

전 략 체 계	혁신 - 2 - 3		구 분	세부완결	
기술분야코드	V1	기술유형코드	C05	작목구분코드	IC-03-1901
과 제 종 류	기관고유		과제번호	LP003663	
과 제 명	인삼 안정생산을 위한 친환경 병해 경감기술 개발				
과 제 책 임 자	성 명		직 급	소속기관 및 부서	
	이 재 형		농업연구사	강원도원 농업환경연구과	
연 구 기 간	2018 ~ 2022		참여연구기관	-	
세부과제명			부 서	세부책임자	연구기간
1) 지상부병 친환경 방제기술 개발 및 실용화 연구			농업환경연구과	이재형	'18 ~ '22
2) 토양병원균 밀도 저감기술 개발 및 현장지원 연구			농업환경연구과	이기욱	'18 ~ '25
색 인 용 어	인삼, 친환경, 잿빛곰팡이병, 예정지, 원인균 밀도분석				

ABSTRACT

A total of 110 microbes were isolated from healthy soils from nine 6-year-old ginseng plantations in Gangwon-do. Through replacement culture with the causative bacteria (*Botrytis cinerea*), BC-046, BC-095, and BC-100 with excellent activity were selected for the first time. As a result of the identification of the first selected antagonist microorganisms, BC-046, BC-095, and BC-100 were identified as *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, and *Bacillus subtilis*, respectively. As a result of the evaluation of the antagonism of the selected antagonistic microorganisms, the activity of the BC-095 strain was the highest. As for antibiotic genes, BC-095 and BC-100 each have four genes, and they also showed protease and cellulase activity. As a result of the treatment of ginseng fields, the control value by treatment zone was 60.5%, 7.5%, and 67.5%, respectively, compared to non-treatment in BC-095, eco-friendly material, and chemical treatment zones. In particular, the control value of BC-095 was approximately 8 times higher. The cryoprotectant for improving the survival rate of selected microorganisms was the highest at 38.4% when treated with 5% skim milk. It was found that the optimal colonization of selected microorganisms in the rhizosphere was established up to 21 days when drenched with culture medium. Optimization conditions such as medium type, temperature, agitation speed, and initial pH were confirmed to confirm culture conditions for mass production of selected antagonistic microorganisms. In the case of BC-046, the growth induction period was shortened after setting the optimal culture conditions, and the cell mass increased by 42% after 10 hours of culture compared to before optimization. As a result of the BC-095 farmhouse verification, 4-year-old organic ginseng farms showed 76% control value. BC-095 will be transferred to Hoengseong-gun and Wonju-si and supplied to farms from 2023.

강원지역 인삼 재배면적은 지속 증가하고 있으나, 평균기온 상승 등 기후변화로 인한 병해 증가로 인삼 안정생산이 위협받고 있다. 인삼 고년근 생산기간 동안 지상부병 중 수량 감소 피해율이 높은 점무늬병과 탄저병의 피해율은 각각 56%와 26% 이다. 인삼 지상부병 생물학적 방제를 위해 *Bacillus subtilis*를 이용한 인삼 점무늬병 방제연구가 수행된 바 있고, 2017년 우리도원에서 인삼 점무늬병 방제에 우수한 활성을 가지는 *Bacillus amyloliquefaciens* KL87을 선발하여 특허출원 한 바 있다. 따라서 본 연구에서는 점무늬병에 이어 인삼의 친환경 방제를 위해 새로운 잣빛곰팡이병 길항미생물 선발 및 방제제를 개발하여 안정적인 인삼 친환경 재배에 기여하고자 한다.

〈제1세부과제: 지상부병 친환경 방제기술 개발 및 실용화 연구〉

(시험 1) 잣빛곰팡이병 방제용 길항미생물 선발

지상부병 친환경 방제기술 개발을 위해 2018년도에 강원도 주요 지역의 건전한 인삼밭의 토양을 채취하여 잣빛곰팡이병의 원인균인 *Botrytis cinerea*의 길항력을 갖는 균주를 선발하였다. 채취한 시료에서 길항미생물을 분리하기 위해 토양 1g과 생리식염수(NaCl 0.85%) 9ml을 섞고 1.5ml conical tube에 10⁻⁴의 농도로 희석하여 미리 제조한 NA배지에 도말하여 30℃에서 1일 동안 배양하였다. 1일 경과 후 모양과 색이 서로 다른 단일콜로니를 needle을 이용해 분리하여 NA 배지에 순수 분리하였다. 분리한 균주들은 20% glycerol에 현탁하여 -70℃ deep freezer에 보관하였다. 원인균인 *Botrytis cinerea* 균주는 농촌진흥청 농업유전자원센터로부터 분양받아 사용하였다. 병원균 보관을 위해 미리 제조해놓은 PDA 배지에 접종하여 25℃ 항온배양기에서 1주일간 배양한 후 멸균한 매스 칼날을 이용해 포자를 긁어 멸균수와 혼합해 포자현탁액을 만들고 20% glycerol을 첨가해 -70℃ deep freezer에 보관하였다. 순수 분리한 길항미생물이 항균 활성을 나타내는지 알아보기 위하여 대치배양법과 펀칭법을 통해 균사생장 억제효과를 검정하였다. 대치배양법은 NA 50% 와 PDA 50%를 혼합한 배지를 만들어 4mm cork borer로 떼어낸 병원균 agar plug를 가운데 접종하고 여기서 3cm 떨어진 주변 4곳에 paper disk를 놓고 각각의 길항미생물 배양액을 100 μ l씩 분주하였다. 위 방법으로 병원균과 길항미생물이 접종된 혼합 배지를 25℃ 항온배양기에서 7일 간 빛을 차단하여 배양하였으며 길항미생물이 균사생장을 억제하는 clear zone 형성 유무를 통해 길항능력이 있는 후보균주를 확인하였다.

(시험 2) 인삼 갯빛곰팡이병 길항미생물 동정

균사생장 억제 능력이 있는 길항미생물을 유전적으로 동정하기 위해 16S rDNA 염기서열 분석을 실시하였다. chromosomal DNA 추출은 LB Broth에서 24 시간 동안 배양시킨 배양액 3mL을 Higene™ Genomic DNA Prep Kit(BIOFACT, Daejeon, Korea)의 방법에 따라 실시하였다. 16s rRNA 부분 증폭을 위해 universal primer인 27F와 1492R primer를 이용하였고 Polymerase Chain Reaction (PCR)은 CFX96™ Touch Thermal Cycler (BIO-RAD, Hercules, CA, USA)를 사용하여 95℃에서 30초간 denaturation 후 65℃에서 30초, 72℃에서 30초 과정을 35회 반복한 후 72℃에서 7분간 반응시켰다. PCR 산물은 1×TAE (Tris acetate-EDTA) buffer를 이용하여 1% agarose gel에서 30분간 전기영동 후 ethidium bromide로 염색하여 UV-transilluminator(DAIHAN Scientific, Korea)에서 DNA 밴드를 확인하였다. 1,600bp 범위에서 증폭된 밴드를 확인 후 Macrogen(서울)에 염기서열 분석을 의뢰하였다. 각각의 염기서열 분석결과는 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에서 BLASTN 프로그램을 이용하여 등록된 염기서열과 비교한 뒤 MEGA X 프로그램 (MEGA, Pennsylvania, PA, USA)을 이용하여 계통도를 작성하였다. 선발균주의 생화학적 분석은 VITEK2 compact (Biomerieux, Craponne, France) 시스템을 이용하여 제품 매뉴얼에 따라 LB Broth 배지에서 25℃, 1일간 배양한 선발미생물의 집락을 원심 분리하여 루프로 따낸 뒤 이를 멸균된 생리식염수에서 2.0 McF의 탁도로 맞춰 BCL card에 침지시켰다. 침지한 card는 제품 카세트에 장착한 뒤 판독 과정을 거쳐 사용하였다. 선발균주의 형태적 특성은 주사형 전자현미경(Scanning Electron Microscope: SEM)을 사용하였으며, 한국기초과학지원연구원(춘천)에 의뢰하여 분석하였다.

(시험 3) 갯빛곰팡이병 길항미생물 방제효과 구명

선발균주의 방제효과를 구명하기 위해 TSB 배지에 35℃에서 72시간 배양 후 배양된 균주를 호모게나이저를 이용하여 세포벽을 제거한 후 세포내·외의 상등액을 이용하여 길항력을 확인하였다. 각각의 용량은 20 μ L, 50 μ L, 100 μ L를 PDA 배지에 분주하여 길항력을 비교하였다. 선발균주의 항생물질 분비 여부를 확인하기 위해 바실러스 속이 주로 가지고 있는 항생물질 유전자를 PCR기법을 이용하여 확인하였다. 항생물질은 Fengycin, Iturin A, Surfactin으로 각각 다양한 사이즈의 유전자를 가지고 있다. PCR 조건은 95℃에서 30초간 denaturation 후 65℃에서 30초, 72℃에서 30초 과정을 28 회 반복한 후 72℃에서 7분간 반응시켰다. 원인균의 세포벽을 분해할 수 있는 효소는 protease와, cellulase를 검정하였다. 길항미생물의 protease 분비를 확인하기 위해 증류수 200mL에 nutrient agar 5g과 skim milk powder 3%를 혼합한 배지를 autoclave (121℃, 30min)하여 petri dish에 분주하여 준비하였다. 준비된 배지에 cork borer를 이용하여 직경 5mm의 구멍을 뚫은 후 미리 배양해놓은 미생물 배양액 20 μ L를 접종하였다. 그리고 25℃에서 5일간 배양한 뒤 배지의 clear zone 형성을 관찰하여 protease 분비를 확인하였다. 길항미생물의 cellulase 분해 효소 분비 여부는 sodium carboxymethyl cellulose (CMC) agar 배지를 Sazci 등 (1986)에서 사용한 방법을 변형하여 확인하였다. 먼저 NA 배지 5g을 증류수 200mL에 녹인 후

CMC(sodium carboxymethyl cellulose) 1%와 congo red 0.01%을 함께 넣어 섞어준 뒤 autoclave를 통해 고압 멸균하여 준비하였다. cellulase 활성 검정 역시 위 방법처럼 미생물 배양액을 접종하여 25℃에서 5일간 배양하여 배지의 clear zone 형성을 관찰하였다.

(시험 4) 잣빛곰팡이병 친환경 방제기술 효과 구명

본 연구는 시험 3에서 길항효과가 가장 좋았던 균주를 강원도 철원군 인삼약초연구소내 5년근 인삼 포장에 처리하여 방제 효과를 확인하였다. 선발 균주 및 무처리를 포함하여 시판용 친환경 자재와 화학약제를 대조구로 활용하였다. 처리 시기는 잣빛곰팡이병 발생 전 4회, 발생 초 4회 총 8회를 일주일 간격으로 처리하였다. 발병률은 4회 처리 후부터 일주일 간격으로 조사하였다.

(시험 5) 선발 미생물 생존율 향상을 위한 동결보호제 선발

선발 미생물의 장기간 보존 시 생존율 향상을 위해 동결보호제를 선발하였다. 동결보호제는 탈지유, 포도당, 펩톤을 이용하였고, 보호제를 각각 배양액의 5%, 10%를 처리하여, 동결 건조 전과 후의 CFU(Colony Forming Unit) 를 측정하였다. 생존율은 동결건조 후 시료의 CFU값과 동결건조 전의 시료의 CFU값을 나눈 후 100을 곱하여 계산하였다.

(시험 6) 선발 미생물 최적 정착방법 개발

본 연구는 관주처리 한 선발균주가 인삼뿌리의 근권에 얼마나 잘 정착하는지를 알아보기 위해 실시하였다. 일정한 크기의 묘삼을 포트에 이식하여 본엽이 4~5매 전개되었을 때 동결건조 된 원제를 희석하여 배양액의 균수와 일정하게 맞춘 후 처리하였고, 대조구로는 증량제와 증류수만 처리하였다. 처리 농도는 1.0×10^5 CFU/mL 으로 하였고 NA배지에서 72시간 배양하여 사용하였다. 처리는 1회 50ml을 관주하였고, 처리 전·후 7일 간격으로 3회 조사하였다. 조사는 시기별로 5개체씩 채취하여 냉동보관 한 후 한꺼번에 TSA배지에 도말하여 CFU를 측정하였다.

(시험 7) 선발 길항미생물 특성검정(배양특성)

선발한 길항미생물(BC-095)의 대량생산을 위한 배양 특성을 알아보기 위해 최적 온도, 최적 배지, 최적 pH를 각각 측정하였다. 최적 온도를 확인하기 위하여 25℃ ~ 50℃까지 5℃간격으로 세팅된 진탕배양기에 TSB(Tryptic soy broth, Difco, USA) 배지에 접종된 A11을 동일양 첨가하고, 분광광도기를 사용하여 OD 600nm에서 1시간 마다 12시간까지 측정하여 균주의 생육을 확인하였다. 최적 배지는 TSB (Tryptic soy broth, Difco, USA), LB (Luria-Bertani broth, Difco, USA), NB (Nutrient broth, Difco, USA) 배지를 이용하여 최적 온도인 35℃에서 온도 측정과 같은 조건으로 측정하여 균체의 생육을 확인하였다. 최적 pH 특성 검정은 pH 5 부터 pH 9 까지 5구간으로 나누어 TSB 배지와 35℃ 조건에서 상기와 같은 방법으로 측정하였다. 이외에도 교반속도, 탄소원, 탄소 농도, 질소원, 질소 농도, 무기염류와 무기염류 농도를 각각 측정하였다.

(시험 8) 잣빛곰팡이병 친환경 방제기술 농가 실증

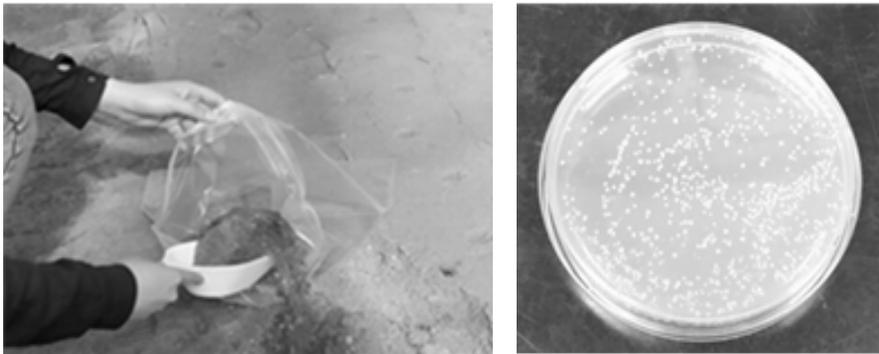
연구소내 포장에서 확인된 선발균주의 방제가를 농가실증하기 위해 화천지역의 유기농 재배 농가 2곳을 선정하여 시험 4의 방법으로 처리 한 후 잣빛곰팡이병의 발병률과 방제가를 확인하였다.

3 결과 및 고찰

〈제1세부과제: 지상부병 친환경 방제기술 개발 및 실용화 연구〉

(시험 1) 잣빛곰팡이병 방제용 길항미생물 선발

토양시료 수집을 위해 철원, 홍천을 포함한 도내 6년근 재배지 9개소에서 건전한 토양을 수집하였다(그림 1). 수집한 토양에서 분리한 미생물은 총 110점으로 1차 스크리닝을 위해 그림 2와 같이 원인균과의 대치 배양을 통해 활성을 확인한 후 활성도를 표 1에 나타내었다. 상대적으로 활성이 우수한 BC-046, BC-095, BC-100을 1차 선발하였다.

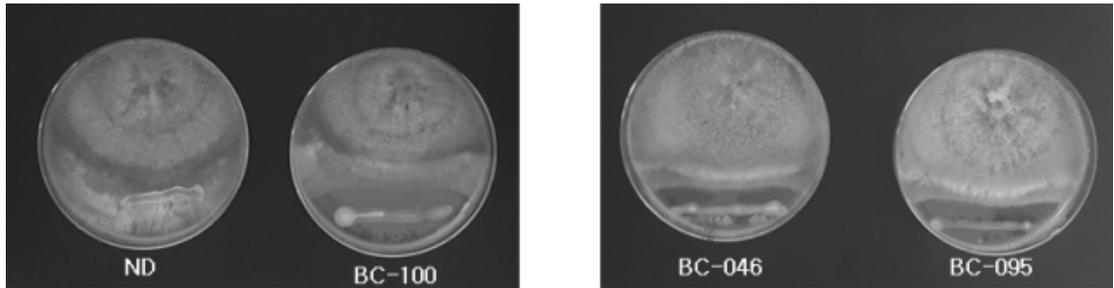


(그림 1) 인삼 재배지 토양시료 수집 및 토양미생물 분리

<표 1> 선발균주 길항활성

일련번호	활성도(mm)	비고 [†]	일련번호	활성도(mm)	비고
BC-010	3	++	BC-083	6	+++
BC-046	8	+++	BC-087	8	+++
BC-059	3	++	BC-095	8	+++
BC-064	3	++	BC-100	9	+++
BC-065	4	++	BC-108	4	++

[†] 억제활성 +: >3mm, ++: 3~5mm, +++: <5mm



* ND: not detected

(그림 2) 잿빛곰팡이병원균 길항미생물 1차 선별

(시험 2) 인삼 잿빛곰팡이병 길항미생물 동정

1차 선별한 길항미생물을 유전적으로 동정하기 위해 각 균주의 Genomic DNA를 추출하여 (그림 3-A) PCR한 결과(그림 3-B, C)를 가지고 염기서열 분석을 한 결과 표 2처럼 모두 바실러스 속으로 확인되었다. BC-046은 *Bacillus thuringiensis*와 98%의 상동성을 보였고, BC-095는 *Bacillus amyloliquefaciens*와 99%상동성을 보였으며, BC-100은 *Bacillus subtilis*와 가장 유사하였다. SEM 촬영 결과도 그림 4와 같이 바실러스의 전형적인 모습인 간균 형태였으며, 유전적 결과를 보조적으로 확인한 생화학적 분석(표 3)도 유전적 분석과 일치하는 결과를 나타내었다. 일반적으로 길항작용을 갖는 미생물 속이 주요균이 바실러스인 점을 감안하면 자연스러운 결과값이라 할 수 있다. 특히 BC-046의 경우는 일명 BT균으로 살충효과를 갖는 것으로 알려져 있다. 따라서 추후에 살충 효과 여부도 확인해 볼 필요가 있으리라 사료된다. 생화학적 분석은 전체 46가지의 기질에 균주의 생육여부(탁도)로 확인하는데 판독결과 일부 불일치되는 경우도 있었지만 대체적으로 유전적 동정 결과와 유사하였다.



(A) DNA 추출

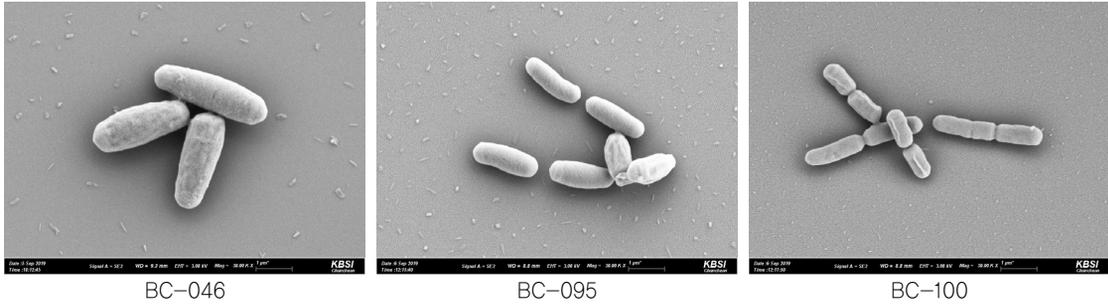
(B) PCR 증폭(ITS)

(C) PCR 증폭(16S)

(그림 3) 길항미생물 동정을 위한 유전자 분석

<표 2> 인삼 잿빛곰팡이병 원인균 길항미생물 동정

No.	Strains	Primer	Identification	Homology(%)	Origin
1	BC-046	27F 1492R	<i>Bacillus thuringiensis</i>	98	토양
2	BC-095	27F 1492R	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99	토양
3	BC-100	27F 1492R	<i>Bacillus subtilis</i>	84	토양



(그림 4) 길항미생물 형태적 동정(SEM)

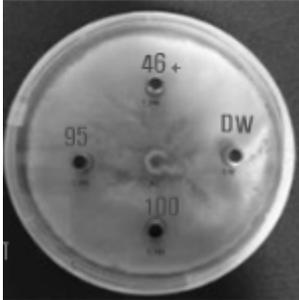
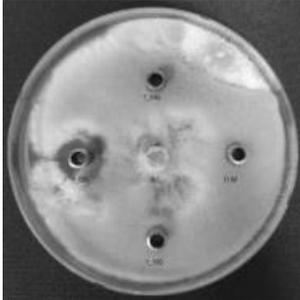
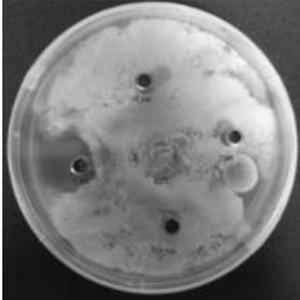
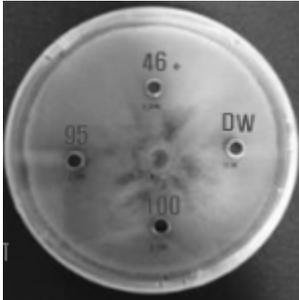
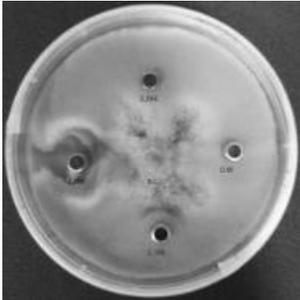
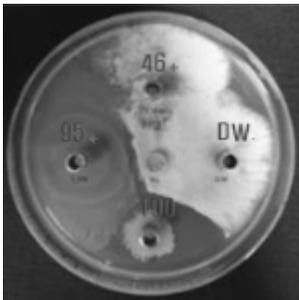
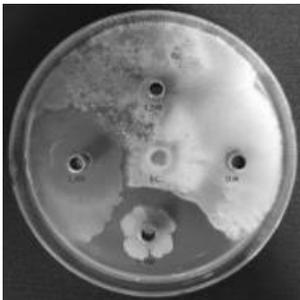
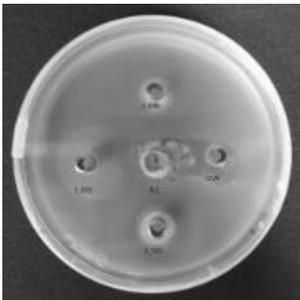
<표 3> 선발 균주별 생화학적 특성분석 및 동정

No.	Biochemical test	046	095	100
1	BETA-XYLOSIDASE	-	+	+
2	L-Lysine-ARYLAMIDASE	-	-	-
3	L-Aspartate ARYLAMIDASE	-	-	-
4	Leucine ARYLAMIDASE	-	-	-
5	Phenylalanine ARYLAMIDASE	+	+	-
6	L-Proline ARYLAMIDASE	-	-	-
7	BETA-GALACTOSIDASE	-	-	-
8	L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE	+	+	+
9	ALPHA-GALACTOSIDASE	-	+	(-)
10	Alanine ARYLAMIDASE	+	-	-
11	Tyrosine ARYLAMIDASE	+	(+)	-
12	BETA-N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE	+	+	-
13	Ala-Phe-Pro ARYLAMIDASE	+	+	+
14	CYCLODEXTRINE	+	-	-
15	D-GALACTOSE	-	-	-
16	GLYCOGENE	-	-	-
17	myo-INOSITOL	-	-	-

No.	Biochemical test	046	095	100
18	METHYL-A-D-Glucopyranoside acidification	-	(-)	+
19	ELLMAN	+	-	-
20	METHYL-D-XYLOSIDE	-	-	-
21	ALPHA-MANNOSIDASE	-	-	-
22	MALTOTRIOSE	(-)	-	-
23	Glycine ARYLAMIDASE	-	(+)	-
24	D-MANNITOL	-	+	+
25	D-MANNOSE	-	+	+
26	D-MELEZITOSE	-	-	-
27	N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE	+	-	-
28	PALATINOSE	-	-	+
29	L-RHAMNOSE	-	-	-
30	BETA-GLUCOSIDASE	-	+	+
31	BETA-MANNOSIDASE	-	-	-
32	PHOSPHORYL CHOLINE	-	-	-
33	PYRUVATE	+	+	+
34	ALPHA-GLUCOSIDASE	(+)	-	-
35	D-TAGATOSE	-	-	-
36	D-TREHALOSE	+	+	+
37	INULIN	-	-	-
38	D-GLUCOSE	+	(-)	+
39	D-RIBOSE	+	-	+
40	PUTRESCINE assimilation	-	-	-
41	Growth in 6.5% NaCl	-	+	+
42	KANAMYCIN RESISTANCE	+	-	-
43	OLEANDOMYCIN RESISTANCE	-	(-)	-
44	ESCULIN hydrolyse	+	+	+
45	TETRAZOLIUM RED	-	+	-
46	PLOMIXIN B RESISTANCE	+	-	-
Identification result		<i>B. thuringiensis</i> <i>B. amyloliquefaciens</i> <i>B. subtilis</i>		

(시험 3) 잿빛곰팡이병 길항미생물 방제효과 구명

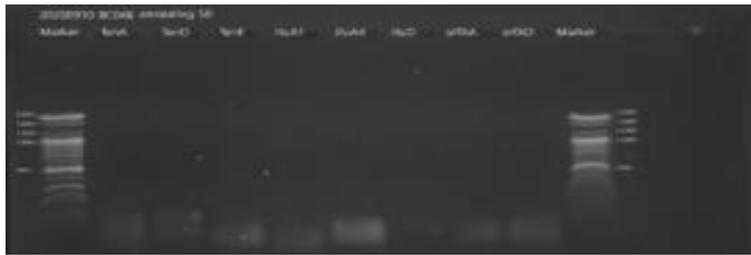
동정한 3균주의 길항효과를 검정하기 위해 최적배지에 72시간 배양한 균주를 원심분리하여 세포내액과 외액으로 분리하고 용량에 따라 대치 배양을 실시하여 정성적으로 활성여부를 확인하였다. 그림 5와 같이 20 μ l 배양액으로 처리 시 BC-095와 BC-100에서 강한 항균 활성을 보여주었으나, 세포내·외에서는 활성이 보이지 않았다. 50 μ l 이상으로 처리부터 균사에 대한 길항작용을 보여주었고 BC-095의 활성이 가장 우수하였다. 추가적인 길항작용을 알아보기 위해 바실러스 속 미생물이 가지고 있는 항생물질 유전자를 확인하였다. 표 4와 같이 3개의 항생제 생산 유전자 프라이머를 이용하여 PCR한 결과 BC-095와 BC-100에서 각각 4개의 유전자가 확인되었고, BC-046에서는 검출되지 않았다. BC-046 균주는 단백질 분해효소와 셀룰로스 분해효소만 확인 할 수 있었다(그림 9). 이러한 결과는 그림 5의 정성적 결과를 뒷받침해주는 결과로 BC-095를 잿빛곰팡이병 길항미생물로 최종 선발하였다.

구분 \ 용량	20 μ l	50 μ l	100 μ l
세포 외 (Extra cellular)			
세포 내 (Intra cellular)			
배양액 처리			

(그림 5) 선발 균주 활성 검정

<표 4> 바실러스 속 항생물질 유전자 검정 프라이머

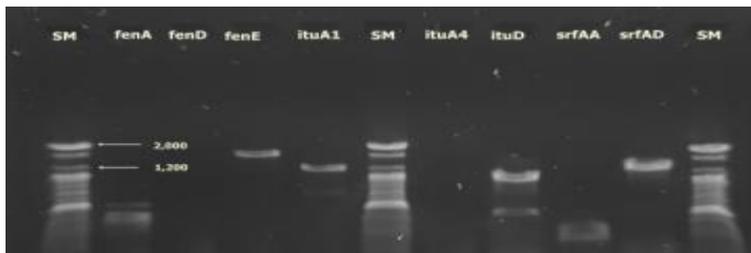
No.	Primer	Sequence	Antibiotic	Size(bp)
1	fenA-F fenA-R	CCT CGC TCC GCA TGA TCT TTT GG CGG GAG CAC GGT GGC AAT GTG		1574
2	fenD-F fenD-R	TTT GGC AGC AGG AGA AGT TT GCT GTC CGT TCT GCT TTT TC	Fengycin	2000
3	fenE-F fenE-R	GTT TCA TGG CGG CGA GCA CG GAT TCG CGG GAA GCG GAT TGA GC		1580
4	ituA1-F ituA1-R	CGC CCG TGA AGG AGC AGC CG GCC AGG AAG CGG GGC TTC AC		1445
5	ituA4-F ituA4-R	CTG CCT GCG TAT ATG ATT CCG GC CCG TGA TGA TGC CGT TCT TCA ATC C	Iturin A	920
6	ituD-F ituD-R	ATG AAC AAT CTT GCC TTT TTA TTA TTT TAA AAT CCG CAA TT		998
7	srfAA-F srfAA-R	GCC CGT GAG CCG AAT GGA TAA G CCG TTT CAG GGA CAC AAG CTC CG		1485
8	srfAD-F srfAD-R	CCG TTC GCA GGA GGC TAT TCC CGC CCA TCC TGC TGA AAA AGC G	Surfactin	1239



[그림 6] BC-046 항생물질 유전자 검정



[그림 7] BC-095 항생물질 유전자 검정



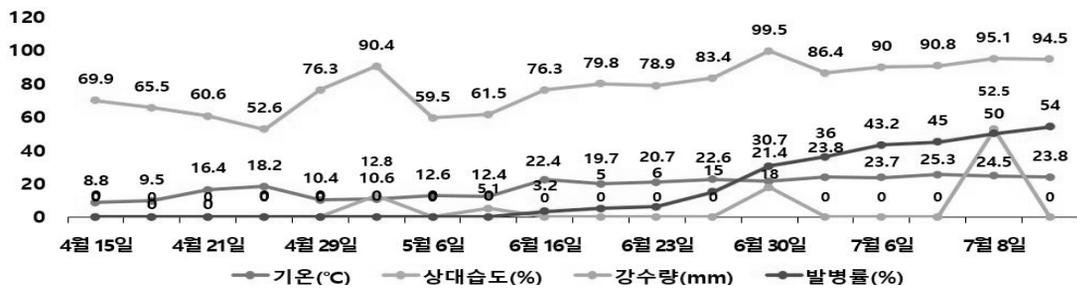
[그림 8] BC-100 항생물질 유전자 검정



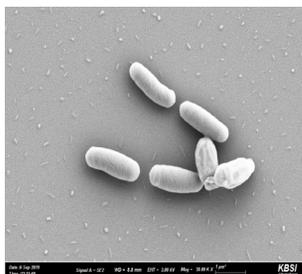
(그림 9) 선발 균주의 효소 활성 검정(좌: protease, 우: cellulase)

(시험 4) 잿빛곰팡이병 친환경 방제기술 효과 구명

잿빛곰팡이병 지상부 발병률 및 방제가 조사를 위한 약제 처리는 병 발생 전 4회(4. 15., 4. 22., 4. 30., 5. 6.)와 발생 초 4회(6. 17., 6. 24., 7. 1., 7. 9.) 총 8회를 관주 처리하였다. 그림 10은 처리 시기를 화살표로 나타내었고, 처리 시기의 기온과 상대습도, 강수량을 표시하였다. 6월 23일까지 미미하던 발병률이 강수량이 많아지는 6월 24일부터 증가하기 시작하여 7월 9일에 54% 까지 증가하였다. 최종 선발한 미생물제(BC-095)는 1×10^6 cfu/ml 수준으로 처리하였고 시판용 친환경자재 및 화학약제는 권장 사용량으로 처리하였다(그림 11). 처리구별 방제가는 BC-095, 친환경자재, 화학약제 처리구에서 각각 60.5%, 7.5% 및 67.5%로 나타났으며, 특히 BC-095의 방제가는 시판용 친환경자재에 비해 약 8배 높음을 확인하였다(그림 12). 방제가 조사시기의 포장 상태는 표 5와 같다.



(그림 10) 약제 처리시기별 기상환경 및 잿빛곰팡이병 발병률



BC-095



시판용 친환경자재(*B. subtilis*)



화학약제(펜피라자민)

(그림 11) 처리약제의 종류

$$\text{방제가(\%)} = \frac{[\text{무처리구 발병률} - \text{처리구 발병률}]}{\text{무처리구 발병률}} \times 100$$

<표 5> 처리구별 지상부 잿빛곰팡이병 발병상황 및 생육양상(5년근)

조사일: 7월 13일

처리구	발병상황									지상부 잎 양상	지상부 줄기 양상	
	A	B	C	D	E	F	G	H	I			
무처리	1	1	1	2	1	1	1		1	1		
	2		1	1	1				1			
	3	1	1	1	1	1			1	1		
	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
	5			2	1	1	1	1	1	1		
	6	1			1	1	1	1	1	1		
	7	2	1	2	1	1	2	1	1	1		
BC-095	1	1	1	1	1	1	2		1	1		
	2	1	1	1	1	1	1	1	1	2		
	3	1	1	1			1		1			
	4	1		1	1	1	1	1	1			
	5	1	1	1	1	2	1	1	1	1		
	6		1	2	1	2	2	2	1	1		
	7	1	2		1	2		1		1		
친환경자재	1	1	1	1	1				1			
	2	1		1		1				1		
	3	1		1		2			2			
	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
	5				3	1	1	1	1			
	6	1		1	2	1	1	2	1	1		
	7	1	1	1	2	1	1	2	1	1		
화학약제	1	1	1	1	1				1			
	2	2		1	1	1	1	1	2	1		
	3			1	1	1	1	1	1			
	4	1	1	1	1	1	1			1		
	5	1		1	1	1	2	1	1			
	6	1	1		1	1	1	1	1	2		
	7	1	1	2	2	1		1	1	2		

■: 결주, □: 이병주(숫자는 발병 경수)

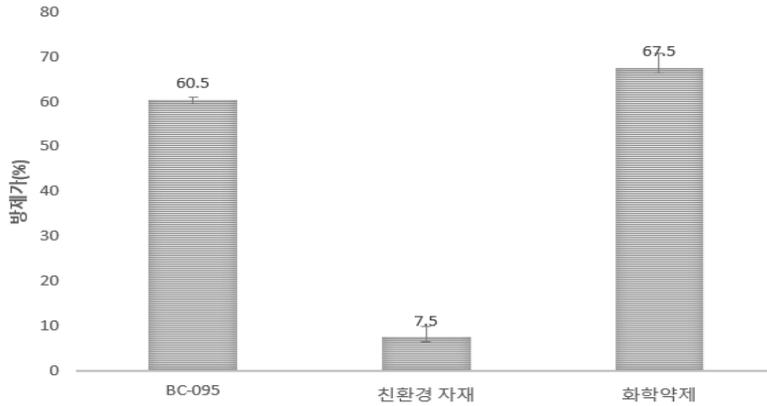


그림 12. 지상부 잣빛곰팡이병 방제가(5년근, 조사 7. 13.)

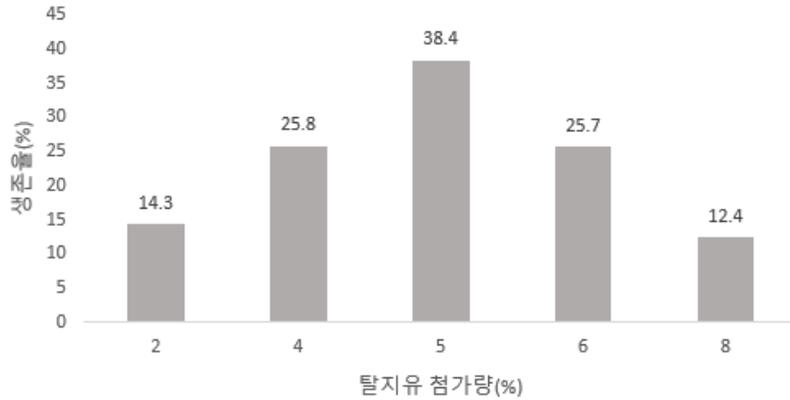
(시험 5) 선발 미생물 생존율 향상을 위한 동결보호제 선발

선발 미생물의 생존율 향상을 위한 동결보호제 선발은 미생물 동결보호제로 주로 사용하는 탈지유와 포도당, 펩톤을 5% 처리시 탈지유 처리구의 BC-095 생존율이 39.2%로 가장 높게 나왔다. 10% 처리구에서는 무처리보다는 높은 생존율을 보였지만 5% 처리구에 비해서는 낮은 생존율을 보여주었다(표 6). 보다 정확한 탈지유 첨가량을 알아보기 위해 탈지유를 2, 4, 5, 6, 8%로 처리하여 생존율을 확인 한 바 5% 처리시에 38.4%로 가장 높은 수치를 보여주었다(그림 13). 따라서 BC-095를 동결 건조하여 사용할 때는 탈지유 5%를 사용하는 것이 가장 바람직하다고 판단된다.

$$\text{생존율(\%)} = \frac{\text{동결건조 후 시료의 } cfu\text{값}}{\text{동결건조 전 시료의 } cfu\text{값}} \times 100$$

<표 6> 동결보호제 첨가량 및 종류에 따른 BC-095 생존율

보호제 첨가량 (%)	보호제 종류	CFU/ml		생존율 (%)
		건조 전	건조 후	
5	Skim milk	1.71×10^{10}	6.67×10^9	39.2
	Glucose	3.43×10^9	3.13×10^8	9.1
	Peptone	5.21×10^{10}	5.32×10^9	10.2
10	Skim milk	1.99×10^{10}	8.41×10^9	10.4
	Glucose	1.21×10^9	1.51×10^8	12.5
	Peptone	1.71×10^9	1.41×10^7	0.8
	무처리	2.47×10^{10}	6.33×10^8	2.6



(그림 13) 탈지유 첨가량에 따른 BC-095 생존율

(시험 6) 선발 미생물 최적 정착방법 개발

본 연구는 선발된 BC-095를 관주 처리 했을 때 처리 방법에 따른 인삼 근권의 정착여부를 알아보기 위해 실시하였다. 그림 14와 같이 본엽이 4~5매 전개되었을 때 동결건조한 원제 BC-095와 배양액을 1회 처리한 후 처리 전·후 일주일 간격으로 3회 인삼 뿌리를 굴취하여 근권의 미생물을 배양하였다. 배양 결과 그림 15와 같이 BC-095의 형태로 배양된 경우는 배양액 처리시에만 나타났다. 처리 후 21일까지 근권에 정착하는 걸로 미루어 볼 때, 관주 처리 시기는 최대 21일을 넘기지 않는 것이 중요하리라 판단된다(그림 16). 원제처리의 경우는 원제 물에 잘 용해되지 않았을 경우와 관주 후 다른 미생물과의 경합에서 우점하지 못했을 가능성이 있으리라 유추된다.



묘삼 선별(3. 31.)

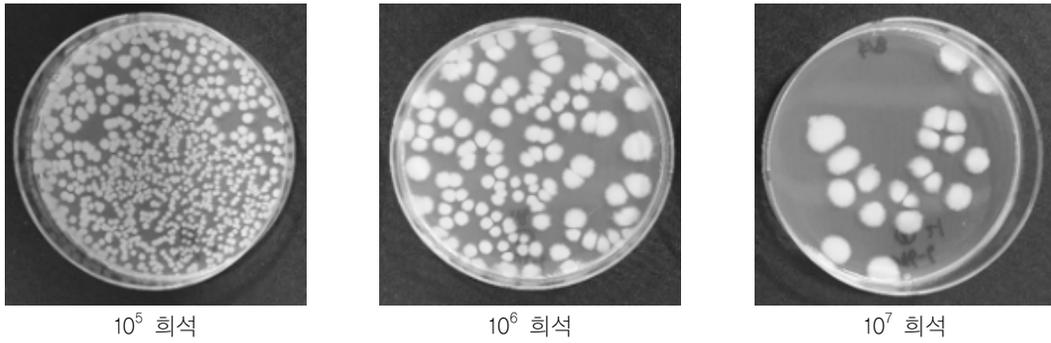


묘삼 정식(4. 1.)



본엽 전개(5. 29.)

(그림 14) 포트 균주 처리 준비



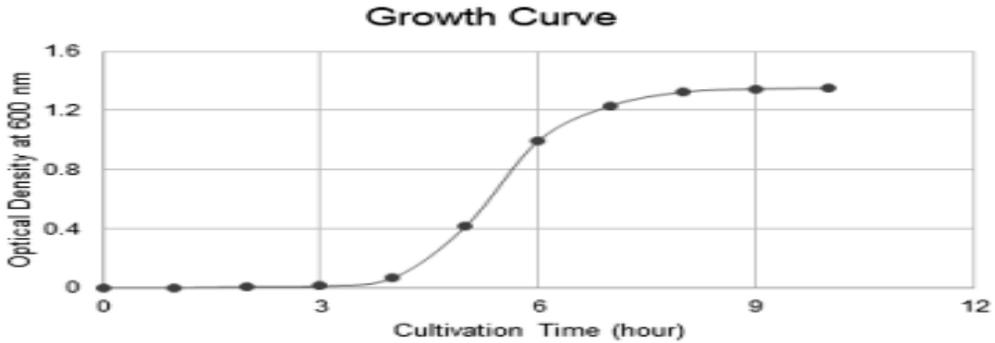
(그림 15) BC-095 원제 생균수 측정

구분	처리 전	처리 후 7일	처리 후 14일	처리 후 21일
원제 처리				
배양액 처리				
무처리 (증량제 처리)				
무처리 (증류수처리)				

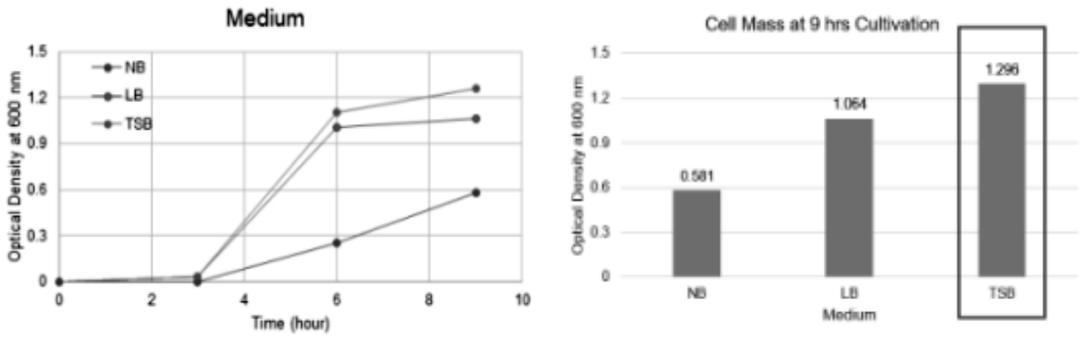
(그림 16) 근권 미생물 분포(1.0×10^5 CFU/mL 처리, NA, 30°C, 72hr 배양)

(시험 7) 선발 길항미생물 특성검정(배양특성)

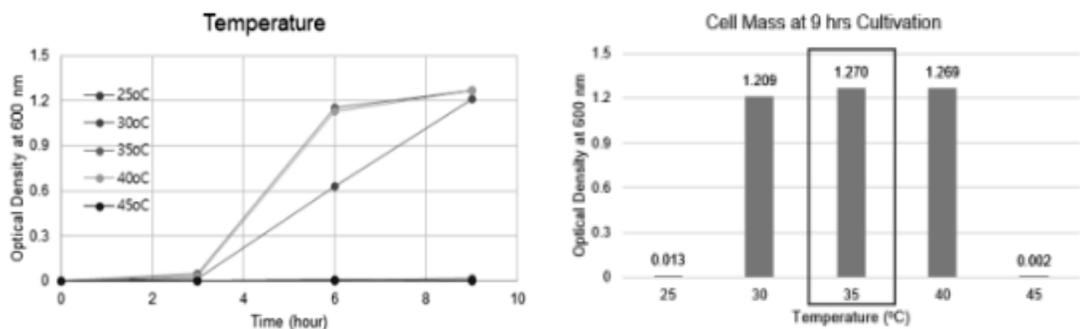
1차 선발한 길항미생물의 대량생산을 위한 배양 특성을 알아보기 위해 BC-046(그림 17-27)의 배지 종류, 온도, 교반 속도, 배양 부피, 초기 pH 등의 최적 조건을 확인하였고, BC-095(그림 29-32)와 BC-100(그림 33-36)도 기본적인 배양특성을 확인하여 최적화하였다. 하지만 다음과 같은 시험결과는 실험실 수준에서의 결과이고 스케일업을 통한 발효조에서 정밀한 추후 시험이 요구된다. 한편 BC-046의 경우 최적 배양 조건 설정 후 생육 유도기는 짧아지고 10시간 후 균체량이 기존에 비해 42% 증가함을 알 수 있었다(그림 28).



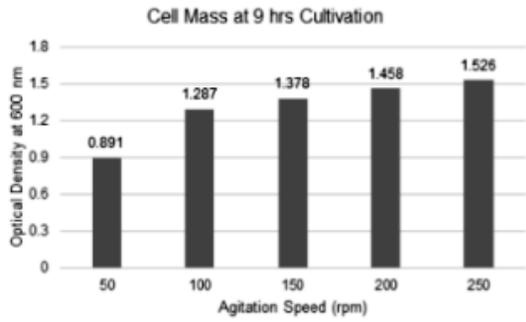
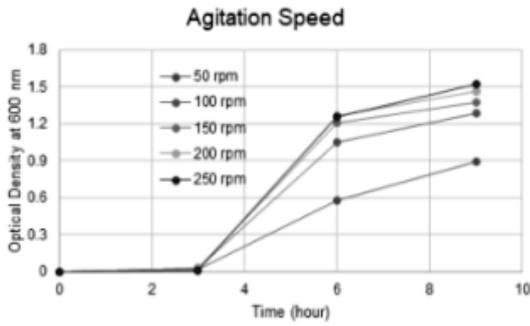
(그림 17) BC-046 생장 곡선



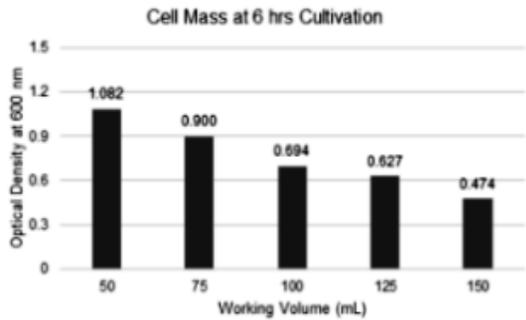
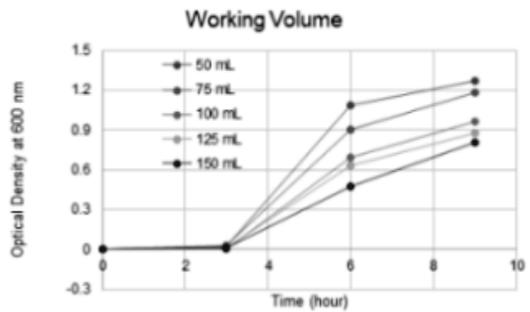
(그림 18) BC-046 최적배지 시험



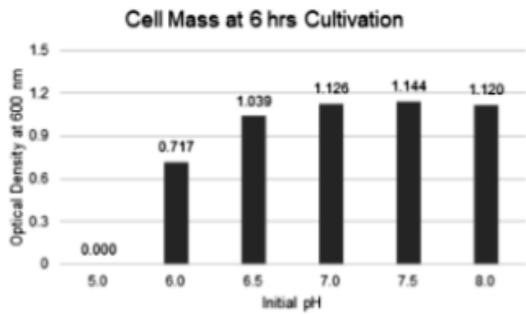
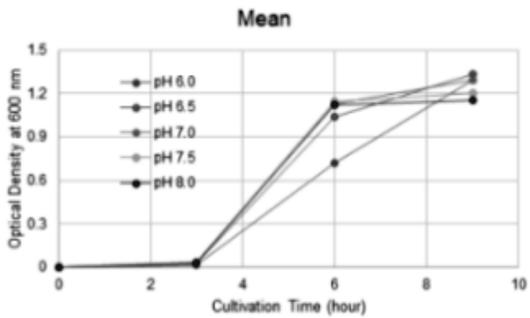
(그림 19) BC-046 최적온도 측정



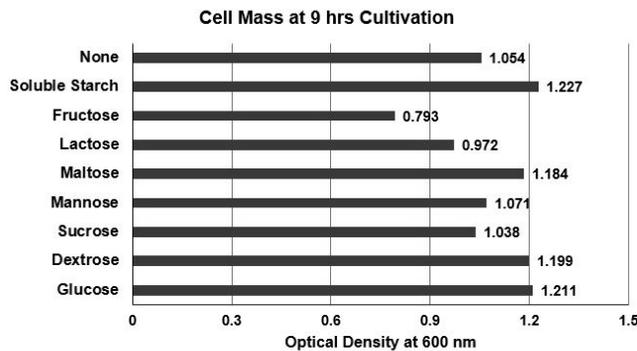
[그림 20] BC-046 최적 교반속도 측정



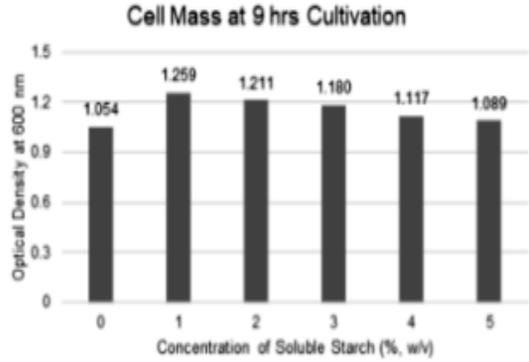
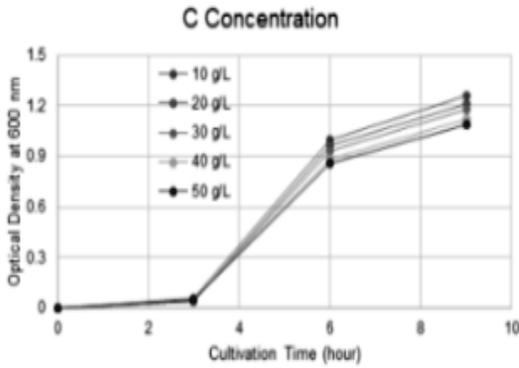
[그림 21] BC-046 최적 배양 부피 측정



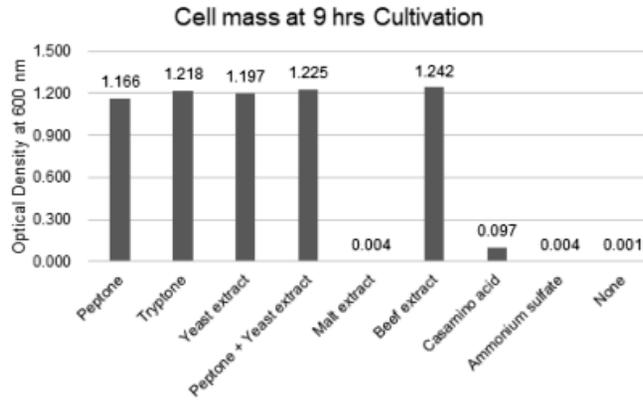
[그림 22] BC-046 최적 pH 측정



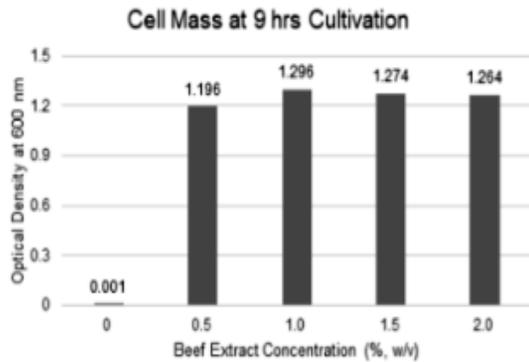
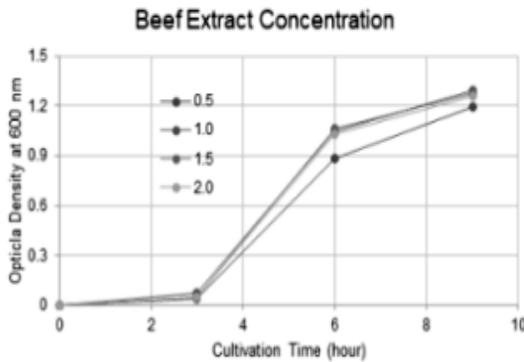
[그림 23] BC-046 탄소원에 따른 생육 비교



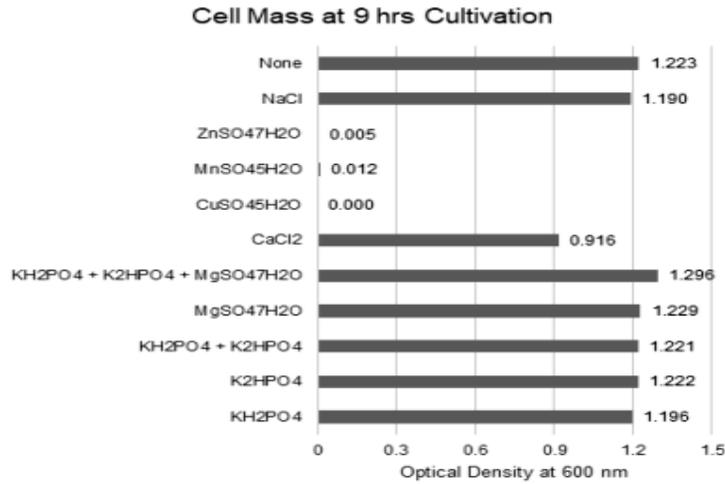
(그림 24) BC-046 탄소원(Soluble starch) 농도별 생육 측정



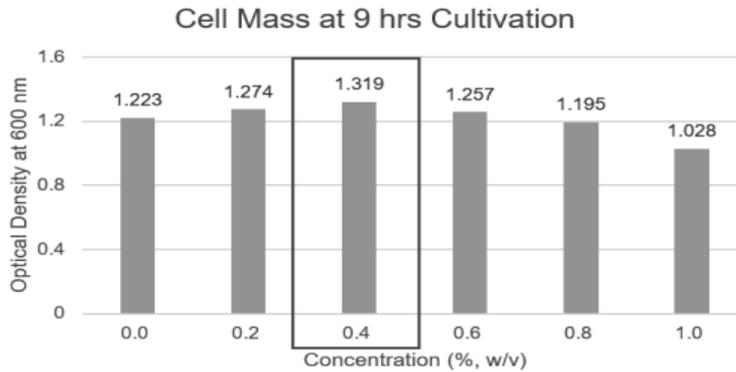
(그림 25) BC-046 질소원에 따른 생육 비교



(그림 26) BC-046 질소원(Beef extract) 농도별 생육 측정



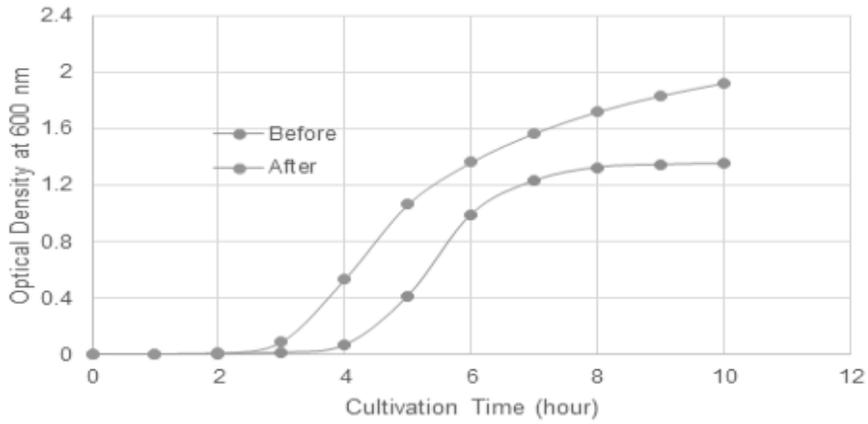
[그림 27] BC-046 무기염류에 따른 생육 비교



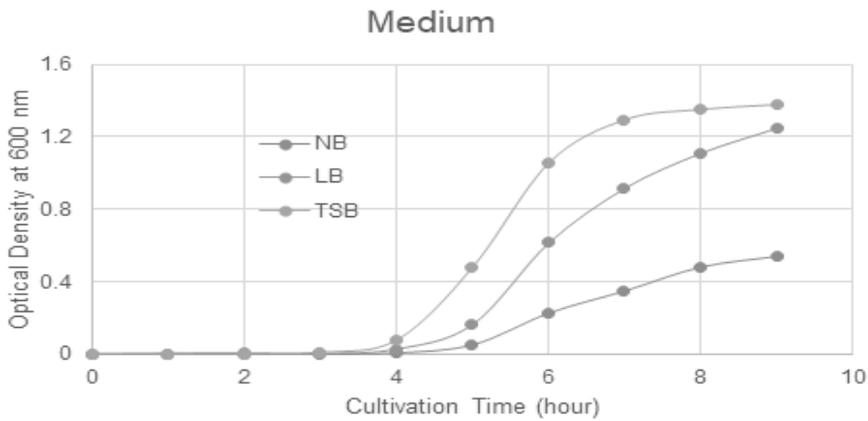
[그림 28] BC-046 무기염류 농도에 따른 생육 비교

<표 7> BC-046 균주의 최적 배양 조건 설정

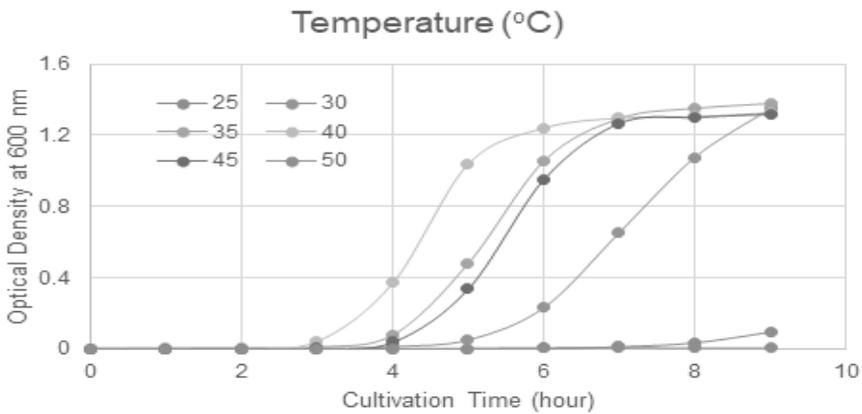
No.	구 분	최적 조건
1	배지 종류	TSB(Tryptic Soy Broth)
2	온도	35℃
3	교반 속도	100 rpm
4	배양 부피	50 ml
5	초기 pH	7.0
6	탄소원	Soluble starch
7	탄소 농도	1%
8	질소원	Beef extract
9	질소 농도	1%
10	무기염류	KH ₂ PO ₄ + K ₂ HPO ₄ + MgSO ₄ ·7H ₂ O(1:2:1)
11	무기염류 농도	0.4%



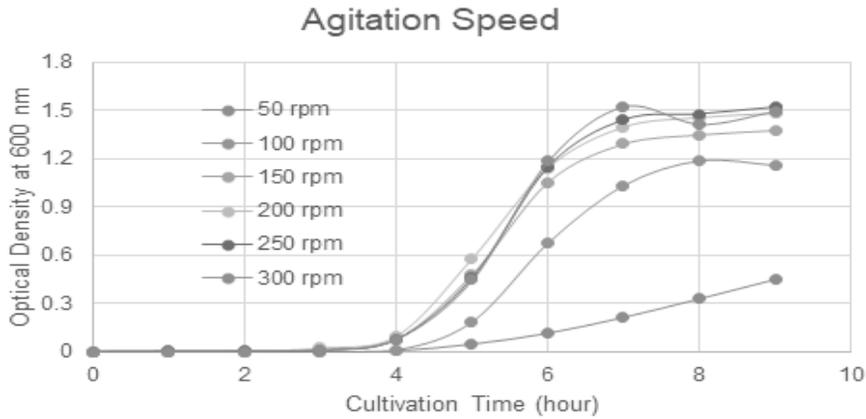
(그림 29) BC-046 최적 배양조건 설정 전·후 비교



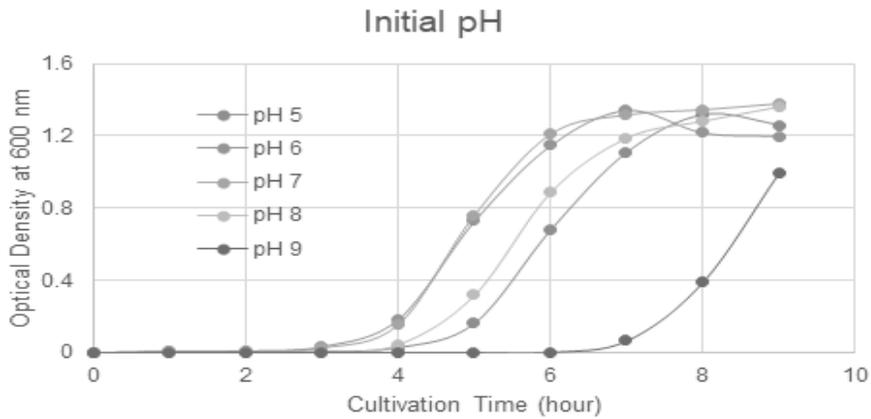
(그림 30) BC-095 최적 배지



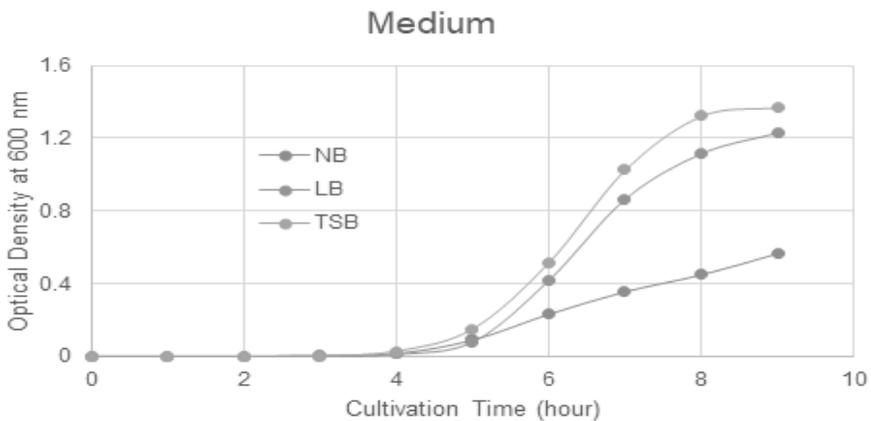
(그림 31) BC-095 최적 온도



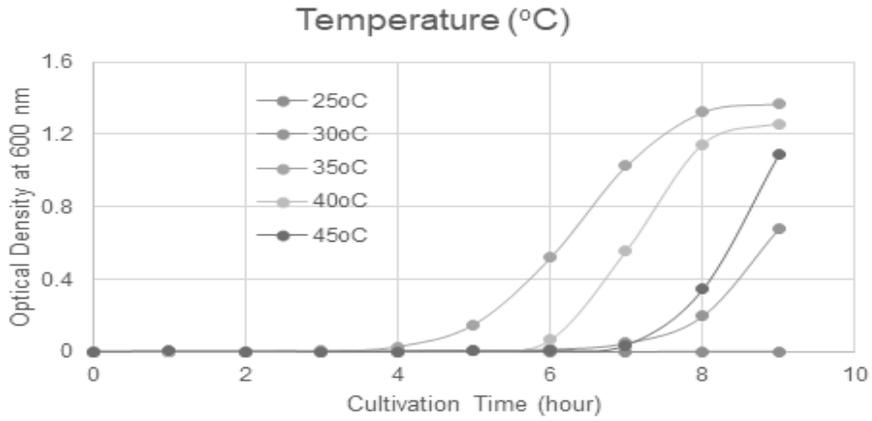
(그림 32) BC-095 교반 속도



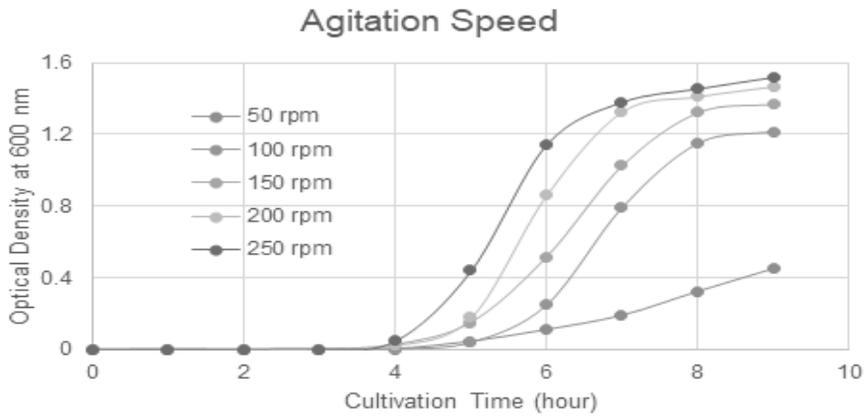
(그림 33) BC-095 최적 pH



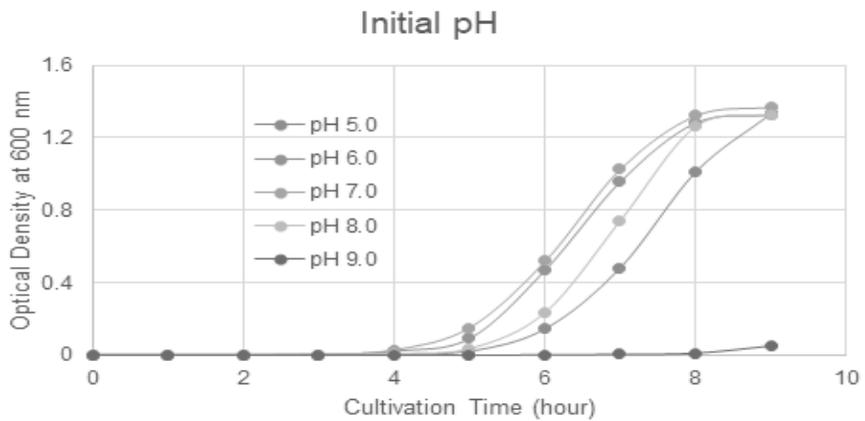
(그림 34) BC-100 최적 배지



(그림 35) BC-100 최적 온도



(그림 36) BC-100 최적 교반 속도



(그림 37) BC-100 최적 pH

(시험 8) 잿빛곰팡이병 친환경 방제기술 농가 실증

BC-095의 농가 실증은 화천에서 유기농으로 재배하는 2농가를 선정하여 시험 4와 동일한 방법으로 약제를 처리하고 잿빛곰팡이병 발병률 및 방제가를 확인하였다. 유기농 재배 농가를 선정한(표 9) 이유는 화학약제 처리에 의한 효과를 최대한 배제하기 위해서이며, BC-095의 처리는 보관의 용이성을 위해 탈지유 5%로 동결건조한 미생물제를 이용하였다(표 8). 발병엽율은 발병엽면적을 전체엽면적으로 나누어 100을 곱하여 계산하였다. 약제는 7월 4일까지 처리했으며, 방제가는 7월 4일부터 8월 29일까지 조사하였다. 4년근 농가에서 방제가는 8월 1일까지 76%를 유지하다가 8월 16일부터 급격히 낮아지는 경향을 보였다. 이는 우리나라의 날씨 특성 상 높은 기온과 다습한 환경 조건 때문이라 판단된다(표 10, 11). 8월 16일의 발병엽율은 통계적 유의성도 보여주었다. 유기농 재배 3년근 인삼의 BC-095 처리 방제가는 92.6%에서 100% 수준을 보여주었으나, 8월 중순부터 급격히 낮은 방제가를 보여주었다(표 13). 아마도 반비가림 시설이라 장마기에 빗물이 유입되어 잿빛곰팡이병이 다발생 되었을 것으로 판단된다. 유기농 4년근 재배 농가와 같이 8월 초순 추가적인 방제가 필요하리라 생각된다. 이와 같은 결과를 바탕으로 횡성군과 원주시에 BC-095를 기술이전하여 2023년부터 농가에 보급할 예정이다(그림 38).

<표 8> 인삼 잿빛곰팡이병 원인균 길항미생물제(BC-095) 제조

균주	동정결과	제조량(kg)	생균수 측정(cfu/g)
BC-095	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1.89	3.65×10^{12}

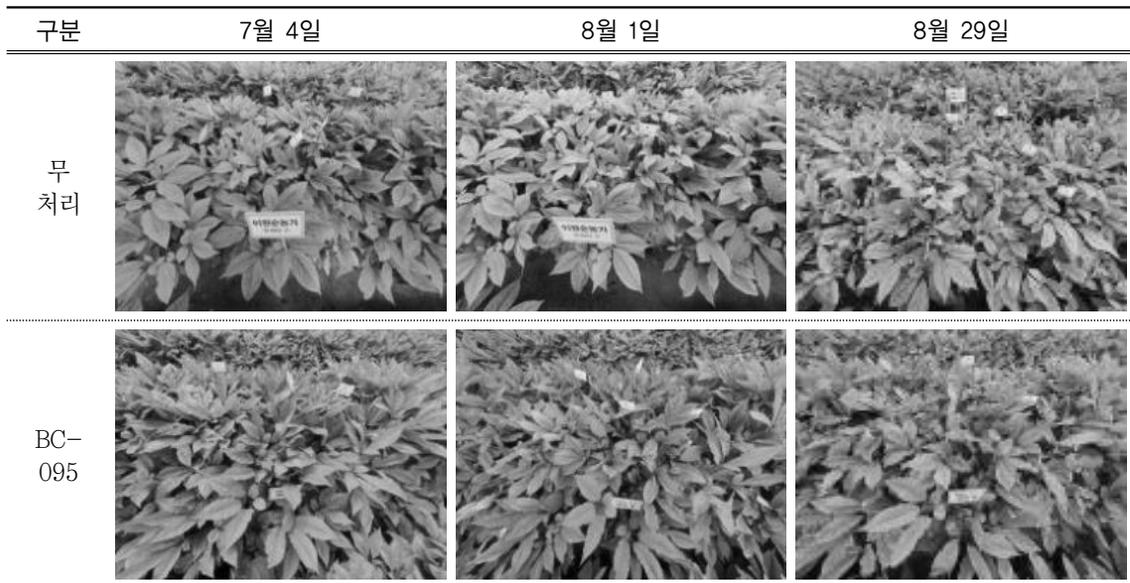
<표 9> 실증 농가 목록

이름	주소	연근	비고
이O순	화천군 계파로 177-4	4	비가림(유기농)
길O관	화천군 안평리 14-39	3	비가림(유기농)

$$\text{발병엽율(\%)} = \frac{\text{발병엽면적}}{\text{전체엽면적}} \times 100$$

$$\text{방제가(\%)} = \frac{[\text{무처리구발병률} - \text{처리구발병률}]}{\text{무처리구발병률}} \times 100$$

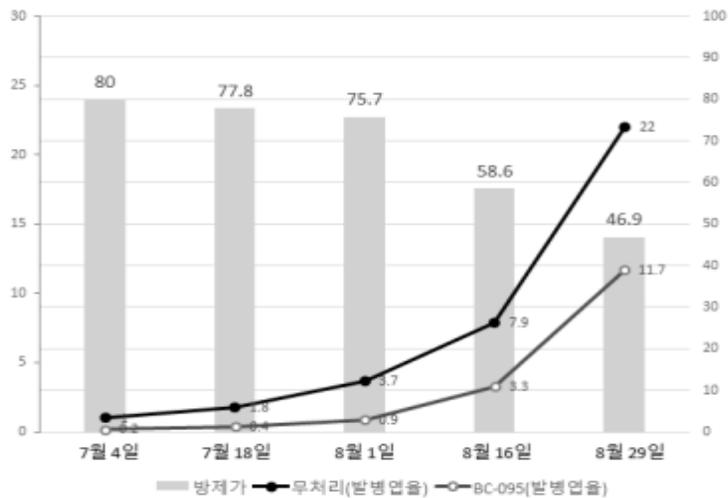
<표 10> 처리구별 지상부 생육 현황(4년근)



<표 11> 처리구에 따른 지상부 발병엽률 및 방제가

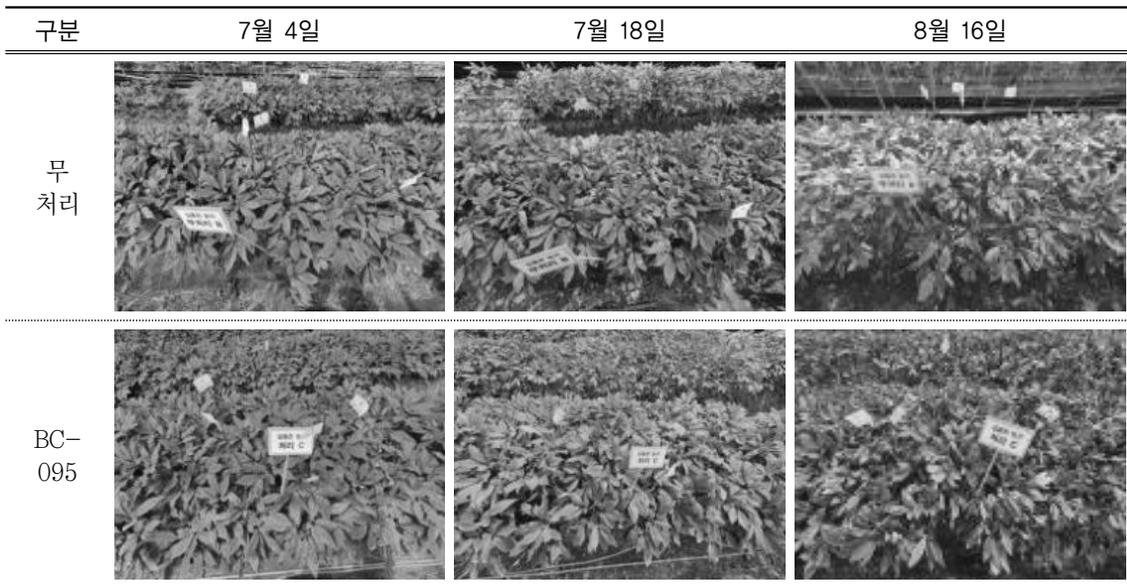
연 근	구 분	7월 4일	7월 18일	8월 1일	8월 16일	8월 29일
4년근	무처리(%)	1.0	1.8	3.7	7.9*	22.0
	BC-095(%)	0.2	0.4	0.9	3.3	11.7
	방제가(%)	80.0	77.8	75.7	58.6	46.9

*: t 검정, $p < 0.05$



(그림 38) BC-095 처리 농가 방제가(4년근, 화천)

<표 12> 처리구별 지상부 생육 현황(3년근)



<표 13> 처리구에 따른 지상부 발병엽률 및 방제기

연 근	구 분	7월 4일	7월 18일	8월 1일	8월 16일
3년근	무처리(%)	2.4	6.3	12.2	35.7
	BC-095(%)	0.0	0.0	0.9	34.1
	방제기(%)	100.0	100.0	92.6	4.3

기술이전 실시 계약서

● 계약명 : 김황이생물(BC-095)을 이용한 인삼 갯빛곰팡이병 친환경 방제 기술

● 실시권의 범위

- 대 상 : 원주시농업기술센터
- 기 간 : 2022. 11. 14. ~ 2022. 11. 13.(1년)

● 기술이전 주요내용

<김황이생물(BC-095)을 이용한 인삼 갯빛곰팡이병 친환경 방제 기술>

① 관주 배양조건 및 사용방법

구 분	최적 배양조건
배지 종류	TSB(Tryptic Soy Broth)
온도	35℃
교반속도	100 rpm
배양 부피	50 ml
조기 pH	7.0
탄소원	Soluble starch
탄소 농도	1%
질소원	Beef extract
질소 농도	1%
무기염류	KH ₂ PO ₄ · K ₂ HPO ₄ · MgSO ₄ (H ₂ O)·2H ₂ O
무기염류 농도	0.4%

- 갯빛곰팡이병 발생 온 초인 4월과 6월에 일주일 간격으로 각 4회 처리
- 처리는 1x10⁷ cfu 농도로 처리하고 인삼밭 1칸 당 1~2ℓ 정도로 충분히 관주



기술이전 계약서(원주시 센터)

센터 내 배양기

(그림 39) BC-095 기술이전을 통한 농가 보급

〈제1세부과제: 지상부병 친환경 방제기술 개발 및 실용화 연구〉

(시험 1) 잣빛곰팡이병 방제용 길항미생물 선발

- 가. 강원도내 인삼 6년근 재배지 9개소에서 건전한 토양을 채취하고 총 110점의 미생물을 순수 분리하였음
- 나. 원인균(*Botrytis cinerea*)과의 대치 배양을 통해 활성이 우수한 BC-046, BC-095, BC-100을 1차 선발하였음

(시험 2) 인삼 잣빛곰팡이병 길항미생물 동정

- 가. 1차 선발한 길항미생물의 동정결과 BC-046, BC-095, BC-100이 각각 *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*로 확인되었음

(시험 3) 잣빛곰팡이병 길항미생물 방제효과 구명

- 가. 선발한 길항미생물의 길항력 평가 결과 BC-095 균주의 활성이 가장 높았음
- 나. 항생물질 유전자는 BC-095, BC-100이 각각 4개의 유전자를 가지고 있고, 프로테아제와 셀룰레아제의 활성도 보여주었음

(시험 4) 잣빛곰팡이병 친환경 방제기술 효과 구명

- 가. 인삼 포장의 처리결과 처리구별 방제가는 BC-095, 친환경자재, 화학약제 처리구에서 무처리 대비 각각 60.5%, 7.5% 및 67.5%로 나타났으며, 특히 BC-095의 방제가는 시판용 친환경자재에 비해 약 8배 높았음

(시험 5) 선발 미생물 생존율 향상을 위한 동결보호제 선발

- 가. 선발 미생물 생존율 향상을 위한 동결보호제는 탈지유 5% 처리 시 38.4%로 가장 높았음

(시험 6) 선발 미생물 최적 정착방법 개발

- 가. 선발 미생물 근권 최적 정착은 배양액으로 관주 처리 시 21일까지 정착하는 것으로 나타남

(시험 7) 선발 길항미생물 특성검정(배양특성)

- 가. 선발 길항미생물의 대량생산을 위한 배양조건 확인을 위해 배지 종류, 온도, 교반속도, 초기 pH 등의 최적화 조건을 확인하였음
- 나. BC-046의 경우 최적 배양 조건 설정 후 생육 유도기가 짧아지고 10시간 배양 후 균체량이 최적화 전에 비해 42% 증가하였음

(시험 8) 잣빛곰팡이병 친환경 방제기술 농가 실증

- 가. BC-095 농가실증 결과 4년근 유기농 인삼 재배 농가에서 76%의 방제가를 보여주었음
- 나. 황성군과 원주시에 BC-095를 기술이전하여 2023년부터 농가에 보급할 예정임

- 김수현, 김다란, 곽윤식. 2020. Isolation and Characterization of Beneficial Microbe Against Ginseng Root Rot Pathogens. pp296-303. 농약과학회지.
- 백순이. 2019. *Bacillus amyloliquefaciens*에 의한 인삼뿌리썩음병의 생물학적 방제. 안동대학교
- 신지훈. 2010. 인삼 근부병원균 *Fusarium solani*에 대한 *Bacillus subtilis* S-5의 길항작용. 한남대학교
- 이종철, 김홍진, 오승환. 1989. 인삼 연작장해 연구에 대한 고찰. pp115-120. 한국작물학회.
- 이혜진. 2012. 인삼 점무늬병과 탄저병에 대한 길항미생물 선발 및 동정. 건국대학교.
- 정기채, 김창배, 김동기, 김복진. 2006. 인삼 주요병에 대한 길항미생물 선발. pp202-205. 한국약용작물학회.
- Sun Zhuo, Yang Limin, Han Mei. 2019. Biological control ginseng grey mold and plant colonization by antagonistic bacteria isolated from rhizospheric soil of *Panax ginseng* Meyer. v.138 pp104-148. Biological control.

연도(연차)	활용구분	제 목
2018(1년)	정책 제안	인삼 친환경 안정생산을 위한 미생물제 지원
	홍 보	인삼 점무늬병 방제용 친환경 미생물제 개발
	홍 보	친환경 농자재 실용화 업무협약 체결
2019(2년)	기초자료	선발 잿빛곰팡이 길항미생물 동정
	기초자료	인삼 재배지 토양병원균 밀도 분석
2020(3년)	영농 정보	유용 미생물 근권 정착을 위한 처리법
	학술발표	잿빛곰팡이 병원균 길항균 선발 및 동정
	홍 보	인삼 잿빛곰팡이병 길항미생물 선발
	홍 보	인삼 지상부병 길항균 현장평가회 개최 2건
2021(4년)	특허출원	인삼 잿빛곰팡이병 방제용 길항미생물제 개발
	학술발표	선발 길항미생물 최적 생육 조건
	홍 보	인삼 친환경 방제제 현장설명회 개최 등 3건
2022(5년)	기술이전	길항미생물 기술이전(원주시농업기술센터)
	기술이전	길항미생물 기술이전(횡성군농업기술센터)
	홍 보	인삼 곰팡이병 방제 철저 당부(춘천mbc 등 2건)

성과지표명		연도		1년차(2018)		2년차(2019)		3년차(2020)		4년차(2021)		5년차(2022)		계	
		목표	실적	목표	실적	목표	실적	목표	실적	목표	실적	목표	실적	목표	실적
산업 재산권	출원									1	1			1	1
	등록														
학술 발표	국제														
	국내	1	1			1	1	1	1					3	3
영농 활용	기술														
	정보					1	1							1	1
정책제안		1	1											1	1
기술이전												1	2	1	2
홍 보		1	2					3		3	1	2		2	10
계		3	4			2	5	2	5					9	18

7 연구원 편성

구분	소속	직급	성명	수행업무	참여년도				
					'18	'19	'20	'21	'22
과제책임자	인삼약초연구소	농업연구사	이재형	과제 총괄		○	○	○	○
세부책임자	인삼약초연구소	농업연구사	이재형	세부주관 수행		○	○	○	○
공동연구자	인삼약초연구소	농업연구사	이광재	분석 지원 및 평가	○				
	인삼약초연구소	농업연구사	모영문	분석 지원	○	○	○	○	○
	인삼약초연구소	농업연구사	이기욱	분석 지원		○	○	○	○
	인삼약초연구소	농업연구사	윤병성	분석 지원				○	○
	인삼약초연구소	공업서기보	박준영	품질 분석				○	○
	인삼약초연구소	농업연구관	원재희	방향 제시	○	○			
	인삼약초연구소	농업연구사	윤예지	분석 지원	○	○	○		
	인삼약초연구소	공업서기	이상규	물품 운반	○	○	○		
인삼약초연구소	농업연구관	엄남용	방향 제시			○	○		