

과제번호  
120042-  
02

보안 과제( ), 일반 과제( O ) / 공개( ), 비공개( O )발간등록번호( O )  
유용농생명자원산업화기술개발사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003866-01

# 유용미생물을 활용한 잔디 주요 병 방제용 친환경 복합제제 개발

2022. 03. 25.

주관연구기관 / 전남대학교 산학협력단  
협동연구기관 / 보란파마

농림축산식품부  
(전문기관)농림식품기술기획평가원

유용미생물  
방제용  
친환경  
복합제제  
개발  
주요  
병

2021

농림식품기술기획평가원  
농림축산식품부

제출문

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “유용미생물을 활용한 잔디 주요 병 방제용 친환경 복합제제 개발”(개발기간 : 2020. 04. 29. ~ 2021. 12. 31.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2022. 03. 25.

주관연구기관명 : 전남대학교 산학협력단  
협동연구기관명 : 보란파마

민정준 (인)  
김현숙 (인)



주관연구책임자 : 상 현 규  
협동연구책임자 : 김 현 숙

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

최종보고서							보안등급 일반[√], 보안[ ]						
중앙행정기관명		농림축산식품부		사업명		사업명		유용농생명자원산업화 기술개발사업					
전문기관명 (해당 시 작성)		농림축산식품기술기획평가 원		사업명		내역사업명 (해당 시 작성)							
공고번호		제 농축2020-64호		총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)		연구개발과제번호		120042-02					
기술 분류	국가과학기술 표준분류	LA0903	50%	LA0908	40%	LA1101	10%						
	농림식품과학기술분류	RA0303	50%	RA0305	30%	RA0304	20%						
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		국문		영문									
연구개발과제명		국문		영문		유용미생물을 활용한 잔디 주요 병 방제용 친환경 복합제제 개발 Development of eco-friendly multi-functional microbial agent for turfgrass diseases using beneficial microbes							
주관연구개발기관		기관명		주소		사업자등록번호		409-82-11942					
				(61186)광주 북구 용봉로77		법인등록번호		206371-0001063					
연구책임자		성명		상현규		직위		조교수					
		연락처		직장전화		휴대전화		-					
				전자우편		국가연구자번호		-					
연구개발기간		전체		2020. 04. 29 - 2021.12. 31 (1년 9개월)									
		단계		1단계		2020. 04. 29 - 2021.12. 31 (1년 9개월)							
연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발비		기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금 지방자치단체 기타( )		합계		연구개발 비외 지원금			
		현금		현금 현물		현금 현물		현금 현물		합계			
총계		528,000		10,150 166,850				538,150 166,850		705,000			
1단계		1년차		226,000 0 75,500				226,000 75,500		301,500			
		2년차		302,000 10,150 91,350				312,150 91,350		403,500			
공동연구개발기관 등		기관명		책임자		직위		휴대전화		전자우편		비고 역할 기관유형	
공동연구개발기관		보란파마		김현숙		대표이사		-		-		공동 중소기업	
위탁연구개발기관		(재)농축산용 미생물산업육 성지원센터		한귀환		팀장		-		-		위탁 재단법인	
연구개발기관 외 기관													
연구개발담당자 실무담당자		성명		상현규		직위		조교수					
		연락처		직장전화		휴대전화		-					
				전자우편		국가연구자번호		-					

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

2022 년 3 월 25 일

연구책임자: 상현규

주관연구개발기관의 장: 전남대학교 산학협력단 (직인)  
 공동연구개발기관의 장: 보란파마 (직인)  
 위탁연구개발기관의 장: (재)농축산용미생물산업육성지원센터 (직인)

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하



## < 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명		유용농생명자원산업화 기술개발사업			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)		
내역사업명 (해당 시 작성)					연구개발과제번호		120042-02
기술 분류	국가과학기술 표준분류	LA0903	50%	LA0908	40%	LA1101	10%
	농림식품 과학기술분류	RA0303	50%	RA0305	30%	RA0304	20%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)							
연구개발과제명		유용미생물을 활용한 잔디 주요 병 방제용 친환경 복합제제 개발					
전체 연구개발기간		2020. 04. 29 - 2021. 12. 31					
총 연구개발비		총 705,000 천원 (정부지원연구개발비: 528,000 천원, 기관부담연구개발비 : 177,000 천원)					
연구개발단계		기초[ ] 응용[ ] 개발[ <input checked="" type="checkbox"/> ] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[ ]		기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준( ) 종료시점 목표( )	
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)							
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)							
연구개발 목표 및 내용	최종 목표		<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 잔디 주요 병 제어 및 잔디 면역 증강 유용미생물 발굴·효능 검증 및 특성분석</li> <li>○ 대량배양·제형화 공정 개발 및 시제품의 효능 검증·안전성 평가</li> <li>○ 현장적용, 사용 매뉴얼 제작·보급 및 교육·컨설팅</li> <li>○ 마케팅 전략 수립 및 사업화</li> </ul>				
	전체 내용		<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 잔디 병 제어 및 잔디 면역 증강 유용미생물 발굴 및 효능 검증                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 기 확보된 미생물의 잔디 병에 대한 길항 능력 조사</li> <li>- 잔디 내생 또는 근권 유래 미생물 분리, 길항 능력 및 면역 증강 효능 검증</li> <li>- 선발된 유용미생물의 생물학적 특성 분석</li> </ul> </li> <li>○ 대량배양 공정·제형화 기술 개발                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 5~100L 발효기를 이용한 대량배양 최적 조건 정립</li> <li>- 2~10톤 규모 대용량 발효기의 대량배양 scale-up 및 배양 매뉴얼 확립</li> <li>- 병 방제를 위한 맞춤형 제형(액상, 입상수화제 등) 공정 및 최적 복합제제 개발</li> </ul> </li> <li>○ 시제품의 효능 검증 및 안전성 평가                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 시제품의 pot assay/소면적 포장 시험을 통한 잔디 병해 제어</li> <li>- 면역 증강 평가 및 현장적용 가능성 검증</li> <li>- 현장적용 가능성이 검증된 시제품을 대상으로 유기농업자재 등록</li> <li>- 시제품의 잔디에 대한 약해 검증, 생태독성 평가</li> </ul> </li> <li>○ 사용 매뉴얼 제작·보급 및 제품등록, 마케팅 전략 수립 및 사업화</li> </ul>				
	1단계 (해당 시 작성)	목표					
	n단계 (해당 시 작성)	내용					

연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 잔디 병해 제어용 및 잔디 면역 증강 유용미생물 자원 발굴·효능 검증</li> <li>○ 유용미생물의 대량배양 공정 및 제형화 기술 개발</li> <li>○ 유기농업자재 등록</li> <li>○ 현장 실증 적용을 위한 사용 매뉴얼 제작 및 보급</li> </ul>												
연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 친환경 병 방제 기반 구축 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 유용미생물 복합제제의 기능성 미생물 농자재 산업화 공정 개발 및 현장적용</li> <li>- 수요자 맞춤형 미생물제제의 제형화</li> <li>- 미생물제제 활용 시스템의 기술이전 및 현장 보급</li> </ul> </li> <li>○ 연구개발사업 기반 조성 및 수준 향상 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 기능성 미생물제제의 방제 및 활성 기작 구명을 통한 효과적인 병원균 방제</li> <li>- 대량배양 및 제형화 기술 개발을 통한 유용미생물제제의 실용화 시스템 개발</li> <li>- 기존의 화학 및 생물농약보다 우수한 활성의 신개념 미생물제제 고안</li> </ul> </li> <li>○ 기능성 유용미생물제제의 개발을 통한 관련 분야 산업 성장 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 친환경, 고부가가치/선도 농업 창출을 통한 동종업계 산업 발전의 토대 마련</li> <li>- 농업용 미생물제제의 실용화 공정 확립을 통한 미생물 산업화 기술 확보</li> </ul> </li> </ul>												
연구개발성과의 비공개여부 및 사유													
연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설·장비	기술 요약 정보	소프트웨어	표준	생명자원		화합물	신품종		
								생명 정보	생물 자원		정보	실물	
	1	1											
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호				
국문핵심어 (5개 이내)	유기농자재		미생물제제		잔디		브라운패취		현장적용 프로토콜				
영문핵심어 (5개 이내)	Organic agricultural materials		Microbial agent		Turfgrass		Brown Patch		Practical protocol				

## < 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요.....	1
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용.....	7
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도.....	22
4. 목표 미달 시 원인분석.....	73
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도.....	73
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획.....	74
7. 참고문헌.....	75

# 1. 연구개발과제의 개요

## 1-1. 연구개발의 개요

- 전 세계적인 화학비료 및 농약 사용 감소 추세와 범정부 차원의 저탄소 녹색성장 정책 기조에 따라 친환경농산물이 각광 받으면서 친환경농자재 및 생물농약시장은 꾸준히 성장하고 있다.
- 국내 잔디의 병해 방제를 위한 농약의 등록은 꾸준히 증가하여 약 807개 품목이 등록되어 있으며, 최근 10년 사이에 54%가 등록되었고 중복 등록된 품목을 1개로 볼 때 282 품목이 잔디용으로 등록되어 있다.
- 이들 중 살균제가 154개 품목으로 압도적으로 많이 등록되어 있으며 병해충 방제를 위해 많은 농약이 사용되어지고 있다. 대다수 농약회사들이 최근 10년여 동안 ‘미투등록’ 및 잔디전문농약 등록에 나서면서 현재는 시장경쟁이 매우 치열한 ‘레드오션’ 분야가 되고 있다.

표 1. 잔디용 농약 구분별 등록 목수 및 잔디병해충 적용 대상 품목수(상위)

구분	품목수	적용병해충	등록품목수
살균제	154	라이족토니아마름병	151
살충제	34	갈색잎마름병	127
제초제	87	동전마름병	87
생장조정제	4	일년생잡초	71
살균, 살충제	2	녹병	56
기타	1	피티옴마름병	56
총합계	282	설부소립균핵병	50
		탄저병	37

(출처:영농자재신문, 2019)

- 농약이 등록된 병해충을 보면 라이족토니아마름병, 갈색잎마름병, 동전마름병, 피티옴마름병, 탄저병, 녹병, 설부소립균핵병, 일년생잡초, 등열록풍뎅이, 거세미나방, 굼벵이류 등이 주류를 이루고 있다.
- 이러한 잔디의 주요 병해를 방제하기 위해 화학농약이 많이 활용되고 있다. 이는 잔디관리자들이 생물농약보다 방제가 좋은 화학농약을 선호하기 때문일 것이다.
- 근래 ‘친환경’이 강조되면서 화학농약과 생물농약을 적절하게 혼용하는 잔디의 관리를 위해 친환경 제제의 수요가 증가하고 있다.
- 잔디의 병해관리를 위한 친환경 제제는 주로 식물추출물이나 미생물을 이용하였다. 최근 인체에 해가 없는 친환경적인 골프장 관리가 대두되면서 미생물을 활용한 잔디관리에 많은 관심을 가지고 있다.
- 잔디 병해 방제를 위한 친환경 농자재에 대한 연구는 아직 소재 개발 및 시제품 제조 단계로 소수가 사업화 되어 있으며 대다수의 천연식물보호제 및 친환경 유기농업자재의 원료 및 제품은 대부분 수입에 의존하고 있는 실정이다.
- 미생물을 이용하여 잔디 병해를 방제할 수 있는 친환경 미생물제의 개발이 필요하며 한지형과 난지형 잔디의 환경 장해 내성 증진 및 생육증진용 다기능성 친환경 농자재의 개발이 필요하다.

## 1-2. 연구개발 대상의 국내·외 현황

### 가. 국내 기술 수준 및 시장 현황

#### ○ 기술현황

- 잔디(zoysiagrass) 주요병, 라이족토니아마름병(large patch, *Rhizoctonia solani*) 등에 대

한 생물학적 방제를 위해 길항미생물(*Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp.)을 선발하여 병 발생을 줄일 수 있음을 보고하였다. (서울시립대, 2008; 목포대, 2013)

- 한국 잔디의 생육 증진 및 대취충의 병원균(*R. solani* AG2-2) 밀도를 감소시키는 3종 미생물(*Streptomyces* sp., *Burkholderia* sp., *Streptomyces* sp. S8)를 분리하여 효능을 검정하여 병원균 밀도를 50% 저감하였으며 생육 증진 효과도 있음을 보고하였다. (경상대, 2017)
- 잔디의 라이족토니아마름병을 억제하는 것으로 알려진 *Streptomyces* sp. S8 균주로부터 항진균 대사물질인 Valinomycin을 분리하여 보고하였다. (경상대, 2019)
- 국내 생물농약에 대한 연구는 한국화학연구원, 한국생명공학연구원, 국립농업과학원 등 연구소와 팜한농(주), (주)그린바이오텍 등의 기업체에서 연구가 진행되었다. 주로 *Bacillus* 계열의 제품들이 많지만, *Bacillus velezensis*를 이용한 제품은 전무하다.
- 국내 잔디병 방제는 대취충에 서식하는 병원균의 밀도를 낮추는 효과가 있는 경종적 방제와 살수시기의 관리, 규산질 비료 등을 이용한 시비관리와 화학적 방제를 주로 사용하고 있지만, 친환경 안전 생물적 방제를 위해 효과가 우수한 미생물 제품 등 친환경 제제의 개발이 필요하다.

### ○ 시장현황

- 국내 농약시장은 1조 5천억 원의 시장을 형성하고 있으며, 생물농약 시장은 100억 원 정도에 불과한 실정이다. 하지만 세계적인 추세로 미생물농약, 생물농약이 성장하고 있고 국내 지원 확대로 중장기적으로 활성화 될 전망이다.

표 2. 바이오 비료 및 바이오(생물) 농약 미래시장 전망(출처:영농자재신문, 2017)

확대 요인	저해 요인	미래시장 전망
경제회복시 환경관심 고조	국내 친환경농산물 퇴보	세계시장 상승추세에 부응 국내 시장도 머지 않아 선호도 회복 상승추세 전환예상
친환경유기식품 수요 증대	평균 농약의 60~70% 수준으로 효과미흡, 농민선호도 저하	친환경유기농식품시장 1~2년내 회복 전망
세계시장 트렌드적 상승	천연물 원료사용 가격이 비교적 고가	해외서 한류에 힘입어 국내제품의 인지도 및 인기 상승
기능성 및 유기질비료 수요 연 5%이상 지속 증가	미생물농약등 연구개발 성공률 저조 및 등록 개발비용 과다소요	한중 FTA 발효로 대부분의 유기농 허용물질 및 자재가 무관세화 되어 수출 활성화 기대

### ○ 경쟁기관현황

- 농약회사별 잔디용 농약등록 품목건수를 보면 팜한농이 선두를 달리고 있으며, 다음으로 는 경농, 인바이오 순이다. 특히 주목할 만한 부분은 제네릭회사 중 인바이오, 한얼사이언스, 선문그린사이언스 등 제네릭 회사들의 약진을 꼽을 수 있다.
- 잔디의 친환경 병해 방제제를 생산하는 기업은 (주)그린바이오농산과 (주)한국마이오케미칼 등이 있으며 (주)그린바이오농산은 *Bacillus subtilis* CJ-9균주를 사용한 탐세이버와 노스팟, 쉐러스 등 *Bacillus subtilis* 균주를 이용한 잔디병해 방제용 천연식물보호제를 생산하고 있으며 각각 라이족토니아마름병, 달라스팟, 피시움마름병 등에 효과가 있다고 하며, (주)한국 바이오케미칼은 80여개의 잔디용 친환경 제제를 생산하며 *Bacillus subtilis* KBC1010 균주를 이용한 재노탄과 *Bacillus* 계열 균주를 이용한 노팡스 등을 생산하여 라이족토니아마름



병, 동전마름병, 엽고병에 효과가 있다고 한다.

### ○ 지식재산권현황

- 생물농약 기술개발에 대한 특허 대부분은 정부출연기관 및 대학에 집중되어 있다.
- 잔디에 사용되는 미생물 관련 특허는 약 6건이 있으며, 그중 브라운패치 또는 라지패치에 관련한 특허는 5건이다. 이중 *Bacillus* 속 균주를 사용한 내용이 대부분이다.

표 3. 잔디에 사용되는 미생물 관련 특허

출원번호	발명 명칭/관련 잔디병	출원년월
10-2002-0049338	신규한 바실러스속 ( <i>Bacillus</i> sp.) CMB26균, 이를 이용한 리포펩티드의 제조방법, 상기 바실러스속 CMB26균 및 또는 리포펩티드를 유효성분으로 함유하는 식물곰팡이균의 살균제/브라운패치, 라지패치	2002.8
10-2004-0099493	잔디의 주요병해를 일으키는 곰팡이성 병원균에 대한 방제용 미생물 <i>Bacillus subtilis</i> EW42-1/동전마름병	2004.11
10-2008-0029722	길항 미생물 함유 잔디의 생육촉진 및 병해방제용 조성물 및 이를 이용한 잔디 관리 방법/브라운패치, 라지패치, 동전마름병, 피시움마름병	2008.03
10-2011-0138408	잔디의 주요 병해에 길항반응을 갖는 신규한 균주인 바실러스 발리스모르티스 GG290, 상기 균주의 배양방법 및 이 균주를 포함하는 방제용 미생물제제 및 그 제조방법/브라운패치, 동전마름병	2011.12
10-2009-0033285	바실러스 서브틸리스 KB-401을 유효성분으로 하는 식물병 방제용 미생물 제제/브라운패치	2012.04
10-2011-0144836	바실러스 서브틸리스 KBC1010 균주 및 이의 배양액을 유효성분으로 함유하는 식물 병원균 방제용 조성물/라지패치	2012.09

## 나. 국외 기술 수준 및 시장 현황

### ○ 기술현황

- 글로벌 농화학기업들은 바이오작물보호제 개발에 대한 역량을 M&A를 통해 확보한 후 효율적인 미생물 배양법을 개발하고, 방제 스펙트럼을 넓히며, 안정적인 효능을 보장할 수 있는 제형을 개발하는 등의 기술 개발에 역량을 집중하고 있으며, 동시에 단독 미생물 혹은 통합 미생물군으로 화학작물보호제에 버금가는 효과를 보이는 새로운 미생물 원제를 개발하려는 업스트림 기술 개발에도 박차를 가하고 있다.

표 4. 방제 스펙트럼을 넓히기 위한 새로운 미생물제의 개발 예

제품명	제조사	특징
Bio-Tam2.0	Isagro, 이탈리아	두 종의 트리코더마균을 혼합한 제형으로 토양병과 지상부병을 모두 방제함
Quickroots	신젠타	바실러스와 트리코더마균의 이질 혼합 제형화로 뿌리 생육 증진
BSST	MBI, 미국	바이오살충제와 바이오살균제, 그리고 바이오살선충제를 모두 혼합한 BSST(Biological Stack Seed Treatment)제품 개발
Xanthion	바스프	화학합성살균제와 바이오살균제의 혼합제형으로 뿌리 생육 증진 및 냉해 내성 증가
ValuntHP	바스프	바이오살균제와 근류균(Rhizobia)의 혼합제제로 병방제와 질소고정을 위한 뿌리혹 형성 증대
Timorex Gold	Stockton, 이스라엘	식물추출물과 제형기술을 통해 방부 및 살세균 효능이 있으며 화학살균제와 혼합사용 가능

## ○ 시장현황

- 지난 몇 년 동안 생물학적 방제를 활용한 종합적 방제(Integrated Pest Management)에 대한 관심이 급증하였다. IPM에 활용 가능한 바이오작물보호제(Bio-pesticide)는 일반적으로 독성 및 환경 잔류성이 낮고 사용자에게 안전하다는 장점이 있다.
- 바이오작물보호제는 전체 작물보호제 시장보다 빠른 속도로 성장하고 있지만, 2015년 기준 25억 달러 규모로 전체 작물보호제 시장에서 4%의 작은 규모를 차지하며 시장 규모 및 비중이 여전히 미미한 실정이다.
- 2012년 바이엘(Bayer)의 AgraQuest 인수, 바스프(BASF)의 Becker-Underwood 인수, 신젠타(Syngenta)의 Pasteuria Bioscience 인수 등 글로벌 농화학기업들이 1억달러 이상의 금액으로 바이오작물보호제기업을 대상으로 한 M&A를 성공시켰다.
- 글로벌 농화학기업들의 활발한 시장 진입의 이유로는 2010년 이후 급격히 증가된 화학 제품들의 독성과 내성 문제를 들 수 있다. 이러한 상황에서 글로벌 농화학기업들은 기존 화학작물보호제의 단점을 보완하고 신제품의 수명을 최대한 늘리기 위해 바이오작물보호제를 적극 활용하고 있다. (LGERI, 2018)
- 글로벌 농화학기업들의 활발한 시장 진입의 이유로 2010년 이후 화학 제품들의 독성과 내성 문제가 크게 이슈화되고 있어 제초제인 파라쿼트와 같이 인축독성으로 인해 사용이 금지되었다.
- 단일 제품 농약의 반복 사용으로 인한 내성 잡초 및 내성병원균의 확산도 문제가 되고 있다. 현재 사용되는 화학제품(2014년 기준)에 대해 내성 곤충 586종, 진균 235종, 잡초 252종이 보고되었다. 이로 인해 농가의 사용량이 증가하고 많은 양의 화학농약의 사용으로 잔류 문제가 제기되고 있으며 PLS 제도에 의하여 비의도적인 잔류 등 추가적인 문제가 되고 있다.
- 기존 대표제품에 대한 독성 및 내성 문제 제기로 글로벌 농화학 회사들에게 새로운 원제 개발의 필요성이 더욱 높아지고 있으나 새로운 원제 개발은 2000년 이후 점점 더 어려워지고 있는 실정이다. 이러한 상황에서 글로벌 농화학기업들은 기존 화학작물보호제의 단점을 보완하고 신제품의 수명을 최대한 늘리기 위해 바이오작물보호제를 적극 활용하고 있다.
- 바이오작물보호제의 대표적인 사례로 AgraQuest의 세레나데라는 제품이 있는데 이는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis* QST713) 균주로 넓은 스펙트럼의 항균활성과 더불어 항세균 효과와 생육 증진 효과도 보이는 것으로 알려져 있으며 누적매출 1억 달러 이상을 기록하였다. 이와 같이 곰팡이뿐만 아니라 세균, 바이러스 등 여러 병에 대한 방제와 대량생산, 안정적 효능 유지를 위한 제형 개발이 가능해진다면 큰 시장으로 확대될 것으로 기대된다.

○ 경쟁기관현황

- 국내와 달리 미국은 현재 *Bacillus subtilis* 이외에 다양한 생물농약을 잔디병 방제에 사용이 되고 있다. (Green Section Record 52(18), Chemical Control of Turfgrass Disease 2020)

표 5. 미국 잔디용 생물농약 종류(Green Section Record 52(18))

상품명	생물농약 Agent	방제 대상
Companion	<i>Bacillus subtilis</i> GB03 strain	썸머패치병 라이족토니아마름병
Rhapsody	<i>Bacillus subtilis</i> QST713 strain	썸머패치병 라이족토니아마름병
EcoGuard	<i>Bacillus licheniformis</i>	동전마름병
Prestop	<i>Gilocladium catenulatum</i> J1446 strain	엽고병 (Foliar diseases)
Regalia PTO	<i>Reynoutria sachalinensis</i>	엽고병 (Foliar diseases)
Actinovate SP	<i>Streptomyces lydicus</i> WYEC 108 strain	뿌리병 (Soilborne diseases)
Bio-Trek, Turfshield, TurfMate	<i>Trichoderma harzianum</i>	라이족토니아마름병, 동전마름병

○ 지식재산권현황

- 해외에서 개발된 바이오작물보호제는 조사된 바로 미국 1436건, 중국 667건, 유럽 527건, 일본 207건으로 개발 및 보고되었으며, 특히 미국, 중국, 유럽은 우리나라보다 생물농약에 대한 연구가 더욱 활발한 실정이다. (키프리스, 2020)

## 2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

### <주관기관: 전남대학교 산학협력단>

#### 1) *Bacillus velezensis* GH1-13 활용 잔디병 제어

##### ① GH1-13의 효능 검증 및 특성 분석

###### - 대치배양

*Rhizoctonia solani* AG-1(IA), AG-1(IB), AG-4, AG2-2(IIIB), AG2-2(IV), *Rhizoctonia cerealis*, *Pythium ultimum*, *Clarireedia jacksonii* 균주에 대한 *Bacillus velezensis* GH1-13 (Kim et al., 2016)의 항진균 활성을 검사했다. *B. velezensis* GH1-13의 단일 콜로니를 5ml의 TSB에 접종하여 30°C 150rpm으로 배양하였다. 그리고 나서 병원균 agar 플러그가 놓일 중간 지점부터 20-25mm 3개 위치에 배양액 10 $\mu$ l(optical density (OD) value = 0.4; 1 $\times$ 10<sup>7</sup>cfu/ml)를 접종하였다. 8종의 균주를 25°C에서 4-5일간 PDA (Potato 4.0g, Dextrose 20.0g, Agar 15.0g/L)에서 배양했으며, 박테리아 접종 1일 후 3개의 콜로니가 자란 부분에서 5mm 떨어진 위치에 병원균 agar 플러그를 PDA 중심에 배치하였다. 그리고 control 역할로 쓰일 박테리아가 없이 병원체만 접종한 것과 함께 25°C에서 배양하였다. 각 병원체의 균집 지름을 관찰하고 접종 후 2-14일 후에 측정하였다.

###### - 현미경에 의한 관찰

*B. velezensis* GH1-13에 대한 갈색잎마름병 병원균의 생존 가능성을 확인하기 위해 *R. solani* AG2-2(IIIB)를 PDA 배지에 25°C에서 8일 동안 배양했다. GH1-13균주에 인접하거나 반대편에서 자라는 *R. solani* AG2-2(IIIB)의 균사는 유리 슬라이드에 뉴트럴레드 (Neutral red, 0.1  $\mu$ g/ml, DaeJung)와 에반스블루 (Evans blue, 0.5  $\mu$ g/ml, Alfa Aesar) 10 $\mu$ l로 각각 5분 동안 염색한 후, ddH<sub>2</sub>O 3회 세척하고, 현미경으로 균사체를 촬영했다.

##### ② GH1-13의 화학농약에 대한 내성 연구 및 Pot assay로 병 방제 효능 검증

###### - GH1-13의 화학농약에 대한 내성 연구

잔디에서 흔히 사용되는 농약이 GH1-13에 미치는 영향을 확인하기 위해 호환성테스트를 수행하였다. 균주 GH1-13을 NB(nutrient broth)배지에 접종하고 28 °C 180 rpm에서 24시간 동안 진탕배양한 후, 농도별(20 $\mu$ g/ml, 50 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ g/ml)로 농약이 들어간 NB배지가 든 플라스크에 150  $\mu$ l의 세균 배양액을 첨가했다. 28°C 180rpm에서 24시간 배양한 후 플라스크당 배양액 중 1ml를 10배로 serial dilution을 한 후, 10배씩 희석한 배지를 각각 NA(nutrient agar) 배지에 도말하였다.

###### - Pot assay로 병 방제 효능 검증

갈색잎마름병에 대한 GH1-13과 농약 아зок시스트로빈(azoxystrobin)의 효능은 크리핑벤트그라스에서 테스트되었다. 120g의 흙이 담긴 포트에서 3주 동안 길러진 크리핑벤트그라스에 PDB에서 3-4일 배양시킨 *R. solani* AG2-2(IIIB) 균주를 접종해 간 병원체를 다음과 같은 방법으로 처리했다; GH1-13 suspension (1 $\times$ 10<sup>6</sup>cfu/ml), azoxystrobin (10 $\mu$ g/ml), GH1-13 suspension (1 $\times$ 10<sup>6</sup>cfu/ml) + half percentage of azoxystrobin(5 $\mu$ g/ml), and half percentage of azoxystrobin (5 $\mu$ g/ml), 살균된 물은 control로 사용되었다. 처리한 후, 질병의 심각도(0-7 scale; 0 = healthy plant, 1 = less than 15% infection, 2 = 15-30% infection,

3 = 30-45% infection, 4 = 45-60% infection, 5 = 60-75% infection, 6 = 75-90% infection, 7 = dead plant)는 접종 후 14일 후에 체크 되었다.

### ③ Pan-genome 분석

Pan-genome 분석은 BPGA 프로그램 (Chaudhari et al., 2016, Kim et al., 2017)을 이용하여 총 364개의 *Bacillus* 균주의 게놈 염기서열의 NCBI의 뉴클레오타이드 데이터베이스를 통해 GH1-13의 특이적인 게놈 특징을 설명하기 위해 수행되었다. 이들 중 269개의 게놈 염기서열은 *B. velezensis*이고, 95개는 다른 *Bacillus* 종의 게놈 염기서열이었다. 모든 유전자는 단백질 서열 식별을 위해 50% cut-off로 NJ방식으로 분석되었다. Orthologs protein coding 서열은 핵심 보존 유전자와 strain-specific 유전자의 식별을 위해 사용되었다.

### ④ SYBR qPCR and TaqMan qPCR을 활용한 GH1-13 균주 특이적인 검출법 개발

GH1-13을 검출하기 위해 플라스미드 DNA와 염색체 DNA 염기서열을 이용해 SYBR qPCR과 TaqMan qPCR 분석에 사용되었다. GH1-13의 RNA는 RNAiso plus kit를 사용해 추출했으며, cDNA로 합성할 때는 PrimeScript 1st Strand cDNA synthesis kit를 사용했다. 플라스미드 DNA의 specific한 증폭을 위해 specific primer(F\_unique/R\_unique)를 디자인하고 BLAST를 이용해 특이성을 분석하였다. 염색체 DNA에서 unique 유전자의 증폭을 위해 특정 primer(F\_uniqueG/R\_uniqueG 및 Ft\_unique/Rt\_unique)와 TaqMan probe를 디자인했다. qPCR의 특이성을 확인하기 위해 *Bacillus velezensis* 균주(GH1-13, JC-14, TSA34-9), *Bacillus subtilis* JC-15, *E. coli*, *Rhizoctonia solani* 등 다양한 종의 유전자 DNA를 동일한 농도 0.1ng/μl로 사용했다. qPCR 민감도 분석의 경우, 1,000,000fg/μl(1ng)에서 10fg/μl(10-fold serial dilutions) 사이의 농도로 GH1-13의 DNA를 검사했다. 각 프라이머 1μl와 SYBR green supermix 10μl, 템플릿 DNA 1μl, DW 7μl를 이용해서 진행했다. TaqMan qPCR은 각 프라이머 1μl와 Universal Probes Supermix (Bio-Rad, California, USA) 10μl, 템플릿 DNA 1μl, probe 1μl, DW 6μl가 포함된 반응물을 이용해서 진행했다. 또한, 근권으로부터 GH1-13을 검출하기 위해 각 포트에서 자란 지 1주 된 크리핑벤트그라스에 각각 3회를 처리(GH1-13, TSA34-9, 비접종)했다.

## 2) 근권유래 *Bacillus velezensis* CMML20-16 활용 잔디병 제어

### ① 잔디 근권 미생물 CMML20-16 선발 및 동정

#### - 균주 선발

잔디 근권 주변의 토양에서 분리·확보한 148점 이상 미생물을 활용하여 잔디 병원성 곰팡이인 *Rhizoctonia solani* AG2-2(IIIB)에 대한 길항 능력을 조사하였다. *R. solani*에 대한 항진균 활성 검정은 접종된 PDA에 균체 도말 후, 25°C에서 3~5일 동안 배양하여 균사체의 성장 억제 정도를 관찰하고, 길항 능력을 갖는 CMML20-16 균주를 선발하였다. 이전 연구된 GH1-13균주보다 잔디의 부착력 및 잔디 주요 병원균에 대한 길항작용 증대를 하기 위해서 잔디근권에서 분리되었고 잔디병원균에 대한 길항능력이 우수한 CMML20-16 균주를 선발하여 실험을 진행하였다.

#### - 균주 동정

선별된 CMML20-16 균주를 16S rRNA, gyr B의 염기서열 분석과 블라스트 프로그램 (Blast program)을 통해 동정하였고, MEGA 프로그램 이용하여 분자계통학적 위치를 확인하였다.

## ② 근권유래 *Bacillus velezensis* CMML20-16의 효능 검증 및 특성 분석

### - 균주 유전체 획득 및 분석

CMML20-16 균주를 Illumina Hiseq X Ten을 이용한 Paired-end 방식 (Illumina sequencing)을 통하여 1,719,705 bp를 읽었다. 그 다음, Fastp Program 및 BBDuk을 이용하여 Adaptor sequence 제거와 quality trimming을 수행한 결과 1,315,744,269bp의 유전체를 얻었다. 또한 gridion을 이용한 Nanopore sequencing method로 전체 유전체를 읽은 후, 일정 조건에 맞는 더 높은 수준의 데이터를 추출하고 이중 1Gb (1,000,021,893bp)만을 이용하여 유전체를 조립하였다. 두 가지 방법으로 읽은 유전체는 Unicycler v0.4.8-beta를 이용하여 Hybrid assembly를 진행하였다. 이러한 신규 어셈블리(*De novo* assembly) 과정을 수행한 결과 총 4,071,981bp의 게놈 DNA(genome DNA)의 서열과 71,675bp의 플라스미드 DNA (Plasmid DNA)의 서열을 밝혔다. Genome annotation은 PGAP를 사용하여 수행하고 OrthoFinder (Emms and Kelly, 2019)는 species tree를 생성하는 데 사용되었다. AntiSMASH bacteria version을 이용하여 유전체 내의 2차 대사산물에 대한 주석화 (Annotation)을 진행하여 항생물질 생합성 유전자군을 조사하였다. *Bacillus velezensis* CMML20-16의 게놈 DNA는 GenBank에 Accession number CP088973번로 등록이 되었으며, 플라스미드 DNA는 GenBank에 Accession number CP088974번으로 등록되었다.

### - 대치배양

*Bacillus velezensis* CMML20-16 균주의 식물 병원균에 대한 생육저지 효과를 확인하기 위해 *Rhizoctonia solani* AG-1(IA), AG-1(IB), AG-4, AG2-2(IIIB), AG2-2(IV), *Rhizoctonia cerealis* 균주와 함께 대치배양을 하였다. CMML20-16의 단일 콜로니를 5ml의 TSB에 접종하여 30°C 150rpm으로 배양하였다. 그리고 나서 병원균 agar 플러그가 놓일 중간 지점부터 20-25mm 3개 위치에 총 균수를  $1 \times 10^8$  cfu/ml로 일정하게 희석하여 10 $\mu$ l를 접종하였다. 6종의 균주를 25°C에서 3-5일간 PDA에서 배양했으며, 박테리아 접종 1일 후 3개의 콜로니가 자란 부분에서 5mm 떨어진 위치에 병원균 agar 플러그를 PDA 중심에 배치하였다. 그리고 control 역할로 쓰일 박테리아가 없이 병원체만 접종한 것과 함께 25°C에서 배양하였다. 각 병원체의 균집 지름을 관찰하고 접종 후 3-5일 후에 측정하였다.

### - 현미경에 의한 관찰

CMML20-16의 잔디 병원균에 대한 직접적인 생육저지 활성을 평가하였다. 갈색잎마름병 (브라운 패취)을 유발하는 *Rhizoctonia solani* AG2-2(IIIB)와 라이족토니아마름병(라지패취)을 유발하는 *Rhizoctonia solani* AG2-2(IV)를 CMML20-16 과 대치배양하고, 현미경으로 확인하였다. CMML20-16에 대한 갈색잎마름병 병원균의 생존 가능성을 확인하기 위해 *R. solani* AG2-2(IIIB)를 PDA 배지에 25°C에서 8일 동안 배양했다. CMML20-16균주에 인접하거나 반대편에서 자라는 *R. solani* AG2-2(IIIB)의 균사는 유리 슬라이드에 뉴트럴레드(Neutral red, 0.1  $\mu$ g/ml, DaeJung)와 에반스블루(Evans blue, 0.5  $\mu$ g/ml, Alfa Aesar)10 $\mu$ l로 각각 5분동안 염색한 후, ddH<sub>2</sub>O 3회 세척하고, 현미경으로 균사체를 촬영했다. CMML20-16의 잔디 병원균에 대한 직접적인 생육저지 활성을 평가하기 위해 *R. solani* AG2-2(IIIB)와 *R. solani* AG2-2(IV)를 CMML20-16 과 대치배양하고, 현미경으로 확인하였다.

### - 배지에 따른 CMML20-16의 성장 분석

CMML20-16을 배양하기에 적합한 배지를 선택하기 위해 균주의 다양한 배지에서의 생장을 확인하였다. TSB (Bacto Tryptone 15.0g, Bacto Soytone 5.0g, NaCl 5.0g/L)에 전배양한 후, 각각의 LB (Tryptone 10.0g, Yeast extract 5.0g, NaCl 10.0g/L), TSB (Bacto Tryptone 15.0g, Bacto Soytone 5.0g, NaCl 5.0g/L), PDB (glucose 20.0g, potato extract 4.0g/L), NYDB (Peptone 1.2g, Yeast extract 1.2g, Dextrose 0.3 g/L), KB (Peptone 20.0g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.5g, Glycerol 15ml/L) 및 BSM(Soytone 0.5%, Sucrose 2%/L) 배지 50 mL에 2 %(v/v)가 되게 접종하여 진탕배양기에서 30 °C, 150 rpm 조건으로 48시간 동안 배양하였다.

#### - pH에 따른 CMML20-16의 성장 분석

CMML20-16 균주를 TSB (Tryptic Soybean Broth) 배지에 전 배양하였다. 그 다음, 1N HCl 과 1N NaOH로 pH를 조절한 50 mL TSB 배지에 2 %(v/v)가 되도록 접종하였고, 진탕 배양기에서 30 °C, 150 rpm의 조건으로 배양하였다. 배양 48시간 후, 600 nm의 흡광도를 조사하여 *Bacillus velezensis* CMML20-16 균주의 성장 정도를 비교했다.

#### - 온도에 따른 CMML20-16의 성장 분석

CMML20-16 균주를 TSB 배지에 접종하고 1일 동안 전배양 하였다. 그 다음, 배양액을 멸균한 50ml의 TSB 배지가 들어있는 삼각 플라스크에 접종한 후, 각각의 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C 및 40 °C 온도에서 48시간 동안 배양하였다.

#### - CMML20-16의 효소 활성 및 식물 생육 촉진 인자 활성 분석

CMML20-16 균주의 여러 종류의 효소 활성 및 식물 생육 촉진 인자 활성을 분석하기 위해, 균주를 TSB 5 ml에 18시간 이상 전배양한 후, 10 µl의 배양액을 각각의 배지에 치상하여 배양하였다. 셀룰로즈 분해 효소 활성은 CMC 콩고 레드 배지 (CMC Congo red medium; MgSO<sub>4</sub> 0.01g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05g, CaCl<sub>2</sub> 0.01g, NaCl 6.0g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.0g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.0g, yeast extract 1.0g, CMC 5.0g, agar 20g/L)염색법을 사용하였다. 단백질 분해 효소 활성 검정은 카제인 평판 배지 (Casein agar; skim milk 100g, agar 20g/L)를 사용하였다. 또한, 젤라틴 분해 효소 검정은 BHM 평판배지 (MgSO<sub>4</sub> 0.2g, CaCl<sub>2</sub> 0.2g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0g, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1.0g, FeCl<sub>3</sub> 0.05g/L)에 균주를 배양한 후 Frazier's reagent ( 2 N HCl에 녹인 15 % HgCl<sub>2</sub>)를 부어 확인하였다. 키틴 분해 효소 활성은 Toshya Agrawal and Anil S Kotasthane (2012)의 콜로이드 키틴 (colloidal chitin) 배지(MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.3g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3.0g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.0g, citricacidmonohydrate 1.0g, agar 15g, Tween-80 200µl, colloidal chitin 4.5 g, Bromocresol purple 0.15 g/L, pH 5로 조정)를 이용하여 키틴 분해 효소 활성을 확인하였다. CMML20-16 의 식물성장촉진인자 형성능 확인을 위하여 IAA 생성능을 확인하였다. IAA 형성능은 Patten and Glick (1996)의 방법을 사용하였다. 스타치 카제인 배지 (Starch Casein Broth; Starch, Soluble 10.0g, Casein 1.0g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5g/L)L-tryptophan을 넣어준 후 균주를 4일간 배양하고 상등액을 Salkowsky reagent (1 ml /0.5 M FeCl<sub>3</sub>과 50 ml/ 35% HClO<sub>4</sub>)와 반응시켜 나타나는 색의 변화를 흡광도를 측정하였다.

### ③ 선발 미생물의 화학농약에 대한 내성 연구 및 Pot assay로 병 방제 효능 검정

#### - 선발 미생물의 화학농약에 대한 내성 연구

CMML20-16 균주를 잔디 병해 방제 및 관리를 위해 사용되는 아족시스트로빈

(Azoxystrobin) 및 플록사피록사드 (Fluxapyroxad)과 혼용이 가능할 경우, 살균제에 대한 사용 저감 효과를 나타낼 수 있으며, 미생물이 토양 및 잔디에 작용하는 시간 동안의 잔디 병해를 억제할 수 있다. 이에, CMML20-16 균주의 배양 시 아зок시스트로빈 및 플록사피록사드를 처리하여 균주의 생장 여부를 확인하고 농약과 함께 사용이 가능한지를 평가하였다.

CMML20-16 균주를 10 ml의 TSB에 전배양한 후, TSB에 아зок시스트로빈을 각각 50 µg/ml 및 20 µg/ml 농도로, 플록사피록사드를 각각 50 µg/ml 및 20 µg/ml 농도로 혼합한 후, 24시간 동안 배양하였다. 그 다음, 200 µl의 배양액을 TSA에 평판 도말한 후, 37 °C에서 12시간 동안 배양하여 콜로니를 계수하여 농약에 대한 내성을 평가하였다. 상기 실험은 총 3회 반복으로 실시하였으며, 농약의 무처리구는 Tryptic Soy Broth (Control), Tryptic Soy Broth와 20µg/ml Azoxystrobin을 섞은 후 CMML20-16을 배양하여 TSA에 도말한 것을 Tryptic Soy Broth + Azoxystrobin (20 µg/ml)으로, Tryptic Soy Broth와 50µg/ml Azoxystrobin을 섞은 후 CMML20-16을 배양하여 TSA에 도말한 것을 Tryptic Soy Broth + Azoxystrobin (50 µg/ml)으로, Tryptic Soy Broth와 20 µg/ml Fluxapyroxad 을 섞은 후 CMML20-16을 배양하여 TSA에 도말한 것을 Tryptic Soy Broth + Fluxapyroxad (20 µg/ml)으로, Tryptic Soy Broth와 50 µg/ml Fluxapyroxad을 섞은 후 CMML20-16을 배양하여 TSA에 도말한 것을 Tryptic Soy Broth + Fluxapyroxad (50 µg/ml)으로 하였다.

#### - 선발된 미생물에 대한 온실 시험 (갈색잎마름병 방제)

CMML20-16 균주와 실제 방제용으로 사용되는 농약인 아зок시스트로빈 (Azoxystrobin)을 원형 포트에 파종하여 키운 크리핑벤트그라스에 처리한 후, 갈색잎마름병 (브라운패치, Brown Patch)의 방제능을 확인하였다. CMML20-16 균주를 TSB 배지에서 30 °C, 150 rpm으로 24시간 진탕 배양한 후,  $1 \times 10^7$  cfu/ml 농도의 배양희석액을 만들어 사용하였다. 대조구로는 화학 농약인 아зок시스트로빈 21.7 µg/ml을 제조하여 사용하였다. CMML20-16 균주 배양희석액과 아зок시스트로빈을 크리핑벤트그라스 원형 포트 네 지점에 1 mL씩 3일 간격으로 2회 처리하였다. 1회 처리 1시간 후에 포트 네 지점에 PDB 배지에서 3일간 배양된 갈색잎마름병 병원균인 *R. solani* AG2-2(III B) 균체를 그라인더 (Grinder)를 이용하여 분쇄한 후 하루 더 배양하여 상기와 같은 방법으로 1mL씩 접종하여 발병시켰다.

#### - 선발된 미생물에 대한 온실 시험 (라이족토니아마름병 방제)

CMML20-16 균주와 실제 방제용으로 사용되는 농약인 아зок시스트로빈 (Azoxystrobin)을 골프장에 식재하는 잔디를 떼어와 원형 포트에 옮겨 키운 후, 처리하여 라이족토니아마름병 (라지패치, Large patch)에 대한 방제능을 확인하였다. CMML20-16 균주를 TSB 배지에서 30 °C, 150 rpm으로 24시간 진탕 배양한 후,  $1 \times 10^7$  cfu/ml 농도의 배양희석액을 만들어 사용하였다. 대조구로는 화학 농약인 아зок시스트로빈 21.7 µg/ml을 제조하여 사용하였다. CMML20-16 균주 배양희석액과 아зок시스트로빈을 잔디 원형 포트 네 지점에 1 mL씩 3일 간격으로 2회 처리하였다. 1회 처리 1시간 후에 포트 네 지점에 PDB 배지에서 5일간 배양 후 그라인더를 이용하여 분쇄한 후 하루 더 배양한 라이족토니아마름병 병원균인 *R. solani* AG2-2(IV) 균체를 1mL씩 접종하여 발병시켰다.

#### ④ 미생물 유래 생리활성 대사산물 분석

CMML20-16 균주의 향진균 활성 물질을 분석하기 위해 균주를 최소배지인 Landy's medium (Glucose 20.0g, L-glutamic acid 2.0g, Ammonium sulfate 2.3g, Yeast extract



1.0g, Potassium dihydrogen phosphate 1.0g, Magnesium sulfate 0.5g, Potassium chloride 0.5g, Copper sulfate 0.0016g, Iron(III) sulfate 0.0012g, Manganese sulfate 0.0014g)에서 30°C, 150RPM, 60시간 동안 배양하였다. 균체를 제거한 배양상등액에 35% 염산으로 pH 2.0으로 맞추고, 4 °C에서 24시간 동안 방치한 후, 원심분리하여 침전물을 획득하였다. 획득한 침전물을 10ml 메탄올로 녹이고, 회전 증발 건조기 (Rotary evaporator)를 통해 얻어진 침전물을 1ml 메탄올에 녹인 후 0.45 um의 비-발열 (Non-pyrogenic) 친수성 필터로 여과하여 HPLC 분석용 시료로 사용하였다.

항진균성 리포펩타이드(Lipopeptide)계 항생제 중 펜기신(Fengycin)과 설펙틴 (Surfactin)을 분석하기 위하여 역상 고속액체크로마토그래피 (Reverse phase High performance liquid chromatography, RP-HPLC)을 이용하였다. Gradient 용매제는 하기 표 1과 표 2에 기재한 바와 같이 분석을 수행하였다.

**표 6. Gradient 용매제; 펜기신(Fengycin)**

Time(min)	용매 A(%)	용매 B(%)
0.0	20	80
50.0	60	40
80.0	80	20
83.0	100	0
92.0	20	80

용매 A는 0.1% 트리플로오로아세트산(Trifluoroacetic acid/TFA)가 첨가된 아세토니트릴 (acetonitrile)을, 용매 B는 0.1% 트리플로오로아세트산(Trifluoroacetic acid/TFA)가 첨가된 물 (Water)을 이용하여 수행하였다. 분석에는 Column은 C18 column을 사용하였으며, 유속은 분당 0.8 ml, 흡광도 205nm에서 시행하였다. 표준물질로는 시그마 알드리치에서 구입한 펜기신을 500µg/ml 사용하였다.

**표 7. Gradient 용매제; 설펙틴(Surfactin)**

Time(min)	용매 A(%)	용매 B(%)
0.0	20	80
50.0	60	40
80.0	80	20
83.0	100	0
92.0	20	80

용매 A는 0.05 % 트리플로오로아세트산 (Trifluoroacetic acid/TFA)가 첨가된 아세토니트릴 (acetonitrile)을, 용매 B는 물(Water)을 이용하여 수행하였다. 분석에는 컬럼 (Column)은 C18 Column을 사용하였으며, 유속은 분당 1 ml, 흡광도 210 nm에서 수행하였다. 표준물질로는 시그마 알드리치에서 구입한 설펙틴을 500µg/ml 사용하였다.

### 3) 내생균 CMML20-21과 근권균 CMML20-20 활용 잔디병 제어

#### ① 잔디 근권 및 내생 미생물 분리 및 선발

전라남도 화순에 위치한 골프장의 난잔디인 중에서 건강한 잔디 5시료, 병이 든 잔디 5시료와 잔디 근권 토양 시료를 채취하였다. 잔디 근권 미생물 분리는 다음과 같이 수행하였다: 1g의 토양을 50ml conical tube에 넣고, 증류수를 총 용량 50ml 맞춤 → 30분간 shaking → serial dilution 3~4 time → NA media에 spreading → 근권 미생물 분리. 잔디 내생 미생물 분리는 다

음과 같이 수행하였다: 잔디 뿌리 증류수 세척 → 1% Naocl(락스)로 소독 → 증류수로 세척(3번) → 건조 후, TSA media에 옮김 → 잔디 내생 미생물 분리.

분리한 근권 및 내생 미생물의 잔디 주요 병(브라운패취 등)과의 대치배양을 통한 우수 길항균 선발하였다. *Rhizoctonia solani* AG2-2 (IIIB)가 접종된 PDA에 접종원의 중심에서 2.5cm 떨어진 3곳에 각각의 미생물(10 $\mu$ l)을 1cm 도말 후, 25°C에서 5~7일 동안 배양하여 균사체의 성장 억제 정도를 관찰하였다.

## ② 잔디 근권 및 내생 미생물의 동정 및 배양

선별된 CMML20-20, CMML20-21 균주는 16S rRNA, *gyrB* 프라이머를 사용하여 염기서열을 분석함. 그 후, 16S rRNA, *gyrB* 서열분석을 기초로 블라스트 프로그램 (Blast program)을 수행하여 CMML20-20, CMML20-21 균주의 분자계통학적 위치를 확인하였다.

*Bacillus velezensis* CMML20-20 균주는 완전배지인 Tryptic soy broth (Soybean-Casein Digest Medium) (Tryptone 17.0g, Soytone 3.0g, Glucose 2.5g, Sodium chloride 5.0g, Dipotassium phosphate 2.5g/L)에서 37°C, 150RPM, OD<sub>600</sub> 0.405(1.38 x 10<sup>7</sup>)동안 배양함. *Bacillus cereus* CMML20-21 균주는 Tryptic soy broth에서 30°C, 150RPM, OD<sub>600</sub> 0.48(3.1 x 10<sup>7</sup>)동안 배양하였다.

## ③ 근권균 CMML20-20과 내생균 CMML20-21의 효능 검증 및 특성 분석

### - 대치 배양

TSA 배지에서 박테리아를 성장시키고, 단일 콜로니를 TSB에 접종 후 배양, OD측정 후, PDA가 포함되어 있는 90mm petri dish 중앙에 병원성 곰팡이 한천 플러그(지름 5mm) 접종하였다. 그 후, 병원성 곰팡이 한천 플러그 위치에서 25mm 떨어진 3곳에 박테리아 접종(박테리아 10 $\mu$ l 사용)하고, 90mm petri dish 중심에 병원성 곰팡이만 접종 (대조군(Control)으로 사용)하여, 대조 곰팡이의 균사체가 접시 전체를 덮을 때까지 25°C에서 5-14일 동안 배양하였다.

$$* \text{억제율 (\%)} = ((R_c - R_t) * 100\%) / R_c$$

R<sub>c</sub>는 control plate상의 fungi plug 위치로부터 fungi의 방사상 균사체 성장이고, R<sub>t</sub>는 대치배양의 fungi plug 위치로부터 fungi의 방사상 균사체 성장을 의미한다.

### - 대치 배양을 통한 병원균 곰팡이 균사 형태 관찰

25°C에서 PDA 배지에 *Rhizoctonia solani* AG2-2 (IIIB)와 박테리아 균주를 7일 동안 공동 배양 후, 박테리아에 인접한 *R. solani* 균사체를 Neutral red(0.1  $\mu$ g/mL) 또는 Evans blue(0.5  $\mu$ g/mL) 10  $\mu$ L의 용액을 슬라이드에 놓고 염색하였다. 실온에서 3-5분 동안 세포를 배양한 다음 3DW로 3-4회 세척하였다. 균의 반대쪽에서 자라는 균사체를 음성대조군으로 처리하고 광학 현미경으로 관찰 및 사진 촬영하였다.

### - 잔디 생장 촉진 분석

박테리아 단일 콜로니를 TSB 50ml에 배양 및 OD측정 후, 원심 분리한다(9,000rpm, 10분, 4°C). 상등액을 0.2 $\mu$ m 필터를 사용하여 2번 정제하였다. MS 식물배지 (sucrose 15g, MB phyto-agar 2.5g, MS (Murashige & Skoog Medium) 2.205g)를 멸균 후, 정제한 상등액(배지 용량의 20%)을 MS 식물 배지와 혼합시켜 plant culture dish에 붓었다. 표면 살균한 30개의 크리핑벤트그라스 종자를 MS 식물배지 플레이트에 접종하고 발아시켰다. 잎의 길이는 접종 후, 15일에 측정하였다.

#### - 균주 유전체 획득 및 분석

두 균주 CMML20-20과 CMML20-21의 genome을 Nanopore 및 Illumina sequencing기법으로 sequence를 획득하였고, 하이브리드 어셈블리를 수행하였다. Genome annotation은 PGAP를 사용하여 수행하고 OrthoFinder는 species tree를 생성하는 데 사용되었다. 2차 대사물질 gene cluster 분석은 genome sequence 정보를 기반으로 antiSMASH bacterial version 프로그램을 사용하여 수행하였다.

#### ④ 곰팡이병 제어 내생균과 근권균 기반 미생물제제의 혼합처리에 의한 복합제제로서 방제 효능 증대 조건 확립

##### - 선발된 근권/내생 미생물에 대한 온실 시험 (갈색잎마름병 방제)

실험이 시작되기 14일 전에 크리핑벤트그라스를 Pot에 심어 놓고 발아시켰다. PDA에 키운 *R. solani* AG2-2 (IIIB) 브라운패취(갈색잎마름병) 균주를 펀칭 도구를 이용하여 플러그를 뚫어 PDB media(약 15ml)가 들어있는 50mm plate에 plug 5개씩 이동시키고 25°C 항온기에 4~5일 배양시켰다. 박테리아 단일 콜로니를 TSB에 배양 및 OD측정 후, 예방적 방제로 박테리아( $1 \times 10^7$  cfu/ml, 1L/m<sup>2</sup>)와 농약(Azoxystrobin (Azo) 100% = 0.1g/m<sup>2</sup>)를 각각 Pot에 5ml씩(혼합처리는 각 박테리아 2.5ml씩, 총 5ml) 뿌리 가까운 위치에 관주 처리하였다. 1시간 후, 50mm plate에 자란 병원균을 뿌리에 가까운 위치에 처리하였다. Pot을 플라스틱 박스에 옮기고, 높은 습도를 처리하면서 보관한다. 병원균 처리 3일 후, 예방적 방제와 같은 방법으로 치료적 방제 처리한다. 병원균 처리 7일 이후에, 사진 촬영과 병 방제율을 측정하였다.

##### - 선발된 근권/내생 미생물에 대한 온실 시험 (라이족토니아마름병 방제)

노지에 재배중인 한국들잔디를 구매하여 Pot에 옮겨서 적응을 시켰다. PDA에 키운 *R. solani* AG2-2 (IV) 라지패취(라이족토니아마름병) 균주를 펀칭 도구를 이용하여 플러그를 뚫어 PDB media(약 15ml)가 들어있는 50mm plate에 plug 5개씩 이동시키고 25°C 항온기에 4~5일 배양시켰다. 박테리아 단일 콜로니를 TSB에 배양 및 OD측정 후, 예방적 방제로 박테리아( $1 \times 10^7$  cfu/ml, 1L/m<sup>2</sup>)와 농약(Azoxystrobin (Azo) 100% = 0.1g/m<sup>2</sup>)를 각각 Pot에 50ml씩(혼합처리는 각 박테리아 25ml씩, 총 50ml) 뿌리 가까운 위치에 관주 처리하였다. 1시간 후, 50mm plate에 자란 병원균을 글라인더를 이용하여 PDB와 함께 갈아서(병원균 72g, PDB 720ml) 뿌리에 가까운 위치에 20ml씩 처리하였다. Pot을 플라스틱 박스에 옮기고, 높은 습도를 처리하면서 보관하였다. 병원균 처리 3일 후, 예방적 방제와 같은 방법으로 치료적 방제 처리하였다. 병원균 처리 7일 이후에, 사진 촬영과 병 방제율을 측정하였다.

##### - Pot assay 검증된 최적의 혼합처리방법을 소면적 포장에 이용한 현장 적용 병 방제 효능 검증 (갈색잎마름병 방제)

PDA에 *R. solani* AG2-2 (IIIB) 브라운패취 균주를 25°C 항온기에 4~5일 배양시켰다. 박테리아 단일 콜로니를 TSB에 배양 및 OD측정 후, 박테리아( $1 \times 10^7$  cfu/ml, 1L/m<sup>2</sup>)와 농약(Azoxystrobin (Azo) 100% = 0.1g/m<sup>2</sup>)를 각 Plot 당 250ml(혼합처리는 각 박테리아 125ml씩, 총 250ml)씩 스프레이를 이용하여 분사하였다. 1시간 후, 병원균을 크리핑벤트그라스 포장에 한 Plot 당 6개 플레이트로 덮어주었다. 일주일 간격으로 3번 반복 처리하고, 사진 촬영 및 병 방제율을 측정하였다.

- Pot assay 검증된 최적의 혼합처리방법을 소면적 포장을 이용한 현장 적용 병 방제 효능 검정 (갈색잎마름병 방제)

PDA에 키운 *R. solani* AG2-2 (IV) 라지패취 균주를 펀칭 도구를 이용하여 플러그를 뚫어 PDB media(약 10ml)가 들어있는 50mm plate에 plug 5개씩 이동시키고 25℃ 항온기에 4~5일 배양시켰다. 50ml 팔콘튜브에 50mm plate에 자란 균사를 4개씩 옮겨 담았다. 농약(Azoxystrobin (Azo) 100% = 0.1g/m<sup>2</sup>)와 최적 산업 배지(Yeast extract 0.8g, Glucose 0.5g, Sodium chloride 0.15g, Potassium hydrogen phosphate 0.25g, sodium carbonate 0.05g, Magnesium sulfate 0.1g)에 성장 시킨 박테리아를 각 Plot 당 250ml(혼합처리는 각 박테리아 125ml씩, 총 250ml)씩 스프레이를 이용하여 분사하였다. 1시간 후, 한국들잔디포장 Plot 당 4개의 50ml 팔콘튜브(50mm plate에 자란 균사를 4개씩 옮긴)로 병원균 처리하였다. 일주일 간격으로 2번 반복 처리하고, 사진 촬영 및 병 방제율을 측정하였다.

<협동기관: 보란파마>

① 소면적 포장을 이용한 시제품의 현장적용

경기도 평택소재의 보란파마 시험재배지에 난지형잔디(중지)와 한지형 잔디(크리핑벤트그라스)를 식재하여 시제품의 현장적용 평가를 위한 소면적 포장지를 조성하였다. 시험포장지 내 잔디 식재는 1×1 m 면적으로 고정하였으며 각 시험구마다 2개소씩 3반복 연구가 가능하도록 조성하였다.



<그림 1. 중지와 크리핑벤트그라스 포장 전경과 시제품 및 살진균제 처리 과정>

② *B. velezensis* GH1-13 기반 미생물제제(시제품)의 안정성 평가

- 유식물 5종에 대한 약해시험

*B. velezensis* GH1-13을 이용하여 개발된 미생물제제의 사용시 주변 환경에 미치는 영향을 파악하기 위하여 유식물(토마토, 오이 고추, 상추, 배추)을 대상으로 약해시험을 실시하였다. 미생물제제의 생균수 함량 2.0×10<sup>8</sup> cfu/ml 기준으로 제작된 시제품을 권장 사용 기준인 500배 희석과 2배 수준이 250배 희석하여 사용하였으며, 유식물 5종의 유묘기에 경엽처리하였다. 실험은 pot assay로 진행하였으며 각 시험구 당 5 pot 씩 1 set로 하여 3 set을 준비하였고, 각 3반복 시험하였다(각 유식물별 총 45pot). 이때 포트는 직경 10cm 규격을 사용하였고, 양도와 상토를 5:5 비율로 사용하였다. 16~17℃ 항온이 유지되도록 비닐하우스 내에서 시험을 진행하였다. 약해시험은 “농약의 등록기준 약효 및 약해 시험기준과 방법”에 준하여 실시하였다.

- New Zealand White계 토끼를 이용한 피부자극성시험

“농약 및 원제의 등록기준” [별표12] 인축독성시험 기준과 방법 (농촌진흥청 고시 제 2021-4호) 중 12-2-6. 피부자극성 시험에 준하여 피부자극성시험을 실시하였다. 농촌진흥청고시 제 2021-4호 인축독성시험 기준과 방법에는 백색토끼를 사용하도록 되어 있으며 New Zealand

White 계 토끼는 농약의 독성시험에 널리 사용되고 있어 기초자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험결과 해석 및 평가가 용이하여 선택되었다. 동물을 구입한 후 초기 및 확인시험으로 각각 9일, 15일 동물실험실의 환경하에서 순화시키면서 일반 건강상태를 관찰하여 건강한 개체만을 시험에 이용하였다. 이때 제모를 실시하여 피부에 이상이 없는 동물만 선택하여 시험하였다. 시험의 사육환경은 온도  $20\pm 3^{\circ}\text{C}$ , 상대습도  $50\pm 20\%$ , 환기시설(공조기), 조명시간 12시간(오전8시~오후8시) 및 조도 150~300 Lux의 실험실 조건에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다. 시험동물은 시험물질 처리 24시간전에 전기면도기를 이용하여 경배부(등부위)의 털을 15×15 cm 넓이로 제모한 다음 건강하고 깨끗한 피부를 가진 동물만을 사용하였다. 2×3 cm로 절개한 거즈를 이용하여 0.5 ml의 미생물제제(생균수  $2\times 10^7\text{cfu/ml}$ )을 처리부위에 도포한 후 시험물질의 유실 및 방출을 방지하기위해 비자극성테이프로 고정 및 유지시켜 시험물질이 경구 및 안점막 등 타 경로로 유입되지 않게 처리하였다. 대조부위는 증류수 처리하여 처리부위와 증상관찰 비교 용도로 활용하였다.

#### - New Zealand White계 토끼를 이용한 안점막자극성시험

피부자극성시험과 동일한 종의 토끼개체와 동일한 사육환경에서 안점막자극성시험을 실시하였다. 미생물 생균수 최대 처리량은  $2.0\times 10^6\text{cfu/ml}$ 으로 설정하였으며, 시험동물은 시험개시 전 24시간이내에 육안으로 양쪽 눈을 검사하여 눈에 이상이 없는 것을 확인하였다. 미생물제제의 처리는 좌안의 하안검을 가볍게 잡아당겨 결막낭 내에 한 차례 처리하였고, 시험물질의 손실을 막기 위해 양안검을 느슨하게 맞춰 잡고 약 1초간 유지하였다. 무처리한 우안은 대조부위로 하여 처리부위와 증상관찰 비교용도로 활용하였다. 미생물제제 처리 후 1, 24, 72시간 및 7일까지 각막혼탁, 홍채이상, 결막 발적, 부종의 평점을 기록하였다.

#### - 랫드를 이용한 급성경구독성/병원성 시험

“농약 및 원제의 등록기준” [별표12] 인축독성시험 기준과 방법 (농촌진흥청 고시 제 2021-4호) 중 12-2-1. 급성경구독성/병원성시험에 준하여 피부자극성시험을 실시하였다. 미생물제제의 급성경구/병원성 시험을 위하여 랫드 시험동물 당  $4.0\times 10^7\text{cfu}$ 를 1회 경구 투여한 후 3일, 7일, 14일 및 21일째에 부검하여 장기를 육안으로 관찰한 다음 체내 잔존 미생물 수와 1일, 3일, 7일 및 14일째의 체외 배출 미생물 수를 검사하였다. 또한, 전 시험기간 동안 일반증상을 관찰하였으며 투여 전, 투여 후 3일, 주 1회씩 체중을 측정하였다. 시험의 사육환경은 온도  $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ , 상대습도  $50\pm 20\%$ , 환기시설(공조기), 조명시간 12시간(오전8시~오후8시) 및 조도 150~300 Lux의 실험실 조건에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다. 시험군(투여군)은 암수 각각 3마리씩 4군 24마리를 (중간부검군-2개군, 최종부검군) 각 군의 비투여대조군으로 암수 각 2마리씩 4군 16마리, 총 40마리를 사용하여 시험하였다. 미생물 체외 배출을 평가하기 위하여 각 시험일마다 대변 내 미생물의 수를 측정하였고, 체내잔존상황을 평가하기 위하여 시험동물 부검후 신장, 뇌, 간장, 폐 비장, 위, 혈액, 임파절을 채취하여 미생물의 수를 측정하였다.

#### - 랫드를 이용한 급성경피독성시험

“농약 및 원제의 등록기준” [별표12] 인축독성시험 기준과 방법 (농촌진흥청 고시 제 2021-4호) 중 12-2-2. 급성경피독성시험에 준하여 피부자극성시험을 실시하였다. 급성경구독성/병원성시험과 동일한 종의 랫드 개체와 동일한 사육환경, 그리고 동일한 미생물제제 사용량으로 시험을 실시하였다. 시험 동물 수는 암수 각각 5마리씩 10마리를 1군으로 하였으며, 개체식별

은 유성매직을 사용하여 각 개체의 미부에 표시하였다. 미생물제제처리 하루 전에 등부위에 제 모기를 이용하여 5×6 cm 이상 크기 넓이로 제모하고, 4×4 cm 크기 면적의 거즈에 미생물제제 시험용액을 균일하게 묻힌 다음 제모된 부위에 고정/유지 시켰다. 도포시킨 시험물질은 24시간 후제거하고 피부에 묻은 잔여 물질은 증류수로 잘 닦고 의료용 탈지면으로 물기를 흡수시킨 다음 관찰을 실시하였다.

**- 담수어류 잉어(*Cyprinus carpio*)를 이용한 환경독성시험**

“농약 및 원제의 등록기준” [별표13] 환경생물 독성시험 기준과 방법 (농촌진흥청 고시 제 2020-34호)에 준하여 환경독성시험을 실시하였다. 본 시험에 사용된 *Cyprinus carpio*는 수생 생태계의 유해성 평가에 널리 사용되고 있고, 본 계통에 관한 비교할 수 있는 충분한 시험기초 자료가 축적되어 있으며, 농촌진흥청 및 OECD 가이드라인에서 추천된 종이기 때문에 선정하였다. 미생물제제는 1.3×10<sup>5</sup>cfu/ml 농도로 적용하였다. 시험용액은 주 1회 간격으로 교체하여 반지수식으로 시험을 진행하여 총 4주간 실시하였다. 시험기간동안 중독증상 및 치사율, 수질 측정(수온, pH, DO), 전장 및 체중 측정, 시험용액의 미생물 생균수 측정, 병리검사, 길고 최 대무작용량(NOCE)을 확인하였다.

**③ *B. velezensis* CMML20-16 잔디 병해 방제 현장적용 기술 개발**

**- *B. velezensis* CMML 20-16의 잔디 라이족토니아마름병(라지패취) 방제 현장적용**

*B. velezensis* CMML20-16의 잔디 라이족토니아마름병 방제 효능 평가를 위하여 난지형 잔디(금잔디) 및 한지형 잔디(벤트그라스)로 구성된 시험재배지에 처리하여 그 경과를 관찰하였다. 폭 1m x 길이 1m로 Randomized complete block design 포장 조성 → 3반복 수행- 잔디 주요 병인 라지패취 병원균의 소면적 포장에 접종 → 제형화된 신규 미생물제제(시제품) 처리 후 효능 검증하였다.

**- *B. velezensis* CMML 20-16의 잔디 갈색잎마름병(브라운패취) 방제 현장적용**

*B. velezensis* CMML20-16의 잔디 갈색잎마름병 방제 효능 평가를 위하여 난지형 잔디(금잔디) 및 한지형 잔디(벤트그라스)로 구성된 시험재배지에 처리하여 그 경과를 관찰하였다. 폭 1m x 길이 1m로 Randomized complete block design 포장 조성 → 3반복 수행- 잔디 주요병인 브라운패취 병원균의 소면적 포장에 접종 → 제형화된 신규 미생물제제(시제품) 처리 후 효능 검증하였다.

**④ *B. velezensis* CMML20-16 시제품의 안정성 평가 및 유기농업자재 등록 및 품질관리 표준화**

**- *B. velezensis* CMML20-16의 유식물 5종에 대한 약해시험**

*B. velezensis* CMML20-16을 이용하여 개발된 미생물제제의 사용시 주변 환경에 미치는 영향을 파악하기 위하여 유식물(잔디, 오이, 토마토, 상추, 고추)을 대상으로 약해시험을 실시하였다. 미생물제제의 생균수 함량 2.0×10<sup>8</sup> cfu/ml 기준으로 제작된 시제품을 권장 사용 기준인 500배 희석과 2배 수준이 250배 희석하여 사용하였으며, 유식물 5종의 유묘기에 경엽처리하였다. 실험은 pot assay로 진행하였으며 각 시험구 당 5 pot 씩 1set로 하여 3set를 준비하였고, 각 3반복 시험하였다(각 유식물별 총 45pot). 이때 포트는 직경 10cm 규격을 사용하였고, 양도와 상토를 5:5 비율로 사용하였다. 16~17℃ 항온이 유지되도록 비닐하우스 내에서 시험을 진행하였다. 약해시험은 “농약의 등록기준 약효 및 약해 시험기준과 방법”에 준하여 실시하

였다.

#### - New Zealand White계 토끼를 이용한 피부자극성시험

“농약 및 원제의 등록기준” [별표12] 인축독성시험 기준과 방법 (농촌진흥청 고시 제 2021-4호) 중 12-2-6. 피부자극성 시험에 준하여 피부자극성시험을 실시하였다. 농촌진흥청고시 제 2021-4호 인축독성시험 기준과 방법에는 백색토끼를 사용하도록 되어 있으며 New Zealand White 계 토끼는 농약의 독성시험에 널리 사용되고 있어 기초자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험결과 해석 및 평가가 용이하여 선택되었다. 동물을 구입한 후 초기 및 확인시험으로 각각 9일, 15일 동물실험실의 환경하에서 순화시키면서 일반 건강상태를 관찰하여 건강한 개체만을 시험에 이용하였다. 이때 제모를 실시하여 피부에 이상이 없는 동물만 선택하여 시험하였다. 시험의 사육환경은 온도  $20\pm 3^{\circ}\text{C}$ , 상대습도  $50\pm 20\%$ , 환기시설(공조기), 조명시간 12시간(오전8시~오후8시) 및 조도 150~300 Lux의 실험실 조건에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다. 시험동물은 시험물질 처리 24시간전에 전기면도기를 이용하여 경배부(등부위)의 털을  $15\times 15\text{ cm}$  넓이로 제모한 다음 건강하고 깨끗한 피부를 가진 동물만을 사용하였다.  $2\times 3\text{ cm}$ 로 절개한 거즈를 이용하여 0.5 ml의 미생물제제(생균수  $2\times 10^7\text{cfu/ml}$ )을 처리부위에 도포한 후 시험물질의 유실 및 방출을 방지하기위해 비자극성테이프로 고정 및 유지시켜 시험물질이 경구 및 안점막 등 타 경로로 유입되지 않게 처리하였다. 대조부위는 증류수 처리하여 처리부위와 증상관찰 비교 용도로 활용하였다.

#### - New Zealand White계 토끼를 이용한 안점막자극성시험

피부자극성시험과 동일한 종의 토끼개체와 동일한 사육환경에서 안점막자극성시험을 실시하였다. 미생물 생균수 최대 처리량은  $2.0\times 10^6\text{cfu/ml}$ 으로 설정하였으며, 시험동물은 시험개시 전 24시간이내에 육안으로 양쪽 눈을 검사하여 눈에 이상이 없는 것을 확인하였다. 미생물제제의 처리는 좌안의 하안검을 가볍게 잡아당겨 결막낭 내에 한 차례 처리하였고, 시험물질의 손실을 막기 위해 양안검을 느슨하게 맞춰 잡고 약 1초간 유지하였다. 무처리한 우안은 대조부위로 하여 처리부위와 증상관찰 비교용도로 활용하였다. 미생물제제 처리 후 1, 24, 72시간 및 7일까지 각막혼탁, 홍채이상, 결막 발적, 부종의 평점을 기록하였다.

#### - 랫드를 이용한 급성경구독성/병원성 시험

“농약 및 원제의 등록기준” [별표12] 인축독성시험 기준과 방법 (농촌진흥청 고시 제 2021-4호) 중 12-2-1. 급성경구독성/병원성시험에 준하여 피부자극성시험을 실시하였다. 미생물제제의 급성경구/병원성 시험을 위하여 랫드 시험동물 당  $4.0\times 10^7\text{cfu}$ 를 1회 경구 투여한 후 3일, 7일, 14일 및 21일째에 부검하여 장기를 육안으로 관찰한 다음 체내 잔존 미생물 수와 1일, 3일, 7일 및 14일째의 체외 배출 미생물 수를 검사하였다. 또한, 전 시험기간 동안 일반증상을 관찰하였으며 투여 전, 투여 후 3일, 주 1회씩 체중을 측정하였다. 시험의 사육환경은 온도  $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ , 상대습도  $50\pm 20\%$ , 환기시설(공조기), 조명시간 12시간(오전8시~오후8시) 및 조도 150~300 Lux의 실험실 조건에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다. 시험군(투여군)은 암수 각각 3마리씩 4군 24마리를 (중간부검군-2개군, 최종부검군) 각 군의 비투여대조군으로 암수 각 2마리씩 4군 16마리, 총 40마리를 사용하여 시험하였다. 미생물 체외 배출을 평가하기 위하여 각 시험일마다 대변 내 미생물의 수를 측정하였고, 체내잔존상황을 평가하기 위하여 시험동물 부검후 신장, 뇌, 간장, 폐 비장, 위, 혈액, 임파절을 채취하여 미생물의 수를 측정하였다.

#### - 랫드를 이용한 급성경피독성시험

“농약 및 원제의 등록기준” [별표12] 인축독성시험 기준과 방법 (농촌진흥청 고시 제 2021-4호) 중 12-2-2. 급성경피독성시험에 준하여 피부자극성시험을 실시하였다. 급성경구독성/병원성시험과 동일한 종의 랫드 개체와 동일한 사육환경, 그리고 동일한 미생물제제 사용량으로 시험을 실시하였다. 시험 동물 수는 암수 각각 5마리씩 10마리를 1군으로 하였으며, 개체식별은 유성매직을 사용하여 각 개체의 미부에 표시하였다. 미생물제제처리 하루 전에 등부위에 제모기를 이용하여 5×6 cm 이상 크기 넓이로 제모하고, 4×4 cm 크기 면적의 거즈에 미생물제제 시험용액을 균일하게 묻힌 다음 제모된 부위에 고정/유지 시켰다. 도포시킨 시험물질은 24시간 후 제거하고 피부에 묻은 잔여 물질은 증류수로 잘 닦고 의료용 탈지면으로 물기를 흡수시킨 다음 관찰을 실시하였다.

#### - 꿀벌(*Apis mellifera*)를 이용한 환경독성시험

농촌진흥청 고시 제 2021-4호(2021.02.19.) “농약 및 원제의 등록기준”, [별표13] “환경생물 독성 시험기준과 방법”, “13-2-4. 꿀벌영향시험에 준하여 환경독성시험을 실시하였다. 본 시험에 사용된 *Apis mellifera*는 환경생물독성 시험생물로 널리 사용되고 있고, 본 계통에 관한 비교할 수 있는 충분한 기초자료가 축적되어 있으며, 해당 시험법에서 추천된 종이기 때문에 선정하였다. 대조군 및 미생물제제의 사용기준(1,000배 희석)의 농도인 1배 농도와 10, 100배 높은 농도로 설정하여 시험농도 당 25마리씩 3반복으로 수행하였다. 관찰종료일인 시험물질 노출 후 9일째의 누적치사 수를 기준으로 대조군 대비 각 시험농도와 비교하여 통계처리 하였다. 산출된 결과에 따라 시험물질 처리군의 영향여부를 판단하여 최대무영향농도(NOEC)를 산출하였다.

#### - 담수어류 잉어(*Cyprinus carpio*)를 이용한 환경독성시험

“농약 및 원제의 등록기준” [별표13] 환경생물 독성시험 기준과 방법 (농촌진흥청 고시 제 2021-4호)에 준하여 환경독성시험을 실시하였다. 본 시험에 사용된 *Cyprinus carpio*는 수생 생태계의 유해성 평가에 널리 사용되고 있고, 본 계통에 관한 비교할 수 있는 충분한 시험기초 자료가 축적되어 있으며, 농촌진흥청 및 OECD 가이드라인에서 추천된 종이기 때문에 선정하였다. 미생물제제는  $1.0 \times 10^6$  cfu/ml 농도로 적용하였다. 시험용액은 주 1회 간격으로 교체하여 반지수식으로 시험을 진행하여 총 4주간 실시하였다. 시험기간동안 증독증상 및 치사율, 수질 측정(수온, pH, DO), 전장 및 체중 측정, 시험용액의 미생물 생균수 측정, 병리검사, 길고 최대무작용량(NOCE)을 확인하였다.

#### - 잔디병 방제용 미생물제제(시제품)의 유기농업자재 공시

상기 시험방법으로 도출된 약효, 약해 및 환경독성시험 결과를 근거로 *B. velezensis* CMML20-16을 포함하는 보란패치그린의 유기농업자재 공시를 진행하였다.

### ⑤ 사용 매뉴얼 제작·보급 및 교육·컨설팅

#### - 잔디병 방제 미생물제제 사용 매뉴얼 개발·보급 및 현장 사용자 교육 및 컨설팅

실험실 내 Pot assay와 소면적 포장지에서 도출된 연구결과를 토대로 잔디병 방제 효능을 담보하는 최소 미생물 생균수와 용량, 사용방법, 효과 및 효능, 보관방법, 그리고 사용시 주의사항을 포함하는 사용 매뉴얼을 개발하였다. 또한, 시제품 처리시 토양 내 잔류기간 및 점유율 등을 명시하고, 기준



재배 환경에 미치는 영향을 기재하여 다음 살포시기 예찰이 가능하도록 참고자료를 마련하였다. 현재까지 보고된 생물제제에 대한 잔디농가와 잔디관리자의 불신을 희석하기 위하여 본 연구진의 미생물제제에 대한 소개 자료를 마련하였으며, 필요에 따라 골프장과 같은 현장에 시제품을 살포하여 효능을 검증하였다.

## ⑥ 마케팅 전략 및 사업화 방안

### - 보란패치 그린의 마케팅 전략 및 사업화 방안

과제 연구기간동안 제작된 잔디병 방제용 미생물제제 “보란패치 그린”의 사업화를 위하여 유기농업자재 공시를 진행하며 농림식품기술기획평가원의 신기술인증과 한국산업기술진흥원의 녹색기술인증을 위한 기술 설명서 제작을 동시에 병행한다. 최우선적으로 국내 주요 잔디 사업분야인 골프장을 대상으로 제품 소개자료와 시제품을 이용하여 홍보를 진행한다. 특히, 화약농약 내성이 높아진 골프장을 주요 수요층으로 설계하였으며, 생물제제 교차 또는 혼입사용에 의한 잔디 질병 관리 및 자연 자정능력 회복을 도모한다. 최종에는 국내 골프 매니아 층이 많이 찾는 태국, 베트남, 중국 등 동남아시아를 대상으로 제품을 판매하기 위하여 각 국가별 공시 조건에 맞는 자료 준비와 등록 절차를 진행한다.

## <위탁기관: (재)농축산용미생물산업육성지원센터>

### ① *B. velezensis* GH1-13 균주의 대량배양용 최적 배지 개발 및 발효조건 확립

잔디 병 방제용용 유용미생물인 *Bacillus velezensis* GH1-13 균주의 대량생산을 위한 최적배지 개발을 목적으로 탄소원과 질소원 선발을 수행하였다. *Bacillus velezensis* GH1-13의 균주의 탄소원을 선발하기 위해 질소원으로 yeast extract 0.8%가 첨가된 기본배지(NaCl 0.15%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.25%, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.05%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1%, pH 7.5)에 각각 0.5% 농도의 Glucose, Fructose, Sucrose, Maltose, Corn starch를 첨가하여 37℃, 150RPM에서 48시간 진탕배양 후 생균수와 내생포자 균수를 측정하였다. 최적 질소원 선발은 탄소원으로 0.5% Glucose가 포함된 위의 기본배지에 각각 0.8% Yeast extract, Peptone, Tryptone, Soytone, Soy bean flour를 대상으로 37℃, 150RPM, 48시간 동안 배양 후 전체 생균수와 내생포자 균를 측정하였다. 생균수와 내생포자(60℃, 1시간 열처리 후) 균수는 연속 희석법으로 TSA 고체배지에 도말하여 48시간 배양 후 colony 계수를 측정하였다. 최적배지 개발을 위한 대조군으로 TSB(Tryptone 1.7%, Soytone 0.3%, Glucose 0.25%, NaCl 0.5%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.25%)를 사용하였다. 최적배지 개발은 생균수와 내생포자 형성 및 균체의 활성도를 목표로 수행하였다. 생균수와 내생포자 형성도 비교는 5 L jar fermenter와 100L 발효기를 기초로 하여 진행하였으며, 최적 배양 조건을 확립하기 위해 배양온도, 통기량, 교반속도, pH 등을 설정하였다.

### ② *B. velezensis* GH1-13 균주의 대량배양 scale-up, 제형화 및 시제품 제작

유용미생물의 대량배양을 위해 위탁기관에서 보유한 1.5톤, 10톤 규모 대용량 발효기를 활용하여 *B. velezensis* GH1-13 균주의 대량배양 scale-up과 배양 매뉴얼을 정립하였다. 5 L jar fermenter와 100L 발효기를 기초로 확립한 대량생산용 최적배지와 상업용 배지인 TSB를 사용하여 1.5톤, 10톤 대용량 발효기 조건에서 30시간 이상 배양하면서 pH 변화, 총 생균수, 내생포자 균수, 용존산소량을 측정하여 대량생산 scale-up 공정을 진행하였다. 생균수와 내생포자(60℃, 1시간 열처리 후) 균수는 위와 같이 연속 희석법으로 TSA 고체배지에 도말하여 48시간 배양 후 colony 계수를 측정하였다.

### ③ *B. velezensis* CMML20-16 대량배양용 최적 배지 개발 및 발효조건 확립

잔디 병 방제용 유용미생물인 *Bacillus velezensis* CMML20-16의 대량생산을 위한 최적배지 개발을 목적으로 탄소원과 질소원 선발을 수행하였다. *Bacillus velezensis* CMML20-16의 균주의 탄소원을 선별하기 위해 질소원으로 yeast extract 0.8%가 첨가된 기본배지(NaCl 0.15%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.25%, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.05%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1%, pH 7.5)에 각각 0.5% 농도의 Glucose, Fructose, Sucrose, Maltose, Corn starch를 첨가하여 37°C, 150RPM에서 48시간 진탕배양한 후 생균수와 내생포자 균수를 측정하였다. 최적 질소원 선발은 탄소원으로 0.5% Glucose가 포함된 위의 기본배지에 각각 0.8% Yeast extract, Peptone, Tryptone, Soytone, Soy bean flour를 대상으로 37°C, 150RPM, 48시간 동안 배양 후 전체 생균수와 내생포자 균를 측정하였다. 생균수와 내생포자(60°C, 1시간 열처리 후) 균수는 연속 희석법으로 TSA 고체배지에 도말하여 48시간 배양 후 colony 계수를 측정하였다. 최적배지 개발을 위한 대조군으로 TSB(Tryptone 1.7%, Soytone 0.3%, Glucose 0.25%, NaCl 0.5%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.25%)를 사용하였다. 최적배지 개발은 생균수와 내생포자 형성 및 균체의 활성도를 목표로 수행하였다. 생균수와 내생포자 형성도 비교는 5 L jar fermenter와 100L 발효기를 기초로 하여 진행하였으며, 최적 배양 조건을 확립하기 위해 배양온도, 통기량, 교반속도, pH 등을 설정하였다.

### ④ *B. velezensis* CMML20-16의 대량배양 scale-up, 제형화 및 시제품 제작

유용미생물의 대량배양을 위해 위탁기관에서 보유한 1.5톤, 10톤 규모 대용량 발효기를 활용하여 *B. velezensis* CMML20-16 균주의 대량배양 scale-up과 배양 매뉴얼을 정립하였다. 5 L jar fermenter와 100L 발효기를 기초로 확립한 대량생산용 최적배지와 상업용 배지인 TSB를 사용하여 1.5톤, 10톤 대용량 발효기 조건에서 30시간 이상 배양하면서 pH 변화, 총 생균수, 내생포자 균수, 용존산소량을 측정하여 대량생산 scale-up 공정을 진행하였다. 생균수와 내생포자(60°C, 1시간 열처리 후) 균수는 위와 같이 연속 희석법으로 TSA 고체배지에 도말하여 48시간 배양 후 colony 계수를 측정하였다.

### 3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

#### 1) 연구수행 결과

##### (1) 정성적 연구개발성과

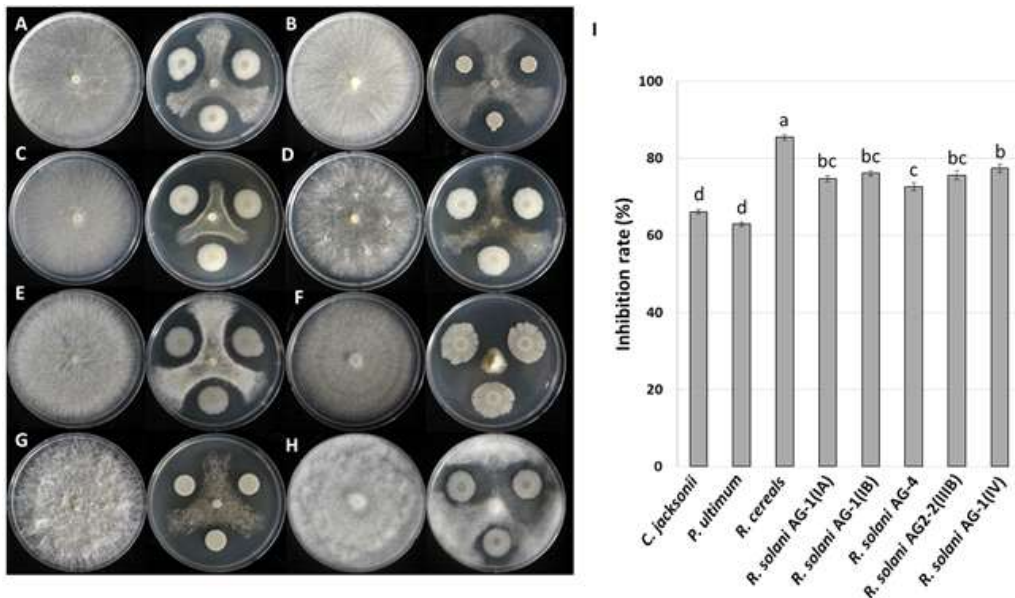
<주관기관 : 전남대학교 산학협력단>

#### 1) *Bacillus velezensis* GH1-13 활용 잔디병 제어

##### ① GH1-13의 효능 검증 및 특성 분석

###### - 대치배양

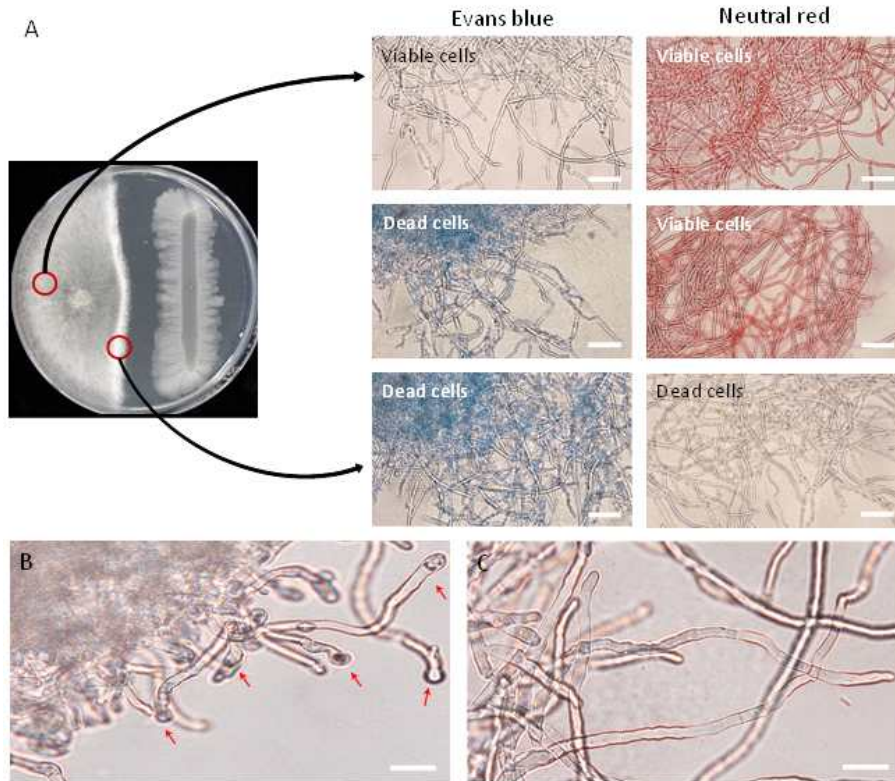
잔디 병원체에 대한 *B. velezensis* GH1-13의 억제 능력을 확인하기 위해 GH1-13과 함께 8개의 병원균에 대한 대치 배양 검사를 수행하였다. 대치배양 분석을 통해 정량적 평가가 가능했고, 8가지 병원성 균주 성장에 대해 억제 활성을 관찰했다. GH1-13은 *Rhizoctonia cerealis*에 대해 85%로 최고 수치의 억제율을 보였으며, 나머지 7 종류의 균주에 대해서는 63-77%의 억제율을 보였다. 이 결과를 토대로 균주 GH1-13은 잔디 병원체를 억제하는 생물 제재로서의 역할을 할 수 있다는 것을 알 수 있었다.



<그림 2. 8가지 잔디 병원체에 대한 *B. velezensis* GH1-13의 항진균 활성>

###### - 현미경에 의한 관찰

*B. velezensis* GH1-13에 의한 *Rhizoctonia solani* AG2-2(IIIb)의 생존 가능성과 형태학적 인 변화를 확인하기 위해 에반스블루(Evans blue)와 뉴트럴레드(Neutral red)에 염색된 균사를 확인하였다. 대치배양한 균주는 균사가 Evans blue에서는 푸르게, Neutral red에서는 무색으로 염색되지 않은 것을 관찰하였다. *R. solani* AG2-2(IIIb)만 단독으로 있던 것은 Evans blue에서는 무색으로, Neutral red에서는 붉게 염색된 것을 관찰하였다. 즉, GH1-13은 *R. solani* AG2-2(IIIb)의 정상적인 균사를 사멸에 이르게끔 한다는 것을 확인할 수 있었다.

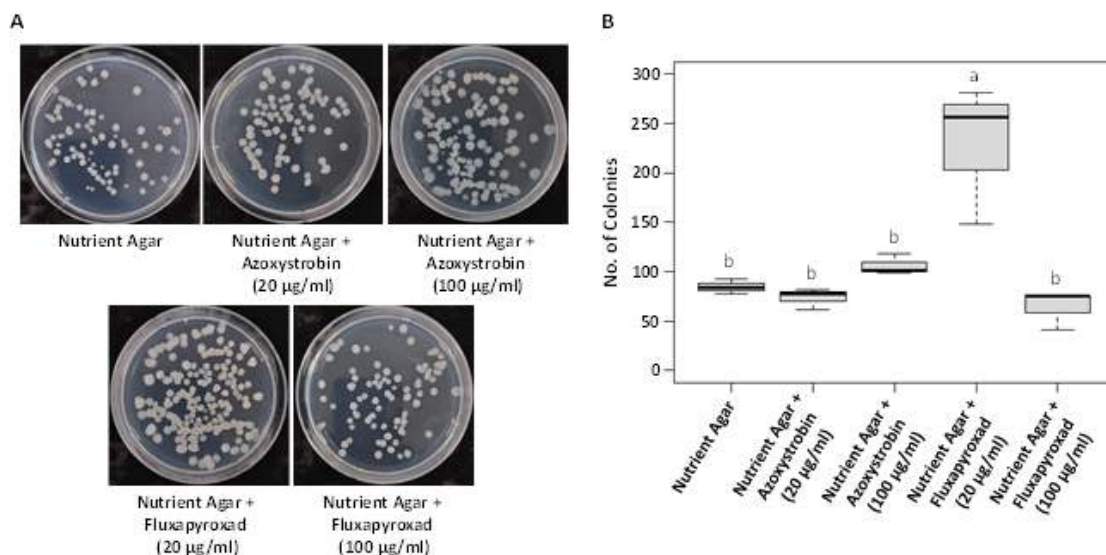


<그림 3. *R. solani* AG2-2 (IIIB)에 대한 *B. velezensis* GH1-13의 억제 효과에 대한 형태학적 관찰>

② GH1-13의 화학농약에 대한 내성 연구 및 Pot assay로 병 방제 효능 검정

- GH1-13의 화학농약에 대한 내성 연구

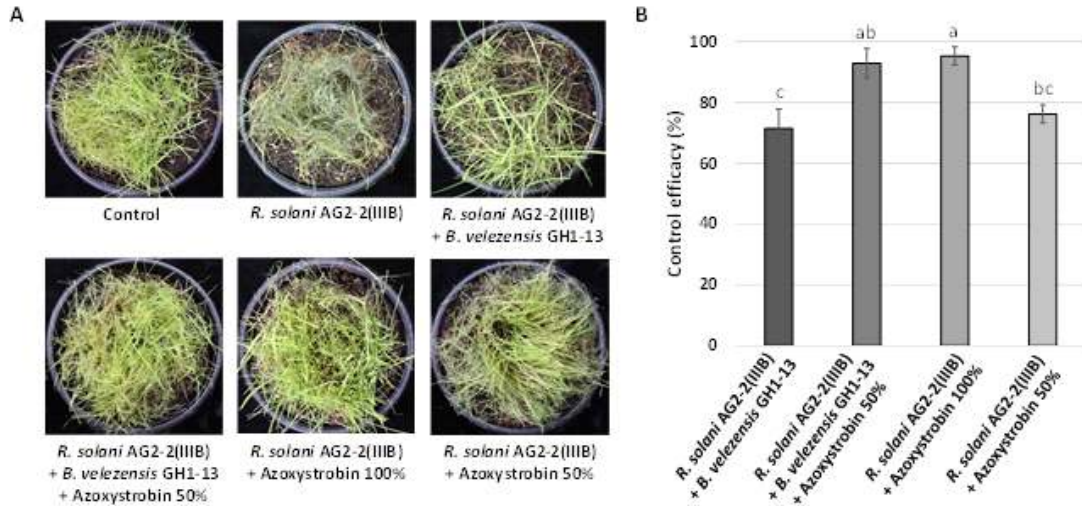
*B. velezensis* GH1-13과 병원균의 억제를 위해 사용되는 농약과의 호환성 테스트를 하기 위해 20 $\mu$ g/ml과 100 $\mu$ g/ml의 아зок시스트로빈(azoxystrobin)과 플루사피록사드(fluxapyroxad)에서 GH1-13의 생존가능성을 테스트했다. 아зок시스트로빈의 20 $\mu$ g/ml과 100 $\mu$ g/ml 농도에서 같이 키운 GH1-13의 콜로니 수는 농약이 없는 곳에서 키운 GH1-13의 콜로니 수와 크게 다르지 않았다. 플루사피록사드의 100 $\mu$ g/ml 농도에서 차이가 없었으나 20 $\mu$ g/ml에서 GH1-13의 콜로니 수가 증가하는 것을 볼 수 있었다.



<그림 4. *B. velezensis* GH1-13과의 아зок시스트로빈(100 $\mu$ g/ml) 및 플루사피록사드(20 $\mu$ g/ml) 호환성 테스트>

- Pot assay로 병 방제 효능 검증

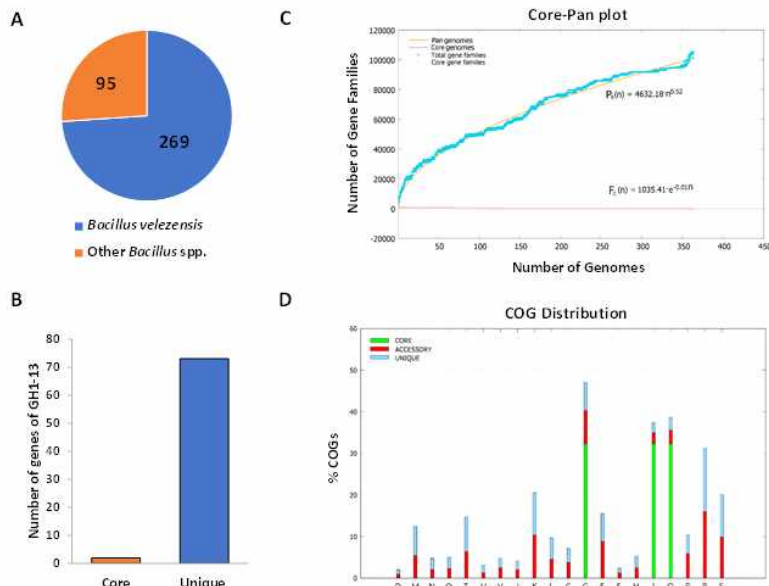
*B. velezensis* GH1-13과 농약 아зок시스트로빈은 크리핑벤트그래스의 갈색잎마름병을 제어하기 위해 사용되었다. GH1-13( $1 \times 10^6$ cfu/ml)의 방제율(%)은  $71.43 \pm 6.3$  SE)이었고 50% 아зок시스트로빈( $76.19 \pm 3.0$  SE)의 방제율(%)과 유사했다. GH1-13( $1 \times 10^6$ cfu/ml)과 50% 아зок시스트로빈(방제율:  $92.86 \pm 4.9$  SE)을 함께 적용한 결과 GH1-13 단독 또는 50% 아зок시스트로빈(방제율:  $95.24 \pm 3.0$  SE)과 유사한 병 감소 효과가 나타났다.



<그림 5. 포트에서의 갈색잎마름병에 대한 농약과 GH1-13 처리구의 비교>

③ Pan-genome 분석

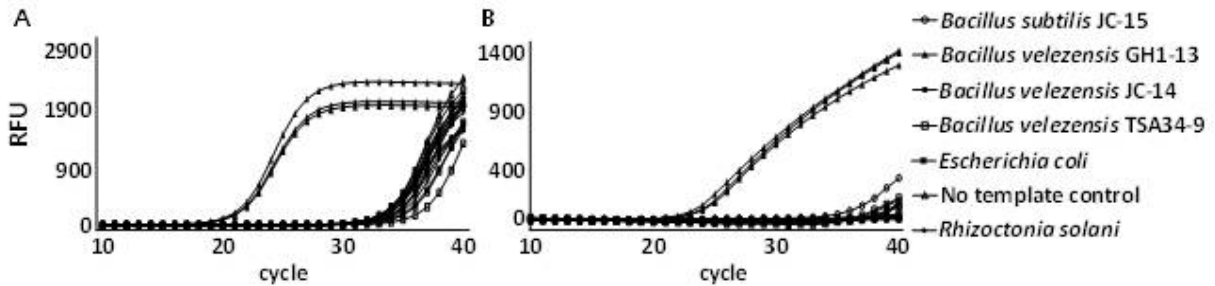
364개의 genome에는 2개의 핵심 유전자가 포함되어 있었으며 73개의 유전자가 GH1-13에서 특이하게 발견되었다. 예측된 코어, unique, 부속 유전자는 COG 범주에 따라 추가로 분류되었고, 다른 기능 범주에서 이들의 비율이 결정되었다. 이후, 73개의 유전자의 BlastX 분석을 통해서 GH1-13만 보유하고 있는 두 개의 독특한 유전자를 발견하였다. 이 두 후보 중 하나는 GH1-13의 염색체에서 유래했고 다른 하나는 플라스미드에서 유래했다. 따라서 이 두 개의 unique 유전자는 GH1-13의 추가 검출을 하는데 사용되었다.



<그림 6. Bacillus 속 364개의 균주에 대한 Pan-genome 분석 결과>

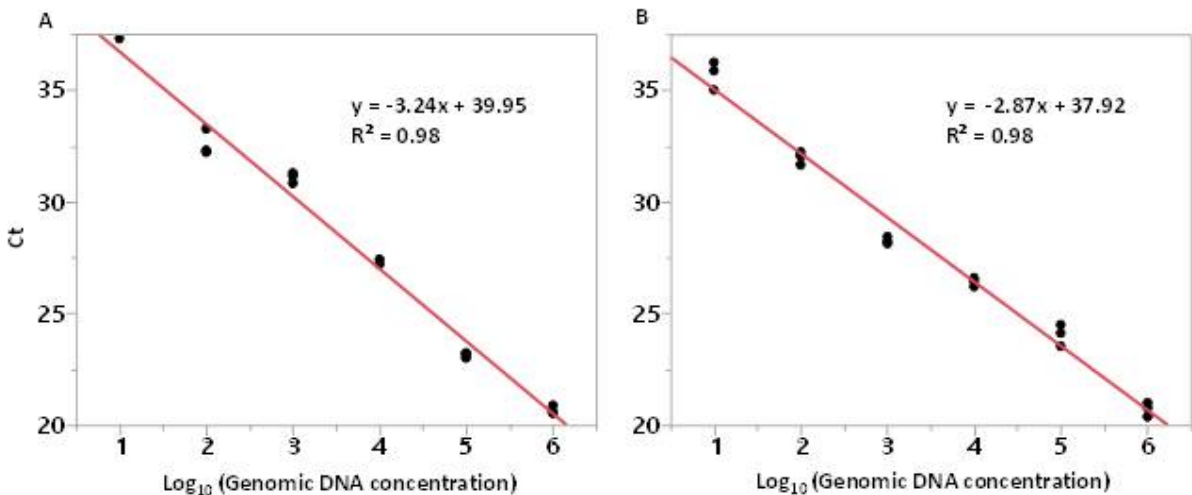
④ SYBR qPCR and TaqMan qPCR을 활용한 GH1-13 균주 특이적인 검출법 개발

*B. velezensis* GH1-13의 검출을 위해 GH1-13의 2개 unique 유전자 타깃으로 하여 다른 세균 및 곰팡이 DNA 샘플을 이용하여 SYBR 와 TaqMan qPCR 분석을 수행하였다. GH1-13의 unique한 염색체 유전자는 SYBR 및 TaqMan qPCR 분석에 의해 증폭되었으며, 이 분석을 통해 다른 *Bacillus* 균주들과 *E. coli*, *R. solani* 균주 DNA와 구별이 되었다.

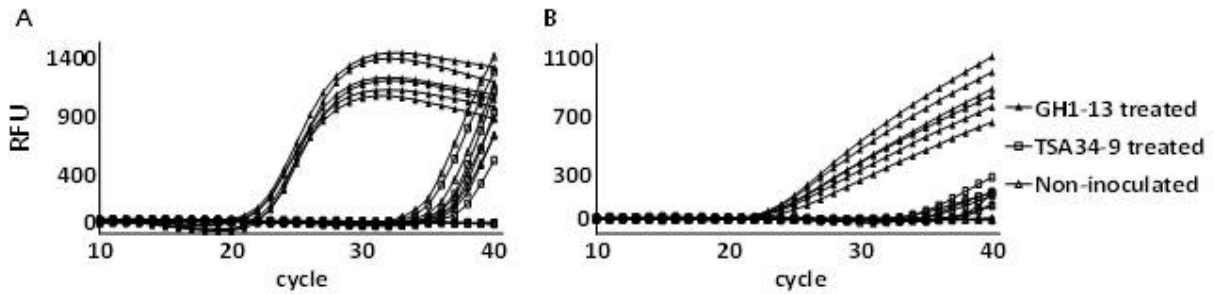


<그림 7. *Bacillus velezensis* GH1-13, *B. velezensis* JC-14, *B. velezensis* TSA34-9, *B. subtilis* JC-15, *E. coli*, *Rhizoctonia solani*의 증폭, (A) SYBR, (B) TaqMan>

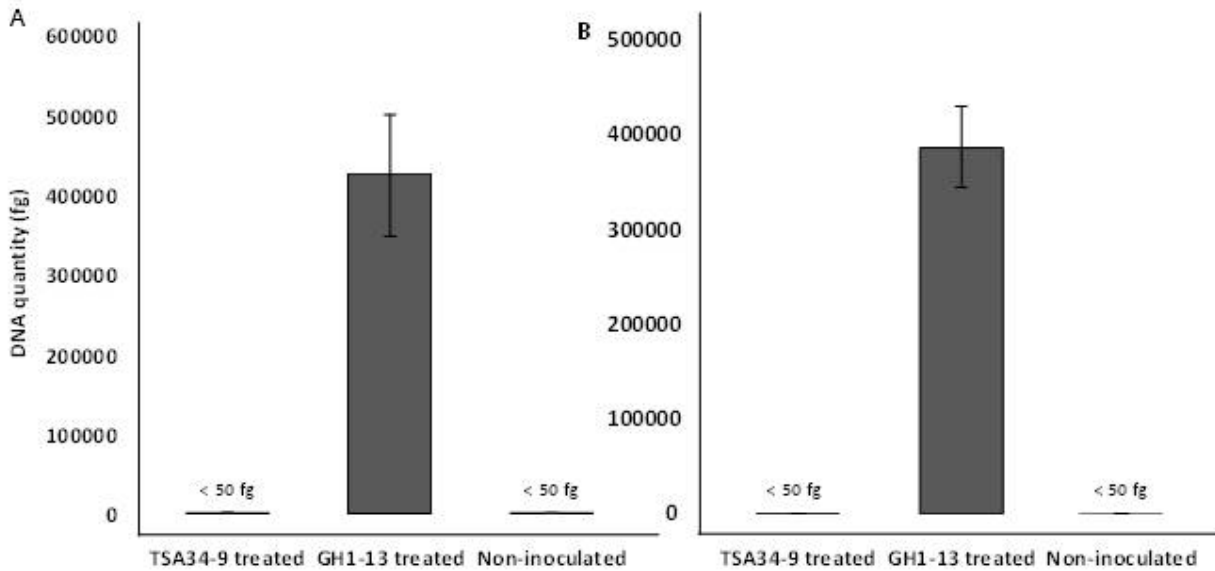
두 개의 unique 유전자 중 염색체 unique 유전자는 크리핑벤트그라스 근권 토양에서 GH1-13의 특정 검출을 위해 선택되었다. GH1-13 처리된 토양만이 평균 Ct 값이 각각 21.82와 22.04인 SYBR과 TaqMan qPCR 분석에 의한 특이 증폭을 보였다. TSA34-9 처리된 토양과 처리되지 않은 토양의 평균 Ct 값은 모두 35 이상이었다. GH1-13가 처리된 토양 샘플에서 검출된 평균 DNA 양은 SYBR 및 TaqMan qPCR 분석에서 각각 427,682 fg/μl과 387,165 fg/μl이었다. TSA34-9 처리 및 무처리구의 경우, 검출된 DNA 양은 모두 50fg/μl 미만이었다.



<그림 8. SYBR qPCR (A)와 TaqMan qPCR (B)에 의한 Calibration curves. Quantifications plotted with serially diluted *Bacillus velezensis* GH1-13 genomic DNA (log transformed) in fentograms against cycle threshold values.>



<그림 9. GH1-13이 처리된 토양 샘플과 TSA34-9이 처리된 토양 샘플을 이용한 unique 유전자에 대한 증폭, (A) SYBR, (B) TaqMan>

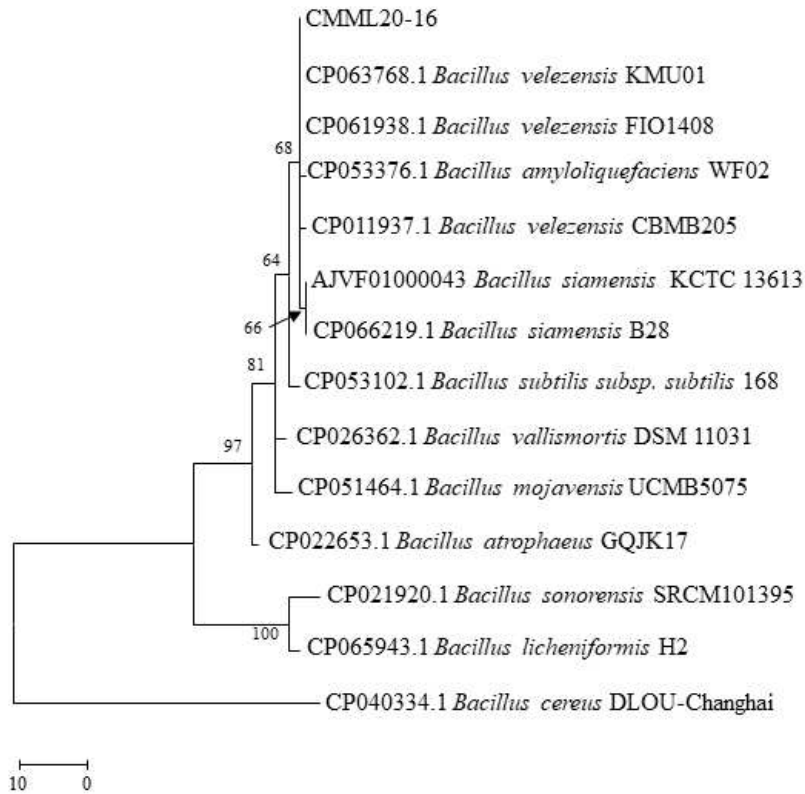


<그림 10. GH1-13이 처리된 토양 샘플과 TSA34-9이 처리된 토양 샘플, 무처리구 토양 샘플에서 검출된 DNA의 양 (A) SYBR, (B) TaqMan>

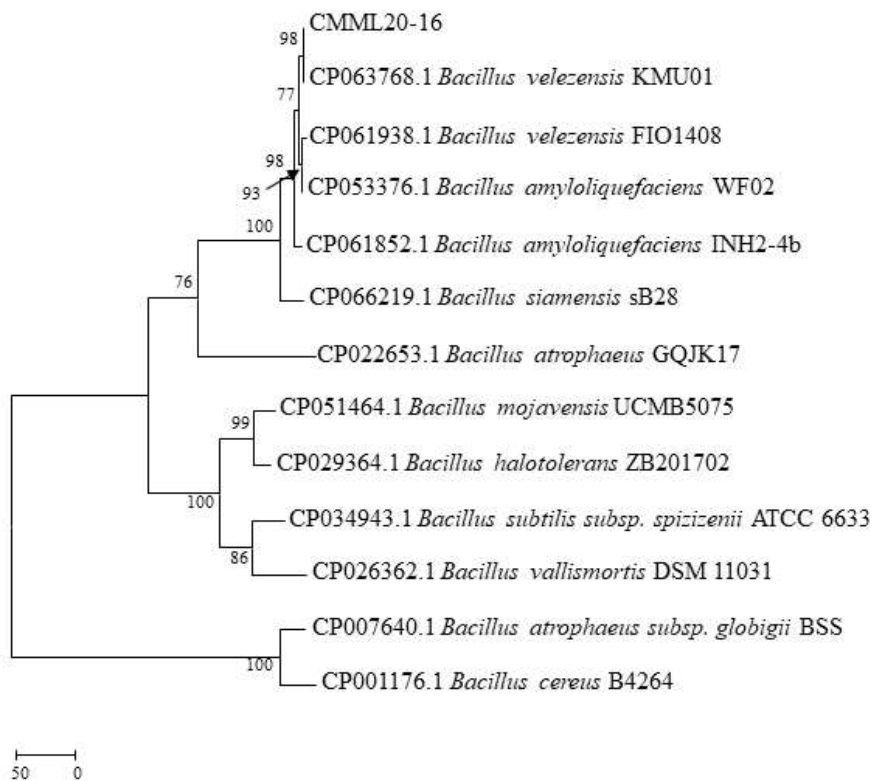
## 2) 근권유래 *Bacillus velezensis* CMML20-16 활용 잔디병 제어

### ① *Bacillus velezensis* CMML20-16 균주 선발 및 동정

중지 잔디 근권에서 총 148개의 미생물을 분리하였고, 분리된 미생물을 브라운패취병원균에 대한 길항능력 검정하여 항균활성이 높은 CMML20-16 균주를 선발되었다. 이 균주의 16S rRNA, gyrB sequence 동정 결과는 *Bacillus velezensis*로 확인되었다.



<그림 11. *Bacillus velezensis* CMML20-16 균주의 16s rRNA 유전자를 이용한 계통도>



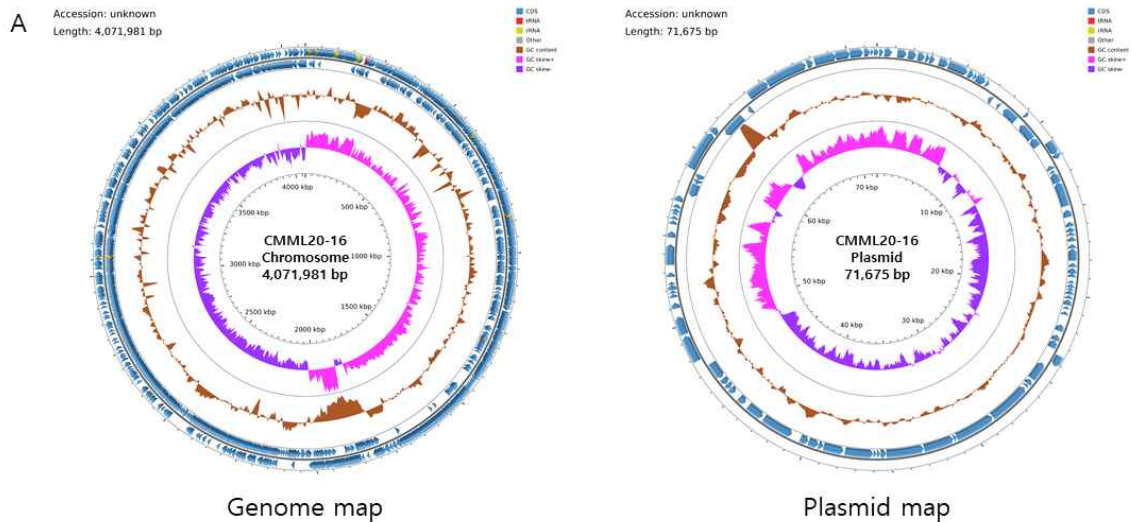
<그림 12. *Bacillus velezensis* CMML20-16 균주의 *gyrB* 유전자를 이용한 계통도>

② 근권유래 *Bacillus velezensis* CMML20-16의 효능 검증 및 특성 분석



- 균주 유전체 획득 및 분석

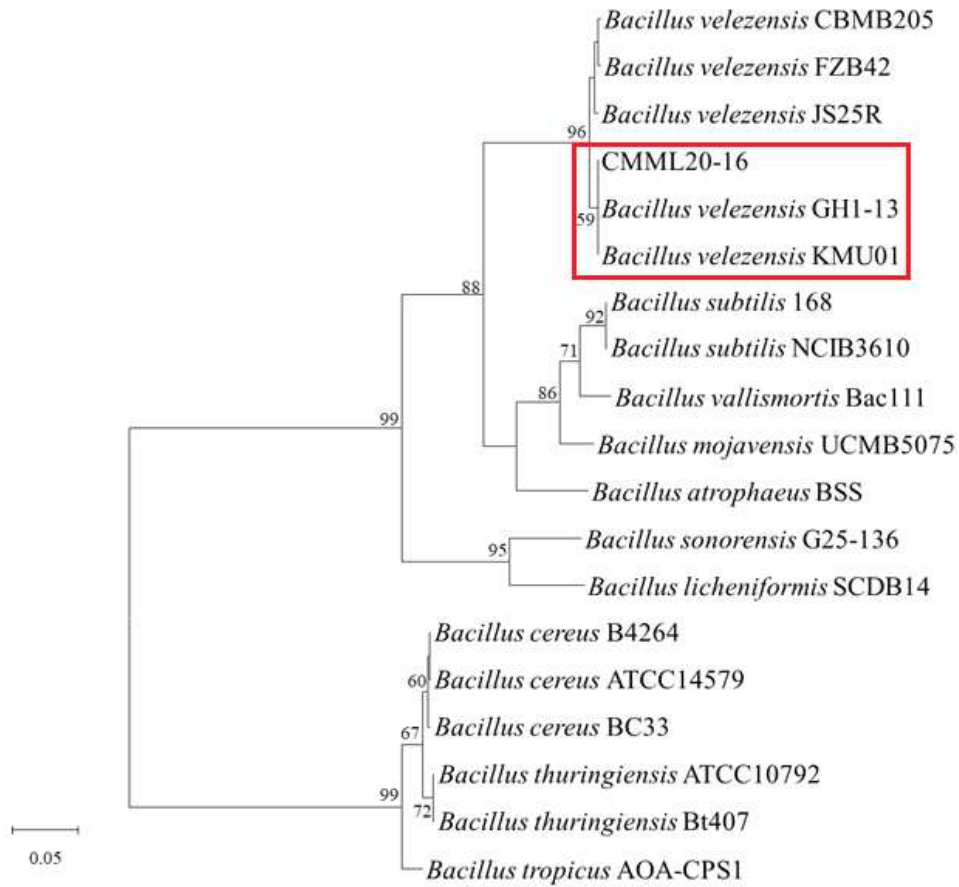
Genome analysis 결과로, *B. velezensis* CMML20-16의 사이즈는 4,071,981 bp 이며, 하나의 플라스미드와 46%의 GC content, 3,850개의 단백질 코딩 유전자를 포함하며, 27개의 rRNA, 86개의 tRNA 유전자를 포함하였다. OrthoFinder가 STAG(모든 유전자의 종 트리 추론)를 사용하여 유전자 트리 데이터 세트에서 추론한 종 트리 결과, CMML20-16은 *Bacillus velezensis*로 확인되었다. Genome sequencing 정보를 기반으로 antiSMASH bacterial version 프로그램을 사용하여 2차 대사물질 gene cluster 분석되었다. CMML20-16은 항진균성 성분은 리포펩티드계 항생제인 펜기신(Fengycin)과 설펙틴(Surfactin) gene cluster가 있다는 것을 확인되었다.



<그림 13. CMML20-16 균주의 원형 지놈 map>

표8. CMML20-16 균주의 원형 지놈 특성

Features	Chromosome	Plasmid
Genome size (bp)	4,071,981	71,675
GC-content (%)	46	32
Protein-coding genes (CDSs)	3,850	102
rRNA genes	27	-
tRNA genes	86	-



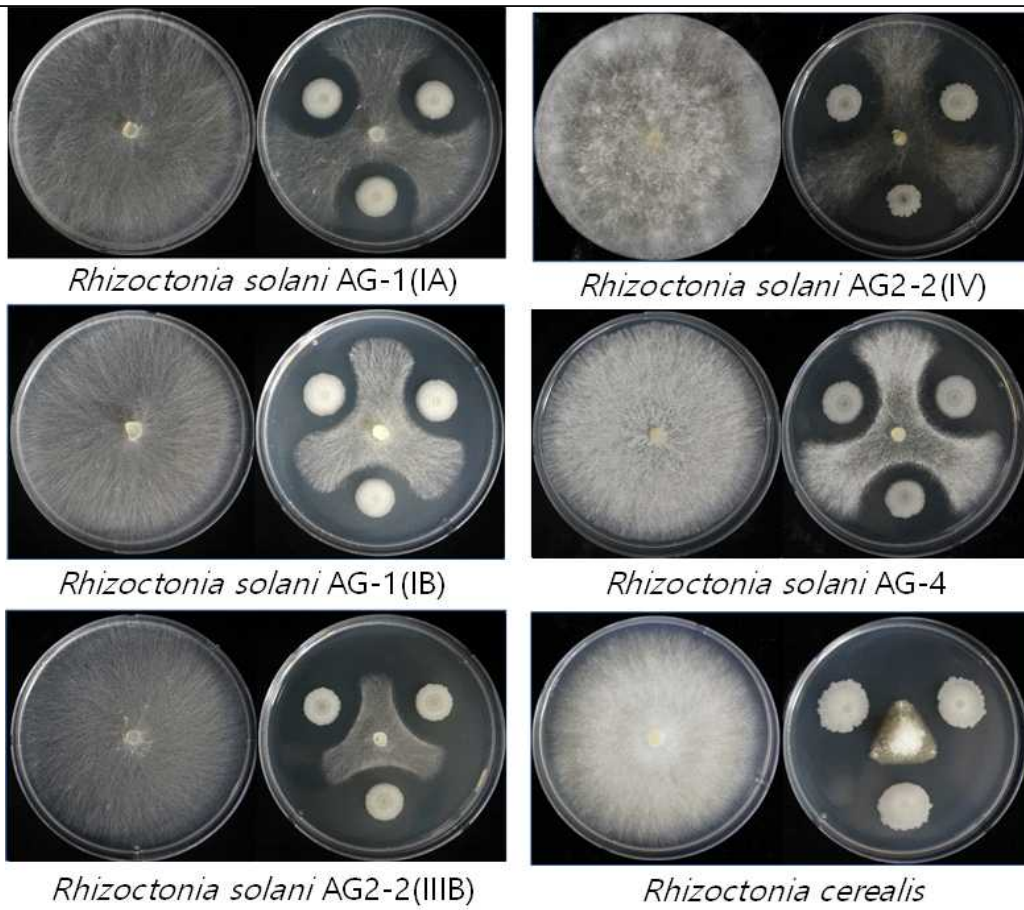
<그림 14. *Bacillus velezensis* CMML20-16 균주의 유전체 분석을 통한 상동성을 확인한 유전학적 계통도>

Region	Type	From	To	Most similar known cluster	Similarity
Region 1	NRPS, transAT-PKS	197,845	274,498	rhizoctin A	22%
Region 2	NRPS	348,214	413,008	surfactin	82%
Region 3	PKS-like	946,965	988,209	butirosin A / butirosin B	7%
Region 4	terpene	1,073,111	1,089,753		
Region 5	transAT-PKS	1,388,780	1,476,577	macrolactin H	100%
Region 6	transAT-PKS, T3PKS, NRPS	1,700,139	1,800,102	bacillaene	100%
Region 7	NRPS, transAT-PKS, betalactone	2,006,781	2,140,805	fengycin	100%
Region 8	terpene	2,169,038	2,190,921		
Region 9	T3PKS	2,255,251	2,296,351		
Region 10	transAT-PKS	2,424,230	2,518,015	difficidin	100%
Region 11	NRPS, RiPP-like	3,140,467	3,192,257	bacillibactin	100%
Region 12	other	3,724,206	3,765,624	bacilysin	100%
Region 13	lanthipeptide-class-ii	3,907,572	3,930,760	mersacidin	100%

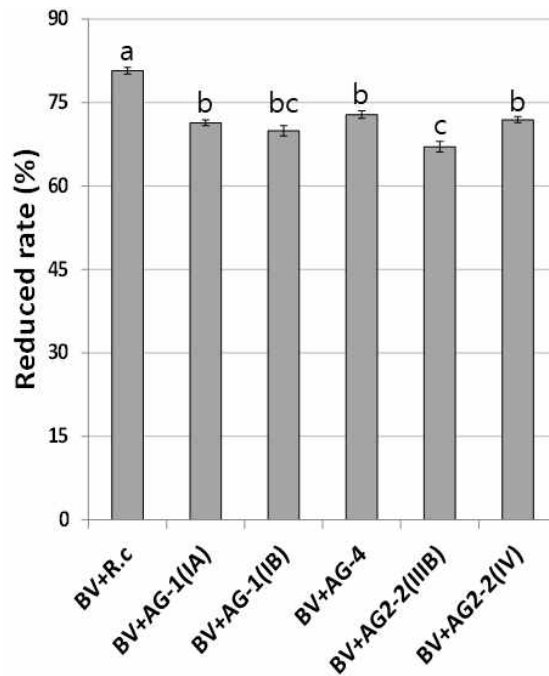
<그림 15. antiSMASH를 이용한 *Bacillus velezensis* CMML20-16 균주의 이차대사산물 대한 주석화>

#### - 대처배양

위 그림 5 및 6에서 확인할 수 있듯이, 라이족토니아마름병 (라지패취)을 유발하는 라이족토니아 솔라니 (*Rhizoctonia solani*) AG2-2(IV), 갈색잎마름병을 유발하는 라이족토니아 솔라니 (*Rhizoctonia solani*) AG1-1A, AG1-1B, AG2-2(IIIB), AG4와 봄마름병, 황색마름병등을 유발하는 라이족토니아 세레아리스 (*Rhizoctonia cerealis*)에서 모두 탁월한 생육 저지능을 보였다.



<그림 16. *Bacillus velezensis* CMML20-16 균주의 식물 병원균에 대한 생육저지 효과 확인 대치배양>

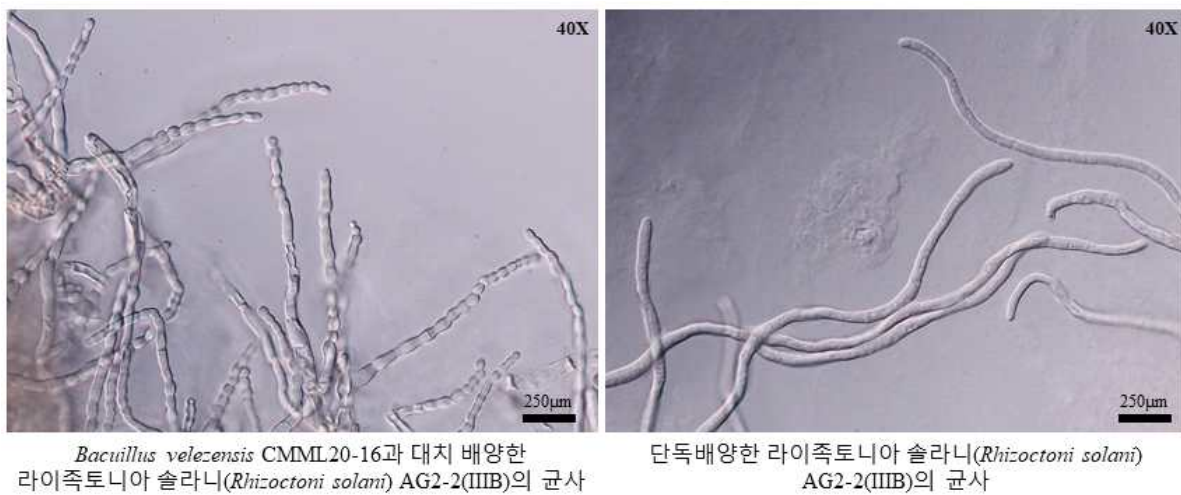


<그림 17. *Bacillus velezensis* CMML20-16 균주의 식물 병원균에 대한 생육저지 결과 그래프>

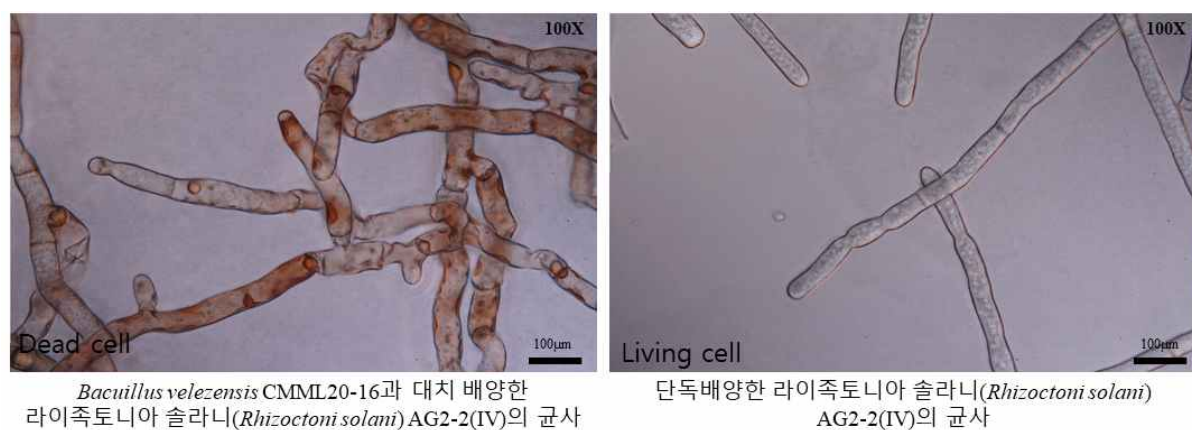
- 현미경에 의한 관찰

*Bacillus velezensis* CMML20-16에 의한 갈색잎마름병균인 라이족토니아 솔라니 AG2-2(III

B)의 저지환의 경계부분을 현미경(Olympus BX51, 40배율)으로 확대 촬영하여 균사의 형태적 변형을 확인하였다. 대치배양한 균주는 저지환 경계에서 균사가 충분히 자라지 못하고 마디가 생기며 자라거나, 균사의 일부가 일그러지거나 납작해지는 등 사멸에 이르러 형태가 아예 망가진 것을 관찰하였다. 즉, *B. velezensis* CMML20-16은 라이족토니아 솔라니 AG2-2(III B)의 정상적인 균사 성장을 저해함을 확인할 수 있었다. 또한, 라이족토니아마름병균인 라이족토니아 솔라니 AG2-2(IV)의 저지환의 경계부분을 현미경 (Olympus BX51, 100배율)으로 확대 촬영하여 균사의 형태적 변형을 확인하였다. 대치배양한 균주는 저지환 경계에서 균사가 갈색으로 변하고, 정상적으로 격벽을 형성하지 못하였으며, 격벽 사이가 짧고 가지치기 (Branching)가 많으며, 일정하지 않은 길이와 형태로 성장하는 것을 확인할 수 있었다. 즉, *B. velezensis* CMML20-16은 라이족토니아 솔라니 AG2-2(IV)의 정상적인 균사 성장을 저해함을 확인할 수 있었다.



<그림 18. *Bacillus velezensis* CMML20-16 균주의 갈색잎마름병(Brown Patch)균인 라이족토니아 솔라니 (*Rhizoctonia solani*) AG2-2(III B)에 대한 성장 저해 효과 확인 결과>

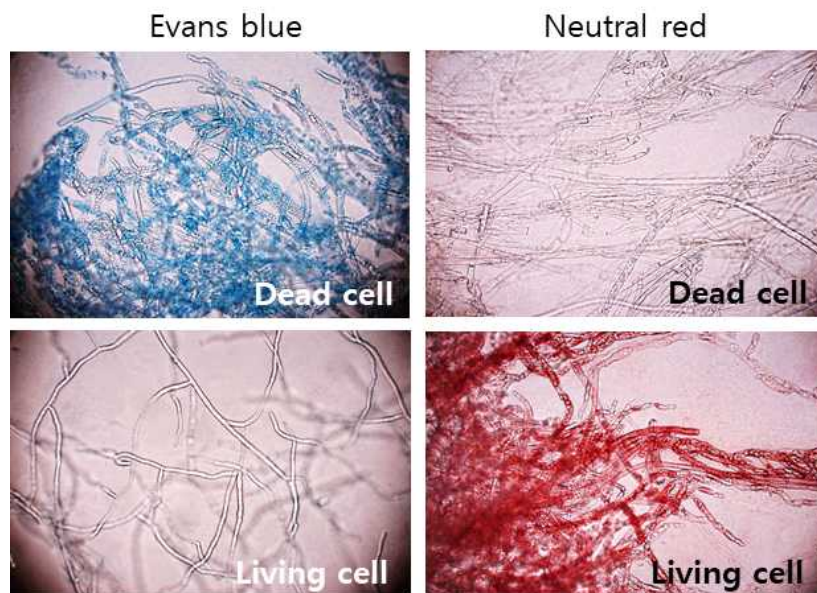


<그림 19. *Bacillus velezensis* CMML20-16 균주의 라이족토니아마름병(Large Patch)균인 라이족토니아 솔라니 (*Rhizoctonia solani*) AG2-2(IV)에 대한 성장 저해 효과 확인 결과>

*Bacillus velezensis* CMML20-16에 인접한 갈색잎마름병균인 라이족토니아 솔라니 AG2-2(III B)를 현미경으로 촬영하여 Evans blue와 Neutral red에 염색된 균사를 확인하였다. 대치배양한 균주는 균사가 Evans blue에서는 푸르게, Neutral red에서는 무색으로 염색되지 않은 것을 관찰하였다. 라이족토니아 솔라니 AG2-2(III B)만 단독으로 있던 것은 Evans blue에서

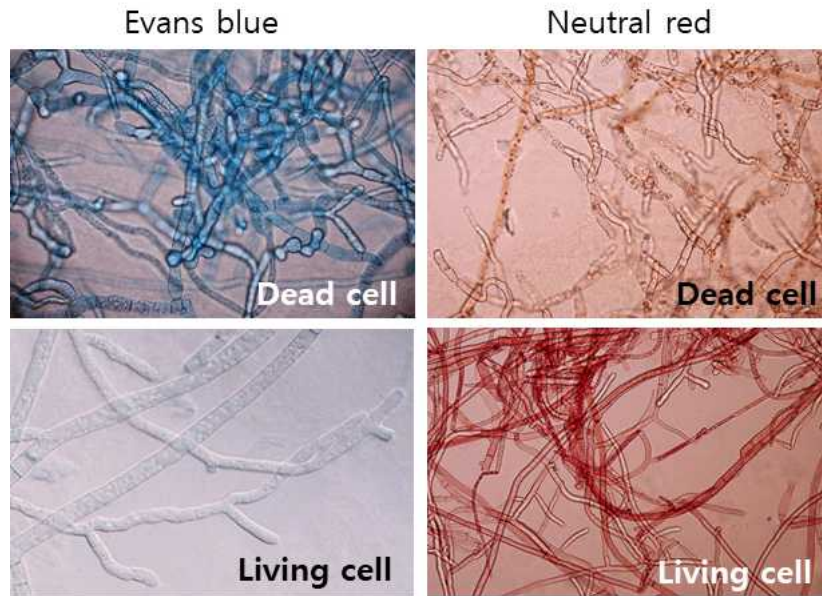
는 무색으로, Neutral red에서는 붉게 염색된 것을 관찰하였다. 즉, *B. velezensis* CMML20-16은 라이족토니아 솔라니 AG2-2(III B)의 정상적인 균사를 사멸에 이르게끔 한다는 것을 확인할 수 있었다. 또한, *B. velezensis* CMML20-16에 인접한 라이족토니아마름병균인 라이족토니아 솔라니 AG2-2(IV)의 부분을 현미경으로 촬영하여 균사의 형태적 변형을 확인하였다. 대치배양한 균주는 균사가 Evans blue에서는 푸르게, Neutral red에서는 무색으로 염색되지 않은 것을 관찰하였다. 라이족토니아 솔라니 AG2-2(IV)만 단독으로 있던 것은 Evans blue에서는 무색으로, Neutral red에서는 붉게 염색된 것을 관찰하였다. 즉, *B. velezensis* CMML20-16이 라이족토니아 솔라니 AG2-2(IV)의 정상적인 균사를 사멸에 이르게끔 한다는 것을 확인할 수 있었다.

### Brown patch



<그림 20. Evans blue와 Neutral red를 이용한 *Bacillus velezensis* CMML20-16 균주의 갈색 잎마름병(Brown Patch)균인 라이족토니아 솔라니 (*Rhizoctonia solani*) AG2-2(III B)에 대한 성장 저해 효과 확인 결과>

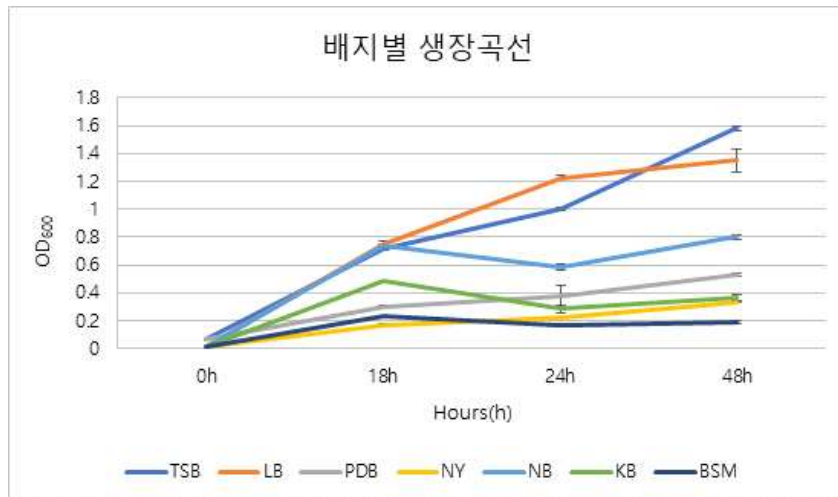
Large patch



<그림 21. Evans blue와 Neutral red를 이용한 *Bacillus velezensis* CMML20-16 균주의 라이족토니아마름병(Large Patch)균인 라이족토니아 솔라니 (*Rhizoctonia solani*) AG2-2(IV)에 대한 생장 저해 효과 확인 결과>

- 배지에 따른 CMML20-16의 생장 분석

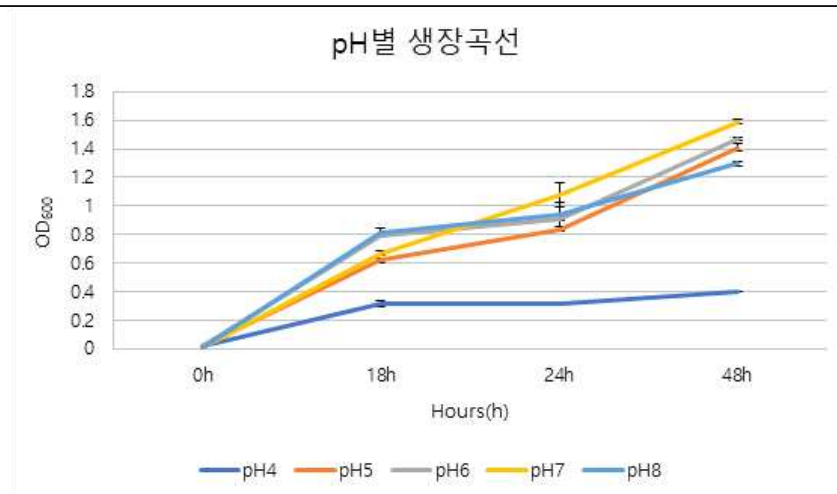
*Bacillus velezensis* CMML20-16 균주는 모든 배지에서 생육이 가능하였으며, 특히, TSB 배지에서 생장이 가장 우수한 것으로 확인되었다.



<그림 22. *Bacillus velezensis* CMML20-16 균주의 배지별 생장곡선 그래프>

- pH에 따른 CMML20-16의 생장 분석

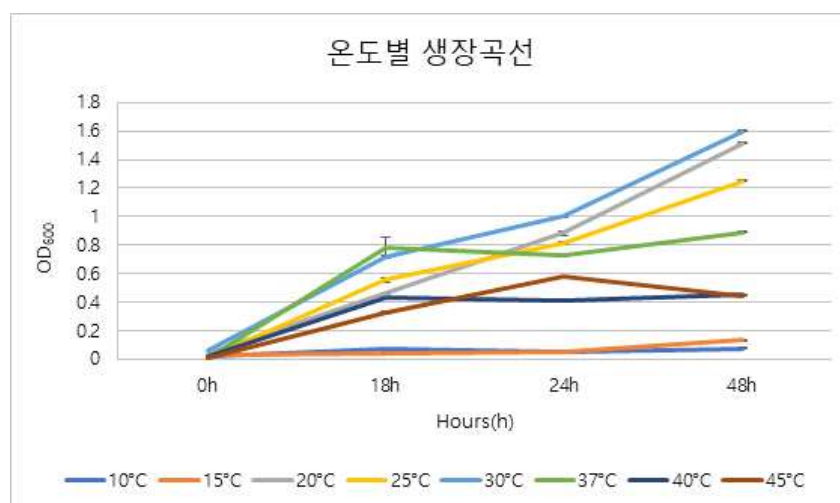
*B. velezensis* CMML20-16 균주는 pH 5 내지 8까지 비슷한 성장을 보였으며, pH 6 내지 7에서 가장 적절한 성장을 나타내었다. 대부분의 식물 병원성 진균이 약산성 토양에서 잘 발생하게 되므로 CMML20-16이 약산성에서 생육이 잘 되는 특성은 CMML20-16 균주 또는 이의 배양액이 잔디 병해의 미생물 제제로서 우수한 효과를 나타낼 수 있음을 의미한다.



<그림 23. *Bacillus velezensis* CMML20-16 균주의 최적 성장 pH를 나타낸 그래프>

- 온도에 따른 CMML20-16의 성장 분석

각각의 배양액을 600 nm에서 흡광도를 조사한 결과, CMML20-16 균주는 20 내지 30 °C에서 잘 자랐으며, 특히, 30 °C에서 높은 성장률을 나타내었다. 또한, 40 °C 이상의 고온에서도 생장이 가능한 것을 확인하였다.



<그림 24. *Bacillus velezensis* CMML20-16 균주의 온도별 성장곡선 그래프>

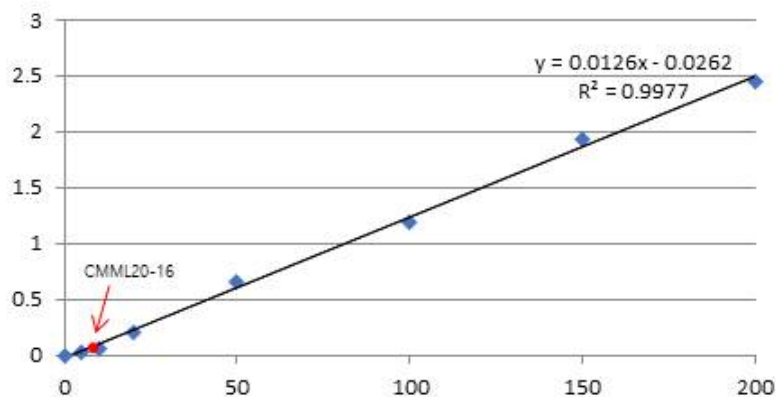
- CMML20-16의 효소 활성 및 식물 생육 촉진 인자 활성 분석

*Bacillus velezensis* CMML20-16 균주는 카제인 평판배지와 젤라틴 분해효소를 분해하며 성장하여 균주 주변의 배지가 투명해진 것을 확인할 수 있었다. 바실러스 벨레젠시스 CMML20-16은 라이족토니아 솔라니 (*Rhizoctonia solani*)와 같은 진균의 주요 세포벽 구성 성분 중 하나인 단백질을 분해함으로써 식물 병원성 진균의 성장을 저해할 수 있다. 또한, 식물의 성장을 촉진하는 인자인 IAA를 약 5 µg/ml 가량 생성하여 잔디의 건강한 생육을 촉진할 수 있다.



<그림 25. 카제인 평판배지에 배양한 CMML20-16의 단백질분해효소 활성 확인 결과 (좌); 젤라틴 평판배지에 배양한 CMML20-16의 젤라틴 분해효소 활성 확인 결과 (우)>

Standard curve for IAA concentration



<그림 26. *Bacillus velezensis* CMML20-16 균주의 식물성장촉진인자 형성능 확인 결과>

표 9. *Bacillus velezensis* CMML20-16 균주가 가진 여러 종류의 효소 활성 및 식물 생육 촉진 인자 활성의 유무

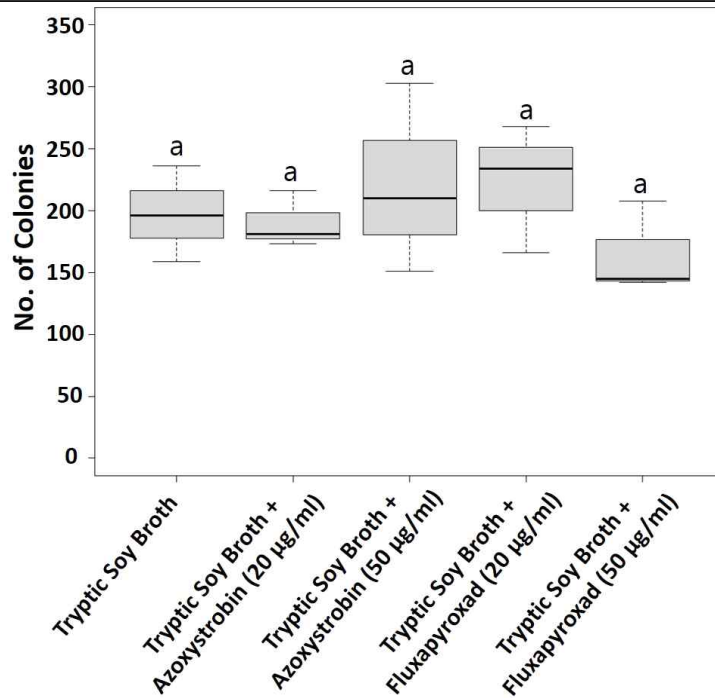
효소	활성 정도
셀룰로오스 분해효소 활성	-
키틴 분해효소 활성	-
단백질 분해효소 활성	+
젤라틴 분해효소 활성	+
IAA 생성능	+

### ③ 선발 미생물의 화학농약에 대한 내성 연구 및 Pot assay로 병 방제 효능 검정

#### - 선발 미생물의 화학농약에 대한 내성 연구

아족시스트로빈 및 플룩사피록사드를 각각 20 µg/ml 씩 처리한 경우 균주의 생장이 잘 이루어졌다. 특히, 아족시스트로빈 및 플룩사피록사드를 각각 50 µg/ml 씩 처리하였을 때도 균주의 생장이 가능 하였으며, 무처리 대조구와 큰 차이를 보이지 않음을 확인할 수 있었다.





<그림 27. *Bacillus velezensis* CMML20-16 균주의 화학농약 (Azoxystrobin, Fluxapyroxad)에 대한 내성 연구>

- 선발된 미생물에 대한 온실 시험 (갈색잎마름병 방제)

갈색잎마름병 방제 효과; 브라운패치 처리구 대비 브라운패치+CMML20-16 균주 처리구에서는 방제가가 약 81.82±4.69 %로 높은 방제가가 나타났다.



<그림 28. 포트 상에서 *Bacillus velezensis* CMML20-16 균주의 갈색잎마름병(Brown Patch)을 발병시킨 잔디에 대한 항균력 확인 결과>

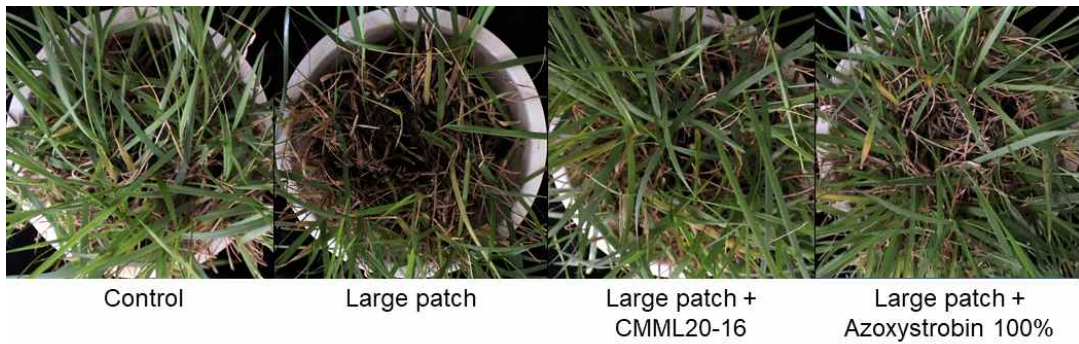
표 10. *Bacillus velezensis* CMML20-16 균주의 갈색잎마름병(Brown Patch)을 발병시킨 잔디에 대한 항균력 수치화

처리구	방제가(%)
브라운패치	12.73±3.64 c
브라운패치+CMML20-16 균주	81.82±4.69 b
브라운패치+아족시스트로빈	98.18±1.82 a

- 선발된 미생물에 대한 온실 시험 (라이족토니아마름병 방제)

라이족토니아마름병 방제 효과; 라지패치 처리구 대비 라지패치+CMML20-16 균주 처리구에서는 방제가가 약 91.67 ±4.17%를 나타냈으며, 시중에 농약으로 사용되는 아족시스트로빈

과 유사한 방제가를 나타낸 것을 확인할 수 있었다.



<그림 29. 포트 상에서 *Bacillus velezensis* CMML20-16 균주의 라이족토니아마름병(Large Patch)을 발병시킨 잔디에 대한 항균력 확인 결과>

표 11. *Bacillus velezensis* CMML20-16 균주의 라이족토니아마름병(Large Patch)을 발병시킨 잔디에 대한 항균력 수치화

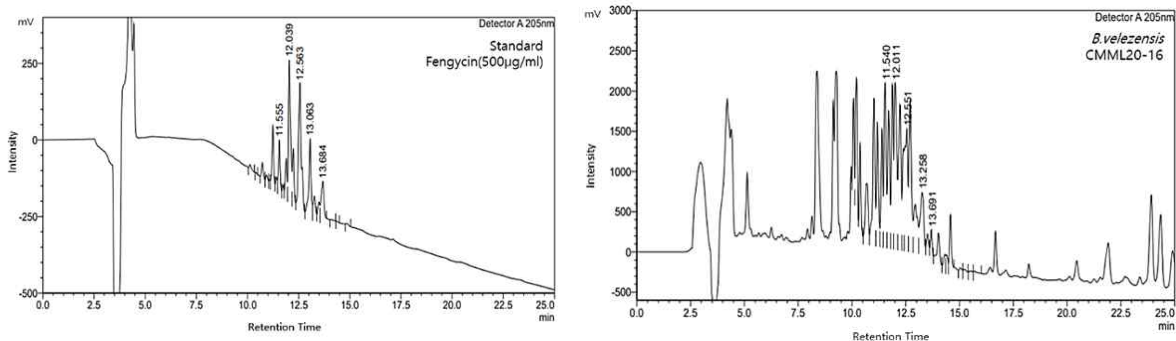
처리구	방제가(%)
라지패치	20.83±2.64 b
라지패치+CMML 20-16 균주	91.67 ±4.17 a
라지패치+아족시스트로빈	100 a

#### ④ 미생물 유래 생리활성 대사산물 분석

CMML20-16의 유전체를 이용하여 antiSMASH bacterial version 프로그램을 통해서 항진균성 성분은 리포펩티드계 항생제인 펜기신(Fengycin)과 설펙틴(Surfactin) gene cluster를 확인하였고, 이 두 항진균 활성 물질이 실제로 CMML20-16에서 생산되는 확인하기 위해서 HPLC 분석을 하였다.

#### - 펜기신(Fengycin) 검출

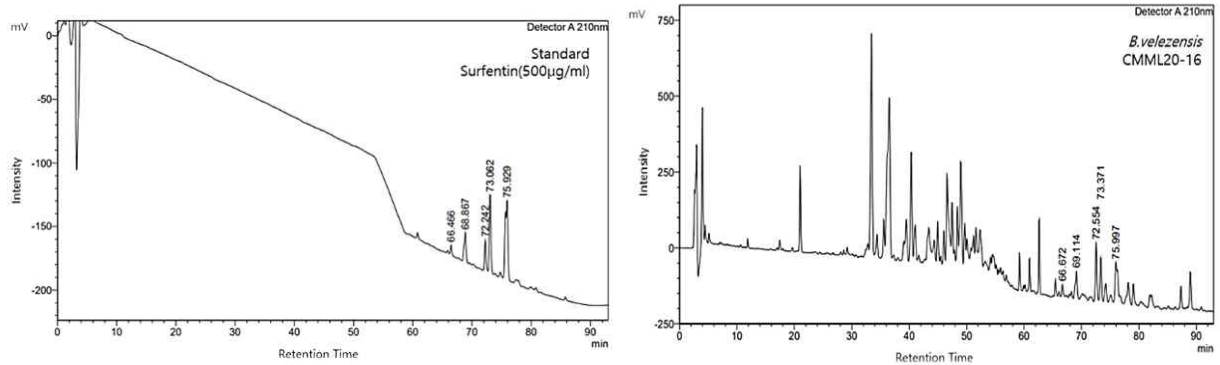
HPLC 분석 결과 머무름 시간 (Retention time)은 11분 내지 15분 사이에 다수의 피크(Peak)가 검출되었고, 이들 피크의 머무름 시간과 표준물질인 펜기신의 머무름 시간을 비교한 결과 거의 같은 시간에 피크가 검출되었다. 이를 통해, *B. velezensis* CMML20-16의 항진균성 성분은 리포펩티드계 항생제인 펜기신(Fengycin)임을 확인할 수 있었다.



<그림 30. 역상 HPLC를 이용한 표준물질 펜기신(500 µg/ml)의 피크(Peak) 나타낸 크로마토그램 (좌); 역상 HPLC를 이용한 *Bacillus velezensis* CMML20-16의 피크 (Peak)를 확인한 결과를 나타낸 크로마토그램 (우)>

## – 설팩틴 검출

HPLC 분석 결과 머무름 시간(Retention time)은 60 내지 90분 사이에 다수의 피크가 검출되었으며, 이들 피크의 머무름 시간과 표준물질인 서팩틴의 머무름 시간을 비교한 결과 거의 같은 시간에 피크가 검출되었다. 이를 통해, *B. velezensis* CMML20-16의 항진균성 성분은 리포펩티드계 항생제인 설팩틴(Surfactin)임을 확인하였다.



<그림 31. 역상 HPLC를 이용한 표준물질 설팩틴(500 µg/ml)의 피크(Peak) 나타낸 크로마토그램 (좌); 역상 HPLC를 이용한 *Bacillus velezensis* CMML20-16의 피크 (Peak)를 확인한 결과를 나타낸 크로마토그램 (우)>

위의 결과를 바탕으로 「바실러스 벨레젠시스 CMML20-16 균주의 배양액 또는 균주 배양액의 추출물을 포함하는 식물병 방제용 조성물, 이의 제조방법 및 식물병 방제 방법」으로 특허 출원 및 기술이전을 하였다.

### 3) 내생균 CMML20-21과 근권균 CMML20-20 활용 잔디병 제어

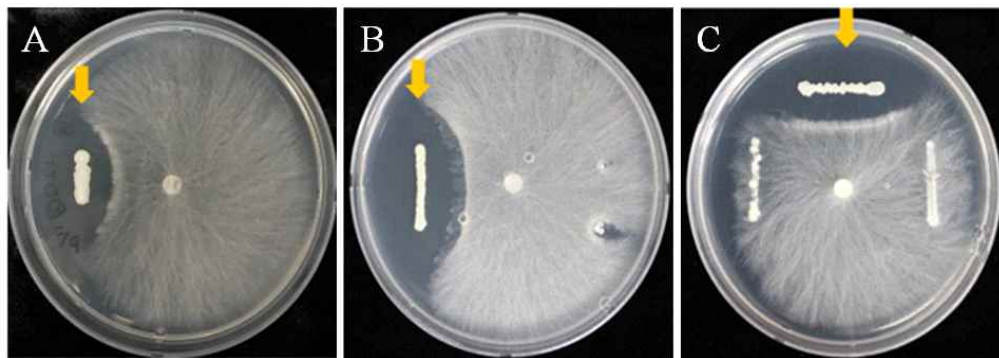
#### ① 잔디 근권 및 내생 미생물 분리 및 선발

골프장(전라남도 화순군 소재) 페어웨이에서 난잔디인 증지에서 건강한 잔디 (뿌리 포함)와 병인든 잔디 및 근권토양 시료 채취하였다. 잔디 근권에서 총 148개의 미생물과 잔디 뿌리에서 총 150개의 내생균 분리하였다.



<그림 32. 잔디 시료 채취 및 잔디 뿌리와 근권 토양 샘플에서 자란 미생물들 사진>

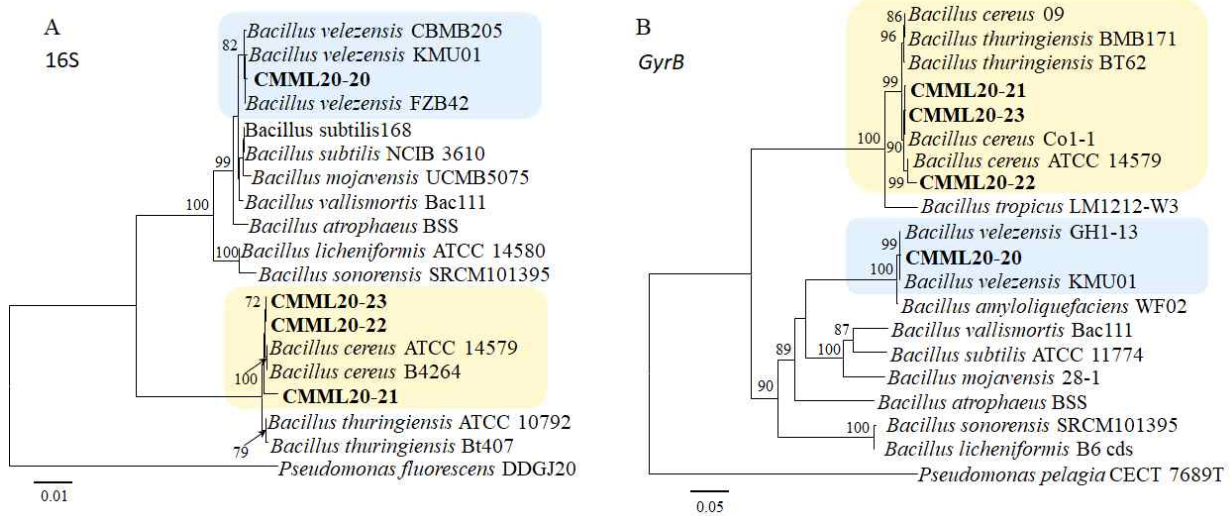
근권과 뿌리에서 분리된 미생물의 브라운패취에 대한 길항능력 검정한 결과 항균활성이 높은 총 6개의 균주가 선발되었다.



<그림 33. 근권과 뿌리에서 분리된 미생물 중 브라운패취병원균에 대한 가장 높은 항균 활성을 보이는 1개의 근권미생물(A)과 2개의 뿌리내생균(B,C)>

#### ② 잔디 근권 및 내생 미생물의 동정 및 배양

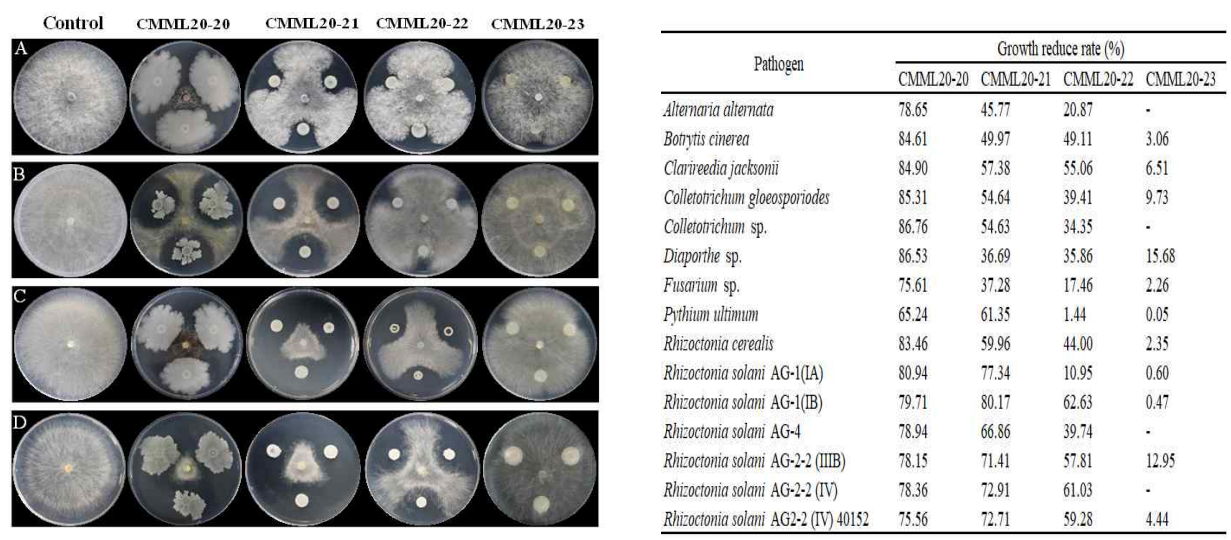
항균활성이 높은 총 3개의 균주의 16S rRNA, gyrB sequence 동정 결과는 근권균 CMML20-20은 *Bacillus velezensis*, 내생균 CMML20-21, CMML20-22, CMML20-23 (negative control)은 *Bacillus cereus*로 확인되었다.



<그림 34. 근권균 CMML20-20, 내생균 CMML20-21, CMML20-22, CMML20-23 계통수 결과 >

③ 근권균 CMML20-20과 내생균 CMML20-21의 효능 검증 및 특성 분석  
- 대치 배양

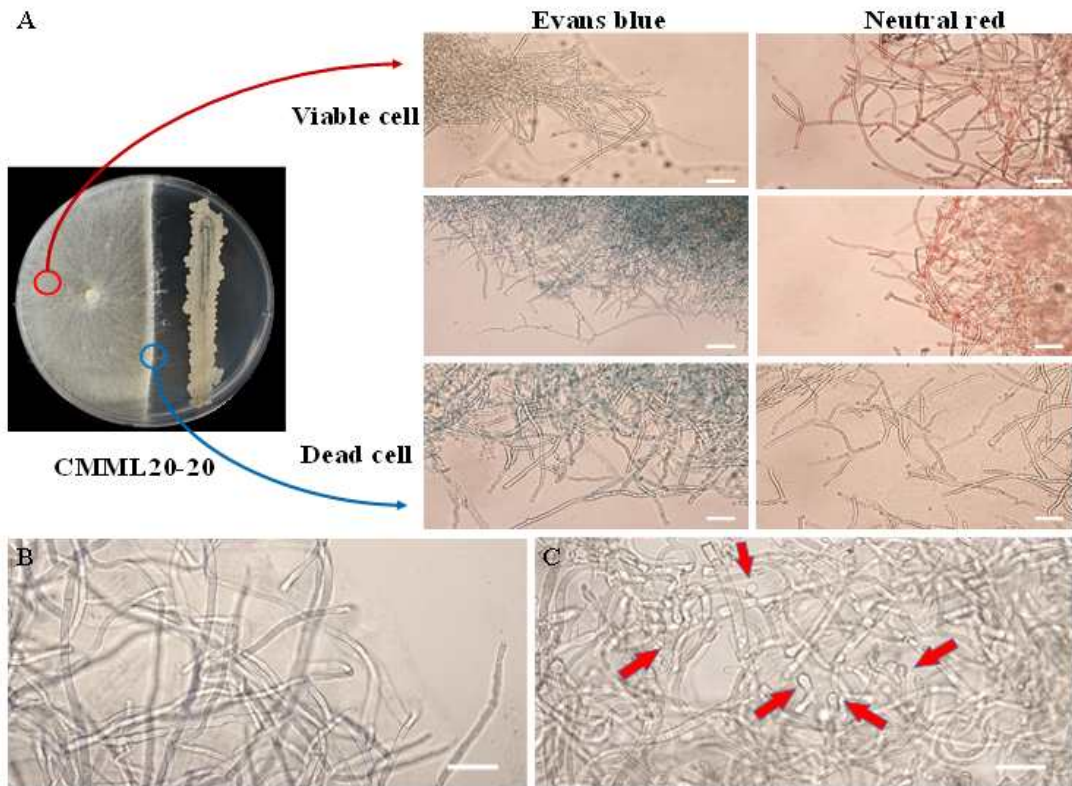
15개의 식물병원균과 대치 배양 결과 잔디 병원균에서 70%이상의 억제율을 확인하였다.



<그림 35. 근권균 CMML20-20, 내생균 CMML20-21, CMML20-22, CMML20-23의 대치배양 결과>

- 대치 배양을 통한 병원균 곰팡이 균사 형태 관찰

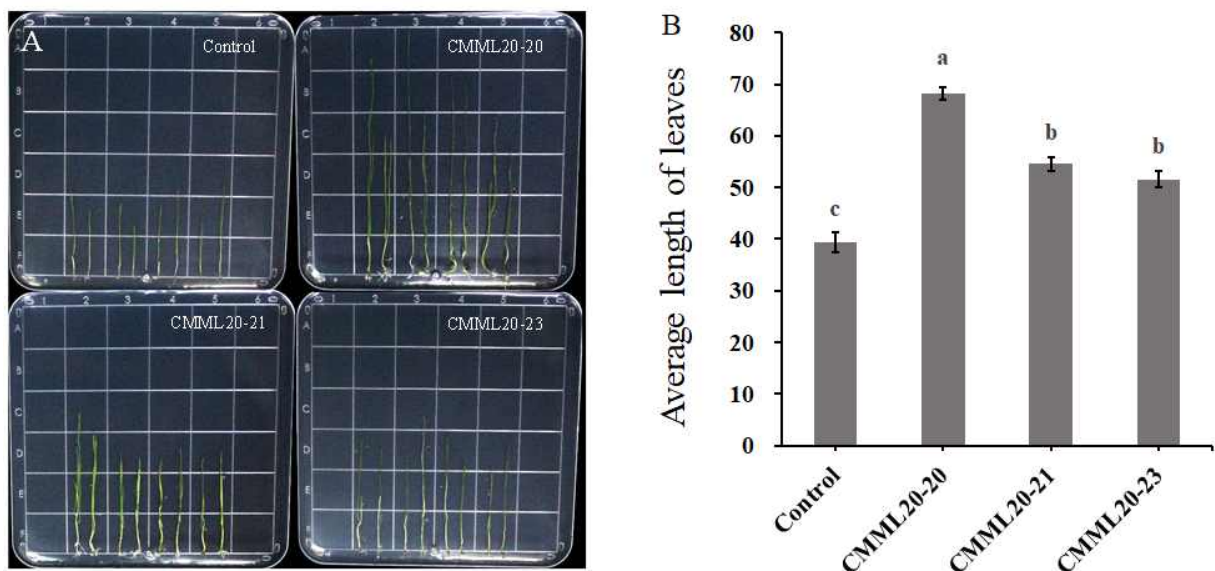
대치 배양을 통한 병원균 곰팡이 세포 형태 관찰 결과로 박테리아 근처에서 자라는 균사체는 파란색으로 염색되었으며, 대조균은 정상 색상만 나타남. 대조적으로 박테리아와 공동 배양된 균사체는 적색으로 염색되지 않음. 대조 영역의 균사체는 억제를 나타내지 않았다. *R. solani*에 대항할 때 말단 균사에서 둥근 세포가 관찰되었다.



<그림 36. 근권균과 대치배양 한 *Rhizoctonia solani* AG2-2(IIIB)의 형태학적 관찰. Bar = 100 $\mu$ m.>

- 잔디 성장 촉진 분석

근권균 *Bacillus velezensis*를 포함한 플레이트에서 크리핑벤트그라스 종자의 길이가 가장 길고, 발아 속도, 발아 수가 가장 많이 관찰되었다. 근권균과 내생균을 포함한 플레이트에서는 대조군과 비교해 볼 때 발아 수, 잎의 길이, 발아 속도가 빨랐다.

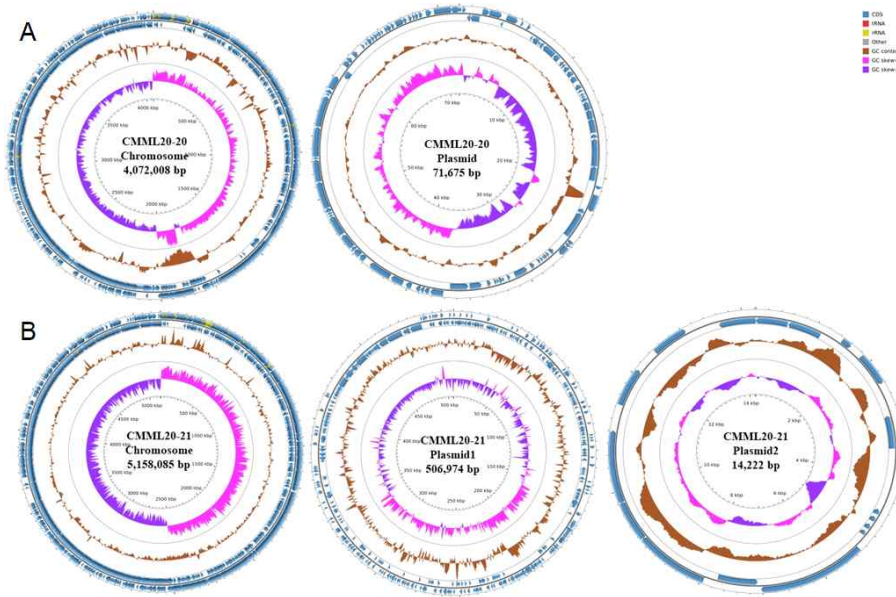


<그림 37. 근권 및 내생 *Bacillus* 균주에 의한 잔디의 식물 성장 촉진 및 비교>

- 균주 유전체 획득 및 분석

Genome analysis 결과로, *B. velezensis* CMML20-20의 사이즈는 4,072,007 bp 이며, 하나의 플라스미드와 46%의 GC content, 3,847개의 단백질 코딩 유전자를 포함하며, 27개의 rRNA, 86개의 tRNA 유전자를 포함하였다. *B. cereus* CMML20-21의 사이즈는 5,158,085 bp

이며, 두개의 플라스미드와 35%의 GC content, 5,020개의 단백질 코딩 유전자를 포함하며, 42개의 rRNA, 107개의 tRNA 유전자를 포함하였다.

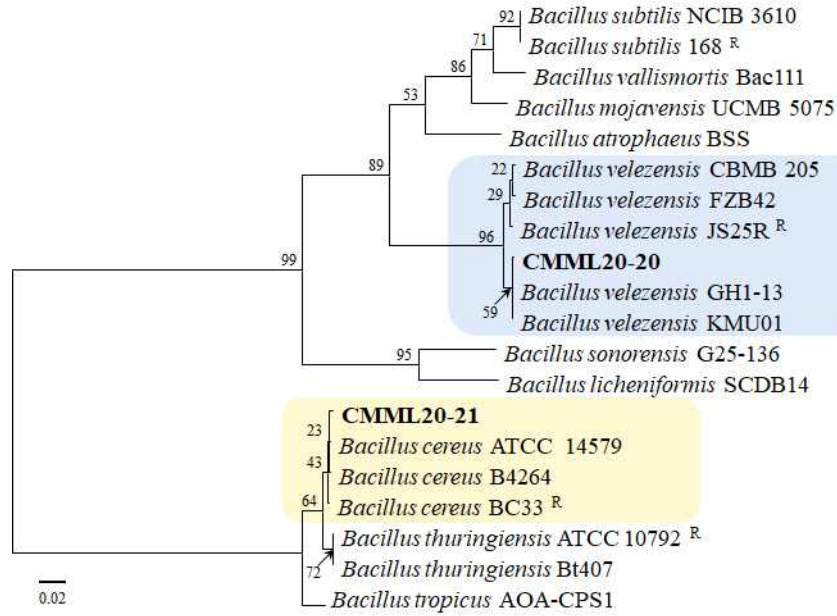


<그림 38. CMML20-20, CMML20-21 균주의 원형 지놈 map>

표 12. CMML20-20, CMML20-21 균주의 원형 지놈 특성

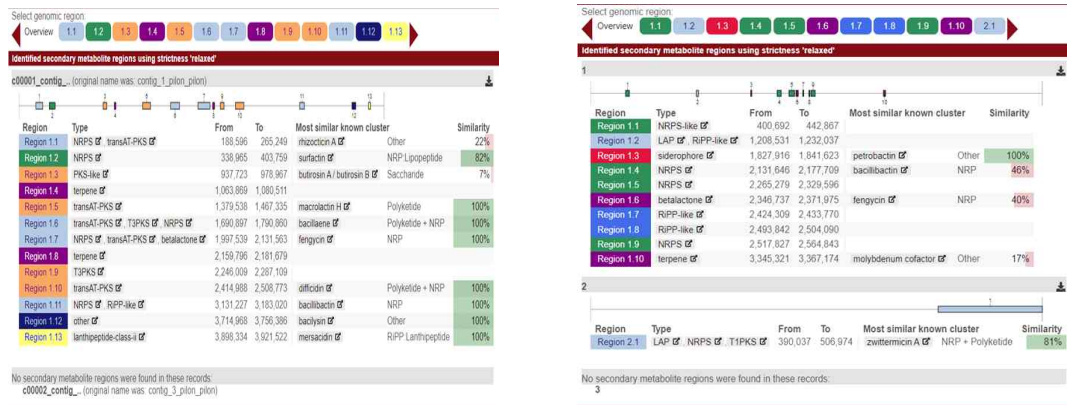
Features	CMML20-20		CMML20-21		
	Chromosome	Plasmid	Chromosome	Plasmid1	Plasmid2
Genome size (bp)	4,072,008	71,675	5,158,085	506,974	14,222
GC-content (%)	46	32	35	32	30
Protein-coding genes (CDSs)	3,847	102	5,020	398	15
rRNA genes	27	-	42	1	-
tRNA genes	86	-	107	-	-

OrthoFinder가 STAG(모든 유전자의 종 트리 추론)를 사용하여 유전자 트리 데이터 세트에서 추론한 종 트리 결과, CMML20-20은 *Bacillus velezensis*, CMML20-21은 *Bacillus cereus*로 확인되었다.



<그림 39. CMML20-20, CMML20-21 균주의 Phylogenomic tree>

Genome sequencing 정보를 기반으로 antiSMASH bacterial version 프로그램을 사용하여 2차 대사물질 gene cluster 분석되었다. CMML20-20은 항진균성 성분은 리포펩티드계 항생제인 펜기신(Fengycin)과 설펙틴(Surfactin) gene cluster가 확인되었고, CMML20-21은 펜기신(Fengycin) gene cluster가 확인되었다.



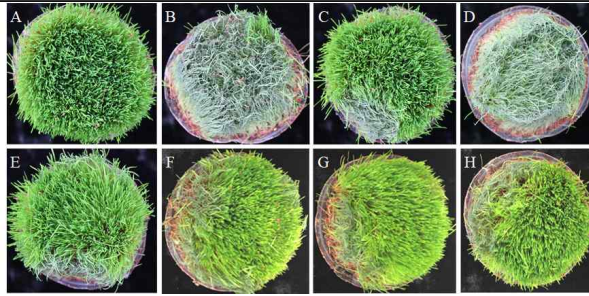
<그림 40. CMML20-20, CMML20-21 균주의 2차 대사물질 gene cluster >

④ 곰팡이병 제어 내생균과 근권균 기반 미생물제제의 혼합처리에 의한 복합제제로서 방제 효능 증대 조건 확립

- 선발된 근권/내생 미생물에 대한 온실 시험 (갈색잎마름병 방제)

갈색잎마름병 방제효과; 브라운패치 처리구 대비 브라운패치+CMML20-20, 브라운패치+CMML20-21, 브라운패치+두 균주혼합 처리구에서는 높은 방제효과가 나타났다.





<그림 41. Pot 분석에서 CMML20-20, CMML20-21 및 CMML20-22를 통해 *Rizoctonia Solani* AG2-2(IIIB) 브라운 패치 질병 제어. A: 대조군, B: 병원균, C: 살균제(아녹시스트로빈), D: CMML20-23(음성 대조군), E: CMML20-20, F: CMML20-21, G: CMML20-22, H: CMML20-20 + CMML20-21>

표 13. Pot에서 CMML20-20, CMML20-21 및 CMML20-22를 통해 *Rizoctonia solani* AG2-2(IIIB) 브라운패치 질병 제어

처리구	방제가(%)
대조군	100 ± 0 a
브라운패치	10.6 ± 1.52 b
브라운패치 + 아족시스트로빈 100%	97 ± 3.03 a
브라운패치 + CMML20-20	95.5 ± 3.11 a
브라운패치 + CMML20-21	89.4 ± 4.93 a
브라운패치 + CMML20-20 + CMML20-21	86.4 ± 4.55 a
CMML20-23 균주 (음성대조군)	12.1 ± 1.92 b

- 선발된 근권/내생 미생물에 대한 온실 시험 (라이족토니아마름병 방제)

라이족토니아마름병 방제 효과; 라지패치 처리구 대비 라지패치+CMML20-20, 라지패치+CMML20-21, 라지패치+두 균주 혼합 처리구에서는 높은 방제가가 나타났다.



<그림 42. *Rizoctonia solani* AG2-2(IV) Pot 분석에서 CMML20-20, CMML20-21 및 CMML20-23에 의한 라지패치 질병 방제. A: 대조군, B: 병원균, C: 살균제(아족시스트로빈), D: CMML20-20, E: CMML20-21, F: CMML20-20 + CMML20-21, G: CMML20-23(음성 대조군)>

표 14. Pot에서 CMML20-20, CMML20-21 및 CMML20-22를 통해 *Rizoctonia solani* AG2-2(IIIB) 라지패치 질병 제어

처리구	방제가(%)
대조군	100 ± 0 a
라지패치	24.2 ± 3.03 c
라지패치 + 아зок시스트로빈 100%	97 ± 1.92 a
라지패치 + CMML20-20	93.9 ± 1.92 a
라지패치 + CMML20-21	93.9 ± 1.92 a
라지패치 + CMML20-20 + CMML20-21	93.9 ± 1.92 a
라지패치 + CMML20-23 (음성대조군)	57.6 ± 3.83 b

- Pot assay 검증된 최적의 혼합처리방법을 크리핑벤트그라스 소면적 포장을 이용한 현장 적용 병 방제 효능 검정 (갈색잎마름병 방제)

갈색잎마름병 방제효과; 브라운패치 처리구 대비 브라운패치+CMML20-20, 브라운패치+CMML20-21, 브라운패치+두 균주 혼합 처리구에서는 높은 방제가가 나타났다.

표 15. 크리핑벤트그라스 소면적포장 에서 CMML20-20과 CMML20-21를 통해 *Rizoctonia solani* AG2-2(IV) 브라운패치 질병 제어

처리구	방제가(%)
대조군	100±0 a
브라운패치	18.2±5.25 b
브라운패치 + Azoxystrobin	93.9±6.06 a
CMML20-20 처리구	100±0 a
CMML20-21 처리구	100±0 a
브라운패치 + CMML20-20	100±0 a
브라운패치 + CMML20-21	87.9±6.06 a
브라운패치 + CMML20-20 + CMML20-21	93.9±6.06a

- Pot assay 검증된 최적의 혼합처리방법을 한국들잔디 소면적 포장을 이용한 현장 적용 병 방제 효능 검정 (라이족토니아마름병 방제)

라이족토니아마름병 방제효과; 라지패치 처리구 대비 라지패치+CMML20-20, 라지패치+CMML20-21, 라지패치+두 균주 혼합 처리구에서는 높은 방제가가 나타났다.

표 16. 한국들잔디 소면적포장 에서 CMML20-20과 CMML20-21를 통해 *Rizoctonia solani* AG2-2(IV) 라지패치 질병 제어

처리구	방제가(%)
대조군	100±0 a
라지패치	30.3±3.03 b
라지패치 + Azoxystrobin	100±0 a
CMML20-20	100±0 a
CMML20-21	100±0 a
라지패치 + CMML20-20	97±3.03 a
라지패치 + CMML20-21	97±3.03 a
라지패치 + CMML20-20 + CMML20-21	100±0 a

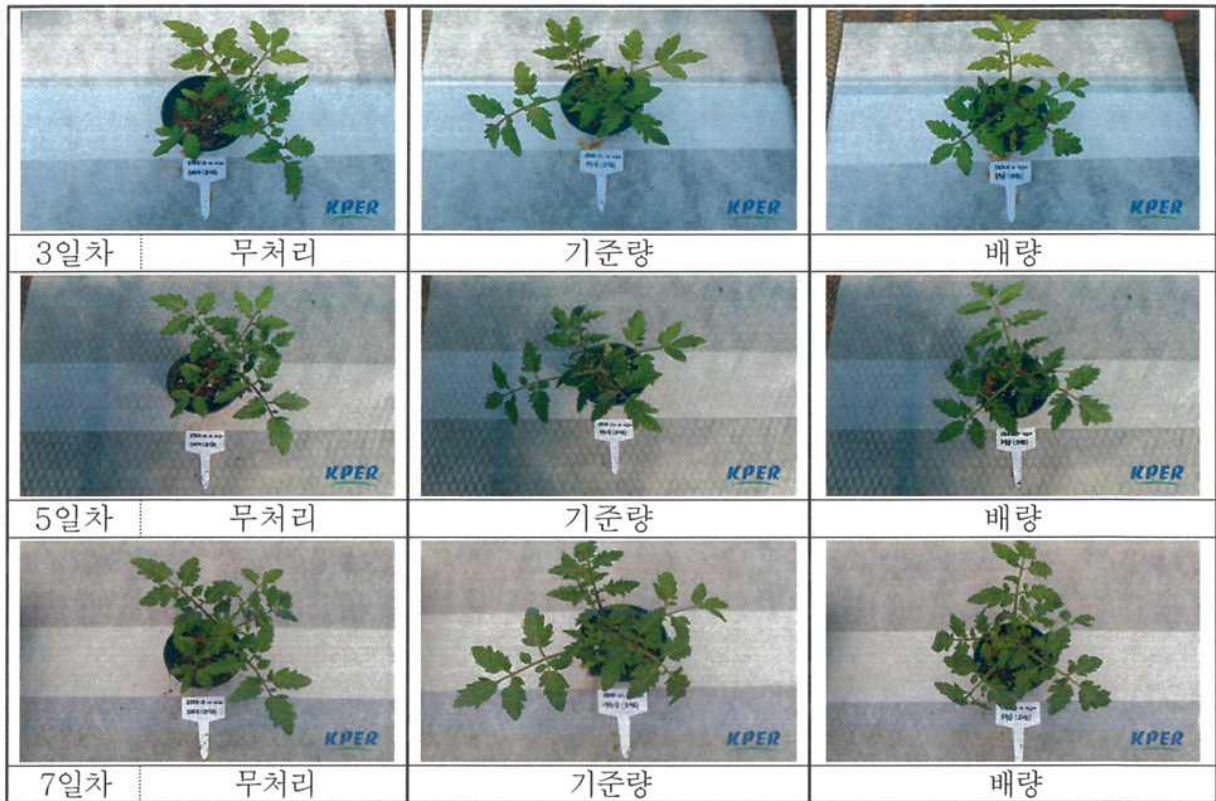
<협동기관 : 보란파마>

① 소면적 포장을 이용한 시제품의 현장적용

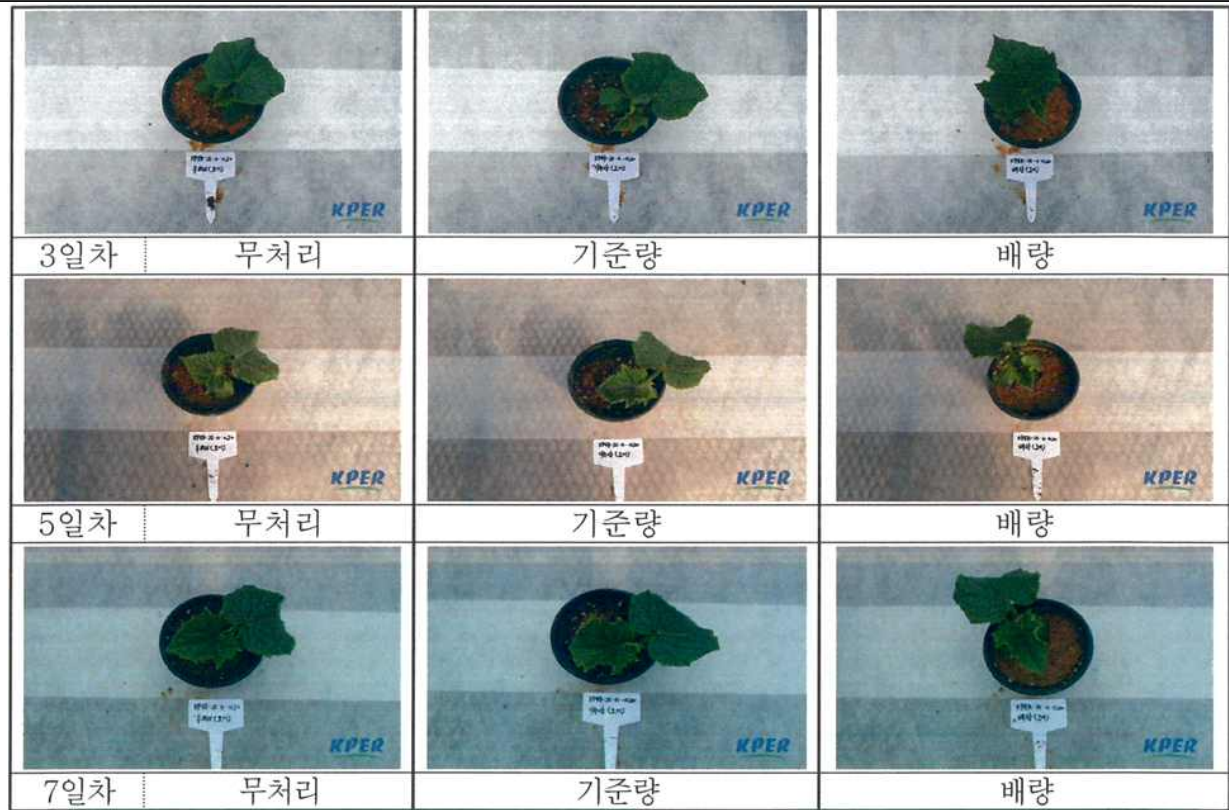
토양 및 잔디시료로부터 신규로 발굴되어 잔디병 원인균 생장억제에 효과를 보이는 선발 미생물의 현장적용 시험을 위하여 전라남도 나주, 경기도 평택에 현장시험지를 조성하였다. 한지형 잔디 크리핑벤트그라스와 난지형 잔디 한국들잔디, 미생물제제 처리구, 미처리구로 구분하여 각각 잔디를 식재하였다. 결과는 위에 전남대학교에서 수행한 소면적 포장 실험과 밀에 현장적용 실험 결과에 나타냈다.

② *B. velezensis* GH1-13 기반 미생물제제(시제품)의 안정성 평가

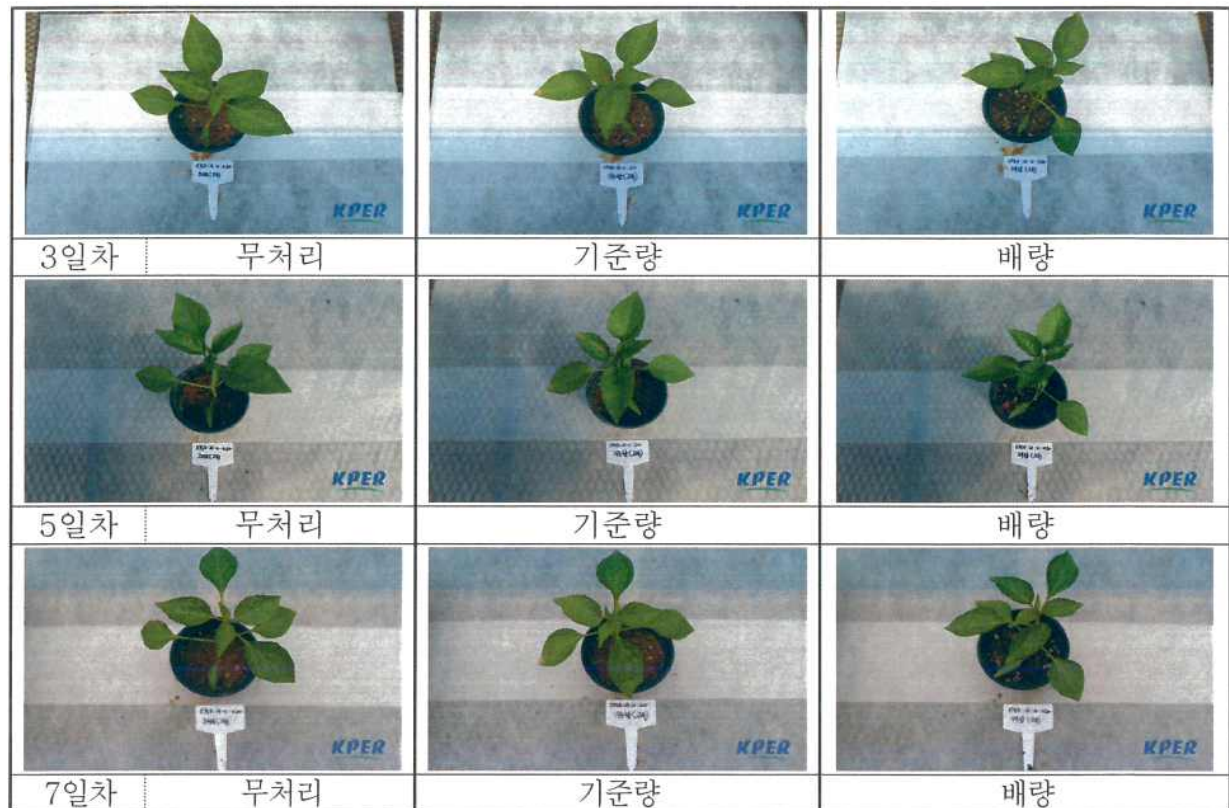
약해시험에 사용된 각 유식물의 품종은 슈퍼도태랑(토마토), 은성백다다기(오이), 칼라볼패(고추), 선풍(상추), 그리고 춘광(배추)이다. 시험작물 정식 1일 후 유묘기에 미생물제제를 경엽처리하였으며, 약제처리 후 작물에 나타나는 외관상 약해 유무를 달관 조사한 결과 5종의 시험작물 모두에서 7일차까지 기준량과 배량에 대하여 약해(약해 판정기준 결과: 0)가 나타나지 않았다. 각 시험의 결과는 아래 그림과 같다.



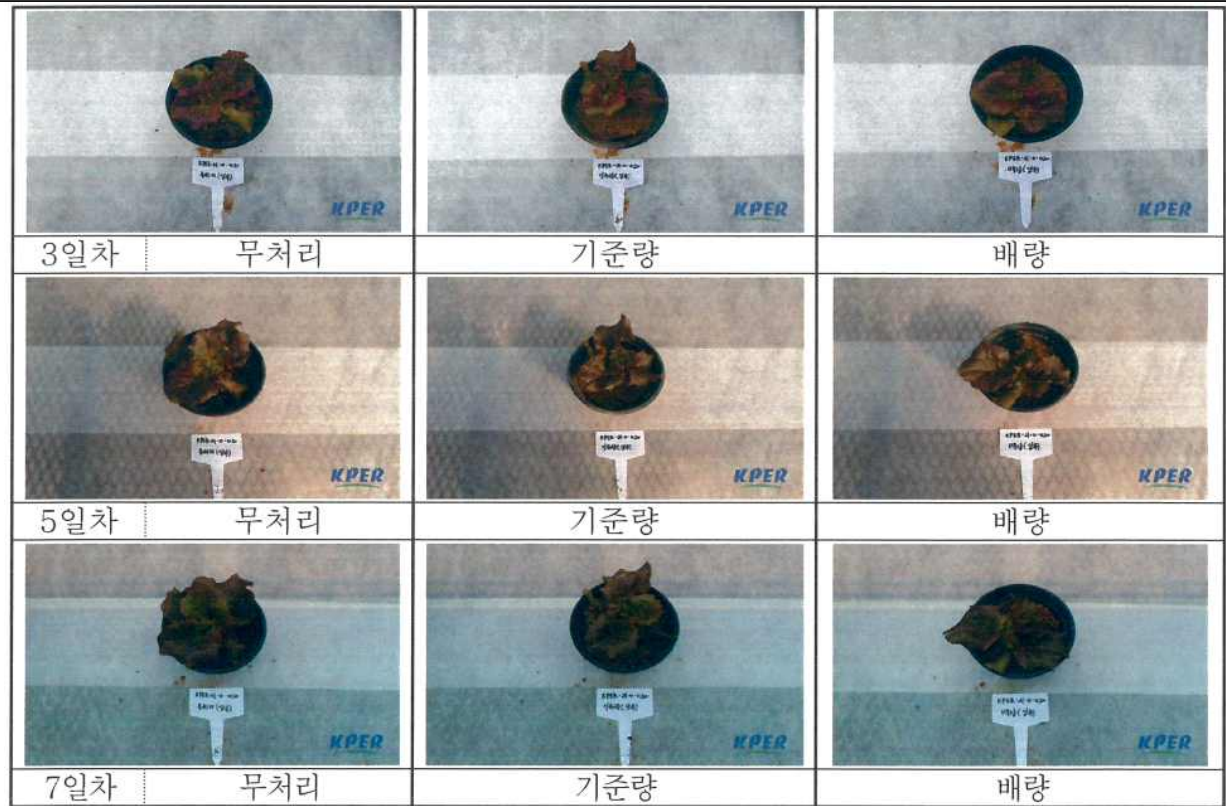
<그림 43. *B. velezensis* GH1-13 미생물제제의 토마토에 대한 약해시험 결과>



<그림 44. *B. velezensis* GH1-13 미생물제제의 오이에 대한 약해시험 결과>



<그림 45. *B. velezensis* GH1-13 미생물제제의 고추에 대한 약해시험 결과>



<그림 46. *B. velezensis* GH1-13 미생물제제의 상추에 대한 약해시험 결과>



<그림 47. *B. velezensis* GH1-13 미생물제제의 배추에 대한 약해시험 결과>

- New Zealand White계 토끼를 이용한 피부자극성시험

New Zealand White계 토끼를 이용하여 미생물제제의 피부자극성시험을 수행하여 일반중독 증상, 치사수, 체중변화 및 피부자극성을 관찰·조사한 결과 시험기간 중 미생물제제 처리에

기인된 치사개체가 관찰되지 않았으며, 중독증상 또한 없었다. 개체별로 시간이 경과함에 따라 체중이 증가하는 추세를 보였다. 시험물질 제거 후 처리부의 국소자극성을 관찰한 결과, 초기 개체에서 4시간 첩포 제거 후 가벼운 부종이 관찰되었으나 1시간 후 소실되었고, 확인 개체에서는 어떠한 피부자극도 관찰되지 않았다.

표 17. 피부반응의 평가

Site	Phases	Animals	Days after treatment			
			0(1hr)	1	2	3
Control site	Erythema & Eschar	A	0	0	0	0
		B	0	0	0	0
		C	0	0	0	0
	Edema	A	0	0	0	0
		B	0	0	0	0
		C	0	0	0	0
Test sites	Erythema & Eschar	A	0	0	0	0
		B	0	0	0	0
		C	0	0	0	0
	Edema	A	0	0	0	0
		B	0	0	0	0
		C	0	0	0	0

초기시험 동물에 각각 3분, 1시간 첩포 제거 후 어떠한 피부반응도 관찰되지 않았고, 4시간 첩포 제거 후 아주 가벼운 부종이 관찰되었다. 그 후, 4시간 첩포를 기준으로 시험물질 노출 종료 후 1, 24, 48 및 72시간에 피부반응을 관찰한 결과, 노출 종료 후 1시간 뒤 부종은 소실되어 정상으로 회복되었으며 이후 동일한 방법으로 확인 시험을 진행하였고, 확인 시험은 시험물질 처리 후 홍반(Erythema) 및 부종(Edema) 등 어떠한 피부반응도 관찰되지 않았다.

**- New Zealand White계 토끼를 이용한 안점막자극성시험**

미생물제제의 안점막자극성시험을 수행한 결과, 미생물제제 0.1ml (2.0×10<sup>6</sup> cfu/ml)를 New Zealand White계 토끼에 투여한 결과 시험기간 중 일반중독증상 및 치사동물은 관찰되지 않았으며, 체중측정결과에서도 모든 개체가 시간이 경과함에 따라 체중이 증가하였다. 시험물질 처리후 24, 48, 72시간의 개체별 평균값을 산출한 결과, 각 개체의 각막 혼탁, 홍채반응의 평균점수는 모두 “0.00”이었고, 결막 발적 및 부종의 평균점수 또한 모두 “0.00”이었다.

표 18. 안반응 및 자극성의 평가

Time	Animals	Corneal opacity: degree of density	Iris	Conjunctiva	
				Redness	Edema
1 hr	A	0	0	0	0
	B	0	0	0	0
	C	0	0	0	0
24 hr	A	0	0	0	0
	B	0	0	0	0
	C	0	0	0	0
48 hr	A	0	0	0	0
	B	0	0	0	0
	C	0	0	0	0
72 hr	A	0	0	0	0
	B	0	0	0	0
	C	0	0	0	0
7 day	A	0	0	0	0
	B	0	0	0	0
	C	0	0	0	0

초기시험 후 어떠한 눈 손상도 관찰되지 않아 동일한 방법으로 확인시험을 진행한 결과, 시험동물 3개체의 비세척군 모두 1시간째 관찰시부터 7일째 관찰시까지 어떠한 자극성도 관찰되지 않았다. 무처리 대조군인 우안 또한 어떠한 자극성도 관찰되지 않았다.

- 랫드를 이용한 급성경구독성/병원성 시험

시험물질 투여 후 3일, 7일, 14일 및 21일째에 시험동물을 부검하여 신장, 뇌, 간장, 폐, 비장, 위, 혈액, 임파절에서의 미생물 수를 측정된 결과, 위에서 미생물이 검출되지 않았다. 미생물제제의 랫드를 이용한 단회 경구 투여시 장기(위)에서는 미생물이 검출되지 않았고, 대변에서 1일째까지 미생물이 검출되었다. 시험 종료시까지 중독증상 및 치사가 없는 것으로 보아 급성독성으로 인한 영향은 없는 것으로 판단하였다.

표 19. 미생물 관찰

장기	투여 후 경과일									
	시험군					대조군				
	1	3	7	14	21	1	3	7	14	21
대변	D <sup>a</sup>	N.D. <sup>b</sup>	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-
신장	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
뇌	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
간장	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
폐	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
비장	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
위	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
혈액	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
임파절	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

a: Detected, b: Not Detected

- 랫드를 이용한 급성경피독성시험

B. *velezensis* GH1-13 미생물제제 시제품을 개체당 처리약량  $4.0 \times 10^7$  cfu로 경피 노출한 결과, 생존한 모든 개체에서 특이한 일반중독증상은 관찰되지 않았으며 치사개체도 또한 관

찰되지 않았다. 모든 시험동물의 체중은 약제투여 후 경과 일에 따라 증가추세를 보였으며 반수치사약량(LD<sub>50</sub>) 평가에서도 개체당 4.0×10<sup>7</sup> cfu씩 단회 경피 투여시 영향이 없는 것으로 판단되었다.

**- 담수어류 잉어(*Cyprinus carpio*)를 이용한 환경독성시험**

잉어(*Cyprinus carpio*)에 대한 담수어류영향시험을 1.3×10<sup>5</sup> cfu/ml의 농도로 30일 동안 반지수식으로 실시한 결과 시험 종료시까지 음성대조군 및 시험물질 처리구에서 모두 치사 개체가 관찰되지 않았고, 어떠한 중독증상도 관찰되지 않았다. 농도유지확인시험 기간 중 0, 3, 4 및 7일에 1.3×10<sup>5</sup> cfu/ml 농도 시험용액을 100배 희석하여 생균수를 측정된 결과 7일차까지 그 수가 유지되었다. 시험기간 중 실험시작일과 미생물 농도 유지를 위하여 시험용수를 교체한 시험용수 교체일에 시험용액의 미생물을 측정된 결과, 시험기간 동안 생균수가 유지됨을 확인 할 수 있었다. 시험기간 중 치사나 병원성을 보이는 개체는 관찰되지 않았고, 시험 종료 후 생존한 전 개체에 대해 부검하여 미생물 감염 여부를 확인한 결과 아가미, 장기 및 근육에 대해 대조군과 비교하였을 때 육안상 차이를 발견할 수 없었다. 이상의 시험결과 *B. velezensis* GH1-13 미생물제제의 잉어에 대한 30일 동안 반수치사농도(LC<sub>50</sub>)는 설정농도 기준으로 1.3×10<sup>5</sup> cfu/ml 초과였고, 최대무작용량은 설정농도 기준으로 1.3×10<sup>5</sup> cfu/ml 이었다.

**표 20. 환경독성시험**

Nominal concentration (cfu/ml)	Number of fish	Cumulative mortality (30 days)	LC50 <sup>a</sup> (cfu/ml)	NOEC <sup>b</sup> (cfu/ml)
Control	10	0		
기준사용량의 1,000배 (1.3×10 <sup>5</sup> )	30	0	>1.3×10 <sup>5</sup>	1.3×10 <sup>5</sup>

a: Median lethal concentration, based on nominal concentration of active ingredient

b: No observed effect concentration

**③ *B. velezensis* CMML20-16 잔디 병해 방제 현장적용 기술 개발**

**- *B. velezensis* CMML 20-16의 잔디 라이족토니아마름병(라지패치) 방제 현장적용**

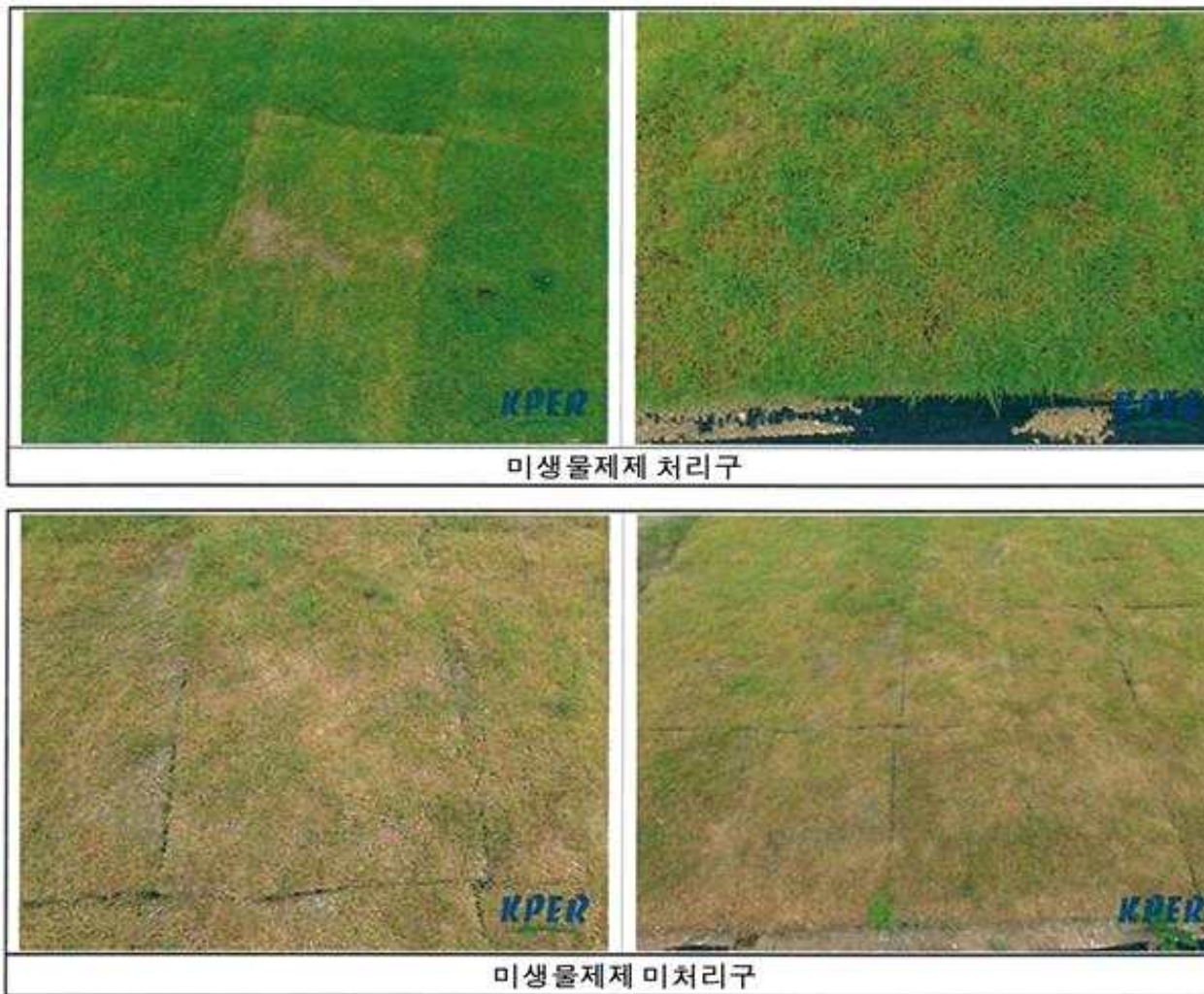
잔디 라이족토니아마름병에 대한 약제방제 효과를 검정하기 위하여 “농약품목등록시험 기준과 방법”에 준하여 시험을 수행하였으며, 평가기준은 무처리 최소발병률 10%이상으로 최종약제처리 7일 후 처리구의 피해면적률을 무처리구와 비교하여 효과를 평가하였다.



표 21. 잔디 라이족토이나마름병(라지패치)에 대한 방제 효과

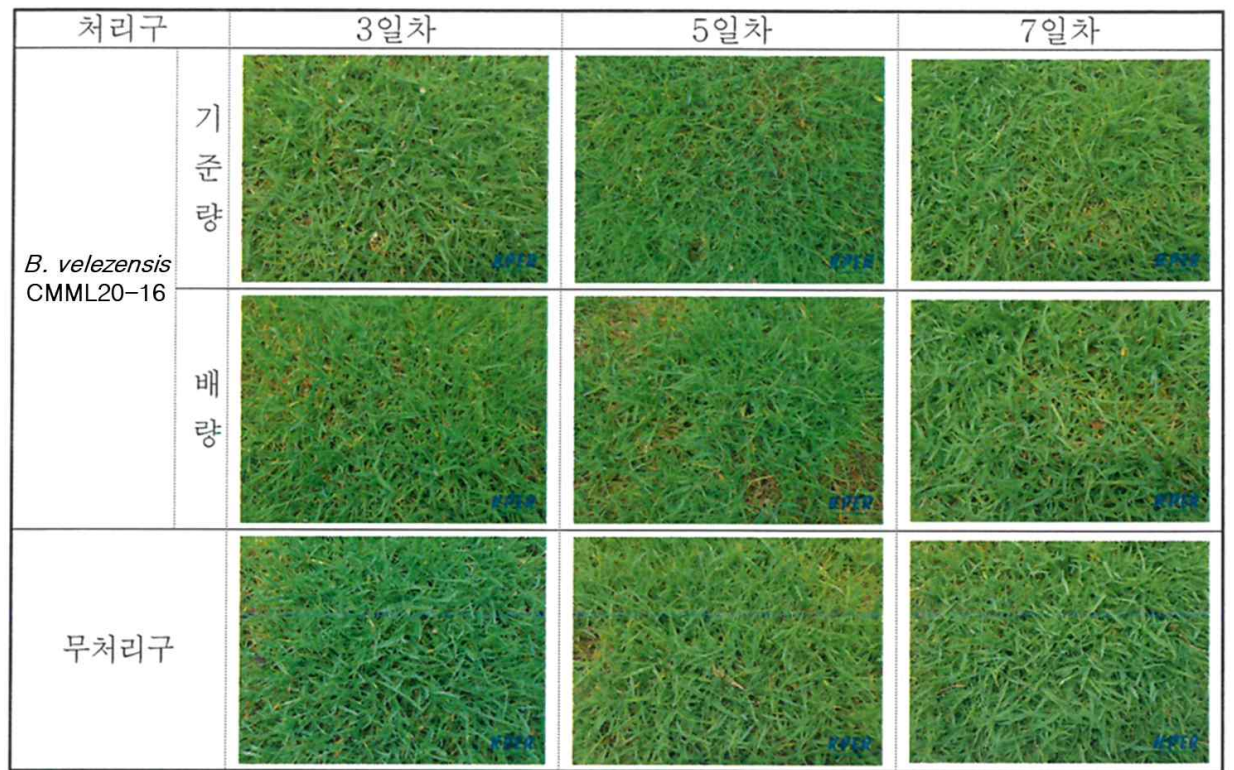
구분	피해면적률(%)				유의차 (DMRT)	방제가 (%)
	A	B	C	평균		
처리구	3.1	4.0	6.5	4.5	b	63.4
미처리구	13.6	10.9	12.3	12.3	a	-

시험을 수행하기 위하여 시험구는 난괴법 3반복으로 배치하였다. 시험의 약효 평가는 최종 약제처리 7일 후 구당 전체 면적에 대한 피해 면적을 조사하여 피해면적률로 표기하였으며, 약해시험평가는 잔디에 기준량, 배량 처리 후 외관상 약해유무를 달관조사하였다. 처리구간의 유의한 검정은 Duncan's multiple range test (DMRT)로 95% 수준에서 유의성을 검정하였다.



<그림 48. B. velezensis CMML20-16의 라지패치에 대한 현장적용시험>

시험을 종합한 결과, 잔디 라이족토이나마름병의 무처리 평균 피해면적률은 12.3%로 약제를 평가하기에 충분한 조건이었다. B. velezensis CMML20-16의 방제효과는 최종약제처리 7일 후 63.4%로 나타났으며, 무처리구 대비 통계적 유의성을 보였다. 또한, 기준량과 배량으로 경엽처리하여 약해유무를 조사한 결과, 외관상 약해는 관찰되지 않았다.



<그림 49. *B. velezensis* CMML20-16의 약해시험>

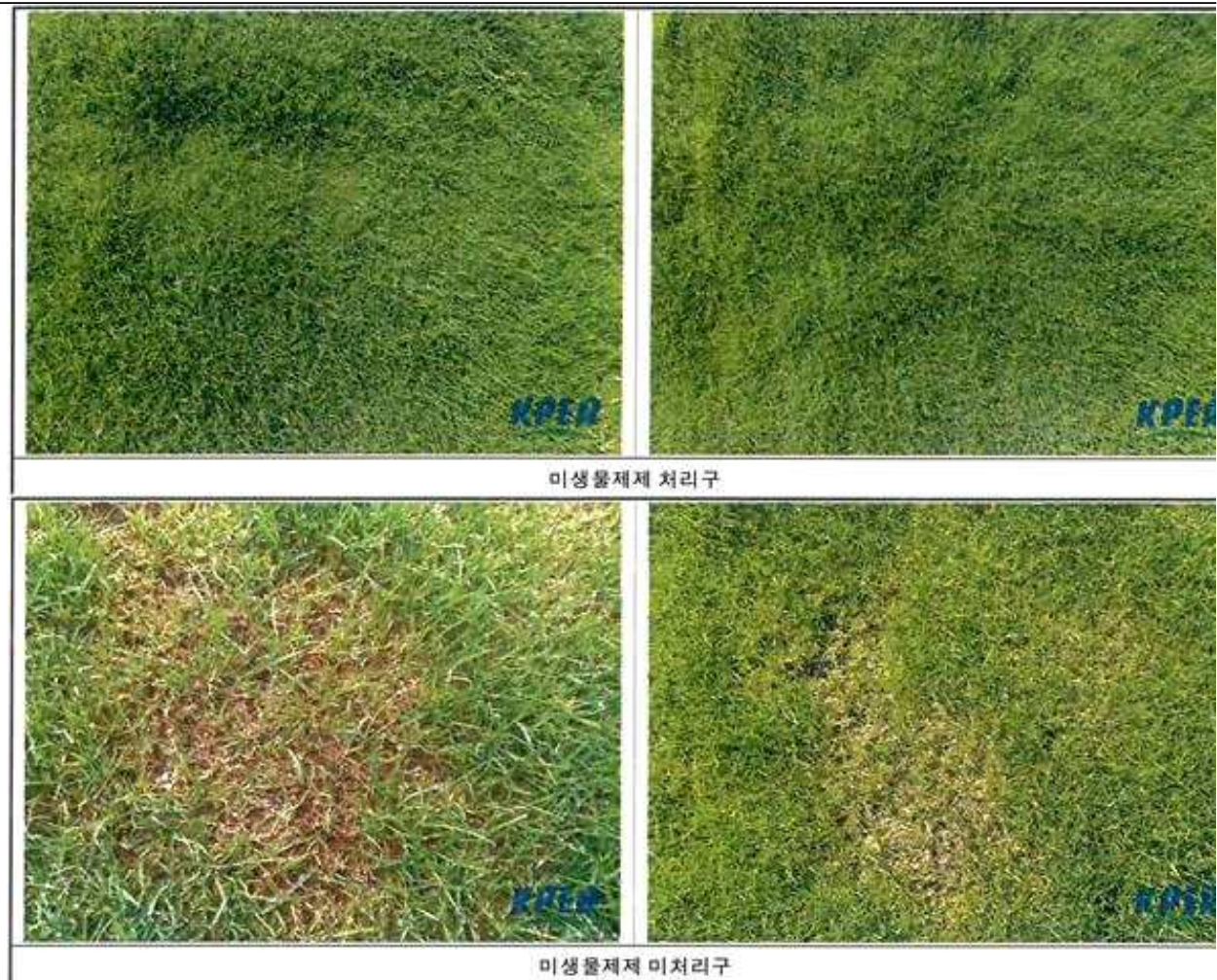
- *B. velezensis* CMML 20-16의 잔디 갈색잎마름병(브라운패치) 방제 현장적용

잔디 갈색잎마름병에 대한 약제방제 효과를 검정하기 위하여 “농약품목등록시험 기준과 방법”에 준하여 시험을 수행하였으며, 평가기준은 무처리 최소발병률 10%이상으로 최종약제 처리 7일 후 처리구의 피해면적률을 무처리구와 비교하여 효과를 평가하였다.

표 22. 잔디 갈색잎마름병(브라운패치)에 대한 방제 효과

구분	피해면적률(%)				유의차 (DMRT)	방제가 (%)
	A	B	C	평균		
처리구	3.3	5.0	7.1	5.2	b	58.1
미처리구	10.0	14.6	12.2	12.3	a	-

시험을 수행하기 위하여 시험구는 난괴법 3반복으로 배치하였다. 시험의 약효 평가는 최종 약제처리 7일 후 구당 전체 면적에 대한 피해 면적을 조사하여 피해면적률로 표기하였으며, 약해시험평가는 잔디에 기준량, 배량 처리 후 외관상 약해유무를 달관조사하였다. 처리구간의 유의한 검정은 Duncan's multiple range test (DMRT)로 95% 수준에서 유의성을 검정하였다.



<그림 50. *B. velezensis* CMML20-16의 브라운패치에 대한 현장적용시험>

시험을 종합한 결과, 잔디 갈색잎마름병의 무처리 평균 피해면적률은 12.3%로 약제를 평가하기에 충분한 조건이었다. *B. velezensis* CMML20-16의 방제효과는 최종약제처리 7일 후 58.1%로 나타났으며, 무처리구 대비 통계적 유의성을 보였다. 또한, 기준량과 배량으로 경엽처리하여 약해유무를 조사한 결과, 외관상 약해는 관찰되지 않았다.

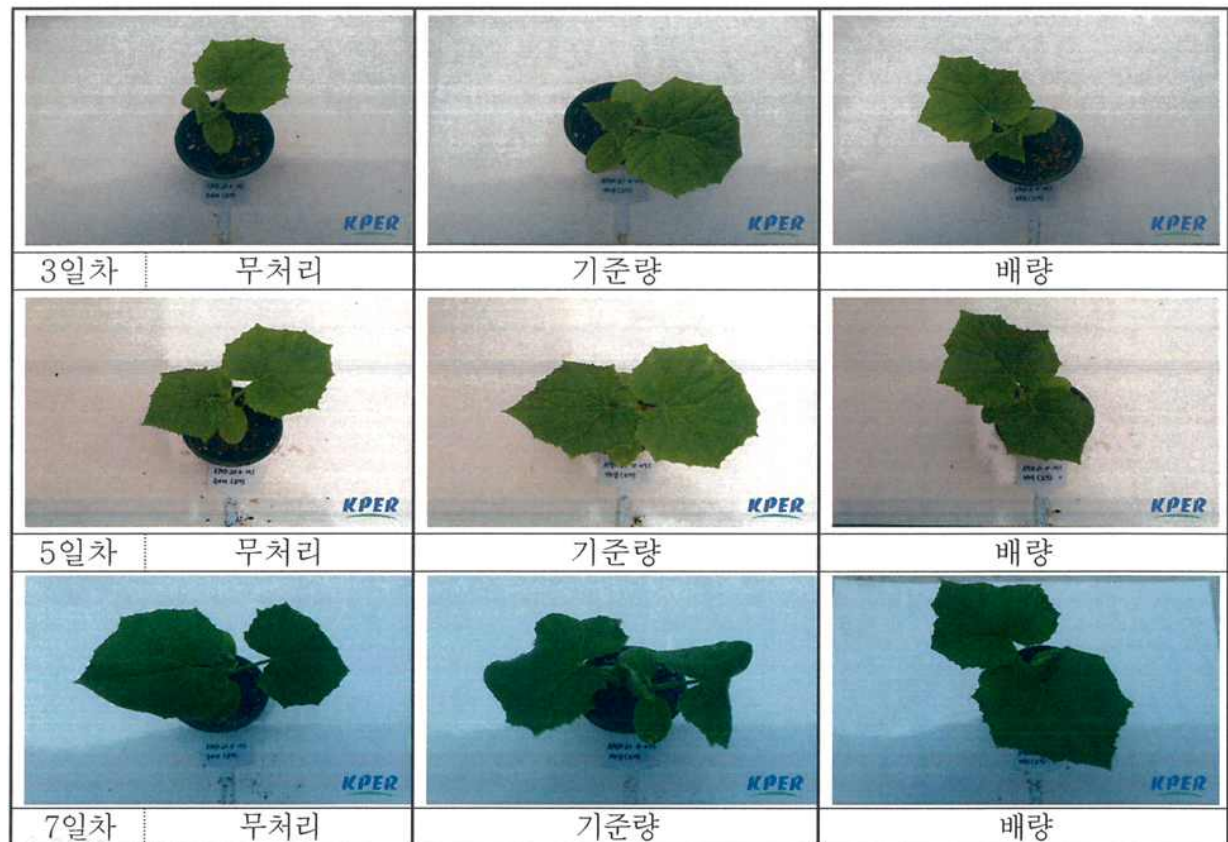
#### ④ *B. velezensis* CMML20-16 시제품의 안정성 평가 및 유기농업자재 등록 및 품질관리 표준화

##### - *B. velezensis* CMML20-16의 유식물 5종에 대한 약해시험

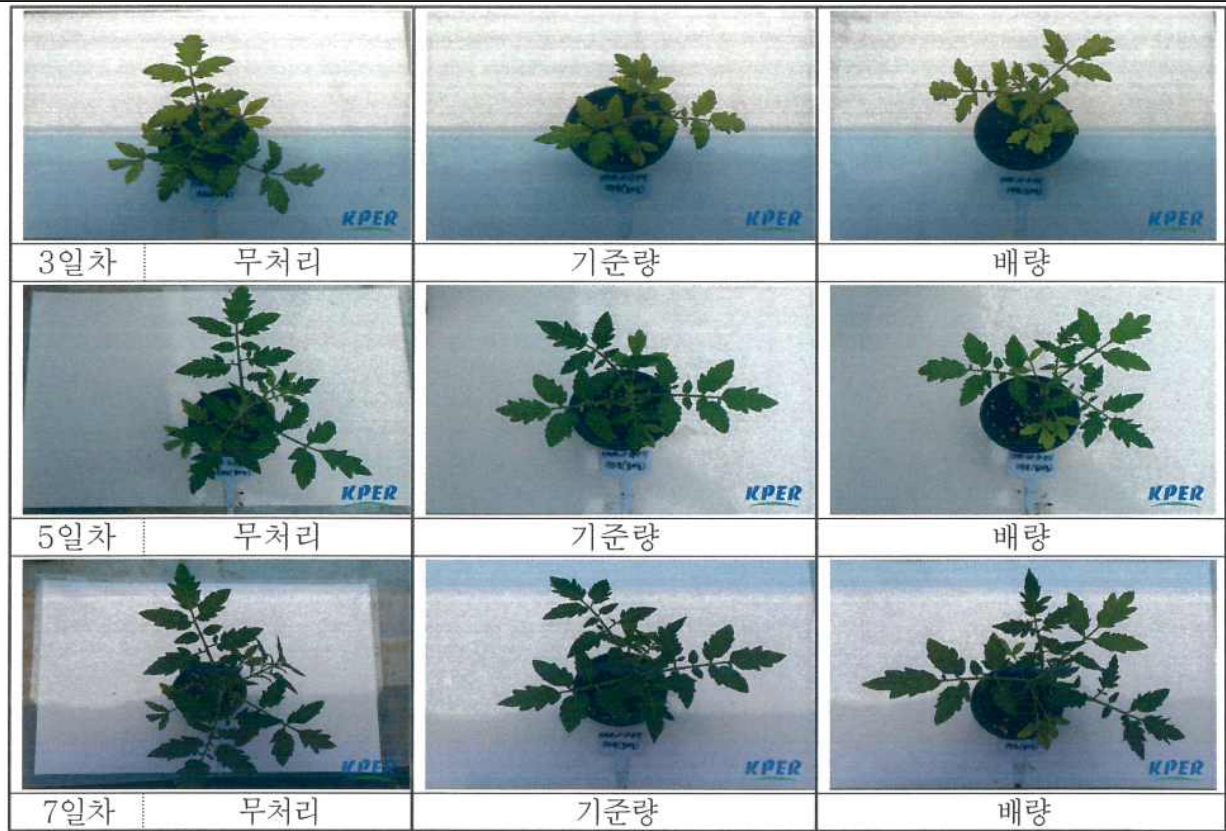
약해시험에 사용된 각 유식물의 품종은 크리핑벤트그라스(잔디), 은성백다다기(오이), 슈퍼도태랑(토마토), 선풍(상추), 그리고 칼라볼패(고추)이다. 시험작물 정식 1일 후 유묘기에 미생물제제를 경엽처리하였으며, 약제처리 후 작물에 나타나는 외관상 약해 유무를 달관 조사한 결과 5종의 시험작물 모두에서 7일차까지 기준량과 배량에 대하여 약해(약해 판정기준 결과: 0)가 나타나지 않았다. 각 시험의 결과는 아래 그림과 같다.



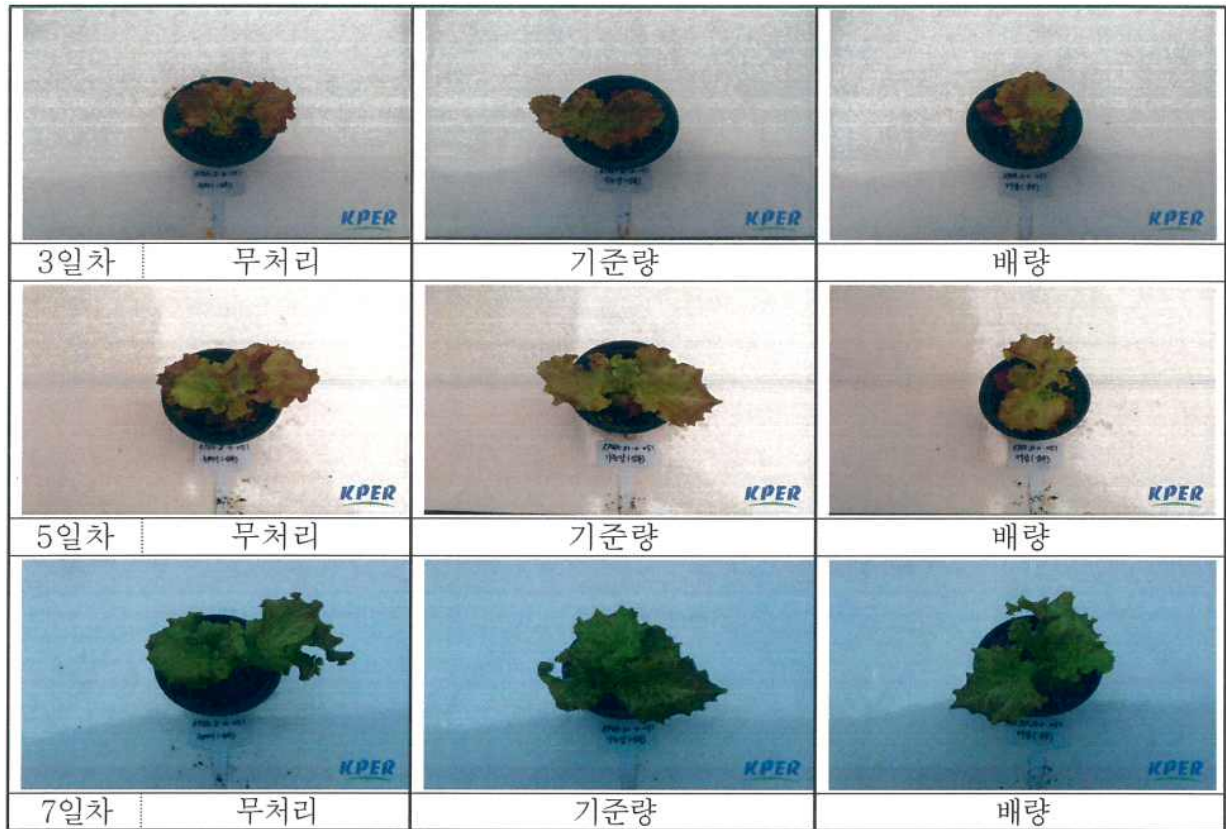
<그림 51. *B. velezensis* CMML20-16 미생물제제의 잔디에 대한 약해시험 결과>



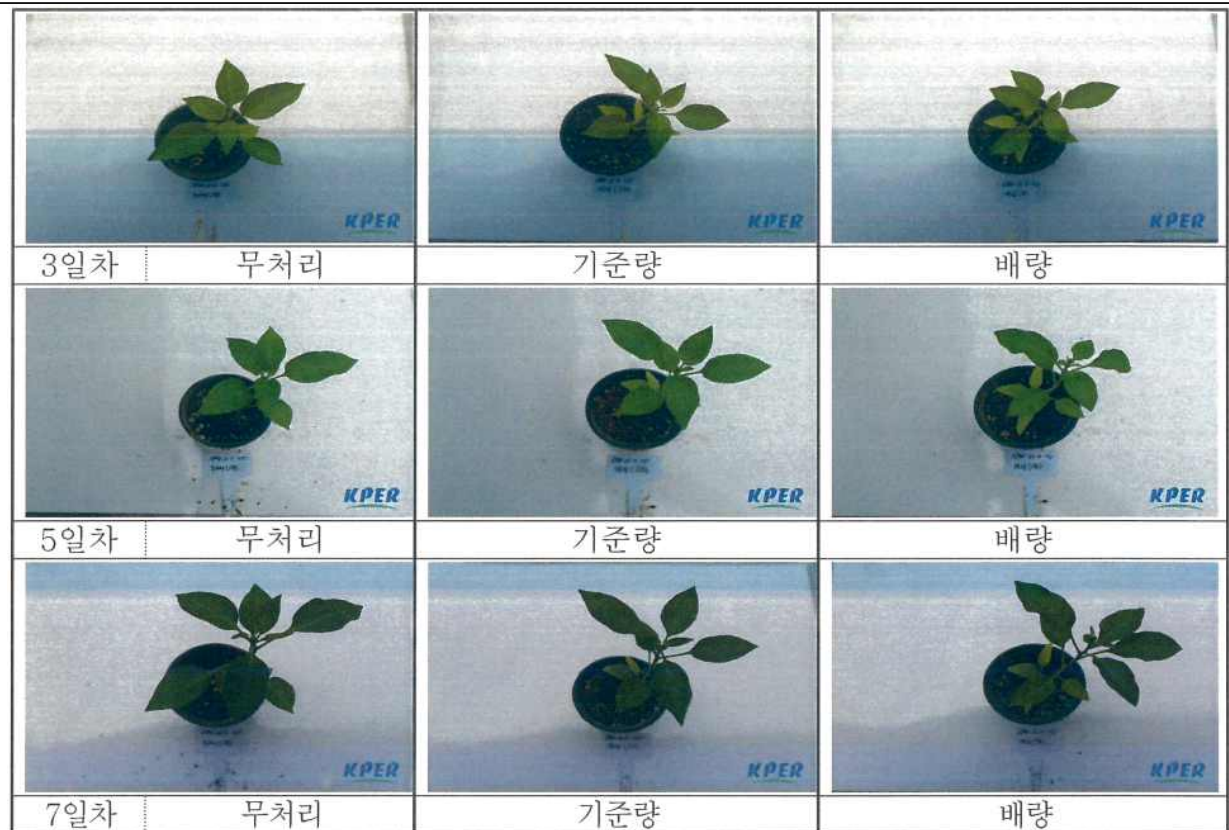
<그림 52. *B. velezensis* CMML20-16 미생물제제의 오이에 대한 약해시험 결과>



<그림 53. *B. velezensis* CMML20-16 미생물제제의 토마토에 대한 약해시험 결과>



<그림 54. *B. velezensis* CMML20-16 미생물제제의 상추에 대한 약해시험 결과>



<그림 55. *B. velezensis* CMML20-16 미생물제제의 고추에 대한 약해시험 결과>

- New Zealand White계 토끼를 이용한 피부자극성시험

New Zealand White계 토끼를 이용하여 미생물제제의 피부자극성시험을 수행하여 일반중독 증상, 치사수, 체중변화 및 피부자극성을 관찰·조사한 결과 시험기간 중 미생물제제 처리에 기인된 치사개체가 관찰되지 않았으며, 중독증상 또한 없었다. 개체별로 시간이 경과함에 따라 체중이 증가하는 추세를 보였다. 시험물질 제거 후 처리부의 국소자극성을 관찰한 결과, 미생물제제 처리 후 홍반 및 부종 등의 어떠한 피부반응도 관찰되지 않았다.

표 23. 피부반응의 평가

Site	Phases	Animals	Days after treatment			
			0(1hr)	1	2	3
Control site	Erythema & Eschar	A	0	0	0	0
		B	0	0	0	0
		C	0	0	0	0
	Edema	A	0	0	0	0
		B	0	0	0	0
		C	0	0	0	0
Test sites	Erythema & Eschar	A	0	0	0	0
		B	0	0	0	0
		C	0	0	0	0
	Edema	A	0	0	0	0
		B	0	0	0	0
		C	0	0	0	0

- New Zealand White계 토끼를 이용한 안점막자극성시험

미생물제제 0.1ml ( $2.0 \times 10^6$  cfu/ml)를 New Zealand White계 토끼에 투여한 결과 시험기간 중 일반중독증상 및 치사동물은 관찰되지 않았으며, 체중측정결과에서도 모든 개체가 시간이 경과함에 따라 체중이 증가하였다. 시험물질 처리 후 24, 48, 72시간의 개체별 평균값을 산출한 결과, 각 개체의 각막 혼탁, 홍채반응의 평균점수는 모두 “0.00”이었고, 결막 발적 및 부종의 평균점수 또한 모두 “0.00”이었다.

표 24. 안반응 및 자극성의 평가

Time	Animals	Corneal opacity: degree of density	Iris	Conjunctiva	
				Redness	Edema
1 hr	A	0	0	0	0
	B	0	0	0	0
	C	0	0	0	0
24 hr	A	0	0	0	0
	B	0	0	0	0
	C	0	0	0	0
48 hr	A	0	0	0	0
	B	0	0	0	0
	C	0	0	0	0
72 hr	A	0	0	0	0
	B	0	0	0	0
	C	0	0	0	0
7 day	A	0	0	0	0
	B	0	0	0	0
	C	0	0	0	0

초기시험 후 어떠한 눈 손상도 관찰되지 않아 동일한 방법으로 확인시험을 진행한 결과, 시험동물 3개체의 비세척군 모두 1시간째 관찰시부터 7일째 관찰시까지 어떠한 자극성도 관찰되지 않았다. 무처리 대조군인 우안 또한 어떠한 자극성도 관찰되지 않았다.

#### - 랫드를 이용한 급성경구독성/병원성 시험

시험물질 투여 후 3일, 7일, 14일 및 21일째에 시험동물을 부검하여 신장, 뇌, 간장, 폐, 비장, 위, 혈액, 임파절에서의 미생물 수를 측정한 결과, 위에서 미생물이 검출되지 않았다. 미생물제제의 랫드를 이용한 단회 경구 투여시 장기(위)에서는 미생물이 검출되지 않았고, 대변에서 1일째까지 미생물이 검출되었다. 시험 종료시까지 중독증상 및 치사가 없는 것으로 보아 급성독성으로 인한 영향은 없는 것으로 판단하였다.

표 25. 미생물 관찰

장기	투여 후 경과일									
	시험군					대조군				
	1	3	7	14	21	1	3	7	14	21
대변	N.D <sup>a</sup>	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-
신장	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
뇌	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
간장	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
폐	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
비장	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
위	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
혈액	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
임파절	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

a: Not Detected

**- 랫드를 이용한 급성경피독성시험**

*B. velezensis* CMML20-16 미생물제제 시제품을 개체당 처리 약량  $1.0 \times 10^8$  cfu로 경피 노출한 결과, 생존한 모든 개체에서 특이한 일반중독증상은 관찰되지 않았으며 치사개체도 또한 관찰되지 않았다. 모든 시험동물의 체중은 약체투여 후 경과 일에 따라 증가추세를 보였으며 반수치사약량(LD<sub>50</sub>) 평가에서도 개체당  $1.0 \times 10^8$  cfu씩 단회 경피 투여시 영향이 없는 것으로 판단되었다.

**- 꿀벌(*Apis mellifera*)를 이용한 환경독성시험**

노출 후 9일차 경과 시, 대조군의 누적 치사율이 24.0%(누적 치사수 18/75개체)로 20.0%를 초과함에 따라 관찰을 종료하였다. 사용기준양 대비 1배, 10배, 100배 농도에 노출된 처리구의 누적 치사율은 관찰종료일을 기준으로 각각 33.3%, 36.0% 및 41.3%이었다. 관찰기간동안 치사개체 외의 대조군과 시험물질 처리군에서 무기력 증상을 보인개체가 소수 관찰되었다. Dunnett t-test 통계처리를 적용한 결과, 대조군과 처리구 사이에서 모두 통계적으로 유의하지 않아(p-value 각 0.551, 0.372, 0.150 >0.05) 꿀벌에 대한 영향이 없는 것으로 나타났다.



표 26. 꿀벌 mortality

구분	꿀벌	Cumulative mortality after exposure										9days mortality (Death/Total)
		4H	1D	2D	3D	4D	5D	6D	7D	8D	9D	
대조군	A	0	0	0	1	1	2	2	3	4	4	24.0% (18/75)
	B	0	0	0	0	2	2	2	3	5	8	
	C	0	0	0	1	2	4	4	4	5	6	
	<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>10</b>	<b>14</b>	<b>18</b>	
1배 처리군	A	0	0	0	1	1	1	3	4	7	12	33.3% (25/75)
	B	0	0	0	0	0	1	1	3	5	6	
	C	0	0	0	1	1	1	3	4	6	7	
	<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>11</b>	<b>18</b>	<b>25</b>	
10배 처리군	A	0	0	0	1	1	3	4	5	7	8	36.0% (27/75)
	B	0	0	0	0	0	0	2	5	5	9	
	C	0	0	0	0	2	2	4	6	8	10	
	<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>16</b>	<b>20</b>	<b>27</b>	
100배 처리군	A	0	0	0	0	2	3	5	6	9	13	41.3% (31/75)
	B	0	0	0	1	1	3	4	5	6	7	
	C	0	0	0	1	2	3	3	6	7	11	
	<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>9</b>	<b>12</b>	<b>17</b>	<b>22</b>	<b>31</b>	

- 담수어류 잉어(*Cyprinus carpio*)를 이용한 환경독성시험

잉어(*Cyprinus carpio*)에 대한 담수어류영향시험을  $1.0 \times 10^6$  cfu/ml의 농도로 30일 동안 반수치사농도로 실시한 결과 시험 종료시까지 음성대조군 및 시험물질 처리구에서 모두 치사 개체가 관찰되지 않았고, 어떠한 중독증상도 관찰되지 않았다. 농도유지확인시험 기간 중 0, 3, 4 및 7일에  $1.0 \times 10^6$  cfu/ml 농도 시험용액을 100배 희석하여 생균수를 측정하고 결과 7일차까지 그 수가 유지되었다. 시험기간 중 실험시작일과 미생물 농도 유지를 위하여 시험용수를 교체한 시험용수 교체일에 시험용액의 미생물을 측정하고 결과, 시험기간 동안 생균수가 유지됨을 확인할 수 있었다. 시험기간 중 치사나 병원성을 보이는 개체는 관찰되지 않았고, 시험 종료 후 생존한 전 개체에 대해 부검하여 미생물 감염 여부를 확인한 결과 아가미, 장기 및 근육에 대해 대조군과 비교하였을 때 육안상 차이를 발견할 수 없었다. 이상의 시험결과 *B. velezensis* CMML20-16 미생물제제의 잉어에 대한 30일 동안 반수치사농도(LC<sub>50</sub>)는 설정농도 기준으로  $1.0 \times 10^6$  cfu/ml 초과였고, 최대무작용량은 설정농도 기준으로  $1.0 \times 10^6$  cfu/ml 이었다.

표27. 환경독성시험

Nominal concentration (cfu/ml)	Number of fish	Cumulative mortality (30 days)	LC50 <sup>a</sup> (cfu/ml)	NOEC <sup>b</sup> (cfu/ml)
Control	10	0	> $1.0 \times 10^6$	$1.0 \times 10^6$
기준사용량의 1,000배 ( $1.0 \times 10^6$ )	30	0		

a: Median lethal concentration, based on nominal concentration of active ingredient

b: No observed effect concentration

## - 잔디병 방제용 미생물제제(시제품)의 유기농업자재 등록

상기 시험방법으로 도출된 약효, 약해 및 환경독성시험 결과를 근거로 유기농업자재 공시를 완료하였다(제 공시-3-4-038). 재단법인 농축산용미생물산업육성지원센터 내 미생물 배양 및 제형 설비를 적극적으로 활용하기 위하여 공동연구기관인 보란패치가 센터 내 벤처지원실에 입주를 하였다. 보란패치그린으로 명명한 시제품의 대량생산을 위하여 생산공정을 확립하였으며 포장용기 및 포장지 선정 등 제품의 사업화를 위한 준비단계에 돌입하였다. 유기농업자재 표시사항의 유효생균수는 최소 기준인  $1.0 \times 10^6$  CFU/ml로 하였으나 실제 제품에 함유된 생균수는 생산공정 확립에 따른  $1.0 \times 10^9$  CFU/ml 이상을 규격화 하여 유통 및 소비 단계에서 발생하는 생균 감소를 대비하였다.



<그림 56. 보란패치그린 시제품과 유기농업자재 공시서 및 표시사항>

## ⑤ 사용 매뉴얼 제작·보급 및 교육·컨설팅

### - 잔디병 방제 미생물제제 사용 매뉴얼 개발·보급 및 현장 사용자 교육 및 컨설팅

주요 잔디병 방제에 탁월한 효능을 지닌 신규 토착미생물 *B. velezensis* CMML20-16을 주성분으로 하는 미생물제제 “보란패치 그린”의 사업화 및 보급을 위하여 사용자 매뉴얼을 개발하였다. 사용자 매뉴얼은 자재의 구분, 주성분, 보증성분량의 유기농업자재에 공시되는 항목들을 포함하며, 제품의 이화학적 특성을 설명하여 현장 사용자의 이해를 도왔다. 제품의 적용 대상이 되는 잔디의 주요 질병중 적용 가능한 대표적 병해(라이족토니아마름병, 갈색잎마름병)를 기재하였고, 사용시기, 사용방법, 사용량에 대한 기본적인 정보를 나열하였다. 살아있는 미생물을 포함하는 제품이므로 사용상 주의사항을 명시하여 현장에서 오남용하는 것을 미연에 방지하였다.

보란패치 그린	
자재구분	병해관리
자재명	토착미생물제제
주성분	미생물 배양물 100%
보증성분량	Bacillus velezensis CMML 20-16 1.0 X 10 <sup>8</sup> CFU/mL 이상
제조업체	보란파마

□ 이화학적 특성

- 보란패치 그린은 국내 토착 죽균 미생물을 활용한 환경친화적 유기농업자재입니다.
- 잔디의 근권(根圈)에서 분리한 토착미생물 바실러스 벨레젠시스 CMML 20-16 균주는 다양한 환경에서 생장할 수 있어 토양 적응성 및 정착력이 매우 높습니다.
- 잔디 주요 병해 원인 균류에 대해 화학농약과 비슷한 수준의 탁월한 방제 효과를 지닙니다.

□ 사용방법

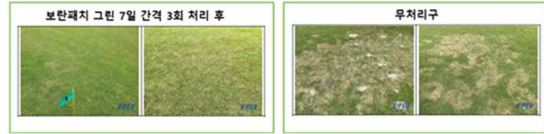
적용대상	적용병해충	사용시기	사용방법	사용량
잔디	라이족트니아마름병 갈색잎마름병	생육기	경엽저리 토양 관주처리	1,000매/㎡씩

□ 효과 및 효능

- 유익 미생물 배양 산물과 질량미생물이 함유된 미생물 배양제로서 라이족트니아마름병(라지패치), 갈색잎마름병(브라운패치) 발생 억제에 탁월한 효능을 지니며 잔디의 뿌리 활착 및 고밀도 세균 등 생육 촉진에도 효과적입니다.



보란패치, 라지패치 등 질병 발생 억제능 향상      뿌리 활착, 고밀도 세균 등 생육 촉진



□ 사용시 주의사항

- 직사광선을 피하여 보관하며 상온보관이 가능하나 되도록 서늘한 곳 또는 저온 냉장고를 권장합니다.
- 보관 중 침전 현상이 일어날 수 있으므로 사용전 흔들어서 사용하십시오.
- 토양소독제와 혼용하지 마십시오.
- 생물제제이므로 토양환경에 따라 효과의 차이를 보일 수 있습니다.
- 살아 있는 미생물을 유효성분으로 하였기에 가능한 빨리 살포하시고 개봉 후에는 전량을 사용하십시오.



그림 1. 시험포장 및 시험구 배치



그림 2. 공시자재 처리

<그림 57. B. velezensis CMML20-16 미생물제제 보란패치그린의 사용자 매뉴얼>

<그림 58. 보란패치그린 현장 컨설팅>

⑥ 마케팅 전략 및 사업화 방안

잔디 사업의 급속한 발전은 국내 잔디 재배면적 증가로 이어졌으나, 건강한 잔디 관리의 측면에서 관행적으로 사용되어온 화학 농약의 무분별한 사용으로 인해 주변 자연 환경에 악영향을 미치는 것은 공공연히 잘 알려진 사실이다. 이에 누구나 쉽게 잔디를 생산(재배)하고 관리 할 수 있는 매뉴얼 개발과 생산자 및 수요자 중심의 기술 워크숍 운영이 매우 절실한 실정이다. 본 연구진은 잔디병 방제에 탁월한 효능을 지닌 친환경제제 “보란패치 그린”의 사용 설명서와 홍보자료를 제작하였다. 주요 고객층으로 1차 국제대회를 개최하는 골프장, 2차 국가기관, 지자체에서 관리 운영하는 공원, 시설물(현충원 등)을 순차적으로 설정하였다. 이들을 대상으로 홍보 마케팅을 꾸준히 진행하는 한편 홍보용 시제품을 함께 보급하여 예비 고객층의 관심을 도모하였다.

← 1차 고객 : 국제대회를 개최하는 골프장

국내 골프장 : 540여개 / 회원제 골프장 : 230여개

← 2차 고객 : 국가기관, 지자체에서 관리하는 공원, 시설물(현충원)



<그림 59. 친환경제제 보란패치그린의 우선 판매 대상이 되는 국내 고객층 설정>

이를 위하여 보란패치 그린의 유기농업자재 공시를 등록하였으며, 이후 국내 총 골프장 540여개 중 우선 고급화를 지향하여 우수 회원제로 운영하는 골프장 230여개와 화학농약 사용량이 엄격한 국제대회 개최 골프장에 이를 판매할 계획이다. 이어서 국가기관 및 지자체에서 관리하는 공원 및 시설물(현충원)등에 있는 잔디밭에 어린이와 가족들이 보다 쾌적하며 친환경속에서 안전하고 건강한 레저활동을 할 수 있도록 신기술 인증 또는 녹색기술인증을 통한 B2G(Business to Government) 판매전략을 수립하여 이를 확고히 하기 위한 기반을 조성하였다.

← 태국, 베트남, 중국 등 동남아 우선 판매 이후 미국 등으로 수출 확대



▶ 보란파마의 기존 네트워크 경험 활용



<그림 60. 보란패치그린의 해외 판매 계획>

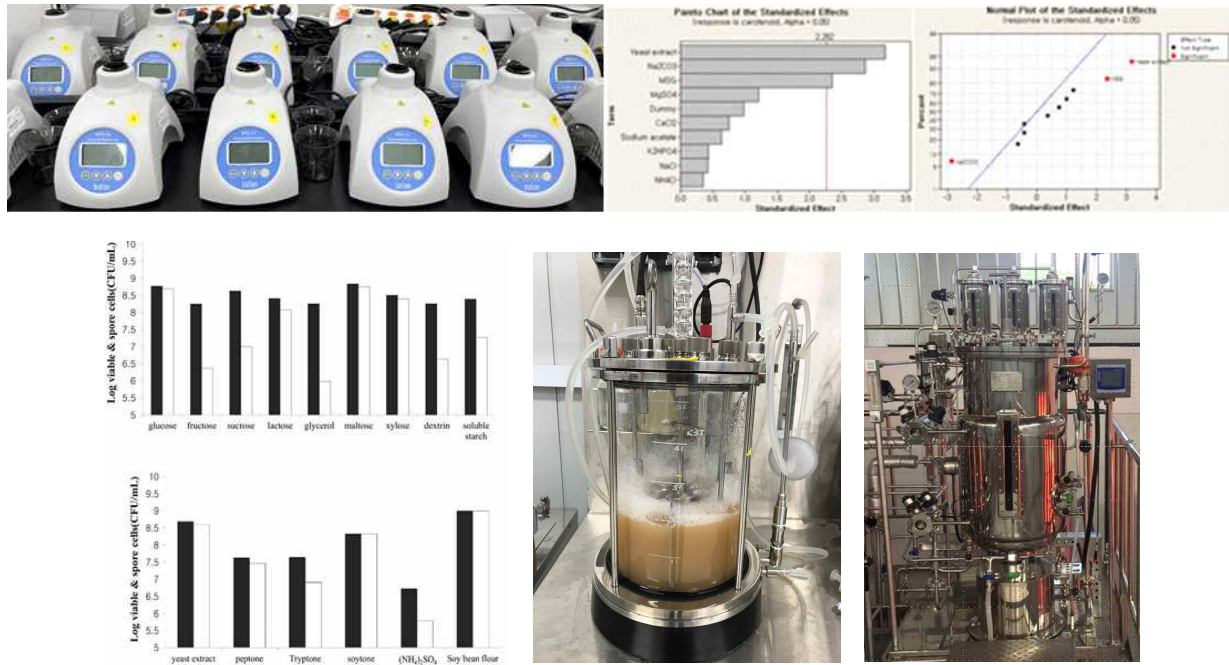
국내 수요층을 대상으로 기반을 확보한 후, 생물제제개발 및 해외 유통/판매의 경험이 다수 보유

하고 있는 공동연구기관 보라파마의 기존 사업 네트워크를 활용하여 태국, 베트남, 중국 등 동남아시아에 우선 판매를 실시하고 향후 미국 등 거대 시장에도 수출을 확대할 예정이다.

<위탁기관 : (재)농축산용미생물산업육성지원센터>

① *B. velezensis* GH1-13 균주의 대량배양용 최적 배지 개발 및 발효조건 확립

잔디 병 방제용 유용미생물인 *B. velezensis* GH1-13 균주의 대량배양용 배지 및 발효 조건을 최적화하기 위해 아래와 같은 연구를 수행하였다. 먼저 *B. velezensis* GH1-13 균주의 대량배양용 최적 배지 개발을 위해 바이오리액터 및 반응표면분석기(RSM)를 이용하였다.



<그림 61. *B. velezensis* GH1-13 균주의 배양 배지 및 5~100L 발효기를 이용한 발효조건 최적화>

*B. velezensis* GH1-13 균주의 대량생산을 위한 최적배지 개발을 목적으로 탄소원과 질소원 선발을 수행하였다. 최적 질소원 선발은 탄소원으로 0.5% Glucose가 포함된 기본배지에 5종류(Yeast extract, Peptone, Tryptone, Soytone, Soy bean flour)의 질소원을 각각 0.8% 첨가하여 48 시간 배양 후 최종 질소원을 선발하였고, 최적 탄소원 선발은 질소원으로 0.8% Yeast extract가 포함된 기본배지에 5종류(Glucose, Fructose, Sucrose, Maltose, Corn starch)의 탄소원을 각각 0.5% 첨가하여 48시간 배양 후 최종 탄소원을 선발하였다.

표 28. GH1-13 균주의 대량생산을 위한 최적배지

탄소원	질소원
Glucose	Yeast extract
Fructose	Peptone
Sucrose	Tryptone
Maltose	Soytone
Corn starch	Soy bean flour

표 29. *Bacillus velezensis* GH1-13의 탄소원, 질소원에 따른 총 생균수, 내생포자 수 및 형성 비율

탄소원	총 생균수(cfu/ml)	내생포자 생균수(cfu/ml)	내생포자 형성률(%)
Glucose	4.2×10 <sup>9</sup>	3.5×10 <sup>9</sup>	83.3
Fructose	2.0×10 <sup>8</sup>	2.5×10 <sup>6</sup>	1.3
Sucrose	3.5×10 <sup>8</sup>	1.6×10 <sup>7</sup>	4.6
Maltose	6.2×10 <sup>8</sup>	5.4×10 <sup>8</sup>	87.1
Corn starch	3.0×10 <sup>8</sup>	2.2×10 <sup>7</sup>	7.3
질소원	총 생균수(cfu/ml)	내생포자 생균수(cfu/ml)	내생포자 형성률(%)
Yeast extract	3.7×10 <sup>9</sup>	3.0×10 <sup>9</sup>	81.1
Peptone	2.9×10 <sup>7</sup>	2.0×10 <sup>7</sup>	69.0
Tryptone	3.8×10 <sup>7</sup>	8.2×10 <sup>6</sup>	21.6
Soytone	2.8×10 <sup>8</sup>	2.0×10 <sup>8</sup>	71.4
Soy bean flour	4.2×10 <sup>9</sup>	3.5×10 <sup>9</sup>	83.3

바이오리액터와 반응표면분석법을 활용하여 생균수 및 내생포자 형성률을 비교한 결과 *B. velezensis* GH1-13 균주의 최적 질소원은 Soy bean flour, 최적 탄소원은 Glucose로 선발하였다.

*B. velezensis* GH1-13 균주의 저비용·고효율 최적 배지를 기반으로 주관기관에서 보유한 5L jar fermenter와 100L 발효기를 활용하여 생균수, 내생포자 형성도를 비교하였다. 그리고 최적 배양 조건을 확립하기 위해 배양온도, 통기량, 교반속도, pH 등을 설정하였다.

5L jar fermenter와 100L 발효기를 활용하여 최적 배양 조건을 탐색한 결과 배양온도 37℃, 통기량 0.4vvm, 교반속도 120RPM, 내부압력 0.4kg/cm<sup>2</sup>, pH 7.0~8.0, 접종량 1%로 최적 배양조건을 확립하였다.

표 30. *B. velezensis* GH1-13 균주의 대량배양 배지 및 발효 조건 확립

조 성	%	구 분	배양 조건
Soy bean flour	0.8	배양온도	37℃
Glucose	0.5	교반속도	100~120RPM
NaCl	0.15	통기량	0.4vvm
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.25	내부압력	0.4 kg/cm <sup>2</sup>
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.05	pH	7.0~8.0
MgSO <sub>4</sub>	0.1	접종량	1%

② *B. velezensis* GH1-13 균주의 대량배양 scale-up, 제형화 및 시제품 제작

잔디 병 방제용 유용미생물의 대량배양 scale-up 및 배양 매뉴얼 정립을 위해 주관기관에서 보유한 1.5톤, 10톤 규모 대용량 발효기를 이용하였다.



<그림 62. 1.5톤 대용량 발효기를 이용한 *B. velezensis* GH1-13 균주의 대량생산>

*B. velezensis* GH1-1L jar fermenter와 100L 발효기를 활용하여 최적 배양 조건을 바탕으로 1.5톤, 10톤 규모 대용량 발효기의 대량배양 scale-up 최적 배양 조건을 탐색한 결과, *Bacillus velezensis* GH1-13 균주는 배양온도 35°C, 배양시간 38시간, 교반속도 100RPM, 통기량 0.3vvm, 내부압력 0.4kg/cm<sup>2</sup>, pH 7.0~8.0, 접종량 1%로 최적 배양조건을 확립하였다.

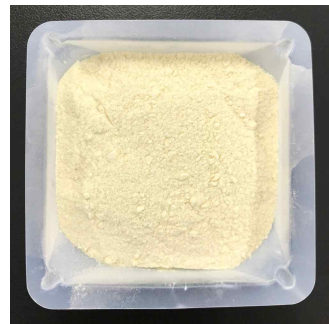
표 31. *B. velezensis* GH1-13 균주의 1.5톤, 10톤 발효기를 이용한 최적 배지 조성 확립

조 성	%	구 분	배양 조건
Yeast extract	0.8	배양온도	35°C
Glucose	0.5	배양시간	36시간
NaCl	0.15	교반속도	100RPM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.25	통기량	0.3vvm
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.05	내부압력	0.4 kg/cm <sup>2</sup>
MgSO <sub>4</sub>	0.1	pH	7.0~8.0
		접종량	1%

*B. velezensis* GH1-13 균주의 1.5톤 대용량 발효기로 배양하여 생균수와 내세포자 형성률을 확인할 결과, 모두 5.0×10<sup>9</sup> 이상의 생균수와 90% 이상의 내세포자 형성률을 확인하였고, 액상과 분말로 제형화 하였다.



<액상>



<분말>

<그림 63. 1.5톤 대용량 발효기를 이용한 *B. velezensis* GH1-13 균주의 대량생산 및 제형화>

### ③ *B. velezensis* CMML20-16 대량배양용 최적 배지 개발 및 발효조건 확립

잔디 병 방제용 유용미생물인 *B. velezensis* CMML20-16 균주의 대량배양용 배지 및 발효 조건을 최적화하기 위해 아래와 같은 연구를 수행하였다. 먼저 *B. velezensis* CMML20-16

균주의 대량배양용 최적 배지 개발을 위해 바이오리액터 및 반응표면분석기(RSM)을 이용하였다.

*B. velezensis* CMML20-16 균주의 대량생산을 위한 최적배지 개발을 목적으로 탄소원과 질소원 선별을 수행하였다. *B. velezensis* GH1-13 균주와 같은 방법으로 최적 질소원 선별은 탄소원으로 0.5% Glucose가 포함된 기본배지에 5종류(Yeast extract, Peptone, Tryptone, Soytone, Soy bean flour)의 질소원을 각각 0.8% 첨가하여 48시간 배양 후 최종 질소원을 선별하였고, 최적 탄소원 선별은 질소원으로 0.8% Yeast extract가 포함된 기본배지에 5종류(Glucose, Fructose, Sucrose, Maltose, Corn starch)의 탄소원을 각각 0.5% 첨가하여 48시간 배양 후 최종 탄소원을 선별하였다.

표 32. *Bacillus velezensis* CMML20-16의 탄소원, 질소원에 따른 총 생균수, 내생포자 수 및 형성 비율

탄소원	총 생균수(cfu/ml)	내생포자 생균수(cfu/ml)	내생포자 형성률(%)
Glucose	$6.0 \times 10^9$	$5.2 \times 10^9$	86.6
Fructose	$1.5 \times 10^9$	$1.2 \times 10^8$	8.0
Sucrose	$3.2 \times 10^8$	$2.0 \times 10^7$	6.3
Maltose	$1.5 \times 10^9$	$8.0 \times 10^8$	53.3
Corn starch	$1.0 \times 10^9$	$1.5 \times 10^8$	15.0
질소원	총 생균수 (cfu/ml)	내생포자 생균수(cfu/ml)	내생포자 형성률(%)
Yeast extract	$6.0 \times 10^9$	$5.2 \times 10^9$	86.6
Peptone	$1.2 \times 10^6$	$1.0 \times 10^5$	8.3
Tryptone	$7.8 \times 10^7$	$1.2 \times 10^7$	15.4
Soytone	$1.5 \times 10^9$	$8.4 \times 10^8$	56.0
Soy bean flour	$1.4 \times 10^9$	$9.2 \times 10^8$	65.7

바이오리액터와 반응표면분석법을 활용하여 생균수 및 내생포자 형성률을 비교한 결과 *B. velezensis* CMML20-16 균주의 최적 질소원은 Yeast extract, 최적 탄소원은 Glucose로 선별하였다.

*B. velezensis* CMML20-16 균주의 저비용-고효율 최적 배지를 기반으로 주관기관에서 보유한 5L jar fermenter와 100L 발효기를 활용하여 생균수, 내생포자 형성도를 비교하였다. 그리고 최적 배양 조건을 확립하기 위해 배양온도, 통기량, 교반속도, pH 등을 설정하였다.

5L jar fermenter와 100L 발효기를 활용하여 최적 배양 조건을 탐색한 결과 배양온도 37°C, 통기량 0.3vvm, 교반속도 150RPM, 내부압력 0.4kg/cm<sup>2</sup>, pH 6.7~7.5, 접종량 1%로 최적 배양조건을 확립하였다.

표 33. *B. velezensis* CMML20-16 균주의 대량배양 배지 및 발효 조건 확립

조 성	%	구 분	배양 조건
Yeast extract	0.8	배양온도	37°C
Glucose	0.5	교반속도	150RPM
NaCl	0.15	통기량	0.3vvm
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.25	내부압력	0.4 kg/cm <sup>2</sup>
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.05	pH	6.7~7.5
MgSO <sub>4</sub>	0.1	접종량	1%



④ *B. velezensis* CMML20-16의 대량배양 scale-up, 제형화 및 시제품 제작

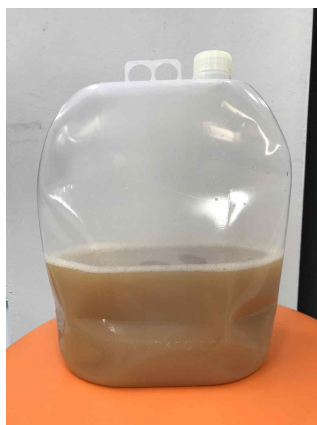
잔디 병 방제용 유용미생물인 *B. velezensis* CMML20-16 균주의 대량배양 scale-up 및 배양 매뉴얼 정립을 위해 주관기관에서 보유한 1.5톤, 10톤 규모 대용량 발효기를 이용하였다.

*B. velezensis* CMML20-16 균주의 5L jar fermenter와 100L 발효기를 활용하여 최적 배양 조건을 바탕으로 1.5톤, 10톤 규모 대용량 발효기의 대량배양 scale-up 최적 배양 조건을 탐색한 결과, *Bacillus velezensis* GH1-13 균주는 배양온도 35℃, 배양시간 38시간, 교반속도 120RPM, 통기량 0.3vvm, 내부압력 0.4kg/cm<sup>2</sup>, pH 6.8~7.5, 접종량 1%로 최적 배양조건을 확립하였다.

표 34. *B. velezensis* CMML20-16 균주의 1.5톤, 10톤 발효기를 이용한 최적 배지 조성 확립

조 성	%	구 분	배양 조건
Yeast extract	0.8	배양온도	35℃
Glucose	0.5	배양시간	38시간
NaCl	0.15	교반속도	120RPM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.25	통기량	0.3vvm
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.05	내부압력	0.4 kg/cm <sup>2</sup>
MgSO <sub>4</sub>	0.1	pH	6.8~7.5
		접종량	1%

*B. velezensis* CMML20-16 균주의 1.5톤 대용량 발효기로 배양하여 생균수와 내생포자 형성률을 확인할 결과, 모두 7.0×10<sup>9</sup> 이상의 생균수와 90% 이상의 내생포자 형성률을 확인하였고, 액상과 분말로 제형화 하였다.



<액상>



<분말>

<그림 64. 1.5톤 대용량 발효기를 이용한 *B. velezensis* CMML20-16 균주의 대량생산 및 제형화>

## (2) 정량적 연구개발성과

(단위 : 건, 천원)

성과지표명	연도		2020~2021	계	가중치 (%)
	논문 [SCIE]	목표(단계별) 실적(누적)			
전담기관 등록·기탁 지표 <sup>1)</sup>	학술발표	목표(단계별)	2	2	5
		실적(누적)	3	3	5
	특허출원	목표(단계별)	1	1	10
		실적(누적)	1	1	10
연구개발과제 특성 반영 지표 <sup>2)</sup>	고용창출	목표(단계별)	2	2	5
		실적(누적)	3	3	5
	시제품제작	목표(단계별)	1	1	10
		실적(누적)	1	1	10
	홍보전시	목표(단계별)	1	1	5
		실적(누적)	1	1	5
계	목표(단계별)	8	8	35	
	실적(누적)	10	10	35	

\* 1) 전담기관 등록·기탁 지표: 논문[에스시아이 Expanded(SCIE), 비SCIE, 평균Impact Factor(IF)], 특허, 보고서원문, 연구 시설·장비, 기술요약정보, 저작권(소프트웨어, 서적 등), 생명자원(생명정보, 생물자원), 표준화(국내, 국제), 화합물, 신종 종 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, 투자 유치), 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, 설계 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).

## (3) 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	Morphology, Molecular Phylogeny, and Pathogenicity of <i>Neofusicoccum parvum</i> , Associated with Leaf Spot Disease of a New Host, the Japanese Bay Tree ( <i>Machilus thunbergii</i> )	Forests	최선규, Narayan Chandra Paul	12(4)	스위스	Multidisciplinary Digital Publishing Institute	SCIE	2021.04.06	1999-4907	50%

#### □ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	2021년 한국식물병리학회 춘계온라인 학술대회	이가희, 최형주, 한귀환, 김현숙, 김평일, 송재경, 상현규	2021.04.22.	온라인	대한민국
2	2021년 (사)한국균학회 춘계학술대회	Haifeng Liu, 최형주, 이가희, 상현규	2021.05.19.	부산, 벡스코	대한민국
3	2021년 (사)한국농약과학회 임시총회 및 추계학술발표회	상현규, Haifeng Liu, 이가희	2021.11.04.	삼척, 솔비치	대한민국

[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	특허출원	대한민국	전남대학교 교산학협 력단. 김현숙	2021.12 .14	10-2021 -017914 6	-	-	-	-	100%	-

○ 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

□ 기술 및 제품 인증

번호	인증 분야	인증 기관	인증 내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증 번호		

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)
1	보란패치그린	2021.09.06	보란파마	-	유기농업자재	-		

□ 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						

\* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			2020년	2021년	
1	유용농생명자원산업 화 기술개발사업	보란파마	1	1	2
2	유용농생명자원산업 화 기술개발사업	전남대학교 산학협력단		1	1
합계			1	2	3

[사회적 성과]




□ 홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	Internet/PC통신	골프타임즈	잔디 주요병 억제하는 미생물 제제 '보란패치 그린' 출시 임박	2021.12.30

(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항 - 해당사항 없음

Communication

# Morphology, Molecular Phylogeny, and Pathogenicity of *Neofusicoccum parvum*, Associated with Leaf Spot Disease of a New Host, the Japanese Bay Tree (*Machilus thunbergii*)

Sungyu Choi <sup>1,†</sup>, Narayan Chandra Paul <sup>1,2,†</sup> , Kye-Han Lee <sup>3</sup>, Hyun-Jun Kim <sup>3,\*</sup>  and Hyunkyung Sang <sup>1,2,\*</sup> 

<sup>1</sup> Department of Integrative Food Bioscience and Biotechnology, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea; sungu425@gmail.com (S.C.); ncpaulnu@gmail.com (N.C.P.)

<sup>2</sup> Kumho Life Science Laboratory, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea

<sup>3</sup> Department of Forest Resources, College of Agriculture and Life Sciences, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea; khl@jnu.ac.kr

\* Correspondence: hjkim0837@jnu.ac.kr (H.-J.K.); hksang@jnu.ac.kr (H.S.)

† These authors contributed equally.



Citation: Choi, S.; Paul, N.C.; Lee, K.-H.; Kim, H.-J.; Sang, H. Morphology, Molecular Phylogeny, and Pathogenicity of *Neofusicoccum parvum*, Associated with Leaf Spot Disease of a New Host, the Japanese Bay Tree (*Machilus thunbergii*). *Forests* 2021, 12, 440. <https://doi.org/10.3390/f12040440>

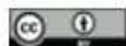
Academic Editor: Benedetto F. Lindstedt

Received: 11 March 2021

Accepted: 31 March 2021

Published: 6 April 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** During a survey of diseased plants on Wando Island, Korea from May to June 2020, a severe leaf spot disease was observed in the upper leaves of Japanese bay tree (*Machilus thunbergii*). Early symptoms were light blackish spots on the leaf surface and enlargement of older spots. Dry leaf spots surrounded with deep black margins were common throughout the plants. Symptomatic leaf samples were collected, and the causal pathogen was isolated on potato dextrose agar (PDA). Three fungal isolates (CMML20-1, CMML20-3, and CMML20-4) were cultured on PDA for morphological characterization at 25 °C in the darkness. Fungal colonies were circular, fast-growing, olivaceous to dark grey, and with abundant aerial mycelium. Sporulation was induced in 14 h-10 h light-dark conditions, and the conidia were single-celled, thin-walled with a smooth surface, ellipsoid with round apices, and measuring 17.5–20.5 (avg. 17.5) μm × 7.5–10.0 (7.9) μm. The morphological characteristics resembled those typical for *Neofusicoccum parvum*. Molecular identification was confirmed by partially sequencing the internal transcribed spacer (ITS) region and the translation elongation factor 1-α (EF1-α) genes. Pathogenicity tests were conducted on detached leaves and whole plants of *M. thunbergii*. High disease prevalence was observed, and Koch postulates were fulfilled. This is the first worldwide report of *N. parvum* causing leaf spots on *Machilus thunbergii*.

**Keywords:** *Machilus thunbergii*; *Neofusicoccum parvum*; new host; phylogeny; Korea

## 1. Introduction

*Machilus thunbergii* Sieb. & Zucc., commonly known as the Japanese bay tree, is a member of the Laurel family (Lauraceae), a diverse and widespread group found throughout tropical and subtropical forest areas of the world, especially in southern Korea, Japan, the Bonin Islands, the Ryukyus, Taiwan, and the warm temperate zones of China and the Philippines [1–3]. It is a broad-leaved evergreen tree with the potential to grow 30 m tall. Parts of *M. thunbergii* plants have been used as a traditional medicine to treat edema, abdominal pain, and abdominal distension in Korea, China, and Japan [4,5]. Due to the destruction of natural resources and the ecological environment, *M. thunbergii* has been listed as a key wild plant protected nationwide in China [1]. Although plant pathogens commonly cause diseases in this plant, few fungal pathogens have been reported for this plant in Japan, China, Korea, and Taiwan. The fungi isolated from Korea were *Endophyllum machii* (Henn.) F. Stevens, *Phomopsis* sp., *Phytophthora cinnamomi* Rands, and *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld. & H. Schrenk [6].

*Neofusicoccum* species, commonly cause diseases in woody plants worldwide [7]. *N. parvum* (Pennycook & Samuels) [8] infects a wide range of host plants and can induce

4. Discussion

The Japanese bay tree is one of the most important forest trees in Japan, Korea, and China. This plant is prevalent in coastal forest areas in Korea [1,2]. The bark and roots of this plant are using as a traditional medicine in continental regions, while the wood is used as mosquito repellent incense [26]. Lignin and alkaloids have been isolated from this plant which contains health-beneficial properties [5,26].

Plant diseases are common to all plants, including Japanese bay trees. To date, little research has been employed to investigate the occurrence and characterization of diseases in this plant. Few plant pathogens except *N. parvum* have been reported for this plant in China, Japan, Korea, and Taiwan; but this pathogen is common in many other plants [6]. The pathological characterization of this plant is little known in Korea. However, to save this plant in the oriental region, it is necessary to know the pathogens associated with it.

During our study of forest pathology, we observed a serious disease occurring in the leaves of *Machilus thunbergii* plants. The pathogen was identified through morphological and molecular approaches by following methods applied earlier [27–31]. Leaf spot disease caused by the fungal pathogen *Neofusicoccum parvum* has been found in other forest plants, including eucalyptus in Spain, blueberry in Korea, cannabis in Italy, and pine in Australia [13,27–29]. Studies suggest that this pathogen may be a latent pathogen and ubiquitous, being distributed across six continents in 29 countries and 90 plant species. However, the disease has never been observed in *M. thunbergii* in any country in the world. The pathogen has been reported from blueberry plants and walnut trees in Korea. The presence of this fungal species in Korea represents a new threat to *M. thunbergii* in forest areas of tropical and subtropical regions where climatic conditions favor the development of the disease. In addition, woody trees under environmental stress or having incurred mechanical injuries in natural calamities like strong winds, typhoons, and cyclones are more vulnerable to this pathogen [13]. Further investigation is required to determine factors promoting diseases associated with *Neofusicoccum parvum*. This could inform strategies to prevent and manage diseases caused by this fungus not only in *Machilus thunbergii* but also in other plants and crops.

**Author Contributions:** Conceptualization, H.S.; methodology, H.S., N.C.P., and S.C.; software, S.C. and N.C.P.; formal analysis, S.C.; data curation, S.C.; writing—original draft preparation, S.C. and N.C.P.; review and editing, S.C., N.C.P., K.-H.L., H.-J.K., and H.S.; supervision, H.S., H.-J.K.; funding acquisition, K.-H.L., H.S., and H.-J.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This study was supported by the Korea Forest Service (Grant No. 2020183C10-2022-AA02) and Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry (IPET) through the Useful Agricultural Life Resources Industry Technology Development Program funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (120042-02), Republic of Korea.

**Data Availability Statement:** The gene sequences have been deposited in GenBank under the accession numbers MW142215, MW535296 & MW535297 for ITS and MW142216, MW535298 & MW535299 for EPI-alpha.

**Acknowledgments:** The authors give very special thanks to Jongseok Park, Jeollanamdo Wando Arboretum, Wando 59105, Republic of Korea for providing the plants for pathogenicity testing.

**Conflicts of Interest:** The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Ren, Q.; Wu, D.; Wu, C.; Wang, Z.; Jiao, J.; Jiang, B.; Zhu, J.; Huang, Y.; Li, T.; Yuan, W. Modeling the potential distribution of *Machilus thunbergii* under the climate change patterns in China. *Off* **2020**, *10*, 217–231. [CrossRef]
- Wu, S.H.; Hwang, C.Y.; Liu, T.P.; Chung, J.D.; Cheng, Y.P.; Hwang, S.Y. Contrasting phylogeographical patterns of two closely related species, *Machilus thunbergii* and *Machilus kusanoi* (Lauraceae), in Taiwan. *J. Biogeogr.* **2006**, *33*, 936–947. [CrossRef]
- Wu, Z.Y.; Raven, P.H.; Hong, D.Y. Flora of China. In *Menispermaceae through Cappariaceae*; Wu, Z.Y., Raven, P.H., Hong, D.Y., Eds.; Missouri Botanical Garden Press: St. Louis, MO, USA, 2008.

<참고 1> 연구성과 실적 증빙자료 예시

성과유형	첨부자료 예시
연구논문	논문 사본(저자, 초록, 사사표기)을 확인할 수 있는 부분 포함, 연구개발과제별 중복 첨부 불가)
지식재산권	산업재산권 등록증(또는 출원서) 사본(발명인, 발명의 명칭, 연구개발과제 출처 포함)
제품개발(시제품)	제품개발사진 등 시제품 개발 관련 증빙자료
기술이전	기술이전 계약서, 기술실시 계약서, 기술료 입금 내역서 등
사업화 (상품출시, 공정개발)	사업화된 제품사진, 매출액 증빙서류(세금계산서, 납품계약서 등 매출 확인가능 내부 회계자료) 등
품목허가	미국 식품의약국(FDA) / 식품의약품안전처(MFDS) 허가서
임상시험실시	임상시험계획(IND) 승인서

## 2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 잔디 주요 병 제어 및 잔디 면역 증강 유용미생물 발굴·효능 검증 및 특성분석	○ 잔디 주요병 제어 및 잔디 생육 증진 유용 미생물 3종 이상 발굴, 효능 검증 및 특성분석	100%
○ 대량배양·제형화 공정 개발 및 시제품의 효능 검증·안전성 평가	○ 1.5톤, 10톤 대용량 발효기를 활용한 대량배양 scale-up ○ 시제품의 효능 검증 및 안정성 평가 완료	100%
○ 현장적용, 사용 매뉴얼 제작·보급 및 교육·컨설팅	○ 잔디 현장 적용 및 사용 매뉴얼 제작·보급 및 교육·컨설팅	100%
○ 마케팅 전략 수립 및 사업화	○ 마케팅 전략 수립 및 사업화 계획 수립	100%

## 4. 목표 미달 시 원인분석 (해당사항없음)

## 5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

- 친환경 병 방제 기반 구축
  - 유용미생물제제의 기능성 미생물 농자재 산업화 공정 개발 및 현장적용
  - 수요자 맞춤형 미생물제제의 제형화
  - 미생물제제 활용 시스템의 기술이전 및 현장 보급
- 연구개발사업 기반 조성 및 수준 향상
  - 기능성 미생물제제의 방제 및 활성 기작 구명을 통한 효과적인 병원균 방제
  - 대량배양 및 제형화 기술 개발을 통한 유용미생물제제의 실용화 시스템 개발
  - 기존의 화학 및 생물농약보다 우수한 활성의 신개념 미생물제제 고안
- 기능성 유용미생물제제의 개발을 통한 관련 분야 산업 성장
  - 친환경, 고부가가치/선도 농업 창출을 통한 동종업계 산업 발전의 토대 마련
  - 농업용 미생물제제의 실용화 공정 확립을 통한 미생물 산업화 기술 확보

## 6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내	
국외논문	SCIE	1	
	비SCIE		
국내논문	계	1	
	SCIE		
	비SCIE	1	
특허출원	계	1	
	국내		
	국외		
특허등록	계	1	
	국내		
	국외		
인력양성	계	1	
	학사		
	석사		
	박사		
사업화	계	1	
	상품출시		
	기술이전		
제품개발	공정개발		
	시제품개발	1	
비임상시험 실시			
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상	
		2상	
		3상	
	의료기기		
진료지침개발			
신의료기술개발			
성과홍보			
포상 및 수상실적			
정성적 성과 주요 내용			

## 7. 참고문헌

- Kim, S. Y., Sang, M. K., Weon, H. Y., Jeon, Y. A., Ryoo, J. H., and Song, J. (2016). Characterization of multifunctional *Bacillus* sp. GH1-13. KJPS. 20, 189-196.
- Kim, S. Y., Song, H., Sang, M. K., Weon, H. Y., and Song, J. (2017). The complete genome sequence of *Bacillus velezensis* strain GH1-13 reveals agriculturally beneficial properties and a unique plasmid. J. Biotechnol. 259, 221-227.
- Chaudhari, N. M., Gupta, V. K., and Dutta, C. (2016). BPGA- an ultra-fast pan-genome analysis pipeline. Sci. Rep. 6, 24373.
- Emms, D. M. and Kelly, S. 2019. OrthoFinder: phylogenetic orthology inference for comparative genomics. Genome Biology 20: 238.



< 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1.	1) 자체평가의견서
	2) 연구성과 활용계획서

## 자체평가의견서

### 1. 과제현황

		과제번호		120042-2	
사업구분					
연구분야				과제구분	단위
사업명	유용농생명자원산업화기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	유용미생물을 활용한 잔디 주요 병 방제용 친환경 복합제제 개발			과제유형	개발
연구개발기관	2020.04.29.~2021.12.31.			연구책임자	상현규
연구기간 연구개발비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2020.04.29.~ 2020.12.31.	226,000	75,500	301,500
	2차년도	2021.04.29.~ 2021.12.31.	302,000	101,500	403,500
	계		528,000	177,000	705,000
참여기업	보란파마				
상대국	-	상대국연구개발기관	-		

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2022. 02. 11.

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
전남대학교 산학협력단	조교수	상현규

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확약	
----	---

## I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

### 1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히불량)

- 잔디 주요병 방제를 위한 기능성 미생물제제 개발 및 현장적용을 통해 친환경 농업의 저변 확대, 신뢰도 제고 및 농가 소득증대에 기여할 괄목할 만한 성과를 도출함
- 또한 개발한 연구성과의 특허 출원 및 앞으로의 기술이전으로 관련 분야 기업체의 매출 증대에도 기여할 것으로 판단됨

### 2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히불량)

- 잔디 주요병 방제를 유용미생물의 선발, 효능검증, 항균 물질 분석 등 학술적 가치가 매우 큼
- 기능성 미생물에 대한 지적소유권 확보, 기술이전 및 향후 제품등록을 통한 매출 증대로 관련 분야 산업체의 매출 증대에 기여할 것으로 예상됨
- 화학농약 대체제로서 기능성 미생물제제의 활용을 통한 친환경 농업 발전에 기여함으로써 사회적 측면에 부합됨

### 3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히불량)

- 기능성 미생물에 대한 학술적 가치를 통한 교육 활용자료, 지식재산권 획득 및 기술이전을 통한 제품등록으로 산업체의 매출 증대에 기여, 잔디 주요 병 방제를 통한 농가의 비용 절감 및 소득증대 기여함

### 4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히불량)

- 잔디 주요병 방제용 기능성 미생물 선발, 효능검증, 대량배양 최적화, 시제품 제작 및 현장 적용 등 본 연구의 당초 계획대로 성실히 수행하였음
- 또한 본 연구의 계획서에 제시한 정성·정량적 성과목표를 달성하였음

### 5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히불량)

- 본 연구를 통해 특허출원1건, 등록 예정 1건, 논문 게재 1건, 기술이전 1건(정액기술료 20,000천원) 등 우수한 성과를 도출함.

## II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
잔디 주요 병 제어 및 잔디 면역 증강 유용미생물 발굴·효능 검증 및 특성분석	20	100	- 잔디 주요 병 제어 유용 미생물 3종 이상 발굴, 효능 검증 및 특성분석
대량배양·제형화 공정 개발 및 시제품의 효능 검증·안정성 평가	20	100	- 1.5톤, 10톤 대용량 발효기를 활용한 대량배양 scale-up - 시제품의 효능 검증 및 안정성 평가 완료
현장적용, 사용 매뉴얼 제작·보급 및 교육·컨설팅	10	100	- 잔디 현장 적용 및 사용 매뉴얼 제작·보급 및 교육·컨설팅
마케팅 전략 수립 및 사업화	10	100	- 마케팅 전략 수립 및 사업화 계획 수립
합계	100점	100	

### III. 종합의견

#### 1. 연구개발결과에 대한 종합의견

- 본 연구를 통한 잔디 주요 방제용 미생물(3종) 선발, 효능 검증, 선발된 주요 미생물의 대사물질(유효성분) 분석 및 안전성 검증 등 학술적 가치를 달성함
- 주요 선발 미생물에 대한 대량생산용 최적 배지 및 발효공정 확립, 시제품 개발을 통한 농가 현장적용을 통한 잔디 병 방제 및 농약 사용 저감에 기여함
- 특허출원 1건, 등록 예정 1건, 논문 1건, 기술이전 1건(정액기술료 20,000천원) 등 연구 성과물을 기반으로 산업체의 제품등록 및 매출 신장에 기여할 것으로 판단됨
- 또한 미생물제제를 활용한 잔디 병방제 등 친환경 농업 저변 확대, 비용 절감, 농가 소득증대 등 경제적/사회적 측면에서 크게 기여할 것임

#### 2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

#### 3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 기능성 미생물제제를 활용한 생물학적 방제로 잔디 병해와 타 작물로의 스펙트럼 확대
- 지식재산권의 통상실시로 맞춤형 제형개발을 통해 다양한 제품개발 및 매출증대에 기여할 것임

### IV. 보안성 검토 - 해당사항 없음

# 연구성과 활용계획서

## 1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	
연구과제명	유용미생물을 활용한 잔디 주요 병 방제용 친환경 복합제제 개발		
주관연구개발기관	전남대학교 산학협력단	주관연구책임자	상현규
연구개발비	정부지원 연구개발비	기관부담연구개발비	기타
	528,000,000원	177,000,000원	총연구개발비 705,000,000원
연구개발기간	2020. 04. 29 - 2021. 12. 31 (1년 9개월)		
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타(    ) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:    )		

## 2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 잔디 주요 병 제어 및 잔디 면역 증강 유용미생물 발굴 · 효능 검증 및 특성분석	○ 잔디 주요병 제어 및 잔디 생육 증진 유용 미생물 3종 이상 발굴, 효능 검증 및 특성분석
② 대량배양 · 제형화 공정 개발 및 시제품의 효능 검증 · 안전성 평가	○ 1.5톤, 10톤 대용량 발효기를 활용한 대량배양 scale-up ○ 시제품의 효능 검증 및 안정성 평가 완료
③ 현장적용, 사용 매뉴얼 제작 · 보급 및 교육 · 컨설팅	○ 잔디 현장 적용 및 사용 매뉴얼 제작 · 보급 및 교육 · 컨설팅
④ 마케팅 전략 수립 및 사업화	○ 마케팅 전략 수립 및 사업화 계획 수립

\* 결과에 대한 의견 첨부 가능

## 3. 연구목표 대비 성과

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화				기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용액) (이)	
	특허출원	특허등록	품종등록	S M A R T 평가기능	건수	기술료 백만원	제품화 건	매출액 백만원	수출액 백만원	고용창출 명		투자유치 백만원	논문				학술발표 건	정책 활용 건		홍보 전시 건
													S C I 건	비 S C I 건						
단위	건	건	건	평가	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	명	건	건			
가중치	10	10			20	10	20	5	5	5	5	5		5			5			
최종 목표	1	1			1	53	2	160	50	2	2	2	1	4			1			
당해 년도 목표	1						1			2		1		2			1			

실적	1					1			3			1			3			1
달성률 (%)	100					100			100			100			100			100

210mm×297mm[(백상지(80g/m<sup>2</sup>) 또는 증질지(80g/m<sup>2</sup>)]

#### 4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	
②	
③	

#### 5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장에 로 해 결	정책 자료	기타
①의 기술										
②의 기술										
③의 기술										

\* 각 해당란에 v 표시

#### 6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	
②의 기술	
③의 기술	

#### 7. 연구종료 후 성과창출 계획

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화				기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용영역)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	SMART	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출		투자 유치	논문 SCI	비SCI			논문평판 F	학술 발표	
단위	건	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건	
가중치	10	10			20	10	20	5	5	5	5				5			5	
최종목표	1	1			1	53	2	160	50	2	2	2	1		4			1	
연구기간내 달성실적	1						1			2		1			3			1	
연구종료후 성과장출	0	1			1	53	1	160	50	0	2	1	1		1			0	



## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 유용농생명자원산업화기술개발사업 유용미생물을 활용한 잔디 주요 병 방제용 친환경 복합제제 개발 연구개발과제 최종보고서이다.
2. 이 연구개발내용을 대외적으로 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부 (농림식품기술기획평가원)에서 시행한 유용농생명자원산업화기술개발사업의 결과임을 밝혀야 한다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 된다.