

보안과제(○), 일반과제()

과제번호 106138-3

은 나노소재와 유용미생물을 활용한 시설재배지 병해 방제
(Management of Greenhouse Crop Diseases with Nano-silver
and Beneficial Microorganisms)

은 나노소재와 길항미생물을 활용한 진균 병해 방제(제 1 세부과제)
(Control of fungal diseases with nano-silver and beneficial microorganisms)

은 나노소재 및 유용 미생물의 사용에 따른 토양 환경영향평가(제 2 세부과제)
(Evaluation of soil environments treated with nano-silver and beneficial
microorganisms)

강원대학교

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “은 나노소재와 유용미생물을 활용한 시설재배지 병해 방제” 과제(제 1 세부과제 “은 나노소재와 길항 미생물을 활용한 진균 병해 방제”, 제 2 세부과제 “은 나노소재 및 유용 미생물의 시용에 따른 토양 환경영향평가”)의 보고서로 제출합니다.

2009 년 4 월 20 일

주관연구기관명 : 강원대학교

주관연구책임자 : 이 윤 수

세부연구책임자 : 양 재 의

연 구 원 : 김 경 수

연 구 원 : 성 은 수

요 약 문

I. 제 목

은 나노소재와 유용미생물을 활용한 시설재배지 병해 방제

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

- 은 나노소재를 활용한 시설재배 작물병해의 효율적인 방제
- 은 나노소재와 유용미생물을 복합적으로 활용한 효율적인 시설재배 작물병해의 방제
- 은 나노소재와 유용미생물의 혼용 사용 가능성 연구 및 실용화
- 은 나노소재와 길항미생물 및 유용세균의 효과적인 적용 캘린더 수립을 통한 병해 방제
- 은 나노소재 및 유용미생물 등 생물소재를 토양에 시용하였을 경우 이에 따른 토양 개량 효과, 물리/화학/생물학적 특성 변화, 토양 질 지표 변화 및 순 기능 변화 등을 monitoring 하여 생물소재의 안전 사용을 위한 guideline을 제시

2. 연구개발의 필요성

- 최근 작물의 시설재배 면적이 급증하고 있으며, 시설재배 하는 작물도 다양화 되고 있는 상황에서 병해에 의한 피해 수준도 급증하고 있어 효과적으로 병해를 방제 할 수 있는 대책이 요구되고 있다. 특히 시설에서 재배 되는 작물 중 오이와 토마토의 재배면적과 생산량이 증대함에 따라 피해도 증가 하고 있다.
- 최근 들어 인구증가 및 생활수준의 향상으로 인한 농산물 수요 증가로 인해 각종 화학비료 및 농약의 사용량이 급증함에 따라 지력 저하, 농약 오염, 환경오염 등 많은 문제점이 발생하고 있다.
- 따라서 일반대중들도 점차 환경 친화적인 농법에 대한 관심이 높아지고 있으며 실제 농가에서도 천연농법이나 유기농법을 적용하여 고소득을 추구하고, 환경보호에도 일조하는 농가들이 증가하는 추세이다.
- 그에 따라 화학비료와 농약을 대체할 수 있는 토양에 존재하는 주요 작물의 생육 촉진, 수확 증가와 유해 병원균에 대한 길항력을 갖는 유용 미생물 자원의 확보가 요구된다.
- 농경지에서의 농약 사용으로 인해 토양 및 농경배수로 인한 지하수와 지표수가 오염되고

있으며 오염된 물을 이용할 경우 피해를 입을 수 있으며 오염된 환경에 서식하는 각종 생물들이 직접적으로 영향을 받는다.

○ 미생물자원은 기존의 인공 화학물질과는 달리 환경 친화적이므로 고소득을 추구하는 차세대 농경기술에의 접목이 용이한 장점이 있다. 또한, 부존자원이 빈약한 우리나라의 실정에 미루어 볼 때 생물자원의 확보라는 측면에서 유리한 시도가 될 수 있다.

○ 그러나 유기합성농약을 대체할 친환경소재로 근래 은 나노소재가 살균효과를 갖는 것으로 보고되었으나 각종 환경 및 유용 미생물에 미치는 영향은 체계적으로 연구되지 않은 채 일부 농가에서 사용되고 있다.

○ 은(Ag) 은 현재까지 화농성 질환, 황색포도상구균, 요소부패균, 대장균, 녹농균, 폐렴균, 레지오넬라균, O-157균 등 각종 내성균에 대한 단세포 병원균을 살균하는 것으로 알려져 있다. 은과 접촉하여 6분 이상 살 수 있는 세균은 없으며, 이러한 은은 병원균의 신진대사를 막아 살균하는 것으로 알려져 있으며, 금속의 은이 방출한 음이온의 전기적 부하가 병원미생물의 생식기능을 제어함으로써 광범위한 항균 및 살균 기능이 있는 것으로 알려져 있다.

○ 보통 은은 인체에 해가 없으며, 독성이 없고, 미생물 체내에 전달되어 원활한 신진대사 기능을 억제하는 650여 가지의 유해성 미생물을 살균하는 것으로 알려져 있다.

○ 시설재배 토양의 경우 염류집적과 단일 작목의 집약적 재배에 따른 연작장애 문제가 심각한 실정이므로 이를 개량할 수 있는 종합적이며 유익한 기능의 친환경적 농업용 생물소재의 개발이 필요하다.

○ 이러한 생물소재가 토양의 특성 및 종합적인 질(quality) 변화에 미치는 영향평가에 관한 연구는 미비한 실정이다. 연구팀의 예비 시험결과에 의하면 선발된 유용미생물과 은 나노소재의 개량제는 시설재배지에서 염류경감 및 미생물활성을 통해 연작장애 문제를 해결할 수 있는 가능한 생물소재로 확인되어 있다.. 따라서 이들 생물소재를 시용하였을 경우 토양의 질 및 환경에 미치는 영향을 종합적으로 평가하여 생물소재의 안전사용 지침을 제시할 필요가 있다.

○ 이러한 연구 결과를 통해 개발되는 지침서(guideline)는 농업 현장에 직접 접목될 수 있는 현장 애로 기술에 해당되며, 미래에 개발되어 현장에 사용될 각종 생물소재의 영향평가를 위한 protocol로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

은 나노소재와 유용미생물의 조화로운 농업적 활용을 위해

1. <제 1 세부과제> 연구개발 내용 및 범위

- 병해 방제가 가능한 유용미생물(길항미생물과 질소고정세균, 인산가용화 세균, phosphatase 고활성 세균 등 식물생장촉진 근류세균)의 활용
- 은 나노소재의 살균성 기내 확인 및 포장 적용 가능성 확인
- 은 나노소재의 사용에 따른 약제내성 병원성 미생물의 발생 가능성 등 안전성 조사
- 은 나노소재 내성 유용미생물의 선발 및 은 나노소재와 유용미생물의 혼용가능성 조사
- 은 나노소재와 유용미생물의 적용 캘린더 작성을 통한 병해 방제 및 생육 촉진 효과 극대화를 통해 병해 방제 비용 절감 및 작물 생산성 극대화

2. <제 2 세부과제> 연구개발 내용 및 범위

1. 은 나노소재 및 미생물의 포장처리에 따른 토양개량 효과 평가
2. 은 나노소재 및 미생물이 토양환경에 미치는 영향 평가를 위한 토양 질(soil quality) 지표 선정 및 최소 단위군(MDS, Minimum Data Set) 구축
3. 은 나노소재 및 미생물의 토양 시용에 따른 토양 질 지표의 시·공간적 변화 평가
4. 은 나노소재의 토양 흡착에 대한 특성을 규명하고 비료 시용에 따른 은 나노소재의 항균성 등을 검정하여 친환경적 농자재 사용의 guideline 제시

IV. 연구개발결과

은 나노소재의 농업적 활용 가능성 확인 및 시설재배 작물병해의 효율적 방제를 위하여 *Alternaria alternata*를 포함하여 30종의 곰팡이 균주와, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*를 포함하여 10가지 세균 균주를 대상으로 WA-CV-WA13B, WA-AT-WB13R과 WA-PR-WB13R 용액의 효과를 검정 하는 각종 시험을 수행 하였으며, 그 연구결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 은 나노 용액의 단독처리 및 혼합처리를 이용한 항균 활성 검정실험 결과, 곰팡이의 경우 실험에 사용한 3가지 배지에서 균주들이 10ppm부터 억제 효과를 나타냈으며, 대부분의 균주가 100ppm에서는 높은 생장 억제 효과를 보여주었다. 또한 경제성을 고려해 저농도에서 곰팡이의 생장억제 효과를 보인 5균주(*Monosporascus cannonballus*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia minor*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Stemphylium solani*)를 선발하였으며, 이들 중 *Sclerotinia minor*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* 과 추가로 선발한 *Sclerotium cepivorum* 이 생성하는 균핵을 대상으로 하여 은 나노액의 단독처리 및 혼합처리에 의한 생장 억제 효과 검정을 수행하였다. 균핵의 생장억제 효과 검정시험 결과, 혼합한 용액보다는 개별적으로 사용한 용액에서 더 나은 억제효과를 나타냈으며, 7ppm부터 약 80% 이상의 억제 효과를 나타냈다. 세균의 경우, 사용한 은 나노액 가운데 WA-PR-WB13R 용액이 3가지 세균에 대해 10ppm에서 높은 억제효과를 보였고, 시험에 사용된 은 나노액 3가지 모두 25ppm에서 세균의 생장을 억제하였다.

2. TEM 관찰 결과, 세포막에 은 나노 입자가 밀집하는 것을 볼 수 있었다. 은 나노 입자는 미생물의 세포막을 크게 손상시킨 것으로 관찰되었으며, 은 나노 입자가 세포막을 손상시켜 미생물을 불활성화 시킨다는 주장을 뒷받침하고 있다.

3. SEM 관찰 결과, 7ppm의 농도로 균사에 처리 하고 1일 경과 후부터 균사의 세포벽이 피해를 입을 것을 확인 하였고, 3일, 5일, 그리고 7일 경과한 경우 모두 그 피해 증상은 은 나노액을 처리 한 후 시간이 지날수록 피해의 정도는 더욱 심화 되었다. 그리고 처리 후 5일과 7일 이 경과한 경우 세포벽이 분해되어 균사가 사멸한 결과를 관찰 하였다.

4. 은 나노 용액의 약해 실험결과, 100ppm까지는 약해가 전혀 일어나지 않았으며, 200ppm이상의 경우는 잎의 변색이 일어났다. 따라서, 100ppm이상의 농도를 사용 시 약해가 발생함을 확인 하였다.

5. 은 나노액에 대하여 내성을 지니는 균주를 선발하는 시험을 수행한 결과, WA-CV-WA13B 용액은 각각의 배지에 Nano-silver WA-CV-WA13B용액을 최초 10ppm으로 실험한 결과 *Bacillus* sp.는 20ppm까지 높은 내성을 보였고, *Pseudomonas koreansis*는 실험 시작점인 10ppm에서 자라지 않아 5ppm으로 농도를 낮춰 실험한 결과 30ppm에서 자라는 내성균을 선발 하였으며, WA-AT-WB13R용액은 10ppm으로 시작을 하여 *Pseudomonas koreansis*는 45ppm까지 높은 내성을 보였으며, *Bacillus* sp. 역시 35ppm에서 자라는 내성균을 선발 하였다. WA-PR-WB13R용액 최초 10ppm으로 처리한 *Pseudomonas koreansis*는 50ppm의 내성을 가진 균을 선발 하였으며, *Bacillus* sp.의 경우 12ppm까지 자라는 내성균을 선발 하였다. 100ppm까지 자라는 내성균을 선발하기 위해 실험을 진행하였으나 내성균을 선발하지 못하였다.

6. 과 흑색썩음균핵병에 대한 은 나노 용액의 생장억제 효과 검정 기내실험 결과, 은 나노액 7ppm부터 효과가 나타났으며, PDA 배지에서 좋은 억제효과를 보였다. 포장 실험에서는 무처리구에 비해 처리구에서 자란 과의 생체중과 건물중 모두 증가하였다.

7. 과 흑색썩음균핵병을 방제하기 위하여 은 나노액을 처리한 토양의 미생물생태에 미치는 영향을 조사한 결과, 세균의 경우 전체적으로 무처리구에 비해 개체수가 줄었으나, 완전 사멸하지는 않았으며, 곰팡이에서는 오히려 증가하는 곳도 나타났다. 곰팡이가 증가한 경우도 과 흑색썩음균핵병 병원균은 관찰되지 않았으며 다른 곰팡이의 개체수가 증가한 것이 관찰되었고, 세균의 개체 수는 초기에 감소하였다 후기에 증가하는 경향이 나타난 것으로 관찰되었다. 은 나노 용액의 사용이 토양 미생물 모두를 사멸시키지 않았으므로, 유용한 토양 미생물이 사멸하거나 감소하지는 않은 것으로 판단되어 진다. 곰팡이의 개체수가 증가하였으나 무처리구와 많은 차이를 나타내지 않았다. 은 나노액을 처리한 과 재배 토양의 성분분석을 실시한 결과 토양 pH는 무처리구와 은 나노 용액을 처리했을 때 그리고 처리 2개월 후 조금씩 차이가 나타났다. EC는 처리 전 334.60에서 처리구는 최대 443.00, 최소 289.50 값을 나타냈으며, 처리 2개월 후에는 228.50으로 감소하였다. 유효태 인산은 무처리구 905.55에 비해 처리구에서 다소 증가하였으나, 처리 2개월 후 646.11로 감소하였고, 유기물 함량도 5.94에서 2개월 후 4.07로 떨어졌다. 질산태 질소는 무처리구와 거의 차이가 나타나지 않았으며, 또한 Ca, Mg 함량은 약간씩 감소하는 경향을 보였으며, K, Na의 경우 약간 증가하였다. 양이온 치환용량(토양이나 교질물 100g이 보유하는 치환성 양이온의 총량을 mg당량으로 나타낸 것, 단위: me/100g)은 처리 전보다 2.98 감소하였다(Table 35). 은 나노 용액 처리구와 2개월 후, 무처리구에 비해 전체적으로 많은 차이가 나지 않았으며, 특히 pH값에서 많은 차이를 나타내지 않아 토양 처리 시 토

양 성분에 많은 영향을 끼치지 않은 것으로 관찰되었다. 성분 분석을 통해 은 나노의 안전성을 관찰할 수 있었다.

8. 파를 재배한 포장에 은 나노 용액을 시용 후 파에서 검출된 은 농도 분석 결과, 25ppm 처리구에서 재배된 파에서 0.48mg의 가장 많은 은 이 검출 되었으며, 50ppm, 100ppm 그리고 10ppm 처리구의 파에서 각각 0.33mg, 0.23mg, 그리고 0.11mg이 검출 되었다. 파 재배 포장에 시용한 은 나노 용액의 농도가 증가됨에 따라 파에서 검출된 은의 농도가 감소한 점으로 보아 은 나노 용액 시용 농도와 은 의 검출과는 반비례하는 관계에 있는 것으로 추정 되며, 이에 대한 추가 적인 실험이 수행될 필요가 있는 것으로 판단된다.

9. 항균성 물질인 키토산의 파 흑색썩음균핵병에 대한 방제효과와 은 나노 용액의 파 흑색썩음균핵병 방제효과를 비교해 보기 위해 pot 실험을 실시하였다. 키토산 A, B와 은 나노 용액 WA-PR-WB13R 용액을 대상으로 하여 실험을 실시하였다. 실험 결과, 은 나노 용액은 50ppm 부터 억제 효과가 나타나기 시작했으며, 키토산 A는 2,000ppm에서 억제효과를 나타냈고, 키토산 B는 1,000ppm에서 억제효과를 나타냈다(Figure 36). 은 나노 용액이 50ppm 정도의 농도에서 효과를 나타냈으며, 키토산은 1,000ppm이상의 높은 농도에서 효과를 나타냈다. 본 실험결과 키토산의 병해 방제 효과는 기대보다 높지 않았으며, 방제효과를 나타내는 은 나노 용액의 농도도 비교적 높은 편에 속하였다. 항균성 물질인 키토산의 파 흑색썩음균핵병에 대한 방제효과와 은 나노 용액의 파 흑색썩음균핵병 방제효과를 비교해 보기 위해 pot 실험을 실시하였다. 키토산 A, B와 은 나노 용액 WA-PR-WB13R 용액을 대상으로 하여 실험을 실시하였다. 실험 결과, 은 나노 용액은 50ppm 부터 억제 효과가 나타나기 시작했으며, 키토산 A는 2,000ppm에서 억제효과를 나타냈고, 키토산 B는 1,000ppm에서 억제효과를 나타냈다(Figure 36). 은 나노 용액이 50ppm 정도의 농도에서 효과를 나타냈으며, 키토산은 1,000ppm이상의 높은 농도에서 효과를 나타냈다. 본 실험결과 키토산의 병해 방제 효과는 기대보다 높지 않았으며, 방제효과를 나타내는 은 나노 용액의 농도도 비교적 높은 편에 속하였다.

10. 은 나노 용액이 흰가루병균에 억제효과에 대해 관찰해본 결과, 발병 후 은나노액 처리가 방제효과에 미치는 영향을 조사한 결과, 1차 포장시험의 경우 호박에서 무처리구에 비해 78%의 억제효과를 100ppm에서 나타냈으며, 오이에서는 농약만큼의 효과는 아니지만 100ppm에서 66.7% 억제효과를 나타냈다. 발병전과 발병후 처리를 한 2차 포장시험의 경우, 호박의 경우 Control 1 (무처리)은 흰가루병에 대해 75.4%의 발병률을 보였다. 발병전 처리에서 Control 2 (Dongbang Agro Co.의 NSS-F)는 37.4%와 Control 4 (Dongbu High-Teck.의 웨나리)는 8.2%를 보였다. 발병전 Nanover™ 처리에서 10ppm은 57.8%, 30ppm은 45.8%, 50ppm은 40.2%, 100ppm은 30.2%의 발병률을 보였다. 발병후 Nanover™ 100ppm처리는 44%의 발병률을 보였다. 발병 전 Nanover™ 처리 100ppm처리가 Control 2 (Dongbang Agro Co.의 NSS-F)보다 효과적이었다. 발병 전 Nanover™ 처리 10ppm과 30ppm은 효과적이지 못했고, 모든 처리에서 Control 4 (Dongbu High-Teck.의 웨나리)가 가장 좋은 효과를 보였다. 오이의 경우는, Control 1 (무처리)은 흰가루병에 대해 50.4%의 발병률을 보였다. 발병전 처리에서 Control 2 (Dongbang Agro Co.의 NSS-F)는 25.4%와 Control 4 (Dongbu High-Teck.의 웨나리)는 5%를 보였다. 발병 전 Nanover™ 처리에서 10ppm은 53.4%, 30ppm은 34.4%, 50ppm은 25%, 100ppm은 20%의 발병률을 보였다. 발병 후 Nanover™ 100ppm 처리는 28.4%의 발병률을 보였다. 발병 전 Nanover™ 처리 10ppm과 30ppm은 효과적이지 못했고, 모든 처리에서 Control 4 (Dongbu High-Teck.의 웨나리)가 가장 좋은 효과를 보였다. 발병 전 Nanover™ 처리 50ppm과 100ppm은 Control 2

(Dongbang Agro Co.의 NSS-F)보다 좋은 효과를 보였다. Nanover™ 100ppm처리에서는 발병 전 처리한 것이 발병 후 처리한 것 보다 효과가 좋았다.

11. 호박 흰가루병(powdery mildew)에 대한 Nano-silver 용액의 균사 및 포자 생장억제 기작에 대하여 확인하기 위하여 은나노액을 농도별로 흰가루병 병원균의 포자와 균사에 처리한 후 SEM으로 관찰한 결과물을 처리한 대조구에 비하여 은 나노액의 처리 농도가 10ppm에서 30, 50, 그리고 100ppm으로 높아질수록 흰가루병 병원균의 포자와 균사의 생장을 억제하는 것을 확인 하였고, 30ppm부터 50ppm, 그리고 100ppm의 경우 그 피해 정도가 더욱 심하여 균사와 포자의 세포막이 손상된 것을 관찰 하였다.

은 나노 소재의 시용에 따른 토양의 물리·화학적 특성 변화 및 은 나노의 토양에 대한 흡착특성을 규명한 후 토양의 화학적·생물학적 특성에 미치는 영향을 평가하기 위한 본 연구의 요약 및 결론은 다음과 같다.

1. 토양 중 은 나노의 효율적인 추출을 위해 총 11가지의 추출제를 평가한 결과 2M-HCl이 다른 추출제에 비해 회수율이 우수한 것으로 평가되었다. 토양에 은 나노를 각각 2 mg kg^{-1} 과 20 mg kg^{-1} 을 처리하여 회수율을 검정한 결과 2M-HCl의 경우 각각 86.3%와 88.0%의 회수율을 나타내 Aqua regia을 이용한 추출결과(82.5%와 84.8%)와 비슷한 회수율을 나타내었다.

2. 실제 시설재배지에 은 나노 용액을 각각 25, 50, 100 mg L^{-1} 의 농도로 관주 처리하여 날짜별 토양의 화학성을 모니터링 한 결과 pH는 6.6 - 6.9 수준으로 시간에 따라 일정하게 나타났으며 EC, 유기물, 유효인산의 경우 시간에 따라 다소 감소하는 경향을 나타내었다. 질소 성분이나 양이온 성분 모두 시간에 따른 농도의 변화는 있었으나 일반적으로 은 나노 용액의 시용에 따른 시험 포장에서의 화학적 특성의 변화는 미비한 것으로 조사되었다.

3. 실제 시설재배지에 처리한 은 나노 용액의 농도를 날짜별로 모니터링한 결과 검출된 은의 농도는 약 0.49 - 4.22 mg kg^{-1} 정도였으며 최고 23.3 mg kg^{-1} 의 은 농도가 검출되었다. 시용한 은의 농도보다 낮은 농도의 은이 검출된 이유는 토양 중 음이온과 은은 결합에 의한 침전이 발생하여 은의 농도가 낮아진 것으로 사료된다.

4. 토양에 은 나노 용액을 처리하여 토양의 질(Soil quality) 평가 항목을 스크린 한 후 은 나노가 토양에 영향을 미치는 화학적 특성과 생물학적 특성을 선별하였다. 은 나노 용액을 토양에 시용할 경우 영향을 미치는 토양의 화학적 특성은 pH, EC, 치환성 Ca, Al, 및 중금속 농도(Mn, Zn, Fe)등에 영향을 미쳤으며, 생물학적 특성 중에서는 토양 호흡에 가장 큰 영향을 미치는 것으로 분석되었다. 은 나노 용액을 처리함에 따라 pH와 EC의 경우 증가하는 경향을 나타내었으며, 치환성 칼슘 역시 은 나노의 처리에 따라 증가되는 경향을 나타내었다. 토양 호흡(soil respiration)은 은 나노 용액을 처리함에 따라 감소하는 경향을 나타내었으며, 이는 은 나노 용액이 미생물의 활성에 영향을 미쳐 CO_2 발생량이 감소한 것으로 사료 된다. 따라서 은 나노소재의 토양 투입에 따른 토양 환경에 대한 영향 평가를 위한 토양 질 평가 항목으로는 pH, EC, 치환성 Ca, Al, 및 토양호흡 등을 고려해야 할 것으로 사료된다.

5. 작물 재배시 생산량을 증대시키기 위해 시용되는 비료 중 칼리 비료에 함유되어 있는 염소(Cl^-)와의 침전반응에 의한 은 나노 용액의 항균성을 평가하기 위해 토양에 KCl과 은 나노 용액을 함께 시용하여 침전물의 생성 및 항균성을 검증하였다. 실험결과 토양에 은 나노를 25, 50, 100 mg L^{-1} 로 처리하였을 경우 처리 농도에 상관없이 은의 농도가 약 7 - 10 mg L^{-1} 가량 줄어들었으며 Cl^- 의 농도 역시 17 mg L^{-1} 가량 줄어들음을 알 수 있었다. 이는 은과 Cl^-

의 반응에 의한 토양 내 침전물의 생성에 기인한 것으로 판단된다.

6. 은 나노 용액과 KCl을 함께 사용한 토양에서의 항균성 검정 결과 역시 박테리아의 경우 은 나노만을 사용한 토양에 비해 균집수가 훨씬 많음을 알 수 있었다. 일주일이 경과한 후 은 나노만을 사용한 토양에서의 박테리아 수는 약 25인 반면 은 나노와 KCl을 함께 사용한 토양에서의 박테리아 수는 은 나노의 농도에 따라 약 26, 120, 110 정도로 높음을 알 수 있었다. 이는 은 나노와 KCl의 반응에 의한 침전물 생성에 따른 은 나노의 항균성이 감소하였기 때문인 것으로 사료된다. 반면, 박테리아에 비해 곰팡이에서는 은 나노와 KCl의 혼용에 의한 항균성 감소가 미비한 것으로 조사되었다.

7. 은 나노 용액의 토양에 대한 흡착 특성을 평가한 결과 은 나노 용액의 흡착 반응은 다중 일차반응 모델(multiple first order kinetic model)을 따름을 알 수 있었다. 이는 초기에 은 나노가 토양에 급속히 흡착된 후 시간에 따라 서서히 증가하는 경향을 나타내었다.

8. 은 나노 용액의 토양에 대한 흡착은 토양 중 점토의 함량이 높고, 온도가 높으며, 초기 은의 농도가 낮을수록 빨리 일어남을 알 수 있었다.

9. 본 연구를 통하여 은 나노 소재의 사용에 따른 토양의 특성 변화 및 토양 질에 미치는 항목을 평가함으로써 실제 은 나노 소재의 활용에 대한 기초 정보를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

V. 연구 성과 및 성과활용 계획

○ 은 나노소재의 농업적 활용 가능성 확인 및 시설재배 작물병해의 효율적 방제법 제시

1. 파 흑색균핵썩음병 병원균의 방제를 위한 은 나노액의 활용
2. 오이 및 호박 흰가루병 병원균 방제를 위한 은 나노액의 활용 및 방제 캘린더 활용

○ 농업용 생물소재의 토양사용 지침서(guideline) 구축

1. 환경 친화적 농업용 생물소재의 토양사용에 대한 guideline 제시
2. 농업용 생물소재의 사용에 따른 토양의 물리·화학·생물학적 변화에 대한 평가 및 환경영향평가를 위한 최소단위군 선정
3. SCI 논문 투고예정 - Environmental factors affecting the sorption of nano-silver particles in soil. *Environmental Pollution*.

SUMMARY

(영문요약문)

Antagonistic effect of nano-silver was tested against 29 and 10 plant pathogenic fungi and bacteria, respectively under different . Among these plant pathogens, 5 plant pathogenic fungi was selected and tested further for their susceptibility to nano-silver at lower concentrations. Also, antagonistic effect of nano-silver was tested against obligate pathogen powdery mildew of cucumber and pumpkin in the field. Three different formular WA-CV-WA13B, WA-AT-WB13R and WA-PR-WB13R were provided from Bioplus Co. and used for *in vitro* tests and field tests. As a result of *in vitro* tests, most fungi tested showed growth inhibition at concentration of 10ppm or higher in some media. Most of the fungi tested showed strong mycelial growth inhibition at concentration of 100ppm or higher with 3 tested nano-silver. Further, among the fungi tested, five fungi such as *Monosporascus cannonballus*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia minor*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Stemphylium solani* showed strong growth inhibition at lower concentrations. These five selected fungi showed strong mycelial growth inhibition at 3, 5, or 7ppm. Sclerotial growth inhibition tests with these selected five fungi showed strong sclerotial growth inhibition at 3, 5, or 7ppm, too. Combination tests of 3 different nano-silver showed the same results for mycelial and sclerotial growth inhibition. In later tests with *Sclerotium cepivorum* , three different nano-silver tested in single treatment or combination treatment showed very strong mycelial and sclerotial growth inhibition both at low and high concentrations. *In vito* tests with bacteria, single treatment or combination treatment of 3 different nano-silver showed strong growth inhibition from 10ppm and complete growth inhibition of bacteria at concentration of 25ppm or higher.

In order to find out the mechanism of antagonism, fungal and bacterial cells were observed with TEM. As a result, aggregation of nano-silver particles along the fungal and bacterial cell walls were observed. In some cases, nano-silver particles were aggregated highly on the damaged cell walls. Also, SEM was used for the observation of effects of nano-silver on the fungal growth under different concentrations and exposure periods. As a result, low concentration of 7ppm damaged the fungal cell walls one day after the treatment. As the exposure period lasted longer, further damages on the fungal cell walls were observed. Five days or longer exposure after the treatment resulted in the death of hyphae.

In a test to determine the dose of damage effects of nao-silver on plants, we used various concentrations of three different nano-silver. As a result, no damage effects of nao-silver on plants were detected under 100ppm or lower. However, damage effects of nao-silver on plants were observed at more than 100ppm or higher, and small dark brown speck formation and discoloration of leaves and stems were observed at 200ppm or higher concentration.

Other than the tests for antagonism of various nano-silver against various plant pathogenic fungi and bacteria, we tried to select nano-silver resistant beneficial

microbes(antagonistic and/or plant growth promoting) so that we can build up the antagonistic effects of nano-silver through the combination of nano-silver and the nano-silver resistant beneficial microbes. As a result, beneficial bacteria *Bacillus* sp. and *Pseudomonas koreansis* showed resistance against nano-silver WA-CV-WA13B at 20ppm and 30ppm, respectively. *Bacillus* sp. and *Pseudomonas koreansis* showed resistance against nano-silver WA-AT-WB13R at 35ppm and 45ppm, respectively. *Bacillus* sp. and *Pseudomonas koreansis* showed resistance against nano-silver WA-PR-WA13B at 12ppm and 50ppm, respectively. These results lead to the conclusion that beneficial microbes could not be combined with nano-silver for the build up of antagonistic effects of nano-silver because the beneficial microbes would not be survived at concentration of 50ppm or higher which is the limit for antagonistic effect.

In vitro tests with *S. cepivorum*, a pathogen of spring green onion stem and root rots, showed growth inhibition of nano-silver at 7ppm or higher concentrations. In field tests, fresh and dry weight of the spring green onion increased with the nano-silver treatment compared to non-treated control. Also, with the treatment of nano-silver, symptoms of stem and root rots diminished and the population of *S. cepivorum* decreased compared to the population of other soil fungi and bacteria. In an analysis of soil planted with spring green onion and treated with nano-silver, there were not much of differences in values of chemical indicators such as soil pH, EC, P₂O₅ content, percentages of organic compounds and T-N, K, Ca, Mg, and Na exchange cation, and CEC compared to those of control. Soil samples collected two months after the treatment also showed similar results. These results showed the safety and stability of nano-silver material. In experiments to re-isolate the nano-silver from spring green onion cultivated in nano-silver treated soil, different amounts of nano-silver were re-isolated depending upon the concentration of nano-silver treated.

In a greenhouse experiment to compare the control effects of nano-silver and kitosan against spring green onion stem and root rots, kitosan showed control effect from 1,000ppm or higher concentrations and nano-silver WA-PR-WB13R showed control effect from 50ppm or higher concentrations. These results indicated the nano-silver is effective at lower concentrations compare to that of kitosan.

In field tests to control the powdery mildews of cucumber and pumpkin, control effects started to show at a concentration of 100ppm or above when the nano-silver was treated after the outbreak of the disease for both cucumber and pumpkin. When the nano-silver was treated before the outbreak of the disease, control effects started to show at a concentration of 30-50ppm for both cucumber and pumpkin. These results indicated that treatment of nano-silver before the outbreak of the disease increased the chance of control of the disease at lower concentrations.

Nano-silver materials have been used in agricultural fields due to their biocide characteristics. However, there is still a lack of information is available for the effect of nano-silver materials on soil when it is applied in field. Therefore, the main purpose of this research is i) evaluating physicochemical properties of soil after nano-silver materials are applied in field, ii) determining sorption characteristics of nano-silver materials in soil to

examine environmental impact assessment (EIA), and iii) proposing guideline to use nano-silver materials for agricultural practices. Results of soil quality analysis showed that nano-silver materials have little impact on chemical properties of soil after it was applied in field. Soil pH and EC were fairly constant at 6.6 – 6.9, and 150 – 600 $\mu\text{S cm}^{-1}$ respectively depending on soil texture for 2 months of experimental period. Also, concentration of organic matter and available-P was slightly decreased after 1 month of nano-silver application but the difference between initial and final concentration was minimal. In order to determine minimum data set (MDS) for obtaining soil quality indicators, total of 16 variables including soil respiration and potentially mineralizable N were measured for 1 month after nano-silver application. Our result showed that pH, EC, exchangeable Ca, Al, and soil respiration were mostly affecting variables on the soil quality after nano-silver material was applied in soil. Sorption characteristic of nano-silver in soil was generally followed multiple first order kinetic model indicating that initial fast sorption was occurred and gradually decreased afterward. Depending on soil texture, rate constant was increased in order of SC(0.0348~0.0660 h^{-1}) > C(0.0141~0.0183 h^{-1}) > SL(0.0020~0.0029 h^{-1}). In addition, rate constant of nano-silver in soil was increased as clay content and temperature were increased. Since fertilizer is co-applied when nano-silver materials are used in agricultural practice, batch experiment was conducted to examine whether biocide characteristics of nano-silver is decreased due to precipitation of nano-silver materials in soil. After nano-silver and KCl as ingredients of potassium fertilizer were co-applied, measured concentration of Ag and Cl^- in soil was decreased compared to control indicating that precipitation was occurred in soil. Also, the result of biocide experiment showed that number of bacteria and fungi were increased at 1 week after experiment. From this result, potassium fertilizer can affect biocide characteristic of nano-silver in soil and the amount of nano-silver applied in field should be considered when fertilizer is co-applied with nano-silver materials. Overall, impact of nano-silver materials on soil quality should be considered to minimize adverse effect of nano-silver materials in environment and our result can be used to utilize nano-silver materials for field application.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1. Outline of research purposes	19
1. Final research objectives	19
2. Necessity for research	19
3. Scopes of research	21
Chapter 2 Domestic and foreign status of technical development	23
1. Foreign status of technical development	23
2. Domestic status of technical development	23
3. Domestic and foreign present status of research	24
Chapter 3 Research contents and results	25
Project 1. Control of fungal plant pathogens with nano-silver and antagonistic microorganisms	
1. Introduction	25
2. Materials and methods	25
가. Materials	25
(1) Nano-silver material	
(2) Fungal and bacterial species tested and culture media	
나. Methods	29
(1) <i>In vitro</i> experiment for antagonism of nano-silver	
(2) Effect of individual treatment of nano-silver against selected fungi <i>in vitro</i>	
(3) Effect of combination treatment of nano-silver against selected fungi <i>in vitro</i>	
(4) Observation of effects of nano-silver on the fungal/bacterial cells with TEM	
(5) Observation of effects of nano-silver on the fungal mycelial growth with SEM	
(6) Determination of the dose of damage effects of nano-silver on plants	
(7) Selection of nano-silver resistant antagonistic and/or plant growth promoting bacteria <i>in vitro</i>	
(8) Inhibition effects of nano-silver on the mycelial growth of spring green onion pathogen <i>S. cepivorum</i>	
(9) Monitoring of microbial population changes and analysis of soil planted with spring green onion and treated with nano-silver	
(10) Detection of nano-silver particles from spring green onion planted in nano-silver treated field	
(11) Comparison of control effects between kitosan and nano-silver against spring green onion root and stem rot pathogen <i>S. cepivorum</i>	
(12) Field control experiments of nona-silver against the powdery mildew disease of pumpkin and cucumber	
(13) Studies of mechanisms of antagonism of Nano-silver against the powdery mildew of pumpkin and cucumber	

3. Results and discussion	33
가. <i>In vitro</i> experiment for antagonism of nano-silver	33
(1) <i>In vitro</i> experiment of nano-silver for antagonism against plant pathogenic fungi	
(2) <i>In vitro</i> experiment of nano-silver for antagonism against plant pathogenic bacteria	
나. Effects of individual treatment of nano-silver against selected fungi <i>in vitro</i>	45
(1) Effects of nano-silver against mycelial growth of selected fungi	
(2) Effects of nano-silver against sclerotial growth of selected fungi	
다. Effects of combination treatment of nano-silver against selected fungi <i>in vitro</i>	60
(1) Effects of nano-silver against mycelial growth of selected fungi	
(2) Effects of nano-silver against sclerotial growth of selected fungi	
라. Observation of effects of nano-silver on the fungal and bacterial cells with TEM	73
마. Observation of effects of nano-silver on the fungal mycelial growth with SEM	74
바. Determination of the dose of damage effects of nano-silver on plants	75
사. Selection of nano-silver resistant antagonistic or plant growth promoting bacteria <i>in vitro</i>	75
아. Inhibition effects of nano-silver on the mycelial growth of spring green onion pathogen <i>S. cepivorum</i>	77
(1) <i>In vitro</i> tests	
(2) Field tests	
자. Monitoring of microbial population changes and analysis of soil planted with spring green onion and treated with nano-silver	85
(1) Monitoring of soil microbial population changes	
(2) Analysis of soil	
차. Detection of nano-silver particles in the spring green onion planted in nano-silver treated field	87
카. Comparison of control effects between kitosan and nano-silver against spring green onion root and stem rots	88
타. Field experiments of nona-silver against the powdery mildew disease of pumpkin and cucumber	89
파. Studies of mechanisms of antagonism of Nano-silver against the powdery mildew of pumpkin and cucumber	99
4. Summary and conclusion	105
 Project 2. Evaluation of soil environments treated with nano-silver and beneficial microorganisms	
1. Introduction	108
2. Development of analytical method for nano-silver	109
가. Physicochemical properties of nano-silver	109
나. Determining extractans for nano-silver	110
3. Evaluation of soil quality with nano-silver application	115
가. Materials and method	115
나. Soil quality analysis	116

4. Development of minimum data set (MDS)	121
가. Materials and method	121
나. Experimental results	125
5. Optimum application rate of nano-silver materials in field	140
가. Materials and methods	140
나. Experimental results	144
(1) Chemical properties of nano-silver	
(2) Effect of potassium fertilizer on nano-silver application in soil	
(3) Biocide experiment with KCl and nano-silver in soil	
(4) Sorption kinetics of nano-silver in soil	
(5) Amount of nano-silver absorbed in soil	
6. Summary and conclusion	164
Chapter 4 Accomplishments and contributions to the related research fields	167
1. Research outlines by year	167
2. Aspects and criteria for result results evaluation	169
3. Contents of research and the level of achievement of research objectives	170
가. Contents of research and the level of achievement of research project 1	170
나. Contents of research and the level of achievement of research project 2	171
4. Level of contributions to the related research fields	171
Chapter 5. Research results and the applications of research results	172
1. Research results	172
가. Published abstracts and articles	172
나. Patents	173
다. Status of levy for technical development	173
라. Status of commercialization	173
마. Achievements of human resources development and use	173
(1) Support for human resources	
(2) Short and long term support for human training	
(3) Support for industrial human resources	
바. Implications of research results in social and economical aspects	174
2. Plans for application of results	174
가. The core know-how	174
나. Technical levels of the research results	175
다. Plans for the applications of the results	175
라. Conditions for the transfer of the research results	175

Chapter 6 Foreign technical informations collected on the course of research development	176
Chapter 7 References	177

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	19
제 1 절	연구개발의 최종목적	19
제 2 절	연구개발의 필요성	19
제 3 절	연구개발의 범위	21
제 2 장	국내·외 기술개발 현황	23
제 1 절	세계적 수준	23
제 2 절	국내수준	23
제 3 절	국내·외의 연구현황	24
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	25
제 1 절	<제 1 세부과제> 은 나노소재와 길항미생물을 활용한 진균 병해 방제	
1.	서론	25
2.	재료 및 방법	25
가.	실험 재료	25
(1)	Nano-silver 용액	
(2)	공시균주 및 배양배지	
나.	실험방법	29
(1)	항균 활성 검정 <i>in vitro</i> 실험	
(2)	은 나노 용액 단독 처리 시 선발된 곰팡이의 생장억제 검정	
(3)	은 나노 용액 혼합 처리 시 선발된 곰팡이의 생장억제 검정	
(4)	투과전자현미경(TEM) 관찰	
(5)	주사현미경(SEM) 관찰	
(6)	은 나노 용액 약해 실험	
(7)	은 나노액 내성균 선발	
(8)	파 흑색썩음균핵병 병원균에 대한 은 나노 용액의 생장억제 효과 실험	
(9)	은나노 용액을 처리한 파 재배토양의 미생물 population 변화 및 토양 분석	
(10)	은나노 용액을 처리한 포장에서 수확한 파로부터 은의 검출분석	
(11)	은 나노 용액과 키토산의 파 흑색썩음균핵병에 대한 방제효과 비교	
(12)	호박과 오이 흰가루병균에 대한 은 나노 용액의 방제 효과 포장 검정	
(13)	호박과 오이 흰가루병균에 대한 은 나노 용액의 방제 효과 기작 구명	
3.	결과 및 고찰	33
가.	항균활성 검정 <i>in vitro</i> 실험	33
(1)	은나노용액 종류별 곰팡이 27개 균주에 대한 항균활성 기내검정	
(2)	은 나노 용액 종류별 세균에 대한 항균활성 기내 검정	

- 나. 은나노 용액 단독 처리 시 선발된 곰팡이의 생장억제 검정 45
 - (1) 선발된 곰팡이 균주의 균사 생장 억제 검정
 - (2) 선발된 곰팡이 균주의 균핵 생장 억제 검정
- 다. 은 나노 용액 혼합 처리 시 선발된 곰팡이의 생장 억제 검정 60
 - (1) 선발된 곰팡이 균주의 균사 생장 억제 검정
 - (2) 선발된 곰팡이 균주의 균핵 생장 억제 검정
- 라. 투과전자현미경(TEM) 관찰 73
- 마. 주사현미경(SEM) 관찰 74
- 바. 은 나노 용액 약해실험 75
- 사. 은 나노액 내성균 선발 75
- 아. 파 흑색썩음균핵병 병원균에 대한 은 나노 용액의 생장억제 효과 실험 77
 - (1) *In vitro* test
 - (2) 포장시험
- 자. 은 나노용액을 처리한 파 재배 토양의 미생물 population 변화 및 토양 분석 85
 - (1) 토양 미생물 population 변화 관찰
 - (2) 토양 성분 분석
- 차. 은 나노 용액을 처리한 포장에서 수확한 파로부터 은의 검출 분석 87
- 카. 은 나노 용액과 키토산의 파 흑색썩음균핵병에 대한 방제효과 비교 88
- 타. 호박과 오이 흰가루병균에 대한 은 나노 용액의 방제 효과 포장 검정 89
- 파. 호박과 오이 흰가루병균에 대한 은 나노 용액의 방제 효과 기작 구명 ... 99

4. 적요 105

제 2 절 <제 2 세부과제> 은 나노소재 및 유용 미생물의 시용에 따른 토양 환경영향평가

- 1. 서언 108
- 2. 은 농도 분석법 개발 109
 - 가. 은 나노용액의 이화학적 특성 분석 109
 - 나. 은 농도 분석을 위한 최적 추출제 선발 110
- 3. 은 나노소재의 시설재배 토양 시용에 따른 토양화학적 평가 115
 - 가. 재료 및 방법 115
 - (1) 공시시험액
 - (2) 토양시료 채취 및 분석
 - (가) 시료채취
 - (나) 토양분석
 - 나. 시설재배지 토양의 처리 후 시기별 토양분석 결과 116
 - (1) 시설재배지 토양의 시기별 토양분석 결과
 - (2) 시설재배지 토양의 은 농도 분석 결과

4. 은 나노소재의 토양 시용에 따른 시설재배지의 토양 질(Soil Quality) 평가 체계 및 최소 단위군(Minimum Data Set) 구축	121
가. 실험 재료 및 방법	121
(1) 공시 토양	
(2) 실험 방법	
(3) 토양시료 채취 및 분석	
(가) 시료채취	
(나) 토양분석	
(4) 통계 분석	
나. 실험 결과	125
(1) 토성	
(2) pH	
(3) EC	
(4) 토양 유기물	
(5) 총 질소	
(6) 유효 인산	
(7) 치환성 칼슘	
(8) 치환성 칼륨	
(9) 치환성 마그네슘	
(10) 치환성 나트륨	
(11) 치환성 알루미늄	
(12) Heavy metal	
(13) Soil Respiration	
(14) Microbial Biomass C	
(15) Microbial Biomass N	
(16) Potentially Mineralizable N	
5. 은 나노소재의 최적투여 비율	140
가. 실험 재료 및 방법	140
(1) 공시시험액	
(2) 공시 토양 및 분석	
(가) 토양과의 흡착 Kinetics 및 흡착 실험	
(나) 은 나노 소재와 토양 중 KCl과의 반응	
(3) 실험방법	
(가) 은 나노 용액의 특성 평가	
(나) 은 나노 소재와 토양 중 KCl의 반응	
(다) 은 나노 용액과 KCl 처리 토양에서의 미생물 Population	
(라) 은 나노 용액의 토양 중 흡착 Kinetics	
(마) 은 나노 용액의 토양 중 흡착량	

나. 실험 결과	144
(1) 은 나노 용액의 화학적 특성	
(2) 은 나노 소재와 토양 중 KCl의 반응	
(3) 은 나노 용액과 KCl 처리 토양에서의 미생물 Population	
(4) 토양 중 은 나노 용액의 흡착 Kinetics	
(5) 은 나노 용액의 토양 중 흡착량	
6. 적요	164
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	167
제 1 절 연도별 연구개발의 목표	167
제 2 절 평가의 착안점 및 기준	169
제 3 절 연구개발 수행내용 및 목표달성도	170
가. 제 1 세부과제의 연구개발 수행내용 및 목표 달성도	170
나. 제 2 세부과제의 연구개발 수행내용 및 목표 달성도	171
제 4 절 관련분야에의 기여도	171
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	172
제 1 절 연구성과	172
가. 논문게재 성과	172
나. 특허 성과	173
다. 기술료 징수 현황	173
라. 사업화 현황	173
마. 인력활용/양성 성과	173
(1) 인력지원 성과	
(2) 장·단기 연수지원 성과: 해당 없음	
(3) 산업기술인력 양성 성과: 해당 없음	
바. 경제사회 파급효과	174
제 2 절 성과활용 계획	174
가. 핵심기술	174
나. 연구결과별 기술적 수준	175
다. 각 연구결과별 구체적 활용계획	175
라. 연구결과에의 기술이전조건	175
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	176
제 7 장 참고문헌	177

제 1 장 연구개발 과제의 개요

제 1 절 연구개발의 최종목적

나노소재와 유용미생물의 조화로운 농업적 활용을 위해 연구개발의 최종 목표는

- 병해 방제가 가능한 생장촉진미생물의 선발
- 은 나노소재의 살균성 기내 확인 및 포장 적용 가능성 확인
- 은 나노소재의 사용에 따른 약제내성 병원미생물의 발현발생 가능성 등 안전성 조사
- 은 나노소재 내성 유용미생물의 선발 및 은 나노소재와 유용미생물의 혼용가능성 조사
- 은 나노소재와 유용미생물의 적용 캘린더 작성을 통한 병해방제 및 생육촉진 효과 극대화, 그리고 이를 통해 병해 방제 비용 절감 및 작물 생산성 극대화
- 은 나노소재 및 미생물 등 생물소재를 토양에 시용하였을 경우 이에 따른 토양개량 효과, 물리/화학/생물학적 특성 변화, 토양 질 지표 변화 및 순 기능 변화 등을 monitoring하여 생물 소재의 안전 사용을 위한 guideline을 제시 등 이다.

제 2 절 연구개발의 필요성

- 최근 작물의 시설재배 면적이 급증하고 있으며, 시설재배 하는 작물도 다양화 되고 있는 상황에서 병해에 의한 피해 수준도 급증하고 있어 효과적으로 병해를 방제 할 수 있는 대책이 요구되고 있다. 특히 시설에서 재배 되는 작물 중 오이와 토마토의 재배면적과 생산량이 증대함에 따라 피해도 증가 하고 있다.
- 최근 들어 인구증가 및 생활수준의 향상으로 인한 농산물 수요 증가로 인해 각종 화학비료 및 농약의 사용량이 급증함에 따라 지력 저하, 농약 오염, 환경오염 등 많은 문제점이 발생하고 있다.
- 따라서 일반대중들도 점차 환경친화적인 농법에 대한 관심이 높아지고 있으며 실제 농가에서도 천연농법이나 유기농법을 적용하여 고소득을 추구하고, 환경보호에도 일조하는 농가들이 증가하는 추세이다.
- 그에 따라 화학비료와 농약을 대체할 수 있는 토양에 존재하는 주요 작물의 생육 촉진, 수확 증가와 유해 병원균에 대한 길항력을 갖는 유용 미생물 자원의 확보가 요구된다.
- 농경지에서의 농약 사용으로 인해 토양 및 농경배수로 인한 지하수와 지표수가 오염되고 있으며 오염된 물을 이용할 경우 피해를 입을 수 있으며 오염된 환경에 서식하는 각종 생물들이 직접적으로 영향을 받는다.

○ 미생물자원은 기존의 인공 화학물질과는 달리 환경친화적이므로 고소득을 추구하는 차세대 농경기술에의 접목이 용이한 장점이 있다. 또한, 부존자원이 빈약한 우리나라의 실정에 미루어 볼 때 생물자원의 확보라는 측면에서 유리한 시도가 될 수 있다.

○ 그러나 유기합성농약을 대체할 친환경소재로 근래 은 나노소재가 살균효과를 갖는 것으로 보고되었으나 각종 환경 및 유용 미생물에 미치는 영향은 체계적으로 연구되지 않은 채 일부 농가에서 사용되고 있다.

○ 은(Ag) 은 현재까지 화농성 질환, 황색포도상구균, 요소부패균, 대장균, 녹농균, 폐렴균, 레지오넬라균, O-157균 등 각종 내성균에 대한 단세포 병원균을 살균하는 것으로 알려져 있다. 은과 접촉하여 6분 이상 살 수 있는 세균은 없으며, 이러한 은은 병원균의 신진대사를 막아 살균하는 것으로 알려져 있으며, 금속의 은이 방출한 음이온의 전기적 부하가 병원미생물의 생식 기능을 제어함으로써 광범위한 항균 및 살균 기능이 있는 것으로 알려져 있다.

○ 보통 은은 인체에 해가 없으며, 독성이 없고, 미생물 체내에 전달되어 원활한 신진대사 기능을 억제하는 650여 가지의 유해성 미생물을 살균하는 것으로 알려져 있다.

○ 시설재배 토양의 경우 염류집적과 단일 작목의 집약적 재배에 따른 연작장애 문제가 심각한 실정이므로 이를 개량할 수 있는 종합적이며 유익한 기능의 친환경적 농업용 생물소재의 개발이 필요함

○ 이러한 생물소재가 토양의 특성 및 종합적인 질(quality) 변화에 미치는 영향평가에 관한 연구는 미비한 실정이다. 연구팀의 예비 시험결과에 의하면 선발된 유용미생물과 은 나노소재의 개량제는 시설재배지에서 염류경감 및 미생물활성을 통해 연작장애 문제를 해결할 수 있는 가능한 생물소재로 확인되어 있음. 따라서 이들 생물소재를 시용하였을 경우 토양의 질 및 환경에 미치는 영향을 종합적으로 평가하여 생물소재의 안전사용 지침을 제시할 필요가 있음.

○ 이러한 연구 결과를 통해 개발되는 지침서(guideline)는 농업 현장에 직접 접목될 수 있는 현장 애로 기술에 해당되며, 미래에 개발되어 현장에 사용될 각종 생물소재의 영향평가를 위한 protocol로 활용될 수 있을 것으로 기대됨.

제 3 절 연구개발의 범위

- 병해 방제가 가능한 길항미생물의 활용
- 은 나노소재가 토양 미생물의 생태적 특성에 미치는 영향
- 은 나노소재와 유용미생물의 혼용 가능성 연구
- 은 나노소재에 의한 내성 병원균 발현가능성 조사

- 은 나노소재와 길항균의 적용 캘린더 작성 및 병해방제 실용화
- 전기전도도, 질산태 질소, 유효인산, 총 질소, 치환성 양이온 (Ca, Mg, K, Na), 양이온치환용량, 은 농도 등 분석
- 화학적 질 지표 (Chemical Quality Index), 물리적 질 지표 (Physical Quality Index) 및 생물학적 질 지표 (Biological Quality Index)의 항목별 측정 주요인분석을 이용한 최소단위군 (MDS) 개발
- 토양질 측정결과 및 PTF (Pedo transfer Function) 등을 이용한 시·공간적 토양질 (SQ)의 계량화 (Scoring)

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 세계적 수준

개념정립 단계	●	기업화 단계		기술 안정화 단계	
---------	---	--------	--	-----------	--

○ 유용미생물을 활용한 생물학적 방제는 개념정립단계를 지나 기업화 초기 단계에 있으나, 나노소재를 활용한 식물병원균의 방제 분야는 이제 개념 정립 단계에 있다. 특히, 은 나노소재의 경우 의약학 분야, 일상생활 용품 분야, 건설업 분야, 인테리어 분야 등에 실용화가 이루어져 산업화, 기업화 단계를 지나고 있는 실정이다. 그러나 은 나노소재의 농업적 활용이나 식물병해 방제적용은 아직 개념정립 단계에 있다.

제 2 절 국내수준

개념정립 단계	●	기업화 단계		기술 안정화 단계	
---------	---	--------	--	-----------	--

○ 은(Ag) 은 현재까지 화농성 질환, 황색포도상구균, 요소부패균, 대장균, 녹농균, 폐렴균, 레지오넬라균, O-157균 등 각종 단세포 병원균을 살균하는 것으로 알려져, 포항공대내 벤처기업인 (주)바이오플러스에 의하여 생산되는 은 나노소재인 NANOVER™가 의료기기 및 의약학 분야, 건강식품 분야, 건축자재 분야, 인테리어 분야, 섬유분야, 각종 생활용품 분야 등에 활용이 되어 상업화가 활발히 이루어지고 있으나, 은 이온(Ag⁺)의 항균활성을 이용한 농업에의 합법적 적용의 경우가 없으며, 특정 식물병원균에 대한 항균효과만을 확인 하는 수준에 그치고 있다.

○ 최근 강원대학교 이윤수 교수 연구팀에서 은 나노소재가 식물에 병해를 야기하는 식물병원 미생물에 대하여 농도에 따라 항균활성이 있는 것으로 확인되어, 은 나노소재의 농업적 활용에 대한 연구가 시작되었음.

○ 각종 생물소재를 토양에 시용할 경우 이들이 토양환경에 미치는 영향을 구명한 결과는 없는 실정임. 은 나노소재를 시용할 경우 은의 이동과 행동에 관한 평가가 필수적으로 요구됨.

제 3 절 국내·외의 연구현황

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
국민대학교	○ colloidal silver 입자의 항균성 조사	- 학술발표
강원대학교 (이윤수 교수)	○ 각종 길항성 및 생장촉진 미생물제 개발 및 미생물 비료 개발	- 미생물 농약 및 비료의 등록 및 허가
	○ 은 나노소재의 항균활성 검정	- 학술발표
바이오플러스 (주)	○ 각종 의료용 은 나노소재 개발	- 각종의료 용구 및 광촉매, 폐수 처리 촉매제 개발
강원대학교 (양재의 교수)	○ 산지농업의 환경영향 및 토양질 계량화 평가모형 개발	- 시책건의 및 영농활용 (농촌진흥청/농업과학기술원)
	○ 지속가능한 토양환경관리를 위한 토양질 지표의 선정과 평가체계 구축	- 환경정책 자료로 활용 (한국환경정책평가연구원)

○ 최근 국내에서도 각종 농업용 미생물제를 개발, 출시하는 회사가 증가하고 있으나 미생물의 선별, 효능 검정 등이 비과학적이고 체계적이지 못하며 이론적인 뒷받침도 부족하고 다양한 생물자원의 개발 측면도 미약한 실정이다.

○ 이제까지 국내외에서 농작물 적용을 위한 미생물들로 주로 식물근권에 존재하는 식물생장촉진 근류세균 (plant growth promoting rhizobacteria; PGPR)이 연구되었는데, 이들의 생장촉진 물질 생성, 인산염 가용화, 병충해 방제효과 등이 주된 기작으로 밝혀졌다.

○ 국내에서는 조무제, 서주원, 이태근, 박창석, 정봉진, 김선옥, 황병국 등의 연구팀에 의해 근류세균을 이용한 미생물 비료 및 농약개발에 대한 연구가 수행되어 상당한 농작물 생육촉진과 병충해 방제 효과가 있는 것으로 나타났다. 그러나 대부분의 근류 세균들은 그 기능이 1-2 가지 정도로 국한되어 작물생육촉진이나 병충해 방제 효과가 다양하지 못했으며 또한 작물숙주에 따라 그 영향이 달리 나타나는 경우가 많았다. 또한 이런 미생물들과 은 나노소재와 연계한 연구는 전무함.

○ 은 나노소재를 이용한 기술은 외국에서도 그다지 많이 개발되지 않았으므로 이 기술의 개발 시 해외 수출을 통해 외화 획득과 기술 수출이 가능해 질 것으로 사료됨.

○ 강원대 이윤수 교수 연구팀에서는 최근 은 나노 소재의 항균활성을 기내 및 포장시험을 통해 확인 한 바 있으며, 포장시험을 통해 은 나노 소재가 토양 생태계의 교란 없이 사용될 가능성을 확인 한 바 있음. 또한 은 나노 소재에 대한 각종 병원균이 내성을 나타내지 않는 것으로 알려져 있어 안전성이 확보된 상태임.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절

<제 1 세부과제> 은 나노소재와 길항미생물을 활용한 진균 병해 방제

1. 서론

은(Ag) 은 현재까지 화농성 질환, 땀 냄새의 원인균인 황색포도상구균, 유아, 어린이의 진 무름 원인인 요소 부패균, 식중독의 원인균인 대장균, 기관지 점막, 눈코 등에 염증 원인균인 녹농균, 폐렴의 원인균인 폐렴균, 레지오넬라균 등 각종 내성균에 대한 단세포 병원균을 살균하는 것으로 알려져 있다.

은(Ag) 과 접촉하여 6분 이상 살 수 있는 세균은 없으며, 이러한 은(Ag)은 병균의 신진대사를 막아 살균하는 것으로 더불어 금속의 은(Ag) 이 방출하는 은 이온(Ag⁺)의 전기적 부하가 병균의 생식기능을 제거함으로써 광범위한 항균 및 살균 기능이 알려진 바 있다. 보통 은(Ag) 은 인체에 해가 없고 독성이 없으며, 미생물 체내에 전달돼 원활한 신진대사 기능을 억제하여 650여 가지의 유해 세균을 죽이는 것으로 알려져 있다.

따라서 본 연구에서는 제조 방법이 다른 3가지 Nano-silver liquid 사용하여 각각의 나노 용액을 이용하여 ○ 병해 방제가 가능한 길항미생물의 선발, ○ 은 나노소재의 병해방제 활용 가능성 확인, ○ 선발된 길항미생물과 은나노액의 혼용을 통한 병해의 방제, ○ 은 나노소재가 토양미생물과 토양생태에 미치는 영향 조사, ○ 은 나노소재의 병해방제 적용 캘린더 작성 등에 대하여 다음과 같은 실험을 수행하였다.

2. 재료 및 방법

가. 실험 재료

(1) Nano-silver 용액

본 실험에 사용한 NanoverTM 용액은 제조 방법이 다른 WA-CV-WA13B(CV), WA-AT-WB13R(AT), WA-PR-WB13R(PR) 3가지 용액을 사용하였으며, 포항공대의 바이오 플러스(주)에서 1,000ppm농도로 제공 받아 각 처리에 맞는 농도로 증류수를 이용하여 희석하여 사용하였으며, 저장온도는 4℃ 냉장 보관하여 필요할 때 마다 꺼내어 사용하였다(Table 1).

Table 1. Three different types of Nano-silver used for the experiments.

Type	Physical form	Average particle size (nm)	Silver contents ($\mu\text{g/ml}$)	Solvent
WA-CV-WA13B	Dark brown Colloid	7~25	50,000	Pure water
WA-AT-WB13R	Colorless Colloid	7~25	10,000	Pure water
WA-PR-WB13R	Colorless Colloid	7~25	10,000	Pure water

(2) 공시균주 및 배양배지

기내 실험에 사용한 균주는 각종 채소 작물에 병을 야기 시키는 곰팡이 29종, 세균은 10종을 사용하였으며, 균주는 농촌진흥청 산하기관인 농용미생물 보존센터(Korean Agricultural Culture Collection, KACC)로부터 분양 받은 균주를 실험에 사용하였으며, *Alternaria alternata*를 포함하여 29종의 곰팡이 균주와, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*를 포함하여 10가지 세균 균주는 Table 2와 Table 3과 같다. 곰팡이 배양에 사용한 배지는 PDA(Potato Dextrose Agar), MEA(Malt Extract Agar), CMA(Corn Meal Agar)를 사용하여 실험하였다. 세균 배지로는 YPG(Yeast Peptone Glucose), YGC(Yeast Extract Glucose Carbonate), NA(Nutrient Agar), MNA(Nutrient OXOID CM3 with Phosphate)를 사용하였다. 추가로 포장에서 직접 분리한 과 흑색썩음균핵병 병원균(*Sclerotium cepivorum*)의 경우는 균사억제 기내실험과 포장시험을 별도로 수행 하였다. 또한 기내에서 배양되지 않는 절대기생균인 흰가루병 병원균(호박 및 오이 흰가루병)에 대한 시험은 기내 시험을 수행 하지 못해 직접 방제효과를 포장시험을 통하여 확인하였다. 따라서 기내 및 포장시험을 포함해 균사 및 균핵의 성장억제 시험 및 포장 검정 등에 모두 31가지 곰팡이 균주를 대상으로 연구가 진행되었다.

Table 2. Plant pathogenic fungi tested.

Species		KACC accession number	The name of a disease and host plant	
			The name of a disease	Host plant
<i>Alternaria alternata</i>	A-1	40019	Alternaria leaf blight, Black spot, Brown leaf spot, Black mold, Stem canker	Burdock, Apple tree, Aloe, Strawberry, Pepper, Tomato
<i>Alternaria brassicicola</i>	A-2	40857	Black spot	Cauliflower, Radish, Cabbage, Mustard tree, Kale
<i>Alternaria solani</i>	A-3	40570	Early blight, Alternaria leaf spot,	Pepper, Tomato, Eggplant, Potato
<i>Botrytis cinerea</i>	B-1	40574	Gray mold	Eggplant, Onion, Tomato, Potato, Pepper, Strawberry, Perilla, buck wheat, Sweet potato, Pear tree, Apple tree, Lettuce, Bean, Cucumber, Pumpkin
<i>Cladosporium cucumerinum</i>	C-1	40576	Scab	Eggplant, Cucumber, Pumpkin, Melon, Watermelon, Horse bean
<i>Colletotrichum acutatum</i>	C-3	40042	Anthraco nose	Mung bean, Pepper, Apple tree
<i>Colletotrichum dematium</i>	C-4	40013	Anthraco nose	Bean, Pepper, Cabbage
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	C-5	40003	Anthraco nose	Bean, Apple tree, Pear tree, Aloe, Pepper, Strawberry, Perilla,
<i>Colletotrichum higginsianum</i>	C-6	40807	Anthraco nose	Radish, Cabbage, Mustard tree
<i>Colletotrichum nigrum</i>	C-7	40973	Anthraco nose	Pepper
<i>Colletotrichum orbiculare</i>	C-8	40808	Anthraco nose	Cucumber, Pumpkin, Watermelon, Melon
<i>Corynespora cassiicola</i>	C-9	40964	Corynespora leaf spot, Leaf spot, Leaf blight, Brown spot	Pepper, Cucumber, Bean, Tomato, Sesame
<i>Cylindrocarpon destructans</i>	C-10	41077	Root rot, Black root rot	Strawberry, Ginseng, Peony
<i>Didymella bryoniae</i>	D-1	40938	Black rot, Gummy stem rot	Cucumber, Pumpkin, Watermelon, Melon
<i>Fusarium oxysporum f. sp. cucumerinum</i>	F-1	40525	Fusarium wilt	Cucumber
<i>F. oxysporum f. sp. lycopersici</i>	F-2	40032	Fusarium wilt	Tomato
<i>F. oxysporum</i>	F-3	40052	Fusarium wilt	Tomato
<i>F. solani</i>	F-4	41643	Fusarium wilt, Dry rot, Root rot,	Potato, Sweet potato, Mung bean, Ginger, Perilla, Foxglove, Ginseng

Table 2. Plant pathogenic fungi tested (Cont.).

Species		KACC accession number	The name of a disease and host plant	
			The name of a disease	Host plant
<i>F. sp.</i>	F-5	40050	Fruit rot, Dry rot, Fusarium rot, Damping-off, Stem rot, Blight,	Potato, Sweet potato, Pepper, Strawberry, Pear tree, Apple tree, Grapevine, Carrot
<i>Glomerella cingulata</i>	G-1	40895	Anthraco nose	Pepper, Strawberry, Pear tree, Apple tree, Grapevine
<i>Monosporascus cannonballus</i>	M-1	40940	Black root rot, Root rot	Cucumber, Pumpkin, Watermelon, Melon
<i>Pythium aphanidermatum</i>	P-8	40156	Damping-off, Blight	Tomato, Tobacco, Spinage, Radish
<i>Pythium spinosum</i>	P-9	41060	Mottle necrosis, Root rot, Dry rot	Sweet potato, Pumpkin, Cabbage
<i>Rhizoctonia solani</i>	R-1	40145	Black scurf, Damping-off, Stem canker, Crown rot, Leaf and stem rot, Root rot	Eggplant, Onion, Tomato, Potato, Pepper, Strawberry, Perilla, Sweet potato, Melon, Watermelon, Bean, Corn, Radish, Cabbage
<i>Sclerotinia minor</i>	S-1	41066	Sclerotinia rot, Small sclerotinia rot	Cauliflower, Kale, Lettuce, Peanut, Tomato. Date
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	S-2	41065	Sclerotinia rot, Small sclerotinia rot	Cauliflower, Kale, Lettuce, Peanut, Date, Tomato
<i>Stemphylium lycopersici</i>	S-3	40967	Leaf spot, White leaf spot	Eggplant, Tomato, Pepper,
<i>Stemphylium solani</i>	S-4	40966	Leaf spot, White leaf spot	Eggplant, Tomato, Pepper,
<i>Sclerotium cepivorum</i>	-	-	stem and root rots	Spring green onion

Table 3. Plant pathogenic bacteria tested.

Species	KACC accession number	The name of a disease and host plant	
		The name of a disease	Host plant
<i>Clavibacter michiganensis</i>	C-1 20122	Bacterial canker	Pepper
<i>Erwinia tracheiphila</i>	E-2 10084	Bacterial wilt	Cucumber
<i>Pseudomonas cichorii</i>	P-1 10137	Bacterial leaf blight, Bacteria root rot, Bacterial rot, Bacterial soft rot	Cabbage, Garlic, Banana, Foxglove
<i>Pseudomonas corrugata</i>	P-2 10141	Pith necrosis	Tomato
<i>Pseudomonas marginalis</i>	P-4 10466	Bacterial rot, Sheath rot, Bacterial soft rot, Bacterial rhizome rot, Bacterial bulb rot, Bacterial leaf spot	Onion, Tomato, Pepper, Lettuce, Cucumber, Ginger, Cabbage, Garlic, Carrot, Kale
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	P-5 10387	Soft rot, Bacterial leaf blight, Bacterial brown streak, Bacterial rot	Eggplant, Pepper, Carrot, Cabbage, Lettuce, Tomato
<i>Pseudomonas syringae</i>	P-6 10396	Bacterial canker, Bacterial leaf spot, Angular leaf spot	Eggplant, Pumpkin
<i>Ralstonia solanacearum</i>	R-1 10220	Bacterial wilt, Bacterial rhizome rot	Eggplant, Potato, Pepper, Tomato, Ginger, Perilla
<i>Xanthomonas campestris pv. campestris</i>	X-1 10377	Bacterial canker, Bacterial spot, Black rot	Cabbage, Kale, Radish
<i>Xanthomonas campestris pv. vesicatoria</i>	X-2 10563	Bacterial spot	Pepper

나. 실험방법

(1) 향균 활성 검정 *in vitro* 실험

향균 활성 검정을 위하여 선발된 28종의 곰팡이 균주 및 10종의 세균 균주를 각각의 한천배지에 각각 제조 방법이 다른 3가지 용액 Nano-silver를 사용하였다.

분양받은 곰팡이의 경우, 고체 PDA배지에 배양 후 은 나노 용액을 10ppm, 25ppm, 50ppm, 100ppm의 농도로 첨가하여 배지(PDA, MEA, CMA)를 조제한 후 배양한 공시 균주를 무균의 cork borer (직경: 0.8cm)를 이용하여 일정한 크기의 agar plug를 Nano-silver가 첨가된 배지 중앙에 접종 한 후 27°C에서 배양하여 최초 2주간 배양하여 무처리구의 직경이 8.5cm가 되도록 배양한 후 2주가 지난 후부터 7일 간격으로 28일간 증식 선단의 직경을 조사 기록하였다.

분양받은 세균을 각 액상 배지에 접종 후 진탕배양기(30°C, 170rpm)에서 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세균의 농도는 1.0×10^5 CFU/ml으로 제조하여 사용하였다. 각 고체배양 배지에 은 나노 용액을 10ppm, 25ppm, 50ppm, 100ppm의 농도로 첨가하여 배지를 조제하였다. 희석된 세균을 10 μ l씩 각각의 고체 배지에 접종하여 도말하였다. 접종 한 후 30°C에서 1~3일간

관찰하면서 세균의 콜로니 수를 계수하여 기록하였다.

(2) 은 나노 용액 단독 처리 시 선발된 곰팡이의 생장억제 검정

28개의 곰팡이 중 각각의 배지와 은 나노 용액에 대해 군사생장 억제 효과가 좋은 5개의 곰팡이 *Monosporascus cannonballus*(M-1), *Rhizotonia solani*(R-1), *Sclerotinia minor*(S-1), *Sclerotinia sclerotiorum*(S-2), *Stemphylium solani*(S-4)를 선발하여 1ppm, 3ppm, 5ppm, 7ppm으로 저농도 실험과 60ppm, 70ppm, 80ppm, 90ppm으로 고농도 실험을 실시하였다.

또한, *Rhizotonia solani*, *Sclerotinia minor*, *Sclerotinia sclerotiorum*에서 형성되는 균핵을 이용하여, 균핵에 대한 은 나노 활성 실험을 실시하였다. 위와 같은 방법으로 은 나노 3가지 용액을 저농도와 고농도에서 실험을 수행 하였으며, PDA, MEA, CMA 배지를 사용하였다. 무균의 핀셋을 이용하여 생성된 균핵을 은 나노가 첨가된 배지 중앙에 접종 한 후, 27°C에 배양하여 최초 2주간 배양하여 무처리구의 직경이 8.5cm가 되도록 배양한 후 2주가 지난 후부터 7일 간격으로 4회 증식선단의 길이를 측정하여 평균을 낸 후, 아래 공식을 이용하여 억제율 (Inhibition rate)을 구하였다.

$$\frac{\text{최대측정치}-\text{측정치}}{\text{최대측정치}} \times 100 = \text{Inhibition rate (\%)}$$

(3) 은 나노 용액 혼합 처리 시 선발된 곰팡이의 생장 억제 검정

은 나노 용액 3가지(이하 WA-CV-WA13B; CV, WA-AT-WB13R; AT, WA-PR-WB13R; PR)용액을 조합하여 4가지 조합(CV+AT, CV+PR, AT+PR, CV+AT+PR) 용액을 만든 후 위와 같은 농도에서 선발된 5균주 *Monosporascus cannonballus*(M-1), *Rhizotonia solani*(R-1), *Sclerotinia minor*(S-1), *Sclerotinia sclerotiorum*(S-2), *Stemphylium solani*(S-4)를 대상으로 하여 은 나노 용액을 혼합하여 군사생장에 어떠한 영향을 미치는지 확인 하였다. 또한 *Sclerotinia minor*(S-1) 균주가 형성하는 균핵에 대하여 은나노 혼합 용액이 어느 정도 길항성을 나타내는 지 확인하였다. 선발된 5개 균주의 군사와 균핵 생장 억제 현상을 통해 방제 가능성을 확인 하고자 실험을 수행 하였다.

(4) 투과전자현미경(TEM) 관찰

은 나노 입자의 부착 형태와 항균 메커니즘을 관찰하고자 은 나노 처리가 된 세균 *Pseudomonas marginalis* 과 곰팡이 *Rhizotonia solani*를 대상으로 하여 에너지 여과 투과 전자현미경(EF-TEM, Energy Filtering-Transmission Electron Microscope, LEO-912AB, OMEGA, LEO) 으로 실험을 수행 하였다. 세균 *Pseudomonas marginalis* 과 곰팡이 *Rhizotonia solani*를 배양 배지에 각각 배양 한 후 은 나노액을 5ppm 에서 50ppm 까지 다양한 농도로 군사에 sprayer로 분사 처리한 후 고정 하여 관찰하였다.

(5) 주사현미경(SEM) 관찰

은나노액 처리가 세균의 생장에 미치는 영향을 확인 하기위하여 25ppm의 농도로 처리한 후 SEM으로도 관찰하였다. 또한, 은나노액 처리가 곰팡이 균사의 생장에 미치는 영향을 확인 하기위하여 저농도에서 매우 민감한 반응을 보이는 곰팡이 균주 가운데 *Sclerotinia sclerotiorum*(S-2)을 선정하여 은 나노액을 7ppm의 농도로 균사에 sprayer로 10ml씩 분사 처리 하였다. 7ppm의 농도로 처리한 다음 처리 1, 3, 5, 7일 후 *Sclerotinia sclerotiorum*(S-2)의 균사를 고정 시키고 저진공 주사현미경 (Low Vacuum - Scanning Electron Microscope , S-3500N, Hitachi Science Systems, Ltd., Japan) 으로 관찰을 실시하였다.

(6) 은 나노 용액 약해 실험

토마토, 고추, 오이, 파를 대상으로 하여 은 나노 3가지 용액을 각각 10ppm, 25ppm, 50ppm, 100ppm 농도로 약해실험을 실시하였다. 약해 시험은 토마토, 고추, 오이, 파를 4-6주간 육묘한 후 육묘한 식물체에 각 농도별로 옆면시비 혹은 관주 처리를 3회 실시 하고 처리 3일 후 약해가 발생되는지 관찰하였다.

(7) 은 나노액 내성균 선발

선발된 식물생장 촉진균 및 길항성균 가운데 은나노액에 대하여 내성을 지니는 균주를 선반하여 은나노액과 혼용을 통해 은나노액의 살균효과를 증대 시키거나 혹은 은나노액의 길항성에 생장촉진균의 식물생장촉진 효과를 보완적으로 사용 하고자 우선 Nano-silver와 혼용이 가능한 지를 확인하기 위하여 은 나노액에 대해 내성을 지닌 내성균을 선발하기 위한 실험을 수행 하였다. 선발 대상균은 식물 생육 촉진을 도와주는 것으로 알려진 *Pseudomonas koreansis* 와 병원성 미생물에 대한 길항성이 있는 것으로 알려져 있는 *Bacillus* sp. 2균주를 사용하였으며, 각각의 배지에 WA-CV-WA13B, WA-AT-WB13R, WA-PR-WB13R용액을 첨가하여 최초 10ppm으로 제조한 배지에 접종 한 후 25℃에서 3-7일간 배양하여 자라나는 내성균을 선발하여 점차적으로 농도를 100ppm 까지 높여가며 실시하였다.

(8) 파 흑색썩음균핵병 병원균에 대한 은 나노 용액의 생장억제 효과 실험

파 흑색썩음균핵병 병원균을 대상으로 은 나노 용액의 길항성 기내 실험을 실시하였다. WA-CV-WA13B, WA-AT-WB13R, WA-PR-WB13R 3가지 용액과 이들 3가지 용액을 혼합한 4가지 혼합 용액을 1ppm, 3ppm, 5ppm, 7ppm, 10ppm, 25ppm, 50ppm, 100ppm 농도로 PDA, MEA, CMA 배지에 치상하여 균사생장 억제효과를 관찰하였다. 포장실험의 경우 은 나노 용액을 각 용액별로 10ppm, 25ppm, 50ppm, 100ppm으로 제조하여 식물의 기저부에 200ml씩 매주 마다 1회씩 총 4회 관주 처리하였다. 4회 관주 처리 5개월 후 수확한 파의 뿌리를 관찰하였고, 수확한 파의 생체중을 측정하고 80℃ 건조기에 건조한 뒤 건조중도 측정하였다.

(9) 은 나노 용액을 처리한 사과 재배 토양의 미생물 population 변화 및 토양 분석

과 재배 포장에서 은 나노 용액이 1주일 간격으로 4회 처리된 곳과 처리되지 않은(무처리) 된 곳의 토양을 샘플링 하여 미생물 개체수의 변화를 조사하였다. 은 나노액이 처리된 혹은 처리되지 않은 포장내의 토양을 채취하여 통풍이 잘되는 음지에서 건조한 후 2mm의 채로 친후, 세균은 1.0×10^4 CFU/ml 농도로 곰팡이는 1.0×10^2 CFU/ml로 희석하여 세균은 TSA배지에 곰팡이는 항생제(streptomycin sulfate salt: 0.3g, Tergitol: 500 μ l, Tetracycline: 0.3g)를 첨가한 PDA 배지에 10 μ l씩 도말하여 계수하였다.

토양 성분 분석 검정은 사과 재배 포장에서 은 나노 용액 처리가 토양 성분의 변화에 영향을 주는지 알아보기 위하여 실시하였으며, 은 나노액이 처리된 포장내의 토양을 채취하여 통풍이 잘되는 음지에서 건조한 후 2mm의 채로 친 후 토양성분 분석을 실시하였다.

(10) 은 나노 용액을 처리한 포장에서 수확한 사과로부터 은의 검출 분석

농도별로 은 나노 용액이 처리된 사과 포장에서 사과를 수확하여 수돗물로 깨끗이 세척하였다. 세척한 사과를 음지에서 자연 건조시킨 후 줄기와 뿌리 등 식물체 5g을 도가니에 넣고 550 $^{\circ}$ C에서 회화 후 왕수(HCl:HNO₃=3:1)를 사용하여 최종 부피를 25ml로 맞추었다. 이렇게 준비한 시료왕수 용액을 ICP를 사용하여 은의 검출 농도를 측정하였다. 은을 검출 하는 과정에서 standard 범위는 0.05 - 1ppm으로 시료와 동일한 비율로 왕수를 첨가 하여 측정하였다.

(11) 은 나노 용액과 키토산의 사과 흑색썩음균핵병에 대한 방제효과 비교

키토산이 사과 흑색썩음균핵병에 대해 억제효과가 있는지 관찰하고, 은 나노 WA-PR-WA13B 용액과 그 효과를 비교해보았다. 키토산은 A, B 두 가지를 사용하였고, 100ppm, 250ppm, 500ppm, 1,000ppm, 2,000ppm 농도로 처리하였고, 은 나노 용액은 10ppm, 25ppm, 50ppm, 100ppm으로 처리하였다. 4-6주 동안 육묘한 사과를 균이 혼입된 토양에 정식 후 매주 1회, 총 4회(4주) 처리하였고, 처리 종료 10일 후 결과를 관찰하였다.

(12) 호박과 오이 흰가루병균에 대한 은 나노 용액의 방제 효과 검증

호박과 오이 잎에 발생하는 흰가루병균에 대해 은 나노 용액이 방제효과를 나타내는지 확인하기 위하여 포장 검정을 실시하였다. 포장검정은 흰가루병이 발생하기 전 처리와 발병후 처리를 하여 활성 검정을 비교 하였다. 1차 시험에서 발병 후 처리의 경우 호박과 오이의 잎에 은 나노 3가지 용액을 10ppm, 25ppm, 50ppm, 100ppm 농도로 제조하여, 각 2L씩 4회 엽면 처리하여 방제효과가 있는지 그리고 은 나노액 사이에 방제효과의 차이가 있는지 확인하였다. 오이는 은 나노 용액의 대조구로 Fenari 농약을 함께 처리하였다. 2차 시험에서는 PR발병 전 처리와 발병 후 처리를 동시에 수행하여 발병 전후의 방제효과를 비교 하였다. 2차시험에서는 NanoverTM WA-CV-WA13B 용액을 사용하여 호박 과 오이 모두 실험구역을 Control 1 (무처리), Control 2 (Dongbang Agro Co.의 NSS-F), Control 3 (발병 후 NanoverTM 100ppm 처리), Control 4 (Dongbu High-Teck.의 웨나리)와 발병 전 10, 30, 50, 100ppm 그리고 발병 후 100ppm 으로

처리 하였다. 호박과 오이 잎에 발병 전 1주일 에 한 번씩 분무 처리를 하여 총 3주 처리하였고, 발병후 처리는 관행대로 분무 처리 하였다. 실험은 2회 반복하였다.

(13) 호박과 오이 흰가루병균에 대한 은 나노 용액의 방제 효과 기작 구명

흰가루병(Powdery mildew)에 대한 은나노액의 항균활성효과를 관찰하기 위하여, 화천의 호박재배 농가에서 흰가루병에 감염된 호박잎을 수집하여, 약 5cm×5cm 크기로 절단하고 Petri Dish(90×15mm)안에서 놓은 다음 바로 각각의 농도(10, 30, 50, 100ppm)의 Nano-silver 용액(WA-CV-WA13B)을 분무하여 처리하고, 대조구는 증류수만을 처리하였다. 이후 1일, 2일, 3일과 4일이 경과한 호박잎을 상온보관하면서 5mm×5mm의 크기로 절단하여 SEM을 관찰하기 위한 전처리하고, SEM(LV-SEM S-3500N Hitachi, Korea Basic Science Institute-Chuncheon)을 이용하여 항균활성효과를 관찰하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 항균활성 검정 *in vitro* 실험

(1) 은 나노 용액 종류별 곰팡이 28개 균주에 대한 항균 활성 기내 검정

(가) WA-CV-WA13B 용액

WA-CV-WA13B 용액을 첨가한 각각 PDA, MEA, CMA 배지표면(87×15mm Petri dish)에 28개의 곰팡이 agar plug를 중앙에 접종한 후 생육 억제 능력을 확인한 결과, 3가지 배지 control에서는 2주 만에 Petri dish의 말단 까지 모두 성장 하였으며, Nano-silver가 첨가된 배지에서는 모든 배지에서 균주들이 10ppm부터 억제 효과를 나타냈으며, 대부분의 균주가 100ppm에서는 높은 생장 억제 효과를 보여주고 있다. 또한 6주간 실험한 결과 대부분의 균주는 시간이 지남에 따라 지속적으로 성장을 보였으며, 3가지 배지에서 공통된 양상을 보였다. 경제성을 고려했을 경우 포장에 살포시 10ppm 이하의 농도에서 효과가 있어야 하므로 10ppm 농도에서 M-1, R-1, S-1, S-2, S-4 는 2주차 와 6주차 선단의 직경 길이가 큰 차이를 보이지 않아 지속적인 억제 효과가 있는 것으로 보여 지며, 현재 이들 5종의 균주에 대하여 10ppm 이하 농도에서의 검증 실험을 하였다. Table 5는 각 배지별 곰팡이들의 길이를 5반복하여 평균값을 나타냈다.

WA-CV-WA13B 용액을 첨가한 PDA배지에서는 100ppm에서 C-4, C-6, F-1을 제외하고는 모두 2주차에서 억제되었다. A-3, C-3, C-10, F-5, M-1, P-8, P-9, R-1, S-1, S-2, S-4의 경우 100ppm에서 6주 동안 지속적인 생장 억제를 보였다. 50ppm에서도 R-1과 S-2는 지속적인 억제양상을 보였다(Table 4A). MEA배지의 경우 PDA배지에 비해 전체적으로 생육 억제가 잘 나타나지는 않으나 M-1, R-1, S-1, S-2, S-4에서는 생육 억제를 나타냈다(Table 4B). CMA배지에서는 S-2와 S-4에서 높은 생육 억제 효과를 나타냈다(Table 4C).

Table 4. Inhibitory effects of nano-silver WA-CV-WA13B against various plant pathogenic fungi on different media *in vitro*.

A. PDA media

(cm/plate)

Fungi	Conc. ¹	CTR ²	10ppm					25ppm					50ppm					100ppm				
			2w ³	3w	4w	5w	6w	2w	3w	4w	5w	6w	2w	3w	4w	5w	6w	2w	3w	4w	5w	6w
A-1	8.5	8.5	3.4	3.5	5.1	5.5	5.7	3.0	4.0	4.7	4.9	5.1	2.6	3.6	4.2	4.5	4.5	0.0	0.0	1.3	2.8	3.5
A-2	8.5	8.5	1.9	2.7	2.9	3.2	3.7	1.6	2.8	3.1	3.6	4.0	1.3	2.0	2.2	2.6	2.7	0.0	1.0	1.0	1.4	1.8
A-3	8.5	8.5	1.9	2.5	2.1	2.4	2.6	1.4	2.2	2.0	2.8	3.0	0.6	1.5	1.4	1.8	2.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
B-1	8.5	8.5	3.1	3.8	4.3	4.6	4.6	2.8	3.4	4.2	4.5	4.5	2.1	2.9	3.5	3.8	4.0	0.7	0.9	2.1	1.9	2.6
C-1	8.5	8.5	1.5	2.7	3.1	4.0	4.7	1.7	2.7	3.2	4.0	4.6	1.6	2.5	2.9	3.6	3.8	0.0	0.6	0.6	1.0	1.6
C-3	8.5	8.5	2.4	3.4	3.9	3.4	4.2	1.8	2.1	3.1	2.9	3.4	0.8	1.1	1.6	1.8	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C-4	8.5	8.5	4.8	5.7	6.2	6.8	6.9	4.0	4.7	5.6	6.3	6.5	2.4	3.1	4.2	4.8	5.2	1.8	2.4	3.6	3.8	4.3
C-5	8.5	8.5	3.2	4.1	4.6	4.8	4.8	2.5	3.3	4.2	4.4	4.6	2.1	2.8	3.5	3.8	4.1	0.0	0.0	0.0	0.3	1.2
C-6	8.5	8.5	5.8	7.1	7.1	7.4	7.9	4.9	6.5	6.8	7.3	7.3	4.5	6.0	6.6	6.9	6.9	4.0	5.6	6.2	6.5	6.4
C-7	8.5	8.5	4.1	5.6	6.9	7.4	8.0	2.8	4.2	5.6	6.3	7.3	2.2	3.2	4.5	5.8	6.8	0.0	0.0	0.6	1.5	3.5
C-8	8.5	8.5	2.6	4.8	6.2	8.5	8.5	3.2	4.6	6.0	7.1	7.9	2.1	3.0	4.1	4.8	5.8	0.2	0.5	0.9	1.1	1.8
C-9	8.5	8.5	2.8	4.1	4.7	5.5	6.0	2.2	3.0	3.9	4.3	5.2	2.2	3.0	3.7	4.4	5.2	0.3	0.5	1.2	2.5	2.7
C-10	8.5	8.5	3.0	3.8	4.3	4.7	5.3	2.3	2.9	3.3	3.7	4.1	1.5	2.2	2.5	2.9	3.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
D-1	8.5	8.5	2.1	3.2	4.4	4.6	4.6	2.1	3.1	4.2	4.4	4.6	1.8	3.0	3.8	4.1	4.4	0.0	0.0	0.0	0.5	1.5
F-1	8.5	8.5	4.2	3.8	6.1	6.3	6.5	3.0	3.8	4.6	5.0	5.5	2.3	3.0	3.6	3.8	4.3	2.1	2.9	3.7	4.1	4.4
F-2	8.5	8.5	3.0	3.7	4.3	4.4	4.6	2.1	3.1	3.2	3.3	3.6	1.5	2.0	2.4	2.5	2.9	0.2	0.3	1.0	1.4	1.5
F-3	8.5	8.5	4.4	5.3	6.1	6.5	6.4	3.2	4.3	5.4	5.6	5.9	2.7	3.8	4.7	5.1	5.7	0.5	0.9	1.3	1.8	2.3
F-4	8.5	8.5	2.2	2.5	3.0	3.3	3.2	1.6	1.8	2.2	2.5	2.5	1.5	2.0	2.5	2.8	2.8	0.6	0.7	1.6	2.5	2.8
F-5	8.5	8.5	2.8	3.5	4.2	4.5	4.8	2.6	3.0	4.1	4.5	4.8	1.7	2.1	2.4	2.9	3.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
G-1	8.5	8.5	5.6	7.3	7.2	8.5	8.5	3.3	4.6	5.1	5.8	6.5	2.7	3.7	4.1	4.8	5.5	0.0	0.3	0.6	1.1	1.6
M-1	8.5	8.5	1.9	2.1	2.0	2.4	2.6	1.1	1.8	2.2	2.3	2.5	0.0	0.0	1.4	1.7	2.1	0.0	0.3	0.3	0.5	0.9
P-8	8.5	8.5	3.9	4.6	4.5	5.1	5.5	2.6	3.4	3.8	4.0	4.3	1.4	1.7	1.7	1.7	1.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
P-9	8.5	8.5	1.2	1.5	1.7	1.2	1.3	1.7	2.3	2.5	2.6	2.9	0.9	1.7	1.9	1.7	1.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
R-1	8.5	8.5	2.5	2.1	2.9	3.6	3.8	2.7	2.8	2.7	3.2	3.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
S-1	8.5	8.5	1.4	1.8	1.5	1.4	2.0	1.4	1.9	1.2	1.4	1.8	1.2	1.2	1.0	1.0	1.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
S-2	8.5	8.5	0.0	0.0	1.2	1.6	2.1	0.0	0.0	0.9	1.0	1.4	0.0	0.0	0.0	0.9	1.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
S-3	8.5	8.5	2.2	3.1	4.4	5.3	5.9	2.1	2.8	3.9	4.9	5.1	1.8	2.9	4.3	5.0	5.4	0.9	1.7	2.9	3.4	4.0
S-4	8.5	8.5	1.1	1.4	1.3	1.9	2.1	1.3	1.5	1.4	1.7	2.1	1.0	1.0	1.0	1.4	1.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

1; Concentration (ppm), 2; Control, 3; Weeks

B. MEA media

(cm/plate)

Conc ¹ Fungi	CTR ²	10ppm					25ppm					50ppm					100ppm				
		2w ³	3w	4w	5w	6w	2w	3w	4w	5w	6w	2w	3w	4w	5w	6w	2w	3w	4w	5w	6w
A-1	8.5	2.8	4.7	5.8	7.2	8.5	2.1	3.3	4.0	5.1	6.1	2	3.0	3.5	4.0	5.1	1.9	2.5	2.9	3.4	4.0
A-2	8.5	1.6	2.8	3.6	4.7	5.9	1.3	2.3	2.9	3.8	4.7	1.1	1.6	1.6	2.5	3.0	1.1	1.5	1.9	2.1	2.6
A-3	8.5	2.0	2.7	2.8	3.6	4.5	1.8	2.7	2.9	3.4	3.9	1.9	2.3	2.4	2.5	2.9	2.1	2.4	2.4	2.9	3.5
B-1	8.5	4.8	6.9	7.0	7.0	7.3	3.9	5.8	6.3	6.6	6.9	3.5	5.4	5.7	5.9	6.3	2.6	4.0	4.5	5.5	6.0
C-1	8.5	1.1	1.4	1.3	2.2	3.9	0.8	2.1	2.4	2.7	1.1	0.8	1.5	1.5	2.5	3.4	0.9	1.3	1.3	1.7	2.1
C-3	8.5	6.5	8.0	8.5	8.5	8.5	6.2	7.9	8.5	8.5	8.5	6.2	7.9	8.5	8.5	8.5	5.8	7.4	7.9	8.5	8.5
C-4	8.5	4.1	6.8	7.5	7.8	8.1	3.7	5.9	6.9	7.5	7.8	3.5	5.6	6.4	7.3	7.4	2.4	3.9	4.6	5.3	6.6
C-5	8.5	5.2	7.1	7.4	7.7	7.6	4	5.9	6.4	6.6	6.8	3.4	5.1	5.8	5.8	6.2	2.5	3.9	4.4	4.8	5.9
C-6	8.5	5.5	7.8	8.1	8.3	8.5	4.2	6.7	7.1	7.4	7.4	3.3	5.3	5.8	6.0	6.7	1.8	3.4	3.9	4.5	5.4
C-7	8.5	6.1	8.3	8.5	8.5	8.5	3.5	5.2	6.0	6.7	6.9	2.3	4.4	4.6	5.6	6.6	1.5	2.4	2.6	3.1	4.2
C-8	8.5	7.5	8.5	8.5	8.5	8.5	7.3	8.5	8.5	8.5	8.5	6.9	8.5	8.5	8.5	8.5	7	8.5	8.5	8.5	8.5
C-9	8.5	3.2	5.0	5.8	7.0	7.4	1.6	2.8	3.7	5.6	6.9	2.1	3.3	3.9	5.1	6.1	1.8	2.7	3.2	3.8	4.8
C-10	8.5	0.0	1.2	2.4	5.8	8.5	0.0	0.2	3.3	6.2	8.5	0.0	0.3	2.3	5.1	7.2	0.0	1.4	1.9	5.6	6.8
D-1	8.5	1.6	2.2	2.8	3.3	5.3	1.3	1.8	1.9	2.4	2.7	1.4	2.0	2.0	2.2	2.8	1.5	1.8	2.1	2.4	2.6
F-1	8.5	5.6	7.1	7.2	7.9	8.4	4.4	5.8	6.4	7.1	7.5	4	5.5	6.3	7.1	7.8	3.4	5.3	5.7	6.8	7.4
F-2	8.5	6.6	8.5	8.5	8.5	8.5	5	6.7	7.0	7.8	8.5	5	6.2	6.4	7.8	8.5	4	5.7	6.2	6.5	8.5
F-3	8.5	6	7.3	8.0	8.5	8.5	4.9	6.3	6.9	7.5	8.5	5.7	7.1	7.3	7.6	8.5	4.9	6.5	6.8	7.1	8.5
F-4	8.5	4.9	6.4	6.7	7.3	8.3	3.9	5.2	5.3	5.9	6.3	4	5.3	5.6	6.0	6.3	2.9	3.9	4.1	4.8	5.1
F-5	8.5	4	5.9	6.5	6.9	8.0	4.5	6.2	6.6	7.0	7.0	3.3	4.5	4.3	5.3	5.6	2.7	3.2	3.8	4.5	5.4
G-1	8.5	3.6	6.4	6.1	8.5	8.5	2.4	3.7	4.4	5.4	6.0	1.7	2.6	3.3	4.1	5.0	1.4	2.1	2.8	3.6	4.3
M-1	8.5	1.4	1.2	1.9	2.0	2.7	0.5	1.0	1.6	1.6	2.7	0	1.0	1.2	1.6	1.8	0	0.6	0.7	1.4	1.7
P-8	8.5	2.7	3.4	4.6	4.3	4.3	6.2	7.4	7.8	7.3	7.5	4.1	6.3	6.8	7.6	7.5	3.6	5.5	6.6	6.5	5.4
P-9	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5	6.9	8.1	8.2	8.5	8.5	2.2	3.9	5.4	5.6	6.4	2.6	4.3	4.8	6.8	7.0
R-1	8.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.9	2.4	2.8	4.2	3.6	0.0	0.0	0.0	0.5	1.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
S-1	8.5	1.5	2.0	3.0	4.0	4.1	0.8	1.9	3.4	3.1	4.0	1.5	1.6	3.2	3.8	3.9	1.6	2.2	3.5	3.5	4.2
S-2	8.5	1.7	5.1	6.2	6.6	8.0	0.4	2.4	3.7	4.5	6.2	0.6	3.4	3.8	4.3	5.7	1.3	3.9	4.3	3.8	6.1
S-3	8.5	2.8	3.9	4.8	5.3	6.9	2.8	4.8	6.1	7.4	8.3	3.2	5.7	6.7	7.5	8.5	3.3	6.2	7.5	8.5	8.5
S-4	8.5	0.9	1.4	1.7	2.0	2.4	1.1	1.4	1.6	1.8	2.1	1.0	1.2	1.5	1.6	2.0	1.0	1.2	1.3	1.5	1.8

1; Concentration (ppm), 2; Control, 3; Weeks

C. CMA media

(cm/plate)

Conc. ¹ Fungi	CTR ²	10ppm					25ppm					50ppm					100ppm				
		2w ³	3w	4w	5w	6w	2w	3w	4w	5w	6w	2w	3w	4w	5w	6w	2w	3w	4w	5w	6w
A-1	8.5	2.3	3.0	4.1	4.6	5.0	1.3	1.8	2.2	2.8	298	1.0	1.2	1.7	1.8	1.8	1.0	1.2	1.5	1.7	1.9
A-2	8.5	0.5	1.0	1.1	1.3	1.5	0.0	0.6	0.9	0.9	1.3	0.0	0.0	1.1	1.2	1.6	0.0	0.8	1.2	1.3	1.6
A-3	8.5	1.3	1.6	1.6	2.0	1.7	1.1	1.3	1.5	1.7	2.3	1.4	1.6	1.6	1.6	1.9	0.7	1.2	1.2	1.7	1.6
B-1	8.5	2.0	2.6	2.7	3.0	3.0	2.0	2.4	2.5	2.9	2.9	1.4	2.0	2.2	2.4	2.3	1.3	0.8	1.9	2.1	2.0
C-1	8.5	1.2	1.8	2.2	2.6	3.0	1.1	1.3	1.5	1.6	1.8	0.0	0.9	1.0	1.3	1.7	0.0	0.9	1.0	1.2	1.8
C-3	8.5	2.3	3.0	4.3	5.3	4.9	1.6	2.2	3.2	3.8	3.8	1.5	1.9	2.4	3.0	3.5	0.8	1.4	1.8	2.4	2.5
C-4	8.5	2.4	2.8	3.0	3.4	3.6	2.8	3.2	3.3	3.7	3.7	2.6	3.1	3.1	3.3	3.5	1.6	2.3	2.9	3.2	3.1
C-5	8.5	1.8	2.3	2.5	2.7	2.6	1.6	1.9	2.1	2.3	2.3	1.4	1.9	2.0	2.1	3.1	1.2	1.5	1.6	1.9	1.9
C-6	8.5	1.4	2.0	2.5	2.8	3.2	1.7	2.2	2.3	2.6	2.8	1.8	2.3	2.3	2.5	2.5	1.8	2.4	2.4	2.6	2.5
C-7	8.5	0.0	1.2	1.7	2.0	2.1	0.0	1.2	1.4	1.8	2.0	0.0	1.0	1.2	1.3	1.4	0.0	0.9	1.2	1.3	1.4
C-8	8.5	2.4	3.5	5.4	6.0	5.8	2.2	3.1	4.2	6.4	6.5	2.2	2.7	4.6	6.3	6.5	2.5	3.4	5.1	6.5	6.5
C-9	8.5	1.5	2.0	2.5	3.4	3.5	1.1	1.7	2.3	2.7	2.9	1.3	1.6	2.0	2.3	2.4	1.1	1.5	2.0	2.1	2.2
C-10	8.5	0.9	1.2	1.3	1.5	1.6	0.7	0.9	1.1	1.1	1.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.2	0.4	0.9
D-1	8.5	2.1	3.0	3.2	3.3	3.3	1.8	2.6	2.8	3.0	3.0	1.7	2.3	2.8	4.4	2.8	1.0	1.4	2.0	2.2	2.1
F-1	8.5	1.6	2.0	2.2	2.6	2.9	1.5	1.9	2.2	2.4	2.5	1.3	1.7	2.0	2.1	2.0	1.4	1.7	1.8	2.1	2.0
F-2	8.5	1.4	1.7	1.9	2.3	2.4	1.3	1.6	1.8	2.0	2.0	1.2	1.4	1.6	1.8	1.9	1.1	1.4	1.5	2.0	1.7
F-3	8.5	1.6	2.1	2.5	2.7	2.8	1.6	2.2	2.5	2.9	3.0	1.6	2.1	2.5	2.8	2.9	1.6	1.9	2.5	2.8	2.7
F-4	8.5	0.4	1.0	1.1	1.2	2.0	0.0	0.8	1.0	1.2	1.8	0.0	1.0	1.1	1.6	1.5	0.0	1.2	1.3	1.7	1.6
F-5	8.5	0.6	1.6	1.9	2.1	2.1	0.4	1.5	1.5	1.7	1.7	1.3	1.8	1.7	2.0	2.0	1.1	1.7	1.8	2.1	2.0
G-1	8.5	1.3	1.8	2.3	2.6	2.8	1.8	2.1	2.3	2.6	2.6	1.8	2.1	2.2	2.2	2.3	1.3	1.7	2.0	0.6	2.0
M-1	8.5	2.0	3.6	6.6	6.8	7.3	0.7	1.3	1.8	2.3	2.4	0.8	2.1	2.3	2.3	2.0	0.2	0.6	0.6	0.6	0.6
P-8	8.5	0.0	3.0	4.0	4.0	4.1	1.9	1.7	2.5	2.6	2.6	1.9	2.1	2.2	2.5	2.4	1.8	2.1	2.4	2.2	2.2
P-9	8.5	2.6	3.7	4.2	4.9	5.3	1.7	2.1	2.6	3.1	3.4	1.4	1.8	2.2	2.6	3.1	1.2	1.4	1.3	1.6	1.9
R-1	8.5	2.4	2.8	2.2	3.0	3.0	2.2	2.2	2.6	2.4	2.5	1.8	1.9	1.9	1.9	1.9	1.6	1.8	1.8	1.8	1.8
S-1	8.5	1.6	1.6	2.8	3.0	3.0	1.6	1.5	1.7	1.8	1.9	1.2	1.7	2.0	2.4	2.4	0.0	0.0	0.7	1.5	1.5
S-2	8.5	0.0	0.4	1.1	1.3	1.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	0.8	0.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
S-3	8.5	1.9	2.3	3.0	3.4	3.5	2.0	2.5	3.0	3.3	3.3	0.0	1.7	2.4	2.6	2.6	0.0	1.2	1.5	1.8	1.9
S-4	8.5	0.0	0.6	1.2	1.3	1.5	0.0	0.0	0.0	1.0	1.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

1; Concentration (ppm), 2; Control, 3; Weeks

(나) WA-AT-WB13R 용액

은 나노 용액 WA-AT-WB13R에 대한 각 배지별(PDA, MEA, CMA) 성장 억제 효과를 나타냈다 (Table 5). WA-CV-WA13B 용액에 비해 성장 억제 효과가 낮은 것으로 관찰되지만, PDA배지에서 A-3, F-3, F-5, M-1, P-9, R-1, S-1, S-2, S-4에서 높은 억제 효과를 나타냈다(Table 5A). WA-AT-WB13R 용액에서도 PDA배지에 비해 MEA배지에서는 억제 효과가 낮아지는 것으로 나타났다(Table 5B). WA-AT-WB13R 용액이 처리된 CMA배지에서는 S-1, S-2, S-4에서 높은 억제 효과를 나타냈다(Table 5C).

Table 5. Inhibitory effects of nano-silver WA-AT-WB3R against various plant pathogenic fungi on different media *in vitro*.

A. PDA media

(cm/plate)

Conc. ¹ Fungi	CTR ²	10ppm					25ppm					50ppm					100ppm				
		2w ³	3w	4w	5w	6w	2w	3w	4w	5w	6w	2w	3w	4w	5w	6w	2w	3w	4w	5w	6w
A-1	8.5	3.1	4.3	4.8	5.3	5.6	2.1	3.1	3.8	4.3	4.4	2.1	3.0	3.7	4.5	4.5	0.0	2.0	1.9	3.2	3.5
A-2	8.5	2.0	3.4	3.6	4.2	4.2	1.3	2.1	2.3	2.5	2.6	1.0	1.7	1.8	2.1	2.4	0.0	0.4	0.7	1.1	1.3
A-3	8.5	1.7	1.8	2.0	2.2	2.4	1.6	2.0	2.1	2.2	2.3	1.8	2.0	2.0	2.1	2.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
B-1	8.5	3.3	4.3	4.8	4.8	4.9	2.5	3.4	4.0	4.1	4.3	2.0	2.6	2.8	2.7	2.9	1.0	0.4	1.6	1.5	1.8
C-1	8.5	1.5	2.8	3.3	4.1	4.7	1.3	2.5	2.9	3.5	4.0	1.0	1.6	1.9	2.4	2.8	0.0	0.8	1.1	1.4	2.2
C-3	8.5	3.0	4.0	4.2	4.4	4.6	1.9	2.3	2.9	3.8	3.9	0.0	1.1	1.8	2.0	2.1	0.0	0.0	0.0	1.8	1.4
C-4	8.5	5.1	5.7	6.6	6.7	7.0	5.1	5.5	6.1	6.7	6.6	3.6	4.2	4.9	4.7	5.4	2.0	2.8	3.2	3.8	4.0
C-5	8.5	3.4	4.2	4.6	5.3	4.7	2.6	3.4	3.9	4.2	4.2	2.1	2.8	3.6	3.9	3.9	1.1	1.9	2.8	3.3	3.5
C-6	8.5	5.8	6.7	7.1	7.5	7.1	4.2	6.1	6.8	6.9	6.6	4.0	4.9	5.5	6.3	5.9	3.0	4.1	4.8	5.3	5.5
C-7	8.5	4.8	6.4	8.5	8.5	5.2	2.6	4.0	5.9	6.9	5.6	1.8	2.9	4.3	5.4	5.2	0.0	1.8	3.6	4.1	4.7
C-8	8.5	3.3	5.0	6.1	6.9	6.8	2.7	3.9	5.8	6.3	6.9	2.4	3.4	4.2	5.2	5.4	0.0	0.6	0.7	1.2	1.3
C-9	8.5	3.5	3.9	5.2	6.1	5.5	2.0	2.8	3.5	4.3	4.4	1.8	2.5	3.4	3.9	4.1	0.0	1.4	2.2	2.2	2.6
C-10	8.5	2.8	4.7	5.2	5.8	6.6	2.3	3.6	4.0	4.6	5.2	1.6	2.8	3.2	3.6	4.4	0.2	0.5	0.5	0.7	0.9
D-1	8.5	2.2	4.0	5.1	4.6	4.4	6.2	3.5	4.7	5.0	4.9	1.6	2.9	3.8	4.2	3.8	0.0	0.0	0.4	0.8	0.9
G-1	8.5	3.3	5.7	2.7	7.1	7.4	2.1	3.9	3.0	5.3	7.2	2.6	2.8	4.6	3.7	6.7	0.0	0.9	6.2	2.3	6.5
F-1	8.5	4.8	6.1	6.8	7.4	7.1	7.0	3.3	3.9	3.8	4.0	2.0	2.6	3.2	3.4	4.2	0.0	1.3	1.8	2.1	2.4
F-2	8.5	3.3	4.3	4.9	5.1	4.9	2.1	2.7	3.1	3.4	3.4	1.7	2.3	2.6	2.9	2.9	0.0	1.3	1.5	2.0	2.2
F-3	8.5	4.3	5.5	6.0	6.5	6.3	2.8	3.9	4.7	5.0	5.2	2.4	3.1	3.9	4.1	4.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
F-4	8.5	2.3	3.0	3.3	3.4	3.3	0.0	1.8	2.8	2.0	2.0	0.0	1.2	1.5	1.6	1.6	0.0	0.0	1.0	1.4	1.5
F-5	8.5	3.0	3.6	4.2	4.9	4.6	1.8	2.2	2.7	3.2	3.2	2.0	2.6	3.5	4.3	4.3	0.0	1.4	2.4	3.1	3.5
M-1	8.5	2.0	2.2	2.5	2.7	2.8	0.0	2.2	2.2	4.1	4.6	0.0	1.6	2.9	3.9	4.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
P-8	8.5	5.4	5.4	6.3	6.4	6.4	3.8	4.7	5.0	5.1	5.1	1.5	2.8	2.9	3.0	3.0	0.3	0.4	0.4	0.4	0.4
P-9	8.5	1.3	1.7	1.8	2.1	2.4	0.0	0.4	0.5	0.6	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
R-1	8.5	1.5	2.3	2.6	3.0	3.7	0.6	1.5	1.6	2.1	2.5	0.4	0.6	0.8	0.9	1.4	0.4	0.6	0.3	0.4	0.4
S-1	8.5	0.0	0.0	0.0	2.3	3.4	0.0	0.0	0.0	2.5	3.0	0.0	0.0	0.0	1.2	1.3	0.0	0.0	0.0	1.8	1.8
S-2	8.5	0.0	0.0	0.0	2.1	2.1	0.0	0.0	0.0	1.5	1.9	0.0	0.0	0.0	1.4	1.4	0.0	0.0	0.0	1.3	2.1
S-3	8.5	2.8	3.9	5.6	5.9	6.1	2.2	2.8	4.4	5.1	5.3	1.8	3.0	3.9	5.2	5.3	0.3	2.2	3.1	4.3	4.8
S-4	8.5	0.4	1.4	1.6	1.8	1.9	0.0	1.0	1.1	1.2	1.4	0.3	1.0	1.0	1.0	1.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

1; Concentration (ppm), 2; Control, 3; Weeks

B. MEA media

(cm/plate)

Conc. ¹ Fungi	CTR ²	10ppm					25ppm					50ppm					100ppm				
		2w ³	3w	4w	5w	6w	2w	3w	4w	5w	6w	2w	3w	4w	5w	6w	2w	3w	4w	5w	6w
A-1	8.5	3.4	4.9	5.8	7.5	8.0	3.1	4.3	5.2	6.0	6.4	2.4	3.1	3.6	3.7	4.7	2.7	3.0	3.5	3.6	3.8
A-2	8.5	1.8	2.5	3.0	3.4	3.6	1.7	2.2	2.8	3.3	3.6	1.8	2.3	2.8	3.2	3.5	2.1	2.4	2.9	3.2	3.6
A-3	8.5	2.0	3.3	4.1	5.3	5.7	1.1	2.4	3.0	3.7	4.1	1.0	1.5	1.8	2.4	2.8	1.1	1.3	1.5	1.7	2.2
B-1	8.5	4.7	6.7	6.9	6.9	7.4	4.0	5.5	6.3	5.8	6.4	3.9	4.8	5.1	5.3	5.5	2.7	3.5	3.7	4.0	4.3
C-1	8.5	1.6	2.0	2.4	2.8	3.3	1.3	1.7	2.0	2.2	2.8	1.3	1.7	1.9	2.0	2.5	3.9	1.7	1.9	1.9	2.4
C-3	8.5	0.0	8.5	8.5	8.5	8.5	0.0	8.5	8.5	7.9	8.5	0.0	8.4	8.4	8.5	8.4	0.0	8.5	8.4	8.5	8.5
C-4	8.5	5.5	7.3	7.9	7.6	8.0	5.1	6.8	7.3	7.3	7.8	4.4	6.4	7.2	7.4	7.4	3.6	5.1	6.2	6.6	7.0
C-5	8.5	5.2	7.2	6.6	7.0	7.7	4.7	6.1	6.5	6.4	6.8	4.2	5.4	5.9	6.0	6.2	3.1	4.0	4.6	5.2	5.4
C-6	8.5	5.2	6.7	7.1	7.1	7.2	4.5	5.5	5.9	6.3	7.0	5.1	6.8	7.3	7.6	7.7	1.8	3.0	3.7	3.9	4.4
C-7	8.5	4.7	5.6	7.6	8.0	8.5	3.9	5.5	6.4	6.9	7.6	3.5	5.0	5.8	6.3	6.7	1.8	2.6	3.0	3.2	3.5
C-8	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5	8.1	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5	8.2	8.5	8.5	8.5	8.5	7.9	8.5	8.5	8.5
C-9	8.5	3.6	5.8	6.8	7.3	7.9	2.9	4.6	5.9	6.5	7.4	3.0	4.9	5.7	6.2	6.3	1.4	2.7	3.4	3.8	3.8
C-10	8.5	3.4	7.4	8.5	8.5	8.5	0.0	0.3	1.0	3.3	3.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
D-1	8.5	1.8	3.1	4.9	5.7	6.6	1.6	1.9	2.3	2.6	3.2	1.7	2.0	2.2	2.3	2.6	1.7	1.8	2.1	2.1	2.4
G-1	8.5	6.2	7.5	7.8	8.1	8.5	6.8	7.8	8.1	7.8	8.1	6.1	7.1	7.4	7.2	7.4	5.0	6.5	7.2	7.2	7.6
F-1	8.5	7.6	8.5	8.5	8.5	8.5	7.9	8.1	8.5	8.5	8.5	6.8	7.8	8.1	8.2	8.5	4.9	6.9	7.1	7.0	7.0
F-2	8.5	7.0	8.2	8.2	8.2	8.5	5.1	7.3	7.3	7.7	7.9	5.7	7.3	7.7	7.5	7.6	5.7	6.2	7.2	7.0	7.4
F-3	8.5	6.0	6.7	7.2	7.5	8.4	4.4	5.1	5.9	6.4	6.5	4.3	4.6	5.6	5.7	5.9	3.0	3.6	4.2	4.4	4.8
F-4	8.5	6.1	7.2	7.6	7.5	7.9	4.9	6.1	6.6	6.5	6.6	4.2	5.9	6.1	6.3	6.5	2.3	3.2	4.3	4.6	5.2
F-5	8.5	8.1	8.5	8.3	8.5	8.5	5.4	5.9	6.3	5.9	6.3	3.8	5.3	6.2	6.4	6.6	2.8	3.7	4.5	4.7	5.1
M-1	8.5	0.0	2.4	2.5	3.0	3.9	0.0	1.9	2.8	2.8	3.3	0.0	2.5	2.7	2.8	3.1	0.3	2.1	2.5	2.7	3.1
P-8	8.5	8.1	8.5	8.5	8.5	8.5	2.2	2.7	8.1	3.4	3.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
P-9	8.5	3.3	3.4	3.4	3.4	3.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
R-1	8.5	0.0	0.0	0.0	0.5	0.6	0.0	0.0	0.0	0.4	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
S-1	8.5	2.6	2.2	3.4	3.3	4.1	3.4	3.4	4.6	5.0	5.2	3.6	4.1	4.3	5.2	4.9	2.8	2.9	3.6	3.7	3.6
S-2	8.5	3.6	3.7	5.0	4.7	5.9	2.8	3.1	3.9	3.6	4.1	4.0	5.2	6.2	6.6	7.7	3.7	4.0	4.8	3.1	4.7
S-3	8.5	4.2	6.0	7.5	8.5	8.5	4.1	6.0	7.5	8.5	8.5	3.8	5.1	6.9	7.0	7.0	4.9	6.6	7.2	7.8	7.9
S-4	8.5	1.0	1.5	1.7	1.8	2.0	1.0	1.2	1.5	1.6	1.9	1.0	1.1	1.4	1.6	2.1	1.1	1.1	1.5	1.6	2.1

1; Concentration (ppm), 2; Control, 3; Weeks

C. CMA media

(cm/plate)

Conc. ¹ Fungi	CTR ²	10ppm					25ppm					50ppm					100ppm				
		2w ³	3w	4w	5w	6w	2w	3w	4w	5w	6w	2w	3w	4w	5w	6w	2w	3w	4w	5w	6w
A-1	8.5	1.2	1.9	2.5	3.5	4.2	0.0	0.9	1.6	2.0	2.2	0.0	0.2	1.1	1.5	1.5	0.0	0.9	1.2	1.3	1.4
A-2	8.5	1.2	1.5	1.8	1.9	2.1	0.0	0.0	1.1	1.2	1.4	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
A-3	8.5	1.5	1.8	2.1	2.4	2.7	1.1	1.3	1.4	1.5	1.7	0.8	1.1	1.2	1.3	1.5	1.0	1.3	1.4	1.4	1.6
B-1	8.5	1.8	2.1	2.4	2.5	2.5	1.3	1.6	1.8	2.0	2.0	1.1	1.3	1.3	1.5	1.5	0.0	0.9	1.2	1.5	1.5
C-1	8.5	1.3	3.1	2.0	2.1	2.5	0.6	1.6	1.5	1.7	2.0	0.6	1.2	1.3	1.5	1.8	0.0	1.0	1.2	1.2	1.5
C-3	8.5	2.5	3.3	3.9	4.8	5.0	2.2	2.5	2.6	3.0	3.1	1.5	1.5	1.5	1.5	1.7	1.2	0.8	1.6	0.0	1.2
C-4	8.5	1.7	2.1	2.0	2.6	2.7	1.4	1.6	1.7	1.9	2.0	0.6	1.2	1.2	1.5	1.5	0.2	1.1	1.2	1.3	1.3
C-5	8.5	1.5	1.8	2.1	2.1	2.1	1.1	1.3	1.3	1.4	1.4	0.0	1.0	0.8	0.8	1.1	0.0	0.2	0.2	0.4	0.6
C-6	8.5	1.5	1.6	2.0	2.1	2.2	0.6	1.2	1.2	1.4	1.5	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.1
C-7	8.5	0.5	1.8	2.7	3.8	4.2	0.2	1.3	2.0	2.6	3.0	0.0	1.1	4.8	2.2	2.4	0.0	0.0	0.0	0.6	1.2
C-8	8.5	3.8	4.7	5.1	5.5	5.7	2.9	3.4	3.6	4.2	4.6	1.9	2.3	1.6	2.7	3.0	2.3	2.7	2.9	3.2	3.2
C-9	8.5	1.7	2.5	3.2	4.1	4.5	0.8	1.2	1.5	2.0	1.9	0.0	0.9	1.3	1.3	1.3	0.0	0.8	1.2	1.4	1.6
C-10	8.5	1.2	1.7	2.0	2.1	2.5	0.8	1.3	1.4	1.5	1.8	0.0	0.0	1.1	1.2	1.5	0.0	0.0	0.2	0.2	0.3
D-1	8.5	2.1	2.9	3.9	3.7	4.5	1.8	2.5	3.0	3.4	3.6	1.6	2.0	2.6	3.0	3.2	1.2	2.7	1.7	1.8	1.7
G-1	8.5	1.8	2.2	2.9	3.5	3.8	0.7	1.5	1.8	2.2	2.6	0.2	1.3	1.5	1.9	2.2	0.0	0.8	3.1	1.3	1.3
F-1	8.5	2.2	2.8	3.0	3.5	3.6	1.3	1.6	1.7	5.0	1.9	1.3	4.2	1.7	1.9	2.1	0.0	0.0	0.0	1.1	1.2
F-2	8.5	1.3	1.5	1.0	1.8	1.9	0.0	0.4	0.2	1.0	1.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5
F-3	8.5	0.0	0.7	1.3	1.6	1.5	0.0	0.0	0.0	0.2	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
F-4	8.5	0.0	0.2	1.0	1.3	1.4	0.0	0.0	0.0	0.3	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
F-5	8.5	0.9	1.4	1.8	2.5	2.8	0.6	1.2	1.4	1.6	2.3	0.4	0.4	0.9	1.2	1.2	0.8	1.3	1.4	1.4	1.5
M-1	8.5	0.0	0.0	0.7	1.8	2.0	0.3	1.6	2.2	3.8	4.6	0.0	0.0	0.6	0.8	0.9	0.0	0.0	0.0	0.3	0.3
P-8	8.5	3.2	4.6	4.9	5.1	5.4	1.4	2.0	2.3	2.6	3.2	1.1	1.5	1.7	1.8	2.1	0.6	1.0	1.0	1.2	1.5
P-9	8.5	2.1	3.4	3.8	4.4	5.1	1.2	1.7	2.0	2.3	2.6	1.0	1.4	1.6	1.8	2.1	0.0	1.2	1.2	1.3	1.6
R-1	8.5	1.2	1.5	1.6	1.8	2.1	1.0	1.3	1.4	1.6	1.7	0.2	1.0	1.1	1.1	1.4	0.0	1.0	0.6	1.0	1.1
S-1	8.5	1.3	1.2	0.0	1.6	2.0	0.0	1.0	0.0	0.8	1.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0
S-2	8.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	1.0	1.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
S-3	8.5	1.3	1.5	2.0	2.3	3.4	1.5	2.0	2.1	2.4	2.6	0.0	0.0	1.2	1.4	1.6	1.0	0.0	1.7	1.9	2.2
S-4	8.5	0.0	1.0	1.1	1.2	1.4	0.0	0.0	0.2	1.0	1.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

1; Concentration (ppm), 2; Control, 3; Weeks

(다) WA-PR-WB13R 용액

WA-PR-WB13R 용액이 첨가된 PDA, MEA, CMA 배지별 곰팡이 생육 억제 효과를 나타냈다 (Table 6). WA-CV-WA13B와 비슷한 억제 효과를 나타냈다. PDA 배지에서 A-1과 C-6을 제외하고 모든 곰팡이가 100ppm에서 효과를 보였다(Table 6A). WA-PR-WB13R이 첨가된 MEA배지에서의 성장 억제 효과를 나타냈다. 앞에 다른 용액에서와 같이 PDA배지에 비해 억제 효과가 낮았다(Table 6B). WA-PR-WB13R이 첨가된 CMA배지에서 S-2와 S-4에서 높은 성장 억제 효과를 나타냈다(Table 6C).

Table 6. Inhibitory effect of nano-silver WA-PR-WB13R against various plant pathogenic fungi on different media *in vitro*

A. PDA media

(cm/plate)

Conc. ¹ Fungi	CTR ²	10ppm					25ppm					50ppm					100ppm				
		2w ³	3w	4w	5w	6w	2w	3w	4w	5w	6w	2w	3w	4w	5w	6w	2w	3w	4w	5w	6w
A-1	8.5	2.9	4.3	4.9	5.3	5.4	2.3	3.6	4.3	4.7	5.0	2.0	3.2	3.8	4.1	4.6	0.1	0.2	0.4	1.2	2.1
A-2	8.5	1.5	2.6	3.5	3.7	4.0	1.1	1.9	2.7	3.0	3.4	1.0	1.5	2.3	2.7	3.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.8
A-3	8.5	1.5	1.8	2.3	2.5	2.7	1.6	1.8	2.1	2.1	2.2	1.7	2.0	2.5	2.6	2.9	0.0	0.0	0.0	0.2	0.4
B-1	8.5	2.8	3.9	4.5	4.6	4.8	2.3	3.3	3.9	4.3	4.5	1.9	2.8	3.3	3.8	4.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C-1	8.5	1.5	1.1	1.1	2.5	3.0	1.1	0.6	1.4	1.7	2.3	1.0	1.2	1.7	2.1	2.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C-3	8.5	1.9	2.8	3.3	3.7	4.2	1.2	1.6	2.0	2.5	2.9	0.8	1.3	1.6	1.9	2.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C-4	8.5	5.0	6.2	6.9	7.4	7.6	3.6	4.6	5.4	5.9	6.2	2.4	3.7	4.2	4.8	5.2	0.6	1.2	1.7	2.7	3.5
C-5	8.5	2.8	3.9	4.3	4.5	4.7	2.3	3.2	3.8	4.2	4.3	2.0	2.7	3.3	3.7	4.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C-6	8.5	4.6	6.7	7.0	7.6	8.4	4.5	6.3	6.7	7.2	8.0	4.2	6.1	6.6	6.9	8.1	2.1	3.8	4.5	5.1	4.7
C-7	8.5	3.8	5.7	6.7	7.1	8.3	2.7	4.4	5.5	6.4	7.4	2.2	3.6	4.7	5.6	6.6	0.0	0.0	0.4	0.7	1.2
C-8	8.5	3.7	7.2	8.1	8.5	8.5	3.6	5.9	6.7	8.2	8.3	2.7	4.3	5.5	6.9	7.8	0.0	0.2	0.3	0.4	0.6
C-9	8.5	2.9	4.2	5.2	6.1	6.7	2.2	3.3	4.1	5.0	5.8	1.8	2.6	3.4	4.1	4.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C-10	8.5	1.9	2.6	3.3	3.7	4.1	1.6	2.2	2.6	2.9	3.2	1.8	2.6	3.5	3.7	3.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
D-1	8.5	2.0	3.2	4.2	5.0	5.5	2.2	3.3	4.0	5.0	5.3	1.9	2.9	3.5	4.0	4.4	0.0	0.0	0.2	0.5	0.8
G-1	8.5	3.6	5.0	6.0	6.4	6.7	2.5	3.3	4.1	4.7	5.1	2.0	2.6	3.2	3.6	4.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
F-1	8.5	3.0	4.0	4.6	4.9	5.1	2.1	2.7	3.0	3.3	3.5	1.7	2.2	2.4	2.7	3.0	0.2	0.3	0.4	0.7	0.8
F-2	8.5	3.2	4.6	5.4	5.8	6.1	2.5	3.4	4.1	4.6	5.1	2.1	2.8	3.4	4.2	4.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
F-3	8.5	1.9	2.7	3.2	3.3	3.5	1.5	2.2	2.7	3.0	3.1	1.5	2.3	3.0	3.3	3.3	0.0	0.0	0.0	0.2	0.2
F-4	8.5	2.4	3.1	3.8	4.3	4.6	2.0	2.5	3.0	3.4	3.8	1.8	2.4	2.9	3.2	3.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
F-5	8.5	3.4	5.0	6.2	6.5	6.8	3.0	4.2	5.2	5.5	5.9	2.2	3.3	4.2	4.6	5.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
M-1	8.5	0.0	2.8	3.3	3.6	3.9	0.5	1.7	2.8	3.1	3.3	0.0	0.2	1.1	1.5	1.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
P-8	8.5	5.2	6.0	6.7	6.9	6.9	3.7	4.4	4.9	5.0	5.1	2.7	3.5	4.0	4.0	4.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
P-9	8.5	1.4	2.0	2.5	2.7	2.9	0.8	1.1	1.5	1.7	1.8	0.4	0.4	0.4	0.5	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
R-1	8.5	0.7	1.1	1.5	1.5	2.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
S-1	8.5	2.2	2.2	2.5	3.3	3.9	1.8	1.9	1.7	2.2	3.0	1.2	1.2	1.0	1.2	1.7	0.2	0.2	0.2	0.4	0.4
S-2	8.5	0.6	1.6	1.6	2.7	3.4	0.0	1.5	1.6	1.7	2.3	0.0	1.4	1.4	1.4	1.5	0.0	0.2	0.4	0.8	0.8
S-3	8.5	1.8	2.7	3.6	4.2	4.8	1.7	2.5	3.3	4.0	4.5	1.6	2.5	3.3	3.9	4.3	0.2	0.2	0.2	0.5	0.6
S-4	8.5	1.0	1.2	1.5	1.6	1.9	1.0	1.0	1.3	1.6	1.8	1.0	1.1	1.6	1.8	2.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

1; Concentration (ppm), 2; Control, 3; Weeks

B. MEA media

(cm/plate)

Conc. ¹ Fungi	CTR ²	10ppm					25ppm					50ppm					100ppm				
		2w ³	3w	4w	5w	6w	2w	3w	4w	5w	6w	2w	3w	4w	5w	6w	2w	3w	4w	5w	6w
A-1	8.5	3.7	5.9	7.4	8.3	8.5	2.5	3.9	4.9	5.8	6.4	2.3	3.1	3.9	4.4	4.9	2.3	5.4	6.2	6.8	7.1
A-2	8.5	1.7	3.0	5.2	6.2	6.8	1.2	2.2	3.2	3.9	4.8	1.0	1.2	1.8	2.3	3.1	1.0	1.3	1.5	1.7	2.3
A-3	8.5	2.0	2.7	3.6	4.1	4.7	1.8	2.4	3.3	3.7	4.3	1.5	2.2	3.0	3.4	3.7	1.6	2.5	3.3	3.7	4.1
B-1	8.5	5.7	7.7	7.8	8.4	8.2	3.5	5.7	6.5	6.7	6.7	2.9	4.7	5.7	6.1	6.1	2.6	6.7	7.1	7.4	7.4
C-1	8.5	1.0	1.3	2.3	3.0	4.1	1.0	1.3	1.8	2.4	3.0	1.1	1.4	1.8	2.1	2.4	1.1	1.5	1.9	2.1	2.6
C-3	8.5	6.8	8.5	8.5	8.5	8.5	6.6	8.5	8.5	8.5	8.5	6.3	8.5	8.5	8.5	8.5	5.8	8.5	8.5	8.5	8.5
C-4	8.5	5.3	8.1	8.1	8.3	8.1	3.2	5.8	7.1	7.4	7.4	2.6	4.5	5.9	6.7	6.9	1.7	6.7	7.4	7.7	7.7
C-5	8.5	5.5	7.4	8.1	8.1	8.3	3.4	5.7	6.4	6.6	6.6	3.0	4.9	6.0	6.3	6.4	2.2	6.6	7.3	7.4	7.5
C-6	8.5	4.4	8.2	8.3	8.3	8.3	1.3	4.1	6.3	6.7	6.9	1.3	3.4	5.3	6.0	6.2	1.2	6.0	7.1	7.4	7.5
C-7	8.5	7.5	8.5	8.5	8.5	8.5	3.2	5.2	6.0	6.6	6.7	1.9	3.5	4.4	4.9	5.2	1.3	6.4	6.9	7.1	7.2
C-8	8.5	7.2	8.5	8.5	8.5	8.5	6.0	7.4	8.5	8.5	8.5	5.6	6.8	8.5	8.5	8.5	5.0	7.8	8.5	8.5	8.5
C-9	8.5	3.8	6.8	7.7	8.1	8.3	2.5	4.7	6.0	6.7	7.2	2.1	3.7	4.7	5.4	5.8	2.0	5.9	6.7	7.2	7.5
C-10	8.5	1.1	4.7	7.6	8.4	8.5	0.0	3.0	6.7	7.7	8.4	0.6	2.3	4.9	6.4	7.2	0.7	3.2	5.7	6.3	6.5
D-1	8.5	1.6	3.1	5.1	6.7	7.1	1.5	2.2	2.8	3.0	3.4	1.3	2.0	2.4	2.7	2.9	1.4	4.0	4.7	5.2	5.5
G-1	8.5	6.2	7.2	8.5	8.5	8.5	4.1	5.4	6.3	6.9	6.9	3.8	5.4	6.1	6.8	6.9	2.6	6.6	7.4	7.7	7.7
F-1	8.5	6.6	8.5	8.5	8.5	8.5	5.5	6.7	7.9	8.0	8.1	4.5	7.1	7.4	7.5	7.5	3.5	7.7	8.1	8.1	8.1
F-2	8.5	6.8	8.5	8.5	8.5	8.5	4.2	5.8	6.9	7.2	7.4	4.0	5.9	7.1	7.3	7.4	3.0	7.2	7.7	7.9	8.0
F-3	8.5	4.4	6.8	7.2	8.1	8.0	3.3	5.6	6.1	6.5	6.6	2.5	4.8	5.5	5.7	5.8	1.9	6.4	6.8	7.2	7.2
F-4	8.5	4.8	6.7	6.8	6.9	7.0	3.5	5.2	6.1	6.6	6.7	2.1	3.1	3.9	4.7	5.2	2.0	5.9	6.3	6.7	6.9
F-5	8.5	3.9	6.5	7.5	8.0	8.4	2.1	3.8	5.4	6.1	6.5	1.5	2.5	3.8	4.5	5.3	1.2	1.6	2.5	3.1	3.8
M-1	8.5	1.5	2.2	3.0	3.3	3.3	1.1	1.3	1.6	2.1	2.1	1.1	1.3	1.5	1.7	1.8	0.7	0.8	0.8	1.1	1.2
P-8	8.5	3.4	3.4	3.4	8.0	3.4	5.1	5.1	5.1	6.1	5.1	1.7	3.0	3.4	4.5	3.4	1.8	3.4	3.4	3.1	3.4
P-9	8.5	0.8	1.7	0.8	3.4	0.8	0.0	0.0	0.0	5.1	0.0	0.0	0.0	0.0	3.4	0.0	0.0	0.0	0.0	3.4	0.0
R-1	8.5	0.0	0.0	0.6	0.8	2.5	1.0	2.0	2.8	3.1	3.3	2.0	3.3	4.1	4.2	4.6	1.9	2.9	3.6	3.8	4.0
S-1	8.5	1.2	1.6	4.2	4.8	4.9	1.3	1.7	3.8	4.0	4.4	1.2	1.5	2.9	3.4	3.4	1.3	3.3	4.9	5.3	5.3
S-2	8.5	0.0	1.4	1.5	1.6	1.8	0.0	0.2	1.2	2.0	4.0	0.0	0.4	0.8	1.5	2.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6
S-3	8.5	3.2	5.7	7.0	1.1	8.5	2.7	5.0	6.6	2.9	8.2	2.3	6.4	7.6	4.2	8.2	2.4	6.4	7.4	3.8	8.3
S-4	8.5	1.0	1.3	1.6	1.7	2.0	1.0	1.3	1.6	1.8	2.1	1.1	1.2	1.6	1.7	1.9	1.0	1.2	1.6	1.7	1.9

1; Concentration (ppm), 2; Control, 3; Weeks

C. CMA media

(cm/plate)

Conc. ¹ Fungi	CTR ²	10ppm					25ppm					50ppm					100ppm				
		2w ²	3w	4w	5w	6w	2w	3w	4w	5w	6w	2w	3w	4w	5w	6w	2w	3w	4w	5w	6w
A-1	8.5	1.5	2.2	2.8	3.5	3.9	1.2	1.6	1.7	2.0	2.1	1.0	1.2	1.3	1.4	1.6	0.8	3.4	3.6	3.8	4.0
A-2	8.5	1.0	1.1	1.2	1.3	1.4	0.0	1.0	1.0	1.0	1.2	0.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.0	1.0	1.1	1.1	1.1
A-3	8.5	1.4	1.9	2.4	2.5	2.8	1.1	1.4	1.7	1.8	2.0	1.1	1.2	1.4	1.5	1.7	1.2	1.4	1.5	1.5	1.5
B-1	8.5	1.9	2.3	2.5	2.6	2.8	1.4	1.8	1.9	2.1	2.2	1.1	1.2	1.4	1.4	1.5	3.2	3.5	3.6	3.7	3.7
C-1	8.5	1.1	1.4	1.6	1.7	1.8	1.0	1.1	1.0	1.3	1.4	0.0	1.0	1.0	1.0	1.1	0.0	0.8	0.8	0.8	0.8
C-3	8.5	2.4	3.2	3.6	4.1	4.5	1.7	2.3	2.7	3.1	3.1	1.4	1.7	1.8	2.1	2.2	0.6	3.9	4.2	4.5	4.6
C-4	8.5	2.6	3.1	3.5	3.6	3.7	2.6	3.3	3.4	3.6	3.6	2.1	2.5	2.5	2.6	2.5	3.9	4.3	4.5	4.6	4.6
C-5	8.5	2.0	2.4	2.6	2.7	2.8	1.6	1.8	2.0	2.2	2.3	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.0	3.5	3.6	3.7	3.8
C-6	8.5	1.2	1.7	2.2	2.4	2.6	1.2	1.6	2.0	2.3	2.5	1.0	1.1	1.2	1.2	1.3	0.0	0.6	3.5	3.6	3.7
C-7	8.5	1.2	1.8	2.2	2.5	2.7	1.2	1.5	1.6	1.8	1.9	0.4	1.0	1.1	3.5	3.8	0.0	0.0	0.6	1.0	1.0
C-8	8.5	2.3	3.4	3.9	4.4	4.8	2.0	2.9	3.4	3.8	3.9	1.7	2.5	3.3	3.5	3.8	3.6	4.3	4.8	5.0	5.2
C-9	8.5	1.7	2.5	2.9	3.4	3.8	1.5	2.2	2.6	3.1	3.4	1.2	1.5	1.8	2.1	2.4	0.9	1.0	1.2	1.3	1.5
C-10	8.5	1.2	1.5	2.0	2.1	2.3	1.0	1.2	1.4	1.5	1.5	0.0	1.0	1.1	1.1	1.3	0.0	0.6	1.0	1.0	1.0
D-1	8.5	1.5	1.6	1.6	1.7	1.9	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	3.0	3.0	3.0	3.1	3.1
G-1	8.5	1.5	2.0	2.1	2.3	2.5	1.4	1.6	1.7	1.9	2.0	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.0	3.3	3.4	3.5	3.6
F-1	8.5	1.5	2.0	2.2	2.5	2.7	1.3	1.6	1.7	1.8	2.0	1.2	1.3	1.4	1.5	1.5	3.1	3.4	3.5	3.6	3.7
F-2	8.5	1.5	2.0	2.2	2.4	2.5	1.7	2.0	2.1	2.4	2.4	1.4	1.6	1.8	2.0	2.0	3.3	3.5	3.7	3.8	3.9
F-3	8.5	1.2	1.4	1.4	1.4	1.5	1.2	1.5	1.4	1.5	1.5	1.4	1.5	1.4	1.3	1.5	3.0	3.2	3.2	3.2	3.2
F-4	8.5	1.1	1.2	1.3	1.5	1.5	1.0	1.2	1.2	1.3	1.4	1.3	1.4	1.3	1.2	1.2	1.4	3.1	3.1	3.1	3.2
F-5	8.5	2.3	3.0	3.4	3.4	3.6	1.8	2.4	2.5	2.6	2.6	1.5	1.8	1.8	1.8	1.9	1.3	1.5	1.6	1.6	1.6
M-1	8.5	0.8	2.2	3.3	4.0	4.6	0.8	1.2	1.3	1.4	1.7	0.5	1.0	1.3	1.5	1.7	0.2	0.4	0.5	0.5	0.6
P-8	8.5	2.7	3.8	4.7	4.7	5.0	1.7	2.4	2.9	3.2	3.4	1.3	1.8	2.1	2.3	2.4	1.0	1.4	1.5	1.6	1.6
P-9	8.5	1.0	1.4	2.0	2.1	2.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.5	0.5	0.5	0.5	0.7	0.8	0.7	0.8	0.8
R-1	8.5	1.2	1.4	1.6	1.7	1.8	1.3	1.4	1.3	1.3	1.3	1.2	1.3	1.5	1.4	1.4	1.1	1.1	1.2	1.6	1.6
S-1	8.5	1.6	2.2	2.5	2.6	2.6	1.4	1.8	2.1	2.2	2.2	0.9	1.2	1.5	1.5	1.4	0.5	0.5	0.9	3.7	3.7
S-2	8.5	1.6	1.8	1.8	1.8	1.6	0.7	0.8	0.8	0.8	1.0	0.0	0.0	0.2	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
S-3	8.5	1.4	1.7	2.0	2.3	2.6	1.2	1.5	1.7	2.0	2.2	1.1	1.1	1.2	1.4	1.7	3.0	3.2	3.3	3.5	3.7
S-4	8.5	1.0	1.0	1.1	1.2	1.3	0.0	1.0	1.0	1.0	1.1	0.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.0	1.0	1.0	1.0	1.0

1; Concentration (ppm), 2; Control, 3; Weeks

(2) 은 나노 용액 종류별 세균에 대한 살균활성 기내 검정

(가) WA-CV-WA13B 용액

WA-CV-WA13B 용액을 첨가한 각각 YPG, YGC, NA, MNA액체배지에 10개의 세균을 접종하여 24h 진탕배양(30°C, 170 rpm) 후 1.0×10^5 CFU/ml 농도로 희석하여 10ppm, 25ppm, 50ppm, 100ppm 은 나노 용액이 첨가된 각 고체배지에 도말하여 접종한 후 3일 동안 colony counting 을 하여 생육 억제 능력을 확인한 결과, 25ppm에서 높은 억제효과를 나타냈다. WA-CV-WA13B 용액의 경우 C-1은 10ppm에서도 성장 억제 효과가 나타났고, 다른 세균에서는 25ppm에서 높은 억제 효과를 나타냈다. WA-CV-WA13B용액 10ppm에서 Control에 비해 C-1을 제외하고는 낮은 성장 억제 효과를 나타냈다. P-2와 P-5에서는 10ppm에서 전혀 효과가 나타나지 않았다(Table 7). WA-CV-WA13B용액이 처리된 각 배지에서의 세균의 성장 억제 효과 결과이다(Fig 1) 25ppm부터 모든 세균에 대해 억제 효과가 나타났다. C-1이 10ppm에서 높은 억제 효과를 보였다.

Table 7. *In vitro* inhibitory effects of nano-silver WA-CV-WA13B against various plant pathogenic bacteria.

Bacteria	Colony number/plate at 1.0×10^5 CFU/ml				
	Control	10ppm	25ppm	50ppm	100ppm
C-1	51.0	9.0	0.0	0.0	0.0
E-1	1354.6	1149.3	0.0	0.0	0.0
P-1	1416.0	1054.3	0.0	0.0	0.0
P-2	246.3	397.3	0.0	0.0	0.0
P-4	1472.0	1313.3	0.0	0.0	0.0
P-5	864.0	909.3	0.0	0.0	0.0
P-6	104.0	69.6	0.0	0.0	0.0
R-1	517.3	362.6	0.0	0.0	0.0
X-1	42.0	37.6	0.0	0.0	0.0
X-2	75.0	61.6	0.0	0.0	0.0

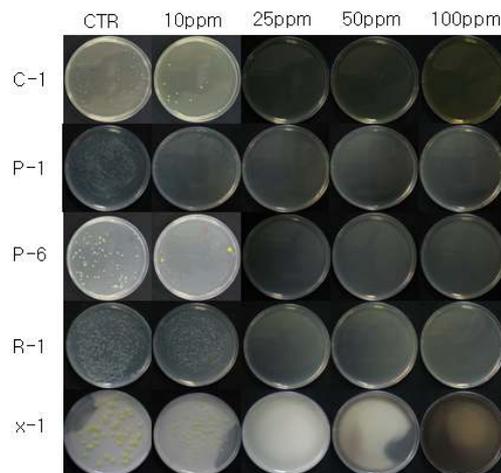


Fig 1. *In vitro* inhibitory effects of nano-silver WA-CV-WA13B against various plant pathogenic bacteria. C-1; *Clavibacter michiganensis*, P-1; *Pseudomonas cichorii*, P-6; *Pseudomonas syringae*, R-1; *Ralstonia solanacearum*, and X-1; *Xanthomonas campestris*.

(나) WA-AT-WB13R 용액

WA-AT-WB13R 용액이 농도별로 첨가된 각 고체배지에서 세균의 colony를 나타냈다. 10ppm에서 P-6에서만 강한 억제효과를 보였다. 10ppm에서 전혀 생장이 이루어 지지 않았고 다른 세균들은 25ppm에서 생장 억제를 나타내었다. X-1은 10ppm에서 적은 억제 효과를 보였다(Table 8). WA-AT-WB13R 용액은 P-6에 대해 10ppm에서 효과를 보였으며, 25ppm에서 WA-CV-WA13B 용액과 같이 모든 세균의 생장을 억제하였다(Figure 2).

Table 8. *In vitro* inhibitory effects of nano-silver WA-AT-WB13R against various plant pathogenic bacteria.

Bacteria	Colony number/plate at 1.0×10^5 CFU/ml				
	Control	10ppm	25ppm	50ppm	100ppm
C-1	51.0	47.3	0.0	0.0	0.0
E-1	1354.6	962.6	0.0	0.0	0.0
P-1	1416.0	1153.0	0.0	0.0	0.0
P-2	246.3	203.3	0.0	0.0	0.0
P-4	1472.0	1067.0	0.0	0.0	0.0
P-5	864.0	899.3	0.0	0.0	0.0
P-6	104.0	0.0	0.0	0.0	0.0
R-1	517.3	408.0	0.0	0.0	0.0
X-1	42.0	16.3	0.0	0.0	0.0
X-2	75.0	64.6	0.0	0.0	0.0

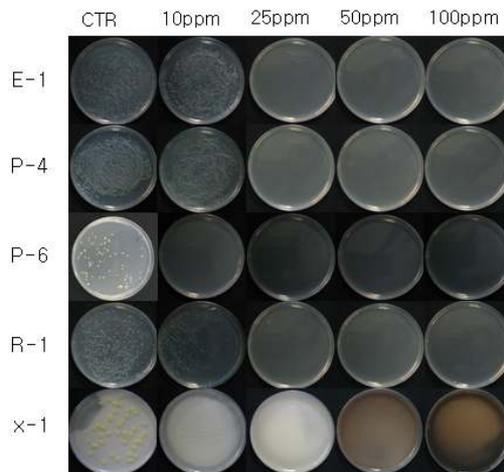


Fig 2. *In vitro* inhibitory effects of WA-AT-WB13R against various plant pathogenic bacteria. E-1; *Erwinia rhapontici*, P-4; *Pseudomonas marginalis*, P-6; *Pseudomonas syringae*, R-1; *Ralstonia solanacearum*, and X-1; *Xanthomonas campestris*.

(다) WA-PR-WB13R 용액

WA-PR-WB13R 용액이 각 농도별로 첨가된 각 고체배지에서 세균의 colony 계수 결과이다

(Table 9). WA-PR-WB13R용액 10ppm에서 P-5, P-6, X-2에서 높은 억제효과를 보였다. 다른 세균에서도 10ppm에서 control에 비해 적은 colony가 나타났다. WA-PR-WB13R 용액이 첨가된 각 배지의 결과이다(Fig3). P-5, P-6과 X-2에서 높은 항균효과를 나타냈다. 25ppm에서는 모두 자라지 않았다.

Table 9. *In vitro* inhibitory effects of nano-silver WA-PR-WB13R against various plant pathogenic bacteria.

Bacteria	Colony number/plate at 1.0×10^5 CFU/ml				
	Control	10ppm	25ppm	35ppm	50ppm
C-1	51.0	44.3	0.0	0.0	0.0
E-1	1354.6	1008.0	0.0	0.0	0.0
P-1	1416.0	1088.0	0.0	0.0	0.0
P-2	246.3	192.0	0.0	0.0	0.0
P-4	1472.0	973.3	0.0	0.0	0.0
P-5	864.0	0.0	0.0	0.0	0.0
P-6	104.0	0.0	0.0	0.0	0.0
R-1	517.3	304.0	0.0	0.0	0.0
X-1	42.0	39.0	0.0	0.0	0.0
X-2	750.0	0.0	0.0	0.0	0.0

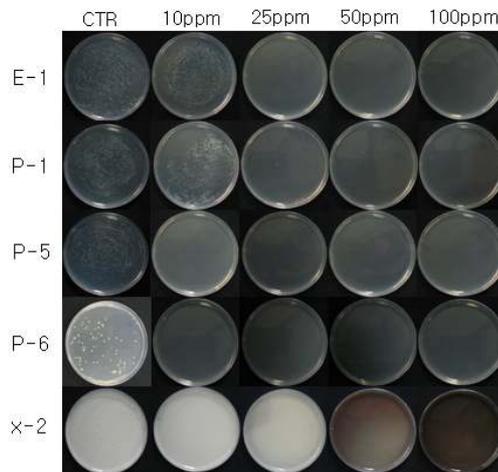


Fig 3. *In vitro* inhibitory effects of WA-PR-WB13R against various plant pathogenic bacteria. E-1; *Erwinia rhapontici*, P-1; *Pseudomonas cichorii*, P-5; *Pseudomonas viridiflava*, P-6; *Pseudomonas syringae*, and X-2; *Xanthomonas campestris*.

나. 은 나노 용액 단독 처리 시 선발된 곰팡이의 생장억제 검정

(1) 선발된 곰팡이 균주의 균사생장 억제 검정

(가) WA-CV-WA13B 용액

경제성을 고려했을 경우 포장에 살포시 10ppm 이하의 농도에서 효과가 있어야 하므로 27개의 곰팡이를 대상으로 은 나노 용액 10ppm 농도에서 5균주(*Monosporascus cannonballus*; M-1, *Rhizoctonia solani*; R-1, *Sclerotinia minor*; S-1, *Sclerotinia sclerotiorum*; S-2, *Stemphylium solani*; S-4)가 10ppm 농도에서 2주차 와 6주차 선단의 직경 길이가 큰 차이를 보이지 않아 지속적인 억제 효과가 있는 것으로 보여 지며, 이들 5종의 균주에 대하여 10ppm 이하 농도에서의 검증 실험을 하였다. 또한 정확한 억제 효과를 알아보기 위해 60ppm, 70ppm, 80ppm, 90ppm에서도 같은 방법으로 실험을 실시하였다. 각 PDA, MEA, CMA배지에서 1ppm, 3ppm, 5ppm, 7ppm 저농도 실험과 60ppm, 70ppm, 80ppm, 90ppm 고농도 실험을 추가적으로 하여 억제율을 구하였다.

WA-CV-WA13B용액이 첨가된 각 배지의 생장 억제율을 나타내고 있다(Table 10). 각각의 배지에서 전체적으로 좋은 억제율을 나타낸 것은 PDA배지였으며, WA-CV-WA13B용액은 M-1에서는 PDA배지에서 3ppm에서 85%, 5ppm에서는 100% 억제율을 보였고, MEA배지에서는 7ppm에서 82%억제율을 보였다. CMA배지에서는 억제효과가 매우 낮았다. R-1은 PDA배지에서 5ppm에서 79%, MEA배지에서 5ppm에서 95%, CMA 배지에서 5ppm에서 76% 억제율을 나타냈다. S-1은 PDA 배지 5ppm에서 91%, 3ppm에서 71% 억제율을 나타냈으며, MEA배지 10ppm에서 72% 억제율을 나타냈다. CMA배지에서는 10ppm에서 76%억제율을 나타냈다. S-2는 PDA배지 3ppm에서 75% 억제율을 나타냈고, MEA배지 5ppm에서 82% 억제율을 나타냈다. CMA배지 5ppm에서는 79% 억제율을 나타냈다. S-4는 PDA배지에서 5ppm에서 85% 억제율을 나타내고, MEA배지 3ppm에서도 80% 억제율을 나타냈다. CMA배지 5ppm에서 82%억제율을 나타냈다. 배지마다 생장 억제율이 차이가 있으나 농도가 높아질수록 생장 억제율이 늘어났으며, PDA배지에서 효과가 더 좋은 것은 배지 성분에 따라 나타나는 차이로 보여 진다. WA-CV-WA13B 용액을 첨가한 배지의 결과, PDA 배지에서 다른 배지에 비해 좋은 억제 효과를 나타냈다. M-1의 경우 CMA배지에서 높은 은 나노 농도에도 불가하고, 낮은 억제효과를 나타냈다(Fig 4).

Table 10. Effects of nano-silver WA-CV-WA13B on the fungal growth on different media *in vitro*.

		Inhibition rate (%)														
Media		PDA					MEA					CMA				
Fungi		M-1	R-1	S-1	S-2	S-4	M-1	R-1	S-1	S-2	S-4	M-1	R-1	S-1	S-2	S-4
Conc. ↓																
CTR		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1ppm		8	34	31	44	15	0	0	1	0	73	0	0	0	5	52
3ppm		85	69	71	75	56	28	47	5	45	80	21	41	29	52	27
5ppm		100	79	91	81	85	69	95	62	82	85	69	76	48	79	82
7ppm		100	78	93	81	90	78	91	89	88	88	75	80	54	86	84
10ppm		79	71	84	91	85	82	99	72	46	84	48	74	76	92	91
25ppm		81	71	85	93	85	86	73	74	66	85	84	76	84	100	95
50ppm		89	100	88	95	88	89	95	73	65	86	81	81	81	95	99
60ppm		100	93	100	100	100	100	87	100	100	91	42	93	82	100	88
70ppm		100	100	100	100	98	100	88	100	100	91	53	100	95	96	96
80ppm		100	92	100	100	96	96	94	100	100	89	60	82	98	100	95
90ppm		100	88	100	100	92	96	93	100	100	91	80	81	100	100	100
100ppm		96	100	100	100	100	92	100	71	62	87	91	82	93	100	100

1; Concentration (ppm)

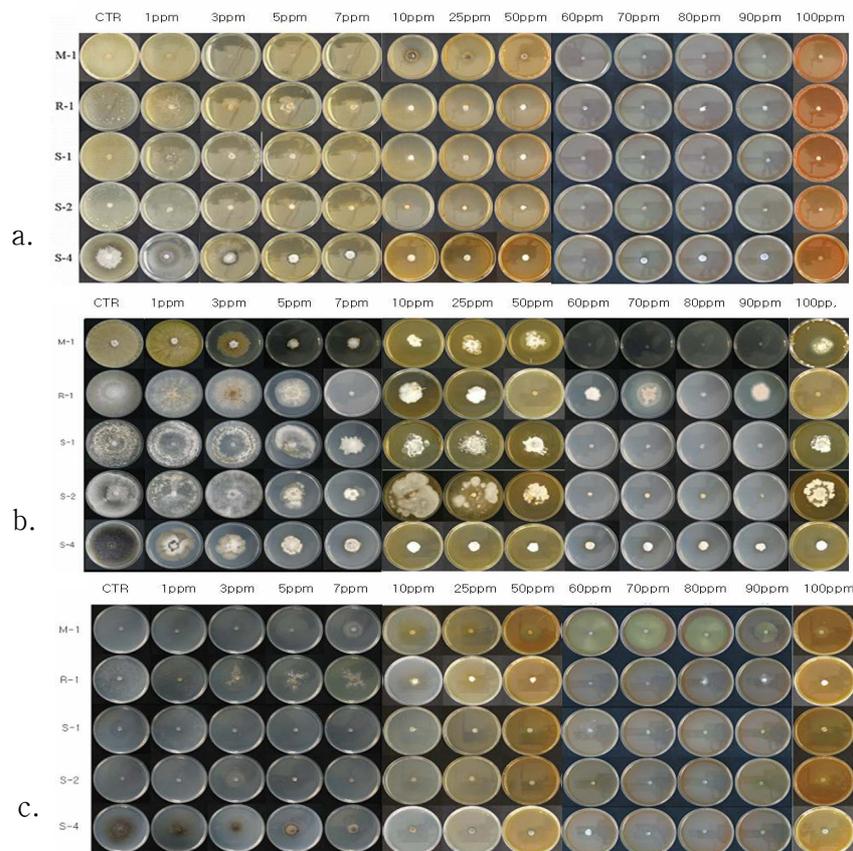


Fig 4. *In vitro* inhibitory effects of WA-CV-WA13B against various fungi on different media. a; PDA media, b; MEA media, c; CMA media, M-1; *Monosporascus cannonballus*, R-1; *Rhizotonia solani*, S-1; *Sclerotinia minor*, S-2; *Sclerotinia sclerotiorum*, and S-4; *Stemphylium solani*.

(나) WA-AT-WB13R 용액

WA-AT-WB13R 용액에서 5균주(*Monosporascus cannonballus*; M-1, *Rhizoctonia solani*; R-1, *Sclerotinia minor*; S-1, *Sclerotinia sclerotiorum*; S-2, *Stemphylium solani*; S-4)에 대한 각 배지의 농도별 억제율을 나타냈다(Table 11). WA-AT-WB13R 용액에서는 MEA배지와 CMA배지가 PDA배지에 비해 더 좋은 억제율을 나타냈다. 특히 고농도 보다 저농도에서 억제율이 높게 나타났다. M-1은 PDA배지 10ppm에서 76%, MEA배지 5ppm에서 86%, CMA배지 10ppm에서 91% 억제율을 나타냈다. R-1은 PDA배지 10ppm에서 74%, MEA배지는 98%, CMA배지 5ppm에서 78% 억제율을 나타냈다. S-1은 PDA배지 10ppm에서 88%, MEA 7ppm에서 88%, CMA배지 10ppm에서 88% 억제율을 나타냈다. S-2는 PDA배지 10ppm에서 92%, MEA 7ppm에서 96%, CMA 5 ppm에서 85% 억제율을 나타냈다. S-4는 PDA배지에서 5ppm에서 74%, MEA배지 5ppm에서 86%, CMA배지 7ppm에서 79% 억제율을 나타냈다. WA-AT-WB13R을 첨가한 각 배지별 성장 억제 결과를 나타냈다(Fig 5). 배지마다 효과가 다르게 나타났으며, 대체적으로 10ppm에서 효과가 나타났다.

Table 11. Effects of nano-silver WA-AT-WB13R on the fungal growth on different media *in vitro*.

		Inhibition rate (%)														
Media		PDA					MEA					CMA				
Fungi	Conc. ¹	M-1	R-1	S-1	S-2	S-4	M-1	R-1	S-1	S-2	S-4	M-1	R-1	S-1	S-2	S-4
CTR			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1ppm		8	3	0	15	22	38	0	1	0	76	0	12	0	0	0
3ppm		60	33	19	55	62	39	0	2	1	53	11	56	33	65	65
5ppm		47	50	41	65	74	86	25	66	53	86	52	78	45	85	64
7ppm		48	61	46	64	76	89	29	88	96	84	46	88	41	86	79
10ppm		76	74	88	92	86	76	98	69	55	85	91	84	88	100	91
25ppm		74	84	89	93	91	79	98	58	66	86	76	98	94	95	92
50ppm		75	92	95	94	91	78	100	56	42	86	95	91	100	100	100
60ppm		10	82	100	99	96	100	81	100	95	99	35	81	81	100	89
70ppm		100	94	100	99	100	100	87	98	100	95	40	78	75	99	91
80ppm		100	95	100	99	100	100	84	99	100	94	40	73	78	98	94
90ppm		100	93	100	92	98	100	91	98	100	89	58	76	80	100	95
100ppm		100	95	93	95	100	79	100	67	60	86	99	93	100	100	100

1; Concentration (ppm)

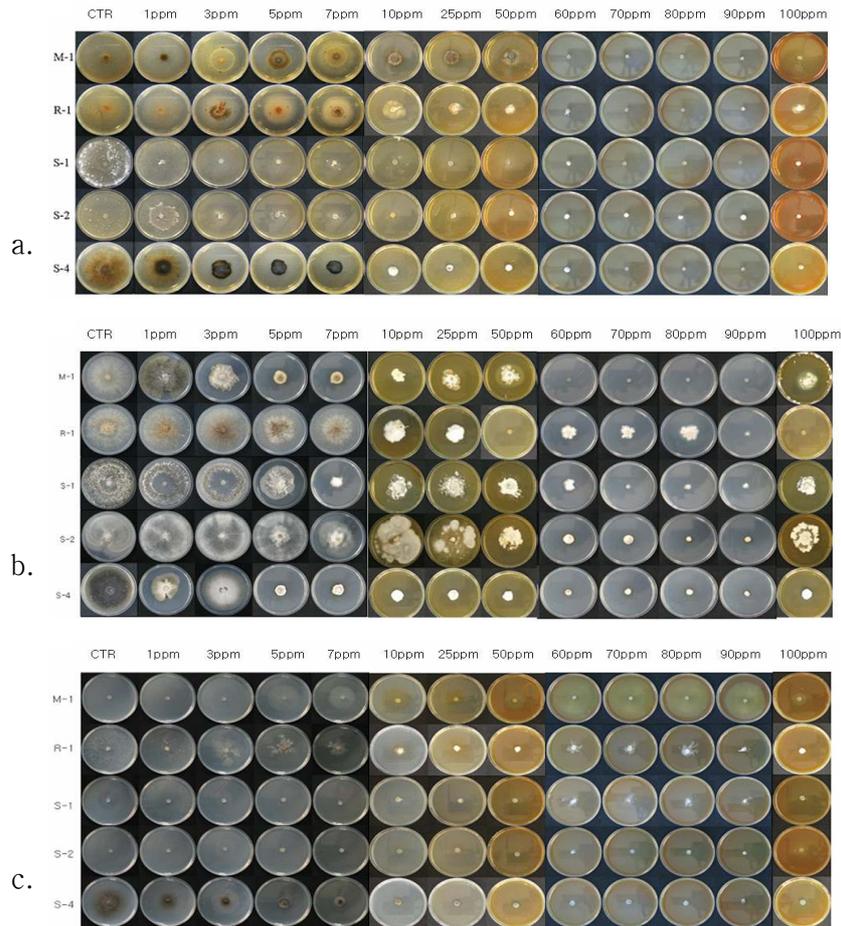


Fig 5. *In vitro* inhibitory effects of WA-AT-WB13R against various fungi on different media. a; PDA media, b; MEA media, c; CMA media, M-1; *Monosporascus cannonballus*, R-1; *Rhizotonia solani*, S-1; *Sclerotinia minor*, S-2; *Sclerotinia sclerotiorum*, S-4; *Stemphylium solani*, and S-4; *Stemphylium solani*.

(다) WA-PR-WB13R 용액

WA-PR-WB13R 용액이 첨가된 각 배지에서의 억제율을 나타냈다(Table 12). WA-PR-WB13R 용액에서 PDA배지와 MEA배지에서 CMA배지에 비해 좋은 효과를 나타냈다. M-1은 PDA배지 7ppm에서 87%, MEA배지 7ppm에서 71%, CMA배지에서 10ppm에서 71% 억제율을 나타냈다. R-1은 PDA 7ppm에서 71%, MEA에서 82%, CMA 10ppm에서 85% 억제율을 나타냈다. S-1은 7ppm에서 71%, MEA에서 98%, CMA 10ppm에서 76% 억제율을 나타냈다. S-2는 PDA 7ppm에서 76%, MEA 7ppm에서 75%, CMA배지에서는 85% 억제율을 나타냈다. S-4의 경우 PDA 7ppm에서 76%, MEA 5ppm에서 82% CMA배지 7ppm에서 78% 억제율을 나타냈다. WA-PR-WB13R 용액이 첨가된 각 배지별 억제효과 결과이다(Fig 6). PDA 배지와 MEA 배지는 7ppm부터 효과가 나타났고, CMA 배지는 10ppm부터 억제 효과가 나타났다.

Table 12. Effects of nano-silver WA-PR-WB13R on the fungal growth on different media *in vitro*.

		Inhibition rate (%)														
Media		PDA					MEA					CMA				
Fungi	Conc. ¹	M-1	R-1	S-1	S-2	S-4	M-1	R-1	S-1	S-2	S-4	M-1	R-1	S-1	S-2	S-4
CTR		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1ppm		0	0	0	0	6	0	0	1	0	71	0	0	0	0	0
3ppm		43	39	47	76	62	33	0	7	4	71	13	6	31	32	39
5ppm		29	22	61	60	57	56	12	36	27	82	46	27	40	42	58
7ppm		87	71	71	76	76	71	82	98	75	86	12	32	60	85	78
10ppm		73	86	72	80	86	74	92	67	88	85	71	85	76	84	89
25ppm		78	100	79	86	87	84	76	71	84	85	88	87	81	92	92
50ppm		92	100	88	88	85	4	65	76	91	85	88	87	87	99	92
60ppm		100	100	100	94	93	95	100	100	96	100	46	100	86	98	88
70ppm		100	92	100	94	95	93	94	100	99	99	42	95	89	100	92
80ppm		100	100	100	92	92	100	100	99	96	100	41	67	84	100	84
90ppm		100	100	100	95	92	98	100	94	96	100	65	67	88	100	94
100ppm		100	100	98	95	100	92	68	60	100	85	95	87	81	100	92

1; Concentration (ppm)

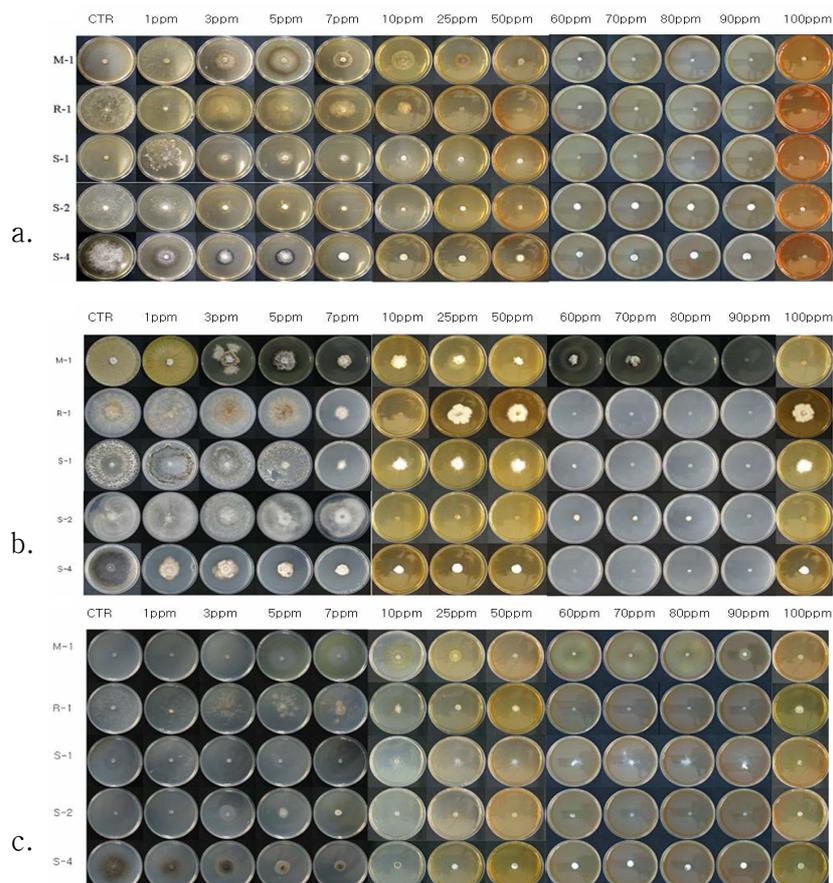


Fig 6. *In vitro* inhibitory effects of WA-PR-WB13R against various fungi on different media. a; PDA media, b; MEA media, c; CMA media, M-1; *Monosporascus cannonballus*, R-1; *Rhizotonia solani*, S-1; *Sclerotinia minor*, S-2; *Sclerotinia sclerotiorum*, and S-4; *Stemphylium solani*.

(2) 선발된 곰팡이 균주의 균핵 성장 억제 검정

Nano-silver에 억제효과가 좋은 곰팡이 *Monosporascus cannonballus*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia minor*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Stemphylium solani*중에서 균핵을 형성하는 *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia minor*, *Sclerotinia sclerotiorum*을 대상으로 하여 Nano-silver가 균핵에 성장 억제 효과가 나타나는지 알아보려고 실시하였다. 3가지 은 나노 용액과 3가지 배지로 위에 제시된 모든 농도에 대해 실험을 하였다.

(가) WA-CV-WA13B 용액

① *Sclerotinia minor*

WA-CV-WA13B 은 나노 용액을 첨가한 PDA, MEA, CMA배지 표면(87×15mm Petri dish)에 S-1의 균핵을 접종하였다. 실험 결과 PDA배지에서는 10ppm부터 94% 억제율을 보였고 100ppm에서 100% 억제율을 나타냈다. MEA배지에서는 낮은 억제율을 나타냈으며, 90ppm에서 92% 억제율을 나타냈다. CMA배지에서는 10ppm에서 94% 억제율을 나타냈으며 100ppm에서 100% 억제율을 나타냈다(Table 13). MEA배지에서 낮은 억제효과를 나타냈으며, PDA와 MEA배지에서는 3ppm부터 억제효과를 보였다(Fig 7). 배지마다 다른 억제 효과를 나타냈다. 은 나노 용액에서 균핵도 억제 효과를 나타냈다.

Table 13. Effects of nano-silver WA-CV-WA13B against sclerotium germination of *Sclerotinia minor* on three different medium.

		Inhibition rate (%)												
Conc. ¹	Media	CTR	1	3	5	7	10	25	50	60	70	80	90	100
	PDA	0	24	62	76	74	94	98	92	95	95	93	95	100
	MEA	0	0	1	44	69	72	76	84	78	75	75	82	79
	CMA	0	0	72	76	86	94	87	99	96	95	93	98	100

1; Concentration (ppm)

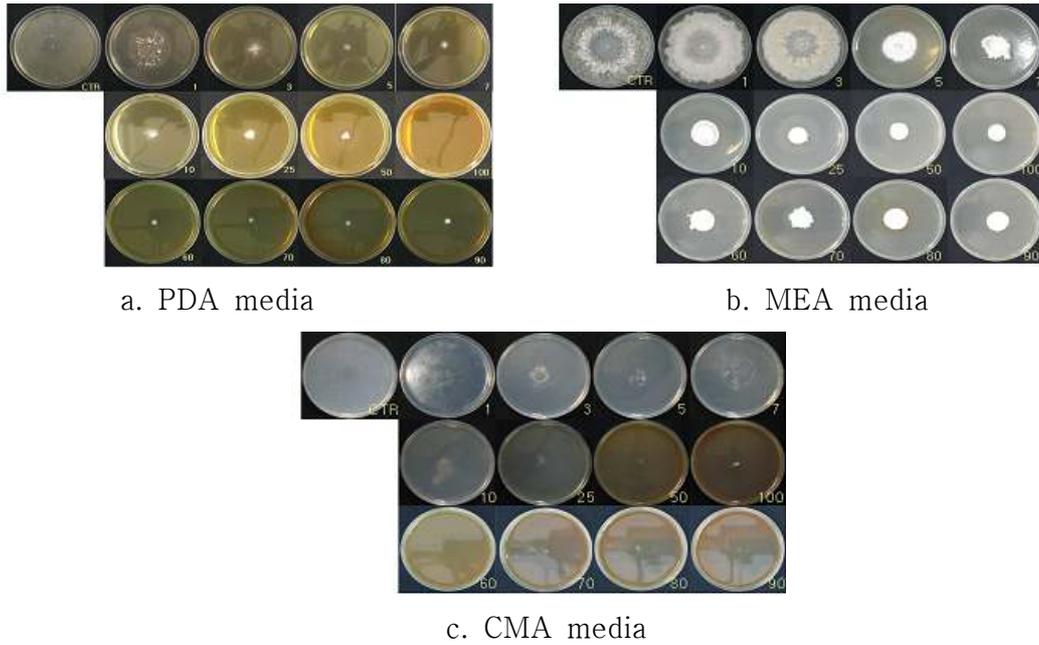


Fig 7. *In vitro* inhibitory effects of WA-CV-WA13B against sclerotium germination of *Sclerotinia minor* on different media.

② *Rhizoctonia solani*

WA-CV-WA13B 은 나노 용액을 첨가한 PDA, MEA, CMA배지 표면(87×15mm Petri dish)에 R-1의 균핵을 접종하였다. 실험 결과 PDA배지에서는 1ppm부터 5ppm까지는 별다른 억제 효과가 없었으나 7ppm에서 52%의 억제율을 나타내었다. MEA배지에서는 3, 5, 7 ppm에서 각각 60, 56, 62%의 억제율을 나타냈으며, CMA배지에서는 3, 5, 7 ppm에서 각각 73, 69, 76%의 억제율을 나타내었다(Table 14). 배지마다 다른 억제 효과를 나타냈지만 MEA 배지와 CMA 배지에서는 3ppm 혹은 그 이상의 농도에서 균핵 발아억제 효과를 나타냈다 (Figure 8).

Table 14. Effects of nano-silver WA-CV-WA13B against sclerotium germination of *R. solani* on three different medium.

		Inhibition rate (%)												
Conc. ¹	Media	CTR	1	3	5	7	10	25	50	60	70	80	90	100
	PDA	0	0	1	2	52	—	—	—	—	—	—	—	—
	MEA	0	0	60	56	62	—	—	—	—	—	—	—	—
	CMA	0	0	73	69	76	—	—	—	—	—	—	—	—

1; Concentration (ppm)

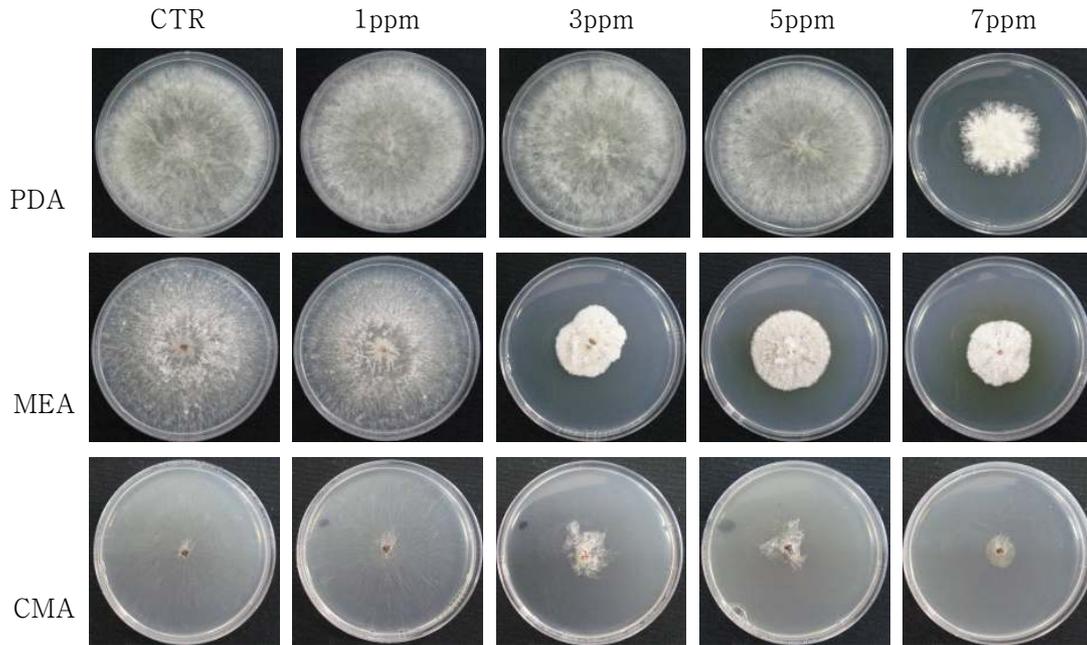


Fig 8. *In vitro* inhibitory effects of WA-CV-WA13B against sclerotium germination of *Rhizoctonia solani* on different media.

③ *Sclerotinia sclerotiorum*

WA-CV-WA13B 은 나노 용액을 첨가한 PDA, MEA, CMA배지 표면(87×15mm Petri dish)에 *Sclerotinia sclerotiorum*의 균핵을 접종하였다. 실험 결과 PDA배지에서는 1ppm부터 5ppm까지는 별다른 억제 효과가 없었으나 7ppm에서 91%의 높은 억제율을 나타내었다. MEA배지에서는 3, 5, 7 ppm에서 모두 100%의 억제율을 나타냈으며, CMA배지에서는 5, 7 ppm에서 각각 32, 79%의 억제율을 나타내었다(Table 15). 배지마다 다른 억제 효과를 나타냈지만 MEA 배지의 경우 3, 5, 7 ppm에서 매우 높은 억제율을 그리고 PDA와 CMA 배지에서는 7ppm에서 높은 균핵 발아억제 효과를 나타냈다 (Fig 9).

Table 15. Effects of nano-silver WA-CV-WA13B against sclerotium germination of *Sclerotinia sclerotiorum* on three different medium.

		Inhibition rate (%)												
Conc. ¹		CTR	1	3	5	7	10	25	50	60	70	80	90	100
Media														
PDA		0	0	0	1	91	-	-	-	-	-	-	-	-
MEA		0	0	100	100	100	-	-	-	-	-	-	-	-
CMA		0	0	0	32	79	-	-	-	-	-	-	-	-

1; Concentration (ppm)

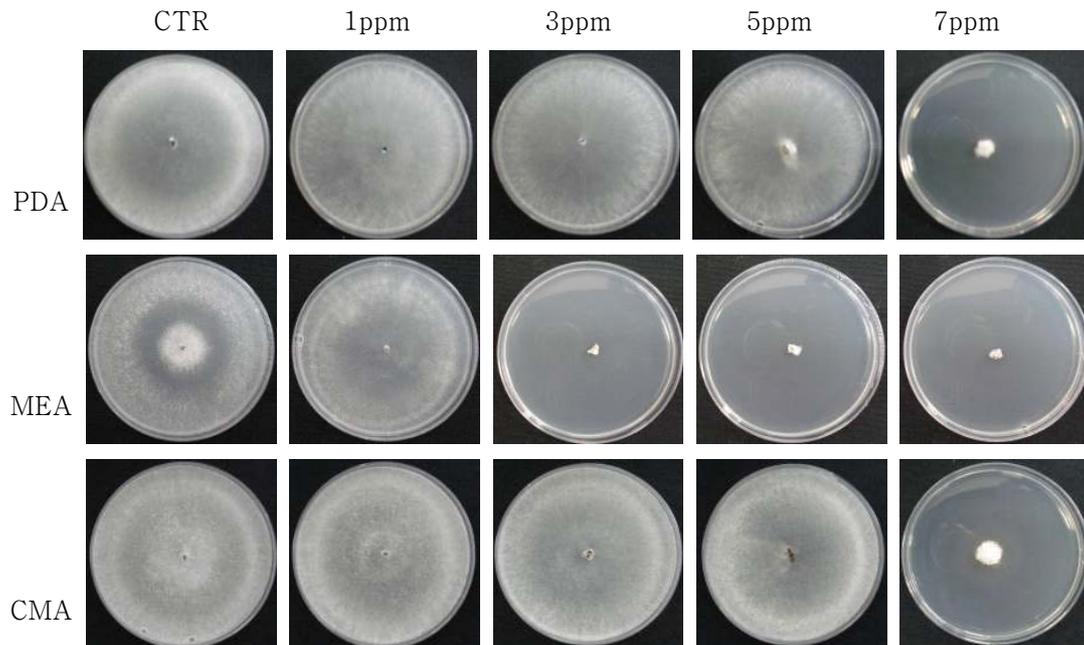


Fig 9. *In vitro* inhibitory effects of WA-CV-WA13B against sclerotium germination of *Sclerotinia sclerotiorum* on different media.

(나) WA-AT-WB13R 용액

① *Sclerotinia minor*

WA-AT-WB13R 용액이 첨가된 PDA, MEA, CMA배지별 균핵에 성장 억제효과를 나타내고 있다. PDA배지에서는 25ppm에서 80% 억제율을 보였고 100ppm에서 98% 억제율을 보였다. MEA 배지에서는 100pp에서 81%, CMA배지에서는 90ppm에서 99% 억제율을 보였다(Table 16). PDA와 CMA배지에서 3ppm부터 억제효과가 나타나고, MEA는 7ppm부터 억제효과가 나타났다(Fig 10).

Table 16. Effects of nano-silver WA-AT-WB13R against sclerotium germination of *Sclerotinia minor* on three different medium.

		Inhibition rate (%)											
Conc. ¹ Media	CTR	1	3	5	7	10	25	50	60	70	80	90	100
PDA	0	28	66	72	71	78	80	87	94	92	92	98	98
MEA	0	4	9	53	78	79	78	73	76	80	75	75	81
CMA	0	0	54	78	82	87	89	78	96	93	94	99	94

1; Concentration (ppm)

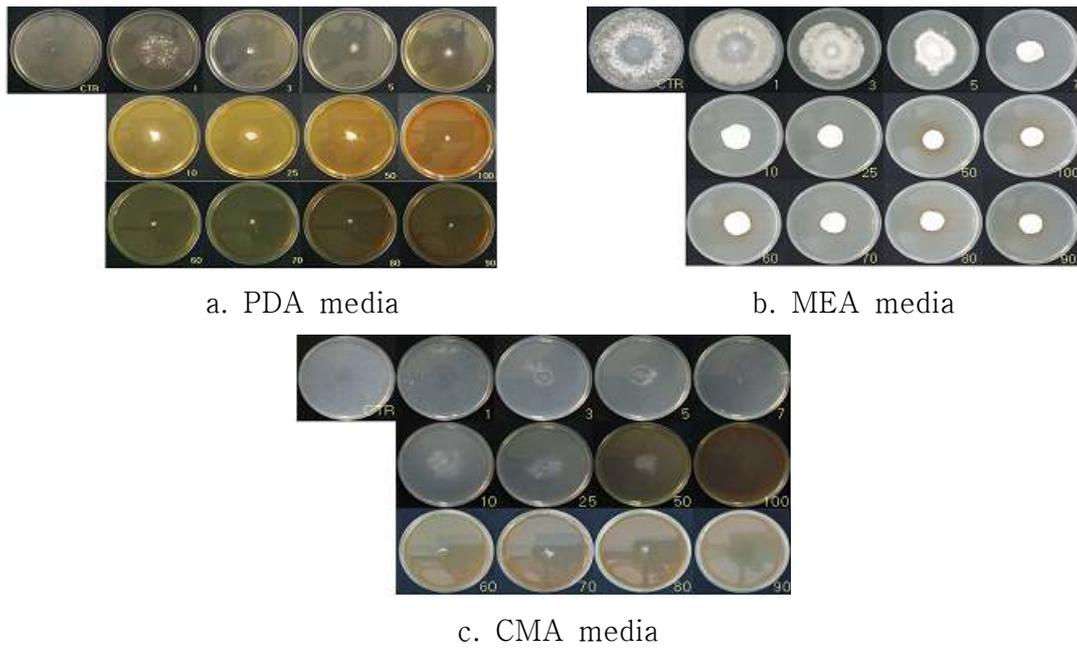


Fig 10. *In vitro* inhibitory effects of WA-AT-WB13R against sclerotium germination of *Sclerotinia minor* on different media.

② *Rhizoctonia solani*

WA-AT-WB13R 은 나노 용액을 첨가한 PDA, MEA, CMA배지 표면(87×15mm Petri dish)에 R-1의 균핵을 접종하였다. 실험 결과 PDA배지에서는 1ppm부터 5ppm까지는 전혀 균핵 발아 억제 효과가 없었으나 7ppm에서 61%의 억제율을 나타내었다. MEA배지에서는 1ppm과 3ppm에서 거의 균핵의 발아를 억제 하지 못했으며 5, 7 ppm에서 각각 58, 71%의 비교적 높은 균핵 발아 억제율을 나타냈다. CMA배지에서는 1ppm에서 매우 낮은 억제율을 그리고 3, 5, 7 ppm에서 각각 76, 88, 86%의 매우 높은 억제율을 나타내었다(Table 17). 배지마다 약간씩 다른 억제 효과를 나타냈지만 PDA 배지에서는 7ppm의 농도 조건이, MEA 배지에서는 5, 7ppm의 농도 조건이 그리고 CMA 배지에서는 3, 5, 7ppm 농도조건이 우수한 균핵 발아억제 효과를 나타냈다 (Fig 11).

Table 17. Effects of nano-silver WA-AT-WB13R against sclerotium germination of *Rhizoctonia solani* on three different medium.

		Inhibition rate (%)											
Conc. ¹ Media	CTR	1	3	5	7	10	25	50	60	70	80	90	100
PDA	0	0	0	0	61	—	—	—	—	—	—	—	—
MEA	0	8	18	58	71	—	—	—	—	—	—	—	—
CMA	0	15	76	88	86	—	—	—	—	—	—	—	—

1; Concentration (ppm)

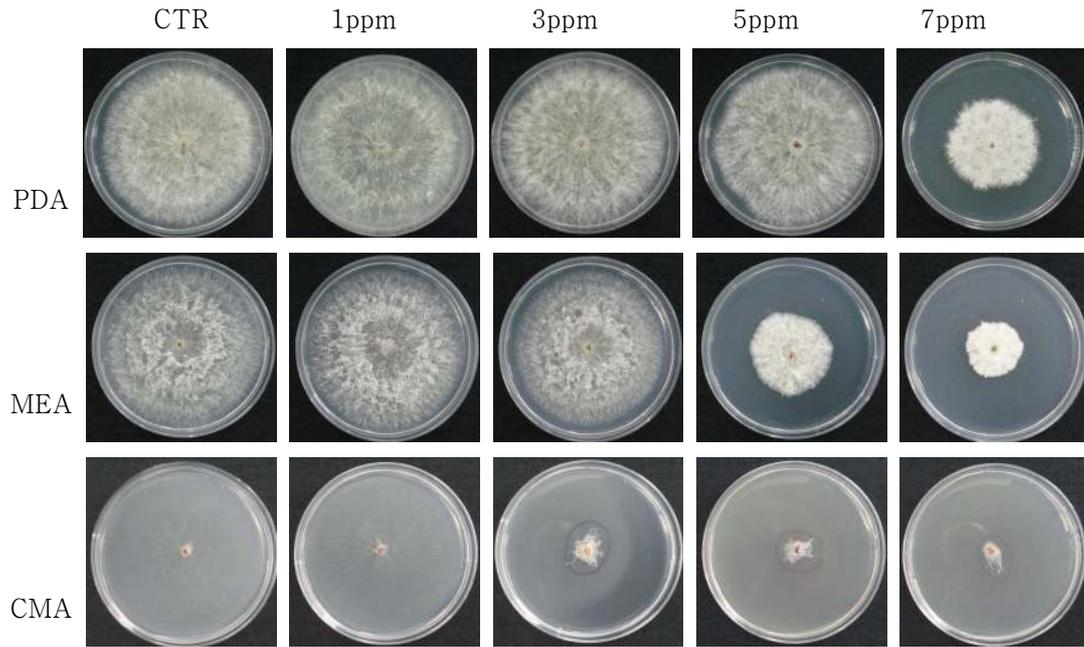


Fig 11. *In vitro* inhibitory effects of WA-AT-WB13R against sclerotium germination of *Rhizoctonia solani* on different media.

③ *Sclerotinia sclerotiorum*

WA-AT-WB13R 은 나노 용액을 첨가한 PDA, MEA, CMA배지 표면(87×15mm Petri dish)에 *Sclerotinia sclerotiorum*의 균핵을 접종하였다. 실험 결과 PDA배지에서는 1, 3ppm 농도 조건은 균핵의 발아억제에 효과가 없었으며 5, 7ppm 농도 조건이 비교적 높은 균핵 발아 억제 효과를 나타 내었다. MEA배지와 CMA 배지에서는 1ppm 농도 조건이 균핵의 생장을 거의 억제하지 못 했으나, 3, 5, 7ppm 농도조건은 100% 균핵의 발아를 억제하였다(Table 18). 배지마다 약간씩 다른 억제 효과를 나타냈지만 PDA 배지에서는 5, 7ppm의 농도 조건이, MEA 배지와 CMA 배지에서는 3, 5, 7ppm의 농도 조건이 100%의 균핵 발아억제 효과를 나타냈다 (Fig 12).

Table 18. Effects of nano-silver WA-AT-WB13R against sclerotium germination of *Sclerotinia sclerotiorum* on three different medium.

		Inhibition rate (%)											
Conc. ¹ Media	CTR	1	3	5	7	10	25	50	60	70	80	90	100
PDA	0	0	0	55	69	-	-	-	-	-	-	-	-
MEA	0	12	100	100	100	-	-	-	-	-	-	-	-
CMA	0	20	100	100	100	-	-	-	-	-	-	-	-

1; Concentration (ppm)

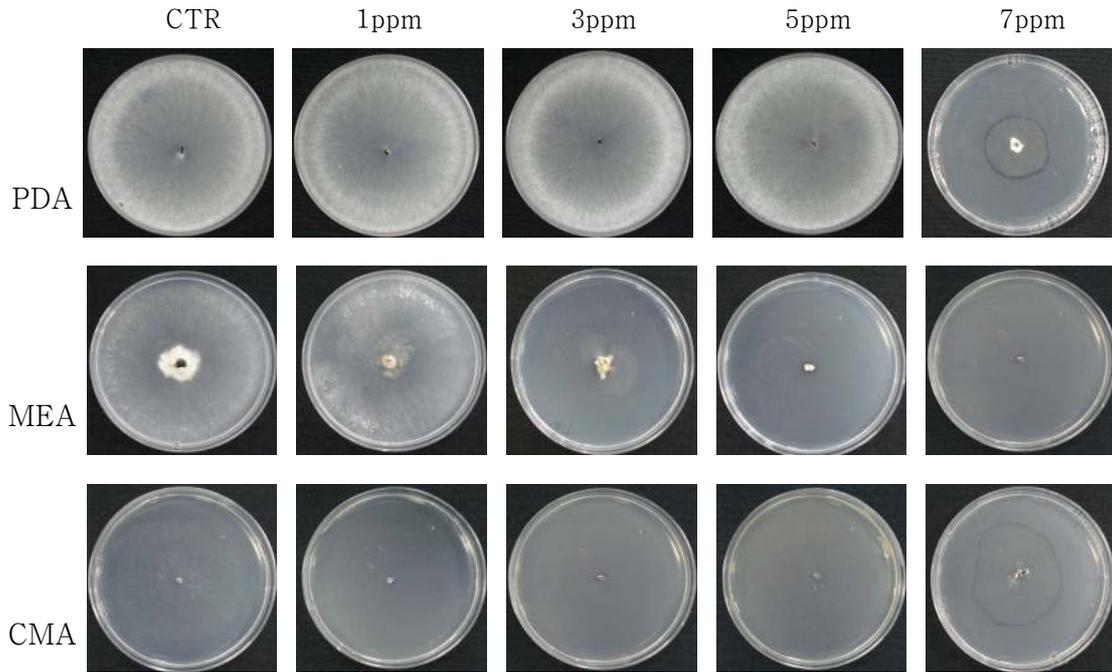


Fig 12. *In vitro* inhibitory effects of WA-AT-WB13R against sclerotium germination of *Sclerotinia sclerotiorum* on different media.

(다) WA-PR-WB13R 용액

① *Sclerotinia minor*

WA-PR-WB13R 용액이 첨가된 PDA, MEA, CMA배지에 각 농도별 균핵 성장 억제효과를 나타내고 있다. PDA배지는 80ppm에서 95%, 100ppm에서 100% 억제율을 나타내었다. MEA배지에서는 100ppm에서 78%, 70ppm, 90ppm에서 81% 억제율을 보였다. CMA배지에서는 60ppm에서 93%, 100ppm에서는 66% 억제율을 보였다(Table 19). PDA배지에서 3ppm부터 생육 억제 효과가 나타났다. MEA배지는 10ppm부터 생육 억제 효과가 나타났다. CMA배지에서는 5ppm부터 생육 억제 효과가 나타났다(Fig 13). 균핵에서는 3가지 용액에서 많은 차이는 없으나, PDA와 CMA배지에서 대체적으로 좋은 억제율을 나타냈고, MEA배지에서 낮은 억제율을 나타냈다.

Table 19. Effect of nano-silver WA-PR-WB13R against sclerotium germination of *Sclerotinia minor* on three different medium.

Conc. Media	Inhibition rate (%)												
	CTR	1	3	5	7	10	25	50	60	70	80	90	100
PDA	0	26	61	69	62	81	84	95	89	86	87	85	100
MEA	0	1	2	12	29	75	80	79	79	81	79	81	78
CMA	0	0	35	47	59	86	68	82	93	86	86	87	66

1; Concentration (ppm)

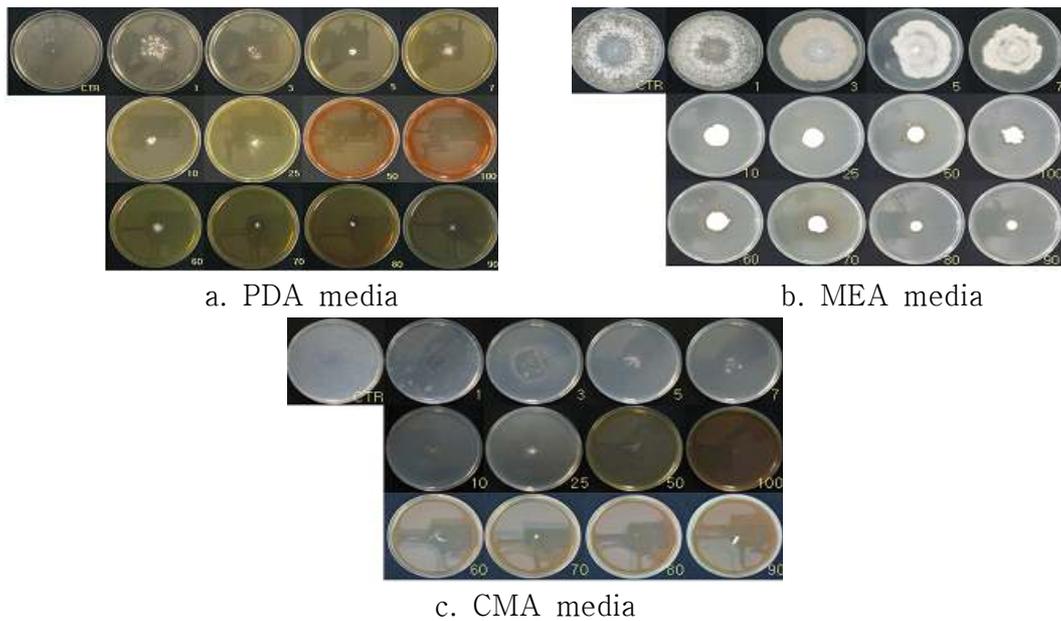


Fig 13. *In vitro* inhibitory effects of WA-PR-WB13R against sclerotium germination of *Sclerotinia minor* on different media.

② *Rhizoctonia solani*

WA-PR-WB13R 은 나노 용액을 첨가한 PDA, MEA, CMA배지 표면(87×15mm Petri dish)에 *Rhizoctonia solani*의 균핵을 접종하였다. 실험 결과 PDA배지에서는 모든 농도 조건이 균핵의 발아억제에 효과가 거의 없거나 전혀 없었으며, MEA배지의 경우 1, 3ppm 농도조건에서 매우 낮은 억제 효과를 그리고 5, 7ppm 농도조건에서는 상당한 억제율을 나타내었다. CMA 배지에서는 1ppm 농도 조건이 균핵의 생장을 거의 억제하지 못했으나, 3, 5, 7ppm 농도조건에서는 85%이상의 매우 높은 균핵의 발아 억제율을 나타내었다(Table 20). 배지마다 약간씩 다른 억제 효과를 나타냈지만 PDA 배지에서는 모든 농도 조건이 억제효과가 없었고, MEA 배지에서는 7ppm 농도조건이 그리고 CMA 배지에서는 3, 5, 7ppm의 농도 조건이 비교적 높은 혹은 매우 높은 균핵의 발아억제 효과를 나타냈다(Figure 14).

Table 20. Effect of nano-silver WA-PR-WB13R against sclerotium germination of *Rhizoctonia solani* on three different medium.

		Inhibition rate (%)											
Conc. Media	CTR	1	3	5	7	10	25	50	60	70	80	90	100
PDA	0	4	0	1	10	-	-	-	-	-	-	-	-
MEA	0	1	18	55	65	-	-	-	-	-	-	-	-
CMA	0	17	85	89	85	-	-	-	-	-	-	-	-

1; Concentration (ppm)

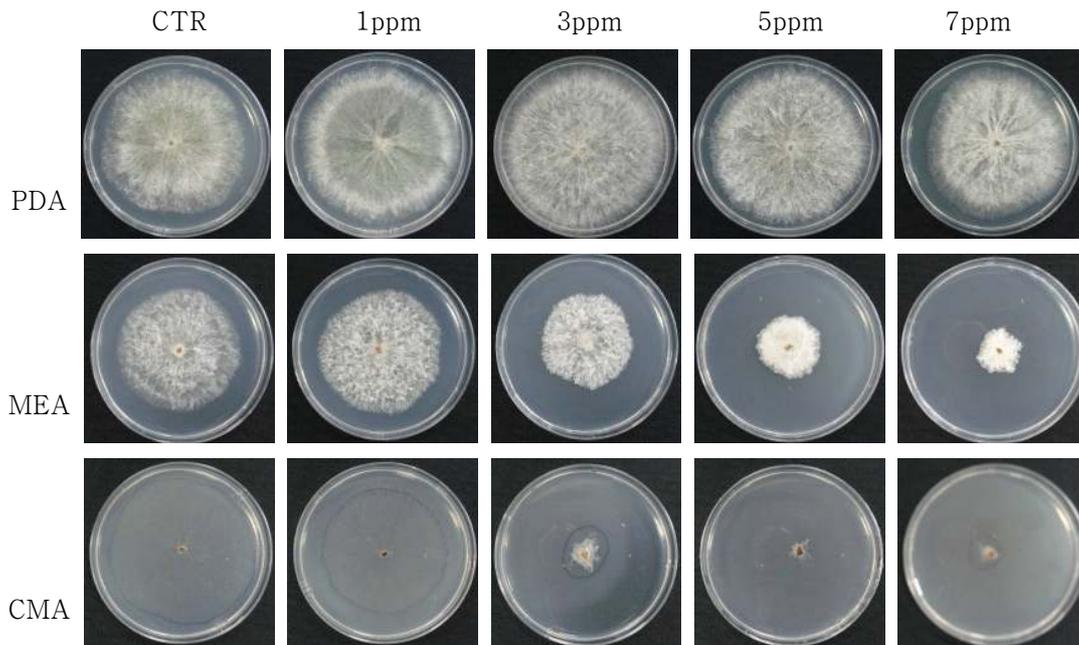


Fig. 14. *In vitro* inhibitory effects of WA-PR-WB13R against sclerotium germination of *Rhizoctonia solani* on different media.

③ *Sclerotinia sclerotiorum*

WA-PR-WB13R 은 나노 용액을 첨가한 PDA, MEA, CMA배지 표면(87×15mm Petri dish)에 *Sclerotinia sclerotiorum*의 균핵을 접종하였다. 실험 결과 PDA배지에서는 모든 농도 조건이 균핵의 발아억제에 효과가 없었으며, MEA배지의 경우 3, 5ppm 농도조건에서 어느정도의 균핵발아 억제 효과를 나타냈고 7ppm의 농도 조건은 100% 균핵의 발아를 억제하였다. CMA 배지에서는 1ppm 농도 조건이 균핵의 생장을 거의 억제하지 못했으나, 3, 5, 7ppm 농도조건에서는 100% 균핵의 발아를 억제하였다(Table 21). 배지마다 약간씩 다른 억제 효과를 나타냈지만 PDA 배지에서는 모든 농도 조건이 억제효과가 없었고, MEA 배지에서는 7ppm 농도조건이 그리고 CMA 배지에서는 3, 5, 7ppm의 농도 조건이 100% 균핵의 발아억제 효과를 나타냈다 (Fig 15).

Table 21. Effect of nano-silver WA-PR-WB13R against sclerotium germination of *Sclerotinia sclerotiorum* on three different medium.

Conc. ¹ Media		Inhibition rate (%)											
		CTR	1	3	5	7	10	25	50	60	70	80	90
PDA	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-
MEA	0	0	41	86	100	-	-	-	-	-	-	-	-
CMA	0	1	100	100	100	-	-	-	-	-	-	-	-

1; Concentration (ppm)

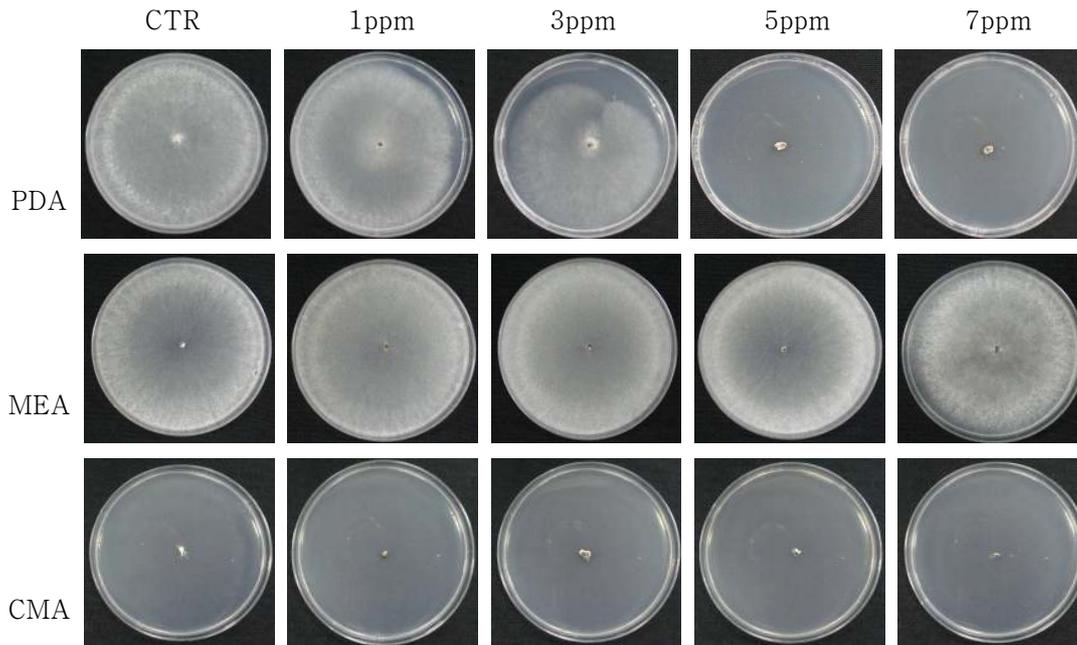


Fig. 15. *In vitro* inhibitory effects of WA-PR-WA13B against sclerotium germination of *Sclerotinia sclerotiorum* on different media.

다. 은 나노 용액 혼합 처리 시 선발된 곰팡이의 성장 억제 검증

(1) 선발된 곰팡이 균주의 균사 성장 억제 검증

선발된 5균주(M-1; *Monosporascus cannonballus*, R-1; *Rhizotonia solani*, S-1; *Sclerotinia minor*, S-2; *Sclerotinia sclerotiorum*, S-4; *Stemphylium solani*)를 대상으로 하여 은 나노 용액을 혼합하여 균사생장에 어떠한 영향을 미치는지, 그리고 선발된 균주 중 3개의 균주 R-1; *Rhizotonia solani*, S-1; *Sclerotinia minor*, S-2; *Sclerotinia sclerotiorum*를 대상으로 혼합된 은 나노 용액이 균핵의 성장에 대하여 어떠한 영향을 미치는지 확인해 보았다. WA-CV-WA13B; CV, WA-AT-WB13R; AT, WA-PR-WB13R; PR용액으로 CV+AT, CV+PR, AT+PR, CV+AT+PR로 혼합하여 위와 같은 방법으로 3가지 배지와 농도별로 실험을 실시하였다.

(가) WA-CV-WA13B와 WA-AT-WB13R 혼합용액

5균주에 대해 WA-CV-WA13B와 WA-AT-WB13R용액을 첨가하여 각 배지에 농도별로 치상하여 성장 억제율을 나타냈다(Table 22). M-1에서는 PDA, CMA 배지에서 50ppm에서 100% 억제율을 나타냈고, MEA 배지에서는 10ppm에서 78% 억제율을 나타냈다. R-1은 PDA, CMA 배지 60ppm에서 100%, 88% 억제율을 나타냈고 MEA 배지에서 50ppm에서 82% 억제율을 나타냈다. S-1은 5ppm에서 효과가 나타났고, S-2는 CMA배지에서 3ppm에서 효과가 나타났으나, PDA, MEA 배지에서는 25ppm부터 효과가 나타났다. S-4는 CMA에서 7ppm에서 87% 억제율을 나타냈다. WA-CV-WA13B용액과 WA-AT-WB13R용액을 혼합한 결과, 개별로 사용하였을 때보다 M-1의 경우 CMA배지에서는 더 좋은 효과를 나타냈지만, 다른 배지에서나, 다른 균주에서는 눈에 띄게 좋은 효과는 기대하기 어려웠다. M-1의 경우, WA-AT-WB13B용액이 WA-CV-WA13B 용액보다 M-1에 대해 CMA배지에서 더 좋은 효과를 나타냈기 때문에 혼합시, CMA배지에서 더 좋은 효과를 나타낸 것으로 생각되어진다. WA-CV-WA13B와 WA-AT-WB13R 용액이 첨가된 각 배지에서 농도별 생육 억제율을 나타내고 있다(Fig 16). PDA배지와 CMA배지에서 MEA배지에 비해 높은 억제율을 나타냈다. 배지마다 억제효과가 다르게 나타났다. M-1의 경우 PDA배지와 CMA배지에서 좋은 억제효과를 나타냈다. S-1은 3가지 배지에서 모두 좋은 억제효과를 나타냈다. S-2도 PDA배지와 CMA배지에서 좋은 효과를 나타냈고, S-4는 MEA 배지와 CMA배지에서 좋은 효과를 나타냈다.

Table 22. Inhibitory effects of nano-silver WA-CV-WA13B and WA-AT-WB13R combination against fungal growth on different media *in vitro*.

		Inhibition rate (%)														
Media		PDA					MEA					CMA				
Fungi		M-1	R-1	S-1	S-2	S-4	M-1	R-1	S-1	S-2	S-4	M-1	R-1	S-1	S-2	S-4
Conc. ¹																
CTR		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1ppm		0	0	9	0	0	0	0	0	56	0	0	65	16	12	
3ppm		5	4	72	61	38	51	0	0	62	28	59	79	84	78	
5ppm		28	26	74	53	46	62	22	66	16	71	60	74	85	79	
7ppm		31	44	71	76	65	68	53	95	68	75	56	79	86	94	
10ppm		21	47	100	65	49	78	52	98	56	82	53	78	84	85	
25ppm		52	18	100	100	55	81	78	98	80	88	69	79	91	87	
50ppm		100	33	100	100	80	81	84	98	80	92	100	76	91	88	
60ppm		99	100	99	100	99	78	55	99	78	82	100	88	87	91	
70ppm		98	100	98	100	99	95	89	96	81	91	100	89	85	93	
80ppm		96	100	100	100	100	100	88	95	86	95	100	87	86	96	
90ppm		99	100	100	100	100	94	55	96	81	88	100	86	84	98	
100ppm		100	100	100	100	73	79	69	95	82	87	100	73	95	89	

1; Concentration (ppm)

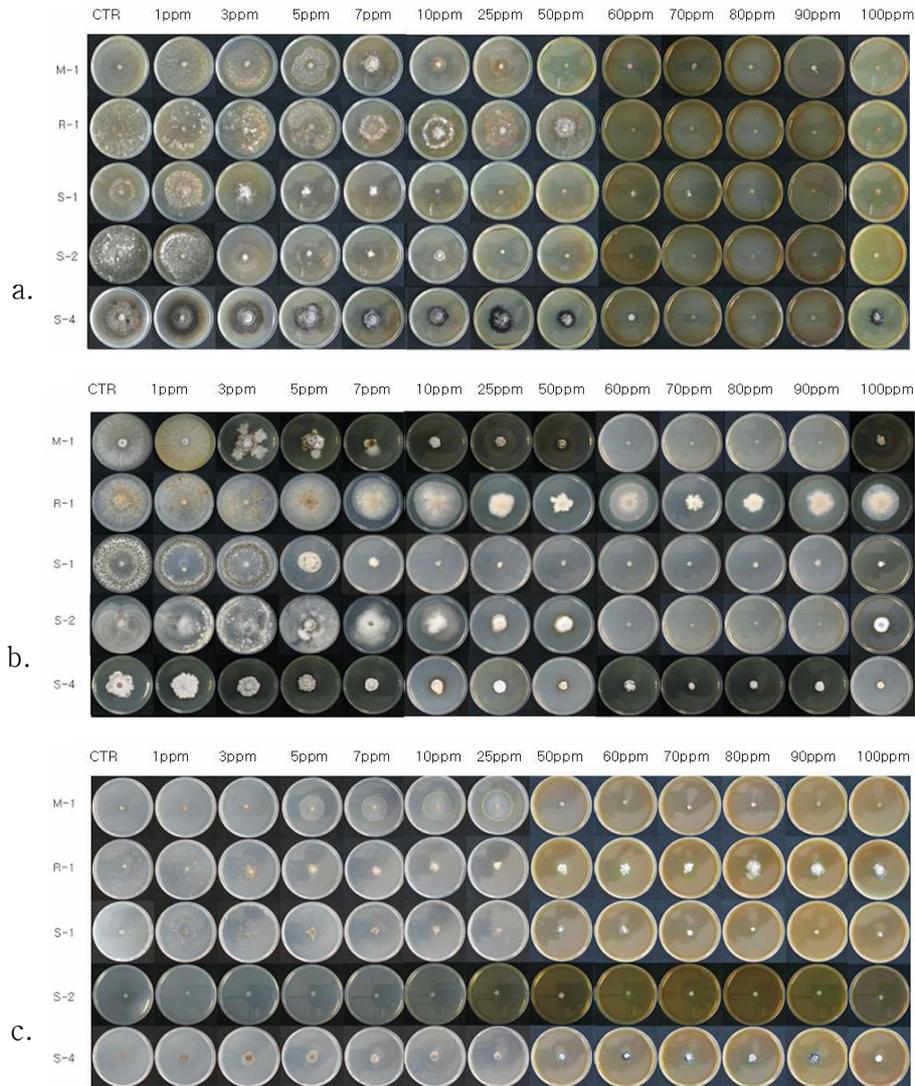


Fig 16. *In vitro* inhibitory effects of WA-CV-WA13B and WA-AT-WB13R combination against various plant pathogenic fungi on different media. a; PDA media, b; MEA media, c; CMA media, M-1; *Monosporascus cannonballus*, R-1; *Rhizotonia solani*, S-1; *Sclerotinia minor*, S-2; *Sclerotinia sclerotiorum*, and S-4; *Stemphylium solani*.

(나) WA-CV-WA13B와 WA-PR-WB13R 혼합용액

WA-CV-WA13B와 WA-PR-WB13R 용액이 첨가된 각 배지에 대한 성장 억제율을 나타내고 있다(Table 23). M-1은 PDA 배지에서 7ppm에서 80% 억제율을 나타냈고, 10ppm에서 87% 억제율을 나타냈다. R-1에서는 대체적으로 좋은 억제효과를 나타내지 않았다. PDA에서 50ppm에서 92% 억제율을 나타냈다. S-1은 PDA 배지에서 5ppm에서 86% 억제율을 나타냈고, CMA 배지에서는 25ppm에서 85% 억제율을 나타냈다. S-2에서는 CMA 배지에서 5ppm에서 82% 억제율을 나타냈으나, MEA 배지에서는 25ppm에서 82% 억제율을 나타냈다. S-4는 PDA 배지에서는 60ppm에서 100% 억제율을 나타냈으나, MEA 배지에서 3ppm에서 81% 억제율을 나타냈다.

WA-CV-WA13B와 WA-PR-WB13R용액은 M-1과 R-1이 10ppm이하에서 낮은 억제율을 나타냈

다. WA-CV-WA13B와 WA-PR-WB13R용액이 처리된 각 배지에서 나타난 결과이다. 대체로 낮은 억제 효과를 나타내고 있다. M-1의 경우 CMA배지 고농도에서도 생장 억제가 낮은 것이 관찰되었다. R-1도 대체로 낮은 억제효과를 나타냈다(Fig 17)

Table 23. Inhibitory effects of nano-silver WA-CV-WA13B and WA-PR-WB13R combination against fungal growth on PDA *in vitro*

Inhibition rate (%)															
Media	PDA					MEA					CMA				
Fungi Conc. ¹	M-1	R-1	S-1	S-2	S-4	M-1	R-1	S-1	S-2	S-4	M-1	R-1	S-1	S-2	S-4
CTR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1ppm	0	0	0	0	0	51	0	0	0	54	0	61	0	0	28
3ppm	16	28	73	81	44	58	6	1	0	81	21	73	60	78	55
7ppm	45	36	86	52	52	59	9	14	2	82	32	72	65	82	82
7ppm	80	55	66	61	60	73	64	58	5	87	41	79	66	81	86
10ppm	54	46	99	100	52	68	19	80	71	89	41	74	75	81	85
25ppm	88	76	95	98	52	87	85	95	82	91	41	73	85	88	93
50ppm	88	92	100	94	75	99	47	84	34	84	44	75	98	84	91
60ppm	87	100	100	100	100	47	75	100	100	100	64	53	87	100	89
70ppm	91	84	100	100	96	56	69	100	98	92	68	59	84	99	91
80ppm	94	75	100	100	100	52	74	100	96	88	71	54	86	99	88
90ppm	92	72	100	100	92	45	72	100	100	88	62	51	86	100	88
100ppm	100	100	100	100	100	100	88	94	94	92	47	73	95	92	95

1; Concentration (ppm)

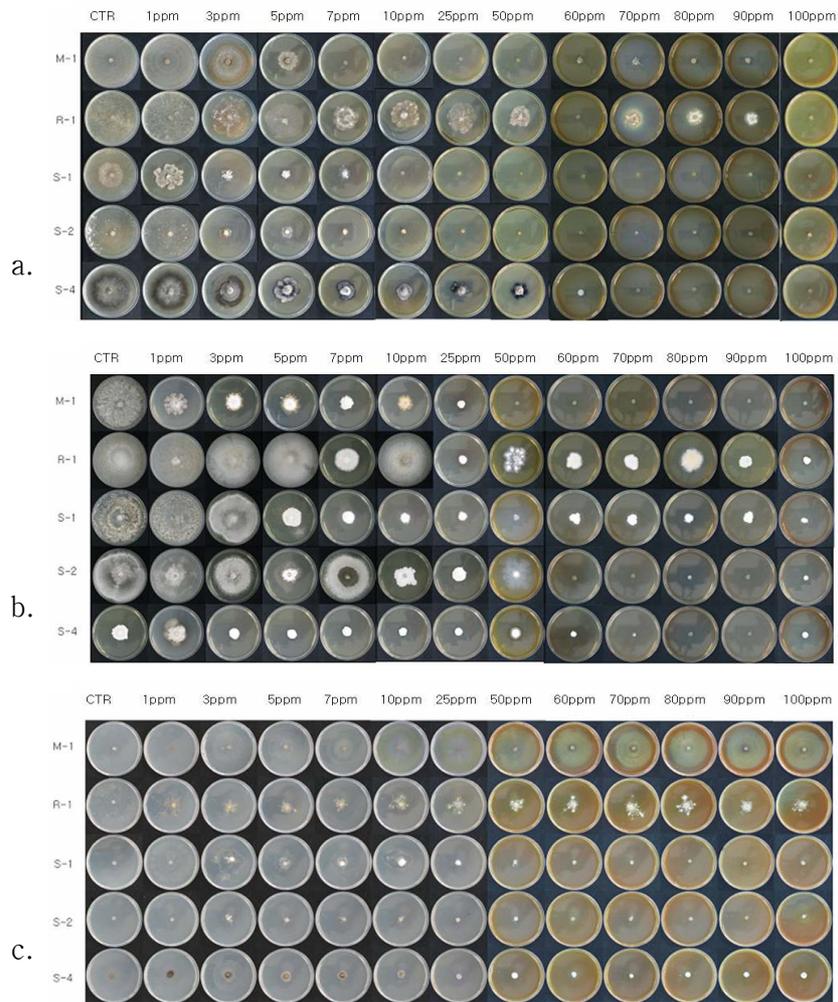


Fig 17. *In vitro* inhibitory effects of WA-CV-WA13B and WA-PR-WB13R combination against various plant pathogenic fungi on different media. a; PDA media, b; MEA media, c; CMA media, M-1; *Monosporascus cannonballus*, R-1; *Rhizotonia solani*, S-1; *Sclerotinia minor*, S-2; *Sclerotinia sclerotiorum*, and S-4; *Stemphylium solani*.

(다) WA-AT-WB13R와 WA-PR-WB13R 혼합용액

WA-AT-WB13R와 WA-PR-WB13R용액이 첨가된 각 배지에 농도별 생장 억제율을 나타내었다 (Table 24). M-1은 PDA 배지 50ppm부터 100% 억제율을 보였고, MEA 배지 25ppm에서 87% 억제율을 나타냈다. R-1은 70, 80ppm에서 88% 억제율을 나타냈고 MEA 배지 25ppm에서 96% 억제율을 나타냈다. S-1은 PDA 배지 5ppm에서 85% 억제율을 나타냈고, MEA 배지 25ppm에서 100% 억제율을 나타냈다. S-2는 PDA 배지 10ppm에서 100% 억제율을 나타냈고, CMA 배지에서는 7ppm부터 80% 이상 억제율을 나타냈다. S-4는 PDA 배지 60ppm에서 91% 억제율을 보였고, MEA 배지와 CMA배지에서는 5ppm부터 비슷한 억제율을 나타냈다. WA-AT-WB13R와 WA-PR-WB13R용액이 처리된 각 배지별 억제 효과 결과이다(Fig 18). PDA 배지가 다른 배지에서 좋은 억제효과를 나타내고 있으나, M-1과 R-1은 전체적으로 좋은 효과를 나타내지는 않는다

다. M-1의 경우 CMA배지에서 고농도 임에도 불구하고 낮은 억제율을 나타내었다. R-1도 낮은 억제율을 보이고 있다.

Table 24. Inhibitory effects of nano-silver WA-AT-WB13R and WA-PR-WB13R combination against fungal growth on different media *in vitro*.

Inhibition rate (%)															
Media	PDA					MEA					CMA				
Fungi Conc. ¹	M-1	R-1	S-1	S-2	S-4	M-1	R-1	S-1	S-2	S-4	M-1	R-1	S-1	S-2	S-4
CTR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1ppm	0	0	13	0	1	5	0	0	0	73	0	0	0	0	5
3ppm	28	25	74	24	53	33	2	0	1	76	4	40	56	71	60
5ppm	40	27	85	40	49	54	5	0	4	80	44	67	54	85	78
7ppm	68	38	85	71	52	59	9	40	7	81	44	67	69	86	80
10ppm	22	29	100	100	51	67	15	60	21	81	46	69	76	85	88
25ppm	61	26	94	100	68	87	96	100	89	88	46	75	84	87	91
50ppm	100	34	99	100	65	89	81	94	91	85	44	73	91	86	89
60ppm	100	73	100	100	91	48	73	81	92	88	71	51	79	85	88
70ppm	100	88	100	100	96	53	71	80	88	93	72	55	75	81	93
80ppm	100	88	100	100	96	47	73	76	95	89	67	51	74	85	89
90ppm	100	79	100	100	98	51	64	78	93	89	67	49	69	80	89
100ppm	100	87	100	100	100	100	86	93	86	87	55	73	94	82	91

1; Concentration (ppm)

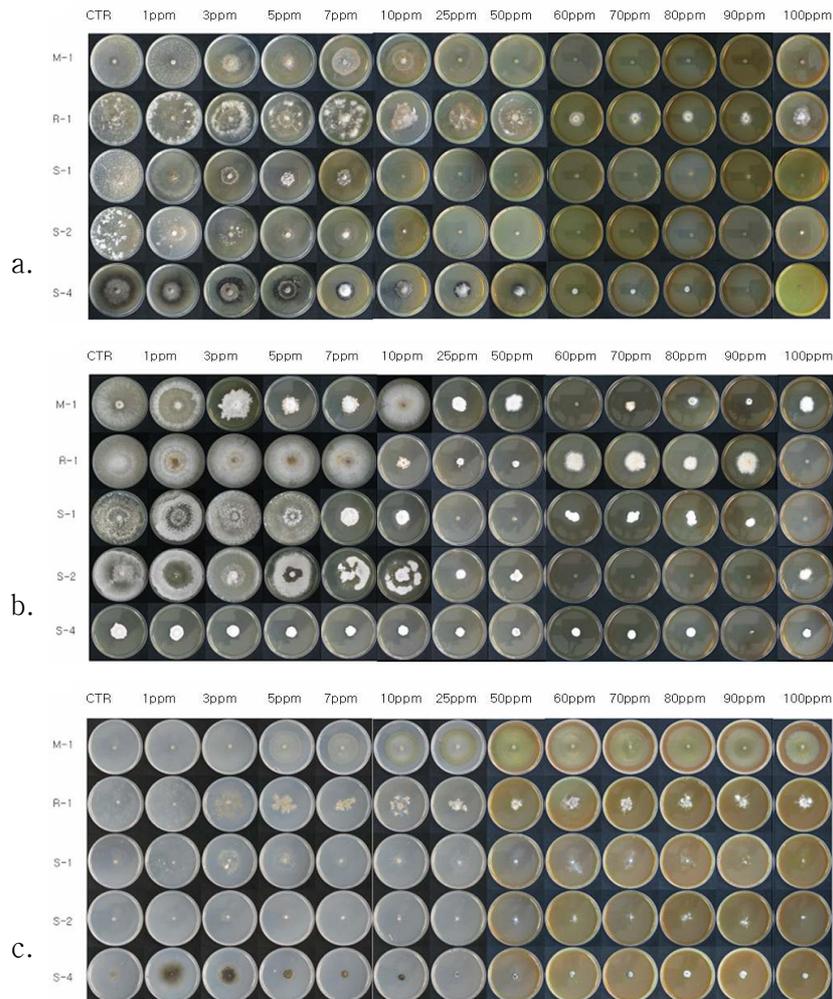


Fig 18. *In vitro* inhibitory effects of WA-AT-WB13R and WA-PR-WB13R combination against various plant pathogenic fungi on different media. a; PDA media. b; MEA media, c; CMA media, M-1; *Monosporascus cannonballus*, R-1; *Rhizotonia solani*, S-1; *Sclerotinia minor*, S-2; *Sclerotinia sclerotiorum*, and S-4; *Stemphylium solani*.

(라) WA-CV-WA13B, WA-AT-WB13R와 WA-PR-WB13R 혼합용액

WA-CV-WA13B, WA-AT-WB13R와 WA-PR-WB13R용액을 첨가된 각 배지에서 은 나노 농도 별 생육 억제율을 나타내고 있다(Table 25). M-1은 PDA배지에 7ppm에서 88% 억제율을 나타냈다. 하지만 MEA배지나 CMA배지에서는 낮은 억제율을 나타냈다. R-1도 PDA배지 5ppm에서 100% 억제율을 나타냈고, 25ppm에서 82% 억제율을 나타냈다. 하지만 MEA배지와 CMA배지에서는 낮은 효과를 보였다. S-1은 PDA배지 10ppm에서 82% 억제율을 나타냈고, MEA배지는 25ppm에서 86% 억제율을 나타냈다. S-2는 10ppm에서 92% 억제율, CMA배지 5ppm에서 92% 억제율을 나타냈다. S-4는 MEA배지 5ppm에서 80% 억제율과 CMA배지 5ppm에서 79% 억제율을 나타냈다. WA-CV-WA13B, WA-AT-WB13R와 WA-PR-WB13R용액이 혼합된 각 배지에서 나타난 생장 억제 결과이다(Fig 19). M-1, R-1과 S-1은 PDA배지에서 좋은 억제효과를 나타냈고, S-2는 PDA배지와 CMA배지에서 좋은 효과를 나타냈다. S-4는 MEA배지와 CMA배지에서 좋은

효과를 나타냈다. 혼합된 용액이 개별로 쓰였을 때 보다 효과가 떨어지는 것으로 관찰되었다. 은 나노 용액이 혼합되면서 항균성을 떨어지는 것으로 생각되어 진다.

Table 25. Inhibitory effects of nano-silver WA-CV-WA13B, WA-AT-WB13R and WA-PR-WB13R combination against fungal growth on different media *in vitro*.

Inhibition rate (%)															
Media	PDA					MEA					CMA				
Fungi Conc. ¹	M-1	R-1	S-1	S-2	S-4	M-1	R-1	S-1	S-2	S-4	M-1	R-1	S-1	S-2	S-4
CTR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1ppm	0	0	28	9	11	0	0	0	1	75	0	0	0	0	5
3ppm	25	68	54	52	48	41	4	4	1	79	9	49	62	74	59
5ppm	52	100	55	65	46	60	12	9	1	80	41	66	68	92	79
7ppm	88	36	62	59	67	66	0	7	53	80	40	67	67	95	78
10ppm	80	72	82	92	54	76	20	51	29	76	44	71	68	92	87
25ppm	64	82	100	80	51	85	78	86	71	88	41	71	64	88	91
50ppm	56	100	96	78	64	73	46	71	76	88	46	75	96	100	86
60ppm	100	100	100	100	100	48	73	81	92	88	51	69	85	99	91
70ppm	100	100	100	100	96	53	72	80	88	93	45	71	98	100	94
80ppm	100	100	100	100	95	47	73	76	96	89	55	75	100	98	96
90ppm	100	100	100	100	100	51	66	78	94	89	48	67	100	99	99
100ppm	100	100	96	67	78	75	46	73	74	92	42	58	82	100	94

1; Concentration (ppm)

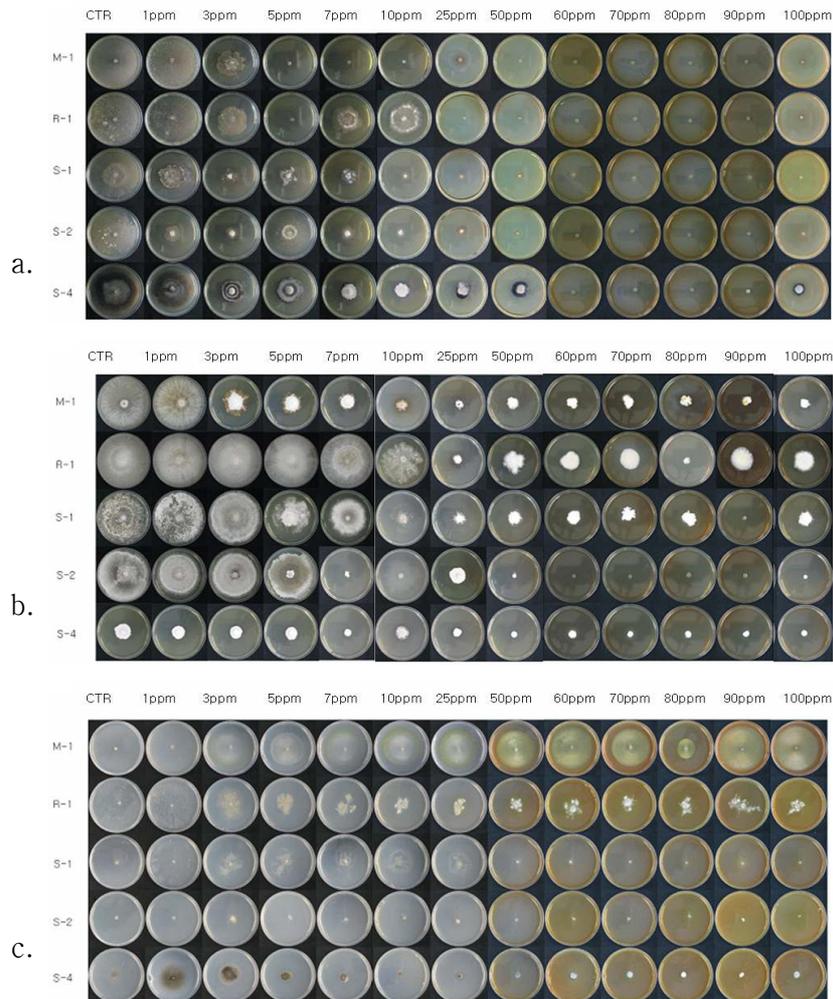


Fig 19. *In vitro* inhibitory effects of WA-CV-WA13B, WA-AT-WB13R and WA-PR-WB13R combination against various plant pathogenic fungi on different media. a; PDA media, b; MEA media, c; CMA media, M-1; *Monosporascus cannonballus*, R-1; *Rhizotonia solani*, S-1; *Sclerotinia minor*, S-2; *Sclerotinia sclerotiorum*, and S-4; *Stemphylium solani*.

(2) 선발된 곰팡이 균주의 균핵 생장 억제 검정

(가) WA-CV-WA13B와 WA-AT-WB13R 혼합용액

① *Sclerotinia minor*

WA-CV-WA13B와 WA-AT-WB13R용액이 첨가된 각 배지별 농도별 생장 억제율을 나타내고 있다. PDA배지 25ppm에서 82% 억제율을 보였고, 100ppm에서 91% 억제율을 나타냈다. MEA배지 50ppm에서 80% 억제율을 나타냈고, 90ppm에서 82% 억제율을 나타냈다. CMA배지는 50ppm에서 81% 억제율을 나타냈고, 100ppm에서 84% 억제율을 나타냈다(Table 26). WA-CV-WA13B와 WA-AT-WB13R용액이 첨가된 각 배지와 농도별 생장 억제효과를 보여주고 있다(Fig 20). 저농도에서 PDA배지와 CMA배지가 MEA배지 보다 더 좋은 억제효과를 나타낸다.

Table 26. Effects of nano-silver WA-CV-WA13B and WA-AT-WB13R combination against sclerotium germination of *Sclerotinia minor* on three different medium.

Inhibition rate (%)													
Conc. ¹ Media	CTR	1	3	5	7	10	25	50	60	70	80	90	100
PDA	0	5	64	64	65	79	82	73	74	88	85	85	91
MEA	0	1	1	46	45	71	75	80	79	78	75	82	74
CMA	0	0	18	76	73	74	58	81	82	58	78	78	84

1; Concentration (ppm)

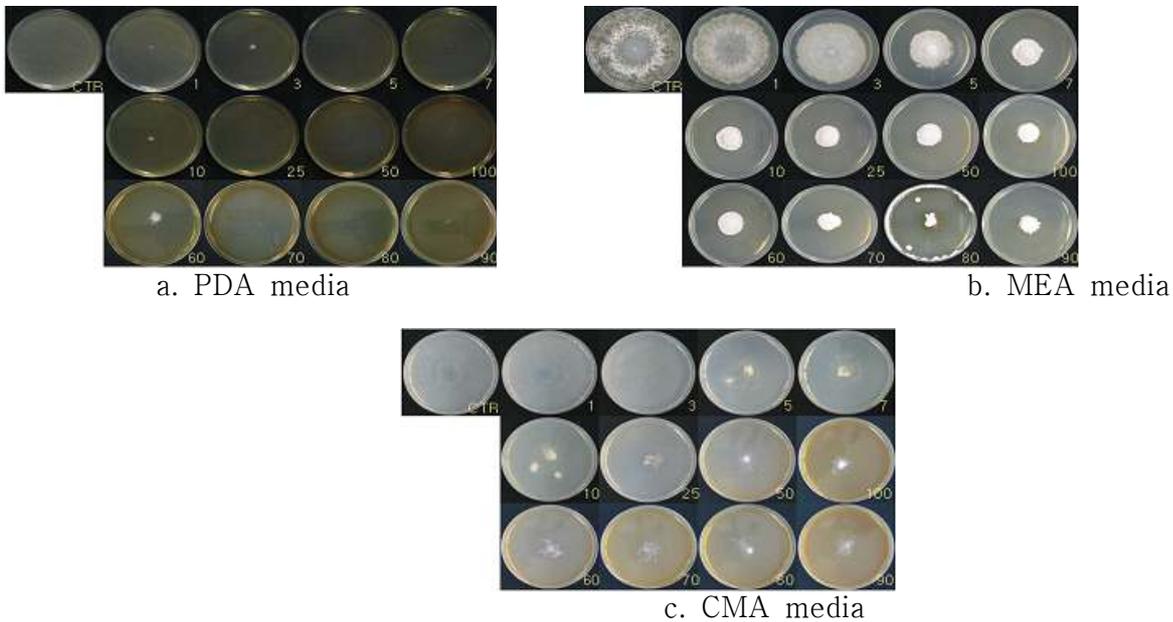


Fig 20. *In vitro* inhibitory effects of WA-CV-WA13B and WA-AT-WB13R combination against sclerotium germination of *Sclerotinia minor* on different media.

이러한 연구 결과는 WA-CV-WA13B와 WA-AT-WB13R 은나노 혼합용액이 *Sclerotinia minor* 의 균핵을 억제한 농도 범위에서 *Rhizoctonia solani*와 *Sclerotinia sclerotium*의 균핵 성장을 억제함을 유추할 수 있다.

(나) WA-CV-WA13B와 WA-PR-WB13R 혼합용액

① *Sclerotinia minor*

WA-CV-WA13B와 WA-PR-WB13R용액을 각 배지에 첨가 후 억제율은 나타내고 있다(Table 27). PDA배지 25ppm에서 80% 억제율을 날내고 100ppm에서 91%억제율을 나타냈다. MEA배지

는 25ppm에서 73% 억제율을 나타내고 높은 농도에서도 높은 억제율을 나타내지 않았다. CMA 배지의 경우 10ppm에서 82% 억제율을 나타냈고, 90ppm에서 91% 억제율을 나타냈다. WA-CV-WA13B와 WA-PR-WB13R용액이 첨가된 각 배지와 농도별 성장 억제 결과를 나타내고 있다(Fig 21). PDA배지와 CMA배지에서 더 좋은 억제효과를 나타냈다.

Table 27. Effects of nano-silver WA-CV-WA13B and WA-PR-WB13R combination against sclerotium germination of *Sclerotinia minor* on three different medium.

		Inhibition rate (%)											
Conc. ¹ Media	CTR	1	3	5	7	10	25	50	60	70	80	90	100
PDA	0	15	59	74	68	72	80	79	86	80	81	76	91
MEA	0	1	1	21	15	67	73	72	74	74	67	73	60
CMA	0	0	47	62	74	82	79	85	82	81	88	91	89

1; Concentration (ppm)

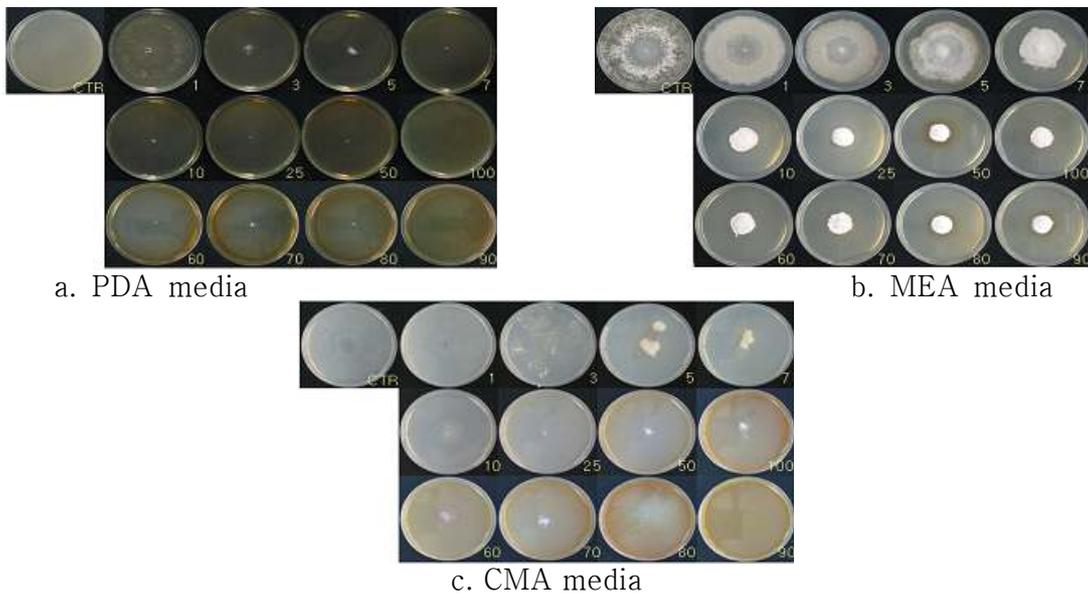


Fig 21. *In vitro* inhibitory effects of WA-CV-WA13B and WA-PR-WB13R combination against sclerotium germination of *Sclerotinia minor* on different media.

이러한 연구 결과는 WA-CV-WA13B와 WA-PR-WB13R 은나노 혼합용액이 *Sclerotinia minor*의 균핵을 억제한 농도 범위에서 *Rhizoctonia solani*와 *Sclerotinia sclerotium*의 균핵 성장을 억제함을 유추할 수 있다.

(다) WA-AT-WB13R와 WA-PR-WB13R 혼합용액

① *Sclerotinia minor*

균핵에 대해서도 은나노 혼합용액에 대해 실험을 실시하였다. 방법은 균사생장 억제 검정에 사용한 방법과 동일하게 진행하였다.

WA-AT-WB13R와 WA-PR-WB13R용액 첨가된 배지에서 농도별 억제율을 나타내고 있다(Table 28). PDA배지 25ppm에서 81% 억제율을 나타냈고, MEA배지 50ppm에서 81% 억제율을 나타냈다. CMA배지 25ppm에서 80% 억제율을 나타냈다. WA-AT-WB13R와 WA-PR-WB13R용액이 첨가된 배지에서의 생장 억제 효과 결과를 보여주고 있다(Fig 22). 5ppm부터 25ppm까지는 PDA 배지에서 좋은 억제 효과를 보여주었다.

Table 28. Effects of nano-silver WA-AT-WB13R and WA-PR-WB13R combination against sclerotium germination of *Sclerotinia minor* on three different medium.

		Inhibition rate (%)											
Conc. ¹ Media	CTR	1	3	5	7	10	25	50	60	70	80	90	100
PDA	0	35	64	78	78	76	81	85	80	82	93	92	88
MEA	0	0	2	26	49	67	68	81	73	82	79	76	78
CMA	0	0	52	66	78	75	80	82	76	80	80	82	89

1; Concentration (ppm)

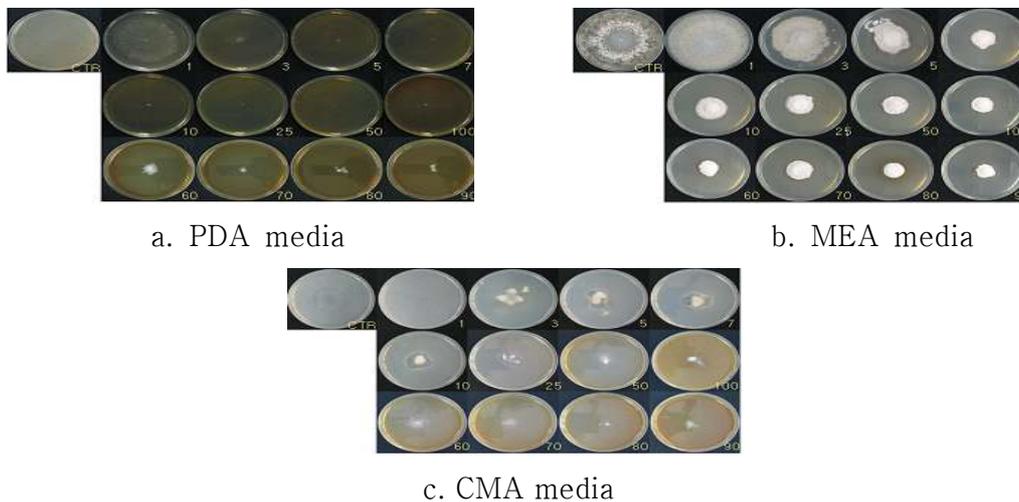


Fig 22. *In vitro* inhibitory effects of WA-AT-WB13R and WA-PR-WB13R combination against sclerotium germination of *Sclerotinia minor* on different media.

이러한 연구 결과는 WA-AT-WB13R and WA-PR-WB13R 은나노 혼합용액이 *Sclerotinia minor*의 균핵을 억제한 농도 범위에서 *Rhizoctonia solani*와 *Sclerotinia sclerotium*의 균핵 성장을 억제함을 유추할 수 있다.

(라) WA-CV-WA13B, WA-AT-WB13R와 WA-PR-WB13R 혼합용액

① *Sclerotinia minor*

균핵에 대해서도 은나노 혼합용액에 대해 실험을 실시하였다. 방법은 균사생장 억제 검정에 사용한 방법과 동일하게 진행하였다. 그 결과, WA-CV-WA13B, WA-AT-WB13R와 WA-PR-WB13R 용액을 첨가한 각 배지와 농도별 생장 억제율을 나타내고 있다(Table 29). PDA 배지 10ppm에서 80% 억제율을 나타냈고, MEA배지는 50ppm에서 81% 억제율을 나타냈다. CMA배지는 25ppm에서 80% 억제율을 나타냈다. WA-CV-WA13B, WA-AT-WB13R 와 WA-PR-WB13R용액이 첨가된 배지에서의 억제효과 결과이다(Fig 23). PDA배지에서 억제효과가 MEA배지와 CMA배지보다 좋은 억제효과를 나타냈다.

균핵 실험에서 혼합용액 중에서 WA-CV-WA13B, WA-AT-WB13R와 WA-PR-WB13R용액이 가장 좋은 억제 효과를 나타냈으나, 다른 용액과 차이는 많이 나지 않았다. 개별용액에 비해 혼합용액이 억제율이 떨어지는 것으로 관찰되었다.

Table 29. Effects of nano-silver WA-CV-WA13B, WA-AT-WB13R and WA-PR-WB13R combination against sclerotium germination of *Sclerotinia minor* on three different medium.

		Inhibition rate (%)											
Conc. ¹ Media	CTR	1	3	5	7	10	25	50	60	70	80	90	100
PDA	0	20	68	76	76	80	86	86	84	85	85	92	96
MEA	0	0	0	46	58	75	73	81	80	79	78	74	76
CMA	0	0	48	72	78	79	80	87	81	80	87	79	92

1; Concentration (ppm)

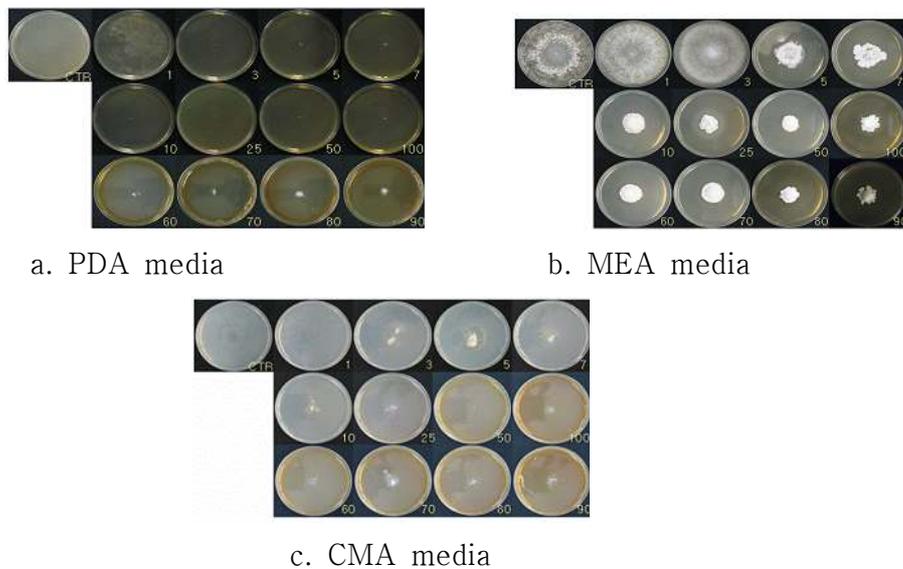


Fig 23. *In vitro* inhibitory effects of WA-CV-WA13B, WA-AT-WB13R and WA-PR-WB13R combination against sclerotium germination of *Sclerotinia minor* on different media.

이러한 연구 결과는 WA-CV-WA13B, WA-AT-WB13R and WA-PR-WB13R 은나노 혼합용액이 *Sclerotinia minor* 의 균핵을 억제한 농도 범위에서 *Rhizoctonia solani*와 *Sclerotinia sclerotium*의 균핵 성장을 억제함을 유추할 수 있다.

라. 투과전자현미경(TEM) 관찰

나노 은 입자에 의해 불활성화된 미생물 특성을 관찰하기 위해 농도별로 은 나노 용액에 곰팡이 *Rhizoctonia solani*와 세균 *Pseudomonas marginalis*을 액체 배양한 후 고정하여 TEM으로 관찰하였다(Fig 24). SEM으로도 관찰하였으나, 25ppm으로 처리하였을 때, 세균 자체가 다 녹아서 관찰이 불가능하였고, 저농도로 처리하여 관찰하였으나 나노 사이즈 입자이기 때문에 SEM상에서는 나노입자가 관찰이 불가능하고, 처리한 은나노 입자의 수가 적으므로 확인이 어려웠다. 따라서 25 ppm으로 처리한 후 SEM으로 관찰 한 경우 세포벽에서 무처리구와 비교하였을 때 눈에 띄는 특징이 나타나지 않았다.

TEM의 관찰 결과 지름 7~25nm 나노 은 입자가 세균과 곰팡이의 세포막에 밀집 되어 있었으며, 몇 입자들은 세포소기관에서도 관찰이 되었으나, 이를 위해서는 X-ray 촬영을 해야 하기 때문에 확인이 되지 않았다.

곰팡이와 세균의 주변에 은 나노 입자가 밀집하는 것을 볼 수 있었다(Fig 25 ①, ④). 나노 은 입자가 밀집하여 뭉쳐져 있고, 세포막 안에 있는 은 나노 입자도 관찰 되었다(Fig ②, ③, ⑤, ⑥). 나노 은 입자는 미생물의 세포막을 크게 손상시킨 것으로 관찰 할 수 있었다. 따라서, 나노 은 입자는 1차적으로 미생물의 세포막에 밀집하여 세포막을 손상시키고, 2차적으로 세포 안으로 침투하여 세포소기관을 용해시킴으로써 미생물을 불활성화 시키는 것으로 관찰 되어진다

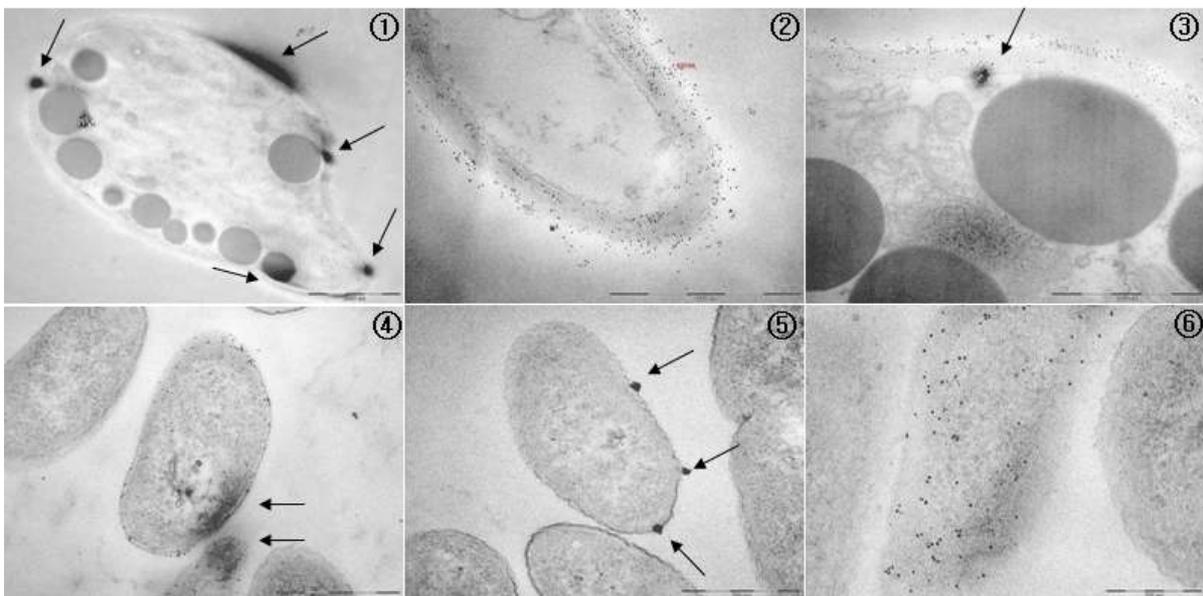


Fig 24. TEM images of *Rhizoctonia solani* and *Pseudomonas marginalis* treated with Nanover™ . ①, ②, ③; *Rhizoctonia solani*, ④, ⑤, ⑥; *Pseudomonas marginalis*. Arrows indicatethe area where the Nanover™ particles are aggregated.

마. 주사현미경(SEM) 관찰

세균의 경우 25ppm의 농도로 처리한 후 SEM으로도 관찰하였으나, 세균 세포 자체가 용해되어 관찰이 불가능하였고, 저농도로 처리하여 관찰하였으나 나노 사이즈 입자이기 때문에 SEM상에서는 나노입자가 관찰이 불가능하고, 처리한 은나노 입자의 수가 적으므로 확인이 어려웠다. 따라서 25 ppm으로 처리한 후 SEM으로 관찰 한 세균의 경우 세포벽에서 무처리구와 비교하였을 때 눈에 띄는 특징이 나타나지 않았다. 은나노액 처리가 곰팡이 균사의 생장에 미치는 영향을 확인 하기 위하여 저농도에서 매우 민감한 반응을 보이는 선발된 곰팡이 균주 가운데 *Sclerotinia sclerotiorum*(S-2)을 선정하여 은나노액을 7ppm의 농도로 균사에 sprayer로 10ml씩 분사 처리하였다. 7ppm의 농도로 처리한 다음 처리 1, 3, 5, 7일 후 *Sclerotinia sclerotiorum*(S-2)의 균사를 고정 시키고 주사현미경으로 관찰을 실시하였다. 그 결과 7ppm의 농도로 균사에 처리 하고 1일 경과 후부터 균사의 세포벽이 피해를 입을 것을 확인 하였고, 3일, 5일, 그리고 7일 경과한 경우 모두 그 피해 증상이 은나노액을 처리 한 후 기간이 지날 수록 피해의 정도는 더욱 심화 되었다. 그리고 처리 후 5일과 7일 이 경과한 경우 세포벽이 분해되어 균사가 사멸한 결과를 관찰 하였다(Fig 25).

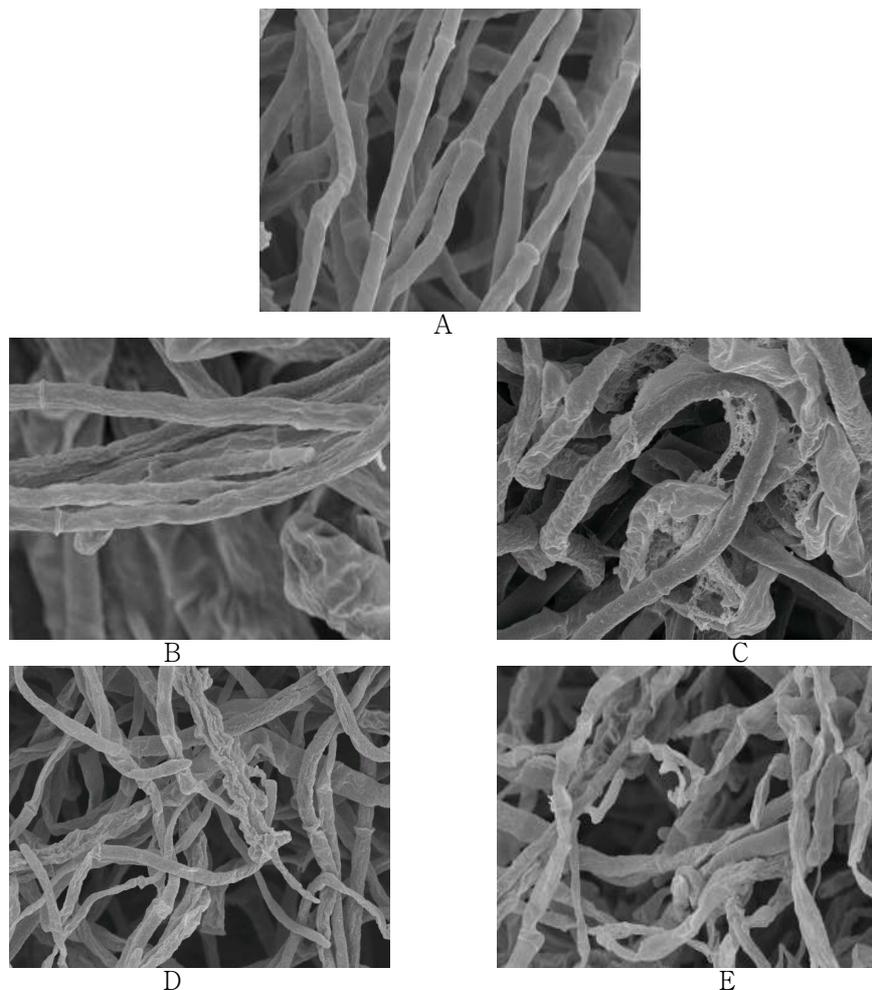


Fig 25. SEM images of *Sclerotinia sclerotiorum* treated with Nanover™ at 7ppm, and observed 1, 3, 5, and 7 days after the treatment(A: Untreated control, B: 1 days after the treatment, C: 3 days after the treatment, D: 5 days after the treatment, E:7 days after the treatment). Note the increase of damages and whitening of hyphae as the days of exposure increased from 1 through 7.

바. 은 나노 용액 약해실험

강원대학교 온실에서 토마토, 오이, 고추, 파를 대상으로 은 나노 용액 3가지와 10ppm, 25ppm, 50ppm, 100ppm, 200ppm, 300ppm, 500ppm, 1000ppm 농도별로 약해 실험을 실시하였다(Fig 26). 무처리구와 비교하여 10ppm, 25ppm, 50ppm, 100ppm에서는 약해가 발생하지 않았으며, 은 나노액 으로 인한 변색도 관찰되지 않았다. 200ppm 이상의 경우 은 나노 입자로 인해 잎 또는 줄기에 갈색 반점이 형성되고 생육 후기에 잎과 줄기가 황화현상을 보이는 것이 관찰되었다. 1,000ppm을 처리할 경우 식물체가 약해를 입어 고사 하는 것이 관찰되었다. 10ppm, 25ppm, 50ppm, 100ppm에서는 약해가 발생하지 않은 것으로 보아 100ppm 이내의 농도에서 작물에 사용이 가능하리라 판단된다.

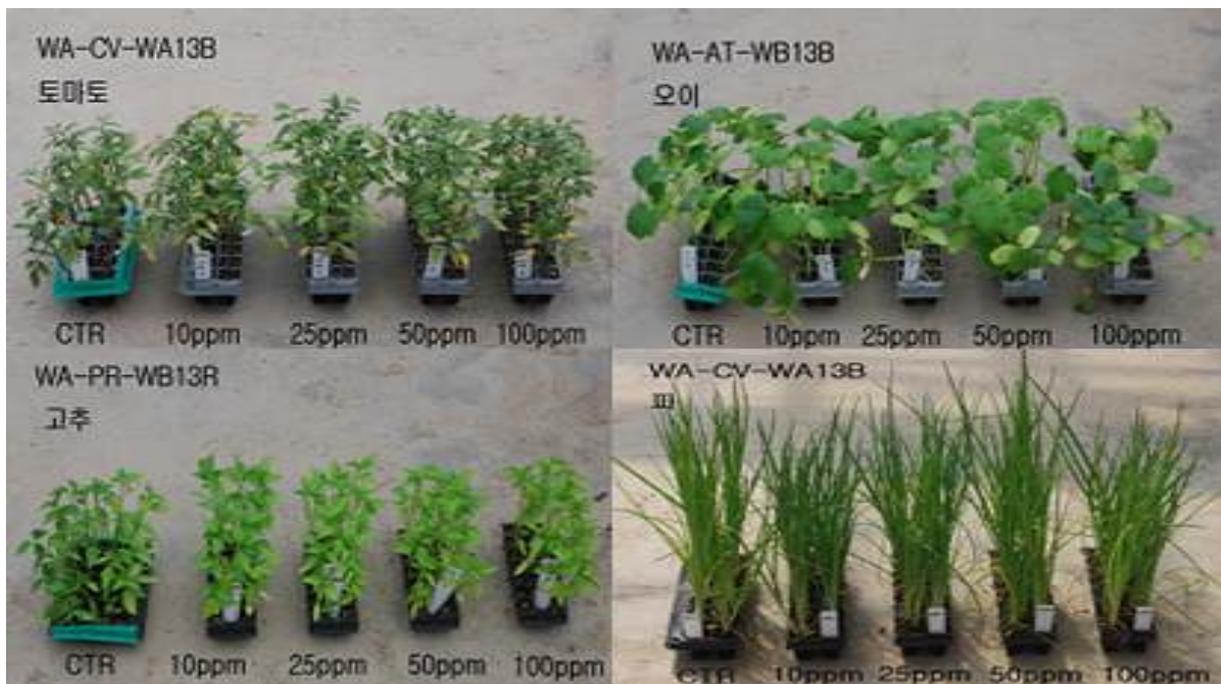


Fig 26. Phytotoxicity tests of Nano-silver liquid on tomato, cucumber, pepper and spring green onion.

사. 은 나노 용액 내성 미생물 선발

선발된 식물생장 촉진균 및 길항성균 가운데 은나노액에 대하여 내성을 지니는 균주를 선발하여 은나노액과 혼용을 통해 은나노액의 살균효과를 증대 시키거나 혹은 은나노액의 길항성에 성장촉진균의 식물생장촉진 효과를 보완적으로 사용 하고자 우선 Nano-silver와 혼용이 가능한 지를 확인하기 위하여 은 나노액에 대해 내성을 지닌 내성균을 선발하기 위한 실험을 수행 하였다. 식물의 생장을 촉진 시키는 것으로 알려진 *Pseudomonas koreansis*와 식물병원 미생물에 대하여 길항성이 있는 것으로 밝혀진 *Bacillus* sp.를 대상균으로 정하였다. 배지에 Nano-silver WA-CV-WA13B용액을 10ppm 농도로 실험한 결과 *Bacillus* sp.는 25ppm까지 내성을 보였고, *Pseudomonas koreansis*는 실험 시작점인 10ppm에서 자라지 않아 5ppm으로 농도를 낮춰 실험

을 시작해 최종적으로 30ppm에서 자라는 내성균을 선발 하였으며, WA-AT-WB13R용액에서는 10ppm으로 시작을 하여 *Pseudomonas kensis*를 45ppm에서 성장하는 strain을 선발 하였으며, *Bacillus* sp. 역시 35ppm에서 자라는 내성균을 선발 하였다. WA-PR-WB13R용액의 경우 50ppm에서 내성을 보이는 *Pseudomonas koreansis*를 선발하였다. *Bacillus* sp.의 경우 최종 12ppm에서 자라는 내성균을 선발 하였다(Table 30, Fig 27). 그러나 12ppm에서부터 50ppm까지의 농도에서 생존하는 *Pseudomonas koreansis*나 *Bacillus* sp.의 population이 매우 낮아 은 나노액와 혼용을 통한 활용은 쉽지 않을 것으로 판단된다. 또한, 대개의 경우 포장에서 은나노 용액이 효과를 나타내는 농도인 50ppm 내지 100ppm의 범위에서는 유용균인 *Pseudomonas koreansis*나 *Bacillus* sp.가 생존 하지 못함에 따라 유용균과 은 나노액의 혼용을 통한 활용은 어려운 것으로 판단된다.

Table 30. Selection of nano-silver resistant *Pseudomonas koreansis* and *Bacillus* sp. against nano silver.

bacteria	Concentration of resistance		
	WA-CV-WA13B	WA-AT-WB13R	WA-PR-WB13R
<i>Pseudomonas koreansis</i>	30ppm	45ppm	50ppm
<i>Bacillus</i> sp.	25ppm	35ppm	12ppm

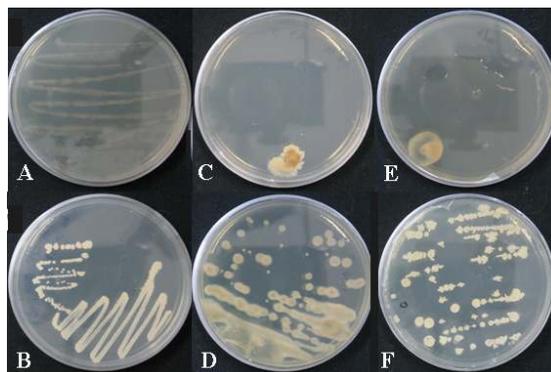


Fig 27. Selection of resistant *Pseudomonas koreansis* and *Bacillus* sp. against nano-silver. A: WA-CV-WA13B *Pseudomonas koreansis* 30ppm, B: WA-CV-WA13B *Bacillus* sp. 25ppm, C: WA-AT-WB13R *Pseudomonas koreansis* 45ppm, D: WA-AT-WB13R *Bacillus* sp. 35ppm, E: WA-PR-WB13R *Pseudomonas koreansis* 50ppm, and F: WA-PR-WB13R *Bacillus* sp. 12ppm.

아. 파 흑색썩음균핵병 병원균에 대한 은 나노 용액의 생장억제 효과 실험

경기도 양수리 파 재배 농가 포장에서 분리한 파 흑색썩음균핵병 병원균(*Sclerotium cepivorum*)을 이용하여 은 나노 용액의 균사 생장 억제 검정을 기내에서 실시하였고, 포장실험도 수행 하였다.

(1) *In vitro* test

은 나노 용액 WA-CV-WA13B, WA-AT-WB13R, WA-PR-WB13R을 사용하여 PDA, MEA, CMA 배지에 1ppm, 3ppm, 5ppm, 7ppm, 10ppm, 25ppm, 50ppm, 100ppm 농도로 맞춘 후 각각의 배지에 치상하여 균사생장을 관찰하였다. 또한 2가지 혹은 3가지 은 나노 용액을 혼합하여 동일한 농도와 배지를 사용하여 균사생장을 관찰하였다.

(가) WA-CV-WA13B 용액

WA-CV-WA13B 용액이 첨가된 각 배지에서 각각의 농도별 생장 억제율을 확인 하였다(Table 31, Fig 28). CMA배지에서 억제율이 가장 높게 나타났으며, PDA배지 7ppm에서 82% 억제율을 나타냈고, CMA배지 3ppm에서 89% 억제율을 나타냈다. MEA배지 경우 10ppm이상에서 억제 효과가 나타났다. 결과적으로 CMA배지에서 은 나노액의 길항성이 가장 좋은 효과를 나타내며, PDA 배지보다 MEA 배지에서 낮은 억제효과를 보였다. 본 실험의 결과 WA-CV-WA13B 용액의 경우 10ppm 농도부터 균사생장을 억제하는 것을 확인 할 수 있었다.

Table 31. Effects of nano-silver WA-CV-WA13B against mycelial growth of *Sclerotium cepivorum* on three different media.

Conc. ¹ Media	Inhibition rate (%)								
	CTR	1	3	5	7	10	25	50	100
PDA	0	1	69	68	82	87	93	100	100
MEA	0	0	0	1	0	68	78	84	87
CMA	0	46	89	92	89	100	100	100	100

1; Concentration

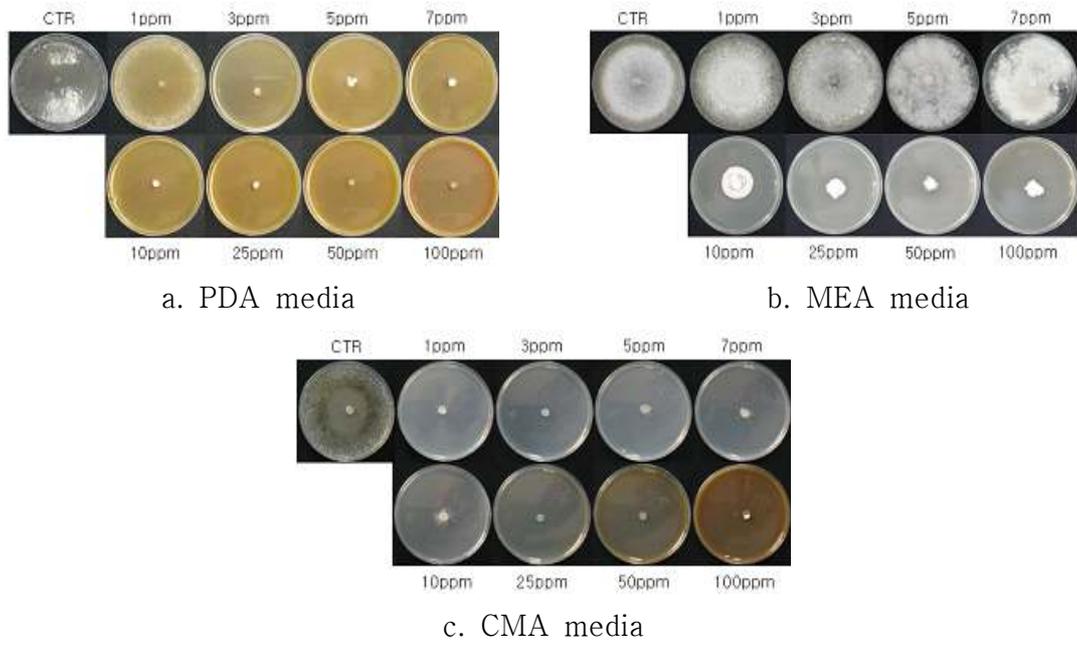


Fig 28. *In vitro* inhibitory effects of WA-CV-WA13B, WA-AT-WB13R and WA-PR-WB13R combination against mycelial growth of *Sclerotium cepivorum* on different media.

(나) WA-AT-WB13R 용액

Table 32와 Fig 29는 WA-AT-WB13R 용액이 첨가된 각 배지별 은 나노 농도에 따른 생장 억제 효과를 나타내고 있다. WA-CV-WA13B용액보다 더 좋은 효과를 보이며, 5ppm PDA배지에서 86%, CMA배지 3ppm에서 93% 억제율을 나타냈다. PDA배지와 CMA배지에서 높은 억제율을 나타냈으며, MEA배지에서는 25ppm에서 81% 억제율을 나타냈다. CMA배지에서 좋은 억제효과를 나타냈으며, MEA 배지에서는 PDA 배지에서 보다 낮은 억제효과를 나타냈다.

Table 32. Effects of nano-silver WA-AT-WB13R against mycelial growth of *Sclerotium cepivorum* on three different media.

Conc. ¹	Inhibition rate (%)								
	CTR	1	3	5	7	10	25	50	100
Media									
PDA	0	0	66	86	86	98	98	100	100
MEA	0	0	0	4	19	54	81	85	85
CMA	0	26	93	94	95	100	99	99	100

1; Concentration

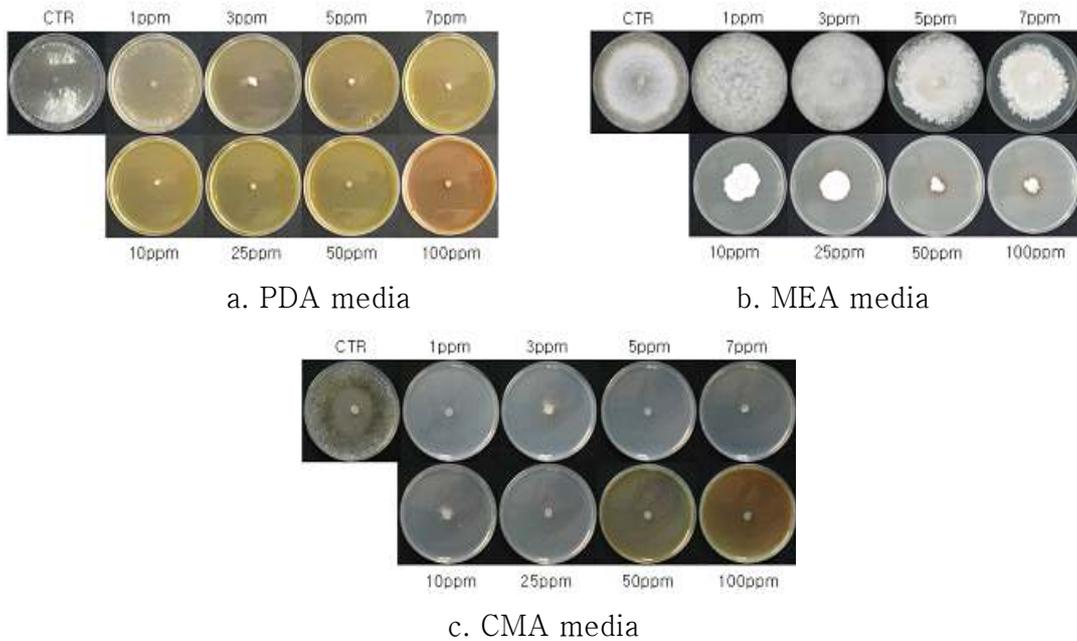


Fig 29. *In vitro* inhibitory effects of WA-AT-WB13R against mycelial growth of *Sclerotium cepivorum* on different media.

(다) WA-PR-WB13R 용액

Table 33과 Fig 30은 WA-PR-WB13R 용액이 첨가된 각 배지별 농도의 생장 억제 효과를 나타내고 있다. PDA배지에서 7ppm에서 81% 억제율을 보였고, CMA배지 10ppm에서 84% 억제율을 나타냈다. MEA배지는 25ppm에서 81% 억제율을 나타냈다. WA-PR-WB13R용액이 첨가된 배지에서 억제 효과를 나타냈다. PDA배지에서 좋은 억제 효과를 나타냈다. 배지에 따른 생장의 차이는 배지의 성분이 균사의 생장에 영향을 미치는 것으로 보였다.

Table 33. Effects of nano-silver WA-PR-WB13R against mycelial growth of *Sclerotium cepivorum* on three different media.

Conc. ¹ Media	Inhibition rate (%)								
	CTR	1	3	5	7	10	25	50	100
PDA	0	0	39	75	81	79	96	100	100
MEA	0	0	0	0	0	71	81	82	88
CMA	0	20	58	56	72	84	72	78	87

1; Concentration

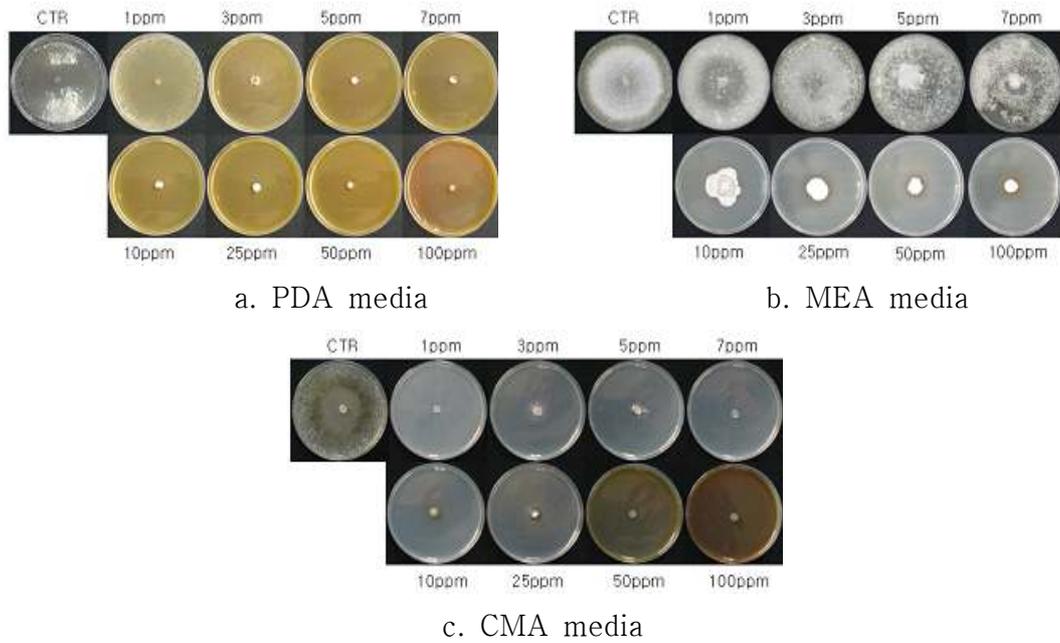


Fig 30. *In vitro* inhibitory effects of WA-PR-WB13R against mycelial growth of *Sclerotium cepivorum* on different media.

(라) WA-CV-WA13B와 WA-AT-WB13R 혼합용액

Table 34와 Fig 31은 WA-CV-WA13B와 WA-AT-WB13R 혼합 용액이 첨가된 각 배지별 성장 억제 효과를 나타내고 있다. CMA배지 3ppm에서 83% 억제율을 나타냈고, PDA배지 7ppm에서 82% 억제율을 보였다. MEA배지 25ppm에서 85% 억제율을 나타냈다. CMA배지에서 다른 배지보다 좋은 억제 효과를 나타냈다.

Table 34. Effects of nano-silver WA-CV-WA13B and WA-AT-WB13R combination against mycelial growth of *Sclerotium cepivorum* on three different media.

Conc. ¹ Media	Inhibition rate (%)								
	CTR	1	3	5	7	10	25	50	100
PDA	0	0	75	79	82	86	92	66	82
MEA	0	0	0	2	13	76	85	84	85
CMA	0	52	82	84	87	84	93	95	96

1; Concentration

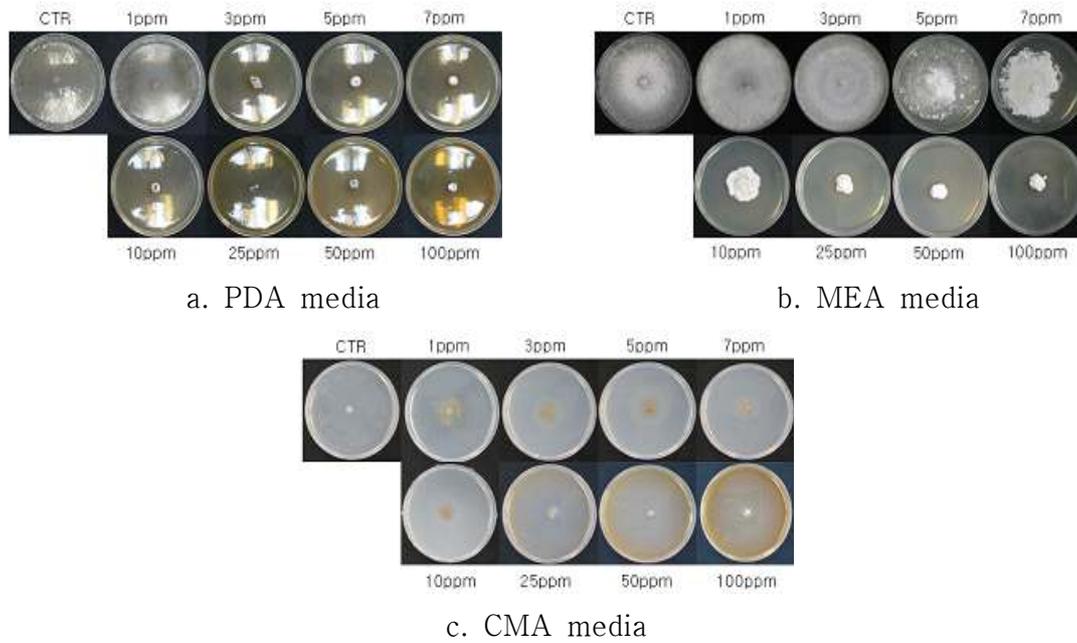


Fig 31. *In vitro* inhibitory effects of WA-CV-WA13B and WA-AT-WB13R against mycelial growth of *Sclerotium cepivorum* on different media.

(마) WA-CV-WA13B와 WA-PR-WB13R 혼합용액

Table 35와 Fig 32는 WA-CV-WA13B와 WA-PR-WB13R 혼합용액이 첨가된 각 배지에서 균핵의 성장 억제 효과를 나타내고 있다. PDA배지 10ppm에서 78%억제율을 나타냈으며, CMA배지 3ppm에서 80% 억제율을 나타냈다. CMA배지에서 높은 억제율을 나타냈다.

Table 35. Effects of nano-silver WA-CV-WA13B and WA-PR-WB13R combination against mycelial growth of *Sclerotium cepivorum* on three different media.

Conc. ¹ Media	Inhibition rate (%)								
	CTR	1	3	5	7	10	25	50	100
PDA	0	15	62	71	74	78	76	100	100
MEA	0	0	0	6	8	67	85	84	85
CMA	0	6	80	82	85	85	95	98	96

1; Concentration

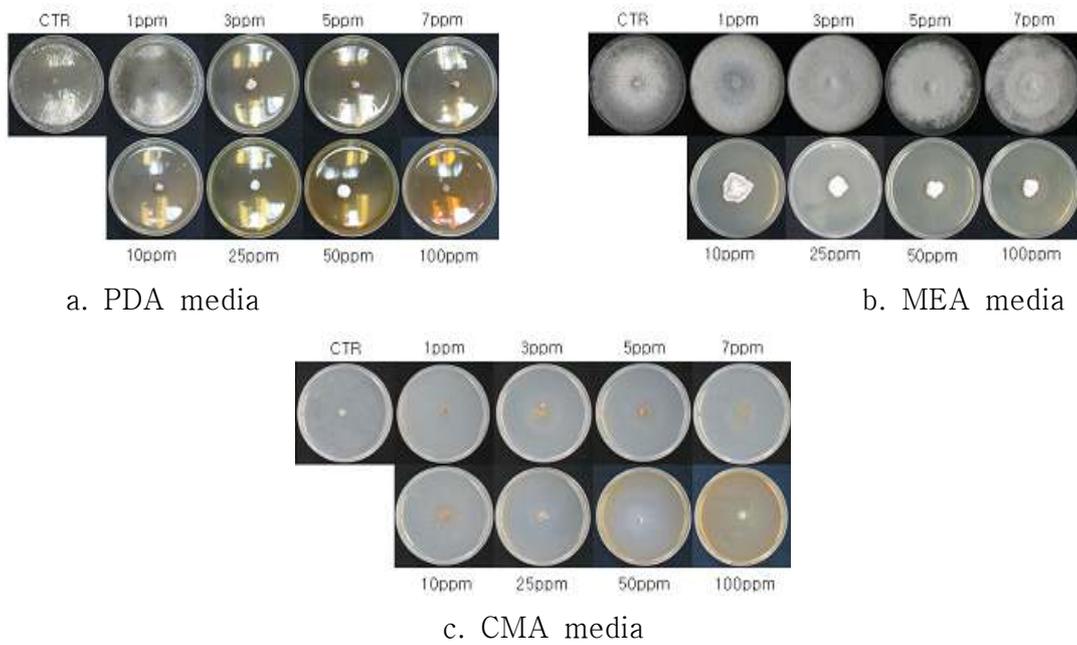


Fig 32. *In vitro* inhibitory effects of WA-CV-WA13B and WA-AT-WB13R combination against mycelial growth of *Sclerotium cepivorum* on different media.

(바) WA-AT-WB13R와 WA-PR-WB13R 혼합 용액

Table 36과 Fig 33은 WA-AT-WB13R와 WA-PR-WB13R 혼합용액이 첨가된 각 배지별 균핵의 생장 억제율을 나타내고 있다. PDA배지 5ppm에서 80% 억제율을 나타냈고, CMA배지 3ppm에서 80%억제율을 나타냈다. WA-AT-WB13R와 WA-PR-WB13R용액이 첨가된 배지에서 억제효과 결과이다 PDA 배지와 CMA 배지는 비슷한 억제 효과를 나타냈다.

Table 36. Effects of nano-silver WA-AT-WB13R and WA-PR-WB13R combination against mycelial growth of *Sclerotium cepivorum* on three different media.

Conc. ¹	Inhibition rate (%)								
	CTR	1	3	5	7	10	25	50	100
PDA	0	0	78	80	80	71	87	98	100
MEA	0	0	0	0	18	52	81	82	85
CMA	0	41	80	84	84	89	88	99	100

1; Concentration

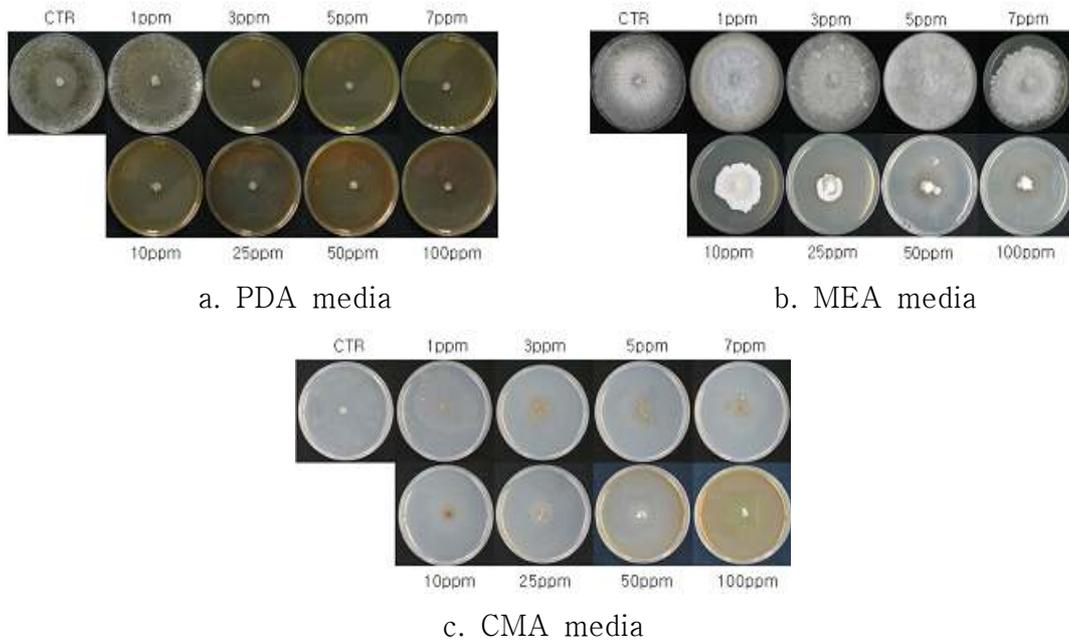


Fig 33. *In vitro* inhibitory effects of WA-AT-WB13R and WA-PR-WB13R combination against mycelial growth of *Sclerotium cepivorum* on different media.

(사) WA-CV-WA13B, WA-AT-WB13R와 WA-PR-WB13R 용액

Table 37과 Fig 34는 WA-CV-WA13B, WA-AT-WB13R와 WA-PR-WB13R 혼합 용액이 첨가된 각 배지별 성장 억제 효과를 나타냈다. PDA배지 25ppm에서 80% 억제율을 나타냈고, CMA배지는 1ppm에서도 68% 억제율을 나타냈고, 3ppm에서 81% 높은 억제효과를 나타냈다. PDA배지와 CMA배지에서 높은 억제효과를 나타냈으나, MEA배지에서는 낮은 억제 효과를 나타냈다.

Table 37. Effects of nano-silver WA-CV-WA13B, WA-AT-WB13R and WA-PR-WB13R combination against mycelial growth of *Sclerotium cepivorum* on three different media.

Conc. ¹ Media	Inhibition rate (%)								
	CTR	1	3	5	7	10	25	50	100
PDA	0	0	71	73	78	62	80	94	96
MEA	0	0	11	12	29	79	81	82	80
CMA	0	68	81	81	82	82	91	94	95

1; Concentration

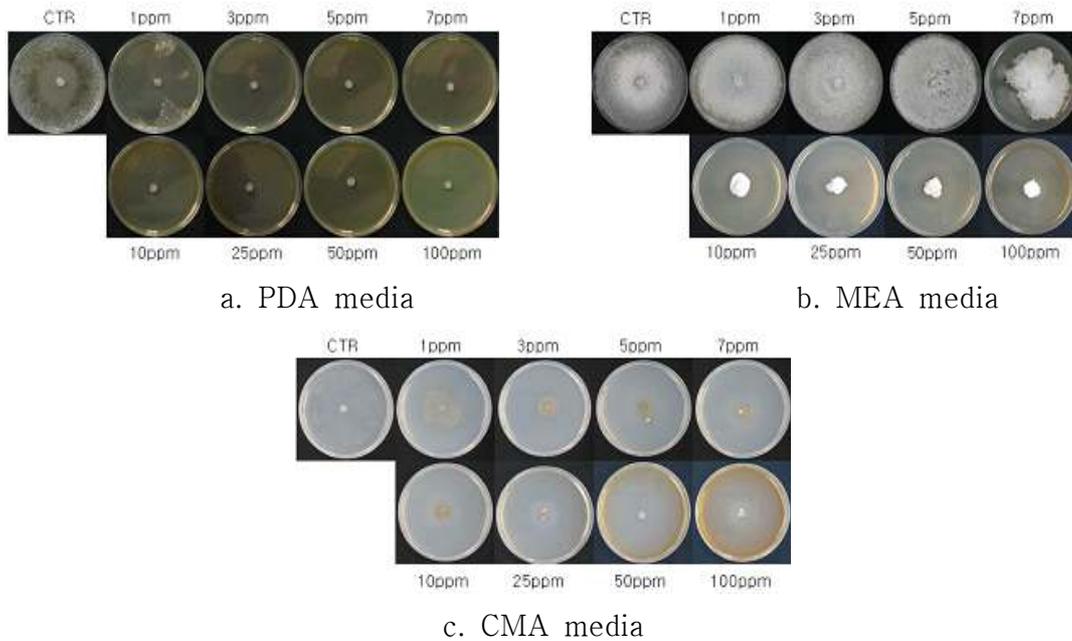


Fig 34. *In vitro* inhibitory effects of WA-CV-WA13B, WA-AT-WB13R and WA-PR-WB13R combination against mycelial growth of *Sclerotium cepivorum* on different media.

은 나노 용액 WA-CV-WA13B, WA-AT-WB13R 그리고 WA-PR-WB13R 개별 용액과 혼합용액 모두 대체적으로 PDA배지와 CMA배지에서 높은 억제효과를 나타냈으며, 은 나노 용액을 혼합하여 처리한 것보다 개별적으로 처리한 것이 억제 효과가 더 높았다. 혼합 용액에서는 WA-AT-WB13R과 WA-PR-WB13R 혼합 용액이 좋은 효과를 보였다.

(2) 포장시험

포장시험의 경우 은 나노 용액을 각 용액별로 10ppm, 25ppm, 50ppm, 100ppm으로 제조하여 식물의 기저부에 200ml씩 매주 마다 1회씩 총 4회 관주 처리하였다. 4회 관주 처리 5개월 후 수확한 파의 뿌리를 관찰하였고, 수확한 파의 생체 중량을 측정하고 80℃ 건조기에 건조한 뒤 건조중도 측정하였다. 은 나노 용액 처리 후 수확시기까지 기다렸다가 수확된 파를 무처리구와 처리구 별로 나누어 생체 중량을 측정하고, 80℃ 건조기에 건조하여 건물 중량을 측정하였다. 그 결과 (Table 38) 무처리구에 비해 처리구에서 생체 중량과 건물 중량 모두 증가하였다. 포장시험에 사용된 3가지 은 나노 용액 가운데 WA-CV-WA13B 용액을 처리한 파의 경우 다른 은 나노 용액에 비해 높은 생체 중량과 건물 중량을 나타내었다. WA-CV-WA13B 용액을 처리한 파의 경우 무처리구에 비해 최대 2배 이상의 생체 중량을 나타냈다. Fig 35에서 이러한 결과를 확인 할 수 있다.

Table 38. Results of treatment of nano-silver on sping green onion.

Nano-siver	WA-CV-WA13B					WA-AT-WB13R				WA-PR-WB13R			
Concentration	CTR	10	25	50	100	10	25	50	100	10	25	50	100
Weight(g)	11.5	28.3	16.8	22.3	21.2	16.1	17.0	18.3	22.4	19.2	19.0	19.0	18.2
Dry weight(g)	0.965	1.998	1.346	1.849	1.666	1.295	1.323	1.564	1.162	1.391	1.102	1.152	1.378



Fig 35. Results of nano-silver treatment on spring green onion. CTR; untreated, A; WA-CV-WA13B, B; WA-AT-WB13R, and C; WA-PR-WB13R treated sping green onions.

자. 은 나노 용액을 처리한 과 재배 토양의 미생물 population 변화 및 토양 분석

(1) 토양 미생물 population 변화 관찰

은 나노 용액을 처리한 곳과 무처리 한 곳의 토양을 샘플링 하여 토양 내의 미생물 개체군의 비교를 하였다. 은 나노 용액에 의해 유용 미생물의 감소가 어느 정도 인지 판단하기 위해 실시하였고, 세균과 곰팡이의 개체 비교를 실시하였다(Tables 39, 40).

세균의 경우 전체적으로 무처리구에 비해 개체수가 줄었으나, 완전 사멸하지는 않았으며, 곰팡이에서는 오히려 증가하는 곳도 나타났다. 곰팡이가 증가한 경우도 파 흑색썩음균핵병 병원균은 관찰되지 않았으며 다른 곰팡이의 개체수가 증가한 것이 관찰 되었고, 세균의 개체수

는 초기에 감소하였다 후기에 증가하는 경향이 나타난 것으로 관찰되었다.

은 나노 용액의 사용이 토양 미생물 모두를 사멸시키지 않았으므로, 유용한 토양 미생물이 사멸하거나 감소하지는 않은 것으로 판단되어 진다. 곰팡이의 개체수가 증가하였으나 무처리구와 많은 차이를 나타내지 않았다.

Table 39. Changes of population of various bacteria from green onion cultivated greenhouse soil.

Conc. ¹ Bacteria	Colony number/plate at 1.0×10 ⁴ CFU/ml												
	CTR ²	A ³ 10	A25	A50	A100	B ⁴ 10	B25	B50	B100	C ⁵ 10	C25	C50	C100
Before	28.3±3.1	22.7±4.2	31.3±5.5	51.3±7.4	32.0±2.6	20.7±8.4	35.7±4.5	23.7±8.5	28.7±4.2	22.3±5.5	22.7±9.5	24.7±7.2	49.0±1.0
	23.0±4.6	16.0±8.7	16.3±1.5	17.0±1.0	13.7±2.1	22.0±2.0	14.3±2.5	15.0±4.0	18.7±6.7	19.3±5.0	12.7±3.1	15.7±7.2	12.7±2.5

1; Concentration, 2; Untreated, 3; WA-CV-WA13B, 4; WA-AT-WB13R, 5; WA-PR-WB13R

Table 40. Changes of population of various fungi from green onion cultivated greenhouse soil.

Conc. ¹ Fungi	Colony number/plate at 1.0×10 ² CFU/ml												
	CTR ²	A ³ 10	A25	A50	A100	B ⁴ 10	B25	B50	B100	C ⁵ 10	C25	C50	C100
Before	7.7±0.6	3.0±1.7	4.0±1.0	0.7±0.6	2.3±1.2	2.3±1.5	0.7±0.6	1.0±1.0	1.3±0.6	0.7±0.6	2.3±0.6	0.7±0.6	1.3±1.5
	7.7±0.6	4.3±1.2	6.0±1.0	1.3±1.5	3.3±0.6	0.7±0.6	1.0±1.0	2.0±1.7	4.3±1.5	1.3±0.6	1.7±0.6	0.3±0.6	1.7±0.6

1; Concentration, 2; Untreated, 3; WA-CV-WA13B, 4; WA-AT-WB13R, 5; WA-PR-WB13R

(2) 토양 성분 분석

은 나노액을 처리한 과 재배 토양의 성분분석을 실시한 결과 토양 pH는 무처리구와 은 나노 용액을 처리했을 때 그리고 처리 2개월 후 조금씩 차이가 나타났다. EC는 처리 전 334.60에서 처리구는 최대 443.00, 최소 289.50 값을 나타냈으며, 처리 2개월 후에는 228.50으로 감소하였다. 유효태 인산은 무처리구 905.55에 비해 처리구에서 다소 증가하였으나, 처리 2개월 후 646.11로 감소하였고, 유기물 함량도 5.94에서 2개월 후 4.07로 떨어졌다. 질산태 질소는 무처리구와 거의 차이가 나타나지 않았으며, 또한 Ca, Mg 함량은 약간씩 감소하는 경향을 보였으며, K, Na의 경우 약간 증가하였다. 양이온 치환용량(토양이나 교질물 100g이 보유하는 치환성 양이온의 총량을 mg당량으로 나타낸 것, 단위: me/100g)은 처리전보다 2.98 감소하였다(Table 41).

은 나노 용액 처리구와 2개월 후, 무처리구에 비해 전체적으로 많은 차이가 나지 않았으며, 특히 pH값에서 많은 차이를 나타내지 않아 토양 처리 시 토양 성분에 많은 영향을 끼치지 않은 것으로 관찰되었다. 성분 분석을 통해 은 나노의 안전성을 관찰할 수 있었다.

Table 41. Analysis of soil treated with various concentrations of nano-silver.

Sample	pH (1:5)	EC(1:5) ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	P_2O_5 (mg/kg)	Organic compounds (%)	T-N (%)	Exc. Cation(cmol(+)/kg)				CEC (cmol(+)/kg)
						K	Ca	Mg	Na	
A ² -10ppm	6.53	364.10	987.10	4.42	0.23	1.11	6.80	3.16	0.35	14.06
A-25ppm	6.46	423.00	1072.17	4.31	0.22	1.42	6.69	3.71	0.39	15.29
A-50ppm	6.56	318.00	938.06	4.68	0.23	1.19	7.02	3.12	0.45	14.87
A-100ppm	6.75	289.50	930.07	4.79	0.25	0.87	6.78	2.66	0.27	13.66
B ³ -10[m	6.76	314.00	1047.84	4.96	0.24	1.32	6.57	2.64	0.32	14.15
B-25ppm	6.83	410.00	1034.65	6.23	0.25	1.48	8.81	3.22	0.46	17.05
B-50ppm	6.60	357.00	975.77	4.68	0.35	0.98	9.79	3.19	0.56	17.17
B-100ppm	6.34	334.60	905.55	4.53	0.25	0.87	7.23	2.85	0.32	14.12
C ⁴ -10ppm	6.40	317.00	1103.57	5.59	0.27	1.52	10.67	2.51	0.32	18.11
C-25ppm	6.58	267.10	987.84	4.92	0.22	1.35	8.63	2.69	0.44	15.97
C-50ppm	6.55	443.00	920.23	4.82	0.24	1.07	6.77	2.06	0.23	14.09
C-100ppm	6.53	357.90	839.61	4.93	0.23	1.15	6.67	2.47	0.22	14.69
CTR ¹	6.65	334.60	905.55	5.94	0.25	1.27	7.68	2.65	0.31	15.86
after 2 months	6.88	228.50	646.11	4.07	0.21	1.34	5.38	2.21	0.87	12.88

1; Untreated, 2; WA-CV-WA13B, 3; WA-AT-WB13R, 4; WA-PR-WB13R

차. 은 나노 용액을 처리한 포장에서 수확한 파로부터 은의 검출 분석

파를 재배한 포장에 은 나노 용액을 시용 후 파에서 검출된 은 농도 분석 결과(Table 42), 25ppm 처리구에서 재배된 파에서 0.48mg의 가장 많은 은 이 검출 되었으며, 50ppm, 100pm 그리고 10ppm 처리구의 파에서 각각 0.33mg, 0.23mg, 그리고 0.11mg이 검출 되었다. 파 재배 포장에 시용한 은 나노 용액의 농도가 증가됨에 따라 파에서 검출된 은의 농도가 감소한 점으로 보아 은 나노 용액 시용 농도와 은 의 검출과는 반비례하는 관계에 있는 것으로 추정 되며, 이에 대한 추가 적인 실험이 수행될 필요가 있는 것으로 판단된다.

Table 42. 과 재배 포장에서 은 나노 용액 사용 후 과에서 회수된 은 농도 분석 결과

시료명	측정값(mg/l)	은농도(mg/kg)
Control-1	0.00	0.00
Control-2	0.00	0.00
Control-3	0.00	0.00
Control 평균	0.00	0.00
10ppm 처리구 1	0.04	0.19
10ppm 처리구 2	0.04	0.20
10ppm 처리구 3	0.03	0.14
10ppm 처리구 평균	0.04	0.11
25ppm 처리구 1	0.09	0.47
25ppm 처리구 2	0.08	0.38
25ppm 처리구 3	0.12	0.61
25ppm 처리구 평균	0.10	0.49
50 ppm 처리구 1	0.09	0.43
50 ppm 처리구 2	0.05	0.25
50 ppm 처리구 3	0.06	0.31
50ppm 처리구 평균	0.07	0.33
100 ppm 처리구 1	0.06	0.29
100 ppm 처리구 2	0.05	0.24
100 ppm 처리구 3	0.04	0.20
100ppm 처리구 평균	0.05	0.24

카. 은 나노 용액과 키토산의 과 흑색썩음균핵병에 대한 방제효과 비교

항균성 물질인 키토산의 과 흑색썩음균핵병에 대한 방제효과와 은 나노 용액의 과 흑색썩음균핵병 방제효과를 비교해 보기 위해 pot 실험을 실시하였다. 키토산 A, B와 은 나노 용액 WA-PR-WB13R 용액을 대상으로 하여 실험을 실시하였다. 실험 결과, 은 나노 용액은 50ppm 부터 억제 효과가 나타나기 시작했으며, 키토산 A는 2,000ppm에서 억제효과를 나타냈고, 키토산 B는 1,000ppm에서 억제효과를 나타냈다(Fig 36). 은 나노 용액이 50ppm 정도의 농도에서 효과를 나타냈으며, 키토산은 1,000ppm이상의 높은 농도에서 효과를 나타냈다. 본 실험결과 키토산의 병해 방제 효과는 기대보다 높지 않았으며, 방제효과를 나타내는 은 나노 용액의 농도도 비교적 높은 편에 속하였다.

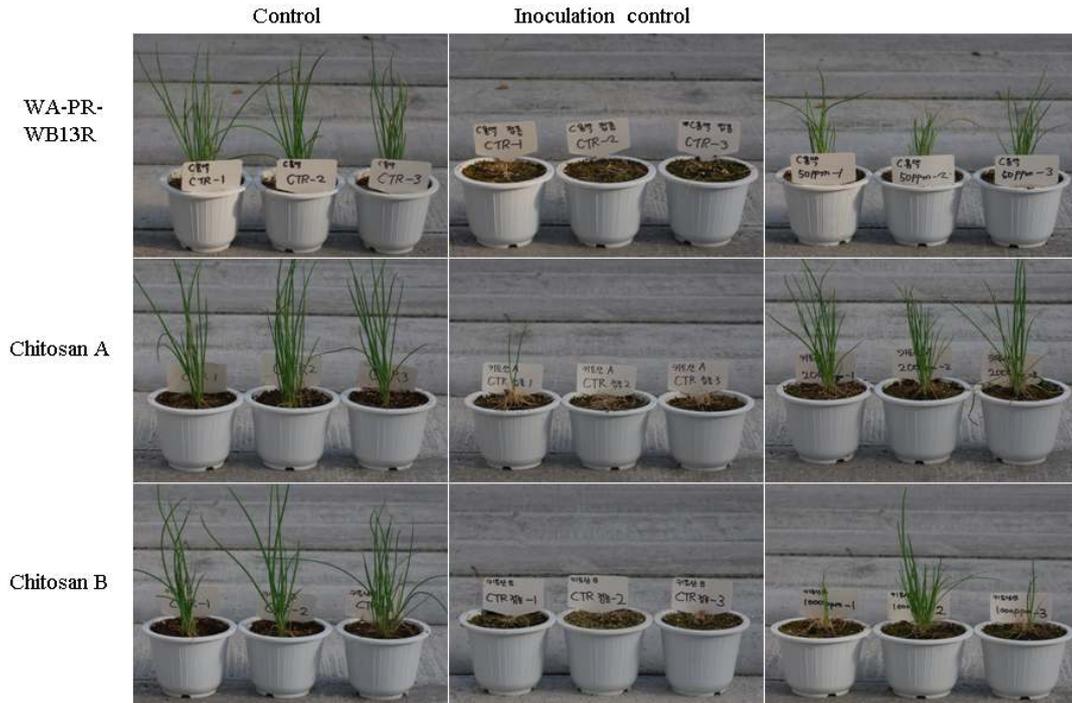


Fig 36. Comparison of results of nano-silver WA-PR-WB13R, chitosan A, and chitosan B treatments on spring green onion. First row; Left: Untreated uninoculated control, Middle: Untreated inoculated control, Right: treated with 50 ppm nano-silver, Second row; Left: Untreated uninoculated control, Middle: Untreated inoculated control, Right: treated with 2,000ppm chitosan, Third row; Left: Untreated uninoculated control, Middle: Untreated inoculated control, Right: treated with 1,000ppm chitosan.

타. 호박과 오이 흰가루병균에 대한 은 나노 용액의 방제 효과 포장 검정

(1) 호박 흰가루병균에 대한 은 나노 용액의 방제 효과 검정

호박 잎에 발생하는 흰가루병에 대해 은 나노 용액을 처리하여 흰가루병원균을 억제하고자 실험을 실시하였다. 3반복하여 실험을 실시하였고, 춘천시 고탄에 있는 호박재배 포장에서 실시하였다. 1차 실험의 경우, 은 나노 용액 3가지를 10ppm, 25ppm, 50ppm, 100ppm 농도로 엽면 시비 하였다. 은 나노 용액별로 농도별 처리 후 병의 발병률과 억제율을 나타냈다(Table 43). 은 나노 용액을 처리한 후, 병 발병률과 억제율을 조사한 결과(Fig. 37) 검정에 사용한 3가지 용액 모두 100ppm에서 높은 억제율을 나타내며, WA-PR-WB13R 용액 100ppm에서 가장 높은 억제율을 나타냈다. 그러나 일관된 억제 효과는 WA-CV-WA13B 와 WA-PR-WB13R 이 모두 유사한 효과를 나타냈다. Figure 38은 나노 용액이 처리된 호박잎을 보여주고 있다. 무처리구에 비해 은 나노 처리된 잎에서 병 발생이 억제되었음을 보여주고 있다

Table 43. Effects of nano-silver treatment against powdery mildew on squash in greenhouse after the disease outbreak.

Nanover™ / ppm	Disease incidence (%)				DMRT	Inhibition rate (%)
	I	II	III	AVE		
WA-CV-WA13B						
10ppm	53	60	67	60	b	29.4
25ppm	65	62	53	60	b	29.4
50ppm	60	70	65	65	b	23.5
100ppm	27	22	26	25	c	70.5
WA-AT-WB13R						
10ppm	57	56	67	60	b	29.4
25ppm	50	66	64	60	b	29.4
50ppm	65	62	68	65	b	23.5
100ppm	30	25	29	28	c	67.0
WA-PR-WA13R						
10ppm	54	53	58	55	b	35.2
25ppm	62	63	55	60	b	29.4
50ppm	60	65	55	60	b	29.4
100ppm	25	20	24	23	c	72.9
Control	87	80	88	85	a	—

C. V. (%) : 9.22

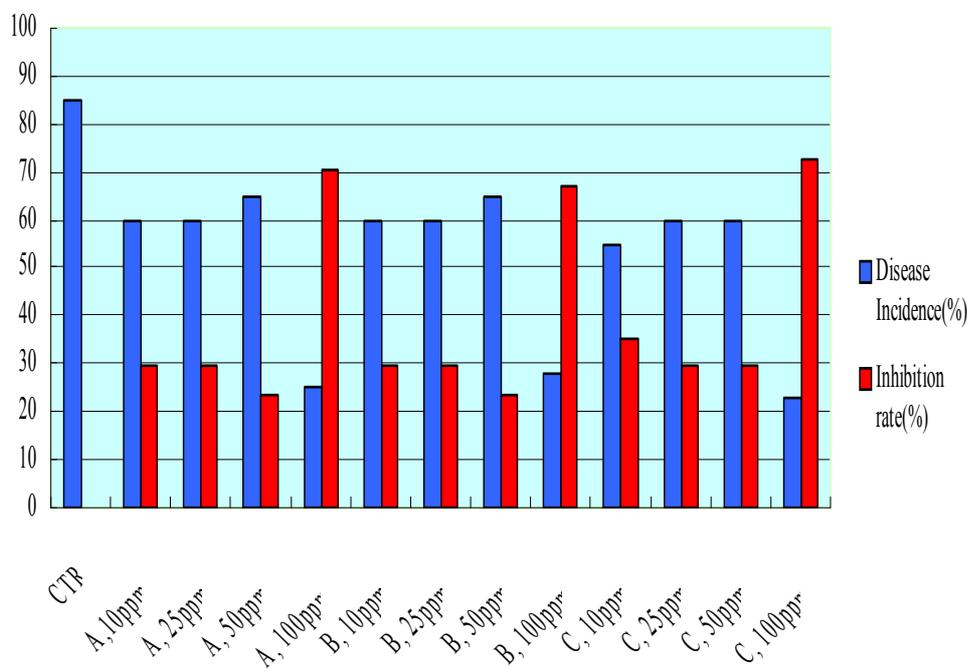


Fig 37. Disease incidence and inhibition rate of nano-silver on squash. A; WA-CV-WA13B, B; WA-AT-WB13R, and C; WA-PR-WB13R.

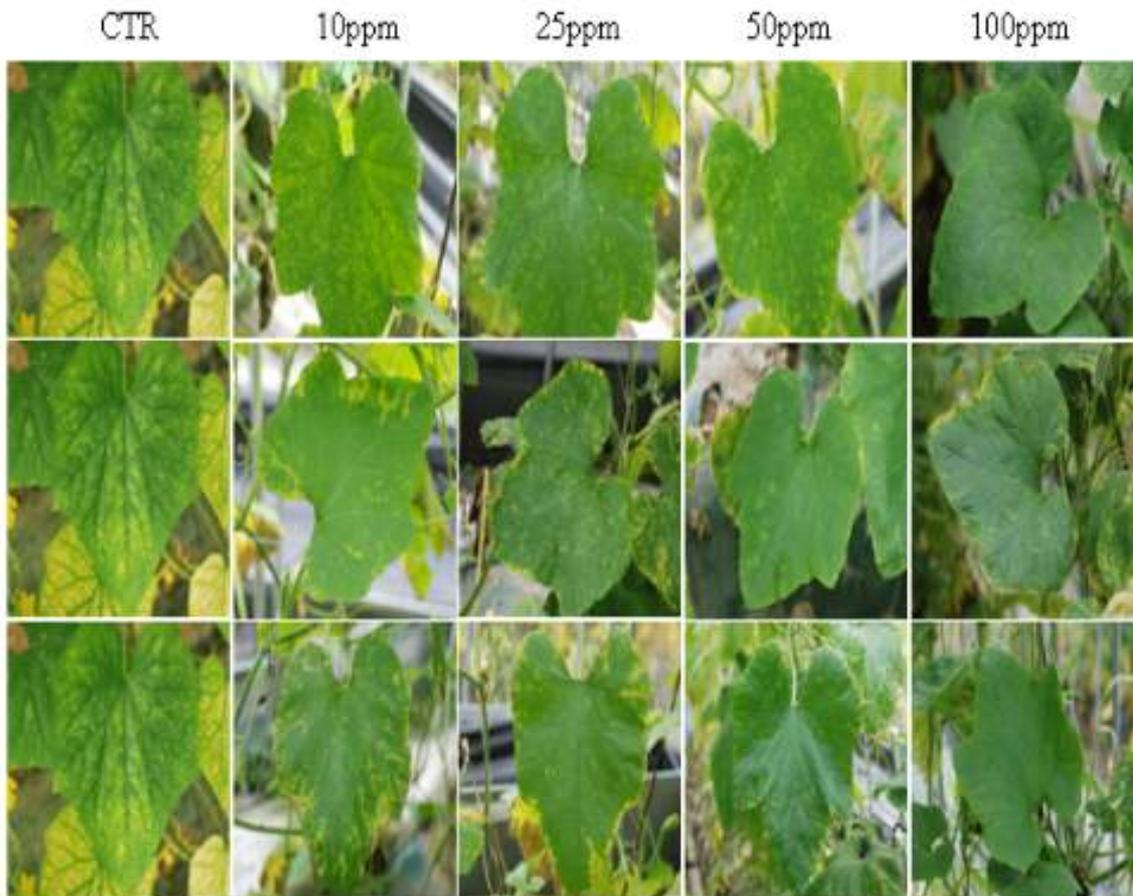


Fig 38. 발병 후 은 나노액 처리가 호박 흰가루병 방제에 미치는 영향 조사 결과. 상단열은 WA-CV-WA13B를 처리한 경우, 중간열은 WA-AT-WB13R을 처리한 경우, 그리고 아래열은 WA-PR-WB13R을 처리한 경우임.

발병전 처리와 발병후 처리를 비교한 2차 포장시험의 결과(Fig 39, 40), Control 1 (무처리)은 흰가루병에대해 75.4%의 발병률을 보였다. 발병전 처리에서 Control 2 (Dongbang Agro Co.의 NSS-F)는 37.4%와 Control 4 (Dongbu High-Teck.의 휘나리)는 8.2%를 보였다. 발병전 Nanover™ 처리에서 10ppm은 57.8%, 30ppm은 45.8%, 50ppm은 40.2%, 100ppm은 30.2%의 발병률을 보였다. 발병후 Nanover™ 100ppm처리는 44%의 발병률을 보였다. 발병전 Nanover™ 처리 100ppm처리가 Control 2 (Dongbang Agro Co.의 NSS-F)보다 효과적이었다. 발병전 Nanover™ 처리 10ppm과 30ppm은 효과적이지 못했고, 모든 처리에서 Control 4 (Dongbu High-Teck.의 휘나리)가 가장 좋은 효과를 보였다. 2차에 걸친 이러한 포장 검정의 결과 호박 흰가루병을 방제하기 위하여 발병 전 은 나노액을 50ppm과 100ppm의 농도로 처리 하면 상당한 수준의 방제효과를 거둘 수 있음을 확인하였다. 특히 1차 포장 검정의 경우에서 밝혀진 바와 같이 발병 후 은 나노액을 처리하는 경우 100ppm 이하의 농도에서는 방제효과를 거두기 어려운 점을 고려해 볼 때 발병 2-3 주 전 은 나노 액을 처리하는 경우 50ppm의 농도에서도 방제 효과를 거둘 수 있음이 확인 되어 실제로 은 나노액을 산업화 하는 경우 제조 단가를 절반으

로 경감 시킬 수 있는 조건을 확인한 것이다. 향후 추가 실험을 통해 방제효과를 증대시킬 수 있는 기술개발이 필요 할 것으로 사료된다.

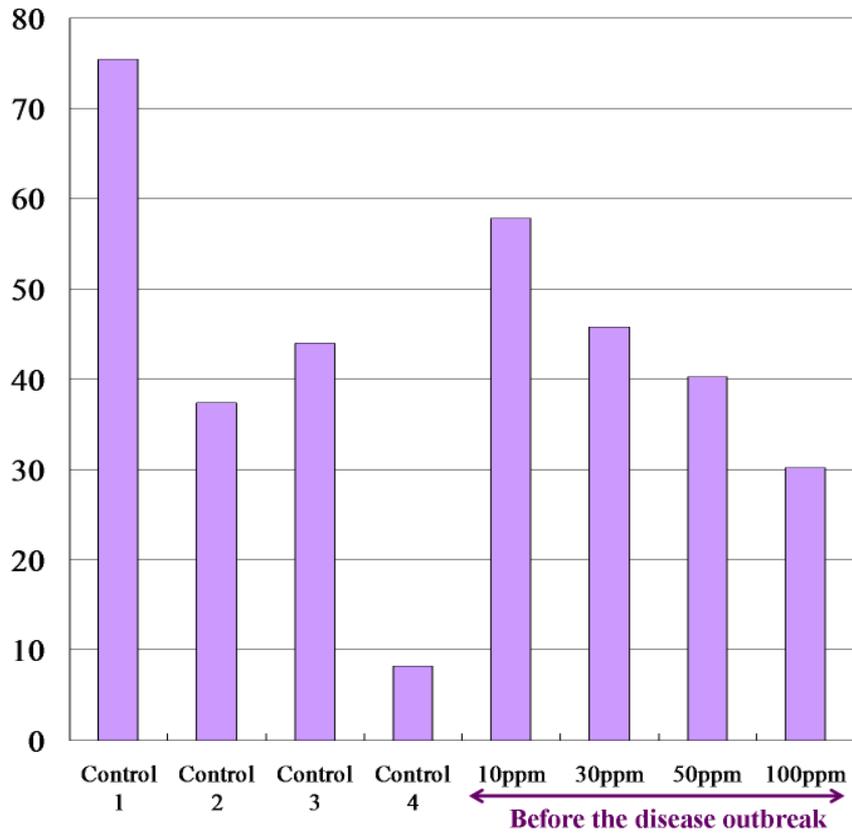


Fig 39. 발병 전 및 발병 후 은 나노액 Nanover™ WA-CV-WA13B 처리가 호박 흰가루병 발병률에 미치는 영향. Control 1 (무처리), Control 2 (Dongbang Agro Co.의 NSS-F), Control 3 (발병 후 Nanover™ 100ppm 처리), Control 4 (Dongbu High-Teck.의 휘나리), Nanover™ 처리(10, 30, 50, 100ppm)

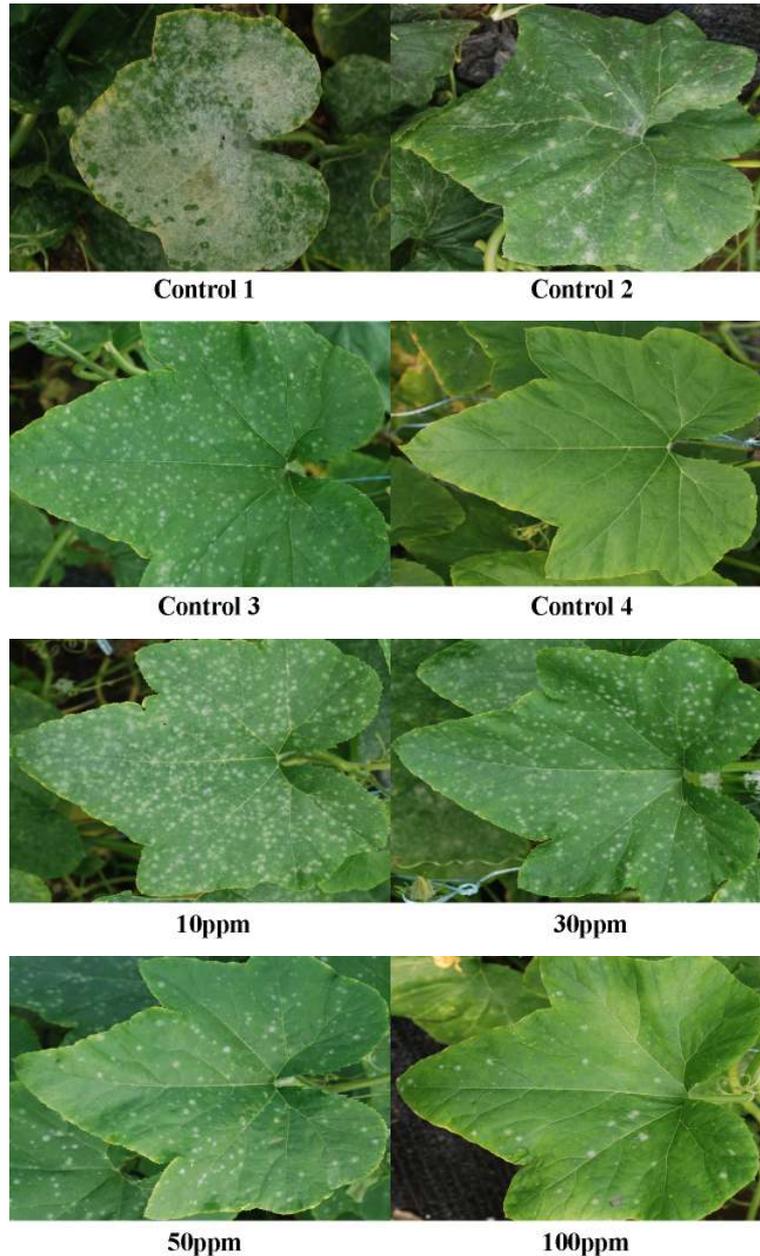


Fig 40. 발병 전 및 발병 후 은 나노액 Nanover™ WA-CV-WA13B 처리가 호박 흰가루병 방제에 미치는 영향. Control 1 (무처리), Control 2 (Dongbang Agro Co.의 NSS-F), Control 3 (발병후 Nanover™ 100ppm 처리), Control 4 (Dongbu High-Teck.의 휘나리), 발병 후 Nanover™ 처리(10, 30, 50, 100ppm)

(2) 오이 흰가루병균에 대한 은 나노 용액 활성 검정

오이 잎에 발생하는 흰가루병에 대해 은 나노 용액을 처리하여 흰가루병원균을 억제하고자 실험을 실시하였다. 은 나노 용액 3가지를 10ppm, 25ppm, 50ppm, 100ppm 농도로 엽면시비 하였다. 강원도 춘천시 고탄(Experiment 1)과 샘밭(Experiment 2)에 있는 오이 포장에서 실험하였고, 대조군으로 Fenari 농약을 사용하였으며, 3반복 실험하였다. 고탄 지역은 오이 흰가루병균

의 진행이 초기 단계였고, 샘밭 지역은 오이 흰가루병균의 진행이 중간 단계였다. 따라서 병원균의 진행단계와 은 나노 효과를 비교하기 위해 2지역에서 실험을 실시하였다.

발병직후 은 나노액 처리가 오이 흰가루병 방제에 미치는 영향을 알아보는 1차 포장 시험을 수행한 결과, 은 나노 용액을 처리했을 때의 발병율과 억제율을 나타내고 있다 (Table 44의 Experiment 1과 Experiment 2). Experiment 1에서는 3가지 용액의 농도가 높아짐에 따라서 억제율이 증가하는 것을 볼 수 있다. 또한 100ppm에서 WA-AT-WB13R 용액은 76% 억제율, WA-CV-WA13B와 WA-PR-WB13R 용액은 78% 억제율을 나타냈다. Experiment 2에서는 3가지 용액 100ppm에서 좋은 억제율을 나타냈다. 하지만, WA-PR-WB13R 용액 25ppm은 억제효과가 나타나지 않았다. WA-CV-WA13B 용액 100ppm에서 66.7%로 가장 높은 억제율을 나타냈다 (Table 44, Experiment 2). 이미 오이 흰가루병균이 진행이 되어 있는 상태였기 때문에 많은 효과를 나타내지는 않았다. 하지만 초기단계에서는 상당히 좋은 억제 효과를 나타냈다.

고탄(Experiment 1)에서 은나노 용액 처리후 발병율과 억제율, 그리고 샘밭(Experiment 2)에서 은나노 용액 처리후 발병율과 억제율을 나타내고 있다 (Fig. 41).

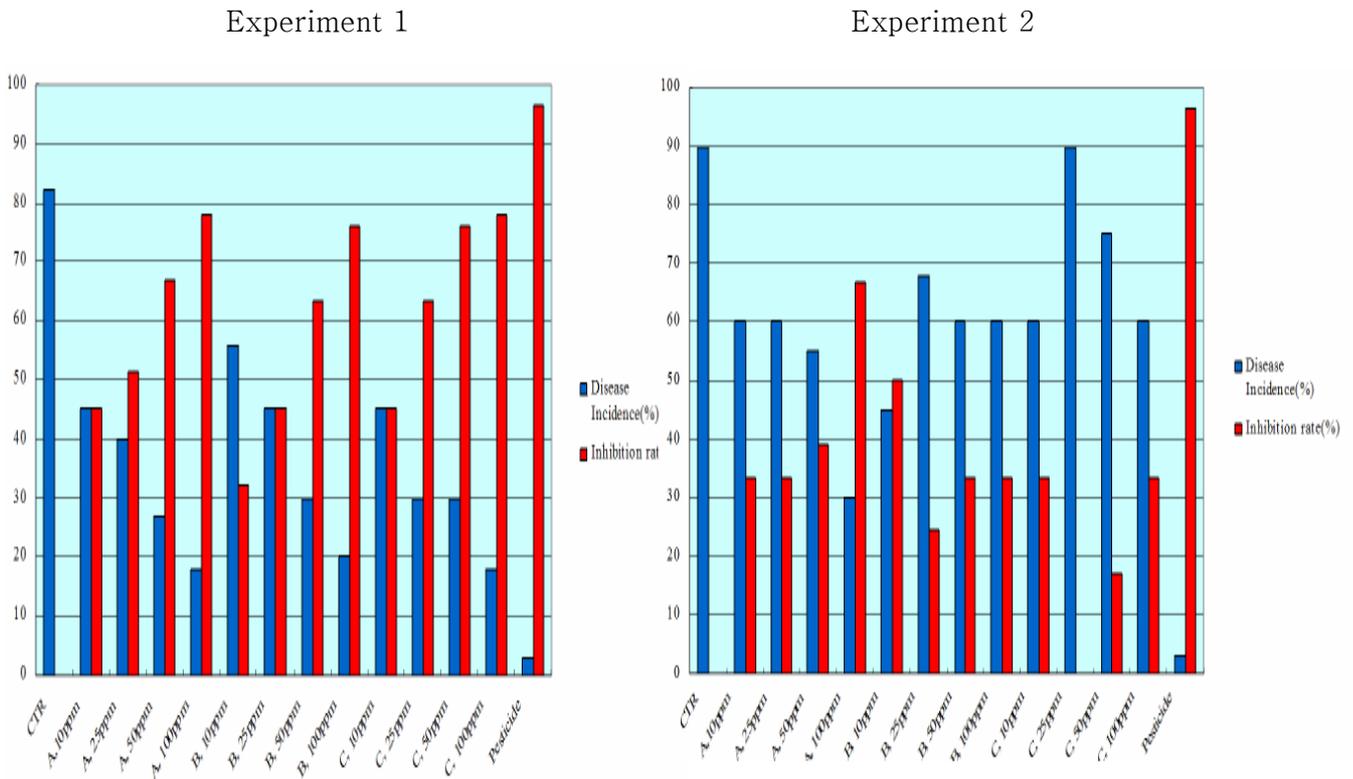


Fig 41. Disease incidence and inhibition rate of nano-silver on cucumber. Experiment 1; Gotan, Experiment 2; Sambat, A; WA-CV-WA13B, B; WA-AT-WB13R, C; WA-PR-WB13R, Pesticide Fenari.

Table 44. Effects of nano-silver treatment against powdery mildew on cucumber in greenhouse after the disease outbreak.

Experiment 1

Nano-silver/ppm	Disease incidence (%)				DMRT	Inhibition rate (%)
	I	II	III	AVE		
WA-CV-WA13B						
10ppm	42	47	46	45	c	45.1
25ppm	38	42	40	40	d	51.2
50ppm	25	26	30	27	e	67.0
100ppm	16	17	21	18	f	78.0
WA-AT-WB13R						
10ppm	53	58	57	56	b	32.0
25ppm	43	46	45	45	c	45.1
50ppm	31	36	23	30	e	63.4
100ppm	18	20	22	20	f	76.0
WA-PR-WB13R						
10ppm	45	46	44	45	c	45.1
25ppm	31	30	29	30	e	63.4
50ppm	19	20	21	20	f	76.0
100ppm	20	15	18	18	f	78.0
Fenari	3	4	2	3	g	96.3
Control	85	78	82	82	a	-

C. V. (%) : 8.02

Experiment 2

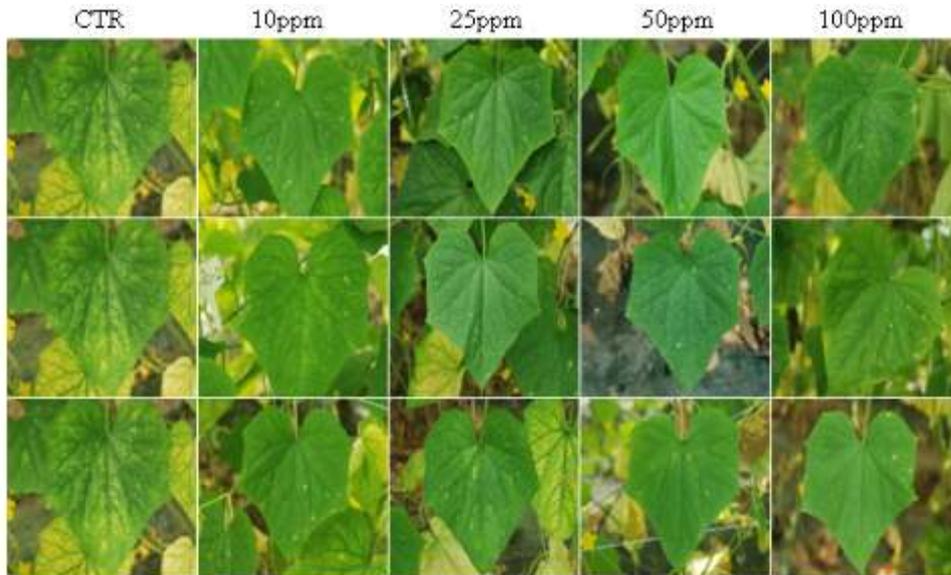
Nano-silver/ppm	Disease incidence (%)				DMRT	Inhibition rate (%)
	I	II	III	AVE		
WA-CV-WA13B						
10ppm	58	63	59	60	d	33.3
25ppm	55	60	65	60	d	33.3
50ppm	55	50	60	55	d	39.0
100ppm	28	35	27	30	f	66.7
WA-AT-WB13R						
10ppm	41	46	48	45	e	50
25ppm	70	65	69	68	c	24.4
50ppm	62	55	63	60	d	33.3
100ppm	57	60	63	60	d	33.3
WA-PR-WB13R						
10ppm	58	65	57	60	d	33.3
25ppm	93	85	92	90	a	0
50ppm	75	73	77	75	b	17.0
100ppm	55	60	65	60	d	33.3
Fenari	3	4	2	3	g	96.3
Control	95	89	86	90	a	-

C. V. (%) : 6.46

고탄 지역에서 은 나노 용액 처리한 경우와 샘밭 지역에서 은 나노 용액 처리한 오이 잎의 결과이다. 발병 초기에 처리된 고탄 지역의 오이의 잎에서 무처리구에 비해 오이 흰가루 병원균이 억제됨을 보여줬다. 하지만, 발병이 이미 진행된 샘밭 지역에 은 나노 용액을 처리한 경우 무처리구에 비해 오이 흰가루병원균이 억제는 되었으나, 고탄 지역만큼 많은 억제율을 보여 주지 않았다(Fig 42). 은 나노 용액이 흰가루병원균에 억제효과에 대해 관찰해본 결과, 호박에서

무처리구에 비해 78%의 억제효과를 100ppm에서 나타냈으며, 오이에서는 농약만큼의 효과는 아니지만 100ppm에서 66.7% 억제효과를 나타냈다. 또한 발병 초기에 은 나노 용액을 처리하는 것이 좋은 효과를 나타냈다.

Experiment 1



Experiment 2

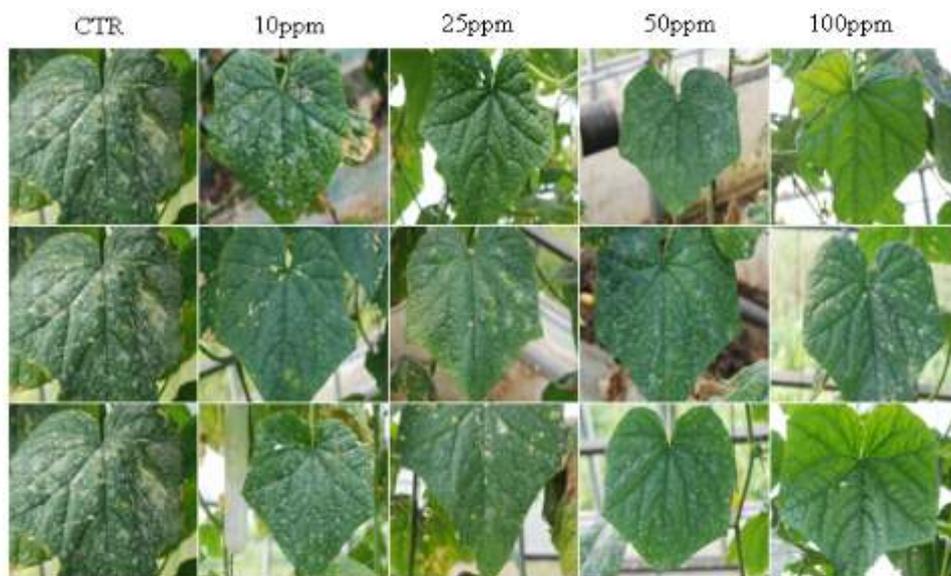


Fig 42. Cucumber leaves treated with different concentrations of nano-silver after the disease outbreak. Experiment 1; Gotan, Experiment 2; Sambat. (상단열은 WA-CV-WA13B를 처리한 경우, 중간열은 WA-AT-WB13R을 처리한 경우, 그리고 아래열은 WA-PR-WB13R을 처리한 경우임.)

발병 전과 발병직후 은 나노액 처리가 오이 흰가루병 방제에 미치는 영향을 비교하기 위한 2차 포장시험을 수행한 결과(Fig 43, 44), Control 1 (무처리)은 흰가루병에 대해 50.4%의 발병률을 보였다. 발병전 처리에서 Control 2 (Dongbang Agro Co.의 NSS-F)는 25.4%와 Control 4 (Dongbu High-Teck.의 휘나리)는 5%를 보였다. 발병 전 Nanover™ 처리에서 10ppm은 53.4%, 30ppm은 34.4%, 50ppm은 25%, 100ppm은 20%의 발병률을 보였다. 발병후 Nanover™ 100ppm 처리는 28.4%의 발병률을 보였다. 발병전 Nanover™ 처리 10ppm과 30ppm은 효과적이지 못했고, 모든 처리에서 Control 4 (Dongbu High-Teck.의 휘나리)가 가장 좋은 효과를 보였다. 발병 전 Nanover™ 처리 50ppm과 100ppm은 Control 2 (Dongbang Agro Co.의 NSS-F)보다 좋은 효과를 보였다. Nanover™ 100ppm처리에서는 발병 전 처리한 것이 발병 후 처리한 것 보다 효과가 좋았다.

2차에 걸친 이러한 포장 검정의 결과 오이 흰가루병을 방제하기 위하여 발병 전 은 나노액을 50ppm과 100ppm의 농도로 처리 하면 상당한 수준의 방제효과를 거둘 수 있음을 확인하였다. 특히 1차 포장 검정의 경우에서 밝혀진 바와 같이 발병 후 은 나노액을 처리하는 경우 100ppm 이하의 농도에서는 방제효과를 거두기 어려운 점을 고려해 볼 때 발병 2-3 주 전 은 나노액을 처리하는 경우 50ppm의 농도에서도 방제효과를 거둘 수 있음이 확인 되어 실제로 은 나노액을 산업화 하는 경우 제조 단가를 절반으로 경감 시킬 수 있는 조건을 확인한 것이다. 향후 추가 실험을 통해 방제효과를 증대시킬 수 있는 기술개발이 필요 할 것으로 사료된다.

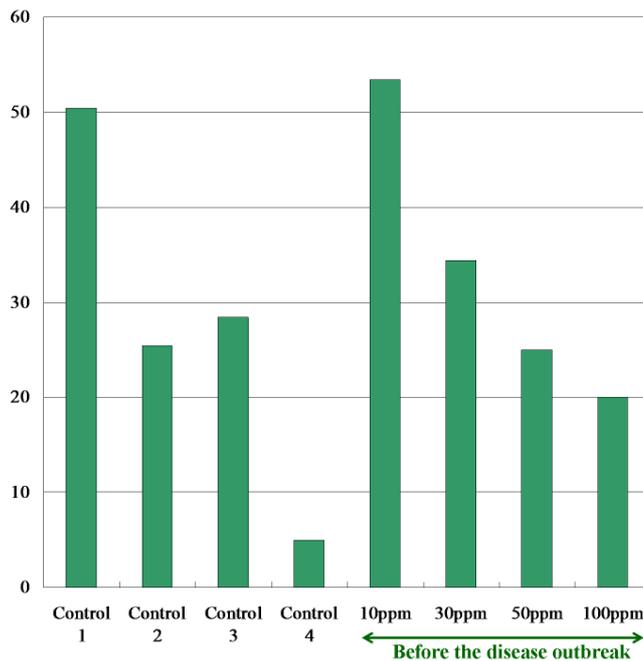


Fig 43. 발병 전 및 발병 후 은 나노액 Nanover™ WA-CV-WA13B 처리가 오이 흰가루병 발병률에 미치는 영향. Control 1 (무처리), Control 2 (Dongbang Agro Co.의 NSS-F), Control 3 (발병 후 Nanover™ 100ppm 처리), Control 4 (Dongbu High-Teck.의 휘나리), Nanover™ 처리(10, 30, 50, 100ppm)

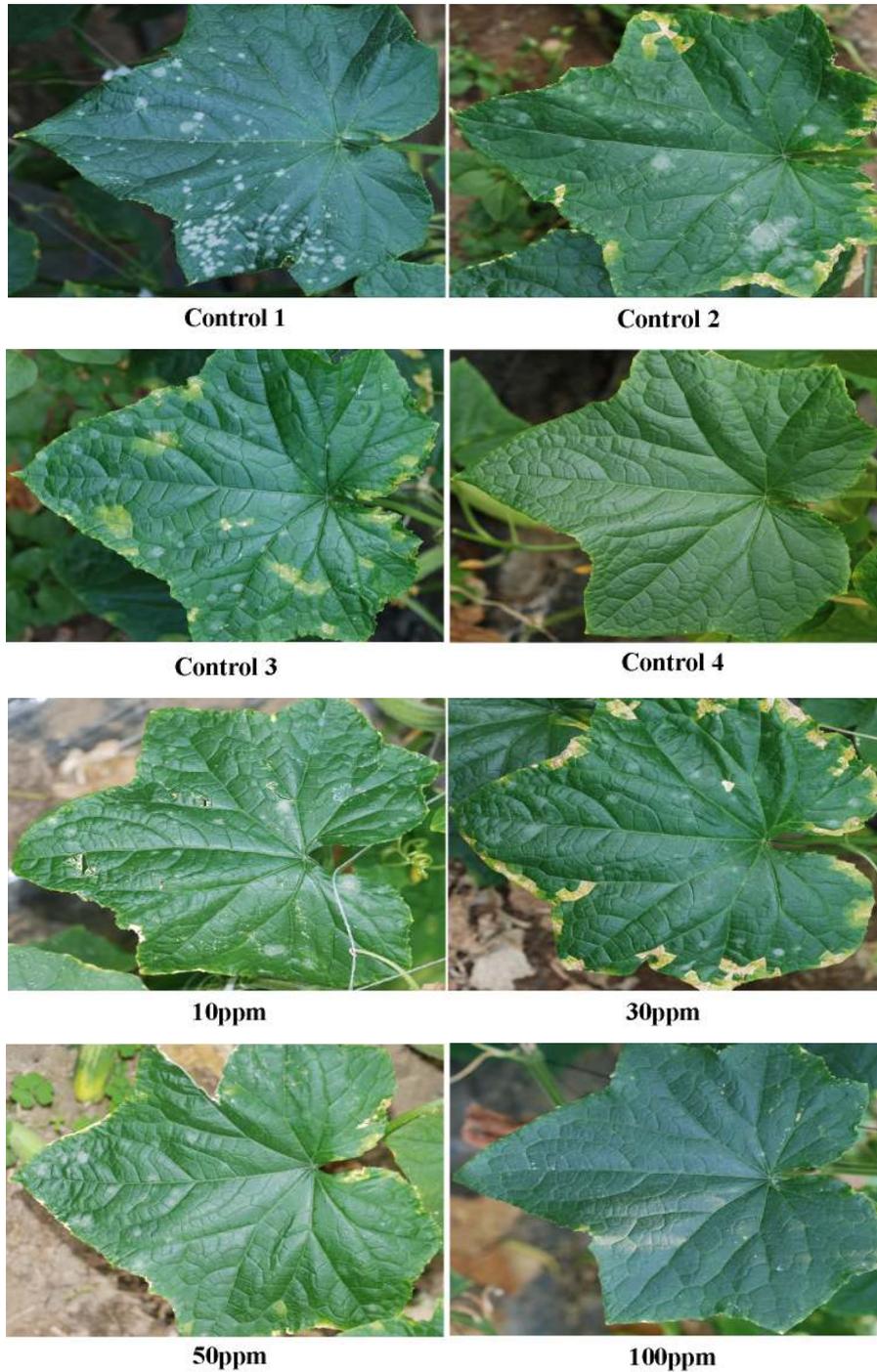


Fig 44. 발병 전 및 발병 후 은 나노액 Nanover™ WA-CV-WA13B 처리가 오이 흰가루병 방제에 미치는 영향. Control 1 (무처리), Control 2 (Dongbang Agro Co.의 NSS-F), Control 3 (발병 후 Nanover™ 100ppm 처리), Control 4 (Dongbu High-Teck.의 휘나리), Nanover™ 처리(10, 30, 50, 100ppm).

과. 호박과 오이 흰가루병균에 대한 은 나노 용액의 방제 효과 기작 구명

호박 흰가루병(powdery mildew)에 대한 Nano-silver 용액의 생장억제 기작을 확인하기 위하여 강원도 화천의 농가에서 재배한 호박을 공시재료로 사용 하였다. 아무것도 처리되지 않은 포장에서 재배된 호박식물에 자연적으로 흰가루병에 감염된 잎을 채집한 후, 실험실에서 호박잎을 5cm×5cm 크기로 절단하고, Petri Dish(90×15mm)에서 증류수와 각각의 농도 Nano-silver 용액을 처리한 후 상온보관하면서, 1일에서 4일까지 1일 간격으로 호박잎을 전 처리하여 SEM(Scanning electron micrographs)으로 관찰하였다. 흰가루병이 걸린 호박잎에 증류수만을 처리하여 SEM을 이용하여 포자와 균사를 관찰한 결과, 일부 주글주글해진 모양의 포자를 관찰되어지나, 그 이외에는 균사와 포자 모두 정상적으로 관찰되었다(Fig 45). 그러나 흰가루병이 걸린 호박잎을 10ppm Nano-silver 용액을 처리한 후 SEM을 이용하여 관찰한 경우, 1일과 2일째에 포자와 균사 모두의 세포막이 손상된 것을 관찰할 수 있었고, 3일과 4일째에는 다시 복구되는 것으로 보였다(Fig 46). 이것은 10ppm Nano-silver 용액이 흰가루병 포자와 균사의 세포막에 손상을 주는 것보다 흰가루병의 병세가 강하여 복구되는 것으로 보여 진다. 그림 47에서는 30ppm Nano-silver 용액을 처리한 후 SEM을 이용하여 관찰하였다. 10ppm 농도를 처리했을 때보다 흰가루병의 포자와 균사에 대해 강한 효과를 보였고, 시간이 지남에 따라 흰가루병 포자와 균사의 세포막 피해 정도가 심해지는 것을 관찰하였다. 흰가루병 병원균 포자와 균사에 대한 피해 정도는 처리한 은 나노 용액의 농도가 50ppm(Fig 48), 그리고 100ppm(Fig 49) 으로 높아짐에 따라 더욱 심해 졌으며, 구체적인 작용 기작은 추가적인 연구가 필요하다고 판단된다.

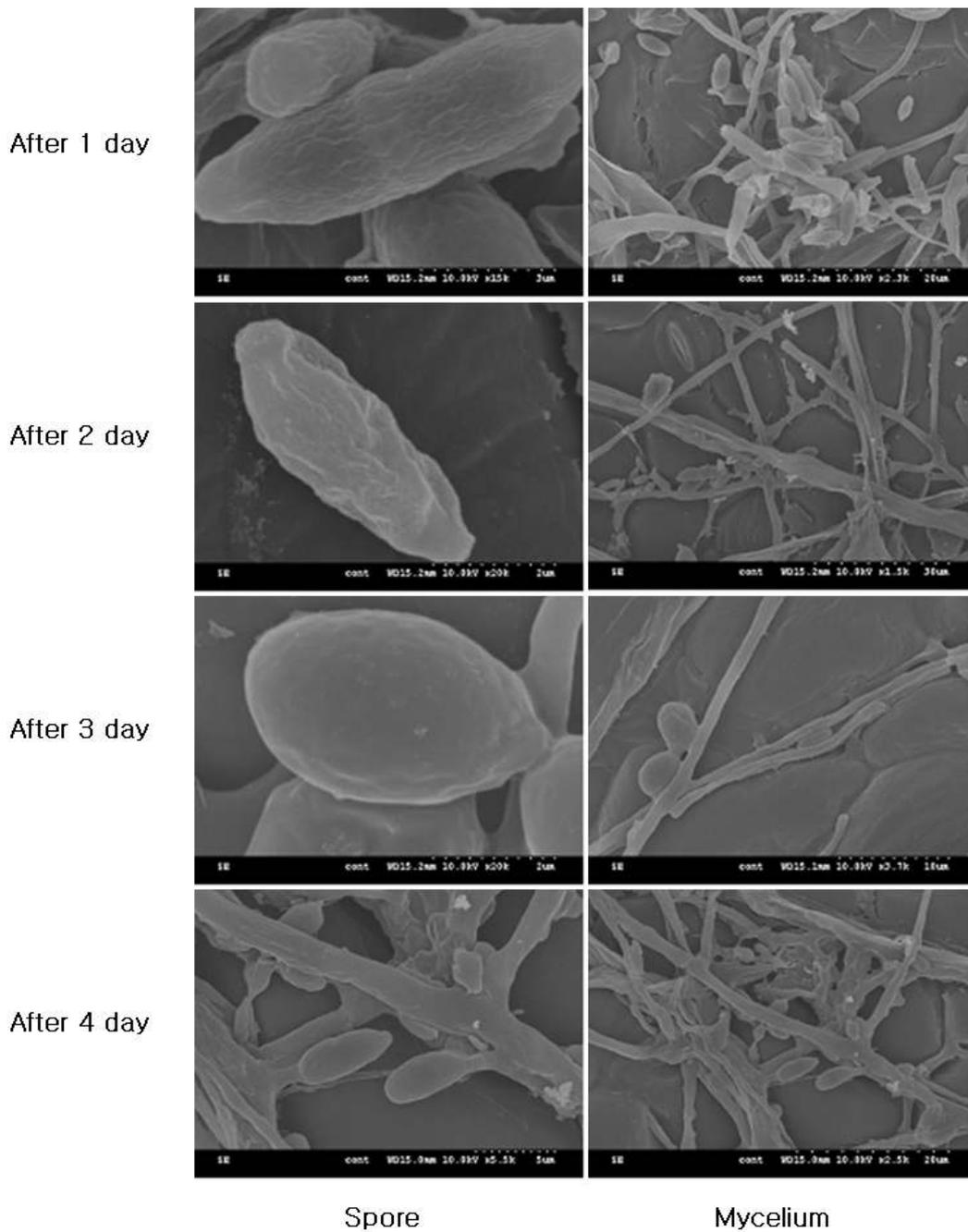


Fig 45. Effect on spores and mycelia of powdery mildews treated with distilled water and observed with SEM over four days with one day interval.

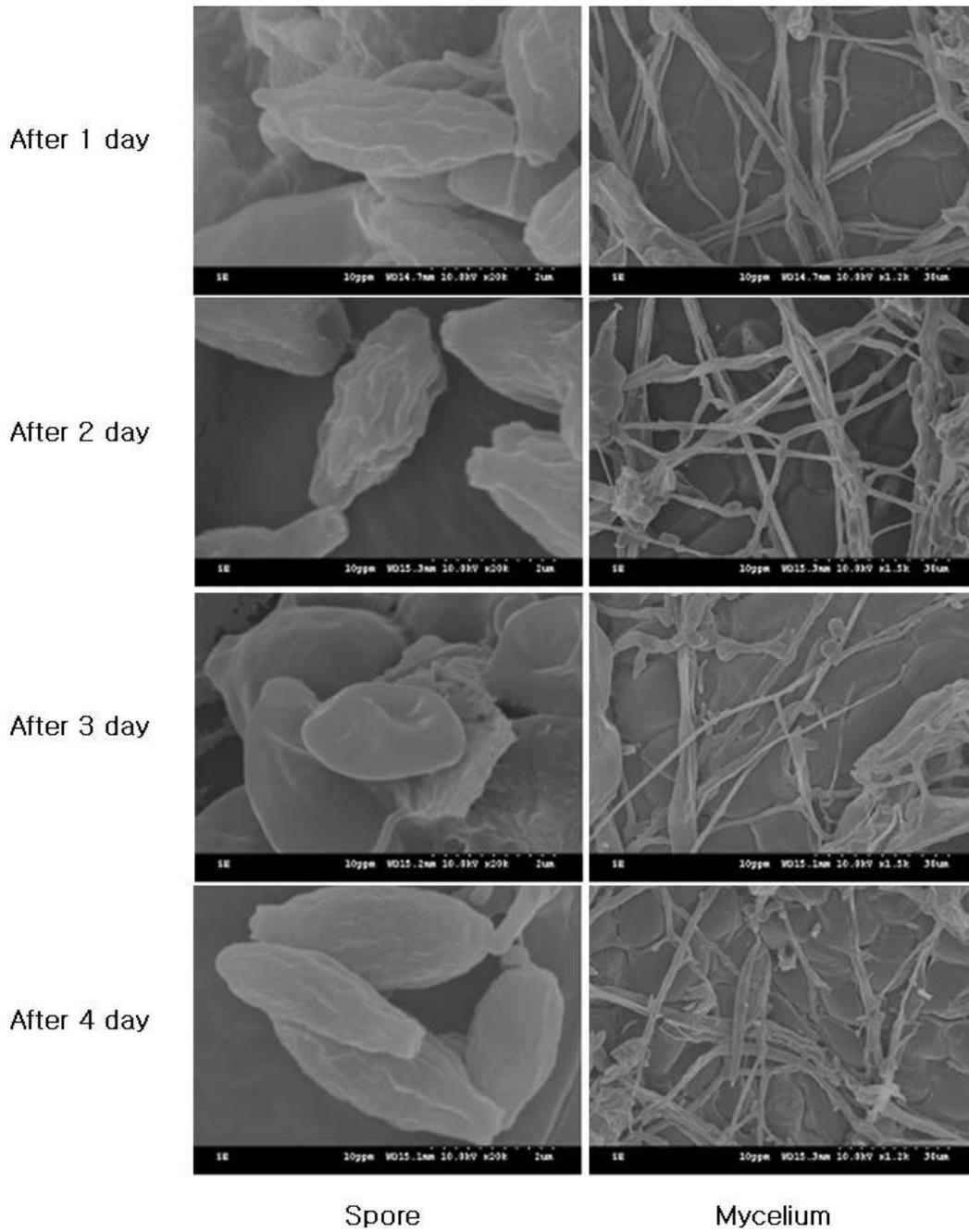


Fig 46. Effect on spores and mycelia of powdery mildews treated with 10ppm Nano-silver liquid WA-CV-WA13B and observed with SEM over four days with one day interval.

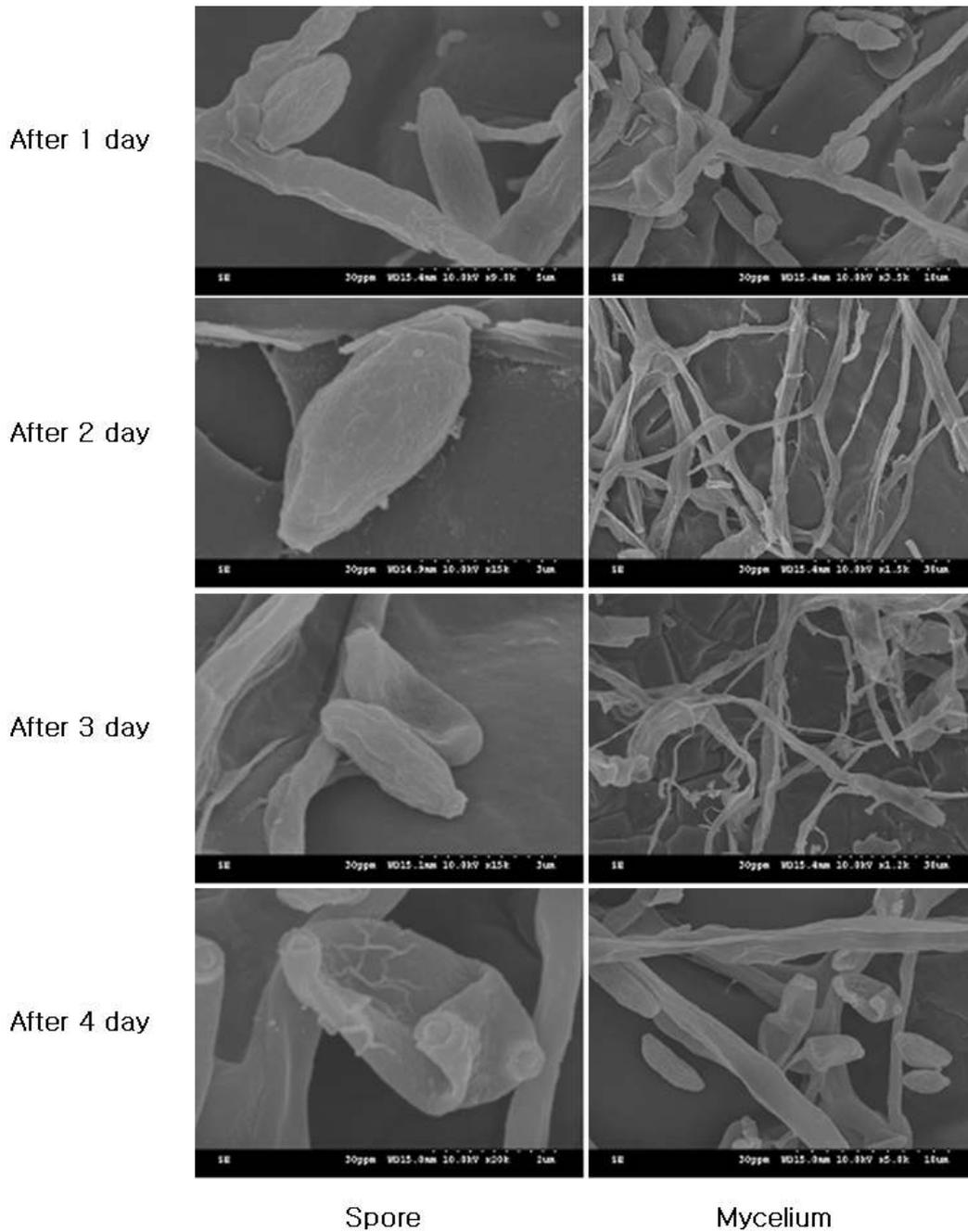


Fig 47. Effect on spores and mycelia of powdery mildews treated with 30ppm Nano-silver liquid WA-CV-WA13B and observed with SEM over four days with one day interval.

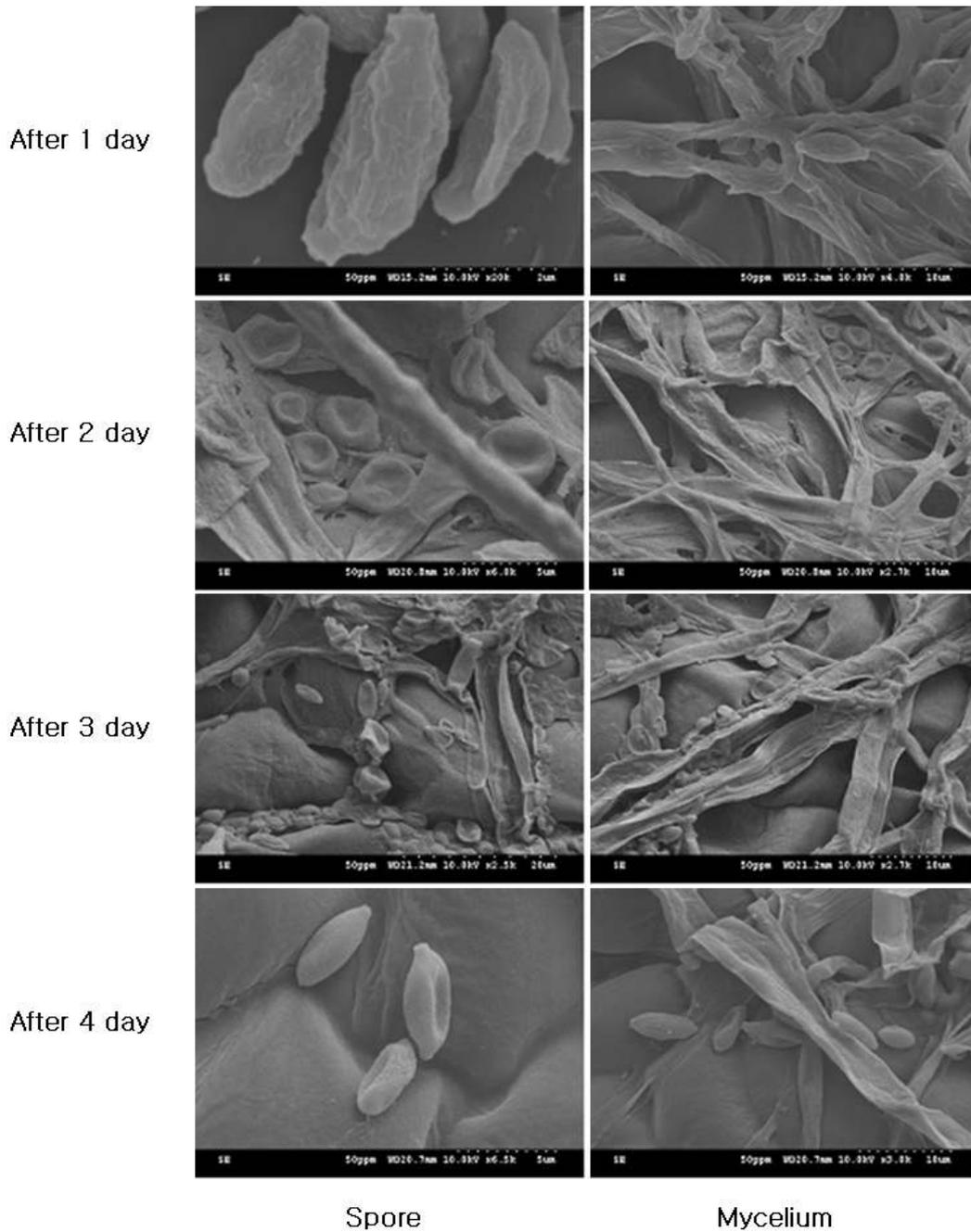


Fig 48. Effect on spores and mycelia of powdery mildews treated with 50ppm Nano-silver liquid WA-CV-WA13B and observed with SEM over four days with one day interval.

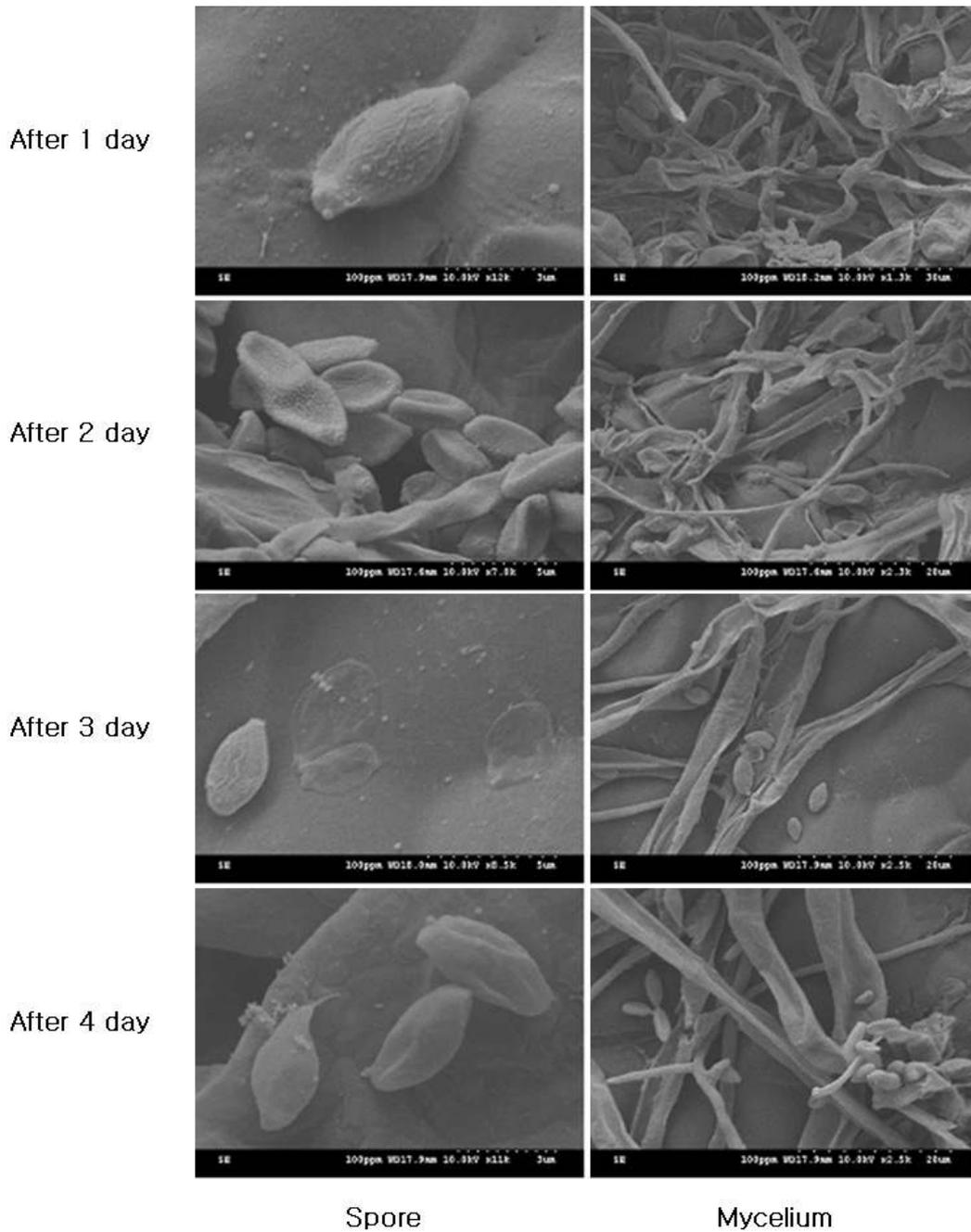


Fig 49. Effect on spores and mycelia of powdery mildews treated with 100ppm Nano-silver liquid WA-CV-WA13B and observed with SEM over four days with one day interval.

4. 적 요

은 나노 용액을 이용한 항균 활성 검정을 하기 위해 *Alternaria alternata*를 포함하여 27종의 곰팡이 균주와, *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*를 포함하여 9가지 세균 균주를 가지고 실험에 사용하였다. 은 나노 용액은 바이오 플러스(주)에서 제공된 WA-CV-WA13B, WA-AT-WB13R과 WA-PR-WB13R용액을 사용하였다.

10ppm, 25ppm, 50ppm, 100ppm 농도로 은 나노 용액을 제조하여 실험한 결과, 1) 곰팡이의 경우 모든 배지에서 균주들이 10ppm부터 억제 효과를 나타냈으며, 대부분의 균주가 100ppm에서는 높은 생장 억제 효과를 보여주고 있다. 또한 6주간 실험한 결과 대부분의 균주는 시간이 지남에 따라 지속적으로 성장을 보였으며, 3가지 배지에서 공통된 양상을 보였다. 경제성을 고려했을 경우 포장에 살포시 10ppm 이하의 농도에서 효과가 있어야 하므로 10ppm 농도에서 효과가 좋은 5균주(*Monosporascus cannonballus*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia minor*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Stemphylium solani*)를 선발하여 1ppm, 3ppm, 5ppm, 7ppm 저농도와 60ppm, 70ppm, 80ppm, 90ppm 고농도 실험을 실시하였다. *Sclerotinia minor*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* 이 생성하는 균핵을 또한 *Sclerotium cepivorum* 이 생성하는 균핵을 대상으로 하여 같은 실험을 하였다. 그리고 은 나노 용액을 혼합하여 4가지 용액 조합을 만들어 *Sclerotinia minor*와 *Sclerotium cepivorum*을 대상으로 같은 실험을 실시하였다. 결과적으로, 곰팡이는 혼합하여 사용한 용액보다는 개별적으로 사용한 용액에서 더 나은 억제효과를 나타냈으며, 7ppm부터 약 80% 이상의 억제 효과를 나타냈다. PDA 배지에서 가장 좋은 억제효과를 나타내었으며, 이는 배지마다 성분이 다르기 때문에 영양적이 차이에서 균사의 생장이 다르게 나타나는 것으로 보인다. 하지만 농도가 높아짐에 따라 높은 억제율이 나타나기도 하지만 오히려 떨어지는 경우도 발생하였는데, 이는 용액의 농도가 높아짐에 따라 나노 은 입자가 용액에 포화상태가 되어 응집함으로써 균사와 닿는 면적이 좁아져 미생물 불활성화 능력이 떨어짐을 나타내는 것으로 보인다. 2) 세균의 경우, WA-PR-WB13R 용액에서 3가지 세균에 대해 10ppm에서 높은 억제효과를 보였고, 3가지 용액 모두 25ppm에서 세균의 성장을 억제하였다.

TEM관찰 결과, 세포막에 은 나노 입자가 밀집하는 것을 볼 수 있었다. 나노 은 입자는 미생물의 세포막을 크게 손상시킨 것으로 관찰되었으며, 나노 은 입자가 세포막을 손상시켜 미생물을 불활성화 시킨다는 주장을 뒷받침하고 있다.

SEM 관찰 결과, 7ppm의 농도로 균사에 처리 하고 1일 경과 후부터 균사의 세포벽이 피해를 입을 것을 확인 하였고, 3일, 5일, 그리고 7일 경과한 경우 모두 그 피해 증상이 은 나노액을 처리 한 후 시간이 지날수록 피해의 정도는 더욱 심화 되었다. 그리고 처리 후 5일과 7일 이 경과한 경우 세포벽이 분해되어 균사가 사멸한 결과를 관찰 하였다.

은 나노 용액의 약해 실험결과, 100ppm까지는 약해가 전혀 일어나지 않았으며, 200ppm이상의 경우는 약간의 잎의 변색이 일어났다. 따라서 100ppm이상의 농도를 사용 시 약해가 일어난다고 생각 된다.

은 나노액에 대하여 내성을 지니는 균주를 선발하는 시험을 수행한 결과, WA-CV-WA13B용액은 각각의 배지에 Nano-silver WA-CV-WA13B용액을 최초 10ppm으로 실험한 결과 *Bacillus* sp.는 20ppm까지 높은 내성을 보였고, *Pseudomonas koreansis*는 실험 시작점인 10ppm에서 자라지 않아 5ppm으로 농도를 낮춰 실험한 결과 30ppm에서 자라는 내성균을 선발 하였으며, WA-AT-WB13R용액은 10ppm으로 시작을 하여 *Pseudomonas koreansis*는

45ppm까지 높은 내성을 보였으며, *Bacillus* sp. 역시 35ppm에서 자라는 내성균을 선발 하였다. WA-PR-WB13R용액 최초 10ppm으로 처리한 *Pseudomonas koreansis*는 50ppm의 내성을 가진 균을 선발 하였으며, *Bacillus* sp.의 경우 12ppm까지 자라는 내성균을 선발 하였다. 100ppm까지 자라는 내성균을 선발하기 위해 실험을 진행하였으나 내성균을 선발하지 못하였다..

과 뿌리 썩음병에 대해 은 나노 용액 실험 결과, 기내 실험에서 7ppm부터 효과가 나타났으며, PDA 배지에서 좋은 억제효과를 보였다. 포장 실험한 결과, 무처리구에 비해 처리구의 생체중과 건물 중 모두 증가하였다. 토양 미생물 개체군 검정에서 세균은 감소하였다. 곰팡이의 경우 조금 증가하는 경향이 나타났으나, 과 뿌리 썩음병균은 관찰되지 않았고, 세균의 감소로 인한 곰팡이의 증가로 보여 졌다. 또한, 토양 미생물의 개체 수에 많은 영향을 끼치지 않음으로 유용미생물 감소에 대해 문제는 없을 것으로 보여 졌다.

토양 분석결과 은 나노 용액의 사용에 따른 시험 포장에서의 화학적 특성의 변화를 판단하기는 어려우며, 다만 은 나노 용액의 사용이 토양의 일반 화학성에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 보인다. 또한 식물의 생육에도 큰 지장을 초래하지 않을 것으로 판단된다. 은 나노 소재에 경우 유해성이 보고된 바가 없으며 인축에게 안전한 것으로 인정되고 있지만 미생물에게는 강한 살균력을 가지는 것으로 알려져 있어 은 나노 소재의 사용에 따른 유용 미생물과 토양의 생물학적 특성 및 토양의 질 평가 항목들에 대한 종합적인 평가가 필요하다.

항균성 물질인 키토산의 과 흑색썩음균핵병에 대한 방제효과와 은 나노 용액의 과 흑색썩음균핵병 방제효과를 비교해 보기 위해 pot 실험을 실시하였다. 키토산 A, B와 은 나노 용액 WA-PR-WB13R 용액을 대상으로 하여 실험을 실시하였다. 실험 결과, 은 나노 용액은 50ppm 부터 억제 효과가 나타나기 시작했으며, 키토산 A는 2,000ppm에서 억제효과를 나타냈고, 키토산 B는 1,000ppm에서 억제효과를 나타냈다(Figure 36). 은 나노 용액이 50ppm 정도의 농도에서 효과를 나타냈으며, 키토산은 1,000ppm이상의 높은 농도에서 효과를 나타냈다. 본 실험결과 키토산의 병해 방제 효과는 기대보다 높지 않았으며, 방제효과를 나타내는 은 나노 용액의 농도도 비교적 높은 편에 속하였다. 항균성 물질인 키토산의 과 흑색썩음균핵병에 대한 방제효과와 은 나노 용액의 과 흑색썩음균핵병 방제효과를 비교해 보기 위해 pot 실험을 실시하였다. 키토산 A, B와 은 나노 용액 WA-PR-WB13R 용액을 대상으로 하여 실험을 실시하였다. 실험 결과, 은 나노 용액은 50ppm 부터 억제 효과가 나타나기 시작했으며, 키토산 A는 2,000ppm에서 억제효과를 나타냈고, 키토산 B는 1,000ppm에서 억제효과를 나타냈다(Figure 36). 은 나노 용액이 50ppm 정도의 농도에서 효과를 나타냈으며, 키토산은 1,000ppm이상의 높은 농도에서 효과를 나타냈다. 본 실험결과 키토산의 병해 방제 효과는 기대보다 높지 않았으며, 방제효과를 나타내는 은 나노 용액의 농도도 비교적 높은 편에 속하였다.

과를 재배한 포장에 은 나노 용액을 시용 후 과에서 검출된 은 농도 분석 결과 (Table 42), 25ppm 처리구에서 재배된 과에서 0.48mg의 가장 많은 은 이 검출 되었으며, 50ppm, 100ppm 그리고 10ppm 처리구의 과에서 각각 0.33mg, 0.23mg, 그리고 0.11mg이 검출 되었다. 과 재배 포장에 시용한 은 나노 용액의 농도가 증가됨에 따라 과에서 검출된 은의 농도가 감소한 점으로 보아 은 나노 용액 시용 농도와 은 의 검출과는 반비례하는 관계에 있는 것으로 추정 되며, 이에 대한 추가 적인 실험이 수행될 필요가 있는 것으로 판단된다.

은 나노 용액이 흰가루병균에 억제효과에 대해 관찰해본 결과, 발병 후 은나노액 처리가 방제효과에 미치는 영향을 조사한 결과, 1차 포장시험의 경우 호박에서 무 처리구에 비해

78%의 억제효과를 100ppm에서 나타냈으며, 오이에서는 농약만큼의 효과는 아니지만 100ppm에서 66.7% 억제효과를 나타냈다. 발병전과 발병후 처리를 한 2차 포장시험의 경우, 호박의 경우 Control 1 (무 처리)은 흰가루병에 대해 75.4%의 발병률을 보였다. 발병전 처리에서 Control 2 (Dongbang Agro Co.의 NSS-F)는 37.4%와 Control 4 (Dongbu High-Teck.의 웨나리)는 8.2%를 보였다. 발병전 Nanover™ 처리에서 10ppm은 57.8%, 30ppm은 45.8%, 50ppm은 40.2%, 100ppm은 30.2%의 발병률을 보였다. 발병 후 Nanover™ 100ppm처리는 44%의 발병률을 보였다. 발병 전 Nanover™ 처리 100ppm처리가 Control 2 (Dongbang Agro Co.의 NSS-F)보다 효과적이었다. 발병 전 Nanover™ 처리 10ppm과 30ppm은 효과적이지 못했고, 모든 처리에서 Control 4 (Dongbu High-Teck.의 웨나리)가 가장 좋은 효과를 보였다. 오이의 경우는, Control 1 (무처리)은 흰가루병에 대해 50.4%의 발병률을 보였다. 발병전 처리에서 Control 2 (Dongbang Agro Co.의 NSS-F)는 25.4%와 Control 4 (Dongbu High-Teck.의 웨나리)는 5%를 보였다. 발병 전 Nanover™ 처리에서 10ppm은 53.4%, 30ppm은 34.4%, 50ppm은 25%, 100ppm은 20%의 발병률을 보였다. 발병 후 Nanover™ 100ppm 처리는 28.4%의 발병률을 보였다. 발병 전 Nanover™ 처리 10ppm과 30ppm은 효과적이지 못했고, 모든 처리에서 Control 4 (Dongbu High-Teck.의 웨나리)가 가장 좋은 효과를 보였다. 발병 전 Nanover™ 처리 50ppm과 100ppm은 Control 2 (Dongbang Agro Co.의 NSS-F)보다 좋은 효과를 보였다. Nanover™ 100ppm처리에서는 발병 전 처리한 것이 발병 후 처리한 것 보다 효과가 좋았다.

호박 흰가루병(powdery mildew)에 대한 Nano-silver 용액의 균사 및 포자 생장억제 기작에 대하여 확인하기 위하여 은나노액을 농도별로 흰가루병 병원균의 포자와 균사에 처리한 후 SEM으로 관찰한 결과물을 처리한 대조구에 비하여 은 나노액의 처리 농도가 10ppm에서 30, 50, 그리고 100ppm으로 높아질수록 흰가루병 병원균의 포자와 균사의 생장을 억제하는 것을 확인 하였고, 30ppm부터 50ppm, 그리고 100ppm의 경우 그 피해 정도가 더욱 심하여 균사와 포자의 세포막이 손상된 것을 관찰 하였다.

본 연구를 통해, 인체에 무해하고 안정성이 뛰어난 은 나노 용액을 이용하여, 농산물의 생산을 늘리고, 환경오염의 피해를 줄일 수 있으며, 나노 입자를 사용함으로써 농약의 남용을 줄이고, 환경도 개선할 수 있을 것으로 기대된다. 저농도로 효과를 증대하여 농가에 농업경영에 비용을 줄임으로써, 경제적이고, 친환경 농업에 사용됨에 따라 농산물 경쟁력 강화될 것으로 기대된다.

제 2 절 <제 2 세부과제>

은 나노소재 및 유용 미생물의 시용에 따른 토양 환경영향평가

1. 서언

최근 작물의 시설재배 면적이 급증하고 있으며, 시설재배 작물도 다양화 되고 있는 상황에서 병해에 의한 피해 수준도 급증하고 있어 효과적으로 병해를 방제 할 수 있는 대책이 요구되고 있다. 또한 인구증가 및 생활수준의 향상으로 인한 농산물 수요 증가로 인해 각종 화학비료 및 농약의 사용량이 급증함에 따라 지력 저하, 농약 오염, 환경오염 등 많은 문제점이 발생하고 있다. 따라서 일반 소비자들도 점차 환경 친화적인 농법에 대한 관심이 높아지고 있으며 실제 농가에서도 천연농법이나 유기농법을 적용하여 고소득을 추구하고, 환경보호에도 일조하는 농가들이 증가하는 추세이다.

은(Ag)은 주기율표 11족의 구리족 원소에 속하는 금속으로 회백색의 광택을 가진 귀금속이다. 은은 오래전부터 보편적인 항균성 물질로 일상생활에 이용되어 왔다. 이런 은의 항균 효과는 1940년대 전후로 개발되기 시작한 페니실린이나 설폰아미드 같은 값싸고 효과적이면서 대량생산이 가능한 항균물질에 밀려 항균물질보다는 귀금속 용도로 사용되어 오고 있다. 하지만 오늘날 약물의 오남용에 따른 약제 내성균의 출현은 인류에 심각한 위협이 되고 있으며, 내성균의 출현은 새로운 약제 개발을 앞서 가고 있을 정도로 빠르게 진행되고 있다. 따라서 기존의 약물과는 다른 기전으로 작용하여 약제 내성을 유발하지 않는 항균물질의 개발이 시급하며, 그 후보물질중 하나가 은 나노이다.

은 나노 입자의 살균 효과는 은 나노 입자가 만들어낸 은이온(Ag⁺)과 활성 산소의 일종인 초과산화물에 의하여 항균 특성을 나타내는 것으로 보고되었다. 초과산화물과 은 이온, 은 나노 입자 자체가 박테리아의 세포벽과 세포막에 손상을 일으킨 후, 은 이온과 은 입자가 세포내로 침투해 박테리아를 파괴한다(Sang et al., 2008). 은 나노 입자와 은 이온을 처리한 세균의 형태학적 특징을 주사 전자현미경과 투과 전자현미경으로 관찰한 결과 은 나노 입자와 은 이온의 항균 특성 및 메커니즘이 상이한 것으로 보고되었다(조 등, 2004; 윤 등, 2005; 송 등, 2006). 은 나노 입자는 미생물의 세포막을 크게 손상시킴으로써 항균 효과를 나타내며, 은 이온의 경우 세포막을 손상시키지 않고 미생물 내부로 확산(diffusion)되어 세포막(cytoplasmic membrane)을 손상시키는 것으로 보고되었다. 또한 그람음성균보다 그람양성균에서 더 우수한 항균력을 나타내며, 은 나노 입자의 항균 성능은 은 이온 용액의 항균 성능과 비교하여 보았을 때 동일한 은 농도를 기준으로 약 20배가량 적은 것으로 연구되었다(윤 등, 2005).

이 등(2005)은 식물에게 병해를 일으키는 *Pseudomonas fluorescenc*, *Bacillus sp*, *Bacillus subtilis*, *Ralstonia solanacearum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Botrytis cinerea* 등과 같은 식물 병원성 미생물에 대한 은 나노 용액의 항균 효과를 확인한 바 있다. 식물 병원성 미생물에 대한 항균 효과를 갖는 은 나노 소재는 식물 병해 방제와 친환경 농산물 생산을 위한 농자재로 활용될 수 있을 것으로 기대된다. 현재 농가에서도 은 나노 소재를 첨가한 농자재가 일부 사용되고 있으나 각종 환경 및 유용 미생물에 미치는 영향은 체계적으로 연구된바 없으며, 특정 식물 병원균에 대한 항균 효과만을 확인하는 수준에 그치고 있다. 또한 은 나노가 토양에 사용될 경우 토양의 특성 및 종합적인 질(quality) 변화에 미치는 영향에 관한 연구도 미

비한 실정이다.

따라서, 본 연구의 목적은 은 나노가 토양에 미치는 영향을 평가하기 위해 은 나노 소재의 특성을 파악하고 토양의 물리·화학적 특성 변화 및 토양 질(Soil quality) 지표 변화 등을 모니터링하여 생물소재의 안전한 사용을 위한 지침을 제시하는 것이다. 또한 은 나노의 토양에 대한 흡착 Kinetics Model과 Sorption Isotherm Model을 적용하여 은 나노소재의 흡착 특성을 규명한 후 토양의 화학적·생물학적 특성에 미치는 영향을 평가하는 것이다.

2. 은 농도 분석법 개발

은 나노소재의 사용에 따른 토양 중 은 농도 분석을 위해 적절한 추출제의 개발과 더불어 은 농도의 분석법을 위한 protocol이 필수적으로 요구되므로, 본 연구에서는 몇 가지 추출제를 선정하여, 토양에 처리된 은의 추출 및 회수율을 분석하였으며, 토양 환경에서의 은 분석에 관한 적절한 protocol을 개발하고자 한다.

가. 은 나노용액의 이화학적 특성 분석

포항공대에서 생산한 은 나노용액 Nanover™를 TEM(Transmission Electron Microscope)을 이용하여 관찰한 결과 <Fig 1.> 과 같이 은 나노 입자가 10~30 nm 정도의 크기로 분포되어 있음을 확인하였다.

Nanover™ 1,000 ppm 용액의 화학적 특성은 <Table 1.>과 같이 pH는 4.26, EC는 11.02 dS m⁻¹로 측정되었다. AAS (Atomic Absorption Spectrometer)를 이용하여 양이온을 측정한 결과 K과 Na는 각각 0.10, 0.90 mg L⁻¹로 측정되었으며, Ca과 Mg는 검출되지 않았다. ICP-AES (Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrophotometer; Perkin elmer optima 3100XL, USA)를 이용하여 Ag 농도를 측정한 결과 998 mg L⁻¹ 로 측정되었다.

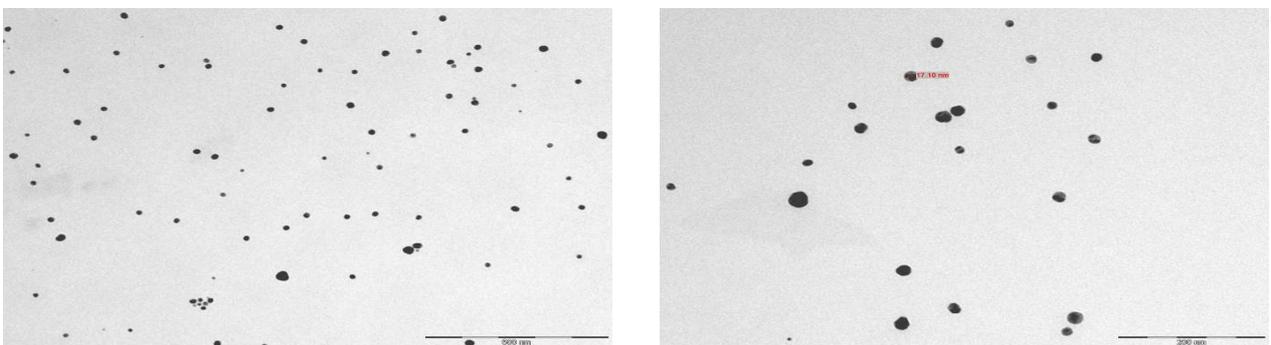


Fig 1. Nanover™의 TEM분석 결과(상:50,000배율, 하:100,000배율)

Table 1. Nanover™의 화학적 특성

pH _(1:5)	EC	Ca	Mg	K	Na	Ag
	dS m ⁻¹	----- mg L ⁻¹ -----				
4.26	11.02	N.D ¹⁾	N.D.	0.10	0.90	998

1) N.D.: Not detected.

나. 은 농도 분석을 위한 최적 추출제 선발

본 연구에서는 몇 가지 추출제를 선정하여 토양에 처리된 은의 추출 및 회수율을 분석하였다. 포항공대에서 생산한 1000 ppm Nano-silver 용액(Nanover™)을 희석하여 공시 토양에 은 나노 용액을 인위적으로 처리하였다. 공시 토양 1 kg과 은 나노 용액 0, 5, 20, 100, 200 ppm 100 ml 를 토양과 잘 섞일 수 있도록 충분히 반죽하여 dry oven에서 하루정도 방치 후 건조된 토양을 실험에 사용하였으며, 토양 중 최종농도를 0.5, 2, 10, 20 mg kg⁻¹ 되도록 하였다. 실험한 공시 토양의 일반적인 화학적 특성은 다음과 같다(Table 2)

현재 토양 중 미량원소 분석을 위한 추출제로 사용되어지고 있는 추출제 중에서 총 11 가지 추출제(Distilled Water, 0.1M-HCl, 1M-HCl, 2M-HCl, 1M-NH₄Cl, 2M-HNO₃, 0.5M-MgCl₂, 0.25-CaCl₂, EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid), DTPA (Diethylene Triamine Pentaacetic Acid), Citric acid)를 선택하여 사용하였으며, 이들에 의한 회수율은 총 분해법(Aqua regia digestion)에 의한 회수율과 비교하였다.

Table 2. 공시토양의 화학적 특성

pH _(1:5)	EC _(1:5)	O.M.	P ₂ O ₅	NH ₄ -N	NO ₃ -N	K	Ca	Mg	Na	CEC
	μS cm ⁻¹	g kg ⁻¹	----- mg kg ⁻¹ -----			----- cmol _c kg ⁻¹ -----				
6.43	107.3	4.01	1592.64	29.12	113.68	1.69	6.54	2.28	0.57	13.28

Table 3. 추출제별 회수율

추출제	비율	처리농도 (2mg kg ⁻¹)	처리농도 (20mg kg ⁻¹)
		회수율(%)	
distilled water	(1:5)	0.25	0.50
0.1M-HCl		8.75	3.23
1M-HCl		60.50	50.46
2M-HCl		86.25	88.00
2M-HNO ₃		8.00	1.50
1M-NH ₄ Cl		4.75	74.15
0.5M-MgCl ₂		N.D. ¹⁾	37.50
0.25M-CaCl ₂		0.25	45.70
0.05M-Citric acid	(1:10)	N.D.	1.30
EDTA		N.D.	0.85
DTPA		1.00	4.00
Aqua regia digestion		82.50	84.81

¹⁾ ND : Not Detected

추출제별 회수율을 비교하기 위하여 은 나노용액을 인위적으로 처리한 토양과 추출제 별로 1:5, 1:10의 비율로 하여 1시간 진탕 후 Whatman No 42. 여지로 여과하여 그 여액의 은 농도를 ICP-AES로 분석하였다. 11가지 추출제 간의 회수율을 비교한 결과는 <Table 3>과 같다. Aqua regia digestion 방법에 의한 실험결과 2 mg kg⁻¹ 처리구에서는 82.50%, 20 mg kg⁻¹ 처리구에서는 84.81%의 회수율이 분석되었으며, Citric acid와 같은 유기산이나 EDTA, DTPA 와 같은 킬레이트 추출제의 경우 낮은 회수율을 보였다. HCl의 경우 추출용액의 농도가 증가할수록 회수율이 증가하여 2M-HCl에서는 2 mg kg⁻¹ 처리구에서 86.25%, 20 mg kg⁻¹ 처리구에서 88.00%의 회수율을 나타내었다. HNO₃의 경우 각각의 처리구에서 8.00%, 1.50%로 회수율이 분석되었다.

실험한 추출제 중 2 mg kg⁻¹와 20 mg kg⁻¹ 처리구에서 85%이상의 가장 높은 회수율을 나타낸 2M-HCl과 20 mg kg⁻¹ 처리구에서 74.15%의 회수율을 보인 NH₄Cl 용액을 선택하여 추출 시간에 따른 농도 변화를 측정하였다.

선택한 HCl과 NH₄Cl의 농도를 2M로 조제하여 추출 시간대별(5분, 30분, 1시간, 2시간, 5시간, 12시간)로 추출된 은의 농도를 분석하였다. 은 나노용액을 인위적으로 처리한 토양과 추출 용액을 1:5 비율로 추출 시간을 다르게 하여 혼합 진탕 후 Whatman No 42. 여지로 여과하여 그 여액의 은 농도를 ICP-AES (Perkinelmer 3100XL, USA)로 은 농도 측정 하였다. 측정 값과 회수율은 <Table 4, 5> 에서 보여주고 있다.

Table 4. 2M-HCl의 추출 시간대별 측정값 및 회수율

처리농도 mg kg ⁻¹		5분	30분	1시간	2시간	6시간	12시간
0.5	측정값	0.45 ± 0.088	0.50 ± 0.039	0.42 ± 0.006	0.42 ± 0.030	0.45 ± 0.005	0.32 ± 0.021
	회수율 (%)	90	100.0	84.0	84.0	90.0	64.0
2	측정값	1.79 ± 0.028	1.78 ± 0.008	1.74 ± 0.028	1.71 ± 0.055	1.66 ± 0.090	1.59 ± 0.015
	회수율 (%)	89.5	89.0	87.0	85.5	83.0	79.5
10	측정값	8.42 ± 0.208	9.03 ± 0.679	9.15 ± 0.180	8.70 ± 0.409	8.75 ± 0.477	8.32 ± 0.076
	회수율 (%)	84.2	90.3	91.5	87.0	87.5	83.2
20	측정값	18.83 ± 0.725	18.55 ± 0.750	18.55 ± 0.218	18.17 ± 0.601	18.63 ± 0.340	18.00 ± 0.522
	회수율 (%)	94.2	92.75	92.75	90.8	93.2	90.0

Table 5. 2M-NH₄Cl의 추출 시간대별 측정값 및 회수율

처리농도 mg kg ⁻¹		5분	30분	1시간	2시간	6시간	12시간
0.5	측정값	N,D. ¹⁾	N,D.	N,D.	N,D.	N,D.	N,D.
	회수율 (%)	0	0	0	0	0	0
2	측정값	0.63 ± 0.026	0.64 ± 0.003	0.59 ± 0.025	0.56 ± 0.010	0.70 ± 0.038	1.02 ± 0.073
	회수율 (%)	31.5	32.0	29.5	28.0	35	51.0
10	측정값	7.00 ± 0.050	7.38 ± 0.058	7.73 ± 0.950	7.53 ± 0.202	8.93 ± 1.350	10.50 ± 1.27
	회수율 (%)	70.00	73.8	77.3	75.3	89.3	105.0
20	측정값	16.45 ± 0.132	15.60 ± 0.050	15.72 ± 0.407	16.15 ± 0.507	15.60 ± 0.492	15.78 ± 0.293
	회수율 (%)	82.25	78	78.6	80.75	78.0	78.90

¹⁾ N.D. : Not Detected

추출 시간에 따른 추출 농도 및 회수율을 분석한 결과 2M-HCl이 평균 80% 이상의 회수율을 나타냈으며, 2M-NH₄Cl의 경우에는 0.5 mg kg⁻¹에서는 검출되지 않았으며, 토양 중 은의 함량이 높을수록 그 회수율이 높아지는 특징을 나타냈다. 2M-NH₄Cl는 2 M-HCl 보다는 토양 중 은을 추출하는 능력이 낮은 것으로 보인다.

<Fig 2>은 2M-HCl의 시간별 추출농도를 나타낸 것이다. 2M-HCl은 5분 이상의 모든 처리구에서 비슷한 농도를 나타내어 5분 이내에 토양 중 은이온이 추출되어 지는 것으로 보인다. <Fig 3>는 2M-NH₄Cl를 추출제로 하여 시간에 따른 추출 농도를 나타낸 것이다. 2M-NH₄Cl의 경우 2M-HCl와는 다르게 추출 시간이 길어짐에 따라 측정값의 변동이 커졌다.

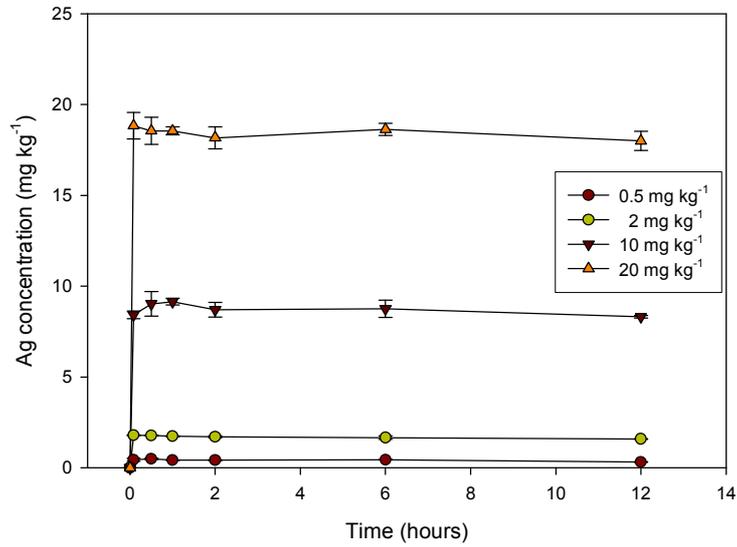


Fig 2. 2M-HCl의 시간대별 추출농도

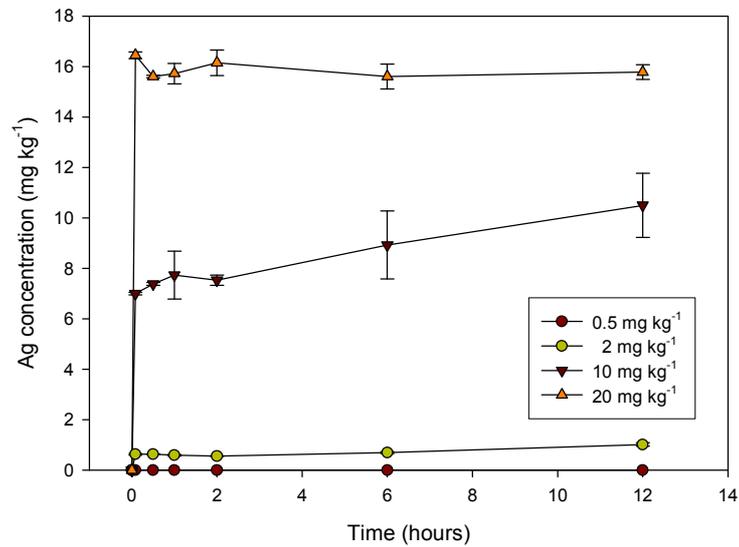


Fig 3. 2M-NH₄Cl의 시간별 추출 농도

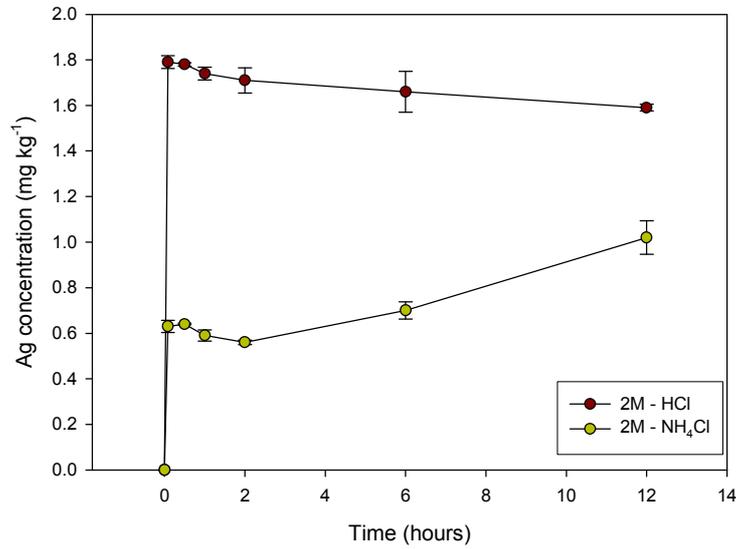


Fig 4. 두 추출제의 시간별 추출농도 비교 (2 mg kg^{-1})

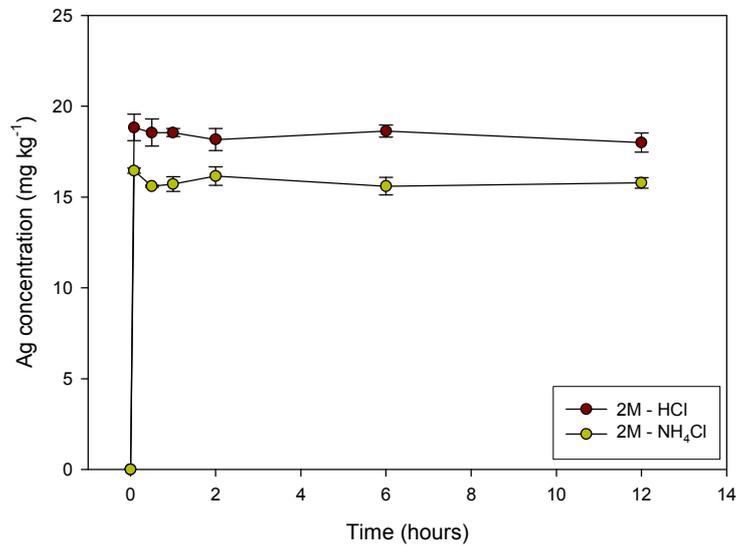


Fig 5. 두 추출제의 시간별 추출농도 비교 (20 mg kg^{-1})

<Fig 4, 5> 는 2 mg kg^{-1} 과 20 mg kg^{-1} 처리구에서 시간별 추출농도를 추출제 별로 비교한 것으로 2M-HCl이 2M-NH₄Cl보다 높은 추출력을 나타냄을 알수있다. 실험 결과 2M-HCl이 실험한 추출제 중에서 토양 중 은 추출 시 그 추출력이 가장 높았으며, 토양과의 반응시간은 5분~30분정도가 적절할 것으로 판단된다.

3. 은 나노소재의 시설재배 토양 시용에 따른 토양화학성 평가

은 나노소재의 사용에 따른 토양 환경 및 유용 미생물에게 미치는 영향에 대한 연구는 미비한 실정이다. 따라서, 은 나노소재를 활용하여 식물 병해방제 및 친환경 농산물 생산을 위한 농자재로 활용하기 위해서는 우선 은 나노소재가 토양 및 주변 환경에 미치는 영향에 대한 평가가 먼저 이루어져야 한다.

가. 재료 및 방법

(1) 공시시험액

실험에 사용한 은 나노용액은 포항공대에서 생산한 Nano-silver 용액 Nanover™를 사용하였으며, 제공받은 상태는 1,000 ppm으로 냉장고에 보관하여 필요에 따라 희석하여 사용하였다.

(2) 토양시료 채취 및 분석

(가) 시료채취

은 나노소재 및 미생물의 토양 투여 전·후 4주 간격으로 토마토 및 오이재배 시설하우스에서 시료를 채취하고 채취한 토양은 풍건 후 2 mm 체를 통과시켜 실험에 사용하였다. 토양은 1세 부과제에서 처리한 시료를 대상으로 분석을 수행하였다.

(나) 토양분석

토양분석은 농촌진흥청 농업과학기술원의 토양 및 식물체 분석법에 의거하여 실험하였다. pH와 EC는 풍건토양 10g에 증류수 50 ml을 가하여 30분간 진탕하고 Whatman No. 2로 여과시킨 후 pH meter (Orion model 921A)와 EC meter (Orion model 50 conductivity meter)를 이용하여 각각 측정하였다. 유기물 함량은 Walkely-Black 방법에 따라 1N $K_2Cr_2O_7$ 을 가하여 반응시킨 후 UV/Vis Spectrophotometer (UV 240 Shimadzu, Japan)로 파장 610 nm에서 비색 정량하였다. 유효인산 함량은 Bray No.1 방법으로 추출하여 ammonium paramolybdate로 발색시킨 후 파장 660 nm에서 UV/Visible Spectrophotometer를 이용하여 비색 정량하였다. 암모니아성 및 질산성 질소는 2M KCl 용액으로 추출한 후 MgO로 알칼리화 후 증류·적정하였다. 치환성 양이온은 1M NH_4OAc (pH 7.0) 용액으로 침출 후 AAS (Atomic Absorption Spectrometer, Shimadzu, Japan)를 이용하여 Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+ 의 함량을 측정하였으며, pH와 양이온함량을 근거로 양이온 치환용량을 산출하였다. 은 농도 분석은 토양과 2M-HCl을 1:5 비율하여 30분간 혼합 진탕 후 Whatman No. 42로 여과하여 그 여액의 은 농도를 ICP-AES (Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrophotometer; Perkin elmer optima 3100XL, USA)로 은 농도 측정 하였다.

나. 시설재배지 토양의 처리 후 시기별 토양분석 결과

철원군 김화읍 청양 6리 북부시험장 시설재배지에 <Table 6>과 같이 처리구를 설치하여 실험을 수행하였다. 2006년 6월부터 8월까지 수행하였으며 처리구별 처리방법에 따라 7월 21일부터는 나노용액을 7일 간격으로 처리하였다. 총 7회에 걸쳐 토양을 채취하여 농촌진흥청 농업과학기술원의 토양 및 식물체 분석법(2000)에 의거하여 토양의 화학성(pH, EC, 유기물, 유효인산, NH₄-N, NO₃-N, 치환성 양이온, 양이온치환능력) 및 은 농도 분석을 수행하였다.

Table 6. 처리구별 처리방법

처리구	처리 방법
CTR 1, 3	무 처리
CTR 2	은 나노용액 100 ppm, 100 ml 관주처리 + 은 나노용액 100 ppm, 100 ml 경엽처리
CTR 4	은 나노용액 100 ppm, 100 ml 관주처리
NV-A 1~4	은 나노용액 25 ppm, 100 ml 관주처리
NV-B 1~4	은 나노용액 50 ppm, 100 ml 관주처리

(1) 시설재배지 토양의 시기별 토양분석 결과

시설 재배지 토양의 시기별 토양 분석 결과, pH는 6.6~6.9 수준으로 작물생육에 알맞은 적정 pH 범위인 6.0~6.5 보다 높게 분석되었다. 이는 다수확을 위하여 농가가 많은 양의 비료를 투입하여 토양의 염기포화율이 높아졌기 때문으로 판단된다. pH는 측정시기별로 비슷한 수준을 유지 하였다 <Fig 6>. 은 나노 용액 처리전과 처리후를 비교하였을 때 pH에 미치는 영향은 미미한 것으로 보인다. EC (1:5)의 경우 전체적으로 감소하는 경향을 보인다<Fig 7>. 이는 작물이 성장함에 따라 토양 내 영양 염류의 양이 감소되면서 EC값이 감소하는 것으로 판단된다.

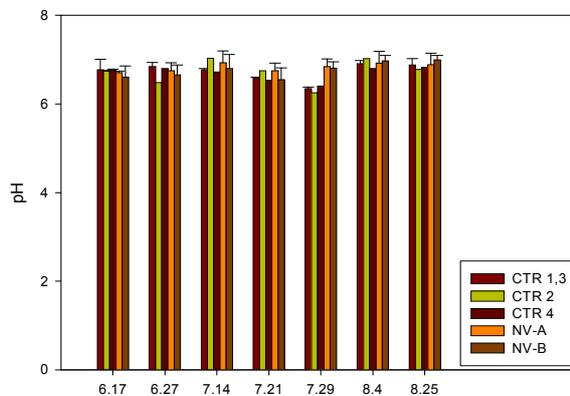


Fig 6. 처리구에 따른 토양의 pH 변화

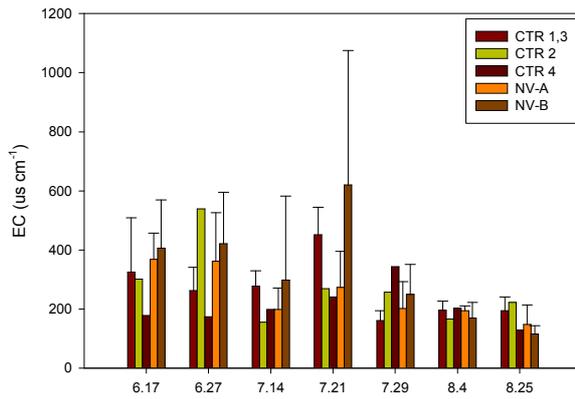


Fig 7. 처리구에 따른 토양의 EC 변화

유기물과 유효 인산의 함량은 우리나라 유기물과 유효인산의 적정 범위인 $20\sim30\text{ g kg}^{-1}$, $350\sim500\text{ mg kg}^{-1}$ 보다 높은 유기물 및 유효 인산이 분석되었으며, 시간이 지남에 따라 모든 처리구에서 유기물 함량, 유효 인산의 함량이 다소 감소하는 경향을 나타내었다<Fig 8, 9>.

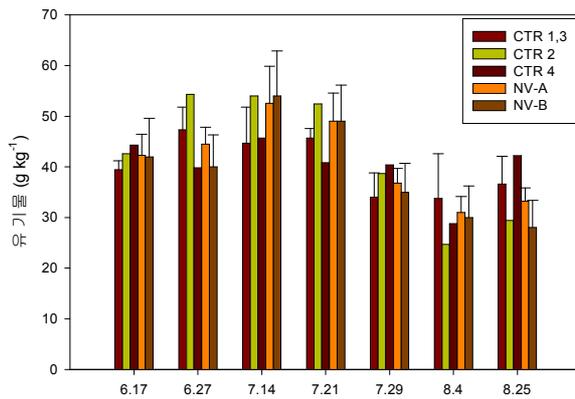


Fig 8. 처리구에 따른 토양의 유기물 함량 변화

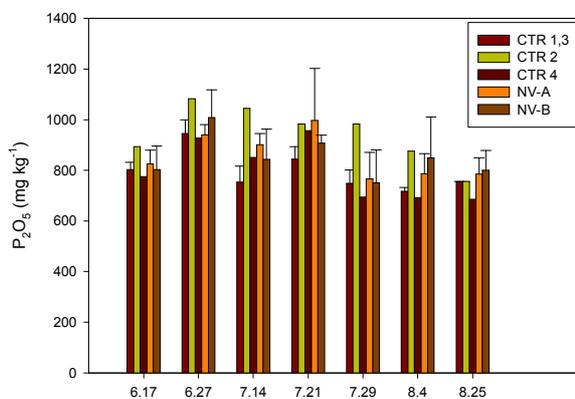


Fig 9. 처리구에 따른 토양의 유효 인산 함량 변화

질소 분석 결과 포장에서는 $\text{NH}_4\text{-N}$ 보다 $\text{NO}_3\text{-N}$ 가 더 높은 경향을 나타내었다. $\text{NH}_4\text{-N}$ 의 경우 시간이 지남에 따라 다소 감소하고 있으며, $\text{NO}_3\text{-N}$ 의 경우 비슷한 수준을 유지하였다<Fig 10, 11>. Ca과 K의 경우의 경우 7월 21일까지는 감소하다 다시 증가하였으며<Fig 12, 13> Mg의 함량은 6월 27일에 모든 처리구에서 증가하여 그 이후에는 차츰 감소하는 경향을 나타내었다 <Fig 14>. Na의 함량 변화는 <Fig 15>에 나타내었다. 양이온 치환 용량은 모든 처리구에서 $11 \text{ cmol}_c \text{ kg}^{-1}$ 이상으로 분석되었다<Fig 16>.

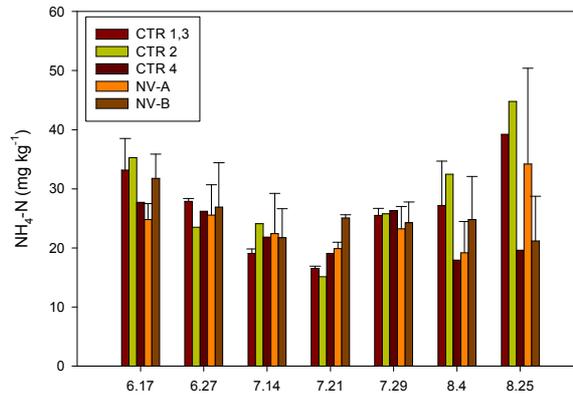


Fig 10. 처리구에 따른 토양의 $\text{NH}_4\text{-N}$ 함량 변화

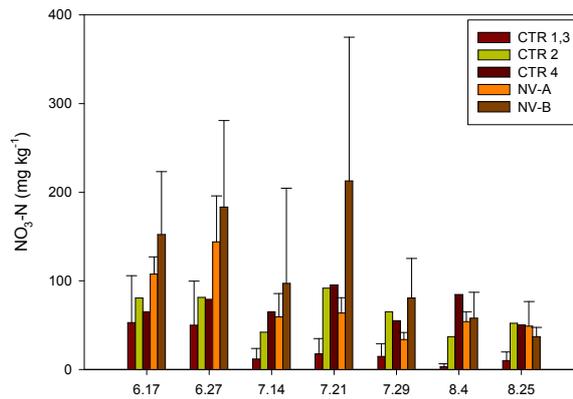


Fig 11. 처리구에 따른 토양의 $\text{NO}_3\text{-N}$ 함량 변화

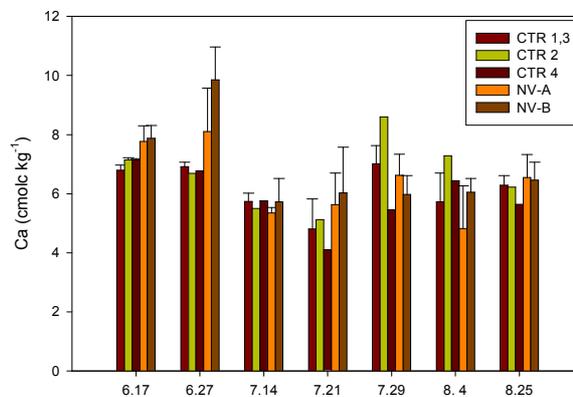


Fig 12. 처리구에 따른 토양의 Ca 함량 변화

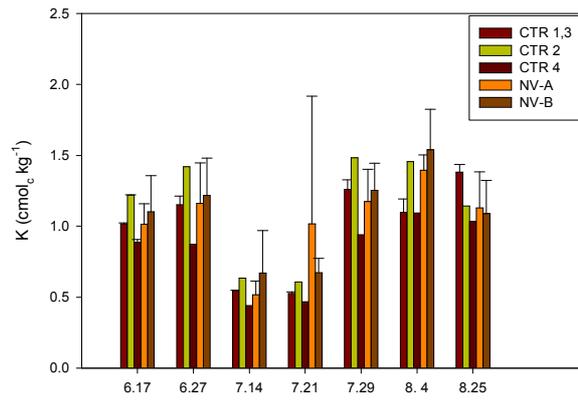


Fig 13. 처리구에 따른 토양의 K 함량 변화

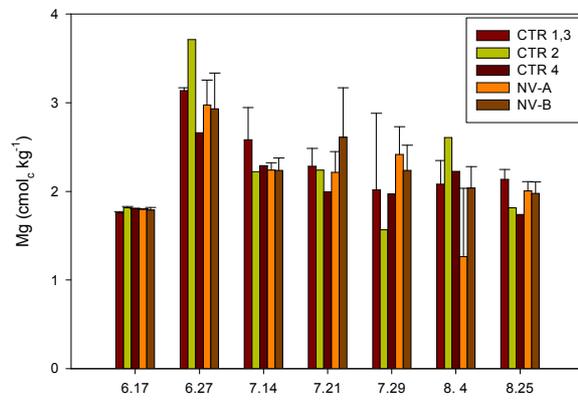


Fig 14. 처리구에 따른 토양의 Mg 함량 변화

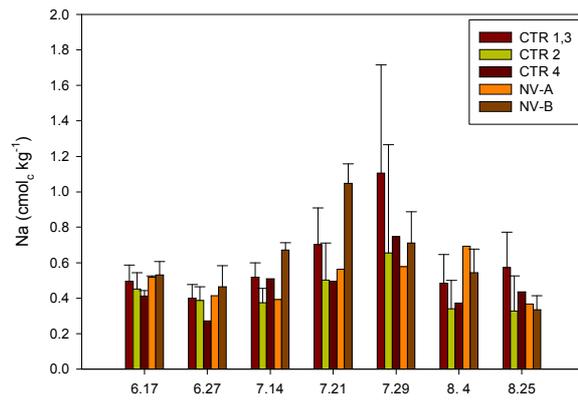


Fig 15. 처리구에 따른 토양의 Na 함량 변화

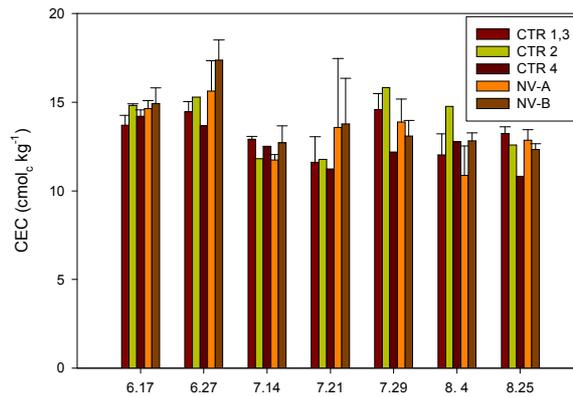


Fig 16. 처리구에 따른 토양의 양이온 치환용량 변화

토양 분석결과 은 나노 용액의 사용에 따른 시험 포장에서의 화학적 특성에 대한 변화는 미비한 것으로 판단된다. 또한 식물의 생육에도 큰 지장을 초래하지 않을 것으로 판단된다. 은 나노 소재의 경우 유해성이 보고된 바가 없으며 인축에게 안전한 것으로 인정되고 있지만 미생물에게는 강한 살균력을 가지는 것으로 알려져 있어 은 나노소재의 사용에 따른 유용 미생물과 토양의 생물학적 특성 및 토양의 질 평가 항목들에 대한 종합적인 평가가 필요하다.

(2) 시설재배지 토양의 은 농도 분석 결과

은 추출 실험 결과 가장 효율이 좋았던 2M-HCl를 이용하여 포장에서 채취한 토양시료와 1:5 비율로 혼합한 후 30분간 진탕하여 Whatman No. 42 여지로 여과하였다. 그 여액을 ICP-AES (Perkinelmer 3100XL, USA)를 이용하여 은의 농도를 분석하였다(Table 7).

은 나노 용액을 처리 후 7월 29일 ~ 8월 25일의 은 농도분석 결과 무처리구인 CTR 1, 3 에서는 은이 검출 되지 않으며, 은 나노용액 100 ppm 100 ml를 관주 및 경엽 처리한 CTR 2 는 7월 29일에 23.30 mg kg⁻¹, 8월 4일에 4.49 mg kg⁻¹, 8월 25일에 14.15 mg kg⁻¹이었으며 다른 처리구와 비교하여 높은 은 농도가 측정된 것은 경엽처리시 토양으로 유입으로 인한 것으로 판단된다. 분석 값이 일정하지 못한 것은 시험포장에서 시기별 토양 시료 채취 시 균일한 시료 채취가 어렵기 때문으로 사료된다.

Table 7. 처리구에 따른 토양의 은 농도

처리구	7월 29일	8월 4일	8월 25일
	----- mg kg ⁻¹ -----		
CTR 1	N.D. ¹⁾	N.D.	-
CTR 3	N.D.	N.D.	ND
CTR 2	23.30	4.49	14.15
CTR 4	0.16	0.19	0.15
NV-A 1	0.35	1.31	1.08
NV-A 2	0.06	0.80	1.14
NV-A 3	1.42	1.64	0.05
NV-A 4	1.63	2.79	TR ²⁾
NV-A Average	0.86 ± 0.78	1.64 ± 0.84	1.07 ± 0.61
NV-B 1	1.56	4.42	0.23
NV-B 2	2.56	1.56	1.44
NV-B 3	2.09	6.75	0.14
NV-B 4	1.29	4.17	0.14
NV-B Average	1.88 ± 0.56	4.22 ± 2.12	0.49 ± 0.64

¹⁾ N.D. = Not Detected

²⁾ TR= Trace

4. 은 나노소재의 토양 시용에 따른 시설재배지의 토양 질 (Soil Quality) 평가 체계 및 최소단위군(Minimum Data Set) 구축

가. 실험 재료 및 방법

(1) 공시 토양

실험에 사용된 공시 토양은 토성이 서로 상이한 3종류를 선택하여 실험하였다. 토양 A는 시설재배지 인근 토양이며 토양 B는 산림토양으로써 강원대학교 인근 산림에서 채취하였다. 토양 C의 경우 점토의 함량을 높이기 위해 고령토를 이용하여 인위적으로 토양의 점토 함량을 조절하였다. 각 토양에 대한 토성은 <Table 8>와 같다.

Table 8. 공시 토양의 토성

	Sand	Silt	Clay	soil texture
	----- % -----			
A	46.3	29.7	24.0	L
B	85.5	0.5	14.0	LS
C	34.7	29.3	36.0	CL

(2) 실험 방법

토성이 상이한 3종류의 토양 4kg을 각각 pot에 담고 은 나노 용액을 무처리, 80 mg kg⁻¹, 500 mg kg⁻¹ 수준으로 3주 동안 매 주마다 처리하여 총 3회 처리하였다. 처리량은 시설하우스 포장시험에서 처리하는 양을 고려하여 설정하였으며, 은 나노 소재가 토양 환경에 미치는 영향을 평가하기 위하여 실제 시용양보다 높은 수준으로 은 나노 용액을 처리하였다<Fig 17>. 분석에 사용된 토양은 은 나노 용액 처리 7일 후 토양 1kg 채취(총4회) 하여 실험에 사용하였다.



Fig 17. 실험 배치도

(3) 토양시료 채취 및 분석

(가) 시료채취

은 나노소재를 토양에 투여한 후 7일 간격으로 토양을 채취하였다. 공시토양을 풍건 후 2 mm 이하의 토양을 화학적 질 평가 항목 분석을 위한 공시재료로 사용하였으며, 현장에서 6 mm이하의 습윤 토양을 선별하여 생물학적 질 평가 항목 분석을 위한 공시토양으로 사용하였다. 화학적, 생물학적 질 평가 항목 분석을 위한 모든 토양은 실험실로 운반하여 4°C이하 냉장 보관을 하였다.

(나) 토양분석

분석항목은 다음의 <Table 9>과 같다.

Table 9. 토양 분석 항목

분석 항목	분석 방법
물리적	
토성	비중계법
화학적	
pH, EC	1:1 Method
토양 유기물	Walkley Black Method
총 질소	Kjeldahl Method
유효 인산	염화제일주석 환원법
치환성 양이온	1N 초산 Ammonium Method
중금속	0.1N-HCl Extraction Method
생물학적	
Soil Respiration	2002. 日本土壤微生物研究會 : 알칼리 흡수법
Microbial Biomass C and N	2002. 日本土壤微生物研究會 : Chloroform 혼증법
Potentially Mineralizable N	1982, Keeney ; 혐기적 배양법

토성은 비중계법을 이용하여 분석하였으며 처리전과 마지막 주차의 토양을 대상으로 분석하였다. 화학적 질 평가 항목 분석은 농촌진흥청 농업과학기술원의 토양 및 식물체 분석법에 의거하여 실험하였다. pH_(1:1)와 EC_(1:1)는 풍건토양 50g에 증류수 50 ml을 가하여 30분간 진탕하고 Whatman No. 2로 여과시킨 후 pH meter (Orion mode 921A)와 EC meter (Orion model 50 conductivity meter)를 이용하여 각각 측정하였다. 유기물 함량은 Walkley-Black 방법에 따라 1N K₂Cr₂O₇을 가하여 반응시킨 후 UV/Vis Spectrophotometer (UV 240 Shimadzu, Japan)로 파장 610 nm에서 비색 정량하였다. 유효인산 함량은 Bray No.1 방법으로 추출하여 ammonium paramolybdate로 발색시킨 후 파장 660 nm에서 UV/Visible Spectrophotometer를 이용하여 비색 정량하였다. 총질소는 토양 1g을 H₂SO₄-H₂O₂ 습식 분해후 분해액을 kjeltec system (2300 kjeltec analyzer, FOSS)을 이용하여 측정하였다. 치환성 양이온은 1M NH₄OAc (pH 7.0) 용액으로 침출 후 AAS (Atomic Absorption Spectrometer, Schmadzu, Japan)를 이용하여 Ca²⁺, Mg²⁺, K⁺, Na⁺의 함량을 측정하였다.

토양의 생물학적 질 평가 항목 분석의 시료조제와 생물학적 질 평가 항목 분석은 土壤微生物實驗法 (日本土壤微生物研究會, 2002)에 준하여 수행하였다. 토양호흡은 습토(건토중량 100g)를 300ml 용량의 Plastic Bottle에 취한 후 0.5M NaOH가 들어있는 Vial 병을 삽입하였으며, 밀봉 후 25℃에서 24시간동안 배양하였다.

배양 후 Vial 병을 꺼내어 Phenolphthalein을 지시약으로 1M HCl을 사용하여 홍적색에

서 무색으로 색이 변할 때까지 적정을 하였고, 다시 Bromocresol green을 지시약으로 0.2M HCl을 사용하여 푸른색에서 노란색으로 변할 때까지 적정을 하였고, 소모된 0.2M HCl의 양을 환산하여 CO₂의 양을 계산하였다<식 2>.

$$\text{CO}_2 \text{ (mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}) = M * T * 44 * 1000 * S^{-1} \quad \text{식 2}$$

[M] = Hydrochloric acid concentration (0.2 mole L⁻¹)

[T] = Titrate volume (ml)

[S] = Soil weight (g)

토양 미생물 생체량 C, N은 日本土壤微生物研究會(2002)의 토양 생물량 C, N의 정량의 방법을 사용하였다. 현장에서 선별한 6mm이하의 토양을 실험실로 운반하여 일주일간 전 배양을 실시하였으며, 수분 증발로 인한 수분 손실 방지를 위해 즉시 수분함량을 측정하였다.

토양 미생물 생체량 C의 정량은 유리 비이커에 건토 50g 상당량의 토양을 취한 후 이것을 클로로포름 약 50ml와 비등석이 들어있는 유리 비이커 및 물을 채운 샐레와 함께 진공 Desiccator에 넣어 뚜껑을 덮고 나서 진공펌프로 감압하였다. 클로로포름이 비등하기 시작하고 나서 3분후 Desiccator의 벨브를 잠그고 이 상태로 25℃에서 24시간동안 어두운 곳에서 정치를 시켰다. 혼증 후 Desiccator의 벨브를 열어 공기가 들어가는 것을 확인하고 나서 감압, 탈기를 여러 회 실시하여 클로로포름을 제거시켰다. 유리 비이커에 담긴 혼증 토양을 250ml 용량의 플라스틱 비이커에 옮긴 후 비 혼증토양을 10배량의 증류수로 현탁 시킨 것을 주사기에 넣어 수회로 나누어 주입하고, 이 토양 시료를 토양호흡측정법에 준하여 배양하여 이산화탄소 발생량을 측정하였으며, 비 혼증 토양도 동시에 배양하고, 이산화탄소 발생량을 측정하였다<식 3>.

$$B_C = [F.S(C) - N.F.S(C)] * 12/44 * k_C^{-1} \quad \text{식 3}$$

[B_C] = Microbial Biomass C

[F.S(C)] = Concentration of CO₂(g) from Fumigated Soil

[N.F.S(C)] = Concentration of CO₂(g) from Not Fumigated Soil

[k_C] = Coefficient of Mineralization C (0.45, At 5 ~ 8.5 pH Condition; Vance *et. al.*, 1987)

토양 미생물 생체량 C의 정량은 배양 후의 토양의 건토 10g 상당량의 토양을 삼각플라스크에 취하고 2%의 염화칼륨 용액 50ml를 첨가하여 30분간 150rpm에서 진탕하였고(비 혼증 토양도 동시에 실시), UV/Vis Spectrophotometer (UV 240 Shimadzu, Japan)로 암모늄태 질소를 비색 정량하였다<식 4>.

$$B_N = [F.S(N) - N.F.S(N)] * K_N \quad \text{식 4}$$

[B_N] = Microbial Biomass N

[F.S(N)] = Concentration of NH₄-N from Fumigated Soil

[N.F.S(N)] = Concentration of NH₄-N from Not Fumigated Soil

[K_N] = Coefficient of Mineralization N (0.57, At Aerobic Condition Soil; Inubushi and Watanabe, 1987)

토양 잠재적인 질소 무기화율은 Keeney(1982)의 방법을 사용하였다. 풍건토양(≤ 2 mm) 20 ± 0.05 g을 Test tube에 취한 후 증류수 25ml를 첨가하여 Hand shaking을 약 1분간 실시하였다. Test tube를 Parafilm으로 밀봉을 하여 7일 동안 40°C 에서 배양을 시킨 후 2M KCl을 50ml 첨가하고, 1시간 동안 Shaking을 실시하였다. 그 후 Whatman No. 42 여과지를 사용하여 응달에서 여과시켰다. 배양 하지 않은 토양 또한 20 ± 0.05 g을 취해 2M KCl 50ml를 첨가한 후 Shaking을 실시하여 응달에서 여과시켰다. 여액을 IUV/Vis Spectrophotometer (UV 240 Shimadzu, Japan)로 암모늄태 질소를 비색 정량하였고, 배양토양과 미 배양토양의 $\text{NH}_4\text{-N}$ 차를 이용하여 잠재적인 질소 무기화율을 계산하였다<식 5>.

$$\text{Potentially Mineralizable N} = (I - R) * 5 \quad \text{식 5}$$

[I] = $\text{NH}_4\text{-N}$ Incubated
[R] = Reference extract

(4) 통계 분석

SAS program를 이용하여 ANOVA 분석($p < 0.05$) 실시하여 은 나노용액 처리에 따른 화학적·생물학적 특성의 결과값 간의 유의성을 평가하였다.

나. 실험 결과

(1) 토성

은 나노 용액 처리 전과 35일 후 500 mg kg^{-1} 처리구를 대상으로 토성을 측정된 결과는 다음과 같다<Table 10, 11>.

Table 10. 은 나노 용액 처리전 토성

Sample	sand	silt	clay	Soil Texture
	----- % -----			
A	46.3	29.7	24	L
B	85.54	0.46	14	LS
C	34.7	29.3	36	CL

Table 11. 은 나노 용액 처리 5주후 토성

Sample	sand	silt	clay	soil texture
	----- % -----			
A-500-1	45.5	34.4	20.1	L
A-500-2	49.1	31.5	19.4	L
A-500-3	45.3	35.7	19.0	L
B-500-1	87.5	0.5	12.0	LS
B-500-2	87.0	0.6	12.4	LS
B-500-3	87.3	0.2	12.5	LS
C-500-1	38.0	27.0	35.0	CL
C-500-2	37.0	29.0	34.0	CL
C-500-3	37.4	30.3	32.3	CL

분석 결과 A 토양의 경우 양토(L), B 토양의 경우 양질사토(LS), C 토양의 경우 식양토(CL)로 은 나노 용액 처리전·후의 토성에는 변화가 없는 것으로 분석되었으며, 은 나노 용액의 토양 투여시 토성에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

(2) pH

은 나노 용액을 처리한 후 7, 14, 21, 35일 토양을 채취하여 pH를 측정된 결과는 다음과 같다 <Table 12>.

Table 12. 은 나노 용액처리에 따른 pH 측정결과

	처리전	7 day	14 day	21 day	35 day
A-con	6.04	6.52	6.04	6.24	5.71
A-80	6.04	6.60	6.02	6.20	5.81
A-500	6.04	6.61	5.99	6.29	5.96
B-con	6.52	7.01	6.66	7.10	6.70
B-80	6.52	6.88	6.68	7.01	6.52
B-500	6.52	6.97	6.73	7.10	6.78
C-con	6.38	6.94	6.41	6.55	6.45
C-80	6.38	6.89	6.63	6.81	6.55
C-500	6.38	6.90	6.70	7.01	6.66

은 나노 용액 처리 35일 후 A(양토), B(양질사토), C(식양토) 처리구에서 모두 control과 비교하여 높아지는 경향을 나타내었으나 ANOVA 분석 결과 A(양토), B(양질사토) 처리구에서는 유의확률($Pr > F$)이 유의수준 $\alpha=0.05$ 보다 높아 유의성이 없는 것으로 분석되었으며, C(식양토) 처리구의 경우 유의확률($Pr > F$)이 유의수준 $\alpha=0.05$ 낮아 유의성이 인정되었으며, 은 나노 용액 처리가 토양 pH에 영향을 주는 것으로 분석되었다. 은 나노 용액을 식양토에 처리할 경우 pH

가 증가하는 경향을 나타내었으며<Fig 18>, 통계적 유의성은 나타나지 않았으나 양토, 양질사토의 경우에도 증가하는 경향을 나타내었다.



Fig 18. 은 나노 용액 처리에 따른 C(식양토) 처리구에서의 pH 변화

(3) EC

은 나노 용액을 처리한후 7, 14, 21, 35일 토양을 채취하여 EC를 측정한 결과는 다음과 같다 <Table 13>.

Table 13. 은 나노 용액처리에 따른 EC 측정결과

	처리전	7 day	14 day	21 day	35 day
	----- uS cm ⁻¹ -----				
A-con	965.33	551.67	718.33	869.67	959.33
A-80	965.33	441.33	988.00	1027.33	1130.67
A-500	965.33	338.30	996.33	1281.33	947.00
B-con	174.70	111.10	125.43	152.17	154.50
B-80	174.70	168.53	134.93	235.40	226.77
B-500	174.70	122.40	110.30	205.20	153.60
C-con	867.67	438.67	596.00	657.67	723.00
C-80	867.67	386.67	447.47	551.33	557.33
C-500	867.67	333.03	396.33	368.33	508.33

은 나노 용액 처리 후 A(양토), B(양질사토) 처리구에서 모두 control과 비교하여 높아지는 경향을 나타내었으며, 특히 80 mg kg⁻¹ 처리구에서 더 높은 증가를 나타내었다. C(식양토) 처리구의 경우에는 EC는 감소하는 경향을 나타내고 있다. 통계 분석 결과 A(양토), B(양질사

토), C(식양토) 처리구 모두 일부 시기에서만 유의성이 있는 것으로 분석되어 은 나노 용액의 농도별 처리에 따른 경향을 도출하기 어려우나, 은 나노 용액처리가 토성에 따라서 증가 혹은 감소와 같은 영향을 미치는 것으로 사료된다.<Fig 19>

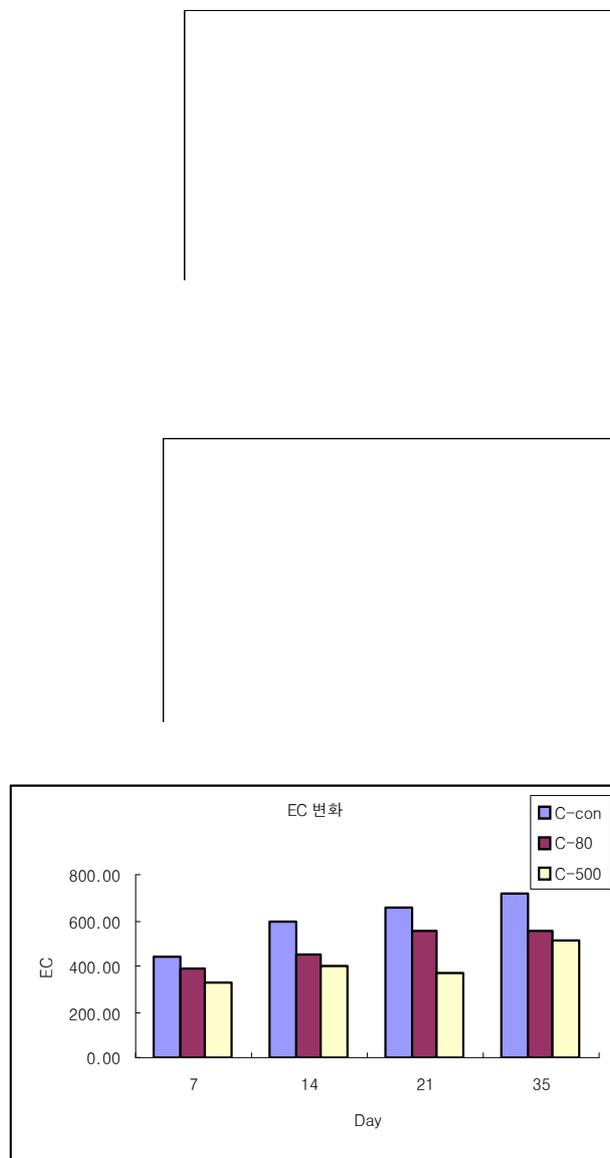


Fig 19. 은 나노 용액 처리에 따른 토성별 EC 변화

(4) 토양 유기물

은 나노 용액을 처리한 후 7, 14, 21, 35일 토양을 채취하여 토양유기물을 측정된 결과는 다음과 같다<Table 14>.

Table 14. 은 나노 용액처리에 따른 토양 유기물 측정결과

	처리전	7 day	14 day	21 day	35 day
	g kg ⁻¹				
A-con	51.94	46.32	58.96	65.91	55.43
A-80	51.94	55.14	62.17	63.81	66.73
A-500	51.94	56.63	65.60	73.98	65.86
B-con	24.62	16.54	20.51	14.96	22.09
B-80	24.62	14.73	17.43	16.68	15.49
B-500	24.62	16.02	19.99	21.56	15.46
C-con	41.06	49.34	35.26	59.25	49.15
C-80	41.06	47.15	49.73	56.99	46.51
C-500	41.06	48.35	44.56	57.71	52.39

통계 분석 결과 A(양토), B(양질사토), C(식양토) 처리구 모두 유의확률(Pr > F)이 유의수준 $\alpha=0.05$ 보다 높아 유의성이 없는 것으로 분석되었으며, 은 나노 용액 처리가 토양 유기물에 미치는 영향은 없는 것으로 판단된다. 따라서 은 나노소재 처리에 따른 토양 질 평가 지표로서 적합하지 않은 것으로 사료된다.

(5) 총 질소

은 나노 용액을 처리한후 7, 14, 21, 35일 토양을 채취하여 총 질소를 측정된 결과는 다음과 같다<Table 15>. 통계 분석 결과 A(양토), B(양질사토), C(식양토) 처리구 모두 유의확률(Pr > F)이 유의수준 $\alpha=0.05$ 보다 높아 유의성이 없는 것으로 분석되었으며, 은 나노 용액 처리가 토양 총 질소에 미치는 영향은 없는 것으로 판단된다.

Table 15. 은 나노 용액처리에 따른 총 질소 측정결과

	처리전	7 day	14 day	21 day	35 day
	----- % -----				
A-con	0.23	0.23	0.24	0.25	0.22
A-80	0.23	0.25	0.24	0.28	0.32
A-500	0.23	0.29	0.28	0.29	0.27
B-con	0.08	0.09	0.08	0.08	0.08
B-80	0.08	0.09	0.08	0.09	0.08
B-500	0.08	0.09	0.08	0.08	0.09
C-con	0.20	0.23	0.21	0.20	0.23
C-80	0.20	0.23	0.22	0.17	0.19
C-500	0.20	0.23	0.21	0.21	0.22

(6) 유효 인산

은 나노 용액을 처리한 후 7, 14, 21, 35일 토양을 채취하여 유효인산을 측정한 결과는 다음과 같다<Table 16>.

Table 16. 은 나노 용액처리에 따른 토양 중 유효인산 측정결과

	처리전	7 day	14 day	21 day	35 day
	----- P ₂ O ₅ (mg kg ⁻¹) -----				
A-con	3691.20	3456.90	3297.10	3201.98	3376.28
A-80	3691.20	3666.41	2969.65	2471.00	3500.83
A-500	3691.20	3676.71	2846.85	3175.47	3028.45
B-con	225.64	243.14	162.78	133.88	174.35
B-80	225.64	188.05	181.29	151.53	183.49
B-500	225.64	212.22	206.81	129.74	173.05
C-con	2717.43	2679.05	2137.08	2519.56	2548.81
C-80	2717.43	2719.92	1805.65	2495.53	2574.82
C-500	2717.43	2731.99	1795.71	2296.01	2332.97

통계 분석 결과 A(양토), B(양질사토), C(식양토) 처리구 모두 유의확률(Pr > F)이 유의 수준 α=0.05 보다 높아 유의성이 없는 것으로 분석되었으며, 은 나노 용액 처리가 토양 유효 인산에 미치는 영향은 없는 것으로 판단된다.

(7) 치환성 칼슘

은 나노 용액을 처리한 후 7, 14, 21, 35일 토양을 채취하여 치환성 Ca을 측정한 결과는 다음과 같다<Table 17>.

Table 17. 은 나노 용액처리에 따른 치환성 Ca 측정결과

	처리전	7 day	14 day	21 day	35 day
	----- cmol(+) kg ⁻¹ -----				
A-con	5.48	4.63	4.61	5.64	4.23
A-80	5.48	4.81	5.24	6.03	4.78
A-500	5.48	5.11	5.28	6.22	4.89
B-con	1.65	2.15	1.77	2.02	1.72
B-80	1.65	1.55	1.86	1.93	1.65
B-500	1.65	1.48	1.87	1.84	1.72
C-con	5.52	4.65	5.62	5.71	5.10
C-80	5.52	4.50	5.35	5.87	4.62
C-500	5.52	5.04	5.65	6.07	4.14

통계 분석 결과 A(양토) 처리구에서 모두 유의확률($Pr > F$)이 유의수준 $\alpha=0.05$ 보다 낮아 유의성이 있는 것으로 분석되었으며, 은 나노 용액을 처리함에 따라 최환성 Ca의 함량이 높아지는 경향을 나타내었다. B(양질사토), C(식양토) 처리구의 경우에는 유의성이 없는 것으로 분석되었다<Fig 20>.

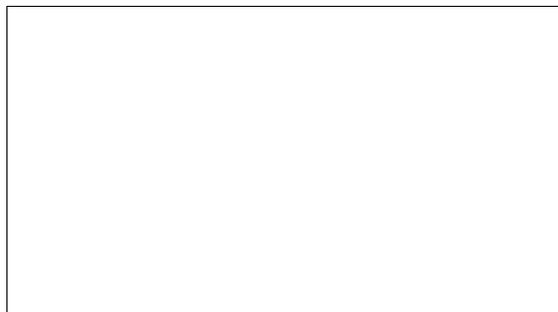


Fig 20. 은 나노 용액 처리에 따른 치환성 Ca의 변화 추이

(8) 치환성 칼륨

은 나노 용액을 처리한 후 7, 14, 21, 35일 토양을 채취하여 치환성 K을 측정한 결과는 다음과 같다<Table 18>.

Table 18. 은 나노 용액처리에 따른 치환성 K 측정결과

	처리전	7 day	14 day	21 day	35 day
	----- cmol(+) kg ⁻¹ -----				
A-con	0.65	0.68	0.63	0.87	0.54
A-80	0.65	0.43	0.44	0.58	0.34
A-500	0.65	0.70	0.69	0.86	0.53
B-con	0.30	0.18	0.22	0.34	0.13
B-80	0.30	0.19	0.26	0.36	0.15
B-500	0.30	0.21	0.28	0.36	0.15
C-con	0.80	0.72	0.79	0.96	0.61
C-80	0.80	0.70	0.83	0.99	0.61
C-500	0.80	0.73	0.87	1.03	0.59

통계 분석 결과 C(식양토) 처리구에서 모두 유의확률($Pr > F$)이 유의수준 $\alpha=0.05$ 보다 높아 유의성이 없는 것으로 분석되었으며, A(양토), B(양질사토) 처리구의 경우에는 유의성이 있는 것으로 분석되었다. 그러나 농도별 은 나노 용액 처리에 따른 경향은 나타나지 않았다.

(9) 치환성 마그네슘

은 나노 용액을 처리한 후 7, 14, 21, 35일 토양을 채취하여 치환성 Mg을 측정한 결과는 다음과 같다<Table 19>.

Table 19. 은 나노 용액처리에 따른 치환성 Mg 측정결과

	처리전	7 day	14 day	21 day	35 day
	----- cmol(+) kg ⁻¹ -----				
A-con	0.70	0.96	0.88	0.93	0.99
A-80	0.70	0.97	0.97	0.99	1.05
A-500	0.70	0.96	0.94	0.98	1.04
B-con	0.22	0.21	0.20	0.23	0.27
B-80	0.22	0.22	0.21	0.21	0.25
B-500	0.22	0.21	0.22	0.19	0.25
C-con	0.57	0.84	0.86	0.82	0.97
C-80	0.57	0.83	0.84	0.87	0.92
C-500	0.57	0.86	0.83	0.82	0.75

통계 분석 결과 A(양토), B(양질사토), C(식양토) 처리구 모두 유의확률($Pr > F$)이 유의수준 $\alpha=0.05$ 보다 높아 유의성이 없는 것으로 분석되었으며, 500 mg kg⁻¹ 농도 이하의 은 나노 용액 처리시 치환성 Mg에 미치는 영향은 미미할 것으로 판단된다.

(10) 치환성 나트륨

은 나노 용액을 처리한 후 7, 14, 21, 35일 토양을 채취하여 치환성 Na를 측정된 결과는 다음과 같다<Table 20>.

Table 20. 은 나노 용액처리에 따른 치환성 Na 측정결과

	처리전	7 day	14 day	21 day	35 day
	----- cmol(+) kg ⁻¹ -----				
A-con	0.14	0.12	0.10	0.13	0.11
A-80	0.14	0.13	0.11	0.15	0.10
A-500	0.14	0.11	0.11	0.15	0.10
B-con	0.11	0.06	0.08	0.11	0.09
B-80	0.11	0.07	0.09	0.12	0.11
B-500	0.11	0.07	0.07	0.12	0.08
C-con	0.10	0.26	0.29	0.33	0.31
C-80	0.10	0.25	0.29	0.34	0.30
C-500	0.10	0.26	0.31	0.34	0.24

통계 분석 결과 A(양토), B(양질사토), C(식양토) 처리구 모두 유의확률(Pr > F)이 유의 수준 α=0.05 보다 높아 유의성이 없는 것으로 분석되었으며, 500 mg kg⁻¹ 농도 이하의 은 나노 용액 처리시 치환성 Na에 미치는 영향은 미미할 것으로 판단된다.

(11) 치환성 알루미늄

은 나노 용액을 처리한 후 7, 14, 21, 35일 토양을 채취하여 치환성 Al을 측정된 결과는 다음과 같다<Table 21>.

Table 21. 은 나노 용액처리에 따른 치환성 Al 측정결과

	처리전	7 day	14 day	21 day	35 day
	----- mg kg ⁻¹ -----				
A-con	918.33	913.33	1008.33	953.33	1170.00
A-80	918.33	861.67	875.00	830.00	935.00
A-500	918.33	826.67	733.33	651.67	895.00
B-con	224.17	234.33	224.33	225.33	314.33
B-80	224.17	220.67	252.67	206.83	298.50
B-500	224.17	189.17	221.33	176.50	255.33
C-con	935.00	743.33	910.00	935.00	1113.33
C-80	935.00	845.00	911.67	928.33	1070.00
C-500	935.00	793.33	865.00	868.33	1073.33

통계 분석 결과 A(양토), B(양질사토)처리구의 경우 유의확률($Pr > F$)이 유의수준 $\alpha=0.05$ 보다 낮아 유의성이 있는 것으로 분석되었으며, 은 나노 용액을 농도별 처리함에 따라 치환성 Al의 농도가 감소하는 경향을 나타내었다<Fig 21>. C(식양토)처리구의 경우 유의확률($Pr > F$)이 유의수준 $\alpha=0.05$ 보다 높아 유의성이 없는 것으로 분석되었다.

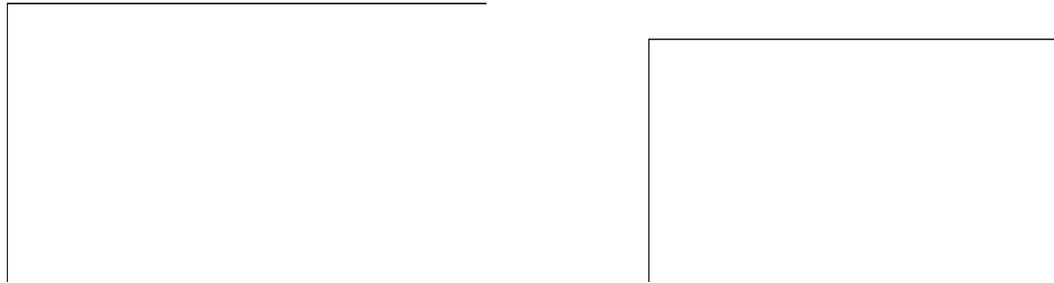


Fig 21. 은 나노 용액 처리에 따른 치환성 Al의 변화 추이

(12) Heavy metal

은 나노 용액을 처리한후 7, 14, 21, 35일 토양을 채취하여 0,1M-HCl을 이용하여 추출한 후 Cr, Mn, Cu, Zn, Cd, Fe을 측정하여 평균값간의 통계 분석을 실시한 결과 Mn, Zn, Fe의 경우에만 유의성 있는 결과를 나타내었다.

(가) Mn

은 나노 용액을 처리한 후 7, 14, 21, 35일 토양을 채취하여 Mn을 측정한 결과는 다음과 같다 <Table 22>.

Table 22. 은 나노 용액처리에 따른 Mn 측정결과

	처리전	7 day	14 day	21 day	35 day
	----- mg kg ⁻¹ -----				
A-con	65.33	64.17	70.00	57.83	83.33
A-80	65.33	61.50	70.50	57.50	84.33
A-500	65.33	69.33	68.83	59.33	88.17
B-con	82.00	77.50	79.33	66.83	92.83
B-80	82.00	78.33	84.33	62.50	95.50
B-500	82.00	76.33	103.00	68.67	104.17
C-con	65.83	52.37	74.17	62.00	87.17
C-80	65.83	67.33	152.47	142.00	99.00
C-500	65.83	137.50	245.55	307.63	257.95

통계 분석 결과 A(양토), B(양질사토)처리구의 경우 유의확률($P > F$)이 유의수준 $\alpha=0.05$ 보다 높아 유의성이 없는 것으로 나타났으며, C(식양토) 경우 유의성이 있는 것으로 분석되었다. A(양토), B(양질사토) 처리구의 경우 통계적 유의성은 없는 것으로 분석되었으나 은나노 용액 처리에 따라 Mn 함량이 증가하는 경향을 나타내고 있으며 C 처리구의 경우에도 마찬가지로 증가하는 경향을 나타내었다. 특히 C(식양토)의 경우 은나노 용액의 처리 농도가 높아질수록 다른 처리구에 비하여 큰 폭으로 증가하였다.<Fig 22>.

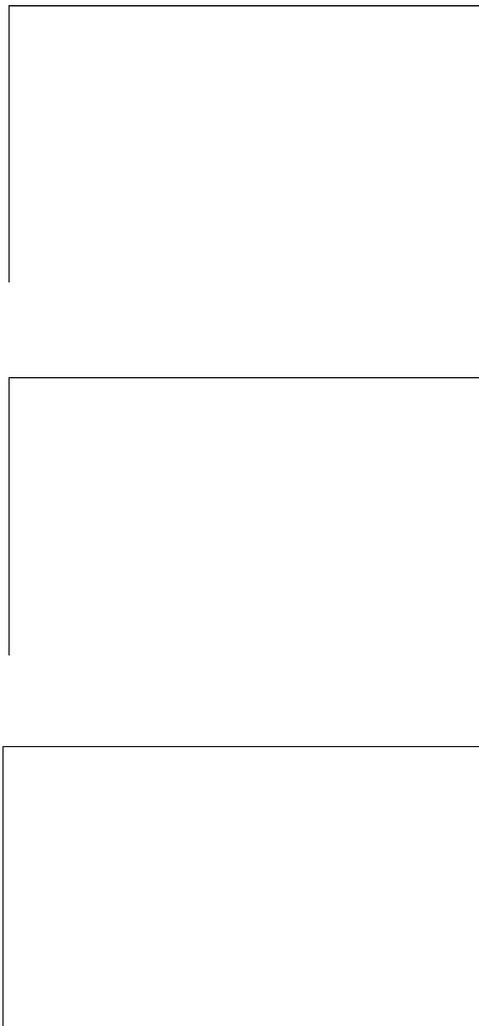


Fig 22. 은나노 용액 처리에 따른 Mn의 변화 추이

(나) Zn

은나노 용액을 처리한 후 7, 14, 21, 35일 토양을 채취하여 Zn을 측정된 결과는 다음과 같다 <Table 23>.

Table 23. 은 나노 용액처리에 따른 Zn 측정결과

	처리전	7 day	14 day	21 day	35 day
	----- mg kg ⁻¹ -----				
A-con	95.33	87.00	89.50	82.17	86.00
A-80	95.33	93.67	95.67	88.50	95.17
A-500	95.33	96.50	93.67	90.17	93.67
B-con	5.31	5.07	4.37	3.91	5.13
B-80	5.31	5.40	4.98	3.88	4.78
B-500	5.31	4.39	4.88	3.57	3.64
C-con	68.83	56.20	67.33	63.17	68.33
C-80	68.83	70.17	68.17	63.50	70.33
C-500	68.83	64.38	67.33	62.83	66.33

통계 분석 결과 A(양토) 처리구의 경우 유의확률($Pr > F$)이 유의수준 $\alpha=0.05$ 보다 낮아 유의성이 있는 것으로 나타났으며, C(식양토), B(양질사토) 처리구의 경우 유의성이 없는 것으로 분석 되었다. A(양토) 처리구의 경우 은 나노 용액을 처리함에 따라 Zn의 함량이 증가하는 경향을 나타내었다<Fig 23>.



Fig 23. 은 나노 용액 처리에 따른 Zn의 변화 추이

(다) Fe

은 나노 용액을 처리한후 7, 14, 21, 35일 토양을 채취하여 Fe을 측정한 결과는 다음과 같다 <Table 24>.

Table 24. 은 나노 용액처리에 따른 Fe 측정결과

	처리전	7 day	14 day	21 day	35 day
	----- mg kg ⁻¹ -----				
A-con	64.83	66.17	62.00	58.67	61.83
A-80	64.83	62.50	52.05	48.32	47.22
A-500	64.83	57.00	40.98	34.25	44.18
B-con	103.50	105.17	121.00	110.83	163.67
B-80	103.50	93.83	126.83	99.50	141.33
B-500	103.50	83.17	113.50	94.17	123.17
C-con	57.33	59.33	40.13	50.00	45.85
C-80	57.33	55.67	48.15	58.17	47.00
C-500	57.33	68.83	61.33	164.17	54.92

통계 분석 결과 A(양토), B(양질사토) 처리구의 경우 유의확률($P > F$)이 유의수준 $\alpha=0.05$ 보다 낮아 유의성이 있는 것으로 나타났으며, C(식양토) 처리구의 경우 유의성이 없는 것으로 분석 되었다. A(양토), B(양질사토) 처리구의 경우 은 나노 용액을 처리함에 따라 Fe의 함량이 감소하는 경향을 나타내었다. C(식양토) 처리구의 경우통계적 유의성은 없었으나 은 나노 용액을 처리함에 따라 증가하는 경향을 나타내었다.<Fig 24>.

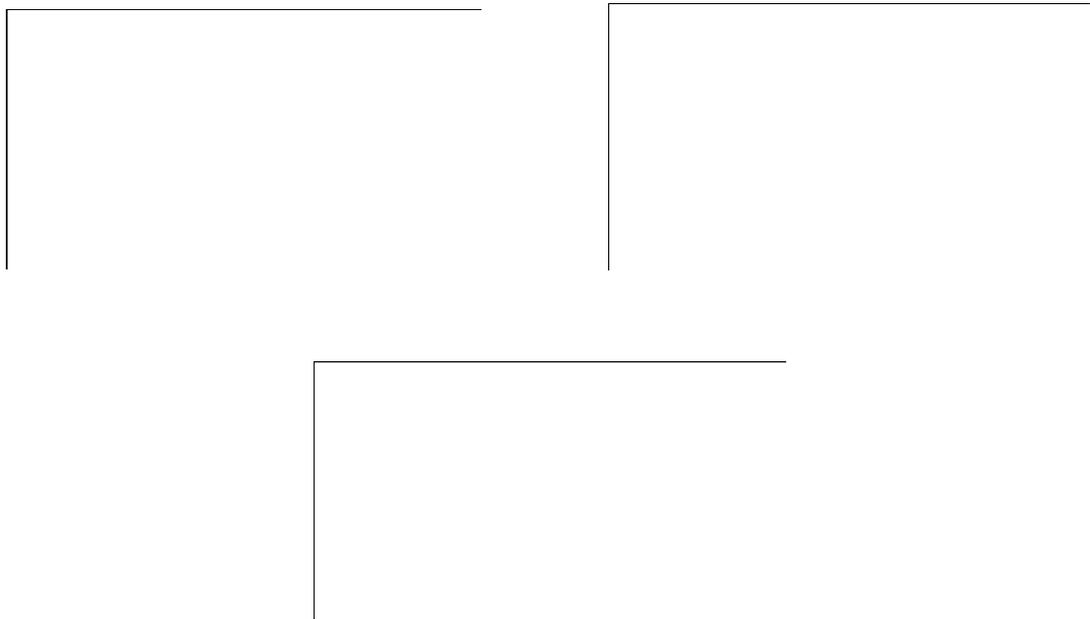


Fig 24. 은 나노 용액 처리에 따른 Fe의 변화 추이

(13) Soil Respiration

은 나노 용액을 처리한후 7, 14, 21, 35일 토양을 채취하여 토양호흡을 측정한 결과 다음과 같다<Table 25>.

Table 25. 은 나노 용액처리에 따른 토양호흡 측정결과

	처리전	7 day	14 day	21 day	35 day
	----- mg kg ⁻¹ day ⁻¹ -----				
A-con	74.31	51.82	51.82	60.13	25.42
A-80	74.31	45.47	47.91	57.69	32.76
A-500	74.31	55.73	49.87	36.18	37.16
B-con	114.89	113.91	94.36	85.07	64.53
B-80	114.89	92.40	79.20	68.93	56.71
B-500	114.89	67.96	67.96	44.98	29.33
C-con	50.36	36.18	41.07	48.40	42.53
C-80	50.36	31.78	34.22	41.56	22.00
C-500	50.36	41.56	51.33	63.56	28.36

통계 분석 결과 A(양토), C(식양토) 처리구의 경우 유의확률($Pr > F$)이 유의수준 $\alpha=0.05$ 보다 높아 유의성이 없는 것으로 나타났으며, B(양질사토) 처리구의 경우 유의성이 있는 것으로 분석되었다. B(양질사토) 처리구의 경우 은 나노 용액의 처리 농도에 따라 Control과 비교하였을 때 토양호흡량이 감소하는 것으로 분석되었다<Fig 25>.



Fig 25. 은 나노 용액 처리에 따른 토양호흡량의 변화 추이

(14) Microbial Biomass C

은 나노 용액을 처리한후 7, 14, 21, 35일 토양을 채취하여 Microbial Biomass C를 측정된 결과 다음과 같다<Table 26>. 통계 분석 결과 A(양토), B(양질사토), C(식양토) 처리구 모두 유의확률

(Pr > F)이 유의수준 $\alpha=0.05$ 보다 높아 유의성이 없는 것으로 분석되었다. 은 나노 용액 처리에 따른 영향을 평가하기 위한 지표로서 적합하지 않은 것으로 사료된다.

Table 26. 은 나노 용액처리에 따른 Microbial Biomass C 측정결과

	처리전	7 day	14 day	21 day	35 day
	----- mg kg ⁻¹ -----				
A-con	256.89	289.78	148.44	170.67	200.89
A-80	256.89	287.11	191.11	140.44	197.33
A-500	256.89	309.33	164.44	142.22	180.44
B-con	44.44	115.56	47.11	114.67	103.11
B-80	44.44	59.56	113.78	33.78	50.67
B-500	44.44	103.11	63.11	77.33	84.44
C-con	140.44	175.11	139.56	178.67	168.89
C-80	140.44	168.00	257.78	128.89	168.89
C-500	140.44	112.00	262.22	98.67	186.67

(15) Microbial Biomass N

은 나노 용액을 처리한 후 7, 14, 21, 35일 토양을 채취하여 Microbial Biomass N을 측정한 결과 다음과 같다<Table 27>.

Table 27. 은 나노 용액처리에 따른 Microbial Biomass N 측정결과

	처리전	7 day	14 day	21 day	35 day
	----- mg kg ⁻¹ -----				
A-con	31.77	38.78	24.52	47.02	19.74
A-80	31.77	39.38	25.40	41.57	24.53
A-500	31.77	44.32	35.24	53.67	19.87
B-con	22.44	20.53	16.13	14.93	15.43
B-80	22.44	20.64	18.72	18.55	13.00
B-500	22.44	22.96	19.81	23.16	14.64
C-con	36.25	29.94	17.56	23.15	28.19
C-80	36.25	24.97	12.85	28.53	20.27
C-500	36.25	29.13	15.08	40.58	13.86

통계 분석 결과 A(양토), B(양질사토), C(식양토) 처리구 모두 유의확률(Pr > F)이 유의 수준 $\alpha=0.05$ 보다 높아 유의성이 없는 것으로 분석되었다. 은 나노 용액 처리에 따른 영향을 평가하기 위한 지표로서 적합하지 않은 것으로 사료된다.

(16) Potentially Mineralizable N

은 나노 용액을 처리한 후 7, 14, 21, 35일 토양을 채취하여 Potentially Mineralizable N을 측정한 결과 다음과 같다<Table 28>.

Table 28. 은 나노 용액처리에 따른 Potentially Mineralizable N 측정결과

	처리전	7 day	14 day	21 day	35 day
	----- mg kg ⁻¹ -----				
A-con	315.57	321.06	432.52	397.42	393.71
A-80	315.57	316.64	454.91	304.93	362.74
A-500	315.57	316.44	554.83	451.91	234.28
B-con	104.42	115.38	221.14	238.04	195.28
B-80	104.42	96.57	466.33	187.66	184.53
B-500	104.42	82.47	192.83	163.59	129.79
C-con	196.15	179.11	362.31	238.38	333.04
C-80	196.15	205.51	292.33	184.95	281.21
C-500	196.15	204.77	388.15	542.58	275.10

통계 분석 결과 A(양토), B(양질사토), C(식양토) 처리구 모두 유의확률($Pr > F$)이 유의 수준 $\alpha=0.05$ 보다 높아 유의성이 없는 것으로 분석되었다. 은 나노 용액 처리에 따른 경향도 나타나지 않았기 때문에 은 나노 용액이 토양 환경에 미치는 영향을 평가하기 위한 지표로서 적합하지 않은 것으로 사료된다.

5. 은 나노소재의 최적투여 비율

은 나노 소재가 식물에게 병해를 야기하는 식물병원성 미생물에 대하여 농도에 따라 항균활성도가 증가한다는 것이 발표되었으며, 향후 토양전염성 식물병해방제를 위한 은 나노용액의 최적 투여량을 산출하기 위하여 토양 중 반응 Kinetics Model과 Sorption Isotherm Model을 도입하여 은 나노소재의 흡착 특성을 구명한 후, 현장에 처리시 식물병원성 미생물에게 활성을 보이는 최적 투여량 산출을 목적으로 batch 실험을 진행 하였다.

가. 실험 재료 및 방법

(1) 공시시험액

실험에 사용한 은 나노용액은 포항공대에서 생산한 Nano-silver 용액 NanoverTM를 사용하였으며, 제공받은 상태는 1,000 ppm으로 냉장고에 보관하여 필요에 따라 희석하여 사용하였다.

Table 29. Nanover™의 화학적 특성

pH _(1:5)	EC	Ca	Mg	K	Na	Ag
	dS m ⁻¹	----- mg L ⁻¹ -----				
4.25	11.02	N.D. ¹⁾	N.D.	0.10	0.90	998

1) N.D.: Not detected.

(2) 공시 토양 및 분석

(가) 토양과의 흡착 Kinetics 및 흡착 실험

토성이 상이한 3종류의 토양을 사용하여 kinetic 및 흡착 실험을 수행 하였으며 토양의 화학적 특성은 다음과 같다. 토양분석은 농촌진흥청 농업 과학 기술원의 토양 및 식물체 분석법 (2000)에 의거 하여 토양의 화학성(pH, EC, 유기물, 유효인산, T-N, 치완성 양이온)을 실험 하였으며 공시 토양의 이화학적 특성은 다음과 같다.

Table 30. 토양의 화학적 특성

Soil texture	Sand	Silt	Clay	pH	EC (1:1)	O.M	CL ⁻	SO ₄ ²⁻
	----- % -----			1:10	uScm ⁻¹	g kg ⁻¹	----mgkg ⁻¹ ----	-
SC	52.2	7.4	40.4	5.66	133.27	41.63	12.84	200.82
C	33.79	11.4	54.9	7.33	106.53	28.82	7.56	21.34
SL	80.4	3.50	16.2	5.08	97.85	2.77	11.791	49.93

(나) 은 나노 소재와 토양 중 KCl과의 반응

경기도 양수리의 시설재배지의 토양을 채취하여 2mm채를 통과 시켜 사용 하였으며 토양의 화학적 특징은 다음과 같다.

Table 31. 공시토양의 이화학적 특성

Soil texture(%)			pH	EC (1:1)	O.M	T-N	P ₂ O ₅	Ca	Mg	K	Na
Sand	Silt	Clay	1:10	uScm ⁻¹	g kg ⁻¹	%	mgkg ⁻¹	-----cmolc kg ⁻¹ -----			
45.8	44.2	10.0	6.63	23.33	30.22	0.25	1905	5.33	0.62	0.57	0.15

채취한 토양 500g을 측량하여 은 나노 용액을 무처리, 25, 50, 100 mg L⁻¹ 500g 으로 농도별 처리하였으며 밭 토양의 기준 비료 시비량(칼리비료 15kg/10a, 인산비료 13kg/10a)을 고려하여 각각 0.1M KCl 무처리, 2.5, 5ml과 0.1M KH₂PO₄ 무처리, 1.25, 2.5ml을 처리 하였다. 처리 방법은 토양과 용액이 잘 혼합 될 수 있도록 은 나노 용액과 0.1M KCl 2.5, 5 ml 또는 0.1M KH₂PO₄ 1.25, 2.5ml 을 혼합 후 넓은 접시 위에서 토양과 혼합액을 골고루 섞어준 후 건조 시켰다.

(3) 실험방법

(가) 은 나노 용액의 특성 평가

은 나노 용액과 KCl이 반응하여 발생하는 침전물을 분리하기 위하여 원심분리(Centrifuse)를 사용 하였으며, 침전물의 형태를 알아보기 위하여 TEM(Transmission Electron Microscope)을 이용하여 분석을 실시하였다. 또한 용액의 화학적 특성을 분석하였다. 실험에 사용한 은 나노 용액은 은 입자와 은 이온이 혼합된 상태로 판단되어 은 입자와 은 이온의 비율을 원심분리(centrifuge) 및 양이온 교환수지(cation exchange resin)를 이용하여 분석하였다.

이온교환수지는 작용기의 힘에 따라 양이온의 경우 강산 또는 약산의 형태를 갖고, 음이온의 경우 강염기성 또는 약염기성 형태를 갖는다. 이것은 다양한 목적으로 이온교환 수지를 선택할 때 고려해야 할 가장 중요한 측면이다. H⁺이온으로 포화된 강산성 이온교환수지의 경우 수소이온이 아닌 다른 양이온의 강력한 이온흡착제로 작용한다. 본 실험에 사용된 강산 형태의 양이온수지(Amberlite IRN- 77; 8% crosslinked)의 이온선택성을 살펴보면 다음과 같다(Skogely and Dobermann, 1996).

Amberlite IRN - 77 (8% crosslinked) : Ba²⁺ > Pb²⁺ > Hg₂⁺ > Sr₂⁺ > Ca₂⁺ > Ni₂⁺ > Mn₂⁺ > Be₂⁺ > Cd₂⁺ > Cu₂⁺ > Co₂⁺ > Zn₂⁺ = Mg₂⁺ = Ag⁺ > Cs⁺ > Rb⁺ > Fe₂⁺ > = K⁺ > NH₄⁺ > H⁺ > Li⁺

(나) 은 나노 소재와 토양 중 KCl의 반응

시료 중 Ag의 농도는 풍건토양 3g을 왕수28ml(HCl:HNO₃=3:1)과 70℃에서 1시간동안 진탕 시킨 후 Whatman NO. 42 로 여과 시켜 3배 희석하여 ICP(Inductively Coupled Plasma Emission Spectrophotometer)로 측정 하였다. Cl⁻의 농도는 토양 10g과 증류수 100ml을 2시간동안 진탕 하여 4000rpm에서 10분동안 원심분리(Centrifuse)하여Whatman NO. 42로 여과 시킨 후 IC(iron Chromatography)로 측정 하였다.(Susan E.J. Buykx, 2004, Simultaneous extraction of bromide, chloride, fluoride and sulfate from soil, wast- and building materials) pH와 유효 인산은 농촌진흥청 농업 과학 기술원의 토양 및 식물체 분석법에 의거 하여 실험하였다. 유효인산은 Bray No.1 방법으로 추출하여 Ammonium paramolybdate로 발색 시킨 후 파장 660 nm에서 UV/Visible Spectrophotometer를 이용 하여 비색 정량 하였다.

(다) 은나노 용액과 KCl 처리 토양에서의 미생물 Population

본 실험에서 사용한 토양은 Table 31과 같으며 본 실험에 사용된 토양에 Nano-silver 용액과 KCl용액을 섞어 반죽하였다. 토양을 반죽 한 후 1일, 3일, 5일, 1주, 2주, 3주, 4주 간격으로 토양을 1g씩 9ml의 멸균수에 넣어 희석한 후 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} 의 희석액을 PDA, NA배지에 도말하여 3일 후 세균과 곰팡이를 counting하였다.

Table 32. 공시토양의 이화학적 특성

sand	silt	clay	Soil Texture
	----- % -----		
46.3	29.7	24	L
85.54	0.46	14	LS
34.7	29.3	36	CL

(라) 은 나노 용액의 토양 중 흡착 Kinetics

은 나노 용액이 토양에 흡착할 경우 온도와 농도에 따른 흡착 Kinetics를 알아보기 위하여 토양과 은 나노 용액을 1:10 비율로 첨가하고 진탕속도 150rpm에서 최대 72시간동안 반응시켰다. 먼저 반응 온도에 따른 흡착 kinetics를 알아보기 위하여 토양과 은 나노 혼합 용액의 온도를 각각 15, 25, 35 °C로 처리한 후 측정하였다. 또한 은 나노 용액의 초기 농도가 흡착에 미치는 영향을 알아보기 위하여 초기 은 나노 용액의 농도를 30, 50, 100 mg L⁻¹ 로 변화시켜 반응을 진행시켰다. 반응 후 용액은 0.45 μm membrane filter로 감압여과한 후 ICP(Inductively Coupled Plasma Emission Spectrophotometer)로 측정하여 시간에 따른 Ag 농도의 변화를 측정하였다. 이렇게 얻은 결과를 기초로 하여 kinetics model을 이용하여 kinetic parameter인 kinetics order, rate constant, rate curve 등을 구하였다. 적용된 kinetic model은 first order kinetic model로 식(1)과 같다(Sparks, 1995)

▶ First-order Kinetic model

$$\frac{d[C]}{dt} = -k[C] \tag{1}$$

$$\ln \frac{[C]_t}{[C]_0} = -kt$$

[C]₀ : initial Ag concentration

[C]_t : Remaining Ag concentration after time, t

t : reaction time (hr)

k : rate constant

(마) 은 나노 용액의 토양 중 흡착량

이화학적 특성이 다른 토양(SC, C, SL)을 사용하여 온도에 따른 은 나노 용액의 토양 흡착량을 비교하기위해 토양과 은 나노 용액을 1:10 비율로 혼합하였다. 용액의 농도는 25, 50, 100, 200,

400, 800 mg L⁻¹로 조절하였고, 반응 온도는 각각 15°C, 25°C, 35°C로 다르게 하여 온도에 따라 흡착되는 Ag양을 조사하였다. 토양에 흡착되는 Ag 양을 계산하기 위하여 다음 식을 이용하여 q값을 구하였다(Holen et al. 1993).

$$q = V \times (C_i - C_e) / m \quad (2)$$

q : mass of adsorbed Ag per unit weight of the treated soils (mmol g⁻¹)

V : volume of solution(L)

C_i : initial Ag concentration (mmol L⁻¹)

C_e : equilibrium Ag concentration (mmol L⁻¹)

m : weight of the chemically treated soil (g)

각각의 평형농도 식에서 얻은 q값의 함수 관계를 도식화하여 Langmuir 흡착 등온곡선(sorption isotherm curve)을 이용하여 최대 흡착량(q_{max})을 산출하였다. 적용된 흡착 등온식은 식 (3)과 같다(Sparks, 1995).

▶ Langmuir 흡착식

$$q = \frac{kCb}{(1+kC)} \quad (3)$$

q : mass of adsorbed Ag per unit weight of the treated soils (mmol g⁻¹)

C : equilibrium Ag concentration (mmol L⁻¹)

b : maximum amount of Ag that can be soil (mmol g⁻¹)

k : a constant related to the binding strength

나. 실험 결과

(1) 은 나노 용액의 화학적 특성

할로젠 족 원소와 결합한 은 화합물 할로젠 족 원소와 결합하여 안전화 상수 값이 높고 용해도는 매우 낮아 용액 중 침전 상태로 존재한다. 은 화합물의 용해도적 상수와 안정화 상수를 나타낸 것이다(Table 33)

Table 33. 은 화합물의 용해도적 상수와 안정화 상수

Compounds	Solubility Product(Ksp)	Stability Constants
AgCl	1.8 * 10 ⁻¹⁰	5.6 * 10 ⁹
AgBr	5.0 * 10 ⁻¹³	2.0 * 10 ¹²
AgI	8.3 * 10 ⁻¹⁷	1.2 * 10 ¹⁶
Ag ₂ CrO ₄	1.2 * 10 ⁻¹²	8.3 * 10 ¹¹

실험에 사용한 은 나노 용액에 Cl^- 이온을 첨가한 결과 흰색 침전이 형성 되었으며 용액 중 은 입자와 은 이온이 공존하고 있는 것으로 판단되었다. 침전이 형성된 용액을 SEM-EDS로 분석한 결과 AgCl 이 형성된 것을 확인하였다. <Figure 26, 27>

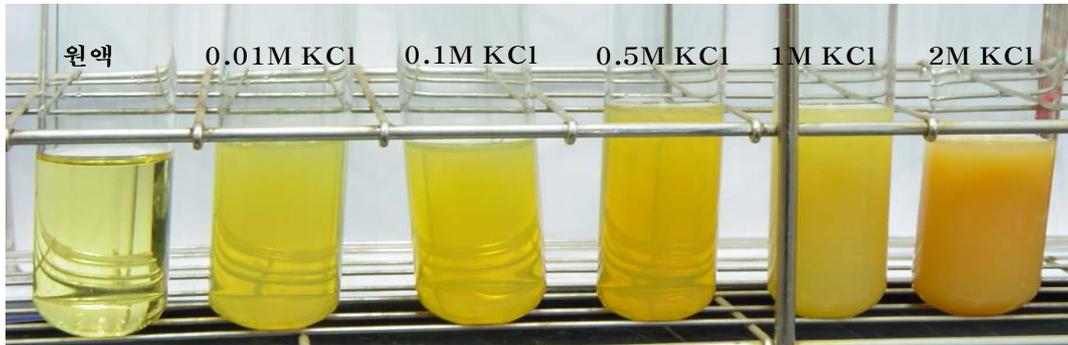
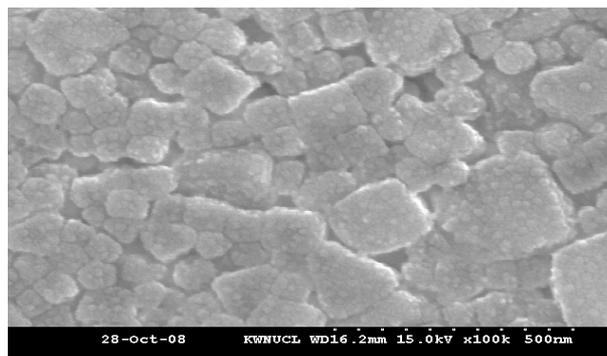
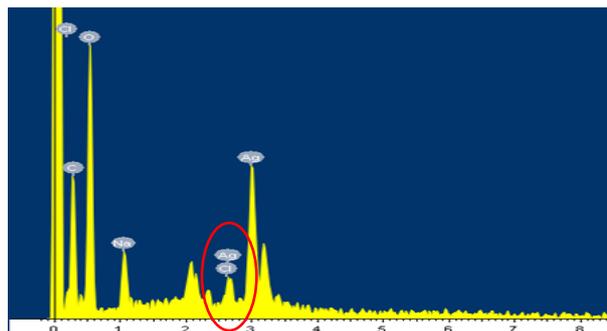


Fig 26. 은 나노 용액과 KCl의 반응



(a)



(b)

Fig 27. 은 나노 용액과 KCl의 반응 후 침전물의 (a) SEM/EDS, (b) TEM 분석

은 입자와 은 이온의 비율을 분석해 보고자 원심분리 및 양이온 교환수지를 이용하여 실험하였다. 먼저 은 나노 용액을 20,000 rpm에서 1시간 원심분리한 후 상등액을 취하여 은 농도를 분석하였다. 또한 강산 형태의 양이온수지(Amberlite IRN-77) 1g을 은 나노 용액 50ml에 넣고 150rpm에서 24시간 교반 후 여액의 은농도를 측정하였다(Table 34).

Table 34. 은 나노 용액안의 은이온 농도 (mg L^{-1})

	Silver nanoparticle solution	Centrifuge	Sorption amount with ion exchange resin
	1003.20	971.30	977.90
	1006.50	965.80	983.18
	995.50	966.90	969.21
AVERAGE	1001.73	968.00	976.76

은 나노 용액을 원심분리하여 은입자와 은 이온을 분리하여 측정된 결과 968 mg L^{-1} 으로 분석되었으며, 이온교환수지에 흡착된 은이온은 976.76 mg L^{-1} 로 분석되었다. 위의 결과로 1000 mg L^{-1} 은 나노 용액 내 은의 대부분은 은 이온 형태로 존재 하는 것으로 판단된다. 따라서 은 나노 용액을 처리시 미생물에 대한 항균력은 은 이온에 나타나며, 은 입자에 의한 효과는 미비할 것으로 판단된다.

은 나노 용액의 농도를 160 mg L^{-1} 로 동일하게 하고 pH를 5, 6, 7, 8로 다르게 처리하여 24시간 방치 후 $0.45\mu\text{m}$ membrane filter로 여과 후 여액의 은 농도를 분석한 결과, pH 변화에 따라 여액의 은 농도가 다르게 측정되었다<Table 35>또한, pH를 조절한 은 나노 용액을 여과한 membrane filter를 SEM을 이용하여 관찰한 결과 가장 많은 농도의 감소가 나타났던 pH 6에서 pH 8과 비교하여 은 입자로 추정되는 물질이 많이 걸러져 있는 것을 확인 하였다<Figure 28>. 은 입자 표면의 제타전위는 용액의 pH와 밀접한 관련이 있으며 제타전위가 은 콜로이드 입자 크기 및 분산 안정성에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(김, 2003). 위의 결과는 pH 변화에 따라 은 입자의 제타전위 및 분산 안정성이 달라져 은 입자의 크기가 달라졌기 때문으로 판단된다. 따라서 은 나노 용액의 제조 방법 및 분산제의 종류에 따라 가장 높은 항균력을 나타낼 수 있는 적정 pH가 존재할 수 있으며 실제 토양에 은 나노를 처리시 pH에 따라 은 나노 용액의 살균 효과가 달라 질 수 있을 것으로 사료된다.

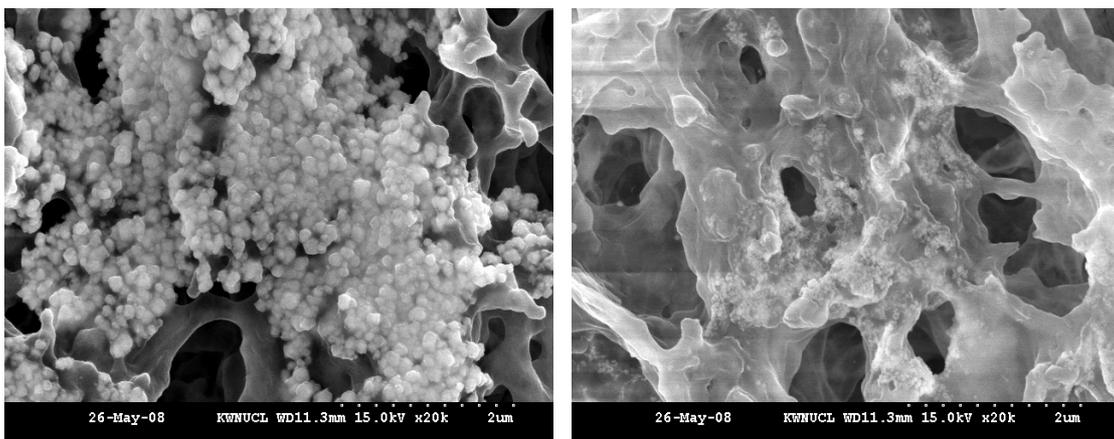


Fig 28. pH에 따른 은 나노 침전입자의 SEM 분석 (좌: pH 6, 우 : pH 8)

Table 35. pH에 따른 은 나노 용액의 은 농도

(unit : mg L⁻¹)

Initial concentration	pH			
	5	6	7	8
160ppm	121	111	143	151
	123	114	154	153
	124	112	155	151

토양 용액 중 존재하는 이온들의 화학종(species)은 이온의 생물독성, 이동성, 및 동태(fate)를 결정하는 중요한 요인이다. 물에 존재하는 이온의 총량은 정량적인 지표로서의 역할을 할 수는 있지만, 생물유효도(bioavailability)를 평가 할 수 없는 단점이 있다. 일반적으로 중금속의 생물유효성은 화학종에 의존하기 때문에 화학종의 평가가 이루어져야 하지만 용액 중 존재하는 모든 화학종을 분석하는 것은 불가능하여 모델링을 통해 화학종을 예측하고 있다.

모델링의 기본원리는 금속이온과 리간드 사이의 열역학적 안정화 상수를 바탕으로 계산하게 된다. 즉 양이온과 음이온 사이의 결합에 대한 열역학적인 참 평형상수 (true equilibrium constants)를 이용하여 pH, 이온강도, 농도 등의 변화에 따라 조건 안정화상수 (Conditional stability constant)로 전환하여 화학종을 계산하게 된다. 열역학적 참 평형상수란 평형상수(K)를 산출할 때 이온의 농도 대신 활동도를 사용하여 계산한 값이다.

Ag의 토양 유입시 토양 용액내 존재할 수 있는 은의 화학종 및 존재형태를 살펴보기 위하여 MINTEQ2를 이용하여 모델링을 실시하였다. 토양 중 존재할 수 있는 양이온 및 음이온을 임의의 농도(0.01 mole L⁻¹)로 입력하여 은의 화학종 및 상대적 분포를 살펴보았다. <Table 36>은 토양 용액 중 존재할 수 있는 은화합물의 화학종 및 존재형태를 나타낸 것이다.

Table 36. 토양 용액 중 존재할 수 있는 은 화합물의 화학종 및 존재 형태

species	Log activity	species	Log activity
Ag(CN) ₂ ⁻	-5.908	AgCl ₃ ²⁻	-6.114
Ag(CN) ₃ ²⁻	-14.300	AgCl ₄ ³⁻	-7.187
Ag(CN)OH ⁻	-10.576	AgF[aq]	-10.650
Ag(HS) ₂ ⁻	-2.562	AgHS[aq]	-0.006
Ag(OH) ₂ ⁻	-17.214	AgI[aq]	-2.851
Ag ⁺	-7.165	AgI ₂ ⁻	-0.036
Ag ₂ MoO ₄ [aq]	-15.760	AgI ₃ ²⁻	-1.422
AgBr[aq]	-3.108	AgI ₄ ³⁻	-2.079
AgBr ₂ ⁻	-0.751	AgNO ₃ [aq]	-7.074
AgBr ₃ ²⁻	-0.695	AgOH[aq]	-12.185
AgCl[aq]	-5.238	AgSO ₄ ⁻	-6.387
AgCl ₂ ⁻	-4.681		

<Table 37>는 토양 용액 중 은(Ag) 화학종의 상대적 분포를 나타낸 것으로 토양에 유입된 은은 주로 할로젠족 원소와 HS⁻와 결합한 형태로 존재할 것으로 사료된다. 또한 토양 중 HS⁻, Br⁻, Cl⁻, I⁻ 이 존재시 은 이온과 결합하여 고형물의 형태로 존재하게 된다<Table 38>.

Table 37. 토양 용액 중 은 화학종의 상대적 분포

Component	% of total component concentration	species name
Ag ⁺	0.031	AgBr[aq]
	9.466	AgBr ₂ ⁻
	1.643	AgBr ₃ ²⁻
	0.056	AgI[aq]
	49.116	AgI₂⁻
	0.308	AgI ₃ ²⁻
	39.230	AgHS[aq]
	0.146	Ag(HS) ₂ ⁻

Table 38. 은 화합물의 Log IAP와 포화지수

Mineral	log IAP	Sat. Index (log IAP* log Ks)
ACANTHITE(AgH ₂ S)	-13.986	22.234
BROMYRITE(AgBr)	-7.708	4.592
CERARGYRITE(AgCl)	-8.548	1.202
IODYRITE(AgI)	-9.451	6.629

(2) 은 나노 소재와 토양 중 KCl의 반응

칼리비료 처리 시 은 나노 용액과 Cl⁻가 혼합되어 AgCl이 형성될 수 있으며 이에 대한 은 나노의 항균 효과를 검증 하고자 칼리비료의 기준 시비량(15kg/10a)에 근거하여 KCl을 토양500g에 각각 처리한 후 처리 전후의 은농도와 Cl⁻의 농도를 비교 분석하였다. 은 나노 용액과 KCl을 처리한 용액 중 침전물을 제외한 상등 용액의 은 농도는 다음과 같다<Table 39>.

Table 39. 은 나노 용액과 KCl을 처리한 용액 중 상등 용액의 은 농도(단위:mg L⁻¹)

		은 나노 용액 처리농도		
		25ppm	50ppm	100ppm
KCl 처리농도	18.64	9.91	41.34	90.20
	37.28	10.70	38.56	93.60

분석 결과 은 나노 용액의 농도는 KCl과 반응 후 은 나노의 농도에 상관없이 약 7 - 10 mg L⁻¹가량 줄어드는 것을 알 수 있었으며 줄어든 은이온은 처리한 KCl의 Cl⁻과 반응하여 침전물인 AgCl이 되는 것을 알 수 있었다. 은 나노와 KCl이 토양 중에서 나타내는 반응을 알아보기 위해 은 나노 용액과 KCl을 토양에 처리 하였으며 처리한 토양에서의 은 농도와 Cl⁻의 농도는 다음과 같다<Table 40., 41>.

Table 40. 은 나노 용액과 KCl을 처리한 토양의 은 농도 (단위:mg Kg⁻¹)

		은 나노 용액 처리농도		
		25ppm	50ppm	100ppm
KCl 처리농도	무처리	4.60	7.76	13.99
	18.64	1.37	2.99	9.66
	37.28	1.43	3.33	10.32

Table 41. 은 나노 용액과 KCl을 처리한 토양의 Cl⁻의 농도 (단위:mg Kg⁻¹)

		은 나노 용액 처리농도		
		25ppm	50ppm	100ppm
KCl 처리농도	무처리	4.15	4.15	4.15
	18.64	5.95	5.82	5.87
	37.28	7.32	7.89	7.54

분석 결과 토양에서의 은 농도는 KCl 처리 후 무 처리 구에 비해 $3 - 4 \text{ mg L}^{-1}$ 가량 줄어드는 것을 알 수 있었다. Cl^- 의 농도역시 KCl 처리 후 토양에서의 Cl^- 농도가 감소함을 알 수 있었다. 토양에 은 나노와 KCl을 각각 25 와 18.64 mg L^{-1} 처리했을 경우 Cl^- 의 농도가 22.79 mg L^{-1} 에서 5.95 mg L^{-1} 로 약 74% 정도 감소하였다. 이와 같은 결과를 바탕으로 토양에 칼리비료가 시용될 경우 은 나노와의 반응에 의해 침전이 일어날 것으로 예상된다.

(3) 은 나노 용액과 KCl 처리 토양에서의 미생물 Population

토양에 칼리비료를 시용할 경우 은 나노와의 반응에 의한 은 나노의 항균효과를 검증하기 위해 세균과 곰팡이의 population을 시간에 따라 모니터링 하였다. <Fig 29, 30>은 각각 은 나노와 KCl의 농도를 달리하여 토양에 처리한 후 박테리아와 곰팡이를 주입하여 시간에 따른 미생물의 군집수를 모니터링한 결과이다. 실험결과 박테리아의 경우 은 나노와 KCl을 함께 시용한 토양에서의 미생물 군집수가 은 나노만을 시용한 토양에서의 미생물 군집수보다 더 많음을 알 수 있었다. 은 나노 25 mg L^{-1} 을 처리한 경우 처음 3일 동안은 박테리아의 군집수 차이가 미비한 반면 5일이 경과한 후에는 은 나노와 KCl을 함께 시용한 토양에서의 박테리아의 개체수가 은 나노만을 처리한 토양에서의 박테리아 개체수에 비해 급속히 증가함을 알 수 있었다. 이는 은 나노와 KCl의 혼용에 의해 토양에 은의 침전물이 생성되어 은 나노의 효과가 다소 감소함으로써 박테리아의 개체수가 증가한 것으로 사료된다. 은 나노를 50 mg L^{-1} 처리하였을 경우에는 1일부터 은 나노와 KCl을 혼용한 처리구의 박테리아 개체수가 은 나노만을 처리한 토양에서의 박테리아 개체수보다 많았으며 시간이 지남에 따라 점차 감소하는 경향을 나타내었다. 은 나노를 100 mg L^{-1} 처리하였을 경우에는 25 mg L^{-1} 의 농도로 처리했을 때와 비슷한 경향을 나타내었다.

곰팡이의 경우, 은 나노와 KCl을 혼용한 처리구의 개체수와 은 나노만을 처리한 처리구의 개체수의 차이가 적음을 알 수 있었다. 이는 곰팡이의 경우 은 나노와 KCl의 반응에 의한 침전물 생성의 영향이 미비한 것으로 판단된다. 따라서 칼리비료 시용에 따른 은 나노의 효과는 박테리아에 대해서는 항균 효과가 저하되는 반면 곰팡이에 대해서는 항균 효과에 큰 영향이 없는 것으로 판단된다.

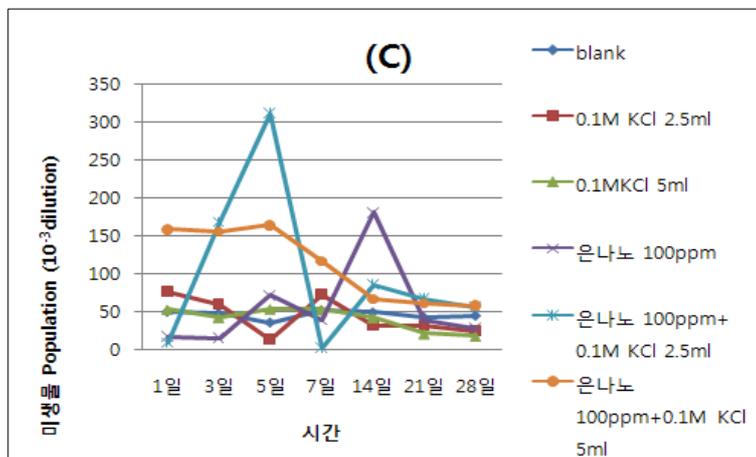
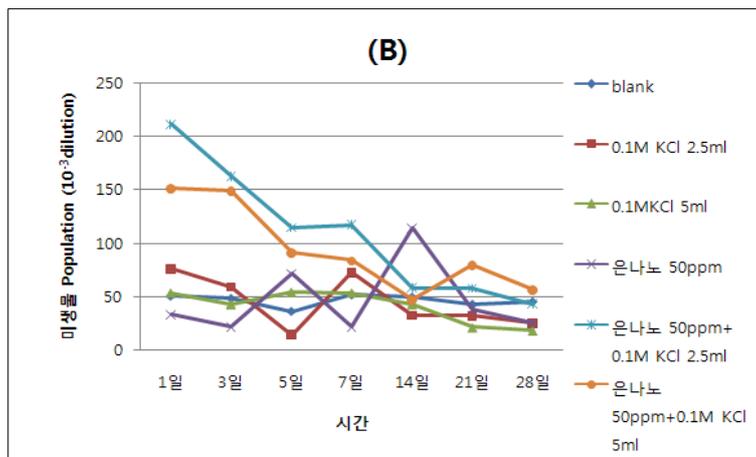
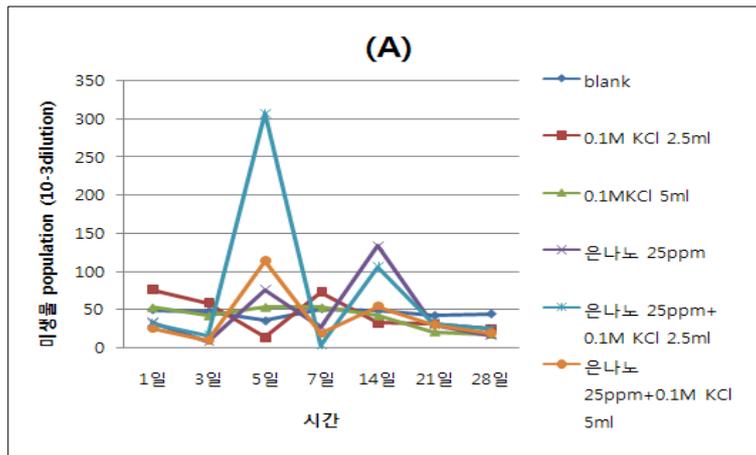


Fig 29. 은 나노와 KCl 혼용에 따른 시간별 박테리아의 개체수 (A) 은 나노 용액 25 mg L⁻¹, (B) 은 나노 용액 50 mg L⁻¹, (C) 은 나노 용액 100 mg L⁻¹,

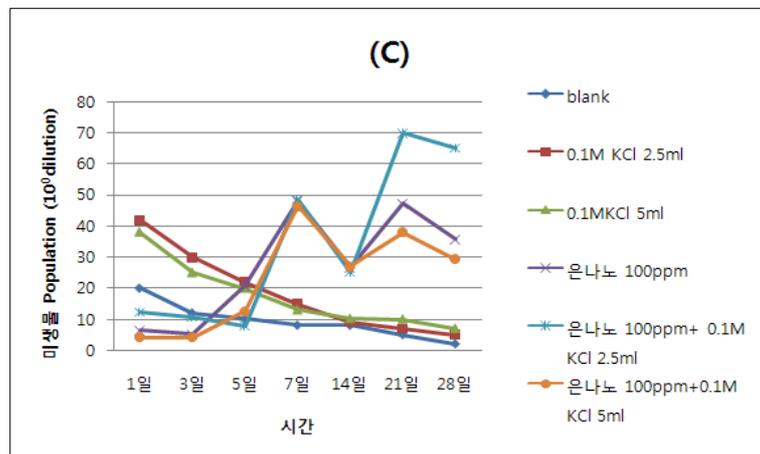
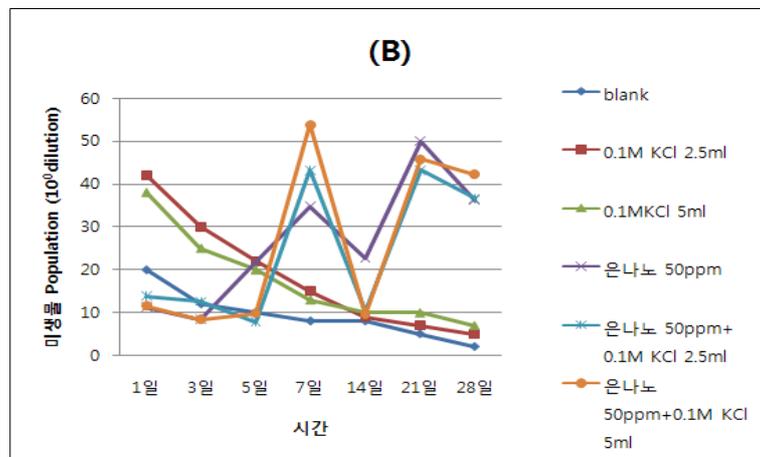
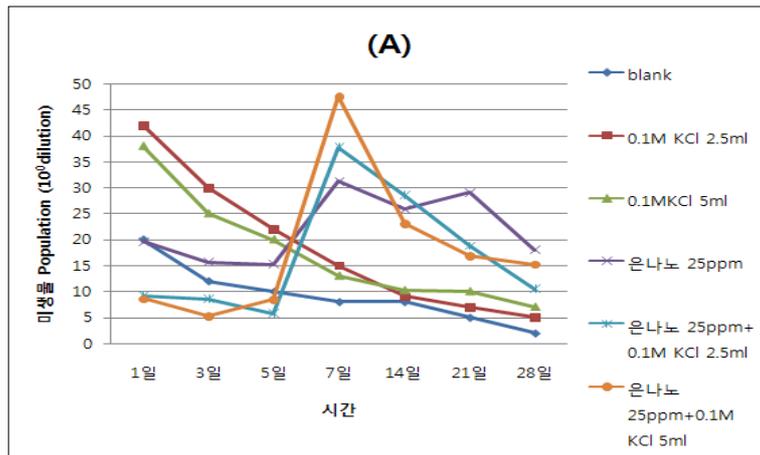


Fig 30. 은 나노와 KCl 혼용에 따른 시간별 곰팡이의 개체수 (A) 은 나노 용액 25 mg L⁻¹, (B) 은 나노 용액 50 mg L⁻¹, (C) 은 나노 용액 100 mg L⁻¹

(4) 토양 중 은 나노 용액의 흡착 Kinetics

Kinetic model은 물질이 특정 시간 후에 남아 있는 농도 및 일정 시간 후에 남게 될 농도를 규정할 수 있을 뿐 아니라 인간, 동물, 식물체 등으로 이동하기 전에 토양 중에서의 동태(fate)를

추정 가능하게 하기 때문에 매우 유용하게 활용될 수 있다(양 등, 1995).

물질의 화학반응속도는 반응에 참여하는 물질의 농도 및 온도, 시간과 같은 요인에 의해 영향을 받는다. 이러한 화학반응속도는 반응기작에 대한 본질적인 원리를 제공하는데 중요하다. 따라서 은 나노 용액과 토양의 상호작용을 충분히 이해하고 시간에 따른 Ag의 농도를 예측하기 위해서는 이들 반응의 kinetic을 파악해야 한다.

(가) 초기 은 나노 용액의 농도에 따른 영향

본 실험은 초기 은 나노 용액의 농도가 토양과의 흡착 반응에 어떠한 영향을 미치는지 알아보는 실험이었다. 반응온도 25°C에서 초기 은 나노 용액의 농도를 각각 30, 50, 100 mg L⁻¹으로 공시토양에 처리하여 시간에 따른 Ag의 농도변화를 조사하였다. <Fig 31~33>은 초기 은 나노 용액의 농도 변화에 따른 시간별 Ag의 농도 변화를 나타낸 것으로 각 초기농도에서 Ag의 농도는 시간에 따라 지수적으로 감소하는 것을 알 수 있었다. 초기 Ag의 농도가 30 mg L⁻¹ 일 때 90%의 은이 흡착된 시간은 SC(Sandy Clay), C(Clayey)에서 각각 30분, 1분 이내에 흡착되었으며, SL(Sandy Loam)에서는 72시간 동안 61% 이상 흡착된 것으로 나타났다. 초기 Ag의 농도가 50 mg L⁻¹ 일 때 90%의 은이 흡착된 시간은 SC, C에서 각각 3시간, 1분 이내에 흡착되는 것으로 나타났으며, SL에서는 72시간동안 52% 이상이 흡착된 것으로 나타났다. 초기 Ag의 농도가 100 mg L⁻¹ 일 때 90%의 은이 흡착된 시간은 SC, C에서 각각 6시간, 5분 이내에 흡착되었으며, SL에서는 72시간 동안 47%의 Ag이 흡착되었다.

<Fig 34~36>은 초기 Ag의 농도에 따른 Ag의 농도 변화를 일차반응모델(first order kinetic model)에 적용한 반응곡선(rate curve)을 나타내고 있다. 이 그림에서 직선의 기울기는 반응속도상수(k)를 나타내고 있으며, 그림에서 보듯이 Ag의 흡착 반응은 1분을 기점으로 반응속도 상수가 차이가 큰 다중일차반응(Multiple First Order)을 따랐다. 이는 반응 1분 전까지는 은 흡착이 순차적으로 일어나지만, 일정농도 이상이 흡착한 후에는 서로 경쟁적으로 흡착반응이 일어나기 때문인 것으로 사료된다.

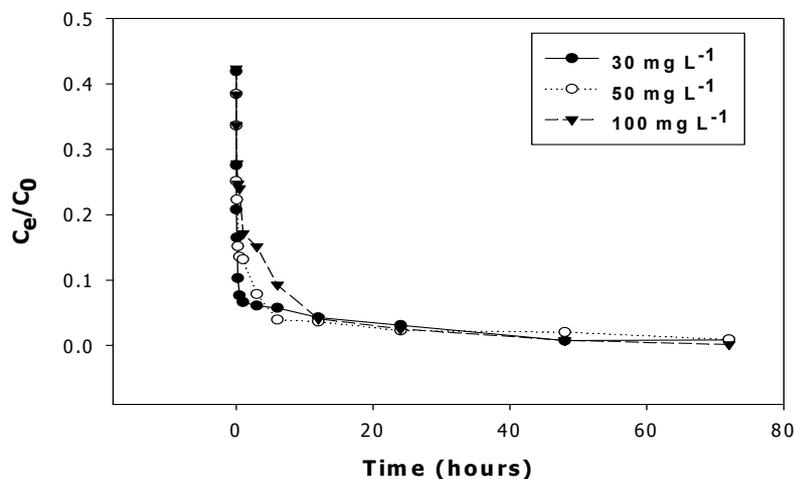


Fig 31. 용액의 농도 변화에 따른 SC의 시간별 Ag의 농도 변화

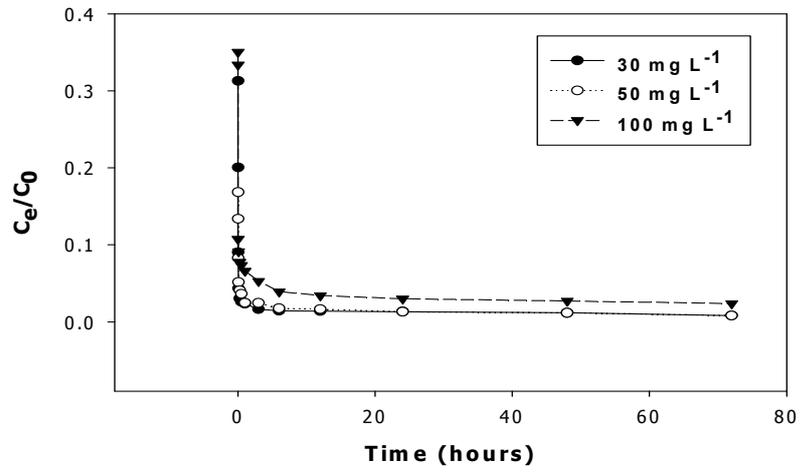


Fig 32. 용액의 농도 변화에 따른 C의 시간별 Ag의 농도 변화

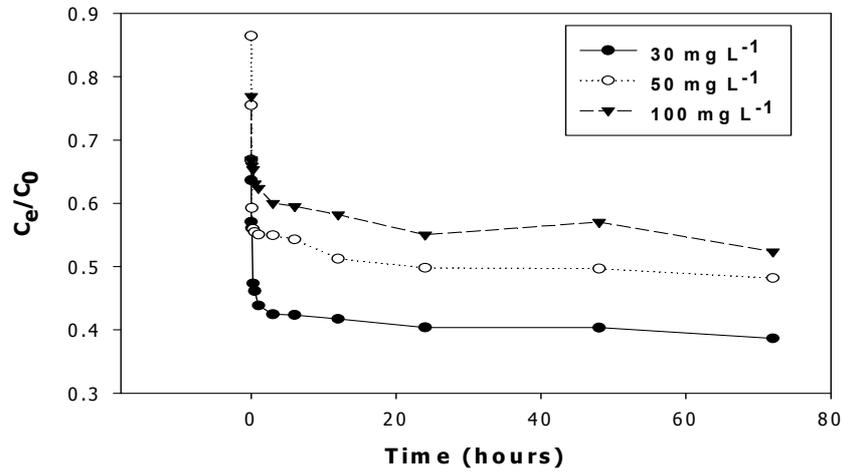


Fig 33. 용액의 농도 변화에 따른 SL의 시간별 Ag의 농도 변화

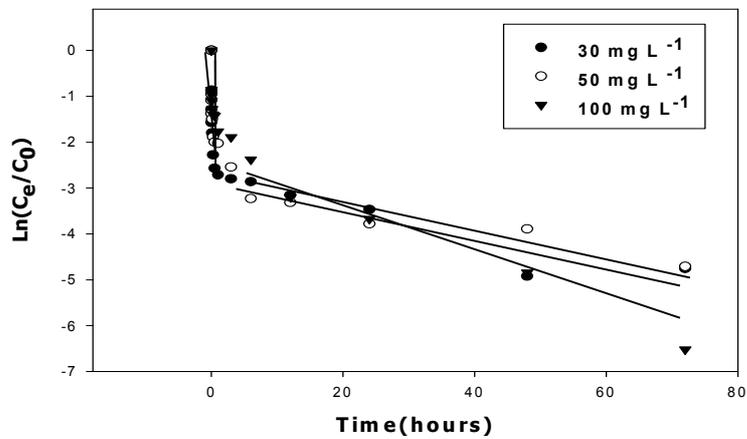


Fig 34. 용액의 농도 변화에 따른 SC의 시간별 Ag의 농도 변화의 일차반응모델에 적용한 반응 곡선

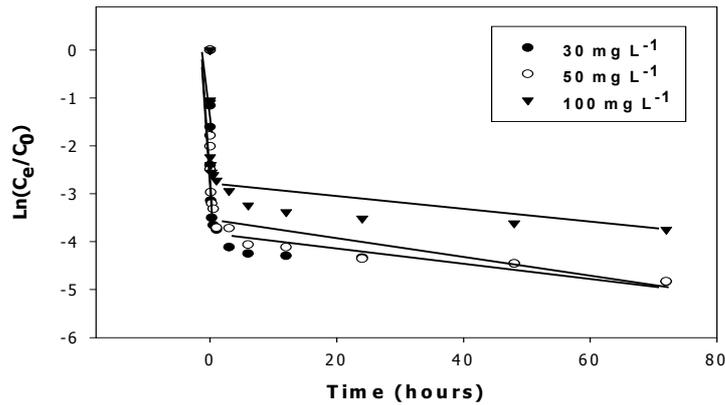


Fig 35. 용액의 농도 변화에 따른 C의 시간별 Ag의 농도 변화의 일차반응모델에 적용한 반응 곡선

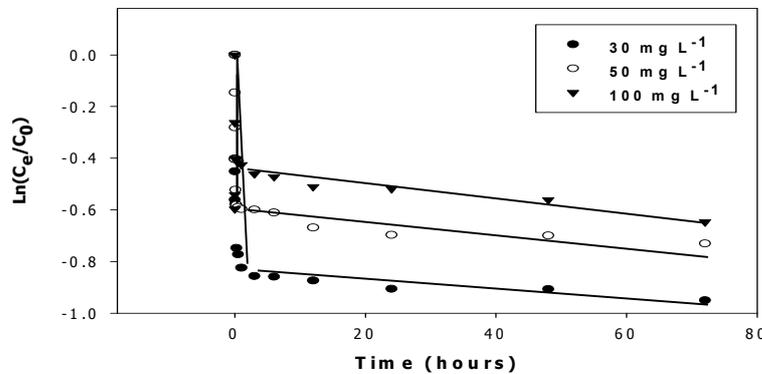


Fig 36. 용액의 농도 변화에 따른 SL의 시간별 Ag의 농도 변화의 일차반응모델에 적용한 반응 곡선

<Table 42> 는 토성과 초기 Ag 농도에 따른 Ag의 흡착 반응 속도를 다중일차반응모델 (Multiple First Order Kinetic Model)에 적용한 것 중 Step I에 대한 반응속도상수(k)와 관계식의 결정계수(r^2)를 보여주고 있다. 반응속도상수(k)는 회귀방정식의 기울기에 대한 절대값 으로서 k 값이 클수록 반응속도가 빠름을 의미한다. SC 토양에서는 초기 Ag의 농도가 증가할수록 반응속도상수(k)는 각각 89.921, 73.015, 56.080 h^{-1} 로 감소하였다. C 토양에서도 마찬가지로 135.59, 131.02, 123.75 h^{-1} 로 감소하였다. SL토양에서는 초기 Ag의 농도가 증가할수록 각각 29.459, 23.890, 35.170 h^{-1} 로 초기농도 100 mg L⁻¹ 처리구에서 반응속도상수(k)가 가장 높았다. 초기의 Ag의 농도가 감소할수록 Ag의 흡착 반응속도가 증가함을 알 수 있다. 이와 같은 결과는 토양의 단위 g당 흡착할 수 있는 Ag의 양은 제한되어 있기 때문으로 판단된다. 토성에 따른 반응속도상수(k)는 C > SC > SL으로 clay 함량이 증가할수록 흡착 반응속도는 증가하는 것으로 판단된다.

Table 42. 토성과 초기 Ag 농도에 따른 Ag의 다중일차반응모델(Multiple First Order Kinetic Model, Step I)

Soil Texture	concentration (mg kg ⁻¹)	Regression equation	r ²
SC	30	Y = -89.921X - 0.2913	0.8337 ^{N.S}
	50	Y = -73.015X - 0.3240	0.7553 ^{N.S}
	100	Y = -56.080X - 0.3179	0.6538 ^{N.S}
C	30	Y = -135.59X - 0.3052	0.9229*
	50	Y = -131.02X - 0.0336	0.9520 ^{N.S}
	100	Y = -123.75X - 0.1923	0.9320 ^{N.S}
SL	30	Y = -29.459X - 0.1389	0.7321*
	50	Y = -23.890X - 0.0336	0.9520*
	100	Y = -35.170X - 0.0938	0.8246 ^{N.S}

Y : ln(C_e/C₀), X : time (hour), *: significant at P<0.05, N.S : Non significant

<Table 43>는 토성과 초기 Ag 농도에 따른 Ag의 흡착 반응 속도를 다중일차반응모델(Multiple First Order Kinetic Model)에 적용한 것 중 Step II에 대한 반응속도상수(*k*)와 관계식의 결정계수(*r*²)를 보여주고 있다. SC 토양에서는 초기 Ag의 농도가 증가할수록 반응속도상수(*k*)는 각각 0.0354, 0.0348, 0.0660 h⁻¹로 나타났으며, C 토양에서는 반응속도상수(*k*)는 각각 0.0141, 0.0183, 0.147 h⁻¹, SL 토양에서는 0.0021, 0.0020, 0.0029 h⁻¹로 나타나 Step II의 경우 초기 Ag의 농도가 Ag 흡착 반응속도에 미치는 영향은 미미한 것으로 판단된다. 토성에 따른 반응속도상수(*k*)는 SC > C > SL로 나타났다.

Table 43. 토성과 초기 Ag 농도에 따른 Ag의 다중일차반응모델 (Multiple First Order Kinetic Model, Step II).

Soil Texture	Concentration (mg kg ⁻¹)	Regression equation	r ²
SC	30	Y = -0.0354X - 2.6241	0.9045***
	50	Y = -0.0348X - 2.3990	0.7942**
	100	Y = -0.0660X - 1.8381	0.9683***
C	30	Y = -0.0141X - 3.8714	0.7081***
	50	Y = -0.0183X - 3.6347	0.7512***
	100	Y = -0.0147X - 2.8741	0.6864**
SL	30	Y = -0.0021X - 0.8170	0.6537***
	50	Y = -0.0020X - 0.6039	0.8087***
	100	Y = -0.0029X - 0.4362	0.9155***

Y : ln(C_t/C₀), X : time (hour), ** : significant at P<0.01, *** : significant at P<0.001

(나) 반응 온도의 영향

일반적으로 반응온도가 증가함에 따라 반응속도와 효율이 증가한다고 알려져 있다. 본 실험에서도 동일한 조건에 대하여 반응온도가 토양과 은 나노 용액의 흡착 반응에 미치는 영향을 알아보기 위하여 반응온도를 15℃, 25℃, 35℃로 각각 다르게 처리한 후 시간별 Ag의 농도 변화를 조사하였다.

<Fig 37~39>는 반응 온도의 변화에 따른 시간별 Ag의 농도 변화를 나타낸 것으로 각 초기농도에서 Ag의 농도는 시간에 따라 지속적으로 감소하는 것을 알 수 있었다.

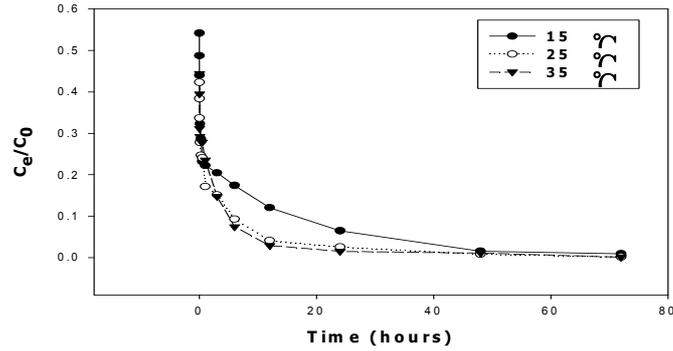


Fig 37. 반응 온도의 변화에 따른 SC의 시간별 Ag의 농도 변화.

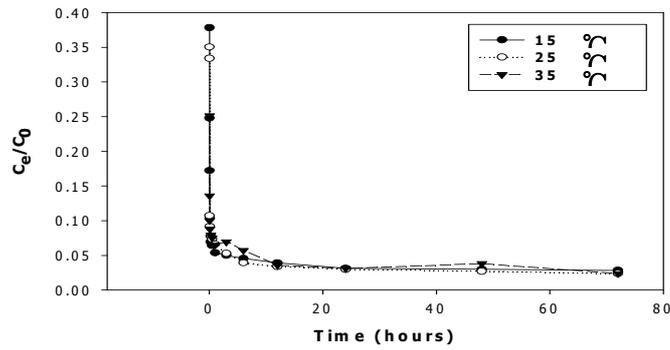


Fig 38. 반응 온도의 변화에 따른 C의 시간별 Ag의 농도 변화.

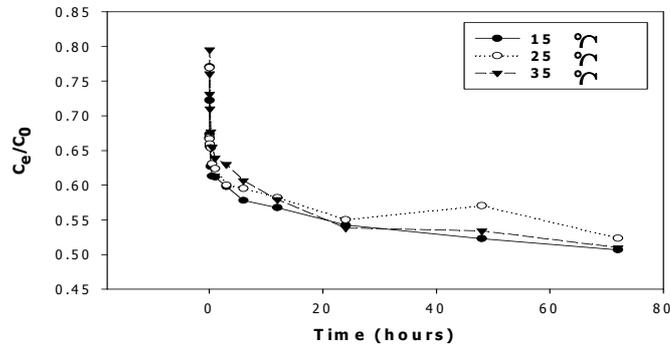


Fig 39. 반응 온도의 변화에 따른 SL의 시간별 Ag의 농도 변화.

<Figure 40~42>는 초기 Ag의 농도에 따른 Ag의 농도 변화를 일차반응모델(first order kinetic model)에 적용한 반응곡선(rate curve)를 나타내고 있다. 이 그림에서 직선의 기울기는 반응속도상수(k)를 나타내고 있으며, 그림에서 보듯이 Ag의 흡착 반응은 1분을 기점으로 반응속도 상수가 차이가 큰 다중일차반응(Multiple First Order)를 따랐다. 이는 반응 1분 전까지는 흡착이 순차적으로 일어나지만, 일정농도 이상이 흡착한 후에는 서로 경쟁적으로 흡착반응이 일어나기 때문인 것으로 사료된다.

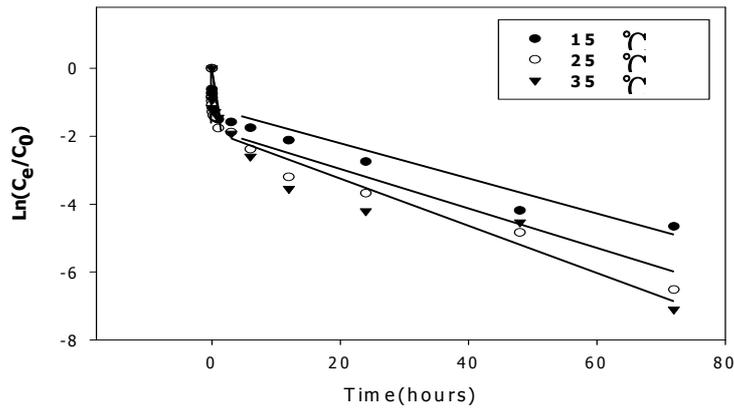


Fig 40. 반응 온도의 변화에 따른 SC의 Ag의 농도 변화를 일차반응모델에 적용한 반응곡선.

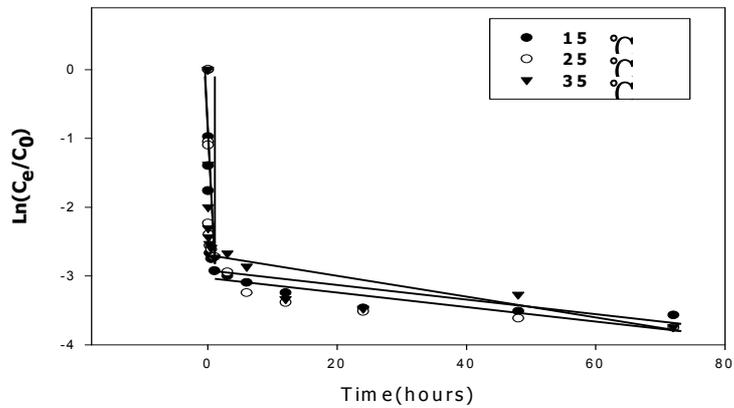


Fig 41. 반응 온도의 변화에 따른 C의 Ag의 농도 변화를 일차반응모델에 적용한 반응곡선.

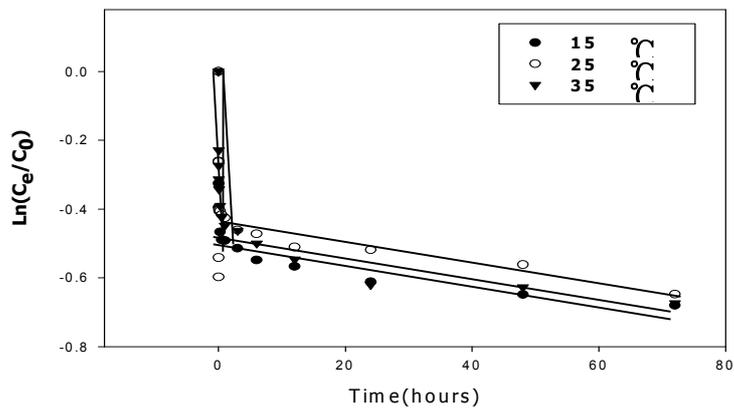


Fig 42. 반응 온도의 변화에 따른 SL의 Ag의 농도 변화를 일차반응모델에 적용한 반응곡선.

<Table 44>는 토성과 초기 Ag 농도에 따른 Ag의 흡착 반응 속도를 Multiple First Order Kinetic Model에 적용한 것 중 Step I에 대한 반응속도상수(k)와 관계식의 결정계수(r^2)를 보여주고 있다. 반응속도상수(k)는 회귀방정식의 기울기의 절대값으로서 k 값이 클수록 반응속도가 빠름을 의미한다. SC 토양에서는 반응 온도가 증가할수록 반응속도상수(k)는 각각 43.015,

56.080, 61.640 h^{-1} 로 증가하였다. C 토양에서도 마찬가지로 98.114, 123.75, 127.35 h^{-1} 로 증가하였으며, 반응 온도가 증가함에 따라 흡착반응속도도 증가하였다. SL 토양에서는 각각 21.249, 35.170, 16.483 h^{-1} 으로 25°C > 15°C > 35°C 순으로 나타났다. 토성에 따라서는 반응속도상수 (k)는 C > SC > SL 순으로 나타났다.

Table 44. 토성과 온도에 따른 Ag의 다중일차반응모델 (Multiple First Order Kinetic Model, Step I).

Soil Texture	Temperature	Regression equation	r ²
SC	15°C	Y = -43.015X - 0.2247	0.6887 ^{N.S}
	25°C	Y = -56.080X - 0.3179	0.6538 ^{N.S}
	35°C	Y = -61.640X - 0.2771	0.7504 ^{N.S}
C	15°C	Y = -98.114X - 0.3163	0.8458 ^{N.S}
	25°C	Y = -123.75X - 0.1923	0.9320*
	35°C	Y = -127.35X - 0.4907	0.7880 ^{N.S}
SL	15°C	Y = -21.249X - 0.0903	0.7687 ^{N.S}
	25°C	Y = -35.170X - 0.0938	0.8246 ^{N.S}
	35°C	Y = -16.483X - 0.0838	0.6997 ^{N.S}

Y : $\ln(C_e/C_0)$, X : time (hour), * : significant at P<0.05, N.S : Non significant

<Table 45>는 토성과 초기 Ag 농도에 따른 Ag의 흡착 반응 속도를 Multiple First Order Kinetic Model에 적용한 것 중 Step II에 대한 반응속도상수(k)와 관계식의 결정계수(r²)를 보여주고 있다. SC 토양에서는 반응 온도가 증가할수록 반응속도상수(k)는 각각 0.0487, 0.0676, 0.0734 h^{-1} 로 증가하였다. C 토양에서도 마찬가지로 0.0111, 0.0147, 0.0146 h^{-1} 로 증가하였으며, SL 토양에서도 0.0028, 0.0029 0.0035 h^{-1} 로 증가하였다. 반응 온도가 증가함에 따라 흡착반응속도도 비례적으로 증가하였다. 토성에 따라서는 반응속도상수(k)는 SC > C > SL 순으로 나타났다.

Table 45. 토성과 온도에 따른 Ag의 다중일차반응모델 (Multiple First Order Kinetic Model, Step II).

Soil Texture	Temperature	Regression equation	r ²
SC	15°C	Y = -0.0487X - 1.4597	0.9750***
	25°C	Y = -0.0676X - 1.7576	0.9651***
	35°C	Y = -0.0734X - 1.7391	0.9119***
C	15°C	Y = -0.0111X - 2.9287	0.7171**
	25°C	Y = -0.0147X - 2.8741	0.6864**
	35°C	Y = -0.0146X - 2.7511	0.7175**
SL	15°C	Y = -0.0028X - 0.5061	0.8697***
	25°C	Y = -0.0029X - 0.4362	0.9155***
	35°C	Y = -0.0035X - 0.4554	0.8001***

Y : $\ln(C_0/C_t)$, X : time (hour), ** : significant at $P < 0.01$, *** : significant at $P < 0.001$
 N.S : Non significant

(5) 은 나노 용액의 토양 중 흡착량

흡착이란 고체와 액체의 경계면에서의 물질의 이동과정을 결정하는 것으로 용액 중 물질이 정전기적 인력에 의해 흡착제 입자의 표면과 결합할 때 일어나는 화학반응이다(양 등, 2001). 흡착양상은 흡착물질의 이화학적 성질과 흡착제의 표면성질에 의하여 크게 영향을 받으며, 실험을 통해 흡착량을 파악하는 것은 실용적인 측면에서 매우 중요하다. 본 실험에서는 토성이 다른 3종류의 토양을 대상으로 은나노 용액을 처리하여 흡착량을 비교하였으며, 반응온도에 따른 흡착량의 변화를 살펴보기 위하여 15°C, 25°C, 35°C로 다르게 처리하여 실험하였다.

그림 43~45는 각각의 토양에서 반응온도 15°C, 25°C, 35°C에 따른 Ag 흡착량을 나타낸 것이다. 반응온도가 증가함에 따라 Ag의 흡착량이 증가함을 알 수 있다. 이 결과를 토대로 Langmuir 흡착식을 적용하여 최대흡착량(q_{max})을 산출하였다.

그림 46~48은 Langmuir 흡착식을 이용하여 온도에 따른 최대 흡착량을 구하기 위하여 곡선적합(Curve fitting) 한 것으로 기울기는 최대흡착량의 역수를 나타내는 것으로 기울기 값이 클수록 최대흡착량이 작다는 것을 알 수 있다. 즉 온도가 높을수록 기울기 값이 낮기 때문에 온도가 높을수록 최대흡착량이 큰 것을 알 수 있다.

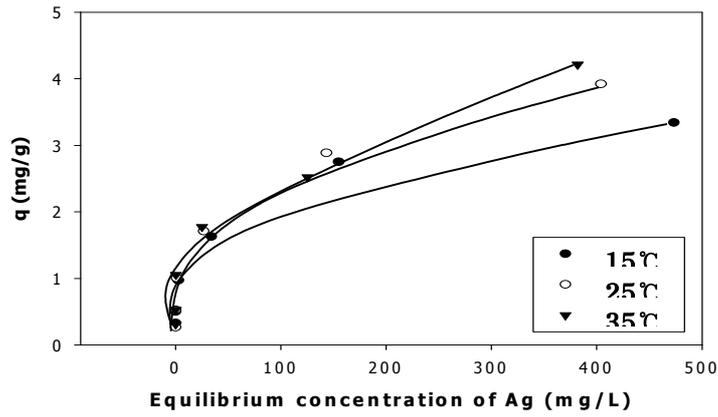


Fig 43. Isotherm model of Ag adsorption in SC soil at various temperatures.

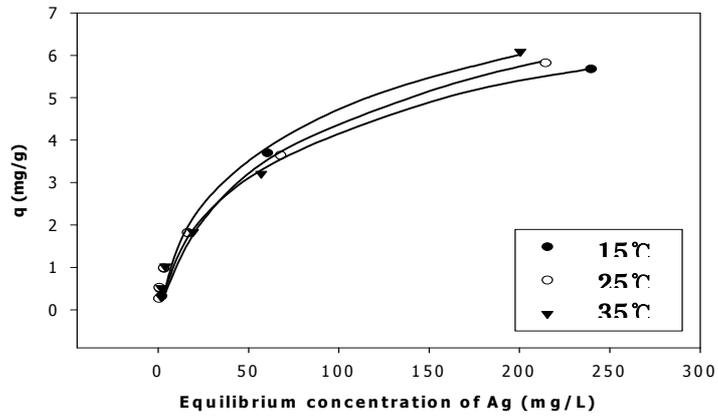


Fig 44. Isotherm model of Ag adsorption in C soil at various temperatures.

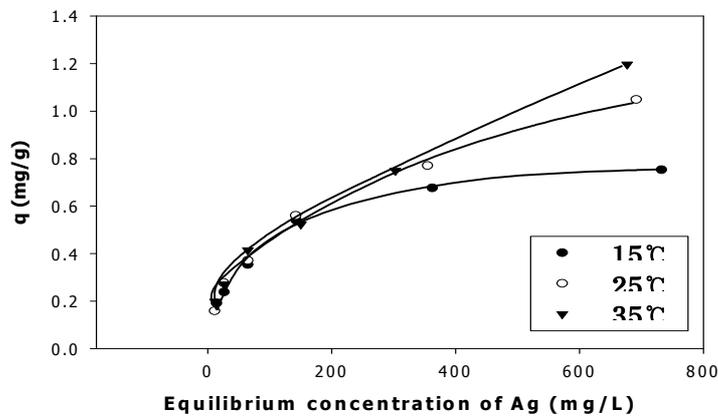


Fig 45. Isotherm model of Ag adsorption in SL soil at various temperatures.

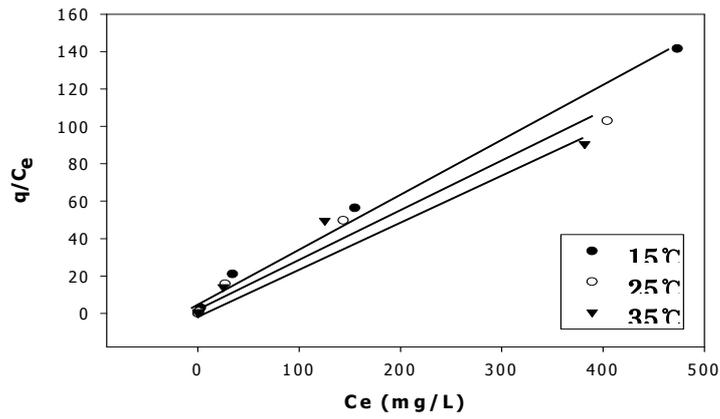


Fig 46. Fitted Langmuir adsorption isotherm of Ag in SC soil at various temperatures.

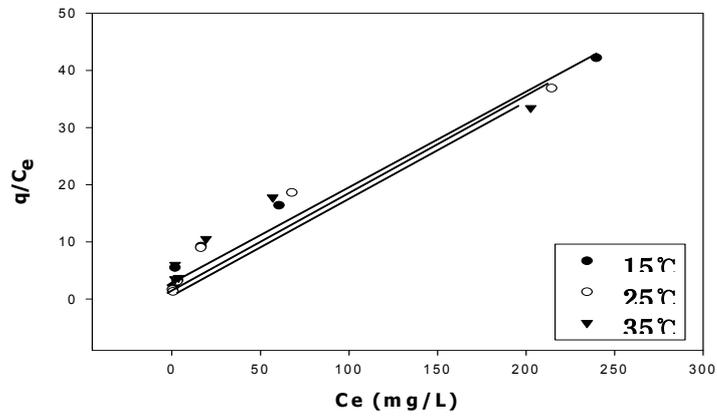


Fig 47. Fitted Langmuir adsorption isotherm of Ag in C soil at various temperatures.

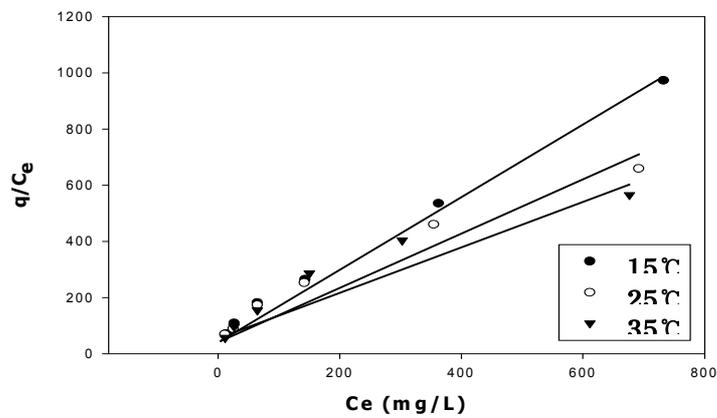


Fig 48. Fitted Langmuir adsorption isotherm of Ag in SL soil at various temperatures.

Table 46은 각 온도에서 토성에 따른 Ag 흡착량을 Langmuir Model에 적용하여 구한 흡착량(q)와 반응후 평형농도와의 결정계수(r^2)를 보여주고 있다. 최대흡착량(q_{max})은 회귀방정식의 기울기의 역수로서 기울기 값이 작을수록 흡착량이 많음을 알 수 있다. SC 토양에서는 반응 온도가 증가함에 따라 최대흡착량은 각각 3.39, 3.93, 4.20 mg g⁻¹으로 증가되었다. C토양에서는 각각 6.25, 6.17, 6.98 mg g⁻¹으로 증가되었으며, SL 토양에서도 0.82, 1.16, 1.35 으로 mg g⁻¹으로 반응온도가 증가됨에 따라 최대흡착량도 증가하였다. 토성에 따라서는 Clay 함량이 높은 C > SC > SL 순으로 최대흡착량이 많음을 알 수 있다.

Table 46. Langmuir equations of Ag adsorption at various temperatures.

Soil Texture	Temperatures	Regression equation	q_{max}	r^2
SC	15°C	$Y = 0.2954X - 4.2870$	3.39	0.9918 ^{***}
	25°C	$Y = 0.2544X - 3.9138$	3.93	0.9809 ^{***}
	35°C	$Y = 0.2382X - 4.8195$	4.20	0.9530 ^{***}
C	15°C	$Y = 0.1599X - 4.5344$	6.25	0.9837 ^{***}
	25°C	$Y = 0.1621X - 0.9620$	6.17	0.9620 ^{***}
	35°C	$Y = 0.1432X - 5.6582$	6.98	0.9499 ^{***}
SL	15°C	$Y = 1.2267X - 81.831$	0.82	0.9977 ^{***}
	25°C	$Y = 0.8607X - 99.589$	1.16	0.9692 ^{***}
	35°C	$Y = 0.7396X - 109.03$	1.35	0.9173 ^{**}

Y : C_e/q

X : C_e , equilibrium Ag concentration (mg/L)

q : mass of adsorbed Ag per unit weight of soil (mg/g)

q_{max} : maximum amount of Ag that can be adsorbed (mg/g)

** : significant at $P < 0.01$

*** : significant at $P < 0.001$

6. 적 요

은 나노 소재의 시용에 따른 토양의 물리·화학적 특성 변화 및 은 나노의 토양에 대한 흡착 특성을 규명한 후 토양의 화학적·생물학적 특성에 미치는 영향을 평가하기 위한 본 연구의 요약 및 결론은 다음과 같다.

토양 중 은 나노의 효율적인 추출을 위해 총 11가지의 추출제를 평가한 결과 2M-HCl 이 다른 추출제에 비해 회수율이 우수한 것으로 평가되었다. 토양에 은 나노를 각각 2 mg kg^{-1} 과 20 mg kg^{-1} 을 처리하여 회수율을 검정한 결과 2M-HCl의 경우 각각 86.3%와 88.0%의 회수율을 나타내 Aqua regia을 이용한 추출결과(82.5%와 84.8%)와 비슷한 회수율을 나타내었다.

실제 시설재배지에 은 나노 용액을 각각 25, 50, 100 mg L^{-1} 의 농도로 관주 처리하여 날짜별 토양의 화학성을 모니터링 한 결과 pH는 6.6 - 6.9 수준으로 시간에 따라 일정하게 나타났으며 EC, 유기물, 유효인산의 경우 시간에 따라 다소 감소하는 경향을 나타내었다. 질소 성분이나 양이온 성분 모두 시간에 따른 농도의 변화는 있었으나 일반적으로 은 나노 용액의 시용에 따른 시험 포장에서의 화학적 특성의 변화는 미비한 것으로 조사되었다.

실제 시설재배지에 처리한 은 나노 용액의 농도를 날짜별로 모니터링 한 결과 검출된 은의 농도는 약 $0.49 - 4.22 \text{ mg kg}^{-1}$ 정도였으며 최고 23.3 mg kg^{-1} 의 은 농도가 검출되었다. 시용한 은의 농도보다 낮은 농도의 은이 검출된 이유는 토양 중 음이온과 은은 결합에 의한 침전이 발생하여 은의 농도가 낮아진 것으로 사료된다.

토양에 은 나노 용액을 처리하여 토양의 질(Soil quality) 평가 항목을 스크린 한 후 은 나노가 토양에 영향을 미치는 화학적 특성과 생물학적 특성을 선별하였다. 은 나노 용액을 토양에 시용할 경우 영향을 미치는 토양의 화학적 특성은 pH, EC, 치환성 Ca, Al, 및 중금속 농도(Mn, Zn, Fe)등에 영향을 미쳤으며, 생물학적 특성 중에서는 토양 호흡에 가장 큰 영향을 미치는 것으로 분석되었다. 은 나노 용액을 처리함에 따라 pH와 EC의 경우 증가하는 경향을 나타내었으며, 치환성 칼슘 역시 은 나노의 처리에 따라 증가되는 경향을 나타내었다. 토양호흡(soil respiration)은 은 나노 용액을 처리함에 따라 감소하는 경향을 나타내었으며, 이는 은 나노 용액이 미생물의 활성에 영향을 미쳐 CO_2 발생량이 감소한 것으로 사료 된다. 따라서 은 나노소재의 토양 투입에 따른 토양 환경에 대한 영향 평가를 위한 토양 질 평가 항목으로는 pH, EC, 치환성 Ca, Al, 및 토양호흡 등을 고려해야 할 것으로 사료된다.

작물 재배시 생산량을 증대시키기 위해 시용되는 비료 중 칼리 비료에 함유되어 있는 염소(Cl^-)와의 침전반응에 의한 은 나노 용액의 항균성을 평가하기 위해 토양에 KCl과 은 나노 용액을 함께 시용하여 침전물의 생성 및 항균성을 검증하였다. 실험결과 토양에 은 나노를 25, 50, 100 mg L^{-1} 로 처리하였을 경우 처리 농도에 상관없이 은의 농도가 약 7 - 10 mg L^{-1} 가량 줄어들었으며 Cl^- 의 농도 역시 17 mg L^{-1} 가량 줄어들음을 알 수 있었다. 이는 은과 Cl^- 의 반응에 의한 토양 내 침전물의 생성에 기인한 것으로 판단된다.

은 나노 용액과 KCl을 함께 시용한 토양에서의 항균성 검정 결과 역시 박테리아의 경우 은 나노만을 시용한 토양에 비해 군집수가 훨씬 많음을 알 수 있었다. 일주일이 경과한 후 은 나노만을 시용한 토양에서의 박테리아 수는 약 25인 반면 은 나노와 KCl을 함께 시용한 토양에서의 박테리아 수는 은 나노의 농도에 따라 약 26, 120, 110 정도로 높음을 알 수 있었다. 이는 은 나노와 KCl의 반응에 의한 침전물 생성에 따른 은 나노의 항균성이 감소하였기 때문인 것으로 사료된다. 반면, 박테리아에 비해 곰팡이에서는 은 나노와 KCl의 혼용에 의한 항균성 감소가 미비한 것으로 조사되었다.

은 나노 용액의 토양에 대한 흡착 특성을 평가한 결과 은 나노 용액의 흡착 반응은 다중 일차반응 모델(multiple first order kinetic model)을 따름을 알 수 있었다. 이는 초기에 은 나노가 토양에 급속히 흡착된 후 시간에 따라 서서히 증가하는 경향을 나타내었다.

은 나노 용액의 토양에 대한 흡착은 토양 중 점토의 함량이 높고, 온도가 높으며, 초기

은의 농도가 낮을수록 빨리 일어남을 알 수 있었다.

본 연구를 통하여 은 나노 소재의 시용에 따른 토양의 특성 변화 및 토양 질에 미치는 항목을 평가함으로써 실제 은 나노 소재의 활용에 대한 기초 정보를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연도별 연구개발의 목표

구분	연도	연구개발의 목표	연구내용	연구범위
1차 년도	2006 - 2007	<제 1 세부과제>		
		<ul style="list-style-type: none"> ○ 병해 방제가 가능한 길항미생물의 활용 ○ 은 나노소재의 활용 가능성 확인 ○ 은 나노소재가 길항균의 생태적 특성에 미치는 영향 연구 ○ 은 나노소재에 의한 내성 병원균 발현가능성 조사 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 활용가능 길항미생물 선정 ○ 은 나노소재의 농도별, 형상별 항균활성 검정 ○ 은 나노소재의 살균성 기내 확인 및 포장 적용 가능성 확인 ○ 은 나노소재에 의한 내성 병원균 발현가능성 조사 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 병해 방제가 가능한 길항미생물의 활용 ○ 은 나노소재와 길항균의 적용 캘린더 작성을 위한 시험 수행 ○ 은 나노소재의 변이유발 가능성 조사 ○ 은 나노소재에 의한 내성 병원균 발현가능성 조사
		<제 2 세부과제>		
		<ul style="list-style-type: none"> ○ 은 나노소재 및 미생물의 시설재배 토양사용에 따른 토양개량 효과 평가 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 은 나노소재 및 미생물의 포장 적용에 따른 토양개량 효과 평가 ○ 은 나노소재 및 미생물 시용이 토양의 물리·화학·생물학적 특성 변화에 미치는 영향 평가 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 시설재배지의 토양 요소별 개량효과 평가 ○ 전기전도도, 질산태질소, 유효인산, 총 질소, 치환성 양이온 (Ca, Mg, K, Na), 양이온치환용량, 은 농도 등 분석

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용	연구범위
2차 년도	2007 - 2008	<제 1 세부과제>		
		○ 은 나노소재가 길항균의 생태적 특성에 미치는 영향 ○ 은 나노소재에 의한 내성 병원균 발현가능성 조사 ○ 은 나노 소재와 유용 미생물의 혼용 가능성 연구 ○ 은 나노소재와 길항균의 적용 캘린더 작성	○ 은 나노소재가 길항균의 생태적 특성에 미치는 영향 ○ 은 나노소재에 의한 내성 병원균 발현가능성 조사 ○ 은 나노 소재와 유용 미생물의 혼용 가능성 연구 ○ 은 나노소재와 길항균의 적용 캘린더 작성	○ 은 나노소재가 길항균의 생태적 특성에 미치는 영향 ○ 은 나노소재에 의한 내성 병원균 발현가능성 조사 ○ 은 나노 소재와 유용미생물의 혼용 가능성 연구 ○ 은 나노소재와 길항균의 적용 캘린더 작성
		<제 2세부과제>		
		○ 은 나노소재 및 미생물의 토양투여에 따른 시설재배지의 토양질 (Soil Quality) 평가체계 및 최소단위군 (MDS) 구축	○ 은 나노소재 및 미생물이 토양환경에 미치는 영향 평가를 위한 토양질 지표의 선정 및 토양질 지표 평가를 위한 최소단위군 (MDS, Minimum Data Set) 구축 ○ 은 나노소재 및 미생물 시용이 토양의 물리·화학·생물학적 특성 변화에 미치는 영향 평가	○ 화학적 질 지표 (Chemical Quality Index), 물리적 질 지표 (Physical Quality Index) 및 생물학적 질 지표 (Biological Quality Index)의 항목별 측정 주요인분석을 이용한 최소단위군 (MDS) 개발 ○ 시설재배지 토양 및 토양용액의 특성 분석

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용	연구범위
3차 년도	2008- 2009	<제 1 세부과제>		
		○ 은 나노소재가 길항균의 생태적 특성에 미치는 영향조사 ○ 은 나노소재에 의한 내성 병원균 발현가능성 조사 ○ 은 나노 소재와 유용 미생물의 혼용 가능성 연구 ○ 은 나노소재와 길항균의 적용 캘린더 작성 및 병해방제 실용화	○ 은 나노소재가 길항균의 생태적 특성에 미치는 영향조사 ○ 은 나노소재에 의한 내성 병원균 발현가능성 조사 ○ 은 나노 소재와 유용 미생물의 혼용 가능성 연구 ○ 은 나노소재와 길항균의 적용 캘린더 작성 및 병해방제 실용화	○ 은 나노소재가 길항균의 생태적 특성에 미치는 영향조사 ○ 은 나노소재에 의한 내성 병원균 발현가능성 조사 ○ 은 나노 소재와 유용미생물의 혼용 가능성 연구 ○ 은 나노소재와 길항균의 적용 캘린더 작성 및 병해방제 실용화
		<제 2 세부과제>		
		○ 은 나노소재 및 미생물의 시용에 따른 시설재배지의 토양질 변화 모니터링 및 평가 프로토콜 구축	○ 은 나노소재 및 미생물의 토양시용에 따른 토양질 지표의 시·공간적 변화 평가	○ 토양질 측정결과 및 PTF (Pedo transfer Function) 등을 이용한 시·공간적 토양질 (SQ)의 계량화

제 2 절 평가의 착안점 및 기준

구분	연도	세부연구개발 목표	가중치	평가의 착안점 및 기준
1차 년도	2006- 2007	<제 1 세부과제> ○ 병해 방제가 가능한 길항미생물의 활용 ○ 은 나노소재의 활용 가능성 확인 ○ 은 나노소재가 길항균의 생태적 특성에 미치는 영향 ○ 은 나노소재에 의한 내성 병원균 발현가능성 조사	60 %	- 나노소재 활용 - 내성병원균발현
		<제 2 세부과제> ○ 은 나노소재 및 미생물의 포장 적용에 따른 토양개량 효과 평가 ○ 은 나노소재 및 미생물 시용이 토양의 물리·화학·생물학적 특성 변화에 미치는 영향 평가	40 %	- 개량토양 평가 - 환경영향평가
2차 년도	2007- 2008	<제 1 세부과제> ○ 은 나노소재가 길항균의 생태적 특성에 미치는 영향 ○ 은 나노소재에 의한 내성 병원균 발현가능성 조사 ○ 은 나노 소재와 유용미생물의 혼용 가능성 연구 ○ 은 나노소재와 길항균의 적용 캘린더 작성	60 %	- 내성 유용미생물 선발 및 혼용 가능성 - 내성 병원균 발현 여부 - 적용캘린더 개발
		<제 2 세부과제> ○ 은 나노소재 및 미생물이 토양환경에 미치는 영향 평가를 위한 토양질 지표의 선정 및 토양질 지표 평가를 위한 최소단위군 (MDS) 구축 ○ 은 나노소재 및 미생물 시용이 토양의 물리·화학·생물학적 특성 변화에 미치는 영향 평가	40 %	- MDS 선정 - 영향평가
3차 년도	2008- 2009	<제 1 세부과제> ○ 은 나노소재가 길항균의 생태적 특성에 미치는 영향조사 ○ 은 나노소재에 의한 내성 병원균 발현가능성 조사 ○ 은 나노 소재와 유용미생물의 혼용 가능성 연구 ○ 은 나노소재와 길항균의 적용 캘린더 작성 및 방제 실용화	60 %	- 영향조사 - 내성균 혼용가능도 - 내성균 발형정도
		<제 2 세부과제> ○ 은 나노소재 및 미생물의 토양시용에 따른 토양질 지표의 시·공간적 변화 평가	40 %	- 토양질 지표 설정 및 평가
최종 평가		<제 1 세부과제> ○ 은 나노소재와 길항 미생물을 활용한 진균 병해 방제	60 %	- 은나노소재와 길항미생물을 활용한 병해방제
		<제 2 세부과제> ○ 은 나노소재 및 미생물의 토양시용에 따른 토양질 환경영향평가	40 %	- 환경영향 평가

제 3 절 연구개발 수행내용 및 목표달성도

가. 제 1 세부과제의 연구개발 수행내용 및 목표 달성도

목 표	연구개발 수행내용	달성도(%)
제 1차년도		
○ 병해 방제가 가능한 길항미생물의 활용	○ 병해방제에 길항균으로 활용이 가능한 미생물 선발	100
○ 은 나노소재의 활용 가능성 확인	○ 성상별로 서로 다른 3가지의 은나노 소재의 농도별 처리를 통해 시설재배지에서 작물에 병해를 유발시키는 세균과 곰팡이에 대하여 은 나노 소재의 활용 가능성을 확인	100
○ 은 나노소재가 길항균의 생태적 특성에 미치는 영향	○ 은나노 소재가 길항균을 포함한 유용미생물 및 각종 토양서식 미생물들의 생태에 미치는 영향을 조사	100
○ 은 나노소재에 의한 내성 병원균 발현가능성 조사	○ 은나노 소재와 혼용이 가능한 유용미생물을 선발한 후, 성상별로 서로 다른 3가지 은 나노 소재의 농도별 처리를 통해 내성균을 선발 하였으나 활용 가능성은 낮음	100
제 2차년도		
○ 은 나노소재에 의한 내성 병원균 발현가능성 조사	○ 은 나노소재에 대해 내성을 지닌 변이 균주를 선발 - 일부 균주의 경우 30-50ppm 범위에서 내성을 지닌 변이 균주를 선발 하였으나 활용 가능한 은 나노액 농도인 100-150ppm에서 내성을 지닌 균주의 선발은 가능치 않은 것으로 확인 되었음	100
○ 은 나노소재와 유용균의 적용 캘린더 작성	○ 은 나노소재와 유용균의 혼용을 통한 최적 적용 캘린더 작성 - 은 나노 소재와 유용균의 혼용이 가능치 않음이 확인됨에 따라 은 나노 소재만을 활용한 적용 캘린더의 작성	100
제 3차년도		
○ 은 나노소재와 길항균의 적용 캘린더 작성 및 병해 방제 실용화	○ 은 나노소재만을 활용한 적용 캘린더의 완성 및 실용화 - 오이 및 호박 흰가루병 병해 방제를 위해 흰가루병 병해 발생 2-3주 전에 은 나노액을 사용하여 낮은 농도의 은나노액으로 방제효과를 거둘 수 있음을 확인 하였고, 이를 실용화 할 계획임	100

나. 제 2 세부과제의 연구개발 수행내용 및 목표 달성도

목 표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
제 1차년도		
○ 은 나노소재의 시설재배 토양 시용에 따른 토양화학성 평가	○ 은 나노소재의 포장 적용에 따른 토양화학성 평가	100
○ 은 나노소재의 최적투여 비율을 정량화	○ 은 나노소재의 토양에서의 흡착 등온식 및 Kinetic model을 산출	100
제 2차년도		
○ 은 나노소재 및 미생물이 토양환경에 미치는 영향 평가를 위한 토양질 지표의 선정 및 토양질 지표 평가를 위한 최소단위군(MDS) 구축	○ 토성, pH, EC, 토양유기물 함량, 총질소, 유효인산, 치환성양이온, 중금속, soil respiration, Microbial Biomass C and N, Potentially Mineralizable N 분석을 통한 MDS 구축	100
제 3차년도		
○ 은 나노소재 및 미생물의 시용에 따른 시설재배지의 토양질 변화 모니터링 및 평가 프로토콜 구축	○ 환경 친화적 농업용 생물소재의 토양시용에 대한 guideline 제시	100
○ 은 나노소재 및 미생물 시용이 토양의 물리·화학·생물학적 특성 변화에 미치는 영향 평가	○ 농업용 생물소재의 사용에 따른 토양의 물리·화학·생물학적 변화에 대한 평가 및 환경영향평가를 위한 최소단위군 선정	100

제 4 절 관련분야에의 기여도

- 과 흑색썩음균핵병 병해 방제방법 개발
 - 과 흑색썩음균핵병 병해의 방제를 위해 은 나노액을 활용해 현장애로를 해결하고 농가에 기술 보급을 모색하고자 한다.
- 호박 및 오이 흰가루병 병해 방제 캘린더 작성 및 방제방법
 - 병해 발생 2-3주 전에 은 나노액을 사용하여 낮은 농도의 은 나노 액으로 방제효과를 거둘 수 있음을 확인 하였고, 이를 실용화 하여 친환경 농자재의 개발에 기여가 가능하다.
- 환경 친화적 농업용 생물소재의 토양시용에 대한 guideline 제시
 - 연구결과를 정책 자료로 활용해 환경 친화적 생물소재의 토양시용에 대한 guideline 제시
- 농업용 생물소재의 사용에 따른 토양의 물리·화학·생물학적 변화에 대한 평가 및 환경영향평가를 위한 최소단위군 선정
 - 연구결과를 정책 자료로 활용하여 토양의 변화에 대한 평가 및 환경 영향평가 지표마련

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구 성과

가. 논문게재 성과

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI 구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2006	Inhibition effect of nano-silver liquid(Nanover™) against various plant microorganisms	정희선	이윤수	김상우, 김영재, 김동은정, 민지선, 김동준, 윤학로, 박영학	The Plant pathology Journal	22(2): 180-181	국내	KSCI
2006	Effect of nano-silver liquid(Nanover™) on the colony growth of bacteria	김상우	이윤수	김은정, 민지선, 강현곤, 김승빈, 정무영, 유만수, 김동준, 윤학로, 한성만	The Plant Pathology Journal	22(4): 399	국내	KSCI
2006	Effect of nano-silver liquid(Nanover™) on the mycelial growth of plant pathogenic fungi	김상우	이윤수	김은정, 민지선, 김승빈, 정무영, 유만수, 김동준, 윤학로, 한성만	Mycobiology	34(4): 254	국내	KSCI
2007	Studies of the control effect of nano-silver liquid (Nanover™) against white rot of spring onion.	민지선	이윤수	Min, J. S., S. W., Kim, Y. J. Kim, Y. S. Lee, S. B. Kim, M. Y. Jung. 2007.	The Plant Pathology Journal	23(4): 338.	국내	SCIE
2007	Control of powdery mildew on squash with nano-silver liquid Nanover™ in the greenhouse	김상우	이윤수	Kim, S. W., J. S. Min, Y. J. Kim, Y. S. Lee, S. B. Kim, M. Y. Jung.	The Plant Pathology Journal	23(4): 336-337.	국내	SCIE
2007	Comparison of inhibition effects of nano-silver liquid (Nanover™) against powdery mildews on cucumber grown in different cultivation conditions	김상우	이윤수	Kim, S. W., J. S. Min, Y. J. Kim, Y. S. Lee, S. B. Kim, M. Y. Jung	The Plant Pathology Journal	23(4): 331.	국내	SCIE
2007	Effect™ of various Nanover™ liquid on the fungal growth <i>in vitro</i>	민지선	이윤수	Kim, S. W., J. S. Min, Y. S. Lee, S. B. Kim, M. Y. Jung, M. S. Yu, D. J. Kim, and H. R. Youn.	The Plant Pathology Journal	23(2): 122.	국내	SCIE
2008	Kim, S. W., Y. J. Kim, and Youn Su Lee. 2008. Growth inhibition of <i>Phytophthora</i> species with Nanover™. The	김상우	이윤수	Kim, S. W., Y. J. Kim, and Youn Su Lee	Plant Pathology Journal	24(2): 216.	국내	SCIE
2008	Effects of pre-treatment of Nanover™ for the control of powdery mildew of green pumpkin.	김영재	이윤수	Y. J. Kim, K. S. Kim, S. B. Kim, M. Y. Jung, and Youn Su Lee.	Research in Plant Disease	14(3): 257-258.	국내	
2008	Effective control of powdery mildews of cucumber with pre-treatment of Nanover™.	김영재	이윤수	Y. J. Kim, K. S. Kim, S. B. Kim, M. Y. Jung, and Youn Su Lee	Research in Plant Disease	14(3): 258.	국내	KSCI
2008	은나노 사용환경이 토양환경질에 미치는 영향평가.	박윤호	양재의	박윤호, 양재의, 이윤수, 옥용식, 김성철, 청주영	2008년도 한국토양비료학회 춘계 학술발표회 논문초록집	Pp. 107.	국내	KSCI

나. 특허 성과: 특허출원

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2009	은 나노액을 이용한 채소 흰가루병 병원균 방제방법	강원대학교 산학협력단	대한민국	10-2009-0041664					

다. 기술료 징수 현황: 해당 없음

기 징수액	당해연도 징수액	향후 징수액	합계

라. 사업화 현황: 해당 없음

사업화명	사업화내용	사업화 업체 개요				기매출액	당해연도 매출액	매출액 합계
		업체명	대표자	종업원수	사업화형태			

마. 인력활용/양성 성과

(1) 인력지원 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
11	2	2	7	-	9	2	0	0	11

(2) 장·단기 연수지원 성과: 해당 없음

장기 (2월 이상)		단기 (2월 미만)	
국내	국외	국내	국외

(3) 산업기술인력 양성 성과: 해당 없음

프로그램명	프로그램 내용	교육기관	교육 개최회수	총 교육시간	총 교육인원

바. 경제사회 파급효과

산업지원 성과 (단위 : 건)				고용창출 성과 (단위 : 명)		
기술지도	기술이전	기술평가	합계	창업	사업체 확장	합계
2	0	0	2	0	0	0

제 2 절 성과활용 계획

가. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	○ 파 흑색썩음균핵병 병해 방제방법
②	○ 오이 및 호박 흰가루병 병해 방제방법 - 병해 발생 2-3주 전에 은 나노액을 사용하여 낮은 농도의 은 나노 액으로 방제 효과를 거둘 수 있음을 확인 하였고, 이를 실용화 할 계획임
③	○ 환경친화적 농업용 생물소재의 토양시용에 대한 guideline 제시
④	○ 농업용 생물소재의 사용에 따른 토양의 물리·화학·생물학적 변화에 대한 평가 및 환경영향평가를 위한 최소단위군 선정

나. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복 제	외국기술 소화흡수	외국기술 개선개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해 결	정책 자료	기타
①의 기술		✓						✓		
②의 기술		✓				✓	✓			
③의 기술		✓							✓	
④위 기술		✓							✓	

* 각 해당란에 v 표시

다. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용 계획 및 기대효과
①의 기술	○ 과 흑색썩음균핵병 병해 방제방법 - 과 흑색썩음균핵병 병해의 방제를 위해 은 나노액을 활용해 현장애로를 해결하고 농가에 기술 보급을 모색하고자 함
②의 기술	○ 오이 및 호박 흰가루병 병해 방제 캘린더 작성 및 방제방법 - 병해 발생 2-3주 전에 은 나노액을 사용하여 낮은 농도의 은 나노 액으로 방제 효과를 거둘 수 있음을 확인 하였고, 이를 실용화 할 계획임
③의 기술	○ 환경 친화적 농업용 생물소재의 토양사용에 대한 guideline 제시 - 연구결과를 정책 자료로 활용이 가능함
④의 기술	○ 농업용 생물소재의 사용에 따른 토양의 물리·화학·생물학적 변화에 대한 평가 및 환경영향평가를 위한 최소단위군 선정 - 연구결과를 정책 자료로 활용이 가능함

라. 연구결과의 기술이전 조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심 기술명	오이 및 호박 흰가루병 병해 방제법		
이전형태	<input checked="" type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	- 천원
이전방식	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전 소요기간	2-3년	실용화 예상시기	2012
기술이전 시 선행조건	없음		

* 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성

* 기술이전 시 선행요건: 기술실시 계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)

* 실용화예상시기: 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

해외의 경우 국내의 경우와 마찬가지로 은 나노소재를 활용한 제품의 개발은 주로 의약학 용품분야, 일상생활 용품 분야, 건설업 분야, 인테리어 분야 등에 실용화가 이루어져 있는 상황이나 은 나노액을 활용한 식물병원균의 방제 분야는 아직 개념도 정립되어 있지 않은 단계에 있다. 따라서 해외의 경우 특히 북미지역의 미국과 캐나다 지역의 경우도 은 나노소재의 활용은 일상 생활용품 분야에서 활용되고 있는 것 이외에 식물병원균의 방제 분야는 아직 개념도 정립되어 있지 않은 상황이다.

제 7 장 참고문헌

Anderson. J. P. E. 1982. Soil Respiration. In Methods of Soil Analysis. Part 2, 2nd, p. 831–871, American Society of Agronomy, Inc/Soil Science Society Organization, America, Inc Publisher, Medison, Wisconsin, USA.

Avakyan, Z. A. (1967). Comparative toxicity of Heavy metals for certain microorganism, *Microbiology* 36: 366–369.

Bekku. Y, Koizumi. H, Oikawa. T, Iwaki. H, 1997. Examination of four methods for measuring soil respiration. *Applied Soil Ecology*. Vol. 5: 247–254.

Berger. T. J., J. A. Spadaro, S. E. Chapin, and R. P. Becker (1976). Electrically generated silver ions: quantitative effects on bacterial and mammalian cell. *Antimicrob. Agents Chemother* 7: 357–358.

Cecil, W. C., Charles, M. P., and Paul, W. K. (1962). “Bactericidal effect of low concentrations of silver,” *J. AWWA*. 54: 208~216.

Eberhart, M. E., M. J. Donovan, and R. A. Outlaw (1978). Abindio calculations of oxygen diffusivity in group IB transition metals, *Phys. Rev*. 46: 744–752.

Gonsalves K. E. , S. P. Rangarajan, J. Wang, 2000. Handbook of Nano structured Materials and Nanotechnology(Edited by H. S. Nalwa). Academic Press. Vol.1, p. 11–21.

Holan, Z. R., B. Volesky and I. prasetyo. 1993. Biosorption of cadmium by Biomass of Marine Algae. *Biotech. Bioeng*. 41:819–825.

Ivan, S. and Branka, S. S. (2004). “Silver nanoparticles as antimicrobial agent : A case study on *E. coli* as a model for gram–negative bacteria,” *J. Colloid Imterf. Sci*. 275: 177~182.

Jeong, H. S., Kim, S. W., Yeh, M. S., Lim, H. S., Kim, D. J., Youn., Han, S. M. and Lee, Y. S. (2005). Inhibition effect of Nano–silver Liquid (Nanover™) against various plant microorganism. International Meeting of the Federation of Korean Microbiological Societies. p272.

Jeong, Y. K., Y. J. Shin, and H. Back. (1998), Antibacterial effect of silver–coated toothbrush, *J. Korean Acad. Dent. Health*, 22, 347–355.

Khanna P. K., Narendra Singh. 2007. Insitu synthesis of silver nano–particles in polymethylmethlmethacrylate. *Materials Chemistry and Physics*. 104. 346–372

- Kim B. K. and C.J. Choi, 2002. *Machine and Materials*, 14, 16.
- Kim Jang Hoi (2004). Nano silver chemotherapeutic agents and its applications. *NICE*. 22(6): 655–660.
- Kim T. N. , Q. L. Feng, J. O. Kim, J. Wu, H. Wang, G. C. Chen, and F. Z. Cui, 1989. *J. Mater. Sci. Mater. Mwd*, 9, 129.
- Lee, K. L., Moyasar, T. Y., and Charles, P. G. (1989). "Efficacy of copper and silver ions reduced levels of free chlorine in inactivation of *Legionella pneumophila*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55(12): 3045–3050.
- Outlaw, R. A. and M. R. Davidson (1994). *SMALL ultrahigh vacuum Science and technology* A12.
- Rami Pedahzur, Ovadia Lev, Badri Fattal and Hillel I. Shuval (1995). "The inactivation of silver ions and hydrogen peroxide in the inactivation of *E. coli* : A preliminary evaluation of a new long acting residual drinking water disinfectant," *Water Sci. Technol.* 31(5–6): 123–129.
- Richard, L. D., and Samuel, F. E. (1997). "The development and functions of silver in water purification and disease control," *Catal. Today* 36: 107–114.
- Richard, L. W.(1963). "Review of the bactericidal effectiveness of silver," *J. AWWA*. 55: 881–996.
- Robert, B. T. and Charles, P. G. (1989). "The molecular mechanisms of copper and silver ion disinfection of bacteria and viruses," *CRC Crit. Rev. Environ. Cont.* 18(4): 295–315.
- Russell, A. D. and Hugo, W. B. (1994). "Antimicrobial activity and action of silver," *Prog. Med. Chem.* 31: 351–370.
- Sang. B. I., Hwang E. T., Lee., J. H., Chae. Y. J., Kim Y. S., Kim B. C., Gu. M. B. 2008. Analysis of the Toxic mode of Action by Silver Nano-Particles Using Stress-Specific Bioluminescent Bacteria. *Small*. 4(6):746–750.
- Skogley, E .O. and A. Dobermann . 1996. *Synthetic Ion – Exchange Resin : Soil and Environmental Studies*. *J. Environ . Quality*. 25:13– 24.
- Sparks, D.L. 1986, *Soil physical chemistry*. CRC Press. pp. 308.
- Wachs, I. E. and R. J. Madix (1978). The oxidation of methanol on a silver catalyst *Surf. sci.* 76: 531–538.
- SSSA and ASA. 1996. *Methods of soil analysis, Part 2 : biological methods*.

SSSA and ASA. 1996. Methods of soil analysis, Part 3 : chemical methods.

Thurman R. B. and C. P. Gerba. 1989. the Molecular Mechanism of silver Ion Disinfection of Bacteria and Viruses. Proc, 1st. Int. Conf. on Gold and silver in Medicine, 8, 295, Washington, U.S.A.

USDA. 2006. Soil Biology and Land Management. Soil Quality–Soil Biology Technical Note No.4.

강환열, 정명주, 정영기 (2000). “금속 은으로 제조한 Ag^+ 용액의 항균 효과와 안정성,” 한국생물공학회지 15(5): 521–524.

김지연, 김성은, 김재은, 이종찬, 윤제용, 2005. 은 이온과의 비교를 통한 나노 은 입자의 항균 특성 연구. 대한환경공학회지 27(7) 771–776.

김영호. 2003. PVP 존재 하에서 알콜환원법에 의한 은 나노입자 콜로이드 제조에 있어서 제타전위의 영향. J. Korean Ind. Eng. Chem. 14(4) 487~492.

농업과학기술원. 2000. 토양 및 식물체 분석법.

송호연, 김영희, 고광균, 오익현, 이병택. 2006. 은 나노 입자의 항균기전과 항균제 응용을 위한 *In vivo* 실험. 대한금속·재료학회지 44(6) 412–417.

양재의, 이규승. 2001 농업환경. 한국환경농학회

임운택, 최형기, 안용현 (2001). “Ag-Hydroxyl Apatite를 담지한 기능성 플라스틱의 항균 성능 평가,” 한국생물공학회지 16(2): 123–127.

조경환, 박수길 (2004). “초음파법으로 제조된 은 나노 입자의 항균특성 연구,” 한국공업화학회지 15(8): 952–955.

정희선, 김상우, 여민섭, 임현식, 김영재, 김은정, 민지선, 이윤수. 2005. 다양한 식물 미생물에 대한 Nano-silver liquid(Nanover™)의 방제 효과. 강원대학교 농업 과학연구소 논문집 제16집 : 125–133.

日本土揚微生物研究會. 2002. 토양미생물 실험법. 월드사이언스. pp. 392–394.

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.