

발 간 등 록 번 호

11-1541000-000522-01

나노기술을 이용한 친환경자재 개발 및 농약 감소를  
위한 서방형 나노제형의 개발에 관한 연구

Development of Environment-friendly Agricultural  
Materials with Nano-technologies and Nano-formulations  
of Controlled Release for Reducing Pesticides

충 남 대 학 교

농림수산식품자료실



0005515

농 립 수 산 식 품 부

# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “나노기술을 이용한 친환경자재 개발 및 농약 감소를 위한 서방형 나노제형의 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2010 년 5 월 29 일

주관연구기관명 : 충남대학교

주관연구책임자 : 유 용 만

세부연구책임자 : 유 용 만

연 구 원 : 운영남, 서미자, 강은진, 강민아,  
윤규식, 권혜리, 조창욱, 김태환,  
길영종, 박 찬, 김기수, 박민우

협동연구기관명 : 고려대학교

협동연구책임자 : 박 현 진

연 구 원 : 방성환, 배상은, 정성균, 이여림

협동연구기관명 : 강원대학교

협동연구책임자 : 이 윤 수

연 구 원 : 정진희, Lamsal, 이제숙, 정선미,  
한상지, 최성은

# 요 약 문

## I. 제 목

나노기술을 이용한 친환경자재 개발 및 농약 감소를 위한 서방형 나노제형의 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

인구 증가에 따른 식량의 수요요구에 맞춰 농산물의 대량생산은 성공하였으나 이에 따른 병·해충의 방제에 사용되는 합성농약의 오·남용으로 인축에 직접적 피해는 물론, 농산물에 남아있는 잔류농약 및 농생태계의 환경오염으로 인해 주변 생태계의 파괴가 심각한 상황이다. 또한 농약에 대한 저항성 병·해충이 증가하는 현상은 이제 사회적 문제로 대두되고 있다. 이러한 문제의 해결을 위해 전세계적으로 지속 가능한 농업(친환경 농업)을 목표로 작물생산을 꾀하고 있다. 특히나 “리우 환경 회의 협약” 이후 WTO/DDA 출범 및 협상에 따라 내국민이 유리하게 이용하고자 세계적으로 화학 합성농약 사용을 줄이려는 추세가 뚜렷이 나타나고 있다. 국내에서도 향후 10년 이내에 화학농약의 사용량을 70%이하로 줄이는 것이 확정되었으나 화학농약인 살충제, 살균제 및 제초제의 사용량 감소 방안은 아직까진 미진한 상태이다. 하지만, 소비자의 안전한 먹거리의 요구로 농업경쟁력의 향상, 농가소득의 보장, 농업생산성 유지를 위한 친환경 및 유기농업의 정착이 요구되고 있는 상황이며, 농업인의 기술적 애로를 해결 할 수 있는 방향의 연구가 필요한 상황임에는 분명하다. 따라서, 인축에 저독성이고 저항성을 낮출 수 있으며 환경오염을 유발하지 않는 친환경적인 천연물유래의 물질의 이용 방법과 기존의 농약을 보다 안전하게 사용하는 탁월한 제제를 개발하여 상용화함으로써, 국내 식량자원의 안전한 확보로 소비자의 요구를 충족시키는 것은 물론, 작물보호부문의 친환경적 방제의 독보적 원천기술을 보유하여 국가의 기술경쟁력 제고에도 기여하고자 한다. 최근 첨단 생명공학 기술로 사용되고 있는 나노바이오기술은 오는 2015년 1800억 달러 규모로 성장할 전망이, 지난 2000년 반도체 세계 시장 규모인 1480억 원을 훨씬 상회하는 수치로 나노바이오의 잠재력과 고속성장세를 방증하고 있으며, 또한 나노기술이 의약시장에 적용되는 시기는 향후 3~7년부터로 약물전달, 생체분석, 생물약품, 생체적합성 물질, 생물농약 등이 제품화 유망 분야인 것으로 예측되고 있다. 이러한 바이오 나노기술은 미국, 일본, 유럽 등 선진국에서 최근 고기능성 물질의 나노캐리어 개발을 위해 막대한 연구비를 투자하고 있으며 외국에서는 기술노출을 꺼려 학술논문에서는 거의 관련 기술이 발표되지 않고 있는 실정으로 현실적으로 본 기술을 해외에서 도입하기는 불가능한 상태이고, 선진국들은 과학적 효능과 안정성이 입증된 나노제품만을 선호하고 있는 추세이므로

과학적으로 그 효과가 검증된 고기능성의 나노 농약제품만이 향후의 국제시장에서 살아남을 수 있다고 판단되고 있다. 또한 농약의 나노화는 농약분야에 새로운 수요를 창출할 수 있는 상품으로 성장할 가능성이 높기 때문에, 농약의 나노화 원천기술을 확보함으로써 나노 농약제품의 생산을 앞당기어 새로운 시장형성을 선도하고 기술 수출에도 기여할 것으로 기대된다.

본 연구에서는 환경오염을 최소화하며 최소의 성분으로도 약효를 극대화시키고 지속시킬 수 있는 서방형제형의 살충제와 살균제 제형을 나노기술을 이용하여 확립하고자 하였으며, 나노제형화한 살충제와 살균제를 다양한 환경에서 용출농도를 조절할 수 있는 나노캐리어 제조를 통해 주요 병해충에 대한 방제기간과 방제효과를 조절할 수 있는 제형을 개발코자 실시하였다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

#### 1. 나노소재 탐색 및 개발

- 은 나노 유용물질 소재 탐색
- 나노화공정의 기술개발 및 응용방법 확립
- 생물고분자물질을 이용한 나노캐리어 제조
- 농약전달시스템에 사용될 다양한 크기의 나노캐리어 비드의 제조

#### 2. 나노소재를 이용할 대상 병·해충과 작물보호제(화학농약, 친환경 자재)의 선발 및 이들의 이용 가능성 검토

- 나노화에 적합한 대상 병·해충의 선발
- 나노화에 적합한 작물보호제 선발 및 적용
- 적용 가능한 병·해충, 작물 및 사용 시기 검토
- 나노화된 농약의 병·해충 침투 기작 구명
- 농약으로 나노화에 성공하고 나서 용출시험이 완료되면 다양한 제형검토

#### 3. 나노기술과 작물보호제의 융합 및 적용

- 활용가능한 물질의 나노화 기술응용 및 나노-바이오 기술 적용 검증
- 나노캐리어의 농약 용출제어 실험
- 2년차에서부터 방제 대상으로 선정된 병·해충의 약효 및 약해 검증을 위한 실내 실험 및 소포장 실험
- 선발된 제품의 다양한 제제화를 통하여 이를 생물검정으로 제제 선정실험
- 나노-바이오 기술이 적용된 은 및 키토산 등 유용물질의 최종 선발

#### 4. 나노기술의 개발



- 선발된 은 및 키토산 등 유용물질의 양산을 위한 공정 개발
- 효과를 증대시킬 수 있는 공정개발의 개선 및 안정성 검증
- 은 및 키토산의 나노화를 위한 나노화 공정의 보완 및 본 가동 시험
- 곤충 및 작물세포의 기공을 통한 나노화 농약의 침투 이행 기작 분석
- 서방형 제형의 개발되면 농약으로서 안정성 시험과 독성감소 시험 및 활용 방법 시험

#### IV. 연구개발결과

1. 나노제형에 적합한 살충제와 그 대상해충을 선발하기 위해 파밤나방, 담배거세미나방, 복숭아혹진딧물, 목화진딧물, 톱다리개미허리노린재, 온실가루이, 꽃노랑총채벌레 등 8종의 방제 대상 해충에 대하여 실내실험을 실시한 결과, 살충효과가 우수하고 많은 작물과 해충에 등록되어 있는 에토펜프록스, 알파사이피메스린 2종과 진딧물류와 같이 흡즙형 구기를 가지고 있는 해충에 대해 높은 살충활성을 보이는 피리플루퀴나존 총 3종의 살충제가 선발되었다. 선발된 3종의 살충제 각각에 대한 대상해충별 나노제형에 따른 살충효과 및 약효지속효과를 조사하여 서방형 제형으로서 개발 가능성을 확인할 수 있었다.
2. 키토산 캐리어에 의해 나노화된 에토펜프록스는 난방제 나방류 해충인 담배거세미나방과 파밤나방 유충에 대해 탁월한 살충활성을 나타내었는데, 처리 후 15일 까지 높은 살충율을 보이며 서방형 제형으로서의 특성을 보여주었다. 특히나 사용된 키토산 캐리어의 특성에 따른 살충제의 살충효과나 약효지속성에 있어 차이를 나타내었는데, 키토산 분자량 30,000 0.1% 타입의 나노제형이 살충효과가 처리 후 15일 이후까지도 나타났다. 이는 나노제형이 아닌 에토펜프록스 처리시 살포 5일 후에도 살충율이 50%이하를 나타내는 것을 볼 때 서방형 제형으로 적합한 것을 보여주고 있다.
3. 나노제형 에토펜프록스의 집파리, 꽃노랑총채벌레, 톱다리개미허리노린재, 온실가루이에 대한 살충효과는 처리 직후 비나노제형과의 초기 살충율에 있어 큰 차이를 보이지 않았으며, 이후 약효지속효과 또한 차이를 보이지 않아 서방형 제형 효과를 판단할 수 없었다.
4. 알파사이피메스린 나노제형에 대한 목화진딧물의 살충력 및 약효지속효과를 조사한 결과, 처리 후 4일까지는 나노타입간 차이를 보이지 않았으나, 처리 후 14일 이후의 키토산 분자량 30,000 0.1% 나노타입의 개체군 증가율이 -0.037로 키토산 분자량 3,000 0.3% 나노타입의 개체군증가율인 0.231보다 낮아 살충효과의 지속성을 확인할 수 있었다. 복숭아혹진딧물의 알파사이피메스린 나노제형에 따른 살충효과 및 약효지속효과는 확인되지 않았다.

5. 피리플루퀴나존 키토산 용액의 분자량과 농도 차이에 의한 나노타입에 따른 복숭아혹진딧물의 약효지속효과와 살충효과를 조사한 결과, CS 30,000 0.1% 나노타입에서 초기살충율이 낮게 나타났으나, 처리 후 16일차에서는 살충율이 70% 이상으로 최고치를 나타내는 것을 확인할 수 있었다. CS 3,000 0.3% 나노타입에서는 살충효과가 18일까지 약 70%이상을 나타내며 서방형제형으로써 효과를 나타내었다.
6. 나노타입별 농도에 따른 복숭아혹진딧물의 살충효과 및 약효지속효과를 조사하였다. CS 30,000 0.1% 나노제형의 농도별 생물실험결과 농도가 가장 높은 100ppm에서 다른 농도보다 살충율이 좋았지만, 농도에 따른 차이는 확인할 수 없었다. 그러나, 복숭아혹진딧물의 개체군 증가율을 확인한 결과, 처리된 농도가 높을수록 증가율은 낮게 나타났다. CS 3,000 0.3% 나노타입 100ppm 생물실험결과, 진딧물 살충율이 22일에서 가장 높게 나타났고, 증가율 또한 저조하게 나타났다.
7. 우리나라의 현재 나노바이오 시장은 22조 규모로 2020년에는 97조 시장으로 성장할 전망이다. 나노기술이 전반적인 의약시장에 적용되는 시기는 향후 3~7년부터로 약물전달, 생체분석, 생물약품, 생체적합성 물질, 생물농약 등이 제품화 유망분야인 것으로 예측되며, 생분해성 나노 기능성 소재, 나노 농약 및 나노 난작물 보호제는 새로운 수요를 창출할 수 있는 상품으로 성장할 가능성이 높다.
8. Top-down 방식의 신기술 가공 기법을 이용한 안정성, 체내이용성, 물리적 특성이 개선된 건강기능성 식품 신소재 개발, 소비자 신뢰 확보와 수출증진을 위한 식품안전, 품질관리, 유통 및 식품서비스 기술 개발, 서방형(controlled release) 제형 개발을 위한 생물고분자를 이용한 나노캐리어 제조하였다.
9. Nano carrier system의 사이즈 조절, 표면특성 조절 및 포박물질 방출분석이 체계적으로 이루어졌으며 목적에 부합하는 제형을 탐색하였다.
10. 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 바이오플러스(주)에서 제공된 WA-CV-WA13B, WA-AT-WB13R과 WA-PR-WB13R용액을 사용하였다. 10ppm, 25ppm, 50ppm, 100ppm 농도로 은 나노 용액을 제조하여 실험한 결과, 곰팡이의 경우 모든 배지에서 균주들이 10ppm부터 억제 효과를 나타냈으며, 대부분의 균주가 100ppm에서는 높은 성장 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 *Sclerotinia cepivorum* 이 생성하는 균핵을 대상으로 하여 같은 실험을 하였다. 그리고 은 나노 용액을 혼합하여 4가지 용액 조합을 만들어 *Sclerotinia minor*와 *Sclerotinia cepivorum*을 대상으로 같은 실험을 실시하였다. 결과적으로, 곰팡이는 혼합하여 사용한 용액보다는 개별적으로 사용한 용액에서 더 나은 억제효과를 나타냈으며, 7ppm부터 약 80% 이상의 억제효과를 나타냈다. PDA 배지에서 가장 좋은 억제효과를 나타내었으며, 이는 배지마다 성분이 다르기 때문에 영양적이 차이에서 균사의 성장이 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. 세균의 경우, WA-PR-WB13R 용액에서 3가지 세균에 대해 10ppm에서 높은 억제효과를 보였고, 3가지 용액 모두 25ppm에서 세균의 성장을 억제하였다. 은 나노 용액의 약해 실험결과, 100ppm까지는 약해가 전혀 일어나지 않았으며, 200ppm이상의 경우는 약간의 잎의 변색이 일어났다. 따라서, 100ppm이상의 농도를 사용시 약해가 일어난다고 생각 된다.

11. TEM 관찰 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 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.
12. 은나노 용액을 활용한 파 뿌리 썩음병 방제효과 검정 기내 및 포장 실험 결과, 기내 실험에서 7ppm부터 효과가 나타났으며, PDA 배지에서 좋은 억제효과를 보였다. 포장 실험한 결과, 무처리구에 비해 처리구의 생체중과 건물중 모두 증가하였다. 토양 미생물 개체군도 세균은 감소하였다. 곰팡이의 경우 조금 증가하는 경향이 나타났으나, 파 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 보여졌다.
13. 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 추정되며, 이에 대한 추가 적인 실험이 수행될 필요가 있는 것으로 판단된다.

14. 작물재배 토양에서 은 나노 용액의 사용이 미치는 영향을 분석한 결과, 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.
15. 은 나노 용액을 처리 후 2008년 포장시험에서 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 2는 7월 29일에 23.30 mg kg<sup>-1</sup>, 8월 4일에 4.49 mg kg<sup>-1</sup>, 8월 25일에 14.15 mg kg<sup>-1</sup>이었으며 다른 처리구와 비교하여 높은 은 농도가 측정된 것은 경엽 처리시 토양으로 유입으로 인한 것으로 판단된다. 분석값이 일정하지 못한 것은 시험포장에서 시기 별 토양 시료 채취시 균일한 시료 채취가 어렵기 때문으로 사료 된다.
16. 은나노 용액을 활용한 고추탄저병 방제 포장시험 결과, 2008년 포장시험의 경우, 무처리 (Control 1)는 84.13%의 감염률을 나타내었고, 발병전 처리에서, 감염률은 D사의 은나노액처리(Control 2)에서 35.39%와 웨나리처리(Control 3)에서 24.61%를 보였고, Nanover™ 10ppm에서 13.41%, 30ppm에서 20.55%, 50ppm에서 9.71%, 100ppm에서 16.66%를 보였다. 발병후 처리에서 감염률은 D사의 은나노액처리(Control 2)에서 72.14%와 웨나리처리 (Control 3)에서 63.15%를 보였고, Nanover™ 10ppm에서 50.32%, 30ppm에서 36.48%, 50ppm에서 67.56%, 100ppm에서 54.63%를 보였다. 발병 후 처리구들의 경우 약제 살포 후 잦은 강우로 약효가 경감하였다는 점을 고려해도, 탄저병 방제에는 Nanover™의 발병 전 처리가 발병 후 처리보다 효과가 좋음을 확인 하였다. 추가적으로 3년차에 방제 효과 검증은 발병 전 후 처리 횟수의 조정 및 농도 별 처리 등을 통해 추가로 수행 예정이다. 결론적으로 본 연구에서 Nanover™의 발병 전 50ppm 처리가 다른 처리에 비하여 가장 좋은 효과를 보였고, Nanover™를 발병 후에 처리한 것 보다 모든 농도에서 발병 전에 처리하였을 때 다른 대조구보다 효과가 있음을 확인 하였다. 2009년 포장시험의 경우, Nanover™ 1회 처리 하였을 때는 30ppm에서 16.47%의 감염률로 은나노의 효과가 가장 좋았고, 2회 처리 하였을 때는 50ppm에서 21.16%로 감염 억제 효과가 가장 좋았다. 3회 처리 하였을 때는 10ppm에서 21.27%로 감염률이 낮았으며, 무처리구에 비하여 전체적으로 낮은 발병률을 나타내었다. 본 실험의 결과 탄저병이 발병 전에 10, 30, 50, 100ppm의 농도로 은나노액을 처리한 경우가

발병 후 100ppm 농도로 처리한 경우나 무처리구 보다 낮은 발병률을 보였다. 발병 후 100ppm의 농도로 처리한 경우 Control 보다 병해 발생억제 효과를 보였지만 은나노액을 발병 전에 처리한 경우 보다 방제효과는 떨어졌다. 결론적으로 WA-PR-WB13R 용액이 고추 탄저병에 대하여 발병 전 처리를 통해 병해발생 억제 효과를 거둘 수 있을 것으로 판단된다.

17. 키토산 코팅 살균제를 이용하여 고추 탄저병 병원균을 대상으로 Controlled release가 가능한 작물 보호제를 선발 할 수 있는지 여부를 확인하기 위한 포장시험의 경우, 고추 탄저병에 효과가 있는 것으로 알려진 살균제인 Tebuconazole을 각각 3,000Da, 30,000Da의 chitosan으로 코팅하여 고추탄저병 발병 초에 포장에서 1-3회 처리하여 발병률을 관찰하였다. 코팅을 하지 않고 처리한 고추 탄저병의 이병률은 42.82%로 나타났다. 살균제 3,000Da를 1000배 희석한 살균제의 1회 처리의 이병률은 34.81%, 2회 처리는 53.92%, 3회 처리 하였을 때는 39.91%로 나타났다. 3,000Da를 1,500배 희석한 살균제의 이병율은 1회 처리 37.18%, 2회 처리 51.73%, 3회 처리는 31.11%로 나타났다. 30,000Da의 1,000배 희석한 살균제의 이병률은 1회 처리 33.77%, 2회 처리 56.94%, 3회 처리는 29.80%로 가장 낮게 나타났다. 30,000Da를 1,500배 희석한 살균제의 이병률은 1회 처리 39.97%, 2회 처리 47.93%, 3회 처리는 38.89%로 나타났다. 코팅한 살균제의 발병 억제의 효과는 코팅한 30,000Da의 Tebuconazole을 1,000배 희석하여 3회 처리하였을 때 가장 좋은 효과를 확인 할 수 있었다.
18. 은나노 용액을 처리한 토마토 잎의 RNA분석을 통해 은나노 처리가 식물체의 유전자 발현에 미치는 영향 조사한 결과, Control에 비해 은나노를 처리하였을 때 항산화 관련 유전자 *LeSOD2*와 *LeAPX2*는 은나노 처리와 상관없이 모두 발현을 했지만 *LeSOD2*는 처리 후 1일과 3일에서 가장 뚜렷한 발현이 있었고 *LeAPX2*도 역시 은나노에 영향을 받지 않고 발현을 했지만 특히 처리 후 1시간과 3시간, 5일 후에 가장 진하게 발현되었다. 병원균 관련 유전자 *LePR1*은 control이 희미하지만 모두 발현 하였고, *LePR1* 역시 은나노 처리에 상관없이 은나노 용액을 처리 후에 증가하는 양상을 보이다 1일 이후에 다시 감소하여 5일에 크게 발현 되다가 다시 줄어드는 경향을 보였다. 토마토의 항산화관련 유전자와 병원균 관련 유전자들은 은나노에 영향을 받지 않고 모두 정상적으로 발현하는 것을 확인 할 수 있었다.
19. 나노 코팅한 Difenoconazole 처리가 오이흰가루(powdery mildew)병의 균사 및 포자의 생육억제 기작을 구명하기 위한 연구를 수행하기 위하여 오이흰가루(powdery mildew)병 병원균을 대상으로 균사 및 포자에 나노 코팅한 Difenoconazole을 처리하여 SEM으로 관찰하였다. 무처리 한 경우 균사와 포자의 표면이 매끄러우며 건강한 것을 관찰 할 수 있다. 반면에 코팅한 Difenoconazole 약제를 처리한 균사와 포자의 경우 균사와 포자의 표면으로 화학 약제가 포도송이 같이 엉겨 붙어 있는 모습을 관찰할 수 있었다. 또한, 처리한 화학 약

제의 코팅 막이 깨져 화학약제가 흘러나오는 모습도 관찰 할 수 있다. 처리 후 시간이 지날 수록 나노 코팅한 Difenoconazole의 효과를 관찰 할 수 있었다. SEM을 x300, x1,000로 관찰한 결과 3,000Da를 1,000배 희석하여 처리한 흰가루의 균사는 처리 직후부터 시간(1일, 3일, 5일, 7일, 10일, 15일)이 경과할수록 균사와 포자가 말라 가는 것을 관찰 하였다. 3,000Da의 코팅한 Difenoconazole을 1,500배 희석하여 처리한 경우에는 처리 후 1일과 3일 경과 하였을 때 무 처리에 비해 미미한 차이가 있었지만 5일 후 부터는 균사와 포자가 급격하게 사멸하는 것을 확인 할 수 있었다. 30,000Da의 코팅한 Difenoconazole을 1,000배 희석하여 처리한 경우 powdery mildew의 포자와 균사가 처리 1일 후부터 균사와 포자가 사멸하는 것을 확인 할 수 있었다. 코팅한 Difenoconazole을 30,000Da의 1,500배 희석 처리한 결과 처리 3일 후부터 포자와 균사 모두 급격하게 사멸하는 것을 관찰 할 수 있었다.

20. 나노 코팅한 Tebuconazole의 고추탄저병 병원균 방제 기작 연구 결과, 무처리 한 경우 균사 표면이 매끄러우며 건강한 균사의 성장을 확인 할 수 있다. 반면에 코팅한 Tebuconazole 약제를 처리 후 시간이 지날수록 나노 코팅한 Tebuconazole의 효과를 관찰 할 수 있었다(1일, 3일, 5일, 10일, 15일). SEM을 x300, x1,000로 관찰한 결과 3,000Da를 1,000배 희석하여 처리한 *Colletotrichum gloeosporioides* 균사는 약제 처리 3일 후 부터 시간이 경과할수록 균사가 조금씩 말라 가는 것을 관찰 하였다. 3,000Da의 코팅한 Tebuconazole을 1,500배 희석하여 처리한 경우에는 처리 후 1~3일 경과 하였을 때 무 처리에 비해 미미한 차이가 있었지만 5일 후 부터는 균사가 급격하게 사멸하는 것을 확인 할 수 있었다. 30,000Da의 코팅한 Tebuconazole을 1,000배 희석하여 처리한 경우 *Colletotrichum gloeosporioides* 균사가 처리 3일 후부터 말라가는 것을 확인 할 수 있었다. 코팅한 Tebuconazole을 30,000Da의 1,500배 희석 처리한 결과 처리 5일 후부터 균사가 급격하게 사멸하는 것을 관찰 할 수 있었다.

21. 은나노 용액의 고추탄저병 병원균 방제기작을 연구하기 위해 은나노 용액을 농도별로 처리한 후 SEM으로 관찰 한 결과, nano-silver 용액은 농도별(30ppm, 50ppm, 100ppm), 처리 후 시간(1일, 3일, 5일, 10일, 15일)에 따른 효과를 관찰 할 수 있었다. SEM을 x300, x1,000로 관찰한 결과 30ppm의 nano-silver 용액을 처리한 *Colletotrichum gloeosporioides* 균사는 약제 처리 5일 후 부터 시간이 경과할수록 균사가 조금씩 말라 가는 것을 관찰 하였다. 50ppm의 nano-silver 용액을 처리한 *Colletotrichum gloeosporioides* 균사의 생장억제 또한 처리 5일 후에 미미한 효과를 보이다가 시간이 경과 할수록 10일, 15일이 경과 할수록 억제효과를 보였다. 100ppm의 경우 역시 처리 5일 후부터 균사가 말라 가는 것을 확인 할 수 있지만 다른 농도에 비해 처리 10일 후엔 거의 모든 균사가 말라 있는 것을 관찰하였다. 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.

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

## SUMMARY

1. In order to select of suitable insecticides and target insect pests for nano formulation, laboratory bioassay tests were carried out with 8 pest insects pests such as *Spodoptera exigua*, *Spodoptera litura*, *Myzus persicae*, *Aphis gossypii*, *Riptortus clavatus*, *Trialeurodes vaporariorum*, and *Frankliniella occidentalis*. In this result, etofenprox and  $\alpha$ -cypermethrin which were registered for controlling many pests in various crops and pyrifluquinazon showed the excellent insecticidal effect on piercing sucking insects such as aphids were selected. Each three insecticides were tested in insecticidal effect against target pests.
2. Etofenprox nano type with chitosan carrier showed excellent insecticidal activities by 15 days after treatment of nano formulation. Especially, there was significant difference in insecticidal effects of nano formulation according to the chitosan carrier type. Among them, chitosan molecular weight 30.000 Da 0.1% nano type showed high mortality after 15 days of treatment. That means this chitosan carrier nano type was suitable for controlled release formulation.
3. Nano formulation etofenprox didn't show immediately insecticidal effects against *M. domestica*, *F. occidentalis*, *R. clavatus*, and *T. vaporariorum* after treatment so that there was no different between nano and non nano type formulation in initial mortality and persistence with the passage of time after treatment. Therefore, it was impossible to confirm controlled release effects
4. As a result of investigation of insecticidal activity of  $\alpha$ -cypermethrin nano formulation, there was no difference between nano types by 4 days after treatment. However, after 14 days of treatment, the population increasing rate of chitosan M.W. 30,000 0.1% treatment population was -0.037 that was lower than that of population with chitosan M.W. 3,000 0.3% treatment. Therefore, it was not confirmed insecticidal effect of  $\alpha$ -cypermethrin nano formulation against *M. persicae*
5. We investigate time-release feature and mortality effect on *Myzus persicae* using different pyrifluquinazon nano type. Pyrifluquinazon was formulated with different molecular weight and density of used chitosan(CS 30,000 0.1% and CS 3,000 0.3%). In the CS 30,000 0.1%, the mortality was weakly occurred at early time, but steadily increased



after 4 days. Finally, we confirmed more than 70% mortality as a peak at 16 days. In CS 3,000 0.3%, the mortality showed about 70% until 18 days as a effective controlled release.

6. We examine time-release feature and feature and mortality effect on *M. persicae* according to the different pyrifluquinazo nano type of concentrations. The CS 30,000 0.1% bioassay results of different concentration were showed that the highest concentration (100ppm) was measured better mortality than other concentration at 0 day, but cannot confirm different effect about dissimilar concentration. However, increasing rates of *M. persicae* were low as treatment concentrate was high. In CS 3,000 0.3% 100ppm concentration bioassay result, aphid mortality reached peak at 22 days and increasing rate also low.
7. The objectives of our part are development of nano-pesticides, selection of the matters to use nano-pesticides and the review of the possibilities of their application using nano-technology in agricultural fields. From these basic purposes we can produce amphiphilic biopolymers and self-controlled nano-carriers and use them to deliver functional materials and these carriers were developed for their many beneficial properties that can overcome limitations such as a short half-life of the core materials, and can help ensure site-dependant targeted delivery and efficient administration of unstable compounds or compounds with low solubility in the used solvent. For these reasons, diverse delivery systems will be developed.
8. The increase in the demand for food resulting from the increase in population brought in successful mass-production of food. However, the abuse and misuse of chemical pesticides have not only resulted in direct harms to both humans and animals, but also the damages to the environment regarding resistance of microorganisms and destruction of ecosystem. Such problems from remnants of pesticides in our environment have arisen as an important social problem.
9. In this work, the nano carrier systems prepared by the ionic interaction between liposomes (containing mainly phosphatidylcholine, other phospholipids and some fatty acids) and chitosan were obtained by the addition of a chitosan-containing solution into the solution containing prepared liposomes and by self-organizing interaction of the positively charged polysaccharide in presence of negative lipid material. The size

distribution and surface properties of prepared nano carrier systems were investigated and the encapsulation efficiency and release profile were measured by gas chromatography. The aim of this work was to investigate the influence of diverse parameters on the physicochemical properties and release profile of resulting delivery systems.

10. 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 vitro* 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.
11. 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 mycelia. In a test to determine the dose of damage effects of nano-silver on plants, we used various concentrations of three different nano-silver. As a result, no damage effects of nano-silver on plants were detected under 100ppm or lower. However, damage effects of nano-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.

12. *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.
13. 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, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 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.
14. 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 was 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<sup>-1</sup>) > C(0.0141~0.0183 h<sup>-1</sup>) > SL(0.0020~0.0029 h<sup>-1</sup>). 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<sup>-</sup> 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.

15. 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 chitosan.
16. In 2008 field control experiments of nano-silver against anthracnose disease of pepper, pre-infection treatment of Nanover<sup>TM</sup> WA-PR-WB13R(3-4 weeks before the outbreak of the diseases) showed infection rate of 13.41, 20.55, 9.71, and 16.66% at 10, 30, 50, and 100ppm as compared to 84.13, 35.39 and 24.61% with control, nano-silver from D company, and Fenari treatment, respectively. Post-infection treatment of Nanover<sup>TM</sup>

WA-PR-WB13R showed infection rate of 50.32, 36.48, 67.56 and 54.63% at 10, 30, 50, and 100ppm as compared to 84.13, 72.14 and 63.15% with control, nano-silver from D company, and Fenari treatment, respectively. These results showed that the pre-treatment of Nanover™ WA-PR-WB13R at concentration of 50ppm is the most effective for the control of anthracnose disease of pepper. In experiment in 2009, single treatment of Nanover™ WA-PR-WB13R at 30 ppm, double treatment at 50ppm and three-time treatment at 10ppm showed the lowest infection rate of 16.47, 21.16 and 21.27%, respectively. These results also indicated that pre-treatment of the Nanover™ WA-PR-WB13R at different concentrations under different application numbers would be necessary for the effective control of the anthracnose disease of pepper.

17. In experiments for the selection of control-release fungicides, we tested uncoated and kitosan-coated Tebuconazole on *Colletotrichum gloeosporioides* in field tests. 1,000 dilution of 3,000 and 30,000Da kitosan-coated Tebuconazole were treated once, twice and three times in the field and compared the infection rate of *Colletotrichum gloeosporioides*. As a results, control showed infection rate of 42.82%. In 1,000 dilution treatment of 3,000Da kitosan-coated Tebuconazole, single treatment showed infection rate of 34.81%, double treatment showed 53.92%, and three-time treatment showed 39.91%. In 1,500 dilution treatment of 3,000Da kitosan-coated Tebuconazole, single treatment showed infection rate of 37.18%, double treatment showed 51.73%, and three-time treatment showed 31.11%. In 1,000 dilution treatment of 30,000Da kitosan-coated Tebuconazole, single treatment showed infection rate of 33.77%, double treatment showed 56.94%, and three-time treatment showed 29.80%. In 1,500 dilution treatment of 30,000Da kitosan-coated Tebuconazole, single treatment showed infection rate of 39.97%, double treatment showed 47.93%, and three-time treatment showed 38.89%. These results showed 1,000 dilution of 30,000Da kitosan-coated Tebuconazole was the most effective when it was treated three times.
18. In studies on the effect of nano-silver treatment on the gene expression of treated tomato plants, it was found that anti-oxidant related genes *LeSOD2* and *LeAPX2* were expressed without regard to the treatment of nan-silver. *LeSOD2* and *LeAPX2* expressed highly 1 and 3 days, and 1hr, 3hr and 5days after the treatment, respectively. Pathogenesis-related gene *LePRI* was also expressed right after the treatment and diminished 1 day after the treatment before it was expressed strongly and diminished 5 days after the treatment. Even though it requires further studies, these results indicated

that anti-oxidant genes and pathogenesis related gene were expressed without regard of the nano-silver treatments.

19. In studies of mechanisms of antagonism of nano-coated Difenoconazole against the powdery mildew of cucumber, it was found that kitosan-coated Difenoconazole was attached on the surfaces of mycelia and spores of powdery mildew after the treatment. Kitosan-coated Difenoconazole was released as the time goes by, and the fungicidal effects were observed. Treatment of 1,000 dilution of 3,000Da kitosan-coated Difenoconazole resulted in shrinkage and death of mycelia and spores as the exposure days increased. However, one day after the treatment of 1,000 dilution of 30,000Da kitosan-coated Difenoconazole shrinkage and death of mycelia and spores were resulted. Five days after the treatment of 1,500 dilution of 3,000Da kitosan-coated Difenoconazole, shrinkage and death of mycelia and spores were resulted. In contrast, three days after the treatment of 1,500 dilution of 30,000Da kitosan-coated Difenoconazole, shrinkage and death of mycelia and spores were resulted. These results indicated that molecular weight of the coating material, not the dilution rate, is the major factor for the inhibition of the growth of mycelia and spores.
  
20. In studies of mechanisms of antagonism of nano-coated Tebuconazole against the anthracnose disease of pepper caused by *Colletotrichum gloeosporioides*, 1,000 dilution of 3,000Da and 30,000Da kitosan-coated Tebuconazole caused shrinking and eventual death of mycelia three days after the treatment. In contrast, 1,500 dilution of 3,000Da and 30,000Da kitosan-coated Tebuconazole caused shrinking and eventual death of mycelia five days after the treatment. These results indicated that the dilution rate, not the molecular weight of the coating material is the major factor for the inhibition of the growth of mycelia and spores.
  
21. In studies of mechanisms of antagonism of nano-silver against the anthracnose disease of pepper, nano-silver showed inhibition effects on mycelia and spores of *Colletotrichum gloeosporioides*. As the concentration of nano-silver was increased from 30 to 100ppm, and the time of exposure to nano-silver was increased, the inhibition effect was increased as shown on damaged mycelia and spores under SEM at x300 and x1,000. The inhibition effects was dramatically increased from day 5 and thereafter through day 15. As the concentration of nano-silver was increased, the time required for the damages were shorten.

# CONTENTS

Korean Summary .....	2
Summary .....	11
Contents .....	18
Korean Contents .....	23
<b>Chapter 1. Outline of research development .....</b>	<b>28</b>
Section 1. Purpose of research development .....	28
Section 2. Necessity of research development .....	31
Section 3. Scope of research development .....	33
<b>Chapter 2. Domestic and Foreign Status of Technical Development .....</b>	<b>36</b>
Section 1. Importance of technology development .....	37
Section 2. Domestic and foreign status of research development .....	38
<b>Chapter 3. Research Contents and Result .....</b>	<b>39</b>
<b>Section 1. Development of environment-friendly insecticides with Nano Biochnology</b> ·39	
1. Selection of insecticides and target insect pests suitable for controlled release.....	39
A. Selection of insecticides for controlling moths .....	39
(1) Selection of effective insecticides for controlling <i>Spodoptera exigua</i> .....	39
(A) Registrated insecticides for <i>S. exigua</i> .....	39
(B) Bioassay of <i>S. exigua</i> for selecting insecticides .....	41
(C) Selection of insect growth regulator .....	43
(D) Field test of controlling of <i>S. exigua</i> .....	45
(E) Control effect of Nano formulation in <i>S. exigua</i> and <i>S. litura</i> .....	47
B. Selection of insecticides for controlling <i>R. clavatus</i> by bioassay of nano formulation·49	
C. Selection of insecticides for controlling <i>M. persicae</i> and <i>A. gossypii</i> by bioassay of nano formulation .....	50
D. Selection of insecticides for controlling <i>T. vaporariorum</i> by bioassay of nano formulation .....	53

2. Insecticidal effects of Nano formulation in various insect pests .....	55
A. Insecticidal effects of etofenprox nano type in various insect pests .....	55
(1) Insecticidal effects against 2 moth species .....	55
(A) Insecticidal effects of nano type(controlled release) against <i>S. litura</i> .....	55
(B) Insecticidal effects of nano type(controlled release) against <i>S. exigua</i> .....	64
(2) Insecticidal effects of etofenprox nano type in aphids .....	65
(A) Insecticidal effects of nano type(controlled release) against <i>M. persicae</i> .....	65
(B) Insecticidal effects of nano type(controlled release) against <i>A. gossypii</i> .....	67
(3) Insecticidal effects of etofenprox nano type in other insect pests .....	68
(A) Insecticidal effects of CS 30,000 0.1% against <i>Musca domestica</i> , <i>F. occidentalis</i> , <i>R. clavatus</i> , <i>T. vaporariorum</i> .....	68
B. Insecticidal effects of $\alpha$ -cypermethrin nano type in target pests .....	71
(A) Insecticidal effects of Nano type 1 (chitosan M.W 3,000, 0.3%) and Nano type 2 (Chitosam M.W 30,000, 0.3%) against <i>A. gossypii</i> .....	71
(B) Insecticidal effects of Nano type 1 (chitosan M.W 3,000, 0.3%) and Nano type 2 (Chitosam M.W 30,000, 0.3%) against <i>M persicae</i> .....	73
(C) Observation of plant surface and aphid cuticle after $\alpha$ -cypermethrin nano type (chitosan M.W 3,000과 30,000) treatment .....	74
C. Insecticidal effects of pyrifluquinazon nano type in aphids .....	78
(1) Chitosan M.W. 30,000 0.1% and Chitosan M.W. 3,000 0.3% .....	78
(2) CS 30,000 0.1% and CS 3,000 0.3% with each concentration .....	80
(A) Insecticidal effects of each concentration of chitosan M.W. 30,000 0.1% nano formulation .....	80
(B) Insecticidal effects of each concentration of chitosan M.W. 3,000 0.3% nano formulation .....	82

**Section 2. Controlled release of nano-carriers and cell surface delivery .....** **84**

1. Control of nano size .....	85
2. The surface charge of Nano-carrier system .....	89
3. Analysis of encapsulation efficiency in Nano carrier system .....	92
4. The stability of the nano carrier systems .....	95
5. Morphological characteristics of Nano carrier system .....	96
6. The core materials' release from the nano carrier system .....	98



### Section 3. Development of environment-friendly fungicides with Nano Biochnology114

Passage 1. Introduction .....	114
Passage 2. Materials and Methods .....	115
1. Materials .....	115
(1) Nano-silver material .....	115
(2) Fungal and bacterial species tested and culture media .....	115
2. Methods .....	118
(1) In vitro experiment for antagonis of nano-silver .....	118
(2) Effect of individual treatment of nano-silver against selected fungi <i>in vitro</i> .....	119
(3) Effect of combination treatment of nano-silver against selected fungi <i>in vitro vitro</i> .....	119
(4) Observation of effects of nano-silver on the fungal/bacterial cells with TEM .....	119
(5) Observation of effects of nano-silver on the fungal mycelial growth with SEM .....	120
(6) Determination of the dose of damage effects of nano-silver on plants .....	120
(7) Inhibition effects of nano-silver on the mycelial growth of spring green onion pathogen <i>S. cepivorum</i> .....	120
(8) Monitoring of microbial population changes and analysis of soil planted with spring green onion and treated with nano-silver .....	120
(9) Detection of nano-silver particles from spring green onion planted in nano-silver treated field .....	121
(10) Analyses of greenhouse soils treated with nano-silver .....	121
(11) Comparison of control effects between kitosan and nano-silver against spring green onion root and stem rot pathogen <i>S. cepivorum</i> .....	122
(12) Field control experiments of nano-silver against anthracnose disease of pepper .....	122
(13) Experiment for the selection of control-release fungicides .....	123
(14) Effect of nano-silver treatment on the gene expression of tomato plants .....	124
(15) Studies of mechanisms of antagonism of nao-coated Difenoconazole against the powdery mildew of cucumber .....	124
(16) Studies of mechanisms of antagonism of nao-coated Tebuconazole against the anthracnose disease of pepper .....	125
(17) Studies of mechanisms of antagonism of nano-silver against the anthracnose disease of pepper .....	125
Passage 3. Results and Discussion .....	126

1. <i>In vitro</i> experiment for antagonism of nano-silver .....	126
(1) <i>In vitro</i> experiment of nano-silver for antagonism against plant pathogenic fungi ...	126
(2) <i>In vitro</i> experiment of nano-silver for antagonism against plant pathogenic bacteria	136
2. Effects of individual treatment of nano-silver against selected fungi <i>in vitro</i> .....	139
(1) Effects of nano-silver against mycelial growth of selected fungi .....	139
(2) Effects of nano-silver against sclerotial growth of selected fungi .....	145
3. Effects of combination treatment of nano-silver against selected fungi <i>in vitro</i> .....	155
(1) Effects of nano-silver against mycelial growth of selected fungi .....	155
(2) Effects of nano-silver against sclerotial growth of selected fungi .....	164
4. Observation of effects of nano-silver on the fungal and bacterial cells with TEM .....	169
5. Observation of effects of nano-silver on the fungal mycelial growth with SEM .....	170
6. Determination of the dose of damage effects of nano-silver on plants .....	171
7. Inhibition effects of nano-silver on the mycelial growth of spring green onion pathogen <i>S. cepivorum</i> .....	171
(1) <i>In vitro</i> test .....	172
(2) Field test .....	179
8. Monitoring of microbial population changes and analysis of soil planted with spring green onion and treated with nano-silver .....	181
(1) Monitoring of soil microbial population changes .....	181
(2) Analysis of soil .....	181
9. Detection of nano-silver particles from spring green onions planted in nano-silver treated soil .....	183
10. Analyses of greenhouse soils treated with nano-silver .....	184
(1) Soil analyses and soil stability .....	184
(2) Determination of nano-silver residue concentration.....	186
11. Comparison of control effects of kitosan and nano-silver against spring green onion root and stem rots .....	187
12. Field control experiments of nano-silver against anthracnose disease of pepper ·	188
13. Experiment for the selection of control-release fungicides .....	192
14. Effect of nano-silver treatment on the gene expression of treated plants .....	193
15. Studies of mechanisms of antagonism of nao-coated Difenoconazole against the powdery mildew of cucumber .....	202
16. Studies of mechanisms of antagonism of nao-coated Tebuconazole against the anthracnose disease of pepper .....	206
17. Studies of mechanisms of antagonism of nano-silver against the anthracnose	

disease of pepper .....	206
<b>Chapter 4. Accomplishments and contributions to the related research fields .....</b>	<b>208</b>
<b>Chapter 5. Research results and the applications of research results .....</b>	<b>213</b>
<b>Chapter 6. Foreign technical informations collected on the course of research development .....</b>	<b>217</b>
<b>Chapter 7. References .....</b>	<b>218</b>

# 목 차

요약문 .....	2
Summary .....	11
Contents .....	18
목차 .....	23
제 1 장    연구개발과제의 개요 .....	28
제 1 절    연구개발의 목표 .....	28
제 2 절    연구개발의 필요성 .....	31
제 3 절    연구개발의 범위 .....	33
제 2 장    국내외 개발기술 현황 .....	36
제 1 절    기술개발의 중요성 및 국내외 관련기술 개발 현황 .....	37
제 2 절    연구개발 대상 기술의 국내외 현황 .....	38
제 3 장    연구개발 수행 내용 및 결과 .....	39
제 1 절    나노-바이오 기술을 활용한 친환경 살충제의 개발 .....	39
1. 나노제형(Cotrolled Release)에 적용가능한 살충제 및 해충 선발 .....	39
가. 나방류 해충방제에 적합한 살충제 선발 .....	39
(1) 파밤나방 방제에 효과적인 살충제의 선발 .....	39
(가) 파밤나방 방제용으로 국내에 등록되어 있는 살충제 .....	39
(나) 파밤나방에 대한 살충활성 검정을 통한 살충제 선발.....	41
(다) 파밤나방의 친환경적 방제를 위한 곤충생장조절제 선발 .....	43
(라) 야외 포장에서의 파밤나방 방제실험을 통한 살충제 선발 .....	45
(마) 파밤나방과 담배거세미나방에 대한 나노제형의 효과검정 .....	47
나. 톱다리개미허리노린재에 대한 나노제형의 효과검정을 통한 살충제 선발 .....	49
다. 복숭아혹진딧물과 목화진딧물에 대한 나노제형의 효과검정을 통한 살충제 선발 .....	50
라. 온실가루이에 대한 나노제형의 효과검정을 통한 살충제 선발 .....	53

2. 선발된 살충제별 나노제형에 따른 해충별 살충효과 .....	55
가. etofenprox 나노제형에 따른 방제대상 해충에 대한 살충효과 .....	55
(1) 나방류 해충에 대한 살충효과 .....	55
(가) 나노제형(서방형제형, 키토산캐리어타입)에 따른 담배거세미나방의 살충효과 .....	55
(나) 나노제형(서방형제형, 키토산캐리어타입)에 따른 과밤나방의 살충효과 .....	64
(2) 진딧물류 해충에 대한 살충효과 .....	65
(가) 나노제형(서방형제형, 키토산캐리어타입)에 따른 복숭아혹진딧물의 살충효과 .....	65
(나) 나노제형(서방형제형, 키토산캐리어타입)에 따른 목화진딧물의 살충효과 .....	67
(3) 기타 해충에 대한 살충효과 .....	68
(가) 집과리, 꽃노랑총채벌레, 톱다리개미허리노린재, 온실가루이에 대한 etofenprox 나노타입 CS 30,000 0.1%(ENC 2)의 살충효과 .....	68
나. $\alpha$ -cypermethrin의 나노제형에 따른 방제대상 해충에 대한 살충효과 .....	71
(1) $\alpha$ -cypermethrin Nano type 1 (chitosan M.W 3,000, 0.3%)과 Nano type 2 (Chitosan M.W 30,000, 0.3%)의 목화진딧물에 대한 살충효과 및 약효 지속 효과 .....	71
(2) $\alpha$ -cypermethrine Nano type 1 (chitosan M.W 3,000, 0.3%)과 Nano type 2 (Chitosan M.W 30,000, 0.3%)의 복숭아혹진딧물에 대한 살충효과 및 약효 지속 효과 .....	73
(3) $\alpha$ -cypermethrin 나노타입(chitosan M.W 3,000과 30,000)에 따른 식물체 표면과 복숭아혹진딧물 충체표면의 부착정도를 확인하기 위한 SEM관찰 .....	74
다. Pyrifluquinazon의 나노제형에 따른 진딧물류 해충에 대한 살충효과 .....	78
(1) 나노타입(CS 30,000 0.1%와 CS 3,000 0.3%)에 따른 복숭아혹진딧물의 살충효과 및 약효지속효과 .....	78
(2) 나노타입(CS 30,000 0.1%와 CS 3,000 0.3%)별 농도에 따른 복숭아혹진딧물의 살충효과 및 약효지속효과 .....	80
(가) 키토산 분자량 30,000 0.1% 나노제형의 농도별 살충효과 .....	80
(나) 키토산 분자량 3,000 0.3% 나노제형의 농도별 살충효과 .....	82
<b>제 2 절 나노캐리어를 이용한 농약의 용출제어 및 세포 표면 전달 .....</b>	<b>84</b>
1. Nano-carrier의 size control .....	85
2. Nano-carrier system의 표면전하분석 .....	89
3. Nano carrier system의 encapsulation efficiency 분석 .....	92

4. Nano carrier system의 안정성 시험 .....	95
5. Nano carrier system의 형태학적인 분석 .....	96
6. Nano carrier system의 방출거동분석 .....	98
<b>제 3 절 나노-바이오 기술을 활용한 친환경 살균제의 개발 .....</b>	<b>114</b>
1. 서 론 .....	114
2. 재료 및 방법 .....	115
가. 실험 재료 .....	115
(1) Nano-silver 용액 .....	115
(2) 공시균주 및 배양배지 .....	115
나. 실험방법 .....	118
(1) 항균 활성 검정 <i>in vitro</i> 실험 .....	118
(2) 은 나노 용액 단독 처리 시 선발된 곰팡이의 생장억제 검정 .....	119
(3) 은 나노 용액 혼합 처리 시 선발된 곰팡이의 생장억제 검정 .....	119
(4) 투과전자현미경(TEM) 관찰 .....	119
(5) 주사현미경(SEM) 관찰 .....	120
(6) 은 나노 용액 약해 실험 .....	120
(7) 파 흑색썩음균핵병 병원균에 대한 은 나노 용액 효과 실험 .....	120
(8) 은 나노 용액을 처리한 파 재배 토양의 미생물 관찰과 토양성분 분석 .....	120
(9) 은 나노 용액을 처리한 포장에서 수확한 파로부터 은의 검출 분석 .....	121
(10) 시설재배지 토양의 은 나노 용액 처리 시기별 토양분석 .....	121
(11) 은 나노 용액과 키토산의 파 흑색썩음균핵병에 대한 방제효과 비교 .....	122
(12) 고추탄저병 방제 포장시험 .....	122
(13) Controlled release가 가능한 살균제 선발 시험 .....	123
(14) 은나노 처리가 식물체의 유전자 발현에 미치는 영향 조사 .....	124
(15) 나노 코팅한 Difenoconazole의 오이흰가루병 방제 기작 연구 .....	124
(16) 나노 코팅한 Tebuconazole의 고추탄저병 병원균 방제 기작 연구 .....	125
(17) 은나노 용액의 고추탄저병 병원균 방제기작 연구 .....	125
3. 결과 및 고찰 .....	126
(1) 항균활성 검정 <i>in vitro</i> 실험 .....	126
(가) 은 나노 용액 종류별 곰팡이 27개 균주에 대한 항균 활성 기내 검정 .....	126
(나) 은 나노 용액 종류별 세균에 대한 항균활성 기내 검정 .....	136
(2) 은나노 용액 단독 처리 시 선발된 곰팡이의 생장억제 검정 .....	139
(가) 선발된 곰팡이 균주의 균사 생장 억제 검정 .....	139

(나) 선발된 곰팡이 균주의 균핵 생장 억제 검정 .....	145
(3) 은 나노 용액 혼합 처리 시 선발된 곰팡이의 생장 억제 검정 .....	155
(가) 선발된 곰팡이 균주의 균사 생장 억제 검정 .....	155
(나) 선발된 곰팡이 균주의 균핵 생장 억제 검정 .....	164
(4) 투과전자현미경(TEM) 관찰 .....	169
(5) 주사현미경(SEM) 관찰 .....	170
(6) 은 나노 용액 약해실험 .....	171
(7) 파 흑색썩음균핵병 병원균에 대한 은 나노 용액 활성 실험 .....	171
(가) <i>In vitro</i> test .....	172
(나) 포장시험 .....	179
(8) 은 나노 용액을 처리한 파 재배 토양의 미생물 관찰 및 토양 성분 분석 .....	181
(가) 토양 미생물 관찰 .....	181
(나) 토양 성분 분석 .....	181
(9) 은 나노 용액을 처리한 포장에서 수확한 파로부터 은의 검출 분석 .....	183
(10) 시설재배지 토양의 은 나노 용액 처리 시기별 토양분석 .....	183
(가) 토양분석(안정성) 평가 .....	184
(나) 시설재배지 토양의 은 농도 분석 .....	186
(11) 은 나노 용액과 키토산의 파 흑색썩음균핵병에 대한 방제효과 비교 .....	187
(12) 고추탄저병 방제 포장시험 .....	188
(13) Controlled release가 가능한 살균제 선발 시험 .....	192
(14) 은나노 처리가 식물체의 유전자 발현에 미치는 영향 조사 .....	193
(15) 나노 코팅한 Difenoconazole의 오이흰가루병 방제 기작 연구 .....	202
(16) 나노 코팅한 Tebuconazole의 고추탄저병 병원균 방제 기작 연구 .....	206
(17) 은나노 용액의 고추탄저병 병원균 방제기작 연구 .....	206
<b>제 4 장    목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....</b>	<b>208</b>
<b>제 1 절   연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표 달성도 .....</b>	<b>208</b>
<b>제 2 절   관련분야의 기술발전예의 기여도 .....</b>	<b>212</b>
<b>제 5 장    연구개발 성과 및 성과활용 계획 .....</b>	<b>213</b>
<b>제 1 절   연구개발결과의 성과 및 활용목표 대비실적 .....</b>	<b>213</b>
1. 연구성과 목표 .....	213

2. 연구성과 활용 목표 .....	213
3. 논문게재 성과 .....	214
4. 특허 성과 .....	216
5. 기술료 징수 현황 .....	216
6. 인력활용/양성 성과 .....	216
7. 경제사회 파급효과 .....	216
제 6 장    연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	217
제 7 장    참 고 문 헌 .....	218



## 제 1 장. 연구개발과제의 개요

### 제 1 절. 연구개발의 목표

#### 1. 연구개발 목표

- 가. Controlled Release의 제형의 개발을 위한 생물고분자를 이용한 나노캐리어 제조
- 나. 서방형의 특성을 만들 수 있는 농약 선발(살충제 3약종, 살균제 2약종) 및 서방형 제형확립
- 다. 서방형 제형에 적합한 살충, 살균제의 대상병해충 선발과 생물용출효과 시험의 확립 및 실용 가능성 실험
- 라. 은나노 화합물의 특성 구명과 은나노의 살균활성에 의한 살균효과 실험으로 2종류 선발, 2차년도 이후 에는 포장실험 및 실용화 검토
- 마. 은 및 키토산 등 유용물질의 나노화 공정기술 확립

## 2. 연차별 및 세부과제별 연구목표 및 연구개발 수행내용

<세부과제> : 나노-바이오 기술을 활용한 친환경 살충제의 개발

구분(연도)	세부연구목표	연구개발 수행내용
1차년도 (2007)	Controlled Release에 적용해충 선발	Controlled Release에 적용 가능한 작물보호제 및 난방제 해충을 선발하여 실험
	Nano Carrier에 가능한 작물보호제 및 살충제 선발	Nano Carrier에 가능한 작물보호제 및 해충을 선발하여 실험
	선발된 나노형 시제품의 대상해충별 실험실 적용 시험	선발된 서방형 시제품의 실험실 적용하여 시험
2차년도 (2008)	선발된 살충제의 나노제형에 따른 대상해충별 살충효과 검증	대상해충에 따른 살충율 조사
	나노캐리어별 서방형제형으로서의 살충효과	처리 후 경과일에 따른 살충효과
	나노제형의 용출현상 확인	나노제형의 식물체와 층계표면의 부착 여부와 처리 후 시간경과에 따른 살충활성 및 약효지속효과 조사
3차년도 (2009)	살충제별 나노제형에 따른 방제대상 해충의 살충활성	대상해충별 나노캐리어에 따른 살충효과
	나노캐리어별 서방형 제형으로서의 가능성 검토	나노제형에 따른 살충효과 및 약효지속 효과조사
	살충제별 서방형제형으로써 적합한 나노제형의 선발	나노제형(나노캐리어)에 따른 대상해충별 살충효과 및 용출정도 조사

<제 1 협동과제> 나노캐리어를 이용한 농약의 용출제어 및 세포표면 전달

구분(연도)	세부연구목표	연구개발 수행내용
1차년도 (2007)	생물고분자 선발 및 양용성 생물 고분자 제조	생물고분자의 나노캐리어로서의 적합 성 및 양용성 고분자의 물성 분석
	나노캐리어 제조	다양한 사이즈의 나노캐리어 제조 기 술성 및 재현성 확인
	방출제어 측정	농약의 발출 시간의 적합성 판단 및 시간별 용출 농도의 분석
2차년도 (2008)	Encapsulation efficiency의 최적화	특정 조건에서 얻을 수 있는 최고의 효율 분석
	나노 사이즈 조절	최종 목표에 적합한 나노캐리어의 size distribution 확보
	나노캐리어로서의 생물 고분자의 양용성 조절	기존 나노캐리어 시스템에 새로운 기 능기 도입 및 치환도 측정
3차년도 (2009)	나노캐리어의 방출제어	방출 메카니즘의 분석 및 제어
	나노 농약의 상업화 시도	기존에 시판되는 농약과 비교해 상업 화 가능성 분석

<제 2 협동과제> 나노-바이오 기술을 활용한 친환경 살균제의 개발

구분(연도)	세부연구목표	연구개발 수행내용
1차년도 (2007)	유용 나노 살균제 소재 선발	유용물질 소재 탐색 및 개발
	유용살균물질을 나노화할 공정의 개발	유용물질을 나노화 할 공정 개발 및 본 가동 시험
2차년도 (2008)	나노화 기술 응용 및 나노-바이오 기술 적용 검증	나노화 기술 응용 및 검증
	은 나노의 안정성 및 안전성 검정	안전성 및 안정성 검정
	약효 및 약해 검증을 위한 실내실 험 및 포장실험	실내 및 포장 시험
3차년도 (2009)	Controlled Release 및 Nano Carrier에 가능한 작물보호제의 활 용성 시험	선발된 농약으로 서방형 제형의 효능 실험
	나노은의 농가포장 실험	나노화된 농약으로 식물 침투 이행 및 생물검정
	은나노화합물의 특성구명 및 포장 에서 화합물 분석	은나노화합물 처리작물체와 처리된 토양에서의 은 농도 변화추이 조사

## 제 2 절. 연구개발의 필요성

- 인구 증가에 따른 식량의 수요요구에 농산물의 대량생산은 성공하였으나 이에 따른 병·해충의 방제에는 합성농약의 오·남용으로 인축에 직접적 피해는 물론, 농산물에 남아있는 잔류농약 및 농생태계의 환경오염으로 인한 주변 생태계의 파괴와 농약에 대한 저항성 병·해충이 증가하는 사회적 문제로 대두되고 있음.
- 이러한 문제의 해결을 위하여 세계는 지속 가능한 농업(친환경 농업)을 목표로 “리우 환경회의 협약” 이후 WTO/DDA 출범 및 협상에 내국민이 유리하게 이용하고자 세계적으로 화학적인 합성농약 사용을 줄이려는 추세가 뚜렷함.
- 국내에서도 향후 10년 이내에 화학농약의 사용량을 70%이하로 줄이는 것이 확정되었으나 화학농약인 살충제, 살균제 및 제초제의 사용량 감소 방안은 미진한 상태임
- 소비자의 안전한 먹거리의 요구로 농업경쟁력의 향상, 농가소득의 보장, 농업생산성 유지를 위한 친환경 및 유기농업의 정착이 요구되고 있는 상황이며, 농업인의 기술적 애로를 해결 할 수 있는 방향의 연구가 필요한 상황임.
- 인축에 저독성이고 저항성을 낮출 수 있으며 환경오염을 유발하지 않는 친환경적인 천연물유래의 물질의 이용 방법과 기존의 농약을 보다 안전하게 사용하는 탁월한 제제를 개발하여 상용화함으로써, 국내 식량자원의 안전한 확보로 소비자의 요구를 충족시키는 것은 물론, 작물보호부문의 친환경적 방제의 독보적 원천기술을 보유하여 국가의 기술경쟁력 제고에도 기여하고자 함.
- 최근 첨단 생명공학 기술로 사용되고 있는 나노바이오기술은 오는 2015년 1800억 달러 규모로 성장할 전망이, 지난 2000년 반도체 세계 시장 규모인 1480억 원을 훨씬 상회하는 수치로 나노바이오의 잠재력과 고속성장세를 방증하고 있으며, 또한 나노기술이 의약시장에 적용되는 시기는 향후 3~7년부터로 약물전달, 생체분석, 생물의약품, 생체적합성 물질, 생물농약 등이 제품화 유망 분야인 것으로 예측됨
- 최선두 연구그룹인 프랑스 L’Oreal사의 경우 바이오 나노입자의 평균크기 150nm 이하로 제조(평균크기는 20nm - 75nm로 분포)하였으며, (주)태평양 연구진은 Phyto Nano Sphere를 개발하였고 100nm-150nm 크기라 보고되고 있고, 본 연구팀의 고려대학교 나노계면공학연구팀은 현재 나노결정을 40nm - 50nm 크기로 제조한 경험이 있다. 현재 마이크론-100nm 크기의 입자 기술은 기술 선진국에 비해 80% 수준이라 할 수 있으나, 100nm 미만의 바이오 나노 입자 제조기술은 신개념 기술이고 급속발전 영역이므로 선진국과 국내기술의 수준차이는 없다고 판단되기 때문에 이를 농업분야에도 활용할 필요가 있음.
- 바이오 나노기술은 미국, 일본, 유럽 등 선진국에서 최근 고기능성 물질의 나노캐리어 개발을 위해 막대한 연구비를 투자하고 있으며 외국에서는 기술노출을 꺼려 학술논문에서는 거의 관련 기술이 발표되지 않고 있는 실정으로 현실적으로 본 기술을 해외에서 도

입하기는 불가능한 상태이고, 선진국들은 과학적 효능과 안정성이 입증된 나노제품만을 선호하고 있는 추세이므로 과학적으로 그 효과가 검증된 고기능성의 나노 농약제품만이 향후의 국제시장에서 살아남을 수 있다고 판단됨.

- 농약의 나노화는 농약분야에 새로운 수요를 창출할 수 있는 상품으로 성장할 가능성이 높기 때문에, 농약의 나노화 원천기술을 확보함으로써 나노 농약제품의 생산을 앞당기어 새로운 시장형성을 선도하고 기술 수출에도 기여할 것으로 기대됨.
- 진보된 나노기술이 생물공학측면에 활발하게 활용되고 있으므로 이를 이용하여 자연환경에 적합하도록 이용할 수 있으며, 특히 병·해충 특성으로 볼 때 천연물유래 작물보호제에 대한 효과의 증진과 화학농약의 단점을 보완 할 수 있는 기술을 확보하여 친환경 농업에 기여 하고, 안전한 농산물을 생산하여 소비자의 요구에 부합될 수 있도록 할 필요성이 있음.

### 제 3 절. 연구개발의 범위

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
나노제형을 만들 수 있는 농약의 선발	일반적 관행 농약으로 방제가 어려운 해충에 대하여 서방형제형으로 만들어 친환경적이고, 효율적인 방제 방법으로 사용하기 위하여 농약의 선발	서방형 제형을 만들기 위한 검토방법에서 개발하고자 하는 재료는 키토산으로 이를 농약의 제형으로 만들기 위해서 는 양이온을 갖는 상품이 가능하다. 이 약제에 조합이 가능한 대상 해충의 생리, 생태적 특성과 적용 작물의 조화를 이뤄 져야 가능하다. 대상해충에 맞는 등록된 200여종의 농약을 모두 검토하여 에토펜프록스와 싸이퍼메스린, 피리플루퀴나존의 3종을 선발함
나노 제형에 적합한 해충의 선발 시험	선발한 2종의 약제에 등록된 해충으로 실험실에서 사육이 가능한 파밤나방, 거세미나방, 배추좀나방, 목화바둑명나방, 진딧물류, 응애류 그리고 톱다리개미허리노린재류 등 8종류로 실험함	제 2 협동과제로부터 만들어진 서방형 제형을 8종의 해충에 적용실험을 함. 대조약제와 서방형약제의 용출특성에 맞추어 해충의 살충실험을 시도함. 일반약제와 서방형약제간의 차이는 나타나고 있으나 아직 정밀하게 정립되지는 안 된 상태임. 현재 서방형제형의 특성이 나타나기 때문에 정밀하게 필요로 하는 형태가 가능하리라 판단됨
선발된 살충제에 효과 있는 대상해충별 실내 및 야외실험 실증시험	실내 및 실외에서 여러 주요 대상해충에 대하여 시험 약제를 살포하고 살충활성과 서방형 제형에 대한 예비실험을 수행함	에토펜프록스, 사이퍼메스린, 피리플루퀴나존 3종의 살충제 나노타입별 살충 효과 및 약효지속효과 관찰을 통한 개발가능성 검토
생물고분자 선발 및 나노 캐리어의 제조	논문 및 실험적 database를 통해 생물고분자 선정	독성이 적으며 자발적인nano-system 형성능을 지닌 amphiphilic한 제재로서 lecithin 을 선정하게 되었고 이 선정 기준 에 있어 기존 실험에서의 lecithin 에 코팅 물질을 적용했을 때의 core material의 용출시간이 지대한 영향을 미침

나노캐리어의 사이즈 조절	실험적 data base를 이용해 lecithin 을 이용한 친환경적 liposome 을 접하고 그들의 nano system 제조 방법을 파악, nano - liposome과 코팅 물질 간의 ionic interaction을 이용한 spontaneous한 반응으로 나노 캐리어 시스템을 구현하게 됨	타겟으로하는 곤충의 기공크기를 기준으로 사이즈 범위 설정 후 high-energy nano -liposome preparation method (ultrasonic energy)를 이용해 나노캐리어를 제조 및 프로토콜에 변수를 두어 사이즈 조절
방출제어측정	잔류농약분석법을 이용한 나노캐리어의 농약 방출 분석	나노캐리어의 농약 방출실험은 Gas chromatography를 이용하여 측정 되었으며 제조된 농약을 core material 로 포함한 나노캐리어를 aqueous한 상태에 두고 지정된 시간마다 그 sample 중 일부를 GC를 통해 분석 잔류 농약을 정량하여 나노캐리어 시스템의 방출 제어기능을 확인
나노 소재의 선발 및 방제대상 병원균 선발	선발된 나노소재의 효능 실험	나노소재 선발
나노은 및 나노 키토산의 특성 실험 및 생물 시험	나노화된 농약으로 식물 침투이행 및 생물검정	나노화합물의 온실 및 포장검정
생물검정으로 살균 성 시제품의 기초 선발	나노은 및 나노키토산의 생물검정 및 특성조사	나노은 및 나노키토산의 생물검정
나노화 기술응용 및 나노-바이오 기술적용 검증	나노화 기술응용적용	은나노 적용
은나노 안정성 검정	은나노의 토양에서의 안전성 및 안정성 검정	은나노의 안전성 및 안정성 검정
Controlled Release 및 Nano carrier에 가능한 작물보호제의 최적화 실험	나노 코팅한 difenoconazole 및 Tebuconazole의 작용기작 연구	나노 코팅한 difenoconazole 및 Tebuconazole의 작용기작 연구

방제력 작성 완료	포장실험을 통한 방제력 작성	방제력 작성
선발자원의 실용화 및 표준 사용기술 확립	선발자원의 실용화 및 표준 사용기술 확립	선발된 은나노액의 실용화 기술 확립



## 제 2 장. 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 기술개발의 중요성 및 국내외 관련기술개발 현황

#### 1. 기술적 측면

최선두 연구그룹인 프랑스의 L'Oreal사의 경우 나노입자의 평균크기 150nm 이하로 제조하였으며, (주)태평양 연구진은 Phyto nano sphere를 개발하였고 100nm-150nm 크기라 보고되고 있다. 본 연구팀의 고려대학교 나노계면공학연구팀은 현재 나노결정을 50~100nm 크기로 제조한 경험이 있다.

#### 2. 경제적 측면

나노바이오 기술은 오는 2015년 1800 억달러 규모로 성장할 전망이다. 이는 지난 2000년 반도체 시장규모인 1480억을 훨씬 상회하는 수치로 나노바이오의 잠재력과 고속성장세를 보여주고 있는 것이다. 생분해성 나노 작물보호제는 새로운 수요를 창출할 수 있는 상품으로 성장할 가능성이 높다.

#### 3. 사회적 측면

현재 마이크론-100nm 크기의 입자 기술은 기술 선진국에 비해 80% 수준이라 할 수 있으나, 100nm 미만의 바이오 나노 입자 제조기술은 신개념 기술이고 급속발전 영역이므로 선진국과 국내기술의 수준차이는 없다고 판단된다. 바이오 나노기술은 미국, 일본, 유럽 등 선진국에서 최근 고기능성 물질의 나노제형물 개발을 위해 막대한 연구비를 투자하고 있으며 외국에서는 기술노출을 꺼려 학술논문에서는 거의 관련 기술이 발표되지 않고 있는 실정으로 현실적으로 본 기술을 해외에서 도입하기 어려운 실정이다, 선진국들은 과학적 효능과 안정성이 입증된 나노제품만을 선호하고 있는 추세이므로 과학적으로 그 효과가 검증된 고기능성의 나노제품이 향후 국제시장에서 살아남을 수 있다.

## 제 2 절 연구개발 대상 기술의 국내·외 현황

### 1. 세계적 수준

- 선진국들은 농산물의 안전성확보가 확실하게 이루어지고 있으며 수입 농산물에 대한 잔류농약 규제가 엄격하다(특히 일본은 PLS법으로 농산물의 잔류농약이 강화됨). 외국의 경우 식물유래 작물보호제는 안전성이 확보가 확실한 것에 한하여 상업화가 되었으며 기술적으로도 약제의 효과가 최대로 뛰어나게 제형을 개발하여 사용하고 있다. 판매되는 제품은 주요 성분표시와 사용용도가 확실하며 유효성분량을 최소화 하면서 최대 방제효과를 나타내도록 제형화 하고 있음
- 외국의 경우 나노 기술을 활용한 금속, 천연물 및 미생물유래 친환경농약의 개발이 아직 활발히 진행되고 있지 않으며, 국내에서 기술이 개발되면 해외 수출을 통한 외화 획득과 기술 수출이 가능하리라 판단됨
- 상업적 바이오 나노분야의 캡슐화 및 입자소형화에 관한 연구는 프랑스의 L'Oreal사, 미국 Chesebrough-Pond's사, Collaborative Laboratories사, Unilever사 등이 활발하게 진행하고 있음.
- 세계 최선두 연구그룹이라 할 수 있는 프랑스의 L'Oreal사는 분자량 400이 넘는 바이오 나노입자의 평균크기 150nm 이하로 제작하였으며[US patent 6,039,936, Mar. 21, 2000] 다른 연구에서는 평균크기가 20nm-75nm로 분포된 결과를 획득하였다고 보고 하였음 [US patent 6,413,527, Jul. 2, 2002]
- 미국 Chesebrough-Pond's사는 바이오 나노 이멀전이 1 $\mu$ m-50 $\mu$ m라 보고하였고[US patent 6,183,774, Feb. 6, 2001], 미국 Collaborative Laboratories사는 liposome 형태의 미세 캡슐이 5 $\mu$ m라 발표하였으며[US patent 6,183,774, Feb. 6, 2001], Unilever사는 원반형 나노입자를 보고하였는데 크기는 10nm-500 $\mu$ m로 넓게 분포되고 1 $\mu$ m-100 $\mu$ m의 입자가 주였음[US patent 6,451,330, Sept. 17, 2002]

### 2. 국내수준

- 천연물 유래 작물보호제는 외국의 원제를 수입하여 소분 판매하거나, 일부 국내 회사들이 식물종자유 유래 농약의 대부분을 유화제를 혼합한 후 Homogenizer를 이용하여 균질화시켜 물과 희석하여 제조하고 있음.
- 국내에서 제조/유통되고 있는 천연물 유래 제품들은 외국으로부터 수입/판매되고 있는 제품으로 대부분 식물성 종자기름(Neem Oil), 야채유, 한약재 및 제충국 등을 주재료로 하여 이들을 혼합한 것임
- 각종 천연물이나 미생물유래 유용물질에 대한 연구 및 그에 대한 활용을 통한 농약개발

- 이 활발히 진행되고 있으나, 나노기술과 금속, 천연물 및 미생물유래 유용물질을 결합시킨 친환경 농약의 개발은 거의 전무한 실정임
- 나노기술을 보유하고 있는 공산업 분야와 나노기술을 활용할 수 있는 농업분야의 학제간 연구가 초기단계에 있어 이에 대한 적극적인 지원이 필요한 상황임
  - 국내의 친환경농업을 위한 생물농약으로 현재 미생물농약이 있으며 2006년 3월 현재 20종(살균제 11종, 살충제 9종)이 출시되어 있음
  - 은(Ag)은 현재까지 화농성 질환, 황색포도상구균, 요소부패균, 대장균, 녹농균, 폐렴균, 레지오넬라균, O-157균 등 각종 단세포 병원균을 살균하는 것으로 알려져, 포항공대 내 벤처기업인 (주)바이오플러스에 의하여 생산되는 은나노 소재인 NANOVER™가 의료가 및 의약학 분야, 건강식품 분야, 건축자재 분야, 인테리어 분야, 섬유분야, 각종 생활용품 분야 등에 활용이 되어 상업화가 활발히 이루어지고 있으나, 은 이온(Ag<sup>+</sup>)의 항균활성을 이용한 농업에의 합법적 적용의 경우가 없고, 특정 식물병원균에 대한 항균효과만을 확인 하는 수준에 그치고 있음.
  - 국내에서는 (주)태평양, (주)LG화학 및 학계에서 몇몇 연구진들이 연구를 수행하는 것으로 알려져 있다. 태평양기술연구소가 열방성 액정에 바이오나노 캡슐은 크기가 약 1μm-15μm이고[Colloid Polym. Sci, 280, 879-885 (2002)], 최근 아이오페 제품에 적용한 Phyto Nano Sphere는 크기가 100nm-150nm라고 보고함.
  - 2003년 5월 현재까지 국내·외를 막론하여 100nm 미만의 크기분포가 균일한 나노 입자형성에 대한 공인된 결과는 보고되지 않았으며, 나노입자 연구는 현재 개념정립 단계임 (한편, 마이크로-100nm 크기의 각종 의약전달용 캡슐의 연구는 기업화 단계라 할 수 있음).

### 3. 국내·외의 연구현황

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
국민대학교	○ colloidal silver 입자의 항균성 조사	- 학술발표
강원대학교 (이윤수 교수)	○ 각종 길항성 및 성장촉진 미생물제 개발 및 미생물 비료 개발	- 미생물 농약 및 비료의 등록 및 허가
강원대학교 (양재의 교수)	○ 은 나노소재의 항균활성 검정	- 학술발표 4건 및 활용화 기초 연구
	○ 은 나노소재 사용이 토양환경에 미치는 영향 평가	- 토양분석 등 기초연구
포항공대 (주)바이오플러스 (정무영, 김승빈 교수)	○ 각종 산업용 은 나노 소재 및 피톤치드 소재 개발 및 활용	- 생활용품 및 기타 산업응용제품 상용화

## 제 3 장. 연구개발 수행 내용 및 결과

### 제 1 절. 나노-바이오 기술을 활용한 친환경 살충제의 개발

#### 1. 나노제형(Cotrolled Release)에 적용가능한 살충제 및 해충 선발

Controlled Release 형태의 제형을 개발하기 위하여 몇가지 조건을 필요로 하게 되었다. 첫째, 이러한 형태의 제형에 의하여 방제를 필요로 하는 해충을 선발하는 것이 첫 번째 조건이 되며, 이는 또한 해충을 언제나 손쉽게 구할 수 있는 조건이 되기도 한다. 따라서 대상해충은 현재 실험실에서 사육가능하며, 야외에서도 빈번히 발생하여 문제가 되는 채집하기 용이한 파밤나방, 거세미나방, 배추좀나방, 목화바둑명나방, 진딧물류(복숭아혹진딧물, 목화진딧물, 보리두갈래진딧물, 무테두리진딧물), 두점박이응애 그리고 톱다리개미허리노린재류로 선발하였다. 둘째 조건은 해충의 방제 적용범위가 넓고 Nano Carrier형태의 제형으로 만들 수 있는 화학적 조건(Nano-carrier의 size는 특정 초음파 강도에서의 ultrasonic - homogenizer의 적용 시간, coating material인 chitosan 분자량 및 용액농도 그리고 alginate를 이용한 2차 coating 및 그 용액의 농도)을 갖고 있는 농약의 선발이 필요했다. 이러한 조건을 갖춘 농약을 (주) 경농 중앙연구소, 고려대학교, 충남대학교 해충제어학실험실 등 세 기관의 연구자가 협의하여 우선 3종류의 살충제를 선발하게 되었다. 선발조건으로는 해충에 대하여 적용범위가 넓고, 약제의 적용 기작에서 침투이행성이며, 원제가 키토산과 결합하여 서방형이 가능하며, 적절한 원제의 용출성이 나타나는 것으로 선별 조건으로 하였다.

#### 가. 나방류 해충방제에 적합한 살충제 선발

##### (1) 파밤나방 방제에 효과적인 살충제의 선발

##### (가) 파밤나방 방제용으로 국내에 등록되어 있는 살충제

실험에 사용되는 파밤나방(*Spodoptera exigua*)은 농촌진흥청 농업생물부 유용곤충과에서 분양받아 실험실에서 인공사료로 1년간 누대 사육한 것을 이용하였다. 사육 조건은 온도  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ , 광주기 16:8h(L:D)이었다. 성충의 먹이로는 10% 설탕물을 산란상자(직경: 20cm, 높이: 15cm의 플라스틱)에 공급하였다. 최근 파밤나방 발생이 증가하면서 약제방제에 대한 어려움을 호소하는 농업인들이 증가하는데 이러한 현상은 파밤나방이 약제에 대한 고유의 저항능력 및 일반 약제에 대한 무분별한 오남용으로 저항성이 나타나기 때문이다. 따라서 본 실험은 우리나라에 등록되어 있는 화학농약의 약제별 감수성을 시험하여 효과적인 약제를 선발 환경친화적인 나노제형으로 만드는 방제 방법을 개발하

고자 시험을 시도하였다. 국내의 파밤나방에 등록되어 있는 화학 농약을 조사하여 대전광역시 인근에서 구입 가능한 살충제 25종을 선별하였다(Table 1).

**Table 1.** Insecticides tested in this study

Types	Insecticide	Formul.	A.I.(%)	Group
Neurotoxin Insecticides	Emamectin benzoate	EC	2.15	Avermectin
	Indoxacarb	WP	10	Oxadiazine
	Indoxacarb	WG	30	Oxadiazine
	Indoxacarb	SC	5	Oxadiazine
	Indoxacarb+Etofenprox	WP	1.5+10	Oxadiazine+Pyrethroid
	Pyridalyl	EW	10	—
	Etofenprox	EC	20	Pyrethroid
	Bifenthrin	WP	2	Pyrethroid
	Cartap hydrochloride	SP	50	Cartap
	Bifenthrin	WG	8	Pyrethroid
	Ethofenprox+Diazinon	WP	8+25	Pyrethroid+Organophosphate
	Acetamiprid+Etofenprox	WP	2.5+8	Neonicotinoid+Pyrethroid
	Methoxyfenozide+Spinosad	SC	10+5	Diacylhydrazine+Spinosyn
	Methoxyfenozide	WP	4	Diacylhydrazine
Insect Growth Regulators	Tebufenozide	WP	8	Diacylhydrazine
	Methoxyfenozide	SC	21	Diacylhydrazine
	Chlorfluazuron	EC	5	Benzoylurea
	Trflubenzuron	SC	5	Benzoylurea
	Imidacloprid+Methoxyfenozide	WP	4+8	Oxadiazide+Diacylhydrazine
	Flufenoxuron	DC	5	Benzoylurea
	Lufenuron	EC	5	Benzoylurea
	Indoxacarb+Teflubenzuron	WP	1+2	Oxadiazine+Benzoylurea
	<i>B.thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i> (S제품)	SC	1×10 <sup>7</sup> cfu/ml	Bacteria
	<i>B.thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> (K제품)	WP	3×10 <sup>6</sup> cfu/mg	Bacteria
<i>B.thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i> (T제품)	WP	1×10 <sup>9</sup> cfu/g	Bacteria	

## (나) 파밤나방에 대한 살충활성 검정을 통한 살충제 선발

Table 1에 제시된 등록된 25종의 살충제 중 22종을 구입하여 각각 제조사의 추천배수로 희석하여 배추잎의 디스크(5×5cm)를 만들고 약액에 30초 침지한 후 꺼내어 충분히 음건한 다음 페트리디쉬(Ø:14mm)에 넣고 파밤나방 3령 유충을 10마리씩 접종하였다. 처리 후 24h 간격으로 5일간 사충수를 조사하였다(작은 붓으로 유충의 몸을 건들여 움직이지 않으면 죽은 것으로 간주). 대조구는 물을 처리하여 유충 10마리씩 실험하였다. 모든 실험은 3반복 실시하였다.

3종의 *B.t.* 약제는 각각 추천배수로 인공사료에 처리하고 파밤나방 2령 유충을 페트리디쉬(Ø:14mm)에 1마리씩 접종하였다. 처리 후 24h 간격으로 5일간 사충수를 조사하였다. 물로 처리한 것을 대조구로하고 유충 20마리씩 2반복 실험하였다. 선발된 약제는 신경독(Neurotoxin)제, 곤충생장 조절제(IGRs) 및 생물농약으로 구분하여 실험하였으며 그 결과, 12종의 신경독제 중 접촉독 및 소화 중독에 의하여 살충효과를 나타내는 Emamectin benzoate EC의 약효가 처리 1일 후 90%의 가장 높은 살충효과를 나타내었고, 처리 3일 후에는 100%의 살충효과가 관찰되었다. 그 다음으로 Indoxacarb WP, WG, SC, Indoxacarb+etofenprox WP, Pyridalyl EW 등 5종 약제가 처리 1일 후 낮은 살충효과를 보였으나, 처리 5일 후에 91%이상에 달하여 비교적 좋은 효과를 나타내었다. 이러한 속효성의 차이는 포장에서의 약제 살포시 작물의 피해정도와 상품성 측면을 고려하여 방제 약제를 선정하는데 주요한 요인이 될 수 있다. 그러나 이러한 약제들은 Nano-carrier 제형으로 만드는데 어려움이 따랐다. 그러나 Etofenprox의 경우는 약 80%의 방제효과를 나타내고 있으나 29종의 작물과 46종의 해충에 등록되어 있고 특히 Nano-carrier 제형으로 가능하기 때문에 선발하기로 결정하였다(Table 2). 한편 이러한 약제에 대하여 사망하는 형태의 관찰이 필요하게 되었다. 이는 약제를 살포하여 해충이 접촉 또는 섭식하고 사망해가는 룰에 의하여 약제가 먹이에 노출된 유효농도에 따라서 차이가 나기 때문이다. 그러므로 파밤나방이 약제에 노출된 시점으로부터 치사하기까지 소요된 시간을 관찰하였다(Fig. 1). 일반적으로 처리 5일 경과 후 사망하게 되므로 약제의 노출 후 7일정도의 잔효농도가 필요할 것으로 고려되었다. 그러므로 Etofenprox를 사용하여 7일 이후까지도 약제가 노출될 수 있도록 Controlled Release 형태의 제형을 만들기로 합의 하였다.

**Table 2.** Mortality of *Spodoptera exigua* against several insecticides

Insecticides	Formul.	A.I. (%)	Dilution	No. of insect tested	Mortality (%±S.E.) after application		
					1 day	3 days	5 days
Emamectin benzoate	EC	2.15	2000	90	90.0±12.0a	100±0a	100±0a
Indoxacarb	WP	10	2000	90	50.0±13.3bc	90.0±17.3ab	100±0a
Indoxacarb	WG	30	6000	90	56.7±16.9b	82.1±15.4abc	96.2±66a
Indoxacarb	SC	5	1000	90	43.3±17.4bcd	71.2±18.5bcd	91.4±9.7ab
Indoxacarb+ Etofenprox	WP	1.5+10	1000	90	16.7±8.8e	71.2±13.2bcd	94.6±2.5ab
Pyridalyl	EW	10	1000	90	31.0±19.3cde	64.0±19.5bcd	92.1±7.7ab
Etofenprox	EC	20	1000	90	22.2±12.5de	71.9±13.2bc	79.5±19.2abc
Bifenthrin	WP	2	1000	90	21.1±13.9de	52.8±18.2de	75.0±19.0abcd
Cartap hydrochloride	SP	50	1000	90	24.4±12.6de	55.0±11.6cde	69.0±19.3bcd
Bifenthrin	WG	8	4000	90	16.7±13.4e	55.0±19.2cde	69.7±19.0bcd
Ethofenprox+ Diazinon	WP	8+25	1000	90	21.1±1.9de	54.2±16.9cde	64.3±18.6cd
Acetamiprid+ Etofenprox	WP	2.5+8	1000	90	8.9±1.9e	35.4±6.6e	51.3±12.7d

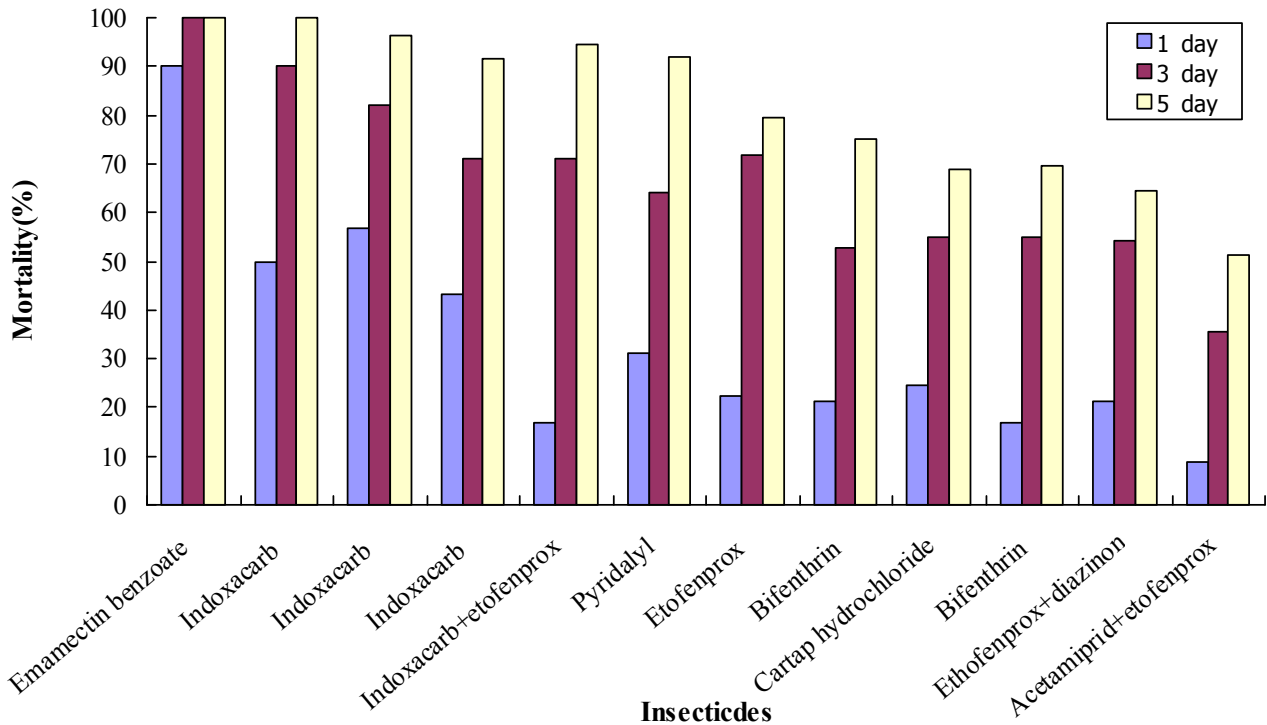


Fig. 1. Mortalities of *Spodoptera exigua* treated with neurotoxic insecticides.

(다) 과밤나방의 친환경적 방제를 위한 곤충생장조절제 선발

한편 나방류에 효과가 인정되면서 친환경 농업이 가능한 작물보호제로서 IGRs가 과밤나방에는 10 종류가 등록되어있다(Table 1). 본 시험에 사용된 IGRs계통의 농약 중에서는 해충의 탈피를 촉진하는 성분과 소화중독 및 접촉독에 의해 해충의 신경전달계를 마비시켜 살충효과를 나타내는 혼합제로 Methoxyfenozide + Spinosad SC의 약효가 가장 높아 처리 1일 후에 약효가 68%이상에 달하여 신경독제 수준으로 빠른 효과가 관찰되었다. 그리고 IGRs 계통의 약제임에도 처리 3일 후 100% 방제효과가 관찰되어 신경독제 못지않은 속효성과 높은 살충효과를 보였다. Methoxyfenozide WP, Tebufenozide WP, Methoxyfenozide SC 등 3종 약제의 약효도 처리 5일 후에는 92%이상에 달하는 비교적 높은 효과를 나타내었다.

본 시험에 사용된 IGRs계 농약에 대한 생물활성에서도 5종류는 살충율이 80%정도로 높았으나 Indoxacarb + Teflubenzuron는 56.4%의 살충율을 보여주었으며, 나머지 4종류는 비교적 낮은 살충활성을 보였다. 한편, IGRs계 농약에서는 처리 후 사망하는 시간 경과에 따라 작물의 경제적 피해가 발생하기 때문에 속효적인 약제가 필요할 것이라 판단된다. 처리된 10개의 약제 중에 Methoxyfenozide + Spinosad SC 약제만 1일후 사망률이 68.9%이고 나머지는 모두 5%미만으로 IGRs계 농약의 특성을 잘 보여주고 있다. 그러나 처리 5일후에는 높은 살충율을 보여주고 있어, 초기 약제 발현이 낮다 하더라도 친환경 농산물 생산을 위한 농가를 위하여서는 이러한 천연물 유래의 저독성 약제이면서 잔류기간이 짧은 약제선발이 꼭 필요하다고 사료된다(Table 3). 그러나 이러한 약제



는 Nano-carrier 형태의 제형에는 어려움이 따를 것으로 여겨져 살충제 선정과정에서 제외시켰다. 비록 IGRs 약제 특성상 지효적 효과가 나타날 것으로 예측하고 실험하였으나 화학농약과 효과가 나타나는 면에서는 비슷한 결과를 나타내는 것을 볼 수 있었다. 그러나 초기 1일의 효과 면에서는 화학농약보다는 지효적으로 나타나므로 이러한 계통의 약제 살포 일정은 발생 초기에 살포하는 것이 방제가를 높이는데 도움이 될 것이다(Fig. 2).

**Table 3.** Mortality of *Spodoptera exigua* against several insect growth regulators

Insecticide	Formul.	A.I. (%)	Dilution	No. of insect tested	Mortality (%±S.E.) after application		
					1 day	3 days	5 days
Methoxyfenozide+ Spinosad	SC	10+5	2000	90	68.9±12.3a	100±0a	100±0a
Methoxyfenozide	WP	4	1000	90	4.4±5.1b	73.2±17.6b	94.4±9.6a
Tebufenozide	WP	8	1000	90	2.2±1.9b	61.7±20.5bc	94.4±9.6a
Methoxyfenozide	SC	21	4000	90	3.3±5.8b	58.4±19.1bcd	92.0±6.9ab
Chlorfluazuron	EC	5	2000	90	2.2±1.9b	41.4±11.3cdef	89.2±10.4ab
Trflubenzurom	SC	5	2000	90	3.3±3.4b	49.8±17.5bcde	77.7±13.1abc
Imidacloprid+ Methoxyfenozide	WP	4+8	1000	90	4.4±2.0b	33.5±13.6def	77.9±17.0abc
Flufenoxuron	DC	5	2000	90	3.3±3.4b	44.0±13.4cde	68.6±19.8bc
Lufenuron	EC	5	1000	90	2.2±3.9b	28.3±7.3ef	63.6±14.7c
Indoxacarb+ Teflubenzuron	WP	1+2	1000	90	2.2±1.9b	16.1±7.5f	56.4±11.9c

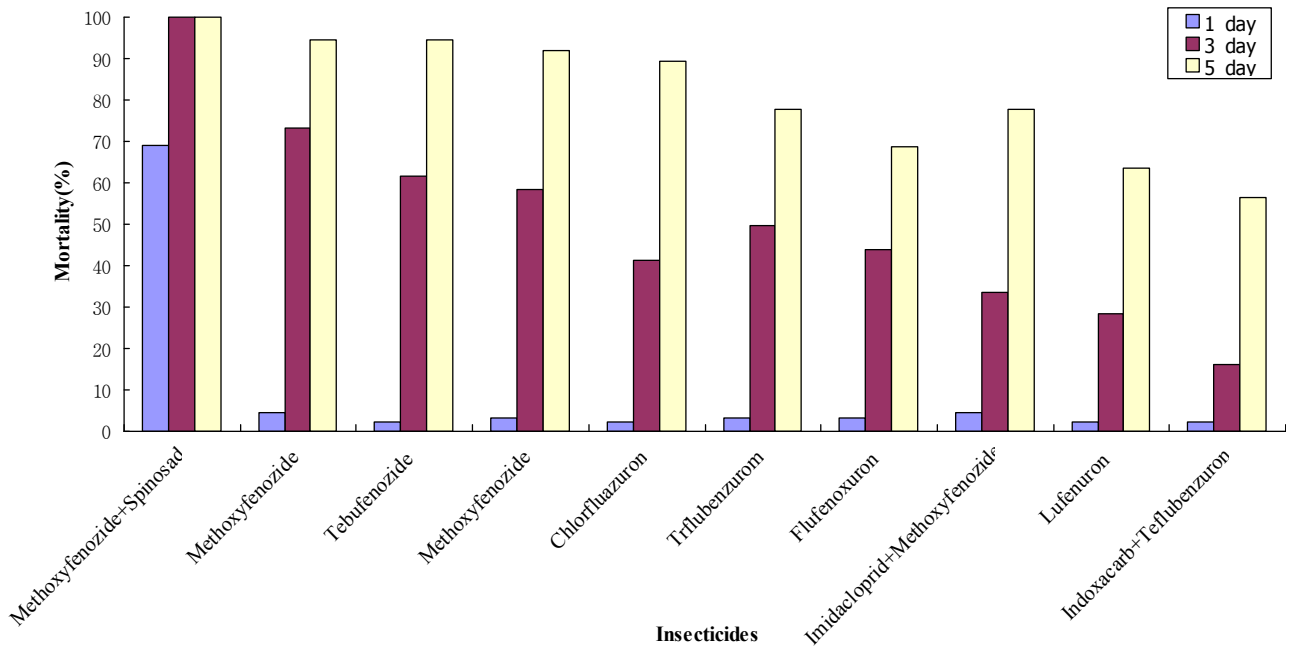


Fig. 2. Mortalities of *Spodoptera exigua* treated with insect growth regulators

(라) 야외 포장에서의 과밤나방 방제실험을 통한 살충제 선발

과밤에 발생하는 과밤나방은 작물자체의 특성과 부화유충이 기주속으로 파고 들어가 섭식하는 습성때문에 방제하기가 매우 어렵다. 따라서 파에 살포된 유효농약 성분이 잔류기간을 최대한 늘려 알에서 부화하여 유충이 되는 해충까지 방제해야 하는 제형의 검토가 이루어져야 한다. 나노제형화에 이용될 살충제 선발에 앞서 실내에서 과밤나방을 대상으로 생물검정을 실시하여 살충효과가 우수한 살충제 14종을 일차적으로 선발하고, 이 후 선발된 살충제를 야외포장에서 적용실험을 수행하여 나노제형으로서 가능성이 있는 살충제를 선발하고자 하였다(Fig. 3).

Table 4에 제시된 14종 살충제의 과밤에서의 과밤나방에 대한 살충효과를 실시한 결과, 실내에서 가장 살충율이 높았던 Etofenprox의 살충율은 야외에서는 45%를 넘지 않아, 실험실과 포장에서의 결과에 있어 현저한 차이가 나타나는 것을 알 수 있었다. 따라서 과작물의 특성과 과밤나방의 생리, 생태적 특성을 고려하여 유효한 농약 성분이 오랫동안(성충과 유충의 알에서 5령까지 섞여 있는 야외포장 상황에서 늦게 부화한 유충까지 죽일 수 있는 서방형 제형) 천천히 노출되는 새로운 나노제형의 개발의 필요성이 요구되는 것이다.

이러한 결과 친환경 농업에 사용되는 주요 농자재의 선발에서는 천연물유래의 생물농약의 종류로서 속효성이면서 방제가가 높게 나타나는 약제를 적절하게 사용하면 보다 안전한 농산물을 생산할 수 있을 것으로 판단된다. 본 실험에서 나타난 약제에 대한 단점으로 지효성 및 낮은 방제가를 나타내는 문제점은 나노 형태와 같은 특수한 제형 개발로 보다 효과 높고 유용하게 연구를 진행 할 계획이다. 이러한 실내 시험을 통하여 과밤나방의 친환경적 종합 방제 방법을 농가 포장에서 확인하여 보급할 수 있는 실험이 필요하게 되었다.



Fig. 3. Photograph shows that researches counted the larva of beet armyworms at each plot on welsh onion field

Table 4. Every time mortality of several insecticides against *Spodoptera exigua*

Types	Insecticide	Decreasing rate of damage plants(%)				Mortality(%)			
		1st	2nd	3rd	Mean	1st	2nd	3rd	Mean
NI	Etofenprox EC	24.1	1.0	11.6	12.5	43.3	45.8	44.5	44.5a
	Indoxacarb WG	27.8	0.0	7.1	11.6	25.9	55.9	49.3	43.7a
	Emamectin benzoate EC	14.8	1.0	14.8	10.2	57.0	8.1	64.0	43.0a
	Bifenthrin WP	5.6	2.4	27.0	11.7	17.0	58.1	48.6	41.2a
	Indoxacarb WP	9.3	3.9	8.3	7.2	11.1	45.8	51.2	36.0a
	Cartap hydrochloride SP	13.0	1.0	3.2	5.7	15.3	34.3	57.5	35.7a
IGR	Etofenprox+diazinon WP	20.4	2.4	5.8	9.5	33.2	49.7	13.0	32.0a
	Teflubenzuron SC	20.4	0.0	5.2	8.5	46.8	56.2	58.3	53.8a
	Methoxypenozide WP	11.1	4.9	12.9	9.6	32.3	55.4	32.4	40.0a
	Chlorfluazuron EC	22.2	1.0	0.7	8.0	37.9	32.7	33.1	34.6a
BT	Methoxypenozide+spinosad SC	31.5	2.4	12.8	15.6	43.1	41.6	16.5	33.7a
	<i>B.t.a</i> -109	33.3	3.9	12.2	16.5	63.0	0.0	68.0	43.7a
	<i>B.t.k</i> -110	11.1	1.0	4.5	5.5	32.0	41.3	36.1	36.5a
	<i>B.t.k</i> -116	22.2	1.0	16.7	13.3	24.0	53.5	28.1	35.2a

(마) 파밤나방과 담배거세미나방에 대한 나노제형의 효과검정

실내 생물검정을 통해 선발된 etofenprox와 cypermethrin 살충제를 Controlled Release 제형의 Etofenprox(고려대학교 서방형 제형 code NLP-에,2,5,6,) 및 Cypermethrin(고려대학교 서방형 제형 code NLP-사,2,5,6,) 나노제형으로 제형화하여(제 2협동과제 고려대학교에서 수행) 파밤나방과 담배거세미나방에 생물검정을 수행하였다. 나노제형 etofenprox는 사용할 때마다 물 10ml에 약량 20mg을 넣어서 잘 희석하여 사용하였으며 대조구처리 비나노제형은 경농제품을 구입하여 기준농도인 1,000배로 희석하여 사용하였다. cypermethrin 나노제형은 사용할때마다 물 10ml에 약량 7mg을 희석하여 사용하였으며 대조구 역시 경농제품을 구입하여 기준농도로 희석하여 사용하였다. 공시충인 파밤나방과 담배거세미나방은 2령 또는 3령 유충을 각각 10마리씩 3반복으로 처리한 후 살충율을 조사하였다. 나노제형은 controll release현상을 확인하기 위해 기주식물체에 처리 후 시간이 경과함에 따라 약제가 살포된 잎을 따서 생물검정에 이용하였다. 두 종 해충 모두 etofenprox와 cypermethrin모두에 대해 사망률이 낮았으며, 나노제형의 살충율이 좀 더 낮게 나타났지만 처리 후 5일째부터 일반제형에 비해 높은 살충율을 보여주는 것을 확인할 수 있었다(Table 5와 6).

Table 5. Mortality of *S. litura* after treatment of etofenprox and cypermethrin on radish leaves

Treatment method	insecticides	Mortality(%) after treatment				
		1 DAY	2 DAY	3 DAY	4 DAY	5 DAY
0 day after treatment	etofenprox	10.0	16.7	33.3	50.0	60.0
	CR-Eto	6.7	6.7	36.7	50.0	70.0
	cypermethrin	3.3	10.0	43.3	60.0	76.7
	CR-Cyper	6.7	13.3	40.0	50.0	66.7
	Control	0.0	3.3	3.3	13.3	16.7
1 day after treatment	etofenprox	3.3	10.0	30.0	46.7	60.0
	CR-Eto	3.3	10.0	33.3	53.3	70.0
	cypermethrin	3.3	13.3	36.7	56.7	70.0
	CR-Cyper	6.7	16.7	40.0	50.0	70.0
	Control	0.0	3.3	6.7	13.3	20.0
3 day after treatment	etofenprox	0.0	6.7	16.7	30.0	53.3
	CR-Eto	3.3	10.0	16.7	36.7	60.0
	cypermethrin	0.0	10.0	20.0	40.0	53.3
	CR-Cyper	3.3	16.7	30.0	50.0	63.3
	Control	0.0	3.3	6.7	13.3	20.0
5 day after treatment	etofenprox	3.3	10.0	20.0	30.0	43.3
	CR-Eto	10.0	16.7	26.7	40.0	50.0
	cypermethrin	0.0	6.7	16.7	26.7	40.0
	CR-Cyper	6.7	20.0	33.3	40.0	53.3
	Control	0.0	0.0	6.7	20.0	30.0

Table 6. Mortality of *S. exigua* after treatment of etofenprox and cypermethrin on radish leaves

Treatment method	insecticides	Mortality(%) after treatment				
		1 DAY	2 DAY	3 DAY	4 DAY	5 DAY
0 day after treatment	etofenprox	23.3	36.7	53.3	60.0	70.0
		23.3	40.0	63.3	70.0	80.0
	1 day after treatment	30.0	46.7	60.0	66.7	80.0
		23.3	43.3	60.0	70.0	80.0
	3 day after treatment	0.0	3.3	6.7	10.0	20.0
1 day after treatment	etofenprox	10.0	20.0	33.3	46.7	60.0
	CR-Eto	13.3	23.3	43.3	56.7	73.3
	cypermethrin	16.7	26.7	50.0	66.7	80.0
	CR-Cyper	16.7	33.3	56.7	73.3	86.7
	Control	0.0	3.3	6.7	16.7	20.0
3 day after treatment	etofenprox	3.3	13.3	23.3	36.7	53.3
	CR-Eto	0.0	10.0	20.0	33.3	56.7
	cypermethrin	3.3	13.3	30.0	46.7	60.0
	CR-Cyper	6.7	13.3	33.3	43.3	63.3
	Control	0.0	0.0	13.3	20.0	23.3
5 day after treatment	etofenprox	0.0	6.7	16.7	30.0	46.7
	CR-Eto	0.0	6.7	16.7	33.3	53.3
	cypermethrin	0.0	3.3	20.0	36.7	63.3
	CR-Cyper	0.0	6.7	26.7	50.0	66.7
	Control	0.0	0.0	6.7	16.7	20.0

나. 톱다리개미허리노린재에 대한 나노제형의 효과검정을 통한 살충제 선발

톱다리개미허리노린재를 실내에서 강낭콩을 기주로 하여 사육한 후, 나노화 서방형 제제의 생물검정에 이용하였다. 나노화 서방형 제제는 제2 협동과제의 결과물을 이용하였는데, etofenprox와 cypermethrin을 추천농도인 1,000배로 희석하여 사용하였으며, 이들의 나노화 서방형 제재인 Controlled Release etofenprox(CR-Eto)와 Controlled Release cypermethrin(CR-Cyper)도 1,000배로 희석하여 사용하였다. 생물검정시 처리 후 24시간과 48시

간 후의 생충수를 조사하였다. 전반적으로 톱다리개미허리노린재는 두 살충제에 대해 살충효과가 좋지 않았으며, 나노제형의 효과를 확인하기 위해서는 추후 처리 후 경과일에 따른 추이를 통해 확인가능할 것으로 보여진다. 결과에서는 뚜렷한 살충효과를 나노제형 역시 확인할 수 없었다(Table 7).

Table 7. Mortalities of etofenprox, cypermethrin, nano types against *R. clavatus*

Treatment method	Insecticides	After 24 hr.				After 48 hr.			
		1	2	3	Ave.	1	2	3	Ave.
spray treatment	etofenprox	30.0	20.0	40.0	30.0	40.0	30.0	50.0	36.7
	CR-Eto	20.0	40.0	30.0	30.0	40.0	50.0	50.0	46.7
	cypermethrin	30.0	30.0	20.0	26.7	50.0	40.0	40.0	43.3
	CR-Cyper	40.0	20.0	40.0	33.3	50.0	40.0	50.0	46.7
	Control	0.0	10.0	10.0	6.7	0.0	10.0	10.0	6.7

다. 복숭아혹진딧물과 목화진딧물에 대한 나노제형의 효과검정을 통한 살충제 선발

복숭아혹진딧물을 실내에서 고추를 기주로 하여 사육한 후, 나노화 서방형 제제의 생물검정에 이용하였다. 나노화 서방형 제제는 제2 협동과제의 결과물을 이용하였으며, 모두 1,000배로 희석하여 처리 후 24시간, 48시간 후의 생충수를 조사하였다. 진딧물류 해충의 경우, 처녀생식에 의해 번식하므로 조사기간내에 생식에 의해 처리된 수보다 증가하는 경향이 있기 때문에 살충율 대신 생충수를 조사하여 비교하고자 하였다.

약제를 처리한 당일에 복숭아혹진딧물을 접종한 후 24시간이 경과한 후에 생충율은 etofenprox가 57%, CR-Eto가 47%의 생충율을 보이고 있으며, cypermethrin 53%와 CR-Cyper 63%의 생존율을 나타내고 있었다. 48시간이 경과한 후에는 etofenprox가 40%, CR-Eto가 37%의 생충율을 보이고 있으며, cypermethrin 37%와 CR-Cyper 60%의 생존율을 나타내었다. 한편 약제처리 6일 후에 복숭아혹진딧물을 접종하였을 경우, 24시간이 경과한 후에 생충율은 etofenprox가 83%, CR-Eto가 73%의 생충율을 보이고 있으며, cypermethrin 77%와 CR-Cyper 67%의 생존율을 나타내고 있었고. 48시간이 경과한 후에는 etofenprox가 70%, CR-Eto가 57%의 생충율을 보이고 있으며, cypermethrin 63%와 CR-Cyper 53%의 생존율을 나타내었다. 이와 같은 결과로 미루어 볼 때에 나노화 서방형 제제의 효과가 좀 더 지속되고 있는 것을 알 수 있었다(Table 8).

목화진딧물은 실내에서 오이를 기주로 하여 사육한 후, 나노화 서방형 제제의 생물검정에 이용하였다. 약제처리방법이나 약제의 희석방법은 복숭아혹진딧물의 방법과 모두 동일하게 수행

하였다.

약제를 처리한 당일에 목화진딧물을 접종한 후 24시간이 경과한 후에 생충율은 etofenprox가 47%, CR-Eto가 40%의 생충율을 보이고 있으며, cypermethrin 43%와 CR-Cyper 47%의 생존율을 나타내고 있었다. 48시간이 경과한 후에는 etofenprox가 33%, CR-Eto가 30%의 생충율을 보이고 있으며, cypermethrin 23%와 CR-Cyper 27%의 생존율을 나타내었다. 한편 약제처리 6일 후에 목화진딧물을 접종하였을 경우, 24시간이 경과한 후에 생충율은 etofenprox가 67%, CR-Eto가 57%의 생충율을 보이고 있으며, cypermethrin 57%와 CR-Cyper 53%의 생존율을 나타내고 있었고. 48시간이 경과한 후에는 etofenprox가 50%, CR-Eto가 43%의 생충율을 보이고 있으며, cypermethrin 43%와 CR-Cyper 37%의 생존율을 나타내었다. 이와 같은 결과로 미루어 볼 때에 복숭아혹진딧물과 마찬가지로 목화진딧물의 경우에도 나노화 서방형 제제의 효과가 좀 더 지속되고 있는 것을 알 수 있었다(Table 9).



Table 8. Survival number of *M. persicae* on red pepper seedling plants treated etofenprox, cypermethrin, nano formulation two insecticides

Treatment	Insecticides	After 24 hr.				After 48 hr.			
		1	2	3	Ave.	1	2	3	Ave.
0 day after treatment	etofenprox	5.0	7.0	5.0	5.7	2.0	5.0	5.0	4.0
	CR-Eto	5.0	4.0	5.0	4.7	4.0	3.0	4.0	3.7
	cypermethrin	5.0	3.0	8.0	5.3	4.0	2.0	5.0	3.7
	CR-Cyper	6.0	5.0	8.0	6.3	6.0	5.0	7.0	6.0
	Control	11.0	10.0	11.0	10.7	11.0	12.0	11.0	11.3
2 day after treatment	etofenprox	7.0	3.0	6.0	5.3	4.0	4.0	7.0	5.0
	CR-Eto	6.0	5.0	9.0	6.7	6.0	5.0	5.0	5.3
	cypermethrin	5.0	5.0	7.0	5.7	5.0	6.0	7.0	6.0
	CR-Cyper	10.0	6.0	9.0	8.3	6.0	4.0	8.0	6.0
	Control	10.0	10.0	10.0	10.0	11.0	10.0	11.0	10.7
4 day after treatment	etofenprox	6.0	8.0	7.0	7.0	5.0	7.0	7.0	6.3
	CR-Eto	8.0	7.0	7.0	7.3	7.0	5.0	6.0	6.0
	cypermethrin	6.0	7.0	7.0	6.7	4.0	6.0	5.0	5.0
	CR-Cyper	7.0	8.0	8.0	7.7	6.0	6.0	7.0	6.3
	Control	10.0	11.0	10.0	10.3	10.0	12.0	11.0	11.0
6 day after treatment	etofenprox	8.0	8.0	9.0	8.3	7.0	7.0	7.0	7.0
	CR-Eto	7.0	7.0	8.0	7.3	6.0	5.0	6.0	5.7
	cypermethrin	8.0	7.0	8.0	7.7	7.0	5.0	7.0	6.3
	CR-Cyper	6.0	7.0	7.0	6.7	5.0	5.0	6.0	5.3
	Control	10.0	10.0	11.0	10.3	10.0	11.0	11.0	10.7

Table 9. Survival number of *A. gossypii* on cucumber seedling plants treated etofenprox, cypermethrin, nano formulation two insecticides

Treatment	Insecticides	After 24 hr.				After 48 hr.			
		1	2	3	Ave.	1	2	3	Ave.
0 day after treatment	etofenprox	4.0	6.0	4.0	4.7	3.0	5.0	2.0	3.3
	CR-Eto	3.0	5.0	4.0	4.0	2.0	4.0	3.0	3.0
	cypermethrin	4.0	4.0	5.0	4.3	2.0	2.0	3.0	2.3
	CR-Cyper	4.0	4.0	6.0	4.7	3.0	2.0	3.0	2.7
	Control	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	9.0	10.0	9.7
2 day after treatment	etofenprox	5.0	4.0	3.0	4.0	4.0	3.0	3.0	3.3
	CR-Eto	5.0	5.0	4.0	4.7	5.0	4.0	2.0	3.7
	cypermethrin	4.0	4.0	4.0	4.0	3.0	3.0	3.0	3.0
	CR-Cyper	7.0	4.0	4.0	5.0	5.0	3.0	3.0	3.7
	Control	9.0	11.0	10.0	10.0	9.0	13.0	11.0	11.0
4 day after treatment	etofenprox	5.0	6.0	6.0	5.7	4.0	5.0	5.0	4.7
	CR-Eto	6.0	5.0	5.0	5.3	6.0	4.0	4.0	4.7
	cypermethrin	5.0	5.0	5.0	5.0	4.0	3.0	4.0	3.7
	CR-Cyper	5.0	6.0	4.0	5.0	3.0	4.0	3.0	3.3
	Control	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	9.0	10.0	9.7
6 day after treatment	etofenprox	7.0	6.0	7.0	6.7	6.0	4.0	5.0	5.0
	CR-Eto	6.0	5.0	6.0	5.7	5.0	4.0	4.0	4.3
	cypermethrin	6.0	5.0	6.0	5.7	5.0	3.0	5.0	4.3
	CR-Cyper	7.0	4.0	5.0	5.3	5.0	3.0	3.0	3.7
	Control	10.0	10.0	11.0	10.3	10.0	10.0	10.0	10.0

라. 온실가루이에 대한 나노제형의 효과검정을 통한 살충제 선발

복숭아혹진딧물을 실험한 방법과 동일하게 온실가루이를 실내에서 토마토를 기주로 하여 사육한 후, 나노화 서방형 제제의 생물검정에 이용하였다. 처리방법과 생물검정 방법 모두 진딧

물류 실험방법과 동일하게 수행하였다.

처리한 결과, 약제를 처리한 당일에 온실가루이를 접종한 후 24시간이 경과한 후에 생충율은 Etofenprox가 33%, CR-Eto가 43%의 생충율을 보이고 있으며, Cypermethrin 37%와 CR-Cyper 43%의 생존율을 나타내고 있었다. 48시간이 경과한 후에는 Etofenprox가 20%, CR-Eto가 27%의 생충율을 보이고 있으며, Cypermethrin 20%와 CR-Cyper 20%의 생존율을 나타내었다. 한편 약제처리 5일 후에 온실가루이를 접종하였을 경우, 24시간이 경과한 후에 생충율은 Etofenprox가 53%, CR-Eto가 47%의 생충율을 보이고 있으며, Cypermethrin 47%와 CR-Cyper 57%의 생존율을 나타내고 있었고. 48시간이 경과한 후에는 Etofenprox가 47%, CR-Eto가 40%의 생충율을 보이고 있으며, Cypermethrin 33%와 CR-Cyper 43%의 생존율을 나타내었다. 이와 같은 결과로 미루어 볼 때에 나노화 서방형 제제의 효과를 확실히 판단할 수는 없었다 (Table 10).

Table 10. Survival number of *T. vaporariorum* on tomato seedling plants treated etofenprox, cypermethrin, nano formulation two insecticides

Treatment	Insecticides	After 24 hr.				After 48 hr.			
		1	2	3	Ave.	1	2	3	Ave.
0 day after treatment	Etofenprox	4.0	3.0	3.0	3.3	3.0	2.0	1.0	2.0
	CR-Eto	5.0	4.0	4.0	4.3	4.0	2.0	2.0	2.7
	Cypermethrin	3.0	3.0	5.0	3.7	2.0	2.0	2.0	2.0
	CR-Cyper	4.0	5.0	4.0	4.3	2.0	3.0	1.0	2.0
	Control	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	9.0	9.7
1 day after treatment	Etofenprox	4.0	3.0	4.0	3.7	3.0	2.0	2.0	2.3
	CR-Eto	5.0	5.0	3.0	4.3	4.0	4.0	1.0	3.0
	Cypermethrin	3.0	4.0	2.0	3.0	2.0	2.0	2.0	2.0
	CR-Cyper	5.0	3.0	3.0	3.7	3.0	1.0	1.0	1.7
	Control	10.0	9.0	10.0	9.7	9.0	9.0	10.0	9.3
5 day after treatment	Etofenprox	5.0	6.0	5.0	5.3	4.0	5.0	5.0	4.7
	CR-Eto	6.0	4.0	4.0	4.7	4.0	4.0	4.0	4.0
	Cypermethrin	4.0	5.0	5.0	4.7	2.0	4.0	4.0	3.3
	CR-Cyper	5.0	6.0	6.0	5.7	4.0	5.0	4.0	4.3
	Control	10.0	9.0	10.0	9.7	9.0	9.0	10.0	9.3

## 2. 선발된 살충제별 나노제형에 따른 해충별 살충효과

### 가. etofenprox 나노제형에 따른 방제대상 해충에 대한 살충효과

#### (1) 나방류 해충에 대한 살충효과

(가) 나노제형(서방형제형, 키토산캐리어타입)에 따른 담배거세미나방의 살충효과

##### ① 생물검정에 이용된 나노제형(서방형 제형)의 제조

실내실험을 통해 나비목 해충에 살충율이 높게 나타난 etofenprox의 서방형 제형은 Bang 등 (2009)에 의해 보고된 방법을 활용하여 제 2협동과제 수행기관(고려대학교)에서 만들었는데, 최적의 캡슐화를 위한 코팅물질과 조건을 선발하고자 liposome에 코팅할 때 사용되는 키토산 용액의 분자량과 농도를 달리하여 제조하였다. 먼저 코팅물질을 선발하고자 키토산의 분자량(MW)과 농도를 조절하여 ENC1(MW 3,000, 0.3%), ENC2(MW 30,000, 0.1%), 그리고 ENC3(MW 30,000, 0.3%)를 제조하였고, 생물검정을 통하여 선발된 ENC2는 모든 etofenprox의 유효성분을 코팅하기 위하여 동일한 재료를 사용하면서도 일부 방법을 수정하여 ENC2A(MW 30,000, 0.1%)를 추가로 제조하였다. 이렇게 제조된 etofenprox controlled release 제형 ENC1(MW 3,000, 0.3%), ENC2(MW 30,000, 0.1%), ENC2A(MW 30,000, 0.1%) 그리고 ENC3(MW 30,000, 0.3%)은 고려대학교 생물고분자공학 실험실에서 제조하여 제공받았으며 생물검정을 위한 대조군으로는 etofenprox를 원제로 사용한 제품 세베로(ai; 20% EC, Kyung-Nong Co., Ltd.)를 농약사에서 구입하여 사용하였다.

농작물에 발생하는 해충은 종류가 다양하며 특히 해충이 알, 유충, 번데기 그리고 성충의 단계가 혼재되어 동시에 발생하고 있다. 그러나 해충방제로 사용되는 작물보호제는 대부분 곤충의 유충이나 성충만을 죽이기 때문에 죽지 않고 알에서 태어나는 유충의 방제는 어려운 상태이다. 또한 해충방제를 위하여 사용되는 약제의 경우, 살포 후 환경조건에 의해 유효성분이 분해되어 시간이 경과함에 따라 그 효과도 따라서 떨어진다. 따라서, 목적해충에 도달하지 못하고 유실되는 약제의 유효성분의 양을 줄일 수 있는 서방형제형 기술은 약효의 지속효과를 연장시켜 약제 살포 횟수를 감소시킬 수 있을 것으로 판단되었다. 약제의 유효 성분을 적절량으로 조절하기 위하여 주로 의약 치료에 사용되는 캡슐화 기술을 바탕으로 살충제나 페로몬 등 다양한 목적의 서방형제형을 만드는 연구는 종종 진행되고 있다(Cao *et al.*, 2005; Cork *et al.*, 2007; Samson and Harris, 1997). 본 실험에서는 해충제어를 위하여 사용되는 살충제 중에서 etofenprox를 주요성분으로 하였으며, 서방형 제형은 코팅물질인 키토산과 레시틴을 이용하여 캡슐화 할 수 있었다.

코팅된 입자는 etofenprox주위를 양용성인 레시틴으로 둘러싸여 동심원 모양의 골격체인 liposome을 형성한다. liposome은 레시틴의 소수성 부분이 안쪽으로 위치하고 바깥쪽은 친수성 부분이 자리 잡게 된다. 이렇게 형성된 liposome의 안쪽은 같은 소수성인 etofenprox를 포

함하게 된다. 형성된 liposome의 외피는 산성상태에서 -전하를 띄기 때문에 산성상태에서 +전하를 보이는 키토산을 이용하여 코팅하였다(Fig. 4). 코팅된 키토산으로 인해 etofenprox의 서방형 제형은 그 자체로서는 가지지 못했던 친수성을 나타내 물에 잘 혼화될 수 있는 특성을 갖는다. 따라서 코팅되어져 완성된 etofenprox 서방형 제형의 형태는 약 200nm ~ 600nm의 다양한 크기를 보인다(Bang *et al.*, 2009).

서방형 제형은 제조시 코팅되는 키토산의 조건을 선별하고자 분자량과 농도의 차이에 따라 ENC1(M.W. 3,000, 0.3%), ENC2(M.W. 30,000, 0.1%), ENC3(M.W. 30,000, 0.3%)로 제조되었다(표 11). 코팅시 사용되는 키토산의 양에 따라 첫 방출이 일어나는 시간, 농약성분인 etofenprox가 방출되어 누적되는 양 그리고 입자의 크기가 다른 것을 볼 수 있다. 코팅시 사용되는 키토산의 양이 가장 적은 ENC1에서 첫 방출이 가장 빠른 14시간 후에 일어났고, 키토산의 양이 가장 많은 ENC3에서는 39시간 후에 첫 방출이 일어난 것을 볼 수 있다. 이 결과를 통해 키토산의 양이 많아질수록 방출이 일어나는 시작 시간이 늦어지는 것으로 확인되었다.

서방형 제형의 살충활성 물질로 사용된 etofenprox는 접촉 및 소화중독의 특성을 가지고 있기 때문에 키토산으로 코팅되어 서서히 용출되는 새로운 제형과 일반적인 제품과의 생물활성을 비교 조사하였다(Table 11). 살충효과를 나타내는 특성에서 200ppm 농도에서 ENC2와 제품인 etofenprox는 접촉 및 소화중독에 모두 100%의 사충률을 보였다. 서방형 제형으로 만들어진 ENC2의 초기 접촉독성의 결과는 비코팅된 농약성분으로 판단된다. 따라서 제조된 서방형 제형은 제조하는 농약을 코팅하여 목적하는 시기에 필요한 양만을 용출시키려는 목적에 부합되지 못하였다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 모든 유효성분을 코팅한 새로운 ENC2A를 제조하였고 ENC2A는 ENC2와 제품인 etofenprox와 달리 200ppm 농도에서 접촉 및 소화중독에 각각 23%, 27%의 사충률을 나타냈다. 그러므로 ENC2A를 활용하여 용출량 및 속도를 일정하게 조절한다면 유효성분의 함량을 투입하여 목적으로 하는 서방형 제형을 완성할 수 있을 것으로 판단되었다.

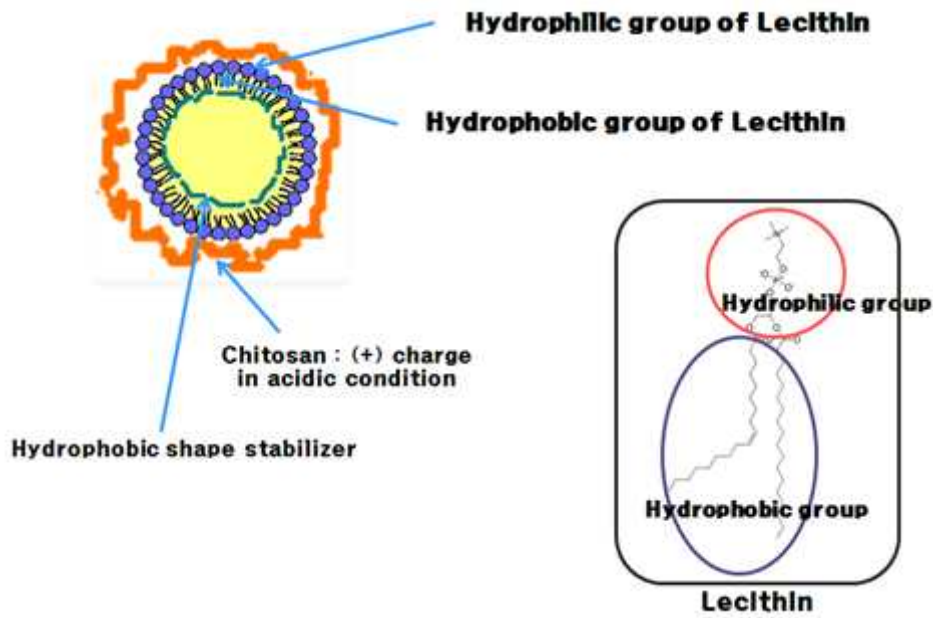


Fig. 4. The schematic of resulting sample

Table 11. The controlled release type of etofenprox made by chitosan

Code number	Coating material <sup>a</sup>	First release time	Existence of non-coated etofenprox
ENC1	Chitosan M.W. 3,000 0.3%	14h.	o
ENC2	Chitosan M.W. 30,000 0.1%	24h.	o
ENC2A	Chitosan M.W. 30,000 0.1%	24h.	x
ENC3	Chitosan M.W. 30,000 0.3%	39h.	o

<sup>a</sup> : Diverse chitosan's molecular weight(g/mole=Da) and chitosan solution's concentration.

② 나노제형의 용출현상 확인

서방형 제형은 위의 reference에 설명된 제조 방법에 따라 liposome을 만들고 원심분리를 통해 pellet상태의 결과물로 분리해 낸다. 그 다음에 이를 물 또는 buffer solution(pH 7.6 또는 pH 10.6)으로 re-suspending시켜주어 저장 샘플을 준비시켜준다. 준비된 이 nano-liposome은

실온에서 보관하였으며 일정한 속도로 준비한 용액을 stirring시켜 주었다. 그 후 미리 정해놓은 일정시간마다 샘플을 꺼내어 소량의 아세톤을 먼저 넣어주고 (이것은 농약의 비중과 낮은 수용해도 때문에 실행하는 단계) 그 다음 샘플을 원심분리하고 그것의 supernatant에 대해 GC를 이용해 그 안에 어느 정도의 유효성분이 들어있는지 확인함으로써 그 일정 시간동안 nano-liposome으로부터 방출된 유효성분의 정량적인 분석을 실행하였다. GC 분석조건은 Bang 등(2009)이 제시한 방법을 활용하였다.

3종류의 서방형 제형의 용출양상은 Fig. 5에서 볼 수 있는 것과 같이 코팅된 키토산의 분자량과 농도의 차이에 따라 다르게 나타난다. 코팅된 키토산의 분자량과 양이 가장 적은 ENC1의 제형은 수분이 접촉되면서 가장 빠르게 방출이 시작되어서 시간이 지나면서 110시간이후 세 제형 중에서 가장 빠르게 누적된 방출량이 많아지고 나서 방출량이 줄어드는 경향을 보여준다. 반면에 키토산의 분자량과 양이 가장 많은 ENC3는 첫 방출이 가장 늦게 시작되어서 160시간이 지나서도 감소하는 현상을 보이지 않았다. 3종류의 제조된 모든 서방형 제형에서 방출되는 etofenprox의 누적 량이 30ppm을 넘기지 못하고 방출양상이 떨어지는 것을 보여준다.

담배거세미나방의 경우, 방제를 위해서는 담배거세미나방 3령충에서 LC<sub>50</sub>의 활성을 나타낼 수 있는 31ppm의 농도가 약 15일 정도 유지하여야 한다(Bae *et al.*, 2003). 일반제품으로 판매되는 etofenprox의 성분인 세베로는 잔효성이 약 7일정도로서 생활사가 약 27일 ~ 36일인 담배거세미나방의 일부 유충과 성충만을 방제한다. 따라서 이 약제의 살포로 죽는 유충과 성충을 제외한 알과 비래해충의 살충을 위해서는 다시 1주일정도의 시간이 필요할 것이다. 그러므로 요구되는 서방형 제형의 특성은 약량이 천천히 방출되어 14일 정도의 약효를 지속할 수 있도록 유지시켜야 한다(Bae, 1999A, Bae, 1999B).

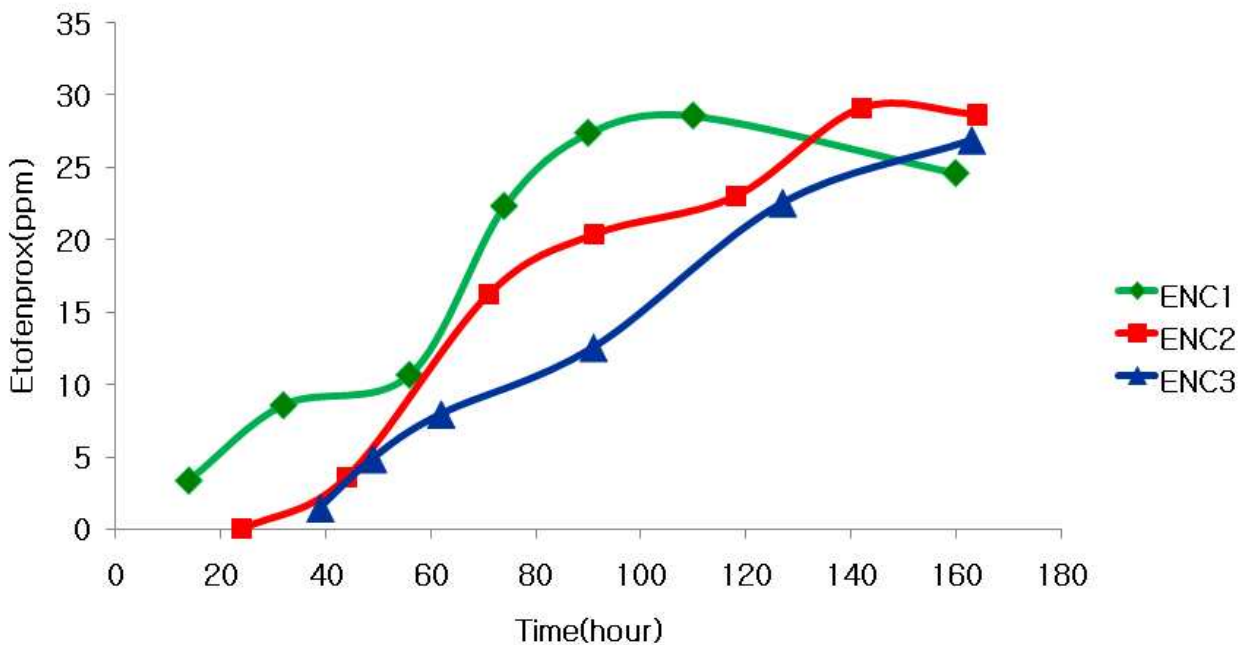


Fig. 5. The etofenprox concentration released from several bio-nano type

### ③ SEM을 이용한 나노제형의 입자형태와 층체와 식물체의 부착정도를 확인

키토산으로 캡슐화된 서방형제형인 ENC2의 형태를 관찰하기 위해 분말상태를 전처리 과정 없이 관찰하였다. 한편 용매와 반응 후 시간에 따른 ENC입자의 변화되는 모습을 확인하기 위해 기주식물에 ENC2를 살포하고 정해진 시간에 따라서 샘플을 제조하여 입자의 형태를 관찰하였다. ENC2가 살포된 식물 잎은 0.5cm × 0.5cm로 깨끗한 가위로 절단하여, 5% glutaraldehyde와 4% paraformaldehyde를 섞은 고정액에 침지시켜 24h, 4℃에서 보관한다. 증류수를 이용하여 단계별 5분씩 세척하고, 에탄올 시리즈와 isoamyl acetate를 이용하여 탈수과정을 거친다. 에탄올 시리즈는 30, 50, 70, 80, 100%로 그리고 100%과정은 2회, 각 단계별 10분씩 수행한다. 다음은 isoamyl acetate를 이용하여 추가적으로 2회, 10분씩 탈수가 이루어진다. 이후 -70℃에서 1시간 동안 동결한 후 24시간에 걸쳐 진공의 조건하에서 건조한다. 건조한 후 알루미늄 stub에 carbon tape를 이용하여 시료를 부착한다. osmium coater(HPC-1SW, Vacuum device)를 이용하여 코팅을 하고, SEM(S-4800, Hitachi)을 이용하여 15kw로 분석한다.

제조된 서방형제형의 나노입자를 확인하기 위하여 전자현미경으로 그 형태와 크기를 관찰하였다(Fig. 6). 제형의 입자는 작은 형태부터 800nm의 크기까지를 나타냈으며 유사한 재료와 방법으로 이미 보고된 내용과 유사하였다(Bang *et al.*, 2009). 또한 입자가 다양한 크기로 혼재되어 있는 것으로 나타났다. 그리고 이러한 형태는 전형적인 liposome의 동심원 모양이 아니라 다각형으로 보이는데 이러한 결과는 제형을 만들 때 다른 계면활성제나 분산제등 제형화 단계에서 필요한 다른 물질을 섞어 주었기 때문으로 판단된다. 서방형 제형의 특성은 시간의 경과에 따라 서서히 약제가 방출되므로 입자의 형태에 어떤 변화가 일어나는지를 SEM을 통해 관찰하였다(Fig. 7). 관찰한 시간은 용매에 서방형 입자가 반응을 시작하면서부터(Fig. 7A), 방출이 일어나기 시작하여 44시간의 경우(Fig. 7B), 계속하여 누적된 방출량을 보이는 142시간이 경과한 사진(Fig. 7C) 그리고 2주 후의 입자 형태(Fig. 7D)를 관찰하였다. 서방형 제형이 용매에 노출이 시작되면서 약제의 방출이 진행되고 그러므로 입자는 크기가 줄어드는 것을 보여준다. 시간이 지날수록 입자의 군집이 줄어드는 것을 볼 수 있으며 그리고 입자의 표면의 형태가 매끈해 지는 모습을 관찰 할 수 있다. 회석된 입자의 크기는 대부분 100nm의 크기를 보여주었다. release가 진행되어도 입자의 형태적인 모습은 크게 변하지 않은 것을 볼 수 있었다. 대조군과 2주 후 입자의 형태를 비교했을 때 크기가 약간 줄어드는 것을 볼 수 있었고 잎에 묻어 있는 입자의 수가 줄어든 것을 관찰할 수 있었다.



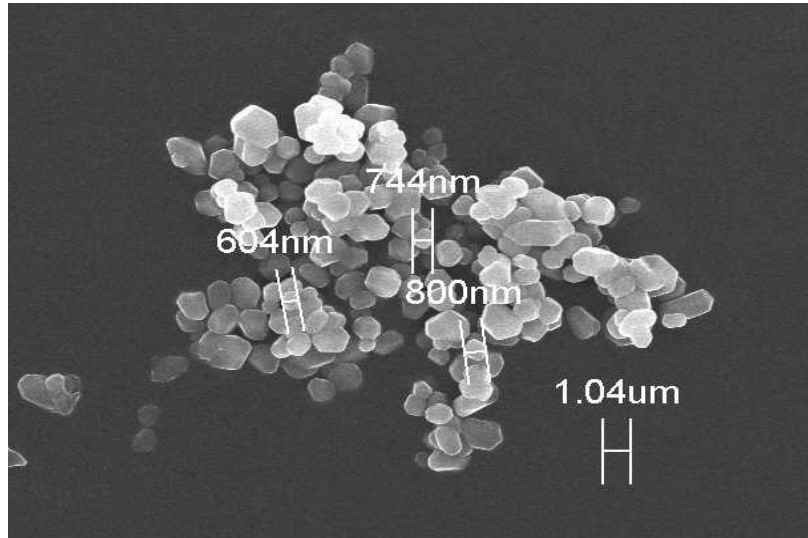


Fig. 6. SEM photograph of ENC2 nano particles

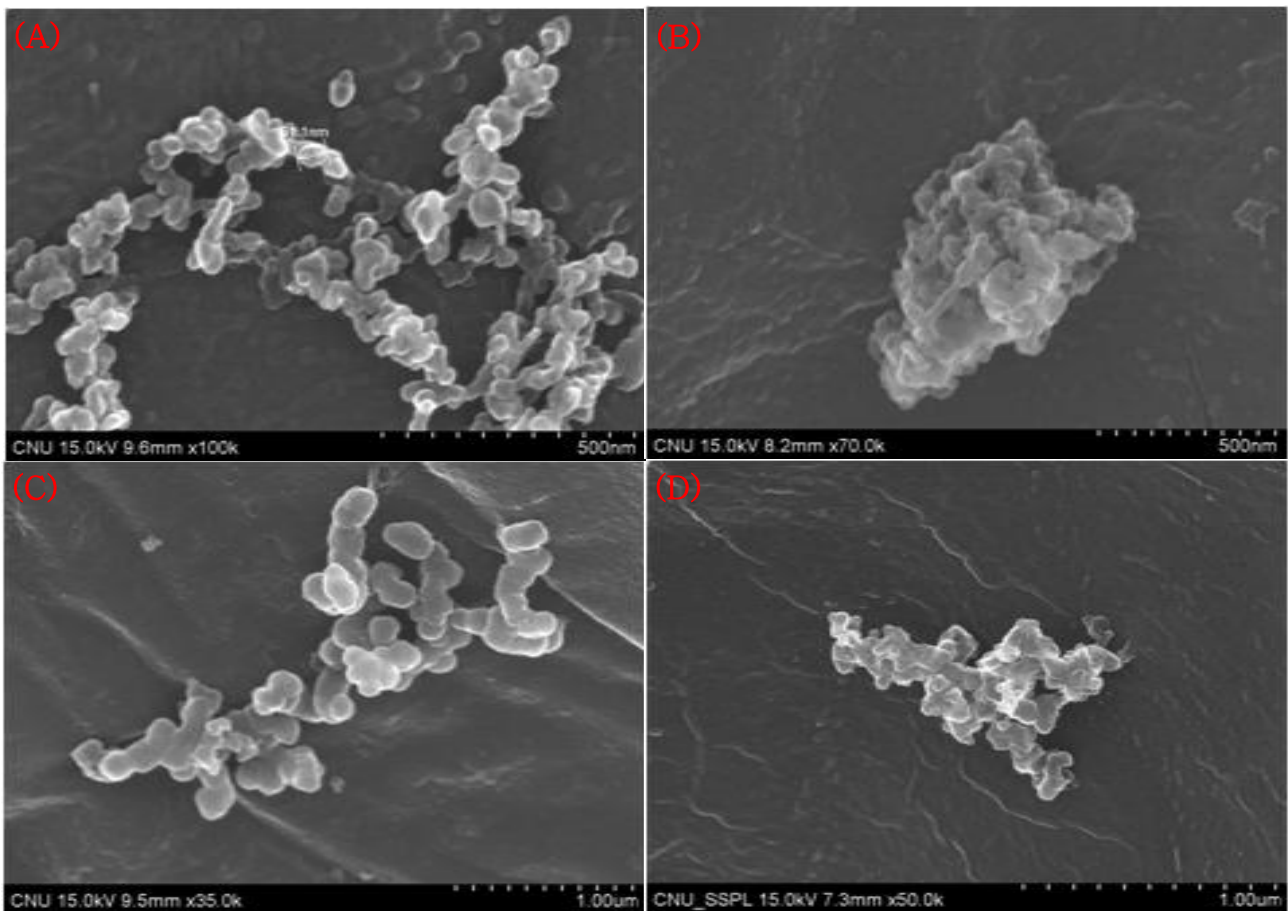


Fig. 7. SEM photographs of treated nano type(ENC2)

(A) After 0 day; (B) After 44 hrs.; (C) After 142 hrs.; (D) After 14 days

#### ④ etofenprox나노제형에 따른 담배거세미나방의 살충효과

만들어진 각각의 서방형제형(ENC1, ENC2, ENC2A, ENC3)은 용매에 노출되면서 용출되는 양에 따라서 해충에 대한 생물활성의 효과를 시험 하였다. 배추유묘에 샘플 약제를 살포하고 나서 시간의 경과에 따라 필요한 만큼의 잎을 채취하여 사용하였다. 시험에 사용된 배추잎은 petri dish에 1 ~ 2cm 두께의 10%한천 배지위에 넣어주어 기주가 시간이 지나도 마르지 않도록 하였다. 격일로 실험을 진행하였으며 약 한 달 동안 잎에 남아있는 세배로 유제와 서방형제형의 용출량에 따른 잔효실험을 진행하였다. 처리구 모두 담배거세미나방 2령 유충 10마리씩을 접종하였고 모든 처리는 3반복으로 수행하였으며, 유충 접종 48시간 후 사충률을 조사하였다. 또한 직접접촉 독성 실험을 통해 제형의 제조 시 코팅되지 않고 남아있는 etofenprox의 유무를 확인하였다. 모든 실내실험은 적어도 3번 이상 진행하였다. 서방형제형의 약해 실험을 위해 etofenprox와 ENC2A는 관행농도의 2배인 500배(400ppm)으로 처리하여 15일 후 기주의 상태 변화와 성장정도를 확인하였다. 약제를 처리한 기주는 다른 해충의 침입을 막기 위해 망케이지를 제작하여 보관하였다.

서방형 제형의 살충활성 물질로 사용된 etofenprox는 접촉 및 소화중독의 특성을 가지고 있기 때문에 키토산으로 코팅되어 서서히 용출되는 새로운 제형과 일반적인 제품과의 생물활성을 비교 조사하였다(Table 12). 살충효과를 나타내는 특성에서 200ppm 농도에서 ENC2와 제품인 etofenprox는 접촉 및 소화중독에 모두 100%의 사충률을 보였다. 서방형 제형으로 만들어진 ENC2의 초기 접촉독성의 결과는 비코팅된 농약성분으로 판단된다. 따라서 제조된 서방형 제형은 제조하는 농약을 코팅하여 목적하는 시기에 필요한 양만을 용출시키려는 목적에 부합되지 못하였다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 모든 유효성분을 코팅한 새로운 ENC2A를 제조하였고 ENC2A는 ENC2와 제품인 etofenprox와 달리 200ppm 농도에서 접촉 및 소화중독에 각각 23%, 27%의 사충률을 나타냈다. 그러므로 ENC2A를 활용하여 용출량 및 속도를 일정하게 조절한다면 유효성분의 함량을 투입하여 목적으로 하는 서방형 제형을 완성할 수 있을 것으로 판단되었다.

서방형 제형의 특성을 비교하기 위하여 각각 다른 조건으로 만들어진 3종류의 나노 ENC제형에 대하여 생물활성 효과 시험을 실시하였다(Fig. 8). ENC1, ENC2, ENC3 그리고 대조군으로 etofenprox에 대한 잔효성의 확인에서 세 가지 제형 모두 대조군보다 지속적으로 높은 사충률을 나타내는 것을 확인 할 수 있다. 대조군으로 사용한 etofenprox는 살포 후 5일 후에 사충률이 50%이하로 되었으며 15일 후에는 사충률을 나타내지 않았다. 반면, 3종류의 서방형 제형 중에서 용출이 가장 빠르게 일어나기 시작한 ENC1은 살포 후 2일까지 사충률이 가장 높게 나타나고, 초기 용출이 늦게 발생하는 ENC3은 가장 낮은 사충률을 나타내는 것을 확인하였다. 시간이 경과함에 따라 살포 후 7일의 사충률을 보면 ENC1은 가장 높은 사충률을 보였지만 9일 이후 사충률이 급격하게 감소하는 현상을 보여줘 지효적인 살충활성을 보이는 제형으로는 적합하지 않았다. 나머지 2제형에도 초기에는 비슷한 사충률 양상을 보였지만 15일 후까지 가

장 높은 사충률을 나타내는 ENC2를 선발하여 개선 시험을 시도하였다.

서방형 제형의 제조과정에서 완전하게 캡슐화되지 않은 etofenprox의 함량에 따른 생물활성의 일정치 못한 효과와 제품으로서의 문제점에 대한 개선이 필요하였다. 따라서 ENC2와 동일한 재료를 사용하였으나 일부 방법을 수정하여 etofenprox가 모두 코팅된 ENC2A를 제조하여 생물시험을 수행하였다(Fig. 9). Fig. 9에서 볼 수 있듯이 ENC2A는 살포 후 사충률이 지속적으로 올라가면서 9일경에는 83%의 사충률을 나타냈다. 살포당일에 100%사충율을 나타냈던 etofenprox 제품은 시간이 지나면서 3일에는 63%의 사충률을 보여주는 것을 확인 하였다. 그러나 초기 사충율이 20%였던 ENC2A제형은 서서히 효과가 나타나면서 3일 후에는 63%의 살충효과를 보이고 있다. LC<sub>50</sub>을 기준으로 관찰 했을 때 etofenprox는 5일 정도까지 살충효과가 유지되는 반면 ENC2A는 약 14일 까지 LC<sub>50</sub>이 유지되는 것을 보여주고 있다. 목적으로 하는 ENC2A의 제형은 초기 살충효과는 낮았고 목적으로 하는 15일경까지의 일정한 약효를 나타내고 있다. 서방형의 ENC2A제형은 etofenprox제품의 2배 정도의 지효적인 약효를 나타내므로 1회 살포로서 2회의 생물효과를 기대할 수 있을 것으로 판단된다. 따라서 언제나 동일하게 만들어진 서방형의 ENC2A제형은 살포초기에 낮은 살충효과를 보완하기 위하여 일정량의 필요한 etofenprox을 혼합하여 제품을 만들 수 있을 것으로 사료된다. 또한 배추에 대하여 etofenprox 및 무처리와 비교하여 특이한 약해증상은 나타나지 않았다.

**Table 12.** Mortality of 2nd instar *S. litura* according to nano formulation types

Formulation Types	Concentration (ppm)	Contact poison	Digestive poison
Control		0% <sup>1</sup>	0%
Etofenprox	200	100%	100%
ENC2		100%	100%
ENC2A		23%	27%

<sup>1</sup> : Mortality after 48 hours

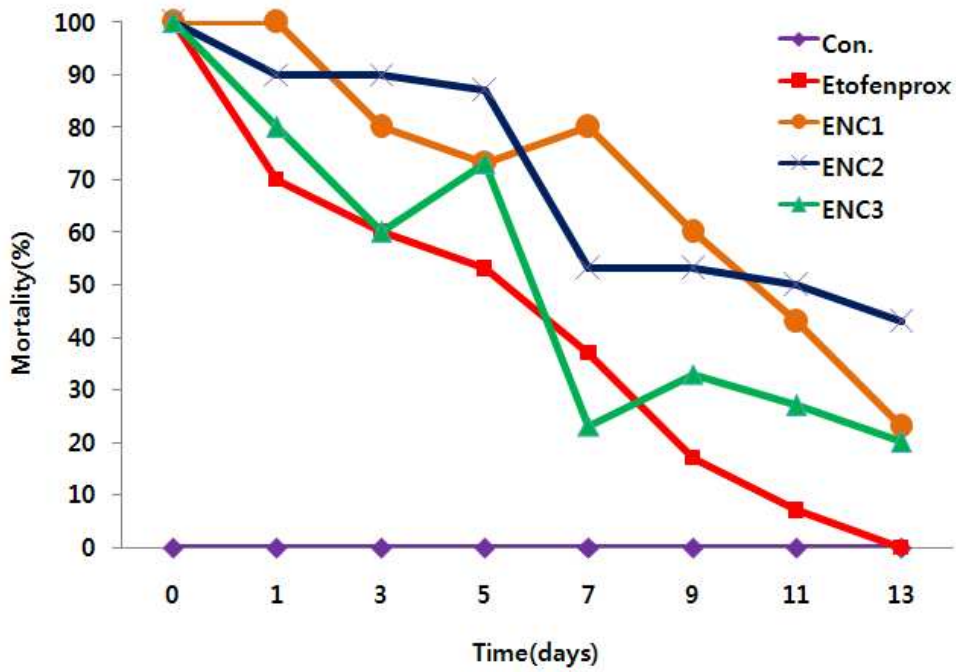


Fig. 8. Mortality of *S. litura* 2nd instars against different ENC type

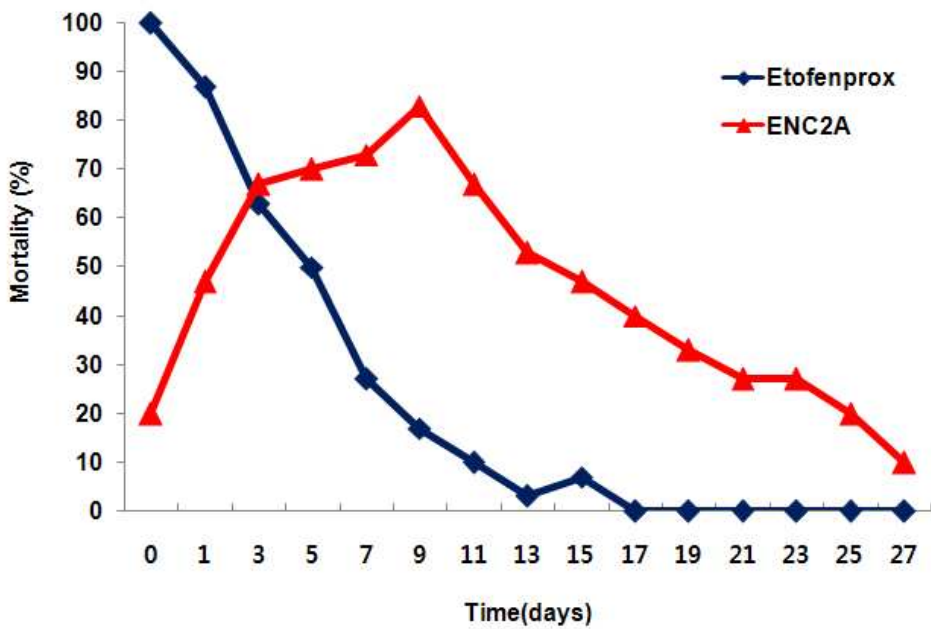
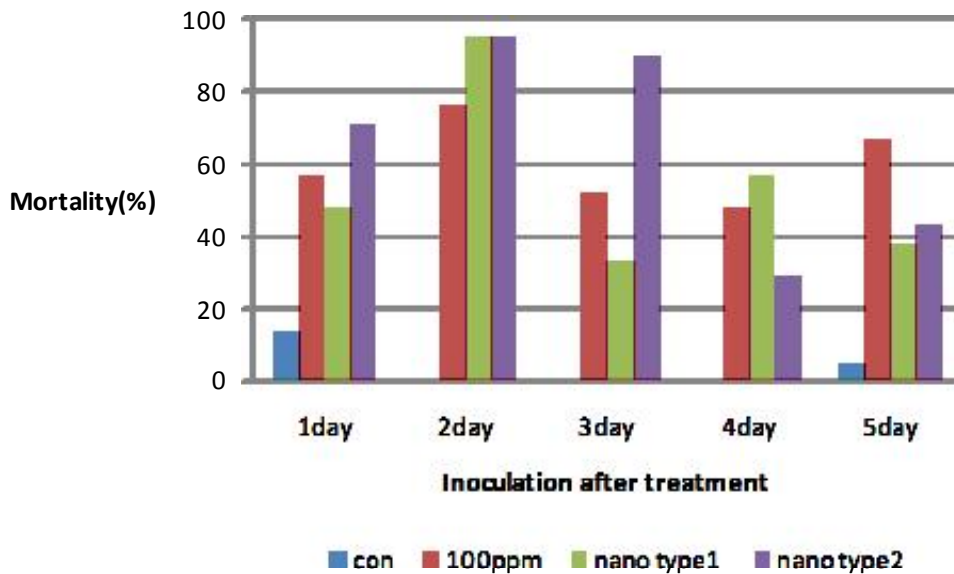


Fig. 9. Mortality of *S. litura* 2nd instar against ENC2A

### (나) 나노제형(서방형제형, 키토산캐리어타입)에 따른 파밤나방의 살충효과

처리방법은 위에 기술한 파밤나방의 방법과 동일하게 수행하였다. Fig. 10에서 보는바와 같이 처리된 시간이 경과함에 따라서 약제의 효과가 변하는 것을 알 수 있다. 100ppm으로 희석한 etofenprox는 5일이 경과되기 전까지 60% 전후의 살충효과를 나타내고 있으나 ENC1(nanotype 1, 키토산 분자량 3,000, 0.1%)의 경우에는 처리한 후 2일째에 90%의 높은 살충효과를 나타내었고, ENC2(nanotype 2, 키토산 분자량 30,000, 0.3%)의 경우에는, 3일째까지 높은 살충효과를 나타내고 있었다. 7일이 경과한 후에 파밤나방 2령 유충을 접종한 경우에는 원제의 경우에도 살충효과가 상승하는 결과를 나타내었지만, nano type 1의 경우가 살충효과가 매우 뛰어남을 알 수 있었다. 9일에서 13일이 경과한 후에 접종한 경우 100%의 높은 살충효과를 나타내고 있음을 알 수 있다. ENC2의 경우에는 7-9일이 경과한 후와 15일이 경과한 후에 높은 살충효과를 나타내고 있어, ENC 1과 2 사이에는 서방형 제형상에 차이점을 찾아 볼 수 있었다. 따라서 담배거세미나방에 대한 효과에서도 나타났듯이 ENC1과 2를 제형상으로 응용할 경우에는 용출이 5일 이후에 계속 유효성분이 배출되는 ENC 1과 5일과 9일 15일에 각각 3차례에 걸쳐 용출되는 ENC 2와는 해충의 발생 특성과 생활사에 맞게 맞추어서 제형을 선택할 필요가 있다고 생각된다.



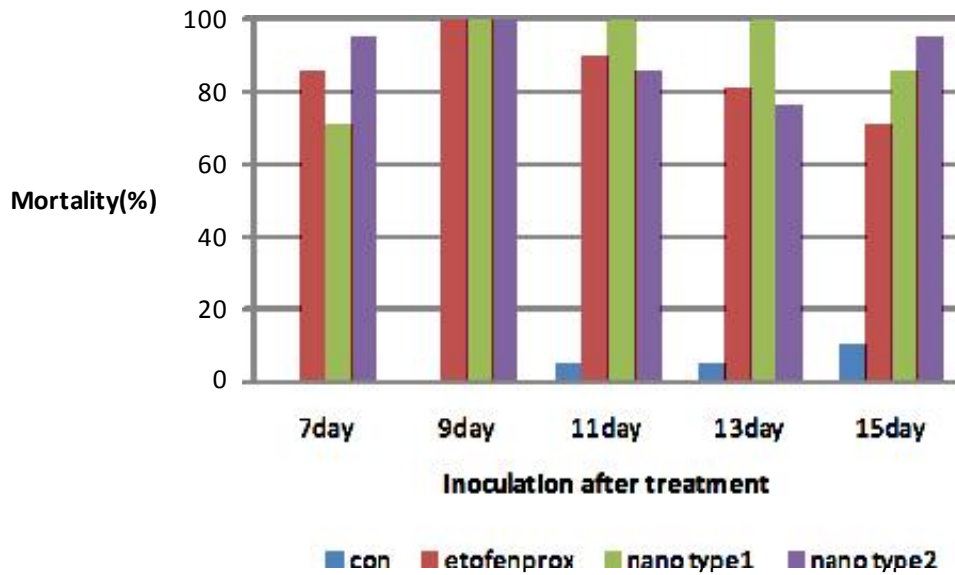


Fig. 10. Mortality of *S. exigua* 2nd stage larve against etofenprox 100ppm, nano type1 and nano type 2

## (2) 진딧물류 해충에 대한 살충효과

### (가) 나노제형(서방형제형, 키토산캐리어타입)에 따른 복숭아혹진딧물의 살충효과

복숭아혹진딧물의 etofenprox의 효과는 무처리구를 제외한 나머지 처리에서는 살충효과가 30% 미만으로 그다지 좋지 않았으며, 6일 후부터 살충율이 서서히 증가하였지만 크게 살충율을 나타내진 않았다 (Fig. 11). 복숭아혹진딧물의 etofenprox에 대한 개체수 증가율은 큰 효과는 없었지만 nano type간 차이를 살펴보면, nano 80%가 증가율 0.234, nano 70%가 0.344로 nano 80%의 타입이 진딧물 증가율을 낮추며 방제효과를 보이며 진딧물의 증가를 억제하는 경향을 확인하였다 (Table. 13).

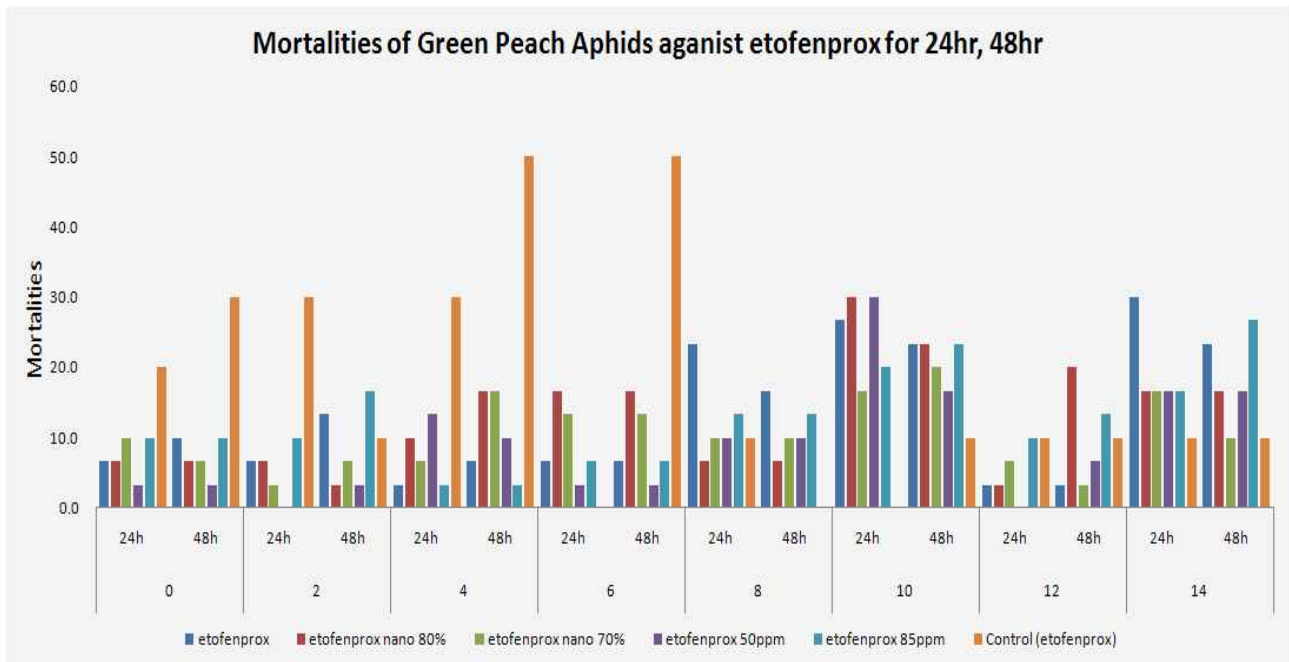


Fig. 11. Mortality of *M. persicae* against etofenprox and nano-etofenprox for 24 and 48 hrs after indirect spraying on plants with interval for 0-14 days.

Table 13. Population increasing rate of *M. persicae* against etofenprox nano type (Nanotype 1, nano 80% and Nanotype 2 nano 70%) after indirect spraying on plants during 48 hrs with interval

	Population increasing rate on days after spraying on plants							
	0	2	4	6	8	10	12	14
<b>Etofenprox</b>	0.037	0.190	0.387	0.324	0.273	0.324	0.184	0.288
<b>Etofenprox nano 80%</b>	0.438	0.283	0.416	0.355	0.290	0.370	0.215	0.234
<b>Etofenprox nano 70%</b>	0.266	0.344	<b>0.172</b>	0.381	0.224	0.424	<b>0.175</b>	0.344
<b>Etofenprox 50Ppm</b>	0.100	0.375	0.256	0.336	0.424	0.207	0.207	0.422
<b>Etofenprox 85Ppm</b>	0.465	0.266	0.406	0.363	0.315	0.316	<b>0.117</b>	0.232
<b>Control</b>	0.394	0.515	0.582	0.265	0.321	0.515	0.203	0.680



(나) 나노제형(서방형제형, 키토산캐리어타입)에 따른 목화진딧물의 살충효과

etofenprox 나노타입(nano 80%와 nano 70%)의 목화진딧물에 대한 살충효과 및 약효지속효과를 비교하기 위해 실험한 결과, etofenprox nano type은 6일 후까지 상당히 높은 수준의 개체군 감소율을 보여주었다. 하지만 8일 후 급격하게 감소하여 원제와 nano type의 차이는 크게 나지 않았다(Fig. 12). 목화진딧물의 etofenprox의 개체군 증가율은 6일 후 까지 억제되었다. 하지만 그 후 큰 억제력은 보이지 않았으며, nano type 70% 사이에도 처리 후 14일이 경과된 날의 개체군 증가율이 각각 0.47과 0.49로 타입간 차이를 나타내지 않았다 (Table 14).

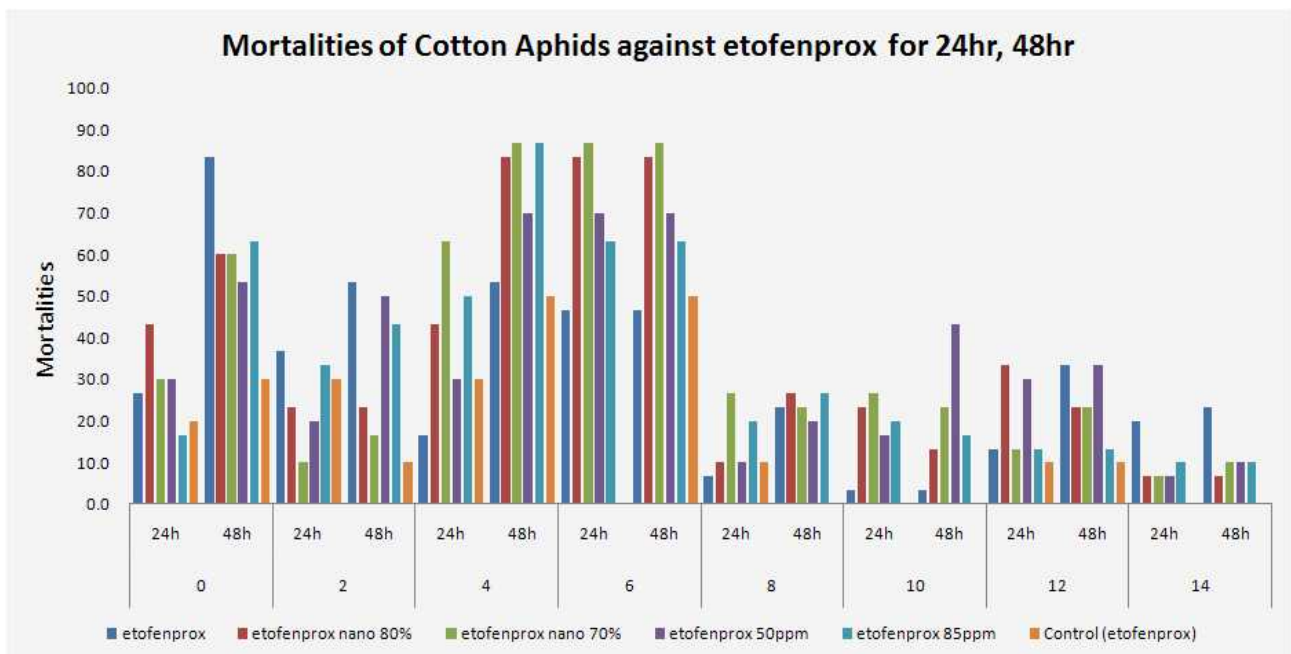


Fig. 12. Mortalities of cotton aphids against etofenprox (Sebero®) and nano-etofenprox for 24 and 48 hrs after indirect spraying on plants with intervals for 0-14 days



Table 14. Population increasing rate of cotton aphids against etofenprox (Sebero®) and nano-etofenprox after indirect spraying on plants during 48 hrs with intervals for 0-14 days.

	Population increasing rate on days after spraying on plants							
	0	2	4	6	8	10	12	14
<b>Etofenprox</b>	-0.920	-0.230	-0.238	-0.252	0.372	0.446	0.200	0.351
<b>Etofenprox nano 80%</b>	0.061	0.275	-0.421	<b>-0.421</b>	0.061	0.315	0.144	0.498
<b>Etofenprox nano 70%</b>	-0.559	0.251	<b>-0.316</b>	<b>-0.316</b>	0.110	0.156	0.361	0.474
<b>Etofenprox 50Ppm</b>	-0.401	0.282	<b>-0.536</b>	<b>-0.536</b>	0.281	<b>-0.222</b>	<b>0.054</b>	0.513
<b>Etofenprox 85Ppm</b>	-0.401	-0.114	1.096	<b>-0.345</b>	0.175	0.300	0.286	0.506
<b>Control</b>	-0.112	0.879	0.091	0.091	0.532	0.394	0.347	0.626

### (3) 기타 해충에 대한 살충효과

#### (가) 집파리, 꽃노랑총채벌레, 톱다리개미허리노린재, 온실가루이에 대한 etofenprox 나노타입 CS 30,000 0.1%(ENC 2)의 살충효과

집파리(*Musca domestica*)와 꽃노랑총채벌레(*Frankliniella occidentalis*), 톱다리개미허리노린재(*Riptortus clavatus*)는 충남대학교 곤충 사육실에서 누대 사육한 곤충을 가지고 실험하였다. 집파리는 병아리 사료와 소나무 톱밥, 이스트 등을 먹이로 하여 유충을 사육하였으며, 번데기에서 우화한 후 3일이 경과한 성충을 본 실험에 사용하였다. 꽃노랑총채벌레는 발아한 후 3주일이 경과된 오이 유묘에 접종하여 개체군을 유지하면서, 실험에는 성충이 된 후 3일이 경과된 꽃노랑총채벌레를 사용하였다. 한편, 톱다리개미허리노린재의 경우에는 강낭콩을 먹이로 사용하여 사육하였으며, 발아한 후 3주일이 경과된 콩 유묘와 강낭콩을 물에 불려서 먹이로 사용하였다. 톱다리개미허리노린재의 성충은 종령 약충에서 우화한 후 3일에서 5일이 경과된 성충을 사용하였다. 온실가루이(*Trialeurodes vaporariorum*)는 토마토 농가의 시설재배지에서 채집한 개체를 실험실에서 오이에 누대사육하면서 사용하였다. 온실가루이는 기주에 온실가루이 성충을 각각 10마리씩 접종한 후, 약제를 살포하고 시간이 경과됨에 따라서 변화하는 개체군 밀도를 처리 후 7일까지 조사하였다. 약제분무는 경엽 처리를 하였고 잎이 축축이 젖을 정도의 양인 약 3ml를 분무처리 하였으며, 대조구인 경우에는 같은 양의 수돗물을 사용하였다.

etofenprox(세베로)와 etofenprox를 나노화한 sebero-nano(CS 30,000 0.1%)를 가지고 실험을 수행한 결과, 집파리 성충은 직접처리 24시간 내에 etofenprox와 sebero-nano에서 모두 100%의 살충율을 나타내었다(Fig. 13). 반면, 꽃노랑총채벌레에서는 살포 후 24시간이 경과한 후에는 95% 전후의 효과를 나타내고 있었지만, 48시간이 경과한 후에는 etofenprox와 sebero-nano에서 모두 100%의 살충율을 나타내었다(Fig. 14). 그러나, 톱다리개미허리노린재는 분무 후 24시간 내에 etofenprox와 sebero-nano에서 모두 100% 살충율을 나타내었다(Fig. 15). 이러한 결과로 미루어 볼 때에, etofenprox와 sebero-nano의 효과는 거의 같은 수준을 나타내고 있어, 나노화한 약제 역시 같은 효과를 보이고 있는 것을 알 수 있었다. Etofenprox(Severo®)의 온실가루이에 대한 효과는 매우 좋아 약제 처리 후 24시간 안에 모두 사망하는 효과를 나타내고 있지만, etofenprox를 나노화한 sebero-nano의 경우에는 독성이 많이 감소하기는 하였으나, 시간이 경과함에 따라서 매우 서서히 약효가 나타나고 있음을 알 수 있었다. 대조구 역시 개체군이 감소하고 있는 추세를 보임에 따라서 이는 온실가루이 성충의 수명이 다함에 따라서 나타나는 증산으로 확인 할 수 있으며, 더 오랜 기간 관찰을 하여 약충의 발달 정도를 계속 관찰할 필요가 있다고 생각된다(Fig. 16).

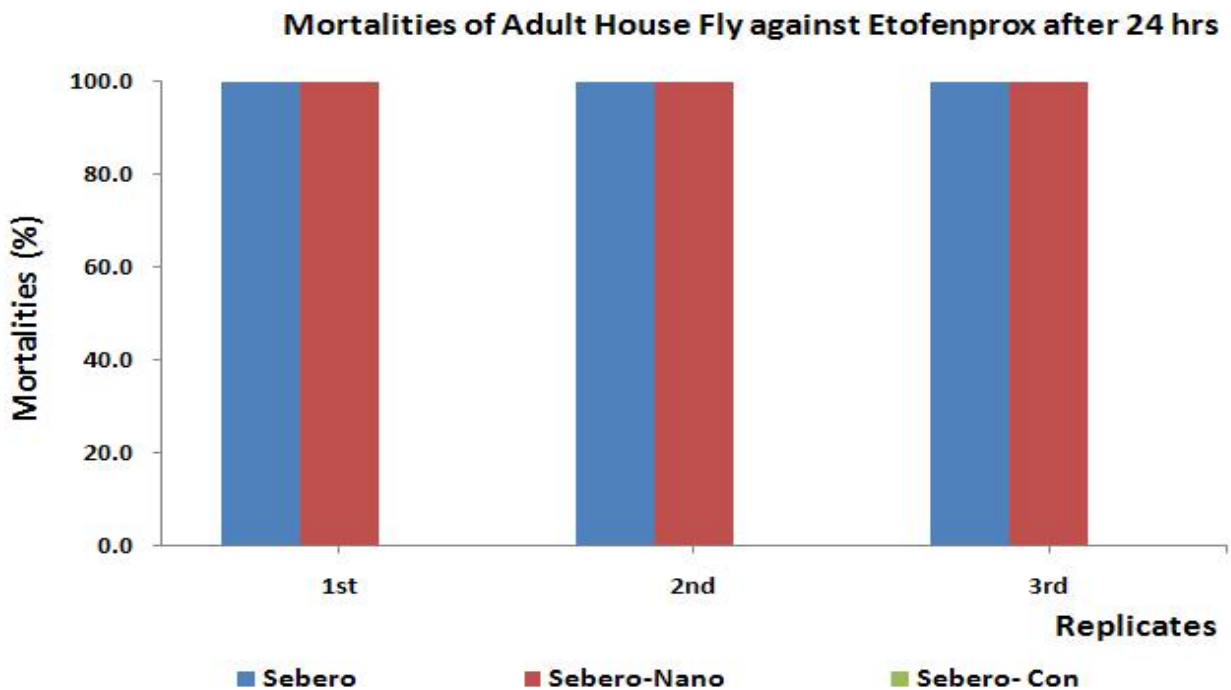


Fig. 13. Mortalities of adult house flies against etofenprox (Severo®) and nano-etofenprox after direct spraying for 24 hours.

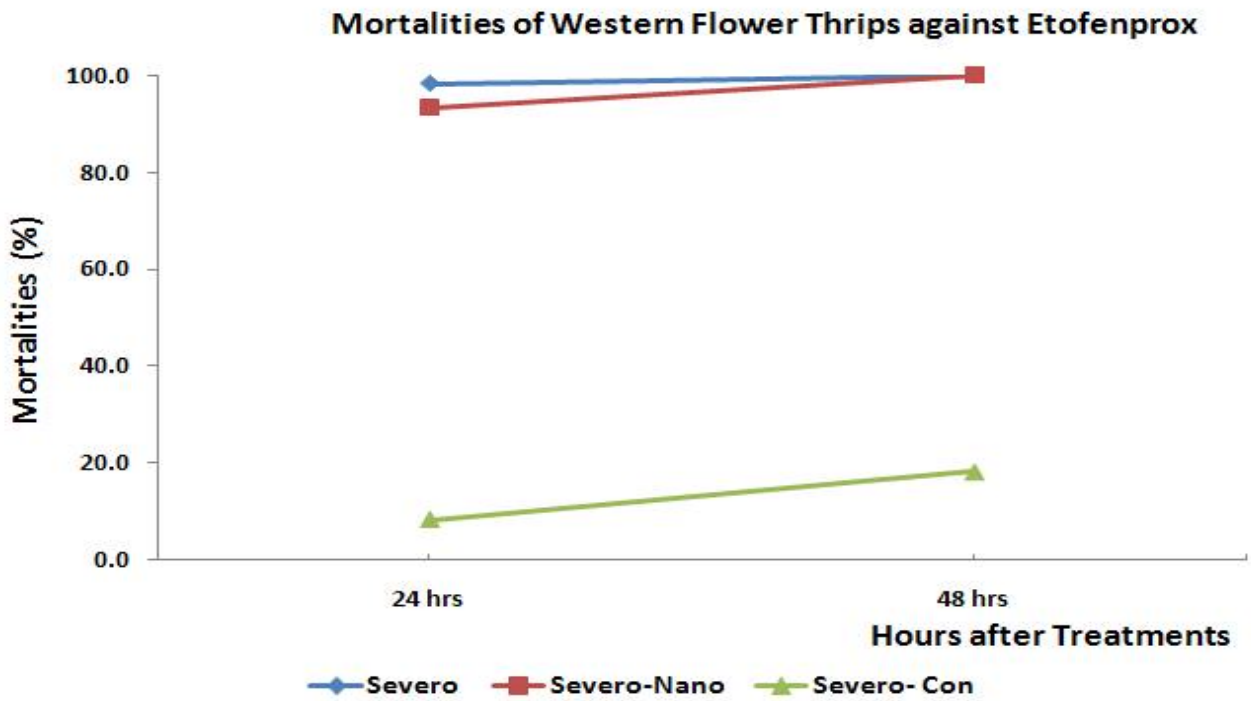


Fig. 14. Mortalities of western flower thrips against etofenprox (Severo®) and nano-etofenprox after direct spraying for 24 and 48 hours.

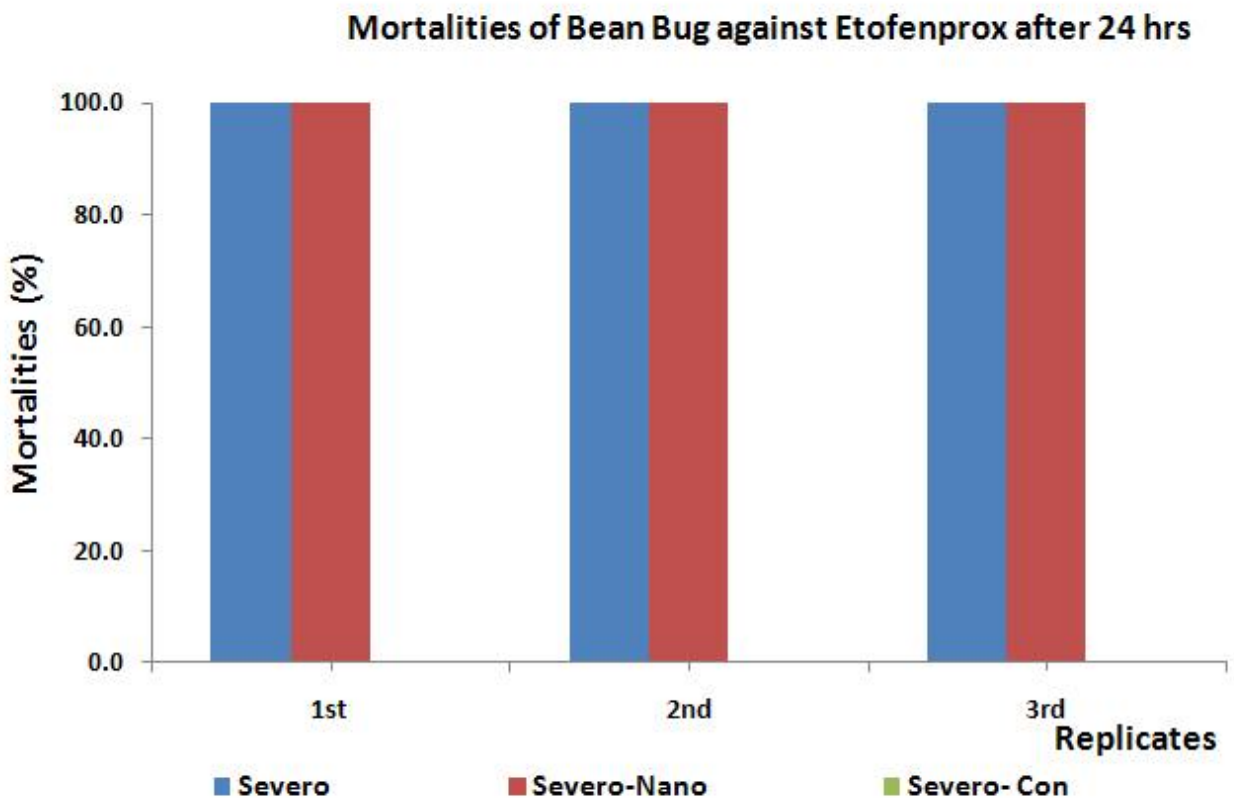


Fig. 15. Mortalities of adult bean bugs against etofenprox (Severo®) and nano-etofenprox after direct spraying for 24 hours

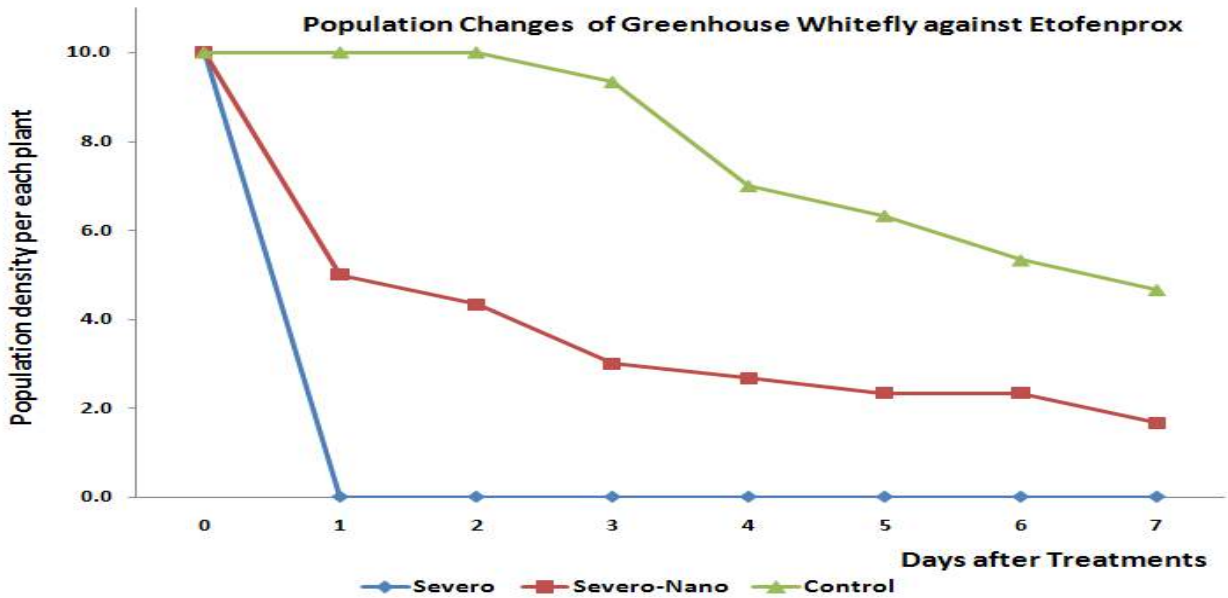


Fig. 16. Population changes of greenhouse whiteflies against etofenprox (Siwontan®) and nano-cypermethrin after direct spraying for 7 days.

#### 나. $\alpha$ -cypermethrin의 나노제형에 따른 방제대상 해충에 대한 살충효과

##### (1) $\alpha$ -cypermethrin Nano type 1 (chitosan M.W 3,000, 0.3%)과 Nano type 2 (Chitosam M.W 30,000, 0.3%)의 목화진딧물에 대한 살충효과 및 약효 지속 효과

목화진딧물의 각 처리에 따른 14일 경과 일까지의 살충율을 살펴본 결과,  $\alpha$ -cypermethrine nano type의 두 제형들이 8일 이후부터는 다소 높은 살충율을 나타내며 약효의 지속성을 보여주었다(Fig. 17). Nano type 1과 2 사이의 좀 더 자세한 살충효과와 약효지속효과를 비교하기 위해 이들의 조사 기간 동안의 목화진딧물 개체군 증가율을 조사하여 비교한 결과, 처리후 4일까지는 두가지 nano type 사이의 개체군 증가율이 비슷한 경향치를 보여주고 있으나, 처리후 경과일 조사 최종일인 14일째에 nano M.W 3,000 타입이 0.231, nano M.W 30,000이 -0.037로 개체군 증가율에 있어 nano M.W 30,000이 살충효과가 높게 나타나 개체군 증가가 적게 된 것을 확인할 수 있었으며, 살충효과의 지속성을 확인할 수 있어 서방형 제제로서의 가능성을 시사할 수 있다고 판단된다(Table 15).

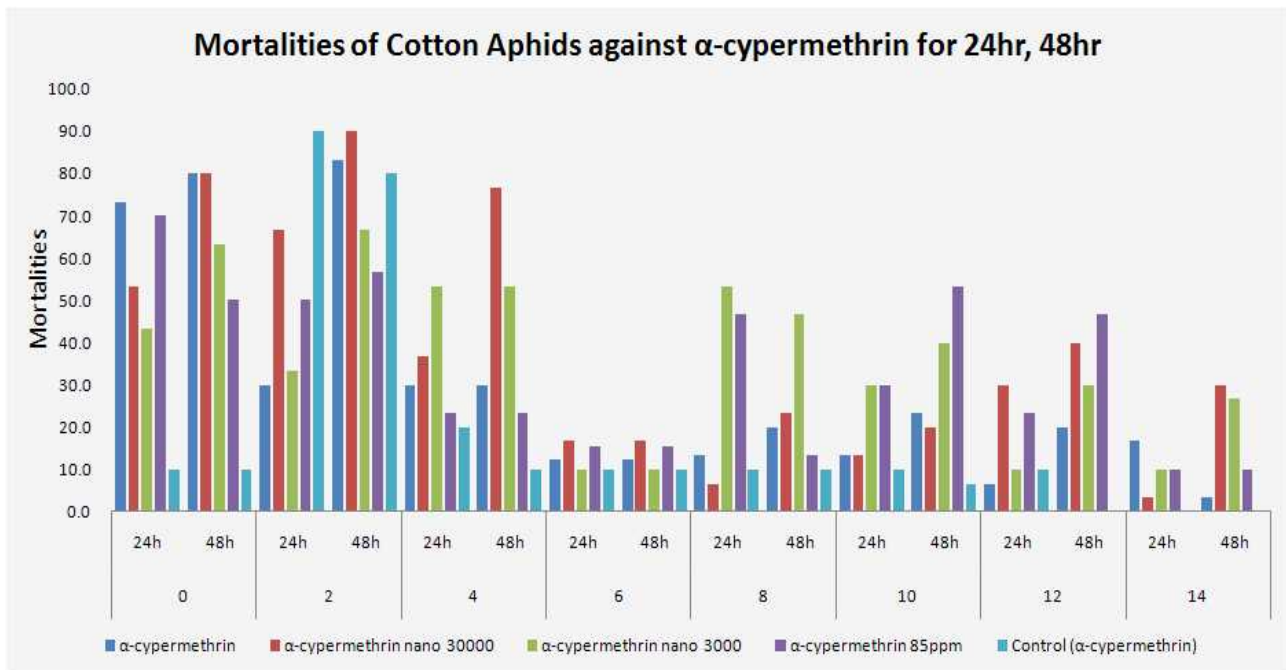


Fig. 17. Mortalities of cotton aphids against  $\alpha$ -cypermethrin (Siwontan®) and nano-etofenprox for 24 and 48 hrs after indirect spraying on plants with intervals for 0-14 days

Table 15. Population increasing rate of cotton aphids against  $\alpha$ -cypermethrin (Siwontan®) and nano-etofenprox after indirect spraying on plants during 48 hrs with intervals for 0-14 days

	Population increasing rate on days after spraying on plants								
	0	2	4	6	8	10	12	14	
$\alpha$ -cypermethrin	-0.536	-0.968	0.278	0.222	0.496	0.42	0.36	0.379	
$\alpha$ -cypermethrin nano 30000	-0.469	-0.353	-0.242	0.437	0.342	0.222	0.074	-0.037	
$\alpha$ -cypermethrin nano3000	-0.272	-0.114	-0.247	0.219	0.209	0.224	0.237	0.231	
$\alpha$ -cypermethrin 85ppm	-0.145	-0.066	0.44	0.632	0.412	0.432	0.002	0.531	
Control	0.705	0.597	0.843	0.987	0.887	0.763	0.597	0.438	

(2)  $\alpha$ -cypermethrine Nano type 1 (chitosan M.W 3,000, 0.3%)과 Nano type 2 (Chitosam M.W 30,000, 0.3%)의 복숭아혹진딧물에 대한 살충효과 및 약효 지속 효과

복숭아혹진딧물의  $\alpha$ -cypermethrine nano type에서는 6일 후 까지 살충율이 매우 좋았던 것으로 나타났지만, 8일 후 급격하게 사망률이 감소하였으며, nano 타입간 차이는 확인하기 어려웠다(Fig. 18). 또한 복숭아혹진딧물의 이틀 처리에 따른 진딧물 개체군 증가율을 조사한 결과에서도 나노타입간의 차이를 확인할 수 없었고, 개체군 증가를 감소시키는 정도도 매우 낮아, 살충효과가 거의 없는 것으로 나타났다(Table 16).

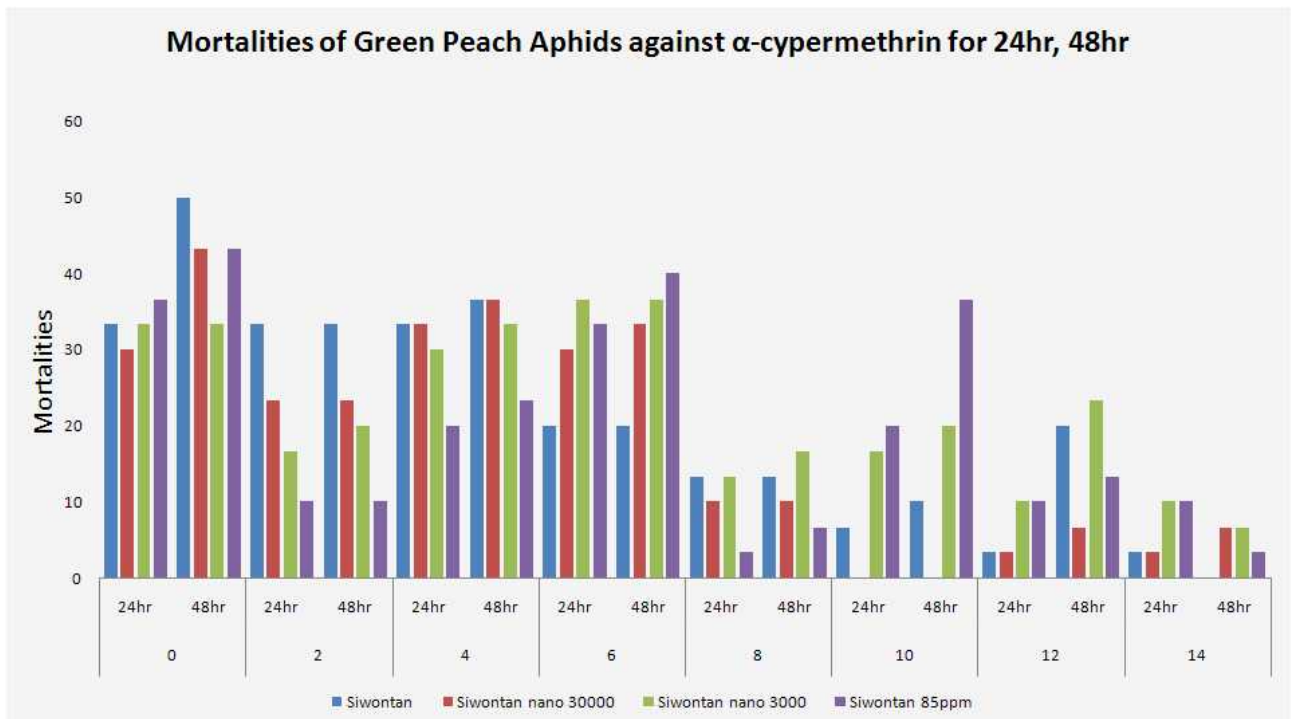


Fig. 18. Mortalities of green peach aphids against  $\alpha$ -cypermethrin (Siwontan®) and nano-etofenprox for 24 and 48 hrs after indirect spraying on plants with intervals for 0-14 days

표 16. Population increasing rate of green peach aphids against  $\alpha$ -cypermethrin (Siwontan®) and nano-etofenprox after indirect spraying on plants during 48 hrs with intervals for 0-14 days

	Population increasing rate on days after spraying on plants							
	0	2	4	6	8	10	12	14
$\alpha$ -cypermethrin	-0.021	0.345	0.235	0.346	0.632	0.176	0.376	0.430
$\alpha$ -cypermethrin nano 30000	-0.114	0.313	0.247	0.202	0.652	0.346	0.608	0.555
$\alpha$ -cypermethrin nano 3000	0.186	0.412	0.264	0.232	0.607	<b>0.001</b>	0.532	0.367
$\alpha$ -cypermethrin 85ppm	0.015	0.477	0.246	0.263	0.605	<b>-0.097</b>	0.475	<b>0.209</b>
control	0.000	0.168	0.294	0.458	0.824	0.235	0.478	0.680

(3)  $\alpha$ -cypermethrin 나노타입(chitosan M.W 3,000과 30,000)에 따른 식물체 표면과 복숭아 흑진딧물 충체표면의 부착정도를 확인하기 위한 SEM관찰

$\alpha$ -Cypermethrin의 나노타입에 따른 살충체의 처리상태와 처리일수의 경과에 따른 캐리어를 통한 controll release 상태를 확인하기 위해 나노타입별, 원제, 무처리구 별로 무작위로 샘플을 선발하여 처리 후 0일차, 6일차, 10일차, 14일차 된 고추잎 표면과 복숭아흑진딧물 충체의 등판, 배판, 구기를 중심으로 전처리 과정을 통해 전자현미경사진을 촬영하였다. 전처리과정은 glutaldehyde 2.5%용액에 침지한 후 멸균수로 세척하고 에탄올시리즈(30, 50, 70, 80, 100%)로 탈수과정을 거쳐, CPD로 건조시킨후, osmium코팅하여 전처리샘플을 완성한 후 주사전자현미경(SEM, HITACHI S-4800)으로 관찰하였다.

SEM사진을 통해 나노타입 살충체의 충체 부착여부를 확인한 결과, 타입별 차이를 확인되지 않았지만, 처리된 시간이 경과함에 따라 입자의 부착정도가 적은 것이 관찰되었다(Figs. 19, 20). 또한 처리 후 나노입자의 변화관찰을 통해, 시간이 경과하면서 입자가 부풀어오르는 swelling현상을 확인할 수 있었는데, 나노입자의 release양상에 따른 결과인지는 추후 좀 더 확인해야 할 것으로 여겨진다. 키토산 분자량 3,000의 나노타입이 30,000보다 swelling 현상이 좀 더 빨리 나타났으며, 약제 처리 후 경과일이 6일차인 동일한 처리일자를 비교했을 때에도 키토산분자량 3,000나노타입이 swelling된 현상이 강하게 나타났다(Fig. 21).

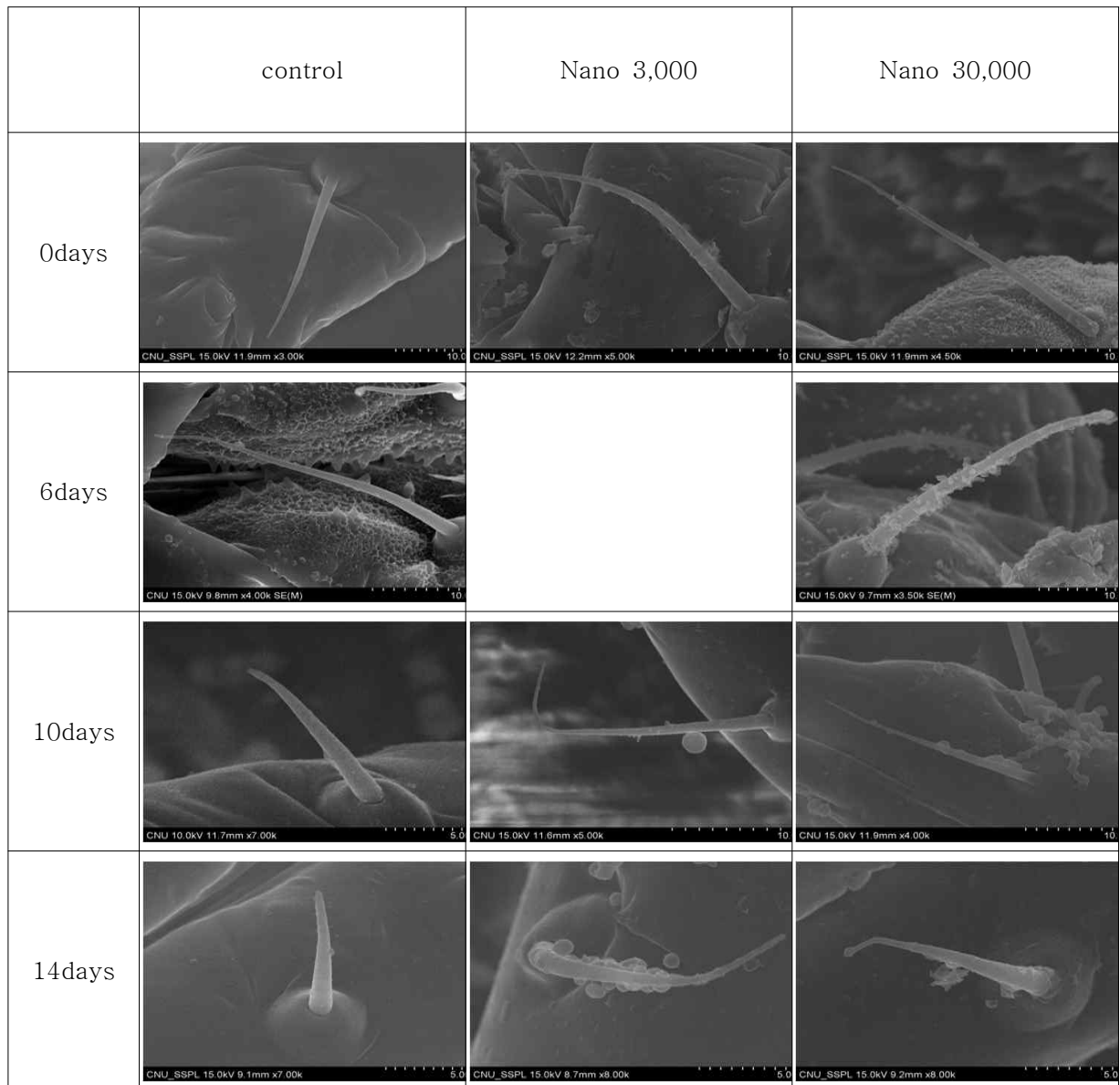


Fig. 19. SEM photographs of mouthpart of the greenpeach aphid treated different nano types  $\alpha$ -cypermethrin at 0 day, 6 day, 10 day, and 14 days after treatment



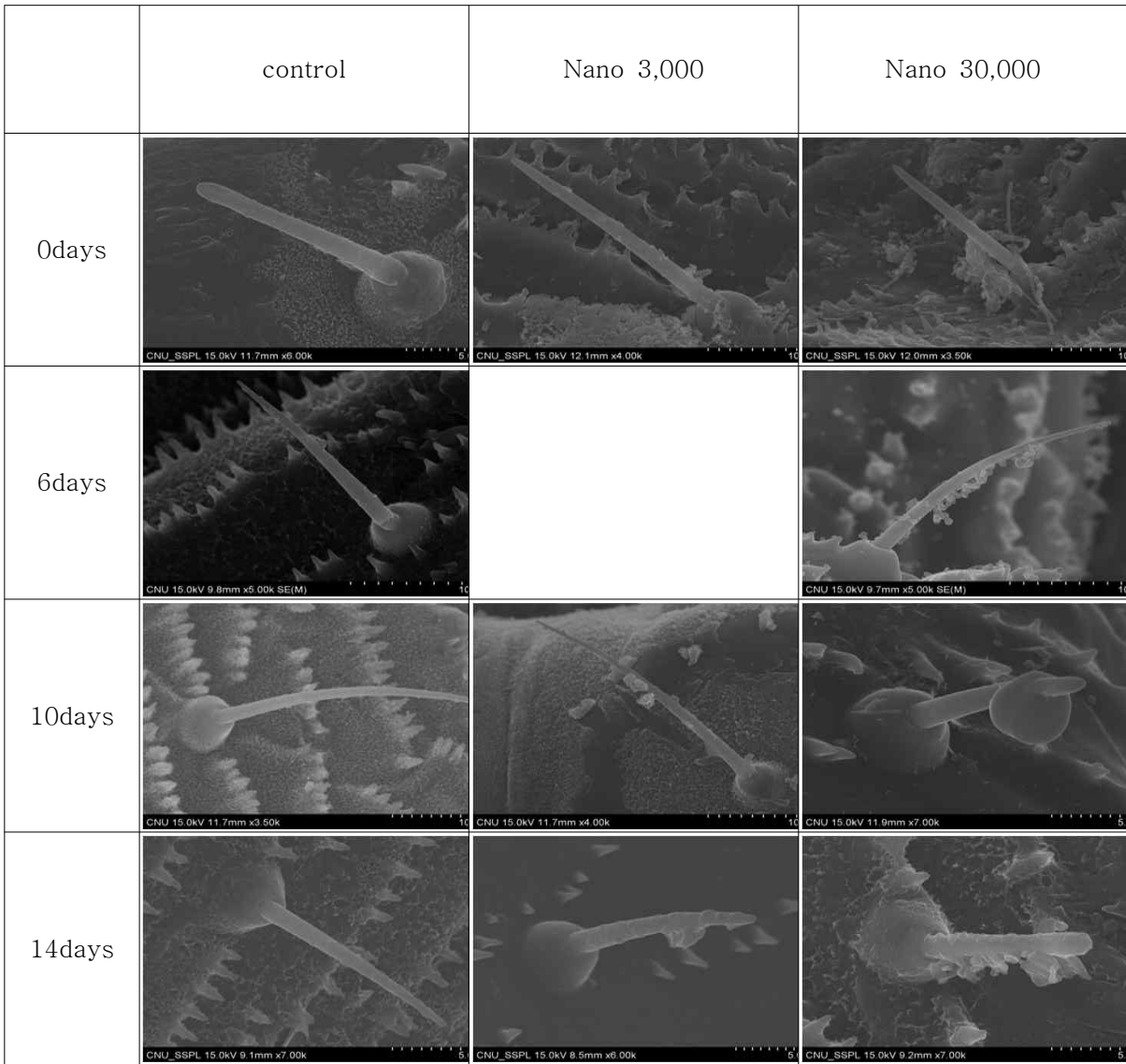


Fig. 20. SEM photographs of dorsal plate of the greenpeach aphid treated different nano types  $\alpha$ -cypermethrin at 0 day, 6 day, 10 day, and 14 days after treatment

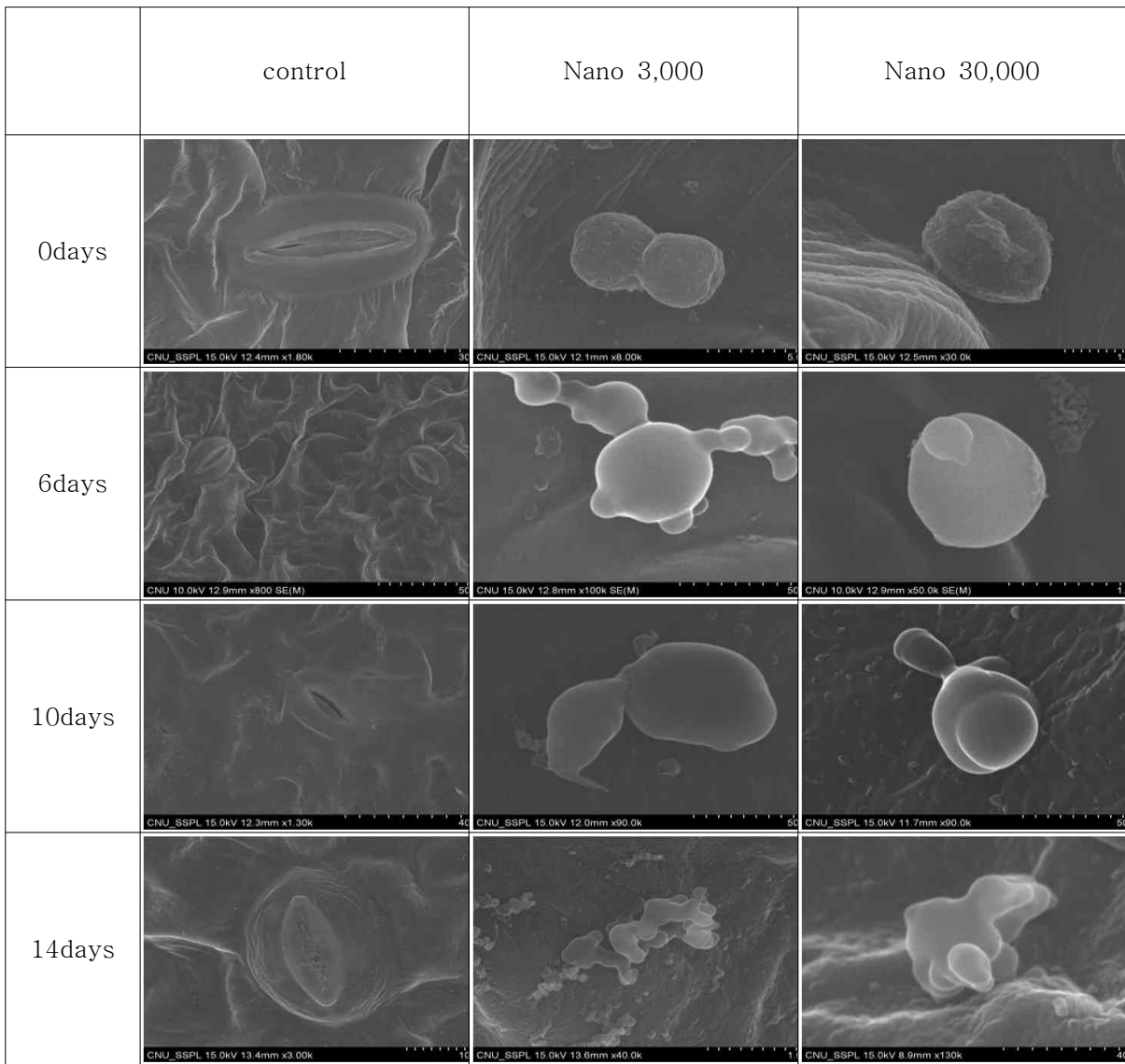


Fig. 21. SEM photographs of surface of hot pepper leaves treated different nano types  $\alpha$ -cypermethrin at 0 day, 6 day, 10 day, and 14 days after treatment

#### 다. Pyrifluquinazon의 나노제형에 따른 진딧물류 해충에 대한 살충효과

##### (1) 나노타입(CS 30,000 0.1%와 CS 3,000 0.3%)에 따른 복숭아혹진딧물의 살충효과 및 약효지속효과

초기에는 나노타입이 살충율이 낮게 나타났으나, 처리 후 시간이 경과하여 4일째부터 살충율이 증가하면서 16일차에 도달해서는 나노타입의 살충율이 70%이상으로 최고치를 보여주는 것을 확인할 수 있다. 일반 살충제의 경우 처리 후 7일 이상이 경과하면 살충효과가 감소하여 본 실험에 사용된 pyrifluquinazon의 경우 처리 후 10일 이후부터 살충율이 감소하는 경향을 나타내었다. 이러한 결과를 통해, 나노타입의 살충제가 서방형제형으로써 잔효효과를 극대화시켜줄 수 있는 가능성을 보여주었다. 또한 나노타입간에도 차이를 보였는데, 키토산 분자량 3,000 0.3% 캐리어로 나노화된 타입의 살충효과가 처리 후 18일까지 70%이상을 나타내며 서방형제형의 효과를 확실히 보여주었다(Fig. 22와 Table 17).

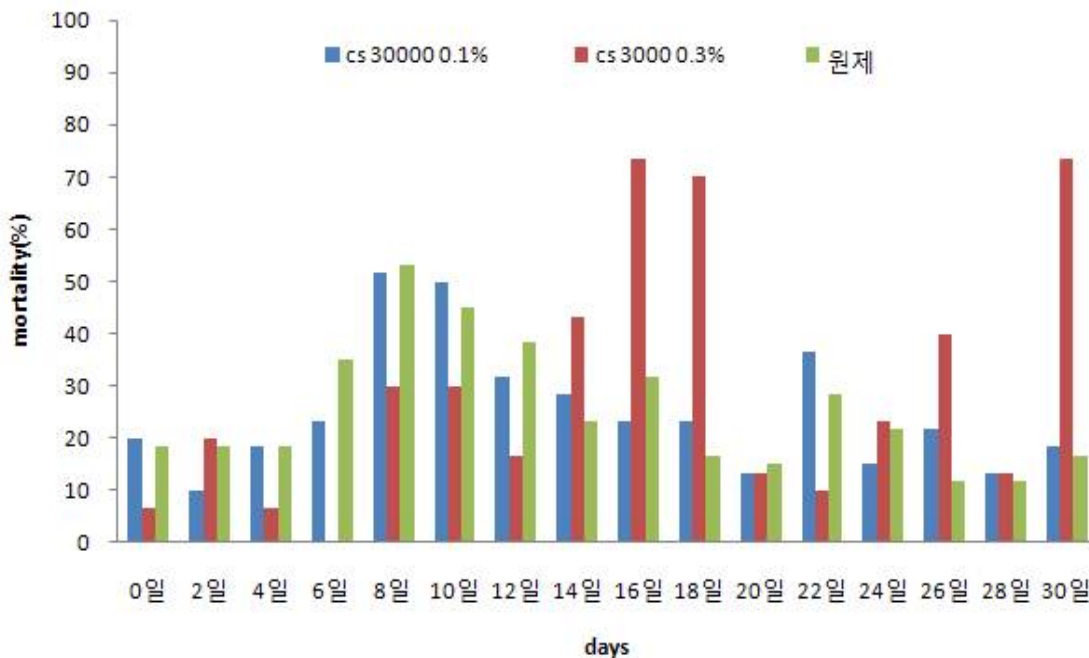


Fig. 22. Mortality of different pyrifluquinazon nano types against *M. persicae*

Table 17. Mortalities of green peach aphids against pyrifluquinazon nano types(different chitosan molecular weight and concentration) at 0, 4, 10, 16, 18, 22, 28 days after indirect spraying on plants

Mortality(%)	Nano type CS 30,000 0.1%	Nano type CS 3,000 0.3%	Non-nano type	P
0 day	13.33±10.33a	6.67±5.77a	16.67±12.11a	0.432
4 day	16.67±15.06a	6.67±11.55a	15.00±18.71a	0.679
10 day	58.33±19.41b	30.00±10.00a	55.00±16.43b	0.085
16 day	21.76±14.72a	73.33±5.77b	45.00±34.50ab	0.032
18 day	35.00±23.45a	70.00±10.00b	16.67±8.16a	0.001
22 day	35.00±23.45a	13.33±11.55a	26.67±23.38a	0.402
28 day	13.33±10.33a	13.33±5.77a	20.00±10.95a	0.472

Table 18. Population increasing rate of green peach aphids against pyrifluquinazon nano types(different chitosan molecular weight and concentration) at 0, 4, 10, 16, 18, 22, 28 days after indirect spraying on plants

Rate of increase(%)	Nano type CS 30,000 0.1%	Nano type CS 3,000 0.3%	Non-nano type	P
0 day	0.152±0.114a	0.343±0.076b	0.087±0.072a	0.007
4 day	-0.004±0.148a	0.074±0.067a	-0.030±0.130a	0.540
10 day	-0.310±0.220a	0.056±0.097b	-0.321±0.278a	0.084
16 day	-0.008±0.164a	-0.008±0.164a	-0.234±0.516a	0.486
18 day	-0.070±0.205a	-0.070±0.205a	0.118±0.262a	0.411
22 day	-0.009±0.108a	0.292±0.056b	-0.059±0.178a	0.009
28 day	0.068±0.102a	0.061±0.053a	0.161±0.091	0.179

(2) 나노타입(CS 30,000 0.1%와 CS 3,000 0.3%)별 농도에 따른 복숭아혹진딧물의 살충효과 및 약효지속효과

(가) 키토산 분자량 30,000 0.1% 나노제형의 농도별 살충효과

농도별 살충효과를 확인한 결과, 처리 당일에는 농도가 가장 높은 100ppm에서 가장 높은 살충율을 나타내었지만, 처리 후 시간이 경과함에 따른 차이는 확인할 수 없었다. 하지만 복숭아혹진딧물의 개체군 증가율을 확인한 결과, 처리된 농도가 높을 수록 증가율이 저조했으며, 처리 후 시간의 경과에 따른 증가율의 차이도 확인한 결과를 보여 나노타입의 살충제 또한 농도에 따라 살충율이 달라질 수 있음을 확인하였으며, 100ppm 농도로 처리했을때 처리 후 28일까지 50%이상의 살충율을 보여주는 것을 확인할 수 있었다(Table 23, Tables 19 and 20).

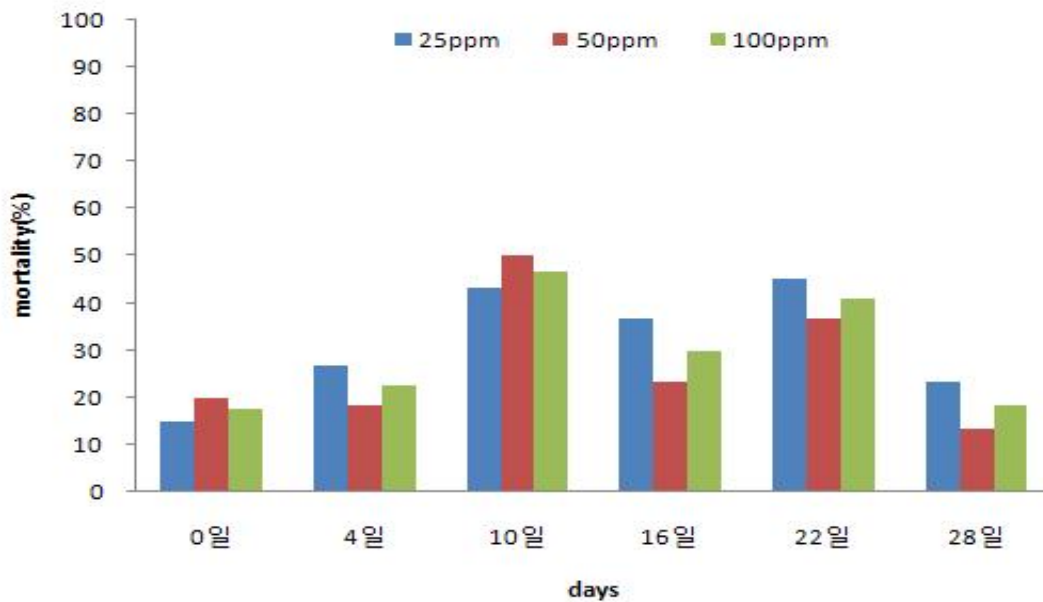


Fig. 23. Mortality of different pyrifluquinazon nano types against *M. persicae* according to pyrifluquinazon nano type (CS 30,000 0.1%) concentrations

Table 19. Mortality of *M. persicae* according to time after treatment of different concentrations of pyrifluquinazon nano type(CS 30,000 0.1%)

Mortality(%)	25ppm	50ppm	100ppm	P
0 day	15.00±12.25a	16.67±10.00a	50.00±34.64b	0.008
4 day	26.67±30.77ab	14.44±15.09a	53.33±39.05b	0.035
10 day	43.33±23.38a	48.89±23.15a	55.56±34.68a	0.708
16 day	36.67±15.06ab	25.56±15.09a	60.00±34.64b	0.022
18 day	16.67±19.66a	30.00±19.36a	75.56±22.42b	0.000
22 day	45.00±35.64a	30.00±20.62a	53.33±31.22a	0.247
28 day	23.33±21.60ab	11.11±9.28a	52.22±32.32b	0.004

Table 20. Population increasing rate of *M. persicae* according to time after treatment of different concentrations of pyrifluquinazon nano type(CS 30,000 0.1%)

Rate of increase(%)	25ppm	50ppm	100ppm	P
0 day	0.230±0.163b	0.215±0.171b	-0.577±0.589a	0.000
4 day	0.105±0.398b	0.126±0.228b	-0.601±0.437a	0.001
10 day	-0.241±0.170b	-0.232±0.214b	-0.758±0.560	0.013
16 day	-0.018±0.104b	-0.044±0.173b	-0.871±0.857a	0.005
18 day	0.070±0.193b	-0.029±0.182b	-0.899±0.551a	0.000
22 day	-0.295±0.588ab	0.092±0.235b	-0.627±0.642a	0.024
28 day	0.060±0.138b	0.132±0.133b	-0.468±0.417a	0.000

(나) 키토산 분자량 3,000 0.3% 나노제형의 농도별 살충효과

이 나노타입도 농도별 살충효과는 큰 차이를 보이진 않았으나, 처리 후 시간이 22일정도 경과한 이후 살충율이 100ppm농도에서 가장 높게 나타나 서방형제형의 농도로써 가장 적합했으며, 진딧물의 증가율 또한 처리후 16일까지는 큰 차이를 보이진 않았으나, 22일 이후부터 고농도 처리에서 증가율이 저조하며 살충효과가 나타나는 것이 확인되었다(Fig. 24, Tables 21 and 22).

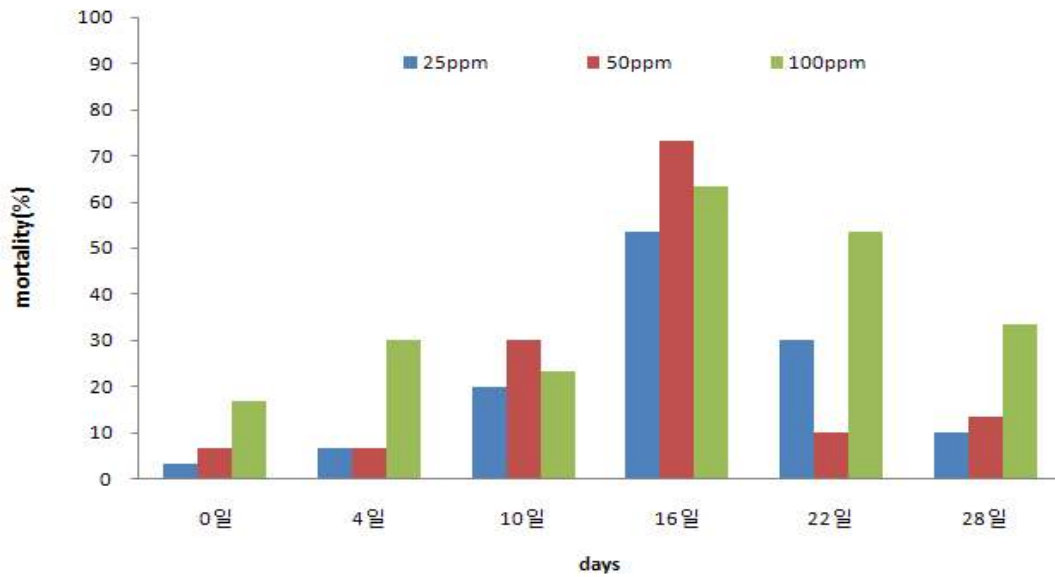


Fig. 24. Mortality of *M persicae* according to time after treatment of different concentration of pyrifluquinazon nano type(CS 3,000 0.3%)

Table 21. Mortality of *M. persicae* according to time after treatment of different concentrations of pyrifluquinazon nano type(CS 3,000 0.3%)

Mortality(%)	25ppm	50ppm	100ppm	P
0 day	3.33±5.77a	6.67±5.77ab	16.67±5.77b	0.068
4 day	6.67±11.55a	6.67±11.55a	30.00±17.32a	0.133
10 day	20.00±10.00	30.00±10.00a	23.33±11.55a	0.533
16 day	53.33±15.28a	73.33±5.77a	63.33±30.55a	0.512
18 day	66.67±28.87a	70.00±10.00a	60.00±26.46a	0.870
22 day	30.00±26.46a	13.33±11.55ab	53.33±5.77b	0.073
28 day	10.00±0.00a	13.33±5.77a	33.33±5.77b	0.002

Table 22. Population increasing rate of *M. persicae* according to time after treatment of different concentrations of pyrifluquinazon nano type(CS 3,000 0.1%)

Rate of increase(%)	25ppm	50ppm	100ppm	P
0 day	0.176±0.077a	0.343±0.076a	0.246±0.120a	0.170
4 day	0.082±0.118a	0.074±0.067a	-0.140±0.200a	0.168
10 day	0.116±0.062a	0.057±0.097a	0.046±0.046a	0.481
16 day	-0.055±0.253a	-0.286±0.351a	-0.225±0.313a	0.656
18 day	-0.558±1.251a	-0.068±0.347a	-0.358±0.693a	0.785
22 day	0.111±0.174ab	0.292±0.556b	0.105±0.203a	0.042
28 day	0.066±0.129a	0.061±0.053a	-0.055±0.059a	0.234



## 제 2 절. 나노캐리어를 이용한 농약의 용출제어 및 세포 표면전달

- 3차년도를 거치면서 nano carrier system의 사이즈 조절 및 포박물질 방출분석이 체계적으로 이행되었으며 목적에 부합하는 제형 조건을 탐색할 수 있었다.

### ※ Sample code ※

- 1) NCS-1 (설명 : Chitosan(molecular weight : 30,000) coated liposome, coating material concentration : 0.3%, core material : etofenprox)
- 2) NCS-2 (설명 : Chitosan(molecular weight : 30,000) coated liposome, coating material concentration : 0.1%, core material : etofenprox)
- 3) NCS-3 (설명 : Chitosan(molecular weight : 3,000) coated liposome, coating material concentration : 0.3%, core material : etofenprox)
- 4) NCS-4 (설명 : Chitosan(molecular weight : 3,000) coated liposome, coating material concentration : 0.1%, core material : etofenprox)
- 5) NCS-5 (설명 : Chitosan(molecular weight : 30,000) coated liposome, coating material concentration : 0.3%, core material : alpha-cypermethrin)
- 6) NCS-6 (설명 : Chitosan(molecular weight : 30,000) coated liposome, coating material concentration : 0.1%, core material : alpha-cypermethrin)
- 7) NCS-7 (설명 : Chitosan(molecular weight : 3,000) coated liposome, coating material concentration : 0.3%, core material : alpha-cypermethrin)
- 8) NCS-8 (설명 : Chitosan(molecular weight : 3,000) coated liposome, coating material concentration : 0.1%, core material : alpha-cypermethrin)
- 9) NCS-9 (설명 : Chitosan(molecular weight : 3,000) coated liposome, coating material concentration : 0.3%, core material : difenoconazole)
- 10) NCS-10 (설명 : Chitosan(molecular weight : 30,000) coated liposome,

coating material concentration : 0.1%,

core material : difenoconazole)

11) NCS-11 (설명 : Chitosan(molecular weight : 3,000) coated liposome,

coating material concentration : 0.3%,

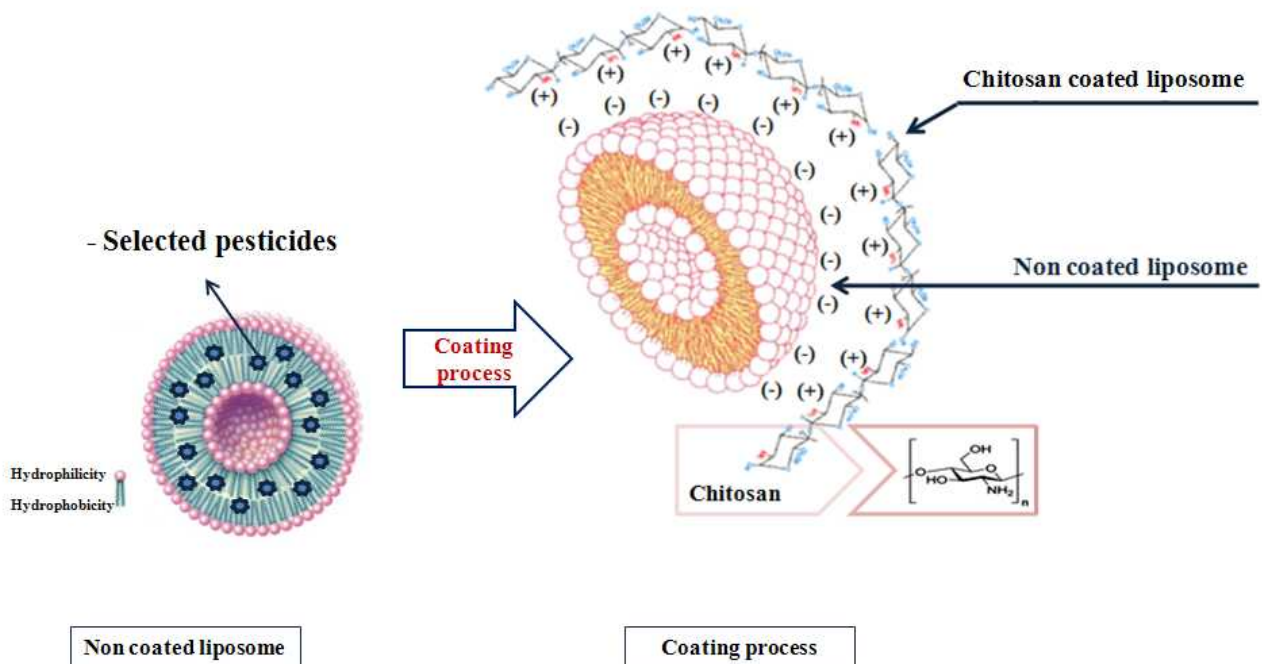
core material : pyrifluquinazon)

12) NCS-12 (설명 : Chitosan(molecular weight : 30,000) coated liposome,

coating material concentration : 0.1%,

core material : pyrifluquinazon)

\* Formation of carrier system (Fig. from the our paper (Journal of Microencapsulation))\*



A schematic of a non-coated and a coated liposome

## 1. Nano-carrier의 size control

-이 실험에서는 nano carrier system의 사이즈를 조절하기 위해 다양한 조건들이 사용되었다. 그 조건들로는 코팅물질(chitosan)의 농도 및 분자량, alginic acid를 이용한 다중코팅, 적용해준 초음파 균질기의 적용시간 등이 그 예라 할 수 있겠다.

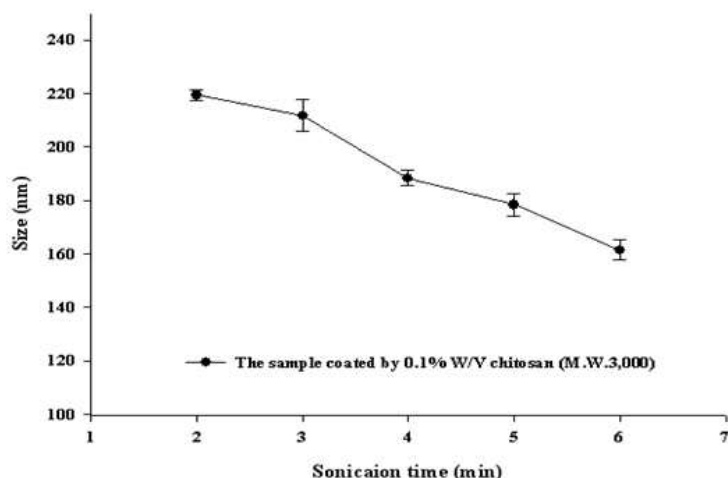


Fig. 1. The effect of sonication time (1, 2, 3, 4, 5 and 6min) on the mean size of prepared-nano carrier systems (n=5) (Preparation condition: M.W. 3,000Da chitosan was used as coating material.(Concentration = 0.1%W/V) And the ratio of lecithin and cholesterol was 6:4.)

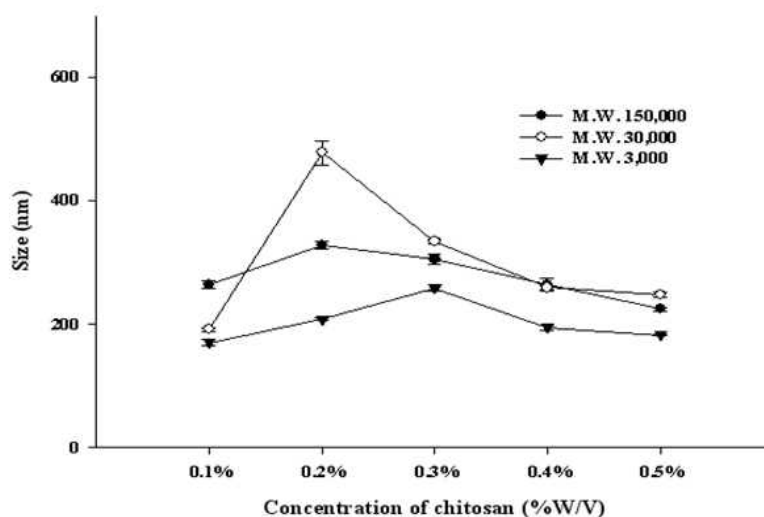


Fig. 2. The effect of molecular weight and concentration of primary coating material (chitosan) on the mean size of prepared nano carrier systems (n=5) (The ratio of lecithin and cholesterol was 6:4.)

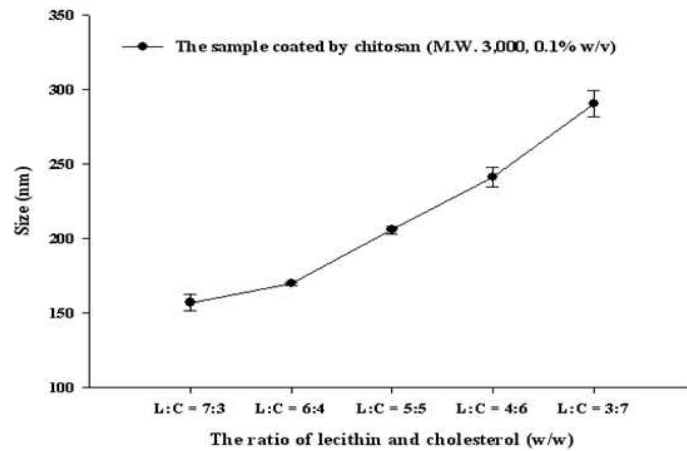


Fig. 3. The effect of the ratio of lecithin and cholesterol on the mean size of prepared nano carrier systems (n=5) (The M.W. 3,000Da chitosan was used as primary coating material and the concentration of it was 0.1% W/V .)

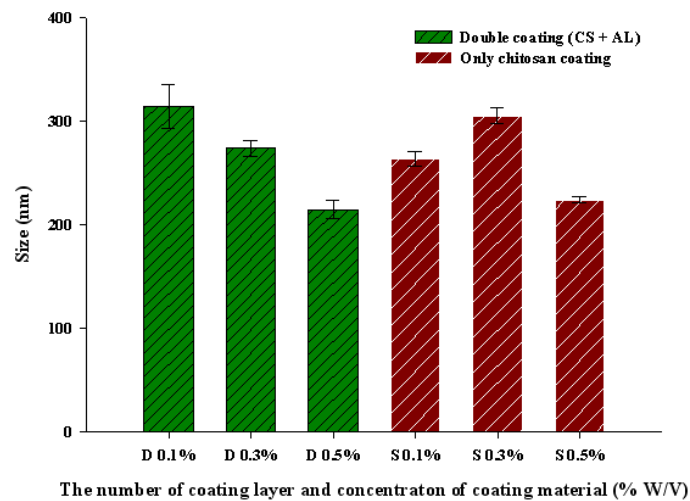


Fig. 4. The effect of the number of coating layers and concentration of coating materials on the mean size of nano carrier systems (n=5) (The M.W. of chitosan was 150,000Da and the ratio of lecithin and cholesterol was 6:4.) (D : Double coating, S : Single coating)

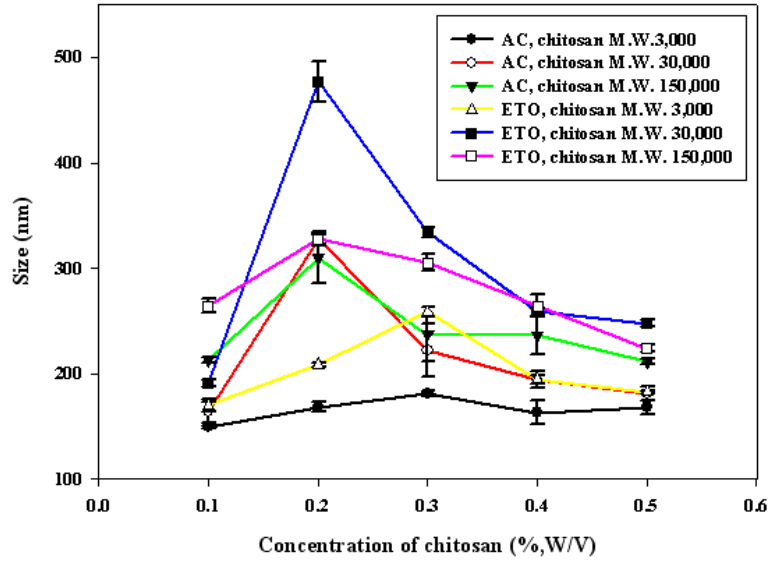


Fig. 5. The effect of molecular weight and concentration of primary coating material (chitosan) on the mean size of prepared nano carrier systems containing etofenprox or alpha-cypermethrin (n = 5) (lecithin : cholesterol = 6 : 4)

- Size control 관련 실험에 대한 결론: Nano carrier system의 평균 사이즈는 적용해준 코팅물질의 분자량과 농도에 큰 영향을 받았으며 이들 조건이 높아질수록 특정 조건이후 shrinking force가 더 크게 작용한다는 것을 알 수 있었다. 이는 코팅물질의 분자량이나 농도가 높아질수록 그들 자체의 표면전하 절대값이 커진다는 사실에서 그 원인을 찾을 수 있었다. 그 외에도 다중코팅, 사용해 준 초음파 균질기의 적용시간, lecithin : cholesterol의 비율도 제형된 nano carrier system의 평균 사이즈에 영향을 미침을 확인 할 수 있었다.

## 2. Nano carrier system의 표면전하분석

이 실험에서는 nano carrier system의 표면전하를 조절하기 위해 다양한 조건들이 사용되었다. 그 조건들로는 코팅물질(chitosan)의 농도 및 분자량, alginic acid를 이용한 다중코팅, 적용해준 초음파 균질기의 적용시간 등이 그 예라 할 수 있겠다.

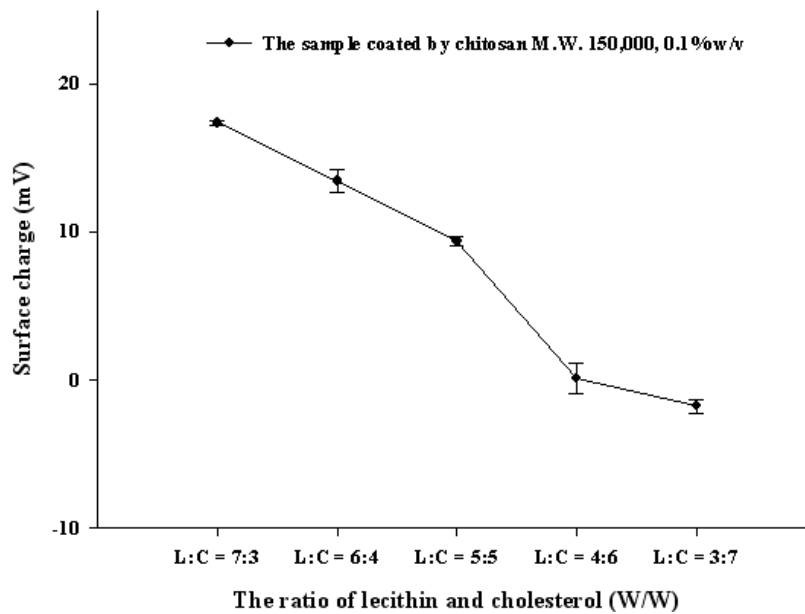


Fig. 6. The effect of the ratio of lecithin and cholesterol on the surface charge of prepared nano carrier systems (n=5) (The chitosan of M.W. 150,000Da was used as a coating material and the concentration of it was 0.1% W/V.)

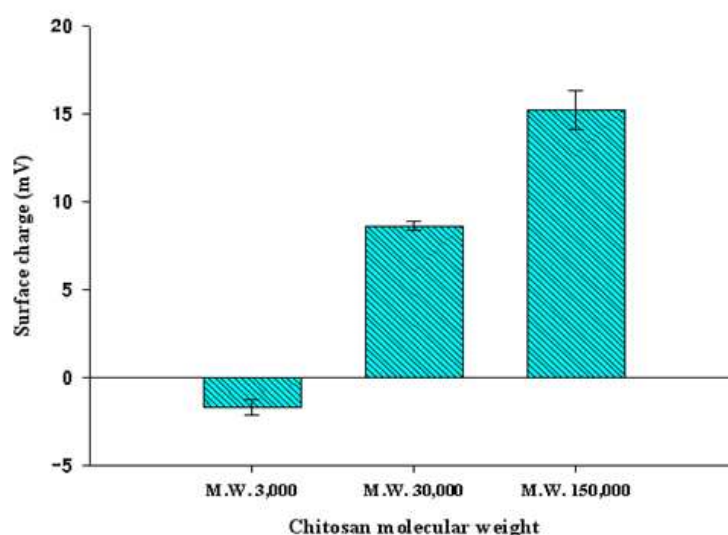


Fig. 7. The effect of the molecular weight on surface charge of prepared nano carrier systems (n=5) (The concentration of chitosan was 0.1% W/V and the ratio of lecithin and cholesterol was 6:4.)

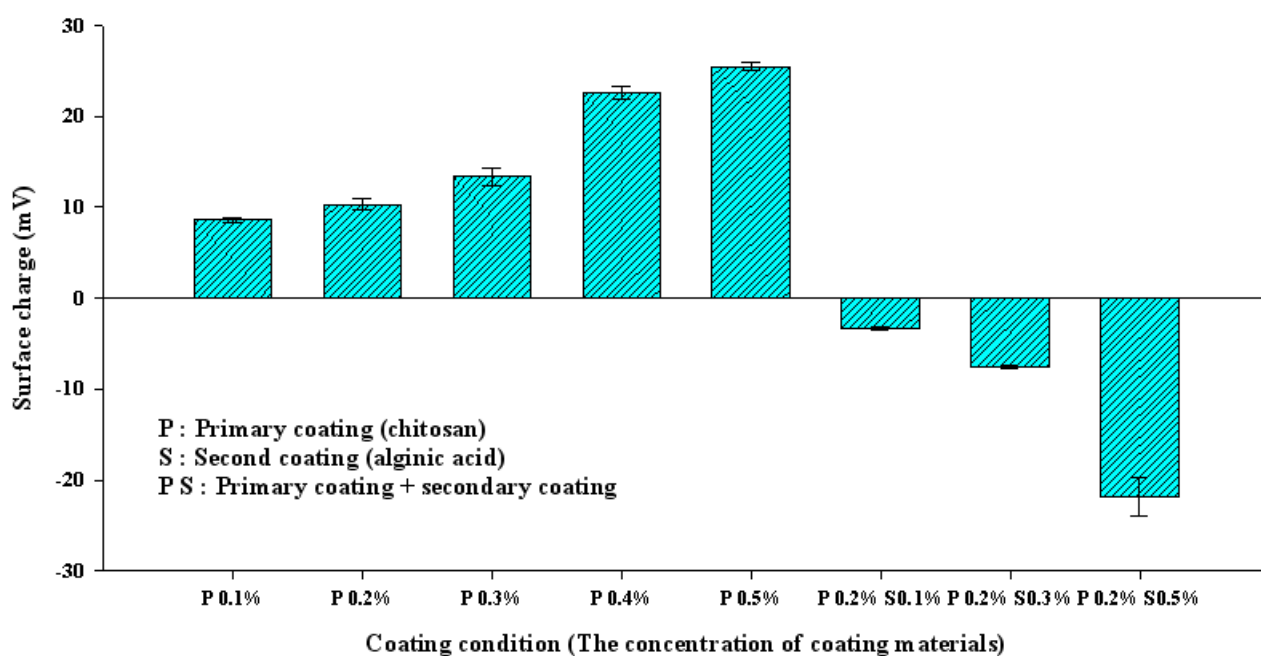


Fig. 8. The effect of the concentration of primary and secondary coating materials on the surface charge of prepared nano carrier systems (n=5) (The chitosan of M.W. 30,000 was used as primary coating material and the ratio of lecithin and cholesterol was 6:4.) (P : Primary coating, PS : Primary coating + secondary coating)

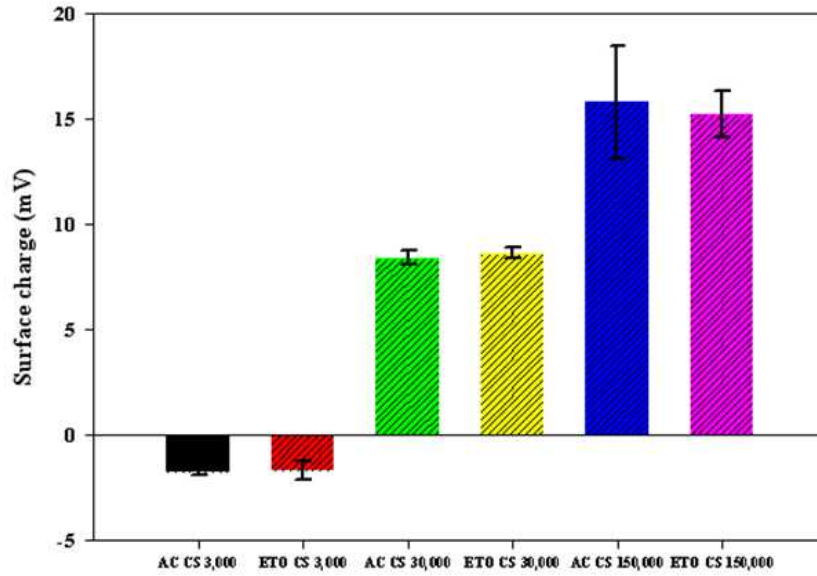


Fig. 9. The effect of the molecular weight on surface charge of prepared nano carrier systems containing etofenprox or alpha-cypermethrin (n = 5) (chitosan 0.1%, W/V; lecithin : cholesterol = 6 : 4)

- Surface charge control 관련 실험에 대한 결론: Nano carrier system의 표면전하는 적용해준 코팅물질의 분자량과 농도에 큰 영향을 받았으며 이들 조건이 높아질수록 코팅물질의 자체의 표면전하 절대값이 커지며 이 사실에서 위 결과들이 설명될 수 있었다. 그 외에도 다중코팅, lecithin : cholesterol의 비율도 제형된 nano carrier system의 표면전하에 영향을 미침을 확인할 수 있었다.



### 3. Nano carrier system의 encapsulation efficiency 분석

-이 실험에서는 nano carrier system의 encapsulation efficiency를 최적화하기 위해 다양한 조건들이 사용되었다. 그 조건들로는 코팅물질(chitosan)의 농도, alginate를 이용한 다중코팅 그리고 사용해준 lecithin과 cholesterol의 비율이 그 예라 할 수 있겠다.

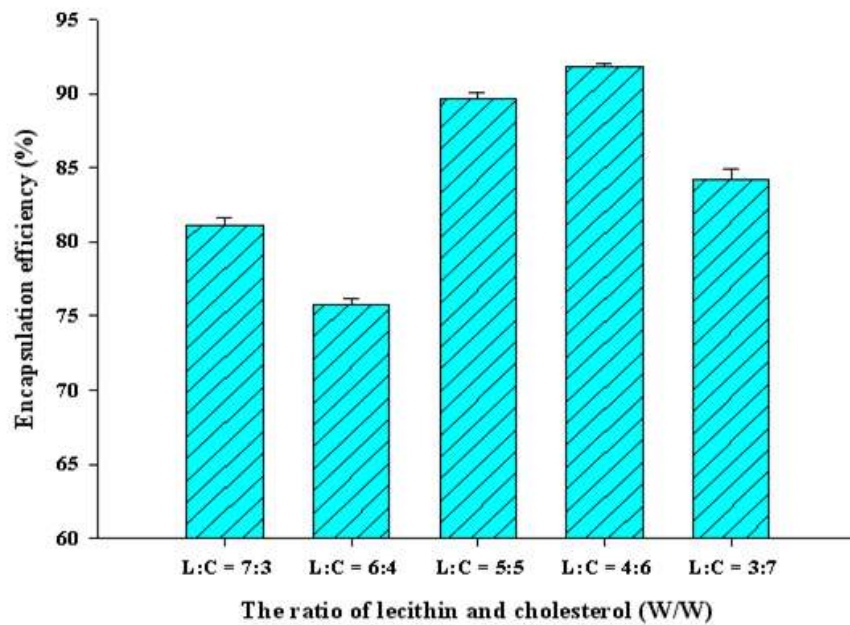


Fig. 10. The effect of the ratio of lecithin and cholesterol on encapsulation efficiency of prepared non coated-liposomes (n=2)

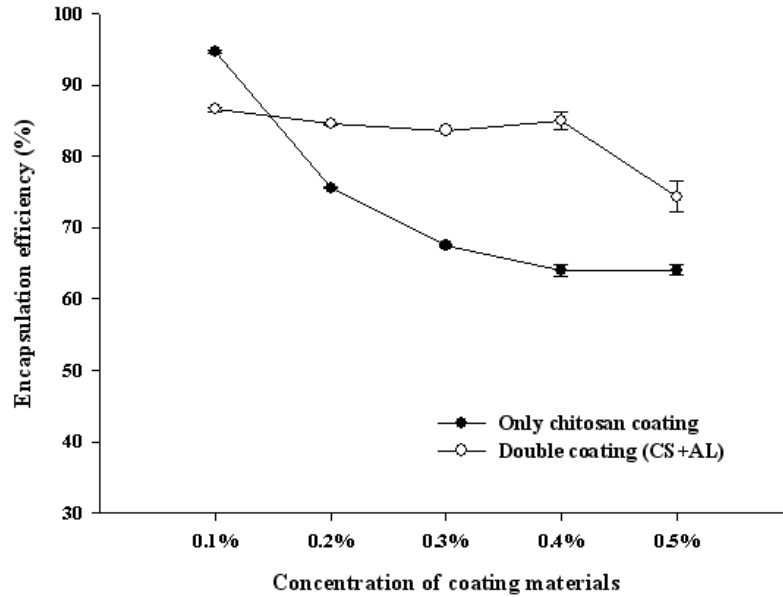


Fig. 11. The effect of the concentration of primary and secondary coating materials on the encapsulation efficiency of prepared nano carrier systems (n=2) (In case of double coating, the used concentration of chitosan was 0.2% W/V and the chitosan of M.W. 150,000 was used as primary coating material) (The ratio of lecithin and cholesterol was 6:4.)

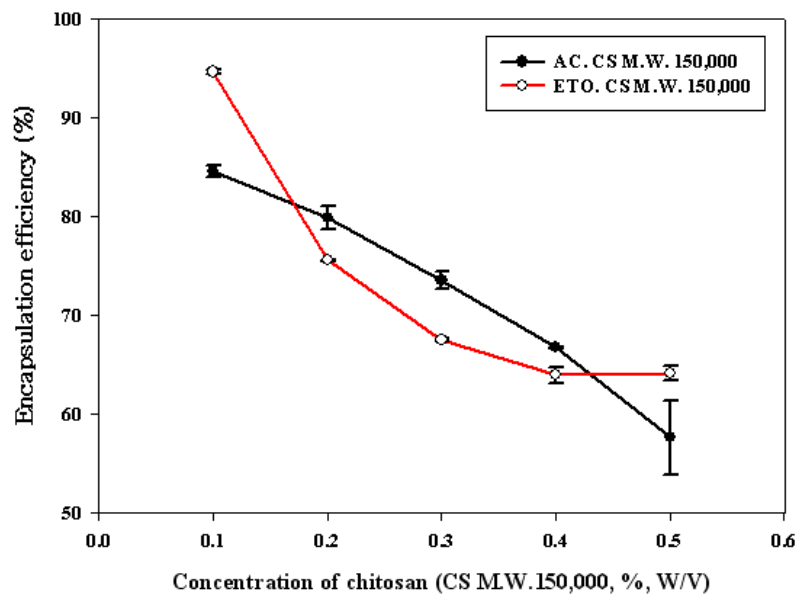


Fig. 12. The effect of the concentration of primary coating material on the encapsulation efficiency of chitosan coated nano carrier systems containing etofenprox and cypermethrin (n = 2) (lecithin : cholesterol = 6 : 4)

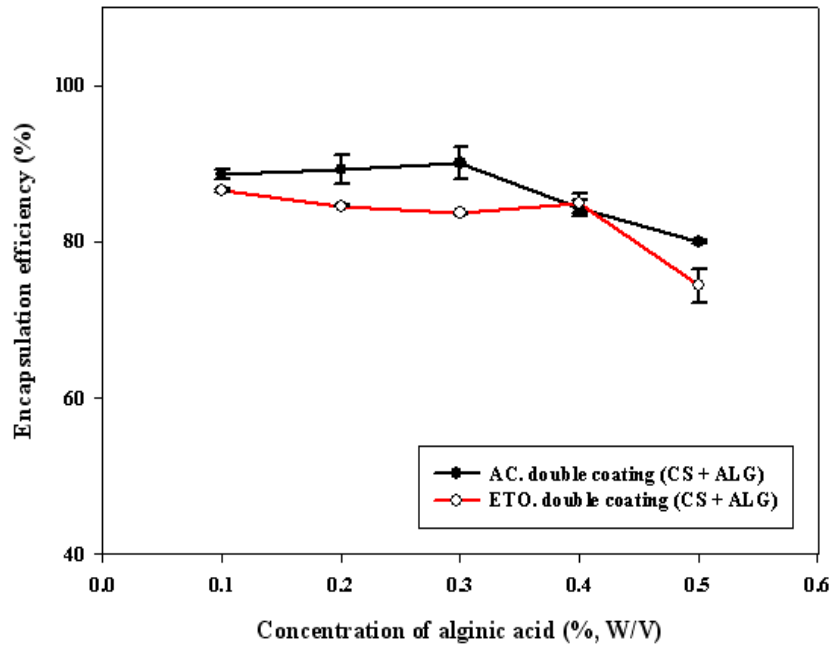


Fig. 13. The effect of the concentration of secondary coating materials on the encapsulation efficiency of double coated nano carrier systems containing etofenprox or alpha-cypermethrin (n = 2) (in case of double coating, primary coating (chitosan); Mw 150 000 Da, 0.2%, W/V) (lecithin : cholesterol = 6 : 4)

- Nano carrier system의 encapsulation efficiency 최적화 관련 실험에 대한 결론: Nano carrier system의 encapsulation efficiency는 적용해준 코팅물질의 농도에 큰 영향을 받았으며 이들 조건이 높아질수록 코팅물질의 자체의 표면전하 절대값이 커지며 shrinking force 값도 커지며 이에 따라 수축되는 과정에서 liposomal surface 근처에 포박된 core material이 방출되어지며 e최종 wncapsulation efficiency가 상대적으로 조금 낮아지게 되었다. 그 외에도 다중코팅(다중으로 코팅 할 때에도 단일코팅 때와 비슷한 거동 보임), lecithin : cholesterol의 비율도 제형된 nano carrier system의 encapsulation efficiency에 영향을 미침을 확인 할 수 있었다.

#### 4. Nano carrier system의 안정성 시험

-제형된 nano carrier system은 일정한 조건에서 저장되어지며 평균 사이즈와 표면전하의 변화를 검토하며 nano carrier system의 안정성의 변화를 분석하였다.

Table 1. The effect of storage time on the stability (mean size and surface charge) of prepared nano carrier systems (chitosan coated samples) (n=5) (chitosan molecular weight: 30 000 Da, concentration: 0.1%, W/V).

Time (days)	Size (nm)	Zeta potential (mV)
0	201.43±2.00	8.75±0.19
1	220.10±3.48	8.64±0.35
2	224.90±2.69	7.51±0.13
3	225.90±0.62	7.30±0.15
4	226.80±3.20	7.04±0.06
5	257.23±2.11	6.8±0.04

- Nano carrier system의 안정성 관련 실험에 대한 결론: Nano carrier system의 안정성은 4일째까지 작은 범위 안에서 사이즈와 표면전하의 약간의 변화만 보이며 안정성이 유지되었으나 5일째부터 그 변화의 폭이 커지며 상대적으로 aggregation의 확률이 커지며 안정성이 떨어지는 것을 관찰할 수 있었다.

## 5. Nano carrier system의 형태학적인 분석

-제형된 nano carrier system은 SEM을 이용해 형태학적으로 분석하였다.

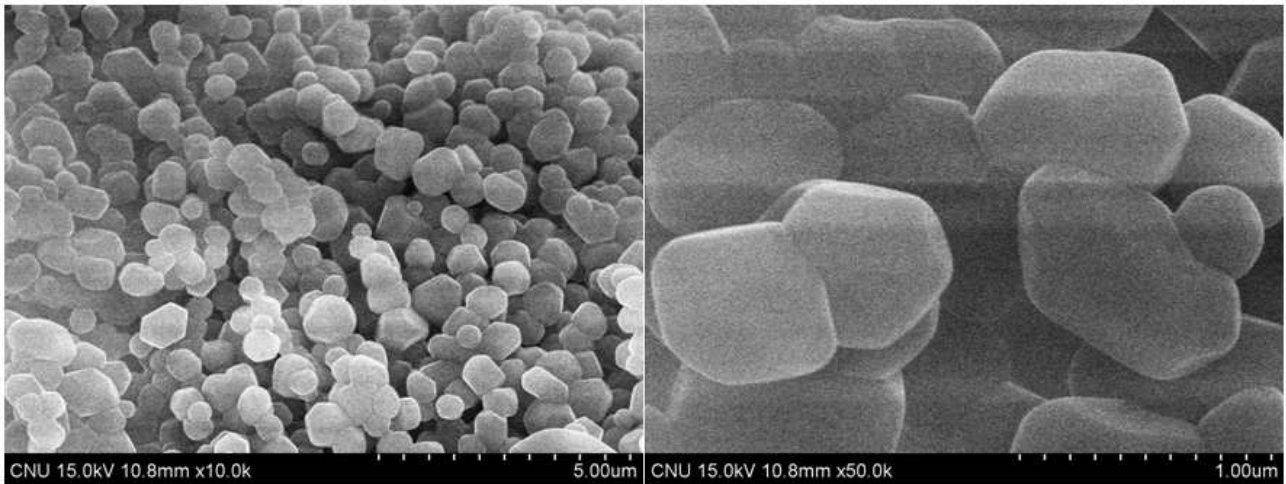


Fig. 14. Scanning electron micrographs of M.W. 3,000, 0.3%, W/V chitosan-coated nano carrier systems containing  $\alpha$ -cypermethrin molecules on the red pepper plant. (A): x10,000; (B): x50,000

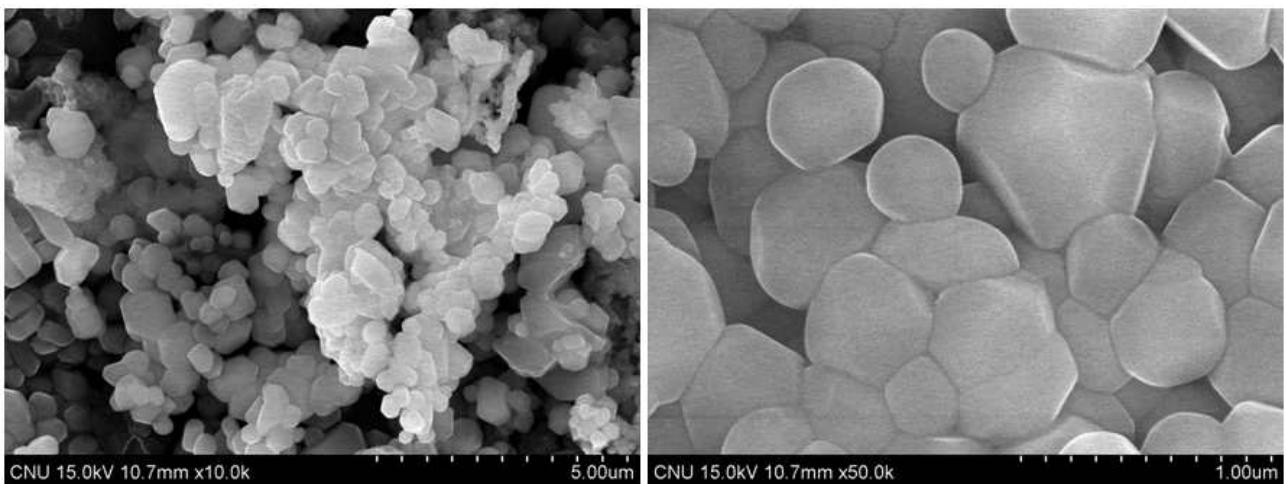


Fig. 15. Scanning electron micrographs of M.W. 30,000, 0.1%, W/V chitosan-coated nano carrier systems containing  $\alpha$ -cypermethrin molecules on the red pepper plant. (A): x10,000; (B): x50,000

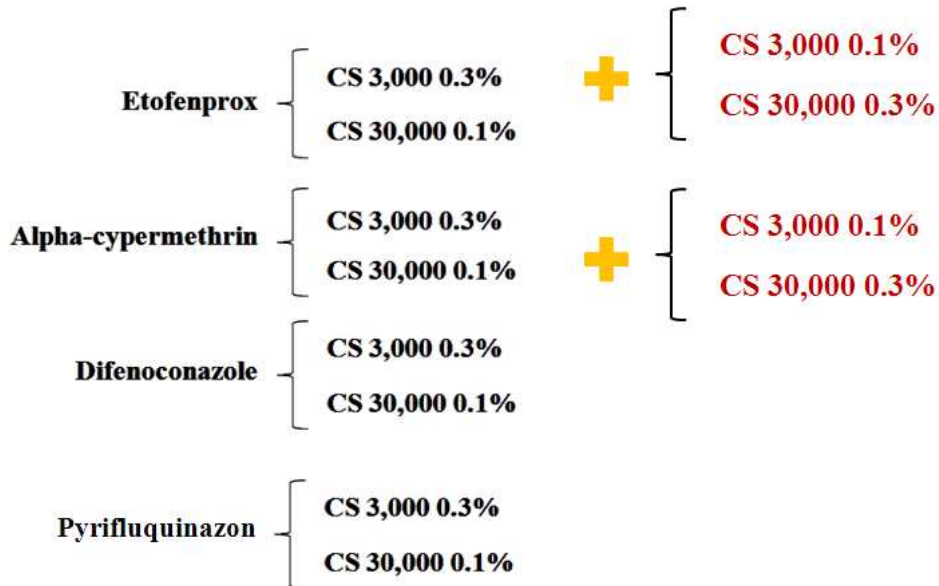


Fig. 16. Scanning electron micrographs of *Myzus persicae* abdomen after treatment of  $\alpha$ -cypermethrin. (M.W. 30,000, 0.1%, W/V chitosan-coated nano carrier systems containing  $\alpha$ -cypermethrin molecules with x2,000.)

- Nano carrier system의 형태학적인 분석 관련 실험에 대한 결론: Nano carrier system을 형태학적으로 살펴본 결과 대부분 구형의 일관성의 지닌 형태를 가지며 제형된 직후의 표면 상태는 매끄러운 것을 확인할 수 있었다. 사이즈에 있어서도 비교적 일관성을 유지하며 제형되었다는 것을 확인 하였다.

6. Nano carrier system의 방출거동분석

**Accumulating release profiles (12 conditions)**



① Etofenprox { CS 3,000 0.3%

**Sample encapsulation efficiency**

Starting point	Coating. M	Core material	Initial C.M. Amount	Encapsulation efficiency
2008.10. 28	M.W. 3,000, 0.3%, CS	<b>Etofenprox</b>	90mg	<b>70.21%</b>
2008. 11. 07	M.W. 30,000, 0.1%, CS	<b>Etofenprox</b>	90mg	<b>73.11%</b>

➔ **Entrapped etofenprox** { M.W. 3,000 : **63.189mg**  
 M.W. 30,000 : **65.799mg**

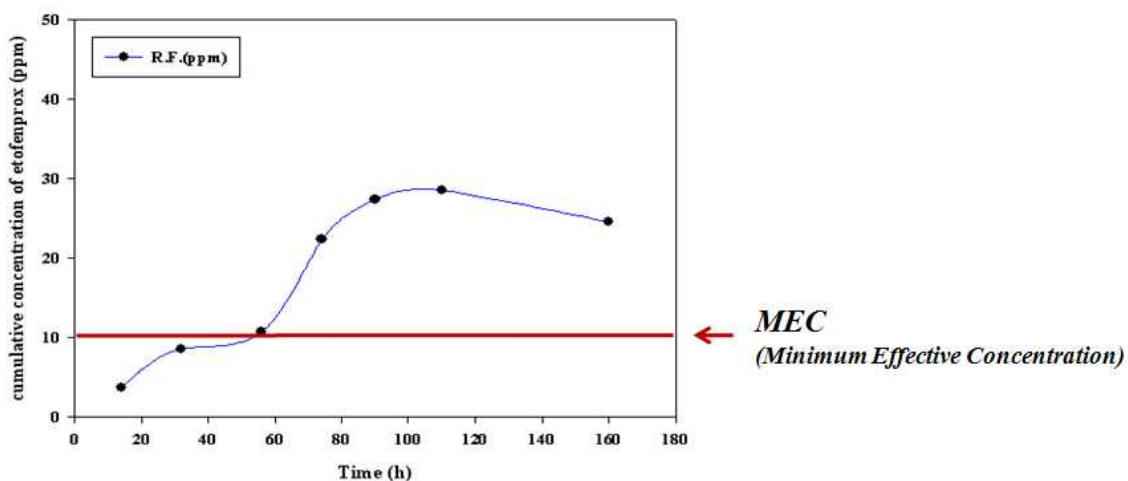
① Etofenprox } CS 3,000 0.3%

**Experiment report**

Starting point	Coating, M	Core material	Initial C.M amount	Encapsulation efficiency
2008.10.28	Chitosan M.W.3000, 0.3%	Etofenprox	90mg	70.21%

Checking point	Area (GC)	% Release profile	ppm (In dissolved sample)
2008. 10. 29 14h	144.2	1.80%	3.73ppm
2008. 10. 30 32h	215.2	3.32%	8.57ppm
2008. 10. 31 56h	245.2	5.10%	10.67ppm
2008. 11. 01 74h	417.0	10.63%	22.33ppm
2008. 11. 03 90h	493.0	12.98%	27.37ppm
2008. 11. 04 110h	511.0	13.56%	28.57ppm
2008. 11.06 160h	453.2	11.71%	24.6ppm

① Etofenprox } CS 3,000 0.3%





② Etofenprox { CS 30,000 0.1%

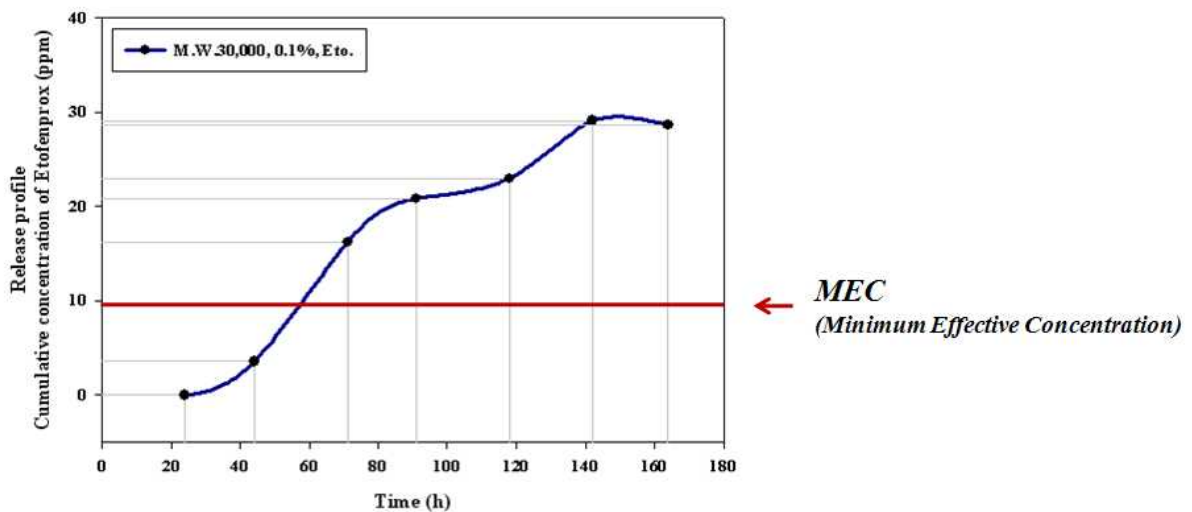
**Experiment report**

Starting point	Coating.M	Core material	Initial C.M amount	Encapsulation efficiency
2008.11. 15	<b>Chitosan</b> <b>M.W.30,000,</b> <b>0.1%</b>	Etofenprox	90mg	<b>73.11%</b>

\* 65.799mg (이론적 encapsulation amount)

Checking point	Area (GC)	% Release profile	ppm (In dissolved sample)
<b>24h</b>	43.6	-	-
<b>44h</b>	141.7	1.63%	<b>3.57ppm</b>
<b>71h</b>	328.1	7.37%	<b>16.2ppm</b>
<b>91h</b>	397.1	9.51%	<b>20.87ppm</b>
<b>118h</b>	428.5	10.47%	<b>23ppm</b>
<b>142h</b>	518.7	13.27%	<b>29.1ppm</b>
<b>164h</b>	512.2	13.07%	<b>28.67ppm</b>

② Etofenprox { CS 30,000 0.1%



③ Alpha-cypermethrin { CS 3,000 0.3%

Sample encapsulation efficiency

Starting point	Coating. M	Core material	Initial C.M. Amount	Encapsulation efficiency
2008.11.15	M.W. 3,000, 0.3%, CS	Alpha-cypermethrin	90mg	69.71%
2008. 11.22	M.W. 30,000, 0.1%, CS	Alpha-cypermethrin	90mg	71.24%

➔ Entrapped etofenprox { M.W. 3,000 : 62.739mg  
M.W. 30,000: 64.11mg

③ Alpha-cypermethrin { CS 3,000 0.3%

Experiment report

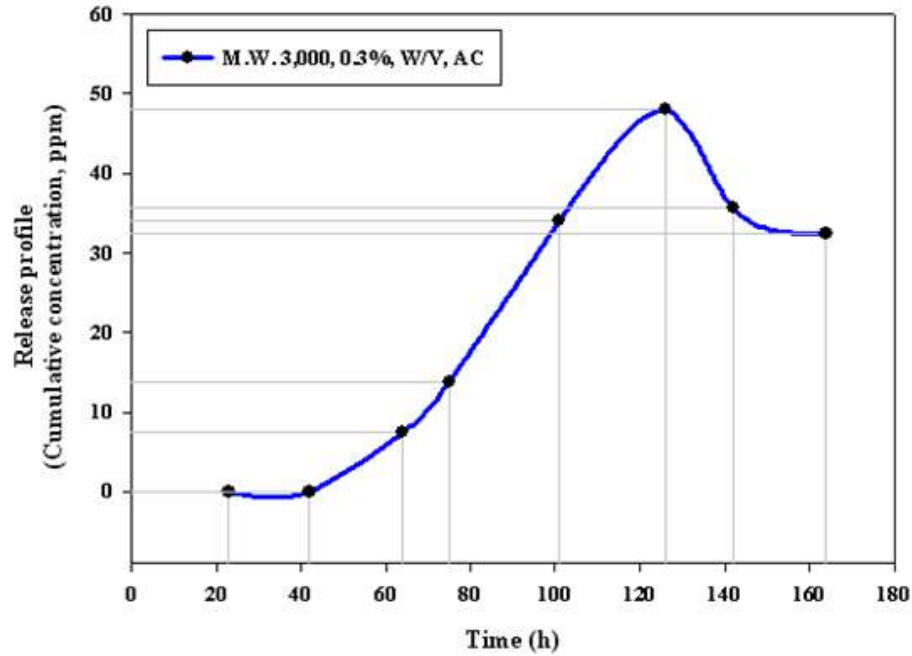
Starting point	Coating.M	Core material	Initial C.M amount	Encapsulation efficiency
2008.11. 12	Chitosan M.W.3000. 0.3%	AC	90mg	69.71%

\* 62.739mg (이론적 encapsulation amount)

Checking point	Area (GC)	% Release profile	ppm (In dissolved sample)
2008. 11. 12 23h	141.7	-	-
2008. 11. 13 42h	215.5	-	-
2008. 11. 14 64h	266.2	3.54%	7.40ppm
2008. 11. 15 75h	325.1	4.81%	13.83ppm
2008. 11. 16 88h	464.0	12.54%	26.22ppm
2008. 11. 17 101h	531.8	16.26%	34.00ppm
2008. 11. 19 126h	652.9	22.90%	48.00ppm
2008. 11. 20 142h	548.1	17.05%	35.66ppm
2008. 11. 21 164h	518.1	15.50%	32.40ppm

③ Alpha-cypermethrin

CS 3,000 0.3%



④ Alpha-cypermethrin

CS 30,000 0.1%

Experiment report

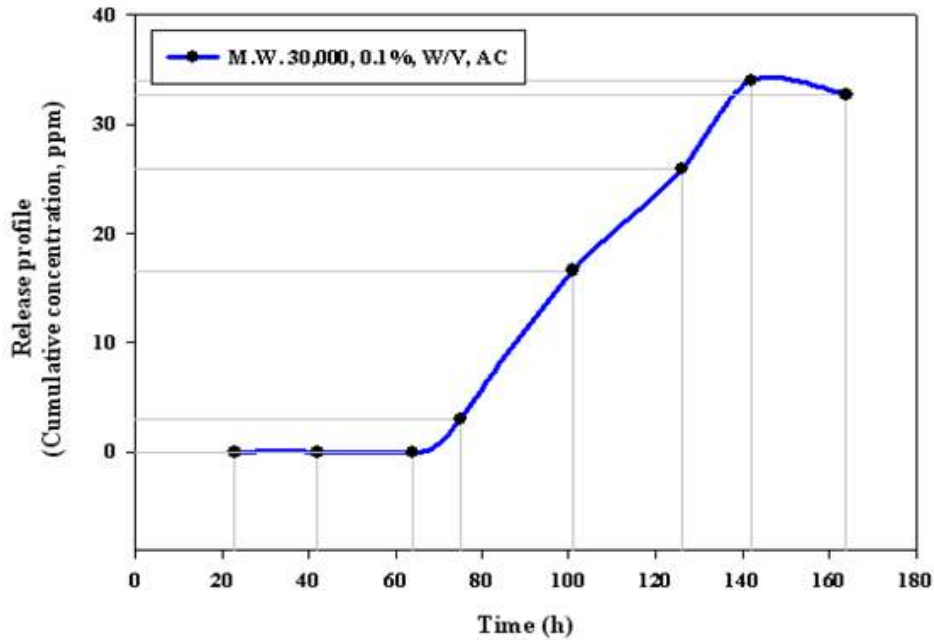
Starting point	Coating.M	Core material	Initial C.M amount	Encapsulation efficiency
2008.11. 12	Chitosan M.W.30,000, 0.1%	AC	90mg	71.24%

\* 64.116mg (이론적 encapsulation amount)

Checking point	Area (GC)	% Release profile	ppm (In dissolved sample)
2008. 11. 12 21h	97.4	-	-
2008. 11. 13 42h	148.1	-	-
2008. 11. 14 60h	171.3	-	-
2008. 11. 15 75h	264.5	1.42%	3.03ppm
2008. 11. 17 101h	382.3	7.79%	16.6ppm
2008. 11. 19 126h	461.7	12.11%	25.89ppm
2008. 11. 20 142h	531.9	15.9%	33.99ppm
2008. 11. 21 164h	520.7	15.32%	32.73ppm

④ Alpha-cypermethrin

CS 30,000 0.1%



⑤ Difenoconazole

CS 3,000 0.3%

Sample encapsulation efficiency

Starting point	Coating. M	Core material	Initial C.M. Amount	Encapsulation efficiency
2008.12. 05	M.W. 3,000, 0.3%, CS	Difenoconazole	90mg	69.52%
2008. 12. 15	M.W. 30,000, 0.1%, CS	Difenoconazole	90mg	71.24%



Entrapped etofenprox

M.W. 3,000 : 62.568mg

M.W. 30,000 : 64.12mg

⑤ Difenoconazole } CS 3,000 0.3%

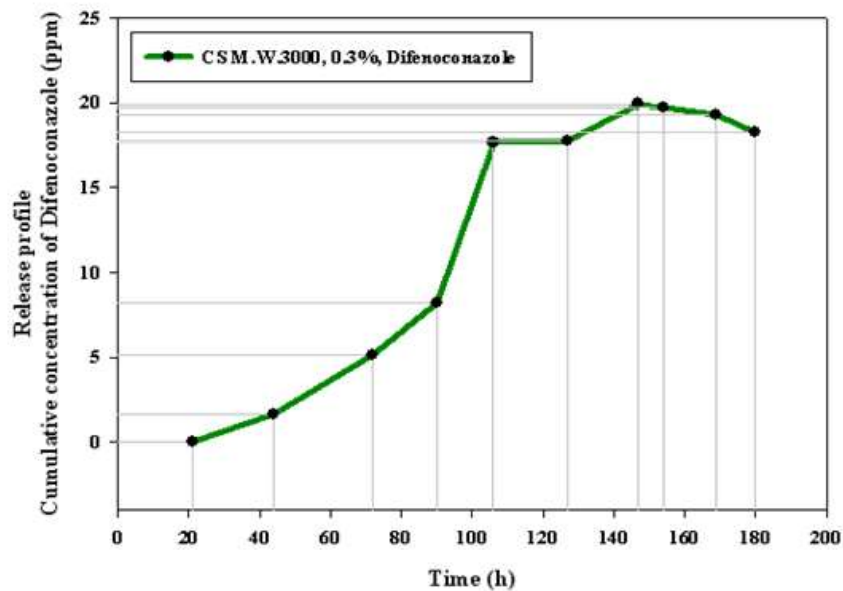
**Experiment report**

Starting point	Coating.M	Core material	Initial C.M amount	Encapsulation efficiency
2008. 12. 01	CS, M.W. 3000, 0.3%	Difenoconazole	90mg	69.52%

+ 62.568mg (이론적 encapsulation amount)

Checking point	Area (GC)	% Release profile	ppm (In dissolved sample)
21h	-	-	-
44h	11.7	0.79%	1.64ppm
72h	36.9	2.48%	5.17ppm
90h	58.58	3.39%	8.20ppm
106h	126.41	8.48%	17.7ppm
127h	127.03	8.52%	17.8ppm
147h	142.25	9.56%	19.94ppm
154h	140.9	9.46%	19.73ppm
169h	137.86	9.25%	19.3ppm
180h	130.71	8.77%	18.3ppm

⑤ Difenoconazole } CS 3,000 0.3%





⑥ Difenoconazole

CS 30,000 0.1%

**Experiment report**

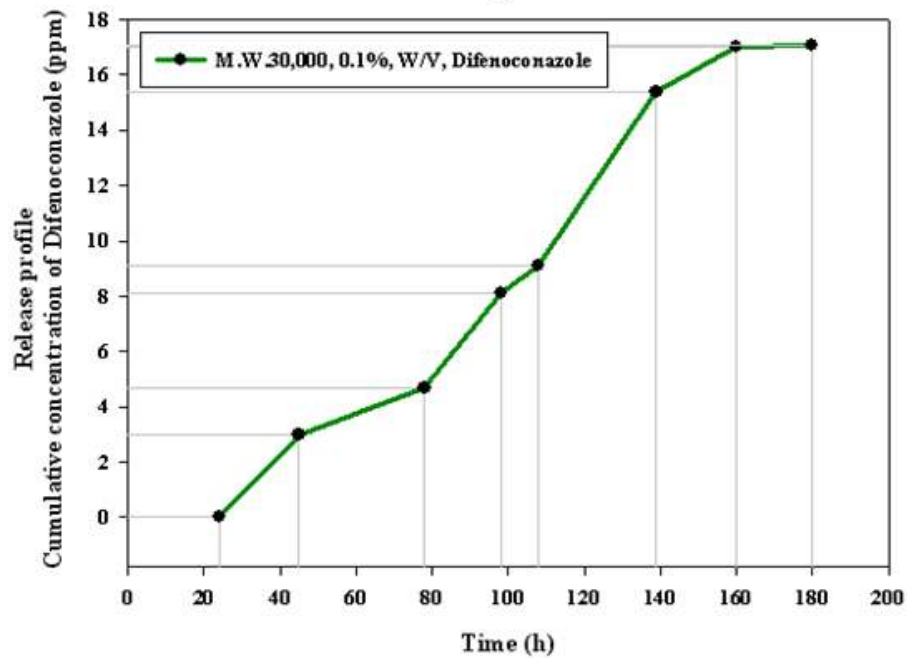
Starting point	Coating.M	Core material	Initial C.M. amount	Encapsulation efficiency
2008. 12. 15	CS. M.W. 30,000, 0.1%	Difenoconazole	90mg	71.24%

\* 64.12mg (이론적 encapsulation amount)

Checking point	Area (GC)	% Release profile	ppm (In dissolved sample)
24h	-	-	-
45h	21.5	1.40%	3.00ppm
78h	32.8	2.18%	4.67ppm
98h	57.8	3.79%	8.10ppm
108h	65	4.26%	9.10ppm
139h	109.7	7.20%	15.40ppm
160h	121.3	7.95%	17.00ppm
180h	121.9	8.00%	17.10ppm

⑥ Difenoconazole

CS 30,000 0.1%



⑦ Etofenprox { CS 3,000 0.1%

Sample encapsulation efficiency

Starting point	Coating. M	Core material	Initial C.M. Amount	Encapsulation efficiency
2009.04. 10	M.W. 3,000, 0.1%, CS	Etofenprox	90mg	74.31%
2009. 04. 27	M.W. 30,000, 0.3%, CS	Etofenprox	90mg	67.52%

➔ Entrapped etofenprox { M.W. 3,000 : 66.879mg  
M.W. 30,000 : 60.768mg

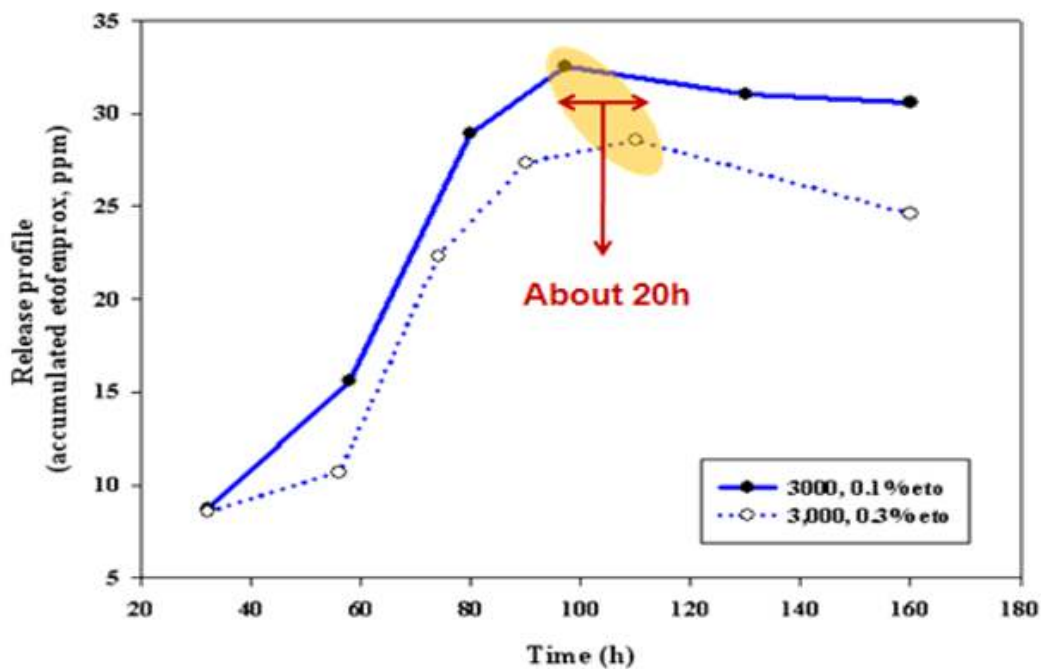
⑦ Etofenprox { CS 3,000 0.1%

Experiment report

Starting point	Coating M	Core material	Initial C.M. amount	Encapsulation efficiency
2009.06.02	CS, M.W. 3,000, 0.1%	ETO	90mg	74.31%

Checking point	Area (GC)	% Release profile	ppm (In dissolved sample)
32h	217.3	3.80%	8.7 ppm
58h	319.8	6.85%	15.6 ppm
80h	517.1	12.68%	28.9 ppm
97h	569.2	14.23%	32.53 ppm
130h	547.7	13.58%	31.07 ppm
160h	541.2	13.39%	30.63 ppm

⑦ Etofenprox { CS 3,000 0.1%



⑧ Etofenprox { CS 30,000 0.3%

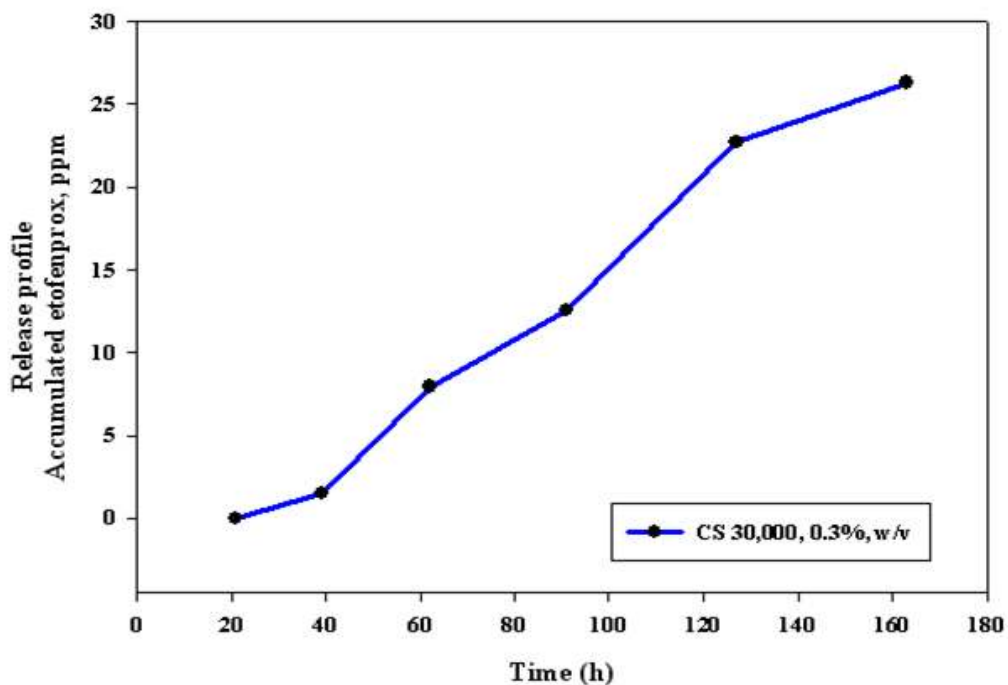
Experiment report

Starting point	Coating M	Core material	Initial C.M. amount	Encapsulation efficiency
2009.06.11	CS, M.W. 30,000, 0.3%	Etofenprox	90mg	67.52%

Checking point	Area (GC)	% Release profile	ppm (In dissolved sample)
21h	23.2	-	-
39h	117.2	0.95%	1.46 ppm
62h	241.6	3.125%	7.95 ppm
91h	328.0	7.99%	12.56 ppm
127h	423.7	11.17%	22.67 ppm
163h	477.4	12.98%	26.31 ppm



⑧ Etofenprox { CS 30,000 0.3%



⑨ Alpha-cypermethrin { CS 3,000 0.1%

Sample encapsulation efficiency

Starting point	Coating. M	Core material	Initial C.M. Amount	Encapsulation efficiency
2009.05. 10	M.W. 3,000, 0.1%, CS	AC	90mg	70.13%
2009. 05. 29	M.W. 30,000, 0.3%, CS	AC	90mg	74.17%

➔ Entrapped AC { M.W. 3,000 : 63.117mg  
M.W. 30,000 : 66.753mg

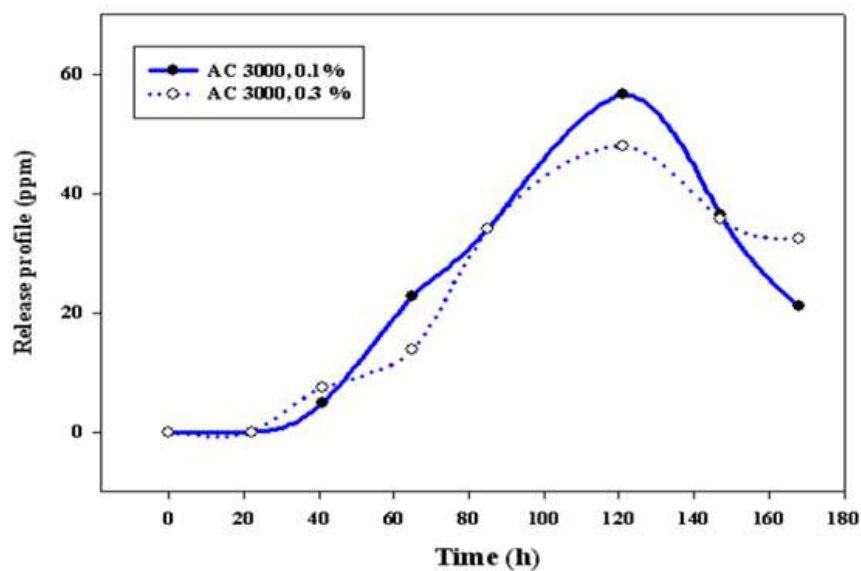
⑨ Alpha-cypermethrin } CS 3,000 0.1%

**Experiment report**

Starting point	Coating.M	Core material	Initial C.M. amount	Encapsulation efficiency
2009.04.17	CS, M.W. 3,000, 0.1%	AC	90mg	70.13%

Checking point	Area (GC)	% Release profile	ppm (In dissolved sample)
22h	456.2	-	-
41h	1119.6	2.295%	4.80 ppm
65h	1742.2	10.93%	22.8 ppm
85h	2128.6	16.282%	34.05 ppm
121h	2905.5	27.05%	56.58 ppm
147h	2208.2	17.38%	36.367 ppm
168h	1679.3	10.058%	21.03 ppm

⑨ Alpha-cypermethrin } CS 3,000 0.1%



⑩ Alpha-cypermethrin

CS 30,000 0.3%

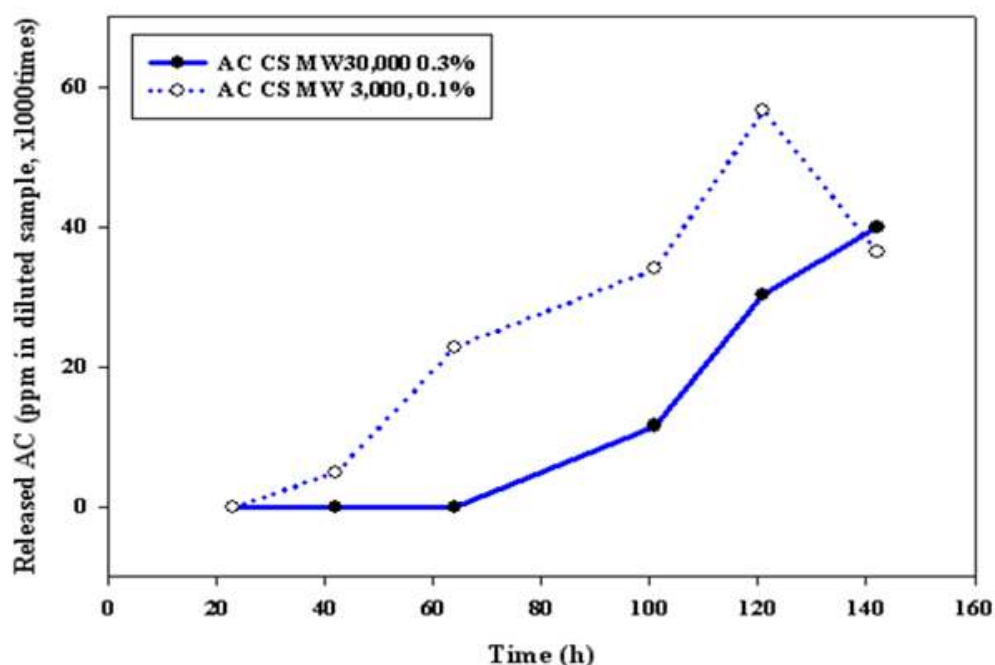
Experiment report

Starting point	Coating M	Core material	Initial C.M. amount	Encapsulation efficiency
2009.05.02	CS, M.W. 30,000, 0.3%	AC	90mg	74.17%

Checking point	Area (GC)	% Release profile	ppm (In dissolved sample)
23h	358.8	-	-
42h	431.3	-	-
64h	574.8	-	-
75h	797.7	-	-
101h	1152.8	5.19%	11.57 ppm
126h	1476.6	13.63%	30.33 ppm
142h	1643.4	17.98%	40.0 ppm

⑩ Alpha-cypermethrin

CS 30,000 0.3%



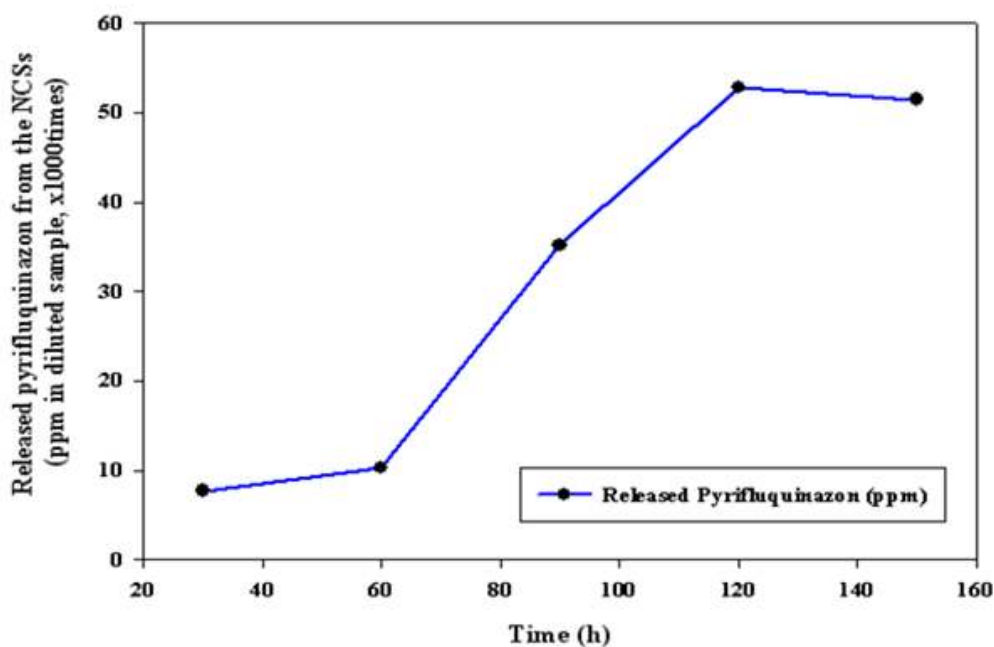
① Pyrifluquinazon { CS 3,000 0.3%  
CS 30,000 0.1%

### Experiment report

Starting point	Coating.M	Core material	Initial C.M amount	Encapsulation efficiency
2009. 11.07	CS. M.W. 30,000, 0.1%	Pyrifluquinazon	100mg	76.40%

Checking point	Area (GC)	% Release profile	ppm (In dissolved sample)
30h	25.65	3.02%	7.7ppm
60h	29.25	4.01%	10.2ppm
90h	65.27	13.78%	35.1ppm
120h	90.8	20.72%	52.77ppm
150h	88.95	20.21%	51.47ppm

① Pyrifluquinazon { CS 3,000 0.3%  
CS 30,000 0.1%



⑫ **Pyrifluquinazon**

**CS 3,000 0.3%**

**CS 30,000 0.1%**

**Experiment report**

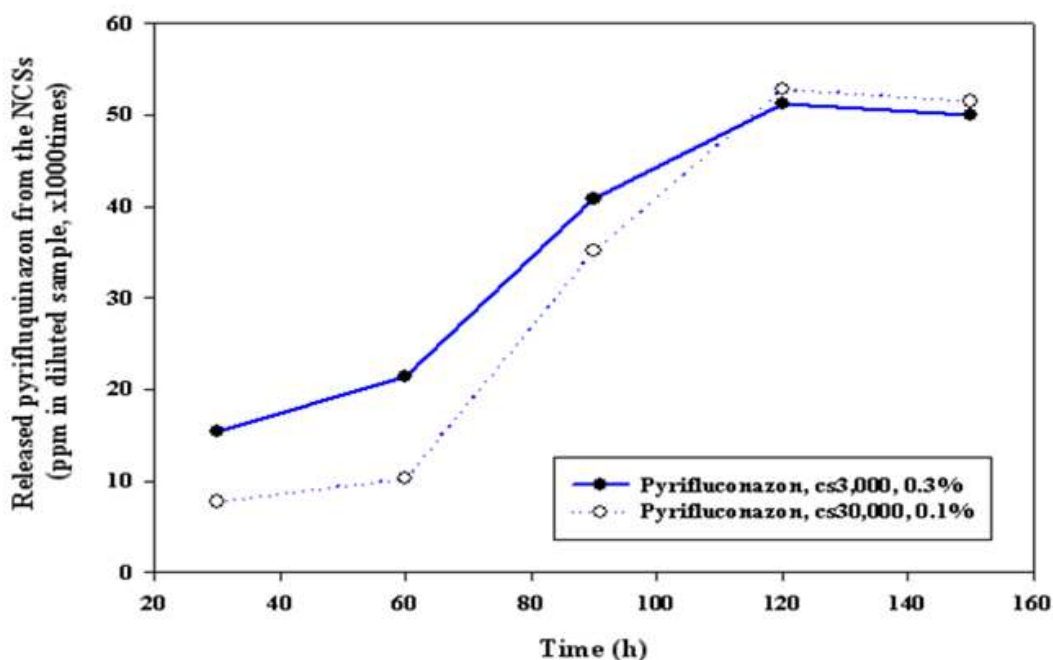
Starting point	Coating.M	Core material	Initial C.M amount	Encapsulation efficiency
2009. 11.14	CS. M.W. 3,000, 0.3%	Pyrifluquinazon	100mg	74.47%

Checking point	Area (GC)	% Release profile	ppm (In dissolved sample)
30h	36.79	6.2	15.4ppm
60h	45.45	8.62	21.4ppm
90h	73.62	16.46	40.87ppm
120h	88.46	20.59	51.13ppm
150h	86.83	20.14	50.00ppm

⑫ **Pyrifluquinazon**

**CS 3,000 0.3%**

**CS 30,000 0.1%**



- Nano carrier system의 release profile 관련 실험에 대한 결론: Nano carrier system의 release profile은 적용해준 코팅물질의 농도 및 분자량에 큰 영향을 받았으며 이들 조건이 높아질수록 코팅물질의 자체의 표면전하 절대값이 커지며 그럴수록 생성된 외부막의 최종 두께도 두꺼워져 이에 따라 그 막을 통한 (carrier system의 막 내부와 외부의 포박물질의 농도 차에 의한 확산을 통한 방출) 포박물질의 방출속도가 느려지는 것을 확인할 수 있었다.

### 제 3 절. 나노-바이오 기술을 활용한 친환경 살균제의 개발

#### 1. 서 론

은(Ag) 은 현재까지 화농성 질환, 땀 냄새의 원인균인 황색포도상구균, 유아, 어린이의 진무를 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<sup>+</sup>)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 용액을 사용하여 각각의 나노 용액을 이용하여

- 병해 방제가 가능한 길항미생물의 선발,
- 은 나노소재의 활용 가능성 확인,
- 은 나노소재가 토양미생물의 생태적 특성 및 토양 환경에 미치는 영향 조사,
- 은 나노소재의 적용 캘린더 작성 등에 대하여 실험을 수행하였으며, 추가적으로

Nano-silver 용액을 이용해 다음의 실험을 수행 하였다.

- 은 나노 용액을 처리한 포장에서 수확한 과로부터 은의 검출 분석
- 시설재배지 토양의 은 나노 용액 처리 시기별 토양분석
- 은 나노 용액과 키토산의 과 흑색썩음균핵병에 대한 방제효과 비교
- 고추탄저병 방제 포장시험
- Controlled release가 가능한 살균제 선발 시험
- 은나노 처리가 식물체의 유전자 발현에 미치는 영향 조사
- 나노 코팅한 Difenoconazole의 오이흰가루병 방제 기작 연구
- 나노 코팅한 Tebuconazole의 고추탄저병 병원균 방제 기작 연구
- 은 나노 용액의 고추탄저병 병원균 방제기작 연구

## 2. 재료 및 방법

### 가. 실험 재료

#### (1) Nano-silver 용액

본 실험에 사용한 Nanover™용액은 제조 방법이 다른 WA-CV-WA13B(CV), WA-AT-WB13R(AT), WA-PR-WB13R(PR)로 3가지 용액을 사용하였으며, 포항공대의 바이오 플러스(주)에서 1,000ppm농도로 제공 받아 각 처리에 맞는 농도로 증류수를 이용하여 희석하여 사용하였으며, 저장은 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

본 실험에 사용한 균주는 각종 채소 작물에 병을 야기 시키는 곰팡이 28종, 세균은 10종을 사용하였으며, 균주는 농촌진흥청 산하기관인 농용미생물 보존센터(Korean Agricultural Culture Collection, KACC)로부터 분양 받아 실험에 사용하였으며, *Alternaria alternata*를 포함하여 27종의 곰팡이 균주와, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*를 포함하여 9가지 세균 균주를 가지고 실험에 사용하였다(Table 2, 3). 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.



Table 2. Plant pathogenic fungi tested.

Species		KACC accessio n 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	Anthracnose	Mung bean, Pepper, Apple tree
<i>Colletotrichum dematium</i>	C-4	40013	Anthracnose	Bean, Pepper, Cabbage
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	C-5	40003	Anthracnose	Bean, Apple tree, Pear tree, Aloe, Pepper, Strawberry, Perilla,
<i>Colletotrichum higginsianum</i>	C-6	40807	Anthracnose	Radish, Cabbage, Mustard tree
<i>Colletotrichum nigrum</i>	C-7	40973	Anthracnose	Pepper
<i>Colletotrichum orbiculare</i>	C-8	40808	Anthracnose	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
<i>Fusarium 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,

Table 3. Plant pathogenic bacteria tested.

Species		KACC accessio n 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>X. 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) 항균 활성 검정 *in vitro* 실험

항균 활성 검정을 위하여 선발된 28종의 곰팡이 균주 및 10종의 세균 균주를 각각의 한천 배지에 각각 제조 방법이 다른 3가지 용액 Nano-silver을 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℃에서 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℃, 170rpm)에서 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세균의 농도는  $1.0 \times 10^5$  CFU/ml으로 제조하여 사용하였다. 각 고체배양 배지에

은 나노 용액을 10ppm, 25ppm, 50ppm, 100ppm의 농도로 첨가하여 배지를 조제하였다. 희석된 세균을 10 $\mu$ l씩 각각의 고체 배지에 접종하여 도말하였다. 접종 한 후 30 $^{\circ}$ C에서 1~3일간 관찰하면서 세균의 콜로니 수를 계수하여 기록하였다.

(2) 은 나노 용액 단독 처리 시 선발된 곰팡이의 성장억제 검정

27개의 곰팡이 중 각각의 배지와 은 나노 용액에 대해 균사생장 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, *Rhizoctonia 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 $^{\circ}$ 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 성장 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 균사생장에 어떠한 영향을 미치는지, 그리고 선발된 균주 중 3개의 균주 R-1, S-1, S-2를 대상으로 혼합된 은 나노 용액이 균핵의 생장에 대하여 어떠한 영향을 미치는지 확인중에 있다.

(4) 투과전자현미경(TEM) 관찰

은 나노 입자의 부착 형태와 항균 메커니즘을 관찰하고자 은 나노 처리가 된 세균 *Pseudomonas marginalis* 과 곰팡이 *Rhizoctonia solani* 을 대상으로 하여 에너지 여과 투과 전자 현미경

(EF-TEM, Energy Filtering-Transmission Electron Microscope, LEO-912AB, OMEGA, LEO) 으로 관찰을 실시하였다.

#### (5) 주사현미경(SEM) 관찰

은나노액 처리가 곰팡이 균사의 생장에 미치는 영향을 확인 하기위하여 저농도에서 매우 민감한 반응을 보이는 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 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. 육묘에 각 농도별로 옆면시비와 관주 처리 후, 약해가 발생 되는지 관찰하였다.

#### (7) 파 흑색썩음균핵병 병원균에 대한 은 나노 용액 효과 실험

파 뿌리 썩음 병원균을 대상으로 은 나노 용액 활성 실험을 실시하였다. 감염된 파에서 균핵을 순수 분리하여 은 나노 용액별 활성 실험을 기내에서 실시하였다. 3가지 용액과 4가지 혼합 용액을 1ppm, 3ppm, 5ppm, 7ppm, 10ppm, 25ppm, 50ppm, 100ppm 농도를 대상으로 PDA, MEA, CMA 배지에 치상하여 위와 같은 방법으로 관찰하였다. 포장실험은 은 나노 용액을 각 용액별로 10ppm, 25ppm, 50ppm, 100ppm으로 제조하여 식물의 기저부에 200ml씩 관주 처리하였다. 주마다 1회 처리 하였으며, 총 4회 처리하였다. 5개월 후 수확한 파의 뿌리를 관찰하였다. 수확한 파의 생체중을 측정하고 80℃ 건조기에 건조한 뒤, 건조중도 측정하였다.

#### (8) 은 나노 용액을 처리한 파 재배 토양의 미생물 관찰 및 토양 성분 분석

파 포장에서 은 나노 용액이 처리된 곳과 무처리 된 곳의 흙을 샘플링하여 미생물 개체수의 변화를 조사하였다. 처리 포장내의 토양을 채취하여 통풍이 잘되는 음지에서 건조한 후 2mm의 체로 친후, 세균은  $1.0 \times 10^4$  CFU/ml로 곰팡이는  $1.0 \times 10^2$  CFU/ml로 희석하여 세균은 TSA배지에 곰팡이는 항생제(Streptomycin sulfate salt: 0.3g, Tergitol: 500 $\mu$ l, Tetracycline: 0.3g)를 첨가한 PDA배지에 10 $\mu$ l씩 도말하여 계수하였다.

토양 성분 분석은 파 포장에 처리된 은 나노 용액에 의한 토양 성분 변화를 알아보기 위하

여 실시하였으며, 처리 포장내의 토양을 채취하여 통풍이 잘되는 음지에서 건조한 후 2mm의 체로 친 후, 토양성분 분석을 실시하였다.

(9) 은 나노 용액을 처리한 포장에서 수확한 파로부터 은의 검출 분석

농도별로 은 나노 용액이 처리된 파 포장에서 파를 수확하여 수돗물로 깨끗이 세척하였다. 세척한 파를 음지에서 자연 건조시킨 후 줄기와 뿌리 등 식물체 5g을 도가니에 넣고 550℃에서 회화 후 왕수(HCl:HNO<sub>3</sub>=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.

(10) 시설재배지 토양의 은나노 용액 처리 시기별 토양 분석

은 나노 용액 Nanover™ 1,000ppm을 토양에 처리(Table 4) 하기 전·후 4주 간격으로 파 재배 시설하우스에서 시료를 채취하였고 토양은 풍건 후 2 mm 체를 통과시켜 실험에 사용하였다. 토양 분석은 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 mode 921A)와 EC meter (Orion model 50 conductivity meter)를 이용하여 각각 측정하였다. 유기물 함량은 Walkely-Black 방법에 따라 1N K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>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<sub>4</sub>OAc (pH 7.0) 용액으로 침출 후 AAS (Atomic Absorption Spectrometer, Schmadzu, Japan)를 이용하여 Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>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.

Table 4. 처리구별 처리방법

처리구	처리 방법
CTR 1, 3	무 처 리
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 (WA-CV-WA13B)	은 나노용액 25 ppm, 100 ml 관주처리
NV-B 1~4 (WA-AT-WB13R)	은 나노용액 50 ppm, 100 ml 관주처리

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

키토산이 과 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 과를 균이 혼입된 토양에 정식 후 매주 1회, 총 4회(4주) 처리하였고, 처리 종료 10일 후 결과를 관찰하였다.

(12) 고추탄저병 방제 포장시험

실험에 사용된 Nanover™ WA-PR-WB13R은 (주)BioPlus에서 제공되었고, 강원대학교의 포장에서 고추 탄저병에 대한 실험을 수행하였다. 2008년 포장 실험의 경우, 실험에 사용된 고추 품종 '건양홍'을 사용하여 무처리(Controrl 1), D사의 은나노액 처리(Control 2), 시판되는 화학약제 F 처리(Control 3), 각 농도별(10, 30, 50, 100ppm) 은 나노 용액을 각각 발병 4주 전부터 발병 후 3주 동안, 그리고 발병 직후 3주 동안 처리하여(Fig. 1) 발병 전 처리의 결과와 발병 직후 처리 결과를 비교 하였다. 발병 전 처리는 발병시점에서 4주 전부터 은 나노 용액을 매주 1회씩 총 8회 처리하였고, 발병후 처리는 발병시점을 기준으로 매주 1회 총 4회 처리한 다음, 1주 후에 그 결과를 평가하였으며, 실험은 2회 반복 수행되었다.

5월					6월				7월				8월						
2	9	16	23	30	6	13	20	27	4	11	18	25	1	8	15	29			
처리조건												발							
												병							
												일							
Control 1(무처리 구)												●	●	●	●	●	●	●	
발병 전후 은나노 10ppm 처리												●	●	●	●	●	●	●	
발병 전후 은나노 30ppm 처리												●	●	●	●	●	●	●	
발병 전후 은나노 50ppm 처리												●	●	●	●	●	●	●	
발병 전후 은나노 100ppm 처리												●	●	●	●	●	●	●	
Control 2(시판되는 D사 은나노 제품)												●	●	●	●	●	●	●	
Control 3(시판되는 화학약제 F)												●	●	●	●	●	●	●	
Control 1(무처리 구)																●	●	●	●
발병 후 은나노 10ppm 처리																●	●	●	●
발병 후 은나노 30ppm 처리																●	●	●	●
발병 후 은나노 50ppm 처리																●	●	●	●
발병 후 은나노 100ppm 처리																●	●	●	●
Control 2(시판되는 D사 은나노 제품)																●	●	●	●
Control 3(시판되는 화학약제 F)																●	●	●	●

결과 평가

Fig. 1. 고추 탄저병 병원균 방제를 위한 은 나노 용액의 처리 스케줄.(●: 처리일)

2009년 포장시험의 경우, 은나노 WA-PR-WB13R의 농도를 10ppm, 30ppm, 50ppm, 100ppm의 농도로 7일 간격으로 3회 처리하고, 처리 7일 후 감염 정도를 측정하였다(disease index: 0: 0%, 1: 10~20%, 2: 20~50%, 3: 50~70%, 4: 70%~). 실험은 2회 반복 수행되었으며, 측정값을 바탕으로 아래 공식을 이용하여 감염률을 산출 하였다.

$$\frac{\sum(\text{발병수} \times \text{계수})}{4N} \times 100 = \text{발병도}$$

N : 조사주수

**(13) Controlled release가 가능한 살균제 선발 시험**

2008년 제 1 협동 연구기관인 고려대에서 제작한 키토산을 코팅한 살균제 Tebuconazole을 이용하여 탄저병 병원균 및 기타 다른 식물병원성 곰팡이를 대상으로 Controlled release가 가능



한 작물 보호제를 선발 할 수 있는지 여부를 확인하기 위하여 포장시험을 3차년도에 수행 하였다. 본 실험에 사용한 chitosan코팅 화학약제는 고려대학교 생물 고분자 공학 연구실에서 탄저병에 효과가 있는 Tebuconazole을 chitosan M.W. 3,000Da와 30,000Da 두 가지 분자량으로 0.3%(W/V)와 0.1%(W/V)의 농도로 코팅하여 nano carrier system을 만들어 공급 받아 사용하였다. 약제의 평균 사이즈는 200nm(150~210nm)로 필요시 물에 희석하여 고추 탄저병이 걸리기 시작한 고추 포장에 7일 간격으로 1회, 2회, 3회 처리구를 지정하여 3반복 처리하여 발병 정도를 측정하였다(disease index: 0: 0%, 1: 10~20%, 2: 20~50%, 3: 50~70%, 4: 70%~). 측정값을 바탕으로 위의 공식을 이용하여 감염율을 산출 하였다.

#### (14) 은나노 처리가 식물체의 유전자 발현에 미치는 영향 조사

본 실험에 사용한 nano-silver용액은 WA-PR-WB13R(AT)을 사용하였으며, 포항공대 바이오 플러스(주)에서 1000ppm상태로 분양 받아 4℃에서 보관하면서 필요시 처리 농도에 따라 물에 희석하여 사용하였다. 은나노 처리가 식물체에 유전적 특성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 대상작물로 토마토를 선정하였다. 본 실험에 사용된 토마토(품종: 천명)는 과종상에 과종하여 2-3 주 동안 자란 후 토마토를 pot에 심어 은나노의 농도를 100ppm로 하여 처리직후, 1시간, 3시간, 6시간, 12시간 1일, 3일 5일, 7일, 9일 간격으로 토마토 잎을 채취하였다. 100ppm의 은나노액을 처리한 한 토마토에서 RNA 추출은 Trizol<sup>®</sup> 시약을 사용하여 제조사(Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)의 protocol에 따라 수행하였다. RT-PCR을 이용한 RNA 검출을 위하여 11.8μl master mix(10x Reaction Buffer 2μl, 25mM MgCl<sub>2</sub>, Deoxynucleotide Mix 2μl, Oligo dT 2μl, RNase inhibitor 1μl, AMV reverse transcriptase 0.8μl)와 RNase free water 8.2μl를 첨가하여 총 20μl로 조정하였다. PCR 수행은 95℃에서 10분간 predenaturation 한후 95℃/15s, 60℃/30s, 72℃/30s 씩 3단계로 45 cycles을 실행한 후 마지막으로 72℃에서 5분간 extension을 실시하였다. 증폭산물은 3% agarose gel을 사용하여 전기 영동하여 cDNA를 확인 하였다.

#### (15) 나노 코팅한 Difenoconazole의 오이흰가루병 방제 기작 연구

본 실험에 사용한 chitosan 코팅 화학약제는 고려대학교 생물 고분자 공학 연구실에서 탄저병에 효과가 있는 Difenoconazole을 chitosan M.W. 3,000Da와 30,000Da 두 가지 분자량으로 0.3%,W/V와 0.1%,W/V의 농도로 코팅하여 nano carrier system을 만들어 공급 받아 사용하였다. 약제의 평균 사이즈는 200nm(150~210nm)로 필요시 물에 희석하여 사용하였다. 실험은 강원도 춘천시 발산면에 위치한 오이 재배 하우스 포장에서 흰가루(powdery mildew) 병이 발병한 오이 잎에 코팅 화학 약제를 각각 1,000배, 1,500배로 희석하여 병반 부분에 직접 분사하였다. 1회 처리한 후 처리직후, 1일, 3일, 5일, 7일, 10일, 15일의 간격으로 sampling해 고정액에

고정시킨 후 코팅약제 Difenoconazole의 병원균 억제기작을 SEM(LV-SEM S-3500N Hitachi, Korea Basic Science Institute-Chuncheon)을 이용하여 관찰하였다.

#### (16) 나노 코팅한 Tebuconazole의 고추탄저병 병원균 방제 기작 연구

본 실험에 사용한 chitosan 코팅 화학약제는 고려대학교 생물 고분자 공학 연구실에서 탄저병에 효과가 있는 Tebuconazole을 chitosan M.W. 3,000Da와 30,000Da 두 가지 분자량으로 0.3%,W/V와 0.1%,W/V의 농도로 코팅하여 nano carrier system을 만들어 공급 받아 사용하였다. 약제의 평균 사이즈는 200nm(150~210nm)로 필요시 물에 희석하여 사용하였다. 본 실험은 고추 탄저병 병원균 *Colletotrichum gloeosporioides*을 기내에서 배양하여 균사 표면에 코팅 화학약제를 각각 1,000배, 1,500배로 희석하여 직접 분사하였다. 1회 처리한 후 처리 후 1일, 3일, 5일, 10일, 15일 간격으로 agar plug를 채취하여 sample을 고정액에 고정시킨 후 균사의 성장 변화를 SEM(LV-SEM S-3500N Hitachi, Korea Basic Science Institute-Chuncheon)을 이용하여 관찰하였다.

#### (17) 은나노 용액의 고추탄저병 병원균 방제기작 연구

은나노 용액의 고추탄저병 병원균 방제기작을 연구하기 위해 은나노 용액을 농도별로 처리한 후 SEM으로 관찰하였고, 은나노 용액 100ppm을 처리 한 후 시간 경과 별로 SEM을 관찰 하였다. 은나노 용액의 고추 탄저병 병원균 방제 기작을 연구하기 위해 은나노 용액 (WA-CV-WA13B)을 30ppm, 50ppm, 100ppm으로 희석하여 기내에서 배양한 *Colletotrichum gloeosporioides* 균사 표면에 은나노 용액을 직접 분사하였다. 처리한 은나노 용액이 고추 탄저병 *Colletotrichum gloeosporioides*균사의 생육에 미치는 영향을 관찰하기 위해 은나노 용액을 처리한 plate에서 은나노 용액의 농도와 시간 별로 agar plug를 sampling 하여 고정액에 고정시켜 SEM(LV-SEM S-3500N Hitachi, Korea Basic Science Institute-Chuncheon)을 이용하여 관찰하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### (1) 항균활성 검정 *in vitro* 실험

(가) 은 나노 용액 종류별 곰팡이 27개 균주에 대한 항균 활성 기내 검정

##### ① WA-CV-WA13B 용액

WA-CV-WA13B 용액을 첨가한 각각 PDA, MEA, CMA 배지표면(87×15mm Petri dish)에 27개의 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 성장 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 성장 억제를 보였다. 50ppm에서도 R-1과 S-2는 지속적인 억제 양상을 보였다(Table 5A). MEA배지의 경우 PDA배지에 비해 전체적으로 생육 억제가 잘 나타나지는 않으나 M-1, R-1, S-1, S-2, S-4에서는 생육 억제를 나타냈다(Table 5B). CMA배지에서는 S-2와 S-4에서 높은 생육 억제 효과를 나타냈다(Table 5C).

Table 5. Inhibitory effects of nano-silver WA-CV-WA13B against various plant pathogenic fungi on different media *in vitro*

A. PDA media (cm/plate)

Conc. <sup>1</sup>	CT	10ppm					25ppm					50ppm					100ppm					
		R <sup>2</sup>	2w <sub>3</sub>	3w	4w	5w	6w	2w	3w	4w	5w	6w	2w	3w	4w	5w	6w	2w	3w	4w	5w	6w
Fungi																						
A-1	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	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	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	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	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	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	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	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	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	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	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	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	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	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	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	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	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	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	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	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	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	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	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	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	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	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	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	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 <sup>1</sup> Fungi	CT R <sup>2</sup>	10ppm					25ppm					50ppm					100ppm				
		2w <sub>3</sub>	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. <sup>1</sup> Fungi	CT R <sup>2</sup>	10ppm					25ppm					50ppm					100ppm				
		2w <sub>3</sub>	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

② WA-AT-WB13R 용액

은 나노 용액 WA-AT-WB13R에 대한 각 배지별(PDA, MEA, CMA) 성장 억제 효과를 나타냈다(Table 6). 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 6A). WA-AT-WB13R 용액에서도 PDA배지에 비해 MEA배지에서는 억제 효과가 낮아지는 것으로 나타났다(Table 6B). WA-AT-WB13R 용액이 처리된 CMA배지에서는 S-1, S-2, S-4에서 높은 억제 효과를 나타냈다(Table 6C).

Table 6. Inhibitory effects of nano-silver WA-AT-WB3R against various plant pathogenic fungi on different media *in vitro*

A. PDA media (cm/plate)

Conc. <sup>1</sup> Fungi	CTR <sup>2</sup>	10ppm					25ppm					50ppm					100ppm				
		2w <sup>3</sup>	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. <sup>1</sup> Fungi	CTR <sup>2</sup>	10ppm					25ppm					50ppm					100ppm				
		2w <sup>3</sup>	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	<b>1.3</b>	<b>1.5</b>	<b>1.7</b>	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. <sup>1</sup> Fungi	CTR <sup>2</sup>	10ppm					25ppm					50ppm					100ppm				
		2w <sup>3</sup>	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

③ WA-PR-WB13R 용액

WA-PR-WB13R 용액이 첨가된 PDA, MEA, CMA 배지별 곰팡이 생육 억제 효과를 나타냈다 (Table 7). WA-CV-WA13B와 비슷한 억제 효과를 나타냈다. PDA 배지에서 A-1과 C-6을 제외하고 모든 곰팡이가 100ppm에서 효과를 보였다(Table 7A). WA-PR-WB13R이 첨가된 MEA배지에서의 생장 억제 효과를 나타냈다. 앞에 다른 용액에서와 같이 PDA배지에 비해 억제 효과가 낮았다(Table 7B). WA-PR-WB13R이 첨가된 CMA배지에서 S-2와 S-4에서 높은 생장 억제 효과를 나타냈다(Table 7C).

Table 7. Inhibitory effect of nano-silver WA-PR-WB13R against various plant pathogenic fungi on different media *in vitro*

A. PDA media (cm/plate)

Conc. <sup>1</sup> Fungi	CTR <sup>2</sup>	10ppm					25ppm					50ppm					100ppm				
		2w <sup>3</sup>	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. <sup>1</sup> Fungi	CTR <sup>2</sup>	10ppm					25ppm					50ppm					100ppm				
		2w <sup>3</sup>	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. <sup>1</sup> Fungi	CTR <sub>2</sub>	10ppm					25ppm					50ppm					100ppm				
		2w <sub>2</sub>	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

(나) 은 나노 용액 종류별 세균에 대한 살균활성 기내 검정

① WA-CV-WA13B 용액

WA-CV-WA13B 용액을 첨가한 각각 YPG, YGC, NA, MNA 액체배지에 10개의 세균을 접종하여 24h 진탕배양(30°C, 170 rpm) 후  $1.0 \times 10^5$  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-WA13B 용액 10ppm에서 Control에 비해 C-1을 제외하고는 낮은 성장 억제 효과를 나타냈다. P-2와 P-5에서는 10ppm에서 전혀 효과가 나타나지 않았다(Table 8). WA-CV-13B 용액이 처리된 각 배지에서의 세균의 성장 억제 효과 결과 이다(Fig. 2) 25ppm부터 모든 세균에 대해 억제 효과가 나타났다. C-1이 10ppm에서 높은 억제 효과를 보였다.

Table 8. *In vitro* inhibitory effects of nano-silver WA-CV-WA13B against various plant pathogenic bacteria.

Bacteria	Colony number/plate at $1.0 \times 10^5$ 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

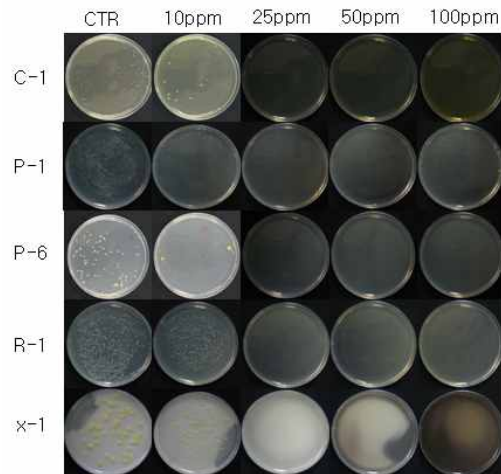


Fig. 2. *In vitro* inhibitory effects of nano-silver WA-CV-WA13R against various plant pathogenic bacteria. C-1; *Clavibacter michiganensis*, P-1; *Pseudomonas cichorii*, P-6; *Pseudomonas syringae*, R-1; *Ralstonia solanacearum*, and X-1; *Xanthomonas campestris*.

② 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 9). WA-AT-WB13R 용액은 P-6에 대해 10ppm에서 효과를 보였으며, 25ppm에서 WA-CV-WA13B 용액과 같이 모든 세균의 생장을 억제하였다(Fig. 3).

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

Bacteria	Colony number/plate at $1.0 \times 10^5$ 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

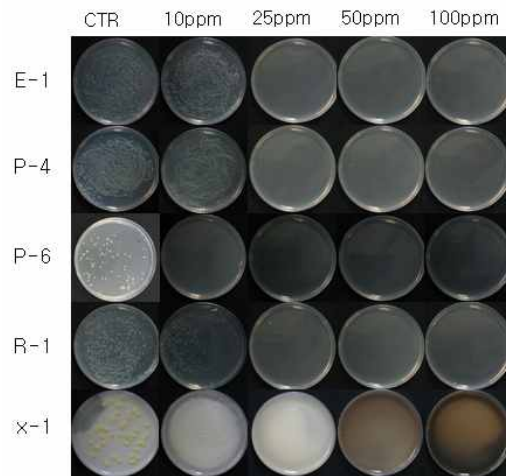


Fig. 3. *In vitro* inhibitory effects of WA-AT-WA13R against various plant pathogenic bacteria. E-1; *Erwinia rhapontici*, P-4; *Pseudomonas marginalis*, P-6; *Pseudomonas syringae*, R-1; *Ralstonia solanacearum*, and X-1; *Xanthomonas campestris*.

### ③ WA-PR-WB13R용액

WA-PR-WB13R용액이 각 농도별로 첨가된 각 고체배지에서 세균의 colony 계수 결과이다 (Table 10). 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(Fig. 4). P-5, P-6과 X-2에서 높은 항균효과를 나타냈다. 25ppm에서는 모두 자라지 않았다.

Table 10. *In vitro* inhibitory effects of nano-silver WA-PR-WB13R against various plant pathogenic bacteria.

Bacteria	Colony number/plate at $1.0 \times 10^5$ 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

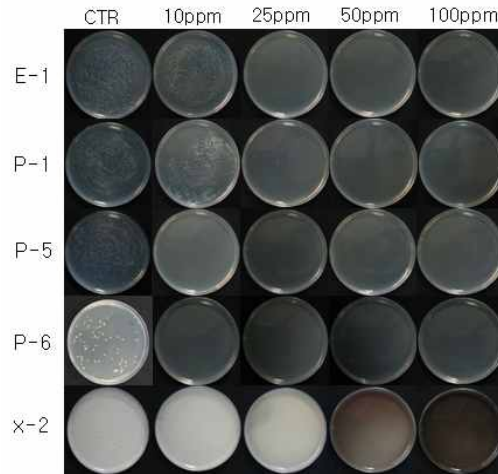


Fig. 4. *In vitro* inhibitory effects of WA-PR-WB13R against various plant pathogenic bacteria. E-1; *Erwinia rhapontici*, P-1; *Pseudomonas cichorii*, P-5; *Pseudomonas viridiflava*, P-6; *Pseudomonas syringae*, and X-2; *Xanthomonas campestris*.

## (2) 은 나노 용액 단독 처리 시 선발된 곰팡이의 생장억제 검정

### (가) 선발된 곰팡이 균주의 균사생장 억제 검정

#### ① 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 보여지며, 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 11). 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 나



타냈다. 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 성분 에 따라 나타나는 차이로 보여진다. 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. 5).

Table 11. Effects of nano-silver WA-CV-WA13B on the fungal growth on different media *in vitro*

		Inhibition rate (%)														
Media		PDA					MEA					CMA				
Fungi	Conc. <sup>1</sup>	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		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)

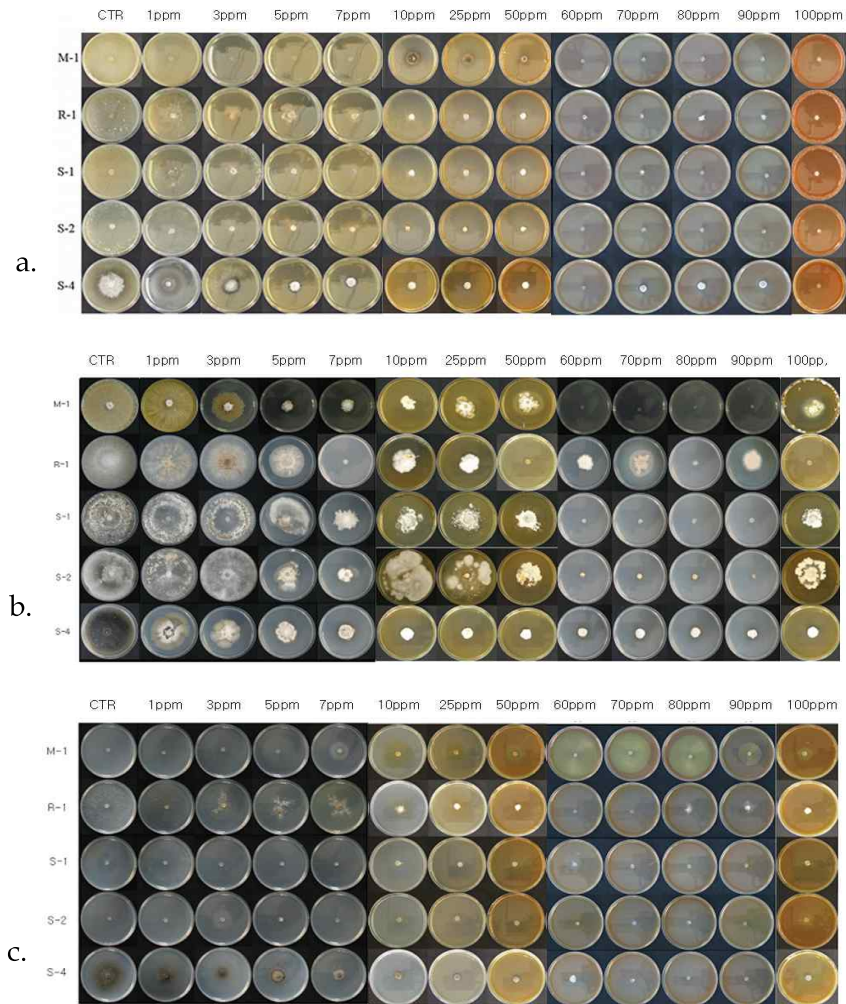


Fig. 5. *In vitro* inhibitory effects of WA-CV-WA13B against various fungi on different media. a; PDA media, b; MEA media, c; CMA media, M-1; *Monosporascus cannonballus*, R-1; *Rhizotonia solani*, S-1; *Sclerotinia minor*, S-2; *Sclerotinia sclerotiorum*, and S-4; *Stemphylium solani*.

## ② 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 12).

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%, MEA배지는 98%, CMA배지 5ppm에서 78% 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. 6). 배지마다 효과가 다르게 나타났으며, 대체적으로 10ppm에서 효과가 나타났다.

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

		Inhibition rate (%)														
Media		PDA					MEA					CMA				
Fungi	Conc. <sup>1</sup>	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		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)

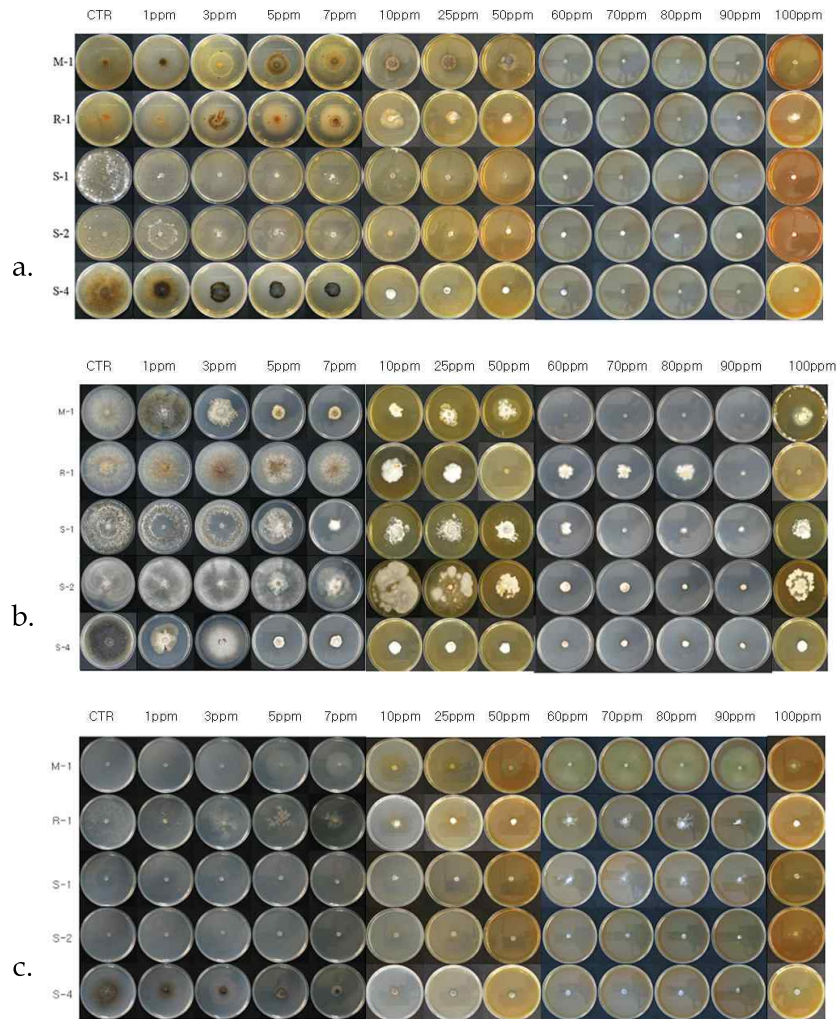


Fig. 6. *In vitro* inhibitory effects of WA-AT-WB13R against various fungi on different media. a; PDA media, b; MEA media, c; CMA media, M-1; *Monosporascus cannonballus*, R-1; *Rhizotonia solani*, S-1; *Sclerotinia minor*, S-2; *Sclerotinia sclerotiorum*, S-4; *Stemphylium solani*, and S-4; *Stemphylium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

### ③ WA-PR-WB13R 용액

WA-PR-WB13R 용액이 첨가된 각 배지에서의 억제율을 나타냈다(Table 13). 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%d 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. 7). PDA 배지와 MEA 배지는

7ppm부터 효과가 나타났고, CMA 배지는 10ppm부터 억제 효과가 나타났다.

Table 13. Effects of nano-silver WA-PR-WB13R on the fungal growth on different media *in vitro*

		Inhibition rate (%)														
Media		PDA					MEA					CMA				
Fungi	Conc. <sup>1</sup>	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)



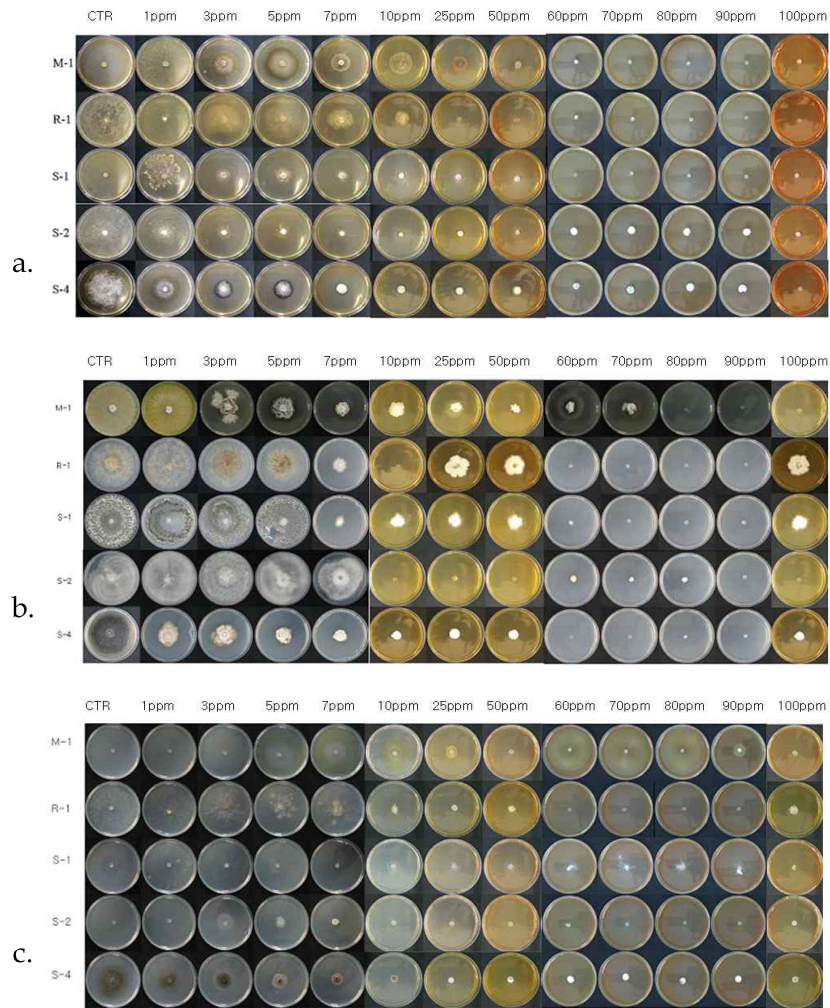


Fig. 7. *In vitro* inhibitory effects of WA-PR-WB13R against various fungi on different media. a; PDA media, b; MEA media, c; CMA media, M-1; *Monosporascus cannonballus*, R-1; *Rhizoctonia solani*, S-1; *Sclerotinia minor*, S-2; *Sclerotinia sclerotiorum*, and S-4; *Stemphylium solani*.

(나) 선발된 곰팡이 균주의 균핵 생성 억제 검증

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.

① WA-CV-WA13B 용액

A. *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 14). MEA배지에서 낮은 억제효과를 나타냈으며, PDA와 MEA배지에서는 3ppm부터 억제효과를 보였다(Fig. 8). 배지마다 다른 억제 효과를 나타냈다. 은 나노 용액에서 균핵도 억제 효과를 나타냈다.

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

		Inhibition rate (%)												
Conc. <sup>1</sup>	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)

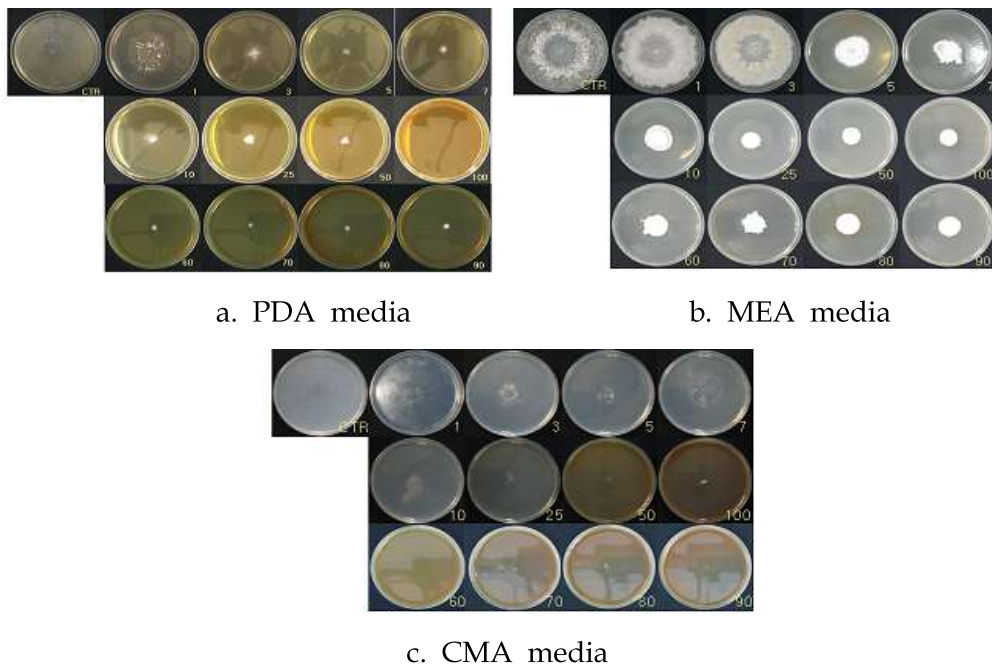


Fig. 8. *In vitro* inhibitory effects of WA-CV-WA13B against sclerotium germination of *Sclerotinia minor* on different media.

B. *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 15). 배지마다 다른 억제 효과를 나타냈지만 MEA 배지와 CMA 배지에서는 3ppm 혹은 그 이상의 농도에서 균핵 발아억제 효과를 나타냈다 (Fig. 9).

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

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

1; Concentration (ppm)

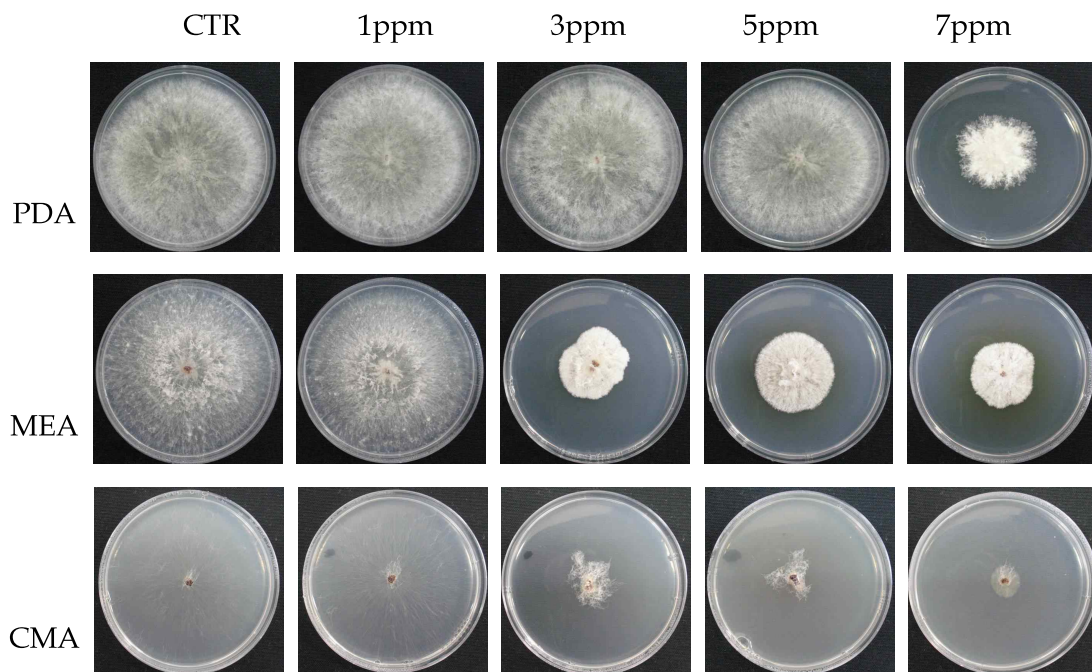


Fig. 9. *In vitro* inhibitory effects of WA-CV-WA13B against sclerotium germination of *Rhizoctonia solani* on different media.



C. *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 16). 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. 10).

Table 16. Effects of nano-silver WA-CV-WA13B against sclerotium germination of *Sclerotinia sclerotiorum* on three different medium.

		Inhibition rate (%)												
Conc. <sup>1</sup>		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)

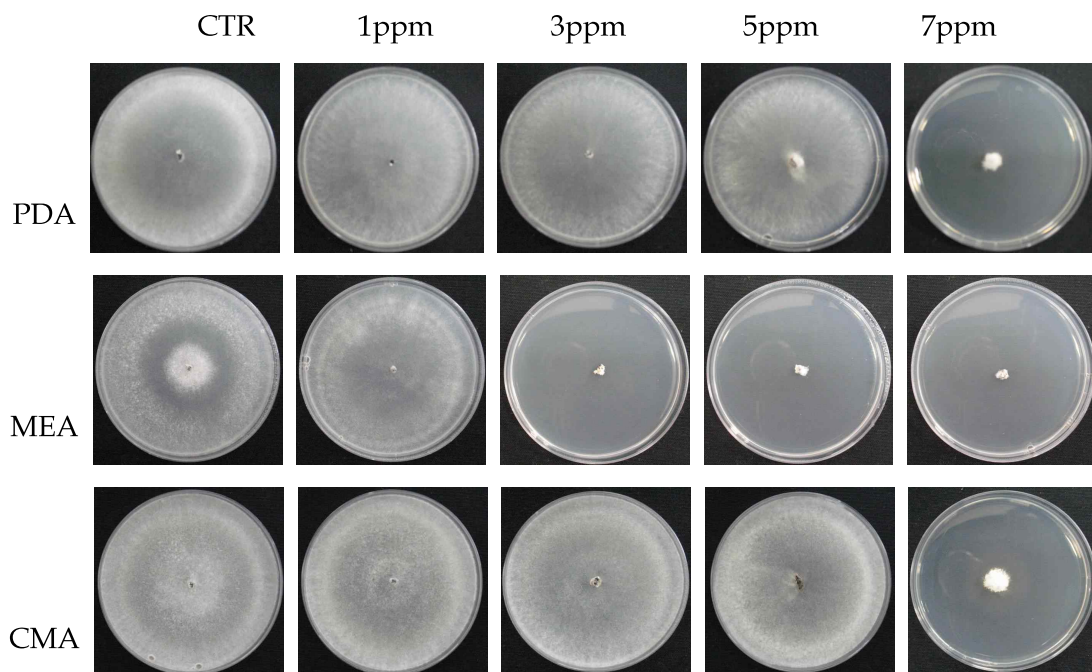


Fig. 10. *In vitro* inhibitory effects of WA-CV-WA13B against sclerotium germination of *Sclerotinia sclerotiorum* on different media.

② WA-AT-WB13R 용액

A. *Sclerotinia minor*

WA-AT-WB13R 용액이 첨가된 PDA, MEA, CMA배지별 균핵에 생장 억제효과를 나타내고 있다. PDA배지에서는 25ppm에서 80% 억제율을 보였고 100ppm에서 98% 억제율을 보였다. MEA배지에서는 100pp에서 81%, CMA배지에서는 90ppm에서 99% 억제율을 보였다(Table 17). PDA와 CMA배지에서 3ppm부터 억제효과가 나타나고, MEA는 7ppm부터 억제효과가 나타났 다(Fig. 11).

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

Conc. <sup>1</sup> Media	Inhibition rate (%)												
	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)

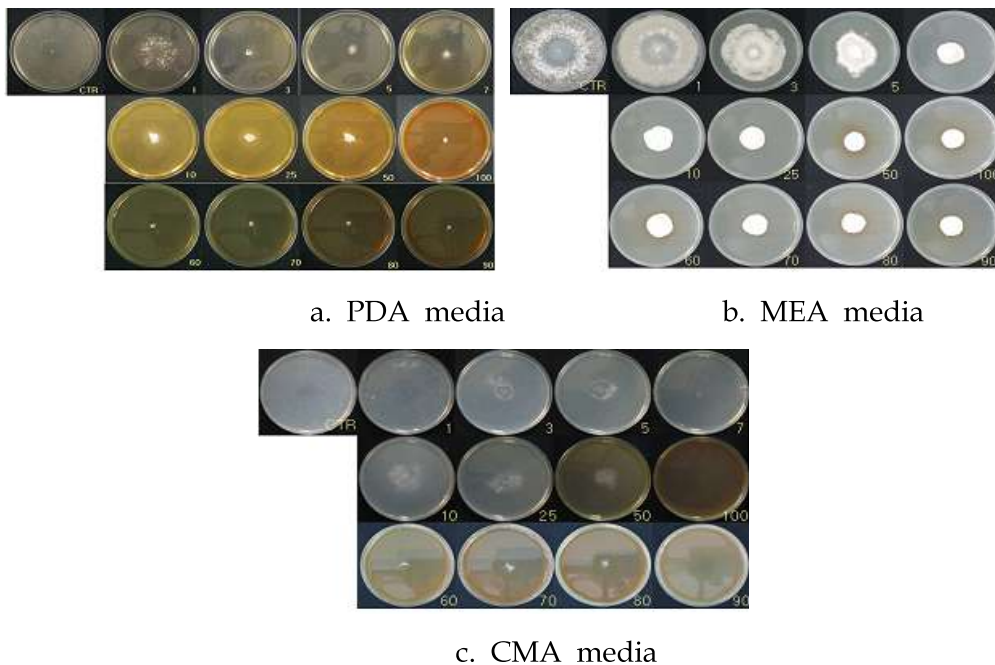


Fig. 11. *In vitro* inhibitory effects of WA-AT-WB13R against sclerotium germination of *Sclerotinia minor* on different media.

B. *Rhizoctonia solani*

WA-AT-WA13B 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 18). 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. 12).

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

		Inhibition rate (%)											
Conc. <sup>1</sup> 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)

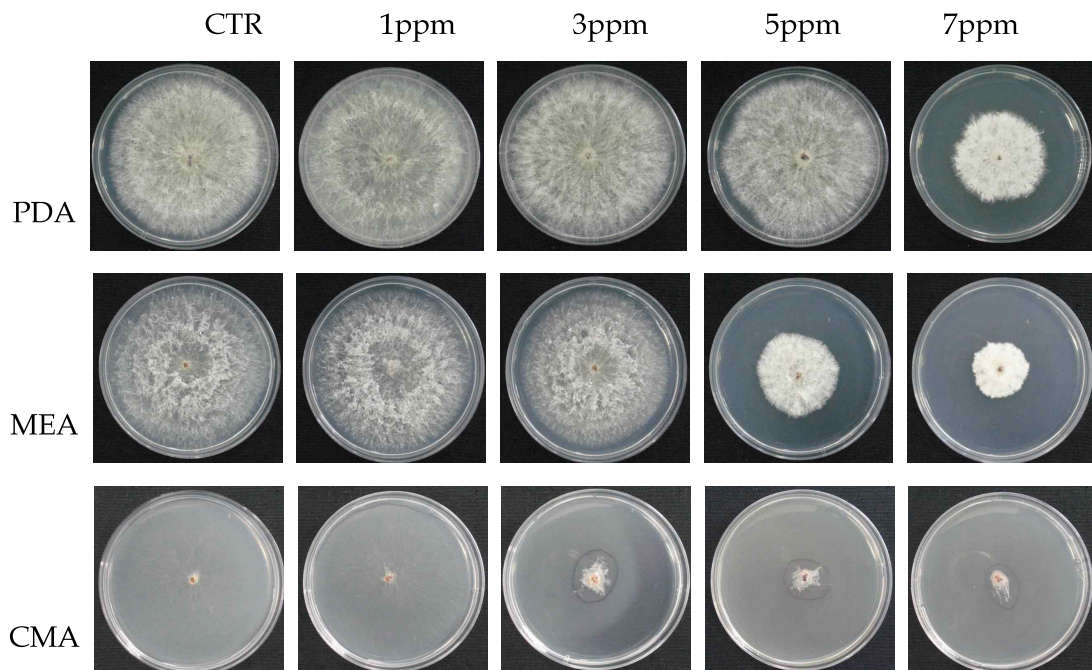


Fig. 12. *In vitro* inhibitory effects of WA-AT-WA13B against sclerotium germination of

*Rhizoctonia solani* on different media.

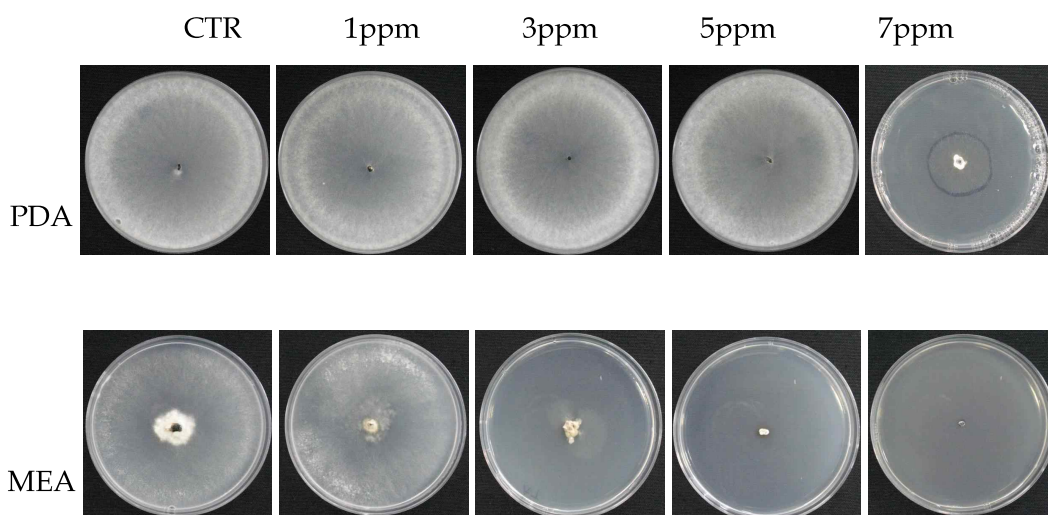
C. *Sclerotinia sclerotiorum*

WA-AT-WA13B 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 못했으나, 3, 5, 7ppm 농도조건은 100% 균핵의 발아를 억제하였다(Table 19). 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. 13).

Table 19. Effects of nano-silver WA-AT-WB13R against sclerotium germination of *Sclerotinia sclerotiorum* on three different medium.

Conc. <sup>1</sup> Media	Inhibition rate (%)												
	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)





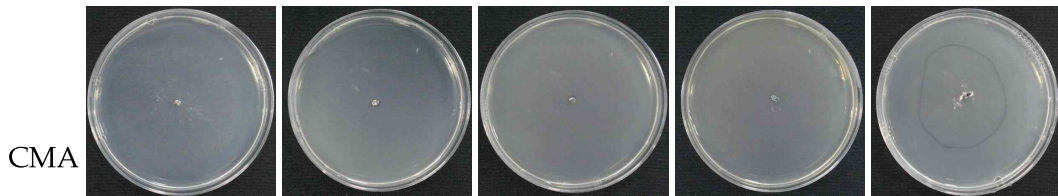


Fig. 13. *In vitro* inhibitory effects of WA-AT-WA13B against sclerotium germination of *Sclerotinia sclerotiorum* on different media.

③ WA-PR-WB13R 용액

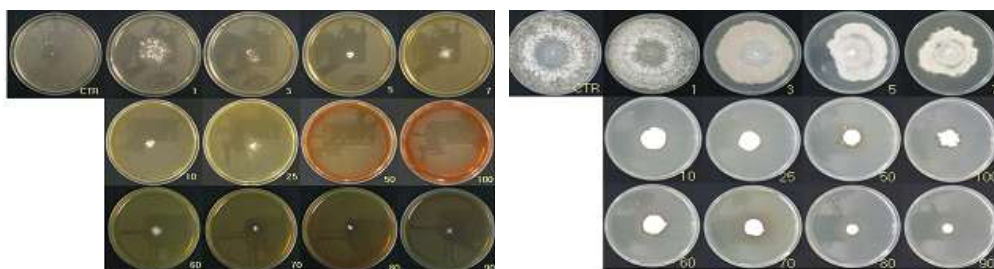
A. *Sclerotinia minor*

WA-PR-WB13R 용액이 첨가된 PDA, MEA, CMA배지에 각 농도별 균핵 생장 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 20). PDA배지에서 3ppm부터 생육 억제 효과가 나타났다. MEA배지는 10ppm부터 생육 억제 효과가 나타났다. CMA배지에서는 5ppm부터 생육 억제 효과가 나타났다(Fig. 9). 균핵 에서는 3가지 용액에서 많은 차이는 없으나, PDA와 CMA배지에서 대체적으로 좋은 억제율을 나타냈고, MEA배지에서 낮은 억제율을 나타냈다.

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

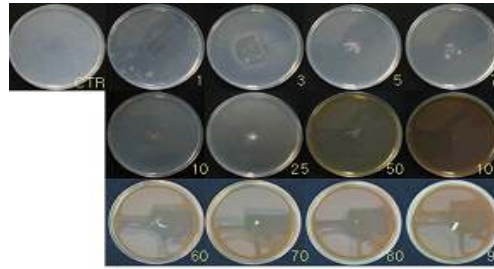
Conc. <sup>1</sup> Media	Inhibition rate (%)												
	CTR	1	3	5	7	10	25	50	60	70	80	90	100
PDA	0	26	61	69	62	81	84	95	89	86	87	85	100
MEA	0	1	2	12	29	75	80	79	79	81	79	81	78
CMA	0	0	35	47	59	86	68	82	93	86	86	87	66

1; Concentration (ppm)



a. PDA media

b. MEA media



c. CMA media

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

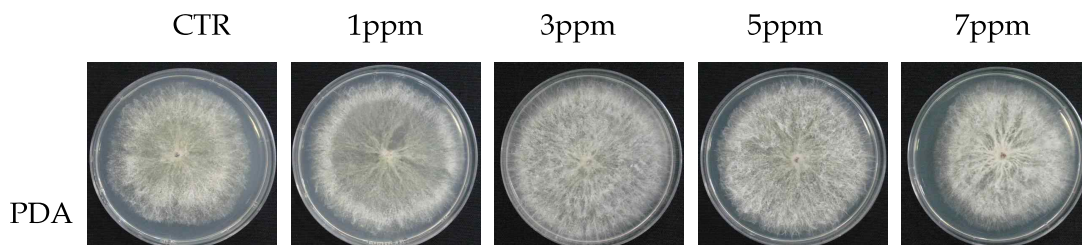
B. *Rhizoctonia solani*

WA-PR-WA13B 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 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 비교적 높은 혹은 매우 높은 균핵의 발아억제 효과를 나타냈다(Fig. 15).

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

Conc. <sup>1</sup> Media	Inhibition rate (%)												
	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)



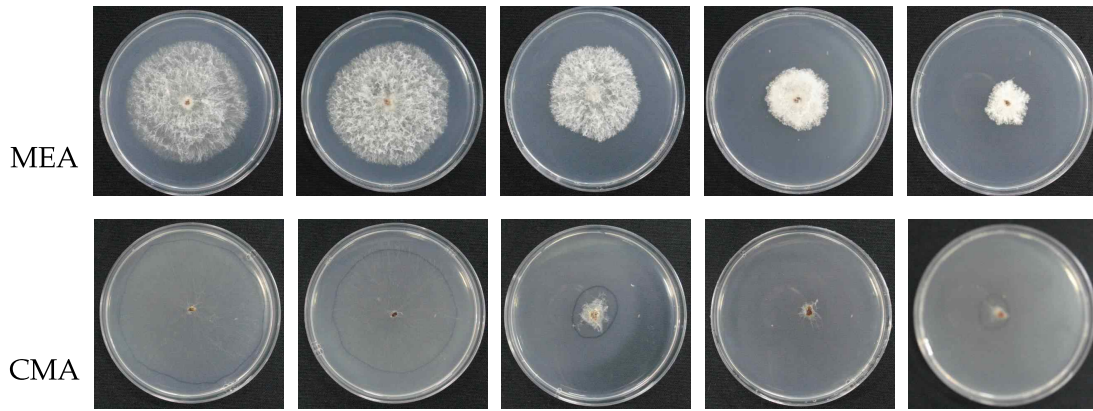


Fig. 15. *In vitro* inhibitory effects of WA-PR-WA13B against sclerotium germination of *Rhizoctonia solani* on different media.

*C. Sclerotinia sclerotiorum*

WA-PR-WA13B 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 성장을 거의 억제하지 못했으나, 3, 5, 7ppm 농도조건에서는 100% 균핵의 발아를 억제하였다(Table 22). 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. 16).

Table 22. Effect of nano-silver WA-PR-WB13R against sclerotium germination of *Sclerotinia sclerotiorum* on three different medium.

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

1; Concentration (ppm)

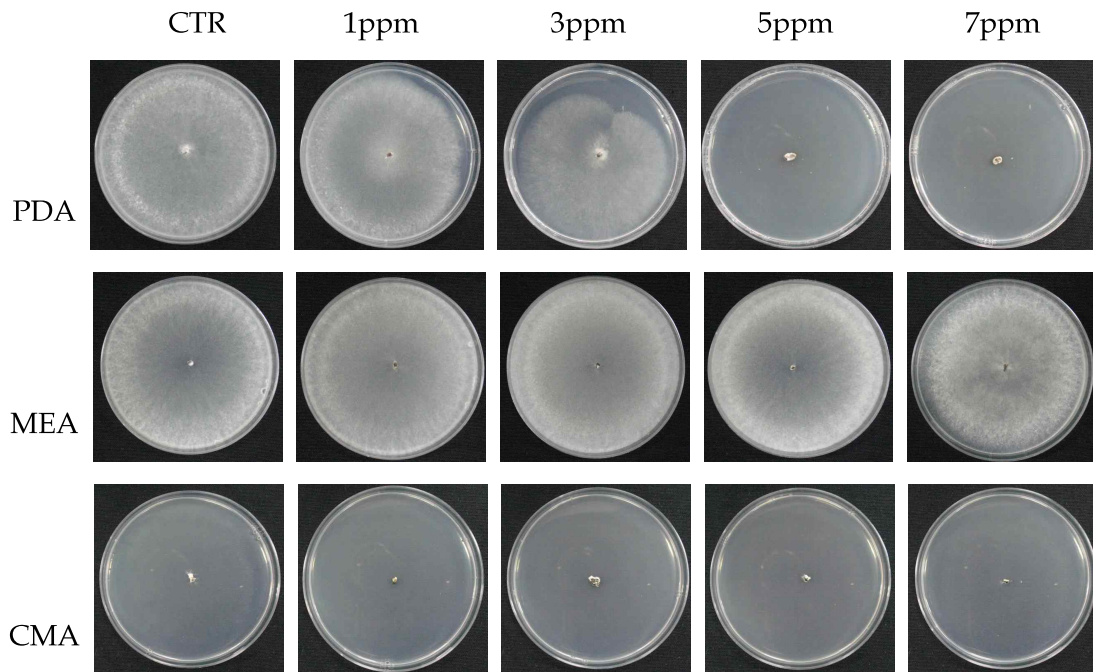


Fig. 16. *In vitro* inhibitory effects of WA-PR-WA13B against sclerotium germination of *Sclerotinia sclerotiorum* on different media.

### (3) 은 나노 용액 혼합 처리 시 선발된 곰팡이의 성장 억제 검정

#### (가) 선발된 곰팡이 균주의 균사 성장 억제 검정

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 생장에 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.

#### ① WA-CV-WA13B와 WA-AT-WB13R 혼합용액

5균주에 대해 WA-CV-WA13B와 WA-AT-WB13R용액을 첨가하여 각 배지에 농도별로 치상하여 성장 억제율을 나타냈다(Table 23). M-1에서는 PDA, CMA 배지에서 50ppm에서 100% 억제율을 나타냈고, MEA 배지에서는 10ppm에서 78% 억제율을 나타냈다. R-1은 PDA, CMA 배



지 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-WB13R용액이 WA-CV-13B용액보다 M-1에 대해 CMA배지에서 더 좋은 효과를 나타냈기 때문에 혼합시, CMA배지에서 더 좋은 효과를 나타낸 것으로 생각되어진다. WA-CV-WA13B와 WA-AT-WB13R용액이 첨가된 각배지에서 농도별 생육 억제율을 나타내고 있다(Fig. 17). PDA 배지와 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 23. Inhibitory effects of nano-silver WA-CV-WA13B and WA-AT-WB13B combination against fungal growth on different media *in vitro*

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

1; Concentration (ppm)

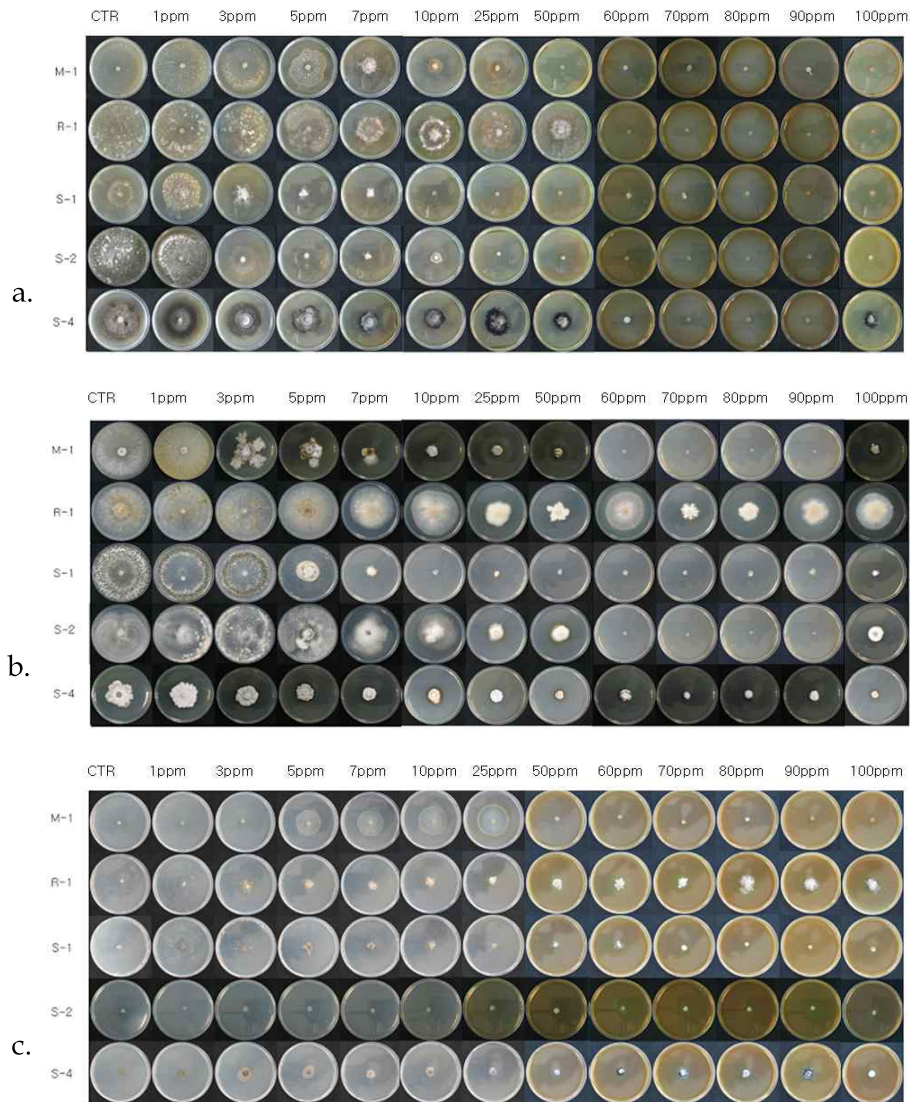


Fig. 17. *In vitro* inhibitory effects of WA-CV-WA13B and WA-AT-WB13R combination against various plant pathogenic fungi on different media. a; PDA media, b; MEA media, c; CMA media, M-1; *Monosporascus cannonballus*, R-1; *Rhizotonia solani*, S-1; *Sclerotinia minor*, S-2; *Sclerotinia sclerotiorum*,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

## ② WA-CV-WA13B와 WA-PR-WB13R 혼합용액

WA-CV-WA13B와 WA-PR-WB13R 용액이 첨가된 각 배지에 대한 성장 억제율을 나타내고 있다 (Table 24). 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 배지

에서는 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 나타냈다. WA-CV-WA13B와 WA-PR-WB13R용액이 처리된 각 배지에서 나타난 결과이다. 대체로 낮은 억제 효과를 나타내고 있다. M-1의 경우 CMA배지 고농도에서도 성장 억제가 낮은 것이 관찰되었다. R-1도 대체로 낮은 억제효과를 나타냈다(Fig. 18)

Table 24. 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. <sup>1</sup>	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)

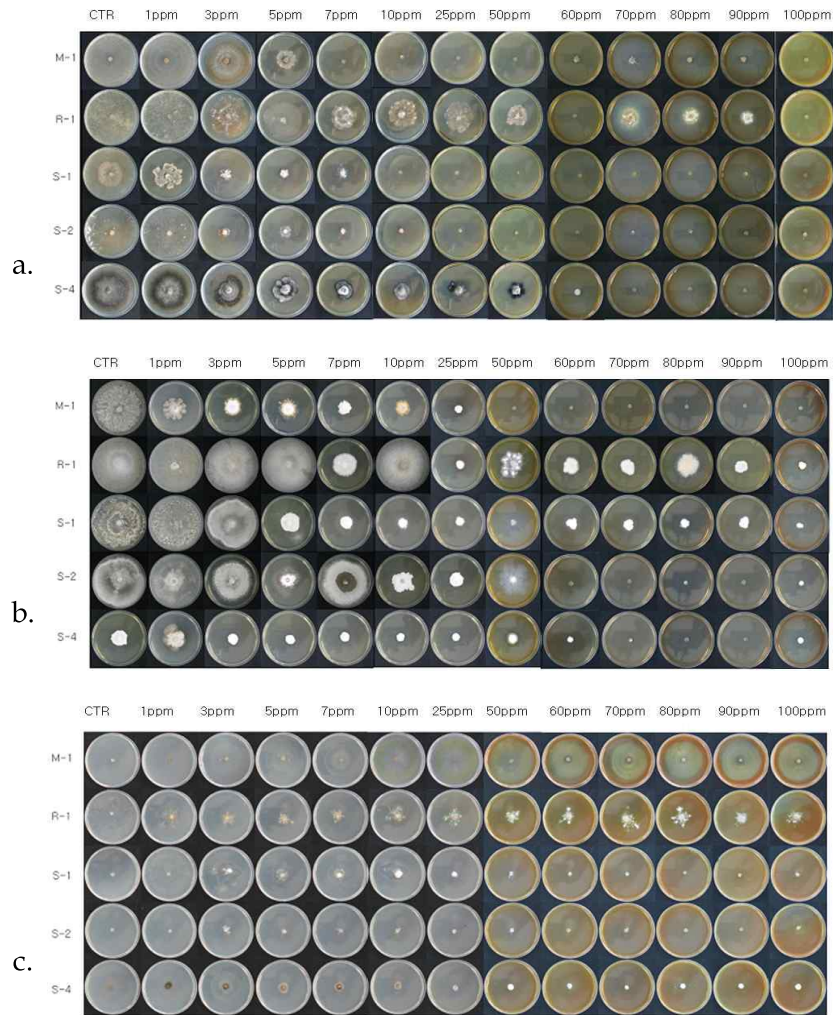


Fig. 18. *In vitro* inhibitory effects of WA-CV-WA13B and WA-PR-WB13R combination against various plant pathogenic fungi on different media. a; PDA media, b; MEA media, c; CMA media, M-1; *Monosporascus cannonballus*, R-1; *Rhizotonia solani*, S-1; *Sclerotinia minor*, S-2; *Sclerotinia sclerotiorum*, and S-4; *Stemphylium solani*.

### ③ WA-AT-WB13R와 WA-PR-WB13R 혼합용액

WA-AT-WB13R와 WA-PR-WB13R용액이 첨가된 각 배지에 농도별 성장 억제율을 나타내었다 (Table 25). 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-WB13R

와 WA-PR-WB13R용액이 처리된 각 배지별 억제 효과 결과이다(Fig. 19). PDA 배지가 다른 배지에서 좋은 억제효과를 나타내고 있으나, M-1과 R-1은 전체적으로 좋은 효과를 나타내지는 않는다. M-1의 경우 CMA배지에서 고농도 임에도 불구하고 낮은 억제율을 나타내었다. R-1도 낮은 억제율을 보이고 있다.

Table 25. 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. <sup>1</sup>	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)



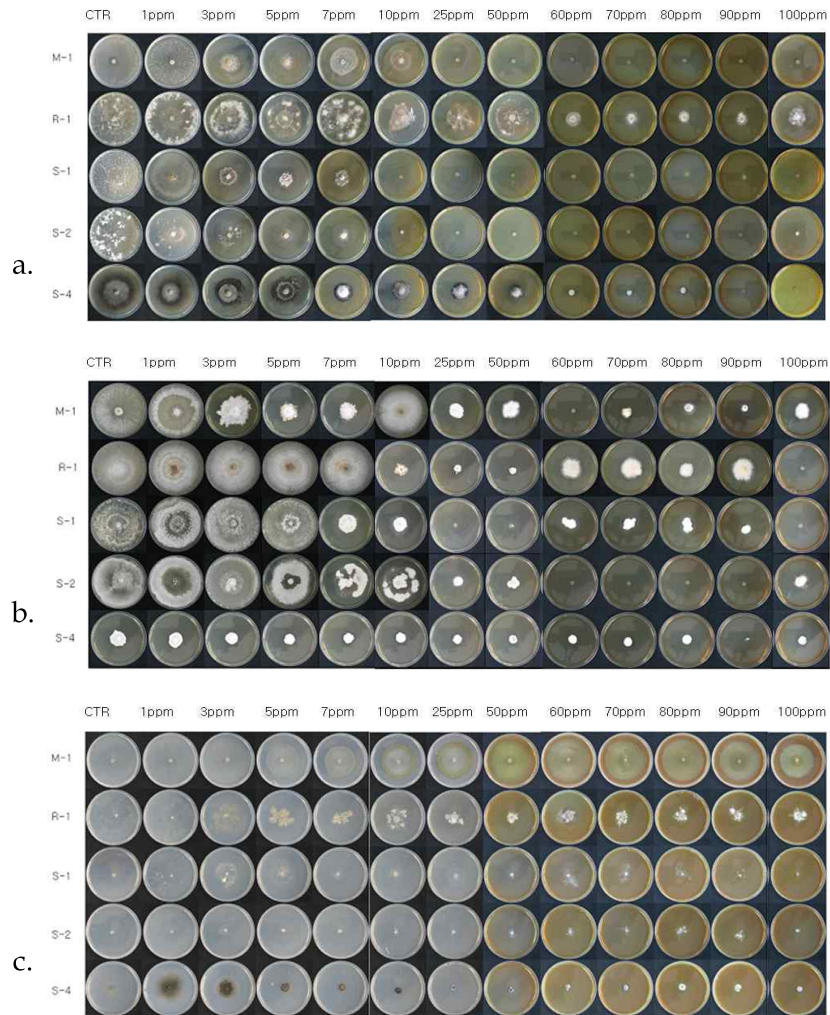


Fig. 19. *In vitro* inhibitory effects of WA-AT-WB13R and WA-PR-WB13R combination against various plant pathogenic fungi on different media. a; PDA media, b; MEA media, c; CMA media, M-1; *Monosporascus cannonballus*, R-1; *Rhizotonia solani*, S-1; *Sclerotinia minor*, S-2; *Sclerotinia sclerotiorum*,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

④ WA-CV-WA13B, WA-AT-WB13R와 WA-PR-WB13R 혼합용액

WA-CV-WA13B, WA-AT-WB13R와 WA-PR-WB13R용액을 첨가된 각 배지에서 은 나노 농도별 생육 억제율을 나타내고 있다(Table 26). 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% 억제

을 나타냈다. WA-CV-WA13B, WA-AT-WB13R와 WA-PR-WB13R용액이 혼합된 각 배지에서 나타난 성장 억제 결과이다(Fig. 20). 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 26. 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. <sup>1</sup>	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)



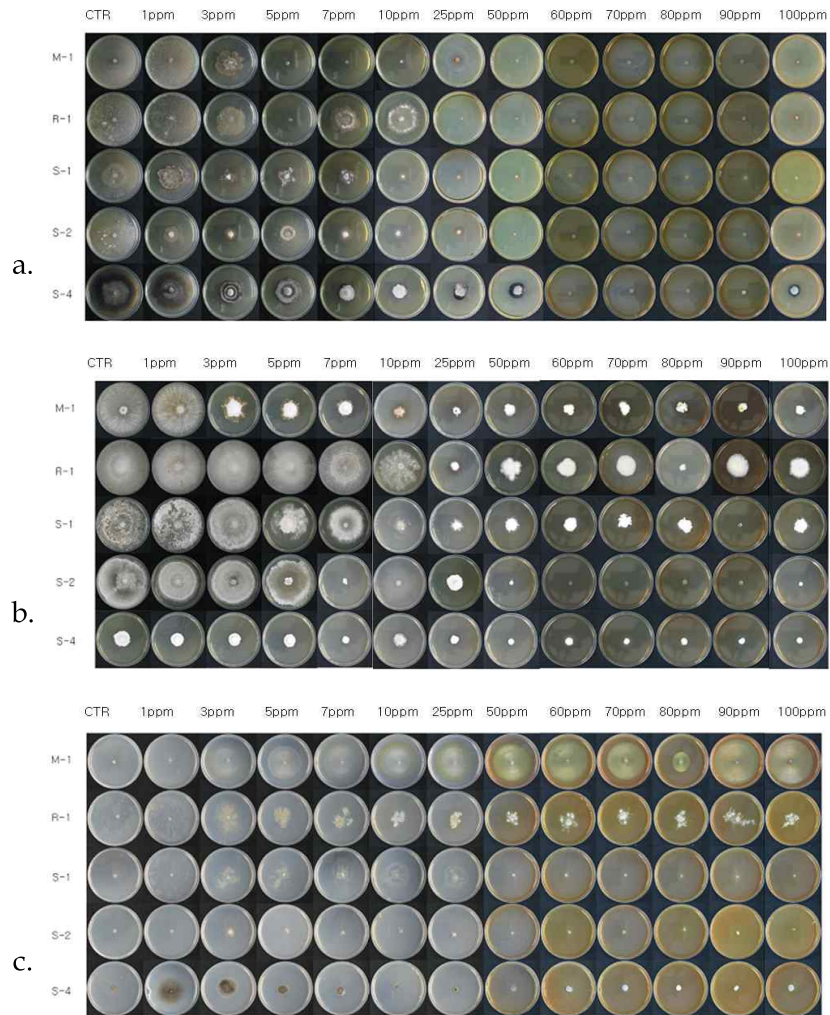


Fig. 20. *In vitro* inhibitory effects of WA-CV-WA13B, WA-AT-WB13R and WA-PR-WB13R combination against various plant pathogenic fungi on different media. a; PDA media, b; MEA media, c; CMA media, M-1; *Monosporascus cannonballus*, R-1; *Rhizotonia solani*, S-1; *Sclerotinia minor*, S-2; *Sclerotinia sclerotiorum*, and S-4; *Stemphylium solani*.

## (나) 선발된 곰팡이 균주의 균핵 성장 억제 검정

### ① WA-CV-WA13B와 WA-AT-WB13R 혼합용액

#### A. *Sclerotinia minor*

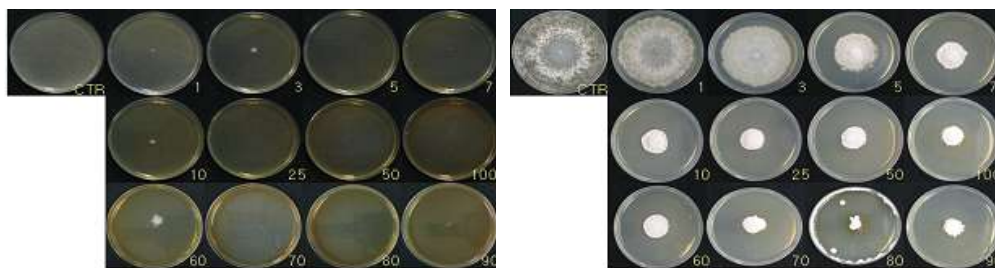
WA-CV-WA13B와 WA-AT-WB13R용액이 첨가된 각 배지별 농도별 성장 억제율을 나타내고 있다. PDA배지 25ppm에서 82% 억제율을 보였고, 100ppm에서 91% 억제율을 나타냈다. MEA 배지 50ppm에서 80% 억제율을 나타냈고, 90ppm에서 82% 억제율을 나타냈다. CMA배지는

50ppm에서 81% 억제율을 나타냈고, 100ppm에서 84% 억제율을 나타냈다(Table 27). WA-CV-WA13B와 WA-AT-WB13R용액이 첨가된 각 배지와 농도별 성장 억제효과를 보여주고 있다(Fig. 21). 저농도에서 PDA배지와 CMA배지가 MEA배지 보다 더 좋은 억제효과를 나타낸다.

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

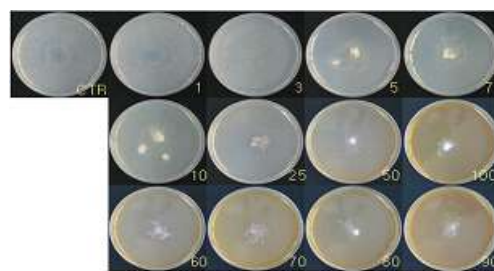
Conc. <sup>1</sup> Media	Inhibition rate (%)												
	CTR	1	3	5	7	10	25	50	60	70	80	90	100
PDA	0	5	64	64	65	79	82	73	74	88	85	85	91
MEA	0	1	1	46	45	71	75	80	79	78	75	82	74
CMA	0	0	18	76	73	74	58	81	82	58	78	78	84

1; Concentration (ppm)



a. PDA media

b. MEA media



c. CMA media

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

② WA-CV-WA13B와 WA-PR-WB13R 혼합용액

A. *Sclerotinia minor*

WA-CV-WA13B와 WA-PR-WB13R용액을 각 배지에 첨가 후 억제율은 나타내고 있다(Table 28). PDA배지 25ppm에서 80% 억제율을 나타내고 100ppm에서 91%억제율을 나타냈다. MEA배지는 25ppm에서 73% 억제율을 나타내고 높은 농도에서도 높은 억제율을 나타내지 않았다. CMA배지의 경우 10ppm에서 82% 억제율을 나타냈고, 90ppm에서 91% 억제율을 나타냈다. WA-CV-WA13B와 WA-PR-WB13R용액이 첨가된 각 배지와 농도별 생장 억제 결과를 나타내고 있다(Fig. 22). PDA배지와 CMA배지에서 더 좋은 억제효과를 나타냈다.

Table 28. 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. <sup>1</sup> 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)

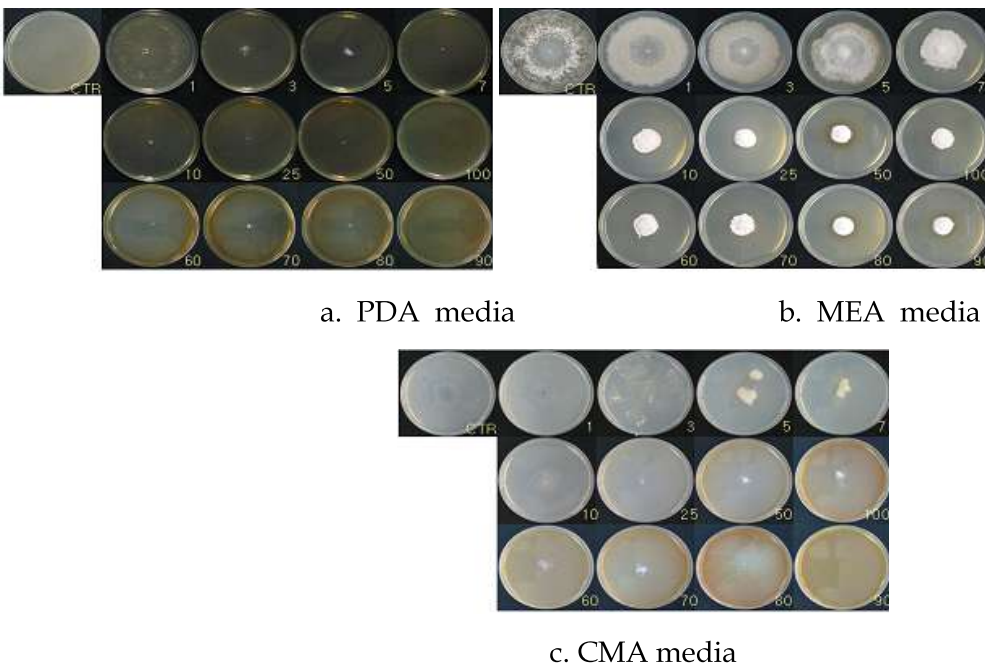


Fig. 22. *In vitro* inhibitory effects of WA-CV-WA13B and WA-PR-WB13R combination against sclerotium germination of *Sclerotinia minor* on different media.

③ WA-AT-WB13R와 WA-PR-WB13R 혼합용액

A. *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 29). 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. 23). 5ppm부터 25ppm까지는 PDA배지에서 좋은 억제 효과를 보여주었다.

Table 29. 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. <sup>1</sup> 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)

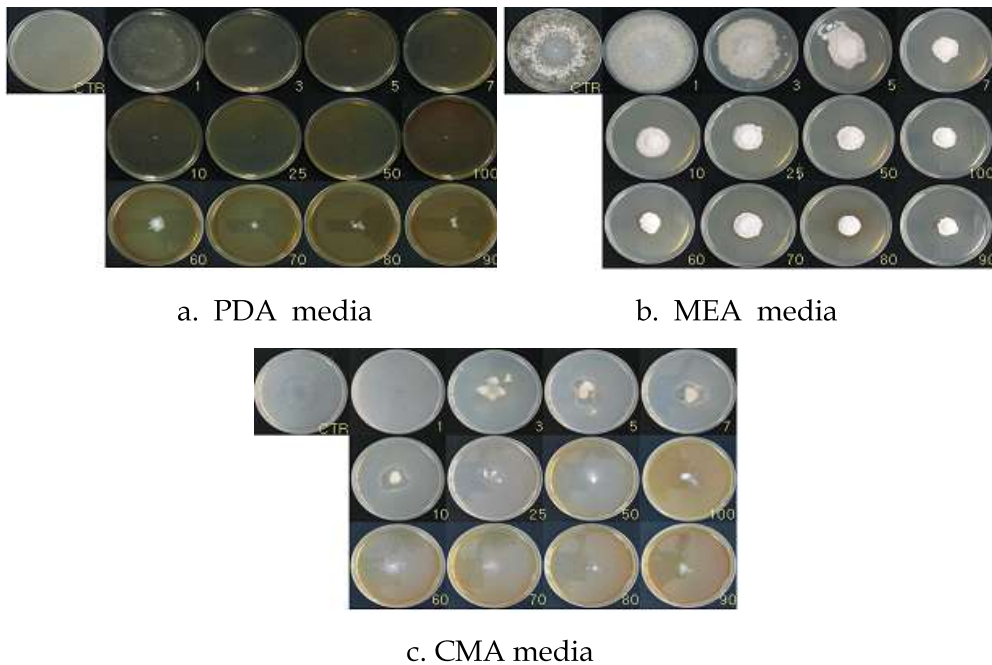


Fig. 23. *In vitro* inhibitory effects of WA-AT-WB13R and WA-PR-WB13R combination against sclerotium germination of *Sclerotinia minor* on different media.



④ WA-CV-WA13B, WA-AT-WB13R와 WA-PR-WB13R 혼합용액

A. *Sclerotinia minor*

균핵에 대해서도 은나노 혼합용액에 대해 실험을 실시하였다. 방법은 균사생장 억제 검정에 사용한 방법과 동일하게 진행하였다. WA-CV-WA13B, WA-AT-WB13R와 WA-PR-WB13R 용액을 첨가한 각 배지와 농도별 생장 억제율을 나타내고 있다(Table 30). PDA배지 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 억제 효과 결과이다(Fig. 24). 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 30. 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.

Conc. <sup>1</sup> Media	Inhibition rate (%)												
	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)

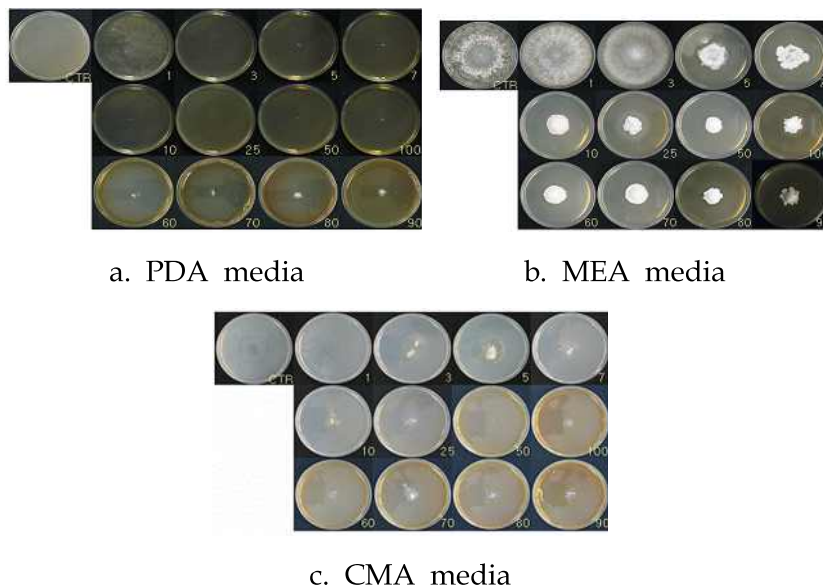


Fig. 24. *In vitro* inhibitory effects of WA-CV-WA13B, WA-AT-WB13R and WA-PR-WB13R combination against sclerotium germination of *Sclerotinia minor* on different media.

#### (4) 투과전자현미경(TEM) 관찰

나노 은 입자에 의해 불활성화된 미생물 특성을 관찰하기 위해 은 나노 용액에 곰팡이 *Rhizoctonia solani*와 세균 *Pseudomonas marginalis*을 액체 배양하여 TEM으로 관찰하였다(Fig. 25). SEM으로도 관찰하였으나, 25ppm으로 처리하였을 때, 세균 자체가 다 녹아서 관찰이 불가능하였고, 저농도로 처리하여 관찰하였으나 나노 사이즈 입자이기 때문에 SEM상에서는 나노 입자가 관찰이 불가능하고, 처리한 은나노 입자의 수가 적으므로 확인이 어려운편이다. 따라서 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.

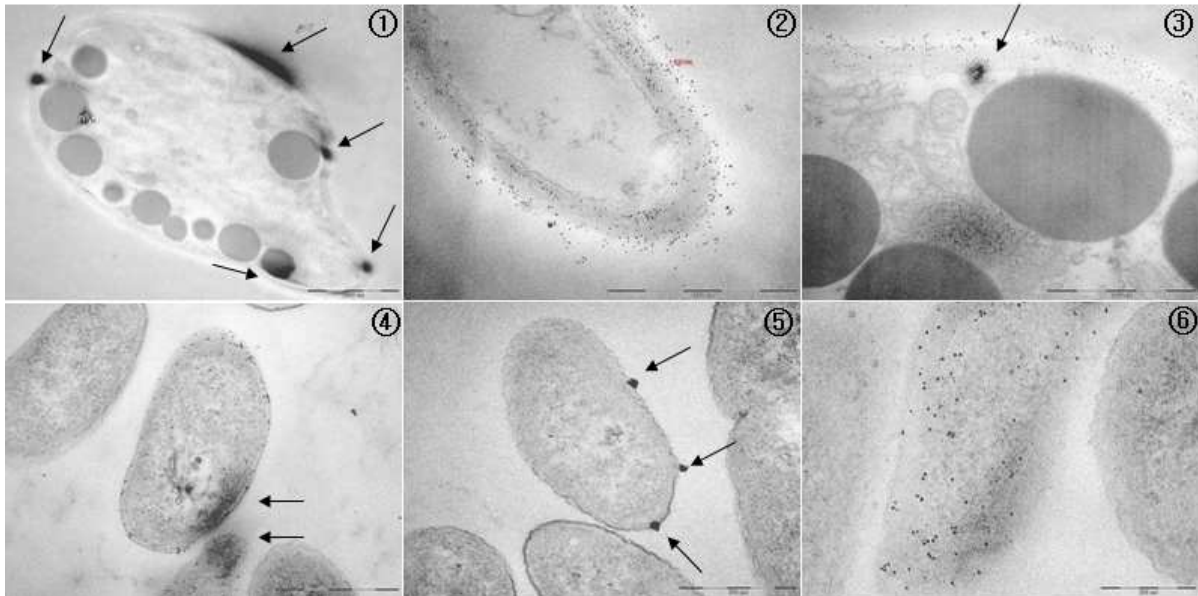


Fig. 25. TEM images of *Rhizoctonia solani* and *Pseudomonas marginalis* treated with Nanover™ . ①, ②, ③; *Rhizoctonia solani*, ④, ⑤, ⑥; *Pseudomonas marginalis*. Arrows indicate the area where the Nanover™ particles are aggregated.

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 관찰되어진다.

### (5) 주사현미경(SEM) 관찰

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. 26).

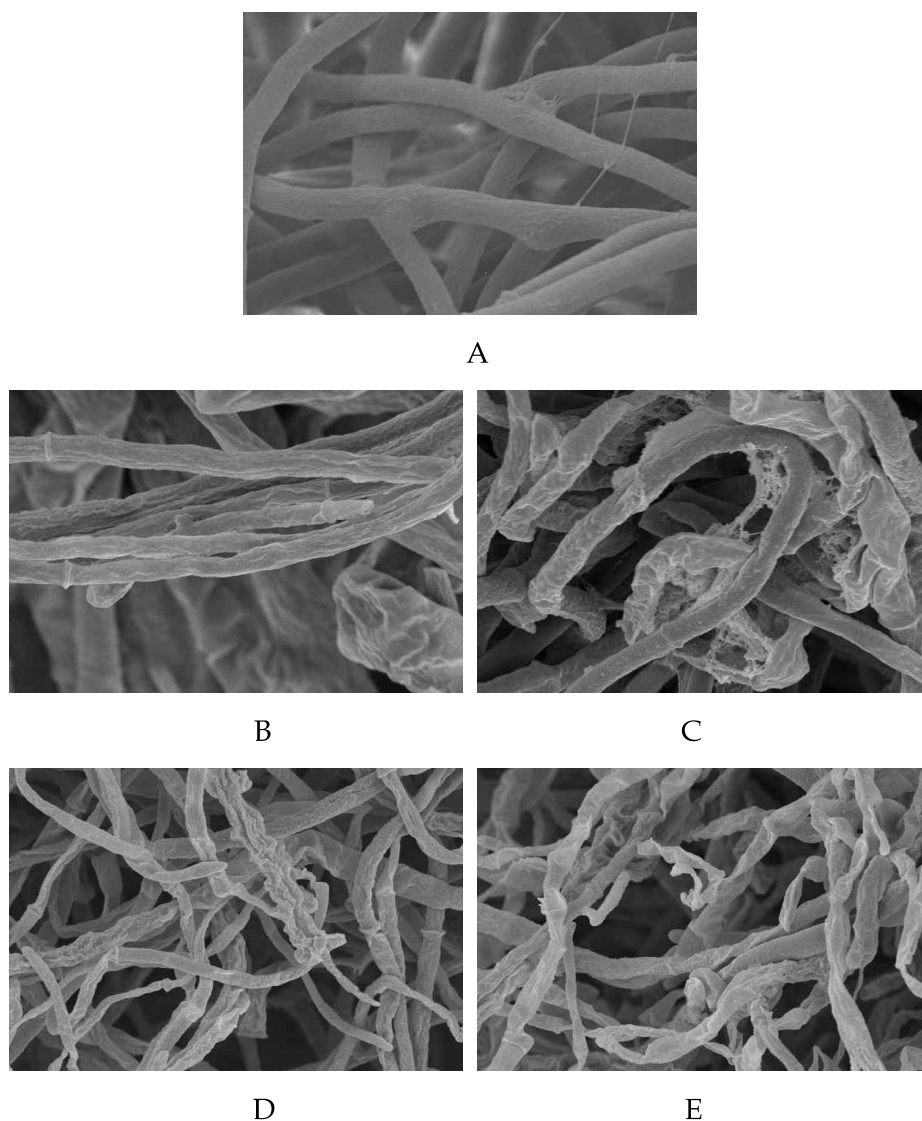


Fig. 26. SEM images of *Sclerotinia sclerotiorum* treated with Nanover™ at 7ppm, and observed 1, 3, 5, and 7 days after the treatment(A: 무처리 Control, B: 처리 후 1일 경과, C: 처리 후 3일 경과, D: 처리 후 5일 경과, E: 처리 후 7일 경과). Note the increase of damages and whitening of hyphae as the days of exposure increased from 1 through 7.

## (6) 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. 27).



Fig. 27. Phytotoxicity tests of Nano-silver liquid on tomato, cucumber, pepper and spring green onion.

무처리구와 비교하여 10ppm, 25ppm, 50ppm, 100ppm에서는 약해가 발생하지 않았으며, 은으로 인한 변색도 나타나지 않았다. 200ppm 이상의 경우 은 나노 입자로 인해 잎 또는 줄기가 은색으로 변색이 되는 것이 관찰되었다. 10000ppm을 처리할 경우 식물체가 약해를 입는 것으로 관찰되었다. 10ppm, 25ppm, 50ppm, 100ppm에서는 약해가 발생하지 않았으며, 탈색도 나타나지 않았다.

## (7) 파 흑색썩음균핵병 병원균에 대한 은 나노 용액 효과 실험

경기도 양수리 김세준씨 파 농가에서 분리한 파 흑색썩음균핵병 병원균(*Sclerotium cepivorum*)을 이용하여 실험하였으며, 분리한 균핵으로 은 나노 용액 생장 억제 검정을 기내에서 실시하였고 포장실험도 수행 하였다.



(가) *In vitro* test

은 나노 용액 WA-CV-WA13B, WA-AT-WB13R, WA-PR-WB13R 용액을 사용하여 1ppm, 3ppm, 5ppm, 7ppm, 10ppm, 25ppm, 50ppm, 100ppm 농도로 PDA, MEA, CMA 배지에 치상하여 관찰하였다. 은 나노 용액을 혼합하여 같은 농도와 배지를 사용하여 관찰하였다.

① WA-CV-WA13B 용액

WA-CV-WA13B 용액이 첨가된 각 배지에서 농도별 성장 억제율을 나타내고 있다(Table 31). CMA 배지에서 억제율이 가장 높게 나타났으며, PDA 배지 7ppm에서 82% 억제율을 나타냈고, CMA 배지 3ppm에서 89% 억제율을 나타냈다. MEA 배지 경우 10ppm 이상에서 억제 효과가 나타났다. WA-CV-WA13B 용액에 대한 각 배지에서의 억제효과 결과이다(Fig. 28). CMA 배지에서 가장 좋은 효과를 나타내며, MEA 배지에서 낮은 억제효과를 보였다.

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

		Inhibition rate (%)							
Conc. <sup>1</sup> Media	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

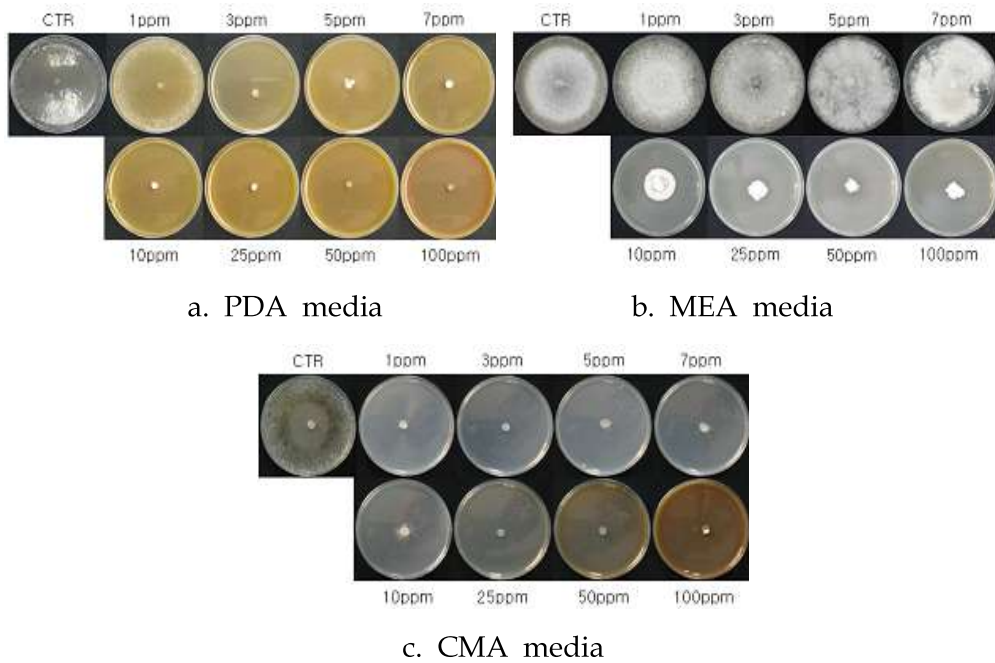


Fig. 28. *In vitro* inhibitory effects of WA-CV-WA13B, WA-AT-WB13R and WA-PR-WB13R combination against *Sclerotium cepivorum* on different media.

② WA-AT-WB13R 용액

WA-AT-WB13R 용액이 첨가된 각 배지별 은 나노 농도에 따른 성장 억제율을 나타내고 있다(Table 32). 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. WA-AT-WB13R용액이 첨가된 배지에서 억제효과 결과이다(Fig. 29). CMA배지에서 좋은 억제효과를 나타냈으며, MEA 배지에서는 낮은 억제효과를 나타냈다.

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

		Inhibition rate (%)								
Conc. <sup>1</sup> Media	CTR	1	3	5	7	10	25	50	100	
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

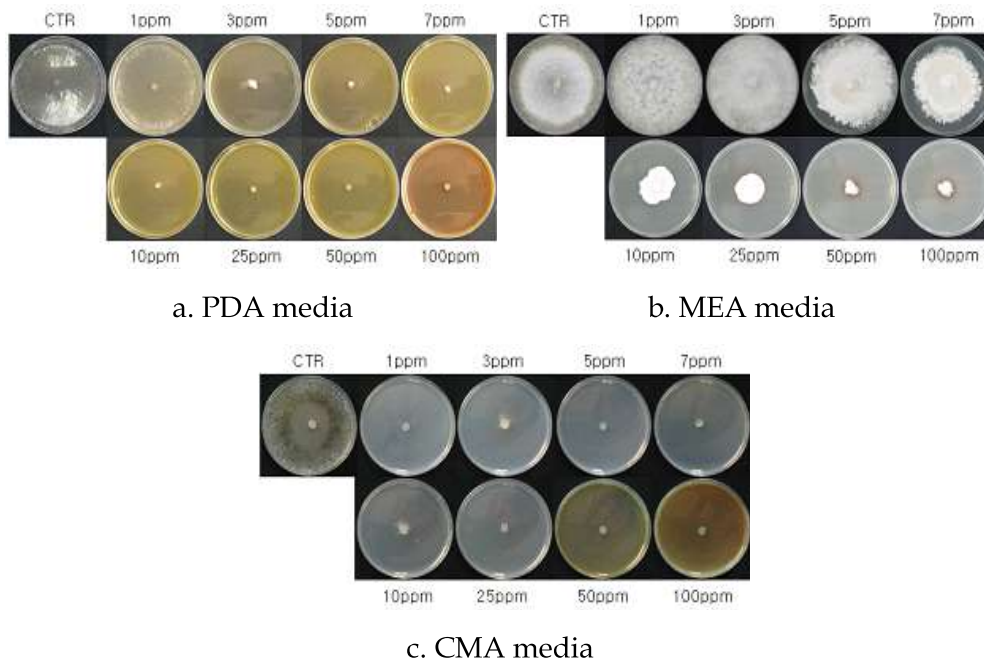


Fig. 29. *In vitro* inhibitory effects of WA-AT-WB13R against *Sclerotium cepivorum* on different media.

### ③ WA-PR-WB13R 용액

WA-PR-WB13R 용액이 첨가된 각 배지별 농도의 생장 억제율을 나타내고 있다(Table 33). PDA배지에서 7ppm에서 81% 억제율을 보였고, CMA배지 10ppm에서 84% 억제율을 나타냈다. MEA배지는 25ppm에서 81% 억제율을 나타냈다. WA-PR-WB13R용액이 첨가된 배지에서 억제 효과를 나타냈다(Fig. 30). PDA배지에서 좋은 억제 효과를 나타냈다. PDA 배지에서 3가지 은 나노 용액의 기내 실험에서 WA-CV-WA13B용액이 가장 좋은 억제율을 나타냈다. 배지에 따른 생장의 차이는 배지의 성분이 균사의 생장에 영향을 미치는 것으로 보였다.

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

Conc. 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

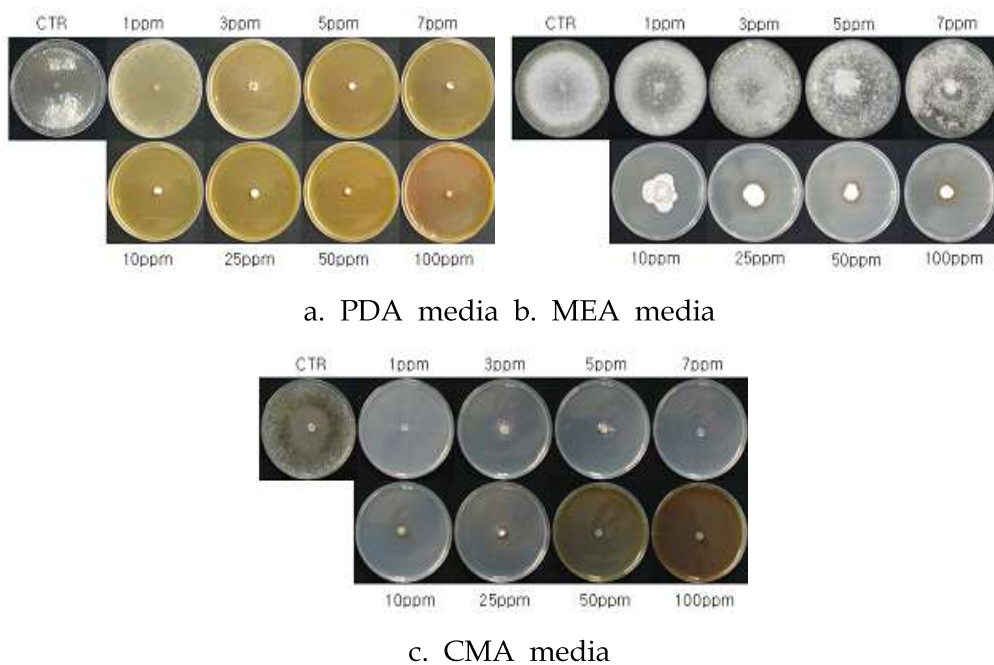


Fig. 30. *In vitro* inhibitory effects of WA-PR-WB13R against *Sclerotium cepivorum* on different media.

④ WA-CV-WA13B와 WA-AT-WB13R 용액

WA-CV-WA13B와 WA-AT-WB13R 용액 이 첨가된 각 배지별 성장 억제율을 나타내고 있다 (Table 34). CMA배지 3ppm에서 83% 억제율을 나타냈고, PDA배지 7ppm에서 82% 억제율을 보였다. MEA배지 25ppm에서 85% 억제율을 나타냈다. WA-CV-WA13B와 WA-AT-WB13R용액 이 첨가된 배지의 억제 효과 결과이다(Fig. 31). CMA배지에서 다른 배지보다 좋은 억제 효과를 나타냈다.

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

Conc. <sup>1</sup> 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

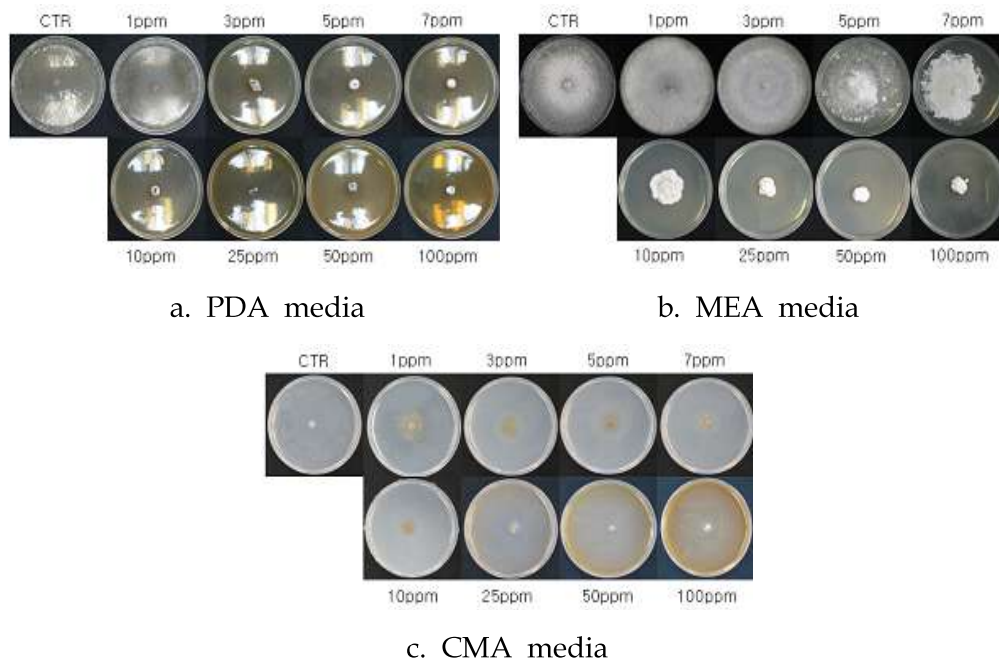


Fig. 31. *In vitro* inhibitory effects of WA-CV-WA13B and WA-AT-WB13R against *Sclerotium cepivorum* on different media.

⑤ WA-CV-WA13B와 WA-PR-WB13R 용액

WA-CV-WA13B와 WA-PR-WB13R용액이 첨가된 각 배지에서 균핵의 성장 억제율을 나타내고 있다(Table 35). PDA배지 10ppm에서 78%억제율을 나타냈으며, CMA배지 3ppm에서 80%억제율을 나타냈다. WA-CV-WA13B와 WA-AT-WB13R 용액이 첨가된 배지의 억제 효과 결과이다 (Fig. 32). CMA배지에서 높은 억제율을 나타냈다.

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

		Inhibition rate (%)								
Conc. <sup>1</sup> Media	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

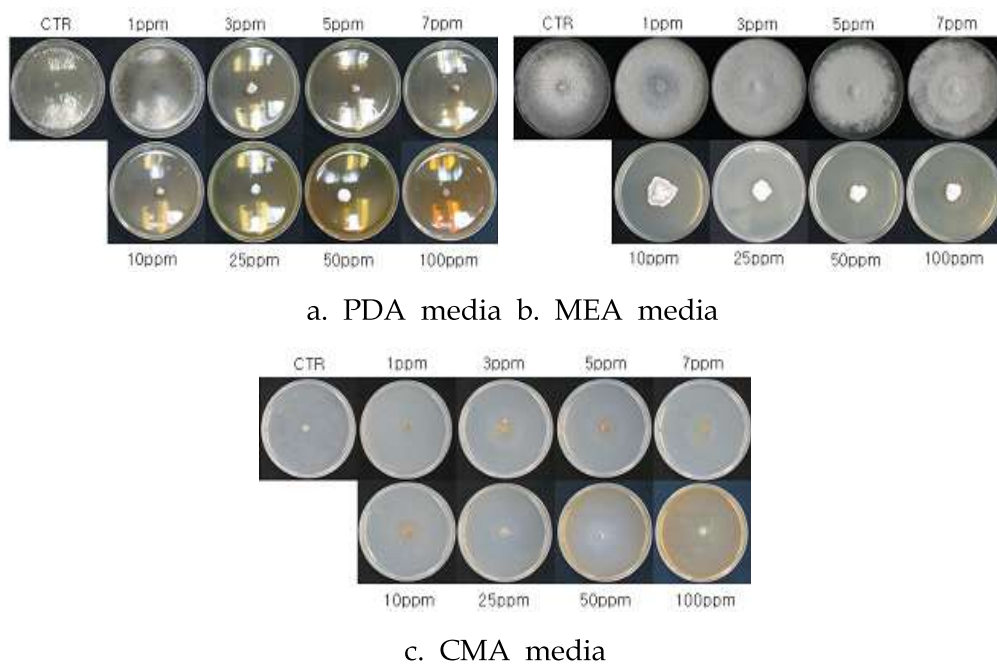


Fig. 32. *In vitro* inhibitory effects of WA-CV-WA13B and WA-AT-WB13R combination against *Sclerotium cepivorum* on different media.

#### ⑥ WA-AT-WB13R와 WA-PR-WB13R 용액

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



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

		Inhibition rate (%)								
Conc. <sup>1</sup> Media	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

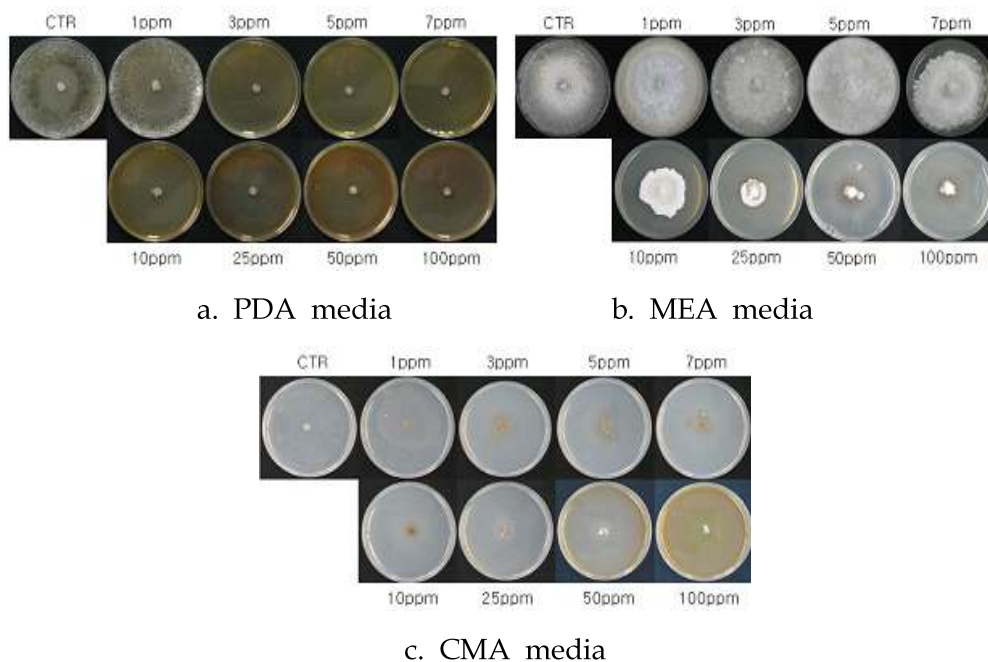


Fig. 33. *In vitro* inhibitory effects of WA-AT-WB13R and WA-PR-WB13R combination against *Sclerotium cepivorum* on different media.

⑦ WA-CV-WA13B, WA-AT-WB13R와 WA-PR-WB13R 용액

WA-CV-WA13B, WA-AT-WB13R와 WA-PR-WB13R 용액이 첨가된 각 배지별 생장 억제율을 나타냈다(Table 37). PDA배지 25ppm에서 80% 억제율을 나타냈고, CMA배지는 1ppm에서도 68%억제율을 나타냈고, 3ppm에서 81% 높은 억제율을 나타냈다. WA-CV-WA13B, WA-AT-WB13R와 WA-PR-WB13R용액이 첨가된 배지에서의 억제효과 결과이다(Fig. 34). PDA 배지와 CMA배지에서 높은 억제효과를 나타냈으나. MEA배지에서는 낮은 억제 효과를 나타냈

다. 개별과 혼합 모두 대체적으로 PDA배지와 CMA배지에서 높은 억제율을 나타냈으며, 은 나노 용액을 혼합하여 처리한 것보다 개별적으로 처리한 것이 억제율이 더 높았다. 혼합 용액에서는 WA-AT-WB13R과 WA-PR-WB13R용액이 좋은 효과를 보였으나, WA-AT-WB13R용액 PDA 3ppm에서 66%, CMA배지에서 93%로 가장 높은 억제율을 나타냈다.

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

		Inhibition rate (%)								
Conc. <sup>1</sup> Media	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

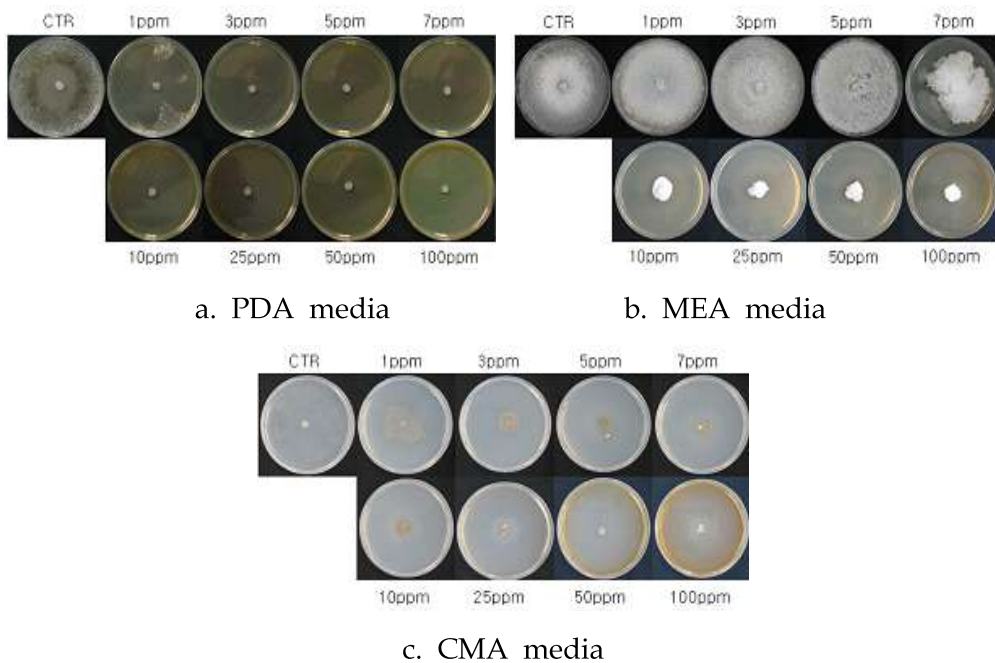


Fig. 34. *In vitro* inhibitory effects of WA-CV-WA13B, WA-AT-WB13R and WA-PR-WB13R combination against *Sclerotium cepivorum* on different media.

#### (나) 포장시험

은 나노 용액 처리 후 수확한 파에 대해 생체중과 건물중을 조사하였다(Table 38). 처리가 끝난 후 수확시기까지 기다렸다가 수확된 파를 무처리구와 처리구 별로 나누어 생체중을



측정하고, 80℃ 건조기에 건조하여 건물중을 측정하였다. 무처리구에 비해 처리구에서 생체중, 건물중 모두 증가하였다. 기재실험에서도 WA-CV-WA13B이 가장 좋은 효과를 나타냈으며, 포장실험에서도 다른 용액에 비해 높은 생체중과 건물 중이 측정되었다. 무처리구에 비해 최대 2배 이상의 생체중을 나타냈다. 각 은 나노 용액 농도별 처리후 수확한 파를 보여주고 있다(Fig. 35).

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

Nano-silver	WA-CV-WA13B					WA-AT-WB13R				WA-PR-WB13R			
	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)	0.96	1.99	1.34	1.84	1.66	1.29	1.32	1.56	1.16	1.39	1.10	1.15	1.37
	5	8	6	9	6	5	3	4	2	1	2	2	8



Fig. 35. Results of nano-silver treatment on spring green onion.

CTR; untreated, A; WA-CV-WA13B, B; WA-AT-WB13R, C; WA-PR-WB13R

(8) 은 나노 용액을 처리한 파 재배 토양의 미생물 관찰 및 토양 성분 분석

(가) 토양 미생물 관찰

은 나노 용액을 처리한 곳과 무처리 한 곳의 토양을 샘플링하여 토양 내의 미생물 개체군의 비교를 하였다. 은 나노 용액에 의해 유용 미생물의 감소가 어느 정도 인지 단하기 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. 하지만 파 뿌리 썩음 병원균이 관찰되지 않았으며, 세균의 개체수가 줄어 증가하는 경향이 나타난 것으로 관찰되어진다. 은 나노 용액이 토양 미생물 모두 사멸시키지 않았으므로, 유용한 토양 미생물이 사멸하거나 감소하지는 않을 것으로 판단되어진다. 곰팡이의 개체수가 증가하였으나 무처리구와 많은 차이를 나타내지 않았다.

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

Conc. <sup>1</sup> Bacteria	Colony number/plate at 1.0×10 <sup>4</sup> CFU/ml												
	CTR <sup>2</sup>	A <sup>3</sup> 10	A25	A50	A100	B <sup>4</sup> 10	B25	B50	B100	C <sup>5</sup> 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
After	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(ppm), 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. <sup>1</sup> Fungi	Colony number/plate at 1.0×10 <sup>2</sup> CFU/ml												
	CTR <sup>2</sup>	A <sup>3</sup> 10	A25	A50	A100	B <sup>4</sup> 10	B25	B50	B100	C <sup>5</sup> 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
After	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(ppm), 2; Untreated, 3; WA-CV-WA13B, 4; WA-AT-WB13R, 5; WA-PR-WB13R

(나) 토양 성분 분석

토양의 성분분석을 실시한 결과 토양 pH는 무처리구와 은 나노 용액을 처리했을 때그리고 처

리 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, Mg함량은 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 처리시 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) ( $\mu$ S/cm)	P <sub>205</sub> (mg/kg)	Organic compounds (%)	T-N (%)	Exc. Cation(cmol(+)/kg)				CEC (cmol(+) ) /kg)
						K	Ca	Mg	Na	
A <sup>2</sup> -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 <sup>3</sup> -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 <sup>4</sup> -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 <sup>1</sup>	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

(9) 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, 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.

Table 42. 파 재배 포장에서 은 나노 용액 시용 후 파에서 회수 된 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
<b>Control 평균</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>
10ppm 처리구 1	0.04	0.19
10ppm 처리구 2	0.04	0.20
10ppm 처리구 3	0.03	0.14
<b>10ppm 처리구 평균</b>	<b>0.04</b>	<b>0.11</b>
25ppm 처리구 1	0.09	0.47
25ppm 처리구 2	0.08	0.38
25ppm 처리구 3	0.12	0.61
<b>25ppm 처리구 평균</b>	<b>0.10</b>	<b>0.49</b>
50 ppm 처리구 1	0.09	0.43
50 ppm 처리구 2	0.05	0.25
50 ppm 처리구 3	0.06	0.31
<b>50ppm 처리구 평균</b>	<b>0.07</b>	<b>0.33</b>
100 ppm 처리구 1	0.06	0.29
100 ppm 처리구 1	0.05	0.24
100 ppm 처리구 1	0.04	0.20
<b>100ppm 처리구 평균</b>	<b>0.05</b>	<b>0.24</b>

(10) 시설재배지 토양의 은 나노 용액 처리 시기별 토양분석

(가) 토양분석(안정성) 평가

시설 재배지 토양의 시기별 토양 분석 결과, pH는 6.6~6.9 수준으로 분석되었으며 일반적으로 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. 36). 은 나노 용액 처리전과 처리 후를 비교하였을 때 pH에 미치는 영향은 미미한 것으로 보인다. EC (1:5)의 경우 전체적으로 감소하는 경향을 보인다(Fig. 37). 이는 작물이 성장함에 따라 토양 내 영양 염류의 양이 감소되면서 EC값이 감소하는 것으로 판단된다.

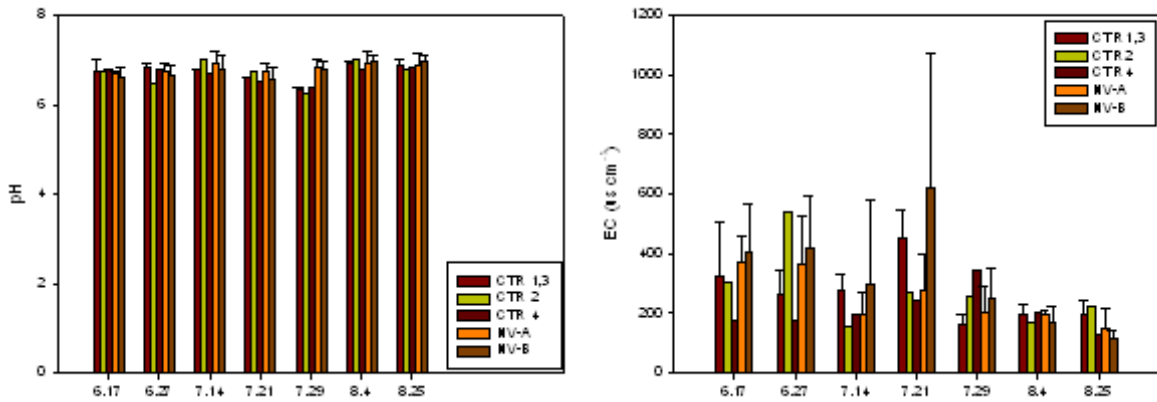


Fig. 36. pH 변화 Fig. 37. EC 변화

유기물과 유효 인산의 함량은 우리나라 유기물 적정 범위인 20~30 g kg<sup>-1</sup>, 유효인산의 적정 범위인 350~500 mg kg<sup>-1</sup> 보다 높은 유기물 및 유효 인산이 분석되었으며, 시간이 지남에 따라 모든 처리구에서 유기물 함량, 유효 인산의 함량이 다소 감소하는 경향을 나타내었다(Figs 38, 39).

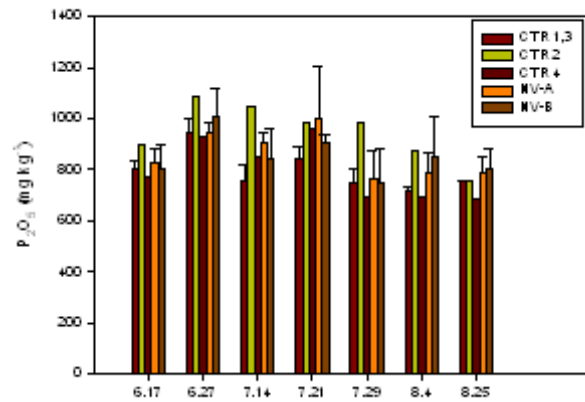
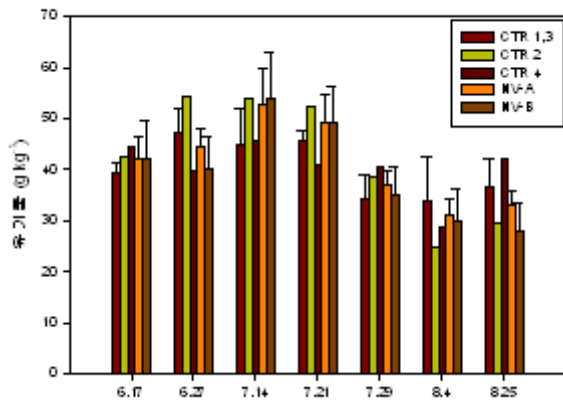


Fig. 38. 유기물 함량 변화 Fig. 39. 유효 인산 함량 변화

질소 분석 결과 포장에서는  $\text{NH}_4\text{-N}$ 보다  $\text{NO}_3\text{-N}$ 가 더 많은 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.s 40, 41). Ca과 K의 경우의 경우 7월 21일까지는 감소하다 다시 증가하고 있으며(Fig.s 42, 43). Mg의 함량은 6월 27일에 모든 처리구에서 증가하여 그 이후에는 차츰 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 44). Na의 함량 변화는 Fig. 45에 나타내었다. 양이온 치환 용량은 모든 처리구에서  $11 \text{ cmol}_c \text{ kg}^{-1}$  이상으로 분석되었다(Fig. 46).

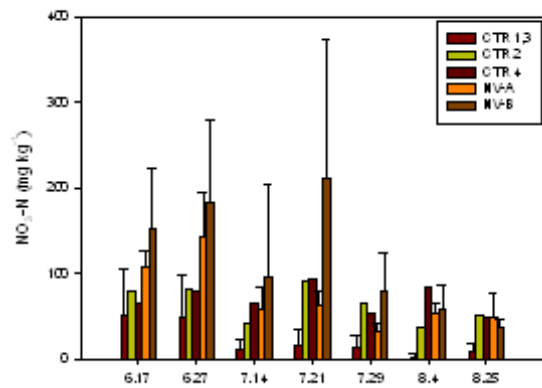
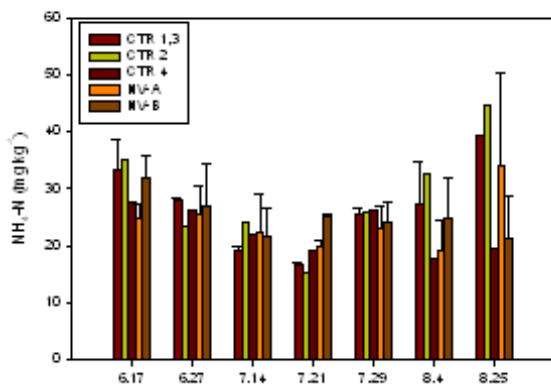


Fig. 40.  $\text{NH}_4\text{-N}$  함량 변화 Fig. 41.  $\text{NO}_3\text{-N}$  함량 변화

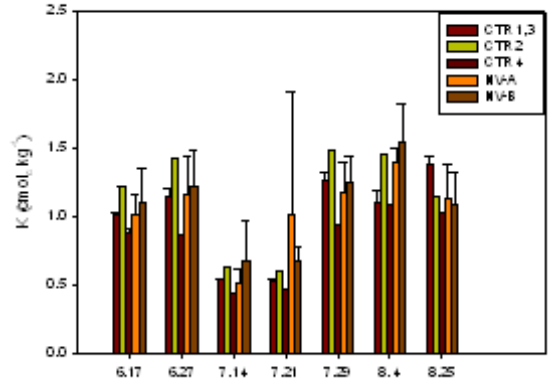
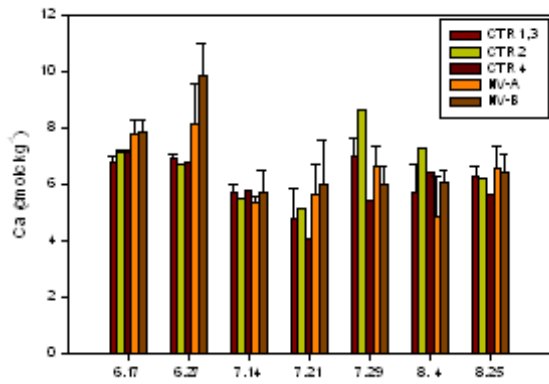


Fig. 42. Ca 함량 변화 Fig. 43. K 함량 변화

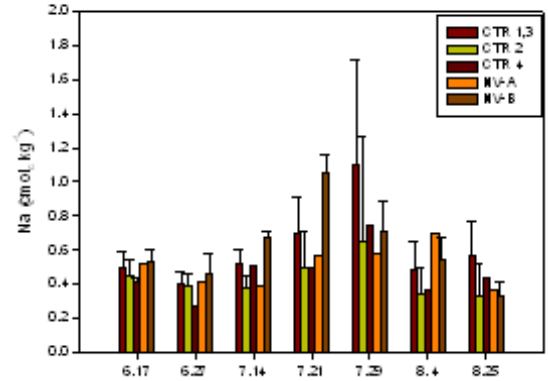
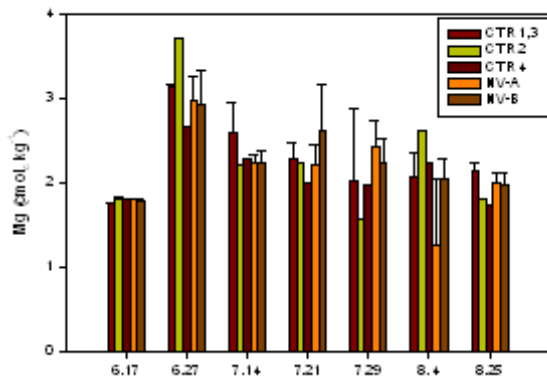


Fig. 44. Mg 함량 변화 Fig. 45. Na 함량 변화

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 용액의 경우 유해성이 보고된 바가 없으며 인축에게 안전한 것으로 인정되고 있지만 미생물에게는 강한 살균력을 가지는 것으로 알려져 있어 은 나노 용액의 사용에 따른 유용 미생물과 토양의 생물학적 특성 및 토양의 질 평가 항목들에 대한 종합적인 평가가 필요하다.

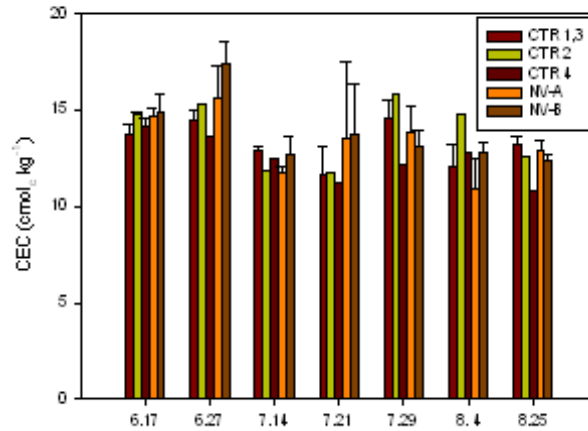


Fig. 46. 양이온 치환용량 변화

(나) 시설재배지 토양의 은 농도 분석 결과

은 추출 실험 결과 가장 효율이 좋은 것으로 판단되는 2M-HCl를 포장에서 채취한 토양시료와 1:5 비율로 혼합하여 30분간 진탕 후 Whatman No. 42 여지로 여과하여 그 여액을 ICP-AES (Perkinelmer 3100XL, USA)를 이용하여 은의 농도 분석하였다(Table 43).

Table 43. 은 농도 분석

처리구	7월 29일	8월 4일	8월 25일
	----- mg kg <sup>-1</sup> -----		
CTR 1	N.D. <sup>1)</sup>	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 <sup>2)</sup>
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

<sup>1)</sup> N.D. = Not Detected

<sup>2)</sup> TR= Trace



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 2는 7월 29일에 23.30 mg kg<sup>-1</sup>, 8월 4일에 4.49 mg kg<sup>-1</sup>, 8월 25일에 14.15 mg kg<sup>-1</sup>이었으며 다른 처리구와 비교하여 높은 은 농도가 측정된 것은 경엽 처리시 토양으로 유입으로 인한 것으로 판단된다. 분석값이 일정하지 못한 것은 시험포장에서 시기별 토양 시료 채취시 균일한 시료 채취가 어렵기 때문으로 사료된다.

### (11) 은 나노 용액과 키토산의 파 흑색썩음균핵병에 대한 방제효과 비교

항균성 물질인 키토산을 이용하여 파 뿌리썩음병에 대해 억제효과와 은 나노 용액과 억제효과를 비교해 보기 위해 실험을 실시하였다. 키토산 A, B와 은 나노 용액 WA-PR-WB13R 용액을 대상으로 하여 실험을 실시하였다. 실험 결과, 은 나노 용액은 50ppm부터 억제 효과가 나타나기 시작했으며, 키토산 A는 2,000ppm에서 억제효과를 나타냈고, 키토산 B는 1,000ppm에서 억제효과를 나타냈다(Fig. 47). 은 나노 용액이 저농도에서 효과를 나타냈으며, 키토산은 1,000ppm이상의 높은 농도에서 효과를 나타냈다.

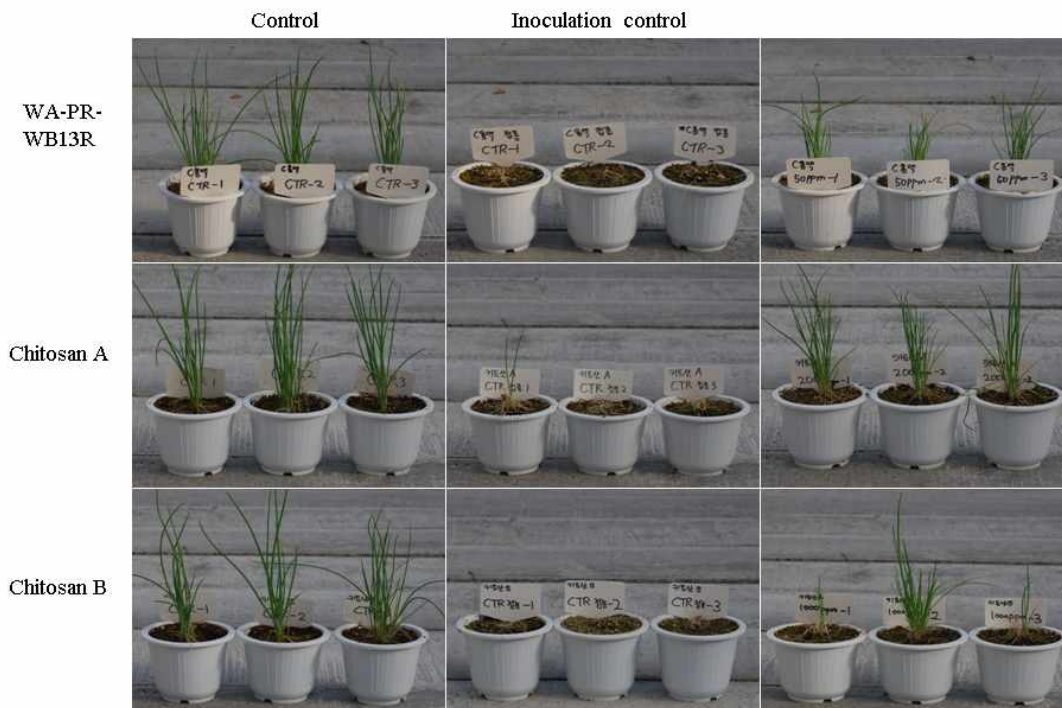


Fig. 47. Comparison of results of nano-silver WA-PR-WB13R, chitosan A, and chitosan B treatments on spring green onion.

## (12) 고추탄저병 방제 포장시험

2008년 포장시험의 경우, 무처리(Control 1)는 84.13%의 감염률을 나타내었고, 발병전 처리에서, 감염률은 D사의 은나노액 처리(Control 2)에서 35.39%와 D사의 F약제 처리(Control 3)에서 24.61%를 보였고, Nanover™ 10ppm에서 13.41%, 30ppm에서 20.55%, 50ppm에서 9.71%, 100ppm에서 16.66%를 보였다. 발병후 처리에서 감염률은 D사의 은나노액처리(Control 2)에서 72.14%와 D사의 F약제 처리(Control 3)에서 63.15%를 보였고, Nanover™ 10ppm에서 50.32%, 30ppm에서 36.48%, 50ppm에서 67.56%, 100ppm에서 54.63%를 보였다(Fig.s 48, 49). 발병 후 처리구들의 경우 약제 살포 후 잦은 강우로 약효가 경감하였다는 점을 고려해도, 탄저병 방제에는 Nanover™의 발병전 처리가 발병 후 처리보다 효과가 좋음을 확인 하였다. 결론적으로 본 연구에서 Nanover™의 발병 전 50ppm 처리가 다른 처리에 비하여 가장 좋은 효과를 보였고, Nanover™를 발병 후에 처리한 것 보다 모든 농도에서 발병 전에 처리하였을 때 다른 대조구보다 효과가 있음을 확인 하였다.

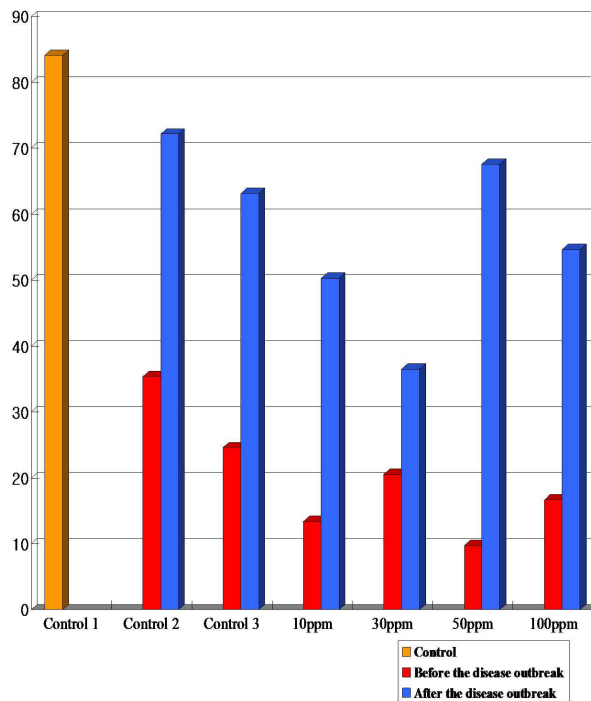


Fig. 48. 발병 전 후 은 나노 용액(Nanover™) 처리가 고추 탄저병 방제에 미치는 영향 결과. Control 1 (무처리), Control 2 (D사의 은 나노 용액), Control 3 (D사의 F약제)와 은 나노 용액(Nanover™) 10ppm, 30ppm, 50ppm 그리고 100ppm 처리. X 축: Nanover™ 처리농도, y축: 이병률(%)

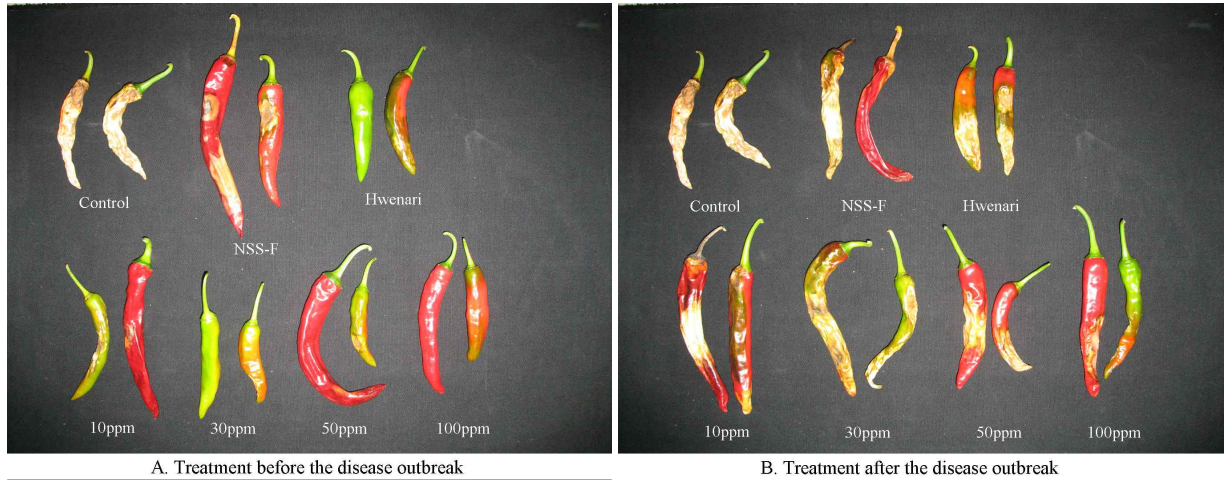


Fig. 49. 발병 전후 은 나노 용액(Nanover™) 처리가 고추 탄저병 방제에 미치는 영향 결과.

2009년 포장 시험의 경우, Nanover™ 1회 처리 하였을 때는 30ppm에서 16.47%의 감염율로 은나노의 효과가 가장 좋았고, 2회 처리 하였을 때는 50ppm에서 21.16%로 감염 억제 효과가 가장 좋았다. 3회 처리 하였을 때는 10ppm에서 21.27%로 감염율이 낮았으며, 무처리구에 비하여 전체적으로 낮은 발병율을 나타내었다(Table 44). 본 실험의 결과 탄저병이 발병 전에 10, 30, 50, 100ppm의 농도로 은나노액을 처리한 경우가 발병 후 100ppm 농도로 처리한 경우나 무처리구보다 낮은 발병율을 보였다. 발병후 100ppm의 농도로 처리한 경우 Control 보다 병해 발생억제 효과를 보였지만 은나노액을 발병 전에 처리한 경우 보다 방제효과는 떨어졌다. 결론적으로 WA-PR-WB13R 용액이 고추 탄저병에 대하여 발병 전 처리를 통해 병해발생 억제 효과를 거둘 수 있을 것으로 판단된다(Fig. 50).

Table 44. Infection rate(%) of pepper treated with different concentrations of nano-silver in field tests.

	control	10ppm	30ppm	50ppm	100ppm	발병 후 100ppm
1회처리	—	20.01	16.47	16.33	18.33	—
2회처리	—	40.95	37.82	21.16	29.33	—
3회처리	63.06	21.27	40.82	21.84	30.35	44.53

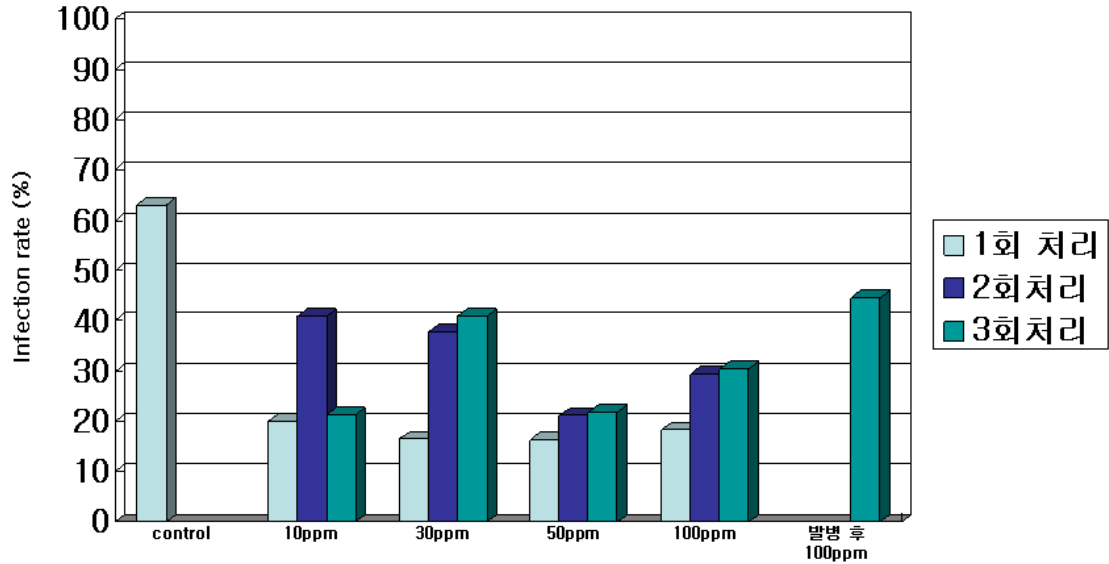


Fig. 50. Infection rate(%) of pepper treated and non-treated with nano-silver before and after the outbreak of the anthracnose on pepper.

### (13) Controlled release가 가능한 살균제 선발 시험

2008년 제 1 협동 연구기관인 고려대에서 제작한 키토산을 코팅한 살균제 Difenoconazole 0.1%와 0.3%가 오이 및 호박 흰가루병 병원균에 대하여 약해를 감소시키면서 방제 효과를 지속적으로 나타내는지 여부를 포장시험을 통해 확인 할 예정이며, 또 다른 키토산 코팅 살균제를 이용하여 고추 탄저병 병원균을 대상으로 Controlled release가 가능한 작물 보호제를 선발 할 수 있는지 여부를 포장시험을 수행 하였다. 그 결과, 고추 탄저병에 효과가 있는 것으로 알려진 살균제인 Tebuconazole을 각각 3,000Da, 30,000Da의 chitosan으로 코팅하여 고추탄저병 발병초에 포장에서 1-3회 처리하여 발병율을 관찰하였다. 코팅을 하지 않고 처리한 고추 탄저병의 이병율은 42.82%로 나타났다. 살균제 3,000Da를 1000배 희석한 살균제의 1회 처리의 이병율은 34.81%, 2회 처리는 53.92%, 3회 처리 하였을 때는 39.91%로 나타났다. 3,000Da를 1,500배 희석한 살균제의 이병율은 1회 처리 37.18%, 2회 처리 51.73%, 3회 처리는 31.11%로 나타났다. 30,000Da의 1,000배 희석한 살균제의 이병율은 1회 처리 33.77%, 2회 처리 56.94%, 3회 처리는 29.80%로 가장 낮게 나타났다. 30,000Da를 1,500배 희석한 살균제의 이병율은 1회 처리 39.97%, 2회 처리 47.93%, 3회 처리는 38.89%로 나타났다. 코팅한 살균제의 발병 억제 효과는 코팅한 30,000Da의 Tebuconazole을 1,000배 희석하여 3회 처리하였을 때 가장 좋은 효과를 확인 할 수 있었다(Table 45, Fig. 51).

Table 45. Infection rate(%) of pepper treated with different concentrations of various molecular weight kitosan-coated fungicide Tebuconazole in field tests.

	non-coating	3,000Da, 1,000배	3,000Da, 1,500배	30,000Da, 1,000배	30,000Da, 1,500배
1회처리	—	34.81	37.18	33.77	39.97
2회처리	—	53.92	51.73	56.94	47.93
3회처리	42.82	39.91	31.11	29.8	38.89

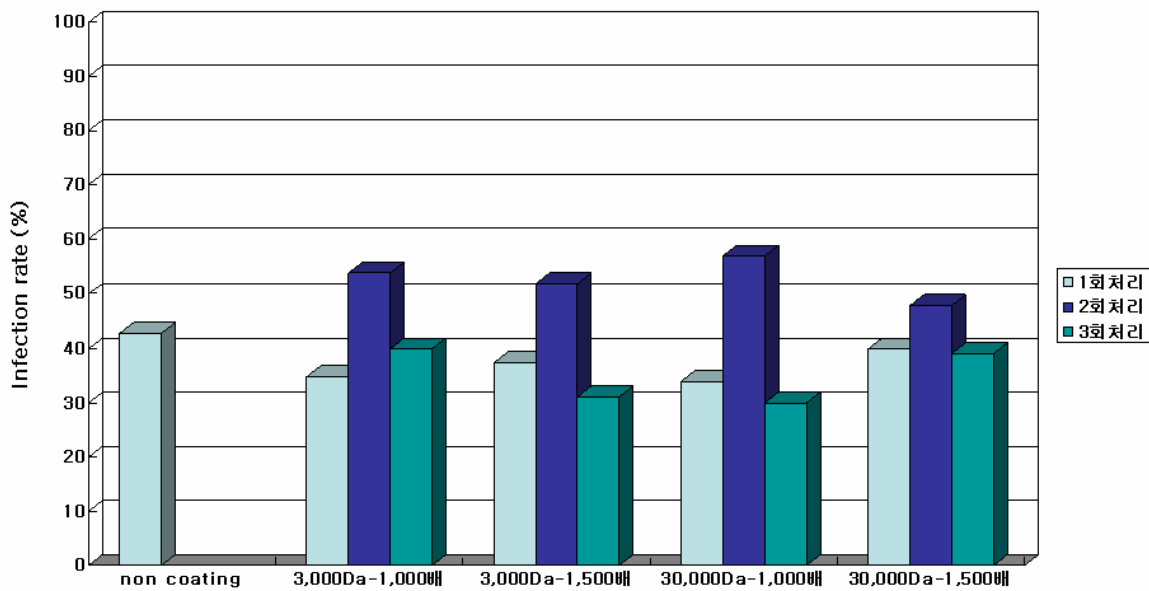


Fig.. 51. Effects of chitosan-coated Tebuconazole on the infection rate of pepper anthracnose disease caused by *Colletotrichum* sp.

**(14) 은나노 처리가 식물체의 유전자 발현에 미치는 영향 조사(은나노 용액을 처리한 토마토 잎의 RNA분석)**

TIP4I는 RNA를 정량 한 것을 나타낸 것이다. Control에 비해 은나노를 처리하였을 때 항산화 관련 유전인자 *LeSOD2*와 *LeAPX2*는 은나노 처리와 상관없이 모두 발현을 했지만 *LeSOD2*는 처리 후 1일과 3일에서 가장 뚜렷한 발현이 있었고 *LeAPX2*도 역시 은나노에 영향을 받지 않고 발현을 했지만 특히 처리 후 1시간과 3시간, 5일 후에 가장 진하게 발현되었다. 병원균 관

련 유전자 LePR1은 control이 희미하지만 모두 발현 하였고, LePR1 역시 은나노 처리에 상관 없이 은나노 용액을 처리 후에 증가하는 양상을 보이다 1일 이후에 다시 감소하여 5일에 크게 발현 되다가 다시 줄어드는 경향을 보였다. 토마토의 항산화관련 유전자와 병원균 관련 유전자 들은 은나노에 영향을 받지 않고 모두 정상적으로 발현하는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 52).

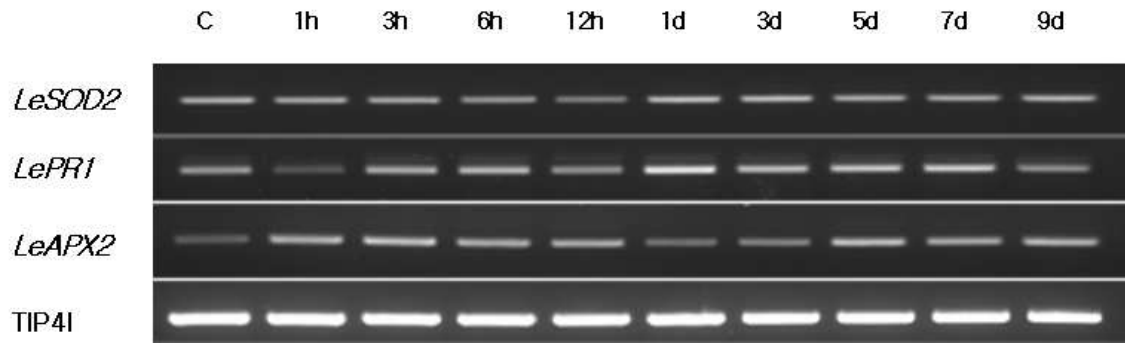


Fig.. 52. Expression of genes encoding enzymes involved in plant defense and ROS metabolism in tomato plants treated with nano-silver.

### (15) 나노 코팅한 Difenoconazole의 오이흰가루병 방제 기작 연구

(가) 나노 코팅한 Difenoconazole 처리가 오이흰가루(powdery mildew)의 균사 및 포자의 생육억제 효과 관찰

나노 코팅한 Difenoconazole이 오이 흰가루병 병원균의 균사 및 포자의 생육에 미치는 영향을 알아보기 위해 상기의 방법으로 처리한 이병 오이 잎을 SEM으로 관찰하였다. 무처리 한 경우 균사와 포자의 표면이 매끄러우며 건강한 것을 관찰 할 수 있다(Fig. 53). 반면에 코팅한 Difenoconazole 약제를 처리한 균사와 포자의 경우 균사와 포자의 표면으로 화학 약제가 포도송이 같이 엉겨 붙어 있는 모습을 관찰할 수 있었다. 또한, 처리한 화학 약제의 코팅 막이 깨져 화학약제가 흘러나오는 모습도 관찰 할 수 있다 (Fig. 54). 처리 후 시간이 지날수록 나노 코팅한 Difenoconazole의 효과를 관찰 할 수 있었다. SEM을 x300, x1,000로 관찰한 결과 3,000Da를 1,000배 희석하여 처리한 흰가루의 균사는 처리 직후부터 시간(1일, 3일, 5일, 7일, 10일, 15일)이 경과할수록 균사와 포자가 말라 가는 것을 관찰 하였다(Fig. 55). 3,000Da의 코팅한 Difenoconazole을 1,500배 희석하여 처리한 경우에는 처리 후 1일과 3일 경과 하였을 때 무 처리에 비해 미미한 차이가 있었지만 5일 후 부터는 균사와 포자가 급격하게 사멸하는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 56). 30,000Da의 코팅한 Difenoconazole을 1,000배 희석하여 처리한 경우 powdery mildew의 포자와 균사가 처리 1일 후부터 균사와 포자가 사멸하는 것을 확인



할 수 있었다 (Fig. 57). 코팅한 Difenoconazole을 30,000Da의 1,500배 희석 처리한 결과 처리 3일 후부터 포자와 균사 모두 급격하게 사멸하는 것을 관찰 할 수 있었다(Fig. 58).

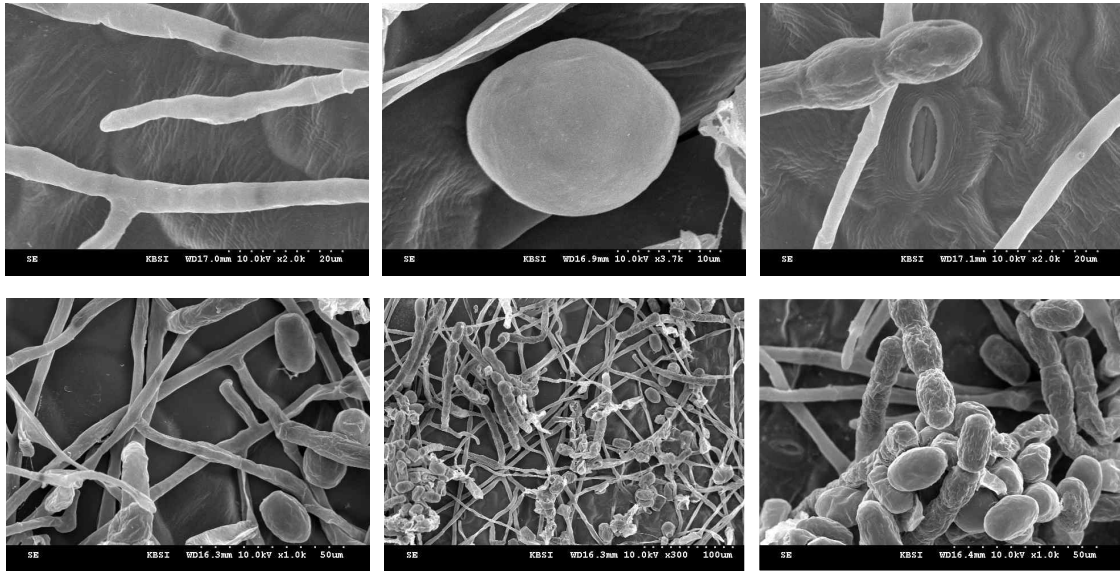
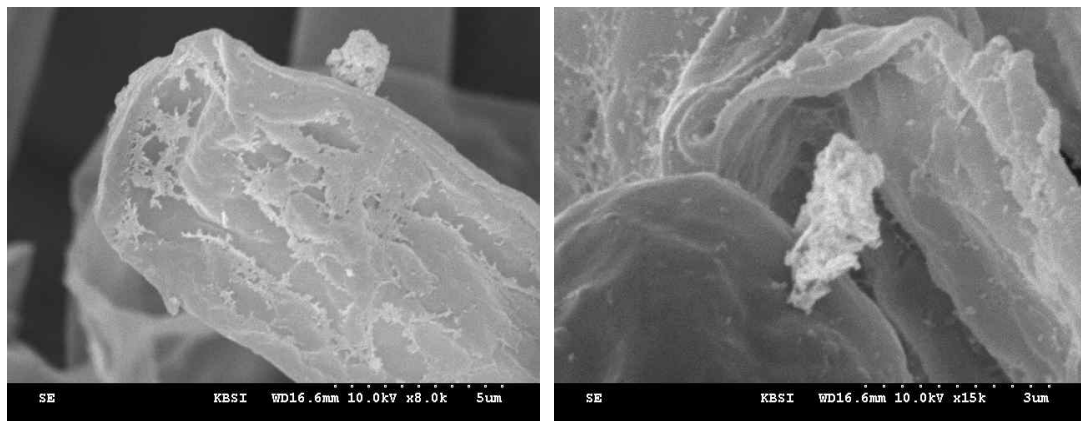


Fig. 53. SEM images of untreated(Control) mycelia and spores of powdery mildews.



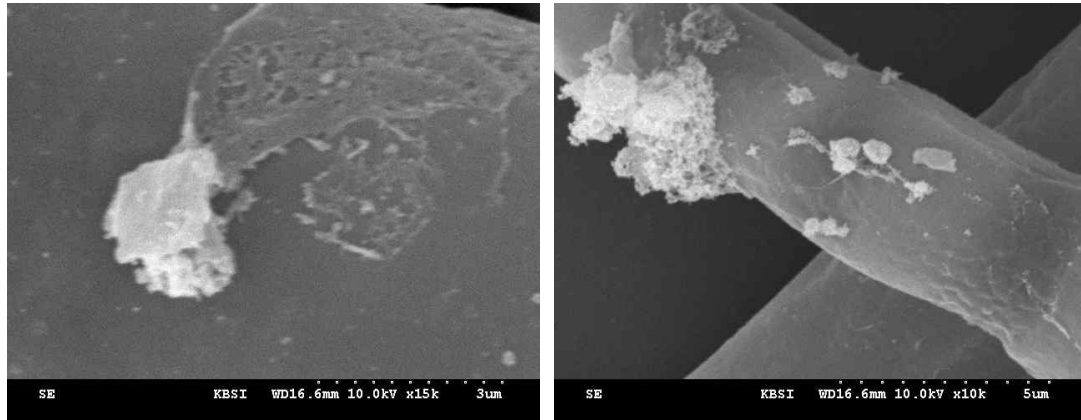
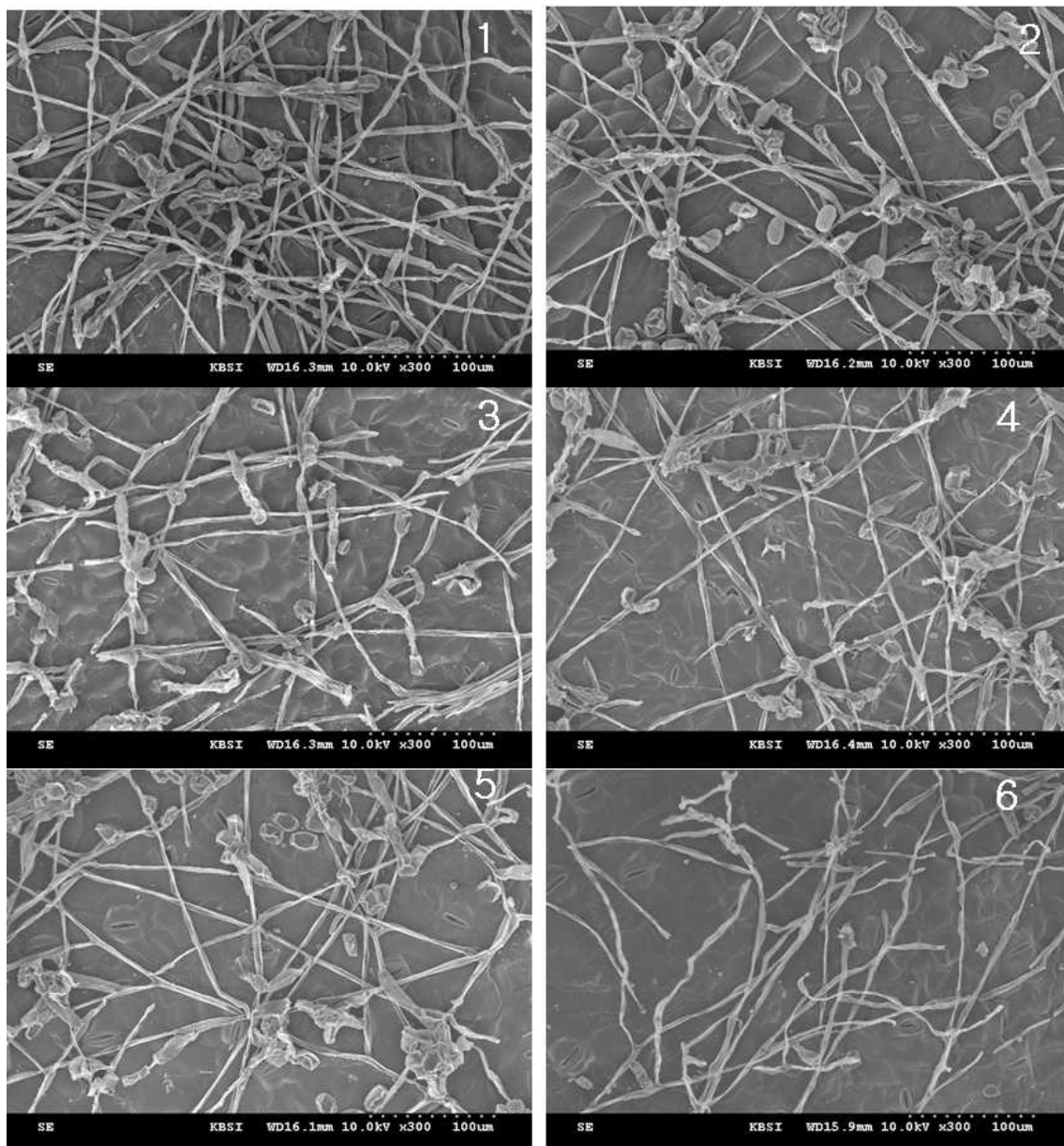


Fig. 54. SEM images of kitosan-coated Difenoconazole on the hyphae and spores of powdery mildews.





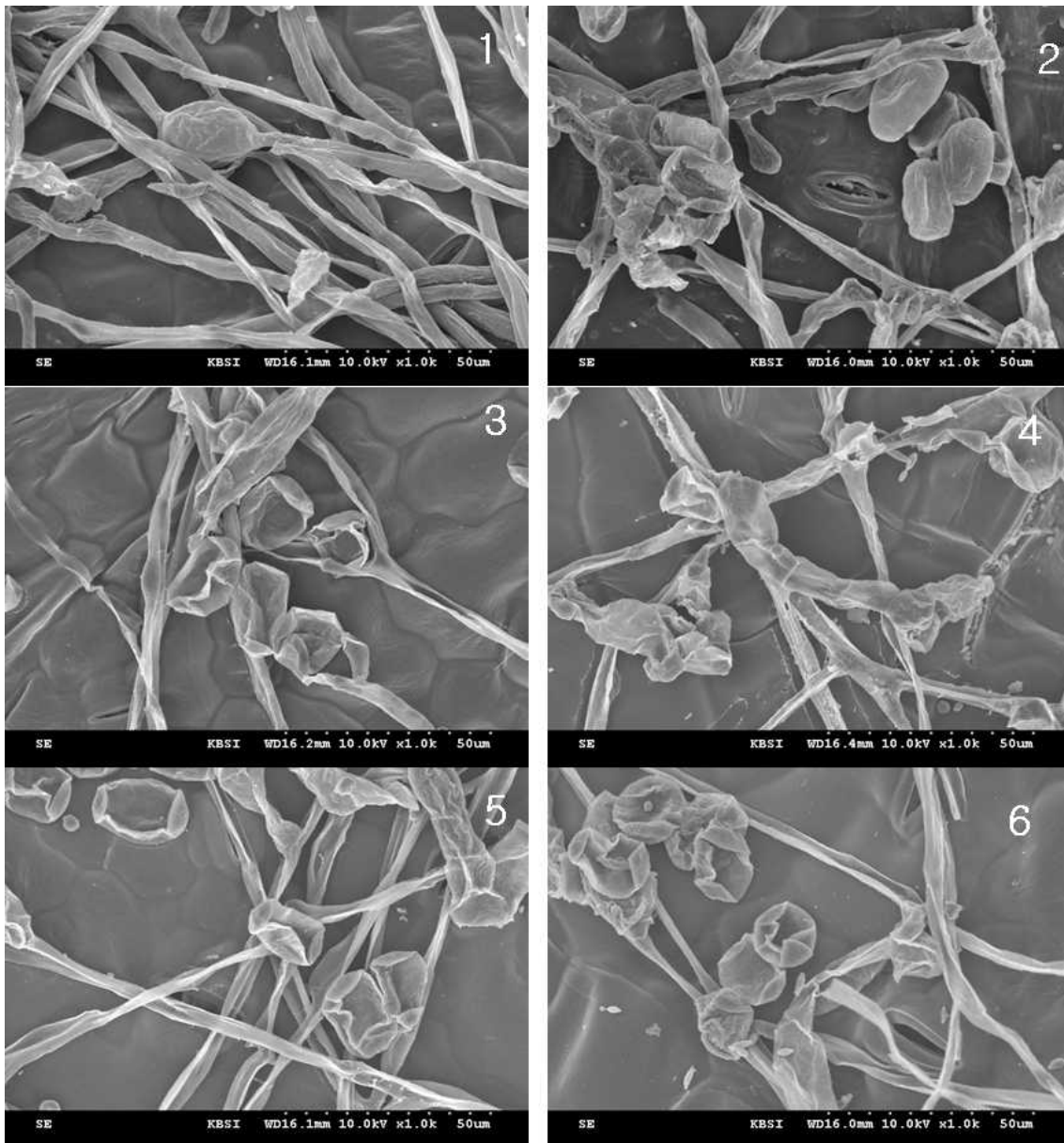
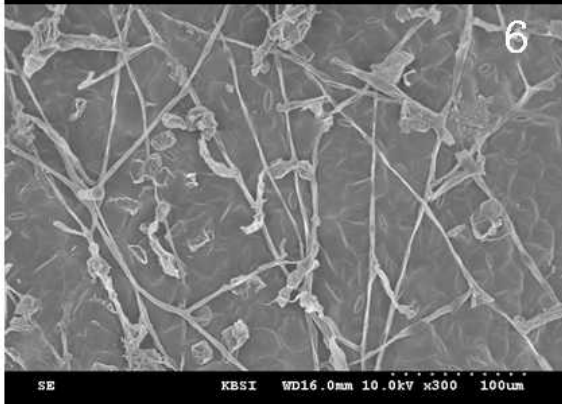
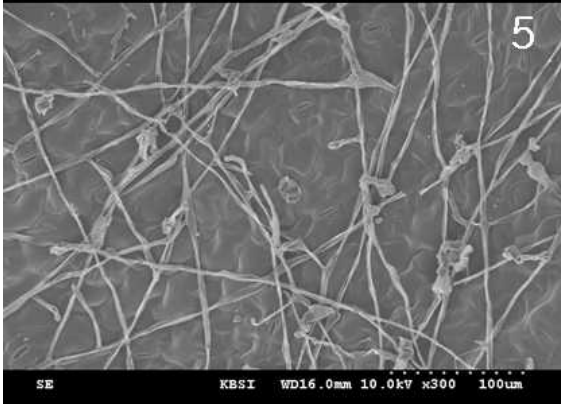
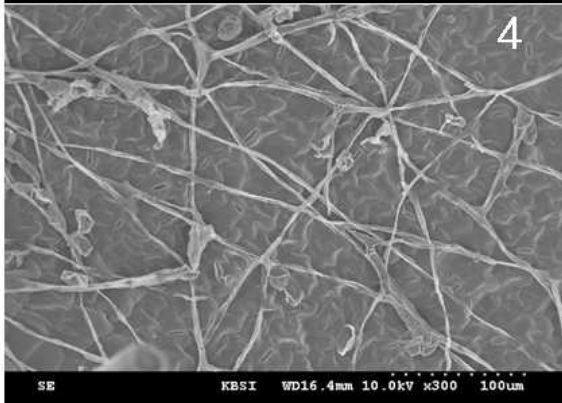
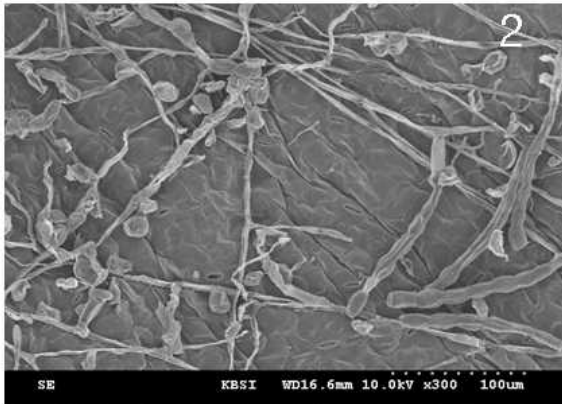
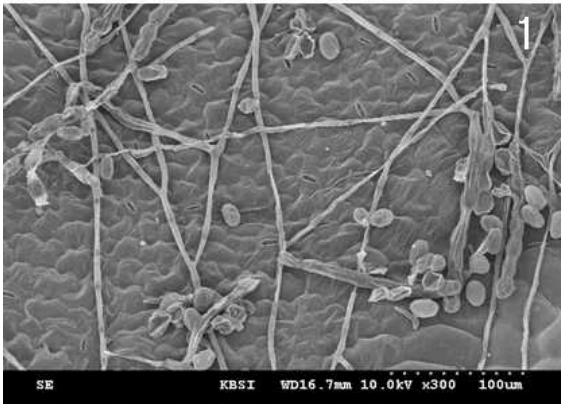


Fig. 55. SEM images of spores and mycelia of powdery mildews treated with 3,000Da kitosan-coated Difenoconazole at x1,000 dilution. 1(1), 3(2) 5(3), 7(4), 10(5), and 15(6) days, respectively, after the treatment.



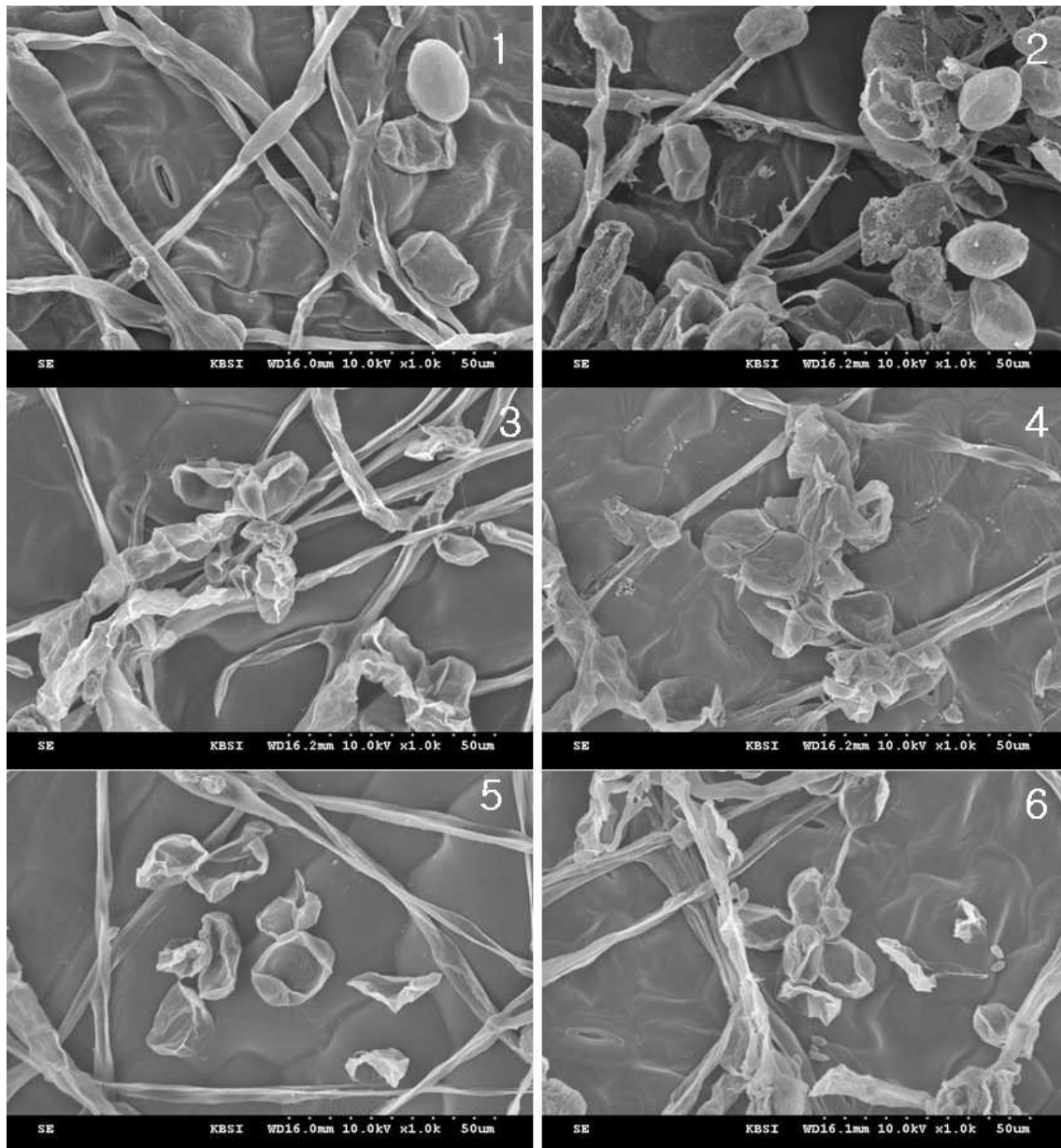
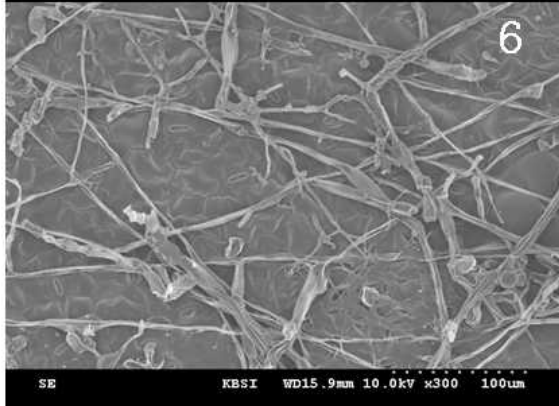
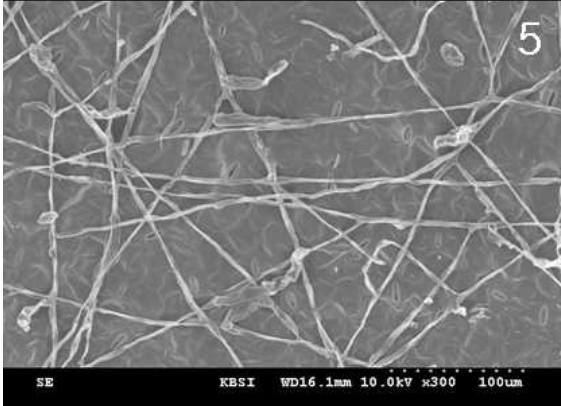
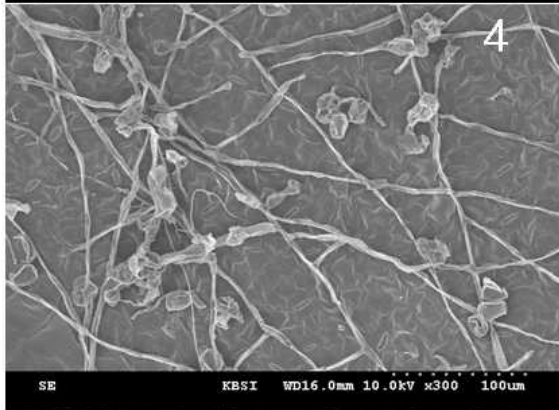
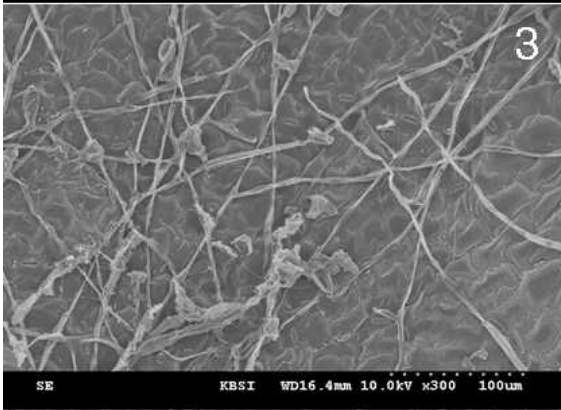
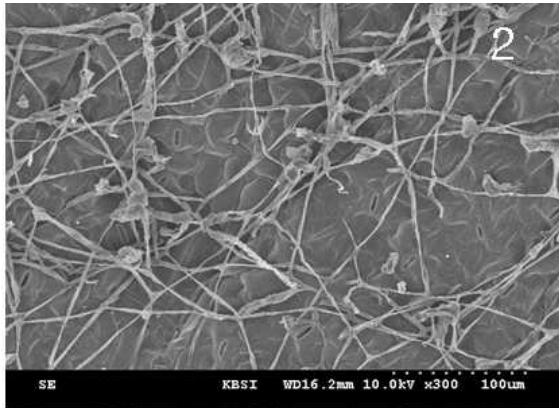
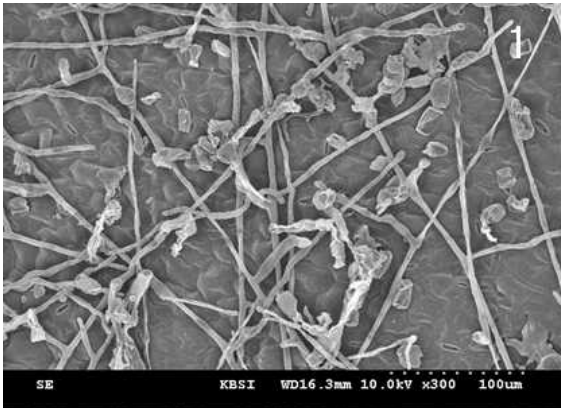


Fig. 56. SEM images of spores and mycelia of powdery mildews treated with 3,000Da kitosan-coated Difenconazole at x1,500 dilution. 1(1), 3(2), 5(3), 7(4), 10(5), and 15(6) days, respectively, after the treatment.



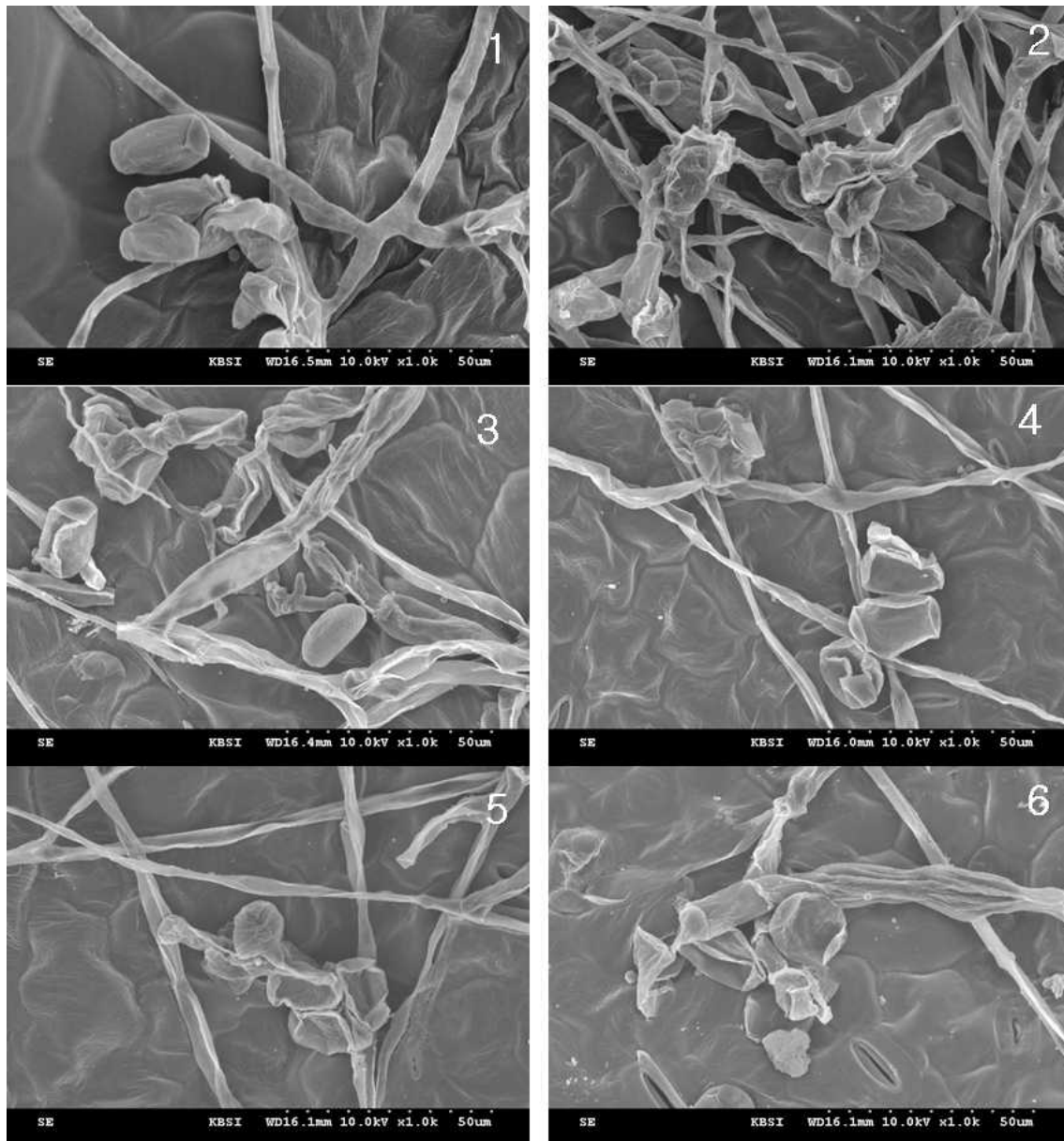
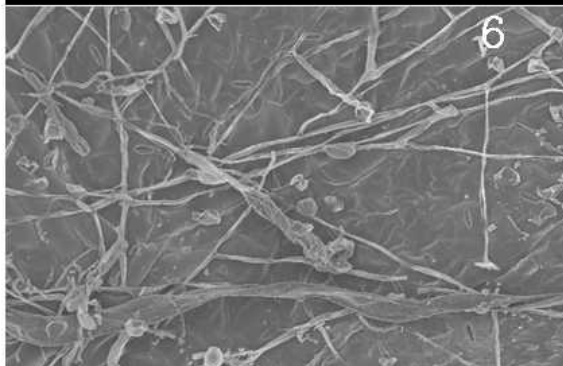
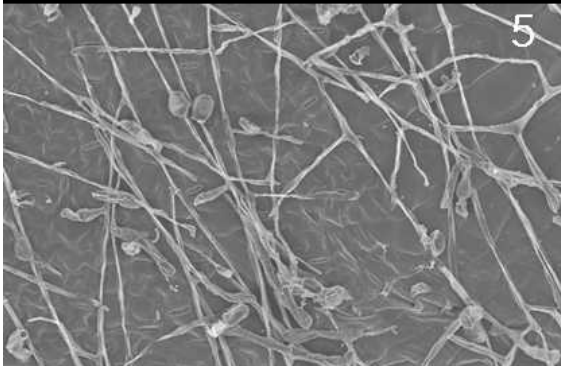
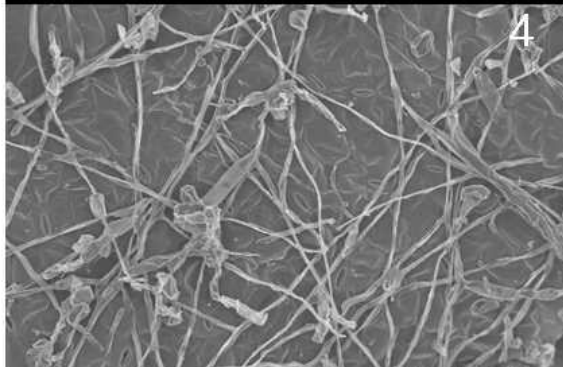
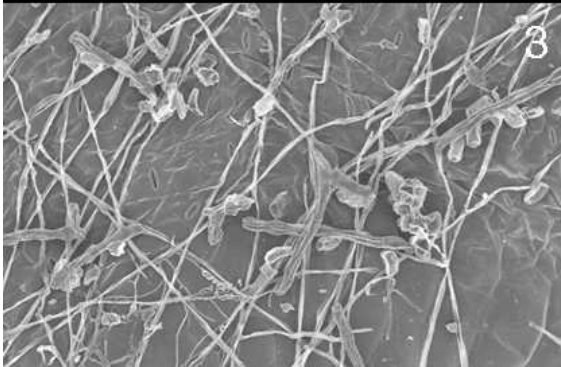
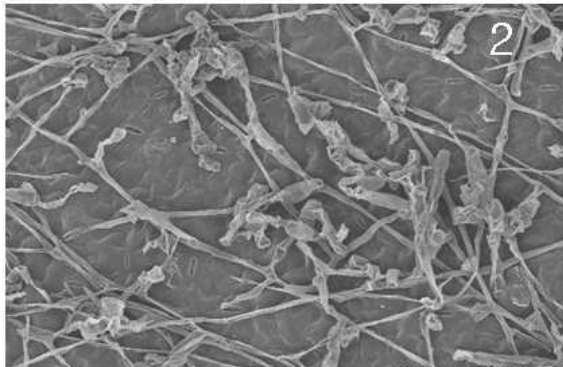
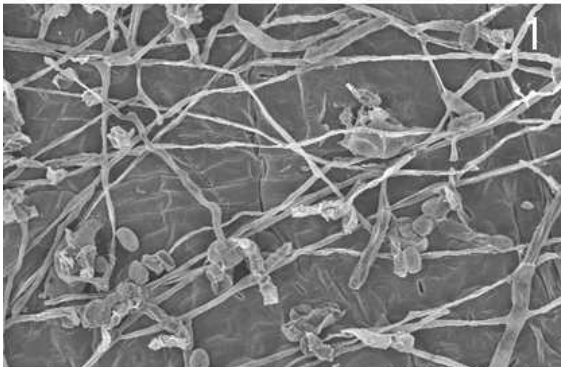


Fig. 57. SEM images of spores and mycelia of powdery mildews treated with 30,000Da kitosan-coated Difenoconazole at x1,000 dilution. 1(1), 3(2), 5(3), 7(4), 10(5), and 15(6) days, respectively, after the treatment.





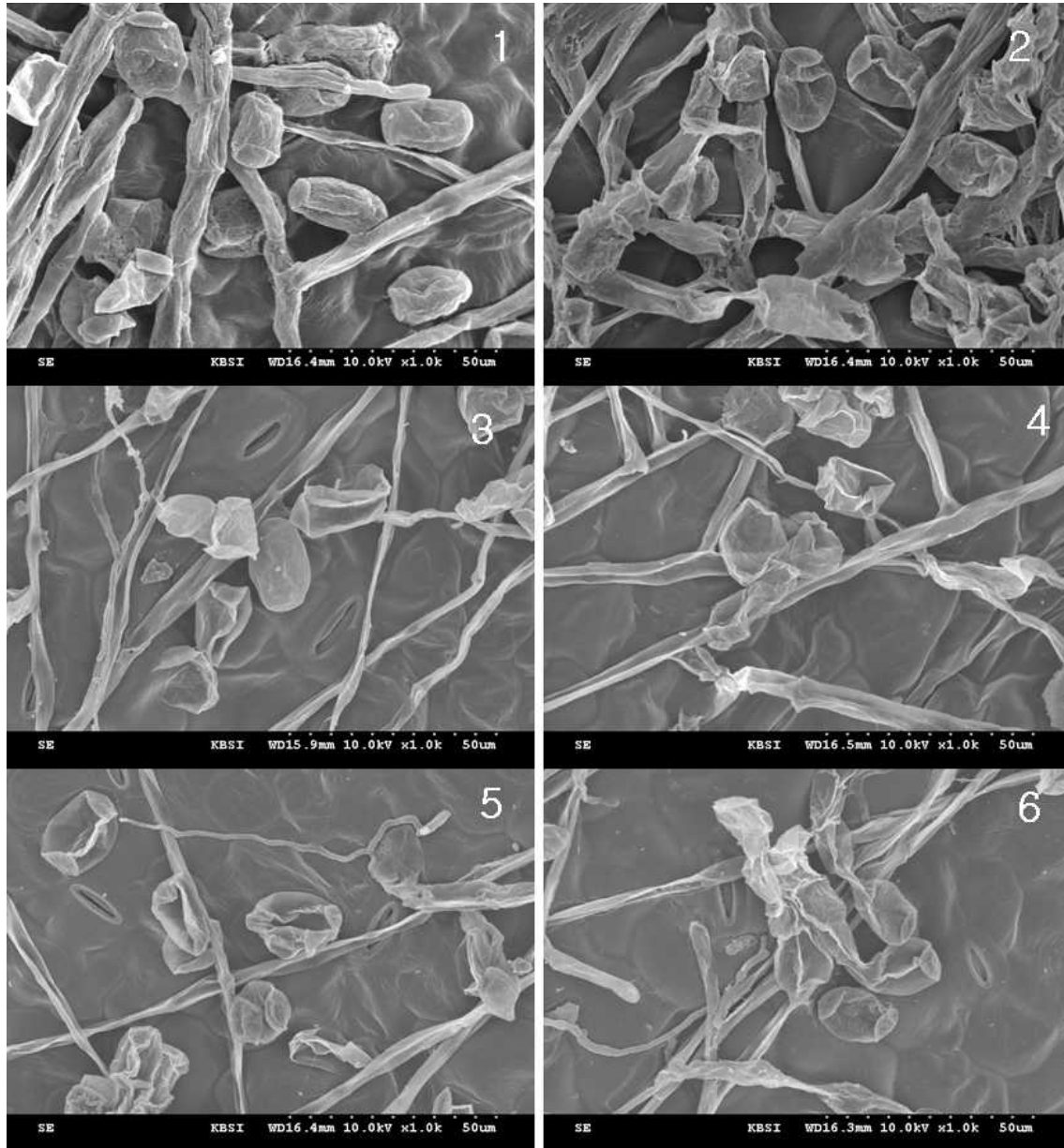


Fig. 58. SEM images of spores and mycelia of powdery mildews treated with 30,000Da kitosan-coated Difenoconazole at x1,500 dilution. 1(1), 3(2), 5(3), 7(4), 10(5), and 15(6) days, respectively, after the treatment.

#### (16) 나노 코팅한 Tebuconazole의 고추탄저병 병원균 방제 기작 연구

나노 코팅한 Tebuconazole이 고추 탄저병 병원균의 균사의 생육에 미치는 영향을 알아보기 위해 *Colletotrichum gloeosporioides*에 코팅약제를 처리한 후 균사의 생장을 SEM으로 관찰하였다. 무처리 한 경우 균사 표면이 매끄러우며 건강한 균사의 생장을 확인 할 수 있다(Fig. 59). 반면에 코팅한 Tebuconazole 약제를 처리 후 시간이 지날수록 나노 코팅한 Tebuconazole의 효과를

관찰 할 수 있었다(1일, 3일, 5일, 10일, 15일). SEM을 x300, x1,000로 관찰한 결과 3,000Da를 1,000배 희석하여 처리한 *Colletotrichum gloeosporioides* 균사는 약제 처리 3일 후 부터 시간이 경과할수록 균사가 조금씩 말라 가는 것을 관찰 하였다(Fig. 60). 3,000Da의 코팅한 Tebuconazole을 1,500배 희석하여 처리한 경우에는 처리 후 1~3일 경과 하였을 땐 무 처리에 비해 미미한 차이가 있었지만 5일 후 부터는 균사가 급격하게 사멸하는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 61). 30,000Da의 코팅한 Tebuconazole을 1,000배 희석하여 처리한 경우 *Colletotrichum gloeosporioides* 균사가 처리 3일 후부터 말라가는 것을 확인 할 수 있었다 (Fig. 62). 코팅한 Tebuconazole을 30,000Da의 1,500배 희석 처리한 결과 처리 5일 후부터 균사가 급격하게 사멸 하는 것을 관찰 할 수 있었다(Fig. 63).

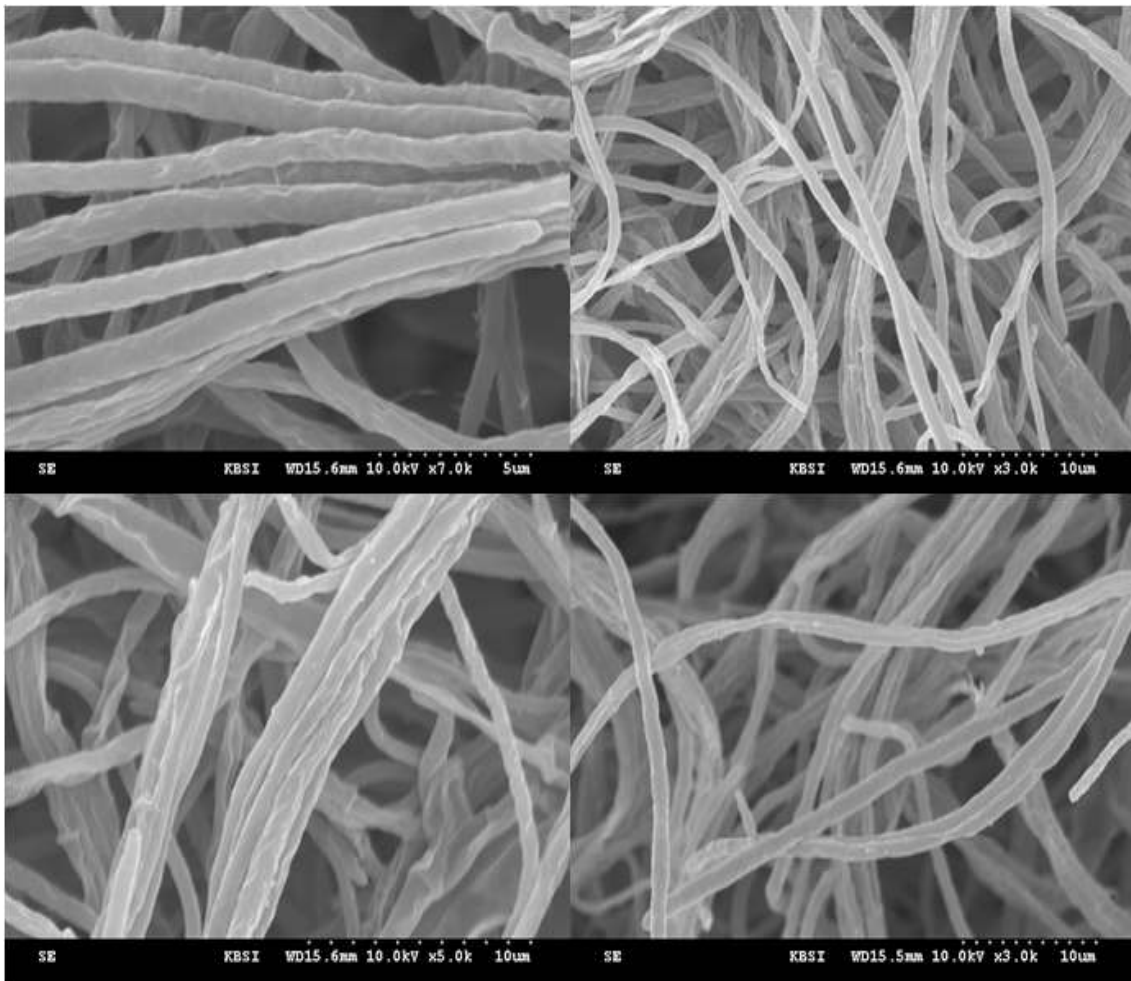


Fig. 59. SEM images of mycelia of *Colletotrichum gloeosporioides*



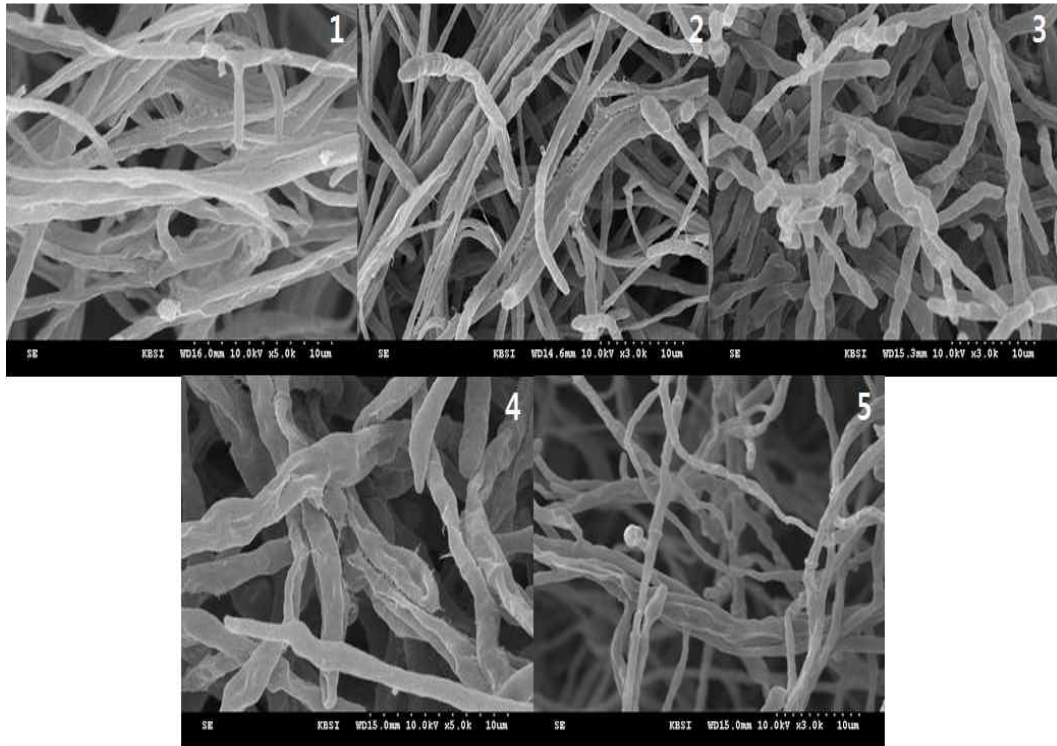


Fig. 60. SEM image of *Colletotrichum gloeosporioides* mycelia treated with 3,000Da kitosan-coated Tebuconazole at x1,000 dilution. One day(1), 3 days(2), 5 days(3), 10 days(4), and 15 days(5) after the treatment, respectively.

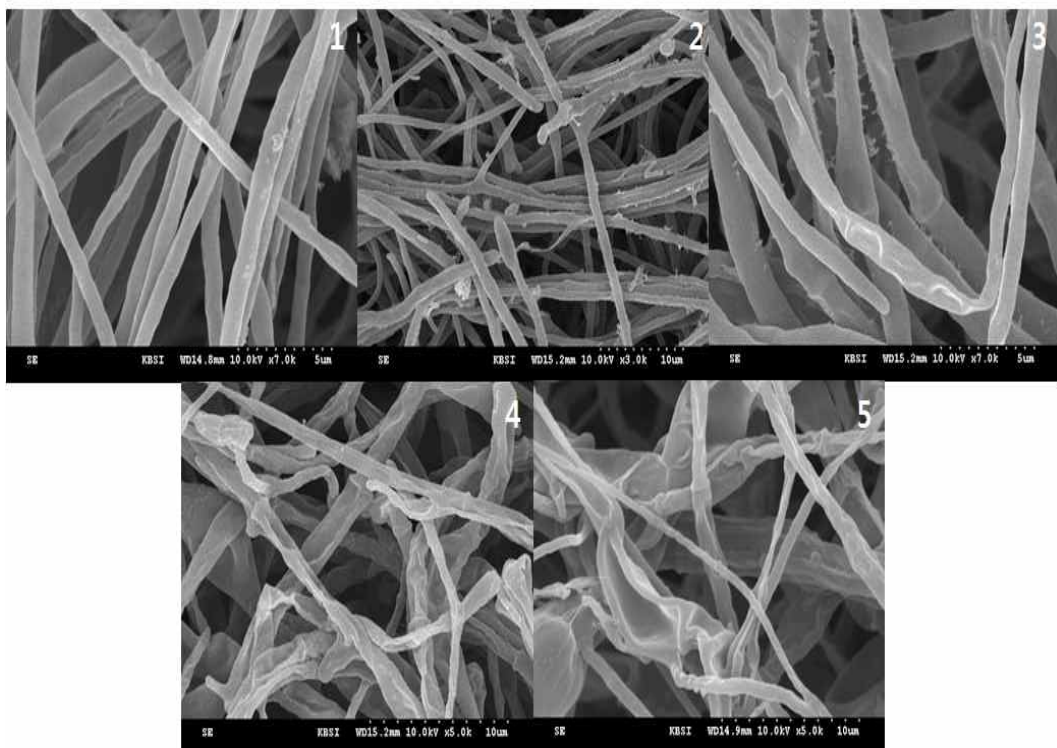


Fig. 61. SEM image of *Colletotrichum gloeosporioides* mycelia treated with 3,000Da kitosan-coated Tebuconazole at x1,500 dilution. One day(1), 3 days(2), 5 days(3), 10 days(4), and 15 days(5) after the treatment, respectively.

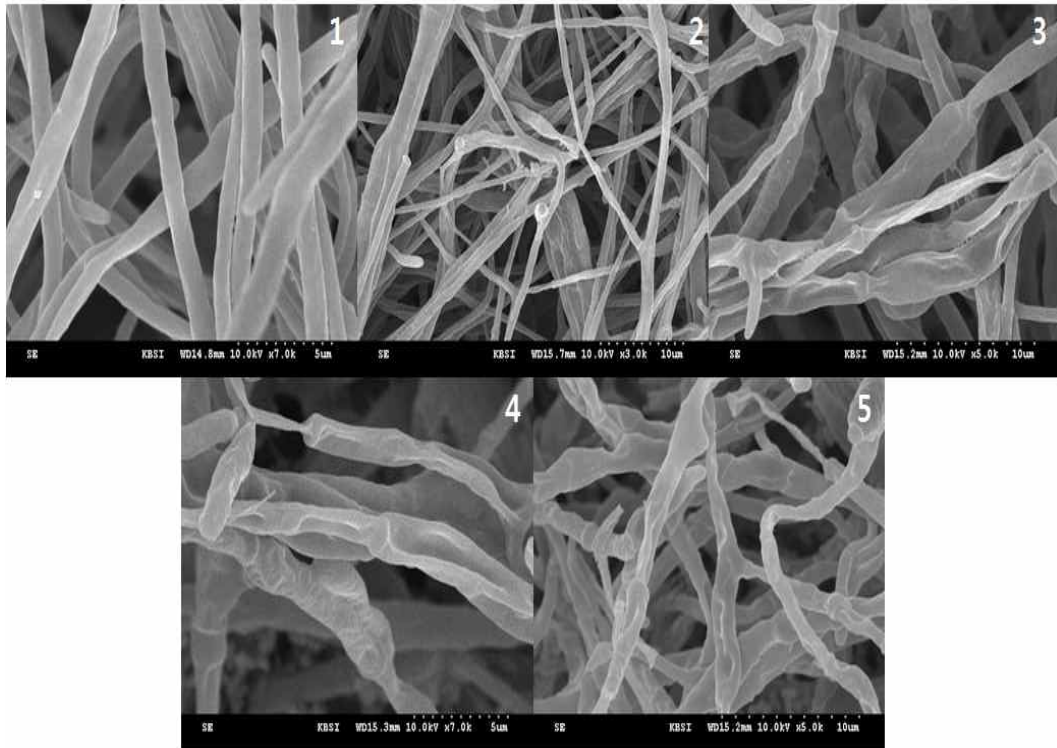


Fig. 62. SEM image of *Colletotrichum gloeosporioides* mycelia treated with 30,000Da kitosan-coated Tebuconazole at x1,000 dilution. One day(1), 3 days(2), 5 days(3), 10 days(4), and 15 days(5) after the treatment, respectively.

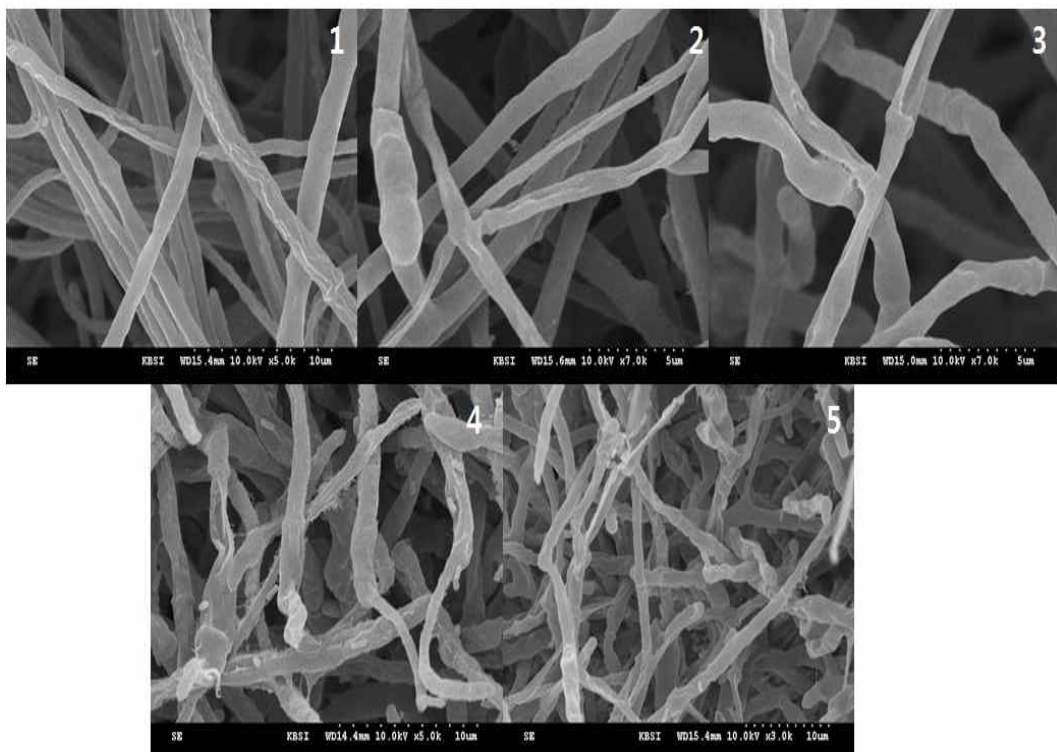


Fig. 63. SEM image of *Colletotrichum gloeosporioides* mycelia treated with 30,000Da kitosan-coated Tebuconazole at x1,500 dilution. One day(1), 3 days(2), 5 days(3), 10 days(4), and 15 days(5) after the treatment, respectively.

### (17) 은나노 용액의 고추탄저병 병원균 방제기작 연구

은나노용액(WA-CV-WA13B)이 고추 탄저병 병원균의 균사 생육에 미치는 영향을 알아보기 위해 *Colletotrichum gloeosporioides*에 nano-silver 용액을 처리 후 균사 생장의 변화를 SEM으로 관찰하였다. nano-silver 용액은 농도별(30ppm, 50ppm, 100ppm), 처리 후 시간(1일, 3일, 5일, 10일, 15일)에 따른 효과를 관찰 할 수 있었다. SEM을 x300, x1,000로 관찰한 결과 30ppm의 nano-silver 용액을 처리한 *Colletotrichum gloeosporioides* 균사는 약제 처리 5일 후 부터 시간이 경과할수록 균사가 조금씩 말라 가는 것을 관찰 하였다(Fig. 64). 50ppm의 nano-silver 용액을 처리한 *Colletotrichum gloeosporioides* 균사의 생장억제 또한 처리 5일 후에 미미한 효과를 보이다가 시간이 경과 할수록 10일, 15일이 경과 할수록 억제효과를 보였다(Fig. 65). 100ppm의 경우 역시 처리 5일 후부터 균사가 말라 가는 것을 확인 할 수 있지만 다른 농도에 비해 처리 10일 후엔 거의 모든 균사가 말라 있는 것을 관찰하였다(Fig. 66).

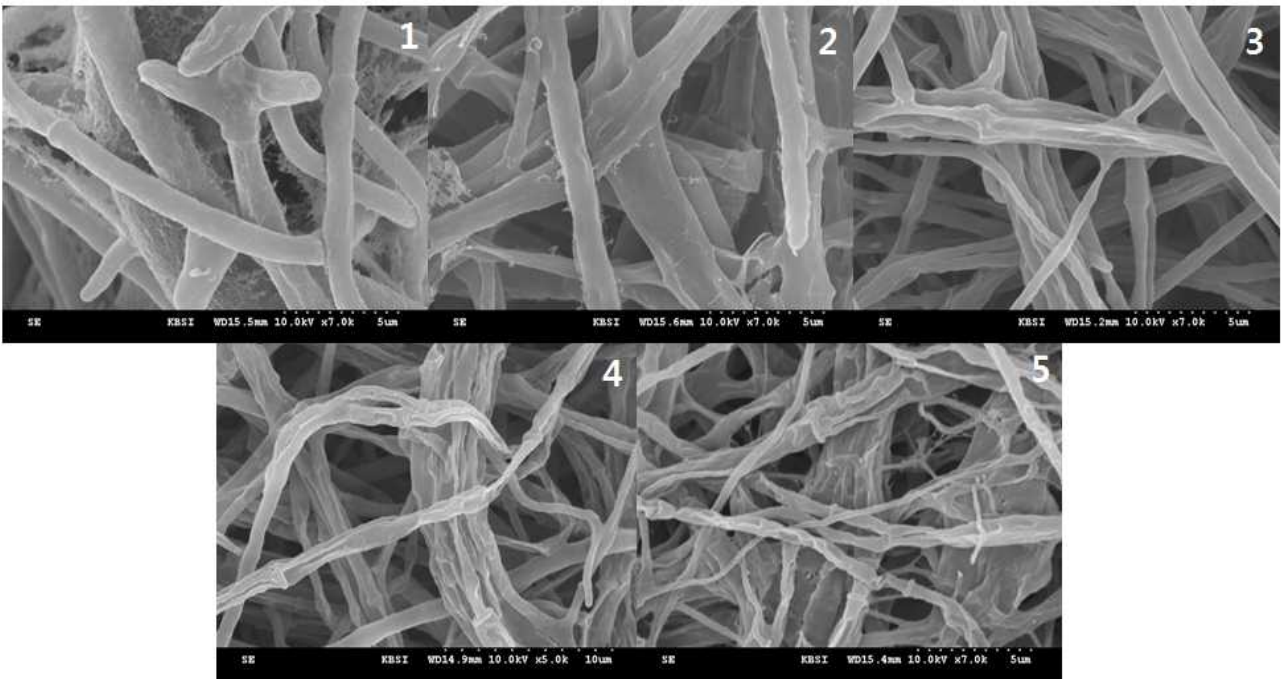


Fig. 64. SEM image of *Colletotrichum gloeosporioides* mycelia treated with 30ppm nano-silver liquid. One day(1), 3 days(2), 5 days(3), 10 days(4), and 15 days(5) after the treatment, respectively.



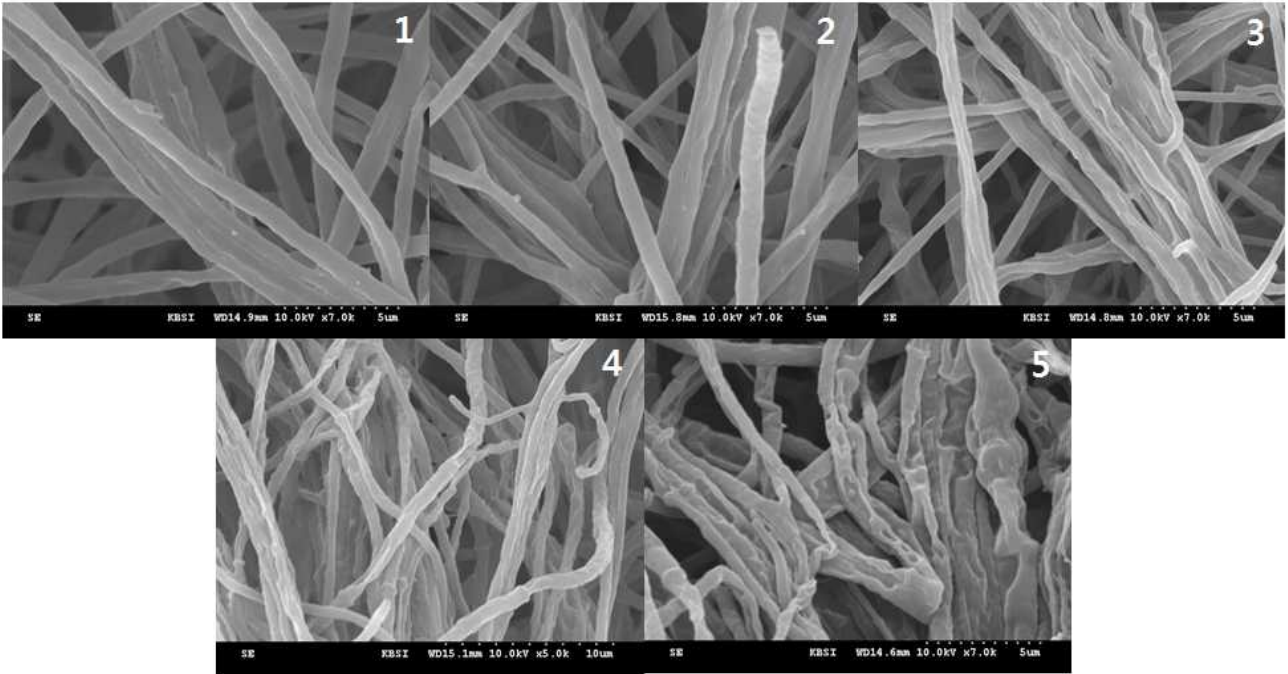


Fig. 65. SEM image of *Colletotrichum gloeosporioides* mycelia treated with 50ppm nano-silver liquid. One day(1), 3 days(2), 5 days(3), 10 days(4), and 15 days(5) after the treatment, respectively.

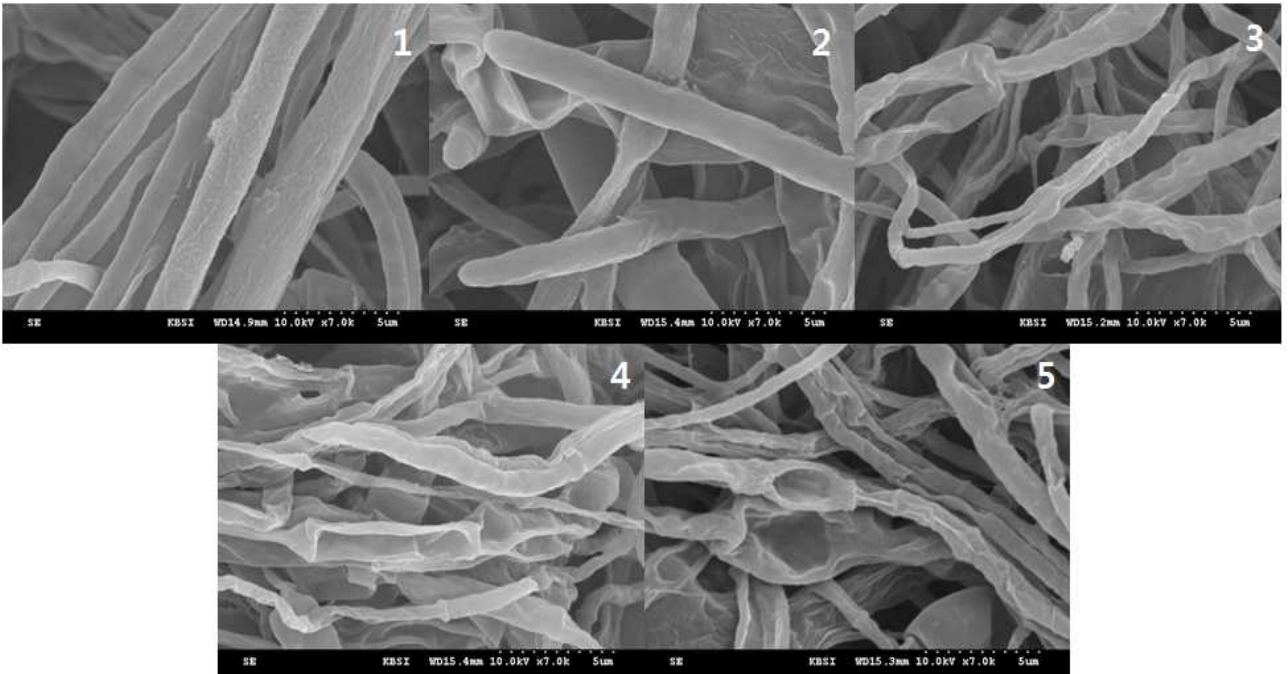


Fig. 66. SEM image of *Colletotrichum gloeosporioides* mycelia treated with 100ppm nano-silver liquid. One day(1), 3 days(2), 5 days(3), 10 days(4), and 15 days(5) after the treatment, respectively.

## 제 4 장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절. 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표 달성도

#### 1. 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도

가. 1차년도 연구개발목표의 달성도

목 표	연구개발 수행내용	달성도(%)
서방형 제형에 적합한 농약의 선발	방제대상 해충에 등록된 200여종의 농약으로부터 키토산을 재료로하여 서방형 제형으로 적합한 살충제 3종을 선발하여 나노제형화함	100
서방형제형이 필요한 대상 방제 해충의 선발	난방제 해충으로 서방형 제형이 필요한 대상 해충으로 파밤나방, 거세미나방, 복숭아혹진딧물, 목화진딧물, 톱다리개미허리노린재, 온실가루이, 꽃노랑총채벌레 등 8종류를 선발하여 실내실험 실시	100
대상해충별 선발된 살충제의 나노제형에 따른 살충효과 및 약효지속효과 검증	선발된 3종의 살충제 각각에 대한 대상해충별 나노제형에 따른 살충효과 및 약효지속효과 조사를 통해 서방형 제형으로서의 개발 가능성 검토	90
생물고분자의 선정	나노캐리어로서 적합한 제재를 선정하고 그 제재에 적합한 나노화 방법을 선정, 실험 프로토콜의 계획	100
나노캐리어의 제조	나노캐리어의 제조에 적합한 방법을 실험적 근거를 두고 선정한 후 제조, 이 실험에서는 high-energy nano liposome preparation method을 선정	100
나노캐리어시스템 표면 특성분석	이 실험에서는 nano carrier system의 표면전하를 조절하기 위해 다양한 조건들이 사용됨. 그 조건들은 코팅물질(chitosan)의 농도 및 분자량, alginic acid를 이용한 다중코팅, 적용해준 초음파 균질기의 적용시간 등 이라 할 수 있음.	90
나노캐리어시스템 size 조절	타겟으로하는 곤충의 기공크기를 기준으로 사이즈 범위 설정 후 high-energy nano-liposome preparation method (ultrasonic energy)를 이용해 나노캐리어를 제조 및 프로토콜에 변수를 두어 사이즈 조절	90
나노 소재의 선발 및 방제대상 병원균 선발	선발된 나노소재의 효능 실험	100
나노은 및 나노 키토산의 특성 실험 및 생물 시험	나노화된 농약으로 식물 침투이행 및 생물검정	90
생물검정으로 살균성 시제품의 기초선발	나노은 및 나노키토산의 생물검정 및 특성 조사	100

나. 2차년도 연구개발목표의 달성도

목 표	연구개발 수행내용	달 성 도(%)
서방형 제형에 적합한 농약의 선발	방제대상 해충에 등록된 200여종의 농약으로부터 키토산을 재료로하여 서방형 제형으로 적합한 살충제 3종을 선발하여 나노제형화함	100
선발된 나노제형화 살충제별 대상해충 적용 실험	에토펜프록스 나노제형에 따른 과밤나방과 담배거세미나방의 살충효과 및 서방형 살충효과 검정 알파사이피메스린 나노제형에 따른 복숭아혹진딧물과 목화진딧물의 살충효과 및 약효지속효과	90
나노제형에 따른 살충효과검정	키토산 캐리어에 따른 살충효과 및 약효지속효과를 담배거세미나방, 복숭아혹진딧물 2종 해충에 대해 검토	100
Encapsulation efficiency 최적화(나노 작물보호제)	이 실험에서는 nano carrier system의 encapsulation efficiency를 최적화하기 위해 코팅물질(chitosan)의 농도, alginic acid를 이용한 다중코팅 등의 다양한 조건들이 사용되었음.	90
다양한 조건으로 방출제어 시도	제조한 나노캐리어의 방출제어 능력을 분석하기 위해 gas chromatography를 이용하여 특정 조건에 노출된 sample의 일부를 채취 해 잔류 농약을 분석	100
나노 피복제의 피복효과 분석	Nano carrier system의 피복효과는 결과물의 표면 분석과 encapsulation efficiency의 분석으로 확인할 수 있음.	90
나노캐리어시스템의 형태학적인 분석(SEM, TEM 분석)	SEM을 이용해 결과물의 3차원적 입체형태를 분석	90
나노화 기술응용 및 나노-바이오 기술적용 검증	나노화 기술응용 적용 검증	100
은 나노 안정성 및 안전성 검정	은나노의 토양에서의 안전성 및 안정성 검정	90
약효 및 약해 검증을 위한 실내실험 및 포장실험	실내 및 포장에서의 약효 및 약해 검정	80

다. 3차년도 연구개발목표의 달성도

목 표	연구개발 수행내용	달 성 도(%)
나노제형에 따른 살충효과 및 서방형제형으로서의 이용가능성 검토	담배거세미나방과 복숭아혹진딧물, 목화진딧물의 키토산 캐리어에 따른 나노약제의 살충효과 및 약효지속효과 조사	90
선발된 나노제형화 살충제별 대상해충 적용 실험	피리플루퀴나존 나노살충제의 키토산 캐리어에 따른 복숭아혹진딧물의 살충효과 및 약효지속효과 관찰	90
나노캐리어의 총체표면과 식물체표면의 부착정도 및 용출정도 확인	알파사이퍼메스린의 키토산캐리어에 따른 나노입자의 변화 확인 및 부착정도 확인을 통한 살충제 지속효과 확인	80
최적의 방출제어 조건 결정 및 적용범위 확대	나노캐리어의 농약 방출실험은 Gas chromatography를 이용하여 측정 되었으며 제조된 농약을 core material 로 포함한 나노캐리어를 aqueous한 상태에 두고 지정된 시간마다 그 sample 중 일부를 GC를 통해 분석 잔류 농약을 정량하여 나노캐리어 시스템의 방출 제어기능을 확인	100
나노캐리어시스템에 목표지향성 부여	Nano carrier system에 복합적 코팅기술을 도입하여 target에 알맞은 목표지향성 부여	90
나노캐리어시스템의 안정성 확보	이 실험은 제작된 nano-carrier system을 특정 온도에서 저장되다가 정해진 시간마다 size와 표면전하를 측정하며 carrier system의 stability를 알아봄.	100
상업적 제품화	Nano type으로 제형된 결과물의 효과를 확인하고 산업체에서의 상품성을 확인, preparation process 로의 도입을 고찰함.	80
Controlled Release 및 Nano carrier에 가능한 작물보호제의 활용성 시험	선발된 농약으로 서방형 제형의 효능실험 나노화된 농약으로 식물 침투 이행 및 생물검정	100
나노은의 농가포장 실험	나노은 및 나노키토산의 생물검정 및 특성조사	80
은나노화합물의 특성구명 및 포장에서의 화합물 분석	은나노화합물 처리 작물체와 처리된 토양에서의 은농도 변화추이조사	90



## 제 2 절. 관련분야의 기술발전예의 기여도

### 1. 기술적 기대효과

- 나노입자제제 개발로 환경오염을 최소화하며 최소의 성분으로 최대의 약효를 발휘할 수 있음.
- 다양한 환경 하에서 나노농약의 용출제어에 의한 농도 조절로 필요한 양만큼 사용 가능함.
- 식물유래 기능성 소재의 나노화로 새로운 개념의 기능성 식품산업 육성이 가능하게 됨.
- 나노-바이오 공정의 개발을 통한 새로운 나노물질 대량생산 기술을 확립하게 됨.
- 효과를 극대화할 수 있는 나노-바이오 기술로서 식물유래 기능성 소재, 금속, 천연물 및 미생물유래 유용물질을 활용한 작물보호제 및 각종 친환경자재의 개발이 가능함.
- 생분해성 생물고분자 화합물을 이용한 환경친화형 나노입자의 서방형 제조기술을 확립함.
- 바이오 나노입자의 안전성 기술을 확보하여 타 나노공학 분야에 적용이 가능함.

### 2. 산업적 기대효과

- 식물유래 기능성 소재 및 키토산 등 유용물질을 활용한 다양한 친환경적인 작물보호 나노제품 개발이 가능함과 동시에 새로운 수요를 창출할 수 있는 신상품을 농업 분야에 응용하여 대외경쟁력을 향상시킬 수 있음.
- 나노 바이오 기술을 활용하여 나노입자 전달 및 서방형 제제 등 농업 분야에서 적용 가능한 독보적 기술을 개발하여 다양한 농업적 응용성이 가능함.
- 기존 화학농약사용량 감소로 인한 환경오염과 잔류독성의 감소가 가능함.
- 기술개발과제 수행 완료시점에는 사업화가 가능하여 경쟁력 있는 나노관련 제품을 수출할 수 있음.

## 제 5 장. 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 제 1 절. 연구개발결과의 성과 및 활용목표 대비실적

#### 1. 연구성과 목표

(단위 : 건수)

구분	특허		신품종				유전자 등록	논문		기타
	출원	등록	품종명 명칭등록	품종생 수입판 매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차년도 (07-08)	목표									
	달성							2		
2차년도 (08-09)	목표	1					1	1		
	달성						1	2		
3차년도 (09-10)	목표		1				2	2		
	달성						1	2	2	
계	목표	1	1				3	3		
	달성	진행중					2	6	2	

\* 연차별 연구성과 목표는 향후 연차평가 등의 정량적 평가지표로 활용됨

#### 2. 연구성과 활용 목표

(단위 : 건수)

구분	기술실시 (이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	목표	2	1			영농활용 1건
	달성	진행중	진행중			진행중

### 3. 논문게재 성과

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI 구분
		주 저자	교신 저자	공동저자				
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	Effect of various Nanover™ liquid on the fungal growth in vitro	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	Inhibition effect on the sclerotinia germination of Sclerotinia minor with Nanover™.	김상우	이윤수	Kim, S. W., Y. J. Kim, M. Y. Jung, S. B. Kim, and Youn Su Lee	The Plant Pathology Journal	24(2): 216	국내	SCIE
2008	Selection of biocontrol agent against Colletotrichum species.	김상우	이윤수	Kim, S. W., Y. J. Kim, and Youn Su Lee	The Plant Pathology Journal	24(2): 216.	국내	SCIE
2008	Enhanced effects of Nanover™ with pretreatment for the control of pepper anthracnose caused by Colletotrichum.	김영재	이윤수	Kim, Y. J., K. S. Kim, S. B. Kim, M. Y. Jung, and Youn Su Lee	Research in Plant Disease	14(3): 257.	국내	학진 등재
2008	파밤나방(Spodoptera exigua)의 환경친화적 방제를 위한 작물보호제의 선발	김대용	유용만	조민수, 최수연, 백승경, 김진수, 윤영남, 황인천	한국응용 곤충학회 지	47(1)	국내	학진 등재
2008	Changes of feeding behaviors of Myzus persicae (Homoptera : Aphididae) depending on inflow concentrations of imidacloprid	Mi Ja Seo	Young Nam Youn	Myong ki Kang, Beom Haeng Jo, In Cheon Hwang, Chul Jang, Yong Man Yu	Korean Journal of Applied Entomology	47(4),	국내	학진 등재
2009	Bactericidal effects of nano-silver liquid against various plant pathogenic bacteria.	김상우	이윤수	Kim, Sang Woo, J. S. Min, and Youn S. Lee.	Research in Plant Disease	15(2): 130-133.	국내	학진 등재

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내 외 구분	SCI 구분
		주 저자	교신 저자	공동저자				
2009	Effects of colloidal silver nanoparticles on sclerotium-forming phytopathogenic fungi.	민지선	이윤수	J. S. Min, K. S. Kim, S. W. Kim, J. H. Jung, K. Lamsal, S. B. Kim, M. Y. Jung, and Y. S. Lee.	Plant Pathology Journal	25(4): 376-380.	국내	SCIE
2009	Studies on the effect of nano-silver liquid against sclerotium-forming fungi.	정진희	이윤수	J. H. Jung, S. W. Kim, J. S. Min, Y. J. Kim, K. Lamsal, K. S. Kim and Y. S. Lee.	Proceeding of the 6th International Joint Symposium	p. 88	국제	기타
2009	Antifungal effects of nano-silver liquid against various plant pathogenic fungi.	김상우	이윤수	S. W. Kim, J. S. Min, Y. J. Kim, J. H. and Y. S. Lee.	Proceeding of the 6th International Joint Symposium	p. 86	국제	기타
2009	Formation of size-controlled nano carrier systems by self-assembly	방성환	박현진	유용만, 황인천	Journal of Microencapsulation	In press	국제	SCI
2009	Etofenprox에 대한 복숭아혹진딧물의 저항성과 감수성 개체군의 생명표와 섭식행동비교	조창욱	윤영남	박초롱, 윤규식, 강민아, 권혜리, 강은진, 서미자, 유용만	한국응용곤충학회지	48(3): 301-310	국내	학진 등재
2009	Etofenprox저항성 복숭아혹진딧물의 thiamethoxam과 fenpropathrin에 대한 섭식행동관찰	조창욱	윤영남	박초롱, 윤규식, 강민아, 권혜리, 석희봉, 강은진, 서미자, 유용만	한국응용곤충학회지	48(4): 493-501	국내	학진 등재
2010	The effect of nano-silver liquid against the white rot of the green onion caused by Sclerotium cepivorum	정진희	이윤수	J. H. Jung, S. W. Kim, J. S. Min, Y. J. Kim, K. Lamsal, K. S. Kim, and Y. S. Lee	Mycobiology	38(1): 39-45	국내	학진 등재

#### 4. 특허 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2010예정									

#### 5. 기술료 징수 현황

기 징수액	당해연도 징수액	향후 징수액	합계

#### 6. 인력활용/양성 성과

##### (1) 인력지원 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
15	2	2	4	7	7	8	0	0	15

##### (2) 장·단기 연수지원 성과

장기 (2월 이상)		단기 (2월 미만)	
국내	국외	국내	국외
0	0	0	0

#### 7. 경제사회 파급효과

산업지원 성과 (단위: 건)				고용창출 성과 (단위: 명)		
기술지도	기술이전	기술평가	합계	창업	사업체 확장	합계
1			1			

## 제 6 장. 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

해당사항 없음

## 제 7 장. 참고문헌

- Abdel-Mohdy, F. A., Fouda, M. M. G., Rehan, M. F., & Aly, A. S. (2008). Repellency of controlled-release treated cotton fabrics based on cypermethrin and prallethrin. *Carbohydrate Polymers*, 73, 92 - 97.
- Agrios, G. N. (2006). *Plant Pathology*. 5th edition. Academic Press.
- Avakyan, Z. A. (1967). Comparative toxicity of Heavy metals for certain microorganism, *Microbiology* 36: 366-369.
- Bang, S. H., Yu, Y. M., Hwang, I. C., & Park, H. J. (2009). Formation of size-controlled nano carrier systems by self-assembly. *Journal of Microencapsulation*, 26(8) (2009) 722 - 733.
- 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.
- Bonferoni, C., Sandri, G., Rossi, S., Ferrari, F., Caramella, C., Aguzzi, C., & Viseras, C. (2008). Polyelectrolyte-drug complexes of lambda carrageenan and basic drugs: relevance of particle size and moisture content on compaction and drug release behavior. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 34, 1188 - 1195.
- Bravo-Osuna, I., Ponchel, G., & Vauthier, C. (2007). Tuning of shell and core characteristics of chitosan-decorated acrylic nanoparticles. *European journal of pharmaceutical sciences* , 30, 143 - 154.
- Cecil, W. C., Charles, M. P., and Paul, W. K. (1962). "Bactericidal effect of low concentrations of silver," *J. AWWA*. 54: 208~216.
- Chen, J., Ping, Q. N., Guo, J. X., Chu, X. Z., & Song, M. M. (2006). Effect of phospholipid composition on characterization of liposomes containing 9-nitrocamptothecin. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 32, 719 - 726.
- Choi, H. S., Seo, S. A., Khang, G., Rhee, J. M., & Lee, H. B. (2002). Preparation and characterization of fentanyl-loaded PLGA microspheres: in vitro release profiles. *International Journal of Pharmaceutics*, 234, 195 - 203.
- Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 323, 149 - 154.
- Dahan, A., Duvdevani, R., Dvir, E., Elmann, A., & Hoffman, A. (2007). A novel mechanism for oral controlled release of drugs by continuous degradation of a phospholipid prodrug along the intestine: In-vivo and in-vitro evaluation of an indomethacin - lecithin conjugate. *Journal of Controlled Release*, 119, 86 - 93.

- Desai, K. G., & Park, H. J. (2006). Effect of manufacturing parameters on the characteristics of vitamin C encapsulated tripolyphosphate-chitosan microspheres prepared by spray-drying. *Journal of Microencapsulation*, 23(1), 91-103.
- 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.
- González-Rodríguez, M. L., Barros, L. B., Palma, J., González-Rodríguez, P. L., & Rabasco, A. M. (2007). Application of statistical experimental design to study the formulation variables influencing the coating process of lidocaine liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, 337, 336 - 345.
- Gore, D. B., & Snape, I. (2008). Freeze - thaw cycling, moisture and leaching from a Controlled Release Nutrient source. *Cold Regions Science and Technology*, 52, 401 - 407.
- Guo, J., Ping, Q., Jiang, G., Huang, L., & Tong, Y. (2003). Chitosan-coated liposomes: characterization and interaction with leuprolide. *International Journal of Pharmaceutics*, 260, 167 - 173.
- Huang, H., & Yang, X. (2003). Chitosan mediated assembly of gold nanoparticles multilayer. *Colloids and Surfaces A*, 226, 77 - 86.
- 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 Interf. 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*. p. 272.
- Jeong, Y. K., Y. J. Shin, and H. Back. (1998), Antibacterial effect of silver-coated toothbrush, *J. Korean Acad. Dent. Health*, 22, 347-355.
- Jung, J. H., Kim, S. W., J. S. Min, Y. J. Kim, K. Lamsal, K. S. Kim and Y. S. Lee. (2009). Studies on the effect of nano-silver liquid against sclerotium-forming fungi. *Proceeding of the 6th Internation Joint Symposium between Japan and Korea..* p.88.
- Jung, J. H., Kim, S. W., J. S. Min, Y. J. Kim, K. Lamsal, K. S. Kim, and Y. S. Lee. (2010). The effect of nano-silver liquid against the white rot of the green onion caused by *Sclerotium cepivorum*. *Mycobiology* 38(1): 39-45.
- Kim, Jang Hoi (2004). Nano silver chemotherapeutic agents and its applications. *NICE*. 22(6): 655-660.
- Kim, S. W., Kim, Y. J. Kim, E. J. Kim, J. S. Min, Y. S. Lee, S. B. Kim, M. Y. Jung, M. S. Yu, D. J. Kim, H. R. Youn, S. M. Han. (2006). Effect of Nano-silver liquid (Nanover™) on the mycelial growth of plant pathogenic fungi (Abstract). *Mycobiology* 34(4): 254.



- Kim, S. W., Kim, Y. J., and Youn Su Lee. (2008). Selection of biocontrol agent against *Colletotrichum* species. *The Plant Pathology Journal* 24(2): 216.
- Kim, S. W., Kim, Y. J., M. Y. Jung, S. B. Kim, and Youn Su Lee. (2008). Inhibition effect on the sclerotinia germination of *Sclerotinia minor* with Nanover™. *The Plant Pathology Journal* 24(2): 216.
- Kim, S. W., Min, J. S., and Youn Su Lee. (2009). Bactericidal effects of nano-silver liquid against various plant pathogenic bacteria. *Research in Plant Disease* 15(2): 130-133.
- Kim, S. W., Min, J. S., Lee, Y. S., S. B. Kim, M. Y. Jung, M. S. Yu, D. J. Kim, and H. R. Youn. (2007). Effect of various Nanover™ liquid on the fungal growth *in vitro* (Abstract). *The Plant Pathology Journal* 23(2): 122.
- Kim, S. W., Min, J. S., Y. J. Kim, J. H. and Y. S. Lee. (2009). Antifungal effects of nano-silver liquid against various plant pathogenic fungi. *Proceeding of the 6th International Joint Symposium between Japan and Korea*. p. 86
- Kim, Y. J., K. S. Kim, S. B. Kim, M. Y. Jung, and Youn Su Lee. (2008). Enhanced effects of Nanover™ with pretreatment for the control of pepper anthracnose caused by *Colletotrichum*. *Research in Plant Disease* 14(3): 257.
- Klinkesorn, U., Sophanodora, P., Chinachoti, P., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2005). Encapsulation of emulsified tuna oil in two-layered interfacial membranes prepared using electrostatic layer-by-layer deposition. *Food Hydrocolloids* 19:1044 - 1053.
- Kulinowski, P., Dorozynski, P., Jachowicz, R., & Weglarz, W. P. (2008). An integrated system for dissolution studies and magnetic resonance imaging of controlled release, polymer-based dosage forms - A tool for quantitative assessment of hydrogel formation processes. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48, 685 - 693.
- Laye, C., McClements, D. J., & Weiss, J. (2008). Formation of Biopolymer-Coated Liposomes by Electrostatic Deposition of Chitosan. *Journal of Food Science*, Vol. 73, Iss. 5, 7-15.
- Lee, K. L., Moyasar, T. Y., and Charles, P. G. (1989). "Efficacy of copper and silver ions reduced levels of oreo chlorine in inactivation of *Legionella pneumophila*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55(12): 3045-3050.
- Liu, N., & Park, H. J. (2008). Chitosan-coated nanoliposome as vitamin E carrier. *Journal of Microencapsulation*, In press.
- Madrigal-Carballo, S., Seyler, D., Manconi, M., Mura, S., Vila, A. O., & Molina, F. (2008). An approach to rheological and electrokinetic behaviour of lipidic vesicles covered with chitosan biopolymer.
- Mertins, O., Sebben, M., Pohlmann, A. R., & Silveira, N. P. (2005). Production of soybean phosphatidylcholine - chitosan nanovesicles by reverse phase evaporation: a step by step

- study. *Chemistry and Physics of Lipids*, 138, 29 - 37.
- Min, J. S., K. S. Kim, S. W. Kim, J. H. Jung, K. Lamsal, S. B. Kim, M. Y. Jung, and Y. S. Lee. (2009) Effects of colloidal silver nanoparticles on sclerotium-forming phytopathogenic fungi. *Plant Pathology Journal* 25(4): 376-380.
- Min, J. S., S. W., Kim, Y. J. Kim, Y. S. Lee, S. B. Kim, M. Y. Jung. (2007). Studies of the control effect of nano-silver liquid (Nanover™) against white rot of spring green onion (Abstract). *The Plant Pathology Journal* 23(4): 338.
- Motwani, S. K., Chopra, S., Talegaonkar, S., Kohli, K., Ahmad, F. J., & Khar, R. K. (2008). Chitosan - sodium alginate nanoparticles as submicroscopic reservoirs for ocular delivery: Formulation, optimization and in vitro characterization. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 68, 513 - 525.
- Ogawa, S., Decker, E. A., McClements, D. J. (2003). Influence of Environmental Conditions on the Stability of Oil in Water Emulsions Containing Droplets Stabilized by Lecithin-Chitosan Membranes. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 51, 5522-5527.
- Outlaw, R. A. and M. R. Davidson (1994). SMALL ultrahigh vacuum Science and technology A12.
- Preetz, C., Rube, A., Reiche, I., Hause, G., & Mäder, K. (2008). Preparation and characterization of biocompatible oil-loaded polyelectrolyte nanocapsules. *Nanomedicine*, 4, 106 - 114.
- 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.
- Siepmann, F., Siepmann, J., Walther, M., MacRae, R. J., & Bodmeier, R. (2008). Polymer blends for controlled release coatings. *Journal of Controlled Release*, 125, 1 - 15.
- Sonvico, F., Cagnani, A., Rossi, A., Motta, S., Di Bari, M. T., Cavatorta, F., Alonso, M. J., Deriu, A., & Colombo, P. (2006). Formation of self-organized nanoparticles by lecithin /

- chitosan ionic interaction. *International Journal of Pharmaceutics*, 324, 67 - 73.
- Thanasukarn, P., Pongsawatmanit, R., & McClements, D.J. (2006). Utilization of layer-by-layer interfacial deposition technique to improve freeze - thaw stability of oil-in-water emulsions. *Food Research International*, 39, 721 - 729.
- Torchilin, V.P. (2005). Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4, 145 - 160.
- Volodkin, D., Mohwald, H., Voegel, J. C., & Ball, V. (2007). Coating of negatively charged liposomes by polylysine: Drug release study. *Journal of Controlled Release*, 117, 111 - 120.
- Wachs, I. E. and R. J. Madix (1978). The oxidation of methanol on a silver catalyst *Surf. sci.* 76: 531-538.
- Wang, B. X., Zhao, Y., & Zhao, X. P. (2007). The wettability, size effect and electrorheological activity of modified titanium oxide nanoparticles. *Colloids and Surfaces A*, 295, 27 - 33.
- Wu, C., Chen, C., Lai, J., Chen, J., Mu, X., Zheng, J., & Zhao, Y. (2008). Molecule-scale controlled-release system based on light-responsive silica nanoparticles. *Chem. Commun.*, 23, 2662-2664.
- 강환열, 정명주, 정영기 (2000). "금속 은으로 제조한 Ag<sup>+</sup> 용액의 항균 효과와 안정성," *한국생물공학회지* 15(5): 521-524.
- 김지연, 김성은, 김재은, 이종찬, 윤제용 (2005). "은 이온과의 비교를 통한 나노 은 입자의 항균성 특성 연구," *대한환경공학회지* 771-776.
- 송호연, 김영희, 고광균, 오익현, 이병택 (2006). "은 나노 입자의 항균기정과 항균제 응용을 위한 *In vivo* 실험", *대한 금속.재료학회지* Vol. 44: No. 6.
- 임윤택, 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.

## 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.