45	2	5.73	0.44	2
Negative Control ①(타사유기질비료)		8.59	0.55	3	10.48	0.69	0	11.01	0.83	0
Negative Control ②(병원균처리)		4.41	0.33	3	2.55	0.17	4	4.57	0.25	3
유기질비료		7.03	0.39	2	8.23	0.46	2	9.13	0.55	0
유기질비료(HCS-1B) 3kg		8.57	0.48	0	7.15	0.47	2	3.27	0.20	4
유기질비료(HCS-1B) 6kg		8.02	0.54	0	2.62	0.15	4	8.29	0.54	0
유기질비료(HCS-1B) 12kg		6.47	0.49	1	6.92	0.49	1	5.97	0.40	3
유기질비료(TB B1-B5) 3kg		8.32	0.38	4	4.08	0.25	3	3.74	0.27	3
유기질비료(TB B1-B5) 6kg		7.63	0.47	0	4.90	0.37	3	3.26	0.26	4
유기질비료(TB B1-B5) 12kg		6.94	0.48	1	6.82	0.53	1	6.92	0.54	1
유기질비료(HCS+TB) 3kg		6.60	0.42	1	3.32	0.24	4	6.27	0.33	1
유기질비료(HCS+TB) 6kg		7.39	0.57	1	3.64	0.30	4	5.42	0.35	2
유기질비료(HCS+TB) 12kg		7.42	0.60	1	7.18	0.53	1	7.94	0.60	0

### 생체중 (g)

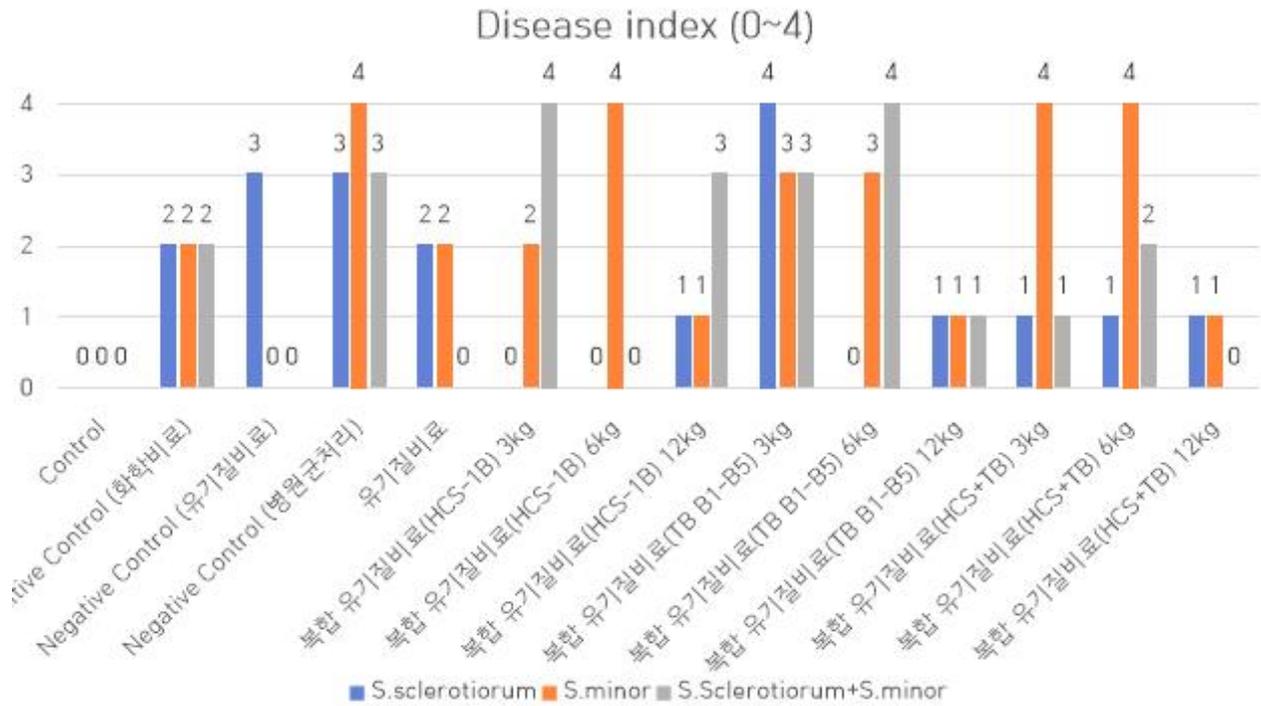


[그림4-82] 상추 균핵병에 대한 병원성 실험 생체중 측정 결과

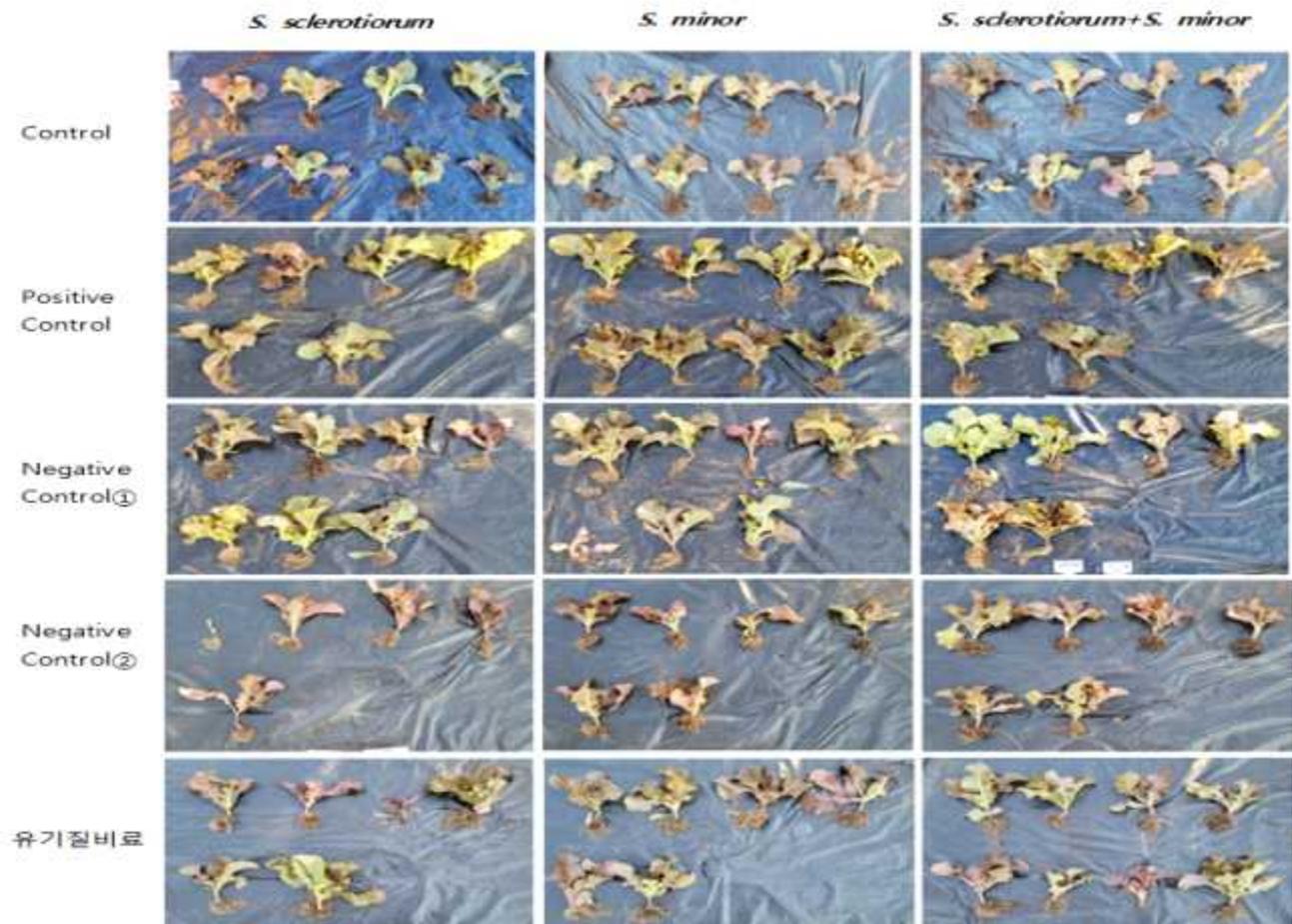
### 건조중 (g)

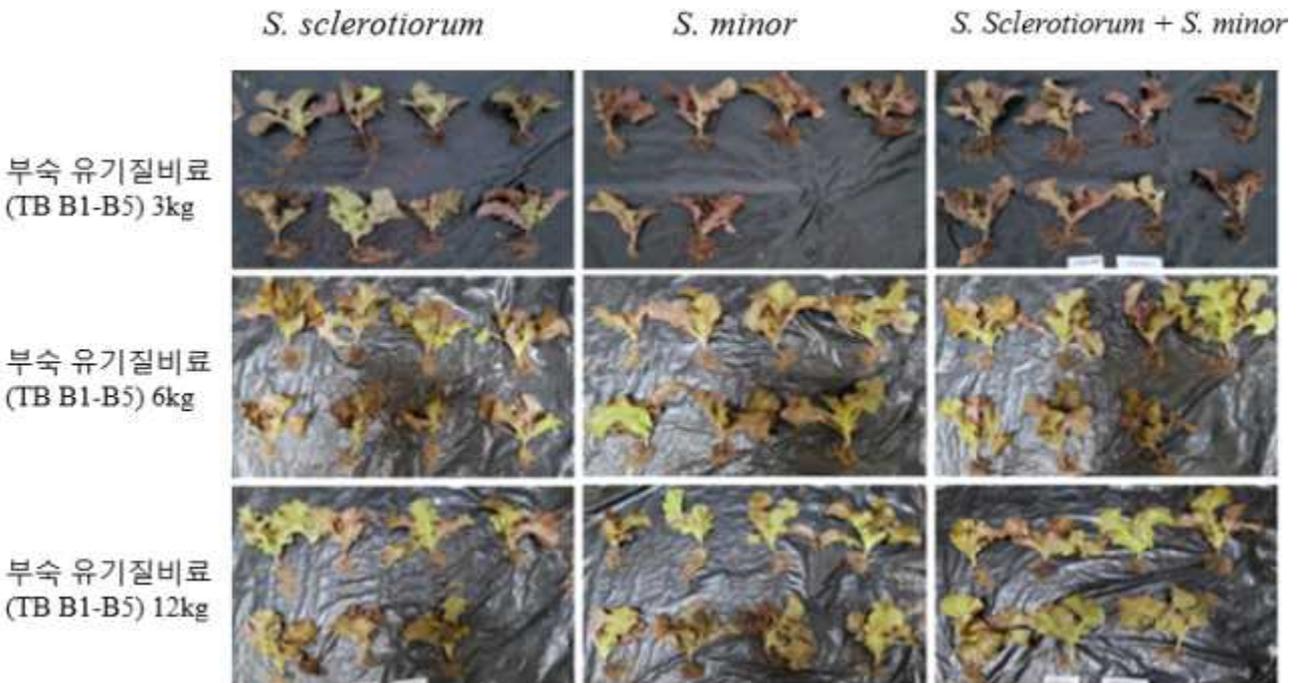
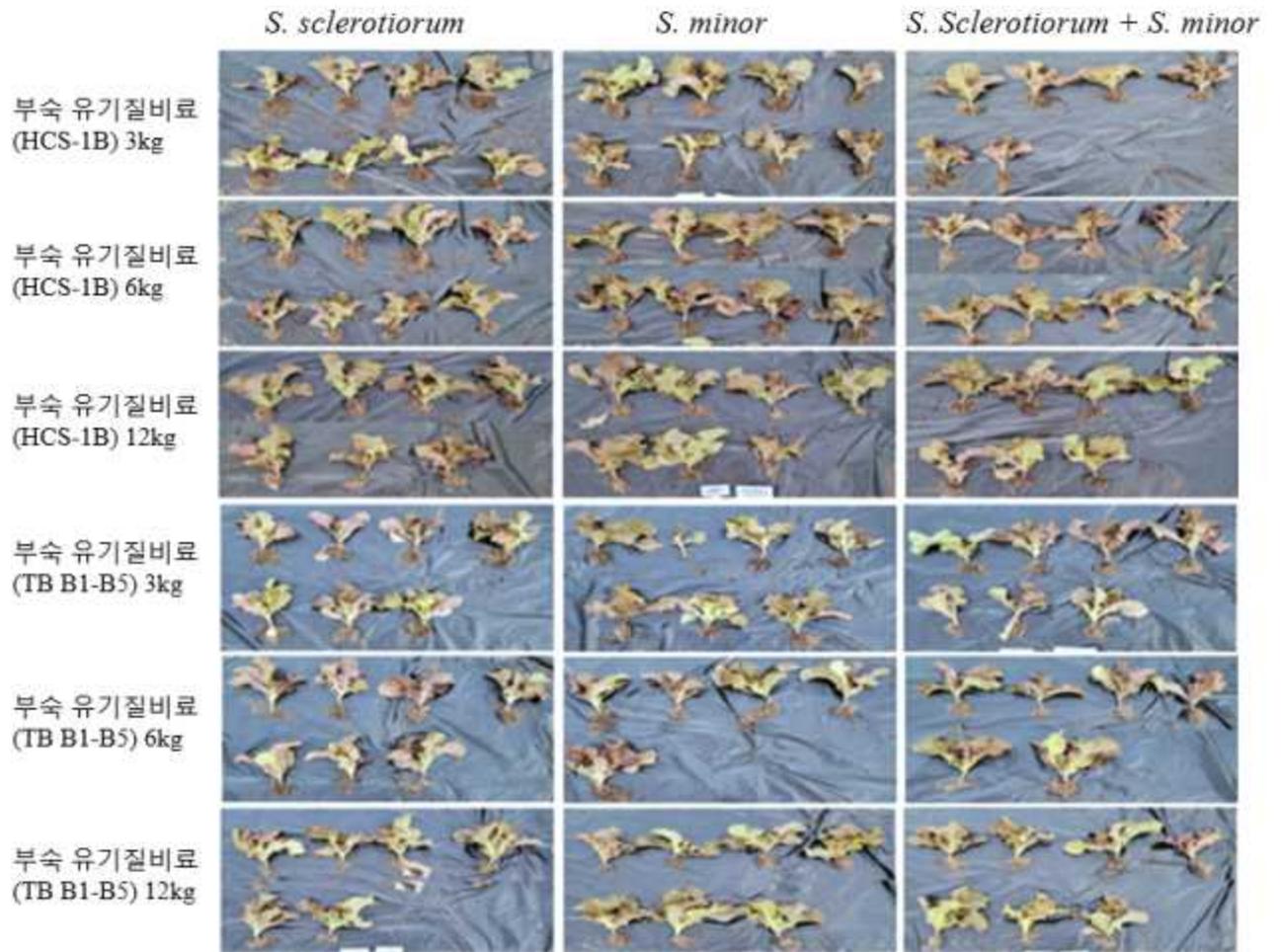


[그림4-83] 상추 균핵병에 대한 병원성 실험 건조중 측정 결과



[그림4-84] 상추 균핵병에 대한 병원성 실험 Disease index 측정 결과





[그림4-85] 상추 균핵병에 대한 병원성 실험

#### 다) 상추 병원균 처리에 따른 미생물상 조사

유기질비료의 비율별 시비를 통한 상추 균핵병 병원성 실험을 진행함과 동시에 시비 전, 후에 따른 시험 포장내의 토양 미생물 중 세균과 곰팡이의 다양성 변화 및 특성을 비교, 분석하기 위하여 실험을 진행하였음.

실험 조건의 토양은 Control, Positive control(뿌리조은, 팜한농), Negative control(토토유박, 엔피코), Negative control(병원균처리), 중부바이오텍 유기질비료(그린나래)을 이용하여 시비를 진행하였으며, 복합 유기질비료의 처리는 일반적인 유기질비료 시비량에 따라 3.3m<sup>2</sup>, 6kg를 정량의 기준으로 3kg, 6kg, 12kg를 시비하였음. 유기질비료(HCS-1B) 3kg, 6kg, 12kg와 유기질비료(TB B1-B5) 3kg, 6kg, 12kg 그리고 유기질비료 혼합(HCS-1B+TB B1-B5) 3kg, 6kg, 12kg씩 비율의 조건으로 시비하였으며, 시비 전과 후로 나뉘어 Auger를 이용하여 지표로부터 15cm 안쪽의 토양을 수집하였음[그림4-86].

토양 시료 채취 방법은 처리구 별로 무작위로 세 지점에서 채취하여 균등하게 섞은 후 토양 세균 균집 분석에 사용하였음. 수집한 토양 시료는 아이스박스(ice box)에 담아 신속히 실험실로 옮겨옴. 토양은 잘 섞은 후 2mm 체로 걸러 균질화하여 200g을 eppendorf tube에 나누어 담았음. 토양 시료 1g을 멸균수 9ml에 넣고 15분간 정치 과정을 진행함. 세균은 혼합액을 Serial dilution 방법을 이용하여 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup> 기준으로 희석하여 Tryptic Soy Agar (TSA) 배지에 각각 30 $\mu$ l씩 접종 도말 후, 28 $^{\circ}$ C에서 3일간 배양하였음. 또한 곰팡이는 항생제 Tetracycline(Sigma-Aldrich<sup>®</sup>), Streptomycin(Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) 2종 3g을 각각 멸균수 30ml에 녹인 후 Minisart<sup>®</sup> Syringe Filter를 이용하여 4.5ml씩 Potato Dextrose Agar (PDA) 배지에 주입하였음. 항생제를 혼합한 PDA 배지에 토양혼합액을 Serial dilution 방법을 이용하여 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> 기준으로 희석해 각각 30 $\mu$ l씩 접종 도말 후, 28 $^{\circ}$ C에서 3일간 배양하였음. 모든 처리구별 승수희석은 3반복으로 진행하였음. 각 시료 당 미생물 수는 평판 배지 상에 나타난 콜로니를 각각 계수한 후 평균한 값을 CFU(Colony Forming Unit) 으로 나타내었음.



[그림4-86] 병원성 처리 토양의 미생물상 조사 지역

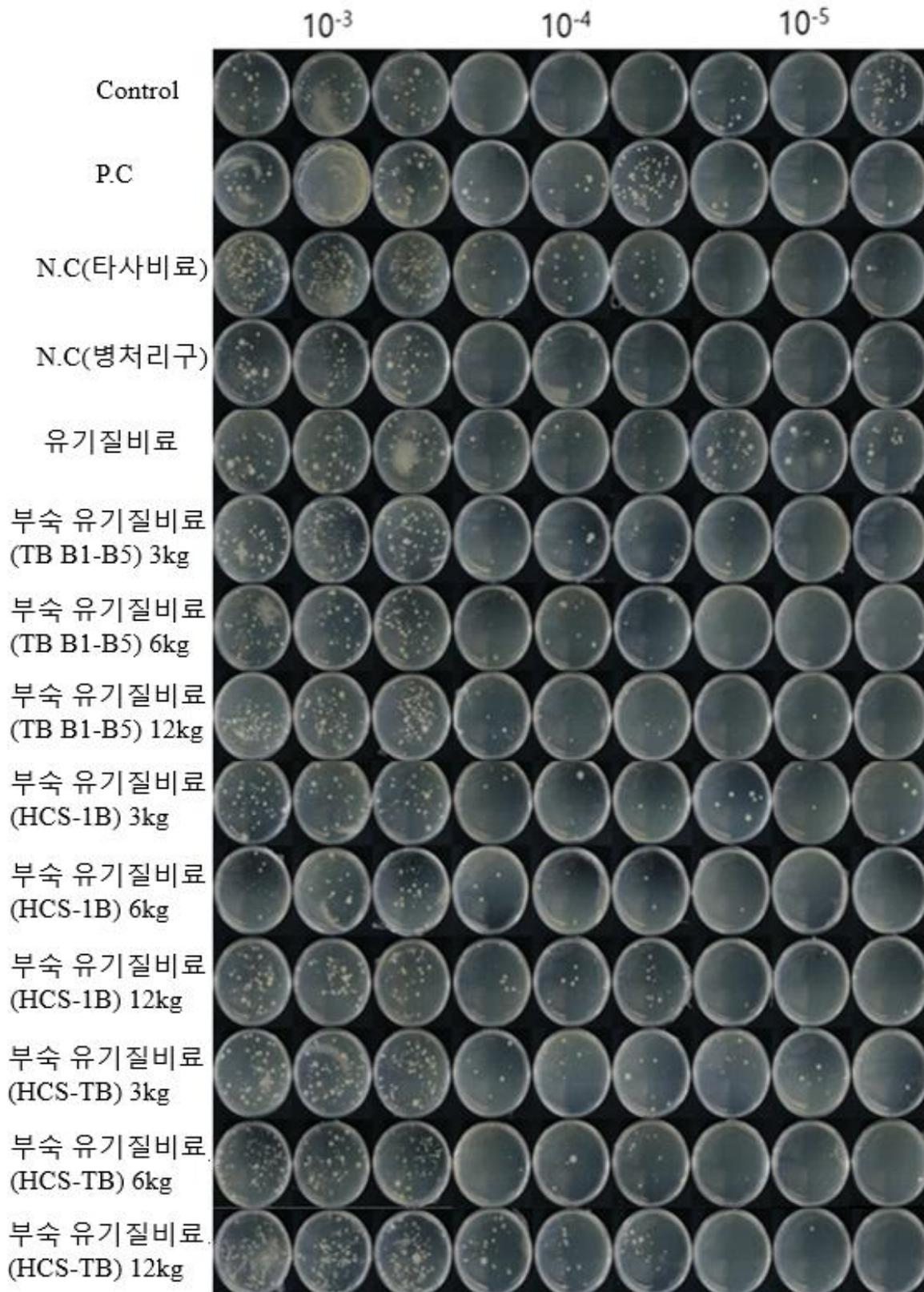
유기질비료를 시비한 처리구에 세균 군집도가 대체적으로 증가하였음.  $10^{-3}$  기준으로 시비 비율이 6kg 처리 시 HCS-1B 6kg, TB B1-B5 6kg, 혼합(HCS-1B+TB B1-B5) 6kg를 시비한 토양내의 세균이 전체적으로 증가했음을 알 수 있으며, Control처리구 및 유기질비료 처리구를 제외한 3kg, 12kg은 토양내의 세균 군집도가 유의미한 증가를 나타냈음[표4-33].

$10^{-4}$  으로 나타난 결과는 Control, 유기질비료, HCS-1B 3kg, TB B1-B5 3kg 처리구의 세균 군집도가 유기질비료를 처리하기 전보다 낮았음. 종합적으로 길항 미생물이 혼합된 복합 유기질비료를 처리 한 토양의 세균 군집도가 처리 전보다 전체적으로 높았으며, 각 처리구의 6kg 비율로 시비할 시 뚜렷한 토양내의 다양성을 나타냈음[표4-33],[표4-34],[그림4-87][그림4-88].

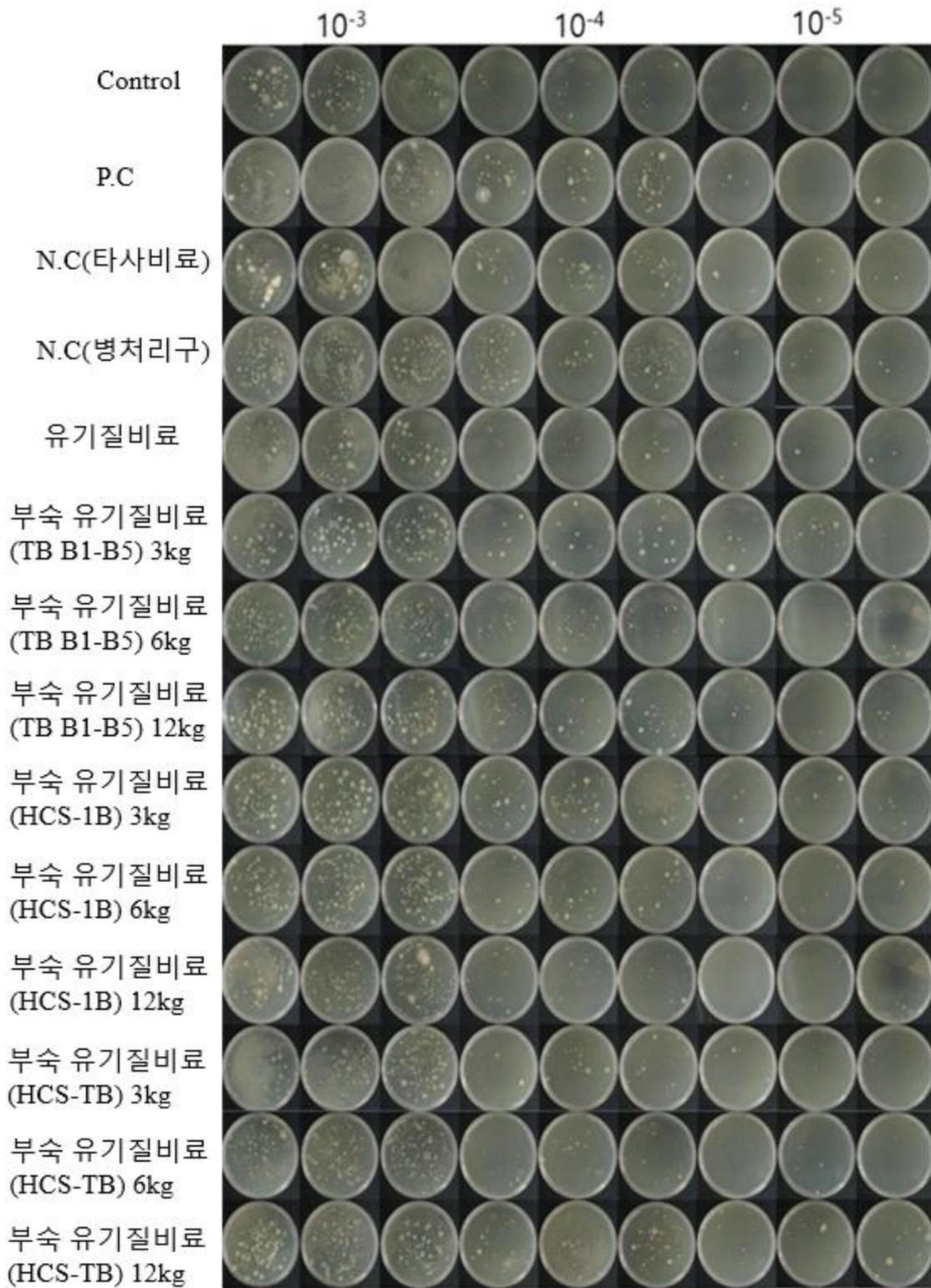
[표4-33] 유기질비료 시비 전, 후 비율 별 토양내의 세균 미생물상 조사

		Bacteria Isolates													
		C <sup>1</sup>	P.C <sup>2</sup>	N.C <sup>3</sup>	N.C <sup>4</sup>	비료 <sup>5</sup>	HC <sup>6</sup> 3kg	HC 6kg	HC 12kg	TB <sup>7</sup> 3kg	TB 6kg	TB 12kg	혼합 <sup>8</sup> 3kg	혼합 6kg	혼합 12kg
처리 전	$10^{-3}$	78	122	74	56	142	85	53	60	60	37	65	59	55	144
	$10^{-4}$	35	37	15	4	70	36	9	20	26	7	16	13	17	43
	$10^{-5}$	20	2	1	0	59	9	2	1	3	0	6	5	6	8
처리 후	$10^{-3}$	24	92	141	131	76	79	89	98	97	129	106	82	93	138
	$10^{-4}$	11	55	71	75	26	24	22	36	23	38	25	17	33	24
	$10^{-5}$	4	6	11	8	6	12	3	10	7	6	4	7	4	7

C<sup>1</sup>: control, P.C<sup>2</sup>: positive control, N.C<sup>3</sup>: negative control\_타사비료, N.C<sup>4</sup>: negative control\_병원균처리, 비료<sup>5</sup>: (주)중부바이오텍 유기질비료, HC<sup>6</sup>: HCS-1B(*B. megaterium*), TB<sup>7</sup>: TB B1-B5(*B. licheniformis*), 혼합<sup>8</sup>: HCS-1B(*B. megaterium*) + TB B1-B5(*B. licheniformis*).



[그림4-87] 병원성 처리 토양내 세균 다양성 결과(시비 전)



[그림4-88] 병원성 처리 토양내 세균 다양성 결과(시비 후)

유기질비료의 비율별 시비한 처리구의 곰팡이 군집도가 대체적으로 증가하였음. 10<sup>-2</sup> 기준으로

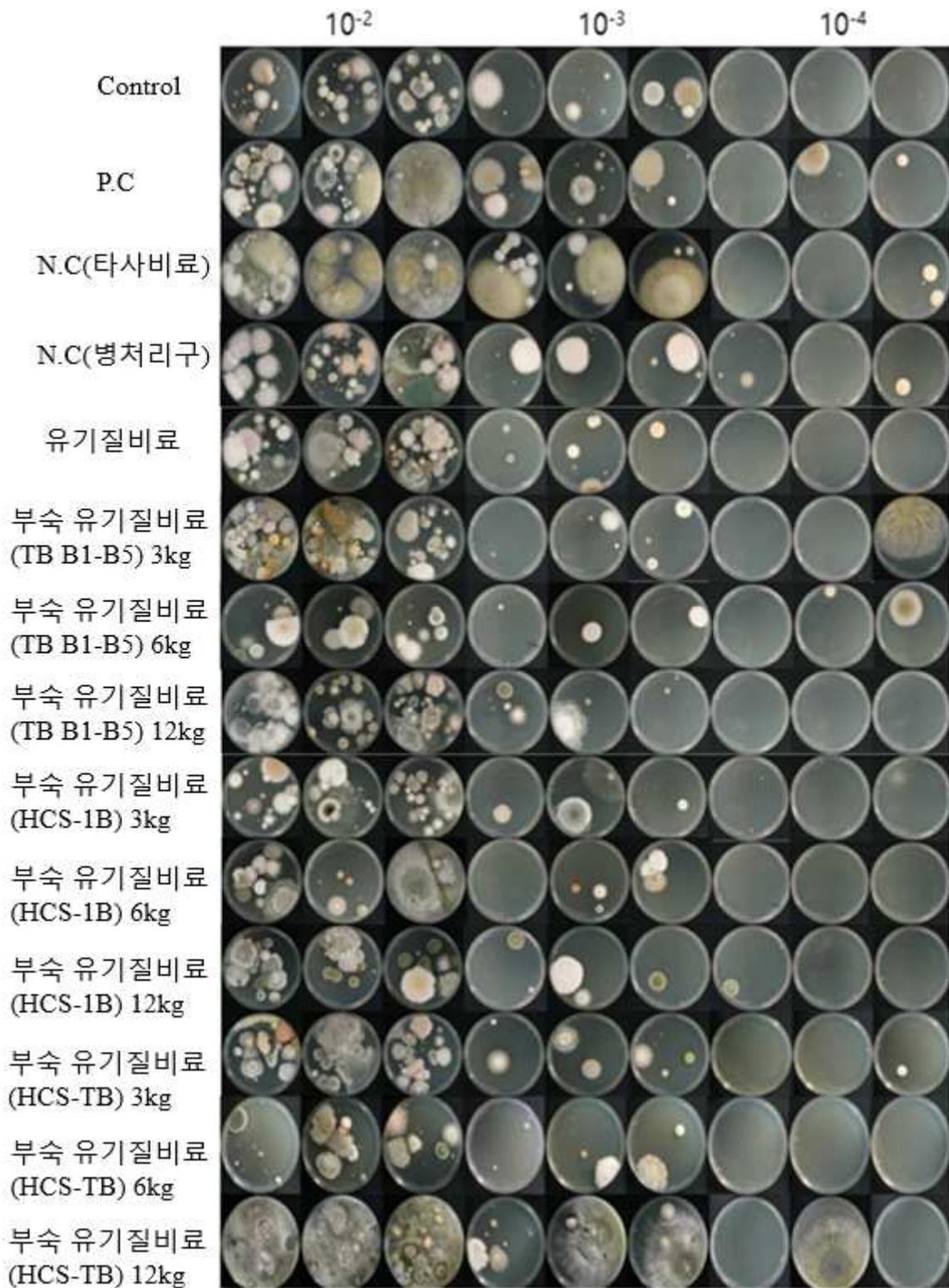
복합 유기질비료 비율별 시비한 처리구 중 6kg, 12kg 처리 시 HCS-1B 6kg, HCS-1B 배량 12kg, TB B1-B5 6kg, 12kg, 혼합(HCS-1B+TB B1-B5) 3kg, 6kg, 12kg 처리구의 토양내 곰팡이가 전체적으로 증가했음을 알 수 있으며, Control처리구 및 Positive control, Negative control, 유기질비료 처리구에서도 증가를 나타냈음[표4-34].

세균 및 곰팡이의 군집을 종합하면, 복합 유기질비료의 비율별 시비한 처리구에서는 전체적으로 미생물의 수가 증가함을 나타냈으며, 시비 비율이 3kg 보다 6kg, 12kg 비율의 처리구가 더 많은 미생물이 증가하였음[표4-34],[그림4-89],[그림4-90].

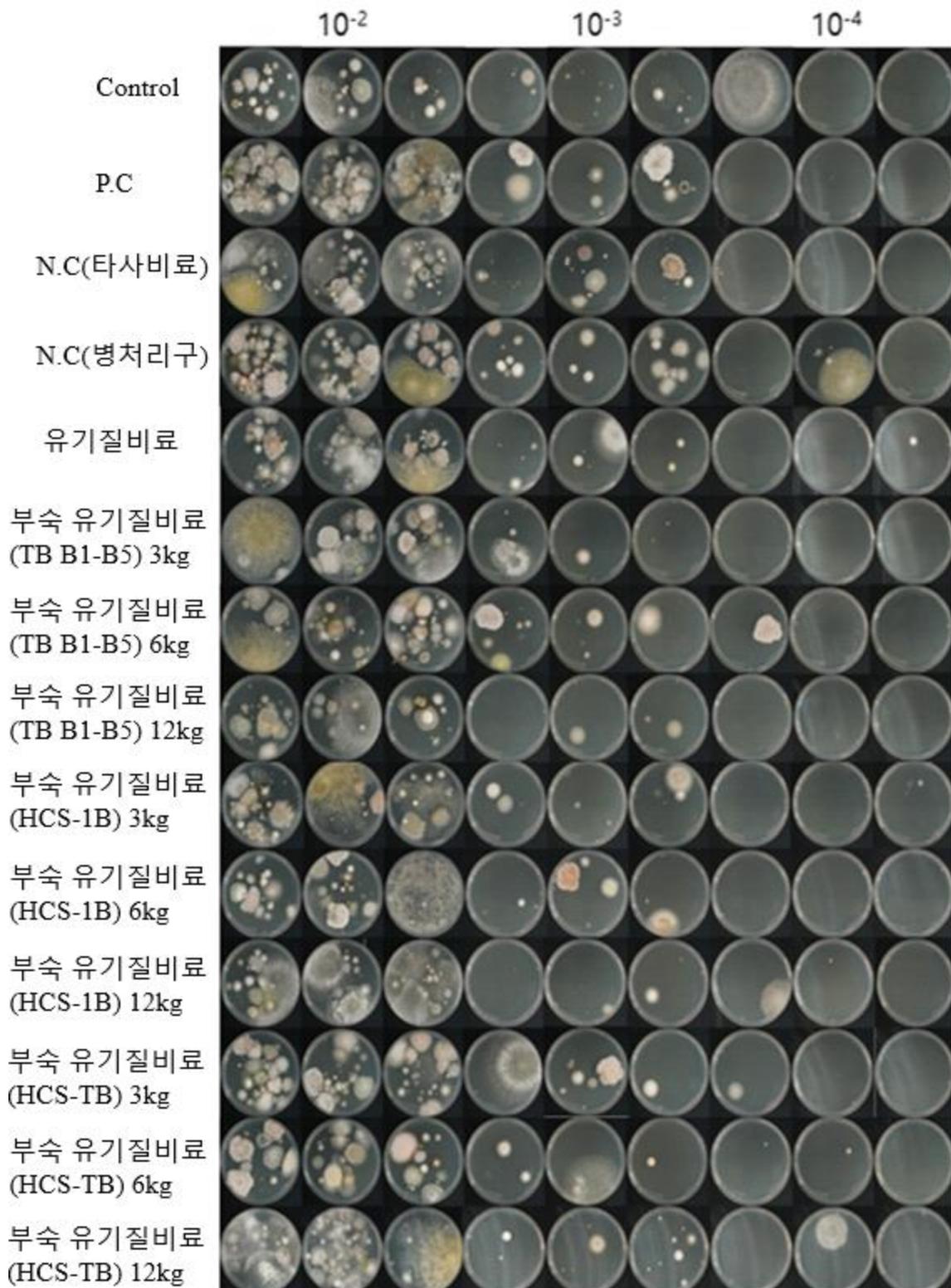
[표4-34] 유기질비료 시비 전, 후 비율 별 토양내의 곰팡이 미생물상 조사

		Fungi Isolates														
		C <sup>1</sup>	P.C <sup>2</sup>	N.C <sup>3</sup>	N.C <sup>4</sup>	비료 <sup>5</sup>	HC <sup>6</sup> 3kg	HC 6kg	HC 12kg	TB <sup>7</sup> 3kg	TB 6kg	TB 12kg	혼합 <sup>8</sup> 3kg	혼합 6kg	혼합 12kg	
처리 전	10 <sup>-2</sup>	14	9	8	9	13	14	9	10	20	9	12	12	7	7	
	10 <sup>-3</sup>	4	3	8	2	4	2	2	2	2	2	2	2	2	4	
	10 <sup>-4</sup>	0	2	1	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	
처리 후	10 <sup>-2</sup>	20	28	25	27	22	11	25	17	19	13	15	26	18	18	
	10 <sup>-3</sup>	4	6	8	7	5	2	5	2	4	5	2	5	2	7	
	10 <sup>-4</sup>	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	

C<sup>1</sup>: control, P.C<sup>2</sup>: positive control, N.C<sup>3</sup>: negative control\_타사비료, N.C<sup>4</sup>: negative control\_병원균처리, 비료<sup>5</sup>: (주)중부바이오텍 유기질비료, HC<sup>6</sup>: HCS-1B(*B. megaterium*), TB<sup>7</sup>: TB B1-B5(*B. licheniformis*), 혼합<sup>8</sup>: HCS-1B(*B. megaterium*) + TB B1-B5(*B. licheniformis*).



[그림4-89] 병원성 처리 토양내 곰팡이 다양성 결과(시비 전)



[그림4-90] 병원성 처리 토양내 곰팡이 다양성 결과(시비 후)

**라) 포장 실증 실험을 통한 상추 성장촉진 효과 확인**

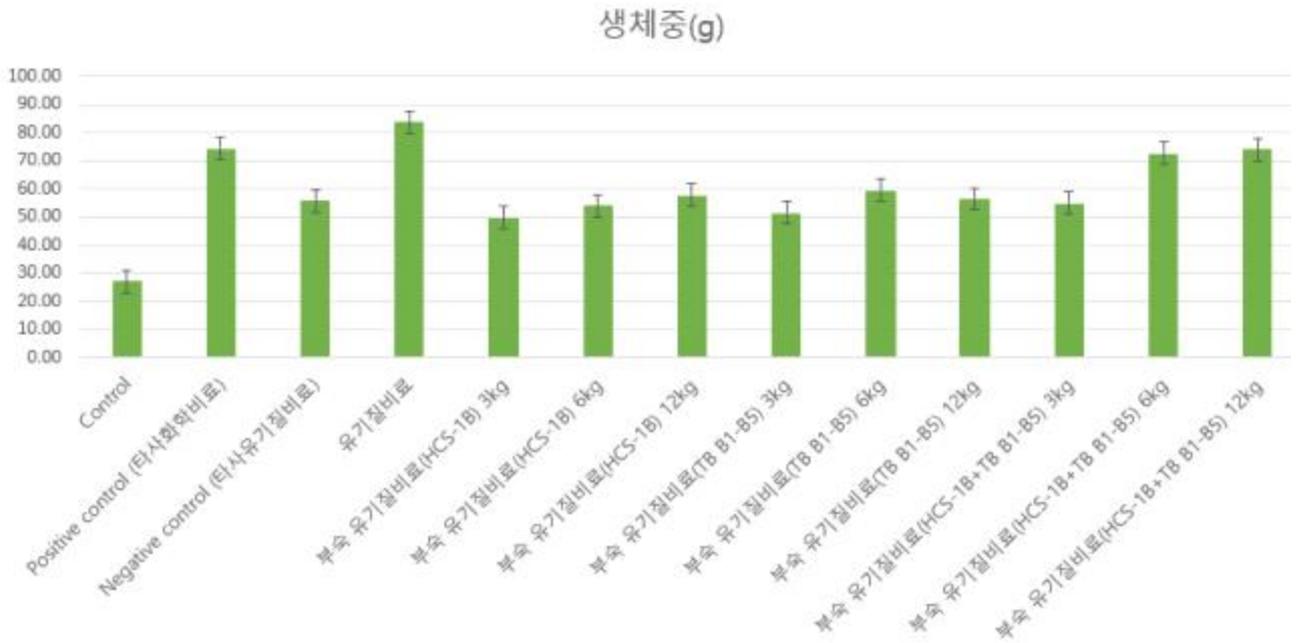
선발된 길항 균주인 HCS-1B(*Bacillus megaterium*)균주 및 식물 성장촉진 미생물인 TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*)균주를 (주)중부바이오텍 유기질비료에 2% 비율로 혼합 후, 펠릿 제형화 과정을 거쳐, 최종적으로 제작된 복합 유기질비료를 이용하여, 포장 실증 실험을 진행함으로써 복합 유기질비료의 시비 비율별 상추 성장촉진 효과를 확인 및 길항균주(*B. megaterium*)와 식물 성장촉진 균주(*B. licheniformis*)의 상호작용 여부를 확인하기 위해 (주)중부바이오텍과 공동 실험을 진행하였음.

실험 조건은 Control, Positive control(뿌리조은, 팜한농), Negative control①(토토유박, 엔피코), 중부바이오텍 유기질비료(그린나래)을 사용하여 실험을 진행하였으며, 복합 유기질비료의 처리는 일반적인 유기질비료 시비량에 따라 3.3m<sup>2</sup>, 6kg를 정량의 기준으로 3kg, 6kg, 12kg를 시비하여 성장촉진효과를 확인하였음. 복합 유기질비료(HCS-1B) 3kg, 6kg, 12kg와 복합 유기질비료(TB B1-B5) 3kg, 6kg, 12kg 그리고 복합 유기질비료(HCS-1B+TB B1-B5) 3kg, 6kg, 12kg씩 비율의 조건으로 시비하였음. 복합 유기질비료를 시비한 후 토양과 섞어 실험을 진행하였으며, 상추(동오적치마, 동오시드)육묘를 정식하여, 3주간 생육을 지켜 본 후 결과를 측정하였음.

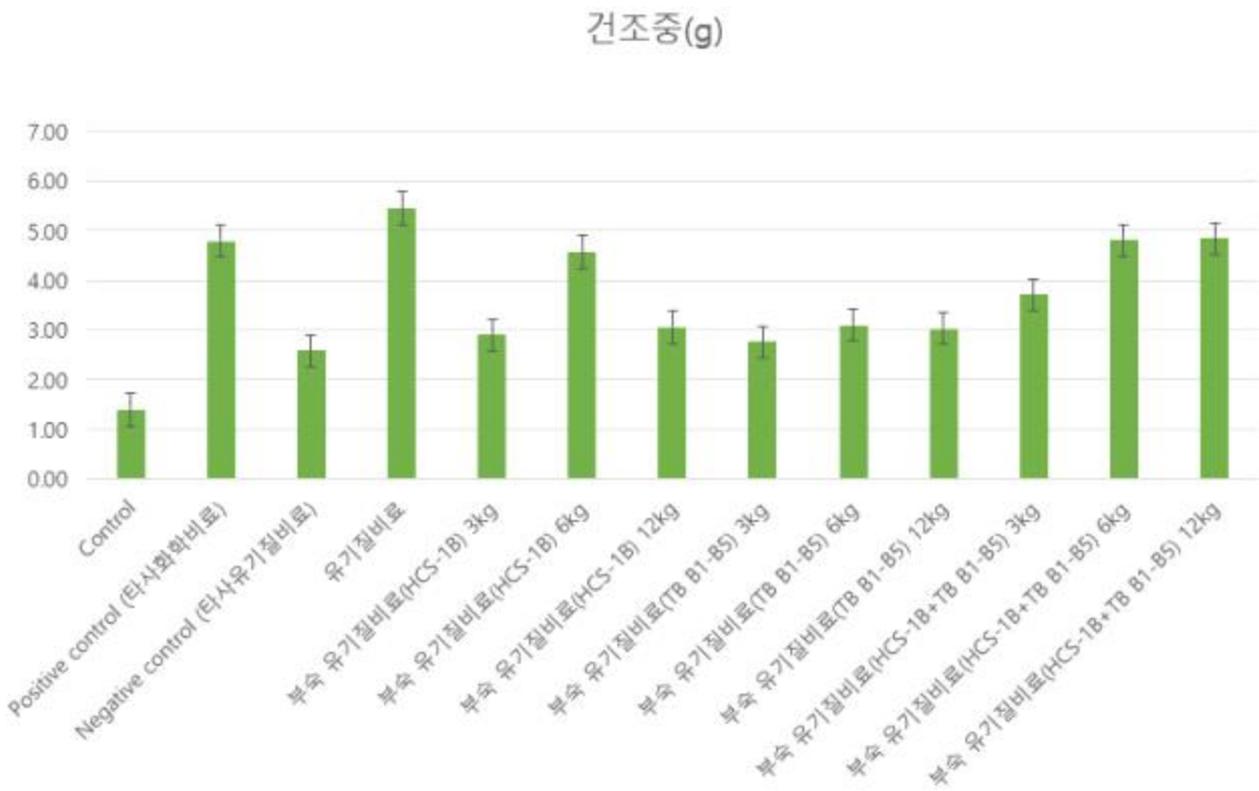
측정 결과, 유기질비료의 길항 미생물을 비율별 혼합한 처리구에서는 복합 유기질비료(HCS-1B+TB B1-B5) 6kg, 12kg 시비 조건이 생체중, 건조중, 엽면적 및 엽록소 함량에서 우수한 결과를 나타냈으며, 복합 유기질비료의 단일 처리구에서는 복합 유기질비료(TB B1-B5) 6kg 및 복합 유기질비료(HCS-1B+TB B1-B5) 12kg의 시비 비율이 타사 유기질비료보다 우수한 성장촉진 효과를 나타냈음.

**[표4-35] 유기질비료의 비율별 시비에 따른 성장촉진효과 결과**

처리구	생체중(g)	건조중(g)	엽면적(cm <sup>2</sup> )	엽록소 함량 (SPAD value)
Control	27.08	1.41	452.40	19.00
Positive control(타사화학비료)	74.47	4.80	994.98	21.36
Negative control(타사유기질비료)	55.74	2.59	721.58	22.36
유기질비료	83.88	5.45	1171.61	20.22
유기질비료(HCS-1B) 3kg	49.65	2.90	743.46	20.83
유기질비료(HCS-1B) 6kg	54.03	4.57	1026.26	19.16
유기질비료(HCS-1B) 12kg	57.82	3.06	883.47	19.75
유기질비료(TB B1-B5) 3kg	51.61	2.76	720.99	20.34
유기질비료(TB B1-B5) 6kg	59.37	3.11	895.16	19.95
유기질비료(TB B1-B5) 12kg	56.50	3.04	953.72	19.81
유기질비료(HCS-1B+TB B1-B5) 3kg	54.80	3.71	907.62	19.58
유기질비료(HCS-1B+TB B1-B5) 6kg	72.72	4.81	927.64	22.12
유기질비료(HCS-1B+TB B1-B5) 12kg	74.22	4.84	1163.83	23.91

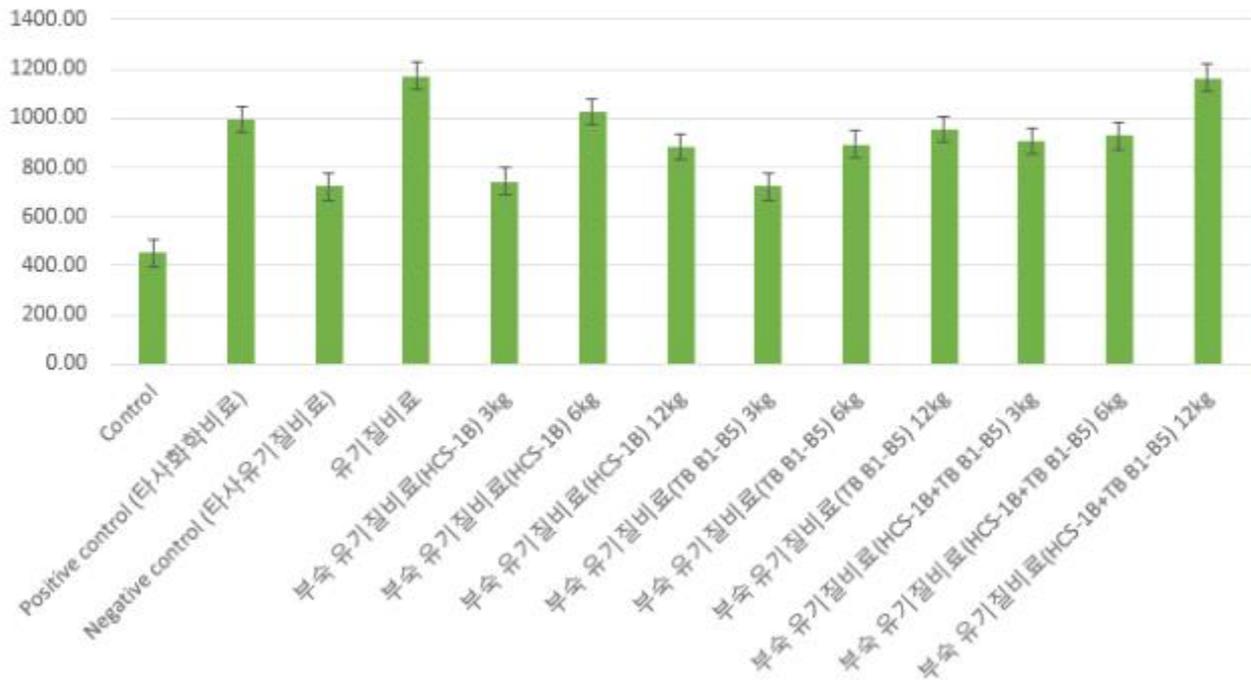


[그림4-91] 유기질비료의 비율별 시비에 따른 생체중 측정 결과



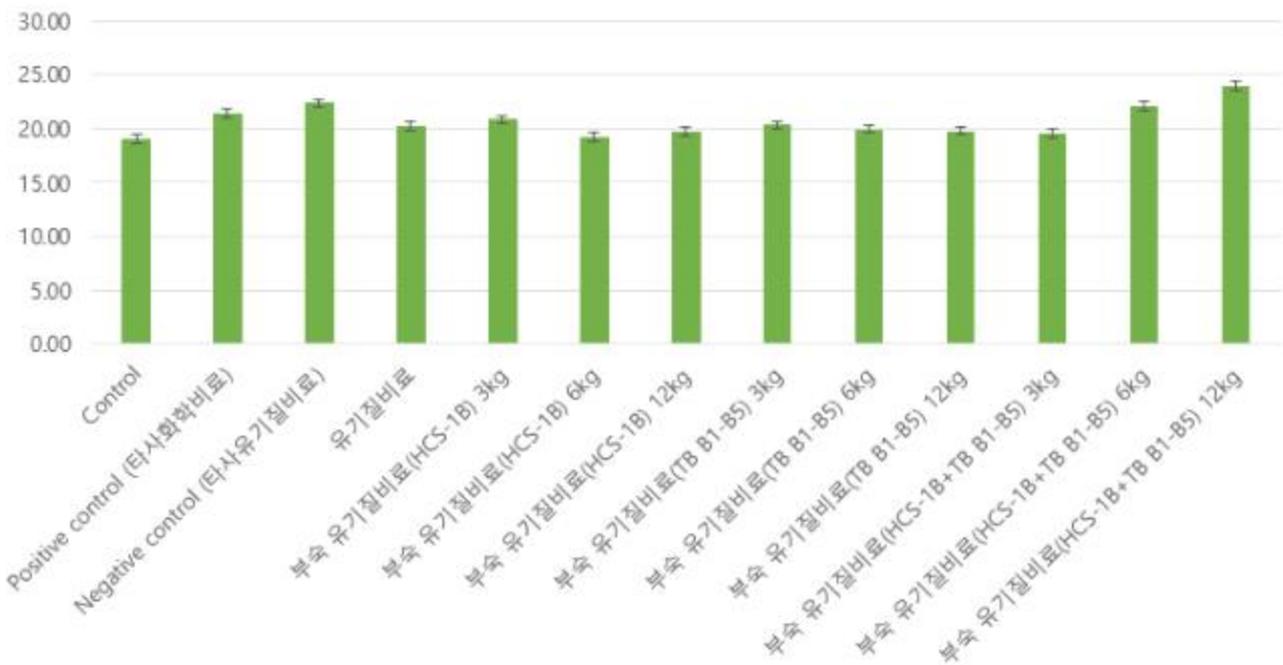
[그림4-92] 유기질비료의 비율별 시비에 따른 건조중 측정 결과

### 엽면적(cm<sup>2</sup>)

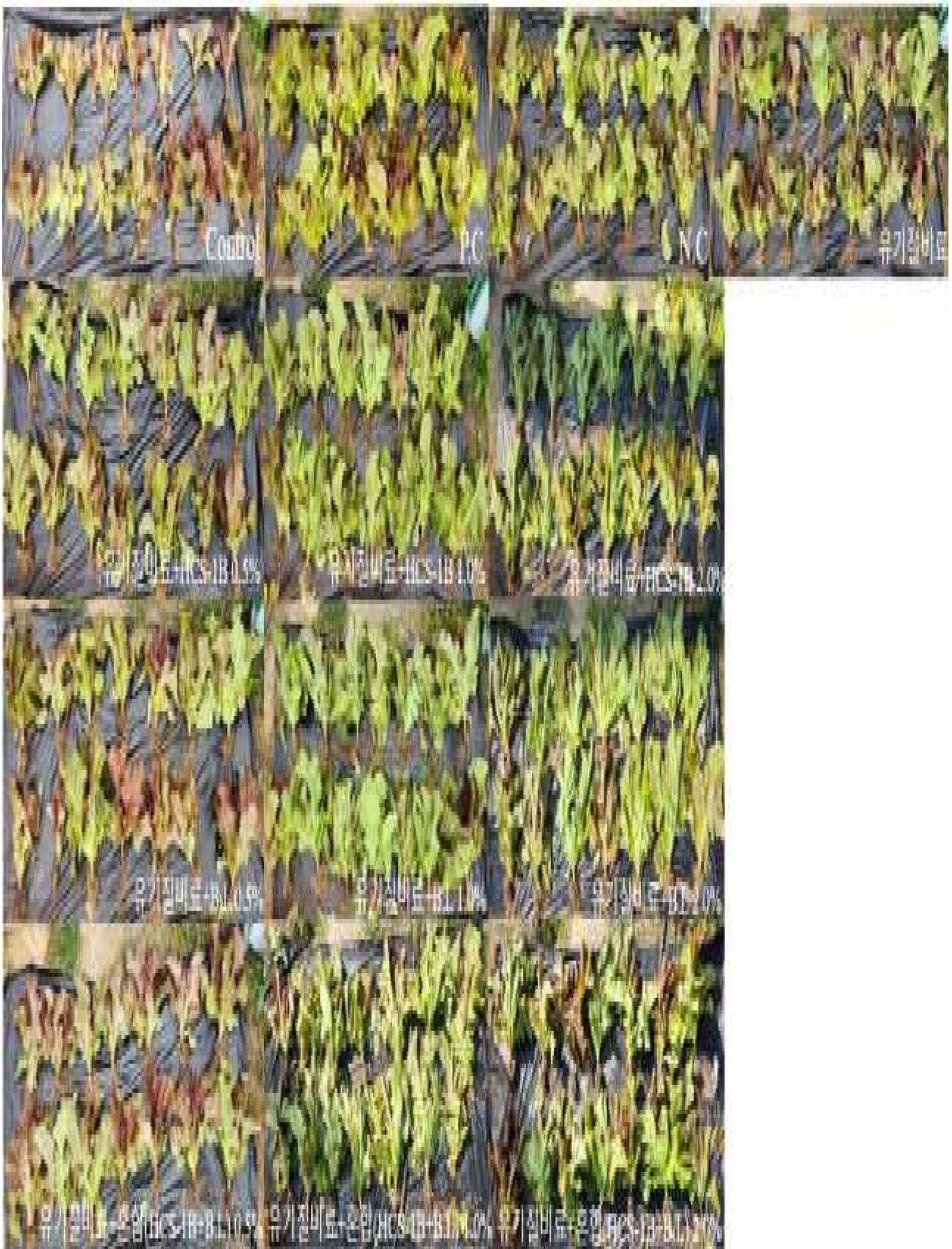


[그림4-93] 유기질비료의 비율별 시비에 따른 엽면적 측정 결과

### 엽록소 함량(SPAD)



[그림4-94] 유기질비료의 비율별 시비에 따른 엽록소 측정 결과



[그림4-95] 유기질비료의 비율별 시비에 따른 상추 성장촉진 효과 확인

#### 마) 비율별 처리에 따른 상추 성장촉진 효과 검정 후 미생물상 조사

유기질비료의 비율별 시비를 통한 상추 성장촉진 실험을 진행함과 동시에 유기질비료 시비 전, 후에 따른 시험 포장내의 토양 미생물 중 세균과 곰팡이의 다양성 변화 및 특성을 비교, 분석하기 위하여 실험을 진행하였음.

실험 조건의 토양은 Control, Positive control(뿌리조은, 팜한농), Negative control(토토유박, 엔피코), 중부바이오텍 유기질비료(그린나래)을 이용하여 시비를 진행하였으며, 유기질비료의 처리는 일반적인 유기질비료 시비량에 따라 3.3m<sup>2</sup>, 6kg를 정량의 기준으로 3kg, 6kg, 12kg를 시비하였음. 유기질비료(HCS-1B) 3kg, 6kg, 12kg와 유기질비료(TB B1-B5) 3kg, 6kg, 12kg 그리고 유기질비료(HCS-1B+TB B1-B5) 3kg, 6kg, 12kg씩 비율의 조건으로 시비하였으며, 시비 전과 후로 나뉘어 Auger를 이용하여 지표로부터 15cm 안쪽의 토양을 수집하였음[그림4-96].

토양 시료 채취 방법은 처리구 별로 무작위로 세 지점에서 채취하여 균등하게 섞은 후 토양 세균 균집 분석에 사용하였음. 수집한 토양 시료는 아이스박스(ice box)에 담아 신속히 실험실로 옮겨옴. 토양은 잘 섞은 후 2mm 체로 걸러 균질화하여 200g을 eppendorf tube에 나누어 담았음. 토양 시료 1g을 멸균수 9ml에 넣고 15분간 정치 과정을 진행함. 세균은 혼합액을 Serial dilution 방법을 이용하여 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup> 기준으로 희석하여 Tryptic Soy Agar (TSA) 배지에 각각 30 $\mu$ l씩 접종 도말 후, 28 $^{\circ}$ C에서 3일간 배양하였음. 또한 곰팡이는 항생제 Tetracycline(Sigma-Aldrich $^{\circ}$ ), Streptomycin(Sigma-Aldrich $^{\circ}$ ) 2종 3g을 각각 멸균수 30ml에 녹인 후 Minisart $^{\circ}$  Syringe Filter를 이용하여 4.5ml씩 Potato Dextrose Agar (PDA) 배지에 주입하였음. 항생제를 혼합한 PDA 배지에 토양혼합액을 Serial dilution 방법을 이용하여 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> 기준으로 희석해 각각 30 $\mu$ l씩 접종 도말 후, 28 $^{\circ}$ C에서 3일간 배양하였음. 모든 처리구별 승수희석은 3반복으로 진행하였음. 각 시료 당 미생물 수는 평판 배지 상에 나타난 콜로니를 각각 계수한 후 평균한 값을 CFU(Colony Forming Unit) 으로 나타내었음.



[그림4-96] 성장촉진 검정 토양의 미생물상 조사 지역

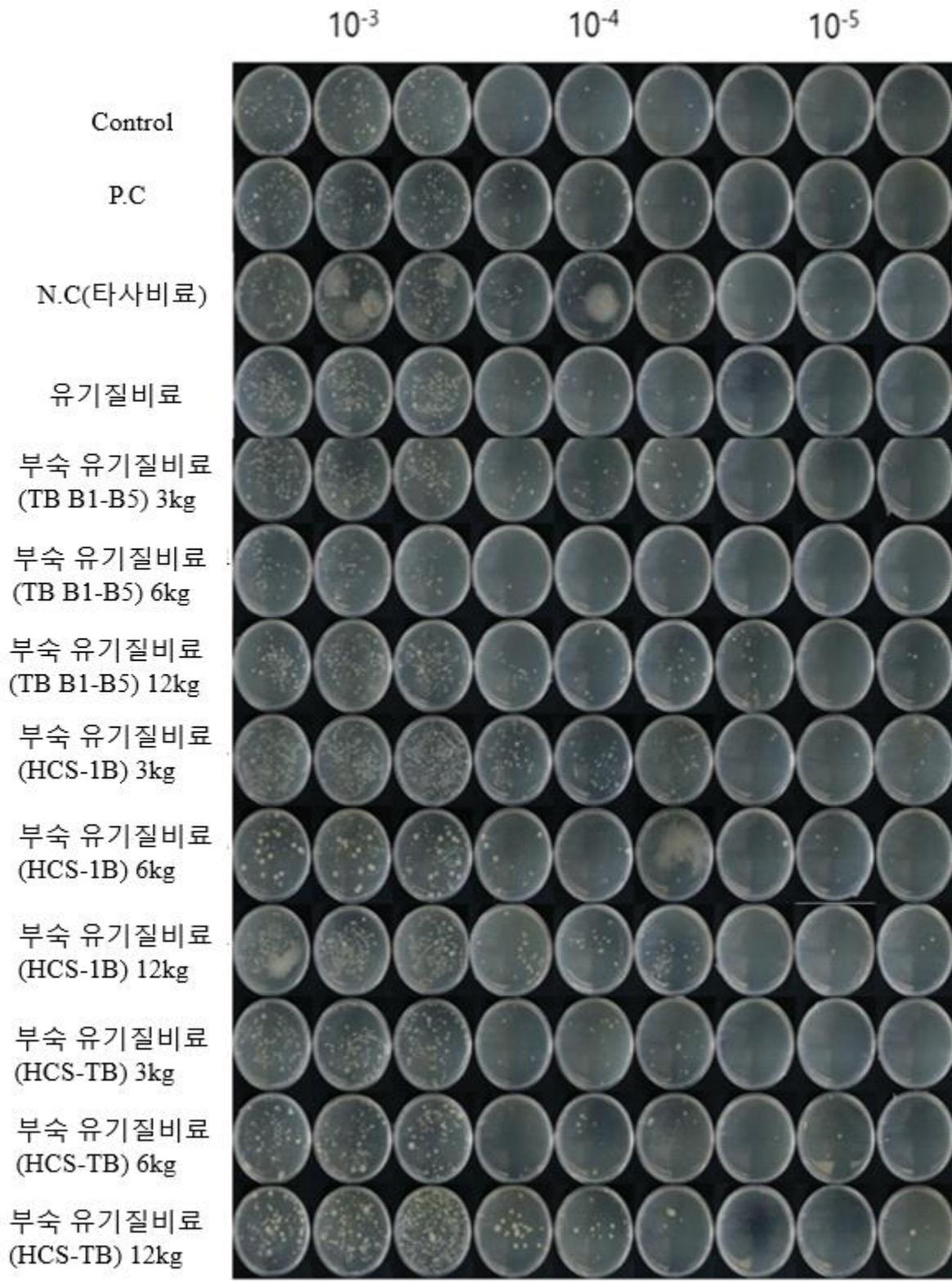
유기질비료를 비율별 시비한 처리구에 세균 군집도가 대체적으로 증가하였음.  $10^{-3}$  기준으로 3kg, 6kg, 12kg처리구의 세균이 전체적으로 증가했음을 알 수 있으며, 3kg, 6kg, 12kg의 비율로 처리한 처리구가 시비 전보다 약 1.5-2배 정도의 증가함을 나타냈음(표 23).

$10^{-4}$  으로 나타난 결과는 Control, 유기질비료를 제외한 HCS-1B 3kg, 6kg, 12kg 및 TB B1-B5 3kg, 6kg, 12kg의 처리구 세균 군집도가 처리하기 전보다 높았으며, 종합적으로 길항 미생물이 혼합된 유기질비료를 처리 한 토양의 세균 군집도가 처리 전보다 전체적으로 높았음. 시비량이 3kg를 시비한 처리구보다 6kg 비율로 시비한 처리구가 뚜렷한 토양내의 다양성을 나타냈음[표 4-36],[그림4-97],[그림4-98].

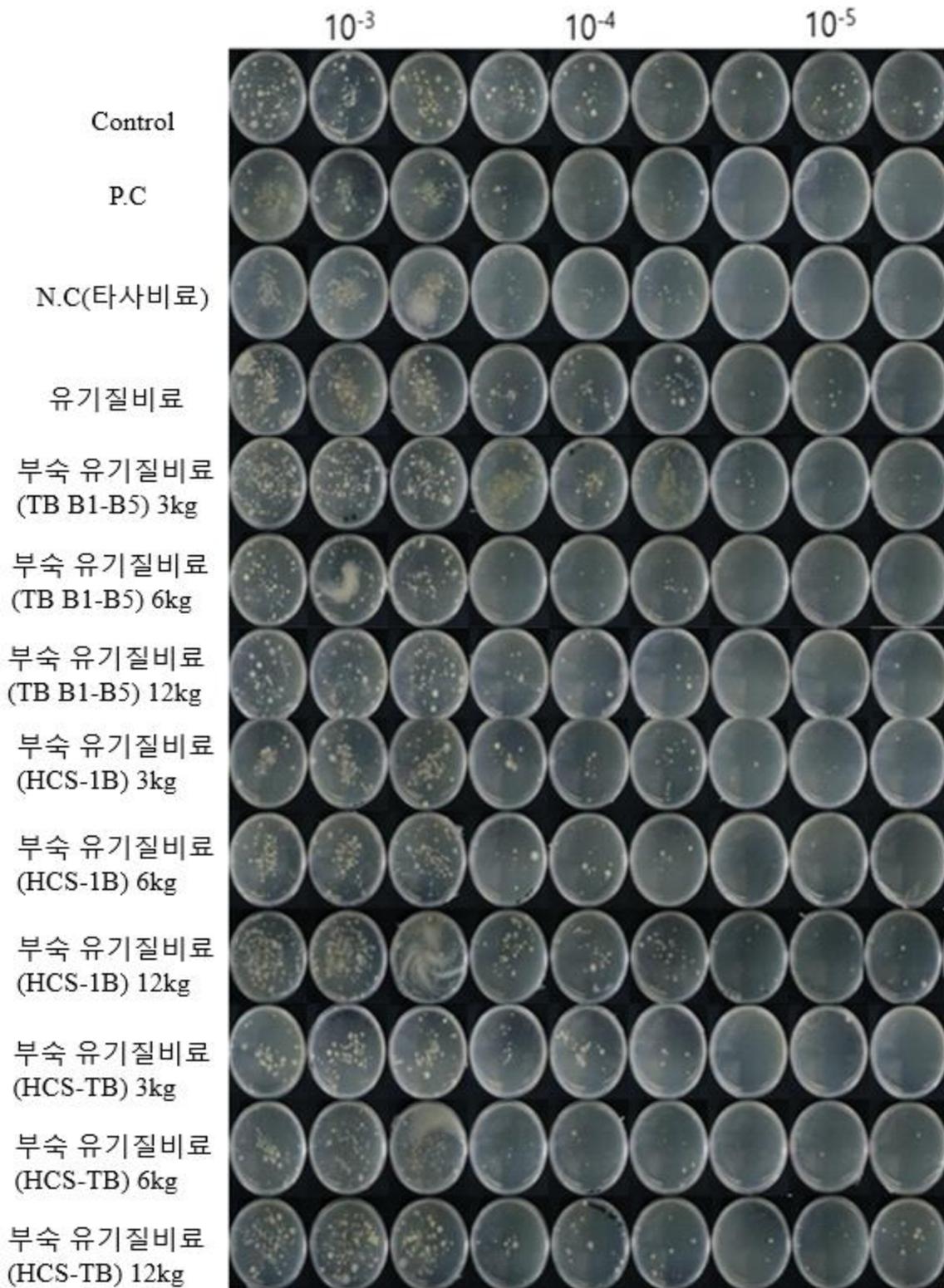
[표4-36] 유기질비료 시비 전, 후 비율 별 토양내의 세균 미생물상 조사

		Bacteria Isolates												
		C <sup>1</sup>	P.C <sup>2</sup>	N.C <sup>3</sup>	비료 <sup>4</sup>	HC <sup>5</sup> 3kg	HC 6kg	HC 12kg	TB <sup>6</sup> 3kg	TB 6kg	TB 12kg	혼합 <sup>7</sup> 3kg	혼합 6kg	혼합 12kg
처리 전	$10^{-3}$	107	412	121	112	265	151	291	292	77	321	272	142	245
	$10^{-4}$	16	50	38	80	45	27	29	31	11	20	88	14	30
	$10^{-5}$	6	6	8	5	3	3	2	5	4	2	2	5	2
처리 후	$10^{-3}$	86	395	142	143	277	216	347	340	191	165	340	298	334
	$10^{-4}$	41	18	45	42	51	34	31	40	31	55	90	27	45
	$10^{-5}$	3	2	9	12	1	31	0	2	4	6	0	2	12

C<sup>1</sup>: control, P.C<sup>2</sup>: positive control, N.C<sup>3</sup>: negative control\_타사비료, 비료<sup>4</sup>: (주)중부바이오텍 유기질비료, HC<sup>5</sup>: HCS-1B(*B. megaterium*), TB<sup>6</sup>: TB B1-B5(*B. licheniformis*), 혼합<sup>7</sup>: HCS-1B(*B. megaterium*) + TB B1-B5(*B. licheniformis*).



[그림4-97] 성장촉진 검정 토양내 세균 다양성 결과 (시비 전)



[그림4-98] 성장촉진 검정 토양내 세균 다양성 결과 (시비 후)

유기질비료를 비율별 시비한 혼합 처리한 처리구에 곰팡이 군집도가 대체적으로 증가하였음. 10<sup>-2</sup> 기준으로 시비 비율이 3kg, 6kg, 12kg 처리 시 HCS-1B 처리구는 전체적으로 곰팡이 수가

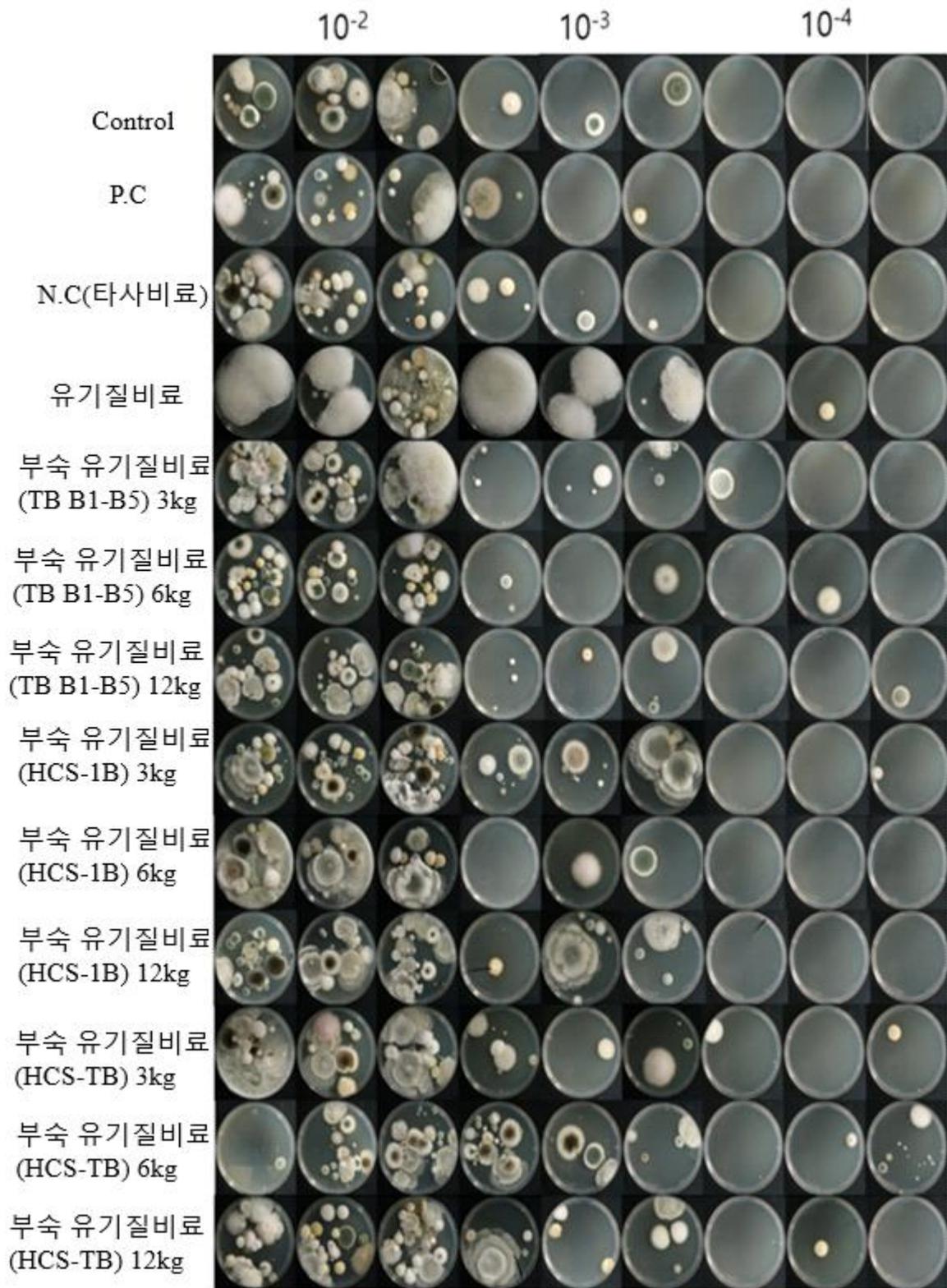
증가하였으며, TB B1-B5처리구 12kg를 제외한 다른 처리구에서는 곰팡이수가 유의미한 감소를 보였음[표4-37].

세균 및 곰팡이의 군집을 종합하면, 유기질비료의 비율별 시비한 처리구에서는 전체적으로 미생물의 수가 증가함을 나타냈으며, 혼합 시비 처리구 중 3kg보다 6kg, 12kg 비율의 처리구가 더 많은 미생물이 증가하였음[표4-37],[그림4-99][그림4-100].

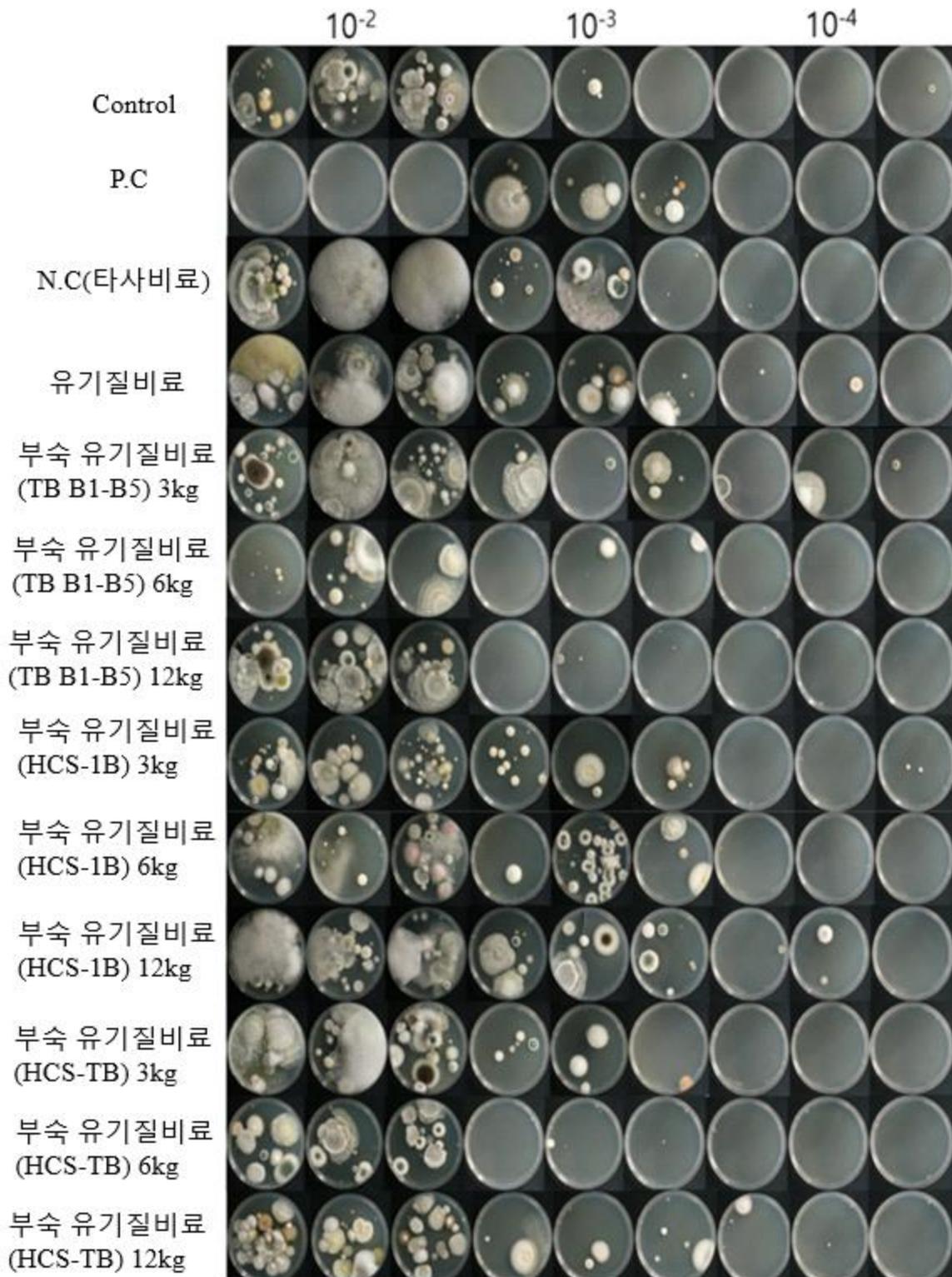
[표4-37] 유기질비료 처리 전, 후 비율 별 토양내의 곰팡이 미생물상 조사

		Fungi Isolates												
		C <sup>1</sup>	P.C <sup>2</sup>	N.C <sup>3</sup>	비료 <sup>4</sup>	HC <sup>5</sup> 3kg	HC 6kg	HC 12kg	TB <sup>6</sup> 3kg	TB 6kg	TB 12kg	혼합 <sup>7</sup> 3kg	혼합 6kg	혼합 12kg
처리 전	10 <sup>-2</sup>	10	10	14	8	15	11	21	17	20	15	14	12	17
	10 <sup>-3</sup>	2	2	4	3	5	2	5	3	2	4	5	10	6
	10 <sup>-4</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0
처리 후	10 <sup>-2</sup>	15	7	6	10	19	13	25	16	7	17	10	13	13
	10 <sup>-3</sup>	2	0	4	8	8	7	7	4	2	0	4	0	2
	10 <sup>-4</sup>	0	0	0	2	0	2	2	2	0	0	0	0	0

C<sup>1</sup>: control, P.C<sup>2</sup>: positive control, N.C<sup>3</sup>: negative control\_타사비료, 비료<sup>4</sup>: (주)중부바이오텍 유기질비료, HC<sup>5</sup>: HCS-1B(*B. megaterium*), TB<sup>6</sup>: TB B1-B5(*B. licheniformis*), 혼합<sup>7</sup>: HCS-1B(*B. megaterium*) + TB B1-B5(*B. licheniformis*).



[그림4-99] 성장촉진 검정 토양내 곰팡이 다양성 결과 (시비 전)



[그림4-100] 생장촉진 검정 토양내 곰팡이 다양성 결과 (시비 후)

## 제3장. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

### 1. 연구개발성과

#### 가. 정성적 연구개발성과

##### 1) 업체류 주요 해충방제를 위한 (토착)광포식성 천적의 제품화

○ 줄알락명나방 알에 대한 참멋애꽃노린재의 온도별 포식량은 모든 온도에서 수컷에 비해 암컷의 포식량이 2배 이상 많았으며, 온도가 높아질수록 포식량은 증가하여 암컷은 30℃에서 12.5개로 15℃에 비해 3.8배, 수컷은 25, 30℃에서 5.6, 5.3개를 포식해 15℃에 비해 각 3.5배, 3.3배 높은 포식률을 확인할 수 있었음.

○ 수입종의 대체천적으로 토착천적의 가능성을 확인하기 위해 25℃에서 미끌애꽃노린재와 참멋애꽃노린재의 포식량을 확인한 결과 참멋애꽃노린재의 포식수는 미끌애꽃노린재 포식수와 비슷하거나 다소 높게 나타났음. 이를 통해 수입종의 대체천적으로 토착천적인 참멋애꽃노린재의 농가적용을 통해 해충 방제가 가능할 것으로 생각됨.

○ 광포식성 천적의 증식 및 정착에 적합한 유지식물에 관한 자료 수집 및 분석을 통해 3종의 식물에 대한 정보를 토대로 참멋애꽃노린재의 발육기간별 생존율 조사를 통해 가장 적합한 유지식물에 대한 조건을 확인한 결과 참멋애꽃노린재의 알부터 5령 약충까지 생존율을 비교한 결과 채송화가 가장 높은 생존율을 보였으며, 그 다음으로 메리골드와 메밀의 순으로 나타났음.

○ 대조구인 줄알락명나방 알을 급이 하였을 때 령기별 총 생육기간은 15.2일로 가장 짧았으며 대체먹이인 브라인쉬림프 알을 급이시 16일, 동애등에 유충을 급이시 17.4일로 확인되었음. 또한 대체먹이 급이에 따른 생존율은 대조구인 줄알락명나방 알을 급이하였을 때 83%, 실험구인 브라인쉬림프 알을 급이하였을 때 80%, 동애등에 유충을 급이하였을 때 78%로 다소 낮았지만 큰 차이는 없는 것으로 확인되었음.

○ 동애등에 유충을 활용한 대체먹이의 경우 총 155개의 알을 산란하였으며, 암컷 한 마리당 평균 51.5개의 알을 산란한 것으로 나타나 기장테두리진딧물 먹이 대비 68.4%의 산란효율을 나타내는 것을 확인할 수 있었으며, 동애등에 유충 대체먹이의 응고에 따른 치사율 등을 감안할 때 대체먹이로서 기존 천연먹이를 대체할 수 있는 가능성이 높은 것으로 확인되었음.

○ 이번 연구에서 활용된 동애등에 유충을 활용한 대체먹이의 경우 동애등에 유충 1Kg당 2,500원으로 참멋애꽃노린재 2만마리 사육기준 10Kg의 동애등에 유충이 소요되며 총 비용은 287,000원으로 참멋애꽃노린재 한 마리당 14원의 비용이 소요되는 것으로 조사되었으며, 이는 기장테두리진딧물을 활용한 사육비용 대비 88%의 원가 절감 효과가 있었으며, 줄알락명나방 알을 활용한 사육비용 대비 85%의 원가 절감 비용 효과를 확인할 수 있었음.

○ 연구 결과 천적 성충 단독처리와 천적의 알이 25개 산란된 식물과의 혼합 처리구에서 해충 방제 효과를 확인한 결과, 무처리구에서 해충밀도는 주당 5마리를 시작으로 7주 후에는 70마리 까지 증가하였으며, 천적의 알이 산란된 혼합 적용구보다 해충밀도가 700배 이상 높은 것을 확인할 수 있었음. 또한 천적 알이 산란된 식물을 적용한 처리구에서는 91.8%의 높은 꽃노랑총채벌레 밀도억제 효과를 보였으며 천적 단독 처리구에 비해 1.4배의 해충 방제효과를 확인할 수 있었음.

○ 천적의 제품화에 관한 국내외 자료 수집 및 분석을 통한 신기술 적용 지침서 작성/배포 및 매뉴얼 개발 및 천적과 화학적 약제 혼용 시 천적 발육 및 수명에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며, 이에 본 연구에서는 선발된 천적과 혼용 가능한 저독성 약제를 선발 실험을 진행하였음. 다섯 가지의 살충제(buprofezin, flonicamid, sulfoxaflor, flupyradifurone, spirotetramat)와 두 가지의 살비제(spiromesifen, emamectin benzoate)에 대해 생물검증을 한 결과 애꽃노린재 두 종에 대해 모두 가장 급성 독성이 적은 것은 buprofezin, flonicamid, spirotetramat, spiromesifen이었음

○ 각각의 먹이조건별 동애등에 유충의 성장을 비교하였을 때 커피박을 급이한 실험구에서 유충의 성장이 낮게 나타났으며, 성충으로의 우화율 또한 가장 낮은 것으로 확인 되었음. 이는 먹이의 소화율이 급격하게 떨어지는 원인으로 판단되며, 이는 동애등에 유충의 스트레스 원인으로 작용될 것으로 판단됨.

○ 동애등에 유충의 가공단계별 식물병원성 균에 대해 항균/항생 펩타이드의 항균활성을 검토한 결과 실험구 모두 10배, 100배 조건에서 항균활성이 높은 것으로 나타났으며, 1,000배 희석 조건에서도 항균활성이 있는 것으로 나타났음. 동애등에 유충의 분쇄 후 큐티클 층을 제거한 후 원심분리를 통해 상청액을 수거한 경우 1,000배액에서도 항생력이 높게 나타나는 것을 확인할 수 있어 대량생산 공정에서는 동애등에의 큐티클 층과 이하 물질을 제거하는 공정이 필요하다고 판단됨.

## 2) 곤충유래 항생/항균 펩티드를 활용한 업체류 세균병 방제 기술 개발

○ 우리는 본 과제를 통하여 쌍별귀뚜라미(*Gryllotalpa orientalis*), 동애등애(*Hermetia illucens*), 흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis seulensis*)에서 항생/항균단백질 존재를 보고. 항생/항균단백질은 lysozyme family, Mucin family, venome-like peptides, defensin, attacin family, Diptericine family 등을 특정하였음. 동시에, 현재까지 보고되지 않은 항생/항균 단백질로 추정되는 유전자 그룹도 발굴하였으며 추후 그들의 특성과 기능을 연구할 필요가 있음.

○ 우리는 본 과제를 통하여 쌍별귀뚜라미(*Gryllotalpa orientalis*), 동애등애(*Hermetia illucens*), 흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis seulensis*)를 대상으로 집단 사육환경을 조절하여 면역 활성화가 유도될 수 있음을 확인하였음. 면역 활성화 여부는 각 곤충의 면역 세포와 면역 유전자들의 발현을 통하여 확인하였으며 이러한 인자들이 면역 활성화 유도인자로 활용될 수 있음을 보고하였음.

○ 우리는 다양한 조건 실험을 바탕으로 집단 면역 활성화 조건을 확립하였고 다양한 항생/항균 단백질들을 분비하는 것을 확인하였음.

○ 면역이 활성화(항생/항균 단백질들이 발현되어 다양한 병원균을 저해하는 효과를 가진) 되어 사육된 쌍별귀뚜라미(*Gryllotalpa orientalis*), 동애등애(*Hermetia illucens*), 흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis seulensis*)들을 대상으로 기능성 분말이나 비료 개발 기초자료 실험을 진행. 즉, 기능성 분말화를 위한 다양한 조건 실험 및 상추를 대상으로 처리 생육 조건도 확립하였음.

○ 상추무름병을 대상으로 저지원 시험, 병반시험, 실험실내 생육 시험 조건을 바탕으로 항생 항균 단백질 과발현을 검증 하였음.

## 3) 식물 성장촉진 미생물을 활용한 복합 유기질비료 개발

○ 식물성장촉진미생물을 선별하기 위해, 경북 포장의 업체류 농가에서 시료를 채취하였으며, 총 34개의 세균과 1개의 곰팡이를 분리하였으며, 분리한 균주는 3회 평판법을 이용하여 24시간, 28℃ 조건에서 배양한 뒤 전문분석 기관(마크로젠)에 의뢰하여, 16s rRNA를 기반으로 동정하였음. 효과가 좋을 것으로 예상되는 *Bacillus lichemiformis*(TB B1-B5)를 활용하여 실험에 사용하였음.

○ Petri Dish 90mm에서 실험한 결과로는 대조구의 경우에는 80%의 발아율을 보인 반면, PA2(*Bacillus subtilis*), TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*) 와 JB-1(*Trichoderma sp.*)의 경우에는 90% 이상의 발아율을 보이는 것으로 확인되었음.

○ 육묘 트레이에서 실험한 발아율 결과로는 Control은 5일차에 64%, 10일차에 76%로 조사되었으며, PA2(*Bacillus subtilis*) 및 JB-1(*Trichoderma sp.*), TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*)의 경우, 5일차 발아율은 80% 이상, 10일차에는 90% 이상으로 가장 좋은 결과를 보였음.

○ 식물 성장촉진 미생물과 균핵병 길항균의 상호관계 결과로는 B18(*Bacillus siamensis*) - JB-1(*Trichoderma sp.*)와 B24(*Burkholderia arboris*) - JB-1(*Trichoderma sp.*)의 상호관계가 있는 것으로 나타남.

○ 식물 성장촉진 미생물인 PA2(*Bacillus subtilis*), TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*)의 상추에 미치는 영향을 확인한 결과 생체중의 평균은 아무것도 처리하지 않은 Control은 80.42g의 생체중을 기록하였으며, Positive control은 95.80g, Negative control 84.06g, PA2 100.93g, TB B1-B5 103.05g을 기록하였음.

○ 계분을 Base로 한 유기질비료 1%를 기본으로 선발된 미생물 혼합 실험 결과 생체중(g)은 Control 78.79g을 기록하였고, TB B1-B5 1%는 139.62g, TB B1-B5 5%는 140.34g, TB B1-B5 10%는 136.87g를 기록하였음. TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*)는 다른 PA2(*Bacillus subtilis*) 및 JB-1(*Trichoderma sp.*)보다 생체중이 높게 조사되었음.

○ 유기질비료에 들어가는 재료는 계분 40%, 마분 10%, 돈분 15%, 마분 10%, 톱밥 등을 활용하였으며, 선발된 미생물인 PA2(*Bacillus subtilis*)와 TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*)은  $1 \times 10^7$  cfu/ml로 조정하여 일정비율별로 혼합하여 공정상에 미치는 영향을 조사하였으며, 유기질비료 공정 실험 진행 후 20일간 온도의 변화를 관찰한 결과, 가장 먼저 6일차에서 TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*) 처리구가 온도 상승의 증가세를 보였으며, 8일차에서 TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*) 처리구에서 가장 높은 온도 69°C로 가장 빨리 온도 변화가 있는 것으로 조사되었음. 또한, 대조구는 10일만에 60도에 도달 한 반면, 다른 처리구에서는 7일~8일사이에 60도 이상의 온도에 도달하는 것으로 조사됨. 이는 *Bacillus* 속은 고초균으로써 발효에도 영향을 미치는 것으로 조사됨.

○ 1차년도에서 식물성장촉진균으로 선발된 TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*)와 길항균으로 선발된 HC S-1B(*Bacillus megaterium*)와의 상호관계를 알아보기 위해, Petri Dish 90mm와 멸균된 Paper disk를 사용하여 상호관계를 확인한 결과, 상호관계가 없는 것으로 조사되었으며, 이후 부속 유기

질 비료의 혼합처리 가능함을 판단하였음.

○ 식물생장촉진균으로 선발된 TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*)의 대량배양을 위한 배지조성을 확인하기 위해, 탄소원 및 질소원, 미량요소원을 조사하였음. 탄소원은 Glucose, Starch, Galactose, Inositol, Sorbitol, Fructose, Maltose, Glycerol을 0.1%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5% 비율로 실험을 진행하였으며, 배양 조건은 진탕배양기(120 rpm, 30°C) 24, 48, 72시간동안 배양하였으며 균체농도를 측정하였음. 균체농도는 흡광도(Jasco V-530 uv/vis spectrophotometer)를 이용하여, 600nm 기준으로 O.D값을 측정하였음. 종합적으로 Stach 2% 비율을 대량배양의 탄소원 최적 조건으로 확립되었음.

○ 질소원으로는 Malt extract, Tryptone, Casein, Yeast extract, Peptone 0.1%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5% 비율로 실험을 진행하였으며, 배양 조건은 진탕배양기(120 rpm, 30°C) 24, 48, 72시간동안 배양하였으며 균체농도를 측정하였음. 균체농도는 흡광도(Jasco V-530 uv/vis spectrophotometer)를 이용하여, 600nm 기준으로 O.D값을 측정하였음. 측정 결과, TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*) 균주의 최적 질소원 종류 및 비율은 질소원 Yeast extract의 2% 비율이 24, 48, 72시간 조건에서의 증식이 우수하였음.

○ 미량요소원으로는 NaCl, KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2% 비율로 실험을 진행하였으며, 측정 결과, TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*) 균주의 최적 미량요소 종류 및 비율은 KCl의 1% 비율이 24, 48, 72시간 조건에서의 증식이 우수하였음.

○ 5L의 발효조에서 식물생장촉진 균주의 증식 여부를 확인하기 위해, 선발된 배지의 조성은 탄소원 Stach 2%와 질소원 Yeast extract 2%, KCl 1%의 비율을 활용하였음. 72시간 배양까지의 세균 밀도(O.D값)과 pH를 측정한 결과, 배양 12시간부터 O.D값이 급격히 상승하여 1.00 이상 측정이 되었으며, 시간이 지날수록 O.D값은 점차적으로 증가하기 시작하여 48시간 이후에는 O.D값이 2.00 이상이 측정되었음. 48시간 이후부터 생균수는 10<sup>8</sup> cfu/ml을 유지하는 것으로 조사되었으며, 배양은 균주의 억제없이 꾸준한 증식을 보였으며, pH는 중성을 유지하였음.

○ 길항 미생물인 HCS-1B(*Bacillus megaterium*) 및 식물 생장촉진 미생물 TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*) 균주를 대상으로 대량배양 조건을 알아보기 위해, 300 L 발효조를 활용하여 실험을 진행하였음. 산업용 배지인 옥수수 전분 3.6kg와 효모추출분말 3.6kg, KCl 1.8kg 첨가한 후 온도는 28°C, 150 rpm, pH 6.3 조건에서 총 72시간동안 4시간 마다 생균수를 측정하였음. HCS-1B (*B. megaterium*) 및 TB B1-B5(*B. licheniformis*) 300L 대량배양 결과, 두 균주 세균의 밀도인 44시간~48시간 내에 10<sup>8</sup> cfu/ml을 유지하는 것으로 조사되었음.

○ HCS-1B(*Bacillus megaterium*) 및 TB B1-B5(*Bacillus licheniformis*) 배양액을 이용하여, 복합 유기질비료의 펠릿 제형화 과정에서의 혼합 비율 확립을 하기 위해, 부숙된 유기질비료에 배양액 1, 2, 3% 비율별 첨가하여 제형화를 진행 한 결과, 배양액 2% 혼합시 제형화에 가장 효율적임을 확인하였음.

○ 유기질 비료의 안정성 및 이화학적 분석 실험을 진행하였으며, 온도별 균체보존율을 확인 결과, CT(-10℃)에서의 전체적으로 생균수  $10^7$ 대를 유지하였으며, 8주차에는 12~18% 정도의 감소하는 추세를 보였음. RT(25℃)에서도 대조구에 비해 처리구에서 높은 증가율을 보였으며, 8주차까지 생균수는 다소 증가하는 추세를 보이고 있었음. AT(50℃)에서는 점차적 감소하는 경향을 보여주고 있으며, 4주차부터 50%의 급격한 감소를 보였음. 이는 미생물의 성장 및 유지를 위해서는 수분이 중요한데, 초기 함수율은 21%에서 4주차 후 함수율이 6% 정도로 매우 낮았음. 이는 실험장비인 건조기가 습도가 공급되지 않아 급격하게 사멸된 것으로 파악됨. 따라서, 원만한 수분 보충시 생균수의 유지가 가능할 것으로 판단됨.

○ 유기질비료의 물에 의한 용해성 실험결과, 침수 후 10분 경과 시부터 미세한 용해현상을 보이다가 30분 경과 후부터 용해되기 시작하여 60분이 경과 후 45%이상 용해상태에 도달하였으며, 3일이 경과한 후 완전한 용해상태에 도달하였음. 균주의 단일 첨가로 제형화한 복합 유기질비료와 두 균주의 혼합 첨가로 제형화한 복합 유기질비료의 용해성 결과가 일치하였으며, 미생물 첨가 유,무에 따른 결과값이 상이하지 않았음.

○ 유기질 비료의 기준에 적합한지를 알아보기 위해 화학성분 분석을 확인하였음. 성분 항목은 비료관리법 규격에 맞춘 시험법으로 유기물 함량, 유기물대 질소비, 부숙도, 병원성 미생물 2종, 염산불용해물, 중금속분석, 염분, 수분 및 질소, 인산, 칼리 함량을 분석하였음. 복합 유기질 비료의 시료의 화학성분 분석결과는 농촌진흥청 고시에 제시된 비료공정규격에 적합한 것으로 조사되었음.

○ 수출을 위한 준비단계로 베트남의 Cuchi 지역 상추재배 농가(11.01419, 106.46899)에서 포장 실험을 진행함으로써 복합 유기질비료의 베트남의 상추 미치는 영향을 확인하였음. 실험결과, 전체적으로 베트남의 기존 처리 방식보다 유기질비료의 생장이 생장이 우수하였으며, 베트남의 기존 방식보다 복합 유기질 비료 처리시 2배 정도의 성장 효과가 있는 것으로 조사됨.

○ 유기질비료를 제품의 상표명 및 디자인을 완성하여 “쓱쓱토“라는 브랜드명으로 진행을 완료하였으며, 부산물비료로 등록을 완료하였음. 또한, 베트남 수출용 제품으로는 기존의 ”GREENNARAE“브랜드명으로 진행이 가능하므로, 기존 등록된 인증을 활용하여 수출 판매를 진행하였음. 2022년에 베트남의 현지법인 NAM MINH CO., LTD와 계약을 진행하여 5컨테이너(약 \$12,000) 수출을 완료 하였음. 또한, 지속적인 수

출진행을 위해 베트남 현지법인과 2023년에 대한 계약을 체결하여 지속적으로 수출을 진행할 예정임.

#### 4) 유용미생물을 활용한 토양병 방제 기술 개발

○ 수집한 토양 시료 중 5개의 토양 시료(CC, HC, WJ, YJ, IC)의 DNA를 추출하여 Illumina sequencing을 진행하였고 분석결과, 상추 재배지 토양 시료 내의 미생물 군집도 및 시료 간의 미생물 분포 차이를 비교함.

○ 토양 시료의 NGS 분석 결과 선발된 11종의 길항균은 4개의 숙 수준에서 낮은 빈도로 확인하였지만, 종 수준에서는 확인되지 않음. 이는 Illumina sequencing 분석 방법의 한계와 선발된 길항균들이 토양에서 극히 낮은 population level을 가져 검출되지 않은 것으로 판단됨.

○ 상추 재배지에서 수집한 8개의 토양 시료와 2개의 뿌리 시료에서 123종의 세균과 62종의 곰팡이를 분리하였음. 분리된 세균 123종 중 *S. sclerotiorum* 와 *S. minor*에 길항을 가지는 미생물 11종을 선발하였으며, 동정 결과 *Bacillus subtilis*(2종), *Bacillus megaterium*(2종), *Bacillus wiedmannii*(2종), *Pseudomonas granadensis*(3종), *Pantoea allii*, *Lysinibacillus fusiformis*이 동정되었음.

○ 기존에 보유하고 있던 세균 균주 5종(B6, B7, B18, B24, B29)을 대상으로 상추에 균핵병을 유발하는 식물 병원성 미생물인 *S. sclerotiorum* 와 *S. minor*를 대상으로 기내 길항성 검정을 실시한 결과, 5종이 길항 효과를 나타냈으며 *Bacillus siamensis* 4종, *Burkholderia arborescens* 1종으로 확인됨.

○ 선발된 11종의 길항미생물을 대상으로 7가지의 biochemical test를 진행한 결과, WJR-2B의 경우 선발한 길항미생물 중 가장 많은 6가지의 biochemical test에서 효소를 분비하는 것으로 확인되어 식물 성장촉진 및 병원균을 억제하는 효소를 분비하는 것을 확인하였음.

○ 상추에 균핵병을 유발하는 식물병원성 미생물과 기존 보유 길항균 B18, B24 균주를 사용하여 상추를 대상으로 pot test를 통해 길항성 검정을 실시하였으며, 선발된 길항균이 병원균을 억제하는 것을 확인하였고 최종적으로 상추 균핵병원균에 길항 효과를 지니는 균주 WJR-6B 및 HCS-1B 두 개의 길항 세균을 선발하였음.

○ 길항성 검정 및 biochemical test 진행 결과를 통하여 선발한 WJR-6B 및 HCS-1B 길항세균을 대상으로 작물 pot 실험을 진행한 결과, WJR-6B 균주는 길항균 후처리에서 0%의 발병율을 보여 상추균핵병 방제에 효과적이었으며, HCS-1B 균주는 길항균 전처리에서 0%의 발병율을 보여 상추균핵병 예방에 효과가 있는 것으로 확인됨. 또한 WJR-6B 균주와 HCS-1B 균주를 혼합처리한 처

리구가 생체중, 건조중, 엽면적 모두 무처리구 및 단일처리구에 비해 높은 측정값을 나타내 상추 생육촉진 효과가 있는 것을 확인하였음.

○ 선발한 길항 세균 WJR-6B 및 HCS-1B의 대량배양을 위해 8가지 탄소원 및 6가지 질소원을 사용하여 최적 배양 조건을 확인하였으며, 두개의 균주 모두 탄소원은 starch가 1, 2, 3%의 비율에서 많이 증식된 것을 확인하였으며, 질소원은 yeast extract가 2, 3, 4%의 비율에서 많이 증식된 것을 확인하여 선발한 길항미생물의 최적 배양 조건을 확립함.

○ 탄소원 및 질소원의 배양 조건을 기준으로 대량배양을 위한 소용량 발효조(5L)에서 HCS-1B 균주를 대상으로 배양 조건을 확인하였고 starch 2%, yeast extract 2% 조건에서 12시간 이후 세균밀도가 최대점을 유지하는 것을 확인하여 starch 2%, yeast extract 2%의 배지 조성이 최적 대량배양 조건으로 판단됨.

○ 상추 포장실증 실험에 앞서 비닐하우스 및 노지 재배지 토양의 이화학적 및 microbiome 분석을 통하여 pH, EC, 질소 함량, 유기질 함량, CEC, 중금속 특성 조사 모두 기준치에 적합한 수치가 확인되었으며, 미생물 군집도 또한 다양한 분포를 보인 것을 확인함.

○ 선발한 길항 세균을 대상으로 포장 실증 실험을 진행하여 상추균핵병 방제 효과를 검정하였으며 유기질비료(HCS-1B)를 6kg 시비하였을 때 *S. sclerotiorum* 병원균에 대한 방제 효과가 높아 상추균핵병 방제를 위한 미생물제재의 가능성이 높은 것으로 판단됨.

○ 상추 생육촉진 효과는 유기질비료(HCS-1B + TB B1-B5)를 6kg, 12kg을 시비하였을 때 생체중, 건조중, 엽면적 및 엽록소 함량이 높은 측정값을 보여주어 유의미한 생육촉진 효과가 있는 것으로 판단됨.

○ 포장 실증 실험을 통하여 유기질비료 시비 전, 후에 따른 포장 내의 토양 미생물의 다양성을 분석하였으며 세균의 경우 유기질비료를 6kg 시비한 처리구에서 세균 군집도가 증가한 것을 확인하였고 곰팡이는 6kg, 12kg에 시비한 처리구에서 곰팡이 군집도가 증가한 것을 확인함.

## 나. 정량적 연구개발성과

< 정량적 연구개발성과표(예시) >

(단위 : 건, 천원)

성과지표명	연도			1단계 (2021~2022)	계	가중치 (%)
		목표(단계별)	실적(누적)			
전담기관 등록·기탁 지표 <sup>1)</sup>	특허출원	목표(단계별)		2건	2건	25
		실적(누적)		2건	2건	25
	논문	목표(단계별)		2건	2건	25
		실적(누적)		2건	2건	25
연구개발과제 특성 반영 지표 <sup>2)</sup>	고용창출	목표(단계별)		1건	1건	25
		실적(누적)		1건	1건	25
	시제품	목표(단계별)		2건	2건	25
		실적(누적)		2건	2건	25
계						100
						100

- \* 1) 전담기관 등록·기탁 지표: 논문[에스시아이 Expanded(SCIE), 비SCIE, 평균Impact Factor(IF)], 특허, 보고서원문, 연구시설·장비, 기술요약정보, 저작권(소프트웨어, 서적 등), 생명자원(생명정보, 생물자원), 표준화(국내, 국제), 화합물, 신물질 등을 말하며, 논문, 학술발표, 특허의 경우 목표 대비 실적은 기재하지 않아도 됩니다.
- \* 2) 연구개발과제 특성 반영 지표: 기술실시(이전), 기술료, 사업화(투자실적, 제품화, 매출액, 수출액, 고용창출, 고용효과, 투자유치), 비용 절감, 기술(제품)인증, 시제품 제작 및 인증, 신기술지정, 무역수지개선, 경제적 파급효과, 산업지원(기술지도), 교육지도, 인력양성(전문 연구인력, 산업연구인력, 졸업자수, 취업, 연수프로그램 등), 법령 반영, 정책활용, 실제 기준 반영, 타 연구개발사업에의 활용, 기술무역, 홍보(전시), 국제화 협력, 포상 및 수상, 기타 연구개발 활용 중 선택하여 기재합니다 (연구개발과제 특성별로 고유한 성과지표를 추가할 수 있습니다).

< 연구개발성과 성능지표(예시) >

평가 항목 (주요성능 <sup>1)</sup> )	단위	전체 항목에서 차지하는 비중 <sup>2)</sup> (%)	세계 최고		연구개발 전 국내 성능수준	연구개발 목표치		목표설정 근거
			보유국/보유기관	성능수준	성능수준	1단계(21~22)	n단계 (YYYY~YYYY)	
1 Quantity	%	15	네덜란드/코퍼트	100	80	100		IOBC 기준 <sup>1)</sup>
2 Mortality	%	15	네덜란드/코퍼트	≤ 5 %	≤ 5 %	≤ 5 %		IOBC 기준
3 항생/항균력	%	10	미국/신젠타	60%	60%	65%		친환경유기농자재
4 유해성분	mg/kg	15	-	-	비료공정규격	비료공정규격		비료공정규격
5 부속도	완료	15	-	-	비료공정규격	비료공정규격		비료공정규격
6 유기물함량	%	20	-	-	비료공정규격	비료공정규격		비료공정규격
7 항생/항균펩티드	서열	10	-	-	1	1		-

- \* 1) 정밀도, 인장강도, 내충격성, 작동전압, 응답시간 등 기술적 성능판단기준이 되는 것을 의미합니다.
- \* 2) 비중은 각 구성성능 사양의 최종목표에 대한 상대적 중요도를 말하며 합계는 100%이어야 합니다.

## 다. 세부 정량적 연구개발성과

### [과학적 성과]

#### 논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Infection-induced molecular pattern recognition proteins in larvae of <i>Protaetia brevitarsis seulensis</i> (Coleoptera: Cetoniidae)	European journal of entomology	Kyeongrin Bang	119:77-84	-	European journal of entomology	SCIE	2022.08.01	1802-8829	100
2	Efficacy of Antagonistic Bacterial Isolates in Suppressing Sclerotinia rot and Promoting Growth in Lettuce	Journal of Agricultural, Life and Environmental Sciences	김현승	34(3):433-444	상추 균핵병 억제 및 성장촉진을 위한 길항 세균의 효능	Journal of Agricultural, Life and Environmental Sciences	비SCIE	2022.12.15	2233-8322	100

#### 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	2021 한국균학회 추계국제학술대회 및 한일균학공동 심포지움	김기영	2021. 10. 28	전남대학교	Use of Next Generation Sequencing (NGS) tool to Analyze the Fungal Diversity in Lettuce Cultivated Soils
2	2021 한국균학회 추계국제학술대회 및 한일균학공동 심포지움	김기영	2021. 10. 28	전남대학교	Screening of Antagonistic Bacteria from Lettuce Cultivated Soils against White Mold in Lettuce Caused by <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>

3	2022 The KSPP Fall International Conference	우지민	2022.10.19	순천대학교	<i>Bacillus megaterium</i> 에 의한 상추의 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> 질병의 생육 촉진 및 억제 및 <i>B. megaterium</i> 의 대량 배양 조건 선별
4	한국응용곤충학회	조영우	2022.04.28	변산 소노벨	Phagocytosis immune priming associated with granulocytes in the cricket, <i>Gryllus bimaculatus</i>
5	한국응용곤충학회	조영우	2022.04.28	변산 소노벨	Classification and characterization of the immune hemocyte in the last larva of <i>Argyreus hyperbius</i> (Linnaeus)

기술 요약 정보

연도	기술명	요약 내용	기술 완성도	등록 번호	활용 여부	미활용사유	연구개발기관 외 활용여부	허용방식

보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호

생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도

[기술적 성과]

지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 프로그램)

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	바이오차 및 미생물을 활용한 유기질 비료 및 그 제조방법	대한 민국	농업회사 법인 (주)중부바 이오텍	2021.11. 29	10-2021- 0166364	-				20%	여
2	바이오차 및 미생물을 활용한 유기질 비료 및 그 제조방법	대한 민국					농업회사 법인(주) 중부바이 오텍	2022.01.2 5	제10-2356 774호	20%	여
3	동애등에 유충을 이용한 참땀애꽃노린재 먹이의 제조방법과 이를 이용한 참땀애꽃노린재 증식방법	대한 민국	농업회사 법인 (주)오상킨 섹트	2022.11 .09	10-2022 -014834 9	-				100%	여

○ 지식재산권 활용 유형

※ 활용의 경우 현재 활용 유형에 √ 표시, 미활용의 경우 향후 활용 예정 유형에 √ 표시합니다(최대 3개 중복선택 가능).

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타
	√									

저작권(소프트웨어, 서적 등)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율

신기술 지정

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

기술 및 제품 인증

번호	인증 분야	인증 기관	인증 내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증 번호		

표준화

○ 국내 표준

번호	인증구분 <sup>1)</sup>	인증여부 <sup>2)</sup>	표준명	표준인증기구명	제안주체	표준종류 <sup>3)</sup>	제안/인증일자

\* 1) 한국산업규격(KS) 표준, 단체규격 등에서 해당하는 사항을 기재합니다.

\* 2) 제안 또는 인증 중 해당하는 사항을 기재합니다.

\* 3) 신규 또는 개정 중 해당하는 사항을 기재합니다.

○ 국제 표준

번호	표준화단계구분 <sup>1)</sup>	표준명	표준기구명 <sup>2)</sup>	표준분과명	의장단 활동여부	표준특허 추진여부	표준개발 방식 <sup>3)</sup>	제안자	표준화 번호	제안일자

\* 1) 국제표준 단계 중 신규 작업항목 제안(NP), 국제표준초안(WD), 위원회안(CD), 국제표준안(DIS), 최종국제표준안(FDIS), 국제표준(IS) 중 해당하는 사항을 기재합니다.

\* 2) 국제표준화기구(ISO), 국제전기기술위원회(IEC), 공동기술위원회1(JTC1) 중 해당하는 사항을 기재합니다.

\* 3) 국제표준(IS), 기술시방서(TS), 기술보고서(TR), 공개활용규격(PAS), 기타 중 해당하는 사항을 기재합니다.

[경제적 성과]

시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)

□ 기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황
1	직접실시	유기성 자원 및 미생물을 활용한 기능성 유기질 비료 개발	농업회사법인 (주)중부바이오텍	2022.09.02	-	-
2	직접실시	참땃애꽃노린재 미니뱅크	농업회사법인 (주)오상킨섹트	2022.10.03	-	-

\* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

□ 사업화 투자실적

번호	추가 연구개발 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자 자금 성격*

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식 <sup>1)</sup>	사업화 형태 <sup>2)</sup>	지역 <sup>3)</sup>	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		
	자기실시	신제품개발	국내	기능성 유기질 비료개발	토양개량 및 식물성장 촉진 기능성유기질 비료	농업회사법인(주) 중부바이오텍	94,855		2022년	4년
	자기실시	신제품개발	국외	기능성 유기질 비료개발	토양개량 및 식물성장 촉진 기능성유기질 비료	농업회사법인(주) 중부바이오텍		11,853	2022년	5년
	자기실시	신제품개발	국내	참땃애꽃노린재 미니뱅크	해충방제를 위한 먹이식물과 천적을 혼합한 제품	농업회사법인(주) 오상킨섹트			2023년	5년

\* 1) 기술이전 또는 자기실시

\* 2) 신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등

\* 3) 국내 또는 국외

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
기능성 유기질 비료개발	2022	94,855	11,853	106,708	세금계산서
합계					

□ 사업화 계획 및 무역 수치 개선 효과

성과		제품개발을 통한 사업화 추진			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	2년			
	소요예산(천원)	230,000			
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후	
		90,000	400,000	700,000	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
			국내	-	5%
국외			-	2%	3%
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		해충 적용범위가 넓은 천적 제품, 항생제를 대체할 수 있는 항균항생펩티드 제품, 병해와 작물성장을 촉진하는 기능성 유기질비료			
무역 수치 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후	
		-	-	-	
	수출	15,000	300,000	400,000	

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			2021	2022년	
1	천적 제품화를 위한 대량생산과 관련하여 추가 인력 고용	농업회사법인 (주)오상킨섹트		1	1
합계				1	1

□ 고용 효과

구분			고용 효과(명)	
고용 효과	개발 전	연구인력		
		생산인력		
	개발 후	연구인력		
		생산인력		

□ 비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

□ 경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

구분	사업화명	수입 대체	수출 증대	매출 증대	생산성 향상	고용 창출 (인력 양성 수)	기타
해당 연도							
기대 목표							

□ 산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원

기술 무역

(단위: 천원)

번호	계약 연월	계약 기술명	계약 업체명	계약업체 국가	기 징수액	총 계약액	해당 연도 징수액	향후 예정액	수출/ 수입

[사회적 성과]

법령 반영

번호	구분 (법률/시행령)	활용 구분 (제정/개정)	명 칭	해당 조항	시행일	관리 부처	제정/개정 내용

정책활용 내용

번호	구분 (제안/채택)	정책명	관련 기관 (담당 부서)	활용 연도	채택 내용

설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

번호	구분 (설계 기준/설명서/지침/안내서)	활용 구분 (신규/개선)	설계 기준/설명서/ 지침/안내서 명칭	반영일	반영 내용

전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황														
			학위별				성별		지역별								
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타				

산업 기술 인력 양성

번호	프로그램명	프로그램 내용	교육 기관	교육 개최 횟수	총 교육 시간	총 교육 인원

다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용

□ 홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	TV 반영	베트남 현지 TV	베트남내에서 중부바이오텍 기능성 유기질 비료 효과 홍보	22년 1월
2	기타	이뉴스투데이	천적 대체먹이 개발로 대량증식을 통한 재배농가 돕는 해충 천적 보급	22년 11월



□ 포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관

[인프라 성과]

□ 연구시설·장비

구축기관	연구시설/연구장비명	규격(모델명)	개발여부(○/×)	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록여부	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록번호	구축일자(YY.MM.DD)	구축비용(천원)	비고(설치 장소)

\* 「과학기술기초법 시행령」 제42조제4항제2호에 따른 연구시설·장비 종합정보시스템을 의미합니다.

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

--	--

2. 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
약제대비용제효과	한국산업기술진흥원 녹색기술의 [천적을 활용한 자재]의 기술 수준: 무처리 대비 생물효과 60% 이상이거나 작물보호제 공시 약제 대비효과 60% 이상 달성	100%
기존 살균제 대비 살균력 확보	기존 살균 방제제 비교분석을 통한 90%이상의 살균 효과 확인	100%
유해성분	비료의 중금속 기준(비료공정규격설정 및 지정 농촌진흥청 고시 제2020-40호) 안정성 확보	100%
부숙도	비료의 부숙도 기준(비료공정규격설정 및 지정 농촌진흥청 고시 제2020-40호) 적합성 확보	100%
유기물함량	비료의 유기물 함량 기준(비료공정규격설정 및 지정 농촌진흥청 고시 제2020-40호) 확보	100%
항생/항균 펩티드 발굴	면역 활성화에 따른 항생펩티드 발굴/아미노산 서열 분석을 통한 항생/항균 펩티드 확보	100%
면역활성화 방법	곤충대상 면역 활성화 방법 개발을 통한 살균제 후보 물질 확보	100%

## 제4장. 목표 미달 시 원인분석

### 1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

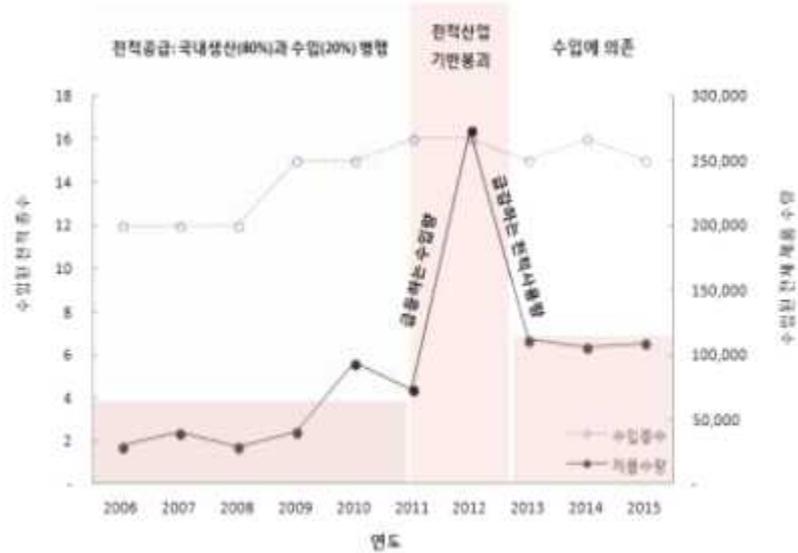
당초 목표계획으로 수립된 매출관련 국내 100,000천원, 수출 100,000천원의 계획을 수립하였으나, 국내 매출은 94,855천원, 수출 실적은 15,000천원을 달성하여 당초 계획대비 국내 매출은 5,000천원, 수출은 85,000천원 미달하였음.

이는 국내의 경우 신규 개발된 유기질 비료의 포장에서의 실증 효과 검증이 늦어지는 관계로 영업현장에서 사용자에게 보다 정확한 정보를 전달할 수 있는 방법에 차질이 있어 당초 계획 대비 매출실적이 높지 않았으며, 수출의 경우 당초 계획과는 달리 베트남 현지 코로나19의 2차 팬데믹으로 인해 본 연구진이 베트남 현지 포장에서의 테스트 및 현지 등록을 위한 베트남 방문에 제한으로 인해 등록을 위한 절차의 진행이 어려워 현지 제품등록이 늦어진 관계로 현지 업체와의 수출 계약이 지연되는 원인으로 당초 예상했던 수출 실적을 달성하지 못하였음.

### 2) 자체 보완활동

#### (1) 천적곤충

- 국민소득증대와 삶의 질 향상에 따른 소비패턴 변화로 친환경농산물 시장규모는 꾸준히 증가 할 것으로 예상(RDA, 2018)
  - ※ 친환경농산물 시장규모: ('10) 3.6조 원 → ('20) 6.6조 원(한국농촌경제연구원)
  - ※ 농약사용량 감축 목표: ('09) 12.1 kg/ha → ('12) 9.7 kg/ha → ('19) 8.0 kg/ha
- 2019년부터 전면 시행되는 농약허용물질목록관리제도에 대비한 친환경 해충방제기술 수요 급증
  - ※ 농약허용물질목록관리제도(PLS, Positive List System): 사용되는 농약 성분을 등록하고 잔류허용기준을 설정해, 등록된 농약 이외에는 잔류허용기준을 일률기준( 0.01mg/kg)으로 적용하는 제도
- 농림축산식품부는 곤충산업을 '20년까지 7,000억 원대로 육성한다는『비전2020』을 발표했으며, 농촌진흥청은 '22년까지 국내천적사용면적은 2,000ha로, 천적시장규모는 200억 원 수준으로 육성하기위한 노력을 경주하고 있음(농촌진흥청, 2018)
  - ※ 천적사용면적: ('10) 2,500 ha → ('12) 630 ha → ('14) 398 ha → ('16) 425 ha
  - ※ 국내천적시장규모: ('10) 1825억 원 → ('12) 523억 원 → ('14) 589억 원 → ('16) 488억 원
  - ※ 천적방제비율: (벨기에, 덴마크) 90%, (캐나다, 스웨덴) 80%, (한국) 1%
- 2014년, 정부(농림축산식품부)와 지자체(경기도)는 천적곤충 산업을 새로운 블루오션 산업으로 육성하기 위한 공감대 형성
  - ※ 경기도농업기술원 내 천적곤충 분야『곤충자원산업화 지원센터』준공(2016. 06)
- 2012년 이후, 국내 천적공급 90%이상 수입에 의존 → 친환경 재배 농업인들의 외국산 천적



【연도별 천적 수입량(농림축산검역본부 검역통계, 2016)】

- 토착천적의 적용 확대를 위한 기반기술 개발이 시급 → 농촌진흥청, 도농업기술원, 천적생산업체 등에서 우수 토착천적의 탐색 및 적용을 위한 연구가 진행 중임(1999~2017)
  - 국내 토착 천적 선발: 예쁜가는배고치벌 등 24종
  - 도입 천적 상품화: 칠레이리응애 등 13종
  - 외래 유입/돌발 해충의 천적 탐색 및 선발: 꽃매미(꽃매미벼룩좀벌), 미국선녀벌레(집게벌), 갈색날개매미충(알기생봉)
- 천적의 대량사육 및 현장활용 기술개발 및 보급 현황(RDA, 2018)
  - (1998) 칠레이리응애 이용 딸기 점박이응애 방제 기술 개발
  - (2015~217) 천적이용 파프리카 해충 종합방제 기술 개발
- 선진국 대비(선진국=100) 국내 천적 곤충 기술 활용 수준 = 59.3
 

※ 한국농촌경제연구원의 곤충 관련 전문가조사 결과(2015. 5. 6.~ 6. 25.)

미국	일본	유럽	평균
60.2	69.4	48.3	59.3

- 천적의 비싼 가격과 활용상의 어려움 → 천적 이용률 확산의 제한요인 → 실수요자인 농민의 의견을 적극 반영한 새로운 천적 적용 기술 개발이 시급함

※ 천적사용 시 애로사항 설문조사(RDA, '16. 7): 가격(50%), 적용기술(23%), 정보(10%)

※ 천적이용 농가 실태조사(경기도농업기술원, '14)

- 천적 이용 시 애로사항(농업인)

응답내용	비율
천적 수입에 따른 배송기간이 길어 적기투입이 어려움	50%
비용이 너무 비쌌	30%
고온기 방제효과가 낮음	20%
규격(마리수) 확인이 어려움	10%
천적을 정착시키기 어려움	10%

- 천적활성화를 위한 건의사항(농업인, 산업체)

응답내용	비율
지속적인 천적 지원 사업이 필요함	60%
비용을 낮추어 활용도를 높여야 함	20%
천적의 이해와 이용에 관한 교육이 필요함	20%
수입의존도를 낮추고 국내생산이 필요함	10%

① 생산계획

구분		(2023년) 개발 종료 후 1년	(2024년) 개발 종료 후 2년	(2025년) 개발 종료 후 3년
국 내	시장점유율(%)	2	5	10
	판매량(단위: 개)	1,200	1,500	2,000
	판매단가(만원)	6.6	6.6	6.6
	국내매출액(백만원)	80	100	130
해 외	시장점유율(%)	-	-	0.1
	판매량(단위: 개)	-	-	6,000
	판매단가(\$)	-	-	66
	해외매출액(백만\$)	-	-	0.4
당사 생산능력 (단위: 개)		2,000	3,000	5,000

② 투자계획

(단위: 백만원)

항목		( 2023 년 ) 개발 종료 후 1년	( 2024 년 ) 개발 종료 후 2년	( 2025 년 ) 개발 종료 후 3년
매출원가		24	75	120
판매관리비		5	10	20
자본적 지출	토지	-	-	-
	건물/구축물	-	-	-
	기계 장치 등	10	30	50
자본적 지출 합계		10	30	50



- 해외 사업 분야 확장 : (주)중부바이오텍의 기존 해외 영업라인을 통해 베트남을 비롯한 동남아 지역에 홍보 및 판매를 지속적으로 진행할 예정임.



【유기질비료 해외수출】

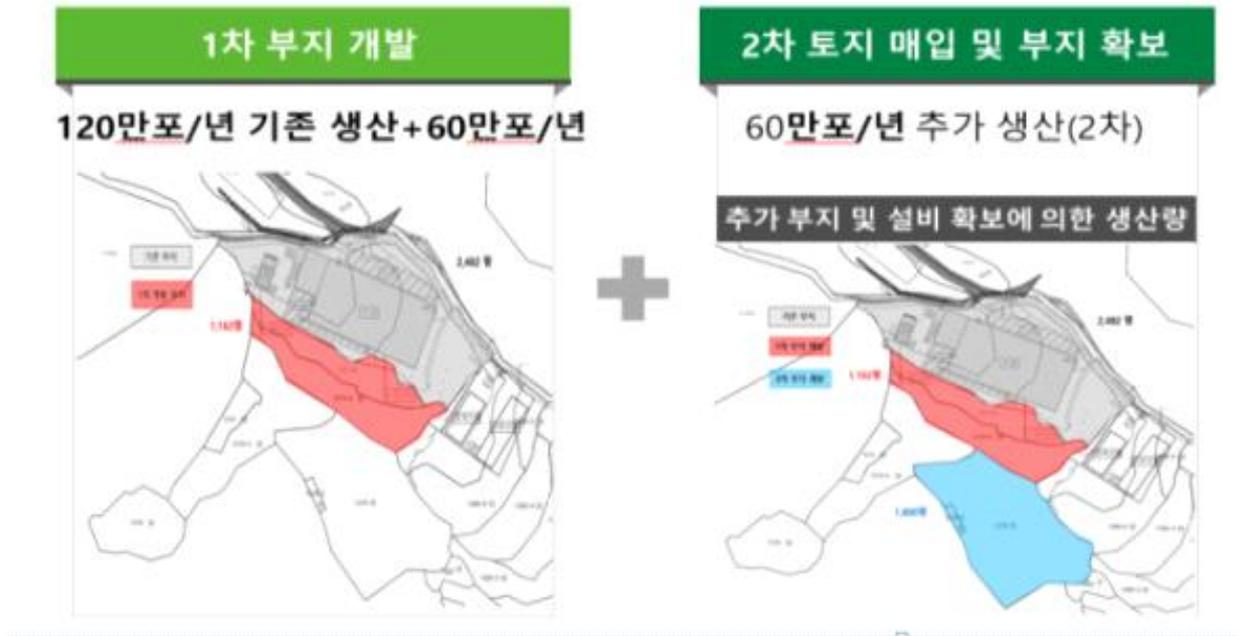
【베트남 농업박람회 전시모습】

## ② 투자 계획

구 분	사업화 년도		
	( 2023 )년 개발종료 후 1년	( 2024 )년 개발종료 후 2년	( 2025 )년 개발종료 후 3년
사업화 제품	기능성 유기질 비료 친환경 살균제	기능성 유기질 비료 친환경 살균제	기능성 유기질 비료 친환경 살균제
투자계획(백만원)	50	80	100
판매 계획 (백만원)	내 수	120	200
	수 출	100	200
	계	220	500
수입대체효과(백만원)	-	200	300
고용 창출(명)	1	-	1

또한, (주)중부바이오텍에서는 기존 120만포/년 설비에서 사업종료 후 5년 동안, 60만포/년의 부지확충과 시설을 보강하여 투자를 진행 예정이며, 이후 2차로 60만포/년 추가 확장 시설을 증설하여 본 사업을 통해서 나온 결과물을 가지고, 국내 및 해외(베트남 등)에 접근할 예정임.

## 투자 방향



【(주)중부바이오텍 투자 계획】

### ③ 생산 계획

기존 유기질 비료 생산 시스템으로 품질 관리를 강화하고, 기능성 유기질 비료 생산라인을 증설하여 연차별로 생산을 지속적으로 확장할 예정이다.

구 분	사업화 년도			
	( 2023 )년 (개발종료 후 1년)	( 2024 )년 (개발종료 후 2년)	( 2025 )년 (개발종료 후 3년)	( 2026 )년 (개발종료 후 4년)
생산량(만포)	10	25	35	45
비고	1차 투자 진행(생산량 60만포/년 추가 증설)			

\* 친환경살균제 및 천적은 별도 라인으로 운영 예정.

### ④ 해외시장 진출 계획

(주)중부바이오텍에서 베트남 현지에 기존 유기질 비료의 판매 라이선스를 발급 받아, 베트남에 수출을 진행하고 있음.

따라서, 기존 유기질 비료의 시장을 확보하고 있으므로, 본 사업을 통해 기능성 유기질 비료를 개발한 후에 베트남 현지 라이선스를 득하고, 베트남의 기존 영업을 통해서 판매가 이루어질 예정이며, 추가적으로 베트남 외에 캄보디아 등의 국가에 시장 진출을 진행 할 예정입니다.



【(주)중부바이오텍 베트남 현지 등록증 발급】



【(주)중부바이오텍 베트남 현지 판매】



【(주)중부바이오텍 베트남 현지 관리농가 및 창고시설】

### 3) 연구개발 과정의 성실성

○ 개발대상 기술의 이용성 강화 전략 수립

#### 적극적인 현장 교육 및 보급으로 연구결과 확산



경기·전지역 지역곤충자원산업지원센터



경북대학교  
경북농민사관학교

- 비전: 농어업에 희망을 더하다
- 미션: 창조적 핵심리더 양성을 통한 농어업 경쟁력 강화
- 경영방침: 농어업인과 호흡하는 현장 중심의 교육실현

※ 2017년 56개 과정 1,647명 수료

▶ 「곤충산업」과정(담당교수: 박종균)을 통한  
현장적용성 제고로 연구결과 확산 추진

- 농림수산물식품부 지원 천적특화 경기도 지역곤충자원산업화지원센터 건립(2016) → 국내 유일 천적곤충산업 지원센터 → 연구클러스터 형성으로 시너지효과 극대화 → 국가 신성장 거점으로 육성 → 전국단위로 전파 가능
- (적극적인 현장교육/보급) 경북농민사관학교 곤충산업 과정을 통해 현장적용성 제고로 연구결과 확산(2차년도)
- 천적 곤충산업 발전을 위한 기반 확충 및 클러스터 구축을 위한 협의체 구성 추진
- 곤충산업 종사자 양성 계획 및 천적산업 생태계 구축 추진

#### 친환경농산물생산 및 홍보(인증, 교육 등)를 통해 적극적인 친환경 병해충방제 기술 활용 보급이 되는 선순환 체계 확립



## 제5장. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

(단위 : 백만원, %)

총괄과제명	세부과제명	기관명	유형	총 연구개발비 (A)	정부지원 연구개발비 (B)	정부지원 연구개발비 비율 (C=B/A)	성과 유형	기술기여도	
								산정 근거	비율
엽채류 주요 병해충 친환경 경방제기술 개발 및 산업화 기술 개발	엽채류의 주요 해충을 방제하기 위한 토착 광포식성 천적의 선발 및 제품화	농업회사법인(주)오상킨섹트	중소기업 (영리)	257	205	79.7	신규 기술개발	해당 없음	해당 없음
	곤충의 면역기능을 규명하여 무름병 유발 세균에 대항하는 항생 펩티드 발굴과 곤충내/외 항생 펩티드 대량 발현조건 개발, 현장 적용 가능성 탐색 및 대량생산시스템 구축, 제품화	강원대학교	대학 (비영리)	175	175	100	신규 기술개발	해당 없음	해당 없음
	토양내 유용미생물과 유기성 자원(축분 등)을 활용한 엽채류의 병원균에 대한 저항성을 갖는 복합유기질 비료 개발 및 산업화	농업회사법인(주)중부바이오텍	중소기업 (영리)	219	175	79.9	신규 기술개발	해당 없음	해당 없음
	엽채류 재배 토양내 Microbiome 분석을 통해 식물병원균 분석 및 길항 미생물 탐색을 통해 토양병해 방제 미생물을 개발하고 최적 처리조건 확립 기술 개발	강원대학교	대학 (비영리)	175	175	100	신규 기술개발	해당 없음	해당 없음
<b>계</b>				<b>826</b>	<b>730</b>	-	-	-	-

## 제6장. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

< 연구개발성과 활용계획표(예시) >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내				
		2023	2024	2025	2026	2027
국외논문	SCIE					
	비SCIE					
국내논문	SCIE					
	비SCIE					
특허출원	국내					
	국외					
특허등록	국내					
	국외					
인력양성	학사					
	석사					
	박사					
사업화	시제품개발	1	1			
	상품출시					
	기술이전					
	공정개발					
	매출액(단위 : 천원)	200,000	300,000	400,000	500,000	600,000
	기술료(단위 : 천원)					
비임상시험 실시						
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상				
		2상				
		3상				
	의료기기					
진료지침개발						
신의료기술개발						
성과홍보			1	1		
포상 및 수상실적						
정성적 성과 주요 내용						

### < 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1.	1) 자체평가의견서
	2) 연구성과 활용계획서
2.	1)
	2)

210mm×297mm[(백상지(80g/m<sup>2</sup>) 또는 중질지(80g/m<sup>2</sup>)]

## 참고 문헌

- Ahmad, M., Rafiq, M., Arif, M.I., et al. 2011. Toxicity of Some Commonly Used Insecticides Against *Coccinella undecimpunctata* (Coleoptera: Coccinellidae). Pakistan J. Zool. 43(6), 1161–1165.
- Alauzet, C., Dargagnon, D., malausa, J.C. 1994. Bionomics of a polyphagous predator: *Orius laevigatus* (Het.: Anthocoridae). Entomophaga. 39, 33–40.
- Ali, A., Rizvi, P.Q. 2007. Development and predatory performance of *Coccinella septempunctata* L. (Coleoptera: Coccinellidae) on different aphid species. J Biol Sci. 7(8), 1478–1483.
- Almasi, A. Sabahi, Q., Talebi, K., et al. 2013. Laboratory evaluation of the toxicity of proteus, pymetrozine, deltamethrin, and pirimicarb on lady beetle *Hippodamia variegata* (GOEZE). J. Plant Protection Research. 53(2), 143–147.
- Alvandy, S., Aghabaglou, S., Goldasteh, S., et al. 2013. Study on Side Effects of Diazinon and Imidaclopride on *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae) Under Laboratory Conditions in Indirect Method in First and Second Generation (Prey Treated with Insecticide). J. Entomology & Zoology studies. 1(5), 78–80.
- Amor, F., Christiaens, O., Bengochea, P., et al. 2012. Selectivity of diacylhydrazine insecticides to the predatory bug *Orius laevigatus*: In vivo and modelling/docking experiments. Pest Management Science. 68(12), 1586–1594.
- An, J.S. 2012. Tree protection. Korea Tree Health Association. Vol. 17. 12–17.
- Angeli, G., Baldessari M., Maines, R., et al. 2005. Side-effects of pesticides on the predatory bug *Orius laevigatus* (Heteroptera: Anthocoridae) in the laboratory. Biocontrol Science and Technology. 15(7), 745–754.
- Aqsa, S., Iqra, A., Sarwar, MK., et al. 2018. Effect of insecticides on *Coccinella septempunctata* (Coleoptera; Coccinellidae); A review. Asian J Agri & Biol. 6(1), 125–134.
- Ashley, J.L., Herbert, D.A., Lewis, E.E., et al. 2006. Toxicity of three acaricides to *Tetranychus urticae* (Tetranychidae: Acari) and *Orius insidiosus* (Anthocoridae: Hemiptera). Journal of Economic Entomology. 99(1), 54–59.
- Barbosa, P.R.R., Michaud, J.P., Bain, C.L., et al. 2017. Toxicity of three aphicides to the gen

- eralist predators *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae) and *Orius insidiosus* (Hemiptera: Anthocoridae). *Ecotoxicology* 26(5), 589–599.
- Babu, A. 1999. Influence of prey species on feeding preference, post-embryonic development of *Coccinella transversalis* F. (Coleoptera: Coccinellidae). *Entomology*. 24, 221–228.
- BBC. 2018. <https://www.bbc.com/news/science-environment-43910536>
- Bianchi, F., Wackers, F.L. 2008. Effects of flower attractiveness and nectar availability in field margins on biological control by parasitoids. *Biological Control*. 46(3), 400–408.
- Bianchi, F.J., Booij, C.J., Tschamntke, T. 2006. Sustainable pest regulation in agricultural landscapes: a review on landscape composition, biodiversity and natural pest control. *Proceedings of the Royal Society B* 273(1595), 1715–1727.
- Bielza, P., Fernandez, E., Gravalos, C., et al. 2009. Testing for non-target effects of spiromesifen on *Eretmocerus mundus* and *Orius laevigatus* under greenhouse conditions. *BioControl*. 54(2), 229–236.
- Biobest. 2008. *Orius* in ornamental crops; a welcome addition for thrips control. *Bio-Bulletin*. 8pp.
- Biondi, A., Desneux, N., Siscaro, G., et al. 2012. Using organic-certified rather than synthetic pesticides may not be safer for biological control agents: Selectivity and side effects of 14 pesticides on the predator *Orius laevigatus*. *Chemosphere*. 87(7), 803–812.
- Bostanian, N.J., Akalach, M. 2006. The effect of indoxacarb and five other insecticides on *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae), *Amblyseius fallacis* (Acari: Phytoseiidae) and nymphs of *Orius insidiosus* (Hemiptera: Anthocoridae). *Pest Management Science*. 62(4), 334–339.
- Bostanian, N.J., Akalach, M. 2004. The contact toxicity of indoxacarb and five other insecticides to *Orius insidiosus* (Hemiptera: Anthocoridae) and *Aphidius colemani* (Hymenoptera: Braconidae), beneficials used in the greenhouse industry. *Pest Management Science*. 60(12), 1231–1236.
- Broughton, S., Harrison, J., Rahman, T. 2014. Effect of new and old pesticides on *Orius armatus* (Gross)—an Australian predator of western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande). *Pest Management Science* 70(3), 389–397.
- Brownbridge, M., Buitenhuis, R., Murphy, G., et al. 2013. Banker plant, trap crops and other bioprotection developments in Canadian greenhouse floriculture. *ISBCA2013*. 133–136.
- Byun, et al. Investigation and Application of Korean Economic Insects. National Institute of

Biological Resources. 120 pp.

- Camargo, C., Giesler, L.J., Siegfried, B.D. 2017. Thiamethoxam toxicity and effects on consumption behavior in argo C., Hu *Orius insidiosus* (hemiptera: Anthocoridae) on soybean. *Environmental Entomology*. 46(3), 693–699.
- Choi, H. 2004. Exposure and Risk Assessment for Applicator during Treatment of Imidacloprid and Thiophanate–methyl in various Crop Fields. Master Thesis in Seoul National University. 85 pp.
- Choi, H., Moon, J.K., Liu, K.H., et al. 2006. Risk Assessment of Human Exposure to Cypermethrin during Treatment of Mandarin Fields. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 50(3), 437–442.
- Choi, Y.S., Hwang, I.S., Park, D.G., et al. 2013. Control Effects of *Frankliniella occidentalis* by using Trap Plants and *Orius laevigatus* in Chrysanthemum PVC House. *J. Pesticide Sci.* 17(4), 440–447.
- Choi, Y.S., Seo, J.H., Jo, H.R., et al. 2016. Technical development of application of trap plant and natural enemy to control sweet potato whitefly in tomato greenhouse. Rural development administration. 41pp.
- Cloyd, R.A. 2012. Indirect Effects of Pesticides on Natural Enemies. Creative Commons Attribution License. 24 pp.
- Dagli, F., Bahsi, S.U. 2009. Topical and residual toxicity of six pesticides to *Orius majusculus* Phytoparasitica. 37(5), 399–405.
- De Carvalho, G.A., Morais, A.A., Rocha, L.C.D., et al. 2005. Selectivity of insecticides to eggs and nymphs of *Orius insidiosus* (Say) (Hemiptera: Anthocoridae). *Neotropical Entomology*. 34(3), 423–427.
- Delbeke, F., Vercruyssen, P., Tirry L., et al. 1997. Toxicity of diflubenzuron, pyriproxyfen, imidacloprid and diafenthiuron to the predatory bug *Orius laevigatus* (Het.: Anthocoridae). *Entomophaga*. 42(3), 349–358.
- Drea, J.J. and Carlson, R.W. 1987. The establishment of *Chilocorus kuwanae* (Coleoptera: Coccinellidae) in eastern United States. *Proc. Entomol. Soc. Wash.* 89, 821–824.
- Eaton, D.L. and Klaassen, C.D. 1996. Principles of toxicology. Casarett and Doull's Toxicology. 4th ed. Pergamon Press. U.S.A. 12–49.
- Elzen, G.W. 2001, Lethal and sublethal effects of insecticide residues on *Orius insidiosus* (Hemiptera: Anthocoridae) and *Geocoris punctipes* (Hemiptera: Lygaeidae). *Journal of*

- Economic Entomology. 94(1), 55–59.
- Elzen, G.W. 2000. Laboratory toxicity of insecticide residues to *Orius insidiosus* and *Geocoris punctipes*. Proceedings Cotton Conferences. 2, 1345–1348.
- Elzen, G.W., Elzen P.J., King E.G. 1998, Laboratory toxicity of insecticide residues to *Orius insidiosus*, *Geocoris punctipes*, *Hippodamia convergens*, and *Chrysoperla carnea*. Southwestern Entomologist. 23(4), 335–342.
- EPA. 2020. EPA actions to protect pollinators. 2020. 1월 브리핑 자료. <https://www.epa.gov>
- Fahimeh, A., Shahnaz, S.N., Kamran, Mahian, Guy, Smagghe. Lethal and sublethal effects of spirotetramat and abamectin on predatory beetles (*Menochilus sexmaculatus*) via prey (*Agonoscena pistaciae*) exposure, important for integrated pest management in pistachio orchard. Belg. J. Zool. 146(2), 113–122.
- Fand, B.B., Suroshe, S.S. 2010. Effect of developmental stage and density of *Phenacoccus solenopsis* Tinsley(Hemiptera: Pseudococcidae) on the predatory performance of four coccinellid. predators. Journal of Biological control. 24(2), 110–115.
- Fenske, R. A. and E. W. Day JR. 2005. Assessment of exposure for pesticide handlers in agricultural, residential and institutional environments. Occupational and residential exposure assessment for pesticides. edited. John Wiley & Sons. Ltd. 11–43.
- Glenister, C.S. 2010. The guardian plant: a meeting place for pests and natural enemies. AERGC Annual Meeting. 67pp.
- Gontijo, P.C., Moscardini, V.F., Michaud J., et al. 2015. Non-target effects of two sunflower seed treatments on *Orius insidiosus* (Hemiptera: Anthocoridae). Pest Management Science. 71(4), 515–522.
- Gredler, G. 2001. Encouraging beneficial insects in your garden. Oregon State University. 4 pp.
- Ham, E.H., Choi, Y.S., Lee, J.S., et al. 2014. Biological Control of *Frankliniella occidentalis* by Banker Plants of *Orius laevigatus* on Rose Greenhouse. J. Nature conservancy. 8(1), 8–11.
- Holling, C.S. 1959. Some characteristics of simple type of predation and parasitism. Can. Entomol. 91, 385–398.
- Hopwood, et al. 2016. Habitat planning for beneficial insects: Guidelines for conservation biological control. The xerces society for invertebrate conservation. 82 pp.
- Hughes, E. A., A. Zalts, J. J. Ojeda, A. P. et al. 2006. Analytical method for assessing poten

- tial dermal exposure to captan, using whole body dosimetry, in small vegetable production units in Argentina. *Pest. Manag. Sci.* 62, 811–818.
- Hughes, E.A., A. P. Flores, L. M. Ramos, A. et al. 2008. Potential dermal exposure to deltamethrin and risk assessment for manual sprayers: Influence of crop type. *Sci. Total Environ.* 391, 34–40.
- IOBC. 2005. Classification of side effects to beneficial organisms. IOBC wprs Working Group "Pesticides and Beneficial Organisms & IOBCwprs Commission "IP Guidelines and Endorsement". 6 pp.
- IOBC. 2002. Classification of side effects to beneficial organisms. IOBC quality control guidelines for natural enemies. IOBC. 20 pp.
- Jensen, J.K. 1984. The Assumptions used for exposure assessment in Determination and assessment of Pesticide exposure. Edited by M. Siewierski. Elsevier. 147–152.
- Kaur, H., Virk, J.S., Kaur, R. 2010. Biology of Australian ladybird beetle, *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant on *Phenacoccus solenopsis* Tinsley. *Journal of Biological control.* 24, 123–125.
- Khani, A., Ahmai, M., Ghadamyari, M. 2012. Side effects of imidacloprid and abamectin on the mealy bug destroyer *Cryptolaemus montrouzieri*. *Trakia J. Sci.* 10(3), 30–35.
- Kim, D.G., Kim, J.W., Jeong, E.H., et al. 2010. A Preliminary Study on the Life Cycle of *Chilocorus kuwanae* (Coleoptera : Coccinellidae) and its Predation Ability on *Pseudaulacaspis prunicola* (Homoptera : Diaspididae). *Journal of Asian agriculture and biotechnology.* 26(1), 7–13.
- Kim, E.H., Lee, H.R., Choi, H., et al. 2011. Methodology for Quantitative Monitoring of Agricultural Worker Exposure to Pesticides. *Kor. J. Pesticide Science.* 15(4), 507–528.
- Kim, E.H., Lee, J.H., Sung, J.H., et al. 2014. Exposure and Risk Assessment for Operator Exposure to Insecticide Acetamiprid during Water Melon Cultivation in Greenhouse using Whole Body Dosimetry. *The Korean Journal of Pesticide Science* 18(4), 247–257.
- Kim, E.H., Moon, J.K., Choi, H., et al. 2012. Exposure and risk assessment of insecticide methomyl for applicator during Treatment on apple orchard. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry.* 55(1), 95–100.
- Kim, G.H., Lee, Y.S., Yoo, J.S., et al. 2003. Development of control method on the major insect pest of rose greenhouses. Ministry of Agriculture and Forestry. 174 pp.
- Kim, K.H., Lee, Y.S. 1999. Selective toxicity of aphicides to the predator *Harmonia axyridis*

- (Coleoptera: Coccinellidae) and *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). Kor. J. Pesticide Science. 3(1), 84–89.
- Kim, K.H., Yi, C.G., Ahn, Y.J., et al. 2015. Fumigant toxicity of basil oil compounds and related compounds to *Thrips palmi* and *Orius strigicollis*. Pest Management Science. 71(9), 1292–1296.
- Kim, Y.H., Kim, J.H. 2003. Biological Control of Aphids on Cucumber in Plastic Green Houses Using Banker Plants. Kor. J. Applied Entomology. 42(1), 81–84.
- Kosari, A.A., Fazeli–Dinan, M. 2016. Residual effects of four pesticides on the predatory bug, *Orius albidipennis* Reut. (Hem.: Anthocoridae). Archives of Phytopathology and Plant Protection. 49, 252–261.
- Kumar, L., Yogi, M.K., Jagdish, J. 2013. Habitat Manipulation for Biological Control of Insect Pests: A Review. Research J. Agriculture & Forestry Sci. 1(10), 27–31.
- Landis, D.A., Wratten, S.D., Gurr, G.M. 2000. Habitat management to conserve natural enemies of arthropod pests in agriculture. Annual review of Entomology. 45(1), 175–201.
- Lee, J.B., Jeong, M.H., Sung, H.J., et al. 2001. Acute toxicity response caused by mixture or tank mix of several insecticides. The Korean Journal of Pesticide Science 5(4), 57–61.
- Lee, Y.S., Jang, M.J., Lee, H.A., et al. 2017. Toxicity of Pesticides to Mycophagous Ladybird, *Illeis koebelei* Timberlake (Coleoptera: Coccinellidae: Halyziini). Kor. J. Pestic. Sci. 21(4), 364–372.
- Logarzo, G.A., Livi III, W., CARPINTERO, D.L. Plant bugs (Heteroptera: Miridae) associated with roadside habitats in Argentina and Paraguay: host plant, temporal, and geographic range effect. Ann. Entomol. Soc. Am. 98(5), 694–702.
- Lucas, E., Labrecque, C., Coderre, D. 2004. *Delphastus catalinae* and *Coleomegilla maculata* lengi (Coleoptera: Coccinellidae) as biological control agents of the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae). Pest management science. 60, 1073–1078.
- Machao–Neto. 2001. Determination of Safe Work Time and Exposure Control Need for Pesticide Applicators. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 67(1). 20–26.
- Matteoni, J.A. 2003. Economics of banker plant systems in Canadian greenhouse crops. 1st International Symposium on Biological Control of Arthropods. 154–155.

- Markkula, M., Tiittanen, K. 1976. "Pest in First" and "natural infestation" methods in the control of *Tetranychus urticae* Koch with *Phytoseiulus persimilis* Athias–Henriot on glasshouse cucumbers. Annual Entomology Fenn. 15, 81–85.
- Meineke, E.K., Dunn, R.R., Sexton, J.O., et al. 2013. Urban Warming Drives Insect Pest Abundance on Street Trees. *plosone*. 8(3), e59687.
- Mollah, M.M.I., Rahman, M.M., Alam, M.Z. 2012. Toxic Effect of Some Insecticides on Predatory Lady Bird Beetles (Coleoptera: Coccinellidae) in Country Bean (*Lablab purpureus* L.) Field. *World J. Zoology*. 7(4), 347–350.
- Moscardini, V.F., Gontijo, P.C., Carvalho, G.A., Oliveira, R.L., Maia, J.B., Silva, F.F. 2013. Toxicity and sublethal effects of seven insecticides to eggs of the flower bug *Orius insidiosus* (Say) (Hemiptera: Anthocoridae). *Chemosphere*. 92(5), 490–496.
- Mughal, T.K., Ullah, Z., Altaf Sabri., Ahmad, S., et al. 2017. In vitro comparative toxicity of different insecticides against adults of seven spotted beetle, *Coccinella septempunctata* L. (Coleoptera: Coccinellidae). *J. Entomology and Zoology Studies*. 5(6), 498–502.
- Nagai, K. 1990. Effect of Insecticides on *Orius* sp., the Natural Enemy of Thrips palmi KARNY. *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology*. 34(4), 321–324.
- Naranjo, S.E., Ellsworth, C.E., Frisvold, G.B. 2015. Economic Value of Biological Control in Integrated Pest Management of Managed Plant Systems. *Annual Review of Entomology*. 60, 621–645.
- National Institute of Agricultural Sciences. 2007. Study of Acceptable operator exposure level (AOEL) Setting of pesticides. National Institute of Agricultural Sciences. Jeonju. Korea. 324–337.
- National Institute of Agricultural Sciences. 2016. AOEL Information. <http://pis.rda.go.kr/spcltyinfo/agchmSafeInfo/toxctyExpsr/aoel.do>(2017. 8. 10.).
- Nikolova, I. 2016. Side effects of two plant insecticide in natural enemies of insects in alfalfa (*Medicago sativa* L.) seed production. *Acta entomologica serbica*. 21, 133–142.
- Nohara, K., 1962. On the overwintering of *Chilocorus kuwanae* Silvestri (Coleoptera: Coccinellidae). *Sci. Bull. Fac. Sci. Bull. Fac. Agric. Kyushu Univ*. 20, 33–39.
- Oh, C.H., Jin, H.Y., Ahn, T.H., et al. 2017. A preliminary study of *Oxalis corniculata* as a new banker plant: Control efficacy against *Panonychus citri* and feeding ability of two natural enemies on *Tetranychina harti*. *Kor. J. Applied Entomology*. 56(3), 267–273.

- Oliveira, M. L. and J. G. Machado-Neto. 2003. Use of manganese as tracer in the determination of respiratory exposure and relative importance of exposure routes in the safety of pesticide applicators in citrus orchards. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 70(3), 415–421.
- SAS Institute. SAS User's Guide:Statistics. SAS Institute, Cary, NC. 2012.
- Skinner, M., Frank, C., Valentin, R. 2011. Aphid banker plant system for greenhouse IPM, step by step. Univ. of Vermont & Biobest USA, Inc. 4pp.
- Park, S.D., Jung, K.C., Choo, Y.D., et al. 1990. Study on Seasonal Occurrence of Apple Mites, *Panonychus ulmi*(Koch) and *Tetranychus urticae*(Koch), in Kyungpook Apple Orchards. *Korean J. Appl. Entomol.* 29(1), 20–24.
- Pietrantonio, P.V., Benedict, J.H. 1999. Effect of new cotton insecticide chemistries, tebufenozide, spinosad and chlorfenapyr, on *Orius insidiosus* and two *Cotesia* species. *Southwestern Entomologist* 24(1), 21–29.
- Podoler, H., Henen, J. 1983. A comparative study of the effects of constant temperatures on development time and survival of two coccinellid beetles of the genus *Chilocorus*. *Phytoparasitica.* 11, 167–176.
- Rocha, L.C.D., Carvalho, G.A., Moura, A.P., et al. 2006(a). Pesticide toxicity to adults of *Orius insidiosus* (Say) (Hemiptera: Anthocoridae). *Bragantia.* 65(2), 309–315.
- Rocha, L.C.D., Carvalho, G.A., Moura, A.P., et al. 2006(b). Toxicity of pesticides used in chrysanthemum crops to eggs and nymphs of *Orius insidiosus* (Say) (Hemiptera: Anthocoridae). *Neotropical Entomology.* 35(1), 83–92.
- Samevesht, M., Gheibi, M., Hesami, S., et al. 2018. Predation by *Anthocoris minki pistaciae* Wagner (Hemiptera: Anthocoridae) on *Agonoscena pistaciae* Burckhardt and Lauterer (Hemiptera: Psyllidae) at different temperatures. *Egyptian Journal of Biological Pest Control.* 28, 76–84.
- Seo, S.Y., Koigoora, S., Kwon, G.M., et al. 2012. Toxicity Evaluation of 'Bt-Plus' on Parasitoid and Predatory Natural Enemies. *Kor. J. Appl. Entomol.* 51(1), 47–58.
- Skinner, M., C. E. F. Sullivan and R. Valentine. 2014. Aphid Banker Plant System for Greenhouse IPM, Step by Step. University of Vermont & BioBest USA, Inc. 4 pp.
- Smith, S.F., Kirschik, V.A. 2000. Effects of Biorational Pesticides on Four Coccinellid Species (Coleoptera: Coccinellidae) having Potential as Biological Control Agents in Interiorscapes. *J. Econ. Entomol.* 93(3), 732–736.

- Studebaker, G.E., Kring, T.J. 2003. Effects of insecticides on *Orius insidiosus* (Hemiptera: Anthocoridae), measured by field, greenhouse and petri dish bioassays. Florida Entomologist. 86(2), 178–185.
- Studebaker, G.E., Kring, T.J. 1999. Lethal and sub-lethal effects of selected insecticides on *Orius insidiosus*. Proceedings of the 1999 Beltwide Cotton Conference. 1204 pp.
- The dietrick institute, Habitats on Farm. [www.dietrick.org/articles/articles.html](http://www.dietrick.org/articles/articles.html)
- Thomson, L. 2012. Pesticide impacts on beneficial species. Australian Government. 7 pp.
- Torres, F.Z., Carvalho, G.A., De Souza, J.R., et al. 2007. Selectivity of insecticides to *Orius insidiosus*. Bragantia. 66(3), 433–439.
- Uc master gardeners santa clara county. 2016. Creating habitat for beneficial insects. <http://www.ucanr.org/blogs/blogcore/postdetail.cfm?postnum=22670>
- Ueno, T. 2012. Insect natural enemies as bioindicators in rice paddies. Korean Journal of Agricultural Science. 39(4), 545–553.
- USDA NRCS. 2009. Plants enhancement activity–PLT08–Habitat development for beneficial insects for pest management.
- van Driesche, R., Kingsley, P., Bryan, M., 1998. Effect of Euonymus Scale (Homoptera: Diaspididae) on Euonymus spp. Survival in Southern New England, with Estimates of Economic Costs of Pest Damage. Environmental Entomology. 27(2), 217–220.
- Yi, C.G., Choi, B.R., Park, H.M., et al. 2006. Fumigant toxicity of plant essential oils to *Thrips palmi* (Thysanoptera: Thripidae) and *Orius strigicollis* (Heteroptera: Anthocoridae). Journal of Economic Entomology. 99(5), 1733–1738.
- Youn, Y.N., Seo, M.J., Shin, J.G., et al. 2003. Toxicity of greenhouse pesticides to multicolored Asian lady beetles, *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). Biological Control. 28, 164–170.
- Walton, V.M., Pringle, K.L. 2001. Effects of Pesticides and Fungicides Used on Grapevines on the Mealybug Predatory Beetle *Nephus 'boschianus'*. S. Afr. J. Enol. Vitic. 22(2), 107–110.
- [www.flickr.com/photos](http://www.flickr.com/photos)
- Chairatana, P., Chu, H., Castillo, P. A., Shen, B., Bevins, C. L., & Nolan, E. M. (2016). Proteolysis triggers self-assembly and unmasks innate immune function of a human  $\alpha$ -defensin peptide. *Chemical science*, 7(3), 1738–1752.
- Cooper, D., & Eleftherianos, I. (2017). Memory and specificity in the insect immune system:

- current perspectives and future challenges. *Frontiers in immunology*, 8, 539.
- Dempsey, P. W., Vaidya, S. A., & Cheng, G. (2003). The art of war: Innate and adaptive immune responses. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 60, 2604–2621.
- Eleftherianos, I., Marokhazi, J., Millichap, P. J., Hodgkinson, A. J., Sriboonlert, A., & Reynolds, S. E. (2006). Prior infection of *Manduca sexta* with non-pathogenic *Escherichia coli* elicits immunity to pathogenic *Photobacterium luminescens*: roles of immune-related proteins shown by RNA interference. *Insect biochemistry and molecular biology*, 36(6), 517–525.
- Hadizadeh, I., Peivastegan, B., Hannukkala, A., Van der Wolf, J. M., Nissinen, R., & Pirhonen, M. (2019). Biological control of potato soft rot caused by *Dickeya solani* and the survival of bacterial antagonists under cold storage conditions. *Plant Pathology*, 68(2), 297–311.
- Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2015). Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature immunology*, 16(4), 343–353.
- King, R. W., Deshaies, R. J., Peters, J. M., & Kirschner, M. W. (1996). How proteolysis drives the cell cycle. *Science*, 274(5293), 1652–1659.
- Pham, L. N., Dionne, M. S., Shirasu-Hiza, M., & Schneider, D. S. (2007). A specific primed immune response in *Drosophila* is dependent on phagocytes. *PLoS pathogens*, 3(3), e26.
- Sadd, B. M., & Schmid-Hempel, P. (2006). Insect immunity shows specificity in protection upon secondary pathogen exposure. *Current Biology*, 16(12), 1206–1210.
- Sallenave, J. M., & Guillot, L. (2020). Innate immune signaling and proteolytic pathways in the resolution or exacerbation of SARS-CoV-2 in Covid-19: key therapeutic targets?. *Frontiers in immunology*, 11, 1229.
- 정은경, 장현철, 용영록, & 김병섭. (2003). 고랭지 배추 무름병 방제를 위한 우수약제 선발. *농약과 학회지*, 7(1), 32–37.
- 한승호, 이송득, & 강명화. (2006). 국내 자생 식물 추출물의 항산화 활성 및 항균효과. *한국약용작물학회지*, 14(1), 49–55.
- Congcong Shen, Yu shi, Kunkun Fan et al. Soil pH dominates elevational diversity pattern for bacteria in high elevation alkaline soils on the Tibetan Plateau. *FEMS Microbiology Ecology*, 2019;95:pp 1–7, 4–6.
- 박흥섭, 조정일. (1996). 길항균 *Bacillus subtilis* CAP134의 대량생산을 위한 배양조건. *한국유기*

농업학회지, 5(1), 87–99.

박준경, et al. "복합기능미생물 *Bacillus velezensis* GH1-13 을 이용한 미생물제형 개발 및 생물학적 특성." *KSBB Journal* 33.4 (2018): 237–246.

정광화, et al. "펠렛 가공처리에 따른 돈분 발효퇴비와 우분 발효퇴비의 물리화학적 특성." *유기물 자원화* 13.4 (2005): 118–127.

Chandra, R. P., Bura, R., Mabee, W. E., Beclin, A., Pan X. and Saddler, J. N. (2007) Substrate pretreatment: The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics. *Biofuels* 108:67–93.

Chitrampalam, P., Figuli, P. J., Matheron, M. E., Subbarao, K. V., & Pryor, B. M. (2008) Biocontrol of lettuce drop caused by *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. minor* in desert agroecosystems. *Plant dis* 92(12):1625–1634.

Hwang J. Y., Shim C. K., Ryu K. Y., Choi D. H. & Jee H. J. (2006) Selection of *Brevibacillus brevis* B23 and *Bacillus stearothersophilus* B42 ad Biological Control Agents against *Sclerotinia* Rot of Lettuce. *Res Plant Dis* 12(3):254–259.

Kim, K. K., Kim, Y. C., Choi, Y. W., Sin, T. S., Park, K. D., Kang, U. G. & Park, H. C. (2008). Biological Control of Plant Pathogens by *Bacillus* sp. AB02. *J Life Sci* 18(6):858–864.

Kumar, A., Saini, S., Prakash, A. and Johri, B. N. (2009) Influence of cultivation practices on phenotypic and genotypic diversity of antagonistic rhizobacteria isolated from soybean (*Glycine max* L.). In: Abstracts, 1st Asian PGPR Congress for Sustainable Agriculture Hyderabad pp118.

Lee, H. J., Kim, J. Y., Lee, J. G., & Hong, S. S. (2014) Biological control of Lettuce sclerotinia rot by *Bacillus subtilis* GG95. *Korean J Mycol* 42(3):225–230.

Malhotra, H., Sharma, S., & Pandey, R. (2018) Phosphorus nutrition: plant growth in response to deficiency and excess. *Plant nutrients and abiotic stress tolerance*. Springer Singapore pp171–190.

Shang, L., Bai, X., Chen, C., Liu, L., Li, M., Xia, X., & Wang, Y. (2019) Isolation and identification of a *Bacillus megaterium* strain with ochratoxin A removal ability and antifungal activity. *Food Control* 106743.

Young, C. S., Clarkson, J. P., Smith, J. A., Watling, M., Phelps, K., & Whipps, J. M. (2004) Environmental conditions influencing *Sclerotinia sclerotiorum* infection and disease development in lettuce. *Plant Pathol J* 53(4):387–397.

#### 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 작물바이러스 및 병해충 대응 산업화 기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 작물바이러스 및 병해충 대응 산업화 기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.