

115088-
2

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

11-1543000-002224-01

젤라틴
분해능이
우수한
신규
균주를
활용한
항선충제
개발
최종
보고
서

젤라틴 분해능이 우수한 신규 균주를 활용한 항선충제 개발 최종보고서

2018. 04. 05.

주관연구기관 / 한국생명공학연구원
협동연구기관 / (주)한국스테비아

2018

농림축산식품부

농림식품기술기획평가원

농림축산식품부

농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

'젤라틴 분해능이 우수한 신규 균주를 활용한 항성총제 개발'(연구개발 기간 : 2015.12.18. ~ 2017.12.17.) 과제의 최종보고서 9부를 제출합니다.

2018.04.05.

주관연구기관명 : 한국생명공학연구원 (대표자)
협동연구기관명 : (주)한국스테비아 (대표자)
참여기관명 : (대표자)



주관연구기관책임자: 이 승 웅
협동연구기관책임자: 이 민 희
참여기관책임자:

농림축산식품부 훈령 제18조에 따라 최종보고서 열람에 동의합니다.

요약문

연구의 목적 및 내용	<p><연구개발 목표> 본 연구개발의 최종목표는 유용 미생물 자원을 활용하여 뿌리혹선충 방제용 친환경 방제제를 개발하고 산업화하는 것으로, <i>in vivo</i> 실험을 통하여 성공적인 미생물 제제를 개발하고 새로운 시장창출의 성공모델을 제시하는 것을 최종 목표로 함</p> <p><연구개발 내용></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 항선충 방제용 미생물소재 연구 <ul style="list-style-type: none"> - 미생물 처리에 따른 항선충 활성 검증: 젤라틴 분해 효소 조사 - 유용 미생물의 선충 알 파괴 및 선충 표피 파괴 활성 검증 - 포트에서 작물 생육 및 선충억제 활성 검증 - 도출된 미생물 추출물에 대한 활성지표물질 분리 및 구조동정 - LC/PDA 또는 LC/MS를 이용한 활성지표성분의 정성 및 정량 분석 ○ 산업화를 위한 제형화 및 안정성 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 유용 미생물의 수용성 분말화 - 동결건조 또는 spray dry 조건 확립 - 미생물 생균수 변화조사 및 안정성 조사 ○ 시험포 및 현장시험 <ul style="list-style-type: none"> - 작물의 생육효과 - 뿌리혹선충 방제 효과 ○ 제품의 인증 및 등록 <ul style="list-style-type: none"> - 비효 및 비해시험 - 비료 및 유기농자재 인증
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> • 특허 - 출원 2건 • 사업화 - 2건 • 비료 및 유기농자재 인증을 위한 자료 확보(12건 보고서) • 논문 - 1건 • 학술발표 - 2건 • 교육/지도 - 5건 • 생물자원 - 3건 • 인력양성 - 3명 • 식물병원성 뿌리혹선충 방제 미생물제 개발을 위한 균주 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 젤라틴 분해 미생물 개발 및 방제 효과 검증 - 살선충 미생물 개발 및 방제효과 검증 - 젤라틴 및 살선충 미생물의 혼합 균주를 이용한 방제 효과 검증 - 공격접종법을 활용한 혼합균주의 효능 검증: 토마토, 고추, 수박 - 현장 적용 시험: 수박, 멜론, 단호박 - 토양 내 선충 및 미생물 분포 분석을 통한 항선충 미생물의 효능 검증 • 산업화를 위한 제형화 및 안정성 <ul style="list-style-type: none"> - 산업용 배지 조성 및 대량 배양 최적화 - 제형화를 위한 동결보호제 및 부형제 선정 • 제품 인증 및 등록 <ul style="list-style-type: none"> - 제형화된 시제품을 균주동정, 유효균수, 오염미생물, 중금속, 비해시험

	<p>완료</p> <ul style="list-style-type: none"> - 경구병원성 시험, 경피시험, 어류영향독성시험, 피부자극시험, 안점막자극성시험 등의 독성시험 완료 - 약해시험 및 약효시험 완료 				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> • 학문적 기술적 측면 <ul style="list-style-type: none"> - 뿌리혹선충 피해경감을 위한 친환경 방제기술 보급 - 토양 병해 방제 기작 구명을 통한 효과적인 뿌리혹선충 방제법 개발 - 미생물 대량배양기술 및 제형화 기술 개발을 통한 유용 미생물 산업화 시스템 개발 - 키틴 및 젤라틴 분해 효소 활성을 나타내는 미생물의 항선충용 방제제로 개발 - 유용 미생물 분리 및 기능규명으로 국내자원 보존 및 우수자원 산업화 • 경제 산업적 측면 <ul style="list-style-type: none"> - 연간 국내에서 소비되는 살선충제 시장은 약 700억원으로, 수입대체 효과를 기대할 수 있음 - 뿌리혹선충 방제용 미생물의 산업화 공정 확립을 통한 미생물 산업화 기술 확보 및 친환경 농산물 수확 증대로 양질의 친환경 농산물 공급 확대 - 친환경 농가 소득 증대 및 친환경 농업 보급 확대가 기대 - 천연자원을 이용한 생물농약 개발로 친환경 농업 활성화, 고부가가치성 친환경농산물 생산에 기여하여 농가소득 증대 - 화학농약 사용량 저감을 통한 환경 개선 효과 및 국민 건강 증진 - 미생물제제 산업화를 통한 친환경적 생물산업 육성기반 구축에 이바지 - 합성농약 대체물질 사용으로 유기 농산물 생산의 친환경적 관리체계 구축으로 농업 생태계 보호 - 고품질 안전 유기농산물 생산으로 생산자와 소비자의 요구 충족 				
국문핵심어 (5개 이내)	뿌리혹선충	미생물	현장연구	상품화	친환경 생물농약
영문핵심어 (5개 이내)					

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	6
2. 연구수행내용 및 성과	12
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	47
4. 연구개발성과의 활용 계획 등	49
붙임. 참고 문헌	50

<별첨> 주관연구기관의 자체평가 의견서

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

- 본 연구개발의 최종목표는 유용 미생물 자원을 활용하여 뿌리혹선충 방제용 친환경 방제제를 개발하고 산업화하는 것으로, *in vivo* 실험을 통하여 성공적인 미생물 제제를 개발하고 새로운 시장창출의 성공모델을 제시하는 것을 최종 목표로 함
 - 식물기생선충 방제소재 개발
 - 산업화를 위한 제형화 및 안정성 확립
 - 시험포 및 현장시험
 - 제품의 상용화 및 유기농자재 등록

1-2. 연구개발의 필요성

■ 연구개발의 과학기술, 경제적 중요성

- 우리나라 시설재배지의 약 54%가 뿌리혹선충에 감염되어 있으며, 감염에 의해 전체 원예작물 생산량의 15% 이상의 수량을 감소시키는 것으로 알려져 있음
- 뿌리혹선충은 직접적으로 작물에 피해를 줄 뿐만 아니라 간접적으로 토양병원균들의 식물체 침입을 증대시켜 2차적으로 다른 병해 유도하는 것으로 알려져 있음
- 화학적 방제는 농자재에 의한 재 오염 발생, 높은 독성과 긴 잔류 기간으로 인한 토양 생태계 불균형, 화학농약에 대한 내성 증가 등 환경적인 문제를 야기함

<뿌리혹선충에 의한 농작물의 피해>

- 뿌리혹선충은 식물에 직접적인 피해를 미칠 뿐만 아니라 간접적으로 바이러스, 박테리아, 곰팡이 등의 병원체가 쉽게 침입할 수 있게 만들어 복합 병을 유발 농작물 생산에 영향을 줌
- 선충의 피해증상은 주로 생육억제와 잎의 황화와 같은 영양결핍 증상으로 나타나는데 이러한 증상은 곰팡이 병이나 해충에 의해서 발생하는 피해와는 다르게 선충의 피해로 진단하기 어려워 피해는 막대하지만 연구는 부족한 실정임
- 뿌리혹선충은 식물에 막대한 피해를 입히는 선충 중에 하나로 식물이 쇠약해져 수량이나 품질이 떨어지는 직접적인 피해와 피해 받은 뿌리가 물이나 양분을 효과적으로 흡수가 어려워 더 많은 비료와 관수가 필요하게 되어 재배비용이 증가하게 됨
- 또한 선충은 작물에 직접적인 병해와 더불어 식물바이러스 매개체로 작용하므로 검역대상이 되어 농산물의 수출입의 제한을 받는 주범이 되기도 함
- Meloidogyne속 뿌리혹선충의 감염은 식물뿌리에 아주 반응성이 심한 산소 라디칼의 출현을 가져오는데 이는 독성 중간체를 형성하여 식물에 산화 스트레스를 가져옴. 기생충 선충이 세포에 침입한 식물들은 광합성 과정과 호흡관계에 압박을 받는 경우도 있음
- 시설재배지에서 연작을 하고 있는 과채류는 뿌리혹선충 피해가 심하여, 연중기온이 높아



고구마 뿌리혹 선충 피해



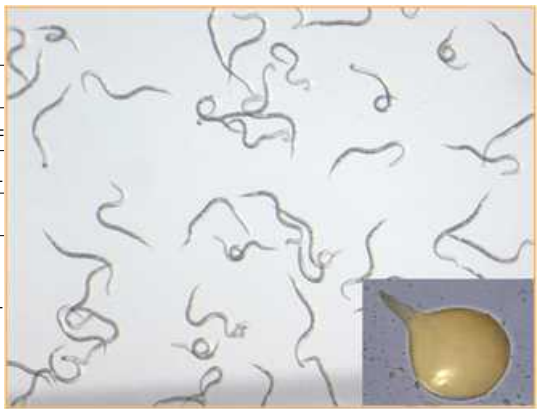
토마토 뿌리혹 선충 피해 (시들음)

지는 우리나라는 앞으로 뿌리혹선충의 피해가 계속 늘어나 살선충제를 처리하지 않으면 재배가 거의 불가능할 것으로 예상됨

- 특히 딸기재배지의 40%가 선충에 감염되어 재배지의 70%에 살선충제가 처리되고 있으며, 땅콩재배지 360,000 ha가 뿌리혹선충에 감염되어있으며 연간 8천만 달러의 피해가 발생하고 있음
- 경북 성주 시설참외재배지는 뿌리혹선충병의 피해로 40~50%의 수량 감소로 년 57억원의 손실을 주고 있음
- 농작물의 선충피해액은 전 세계적으로 연간 800~1,000억 달러로 추정되며, 미국에서 1년에 90억달러, 개발도상국에서는 선충에 대한 피해가 더 크게 발생하고 있음.
- 따라서 선충 피해를 최소화 할 수 있는 친환경 방제제의 필요가 절실하게 요구되고 있는 실정임

<뿌리혹선충 방제 및 문제점>

- 70종 이상의 식량작물, 원예작물, 목본류등에 경제적으로 큰 피해를 입히는 것은 *Meloidogyne* 속 선충은 고구마뿌리혹선충(*Meloidogyne incognita*), 땅콩뿌리혹선충(*M. arenaria*), 당근뿌리혹선충(*M. javanica*) 및 자바뿌리혹선충(*M. hapla*) 등 4종이 알려져 있음
- 뿌리혹선충의 방제는 화학적 방제(살선충 약제방제), 물리적 방제(태양열소독, 온탕 침지법), 경종적 방제(토양개량, 객토, 답전윤환, 저항성 품종의 육종, 저항성 윤작, 유인식물 재배), 생물적 방제(살선충 천적) 등의 다양한 방법들이 적용되고 있음
- 화학적 방제에 사용되는 살선충제인 훈증제, 액체살선충제는 토양, 물, 농기구 등에 의해 재오염이 발생하며, 높은 독성과 긴 잔류 기간으로 인해 토양 생태계 불균형과 같은 환경 문제를 발생시키므로 근본적인 방제는 아닌 것으로 인식되고 있음. 특히 화학농약에 대한 내성을 키우는 결과를 가져옴
- 특히 유기합성농약들의 인체 및 자연 환경에 미치는 악영향이 밝혀지면서 Aldicarb, Fenamiphos, Methyl bromide, DBCP, EDB등 효과 좋은 살선충제들의 등록이 취소됨. 따라서 이런 농약을 대신할 수 있는 친환경 제제들이 절실히 요구되고 있음
- 선충의 유충을 공격하는 포식성곰팡이에 대한 연구대신에, 접종원이 되는 선충의 알이나 암컷을 직접 공격하는 기생성곰팡이(egg parasitic fungi)들이 주가 되고 있음
- 최근 친환경적인 측면에서 저항성 품종 재배, 천적을 이용한 생물적 방제, 살선충 물질을 함유한 식물추출물을 이용하여 방제하는 방법 등 친환경적이고 특이한 작용 기작을 가진 새로운 살선충 물질 탐색을 탐색하는 연구들이 진행되고 있음
- 살선충 효과가 있는 고삼추출물, wild sesame seed oil, aldehyde, ketones & linolenic acids 등의 상품과 선충의 천적으로 알려진 바이러스, 리케차, 무척추동물, 세균, 포식성곰팡이, 기생성곰팡이 등이 보고되고 있으나, 곰팡이나 세균을 이용한 선충방제의 가능성이 가장 높을 것으로 예측됨
- 시중에서 판매되는 대부분의 미생물제제는 확실한 실험결과를 제시하지 못한 것이 태반으로 효과가 없는 작물에 살포하는 일이 많아 효과를 보지 못해 유기농자재에 대한 소비자의 불신으로 이어짐으로 이와 같은 문제를 해결하기 위해 맞춤형 유기농자재의 개발이 필요함



뿌리혹선충의 유충과 성충

<선충천적>

종류	Species
바이러스	단지 2종 보고
리케차	단세포의 막대형, 이분법 번식
무척추동물	Mononchus spp. (포식성선충), Lesioseius kinikini (응애), Tardigrade (완보류) Theratomyxa weberi (마메바), Onychiurus armatus (톡토기)
세균	Pasteuria penetrans (순활물기생), PGPR
기생성곰팡이	Catenaria spp., Myzocytiium spp., Harposporium spp., Paecilomyces lilacinus Pochonia (=Verticillium) chlamydosporium Dactylella oviparasitica, Nematophthora gynophila, sterile mycelium (ARF18) Mycorrhiza (균근, 菌根)
포식성곰팡이	Arthrobotrys spp., Monacrosporium spp., Dactylella spp., Nematocionus spp.

=> 따라서 본 연구에서는 유용 미생물자원을 도출하고, 이를 이용하여 선충 방제효과를 규명하고, 작물에 실증 효과 실험을 수행하여 뿌리혹선충 방제를 위한 친환경 방제제를 개발하고자 함. 기존에 보고된 미생물 및 식물 추출물들은 항선충 효능을 나타내는 활성 작용기작에 대한 연구가 불충분하며, 그 효능도 미미한 경우가 많음. 본 연구에서는 성충 또는 유충의 운동성과 활동성에 영향을 줄 수 있는 친환경 미생물자원을 개발하고자 함. 추가적으로 선충 알의 키틴 및 젤라틴 성분에 영향을 줄 수 있는 미생물 자원을 도출하여 선충 제어에 응용하는 연구를 수행하고자 함

■ 연구개발의 경제 · 산업적 중요성

- 뿌리혹선충에 의한 작물 피해액은 전 세계적으로 1,200억불에 이르며, 국내 뿌리혹선충에 의한 과채류 생산 손실액은 2,500억 원으로 추정되고 있음. 국내에서 소비되는 살선충제의 시장이 약 700억원에 이룸
- 기존에 사용하던 화학농약의 문제점으로 사용의 제한이 넓어짐에 따라 친환경유기농자재 시장은 성장세를 보일 것으로 전망됨. 따라서 확실한 효과와 지속가능한 천연소재의 유기농자재의 개발이 필요함
- 화학적 방제를 대체할 수 있는 미생물제제들이 시판되고 있으나, 살선충 효과를 나타내지 않는 경우가 많으므로 보다 효과적인 새로운 친환경 제제의 개발이 절실함

- 국내의 시설원에 재배지에는 뿌리혹선충의 감염으로(성주 약85% 재배농가 뿌리혹선충 감염) 매년 약 30-40%의 수량감소를 가져오고 있으며, 이 뿌리혹선충은 우리나라의 거의 모든 시설원예작물(오이, 수박, 참외, 토마토 등)에 피해를 주고 있음
- 연간 국내에서 소비되는 살선충제 시장은 약 700억원으로, 향후 뿌리혹선충의 방제 및 관리기술에 대한 지속적인 투자와 연구가 없다면 작물의 피해는 물론이고 살선충제 시장도 국내는 물론 전 세계적으로 급격히 증가할 것으로 예상됨
- 살선충제는 살균제나 살충제에 비하여 시장이 작아서 대부분 살균, 살충 연구에 덧붙여 개발되었으며 지금까지의 대부분 살선충제는 살균제 혹은 살충제로 동시에 등록되어 있음
- 국내 친환경 유기농자재 시장은 약 8천억 원 수준으로, 친환경농자재 시장규모는 2000년 1천억 원에서 2012년 8천억 원에 491업체 정도로 추정함
- 또한 생물농약 친환경농자재 지원정책의 축소와 친환경유기농산물의 부실인증에 따른 파동, 2015년 저농약패지에 따른 유기농산물 재배농가의 감소 등으로 최악의 과도에 빠졌던 유기농업자재시장은 천연식물보호제 (구 생물농약) 또는 바이오농약으로 개념이 정리되고 복합제 또는 다기능성 유기농

자재의 요구가 높아지고 있음

- 현재 국내에는 1,237개의 친환경유기농자재가 공시되어 있지만, 효과와 작용특성을 고려한 기술개발은 부족한 상황에서 본 연구결과를 기반으로 체계적이고 과학적인 우수미생물 소재와 천연물질을 활용한 제품개발이 활성화될 것으로 기대됨
- 친환경유기농자재의 개발은 소재 및 미생물 이용 다양화와 수요창출, 농가소득 증대, 토양개선 효과를 통한 환경오염 방지가 가능하며, 보다 손쉬운 친환경농업이 가능하게 하며, 이를 통하여 농약의 소비를 줄고, 부가가치가 높은 작물의 생산으로 재배농가의 수익성을 높일 수 있음
- 유기농산물을 활용한 건강식품류는 해외수출이 의약품에 비해 비교적 용이하기 때문에, 연 1500억 달러에 이르는 건강기능식품시장에 쉽게 진출할 수 있어 새로운 부가가치상품의 개발이 용이함
- 화학비료와 화학약품의 남용으로 토양 상태악화와 내성병균의 등장으로 장기적으로 피해가 증가하는 추세로 친환경적인 지속가능한 소재의 개발로 환경오염의 방지와 투자비용의 감소로 자연스런 농가소득으로 이어짐

<선충농약>

품목명	상표	적용선충	300평당 사용량	제제, 계통
다조메(입제)	뱃사미드	토양병해	20-30kg	훈증제
메탐소디움(액)	킬퍼	뿌리혹선충	40 liter	훈증제
디메칠빈포스(유제)	란가도	뿌리혹선충	6kg	유기인계
에토프(입제)	모캡, 에스캡	뿌리혹선충	9kg	유기인계
카두사포스(입제)	럭비, 아파치, 사리프	뿌리혹선충	3kg	유기인계
카보(입제)	후라단, 큐라텔, 카보단, 카보텔	뿌리혹선충 잎선충	3-5kg	비훈증제, 침투성
타보(입제)	카운타, 땅사, 톱타자, 유별나, 말뚝, 멀땅충	뿌리혹선충	6kg	유기인계
펜치온유제	리바이짓드, 저넉놀	벼미삭선충	20ml/20㎡	유기인계 침투성(동물)
포스치마제이드(입제)	선충탄	뿌리혹선충	4-6kg	유기인계 침투미행성

1-3. 연구개발 범위

- 향선충 활성 검색계 확립 및 운용
 - 뿌리혹 선충 및 숙주식물의 확보
 - 토양미생물을 활용한 선충생육억제제 개발
- 젤라틴 분해활성 검증
 - 선충 알에 영향을 주어 부화율을 줄일 수 있는 미생물 개발
- 미생물 대량생산 공정 개발
 - 온도, 배양시간, 배지, 포자형성 최적화 배양 조건 확립
 - 유효 균수 량과 활성의 상관관계 연구
 - 대량생산 공정별 최적화 연구
- 제형화 및 안정성 확립
 - 액상 및 분말 제품의 안정성 확립
 - 동결보호제, 부형제, 보조제, 기능성 강화 부형제의 선별
 - 동결건조공정의 최적화
 - 제형화 안정성 확립

- 활성지표성분 분리 분석
 - 유기용매 분획물에 대한 유기용매의 극성차를 이용한 순상, 역상 실리카겔 및 크기배재크로마토그래피 (Sephadex)법을 이용하여 분리, 정제 함
 - semi-prep. HPLC를 이용하여 순수한 생리활성물질을 분리함
 - 순수하게 분리 정제된 생리활성물질에 대하여 1D-NMR (¹H-, ¹³C-) 및 2D-NMR (DEPT, MQC, HMBC)를 이용하여 활성물질의 구조 결정하고 MS를 통해 분자량 결정
 - HPLC를 이용하여 활성 유기용매 분획물에 크로마토그래피 패턴 분석 하고, 순수하게 분리 정제된 물질에 대한 정성/ 정량 분석
 - LC/PDA 또는 LC/MS 기기를 이용하여 생물소재로부터 생리활성물질 또는 활성분획물의 최적 추출·분리분석 조건을 확립하여 대량생산의 기반을 제공
- 농가현장시험 (소포장시험)
 - 현장시험설계 : 적용작물, 살포시기, 살포횟수, 사용량
 - 효능검증설정 : 작물생육효과, 식물기생선충 방제효능
 - 토양 내 미생물상 변화양상 분석
 - 재배 식물의 뿌리혹선충 감염여부 분석
 - 재배 식물의 수확량 분석
 - 기존 유기농약과의 효능차이 분석
- 제품의 인증 및 등록
 - 유효성분에 대한 이화학 시험
 - 작물에 대한 약해 시험
 - 독성시험 (경구, 경피, 피부, 안막, 어독성, 꿀벌)
 - 유효성분 검사
 - 비료 등록 및 유기농자재 인증

<국내 동향>

- 국내 생물농약으로 등록된 것은 살균제 15종, 살충제 16종으로 총 31종이 있으며 친환경유기농자재로 약 100여종이 등록되었으나 대부분 외국의 원재를 수입하여 판매하거나 님오일, 제충국 등을 혼합하여 판매하고 있음
- 뿌리혹선충 방제 약제는 카두사포스(러비, 아파치), 카두사포스·카보설펜(투아웃), 포스치아제이트(선충탄), 카보(후라단) 등이 있으며, 태양열을 이용하여 하우스 내부를 소독하는 방법을 함께 이용함
- *Pasteuria* sp. 등의 세균을 이용한 생물적방제 가능성이 현재 다각적으로 연구되고 있음
- 정향, 콩, 프라이애쉬 등의 식물 추출물 및 식물 유래 정유성분등이 뿌리혹선충 방제용 제품 개발을 위해 연구되고 있음
- 뿌리혹선충 유전자의 RNA 간섭 억제에 의한 선충저항성 식물 개발 및 선충방제에 관한 연구가 진행되고 있음.
- 분자적인 면에서 식물기생충인 선충과 숙주 식물간의 상호작용 즉 선충의 분비 시스템과 선충에 감염된 식물의 신호 시스템, 식물의 방어반응 등의 연구가 최근 진행되고 있음

<선충관련생물농약>

상표명	자재종류	제조사명	상표명	자재종류	제조사명
네마토킬	총해관리용	(재)전남생물산업진흥원 생물방제연구센터	참선충	총해관리용	(주)에코원
선그린	병해총관리용	KG케미칼(주)	네마스탑골드	토양개량및작물생육용	(주)에코원
해방뿌리	병해관리용	우진비앤지(주)	네마큐	병해총관리용	(주)오더스

네마트론	충해관리용	(주)넬바이오텍	참선충 입제	충해관리용	(주)이에스에프
박스타골드	병해충관리용	(주)대덕에이티	땅거미	충해관리용	(주)한국바이오케미칼
랜드세이버 유제	해충관리용	(주)대덕에이티	선충큐	병해충관리용	(주)한얼사이언스
대유선충독	충해관리용	(주)대유	마이코젯	토양개량및작물생육용	진영기업(주)
대유쏘일닥터	토양개량및작물생육용	(주)대유	선충에액제	미생물제제	(주)한국바이오케미칼
대유플라즈마님	병해충관리용	(주)대유	네마다운	미생물제제	동운바이오
천궁	충해관리용	(주)비아이지	그린캡스	토양미생물제제	(주)비아이지
불휘	충해관리용	(주)비아이지	선충사냥	병해충관리용	(주)씨엠씨코리아
네마스타	충해관리용	(주)비아이지	에코윈-에스(S)	충해관리용	(주)에코윈

<국의 동향>

- 미국 캘리포니아 대학 (UC Davis University) 과 노스 캐롤라이나 대학 (North Carolina State University) 의 공동 연구팀이 토양에 서식하는 벌레의 일종으로 전세계적으로 매우 광범위하게 작물에 피해를 주는 해충의 뿌리혹 선충 (Meloidogyne hapla) 의 유전체 지도를 완성하였음
- 미국의 경우 2001년에는 EDEN Bioscience사가 Harpin(생화학 살균제), 2003년에는 Agraquest사가 Serenade(미생물 살균제), 그리고 2004년에는 Jeneil사가 Rhamnolipid(생화학 살균제)의 개발함
- 유전자조작 선충 저항성(genetically modified nematode resistance: GMNR) 식물 개발: 선충사육과 식물에서 흡수하는 단백질 소화를 막는 시스템인 단백질분해효소 억제인자(cystatins)를 과발현시켜 선충에 효용
- 선충의 콜린 신경시스템 표적: 아세틸콜린에스테라아제 또는 니코틴 아세틸콜린 수용기[nAChRs]로의 결합으로 합성 펩티드
- RNAi-기초 이식 유전자를 통한 선충 저항성 품종 개발

<식물유래 생물농약>

물질명	유래	활성
Cinnamylaldehyde	<i>Cassia tora</i>	살균제 /해충유인제
Fatty acids(Oleic acid)	식물	제초제 /살균제 /살충제
Jajoba oil	<i>Simmondsia californica</i>	살균제 /살충제
<i>Macleaya</i> extract	<i>Macleaya cordata</i>	살균제
Milsana	<i>Reynoutria sachalinensis</i>	살균제

2. 연구수행내용 및 성과

2-1. 연구수행 방법

○ 균주 분리 및 배양

실험에 이용한 균주는 전북 정읍시에 위치한 내장산에서 채취해 온 토양에서 분리한 균주임. 균주의 분리는 먼저 토양 1 g을 0.85% NaCl 9 mL에 넣고 연속희석법을 이용해 104~106 까지 희석하였으며, LB agar배지(DB Difco, France)에 도말하여, 37°C에서 48시간 배양함. 이때 점질물을 생성하거나 형태적으로 바실러스의 특성을 보이는 균주를 1차 분리하여 LB broth를 사용해 37°C, 160 rpm으로 48 시간 진탕 배양하여 배양액과 균주 모두를 사용하였음.

○ 뿌리혹선충 증식

고구마 뿌리혹선충(*Meloidogyne incognita*)은 고추(홍농, 청양) 유묘를 이용해 증식하여 사용하였음. 실험에 사용된 뿌리혹선충은 Moon et al. (2010)의 방법을 활용해 포트에 멸균된 상토(홍농, 바이오그린상토) 200 g을 넣고, 4주 키운 고추에 알에서 탈피한 2령의 고구마 뿌리혹선충(1,000마리/10 mL)을 접종하여 2~3달간 증식시켜 사용하였음. 난낭은 뿌리혹선충을 접종한 60일이 지난 고추의 뿌리를 흐르는 물에 씻어 핀셋을 이용해 뿌리혹에 붙어있는 난낭을 채집하였음.

○ 젤라틴 분해 실험

토양에서 분리된 균주들의 젤라틴 분해력 실험은 Nutrient gelatin 배지 [0.3% Beef extract (BD Difco, France), 0.5% Peptone (BD Difco, France), 12% Gelatin (WAKO, Japan)]를 사용하였음. Nutrient gelatin 배지에 백금을 이용해 분리된 균주를 접종하여 37°C, 24시간 배양 후 젤라틴배지의 분해 정도를 측정하였음.

○ 16S rRNA 염기서열을 이용한 균주동정

분리된 균주의 계통분류학적인 위치를 확인하기 위하여 16S ribosomal RNA gene의 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene 과 internal transcribed spacer 2를 포함하는 염기서열을 분석하였음. 선발한 균주의 16S rRNA sequence를 “Genebank” database에 블라스트 프로그램을 이용하여 기존에 보고된 균주와 비교하여 높은 상동성을 나타내는 것을 명명하였음.

○ 난낭 분해효과 검정

난낭 분해 검정에 이용된 고구마 뿌리혹선충 난낭은 2령의 난낭을 채취하여 사용하였음. 분리된 균은 10^6 CFU/100 μ L을 처리하였고, 균주는 10,000 rpm, 30분간 원심분리하여 상등액과 분리하여 사용하였음. 균주를 처리한 난낭은 25°C에 넣어두고 1일 간격으로 3일간 현미경을 사용해서 분해도를 확인하였음.

○ 살선충 활성 측정

고추뿌리에서 3개월간 생육시킨 뿌리혹선충의 알을 분리해 증류수에 넣고 5일간 부화시킨 후, 뿌리혹선충이 들어있는 증류수를 96 웰 플레이트의 각 웰 당 80 μ L씩 분주하고(약 100마리/웰), 미리 배양한 상기 방선균 배양액 20 μ L를 첨가하여(최종 배양액농도 20%) 25°C 배양기에서 배양하였음. 그 다음, 실제 현미경을 사용하여 12 시간, 24 시간, 48 시간 간격으로 선충의 형태를 확인하였음.

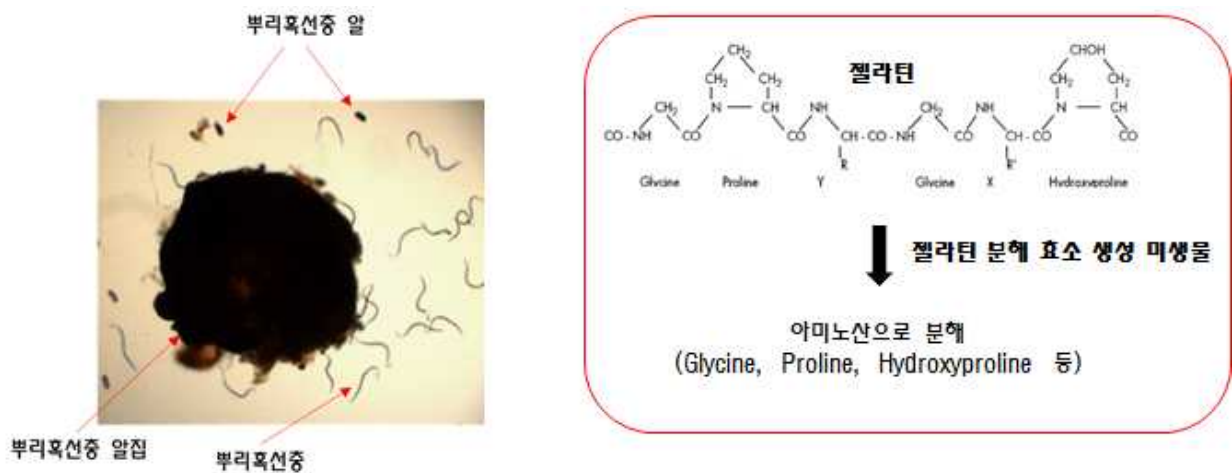
○ 포트 방제효과 검정

젤라틴 및 뿌리혹선충 난낭 분해 균주에 대한 고구마 뿌리혹선충 방제효과는 실내 포트에서 실험하였음. 직경 9 cm 와 높이 8.5 cm 플라스틱 포트에 4주된 고추 유묘(홍농, 청양)를 멸균된 상토(홍농, 바이오그린상토) 200 g을 넣어 심었음. 그리고 2령의 고구마 뿌리혹선충 난낭에서 부화시킨 유충 1,000마리/10 mL을 넣어 20일간 감염시켰음. 미리 최종 선별된 3종의 균주를 10^9 CFU/mL로 배양하여 100배 희석해서 20일 감염이 끝난 고추포트에 50 mL씩 2주에 한번 씩 처리하였으며, 그 외 대조균은 물만 처리하였음. 고추 모종에 물은 4~5일에 한번씩 70 mL씩 관수하며 90일간 키웠으며, 60일과 90일에 고추모종 뿌리를 채취하여 흐르는 물에 천천히 씻어 핀셋으로 고추 뿌리에 형성된 난낭을 채집하여 수를 측정하고, 고추 지상부의 생육차이를 조사하였음.

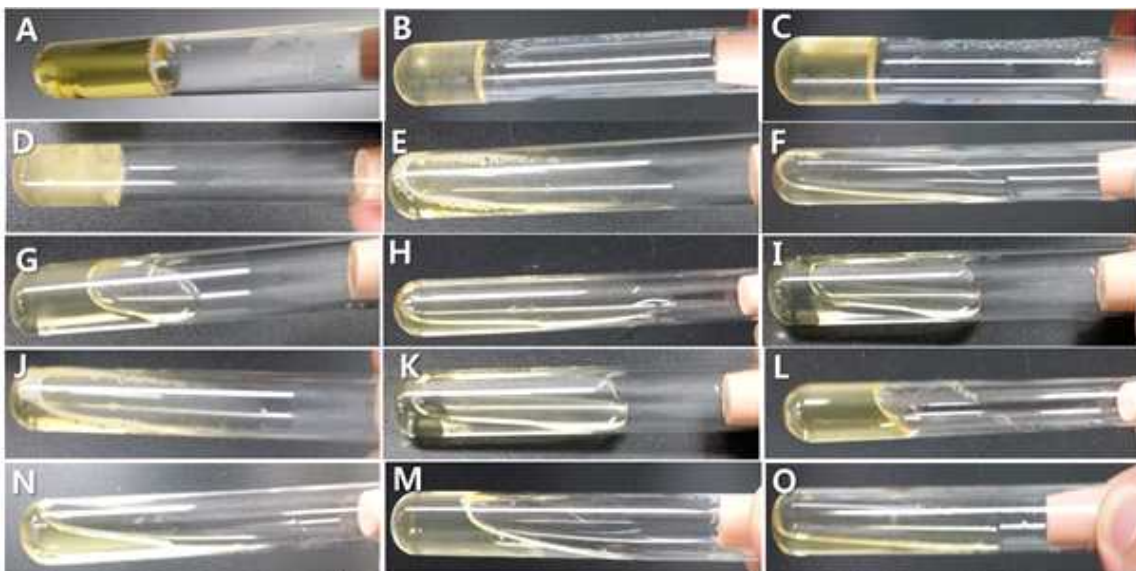
2-2. 식물병원성 뿌리혹선충 방제 미생물제 개발을 위한 균주 개발

(1) 젤라틴 분해능이 우수한 균주의 개발

● 뿌리혹선충 난양의 주성분 중 하나인 젤라틴을 분해하여 정상적인 부화가 이루어지지 않게 하기 위해 젤라틴분해능이 우수한 균주를 선별하기 위한 실험을 진행하였음. 증류수와 향선충 미생물로 널리 알려진 바실러스 서렌지네시스 KCTC1108, KCTC150를 대조균으로 하여 토양으로부터 분리된 균주들에 대한 젤라틴 분해능을 측정하였음. 토양에서 분리된 균주들의 젤라틴 분해력 실험은 Nutrient gelatin 배지 [0.3% Beef extract (BD Difco, France), 0.5% Peptone (BD Difco, France), 12% Gelatin (WAKO, Japan)]를 이용하여 37°C, 24시간 배양한 후 분해 정도를 측정하였음. 실험결과, 바실러스 KRB-5, KRB-9, KRB-10, KRB-12 번 균주에서 젤라틴 분해능이 우수한 것을 확인하였음.



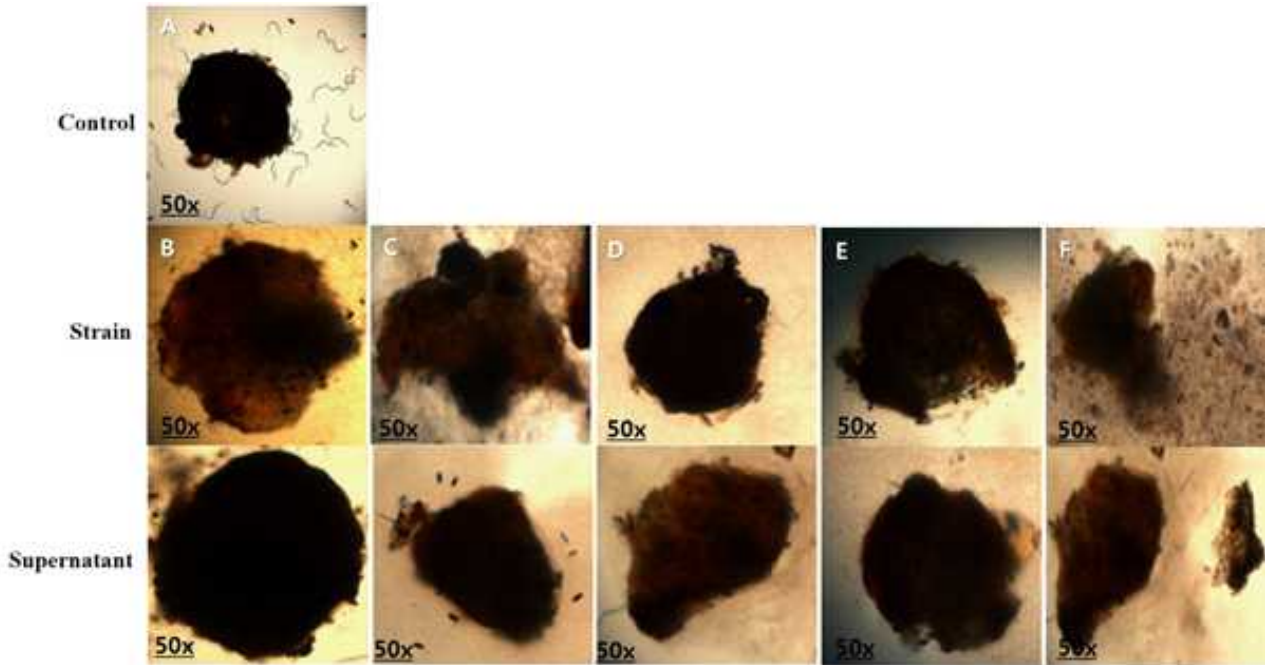
[그림 1] 뿌리혹선충 난양 및 젤라틴 분해 도식도



[그림 2] 분리된 균주의 젤라틴 분해능 결과

A: Control (H₂O), B: *B. thuringiensis* KCTC 1108, C: *B. thuringiensis* KCTC 1508, D: KRA-1, E: KRB-2, F: KRB-3, G: KRB-4, H: KRB-5, I: KRB-6, J: KRB-7, K: KRB-8, L: KRB-9, N: KRB-10, M: KRB-11, O: KRB-12.

● 젤라틴 분해능이 우수한 바실러스 KRB-5, KRB-9, KRB-10, KRB-12 균주와 바실러스 서린지네시스 KCTC 1508 균주를 이용하여 고추뿌리에서 분리한 2령의 뿌리혹선충 난낭분해능을 평가하였음. 평가결과 KRB-5 및 KRB-10 균주의 균체에서 우수한 분해능을 보이는 것을 확인하였음. 또한, KRB-10 균주는 상등액에서도 뿌리혹선충의 난낭을 분해하는 활성이 가장 우수한 것을 확인하였음. 항선충 활성을 나타내는 방선균 상등액에서는 난낭 분해능을 보이지 않음. (바실러스는 균체만 접종하여도 분해능이 우수하여 미생물제의 가능성이 우수함)



[그림 3] 분리된 균주의 뿌리혹 선충 난낭의 분해능 결과

A: Control (H₂O), B: *B. thuringiensis* KCTC 1108, C: KRB-5, D: KRB-9; E: KRB-10, F: KRB-12.

● 젤라틴 분해능이 우수한 바실러스 4종의 16s rRNA sequence를 진행하였음. 바실러스는 *Bacillus subtilis* (KRB-5, KRB-12)와 *B. amyloliquefaciens* (KRB-9, KRB-10)로 동정 되었음. 젤라틴 분해능이 가장 우수한 KRB-12 균주 *Bacillus subtilis* KRB-12로 명명하였으며, KCTC에 특허균주로 기탁되었음(기탁번호는 각각 KCTC18480P를 부여 받았음).

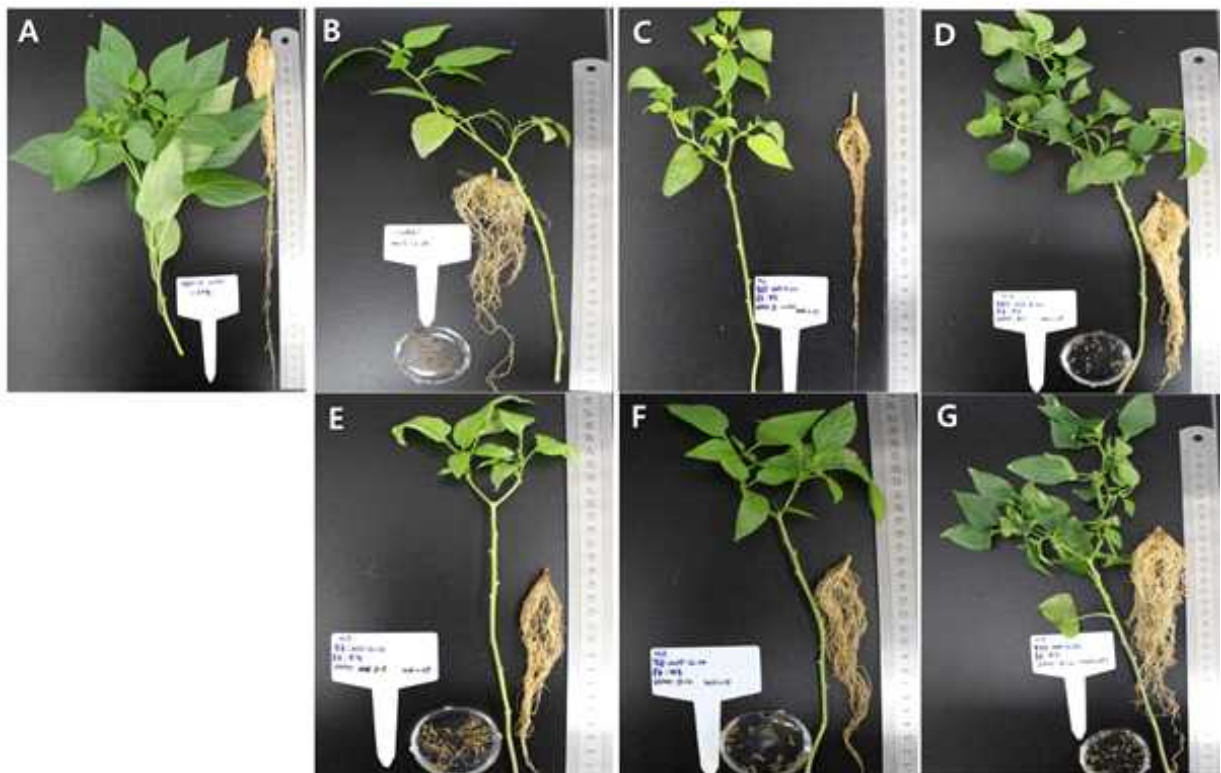
① KRB-12 균주의 16s rRNA sequence 결과

Bacillus subtilis strain DSM 10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Length = 1517
 TTTTGAGGTTTGATTTCGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGC
 GGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGAAACCGGGCTAATACCGGATGGTTGTTGAACCGCATG
 GTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGC
 GTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGCAATGGACGA
 AAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCAATAGGGCGGTA
 CCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTA
 AAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAACTTGAAGTGCAGAAGAGGA
 GAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACGACGCTGAGGAGC
 GAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGC

AGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGT
 TTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGG
 TGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACT
 CTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGTACACACGTGTACAATGGAC
 AGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAA
 TCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGT
 CGGTGAGGTAACCTTTAGAGCCGCCCGAAGTGTGAGCC

● 바실러스균주들의 뿌리혹선충 방제효과(pot 실험)

- 포트에는 멸균된 상토 60 g을 넣고 미리 2개월간 키운 고추(부강)를 정식 후 뿌리 활착을 위해 2주간 생육시킨 후, 포트묘의 뿌리 부분에 뿌리혹선충의 난낭을 증류수를 이용해 부화시킨 뿌리혹선충(약 1000마리)를 접종하고 20일간 감염시켰음. 감염 후, LB배지에서 배양한 바실러스 서브틸러스 KRB-5, -9, -10, -12균주, 바실러스 서린지네시스 KCTC-1108를 각각 100배 희석하여 100 mL씩 2주 1회 (총 6회) 단독 처리한 후 방제 효과를 확인하였음. 3~4일에 한번 씩 배양액 없이 물만 분주하였으며, 대조군은 배양액을 넣지 않고 물만 넣어주었음. 1개월 단위로 포트에서 고추모종을 꺼내 뿌리에 붙은 선충의 난낭 개수를 측정하여 부화 및 재침투 와 선충의 활성을 보았음.
- 실험결과, 바실러스 서브틸러스 KRB-5 및 KRB-12균주 배양액을 처리한 군에서 지상부 및 뿌리의 생육이 우수한 것을 확인하였음. 바실러스 서린지네시스 KCTC-1108 균주의 배양액은 효과가 없었음.



[그림 4] 바실러스 균주들의 뿌리혹선충 방제효과(pot 실험)

A: Negative control (H₂O), B: Control (LB media), C: *B. thuringiensis* KCTC 1108, D: *B. subtilis* KRB-5, E: *B. amyloliquefaciens* KRB-9, F: *B. amyloliquefaciens* KRB-10, G: *B. subtilis* KRB-12.

[표-1] 고추 모종 지상부 및 지하부의 길이, 건조 무게 변화 (pot 실험)

Treatments	30 days				60 days			
	Root length (cm)	Shoot length (cm)	Dry weight of the root (g)	Dry weight of the shoot (g)	Root length (cm)	Shoot length (cm)	Dry weight of the root (g)	Dry weight of the shoot (g)
H ₂ O	19.8±0.84	28.2±0.84	0.18±0.02	0.88±0.03	32.0±1.58	34.6±2.61	0.22±0.01	0.92±0.03
LB media	18.2±0.84	27.2±1.3	0.15±0.01	0.49±0.05	21.2±0.84	31.4±0.89	0.16±0.01	0.45±0.04
KRB-5	18.5±0.59	27.6±0.85	0.17±0.02	0.76±0.04	19.8±0.94	31.4±1.23	0.20±0.02	0.79±0.03
KRB-12	18.8±0.84	28.6±0.55	0.17±0.01	0.79±0.03	20.8±0.84	32.6±1.67	0.21±0.01	0.81±0.04

- 60일 후 토양 내 뿌리혹 선충 수는 1830개로 증가하였으며, 고추 모종의 뿌리에 생성된 뿌리혹의 개수는 140개로 증가하였음. 바실러스 서브틸러스 KRB-12균주 배양액을 처리한 군의 토양 내 뿌리혹 선충 및 고추 모종의 뿌리에 생성된 뿌리혹의 수는 대조군과 비교하여 각각 1108개, 73.8개로 감소하는 경향을 나타내 우수한 항선충 활성을 나타내는 것으로 확인하였음.

[표-2] 토양 및 뿌리혹 수 변화 (pot 실험)

Treatments	No. of nematode inoculation 1day	30 days		60 days	
		No. of juveniles per 100 g soil	No. of egg sac per root	No. of juveniles per 100 g soil	No. of egg sac per root
H ₂ O	-	-	-	-	-
LB media	1030±67.08	1306±82.95	78.8±6.53	1830±69.28	140.8±10.06
KRB-5	1017±59.68	693±102.55	64.2±4.72	1352±101.42	90.3±5.58
KRB-12	1034±63.87	582±107.33	53.2±7.85	1108±98.59	73.8±6.98

- 바실러스 서브틸러스 KRB-5 및 KRB-12 균주를 처리한 후 30일 및 60일 후 토양 내 미생물 균총 변화를 확인한 결과, 처리 전 $\times 10^3$ /1g 존재하던 미생물 수치가 미생물을 처리하지 않은 경우 10배 증가하였음. 그러나 미생물을 처리한 경우 각각 $\times 10^7$ /1g 으로 증가하는 것을 확인하였음.

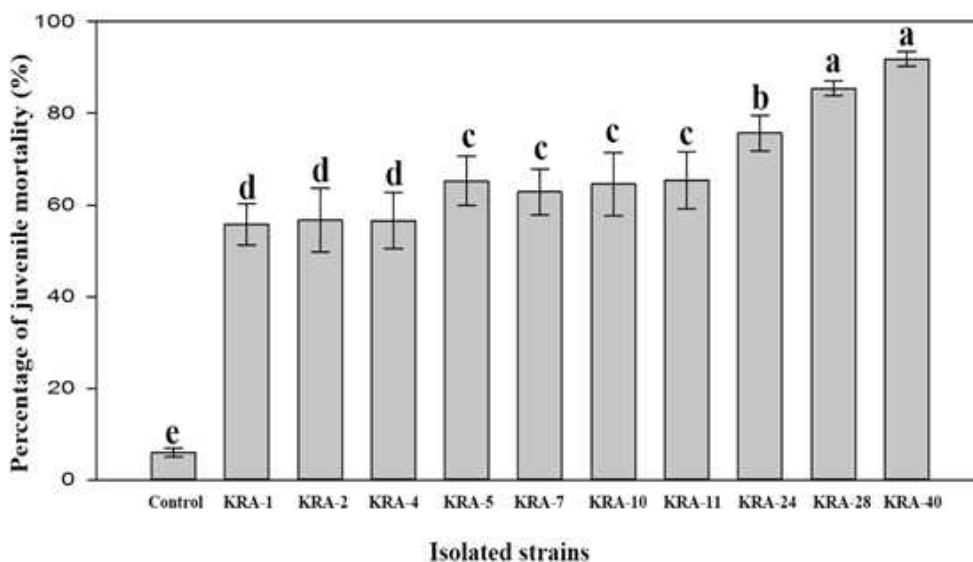
[표-3] 토양 내 균총 변화 (pot 실험)

Treatments	1 day before treatment		30 days		60 days	
	No. of total bacteria per 1 g soil	No. of actinomycetes per 1 g soil	No. of total bacteria per 1 g soil	No. of actinomycetes per 1 g soil	No. of total bacteria per 1 g soil	No. of actinomycetes per 1 g soil
H ₂ O	4.2±1.9×10 ³	-	2.9±0.9×10 ⁴	-	8.1±2.3×10 ⁴	-
LB media	6.1±2.5×10 ³	-	6.3±0.7×10 ⁴	-	3.5±0.7×10 ⁵	-
KRB-5	4.7±1.5×10 ³	-	2.2±0.4×10 ⁶	-	2.7±1.2 ×10 ⁷	-
KRB-12	5.0±1.2×10 ³	-	2.5±0.7×10 ⁶	-	3.2±0.9 ×10 ⁷	-

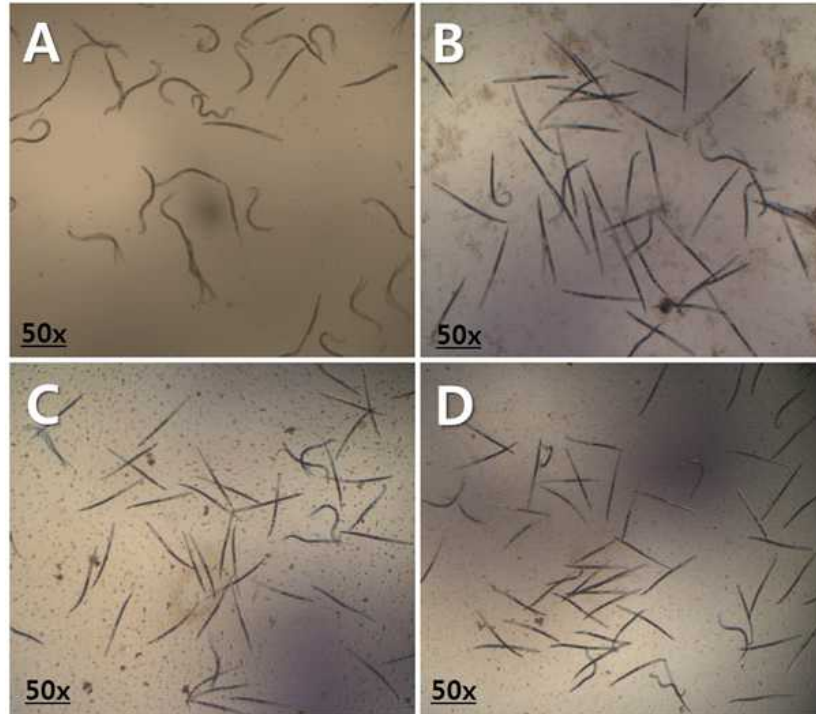
(2) 살선충 활성이 우수한 균주의 개발

● 뿌리혹선충을 대상으로 항선충 활성이 우수한 균주를 도출하기 위하여, 고추뿌리에서 감염시킨 2령의 뿌리혹선충 난낭을 채취해 “베르만 깔데기법”으로 뿌리혹선충을 부화시켜 실험에 사용하였음. 부화가 끝난 뿌리혹선충이 들어있는 증류수를 96well plate의 각 well당 80 µL씩 분주하고(약 100마리/well), 미리 배양한 방선균 배양액 20 µL를 첨가해(최종 배양액농도 20%) 25℃ 배양기에서 배양하였음. 그 후 실체현미경을 사용해 12시간, 24시간, 48시간 간격으로 선충의 형태를 확인하였음. 이때 일자로 퍼져서 움직임이 없는 선충은 죽었다고 측정하고, 좌우로 꿈틀거리는 선충은 생육하였다고 판단하여 치사율을 측정하였으며, 실험에 사용된 방선균 배양액은 모두 3반복으로 진행하였음.

- 토양으로부터 분리된 방선균을 대상으로 뿌리혹선충에 대한 항선충 활성을 측정한 결과, 10종의 방선균에서 뿌리혹선충의 생육을 억제하였으며, 이중 KRA-24, KRA-28, KRA-40에서 우수한 항선충 활성을 나타냈음.



[그림 5] 분리된 균주의 뿌리혹선충의 살선충효과



[그림 6] 분리된 균주의 뿌리혹선충의 살선충 효과
 A: Control (H₂O), B: KRA-24, C: KRA-28, D: KRA-40.

● KRA-28, KRA-40 균주는 국내 비료공정규격 설정 및 지정(농촌진흥청공시)에 공시된 균주이며, 국외에서 제품으로 사용되는 균주로 항선충 활성에 대한 재현성 실험을 실시하였음. 실험결과, 방선균-28균주의 살선충 활성은 88.0%로 측정되었으며, 방선균-40균주의 경우 92.6%의 가장 우수한 살선충 활성을 보였음.

[표-4] KRA-28, KRA-40 균주의 뿌리혹선충에 대한 살선충 활성

처리군	생존 선충 수/시험 선충 수			치사율(%)
	반복 I	반복 II	반복 III	
KRA-28	10/103	15/109	12/101	88.0%
KRA-40	6/101	10/104	6/102	92.6%
무처리군	102/103	100/102	100/103	-

- 살선충 활성이 우수한 KRA-24, KRA-28, KR-40 균주에 대하여 배양액 희석 배수에 따른 살선충 활성을 측정 한 결과, 3 균주 모두 농도 의존적인 살선충 활성을 나타내는 것을 확인하였음.

[표-5] KRA-224, -28, -40 균주 배양액의 농도별 살선충 활성

Strains	Concentrations (%)	Mortality (%)	Corrected mortality (%)
Control (H ₂ O)		6.0±0.5	-
KRA-24	10	80.2±2.2	78.9±2.5
	5	65.7±2.4	63.9±2.4
	3	56.6±3.0	53.2±2.8
	1	42.1±2.4	38.3±2.6
KRA-28	10	87.0±2.5	86.3±2.7
	5	72.9±2.3	71.4±2.6
	3	61.4±2.2	58.9±2.4
	1	47.5±3.2	43.9±3.5
KRA-40	10	91.3±1.5	89.7±3.9
	5	79.7±1.4	78.5±1.5
	3	65.5±1.8	63.1±2.0
	1	51.0±2.9	47.3±2.6

● 뿌리혹선충의 살선충 효과가 우수한 방선균 5종의 16s rRNA sequence를 분석한 결과, *Streptomyces nigrescens* (KRA-40), *S. yatensis* (KRA-28), *S. misionensis* (KRA-24), *S*로 동정되었음. 향선충 활성이 우수한 KRA-40 균주는 16s rRNA sequence 결과 각 *Streptomyces nigrescens* 와 99% 상동성을 보였으며, *Streptomyces nigrescens* KRA-40으로 명명하였음. 두 균주는 KCTC에 특허균주로 기탁되었음(기탁번호는 KCTC18482P를 부여 받았음).

② KRA-40 균주의 16s rRNA sequence 결과

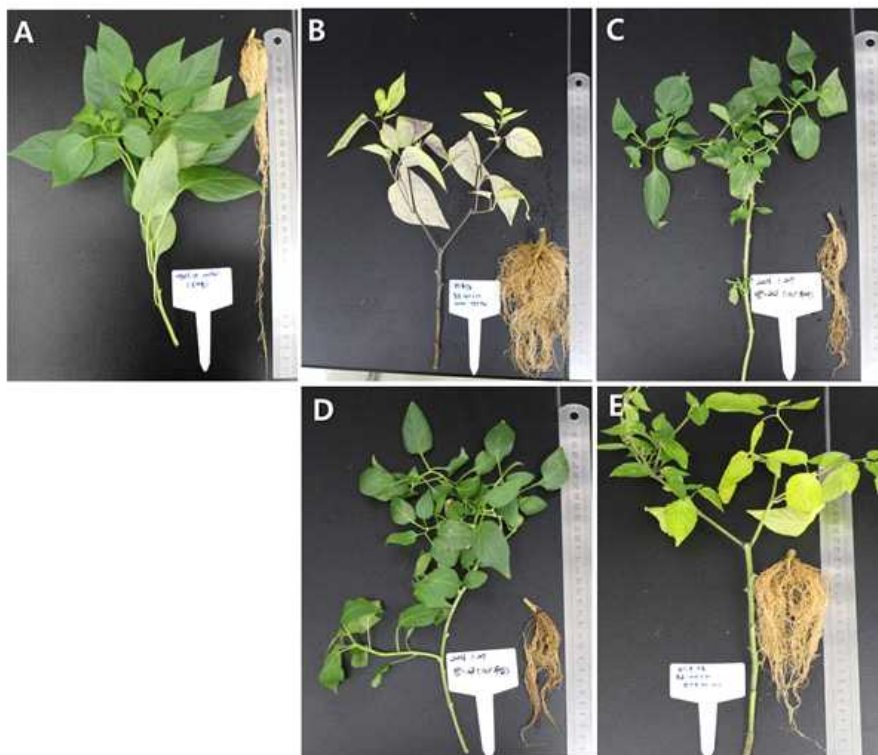
Streptomyces nigrescens strain DSM 40276 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length = 1518

TTTGAGTTTGAATTCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAACCTCCTTCGGGAGGGGATTAGTGGCGA
ACGGGTGAGTAACACGTGGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGAAACGGGGTCTAATACCGGATACGACTACCGACCGCATGGTCTG
GTGGTGAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGGCGCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTG
AGAGGGCGACCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCA
GCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCCCGGCTA
ACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGCGGCTTGTACGTCGGATGT
GAAAGCCCGGGGCTTAACCCGGGTCTGCATTGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCCG
AGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCC

TGGTAGTCCACGCCGTAACGTTGGGAAGTAGGTGTGGGCGACATTCCACGTCGTCGGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTTCGCCGCTGGGGAGT
 ACGGCCGCAAGGCTAAAAGTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAA
 GGCTTGACATACACCGGAAAACCTGGAGACAGGGTCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGT
 TGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGATGGGGACTCACAGGAGACTGCCGGGGTCAACTC
 GGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACAGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGA
 GGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATT
 GCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACGTACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGAGA
 ATGTCAAGGACGTAA

● 방선균 균주들의 뿌리혹선충 방제효과(pot 실험)

- 포트에는 멸균된 상토 60 g을 넣고 미리 2개월간 키운 고추(부강)를 정식 후 뿌리 활착을 위해 2주간 생육시킨 후, 포트묘의 뿌리 부분에 뿌리혹선충의 난낭을 증류수를 이용해 부화시킨 뿌리혹선충(약 1000마리)를 접종하고 20일간 감염시켰음. 감염 후, GSS배지에서 배양한 방선균 KRA-24, -28, -40 균주를 각각 100배 희석하여 100 mL씩 2주 1회 (총 6회) 단독 처리한 후 방제 효과를 확인하였음. 3~4일에 한번 씩 배양액 없이 물만 분주하였으며, 대조군은 배양액을 넣지 않고 물만 넣어주었음. 1개월 단위로 포트에서 고추모종을 꺼내 뿌리에 붙은 선충의 난낭 개수를 측정하여 부화 및 재침투와 선충의 활성을 보았음.
- 실험결과, KRA-40균주 배양액을 처리한 군에서 지상부 및 뿌리의 생육이 우수한 것을 확인하였음. KRA-24 및 KRA-28 균주 배양액은 지상부의 생육에는 효과를 나타내지만 지하부의 생육에는 영향을 주지 못하는 것으로 판단됨.



[그림 7] 분리한 바실러스 속 미생물의 방제효과

A: Negative control (H₂O), B: Control (GSS medium), C: KRA-24, D: KRA-28, E: KRA-40.

[표-6] 고추 모종 지상부 및 지하부의 길이, 건조 무게 변화 (pot 실험)

Treatments	30 days				60 days			
	Root length (cm)	Shoot length (cm)	Dry weight of the root (g)	Dry weight of the shoot (g)	Root length (cm)	Shoot length (cm)	Dry weight of the root (g)	Dry weight of the shoot (g)
H ₂ O	19.8±0.84	28.2±0.84	0.18±0.02	0.88±0.03	32.0±1.58	34.6±2.61	0.22±0.01	0.92±0.03
GSS media	18.6±0.55	24.6±1.67	0.17±0.01	0.56±0.03	20.0±0.71	28.4±1.14	0.22±0.01	0.62±0.01
KRA-24	19.1±2.12	28.2±2.11	0.19±0.01	0.62±0.07	20.4±2.14	30.0±2.12	0.20±0.04	0.71±0.05
KRA-28	18.9±1.87	28.7±1.34	0.19±0.03	0.63±0.03	21.3±2.32	30.0±3.78	0.21±0.02	0.72±0.02
KRA-40	19.2±2.77	29.2±2.17	0.19±0.02	0.64±0.05	22.8±3.64	32.0±2.55	0.21±0.03	0.76±0.06

- 60일 후 토양 내 뿌리혹 선충 수는 1812개로 증가하였으며, 고추 모종의 뿌리에 생성된 뿌리혹의 개수는 152개로 증가하였음. KRA-40균주 배양액을 처리한 군의 토양 내 뿌리혹 선충 및 고추 모종의 뿌리에 생성된 뿌리혹의 수는 대조군과 비교하여 각각 538개, 40개로 감소하는 경향을 나타내 가장 우수한 항선충 활성을 나타내는 것으로 확인하였음. 또한 KRA-24 및 KRA-28 균주들도 우수한 항선충 활성을 나타냄.

[표-7] 토양 및 뿌리혹 수 변화 (pot 실험)

Treatments	No. of nematode inoculation 1day	30 days		60 days	
		No. of juveniles per 100 g soil	No. of egg sac per root	No. of juveniles per 100 g soil	No. of egg sac per root
H ₂ O	-	-	-	-	-
GSS media	1012±63.01	1300±72.11	79.2±6.83	1812±65.35	152±8.15
KRA-24	1048±62.38	485±72.23	45.2±6.85	859±49.25	72.0±4.25
KRA-28	1051±41.39	420±65.21	45.1±7.11	842±62.15	61.2±6.23
KRA-40	1030±51.48	366±60.25	30.2±8.41	538±44.38	40.0±7.31

- KRA-24, KRA-28 및 KRA-40 균주를 처리한 후 30일 및 60일 후 토양 내 미생물 균총 변화를 확인한 결과, 처리 전 $\times 10^3$ /1g 존재하던 박테리아 수치는 미생물 처리에 따라 10배 증가하였음. 그리고 방선균의 수치는 $\times 10^4$ /1g 및 $\times 10^5$ /1g 으로 각각 10배, 100 배 증가하는 것을 확인하였음.

[표-8] 토양 내 균총 변화 (pot 실험)

Treatments	1 day before treatment		30 days		60 days	
	No. of total bacteria per 1 g soil	No. of actinomycetes per 1 g soil	No. of total bacteria per 1 g soil	No. of actinomycetes per 1 g soil	No. of total bacteria per 1 g soil	No. of actinomycetes per 1 g soil
H ₂ O	4.2±1.9×10 ³	-	2.9±0.9×10 ⁴	-	8.1±2.3×10 ⁴	-
GSS media	5.1±0.8×10 ³	-	5.4±0.7×10 ⁴	-	8.5±2.3×10 ⁵	-
KRA-24	4.8±1.6×10 ³	-	3.9±1.2×10 ⁴	2.1±1.3×10 ³	4.9±0.6×10 ⁵	6.2±2.1×10 ⁴
KRA-28	5.1±1.0×10 ³	-	3.4±0.9×10 ⁴	2.6±1.2×10 ³	5.1±0.4×10 ⁵	7.1±1.4×10 ⁴
KRA-40	5.4±2.0×10 ³	-	3.8±0.7×10 ⁴	3.7±0.8×10 ³	5.6±0.8×10 ⁵	7.2±1.9×10 ⁴

(3) 고추모종에서 바실러스와 방선균 혼합균주의 뿌리혹선충 방제효과(pot 실험)

● 젤라틴 분해 활성이 가장 우수한 KRB-12 균주 및 살선충 활성이 가장 우수한 KRA-40 균주는 고추 모종을 이용한 pot 실험 결과를 통하여 다른 균주들과 비교하여 우수한 항선충 활성을 나타내는 것을 확인하였음.

- 항선충 미생물제로 개발할 경우 선정된 미생물들은 항선충제(화학합성 화합물)가 존재하는 토양에 처리할 수 있으므로, 선충제 존재에 따른 미생물의 생존율을 측정하였음. 시중에 판매되는 3종의 항선충제가 농도별로 존재하는 배지에 선정된 2종의 균주인 KRB-12, KRA-40 균주를 처리 후 72시간 동안 균수 변화를 측정하였음.

- 실험결과, 3종 선충제의 농도가 0.1, 0.5, 1.0, 3.0%로 증가함에 따라 KRB-12 및 KRA-40 균주의 균수는 감소하는 경향을 나타냈으며, 5.0% 존재 하에서는 두 균주 모두 확인을 할 수 없었음. 일반적으로 선충제는 토양에 0.5%를 처리하는 것으로 알려져 있음. 따라서 KRB-12 및 KRA-40 균주의 경우 선충제 0.5% 존재 하에서도 각각 ×10⁶, ×10⁴ 정도의 균주들이 존재하며 미생물로서의 기능을 할 것으로 생각됨.

[표-9] 선충제 농도별 KRA-12 및 KRA-40의 생존률

Treatment concentration (%)	<i>B. subtilis</i> KRB-12	<i>S. nigrescens</i> KRA-40
0	3.0±0.3×10 ⁹	2.0±0.2×10 ⁵
0.1	2.0±0.3×10 ⁸	1.5±0.4×10 ⁵
0.5	3.0±0.7×10 ⁶	4.7±1.0×10 ⁴
1.0	1.3±0.3×10 ⁵	6.6±1.1×10 ³
3.0	2.2±0.8×10 ⁴	5.0±1.1×10 ²
5.0	-	-

Ethoprophos	0	$3.2 \pm 0.6 \times 10^9$	$2.5 \pm 0.3 \times 10^5$
	0.1	$1.8 \pm 0.3 \times 10^8$	$1.7 \pm 0.3 \times 10^5$
	0.5	$5.6 \pm 1.1 \times 10^6$	$2.4 \pm 0.4 \times 10^4$
	1.0	$7.3 \pm 1.7 \times 10^5$	$6.5 \pm 1.8 \times 10^3$
	3.0	$5.2 \pm 1.0 \times 10^4$	$1.1 \pm 0.2 \times 10^3$
	5.0	-	-
	Terbufos	0	$2.9 \pm 0.4 \times 10^9$
0.1		$2.2 \pm 0.4 \times 10^8$	$8.3 \pm 1.8 \times 10^4$
0.5		$5.2 \pm 1.4 \times 10^6$	$2.5 \pm 0.7 \times 10^4$
1.0		$2.8 \pm 1.0 \times 10^5$	$4.0 \pm 1.5 \times 10^3$
3.0		$3.1 \pm 1.4 \times 10^4$	$2.7 \pm 0.5 \times 10^2$
5.0		-	-

- 젤라틴 분해능이 우수한 KRB-12, 살선충 활성이 우수한 KRA-40 균주는 다른 효능으로 향선충 활성을 나타내는 균주이기 때문에 미생물제로 개발하여 현장에 적용할 경우 더 우수한 향선충 활성을 나타낼 것으로 생각됨. 따라서 함께 처리할 경우 토양 내에서 상호 저해하지 않고 생존할 수 있는지 알아보기 위하여 교차 저해활성을 측정하였음. 결과적으로 두 균주는 상호 저해활성을 나타내지 않음.



[그림 8] KRB-12 및 KRA-40 균주의 상호 교차 저해활성

● 뿌리혹선충 방제를 위한 현장실험을 진행하기 전에 최종 선택한 KRB-12, KRA-40 균주 배양액을 혼합 처리할 경우 단독 균주와 비교하여 향선충 활성이 우수한지 고추모종을 이용한 pot실험을 진행하였음. 혼합균주가 처리된 군은 단독으로 처리했을 때보다 고추의 생육상태 좋아졌으나, 향선충제를 처리한 경우 생육을 감소시키는 것을 확인할 수 있었음.



[그림 9] 혼합균주의 뿌리혹선충 방제효과

A: Negative control (H₂O), B: Control 1 (LB medium) C: Control 2 (GSS medium), D: Fosthiazate, E: *B. subtilis* KRB-12, F: *S. nigrescens* KRA-40, G: *B. subtilis* KRB-12 + *S. nigrescens* KRA-40, H: *B. subtilis* KRB-12 + *S. nigrescens* KRA-40 + Fosthiazate.

[표-10] 고추 모종 지상부 및 지하부의 길이, 건조 무게 변화 (pot 실험)

Treatments	30 days				60 days			
	Root length (cm)	Shoot length (cm)	Dry weight of the root (g)	Dry weight of the shoot (g)	Root length (cm)	Shoot length (cm)	Dry weight of the root (g)	Dry weight of the shoot (g)
H ₂ O	19.8±0.84	28.2±0.84	0.18±0.02	0.88±0.03	32.0±1.58	34.6±2.61	0.22±0.01	0.92±0.03
LB media	18.2±0.84	27.2±1.3	0.15±0.01	0.49±0.05	21.2±0.84	31.4±0.89	0.16±0.01	0.45±0.04
GSS media	18.6±0.55	24.6±1.67	0.17±0.01	0.56±0.03	20.0±0.71	28.4±1.14	0.22±0.01	0.62±0.01
Fosthiazate	17.4±0.89	28.6±1.14	0.16±0.01	0.62±0.03	20.0±0.84	28.2±1.79	0.19±0.01	0.62±0.01
KRB-12	18.8±0.84	28.6±0.55	0.17±0.01	0.79±0.03	20.8±0.84	32.6±1.67	0.21±0.01	0.81±0.04
KRA-40	19.2±2.77	29.2±2.17	0.19±0.02	0.64±0.05	22.8±3.64	32.0±2.55	0.21±0.03	0.76±0.06
KRB-12+KRA-40	18.2±1.92	27.4±1.34	0.19±0.02	0.68±0.05	22.8±2.59	32.2±4.49	0.23±0.04	0.78±0.07
F+KRB-12+KRA-40	18.8±0.84	29.4±0.55	0.19±0.01	0.67±0.06	23.8±1.48	33.8±1.79	0.23±0.02	0.80±0.03

- 60일 후 토양 내 뿌리혹 선충 수는 1830개로 증가하였으며, 고추 모종의 뿌리에 생성된 뿌리혹의 개수는 140개로 증가하였음. KRB-12균주 배양액을 처리한 균의 토양 내 뿌리혹 선충 및 고추 모종의 뿌리에 생성된 뿌리혹의 수는 대조군과 비교하여 각각 1108개, 73개로 감소하는 경향을 나타냈으며, KRA-40 균주는 각각 538개, 40개로 감소하였음. 특히 KRB-12 및 KRA-40 균주를 혼합하여 처리할 경우 각각 506

개, 26개로 감소하는 효과가 우수한 것을 확인하였음. 또한, 선충제와 혼합균주를 처리하였을 때, 선충제 단독 처리 군과 비교하여 효과가 증가된 것을 확인하였음.

[표-11] 토양 및 뿌리혹 수 변화 (pot 실험)

Treatments	No. of nematode inoculation 1day	30 days		60 days	
		No. of juveniles per 100 g soil	No. of egg sac per root	No. of juveniles per 100 g soil	No. of egg sac per root
H ₂ O	-	-	-	-	-
LB media	1030±67.08	1306±82.95	78.8±6.53	1830±69.28	140.8±10.06
GSS media	1012±63.01	1300±72.11	79.2±6.83	1812±65.35	152±8.15
Fosthiazate	10.38±77.91	252±46.58	7.6±1.14	514±76.03	16±2.92
KRB-12	1034±63.87	582±107.33	53.2±7.85	1108±98.59	73.8±6.98
KRA-40	1030±51.48	366±60.25	30.2±8.41	538±44.38	40.0±7.31
KRB-12+KRA-40	988±14.83	334±24.08	30.0±2.35	506±20.74	26.6±2.41
F+KRB-12+KRA-40	1014±25.1	202±47.64	9.8±2.39	436±56.83	16.4±3.21

- 토양내 미생물 군총 변화를 확인한 결과 박테리아 및 방선균의 군수가 증가한 것을 확인하였음.

[표-12] 토양 내 군총 변화 (pot 실험)

Treatments	1 day before treatment		30 days		60 days	
	No. of total bacteria per 1 g soil	No. of actinomycetes per 1 g soil	No. of total bacteria per 1 g soil	No. of actinomycetes per 1 g soil	No. of total bacteria per 1 g soil	No. of actinomycetes per 1 g soil
H ₂ O	4.2±1.9×10 ³	-	2.9±0.9×10 ⁴	-	8.1±2.3×10 ⁴	-
LB media	6.1±2.5×10 ³	-	6.3±0.7×10 ⁴	-	3.5±0.7×10 ⁵	-
GSS media	5.1±0.8×10 ³	-	.4±0.7×10 ⁴	-	8.5±2.3×10 ⁵	-
Fosthiazate	4.2±2.0×10 ³	-	2.7±1.2×10 ³	-	5.9±1.3×10 ³	-
KRB-12	5.0±1.2×10 ³	-	.5±0.7×10 ⁶	-	3.2±0.9×10 ⁷	-
KRA-40	5.4±2.0×10 ³	-	3.8±0.7×10 ⁴	3.7±0.8×10 ³	5.6±0.8×10 ⁵	7.2±1.9×10 ⁴
KRB-12+KRA-40	5.2±2.3×10 ³	-	2.6±0.6×10 ⁶	4.8±1.1×10 ³	2.9±0.9×10 ⁷	5.9±0.7×10 ⁴
F+KRB-12+KRA-40	3.8±1.4×10 ³	-	1.3±0.3×10 ⁶	3.8±0.6×10 ³	2.5±0.6×10 ⁷	3.7±0.7×10 ⁴

(3) 스테비아분말에서 뿌리혹선충 방제효과

● 미생물제제를 만들 때 부용제로 사용할 수 있는 스테비아 분말을 사용해 뿌리혹선충 방제 가능성과 식물의 생육을 확인하였음. 전반적으로 스테비아 분말에는 뿌리혹선충 방제 효과가 미비하지만 1%첨가 군에서 식물의 생육이 증가하는 것을 확인하였음. 후에 미생물제 개발에 부용제로의 가치가 우수함.



[그림 10] 스테비아 분말의 뿌리혹선충 방제효과

2-3. 식물병원성 뿌리혹선충 방제 미생물제 개발을 위한 하우스 실험(선충 공격접종)

● 하우스 실험에서 고추에 대한 뿌리혹선충 방제효과(선충 공격접종)

- 협동기관 소재의 하우스에서 수박, 토마토 및 고추를 대상으로 뿌리혹선충을 공격접종 한 후 혼합균주를 사용하여 방제 효과를 측정하였음. 뿌리혹선충의 난양을 증류수를 이용해 부화시킨 뿌리혹선충(약 1000마리)를 직접 작물에 접종하고, 혼합균주를 10%로 희석한 후 15일 1회 간격으로 총 4회 처리하고 선충 방제 효과를 확인하였음.
- 하우스 실험 진행시 작물재배 전문가(협동과제 책임자)와 같이 실험을 진행하였음. 고추, 토마토, 수박의 생육시기와 순지르기 등의 실험을 진행한 상태에서 3개월 뒤에 뿌리의 상태를 보고 방제효과를 평가하였음. 이때 제품군(선충탄)은 뿌리혹선충 방제효과는 우수하나 식물의 생육을 억제하는 효능을 보였고, 본 실험에서 사용한 처리군은 방제효과와 식물생장을 대조군보다 촉진하는 효과를 보였음.



[그림 11] 하우스 실험



[그림 12] 하우스 실험에서 혼합균주의 고추에 대한 뿌리혹선충 방제효과(선충 공격접종)

● 하우스 실험에서 토마토에 대한 뿌리혹선충 방제효과(선충 공격접종)

- 토마토는 전반적으로 선충의 침투가 잘 이루어지지 않는 작물로 하우스 실험을 진행한 결과 선충만 처리한 군과 비교해 비슷한 결과를 얻고, 제품군에 비해 좋은 결과를 얻었음. 하지만 제품군과 선충만 처리한 군에 비해 지상부의 생육이 우수하였음.



[그림 13] 하우스 실험에서 혼합균주의 토마토에 대한 뿌리혹선충 방제효과(선충 공격접종)

● 하우스 실험에서 수박에 대한 뿌리혹선충 방제효과(선충 공격접종)

- 수박은 선충의 침투가 매우 잘 이루어지는 작물로 하우스 실험을 진행한 결과 선충만 처리한 군과 제품군에 비교해 상당히 우수한 결과를 얻었음. 하지만 제품군에 비해 전반적으로 뿌리에 흑이 많지만 크게 감염되지 않고, 지상부의 생육이 우수하였음.

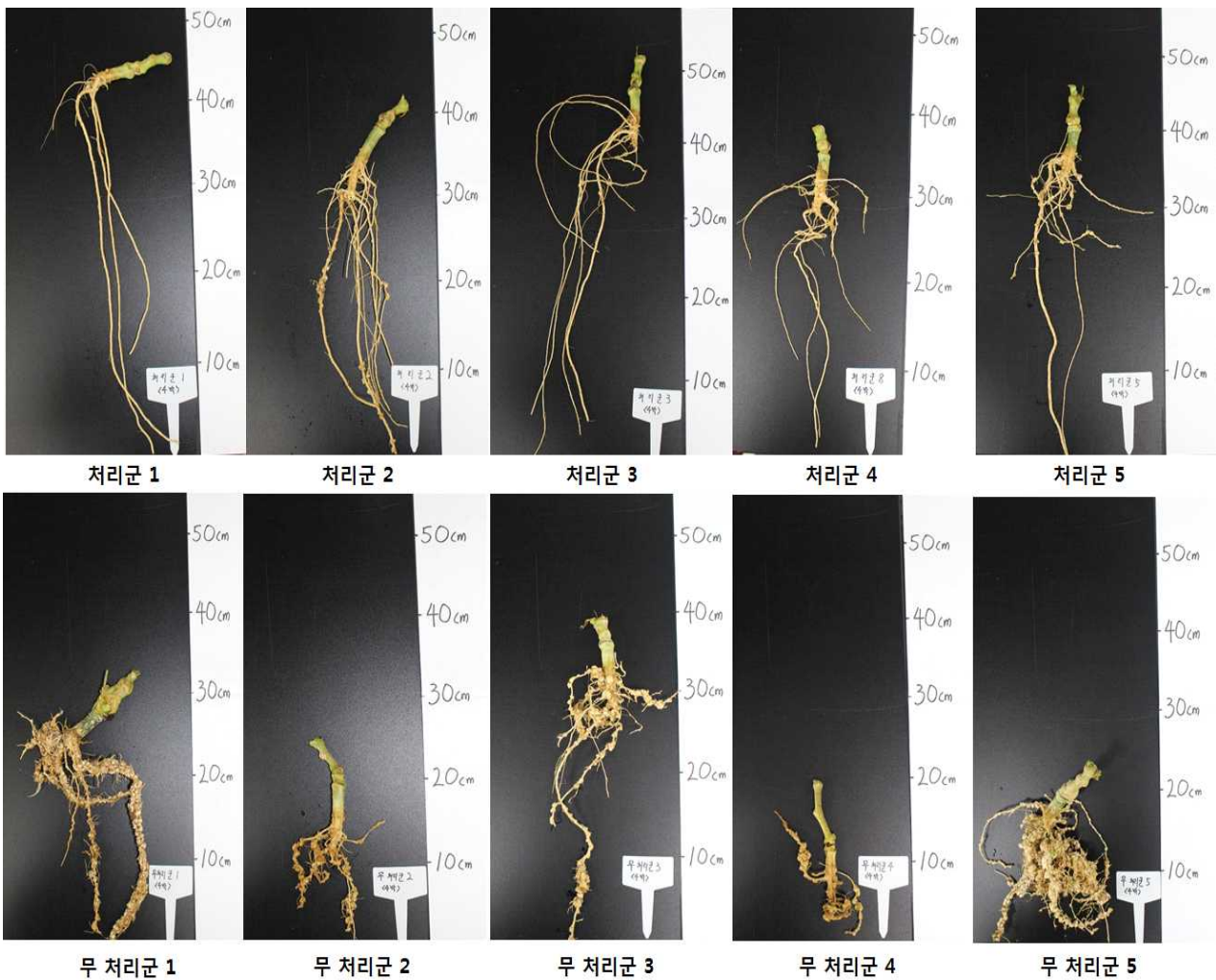


[그림 14] 하우스 실험에서 혼합균주의 수박에 대한 뿌리혹선충 방제효과(선충 공격접종)

2-4. 식물병원성 뿌리혹선충 방제 미생물제 개발을 위한 현장실험

(1) 수박에 대한 뿌리혹선충 방제효과

- 현장실험은 2016.6.7.~8.14일까지 충남 부여군에 위치한 A 농장주의 하우스200평에서 수박 520주를 심어서 실험하였음. KRB-12와 KRA-40 배양액 각 10L씩 2톤의 물에 희석해 15일에 1회(총 4회) 관주로 실험을 진행하였음. 실험결과 선충이 대략적으로 200주 이상 자연적으로 감염되었음. 감염된 군에서 뿌리를 채취한 결과 본 실험에서 개발된 미생물을 처리한 군에서는 감염은 되었지만 추가적인 감염이 일어나지 않아 정상적인 수박의 생육과 수확이 가능하였음. 무처리군은 도중에 고사한 수박과 고사하지 않은 수박의 뿌리를 채취한 결과 뿌리혹이 심하게 붙어 정상적인 수박의 생육이 불가능하였고, 뿌리가 썩어 사라지고 있었음. 본 실험에서 사용한 혼합균주의 효능이 우수한 것을 확인하였음.



[그림 15] 수박농가 현장실험에서 혼합균주의 뿌리혹선충 방제 효과

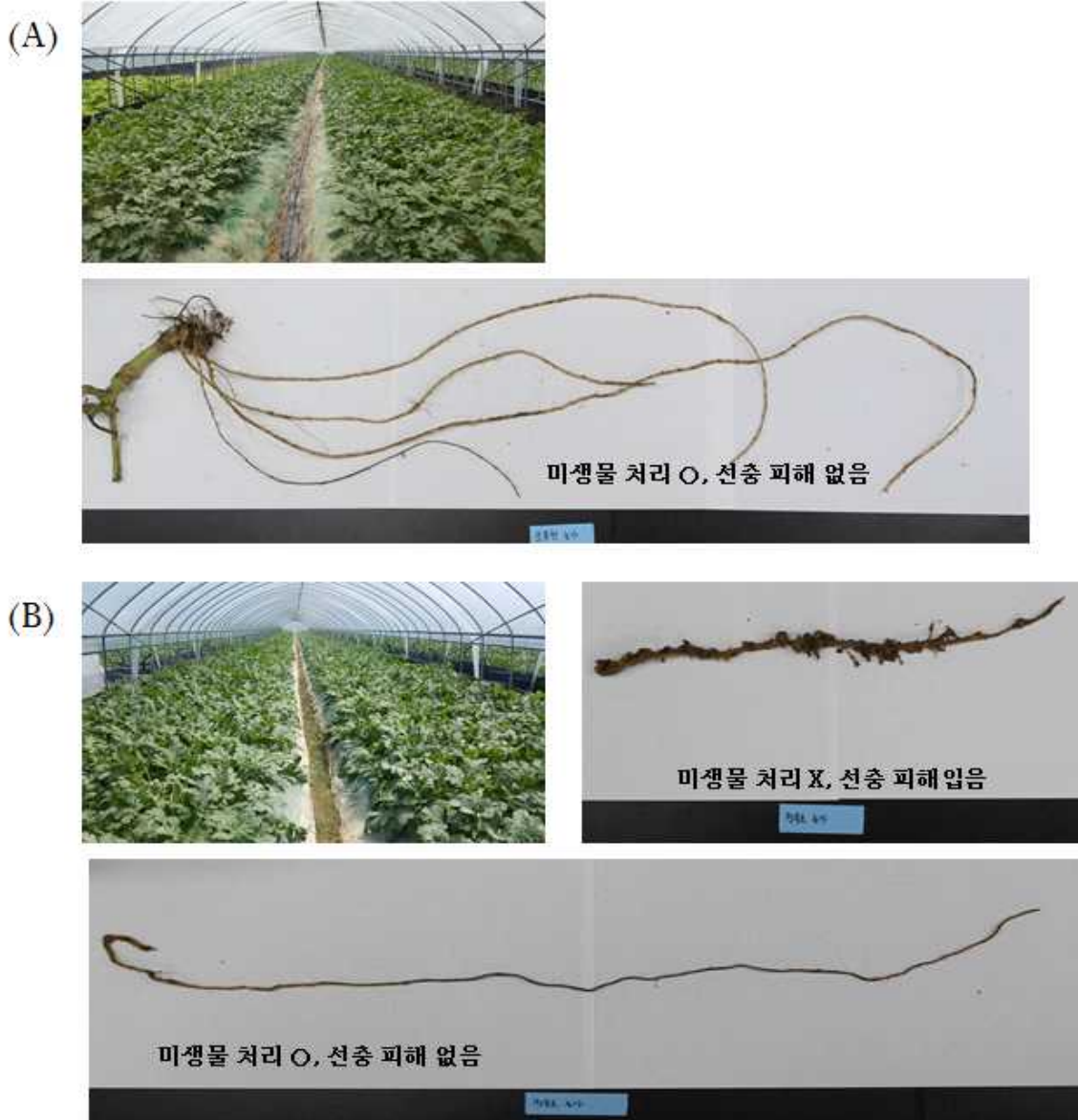
(2) 수박에 대한 뿌리혹선충 방제효과(연작)

- 현장실험은 2017. 6월부터 2017. 8월까지 충남 부여군에 위치한 A 농장주의 하우스 200평에서 수박 500여주를 심어서 실험하였으며, 추가적으로 부여군에 위치한 B농장주의 하우스에서도 실험을 진행하였음. KRB-12와 KRA-40 배양액 각 10L씩 2톤의 물에 희석해 15일에 1회(총 4회) 관주로 실험을 진행하였

으며, 3개월 후 수박 뿌리, 토양 내 선충 및 미생물 분포를 분석하였음.

- A 농가의 실험 결과, 선충에 의한 피해는 없었으며 평균 7~8 kg 의 수박을 전년도와 비슷하게 수확하였음. 그러나, 미생물을 처리하지 않은 하우스에서는 잎마름병에 의한 피해가 있었음.

- B 농가의 실험결과, 미생물이 처리되지 않은 곳은 선충의 피해를 입었으나, 미생물이 처리된 곳은 선충의 피해가 없었음. 평균 7~8 kg 의 수박을 전년도와 비슷하게 수확하였음.



[그림 16] 수박농가 현장실험에서 혼합균주의 뿌리혹선충 방제 효과

(A) A 농가, (B) B 농가

- 토양 내 선충 수를 측정한 결과, 조유현 농가의 경우 수확 전 후 선충 수가 $\times 10^2$ /토양 100 g으로 변화가 없었음. 전부호 농가는 수확 전 $\times 10^3$ /토양 100 g의 선충수가 $\times 10^2$ /토양 100 g으로 감소하였음.

[표-13] 미생물 처리 전후 토양 내 선충 변화

구분	파종전	수확후
	토양 100g 당 선충 수	
A 농가	2.4×10^2	2.4×10^2
B 농가	4.2×10^3	7.6×10^2

- 두 농가를 대상으로 파종 전과 수확 후 토양 내 미생물 균을 조사하였음. 조사결과, 연작 피해 실험을 진행한 A 농가의 경우 파종전보다 수확 후 토양내 총균수 및 방선균의 수치가 10배 증가하였으며, 토양상태가 개선 된 것을 확인하였음. 또한, B 농가의 경우 파종전보다 수확 후 토양내 방선균의 수치가 10배 증가하였으며, 토양상태가 개선 된 것을 확인하였음.

[표-14] 미생물 처리 전후 토양 내 미생물 균수 변화

구분	colony forming units/gram			토양상태		토양pH	
	총균수	방선균	곰팡이	B/F	A/F		
A 농가	파종前	4.8×10^7	2.2×10^6	3.0×10^5	160	7.33	5.18
	수확後	2.0×10^8	1.7×10^7	3.5×10^4	5,714	486	5.36
B 농가	파종前	3.4×10^7	7.4×10^4	2.0×10^5	170	0.37	4.31
	수확後	4.5×10^7	6.5×10^5	1.0×10^4	4,500	65	4.41

(3) 멜론에 대한 뿌리혹선충 방제효과

- 멜론 작물의 현장실험은 2016년 6월부터 9월까지 정읍에 위치한 농장주의 하우스 200평에서 약 500주를 심어서 혼합균주를 2톤의 물에 100배 희석하여 15일에 1번씩 총 4회 관주하여 실험하였음. 실험결과 선충이 대략적으로 100주 이상 자연적으로 감염되었음. 수박과 마찬가지로 감염된 균에서 뿌리를 채취한 결과 본 실험에서 개발된 미생물을 처리한 균에서는 감염은 되었지만 추가적인 감염이 일어나지 않아 정상적인 멜론의 생육과 수확이 가능하였음. 무처리군은 도중에 고사하거나 뿌리가 썩어서 사라지거나 수확이 어려웠음. 본 실험결과 개발된 혼합균주의 효능이 우수하였음.

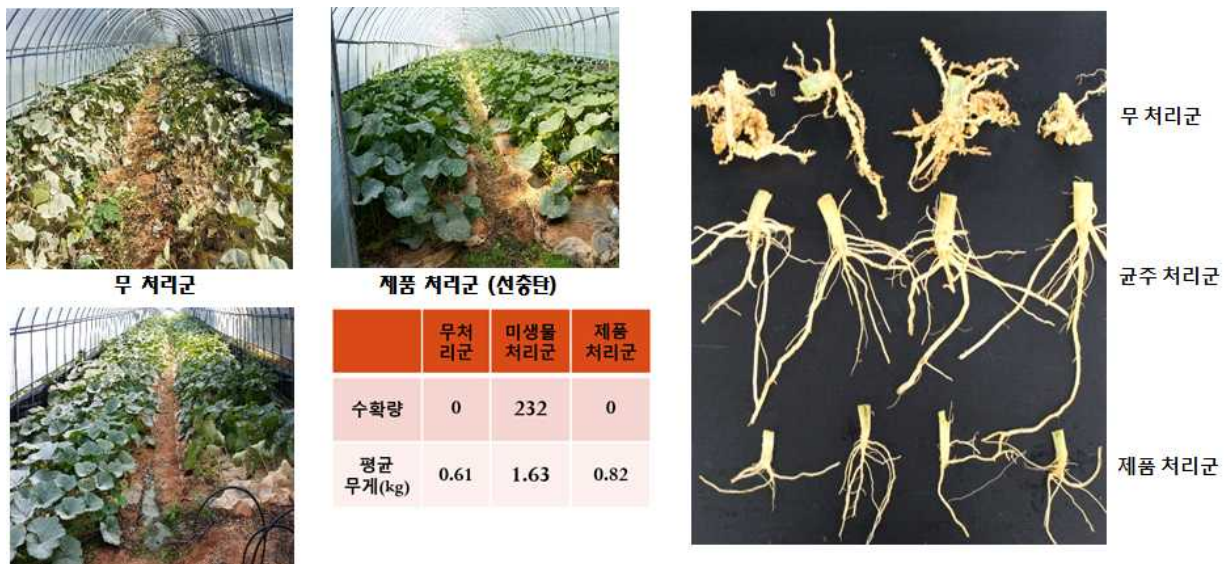


[그림 17] 멜론농가 현장실험에서 혼합균주의 뿌리혹선충 방제효과

(4) 단호박에 대한 뿌리혹선충 방제효과

- 단호박 작물의 현장실험은 2016년 8월부터 10월까지 고창에 위치한 농장주의 하우스 약 600평(하우스 4동)에서 각 하우스당 약 240주를 심어서 혼합균주를 3~4일마다 각 균주 5 L씩 혼합 분주 (20회)- 각 균주 100 L씩 분주하였음(선충의 피해가 심한 곳으로 사용자의 요청에 따라 한 작기 사용량 100 L를 20 회로 분할해서 적은 양으로 자주 사용함).

- 실험결과 선충이 대략적으로 100주 이상 자연적으로 감염되었음. 수박과 마찬가지로 감염된 군에서 뿌리를 채취한 결과 본 실험에서 개발된 미생물을 처리한 군에서는 감염은 되었지만 추가적인 감염이 일어나지 않아 정상적인 단호박의 생육과 수확이 가능하였음. 무처리군은 도중에 고사하거나 뿌리가 썩어서 사라지거나 수확이 어려웠고 제품처리군은 선충피해는 거의 없었지만 생육에 저해를 받아 수확에 어려움을 겪었음. 본 실험결과 개발된 혼합균주의 효능이 우수하였음.



[그림 18] 단호박농가 현장실험에서 혼합균주의 뿌리혹선충 방제효과

- 토양 내 선충수를 확인해본 결과, 미생물 제 처리 전 약 4,500 마리/토양 100g 가 존재하였으며, 60 일 후 미생물 혼합처리 시 약 1,680 마리/토양 100g 로 토양 내 선충수가 감소한 것을 확인하였음. 미생물제 방제가는 62.5%로 계산되었으며, 선충제와 유사하였음.

[표-15] 미생물 처리 전후 토양 내 선충 변화

Treatments	No. of nematode per 100 g soil		Control rate (%)
	0 day	60 day	
Non-treat	4420±941	4940±541.3	-
Fosthiazate	4560±937	1600±435.9	65.9
KRB-12 + KRA-40	4480±846	1680±476.5	62.5

- 토양 내 미생물 변화를 확인해본 결과, 박테리아 및 방선균은 미생물 처리 시 10배 증가하였음. 그러나 미생물을 처리하지 않은 군에서는 100 배 감소하였으며, 선충제 처리 군에서는 박테리아와 방선균이 각각 10배 및 100배 감소하였음.

[표-16] 미생물 처리 전후 토양 내 미생물 균수 변화

Treatments	1 day before treatment		30 days		60 days	
	No. of total bacteria per 1 g soil	No. of actinomycetes per 1 g soil	No. of total bacteria per 1 g soil	No. of actinomycetes per 1 g soil	No. of total bacteria per 1 g soil	No. of actinomycetes per 1 g soil
Non-treat	2.9±0.3×10 ⁶	1.7±0.5×10 ⁴	2.9±0.3×10 ⁷	4.9±1.1×10 ⁴	6.2±0.8×10 ⁶	6.1±2.2×10 ²
Fosthiazate	3.0±0.3×10 ⁶	1.8±0.3×10 ⁴	2.8±0.2×10 ⁶	9.1±0.6×10 ³	7.1±1.5×10 ⁵	2.6±0.6×10 ²
KRB-12+KRA-40	2.7±0.6×10 ⁶	1.8±0.4×10 ⁴	3.5±0.3×10 ⁷	5.9±0.7×10 ⁵	5.8±0.3×10 ⁷	3.8±0.4×10 ⁵

2-5. 미생물 액상 제형 및 고상 제형에 따른 항선충 활성 비교실험(pot 실험)

- 지금까지 미생물을 이용한 pot 실험, 공격접종실험 및 현장적용실험은 액상 제형을 이용하여 실험을 실시하였음. 액상제형의 경우 장기간 보관 능력이 떨어져 미생물의 활성이 감소 될 수 있기 때문에, 협동 기관에서 제조한 고상 제형의 시제품에 대하여 고추모종을 이용한 항선충 활성을 측정하였음.
- 기존의 실험 방법에 의하여 실험을 진행하였으며, 액상 및 고상 제형은 250, 500, 1000, 2000 배 희석하여 실험을 진행하였음. 30일 및 60일에 고추 모종의 생육, 토양 내 선충 수 및 미생물 균수 변화를 측정하였음.
- 고추 모종의 생육 변화를 측정해본 결과, 액상(L) 및 고상(P) 제형 모두 유사한 생육변화를 보였음. 미생물 미처리군과 비교하여 미생물 처리군에서 지상부 및 지하부의 길이, 무게가 증가하였음. 선충제의 경우 지상부 및 지하부의 생육에 영향을 주는 것을 확인하였음.

[표-17] 고추 모종 지상부 및 지하부의 길이, 건조 무게 변화(pot 실험)

Treatments	30 days				60 days			
	Root length (cm)	Shoot length (cm)	Dry weight of the root (g)	Dry weight of the shoot (g)	Root length (cm)	Shoot length (cm)	Dry weight of the root (g)	Dry weight of the shoot (g)
Negative control	18.8±0.45	26.4±4.16	0.18±0.01	0.83±0.03	31.4±1.82	34.8±1.64	0.22±0.02	0.95±0.04
Control	18.2±0.84	27.8±1.79	0.16±0.01	0.50±0.01	20.4±1.52	30.8±1.79	0.16±0.01	0.48±0.03
Fosthiazate	17.8±1.3	28.0±1.73	0.17±0.02	0.61±0.03	19.2±1.79	29.8±1.92	0.19±0.01	0.63±0.04
P - 250	20.0±1.58	29.6±0.89	0.18±0.01	0.82±0.02	22.8±2.17	33.6±2.07	0.23±0.01	0.87±0.05
P - 500	17.8±1.3	30.2±1.3	0.17±0.01	0.67±0.02	20.6±1.67	31.4±1.95	0.21±0.01	0.77±0.05
P - 1,000	18.4±1.14	29.8±0.84	0.19±0.01	0.67±0.04	21.8±1.79	33.6±1.14	0.21±0.01	0.79±0.02
P - 2,000	19.0±0.71	27.6±1.14	0.18±0.01	0.68±0.03	22.4±2.3	32.6±1.52	0.21±0.01	0.73±0.04
L - 250	20.6±1.14	30.0±1.58	0.19±0.01	0.84±0.03	23.0±2.24	34.0±1.58	0.24±0.02	0.90±0.03
L - 500	18.2±1.48	30.0±1.58	0.18±0.01	0.67±0.03	22.4±1.14	32.2±1.3	0.21±0.01	0.79±0.03
L - 1,000	18.4±1.14	30.2±1.79	0.19±0.01	0.69±0.03	22.2±1.1	33.4±1.14	0.20±0.01	0.82±0.04
L - 2,000	18.2±1.64	29.4±1.82	0.18±0.01	0.69±0.03	21.6±1.52	32.0±1.87	0.22±0.02	0.72±0.04

- 토양 내 선충 변화를 확인해본 결과, 액상 및 고상 제형 모두에서 농도 의존적으로 토양 내 선충의 수 및 뿌리에 생성되는 뿌리혹의 개수를 감소시켰음. 또한, 토양 내 미생물 변화를 확인해본 결과, 액상 및 고상 제형에서 미생물의 균수 증가가 확인 됨.

[표-18] 미생물 처리 전후 토양 내 선충 변화(pot 실험)

Treatments	No. of juveniles per 100 g soil	30 days		60 days	
		No. of juveniles per 100 g soil	No. of egg sac per root	No. of juveniles per 100 g soil	No. of egg sac per root
Negative control	-	-	-	-	-
Control	1032±58.05	1322±66.48	81.0±6.16	1866±76.03	150.60±8.17
Fosthiazate	1018±30.33	264.0±55.5	10.2±1.3	506.0±65.04	20.06±1.14
P - 250	1080±42.43	342.0±65.73	34.0±6.89	532.0±39.62	50.4±7.06
P - 500	1030±41.83	494.0±20.74	52.4±4.51	654.0±51.77	63.8±5.02
P - 1,000	1022±46.58	562.0±108.95	71.4±9.37	1086.0±69.86	85.0±8.89
P - 2,000	1038±37.01	718.0±34.21	77.4±5.18	1178.0±96.28	98.4±4.39
L - 250	1016±33.62	326.0±48.79	31.4±5.13	524.0±38.47	49.4±4.72
L - 500	1006±43.93	476.0±24.08	50.2±2.95	612.0±46.58	60.2±2.95
L -1,000	1002±22.8	520.0±70.36	68.2±8.44	948.0±52.63	85.8±4.09
L -2,000	1004±34.35	694±11.40	71.2±3.56	1154.0±64.27	92.6±6.31

[표-19] 미생물 처리 전후 토양 내 미생물 균수 변화(pot 실험)

Treatments	1 day before treatment		30 days		60 days	
	No. of total bacteria per 1 g soil	No. of actinomycetes per 1 g soil	No. of total bacteria per 1 g soil	No. of actinomycetes per 1 g soil	No. of total bacteria per 1 g soil	No. of actinomycetes per 1 g soil
Negative control	4.1±1.2×10 ³	-	2.8±0.7×10 ⁴	-	8.3±1.7×10 ⁴	-
Control	4.8±1.3×10 ³	-	5.5±0.5×10 ⁴	-	2.3±0.8×10 ⁵	-
Fosthiazate	3.6±1.7×10 ³	-	3.3±2.0×10 ³	-	6.7±1.9×10 ³	-
P - 250	4.7±0.8×10 ³	-	3.4±1.1×10 ⁵	1.7±0.5×10 ²	5.5±1.3×10 ⁶	6.3±1.1×10 ²
P - 500	4.1±1.3×10 ³	-	2.1±0.5×10 ⁵	1.1±0.2×10 ²	1.7±0.4×10 ⁶	1.5±0.4×10 ²
P - 1,000	5.0±1.3×10 ³	-	9.9±0.8×10 ⁴	6.8±2.6×10	2.8±0.7×10 ⁵	9.6±2.1×10
P - 2,000	5.0±1.0×10 ³	-	6.2±0.7×10 ⁴	3.7±1.0×10	1.5±0.4×10 ⁵	5.7±1.8×10
L - 250	5.2±0.6×10 ³	-	3.3±1.0×10 ⁵	2.1±0.4×10 ²	5.7±0.6×10 ⁶	7.6±0.9×10 ²
L - 500	4.4±0.9×10 ³	-	2.4±0.5×10 ⁵	1.4±0.2×10 ²	2.0±0.4×10 ⁶	2.0±0.6×10 ²
L -1,000	4.8±1.2×10 ³	-	1.1±0.1×10 ⁵	8.6±1.1×10	3.8±0.8×10 ⁵	1.2±0.1×10 ²
L -2,000	5.3±0.6×10 ³	-	6.7±1.5×10 ⁴	4.9±1.3×10	1.9±0.3×10 ⁵	7.5±1.3×10

2-6. 고상 제형의 균수변화 측정

- 협동기관에서 제조된 고상 제형에 대한 안정성 실험을 위하여 기간별 함유된 균수의 변화를 측정하였음. 상온에서 보관하며 2017년 1월부터 9월까지 3개월 간격으로 균수 변화를 측정한 결과, $10^6 \sim 10^7$ 의 유효균수가 측정되어졌으며 기간별 균수 변화가 없는 것을 확인하였음.

[표-20] 기간별 유효균수 변화

날짜	CFU/g
2017년 1월	$7.5 \times 10^6 \sim 2.2 \times 10^7$
	$7.2 \times 10^6 \sim 1.1 \times 10^7$
	$7.7 \times 10^6 \sim 2.5 \times 10^7$
2017년 3월	$7.0 \times 10^6 \sim 2.1 \times 10^7$
	$6.6 \times 10^6 \sim 1.3 \times 10^7$
	$7.5 \times 10^6 \sim 2.2 \times 10^7$
2017년 6월	$7.1 \times 10^6 \sim 2.1 \times 10^7$
	$6.7 \times 10^6 \sim 1.2 \times 10^7$
	$7.7 \times 10^6 \sim 2.5 \times 10^7$
2017년 9월	$6.5 \times 10^6 \sim 2.0 \times 10^7$
	$8.0 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^7$
	$7.5 \times 10^6 \sim 2.0 \times 10^7$



2-7. KRB-12 및 KBA-40 배양액으로부터 유효활성 성분의 분리정제

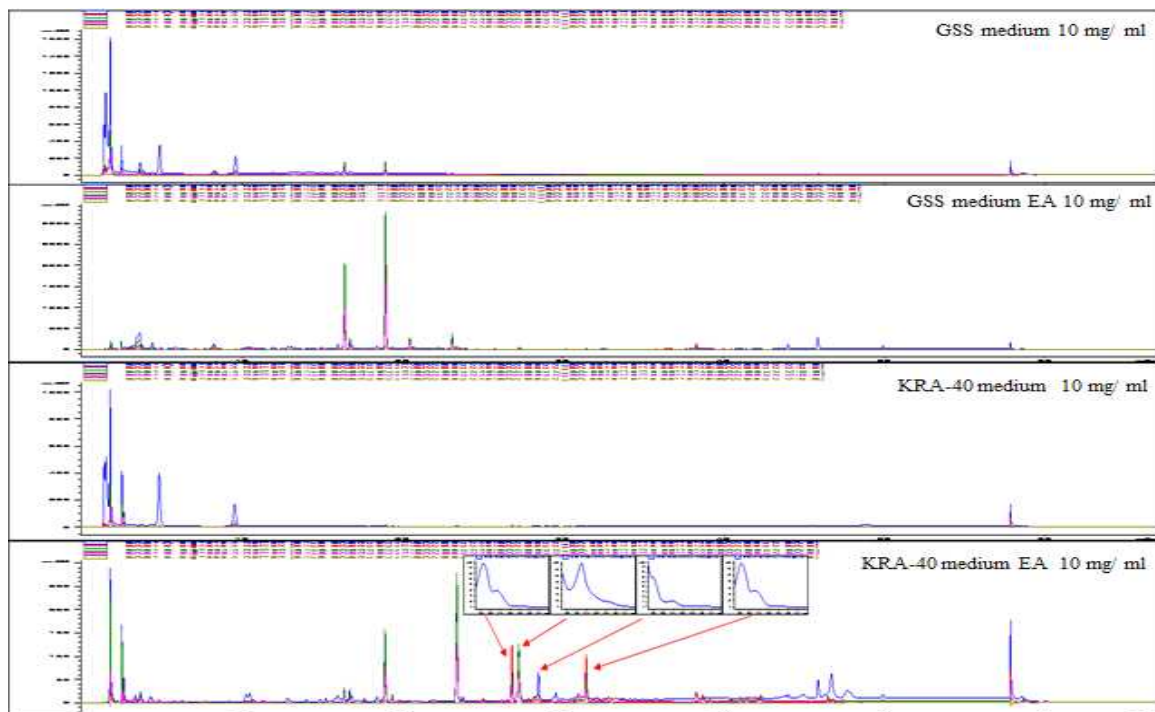
- 살선충 활성이 우수한 KRA-40 번 균주의 미생물 배양액으로 활성을 나타내는 유효활성 성분을 분리하기 위하여 액체크로마토그래피법으로 배양액을 분석하였음
- step gradient 용매 조건을 이용하여 컬럼, 이동상 및 분석 시간을 설정하여 최적의 분석 조건을 확립함.
- 방선균 배양용 배지성분으로 20분대에 확인되며, 방선균 KRA-40 균주 배양액은 20~40분대에 메인 peak들이 관찰됨
- 하지만 메인 성분으로 분석된 peak들이 GSS 배지에 함유된 콩성분인 isoflavonoid계 화합물로 확인되었음.

> GSS medium 및 KRA-40

GSS medium	150 ml
KRA-40	150 ml
↓	
EA 150 ml × 4 extraction	
GSS	19.6 mg
KRA-40	398.45mg
Sample : 10 mg / ml	

HPLC condition			
HPLC	Agilent 1200 series		
Column	YMC Hydrosphere C ₁₈ (4.6 μm × 150 mm)		
Flow rate	1.0 ml/min		
UV length	DAD		
Injection volume	10 μL		
Column Temp.	25°C		
Mobile phase	TIME(min)	H ₂ O	MeCN
	00:00	95	5
	05:00	95	5
	25:00	60	40
	45:00	0	100
	55:00	0	100
	57:00	95	5
	67:00	95	5

[그림 19] HPLC 분석조건



[그림 20] 방선균 KRA-40 배양액 및 방선균 배지(GSS 배지)의 크로마토그램

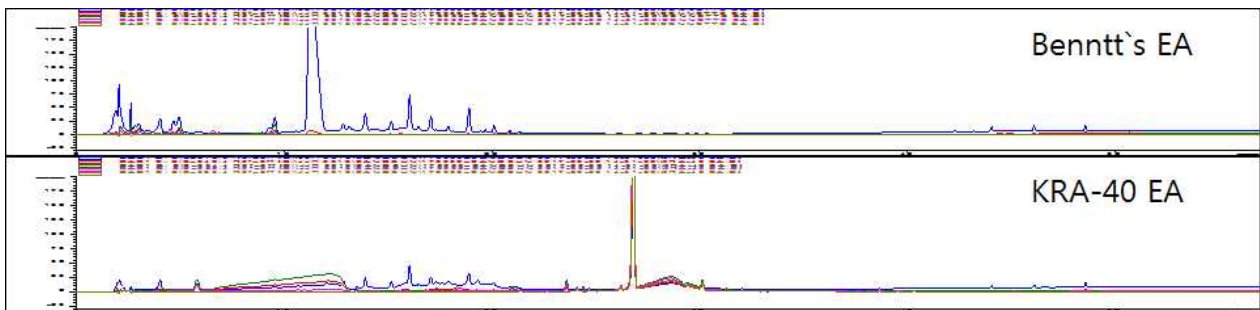
- 따라서 배지성분이 이외에 방선균의 대사산물을 분석하기 위하여 Benntt' s 배지를 이용하여 방선균 40을 배양한 후 HPLC 분석을 실시하였음.
- 분석결과 미생물이 함유되지 않은 배지의 성분들은 20분대에서 확인이 되었으며, 방선균 40번을 배양한 배양액에서는 30분대에 main peakemfdl 확인되었음.
- 또한, KRB-12 균주 배양액을 분석한 결과 45분 이후에 main peak들을 확인할 수 있음.

➢ LB medium 및 KRB-12, Benntt' s medium 및 KRA-40

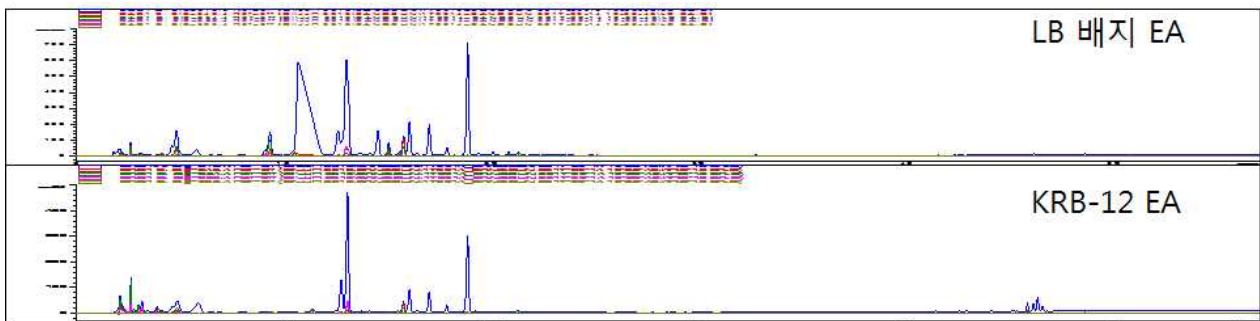
LB medium	150 ml
KRB-12	150 ml
Benntt' s medium	150 ml
KRA-40	150 ml
↓	
EA 150 ml × 2 extraction	
Sample : 1 mg / ml	

HPLC condition			
HPLC	Agilent 1200 series		
Column	YMC Hydrosphere C ₁₈ (4.6 μm × 150 mm)		
Flow rate	1.0 ml/min		
UV length	DAD		
Injection volume	10 μL		
Column Temp.	25°C		
Mobile phase	TIME(min)	H ₂ O	MeCN
	00:00	95	5
	05:00	95	5
	35:00	50	50
	45:00	0	100
	55:00	0	100
	57:00	95	5
	67:00	95	5

[그림 21] HPLC 분석조건



[그림 22] 방선균 KRA-40 배양액 및 방선균 배지(Benntt' s 배지)의 크로마토그램



[그림 23] 바실러스 KRB-12 배양액 및 LB 배지 크로마토그램

2-8. 산업화를 위한 제형화 및 안정성 확립

- 미생물제제의 유통 안정성을 확인하기 위하여 선발된 대량 생산용 배지에서 키운 미생물의 균주 보존성을 조사하였음. 각각 4℃, 40℃, 65℃에 보관하여, 보관된 미생물 배양액은 0일째, 7일째, 30일째, 60일째 배지에 도말하여 30℃에서 36시간 배양한 후 균수를 측정하였음. 4℃와 40℃에 보관할 경우 균수의 변화는 거의 없었으며 65℃에 보관했을 경우에도 크게 균수 변화는 일어나지 않았음. 통상적으로 65℃에서 60일간 보관했을 경우와 실온에서 1년간 보관했을 경우의 보존율이 같다고 판단할 경우 본 제품의 생균수는 1년 이상 보존되는 것으로 판단됨.

- 부형제와 보조제로서는 스테비아의 추출물과 스테비아 부산물을 활용하였으며, 스테비아는 항산화효능과 유기물 분해능이 뛰어나며 유효 미생물인 토양환경에 적응하는 동안 먹이로도 사용되는 최적의 부형제 및 기능보조제로 적합하였음. 또한 식물자원의 고분자는 바이오응집제로도 활용이 되므로 미생물제제의 제형화 및 바이오응집제로도 활용되고 있어 제형화의 재료로도 가능성이 높아 산업화시 원가 절감에 도움이 될 것으로 판단됨.

- 다양한 제형 개발을 위해 단일 미생물을 이용한 분말형 수화제 제품과 우수 균주 2종을 이용한 액상형 제품으로 개발하였음. 분말형 제품을 위해 동결 보호제와 안정제 등을 포함하여 기존의 바실러스 동결건조 공정을 활용하여 제품을 개발하였음. 액상형 제품은 스테비아 추출물을 활용하여 균의 보존성 및 안정성 그리고 식물의 저항성을 높여주었음.

- 개발된 미생물자원의 제품화를 위해 대량배양을 위한 산업용 배지성분 조건을 확립하였음. 확립된 배지 성분 조성은 효모추출물 (5g/L), Tryptone (10g/L), NaCl (10g/L), Stevioside (5g/L), Stevia extract (10g/L), Microelement mixture (0.1g/L)이며, 배지 제조 후 배양기에서 7일 간 배양하였음. 배양이 완료된 균주는 분말형 제품을 위해 연속원심분리기를 이용하여 배양액을 제거하였고, Dextrin을 동결보존제로 사용하여 혼합 후 2~3일 간 동결건조 하여 균주를 확보하여 제품화 함.

- 따라서 항선충 능력이 뛰어난 우수균주 2종을 활용한 분말형태와 액상형태의 제품군으로 제형화를 하였으며, 비료등록 및 유기농자재로 공시하여 상품화하는데 활용하고자 함.

- ① 상품화 1. 분말형 토양미생물제제 (유기농자재) : 항선충능 우수 토양미생물을 동결보존제와 안정제 등으로 동결건조하여 제형화한 분말형 수화제 제품군
- ② 상품화 2. 액상형 토양미생물제제 (비료) : 항선충능 우수미생물 2종을 활용하여 선충을 제어하고 발근력과 작물생육촉진에 우수한 스테비아 추출물을 활용하여 선충에 피해를 받은 뿌리의 발근을 촉진하여 작물생활에 도움을 주는 한 액상비료 형태의 제품군

2-9. 제품의 인증 및 등록

- 제형화된 시제품을 균주동정, 유효균수, 오염미생물, 중금속, 비해시험 등을 농진청지정 비료시험기관 지정기관에 시험 의뢰하여 시험분석 하였음.

- 액상제품의 경우 유효 미생물 생균수 측정을 3반복으로 실시한 결과 대표미생물의 생균수는 각각 *Bacillus subtilis*는 3.67×10^7 cfu/ml(g), *Streptomyces nigrescens*는 2.33×10^2 cfu/ml(g) 이상이 확인 되었음.

- 액상 제형으로부터 유효미생물을 분리하여 16S rRNA 유전자 염기서열 분석 결과, *Bacillus subtilis*에 100%, *Streptomyces nigrescens*에 99% 유사성을 가지고 있는 균주로 확인되었음.

제 16-M-72-1호			
미생물제제 분석성적서			
위탁자	① 성명 (법인명)	한국스테인아㈜	② 주민등록번호 (법인등록번호)
	③ 주소	권라북도 정읍시 입암면 검자중앙길 134-19	
공시품	④ 성상	액상	
	⑤ 상표명 (유효미생물)	스테비 선충질 액상 (Bacillus subtilis, Streptomyces nigrescens)	
⑥ 제조회사	한국스테인아㈜		
⑦ 검사방법	1. 유전자 염기서열 상동성 검색을 통한 균주 확인		
⑧ 용도	등록/인증용(신규)		
⑨ 분석항목	유효미생물		분석치 [cfu/mL(g)]
	Bacillus subtilis		3.67 × 10 ⁷
	Streptomyces nigrescens		2.33 × 10 ²
1) 본 성적서는 시료당 3항목 분석한 후의 결과입니다. 2) 본 성적서는 고배율 제공한 시료를 시험한 결과로써 전체제제에 대한 품질을 보증하지는 않음. 3) 본 성적서의 결과는 광도, 인산, 온도 및 소용 등외 수인자로 사용하실 수 없음.			
시험일자	2016년 12월 20일 최은희		
강원대학교 친환경농산물안전성센터장 (인)			

제 16-M-72-3호			
미생물제제 분석성적서			
위탁자	① 성명 (법인명)	한국스테인아㈜	② 주민등록번호 (법인등록번호)
	③ 주소	권라북도 정읍시 입암면 검자중앙길 134-19	
공시품	④ 성상	분말	
	⑤ 상표명 (유효미생물)	스테비 선충질 분말 (Bacillus subtilis)	
⑥ 제조회사	한국스테인아㈜		
⑦ 검사방법	1. 유전자 염기서열 상동성 검색을 통한 균주 확인		
⑧ 용도	등록/인증용		
⑨ 분석항목	유효미생물		분석치 [cfu/mL(g)]
	Bacillus subtilis		2.43 × 10 ⁷
1) 본 성적서는 시료당 3항목 분석한 후의 결과입니다. 2) 본 성적서는 고배율 제공한 시료를 시험한 결과로써 전체제제에 대한 품질을 보증하지는 않음. 3) 본 성적서의 결과는 광도, 인산, 온도 및 소용 등외 수인자로 사용하실 수 없음.			
시험일자	2016년 12월 20일 최은희		
강원대학교 친환경농산물안전성센터장 (인)			

[그림 26] 액상 및 분말형 향선충제 미생물 분석 시험성적서

- 제형화된 두 가지 시제품의 오염 미생물을 농촌진흥청 지정시험기관인 강원대학교에 의뢰하였음. 병원성 대장균(*Escherichia coli* 0157:H7), 병원성 살모넬라(*Salmonella* spp.), 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*), 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*) 5종의 병원성 미생물에 대한 분석을 실시하였음.
- 액상 및 분말형 제형에 대한 오염 미생물 분석실험결과, 5종의 병원성 미생물에 대하여 불검출 되었음.

병원성미생물 검정기록서

1. 검사항목 : '한국스테인아㈜ 스테비 선충질 액상' 내 병원성미생물 검정

2. 검사뢰제품명 : 한국스테인아㈜ 스테비 선충질 액상



3. 병원성미생물 검사방법

(1) 시료 조제
'한국스테인아㈜ 스테비 선충질 액상' 제품 1mL을 멸균된 생리식염수 9mL에 넣어 혼합하여 1:10 희석액을 제조함.

(2) 병원성 대장균(*Escherichia coli* 0157:H7) 검사
선택배지인 Eosin Methylene Blue Agar 배지에 조제된 시료 100μL를 접종 한 후 이를 37°C에서 48~72시간 배양한 후 광학적 colony의 유무를 확인함.

(3) 병원성 살모넬라(*Salmonella* spp.) 검사
선택배지인 Hektoen Enteric Agar 배지에 조제된 시료 100μL를 접종 한 후 이를 37°C에서 48~72시간 배양한 후 광학적 colony의 유무를 확인함.

(4) 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 검사
선택배지인 Baird Parker Agar 배지에 조제된 시료 100μL를 접종 한 후 이를 37°C에서 24~48시간 배양한 후 광학적 colony의 유무를 확인함.

(5) 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*) 검사
선택배지인 Oxford Agar 배지에 조제된 시료 100μL를 접종 한 후 이를 37°C에서 24~48시간 배양한 후 광학적 colony의 유무를 확인함.

(6) 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*) 검사
선택배지인 Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar 배지에 조제된 시료 100μL를 접종 한 후 이를 37°C에서 24~48시간 배양한 후 광학적 colony의 유무를 확인함.

4. 병원성미생물 검사 결과

(1) 병원성 대장균(*Escherichia coli* 0157:H7) 검사 결과
'한국스테인아㈜ 스테비 선충질 액상'에 대한 병원성 대장균의 검사 결과 광학적 colony가 검출되지 않아 병원성 대장균 음성으로 판정되었음.



병원성 대장균(*Escherichia coli* 0157:H7) 불검출

(2) 병원성 살모넬라(*Salmonella* spp.) 검사 결과
 '한국스태비아류 스테미 선충집 분말'에 대한 병원성 살모넬라의 검사 결과 검은색 colony가 검출되지 않아 병원성 살모넬라 음성으로 판정되었음.



(3) 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 검사 결과
 '한국스태비아류 스테미 선충집 분말'에 대한 황색포도상구균의 검사 결과 검은색 colony가 검출되지 않아 황색포도상구균 음성으로 판정되었음.



(4) 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*) 검사 결과
 '한국스태비아류 스테미 선충집 분말'에 대한 리스테리아 모노사이토제네스의 검사 결과 검은색 colony가 검출되지 않아 리스테리아 모노사이토제네스 음성으로 판정되었음.



(5) 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*) 검사 결과
 '한국스태비아류 스테미 선충집 분말'에 대한 바실러스 세레우스의 검사 결과 분홍색 colony가 검출되지 않아 바실러스 세레우스 음성으로 판정되었음.



[그림 27] 액상형 항선충제 시제품 오염미생물 분석

병원성미생물 검정기록서

1. 검사항목: '한국스태비아류 스테미 선충집 분말' 내 병원성미생물 검정
2. 검사의뢰제품: 한국스태비아류 스테미 선충집 분말



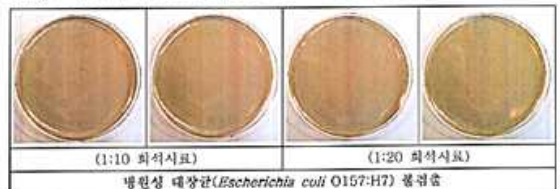
3. 병원성미생물 검사방법

- (1) 시료 조제
 '한국스태비아류 스테미 선충집 분말' 제품 1mL(g)을 멸균된 생리식염수 9mL에 넣어 혼합하여 1:10 희석액을 만든 후 이를 5mL를 위해 멸균된 생리식염수 5mL를 넣어 1:20 희석액을 제조함.
- (2) 병원성 대장균(*Escherichia coli* O157:H7) 검사
 선택배지인 Eosin Methylene Blue Agar 배지에 조제된 시료 100μL를 접종 한 후 이를 37°C에서 48~72시간 배양한 후 검은색 colony의 유무를 확인함.
- (3) 병원성 살모넬라(*Salmonella* spp.) 검사
 선택배지인 Hektoen Enteric Agar 배지에 조제된 시료 100μL를 접종 한 후 이를 37°C에서 48~72시간 배양한 후 검은색 colony의 유무를 확인함.

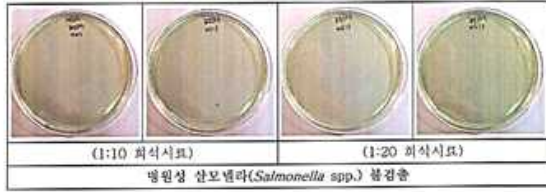
- (4) 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 검사
 선택배지인 Baird Parker Agar 배지에 조제된 시료 100μL를 접종 한 후 이를 37°C에서 24~48시간 배양한 후 검은색 colony의 유무를 확인함.
- (5) 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*) 검사
 선택배지인 Oxford Agar 배지에 조제된 시료 100μL를 접종 한 후 이를 37°C에서 24~48시간 배양한 후 검은색 colony의 유무를 확인함.
- (6) 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*) 검사
 선택배지인 Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar 배지에 조제된 시료 100μL를 접종 한 후 이를 37°C에서 24~48시간 배양한 후 인분홍색 colony의 유무를 확인함.

4. 병원성미생물 검사 결과

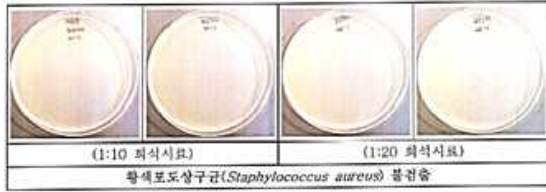
- (1) 병원성 대장균(*Escherichia coli* O157:H7) 검사 결과
 '한국스태비아류 스테미 선충집 분말'에 대한 병원성 대장균의 검사 결과 청록색 colony가 검출되지 않아 병원성 대장균 음성으로 판정되었음.



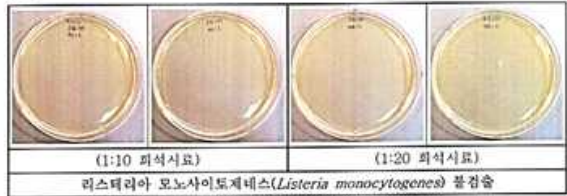
(2) 병원성 살모넬라(*Salmonella* spp.) 검사 결과
 '한국스태비아® 스테미 선종립 분말'에 대한 병원성 살모넬라의 검사 결과 검출된 colony가 검출되지 않아 병원성 살모넬라 음성으로 판정되었음.



(3) 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 검사 결과
 '한국스태비아® 스테미 선종립 분말'에 대한 황색포도상구균의 검사 결과 검출된 colony가 검출되지 않아 황색포도상구균 음성으로 판정되었음.



(4) 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*) 검사 결과
 '한국스태비아® 스테미 선종립 분말'에 대한 리스테리아 모노사이토제네스의 검사 결과 검출된 colony가 검출되지 않아 리스테리아 모노사이토제네스 음성으로 판정되었음.



(5) 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*) 검사 결과
 '한국스태비아® 스테미 선종립 분말'에 대한 바실러스 세레우스의 검사 결과 분홍색 colony가 검출되지 않아 바실러스 세레우스 음성으로 판정되었음.




[그림 28] 분말형 향선충제 시제품 오염미생물 분석


제 C-C-2016-83-1호			
병원성미생물 검사성적서			
위탁자	① 성명 (법인명)	한국스태비아®	② 주민등록번호 (법인등록번호)
주소	③ 주 소	전라북도 정읍시 입암면 검지중앙길 134-19	
공시품	④ 성 상	액상	
	⑤ 상 표 명	스테미 선종립 액상	
	⑥ 제조회사	한국스태비아®	
	⑦ 검사방법	o 병원성미생물 선택배지를 이용한 검정	
	⑧ 용 도	등록/인증용	
검사항목	병원성 미생물		검사 결과
	병원성 대장균(<i>Escherichia coli</i> O157:H7)		불검출
	병원성 살모넬라(<i>Salmonella</i> spp.)		불검출
	황색포도상구균(<i>Staphylococcus aureus</i>)		불검출
	리스트테리아 모노사이토제네스(<i>Listeria monocytogenes</i>)		불검출
	바실러스 세레우스(<i>Bacillus cereus</i>)		불검출
<small>1) 본 성적서는 시료를 3연속 분석한 후의 결과 값임. 2) 본 성적서는 고객이 제공한 시료를 시험한 결과로서 전체제품에 대한 품질을 보증하지는 않음. 3) 본 성적서의 결과는 당고, 건담, 온도 및 수분 등에 따라 수당함량의 사용량에 따라 달라질 수 있음.</small>			
시험책임자		2016년 12월 20일	최은화
강원대학교 친환경농산물안전성센터장 (인)			

제 C-C-2016-83-3호			
병원성미생물 검사성적서			
위탁자	① 성명 (법인명)	한국스태비아®	② 주민등록번호 (법인등록번호)
주소	③ 주 소	전라북도 정읍시 입암면 검지중앙길 134-19	
공시품	④ 성 상	분말	
	⑤ 상 표 명	스테미 선종립 분말	
	⑥ 제조회사	한국스태비아®	
	⑦ 검사방법	o 병원성미생물 선택배지를 이용한 검정	
	⑧ 용 도	등록/인증용	
검사항목	병원성 미생물		검사 결과
	병원성 대장균(<i>Escherichia coli</i> O157:H7)		불검출
	병원성 살모넬라(<i>Salmonella</i> spp.)		불검출
	황색포도상구균(<i>Staphylococcus aureus</i>)		불검출
	리스트테리아 모노사이토제네스(<i>Listeria monocytogenes</i>)		불검출
	바실러스 세레우스(<i>Bacillus cereus</i>)		불검출
<small>1) 본 성적서는 시료를 3연속 분석한 후의 결과 값임. 2) 본 성적서는 고객이 제공한 시료를 시험한 결과로서 전체제품에 대한 품질을 보증하지는 않음. 3) 본 성적서의 결과는 당고, 건담, 온도 및 수분 등에 따라 수당함량의 사용량에 따라 달라질 수 있음.</small>			
시험책임자		2016년 12월 20일	최은화
강원대학교 친환경농산물안전성센터장 (인)			

[그림 29] 액상 및 분말형 향선충제 시제품의 오염미생물 분석시험성적서

- 또한 중금속 8종(비소, 카드뮴, 수은, 납, 크롬, 구리, 니켈, 아연) 분석 결과 비료 등록 기준인 비소 20mg/kg이하, 카드뮴 2mg/kg이하, 수은 1mg/kg이하, 납 50mg/kg이하, 크롬 90mg/kg이하, 구리 120mg/kg이하, 니켈 20mg/kg이하, 아연 300mg/kg이하로 나와 개발한 두가지 형태의 제품 모두 비료 및 유기농자재로 등록이 가능함을 확인하였음.

발령번호 제 16-F-98-6 호		실인책임자	최용민	
검사 성적서				
위탁자	① 상호 한국스태비아㈜	② 주민등록번호	*****-*****	
③ 주소	전라북도 정읍시 입암면 집지중앙길 134-19			
공시품	④ 비료명명 스테비 선충킬 액상	⑤ 수량	1킬	
⑥ 번호	16-F-579			
⑦ 제조자 성명	임 병 훈			
⑧ 생산연월일	2016년 11월 19일			
⑨ 수량				
⑩ 검사 방법	공정분석법			
검사 성적	⑪ 항목 건물중에 대하여	단위	분석치	기준치
		비 소 mg/kg	흔적	20
		카 드 뮴 mg/kg	흔적	2
		수 은 mg/kg	흔적	1
		납 mg/kg	7.66	50
		크 뮴 mg/kg	57.52	90
		구 리 mg/kg	80.51	120
		니 켈 mg/kg	19.58	20
		아 연 mg/kg	112.56	300
1) 본 성적서는 고객이 제공한 시료를 시험한 결과로써 전체제품에 대한 품질을 보증하지는 않음. 2) 본 성적서의 결과는 광고, 전단, 홍보 및 소송 등의 수단으로 사용하지할 수 없음.				
농촌진흥청 비료의 품질검사방법 및 시료채취기준 제10조 제1항의 규정에 의한 검사성적서입니다.				
2016. 11. 				
강원대학교 친환경농산물안전성센터장 (인)				

발령번호 제 16-F-98-6 호		실인책임자	최용민	
검사 성적서				
위탁자	① 상호 한국스태비아㈜	② 주민등록번호	*****-*****	
③ 주소	전라북도 정읍시 입암면 집지중앙길 134-19			
공시품	④ 비료명명 스테비 선충킬 액상	⑤ 수량	1킬	
⑥ 번호	16-F-579			
⑦ 제조자 성명	임 병 훈			
⑧ 생산연월일	2016년 11월 19일			
⑨ 수량				
⑩ 검사 방법	공정분석법			
검사 성적	⑪ 항목 건물중에 대하여	단위	분석치	기준치
		비 소 mg/kg	흔적	20
		카 드 뮴 mg/kg	흔적	2
		수 은 mg/kg	흔적	1
		납 mg/kg	7.66	50
		크 뮴 mg/kg	57.52	90
		구 리 mg/kg	80.51	120
		니 켈 mg/kg	19.58	20
		아 연 mg/kg	112.56	300
1) 본 성적서는 고객이 제공한 시료를 시험한 결과로써 전체제품에 대한 품질을 보증하지는 않음. 2) 본 성적서의 결과는 광고, 전단, 홍보 및 소송 등의 수단으로 사용하지할 수 없음.				
농촌진흥청 비료의 품질검사방법 및 시료채취기준 제10조 제1항의 규정에 의한 검사성적서입니다.				
2016. 11. 				
강원대학교 친환경농산물안전성센터장 (인)				

[그림 30] 분말형 및 액상형 향선충제 중금속 분석 시험성적서

- 분말형 향선충제를 병해충관리용 자재로 등록하기 위한 분석으로 제품에 대한 경구병원성 시험, 경피시험, 어류영향독성시험, 피부자극시험, 안점막자극성시험 등의 독성시험을 (주)한국생물안전성연구소에 의뢰하여 진행하였음. 다섯 가지 독성 평가에서 레드, 잉어, 토끼에서 일반중독현상, 치사수, 체중변화 및 자극현상 등을 측정한 결과 급성독성으로 인한 영향은 없는 것으로 판단되었음.

- 개발된 제품의 판매 및 홍보에 도움을 주고, 유기농자재 인증을 위해 향선충제의 약해시험 및 약효시험을 (주)한국생물안전성연구소에 의뢰하여 진행하였음. 약해 시험은 고추, 배추, 상추, 오이, 토마토를 이용하여 진행하였고, 약효시험은 대표적인 선충 피해 작물인 참외를 이용하였음. 약해시험은 관주처리 시 생육저해가 나타나는지를 관찰하였으나 대조구와 비교했을 때 기준량 및 배량 처리하여도 약해가 나타나지 않아 유기농자재로서의 실용성을 인정받았음.

- 또한 약효시험을 위해 참외 뿌리혹선충 방제효과 시험을 실시한 결과 방제가 74.4%라는 우수한 방제효과를 보여 유기농업자재로 실용성이 있음이 확인되었음.

- 스테비 선충킬의 참외(부자꿀)에 대한 약해시험 결과 기준량, 배량에서 외관상 나타난 약해증상은 없었음.

2. 시험방법

가. 농촌진흥청 고시'농약의 등록기준 약효 및 약해 시험기준과 방법'에 준함.

나. 대상해충: 뿌리혹선충류(*Meloidogyne spp.*)

다. 시험작물(품종): 참외(부자골)

라. 대상충해 발생상황: 참외 뿌리혹선충은 약제처리 전 무처리 평균 생충수는 71.3마리, 최종약제처리 60일 후 무처리 평균 뿌리혹지수 4.8로 약효를 검정하기에 충분하였음.

시 험 약 제	주원료 함량(%)	약 효 시 험	
		희석배수 및 사용량	처리시기 및 방법
미생물 처리군	KRB-12(1×10^6 cfu/ml) + KRA-40(1×10^2 cfu/ml)	500배 (1,000g/660m ³)	정식후 7일간격 4회 토양관주처리 (2/10, 17, 24, 3/3)
무 처 리	-	-	-

[그림 31] 참외 뿌리혹선충 방제효과 실험방법

[표-21]참외 뿌리혹선충에 대한 약제방제 효과(최종 약제 처리 후 60일차)

시험약제	약제처리전 밀도(마리)	생충률(%)				유의차 (DMRT)	방제가 (%)
		I 반복	II 반복	III반복	평 균		
미생물(KRB-12+ KRA-40)	75.0	101.6	33.7	50.0	61.8	b	74.4
무 처 리	71.3	218.2	247.1	259.4	241.6	a	-

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표 및 목표 달성여부

구분	연구개발의 목표	달성내용	달성도(%)
1차년도	뿌리혹선충 방제용 유용미생물 개발	<ul style="list-style-type: none"> 젤라틴 분해능이 우수한 3종 바실러스 및 1종의 방선균 분리 항선충 활성을 보이는 10종의 방선균 분리 	100
	유용미생물을 이용한 항선충 활성 검증	<ul style="list-style-type: none"> 3종 바실러스 및 1종의 방선균 균주의 균체 및 상등액에서 뿌리혹선충 난낭을 분해하는 활성을 나타냄 10종의 방선균에서 뿌리혹선충의 생육을 억제함 분석결과 4종의 바실러스와 5종의 방선균이 선정되었으며, <i>Bacillus subtilis</i> (KRB-5, KRB-12), <i>B. amyloliquefaciens</i> (KRB-9, KRB-10), 방선균 <i>Streptomyces nigrescens</i> (KRA-40), <i>S. yatenensis</i> (KRA-28), <i>S. misionensis</i> (KRA-14, KRA-24), <i>S. flavogriseus</i> (KRA-6)으로 동정됨 	
	미생물제제의 효능검증 시험	<ul style="list-style-type: none"> 고추모종을 이용한 포트 실험결과 각각 2종의 바실러스 및 방선균균주에서 방제 효과를 보임 바실러스와 방선균을 혼합하여 처리한 결과 단독 처리군 보다 생육 상태나 뿌리혹선충 방제 효과가 우수함 고추, 토마토, 수박에 선충을 공격접종하고 방제효과를 확인함 수박 농가에서 (현장실험, 부여) 	
	선정된 유용미생물로부터 활성지표성분의 분리	<ul style="list-style-type: none"> 액체크로마토그래피법을 이용한 step gradient 용매 조건을 이용하여 컬럼, 이동상 및 분석 시간을 설정하여 미생물 배양액 분석 에틸아세테이트 분획에 대한 컬럼크로마토그래피 이용한 성분 분리정제 	
	산업화를 위한 제형화 및 안정성 확립	<ul style="list-style-type: none"> 바실러스 및 방선균의 산업용 배지조성 균주의 대량배양 최적화 동결보호제로 덱스트린과 포도당을 선정 부형제로 균주 영양성분 및 미량원소 선정 	
	제품의 인증 및 등록	<ul style="list-style-type: none"> 유기농업자재 관련규정 및 자재의 사용 허용성 검토 생균수 측정, 독성시험 등 항목점검 유기농업자재 시험기관 및 비료시험기관 선정 및 준비서류 점검 	
2차년도	유용미생물 대량 배양 체계	<ul style="list-style-type: none"> KRB-12 및 KRA-40 균주에 대한 500 L 대량배양 	100

확립	조건 확립 및 대량생산 • 부형제로 사용할 스테비아 분말에 대한 항선충 활성 검증
현장시험(소포장시험)	• 수박 농가에서 연작 시험(현장실험, 부여) • 멜론 농가에서 현장 적용실험(정읍) • 단호박 농가에서 현장 적용실험(고창)
제품에 대한 기시법 개발	• KRB-12 및 KRA-40 균주에 대한 최적 분석법 확립
산업화를 위한 제형화 및 안정성 확립	• 액상 및 고상제형에 대한 항선충 활성 비교 (pot 실험) • 분말형 제형에 대한 균수 변화측정 • 산업화를 위한 제형화 및 안정성 확립
제품의 인증 및 등록	• 제형화된 시제품을 균주동정, 유효균수, 오염 미생물, 중금속, 비해시험 완료 • 경구병원성 시험, 경피시험, 어류영향독성시험, 피부자극시험, 안점막자극성시험 등의 독성시험 완료 • 약해시험 및 약효시험 완료 • 친환경농자재 및 비료 등록을 위한 준비 완료

3-2. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

- 목표 미달성 원인
 - 성과목표인 기술이전 1건 및 제품화 1건을 달성하지 못했음.
 - 현재 협동기관과 기술이전을 위한 협상을 진행하고 있음.
- 후속연구의 필요성
 - 본 연구에서는 액상 제형을 기반으로 미생물에 대한 연구를 진행하였음.
 - 액상 제형보다는 운송과 장기 보관에 유리한 분말상 제형에 대한 제형화 연구가 필요함.
 - 분말상 제형에 대한 현장 적용시험이 필요함.
 - 분말상 제형에 대한 친환경 농자재 인증을 위한 독성시험, 유효성분 검사, 약해 및 약효 시험을 진행하기 위하여 후속 연구가 필요함(협동기관).
 - 미생물자원 및 배양기술을 이용한 병해충방제 및 작물생육촉진자재 개발을 위한 지속적 연구개발을 추진하고자 함(주관기관).

4. 연구개발성과의 활용 계획 등

- 학문적 기술적 측면
 - 뿌리혹선충 피해경감을 위한 친환경 방제기술 보급
 - 토양 병해 방제 기작 구명을 통한 효과적인 뿌리혹선충 방제법 개발
 - 미생물 대량배양기술 및 제형화 기술 개발을 통한 유용 미생물 산업화 시스템 개발
 - 키틴 및 젤라틴 분해 효소 활성을 나타내는 미생물의 항선충용 방제제로 개발
 - 유용 미생물 분리 및 기능규명으로 국내자원 보존 및 우수자원 산업화
- 경제 산업적 측면
 - 연간 국내에서 소비되는 살선충제 시장은 약 700억원으로, 수입대체 효과를 기대할 수 있음
 - 뿌리혹선충 방제용 미생물의 산업화 공정 확립을 통한 미생물 산업화 기술 확보 및 친환경 농산물 수확 증대로 양질의 친환경농산물 공급 확대
 - 친환경 농가소득 증대 및 친환경 농업 보급 확대가 기대
 - 천연자원을 이용한 생물농약 개발로 친환경 농업 활성화, 고부가 가치성 친환경농산물 생산에 이바지하여 농가소득 증대
 - 화학농약 사용량 저감을 통한 환경 개선 효과 및 국민 건강 증진
 - 미생물제제 산업화를 통한 친환경적 생물산업 육성기반 구축에 이바지
 - 합성농약 대체물질 사용으로 유기 농산물 생산의 친환경적 관리체계 구축으로 농업 생태계 보호
 - 고품질 안전 유기농산물 생산으로 생산자와 소비자의 요구 충족

붙임. 참고문헌

- Abdal, S.A., Algam, S.A.A., Lbrahim, E.A., Naim, A.M.E. 2014. In vitro screening of *Bacillus* isolates for biological control of early blight disease of tomato in shambat soil. *World J. Agric. Res.* 2, 47-50.
- Bridge, J. 1996. Nematode management in sustainable and subsistence agriculture. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34, 201-205.
- Casey, J.T., Walsh, P.K., O' Shea, D.G., 2007. Characterisation of adsorbent resins for the recovery of geldanamycin from fermentation broth. *Sep purify Technol.* 53, 282-288.
- Chitwood, D.J. 2002. Phytochemical based strategies for nematode control. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40, 221-249.
- de Lima Procópio, R.E., da Silva, I.R., Martins, M.K., de Azevedo, J.L., de Araújo, J.M., 2012. Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Braz J Infect Dis.* 16, 466-471.
- Elbadri, G.A., Lee, D.W., Park, J.C., Yu, H.B., Choo, H.Y. 2008. Evaluation of various plant extracts for their nematocidal efficacies against juveniles of *Meloidogyne incognita*. *J. Asia Pacific Entomol.* 11, 99-102.
- Flury, M., Papritz, A. 1993. Bromide in the natural environment: Occurrence and toxicity. *J. Environ. Qual.* 22, 747-758.
- Gu, Y. Q., Mo, M.H., Zhou, J.P., Zou, C.S., Zhang, K.Q. 2007. Evaluation and identification of potential organic nematocidal volatiles from soil bacteria. *Soil Biol. Biochem.* 39, 2567-2575.
- Ha, W.J., Kim, Y.C., Jung, H.C., Park, S.K. 2014. Control of the root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) on Cucumber by a liquid bio-formulation containing chitinolytic bacteria, chitin and their products. *Res. Plant dis.* 20, 112-118.
- Igonoffo, C.M., Dropkin, V.H., 1977. Deleterious effect of the thermostable toxin of *Bacillus thuringiensis* on species of soil-inhabiting, myceliophagus, and plant-parasitic nematodes. *J. Kans. Entomol. Sac.* 50, 394-398.
- Khan. Z., Kim, S. G., Jeon, Y. H., Khan, H. U., Son, S. H., Kim, Y. H., 2008. A plant growth promoting rhizobacterium, *Paennibacillus polymyxa* strain GBR-1, suppresses root-knot nematode. *Bioresour. Technol.* 99, 3016-3023.
- Kim, D.G., Choi, S.K. 2001. Effects of incorporation method of nematocides on reproduction of *Meloidogyne arenaria*. *Korean J. Appl. Entomol.* 40, 89-95.
- Kim, S.S., Kang, S.I., Kim, J.S., Lee, Y.S., Hong, S.H., Naing, K.W., Kim, K.Y. 2011. Biological control of root-knot nematode by *Streptomyces sampsonii* KK1024. *Korean J. Soil Sci. Fert.* 44, 1150-1157.
- Lee, Y.S., Anees, M., Nam, H. 2013. Biocontrol potential of *Lysobacter antibioticus* HS124 against the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, causing disease in tomato. *Nematology.* 5, 545-555.
- Liang, L.M., Meng, Z.H., Ye, F.P., Yang, J.K., Liu, S.Q., Sun, Y.N., Guo, Y., Mi, Q.L., Huang, X.W., Zou, C.G., Rao, Z.H., Lou, Z.Y., Zhang, K.Q. 2016. The crystal structures of two cuticle-degrading proteases from nematophagous fungi and their contribution to infection against nematodes. *FASEB J.* 24, 1391-1400.
- Moon, H.S., Khan, Z., Kim, S.G., Son, S.H., Kim, Y.H., 2010. Biological and structural mechanisms of disease development and resistance in chili pepper infected with the root-knot nematode. *Plant pathol. J.* 26, 149-153.
- Oka, Y., Ben-Daniel, B., Cohen, Y. 2012. Nematicidal activity of the leaf powder and extracts of *Myrtus communis* against the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Plant Pathol.* 61, 1012-1020.
- Pavaraj. M., Bakavathiappan, G., Baskaran, S. 2012. Evaluation of some plant extracts for their nematocidal properties against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *J. Biopest.* 5, 106-110.
- Ruanpanum, P., Laatsch, H., Tangchitsomkid, N., Lumyong, S., 2011. Nematicidal activity of fervenulin isolated from a nematocidal actinomycete, *Streptomyces* sp. CMU-MH021, on *Meloidogyne incognita*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27, 1373-1380.
- Singh, A.K., Rautela, R., Cameotra, S.S. 2014. Substrate dependent *in vitro* antifungal activity of *Bacillus* sp strain AR2. *Microb. Cell Fact.* 13, 67.
- Thomas, S. H. 1978. Population densities of nematodes under seven tillage regimes. *J Nematol.* 10, 24-27.
- Yang, J., Zhu, X., Cao, M., Wang, C., Zhang, C., Lu, Z., Lu, F. 2016. Genomics-Inspired discovery of three antibacterial active metabolites, Aurantinins B, C, and D from compost-associated *Bacillus subtilis* fm60. *J. agric. Food Chem.* 64, 8811-8820.
- Zhang, Y., Qiao, M., Weber, E., Baral, H.O., Hagedorn, G., Zhang, K., Yu, Z. 2010. *Arthrobotrys scaphoides* from China and Europe with a phylogenetic analysis including the type strain. *Mycotaxon* 111, 291-300.
- Zhu, Y.Z., Park, D.S., Cho, M.R., Hur, J.H., Lim, C.K. 2005. Suppression of *Meloidogyne arenaria* by different treatments of *Pasteuria penetrans*. *J. Pestic. Sci.* 9, 437-441.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발 사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발 사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.