

완결과제 최종보고서

일반과제(○), 보안과제()

(과제번호 : PJ009951)

유용미생물을 이용한 인삼잘록병 친환경 방제기술개발

(Development of eco-friendly control technology of the ginseng damping off using beneficial microorganism)

충남대학교

연구수행기간

2014. 02. ~ 2016. 12.

농촌진흥청

제 출 문

농촌진흥청장 귀하

본 보고서를 “유용미생물을 이용한 인삼질록병 친환경 방제기술개발”에 관한 연구
(개발기간 : 2014. 02. 01 - 2016. 12. 31) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

제1세부연구과제 : 인삼질록병 방제 미생물의 제형 개발

제1협동연구과제 : 인삼질록병 방제 미생물의 생성 유용물질 동정 및 특성 분석

제2협동연구과제 : 인삼질록병 방제 미생물 선발 및 사용법 개발

제3협동연구과제 : 미생물을 이용한 인삼질록병 포장 방제효과 구명

제4협동연구과제 : 인삼질록병 방제 미생물의 특성 분석 및 토양환경 영향 평가

2017. 2. 28.

제1세부연구기관명 : 충남대학교

제1세부연구책임자 : 최재을

참여연구원 : 김정선, 이강선, 나상권, 정성희

제1협동연구기관명 : 전북대학교

제1협동연구책임자 : 윤봉식

참여연구원 : 이인경, 김지율, 응엔반민, 우이음, 이윤주, 정경운, 최재형, 김재욱

제2협동연구기관명 : 국립농업과학원

제2협동연구책임자 : 이상엽

참여연구원 : 김정준, 한지희, 원향연

제3협동연구기관명 : 국립원예특작과학원

제3협동연구책임자 : 박경훈

참여연구원 : 이성우, 이승호

제4협동연구기관명 : 국립농업과학원

제4협동연구책임자 : 송재경

참여연구원 : 김상윤, 이상엽, 원향연, 상미경

주관연구책임자 : 최재을 ⑨

주관연구기관장 : 충남대학교 산학협력단장



농촌진흥청 농업과학기술 연구개발사업 운영규정 제51조에 따라 보고서
열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제번호	PJ009951		연구기간	2014. 02. 01 - 2016. 12. 31
연구사업명	단위사업명	현장실용화농업기술		
	세부사업명	친환경안전농축산물생산기술		
	내역사업명	친환경미생물농자재 현장적용기술		
연구과제명	주관과제명	유용미생물을 이용한 인삼잘록병 친환경 방제기술개발		
	세부(협동) 과제명	(1세부) 인삼잘록병 방제 미생물의 제형 개발 (1협동) 인삼잘록병 방제 미생물의 생성 유용물질 동정 및 특성 분석 (2협동) 인삼잘록병 방제 미생물 선발 및 사용법 개발 (3협동) 미생물을 이용한 인삼잘록병 포장 방제효과 구명 (4협동) 인삼잘록병 방제 미생물의 특성 분석 및 토양환경 영향 평가		
연구책임자	구분	연구기관	소속	성명
	1세부	충남대학교	농업과학연구소	최재을
	1협동	전북대학교	생명공학부	윤봉식
	2협동	국립농업과학원	농업미생물과	이상엽
	3협동	국립원예특작과학원	인삼과	박경훈
	4협동	국립농업과학원	농업미생물과	송재경
총 연구기간 참여 연구원 수	총: 24 명 내부: 10 명 외부: 14 명	총 연구개발비	정부: 900,000천 원 민간: 90,000천 원 계: 990,000천 원	
위탁연구기관명 및 연구책임자		참여기업명	(주) 그린아그로	
국제공동연구	상대국명:	상대국 연구기관명:		
<p>본 연구는 인삼의 재배과정에서 <i>Pythium</i> sp.와 <i>Rhizoctonia solani</i>의 복합적으로 감염으로 발생하는 인삼잘록병의 피해를 막기 위하여 안전하고 무독하며 부작용이 없는 방제제의 개발이다. 인삼 잘록병균에 항균성이 있는 <i>B. velezensis</i> CC112 균주 배양액의 토양관주 처리 하에서 60% 이상의 방제 효과가 있었다. <i>B. velezensis</i> CC112 균주로 제조한 시제품의 토양관주 처리에서는 <i>Rhizoctonia solani</i> 애 77.3%, <i>Pythium</i> sp. 애 65.7% 방제효과가 있었다.</p> <p><i>B. velezensis</i> CC112 균주의 시제품은 인삼종자의 발아 및 생육을 촉진시키는 경향이었고 상추를 비롯한 검정 식물에 약해가 없었으며 포유류와 물고기에 대한 독성이 없었다. <i>B. velezensis</i> CC112 균주를 처리에 따른 잘록병원균 밀도는 무처리 대비 선발균주 처리구에서 약 39%~7% 수준으로 감소되는 것으로 조사되었으며, 미생물 군집 특성 변동은 크지 않았다. 따라서 <i>B. velezensis</i> CC112 균주에 의한 미생물제제는 인삼잘록병 친환경 방제제로 활용할 수 있을 것으로 예상되었다.</p>				보고서 면수 : 163

〈 국 문 요 약 문 〉

연구의 목적 및 내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 인삼모잘록병 방제 미생물의 선발 및 항균활성성분 규명 ○ 유용미생물을 이용한 인삼모잘록병의 친환경 방제기술 개발 ○ 인삼 잘록병 방제를 위한 선발균의 생리활성 특성 구명 및 토양 환경 영향 평가 ○ 인삼잘록병 방제용 미생물제제 개발을 위한 유용미생물의 대량 배양법, 미생물제의 제형 개발, 미생물제의 안전성과 독성을 검정. ○ 미생물을 활용한 인삼잘록병 친환경 방제제의 사용법 개발 					
연구개발성과	<p><i>B. velezensis</i> CC112 균주는 인삼 잘록병을 일으키는 <i>Rhizoctonia solani</i>를 비롯한 여러 식물병원균의 군사 생장을 억제하였다. 인삼 잘록병균 <i>R. solani</i>에 대하여 <i>B. velezensis</i> CC112 균주를 Luria-Bertani (LB)와 <i>Bacillus</i>-soytone medium 배지에 배양한 10배 희석액의 종자침지처리와 LB배지에 배양한 10배 희석액을 토양관주처리하여 65.8%, 67.1%와 64.2% 방제효과를 나타냈다. <i>B.velezensis</i> CC112 균주의 시제품을 100배로 희석하여 토양관주처리하여 <i>Rhizoctonia solani</i> 에 77.3%, <i>Pythium</i> sp.에 65.7% 방제효과를 각각 나타내었다.</p> <p>토양으로부터 분리한 방선균 중에서 <i>Streptomyces</i> 속 균주 BS065, A1444, A75, A3265, A501 균주를 선발하고 다양한 chromatography 및 HPLC로 항균활성물질을 정제하여 분광분석방법으로 scopafungin, guanidylfungin A 및 methyl guanidylfungin A, fungichromin 등으로 규명하였다.</p> <p>탈크제형 <i>Bacillus velezensis</i> CC112를 종자 침지 및 관주처리 했을 때 인삼모잘록병 방제가 46.8%, 제올나이트 제형 M75를 종자 침지 및 관주 처리했을 때 45.9%의 방제가를 나타났다. 미생물 3종에 대한 인삼생육촉진 효과를 분석한 결과 인삼의 근중, 근장을 증가시키는 것으로 확인되었다.</p> <p>인삼잘록병 방제를 위해 개발된 미생물제의 대량 배양용 배지와 증량제는 각각 PSA 배지와 탈크(Talc)가 가장 안정적이었다. 미생물제(Diluent talc)는 인삼종자의 발아 및 생육 촉진 효과가 있었고, 독성검정 결과 포유류와 물고기에 독성이 없었다.</p> <p>인삼잘록병 방제를 위한 선발균, CC112는 <i>Bacillus velezensis</i>로 동정되었으며, 다양한 효소활성 및 인삼잘록병 방제 관련 이차대사물질 생합성 관련 유전자를 보유하였다. 선발균 처리에 따라 인삼토양 내 유용균 밀도는 약 4~9일 유지되었다. 유용균 처리에 따른 잘록병원균(<i>Rhizoctonia solani</i> and <i>Pythium ultimum</i>) 밀도는 무처리 대비 선발균주 처리구에서 약 39%→7% 수준으로 감소하였으며, 미생물 군집 특성 변동은 크지 않았다.</p>					
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 인삼모잘록병에 효과적인 활성미생물의 유효성분 규명 및 활성분을 이용한 quality control 체계 구축 ○ 인삼모잘록병의 생물적 방제제 개발로 친환경 고품질 인삼생산 ○ 친환경 인삼재배 포장에 선발균주를 적극 활용함으로서 인삼잘록병원균 억제를 통한 인삼 생산량 확보에 기여하고자 함 ○ 미생물제 사용으로 잘록병 방제로 친환경 인삼 뿌 생산에 기여함 ○ 미생물제를 등록하고 기술이전을 실시하여 실용화 확대. 					
중심어 (5개 이내)	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 15%;">인삼</td> <td style="width: 15%;">잘록병</td> <td style="width: 15%;">유용미생물</td> <td style="width: 15%;">방제</td> <td style="width: 15%;">친환경</td> </tr> </table>	인삼	잘록병	유용미생물	방제	친환경
인삼	잘록병	유용미생물	방제	친환경		

〈 Summary 〉

Purpose& Contents	<ul style="list-style-type: none"> ○ Development of eco-friendly control technology of ginseng damping off using useful microorganisms ○ Antagonistic bacteria effective to ginseng damping-off were selected, and substances from the bacteria were identified. ○ Development of control technology of the ginseng damping-off using beneficial microorganism ○ Mass culture of beneficial microorganism for developing microorganism formulation for the control of ginseng damping-off, development of the dosage forms of microorganism products and test of their safety and toxicity. ○ Evaluation of metabolic activities of selected microbes for suppressing <i>R. solani</i> and their impact on soil properties in a ginseng cultivated soil.
Results	<p><i>Bacillus velezensis</i> CC112 inhibited the mycelial growth of several plant pathogens including <i>Rhizoctonia solani</i> causing damping-off on ginseng. Control efficacy for <i>R. solani</i> by treatment of seed dipping with Luria-Bertani (LB) and <i>Bacillus</i>-soytone medium (BSM) broth diluted in 10 times, and soil dipping and soil drenching with LB broth diluted in 10 times of <i>B. velezensis</i> CC112 was 65.8%, 67.1%, and 64.2%, respectively. Treatment of soil drenching with 100 times of the prototype of <i>B. velezensis</i> CC112 for <i>Rhizoctonia solani</i> and <i>Pythium</i> sp. revealed control efficacy of 77.3% and 65.7%, respectively.</p> <p>Streptomyces spp. BS065, A1444, A75, A3265, and A501 were selected. After fermentation, antifungal substances were purified through various column chromatographies and HPLC. The active compounds were identified as scopafungin, guanidylfungin A, methyl guanidylfungin A, and fungichromin by spectroscopic methods. The effect of antimicrobial activity on ginseng damping off was investigated by using six kinds of beneficial microorganisms.</p> <p>The control effect of <i>Bacillus velezensis</i> CC112 with talc formulation was 46.8% and <i>Bacillus velezensis</i> M75 with zeolite formulation was 45.9% when it was treated with seed immersion and irrigation treatment. It was confirmed that the effect of promoting growth of ginseng of three kinds of <i>Bacillus velezensis</i> was investigated to increase root weight and height of ginseng.</p> <p>Among media and diluents for the mass culture of microorganism products developed for the control of ginseng damping-off, PSA media and Talc were most stable. The microorganism product(diluent talc) was effective in promoting germination and growth of ginseng seeds. The test of its toxicity shows that it was non-toxic to mammalia and fishes.</p> <p>Isolate, CC112 which was identified as <i>Bacillus velezensis</i>, showed diverse enzymatic activities and possessed gene clusters related to the biosynthesis of secondary metabolites for suppressing activities of plant pathogenic fungi. The population of selected microbe has maintained its relevant proportion for 4 to 9 days during ginseng cultivation. Plant fungal pathogens(<i>Rhizoctonia solani</i> and <i>Pythium ultimum</i>) were significantly suppressed by the application of selected microbes(in particular, CC112) in a range of 39%→7% as compared to the control(no application) and bacterial communities were not significantly altered by their applications without altering bacterial community structure in a ginseng soil.</p>

Expected Contribution	<p>Production of ecofriendly ginseng seedling according to using of organic agricultural material for the control of ginseng damping-off by <i>Bacillus velezensis</i> CC112</p> <p>Identification of antifungal substances from antagonistic bacteria effective to ginseng damping-off, and establishment of quality control system using antifungal substances.</p> <p>Production of eco-friendly high quality ginseng by developing biological control agent of ginseng damping offOur results will be utilized in effectively monitoring microbial ecological changes in population of beneficial microbes and plant pathogenic fungi, which will be used in field applications for improving activities of beneficial microbes and suppressing plant pathogens for the future.</p>				
Keywords	ginseng	damping-off	beneficial microorganism	biocontrol	ecofriendly

〈 목 차 〉

제 1 장 연구개발과제의 개요	7
제 2 장 국내외 기술개발 현황	11
제 3 장 연구수행 내용 및 결과	15
제 4 장 목표달성을 및 관련분야에의 기여도	143
제 5 장 연구결과의 활용계획 등	146
제 6 장 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	147
제 7 장 연구개발성과의 보안등급	148
제 8 장 국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비현황 ...	149
제 9 장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	150
제 10장 연구개발과제의 대표적 연구실적	151
제 11장 기타사항	153
제 12장 참고문헌	154

제 1 장 연구 개발 과제의 개요

제1절 연구 개발 목적

최근 안전한 농산물에 대한 소비자들의 관심은 웰빙(Well-Being) 및 로하스(LOHAS)라는 새로운 먹거리 문화를 형성하고 있으며, FTA의 확대는 소비자들의 요구에 대해 공급자간의 국제적 경쟁체계를 유도하고 있어 글로벌 시장에서의 생존을 위한 농업경쟁력 강화가 절실히 요구되고 있다. 국내 친환경 농산업의 경쟁력을 확보하기 위해 정부에서는 ‘친환경농업육성책’을 통해 2010년까지 친환경 농산물 생산비중을 10%까지 확대하고, 화학농약과 화학비료의 사용량을 2013년까지 2005년 대비 30%로 감축하는 정책을 펼친 바 있다.

식물병의 현실적인 방제는 살균제에 의존하는 것이나 다량살포에 의한 약제 저항성균주와 변이 균주의 출현, 농약의 오·남용에 의한 잔류문제 등 안전성의 문제 제기에 따른 환경 친화적 새로운 방제제의 개발이 절실하다.

인삼잘록병은 육묘과정에서 인삼종자가 발아하는 동안 또는 출아 전후에 감염되어 큰 피해를 주는 토양병해로서 묘삼에서 뿐만아니라 직파나 이식재배에서 발병하여 결주의 주요 원인이 되고 있다. 잘록병 방제약제로 오랫동안 사용한 toclofos-methy이 수삼에서 검출되어 등록이 취소되었다. 그 후에 티플루자마이드, 펜사이클론, 에트리디오졸 등에 의한 방제를 실시하고 있으나 묘삼뿐만아니라 수삼에서도 농약 잔류가 보고되고 있다.

유기농 인삼을 원료로 사용하고 있는 유기농 화장품, 유기농 홍삼제품은 원료수요가 증가하고 있으나 유기농 묘삼이 거의 생산되지 않아 유기농 인삼의 수급에 어려움을 겪고 있을 뿐만 아니라 양액재배 기술의 발달로 인삼의, 잎, 줄기, 뿌리를 채소로 활용하는 새싹삼은 무농약 또는 유기농 묘삼을 사용해야 하지만 무농약 또는 유기농으로 인증된 묘삼이 거의 없어 농약 잔류의 위험이 있는 일반 묘삼을 사용하고 있는 실정이다.

이상과 같이 유기농 인삼에 대한 소비 증가로 화학농약을 사용하지 않는 인삼재배기술의 개발이 요구되고 있다. 유기농 묘삼의 생산의 가장 큰 저해 요인은 잘록병의 유기농 방제 기술이 개발되지 않았다는 것이다.

인삼잘록병을 방제하기 위한 미생물제형의 개발을 위해서는 잘록병방제에 효과적인 미생물의 선발, 대량증식 기술의 개발, 미생물의 제형 개발, 방제 효과를 증대하기 위한 처리방법, 미생물제제의 등록 등이 이루어져야 할 것이다.

본 과제의 목표는 첫째, 인삼잘록병 방제를 위한 선발균의 분류, 동정 및 생리활성을 구명하는 것이며 둘째, 선발된 균으로부터 병 억제 관련 유용 유전자 분석을 실시하고 셋째, 방제용 미생물의 대량증식법, 미생물제형제의 개발, 미생물제의 안전성을 검정 넷째, 인삼잘록병 방제를 위한 선발균의 토양 환경 영향 평가를 수행하여 궁극적으로 유용미생물을 이용한 인삼잘록병 친환경 방제 기술을 개발하고자 하는 것이다.

▶ 인삼질특병 미생물제제 개발의 필요성

- 인삼(묘삼) 잔류농약 문제 심각
- 유기농 인삼 및 제조용 인삼의 수요 급증
- 검증되지 않은 미생물제제의 난립
- 현장에서의 낮은 방제가 및 불안정한 효과

- 인삼 잔류농약에 따른 소비자들의 불신 팽배
- 그럼에도 불구하고 “썩말한 유기농재배 부재”

▶ 문제 극복 방법



제2절 연구 개발의 필요성

최근 안전한 농산물에 대한 소비자들의 관심은 웰빙(Well-Being) 및 로하스(LOHAS)라는 새로운 먹거리 문화를 형성하고 있으며, FTA의 확대는 소비자들의 요구에 대해 공급자간의 글로벌 경쟁체계를 유도하고 있어 글로벌 시장에서의 생존을 위한 농업경쟁력 강화가 절실히 요구되고 있다. 국내 친환경 농산업의 경쟁력을 확보하기 위해 정부에서는 ‘친환경농업육성책’을 통해 2010년까지 친환경 농산물 생산 비중을 10%까지 확대하고, 화학농약과 화학비료의 사용량을 2013년까지 2005년 대비 30%로 감축하는 정책을 펼친바 있다. 식물병의 현실적인 방제는 살균제에 의존하는 것이나 다량살포에 의한 약제 저항성균주와 변이 균주의 출현, 농약의 오·남용에 의한 잔류문제 등 안전성의 문제 제기에 따른 환경 친화적 새로운 방제제의 개발이 절실하다.

인삼(Panax ginseng)은 한국을 대표하는 특산물로 9,510 억 원('11) 생산이 증가하였으며, 85개국에 189백만불('11)을 수출하였으며, 세계적인 웰빙 트렌드에 따라 인삼산업의 규모는 2조원 ('11) 확대되고 있으며, 0.46kg/인('10) 인삼소비량 증가 추세이다. 최근 기후변화, 예정지 고갈 등 재배환경 악화로 인한 병해발생 증가 및 화학농약의 과다사용으로 농산물의 잔류 위해 우려를 극복할 수 있는 안전한 친환경 농업에 대한 관심이 증대되고 있다. 인삼 모발의 모잘록병 원균인 Rhizoctonia solani에 의한 수량감소는 양주에서 20%, 부여에서 10%, 금산에서 30%로 매우 높았으며, 금산에서는 5~50%의 수량감소를 보여(인삼과 자료), 인삼 묘 재배에서 심각한 피해를 주고 있는 잘록병의 효과적인 친환경 방제제 개발이 필요한 실정으로 친환경 인삼 생산을 위한 잘록병 방제를 위한 화학농약 대체 미생물이나 천연물 유래 물질을 활용한 인삼잘록병 방제제 개발과 효과증진 기술 개발이 요구되고 있다.

인삼재배는 대부분의 농가에서 1년간 묘삼을 이식하여 재배한다. 그러나 인삼을 육묘하는 동안 피해가 심한 인삼잘록병은 화학적 방제에 의존하고 있지만 아직까지 친환경 존하였으며 방제효과가 우수한 친환경 방제제가 개발되지 않아 무농약 또는 유기농 재배에 많은 어려움을 갖고 있다.

따라서 친환경 인삼재배를 위해서는 화학농약 대체 미생물이나 천연물 유래 물질을 활용한 인삼 잘록병 방제제 개발이 필요하다. 친환경농업을 위한 미생물제제 등의 개발을 위한 연구에 박차를 가하고 있으며 성공적인 예는 많지 않다. 그러나 인삼모잘록병은 출아 전후 1~2개월 관리만으로 방제가 가능하여 미생물제제에 의한 방제성공 가능성성이 매우 높다.

친환경 방제제는 안전하고 무독하며 부작용이 없는 인삼잘록병 방제 미생물로부터 다양한 크로마토그라피법을 이용하여 활성성분을 분리 정제하고, 분광분석법을 이용하여 활성성분의 화학구조를 구명하며, 데이터베이스검색을 통하여 화합물의 동정 및 화합물의 화학적 생물학적 정보를 밝히는 것이다. 또한, 본 연구는 활성성분에 기반한 친환경농자제를 개발하도록 협동연구기관에 정보를 제공하고 이를 통하여 협동연구기관에서는 인삼잘록병에 유효한 활성 미생물 및 활성성분의 최적화를 통한 제형 개발 및 제제화 연구를 수행하고, 제제의 안전성 및 안정성 평가를 수행하여 인삼잘록병 방제효능이 우수한 유기농자제의 개발을 수행하도록 지원할 필요가 있다.

Bacillus subtilis 계열 미생물 자체에 대한 식물방제효과에 대한 검증은 실내 실험을 통해 대부분의 연구가 진행되고 있으나 실제 인삼 재배 포장 내 처리 후 병원균 및 유용균의 밀도 변화(정착능 및 생존능)에 대한 평가는 거의 수행되지 않고 있어, 유용균을 활용한 생물학적 방제 효과가 정확히 평가되지 않고 있는 실정이다. 최근 보고에 따르면 토양 내 미생물 군집의 변화가 작물의 생육을 비롯하여 토양 생물 나아가 인류의 건강까지도 영향을 줄 수 있는 것으로 보고되었으며(Wall et al., 2015), 유용균 처리에 따른 토양 내 미생물 군집의 변화가 전체 토양 생태에 미치는 파급력이 높을 것으로 판단되어 방제 미생물 처리에 따른 토양 내 유용균을 포함한 전체 미생물 군집 특성 변화에 대한 정밀한 조사가 요구된다. 최근 국외 연구에서는 생물학적 방제기술 개발 및 활용도 증진을 위해 차세대 유전체 분석법(Next generation sequencing, NGC)을 활용하여 방제미생물의 유전학적 특성과 생태학적 기능을 구명하는 비교 연구가 진행되고 있으나(Chowdhury et al., 2015), 현재 국내 관련분야에 관한 연구는 여전히 미흡하다.

유용미생물을 활용한 친환경적 방제기술의 개발 즉 유용미생물 선발 및 생리학적 특성 구명을 비롯한 토양 생태적인 연구는 생물학적 방제 연구에서 가장 기초적인 연구로서 판단되며 관련 연구를 통해 인삼잘록병 방제 및 지속적인 생산량 확보를 통해 농가소득 증대에도 큰 역할을 할 것으로 기대한다.

제3절 연구 개발 범위

본 과제의 연구 개발 범위는 인삼 잘록병의 방제를 위하여 항균활성검정과 잘록병에 대한 방제효과 검정하여 우수 군주를 선발하고, 인삼 잘록병에 대한 시제품의 처리방법별 방제효과와 약해 검정을 수행하는 것이다.

인삼모잘록병에 유효한 미생물소재를 발굴하고, 활성성분을 구명하여 효능이 우수한 친환경 농자재를 개발하고자 하였다. 본 연구개발의 내용 및 범위는 다음과 같다.

토양 및 식물체로부터 다양한 미생물을 분리하여 배양한 후 실험실적 방법에 의하여 인삼모잘록병원균인 *Rhizoctonia solani*와 *Pythium* sp. 군주에 유효한 미생물을 스크리닝한다.

16S rDNA의 염기서열 분석 및 배양적, 형태적, 생리적 특성을 바탕으로 분리한 미생물을 동정한다.

BuOH, EtOAc, CHCl₃, hexane 등 다양한 유기용매를 이용한 용매 분배에 의하여 활성 성분을 분배하고, silica gel, Diaion HP-20, Sephadex LH-20 등의 수지를 이용한 column chromatography, preparative TLC 및 HPLC를 수행하여 항균활성물질을 분리, 정제한다.

ESI-mass 등을 측정하여 화합물의 분자량을 밝히고, ¹H NMR, ¹³C NMR, ¹H-¹H COSY, HMQC, HMBC 등의 NMR 측정을 통하여 화학구조를 해석한다.

SciFinder 등 각종 database를 이용하여 분리한 화합물의 신규성 여부를 확인한다.

인삼잘록병 방제용 균주의 대량생산 공정 확립하기 위하여 잘록병 방제용으로 선발된 세균의 기본 증식 조건을 규명하기 위하여 탄소원, 질소원, 최적온도, 최적 pH를 조사한다.

미생물제 제형화 소제 선발하기 위하여 미생물제 제형화 소제용으로 선발된 증량제의 오염도를 측정, 세균 배양액, 제형화 소제에 침지한 종자 및 인삼 종자를 파종 후 세균 배양액, 제형화 소제의 관주 처리가 인삼 종자의 발아 및 생육에 미치는 영향을 조사한다.

제형화한 미생물제의 안전성 및 안정성 검정하기 위하여 증제형화 소제 + 세균배양액에 침지한 종자 및 인삼 종자를 파종 후 제형화한 미생물제의 관주 처리가 인삼 종자의 발아 및 생육에 미치는 영향을 조사하여 제형화한 미생물제의 안전성 검정한다.

잘록병 방제용 미생물 제품의 미생물 안전성 검정 및 인증 신청을 위하여 잘록병 방제용 미생물 제품의 미생물의 동정, 보증 균수 측정, 잘록병 방제용 미생물 제품의 약해검정을 한다.

유용미생물을 이용한 인삼모잘록병의 생물적 방제기술을 개발하기 위하여, 병원균을 포장에 균일하게 접종하는 간이접종법 개발, 유용미생물 처리에 따른 포장방제효과 분석, 선발된 미생물 시제품의 포장방제 효과 등을 포함한다. 간이접종법 개발을 위하여 인삼 주산지로 부터 모잘록병원균을 분리 수집하였다. 현재까지 인삼 모잘록병의 생물적 방제 기술이 확립되어 있지 않아, 정확한 방제효과를 분석하기 위하여 병원성이 확인된 모잘록병원균을 접종하여 이병토양을 조성하였으며 유용미생물을 처리하여 정확한 포장방제 효과를 분석한다.

인삼 잘록병의 방제를 위하여 선발된 균주를 동정하고, 생리활성 및 유전체 특성 분석을 통해 선발 미생물의 특성을 분석하고, 선발균주 처리에 따른 토양 내 선발균주 및 병원균의 밀도 변화 및 토양미생물 군집 분석을 수행하는 것이다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제1절 국내 연구 현황

우리나라의 인삼에 발생하는 잘록병의 병원균은 *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*, *Pythium debaryanum*이 보고되어 있다(The Korean Society of Plant Pathology, 2009). 인삼 잘록병은 묘삼생산에 직결되는 가장 중요한 토양병으로 과도한 짚 멀칭 등으로 토양습도가 높고 서늘하면서 다비, 밀식 재배환경에서 갑자기 집단적으로 발생한다(Rahman 등, 2007). 인삼에서 *Rhizoctonia solani*에 의한 잘록병은 4월 중하순에 시작하여 5월 상순에 발생하며 땅에 접한 줄기부위가 암갈색으로 마르면서 쓰러진다. *Pythium ultimum*에 의한 잘록병은 5월 하순 이후 발생하고 줄기부위가 흐물거리며 물러 썩는 증상으로 나타난다고 하였다[3]. 이러한 인삼 잘록병의 피해는 19%~30% 보고된 바 있다(Hong, 1964).

인삼 모잘록병 방제에 과거에 pentachloronitrobenzene(PCNB)부터 tolclofos-methyl로 20년간 사용되어 왔고, 최근에는 fludioxinil이 등록되어 사용하고 있으나(Yu 등, 1989), 이를 화학약제의 오남용에 따른 약해, 약제내성 및 환경오염이 우려되며 친환경 인삼 모 생산 및 공급을 위하여 친환경 방제제 개발이 필요하다.

잘록병에 대한 생물적 방제 연구는 Kim 등(2002)과 Joo 등(2002)이 *B. ehimensis*를 분리하여 *R. solani* AG-4와 *P. ultimum*에 의한 채소류의 모잘록병, Yang 등(2002)은 *B. stearothermophilus*를 이용하여 여러 제제로 제조하여 오이 잘록병균 *Pythium aphanidermatum*에 처리하여 화학 살균제와 비슷한 방제 효과를 나타내어 개발 가능성을 보여주었다. Jo 등(2014)은 미국의 AgraQuest사가 개발한 Serenade (*Bacillus subtilis* QST713) 제품을 고추와 오이의 *R. solani*와 *Pythium ultimum*에 대한 방제 효과를 검토한 바 있다.

우리나라의 경우 생물농약 개발 분야에 대한 연구는 성장 단계로서 대부분의 기술들은 한국화학연구원, 한국생명공학연구원, (주)동부하이텍, (주)경농, (주)그린바이오텍, (주)흙살림, (주)비아이지, 고려바이오 등의 연구기관과 중소기업 또는 벤처기업을 중심으로 선진국 대비 70% 정도 갖추고 있는 실정이나, 대량 발효 공정 기술 및 제제/제형화 기술 등은 선진국 수준에 비하여 크게 부족한 실정이다.

국내에서 등록된 중요한 바이오농약에는 Bt제와 더불어 미생물에서 유래한 살균제로 polyoxin, streptomycin, oxytetracyclin, blashcidin-S, validamycin, kasugamycin이, 미생물에서 유래한 살충제로 spinosad와 avermectin, 식물에서 유래한 식물생장조절제에는 CA(gibbehliic acid), IAA(indole-3-acetic acid), IBA, 6-BA 등이 있으나 국내에서 사용하는 전체 농약에서 바이오농약이 차지하는 비중은 1% 미만의 시장을 형성하고 있다.

- 현재 국내에서 판매되고 있는 제품들 중에서는 품목당 매출액이 5억 원 이상 되는 제품은 거의 없으나, 시장이 팽창하고 또한 우수한 생물농약의 등록이 활발하게 진행되면 품목당 50억 원대 이상의 제품이 곧 다수 등장할 것으로 기대된다.
- 정부의 체계적인 지원 하에 산·학·연·관이 상호 협력하는 종합적인 연구를 진행하여 star 생물농약을 개발할 수 있고 기술수준을 발전시킬 수 있을 것으로 판단된다.

국내의 경우 식물병해충을 방제하기 위한 생물농약 개발에는 주로 미생물을 이용한 제품 개발에 대부분의 연구진들이 집중하고 있다. 국내의 경우 미생물살균제로 17개 제품이 등록되어 있는데, 이 중에 4개의 제품은 수입한 제품이고, 나머지 13개 제품은 국내에서 개발된 제품이다. 17개 제품들 중에서 13개 제품이 *Bacillus* 속 균주, *Paenibacillus* 속 1균주이며, *Streptomyces* 속 2균주, *Ampelomyces* 속 1균주이다.

국내에서 인삼에 등록되어 있는 미생물농약은 점무늬병에 셀러스액상수화제, 에코제트, 수화제와 테라스수화제가, 역병에는 탑시드액상수화제, 점무늬병과 뿌리썩음병 발생 억제 친환경 유기농자재(삼육오미생물제) 및 토양병 발생 억제 토양미생물제(진메이트)가가 등록되어 있으나 인삼 잘록병 방제제는 개발되지 않았다(농진청).

증량제는[diluent, 增量劑]는 농약의 제제형태 중 주제(主劑)의 희석 또는 주제의 약효를 증진시키기 위하여 사용하는 재료로 국내에서는 벤토나이트, 제오라이트, 탈크 등이 사용되고 있다.

최근 들어 길항미생물을 적용하여 토양병해를 효율적으로 방제하기 위한 방법 중의 하나로 유용미생물을 종자에 처리하는 미생물 pelletting 종자 개발도 시도되고 있다.

국내에서 인삼연구는 과거에는 담배인삼공사 인삼연초연구원을 중심으로 수행되어 왔다. 1996년 인삼산업법 제정으로 인삼산업 및 연구 기능이 농림축산식품부로 이관되어 재배 및 생산 관련 연구는 농촌진흥청에서 수행되어 왔으며 제품가공 및 효능은 한국식품연구원에서 수행 왔다. 고려인삼의 항암효과와 면역기능 등의 연구가 경희대학교와 건국대학교 등 대학을 중심으로 수행되고 있으며, 의약용 소재 개발, 기능성식품개발, 발효연구 등으로 진행되고 있다 (Park et al., 2006).

인삼병해 방제를 위해서 석회 보르도액 및 유기유황을 활용한 지상부 병해 방제 연구가 국내에서 단편적으로 수행되어 왔으며(Lee et al, 2010; Kim and Park, 2013), 인삼모잘록병에 관한 연구는 살균제를 이용한 방제 시험이 주로 수행되어 왔다(Yu et al, 1989; Shin et al, 2015).

지속 가능한 농업 발전과 환경보전의 중요성이 부각되면서 합성농약 및 화학비료를 사용하는 관행농업에서 유기비료 및 친환경농업자재를 사용하는 친환경농업과 유기농업이 소비자로부터 각광을 받고 있다. 친환경농산물의 생산을 위하여 국내에서 미생물제제 및 친환경농업자재를 이용한 인삼병해 방제기술이 개발되었으나 농업현장에 널리 보급되지 못하였다(Li and Choi, 2009; Lim et al., 2014, Seo et al., 2011). Jo 등(2014)은 *Bacillus subtilis* QST713으로 만들어진 상업용 미생물제(AgraQuest, USA)를 이용하여 고추와 오이에서 발생하는 *P. ultimum* 과 *R. solani*의 방제 효과를 분석하였다. 국내에서 인삼모잘록병의 생물적 방제연구는 최근에 Lee 등(2016)과 Woo 등(2016)에 의해 활발하게 진행되고 있으며 유기묘삼의 수요와 함께 중요성이 부각되고 있다. 2000년대 후반 캐나다에서 *Gliocladium catenulatum*을 이용한 모잘록병의 방제연구가 시작되었으며 최근에는 *Bacillus* 와 *Pseudomonas*균을 이용한 생물적 방제연구가 국외에서 활발히 수행되고 있다(Rahman and Punja, 2007; Khabbaz et al, 2015). Abbasi(2013)는 감자토양으로부터 분리한 미생물을 이용하여 토양전염성 병에 대한 병억제 조건을 규명하였으며, Khabbaz 등(2015)은 *Bacillus* 와 *Pseudomonas*균을 이용하여 *P. capsici*와 *R. solani*에 의해 발생하는 무와 오이의 모잘록병과 뿌리썩음병 방제기술을 개발하였다. 또한 Bashan 등(2014)은 길항미생물을 병방제와 생육촉진을 위하여 종자, 뿌리, 토양에 쉽게 적용가능하도록 피트모스, 탈크 및 베미큘라이트와 같은 증량제를 활용하여 제제화하는 연구를 수행하였다. 길항균을 이용하여 인삼모잘록병의 성공적인 방제를 위해서는 길항균을 효과적으로 토

양 및 식물체의 균권에 정착시키는 기술 개발이 필요하다. 또한, 길항균과 병원균의 밀도를 동시에 판별할 수 있는 정량검출법 등이 개발된다면 미생물제의 처리시기 및 처리량 검토를 통해 효과적인 생물적 방제기술을 개발할 수 있을 것으로 판단된다. 차세대 유전체 분석 기법인 pyrosequencing을 이용하여 다양한 생태(콩 재배토양 및 곤충소화기관 등)에 존재하는 미생물의 다양성 및 군집 구조를 분석하였다(Choi et al., 2015; Lee et al., 2015). 정량 PCR(qPCR)은 다양한 환경으로부터 특정 유전자의 정량, 발현 정도 등을 확인하고 미생물 군집의 기능을 분석하기 위한 좋은 방법으로 활용되고 있으며 유용균의 처리 후 실내 및 포장 실험 조건에 따른 유용균의 밀도 변화를 분석하였다(Kim et al., 2015). 병원균의 유전체 분석을 통한 특이 탐침(specific primer)을 제작하여 인삼 뿌리썩음병균을 검출할 수 있는 기술 개발하였다(원예원, 2015).

토양시료에서 특이적으로 검출하기 위해서 Real-time PCR 기법을 확립하여 인삼의 토양 병원균인 *Pythium*을 특이적으로 검출하는 기술을 개발하였다(원예원, 2008). 항생제가 토양과 수생환경 내에서 미생물 군집에 미치는 영향을 분석하였으며, 특히 미생물 군집구조 변화, 저항성의 확장, 생태적 기능교란 등을 중점적으로 분석하였다(Allen et al., 2010). 최근들어 NGS 기술의 발달로 세균의 DNA 염기서열 분석 비용이 감소하여 유용 유전자의 탐색 및 유용활성 기작을 구명하기 위한 유전체연구가 많이 수행되고 있으며 다양한 분야에서도 활용되고 있다.

제2절 국외 연구 현황

국외의 미생물농약 개발은 149종(BCPC), 일본 35종, 중국 53종이 등록되어 사용하고 있으며, 전 세계의 미생물농약시장의 시장규모는 2017년에 340백만달러 예상하고 있다. AgraQuest 사가 개발한 바실러스 서브틸리스 제제(세레나데)는 Iturin 등의 웨타이드 항생 물질을 생산하며 BASF Co.에서 년간 400억원의 매출 달성을 하였다. 잘록병에 대한 생물적 방제 연구는 *Bacillus* spp, *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp., *Pseudomonas* spp. 등이 이용되었으며(Georgakopoulos 등, 2002; Howell 등, 1980; Zamanizadeh 등, 2011), 인삼 모잘록병에 *Clonostachys rosea* f. *catenulata* 이용한 연구(Rahman, 2007). *Rhizoctonia solani*에 항균활성을 가진 내생 방선균을 분리(Goudjal Y, 2013)하였으며. 식물병 방제와 관련이 있는 *Bacillus* 균주의 이차대사산물 중 cyclic lipopeptides (bacillomycin D, fengycin, iturin, surfactin), a dipeptide (bacilysin), siderophore (bacillibactin), polyketides (bacillaene, difficidin, and macrolactin), bacteriocin (plantazolicin, amylocyclicin) 등이 생합성 관련 유전자를 보유하고 있어(Soumitra 등, 2015), 병원 세균의 생육억제나 곰팡이병균의 군사 생장 등을 억제하여 식물 병을 친환경적 방제에 가장 잘 상품화되어 농가에서 활용되고 있다.

생물농약의 시장은 도입단계를 지나 성장초기 단계로서 전 세계적으로 친환경정책 및 안전한 농산물에 대한 관심이 증가함에 따라 폭발적으로 시장이 신장하리라 기대되고 있으며 Santander Investment에 의하면 매년 약 20%씩 시장이 신장할 것으로 추정하고 있다.

생물농약의 경우 대기업보다는 주로 벤처나 중소기업들이 시장을 선도하고 있으며, 년간 500억원 이상 매출의 비교적 큰 규모의 회사로는 Valent BioSciences, Certis USA, Koppert 등이 있으며, 작지만 성공적인 회사로 평가받고 있는 AgraQuest 및 BioWorks 등이 있다.

선진국에서는 친환경농업정책의 일환으로 정부로부터 정책적 후원을 받으면서, 독자적으로 미생물과 천연물을 선발하거나 대학 및 연구소로부터 아웃소싱을 통하여 우수한 후보물을 확보하여 생물농약을 개발하고 있다.

유럽의 경우 미생물농약이 112개가 등록되어 시판되고 있으며, 천연물농약은 58개가 등록되어 있고, Semiochemicals(반합성화합물) 농약이 56개가 등록되어 있다.

미국의 경우에는 천적이 생물농약에 포함되어 있지 않으며, 선진 3개국(미국, 영국, 일본)의 생물농약 중에서 미생물농약과 생화학농약의 비율은 각각 46%와 36%로서 전체의 82%를 차지하고 있다.

제3절 국외 연구 현황 비교 및 필요 연구 분야

최근들어 NGS 기술의 발전과 더불어 미생물 생태분야의 연구가 활발하게 진행됨에 따라 인간-미생물 유전체 분석이 완료되고, 미생물이 인체의 건강과 신진대사에 많은 영향을 끼치고 있음이 밝혀지게 되었다. 뿐만 아니라 토양 내 미생물 군집의 변화가 작물의 생육 및 토양 생물 다양성 및 전체적인 활성에도 영향을 줄 수 있는 것으로 보고되어(Wall et al., 2015), 이들 미생물의 생태 및 상호작용을 밝히기 위한 연구가 방대하고 다양하게 이루어지고 있다. 특히 식물공생 미생물(symbiont)을 비롯한 근권미생물(rhizobacteria) 및 내생 미생물(endophytic microbes)은 질소고정 및 인산가용화 증진을 통해 식물에 필요한 영양분을 공급하는데 유익한 기능을 하는 것으로 알려져 있으며(Graham and Vance, 2000), 항균물질과 항생제를 생산하여 식물병원균을 억제하는 역할 또한 수행한다. 시데로포어 생산이나 식물의 전신유도저항성(ISR) 가동으로 양분에 대한 타 미생물과의 경쟁에서 우위를 차지하게 함으로써 식물의 성장을 촉진하는데 도움을 주는 것으로 알려져 있으나(Lugtenberg and Kamilova, 2009), 이에 관련된 국내 연구는 배양의존적인 연구를 제외하면 매우 미미한 실정이다.

최근 Omics 기술의 발달에 따라 활발한 비배양적연구가 가능해져 더 활발한 공생미생물 생태연구가 가능해질 것으로 기대한다. 특히 작물 근권 미생물과 공생 미생물의 생리 및 생태 연구 및 상호작용에 관한 연구는 작물의 건강과 생산성 증진에 관한 필수적인 연구 분야이다. 향후 식물-미생물 상호작용에 대한 미생물측면의 연구가 더욱 필요하게 될 것이며, 이를 활용한 식물병 방제기술 개발에 대한 연구가 다각적으로 이루어져야 할 것으로 본다.

제 3 장 연구 수행 내용 및 결과

제1절 인삼잘록병 방제 미생물의 생성 유용물질 동정 및 특성 분석

1. 재료 및 방법

가. 인삼잘록병 방제용 미생물 선발을 위한 분리균주의 항균활성 조사

(1) 미생물 분리

인삼잘록병 방제용 미생물을 선발을 위하여 인삼 시료를 채취한 뒤 막자사발을 이용하여 마쇄하였다. 마쇄한 인삼을 십진희석법(10-fold dilution methods)을 이용하여 희석하고, LB 배지에 도말하여 미생물을 분리하였다. 분리한 미생물은 순수분리 후 20% Glycerol 을 이용하여 -80°C에 보관하며 실험에 사용하였다.

(2) 병원균의 분리

병원균은 포장에서 잘록병에 감염된 인삼을 채취하여 직접 분리하였다. 이병된 부위를 70% 에탄올에 30초 동안 침지 후 멸균수에 1분간 수세하였다. 소독한 이병부위를 멸균 된 여과지 위에 올려 수분을 제거하고, 물한천(Water agar) 배지에 치상하여 병원균을 분리하였다.

(3) 병원균 배양

분리하여 공시된 균주는 LB(Luria Bertani) 배지에 접종하여 28°C/180rpm에서 48시간 동안 배양하여 사용하였고, 인삼잘록병균은 PDA(Potato Dextrose Agar) 배지에 접종 후 28°C에서 7일간 배양하였다.

(4) 항균활성 검정

PDA(Potato dextrose agar) 배지의 중앙에 인삼잘록병균(*Rhizoctonia solani*, *Pythium* spp.)을 각각 치상하고, 가장자리에 인삼에서 분리한 미생물을 접종하였다. 접종한 plate 는 25°C에 배양 7일 후 저지원의 크기를 조사하였다.

나. 인삼잘록병 방제용 균주 배양액의 인삼잘록병균에 대한 항균활성 조사

(1) 시험균주

항균활성 검정에서 *R. solani*, *Pythium* spp.에 대하여 항균활성 능력이 뛰어난 7균주를 선발하였다. 선발한 균주를 병원성이 강한 *R. solani* 균주 3종, *Pythium* spp. 균주 3종을 대상으로 항균활성 검정을 실시하였다.

(2) 시험 균주 배양

선발된 7종의 균주를 LB 배지에 접종하여 28°C에서 48시간동안 배양하였다. 48시간 배양 후 균주 배양액을 13,000rpm에서 20분간 원심분리 후, 상정액을 취하고, 0.22μm

syringe filter를 이용하여 균체를 완전히 제거하였다. 균체가 완전히 제거된 배양액을 이용하여 실험에 사용하였다.

(3) 항균활성 검정

PDA 배지의 중앙에 인삼잘록병균 *R. solani*, *Pythium* spp.를 각각 치상하고, 가장자리에 8mm의 paper disc를 치상하였다. 치상한 paper disc에 원심분리 후 필터링한 배양액을 50 μ l 접종하였다. 접종한 plate는 28°C에서 7일간 배양 후 저지원의 크기를 조사하였다.

다. 인삼잘록병 방제용 균주의 생물검정 및 균주 선발

(1) 시험균주

항균활성 검정을 통하여 선발한 #13, #26, #34, #35, #36균주를 이용하여 1차 생물검정을 실시하였고, 추가로 2균주를 더 선발하여 #36, A03-75, CC112 균주로 2차 생물검정을 실시하였다.

(2) 선발균주 및 병원균 배양

선발균주 #13, #26, #36, CC112 균주는 LB 배지에서 28°C, 180rpm의 조건으로 48시간동안 배양 후 생물검정에 사용하였다. #34, #35, A03-75 균주는 GSS 배지에서 28°C, 180rpm, 7일간 배양하였다. 인삼잘록병균은 보리배지(보리 10mL, 멸균수 20mL)에 접종하여 28°C에서 2주간 배양 후 접종원으로 생물검정에 사용하였다.

(3) 시험 상토

유기농 인삼재배용 전용상토 (Peatmoss, Vermiculite, Perlite 등)를 30×50×25cm의 스티로폼 상자에 10L씩 사용하였다.

(4) 처리방법

인삼재배용 상토에 인삼 종자를 파종한 14일 후 인삼잘록병균을 배양한 보리배지를 (5g/상자) 접종하였다. 인삼잘록병균을 접종한 후 선발균주의 배양액을 10⁷ CFU/mL의 농도로 희석하여 1주당 10mL씩 7일 간격으로 3회 관주처리 하였고, 최종 처리 7일 후 병원균별 이병주율(%)을 조사하였다. 시험구 배치는 완전임의배치 3반복으로 하였고, 각 반복은 48립씩으로 하였다.

라. 선발미생물의 배양적 특성 조사

(1) 선발 균주의 배양온도별 균 생장 조사

선발 미생물 #13, M75, CC112, #53, #164균주를 TSA배지에 배양하여 자란 균을 루프로 긁어 삼등분한 LBA배지에 균을 한 획선을 3반복하여 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 28°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C의 온도에서 5일간 배양한 후 온도별 균의 생육을 조사하였다.

(2) 선발 균주의 pH별 균 생장 조사

1N HCl과 1N NaOH를 이용하여 TSB배지의 pH를 조정하여 선발균주를 LB(Luria Bertani) 배지를 이용하여 미생물을 배양한 후 각각의 배지에 전 배양 균주를 2%(v/v)으로 접종하여 진탕배양기에서 25°C, 180rpm의 조건으로 48시간 후 배양액을 희석하여 LB 배지에 도말하여 균수를 조사하였다.

(3) 선발 균주의 배지종류별 균 생장 조사

선발 *Bacillus* 균주는 #13, M75, CC112를 사용하였다. 배지 종류는 LB(trypotone 10g, yeast extract 5g, NaCl 10g), TSB (Bacto Tryptone 15g, Bacto Soytone 5g, NaCl 5g), PDB (glucose 20g, potato extract 4g), NYDB(Nutrient Yeast Dextrose Broth, Peptone 1.2g, Yeast extract 1.2g, Dextrose 0.3g), YP(Yeast extract 5g, Peptone 5g, NaCl 5g), KB(Peptone 20g, K₂HPO₄ 1.5g, MgSO₄·7H₂O 1.5g, Glycerol 15mL/L) , BSM(Soytone 0.5%, Sucrose 2%) 사용하였다.

각각의 배지에 전배양한 균주를 2%(v/v) 으로 접종하여 진탕배양기에서 25°C, 180rpm, 48시간 후 배양액을 희석하여 LB(Luria Bertani) 배지에 도말하여 균수를 조사하였다.

선발 *Pseudomonas* 균주는 #53과 #164균주를 사용하였고, 배지는 LB, TSB, NB, KB, PDB를 사용하였다. 각각의 배지에 전 배양 균주를 2%(v/v) 으로 접종하여 25°C, 180rpm에서 48시간 동안 배양하였다. 배양 후 LB 배지에 도말하여 25°C에서 2일간 배양 후 생균수를 조사하였다.

마. 선발 균주의 배지종류별 인삼 잘록병균 발생 억제 효과 검정

(1) 상자 이용한 선발 균주의 배지별 인삼 잘록병균 발생 억제 효과 검정

선발미생물 5종(#13, M75, CC112, #53, #164)중에서 바실러스균주는 선발한 배지 LB, KB, BSM, 슈도모나스균주(#53, #164)는 선발한 배지 LB, TSB, NYDB를 사용하였다.

접종원 배양은 선발된 5종의 균주 중 #13, M75, CC112 균주는 LB, KB, BSM 배지에, #53, #164 균주는 LB, TSB, NYDB 배지에 접종한 뒤 28°C, 180rpm에서 48시간동안 배양하였다. 잘록병균 배양은 인삼잘록병균의 경우 보리배지에 접종하여 28°C에서 2주간 배양 후 사용하였다. 시험 상토는 유기농 인삼재배용 상토를 30×50×25cm의 스티로폼 상자에 담아서 사용하였다. 처리방법은 균주별 배지종류별 한 배양액 당 3반복은 종자침지 후 파종, 3반복은 종자침지 파종 후 관주처리를 6회 처리하였다. 종자침지는 각 배양액을 10배 희석하여 30분 침지한 후 파종하였고, 병원균은 파종 10일 후 인삼잘록병균

을 배양한 보리배지를 0.5g/상자 접종하였다. 관주처리는 균주 배양액을 10^7 CFU/mL의 농도로 희석하여 1주당 10mL씩 7일 간격 6회 관주처리 7일후에 이병주율을 조사하였다.

(2) 포장에서 선발균주의 인삼종자 침지처리 시 입모를 조사

대전의 인삼 육묘포장에서 선발 균주를 BSM배지에서 25°C, 180rpm에서 48시간 배양하여 10배로 희석한 배양액에 인삼종자를 1시간 침지한 후 5.22일 파종하여 6월 18일 입모수를 조사하였다.

바. 선발 미생물의 잘록병균 생육 억제 작용기작 구명

선발 5균주(#13, M75, CC112, #53, #164)를 위와 같이 pH와 배지종류별로 48시간 배양한 배양액을 14,000 rpm, 4°C에서 10분간 원심분리 후 회수한 상징액을 0.22μm syringe filter를 이용하여 균체를 완전히 제거하여 PDA(Potato Dextrose Agar)배지의 중앙에 *Rhizoctonia solani*와 *Pythium* sp.의 균총을 치상하고 가장자리에 여과한 상징액 50ul를 접종한 직경 8mm paper disc를 올려놓고 25°C에서 배양 7일 후 저지원의 크기를 조사하였다.

선발 5균주(#13, M75, CC112, #53, #164)에 대한 휘발성물질 생성을 조사하기위하여 5 균주를 TSA배지에서 25°C에서 48시간 배양하여 I 플레이트에 분주한 TSA배지에 선발 균주를 도말하여 25°C에서 24시간 배양한 후, I 플레이트의 PDA(Potato Dextrose Agar)가 분주된 곳의 가장자리에 *Rhizoctonia solani*와 *Pythium* sp.의 균총을 치상하고 25°C에서 배양 후 4~7일 후 병원균의 균사 생육억제를 조사하였다.

사. 방선균의 인삼 잘록병 방제 효과 검정

(1) 방선균 및 잘록병균 배양

방선균 A75와 A501균주는 GSS배지(soluble starch 10 g, glucose 20 g, soybean flour 25 g, beef extract 1 g, yeast extract 4 g, NaCl 2 g, K₂HPO₄0.25g,CaCO₃2g/L,pH7.0)를 이용하였으며, 1 L 삼각플라스크에 200 mL 씩 분주한 후 25°C에서 150 rpm으로 7일간 진탕 배양하여 사용하였다. 잘록병균은 *Rhizoctonia solani* 와 *Pythium* sp. 균주는 방제 효과 검정을 위하여 PDA(Potato Dextrose Agar)에서 25°C에서 5일간 배양한 후에 보리 배지를 2회 멸균하여 각 균주의 균총을 떼어내어 보리배지에 접종하여 25°C에서 2주간 배양후 접종원으로 사용하였다.

(2) 방선균의 인삼 잘록병균에 대한 항균활성 검정

식물병원균 *Rhizoctonia solani* 와 *Pythium* sp. 균주를 PDA) 배지에 이식 후 28°C에서 5일간 배양하여 직경 5mm인 코르크보러를 이용하여 병원균의 균총을 PDA 배지가 분주된 일회용 페트리디쉬 중앙에 치상하였다. 방선균 A75와 A501균주를 MBA 평판배지에 배양하여 루프를 이용하여 방선균을 떼어내어 PDA 배지가 분주된 일회용 페트리디쉬에 3개소에 치상하여 28°C 항온기에서 7일간 배양 후 저지원의 직경을 조사하였다.

그리고 방선균 A75와 A501균주의 휘발성 물질 생성에 의한 *Rhizoctonia solani* 와 *Pythium* sp. 균주의 항균력 조사는 I 플레이트를 이용하여 TSA 배지와 PDA 배지를 분주하여 방선균을 TSA배지에 도말하여 5일간 25°C에서 배양한 다음, PDA 배지에서 배양한 *Rhizoctonia solani* 와 *Pythium* sp. 균총을 직경 5mm인 코르크보러를 이용하여 균총을 PDA 배지가 분주된 I 플레이트에 치상하여 25°C에서 3일간 배양한 후 조사하였다.

(3) 방선균의 인삼 잘록병 방제 효과 검정

어상자(500×340×400mm)에 인삼재배용 상토(Shinsung Mineral, Goesan, Korea)를 사용하여 개갑 인삼 종자를 상자당 54립씩 3반복으로 파종하였다. 병원균 *Rhizoctonia solani* 와 *Pythium* sp. 균주의 배양은 PDA 배지에 배양한 후 보리배지에 균총을 이식하여 25°C에서 15일간 배양하여 접종원으로 사용하였다. 방선균 A75와 A501균주를 GSS배지에서 7일간 배양한 배양액을 사용하였다.

(4) 방선균의 *Rhizoctonia solani* 와 *Pythium* sp. 에 대한 방제효과 검정

종자침지처리는 방선균 A75와 A501균주를 GSS배지에서 7일간 배양한 각각의 배양액을 10배와 20배로 희석하여 인삼 개갑 종자를 1시간 침지한 후 파종하였다. 그리고 관주처리는 인삼 개갑종자를 파종 직후 균주별 배양액을 10배와 20배로 희석하여 주당 10ml 씩 7일 간격 3회 관주 처리하였다. 모든 처리에서 병원균의 접종은 병원균 *Rhizoctonia solani* 와 *Pythium* sp. 을 각각 배양한 보리를 상자당 0.5g/상자 접종하였고, 접종 4주후에 이병주를 조사하였다.

(5) 방선균 배양액 혼합처리에 의한 *Rhizoctonia solani* 와 *Pythium* sp. 에 대한 방제효과 검정

방선균 A75와 A501균주를 GSS배지에서 7일간 배양한 각각의 배양액을 1:1(v/v)로 혼합하여 사용하였다. 종자 침지처리구는 방선균 A75와 A501균주의 혼합한 배양액을 50배로 희석하여 개갑종자를 1시간 침지하여 어상자에 파종하였다. 또한 관주처리구는 인삼 개갑종자를 어상자에 파종한 직후 2 균주의 배양한 혼합액을 100배로 희석하여 주당 10ml씩 처리하였고, 20일후에 7일 간격 3회 관주 처리하였다. 그리고 종자침지처리+관주처리구는 종자를 배양한 혼합액 50배로 침지처리하여 파종한 직후에 배양한 혼합액을 100배로 희석하여 주당 10ml씩 관주처리하였으며, 20일후에 7일 간격 3회 관주처리하였다. 병원균의 접종은 병원균을 각각 배양한 보리를 인삼종자 파종 20일 후에 상자당 0.5g/상자씩 접종하여, 인삼종자의 발아와 잘록병 발생은 병원균 접종 42일후에 조사하였다.

아. 선발 바실러스 균주의 시제품의 인삼 잘록병 방제 효과 검정 및 약해 조사

(1) 시제품의 균수조사

충남대학교로부터 받은 #13, M75, CC112균주의 시제품 3종류를 시험관에 멸균수 9ml과 시제품 #13, CC112, M75를 각각 1ml을 넣어 희석하고, 희석액 1ml을 피펫으로 채취하여 멸균수 9ml에 넣어 다시 희석하였다. 계속 희석한 후 TSA배지에 $100\mu\text{l}$ 를 5반복으로 분주하여 도말하였다. 25°C 배양기에서 48시간 배양한 후 균수를 조사하였다.

(2) 시제품의 인삼 잘록병에 대한 방제효과 검정

어상자($500\times300\times150\text{ mm}$)에 인삼재배용 상토(Shinsung Mineral, Goesan, Korea)를 사용하여 개각 인삼 종자를 상자당 54립씩 3반복으로 파종하였다. 병원균 *Rhizoctonia solani*와 *Pythium* sp. 균주의 배양은 PDA 배지에 배양한 후 보리배지에 균총을 이식하여 25°C 에서 15일간 배양하여 접종원으로 사용하였다.

시제품(탈크) 3은 종자침지와 관주처리는 10, 20, 50, 100배로 희석하였으며, 종자 침지 처리구는 희석배수별로 개각종자를 1시간 침지하여 상자에 파종하였다. 또한 관주처리구는 인삼 개각종자를 상자에 파종한 다음 시제품을 희석배수별로 주당 10 mL씩 관주 처리하였고, 병원균의 접종은 *Rhizoctonia solani*를 배양한 보리를 인삼종자 파종 후에 상자당 8개씩 접종하여 이병주와 약해를 조사하였다.

시제품(제오라이트) 2는 종자침지는 10배와 20배, 관주처리는 50배와 100배로 희석하였으며, 위와 같은 방법으로 처리하여 조사하였고, 시제품 3는 종자 침지와 관주처리를 50배와 100배로 처리하고 *Rhizoctonia solani* 와 *Pythium* sp. 를 각각 배양한 보리를 인삼 종자 파종 후에 상자당 8개씩 접종하여 이병주를 조사하였다.

시제품(벤토나이트) 1를 각각 50배, 100배로 희석하여 종자를 1시간 침지하였다. 침지 후 구당 54립씩 파종하였다. 관주처리는 시제품을 각각 50배, 100배로 희석하여 파종한 인삼 종자 한 립 당 10ml씩 7일 간격 3회 관주하였으며 3반복으로 실시하였다. 인삼잘록병원균(*R. solani*, *Pythium* sp.)은 PDA배지 25°C 항온기에서 7일간 배양하고, 균총을 5mm cork borer로 떼어내어 멸균한 보리배지에 인삼잘록병원균을 15일간 배양하여 구당 8알씩 접종하였다.

(3) 시제품의 약해 조사

#13, M75, CC112균주의 3종 시제품에 대하여 인삼 개갑종자를 어상자나 두부상자 54립씩 파종하였다. 침지처리는 시제품별 희석액에 1시간 침지 후에 파종하였고 관주처리는 파종후에 희석배수별로 종자당 10ml씩 7일 간격 3회처리하여 종자발아율, 초장 및 반점율 조사하였다.

2. 결과

가. 인삼잘록병 방제용 미생물 선발을 위한 균주별 항균활성

(1) 분리 미생물의 인삼잘록병균에 대한 항균활성

인삼에서 분리한 총 38균주 중 *R. solani*에 대해서는 #5, 7, 8, 13, 26, 27, 28, 32, 33, 34, 35, 36의 총 12개의 균주가 *Pythium* spp.에 대해서는 #13, 27, 28, 32, 33, 34, 35, 36의 총 8개의 균주가 높은 항균활성을 나타내었다. 이를 균주 중 #13, 26, 34, 35, 36, A03-75, CC112 균주를 선발하였다(Table 1-1, 1-2, Fig. 1).

Table 1-1. Antifungal activity of biocontrol agent against ginseng damping-off caused by *Rhizoctonia solani*

No. of isolate	Inhibition zone (mm)									
	1 ^a	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
5	2.1	5.2	6.9	6.4	6.4	4.7	7.7	5.6	6.5	6.5
6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
7	8.1	9.2	11.2	10.7	11.2	7.2	9.9	10.8	11.5	10.2
8	2.0	3.6	5.7	7.3	8.9	3.8	7.3	5.8	8.9	7.5
9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
10	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
11	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
12	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
13	2.2	5.8	5.9	7.7	4.5	4.8	8.1	6.2	7.5	7.5
14	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
15	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
16	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
17	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
18	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
19	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
20	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
21	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
22	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
23	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
24	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
25	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
26	6.9	10.3	10.4	9.7	10.3	7.5	10.1	9.2	10.9	9.1
27	6.0	10.1	10.2	9.9	11.0	7.5	10.4	10.1	11.3	9.2
28	5.1	5.3	8.8	8.3	9.3	3.6	8.0	9.6	10.6	8.3
29	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
30	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
31	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
32	2.6	5.5	7.0	8.2	8.2	5.3	6.6	7.5	8.2	8.4
33	6.8	9.0	9.9	9.9	10.7	6.6	8.5	11.0	11.2	9.2
34	2.4	4.6	4.4	4.6	5.2	2.8	4.7	4.1	4.9	3.2
35	5.5	8.2	10.4	7.9	8.7	5.7	7.5	7.9	7.4	7.3
36	7.1	10.1	10.1	5.5	10.5	6.3	9.0	4.2	8.6	5.5
A03-75	1.9	1.7	4.5	6.6	6.6	5.1	3.2	2.7	3.3	2.0
CC112	7.5	10.3	10.1	5.0	10.2	6.3	8.0	3.2	5.0	5.0

*a : Number of *R. solani*.

Table 1-2. Antifungal activity of biocontrol agent against ginseng damping-off caused by *Pythium* spp.

No. of isolate	Inhibition zone (mm)									
	1 ^a	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0.0a	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
5	0.0	7.4	0.0	0.0	0.0	0.0	5.8	8.5	6.4	2.9
6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
7	0.0	0.0	0.0	6.9	0.0	0.0	0.0	5.5	5.6	3.5
8	0.0	0.0	0.0	8.3	0.0	0.0	5.2	4.3	3.3	5.6
9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
10	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
11	0.0	0.0	0.0	7.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
12	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
13	4.4	5.7	5.3	6.4	10.7	7.4	6.3	5.9	7.7	7.6
14	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
15	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
16	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
17	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
18	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
19	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
20	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
21	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
22	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
23	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
24	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
25	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
26	0.0	0.0	0.0	5.4	0.0	0.0	0.0	0.0	7.5	6.9
27	3.9	5.3	9.4	7.2	7.1	7.7	5.7	5.8	6.3	6.0
28	4.7	7.3	6.2	3.6	9.6	5.8	6.2	5.0	6.7	5.9
29	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
30	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
31	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
32	7.2	5.9	6.69	5.7	10.0	6.2	7.4	6.9	7.7	7.5
33	6.9	6.1	8.5	6.7	8.7	6.2	9.0	9.4	7.6	8.1
34	2.9	1.7	7.7	7.9	8.1	7.7	4.7	4.4	3.6	2.6
35	1.9	1.7	6.0	6.7	7.8	6.1	2.2	3.7	8.8	6.5
36	3.5	0.0	0.0	5.3	3.5	7.5	6.3	5.5	7.1	5.0
A03-75	1.5	1.2	5.0	7.5	7.0	6.1	2.4	4.0	6.0	6.0
CC112	4.0	1.2	2.2	2.1	3.2	2.6	2.0	2.0	3.2	1.5

*a : Number of *Pythium* sp.

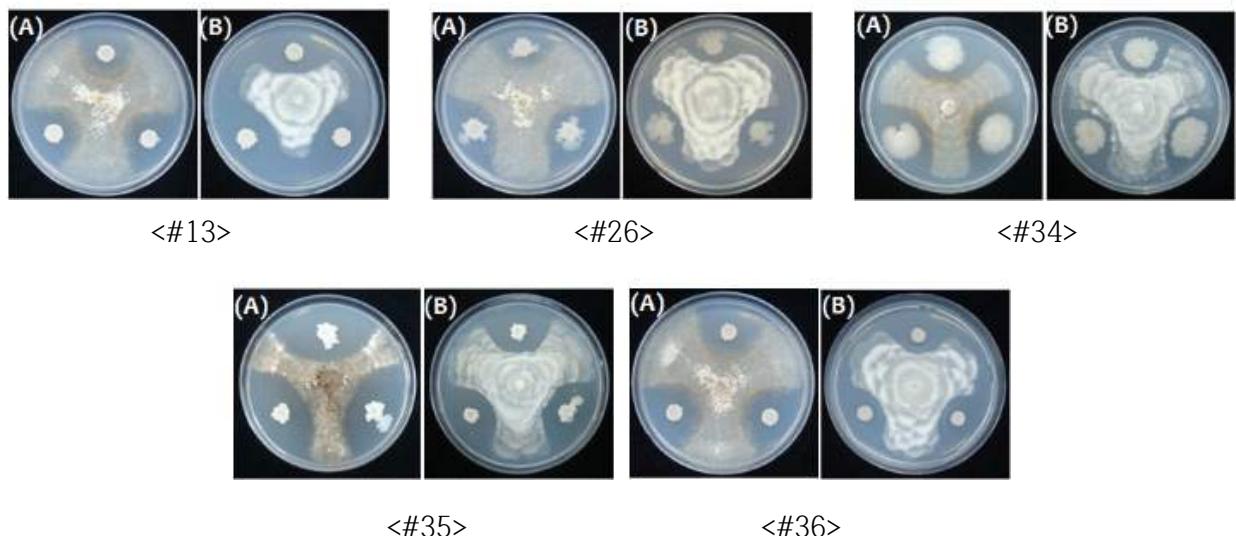


Fig.1-1. Inhibition of fungal growth by biocontrol agent in dual culture.

*(A) *Rhizoctonia solani*, (B) *Pythium* sp.

나. 인삼잘록병 방제용 균주 배양여액의 인삼잘록병균에 대한 항균활성

(1) 선발 미생물의 배양여액을 이용한 항균활성

균주 배양 후 균체를 제거한 배양여액을 이용한 항균활성능력을 조사한 결과 #13, #26, #36번 균주 모두 *R. solani*에 대해서는 균체를 이용한 항균활성 조사 시 보다는 감소하였지만, 배양여액에서도 상당한 항균활성 효과를 나타내었다. 그러나 *Pythium* spp.에 대해서는 배양여액은 저지원의 크기가 현저히 작아짐을 확인할 수 있었다(Table 1-3, Fig. 1-2).

CC112 균주가 *Rhizoctonia solani* 등 여러 식물병원균에 대하여 항균활성을 나타낸 것은 식물병 방제와 관련이 있는 바실러스 균주의 이차대사산물 중 cyclic lipopeptides (bacillomycin D, fengycin, iturin, surfactin), a dipeptide (bacilysin), siderophore (bacillibactin), polyketides (bacillaene, difficidin, macrolactin), bacteriocin (plantazolicin, amylocyclicin) 등이 생합성 관련 유전자를 보유하고 있는 것(Lee 등, 2012; Soumitra 등, 2015,)으로 추정된다.

Table 1-3. Antifungal activity of cell-free supernatant(CFS) by biocontrol agents

No. of isolate	Inhibition zone (mm)					
	<i>Rhizoctonia solani</i>			<i>Pythium</i> spp.		
	1 ^a	2	3	1 ^b	2	3
13	3.1	2.8	2.7	0.0	0.0	0.7
26	2.8	3.8	2.1	0.0	0.0	0.8
34	2.1	2.8	2.7	0.0	0.0	0.2
35	3.2	2.4	3.0	0.0	0.0	0.2
36	8.5	8.2	9.7	0.0	0.0	0.2
A03-75	2.3	2.4	2.2	0.0	0.0	0.4
CC112	3.5	2.2	3.4	0.0	0.0	0.2

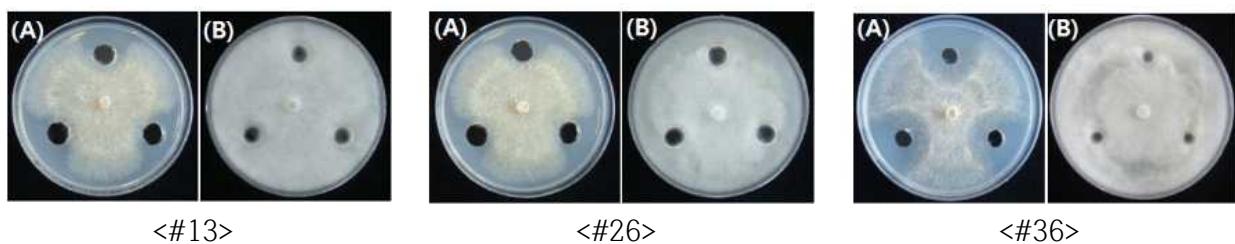
*^a : Number of *R.solani*, ^b : Number of *Pythium* spp.

Fig. 1-2. Inhibition of fungal growth by CFS of biocontrol agent.

*(A) *Rhizoctonia solani*, (B) *Pythium* sp.

다. 인삼잘록병 방제용 선발 균주의 생물검정 및 우수균주 선발

(1) 인삼잘록병 방제용 선발 균주의 1차 생물 검정

1차 생물검정을 통하여 인삼잘록병 방제효과를 조사한 결과, #13 균주와 #35 균주가 *R.solani*에 의한 잘록병에 대해서 각각 54.0, 52.7%의 방제 효과를 나타내었다. 또한 *Pythium* spp.에 의한 잘록병에 대해서는 #13번 균주는 60.9, #35번 균주는 73.5%의 방제 효과를 나타내었다(Table 1-4. Fig. 1-3).

Table 1-4. Effect of biocontrol agent treatment on damping-off caused by *R.solani* and *Pythium* sp. on ginseng in pots (1st experiment).

No. of isolate	<i>Rhizoctonia solani</i>		<i>Pythium</i> sp.	
	Infected plant (%)	Control efficiency (%)	Infected plant (%)	Control efficiency (%)
13	18.2a ^a	54.0	11.7ab ^{a)}	60.9
26	27.7c	33.0	21.9d	26.5
34	26.2c	34.3	12.1b	59.4
35	20.5ab	52.7	7.9a	73.5
36	31.0d	35.3	17.1c	42.6
Control	42.5e	-	29.8e	-

^{a)} In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by Duncan's multiple range test..



< *Rhizoctonia solani*에 의한 모잘록병 >



< *Pythium* sp.에 의한 모잘록병 >

Fig. 1-3. Bioassay of biocontrol agent of damping off caused by *R.solani* and *Pythium* sp.

(2) 인삼질록병 방제용 선발 균주의 2차 생물 검정

2차로 #36, A03-75, CC112 균주를 대상으로 인삼질록병 방제효과를 조사하였다. 그 결과 처리한 3균주 중 CC112 균주가 *R solani* 와 *Pythium* sp.에 대해서 각각 23.1, 45.5%로 처리 균주 중 높은 방제효과를 나타내었다(Table 1-5).

Table 1-5. Effect of biocontrol agent treatment on damping-off caused by *R.solani* and *Pythium* sp. on ginseng in pots (2nd experiment).

No. of isolate	<i>Rhizoctonia solani</i>		<i>Pythium</i> sp.	
	Infected plant (%)	Control efficiency (%)	Infected plant (%)	Control efficiency (%)
36	33.3a ^{a)}	7.7	15.3b ^{a)}	0.0
A03-75	31.9a	11.5	13.9b	9.1
CC112	27.8a	23.1	8.3a	45.5
Control	36.1a	-	15.3b	-

^{a)} In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by Duncan's multiple range test.

라. 선발미생물의 배양적 특성 조사

바실러스 선발 3균주의 온도별 생장은 15°C부터 50°C까지 생육이 가능하였으며, #13과 M75균주는 40°C에서 적온이었고, CC112균주는 40~45°C가 적온이었으며, 슈도모나스균주 #53균주는 20~50°C에서 생육하였고, 적온은 40~45°C이며, #164균주는 15~50°C에서 생육하였고, 적온은 35~40°C이다(Table 1-6).

Table 1-6. Growth of selected isolates at cultural temperature

Temperature (°C)	Growth degree of isolate				
	#13	M75	CC112	#53	#164
10	-	-	-	-	-
15	+	+	+	-	+
20	+	+	+	+	+
25	+	+	+	+	+
28	+	+	+	+	+
30	+	+	+	+	++
35	++	++	+	++	+++
40	+++	+++	+++	+++	+++
45	+	+	+++	+++	+
50	+	+	+	+	+

-: Non-growth, + : 1mm~10mm, ++ : 10.1mm~15mm, +++ : 15.1mm~25mm.

바실러스 선발 3균주의 pH별 균 생장은 균주별로 차이가 있었으며, #13균주는 pH 4~9 사이의 폭넓은 균 생장을 나타났고, M75균주는 pH 5~6에서, CC112 균주는 pH 6에서 생장이 가장 좋았으며, 슈도모나스 #53과 #164균주는 pH 6~7에서 균 생장이 가장 좋았다(Table 1-7).

Table 1-7. No. of colony of selected isolates after incubation at pH

pH	No. of colony of isolate (cfu/ml)				
	#13	M75	CC112	#53	#164
4	9.5×10^8 b ^{a)}	2.0×10^7 a ^{a)}	4.0×10^7 a ^{a)}	4.0×10^7 a ^{a)}	1.1×10^7 a ^{a)}
5	1.0×10^9 b	3.1×10^9 c	1.2×10^8 b	1.2×10^8 b	3.5×10^7
6	4.6×10^8 a	2.4×10^9 c	1.4×10^9 c	2.1×10^9 c	2.3×10^9 c
7	1.8×10^9 b	4.5×10^8 b	2.0×10^7 a	1.9×10^9 c	3.6×10^9 c
8	7.8×10^8 ab	3.9×10^8 b	2.2×10^7 a	9.1×10^7 a	2.0×10^8 b
9	1.3×10^9 b	9.2×10^7 a	2.5×10^6 b	5.2×10^7 a	2.4×10^7 a

^{a)} In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by Duncan's multiple range test.

그리고 선발균주에 대한 배지종류별 균 생장을 조사한 결과에서 #13균주는 BSM 배지가 4.7×10^9 으로 가장 좋았으며, M75균주는 BSM과 LB배지가 $1.0 \sim 5.2 \times 10^8$ 좋았으며, CC112균주는 BSM배지에서 1.2×10^9 , #53균주는 LB배지에서 1.2×10^{10} , #164균주는 LB와 TSB배지에서 $2.0 \sim 2.1 \times 10^{10}$ 균생장이 좋았다(Table 1-8).

Table 1-8. No. of colony of selected isolates cultured using several media

Medium	No. of colony of isolate (cfu/ml)				
	<i>Bacillus</i> spp.			<i>Pseudomonas</i> spp.	
	#13	M75	CC112	#53	#164
LB	3.3×10^7 a ^{a)}	1.0×10^9 b ^{a)}	4.9×10^8 bc ^{a)}	1.2×10^{10} b ^{a)}	2.1×10^{10} b ^{a)}
TSB	5.3×10^8 ab	1.0×10^8 a	1.9×10^7 b	8.8×10^9 ab	2.0×10^{10} b
NYDB	1.0×10^8 ab	1.0×10^8 a	1.0×10^6 a	-	-
KB	1.8×10^8 ab	5.2×10^8 ab	9.0×10^7 b	3.3×10^9 a	2.7×10^9 a
YP	1.3×10^8 ab	7.5×10^7 a	4.2×10^7 b	-	-
BSM	4.7×10^9 b	2.6×10^9 b	1.2×10^9 c	-	-
NB	-	-	-	4.0×10^9 a	8.1×10^9 ab

^{a)} In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by Duncan's multiple range test.

마. 선발 균주의 배지별 인삼 잘록병균 발생 억제 효과

(1) 상자 이용한 선발 균주의 배지별 인삼 잘록병균 발생 억제 효과 검정

선발 *Bacillus* 균주에 대하여 선발한 배지를 이용하여 처리방법별 *R.solani*에 의한 인삼 잘록병 발생 억제 효과는 #13균주는 LB 배지에 10배 희석하여 침지처리가 64.8%, LB배지에 침지 및 관주처리가 54.7%방제 하였으며, M75균주는 LB배지에서 침지처리가 47.9%, BSM배지에서 침지와 관주처리구가 50.8%, CC112균주는 LB배지 배양하여 10배 희석액 침지가 65.8%, BSM 배지 이용한 침지가 67.1%, LB배지에 침지 및 관주처리구에서 64.2%, BSM 배지 이용한 침지 및 관주처리구가 53.8% 방제효과를 나타내었다 (Table 1-9, Fig. 1-4). 일반적으로 배양액에 침지처리가 침지 및 관주처리구 보다 효과가 좋았다.

Table 1-9. Control effect of cultured broth of *Bacillus* isolates using several media on ginseng damping-off caused by *R. solani*

Treatment	#13		M75		CC112		Control
	Infected plant (%)	Control efficacy (%)	Infected plant (%)	Control efficacy (%)	Infected plant (%)	Control efficacy (%)	Infected plant (%)
LB(dipping)	10.8 def ^{a)}	64.8	16.0a-f	47.9	10.5ef	65.8	
KB(dipping)	20.3a-f	33.9	17.8a-f	42.0	22.5a-e	26.7	
BSM(dipping)	19.0a-f	38.1	17.5a-f	43.0	10.1 f	67.1	
LB (dipping+drenching)	13.9b-f	54.7	25.8abc	16.0	11.0c-f	64.2	30.7a
KB (dipping+drenching)	21.1a-f	31.3	26.6ab	13.4	23.2a-d	24.4	
BSM (dipping+drenching)	21.9a-f	28.7	15.1b-f	50.8	14.2b-f	53.8	

^{a)} In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by Duncan's multiple range test.

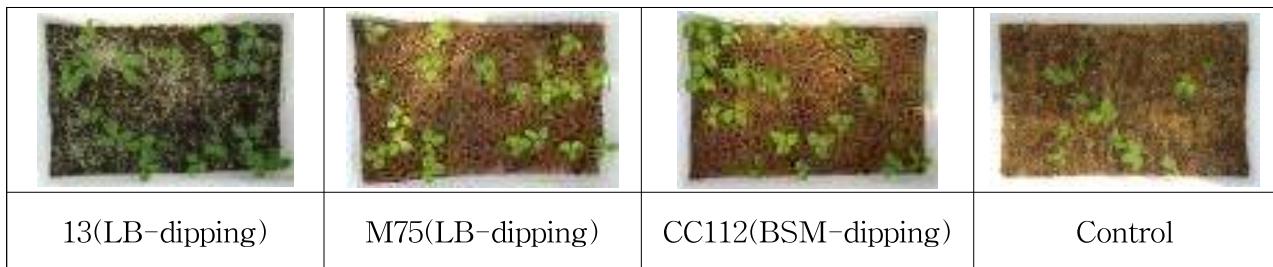


Fig. 1-4. Control effect treated with seed dipping of several cultured broth of *Bacillus* isolates on ginseng damping-off caused by *R. solani*.

선발 *Pseudomonas* 균주의 선발한 배지를 이용하여 처리방법별 *Pythium* sp.에 의한 인삼 잘록병 발생 억제 효과를 조사한 결과, #53균주가 LB 배지를 이용한 침지처리가 69.3%, NYDB배지를 이용한 침지처리구가 66.8%, TSB배지를 이용한 침지처리에서 58.3% 방제효과를 나타내었고, #164균주는 TSB배지를 이용한 침지처리구에서 71.4%, NYDB배지를 이용한 침지처리구가 59.0%, NYDB배지를 이용한 침지 및 관주처리구가 82.0%의 방제효과를 나타내었으며, 침지처리와 관주처리한 처리구보다도 침지처리가 효과적이었다(Table 1-10).

Table 1-10. Control effect of cultured broth of *Pseudomonas* isolates using several media on ginseng damping-off caused by *Pythium* sp.

Treatment	#53		#164		Control
	Infected plant (%)	Control efficacy (%)	Infected plant (%)	Control efficacy (%)	Infected plant (%)
LB(dipping)	8.7 e ^{a)}	69.3	13.1b-e ^{a)}	53.7	
TSB(dipping)	11.8cde	58.3	8.1 e	71.4	
NYDB(dipping)	9.4de	66.8	11.6 cde	59.0	
LB(dipping+drenching)	30.1abc	-	21.1 a-e	25.4	28.3a-d
TSB(dipping+drenching)	31.7ab	-	33.7 a	-	
NYDB(dipping+drenching)	17.0a-e	39.9	5.1 cde	82.0	

^{a)} In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by Duncan's multiple range test.

(2) 포장에서 선발균주의 인삼종자 침지처리 시 입모률

인삼 묘포장에서 바실러스 3균주를 BSM배지에서 배양한 배양액을 10배로 희석하여 인삼 개갑종자를 침지하여 포장에 과종한 결과, 무처리에 비하여 입모율이 14.2~69% 증가되었으며, CC112균주가 69%, M75균주가 62.7% 향상되었지만 통계적 유의성은 없었다(Table 1-11, Fig. 1-5).

Table 1-11. Comparison of ginseng seedling by seed dipping with cultured broth of *Bacillus* isolates at ginseng nursery in Daejeon

Isolate	No. of ginseng seedling				Index(%)
	1 replicate	2	3	Average	
M75	222	139	132	164.3 ^{a)}	162.7
#13	177	126	43	115.3a	114.2
CC112	208	208	96	170.7a	169.0
Control	103	115	85	101.0a	-

- 대전 묘암포장에서 배양액을 10배 희석액에 침지 후 5월 22일 파종하여 6월 18일 조사.

^{a)} In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by Duncan's multiple range test.

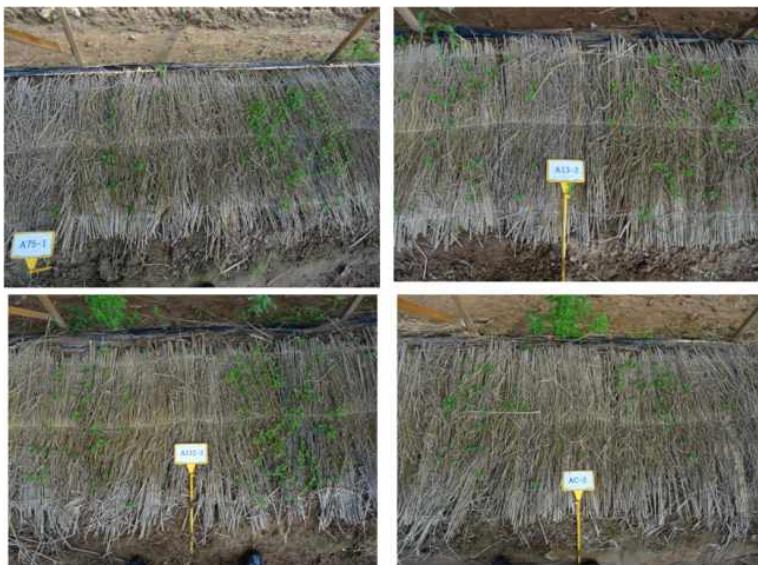


Fig. 1-5. Ginseng seedling after 17 days treated with seed dipping in cultured broth of *Bacillus* isolates at ginseng nursery.

바. 선발 미생물의 잘록병균 생육 억제 작용기작 구명

선발 미생물 바실러스 3균주(#13, M75, CC112)의 pH별로 배양액을 여과한 배양액을 *R. solani* 와 대치 배양하여 항균활성을 조사한 결과, 균주별로 차이가 있었다(Table 1-12). #13균주는 pH 6에서 활성이 있었고, M75균주는 pH 6~8에서, CC112균주는 pH 6~7에서 활성을 각각 나타내었다. 바실러스 3균주는 *Pythium. sp*에 대하여 전혀 활성을 나타나지 못하였다(Table 1-13).

Table 1-12. Antifungal of cell-free supernatant of cultured broth of biocontrol agents at different pH against *R. solani*.

pH	Inhibition zoon (mm)		
	#13	M75	CC112
4	0.0a ^{a)}	0.0a	0.0a
5	0.0a	0.0a	0.0a
6	2.0a	6.0b	3.0b
7	0.0a	4.0b	1.0a
8	0.0a	4.0b	0.0a
9	0.0a	0.0a	0.0a

^{a)} In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by Duncan's multiple range test..

Table 1-13. Antifungal of cell-free supernatant of cultured broth of biocontrol agents at different pH against *Pythium* sp.

pH	Inhibition zoon (mm)		
	#13	M75	CC112
4	0.0	0.0	0.0
5	0.0	0.0	0.0
6	0.0	0.0	0.0
7	0.0	0.0	0.0
8	0.0	0.0	0.0
9	0.0	0.0	0.0

바실러스 3균주는 배지종류별에서 BSM배지에서만 배양여액이 *R. solani*에 대하여 모두 항균활성을 나타내었으며(Table 1-14), *Pythium* sp.에 대하여 전혀 활성을 나타나지 못하였다(Table 1-15).

Table 1-14. Antifungal of cell-free supernatant of cultured broth of biocontrol agents at several media against *R. solani*.

Media	Inhibition zoon (mm)		
	#13	M75	CC112
LB	0.0	0.0	0.0
TSB	0.0	0.0	0.0
NYDB	0.0	0.0	0.0
KB	0.0	0.0	0.0
YP	0.0	0.0	0.0
BSM	2.0	3.0	2.0

Table 1-15. Antifungal of cell-free supernatant of cultured broth of biocontrol agents at several media against *Pythium* sp.

Media	Inhibition zoon (mm)		
	#13	M75	CC112
LB	0.0	0.0	0.0
TSB	0.0	0.0	0.0
NYDB	0.0	0.0	0.0
KB	0.0	0.0	0.0
YP	0.0	0.0	0.0
BSM	0.0	0.0	0.0

선발 미생물 *Bacillus* 3균주(#13, M75, CC112)와 *Pseudomonas* 2균주(#53, #164)에 대하여 휘발성물질의 생성 여부를 조사한 결과, *Rhizoctonia solani* 와 *Pythium* sp. 에 대하여 I 플레이트 상에서 균사 생육 억제 효과를 나타나지 않아서 휘발성물질을 생성하지 않는 것으로 판단되었다(Table 1-16).

Table 1-16. Volatile production of biocontrol agents against *R. solani* and *Pythium* sp.

Pathogen	Inhibition zoon (mm)				
	#13	M75	CC112	#53	#164
<i>Rhizoctonia solani</i>	0	0	0	0	0
<i>Pythium</i> sp	0	0	0	0	0

사. 분리 방선균의 인삼잘록병 방제 효과

(1) 인삼 잘록병균에 대한 항균활성

Streptomyces sp. A75와 A501균주의 인삼에 병원성 있는 *Rhizoctonia solani* 와 *Pythium* sp. 에 대하여 균사 생장 억제를 조사한 결과, *Rhizoctonia solani* 에 대하여 A75균주가 14.2mm로 A501균주 보다 균사생육 저지 효과가 우수하였으며, *Pythium* sp. 에 대하여 A501균주가 3.3mm로 A75균주 보다 균사생육을 억제하였으나 미약하였다 (Table 1-17, Fig. 1-6). *Streptomyces* sp. A75와 A501균주의 휘발성 물질생성에 의한 *Rhizoctonia solani* 와 *Pythium* sp. 의 균사 생육 억제 효과를 조사한 결과에서는 *Streptomyces* sp. A75와 A501균주 모두가 에 대한 *Rhizoctonia solani* 에 대하여 억제 효과가 미약하였고(Fig. 1-7), *Pythium* sp. 에 대한 억제 효과는 없었다. *Streptomyces* sp. A75와 A501균주의 *Rhizoctonia solani* 와 *Pythium* sp.에 대하여 항균활성을 나타낸 것은 *Rhizoctonia solani* 에 항균활성을 갖는 방선균 A2365균주의 guanidylfungin A 와 methyl guanidylfungin A의 활성 성분을 동정된 바와 같이 *Streptomyces* 속균이 세포 벽 분해효소 생성하거나 항곰팡이물질 등을 생성(Woo 등, 2016; Lahdenpera, 1991; Elson 등, 1994; Handelsman 등, 1996)하여 나타난 결과로 추정되며 이를 위한 물질분석이 요구된다.

Table 1-17. Antifungal activity of *Streptomyces* sp. A75 and A501 on fungal pathogens of ginseng incubated at 28°C for 6 days on PDA media

Pathogenic fungi isolated from ginseng	Inhibition zone of mycelial growth (mm)	
	<i>Streptomyces</i> sp. A75	A501
<i>Rhizoctonia solani</i>	14.2	7.8
<i>Pythium</i> sp.	1.0	3.3

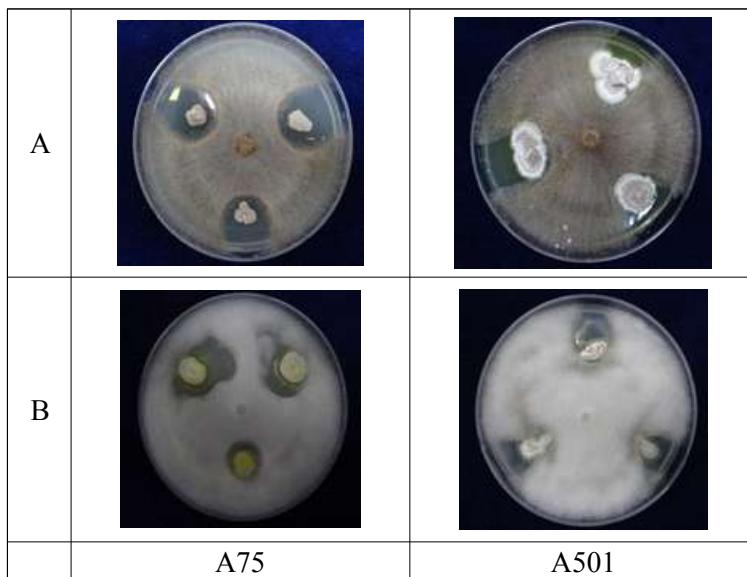


Fig. 1-6. Inhibition effect of mycelial growth of ginseng pathogenic fungi, *Rhizoctonia solani* (A) and *Pythium* sp. (B) by *Streptomyces* sp. A75 and A501.

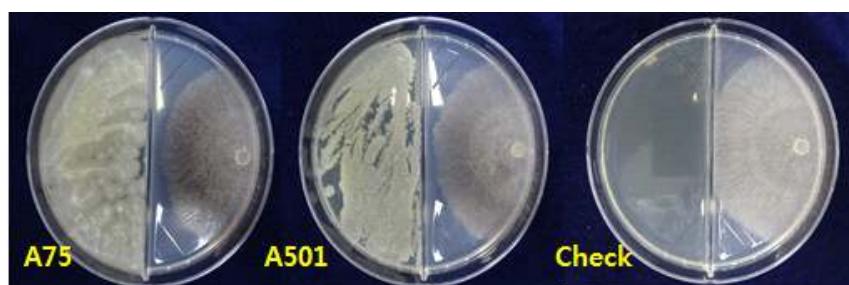


Fig. 1-7. Inhibition effect of mycelial growth of *Rhizoctonia solani* by volatile of *Streptomyces* sp. A75 and A501 on I plate at 25°C.

(2) 방선균주별 인삼 째록병(*Rhizoctonia solani* 와 *Pythium* sp.)에 대한 방제효과
방선균주의 배양액을 희석하여 *Rhizoctonia solani*에 처리한 결과, A75균주가 A501균주보다 처리 효과가 높았으며, 인삼 종자의 침지처리가 토양에 관주처리구 보다 효과적 이었다. A75균주의 배양액을 20배로 희석하여 종자 침지처리가 80.9% 방제 효과를 나타 내었지만 통계적 유의성은 없었다(Table 18).

Table 1-18. Control effect of ginseng damping off caused by *Rhizoctonia solani* using cultured broth of *Streptomyces* sp. A75 and A501

Isolate	Treatment	Dilution(x)	Infected plant(%)	Control efficacy(%)
A75	Seed dipping	10	8.4 a ^{a)}	5.6
		20	1.7 a	80.9
	Drenching on soil after sowing	10	34.8 b	-
		20	17.4 ab	-
A501	Seed dipping	10	9.7 a	-
		20	7.4 a	16.9
	Drenching on soil after sowing	10	20.9 ab	-
		20	9.2 a	-
Untreated check			8.9 a	-

^{a)} In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by Duncan's multiple range test.

Pythium sp.에 대하여 A501균주가 A75균주보다 처리 효과가 높았으며, 관주처리가 종자 침지처리 보다 효과적이었다. A501균주의 배양액을 10배로 희석하여 토양관주처리가 85.8%, 20배 희석액의 토양관주처리가 56.7% 방제 효과를 내었지만 통계적 유의성은 없었다(Table 1-19). 이들 결과는 항균활성검정 결과와 같이 A75균주가 *Rhizoctonia solani*에 항균력이 있어 방제 효과가 높았으며, *Pythium* sp.에는 방제 효과가 없었다. A501균주는 *Rhizoctonia solani*에 효과가 낮았으나, *Pythium* sp.에는 높은 방제 효과를 나타내었다. 미생물제 Serenade (바실러스 서브틸리스)는 *Rhizoctonia solani*에 의한 고추와 오이의 잘록병 방제에 9배 희석하여 관주처리로 58%와 54% 방제 효과를 각각 나타내었으며, *Pythium ultimum*에 의한 고추와 오이의 잘록병을 9배 희석액으로 관주처리하여 각각 57%와 7.7% 방제 효과를 나타내었지만(Jo 등, 2014), A501균주와 A75균주가 잘록병 방제효과가 높아서 우수한 균주라 생각되었다.

Table 1-19. Control effect of ginseng damping off caused by *Pythium* sp. using cultured broth of *Streptomyces* sp. A75 and A501

Isolate	Treatment	Dilution(x)	Infected plant (%)	Control efficacy(%)
A75	Seed dipping	10	15.1 ab ^{a)}	-
		20	11.2 ab	11.8
	Drenching on soil after sowing	10	37.4 b	-
		20	12.8 ab	-
A501	Seed dipping	10	13.3 ab	-
		20	28.1 ab	-
	Drenching on soil after sowing	10	1.8 a	85.8
		20	5.5 a	56.7
Untreated check			12.8 ab	-

^{a)} In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by Duncan's multiple range test.

(3) 방선균주 배양액 혼합처리의 *Rhizoctonia solani* 와 *Pythium* sp. 에 대한 방제효과

인삼 잘록병의 병원균은 *R. solani*, *Pythium* spp.로 보고 되어 있어 한번에 두 잘록병균을 방제하기 위하여 2균주의 방선균의 배양액을 같은 비율(1:1, v/v)로 혼합하여 *Rhizoctonia solani*에 대하여 처리한 결과, 방선균처리는 종자발아에 영향을 미치지 않았으며, 2균주의 배양액을 혼합한 50배 희석액을 인삼 종자 침지처리가 81.3%, 100배 희석액의 관주처리가 84.8%로 높은 방제효과를 보였으나, 종자침지처리와 토양관주처리를 같이 처리한 구에서는 32.3%로 방제효과가 저조하였다(Table 1-20, Fig. 1-8). *Pythium* sp.에 대해서는 종자침지처리와 토양관주처리가 각각 51.0%와 52.1%의 방제 효과를 나타내었고, 종자 침지처리+토양관주처리에서는 75.3%로 방제효과를 보였다(Table 1-21, Fig. 1-9). 이상의 결과를 요약하면, 방선균 2균주의 배양액을 혼합액은 *Rhizoctonia solani*에 의한 잘록병은 종자침지 또는 토양관주, *Pythium* sp.에 의한 잘록병은 종자 침지+토양 관주 처리하는 것이 75%~84.8%의 방제효과를 나타내어 Woo 등(2016)의 방선균 A3265의 배양액에 종자 침지처리하여 음건한 종자를 파종한 시기에 따라서 인삼 잘록병이 1.0~6.3%, 무처리가 4.5~19.2% 발병하여 67.2~77.8% 방제 효과로 이 방선균 주 보다 방제효과가 높았다. 또한 Cho 등(2007)에 의하면 *Rhizoctonia solani*에 의한 잘록병은 4월 중하순에 시작하여 5월 상순에, *Pythium ultimum*에 의한 잘록병이 5월 하순 이후에 발생한다는 보고에 의하면 인삼종자 파종 시에 방선균 A75와 A501 균주의 배양액을 혼합하여 종자침지처리하고 토양관주처리를 같이 처리하는 것이 두 병원균에 의한 잘록병의 방제효과를 높일 수 있다고 생각된다.

Table 1-20. Control effect of ginseng damping off caused by *Rhizoctonia solani* using mixing treatment(1:1, v/v) of the cultured broth of *Streptomyces* sp. A75 and A501 incubated on 25°C with 160 rpm for 7 days in GSS medium

Treatment	Dilution (x)	No. of germinated seed (average)	Infected plant (%)	Control efficacy(%)
Seed dipping	50	52.0 a ^{a)}	3.2 ab ^{a)}	81.3
Drenching on soil after sowing	100	49.0 a	2.6 a	84.8
Seed dipping+ drenching	50+100	45.3 a	11.6 bc	32.2
Untreated check		46.7 a	17.1 c	-

^{a)} In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by Duncan's multiple range test.



Fig. 1-8. Control effect of mixing treatment (1:1 v/v) of the cultured broth of *Streptomyces* sp. A75 and A501 on ginseng damping off caused by *Rhizoctonia solani*. A, Dipping; B, Drenching; C, Dipping+ drenching; D, Untreated check.

Table 1-21. Control effect of ginseng damping off caused by *Pythium* sp. using mixing treatment(1:1, v/v) of the cultured broth of *Streptomyces* sp. A75 and A501 incubated on 25°C at 160 rpm for 7 days in GSS media

Treatment	Dilution (x)	No. of germinated seed (average)	Infected plant(%)	Control efficacy(%)
Seed dipping	50	49.3 a ^{a)}	12.9 a ^{a)}	51.0
Drenching on soil after sowing	100	45.3 b	12.6 a	52.1
Seed dipping+ drenching	50+100	46.7 ab	6.5 a	75.3
Untreated check		45.7 b	26.3 b	-

^{a)} In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by Duncan's multiple range test.

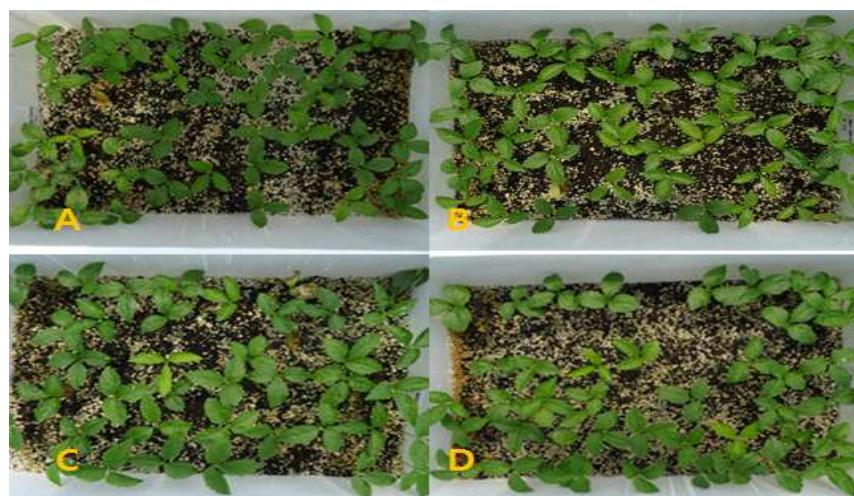


Fig. 1-9. Control effect of mixing treatment (1:1, v/v) of the cultured broth of *Streptomyces* sp. A75 and A501 on ginseng damping off caused by *Pythium* sp. A, Dipping; B, Drenching; C, Dipping+ drenching; D, Untreated check.

아. 선발 미생물 시제품의 인삼잘록병 방제 효과 및 약해

(1) 시제품의 균수조사

#13, M75, CC112균주의 시제품에 대한 균수를 조사한 결과에서 시제품(벤토나이트) 1은 #13균주는 1.1×10^8 cfu/g, M75균주는 7.5×10^7 cfu/g, CC112균주는 1.5×10^8 cfu/g 균밀도를, 시제품(제오라이트)2는 #13균주는 2.2×10^8 cfu/g, M75균주는 8.0×10^7 cfu/g, CC112균주는 1.2×10^8 cfu/g 균밀도를, 시제품(탈크) 3은 #13균주는 7.6×10^7 cfu/g, M75균주는 4.7×10^7 cfu/g, CC112균주는 3.2×10^7 cfu/g 균수를 나타내었다(Table 22). 시제품 중에서 시제품(제오라이트) 2가 가장 높은 균수를 나타내었지만 물에 잘 희석이 되지 않아 사용에 불편하였다.

Table 1-22. No. of colony of the prototypes of *Bacillus* isolates on the TSA media after incubation for 48 hrs at 25°C

Prototype	Isolate (dilution)	No. of colony(cfu/ml)					Average
		1 rep.	2	3	4	5	
1(벤토나이트)	#13(10^{-5})	109	98	122	112	110	1.1×10^8
	#13(10^{-6})	10	11	12	8	10	1.0×10^8
	CC112(10^{-5})	90	89	99	82	100	9.2×10^7
	CC112(10^{-6})	8	9	11	7	9	8.8×10^7
	M75(10^{-5})	72	70	85	69	80	7.5×10^7
	M75(10^{-6})	7	6	9	6	7	7.0×10^7
2(제오라이트)	#13(10^{-5})	220	231	202	235	217	2.2×10^8
	#13(10^{-6})	18	21	22	28	20	2.1×10^8
	CC112(10^{-5})	125	120	110	130	119	1.2×10^8
	CC112(10^{-6})	12	10	12	11	10	1.1×10^8
	M75(10^{-5})	86	79	85	77	73	8.0×10^7
	M75(10^{-6})	7	6	6	9	7	7.0×10^7
3(탈크)	#13(10^{-5})	75	70	82	75	78	7.6×10^7
	#13(10^{-6})	6	5	9	8	7	7.0×10^7
	CC112(10^{-5})	25	22	36	42	35	3.2×10^7
	CC112(10^{-6})	2	2	3	3	3	2.6×10^7
	M75(10^{-5})	36	73	35	47	43	4.7×10^7
	M75(10^{-6})	5	6	6	4	4	5.0×10^7

- Prototype 1; 처리일 1. 11, 조사일 1. 13, prototype 2; 처리일 3. 7, 조사일 3.9, prototype 3; 처리일 4. 1, 조사일 4. 3.

(2) 시제품의 인삼 잘록병 방제효과

선발 균주의 시제품(탈크) 3에 대한 인삼 잘록병균(*Rhizoctonia solani*)에 대하여 종자 침지와 관주 처리한 결과에서 #13균주 시제품을 20배액 종자침지가 57.7%, 50배액 종자 침지가 88.6%, 50배액 관주처리가 78.5%, 100액 관주처리가 55.7% 방제 하였으며, M75 균주의 시제품은 20배액 침지, 50배액 침지, 100배액 침지처리가 65.1%, 89.9%, 87.3%의 방제효과를 보였으며, 10배액 관주처리가 75.2% 방제효과를 나타내었으며, CC112균주 시제품은 10배액 침지와 20배액 침지에서 77.9%, 88.6% 방제 효과를, 10배액, 20배액과 50배 관주처리 87.3%, 83.2%와 65.8% 방제 효과를 나타내었다(Table 1-23). 약해 조사는 시제품 처리 후 인삼 유묘에 나타나는 반점은 전혀 없었고, 인삼 유묘의 초장차이도 없었다. 인삼 종자의 발아율은 무처리가 25.9%로 3균주의 시제품의 10배 희석처리구에서는 무처리구보다 높은 29.6~40.7% 종자발아율을 나타냈다(Table 1-24).

Table 1-23. Control effect of ginseng damping-off caused by *Rhizoctonia solani* treated with seed dipping and soil drenching of the prototype 3

Prototype 3	Treatment	Dilution (x)	Infected plant(%)	Control efficacy(%)
#13	Seed dipping	10	9.6 abcd	35.6
		20	6.3 abcd	57.7
		50	1.7 a	88.6
		100	19.7 d	-
	Drenching on soil after sowing	10	5.1 abc	65.8
		20	11.0 abcd	26.2
		50	3.2 abc	78.5
		100	6.6 abcd	55.7
	Seed dipping	10	4.2 abc	8.7
		20	10.4 abcd	65.1
		50	7.1 abcd	89.9
		100	3.9 abc	87.3
M75	Drenching on soil after sowing	10	10.1 abcd	75.2
		20	8.7 abcd	43.6
		50	13.6 abcd	47.7
		100	5.2 abc	-
	Seed dipping	10	1.5 a	77.9
		20	1.9 ab	88.6
		50	3.7 abc	22.8
		100	8.4 abcd	45.6
	Drenching on soil after sowing	10	7.8 abcd	87.3
		20	16.0 cd	83.2
		50	12.6 abcd	65.8
		100	12.5 abcd	36.9
Untreated check		-	3.7 abc	-

- 파종일 3. 17., 접종일 4. 18., 조사일 5. 30. ^{a)} In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by Duncan's multiple range test.

Table 1-24. Seed germination and plant height of ginseng treated with seed dipping and soil drenching of the prototype 3

Prototype 3	Treatment	Seed germination (%)				Plant height (mm)	
		10 fold	20 fold	50 fold	100 fold	10 fold	20 fold
#13	Seed dipping	33.3	37.0	13.0	20.4	39.8 a ^{a)}	39.1 a
	Drenching	40.7	31.5	18.5	18.5	40.0 a	39.1 a
M75	Seed dipping	29.6	20.4	27.8	18.5	39.6 a	39.6 a
	Drenching	31.5	22.2	35.2	37.0	39.7 a	39.2 a
CC112	Seed dipping	35.2	33.3	29.6	22.2	40.1 a	39.3 a
	Drenching	38.9	20.4	18.5	22.2	39.9 a	39.7 a
Untreated check		-				25.9	
						38.8 a	

- 파종일 3. 17, 종자발아조사일 4. 27. 초장조사 : 5. 30. ^{a)} In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by Duncan's multiple range test.

선발 균주의 시제품(제오라이트)2에 대한 인삼 잘록병균(*Rhizoctonia solani*)에 대하여 종자침지와 관주 처리한 결과에서 #13균주 시제품의 침지와 관주처리 효과는 매우 저조하였으며, M75균주의 시제품은 20배 희석액 종자침지가 78.6% 방제효과를, CC112균주의 시제품은 50배 희석액 관주처리에서 62.1% 방제효과를 나타내었다(Table 1-25). 시제품 2의 약해 조사는 인삼 유묘에 나타나는 반점은 전혀 없었고, 유묘의 초장은 차이가 없었으며, 시제품의 인삼 종자의 발아율은 무처리가 87.6%로 3균주의 시제품의 침지나 관주처리에서 77.2~90.1% 종자발아율을 나타냈다(Table 1-27).

Table 1-25. Control effect of ginseng damping-off caused by *Rhizoctonia solani* treated with seed dipping and soil drenching of the prototype 2

Prototype 2	Treatment	Dilution (x)	Infected plant(%)	Control efficacy(%)
#13	Seed dipping	10	8.4 abc	18.5
		20	6.9 abc	33.0
	Drenching	50	10.6 abc	-
		100	11.5 abc	-
M75	Seed dipping	10	12.8 c	-
		20	6.5 abc	78.6
	Drenching	50	7.4 abc	5.8
		100	6.6 abc	13.6
CC112	Seed dipping	10	10.8 abc	12.6
		20	2.2 a	3.9
	Drenching	50	9.7 abc	62.1
		100	8.9 abc	35.0
Untreated check		-	3.9 a	-

- 파종일 4. 7., 접종일 4. 25., 조사일 5. 30. ^{a)} In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by Duncan's multiple range test.

선발 균주의 시제품(제오라이트)2에 대한 인삼 잘록병균(*Pythium* sp.)에 대하여 종자침지와 관주처리한 결과에서 #13균주 시제품의 침지(10배)와 관주처리(100배)처리구가 72.1%, M75균주의 시제품은 20배 희석액 종자침지(20배)가 79.8% 방제효과를, CC112균주의 시제품은 20배 희석액 종자침지처리에서 50.5% 방제효과를 나타내었다(Table 1-26).

Table 1-26. Control effect of ginseng damping-off caused by *Pythium* sp. treated with seed dipping and soil drenching of the prototype 2

Prototype 2	Treatment	Dilution (x)	Infected plant(%)	Control efficacy(%)
#13	Seed dipping	10	9.3 abc	55.3
		20	9.0 abc	56.7
	Drenching	50	17.4 abcdef	16.4
		100	8.2 abc	60.6
		10+50	16.6 abcdef	20.2
	Seed dipping + Drenching	10+100	5.8 ab	72.1
		20+50	29.8 efg	-
		20+100	12.1 abcd	41.8
	Seed dipping	10	14.1 abcde	32.2
		20	4.2 a	79.8
M75	Drenching	50	28.6 defg	-
		100	19.0 abcdefg	8.7
		10+50	12.4 abcd	40.4
	Seed dipping + Drenching	10+100	8.7 abc	58.2
		20+50	35.1 g	-
		20+100	19.2 abcdefg	7.7
	Seed dipping	10	11.4 abc	45.2
		20	10.3 abc	50.5
CC112	Drenching	50	30.8 efg	-
		100	18.0 abcdefg	13.5
		10+50	21.8 bcdefg	-
	Seed dipping + Drenching	10+100	18.5 abcdefg	11.1
		20+50	31.7 fg	-
		20+100	25.0 cdefg	-
	Untreated check		20.8 abcdefg	-

- 조사일 5. 30. ^{a)} In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 1% level by Duncan's multiple range test.

Table 1-27. Seed germination and plant height of ginseng treated with seed dipping and soil drenching of the prototype 2

Prototype 2	Treatment	Seed		Plant	
		Dilution(x)	germination (%)	Dilution(x)	height (mm)
#13	Seed dipping	10	77.2 a ^{a)}	10	48.0 a ^{a)}
		20	83.9 a		
	Drenching	50	90.1 a	10	47.8 a
		100	87.8 a		
M75	Seed dipping	10	82.7 a	10	47.8 a
		20	77.8 a		
	Drenching	50	86.4 a	10	47.8 a
		100	88.9 a		
CC112	Seed dipping	10	81.5 a	10	47.9 a
		20	82.7 a		
	Drenching	50	78.4 a	10	47.8 a
		100	89.5 a		
Untreated check		-	87.6 a	-	47.7 a

- 파종일 4. 7., 종자발아조사일 4. 27. 초장조사 5. 23. ^{a)} In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 1% level by Duncan's multiple range test.

선발 균주의 시제품(벤토나이트) 1에 대한 인삼 잘록병균(*Rhizoctonia solani*)에 대하여 종자침지와 관주 처리하다 결과에서 #13균주 시제품의 침지처리는 매우 저조하였으며, 50배액과 100배액 관주처리에서 50.0%와 47.2% 방제효과를, M75균주의 시제품은 100 배액 종자침지가 50.6% 방제효과를, 50배액 관주처리에서 67.6% 방제효과를 보였으며, CC112균주 시제품은 50배액과 100배 침지처리에서 30.7%, 47.2% 방제 효과를, 50배액과 100배 관주처리에서 52.3%와 77.3% 방제효과를 나타내었다(Table 1-28, Fig. 1-10).

Table 1-28. Control effect of ginseng damping-off caused by *R. solani* treated with seed dipping and soil drenching of the prototype 1 of *Bacillus* isolates

Prototype 1	Treatment	Dilution (x)	Infected plant(%)	Control efficacy(%)
#13	Seed dipping	50	14.5 a	17.6
		100	13.0 a	26.1
	Drenching	50	8.8 a	50.0
		100	9.3 a	47.2
M75	Seed dipping	50	14.3 a	18.8
		100	8.7 a	50.6
	Drenching	50	5.7 a	67.6
		100	11.4 a	35.2
CC112	Seed dipping	50	12.2 a	30.7
		100	9.3 a	47.2
	Drenching	50	8.4 a	52.3
		100	4.0 a	77.3
Untreated check		-	17.6 a	-

- 파종일 4. 20., 접종일 5. 2., 조사일 5. 30. ^{a)} In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by Duncan's multiple range test.

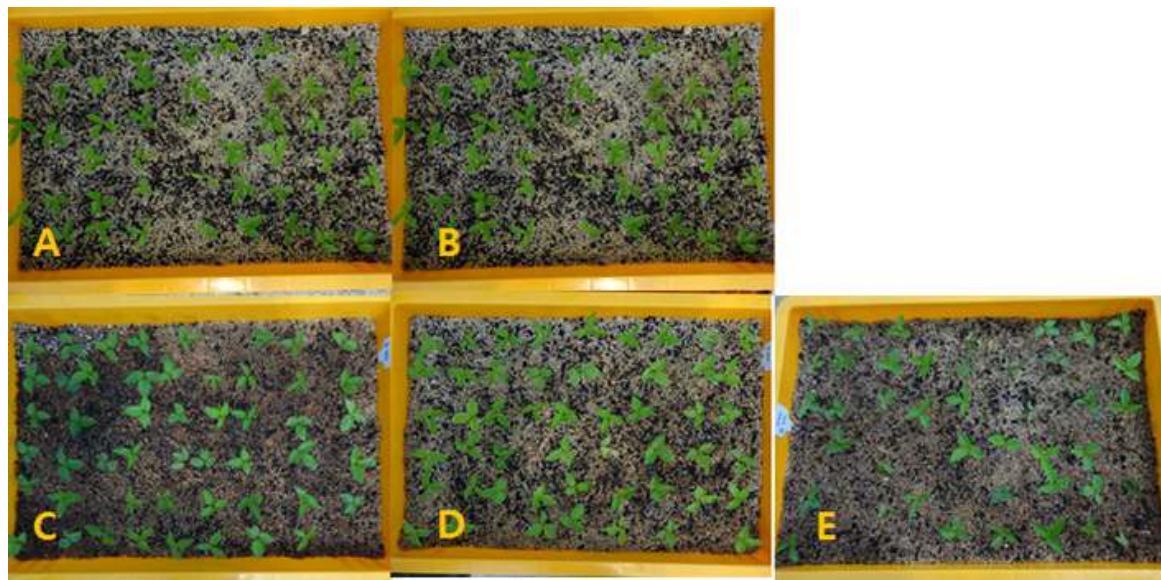


Fig. 1-10. Control effect of the prototype 1 of *B. velezensis* CC112 on ginseng damping-off caused by *Rhizoctonia solani*. A: Seed dipping (50 fold), B: Seed dipping (100 fold), C: Soil drenching (50 fold), D: Soil drenching (100 fold), E: Untreated check.

선발 균주의 시제품(벤토나이트) 1에 대한 인삼 짙록병균(*Pythium* sp.)에 대하여 종자 침지와 관주 처리하다 결과에서 #13균주 시제품의 50배액과 100배 침지처리의 방제효과는 24.4%, 45.2%로 저조하였으며, 50배액과 100배액 관주처리에서 62.2%와 41.7% 방제효과를, M75균주의 시제품은 50배액과 100배 종자침지가 61.7%, 25.2%, 50배액과 100배 관주처리에서 77.8%, 50.4% 방제효과를 보였으며, CC112균주 시제품은 50배액과 100배 침지처리에서 39.1%, 38.3% 방제 효과를, 50배액과 100배 관주처리에서 56.5%와 65.7% 방제효과를 나타내었다(Table 1-29, Fig. 1-11).

Table 1-9. Control effect of ginseng damping-off caused by *Pythium* sp. treated with seed dipping and soil drenching of the prototype 1 of *Bacillus* isolates

Prototype 1	Treatment	Dilution (x)	Infected plant(%)	Control efficacy(%)
#13	Seed dipping	50	17.4 ab	24.4
		100	12.6 ab	45.2
	Drenching	50	8.7 ab	62.2
		100	13.4 ab	41.7
M75	Seed dipping	50	8.8 ab	61.7
		100	17.2 ab	25.2
	Drenching	50	5.1 a	77.8
		100	11.4 ab	50.4
CC112	Seed dipping	50	14.0 ab	39.1
		100	14.2 ab	38.3
	Drenching	50	10.0 ab	56.5
		100	7.9 ab	65.7
Untreated check		-	23.0 b	-

- 평균일 4. 20., 접종일 5. 2., 조사일 5. 30. ^{a)} In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by Duncan's multiple range test.

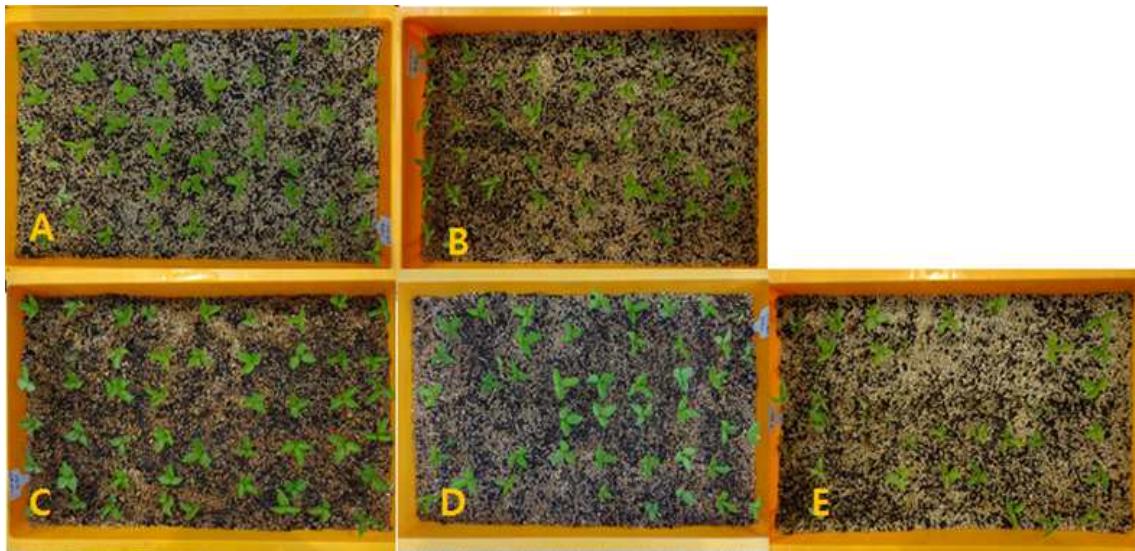


Fig. 1-11. Control effect of the prototype 1 of *B. velezensis* CC112 on ginseng damping-off caused by *Pythium* sp. A: Seed dipping (50 fold), B: Seed dipping (100 fold), C: Soil drenching(50 fold), D: Soil drenching (100 fold), E: Untreated check.

시제품(벤토나이트) 1의 약해 조사는 인삼 유묘에 나타나는 반점은 전혀 없었고, 인삼 종자의 발아율은 무처리가 95.1%로 3군주의 시제품 처리구에서는 83.3~98.8% 종자발아율을 나타냈지만 통계적 유의성은 없었다(Table 1-30).

Table 1-30. Seed germination and plant height of ginseng treated with seed dipping and soil drenching of the prototype 1 of *Bacillus* isolates

Prototype 1	Treatment	Seed germination (%)		Plant height (mm) 50 fold
		50 fold	100 fold	
#13	Seed dipping	93.2 a ^{a)}	84.0 a ^{a)}	51.2 a ^{a)}
	Drenching	90.1 a	85.2 a	50.9 a
M75	Seed dipping	98.8 a	92.6 a	51.2 a
	Drenching	96.3 a	93.2 a	51.0 a
CC112	Seed dipping	90.7 a	83.3 a	51.4 a
	Drenching	90.8 a	97.5 a	51.3 a
Untreated check	-	95.1 a		51.1 a

- 파종일 4. 20., 종자발아조사일 5. 11. 초장조사 5. 30. ^{a)} In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by Duncan's multiple range test.

Yang 등(2002)은 *B. stearothermophilus*를 이용하여 탈크, 제오라이트, 벤토나이트, 벤토나이트+탈크, 탈크+제오라이트, 벤토나이트+제오라이트 제제를 만들어서 오이 잘록병균(*Pythium aphanidermatum*)이 처리된 상토 혼화 처리한 결과에서 탈크, 제오라이트, 벤토나이트 각각의 단제는 45%~55%, 두 보조제를 혼합한 벤토나이트+탈크, 탈크+제오라이트, 벤토나이트+제오라이트 제제는 단제보다 높은 58%~70%의 방제효과를 나타내었으며, 화학살균제와 비교시에도 비슷한 방제 효과를 나타내었다고 하였다. CC112 군주의 벤토나이트 제품과 비교하면 토양관주 100배액 처리가 77.3%로 나타나 *B.*

stearothermophilus 균주보다 높은 방제 효과를 보여서 제품으로 개발 가능성을 보여주었다. 그리고 미생물제품 Serenade (*B. subtilis* QST713)를 9배 희석하여 관주 처리하여 *Rhizoctonia solani*에 의한 고추와 오이의 잘록병을 58%와 54% 방제 효과를 각각 나타냈으며, 같은 방법으로 *Pythium ultimum*에 의한 고추와 오이의 잘록병에 57%와 7.7% 방제 효과를 나타냈다(Jo 등, 2014), CC112 균주의 시제품(벤토나이트) 100배액 관주처리가 Serenade보다 높은 잘록병균 *Rhizoctonia solani*와 *Pythium* sp.에 높은 방제효과를 나타내어 잘록병 방제에 우수한 균주라 생각된다.

제2절 인삼잘록병 방제 미생물의 생성 유용물질 동정 및 특성 분석

1. 재료 및 방법

가. 공시균주

본 연구에 사용한 공시균주는 농촌진흥청에서 선발한 인삼잘록병 방제에 유효한 미생물 *Bacillus* sp. #13, #26, #36, #35, #37, M75, CC112 균주 및 제1협동과제를 수행하는 본 연구팀에서 선발한 방선균 BS065, A75, A501, A515, A704, A1444, A3265, A3283 균주의 유효성분을 규명하고자 수행하였다.

나. 공시균주의 배양

Bacillus sp. #13, #35, BS065, A75, A501, A515, A704, A1444, A3265, A3283 균주: 농촌진흥청에서 제공한 *Bacillus* sp. #13, #35 균주 및 본 연구팀에서 선발한 방선균 BS065, A75, A501, A515, A704, A1444, A3265, A3283 균주는 MBA(glucose 5 g, soluble starch 5 g, malt extract 1 g, yeast extract 1 g, N-Z amine 1 g, agar 15 g/L)배지에 보존한 후 계대 배양하여 사용하였다. 또한 활성성분 규명을 위한 배양은 GSS(soluble starch 10 g, glucose 20 g, soybean flour 25 g, beef extract 1 g, yeast extract 4 g, NaCl 2 g, K₂HPO₄ 0.25 g, CaCO₃ 2 g/L, pH 7.0)배지를 이용하였으며, 1L 플라스크에 200 mL 씩 분주한 후 25°C, 150 rpm에서 7일간 배양하였다.

#26 균주: 농촌진흥청에서 제공한 #26 균주를 LB(tryptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 10 g/L, pH 7.0)배지 300 mL이 들어있는 1 L 플라스크에 접종한 후 30°C, 150 rpm에서 3일간 배양하였다.

#37 균주의 배양: 농촌진흥청에서 제공한 #37 균주를 PDB(potato starch 4 g, dextrose 20 g)배지 600 mL이 들어있는 1 L 플라스크를 121°C에서 15분간 멸균한 후 접종하여 26°C에서 2주간 정치배양 하였다.

다. 공시균주의 배양조건 설정

#13 균주: #13 균주의 배양방법을 개선하고자 배양 시간에 따른 pH 및 OD값의 변화를 조사하였다. 우선적으로 LB(tryptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 10 g/L, pH 7.0)배지 300 mL이 들어있는 1 L 플라스크를 121°C에서 15분간 멸균한 후, #13 균주를 접종하여 30°C, 130 rpm에서 3일간 배양하며 배양시간에 따른 pH값과 OD값을 측정하였다.

#26 균주: 분양받은 #26 균주를 LB(tryptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 10 g/L, pH 7.0)배지 300 mL이 들어있는 1 L 플라스크에 접종한 후 30°C, 150 rpm에서 3일간 배양하며 배양시간에 따라 pH값과 OD값의 경시적 변화를 측정하였다.

방선균 A1444 균주의 탄소원에 따른 균 생육: 탄소원의 종류에 따른 방선균 A1444 균주의 생육과 활성물질 생산의 변화를 알아보기 위해 기본 배지(yeast extract. 0.4%, NaCl 0.2%, K₂HPO₄ 0.025%) 100 mL에 탄소원으로 glucose, glycerol, starch, sucrose, dextrin을 각각 1.5% (w/v)가 되도록 첨가한 후 6일간 배양하였다. 각 배양액의 최종 pH값과 생균수를 측정하였다.

선발 방선균 A1444 균주의 질소원에 따른 균 생육: 질소원의 종류에 따른 방선균 A1444 균주의 생육과 활성물질 생산의 변화를 알아보기 1.5% glycerol을 탄소원으로 기본 배지 (yeast extract. 0.4%, NaCl 0.2%, K₂HPO₄ 0.025%)에 유기태와 무기태질소원 1.5%(w/v)를 첨가하여 탄소원과 동일한 방법으로 균 생육을 조사하였다. 질소원은 유기태 질소원으로 yeast extract, beef extract, malt extract, tryptone, bacto peptone, soytone, corn steep liquor, soybean flour을 사용하였으며, 무기태질소원으로 ammonium sulfate, sodium nitrate를 사용하였다.

라. 인삼잘록병에 대한 항균활성 검정

정제과정에서 각 분획물의 항균활성 검정은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. PDA(potato starch 4 g, dextrose 20 g, agar 15 g/L)배지 300 mL이 들어있는 500 mL 플라스크를 121°C에서 15분간 멸균한 후, PDA 배지에서 배양된 병원균 *Pythium* sp.과 *Rhizoctonia solani* 균주의 균사선단 부분을 13 mm cork borer로 빼어내어 새로 멸균한 PDA배지에 접종하였다. 동시에 상층액 및 균체 acetone 추출물을 0.22 μm syringe filter로 거른 뒤 멸균된 paper disc에 40 μl씩 흡수시켜 상기 배지에 올린 후 25°C에서 2일간 배양 후 clear zone의 직경을 측정하였다.

마. 인삼잘록병 억제 항균활성물질의 분리 및 정제

공시균주의 배양액으로부터 다음과 같은 방법을 적절히 병행 사용하여 인삼잘록병 억제 항균활성물질을 분리, 정제하였다. 즉 배양액을 원심 분리하여 균체와 상등액으로 나눈 후 균체는 아세톤으로 추출하였다. 균체 아세톤 추출물과 상등액의 항균활성을 검정한 후 활성을 지닌 분획으로부터 활성성분을 정제하였다. 초기 정제를 위하여 hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol 등 다양한 유기용매를 이용하여 물질의 분배추출을 수행하였고, 활성을 나타낸 분획은 silica gel, Diaion HP-20, C₁₈ Sep-pak cartridge 등 다양한 수지를 선택하여 column chromatography를 수행하여 활성성분의 분리, 정제를 수행하였다.

또한 Sephadex LH-20 등과 같은 gel filtration 수지를 이용한 column chromatography를 수행하였으며 최종적으로는 preparative TLC 및 HPLC를 수행하여 고순도의 활성 성분을 분리, 정제하였다. 각 균주별 정제과정 및 진행사항은 연구결과에 기술하였다. 활성 성분의 비교분석을 위한 HPLC는 column: C₁₈ column, 10 × 150 mm; solvent: 10–100% aqueous methanol/0.04% trifluoroacetic acid; flow rate: 1 ml/min의 조건에서 수행하였다.

바. 활성성분의 화학구조 구명

분리 정제한 항균활성물질의 화학구조는 아래의 방법에 의하여 구명하였다.

Mass spectrum 분석: Positive mode 혹은 negative mode에서 FAB-mass 및 ESI-mass spectrum을 측정하여 화합물의 분자량을 밝혔다.

NMR spectrum의 측정은 정제된 시료를 중수소로 치환된 용매에 녹여 JEOL사의 JNM-ECA600 600MHz FT-NMR spectrometer를 사용하여 ¹H NMR, ¹³C NMR, ¹H-¹H COSY, HMQC, HMBC 등의 spectrum을 측정하여 해석하였다. 내부표준물질로는 TMS (tetramethylsilane)를 사용하였다.

¹H NMR spectrum의 측정: ¹H NMR spectrum을 측정, 해석하여 화합물에 함유된 수소원자의 수와 각 수소의 주변 환경에 위치한 원소를 유추하였다.

¹³C NMR spectrum의 측정: ¹³C NMR spectrum을 측정, 해석하여 화합물에 함유된 탄소원자의 수와 각 탄소의 주변 환경에 위치한 원소를 유추하였다.

¹H-¹H COSY spectrum의 측정: ¹H-¹H COSY spectrum을 측정하여 각 수소간의 coupling constants 및 결합 상관관계(²J_{H-H}, ³J_{H-H})를 밝혔다.

HMQC spectrum의 측정: HMQC spectrum을 측정하여 proton-bearing carbon (¹J_{C-H})에 관한 상관관계를 밝혔다.

HMBC spectrum의 측정: HMBC spectrum을 측정하여 각 수소와 탄소간의 상관관계 (²J_{C-H}, ³J_{C-H})를 밝혔다.

사. 시약 및 기기

공시균주 배양에 사용한 배지는 주로 Difco (USA) 제품을 사용하였다. 각 정제과정 및 column chromatography에서 사용된 hexane, ethyl acetate, methanol, acetone등의 용매는 SK케미칼 (Korea), 대정화금 (Korea) 제품을 HPLC 용매는 Merck (Germany), Baxter (Burdick & Jackson, USA) 제품을 사용하였고, NMR 용매 CDCl₃, CD₃OD 등은 Aldrich (USA) 제품을 사용하였다. 물질 정제 과정에 사용한 silica gel은 70–230 mesh 크기로 Merk사, Sephadex LH-20 (bead size 25~100 μm, Sweden)은 Pharmacia사, ODS Sep-pak cartridge (RP-18, USA)는 Alltech사 및 역상 TLC (RP-18, F254, USA)는 Merck사, ODS gel은 Waters사의 제품을 사용하였다. 그 외에 순상 TLC (Merck, Kieselgel 60F, 70~230 mesh, USA) 및 역상 TLC (Merck, RP-18, F254, USA)를 사용하였다. 시료를 농축하기 위한 감압농축기는 EYELA (Tokyo Rkakikai Co., LTD)의 rotary vacuum evaporator를 사용하였다. HPLC (high performance liquid chromatography)는 Tosoh사(UV-8010)와 Hitachi 사(Hitachi L-2455 diode array detector, L-2130 HPLC pump, EZchrom elite data system)의 기기를 사용하였다. HPLC column은 분석용 직경 4.6×150 mm와 분취용 직경 20×150 mm (Cosmosil, RP-18, Japan)를 사용하였다.

2. 결과

가. *Bacillus* sp. #13 균주의 항균활성물질 구명

(1) *Bacillus* sp. #13 균주의 배양

Bacillus sp. #13균주의 항균활성성분을 규명하기 위하여 연구방법에 기술한 바와 같이 MBA 배지를 사용하여 계대배양한 후, GSS 배지를 이용하여 10 L를 배양하였다.

(2) 활성물질의 분리 및 정제

정제과정에서 항균활성분획을 확인하기 위하여 연구방법에 기술한 바와 같이 각 분획물의 항균활성을 검정하며 정제를 수행하였다. #13 균주 배양액을 6,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액과 균체로 나눈 후 균체는 acetone으로 추출하였다. 상층액과 균체 추출물을 상술한 방법으로 항균활성을 측정한 결과, 균체 acetone 추출물에서는 활성이 나타나지 않은 반면 상층액에서는 약한 항균 활성이 나타났다(그림 2-1).

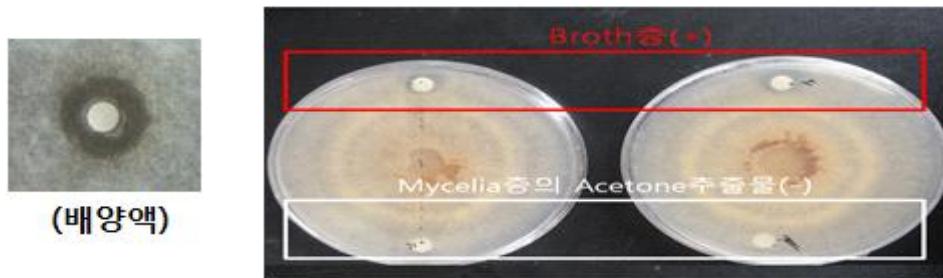


그림 2-1. *Rhizoctonia solani*에 대한 항균 활성.

따라서 상층액을 Diaion HP-20 column chromatography를 이용하여 정제하였다. Diaion HP-20 resin 1 L에 #13 배양액 10 L를 흘려 흡착시킨 후 30%, 50%, 70%, 100% aqueous methanol을 각각 3 L씩 차례로 흘려주어 용출하였다(그림 2-2). 그 결과 100% MeOH 용출물에서 약한 항균활성을 나타내었으나 활성이 매우 약하여 그 이상의 정제는 수행하지 못하였고 배양법 개선 실험을 수행하였다(그림 2-3).

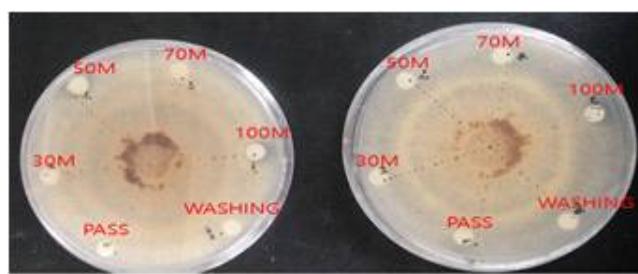


그림 2-2. Diaion HP-20 column 용출물의 *Rhizoctonia solani*에 대한 항균 활성.

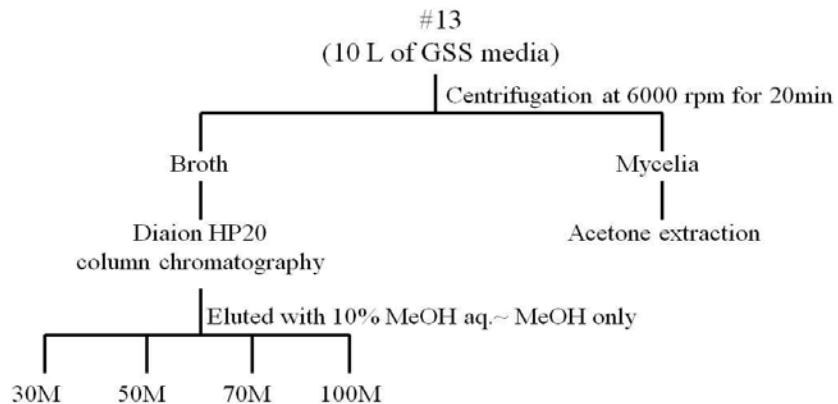


그림 23. 항균활성성분의 분리 및 정제 과정.

(3) *Bacillus* sp. #13 균주의 배양 시간에 따른 pH 및 OD값의 조사

#13 균주의 항균활성이 약하게 나타나 배양방법을 개선하고자 하였으며, 연구방법에 기술한 바와 같이 LB 배지에 배양하며 배양시간에 따른 pH값과 OD값의 경시적 변화를 조사하였다(그림 2-4). 그 결과 배양 2일에서 가장 좋은 생육과 항균활성을 나타내었다. 그러나 상술한 정제법으로 활성물질의 분리를 시도하였으나 활성이 매우 약하여 정제과정 중에 활성이 소실되었다. 따라서 활성성분이 휘발성 성분으로 추출되어 휘발성 성분의 분석연구를 수행하였다.

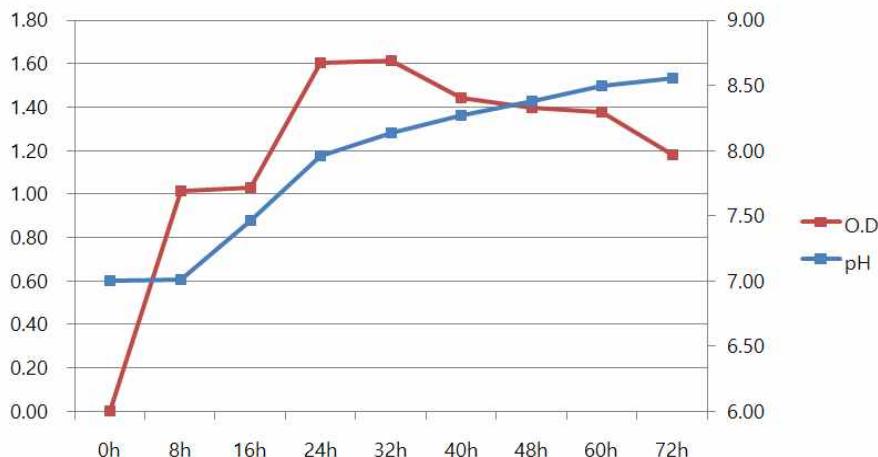


그림 2-4. 배양시간에 따른 pH 및 OD값의 변화.

(4) *Bacillus* sp. #13 균주 휘발성물질의 항균활성

Bacillus sp. #13 균주는 농과원의 협동연구과제팀에서 선발한 잘록병 방제 미생물이다. 본 균주는 균체의 존재 하에서는 강한 항균활성을 나타내지만 균체가 제거된 배양액에서는 항균활성을 나타내지 않았다. 따라서 본 균주는 균주의 생육상태에서 휘발성물질을 생성하여 항균활성을 나타내는 것으로 추측되어 휘발성성분의 항균활성을 검정하였다. *Bacillus* sp. #13 균주의 휘발성물질의 항균활성검정은 I-plate를 사용하여 검정하였다. 그 결과 아래의 그림 5와 같이 #13 균주의 배양시 항균 휘발성 물질에 의하여 인삼잘록 병균인 *Pythium*과 *Rhizoctonia solani*의 생장이 억제되었다.

그림 2-5. *Bacillus* sp. #13 균주 휘발성물질의 항균활성.

(5) *Bacillus* sp. #13 균주가 생성하는 휘발성 항균활성물질의 분석

선발 *Bacillus* sp. #13 균주가 생성하는 휘발성 항균활성물질의 구명을 위해 *Bacillus* sp. #13 균주의 배양 시에 발생하는 휘발성물질을 포집하여 GC-mass 분석을 2회 반복하여 수행하였다. 반복실험의 결과는 매우 유사하게 나타났으며 그 결과는 아래의 그림 2-6과 같다. GC-mass 분석 결과 Rt 6.5, 8.4, 13.9, 16.9, 19.8, 20.6 분에서 반복적으로 피크가 검출되었으며, 이들 피크의 화합물을 라이브러리로 검색한 결과 benzaldehyde를 제외하고는 database의 화합물들과 매우 낮은 유사성을 나타내었다.

6.5	40.8	Styrene
8.4	67.3	Benzaldehyde
13.9	13.1	Pyraaine, (2-methylpropyl)-
16.9	11.0	10-Methyl-8-tetradecen-1-ol acetate
19.8	26.0	Cyclobutane, 1,2-diphenyl-
20.5	50.1	Naphthalene, 1,2,3,4-tetrahydro-2-phenyl-

그림 2-6. *Bacillus* sp. #13 균주가 생성하는 휘발성 물질의 GC-mass 분석 및 휘발성 물질의 GC-mass library 검색 결과.

나. *Bacillus* sp. #26 균주의 항균활성물질 구명

(1) *Bacillus* sp. #26 균주의 배양 시간에 따른 pH 및 OD값의 조사

Bacillus sp. #26 균주의 항균활성물질 규명에 앞서 배양조건을 조사하였다. 분양받은 #26 균주를 LB배지에 접종한 후 배양시간에 따른 pH값과 OD값의 경시적 변화를 측정하였다. 그 결과 배양기간에 따라 pH값은 점차적으로 증가하여 배양 3일 후에는 pH 8.4 까지 도달하였다. 반면 OD값은 배양 35시간에 최대치에 도달하였다(그림 2-7).

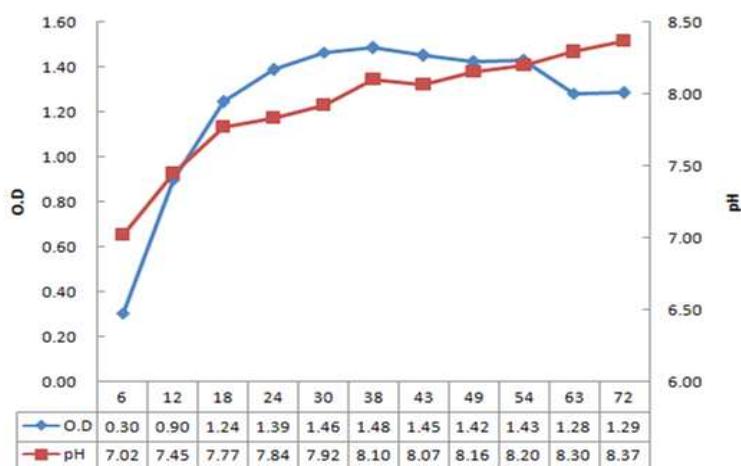


그림 2-7. 배양시간에 따른 pH 및 OD값의 변화.

(2) *Bacillus* sp. #26 균주 배양액으로부터 활성물질의 분리 및 정제

Bacillus sp. #26 균주 배양액을 6000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 상층액은 Diaion HP-20 column에 흡착시켜 chromatography를 실시하고 균체는 acetone으로 추출하였다. Diaion HP-20 resin 1 L에 #26 균주 배양액 상층액 10 L를 흘려 흡착시킨 후, 30%, 50%, 70%, 100% aqueous methanol을 3 L씩 차례로 흘려주어 용출하였다(그림 2-8). 각 용출물에 대하여 항균활성을 검정한 결과 현저히 활성이 감소되었으며, 이같은 특성은 위의 *Bacillus* sp. #13과 동일한 현상으로 활성성분이 휘발성물질로 추정되어 그 이상의 분석은 수행하지 않았다.

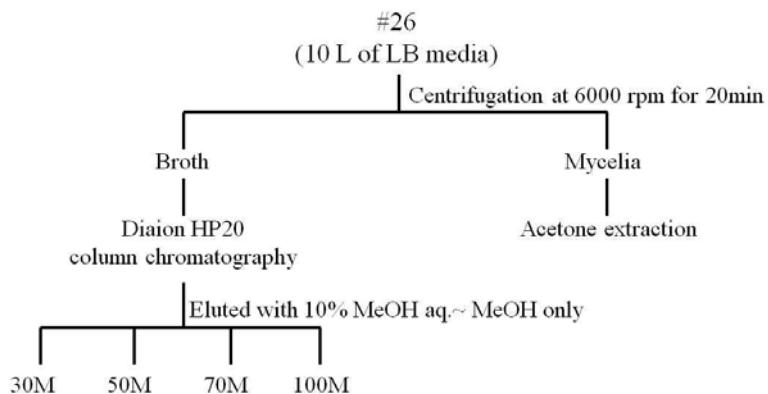


그림 2-8. 항균활성성분의 분리 및 정제 과정.

다. 항균활성 기반 인삼찰록병 방제효능을 지닌 토양 미생물의 탐색

(1) 새로운 방선균의 스크리닝

토양으로부터 분리한 방선균 1,270 균주를 대상으로 인삼찰록병 병원균인 *Rhizoctonia solani*에 우수한 항균활성을 나타내는 8종의 방선균을 선발하였다. 이들 8종의 방선균 BS065, A75, A501, A515, A704, A1444, A3265, A3283 균주를 MBA 배지에 계대배양하여 보존한 후 GSS 배지에 7일간 배양하였다.

(2) 선발한 8종 방선균의 항균활성

병원균 *Rhizoctonia solani* 균주와 *Pythium* sp. 균주에 대하여 선발한 8종 방선균의 항균활성을 검정한 결과 BS065, A704 균주가 두 병원균에 공통적으로 강한 항균활성을 나타내었다(그림 2-9). 또한, A501, A3283 등의 균주가 *Rhizoctonia solani*에 대하여 상대적으로 강한 항균활성을 나타내어 이를 방선균을 대상으로 활성물질의 분리 및 정제를 수행하였다.

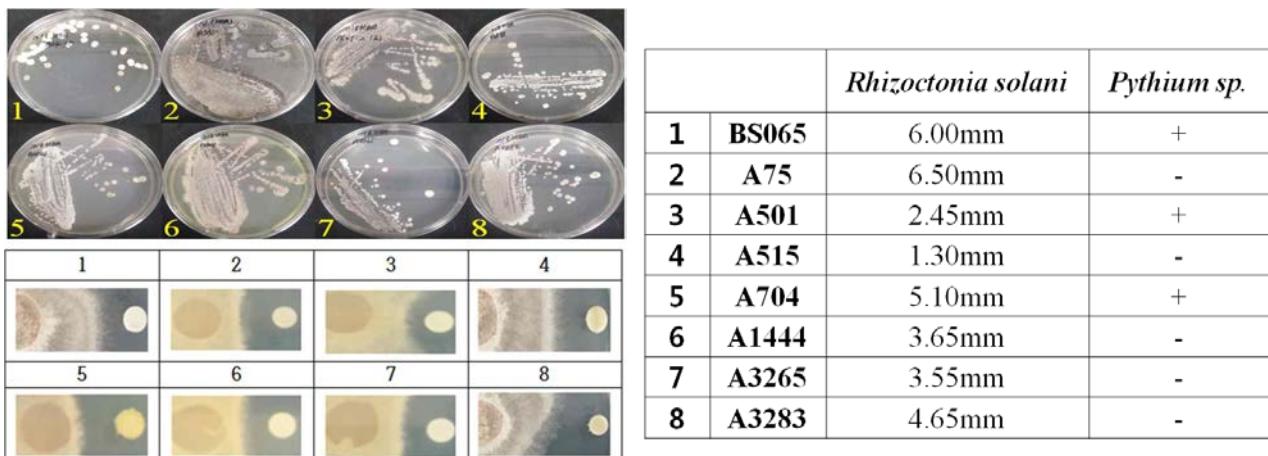


그림 2-9. 인삼잘록병 병원균에 대한 선발 방선균의 항균활성.

라. 방선균 BS065 균주의 항균활성물질 구명

(1) 방선균 BS065 균주 배양액으로부터 항균활성물질의 분리 및 정제

선발 방선균 BS065 균주를 상술한 GSS배지에 배양하여 3 L의 배양액을 확보하였다. 배양액을 원심분리하여 균체와 상등액으로 나눈 후 균체는 아세톤으로 추출하였다. 균체 아세톤 추출물과 상등액의 항균활성을 검정한 결과 균체 추출물에서는 항균활성이 없는 반면 상등액은 강한 항균활성을 나타내었다. 따라서 상등액을 Diaion HP-20 column에 흡착시킨 후, 50%, 100% aqueous methanol로 용출하였다. 각 용출물의 항균활성을 조사한 결과 methanol 용출물에서 강한 항균활성을 나타내었다. Methanol 용출물을 농축한 후 C₁₈ Sep-pak cartridge에 적용한 후 40~100% aqueous methanol로 용출하여 활성 물질 compound A를 정제하였다(그림 2-10).

Culture broth of *Streptomyces* sp. BS065

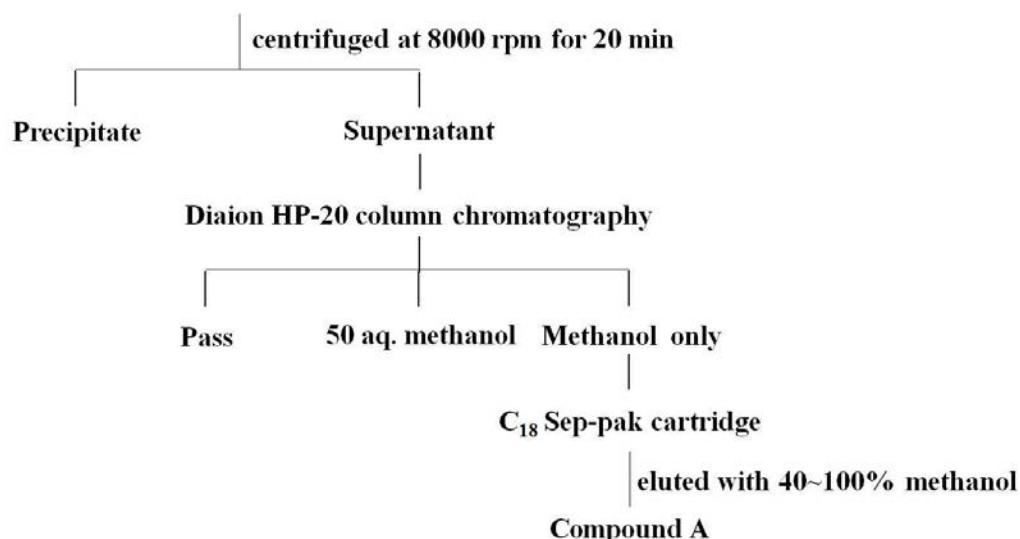


그림 2-10. BS065 균주 배양액으로부터 항균활성물질의 분리 및 정제 과정.

(2) 방선균 BS065 균주 배양액으로부터 분리한 항균활성물질의 화학구조 구명

선발 방선균 BS065 균주의 배양액으로부터 정제한 항균활성물질 compound A의 화학구조는 표준시료와의 TLC 분석에 의하여 결정되었다. 방선균 BS065 균주는 선행연구에 의하여 항균물질 scopafungin을 생산하는 것으로 밝힌 바 있다. 따라서 정제한 compound A와 scopafungin의 표준품을 TLC(ODS TLC, 전개용매: 85% aqueous methanol)로 분석하였으며 그 결과 동일한 Rf값을 나타내어 항균활성물질을 scopafungin으로 동정하였다(그림 2-11). Scopafungin의 화학구조를 그림 2-12에 나타내었다.

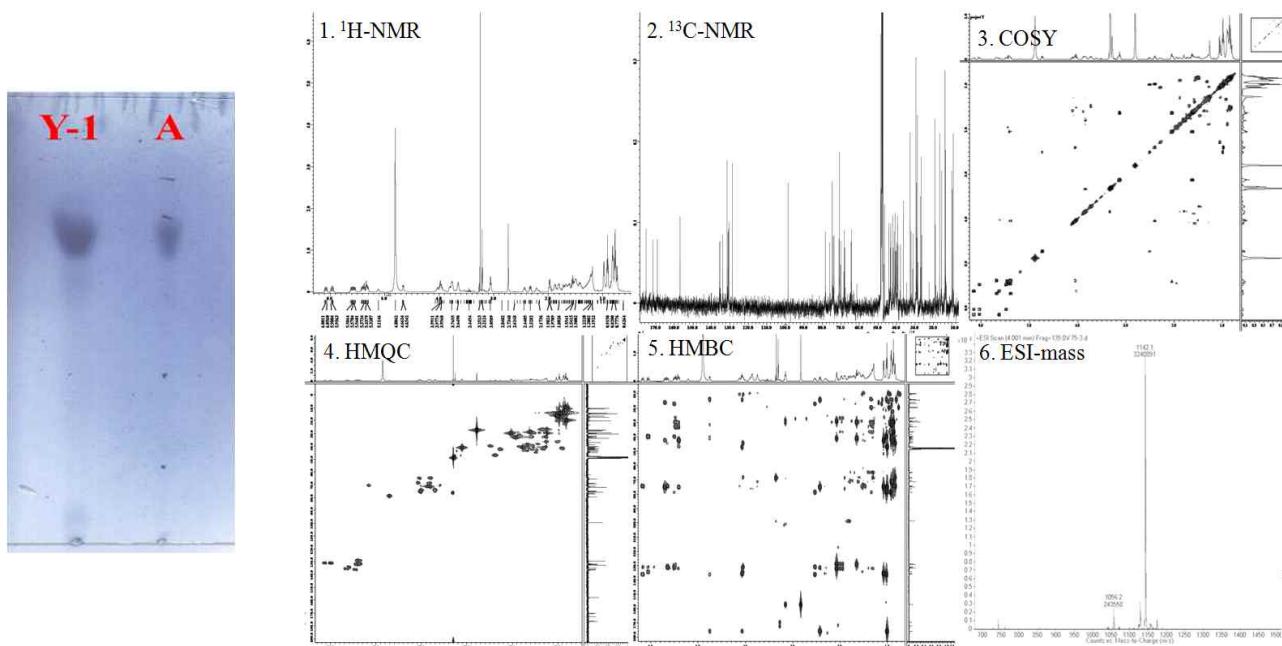


그림 2-11. Scopafungin (Y-1)과 compound A의 TLC 비교 및 NMR spectrum.

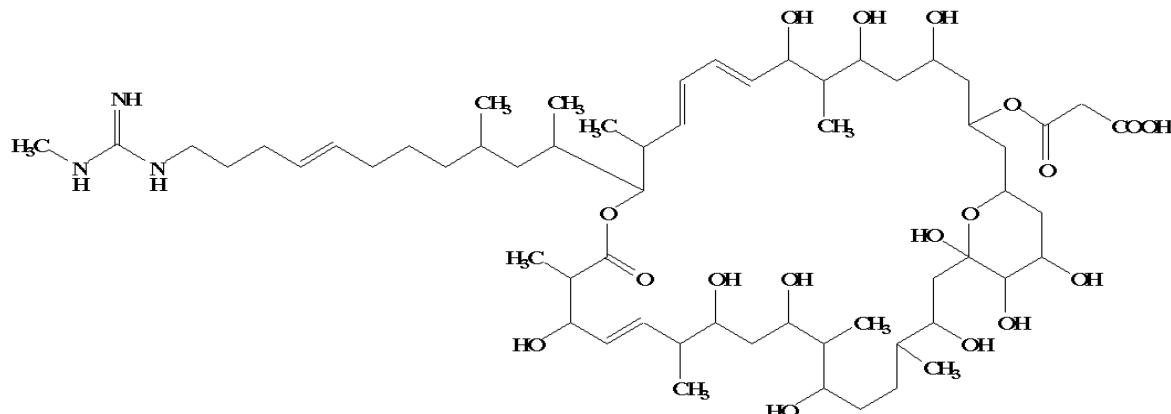


그림 2-12. Compound A (= scopafungin)의 화학구조.

(3) 화합물 compound A의 항균활성

선발 방선균 BS065 균주의 배양액으로부터 정제한 활성물질 compound A의 항균활성을 인삼잘록병 병원균인 *Rhizoctonia solani*와 *Pythium* sp. 균주에 대하여 검정한 결과 compound A는 두 균주에 공통적으로 항균활성을 나타내었다.

마. 방선균 A1444 균주의 배양조건 설정 및 항균활성물질 구명

(1) 방선균 A1444 균주의 탄소원에 따른 균 생육의 변화

탄소원이 균 생육에 어떠한 영향을 미치는지 조사하기 위해 연구방법에 기술되어 있는 방법에 의하여 실험을 수행하였다. 탄소원에 따른 GSS 배지의 탄소원의 조성을 변경하여 6일간 배양하였다. 그 결과 생육에 가장 우수한 탄소원은 glucose와 glycerol이었으며 대체적으로 나머지 starch, sucrose, dextrin을 탄소원으로 첨가한 경우에도 잘 생육하였다(표 2-1).

표 2-1. 방선균 A1444 균주의 탄소원에 따른 생육의 변화

탄소원	균사생장	Final pH
Glucose	+++	7.4
Glycerol	+++	8.2
Starch	++	9.0
Sucrose	++	9.2
Dextrin	++	7.1
GSS	++	7.8
Control	+	5.5

(2) 방선균 A1444 균주의 질소원에 따른 균 생육의 변화

질소원 이용성은 1.5% glycerol을 탄소원으로 하는 GSS 배지에 무기태질소원 2종류, 유기태 질소원 8종류를 각각 첨가하여 탄소원과 동일한 방법으로 균 생육을 조사하였다. 그 결과 균 생육은 tryptone, beef extract를 첨가한 배지에서 우수하였다(표 2-2).

표 2-2. 방선균 A1444 균주의 질소원에 따른 생육의 변화

질소원	균사생장	Final pH
Soybean flour	++	8.2
Corn steep liquor	++	7.4
Soytone	+	8.2
Peptone	++	8.5
Tryptone	+++	8.3
Malt extract	-	5.5
Beef extract	+++	8.5
Yeast extract	++	8.5
Ammonium sulfate	-	6.2
Sodium nitrate	++	7.2
GSS	++	7.5
Control	+	5.7

(3) 방선균 A1444 균주 배양액으로부터 항균활성물질의 분리 및 정제

선발 방선균 A1444 균주를 GSS 배지에 배양하여 3 L의 배양액을 확보하였다. 배양액을 원심분리하여 균체와 상등액으로 나눈 후 균체는 아세톤으로 추출하였다. 균체 아세톤 추출물과 상등액의 항균활성을 검정한 결과 균체 아세톤 추출물과 상등액 모두에서 항균활성을 나타내었다. 따라서 균체 아세톤 추출물을 감압농축하여 아세톤을 제거한 후 상등액과 합하였다. 이를 Diaion HP-20 column에 흡착시킨 후, 30%, 50%, 70%, 100% aqueous methanol로 용출하였다. 각 용출물의 항균활성을 조사한 결과 70% aqueous methanol 용출물에서 강한 항균활성을 나타내었다. 70% aqueous methanol 용출물을 농축한 후 10%-100% methanol을 용출용매로 이용하여 preparative MPLC를 수행하였다. MPLC 활성분획을 농축한 후 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하였으며. 각 용출물의 항균활성을 조사하여 활성분획을 농축한 후 C₁₈ Sep-pak cartridge column chromatography를 수행하여 40%, 50%, 55%, 60%, 100% aqueous methanol로 용출하였다. 각 용출물의 항균활성을 조사한 결과 50% aqueous methanol 용출물에서 강한 항균활성을 나타내었다. 50% aqueous methanol 용출물을 농축한 후 45% aqueous methanol을 용출용매로 이용하여 C₁₈ Sep-pak cartridge column chromatography를 재수행하여 활성물질 A1444-1을 정제하였다(그림 2-13).

Culture broth of A1444

centrifuge, 6000 rpm, 20 min

Precipitate	Supernatant
extracted with acetone	

Diaion HP-20 column chromatography

Pass 30% 50% 70% 100% MeOH

MPLC column chromatography
eluted with 10~100% methanol

Sephadex LH-20 column chromatography
eluted with 100% methanol
C₁₈ Sep-pak cartridge

40% 50% 55% 60% 100% MeOH

C₁₈ Sep-pak cartridge
eluted with 45% aq. methanol

Compound A1444-1

그림 2-13. 방선균 A1444 균주 배양액으로부터 항균 활성물질의 분리 및 정제 과정.

(4) 방선균 A1444 균주 배양액으로부터 분리한 항균활성물질의 화학구조

선발 방선균 A1444 균주의 배양액으로부터 정제한 항균활성물질 A1444-1의 화학구조는 ESI-mass 분석과 표준시료를 이용한 HPLC retention time의 비교에 의하여 결정되었다.

ESI-mass spectrum의 측정 및 해석: 화합물 A1444-1의 분자량을 밝히기 위하여 ESI-mass spectrum을 측정하였다. Positive mode에서 측정한 결과 m/z 1130.3에서 $[M+H]^+$ peak가 관찰되어 본 화합물의 분자량을 1,129로 확인하였다(그림 2-14). 이는 앞에서 기술한 방선균 A3265에서 분리한 화합물 A3265-1 (guanidylfungin A)과 동일한 분자량을 나타내었다. 따라서 화합물 A1444-1은 guanidylfungin A로 유추되었다.

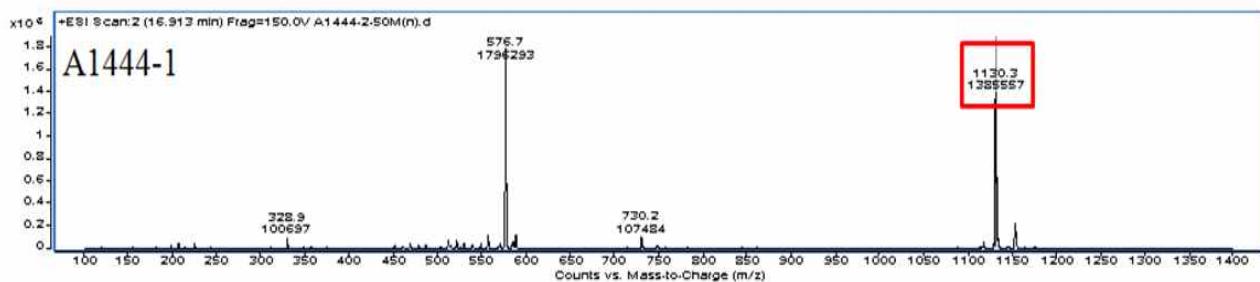


그림 2-14. 활성물질 A1444-1의 ESI-mass spectrum (positive mode).

HPLC retention time의 비교: 화합물 A1444-1이 guanidylfungin A로 유추되어 앞의 guanidylfungin A와 HPLC retention time을 비교하였다. HPLC 분석(C_{18} column 10×150 mm, 10–100% aq. methanol/0.04% TFA, 1 ml/min) 결과 A1444-1과 guanidylfungin A의 HPLC retention time이 그림 2-15에 나타낸 바와 같이 잘 일치하였다. 따라서 화합물 A1444-1을 guanidylfungin A로 동정하였다. 그림 2-16에 활성물질 A1444-1 (= guanidylfungin A)의 화학구조를 나타내었다.

그림 2-15. 활성물질 A1444-1과 guanidylfungin A의 HPLC retention time 비교.

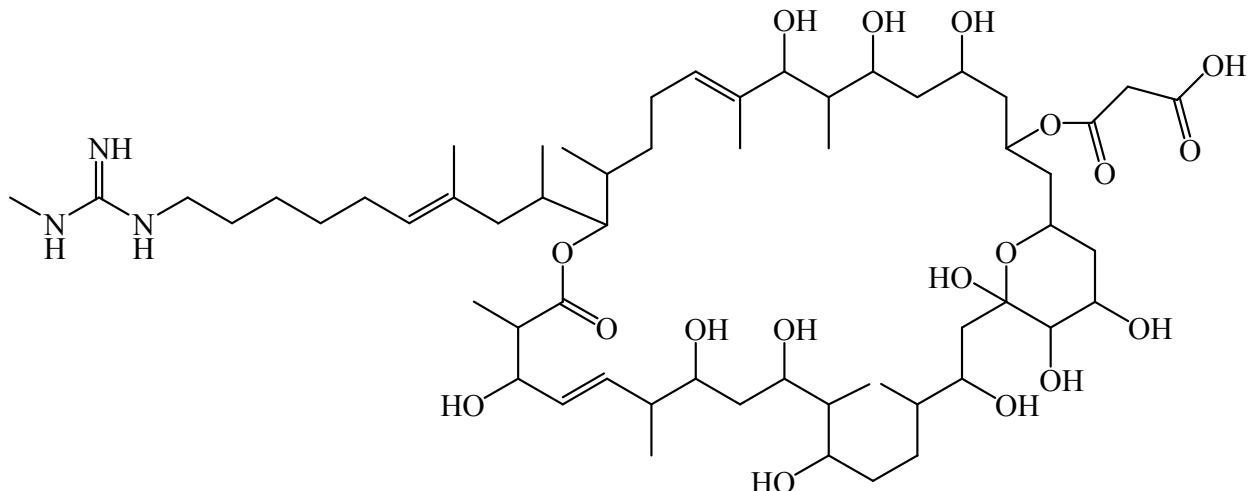


그림 2-16. 활성물질 A1444-1 (= Guanidylfungin A)의 화학구조.

바. 선발 방선균 A75 균주의 항균활성물질 구명

(1) 선발 방선균 A75 균주 배양액으로부터 항균활성물질의 분리 및 정제

선발 방선균 A75 균주를 GSS배지에 배양하여 3 L의 배양액을 확보하였다. 배양액을 원심분리하여 균체와 상등액으로 나눈 후 균체는 아세톤으로 추출하였다. 균체 아세톤 추출물과 상등액의 항균활성을 검정한 결과 균체 아세톤 추출물과 상등액 모두에서 항균활성을 나타내었다. 따라서 균체 아세톤 추출물을 감압농축하여 아세톤을 제거한 후 상등액과 합하였다. 이를 Diaion HP-20 column에 흡착시킨 후, 30%, 50%, 70%, 100% aqueous methanol로 용출하였다. 각 용출물의 항균활성을 조사한 결과 70% aqueous methanol과 100% methanol 용출물에서 강한 항균활성을 나타내었다. 따라서 70% aqueous methanol 용출물과 100% methanol 용출물을 합하여 농축한 후 50-100% methanol을 용출용매로 이용하여 preparative MPLC를 수행하였다. MPLC 용출물 중 활성분획을 농축한 후 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하였다. 용출물의 활성분획을 농축한 후 C₁₈ Sep-pak cartridge column chromatography를 45% aqueous acetonitrile로 용출하였다. 용출된 활성분획을 농축한 후 preparative ODS HPLC를 통하여 활성물질 compound A75-2를 정제하였다(그림 2-17).

Culture broth of A75

centrifuge, 6000 rpm, 20 min

Precipitate

extracted with acetone

Supernatant

Diaion HP-20 column chromatography

Pass 30% 50% 70% 100% MeOH

MPLC column chromatography

eluted with 50~100% methanol

Sephadex LH-20 column chromatography

eluted with 70% methanol

C_{18} Sep-pak cartridge

eluted with 45% aq. ACN

Preparative ODS HPLC

Compound A75-2

그림 2-17. 방선균 A75 균주로부터 항균물질의 정제 과정.

(2) 방선균 A75 균주 배양액으로부터 분리한 항균물질 A75-2의 화학구조

방선균 A75 균주의 배양액으로부터 정제한 항균활성물질 A75-2의 화학구조는 ESI-mass spectrum 및 1H NMR spectrum의 측정과 이로부터 유추되는 화합물의 표준 시료와의 데이터를 비교 분석하여 결정하였다. 즉 정제한 compound A75-2의 ESI-mass spectrum 측정 결과 m/z 1142에서 $[M+H]^+$ 피크가 관찰되어 분자량이 1,141로 확인되었다(그림 2-18). 이는 방선균 BS065 균주로 분리한 항생물질 scopafungin과 동일한 분자량이었다.

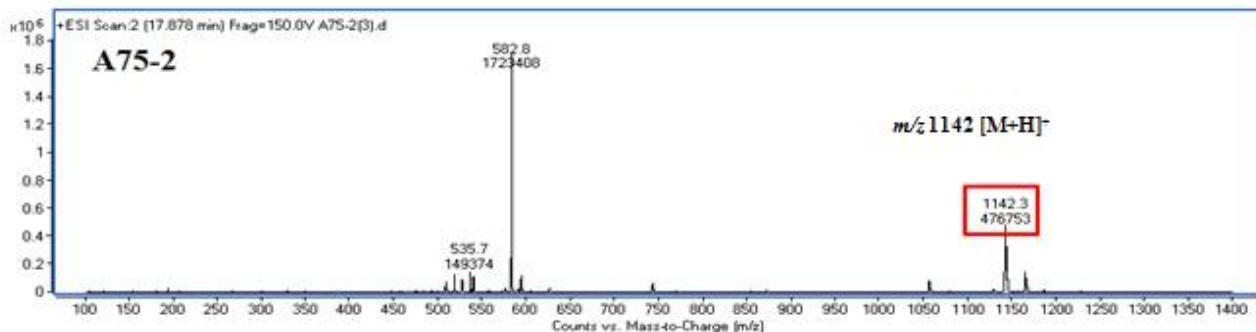


그림 2-18. 활성물질 A75-2의 ESI-mass spectrum.

따라서 A75-2의 ^1H NMR spectrum을 측정하여 scopafungin의 ^1H NMR spectrum과 비교하였다(그림 2-19). 그 결과 화합물 A75-2와 scopafungin의 ^1H NMR spectrum이 일치하여 화합물 A75-2의 화학구조를 scopafungin으로 동정하였다. Scopafungin의 화학구조를 그림 2-20에 나타내었다.

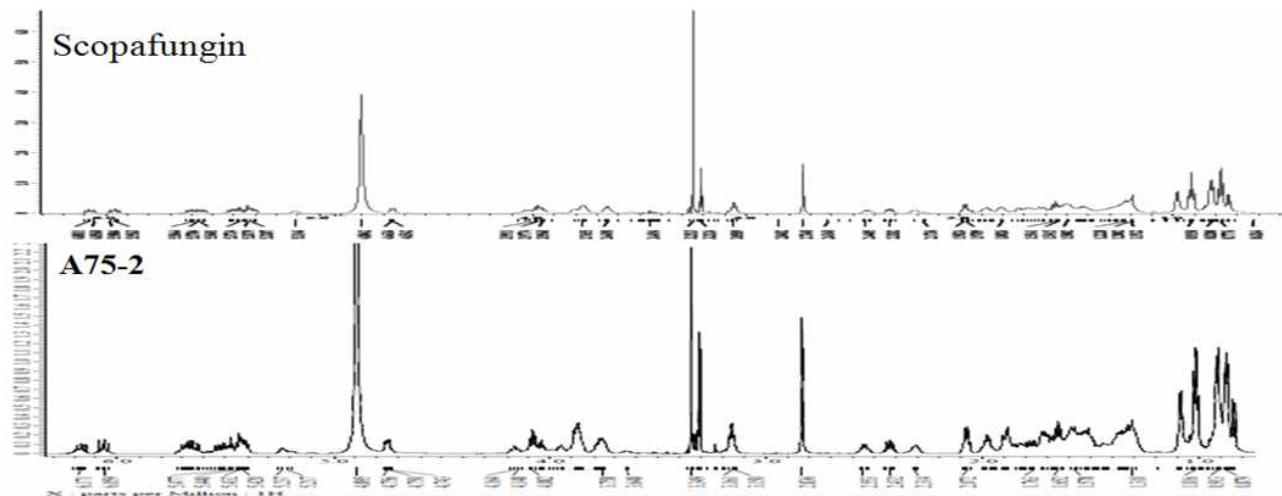


그림 19. Scopafungin과 활성물질 A75-2의 ^1H NMR spectrum 비교.

그림 20. 활성물질 A75-2 (= scopafungin)의 화학구조.

(3) 화합물 A75-2의 항균활성

선발 방선균 A75 균주의 배양액으로부터 정제한 활성물질 A75-2의 항균활성을 인삼찰록병 병원균인 *Rhizoctonia solani* 균주에 대하여 검정한 결과 compound A75-2는 강한 항균활성을 나타내었다. 항균활성검정결과를 아래의 그림 2-21에 나타내었다.

그림 2-21. *Rhizoctonia solani* 균주에 대한 활성물질 A75-2의 항균활성.

사. 방선균 A3265 균주의 항균활성물질 구명

(1) 방선균 A3265 균주 배양액으로부터 항균활성물질의 분리 및 정제

선발 방선균 A3265 균주를 GSS배지에 배양하여 3 L의 배양액을 확보하였다. 배양액을 원심분리하여 균체와 상등액으로 나눈 후 균체는 아세톤으로 추출하였다. 균체 아세톤 추출물과 상등액의 항균활성을 검정한 결과 균체 아세톤 추출물과 상등액 모두에서 항균활성을 나타내었다. 따라서 균체 아세톤 추출물을 감압농축하여 아세톤을 제거한 후 상등액과 합하였다. 이를 Diaion HP-20 column에 흡착시킨 후, 30%, 50%, 70%, 100% aqueous methanol로 용출하였다. 각 용출물의 항균활성을 조사한 결과 70% aqueous methanol 용출물에서 강한 항균활성을 나타내었다. 따라서 70% aqueous methanol 용출물을 농축한 후 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하였다. 항균활성을 나타내는 분획을 모아 농축한 후 40–100% methanol을 용출용매로 이용하여 MPLC를 수행하였다. 용출물 분획 중 항균활성을 나타내는 분획을 모아 농축한 후 30% aqueous acetonitrile용매에 용해시킨 결과 침전물과 용액이 형성되었다. 침전물을 TLC(ODS TLC, 전개용매: 80% aqueous methanol)로 분석한 결과 순수물질로 정제되었음을 확인하였고 compound A3265-2로 명명하였다. 나머지 용액을 농축한 후 preparative ODS HPLC를 이용하여 compound A3265-1을 정제하였다(그림 2-22).

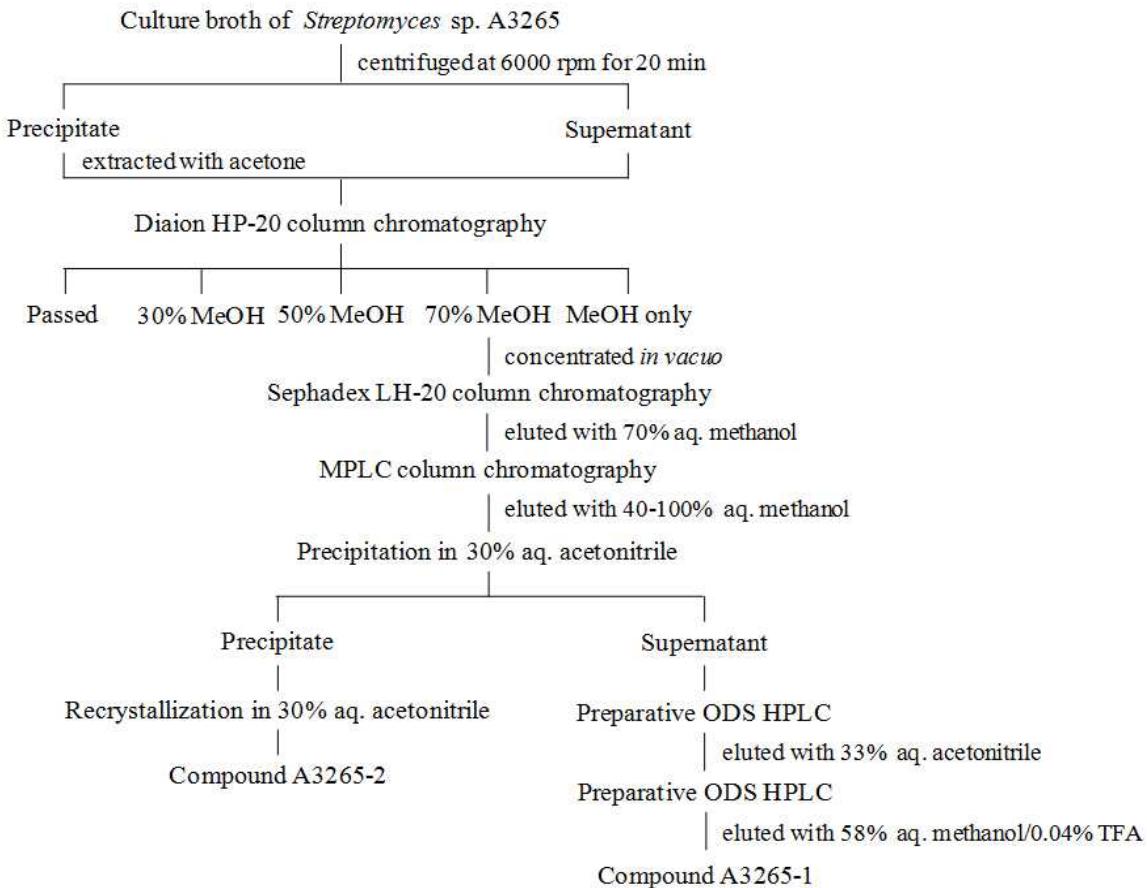


그림 2-22. 방선균 A3265 균주 배양액으로부터 항균활성물질의 정제 과정.

(2) 방선균 A3265 균주 배양액으로부터 분리한 항균활성물질의 화학구조

(가) Compound A3265-1의 화학구조

방선균 A3265 균주의 배양액으로부터 정제한 항균활성물질 compound A3265-1의 화학구조를 구명하기 위하여 ESI-mass spectrum 및 CD₃OD에 녹여 ¹H NMR, ¹³C NMR, ¹H-¹H COSY, HMQC 및 HMBC spectrum을 측정하여 해석하였다.

ESI-mass spectrum의 측정 및 해석: 화합물 A3265-1의 분자량을 밝히기 위하여 ESI-mass spectrum (그림 2-23)을 측정하였다. Positive mode에서 측정한 결과 *m/z* 1130.4에서 [M+H]⁺ peak, *m/z* 1152.3에서 [M+Na]⁺ peak가 관찰되었고, 이로부터 본 화합물의 분자량을 1,129로 확인하였다.

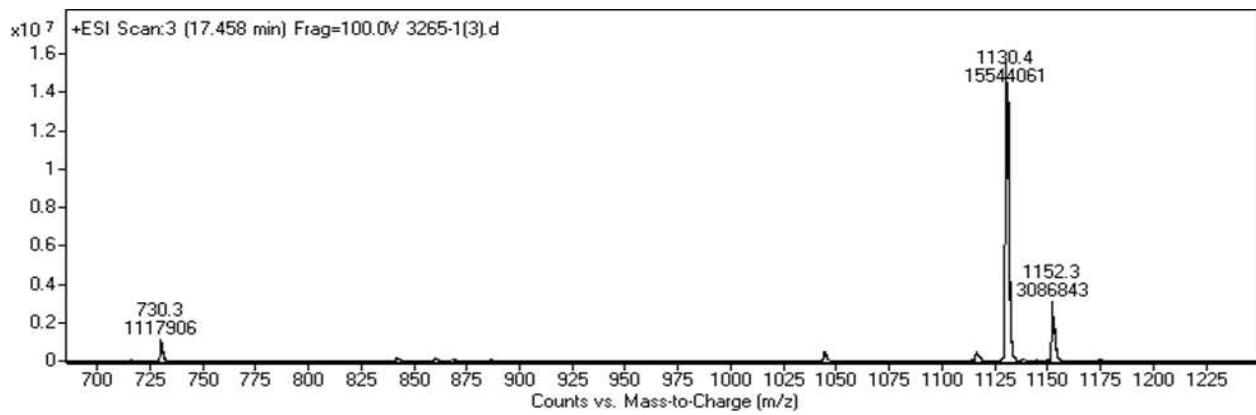


그림 2-23. 활성물질 A3265-1의 ESI-mass spectrum (positive mode).

¹H NMR spectrum의 측정 및 해석: ¹H NMR spectrum (그림 2-24)을 측정한 결과, 5.72, 5.44, 5.33, 5.32 ppm에서 네 개의 olefinic methine proton, 3.5–4.2 ppm에서 다수의 oxygenated methine proton, 2.82 ppm에서 한 개의 N-methyl proton, 0.5–1.5 ppm에서 아홉 개의 methyl proton이 관찰되었다.

A3265-1

그림 2-24. 활성물질 A3265-1의 ¹H NMR spectrum.

¹³C NMR spectrum의 측정 및 해석: ¹³C NMR spectrum (그림 2-25)을 측정한 결과, 177.0, 170.5, 169.1 ppm에서 세 개의 carbonyl carbon, 158.3 ppm에서 한 개의 guanidyl carbon, 120–140 ppm에서 여섯 개의 olefinic carbon, 102.9 ppm에서 한 개의 hemiacetal carbon, 60–85 ppm에서 oxygenated carbon, 20–60 ppm에서 methylene 및 methine carbon, 10–18 ppm에서 아홉 개의 methyl carbon이 관찰되었다.

A3265-1

그림 2-25. 활성물질 A3265-1의 ^{13}C NMR spectrum.

이상의 ESI-mass spectrum, ^1H NMR 및 ^{13}C NMR spectrum을 바탕으로 항균활성물질에 대한 문헌검색을 수행한 결과 활성물질 A3265-1은 guanidylfungin A로 유추되었다. 따라서 이의 확인을 위하여 ^1H - ^1H COSY, HMQC, HMBC spectrum을 측정하여 2D NMR spectrum의 해석 결과와 화학구조가 일치하는지를 확인하였다.

2D NMR spectrum의 측정 및 해석: 아래의 ^1H - ^1H COSY, HMQC, HMBC spectrum (그림 2-26)을 측정하여 본 화합물이 guanidylfungin A의 구조와 일치하는지를 확인한 결과, 동일한 화합물로 판명되어 항균활성물질 A3265-1을 guanidylfungin A (그림 2-27)로 동정하였다.

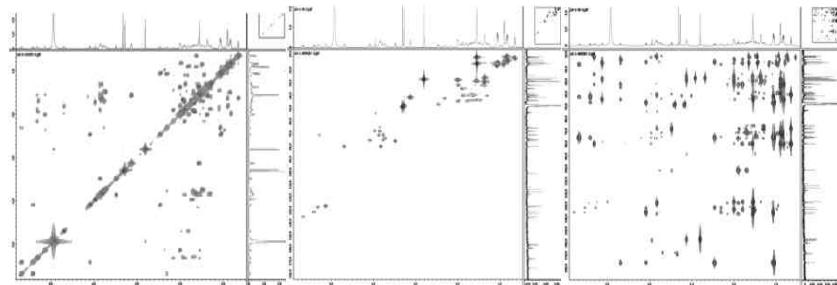


그림 2-26. 활성물질 A3265-1의 2D NMR spectrum

(좌: COSY, 중: HMQC, 우: HMBC).

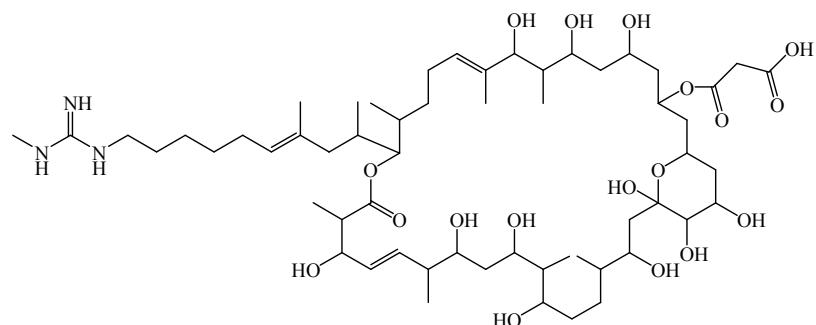


그림 2-27. 활성물질 A3265-1 (= guanidylfungin A)의 화학구조.

(가) Compound A3265-2의 화학구조

방선균 A3265 균주의 배양액으로부터 정제한 활성물질 compound A3265-2의 화학구조를 구명하기 위하여 ESI-mass spectrum 및 CD₃OD에 녹여 ¹H NMR, ¹³C NMR spectrum을 측정하여 해석하고 guanidylfungin A의 구조와 비교, 분석하였다.

ESI-mass spectrum의 측정 및 해석: 화합물 A3265-2의 분자량을 밝히기 위하여 ESI-mass spectrum (그림 2-28)을 측정하였다. Positive mode에서 측정한 결과 *m/z* 1144.4에서 [M+H]⁺ peak, *m/z* 1166.3에서 [M+Na]⁺ peak가 관찰되었고, 이로부터 본 화합물의 분자량을 1,143로 확인하였다. 이는 활성물질 A3265-1 보다 본 화합물의 분자량이 14가 큰 것을 나타낸다.

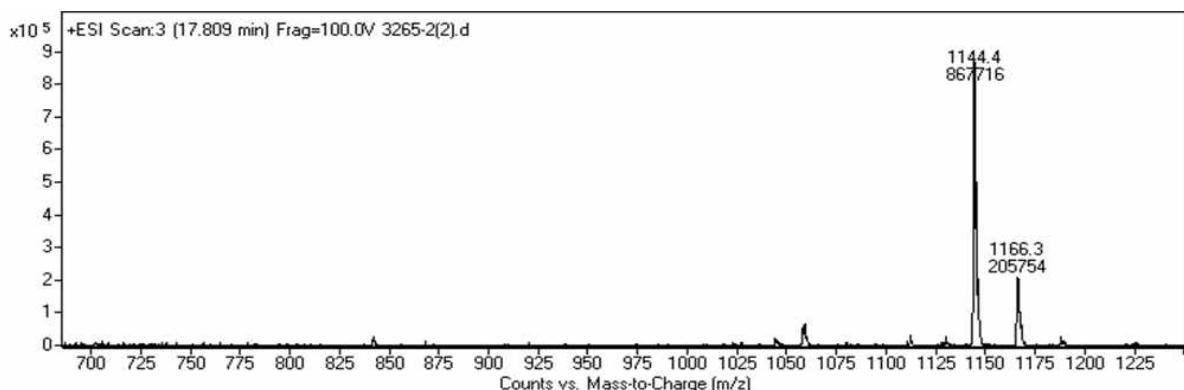


그림 2-28. 활성물질 A3265-2의 ESI-mass spectrum (positive mode).

¹H NMR spectrum의 측정 및 해석: ¹H NMR spectrum (그림 2-29)을 측정한 결과, 3.98 ppm에서 용매(-OCD₃)에 의하여 치환된 것으로 보이는 methoxy proton을 제외하고는 본 화합물은 화합물 A3265-1과 매우 유사하였다.

A3265-2

그림 2-29. 활성물질 A3265-2의 ¹H NMR spectrum.

¹³C NMR spectrum의 측정 및 해석: ¹³C NMR spectrum (그림 2-30)을 측정한 결과, 54.9 ppm에서 용매(-OCD₃)에 의하여 치환된 것으로 보이는 methoxy carbon을 제외하고는 본 화합물은 화합물 A3265-1과 매우 유사하였다.

A3265-2

TFA

TFA

그림 2-30. 활성물질 A3265-2의 ¹³C NMR spectrum.

이상의 ESI-mass spectrum, ¹H NMR spectrum, ¹³C NMR spectrum은 본 화합물이 guanidylfungin A 보다 분자량이 14가 크고 이는 methoxy group에 기인하는 것임을 나타내었다. 또한 methoxy group이 용매에 의하여 쉽게 치환된 것으로부터 guanidylfungin A의 hemiacetal carbon에 methyl 기가 치환된 것임을 알았다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌검색을 수행한 결과 활성물질 A3265-2의 화학구조를 methyl guanidylfungin A로 결정하였다. 그림 2-31에 활성물질 A3265-2 (= methyl guanidylfungin A)의 화학구조를 나타내었다[5].

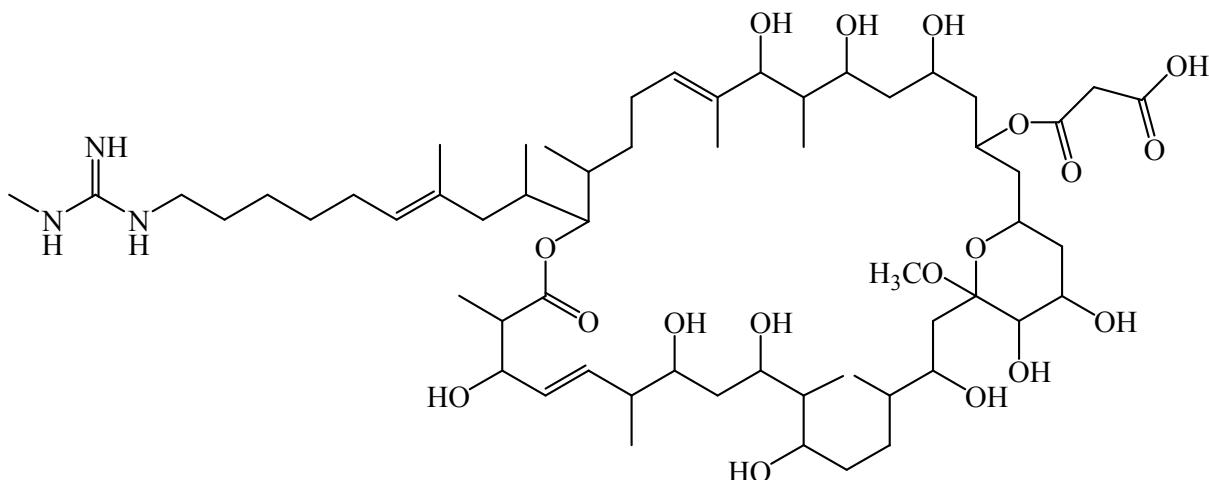


그림 2-31. 활성물질 A3265-2 (= methyl guanidylfungin A)의 화학구조.

(3) 활성물질 A3265-1과 A3265-2의 항균활성

선발 방선균 A3265 균주의 배양액으로부터 정제한 활성물질 A3265-1, A3265-2의 항균활성을 인삼잘록병 병원균인 *Rhizoctonia solani* 균주에 대하여 검정한 결과 compound A3265-1, A3265-2는 그림 32와 같이 강한 항균활성을 나타내었다.

그림 2-32. 활성물질 A3265-1, A3265-2의 *Rhizoctonia solani* 균주에 대한 항균활성.

아. 방선균 A501 균주의 항균활성물질 구명

(1) 방선균A501 균주 배양액 유래 항균활성물질의 분리 및 정제

인삼 잘록병에 유효한 토양 세균을 스크리닝한 결과, 방선균 A501 균주가 높은 활성을 나타내어 방선균 A501 균주를 배양하여 활성물질을 분리, 정제하였다. 선발한 방선균 A501 균주를 1 L 플라스크에 200 mL의 GSS 배지 (glucose 20 g, soluble starch 10 g, meat extract 1 g, yeast extract 4 g, sodium chloride 2 g, potassium phosphate dibasic anhydrous 0.05 g, soybean flour 25 g/L, pH 7.0)를 분주하여 120 rpm, 27°C에서 2일간 전배양한 후 상기조건으로 7일간 3 L를 배양하였다. 방선균 A501 배양액을 6,000 rpm으로 25분간 원심분리하여 균사체와 배양액으로 나누고, 균사체는 아세톤으로 추출하여 감압농축을 통해 아세톤을 제거한 후 배양액과 혼합하였다. 혼합액은 Diaion HP-20 resin에 흡착시켜 methanol : H₂O (30% aqueous methanol → methanol)을 용출용매로 하여 column chromatography를 수행하였다. 항균활성 검정결과 70% aqueous methanol 분획과 methanol 분획이 활성분획으로 확인되었다. 활성분획인 70% aqueous methanol 분획을 감압 농축한 후, 물에 녹여 ethyl acetate로 분배 추출하여 감압 농축하였다. 활성분획인 methanol 분획을 감압 농축하여 얻은 분획물과 상기 분획물을 모아 chloroform : methanol (10:1, 5:1, 2:1, 1:1, v/v)을 용출용매로 하여 silica gel column chromatography를 수행하였다. 활성분획(CHCl₃ : MeOH = 5:1, v/v)을 감압 농축한 뒤 ODS HPLC (26% aqueous acetonitrile, 3 mL/min)로 분취하여 화합물 1을 분리, 정제하였다(그림 2-33).

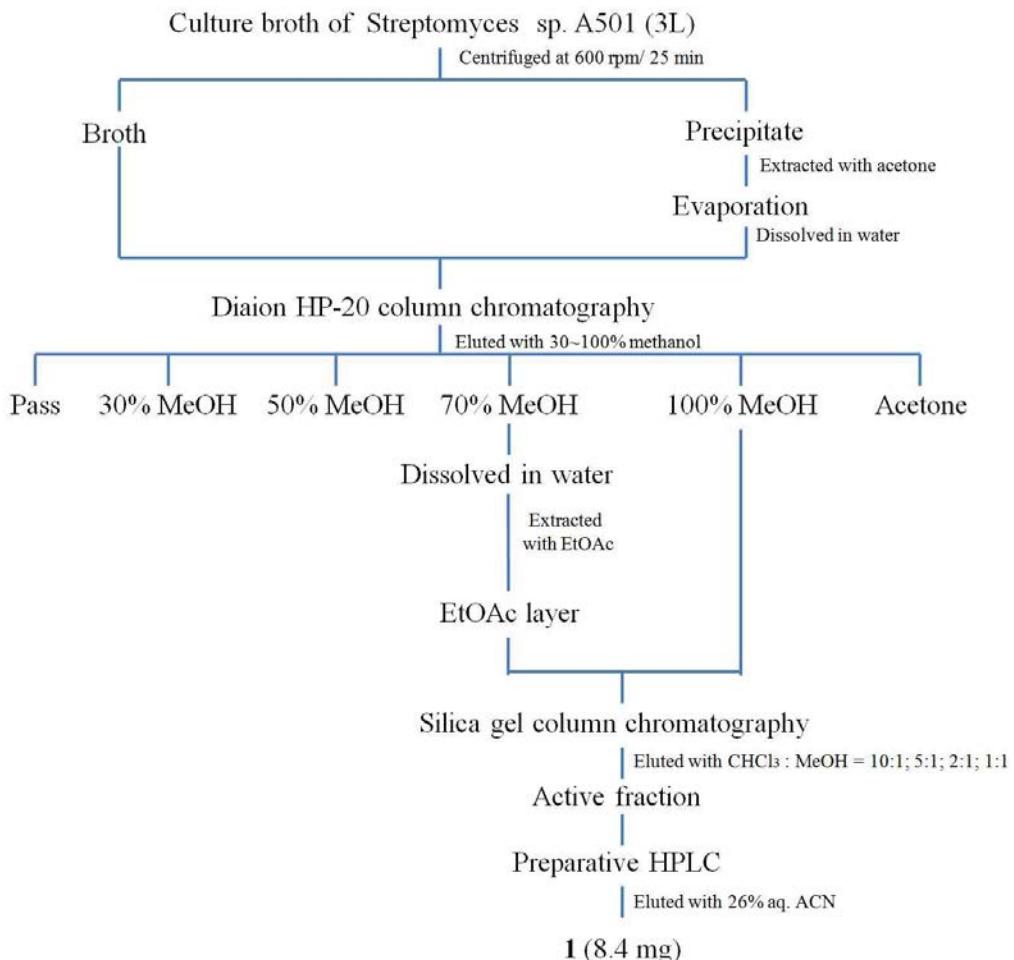


그림 2-33. 방선균 A501 균주 배양액으로부터 항균활성물질의 정제 과정.

(2) 방선균A501 균주 배양액 유래 항균활성물질의 화학구조 규명

방선균A501 배양액에서 분리한 항균성 물질 1의 화학구조를 규명하기 위하여 CD₃OD에 녹여 ¹H NMR, ¹³C NMR 등의 1차원 NMR을 비롯하여 ¹H-¹H COSY, HMQC, HMBC 등의 2차원 NMR을 측정하여 해석하였다. 또한 mass 분석을 수행하여 화학구조를 확인하였다.

¹H NMR spectrum의 측정 및 해석: ¹H NMR spectrum (그림 2-34)을 측정한 결과, 6.01 – 6.44 ppm 사이에서 9개의 olefinic methine proton, 3.24 – 4.82 ppm 사이에서 11개의 oxygenated methine proton, 2.54 ppm에서 1개의 methine proton, 1.24 – 1.75 ppm 사이에서 18개의 methylene proton, 0.89, 1.28, 1.77 ppm에서 3개의 methyl proton이 관찰되었다.

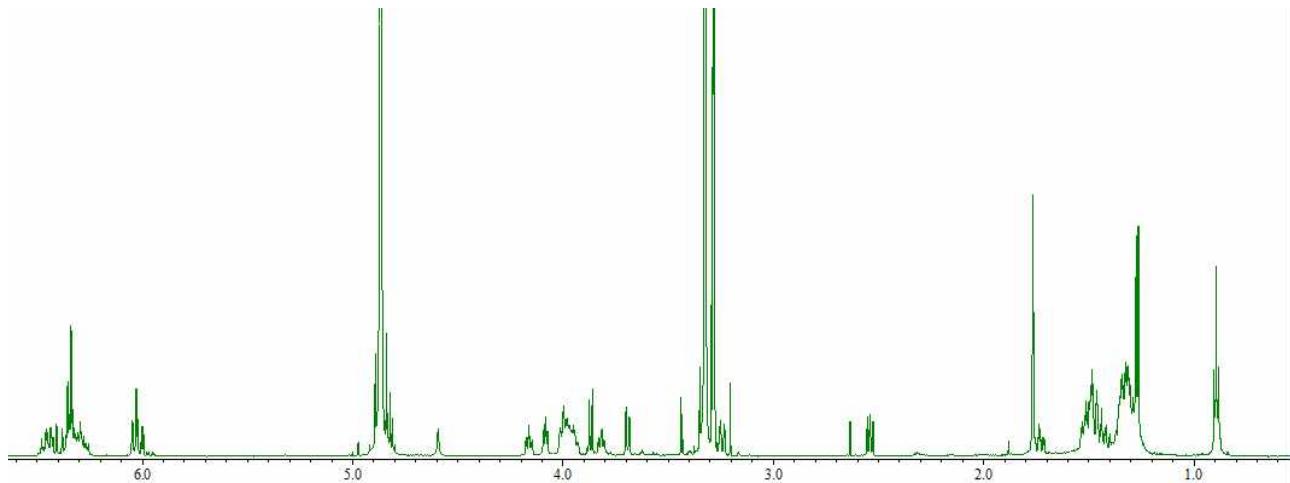


그림 2-34. 화합물 1의 ^1H NMR spectrum.

^{13}C NMR spectrum의 측정 및 해석: ^{13}C NMR spectrum (그림 2-35)을 측정한 결과, 총 35개의 탄소가 관찰되었다. 171.6 ppm에서 1개의 carbonyl carbon, 137.2 ppm에서 1 개의 sp^2 quaternary carbon, 127.7 – 134.1 ppm 사이에서 9개의 sp^2 methine carbon, 68.9 – 79.1 ppm 사이에서 11개의 oxygenated methine carbon, 59.1 ppm에서 1개의 methine carbon, 22.4 – 43.8 ppm 사이에서 9개의 methylene carbon, 10.3, 13.1, 16.6 ppm에서 3개의 methyl carbon이 관찰되었다.

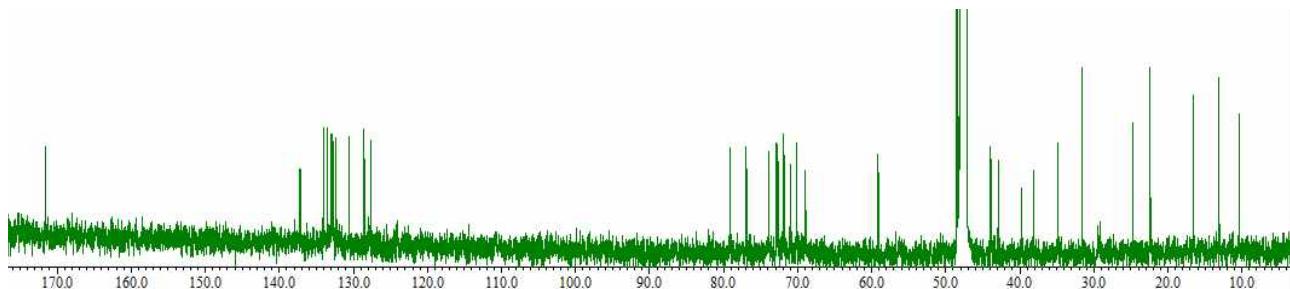


그림 2-35. 화합물 1의 ^{13}C NMR spectrum.

$^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY spectrum의 측정 및 해석: 화합물 1의 부분구조를 규명하기 위하여 $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY spectrum (그림 2-36)을 측정하여 해석하였다. 그 결과 화학구조에 도시한 3개의 부분구조를 구명하였다.

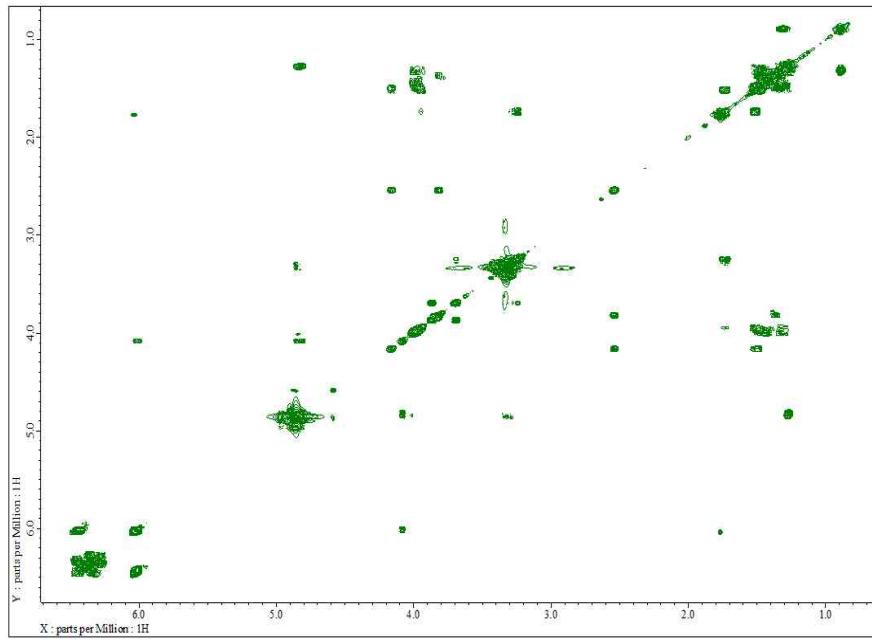


그림 2-36. 화합물 1의 ^1H - ^1H COSY spectrum.

HMQC spectrum 및 HMBC spectrum의 측정 및 해석: HMBC spectrum (그림 2-37)을 측정하여 해석한 결과, 각각의 수소로부터 관찰된 long-range correlation으로부터 화학구조에 도시한 본 화합물의 부분구조를 규명할 수 있었다(그림 2-38). HMQC spectrum의 cross-peak가 심하게 중첩되어 명확한 구조를 규명할 수 없었으나 UV spectrum을 통하여 5개의 conjugated double-bond를 확인하여 polyene 계열 화합물임을 알 수 있었다. 이상의 결과로부터 화합물 1의 화학구조를 polyene 계열 항생물질인 fungichromin으로 동정하였다(그림 2-38)[6-8].

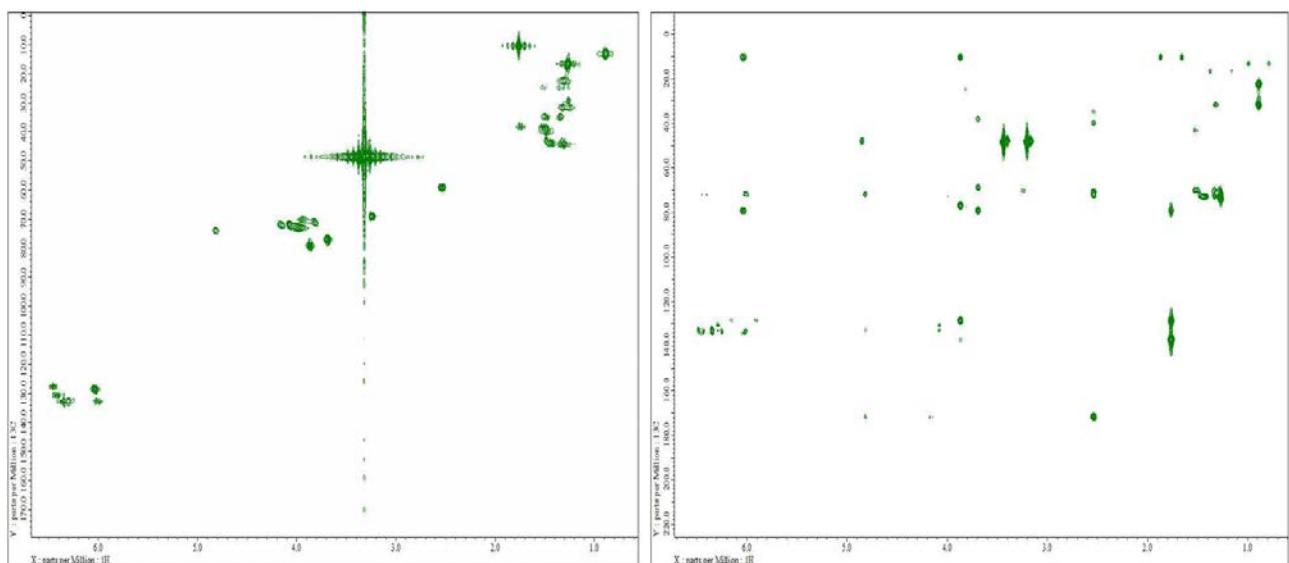


그림 2-37. 화합물 1의 HMQC 및 HMBC spectrum.

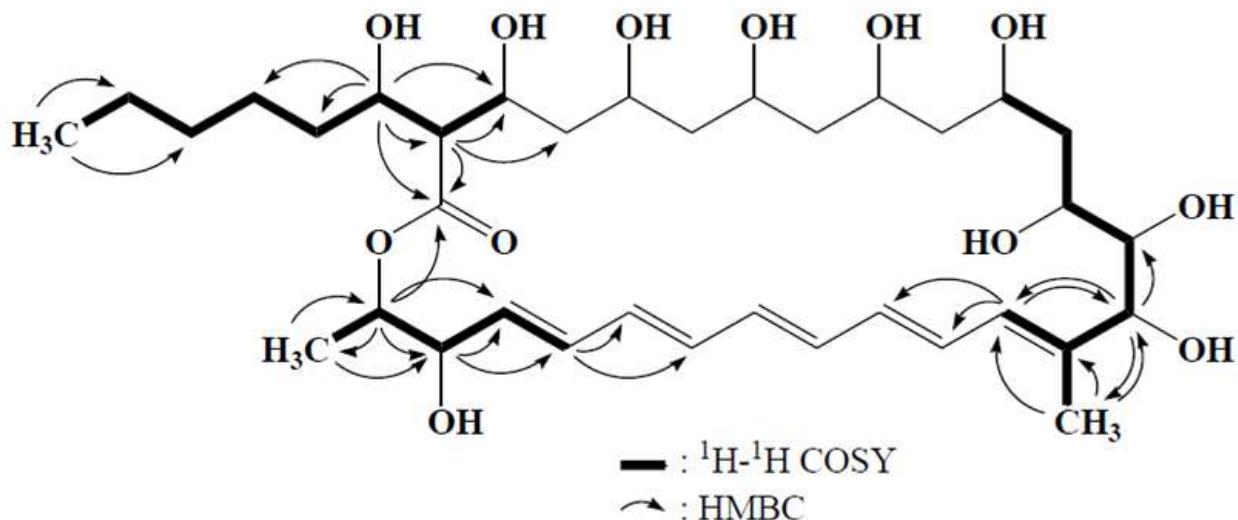


그림 2-38. 화합물 1의 화학구조.

ESI-mass spectrum의 측정 및 해석: NMR 분광분석으로부터 화합물 1의 화학구조를 규명하였다. 이를 확인을 위하여 ESI-mass spectrum을 측정하여 분자량을 확인하였다. ESI-mass spectrum (그림 2-39)을 측정한 결과, m/z 693에서 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ peak가 관찰되었으며 m/z 669에서 $[\text{M}-\text{H}]^-$ peak가 관찰되어 분자량이 670임을 확인하였다. 이는 NMR 분광분석에 의하여 결정된 화학구조와 정확히 일치하였다.

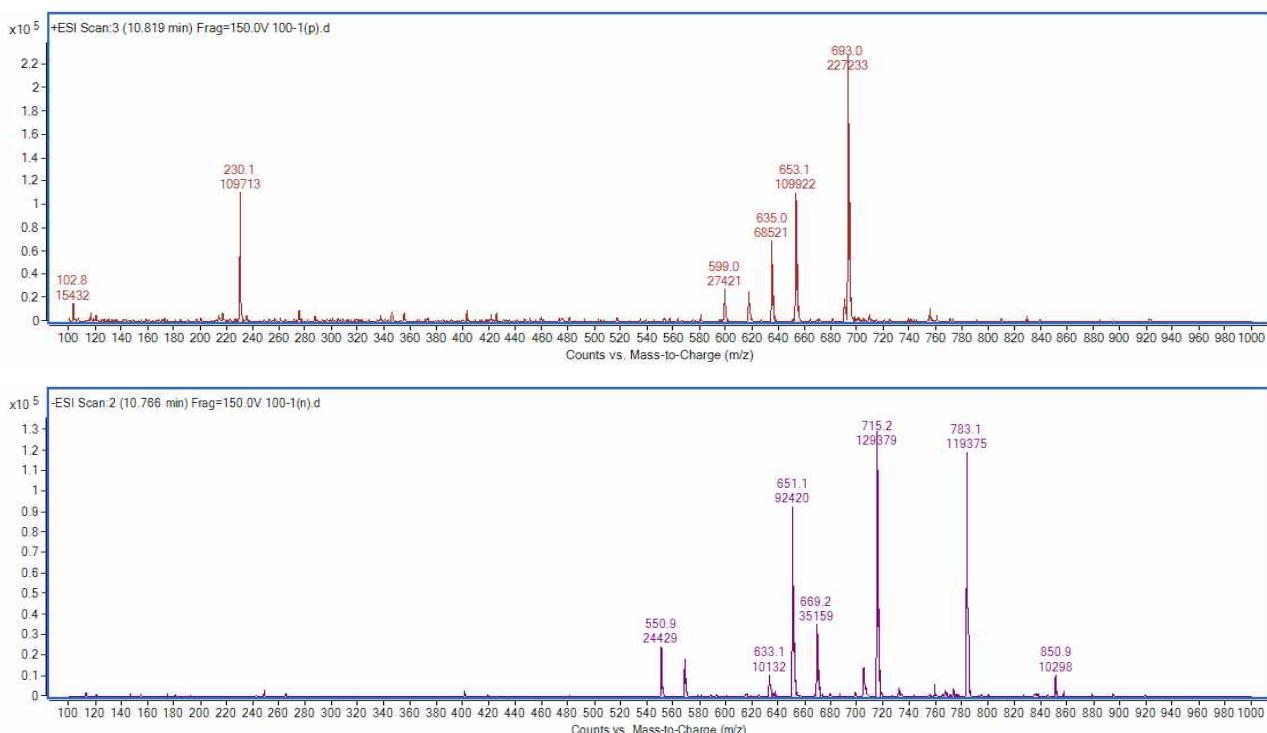


그림 2-39. 화합물 1의 ESI-mass spectrum (위: positive mode, 아래: negative mode).

(3) 방선균 A501균주에 의한 인삼 잘록병 방제 효과

인삼종자의 발아율은 74.8%로 무처리구 73.1%와 비슷하였다. 방선균 배양액에 침지한 인삼종자의 잘록병 발병률은 10.7%로 무처리 19.2%에 비해 유의적으로 발병률이 감소하여 55.7%의 방제효과를 나타내었다(그림 2-40).

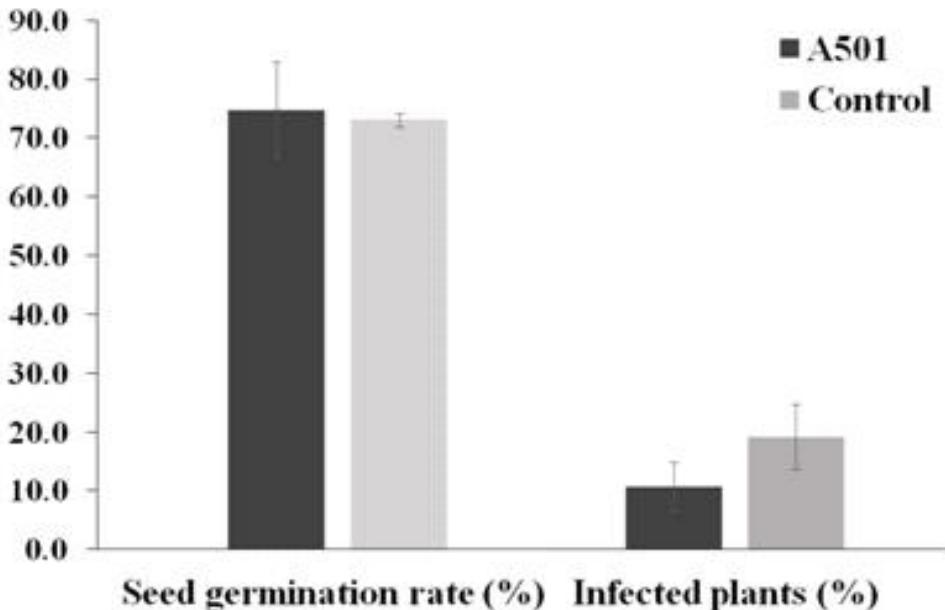


그림 2-40. 방선균 A501의 포장에서의 인삼 잘록병 방제 효과.

자. #35 방선균 및 #37 균주의 항균활성물질 규명

(1) #35 방선균 및 #37 균주의 배양 및 항균활성 검정

#35 방선균 균주는 MBA 배지에 계대배양하여 보관한 후 GSS 배지에 접종하여 7일간 배양하였고, #37 균주는 PDB 배지에 접종한 후 26°C에서 2주간 정치배양 하였다. 인삼 잘록병 병원균 *Pythium* sp.과 *Rhizoctonia solani*에 대하여 이들 배양액의 항균활성을 검정한 결과 모두 항균활성을 나타내지 않아 이들 균주에 대한 실험은 수행하지 않았다.

차. QC를 위한 활성성분의 검출방법 확립

본 연구에서 항균활성물질을 구명한 5종의 방선균 *Streptomyces* sp. BS065, A1444, A75, A3265, A501 균주를 배양한 후 균주 배양액에서 항균활성성분을 간단하게 검출할 수 있는 방법을 모색하였다. 이는 본 균주들에 대한 산업화 연구를 수행할 경우 안정한 활성을 위한 QC의 일환으로 활용할 수 있기 때문이다. 그 결과 아래의 그림 2-41과 같이 각 균주의 배양액으로부터 활성성분을 검출할 수 있는 HPLC 방법을 확립할 수 있었다.

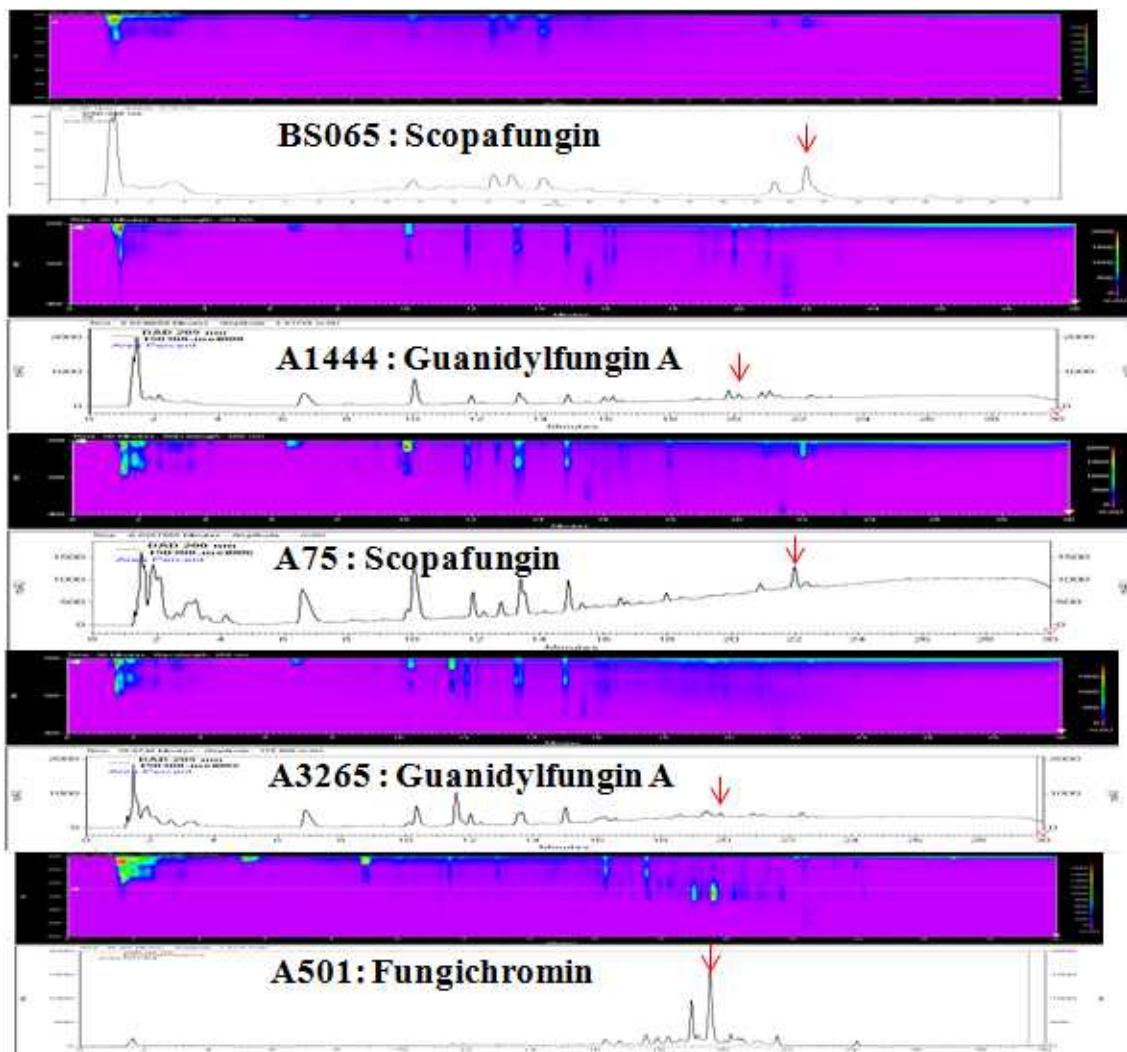


그림 2-41. 선발한 방선균의 항균활성물질을 검출하기 위한 HPLC profile (붉은색 화살표는 활성물질의 피크를 나타냄).

제 3 절. 인삼잘록병 방제 미생물의 제형 개발

1. 재료 및 방법

가. 인삼잘록병균에 항균성 균주의 최적 증식조건 확립

(1) 인삼잘록병균에 항균성 균주의 증식에 효과적인 탄소원 선발

(가) 공시균주

농촌진흥청 국립농업과학원 농업미생물과에서 *Pythium* sp. 및 *Rhizoctonia solani*에 의한 인삼잘록병에 항균 효과가 있는 균주 #13, #26, #36, M75, CC112를 분양받아 사용하였다.

(나) 사용배지

M9 basal medium (Na_2HPO_4 6.8g, KH_2PO_4 3g, NaCl 0.5g, NH_4Cl 1g)를 사용하였다.

(다) 탄소원 첨가배지에서 배양

인삼찰록병균에 항균성이 있는 균주의 생장에 효과적인 탄소원을 선별하기 위하여 M9 basal medium에 탄소원 Dextrose, Fructose, Galactose, Glucose, Glycerol, Lactose, Maltose, Mannitol, Mannose, Starch (potato), Sucrose를 각각 1.0% 첨가한 후 YP배지 (Yeast extract 5g, Peptone 5g, NaCl 5g)에서 24시간 동안 배양한 공시균을 100ul 접종하고 28°C에서 180rpm으로 진탕배양 하였다.

(라) 증식량 조사

탄소원에 따른 균주의 증식량을 측정하기 위하여 24, 48시간 배양 후에 분광광도계 (Spectrophotometer, SHIMADZU, JAPAN)로 600nm에서 OD값을 조사하였다.

(2) 인삼찰록병균에 항균성 균주의 증식에 효과적인 질소원 선별

(가) 공시균주, 배지 및 증식량 조사는 탄소원과 동일한 방법으로 실시하였다.

(나) 질소원 첨가배지에서 배양

인삼찰록병균에 항균성 균주의 생장에 미치는 질소원의 영향을 조사하기 위해 M9 basal medium에 질소원인 NH_4Cl 을 제외하고 탄소원 선별실험에서 공시세균의 증식에 가장 효과적인 탄소원으로 확인된 Sucrose 1.0%를 첨가하였다. 질소원은 KNO_3 , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Bacto-peptone, Soybean meal, Tryptone을 각각 1.0% 첨가한 후 탄소원 선별과 동일한 방법으로 배양하였다.

(3) 인삼찰록병균에 항균성 균주의 증식에 효과적인 탄소원 및 질소원 농도 결정

(가) 공시균주, 배지 및 증식량 조사는 탄소원과 동일한 방법으로 실시하였다.

(나) 탄소원 및 질소원 농도

M9 basal medium에 공시균주의 증식에 가장 효과적인 탄소원 Sucrose와 질소원 Tryptone을 각각 0.5, 1, 2, 5% 농도로 희석하여 첨가하고 YP배지에서 24시간 동안 배양한 공시균을 100ul 접종하고 28°C에서 180rpm으로 진탕배양 하였다.

(4) 인삼잘록병균에 항균성 균주의 대량생산용 배지 선발

경제성을 고려하여 인삼잘록병균에 항균성 균주의 대량생산용 배지 선발을 위해 Sucrose, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Tryptone을 각각 0.5, 1, 1.5% 농도로 혼합하여 배지를 조성하고 앞의 실험과 동일한 방법으로 배양한 후 OD값을 조사하였다.

(5) 인삼잘록병균에 항균성 균주의 배양 적정 온도 조사

인삼잘록병균에 항균성 균주의 배양 적온을 조사하기 위해 YP배지에서 24시간 동안 종균배양한 배양액 1ml을 YP배지 20ml에 접종하여 5°C ~ 40°C까지 5°C 간격으로 설정한 후, 140rpm에서 배양하였다. 48시간 배양 후에 분광광도계로 600nm에서 OD값을 조사하였다.

(6) 인삼잘록병균에 항균성 균주의 배양 적정 pH조사

인삼잘록병균에 항균성 균주의 배양에 적합한 pH를 알아보기 위하여 YP배지의 pH를 각각 5 ~ 7.5 까지 0.5 간격으로 수정한 후 YP배지에서 24시간 동안 종균배양한 배양 액 1ml을 접종하여 25°C에서 140rpm으로 배양하였다. 48시간 배양 후에 분광광도계로 600nm에서 OD값을 조사하였다.

나. 인삼잘록병균에 항균성 균주의 생물적 안전성 검정

(1) 공시균주

농촌진흥청 국립농업과학원 농업미생물과에서 *Pythium* sp. 및 *Rhizoctonia solani*에 의한 인삼잘록병균에 항균성이 있는 균주 #13, #26, #36, M75, CC112를 분양받아 사용하였다.

(2) 접종원 배양

공시균주를 YP배지 (Yeast extract 5g, Peptone 5g, NaCl 5g)에 접종하여 28°C에서 48시간 배양하여 사용하였다.

(3) 시험용 상토

본 연구실에서 개발한 유기농 인삼재배용 상토 (Peatmoss, Vermiculite, Perlite 등)를 사용하였다.

(4) 침지접종

1000×120×25cm의 베드에 유기농 인삼재배용 상토를 채우고 #13, #26, #36, M75, CC112 균주 배양액을 $10^6\text{--}10^8$ CFU/ml로 희석하여 인삼 종자를 30분간 침지한 후, 음건 후에 3×3cm의 간격으로 2014년 4월 7일 및 9월 26일 파종하였다. 시험구는 임의배치 5반복, 반복당 100립씩 파종하였다.

(5) 관주접종

균액의 이동을 막기 위하여 30×50×25cm 스티로폼 상자에 유기농 상토를 채우고 2014년 4월 7일 및 9월 26일 종자를 파종 및 7일 후에 균주 배양액을 $10^6\text{--}10^8$ CFU/ml 밀도로 희석하여 관주처리 (200mL/포트) 하였다 시험구는 임의배치 5반복, 반복당 100립씩 파종하였다.

(6) 조사항목

인삼질록병균에 항균성 미생물에 의한 생육 촉진 또는 억제 효과의 검정을 위하여 발아율, 초장, 균장, 균직경, 균중을 조사하였다.

다. 인삼질록병 방제용 균주의 대량생산 공정 확립 ((주) 그린아그로)

(1) 종균 배양

(가) 사용균주 : *Bacillus* sp. (No. 13, 75, 112)

(나) 배지조성 및 pH

Peptone 3 g, Yeast Extract 3 g, 이인산칼륨 2, Sucrose 15 g, 황산마그네슘 0.2 g, pH 7.0 ~ 7.2, 층류수 1L

(다) 배양법

상기 배지를 250ml Baffle Flask(1차 seed)에 50ml, 2 L Baffle Flask(2차 seed)에 700 ml 첨가후 121°C, 1.2Kg/cm²에서 20분간 멸균하였다. Shaking Incubator를 이용하여 33°C, 150rpm에서 20시간 배양하여 1, 2차 종균으로 사용하였다.

(2) 본 배양

(가) 사용균주 : 종균배양 균주와 동일

(나) 배지조성 및 pH : 종균배양 균주와 동일

(다) 배양법

온도를 123°C까지 올린 후, 압력 1.3Kg/cm²을 유지하여 20분 동안 멸균처리하고 배양온도 33°C까지 냉각한다.

멸균된 Fermentor를 이용하여 33 °C, 150rpm에서 24 ~ 36 시간 배양하였으며 pH와 소포제는 배지와 함께 초기에 조정되어 멸균하였다.

라. 인삼잘록병 방제용 미생물제 제형화 소재 선발 및 안전성 검정

(1) 미생물 제제용 보조제 선발 기준

(가) 인체 무독성 및 유기농 자재

(나) 점착력 (점결제) : 미생물제의 유효성분이 종자나 작물에 부착 정도

(다) 분산력 : 물에 희석 시 침전이 발생하지 않고 콜로이드 상태 유지

(라) 흡수력 (농축효과) : 균 배양액 중의 물의 흡수능력

(마) 발아 및 생육 촉진 효과

(바) 보존 안정성 : 미생물제의 변질을 방지하기 위한 효과

(2) 친환경 증량제의 생물적 안전성 검정

(가) 인삼전용 상토에서의 생물적 안정성 검정

① 종자 침지처리

- BSM 배지에 균을 접종하여 28°C에서 48시간 배양한 배양액을 100배 희석하여 인삼 종자를 1시간 침지한 후 음건하여 파종하였다.
- 증량제 선발 기준에 적합하고 가격이 저렴하며 친환경 증량제로 많이 사용하는 Bentonite와 Zeolite를 지하수로 각각 1%와 10%로 희석하여 종자를 1시간 침지 처리한 다음에 음건 후 파종하였다. 또한 균 배양액에 증량제를 각각 1%로 희석한 혼합액에 종자를 1시간 침지 및 음건하여 파종하였다.

② 재배법

- 인삼전용상토를 비닐하우스의 베드에 20cm의 두께로 채운 다음 2015년 4월 1일에 재식거리 3×3cm로 점파하였다. 농약은 전혀 사용하지 않았다.

③ 조사방법

- 시험구별로 최초 발아 30일 후 발아율을 조사하였으며, 엽색은 2015년 6월 15일 엽색도계 (SPAD-502)를 이용하여 측정하였다. 생육조사는 7월 6일에 10개체를 채취하여 초장, 근장 및 식물체의 생체중을 조사하였다.

(나) 토양에서의 생물적 안정성 검정

- ① 종자 침지처리는 상토 검정법과 동일한 방법으로 실시하였다.

② 재배법

- 충남대학교 부속농장에서 1년간 예정지 관리한 토양에 2015년 3월 24일 3×3cm로 점파하였다. 일반재배와 동일하게 재배·관리하였으며, 농약은 전혀 사용하지 않았다.

③ 조사방법

- 생육조사는 7월 7일에 20개체를 채취하여 초장, 근장 및 식물체의 생체중을 조사하였다.

마. 인삼잘록병 방제용 미생물제의 제제화 공정 확립

(1) 분상수화제 공정 확립 ((주) 그린아그로)

(가) 종균배양

균주는 #13, M75, CC112를 사용하였다. 배지조성은 Peptone 3g/L, Yeast Extract 3g/L, 이인산칼륨 2g/L, Sucrose 15g/L, 황산마그네슘 0.2g/L, pH는 7.0 ~ 7.2로 조절하였다. Shaking Incubator를 이용하여 33°C, 150rpm에서 20시간 배양하여 종균으로 사용하였다.

(나) 본 배양

본 배양용 배지는 Sucrose 15g/L, 가용성 전분 1g/L, 이인산칼륨 2g/L, 황산마그네슘 0.2g/L, Yeast Extracts 3g/L, Soy Peptone 3g/L, pH는 7.0 ~ 7.2로 조절하였다. 발효조에 150L의 분량으로 배지를 넣고 스텀 보일러를 이용하여 123°C까지 올린 후, 압력 1.3Kg/cm²을 유지하여 20분 동안 멸균처리 하였다. 배지가 30°C 정도 식은 후에 종균 배양한 균주 (#13, M75, CC112)를 이용하여 본 배양 하였다. 내생포자의 생성을 촉진시키기 위하여 33°C, 150rpm에서 24 ~ 36 시간 배양하였다.

내생포자의 생성을 촉진시키기 위하여 33°C에서 150rpm으로 24 ~ 36 시간 배양하였다.

(다) 분상 수화제 공정 확립

본 배양하여 얻은 배양액 100L를 연속원심분리기로 8,000rpm에서 20배 농축하였다. 농축한 배양액을 증량제 Bentonite, Zeolite, Talc에 살포하여 균체수가 10^8 이 되게 리본 믹서에서 혼합하여 제조하였다.

(2) 시제품의 특성 조사

시제품의 특성을 알아보기 위하여 분산력, 세균밀도, 오염정도를 조사하였다. 시제품은 물에 희석하여 분산정도를 육안으로 측정하였으며, king's배지에 평판배양법으로 배양하여 균 밀도와 오염정도를 확인하였다.

(3) 증량제(Talc)를 첨가한 시제품의 생물적 안전성 검정

(가) 세균

- ① 처리방법 : 시제품(Talc 첨가 제품)의 1% 및 10% 용액에 인삼종자를 30분 침지 후 상토 및 포장에 파종하였다.
- ② 파종시기 : 가을파종(11~12월) 및 봄 파종(3월)
- ③ 조사방법 : 발아율 및 생육량 (초장, 근장, 생체중 등) 비교

(나) 방선균

- ① 재배법 : 배양액을 100배 희석하여 증량제(Talc 10%)를 첨가하고 인삼종자를 30분 침지 후 상토 및 포장에 파종
- ② 파종시기 : 가을파종(11~12월) 및 봄 파종(3월)
- ③ 조사방법 : 발아율 및 생육량 (초장, 근장, 생체중 등) 비교

(4) 시제품 안정성 검정

시제품의 저장 기간에 따른 균주의 생존을 검정하기 위하여 40°C 및 실온에 보관하여 균의 밀도를 조사하였다. 조사방법은 king'배지에 평판배양법으로 배양하여 균 밀도를 확인하였다.

2. 결과

가. 인삼잘록병균에 항균성 균주의 최적 증식조건 확립

(1) 인삼잘록병균에 항균성 균주의 증식에 효과적인 탄소원 선별

탄소원이 인삼잘록병균에 항균성 균주의 생장에 미치는 영향을 조사하기 위해 M9 basal medium에 11종의 탄소원을 각각 1% 씩 첨가한 후, 인삼잘록병균에 항균성 균주인 #13, #26, #36를 접종하고 48시간 진탕 배양하여 균주의 증식 정도를 조사한 결과, 대부분의 탄소원에서 증식이 모두 양호한 수준으로 탄소원 선별의 큰 의미가 없었다. 인삼잘록병균에 항균성 균주인 M75와 CC112를 접종하고 48시간 진탕 배양하여 균주의 증식 정도를 조사한 결과는 그림 3-1과 같다.

균주 M75는 공시한 탄소원에서 모두 증식하였으나 Dextrose, Mannitol, Sucrose를 첨가한 배지에서 증식이 양호하였으며, Sucrose를 첨가한 배지에서 OD값이 가장 높았다. 균주 CC112도 M75와 마찬가지로 공시한 탄소원에서 모두 증식하였으며, Sucrose를 첨가한 배지에서 OD값이 가장 높아 Sucrose를 인삼잘록병 방제용 균주의 생장에 가장 우수한 탄소원으로 선별하였다.

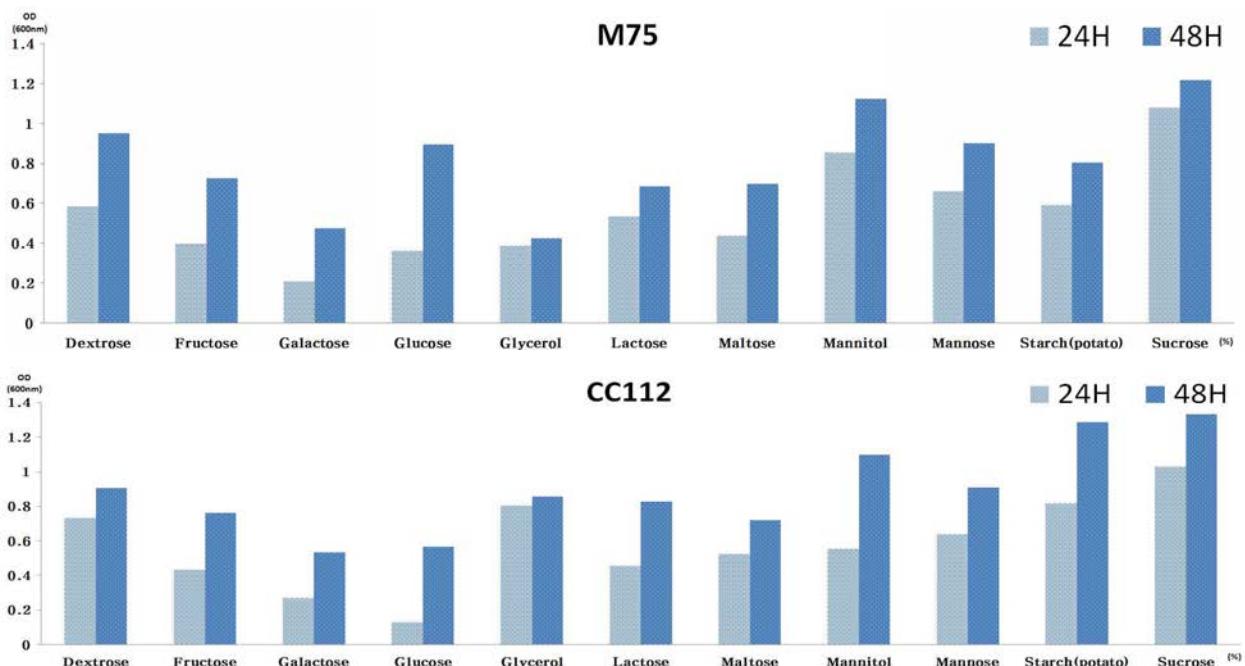


그림 3-1. YP배지에서 pH가 균주 M75 및 CC112의 증식에 미치는 영향(48시간 배양).

(2) 인삼잘록병균에 항균성 균주의 증식에 효과적인 질소원 선별

탄소원 선별 결과에 따라 결정된 탄소원 Sucrose를 M9 basal medium에 고정하고 NH₄Cl를 제외한 M9배지에 질소원을 달리하고 탄소원 선별과 동일한 방법으로 실험한 결과는 그림 3-2와 같다.

균주 M75와 CC112 모두 Soybean meal, Peptone, Bacto-peptone, Tryptone과 같은 유기질 질소원과 (NH₄)₂SO₄, NH₄Cl, KNO₃와 같은 무기질 질소원에서 증식이 양호하였다. 그 중에서 Tryptone을 첨가한 배지에서 OD값이 월등히 높았다. 이에 따라 인삼잘록병 방제용 균주 생장에 우수한 질소원으로는 Tryptone을 선별하였다.

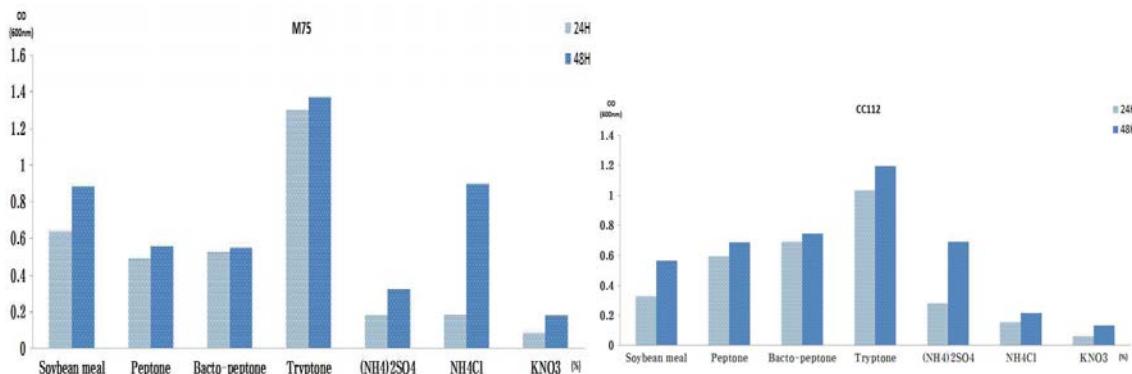


그림 3-2. 질소원의 종류가 균주 M75 및 CC112의 증식에 미치는 영향

(3) 인삼잘록병균에 항균성 균주의 증식에 효과적인 탄소원 및 질소원 농도

인삼잘록병균에 항균성 균주의 증식에 효과적인 탄소원 Sucrose의 농도가 인삼잘록병균에 항균성용 균주의 생장에 미치는 영향을 조사하였다. Sucrose의 농도를 0.5, 1, 2, 5%의 농도로 변화시켜 조사한 결과는 그림 3-3과 같다.

균주 M75의 경우 5%의 농도에서 가장 높은 OD값을 보였으나 0.5, 1, 2%의 농도와 큰 차이는 없었다. 균주 CC112의 경우도 M75와 마찬가지로 5% 농도에서 가장 높은 OD값을 보였다.

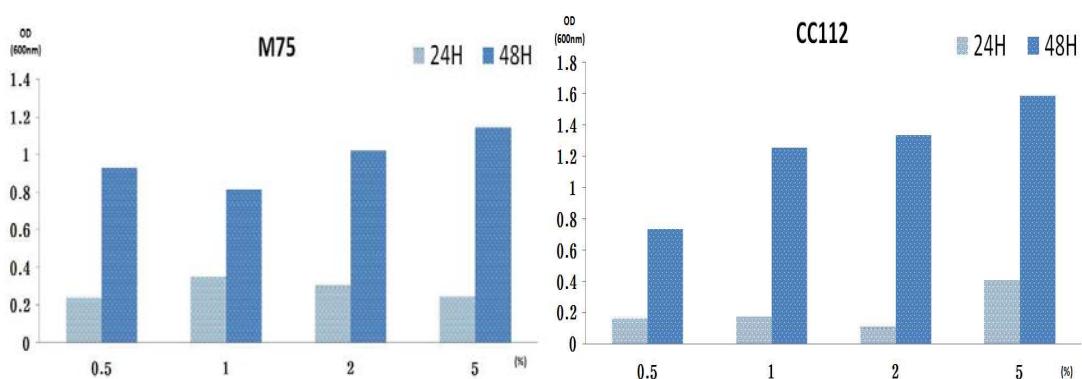


그림 3-3. Sucrose 농도가 균주 M75 및 CC112의 증식에 미치는 영향

인삼잘록병균에 항균성 균주의 증식에 효과적인 질소원 Tryptone의 농도가 인삼잘록병균에 항균성 균주의 생장에 미치는 영향을 조사하였다. Tryptone의 농도를 0.5, 1, 2, 5%로 변화하여 조사한 결과는 그림 3-4와 같다.

균주 M75와 CC112는 Tryptone의 농도가 높을수록 OD가 증가하는 경향이었으며, Tryptone을 5% 농도로 첨가되었을 때 가장 높은 OD값을 나타냈으며, 전체적으로 세균의 생장은 질소원인 Tryptone의 양에 비례하여 증가하는 것으로 나타났다.

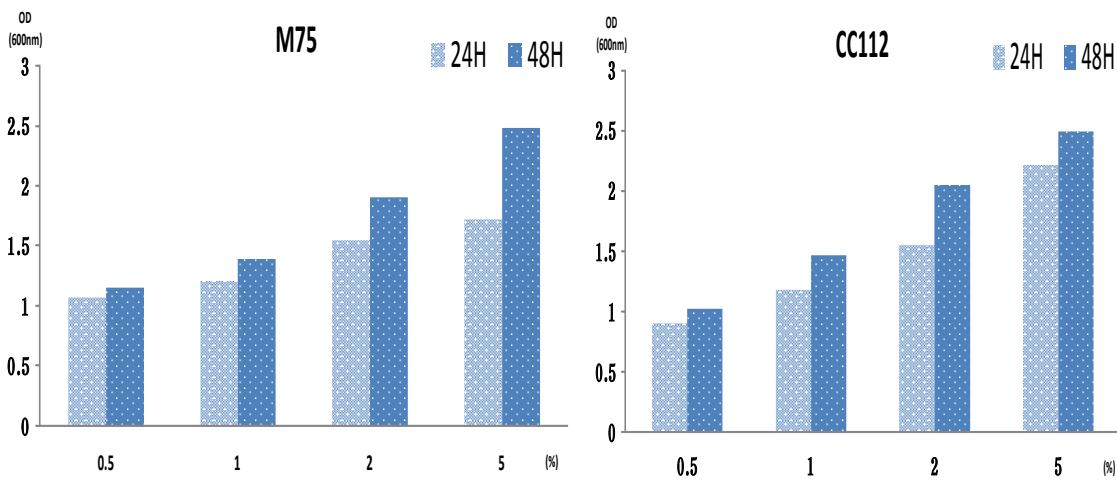


그림 3-4. Tryptone의 농도가 균주 M75 및 CC112의 증식에 미치는 영향

(4) 인삼잘록병균에 항균성 균주의 경제적인 대량생산용 배지 조성

인삼잘록병균에 항균성 균주의 대량생산용 배지의 경제성을 고려하여 배지 선발을 위하여 공시균주의 증식에 효과가 우수한 탄소원 Sucrose, 질소원 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 질소원 및 미량요가 다량 포함된 Tryptone을 사용하여 증식량을 측정하였다. 공시 시약을 각각 0.5, 1, 1.5% 농도로 혼합하여 배지를 만들고 앞의 실험과 동일한 방법으로 OD값을 조사한 결과는 표 3-1 같다.

대조구로 설정한 YP배지보다 Sucrose, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Tryptone을 각각 1%와 1.5% 농도로 각각 혼합하여 배지를 조성 하였을 때 OD값이 더 높았다. 따라서 이 혼합 배지를 대량 생산용 배지로 사용이 가능 할 것으로 판단된다.

표 3-1. Sucrose, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Tryptone의 농도가 인삼잘록병 방제용 균주의 증식에 미치는 영향

구분	M75		CC112	
	24 ^{a)}	48	24	48
SNT 0.5*	1.194	1.224	1.131	1.285
SNT 1	1.792	1.921	1.889	1.906
SNT 1.5	2.108	2.111	2.230	2.258
YP medium	1.334	1.407	1.282	1.563

^{a)}Culture time (hr),

*SNT 0.5 : Sucrose, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Tryptone respectively 0.5%

SNT 1 : Sucrose, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Tryptone respectively 1%

SNT 1.5 : Sucrose, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Tryptone respectively 1.5%

(5) 인삼찰록병균에 항균성 균주의 배양 적정 온도 조사

인삼찰록병균에 항균성 균주의 성장에 최적온도를 조사하기 위하여 5 ~ 40°C의 범위에서 5°C 간격으로 각각 배양하여 측정한 OD값은 그림 3-5와 같다.

균주 M75는 20°C 이상에서 성장이 양호하였고, 특히 35°C에서 OD값이 1.37로 가장 높았으며, 5°C와 10°C에서는 거의 성장하지 못하였다. 또한, 균주 CC112는 20°C 이상에서 성장이 좋았으며, 특히 35°C에서 OD값이 1.38로 가장 높았다.

이상의 결과에서 공시균주는 25°C이상에서 생육이 매우 양호하였으나 10°C이하에서는 생육이 저조하였다. 인삼종자는 11월~12월, 3월에 파종하고, 인삼종자는 10°C이상에서 발아가 양호하므로 처리농도 및 처리방법에 관한 연구가 병행되어야 할 것으로 판단된다.

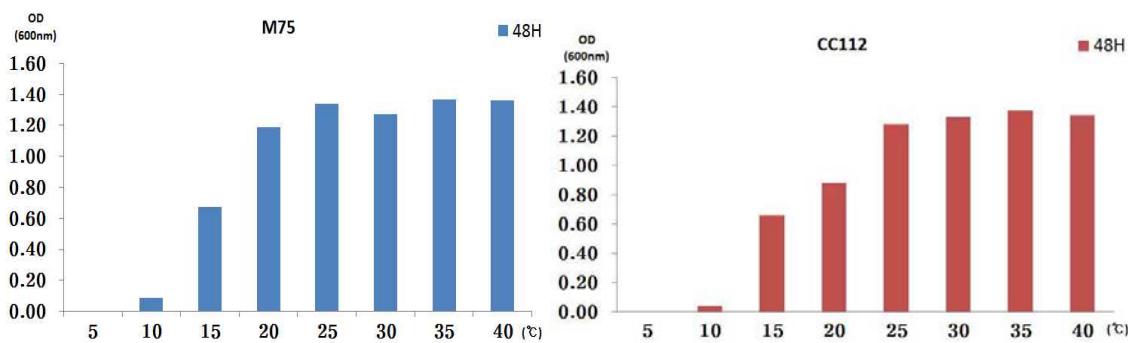


그림 3-5. YP배지에서 배양 온도가 균주 M75 및 CC112의 증식에 미치는 영향(48시간 배양)

(6) 인삼찰록병균에 항균성 균주의 배양 적정 pH 조사

인삼찰록병균에 항균성 균주의 성장에 최적 pH를 조사하기 위하여 5.0 ~ 7.5의 범위에서 0.5 간격으로 배지의 농도를 조절하여 진탕배양하여 OD값을 측정한 결과는 그림 1-6과 같다.

균주 M75의 경우는 pH 5.0 ~ 7.5 범위에서 OD값이 1.23 ~ 1.37로 큰 차이가 없었다. 그러나 균주 CC112의 경우 pH 5.5에서 OD값이 1.28로 가장 높게 나타났다.

이와 같은 실험 결과는 인삼찰록병 방제용 균주 배양 시 배지의 pH는 5.5가 최적 조건으로 판단되었다.

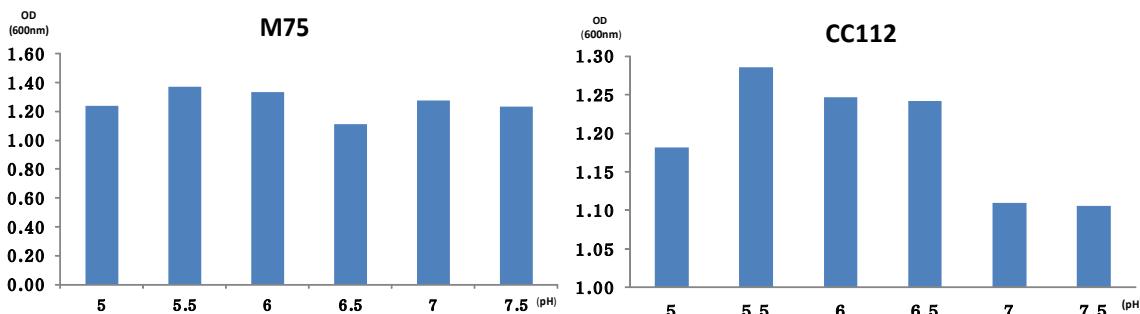


그림 3-6. YP배지에서 pH가 균주 M75 및 CC112의 증식에 미치는 영향(48시간 배양)

나. 인삼찰록병균에 항균성 균주의 생물적 안전성 검정

(1) 인삼찰록병균에 항균성 균주의 배양액 침지처리가 종자의 발아에 미치는 영향

인삼찰록병균에 항균성 균주의 생물적 안전성 검정을 위해 #13, #26, #36 균주는 4월 7일 인삼 종자를 파종하여 5월 23일 발아율을 조사한 결과는 그림 3-7과 같다.

#13 균주의 10^6 , 10^8 cells/ml과 #26 균주의 10^6 , 10^7 cells/ml 배양액으로 침지처리 한 인삼종자의 발아율은 무처리구에 비해 약간 증가하는 경향이었으나 유의차는 없었으며, 나머지 처리구에서는 감소하였으며, #13 균주의 10^6 , #36 균주의 10^6 , 10^7 , 10^8 cells/ml 처리구와는 유의차가 인정되었다(그림 3-7). 이러한 결과는 공시균주의 침지가 인삼의 발아에 영향이 없어 미생물제제용 균주로 활용할 수 있다고 판단되었다.

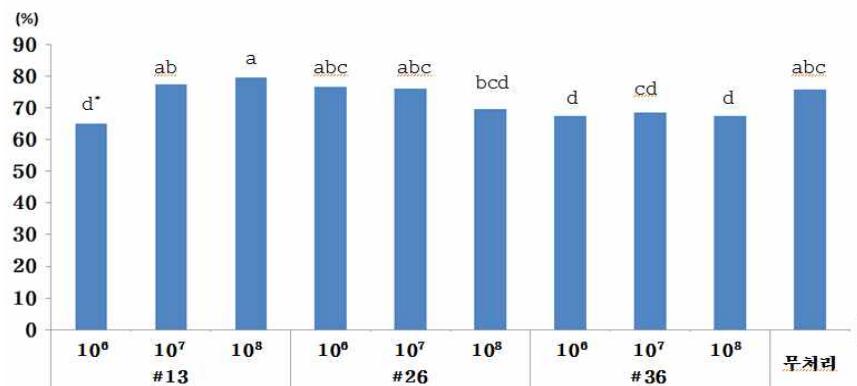


그림 3-7. 인삼찰록병 방제용 세균배양액의 침지처리가 인삼종자의 발아에 미치는 영향

* 파종일 : 2014년 4월 7일, 조사일 : 5월 23일,

*Duncan's multiple range test at 5% level.

인삼 찰록병 방제용 균주의 생물적 안전성 검정을 위해 M75 및 CC112 균주는 9월 26일 인삼 종자를 파종하여 10월 27일 발아율을 조사한 결과는 그림 1-8과 같다. 공시균 처리구의 발아율은 무처리구와 비교하였을 때, 양호하였으며 균주 M75 10^8 cell/ml의 처리구의 발아율이 가장 높았으나 유의성은 인정되지 않았다(그림 3-8).

M75 및 CC112 균주의 처리에 의한 발아율은 인삼 종자의 저장 기간이 길어 저조하였으나 무처리에 비하여 증가하는 경향이었으므로 인삼찰록병 방제용 균주로 활용할 수 있을 것으로 판단되었다

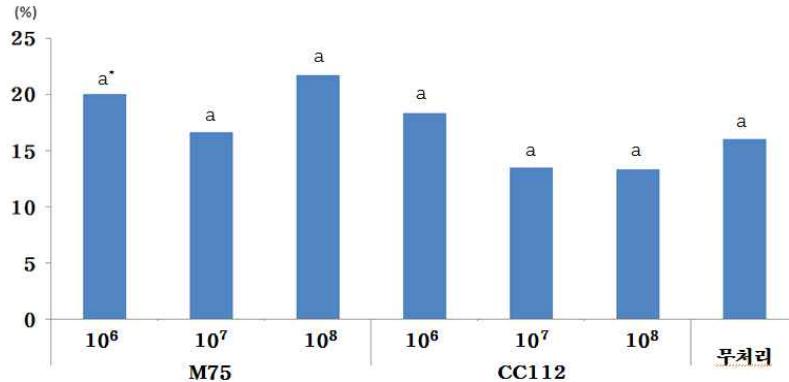


그림 3-8. 인삼잘록병 방제용 세균배양액의 침지처리가 인삼종자의 발아에 미치는 영향

* 파종일 : 2014년 9월 26일, 조사일 : 10월 27일,

*Duncan's multiple range test at 5% level.



그림 3-9. 인삼잘록병 방제용 세균의 종자 침지처리에 따른 생육 상황 (5월23일)

(2) 인삼잘록병 방제용 세균 배양액의 침지처리가 묘삼 생육에 미치는 영향

인삼 잘록병 방제용 균주 #13, #26, #36의 배양액 침지처리가 묘삼의 초장, 근장, 근직경, 근중에 미치는 영향은 표 3-2와 같다. 2014년 4월 7일 인삼 종자를 파종하였으며, 생육조사는 9월 26일에 처리구당 30주씩 3반복으로 실시하였다.

#13 균주 10^6 , 10^7 cells/ml 및 #26 균주 10^6 cells/ml 배양액으로 침지처리한 종자의 초장은 무처리구 보다 증가하였으나 유의성은 #13 균주 10^6 cells/ml 처리구에서만 유의성이 인정되었다. #13 균주 10^8 , #26 균주 10^8 , #36 균주 10^7 , 10^8 cells/ml에서는 초장이 감소하였으며, 무처리구와 유의성이 인정되었다.

근중은 #26 균주의 10^8 , #36 균주의 10^6 cells/ml 처리구에서 약간 감소하였으나 무처리구와 유의성이 인정되지 않았다. 근장은 #13 공시균주의 10^6 , 10^7 cells/ml 처리구에서는 무처리구에 비하여 증가하는 경향이었으나 #26 균주 10^7 cells/ml에서만 무처리구와 유의성이 인정되었다. 근직경은 공시균의 처리구에서 무처리구보다 증가하는 경향이었으나 #13 균주 10^6 cells/ml 처리구에서만 유의성이 인정되었다.

공시균주의 침지처리가 인삼의 발아 및 근장, 근직경, 근중에 영향을 조사한 결과 대부분의 처리구에서 영향이 적었다. 공시균주를 인삼잘록병 방제용 미생물제로 사용하위해서 10^7 cells/ml 이하로 이용하거나 배양액 대신에 균체를 활용, 또는 증식배지의 선택을 검토하여야 할 것으로 사료된다.

표 3-2. 인삼잘록병 방제용 세균 배양액의 침지처리가 묘삼 생육에 미치는 영향

Growth characteristics	13 ^{a)}			26			36			무처리
	10^6 ^{b)}	10^7	10^8	10^6	10^7	10^8	10^6	10^7	10^8	
Plant height (cm)	11.3a*	10.7b	9.20c	11.1ab	10.5b	9.50c	10.4b	9.60c	9.20c	10.6b
Root length (cm)	14.2ab	14.3ab	11.7c	13.3abc	15.0a	11.2c	12.8bc	15.0a	13.1abc	12.8bc
Root diameter (mm)	4.19a	3.87b	3.88b	3.82b	3.69b	3.77b	3.84b	3.73b	3.89b	3.74b
Root weight (g)	0.46ab	0.44ab	0.42ab	0.42abc	0.46ab	0.35c	0.39bc	0.47a	0.43ab	0.43ab

^{a)}No. of isolate, ^{b)}Bacterial density (cells/ml), *Duncan's multiple range test at 5% level.



그림 3-10. 인삼잘록병 방제용 세균 배양액의 침지처리가 묘삼 생육에 미치는 영향

* Bacterial density of isolate 26. 10^6 , 10^7 , 10^8 cell/ml, control.,

* 파종일 : 2014년 9월 26일, 조사일 : 10월 27일

인삼 잘록병 방제용 균주 M75 및 CC112의 배양액 침지처리가 묘삼의 생체중에 미치는 영향은 그림 3-11과 같다. 2014년 9월 26일 인삼 종자를 파종하여 조사는 11월 5일에 처리구당 30주씩 3반복으로 실시하였다.

생체중은 M75 균주 10^6 cells/ml 처리구에서 가장 좋았으며 무처리구와 유의성이 인정되었다. 그 밖에 처리구에서는 무처리구와 비슷한 수준이었다.

공시균주 M75 및 CC112의 침지처리가 인삼의 빨아 및 생육에 영향이 없어 미생물제제용 균주로 활용할 수 있다고 판단되었다. 그러나 파종의 시기가 늦어 생육에 적합한 환경이 아니었다고 판단되며, 생육에 알맞은 시기에 정밀조사가 필요할 것으로 사료된다.

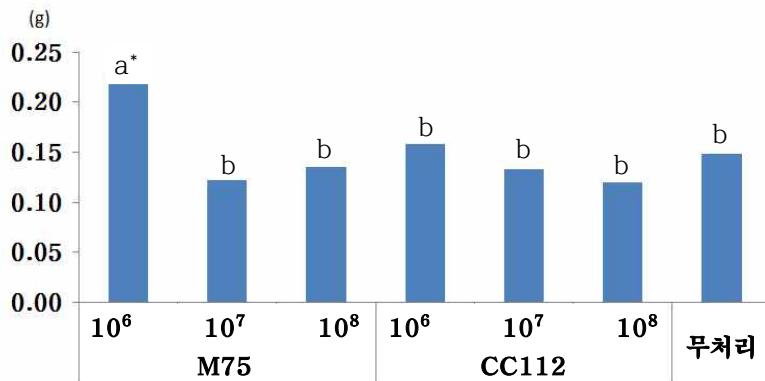


그림 3-11. 인삼질록병 방제용 세균 배양액의 침지처리가 묘삼 생육에 미치는 영향

* 파종일: 2014년 9월 26일, 조사일: 11월 5일, *Duncan's multiple range test at 5% level.

(3) 인삼질록병 방제용 세균 배양액의 관주처리가 인삼종자 발아에 미치는 영향

4월 7일 인삼 종자를 파종 후 인삼 질록병 방제용 균주 #13, # 26, #36의 배양액을 관주 처리하여 5월 23일 발아율을 조사한 결과 그림 3-12, 13과 같다.

#13 균주 10^8 cells/ml과 #36 균주 10^7 , 10^8 cells/ml로 관주처리 한 종자의 발아율은 무처리구 58.0% 보다 약간 증가하는 경향이었다. 그러나 처리와 무처리 간에 유의성은 인정되지 않았다.

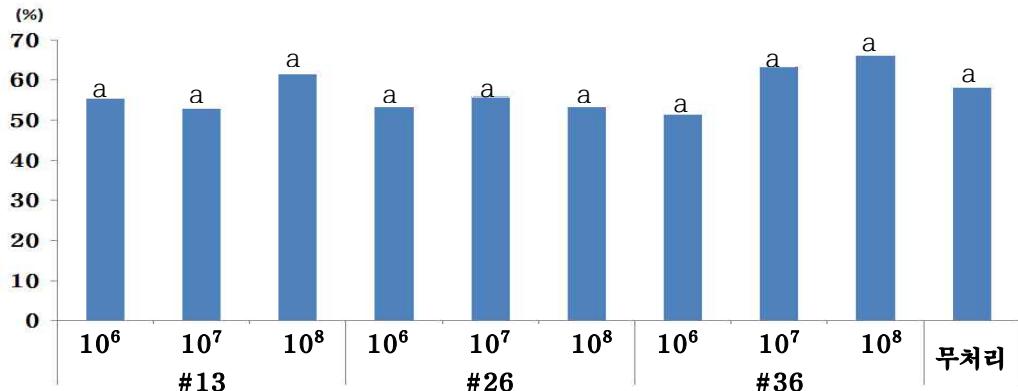


그림 3-12. 인삼질록병 방제용 세균 배양액의 관주처리가 인삼종자 발아에 미치는 영향

* 파종일 : 2014년 4월 7일, 조사일 : 5월 23일, *Duncan's multiple range test at 5% level.

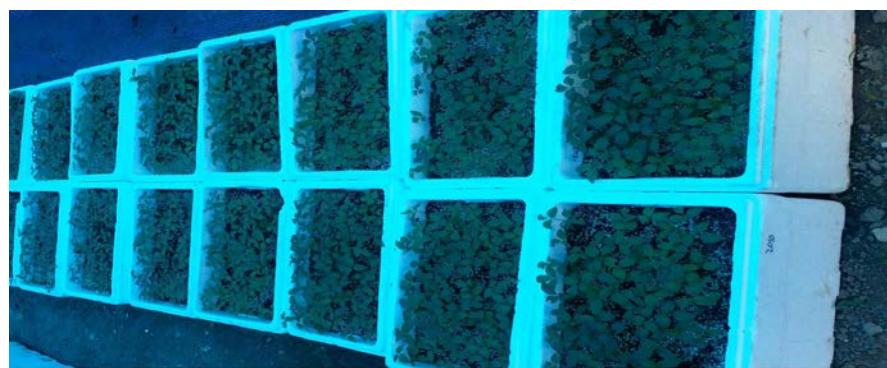


그림 3-13. 인삼질록병 방제용 균주의 관주처리에 따른 인삼 생육상황 (5월23일)

9월 26일 인삼 종자를 파종 후 인삼 잘록병 방제용 균주 M75 및 CC112의 배양액을 관주처리하여 10월 27일 발아율을 조사한 결과 그림 3-14와 같다.

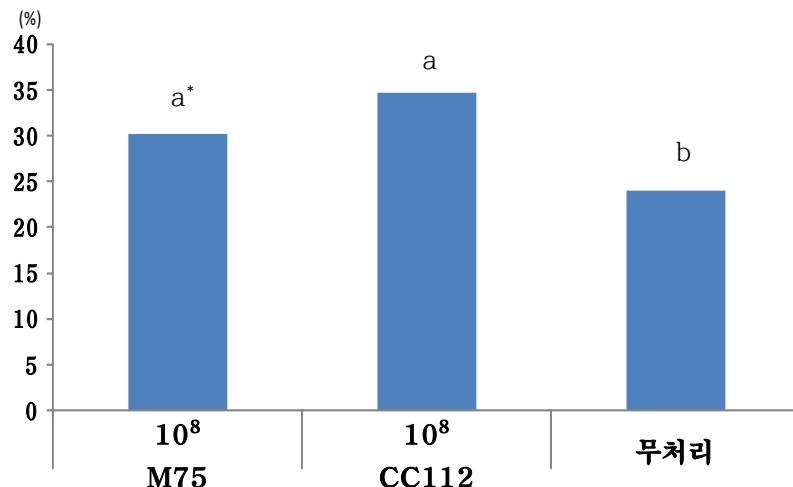


그림 3-14. 인삼잘록병 방제용 세균 배양액의 관주처리가 인삼종자 발아에 미치는 영향

* 파종일: 2014년 9월 26일, 조사일: 10월 27일, *Duncan's multiple range test at 5% level.

공시균 처리구의 발아율은 무처리구에 비하여 높았다. 균주 CC112 10^8 cell/ml 의 처리구의 발아율이 가장 높았으며, 유의성이 인정되었다. M75 및 CC112 균주의 처리에 의한 발아율은 인삼 종자의 저장 기간이 길어 저조하였으나 무처리에 비하여 증가하는 경향이 있으므로 인삼잘록병 방제용 균주로 활용할 수 있을 것으로 판단되었다.

(4) 인삼잘록병 방제용 세균 배양액의 관주처리가 묘삼 생육에 미치는 영향

인삼 잘록병 방제용 균주 #13, #26, #36의 배양액 관주처리가 묘삼의 초장, 근장, 근직경, 근중에 미치는 영향은 표 3-3과 같다. 2014년 4월 7일 인삼 종자를 파종하여 조사는 9월 26일에 처리구당 30주씩 3반복으로 실시하였다.

#13 균주의 10^7 cell/ml 관주처리구의 초장은 무처리구 보다 생육이 양호하였으며, 근중은 #13균주 10^7 cell/ml , #26균주 $10^6, 10^7 \text{ cell/ml}$ 의 관주처리구가 무처리구에 비하여 증가하였으나, 나머지 처리구에서는 감소하였다. 그러나 대부분이 무처리와 #36 균주의 처리구에서는 유의성이 인정되었다(표 3-3).

#13과 #26 균주의 $10^6, 10^7 \text{ cell/ml}$ 밀도의 관주 처리가 인삼의 발아 및 초장, 근장, 근직경, 근중에 영향이 없어 미생물제제용 균주로 활용할 수 있다고 판단되었다. 그러나 10^8 cell/ml 및 #36 균주는 인삼의 생육이 저해되어 배양액의 희석, 균체만을 활용하거나 배양 배지의 검토가 필요하다고 사료된다.

인삼 잘록병 방제용 균주 M75 및 CC112의 배양액 침지처리가 묘삼의 생체중에 미치는 영향은 그림 3-16과 같다. 2014년 9월 26일 인삼 종자를 파종하여 조사는 11월 5일에 처리구당 30주씩 3반복으로 실시하였다.

생체중은 균주 M75 및 CC112의 관주처리구에서 무처리구에 비하여 좋았으며, 유의성

이 인정되었다. 따라서 공시균주 M75 및 CC112의 침지처리가 인삼의 발아 및 생육에 영향이 없어 미생물제제용 균주로 활용할 수 있다고 판단되었다. 그러나 파종의 시기가 늦어 생육에 적합한 환경이 아니었다고 판단되며, 생육에 알맞은 시기에 정밀조사가 필요할 것으로 사료된다.

표 3-3. 인삼질록병 방제용 세균 배양액의 관주처리가 묘삼 생육에 미치는 영향

Growth characteristics	13 ^{a)}			26			36			무처리
	10 ^{6b)}	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	
Plant hight (cm)	12.4ab*	12.6a	11.8bc	12.5ab	12.2ab	11.5cd	10.4e	11.2d	11.3d	12.5a
Root length (cm)	16.8ab	16.9a	13.5de	16.2abc	14.8abcd	13.7cde	14.3bcd	14.0cde	12.2e	15.0abcd
Root diameter (mm)	3.91cde	4.16abcd	3.99bcde	4.24abc	4.55ab	3.96cde	4.00bcd	3.45e	3.63de	4.67a
Root weight (g)	0.44de	0.55d	0.50c	0.56ab	0.60a	0.47cd	0.40e	0.44de	0.35f	0.50c

^{a)}균주명, ^{b)}세균밀도(cells/ml), *Duncan's multiple range test at 5% level.

* 파종일 : 2014년 4월 7일, 조사일 : 9월 26일.



그림 3-15. 인삼질록병 방제용 세균 배양액의 관주처리가 묘삼 생육에 미치는 영향

* #13 균주, #26 균주, #36 균주, 무처리, 파종일 : 2014년 4월 7일, 조사일 : 9월 26일.

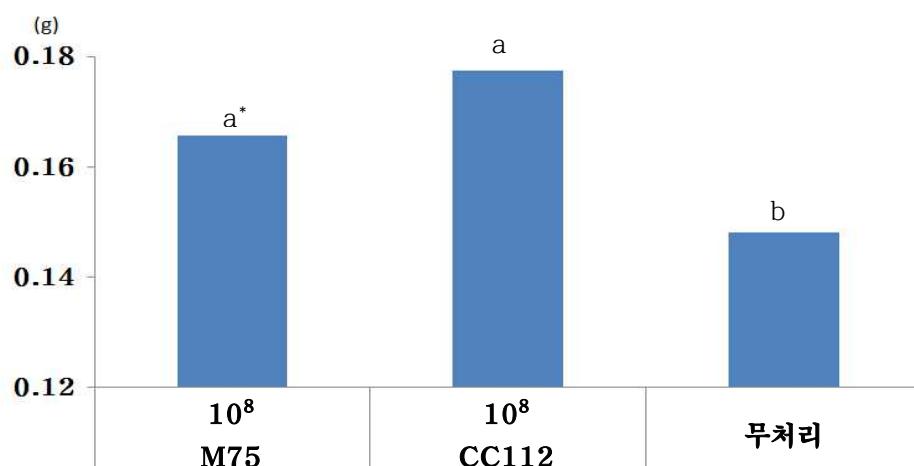


그림 3-15. 인삼질록병 방제용 세균 배양액의 관주처리가 묘삼 생육에 미치는 영향

* #13 균주, #26 균주, #36 균주, 무처리, 파종일 : 2014년 4월 7일, 조사일 : 9월 26일.

*Duncan's multiple range test at 5% level.

다. 인삼잘록병 방제용 균주의 대량생산 공정 확립 ((주) 그린아그로)

(1) 대량 배양한 세균 밀도

Bacillus sp. # 13, 75, 112 균주를 Peptone 3 g, Yeast Extract 3 g, 이인산칼륨 2 g, Sucrose 15 g, 황산마그네슘 0.2 g, pH 7.0 ~ 7.2, 증류수 1L에 증식한 결과 세균 최대 밀도는 $2 \sim 8 \times 10^8$ cfu/ml 이었다.

(2) 배양액의 처리

100 L 배양액을 연속원심분리기(8,000rpm의 속도)를 이용하여 20배 농축하였다. 부형제 (ZEO 300)에 살포하여 균체수가 10^8 cfu/g이 되게 리본 믹서기에서 혼합하였다.

라. 인삼잘록병 방제용 제형화 소재 선발 및 안전성 검정

(1) 미생물 제제용으로 선발한 보조제의 특성

증량제의 선발 기준에 따라 증량제로서의 역할이 우수하고 친환경 자재로 많이 사용하는 벤토나이트와 제올라이트를 선발하였다.

(가) 벤토나이트 (규산염 화합물)의 특성

- ① Mg, Ca, Al 등이 함유되어 토양 개량제, 농약증량제, 동물사료 첨가제, 화장품 재료로 이용
- ② 물 5배 흡수, 점착력, 분산력 등이 우수함.
- ③ 현재 주로 사용되는 광물성 증량제

(나) 제올라이트 (규산염 화합물)의 특성

- ① 벤토나이트, 유기물, Mg, Ca, Mn, Fe Al 등이 함유되어 토양 개량제, 농약증량제, 상토원료, 동물사료 첨가제로, 악취제거에 이용
- ② 탈수, 흡착력이 강하고 염류장해 완화,
- ③ 분의 시 부패방지
- ④ 현재 주로 사용되는 광물성 증량제



증량제 1% 희석



희석 후 10분 경과

그림 3-17. 선발 보조제의 분산력 검정

(2) 친환경 증량제의 생물적 안전성 검정

(가) 인삼전용 상토에서의 생물적 안정성 검정



그림 3-18. 인삼전용 상토에서의 종자 침지처리구의 생육 상황 (6월 15일)

① 인삼전용 상토에서 균 배양액에 침지한 종자의 발아율

균 배양액에 침지한 인삼종자의 발아는 4월 16일에 시작하였으며, 최종 발아율은 5월 16일에 조사하였다.

공시균주 #13, 균M75, 균CC112의 배양액에 침지하여 파종한 종자의 발아율은 그림 1-19와 같이 각각 90.7%, 90.0%, 89.3%로 무처리구 87.7%에 비하여 약간 증가하는 경향이었으나 처리구 간의 유의성은 나타나지 않았다(그림 3-19).

② 인삼전용 상토에서 증량제 희석액에 침지한 종자의 발아율

Bentonite를 각각 1%와 10%로 희석한 용액에 침지하여 파종한 종자의 발아율은 각각 90.2%와 90.3%이었으며, 무처리구 87.7%에 비하여 약간 증가하였다. Zeolite를 각각 1%와 10%로 희석한 용액에 침지하여 파종한 종자의 발아율은 각각 94.7%와 94.3%로, Bentonite 처리구나 무처리구보다 발아율이 높았으며, Zeolite 처리구에서는 유의성이 나타났다(그림 3-20).

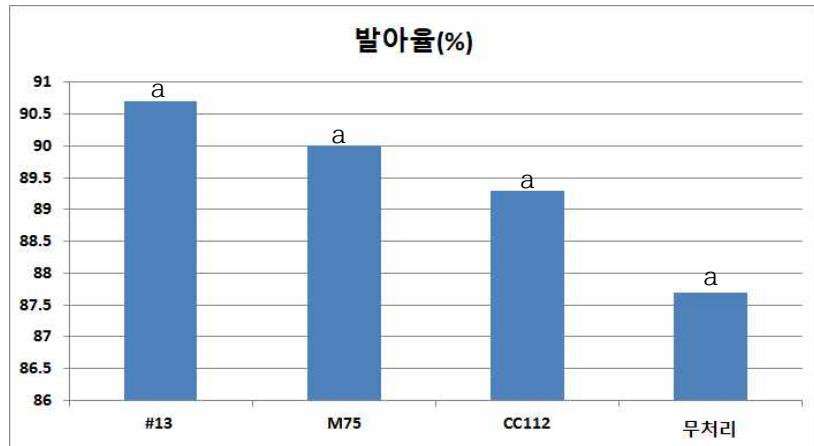


그림 3-19. 균 배양액에 침지한 인삼종자의 인삼전용 상토에서의 발아율

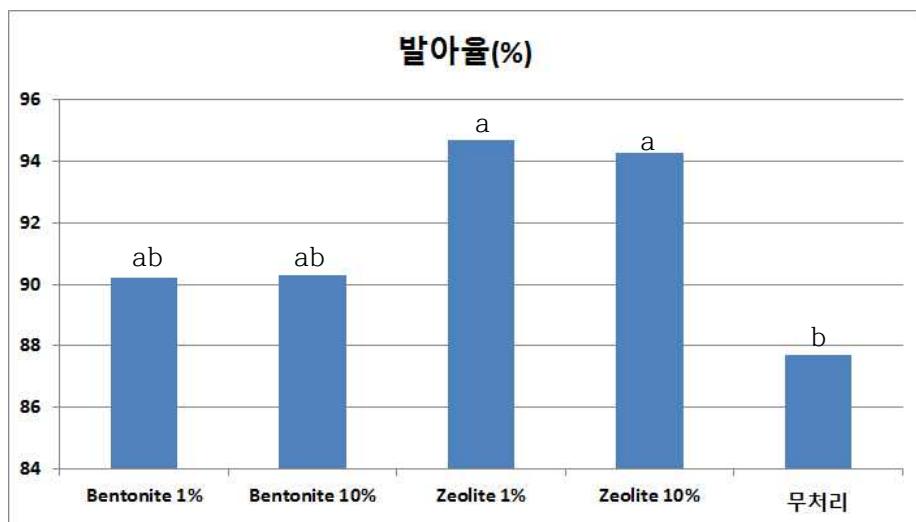


그림 3-20. 증량제 희석액에 침지한 인삼종자의 인삼전용 상토에서의 발아율

③ 인삼전용 상토에서 균 배양액과 증량제 혼합액에 침지한 종자의 발아율

균 배양액과 증량제의 혼합액에 침지한 종자가 발아에 미치는 영향을 알아보기 위하여 균 배양액에 각각의 증량제 1%를 혼합하여 음건한 후 발아율을 조사하였다.

그 결과 그림 3-21과 같이 모든 혼합액 처리구에서 무처리구보다 높은 발아율을 보였다. 특히, #13+Zeolite 처리구와 M75+Zeolite 처리구의 발아율이 가장 높았으며, 무처리구와 유의성이 나타났다.

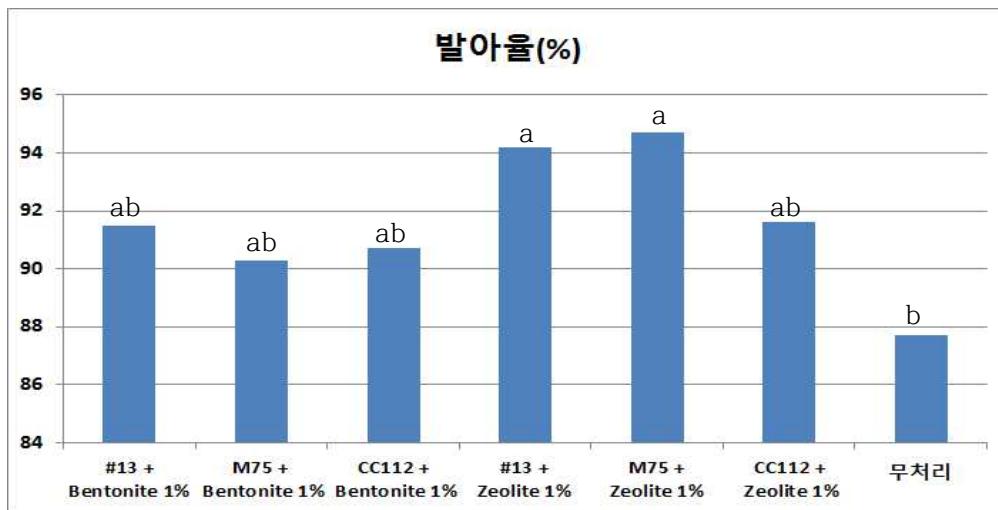


그림 3-21. 균 배양액과 증량제 혼합액에 침지한 종자의 인삼전용 상토에서의 발아율

④ 인삼전용 상토에서 균 배양액에 침지한 종자의 엽색

#13, M75, CC112의 균 배양액에 침지한 종자의 엽색은 각각 21.4, 20.0, 18.7 이었으며, 무처리구는 19.9로 균 #13 배양액에 침지한 종자 처리구에서 엽색이 가장 높았으나, 처리구간에 유의성이 나타나지 않았다(그림 1-22).

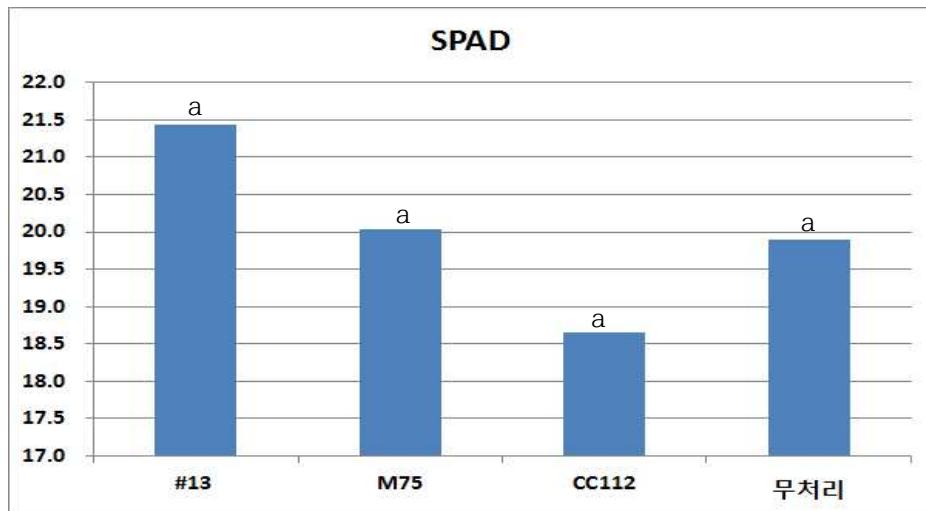


그림 3-22. 인삼전용 상토에서 균 배양액에 침지한 종자의 엽색

⑤ 인삼전용 상토에서 증량제 희석액에 침지한 종자의 엽색

증량제 희석액에 침지한 종자의 엽색은 Bentonite 1%와 10%에서 각각 20.7, 20.8로 차이가 없었으며, Zeolite 1%와 10%에서 각각 20.8, 22.0으로 무처리구 19.9보다 약간 높았다. 무처리구보다 모든 처리구에서 엽색이 높았지만, 처리구간에 유의성은 나타나지 않았다(그림 3-23).

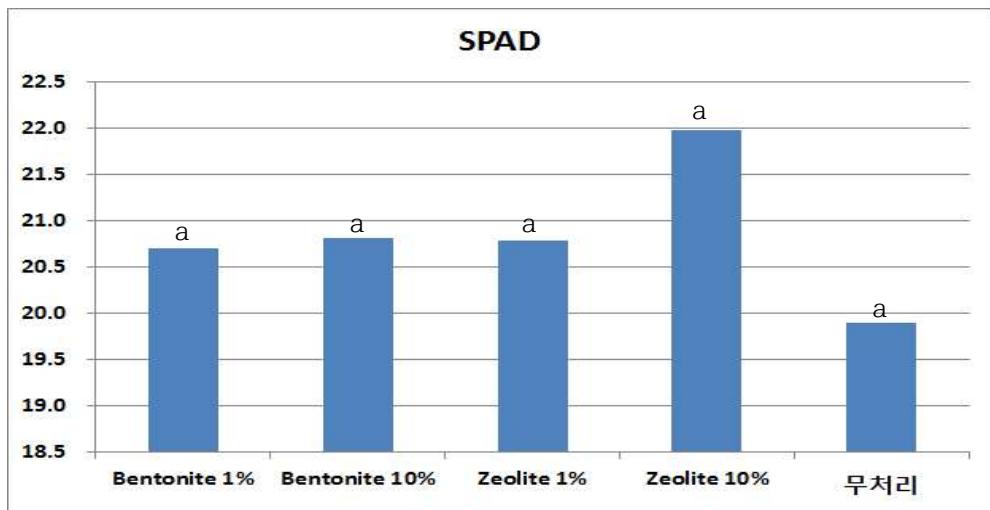


그림 3-23. 인삼전용 상토에서 증량제 희석액에 침지한 종자의 엽색

⑥ 인삼전용 상토에서 균 배양액과 증량제 혼합액에 침지한 종자의 엽색

균#13, M75, CC112와 Bentonite 1%를 혼합하여 침지한 종자의 엽색은 각각 17.9, 18.3, 18.3으로 무처리구 19.9보다 약간 감소하였다. Zeolite 1%를 혼합하여 침지한 처리구에서는 각각 17.8, 16.8, 20.6으로 CC112+Zeolite 1% 처리구에서 엽색이 가장 높았으며, 유의성이 나타났다(그림 3-24).

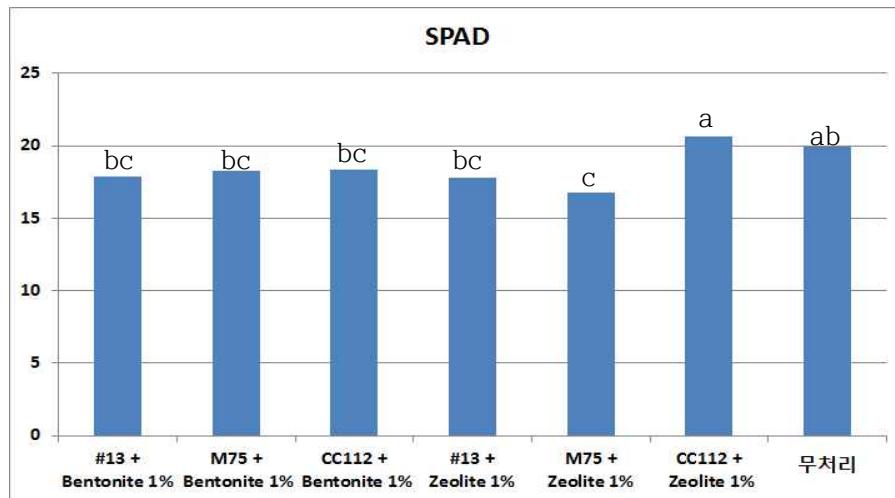


그림 3-24. 인삼전용 상토에서 균 배양액과 증량제 혼합액에 침지한 종자의 엽색

⑦ 인삼전용 상토에서 증량제 희석액에 침지한 종자의 생육 비교

증량제 희석액에 침지한 종자의 생육특성은 표 3-4, 그림 3-25와 같다. 초장, 근장 및 생체중은 처리구 Zeolite 10%에서 각각 9.88cm, 11.0cm, 0.46g으로 가장 높게 나타났으며, 근장을 제외한 초장과 생체중은 처리간에 유의성이 나타났다.

표 3-4. 인삼전용 상토에서 증량제 희석액에 침지한 종자의 생육특성

처리구	초장 (cm)	근장 (cm)	생체중 (g)
Bentonite1%	9.42ab	10.7a	0.43ab
Bentonite10%	8.89bc	10.6a	0.37bc
Zeolite1%	8.87bc	10.9a	0.38bc
Zeolite10%	9.88a	11.0a	0.46a
무처리	8.69c	10.4a	0.32c

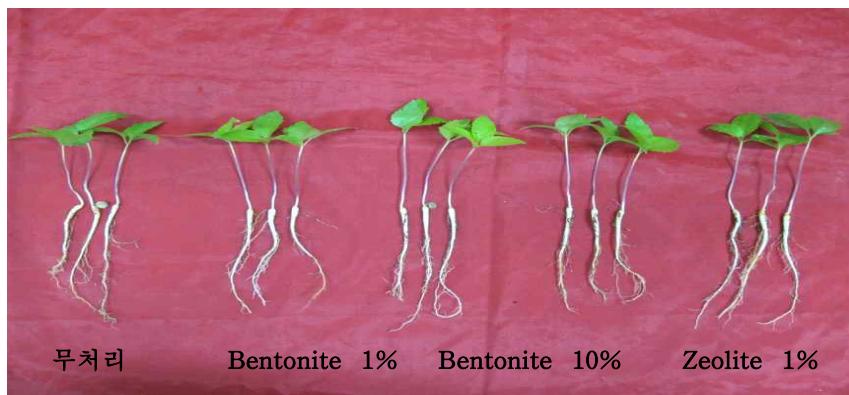


그림 3-25. 인삼전용 상토에서 증량제 희석액에 침지한 종자의 생육상태

⑧ 인삼전용 상토에서 균 배양액과 증량제 혼합액에 침지한 종자의 생육 비교

균 배양액과 증량제 혼합액에 침지한 종자의 생육은 대부분의 처리구에서 비슷한 수준으로 나타났다. 초장은 #13 + Bentonite 처리구에서 9.22cm로 가장 높았으며, 근장은 CC112 + Bentonite 처리구에서 11.2cm, 생체중은 #13 + Bentonite 처리구와 M75 + Bentonite 처리구에서 0.37g으로 가장 높았다(표 3-5, 그림 3-26, 그림 3-27).

이상과 같이 인삼잘록병 방제용 미생물제제에 첨가하는 증량제로는 Bentonite와 Zeolite 2종 모두 사용이 가능 할 것으로 판단된다.

표 3-5. 인삼전용 상토에서 균 배양액과 증량제 혼합액에 침지한 종자의 생육특성

처리구	초장 (cm)	근장 (cm)	생체중 (g)
#13 + Bentonite 1%	9.22a	10.9a	0.37a
M75 + Bentonite 1%	8.83a	10.6a	0.37a
CC112 + Bentonite 1%	9.03a	11.2a	0.36a
#13 + Zeolite 1%	9.07a	10.4a	0.34a
M75 + Zeolite 1%	8.85a	10.4a	0.34a
CC112 + Zeolite 1%	9.18a	10.7a	0.35a
무처리	8.69a	10.4a	0.32a



그림 3-26. 균 배양액과 증량제 Bentonite 혼합액에 침지한 종자의 생육



그림 3-27. 균 배양액과 증량제 Zeolite 혼합액에 침지한 종자의 생육

(나) 토양에서의 생물적 안정성 검정

① 일반토양에서 균 배양액에 침지한 종자의 발아율

균 배양액에 침지한 종자의 토양재배 묘삼의 생육을 조사한 결과는 표 3-6과 같다. 초장은 M75 처리구에서 16.4cm, 근장은 #13 처리구에서 7.9cm 생체중은 CC112 처리구에서 1.09g으로 가장 높았으며, 처리구간에 유의성이 나타났다.

표 3-6. 토양에서 균 배양액에 침지한 종자의 생육특성

처리구	초장 (cm)	근장 (cm)	생체중 (g)
#13	15.8ab	7.90a	0.89ab
#53	15.0ab	6.27bc	0.76b
M75	16.4a	7.68ab	0.92ab
CC112	15.3ab	7.76a	1.09a
#164	15.2ab	5.44c	0.79ab
무처리	13.3b	6.84abc	0.69b



그림 3-28. 일반토양에서의 종자 침지처리구의 생육 상황 (7월 7일)

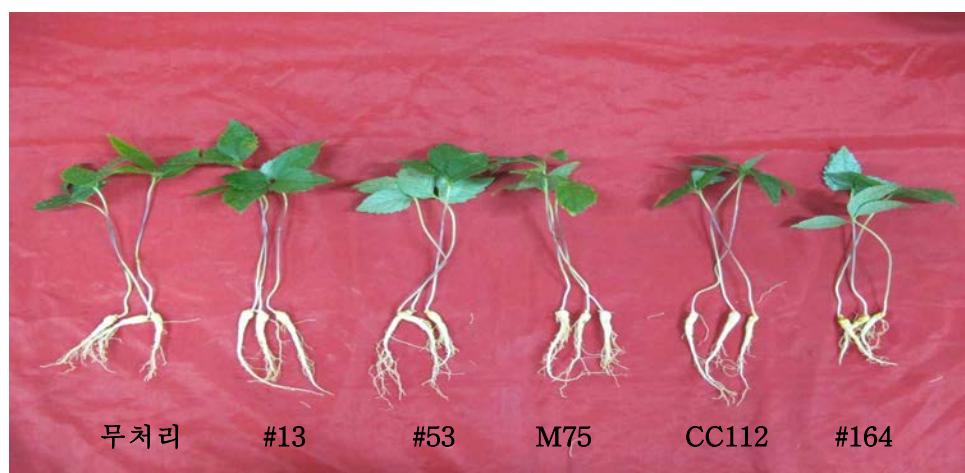


그림 3-29. 토양에서 균 배양액에 침지한 종자의 생육 상태

② 토양에서 증량제 희석액에 침지한 종자의 생육 비교

증량제 희석액에 침지한 종자의 생육을 조사한 결과는 표 1-7과 같다. 초장은 Bentonite 1% 처리구에서 15.8cm, 근장은 Zeolite 10% 처리구에서 8.60cm, 생체중은 Bentonite 1% 처리구에서 0.87g으로 가장 높게 나타났으나 처리 간에 유의성은 나타나지 않았다.

표 3-7. 토양에서 증량제 희석액에 침지한 종자의 생육특성

처리구	초장 (cm)	근장 (cm)	생체중 (g)
Bentonite1%	15.8a	8.47a	0.87a
Bentonite10%	15.7a	6.65a	0.79a
Zeolite1%	15.1a	8.00a	0.81a
Zeolite10%	15.4a	8.60a	0.86a
무처리	15.2a	7.08a	0.76a



그림 3-30. 일반토양에서 증량제 희석액에 침지한 종자의 생육상태

마. 인삼잘록병 방제용 제제화 공정 확립

(1) 분상 수화제 공정 확립 ((주) 그린아그로)

내생포자의 생성을 촉진시키기 위하여 33°C에서 150rpm으로 24 ~ 36 시간 배양하여 얻은 배양액 100L를 연속원심분리기로 8,000rpm에서 20배 농축하였다. 농축한 배양액을 증량제에 살포하여 균체수가 10^8 이 되게 리본 믹서에서 혼합하여 알루미늄 백에 1kg 씩 소포장 하였다.



그림 3-31. 시제품 생산에 사용된 리본믹서(좌) 및 연속원심분리기(우)



그림 3-32. 인삼 잘록병 방제용 미생물제 시제품(Talc 첨가 제품)

(2) 시제품의 특성 조사

(가) 시제품의 분산력 검정

시제품의 분산정도는 모두 양호하였으며, Talc가 가장 우수하였다(표 3-8).

표 3-8. 미생물제 증량제의 분산정도 비교

증량제 종류	분산정도
Zeolite	보통
Bentonite	보통
Talc	우수

① 시제품의 균 밀도 조사

시제품의 세균 밀도를 조사한 결과 표 3-9와 같다. Zeolite를 증량제로 사용한 시제품에서 균주 #13과 CC112는 각각 2.3×10^7 , 4.2×10^7 CFU/ml로 Bentonite와 Talc를 증량제로 사용한 시제품보다 균 농도가 높았으며, 균주 M75의 경우 Talc를 증량제로 사용한 시제품에서 1.8×10^7 CFU/ml로 가장 높았다.

표 3-9. 중량제 종류에 따른 시제품의 균 농도 비교

증량제 종류		균 농도 (CFU/ml)
Zeolite	#13	2.3 X 10 ⁷
	M75	1.3 X 10 ⁷
	CC112	4.2 X 10 ⁷
Bentonite	#13	1.68 X 10 ⁷
	M75	1.6 X 10 ⁶
	CC112	1.2 X 10 ⁶
Talc	#13	2.01 X 10 ⁷
	M75	1.8 X 10 ⁷
	CC112	1.99 X 10 ⁷

② 시제품의 오염 세균 검정

시제품의 세균의 오염을 검정한 결과 그림 3-33에서와 같이 Zeolite에서는 높은 밀도로 오염되었으나, Bentonite와 Talc를 첨가한 배지에서는 오염되지 않았다(그림 3-34).



그림 3-33. Zeolite를 첨가한 제품의 오염도 측정 - 오염



그림 3-34. Bentonite(좌), Talc(우)를 첨가한 제품의 오염도 측정

③ 제품의 분산도, 균밀도, 오염정도를 확인 한 결과 분산정도가 가장 우수하며, 오염이 없고 균밀도도 높은 Talc를 시제품의 증량제로 최종 결정하였다.

(3) 증량제(Talc)를 첨가한 시제품의 생물적 안전성 검정

(가) Talc 첨가 시제품에 침지 후 겨울 파종한 인삼의 생육 (토양재배)

Talc 첨가 시제품에 침지 후 토양에 겨울 파종한 인삼의 생육 특성은 표 3-10과 같다. 발아율과 근중은 시제품 희석액 1%와 10% 처리구 모두에서 무처리구보다 높았으며, 근중은 처리간에 유의성이 나타났다. 반면 근직경은 무처리구에서 가장 높게 나타났으나 유의성은 나타나지 않았다.

표 3-10. Talc 첨가 시제품에 침지 후 겨울 파종한 인삼의 생육 (토양 재배)

희석	균주명	발아율 (%)	초장 (cm)	경직경 (mm)	근장 (cm)	근직경 (mm)	지상부중 (g)	근중 (g)
1%	#13	74.0a*	13.5a	1.34a	10.6ab	3.60a	0.30a	0.25ab
	M75	68.1a	13.9a	1.34a	10.3b	3.45a	0.32a	0.25ab
	CC112	61.5a	13.8a	1.32a	9.89bc	3.61a	0.33a	0.28ab
10%	#13	62.6a	13.7a	1.36a	11.2a	3.63a	0.33a	0.29a
	M75	67.2a	14.0a	1.36a	10.5ab	3.58a	0.33a	0.27ab
	CC112	79.7a	13.6a	1.33a	11.3a	3.39a	0.30a	0.25ab
무처리		55.3a	13.0a	1.32a	9.23c	3.65a	0.30a	0.23b

파종기 : 2015년 12월 1일. *Duncan's multiple range test at 5% level.

① 방선균과 Talc 혼합액에 침지 후 겨울 파종한 인삼의 생육 비교 (토양재배)

방선균 시제품에 침지 후 토양에 겨울 파종한 인삼의 생육 특성은 표 1-11과 같다. 근중은 방선균 처리구 모두 무처리구와 같거나 높았으나, 발아율은 무처리구에서 가장 높게 나타났다. 근중과 발아율 모두 유의성은 나타나지 않았다.

표 3-11. 방선균과 Talc 혼합액 침지 후 겨울 파종한 인삼의 생육 특성 (토양재배)

희석	균주명	발아율 (%)	초장 (cm)	경직경 (mm)	근장 (cm)	근직경 (mm)	지상부중 (g)	근중 (g)
100배	A075	52.2a*	12.5a	1.35a	8.33b	3.83a	0.29a	0.25a
	A501	48.5a	12.6a	1.31a	10.1a	3.54a	0.28a	0.23a
	A3265	46.7a	12.5a	1.31a	8.38b	3.62a	0.29a	0.24a
무처리		55.3a	13.0a	1.32a	9.23ab	3.65a	0.30a	0.23a

파종기 : 2015년 12월 1일. *Duncan's multiple range test at 5% level.



그림 3-35. 방선균과 Talc 혼합액에 침지 후 겨울 파종한 인삼의 생육 특성 (토양재배)
(좌로부터 무처리, A075, A501, A3265)

② Talc 침가 시제품에 침지 후 봄 파종한 인삼의 생육 (토양재배)

세균 시제품에 침지 후 토양에 봄 파종한 인삼의 생육 특성은 표 3-12와 같다. 발아율은 1% M75 균주 처리구를 제외한 나머지 처리구에서 무처리구보다 높았으며, 근중은 10% M75, CC112 균주 처리를 제외한 나머지 처리구에서 무처리구보다 높았다. 모든 조사항목에서 유의성은 나타나지 않았다.

표 3-12. Talc 침가 시제품에 침지 후 봄 파종한 인삼의 생육 특성 (토양재배)

회석비	균주명	발아율 (%)	초장 (cm)	경직경 (mm)	근장 (cm)	근직경 (mm)	지상부중 (g)	근중 (g)
1%	#13	76.2a*	15.5a	1.27a	9.64a	4.16a	0.35a	0.34a
	M75	72.2a	15.4a	1.30a	10.2a	4.12a	0.35a	0.34a
	CC112	75.2a	15.5a	1.32a	10.3a	4.10a	0.36a	0.34a
10%	#13	74.0a	15.3a	1.29a	10.1a	4.16a	0.35a	0.33a
	M75	80.4a	15.5a	1.31a	9.73a	4.07a	0.35a	0.32a
	CC112	77.7a	15.5a	1.29a	9.64a	9.58a	0.36a	0.32a
무처리		73.1a	15.6a	1.26a	9.70a	4.17a	0.35a	0.33a

파종일 : 2016년 3월 20일 *Duncan's multiple range test at 5% level.

③ 방선균과 Talc 혼합액에 침지 후 봄 파종한 인삼의 생육 비교 (토양재배)

방선균 시제품에 침지 후 토양에 봄 파종한 인삼의 생육 특성은 표 3-13과 같다. 발아율은 A501, A3265 처리구에서 무처리구보다 높았으며, 근중은 모든 처리구에서 무처리구보다 높았다. 모든 조사항목에서 유의성은 나타나지 않았다.

표 3-13. 방선균과 Talc 혼합액에 침지 후 봄 파종한 인삼의 생육 특성 (토양재배)

희석	균주명	발아율 (%)	초장 (cm)	경직경 (mm)	근장 (cm)	근직경 (mm)	지상부중 (g)	근중 (g)
100배	A075	67.4a*	15.9a	1.29a	9.76a	4.24a	0.36a	0.34a
	A501	74.8a	15.8a	1.27a	9.73a	4.29a	0.36a	0.34a
	A3265	73.9a	15.5a	1.29a	9.72a	4.28a	0.36a	0.35a
무처리		73.1a	15.6a	1.26a	9.70a	4.17a	0.35a	0.33a

파종일 : 2016년 3월 20일. *Duncan's multiple range test at 5% level.

그림 3-36. 방선균과 Talc 혼합액에 침지 후 봄 파종한 인삼의 생육 특성 (토양재배)
(좌로부터 무처리, A075, A501, A3265)

④ Talc 첨가 시제품에 침지 후 겨울 파종한 인삼의 생육 (상토재배)

세균 시제품에 침지 후 상토에 겨울 파종한 인삼의 생육 특성은 표 3-14와 같다. 10% #13, M75, CC112 처리구에서 발아율은 각각 82.9, 83.6, 82.2%로 다른 처리구에 비하여 월등하였으며, 근중은 1% CC112 처리구에서 0.36g으로 가장 높았다. 발아율과 근중 조사항목에서 유의성은 나타나지 않았다.

표 3-14. Talc 첨가 시제품에 침지 후 겨울 파종한 인삼의 생육 (상토재배)

희석	균주명	발아율 (%)	초장 (cm)	경직경 (mm)	근장 (cm)	근직경 (mm)	지상부중 (g)	근중 (g)
1%	#13	76.4a*	11.0ab	1.22ab	12.6a	2.99b	0.24b	0.31a
	M75	78.9a	11.7a	1.21b	13.3a	3.05ab	0.27ab	0.32a
	CC112	76.2a	11.7a	1.22ab	13.1a	3.30a	0.28a	0.36a
10%	#13	82.9a	11.3ab	1.21ab	13.0a	3.16ab	0.26ab	0.31a
	M75	83.6a	11.2ab	1.20b	12.9a	3.25ab	0.26ab	0.32a
	CC112	82.2a	11.3ab	1.26a	12.8a	3.29a	0.27ab	0.33a
무처리		78.3a	10.7b	1.22ab	12.7a	3.09ab	0.25ab	0.31a

파종일 : 2015년 12월 8일. *Duncan's multiple range test at 5% level.

⑤ 방선균과 Talc 혼합액에 침지 후 겨울 파종한 인삼의 생육 비교 (상토재배)

방선균 시제품에 침지 후 상토에 겨울 파종한 인삼의 생육 특성은 표 3-15와 같다. A075, A3265 처리구에서 발아율은 각각 82.9, 84.42%로 다른 처리구에 비하여 월등하였으며, 근중은 A3265 처리구에서 0.35g으로 가장 높았다. 발아율과 근중 조사항목에서 유의성은 나타나지 않았다.

표 3-15. 방선균과 Talc 혼합액에 침지 후 겨울 파종한 인삼의 생육 (상토재배)

희석	균주명	발아율 (%)	초장 (cm)	경직경 (mm)	근장 (cm)	근직경 (mm)	지상부중 (g)	근중 (g)
100배	A075	82.9a*	11.1b	1.22b	12.8a	3.15a	0.26ab	0.32a
	A501	78.9a	12.8a	1.27a	11.9a	3.23a	0.29a	0.33a
	A3265	84.4a	12.3a	1.23ab	11.7a	3.35a	0.29a	0.35a
무처리		78.3a	10.7b	1.22ab	12.7a	3.09a	0.25b	0.31a

파종기 : 2015년 12월 8일. *Duncan's multiple range test at 5% level.



그림 3-37. 방선균과 Talc 혼합액에 침지 후 겨울 파종한 인삼의 생육 (상토재배)
(좌로부터 무처리, A075, A501, A3265)

(라) 시제품 안정성 검정

시제품의 저장온도 및 기간에 따른 균주의 생존을 검정하기 위하여 실온 및 40°C에 보관하여 균의 농도를 조사한 결과 표 3-16과 같다. 8월 31일, 시제품 생산 직후 세균 농도는 균주 #13, M75, CC112에서 각각 2.01×10^7 , 1.80×10^7 , 1.99×10^7 CFU/ml 이었다. 2개월 후, 10월 31일 실온에서 보관한 시제품의 세균 농도는 균주 #13, M75, CC112에서 각각 6.4×10^6 , 6.8×10^6 , 7.2×10^6 CFU/ml 이었으며, 40°C에서 보관한 시제품의 경우 #13, M75, CC112에서 각각 4.0×10^6 , 4.3×10^6 , 5.1×10^6 CFU/ml로 실온에서 보관한 경우와 거의 차이가 없었다.

표 3-16. 저장온도 및 기간에 따른 Talc 첨가 시제품의 세균 밀도 변화

보관온도	균주명	세균농도(CFU/ml)	
		8월 31일	10월 31일
실온	#13	2.01 X 10 ⁷	6.4 X 10 ⁶
	M75	1.80 X 10 ⁷	6.8 X 10 ⁶
	CC112	1.99 X 10 ⁷	7.2 X 10 ⁶
40°C	#13	2.01 X 10 ⁷	4.0 X 10 ⁶
	M75	1.80 X 10 ⁷	4.3 X 10 ⁶
	CC112	1.99 X 10 ⁷	5.1 X 10 ⁶

사. 제품의 미생물 안전성 검정 및 인증 신청 : 수화제 1종

(1) 미생물검정 검사성적서 : 강원대학교 친환경농산물 안전성센터

(가) 유효성분 : 미생물동정 검사성적서, 보증균수

제 16-M-47-1호 미생물제제 분석성적서			
위 탁 자	① 성 명 (법인명)	충남대학교 산학협력단	② 주민등록번호 (법인등록번호) *****-*****
	③ 주 소	대전광역시 유성구 대학로 99	
공 시 품	④ 성상	분상	
	⑤ 상표명 (유효미생물)	안 잘록 (<i>Bacillus methylotrophicus</i>)	
	⑥ 제조회사	충남대학교 산학협력단	
	⑦ 검사방법	1. 유전자 염기서열 상동성 검색을 통한 균주 확인	
	⑧ 용 도	등록용/인증용(신규)	
⑨ 분석항목	유효미생물		분석자 [cfu/ml.(g)]
	<i>Bacillus methylotrophicus</i>		4.00 × 10 ⁸
시험책임자	2016년 8월 3일	최은화	
 강원대학교 친환경농산물안전성센터장 (인)			

(나) 유해성분 : 병원성미생물 검사성적서

제 C-C-2016-49-1호 병원성미생물 검사성적서			
위 탁 자	① 성명 (법인명)	충남대학교 산학협력단	② 주민등록번호 (법인등록번호)
공 시 품	③ 주소	대전광역시 유성구 대학로 99	
	④ 성상	분상	
	⑤ 상표명	안찰록	
	⑥ 제조회사	충남대학교 산학협력단	
	⑦ 검사방법	o 병원성미생물 선택배지를 이용한 검정	
	⑧ 용도	등록/인증용(신규)	
⑨ 검 사 항 목	병원성 미생물		검사 결과
	병원성 대장균(<i>Escherichia coli</i> O157:H7)		불검출
	병원성 살모넬라(<i>Salmonella</i> spp.)		불검출
	황색포도상구균(<i>Staphylococcus aureus</i>)		불검출
	리스테리아 모노사이토제네스(<i>Listeria monocytogenes</i>)		불검출
	마실러스 세레우스(<i>Bacillus cereus</i>)		불검출
1) 본 성적서는 시료를 3만복 분석한 후의 결과 값임. 2) 본 성적서는 고객이 제공한 시료를 시험한 결과로서 전체제품에 대한 품질을 보증하지는 않음. 3) 본 성적서의 결과는 광고, 전단, 홍보 및 소송 등에 수단으로 사용하실 수 없음.		시험 일자	
		2016년 8월 3일	최은화
(인) 강원대학교 친환경농산물안전성센터장 			

(2) 시제품 잔류농약 검사서 : 강원대학교 친환경농산물 안전성센터

잔류농약 시험(검사)성적서

1. 검사시료

발급번호	제 EFAPSC-2016-45-1 호	발급일	2016. 8. 9.
의뢰인	성명 충남대학교 산학협력단	사업자등록번호	314-82-09264
	주소 대전광역시 유성구 대학로 99		
의뢰내용	대상품목명 안찰록	Lot. No.	
	시험개요 잔류농약검사 (Abamectin 외 335종)		
	용도 유기농업자제목록공시용		

2. 검사결과

No.	검출성분명 (Pesticide Name)	검출치 (mg kg⁻¹)
1	불검출	-
분석을 실시한 Abamectin 외 335종에서 위 성분을 제외한 나머지 성분은 불검출입니다.		

* 불검출은 검출한계 미만으로 검출이 되지 않은 것을 뜻함.

** 본 성적서는 고객이 제공한 시료를 시험한 결과로서 전체제품에 대한 품질을 보증하지는 않음.

*** 본 성적서의 결과는 광고, 전단, 홍보 및 소송 등에 수단으로 사용하실 수 없음.

강원대학교 친환경농산물안전성센터장



(3) 유식물 약해 시험성적서 : 응용생물시험연구소

(가) '안 잘록'의 유기농업자재 공시를 위한 작물 약해 시험(응용생물시험 연구소)

① 종자 침지 시험작물(품종)

- 상추(적치마), 배추(신선엇갈이), 열무(참존), 오이(네박자), 벼(삼광)
- 시험자재 "안 잘록"은 시험 대상작물인 상추, 배추, 오이, 열무, 벼에 대하여 종자침지 적량, 배량 처리구 모두 약해 증상이 나타나지 않았음.

② 관주 처리 시험작물(품종)

- 상추(적치마), 배추(신선엇갈이), 열무(참존), 시금치(다이아), 근대(백경)
- 시험자재 "안 잘록"은 시험 대상작물인 상추, 배추, 열무, 시금치, 근대에 대하여 관주처리 적량, 배량 처리구 모두 약해 증상이 나타나지 않았음.

(4) 독성에 대한 시험 성적서 : (주)에이비솔루션

(가) 안 잘록의 개체당 1.0×10^8 cfu의 단위에 해당하는 미생물은 급성경피독성, 급성경구독성, 안점막자극성, 피부자극성, 담수어류에 영향이 없었다.

담수어류독성 (호서대학교 안전성평가센터)

Study No. : ERI6088

1. 요약

담수어류를 이용한 안잘록 (*Bacillus methylotrophicus*)에 대한 담수어류(잉어, *Cyprinus carpio*) 노출시 나타나는 독성증상을 평가하기 위해 잉어(*Cyprinus carpio*)를 이용하여 영향시험을 30일 동안 반지수식으로 실시하였다.

시험용액 중 시험물질의 농도는 유효성분을 기준으로 대조군 및 8.0×10^6 cfu/mL 으로 하여 한계시험(limit test)을 실시하였다.

시험의 결과는 아래와 같으며 설정농도에 의해 결과를 표기하였다.

Observation time	$LC_{50}^{(1)}$ (cfu/mL)	95 % Confidence limits (cfu/mL)	NOEC ⁽²⁾ (cfu/mL)
30 days	$> 8.0 \times 10^6$	-	8.0×10^6

1) Median lethal concentration, based on nominal concentration of active ingredient

2) No observed effect concentration

시험기간 중 치사가 일어나지 않는 최고농도는 8.0×10^6 cfu/mL 이었다.

시험기간 중 대조군 및 처리군에서는 일반중독증상이나 특이증상은 관찰되지 않았다.

시험에 사용된 대조군에 대한 시험시작전 시험어의 전장은 $4.48 \text{ cm} \pm 0.19 \text{ cm}$, 체중은 평균 $1.44 \text{ g} \pm 0.12 \text{ g}$ 이었고, 시험종료후 시험어의 전장은 $5.29 \text{ cm} \pm 0.23 \text{ cm}$, 체중은 평균 $2.15 \text{ g} \pm 0.16 \text{ g}$ 이었다.

시험에 사용된 처리군에 대한 시험시작전 시험어의 전장은 $4.53 \text{ cm} \pm 0.20 \text{ cm}$, 체중은 평균 $1.48 \text{ g} \pm 0.12 \text{ g}$ 이었고, 시험종료후 시험어의 전장은 $5.20 \text{ cm} \pm 0.17 \text{ cm}$, 체중은 평균 $2.09 \text{ g} \pm 0.17 \text{ g}$ 이었다.

시험기간 중 pH는 평균 7.73(최소 7.50 ~ 최대 7.99), DO는 평균 7.66 mg/L(최소 6.81 mg/L ~ 최대 8.44 mg/L)으로 포화용존산소량의 평균 88.4 %(최소 78.5 % ~ 최대 97.3 %)이었으며, 수온은 평균 21.6 °C (최소 21.3 °C ~ 최대 21.8 °C)이었으며, 경도는 49.0 mg/L(최소 42 mg/L ~ 최대 55 mg/L)이었다.

이상의 시험결과 본 시험물질의 30일-LC₅₀은 설정농도를 기준으로 8.0×10^6 cfu/mL 이상으로 확인되었다.



급성경피독성

급성경구독성

Final Report & Study No: AD16006N



Final Report & Study No: AO16006N

**I. 요약**

본 시험은 시험물질인 안 잘록(*Bacillus methylotrophicus*)을 암수 SD제 랫드를 사용하여 급성 경피투여 하였을 때의 독성을 조사하고, 사망율을 알아보기 위하여 실시하였다. 투여농도는 개체당 1.0×10^8 cfu/mL 단위에 해당하는 미생물농력을 투여하였다. 대조군은 별도로 두지 않았으며, 암수 각 5 마리를 사용하여 투여한 후 14 일간의 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰한 결과는 다음과 같다.

- 1) 시험기간 동안 사망동들은 관찰되지 않았다.
 - 2) 일반증상에서 시험물질 투여와 관련된 증상은 관찰되지 않았다.
 - 3) 체중측정결과; 모든 동물에서 정상적인 체중증가가 관찰되었다.
 - 4) 부검 육안 소견 결과, 시험물질 투여와 관련된 이상소견이 관찰된 동물은 없었다.
- 이상의 결과, 본 시험의 조건에서 안 잘록(*Bacillus methylotrophicus*)의 개체당 1.0×10^8 cfu의 단위에 해당하는 미생물을 1 회 경피투여시 암수 모든 동물에서 영향이 없는 것으로 판단되었다.

I. 요약

본 시험은 시험물질인 안 잘록(*Bacillus methylotrophicus*)에 대한 급성경구독성/병원성시험을 암수 SD제 랫드를 사용하여 개체당 1.0×10^8 cfu의 단위에 해당하는 미생물을 1 회 경구 투여한 후 사망동률, 일반증상 및 체중변화를 관찰하였고, 3, 7, 14 및 21 일에 부검하여 장기를 육안으로 관찰한 다음 체내 진존 미생물을 수와 1, 3, 7 및 14 일의 번을 받아서 체외 배출 미생물을 수를 검사하였다. 그 결과는 다음과 같다.

- 1) 시험기간 동안 사망동률은 관찰되지 않았다.
 - 2) 일반증상에서 시험물질 투여와 관련된 증상은 관찰되지 않았다.
 - 3) 체중측정결과; 모든 동물에서 정상적인 체중증가가 관찰되었다.
 - 4) 부검 육안 소견 결과, 시험물질 투여와 관련된 이상소견이 관찰된 동물은 없었다.
 - 5) 체외 배출된 미생물을 수를 검사한 결과, 시험물질 투여군 및 대조군은 모든 동물에서 체외로 배출된 미생물이 검출되지 않았다.
 - 6) 체외 배출된 미생물을 수를 검사한 결과, 시험물질 투여 후 1 일차에 수컷 5 레 및 암컷 4 레에서 검출되었고, 암수 모두 3 일째부터 미생물은 검출되지 않았다. 대조군은 모든 동물에서 체외로 배출된 미생물이 검출되지 않았다.
 - 7) 체내 진존된 미생물을 수를 검사한 결과, 시험물질 투여군 및 대조군은 체내에서 미생물이 검출된 동물은 관찰되지 않았다.
- 이상의 결과로부터 안 잘록(*Bacillus methylotrophicus*)의 개체당 1.0×10^8 cfu의 단위에 해당하는 미생물을 1 회 경구 투여 시 암수 모든 동물에서 영향이 없는 것으로 판단된다.

안점막자극성

피부자극성

Final Report & Study No: AE16006N



Final Report & Study No: AI16006N

**I. 요약**

본 시험은 시험물질 안 잘록(*Bacillus methylotrophicus*)의 안점막자극성을 조사하기 위하여 수컷 New Zealand White계 토끼의 안점막에 10^7 에 해당하는 시험물질을 투여한 후 평가하였다.

그 결과는 다음과 같다.

- 1) 시험기간 동안 사망동들은 관찰되지 않았다.
 - 2) 일반증상은 시험물질 투여와 관련된 이상증상이 관찰되지 않았다.
 - 3) 체중변화는 시험기간 동안 모든 동물에서 정상적인 체중 증가가 관찰되었다.
 - 4) 시험물질 투여 후 안점막자극성을 관찰한 결과, 결막, 발적의 안점막자극성이 관찰되었으며, 결찰된 자극성은 투여 후 1 일째에 회복되었다. 각막, 충채에 대한 자극성, 결막의 부종 및 배출물은 관찰되지 않았다. 대조부위인 좌안의 경우 각막, 충채 및 결막에 대한 특이한 증상이 관찰되지 않았다.
 - 5) Draize의 평가방법에 따라 시험물질 투여 후 1 시간, 1, 2, 3, 4 일 및 7 일째의 평균안점막 자극지수(M.O.I.)는 0.7, 0.0, 0.0, 0.0, 0.0 및 0.0으로 산출되었으며, 급성안점막자극지수(A.O.I.)는 0.7로 산출되었다.
- 이상의 결과로 보아 본 시험 조건 하에서 시험물질 안 잘록(*Bacillus methylotrophicus*)의 수컷 New Zealand White계 토끼의 안점막에 대한 안점막자극성시험 결과 자극성이 있는 물질로 판단되었다.

I. 요약

본 시험은 시험물질 안 잘록(*Bacillus methylotrophicus*)의 피부자극성을 조사하기 위하여 암컷 New Zealand White계 토끼의 피부에 투여한 후 평가하였다.

그 결과는 다음과 같다.

- 1) 시험기간 동안 사망동들은 관찰되지 않았다.
 - 2) 일반증상은 시험물질 투여와 관련된 증상이 관찰되지 않았다.
 - 3) 체중변화는 시험기간 동안 모든 동물에서 정상적인 체중 증가가 관찰되었다.
 - 4) 피부반응 관찰결과, 시험물질 투여부위와 대조부위 모두 모든 동물에서 이상반응이 관찰되지 않았다.
 - 5) 피부자극성의 평가결과 일차자극지수(R.L.I.)는 0.0으로 산출되었다.
- 이상의 결과로 보아 본 시험 조건 하에서 시험물질 안 잘록(*Bacillus methylotrophicus*)의 암컷 New Zealand White계 토끼의 피부에 대한 피부자극성시험 결과 자극성이 없는 물질로 판단되었 다.

제4절 미생물을 이용한 인삼질록병 포장 방제효과 구명

1. 재료 및 방법

가. 인삼모질록병 포장검정을 위한 접종법 개발

(1) 병원균의 분리

인삼모질록병의 방제효과 분석을 위하여 충북 음성, 괴산, 증평에 위치한 모포로부터 질록 증상을 보이는 시료를 채집하였다. 채집한 식물체는 건전 부위와 이병줄기를 1% 차아염소산나트륨 용액에서 1분간 표면 살균하였다. 멸균수를 이용하여 2회 세척하고, 멸균된 필터페이퍼 위에서 10분 동안 건조하였다. 물한천 배지에 멸균한 식물체를 올려놓고 20°C 배양기에서 2~3일간 배양하고, 현미경을 통하여 균사를 확인하고 멸균한 칼을 이용하여 PDA배지에 옮겨 5일간 배양하였다. 분리된 병원균은 PDA 사면배지에 보관하면서 실험에 사용하였다.

(2) 접종원 준비

포장검정을 위한 접종원 준비는 Kim 등(2010)의 방법을 수정하여 사용하였다. *R. solani* 균주와 *Pythium* 균주는 국립농업과학원으로부터 분양 받아 실험에 사용하였다. 각각의 병원균은 PDA 배지에 접종하여 3일간 배양하고, 멸균된 코르크보러를 이용하여 5mm의 균사조각을 만들었다. 밀기울 왕겨배지(밀기울 300ml, 왕겨 150ml, 증류수 150ml)를 121°C에서 3회 멸균하고 식힌 다음, 병원균 5mm의 균사조각을 10개씩 접종하고 20°C에서 2주간 배양하고 실온에서 풍건하였다. 풍건된 배지는 250mesh의 체로 치고 균일한 크기의 접종원만을 사용하였다.

(3) 포트검정

인삼재배용 상토 20kg(Shinsung Mineral, Goesan, Korea)을 육묘용 상자 (500×320×200mm)에 넣은 다음, 개갑된 인삼 종자 150개씩 파종하였다. *Bacillus* 4종은 LB 20ml에서 전배양 한 다음 1% 농도로 500ml LB에 접종하고 30°C, 200rpm에서 2일간 배양하였다. *Streptomyces* 2종은 GSS 배지 20ml에서 전 배양 한 다음 1% 농도로 500ml GSS 배지에 접종하고 30°C, 200rmp에서 1주일간 배양하였다. 미생물 배양액은 6 CFU/ml로 회색한 다음 물뿌리개를 이용하여 상자당 1L씩 관주처리 하였다. 길항균 처리는 종자 파종 다음날부터 10일 간격으로 3회 처리 하였으며, 방제효과는 마지막 처리 1주일 후 발아된 개체수를 대상으로 아래와 같은 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{방제가} = ((\text{무처리 발병주율} - \text{처리 발병주율}) / (\text{무처리 발병주율})) \times 100$$

(4) 모잘록병 포장검정을 위한 접종원 농도구명

(가) 호밀배지 조제

모잘록병의 방제효과 검정을 하기 위한 병원균의 준비는 Yu et al.(1989)의 방법을 수정하여 사용하였다. 인삼 모발으로 순수 분리하여 병원성이 확인된 *R. solani* AG2-1 (KCCM60603) 균주를 PDA(glucose 20g, potato extract 4g, agar 15g/L)에 접종하여 20°C에서 5일간 배양하고 지름이 5mm인 코르크 보러를 이용하여 균사 조각을 만들었다. 호밀과 물을 9:1의 비율로 혼합하고 하루 동안 불린 다음에 121°C에서 3회 멸균 하였다. 멸균된 호밀에 *R. solani* 균사 조각을 10개씩 접종하고, 25°C에서 배양하면서 2일 간격으로 흔들어 병원균이 균일하게 생육하도록 하였다. 2주 동안 배양한 호밀 배지는 실온에서 풍건 후 방제효과 검정을 위한 접종원으로 사용하였다.

(나) 병원균의 최적 접종농도

인삼모잘록병의 포장 방제효과 검정을 위하여 병원균의 최적접종 농도를 구명하기 위하여 인삼재배용 상토 20kg(Shinsung Mineral, Goesan, Korea)를 육묘용 상자 (500×320×200mm)에 넣은 다음, 개갑된 인삼 종자 150개씩 파종하였다. 실온에서 풍건한 이병호밀을 0.5g, 1g, 2.5g, 5g, 10g의 농도로 접종하고 표면을 마사토로 2cm씩 복토하였다. 발병주율은 파종 5주 후에 이병된 개체수를 조사하여 산출하였다.

나. 유용미생물을 이용한 포장 방제효과 검정

(1) 유용미생물 처리에 따른 관행포장 방제효과(1년차)

포장방제 효과 검정은 충북 음성군 소이면에 위치한 묘포에서 수행하였다. 인삼 종자는 1칸당 1800개씩 파종한 후 병원균이 접종된 배지를 토양 표면에 칸(180×90cm) 당 50g씩 접종하고, 마사토를 3cm 뚜껑으로 복토하였으며 두둑상면은 벗집으로 부초해 수분을 유지하도록 하였다. 기타 인삼재배법은 농촌진흥청 인삼표준영농교본(2014)에 준하여 수행하였다. 길항균은 인삼모잘록병원균에 대해 항균활성이 확인된 균주 (*Bacillus* 4종: 13, 26, 36, 38 ; *Streptomyces* 2종: 34, 35)를 국립농업과학원으로부터 분양받아 실험에 사용하였다. *Bacillus* 4종은 LB 20ml에서 전배양 한 다음 1% 농도로 500ml LB에 접종하고 30°C, 200rpm에서 2일간 배양하였다. *Streptomyces* 2종은 GSS 배지 20ml에서 전 배양 한 다음 1% 농도로 500ml GSS 배지에 접종하고 30°C, 200rmp에서 1주일간 배양하였다. 미생물 배양액은 6 CFU/ml로 희석한 다음 물뿌리개를 이용하여 5월 2일부터 10일 간격으로 3회 칸 당 5L 관주처리 하였다. 방제효과 조사는 길항균 마지막 처리 후 1주일 후 조사하였으며 방제가는 아래와 같은 식으로 조사하였다.

$$\text{방제가} = ((\text{무처리 발병주율} - \text{처리 발병주율}) / (\text{무처리 발병주율})) \times 100$$

(2) 유용미생물 처리에 따른 비가림하우스 포장 방제효과(1년차)

비가림하우스에서의 방제 효과 검정은 충북 음성군 소이면에 위치한 묘포에서 수행하였다. 종자파종, 병원균 접종 및 길항균 배양방법은 관행포장의 방법과 동일하게 수행하였다. 길항균 처리는 7일 간격으로 4회 처리 하였고, 길항균 마지막 처리 후 1주일 후 방제가를 조사하였다.

(3) 유용미생물 처리에 따른 관행포장 방제효과(2년차)

포장방제 효과 검정은 충북 음성군 소이면에 위치한 묘포와 강원도 평창군 진부면에 위치한 묘포에서 처리당 5반복으로 수행하였다. 인삼 종자는 1칸당 1800개씩 파종하였다. 병원균이 접종된 배지를 토양 표면에 칸($180 \times 90\text{cm}$) 당 50g씩 접종하고, 마사토를 3cm 뚜껑으로 복토하였으며 두둑상면은 벗집으로 부초해 수분을 유지하도록 하였다. 길항균은 인삼모잘록병원균에 대해 항균활성이 확인된 균주(*Bacillus velezensis* 3종 : #13, M75, CC112; *Streptomyces* 2종 : A3075, A3265)를 국립농업과학원으로부터 분양받아 실험에 사용하였다. *Bacillus* 3종은 LB 20ml에서 전배양 한 다음 1% 농도로 500ml LB에 접종하고 30°C, 200rpm에서 2일간 배양하였다. *Streptomyces* 2종은 GSS 배지 20ml에서 전 배양 한 다음 1% 농도로 500ml GSS 배지에 접종하고 30°C, 200rmp에서 1주일간 배양하였다. 미생물 배양액은 6 CFU/ml로 희석한 다음 물뿌리개를 이용하여 7일 간격으로 4회 칸 당 5L 관주처리 하였다. 방제효과는 길항균 마지막 처리 후 1주일 후 조사하였다.

(4) 유용미생물 처리에 따른 비가림하우스 포장 방제효과(2년차)

포장방제 효과 검정은 충북 음성군 소이면에 위치한 묘포에서 수행하였다. 인삼 종자는 1칸당 1800개씩 파종하였다. 병원균이 접종된 배지를 토양 표면에 칸($180 \times 90\text{cm}$) 당 50g씩 접종하고, 마사토를 3cm 뚜껑으로 복토하였으며 두둑상면은 벗집으로 부초해 수분을 유지하도록 하였다. 길항균은 인삼모잘록병원균에 대해 항균활성이 우수한 균주(*Bacillus velezensis* 3종 : #13, M75, CC112 *Streptomyces* 2종 : A3075, A3265)는 국립농업과학원으로부터 분양받아 실험에 사용하였다. *Bacillus* 3종은 LB 20ml에서 전 배양 한 다음 1% 농도로 500ml LB에 접종한 30°C, 200rpm에서 2일간 배양하고, *Streptomyces* 2종은 GSS 배지 20ml에서 전 배양 한 다음 1% 농도로 500ml GSS 배지에 접종하고 30°C, 200rmp에서 1주일간 배양하였다. 미생물 배양액은 6 CFU/ml로 희석한 다음 물뿌리개를 이용하여 4월 10일부터 7일 간격으로 4회 칸 당 5L 관주처리 하였다. 방제효과 길항균 마지막 처리 후 1주일 후 조사하였다.

다. 시제품을 이용한 인삼모잘록병 방제효과 분석

(1) 시제품의 미생물의 농도확인

미생물 시제품의 농도를 확인하기 위하여, 멸균수를 이용하여 10^{-6} 까지 희석하였다. LB 배지에 미생물 희석액을 100ul씩 도말하고 30°C에서 2일 간 배양하고 배지위에서 자라나온 균총을 계수하였으며 log CFU/ml로 환산하였다.

(2) 인삼모잘록병의 포장방제효과 분석(관행포장)

미생물 시제품을 이용한 포장방제 효과 검정은 충북 음성군 소이면에 위치한 묘포에서 처리당 5반복으로 수행하였다. 제오라이트를 제형으로 한 *Bacillus velezensis* 3종 (#13, M75, CC112)은 충남대학교로부터 분양받아 사용하였다. 미생물 시제품을 물로 100배 희석하여 6 log CFU/m로 조정하여 개갑된 인삼 종자를 1시간 침지처리 하고 하루동안 풍건하였다. 길항균이 처리된 인삼 종자는 1칸당 1800개씩 파종하였다. 병원균이 접종된 배지를 종자 파종 후 토양 표면에 칸(180×90cm) 당 25g씩 접종하고, 마사토를 3cm 뚜껑으로 복토하였으며 두둑상면은 벗집으로 부초해 수분을 유지하도록 하였다. 미생물 시제품을 물로 100배 희석하여 6 log CFU/m로 조정하였으며 물뿌리개를 이용하여 4월 5일부터 5일 간격으로 7회, 7일 간격으로 5회 처리하였으며 칸 당 5L 관주처리 하였다. 방제효과는 각각 길항균 마지막 처리 후 1주일 후 조사하였다. 길항균 처리에 따른 묘삼의 생육효과를 분석하기 위하여 10월말에 처리구당 30개씩을 채집하여 균중, 균장 및 균경을 조사하였다.

(3) 인삼모잘록병의 포장방제효과 분석(비가림 하우스)

미생물 시제품을 이용한 포장방제 효과 검정은 충북 음성군 소이면에 위치한 비가림 하우스 묘포에서 처리당 6반복으로 수행하였다. 인삼 종자는 1칸당 1800개씩 파종하였다. 병원균이 접종된 배지를 종자 파종 후 토양 표면에 칸(180×90cm) 당 25g씩 접종하고, 마사토를 3cm 뚜껑으로 복토하였으며 두둑상면은 벗집으로 부초해 수분을 유지하도록 하였다. 탈크와 제올나이트를 제형으로 한 *Bacillus velezensis* 3종(#13, M75, CC112)은 충남대학교로부터 분양받아 실험에 사용하였다. 미생물 시제품을 물로 100배 희석하여 6 log CFU/m로 조정하였다. 물뿌리개를 이용하여 4월 15일부터 7일 간격으로 4회 칸 당 5L 관주처리 하였다. 방제효과 조사는 길항균 마지막 처리 후 1주일 후 조사하였다. 길항균 처리에 따른 묘삼의 생육효과를 분석하기 위하여 10월말에 처리구당 30개씩을 채집하여 균중, 균장 및 균경을 조사하였다.

(4) 미생물제의 방제효과 증진을 위한 친환경자재의 탐색

인삼모잘록병의 방제효과를 높이기 위해 병용처리 가능한 친환경 자재를 선발하고자, 항균효과가 높은 식물 10종을 탐색하였다. 항균활성 효과가 높은 정향과 육계를 선발하여, 70% 에탄올을 이용하여 2주간 추출하고, 인삼모잘록병원균의 억제 정도를 조사하였다. 선발한 미생물 *Bacillus velezensis* 3종에 대한 생육저해 정도를 조사하고 인삼모잘록병의 방제를 위해 병용처리가 가능한지를 검토하였다.

라. 통계분석

포장 방제효과 분석은 5반복 이상 난피법으로 배치하여 실험을 수행하였다. 처리 평균간 비교를 위하여 R프로그램(version 3.1.1)을 이용해 ANOVA 분석 및 Duncan 다중검정($P \leq 0.05$)을 수행하였으며, 결과들은 평균값으로 표시하였다.

2. 결과

가. 인삼모잘록병 포장검정을 위한 접종법 개발

(1) 병원균의 분리

충북 음성, 충주, 괴산 지역으로부터 모잘록 증상을 보이는 채집하여 *R. solani* 30균주와 *Pythium* sp. 8균주를 분리하였다. *R. solani*에 의한 모잘록병은 그림 4-1과 같이 지제부 부위가 잘록해지면서 식물체가 쓰러지며 잎의 가장 자리가 마르는 증상을 보이지만, *Pythium*에 의한 모잘록병 증상은 그림 4-2와 같이 잎의 뿌리 끝이 잘록해지면서 잎이 푸르른 채로 넘어가는 증상을 보였다. 대부분의 포장에서 모잘록병의 원인균으로는 *R. solani* AG2-1에 의한 것으로 확인 되었으며, 지역에 관계없이 최대 40% 까지 병이 나타나는 것으로 조사 되었다. *Pythium* spp 균에 의한 모잘록병은 주로 관수시설이 설치된 시설재배 포장에서 심하게 발생되었으며 최대 30%까지 발생하였다.



그림 4-1. *Rhizoctonia solani*에 의한 모잘록병



그림 4-2. *Pythium* spp.에 의한 모잘록병

(2) 포트검정

모잘록병원균 *Rhizoctonia solani*와 *Pythium* spp.을 복합 접종한 포트 실험을 통해, 유용미생물의 인삼모잘록병 방제효과를 확인하였다. 방선균 34번, 35번 균주 배양액을 처리구에서 이병주율이 각각 42.4%와 40.4%로 낮게 확인 되었으며, 방제가도 각각 37.1%와 40.1%로 다른 처리구 보다 높게 확인되었다(그림 4-3). Woo 등(2016)은 방선균을 이용한 인삼모잘록병의 방제효과 연구에서 *Streptomyces* 속에 속하는 방선균은 세포벽 분해효소와 항진균 물질을 생산하여 모잘록병을 효과적으로 방제할 수 있다고 보고하였으며, 본 결과에서도 방선균 배양액을 처리했을 때 인삼모잘록병 방제 효과가 다른 처리구보다 높게 확인되었다.

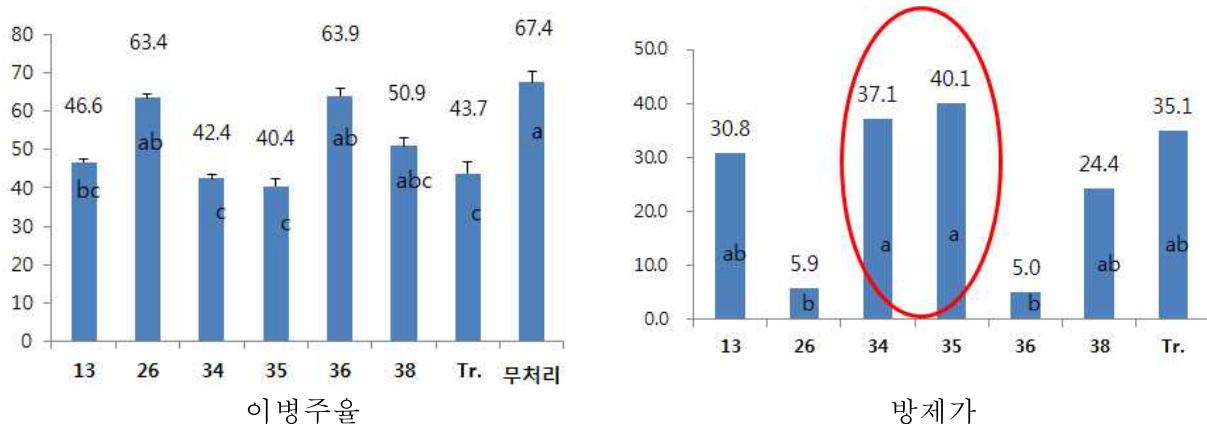


그림 4-3. 포트 검정을 통한 모잘록병 방제효과

(3) 모잘록병 포장검정을 위한 접종원 농도구명

인삼모잘록병의 포장검정을 위하여, 대부분의 인삼 포장에서 발생하는 *R. solani*의 균주를 대상으로 접종원의 최적 농도를 조사하였다. 병원균이 접종된 이병호밀을 0.5에서 10g의 농도로 접종하였을 때 인삼이 출아하면서 부터 모잘록 증상을 보이기 시작하여, 파종 후 5주 후에는 이병된 묘가 그림 4-4와 같이 포트에서 확인이 불가능 하였다. 이병호밀을 1g, 2.5g, 5g을 표면 접종하였을 경우 이병율이 40~60%로 모잘록병이 발생하였으며, 2.5g과 5g을 접종했을 때는 60%내외의 균일한 이병율을 보였다(그림 4-5). 이러한 결과를 바탕으로 포장검정을 위한 접종원의 접종 농도는 칸 당(180×90cm) 25g에서 50g 수준으로 생각된다.



그림 4-4. 접종원 농도에 따른 모잘록병 발생정도

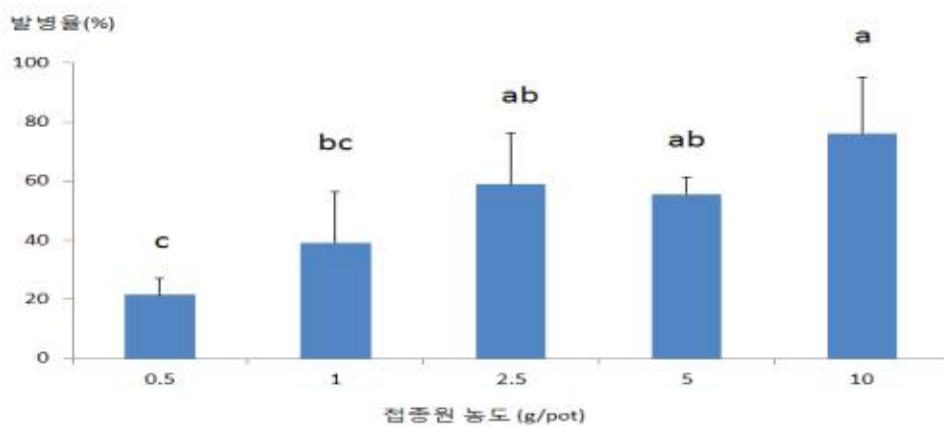


그림 4-5. 접종원 농도에 따른 모잘록병 발생율

나. 유용미생물을 이용한 포장 방제효과 검정

(1) 유용미생물 처리에 따른 관행포장 방제효과(1년차)

관행 포장에서 인삼모잘록병의 방제효과를 분석 한 결과는 표 4-1과 같다. 관행 포장에서 인삼 모잘록병의 방제효과를 조사한 결과, 사파이어를 처리한 약제 대조구에서는 76%의 방제효과를 나타냈으나, 길항균을 처리한 모든 처리구에서는 40% 내외로 확인되었다. 하지만, 무처리구의 이병주율이 1.6%로 확인되어 정확한 포장 방제효과를 확인 할 수 없었다(그림 4-6). 정확한 방제효과 분석을 위하여 무처리구에서 모잘록병 발생을 높여야 할 것으로 판단된다.

표 4-1. 유용미생물 처리에 의한 모잘록병 포장 방제 효과(DMRT 5%)

균주명	이병주율(%)	방제가
13	1.0 ^{bc}	36.9 ^b
26	1.3 ^{ab}	17.8 ^b
34	0.9 ^{bc}	43.0 ^{ab}
35	1.0 ^{abc}	34.1 ^b
36	0.9 ^{bc}	42.0 ^{ab}
38	0.9 ^{bc}	42.0 ^{ab}
약제대조구	0.4 ^c	74.9 ^a
무처리	1.6 ^a	-



그림 4-6. 길항균 처리에 의한 모잘록병 방제효과(관행재배)

(2) 유용미생물 처리에 따른 비가림하우스 포장 방제효과(1년차)

비가림하우스 포장에서 인삼 모잘록병의 방제효과를 조사한 결과 표 4-2와 같다. 무처리구에서의 모잘록병 발생율은 5.7%로 확인되었으며, *Streptomyces* 34번, 35번 처리구에서는 이병주율이 각각 2.0%와 1.3% 확인 되었으며 방제가가 65.1%와 75.9%로 확인되었다. *Bacillus* 균주 처리구에서는 26번 균주를 처리했을 때 이병주율이 2.0%로 확인되었으며 방제가는 64%로 높게 확인되었다.

모잘록병의 발생률이 파종 깊이에 따라 달라진다는 Yu 등(1990)의 보고에서처럼, 정확한 방제효과 분석을 위해서는 균일하게 병원균을 접종하는 것이 필요하며, 무처리구의 발생율을 높이는 것이 필요하다.

표 4-2. 유용미생물 처리에 의한 모잘록병 포장 방제 효과 (비가림하우스, DMRT 5%)

균주명	이병주율	방제가
13	3.6 ^b	36.4 ^c
26	2.0 ^c	64.0 ^b
34	2.0 ^c	65.1 ^b
35	1.3 ^{cd}	75.9 ^{ab}
36	2.7 ^{bc}	53.0 ^{bc}
38	2.7 ^{bc}	53.0 ^{bc}
약제대조구	0.52 ^{cd}	90.7 ^a
무처리	5.7 ^a	-

(3) 유용미생물 처리에 따른 관행포장 방제효과(2년차)

충북 음성군 소이면에 위치한 포장에서 선발한 *Bacillus* 3종(#13, M75, CC112)과 *Streptomyces* 2종(A3075, A3265)을 관주 처리한 결과, #13과 M17 처리구에서 이병율이 각각 49.7%와 60%로 조사되었다(표 4-3). 무처리구의 발생율이 61.1% 높게 확인되었으며 대조약제인 fludioxonil 분의 처리구에서 발생율이 22.2%로 확인되었다. 그림 4-7과 같이 병원균을 접종한 이병포장에서 4월 중순 이후부터 출아 후 땅에 접한 지제부가 암갈색으로 마르면서 쓰러지는 증상을 보였으며 원형으로 병이 빠르게 확산되었다(Cho 등, 2007). 본 조사에서도 병원균을 접종한 무처리구에서 병이 빠르게 퍼지는 것을 확인할 수 있었다.

표 4-3. 유용미생물 처리에 의한 모잘록병 포장 방제 효과(관행포장, DMRT 5%)

Treatment	Infection rate(%)	Control value(%)
A3075	60.7 ^a	9.6
A3265	56 ^a	16.6
#13	49.7 ^a	26.0
M75	50 ^a	25.5
CC112	55.4 ^a	17.4
약제처리구	22.2 ^b	66.9
무처리	67.1 ^a	



그림 4-7. 길항균 처리에 의한 모잘록병 방제효과(관행포장-음성)

강원도 평창군 진부면에 위치한 포장에서 방제효과를 조사한 결과는 표 4-4와 같다. 모든 처리구에서 10%내외의 방제효과를 보였으며, 약제 처리구에서도 55%내외의 낮은 방제효과를 보였다. 진부포장의 5~6월 평균 온도가 20°C내외의 서늘한 온도조건을 가지고 있어, 모잘록병원균을 접종할 경우 병이 심하게 확대되는 것으로 조사되었다. Hudelson and Parke (1995)의 보고처럼, 인삼 모잘록병은 유묘출현이 저온에서 지연되거나 토양에 습도가 높거나 온도가 낮을 때 병이 확산된다. 효과적인 방제를 위해서는 모잘록병의 생육적온이 20°C 내외이므로, 길항균을 이용하여 병 발생 전에 접종하여 토양 내에 안정적으로 정착 시켜야 할 것으로 생각된다.

표 4-4. 길항미생물 처리에 따른 인삼모잘록병 방제효과(관행포장-진부,DMRT 5%)

Treatment	Infection rate(%)	Control value(%)
A3075	46.9 ^a	-
A3265	32.2 ^{ab}	9.9
#13	33.2 ^{ab}	7.4
M75	25.4 ^{ab}	7.4
CC112	44.7 ^a	-
약제처리구	15.9 ^b	55.7
무처리	35.8 ^{ab}	-

(4) 유용미생물 처리에 따른 비가림하우스 포장 방제효과(2년차)

비가림 하우스에서 길항미생물을 처리 한 후 병 방제효과를 분석한 결과 약제 대조구에서 74.7%의 발병율이 높게 확인되었으며, 길항균 처리구에서 방제효과 10% 내외로 낮게 확인되었다(표 4-5).

표 4-5. 길항미생물 처리에 따른 인삼모잘록병 방제효과(비가림하우스, DMRT 5%)

Treatment	Infection rate(%)	Control value(%)
A3075	82.4 ^a	-
A3265	64.0 ^a	14.3
#13	67.2 ^a	10.1
M75	65.2 ^a	12.8
CC112	74.7 ^a	-
약제처리구	11.9 ^b	84.1
무처리	74.7 ^a	-

이와 같이 길항균 처리에 따른 방제효과가 낮은 이유는 인삼 종자는 12월 초에 파종 하였으나 파종 후 약 4개월 이후에 미생물을 처리하였기 때문으로 생각된다. Proctor and Lauttit (1995)의 보고처럼 종자를 가을에 파종할 경우 인삼종자가 토양 속에 존재하다가 병원균에 노출될 경우, 이듬해 봄에 모잘록 증상을 일으키는 것으로 생각된다. 따라서, 미생물제를 종자에 처리한 후 종자의 발아정도를 확인하여 사용하는 것이 모잘록병 방제에 효과적으로 생각된다. 유용미생물 처리에 따른 인삼 생육 정도를 조사한 결과 미생물 처리 구의 균중은 무처리구와 유사하거나 감소하였으며, 균장에서는 처리구별로 차이가 없는 것으로 확인되었다(표 4-6, 그림 4-8).



그림 4-8. 유용미생물 처리에 따른 인삼 뿌리 생육

표 4-6. 유용미생물 처리에 따른 인삼 생육 정도(DMRT 5%)

처리구	근중(g)	근장(cm)
A3075	0.62bc	13.4a
A3265	0.66b	13.4a
#13	0.40e	11.4b
M75	0.53d	12.9a
CC112	0.49d	12.7a
약제대조구	0.75a	13.7a
무처리	0.60c	12.8a

다. 시제품을 이용한 인삼모잘록병 방제효과 분석

(1) 시제품의 미생물의 농도확인

미생물시제품의 농도를 조사한 결과 제형의 종류와 상관없이 제오라이크와 탈크 제형에서 8 log CFU/ml 내외로 확인되었다(표 4-7). 이러한 결과를 바탕으로 인삼포장 처리할 때 물로 100배로 희석하여 사용할 경우 6 log CFU/ml 농도로 포장에 적용 가능할 것으로 판단된다.

표 4-7. 미생물 시제품의 제형별 농도

균주명	제올라이트	탈크
#13	7.8	7.7
M75	7.8	7.9
CC112	8.4	8.1

(2) 인삼모잘록병의 포장방제효과 분석(관행포장)

제올라이트를 기반으로 제조된 미생물 3종을 종자 침지 하여 추파한 후, 4월 초부터 5일 간격과 7일 간격으로 미생물을 6 log CFU/ml씩을 칸 당 10L씩 접종하였다. 그 결과 미생물체를 5일 간격으로 처리 했을 때 7일 간격보다 방제 효과가 높았다(표 4-8). 무처리구와 3종의 미생물 처리구를 비교했을 때 처리간격에 상관없이 #13번 균주를 처리했을 때 다른 처리구보다 이병주율이 낮았으나 처리 간에 유의적인 차이는 확인되지 않았다. 대조구인 Fludioxonil 처리구의 방제가가 78.9%와 73.5%의 감안했을 때 미생물제제의 방제효과는 비교적 높은 것으로 판단된다. Rahman 와 Punja(2007) 는 화기삼(*Panax quinquefolius*)을 대상으로 Prestop (*Glocladium catenulatum* J1446) 의 종자 침지 및 관주처리에 의해 모잘록병이 50% 내외로 감소한다고 보고한 바 있다. 국내에서 Jo 등(2014)은 미국 AgraQuest사에 개발한 Serenade (*Bacillus subtilis* QST 713) 을 처리하여 고추와 오이에서 모잘록병의 방제효과를 분석하였다. Serenade를 9배 희석하여 처리하였을 때 고추와 오이에서 *Rhizoctonia solani*에 의한 모잘록병과 오이에서 *Pythium*에 의한 모잘록병에 50% 내외의 방제효과를 확인하였다. 따라서 종자침지 등의 처리방법 및 조건 등을 통해 낮은 방제효과를 높일 수 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다.

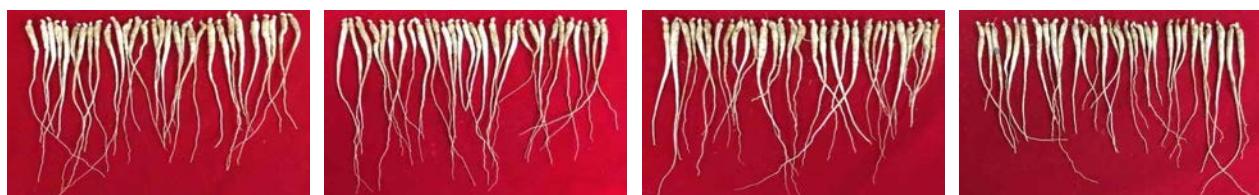
표 4-8. 미생물 시제품 처리간격에 따른 인삼질록병 포장방제 효과(관행재배, DMRT 5%)

처리	처리간격			
	5일		7일	
	이병주율(%)	방제가(%)	이병주율(%)	방제가(%)
#13	26.1a	36.1	27.6a	34.8
CC112	31.7a	22.3	35.6a	15.8
M75	28.5a	30.2	35.7a	15.7
약제대조구	8.6b	78.9	11.2b	73.5
무처리	40.8a	-	42.4a	

미생물 시제품 3종 처리에 따른 생육촉진 효과를 분석한 결과, 5일 간격으로 처리 했을 때 M75 처리구에서, 7일 간격으로 처리 했을 때는 #13번 균주에서 균중을 유의적으로 촉진하는 것으로 확인되었다(표 4-9, 그림 4-9).

표 4-9. 미생물 시제품 처리에 따른 인삼생육촉진 효과(DMRT 5%)

처리	5일 간격			7일 간격		
	근중(g)	근장(mm)	근경(mm)	근중(g)	근장(mm)	근경(mm)
#13	0.33b	10.3ab	3.92bc	0.37a	11.5a	3.98a
CC112	0.32b	10.7ab	3.65d	0.32b	10.7b	3.91ab
M75	0.37a	10.6ab	3.99bc	0.27c	10.2bc	3.76bc
약제대조구	0.38a	9.8b	4.16a	0.33b	10.7b	3.84ab
무처리	0.32b	9.8b	3.81c	0.32b	9.8c	3.80b



M75균주 5일 간격 처리

#13 균주 7일 간격 처리

약제 대조구

무처리구

그림 4-9. 미생물 시제품 처리에 따른 인삼생육 촉진

(3) 인삼모잘록병의 포장방제효과 분석(비가림 하우스)

탈크와 제올나이트 제형으로 제조된 미생물 3종의 시제품을 대상으로 모잘록병의 방제효과를 분석한 결과는 표 4-10과 같다. 탈크 제형의 경우 CC112 균주가 46.8%로 무처리와 비교하여 유의적인 방제효과를 갖는 것으로 확인되었으며, 제올나이트 제형의 경우 M75균주가 45.9%의 방제효과를 보여 무처리와 비교적 높은 방제효과를 나타내었다(그림 4-10). *Bacillus velezensis*는 iturin, surfactin과 같은 항생물질 등을 생성하고 IAA와 siderophore 등을 생성하는 것으로 알려져 있어 작물의 생물적 방제에 활용 가능한 것으로 보고되었다(Ait Kaki et al, 2013; Cawoy et al, 2011). 유용미생물을 이용

하여 식물병을 효과적으로 방제하기 위해서는 미생물을 인삼 균권 및 뿌리표면에 안정적으로 정착시키는 것이 필요하다. 또한 미생물 균주별로 적합한 제형을 선발하여 식물병의 방제효과를 높이는 것이 중요하다(Yáñez-Mendizábal et al, 2012; Bashan et al, 2014). 방제효과 증진을 위해서 약효지속성 여부 및 균주의 인삼 균권 및 토양내 안정적인 청작 연구가 추가적으로 보완 된다면 향후 인삼모잘록병의 방제를 위해서 농가에서 활용 가능할 것으로 판단된다.

표 4-10. 미생물 시제품 제형별 인삼모잘록병 포장방제 효과(DMRT 5%)

처리	탈크		제올나이트	
	이 병률(%)	방제가(%)	이 병률(%)	방제가(%)
#13	32.2ab	32.4	43.0a	17.2
CC112	25.3bc	46.8	40.4a	22.1
M75	30.2ab	36.7	28.1ab	45.9
약제대조구	11.8c	75.2	6.9b	86.8
무처리	47.7a		51.9a	-

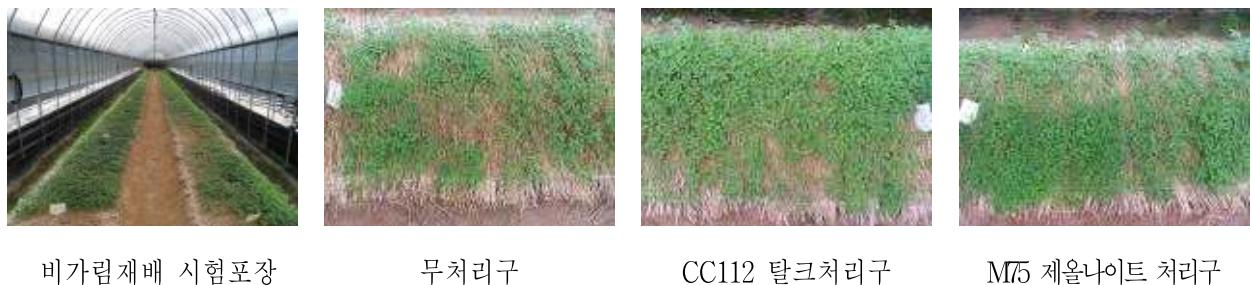


그림 4-10. 미생물 시제품 처리에 따른 모잘록병 발생

탈크 제형을 처리했을 때 CC112균주가 균중, 균장, 균경을 모두 유의적으로 증가시켰으며, 제올나이트 제형에서는 M75균주가 무처리 대비 생육촉진효과가 확인되었다(표 4-11, 그림 4-11). Bak 등(2010)은 인삼근권 토양으로부터 식물생장촉진세균을 분리하여 작물에 활용가능성을 검토한 바 있다. Eum 등(2014)은 인삼 종자로부터 내생균을 분리하여 질소고정능, 인산가용능 및 IAA 생성능 등 생물비료활성을 평가하였다. *Bacillus velezensis* 는 protease, cellulase, xylase 등 세포벽분해 효소를 생성하고 IAA와 불용성 인산 등을 가용하여 생물비료로 활용가능 것으로 보고되었다(Hong et al, 2012). 인삼은 인삼산업법에 적용을 받아 질소, 인산, 가리를 제 1원소로 하는 화학비료를 사용할 수 없기 때문에, 옥신 및 siderophore를 생성하는 PGPR균 등을 처리하는 것도 인삼 재배에 도움이 될 것으로 생각된다.

표 4-11. 미생물 시제품 처리에 따른 인삼 생육촉진 효과(DMRT 5%)

처리	탈크			제올나이트		
	근중(g)	근장(mm)	근경(mm)	근중(g)	근장(mm)	근경(mm)
#13	0.59a	11.81bc	4.02b	0.50a	12.52a	3.44b
CC112	0.67a	12.76a	4.29a	0.37b	11.38b	3.35b
M75	0.40b	12.21c	3.54d	0.53a	12.37a	3.69a
약제대조구	0.47b	11.43c	3.79c	0.34b	11.41b	3.32bc
무처리	0.43b	12.40ab	3.71cd	0.32b	12.21b	3.15c

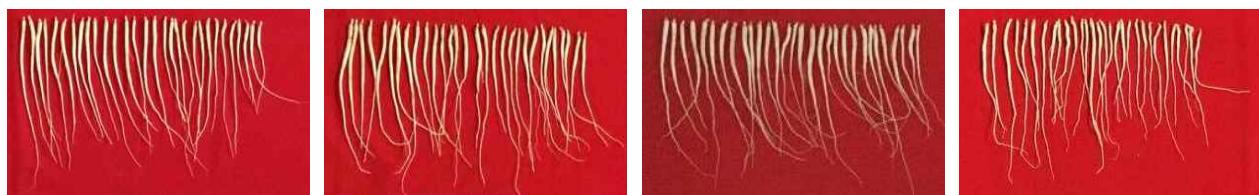


그림 4-11. 미생물 시제품 처리에 따른 인삼생육 촉진

(4) 미생물제의 방제효과 증진을 위한 친환경자재의 탐색

인삼모잘록병의 방제효과를 높이기 위한 모잘록병원균에 항균 활성이 있는 식물체를 선발하였다. 70% 에탄올로 정향과 육계를 추출하고 PDA배지에 10, 100, 1000ppm의 농도로 첨가한 후 모잘록병원균 *Rhizoctonia solani*를 접종하고 균사 생육억제 정도를 조사하였다. 그 결과 정향과 육계 모두 1000ppm이 농도로 첨가하였을 때 병원균의 균사 생육을 유의적으로 억제 하였으며, 특히 정향 추출물에서 균사 생육 억제 효과가 우수하였다(그림 4-12). *Bacillus velezensis* 균주 3종의 배양액을 LB Agar배지에 0.1% 접종 하고, 정향과 육계추출물을 30ul씩을 페이퍼 디스크에 접종 한 후 미생물의 생육억제 정도를 확인 한 결과 정향과 육계추출물 모두 1,000ppm이 농도에서 미생물의 생육이 저해 되는 것으로 확인 되었다(표 4-12). 본 연구결과에서 정향과 식물추출물은 미생물과 혼용 처리했을 경우에는 길항균의 생육도 저해하기 때문에 혼용처리는 어려운 것으로 확인 되었다. 하지만, 인삼 포장에서 모잘록병원균의 생육이 억제 되는 6월 이후에는 인삼에 발생하는 지상부 병해의 방제에 활용 가능한 것으로 판단되며, 정향 추출물을 1,000ppm의 농도로 희석하여 인삼에 살포할 경우 잿빛곰팡이와 탄저병 등을 효과적으로 방제 할 수 있었으며 방제효과는 60% 내외로 확인되었다.

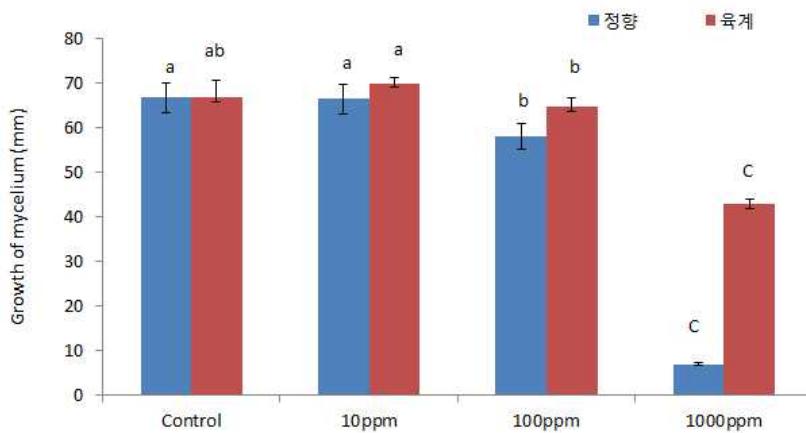


그림 4-12. 정향과 육계추출물에 의한 *Rhizoctonia solani*의 균사생육 정도

표 4-12. 식물추출물에 대한 *Bacillus velezensis* 균주의 생육저해 정도

균주명	육계추출물 농도(ppm)			정향추출물 (ppm)			무처리
	10	100	1,000	10	100	1,000	
#13	-	+	++	-	+	++	-
M75	-	+	+++	-	+	++	-
CC112	-	+	++	-	-	++	-

※ 생육억제 정도 : +++: 심함, ++보통, + 적음, - 없음

제5절 인삼잘록병 방제 미생물의 특성 분석 및 토양환경 영향 평가

1. 재료 및 방법

가. 인삼잘록병 방제 미생물의 특성분석(1차년도, 2015년)

(1) 공시균주 : 인삼잘록병 방제를 위한 선발균

(2) 주요조사 항목

(가) 선발균의 분류, 동정 및 생화학적인 특성 분석

(나) 선발균의 유용 유전자 분석

(3) 실험방법

(가) 선발균의 분류 동정 : 16S rRNA gene 이용

(나) 선발균의 생리활성 분석

- ① 탄소동화능, 효소활성(chitinase, cellulase, phosphate solubilization)

(다) 선발균의 유용 유전자 분석 : NGS를 이용한 선발균의 유전체 분석

- ① 유전체 초안 작성(해독, 주석) 및 유전체 비교 분석
- ② 유전체 구조 및 특성
- ③ 길항관련 유전자 동정

나. 선발균 사용에 따른 토양환경 영향 평가(2016)

(1) 공시균주

(가) 유용 미생물 : 인삼잘록병 방제를 위한 선발균

(나) 인삼잘록병균 : *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*

(2) 주요조사 항목

(가) 유용미생물 처리 인삼 포장 내 미생물 분포 조사 및 군집구조 분석

(3) 실험방법

(가) 처리된 선발균과 토양내 인삼 잘록병균의 밀도 분석 : qPCR

- ① 유용균 및 잘록병원균 검출을 위한 특이 프라이머 선정 또는 제작
- ② 잘록병균을 정량하기 위한 프라이머 선정
- ③ qPCR Master Mix를 이용한 PCR 및 유전자 정량 및 표준 곡선 작성
- ④ 유용균과 잘록병균의 정량분석

(나) 선발균 처리에 따른 포장의 미생물 분포 변동 분석 : pyrosequencing

- ① Mothur를 이용한 염기서열 정리 및 분류와 군집분석
- ② Heatmap을 이용한 우점 OTU간의 분석
- ③ Venn diagram을 이용한 주요 OTU 분석

2. 결과

가. 인삼잘록병 방제 미생물의 특성분석(1차년도, 2015년)

(1) 인삼잘록병 방제를 위한 균주 분리 및 선발

작물 생육 촉진 및 병 방제에 활용할 수 있는 세균을 분리하기 위해 폐면배지, 인삼재 배 토양과 토마토 시설 재배지 등의 다양한 분리원에서 시료를 채취하였다. 토양시료의 경우 약 1 cm의 표토를 제거한 후 오거(auger)를 이용하여 15 cm 깊이까지 채취하였다. 각 시료 0.1~1 g을 9 ml의 멸균수에 혼탁하여 R2A 배지에 혼탁액 0.1 ml를 도말한 후 28 °C 항온기에서 약 3일간 배양하였다. R2A배지의 조성은 Yeast extract 0.5 g, Proteose peptone 0.5 g, Casamino acids 0.5 g, Glucose 0.5 g, Soluble starch 0.5 g, Na-pyruvate 0.3 g, K₂HPO₄ 0.3 g, MgSO₄·7H₂O 0.05 g, Agar 15 g, Distilled water 1,000 mL이며 pH 7.0으로 조절하였다. 다양한 세균을 분리하기 위해 무작위로 다른 형태를 띠거나 색깔을 보이는 집락을 순수분리 하였다.

(2) 선발균의 분류 및 동정

인삼잘록병 방제 미생물 균주의 동정을 위해 16S rRNA 유전자를 이용하여 염기서열을 분석하였다(Wang et al., 2007). 선발 균주는 R2A broth에 접종하여 28 °C에서 24시간 이상 배양한 후 원심분리하여 균체를 수확하였다. QIAamp DNA mini kit (Qiagen, USA)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. 16S rRNA 유전자는 범용 프라이머인 27F와 1492R을 사용하여 PCR한 후 유전자의 증폭산물을 얻었다(Yamamoto and Harayama, 1995; Song et al., 2004; Kim et al., 2016). 16S rRNA 유전자의 염기서열 분석은 3개의 프라이머(800R, 518F, 984F)를 이용하였으며 제노텍(대전, 한국)에 의뢰하여 분석결과를 얻었다. 얻어진 염기서열은 Seqman (DNASTAR, USA)을 이용하여 직접 오류를 검정하고 연결하였다. 각 유전자의 비교분석을 위해서 16S rRNA 유전자의 염기서열은 EzTaxon-e 서버를 통해서 얻었다. 계통도의 작성은 위해 MEGA 5.0 프로그램의 Clustal W 프로그램으로 염기서열을 정렬하였으며, Neighbor-joining 알고리즘을 사용하고 1,000회 반복 bootstrapping을 통해 계통도의 신뢰성을 확보하였다(Tamura et al., 2011).

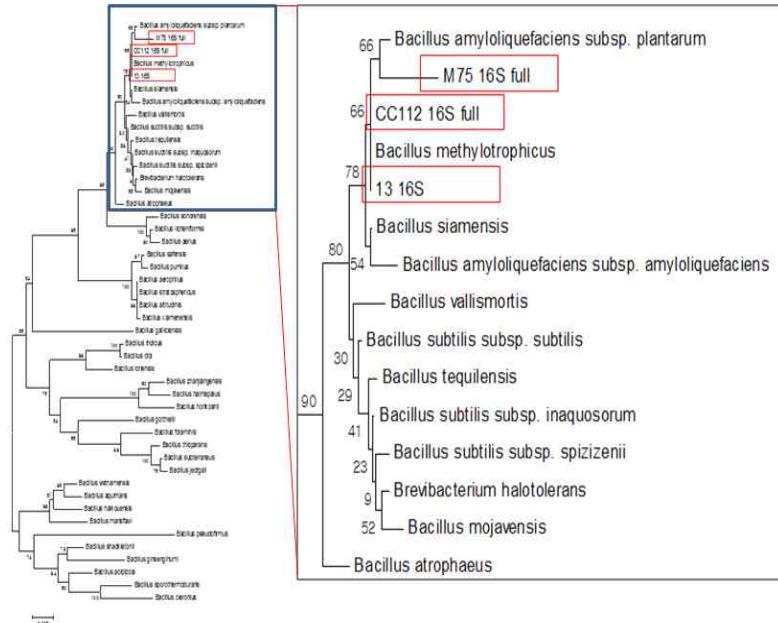


그림 5-1. 16S rRNA 유전자를 이용한 선발균(M75, CC112, B13)의 계통유전학적인 분석.

인삼찰록병 방제를 위하여 총 4개의 유용균을 선발하였다 (M75, CC112, B13, A03-75). 16S rRNA 유전자를 활용하여 선발균을 분류 및 동정한 결과, 선발된 세균중 M75, CC112, B13 균주는 모두 *Bacillus methylotrophicus*로 동정되었다(그림 5-1). 최근에 *B. methylotrophicus*는 *B. velezensis*로 재분류되어(Dunlap et al., 2016), 세 선발균주는 모두 *B. velezensis*로 재확인되었다. 선발된 세균(A03-75)은 방선균으로서 *Streptomyces antimycoticus*와 가까운 것으로 동정되었다(그림 5-2). 인삼 방제 미생물 제재로서 균주 활성 및 제재화 용이성을 고려하여 *Bacillus* 균주를 대표균주로 선발하여 추가적인 연구를 수행하였다.

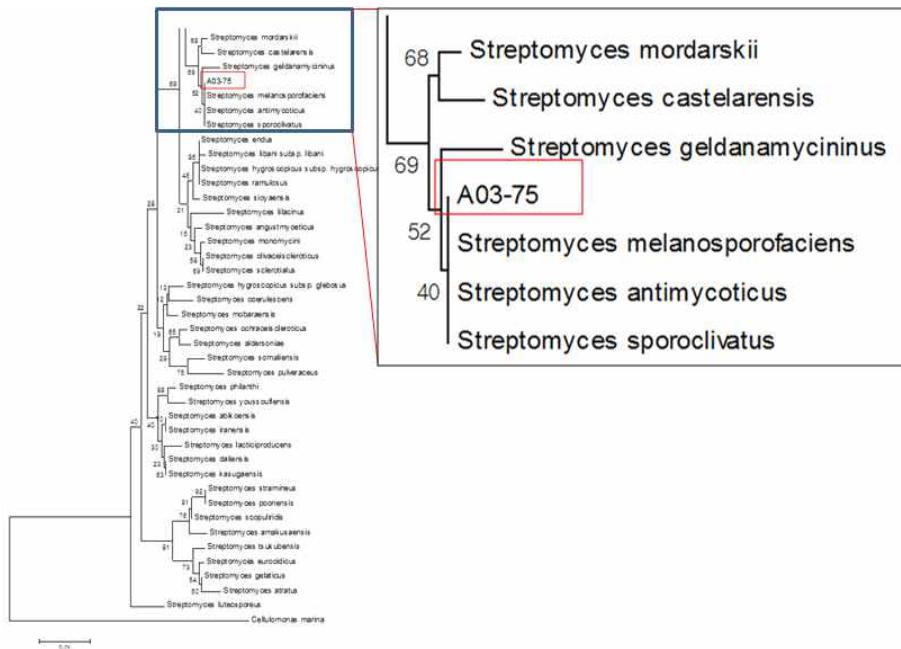


그림 5-2. 16S rRNA 유전자를 이용한 선발균(A03-75)의 계통유전학적인 분석.

(3) 선발균의 생리활성(효소활성) 분석

(가) 효소 활성 및 특성 분석

선발 균주가 분비하는 효소의 특성 분석 및 생리학적 특성은 API kit (API ZYM, Biomérieux, Marcy-L'Etoile, France)를 사용하여 관찰하였다며, 제조사의 방법에 따라 분석을 수행하였다(그림 5-3). 세 균주의 효소활성은 각각 달랐으나 모든 균주가 esterase, esterase lipase, acid phosphatase와 α -glucosidase 활성을 동시에 나타내었으며, CC112에서 Leucine arylamide, Valine arylamidase, Trypsin, α -chymotrypsin, β -glucosidase 활성을 포함하여 가장 다양한 효소활성을 나타내었다.

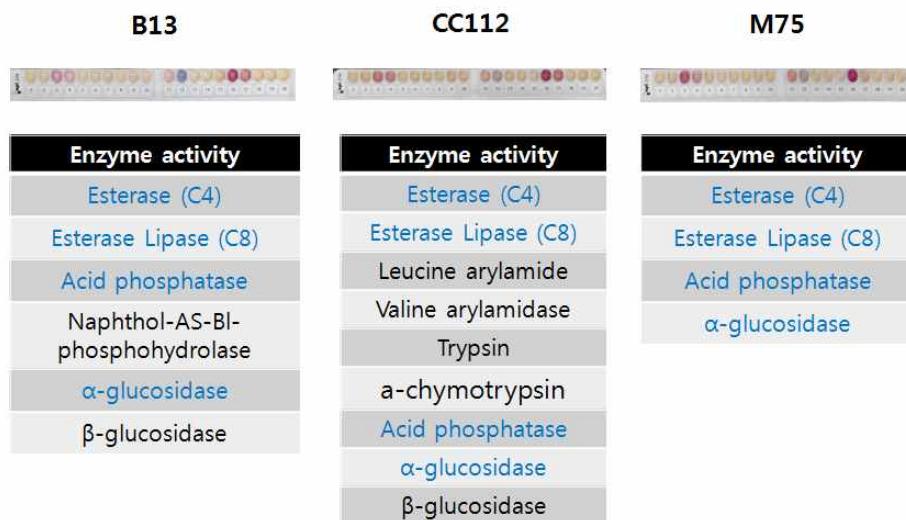


그림 5-3. API kit를 이용한 선발균의 효소활성 검정.

(나) Cellulase 및 xylanase 활성 분석

Cellulase와 xylanase 분비능은 R2A agar에 각각 0.4% carboxymethyl cellulose와 0.4% xylan을 기질로 첨가하여 제조하였다. 이에 분리 균주(O.D₆₀₀ 1.0)를 접종하여 28 °C에서 18 h 배양한 후, 0.1% congo red로 30 min 염색하고 1 M NaCl 용액으로 세척하여 clear zone을 관찰하였다. Cellulase 및 Xylanase 활성 검정한 결과 모든 균주에서 cellulose와 xylanase 활성을 보였다(그림 5-4). *Bacillus* 속의 미생물들은 체외분비효소인 cellulase, xylanase, lactase 등을 분비하여 난분해성 물질을 분해하고 이를 탄소원으로 이용할 수 있는 것으로 알려져 있으며(Kim et al., 1995; Kim et al., 2004; Lee and Choi, 2006), 선발균주 모두 관련 기능을 보유하고 있는 것으로 조사되었다.

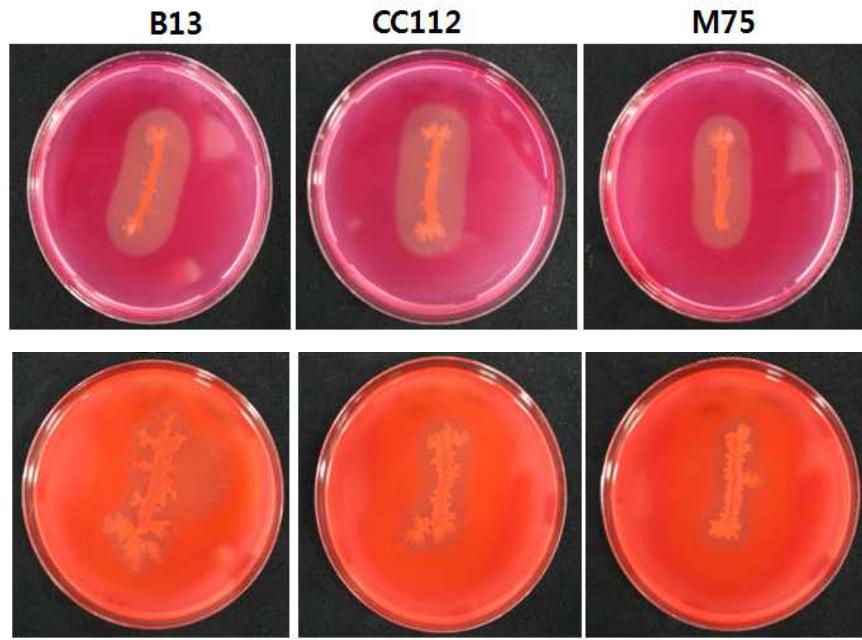


그림 5-4. Cellulose와 xylan을 이용한 유용균의 분해효소 활성 검정.

(다) Protease 활성

Protease 분비능은 R2A agar에 1% skim milk, lipase 측정배지에는 R2A agar에 1% tri-butyrin을 첨가하여 제조하였다. 효소활성 측정은 선택배지에 96 pin replicator로 접종하여 high-throughput 방법으로 1차 스크리닝 한 후, 선발된 단일 균주에 대해 확정 실험을 실시하였다. 선발된 *Bacillus* 세 균주(B13, CC112, M75) 모두 단백질 분해 활성을 보였다(그림 5-5).

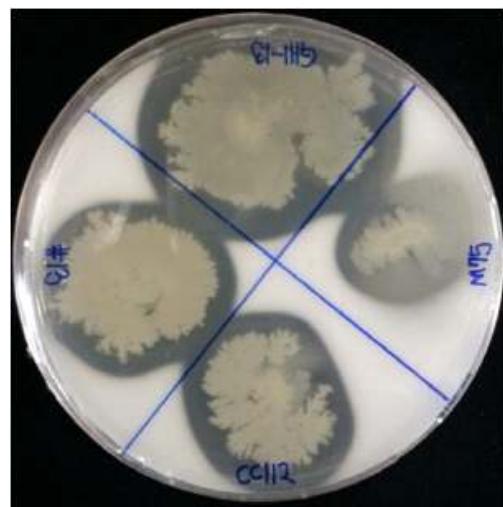


그림 5-5. Skim milk를 이용한 유용균의 분해효소 활성 검정.

(라) 인산가용화 활성 검정

인산 가용능 활성 검정을 위해 Pikovskaya's agar 배지 (Pikovskaya, 1948)에 난용성 인산염인 TCP (tricalcium phosphate)를 0.5% 첨가한 배지에서 clear zone 형성 유무를 관찰하였으나, 세 선발균주에서 인산 가용화능은 관찰되지 않았다.

(4) 선발균의 유용 유전자 분석

선발 균주의 인삼잘록병 방제 관련 유용유전자 탐색을 위해 세 균주 B13, CC112, M75 를 tryptic soy broth (TSB)에 접종하여 약 24시간 배양(약 1×10^9 cfu/ml)한 후 균체를 13,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 버린 후 균체만을 수확하였다. 수확한 균체는 동결한 후 (주)천랩(Chunlab, Seoul)에 의뢰하여 whole genome sequencing 유전체 분석을 실시하였다. 유전체 분석은 그림 x과 같은 분석체계를 통하여 유전자 분석을 수행하였다. Pacific Biosciences (PacBio) RSII Single Molecule Real Time sequencing 기법 및 20-kb SMRTbellTM template library를 활용하여 유전체 분석을 실시하였으며, 분석 후 SMRT Analysis 2.3.0 및 CLC genomics workbench 7.5.1 (CLCbio) 프로그램을 활용하여 원형 chromosome으로 assemble을 실시하였다(그림 5-6). 분석한 유전자는 (주)천랩의 자체 pipeline과 NCBI Prokaryotic Genomes Automatic Annotation Pipeline (PGAAP)을 참고하여 유전자 주석(gene annotation)을 실시하였다. 추가적으로 이차대사 산물 생합성과 관련된 non-ribosomal peptide synthetase(NRPS)와 polyketide synthase (PKS) 유전자는 antiSMASH3.0을 활용하여 분석하였다(Weber et al., 2015).

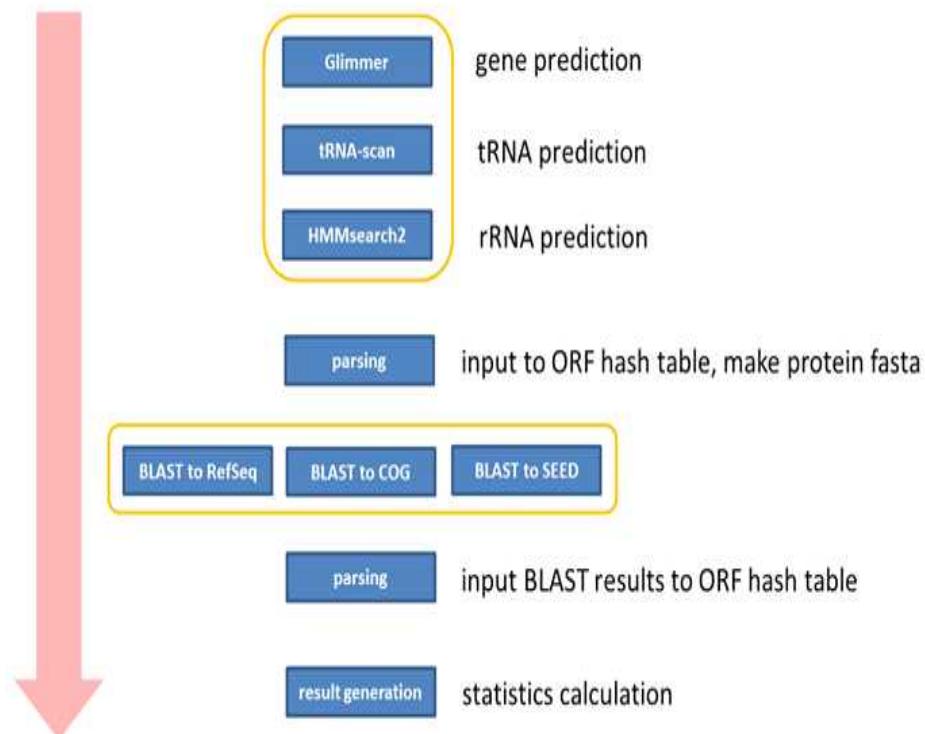


그림 5-6. 유전체 염기서열로부터 유전자 주석(annotation)을 위한 분석 체계.

유전체 분석 결과 세 선발균주의 크기는 3,920,763~4,007,450 bp(평균 3,948,360 bp)로 조사되었으며, 세 균주 중에서 M75균주가 가장 큰 유전체 크기를 지니고 있는 것으로 조사되었다(표 5-1, 그림 5-7). 전체 유전자 수는 3,848~3,985개(평균 3,924개)로 조사되었으며, 유전체 크기가 커진 M75 균주에서 가장 높게 나타났다. 전체 유전자 중 단백질을 암호화하는 DNA 염기서열인 Protein-coding genes (CDSs)의 경우도 동일한 경향을 나타내었다. G+C 함량은 세 균주에서 46.45~46.6%로 나타났으나 큰 차이를 보이지 않았으며, rRNA 및 tRNA 유전자 수는 동일한 것으로 조사되었다. 선발중인 세 균주의 유전체를 PacBio를 이용하여 균주 모두 유전체 전장을 분석하였다. 특히 B13균주의 경우 다른 균주보다 작은 chromosome을 가졌으나 다른 균주에 없는 plasmid를 보유한 것으로 분석되었다. 일반적으로 *Bacillus* spp. strains에서 드물게 플라스미드를 보유하고 있는 것으로 보고되고 있으며(Cawoy et al., 2015), plasmid가 항생물질 및 균주의 생장속도 등에도 다양하게 영향을 미칠 수 있는 것으로 보고되고 있어(Molinatto et al., 2017), plasmid의 기능 및 인삼잘록병 방제능에 대한 상관관계 등이 추가적인 연구를 통해 밝혀져야 할 것으로 본다.

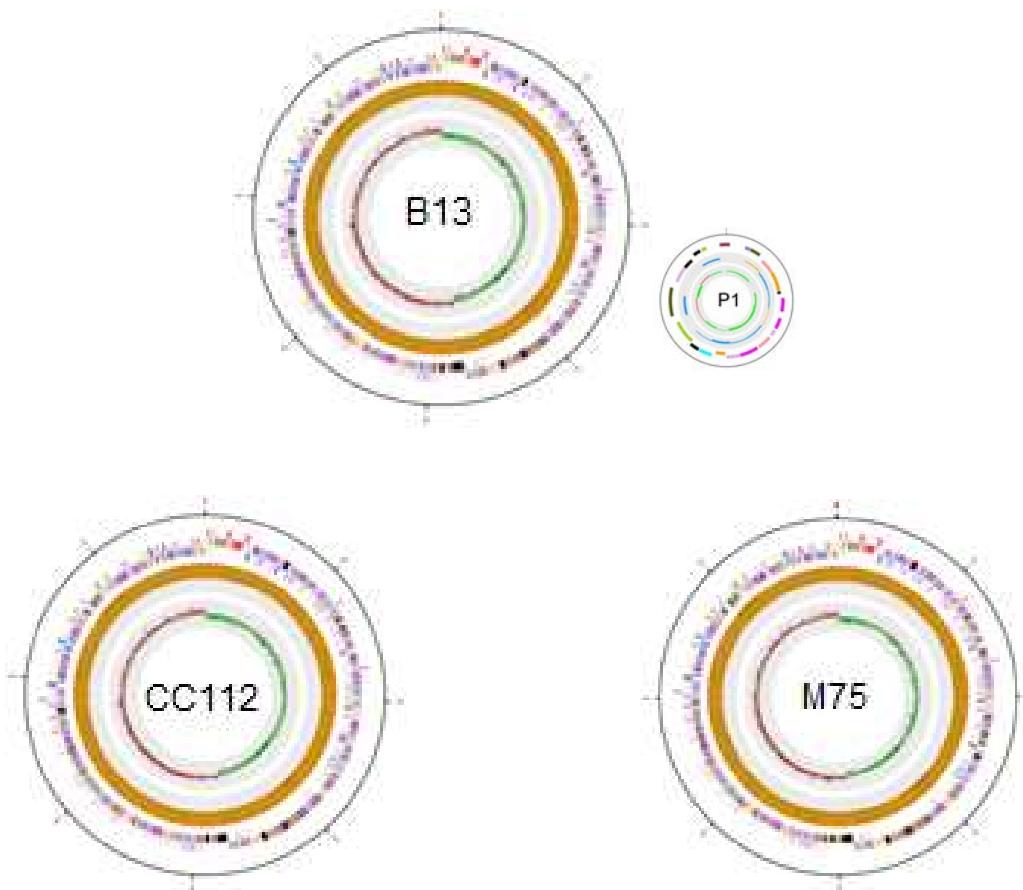


그림 5-7. 유용 선발균의 유전체 지도(circular map).

표 5-1. Cluster of orthologous groups(COGs)를 이용한 유전자 해독 및 수

Strains	Genomic features						
	Genome size (bp)	Number of G+C contig	contents (%)	Total number of genes	Protein-coding genes (CDSs)	rRNA genes	tRNA genes
B13	3,920,763	2	46.45	3,940	3,827	27	86
CC112	3,916,868	1	46.46	3,848	3,735	27	86
M75	4,007,450	1	46.60	3,985	3,872	27	86

COG 분석에 의해 선발 균주 전체에서 잘록병의 방제와 관련될 것으로 추정되는 이차 대사산물의 생합성과 관련된 유전자를 84~96개가 확인되었으며, M75균주에서 다소 높은 것으로 확인되었다(표 5-2). 그러나 이차대사산물 관련 유전자 수와 실질적인 인삼잘록병의 방제 효과와는 직접적인 상관관계 뚜렷하지 않은 것으로 분석되었다. 유전자의 존재와 병 방제 능력에 대한 연계성에 대해서는 유전자 발현정도와 환경요인과 큰 관련이 있을 것으로 판단하였다. 특히 이차대사산물 생합성 관련 유전자를 보다 정밀하게 조사해야 할 필요성이 있어 추후 antiSMASH와 같은 프로그램을 활용해서 추가적인 조사 를 수행하였다.

표 5-2. Cluster of orthologous groups(COGs)를 이용한 유전자 해독 및 수

COG	Description	B13		CC112		M75	
		No. of Genes	RP (%)	No. of Genes	RP (%)	No. of Genes	RP* (%)
J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	162	4.6	159	4.6	160	4.6
K	Transcription	267	7.6	262	7.6	270	7.8
L	Replication, recombination and repair	142	4.0	138	4.0	141	4.1
D	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	36	1.0	36	1.1	36	1.0
O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	109	3.1	102	3.0	101	2.9
M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	200	5.7	195	5.7	203	5.8
N	Cell motility	42	1.2	42	1.2	42	1.2
P	Inorganic ion transport and metabolism	196	5.6	188	5.5	183	5.3
T	Signal transduction mechanisms	147	4.2	143	4.2	136	3.9
C	Energy production and conversion	185	5.3	181	5.3	177	5.1
G	Carbohydrate transport and metabolism	245	7.0	244	7.1	236	6.8
E	Amino acid transport and metabolism	304	8.6	291	8.5	297	8.5
F	Nucleotide transport and metabolism	82	2.3	80	2.3	86	2.5
H	Coenzyme transport and metabolism	113	3.2	111	3.2	109	3.1
I	Lipid transport and metabolism	115	3.3	109	3.2	104	3.0
Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	96	2.7	87	2.5	84	2.4
S	Function unknown	1081	31	1072	31	1112	32
Total		3,522	100	3,440	100	3,477	100

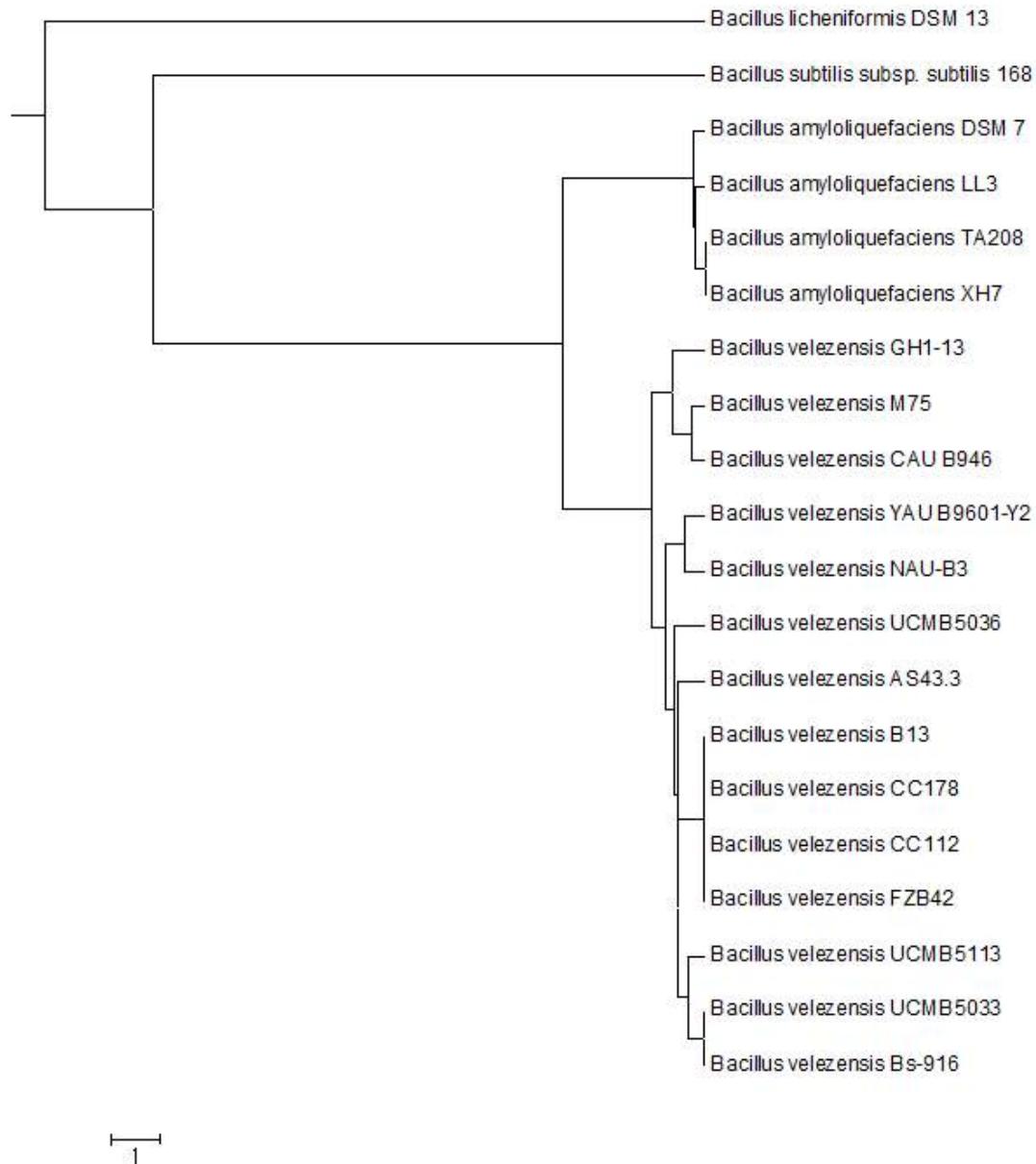


그림 5-8. Average Nucleotide Identity (ANI)를 이용한 선발균주의 계통학적 분류.

유전체 분석 결과를 활용하여 ANI 분석을 수행한 결과 선발 균주는 모두 16S rRNA 유전자를 활용한 동정결과와 동일한 *Bacillus velezensis* 인 것으로 판명되었다(그림 5-8). M75 균주의 경우 *B. velezensis* CAU B946 균주와 계통학적으로 가까운 것으로 확인되었으며, B13 및 CC112 균주는 생물학적 방제에 탁월한 효과가 있는 것으로 보고된 *B. velezensis* FZB42 균주(Chowdhury et al., 2015)와도 계통학적으로도 매우 가까운 근연종이어서 방제효과 또한 뛰어날 것으로 판단하였다.

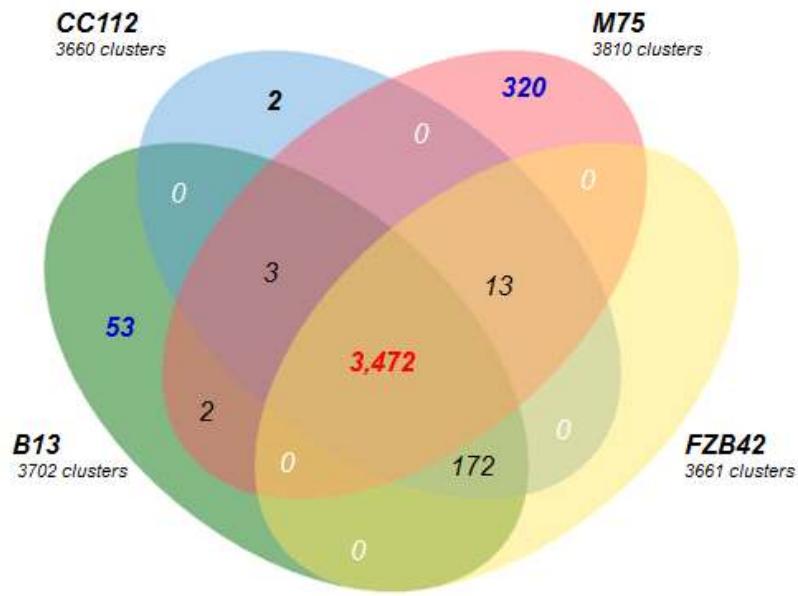


그림 5-9. Gene clustering 분석을 활용한 선발균주 공유 및 특이 유전자 탐색.

표 5-3. 이차 대사산물 생합성 유전자 군 추정 결과

Metabolite	Genes and gene cluster	Strains (genetic similarity)		
		B13	CC112	M75
Sfp-dependent NRS of lipopeptides				
Bacillibactin	<i>dhbABCDEF</i>	+(100%)	+(100%)	+(100%)
Fengycin	<i>femABCDE</i>	+(100%)	+(100%)	+(100%)
Locillomycin	<i>locABCD</i>	+(14%)	-	-
Surfactin	<i>srfABCD</i>	+(91%)	+(91%)	+(82%)
Sfp-dependent NRS of polyketides				
Bacillaene	<i>baeBCDE, acpK, baeGHIJLMNRS</i>	+(100%)	+(100%)	+(100%)
Difficidin	<i>dfnAYXBCDEFGHIJKLM</i>	+(100%)	+(100%)	+(100%)
Macrolactin	<i>mlnABCDEFGHI</i>	-	+(100%)	+(100%)
Sfp-independent NRS				
Bacilysin	<i>bacABCDE, ywfG</i>	+(100%)	+(100%)	+(100%)
Microcin-Thiopeptide-Lantipeptide				
Kijanimicin	<i>kijBDS</i>	-	-	+(4%)

선발균주와 *B. velezensis* FZB42 균주의 유전체를 비교한 결과 3,472개 유전자를 서로 공유하고 있으며 선발균주 별로 특이적으로 보유하고 있는 유전자수는 큰 차이를 나타내었다(그림 5-9). 특히 M75균주는 320개의 유전자를 더 보유하고 있었으며, B13 균주의 경우 53개의 유전자를 더 보유하고 있는 것으로 확인하였다. 이는 균주별로 유전체의 크기에 따라 그 수가 차이가 났을 가능성이 높은 것으로 분석하였다. 균주 간 보유하고 있는 유전체 특성 차이로 인해 이차대사산물의 생합성과 관련된 기능의 차이가 있을 것으로 판단되며, 인삼잘록병 방제 활성에 미치는 영향 또한 다르게 나타날 수 있을 것으로 평가하였다.

세 선발 균주 이차대사산물 생합성 관련 추정 유전자 분석 결과(표 5-3), 전체에서 다양한 NRPS(Non-ribosomal peptide synthetases)에 의해서 합성된 lipopeptides 계열인 Bacillibactin, Bacilysin, Fengycin, Surfactin과 PKS(polyketides)에 의한 Bacillaene, Difficidin 생합성과 관련된 유전자가 검출이 되어 충분한 항균 및 항진균 활성이 있는 것으로 판단되며(Borriiss, 2013), 따라서 선발균주는 인삼잘록병 방제를 위한 미생물로서 잠재성이 높을 것으로 평가하였다.

16S rRNA gene 을 이용한 선발균 분류 동정 결과 인삼잘록병 방제를 위한 선발균의 분류 및 동정 결과, 선발된 세 균주(B13, CC112, M75)는 모두 *Bacillus velezensis*로 동정되었다.

선발균의 생리활성을 분석한 결과 Esterase, esterase lipase, acid phosphatase, α-glucosidase, cellulase, xylanase, protease 등의 활성이 있는 것으로 확인되었다.

NGS를 이용한 선발균 유용 유전자 분석 결과 선발된 균주 전체에서 인삼잘록병 방제와 관련 있을 것으로 추정되는 이차대사물질 생합성 관련 유전자(Bacillaene, Bacillibactin, Bacilysin, Difficidin, Fengycin, Surfactin)가 검출되었다.

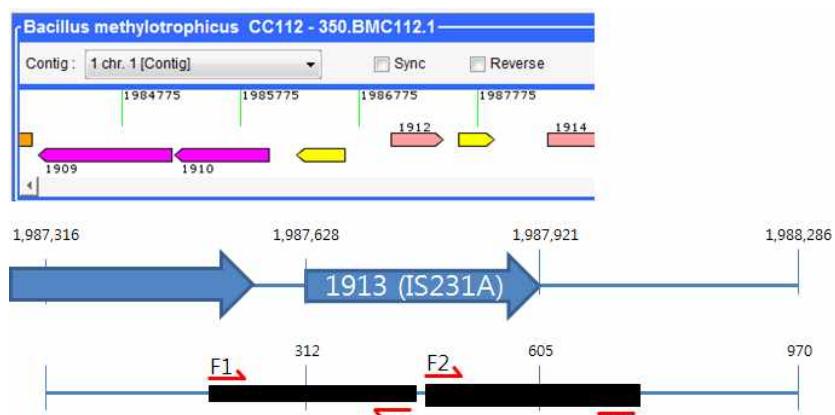
1차년도 선발된 균주는 인삼잘록병 방제를 위한 미생물 제제로서 충분한 잠재능을 지니는 것으로 평가되었으며, 현장에서 균주 처리 후 유용균/병원균 밀도 변화 및 토양 미생물 군집 특성 변화를 평가하기 위한 연구를 2차년도에 중점적으로 수행하였다.

나. 선발균 사용에 따른 토양환경 영향 평가(2016)

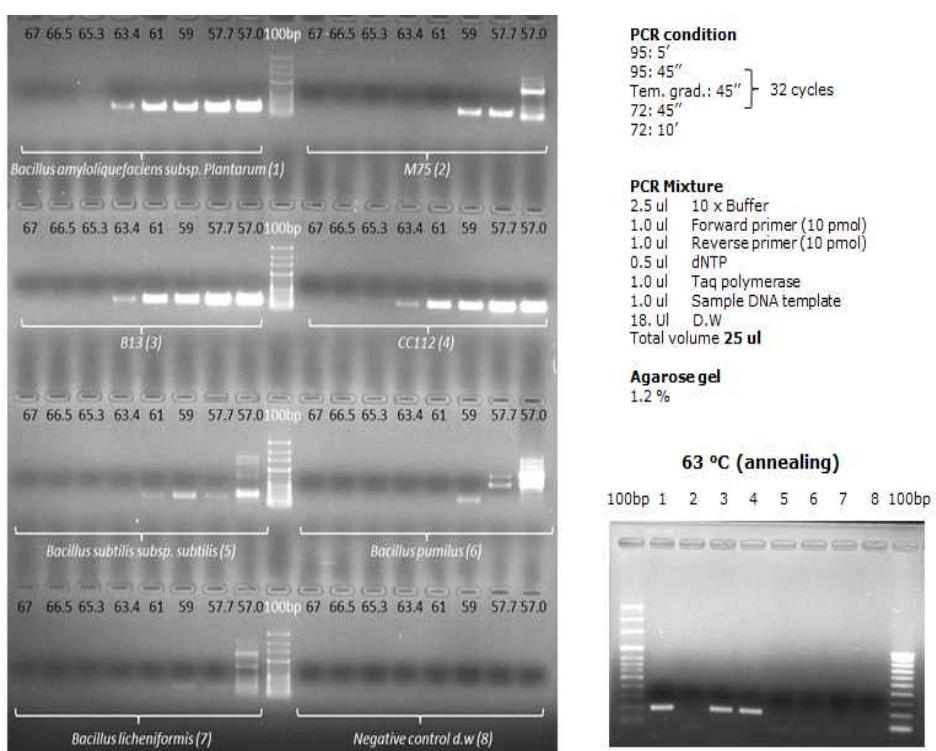
(1) 선발균과 토양 내 인삼 잘록병균의 밀도 분석

(가) 선발균의 검출을 위한 특이 프라이머 선정 및 제작

선발균주의 검출을 위한 특이 프라이머 선정 및 제작을 위해 세 선발균주 중 CC112 균주를 인삼잘록병 방제효과 및 제재화를 위한 미생물 밀도 등을 과제 수행 전반적으로 고려하여 최적의 균주로 선발하였다. 유전체 분석 데이터를 기반으로 유전체 상에서 특이적으로 삽입된 유전자 부위(Insertion sequence region)를 대상으로 균주 특이 primer를 제작하였다. 자세한 프라이머 염기서열은 표 5-4에 나타내었다.



(a) CC112의 유전체를 이용한 특이 프라이머의 제작



(b) gradient PCR 및 특이성 검정을 통한 최적 조건 확립

그림 5-10. 균주 및 병원균 특이 프라이머 제작(a) 및 최적 분석 조건 확립(b).

선발 균주 특이적 검출을 위하여 제작된 프라이머를 활용하여 다양한 조건에서 PCR 증폭 후 1.2% agarose gel에 밴드 확인하였다. 이때 제작 프라이머의 균주 특이성을 확인하기 위해 reference 균주로서 계통학적으로 가까운 *Bacillus* spp.을 활용하여 분석 최적조건을 확인한 후 최종적으로 CC112_F1-R1 set을 선발하였으며, 선발균 정량분석을 위한 최적 분석 조건을 확립하였다(그림 5-10).

(나) 인삼잘록병균을 정량하기 위한 프라이머 선정(Nested PCR 활용)

인삼 재배 토양 내 병원균은 유용균 및 일반적인 토양 미생물에 비해 밀도가 상대적으로 낮고, 대부분의 경우 qPCR의 검출한계 이하로 존재할 때가 대부분이어서 일반 qPCR로 정량이 어려운 한계가 있다. 하지만 Nested PCR을 활용할 경우 그 정량한계를 극복할 수 있으며 이를 활용하여 인삼잘록병원균의 상대적인 정량이 가능할 것으로 판단하였다. 본 연구에서는 인삼 잘록병원균의 정량분석을 위해 ITS1/ITS4 프라이머를 사용하여 1차적으로 곰팡이 군집 전체를 PCR 한 후 그 증폭산물을 100배 희석하여 ST-RS1/ITS4(*R. solani*)와 AFP276/ITS4(*P. ultimum*) 프라이머를 활용하여 2차적으로 qPCR 정량분석을 실시하였다(표 5-4).

표 5-4. 정량분석을 위해 선발 및 제작된 프라이머

Organism	Primers	Sequence (5' - 3')	Target
CC112	CC112_F1	CTGCGCGTTAGTCCAATA	IS region
	CC112_R1	CTGAACAAACCCAACATCC	IS region
<i>Pythium ultimum</i>	AFP276(F)	TGTATGGAGACGCTGCATT	ITSII
<i>Rhizoctonia solani</i>	ST-RS1(F)	AGTGTATGCTGGTTCCACT	ITSII
Fungi	ITS1(F)	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	18S rDNA
Universal	ITS4(R)	TCCTCCGCTTATTGATATGC	28S rDNA

(다) qPCR(SYBR) Master Mix를 이용한 PCR 및 유전자 정량 및 표준 곡선 작성

qPCR을 활용한 정량 분석을 위해 표준물질을 제작하였다. CC112 및 인삼잘록병원균 특이 프라이머로 PCR을 수행한 후 최종 유전자 증폭산물을 QIAquick Gel Extraction Kit(Qiagen, USA)를 이용해 얻은 후 정제하여 *E.coli*에 형질전환 실시하였다. 형질전환된 *E.coli*를 LB broth에 접종 후 37 °C에서 약 24시간 배양하여 Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems (Promega, USA)를 이용하여 plasmid를 추출하였다. 순차적으로 plasmid를 희석하여 표준곡선을 제작하는데 활용하였다. 표준물질을 사용하여 qPCR 반응 최적화를 실시하였고, 이때 반응곡선 및 융해곡선을 고려하여 최적 분석 조건을 확립하였다(그림 5-11).

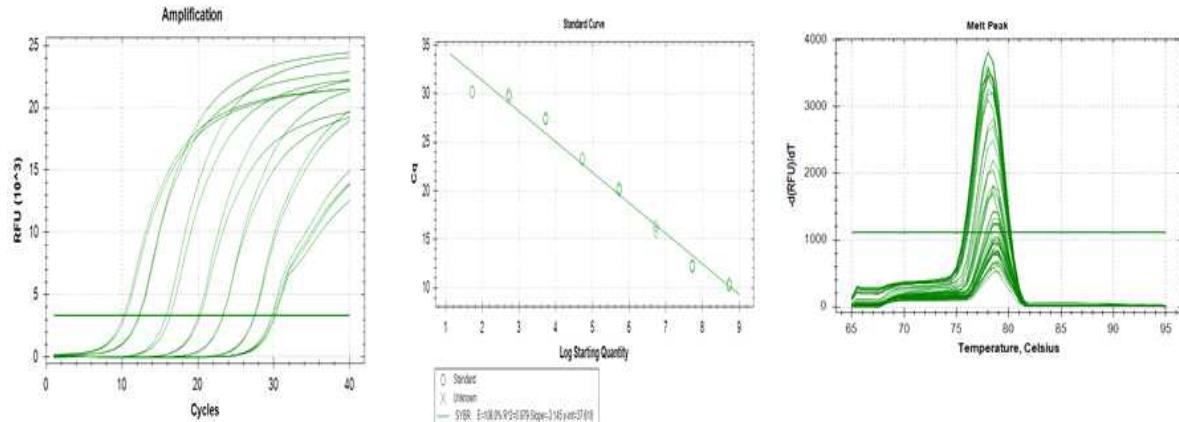


그림 5-11. qPCR 반응곡선, 표준곡선 제작 및 융해곡선.

(라) 유용균과 잘록병균의 정량분석

① 유용균 정량분석

유용균 및 인삼잘록병원균 밀도 분석을 위해 충북 음성군 인삼특작부 내 인삼 채배 포장에서 토양을 채취하였다. 이때 토양의 특성은 표 5-5와 같았다. 채취한 토양은 8 mm 체로 걸러서 불순물과 자갈을 제거하고 어박스에 동일하게 충진하였다(그림 5-12, 5-13). 유용균은 종자 침지 처리와 종자 파종 후 관주하는 두 가지 방법을 선택하여 처리하였다. 각 균주 별로 제재화 한 제품을 1%(100배 희석액) 수준으로 희석하여 관주하거나, 희석 액에 1시간 종자 침지 후 약 2시간 풍건하여 파종하였다. 유용균 처리 후 약 2~3일 간격으로 시료를 채취하여 특이 프라이머를 사용하여 유용균 밀도를 정밀하게 조사하였다. 유용균 밀도가 감소하여 무처리와 차이가 없는 시점까지 조사자를 실시하였다.

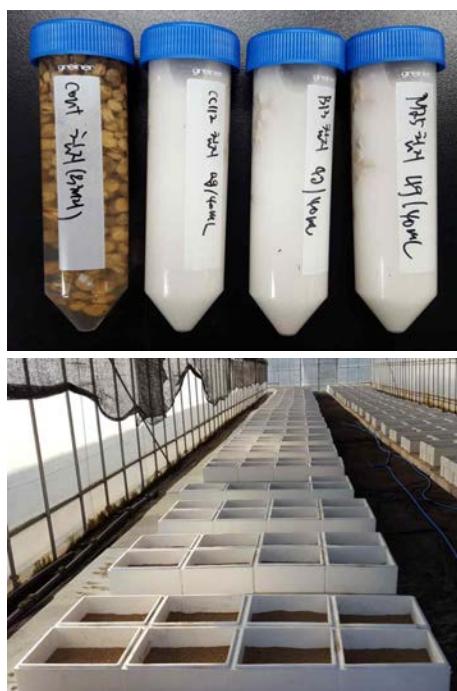


그림 5-12. 종자 침지 처리(위) 및 토양충진(아래).



그림 5-13. 인삼 종자 파종.

표 5-5. 공시토양 특성

pH (H ₂ O, 1:5)	OM (g kg ⁻¹)	T-N (mg kg ⁻¹)	Av. P ₂ O ₅ (mg kg ⁻¹)	Exch. cations (cmol ⁺ kg ⁻¹)		
				Ca	Mg	K
6.73	11.9	0.47	179.2	3.63	1.08	0.12

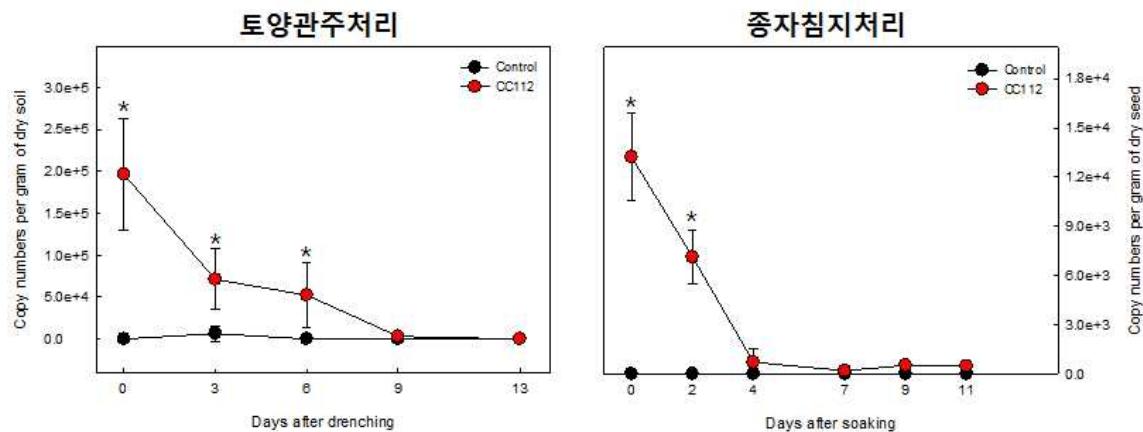


그림 5-14. 균주 처리방법에 따른 시기별 인삼 재배 토양 내 유용균 정량분석.

균주 처리 방법에 따라 약 4~9일 가량 유용 균주 밀도가 유지되는 것으로 확인하였다 (그림 5-14). 관주 처리 후 토양에서 9일 정도 유용균 밀도를 유지하는 것으로 분석되었다. 이전 연구에서 인삼 뿐리썩음병에 길항력이 있는 *Bacillus amyloliquefaciens* GR4-5 균주를 관주 처리 후 균주 밀도 변화를 조사한 결과, 실내조건을 제외한 실외 및 포장시험에서는 *Bacillus sp. group*의 유전자 수는 균주 처리 후 약 7일 내외로 유용균 밀도를 유지할 수 있는 것으로 나타났다(Kim et al., 2015). 따라서 노지에서 관주 처리를 할 경우 평균적으로 1주일 간격으로 여러 번 이상 처리를 해야 유용균 밀도를 유의하게 유지할 수 있을 것으로 판단한다. 종자침지의 경우 적은 양이지만 균주 밀도가 11일 이상 유지되는 것으로 나타났다. 하지만 4일 이후부터 무처리 대비 유의미한 차이를 보이지는 않았으나 다소나마 유용균 밀도가 유지되는 것을 보아 아주 적은 밀도로 존재할 가능성 이 높을 것으로 보인다. 추후 더 정밀한 방법(예; FISH 등)을 이용하여 정착능에 대한 분석이 필요할 것으로 평가하였다.

② 인삼잘록병 원인균 정량분석

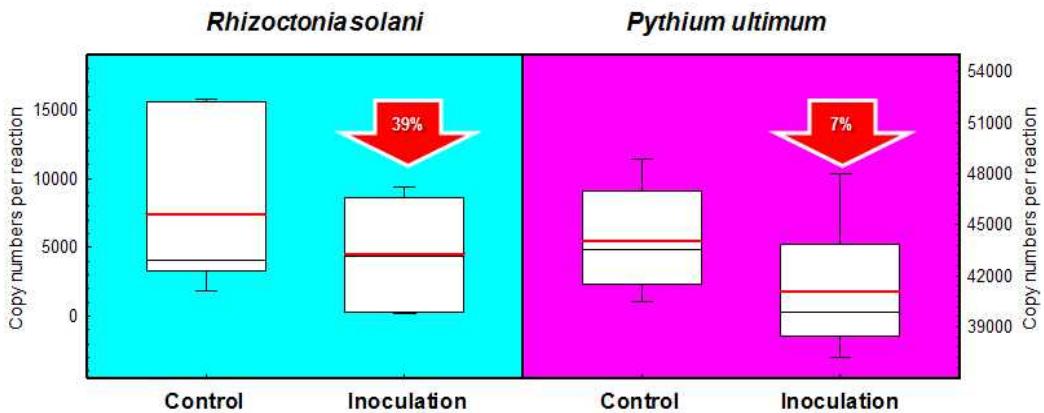


그림 5-15. 선발균의 관주 처리에 따른 인삼 재배 토양 내 병원균 정량분석.

유용균 처리에 따라 인삼 토양 내 병원균 밀도를 무처리 대비 *Rhizoctonia solani* 의 경우 약 39%, *Pythium ultimum* 은 약 7% 수준에서 인삼 잘록병균의 분포를 줄여주는 효과가 있어 방제 효과가 있는 것으로 조사되었다(그림 5-15). 이는 아마도 유용균에서 분비되는 항균 물질의 생산으로 인해 식물병원성 곰팡이의 밀도가 억제될 수 있었던 것으로 본다.

(2) 유용미생물 처리 인삼 포장 내 미생물 분포 조사 및 군집구조 분석

qPCR 결과를 근거로 관주 6일차 및 13일차 토양 시료를 채취하여 DNA를 추출하였으며, 미생물 분포 조사를 실시하였다. DNA는 제조사의 방법에 따라 토양 0.5 g을 PowerSoil DNA isolation kit(Mo Bio, USA)를 사용하여 추출하였다. 추출된 DNA는 Qubit 2.0 Fluorometer(Life Technologies Inc., Carlsbad, USA)을 통해 정량하였다. 추출된 DNA의 파이로시퀀싱 분석은 Chunlab(Seoul, Korea)에 의뢰하여 Illumina MiSeq platform 장비를 사용하여 수행하였다. 시퀀싱은 16s rRNA V3-V4 region을 대상으로 수행되었으며, 프라이머와 바코드는 341F-805R을 사용하였다(Fadrosh et al., 2014). 염기서열은 UPARSE 파이프라인을 이용하여 OTU 클러스터링 분석을 수행하였다. 염기서열들은 Mothur(version 1.27.0) 프로그램을 이용하여 분석하였으며(Schloss et al., 2009), 기준에 표준화된 분석 파이프라인을 참조하여 염기서열을 정리하고 분석하였다(Choi et al., 2015; Lee et al., 2015). Good의 coverage, 종 풍부도 추정치, 다양성지수 및 Venn diagram은 Mothur 프로그램을 이용하여 계산하였다(Schloss et al., 2009). 시료간의 유사성 기반의 베타다양성 분석은 PCA 분석을 이용하였다.

(가) Mothur를 이용한 염기서열 정리 및 분류와 군집분석

① 유용균 처리 후 토양 미생물 종 풍부도 및 다양성 변화

유용균 처리에 따른 토양 미생물 종 풍부도와 다양성은 관주 처리 초기(6일)에 감소하는 양상이었으나, 13일 이후 무처리 토양과 동일한 수준으로 회복되는 경향을 보였다(그림 5-16, 5-17). 이러한 결과는 유용미생물의 처리 초기에 토양미생물의 군집에 영향을 주나 일정 시간이 지난 후 토양미생물 군집의 완충 작용으로 인해 원래의 군집구조로 회복하는 것으로 보인다.

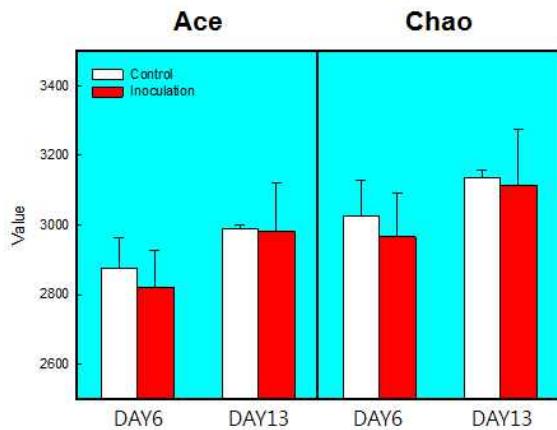


그림 5-16. 유용균 처리에 따른 종 풍부도 변화.

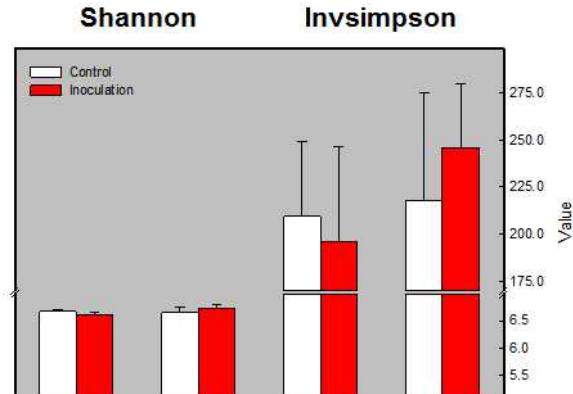


그림 5-17. 유용균 처리에 따른 종 다양성변화.

② Venn diagram 및 heat map을 이용한 우점 OTU의 분석

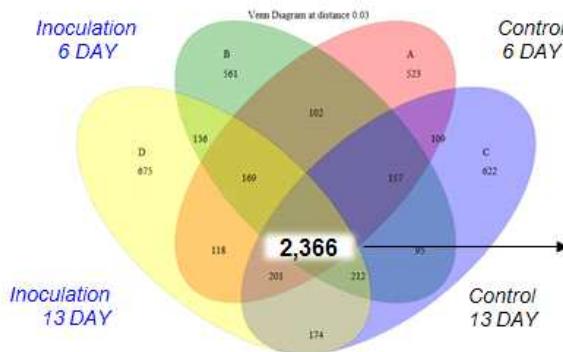


그림 5-18. Venn diagram 분석.

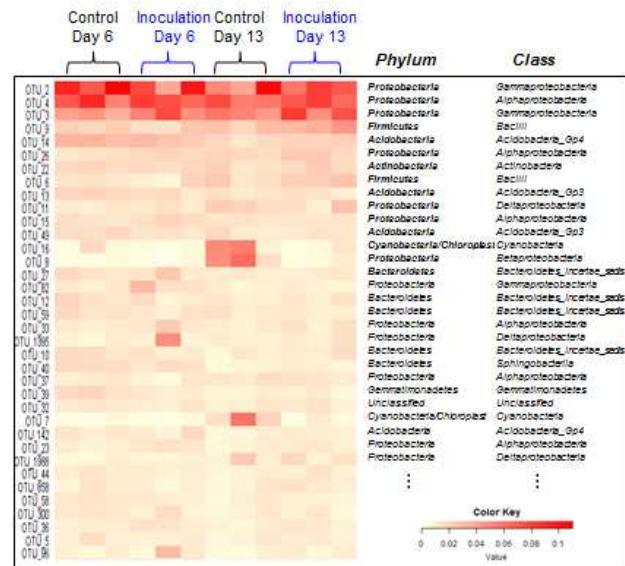


그림 5-19. Heat map을 이용한 OTU분석.

토양 전체에서 2,366개 OTU를 공유하였고(그림 5-18), 주로 우점 OTU는 *Proteobacteria*에 속하는 것으로 조사되었다. control 시료(13일)에서 나타나는 변화는 chloroplast의 오염으로 판단되어 우점 OTU 분포는 관주 처리에 따라 뚜렷한 변동을 보이지 않았다(그림 5-19).

③ 토양 내 우점 군집의 비교

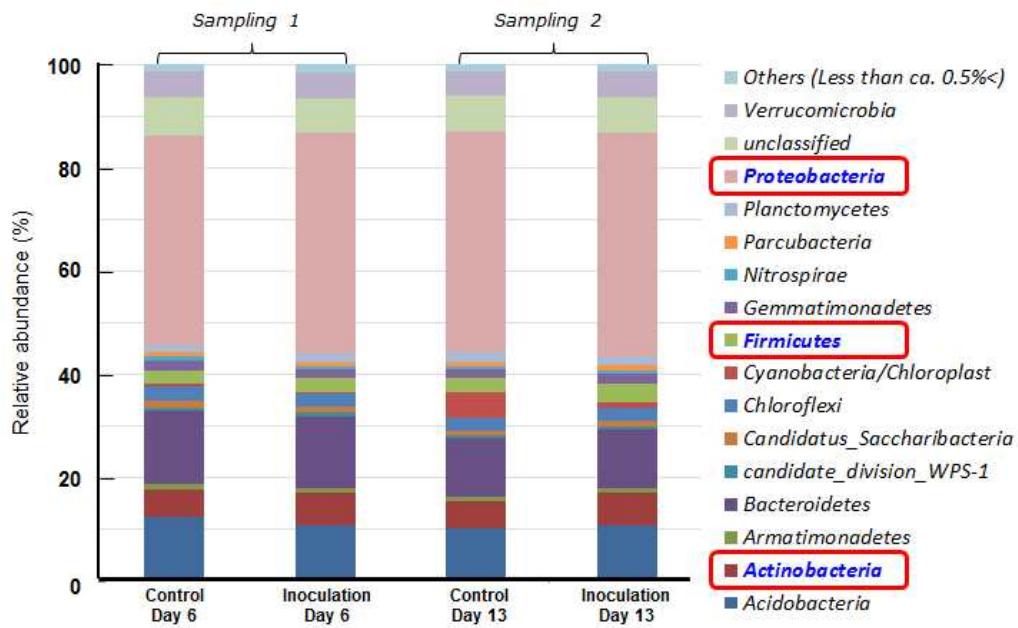


그림 5-20. 선발균 처리에 따른 토양 내 미생물 분포 변동 분석(phylum 수준).

우점 군집은 phylum 수준에서는 *Proteobacteria* 인 것으로 조사되었으며, 일반적으로도 토양 내 phylum 수준에서 *Proteobacteria* 우점하는 것으로 알려져 있다(Schloss and Handelsman, 2006). 선발균 처리에 따라 *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* 의 비율이 상대적으로 증가하는 것으로 나타났다(그림 5-20).

④ 유용미생물 처리 후 군집의 변동 해석

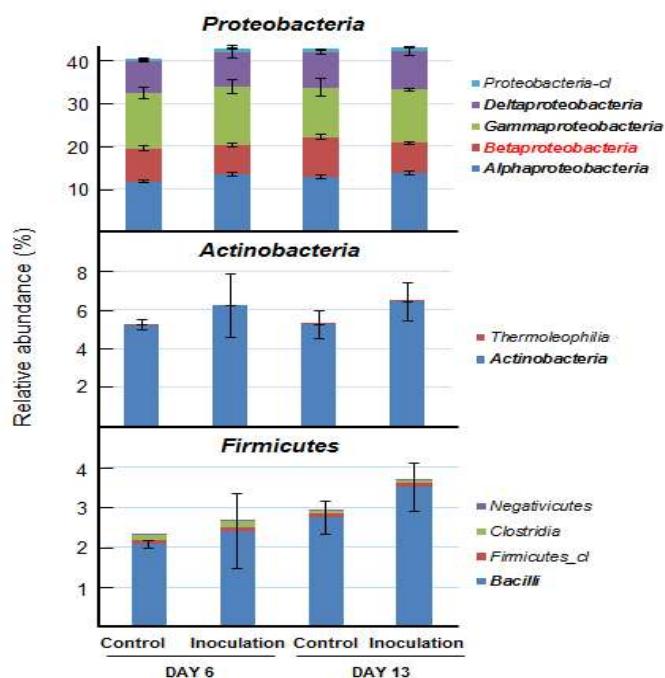


그림 5-21. 선발균 처리에 따른 토양 내 미생물 분포 변동 분석(class 수준).

Proteobacteria 문에서는 *Gammaprobacteria* 강의 비율이 선발균 처리에 따라 증가하는 경향을 보인 반면 *Betaproteobacteria* 강의 비율은 감소하였다(그림 5-21). *Actinobacteria* 및 *Bacilli* 강의 비율 또한 선발균 처리에 따라 증가하는 경향을 나타내었다.

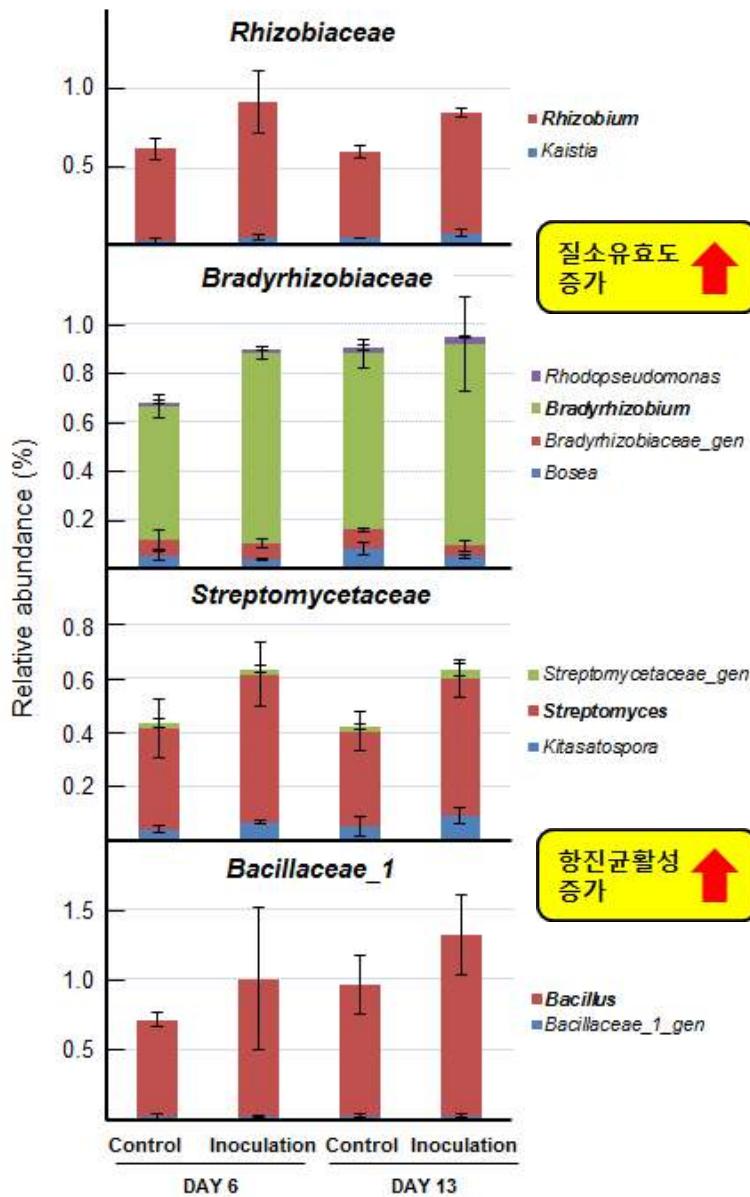


그림 5-22. 선발균 처리에 따른 토양 내 미생물 분포 변동 분석(genus 수준).

Genus 수준에서는 선발균 처리에 따라 질소 고정에 관여하는 *Rhizobium* 및 *Bradyrhizobium*의 비율을 증가되는 경향을 보였다. 일반적으로 *Rhizobium*과 *Bradyrhizobium*은 주로 콩과식물을 대상으로 공생적으로 질소를 고정하는 균으로서 연간 질소를 약 50~100 kg 가량 공급할 수 있다(Graham and Vance, 2000). 이러한 균주의 비율 증가가 토양 내 질소의 유효도를 상대적으로 증가시켜 인삼생육에 다소 긍정적인 영향을 줄 수 있었던 것으로 추정된다(그림 5-22). 하지만 인삼의 경우 콩과식물과 같이 직접적으로 질소를 고정할 수 없는 점을 감안하면 공생에 의한 질소 공급효과는

크지 않을 것으로 판단되나, 타 식물(콩과잡초) 등과의 상호작용을 통해서 인삼 생육에 긍정적인 영향을 줄 수 있는 것으로 추정하였다. 항생물질 생성능이 존재하는 것으로 보고된 *Streptomyces*(Omura et al., 2001) 및 *Bacillus*(Nakano and Zuber, 1990) 비율은 선발균 처리에 따라 증가되는 경향을 보였다. 결과적으로 유용 균주처리를 통해 토양 내 전체 미생물 군집에서 항균물질을 생산할 수 있는 군집 분포가 상대적으로 증가한 것이 인삼질록병 방제에 긍정적인 효과를 줄 수 있었던 것으로 추정하였다.

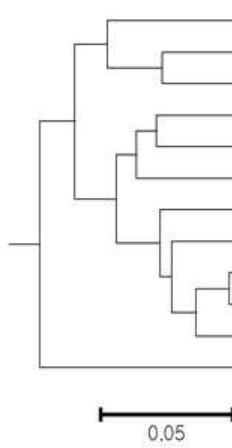


그림 5-23. Bray-curtis 분석을 통한 군집분석.

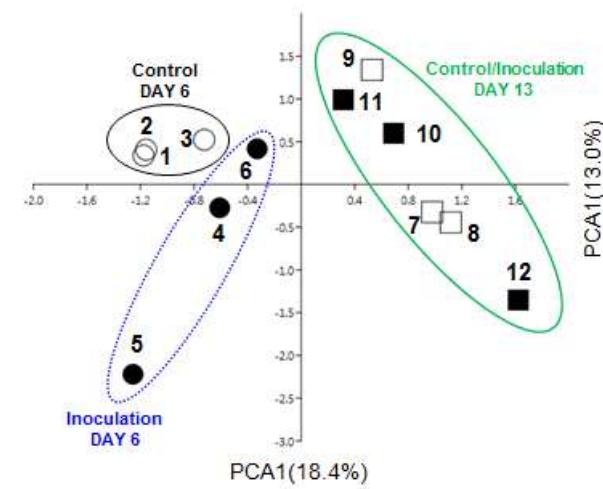


그림 5-24. 주성분 분석을 활용한 미생물 군집특성 변화.

Bray-curtis 분석 및 주성분 분석을 활용한 군집 특성 변화를 조사한 결과, 유용 균주 처리 후 초기 미생물 분포에서는 변동을 보였으나 이후 본래 토양의 특성으로 회복되는 경향을 보였다(그림 5-23, 24). 이는 토양이 지닌 완충능으로 인해 초기의 변화되었던 미생물 군집이 점차 원래의 특성으로 회복될 수 있는 것으로 보고되었다(Griffiths and Philippot, 2013). 이를 통해 유용균주의 처리는 원래 토양 미생물 군집 특성을 변화시키지 않으면서 인삼질록병을 효과적으로 방제할 수 있는 좋은 방제기술이 될 것으로 본다.

이상의 결과를 요약하면 인삼재배 토양 내 유용균 밀도 분석 결과 유용균 처리는 최소 1주일 간격으로 2-3회 이상 처리해야 할 것으로 판단되었다. 유용균 처리에 따른 질록병 원균 밀도는 무처리 대비 선발균주 처리구에서 약 39-7% 수준으로 감소되는 것으로 조사되었으며 미생물 군집 특성 변동은 크지 않은 것으로 조사되었다. 특히 균주 처리에 따라 *Bacillus* 및 *Streptomyces* 속의 비율이 증가되어 인삼질록병 방제에 긍정적인 영향을 준 것으로 추정된다. 결론적으로 인삼 재배 토양 내 유용균 처리는 토양비옥도를 개선하고 전체적인 토양미생물의 변동없이 인삼질록병을 방제할 수 있는 유용한 방안이 될 수 있을 것으로 판단된다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야 기여도

제1절 목표대비 달성도

당초 목표	가중치(%)	개발 내용	달성도(%)
1) 인삼잘록병 방제 우수 균주 선발	4	- 선발균주 #13, M75, CC112균의 잘록병균에 대한 방제 효과	100
2) 선발미생물의 배양적 특성 조사	2	- 선발균주의 온도, pH, 배지종류별 배양 조건구명	100
3) 선발미생물의 배지종류별 잘록병 발생 억제 효과 조사	3	- 선발 균주별 배지종류에서 잘록병 방제 효과	100
4) 선발 미생물의 잘록병균 생육 억제 작용기작 구명	3	- 잘록병균에 대한 균사생육억제 및 휘발성물질 생성	100
5) 인삼잘록병 방제 미생물 시제품의 효과 최적화 및 약해 검정	3	- 선발 3균주의 시제품 3종의 잘록병 방제 효과 및 종자발아율	100
6) 스크리닝에 의한 우수 미생물의 선발	2	- 토양 미생물을 대상으로 인삼잘록병 길항 미생물을 스크리닝하여 8종의 미생물을 선발함.	100
7) 최적 배양조건 검토 및 확립	3	- Bacillus sp. #13 균주의 배양 시간에 따른 pH 및 OD값 등 경시적 변화를 조사함 - Bacillus sp. #26 균주의 배양 시간에 따른 pH 및 OD값 등 경시적 변화를 조사함 - 방선균 A1444 균주의 탄소원, 질소원의 이용성을 조사하여 최적 배양조건을 검토함.	100
8) 다양한 크로마토그라피법 및 HPLC 등 정제 기법을 이용한 활성성분의 분리 및 정제	5	- 선발한 Bacillus sp. #13, #26으로부터 크로마토그라피에 의한 활성 분획물 제조. - 방선균 BS065 균주로부터 다양한 크로마토그라피를 수행하여 1종의 항균활성물질을 분리, 정제함. - 방선균 A1444 균주로부터 다양한 크로마토그라피를 수행하여 1종의 항균활성물질을 분리, 정제함. - 방선균 A75 균주로부터 다양한 크로마토그라피 및 HPLC를 수행하여 1종의 항균활성물질을 분리, 정제함. - 방선균 A3265 균주로부터 다양한 크로마토그라피 및 HPLC를 수행하여 2종의 항균활성물질을 분리, 정제함. - 방선균 A501 균주로부터 다양한 크로마토그라피 및 HPLC를 수행하여 1종의 항균활성물질을 분리, 정제함.	100

당초 목표	가중치(%)	개발 내용	달성도(%)
9) HPLC 비교 분석, Mass, NMR 등의 분광분석법에 의한 화합물의 화학구조 구명	5	<ul style="list-style-type: none"> - 선발한 <i>Bacillus</i> sp. #13 균주의 휘발성 항균 성분을 포집하여 GC-mass로 분석함. - 선발한 방선균 BS065 균주의 활성성분을 TLC 분석 및 NMR 측정을 통하여 화학구조를 <i>scopafungin</i>으로 구명함. - 방선균 A1444 균주의 활성성분을 HPLC 분석, ESI-mass 및 NMR 측정을 통하여 <i>guanidylfungin A</i>로 구명함. - 방선균 A75 균주의 활성성분을 HPLC 비교 분석, ESI-mass 측정을 통하여 <i>scopafungin</i>으로 구명함. - 방선균 A3265 균주로부터 분리한 2종의 활성성분을 ESI-mass, 1D 및 2D NMR 측정을 통하여 각각 <i>guanidylfungin A</i> 및 <i>methyl guanidylfungin A</i>로 구명함. - 방선균 A501 균주로부터 분리한 활성성분을 ESI-mass, 1D 및 2D NMR 측정을 통하여 polyene 계 항생물질인 <i>fungichromin</i>으로 구명함. 	100
10) 분리한 단일성분 화합물의 항균활성 평가	3	<ul style="list-style-type: none"> - 각각의 길항미생물로부터 분리한 화합물에 대하여 항균활성을 평가함. 	100
11) QC를 위한 항균활성성분 검출방법의 확립	2	<ul style="list-style-type: none"> - 선발한 5종 방선균의 항균활성성분을 검출할 수 있는 HPLC 방법의 확립. 	100
12) 잘록병 방제용 균주의 생물적 안전성 검정	3	<ul style="list-style-type: none"> - 인삼 잘록병 방제용 균주가 인삼발아 및 생육에 미치는 향을 조사하여 미생물제로 활용이 가능 하다는 것을 증명함. 	100
13) 인삼잘록병 방제용 균주의 최적 증식 조건 확립	3	<ul style="list-style-type: none"> - 인삼잘록병 방제용 균주의 최적 온도, pH, 탄소원, 질소원 및 대량생산 배지 선발을 완료함. 	100
14) 인삼잘록병 방제용 균주의 대량생산 공정 확립	3	<ul style="list-style-type: none"> - 대량생산용 탄소원, 질소원 선발 및 배지결정 	100
15) 인삼잘록병 방제용 제형화 소재 선발	4	<ul style="list-style-type: none"> - 친환경 중량제 선발 	100
16) 제형화 소재의 생물적 안전성 검정	5	<ul style="list-style-type: none"> - 친환경 중량제의 생물적 안전성 검정 	100
17) 인삼잘록병 방제용 제제화 공정 확립	5	<ul style="list-style-type: none"> - 분상수화제 공정 확립 및 시제품의 물리·생물적 안전성 검정 	100
18) 인삼잘록병 방제용 균주의 대량 생산 및 상품화	4	<ul style="list-style-type: none"> - 균주의 저비용 대량생산 시스템 개발 	100
19) 인삼잘록병 방제용 미생물제제의 제품화	5	<ul style="list-style-type: none"> - 잘록병방제용 미생물제의 제형화 	100
20) 제품의 생물·화학적 안전성 및 안정성 검정	4	<ul style="list-style-type: none"> - 인삼종자의 발아 및 생육영향 조사 - 제품의 생태독성, 병원성 미생물 등 분석 	100
21) 인증 신청 : 수화제 1종	5	<ul style="list-style-type: none"> - 유기농자재 목록 공시 신청 	100

당초 목표	가중치(%)	개발 내용	달성도(%)
22) 선발 유용미생물의 인삼잘록 병원균 포장방제효과 구명	4	- 선발미생물의 잘록병방제 효과분석	100
23) 미생물 시제품의 인삼 잘록병 포장 방제효과 구명	5	- 접종원 농도 구명 및 포장 방제효과 분석	100
24) 유용미생물의 묘삼 생육 촉진효과 구명 및 현장 실증	3	- 포장조건, 처리방법별 방제효과 분석	100
25) 선발균의 분류, 동정 및 생리활성을 구명	3	- 선발균주(M75, CC112, B13)를 Bacillus로 동정하였고 효소활성 및 생리활성 구명함	100
26) 선발균으로부터 병역제 관련 유용 유전자 분석	3	- 선발균주 유전체 분석을 실시하였으며, 2차대사산물 생합성 유전자군을 확인하였음	100
27) 선발균의 토양 환경 영향 평가	5	- 선발균 처리에 따라 미생물 군집특성이 크게 변하지 않는 것을 확인하였음	100
28) 유용균과 병원균의 토양 내 밀도 검정	3	- 유용균의 경우 약 4~9일 정도 밀도가 유지되는 것으로 확인하였으며 관주처리에 의해 인삼잘록병 원인균의 밀도를 39-7% 수준으로 감소시킬 수 있는 것으로 조사됨	100
	100		

제2절 정량적 성과

연도 성과지표명		당초 목표 (전체)	실적	달성도 (%)	가중치 (%)
논문게재	SCI	4	3	75	15
	비SCI	6	4	66.6	20
산업재산권	출원	1	1	100	10
학술발표	국제	7	9	128.5	10
	국내	9	15	166.6	10
기술이전		1	1	100	5
영농기술·정보 기관제출		2	2	100	10
생물자원 등록 · 기탁		1	2	200	5
생명정보 등록 · 기탁		2	2	100	5
홍보		1	3	300	5
농자재심사/등록		1	1	100	5
계		35	43	122.8	100

제 5 장 연구 결과의 활용 계획

제1절 추가연구의 필요성

본 연구는 인삼잘록병에 대한 화학농약의 대체체로서 미생물을 이용한 친환경방제제의 개발을 연구의 목표로 하였다. 본 연구를 통하여 선발한 바실러스 균주는 활용을 위하여 제품으로 개발하였으나 방선균은 강한 항균활성과 활성성분의 구명은 수행되었으나 제품으로의 개발은 이루어지지 않았다. 그 이유는 방선균의 활용을 위하여는 친환경농자재 등으로 등록을 하여야 하나 항생물질을 생산하면 등록이 제한되어 많은 연구 결과에도 불구하고 산업화로 연결되지 못하였다. 그러나 추후 방선균 등의 등록이 가능하도록 친환경방제제의 등록 규정이 개정되면 추가연구를 진행하여 친환경농자재 혹은 생화학농약으로 개발할 예정이다.

특히 포장실험에서 인삼종자를 방선균에 침지하여 파종한 결과 인삼모잘록병 발병 억제에 뛰어난 효과를 나타내는 것을 확인한 바 추후 이같은 처리 방법을 이용하여 방선균의 활용을 모색할 예정이다. 이같은 후속연구가 진행될 경우 효과가 안정적이고 활성이 우수한 인삼잘록병 방제제가 개발될 것으로 판단된다.

제2절 타 연구에의 응용 및 기업화 추진방안

항균활성성분의 구명은 추후 산업화연구에 유용하게 활용될 수 있을 것이다. 즉 본 연구에서 규명한 항균 활성성분의 화학구조를 바탕으로 제형화 및 quality control 체계를 구축할 수 있을 것이다. 특히 기존의 살균제 및 바실러스 제품의 경우 균체수만을 중심으로 quality control 체계를 갖추어 실제적으로 활성성분은 배제되어 있는 상황이다. 본 연구는 미생물제제의 활성에 큰 영향을 미치는 활성성분을 밝힌 것으로 이는 기존의 미생물 살균제와는 차별화되고 안정한 효능을 지닌 제품을 개발하는데 큰 도움이 될 것이다. 특히 앞으로 산업화 추진과정에서 진행될 제품 개발에 본 연구 결과는 유용하게 활용될 것으로 판단된다.

본 과제에서 도출된 연구결과를 바탕으로 2018년 현장 실증 시범사업을 묘삼 재배 농가를 대상으로 수행할 계획이며, 새싹삼 재배 및 식의약품 소재를 위한 묘삼 재배 농가에 기술을 확대보급하여 고품질 청정 유기 묘삼 재배가 가능하게 할 것이다. 현장 실증을 통하여 방제효과가 확인되면, 유기인삼 재배 농가에 확대 보급 할 것이다. 이를 통하여 소비자 신뢰도 제공 및 고려인삼의 대외 경쟁력 확보가 가능하며 농가소득 향상 및 인삼 산업 활성화가 가능할 것으로 기대된다. 또한, 제형화 연구와 길항균 밀도판별 기술에 대한 추가 연구가 수행된다면 더 높은 인삼모잘록병의 방제효과를 얻을 수 있을 것으로 기대된다. 향후 이론적 지식과 연구 결과 등을 검토하여 인삼모잘록병의 포장 방제효과에 관하여 논문을 추가로 투고할 예정이다.

삼잘록병을 억제할 수 있는 유용미생물의 활성 및 정착능 강화를 위한 기반자료로 활용하고, 인삼잘록병균을 저해와 관련된 유용 유전자를 확보하고 기작을 구명할 수 있는 기반 마련하고자 한다. 또한 포장이나 온실에서의 미생물생태의 변화를 분석하고 유용미생물 정착 밀도와 인삼 잘록병원균의 밀도변화를 측정하여 현장 적용 시기 등의 확립에 사용하고자 한다.

제 6 장 연구 과정에서 수집한 해외 과학 기술 정보

- 세계적으로 2015년 등록 또는 출시 신규 생물농약 : 20종
 - 미생물살균제 8종, 미생물세균제 1종, 미생물 살충제 9종, 미생물제초제 1종, 생화학농약 1종(Biologicals 2016, Agrow)
- 독일 ABiTEP GmbH의 *Rhizoctonia solani* 방제제 RhizoVital[®]42 (*B. amyloliquefaciens* FZB42)
 - 이) 작용기작 : 2차대사물질에 bacteriocin (plantazolicin, amylocyclicin) 구명)
- 최근 들어 생물농약의 개발에 활성성분을 규명하여 quality control에 활용하고자 많은 연구가 진행되고 있다. 특히 바실러스 제제의 경우 단순히 세포의 농도만을 제품의 quality control에 활용하였으나 바실러스의 경우도 다양한 항생물질을 생성하는 것이 알려져 활성성분에 관한 연구가 진행되고 있다.

제 7 장 연구 개발 결과의 보안 등급

○ 없음

제 8 장 국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비 현황

○ 없음

제 9 장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

1. 연구실 안전조치 이행실적

- 기술적 위험요소 분석
 - 특이한 기술적 위험요소는 없음.
- 안전관리대책
 - 안전관리 부분은 일반적인 실험실 안전 수칙 준수

2. LMO 연구시설 및 수입신고 현황

- 해당 사항 없음-

제 10 장 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문 /특허 /기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문 게재지/ 특허 등록국 가	Impact Factor	논문 게재일 /특허 등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/ 인용횟수 등)
1	논문	Biocontrol of Ginseng Damping-off by <i>Bacillus velezensis</i> CC112	농과원	주담당	한국		2016.09.30	단독사사	비SCI
2	논문	Streptomyces sp. A75와 A501균주의 인삼 잘록병에 대한 방제효과	농과원	주담당	한국		2016.12.30	단독사사	
3	특허	신규 미생물바실러스 메틸로트로피쿠스 CC112 또는 이를 함유하는 미생물 제제	농과원	주담당	한국		2016.11.10	단독사사	
4	기술 이전	신규 미생물바실러스 메틸로트로피쿠스 CC112 또는 이를 함유하는 미생물 제제	농과원	주담당	한국		2016.12.2		
5	영농 활용 기관 제출	유용미생물(B. <i>velenzensis</i> CC112)의 시제품을 이용한 인삼 잘록병 방제	농과원	주담당			2016.12	단독사사	
6	논문	Antifungal substances from Streptomyces sp. A3265 antagonistic to plant pathogenic fungi	전북대 학교	교신	Mycobiology	0.5	2014.09.30	단독사사	SCIE
7	논문	Antagonistic Effect of Streptomyces sp. BS062 against Botrytis Diseases	전북대 학교	교신	Mycobiology	0.5	2014.09.30	단독사사	SCIE
8	학술 발표	Guanidylfungin A and methylguanidylfungin A, the antifungal compounds isolated from <i>Streptomyces</i> sp. A3265	전북대 학교	교신			2015.05.14	단독사사	
9	학술 발표	<i>Streptomyces</i> sp. A501로부터 polyene antibiotic의 분리 정제	전북대 학교	교신			2015.06.25	단독사사	
10	학술 발표	Antifungal substance from <i>Streptomyces</i> sp. A704 effective to ginseng damping-off disease	전북대 학교	교신			2016.05.19	단독사사	

번호	구분	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역 할	논문 게재지/ 특허 등록국 가	Impact Factor	논문 게재일 /특허 등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/ 인용횟수 등)
11	학술 발표	Antifungal substances from antagonistic bacteria effective to ginseng damping-off disease	전북대 학교	교신			2016.06.23	단독사사	
12	학술 발표	Antimicrobial activity of mushrooms and their culture broths	전북대 학교	교신			2016.11.03	단독사사	
13	논문	방선균 A3265 균주에 의한 인삼 잘록병의 방제	충남대 학교 농업과학연구 소	교신 저자	한국균학회 지		2016.09.12	단독사사	비SCI
14	논문	인삼모잘록병 원균에 항균활성을 갖는 Bacillus 균의 분리 및 특성조사	원예원	주 저 자	농약과학 회지	-	2016.11.23	단독	비SCI
15	기타 (영농)	Bacillus velezensis CC112를 이용한 인삼모잘록병 방제방법	원예원	주 담당	-	-	-	-	-
16	논문	Complete genome sequence of Bacillus velezensis M75, a biocontrol agent against fungal plant pathogens, isolated from cotton waste	국립농 업과학 원		ournal of Biotechnolo gy	2.66	2.17.1.3.	단독사사	SCI

제 11 장 기타사항

○ 없음

제 12 장 참고문헌

농림수산식품부. 2016. 2015년 인삼통계자료집. pp136.

농촌진흥청. 2014. 농업기술길잡이 인삼. pp. 352.

식품의약품안전처. 2015. 식품공전.

Abbasi, P. A. 2013. Establishing suppressive conditions against soilborne potato diseases with low rates of fish emulsion applied serially as a pre-plant soil amendment. Can. J. Plant Pathol. 35:10-19.

Ait Kaki, A., N. K. Chaeouche, L. Dehimat, A. Milet, M. Youcef-Ali, M. Ongena, and P. Thonart. 2013. Biocontrol and plant growth promotion characterization of *bacillus* species isolated from *Calendula officinalis* Rhizosphere. Indian J. Microbiol. 53(4)447-452.

Allen, H. K., Donato, J., Wang, H. H., Cloud-Hansen, K. A., Davies, J., Handelsman, J., 2010. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. Nature Reviews Microbiology 8(4), 251-259.

Amer GA, Utkhede RS. 2000. Development of formulations of biological agents for management of root rot of lettuce and cucumber. Can. J. Microbiol. 46: 809-816.

Aska O, Shoda M. 1996. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. Appl Environ Microbiol. 62: 4081-4085.

Bae, Y. S., B. Y. Park, T. J. An, B. Y. Yeon, S. W. Lee and N. S. Seong. 2006. Selection of potential fungicides for control of ginseng seedling damping off and research on fungicide application for disease control in farms. Treat. of Crop Sci. 7:679-698.

Bak, H. S. Y. P. Jung, and M. H. Yoon. 2010. Isolation and Characterization of the auxin producing plant growth promoting rhizobacterium from soil in a ginseng field. J. Agri. Sci. 37(3):377-382.

Bashan, Y., L. E. de-Bashan, S. R. Prabhu, and J. P. Hernandez. 2014. Advances in plant growth-promotion bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives. Plant and Soil. 378:1-33.

Borriiss, R., 2013. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. Molecular microbial ecology of the rhizosphere. Wiley, Hoboken 2, 883–898.

Cawoy, H, W. Bettoli, P. Fickers, and M. Ongena. 2011. Bacillus-based biological control of plant Diseases. Agricultural and biological sciences. In: Stoytcheva M(ed) Pesticides in the modern world—pesticides use and management, Chap 13, pp 273 - 302

Cawoy, H., Debois, D., Franzil, L., De Pauw, E., Thonart, P., Ongena, M., 2015. Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*. Microbial Biotechnology 8, 281 - 295.

Cho DH, Cho HS, Shin JS, Park DW. 2007. Control of damping-off and ginseng stem fungus gnat of ginseng. KT&G Ginseng research report. pp28-33.

Cho, D. H., H. S. Cho, J. S. Shin and D. W. Park .2007. Control of damping-off and ginseng seedlings incited by *Rhizoctonia solani*. Korean J. Ginseng Res. 13:114–118.

Choi, M. Y., Ahn, J. H., Song, J., Kim, S. H., Bae, J. W., Weon, H. Y., 2015. Analysis of gut bacterial diversity and exploration of cellulose-degrading bacteria in xylophagous insects. The Korean Journal of Microbiology 51(3), 209–220.

Chowdhury, S. P., Hartmann, A., Gao, X., Borriiss, R., (015. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 - a review. Frontiers in microbiology 6, 780.

Chung JS. 2005. Development of Microbialpelleting seed for soil borne supperession and plant growth promoting. Technology Development Program for Agriculture and Forestry Kor. 15–23.

Chung, H. S., Kim. C. H., 1978. Biological control of ginseng root rot with soil amendments. Proc, 2nd Int. *Ginseng symposium*, Korea Ginseng Res. Inst., Seoul. Korea. p.67.

Chung, K. C., Kim, C. B., Kim, D. K., Kim, B.J., 2006. Isolation of antagonistic bacteria against major disease in *Panax Ginseng* C.A. meyer. Korean Journal of Medicinal Crop Science 14, 202–205.

Chung, Y. R., Chung, H. S., Oh, S. H., 1982. Identification of streptomyces species antagonistic to *Fusarium solani* causing Ginseng root rot. The Korean Journal of Microbiology 20, 73–79.

Cope AC, Johnson HE. 1958. Fungichromin. determination of the structure of the pentaene chromophore. J. Amer. Chem. Soc., 80: 1504–1506.

Dunlap, C.A., Kim, S.J., Kwon, S.W., Rooney, A.P., 2016. *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and ‘*Bacillus oryzicola*’ are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenomics. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 66, 1212–1217.

Elson MK, Kelly JF, Nair MG. 1994. Influence of antifungal compounds from a soil-borne actinomycete on *Fusarium* spp. in asparagus. J Chem Ecol 20:2835–46.

Fadrosh D. W., Ma, B., Gajer, P., Sengamalay, N., Ott, S., Brotman, R. M., Ravel, J., 2014. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform. Microbiome 2, 6.

Georgakopoulos DG, Fiddaman P, Leifert C, Malathrakis NE. 2002. Biological control of cucumber and sugar beet damping off caused by *Pythium ultimum* with bacterial and fungal antagonists. J Appl Microbiol 92:1078–86.

Goudjal Y, Toumatia O, Sabaou N, Barakate M, Mathieu F, Zitouni A. 2013. Endophytic actinomycetes from spontaneous plants of Algerian Sahara: indole-3-acetic acid production and tomato plants growth promoting activity. World J Microbiology and Biotechnology. 29(10):1821–29.

Graham, P. H., Vance, C. P., 2000. Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. Field Crops Research 65, 93–106.

Griffiths, B.S., Philippot, L., 2013. Insights into the resistance and resilience of the soil microbial community. FEMS Microbiology Reviews 37, 112–129.

Handelsman J, Stabb EV. 1996. Biocontrol of soilborne plant pathogens. Plant Cell 8:1855–69.

Harman GE. 1991. Seed treatments for biological control of plant disease. Crop Prot. 10: 1666–171.

Hong SK. 1964. Survey of ginseng cultivation in Southern Korea. So-yeun. (Central Monopoly Institute) 6:27–44.

Hong, E. H., S. H. Lee, R. T. Vendan, and Y. H. Rhee. 2012. Molecular diversity of rhizobacteria in ginseng soil and their plant benefiting attributes. Korean J. Micobiol. 48(4):246–253.

Howell CR, Stipanovic, RD. S 1980. Suppression of *Pythium ultimum*-induced damping-off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, pyoluteorin. Phytopathology 70:712–5.

Huang X, Zhang N, Yong X, Yang X, Shen Q. 2011. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off disease in cucumber with *Bacillus pumilus* SQR-N43. Microbiological research 167: 135 – 143.

Hudelson, B. D. and J. L. Parke. 1995. Etiology of a seedling root rot of American ginseng in Wisconsin. Simon Fraser University Press. pp. 133–140.

Jack AL, Lee JP, Lee SW, Kim CS, Son JH, Song JH, Lee KY, Kim HJ, Jung SJ, Moon BJ. 2006. Evaluation of formulations of *Bacillus licheniformis* for the biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis cinerea*. Biol. 37: 329–337.

Jo EJ, Kang BG, Jang KS, Choi YH, Kim JC, Choi GJ. 2014. Control efficacy of serenade formulation against *Rhizoctonia* and *Pythium* damping-off diseases. Res Plant Dis 20:201–5.

Jo, E. J., B. G. Kang, K. S. Jang, Y. H. Choi, J. C. Kim, and G. J. Choi. 2014. control efficacy of Serenade formulation against *Rhizoctonia* and *Pythium* damping-off diseases. Res Plant Dis. 20:201–105.

Joo GJ, Kim JH, Kang SJ. 2002. Isolation and antifungal activity of *Bacillus ehimensis* YJ-37 as antagonistic against vegetables damping-off fungi. Korean J Life Sci 12:200–7.

Joo GJ, Kim JH, Kang SJ. 2002. Isolation and antifungal activity of *Bacillus ehimensis* YJ-37 as antagonistic against vegetables damping-off fungi. Korean J. Life Sci., 12: 200–207.

Khabbaz, S. E. L. Zhang, L. A. Cáceres, M. Sumarah, A. Wang, and P. A. Abbasi. 2015. Characterization of antagonistic *Bacillus* and *Pseudomonas* strains for biocontrol potential and suppression of damping off and root rot disease. Ann Appl Biol. 166:456–471.

Kim JH, Choi YH, Kang SJ, Rhee IK, Joo GJ. 2002. Biocontrol of vegetables damping-off by *Bacillus ehimensis* YJ-37. Korean J Life Sci 12:416-22.

Kim JH, Choi YH, Kang SJ, Rhee IK, Joo GJ. 2002. Biocontrol of vegetables damping-off by *Bacillus ehimensis* YJ-37. Korean J. Life Sci., 12: 416-422.

Kim, B. Y., Ahn, J. H., Weon, H. Y., Song, J., Kim, S. I., Kim, W. G., 2012. Isolation and characterization of *Bacillus* species possessing antifungal activity against ginseng root rot pathogens. The Korean Journal of Pesticide Science 16(4), 357-363.

Kim, D. J., Shin, H. J., Min, B. H., Yoon, K. H., 1995. Isolation of a thermophilic *Bacillus* sp. producing the thermostable cellulase-free xylanase, and properties of the enzyme. The Korean Society for Microbiology and Biotechnology 23(3), 304-310.

Kim, D. Y., Kim, B. Y., Ahn, J. H., Weon, H. Y., Kim, S. I., Kim, W. G., Song, J., 2015. Quantitative analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* GR4-5 in soil. Korean Journal of Organic Agricultue 23, 847-858.

Kim, H. J. H. S. Jang, S. M. Lee, J. Kim, J. Shin, and H. T. Kim. 2010. Effect of inoculum concentration of *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum* causing damping off of pepper and cucumber on the efficacy of the mixture of etridiazole and thiophanate methyl. Korean J. Pest. Sci. 14(1)65-71.

Kim, J. Y., Heo, S. H., Hong, J. H., 2004. Isolation and characterization of an alkaline cellulase produced by alkalophilic *Bacillus* sp. HSH-810. The Korean Society for Microbiology and Biotechnology 40(2), 139-146.

Kim, S. I., Yoo, S. J., Kim, H. G., 1997. Selection of antagonistic bacteria for biological control of ginseng diseases. The Plant Pathology Journal 13, 342-348.

Kim, S. Y., Sang, M. K., Weon, H. Y., Jeon, Y. A., Ryoo, J. H., Song, J., 2016. Characterization of multifunctional *Bacillus* sp. GH1-13. The Korean Journal of Pesticide Science 20, 189-196.

Kim, W. S. and J. S. Park. 2013. Selection and control effect of environmental friendly organic materials for controlling the ginseng *Alternaria* blight. Kerean J. Medicinal Crop Sci. 21(5)388-393.

Lahdenpera ML. 1991. Streptomyces-a new tool for controlling plant diseases. Agro Food Ind Hi Tech 2:25-7.

Lee SY, Kim BY, Ahn JH, Song J, Seol YJ, Kim WG, Weon HY. 2012. Draft genome sequence of the biocontrol bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* strain M27. *J Bacteriol* 194:6934 - 5.

Lee, J. H., Choi, S. H., 2006. Xylanase production by *Bacillus* sp. A-6 isolated from rice bran. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 16(12), 1856–1861.

Lee, S. W., G. S. Kim, D. Y. Hyen, Y. B. Kim, S. W. Kang, and S. W. Cha. 2010. Effects of spraying lime bordeaux mixture on yield, ginsenoside, and 70% ethanol extract contents of 3 years old ginseng in *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Korean J. Medicinal Crop. Sci.* 18:244-247.

Lee, S. Y., J. Song, K. H. Park, H. Y. Weon, J. J. Kim, and J. H. Han. 2016. Biocontrol of Ginseng Damping-off *Bacillus velezensis* CC112. *Kor. J. Mycol.* 44(3):176–183.

Lee, Y., Ahn, J. H., Choi, Y. M., Weon, H. Y., Yoon, J. H., Song, J., 2015. Bacterial core community in soybean rhizosphere. *The Korean Journal of Microbiology*, 51(4), 347–354.

Leisso, R., P. Miller and M. Burrows. 2009. The influence of biological and fungicidal seed treatment on chickpea damping off. *Canadian J. Plant Pathol.* 31:38–46.

Li, X. and J. E. Choi. 2009. Development of a system for controlling ginseng *Alternaria* leaf blight to reduce fungicide application and use. *Res. Plant Dis.* 15(1):17–22.

Lim, J. S., H. S. Mo, E. H. Lee, K. C. Park, and C. M. Chung. 2014. Suppressive effects of Homemade environment friendly materials on *Alternaria* Blight and anthracnose of ginseng. *Korean J. organic Agri.* 22(4)705–718.

Lugtenberg, B., Kamilova, F., 2009. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology* 63, 541–556.

Mathre DE, Cookand, R. JN, Callan W. 1999. From discovery to use :traversing the world of commercializing biocontrol agents for plant disease control. *Plant Disease* 83: 972–983.

Molinatto, G., Franzil, L., Steels, S., Puopolo, G., Pertot, I., Ongena, M., 2017. Key impact of an uncommon plasmid on *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* S499 developmental traits and lipopeptide production. *Frontiers in Microbiology* 8, 17.

Nakano, M. M., Zuber, P., 1990. Molecular biology of antibiotic production in *Bacillus*. *Critical Reviews in Biotechnology* 10, 223–240.

Noguchi H, Harrison PH, Arai K, Nakashima TT, Trimble LA, Vederas JC. 1988. Biosynthesis and full NMR assignement of fungichromin, a polyene antibiotic from *Streptomyces cellulosae*. J. Am. Chem. Soc., 110: 2938–2945.

Omura, S., Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Takahashi, C., Shinose, M., Takahashi, Y., Horikawa, H., Nakazawa, H., Osonoe, T., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., Hattori, M., 2001. Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. Proceedings of the National Academy of Sciences 98, 12215–12220.

Park, S. Y. J. Cho, J. P, and H. D. Hong. 2006. Meta analysis of studies and patents on Korean ginseng in Recent 5 years in Korea and prospective needs. J. Ginseng Res. 30(4)212–219.

Pikovskaya, R. I., 1948. Mobilization of phosphorous in soil in connection with the vital activity of some microbial species. Mikrobiologiya 17, 362–370.

Rahman M, Punja ZK. 2007. Biological control of damping-off an American ginseng (*Panax quinquefolius*) by *Clonostachys rosea* f. *catenulata* (= *Gliocladium catenulatum*). Can J Plant Pathol 29:203–7.

Rahman, M. and Z. K. Punja. 2007. Biological control of damping off on American ginseng(*Panax quinquefolius*) by *Clonosachys rosea* f. *catenulata*. Can. J. Plant Pathol. 29:203–207.

Robert P.L. 1998. Formulation of the biocontrol fungus *Cladorrhinum foecundissimum* to reduce Damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum*. Biol Control. 12: 182–190.

Schloss, P. D., Handelsman, J., 2006. Toward a census of bacteria in soil. PLOS Computational Biology 2, e92.

Seo, M. J., H. S. Shin, C. S. Gawk, S. H. Jo, J. S. Shin, D. H. Cho, Y. N. Youn, and Y. M. Yu. 2011. Environmental-friendly control of the ginseng stem fungus gnat in the ginseng field. The Korean Journal of Pesticide Science. 15(4)471–478.

Shim, J. W., Lee, M. W., 1991. Identification of streptomyces species antagonistic to *Fusarium solani* or *Cylindrocarpon destructans* causing ginseng root rots. The Korean Journal of Mycology 19, 66–73.

Shin JS, Lee SH, Cho HS, Cho DH, Kim KJ, Hong TK, Park CS, Lee SK, Jung HY. 2015. Screening of seed treatment fungicide for control of damping-off caused by *Rhizoctonia solani* on *Panax ginseng*. Korean J. Pestic. Sci., 19: 424-427.

Shin, J. H., Yun, B. D., Kim, H. J., Kim, S. J., Chung, D.Y., 2012. Soil environment and soil-borne plant pathogen causing root rot disease of ginseng. Korean Journal of Soil Science and Fertilizer 45(3), 370-376.

Shin, J. S. Lee, H. Cho, D. Cho, K. Kim, T. Hong, Chol. Park, S. Lee, and H. Jung. 2015. Screening of seed treatment fungicide for control of damping-off casued by *Rhizoctonia solani* on *Panax ginseng*. Korean J. Pestic. Sci. 19(4):424-427.

Sin YM, Son YU, Lee SH, Jeong JY, Won YJ, Lee CH, Kim WS, Chae KR, Hong MK. 2005. Studies on the development of removal technique of residual pesticides in ginseng concentration. Korean J. Pestic. Sci., 9: 41-50.

Song, J., Lee, S. C., Kang, J. W., Baek, H. J., Suh, J. W., 2004. Phylogenetic analysis of streptomyces spp. Isolated from potato scab lesions in korea on the basis of 16s rRNA gene and 16s-23s rdna internally transcribed spacer sequences. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 54(1), 203-209.

Soumitra PC, Anton H, XueWen G, Rainer B. 2015. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42-a review. Frontiers in Microbiology/ www. frontiersin.org 6:1-11.

Stephens, C. T., L. J. Herr and A. F. Schmitthenner 1982 Characterization of *Rhizoctonia* isolates associated with damping off of bedding plants. Plant Dis. 66:700-703.

Tamura, K., D. Peterson, N., Peterson, G., Stecher, M., Nei, S. Kumar., 2011. Mega 5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution 28(10), 2731-2739.

The Korean Society of Plant Pathology. 2009. List of plant diseases in Korea. 5th ed. Seoul: Korean Society of Plant Pathology

Tytell AA, McCarthy FJ, Fisher WP, Bolhofer WA, Charney J. 1955. Fungichromin and fungichromatin: new polyene antifungal agents. Antibiot. Annu. 1955: 716-718.

Um, Y., B. R. Kim, J. J. Jeong, C. M. Chung, and Y. Lee. 2014. Identification of endophytic bacteria in *Panax ginseng* seeds and their potential for plant growth promotion. Korean J. Medicinal Crop Sci. 22(4):306–312.

Van Minh N, Woo EE, Kim JY, Kim DW, Hwang BS, Lee YJ, Lee IK, Yun BS. 2015. Antifungal substances from *Streptomyces* sp. A3265 antagonistic to plant pathogenic fungi. Mycobiology 43: 333–338.

Wall, D. H., Nielsen, U. N., Six, J., 2015. Soil biodiversity and human health. Nature 528, 69–76.

Wang, L. T., Lee, F. L., Tai C. J., Kasai, H., 2007. Comparison of *gyrB* gene sequences, 16s rRNA gene sequences and DNA–DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 57(8), 1846–1850.

Weber, T., Blin, K., Duddela, S., Krug, D., Kim, H. U., Brucolieri, R., Lee, S. Y., Fischbach, M. A., Muller, R., Wohlleben, W., Breitling, R., Takano, E., Medema, M. H., 2015. antiSMASH 3.0 - a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. Nucleic Acids Research 43, W237 - W243.

Woo EE, Lee GS, Lee IK, Choi JE, Yun BS. 2016. Control of ginseng damping - off by *Streptomyces* sp. A3265. Kor J Mycol 44:193–5.

Woo, E. E., G. S. Lee, I. K. Lee, J. E. Choi, and B. S. Yun. 2016. Control of ginseng damping off by *Streptomyces* sp. A3265. Kor J. Mycol. 44(3):193–196.

Yamamoto, S., Harayama, S., 1995. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. Applied and Environmental Microbiology 61(3), 1104–1109.

Yáñez-Mendizábal, V., I Viñas, J. Usall, R. Torees, C. Solsona, M. Abadias, and N. Teixidó. 2012. Fourmulation development of the biocontrol agent *Bacillus subtilis* strain CPA-8 by spray-drying. J. Appl. Microbiol. 112:954–965.

Yang HS, Sohn HB, Chung YR. 2002. Biological control of Pythium damping-off of cucumber by *Bacillus stearothermophilus* YC4194. Res Plant Dis 8:234–8.

Yu YH, Cho DH, Ohh SH. 1989. Effect of tolclofos-methyl on damping - off of ginseng seedlings incited by *Rhizoctonia solani*. Korean J Ginseng Ski 13:114–8.

Yu, Y. H. D. H. Cho, S. H. Ohh. 1990. Effect of seedling depth on severity of damping-off ginseng seedlings caused by *Rhizoctonia solani*. 14(3):432–436.

Zamanizadeh HR, Hatami N, Aminaee MM, Rakhshandehroo F. 2011. Application of biofungicides in control of damping disease off in greenhouse crops as a possible substitute to synthetic fungicides. Int J Environ Sci Technol (Tehran) 8:129-36

주 의

1. 이 보고서는 농촌진흥청에서 시행한 「친환경안전농축산물생산기술사업」의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농촌진흥청에서 시행한 「친환경안전농축산물생산기술사업」의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.