

최 중
연구보고서

길항균을 이용한 입고병방제용 항균상토 및
포장적용기술 개발

Development of bed soil for protection of damping-off
disease using microbial antagonists and its field
application

고려바이오 연구소
(서울대학교 농업생명과학대학)

농림부 도서실



0010000

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “길항균을 이용한 입고병방제용 항균상토 및 포장적용기술 개발”
과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004 년 8 월 18 일

주관연구기관명 : 고려바이오연구소

총괄연구책임자 : 김 영 권

세부연구책임자 : 김 영 권

연 구 원 : 홍 석 일

연 구 원 : 홍 명 표

연 구 원 : 남 명 혼

연 구 원 : 최 재 필

연 구 원 : 안 경 현

위탁연구기관명 : 서울대학교

농업생명과학대학

위탁연구책임자 : 가 종 익

연 구 원 : 조 민 정

연 구 원 : 정 미 금

요 약 문

I. 제 목

길항균을 이용한 입고병방제용 항균상토 및 포장적용기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

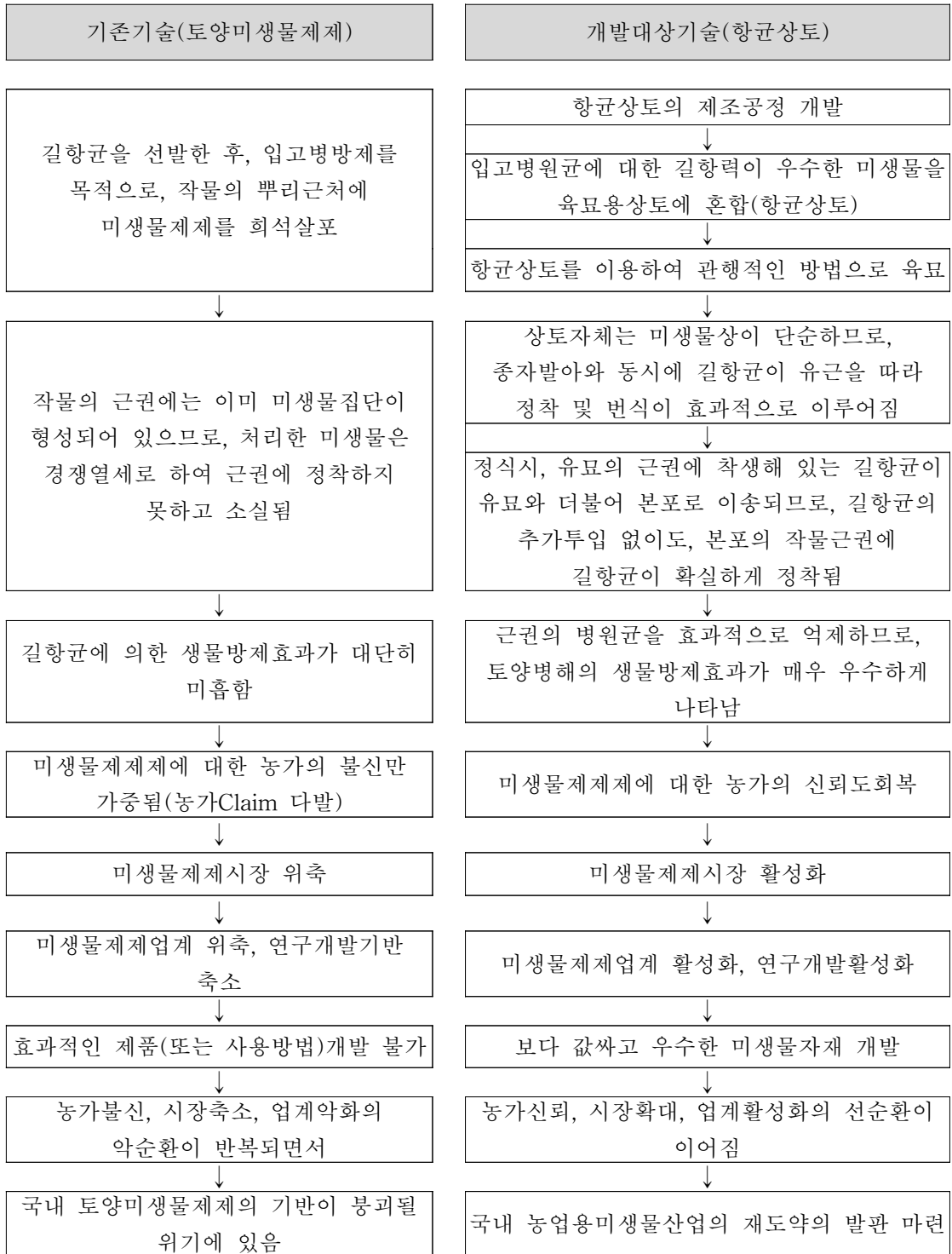
본 연구는 입고병 또는 잘록병균(Rhizoctonia, Pythium, Fusarium)에 대한 생육억제력이 우수한 길항균(Microbial Antagonists)을 함유하는 육묘용상토(이하 항균상토)의 개발에 관한 것이다. 토양전염성병원균이 유발하는 병으로서 어린작물에 가장 치명적이다. 입고병은 수종의 토양병원균이 복합적으로 작용하여 발생하는 병으로서, 이들 병원균은 토양중에서 포자 또는 균핵상태로 월동하고 환경조건이 좋아지면 발아하여 어린작물에 침입, 감염시키므로써 농사에 막대한 피해를 일으키는 병원균이다. 이러한 토양병원균은 토양에 포자상태로 항시 존재하므로 화학적인 방법으로는 근절할 수 없는 병해이다. 길항미생물은 항균물질생산, 병원균용균, 서식장소경쟁, 영양성분경쟁 등의 기작으로 식물병원균을 무력화시켜 병해발생을 방제할 수 있는 기능성미생물이다. 즉, 만일 농토에 처리한 길항미생물이 토양에 안정적으로 정착하여 지속적으로 증식할 수만 있다면, 길항미생물은 원리적으로 식물병원균을 매우 효율적이고 지속적으로 억제하여, 식물병을 환경친화적으로 방제할 수 있는 생물농자재이다. 상토는 피트모스, 코코넛피트, 제오라이트, 비료성분 등을 함유하여 종자로부터 유식물을 키우기 위한 인공배지로서, 통기성, 입도, 보습성, 배수성, 보비력, 뿌리활착성 등의 물리화학적 특성을 최적화시켜 유식물을 건강하게 재배할 수 있도록 하는 농자재이다.

길항균을 이용한 입고병(잘록병) 방제의 필요성은 다음과 같다. 즉, 안정적인 농업생산성확보를 위해서는 건실한 육묘생산이 필수적이며, 입고병은 토양전염성병해의

일종으로서, 토양살균제에 의한 방법은 일시적인 방제에 그치게 된다. 무공해농산물 생산을 위해서는 육묘기때부터 환경친화적인 방제기법을 도입해야 하며, 육묘는 조절된 환경내에서의 재배이므로, 길항균이 정상적으로 근권에 정착되면 육묘기간 내내 지속적인 병해방제가 가능하므로, 육묘중의 입고병은 항균상토로서 해결 가능한 것으로 판단된다

토양미생물제제의 효과에 대한 농가소비자 반응을 살펴보면 다음과 같다. 즉, 토양미생물제제는 약 7-8년전 외국수입품이 도입되기 시작하면서, 국내에서는 사용방법 및 효과에 대한 검증없이 무분별하게 농가에 확대보급되고 있다. 이후, 국내의 여러 중소기업에서 상기와 같은 공정으로 길항미생물제제를 무분별하게 제조하여 정확한 효과검증 없이 판매하게 되므로써, 제조업체간에는 과당경쟁, 농민소비자에게는 제품에 대한 불신만을 야기시키고 있다. 즉, 제조업체에서는 토양내에서의 길항균의 생리, 생태적인 동태(토양정착성 및 증식성)에 대한 정확한 연구자료 없이, 단순히 길항균의 원리적인 특성만을 강조한 제품을 제조, 판매하고 있으며, 따라서 제품개발에 많은 비용이 소요되지 않으므로써, 결국 업체간에는 효과가 검증되지 않은 수많은 제품을 가지고 과당경쟁하고 있는 실정이다. 소비자측면에서, 농민은 제조업체로부터의 부정확한 정보에 현혹되어 미생물제제에 대한 막연한 기대감을 가지고 제품을 적극 구매하여 사용하고 있으나, 실제포장에서 사용하기가 매우 불편할 뿐 아니라, 객관적인 효과가 나타나는 경우는 많지 않은 것이 현실이다. 따라서, 토양미생물제제의 잠재시장은 매우 크지만, 상기와 같은 이유로 인하여 토양미생물제제의 현재 시장상황은 답보상태에 머물고 있다.

따라서, 본 연구에서는 길항균을 포함하는 상토(항균상토)를 이용하여 육묘중에 발생할 수 있는 입고병을 방제하고자 한다. 즉, 대부분의 토양미생물제제(기존기술)는 작기중의 작물에 처리하도록 되어있으나, 본 연구에서는 길항미생물을 상토에 접종하여 육묘초기부터 길항균을 근권에 착생시키고자 한다. 아래의 표에 개발대상기술과 기존기술을 비교하였다



아래의 표는 농가소비자입장에서 기존기술과 개발예정기술을 비교한 것이다.

항목별		기존기술	개발대상기술
농가소비자측면	처리비용	① 별도의 유통과정을 통한 개별제품을 고가로 구입해야 하며, ② 토양처리시 근권이외의 부분에 떨어지는 loss분이 대단히 많으므로 ===> 농가비용이 과다함 (처리비용 : 75-100원/평)	① 길항균이 상토에 혼합되어 있어 기존 상토유통경로를 통하므로, 길항균의 원가구입이 가능하며, ② 길항균이 정확히 근권에만 처리되므로 loss가 없어 ===> 농가비용이 최소화됨 (처리비용 : 25-30원/평)
	작업성	① 미생물제제의 희석 및 살포를 위한 별도의 작업이 필요함	① 관행적인 육묘작업이면 충분하므로 별도의 작업 불필요
길항균의 정착성 및 증식성		① 근권에 기존에 정착되어 있는 미생물과의 경합관계 ② 기존기술제품의 제조공정특성상 길항균자체의 정착력이 매우 약하므로 ===> 길항균의 정착율 및 증식율이 매우 낮음	① 유근 생장과 동시에 길항균의 근권정착이 시작되며 ② 길항균이 근권의 우점균이 되어 경쟁적우위를 점하게 되므로 ===> 길항균정착성 및 증식성은 매우 우수함
길항균의 효과(항병력 및 생육촉진효과)		① 근권에 정착된 길항균의 밀도가 낮으므로 정상적인 효과를 나타내기 어려움	① 근권의 길항균밀도가 매우 높으므로 자연히 항병력 및 생육촉진효과가 매우 우수하게 나타남

결론적으로 미생물(길항미생물)을 토양에 직접 처리하는 방법보다, 미생물을 상토에 혼합하여 육묘단계부터 근권에 정착시키는 방법이 훨씬 효과적이라 할 수 있다

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

구분	주요 개발내용 및 범위
1단계(기초연구)	<ul style="list-style-type: none"> ◎ 자료조사(길항균, 묘입고병, 상토) ◎ 육묘시스템의 현황 및 문제점 조사 ◎ 전문육묘장 등 잠재소비자의 Mind조사 ◎ 기존상토의 오염균제거 연구 ◎ 유통중인 토양미생물제제 분석 ◎ 길항균 성능평가 및 선발 ◎ 길항균 배양기술 확립(배양조건 및 배양방법) ◎ 배합전 길항균전처리기술 개발 ◎ 길항균과 상토원자재의 Compatibility 조사 ◎ 길항균정착 및 번식을 제고를 위한 첨가제선발 ◎ 길항균 배합비율 최적화 ◎ 길항균과 상토의 배합공정기술 확립
2단계(응용연구 및 시제품제작)	<ul style="list-style-type: none"> ◎ 길항균 선발계속 및 성능개선 ◎ 시제품 제조 ◎ 시제품내 길항균의 경시적안정성 제고연구 ◎ 시제품의 물리화학적 안정성 조사 ◎ 육묘상에서의 미생물상 정밀분석 ◎ 육묘상에서의 길항균정착성 평가 및 개선 ◎ 육묘상에서의 길항균증식성 평가 및 개선 ◎ 육묘상에서 길항균의 문제점 조사 ◎ 항균상토의 입고병방제효과 검증 ◎ 항균상토의 생육촉진효과 검증 ◎ 유해물질(농약 등)에 대한 길항균내성평가 ◎ 농약 대비 길항균의 입고병방제가 비교평가 ◎ 본포정식후 근권의 길항균밀도변화 조사 ◎ 본포에서의 입고병 방제효과평가 ◎ 토양미생물제제와의 효과비교 평가연구 ◎ 농가실증시험(3개소 이상)

구분	주요 개발내용 및 범위(계속)
3단계(사업화)	<ul style="list-style-type: none"> ◎ 기존상토와의 경제성분석 ◎ 특허출원 2건(길항균 및 항균상토제조방법) ◎ 항균상토의 양산체제 및 품질관리시스템 구축 ◎ 장기유통시 길항균 생존율 개선방안 강구 ◎ 기존 상토판매대리점에 대한 신제품 홍보 및 교육 ◎ 농가현장결과 자료수집 및 현장기술자료 제작 ◎ 해외시장 개척추진

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

I) 연구개발 결과

1. 항균상토에 대한 소비자 mind 조사

전국 67개소의 육묘장 중, 33개소를 대상으로 항균상토에 대한 전화조사결과, 응답자 중, 67%가 항균상토 필요하다고 하였고, 항균상토를 구입하여 사용할 의사가 있는 경우가 82% 이었으며, 사용할 의향이 있는 응답자 중 74%는 일반상토의 110% 가격 까지 수용할 수 있는 것으로 확인되므로써, 본 조사결과, 항균상토는 그 시장성이 매우 밝은 것으로 판단된다.

2. 토양미생물제제 기존제품분석

전국적으로 유통되고 있는 토양미생물제제 중, 22개의 제품을 수집하였으며 제형별로 분류하면 액제가 10제품(45%), 분제가 7제품(32%), 입제가 5제품(23%)인 것으로 나타났다. 한편, 상당수의 제품은 악취발생, 표면에 부유물형성, 침전발생, 용기팽창(또는 쭉그러듦), 덩어리집, 곰팡이발생 등 내용물의 상태가 매우 불량한 것으로 나타났다. 이러한 현상은 제품이 생물학적으로 안정화되지 않았기 때문인 것으로 판단된다.

또한, 수집제품내 미생물의 안정성을 평가하기 위하여, 수집 2개월후의 미생물밀도를 조사하여 수집당시와 비교한 결과, 제품에 따라서는 미생물이 경시적으로 매우 안정한 경우도 있었으나, 2개월후에 상당수의 미생물이 사멸되는 제품도 있는 것으로 나타났다.

3. 길항균 선발

주관연구기관(고려바이오연구소)이 기보유하고 있는 20종의 우수길항균 Pool(세균 15종, 곰팡이 5종)과 수집된 기존토양미생물제제로부터 분리한 우수길항균(5종)의 입고병원균 3종에 대한 길항력을 평가하였으며, 그 결과 3종의 입고병원균 모두에 대하여 강력한 길항력을 발휘하는 8종의 미생물(세균 5종, 곰팡이 3종)을 선발하였다. 선발한 세균 5종은 모두 *Bacillus*이며, 곰팡이 3종은 모두 *Trichoderma* 인 것으로 나타났다.

5종의 세균 중, KB-6과 df-14 그리고 3종의 곰팡이 중 KF-3의 경우에는, 경시적으로 열에 비교적 안정한 항균성분을 분비하는 것으로 나타났다. 즉, 여타의 미생물은 시간이 경과하면서 또는 온도가 높아지면서 Cell-Free Extract의 항균활성이 급격히 저하되는 것으로 확인되었으나, 상기 3종의 길항균의 경우에는 보관온도(50℃까지) 및 보관기간(20일까지)에 관계없이 초기활성의 70% 이상을 유지하는 것으로 확인되었다.

3종의 우수길항균(KB-6, df-14, KF-3)의 액체배양액 희석액(100배)을 무우종자에 처리하여 종자의 발아율 및 무우유묘생육에 대한 영향을 평가하였다. 즉, 세균배양액과 곰팡이 배양액(Whole Broth)을 100배 희석하여 Tray에 파종한 무우종자에 5일 간격으로 3회 처리한 결과, 3종의 길항균 모두 종자발아에 대한 악영향은 전혀 없었으며, 유묘생육조사 결과로 볼 때, 길항균은 유묘생육을 오히려 촉진시키는 것으로 나타났다. 이는 길항균이 분비한 Metabolites에 의한 작용인 것으로 판단된다.

4. 길항균의 항균특성

입고병을 유발시키는 3종의 진균 중에서 *Rhizoctonia solani*는 Basidiomycete에 속하는 진균으로서 cell wall에 glucan과 chitin이 많이 함유되어 있고, *Pythium ultimum*은 Oomycetes 종류로서 cell wall에 cellulose와 glucan을 많이 가지고 있는 것으로 보고되었다. 따라서, 본 연구에서는 여러 종류의 배지를 사용하여 분리된 길항

균이 진균의 cell wall 구성성분을 분해하는 효소 (glucanase, mannanase, cellulase, xylanase)를 분비하는가 조사하였다. 한편, Fusarium oxysporium도 이들 분해효소에 의해 영향을 받지만 특히 ferric ion등의 영양분에 대한 경쟁관계를 통해 길항균이 항균효과를 나타내는 것으로 보고된 바, 본 연구에서도 ferric ion을 chelation시키는 siderophore를 분리된 길항균이 생성하는지를 조사하였다. 시험결과, 조사된 효소 모두에 대하여 양성반응을 보이는 균주들이 병원균 Fusarium oxysporium, Rhizoctonia solani, Pythium ultimum 에 모두 길항력을 발휘하는 것으로 나타나 효소의 양성반응과 길항력사이에 밀접한 관계가 있는 것으로 나타났다.

5. 길항균 배양기술확립

본 연구에서 선발한 길항균 KB-6와 곰팡이 KF-3을 대상으로 배양기술을 확립하였다. 즉, 길항균 KB-6는 세균이므로 액체배양조건을, KF-3는 곰팡이이므로 고체배양조건을 확립하였으며, 그 결과는 아래와 같다. 즉, KB-6은 액체배양 3일차에 최대균밀도가 $7 \times 10^9/\text{ml}$ 이며, KF-3는 고체배양 9일차에 최대균밀도가 $6 \times 10^8/\text{g}$ 인 것으로 확인되었다.

1) KB-6의 최적 액체 배양조건

가) 최적 배지조건

구분	최적성분 및 농도	최적배지조건 및 최대균밀도
탄소원	Glucose 3% 당밀 5%	◎ 최적배지조건 : Glucose 3% Soybean Flour 2% KH ₂ PO ₄ 0.1% MgSO ₄ 0.05% Yeast Extract 0.2% ◎ 최대균밀도 : $5 \times 10^9/\text{ml}$
질소원	Peptone 0.3% Soybean Flour 2.0%	
무기염류	KH ₂ PO ₄ 0.1% MgSO ₄ 0.05%	
Growth factor	Yeast Extract 0.2%	

나) 최적 배양조건

구분	최적조건	최적배양조건 및 최대균밀도
Agitation	150rpm	◎ 최적배양조건 : 교반속도 150rpm 배지사입율 20% 초기 pH 7.0 접종비율 2% 배양온도 30℃ ◎ 최대균밀도 : 7 X 10 ⁹ /ml
Media charge Volume	20% 이하	
Inoculum Ratio	2% 이상	
초기 pH	7.0	
배양기간	3일	
온도	28-30℃	

2) KF-3의 최적 고체 배양조건

가) 최적 배지조건

구분	최적성분	최적배지조건 및 최대균밀도
main media	탈지강	◎ 최적배지조건 : 탈지강 Glucose 1% Soybean Flour 3% KH ₂ PO ₄ 0.1% MgSO ₄ 0.05% Yeast Extract 0.2% ◎ 최대균밀도 : 4 X 10 ⁸ /g
sub media	Glucose 1% S. Flour 3.0%	

나) 최적 배양조건

구분	최적조건	최적배양조건
합수율	55-60%	◎ 최적배양조건 : 합수율 60% 접종비율 5% 이상 혼합접종 배지사입율 30% 배양기간 5일. 배양온도 30℃ ◎ 최대균밀도 : $6 \times 10^8/g$
접종량	5% 이상	
접종방법	혼합접종	
배지사입율	30% 이하	
배양기간	4-5일	
배양온도	28-30℃	

6. 액상제제의 안정화연구

액상제제화시의 고려사항은 3가지로 요약할 수 있다. 즉, 유효미생물의 생존성, 제품의 이화학적 물성안정성, 포자의 발아생리 활성화 등이다. 본 시험에서는 Bacillus균을 사용하므로 포자형태를 이용하면 유효미생물의 생존성에는 문제가 없다. 따라서 본 시험에서는 물성안정성을 위한 제제화 조건연구를 실시하였으며, 그 결과, 물성안정성을 위해서는 안정제로서 K-sorbate를 0.1-0.3% 사용함으로써, 제품의 이화학적 안정성을 달성할 수 있는 것으로 나타났다.

7. 포자 발아율 증진연구

발아생리 활성화를 위한 첨가제선발 연구 결과, 세균의 경우에는 포자액에 Glucose를 1.0%, 곰팡이의 경우에는 Citric acid를 1.0% 첨가함으로써, 포자의 발아율을 약 10% 이상 증가시킬 수 있는 것으로 나타났다.

8. 길항균 초기번식촉진용 영양성분 선별연구

길항균을 상토에 혼합하여 길항균상토를 제조하는 목적은 길항균이 파종용 상토에 효율적으로 정착하고 유묘의 근권에 정착 및 번식함으로써 입고병원균의 번식을 억제하여 결국에는 묘입고병을 방제하기 위함이다. 길항균이 함유된 상토를 이용하여 묘

입고병을 방제하기 위해서는 길항균이 상토와 유묘의 근권에 효율적으로 정착 및 번식할 수 있어야 하며, 이를 위하여 가장 중요한 것은 길항균의 초기번식용 먹이성분이다. 즉, 길항균은 이들 성분을 이용하여 초기증식을 도모할 수 있으며, 결국 근권부위에 Colonize할 수 있는 것이다. 따라서, 본 항에서는 길항균의 번식은 조장하면서 병원균의 생육과는 무관한 배지성분을 선발하여 길항균제조시 활용함으로써, 길항균의 입고병방제효과를 증진시키고자 하였다. 상토 또는 근권에 길항균의 효율적인 정착 및 번식을 위한 가장 중요한 성분은 탄소(energy)원이며, 따라서 본 항에서는 다양한 탄소원중에서, 길항균제제화시 혼입하여 처리함으로써 길항균의 유일한 탄소 및 에너지원으로 작용하여 길항균의 작용점에서의 번식을 극대화시킬 수 있는 최적의 성분을 선발하고자 하였으며, 그 결과 Glucose, Fructose, Maltose, Sucrose, Mannitol, Inositol, Sorbitol 등의 길항균 번식촉진력이 가장 우수한 것으로 나타났다. 따라서, 향후 길항세균 제제화시, 이들 성분을 투입하여 제조함으로써 길항세균의 초기활성을 증진시킬 수 있는 것이다

9. 길항균정착율 제고용 첨가제 선발연구

이전의 시험에서 선발된 탄소(에너지)원을 이용하여 길항균정착율 제고효과를 실험실적으로 검증하기 위하여 길항균의 종자처리시험을 실시하였다. 즉, 길항균과 선발성분(1g/L)을 혼합하여 표면살균한 상추종자에 처리하고, 멸균된 인공토양을 별도로 준비하여 Colony상으로 길항세균(KB-6)과 구별될 수 있는 Pseudomonas, Streptomyces, Fusarium conidia 등을 혼합하였다. 길항균처리종자를 상기토양에 파종하여 취아가 완성된 시점에 종자를 회수하여 종자표면에 정착해있는 길항균의 밀도를 조사하였다. 시험결과, 무처리구의 정착율을 100으로 하였을 때, Glucose는 114, Butyric acid는 113을 나타내고 있어, 이들 성분은 길항균정착율 제고효과가 매우 우수한 것으로 나타났다. 즉, 여러종류의 미생물이 혼재하고 있는 상태에서도 Glucose와 Butyric acid는 길항세균(KB-6)이 종자표면에 효율적으로 정착할 수 있도록 화학적인 환경을 조성해주는 것으로 판단된다.

10. 길항균의 전처리공정 개발

길항균제품의 길항균밀도는 보통 10^7 - 10^8 /g 수준의 고농축형태이므로 이를 상토에

직접 사용할 수는 없다. 즉, 상토에 혼합하기 이전에 길항균제품은 상토제조과정중에 적절한 방법으로 증량하여야 한다. 다시 말하면, 길항균제품을 상토에 고르게 혼합하기 위해서는 사전에 inert한 증량물을 이용하여 양을 늘려야 한다.

상토회사에서는 일반적으로 길항균을 미리 증량제를 이용하여 다량의 증량물을 제조해 놓은 후 필요에 따라 일정량씩을 사용하게 되므로, 혼합물내 길항균의 경시적 안정성과 상토원재료와의 혼합균질성을 확보해야 한다.

길항균을 증량함에 있어서 증량용재료는 상토원재료와의 혼합균질성을 고려하여 선택하여야 한다. 즉, 길항균 증량물을 상토에 투입할 때, 증량물의 입도, 비중 등에 따라 상토내에서 길항균의 분포도에 많은 편차가 생길 수 있으며, 이러한 경우에 항균상토의 효과가 표준화될 수 없다. 즉, 상토와의 혼합균질성이 확보될 수 있는 증량물을 선택하여 사용해야 한다. 따라서 본 항에서는 수급이 용이하고 경제성이 있으며 상토에 범용적으로 사용할 수 있는 원료중에서 길항균의 균질성이 확보될 수 있는 최적의 증량물을 선발하는 연구를 실시하였다. 시험결과, 증량물 종류에 따른 길항균 밀도 편차가 매우 심한 것으로 나타났다. 즉, 탈지강, 제오라이트(0.1-0.5mm)와 같이 입도가 너무 작은 재료의 경우에는 길항균증량물이 밀부분으로 치우치게 되어 균밀도 편차가 매우 큰 것으로 나타났다. 또한 제오라이트(1.0-3.0mm)와 같은 경우에는 입도가 너무 커서 역시 균밀도편차가 크게 나타나고 있다. 본 시험결과, 가장 적합한 증량제는 제오라이트(0.5-1.0mm)인 것으로 나타났으며, 피트모스의 경우에도 양호한 결과를 보이기는 하나 피트모스를 이용할 경우에는 물을 첨가해야 하는 등 증량작업성이 나쁘다는 문제점이 있다.

11. 항균상토의 보관조건 최적화연구

상토는 종자를 파종하여 유작물을 키우는 농자재이므로, 농민소비자들로서는 그 품질에 매우 민감한 품목이다. 따라서 길항균을 투입한 제품이 유통중에 어떠한 물성변화도 있어서는 안된다. 본 항에서는 상토의 제조, 포장, 보관과정중에 발생할 수 있는 모든 조건을 설정하여 상토의 외관물성변화를 조사하였다. 변온보관은 20-50℃의 온도편차를 두어 보관한 것이며, 고온보관시험구는 70℃의 조건으로 하였다. sealing시험구는 시료를 비닐랩으로 완전밀봉하였으며 unsealing시험구는 공기가 통할 수 있도록 하였다. 처리 30일 후에 상토의 색깔변화, 냄새발생, 뭉침현상 등을 조사하였으며, 그 결과는 다음과 같다. 즉, 상온보관시, unsealing시험구는 물성이 완전 정상이나

sealing시험구는 일반상토, 항균상토 모두 뭉침현상이 발생하였다. 이러한 뭉침현상은 길항균을 투입하였기 때문이 아니라, 상토에 기존하던 수분이 특정부분에 치우침으로써 발생하는 현상인 것으로 판단된다. 변온보관의 경우, sealing시험구는 항균상토에서만 뭉침현상이 발생하였으며 unsealing시험구는 일반상토에서만 뭉침현상이 발생한 것으로 보아, 이는 시료제조 및 보관의 ERROR때문인 것으로 판단된다. 고온보관의 경우, unsealing시험구는 시료가 완전히 건조되어 어떠한 이상현상도 발견할 수 없는 상황이며 sealing시험구에서는 두시료 모두 뭉침현상이 비교적 심하게 나타났다. 즉, 고온에서는 상토내 수분증발이 매우 심하였기 때문에 뭉침현상도 심해진 것으로 판단된다. 이상의 결과로 볼 때, 길항균이 들어있는 항균상토와 일반상토의 물리화학적, 생물학적 특성은 거의 유사한 것으로 판단된다. 또한 상토제품 포장시, 완전밀봉하지 않는 것이 바람직하며, 온도변화가 심하지 않은 장소에서 보관해야 하는 것으로 확인되었다.

12. 길항균의 항균성Metabolite의 안전성 평가

상토는 종자를 파종하여 묘를 키우는 자재이므로, 길항균을 함유하는 항균상토는 육묘과정중에 안전해야 한다. 즉, 종자발아과정은 대단히 민감한 과정으로서 종자주위에 약간의 toxic한 성분만 존재하여도 발아율이 저하되거나 발아가 전혀 불가능하게 되므로, 본 항에서는 길항균배양액내 항균성 Metabolite의 종자발아율에 대한 영향 및 유식물에 대한 영향을 평가하여 길항균의 안전성을 확인하고자 하였다. 즉, 3종의 길항균(df-14, df-24, df-35) 액체배양액의 cell-free filtrate를 무우종자에 처리하여 종자의 발아율 및 무우묘생육에 대한 영향을 평가한 결과, TSB에서 2일 배양한 세균배양액과 ISP-2에서 5일 배양한 방선균 배양액의 cell-free filtrate를 100배 희석하여 Tray에 파종한 무우종자에 5일 간격으로 3회 처리한 경우에도 3종의 길항균 모두 종자발아에 대한 악영향은 전혀 없었으며, 육묘생육조사 결과로 볼 때, 길항균은 육묘생육을 오히려 촉진시키는 것으로 나타났다. 이는 길항균이 분비한 Metabolites에 의한 작용인 것으로 판단된다.

13. 선발된 길항균 동정

16S rDNA Sequencing method를 활용하여 3종의 길항균을 동정한 결과는 다음과

같다.

strain	동정결과
df-14	<i>Bacillus</i> sp. Bch1
df-24	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
df-35	<i>Streptomyces panayensis</i>

14. 시제품제조 및 안정성확보

이전의 시험결과를 기초로 하여 아래와 같은 제조공정으로 향균상토 시제품 1톤을 제조하였다.

① 길항균배양액 제조

선발된 길항균 2종(KB-6, df-14) 각각을 최적의 액체배양배지(Glucose 3%, Soybean Flour 2%, KH₂PO₄ 0.1%, MgSO₄ 0.05%, Yeast Extract 0.2) 및 배양조건(교반속도 150rpm, 배지사입율 20%, 초기 pH 7.0, 접종비율 2%, 배양온도 30℃)에서 3일간 진탕배양하여 길항균 각각 5-7 X 10⁹/ml 밀도의 배양액 5리터씩을 제조하여 총 10리터의 배양액을 준비

② 길항균배양액 흡착,증량 및 건조

길항균배양액 10리터를 100배증량(1,000kg)의 제오라이트에 흡착 및 건조

③ 각종 기능성성분 투입

상기의 건조물에 Glucose 1%, Lactic acid 0.1%, Butyric acid 0.1%를 투입 및 혼합

④ 반제품 제조

상기의 혼합물을 “상토반제품(나)”에 혼합

⑤ 완제품 제조

이를 “상토반제품(가)”와 혼합하여 완제품 제조

제품의 길항성능이 정상적으로 발휘되기 위해서는 길항균이 제품내에서 안정적으로 생존해 있어야 한다. 상기 시제품내 길항균밀도를 경시적으로 분석하여 항균상토제품의 생물학적 안정성을 조사하므로써, 제품의 성능변화 여부를 예측하고자 하였다. 시료는 상온에 보관하면서 10-50일 간격으로 총 12회 채취하여 길항균 및 잡균밀도를 정량적으로 분석한 결과, 길항균은 12개월까지도 밀도가 전혀 저하되지 않는 것으로 확인되었다

또한, 시제품을 다양한 온도조건 및 포장상태를 달리하여 보관하면서 제품의 물리화학적 안정성을 평가하므로써, 제품의 최적보관조건을 확립하였다. 즉, 시제품을 50리터씩 마대 또는 비닐포장하여 저온(4℃), 항온(25℃) 및 상온(15-30℃)조건에서 30일간 보관하면서 제품에 곰팡이발생 여부 및 수분흡수력 변화 등을 조사하여 제품의 이화학적 안정성을 평가하였으며, 결과는 다음과 같다. 즉, 제품은 비닐포장보다는 마대포장하는 것이 바람직한 것으로 나타났으며, 상온상태의 변온조건보다는 항온조건에, 더욱 바람직하게는 저온조건에 보관하는 것이 바람직한 것으로 나타났다. 그러나, 실제로 상토제품을 저온 또는 항온보관할 수는 없으므로, 항균상토는 마대포장하여 가급적 통풍이 잘되고 서늘한 조건에서 보관하는 것이 바람직하다. 또한 모든 분석항목에서 항균상토는 일반상토와 동일한 특성을 나타내므로써, 길항균의 상토내 투입은 상토의 물성 및 기능에 아무런 악영향을 주지 않음을 확인하였다.

15. 길항균의 정착성 평가

항균상토가 입고병 방제효과를 발휘하기 위해서는 길항균이 육묘용 배지 또는 육묘근권에 정착하여야 한다. 일반적으로 미생물의 근권정착은 처리후 수일이내에 이루어지므로 본 시험에서는 항균상토에 배추와 오이종자를 파종한 후 7일차에 길항균의 근면정착성 및 육묘배지에서의 정착성을 평가하였다. 길항균의 배추 근면에서의 정착성 조사결과, 길항균종류 및 상토부위별로 정착성이 서로 차이를 알 수 있다. 대체로 육묘배지보다는 근면에서의 정착성이 더 양호한 것으로 나타났는데, 이는 뿌리의 Exudate로 인하여 길항균이 근면에 정착하는데 더욱 유리하기 때문인 것으로 판단된다. 또한 KB-6의 정착율(65.4-88.5%)보다는 df-14의 정착율(135.5-171.0%)이 훨씬 높은 것으로 나타났는데, 이는 배추에는 생리적특성으로 볼 때 길항균 df-14의 정착특

성이 더욱 우수함을 나타낸다. 그러나, KB-6의 경우에도 정착율이 비교적 낮기는 하나, 이후 증식성만 양호하다면 입고병 방제효과를 나타내는데 별 문제가 없는 수치이다.

오이의 경우, 역시 길항균종류 및 상토부위별로 정착성이 서로 다름을 알 수 있다. 배추와 마찬가지로 육묘배지보다는 근면에서의 정착성이 더 양호한 것으로 나타났다. 특이한 점으로는 오이의 경우에는 배추와는 반대로 KB-6의 정착율(118.8-181.3%)이 df-14의 정착율(91.7-102.1%)보다 더 높은 것으로 나타났다. 따라서 작목별로 뿌리의 Exudate에 적합한 길항균이 서로 다름을 확인하였다.

이상의 결과로 볼 때, 잦은 관수에도 불구하고 길항균의 밀도가 일정한 수준을 유지하는 것으로 보아, 본 연구에서 선발한 2종의 길항균은 육묘상에서의 정착성이 매우 우수하다고 할 수 있다.

16. 육묘상에서의 길항균증식성 평가

길항균이 육묘기간내내 입고병을 지속적으로 방제할 수 있기 위해서는, 근권에 정착한 길항균이 병원균을 지속적으로 억제할 수 있도록 길항균이 육묘상에서 증식하여야 한다. 따라서 본 연구에서는 항균상태를 처리한 후, 육묘초기부터 후기까지 일정한 주기로 길항균의 근권밀도를 조사함으로써 길항균증식성을 평가하였다. 본 시험에서는 길항균 뿐 아니라 상토내에 서식하는 모든 미생물을 균종별로 분석하였다. 배추 육묘상에서의 길항균증식성 조사 결과, 길항균의 증식성은 균종에 따라 약간의 차이는 있으나 2종의 길항균 모두 23일동안 약 220배의 밀도증가율을 나타내고 있는데, 이는 길항균이 영양성분이 제한된 환경하에서도 정착 및 증식이 양호함을 나타낸다고 할 수 있다. 여타 미생물의 경우, 세균은 점진적으로 밀도가 증가하고 있고, 곰팡이는 밀도증가가 거의 없으며, 방선균의 경우에는 6배 이상의 밀도증가율을 보이고 있다.

배추와 마찬가지로 오이의 경우에도, 2종의 길항균 모두 23일동안 약 147-162배의 밀도증가율을 나타내고 있어 비교적 양호한 증식성을 가지고 있음을 알 수 있다.

이상의 길항균 정착 및 증식성 시험결과로 볼 때, 길항균 df-14와 KB-6은 작목별로 약간의 차이는 있으나 정착성 및 증식성이 우수한 것으로 판단되며 따라서 항균상태의 입고병방제용 길항균으로 사용하기에 매우 적절한 특성을 가지고 있다고 할 수 있다.

17. 길항균 정착효율 증진을 위한 항균상토 사용법 확립

항균상토를 사용하여 소기의 목적을 달성하기 위해서는 우선 제조업체측에서 우수한 길항균을 함유하는 고품질의 항균상토를 제조하여야 한다. 그러나 농자재는 사용자농민이 사용하는 방법에 따라 그 효과가 다르게 나타나므로, 항균상토 역시 사용방법을 최적화할 필요가 있다. 항균상토를 사용하여 길항균 정착, 증식효율을 제고하기 위한 방법으로는 육묘환경조절 방법 또는 길항균증식용 배지첨가방법이 있을 수 있다. 육묘환경조절 방법은 특히 상토가 마르지 않도록 하여 길항균의 활성이 저하되지 않도록 하는 방법 또는 물줄 때 길항균증식용 영양성분을 같이 처리하여 길항균의 증식성을 제고하는 방법 등이 있다. 길항균증식용 배지 첨가방법은 길항균의 정착, 증식을 촉진할 수 있는 영양성분을 상토에 미리 투입하여 길항균의 먹이성분을 충분히 확보하므로써 육묘상에서 길항균의 활성을 제고하는 방법이다.

후자의 방법은 항균상토 제조시에 고려할 사항이므로 본 연구에서는 상토 건조방지용 습윤제 및 관수용 영양제를 최적화하여 항균상토 사용법을 확립하고자 하였으며, 그 결과는 다음과 같다.

즉, 습윤제는 상토마름현상을 억제 또는 지연시킬 수 있는 것으로 나타났으며, 습윤제의 종류 및 농도에 따라서 그 효과가 서로 다른 것을 알 수 있다. 대체로 습윤제의 농도가 높으면 배추표면이 무르는 등 약해가 생기므로 습윤제를 적정농도로 사용해야 할 것으로 사료된다. 본 연구결과상으로는 OA-1019를 100ppm으로 처리하는 것이 가장 양호한 건조방지효과를 나타내고 있다.

습윤제는 이미 건조한 상토의 수분흡수력을 향상시키는 특성이 매우 우수하며, 습윤제의 종류 및 농도에 따라서 그 효과가 서로 다르게 나타나는 것을 알 수 있다. 습윤제 농도가 높을수록 수분흡수력은 우수하나 작물에 대한 약해를 고려하면 OA-1019를 50-100ppm으로 처리하는 것이 가장 바람직하다고 할 수 있다.

결론적으로 육묘상에 물줄 때 OA-1019를 100ppm농도로 혼합하여 약 2일 주기로 관수하므로써, 상토마름현상을 억제 또는 지연시킬 수 있으며 또한 이미 건조한 상토의 수분흡수력을 향상시킬 수 있다. 한편 항균상토의 시용효과를 제대로 보기 위해서는 육묘상이 과건조하지 않도록 해야 한다.

18. 길항균의 육묘에 대한 영향 평가

상토는 종자를 파종하여 묘를 키우는 자재이므로, 길항균을 함유하는 항균상토는 육묘과정중에 병리학적, 생리학적으로 안전해야 한다. 본 연구에서는 길항균배양액 자체의 종자발아에 대한 영향 및 유식물에 대한 영향을 평가하여 길항균의 안전성을 확인하고자 하였다.

즉, 길항균이 종자발아에 미치는 영향평가지험 결과, 길항균 2종의 배양액은 100, 300, 500배 희석액 모두에서 배추와 오이종자발아에 대한 악영향은 전혀 없었다. 즉, 이들 길항균이 들어있는 항균상토를 이용하여 종자를 파종해도 종자발아에는 아무런 악영향이 없음을 확인하였다. 한편, 길항균이 유묘생육에 미치는 영향을 평가한 결과, 길항균은 배추와 오이유묘의 생육에 악영향을 전혀 미치지 않음을 알 수 있으며, 오히려 희석배수가 진하면 유묘의 생육을 촉진시키는 것으로 나타났다. 이러한 유묘생육촉진효과는 길항균배양액내에 함유되어 있는 2차대사산물에 기인하는 것으로 판단된다.

이상의 결과를 종합하면, 길항균 2종은 종자발아에 대하여 어떠한 악영향도 주지 않으며, 유묘의 생육에 대해서는 오히려 지상부 및 지하부의 생육을 촉진시키는 것으로 나타나, 길항균을 함유하는 항균상토는 농가에서 사용하기에 매우 적합하다고 할 수 있다.

19. 시제품의 효과검증(육묘장에서의 실증시험)

지금까지 입고병원균에 대한 길항력이 우수하고 근권정착성 및 증식성이 우수하며, 종자 및 유작물에 대하여 악영향이 없는 길항균 2종을 최종선발하였다. 또한, 길항균이 함유된 항균상토 제조공정을 확립하여 2종의 길항균이 함유된 시제품 1톤을 제조하여 다양한 적용시험을 실시한 결과, 본 시제품은 육묘상의 입고병을 방제하고 유묘의 생육을 촉진시킬 수 있는 기본적인 특성을 보유하고 있음을 확인하였다. 따라서, 본 연구에서는 시제품을 실제로 육묘장에 적용하여 현장수준에서의 성능을 평가하고자 하였다

즉, 항균상토의 농약대비 입고병 방제효과를 평가한 결과, 항균상토를 처리한 경우

(이병율 5.78%), 농약처리 일반상토의 이병율(5.15%)과 거의 유사하게 나타났으며, 농약을 처리하지 않은 일반상토의 이병율은 43.75%로서 매우 높게 나타났다. 위의 결과로 볼 때, 항균상토는 입고병 방제용 농약을 처리한 경우와 거의 같은 방제가를 나타내므로써, 항균상토의 입고병 방제효과는 매우 우수하다고 할 수 있다.

한편, 오이 자가육묘 농가에서 항균상토를 이용하여 육묘시험을 실시하여 육묘 종료시점에 육묘성적을 평가한 결과, 육묘성적은 항균상토를 사용한 경우가 일반상토를 사용한 경우보다 더 우수함을 알 수 있다. 즉 항균상토를 사용한 경우, 일반상토보다 지하부생육량은 22.4%, 지상부생육량은 23.4% 증가한 것으로 나타났으며, 묘의 품질은 서로 비슷하였으나, 묘의 상품율은 항균상토처리구가 96.4%로 일반상토를 처리한 경우보다 2.2% 높게 나타났다. 이상의 결과로 볼 때, 항균상토는 입고병 방제효과 뿐 아니라, 육묘성적도 부분적으로 개선한다는 사실을 확인할 수 있었다.

20. 본포에서의 효과검증

항균상토를 이용하여 재배한 유묘는 길항균이 근권에 다량 포진해 있으므로, 원리적으로는 본포에 정식할 때 길항균이 묘에 묻어서 이식되므로, 이식후에도 정식묘의 근권에는 길항균이 정착해 있게 된다. 본포로 이송된 길항균은 본포의 토양환경 및 재배환경이 적합할 경우에는 지속적으로 증식하여 본포에서 발생할 수 있는 각종 토양병해를 방제할 수 있다. 물론, 본포는 각종 비료와 농약 등 길항균의 활성을 저해할 수 있는 물질이 투입될 수 밖에 없는 환경이므로, 길항균이 제역할을 할 수 있는지는 불확실하다. 따라서, 본 연구에서는 이를 검증하고자 항균상토를 이용하여 재배한 묘를 본포에 이식한 후, 토양병해방제효과, 본작물의 생육촉진효과 등을 비교조사하고 작물의 생산성을 평가분석하였다.

오이를 이용하여 본포에서의 토양병해 방제효과를 평가한 결과, 지상부병해에 대해서는 항균상토처리구와 일반상토대조구간에 차이가 없는 것으로 나타났으나, 지하부/지제부병해에 대해서는 항균상토처리구에는 토양처리용 살균제를 시약하지 않았음에도 불구하고 덩굴쪼김병과 역병의 발생이 줄어든 것으로 나타났다. 시험농가의 오이 수확시점까지의 농약살포일지를 분석한 결과, 지제부병해인 덩굴쪼김병 방제를 위하여, 일반상토대조구인 4동의 비닐하우스에는 각동마다 해당농약(이프로수화제)을 2회 살포하였으나, 항균상토처리구에는 같은 농약을 1회만 살포한 것으로 확인되었다. 또한, 역병방제용 농약(웅달샘)의 경우에도 일반상토대조구에는 각동마다 4회 살포하였

으나, 항균상토처리구에는 2회만 살포한 것으로 확인되었다. 이상의 결과로 볼 때, 항균상토에서 육묘한 묘의 근권에 서식하고 있던 길항균이 본포에서도 항균활성을 발휘하여 토양내 병원균의 번식을 억제한 것으로 판단되며, 따라서 병원균의 토양내 밀도가 감소하여 병발생이 적었던 것으로 사료된다. 그러나 세균병인 세균성시들음병의 발생양상은 처리구와 대조구간에 차이가 없었다. 또한 지상부에 발생하는 노균병, 탄저병, 흑성병, 만고병, 흰가루병, 잿빛곰팡이병 등에 대해서도 처리구와 대조구의 발병양상은 비슷한 것으로 나타났다. 즉, 이들 지상부병해의 병원균 역시 토양내에서 월동하여 포자가 엽면에 붙어서 병을 일으키지만, 발병부위가 지상부인 관계로 처리구의 효과가 없었던 것으로 판단된다.

한편, 본포에서의 생육촉진효과 평가와 관련하여 총 5회에 걸친 수확량을 서로 비교한 결과, 항균상토처리구는 703개, 일반상토대조구는 588개로서, 항균상토처리구가 20.7% 증수되었다. 이는 길항균이 근권에서 오이에 유용한 생리활성물질을 분비하여 오이의 작물생리가 활성화되어 나타난 현상이거나 또는 길항균이 토양병원균을 억제하여 병해로 인한 수확량손실이 적었기 때문인 것으로 판단된다. 결론적으로 길항균이 함유된 항균상토는 오이의 수확량을 상당량 증가시키는 특성이 있음을 확인하였다.

21. 작물생산성 평가, 분석

항균상토를 이용하여 육묘를 함에 있어서 육묘장 및 자가육묘농가 입장에서는, 입고병방제효과 및 생육촉진효과가 있는 반면 항균상토 구입에 따른 추가부담이 생기므로, 경제성분석을 실시하여 상토 소비자 입장에서 실질적인 이익이 있는지를 확인해야 한다. 또한, 항균상토에서 재배한 묘를 구입하여 본포에서 재배하는 농민의 입장에서는 약간 비싼 값을 주고 묘를 구입하게 되므로 작물수확량 증가가 비싼 묘값을 상쇄할 수 있는지에 대한 분석이 필수적이다. 이러한 부분은 본 연구과제의 사업화를 위해서도 반드시 검증해야 할 사안이므로, 본 연구에서는, 항균상토 사용에 따른 농가 추가비용과 생산성증가에 따른 추가수익금을 정밀하게 분석하여 항균상토제품이 제조자 뿐 아니라 소비자에게도 경제적인지를 검증하고자 한다. 이하, 오이에 대한 항균상토의 경제성을 상토비용, 육묘(또는 수확물)판매액 및 추가인건비 등을 중심으로 분석하였다.

우선, 육묘장 및 자가육묘농가 입장에서의 경제성분석결과, 항균상토 사용에 따른 추

가지출금액(80,000원-60,000원)은 20,000원이며, 추가수입금액(2,480,000-2,400,000)은 80,000원이므로, 60,000원의 추가순익이 발생하는 것으로 분석되었다. 한편, 묘를 구입하여 본포재배하는 농가 입장에서의 경제성분석결과, 향균상토묘 사용에 따른 추가지출금액(620,000원-600,000원)은 20,000원이며, 오이판매에 따른 추가수입금액(51,200,000-50,000,000)은 1,200,000원이므로, 1,180,000원의 추가순익이 발생하는 것으로 분석되었다. 560박스의 오이가 추가로 수확되므로 여기에 소요되는 인건비(1,000원/박스 X 560박스) 560,000원을 제하면, 순수한 추가수익금(1,180,000-560,000)은 620,000원이 된다.

22. 길항균의 16S rDNA 분석

다양하게 선발된 길항균중에서 *Bacillus species*가 우점 group로 관찰된 바, 이들 *Bacillus* 종의 16S rDNA 염기 1500bp 분석을 통해 균주의 계통분류학적 종다양성을 조사하였고 이들 균주의 계통분류학적 상호 연관정도를 분석하여 dendrogram을 작성하였다

23. 길항균의 DNA fingerprint 분석

여러 종류의 토착미생물 및 다른 *Bacillus* 종과 본 연구에서 분리된 균주를 구별할 수 있는 방안을 강구하기 위해 각 균주의 염색체에 존재하는 repetitive extragenic palindromic sequences의 다양성을 PCR에 의해 분석함으로써 각 균주의 지문에 해당하는 DNA fingerprint를 비교 분석하였다. *Bacillus* 종은 REP-PCR 방법으로는 DNA band가 매우 제한적으로 생성되는 것으로 종래에 학술보고가 있었는데, 본 연구에서는 primer 조건을 단순화시키고 2차 PCR를 함께 수행하여 분석함으로써 각 *Bacillus* 균주를 구별할 수 있는 DNA fingerprint를 얻었다. 이 방법으로 25종의 *Bacillus species*가 각각 고유한 염색체 DNA band pattern을 가지고 있는 것으로 밝혀져 이들 균주를 토착미생물과 쉽게 구별할 수 있을 뿐만 아니라, 개발된 균주의 특허등록, 실용화하는데 있어서 중요한 자료로 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

24. strain-specific PCR 분석

경작토양에 사용할 균주가 경작토양에서 길항활성을 효과적으로 발휘하기 위해서는 우선 이 균주가 제형화된 제품에서 오래 동안 생존해 있어야 하고, 또한 토양에 처리하였을 때 실제환경에서 그 제품에 들어 있는 균주의 밀도가 일정수준으로 유지되어야 한다. 실험실에서 개발된 균주가 대부분 실제현장에서 효율성이 떨어지는 주요 요인이 그 개발된 균주의 균집밀도가 급격하게 쇠퇴하는 것으로 밝혀지고 있는데 이를 검증하여 효과적인 길항균 제품을 개발하려면 개발된 특정균주를 토양에서 일정기간동안 추적할 수 있는 방법이 강구되어야 한다. 본 연구에서는 이 부분을 검증하기 위해 특정 *Bacillus* 균주를 토양에 접종하고 그 균집밀도를 분석하는 방법으로서 분자미생물생태학적 방법을 사용하였다. 위에서 얻어진 16S rDNA의 전체 염기서열을 균주간 상호 비교 분석하여 균주 DF20을 경작토양의 다른 *Bacillus* 종으로부터 선택적으로 검출할 수 있는 방법에 관해 조사하였는데, DF20은 입고병을 일으키는 3종류의 진균에 모두 길항능력을 보이는 균주 중의 한 균주이다. 특히 이 균주는 16S rDNA의 전체 염기서열을 상호 비교하였을 때 이 균주에 특이한 부분이 관찰되는 바, strain 수준에 적용되는 primer를 제작할 수 있었다.

이 균주는 16S rDNA 분석에서 *B. pumilus*로 분류되었는데, 전체 25종의 균주중에서 다른 종으로 분류된 일부 균주(*B. subtilis*로 동정된 길항균 DF3와, *Bacillus* sp.인 DF12, DF14, DF15, DF16, DF36, DF49, DF56, *B. anthracis*인 DF17)등을 대조균주로 하여 위의 제작된 primer를 이용하여 PCR을 수행한 결과, 다른 균주에서는 관찰되지 않은 약 500bp의 특이적인 DNA band가 target 균주 DF20에서만 검출되었다

결국 위의 primer는 strain-specific PCR에 의해 전체 균주중에서 DF20 균주만을 선택적으로 식별하는데 유용하게 활용될 수 있는 것으로 예상된다.

25. 토양에서의 DF20 균주 검출

위에서 사용된 primer를 이용하여 실제의 경작토양에서 길항균 DF20을 선별적으로 검출할 수 있는가 알아보기 위해 이 균주를 10^7 수준으로 토양에 접종하고 Quiagen사의 FastDNA Spin Kit를 이용해 soil DNA를 추출하였다.

이 soil DNA를 연속 희석한 후, DF20의 primer를 사용하여 MPN-PCR를 실시한 결과, 크기가 약 500bp인 DNA band가 10^{-3} 희석 DNA부터 10^{-7} 희석 DNA까지 검출되었다. 따라서, 접종된 DF20의 토양에서의 균집밀도는 soil DNA 분석 결과 10^7 수준으로 나타나 처음에 실험실에서 접종한 밀도와 일치함을 알 수 있다. 한편, DF20을

접종하지 않았던 대조구 토양의 DNA에서는 band가 나타나지 않아 사용된 primer가 균주 DF20에 매우 특이적으로 반응함을 알 수 있고, 이 방법이 토양에 처리된 길항균 DF20을 효과적으로 검출, 추적하는 데에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

26. 길항균 양산시스템 확립

입고병 방제용 길항균 양산공정 개발과 관련하여, 선발길항균(세균 및 곰팡이) 각각의 양산공정을 확립하였으며, 양산에 필요한 설비 및 원자재 규격을 확정하였다. 또한, 항균상토 양산공정 개발과 관련하여, 원료투입비율 및 material balance를 최적화하였으며, 항균상토 제조용 설비 규격을 확정하였다. 한편, 제품양산을 위한 품질관리 시스템 구축과 관련하여, 길항균제제의 품질관리항목(함수율, 길항균밀도, 물성, 입도, 오염균밀도) 및 표준치를 설정하였으며, 항균상토의 품질관리항목(함수율, 길항균밀도, 저장안정성) 및 표준치를 설정하였다.

27. 경제성분석(일반상토 대비)

일반상토와의 경제성(제조원가) 비교분석과 관련하여, 상토 제조원가, 판매가, 농가 육묘비용 등을 비교분석하였으며, 상토업체 및 농가 모두에게 이익이 될 수 있는 방안을 확립하였다

28. 사후관리시스템 개발

제품판매활성화를 위한 농가지원시스템 구축과 관련하여, 효과적인 사용방법 지도, 각종 분석지원 및 차별화된 육묘 시스템 홍보 방안을 확립하였다

29. 장기유통시 길항균 생존율 개선방안 연구

유통중 제품내 길항균 사멸율을 최소화하기 위하여, 길항균의 포자화, 상토의 함수율 조절, 항균상토 제조시의 수분분산성 개선 등의 길항균생존율 제고방안을 확립하였다

30. 농가현장결과 자료수집 및 현장기술자료 제작

항균상토의 입고병 방제효과 및 건전묘육성효과 등의 검증 및 사진자료화를 위하여, 오이, 고추, 토마토묘의 생육량, 건전성, 입고병발병율, 세균형성을 등을 시험조사하였으며, 육묘장 관계자로부터 육묘소감을 청취한 결과, 매우 만족한 반응을 확인하였으며, 이상의 시험결과를 사진자료화하였다.

II) 연구개발결과의 활용

1. 연구결과의 활용방안

본 과제의 내용은 길항균 선발, 길항균의 토양내 검출기술 개발, 길항균 배양조건 확립, 항균상토 제조공정 확립, 항균상토의 농가실증연구, 사업화를 위한 각종자료 확보 등으로 구성되어 있으며, 본 과제수행을 통하여 얻은 결과들은 여타 길항균제제 또는 미생물살균제 개발시의 중요한 참고자료가 될 수 있다. 또한, 길항균의 토양내 정착성 및 증식성 개선과 관련된 연구결과는 생물제제의 제제화연구 분야에 적극 활용될 수 있다. 한편, 본 연구에서 개발한 기능성 항균상토로 인하여 상토업계의 시장이 확대될 수 있으며, 농가의 육묘효율성을 제고시키는 등 농업생산성 향상의 전기를 마련할 수 있다. 또한, 길항균의 염색체 구조에 대한 연구에서 얻어진 각 균주의 DNA fingerprint는, 16S rRNA 유전자의 염기서열과 함께, 분리된 길항균주의 종다양성을 규명하는데 매우 중요하다. 길항균의 검출기술과 환경적응능력에 대한 연구 결과는 실제 제품에 사용될 균주의 생존 상태를 점검하여 토양에서 지속적으로 길항력을 발휘할 수 있는가를 분석하는데 활용된다.

2. 사업화방안

사업화 추진방안과 관련하여, 입고병 방제용 길항미생물 제품은 본 연구의 주관기관인 고려바이오연구소에서 사업화 추진 예정이며, 항균상토의 경우에는 상토전문제조업체에 기술이전하여 사업화를 추진하거나 또는 당사에서 직접 사업화(기존의 상토제조업체와 OEM 계약생산)할 예정이다

3. 특허출원

본 연구결과 길항력이 우수한 길항균 2종(Bacillus, Trichoderma)를 이용한 항균상토 제조방법에 대한 특허를 출원하였으며 특허출원 내역은 다음과 같다.

1) Bacillus를 이용한 항균상토 제조방법

구분	내용
권리	특허
출원인	김 영권
출원일자	2003. 10. 21
출원번호	10-2003-0073455
발명명칭	모잘록병 방제용 항균상토 및 그 제조방법 {BED SOIL FOR PROTECTION OF DAMPING-OFF DISEASE AND METHOD THEREOF}

2) Trichoderma를 이용한 항균상토 제조방법

구분	내용
권리	특허
출원인	김 영권
출원일자	2004. 07. 05
출원번호	10-2004-0051893
발명명칭	모잘록병 방제용 길항균 및 이를 이용한 항균상토 및 그 제조방법 {ANTAGONISTIC MOLD FOR PROTECTION OF DAMPING-OFF DISEASE AND BED SOIL COMPRISING THE MOLD AND METHOD THEREOF}
비고	개발된 균주는 한국미생물보존센터(KFCC)에 기탁번호 KCCM 10582로서 기탁

4. 학회발표 및 학술지 게재

1) SCI 논문게재

Cho, M. J., Y. K. Kim, and J. O. Ka. 2004. Molecular differentiation of *Bacillus* spp. antagonistic against phytopathogenic fungi causing damping-off disease. *J. Microbiol. Biotechnol.* 14(3): 599-606.

2) 학회발표

Joe, M. J. and J. O. Ka. 2003. Isolation and molecular differentiation of *Bacillus* spp. antagonistic against phytopathogenic fungi causing damping-off disease. 2003 Annual Meeting, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology.

Joe, M. J. and J. O. Ka. 2002. Phenotypic and genetic characterization of antifungal biocontrol bacteria isolated from agricultural soils. 2002

SUMMARY

(영문 요약문)

This study is on technical development of biologically controlling the wilt disease through development of antagonistic bed soil which contain antagonists with excellent antagonistic activities against pathogen causing the wilt disease. We have selected three types of excellent bacteria which do excellent antagonistic activities against the wilt disease pathoen and have identified these were Bacillus sp., Trichoderma harzianum. These antagonists have no bad effect on plants and have seedling growth stimulating characteristics. Also, these antagonists have high production level of mold cell wall component breaking down enzymes like glucanase, mannanase, cellulase, and xylanase.

By studying the culture conditions of Antagonists, the maximum density of the germ of Bacillus reached 7×10^9 /ml through liquid culture, and the maximum density of the germ of Trichoderma reached 6×10^8 /g through solid culture.

Spore germination study showed that adding 1.0% of glucose and 1.0% of citric acid to the bacterial spore solution can increase about 10% of germination rate. We have selected a special nutritional component which can increase an enormous amount of multiplication. We have also selected glucose and butyric acid as colonization increasing component which can create a chemical environment for Bacillus to settle effectively even though many microorganisms are mixed within.

We have established the manufacturing process of the antagonistic bed soil. And we had manufactured 1 ton of testing product and analyzed the density of antagonists periodically and found that the density of the antagonists did not decrease at all after twelve months. And after evaluating antagonist colonization in cucumber and asian cabbage, KB-6 had the colonization efficiency of 65.4-181.3% and df-14 had 91.7-171.0% of colonization efficiency. According to the result, even after frequent irrigation, a certain level of antagonist density was maintained; and thus the two selected antagonists can be said to have excellent colonization efficiency on seedling cultivation.

On the other hand, after analyzing antagonist multiplication efficiency on the asian cabbage and the cucumber seedling cultivation, both types of Bacillus showed density multiplication rate of about 147-200 folds after 23days. And thus, this showed the Bacillus can settle and multiply satisfactorily in a nutrition limited condition and proves that these antagonists have the adequate traits for antagonistic bed soil to be able to be used as wilt controlling antagonists.

After studying optimization of packaging and storage condition of antagonistic bed soil, the fact that the antagonistic bed should not be packed tightly and stored at a place where the temperature variation is not so great.

After the demonstration of the testing product on seedling bed, the wilt disease controlling effectiveness compared with pesticide was analyzed; and its result was that in case of treating the antagonistic bed soil, diseasing rate was 5.78% and pesticide treated soil showed the diseasing rate was 5.15%. And untreated soil's diseasing rate was very high with 43.75. According to the result, the wilt disease controlling effect of the antagonistic bed soil is very high.

After analyzing seedling effectiveness of self-seedling cucumber farm using antagonistic bed soil, use of antagonistic bed soil showed a higher effectiveness against untreated soil.

Seedlings cultivated using antagonistic bed soil were transplanted to the main field patch and protection activity against soil-borne disease and plant growth promotion effectiveness was analyzed and the leaf disease was not effected by either types of soil but the soil-borne disease, fusarium wilt and blight outbreak, even though not treated with pesticide, decreased greatly.

In relation to bed soil(not including antagonists) and its economic efficiency (cost of production) comparison analysis, bed-soil production cost, selling price, seedling cost of a farm were compared and analyzed and a plan to benefit both the bed soil manufacturer and the farm was established.

We have established the specification of the raw material and facilities of wilt controlling antagonist and antagonistic bed soil production and mass production process. Also, quality control (i.e. moisture contents rate, density of antagonists, property, status of size, density of contaminated bacteria, etc.) techniques for the bed soil were accomplished. In relevance establishing farm supporting system to promote product sales, instructing effective using method, various analysis support and publicizing specialized seedling system promotion plan were established.

We have confirmed proofs and pictured materials for publicizing the effect of Wilt controlling efficiency and healthy seedling culturing effectiveness.

CONTENTS
(영 문 목 차)

Chapter 1. Summary	41
1. Outline of new technology	41
2. Effect of new technology	46
3. Market analysis	48
Chapter 2. The present state of domestic and foreign technologies	49
1. Importance and state of objective technology	49
Chapter 3. Research items and results	55
1. The present state of seedling culture system and the points at issue	55
2. Analysis of current soil microbial products	58
3. Isolation of soil microorganisms	64
4. Analysis of microbial antagonism	65
5. Analysis of 16S rDNA sequences	68
6. Anti-fungal properties of antagonistic microorganisms	73

7. Analysis of DNA fingerprints of antagonistic <i>Bacillus</i> species	76
8. Analysis of 16S rDNA RFLP of antagonistic <i>Bacillus</i> species	77
9. Analysis of RIS-LP of antagonistic <i>Bacillus</i> species	80
10. Strain-specific PCR	81
11. Comparison and selection of excellent antagonists	84
12. Establishment of culture techniques	88
13. Selection of effective additives for antagonists	100
14. Development of pre-treatment process for antagonists	109
15. Development of blending techniques of antagonists and soil	112
16. Establishment of manufacturing process for antifungal soil	115
17. Efficiency evaluation of antifungal metabolites	119
18. Preparation of trial products and stability test	124
19. Colonization and proliferation of antagonistic microorganisms	128
20. Effect of antagonists on seedling	149
21. Verification of effect of trial products	152
22. Analysis of rhizosphere microorganisms	155
23. Verification of effect on regular field	160
24. Establishment of mass production of antagonistic microorganisms	166
25. Establishment of manufacturing process of antifungal soil	170
26. Development of quality control technology	174
27. Analysis of economical efficiency	179
28. Business and campaign of publicity for marketing	182
29. Development of management system	186
30. Collection of consumer field data and preparation of field guidance techniques	186
31. Patent application	196
32. Overseas markets cultivation	198

Chapter 4. Objective achievement and contribution to related area	199
Chapter 5. Application plan of research results	207
Chapter 6. Foreign technologies collected during research project	209
Chapter 7. References	207

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	41
제 1 절	개발 대상기술(또는 제품)의 개요	41
제 2 절	기술개발의 효과	46
제 3 절	시장현황	48
제 2 장	국내외 기술개발 현황	49
제 1 절	개발 대상기술의 중요성 및 국내·외 관련기술의 현황	49
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	55
제 1 절	육묘시스템의 현황 및 문제점 조사	55
제 2 절	유통중인 토양미생물제제 분석	58
제 3 절	토양세균의 분리	64
제 4 절	길항력 분석	65
제 5 절	길항균의 16S rDNA 분석	68
제 6 절	길항균의 항균특성	73
제 7 절	<i>Bacillus</i> 길항균의 DNA fingerprint 분석	76
제 8 절	<i>Bacillus</i> 종의 16S rDNA RFLP (restriction fragment length polymorphism)분석	77
제 9 절	<i>Bacillus</i> 종의 RIS-LP (ribosomal intergenic spacer length polymorphism) 분석	80

제 10 절	strain-specific PCR 분석	81
제 11 절	길항균 성능평가 및 우수균선발	84
제 12 절	길항균 배양기술 확립	88
제 13 절	길항균 효력증진용 첨가제선발	100
제 14 절	길항균의 전처리공정 개발	109
제 15 절	길항균과 상토의 배합기술 개발	112
제 16 절	항균상토 제조공정 확립	115
제 17 절	길항균의 항균성Metabolite의 성능평가	119
제 18 절	시제품제조 및 안정성확보	124
제 19 절	길항균의 정착 및 증식성	128
제 20 절	길항균의 육묘에 대한 영향	149
제 21 절	시제품의 효과검증(육묘장에서의 실증시험)	152
제 22 절	근권의 미생물분석	155
제 23 절	본포에서의 효과검증	160
제 24 절	길항균 양산시스템 확립	166
제 25 절	항균상토 제조공정 확립	170
제 26 절	품질관리 기법 개발	174
제 27 절	경제성분석(일반상토 대비)	179
제 28 절	Marketing을 위한 영업 및 홍보용 기술자료	182
제 29 절	사후관리시스템 개발	186
제 30 절	농가현장결과 자료수집 및 현장기술자료 제작	186
제 31 절	특허출원	196
제 32 절	해외시장 개척추진	198
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	199
제 5 장	연구개발결과의 활용계획	207

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 208

제 7 장 참고문헌 209

표 목 차

<표-1> 전국 육묘장 현황	57
<표-2> 육묘장의 항균상태에 대한 mind 조사 결과	57
<표-3> 유통중인 토양미생물제제 확보현황	59
<표-4> 유통중인 토양미생물제제의 미생물분석결과	60
<표-5> 수집제품의 경시적 미생물안정성 평가 결과	61
<표-6> 수집제품에서 분리한 우점균의 입고병균에 대한 항균력 평가결과	63
<표-7> Relative inhibition of pathogens by bacterial isolates on YMG	66
<표-8> Identification of isolates by 16S rDNA sequences	71
<표-9> Antagonistic properties of isolates	74
<표-10> 주관기관 보유 길항균의 입고병균에 대한 항균력 평가결과	85
<표-11> 항균성 Metabolite의 보관온도 및 기간에 따른 안정성평가 결과	86
<표-12> 길항균 배양액의 종자발아율 및 육묘생육에 대한 영향시험결과	87
<표-13> 길항세균(KB-6, KB-15의 Growth curve)	87
<표-14> 길항균 KB-6의 최적 배지조건(액체배양)	89
<표-15> 길항균 KB-6의 최적 배양조건(액체배양)	90
<표-16> 길항균 KB-6의 최적 배지조건(고체배양)	91
<표-17> 길항균 KB-6의 최적 배양조건(고체배양)	92
<표-18> 길항세균의 액체배양시 시간별 포자형성을	92
<표-19> 길항세균의 고체배양시 시간별 포자형성을	93
<표-20> 길항균 KF-3의 최적 배지조건	94
<표-21> 길항균 KF-3의 최적 배양조건	95
<표-22> 길항곰팡이의 배양기간별 포자형성을	95
<표-23> 액상제제의 물성안정화 시험결과-1(세균 KB-6의 경우)	96
<표-24> 액상제제의 물성안정화 시험결과-2(곰팡이 KF-3의 경우)	97
<표-25> 액상제제의 발아생리활성화 시험결과-1(세균 KB-6의 경우)	98
<표-26> 액상제제의 발아생리활성화 시험결과-2(곰팡이 KF-3의 경우)	98

<표-27> 함수올에 따른 분제의 물성변화 조사결과-1(세균 KB-6의 경우)	99
<표-28> 함수올에 따른 분제의 물성변화 조사결과-2(곰팡이 KF-3의 경우)	99
<표-29> 길항균활성을 증진시킬 수 있는 탄소 및 에너지원	102
<표-30> 길항세균(KB-6)활성 증진용 탄소(에너지)원 선발시험 결과	104
<표-31> 길항곰팡이(KF-3)활성 증진용 탄소(에너지)원 선발시험 결과	105
<표-32> 각종 탄소(에너지)원의 Pythium생육에 대한 영향 평가결과	106
<표-33> 각종 Compounds에 의한 길항균정착을 제고효과	108
<표-34> 종자처리 및 육묘시험 결과	109
<표-35> 증량물 종류에 따른 길항균밀도 편차시험결과	111
<표-36> 길항균증량물의 온도별 경시적안정성 조사결과	112
<표-37> 길항곰팡이(KF-3)의 생물학적 Compatibility 조사결과	114
<표-38> 길항세균(KB-6)의 생물학적 Compatibility 조사결과	114
<표-39> 함수올에 따른 길항세균(KB-6) 생존율 조사결과	117
<표-40> 함수올에 따른 길항곰팡이(KF-3) 생존율 조사결과	118
<표-41> 여러조건하에서의 상토물성변화 조사결과	119
<표-42> 항균성 Metabolite의 보관온도 및 기간에 따른 안정성평가 결과(Halo size)	122
<표-43> 길항균 배양액(cell-free filtrate)의 종자발아율 및 육묘생육에 대한 영향시험결과	123
<표-44> 길항세균(df-14, df-24)의 Growth curve	123
<표-45> 길항균 동정결과	124
<표-46> 시제품내 길항균 안정성 평가결과	126
<표-47> 시제품의 이화학적 안정성 평가결과	127
<표-48> 일반상토 육묘배추의 근권미생물 분석결과	131
<표-49> 일반상토 육묘오이의 근권미생물 분석결과	131
<표-50> 배추 육묘상에서의 길항균정착성 평가 결과(파종후 7일차)	132
<표-51> 오이 육묘상에서의 길항균정착성 평가 결과(파종후 7일차)	133
<표-52> 배추 육묘상에서의 길항균증식성 조사 결과	135
<표-53> 오이 육묘상에서의 길항균증식성 조사 결과	136
<표-54> 배추 본포에서의 길항균 정착 및 증식성 조사 결과 (농약 처리 관행구)	138

<표-55> 배추 본포에서의 길항균 정착 및 증식성 조사 결과 (농약 무처리 시험구)	139
<표-56> 오이 본포에서의 길항균 정착 및 증식성 조사 결과 (농약 처리 관행구)	140
<표-57> 오이 본포에서의 길항균 정착 및 증식성 조사 결과 (농약 무처리 시험구)	141
<표-58> 습윤제 처리에 따른 상토 건조 억제효과 평가결과	144
<표-59> 습윤제 처리에 따른 기건조상토의 수분흡수 양상 조사결과	145
<표-60> 상토내 수분환경이 길항균생육에 미치는 영향 조사결과	146
<표-61> 영양제의 길항균증식율 제고효과 평가결과	147
<표-62> 항균상토와 토양미생물제제의 근권정착율 비교시험 결과	148
<표-63> 길항균이 종자발아에 미치는 영향 평가결과	150
<표-64> 길항균이 육묘생육에 미치는 영향 평가결과	151
<표-65> 항균상토의 입고병 방제효과 평가결과	153
<표-66> 육묘중 근권내 길항균밀도 조사결과	154
<표-67> 항균상토의 육묘성적 개선효과 평가결과	155
<표-68> 항균상토 처리 배추묘의 근권미생물상 정밀분석결과	157
<표-69> 본포 이식후 배추의 근권미생물상 정밀분석결과	159
<표-70> 항균상토 처리묘의 본포에서의 토양병해 방제효과 평가결과	162
<표-71> 항균상토 처리묘의 본포에서의 수확량 및 품질조사 결과	164
<표-72> 육묘장 및 자가육묘농가 입장에서의 경제성분석	165
<표-73> 농가입장에서의 경제성분석	166
<표-74> 길항균 양산용 설비규격(1일 생산량 1톤 기준)	169
<표-75> 길항균 제품 제조용 원자재 규격	170
<표-76> 일반상토 제조 material balance	172
<표-77> 항균상토 제조 material balance	173
<표-78> 항균상토 제조용 설비(추가 필요설비)	174
<표-79> 항균상토 제조시의 추가비용산출내역	179
<표-80> 육묘비용 비교분석(항균상토 및 일반상토 판매가격 동일)	180
<표-81> 육묘비용 비교분석(항균상토 가격 = 일반상토 가격 + 2000원)	181
<표-82> 묘생육의 경시적 변화조사 결과(달관조사결과)	188

<표-83> 묘의 건전성 조사 결과(육묘 종료시점)	188
<표-84> 육묘중 입고병 발병을 조사결과	189
<표-85> 묘의 세균발달상 조사결과	189
<표-86> Bacillus를 이용한 항균상토 제조방법 특허 내역	197
<표-87> Trichoderma harzianum을 이용한 항균상토 제조방법 특허 내역	198

[그림-1] REP-PCR DNA fingerprint patterns of the bacilli isolates. Lanes : 1, df3; 2, df7 3, df11 4, df12 5, df14 6, df15 7, df16 8, df18 9, df19 10, df20 11, df21 12, df27 13, df30 14, df36 15, df39; 16, df41; 17, df44; 18, df48; 19, df49; 20, df56; 21, df60; 22, df61; M, DNA size marker. 77

[그림-2] Restriction patterns with *CfoI* (A) and *MspI* (B) of PCR-amplified product of 16S rDNA of the bacilli isolates. Lanes : 1, df3; 2, df7; 3, df11; 4, df12; 5, df14; 6, df15; 7, df16; 8, df18; 9, df19; 10, df20; 11, df21; 12, df27; 13, df30; 14, df36; 15, df39; 16, df41; 17, df44; 18, df48; 19, df49; 20, df56; 21, df60; 22, df61; M, DNA size marker. 79

[그림-3] RIS-LP banding patterns of the bacilli isolates. Lanes : 1, df3; 2, df7; 3, df11; 4, df12; 5, df14; 6, df15; 7, df16; 8, df18; 9, df19; 10, df20; 11, df21; 12, df27; 13, df30; 14, df36; 15, df39; 16, df41; 17, df44; 18, df48; 19, df49; 20, df56; 21, df60; 22, df61; M, DNA size marker. 81

[그림-4] Amplified DNA bands obtained from the representative isolates and soils with strain DF14-specific primers designed based on 16S rDNA sequences. Lanes : 1, df3; 2, df11; 3, df14; 4, df20; 5, df30; 6, df36; 7, df44; 8, df60; 9, soil DNA inoculated with df14 at 10^4 cells/g soil; 10, control soil DNA not inoculated with df14; M, DNA size marker. 83

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 개발 대상기술(또는 제품)의 개요

【 농가현장으로부터 토양미생물제제에 대한 사용효과사례 】

농가별	미생물제제 사용사례	사용소감(결과)
경남 거창 딸기농가	◎흰가루병방제용 미생물제제 3회 사용	▶처리후 1-2일 동안 억제되는 듯 하다가 곧바로 재발됨
경북 성주 참외농가	◎선충방제용 미생물제제 2회 사용	▶선충방제효과 확인할 수 없음
충북 옥천 수박농가	◎입고병 방제용으로 미생물제제 사용	▶농약방제가의 20% 수준정도 도입
전남 구례 오이농가	◎젓빛곰팡이병 방제를 위하여 미생물제제 5회 사용	▶5회 사용하는 동안 방제효과가 나타나지 않아 정상적인 수확을 하지 못함

1. 제품의 개요

본 제품은 입고병 또는 잘록병균(Rhizoctonia, Pythium, Fusarium)에 대한 생육억제력이 우수한 길항균(Microbial Antagonists)을 함유하는 육묘용상토(이하 항균상토)의 개발에 관한 것이다.

1) 입고병

토양전염성병원균이 유발하는 병으로서 어린작물에 가장 치명적이다. 입고병은 수

종의 토양병원균이 복합적으로 작용하여 발생하는 병으로서, 이들 병원균은 토양중에서 포자 또는 균핵상태로 월동하고 환경조건이 좋아지면 발아하여 어린작물에 침입, 감염시킴으로써 농사에 막대한 피해를 일으키는 병원균이다. 이러한 토양병원균은 토양에 포자상태로 항시 존재하므로 화학적인 방법으로는 근절할 수 없는 병해이다.

2) 길항미생물

항균물질생산, 병원균용균, 서식장소경쟁, 영양성분경쟁 등의 기작으로 식물병원균을 무력화시켜 병해발생을 방제할 수 있는 기능성미생물이다. 즉, 만일 농토에 처리한 길항미생물이 토양에 안정적으로 정착하여 지속적으로 증식할 수만 있다면, 길항미생물은 원리적으로 식물병원균을 매우 효율적이고 지속적으로 억제하여, 식물병을 환경친화적으로 방제할 수 있는 생물농자재이다.

3) 육묘용 상토

상토는 피트모스, 코코넛피트, 제오라이트, 비료성분 등을 함유하여 종자로부터 유식물을 키우기 위한 인공배지로서, 통기성, 입도, 보습성, 배수성, 보비력, 뿌리활착성 등의 물리 화학성을 최적화시켜 유식물을 건강하게 재배할 수 있도록 하는 농자재이다.

2. 개발대상기술의 핵심POINT

본 연구는 길항균을 이용하여 입고병을 생물학적으로 방제하기 위한 기술 및 제품을 개발하고자 하며, 그 핵심기술은 다음과 같다.

1) 길항균의 근권정착

길항균이 포장에서 생육촉진효과 및 병해방제효과를 발휘하기 위해서는, 일차적으로 길항균이 근권에 안정적으로 정착해야 한다. 즉, 그 성능이 아무리 우수한 길항균이라 하더라도 근권에 정착하지 못한다면 아무런 역할도 할 수 없는 것이다. 본 연구는 길항균이 근권에 반드시 정착할 수 있도록 하기 위하여, 길항균을 종자파종단계에서 처리하고자 한다.

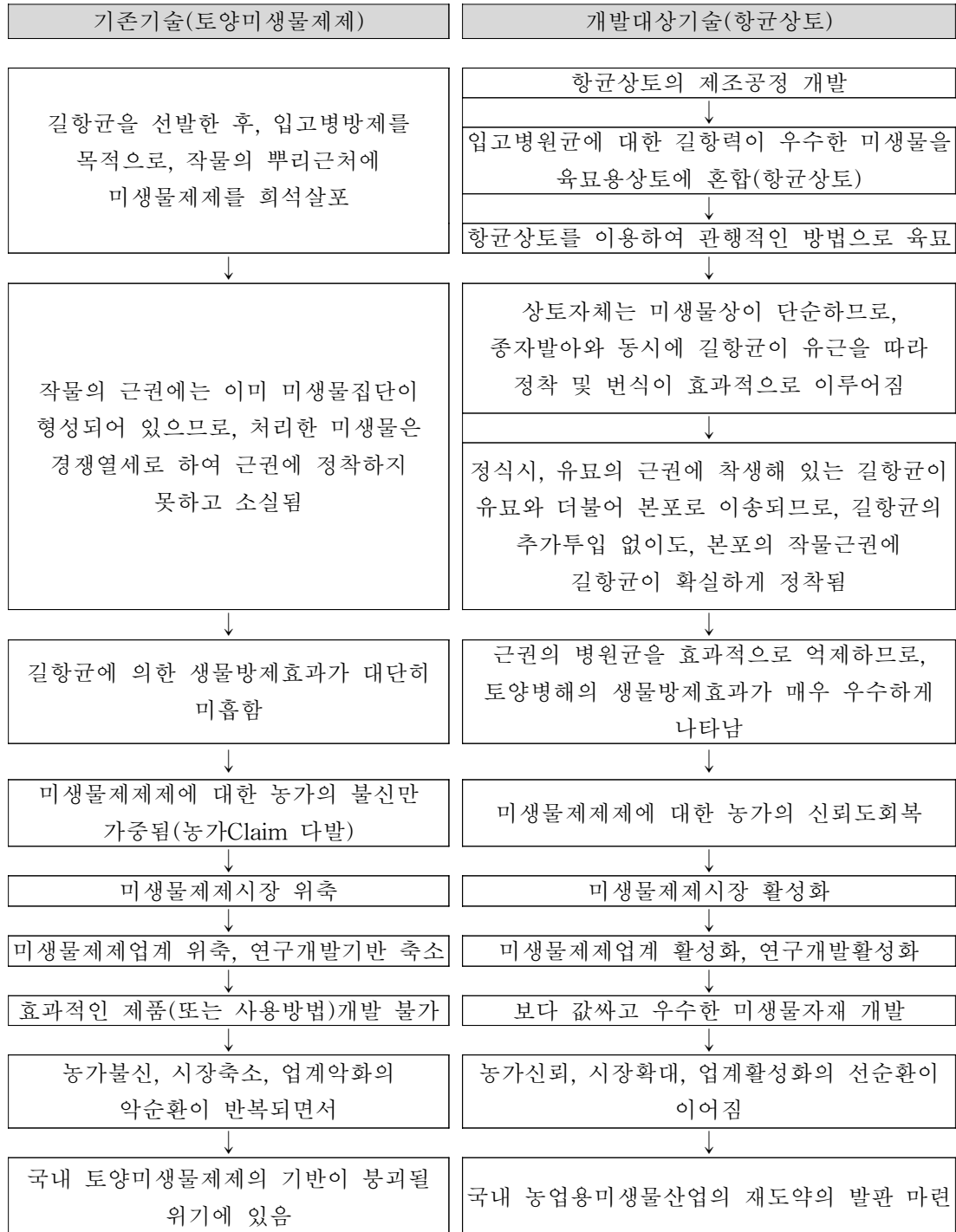
2) 길항균의 종자파종단계 처리

길항균을 종자파종단계에서 처리하기 위한 가장 간단하고 효율적인 방법은, 길항균을 함유하는 육묘용상토에 종자를 파종 및 육묘하는 방법이다. 즉, 이러한 항균상토를 사용함으로써, 길항균의 근권정착이 확실하게 이루어질 수 있다. 왜냐하면, 상토자체는 순수유기물과 소량의 비료성분으로 구성되어 있어 미생물학적으로 매우 Clean한 상태이므로 여기에 길항균을 미리 혼합해 놓게 되면, 종자파종직후 길항균이 즉시 발아하여 미생물학적경쟁 없이 유근을 따라 정착되기 때문이다.

3) 길항균의 근권에서의 증식

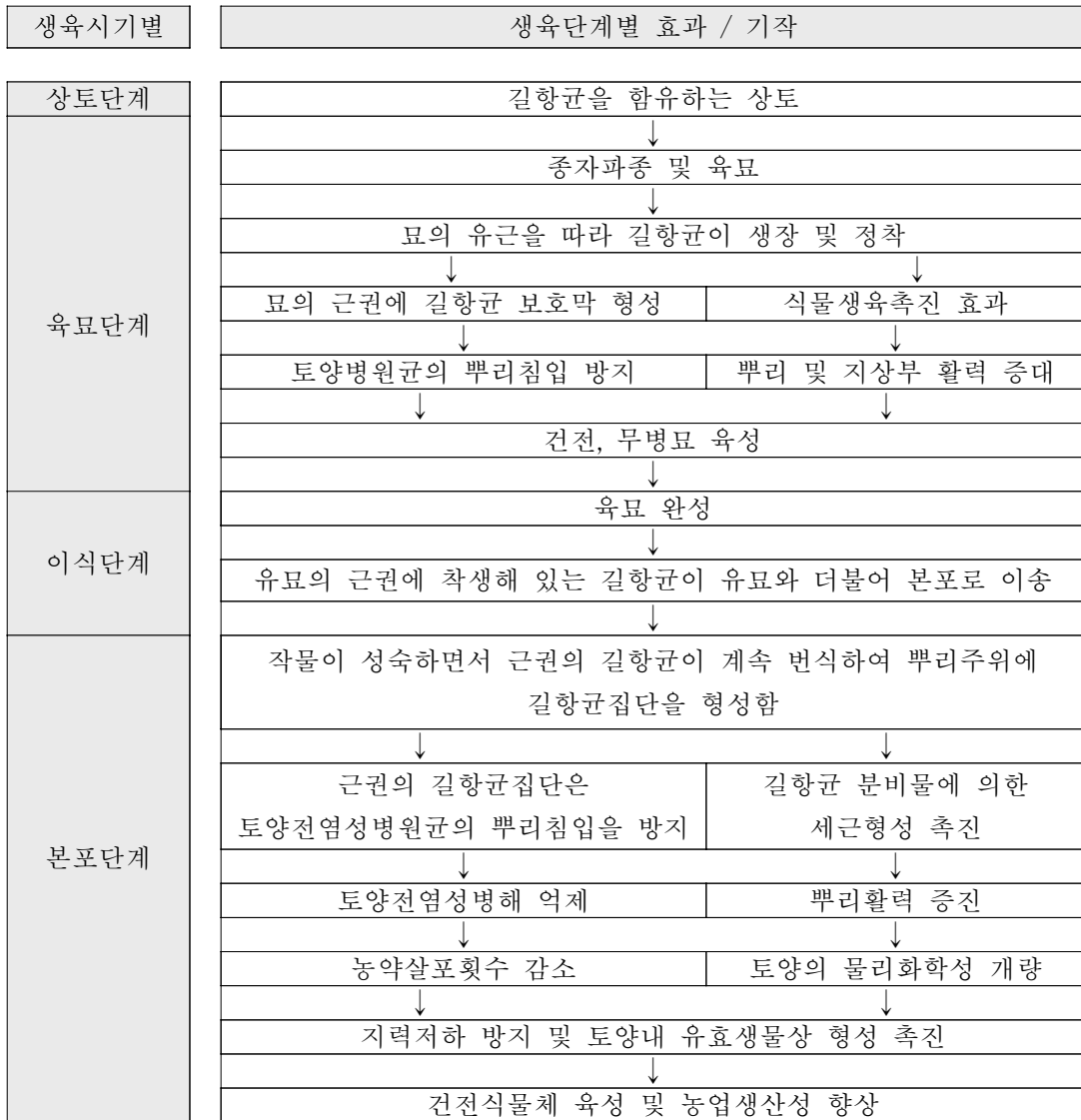
상토의 구성성분의 대부분은 섬유소계의 유기물이며, “Trichoderma”와 같은 길항곰팡이는 섬유소 이용능력이 특별히 우수하므로, “Trichoderma”와 같은 길항곰팡이는 근권의 상토층에서 매우 빠른속도로 증식할 수 있는 것이다.

3. 기존기술에 대한 비교우위성



4. 개발대상기술의 효과

이러한 항균상토를 이용하여 육묘를 하므로써, 육묘단계에서 발생할 수 있는 토양 전염성병해(특히, 입고병 또는 잘록병)을 미생물학적으로 방제할 수 있으며, 나아가서 본포에서도 지속적으로 병해발생억제효과를 나타낼 수 있다. 항균상토의 작물생육시기별 효과를 도식화하면 다음과 같다.



제 2 절 기술개발의 효과

1. 기술개발에 따른 기대효과 및 파급효과

구 분	기 대 효 과 / 파 급 효 과
경제,산업적측면	<ul style="list-style-type: none"> ◎ 입고병의 친환경적 방제로 육묘생산성 증대 ◎ 길항미생물의 입고병 방제효과 제고에 따른 농가생산성 제고 ◎ 농약 또는 미생물제제 처리에 소요되는 비용 및 인력 절감 ◎ 농업용 미생물제제의 효력증진에 따른 길항균 시장규모 확대 ◎ 건전육묘 생산기술개발로 인한 육묘산업 발전 ◎ 상토업계의 기능성상토개발 유도 및 수출시장 개척
기술적측면	<ul style="list-style-type: none"> ◇ 길항균 제조기술분야의 정확한 방향성 제시 ◇ 항균상토개발로 인한 상토업계의 기술적 전기 마련 ◇ 육묘용상토제품의 품질차별화 및 기술수출 ◇ 여타 병해방제용 길항미생물개발로의 적용확대
사회,문화적측면	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 환경친화적인 농업기술개발에 따른 무공해농산물 생산 ▶ 입고병방제효과 제고로 인한 미생물제제에 대한 농가불신해소 ▶ 길항균 제조업계의 구조조정 및 경쟁력강화

2. 기술개발에 따른 사업적인 효과

구 분	기 대 효 과
사업성	◎ 기존의 미생물제제시장에 그대로 접목이 가능하므로 사업성 큼 ◎ 기존의 미생물제제보다 성능이 우수하므로 사업의 성장성도 우수함
실용성	◎ 상토는 농업의 필수자재이며, 일반상토 대비 항균상토의 가격은 110% 내외이므로 실용성이 매우 높음
부가가치성	◎ 길항균제제 및 상토의 부가가치가 높아지므로 사업의 수익성이 향상됨
수출가능성	◎ 기능성(항균)상토개발로 상토분야의 가격경쟁력 및 품질경쟁력이 제고되므로써, 수출가능성(일본, 대만, 호주 등)이 매우 큼
수입 대체효과	◎ 현재 일본, 미국 등으로부터 수입되는 미생물제제보다 성능이 월등히 우수하므로 수입대체효과(연간 약 50억원)가 매우 큼

3. 기술상, 제도상의 문제점

- 기술적, 제도적문제점 없음

제 3 절 시장현황

1. 길항균 시장

구분	연도별 시장규모(억원)					비고
	2001	2002	2003	2004	2005	
국내	200	200	200	400	600	
국외(일본)	800	900	1,000	2,000	4,000	
합계	1,000	1,100	1,200	2,400	4,600	

- * 산출근거
- 2001, 2002, 2003년 : 토양미생물제제의 시장규모
 - 2004년(본 연구개발완료 후 1년차) : 전년도 대비 2배의 시장규모
 - 2004년 이후 : 매년 50%씩 증가

2. 항균상토 시장

구분	연도별 시장규모(억원)					비고
	2001	2002	2003	2004	2005	
국내	480	500	520	1,040	1,560	
국외(일본)	4,000	4,400	4,800	9,600	14,400	
합계	4,480	4,900	5,320	10,640	15,960	

- * 산출근거
- 2001, 2002, 2003년 : 일반상토의 시장규모
 - 2004년(본 연구개발완료 후 1년차) : 전년도 대비 2배의 시장규모
 - 2004년 이후 : 매년 50%씩 증가

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 개발 대상기술의 중요성 및 국내·외 관련기술의 현황

1. 길항균을 이용한 입고병(잘록병) 방제의 필요성

- 가. 안정적인 농업생산성확보를 위해서는 건실한 육묘생산이 필수적임
- 나. 입고병은 토양전염성병해의 일종으로서, 토양살균제에 의한 방법은 일시적인 방제에 그침
- 다. 무공해농산물생산을 위해서는 육묘기때부터 환경친화적인 방제기법을 도입해야 함
- 라. 육묘는 조절된환경내에서의 재배이므로, 미생물학적 병해방제가 가능함
- 마. 길항균이 정상적으로 근권에 정착되면, 육묘기간 내내 지속적인 병해방제가 가능함

2. 입고병방제를 위한 기존의 길항균제조기술 현황

- 가. 길항균 “Trichoderma”와 “Bacillus”는 토양서식미생물로서, 작물생육촉진효과 뿐 아니라 병원성곰팡이에 대한 억제력이 매우 우수한 것으로 알려져 있다.
- 나. 따라서 최근 이들 유용미생물을 인공적으로 배양하여 작물생육촉진 및 토양전염성병해방제용 미생물제품으로 판매하는 업체가 급격하게 증가하고 있으며, 대부분의 제품은 다음과 같은 공정을 통하여 제조 및 유통된다.

순서	공 정 내 용	비 고
1	◎ 목적미생물 선발 및 보관	※ Plant Growth Promoting Rhizobacteria 또는 Antagonistic Microorganism
2	◎ 목적미생물 종배양(Seed Culture)	
3	◎ 목적미생물 본배양(Mass Culture)	※ 액체배양 또는 고체배양
4	◎ 배양액(또는 균체)회수	※ Spore-Harvest 또는 Whole broth 사용
5	◎ 제제화(미생물안정화 / 물성조정)	※ 제제화과정은 각업체의 기업비밀임
6	◎ 미생물제품 완성	※ 부산물비료 토양미생물제제 등록
7	◎ 제품 유통	※ 유통기간 약 6-12개월
8	◎ 농가에서 사용	※ 약 1000배 희석하여 토양관주/엽면처리

3. 토양미생물제제의 효과에 대한 농가소비자 반응

- 토양미생물제제는 약 7-8년전 외국수입품이 도입되기 시작하면서, 국내에서는 사용방법 및 효과에 대한 검증없이 무분별하게 농가에 확대보급되고 있다.
- 이후, 국내의 여러 중소기업에서 상기와 같은 공정으로 길항미생물제제를 무분별하게 제조하여 정확한 효과검증 없이 판매하게 됨으로써, 제조업체간에는 과당경쟁, 농민소비자에게는 제품에 대한 불신만을 야기시키고 있다.
- 즉, 제조업체에서는 토양내에서의 길항균의 생리,생태적인 동태(토양정착성 및 증식성)에 대한 정확한 연구자료 없이, 단순히 길항균의 원리적인 특성만을 강조한 제품을 제조, 판매하고 있으며, 따라서 제품개발에 많은 비용이 소요되지 않음으로써, 결국 업체간에는 효과가 검증되지 않은 수많은 제품을 가지고 과당경쟁하고 있는 실정이다.
- 소비자측면에서, 농민은 제조업체로부터의 부정확한 정보에 현혹되어 미생물제제에 대한 막연한 기대감을 가지고 제품을 적극 구매하여 사용하고 있으나, 실제포장에서 사용하기가 매우 불편할 뿐 아니라, 객관적인 효과가 나타나는 경우는 많지 않은 것이 현실이다. 따라서, 토양미생물제제의 잠재시장은 매우 크지만, 상기와 같은 이유로 인하여 토양미생물제제의 현재 시장상황은 답보상태에 머물고 있다.

4. 기존의 토양미생물제제의 효과가 불안정한 이유

구 분	토양미생물제제의 문제점
◎ 처리의 효율성	▶ 10^7 /ml 밀도수준의 미생물제제를 약 1,000배 희석(10^4 /ml)하여 토양 처리하는 것이 보통이나, 이 정도의 밀도로는 포장에서 효과를 나타 내기가 어렵다
◎ 길항력	▶ 기내에서 연속계대배양하여 만든 길항균은 기내순화되어, 길항력이 저하되는 것이 보통이며, 따라서 Field에서 효과를 발휘하기가 어렵다
◎ 토양정착성	▶ 이미 안정한 미생물생태계를 구성하고 있는 근권에, 외부에서 투입된 길항균이 정착하기란 사실상 불가능하다
◎ 토양내 증식성	▶ 이미 정착된 근권미생물과의 경합때문에 길항균의 토양증식성은 매우 불량하다
◎ 경제성	▶ 토양처리용 미생물제제의 시장가격은 보통 15,000-20,000원/150평으로 농가입장에서는 매우 고가이다
◎ 품질의 일관성	▶ 기존의 미생물제제는 유통기간중에 상당수의 미생물이 사멸되며, 따라서 품질의 일관성이 떨어진다
◎ 농가 작업성	▶ 미생물제제 처리를 위해서, 농가에서는 별도의 관수작업이 필요하다

5. 입고병의 생물학적방제를 위한 당 연구진의 접근방법

- 작물의 병은 근본적으로 토양으로부터 발생되며, 토양의 생물학적특성과 병해발 생은 매우 밀접한 관련을 가진다.
- 근권미생물은 작물생장을 촉진(PGPR)할 뿐 아니라, 유해미생물을 제어 (BIOCONTROL)하는 역할도 한다. 예로부터 Trichoderma와 같은 길항미생물 이 근권에 정착해 있는 작물은 병해를 거의 받지 않는 것으로 알려져 있다.
- 따라서 식물병해를 미생물학적으로 방제하기 위해서는 **상기와 같은 특성을 가 지는 미생물이 근권에 정착 및 번식할 수 있도록 하는 것이 가장 중요하다.**

- 따라서, 본 연구에서는 입고병(잘록병)의 생물학적방제를 위한 핵심기술인 길항균의 근권정착기술 및 근권증식기술을 개발하기 위하여 다음과 같은 접근방법을 채택하였다.

공정/시기별	내용/기작
● 길항균선발	◎ 길항력 및 근권정착력이 우수한 균을 중점 선발
● 길항균배양	◎ 길항균이 약조건에서도 생존할 수 있도록 길항균을 특수배양
● 상토제조시 길항균혼합	◎ 길항균이 포자형태로 상토내에 생존
● 항균상토	◎ 포자상태의 길항균이 상토유통기간 중 안정적으로 생존
● 육묘초기	◎ 농가에서 상토에 수분공급시 길항균포자가 발아하여 유근에 정착 시작
● 육묘생장	◎ 길항균이 유근을 따라 번식하면서 고유의 기능(길항력 / 발근 촉진)발휘
● 본포정식	◎ 육묘의 근권에 착생해 있는 길항균이 육묘와 더불어 본포로 이송
● 본포생육기	◎ 길항균이 세근발달 촉진기능 수행
● 병해발생시	◎ 길항균이 뿌리의 생물학적 보호막기능을 발휘하여 병해방제
● 수확기이후	◎ 토양내 길항균이 포자상태로 휴면, 월동하여 다음 작기에 활동재개

6. 개발대상기술과 기존기술과의 차이점 요약

가. 기존기술 요약

- 1) 선발된 길항미생물을 기내배양한 후, 여과 또는 농축하여 미생물자체를 제품화
- 2) 미생물완제품을 전문판매상을 통하여 유통 및 농가판매
- 3) 농가는 대형물통을 별도로 준비하여 추천배율로 희석한 후, 엽면살포 또는 토양관주

나. 개발대상기술 요약

- 1) 섬유소를 주성분으로 하는 농가부산물을 이용하여 길항미생물을 고체배양(Solid-State Fermentation)하면서 Sporulation 유도 및 저온건조처리
- 2) 육묘용상토에 혼합 및 기능성항균상토로서 농가에게 판매
- 3) 농가는 관행적인 방법으로 육묘작업 실시

7. 개발대상기술과 기존기술의 비교

대부분의 토양미생물제제(기존기술)는 작기중의 작물에 처리하도록 되어있으나, 본 연구에서는 길항미생물을 상토에 접종하여 육묘초기부터 길항균을 근권에 착생시키고자 한다. 개발대상기술과 기존기술을 소비자입장에서 비교하면 다음과 같다.

결론적으로 미생물(길항미생물)을 토양에 직접 처리하는 방법보다, 미생물을 상토에 혼합하여 육묘단계부터 근권에 정착시키는 방법이 훨씬 효과적이라 할 수 있다.

항목별		기존기술	개발대상기술
농가소비자 측면	처리 비용	<p>① 별도의 유통과정을 통한 개별제품을 고가로 구입해야 하며,</p> <p>② 토양처리시 근권이외의 부분에 떨어지는 loss분이 대단히 많으므로 ==> 농가비용이 과다함 (처리비용 : 75-100원/평)</p>	<p>① 길항균이 상토에 혼합되어 있어 기존 상토유통경로를 통하므로, 길항균의 원가구입이 가능하며,</p> <p>② 길항균이 정확히 근권에만 처리되므로 loss가 없어 ==> 농가비용이 최소화됨 (처리비용 : 25-30원/평)</p>
	작업성	<p>① 미생물제제의 희석 및 살포를 위한 별도의 작업이 필요함</p>	<p>① 관행적인 육묘작업이면 충분하므로 별도의 작업 불필요</p>
길항균의 정착성 및 증식성		<p>① 근권에 기존에 정착되어 있는 미생물과의 경합관계</p> <p>② 기존기술제품의 제조공정 특성상 길항균자체의 정착력이 매우 약하므로 ==> 길항균의 정착율 및 증식율이 매우 낮음</p>	<p>① 유근 생장과 동시에 길항균의 근권정착이 시작되며</p> <p>② 길항균이 근권의 우점균이 되어 경쟁적우위를 점하게 되므로 ==> 길항균정착성 및 증식성은 매우 우수함</p>
길항균의 효과(항병력 및 생육촉진효과)		<p>① 근권에 정착된 길항균의 밀도가 낮으므로 정상적인 효과를 나타내기 어려움</p>	<p>① 근권의 길항균밀도가 매우 높으므로 자연히 항병력 및 생육촉진효과가 매우 우수하게 나타남</p>

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 육묘시스템의 현황 및 문제점 조사

1. 이론적·실험적 접근방법

길항균, 묘입고병(damping-off disease) 및 상토 등에 대한 일반적인 특성을 기술하였으며, 우편설문조사를 통하여 전국육묘장의 현황, 애로사항 파악 및 항균상토에 대한 수요조사를 하였다.

2. 연구내용

가. 길항균

항균물질생산, 병원균용균, 서식장소경쟁, 영양성분경쟁 등의 기작으로 식물병원균을 무력화시켜 병해발생을 방제할 수 있는 기능성미생물이다. 즉, 만일 농토에 처리한 길항미생물이 토양에 안정적으로 정착하여 지속적으로 증식할 수만 있다면, 길항미생물은 원리적으로 식물병원균을 매우 효율적이고 지속적으로 억제하여, 식물병을 환경친화적으로 방제할 수 있다.

나. 묘입고병(damping-off disease)

토양전염성병원균이 유발하는 병으로서 어린작물에 가장 치명적이다. 입고병은 수종의 토양병원균(*Fusarium oxysporium*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*)이 복합적으로 작용하여 발생하는 병으로서, 이들 병원균은 토양중에서 포자 또는 균핵상태로 월동하고 환경조건이 좋아지면 발아하여 어린작물에 침입, 감염시킴으로써 농사에 막대한 피해를 일으키는 병원균이다. 이러한 토양병원균은 토양에 포자상태로 항상 존재하므로 화학적인 방법으로는 근절할 수 없는 병해이다.

다. 상토

상토는 피트모스, 코코넛피트, 제오라이트, 비료성분 등을 함유하여 종자로부터 유식물을 키우기 위한 인공배지로서, 통기성, 입도, 보습성, 배수성, 보비력, 뿌리활착성 등의 물리 화학성을 최적화시켜 유식물을 건강하게 재배할 수 있는 농자재이다.

라. 육묘시스템의 현황 및 문제점

1) 현황

- 농촌의 인력감소 및 농업전문화에 따라, 자가상토 제조농가의 수가 급격히 감소하면서, 인공상토의 수요가 점점 증가함.
- 상기와 같은 맥락에서, 자가육묘 농가도 점점 감소함에 따라, 묘에 대한 수요도 점점 증가함.
- 결국, 육묘산업이 발달함에 따라, 육묘시장 역시 급속도로 증가하고 있음.
- 육묘장의 규모도 경쟁력확보를 위하여 점차 대형화되고 있음.
- 전문육묘장 추세에 따라, 작목도 점차 전문화되어 단일육묘사업장이 증가하고 있음.

2) 문제점

- 육묘장의 갯수 및 규모는 증가하고 있으나, 육묘기술의 발달은 그에 미치지 못하고 있음.
- 특히, 품질이 표준화되지 않은 상토를 사용하므로써, 육묘성적이 일정하지 않으며, 상토내 입고병원균의 혼입 등으로 인하여 육묘과정중에 입고병이 다발함.

마. 전문육묘장 등 잠재수요처의 Mind 조사

1) 전국육묘장 현황

다음의 표-1에 나타난 바와 같이, 전국에는 67개의 육묘장이 영업중인 것으로 나타났다.

<표-1> 전국 육묘장 현황

지역	현황	지역	현황
강원도	국사랑 등 6개소	충남	공주원예영농조합 등 11개소
경기도	여주육묘장 등 7개소	충북	충주육묘장 등 2개소
전남	함평 천지프러그 등 10개소	경남	초전육묘장 등 13개소
전북	가나안프러그 등 8개소	경북	성주육묘장 등 6개소
대전	금강육묘원 1개소	광주	광주육묘장 1개소
울산	언양육묘장 1개소	제주	한라육묘 1개소

2) 항공상토에 대한 mind 조사

전국 67개소의 육묘장 중, 33개소를 대상으로 항공상토에 대한 전화조사결과는 다음의 표-2와 같다. 응답자 중, 67%가 항공상토 필요하다고 하였고, 항공상토를 구입하여 사용할 의사가 있는 경우가 82% 이었으며, 사용할 의향이 있는 응답자 중 74%는 일반상토의 110% 가격까지 수용할 수 있는 것으로 확인되었다. 본 조사결과, 항공상토는 그 시장성이 매우 밝은 것으로 판단된다.

<표-2> 육묘장의 항공상토에 대한 mind 조사 결과

조사내용	응답결과	
항공상토가 필요하다고 생각하는가 ?	필요함	22개소(67%)
	불필요함	3개소(9%)
	무응답	8개소(24%)
항공상토 출시될 경우, 사용할 의향이 있는가 ?	의향 있음	27개소(82%)
	의향 없음	3개소(9%)
	무응답	3개소(9%)
사용할 의향이 있다면, 어느정도 가격까지 수용할 수 있는가 ?	일반상토의 110%	20개소(74%)
	일반상토의 120%	6개소(22%)
	일반상토의 130%	1개소(4%)

제 2 절 유통중인 토양미생물제제 분석

1. 이론적·실험적 접근방법

가. 제품내 유효미생물 분석

제품 10g을 100ml의 멸균증류수에 풀어 10분간 진탕시킨 후, 균종별 분석배지에 Spreading하여 유효미생물을 분석하였다. 즉, 세균은 Tryptic soy agar 배지를 이용하였으며, 곰팡이의 경우에는 세균생장을 억제하기 위하여 항생제 Streptomycin sulfate 가 10mg/L 함유되어 있는 PDA배지를 이용하여 분석하였다.

나. 제품의 경시적안정성 평가

제품내 유효미생물의 경시적 안정성을 확인하기 위하여 제품을 상온보관하면서 정기적으로 Sampling하여 유효미생물의 밀도를 조사하였다. 조사방법은 상기 1)항과 같다.

2. 연구내용

가. 토양미생물제제 제품 확보 및 미생물분석

전국적으로 유통되고 있는 토양미생물제제 수집현황은 다음의 표-3과 같다. 즉, 총 22개의 수집제품을 제형별로 분류하면 액제가 10제품(45%), 분제가 7제품(32%), 입제가 5제품(23%)인 것으로 나타났다. 한편, 상당수의 제품은 악취발생, 표면에 부유물형성, 침전발생, 용기팽창(또는 쭉그러듦), 덩어리짐, 곰팡이발생 등 내용물의 상태가 매우 불량한 것으로 나타났다. 이러한 현상은 제품이 생물학적으로 안정화되지 않았기 때문인 것으로 판단된다.

<표-3> 유통중인 토양미생물제제 확보현황

수집지역	제조사(제품명)	제형	비고(외관물성)
경기	“K”사(“N”제품)	Liquid	악취, 표면부유물
	“P”사(“I”제품)	Powder	양호
강원	“K”사(“G”제품)	Liquid	표면부유물
	“T”사(“L”제품)	Liquid	다량의 침전물
충북	“L”사(“R”제품)	Powder	덩어리지고 곰팡이핍
	“A”사(“P”제품)	Granule	양호
충남(대전)	“F”사(“E”제품)	Liquid	양호
	“B”사(“L”제품)	Liquid	가스로 팽창됨
경북(대구)	“G”사(“P”제품)	Granule	부분적으로 덩어리짐
	“S”사(“N”제품)	Powder	양호
	“K”사(“I”제품)	Liquid	양호
경남(울산)	“G”사(“M”제품)	Granule	곰팡이핍
	“C”사(“N”제품)	Powder	양호
	“T”사(“T”제품)	Liquid	악취, 표면부유물
	“P”사(“L”제품)	Liquid	가스로 팽창됨
	“D”사(“P”제품)	Powder	양호
전남(광주)	“K”사(“C”제품)	Granule	가스로 팽창됨
	“O”사(“O”제품)	Liquid	양호
	“T”사(“T”제품)	Powder	양호
전북	“P”사(“N”제품)	Powder	양호
	“K”사(“B”제품)	Liquid	용기가 쭈그러짐
	“L”사(“S”제품)	Granule	양호

수집된 제품의 미생물분석결과는 다음의 표-4와 같다. 미생물분석은 보증균에 국한하지 않고 제품내에 들어있는 모든미생물을 분석하였다. 제품의 외관물성이 양호하지 않은 경우에는 오염균에 의한 간섭이 심하므로 우점미생물을 선별하지 않았다.

제품내의 미생물은 세균, 곰팡이, 효모 등으로 구성되어 있으며, 제품에 따라서는

세균과 효모 또는 세균과 곰팡이가 혼합되어 있는 것으로 나타났다.

제품으로부터 우점균 분리결과, 대부분의 제품내에는 1-2종의 우점균이 존재하는 것으로 나타났다.

<표-4> 유통중인 토양미생물제제의 미생물분석결과

수집지역	제조사(제품명)	미생물분석 결과(ml, g당)	우점미생물
경기	“K”사(“N”제품)	세균 7×10^4	-
	“P”사(“I”제품)	세균 3×10^7 곰팡이 2×10^6	세균 2종, 곰팡이 1종
강원	“K”사(“G”제품)	세균 3×10^6 효모 9×10^6	세균 1종
	“T”사(“L”제품)	세균 2×10^6 효모 2×10^5	없음
충북	“L”사(“R”제품)	세균 7×10^7 곰팡이 8×10^5	-
	“A”사(“P”제품)	세균 4×10^7 곰팡이 3×10^6	세균 2종, 곰팡이 1종
충남(대전)	“F”사(“E”제품)	세균 3×10^8	세균 1종
	“B”사(“L”제품)	세균 2×10^3	-
경북(대구)	“G”사(“P”제품)	세균 8×10^7 곰팡이 2×10^5	없음
	“S”사(“N”제품)	세균 3×10^3 곰팡이 6×10^7	곰팡이 1종
	“K”사(“I”제품)	세균 4×10^8	세균 1종
경남(울산)	“G”사(“M”제품)	세균 4×10^5 곰팡이 7×10^7	없음
	“C”사(“N”제품)	세균 3×10^8 곰팡이 2×10^3	세균 1종
	“T”사(“T”제품)	세균 3×10^5	-
	“P”사(“L”제품)	세균 9×10^4	-
	“D”사(“P”제품)	세균 7×10^7 곰팡이 6×10^3	세균 2종
전남(광주)	“K”사(“C”제품)	세균 2×10^4	-
	“O”사(“O”제품)	세균 2×10^8	세균 1종
	“T”사(“T”제품)	세균 2×10^3 곰팡이 6×10^7	곰팡이 1종
전북	“P”사(“N”제품)	세균 4×10^8 곰팡이 8×10^3	세균 1종, 곰팡이 1종
	“K”사(“B”제품)	세균 3×10^4	-
	“L”사(“S”제품)	세균 2×10^7 곰팡이 4×10^4	세균 2종

* 세균은 TSB배지에서 2일 배양, 곰팡이와 효모는 PDA배지(Streptomycin sulfate가 50mg/L의 농도로 포함)에서 5일 배양하여 생성되는 콜로니를 계수하여 조사하였다.

나. 토양미생물제제 제품의 경시적안정성 평가

수집제품내 미생물의 안정성을 평가하기 위하여, 수집 2개월후의 미생물밀도를 조사하여 수집당시와 비교하였다(표-5).

즉, 제품에 따라서는 미생물이 경시적으로 매우 안정한 경우도 있었으나, 2개월후에 상당수의 미생물이 사멸되는 제품도 있는 것으로 나타났다.

<표-5> 수집제품의 경시적 미생물안정성 평가 결과

수집지역	제조사(제품명)	미생물분석 결과(ml, g당)			
		수집직후		수집 2개월 후	
경기	“K”사(“N”제품)	세균 7×10^4		세균 5×10^4	
	“P”사(“I”제품)	세균 3×10^7	곰팡이 2×10^6	세균 1×10^7	곰팡이 5×10^4
강원	“K”사(“G”제품)	세균 3×10^6	효모 9×10^6	세균 2×10^6	효모 2×10^6
	“T”사(“L”제품)	세균 2×10^6	효모 2×10^5	세균 7×10^5	효모 2×10^5
충북	“L”사(“R”제품)	세균 7×10^7	곰팡이 8×10^5	세균 6×10^7	곰팡이 3×10^5
	“A”사(“P”제품)	세균 4×10^7	곰팡이 3×10^6	세균 5×10^7	곰팡이 2×10^6
충남(대전)	“F”사(“E”제품)	세균 3×10^8		세균 3×10^8	
	“B”사(“L”제품)	세균 2×10^3		세균 1×10^3	
경북(대구)	“G”사(“P”제품)	세균 8×10^7	곰팡이 2×10^5	세균 7×10^7	곰팡이 1×10^5
	“S”사(“N”제품)	세균 3×10^3	곰팡이 6×10^7	세균 5×10^3	곰팡이 7×10^7
	“K”사(“I”제품)	세균 4×10^8		세균 3×10^8	
경남(울산)	“G”사(“M”제품)	세균 4×10^5	곰팡이 7×10^7	세균 4×10^5	곰팡이 7×10^7
	“C”사(“N”제품)	세균 3×10^8	곰팡이 2×10^3	세균 4×10^8	곰팡이 1×10^3
	“T”사(“T”제품)	세균 3×10^5		세균 5×10^4	
	“P”사(“L”제품)	세균 9×10^4		세균 2×10^4	
	“D”사(“P”제품)	세균 7×10^7	곰팡이 6×10^3	세균 7×10^7	곰팡이 4×10^3
전남(광주)	“K”사(“C”제품)	세균 2×10^4		세균 1×10^4	
	“O”사(“O”제품)	세균 2×10^8		세균 2×10^8	
	“T”사(“T”제품)	세균 2×10^3	곰팡이 6×10^7	세균 2×10^3	곰팡이 5×10^7
전북	“P”사(“N”제품)	세균 4×10^8	곰팡이 8×10^3	세균 2×10^8	곰팡이 4×10^3
	“K”사(“B”제품)	세균 3×10^4		세균 4×10^4	
	“L”사(“S”제품)	세균 2×10^7	곰팡이 4×10^4	세균 2×10^7	곰팡이 5×10^4

* 제품은 상온에서 보관

* 세균은 TSB배지에서 2일 배양, 곰팡이와 효모는 PDA배지(Streptomycin sulfate가 50mg/L의 농도로 포함)에서 5일 배양하여 생성되는 콜로니를 계수하여 조사하였다.

다. 균종별 항균력 평가

수집한 토양미생물제제 제품에서 분리한 우점균 19종(세균 14종, 곰팡이 5종)의 입고병원균 3종에 대한 길항력을 평가하였으며, 그 결과 입고병원균 3종에 대하여 길항력이 우수한 세균 6종과 곰팡이 1종을 확보하였다(표-6). 참고로, 세균의 경우에는 Inhibition Zone Method에 의한 Halo size를 조사하여 항균력을 측정하였다. 즉, PDA 배지에 각 병원균의 포자액 또는 균사절편액을 Spreading한 후, 중앙부위에 길항균을 Poking접종하여 4일간 Incubation한 후, 길항균 주위에 형성되는 Inhibition Zone의 지름을 측정하므로써 길항력을 정량평가하였다. 한편, 곰팡이의 경우에는 길항균과 병원균간의 대치배양을 통하여 항균력을 측정하였다. 즉, PDA배지상에 길항균과 병원균을 인접한 상태로 접종한 후, 7일간 배양하여 균사간 접촉지점을 기점으로 하여 병원균 균사위로 Overgrowth하는 정도를 조사하여 길항력을 평가하였다.

<표-6> 수집제품에서 분리한 우점균의 입고병균에 대한 항균력 평가결과

균주 일련번호	입고병균에 대한 길항력(inhibition zone, mm)		
	Fusarium	Pythium	Rhizoctonia
B-1	4	2	7
B-2	8	3	10
B-3	13	11	17
B-4	2	0	0
B-5	4	2	6
B-6	1	1	2
B-7	0	1	3
B-8	5	2	6
B-9	9	7	8
B-10	7	6	11
B-11	11	13	15
B-12	14	12	11
B-13	21	17	18
B-14	2	1	4
F-1	+	-	+
F-2	++	++	+
F-3	+	-	-
F-4	-	-	+
F-5	+	+	-

- : 길항력 없음 , + : 길항력 있음 , ++ : 길항력 우수함(길항곰팡이의 경우)

제 3 절 토양세균의 분리

1. 이론적·실험적 접근방법

우선 포자를 형성하는 *Bacillus*종과 *Streptomyces*종들을 선별하기 위하여 각 토양 시료 10g을 15분간 80도에서 열처리를 하였다. 그 후, 식염수(0.9% NaCl)에 1000배 희석한 후 그 토양 희석액의 100ul를 PTYG배지에 도말하였다. 여기에 사용된 PTYG의 조성은 다음과 같다.

PTYG (1L)

Peptone	0.25g
Trypton	0.25g
Yeast extract	0.5g
Glucose	0.5g
MgSO ₄	0.03g
CaCl ₂	0.003g
agar	15.0g

28℃의 배양기에서 4-5일이 경과한 후, 배지에 약 30-300콜로니가 생성된 것을 확인하고 각각의 콜로니들을 종류별로 분류하여 다른 배지에 옮겨 담았다. 총 30개 지역으로부터 700여종의 토양세균을 분리하였으며 이들을 대상으로 길항력 테스트를 시행하였다.

2. 연구내용

전국 각 지역에서 채취된 30여종의 토양시료를 80℃에서 열처리한 후, 세균 분리를 시도한 결과 약 700여종의 그람양성균이 순수 분리되었다. 이들 세균은 PTYG (peptone-tryptone-yeast extract-glucose) 배지에서 잘 자라며 각 colony의 형태도 용이하게 구별되어 열처리와 PTYG배양을 통해 여러 종류의 그람양성 균주를 짧은 시

간에 많이 확보할 수 있게 되었다.

제 4 절 길항력 분석

1. 이론적·실험적 접근방법

후보길항균의 길항능력을 조사하기 위하여 YMG배지를 이용하여, 입고병을 일으키는 *Fusarium oxysporium*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum* 등을 대상으로 하여 inhibition zone 방법으로 길항력을 분석하였다.

2. 연구내용

길항능력을 조사하는 배지로는 YMG (yeast extract-maltose-glucose) 배지를 사용하였는데, 이 배지에서 진균류와 그람양성 균주가 모두 잘 자랐으며 길항작용으로 생기는 inhibition zone이 선명하게 관찰되었다. 이 YMG 배지를 사용하여 3종류의 진균에 대한 길항력을 분석한 결과, 총 700여종의 균주 중에서 9.4%에 해당하는 66종이 항균 양성반응을 보여 주었다 (표-7). 이들 양성균주 중에서 특히 df12, df14, df22, df24, df29, df31, df35, df49, df56 등의 9 균주는 입고병을 일으키는 *Fusarium oxysporium*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum* 진균 모두에 길항력을 가지고 있었고, df19, df21, df29, df38, df43 등의 5 균주는 inhibition zone의 크기가 10mm 이상 되는 길항력을 보여 주었다.

<표-7> Relative inhibition of pathogens by bacterial isolates on YMG

strain	Antifungal activity* against fungi causing damping-off disease		
	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Pythium ultimum</i>
df1	++	-	-
df2	++	-	-
df3	++	+	-
df4	++	-	-
df5	+	-	-
df6	-	++	-
df7	+	++	-
df8	+	+	-
df9	+	+	-
df10	+	+	-
df11	+	+	-
df12	+	+	+
df13	++	-	-
df14	++	++	++
df15	-	+	-
df16	+	-	-
df17	+	+	-
df18	+	-	-
df19	+++	++	-
df20	++	-	+
df21	+++	++	-
df22	++	+	+
df23	+	-	-
df24	++	++	+
df25	++	++	-
df26	+	+	-
df27	+	-	-
df28	++	-	+
df29	++	+++	+
df30	+	-	+
df31	+	+	+
df32	+	-	-
df33	+	-	-
df34	+	+	-

strain	Antifungal activity against fungi causing damping-off disease		
	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Pythium ultimum</i>
df35	++	+	+
df36	++	-	+
df37	+	-	+
df38	+++	-	+
df39	++	-	+
df40	+	-	+
df41	+	+	-
df42	-	+	-
df43	+++	-	-
df44	+	-	+
df45	+	-	+
df46	+	-	+
df47	+	+	-
df48	-	+	-
df49	++	+	++
df50	+	-	-
df51	-	+	-
df52	-	-	+
df53	+	-	+
df54	+	-	+
df55	+	+	-
df56	+	+	++
df57	-	+	-
df58	+	-	+
df59	+	-	-
df60	+	+	-
df61	-	-	+
df62	++	-	-
df63	+	-	-
df64	++	-	+
df65	+	-	-
df66	+	-	+

* + ; 1-5mm, ++ :5-10mm, +++ :10-15mm, - : no inhibition zone

제 5 절 길항균의 16S rDNA 분석

1. 이론적 · 실험적 접근방법

분리된 길항 세균들의 동정을 위하여 16S rDNA(ribosomal DNA)의 DNA sequencing을 시도하였다. 0.05N의 NaOH를 사용하여 세포 파괴를 유도했으며 동정에 필요한 16S rDNA를 PCR(Polymerase Chain reaction)법으로 증폭하기 위하여 27mF, 1492R primer를 이용하였다. 시행된 PCR의 반응조건은 아래와 같다.

- ① 94℃ 5min
- ② 94℃ 1min
- ③ 55℃ 1min
- ④ 72℃ 1min 30sec
- ⑤ go to 2step(29times)
- ⑥ 72℃ 10min
- ⑦ 4℃ hold

증폭된 DNA는 Agarose Gel Electrophoresis(0.7% agarose)를 이용하여 1.5kb의 크기가 확인되었으며, QIAGEN사의 DNA elution kit를 사용하여 해당 DNA만을 Agarose Gel로부터 순수분리하였다. 앞에서 얻은 DNA를 pGEM-T easy vector에 접합한 뒤에 Electroporation으로 E.coli 10B에 삽입하였으며, Lac selection법을 이용하여 plasmid로 인해 형질전환된 콜로니만을 선별하였다. Lac selection에 쓰인 LB-agar배지와 그 함유물의 조성은 다음과 같다.

(LB 배지 1L당)

Tryptone	10g
Yeast Extract	5g
NaCl	5g
Ampicilin	50ug/ml

(1개 plate당 도말한 IPTG와 X-Gal의 양)

X-Gal:100ul of 100mM

IPTG : 20ul of 50mg/ml

앞에서 선발된 콜로니는 다시 LB 액체배지에 접종하여 배양되었으며 이들로부터 재조합된 plasmid DNA를 회수하였고 현재 ABI PRISM사의 Big dye sequencing kit와 519R, M13, 27mF등의 primer들을 이용하여 PCR을 시행하는 단계에서 진행중이다. 여기서 쓰인 PCR 반응 조건은 다음과 같다.

- ① 96℃ 2min
- ② 96℃ 10sec
- ③ 50℃ 5sec
- ④ 60℃ 4min
- ⑤ go to step 1 (24 times)
- ⑥ 4℃ hold

이 반응으로 증폭된 DNA는 ABI PRISM사의 3700 DNA analyzer를 이용하여 Sequencing을 하였으며, 출력된 DNA 염기서열을 미국NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 세균 DNA 데이터 베이스에 등록된 자료와 비교하여 각 균주의 계통분류학적 위치를 분석하였다.

2. 연구내용

전국 각 지역에서 순수 분리된 약 700여종의 토양미생물중에서 길항능력을 가지고 있는 것으로 밝혀진 66종 균주의 16S rDNA의 염기서열을 분석하여 이들 균주의 계통분류학적 종 다양성을 조사하였다 (표-8). 분리된 이들 길항균은 주로 *Bacillus* species (22종), *Paenibacillus* species (10종), *Streptomyces* species (21종)에 속하는 것으로 밝혀졌고 일부 균주는 *Brevibacillus* species, *Sphingomonas* species, *Nocardia* species등과 연관성을 가진 것으로 나타났다.

이 후의 토양환경에 관련된 연구에서는 이들 균주 중에서 우점 group으로 나타난 *Bacillus* species에 대해 집중적으로 조사하였다. 이들 *Bacillus* 균주의 토양에서의 길

항균 검출 기술과 환경적응능력을 조사하기 위해 약 1500 bp에 달하는 16S rDNA 염기서열전체를 분석하였고, 각 균주의 DNA fingerprint를 분석하였으며, strain-specific PCR 방법을 활용하여 토양의 토착미생물에 섞여 있는 개발균주의 검출과 군집밀도를 분석하는 연구를 수행하였다.

<표-8> Identification of isolates by 16S rDNA sequences

strain	area	16S rDNA sequence analysis
df1	경남하동	<i>Streptomyces diastatochromogenes</i>
df2	경북상주	<i>Sphingomonas suberifaciens</i>
df3	경남김해	<i>Bacillus subtilis</i> strain T2
df4	충남천안	<i>Brevibacillus reuszeri</i>
df5	충남천안	<i>Streptomyces</i> sp. EF-16
df6	경남거창	<i>Bacillus</i> sp. RZ-254
df7	충북청원	<i>Bacillus subtilis</i> strain T2
df8	경남김해	<i>Streptomyces panayensis</i>
df9	충남천안2	<i>Streptomyces panayensis</i>
df10	경남김해	<i>Streptomyces panayensis</i>
df11	경남김해	<i>Bacillus subtilis</i>
df12	충남서산	<i>Bacillus</i> sp. Bch1
df13	경북김천	Uncultured bacterium
df14	경남김해	<i>Bacillus</i> sp. Bch1
df15	경남김해	<i>Bacillus</i> sp.
df16	경남하동	<i>Bacillus</i> sp.
df17	경남김해	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
df18	경남김해	<i>Bacillus</i> sp. TKSP21
df19	경남김해	<i>Bacillus</i> sp.
df20	충남천안2	<i>Bacillus pumilus</i>
df21	경남김해	<i>Bacillus</i> sp.
df22	경북상주	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
df23	경남김해	<i>Paenibacillus burgondia</i>
df24	경남하동	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
df25	경남하동	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
df26	경남김해	<i>Streptomyces panayensis</i>
df27	경북상주	<i>Bacillus</i> sp.
df28	경남김해	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
df29	경남김해	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
df30	경남김해	<i>Bacillus</i> sp.
df31	경북김천	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
df32	경북김천	<i>Streptomyces</i> sp.
df33	경남하동	<i>Streptomyces panayensis</i>
df34	경남하동	<i>Streptomyces panayensis</i>

strain	area	16S rDNA sequence analysis
df35	전북부안	<i>Streptomyces panayensis</i>
df36	전북부안	<i>Bacillus</i> sp.
df37	전북부안	<i>Streptomyces heteromorphus</i>
df38	전북부안	<i>Streptomyces heteromorphus</i>
df39	전북부안	<i>Bacillus pumilus</i>
df40	경북문경	<i>Brevibacillus reuszeri</i>
df41	경북밀양	<i>Bacillus subtilis</i>
df42	전남화순	Soil bacterium S107D1
df43	전남영광	<i>Nocardia</i> sp.
df44	강원횡성	<i>Bacillus</i> sp.
df45	충북괴산	Soil bacterium S107D1
df46	경기화성	<i>Brevibacillus reuszeri</i>
df47	경기수원	<i>Paenibacillus</i> sp.
df48	전남화순	<i>Bacillus</i> sp.
df49	전남영광	<i>Bacillus</i> sp.
df50	광주시	<i>Streptomyces panayensis</i>
df51	전남장성	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
df52	전남강진	<i>Brevibacillus reuszeri</i>
df53	충북계산	<i>Streptomyces</i> sp.
df54	경기화성	<i>Streptomyces</i> sp.
df55	경기수원	<i>Streptomyces</i> sp.
df56	광주시	<i>Bacillus</i> sp.
df57	광주시	<i>Sphingomonas hygrosopicus</i>
df58	광주시	<i>Sphingomonas</i> sp.
df59	광주시	<i>Streptomyces lavendulae</i>
df60	전남장성	<i>Bacillus subtilis</i>
df61	전남강진	<i>Bacillus subtilis</i>
df62	전남강진	<i>Streptomyces diastatochromogenes</i>
df63	전남보성	<i>Streptomyces</i> sp.
df64	전남보성	<i>Streptomyces heteromorphus</i>
df65	전남보성	Soil bacterium S99D1
df66	전남보성	<i>Streptomyces panayensis</i>

제 6 절 길항균의 항균특성

1. 이론적·실험적 접근방법

길항균이 입고병원균의 세포벽 구성성분을 분해하는 효소류인 glucanase, mannanase, cellulase, xylanase 등을 분비하는지를 조사하였으며, 또한 철성분을 chelation시키는 siderophore를 생성하는지를 조사하는 방법으로 길항균의 항균특성을 조사하였다.

2. 연구내용

입고병을 유발시키는 주요 3 진균 중에서 *Rhizoctonia solani*는 Basidiomycete에 속하는 진균으로서 cell wall에 glucan과 chitin이 많이 함유되어 있고, *Pythium ultimum*은 Oomycetes 종류로서 cell wall에 cellulose와 glucan을 많이 가지고 있는 것으로 보고되었다. 따라서, 본 연구에서는 여러 종류의 배지를 사용하여 분리된 길항균이 진균의 cell wall 구성성분을 분해하는 효소 (glucanase, mannanase, cellulase, xylanase)를 분비하는가 조사하였다 (표-9). 한편, *Fusarium oxysporium*도 이들 분해 효소에 의해 영향을 받지만 특히 ferric ion등의 영양분에 대한 경쟁관계를 통해 길항균이 항균효과를 나타내는 것으로 보고된 바, 본 연구에서도 ferric ion을 chelation시키는 siderophore를 분리된 길항균이 생성하는지를 조사하였다 (표-9). 실험 결과 분리된 전체 66균주 중에서 약 14%가 glucanase test에 양성반응을 나타내었고, 약 42%가 mannanase test에, 약 15%가 cellulase test에, 약 55%가 xylanase test에, 그리고 약 45%의 균주가 siderophore에 양성반응을 나타내었다. 전체적으로 볼 때, 분리된 균주 중에서 약 73%에 해당하는 균주가 최소한 한 가지 이상의 길항효소를 분비하는 것으로 나타났고, 한편 18 균주는 이들 효소 실험에서 전혀 양성반응을 보이지 않아 다른 요소 즉 항생제나 HCN에 의한 길항작용이 그 주요 길항인자가 될 것으로 추정된다. 길항균주 중에서 df23, df24, df25, df28, df29등의 5균주는 조사된 효소 실험에 대해 모두 양성반응을 보이는 것으로 나타났는데, 이 중에서 df24와 df29 등의 2균주는 병원성 진균 *Fusarium oxysporium*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*에 모두 길항력을 발휘하는 것으로 나타나 효소의 양성반응과 길항력 사이에 밀접한 관

계가 있는 것으로 나타났다.

<표-9> Antagonistic properties of isolates

strain	production of secondary metabolites				
	glucanase	mannanase	cellulase	xylanase	siderophore
df35	-	-	-	+	-
df36	-	-	-	+	-
df37	-	-	-	-	-
df38	-	+	-	+++	-
df39	-	+++	-	+	++
df40	-	-	-	-	+
df41	-	-	-	-	-
df42	-	+++	-	+	+++
df43	-	-	-	-	-
df44	-	-	-	-	+
df45	-	-	-	-	-
df46	-	-	-	-	-
df47	-	-	-	-	-
df48	-	-	-	++	+
df49	-	-	-	-	-
df50	-	-	-	-	+
df51	-	+++	-	+	++
df52	-	-	-	+	-
df53	-	-	-	-	-
df54	-	-	-	-	-
df55	-	-	-	-	-
df56	-	-	-	+	-
df57	-	-	-	++	+
df58	-	-	-	-	-
df59	-	-	-	-	+
df60	-	+++	-	+	++
df61	-	-	-	+	-
df62	+	-	+++	++	+
df63	-	-	-	+	-
df64	-	-	-	+	-
df65	-	-	-	-	-
df66	-	-	-	-	-

strain	Production* of secondary metabolites				
	glucanase	mannanase	cellulase	xylanase	siderophore
df1	-	-	+++	++	+
df2	-	+	+	-	+
df3	-	+++	-	+	++
df4	-	+	-	-	++
df5	+	-	-	++	+
df6	-	+++	-	+	++
df7	--	++	-	-	-
df8	-	-	-	-	-
df9	-	-	-	-	-
df10	-	-	-	-	-
df11	-	+++	-	+	++
df12	-	++	-	+	+
df13	-	-	-	-	++
df14	-	++	-	+	-
df15	-	++	-	+	+++
d16	-	++	-	+	++
df17	-	-	-	-	-
df18	-	+++	-	+	-
df19	-	+++	-	+	-
df20	-	+	-	+++	-
df21	-	++	-	++	-
df22	+++	+++	++	++	-
df23	++	+++	+	++	+
df24	+++	+++	++	++	+
df25	+++	+++	++	++	+
df26	-	-	-	-	-
df27	-	++	-	+	++
df28	++	++	++	++	+
df29	+++	+++	++	++	+
df30	-	++	-	+	-
df31	+++	+++	++	++	-
df32	-	-	-	+	-
df33	-	-	-	-	+
df34	-	-	-	-	+

*Siderophores and enzymes activity *in vitro*: + represents <5 mm wide zone; ++ represents 5-10mm wide zone; +++ represents >10 mm wide zone.

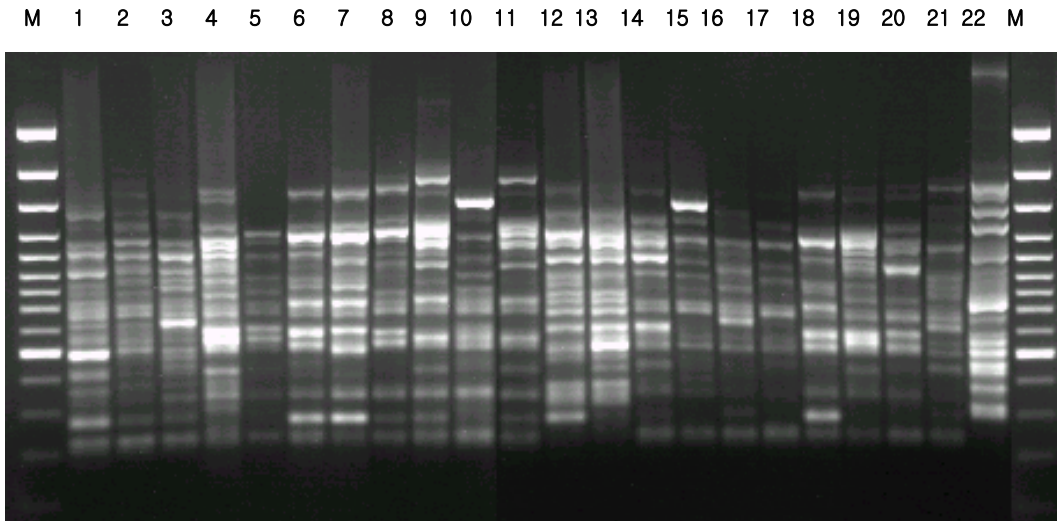
제 7 절 *Bacillus* 길항균의 DNA fingerprint 분석

1. 이론적 · 실험적 접근방법

여러 종류의 토착미생물 및 다른 *Bacillus* 종과 본 연구에서 분리된 균주를 구별하여 이들 균주를 토착미생물과 쉽게 구별할 수 있을 뿐만 아니라, 개발된 균주의 특허등록, 실용화하는데 있어서 중요한 자료로 사용될 수 있도록 하기 위하여 각 균주의 염색체에 존재하는 repetitive extragenic palindromic sequences의 다양성을 PCR에 의해 분석함으로써 각 균주의 지문에 해당하는 DNA fingerprint를 비교 분석하였다.

2. 연구내용

Bacillus 종은 REP-PCR 방법으로는 DNA band가 매우 제한적으로 생성되는 것으로 종래에 학술보고가 있었는데, 본 연구에서는 PCR 조건을 최적화시키고 추출된 염색체 DNA를 대상으로 PCR을 수행함으로써 각 *Bacillus* 균주를 구별할 수 있는 DNA fingerprint를 얻을 수 있었다. 이 방법으로 [그림-1] 에서 나타나 있듯이 22종의 *Bacillus* species중 20종이 각각 고유한 염색체 DNA band pattern을 가지고 있는 것으로 밝혀져 이들 균주를 토착미생물과 쉽게 구별할 수 있을 뿐만 아니라, 개발된 균주의 특허등록, 실용화하는데 있어서 중요한 자료로 사용될 수 있을 것으로 기대된다.



[그림-1] REP-PCR DNA fingerprint patterns of the bacilli isolates. Lanes : 1, df3; 2, df7 3, df11 4, df12 5, df14 6, df15 7, df16 8, df18 9, df19 10, df20 11, df21 12, df27 13, df30 14, df36 15, df39; 16, df41; 17, df44; 18, df48; 19, df49; 20, df56; 21, df60; 22, df61; M, DNA size marker.

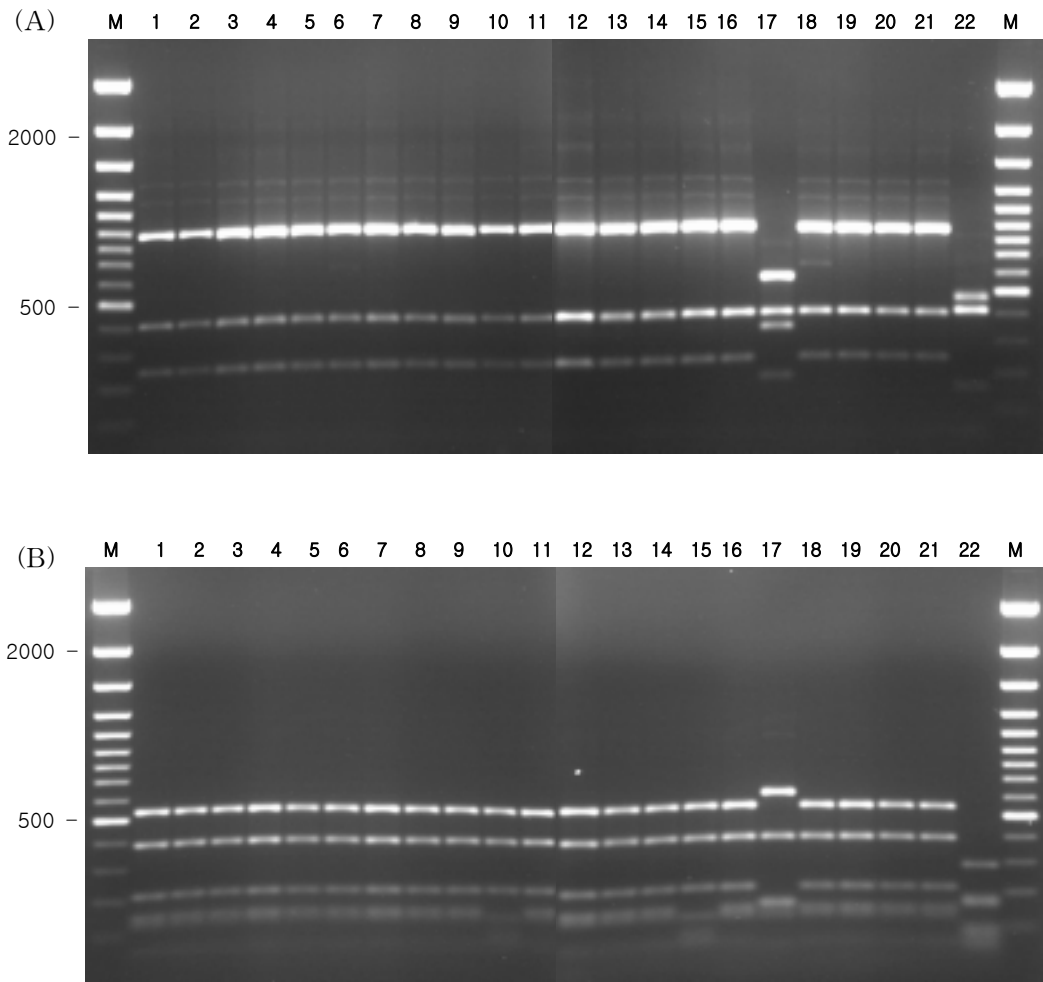
제 8 절 *Bacillus* 종의 16S rDNA RFLP (restriction fragment length polymorphism) 분석

1. 이론적 · 실험적 접근방법

Bacillus 균주에서 염색체를 추출한 후 bacterial universal primer인 27f와 1492r를 사용하여 PCR을 수행하였고, 여기에서 얻어진 16S rDNA를 *CfoI*과 *MspI* 제한효소로 처리하여 각 균주의 16S rDNA의 RFLP (restriction fragment length polymorphism)를 비교 조사하였다

2. 연구내용

22종의 *Bacillus* 균주에서 염색체를 추출한 후 bacterial universal primer인 27f와 1492r를 사용하여 PCR을 수행하였고, 여기에서 얻어진 16S rDNA를 *CfoI*과 *MspI* 제한효소로 처리하여 각 균주의 16S rDNA의 RFLP (restriction fragment length polymorphism)를 비교 조사한 결과가 Figure 2에 나타나 있다. *CfoI* 처리에서는 각 균주가 3 - 4개의 선명한 DNA band를 보여 주고 있는데, 전체적으로 3개의 주요 group으로 분류되었다. 균주 df44와 df61이 각각 다른 RFLP pattern을 나타내어 2개의 minor group을 형성하였고, 나머지 20균주는 똑같은 DNA band pattern을 나타내어 커다란 한 major group을 형성하고 있었다. 이러한 DNA band pattern은 제한효소 *MspI*으로 처리하였을 때에도 같은 grouping결과를 나타내었다. 16S rDNA RFLP 분석은 *Lactobacillus*종이나 *Bradyrhizobium*종에서 매우 가까이 연관된 균주들을 비교 분석하는데 유용하게 활용된 것으로 보고되었으나, 본 연구에서 *Bacillus*종의 비교 분석에는 유용하지 않은 것으로 나타났다. 특히 *B. subtilis*, *B. pumilus*, *Bacillus* sp.등 서로 다른 종으로 분류된 균주들조차 이 16S rDNA RFLP 분석에서는 같은 band pattern을 보이고 있는 것으로 나타나, *Bacillus*종을 비교 분석하는 데에는 이 방법보다 REP-PCR 방법이 더 유용함을 알 수 있었다.



[그림-2] Restriction patterns with *CfoI* (A) and *MspI* (B) of PCR-amplified product of 16S rDNA of the bacilli isolates. Lanes : 1, df3; 2, df7; 3, df11; 4, df12; 5, df14; 6, df15; 7, df16; 8, df18; 9, df19; 10, df20; 11, df21; 12, df27; 13, df30; 14, df36; 15, df39; 16, df41; 17, df44; 18, df48; 19, df49; 20, df56; 21, df60; 22, df61; M, DNA size marker.

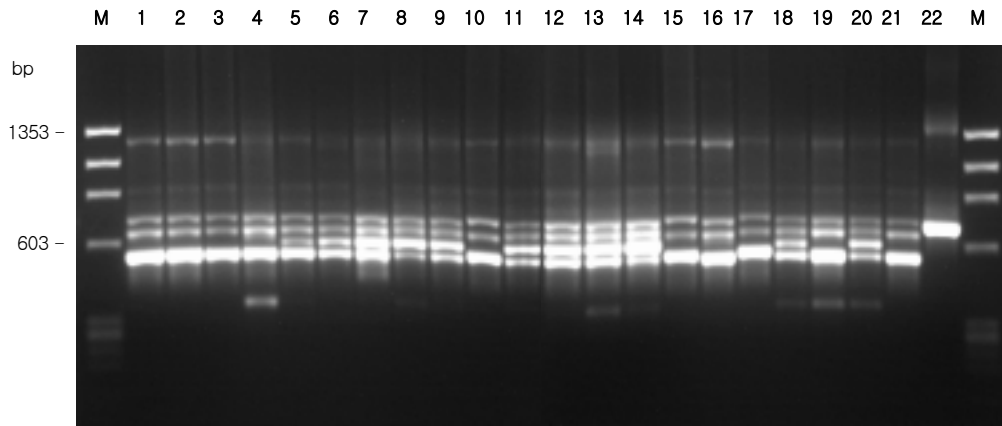
제 9절 *Bacillus* 종의 RIS-LP (ribosomal intergenic spacer length polymorphism) 분석

1. 이론적 · 실험적 접근방법

각 *Bacillus* 종을 strain 수준에서 식별할 수 있는지를 조사하기 위해 16S-23S rDNA spacer 지역을 primer S1391f와 L208r을 사용하여 증폭시킨 후 얻어지는 DNA band pattern을 비교 분석하였다.

2. 연구내용

각 *Bacillus* 종을 strain 수준에서 식별할 수 있는지를 조사하기 위해 16S-23S rDNA spacer 지역을 primer S1391f와 L208r을 사용하여 증폭시킨 후 얻어지는 DNA band pattern을 비교 분석하였다 (그림 3). RIS-PCR 결과 각 균주에서 1 - 4개의 DNA band가 나타났는데 전체적으로 이들 22 균주는 4 group으로 분류되었다. 7 균주와 11 균주가 각각 2개의 major group을 형성하였고 1 균주와 3 균주가 각각 2개의 minor group을 형성하였다. *B. subtilis* 로 분류된 모든(df61 제외) 균주가 같은 group에 속하였고 *B. pumilus*로 분류된 두 균주도 같은 group에 속하는 것으로 분류되어 이 방법이 어느 정도 일관성을 가지고 있는 것으로 관찰되었으나, REP-PCR 방법보다는 이들 *Bacillus* 균주를 strain 수준에서 식별하는 해상력이 낮은 것으로 나타났다.



[그림-3] RIS-LP banding patterns of the bacilli isolates. Lanes : 1, df3; 2, df7; 3, df11; 4, df12; 5, df14; 6, df15; 7, df16; 8, df18; 9, df19; 10, df20; 11, df21; 12, df27; 13, df30; 14, df36; 15, df39; 16, df41; 17, df44; 18, df48; 19, df49; 20, df56; 21, df60; 22, df61; M, DNA size marker.

제 10 절 strain-specific PCR 분석

1. 이론적 · 실험적 접근방법

앞에서 분류한 길항균의 염기서열을 비교, DNA STAR program을 이용하여 *Fusarium oxysporium*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum* 진균 모두에 길항력을 가진 df14의 specific primer를 제작하였다. df14 specific primer는 길항균 df3, df11, df20, df15, df30, df36, df36, df44, df60을 각각 비교균으로 사용하여 PCR(Polymerase Chain Reaction)을 시행한 후 Agarose Gel Electrophoresis (0.7%)를 이용하여 확인하였다.

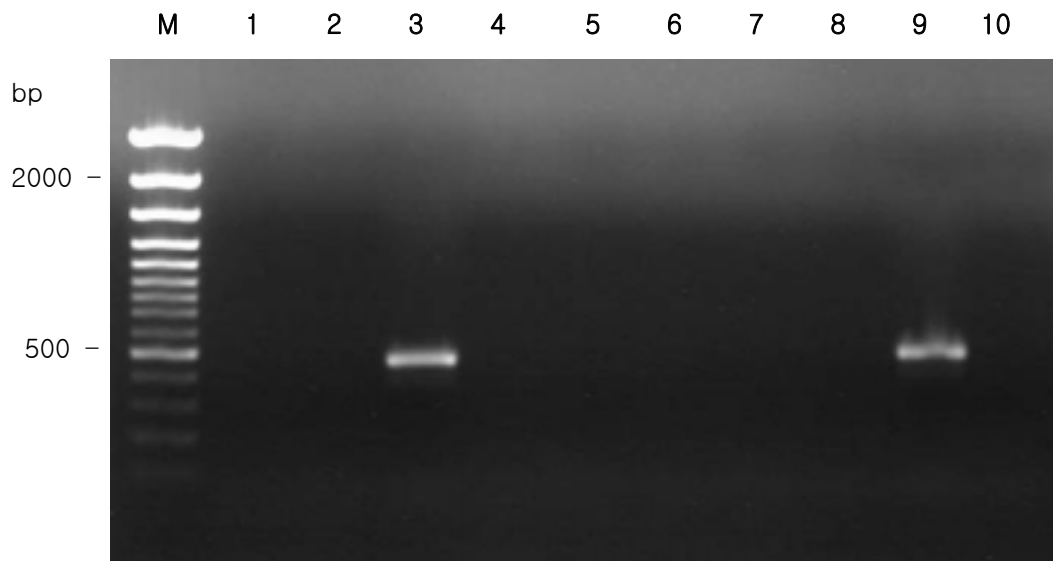
PCR의 반응조건은 다음과 같다.

- ① 94℃ 5min
- ② 94℃ 1min
- ③ 55℃ 1min
- ④ 72℃ 1min 30sec
- ⑤ go to 2 step(29 times)
- ⑥ 72℃ 10min
- ⑦ 4℃ hold

2. 연구내용

경작토양에 사용할 균주가 경작토양에서 길항활성을 효과적으로 발휘하기 위해서는 우선 이 균주가 제형화된 제품에서 오래 동안 생존해 있어야 하고 또한 토양에 처리하였을 때 실제 환경에서 그 제품에 들어 있는 균주의 밀도가 일정수준으로 유지되어야 한다. 실험실에서 개발된 균주가 대부분 실제현장에서 효율성이 떨어지는 주요 요인이 그 개발된 균주의 균집밀도가 급격하게 쇠퇴하는 것으로 밝혀지고 있는데 이를 검증하여 효과적인 길항균 제품을 개발하려면 개발된 특정균주를 토양에서 일정기간동안 추적할 수 있는 방법이 강구되어야 한다. 본 연구에서는 이 부분을 검증하기 위해 특정 *Bacillus* 균주를 토양에 접종하고 그 균집밀도를 분석하는 방법으로서 분자미생물생태학적 방법을 사용하였다. 위에서 얻어진 16S rDNA의 전체 염기서열을 균주간 상호 비교 분석하여 균주 df14를 경작토양의 다른 *Bacillus* 종으로부터 선택적으로 검출할 수 있는 방법에 관해 조사하였는데, DF14는 입고병을 일으키는 3종류의 진균에 모두 길항능력을 보이는 균주 중의 한 균주이다. 특히 이 균주는 16S rDNA의 전체 염기서열을 상호 비교하였을 때 이 균주에 특이한 부분이 관찰되는 바, strain 수준에 적용되는 primer를 제작할 수 있었다. 이 균주는 Table 1의 16S rDNA 분석에서 *Bacillus* sp.로 분류되었는데, 전체 22종의 균주 중에서 다른 종으로 분류된 일부 균주 (*B. subtilis*로 동정된 길항균 df3, df11와 df60, *Bacillus* sp.인 df30, df36와 df44, *B. pumilus*인 df20)등을 대조균주로 하여 위의 제작된 primer를 이용하여 PCR을 수행한 결과, 다른 균주에서는 관찰되지 않은 약 500bp의 특이적인 DNA band가 target 균주 df14에서만 검출되었다 (그림 4). 더욱이, 균주 df14를 접종한 토양과 접종하지 않은 토양을 비교 분석하였을 때, 균주 DF14를 접종한 토양에서만 target band가 검

출되는 것으로 관찰되어 사용된 primer가 균주 df14에 매우 특이적으로 반응함을 알 수 있었다. 결국 위의 primer는 strain-specific PCR에 의해 다른 균주나 토양에서 df14 균주만을 선택적으로 식별하는데 유용하게 활용될 수 있는 것으로 예상되어 자연환경에 도입된 이 길항균주의 생존상태와 밀도를 분석하는데 효과적으로 사용될 것으로 기대된다.



[그림-4] Amplified DNA bands obtained from the representative isolates and soils with strain DF14-specific primers designed based on 16S rDNA sequences. Lanes : 1, df3; 2, df11; 3, df14; 4, df20; 5, df30; 6, df36; 7, df44; 8, df60; 9, soil DNA inoculated with df14 at 10^4 cells/g soil; 10, control soil DNA not inoculated with df14; M, DNA size marker.

제 11 절 길항균 성능평가 및 우수균선발

1. 이론적·실험적 접근방법

가. 세균의 경우

PDA배지에 대상병원균을 Spreading하거나 또는 Pour plate 방법으로 배지를 제조한 후, 후보길항균을 중앙부위에 접종하여 2-3일간 배양하면서 길항균주위에 형성되는 Inhibition zone을 조사하는 방법으로 세균의 길항력을 평가하였다.

나. 곰팡이의 경우

PDA배지의 한쪽부분에는 대상병원균을, 다른 한쪽부분에는 길항곰팡이를 접종하는 대치배양법으로 4-5일간 배양하면서 길항균과 병원균의 접촉부위에서 발생하는 균사간 반응을 확인하여 길항력을 평가하였다.

2. 연구내용

주관연구기관(고려바이오연구소)이 기보유하고 있는 길항균 Pool을 이용하여, 입고병원균에 대한 항균력을 조사하여 상토에의 적용가능성을 탐색하였다.

가. 길항균 확보

주관연구기관이 보유중인 곰팡이억제능력이 있는 길항균은 총 22종(세균 15종, 곰팡이 5종)으로서, 세균은 Bacillus와 Pseudomonas이며, 곰팡이는 모두 Trichoderma이다.

나. 길항균의 입고병원균에 대한 항균력 평가

주관연구기관 보유길항균과 수집된 제품으로부터 분리한 우수길항균(전체 25종)의

입고병원균 3종에 대한 길항력을 평가하였으며, 그 결과는 다음의 표-10과 같다. 즉, 3종의 입고병원균 모두에 대하여 강력한 길항력을 발휘하는 8종의 미생물(세균 5종, 곰팡이 3종)을 선발하였다.(시험방법은 전과 동)

<표-10> 주관기관 보유 길항균의 입고병원균에 대한 항균력 평가결과

균주 일련번호	입고병원균에 대한 길항력(inhibition zone, mm)		
	Fusarium	Pythium	Rhizoctonia
KB-1	12	9	12
KB-2	9	6	9
KB-3	15	11	12
KB-4	21	19	22
KB-5	14	11	12
KB-6	24	27	21
KB-7	13	15	16
KB-8	16	18	19
KB-9	14	11	16
KB-10	8	10	6
KB-11	7	11	8
KB-13	11	14	15
KB-14	13	12	11
KB-15	22	28	24
KB-16	18	19	21
B-3	11	13	14
B-9	4	8	5
B-10	11	8	10
B-11	13	12	11
B-12	16	10	9
B-13	22	21	19
KF-1	++	++	++
KF-2	+	+	+
KF-3	++	++	++
KF-4	-	+	+
KF-5	+	-	+
F-2	++	++	+

- : 길항력 없음 , + : 길항력 있음 , ++ : 길항력 우수함

다. 항균성 Metabolite의 이화학적 안정성평가

3종의 입고병원균에 대하여 길항력이 우수한 것으로 나타난 8종(세균 5종, 곰팡이 3

종)의 길항균을 액체배양하여 항균성성분이 함유된 배양액을 준비하였다. 이 항균성성분의 Stability of Antifungal Activity를 평가하기 위하여 그 Cell-Free Extract를 온도와 기간을 달리하여 보관하면서 항균활성을 조사하였다. 즉, 세균의 경우, 길항균을 TSB배지에서 2일간 액체진탕배양한 후, 0.45 μ m membrane으로 Filter하여 그 filtrate의 입고병원균에 대한 항균력을 경시적으로 평가하였다. 곰팡이의 경우, 길항균을 PDA배지에서 5일간 액체진탕배양한 후, 역시 0.45 μ m membrane으로 Filter하여 그 filtrate의 입고병원균에 대한 항균력을 평가하였다. 그 결과는 다음의 표-11과 같다. 참고로, 본 시험은 3종의 입고병원균 중, 취급이 용이한 Fusarium에 대해서만 실시하였으며, Filter Paper에 Filtrate를 0.05ml loading하여 inhibition zone을 측정하는 방법으로 항균활성을 평가하였다.

5종의 세균 중, KB-6과 KB-15 그리고 3종의 곰팡이 중 KF-3의 경우에는, 경시적으로 열에 비교적 안정한 항균성분을 분비하는 것으로 나타났다. 즉, 여타의 미생물은 시간이 경과하면서 또는 온도가 높아지면서 Cell-Free Extract의 항균활성이 급격히 저하되고 있으나, 상기 3종의 길항균의 경우에는 보관온도(50 $^{\circ}$ C까지) 및 보관기간(20일까지)에 관계없이 초기활성의 70% 이상을 유지하는 것으로 확인되었다.

<표-11> 항균성 Metabolite의 보관온도 및 기간에 따른 안정성평가 결과

균주번호	초기활성	25 $^{\circ}$ C에서의 보관기간에 따른 활성		보관온도에 따른 활성 (10일 후)	
		5일 후	20일 후	25 $^{\circ}$ C	50 $^{\circ}$ C
KB-4	23	16	4	7	3
KB-6	24	22	19	21	16
KB-15	21	18	17	17	16
KB-16	21	12	5	6	1
B-13	20	17	5	10	3
KF-1	++	++	-	+	-
KF-3	++	++	++	++	+
F-2	++	+	+	+	+

- : 길항력 없음 , + : 길항력 있음 , ++ : 길항력 우수함

라. 길항균 배양액의 종자발아율 및 유묘생육에 대한 영향평가

3종의 우수길항균(KB-6, KB-15, KF-3)의 액체배양액 희석액(100배)을 무우종자에 처리하여 종자의 발아율 및 무우유묘생육에 대한 영향을 평가하였다. 즉, TSB에서 2일 배양한 세균배양액과 PDB에서 5일 배양한 곰팡이 배양액(Whole Broth)을 100배 희석하여 Tray에 파종한 무우종자에 5일 간격으로 3회 처리하였다. 그 결과는 다음의 표-12와 같다. 즉, 3종의 길항균 모두 종자발아에 대한 악영향은 전혀 없었으며, 유묘생육조사 결과로 볼 때, 길항균은 유묘생육을 오히려 촉진시키는 것으로 나타났다. 이는 길항균이 분비한 Metabolites에 의한 작용인 것으로 판단된다.

<표-12> 길항균 배양액의 종자발아율 및 유묘생육에 대한 영향시험결과

처리구분	종자발아율(%)	유묘생육량(10일간 길이생장, mm)
KB-6	93%	95
KB-15	91%	96
KF-3	92%	98
대조구	90%	89
무처리구	92%	85

* 무처리구 : 물만 급수함

* 대조구 : 길항균배양에 사용한 배지성분을 100배 희석하여 처리

마. 길항균의 Growth curve 작성

길항균 KB-6와 KB-15를 대상으로 액체배지(Glucose 1%, Soybean flour 0.2%, MgSO4 0.05%, KH2PO4 0.05%)에서의 Growth curve를 작성하였으며, 그 결과는 다음과 같다(표-13). 즉, 길항세균 KB-6와 KB-15는 24-36시간동안 배양함으로써 최대의 균밀도가 되는 것으로 나타났다.

<표-13> 길항세균(KB-6, KB-15)의 Growth curve

구분	경과시간(h)별 균밀도(cfu/ml)						
	0	6	12	18	24	36	48
KB-6	5×10^3	8×10^4	9×10^6	3×10^8	8×10^8	9×10^8	8×10^8
KB-15	3×10^3	5×10^4	6×10^6	2×10^8	6×10^8	7×10^8	7×10^8

제 12 절 길항균 배양기술 확립

1. 이론적·실험적 접근방법

가. 배지조건

길항균배양에 최적합한 탄소원, 질소원, 무기염류 및 Growth factor를 선별하기 위하여, 다양한 후보성분을 대상으로 종류 및 농도별로 배양수율을 조사하였다. 즉, 여타의 성분은 동일하게 하는 Basal medium하에서 최적화하고자 하는 성분만을 달리하여 배양한 후 배양균밀도를 상대비교하는 방법으로 배지조건을 최적화하였다.

나. 배양조건

길항균배양에 최적합한 교반속도, 배지사입율, 초기 pH, 접종비율, 배양온도 등을 도출하기 위하여, 여타의 조건은 동일하게 설정한 후 최적화하고자 하는 Factor만을 서로 달리하여 배양한 후 배양균밀도를 상대비교하는 방법으로 배양조건을 최적화하였다.

2. 연구내용

길항균 KB-6와 KB-15는 생리적으로 매우 유사한 특성을 가지고 있는 것으로 판단되므로, 본 항에서는 세균 KB-6와 곰팡이 KF-3을 대상으로 배양기술을 확립하고자 한다.

가. 길항균 KB-6의 배양기술 확립

1) 액체배양용 배지조건 및 배양조건 확립

가) 배지조건 최적화연구

Continuous Stirred Tank Reactor(CSTR)방식으로 길항세균을 배양함에 있어서, 배

양에 적합한 각종 배지조건을 최적화 하고자 한다. 본 시험에서는 다양한 탄소원과 질소원, 그리고 무기염류 및 Growth factor를 사용하여 배지종류 및 농도를 최적화하였으며, 그 결과는 다음의 표-14와 같다. 즉, 최적배지조건은 Glucose 3%, Soybean Flour 2%, KH₂PO₄ 0.1%, MgSO₄ 0.05%, Yeast Extract 0.2%인 것으로 나타났으며, 이때의 배양액내 균밀도는 최대 7 X 10⁹/ml 가 되었다.

<표-14> 길항균 KB-6의 최적 배지조건(액체배양)

구분	성분종류	농도범위	최적성분 및 농도	최적배지조건 및 최대균밀도
탄소원	Glucose	1-7%	Glucose 3% 당밀 5%	◎ 최적배지조건 : Glucose 3% Soybean Flour 2% KH ₂ PO ₄ 0.1% MgSO ₄ 0.05% Yeast Extract 0.2% ◎ 최대균밀도 : 5 X 10 ⁹ /ml
	Sucrose	1-7%		
	당밀	1-10%		
	Corn Starch	1-7%		
	밀가루	1-7%		
질소원	Peptone	0.1-0.7%	Peptone 0.3% Soybean Flour 2.0%	
	Soybean Flour	0.5-2.0%		
	Soytone	0.1-1.0%		
	CSL	0.5-3.0%		
	Tryptone	0.2-0.8%		
무기염류	KH ₂ PO ₄	0.05-0.5%	KH ₂ PO ₄ 0.1% MgSO ₄ 0.05%	
	MgSO ₄	0.05-0.5%		
Growth factor	Yeast Extract	0.05-0.5%	Yeast Extract 0.2%	
	Beef Extract	0.05-0.5%		
	Malt Extract	0.05-0.5%		

* 모든 시험에서 배양조건은 다음과 같다

: 교반속도 200rpm, 배지사입율 20%, 초기 pH 6.5, 접종비율 1%, 배양온도 28℃

나) 배양조건 최적화연구

Continuous Stirred Tank Reactor(CSTR)방식으로 길항세균을 배양함에 있어서, 배양에 적합한 각종 배양조건을 최적화 하고자 한다. 본 시험에서는 교반속도, 배지사입

비율, 초기 pH, 접종비율, 배양온도 등의 조건을 달리하여 배양수율을 평가하였으며, 그 결과는 다음의 표-15와 같다. 즉, 최적배양조건은 교반속도 150rpm, 배지사입율 20%, 초기 pH 7.0, 접종비율 2%, 배양온도 30℃인 것으로 나타났으며, 이때의 배양액 내 균밀도는 최대 7×10^9 /ml 가 되었다.

<표-15> 길항균 KB-6의 최적 배양조건(액체배양)

구분	처리범위	최적성분 및 농도	최적배양조건 및 최대균밀도
Agitation	50-200rpm	150rpm	◎ 최적배양조건 : 교반속도 150rpm 배지사입율 20% 초기 pH 7.0 접종비율 2% 배양온도 30℃
Media charge Volume	10-60%	20% 이하	
Inoculum Ratio	1-20%	2% 이상	
초기 pH	4.0-8.0	7.0	
배양기간	0.5-4.0일	3일	
온도	20-35℃	28-30℃	
			◎ 최대균밀도 : 7 X 10 ⁹ /ml

2) 고체배양을 위한 배지조건 및 배양공정 개발

가) 배지조건 최적화연구

Solid-State Fermentation 방식으로 길항세균을 배양함에 있어서, 고체배양에 적합한 배지조건을 최적화 하고자 한다. 즉, 배지의 주성분으로 말분, 밀기울, 탈지강, 옥분, 밀겨 등을 농도별로 투입하여 길항균의 배양성을 조사하였다. 한편, 배지의 부성분으로는 Glucose, Soybean Flour, 당밀, CSL, Tryptone 등을 농도별로 투입하여 길항균의 배양성을 조사하였으며(이때, 배지의 함수율은 공히 60%로 조절하였음), 그 결과는 다음의 표-16과 같다. 즉, 고체배양시의 최적배지는 탈지강을 주성분으로 하고 Glucose 1%, Soybean Flour 3%, KH₂PO₄ 0.1%, MgSO₄ 0.05%, Yeast Extract 0.2% 인 것으로 나타났으며, 이때의 배양물내 균밀도는 최대 4×10^8 /g 가 되었다.

<표-16> 길항균 KB-6의 최적 배지조건(고체배양)

구분	성분종류	함수율/ 첨가농도	최적성분	최적배지조건 및 최대균밀도
main media	말분	60%	탈지강	◎ 최적배지조건 : 탈지강 Glucose 1% Soybean Flour 3% KH ₂ PO ₄ 0.1% MgSO ₄ 0.05% Yeast Extract 0.2%
	밀기울			
	탈지강			
	옥분			
	밀겨			
sub media	Glucose	1-3%	Glucose 1% S. Flour 3.0%	◎ 최대균밀도 : 4 X 10 ⁸ /g
	Soybean Flour	1-5%		
	당밀	1-10%		
	CSL	1-10%		
	Tryptone	0.5-1.0%		

나) 배양조건 최적화연구

Solid-State Fermentation 방식으로 길항세균을 배양함에 있어서, 고체배양에 적합한 배지조건을 최적화 하고자 한다. 즉, 상기의 최적배지에서 함수율, 접종량, 접종방법, 배지사입율, 배양기간, 배양온도 등을 달리하여 길항균의 배양성을 조사하였으며 그 결과는 다음의 표-17와 같다. 표에 나타난 바와 같이, 길항균의 최적배양조건은 함수율 60%, 접종비율 5% 이상, 혼합접종, 배지사입율 30%, 배양기간 5일, 배양온도 30℃인 것으로 나타났으며, 이때의 배양물내 균밀도는 최대 6 X 10⁸/g 가 되었다.

<표-17> 길항균 KB-6의 최적 배양조건(고체배양)

구분	처리범위	최적성분 및 농도	최적배양조건
함수율	40-80%	55-60%	◎ 최적배양조건 : 함수율 60% 접종비율 5% 이상 혼합접종 배지사입율 30% 배양기간 5일. 배양온도 30℃ ◎ 최대균밀도 : 6 X 10 ⁸ /g
접종량	1-10%	5% 이상	
접종방법	표면/혼합접종	혼합접종	
배지사입율	10-70%	30% 이하	
배양기간	1-6일	4-5일	
배양온도	20-40℃	28-30℃	

3) 내구체(포자)형성조건 확립

가) 액체배양시의 포자형성조건 확립

길항균 KB-6은 Bacillus속이므로, Vegetative cell이 배양후기에는 Spore가 된다. 길항균배양물을 미생물제품으로 제제화하기 위해서는 Spore형태로 전환시켜야 한다. 본 연구에서는 배양기간에 따른 포자형성율을 조사하였으며, 포자형성율이 최대가 되는 배양시간을 도출하였다. 이전의 시험에서 확립한 최적배양조건(표-14, 표-15)으로 배양하면서 배양액의 시료를 채취하여 포자형성율을 조사하였으며, 그 결과는 다음의 표-18와 같다. 즉, 3일배양이 최적이며, 이때 배양액내 포자밀도는 약 7.3 X 10⁸/ml이었다. 참고로, 포자확인온도는 80℃에서 15분간 열처리하여 포자가 되지 않은 Vegetative cell은 죽이는 방법으로 하여 실시하였다.

<표-18> 길항세균의 액체배양시 시간별 포자형성율

균종	배양시간별 포자밀도(X1,000,000/ml)					
	24h	36h	48h	72h	96h	120h
KB-6	<1	13	480	7,260	7,320	7,180

나) 고체배양시의 포자형성조건 확립

고체배양기간동안 경시적으로 포자생성수율을 조사하여, 포자형성율이 최대가 되는 배양시간을 도출하였다. 이전의 시험에서 확립한 최적배양조건(표-16, 표-17)으로 배양하면서 일정시간별로 배양물시료를 채취하여 포자형성율을 조사하였으며, 그 결과는 표-19와 같다. 즉, 4일배양이 최적이며, 이때 배양물내 포자밀도는 약 $6.1 \times 10^8/g$ 이었다. 이 결과로 볼 때, 고체배양보다는 액체배양이 보다 바람직함을 알 수 있다.

<표-19> 길항세균의 고체배양시 시간별 포자형성율

균종	배양시간별 포자밀도(X100,000/g)					
	24h	36h	48h	72h	96h	120h
KB-6	<1	2	140	2,580	6,130	6,240

나. 길항균 KF-3의 배양기술 확립

일반적으로 곰팡이의 산업적배양은 Solid State Fermentation을 통하여 실시하며, 따라서 본 항에서는 길항곰팡이 KF-3 고체배양기술을 확립하고자 한다.

1) 배지조건 최적화연구

Solid-State Fermentation 방식으로 길항곰팡이를 배양함에 있어서, 고체배양에 적합한 배지조건을 최적화 하고자 한다. 그 시험방법 및 결과는 다음의 표-20과 같다. 즉, 세균 고체배양시와 동일한 주성분과 부성분을 사용하여 최적배지조건을 도출하였으며, 이때 함수율은 50%로 조절하였다. 길항곰팡이는 제제화시, 반드시 포자를 이용해야 하므로, 본 항에서 시험조건에 따르는 배양수율 평가는 포자밀도를 정량적으로 측정하므로써 실시하였다. 즉, 본 길항곰팡이의 포자는 50℃에서 10분간 열처리에 의해서도 생존이 가능하며, 균사체는 이러한 처리조건에서 99% 이상 사멸하므로, 평가대상물을 이러한 조건으로 처리하여 포자의 밀도를 측정하였다. 표-20에서 나타난 바와 같이, 길항균 KF-3의 최적 배지조건은 탈지강을 주성분으로 하는 Glucose 1%,

Corn starch 1%, CSL 2%, KH₂PO₄ 0.1%, MgSO₄ 0.05%, Yeast Extract 0.2%인 것으로 나타났으며, 이때의 배양물건물내 균밀도는 최대 3 X 10⁸/g 가 되었다.

<표-20> 길항균 KF-3의 최적 배지조건

구분	성분종류	합수율/ 첨가농도	최적성분	최적배지조건
main media	말분	50%	탈지강	◎ 최적배지조건 : 탈지강 Glucose 1% Corn starch 1% CSL 2% KH ₂ PO ₄ 0.1% MgSO ₄ 0.05% Yeast Extract 0.2% ◎ 최대균밀도 : 3 X 10 ⁸ /g
	밀기울			
	탈지강			
	옥분			
	밀겨			
sub media	Glucose	1-3%	Glucose 1% Corn starch 1% CSL 2.0%	
	Corn starch	1-3%		
	Soybean Flour	1-5%		
	당밀	1-10%		
	CSL	1-10%		
	Tryptone	0.5-1.0%		

2) 배양조건 최적화연구

Solid-State Fermentation 방식으로 길항곰팡이를 배양함에 있어서, 고체배양에 적합한 배지조건을 최적화 하고자 한다. 그 시험방법 및 결과는 다음의 표-21과 같다. 즉, 표-20의 최적배지조건에서 합수율, 접종량, 접종방법, 배지사입율, 배지사입율, 배양온도 등을 달리하여 배양수율을 평가한 결과, 길항균 KF-3의 최적 배양조건은 합수율 50%, 접종비율 5% 이상, 혼합접종, 배지사입율 45%, 배양기간 8-10일, 배양온도 26℃인 것으로 나타났으며, 이때의 배양물건물내 균밀도는 최대 6X 10⁸/g 가 되었다.

<표-21> 길항균 KF-3의 최적 배양조건

구분	처리범위	최적성분 및 농도	최적배양조건
함수율	40-80%	45-50%	◎ 최적배양조건 : 함수율 50% 접종비율 5% 이상 혼합접종 배지사입율 45% 배양기간 12일 배양온도 26℃
접종량	1-10%	5% 이상	
접종방법	표면/혼합접종	혼합접종	
배지사입율	10-70%	50% 이하	
배양기간	1-20일	8-10일	
배양온도	20-40℃	24-27℃	
			◎ 최대균밀도 : 6 X 10 ⁸ /g

3) 내구체(포자)형성조건 확립

고체배양기간동안 경시적으로 포자생성수율을 조사하여, 포자형성율이 최대가 되는 배양시간을 도출하였다. 이전의 시험에서 확립한 최적배양조건(표-20, 표-21)으로 배양하면서 일정시간별로 배양물시료를 채취하여 포자형성율을 조사하였으며, 그 결과는 표-22와 같다. 즉, 9일배양이 최적이며, 이때 건조배양물내 포자밀도는 약 5.9 X 10⁸/g이었다.

<표-22> 길항곰팡이의 배양기간별 포자형성율

균종	배양시간별 포자밀도(X100,000/g)						
	2일	4일	6일	9일	12일	15일	18일
KB-6	<1	60	1,200	5,900	5,830	5,790	5,710

다. 길항균 제제화조건 연구

1) 액상제제화

액상제제화시의 고려사항은 3가지로 요약할 수 있다. 즉, 유효미생물의 생존성, 제품의 이화학적 물성안정성, 포자의 발아생리 활성화 등이다. 본 시험에서는 Bacillus균을 사용하므로 포자형태를 이용하면 유효미생물의 생존성에는 문제가 없다. 따라서 본 시험에서는 물성안정성을 위한 제제화 조건연구를 실시하였다. 세균의 경우, 포자액에 각각의 안정제를 농도별로 투입하여 30일동안 경시적으로 배양액의 pH 및 냄새변화를 조사하여 물성을 확인하였다. 곰팡이의 경우 고체배양된 포자액을 대상으로 세균과 동일한 방법으로 실시하였다. 그 시험결과는 다음의 표-23, 24과 같다. 즉, 물성안정성을 위해서는 안정제로서 K-sorbate를 0.1-0.3% 사용함으로써, 제품의 이화학적 안정성을 달성할 수 있는 것으로 나타났다.

<표-23> 액상제제의 물성안정화 시험결과-1(세균 KB-6의 경우)

안정제		제품의 pH변화			제품의 냄새 및 기타변화		
종류	농도(%)	초기	10일후	30일후	초기	10일후	30일후
K-sorbate	0.05	7.3	6.5	6.9	무취 /정상	산취	산취
	0.1		7.2	7.3		무취	무취
	0.3		7.3	7.3		무취	무취
Na-benzoate	0.1		7.1	7.0		무취	산취(가스발생)
	0.2		6.3	5.3		무취	산취(가스발생)
	0.5		7.1	6.9		무취	무취
Na-propionate	0.2		5.2	4.5		산취	산취(가스발생)
	0.5		6.2	5.8		산취	산취
	1.0		7.2	6.3		무취	무취
Na-dehydroacetate	0.1		6.4	5.1		무취	산취(가스발생)
	0.2		6.8	6.0		무취	약산취
	0.5		7.2	6.8		무취	무취
Control		5.1	4.9	산취	산취(가스발생)		

<표-24> 액상제제의 물성안정화 시험결과-2(곰팡이 KF-3의 경우)

안정제		제품의 pH변화			제품의 냄새 및 기타변화		
종류	농도(%)	초기	10일후	30일후	초기	10일후	30일후
K-sorbate	0.05	6.5	6.9	6.9	무취 /정상	무취	가스발생
	0.1		6.5	6.4		무취	무취
	0.3		6.5	6.5		무취	무취
Na-benzoate	0.1		7.0	7.3		무취	가스발생
	0.2		6.2	5.6		무취	산취(가스발생)
	0.5		6.6	6.7		무취	무취
Na-propionate	0.2		5.7	4.9		산취	산취(가스발생)
	0.5		5.8	4.5		산취	산취(가스발생)
	1.0		7.0	7.5		무취	가스발생
Na-dehydroacetate	0.1		6.1	5.4		무취	산취(가스발생)
	0.2		6.4	6.1		무취	산취
	0.5		7.3	6.9		무취	가스발생
Control		5.4	4.3	산취	산취(가스발생)		

다음으로는 발아생리 활성화를 위한 제제화 조건연구를 실시하였다. 포자액에 각각의 발아활성제를 종류 및 농도별로 투입하여 30분간 방치한 후, TSA 또는 PDA배지에 도말하여 Colony Forming Unit을 계수함으로써 포자발아율을 조사하였다. 그 시험결과는 다음의 표-25, 26과 같다. 즉, 세균의 경우에는 포자액에 Glucose를 1.0%, 곰팡이의 경우에는 Citric acid를 1.0% 첨가함으로써, 포자의 발아율을 약 10% 이상 증가시킬 수 있는 것으로 나타났다.

<표-25> 액상제제의 발아생리활성화 시험결과-1(세균 KB-6의 경우)

발아활성제	첨가농도	Spore 발아율	발아활성제	첨가농도	Spore 발아율
Glucose	0.5	93%	Citric acid	0.5	90%
	1.0	97%		1.0	91%
Sucrose	0.5	89%	Succinic acid	0.5	90%
	1.0	90%		1.0	89%
Maltose	0.5	91%	Malic acid	0.5	91%
	1.0	90%		1.0	88%
Sorbitol	0.5	95%	Lactic acid	0.5	82%
	1.0	90%		1.0	80%
Glycerol	0.5	86%	Oxalic acid	0.5	87%
	1.0	88%		1.0	90%
무처리구-1		87%	무처리구-2		85%

<표-26> 액상제제의 발아생리활성화 시험결과-2(곰팡이 KF-3의 경우)

발아활성제	첨가농도	Spore 발아율	발아활성제	첨가농도	Spore 발아율
Glucose	0.5	88%	Citric acid	0.5	95%
	1.0	87%		1.0	96%
Sucrose	0.5	85%	Succinic acid	0.5	84%
	1.0	91%		1.0	85%
Maltose	0.5	86%	Malic acid	0.5	88%
	1.0	89%		1.0	89%
Sorbitol	0.5	91%	Lactic acid	0.5	84%
	1.0	84%		1.0	85%
Glycerol	0.5	87%	Oxalic acid	0.5	85%
	1.0	85%		1.0	90%
무처리구-1		86%	무처리구-2		86%

2) 분상제제화

분상제제화시의 고려사항 역시 액상과 동일하나, Bacillus의 포자형태를 이용하므로 유효미생물의 생존성에는 문제가 없으며, 발아생리 활성화를 위해서는 액상제제화시에 첨가하는 Glucose를 1.0%(세균) 또는 Citric acid를 1.0%(곰팡이) 사용함이 바람직하다. 다만 물성안정성을 위해서는 제품의 함수율을 최적화해야 하며 균종별로 함수율에 따른 물성조사결과는 다음의 표-27, 28와 같다. 즉, 분상제품 제조시, 함수율을 12% 이하로 해야 제품의 이화학적 물성변화가 없는 것으로 나타났다.

<표-27> 함수율에 따른 분제의 물성변화 조사결과-1(세균 KB-6의 경우)

함수율	이화학적물성 조사결과(1개월 후)			
	냄새	몽침현상	곰팡이발생	색변
8%	정상	정상	없음	없음
12%	정상	정상	없음	없음
16%	약산취	몽침발생	부분적발생	없음
20%	산취	몽침발생	발생	갈변

<표-28> 함수율에 따른 분제의 물성변화 조사결과-2(곰팡이 KF-3의 경우)

함수율	이화학적물성 조사결과(1개월 후)			
	냄새	몽침현상	곰팡이발생	색변
8%	정상	정상	없음	없음
12%	정상	정상	없음	없음
16%	산취	몽침발생	발생	갈변
20%	산취	몽침발생	다수 발생	갈변 심함

제 13 절 길항균 효력증진용 첨가제선발

1. 이론적·실험적 접근방법

Trichoderma와 Bacillus는 종자 및 뿌리썩음병에 대한 생물방제용 길항균으로 널리 알려져 있으며, 종자에 처리하여 Pythium과 Rhizoctonia성 병해를 성공적으로 방제하였다는 보고도 다수 있다. 비록 병해를 다소 경감시킬 수는 있으나, 이들 길항균은 종중 근권에 제대로 정착하지 못할 뿐 아니라, 화학농약에 비하여 그 효과가 떨어지는 것은 사실이다. 따라서, 길항균의 이러한 미진한 부분을 보완하기 위하여 다양한 물리·화학적 처리, 방제가 향상을 위한 돌연변이체 유도, 농약저항성을 가지는 균주개발 등의 시도가 행해지고 있다.

길항균을 상토에 혼합하여 길항균상토를 제조하는 목적은 길항균이 과중용 상토에 효율적으로 정착하고 유묘의 근권에 정착 및 번식함으로써 입고병원균의 번식을 억제하여 결국에는 묘입고병을 방제하기 위함이다. 길항균이 함유된 상토를 이용하여 묘입고병을 방제하기 위해서는 길항균이 상토와 유묘의 근권에 효율적으로 정착 및 번식할 수 있어야 하며, 이를 위하여 가장 중요한 것은 길항균의 초기번식용 먹이성분이다. 즉, 길항균은 이들 성분을 이용하여 초기증식을 도모할 수 있으며, 결국 근권부위에 Colonize할 수 있는 것이다. 따라서, 본 항에서는 길항균의 번식은 조장하면서 병원균의 생육과는 무관한 배지성분을 선별하여 길항균제조시 활용함으로써, 길항균의 입고병방제효과를 증진시키고자 한다. 상토 또는 근권에 길항균의 효율적인 정착 및 번식을 위한 가장 중요한 성분은 탄소(energy)원이다.

따라서 본 항에서는 표-28과 같은 다양한 탄소원중에서, 길항균제제화시 혼합하여 처리함으로써 길항균의 유일한 탄소 및 에너지원으로 작용하여 길항균의 작용점에서 번식을 극대화시킬 수 있는 최적의 성분을 선별하고자 한다. 또한 이들 성분중에서 병원균의 활성은 최소화시킬 수 있는 성분을 선별하여 제제화함으로써 병원균의 번식을 억제할 수 있는 제제화기술을 개발하고자 한다.

2. 연구내용

가. 길항균 효력증진용 첨가제선발

1) 시험방법

가) 길항균 생육량 평가

- 길항균 : Trichoderma(KF-3), Bacillus(KB-6)
- 배양용 배지 : Buffered synthetic basal medium(pH 6.8)
 - ▶ KH₂PO₄ 0.9g/L, K₂HPO₄ 0.9g/L, KCl 0.2g/L, NH₄NO₃ 1.0g/L, CaCl₂ 0.2g/L, MgSO₄ 0.2g/L, FeSO₄ 0.002g/L, MnSO₄ 0.002g/L, ZnSO₄ 0.002g/L
- 길항균 접종 : 배양용 배지 1ml당 1,000,000개의 spore가 되도록 접종
- 탄소원 투입농도 : 배지 1L당 1g 투입
- 길항균 생육량 측정
 - ▶ 세균의 경우, 24시간 배양후 serial dilution하여 균밀도를 측정하였으며, 곰팡이의 경우, 48시간 진탕배양액을 Whatman No. 1 filter paper로 거른 후 60℃로 overnight 건조하여 mycelial dry wt를 측정하였다. 대조구로서는 길항균을 접종하지 않은 상태의 것을 filter 및 dry하여 측정하였다.

나) 병원균 생육억제 평가

- 병원균 : Pythium ultimum
- 배양용 배지
 - ▶ 150g의 고추씨를 1리터의 물에 넣어 1시간동안 끓인 후 가제로 걸러내고 멸균하여 고추종자 추출액을 제조하여 Pythium 배양용배지로 사용하였다
- 배지 제조 및 탄소원 투입 : 상기의 추출액 1L당 1g의 탄소원을 넣고, 이를 petri dish에 10ml 분주하였다
- 병원균 접종 : 48시간 배양한 Pythium ultimum의 agar disc(직경 5mm)를 상기 petri dish에 접종
- 병원균 생육량 측정

- ▶ 25℃에서 48시간 표면배양하여 상기와 같은 방법으로 mycelial dry wt를 측정하였다. 대조구로서는 탄소원을 첨가하지 않은 상태의 것을 filter 및 dry하여 측정하였다.

표-29. 길항균활성을 증진시킬 수 있는 탄소 및 에너지원

계열별	성분명
mono-carboxylic acids	Formic, Acetic, Propionic, Butyric, Valeric, Caproic Caprylic, Capric, Lauric, Myristic, Palmitic, Stearic Oleic, Linoleic, Linolenic, Lactic, Sorbic
Di, tri-carboxylic acids	Oxalic, Malonic, Succinic, Maleic, Fumaric, Citric
Aromatic acids	p-hydroxybenzoic, Salicylic, Benzoic, Gallic, Tannic
Aromatic aldehydes	p-hydroxybenzaldehyde
phenols	2-naphthol, phenol
Mono-saccharides	Glucose, Fructose, Galactose, Mannose, Xylose
di, tri-saccharides	Lactose, Maltose, Cellobiose, Sucrose, Amylose
Polysaccharides	Cellulose, Starch, Xylan
Polyhydroxy alcohols	Mannitol, Inositol, Sorbitol
기타	Tween 20, Tween 80, Ascorbic acid, CaO, Glycerol

2) 시험결과

가) 길항균 생육량 평가 결과

표-29의 각종 탄소(에너지)원을 이용하여 길항균의 번식효과를 조사한 결과는 다음의 표-30, 표-31과 같다. 표-30은 세균(KB-6), 표-31은 곰팡이(KF-3)에 대한 결과이다. 표-30에 나타난 바와 같이, Glucose, Fructose, Maltose, Sucrose, Mannitol, Inositol, Sorbitol 등은 길항균의 번식을 조장하여 $41-45 \times 10^6/\text{ml}$ 의 배양성을 나타내 가장 우수한 탄소(에너지)원인 것으로 나타났다. 또한, Succinic, Maleic, Fumaric, Citric acid 등도 $31-33 \times 10^6/\text{ml}$ 의 배양성을 나타내 역시 비교적 우수한 탄소(에너지)원인 것으로 나타났다. 따라서, 향후 길항세균 제제화시, 이들 성분을 투입하여 제

조합으로써 길항세균의 초기활성을 증진시킬 수 있을 것으로 판단된다.

또한, 표-31에 나타난 바와 같이, 고추종자추출액에 각각의 성분을 투입하여 길항곰팡이의 생육량(mycelial dry weight, 48h)을 조사한 결과, Lactose, Maltose, Starch 등의 효과가 가장 우수하였으며, Glucose, Fructose, Sucrose, Cellulose, Mannitol, Inositol 등도 비교적 우수한 특성을 나타내고 있다. 특이할 점은 p-hydroxybenzoic acid의 길항균증식효과가 비교적 양호하게 나타났다는 점이다. 따라서, 향후 길항곰팡이 제제화시, 이들 성분을 투입하여 제조함으로써 길항균의 초기활성을 증진시킬 수 있을 것으로 판단된다.

즉, 길항균을 이용하여 항균상토를 제조할 경우, 이들 길항균이 상토 및 근권에서 효율적으로 정착 및 증식하도록 하기 위해서는 상기의 성분을 투입하여 제조하는 것이 바람직하다고 할 수 있다. 즉, 이들 성분은 미생물의 영양분이 거의 없는 육묘상에서 초기에 길항균의 탄소원 및 에너지원으로 작용함으로써 길항균의 근권정착 및 번식을 조장하여 입고병원균에 대한 길항능이 극대화될 수 있는 것이다.

<표-30> 길항세균(KB-6)활성 증진용 탄소(에너지)원 선발시험 결과

탄소(에너지)원에 따른 길항세균 KB-6의 배양성			
탄소원종류	균밀도 (X 10 ⁶ /ml)	탄소원종류	균밀도 (X 10 ⁶ /ml)
Formic	14	Gallic	15
Acetic	11	Tannic	7
Propionic	21	p-hydroxybenzaldehyde	8
Butyric	8	2-naphthol	4
Valeric	13	phenol	2
Caproic	14	Glucose	44
Caprylic	12	Fructose	45
Capric	11	Galactose	36
Lauric	21	Mannose	32
Myristic	22	Xylose	27
Palmitic	24	Lactose	25
Stearic	27	Maltose	41
Oleic	24	Cellobiose	15
Linoleic	16	Sucrose	42
Linolenic	19	Amylose	14
Lactic	21	Cellulose	9
Sorbic	14	Starch	34
Oxalic	22	Xylan	22
Malonic	25	Mannitol	45
Succinic	33	Inositol	43
Maleic	31	Sorbitol	41
Fumaric	32	Tween 20	11
Citric	32	Tween 80	7
p-hydroxybenzoic	11	Ascorbic acid	18
Salicylic	14	CaO	2
Benzoic	14	Glycerol	21
대조구-1	1	대조구-2	1

<표-31> 길항곰팡이(KF-3)활성 증진용 탄소(에너지)원 선발시험 결과

탄소(에너지)원에 따른 길항곰팡이 KF-3의 배양성			
탄소원종류	mycelial dry wt.(mg)	탄소원종류	mycelial dry wt.(mg)
Formic	6	Gallic	3
Acetic	5	Tannic	6
Propionic	6	p-hydroxybenzaldehyde	4
Butyric	7	2-naphthol	2
Valeric	4	phenol	1
Caproic	3	Glucose	33
Caprylic	3	Fructose	35
Capric	3	Galactose	29
Lauric	3	Mannose	24
Myristic	5	Xylose	23
Palmitic	5	Lactose	45
Stearic	3	Maltose	43
Oleic	3	Cellobiose	25
Linoleic	1	Sucrose	31
Linotenic	1	Amylose	22
Lactic	1	Cellulose	31
Sorbic	0	Starch	42
Oxalic	1	Xylan	13
Malonic	0	Mannitol	38
Succinic	2	Inositol	32
Maleic	0	Sorbitol	28
Fumaric	3	Tween 20	5
Citric	4	Tween 80	6
p-hydroxybenzoic	14	Ascorbic acid	17
Salicylic	2	CaO	1
Benzoic	3	Glycerol	24
대조구-1	0	대조구-2	0

나) 병원균의 생육에 대한 영향평가

표-29의 각종 Compounds가 병원균(Pythium)의 번식에 미치는 영향을 조사한 결과는 다음의 표-32와 같다.

<표-32> 각종 탄소(에너지)원의 Pythium생육에 대한 영향 평가결과

탄소(에너지)원에 따른 병원균(Pythium)의 배양성			
탄소원종류	mycelial dry wt.(mg)	탄소원종류	mycelial dry wt.(mg)
Formic	1	Gallic	5
Acetic	6	Tannic	1
Propionic	4	p-hydroxybenzaldehyde	5
Butyric	1	2-naphthol	3
Valeric	3	phenol	2
Caproic	4	Glucose	36
Caprylic	5	Fructose	29
Capric	5	Galactose	26
Lauric	4	Mannose	31
Myristic	4	Xylose	21
Palmitic	5	Lactose	41
Stearic	3	Maltose	46
Oleic	2	Cellobiose	22
Linoleic	1	Sucrose	28
Linolenic	0	Amylose	25
Lactic	0	Cellulose	23
Sorbic	1	Starch	35
Oxalic	2	Xylan	22
Malonic	1	Mannitol	31
Succinic	2	Inositol	27
Maleic	1	Sorbitol	25
Fumaric	2	Tween 20	7
Citric	3	Tween 80	4
p-hydroxybenzoic	1	Ascorbic acid	13
Salicylic	1	CaO	1
Benzoic	2	Glycerol	29
대조구-1	15	대조구-2	14

표-32에 나타난 바와 같이, 대부분의 성분들은 길항곰팡이 KF-3와 병원균 Pythium

의 생육을 동시에 조장한다. 그러나 Formic acid, Butyric acid, p-hydroxybenzoic acid, Tannic acid 등의 acids는 길항곰팡이 KF-3의 생육은 조장하나 병원균 Pythium의 생육에는 거의 영향을 주지 않는 것으로 나타났다.

즉, 이들 4종의 acids를 이용하여 길항곰팡이를 제제화할 경우, 길항균은 이들 성분을 이용할 수 있음으로써 정착 및 증식성이 매우 양호해지나, 병원균은 이들 성분을 이용할 수 없으므로 이들의 생육은 조장되지 않는다. 결국, 이들 성분을 이용함으로써 병원균에는 아무 영향없이 길항균의 번식만을 촉진시킬 수 있는 것이다.

나. 길항균정착율 제고효과 평가

이전의 시험에서 선발된 탄소(에너지)원을 이용하여 길항균정착율 제고효과를 실험실적으로 검증하기 위하여 길항균의 종자처리시험을 실시하였다. 즉, 길항균과 선발성분(1g/L)을 혼합하여 표면살균한 상추종자에 처리하였다. 한편, 멸균된 인공토양을 별도로 준비하여 Colony상으로 길항세균(KB-6)과 구별될 수 있는 Pseudomonas, Streptomyces, Fusarium conidia 등을 혼합하였다. 길항균처리종자를 상기토양에 파종하여 취아가 완성된 시점에 종자를 회수하여 종자표면에 정착해있는 길항균의 밀도를 조사하였다. 본 시험은 길항균정착율을 정확하게 정량적으로 산출하기 위하여 길항세균(KB-6)를 대상으로 실시하였다. 첨가제를 사용하지 않은 경우를 Control로 하였으며, 시험결과는 다음의 표-33과 같다. 즉 무처리구의 정착율을 100으로 하였을 때, Glucose는 114, Butyric acid는 113을 나타내고 있어, 이들 성분은 길항균정착율 제고효과가 매우 우수한 것으로 나타났다. 반대로 Formic acid, p-hydroxybenzoic acid 등은 길항균의 정착율 오히려 떨어뜨리는 결과를 나타내고 있다. 즉, 여러종류의 미생물이 혼재하고 있는 상태에서도 Glucose와 Butyric acid는 길항세균(KB-6)이 종자표면에 효율적으로 정착할 수 있도록 화학적인 환경을 조성해주는 것으로 판단된다.

<표-33> 각종 Compounds에 의한 길항균정착율 제고효과

성분명	길항균정착율(%)	비고
Glucose	114	◎ 정착율은 Control 대비 백분율(%) ◎ 정착율은 취아직후종자표면에 존재하는 길항균밀도를 조사하여 산출하였음 ◎ 종자당 초기균밀도는 3.2×10^7 이었음
Fructose	106	
Maltose	106	
Lactose	98	
Starch	106	
Formic acid	92	
Butyric acid	113	
p-hydroxybenzoic acid	94	
Tannic acid	102	
Control	100	

다. 길항균 종자처리에 의한 입고병 방제효과 평가

이전의 시험에서 선발된 탄소(에너지)원의 입고병방제 상승효과를 실험실적으로 검증하기 위하여 종자처리 및 육묘시험을 실시하였다. 즉, 길항균과 선발성분을 혼합하여 상추종자에 처리한 후, 입고병균(Pythium)이 고밀도로 존재하는 토양에 파종 및 육묘하면서 입고병 발병상황을 조사하였다. 본 시험은 길항곰팡이(KF-3)만을 대상으로 실시하였다.

1) 시험방법

- PDA배지에서 10일간 배양한 곰팡이(KF-3)의 conidia solution 준비
- Tween 80이 0.5% 되도록 혼합
- 상기의 탄소(에너지)원 성분을 1g/L의 농도가 되도록 혼합
- 이 혼합액과 상추종자를 혼합 및 교반하여 종자표면에 길항균을 코팅 (종자 1개당 길항균의 수를 10,000-40,000개로 조정)
- 코팅종자 20개씩을 자연적으로 Pythium으로 만연된 사질토양에 파종
- 10일간 육묘하면서 발병을 조사

2) 시험결과

표-29의 각종 Compounds 중, 특징적인 성질을 가지는 성분을 대상으로 종자처리 시험을 실시한 결과는 다음의 표-34과 같다. 즉, acids류를 제외한 모든 성분들은 종자발아율이 비교적 낮은 편이며, 묘발병율은 비교적 높은 것으로 나타났다. acid성분들은 종자의 발아율 및 발병율을 매우 개선시키는 것으로 나타났다. 결국, 이들 acid류는 길항균(KF-3)의 생육을 촉진시키면서 병원균(Pythium)의 생육에는 아무런 영향을 주지 않음으로써 입고병을 효율적으로 방제한 것으로 판단된다.

<표-34> 종자처리 및 육묘시험 결과

성분명	종자발아율(%)	묘 발병율(%)
Glucose	45	65
Fructose	55	70
Maltose	35	75
Lactose	60	85
Starch	60	65
Formic acid	75	30
Butyric acid	80	30
p-hydroxybenzoic acid	80	45
Tannic acid	70	35
Control	80	60

제 14 절 길항균의 전처리공정 개발

1. 이론적 · 실험적 접근방법

길항균제품의 길항균밀도는 보통 10^7 - 10^8 /g 수준의 고농축형태이므로 이를 상토에 직접 사용할 수는 없다. 즉, 상토에 혼합하기 이전에 길항균제품은 상토제조공정중에 적절한 방법으로 증량하여야 한다. 다시 말하면, 길항균제품을 상토에 고르게 혼합하

기 위해서는 사전에 inert한 증량물을 이용하여 양을 늘려야 한다.

상토회사에서는 일반적으로 길항균을 미리 증량제를 이용하여 다량의 증량물을 제조해 놓은 후 필요에 따라 일정량씩을 사용하게 되므로, 혼합물내 길항균의 경시적 안정성과 상토원재료와의 혼합균질성을 확보해야 한다. 따라서 본 항에서는 이들 인자를 고려한 길항균 전처리공정을 최적화 하고자 한다.

2. 연구내용

가. 상토 원재료와의 혼합균질성 확보

길항균을 증량함에 있어서 증량용재료는 상토원재료와의 혼합균질성을 고려하여 선택하여야 한다. 즉, 길항균 증량물을 상토에 투입할 때, 증량물의 입도, 비중 등에 따라 상토내에서 길항균의 분포도에 많은 편차가 생길 수 있으며, 이러한 경우에 항균상토의 효과가 표준화될 수 없다. 즉, 상토와의 혼합균질성이 확보될 수 있는 증량물을 선택하여 사용해야 한다. 따라서 본 항에서는 수급이 용이하고 경제성이 있으며 상토에 범용적으로 사용할 수 있는 원료중에서 길항균의 균질성이 확보될 수 있는 최적의 증량물을 선발하고자 한다.

1) 시험방법

- 다양한 증량물을 이용하여 (탈지강 흡착)길항균 KF-3를 10배로 증량
- 상토완제품(상토회사 제공)에 상기증량물을 1%(w/w) 투입하여 길항균의 산술적농도를 $10^5/g$ 으로 조정
- 교반기를 이용하여 1분간 교반
- 상하좌우 각부위에서 4점의 시료 채취
- 시료내 길항균밀도 조사하여 시료간 균밀도 편차 확인

2) 시험결과

증량물 종류에 따른 길항균밀도 편차시험결과는 다음의 표-35과 같다. 즉, 탈지강,

제오라이트(0.1-0.5mm)와 같이 입도가 너무 작은 재료의 경우에는 길항균증량물이 밑부분으로 치우치게 되어 균밀도 편차가 매우 큰 것으로 나타났다. 또한 제오라이트(1.0-3.0mm)와 같은 경우에는 입도가 너무 커서 역시 균밀도편차가 크게 나타나고 있다. 본 시험결과, 가장 적합한 증량제는 제오라이트(0.5-1.0mm)인 것으로 나타났으며, 피트모스의 경우에도 양호한 결과를 보이기는 하나 피트모스를 이용할 경우에는 물을 첨가해야 하는 등 증량작업성이 나쁘다는 문제점이 있다.

<표-35> 증량물 종류에 따른 길항균밀도 편차시험결과

증량물	시료별 길항균 밀도(cfu/g)				비고(비중)
	시료-1	시료-2	시료-3	시료-4	
탈지강	3 X 10 ⁴	42 X 10 ⁴	21 X 10 ⁴	6 X 10 ⁴	0.5
제오라이트 (0.1-0.5mm)	< 10 ⁴	21 X 10 ⁴	5 X 10 ⁴	58 X 10 ⁴	2.0
제오라이트 (0.5-1.0mm)	8 X 10 ⁴	14 X 10 ⁴	7 X 10 ⁴	11 X 10 ⁴	1.8
제오라이트 (1.0-3.0mm)	5 X 10 ⁴	< 10 ⁴	51 X 10 ⁴	20 X 10 ⁴	1.5
피트모스	9 X 10 ⁴	21 X 10 ⁴	14 X 10 ⁴	4 X 10 ⁴	0.2

나. 혼합물내 길항균의 경시적 안정성

상토회사측에서 길항균증량물을 일정기간 보관하면서 사용함에 따른 길항균의 경시적 안정성이 매우 중요하다. 따라서 본 항에서는 표-35에서 선발된 증량물을 이용하여 제조한 길항균증량물의 경시적안정성을 조사하고자 한다.

1) 시험방법

- 제오라이트(0.5-1.0mm)를 이용하여 길항균(KF-3)증량물(2.5 X 10⁷/g) 제조
- 20℃, 35℃, 55℃에 보관하면서 길항균의 경시적 생존을 조사

2) 시험결과

길항균증량물의 경시적안정성 조사결과는 다음의 표-36와 같다. 즉, 길항균증량물은 20℃에서 약 1개월까지는 안정성이 100% 확보되는 것으로 나타났다. 그러나 40℃에서는 30일 후 약 12.5%의 길항균이 사멸된 것으로 나타났으며, 55℃에서는 5일 후부터 급격하게 사멸되어 30일 후에는 약 67%의 길항균이 사멸되는 것으로 나타나 길항균은 고온에서는 안정하지 않은 것으로 확인되었다. 중고온에서 길항균이 안정하지 않은 것으로 나타난 것은 길항균 증량과정중에 일정량의 수분이 첨가되었기 때문인 것으로 판단된다.

<표-36> 길항균증량물의 온도별 경시적안정성 조사결과

보관온도	길항균 생존밀도(cfu/g)			
	초기	5일 후	15일 후	30일 후
20℃	2.4×10^7	2.6×10^7	2.6×10^7	2.4×10^7
40℃	2.4×10^7	2.3×10^7	2.3×10^7	2.1×10^7
55℃	2.4×10^7	1.6×10^7	0.7×10^7	0.8×10^7

제 15 절 길항균과 상토의 배합기술 개발

1. 이론적·실험적 접근방법

항균상토는 상토원재료와 길항균이 혼합되어 있는 형태의 미생물농자재라 할 수 있다. 항균상토는 길항균의 생물학적 방제효과를 꾀하고자 하는 제품이므로 제품내에서 길항균이 사멸되지 않아야 한다. 따라서 본 항에서는 상토의 각각의 원료와 길항균이 생물학적으로 서로 부합되는지의 여부를 확인하고자 한다.

2. 연구내용

1) 시험방법

- 상토회사로부터 각각의 상토원재료 5종과 완제품 2종 입수
- 상토원재료 각각 또는 상토완제품에 길항균 2종을 중량비로 각각 1% 투입 단, 비료성분의 경우, 중량비로 동량 혼합하여 시료 제조
- 상온(18-25℃)에 보관하면서 길항균생존율 조사

2) 시험결과

상토원재료와 길항균의 생물학적 Compatibility 조사결과는 다음의 표-37, 표-38와 같다. 표-37에 나타난 바와 같이, 제오라이트, 코코피트, 피트모스는 길항곰팡이(KF-3)의 활성화에 어떠한 영향도 주지 않는 것으로 나타났으며, 비료성분은 길항곰팡이의 생존율을 떨어뜨리는 것으로 나타났다. 그러나, 상토완제품 2종에 길항곰팡이를 혼합하여 생존율을 조사한 결과, 길항곰팡이가 전혀 사멸되지 않는 것으로 확인되었다.

표-38는 길항세균 KB-6의 안정성에 대한 결과이며, KF-3의 경우와 마찬가지로 비료성분과 혼합된 것을 제외하고는 모든 경우에 길항세균의 안정성이 우수한 것으로 나타났다.

생존율이 저하되는 것은 비료성분의 농도가 과하였기 때문인 것으로 판단된다. 즉, 상토완제품에는 극히 소량의 비료성분만이 들어가기 때문이다. 그러나 비료성분은 길항균의 생존에 상당한 악영향을 주는 것으로 나타났으므로, 향후 항균상토 제조시에는 비료성분을 적량으로 조절해야 할 것으로 판단된다.

<표-37> 길항곰팡이(KF-3)의 생물학적 Compatibility 조사결과

배합별	길항균(KF-3) 생존밀도(cfu/g)			
	초기	5일 후	10일 후	20일 후
길항균+제오라이트	2.4 X 10 ⁵	2.3 X 10 ⁵	2.6 X 10 ⁵	2.4 X 10 ⁵
길항균+코코피트	2.4 X 10 ⁵	2.5 X 10 ⁵	2.3 X 10 ⁵	2.5 X 10 ⁵
길항균+피트모스	2.4 X 10 ⁵	2.2 X 10 ⁵	2.4 X 10 ⁵	2.5 X 10 ⁵
길항균+비료성분(분말)*	2.4 X 10 ⁵	1.8 X 10 ⁵	1.5 X 10 ⁵	1.6 X 10 ⁵
길항균+상토완제품(1)	2.4 X 10 ⁵	2.2 X 10 ⁵	2.5 X 10 ⁵	2.3 X 10 ⁵
길항균+상토완제품(2)	2.4 X 10 ⁵	2.5 X 10 ⁵	2.7 X 10 ⁵	2.5 X 10 ⁵

* 비료성분 : N, P, K 혼합물

<표-38> 길항세균(KB-6)의 생물학적 Compatibility 조사결과

배합별	길항균(KB-6) 생존밀도(cfu/g)			
	초기	5일 후	10일 후	20일 후
길항균+제오라이트	1.3 X 10 ⁷	1.2 X 10 ⁷	1.4 X 10 ⁷	1.3 X 10 ⁷
길항균+코코피트	1.3 X 10 ⁷	1.2 X 10 ⁷	1.3 X 10 ⁷	1.4 X 10 ⁷
길항균+피트모스	1.3 X 10 ⁷	1.5 X 10 ⁷	1.4 X 10 ⁷	1.3 X 10 ⁷
길항균+비료성분(분말)*	1.3 X 10 ⁷	1.1 X 10 ⁷	0.8 X 10 ⁷	0.8 X 10 ⁷
길항균+상토완제품(1)	1.3 X 10 ⁷	1.4 X 10 ⁷	1.5 X 10 ⁷	1.3 X 10 ⁷
길항균+상토완제품(2)	1.3 X 10 ⁷	1.4 X 10 ⁷	1.4 X 10 ⁷	1.3 X 10 ⁷

제 16 절 항균상토 제조공정 확립

1. 이론적·실험적 접근방법

항균상토 제조공정을 확립학 위하여, 기존의 상토제조공정을 검토하고, 상토제조공정에 길항균투입방법을 고찰하여 기존공정에 추가되는 비용이 최소화되고 작업성에 악영향이 없도록 하여야 한다. 또한 상토의 함수율에 따른 길항균의 안정성을 확인하고 항균상토의 보관조건 최적화하여 제품의 품질을 일정하게 유지하고자 한다

2. 연구내용

이상의 연구결과를 토대로 하여 효과적이고 안정한 물성의 항균상토를 제조하기 위한 공정을 확립하고자 한다.

가. 길항균 투입방법 최적화

1) 기존의 상토제조공정

일반적으로 상토제조는 Cocopeat, 분말Zeolite, 입상Zeolite, 비료물 등의 원료를 사용하여, 제조회사에 따라 약간씩 다르긴 하나 제조공정은 다음과 같다.

- 압축 Cocopeat를 파쇄하여 분말Zeolite를 혼합
- 혼합기내에서 상기혼합물에 비료물A를 Spray 첨가 및 혼합하여 반제품(가) 제조
- 입상Zeolite에 비료물B를 첨가 및 혼합하여 반제품(나) 제조
- 상기 반제품(가)와 (나)를 혼합하여 완제품 제조

2) 길항균투입방법 고찰

- 길항균은 분말 또는 입상형태이며, 이전의 시험결과에 나타났듯이 길항균이 비료물에 직접 접촉하는 것은 안정성면에서 바람직하지 않으므로, 상기공정중 길항균은 Cocopeat 또는 Zeolite에 혼합처리하는 것이 바람직하다.

- 길항균은 입상(0.5-1.0mm)의 제오라이트를 이용하여 증량하는 것이 바람직하므로(표-35), 이 증량물을 분말상의 제오라이트에 투입하는 것은 입도차이 때문에 적절하지 않다.
- 또한, 입상의 제오라이트 또는 파쇄된 코코피트에 직접 투입하는 것은 길항균 혼합을 위한 별도의 혼합공정이 추가적으로 필요하게 되므로 생산성을 저하시키는 원인이 될 수 있다.
- 비료성분은 길항균의 안정성에 악영향을 주는 것으로 확인되었기 때문에, 모든 비료성분이 제오라이트 또는 코코피트에 흡수, 흡착된 이후의 공정에 길항균을 투여하는 것이 바람직하다.
- 따라서, 당 연구진은 상토의 기존제조공정을 면밀히 관찰한 결과, 다음과 같은 길항균 최적투입방법을 도출하였다. 즉, 반제품(가)와 반제품(나)는 비료성분이 모두 흡착된 상태이므로, 여기에 길항균을 투여하는 것이 바람직하며, 반제품(가) 또는 (나)에 길항균을 직접 투여하는 것은 별도의 추가혼합작업이 필요하게 된다. 반제품(가)와 반제품(나)는 각각 컨베이어를 타고 이송되어 재혼합작업을 하게 되므로, 이 과정에서 길항균을 투입하는 것이 가장 바람직하다. 따라서 결론적으로, 길항균은 반제품(가) 또는 반제품(나)의 최종혼합을 위한 컨베이어 이송과정중에 연속적으로 투여함으로써, 길항균의 안정성 및 상토내에서의 균질성 등을 확보할 수 있으며, 또한 길항균의 투입작업을 효율적으로 할 수 있다.

3) 항균상토 생산성 고찰

상기에서 확립한 제조공정에 준하여 항균상토를 제조할 경우, 길항균증량물을 정량적으로 이송할 수 있는 컨베이어 이외에는 별도의 설비가 필요치 않으며, 따라서 상토 제조회사측으로서는 항균상토 제조를 위한 별도의 설비비가 소요되지 않는다. 결국, 본 공정을 활용할 경우, 당 연구진과 공동으로 항균상토사업을 추진할 상토회사의 1일 생산량 약 80톤(16KG x 5,000포/1일) 전체를 항균상토화할 수 있다.

나. 상토의 함수율에 따른 길항균의 안정성

길항균제제는 일반적으로 저수분상태에서 매우 안정한 것으로 알려져 있다. 대부분의 상토는 약 30-40%의 수분함량을 가지고 있으므로, 함수율에 따른 길항균의 안정

성을 확인하여 상토의 함수율조정을 위한 기초자료로 활용하고자 한다.

1) 시험방법

- 상기와 같은 공정으로 시료 제조(단, 비료물 제조를 위한 증량수의 양을 서로 달리하여 수분함량을 차별화)
- 상온(15-25℃)에 보관하면서 길항균생존율을 경시적으로 조사(시료당 5site에서 sampling하여 평균치 계산)

2) 시험결과

함수율에 따른 길항균생존율 조사결과는 다음의 표-38, 표-39과 같다. 즉, 세균(표-39)의 경우, 함수율 20%까지는 길항균안정성에 문제가 없으나, 함수율이 증가하면서 생존율이 저하되어 수분함량 50%에서는 30일후에는 약 58%만이 생존하는 것으로 나타났다. 반면, 곰팡이(표-40)의 경우에는 함수율 40%까지는 안정성에 문제가 없는 것으로 나타났으며, 50%의 함수율에서는 안정성이 저하되기 시작하는 것으로 확인되었다.

<표-39> 함수율에 따른 길항세균(KB-6) 생존율 조사결과

함수율(%)	길항균(KF-3)생존율(%)			
	초기	5일 후	15일 후	30일 후
15	100	100	99	100
20	100	99	98	100
25	100	98	100	99
30	100	99	97	98
35	100	98	98	99
40	100	97	98	98
50	100	98	97	95

<표-40> 함수율에 따른 길항곰팡이(KF-3) 생존율 조사결과

함수율(%)	길항균(KB-6)생존율(%)			
	초기	5일 후	15일 후	30일 후
15	100	100	99	100
20	100	99	98	99
25	100	98	96	94
30	100	97	93	92
35	100	94	88	81
40	100	90	82	78
50	100	85	71	58

다. 항균상토의 보관조건 최적화

상토는 종자를 파종하여 유작물을 키우는 농자재이므로, 농민소비자들로서는 그 품질에 매우 민감한 품목이다. 따라서 길항균을 투입한 제품이 유통중에 어떠한 물성변화도 있어서는 안된다. 본 항에서는 상토의 제조, 포장, 보관과정중에 발생할 수 있는 모든 조건을 설정하여 상토의 외관물성변화를 조사하였다. 변온보관은 20-50℃의 온도편차를 두어 보관한 것이며, 고온보관시험구는 70℃의 조건으로 하였다. sealing시험구는 시료를 비닐랩으로 완전밀봉하였으며 unsealing시험구는 공기가 통할 수 있도록 하였다. 처리 30일 후에 상토의 색깔변화, 냄새발생, 뭉침현상 등을 조사하였으며, 그 결과는 다음의 표-41과 같다. 즉, 상온보관시, unsealing시험구는 물성이 완전 정상이나 sealing시험구는 일반상토, 항균상토 모두 뭉침현상이 발생하였다. 이러한 뭉침현상은 길항균을 투입하였기 때문이 아니라, 상토에 기존하던 수분이 특정부분에 치우침으로써 발생하는 현상인 것으로 판단된다. 변온보관의 경우, sealing시험구는 항균상토에서만 뭉침현상이 발생하였으며 unsealing시험구는 일반상토에서만 뭉침현상이 발생한 것으로 보아, 이는 시료제조 및 보관의 ERROR때문인 것으로 판단된다. 고온보관의 경우, unsealing시험구는 시료가 완전히 건조되어 어떠한 이상현상도 발견할 수 없는 상황이며 sealing시험구에서는 두시료 모두 뭉침현상이 비교적 심하게 나타났다. 즉, 고온에서는 상토내 수분증발이 매우 심하였기 때문에 뭉침현상도 심해진 것으로 판단된다. 이상의 결과로 볼 때, 길항균이 들어있는 항균상토와 일반상토의 물리화학적, 생물학적 특성은 거의 유사한 것으로 판단된다. 또한 상토제품 포장시, 완전밀봉하지 않는 것이 바람직하며, 온도변화가 심하지 않은 장소에서 보관해야 할 것으로

판단된다.

<표-41> 여러조건하에서의 상토물성변화 조사결과

처 리		항균상토	일반상토
상온보관	sealing	색변	×
		냄새	×
		몽침현상	×/△
	unsealing	색깔	×
		냄새	×
		몽침현상	×
변온보관	sealing	색	×
		냄새	×
		몽침현상	×/△
	unsealing	색	×
		냄새	×
		몽침현상	×
고온보관	sealing	색	×
		냄새	×
		몽침현상	△
	unsealing	색	- 완전히 건조됨 - 색변, 냄새, 몽침현상 없음
		냄새	
		몽침현상	

× : 변화없음, △ : 조금발생, ○ : 발생량 많음

제 17 절 길항균의 항균성Metabolite의 성능평가

1. 이론적·실험적 접근방법

항균상토의 입고병에 대한 생물적 방제효과는 투입한 길항균이 증식하면서 균체외로 분비하는 2차대사산물(항균성Metabolite)에 의하여 발휘된다. 따라서 본 항에서는

1차년도에 위탁기관에서 효소활성도 및 입고병원균 3종에 대한 항균력이 우수한 것으로 확인, 선발한 길항균을 대상으로 하여 그 항균성 Metabolite의 성능 및 안전성에 대한 평가를 실시하여 항균상토의 입고병방제효과를 예측하고자 하였다.

가. 길항균의 입고병원균에 대한 항균력 평가

- 선발길항균의 입고병원균 3종(Fusarium , Pythium, Rhizoctonia)에 대한 항균력을 Dual Culture 방법을 통하여 평가하였다.

나. 항균성 Metabolite의 이화학적 안정성평가

- 항균성 Metabolite는 생물적방제의 중요한 인자이므로, 길항균배양액의 Cell-free extract를 대상으로 하여 경시적으로 항균력의 변화를 조사하므로써, 그 이화학적 안정성을 평가하였다.

다. 항균성 Metabolite의 종자발아율에 대한 영향평가

- 항균성 Metabolite의 작물에 대한 약해검증시험으로써, 무우종자를 항균성 Metabolite Solution에 침적처리하여 종자발아율에 대한 영향성을 평가하였다.

라. 항균성 Metabolite의 유묘생육에 대한 영향평가

- 항균성 Metabolite의 작물에 대한 약해검증시험으로써, 항균성 Metabolite Solution을 유작물에 관주 및 엽면처리하여 작물의 생육에 대한 영향성을 평가하였다.

2. 연구내용

항균상토란 육묘기간중 또는 본포에서 입고병의 발생을 생물학적으로 방지하기 위하여 길항균을 상토에 투입하여 만든 길항균함유상토를 말한다. 항균상토의 입고병에 대한 생물적 방제효과는 투입한 길항균이 육묘배지 또는 본포토양에서 증식하면서 균

체외로 분비하는 2차대사산물(항균성Metabolite)에 의하여 발휘된다. 즉, 이들 길항균이 분비하는 항균성Metabolite는 인접한 입고병병원균의 생육을 억제하므로써 병원균의 밀도를 피해밀도 이하로 유지시켜, 입고병의 발생을 억제하는 것이다. 따라서 본 항에서는 이러한 항균성Metabolite의 성능을 평가하고자 하며, 일반적으로 농자재는 약효 뿐 아니라 농작물에 대한 약해검증도 매우 중요하므로, 그 안전성에 대한 평가를 실시하여 항균상태의 입고병방제효과를 예측하고자 한다.

가. 항균성 Metabolite의 이화학적 안정성평가

길항균은 항균물질 생산, 병원균 용균, 병원균과의 경쟁, 시데로포 생산 등의 다양한 기작으로 병원균을 억제하여 생물적방제효과를 나타낸다. 이러한 여러가지의 기작 중, 길항균이 분비하는 항균성 대사물질에 의한 방제효과가 가장 중요하다. 길항균이 증식하면서 균체외로 분비하는 2차대사산물(항균성Metabolite)에 의하여 인접한 입고병병원균의 생육이 억제되므로써 병원균의 밀도가 피해밀도 이하로 유지되어 입고병의 발생이 억제되는 것이다. 즉, 항균성 Metabolite는 생물적방제의 중요한 인자이므로, 본 항에서는 길항균배양액의 Cell-free extract를 대상으로 하여 경시적으로 항균력의 변화를 조사하므로써 항균성Metabolite의 이화학적 안정성을 평가하였다. 본 시험은 1차년도에 위탁기관에서 선발한 3종의 길항균(df-14, df-24, df-35)에 대해서 실시하였다.

즉, 3종의 길항균을 액체배양하여 항균성성분이 함유된 배양액을 준비하였다. 이 항균성성분의 Stability of Antifungal Activity를 평가하기 위하여 그 Cell-Free Extract를 온도와 시간을 달리하여 보관하면서 항균활성을 조사하였다. 즉, 세균의 경우, 길항균을 TSB배지에서 2일간 액체진탕배양한 후, 0.45 μ m membrane으로 Filter하여 그 filtrate의 입고병원균에 대한 항균력을 경시적으로 평가하였다. 방선균의 경우, 길항균을 ISP-2배지에서 5일간 액체진탕배양한 후, 역시 0.45 μ m membrane으로 Filter하여 그 filtrate의 입고병원균에 대한 항균력을 평가하였다. 그 결과는 다음의 <표-41>과 같다. 참고로, 본 시험은 3종의 입고병원균 중, 취급이 용이한 Fusarium에 대해서만 실시하였으며, Filter Paper에 Filtrate를 0.05ml loading하여 inhibition zone을 측정하는 방법으로 항균활성을 평가하였다.

3종의 길항균 중, df-14(*Bacillus* sp.)는, 경시적으로 열에 비교적 안정한 항균성분을 분비하는 것으로 나타났다. 그러나, df-24와 df-35는 시간이 경과하면서 또는 온도가 높아지면서 Cell-Free Extract의 항균활성이 급격히 저하되는 것으로 나타났다.

<표-42> 항균성 Metabolite의 보관온도 및 기간에 따른 안정성평가 결과(Halo size)

균주번호	초기활성	25℃에서의 보관기간에 따른 활성		보관온도에 따른 활성 (10일 후)	
		5일 후	20일 후	25℃	50℃
df-14	26	21	19	20	17
df-24	27	20	12	18	6
df-35	23	17	11	14	2

나. 길항균 배양액의 종자발아율 및 유묘생육에 대한 영향평가

상토는 종자를 파종하여 묘를 키우는 자재이므로, 길항균을 함유하는 항균상토는 육묘과정중에 안전해야 한다. 즉, 종자발아과정은 대단히 민감한 과정으로서 종자주위에 약간의 toxic한 성분만 존재하여도 발아율이 저하되거나 발아가 전혀 불가능하게 되므로, 본 항에서는 길항균배양액내 항균성 Metabolite의 종자발아율에 대한 영향 및 유식물에 대한 영향을 평가하여 길항균의 안전성을 확인하고자 한다.

3종의 길항균(df-14, df-24, df-35) 액체배양액의 cell-free filtrate의 희석액(100배)을 무우종자에 처리하여 종자의 발아율 및 무우묘생육에 대한 영향을 평가하였다. 즉, TSB에서 2일 배양한 세균배양액과 ISP-2에서 5일 배양한 방선균 배양액의 cell-free filtrate를 100배 희석하여 Tray에 파종한 무우종자에 5일 간격으로 3회 처리하였다. 그 결과는 다음의 <표-43>와 같다. 즉, 3종의 길항균 모두 종자발아에 대한 악영향은 전혀 없었으며, 유묘생육조사 결과로 볼 때, 길항균은 유묘생육을 오히려 촉진시키는 것으로 나타났다. 이는 길항균이 분비한 Metabolites에 의한 작용인 것으로 판단된다.

<표-43> 길항균 배양액(cell-free filtrate)의 종자발아율 및 유묘생육에 대한
영향시험결과

처리구분	종자발아율(%)	유묘생육량(10일간 길이생장, mm)
df-14	98%	97
df-24	94%	91
df-35	91%	84
대조구	97%	87
무처리구	96%	86

* 무처리구 : 물만 급수함

* 대조구 : 길항균배양에 사용한 배지성분을 100배 희석하여 처리

다. in vitro Growth rate 평가

3종의 길항균 중, 이상의 시험에서 항균성Metabolite의 이화학적 안정성 및 종자발아율 시험 결과, 바람직한 특성을 보유하는 것으로 확인된 2종의 길항균(df-14, df-24)에 대해서 액체배지(Glucose 1%, Soybean flour 0.2%, MgSO4 0.05%, KH2PO4 0.05%)에서의 Growth curve를 작성하였으며, 그 결과는 다음의 <표-44>과 같다. 즉, 길항세균 df-14와 df-24는 24-36시간동안 배양함으로써 최대의 균밀도($8-9 \times 10^8$ /ml)가 되는 것으로 나타났다.

<표-44> 길항세균(df-14, df-24)의 Growth curve

구분	경과시간(h)별 균밀도(cfu/ml)						
	0	6	12	18	24	36	48
df-14	7×10^3	4×10^4	4×10^6	5×10^8	9×10^8	9×10^8	9×10^8
df-24	5×10^3	7×10^4	8×10^6	3×10^8	8×10^8	8×10^8	8×10^8

라. 선발된 길항균 동정

16S rDNA Sequencing method를 활용하여 3종의 길항균을 동정한 결과는 다음의 <표-45>와 같다.

<표-45> 길항균 동정결과

strain	동정결과
df-14	<i>Bacillus</i> sp. Bch1
df-24	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
df-35	<i>Streptomyces panayensis</i>

제 18 절 시제품제조 및 안정성확보

1. 이론적·실험적 접근방법

가. 시제품 1톤 규모 생산

- 일반적인 상토제조공정에 준하되, 길항균투입량이 매우 적어 상토에 대한 혼합성이 불량해지므로 길항균을 상토제조용 원자재(제오라이트 등)에 미리 혼합 및 증량하여 항균상토를 제조함으로써 길항균의 혼합분산성을 증진시키는 방법으로 시제품을 제조하였다.

나. 시제품내 길항균의 경시적 안정성제고 연구

- 정기적으로 시제품의 여러부위를 채취 및 혼합하여 길항균밀도를 분석하므로써 제품내 길항균의 생물학적 안정성을 경시적으로 평가하였다.

다. 시제품의 물리화학적 안정성제고 연구

- 정기적으로 시제품의 여러부위를 관찰 또는 채취하여 외관물성 변화여부 및 냄새

새, 색깔, 덩어리지는 현상 등을 조사하는 방법으로 시제품의 이화학적안정성을 경시적으로 평가하였다.

2. 연구내용

가. 시제품 제조

이전의 시험결과를 기초로 하여 아래와 같은 제조공정으로 항균상토 시제품 1톤을 제조하였다. 참고로, 일반적인 상토 제조공정은, “압축 Cocopeat를 파쇄하여 분말 Zeolite를 혼합 => 혼합기내에서 상기혼합물에 비료물A를 Spray 첨가 및 혼합하여 반제품(가) 제조 => 입상Zeolite에 비료물B를 첨가 및 혼합하여 반제품(나) 제조 => 상기 반제품(가)와 (나)를 혼합하여 완제품 제조”로 이루어진다.

1) 길항균배양액 제조

선발된 길항균 2종(KB-6, df-14) 각각을 최적의 액체배양배지(Glucose 3%, Soybean Flour 2%, KH₂PO₄ 0.1%, MgSO₄ 0.05%, Yeast Extract 0.2) 및 배양조건 (교반속도 150rpm, 배지사입율 20%, 초기 pH 7.0, 접종비율 2%, 배양온도 30℃)에서 3일간 진탕배양하여 길항균 각각 5-7 X 10⁹/ml 밀도의 배양액 5리터씩을 제조하여 총 10리터의 배양액을 준비

2) 길항균배양액 흡착,증량 및 건조

길항균배양액 10리터를 100배증량(1,000kg)의 제오라이트에 흡착 및 건조

3) 각종 기능성성분 투입

상기의 건조물에 Glucose 1%, Lactic acid 0.1%, Butyric acid 0.1%를 투입 및 혼합

4) 반제품 제조

상기의 혼합물을 “상토반제품(나)”에 혼합

5) 완제품 제조

이를 “상토반제품(가)”와 혼합하여 완제품 제조

나. 시제품내 길항균의 경시적 안정성평가

제품의 길항성능이 정상적으로 발휘되기 위해서는 길항균이 제품내에서 안정적으로 생존해 있어야 한다. 상기 시제품내 길항균밀도를 경시적으로 분석하여 항균상토제품의 생물학적 안정성을 조사하므로써, 제품의 성능변화 여부를 예측하고자 한다. 시료는 상온에 보관하면서 10일 간격으로 총 5회 채취하여 길항균 및 잡균밀도를 정량적으로 분석하였으며, 길항균은 길항균자체의 colony모양 및 색깔로 구별하였다. 시험결과는 다음의 <표-46>와 같다.

<표-46> 시제품내 길항균 안정성 평가결과

구분	항균상토 시제품내 미생물밀도(cfu/g)					
	초기	10일 후	20일 후	30일 후	40일 후	50일 후
길항균밀도	4.5 X 10 ⁷ (100.0)	4.6 X 10 ⁷ (102.2)	4.5 X 10 ⁷ (100.0)	4.4 X 10 ⁷ (97.8)	4.5 X 10 ⁷ (100.0)	4.4 X 10 ⁷ (97.8)
잡균밀도	3.8 X 10 ⁵ (100.0)	3.5 X 10 ⁵ (92.1)	4.1 X 10 ⁵ (107.9)	3.7 X 10 ⁵ (97.4)	3.9 X 10 ⁵ (102.6)	4.1 X 10 ⁵ (107.9)

* 괄호안의 숫자는 초기 대비 상대백분율(%)

<표-46>에 나타난 바와 같이, 제품내 길항균밀도 조사결과 50일 후까지도 생물학적안정성이 유지되는 것으로 나타났다. 잡균은 상토원재료에 기존하던 균으로서 이 잡균도 일정한 밀도를 유지하는 것으로 나타나, 본 연구에서 제조한 항균상토 시제품은 생물학적으로 매우 안정한 것으로 판단된다. 항균상토제품은 시장에서 1년까지 유통되므로, 본 시험은 앞으로 1년동안 계속 진행하여 길항균의 안정성을 장기적으로 평가할 예정이다.

다. 시제품의 물리화학적 안정성 평가

본 항에서는 시제품을 다양한 온도조건 및 포장상태를 달리하여 보관하면서 제품의 물리화학적 안정성을 평가하였다. 즉, 시제품을 50리터씩 마대 또는 비닐포장하여 저

온(4℃), 향온(25℃) 및 상온(15-30℃)조건에서 30일간 보관하면서 제품에 곰팡이발생 여부 및 수분흡수력 변화 등을 조사하여 제품의 이화학적 안정성을 평가하였으며, 결과는 다음의 <표-47>과 같다. 곰팡이발생 여부는 육안으로 조사하였으며, 수분흡수력은 Pot에 상토를 채워넣은 후 물을 부어 상토가 물을 흡수하는 정도를 조사하는 방법으로 시험을 실시하였다. 시험은 분석항목별로 일반상토와 비교하였다.

<표-47> 시제품의 이화학적 안정성 평가결과

온도조건	포장조건	분석항목	분석결과	
			항균상토	일반상토
향온조건	마대포장	곰팡이발생	X	X
		수분흡수력	++	++
	비닐포장	곰팡이발생	△	△
		수분흡수력	+	+
저온조건	마대포장	곰팡이발생	X	X
		수분흡수력	++	++
	비닐포장	곰팡이발생	X	X
		수분흡수력	++	++
상온조건	마대포장	곰팡이발생	X	X
		수분흡수력	+	+
	비닐포장	곰팡이발생	△	△
		수분흡수력	-	-

곰팡이발생 : × 없음, △ 조금발생, ○ 발생량 많음

수분흡수력 : - 불량, + 보통, ++ 양호

<표-47>에 나타난 바와 같이, 제품은 비닐포장보다는 마대포장하는 것이 바람직한 것으로 나타났으며, 상온상태의 변온조건보다는 향온조건에, 더욱 바람직하게는 저온조건에 보관하는 것이 바람직한 것으로 나타났다. 그러나, 실제로 상토제품을 저온 또는 향온보관할 수는 없으므로, 항균상토는 마대포장하여 가급적 통풍이 잘되고 서늘한 조건에서 보관하는 것이 바람직하다. 또한 모든 분석항목에서 항균상토는 일반상토와 동일한 특성을 나타내므로써, 길항균의 상토내 투입은 상토의 물성 및 기능에 아무런 악영향을 주지 않음을 확인하였다.

제 19 절 길항균의 정착 및 증식성

1. 이론적·실험적 접근방법

가. 육묘상에서의 미생물상 정밀분석

- 길항균을 처리하지 않은 묘상의 근권토양내 균종별 미생물을 경시적으로 분석하였다. 즉, 10-fold로 serial dilution하여 세균은 NA배지에, 곰팡이는 항생제가 첨가된 PDA배지에 도말하여 균종별로 Colony Forming Unit를 조사하였다.

나. 육묘상에서의 길항균정착성 평가

- 길항균의 정착여부는 수일이내에 판정되므로, 본 항에서는 항균상토 육묘초기에 길항균의 근권정착성을 평가하였다.
- 길항균 밀도조사는 해당배지에서의 길항균의 특징적인 콜로니모양 및 색깔을 이용하여 계수하므로써 잡균과의 혼동을 회피하였다.
- 즉, 세균은 NA배지에, 곰팡이는 항생제가 첨가된 PDA배지에 도말 및 균종별로 Colony Forming Unit를 조사하여 초기의 길항균밀도와 비교하므로써, 길항균의 정착성을 평가하였다.

다. 육묘상에서의 길항균증식성 평가

- 길항균의 증식은 육묘초기부터 육묘후기까지 이루어지므로, 본 항에서는 항균상 토처리후 일정한 주기로 길항균의 근권밀도를 조사하므로써 길항균증식성을 평가하였다.
- 길항균 밀도조사는 해당배지에서의 길항균의 특징적인 콜로니모양 및 색깔을 이용하여 계수하므로써 잡균과의 혼동을 회피하였다.

- 즉, 세균은 NA배지에, 곰팡이는 항생제가 첨가된 PDA배지에 도말 및 균종별로 Colony Forming Unit를 조사하여 길항균밀도를 경시적으로 측정하므로써, 길항균의 증식성을 평가하였다.

라. 본포에서의 길항균 정착 및 증식을 평가

- 일정한 주기로 육묘상에서의 평가방법과 동일한 방법으로 하여 실시하였다.
- 정식초기를 비교기준점으로 하였으며, 10개지점 이상의 근권토양을 채취하여 평균치를 구하였다.
- 뿌리에 접해있는 모든 토양을 채취하여 균질화시켜 미생물분석을 실시하였다.

마. 길항균 정착효율 증진을 위한 항균상토 사용법 확립

- 일반적인 상토사용법은 트레이에 담은 작업, 파종작업, 물주기, 육묘작업으로 진행된다.
- 길항균 정착, 증식효율을 제고하기 위한 방법으로는 육묘환경조절 방법 및 길항균증식용 배지첨가방법이 있을 수 있다.
- 육묘환경조절 방법은 특히 상토가 마르지 않도록 하여 길항균의 활성이 저하되지 않도록 하는 방법 또는 물줄 때 길항균증식용 영양성분을 같이 처리하여 길항균의 증식성을 제고하는 방법이며, 배지첨가방법은 길항균의 정착, 증식을 촉진할 수 있는 영양성분을 상토에 미리 투입하여 길항균의 먹이성분을 충분히 확보하므로써 육묘상에서 길항균의 활성을 제고하는 방법이다. 일반적으로 상토재료로서 Peatmoss는 Coconut peat보다 덜 마르는 특성이 있다. 상토에는 길항균의 영양분이 부족하므로, 길항균의 번식을 촉진시키기 위한 먹이로서 당성분(sugar)을 첨가하는 경우가 있는데, 상토보관중에 물성을 변화시키거나 육묘시 오히려 병원균의 생육을 조장하는 경우가 있으므로 주의하여야 한다.

- 후자의 방법은 상토제조시에 고려할 사항이므로, 본 항에서는 전자의 방법을 통하여 길항균 정착효율을 증진시키고자 한다. 즉, 습윤제의 종류 및 처리농도에 따라 배지가 마르는 시간주기를 평가하고, 한편으로는 영양제종류 및 처리농도에 따라 길항균의 증식성을 평가하므로써, 최적의 습윤제 및 영양제를 선발하고자 한다.

바. 토양미생물제제와의 정착율 비교평가

- 육묘단계에서 정착율을 비교하였다
- 즉, 시중 유통되고 있는 토양미생물제제 3종을 처리한 경우와 항균상토를 처리한 경우의 근권미생물밀도를 비교하는 방법으로 평가하였다.
- 본 항에서는 길항균밀도만을 측정하지 않고, 근권미생물을 균종별로 전체밀도를 조사하는 방법으로 정착, 증식율을 비교하였다.

2. 연구내용

본 항에서는 항균상토를 이용하여 육묘하는 과정중, 처리한 길항균이 근권에 어느 정도 정착하고 증식하는지를 조사하였으며, 본포에서 근권에 정착해 있는 길항균의 밀도를 평가하여 길항균의 정착 및 증식성을 조사하였다. 또한, 길항균 정착효율 증진을 위한 항균상토 사용법 확립하고, 일반적인 토양미생물제제와의 근권정착효율을 비교평가하였다.

가. 육묘상에서의 미생물상 정밀분석

길항균을 처리한 묘의 근권에 길항균의 정착 및 증식성을 평가하기 이전에, 일반상토를 사용한 육묘시의 근권미생물상을 정밀분석하여 기초자료화하고자 한다. 따라서, 일반상토를 이용하여 배추와 오이를 육묘하면서 정기적으로 묘의 근권토양을 채취하여 미생물상을 균종별로 조사분석하였다. 즉, 육묘중인 배추와 오이 각각의 근권상토를 일정한 간격으로 채취하여 세균은 NA배지에, 곰팡이는 항생제가 첨가된 PDA배지

에, 방선균은 ISP-2배지에 도달하여 균종별로 Colony Forming Unit를 조사하는 방법으로 묘상의 근권미생물을 균종별로 경시적으로 분석하였다. 분석결과는 다음의 <표-48>, <표-49>과 같다

<표-48> 일반상토 육묘배추의 근권미생물 분석결과

균종별	균종별 경시적밀도 조사결과			
	5일	10일	15일	20일
세균	24 X 10 ⁷	35 X 10 ⁷	66 X 10 ⁷	74 X 10 ⁷
곰팡이	22 X 10 ⁴	28 X 10 ⁴	19 X 10 ⁴	21 X 10 ⁴
방선균	15 X 10 ⁵	135 X 10 ⁵	129 X 10 ⁵	141 X 10 ⁵

<표-49> 일반상토 육묘오이의 근권미생물 분석결과

균종별	균종별 경시적밀도 조사결과			
	5일	10일	15일	20일
세균	17 X 10 ⁷	26 X 10 ⁷	29 X 10 ⁷	24 X 10 ⁷
곰팡이	62 X 10 ⁴	58 X 10 ⁴	68 X 10 ⁴	59 X 10 ⁴
방선균	5 X 10 ⁵	54 X 10 ⁵	68 X 10 ⁵	55 X 10 ⁵

<표-48>은 배추 육묘의 근권미생물 분석결과로서, 세균은 초기 2.4억마리/g에서 20일 후 7.4억마리/g으로 증가하는 것으로 나타났고, 방선균 역시 초기 150만마리/g에서 20일 후 1,410만마리/g으로 증가하는 것으로 나타났다. 세균은 밀도가 점진적으로 증가하는 반면, 방선균은 10일차에 밀도가 폭발적으로 증가하고 이후부터는 그 밀도가 일정한 수준으로 계속 유지되는 것으로 나타났다. 그러나, 곰팡이의 경우에는 20일 경과후에도 초기와 비슷한 밀도를 유지하는 것으로 나타났다. 즉, 육묘가 생육하면서 근권에 다양한 Exudate를 분비하고 근권미생물이 이들 영양성분을 이용하여 번식하므로써 육묘일수가 경과할수록 근권미생물의 밀도가 증가하는 것으로 판단된다. 단, 곰팡이의 경우에는 균사체형태로 자라므로 colony forming units가 증가하지는 않았지만 세균류처럼 균체량은 증가하였을 것으로 예상된다.

<표-49>은 오이에 대한 결과로서, 균종별 밀도변화추이는 배추와 비슷하나, 세균의 경시적 밀도증가율이 비교적 낮고, 곰팡이는 밀도증감이 거의 없으며, 방선균은 절대 밀도가 배추보다 낮은 것으로 나타났다.

나. 육묘상에서의 길항균정착성 평가

항균상토가 입고병 방제효과를 발휘하기 위해서는 길항균이 육묘용 배지 또는 육묘 근권에 정착하여야 한다. 일반적으로 미생물의 근권정착은 처리후 수일이내에 이루어 지므로 본 시험에서는 항균상토에 배추와 오이종자를 파종한 후 7일차에 길항균의 근면정착성 및 육묘배지에서의 정착성을 평가하였다. 근면정착성은 뿌리외피부분과 뿌리에 붙어있는 상토 부분만을 채취하여 멸균수에 풀어서 길항균밀도를 측정하는 방법으로 조사하였으며, 육묘배지에서의 정착성은 뿌리분비물의 영향을 받지 않는 부분(뿌리로부터 1cm 이상 떨어진 부분의 상토)의 길항균밀도를 측정하는 방법으로 조사하였다. 길항균 밀도조사는 해당배지에서의 길항균의 특징적인 콜로니모양 및 색깔을 이용하여 계수하므로써 잡균과의 혼동을 회피하였으며, 대상시료를 멸균수에 풀어서 NA배지에 도말 및 Colony Forming Unit를 조사하여 초기의 길항균밀도와 비교하므로써, 길항균의 정착성을 평가하였다. 분석결과는 다음의 <표-50>, <표-51>과 같다.

<표-50> 배추 육묘상에서의 길항균정착성 평가 결과(파종후 7일차)

균종별	근면 정착성 조사결과(cfu/g)		육묘배지 정착성 조사결과(cfu/g)	
	초기	7일 후	초기	7일 후
KB-6	2.6 X 10 ⁷ (100.0)	2.3 X 10 ⁷ (88.5)	2.6 X 10 ⁷ (100.0)	1.7 X 10 ⁷ (65.4)
df-14	3.1 X 10 ⁷ (100.0)	5.3 X 10 ⁷ (171.0)	3.1 X 10 ⁷ (100.0)	4.2 X 10 ⁷ (135.5)
합계	5.7 X 10 ⁷ (100.0)	7.6 X 10 ⁷ (133.3)	5.7 X 10 ⁷ (100.0)	5.9 X 10 ⁷ (103.5)

* 괄호안의 숫자는 초기 길항균 밀도 대비 상대백분율(%)

<표-51> 오이 육묘상에서의 길항균정착성 평가 결과(과종후 7일차)

균종별	근면 정착성 조사결과(cfu/g)		육묘배지 정착성 조사결과(cfu/g)	
	초기	7일 후	초기	7일 후
KB-6	3.2 X 10 ⁷ (100.0)	5.8 X 10 ⁷ (181.3)	3.2 X 10 ⁷ (100.0)	3.8 X 10 ⁷ (118.8)
df-14	4.8 X 10 ⁷ (100.0)	4.9 X 10 ⁷ (102.1)	4.8 X 10 ⁷ (100.0)	4.4 X 10 ⁷ (91.7)
합계	8.0 X 10 ⁷ (100.0)	10.4 X 10 ⁷ (130.0)	8.0 X 10 ⁷ (100.0)	8.2 X 10 ⁷ (102.5)

* 괄호안의 숫자는 초기 길항균 밀도 대비 상대백분율(%)

배추육묘상에서 과종 7일 후의 길항균정착성 조사결과(표-50), 길항균종류 및 상토 부위별로 정착성이 서로 다름을 알 수 있다. 대체로 육묘배지보다는 근면에서의 정착성이 더 양호한 것으로 나타났는데, 이는 뿌리의 Exudate로 인하여 길항균이 근면에 정착하는데 더욱 유리하기 때문인 것으로 판단된다. 또한 KB-6의 정착율(65.4-88.5%) 보다는 df-14의 정착율(135.5-171.0%)이 훨씬 높은 것으로 나타났는데, 이는 배추에는 생리적특성으로 볼 때 길항균 df-14의 정착특성이 더욱 우수함을 나타낸다. 그러나, KB-6의 경우에도 정착율이 비교적 낮기는 하나, 이후 증식성만 양호하다면 입고병 방제효과를 나타내는데 별 문제가 없는 수치이다.

오이의 경우(표-51) 역시 길항균종류 및 상토부위별로 정착성이 서로 다름을 알 수 있다. 배추와 마찬가지로 육묘배지보다는 근면에서의 정착성이 더 양호한 것으로 나타났다. 특이한 점으로는 오이의 경우에는 배추와는 반대로 KB-6의 정착율(118.8-181.3%)이 df-14의 정착율(91.7-102.1%)보다 더 높은 것으로 나타났다. 따라서 작목별로 뿌리의 Exudate에 적합한 길항균이 서로 다름을 확인하였다.

이상의 결과로 볼 때, 잦은 관수에도 불구하고 길항균의 밀도가 일정한 수준을 유지하는 것으로 보아, 본 연구에서 선발한 2종의 길항균은 육묘상에서의 정착성이 매우 우수하다고 할 수 있다.

다. 육묘상에서의 길항균증식성 평가

이상의 시험에서는 육묘상에서의 길항균정착성을 평가하였으며, 평가결과 본 연구에서 선발한 세균 2종의 정착성이 매우 우수함을 확인하였다. 길항균이 육묘기간내내 입고병을 지속적으로 방제할 수 있기 위해서는, 근권에 정착한 길항균이 병원균을 지속적으로 억제할 수 있도록 길항균이 육묘상에서 증식하여야 한다. 따라서 본 연구에서는 항균상토를 처리한 후, 육묘초기부터 후기까지 일정한 주기로 길항균의 근권밀도를 조사하므로써 길항균증식성을 평가하였다. 길항균 밀도조사는 해당배지에서의 길항균의 특징적인 콜로니모양 및 색깔을 이용하여 계수하므로써 잡균과의 혼동을 회피하였다. 뿌리로부터 1cm이내의 상토층을 채취하여 멸균수에 풀어 NA배지에 도말 및 Colony Forming Unit를 조사하여 초기의 길항균밀도와 비교하므로써, 길항균의 증식성을 평가하였다. 본 시험에서는 길항균 뿐 아니라 상토내에 서식하는 모든 미생물을 균종별로 분석하였으며, 분석결과는 다음의 <표-52>, <표-53>와 같다.

<표-52> 배추 육묘상에서의 길항균증식성 조사 결과

구 분	균종별 밀도(cfu/g 상토)				
	세균			곰팡이	방선균
	기타세균	길항균(KB-6)	길항균(df-14)		
초기	1.3 X 10 ⁷	2.8 X 10 ⁵ (100.0)	7.2 X 10 ⁵ (100.0)	12 X 10 ⁴	2.5 X 10 ⁶
6일차	2.6 X 10 ⁷	1.3 X 10 ⁶ (464.3)	4.6 X 10 ⁶ (638.9)	15 X 10 ⁴	11.8 X 10 ⁶
12일차	4.2 X 10 ⁷	4.4 X 10 ⁷ (15,714.3)	12.9 X 10 ⁷ (17,916.7)	17 X 10 ⁴	12.1 X 10 ⁶
17일차	4.6 X 10 ⁷	5.9 X 10 ⁷ (21,071.4)	16.1 X 10 ⁷ (22,361.1)	15 X 10 ⁴	11.5 X 10 ⁶
23일차	4.1 X 10 ⁷	6.2 X 10 ⁷ (22,142.9)	15.9 X 10 ⁷ (22,083.3)	14 X 10 ⁴	15.3 X 10 ⁶

* 괄호안의 숫자는 초기 균밀도 대비 상대백분율(%)

배추 육묘상에서의 길항균증식성 조사 결과, 길항균의 증식성은 균종에 따라 약간의 차이는 있으나 2종의 길항균 모두 비교적 양호한 것으로 나타났다. KB-6의 경우, 초기밀도 대비 6일차에는 4.64배로 약간 증가하였으나, 12일차에는 157배, 17일차에는 210배, 23일차에는 221배로 증가하는 것으로 나타났다 한편, df-14의 경우, 초기밀도대비 6일차에 6.38배, 12일차에는 179배, 17일차에는 223배, 23일차에는 220배로 증가하는 것으로 나타났다. 길항균은 23일동안 약 220배의 밀도증가율을 나타내고 있는데, 이는 길항균이 영양성분이 제한된 환경하에서도 정착 및 증식이 양호함을 나타낸다고 할 수 있다. 이들 길항균은 증식하면서 항균물질을 분비하므로써 병원균의 생육을 억제할 수 있는 기본적인 특성을 가지고 있다고 할 수 있다. 여타 미생물의 경우, 세균은 점진적으로 밀도가 증가하고 있고, 곰팡이는 밀도증가가 거의 없으며, 방선균의 경우에는 6배 이상의 밀도증가율을 보이고 있다.

<표-53> 오이 육묘상에서의 길항균증식성 조사 결과

구 분	균종별 밀도(cfu/g 상토)				
	세균			곰팡이	방선균
	기타세균	길항균(KB-6)	길항균(df-14)		
초기	2.3×10^7	2.1×10^5 (100.0)	3.4×10^5 (100.0)	39×10^4	1.2×10^6
6일차	2.8×10^7	3.2×10^6 (1,523.8)	7.3×10^6 (2,147.1)	35×10^4	8.9×10^6
12일차	4.8×10^7	2.6×10^7 (12,380.9)	4.7×10^7 (13,823.5)	46×10^4	11.5×10^6
17일차	3.7×10^7	3.2×10^7 (15,238.1)	5.2×10^7 (15,294.1)	32×10^4	13.7×10^6
23일차	4.3×10^7	3.1×10^7 (14,761.9)	5.5×10^7 (16,176.4)	34×10^4	12.4×10^6

* 괄호안의 숫자는 초기 균밀도 대비 상대백분율(%)

배추와 마찬가지로 오이의 경우에도, 2종의 길항균 모두 비교적 양호한 증식성을 가지고 있음을 알 수 있다. KB-6의 경우, 초기밀도 대비 6일차에는 15.2배로 약간 증가하였으나, 12일차에는 124배, 17일차에는 152배, 23일차에는 148배로 증가하는 것으로 나타났다. 한편, df-14의 경우, 초기밀도대비 6일차에 21배, 12일차에는 138배, 17일차에는 153배, 23일차에는 162배로 증가하는 것으로 나타났다. 길항균은 23일동안 약 147-162배의 밀도증가율을 나타내고 있는데, 이는 길항균이 영양성분이 제한된 환경하에서도 정착 및 증식이 양호함을 나타낸다고 할 수 있다.

이상의 길항균 정착 및 증식성 시험결과로 볼 때, 길항균 df-14와 KB-6은 작목별로 약간의 차이는 있으나 정착성 및 증식성이 우수한 것으로 판단되며 따라서 항균상토의 입고병방제용 길항균으로 사용하기에 매우 적절한 특성을 가지고 있다고 할 수 있다.

라. 본포에서의 길항균 정착 및 증식을 평가

이상의 시험에서는 육묘상에서의 길항균 정착성 및 증식성을 평가하였다. 본 항에서는 길항균이 정착, 증식해 있는 육묘를 본포에 정식하고, 정식 후 본포에서의 길항균의 정착, 증식성을 평가하여 본포에서 발생할 수 있는 토양병해에 대해서도 길항력을 발휘할 수 있는지에 대한 예측을 하고자 한다.

본 항에서는 상기의 시험(다-3)에서 육묘한 배추(노랑김장배추)와 오이(백다다기) 육묘를 이용하여 배추농가와 오이농가에서 본포시험을 실시하였다. 즉, 농가의 본포에 길항균이 정착해 있는 배추와 오이를 각각 50주씩 정식한 후 주기적으로 근권미생물을 분석하여 길항균의 토양내 동태를 조사하였다. 본 시험은 정식전,후 농약을 처리하는 관행방법의 경우와 전혀 농약을 처리하지 않은 경우로 구분하여 실시하므로써, 농약처리가 길항균 정착 및 증식에 미치는 영향도 동시에 평가하였다. 길항균의 정착, 증식성 여부는 정식직후의 길항균 밀도를 기준으로 하여 비교평가하였으며, 10개지점의 근권토양을 채취하여 평균치를 산출하였다. 토양시료는 뿌리에 접해있는 모든 토양을 채취하여 균질화시켜 미생물분석을 실시하였으며, 길항균 밀도조사는 해당배지에서의 길항균의 특징적인 콜로니모양 및 색깔을 이용하여 계수하므로써 잡균과의 혼동을 피하였다. 시험결과는 <표-54>, <표-55>, <표-56>, <표-57>과 같다.

<표-54> 배추 본포에서의 길항균 정착 및 증식성 조사 결과(농약 처리 관행구)

구 분	균종별 밀도(cfu/g 토양)				
	세균			곰팡이	방선균
	기타세균	길항균(KB-6)	길항균(df-14)		
정식직후	8.3 X 10 ⁶	1.3 X 10 ⁶ (100.0)	1.5 X 10 ⁶ (100.0)	2 X 10 ⁴	2.1 X 10 ⁵
10일차	13.8 X 10 ⁶	2.1 X 10 ⁶ (161.5)	5.1 X 10 ⁶ (340.0)	3 X 10 ⁴	5.3 X 10 ⁵
20일차	62.7 X 10 ⁶	4.6 X 10 ⁶ (353.8)	6.5 X 10 ⁶ (411.1)	18 X 10 ⁴	4.4 X 10 ⁵
30일차	59.3 X 10 ⁶	6.6 X 10 ⁶ (507.7)	6.2 X 10 ⁶ (433.3)	21 X 10 ⁴	12.8 X 10 ⁵
40일차	53.2 X 10 ⁶	5.8 X 10 ⁶ (446.2)	5.3 X 10 ⁶ (353.3)	17 X 10 ⁴	11.5 X 10 ⁵

* 괄호안의 숫자는 초기 균밀도 대비 상대백분율(%)

* 정식 7일 전, 농약(살균제, 살충제)을 토양혼화처리

<표-54>에 나타난 것처럼, 길항균 2종은 배추 본포에서도 밀도가 높지는 않지만 지속적으로 증식하고 있음을 알 수 있다. 길항균 KB-6은 재배 40일차에 정식직후 대비 446.2%의 밀도증가율을 나타내며, df-14는 353.3%의 밀도증가를 나타내고 있는 것으로 볼 때, 농약을 처리한 관행포장임에도 불구하고 일정기간이 지난후부터는 길항균은 정상적인 증식활성을 나타내고 있다고 할 수 있다.

육묘종료시점의 길항균밀도는 10⁷ 이상의 수준이었으나 정식 직후에는 10⁶ 수준으로 떨어졌는데, 이는 농약처리에 의하여 90% 이상의 길항균이 사멸되었다는 것을 의미하며, 정식 10일차부터는 길항균의 밀도가 증가하기 시작하여 40일차에는 5-6 X 10⁶/g의 밀도가 되는 것으로 보아 시간이 지나면서 길항균의 증식활성이 회복됨을 알 수 있다.

토양내 기타세균은 정식직후부터 재배 40일차까지 계속 길항균보다 밀도가 훨씬 높게 나타나고 있는데, 이는 토양에 기존하는 세균류의 다양성에 기인하는 것으로 판단된다. 곰팡이의 경우, 토양살균제를 처리하였음에도 불구하고 밀도가 증가하고 있는데, 이는 토양살균제가 토양내 병원성곰팡이에 대한 방제효과가 매우 미흡하다고 하

는 것을 간접적으로 나타내는 것이다. 방선균의 경우, 길항균과 마찬가지로 농약에 의하여 많은 숫자가 사멸되는 것으로 나타났으며 또한 시간이 경과하면서 증식활성이 회복되는 것으로 나타났다.

<표-55> 배추 본포에서의 길항균 정착 및 증식성 조사 결과(농약 무처리 시험구)

구 분	균종별 밀도(cfu/g 토양)				
	세균			곰팡이	방선균
	기타세균	길항균(KB-6)	길항균(df-14)		
정식직후	31.7 X 10 ⁶	12.5 X 10 ⁶ (100.0)	10.2 X 10 ⁶ (100.0)	13X 10 ⁴	13.6 X 10 ⁵
10일차	43.3 X 10 ⁶	13.6 X 10 ⁶ (108.8)	11.1 X 10 ⁶ (108.8)	18 X 10 ⁴	42.6 X 10 ⁵
20일차	38.3 X 10 ⁶	25.2 X 10 ⁶ (201.6)	29.3 X 10 ⁶ (287.3)	24 X 10 ⁴	34.7 X 10 ⁵
30일차	39.8 X 10 ⁶	23.9 X 10 ⁶ (191.2)	34.7 X 10 ⁶ (340.2)	16 X 10 ⁴	46.4 X 10 ⁵
40일차	41.4 X 10 ⁶	25.3 X 10 ⁶ (202.4)	35.6 X 10 ⁶ (349.0)	19 X 10 ⁴	42.1 X 10 ⁵

* 괄호안의 숫자는 초기 균밀도 대비 상대백분율(%)

* 재배기간중 어떤 농약도 처리하지 않음

<표-55>는 농약을 처리하지 않은 상태에서 재배한 배추의 근권미생물 분석결과이며, 길항균 2종은 배추 본포에서도 비교적 높은 밀도를 유지하면서 지속적으로 증식하고 있음을 알 수 있다. 길항균 KB-6은 재배 40일차에 정식직후 대비 202.4%의 밀도증가율을 나타내며, df-14는 349.0%의 밀도증가를 나타내고 있다. 농약 처리하지 않은 경우가 농약을 처리한 경우보다 길항균 밀도증가율은 낮지만 길항균의 절대밀도는 월등히 높으므로, 토양전염성병해를 생물학적으로 보다 효율적으로 방제하기 위해서는 농약을 사용하지 않는 것이 바람직하다고 할 수 있다.

기타세균의 경우 초기부터 상당히 높은 밀도를 나타내고 있으며 이 밀도가 지속적으로 유지되는 것으로 나타났으며, 기타세균 대비 길항균의 밀도비율이 농약을 처리한 경우보다는 훨씬 높음을 알 수 있다. 방선균의 경우 역시 초기부터 밀도가 상당히

높으며 재배시간이 경과하면서 밀도가 지속적으로 증가하는 것으로 나타났다

이상의 결과로 볼 때, 본 연구에서 선발한 2종의 길항균(KB-6, df-14)은 배추 육묘장에서 뿐만 아니라 본포에서도 정착성 및 증식성이 양호함을 확인하였으며, 따라서 육묘상에서의 입고병은 물론, 본포에서도 각종 토양전염성 병해를 방제할 수 있는 기본적인 특성이 있는 것으로 판단된다.

<표-56> 오이 본포에서의 길항균 정착 및 증식성 조사 결과(농약 처리 관행구)

구 분	균종별 밀도(cfu/g 토양)				
	세균			곰팡이	방선균
	기타세균	길항균(KB-6)	길항균(df-14)		
정식직후	3.7 X 10 ⁶	2.7 X 10 ⁶ (100.0)	1.2 X 10 ⁶ (100.0)	3 X 10 ⁴	4.6 X 10 ⁵
10일차	11.3 X 10 ⁶	2.3 X 10 ⁶ (85.2)	2.7 X 10 ⁶ (225.0)	5 X 10 ⁴	3.7 X 10 ⁵
20일차	25.1 X 10 ⁶	4.6 X 10 ⁶ (170.4)	3.2 X 10 ⁶ (266.7)	21 X 10 ⁴	5.1 X 10 ⁵
30일차	67.7 X 10 ⁶	5.1 X 10 ⁶ (188.9)	5.6 X 10 ⁶ (466.7)	12 X 10 ⁴	8.3 X 10 ⁵
40일차	64.7 X 10 ⁶	4.9 X 10 ⁶ (181.5)	4.9 X 10 ⁶ (408.3)	13 X 10 ⁴	9.3 X 10 ⁵

* 괄호안의 숫자는 초기 균밀도 대비 상대백분율(%)

* 정식 7일전, 농약(살균제, 살충제)을 토양혼화처리

<표-56>는 관행적으로 농약을 처리하면서 본포에서 오이를 재배하면서 길항균 정착 및 증식성 조사한 결과로서, <표-54>의 배추의 경우와 대체로 유사한 양상을 보이고 있다. 즉, 길항균 2종은 오이 본포에서도 밀도가 약간 낮긴 않지만 지속적으로 증식하고 있음을 알 수 있다. 길항균 KB-6은 재배 40일차에 정식직후 대비 181.5%의 밀도증가율을 나타내며, df-14는 408.3%의 밀도증가를 나타내고 있는 것으로 볼 때, 농약을 처리한 관행포장임에도 불구하고 KB-6의 경우에는 20일차부터, df-14의 경우에는 10일차부터 길항균이 정상적인 증식활성을 나타내고 있다.

역시, 농약처리에 의하여 90% 이상의 길항균이 사멸되었다가 시간이 지나면서 길항

균의 밀도가 증가하기 시작하여 40일차에는 약 $4.9 \times 10^6/\text{g}$ 의 밀도가 되는 것으로 보아 시간이 지나면서 길항균의 증식활성이 회복됨을 재확인하였다.

토양내 기타세균, 곰팡이, 방선균의 경우, 배추의 경우와 유사한 양상으로 나타났다.

<표-57> 오이 본포에서의 길항균 정착 및 증식성 조사 결과(농약 무처리 시험구)

구 분	균종별 밀도(cfu/g 토양)				
	세균			곰팡이	방선균
	기타세균	길항균(KB-6)	길항균(df-14)		
정식직후	42.3×10^6	18.1×10^6 (100.0)	8.6×10^6 (100.0)	6×10^4	8.3×10^5
10일차	38.6×10^6	12.3×10^6 (68.0)	19.7×10^6 (229.1)	12×10^4	22.5×10^5
20일차	43.3×10^6	27.4×10^6 (151.4)	16.7×10^6 (194.2)	13×10^4	14.7×10^5
30일차	44.7×10^6	26.2×10^6 (144.8)	31.3×10^6 (363.9)	8×10^4	29.1×10^5
40일차	40.1×10^6	29.7×10^6 (164.1)	28.4×10^6 (330.2)	9×10^4	22.6×10^5

* 괄호안의 숫자는 초기 균밀도 대비 상대백분율(%)

* 재배기간중 어떤 농약도 처리하지 않음

<표-57>는 농약을 처리하지 않은 상태에서 재배한 오이의 근권미생물 분석결과이며, 길항균 2종은 오이 본포에서도 비교적 높은 밀도를 유지하면서 지속적으로 증식하고 있음을 알 수 있다. 길항균 KB-6은 재배 40일차에 정식직후 대비 164.1%의 밀도증가율을 나타내며, df-14는 330.2%의 밀도증가를 나타내고 있다.

기타세균과 방선균 모두 초기부터 상당히 높은 밀도를 나타내고 있으며 이 밀도가 지속적으로 유지되는 것으로 나타났다.

이상의 결과로 볼 때, 본 연구에서 선발한 2종의 길항균(KB-6, df-14)은 오이 육묘상에서 뿐만 아니라 본포에서도 정착성 및 증식성이 양호함을 확인하였으며, 따라서

육묘상에서의 입고병은 물론, 본포에서도 각종 토양전염성 병해를 방제할 수 있는 기본적인 특성이 있는 것으로 판단된다.

이상, 본 연구에서 선발한 2종의 길항세균의 본포에서의 정착성 및 증식성을 조사하였다. 2종의 길항균은 정도의 차이는 있지만 모두 본포에서도 정착 및 증식성이 비교적 양호함을 확인하였으며, 따라서 이들 길항균을 이용하여 항균상토를 제조하여 일반상토를 대체사용할 경우, 길항균이 육묘상에서 근권에 정착 및 증식하므로써 묘 입고병을 방제할 뿐 아니라 본포에서도 정착 및 증식하므로써 본포에서의 토양전염성 병해도 방제할 수 있을 것으로 판단된다.

마. 길항균 정착효율 증진을 위한 항균상토 사용법 확립

항균상토를 사용하여 소기의 목적을 달성하기 위해서는 우선 제조업체측에서 우수한 길항균을 함유하는 고품질의 항균상토를 제조하여야 한다. 그러나 농가에서는 사용자농민이 사용하는 방법에 따라 그 효과가 다르게 나타나므로, 항균상토 역시 사용방법을 최적화할 필요가 있다. 본 항에서는 육묘상에서 항균상토의 효과가 극대화될 수 있는 항균상토 사용방법을 최적화하고자 한다.

항균상토를 사용하여 길항균 정착, 증식효율을 제고하기 위한 방법으로는 육묘환경 조절 방법 또는 길항균증식용 배지첨가방법이 있을 수 있다. 육묘환경조절 방법은 특히 상토가 마르지 않도록 하여 길항균의 활성이 저하되지 않도록 하는 방법 또는 물을 줄 때 길항균증식용 영양성분을 같이 처리하여 길항균의 증식성을 제고하는 방법 등이 있다. 길항균증식용 배지 첨가방법은 길항균의 정착, 증식을 촉진할 수 있는 영양성분을 상토에 미리 투입하여 길항균의 먹이성분을 충분히 확보하므로써 육묘상에서 길항균의 활성을 제고하는 방법이다.

후자의 방법은 항균상토 제조시에 고려할 사항이므로 본 연구에서는 상토 건조방지용 습윤제 및 관수용 영양제를 최적화하여 항균상토 사용법을 확립하고자 한다.

1) 습윤제 선발

육묘과정중 상토가 마르는 현상은 비일비재하다. 즉, 하루 또는 이틀을 주기로 상토가 건조되며 농가에서는 주기적으로 물을 관수하여 적정수분을 유지하게 된다. 이렇게 상토가 주기적으로 건조하게 되면, 상토내 길항균이 수분스트레스를 받아 생육이

저조해질 수 있다. 또한, 상토가 한번 마르면 관수를 하여도 물이 상토내로 골고루 침투하기 어렵게 된다. 따라서, 본 연구에서는 적절한 습윤제를 선발함으로써, 상토의 마름현상을 억제하고 길항균의 수분스트레스를 방지하며, 마른상토의 침수력을 개선하고자 한다.

습윤제를 종류별, 농도별로 배추를 육묘중인 pot내 상토에 처리하여 상토가 마르는 시간을 비교하고(표-58), 이미 건조된 상토에 습윤제를 농도별, 종류별로 처리하여 상토가 물을 흡수하는 양상을 조사함으로써(표-59), 상토건조방지용 최적의 습윤제를 선발하였다. 또한 계속 적정한 수분을 유지하고 있는 상토 그리고 적습과 건조를 반복하고 있는 상토의 길항균밀도를 서로 비교하여(표-60) 길항균생육에 대한 수분의 영향을 조사하였다.

<표-58> 습윤제 처리에 따른 상토 건조 억제효과 평가결과

습윤제종류	처리농도(ppm)	pot전체가 마르는데 소요되는 시간(hr)	배추의 이상증상	비고
OA-1019	50	30	이상없음	28℃의 incubator에서 보관 pot밑으로 처리액이 침출되도록 충분히 관수
	100	48	이상없음	
	200	48	표면이 물러짐	
EUDO	50	24	이상없음	
	100	36	표면이 물러짐	
	200	36	표면이 물러짐	
NP-1025	50	18	이상없음	
	100	24	이상없음	
	200	48	표면이 물러짐	
HCA-1035	50	24	이상없음	
	100	48	표면이 물러짐	
	200	48	표면이 물러짐	
무처리		18	이상없음	

이상의 시험결과, 습윤제는 상토마름현상을 억제 또는 지연시킬 수 있는 것으로 나타났다. 습윤제의 종류 및 농도에 따라서 그 효과가 서로 다른 것을 알 수 있다. 대체로 습윤제의 농도가 높으면 배추표면이 무르는 등 약해가 생기므로 습윤제를 적정 농도로 사용해야 할 것으로 사료된다. 본 연구결과상으로는 OA-1019를 100ppm으로 처리하는 것이 가장 양호한 건조방지효과를 나타내고 있다.

<표-59> 습윤제 처리에 따른 기건조상토의 수분흡수 양상 조사결과

습윤제종류	처리농도(ppm)	수분을 흡수한 상토의 부피비율(%)	비고
OA-1019	50	80	◎ 과건조한 상토를 대상으로 시험 실시 ◎ 습윤제 희석액을 상토에 1분동안 연속 살포 후, 10분경과 시점에 상토가 물을 먹은 양상을 조사(물을 먹은 부피/상토 전체부피)
	100	90	
	200	90	
EUDO	50	60	
	100	80	
	200	90	
NP-1025	50	60	
	100	80	
	200	90	
HCA-1035	50	60	
	100	80	
	200	90	
무처리		30	

<표-59>에 나타난 바와 같이, 습윤제는 이미 건조한 상토의 수분흡수력을 향상시키는 특성이 매우 우수하며, 습윤제의 종류 및 농도에 따라서 그 효과가 서로 다르게 나타나는 것을 알 수 있다. 습윤제 농도가 높을수록 수분흡수력은 우수하나 작물에 대한 약해를 고려하면 <표-58>과 마찬가지로 OA-1019를 50-100ppm으로 처리하는 것이 가장 바람직하다고 할 수 있다.

<표-60> 상토내 수분환경이 길항균생육에 미치는 영향 조사결과

수분조건	길항균종류	길항균밀도(cfu/g)		비고
		3일차	7일차	
적정 수분조건	KB-6	5.7 X 10 ⁷ (167.6)	6.1 X 10 ⁷ (179.4)	◎ 가습기를 이용하여 적정수분을 유지
	df-14	2.8 X 10 ⁷ (133.3)	3.6 X 10 ⁷ (171.4)	
적습/건조 반복조건	KB-6	2.1 X 10 ⁷ (61.8)	1.8 X 10 ⁷ (52.9)	◎ 적습과 건조를 1일 주기로 반복
	df-14	1.2 X 10 ⁷ (57.1)	0.8 X 10 ⁷ (38.1)	

* 상토내 초기 길항균밀도 : KB-6 3.4 X 10⁷, df-14 2.1 X 10⁷

* 괄호안의 숫자는 초기 길항균밀도 대비 상대백분율(%)

<표-60>는 적정한 수분을 유지하고 있는 상토 그리고 적습과 건조를 반복하고 있는 상토의 길항균밀도를 서로 비교한 것으로서, 각각의 상토에 대하여 길항균 2종을 각각 접종한 후 3일과 7일차에 길항균밀도 조사하는 방법으로, 길항균생육에 대한 수분의 영향을 조사하였다. <표-60>에서 알 수 있듯이, 2종의 길항균 모두 적정수분조건에서의 밀도가 적습/건조 반복조건에서의 밀도보다 훨씬 높은 것으로 나타났다. 즉, 적정수분조건에서는 길항균의 밀도가 시험초기보다 증가하였으나, 적습/건조 반복조건에서는 시험초기보다 오히려 밀도가 감소하는 것을 알 수 있다. 따라서 항균상토의 시용효과를 극대화하기 위해서는 육묘상이 건조하지 않도록 유지해야 할 것으로 판단된다.

이상 <표-58, 59, 60>를 종합하면 다음과 같은 결론을 도출할 수 있다. 즉, 육묘상에 물줄 때 OA-1019를 100ppm농도로 혼합하여 약 2일 주기로 관수하므로써, 상토마름현상을 억제 또는 지연시킬 수 있으며 또한 이미 건조한 상토의 수분흡수력을 향상시킬 수 있다. 한편 항균상토의 시용효과를 제대로 보기 위해서는 육묘상이 과건조하지 않도록 해야 한다.

2) 영양제 효과 평가

오이 육묘중에 물줄 때, 길항균증식용 영양성분을 투입하여 영양제의 길항균증식용

제고효과를 평가하고자 한다. 즉, 시중에 유통되고 있는 영양제 5종을 입수하여 관수 시마다 투여한 후 길항균밀도를 조사하였으며 시험결과는 다음의 <표-61>과 같다.

<표-61> 영양제의 길항균증식을 제고효과 평가결과

영양제종류(상품명)	길항균밀도(cfu/g)		비고
	5일차	10일차	
나르젠	4.7 X 10 ⁷ (90.4)	4.9 X 10 ⁷ (90.7)	◎ 영양제는 사용법에 준한 권장희석배수 로 관수(2일 간격으 로 3회 관수처리)
트리코마	5.4 X 10 ⁷ (103.8)	5.3 X 10 ⁷ (98.1)	
빛사랑	5.1 X 10 ⁷ (98.1)	5.8 X 10 ⁷ (107.4)	
바이오키토	5.3 X 10 ⁷ (101.9)	5.5 X 10 ⁷ (101.9)	
아키아	5.6 X 10 ⁷ (107.7)	5.2 X 10 ⁷ (96.3)	
무처리	5.2 X 10 ⁷ (100.0)	5.4 X 10 ⁷ (100.0)	

* 상토내 초기 길항균밀도 : KB-6 3.4 X 10⁷ , df-14 2.1 X 10⁷

* 괄호안의 숫자는 무처리구의 길항균밀도 대비 상대백분율(%)

<표-61>은 영양제처리가 길항균증식을 제고에 미치는 효과를 평가한 결과인데, 어떤 영양제도 길항균의 밀도를 유의성있게 높이지 못하고 있음을 알 수 있다. 즉, 이들 영양제는 길항균의 적절한 영양성분이 되지 못하였거나 또는 관수와 동시에 용탈되므로써 제기능을 하지 못한 것으로 판단된다. 따라서 본 연구에서는 길항균증식용 영양제는 검토대상에서 제외하는 것으로 하였다.

바. 토양미생물제제와의 정착율 비교평가

항균상토를 사용하는 목적은 최소의 비용으로 길항균을 근권에 정착 및 증식시켜 육묘단계에서 발생할 수 있는 토양전염성 병해를 방제하는데 있다. 항균상토의 가장 중요한 장점은 이전의 시험결과에서도 확인되었듯이, 처리한 길항균이 매우 효율적으

로 근권에 정착한다는 점이다.

본 연구에서는 항균상토를 사용했을 때와 일반토양미생물제제를 사용했을 때의 육묘상에서의 길항균 근권정착성 및 증식성을 비교평가하였다. 즉, 상기와 같이 길항균을 서로 다른 방법으로 처리한 후, 주기적으로 근권미생물을 균종별로 분석하였다. 이 분석결과를 미생물(또는 길항균)을 처리하지 않은 경우와 비교하여 항균상토와 미생물제제의 효율성을 상대평가하였으며, 시험결과는 다음의 <표-62>과 같다.

<표-62> 항균상토와 토양미생물제제의 근권정착을 비교시험 결과

구분	균종별 근권미생물밀도 조사결과(cfu/g)					
	과종 후 5일			과종 후 10일		
	세균	곰팡이	방선균	세균	곰팡이	방선균
항균상토	58 X 10 ⁶ (148.7)	7 X 10 ⁴ (58.3)	29 X 10 ⁵ (138.1)	54 X 10 ⁶ (135.0)	11 X 10 ⁴ (64.7)	34 X 10 ⁵ (154.5)
토양 미생물제제-1	41 X 10 ⁶ (105.1)	12 X 10 ⁴ (100.0)	18 X 10 ⁵ (85.7)	39 X 10 ⁶ (97.5)	18 X 10 ⁴ (105.9)	24 X 10 ⁵ (109.1)
토양 미생물제제-2	42 X 10 ⁶ (107.7)	14 X 10 ⁴ (116.7)	22 X 10 ⁵ (104.8)	45 X 10 ⁶ (112.5)	16 X 10 ⁴ (94.1)	19 X 10 ⁵ (86.4)
토양 미생물제제-3	38 X 10 ⁶ (97.4)	11 X 10 ⁴ (91.7)	24 X 10 ⁵ (100.0)	42 X 10 ⁶ (100.0)	21 X 10 ⁴ (123.5)	23 X 10 ⁵ (104.5)
무처리	39 X 10 ⁶ (100.0)	12 X 10 ⁴ (100.0)	21 X 10 ⁵ (114.3)	40 X 10 ⁶ (105.0)	17 X 10 ⁴ (100.0)	22 X 10 ⁵ (100.0)

* 괄호안의 숫자는 무처리구의 균종별 미생물밀도 대비 상대백분율(%)

<표-62>은 항균상토와 토양미생물제제를 각각 육묘상에 처리하여 경시적으로 근권미생물상을 균종별로 분석한 것으로서, 토양미생물제제 3종을 처리한 경우는 세균, 곰팡이, 방선균 각각의 밀도가 무처리구와 크게 다르지 않은 것으로 나타났으며, 분석한 Colony의 양상(모양, 색깔 등)도 무처리구와 거의 같은 것으로 나타났다. 즉, 처리한 미생물이 정착 및 증식하였다면, 균종별 밀도 및 colony의 양상이 무처리구와는 다르게 나타나야 하는데 그렇지 않은 것으로 보아 미생물제제 3종을 처리한 경우는 처리

한 미생물이 근권에 정착 및 증식하지 못하였음을 간접적으로 알 수 있다.

반면, 항균상토를 처리한 경우는 세균, 곰팡이, 방선균의 밀도가 여타의 경우와 비교하여 매우 다르게 나타났다, 즉. 무처리구나 토양미생물제제를 처리한 경우에 비하여, 세균과 방선균의 밀도는 훨씬 증가하였으며 곰팡이의 밀도는 오히려 감소하고 있다. 이는 항균상토내 길항세균이 정착 및 증식하여 세균의 밀도가 증가한 것이고, 길항균이 증식하면서 분비한 항균물질에 의하여 곰팡이의 생육이 억제되어 곰팡이의 밀도는 감소한 것으로 해석할 수 있다. 또한 Colony의 양상으로 볼때도, 항균상토 처리구와 여타시험구는 colony의 모양이나 색깔이 서로 다르게 나타나, 결국 길항균이 증식하면서 여타미생물의 생육에 적지 않은 영향을 주었음을 예상할 수 있다.

본 연구결과, 길항균의 근권정착 및 증식을 도모하여 육묘중에 발생할 수 있는 각종 토양전염성 병해를 억제하기 위해서는, 육묘중에 토양미생물제제를 살포하는 것보다는 길항균이 혼합된 상토를 이용하여 육묘하는 것이 훨씬 바람직함을 알 수 있다.

제 20 절 길항균의 육묘에 대한 영향

1. 이론적·실험적 접근방법

가. 길항균이 종자발아에 미치는 영향평가

- 길항균의 작물에 대한 약해검증시험으로써, 무종자를 길항균 배양액에 침적처리한 후, 발아율을 평가하여 길항균의 종자발아율에 대한 영향성을 평가하였다.

나. 길항균이 육묘생육에 미치는 영향평가

- 길항균의 작물에 대한 약해검증시험으로써, 길항균배양액을 유작물에 관주 및 엽면처리한 후, 생육량을 조사하여 길항균의 작물생육에 대한 영향성을 평가하였다.

2. 연구내용

상토는 종자를 파종하여 묘를 키우는 자재이므로, 길항균을 함유하는 항균상토는 육묘과정중에 병리학적, 생리학적으로 안전해야 한다. 본 연구에서는 길항균배양액 자체의 종자발아에 대한 영향 및 유식물에 대한 영향을 평가하여 길항균의 안전성을 확인하고자 한다.

가. 길항균이 종자발아에 미치는 영향평가

본 연구에서 최종선발한 길항균 2종(KB-6, df-14)의 액체배양액을 무우종자와 오이종자에 처리하여 종자발아율에 대한 영향을 평가하였다. 즉, TSB배지에서 2일간 배양한 각각의 배양액을 100배, 300배, 500배 희석하여 gauze가 깔린 petri dish에 각각 10ml씩 처리하였다. 그리고 petri dish당 20개씩의 종자를 파종한 후 25℃에서 4일간 incubation하여 발아된 종자수를 조사하였으며 그 결과는 다음의 <표-63>와 같다.

<표-63> 길항균이 종자발아에 미치는 영향 평가결과

길항균	희석배수	길항균처리에 따른 종자발아율			
		무우종자		오이종자	
		발아된 종자수	발아율(%)	발아된 종자수	발아율(%)
KB-6	100	20	100	20	100
	300	19	95	20	100
	500	20	100	20	100
df-14	100	20	100	20	100
	300	20	100	19	95
	500	19	95	19	95
대조구		20	100	20	100

* 대조구 : 증류수만 처리

<표-63>에 나타난 것처럼, 길항균 2종의 배양액은 100, 300, 500배 희석액 모두에

서 배추와 오이종자발아에 대한 악영향은 전혀 없었다. 즉, 이들 길항균이 들어있는 항균상토를 이용하여 종자를 파종해도 종자발아에는 아무런 악영향이 없음을 확인하였다.

나. 길항균이 유묘생육에 미치는 영향평가

본 연구에서 최종선발한 길항균 2종(KB-6, df-14)의 액체배양액을 무우와 오이유묘에 처리하여 유묘생육에 대한 영향을 평가하였다. 즉, TSB배지에서 2일간 배양한 각각의 배양액을 100배, 300배, 500배 희석하여 파종 5일이 경과한 유묘에 2일 간격으로 2회 전면관수한 후, 15일간 육묘하면서 묘의 생육량을 분석하였다. 지하부생육량 조사는 뿌리생중량을, 지상부생육량 조사는 지표로부터 5cm이상의 유묘전체의 생중량을 측정하였으며, 시험결과는 다음의 <표-64>과 같다.

<표-64> 길항균이 유묘생육에 미치는 영향 평가결과

길항균	희석배수	길항균처리에 따른 유식물생육량(g)			
		무우		오이	
		지하부생중량	지상부생중량	지하부생중량	지상부생중량
KB-6	100	1.23(104.2)	24.1(110.0)	1.22(111.9)	22.2(109.9)
	300	1.20(101.7)	22.7(103.7)	1.19(119.2)	21.8(107.9)
	500	1.21(102.5)	21.1(96.3)	1.17(107.3)	21.3(105.4)
df-14	100	1.24(105.1)	23.8(108.7)	1.18(108.3)	23.2(114.9)
	300	1.23(104.2)	22.5(102.7)	1.16(106.4)	22.5(111.4)
	500	1.21(102.5)	22.2(101.4)	1.11(101.8)	21.3(105.4)
대조구		1.18(100.0)	21.9(100.0)	1.09(100.0)	20.2(100.0)

* 괄호안의 숫자는 대조구(증류수 처리)의 생육량 대비 상대백분율(%)

<표-64>에 나타난 바와 같이, 길항균은 배추와 오이유묘의 생육에 악영향을 전혀 미치지 않음을 알 수 있으며, 오히려 희석배수가 진하면 유묘의 생육을 촉진시키는 것으로 나타났다. 즉, 길항균 KB-6 100배액은 무우의 지하부생육량을 4.2%, 지상부생육량을 10.0% 증가시켰으며, 오이의 지하부생육량을 11.9%, 지상부생육량을 9.9% 증가시키는 것으로 확인되었다. 한편, 길항균 df-14 100배액은 무우의 지하부생육량을

5.1%, 지상부생육량을 8.7% 증가시켰으며, 오이의 지하부생육량을 8.3%, 지상부생육량을 14.9% 증가시키는 것으로 나타났다. 이러한 유묘생육촉진효과는 길항균배양액내에 함유되어 있는 2차대사사물에 기인하는 것으로 판단된다.

이상의 결과를 종합하면, 길항균 2종은 종자발아에 대하여 어떠한 악영향도 주지 않으며, 유묘의 생육에 대해서는 오히려 지상부 및 지하부의 생육을 촉진시키는 것으로 나타나, 길항균을 함유하는 항균상토는 농가에서 사용하기에 매우 적합하다고 할 수 있다.

제 21 절 시제품의 효과검증(육묘장에서의 실증시험)

1. 이론적·실험적 접근방법

가. 농약대비 입고병 방제효과 평가

- 육묘 종료시점에 건전묘 대비 병든묘의 비율을 조사하여 농약(입고병방제용) 대비 방제효과를 평가하였다.

나. 작물생육촉진효과 평가

- 육묘 종료시점에 지상부 및 지하부생중량을 조사하여 일반상토처리구 대비 생육량을 비교평가하였다.

2. 연구내용

지금까지 입고병원균에 대한 길항력이 우수하고 근권정착성 및 증식성이 우수하며, 종자 및 유작물에 대하여 악영향이 없는 길항균 2종을 최종선발하였다. 또한, 길항균이 함유된 항균상토 제조공정을 확립하여 2종의 길항균이 함유된 시제품 1톤을 제조

하여 다양한 적용시험을 실시한 결과, 본 시제품은 육묘상의 입고병을 방제하고 육묘의 생육을 촉진시킬 수 있는 기본적인 특성을 보유하고 있음을 확인하였다. 따라서, 본 연구에서는 시제품을 실제로 육묘장에 적용하여 현장수준에서의 성능을 평가하고자 한다.

가. 항균상토의 농약대비 입고병 방제효과 평가

오이 자가육묘 농가에서 항균상토를 이용하여 육묘시험을 실시하였으며, 육묘 종료시점에 건전묘 대비 병든묘의 비율을 조사하여 농약(입고병방제용) 대비 방제효과를 비교평가하였다. 즉, 오이농가의 자가육묘장에서 본 연구의 항균상토 시제품을 이용하여 640주의 파종용 트레이를 준비하였으며 여기에 관행적인 방법으로 오이종자(백다다기)를 파종하였다. 파종후 농가의 육묘장에서 관행적인 방법으로 관리하여 육묘하였으며 육묘기간 중 입고병 방제용 농약은 시약하지 않았고, 필요할 경우에는 습윤제(OA-1019)가 100ppm 포함된 물을 관수하도록 하였다. 한편 비교구로서는 동일한 양의 종자를 별도로 파종하여, 습윤제 사용없이 입고병용 농약(지오판) 처리구와 농약 무처리구를 별도로 관리하였다. 육묘종료시점에 항균상토처리구와 관행구의 오이입고병 발생주수를 조사, 비교하여 항균상토의 효과를 평가하였으며, 참고로 항균상토처리구의 근권내 길항균밀도를 분석하여 농가현장에서의 길항균의 정착 및 증식성을 재검증하였다. 시험결과는 다음의 <표-65>, <표-66>와 같다.

<표-65> 항균상토의 입고병 방제효과 평가결과

구분	입고병 방제효과			비고
	건전주수	이병주수	이병율(%)	
항균상토	603	37	5.78	◎ 본포에 이식 가능한묘는 모두 건전주로 분류하였음
일반상토 (농약처리)	607	33	5.15	
일반상토 (농약무처리)	360	280	43.75	

* 육묘기간 중, 습윤제가 들어있는 물을 3회 관수함

<표-65>에 나타난 바와 같이, 항균상토를 처리한 경우(이병율 5.78%), 농약처리 일반상토의 이병율(5.15%)과 거의 유사하게 나타났으며, 농약을 처리하지 않은 일반상토의 이병율은 43.75%로서 매우 높게 나타났다. 위의 결과로 볼 때, 항균상토는 입고병 방제용 농약을 처리한 경우와 거의 같은 방제가를 나타내므로써, 항균상토의 입고병 방제효과는 매우 우수하다고 할 수 있다.

<표-66> 육묘중 근권내 길항균밀도 조사결과

구분	길항균 종류별 밀도(cfu/g)			
	초기	5일차	10일차	20일차
KB-6	2.6 X 10 ⁷ (100.0)	4.3 X 10 ⁷ (165.4)	5.5 X 10 ⁷ (211.5)	5.3 X 10 ⁷ (203.8)
df-14	2.1 X 10 ⁷ (100.0)	4.9 X 10 ⁷ (233.3)	5.8 X 10 ⁷ (276.2)	6.5 X 10 ⁷ (309.5)

* 괄호안의 숫자는 초기 길항균밀도 대비 상대백분율(%)

오이 육묘중에 근권의 길항균밀도를 조사한 결과는 <표-65>와 같으며, 2종의 길항균은 시간이 경과하면서 밀도가 증가하고 있는데, 이는 이전의 pot수준에서의 근권내 길항균밀도 조사결과와 유사한 양상이다. 육묘 20일차에 KB-6은 초기밀도 대비 약 2배, df-14는 약 3배의 밀도를 나타내고 있다. 이러한 근권의 길항균밀도증가는 입고병 방제효과와 매우 깊은 관련이 있는 것으로 판단된다.

나. 항균상토의 육묘성적 개선효과 평가

오이 자가육묘 농가에서 항균상토를 이용하여 육묘시험을 실시하였으며, 육묘 종료 시점에 육묘성적을 평가하였다. 즉, 오이농가의 자가육묘장에서 본 연구의 항균상토 시제품을 이용하여 320주의 파종용 트레이를 준비하였으며 여기에 관행적인 방법으로 오이종자(백다다기)를 파종하였다. 파종후 농가의 육묘장에서 관행적인 방법으로 관리하여 육묘하였으며 육묘기간 중 입고병 방제용 농약은 시약하지 않았고, 필요할 경우에는 습윤제(OA-1019)가 100ppm 포함된 물을 관수하도록 하였다. 한편 비교구로서는

일반상토를 이용하여 입고비용 농약(지오판)을 시약하면서 관리하였다. 육묘종료시점에 항균상토처리구와 관행구의 생육량(지상부생중량 및 지하부생중량) 및 묘의 품질을 조사, 비교하여 항균상토의 육묘성적 개선효과를 평가하였다. 시험결과는 다음의 <표-67>과 같다.

<표-67> 항균상토의 육묘성적 개선효과 평가결과

구분	항균상토의 오이 육묘성적 개선효과			
	지하부생중량	지상부생중량	묘의 품질	묘의 상품율(%)
항균상토 처리구	1.75(122.4)	34.3(123.4)	양호	96.4
일반상토 처리구	1.43(100.0)	27.8(100.0)	양호	94.2

* 괄호안의 숫자는 일반상토처리구의 생육량 대비 상대백분율(%)

항균상토의 육묘성적 개선효과 평가결과는 <표-67>과 같으며, 육묘성적은 항균상토를 사용한 경우가 일반상토를 사용한 경우보다 더 우수함을 알 수 있다. 즉 항균상토를 사용한 경우, 일반상토보다 지하부생육량은 22.4%, 지상부생육량은 23.4% 증가한 것으로 나타났으며, 묘의 품질은 서로 비슷하였으나, 묘의 상품율은 항균상토처리구가 96.4%로 일반상토를 처리한 경우보다 2.2% 높게 나타났다.

이상의 결과로 볼 때, 항균상토는 입고병 방제효과 뿐 아니라, 육묘성적도 부분적으로 개선한다는 사실을 확인할 수 있었다.

제 22 절 근권의 미생물분석

1. 이론적·실험적 접근방법

가. 항균상토 시용에 따른 근권미생물상 변화 조사

- 길항균이 포함된 항균상토는 근권의 여타미생물의 생리, 생태에도 영향을 줄 수 있다.
- 따라서, 항균상토를 처리하여 재배중인 묘를 대상으로, 주기적으로 근권부를 채취하여 전체적인 미생물밀도를 균종별로 분석하였다.

나. 본포 정식후의 근권미생물상 분석

- 길항균이 포함된 항균상토는 본포 정식후에도 근권의 여타미생물의 생리, 생태에도 영향을 줄 수 있다.
- 따라서, 항균상토를 처리하여 재배한 묘를 본포에 정식한 후, 주기적으로 근권부를 채취하여 전체적인 근권미생물밀도를 균종별로 분석하였다.

2. 연구내용

항균상토는 길항균을 고밀도로 함유하는 기능성상토로서, 이 길항균은 육묘기간중 근권부의 여타미생물상의 생리, 생태에도 영향을 줄 수 있다. 육묘중 길항균은 근권미생물상의 일정비율을 항상 점하게 되므로, 본포 정식 후에도 이 길항균은 본답의 근권미생물상에도 큰 영향을 주게 된다. 따라서 본 연구에서는 길항균 처리에 따른 근권미생물상의 변화를 정밀분석하여 항균상토의 기능을 미생물학적으로 분석, 규명하고자 한다.

가. 항균상토 시용에 따른 육묘근권미생물상 변화 조사

길항균이 포함된 항균상토는 육묘중 근권의 여타미생물에 대해서 생리, 생태학적으로 영향을 주므로, 본 연구에서는 항균상토를 처리하여 재배중인 배추묘를 대상으로, 주기적으로 근권부를 채취하여 전체적인 미생물밀도를 균종별로 분석하고 근권미생물상의 변화를 이론적으로 규명하고자 한다. 특히, 효모류와 방선균은 현미경을 이용하

여 정확하게 분석하였다. 분석시기마다 5개지점의 시료를 채취하여 근권미생물상의 변화를 정밀분석하여 항균상태의 기능을 미생물학적으로 분석, 규명하고자 하며, 분석결과는 다음의 <표-68>과 같다.

<표-68> 항균상태 처리 배추묘의 근권미생물상 정밀분석결과

균종별	육묘기간중 균종별 근권미생물상 분석결과(X10,000cfu/g)					
	초기	2일차	5일차	10일차	15일차	20일차
세균	3,290 (100)	4,680 (142)	4,510 (137)	6,670 (203)	7,920 (241)	7,560 (230)
곰팡이	24 (100)	21 (88)	16 (67)	12 (50)	14 (58)	11 (46)
효모류	18 (100)	15 (83)	21 (117)	22 (122)	17 (94)	21 (117)
방선균	220 (100)	620 (282)	710 (323)	640 (291)	780 (355)	760 (345)
합계	3,762 (100)	5,336 (142)	5,257 (140)	7,344 (195)	8,731 (232)	8,352 (222)

* 괄호안의 숫자는 초기 미생물밀도 대비 상대백분율(%)

항균상태를 처리하여 육묘중인 배추의 근권미생물상을 정밀분석한 결과는 <표-68>과 같다. 육묘기간동안 총 6회에 걸쳐 근권미생물분석을 실시하였으며, 근권시료는 뿌리가 감싸고 있는 상토 전체를 채취하여 균질화시켜 시료마다 5반복으로 미생물분석을 실시하였다. 전체적으로 세균은 밀도가 증가하는 추세, 곰팡이는 밀도가 감소하는 추세, 효모류는 밀도증감이 거의 없는 추세, 방선균은 밀도가 대폭 증가하는 추세인 것으로 나타났다.

세균의 경우, 초기 대비 2일차에는 42% 증가하고 5일차에는 37% 증가하였으며, 10일차에는 103% 증가하였다. 즉, 세균은 밀도가 한단계 level-up된후 며칠간 유지되다가 다시 2단계 상승하는 것을 알 수 있다. 그리고 20일차까지 103-141%의 밀도상승이 지속적으로 유지되어 7-8 X 10⁷/g 수준이 되는 것으로 나타났다. 즉, 세균밀도는 어느 한계치 이상으로 증가하지 않음을 알 수 있다.

곰팡이의 경우, 세균과는 반대로 육묘기간이 경과하면서 밀도가 감소하여 20일차에

는 초기 대비 약 50% 수준이 되는 것을 알 수 있다. 곰팡이는 10일차에 밀도가 절반으로 줄어들어 이 밀도가 육묘종료시점까지 계속 유지되는 것으로 나타났다. 즉, 곰팡이의 경우에도 밀도가 어느 한계치 이하로 감소하지는 않음을 알 수 있다.

효모류의 경우, 육묘기간중 밀도의 증감이 거의 없는 것으로 나타났는데, 이는 길항균은 효모의 밀도변화에 영향을 주지 않음을 의미하는 것으로 해석할 수 있다. 즉, 20일차까지 초기 대비 약 20%의 편차를 두고 증감을 반복하고 있다.

방선균의 경우, 길항균처리에 의하여 밀도가 가장 많이 증가하는 균종인 것으로 나타났다. 즉, 2일차부터 초기 대비 182%가 증가하였고, 이후 계속해서 증가하여 육묘종료시점에는 약 250%가 증가한 것으로 나타났다. 이러한 결과로 볼 때, 방선균은 상토 원료내에 이미 고밀도로 존재하고 있었음을 알 수 있다. 한편, 이렇게 방선균의 밀도가 대폭 증가한 것은 세균이 번식하면서 체외로 분비하는 2차대사산물을 방선균이 빠른 속도로 흡수이용하였기 때문이거나, 상토원재료가 방선균의 증식에 적합한 성분으로 구성되어 있거나, 또는 방선균이 묘의 분비물에 대한 이용성이 우수하였기 때문인 것으로 판단된다.

미생물간의 밀도증감에 대한 이론적분석결과는 다음과 같다. 즉, 세균 특히 길항균이 근권에서 증식하면서 항균성 2차대사산물을 분비하였을 것으로 판단되며, 이들 물질은 근권에서 곰팡이의 생육을 억제하였을 것으로 판단된다. 따라서, 세균의 밀도가 증가하면서 곰팡이의 밀도는 감소한 것으로 추측된다. 당연히, 이들 곰팡이중에는 입고병을 유발하는 병원성곰팡이(Fusarium, Rhizoctonia, Pythium)가 포함되어 있을 것이므로, 이전의 결과에 나타났듯이, 항균상토 처리에 의하여 입고병이 방제된 것으로 해석할 수 있다.

육묘기간이 경과하면서 근권미생물밀도가 약 2.2배 증가했는데, 이는 묘가 이용해야 할 영양분을 미생물이 이용하였다는 것을 의미하므로 따라서 묘의 생육이 일시적으로 위축되었을 수도 있으나, 실제로는 묘의 생육이 전혀 위축되지 않고 오히려 점차적으로 생육이 개선되는 것으로 나타났다. 따라서, 길항균은 식물이 직접 이용할 수 없는 유기물을 분해하여 스스로 번식하면서 그 분해산물을 식물이 이용할 수 있게 하므로써 묘의 건전생육을 도모하는 것으로 판단된다.

나. 항균상토 재배묘의 본포 정식후의 근권미생물상 분석

길항균이 포함된 항균상토를 이용하여 재배한 묘를 본포에 정식하면, 길항균이 유

묘의 근권에 묻어 본포로 옮겨지므로 본답의 근권미생물에도 많은 영향을 주게 된다. 따라서, 본 연구에서는 항균상태를 처리하여 재배한 묘를 본포에 정식한 후, 주기적으로 근권부를 채취하여 본답에서의 근권미생물을 균종별로 분석하였다.

즉, 상기의 시험에서 육묘한 배추묘를 하우스에 옮겨심은 후, 40일동안 주기적으로 근권토양시료를 채취하여 이전과 같은 방법으로 본답의 근권미생물상을 정밀분석하였으며, 분석결과는 다음의 <표-69>과 같다.

<표-69> 본포 이식후 배추의 근권미생물상 정밀분석결과

균종별	배추 본답에서의 균종별 근권미생물상 분석결과(X10,000cfu/g)					
	초기	5일차	10일차	20일차	30일차	40일차
세균	7,180 (100)	1,210 (17)	3,670 (51)	4,150 (58)	3,690 (51)	4,260 (59)
곰팡이	12 (100)	2 (17)	37 (308)	86 (717)	94 (783)	88 (733)
효모류	19 (100)	6 (32)	11 (58)	13 (68)	8 (42)	10 (53)
방선균	720 (100)	80 (11)	290 (40)	320 (44)	280 (39)	310 (43)
합계	7,931 (100)	1,298 (16)	4,008 (51)	4,569 (58)	4,072 (51)	4,668 (59)

* 괄호안의 숫자는 초기 미생물밀도 대비 상대백분율(%)

<표-69>은 본포 이식후 배추의 근권미생물상 정밀분석결과로서, 곰팡이류를 제외한 모든 균종은 작기종료시점에 초기 대비 절반정도의 밀도를 유지하고 있음을 알 수 있다. 본답에서는 무사마귀병 방제를 위하여 후론사이드 분제를 토양혼화처리하였고, 노균병방제용 살균제와 나비목해충 방제용 살충제를 관행적으로 처리하였으며, 이들 농약처리로 인하여 대부분의 미생물이 악영향을 받아 근권내 밀도가 저하된 것으로 판단되며, 또한 본포토양의 생물학적 환경이 좋지 않아 근권미생물상이 전반적으로 불량하게 나타난 것으로 판단된다.

세균과 방선균은 분석결과의 양상이 매우 유사한데, 5일차에 밀도가 급격히 저하되어 11-17% 수준이 되었으며, 이후 서서히 회복되기 시작하여 40일차에는 43-59% 수준까지 증가한 것으로 나타났다. 이 결과로 볼 때, 무사마귀병 방제용 토양혼화처리

농약인 후론사이드는 토양세균류에도 심한 악영향을 주는 것으로 판단된다. 그러나 후론사이드를 처리하였음에도 불구하고 재배 30일 이후부터 무사마귀병이 발생하여 배추상품율이 65% 수준에 불과하였으며, 따라서 토양병해방제용 농약의 방제가가 높지 않음을 알 수 있었다.

곰팡이류의 경우, 5일차에는 밀도가 대폭 저하되었다가 10일차 이후부터는 밀도가 폭증하고 있는데, 이는 곰팡이를 생물학적으로 제어할 수 있는 세균과 방선균의 밀도가 상대적으로 낮았기 때문인 것으로 판단된다.

이상과 같은 결과로 볼 때, 항균상토를 이용하여 재배한 묘를 본포에 이식하게 되면 길항균을 포함하는 세균의 밀도가 초기밀도만큼 유지되기 어렵다는 사실을 알 수 있다. 이는 농가에서 관행적으로 사용하는 농약으로 인하여 상당수의 미생물이 사멸되기 때문이며, 또한 연작 및 비료와 농약의 남용으로 토양의 생물학적 환경이 불량해지므로써 미생물의 증식이 활발하게 이루어지기 어렵기 때문이다.

따라서, 항균상토의 효과가 본포에서도 나타나게 하기 위해서는 농약과 화학비료의 남용을 자제하고, 토양에 유기물을 시용하여 토양의 생물학적 환경을 개선시켜, 근권에서의 미생물의 활성을 높여주어야 할 것이다.

제 23 절 본포에서의 효과검증

1. 이론적·실험적 접근방법

가. 본포에서의 토양병해 방제효과 평가

- 오이 자가육묘 농가에서 항균상토를 이용하여 재배한 육묘를 상토가 포함된 채로 본포(200평 비닐하우스 1동)에 이식하여 오이를 재배(시험구)하였다. 나머지 4동에는 일반상토로 재배한 오이묘를 정식하여 항균상토처리 오이(대조구)와 비교하였다.

나. 본포에서의 생육촉진효과 평가

- 항공상토를 이용하여 재배한 오이유묘를 상토가 포함된 채로 본포에 이식하여 오이를 재배(시험구)하여, 일반상토로 재배한 경우와 비교하였다.
- 항공상토시험구와 일반상토대조구는 모든 재배관리를 서로 동일하게 하였다. 즉, 정식전에 살균제와 살충제를 토양처리하였으며, 비료와 농약은 관행적으로 처리하였다. 오이 4차수확부터 8차수확까지 오이의 수확량을 조사하고 시기별로 수확한 오이를 상품, 중품, 하품으로 나누어 등급별로 조사하여, 시험구와 대조구간의 수량 및 품질을 비교하였다.

다. 작물생산성 평가, 분석

- 항공상토 사용에 따른 농가 추가비용과 생산성증가에 따른 추가수익금을 정밀하게 분석하여 항공상토제품이 제조자 뿐 아니라 소비자에게도 경제적인지를 검증하고자 하였으며, 본 연구에서는 오이에 대한 항공상토의 경제성을 상토비용, 유묘(또는 수확물)판매액 및 추가인건비 등을 중심으로 분석하였다.

2. 연구내용

항공상토를 이용하여 재배한 유묘는 길항균이 근권에 다량 포진해 있으므로, 원리적으로는 본포에 정식할 때 길항균이 묘에 묻어서 이식되므로, 이식후에도 정식묘의 근권에는 길항균이 정착해 있게 된다. 본포로 이송된 길항균은 본포의 토양환경 및 재배환경이 적합할 경우에는 지속적으로 증식하여 본포에서 발생할 수 있는 각종 토양병해를 방제할 수 있다. 물론, 본포는 각종 비료와 농약 등 길항균의 활성을 저해할 수 있는 물질이 투입될 수 밖에 없는 환경이므로, 길항균이 제역할을 할 수 있는지는 불확실하다. 따라서, 본 연구에서는 이를 검증하고자 항공상토를 이용하여 재배한 묘를 본포에 이식한 후, 토양병해방제효과, 본작물의 생육촉진효과 등을 비교조사하고 작물의 생산성을 평가분석하였다.

가. 본포에서의 토양병해 방제효과 평가

오이 자가육묘 농가에서 항균상토를 이용하여 재배한 유묘를 상토가 포함된 채로 본포(200평 비닐하우스 1동)에 이식하여 오이를 재배(시험구)하였다. 나머지 4동에는 일반상토로 재배한 오이묘를 정식하여 항균상토처리 오이(대조구)와 비교하였다.

항균상토 시험구는 정식전에 토양처리살균제를 투여하지 않았으며, 길항균의 토양내 증식을 도모하기 위하여 200평에 1.5톤의 퇴비를 투여한 후 로타리하였다. 비료와 엽면살포용 농약은 관행적으로 처리하였다. 오이수확 종료시점에 토양병 발생양상을 조사하여 대조구와 비교하였다.(대조구는 정식전에 살균제와 살충제를 토양혼화처리하는 물론 모든 시약과 시비를 관행적인 방법으로 실시하였다) 항균상토 처리구의 토양병해 방제효과 평가결과는 다음의 <표-70>와 같다.

<표-70> 항균상토 처리묘의 본포에서의 토양병해 방제효과 평가결과

병해별		발병양상		비고
발병부위별	병명	일반상토 대조구	항균상토 처리구	
지하부 /지제부병해	덩굴쪼김병	△	X	◎ 항균상토 처리구와 일반상토 대조구 모두 관행적인 방법으로 농약 처리(단, 항균상토처리구는 토양처리살균제는 시약하지 않음) ◎ 발병양상결과는 농가의 소견을 참고하여 작성함
	역병	O	△	
	세균성시들음병	△	△	
지상부병해	노균병	O	O	
	탄저병	△	△	
	흑성병	△	△	
	만고병	△	△	
	흰가루병	O	O	
	갯빛곰팡이병	O	O	

O : 병이 다발하여 농약을 3회 이상 살포한 경우

△ : 예년에 비하여 병발생이 약하여 농약을 2회 이하로 살포한 경우

X : 병이 거의 발생하지 않아 예방용 농약을 1회 이하로 살포한 경우

<표-70>는 항균상토를 이용하여 재배한 오이유묘를 본포에 이식한 후, 본작물에 발생하는 각종병해 발생현황을 요약한 결과이다. 지상부병해에 대해서는 항균상토처

리구와 일반상토대조구간에 차이가 없는 것으로 나타났으나, 지하부/지체부병해에 대해서는 항균상토처리구에는 토양처리용 살균제를 시약하지 않았음에도 불구하고 덩굴쪄김병과 역병의 발생이 줄어든 것으로 나타났다.

시험농가의 오이 수확시점까지의 농약살포일지를 분석한 결과, 지체부병해인 덩굴쪄김병 방제를 위하여, 일반상토대조구인 4동의 비닐하우스에는 각동마다 해당농약(이프로수화제)을 2회 살포하였으나, 항균상토처리구에는 같은 농약을 1회만 살포한 것으로 확인되었다. 또한, 역병방제용 농약(웅달샘)의 경우에도 일반상토대조구에는 각동마다 4회 살포하였으나, 항균상토처리구에는 2회만 살포한 것으로 확인되었다. 이상의 결과로 볼 때, 항균상토에서 육묘한 묘의 근권에 서식하고 있던 길항균이 본포에서도 항균활성을 발휘하여 토양내 병원균의 번식을 억제한 것으로 판단되며, 따라서 병원균의 토양내 밀도가 감소하여 병발생이 적었던 것으로 사료된다. 그러나 세균병인 세균성시들음병의 발생양상은 처리구와 대조구간에 차이가 없었다. 또한 지상부에 발생하는 노균병, 탄저병, 흑성병, 만고병, 흰가루병, 잿빛곰팡이병 등에 대해서도 처리구와 대조구의 발병양상은 비슷한 것으로 나타났다. 즉, 이들 지상부병해의 병원균 역시 토양내에서 월동하여 포자가 엽면에 붙어서 병을 일으키지만, 발병부위가 지상부인 관계로 처리구의 효과가 없었던 것으로 판단된다.

참고로, 덩굴쪄김병은 *Fusarium*에 의하여 발병되는 병으로서 병원균이 피해경엽과 함께 토양속에서 균사 또는 후막포자형태로 잔존하면서 전염원으로 작용하여 뿌리와 줄기에 병을 일으킨다. 역병은 조균류인 *Phytophthora*에 의하여 발병되며, 토양속에서 월동한 난포자가 강우나 관수와 함께 유출되어 유주자를 방출하여 특히 줄기의 지체부를 가해하여 병을 일으킨다.

나. 본포에서의 생육촉진효과 평가

상기의 사-1과 동일한 농가에서 실시하였으며, 항균상토를 이용하여 재배한 오이유묘 300주를 상토가 포함된 채로 본포에 이식하여 오이를 재배(시험구)하였다. 별도로 일반상토로 재배(대조구)한 오이묘 300주를 같은 하우스의 다른 위치에 정식하여 항균상토처리 오이와 비교하였다.

항균상토시험구와 일반상토대조구는 모든 재배관리를 서로 동일하게 하였다. 즉, 정식전에 살균제와 살충제를 토양처리하였으며, 비료와 농약은 관행적으로 처리하였다. 오이 4차수확부터 8차수확까지 시장출하 가능한 오이의 수확량을 조사하고 시기별로

수확한 오이를 상품, 중품, 하품으로 나누어 등급별로 조사하여, 시험구와 대조구간의 수량 및 품질을 비교하였으며 조사결과는 다음의 <표-71>과 같다.

<표-71> 향균상토 처리묘의 본포에서의 수확량 및 품질조사 결과

처리구분	수량/품질	수확시기별 수확량 및 품질					
		4차수확	5차수확	6차수확	7차수확	8차수확	총계
향균상토 시험구	수량	118	159	132	149	152	703
	상,중,하품의 비율	3 : 6 : 1	4 : 5 : 1	4 : 5 : 1	2 : 7 : 1	2 : 6 : 2	-
일반상토 대조구	수량	96	133	118	115	126	588
	상,중,하품의 비율	4 : 5 : 1	3 : 5 : 2	3 : 6 : 1	3 : 6 : 1	4 : 5 : 1	-

<표-71>은 향균상토를 이용하여 재배한 묘를 본포에 이식하여 본포재배하면서 수확량 및 품질을 일반상토를 사용한 대조구와 비교조사한 결과이다. 총 5회에 걸친 수확량을 서로 비교한 결과, 향균상토처리구는 703개, 일반상토대조구는 588개로서, 향균상토처리구가 20.7% 증수되었다. 이는 길항균이 근권에서 오이에 유용한 생리활성물질을 분비하여 오이의 작물생리가 활성화되어 나타난 현상이거나 또는 길항균이 토양병원균을 억제하여 병해로 인한 수확량손실이 적었기 때문인 것으로 판단된다.

한편, 수확한 오이를 품질등급별로 조사한 결과, 처리구와 대조구간에 유의성 있는 차이를 확인할 수 없었다.

결론적으로 길항균이 함유된 향균상토는 오이의 수확량을 상당량 증가시키는 특성이 있음을 확인하였다.

다. 작물생산성 평가, 분석

향균상토를 이용하여 육묘를 함에 있어서 육묘장 및 자가육묘농가 입장에서는, 입고병방제효과 및 생육촉진효과가 있는 반면 향균상토 구입에 따른 추가부담이 생기

므로, 경제성분석을 실시하여 상토 소비자 입장에서 실질적인 이익이 있는지를 확인해야 한다. 또한, 항균상토에서 재배한 묘를 구입하여 본포에서 재배하는 농민의 입장에서는 약간 비싼 값을 주고 묘를 구입하게 되므로 작물수확량 증가가 비싼 묘값을 상쇄할 수 있는지에 대한 분석이 필수적이다. 이러한 부분은 본 연구과제의 사업화를 위해서도 반드시 검증해야 할 사안이므로, 본 연구에서는, 항균상토 사용에 따른 농가 추가비용과 생산성증가에 따른 추가수익금을 정밀하게 분석하여 항균상토제품이 제조자 뿐 아니라 소비자에게도 경제적인지를 검증하고자 한다. 이하, 오이에 대한 항균상토의 경제성을 상토비용, 유묘(또는 수확물)판매액 및 추가인건비 등을 중심으로 분석하였다(본 연구는 상기 사-2의 오이농가를 대상으로 경제성 분석을 실시한 것이므로, 여타 농가 또는 여타 작목의 경우에는 분석결과가 다르게 나타날 수 있다)

1) 육묘장 및 자가육묘농가 입장에서의 경제성분석

육묘장에서는 상토를 포함한 각종 자재를 이용하여 육묘하여 묘를 판매하는 사업이며, 본 항에서는 40구 트레이 200판을 기준으로 수지현황을 일반상토(6,000원/50리터 1포)와 항균상토(8,000원/50리터 1포)를 각각 비교분석하였으며 그 결과는 다음의 <표-72>과 같다

<표-72> 육묘장 및 자가육묘농가 입장에서의 경제성분석

구분	항목	일반상토 사용시	항균상토 사용시
지출	상토비용	50L 10포 = 60,000원	50L 10포 = 80,000원
수입	유묘판매액	300원/본 X 8,000본 = 2,400,000원	310원/본 X 8,000본 = 2,480,000원

<표-72>에 나타난 바와 같이, 항균상토 사용에 따른 추가지출금액(80,000원-60,000원)은 20,000원이며, 추가수입금액(2,480,000-2,400,000)은 80,000원이므로, 60,000원의 추가순익이 발생하는 것으로 분석되었다. 일반상토는 50리터 1포당 6,000원이며, 항균상토는 8,000원으로 산정하였으며, 항균상토로 재배한 묘는 일반묘(300원/본)보다 10원 비싼 310원/본으로 산정하여 계산하였다.

2) 묘를 구입하여 본포재배하는 농가 입장

농가는 육묘장으로부터 묘를 구입하여 본포재배하게 되며, 본 항에서는 1000평(오이 2000주) 기준으로 수지현황을 일반상토묘(300원/본)와 항균상토묘(310원/본)를 이용하여 비교분석하였으며 그 결과는 다음의 <표-73>와 같다.

<표-73> 농가입장에서의 경제성분석

구분	항목	일반상토 사용시	항균상토 사용시
지출	유묘 구입금액	300원/주 X 2000주 = 600,000원	310원/주 X 2000주 = 620,000원
수입	오이판매액	20,000원/박스 X 2500박스 = 50,000,000원	20,000원/박스 X 2560박스 = 51,200,000원 (항균상토 사용시 수확량 2.38% 증가)

<표-73>에 나타난 바와 같이, 항균상토묘 사용에 따른 추가지출금액(620,000원-600,000원)은 20,000원이며, 오이판매에 따른 추가수입금액(51,200,000-50,000,000)은 1,200,000원이므로, 1,180,000원의 추가순익이 발생하는 것으로 분석되었다. 560박스의 오이가 추가로 수확되므로 여기에 소요되는 인건비(1,000원/박스 X 560박스) 560,000원을 제하면, 순수한 추가수익금(1,180,000-560,000)은 620,000원이 된다. 이전의 시험 결과에서 항균상토 사용시 수확량이 2.38% 증가한다는 결과를 기초로 하여 계산하였다.

제 24 절 길항균 양산시스템 확립

1. 이론적·실험적 접근방법

항균상토란 입고병원균에 대한 항균력이 우수한 길항균을 포함하는 기능성상토를

말하므로, 항균상토를 양산하기 위해서는 우선 길항균 양산시스템부터 확립하여야 한다. 본 연구에서는 길항균양산을 위한 시스템(제조공정 및 양산설비 규격 등)을 확립하고자 한다.

2. 연구내용

가. 길항균 제조공정

길항균의 효율적인 제조공정은 다음과 같다.

1) 길항균 원균 배양

가) 세균(Bacillus) 배양

본 연구에서 선발한 길항세균 원균을 발효조에서 3-4일간 배양하여 포자를 형성시킨다.

나) 곰팡이(Trichoderma) 배양

본 연구에서 선발한 길항곰팡이 원균을 고체배양방식으로 7-8일간 배양하여 포자를 함유하는 고체배양물을 제조한다. 즉, 고체배양용 용기(약 2리터 용량)에 배지를 채운 후, 멸균하고, 종균을 접종하여 고체배양 전용 항온실에서 7-8일간 배양하여 고체배양물을 제조한다.

2) 배양액(물) 흡착 및 건조

가) 세균의 경우

혼합건조기내에 적정량(배양액 중량의 30-50배)의 탈지강 또는 밀겨 등을 투입한 후, 포자화된 배양액을 노즐분사하는 방식으로 골고루 흡착시킨다. 흡착이 완료되면 45℃를 초과하지 않는 온도도 가열하면서 16-20시간 혼합하여 수분함량 10-12% 내외로 건조시킨다.

나) 곰팡이의 경우

혼합건조기내에 적정량(배양액 증량의 30-50배)의 탈지강 또는 밀겨 등을 투입한 후, 곰팡이 고체배양물을 단순투여하여 45℃를 초과하지 않는 온도도 가열하면서 16-20시간 혼합하여 수분함량 10-12% 내외로 건조시킨다.

3) 길항균 밀도 조사

길항균배양액 건조물 단위증량당 길항균 밀도를 조사한다..

4) 증량 및 포장

길항균 최종제품의 단위증량당 길항균밀도규격에 맞도록, 적절한 증량제(탈지강, 밀겨, 제오라이트, 질석 등)를 이용하여 길항균건조물을 증량한 후, 규정된 증량으로 포장한다.

5) 품질검사

완제품의 품질을 분석한다. 분석항목은 길항균밀도, 잡균밀도, 수분함량, 경시적 물성안정성 등으로 한다.

6) 출하

품질검사결과 합격된 batch에 대하여 완제품으로 출하한다

나. 제품양산용 설비설계 및 원자재 규격

길항균을 효율적이고 안정적으로 양산하기 위해서는 최적의 양산설비가 필요하며, 본 연구에서는 양산용 설비종류 및 규격을 검토하였다. 또한 길항균배양 및 완제품 제조를 위한 원자재 규격을 설정하였다.

<표-74> 길항균 양산용 설비규격(1일 생산량 1톤 기준)

설비명	필요규격	용도
fermenter	- 발효조 총용량 300L - 발효조재질 SUS 316 - 무균공기 공급장치	길항세균(Bacillus) 배양
혼합건조기	- 총용량 5,000L - 건조기 재질 SUS 304 - 온도 및 교반속도 조절장치	길항균 혼합, 건조
배지충진기	- 충전속도 20-30개/분 - 중량 감지장치	곰팡이 배양용 배지 충전
멸균기	- 가로,세로,높이 2mX3mX2m - 121℃에서 2시간 멸균 - 전기보일러 장착	곰팡이 배양용 배지 멸균
배양실	- 가로,세로,높이 4mX6mX2m - 항온항습장치, 선반장치	길항곰팡이 배양
배합기	- 총용량 3,000L - 재질 SUS 304 - 교반장치 및 배출장치	길항균건조물의 증량, 혼합
포장기	- 비닐 자동포장(중량감지 장치) - 컨베이어 장착	완제품 포장

<표-75> 길항균 제품 제조용 원자재 규격

원자재명	규격	비고
포도당	식품용	길항세균 배양용 배지
대두분	식품용	길항세균 배양용 배지
무기염류	식품용	길항세균 배양용 배지
피트모스	수입품, 함수율 5% 이하, pH 6.0 이하, EC 0,3 이하	길항곰팡이 배양용 배지
탈지강	함수율 12% 이하, 입도 20mesh 이하	길항곰팡이 배양용 배지 증량제, 흡착제
밀겨	함수율 12% 이하, 입도 20mesh 이하	길항곰팡이 배양용 배지 증량제, 흡착제
고체배양용기	Polypropylene 재질, 2L 이하, 기체투과성 cap	길항곰팡이 배양용 용기
포장지	polyethylene 재질	완제품 포장

제 25 절 항균상토 제조공정 확립

1. 이론적·실험적 접근방법

상토는 여러 가지 원자재를 혼합하여 대량(업체별로 연간 수십만포 규모)으로 제조하는 농자재로서, 대량생산제품이므로 제조공정을 바꾸거나 공정을 추가하는 것이 쉬운 일이 아니다. 따라서, 본 연구에서는 기존 상토 제조공정중에 많은 비용이 소요되지 않으면서 간단한 방법으로 길항균을 투입하기 위하여 길항균 전처리공정, 길항균

투입공정, 길항균 투입설비, 길항균 투입방법 등을 최적화하고자 한다.

2. 연구내용

입고병원균에 대한 항균특성이 우수한 길항균을 함유하는 상토(항균상토)를 효율적으로 제조하기 위하여 본 연구에서는 항균상토의 제조공정을 확립하였다.

가. 일반상토 제조공정

1) 원료투입비율 및 material balance

일반적으로 상토의 주요원료는 제조회사마다 약간 차이는 있으나, Coconut peat, Peat moss, 입상Zeolite, 분말Zeolite, 비료성분 등이다. 즉, 제조회사별로 이들 성분의 종류 및 투입비율을 달리하여 서로 다른 목적의 상토(원예용, 수도용)를 제조하게 된다. 또한 육묘기간이 긴 작목과 짧은 작목의 경우에도 서로 다른 비율의 원료를 사용하게 된다. 본 연구에서는 항균상토의 최적제조공정을 도출하고자 충청북도 소재 상토회사의 고추육묘용 상토 제조공정을 조사하였으며, 그 공정은 다음과 같다.

- ① 압축된 Cocopeat를 파쇄기를 이용하여 잘게 부순 후, 분말형의 Zeolite를 혼합한다
- ② 상기 혼합물에 요소 3과 제일인산가리 5의 비율로 구성된 비료물을 혼합하되, 상토에 투입할 총비료량의 70%만을 혼합한다
- ③ 별도로, 상토에 투입할 총비료량의 30%를 흡착시킨 입상Zeolite를 준비하여 ②의 혼합물에 혼합한다
- ④ 이를 포장하여 출하한다

2) 전체적인 material balance

일반상토 1톤 제조시의 전체적인 물질수지는 다음의 표-75과 같다

<표-76> 일반상토 제조 material balance

원료명	투입중량(kg)	투입비율(%)
Cocopeat	200	20
입상Zeolite	250	25
분말Zeolite	300	30
요소	20	2
제일인산가리	30	3
물	200	20
합계	1,000	100

나. 향균상토 제조공정

상기의 일반상토 제조공정을 참고로 하여 길항균을 함유하는 향균상토 제조공정을 확립하였다

1) 원료투입비율 및 material balance

일반적으로 길항균제제내 길항균밀도는 매우 높다(4-5억마리/g). 또한, 상토 단위 중량당 투입할 길항균제제의 중량비율이 매우 적다(상토 중량 대비 0.5-1.0%). 따라서, 길항균을 상토에 직접 투입하기보다는 상토원료로 사용되는 재료(제오라이트 등)를 이용, 증량하여 투입하는 것이 바람직하다. 또한 향균상토 제조시 고려해야 할 중요한 사항중의 하나는 길항균을 어느공정중에 투입해야 하는지의 문제이다. 즉, 기존 제조공정의 작업성에 영향을 주지 않으면서 효율적으로 길항균을 투입해야 하는 것이다. 이러한 점들을 고려하여 다음과 같은 향균상토 제조공정을 확립하였다

- ① 길항균 5kg을 지하수 5L와 함께 분말Zeolite 100kg에 골고루 혼합하여 길항균증량물을 제조한다.
- ② 이 길항균증량물을 과채된 Cocopeat를 이송하는 컨베이어의 중간부분으로 연속적으로 투입한다. 즉, 길항균 증량물 이송전용 컨베이어를 이용하여 길항균이 Cocopeat에 고르게 혼합되도록 하므로써, 길항균이 상토전체에 고르게 분포되도록 할 수 있는 것이다
- ③ 나머지 공정은 일반상토제조시와 동일하게 실시하여 최종적으로 향균상토를 제조

한다.

결국, 향균상토 제조시의 추가공정은 길항균증량물 제조공정과 길항균증량물 이송 공정이며, 이같은 공정으로 향균상토를 제조하므로써, 추가작업량을 최소화하여 경제성을 확보할 수 있는 것이다.

2) 전체적인 material balance

향균상토 1톤 제조시의 전체적인 물질수지는 다음의 표-77와 같다

<표-77> 향균상토 제조 material balance

원료명	투입증량(kg)	투입비율(%)
길항균제제	5	0.5
Cocopeat	200	20
입상Zeolite	250	25
분말Zeolite	300	30
요소	20	2
제일인산가리	30	3
물	195	19.5
합계	1,000	100

다. 향균상토 제조용 설비 규격

향균상토 제조를 위해서는 길항균증량물 제조공정과 길항균증량물 이송공정이 필요하며 여기에 필요한 설비의 규격은 다음과 같다.

<표-78> 항균상토 제조용 설비(추가 필요설비)

설비명	필요규격	용도
배합기	- 배합기 총용량 1000L - 발효조재질 SUS/Steel - 혼합 및 배출장치	길항균증량물 제조
이송컨베이어	- 총길이 5m의 이동형 - 이송속도 조절형	길항균증량물 이송

제 26 절 품질관리 기법 개발

1. 이론적·실험적 접근방법

농자재의 효율적인 생산 및 판매관리를 위해서는 제품의 품질관리기법이 설정되어, 품질조사를 한 후 일정한 품질의 제품이 출하되어야 한다. 항균상토 역시 이러한 과정을 통하여 출하되어야 하며, 항균상토는 신개념의 제품이므로 새로운 품질관리기법이 개발되어야 한다. 즉, 길항균제제의 품질관리(함수율, 길항균밀도, 제품의 물성, 입도 등)와 항균상토의 품질관리(함수율, 길항균밀도, 저장안정성 등)를 위한 규격화된 기법을 개발하고자 한다.

가. 길항균제제의 품질관리

길항균제제는 적정온도내에서 장기보관시에도 길항균이 사멸하지 않아야 하며, 제품의 변질이 없어야 한다. 이러한 품질관리를 위해서는 적절한 품질관리 기법이 개발되어야 하며, 따라서 본 연구에서는 길항균제제의 품질관리항목별 표준을 설정하고자 한다.

1) 함수율

가) 분석방법

길항균제제(분말상) 시료 100-200g을 채취하여 dry oven을 이용하여 105℃에서 3시간 건조 후, 감량된 중량을 측정하여 시료내 함유율을 측정한다.

나) 표준치 범위

함수율 표준치는 10-12%이어야 한다. 함유율이 10% 이하가 되면 과건조로 인하여 길항균포자가 사멸할 수 있으며 또한 길항균증량물 제조시에 작업성이 불량해진다. 반대로 함유율이 12% 이상이 되면, 수분활성도가 높아져 길항균 및 잡균이 번식하여 제품의 물성이 불량해질 뿐 아니라 길항균의 경시적생존율이 급격히 저하된다.

2) 길항균밀도

가) 분석방법

길항균제제 시료 10g을 멸균증류수를 이용하여 10배수로 연속 희석하여 TSA(Tryptic Soy Agar)배지에 도말한 후, 2-3일간 배양하여 형성된 콜로니를 계수한다(단, 목적 길항균과 다른 형태를 콜로니는 계수에서 제외한다). 이러한 분석은 제품 제조후 15-30일 간격으로 180일동안 실시하여 제품내 길항균의 생존성을 경시적으로 조사한다.

나) 표준치 범위

길항균제제의 균밀도는 $4-5 \times 10^8/g$ 의 범위가 적정하며, 저온 및 상온조건하에서 180일 경과후에도 95% 이상의 길항균이 생존하여야 한다.

3) 제품의 물성

가) 분석방법

제품을 저온(4℃), 향온(25℃), 고온(50℃), 변온(10-40℃) 조건에서 3개월간 보관하면서 제품이 덩어리지는지의 여부, 제품표면에 곰팡이발생 여부, 악취발생 여부, 내용물 변색 여부 등을 달관조사한다.

나) 표준치 범위

저온, 향온, 고온, 변온조건 모두에서 3개월후에도 초기의 물성을 그대로 유지하여

여야 한다. 즉, 3개월동안 제품이 덩어리지지 않아야 하며, 곰팡이가 피지 않아야 하며, 악취 및 변색이 생기지 않아야 한다.

4) 제품의 입도

가) 분석방법

제품을 20메쉬 표준망체로 쳤을 때 통과되는 양의 부피비율과 30메쉬 표준망체로 쳤을 때 통과되는 양의 부피비율을 계산한다.

나) 표준치 범위

제품을 20메쉬 표준망체로 쳤을 때, 통과분이 부피비로 90% 이상이 되어야 하며, 30메쉬 통과분은 20% 이하이어야 한다.

5) 오염균밀도

가) 분석방법

길항균제제 시료 10g을 멸균증류수를 이용하여 10배수로 연속 희석하여 ①항생제가 첨가(streptomycin 10ppm, ganamycin 5ppm)된 TSA(Tryptic Soy Agar)배지에 도말한 후, 3-5일간 배양하여 형성된 진균 콜로니를 계수하고 ②TSA(Tryptic Soy Agar)배지에 도말한 후, 2-3일간 배양하여 형성되는 세균콜로니중에서 길항균콜로니 숫자를 뺀 나머지를 계수하여, 상기 ①과 ②를 합산한다.

나) 표준치 범위

상기 ①과 ②의 합산이 오염균의 숫자이며, 이 비율이 길항균밀도의 3%를 초과하지 않아야 한다.

나. 항균상토의 품질관리

1) 길항균밀도

가) 분석방법

항균상토 제품시료 100g을 멸균증류수를 이용하여 10배수로 연속 희석하여 TSA(Tryptic Soy Agar)배지에 도말한 후, 2-3일간 배양하여 형성된 콜로니를 계수한다(단, 목적 길항균과 다른 형태를 콜로니는 계수에서 제외한다). 이러한 분석은 제품 제조후 15-30일 간격으로 180일동안 실시하여 제품내 길항균의 생존성을 경시적으로 조사한다.

나) 표준치 범위

길항균제제의 균밀도는 $0.8-1.0 \times 10^6/g$ 의 범위가 적정하며, 저온 및 상온조건하에서 180일 경과후에도 95% 이상의 길항균이 생존하여야 한다

2) 함수율

가) 분석방법

항균상토 제품시료 500-1000g을 채취하여 dry oven을 이용하여 105℃에서 3시간 건조 후, 감량된 중량을 측정하여 시료내 함수율을 측정한다.

나) 표준치 범위

함수율 표준치는 $20 \pm 2\%$ 이어야 한다. 함수율이 너무 낮으면 제조공정상 원하는 제품물성을 얻기가 어려우며, 반대로 함수율이 너무 높으면 저장중에 제품이 딱지거나 곰팡이가 발생할 소지가 있다.

3) 저장안정성

가) 분석방법

시제품을 180일간 야외조건에서 보관하면서 15일 간격으로 길항균밀도, 표면물성(곰팡이발생 및 딱지는 현상 여부), 냄새 등을 조사한다.

나) 표준치 범위

180일 경과후에도 제품내에서 95% 이상의 길항균이 생존해 있어야 하며, 잡균의 밀도는 표준치(길항균밀도의 3%)를 초과하지 않아야 한다. 또한 당해기간동안 제품을 보관하면서 제품 표면에 곰팡이가 발생 하거나 딱지는 현상이 발생하지 않아야 하며,

제품에서 냄새(악취)가 나지 않아야 한다.

다. 장기유통시 길항균 생존율 개선방안 연구

항균상토와 일반상토의 차이점은 상토내 길항균함유 여부이며, 항균상토는 이 길항균은 제품내에서 장기간 생존해 있어야만 그 효과를 나타낼 수 있는 것이다. 따라서, 본 연구에서는 항균상토의 장기유통시 길항균의 생존성을 높힐 수 있는 방안에 대하여 강구하고자 한다.

1) 길항균의 포자화

미생물중에서 포자를 형성할 수 있는 특성을 가진 종류의 길항균을 항균상토 제조용으로 사용하여야 한다. 즉, 미생물의 포자는 극한조건(고온, 저온, 과건조, 자외선노출 등)에서도 죽지 않고 생존할 수 있는 능력이 탁월하며, 따라서, 항균상토 유통중에 이러한 악조건에 맞닥뜨리는 경우가 많으므로, 항균상토 제조시에는 이러한 포자형태의 길항균을 사용하여야 한다. 이러한 방법으로 포자를 이용하므로써, 항균상토 장기유통시 길항균의 안정성을 확보 할 수 있는 것이다.

2) 상토의 함수율

미생물의 생존성에 영향을 주는 가장 큰 요인은 길항균을 함유하는 제품의 함수율이다. 제품의 함수율이 높으면 길항균의 포자가 발아하여 번식하다가 결국은 사멸하게 될 뿐 아니라 제품을 변질시키는 주요요인이 된다. 따라서 항균상토 제품의 함수율을 $20\% \pm 2\%$ 이내로 유지하여 길항균이 제품내에서 발아하는 것을 억제하여야 한다. 이러한 방법으로 제품의 함수율을 조절하므로써, 항균상토 장기유통시 길항균의 안정성을 확보 할 수 있는 것이다.

3) 항균상토 제조공정

상토 제조공정중에 수분을 첨가하는 공정이 있는데, 첨가하는 수분의 분산성은 매우 중요하다. 즉, 수분이 골고루 분산되지 않아서 특정 부분에 수분이 과량 존재하게 되면 그 부분을 중심으로 길항균이 발아하여 활동하므로써 길항균이 사멸되거나 제품이 변질될 수 있다. 따라서 수분 공급시 미세노즐을 통하여 살포하고 충분한 교반을 통하여 수분이 고르게 분산될 수 있도록 하여야 한다. 이러한 방법으로 첨가하는 수

분의 분산성을 높여주므로, 향균상토 장기유통시 길항균의 안정성을 확보 할 수 있는 것이다

제 27 절 경제성분석(일반상토 대비)

1. 연구내용

가. 상토 제조원가 비교분석

향균상토는 일반상토에 길항균을 첨가한 제품으로서, 첨가하는 길항균만큼의 제조비용이 추가된다. 본 항에서는 향균상토 제조시의 추가비용을 산출하고자 하며, 비용산출내역은 다음의 표-79과 같으며, 결국 향균상토는 일반상토 대비 포당 200원의 제조비용이 추가 소요되는 것으로 나타났다

<표-79> 향균상토 제조시의 추가비용산출내역

항목	내역
길항균제 제조원가	1,000원/kg
길항균제 투입공정비 및 인건비	1,000원/kg
상토 1포(50L)당 길항균제 투입량	100g/포
향균상토 제조시의 추가비용	200원/포

나. 상토 판매가 비교분석

일반상토의 경우, 이윤을 포함한 공장출고가는 회사마다 차이는 있으나, 대략 3,800원-4,000원/포(50L) 정도이다. 따라서, 표-6에 나타난 바와 같이 향균상토를 제조하기 위해서는 포당 200원의 비용이 추가 소요되므로 상토제조사측에서 기존과 동일한 이윤을 취하기 위해서는 대략 4,000원-4,200원/포(50L) 정도의 출고가를 책정하여야 한

다. 즉, 향균상토 출고가 역시 일반상토보다 200원이 높아지게 된다.

다. 농가 육묘비용 비교분석

본 항에서는 육묘장 및 자가육묘농가 입장에서의 경제성분석을 실시하였다. 육묘장 및 자가육묘농가에서는 상토를 포함한 각종 자재를 이용하여 육묘하게 되는데, 본 항에서는 40구 트레이 200판을 기준으로 수지현황을 일반상토(6,000원/50리터 1포)와 향균상토(8,000원/50리터 1포)를 각각 비교분석하였으며 그 결과는 다음의 표-80, 표-81과 같다. 표-80은 향균상토 판매가격을 일반상토와 동일하게 할 경우의 비교표이며, 표-81은 향균상토 판매가격을 일반상토보다 포당 2,000원 높게 책정했을 때의 비교표이다.

<표-80> 육묘비용 비교분석(향균상토 및 일반상토 판매가격 동일)

항목	상토비용/평균 공장출고가	육묘판매액
일반상토(10포) 사용시	60,000원/39,000원	①300원/본 X 8,000본 = 2,400,000원
향균상토(10포) 사용시	60,000원/41,000원	①300원/본 X 8,000본 = 2,400,000원 ②310원/본 X 8,000본 = 2,480,000원

표-80에 나타난 바와 같이 향균상토 판매가를 일반상토와 동일하게 하고 향균상토를 이용하여 만든 묘의 판매단가를 310원(일반상토 육묘단가 300원)으로 할 경우, 육묘장 또는 농가는 80,000원의 추가이익이 발생하여, 이들 소비자들로서는 같은 가격으로 고급상토(향균상토)를 이용하면서도 추가적인 이익을 거둘 수 있는 장점이 있다. 다만, 이 경우 상토 판매대리점의 이윤이 줄어들게 되는데, 향균상토의 입고병 방제효과 등과 같은 품질이 검증되어 농가의 반응이 양호하게 나오게 되면 판매량이 많아져 충분한 수익을 거둘 수 있을 것으로 판단된다 .

<표-81> 육묘비용 비교분석(항균상토 가격 = 일반상토 가격 + 2000원)

항목	상토비용/평균 공장출고가	육묘판매액
일반상토(10포) 사용시	60,000원/39,000원	①300원/본 X 8,000본 = 2,400,000원
항균상토(10포) 사용시	80,000원/41,000원	①300원/본 X 8,000본 = 2,400,000원 ②310원/본 X 8,000본 = 2,480,000원

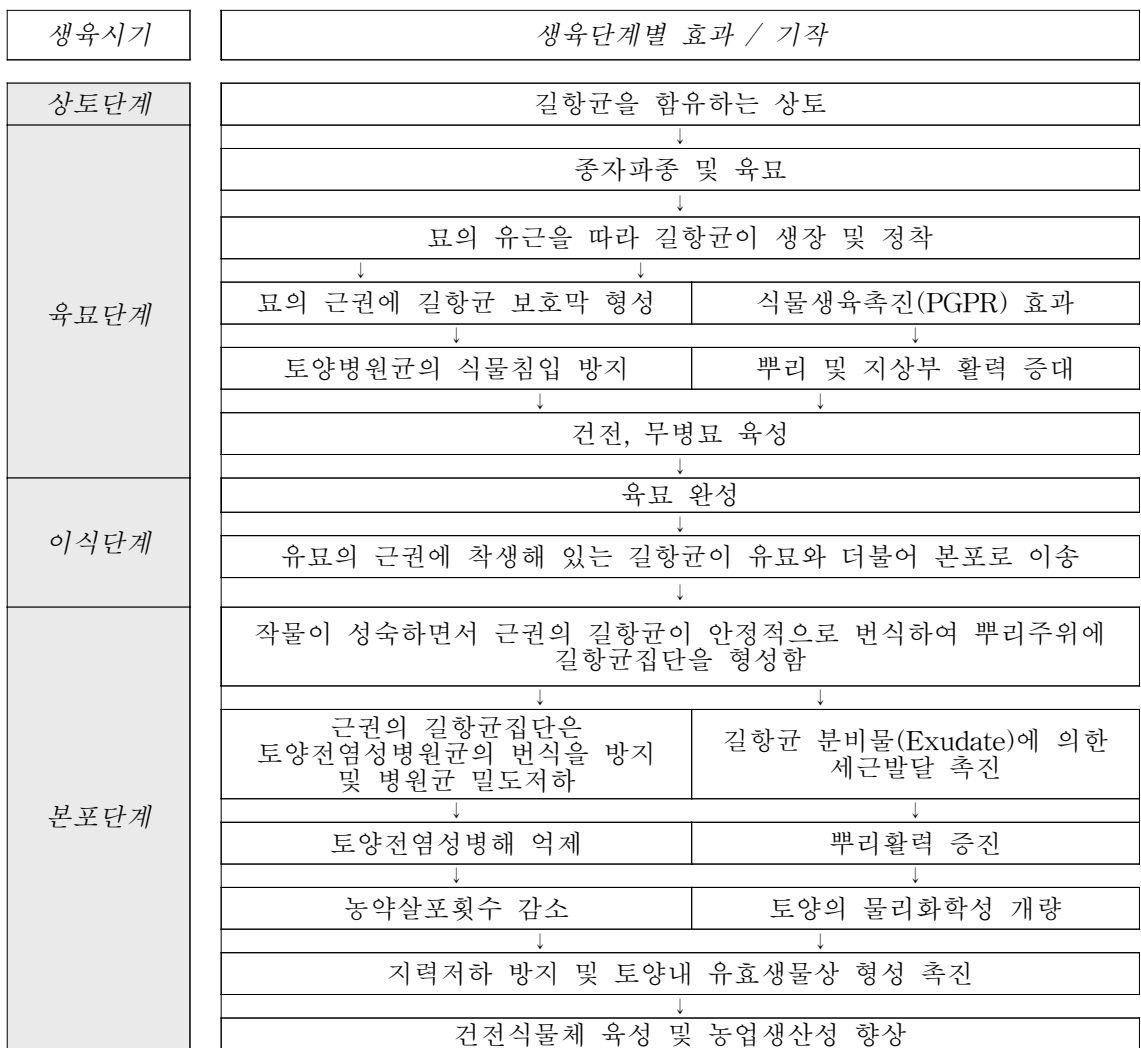
표-81에 나타난 바와 같이 항균상토 판매가를 일반상토보다 2000원 높게 책정하고 항균상토를 이용하여 만든 묘의 판매단가를 일반상토 육묘단가 300원과 동일하게 할 경우, 상토소비자로서는 20,000원의 소득이 감소하게 된다. 그러나 이 경우, 상토소비자로서는 묘 상품율이 증가 또는 묘의 품질이 높아져 생산성이 증가하면 이 소득감소분을 충분히 상쇄할 수 있을 것으로 판단된다. 한편, 항균상토를 이용하여 만든 묘의 판매단가를 310원(일반상토 육묘단가 300원)으로 할 경우, 육묘장 또는 농가는 60,000원의 추가이익이 발생하여, 이들 소비자들로서는 역시 같은 가격으로 고급상토(항균상토)를 이용하면서도 추가적인 이익을 거둘 수 있는 장점이 있다. 이 경우 역시 상토 판매대리점의 이윤이 줄어들게 되는데, 항균상토의 판매량이 많아지면 충분한 수익을 거둘 수 있을 것으로 판단된다.

결국, 항균상토의 경제성은 다음의 두가지로 분류하여 고려할 수 있다. 첫째, 길항균을 추가 투입하여 상토를 고급화한 후, 일반상토와 같은 가격으로 판매할 경우, 소비자에게는 추가이익이 발생하지만, 상토제조사와 상토판매대리점으로서의 약간의 단기적인 손실을 감수해야 한다. 그러나 육묘중에 입고병 발생이 현저하게 줄어들어 제품의 품질경쟁력이 확보되면 항균상토 전체판매량이 증가하여 결국은 농가와 제조사 및 판매점 모두에게 이익이 발생할 수 있을 것으로 판단된다. 둘째, 길항균을 추가 투입하여 상토를 고급화한 후, 일반상토보다 높은 가격으로 판매할 경우, 상토제조사와 상토판매대리점에게는 추가이익이 발생하지만, 반대로 소비자에게는 약간의 추가비용이 발생한다. 그러나, 소비자(상토회사 또는 농가)로서는 항균상토로 육묘한 건전묘를 판매 또는 자가사용하여 본포에서 생산성을 높이므로써 수익성을 확보할 수 있다고 판단된다.

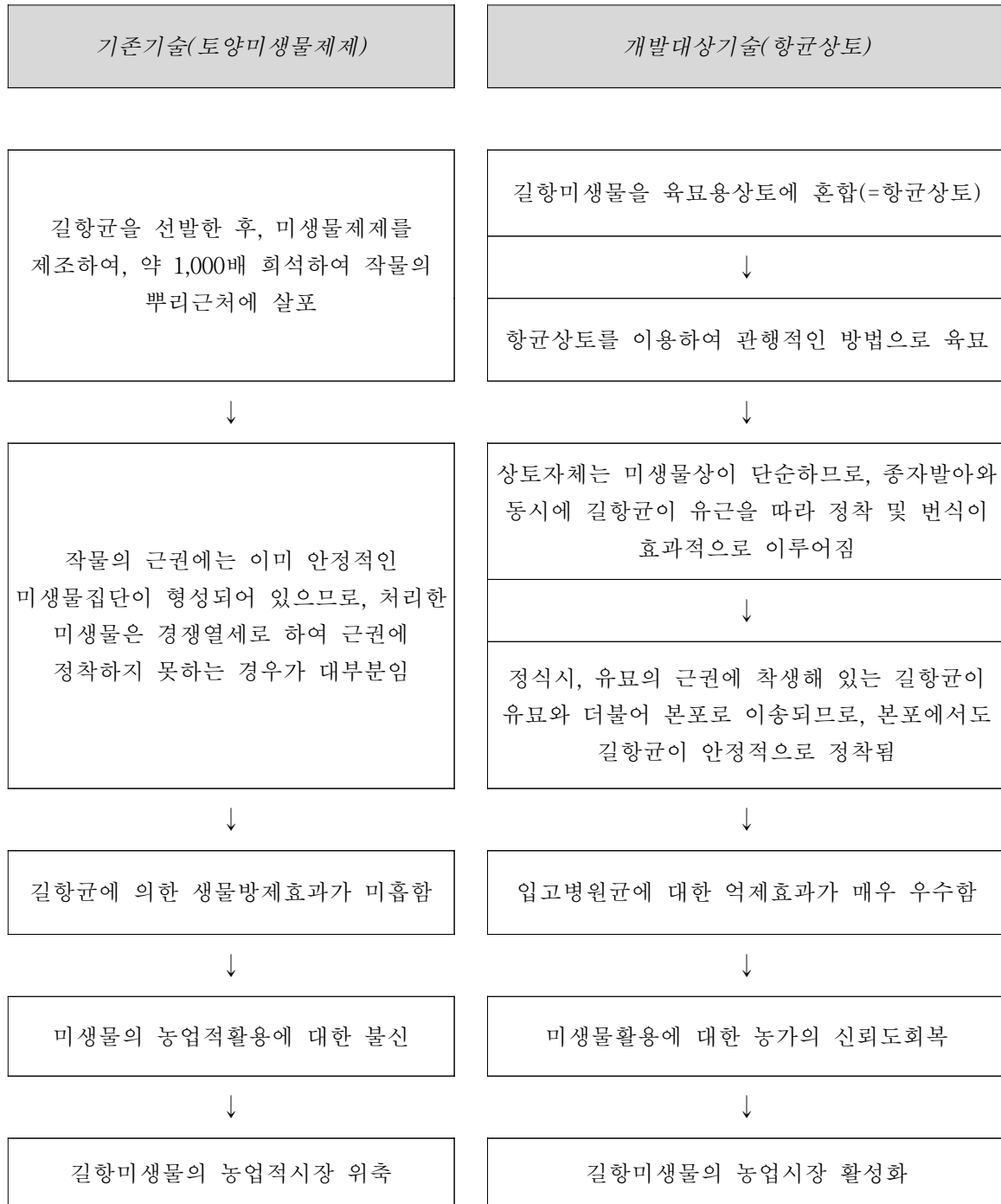
제 28 절 Marketing을 위한 영업 및 홍보용 기술자료

1. 연구내용

가. 항균상토의 효과기작 자료



나. 기존기술(토양미생물제제)과의 차별성 - 효과측면



다. 기존기술과의 (토양미생물제제)과의 차별성 - 농가소비자측면

항목별	기존기술(미생물제제)	개발대상기술(항균상토)
구입및 처리비용	① 별도의 유통과정을 통한 개별제 품을 고가로 구입해야 하며, ② 토양처리시 근권이외의 부분 에 떨어지는 loss분이 대단히 많으므로 ===> 농가비용이 과다함 (처리비용 : 75-100원/평)	① 기존 상토유통경로를 통하므로, 길항균의 염가구입이 가능하며, ② 길항균이 정확히 근권에만 처리 되므로 loss가 없어 ===> 농가비용이 최소화됨 (처리비용 : 25-30원/평)
작업성	① 미생물제제의 희석 및 살포 를 위한 별도의 작업이 필요	① 관행적인 육묘작업이면 충분 하므로 별도의 작업 불필요

라. 연구결과물 전시회 개최

2004. 6. 30 - 7. 3까지 서울 코엑스(COEX) 1층 인도양홀에서 개최된 “친환경/유
 기농박람회. 식품소재/첨가물전”에 본 연구의 결과물을 전시 및 홍보하였다(부스 No.
 202)

<전시회 사진자료>



제 29 절 사후관리시스템 개발

1. 이론적·실험적 접근방법

육묘장 또는 개별농가에 항균상토 제품을 판매한 후, 제품의 사용효과를 극대화할 수 있도록 애프터서비스 차원에서 다음과 같은 지원시스템을 구축하였다

2. 연구내용

가. 효과적인 사용방법 지도

- 제품 보관방법에 대한 지도
- 길항균의 입고병 방제 작용원리에 대한 이론적인 설명

나. 길항균밀도의 경시적 분석지원

- 핵심육묘장 또는 선도농가 육묘시, 작목별로 육묘중 길항균밀도 분석 및 자료화

다. 차별화된 육묘 시스템 홍보

- 길항균이 함유된 항균상토를 이용하여 재배한 묘임을 홍보할 수 있는 자료 제작 및 홍보물 지원

제 30 절 농가현장결과 자료수집 및 현장기술자료 제작

1. 이론적·실험적 접근방법

본 항에서는 본 연구에서 개발한 항균상토(*Trichoderma harzianum* 함유)를 이용하여 충북 청원군 소재 “ㅎ” 육묘장에서 대량으로 육묘를 실시하였으며, 작목별 적용 방법 및 결과를 기술하고자 한다

2. 연구내용

가. 목적

본 연구에서 개발한 항균상토 제품의 현장적용을 통하여 입고병 방제효과 및 튼튼묘육성효과 등의 검증을 통하여 소비자의 반응을 조사 하고 현장적용 기술자료를 제작하고자 한다

나. 작목별 처리방법

- 1) 시험적용 작목은 오이, 고추, 토마토로 하였으며, 일반상토와 항균상토 각각에서의 육묘성적을 조사, 비교하였다
- 2) 오이(품종명 : 청낙합)는 28일, 고추(품종명 : 부자)은 30일, 토마토(품종명 : 슈퍼도테랑)는 38일간 육묘하면서 결과를 평가하였다
- 3) 육묘기간중 모든 처리(시비 및 시약)는 동일하게 관행적으로 실시하였다
- 4) 조사항목은 묘의 생육량, 건전성, 입고병발병율, 세균형성을 등으로 하였으며, 별도로 육묘장 관계자의 육묘소감을 조사하였다

다. 처리결과

일반상토와 항균상토의 육묘성적 비교시험결과는 다음의 표-81, 82, 83, 84와 같다. 표-82에 나타난 바와 같이, 3가지 작목 모두 묘의 건전성에는 별 차이가 없는 것으로 나타났다. 표-81에 나타난 바와 같이, 3가지 작목 모두, 항균상토를 사용하면 묘의 생육이 월등히 양호해짐을 알 수 있다. 표-83은 입고병 발병율 조사 결과로서, 항균상토의 입고병 억제효과가 인정된다고 할 수 있다. 즉, 항균상토를 사용했을 경우, 입고병 발병율이 6-9% 저하되는 것으로 나타났다. 표-84에서 알 수 있듯이, 고추와 토마토의 경우에는 항균상토의 세균발달촉진효과가 인정된다고 할 수 있다

<표-82> 묘생육의 경시적 변화조사 결과(달관조사결과)

구분		묘의 경시적 생육량		
		8일차	16일차	25일차
오이	일반상토	+	++	+++
	항균상토	++	+++	++++
고추	일반상토	+	++	+++
	항균상토	++	+++	++++
토마토	일반상토	+	++	+++
	항균상토	++	+++	++++

+ : 불량 , ++ : 보통 , +++ : 양호 , ++++ : 우수

<표-83> 묘의 건전성 조사 결과(육묘 종료시점)

구분		묘의 건전도
오이	일반상토	+++
	항균상토	+++
고추	일반상토	++++
	항균상토	++++
토마토	일반상토	+++
	항균상토	+++

+ : 불량 , ++ : 보통 , +++ : 양호 , ++++ : 우수

<표-84> 육묘중 입고병 발병율 조사결과

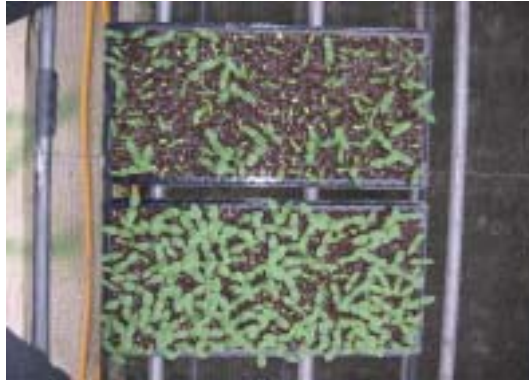
구분		입고병 발병율(%)
오이	일반상토	12
	항균상토	3
고추	일반상토	11
	항균상토	4
토마토	일반상토	8
	항균상토	2

<표-85> 묘의 세균발달상 조사결과

구분		세균발달상태
오이	일반상토	+++
	항균상토	+++
고추	일반상토	++
	항균상토	+++
토마토	일반상토	+++
	항균상토	++++

+ : 불량 , ++ : 보통 , +++ : 양호 , ++++ : 우수

사진-1 : 오이 육묘 사진(파종 8일 후)



위 : 일반상토 아래 : 항균상토

사진-2 : 오이 육묘 전경 사진



사진-3 : 고추 육묘 사진(파종 8일 후)



우 : 일반상토 좌 : 항균상토

사진-4 : 고추 육묘 전경 사진



사진-5 : 토마토 육묘 사진(과종 15일 후)



우 : 향균상토 좌 : 일반상토

사진-6 : 토마토 육묘 사진(과종 25일 후)



우 : 향균상토 좌 : 일반상토

사진-7 : 토마토 육묘 전경 사진



사진-8 : 토마토 접목묘 육묘 전경 사진



사진-9 : 입고병이 발생하여 중간중간 묘판이 없어진 육묘장



사진-10 : 육묘장에서 사용중인 입고병 방제용 농약류



사진-11 : 육묘장 전경



라. 육묘장 관계자의 소감

이상의 묘생육량, 건전도, 입고병 억제효과, 세균발달정도 등의 조사결과로 볼때, 향균상토는 건전묘 육성효과 및 입고병 억제효과를 가지는 것으로 나타났으며, 세균 발달을 촉진시키는 특성을 가지고 있다고 판단된다.

제 31 절 특허출원

본 연구과제의 핵심중요기술에 대하여 2건의 특허를 출원하였으며, 구체적인 출원 내역은 다음과 같다.

1. 특허-1(2003년 출원)

본 연구결과 길항력이 우수한 세균, 즉 Bacillus를 이용한 향균상토 제조방법에 대한 특허를 출원하였으며 특허출원 내역은 다음의 표-86와 같다.

<표-86> Bacillus를 이용한 항균상토 제조방법 특허 내역

구분	내용
권리	특허
출원인	김 영권
출원일자	2003. 10. 21
출원번호	10-2003-0073455
발명명칭	모잘록병 방제용 항균상토 및 그 제조방법 {BED SOIL FOR PROTECTION OF DAMPING-OFF DISEASE AND METHOD THEREOF}
심사청구	유
조기공개신청	무
우선권주장	무
국내우선기한	2004. 10. 21
해외출원기한	2004. 10. 21
보정기한	특허결정 등본의 송달전 또는 최초거절이유 송달전

2. 특허-2(2004년 출원)

본 연구에서는 길항력이 우수한 곰팡이 1종(*Trichoderma harzianum*)도 개발하였으며, 이를 이용한 항균상토 제조방법에 대한 특허 출원내역은 다음의 표-86과 같다. 본 특허에서는 개발된 균주의 명칭은 *Trichoderma harzianum*이며, 한국미생물보존센터(KFCC)에 기탁번호 KCCM 10582로서 기탁하였다.

<표-87> Trichoderma harzianum을 이용한 항균상토 제조방법 특허 내역

구분	내용
권리	특허
출원인	김 영권
출원일자	2004. 07. 05
출원번호	10-2004-0051893
발명명칭	모잘록병 방제용 길항균 및 이를 이용한 항균상토 및 그 제조방법법 {ANTAGONISTIC MOLD FOR PROTECTION OF DAMPING-OFF DISEASE AND BED SOIL COMPRISING THE MOLD AND METHOD THEREOF}
심사청구	유
조기공개신청	무
우선권주장	무
국내우선기한	2005. 07. 05
해외출원기한	2005. 07. 05
보정기한	최초거절이유통지 또는 특허결정 전까지

제 32 절 해외시장 개척추진

현재, 일본은 원예용상토 시장이 대단히 크며, 일본의 원예용 상토시장 개척을 위하여 금년 10월중 동경에서 개최되는 전시회에 참석하여 본 연구결과물 및 개발제품을 홍보할 계획이다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 1년차 목표달성도

가. 토양미생물제제 기존제품분석

당초목표	개발실적	달성도(%)
● 제품별 균종/균밀도 파악 및 균종별 항균력 확인	균종, 균밀도, 항균력 확인 완료	100%
● 제품별 미생물의 경시적안정성 평가, 확인	미생물의 경시적 안정성 확인 완료	100%

나. 길항균 선발

당초목표	개발실적	달성도(%)
● Halo Size 10mm 이상의 길항균 6종 이상 선발	Halo Size 10mm 이상의 세균 5종, 곰팡이 3종 선발	100%

다. 길항균 배양기술확립

당초목표	개발실적	달성도(%)
● 액체배양 : 수율 5×10^9 /ml, 배양기간 4일	3일배양, 균밀도 7×10^9 /ml	100%
● 고체배양 : 수율 5×10^8 /g 배양기간 10일	9일배양, 균밀도 6×10^8 /g	100%

라. 정착율 및 번식률 제고를 위한 첨가제

당초목표	개발실적	달성도(%)
● 첨가제에 의한 정착율 제고 10% 이상	Glucose, Butyric acid를 이용하여 정착율 13-14% 제고	100%
● 첨가제에 의한 증식율 제고 100배 이상	배추의 경우, 증식율 약 220배 달성 오이의 경우, 증식율 약 155배 달성	100%

마. 길항균 배합율 최적화

당초목표	개발실적	달성도(%)
● 길항균 배합비 0.3% 이내	길항균배합비율 0.1-0.2% 달성	100%

바. 길항균 배합공정 최적화

당초목표	개발실적	달성도(%)
● 50톤 이상/1일	별도의 설비비투자 없이 1일 80톤 생산 가능	100%

2. 2년차 목표달성도

가. 길항균 선발

당초목표	개발실적	달성도(%)
● 길항균 확보 및 입고병원균에 대한 항균력 평가	◎ 길항균 88종 확보 및 입고병원균 3종에 대한 길항력평가 완료	100%
● 길항균의 항균성Metabolite의 안정성 및 안전성평가	◎ 항균성Metabolite의 경시적안정성 확인 완료 및 종자발아율/유식물생육시험을 통한 안전성확인 완료	100%
● 길항균 동정	◎ 선발길항균중 세균3종, 곰팡이 1종의 동정완료	100%

나. 시제품제조 및 안정성확보

당초목표	개발실적	달성도(%)
● 시제품 1톤 제조	◎ $4.5 \times 10^7/g$ 의 길항균을 함유하는 시제품 1톤 제조하여 다양한 시험에 활용	100%
● 시제품의 안정성 확인,평가	◎ 온도조건 및 포장조건에 따른 생물학적, 이화학적 안정성 확인완료	100%

다. 길항균의 정착성 및 증식성 평가

당초목표	개발실적	달성도(%)
● 육묘상에서의 정착성 및 증식성평가	◎ 102.5-133.3%의 정착성, 155-220배의 증식을 확인	100%
● 본포상에서의 정착성 및 증식성평가	◎ 농약처리시 181.5-446.2%의 정착증식성, 농약무처리시 164.1-644.0%의 정착증식성 확인(재배 40일차 결과)	100%
● 정착율증진을 위한 항균상토 사용법확립	◎ 물줄 때 습윤제 OA-1019를 100ppm농도로 혼합하여 약 2일 주기로 관수하므로써, 정착율 증진가능함을 확인	100%
● 토양미생물제제와의 정착율 비교	◎ 근권내 총세균밀도 비교결과, 항균상토 처리시 20.0-52.7%의 밀도증가를 확인함	100%

라. 길항균의 육묘에 대한 영향평가

당초목표	개발실적	달성도(%)
● 종자발아에 대한 영향평가	◎ 길항균은 종자발아에 대하여 어떠한 악영향도 주지 않음을 확인함	100%
● 육묘생육에 대한 영향평가	◎ 길항균은 육묘생육에 대한 악영향이 없으며, 오히려 육묘생육을 촉진시킴을 확인함	100%

마. 시제품의 효과검증(육묘장에서의 실증시험)

당초목표	개발실적	달성도(%)
● 항균상토의 농약대비 입고병 방제효과 평가	◎ 입고병용 농약 “지오판”과 동등한 방제효과를 나타냄	100%
● 항균상토의 육묘성적 개선효과 평가	◎ 지하부 및 지상부생육량이 각각 22.46%, 23.4% 증가하며, 묘의 상품율도 2.2% 개선시킴을 확인함	100%

바. 항균상토 처리후의 근권미생물 분석

당초목표	개발실적	달성도(%)
● 육묘근권미생물상 변화 조사	◎ 항균상토는 육묘중 근권의 여타미생물에 대해서도 생리, 생태학적으로 상당한 영향을 주고 있음을 확인함	100%
● 본포 정식후의 근권미생물상 분석	◎ 본포에 정식후에도 여타미생물의 밀도에 일정한 영향을 줌	100%

사. 본포에서의 효과검증

당초목표	개발실적	달성도(%)
● 본포에서의 토양병해 방제효과 평가	◎ 덩굴쪄짐병과 역병의 발생이 부분적으로 감소함	100%
● 본포에서의 생육촉진효과 평가	◎ 수확농산물(오이)이 2.4% 증수되었으나, 오이의 품질개선효과는 없는 것으로 나타남	100%
● 작물생산성 평가, 분석	◎ 현재까지, 육묘장 및 농가입장에서 모두 일정한 추가수익이 발생하는 것으로 나타남	100%

3. 3년차 목표달성도

가. 길항균 양산시스템 확립

당초목표	개발실적	달성도(%)
● 입고병 방제용 길항균 양산공정 개발	◎ 선발길항균(세균 및 곰팡이) 각각의 양산공정 확립 ◎ 양산에 필요한 설비 및 원자재 규격설정	100%
● 항균상토 양산공정 개발	◎ 원료투입비율 및 material balance 최적화 ◎ 항균상토 제조용 설비 규격설정	100%
● 제품양산을 위한 품질관리시스템 구축	◎ 길항균체제의 품질관리항목(함수율, 길항균밀도, 물성, 입도, 오염균밀도) 및 표준치 설정 ◎ 항균상토의 품질관리항목(함수율, 길항균밀도, 저장안정성) 및 표준치 설정	100%

나. 경제성분석(일반상토 대비)

당초목표	개발실적	달성도(%)
● 일반상토와의 경제성(제조원가) 비교분석	◎ 상토 제조원가, 판매가, 농가 육묘비용 등을 비교분석하였으며, 상토업체 및 농가 모두의 이익방안 확립	100%

다. 사후관리시스템 개발

당초목표	개발실적	달성도(%)
● 제품판매활성화를 위한 농가지원시스템 구축	◎ 효과적인 사용방법 지도, 각종 분석지원, 차별화된 육묘 시스템 홍보 방안 확립	100%

라. 장기유통시 길항균 생존율 개선방안 연구

당초목표	개발실적	달성도(%)
● 유통중 제품내 길항균 사멸을 최소화	◎ 길항균의 포자화, 상토의 함수율 조절, 항균상토 제조시의 수분분산성 개선 등을 통하여 길항균생존율 제고	100%

마. 농가현장결과 자료수집 및 현장기술자료 제작

당초목표	개발실적	달성도(%)
● 항균상토의 입고병 방제 효과 및 건전묘육성효과 등의 검증 및 사진자료화	◎ 오이, 고추, 토마토묘의 생육량, 건전성, 입고병발병율, 세균형성을 조사 및 육묘장 관계자의 육묘소감 조사결과 매우 양호한 반응인 것으로 확인되었으며, 시험결과 사진자료화 완성	100%

4. 관련분야에의 기여도

본 과제の内容은 길항균 선발, 길항균 배양조건 확립, 항균상토 제조공정 확립, 항균상토의 농가실증연구, 사업화를 위한 각종자료 확보 등으로 구성되어 있으며, 본 과제수행을 통하여 얻은 결과들은 여타 길항균제제 또는 미생물살균제 개발시의 중요한 참고자료가 될 수 있다. 또한, 길항균의 토양내 정착성 및 증식성 개선과 관련된 연구 결과는 생물제제의 제화연구 분야에 적극 활용될 수 있다. 한편, 본 연구에서 개발한 기능성 항균상토로 인하여 상토업계의 시장이 확대될 수 있으며, 농가의 육묘효율성을 제고시키는 등 농업생산성 향상의 전기를 마련할 수 있다.

5. 연구결과의 학회(논문) 발표

5-1. SCI 논문 게재

Cho, M. J., Y. K. Kim, and J. O. Ka. 2004. Molecular differentiation of **Bacillus** spp. antagonistic against phytopathogenic fungi causing damping-off disease. **J. Microbiol. Biotechnol.** 14(3): 599-606.

5-2. 학회발표

Joe, M. J. and J. O. Ka. 2003. Isolation and molecular differentiation of *Bacillus* spp. antagonistic against phytopathogenic fungi causing damping-off disease. 2003 Annual Meeting, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology.

Joe, M. J. and J. O. Ka. 2002. Phenotypic and genetic characterization of antifungal biocontrol bacteria isolated from agricultural soils. 2002

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 추가연구의 필요성

- 본 연구는 기초연구부터 사업화연구까지 실시하여 제품생산, 홍보 및 판매에 이르는 전과정에 대하여 기술개발을 완료하였으므로 추가연구는 불필요함

2. 타연구에의 응용성

- 여타 길항균제제 또는 미생물살균제 개발시의 가장 중요한 분야인 제제화 연구에 중요한 참고자료가 되어, 유관연구의 연구성과를 극대화할 수 있다
- 길항균의 토양내 정착성 및 증식성에 대한 연구결과를 활용함으로써, 길항균제제의 실질적인 효과를 증진시킬 수 있다
- 또한 기능성 상토개발에 직접적으로 활용할 수 있다

3. 기업화 추진방안

- 입고병 방제용 길항미생물 제품은 본 연구의 주관기관인 고려바이오연구소에서 사업화 추진 예정임
- 항균상토의 경우, 상토전문제조업체에 기술이전하여 사업화를 추진하거나 또는 당사에서 직접 사업화(기존의 상토제조업체와 OEM 계약생산)할 예정임
- 본 연구의 참여기업인 고려바이오연구소(당사)는 8년간 농업용 미생물제제의 판매사업을 영위해온 업체로서 전국적으로 약 20여개의 총관시스템을 운영중에 있으므로, 같은 농자제품목인 항균상토의 사업화를 수월하게 추진할수 있다

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

해당 없음

제 7 장 참고문헌

BACKMAN, P. A., and R. Rodriguez-Kabana. 1975. A system for growth and delivery of bio-logical control agents to the soil. *Phytopathology* 65:819-821.

BAKER, K. F., and R. J. Cook. 1974. *Biological control of plant pathogens*. St. Paul, MN: The American Phytopathological Society Press.

BAKER, KG, Broadbent P, and Waterworth Y (1971) Bacteria and actinomycetes antagonistic to fungal root pathogens in Australian soils. *Aust J Biol Sci* 24:925-944.

BEYER M, and Diekmann H (1985) The chitinase system of *Streptomyces* sp. ATCC 11238 and its significance for fungal cell wall degradation. *Appl Microbiol Biotechnol* 23:140-146.

BLUME, M., and G. E. HARMAN. 1979. *Thielaviopsis basicola*: A component of the pea root rot complex in New York State. *Phytopathology* 69:785-788.

BURCHFIELD, H. P. 1967. Chemical and physical interactions. Pages 463-508 in : D. C. Torgeson, ed. *Fungicides, An Advanced Treatise*. Academic Press, New York. 697pp.

CHANG, I., and T. KOMMEDAHL. 1968. Biological control of seedling blight of corn by coating kernels with antagonistic organisms. *Phytopathology* 58:1395-1401.

CHET, I., Y. HADAR, Y. ELAD, J. KATAN, and Y. HENIS. 1979. Biological control of soil-borne plant pathogens by *Trichoderma harzianum*. Pages 585-591 in B. Schippers and W. Gams, eds. *Soil-Borne Plant Pathogens*. Academic press. New York.

CHEST, I, and Elad Y (1986) Possible role of competition for nutrients in biocontrol of *Pythium* damping-off by bacteria. *Phytopathol* 135:190-195.

CONWAY, K. E., C. G. Fisher, and J. E. Motes. 1982. A new technique for delivery of biological agents with germinated vegetable seed. *Phytopathology* 72:987(Abstr.).

CRANSTON, P. M. 1983. Alginic acid derivatives as a solidifying agent for microbiological nutrient suspensions. *Food Technology in Australia* 35:134-136.

FRAVEL, D. R., J. J. Marois, R. D. Lumsden, and W. J. Connick, Jr. 1985. Encapsulation of potential biocontrol agents on alginate-clay matrix. *Phytopathology* 75:774-777.

GLOER JB (1994) The chemistry of fungal antagonism and defense. *Can J Bot* 73:1265-1274.

HARMAN, G. E., C. J. ECKENRODE, and D. R. WEBB. 1978. Alteration of spermosphere ecosystems affecting oviposition by the bean seed fly and attack by soilborne fungi on germinating seeds. *Ann. Appl. Biol.* 90:1-6

HENIS, Y., A. GHAFAR, and R. BAKER. 1978, Integrated control of *Rhizoctonia solani* damping-off of radish: effect of successive plantings, PCNB, and *Trichoderma harzianum* on pathogen and disease. *Phytopathology* 68:900-907.

HENIS, Y., A. GHAFAR, R. BAKER, and S. L. GILLESPOE. 1978. A new soil-sampler and its use for the study of population dynamic of *Rhizoctonia solani* in soil. *Phytopathology* 68:371-376

HOCH, H., and G. S. ABAWI. 1979. Biological control of *Pythium* root rot of table

beet with *Corticium* sp. *Phytopathology* 69:417-419.

IOANNOU, N., R. W. Schneider, and R. G. Grogan. 1977. Effect of flooding on the soil gas composition and the production of microsclerotia by *Verticillium dahliae* in the field. *Phytopathology* 67:651-656

KELLEY, W. D. 1976. Evaluation of *Trichoderma harzianum*-impregnated clay granules as a biocontrol for *Phytophthora cinnamoni* causing damping-off of pine seedlings. *Phytopathology* 66:1023-1027.

KO, W., and H. F. HORA. 1971. A selective medium for the quantitative determination of *Rhizoctonia solani* in soil. *Phytopathology* 61:707-710.

KOMMEDAHL, T., and I. CHANG. 1975. Biocontrol of corn root infection in the field by seed treatment with antagonists. *Phytopathology* 65:296-300.

KORSTEN L, Jager ES De, and Villiers EE De (1995) Evaluation of bacterial epiphytes isolated from avocado leaf and fruit surfaces for biocontrol of avocado postharvest diseases. *Plant Dis* 79:1149-1156.

LEMANCEAU P, Bakker PAHM, Kogel WJ De, Alabouvette C, and Schippers B (1993) Antagonistic effect of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* F047 and Pseudobactin 358 upon pathogenic *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Appl Environ Microbiol* 59:74-82.

LEWIS, J. A., and G. C. Papavizas. 1985. Characteristics of alginate pellets formulated with *Trichoderma* and *Gliocladaum* and their effect on the proliferation of two fungi in soil. *Plant Pathology* 34:571-577.

LIU, S., and R. BAKER. 1980. Mechanism of biological control in soil suppressive to *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 70:404-412.

- LIU. S., and E. K. VAUGHN. 1965. Control of *Pythium* infection in table beet seedling by antagonistic microorganisms. *Phytopathology* 55:986-989.
- MARTEN P, Smalla K, and Berg G (2000) Genotypic and phenotypic differentiation of an antifungal biocontrol strain belonging to *Bacillus subtilis*. *J Appl Microbiol* 89:463-471.
- MILUS EA, and Rothrock CS (1993) Rhizosphere colonization of wheat by selected soil bacteria over diverse environments. *Can J Microbiol* 39:335-341.
- MIRCETICH, S. M. 1971. The role of *Pythium* in feeder roots of diseased and symptomless peach trees and in orchard soils in peach tree decline. *Phytopathology* 61:357-360.
- OEDJIJONO, Line MA, and Dragar C (1993) Isolation of bacteria antagonistic to a range of plant pathogenic fungi. *Soil Biol Biochem* 25:247-250.
- PAPAVAZAS, G. C., D. R. Fravel, and J. A. Lewis. 1987. Proliferation of *Trifarosomyces flavus* in soil in alginate pellets. *Phytopathology* 77: 131-136.
- PIECZARKA, D. J., and G. S. ABAWI. 1978. Populations and biology of *Pythium* species associated with snap bean roots and soils in New York. *Phytopathology* 68:409-416.
- SUNDHIM, L. 1977. Attempts at biological control of *Phomopsis sclerotioides* in cucumber. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 83:439-442.
- TOYOTA K, Ritz K, and Young IM (1996) Microbiological factors affecting the colonisation of soil aggregates by *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*. *Soil Biol Biochem* 28:1513-1521.

- WALKER, H. L., and W. J. Connick, Jr. 1983. Sodium alginate for production and formulation of mycoherbicides. *Weed Science* 31:333-338.
- WELLER DM (1988) Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Ann Rev Phytopathol* 26:379-407.
- WELLS. H. D., D. K. BELL. and C. A. JAWORSKI. 1972. Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a biological control for *sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 62:442-447.
- WRIGHT. J. M. 1956. Biological control of a soil-borne *Pythium* infection by seed inoculation. *Plant Soil* 8:132-140.
- WU. W. 1976. Biological control of seed-and soil-borne fungi associated with wheat and oats. *Bot. Bull., Acad. Sinica (Taipei)* 17:161-168.
- YUAN WM, and Crawford DL (1995) Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. *Appl Environ Microbiol* 61:3119-3128.

주 의

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