

과제구분	기본연구	수행시기		전반기	
연구과제 및 세부과제명		연구분야 (code)	수행 기간	연구실	책임자
유용미생물 이용 환경개선 및 생물학적 방제 기술 개발		작물보호 LS0604	'07 ~'09	농업기술원 환경농업연구과	이현주
1) 시설상추 병해 방제용 유용미생물 효과 검정		작물보호 LS0604	'07 ~'09	농업기술원 환경농업연구과	이현주
색인용어	생물적방제, 상추병해, 바실러스, 균핵병, 시들음병				

ABSTRACT

Sclerotinia sclerotiorum is a plant pathogenic fungus that can result in serious yield and quality losses in the winter lettuce field. Thus, biological control of soilborn pathogen would be a good alternative strategy due to a recent enormous demand for non-chemical control. Several isolates which had mycelia growing inhibition ability in vivo test against *Sclerotinia* rot caused by *S. sclerotiorum* and Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporium* were isolated from the diseased soil. As the result of pot experiment, *Bacillus* strain GG95 showed high level of mycelia growing inhibition ability among tested strains. This was identified as a strain of *Bacillus subtilis* based on multiple sequence alignment of 16s rRNA obtained from NCBI and we named this bacteria *B. subtilis* GG95. Greenhouse experiment was conducted to test effectiveness of *B. subtilis* GG95 to control *Sclerotinia* rot. Drench application of *B. subtilis* GG95 in the Lettuce showed 88% effective values. So, *B. subtilis* GG95 would be a promising biocontrol agent for the control of *sclerotinia* rot.

Key words : Biological control, *Bacillus subtilis*, *Sclerotinia* rot, Fusarium wilt, Lettuce

1. 연구목표

상추에 발생하는 병은 약 28종이 국내에 보고되어 있으며(한국식물병명목록, 2009), 그 중 *Sclerotinia sclerotiorum* 에 의한 균핵병은 다범성균으로 64과 225속 383종의 식물을 침해하고(Mordue, 1976), 특히 겨울철 저온 다습한 환경에서 발생이 심하며 기주 범위가 매우 넓어 상추 뿐만 아니라 거의 모든 채소작물에 발생하며 경제적 피해가 심각하다(황 등, 2006). 이러한 균핵병 등의 토양병해를 방제하기 위해 지금까지 농가에서는 프로파, 베노밀 등의 다양한 화학농약을 살포하고 있으나 그 효과가 크지 않고, 인축에 대한 독성과 잔류농약에 대한 환경오염 등의 화학적 방제의 문제를 해결하기 위한 대체수단이 절실히 요구되고 있다. 그 해결책으로 친환경 또는 유기농자재를 이용하는 생물학적 방제가 시도되고 있다(황 등, 2006; 김 등, 2004). 특히 생물적 방제를 위해서 외국에서는 *Coniothyrium minitans* (Simon et al, 2001), *Trichoderma viride* (Whipps et al, 1992) 등 길항균을 이용한 균핵병 방제가 보고된 바 있으며, 우리나라에서도 다양한 길항균을 이용한 생물적 방제에 대한 시도가 이루어지고 있다(박 등, 2006; 김 등 2008).

본 연구는 상추 연작재배지에서 심한 피해를 주고 있는 문제병해인 균핵병과 시들음병을 대상으로 친환경 및 유기재배 농가에서 농약을 대체 사용할 수 있는 미생물 방제제를 개발하기 위하여, 시설재배 상추의 근권 토양에서 미생물을 분리, 길항미생물을 선발, 동정하고 생물적 방제 가능성을 탐색하고자 수행하였다.

2. 재료 및 방법

가. 균핵병과 시들음병 발생조사 및 병원균 분리

경기도내 주요 시설채소 재배지역인 고양, 용인, 이천 등을 중심으로 2007년 1월부터 균핵병과 시들음병 발생을 조사하였다. 겨울철에는 균핵병이 발생한 상추를 채취하고, 여름철에는 시들음병 병징을 보이는 상추의 뿌리를 채취하여 균핵병은 병든 조직 또는 균사 및 균핵을, 시들음병은 내부 갈변된 부위의 조직 절편을 1% sodium hypochloride, 70% EtOH에 약 1분간 표면살균 후 멸균수로 세척하여 PDA(Potato Dextrose Agar, Difco) 평판배지 위에 놓고 25°C, 암조건 하에서 2일간 배양하였다. 평판배지에서 자라는 균사절편을 PDA 평판배지에 2-3회 반복 이식하여 병원균을 순수 분리하였다. 순수 분리된 병원균은 4°C 저온 배양기에 보존하면서 실험에 이용하였다.

나. 길항미생물 분리 및 선발

경기도내 4개 주요 시설재배 생산 단지 내 상추재배 포장에서 근권 부위 토양을 채취하여 10g의 토양을 살균수 90ml과 혼합하고, 1ml을 채취하여 9ml 멸균수에 차례대로 희석한 후 NA(Nutrient Agar) 배지에 100µl씩 평판희석법으로 25°C에서 3일 이상 배양하였다. 이후 생성된 다양한 콜로니에서 분리한 220균주를 대상으로, 미리 분리해 보관 중인 상추 균핵병균 *S. sclerotiorum* 과 시들음병균 *F. oxysporum* 각각에 대하여 7일 이상 25°C에서 대치배양 후 형성되는 병원균의 균사생육 저지대를 조

사하여 항균활성이 높은 균주를 길항균으로 선발하였다.

다. 선발 길항균의 포트내 길항력 검정

1차로 선발한 4균주를 온실 내 포트 검정을 통해 방제효과가 높은 균주를 최종 선발하였다. 이때 방제효과 검정은 NB 배지에서 1일간 진탕 배양하여 10^8 cfu/ml로 농도를 조정한 후 배양액을 청치마 품종의 상추 잎의 앞, 뒷면에 10ml씩 골고루 분무접종하고, 접종 1일 후 PDA 배지에서 1주일간 배양한 직경 8mm의 균핵병원균의 군사절편을 핀으로 상처를 낸 후 앞면에 부착하여 발병을 유도하였고 3일 후부터 발병도를 조사하여 방제가로 환산하였다.

라. 길항미생물 동정

상추의 균핵병과 시들음병에 대해 모두 길항력을 가진 미생물 균주의 생화학적 특성은 세균동정기 Vitek 2 compact의 BCL카드를 이용하여 조사하였고, 16s rRNA 염기서열 분석을 통해 NCBI blast 검색으로 유전적 동정을 하였고 형태적 확인을 위해 주사전자현미경(HITACHI S-3000)으로 관찰하였다.

마. 선발 길항미생물 *Bacillus subtilis* GG95의 최적배양 조건

선발된 길항미생물에 대한 적정 배양조건 확인을 위해 온도범위 5°C 간격으로 10~35°C사이에서 180rpm 24시간 배양 후 분광광도계에서 OD 600nm에서 값을 측정하였고, pH는 pH3~8사이에서 pH 1간격으로 조사하였다. 적정한 영양원을 선발하기 위해 최소배지(K_2HPO_4 0.7%, KH_2PO_4 0.2%, 글루코스 0.5%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01%)에 탄소원을 결정하기 위해 글루코스를 제외하고 sucrose 등 각각의 탄소원을 전체용액에 1% 농도로 첨가하여 25°C, 180rpm으로 24시간 배양 후 배양정도와 균핵병균과 시들음병균에 대치 배양하여 항균활성을 측정하였고, 질소원은 최소배지에서 $(NH_4)_2SO_4$ 0.1% 대신 peptone 등 질소원을 0.5%씩 첨가하여 배양정도와 항균활성을 조사하였다. 무기염류는 최소배지에서 무기염류인 K_2HPO_4 0.7%, KH_2PO_4 0.2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01% 대신 $MgCl_2$ 등 각각의 무기염류를 5mM씩 첨가하여 길항미생물의 배양과 항균활성을 비교하였다.

바. *B. subtilis* GG95의 균핵병 예방효과 포장 시험

비닐하우스에 상추를 정식한 후 포장 내 토양에 25°C, 180rpm 으로 TSB배지에서 24시간 배양한 길항미생물을 3회 관주하였다. 그 후 상추 균핵병에서 분리한 병원균을 15°C PDA 배지에서 2주 이상 배양하여 형성된 균핵을 상추 포기당 3개씩 뿌리 부분의 토양 속에 접종하고, 1주일 후부터 균핵병의 발병정도를 조사하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 발병조사 및 병원균 분리

2007년 1월부터 12월까지 경기도내 시설채소 재배지역에서 발병되는 토양병의 발병율을 조사한 결과 균핵병은 10월부터 발생되기 시작하여 이듬해 5월까지 계속 병 발생이 관찰되었으며 12월경 이천의 재배농가에서는 40%까지 병이 발생하여 피해가 심각한 농가도 있었다. 시들음병은 3월부터 시작하여 여름철 고온기에 발생이 심하였으며 9월까지 지속적으로 관찰되었다(표 1). 균핵병의 병징을 관찰한 결과, 상추의 지체부와 잎에 수침상의 병반이 형성되어 갈색내지 흑갈색으로 변하다가, 습도가 높아지면서 발병부위의 무름 증상이 심해지고 확대되며, 흰색 균사가 덮이면서 식물체 전체가 고사하고 완전히 고사한 식물체의 잎은 종잇장처럼 마르기도 하며, 균사와 함께 흑색의 균핵이 형성되었다. 시들음병은 하엽이 황화되고 생육이 부진하며 포기 전체가 위축되는 증상과 발병주의 줄기 도관부를 따라 뿌리까지 갈변되는 증상과 함께 뿌리의 발육이 저조하고 포기가 쉽게 뽑히는 증상을 보였다(김, 2010).

표 1. 경기도 주요 시설상추 재배지 균핵병과 시들음병의 발생율

조사시기	균핵병		시들음병	
	발병율(%)	조사지역	발병율(%)	조사지역
1월	1.5, 2.6	평택, 용인	-	-
3월	3.8	남양주	2~85	고양
5월	0.5	용인	24~84	용인
6월	-	-	0.5~38	남양주, 이천
7월	-	-	5~95	남양주
9월	-	-	5~30, 1~65	용인, 이천
10월	0.1	이천	-	-
12월	2~40	이천	-	-

분리된 병원균에 대한 생육특성 조사결과, 균핵병균은 15°C~25°C 비교적 저온에서 생육이 잘 되었으며 30°C 이상의 고온에서는 거의 생육이 되지 않았다. 시들음병균은 저온에서 보다는 20°C에서 30°C의 온도에서 생육이 잘 되었고 이는 두 병원균의 재배지내 포장에서의 발생시기별 기온과 유사한 경향이었다(표 2). 한편, 지역별로 분리된 병원균의 생육에 있어 2종 병균 모두 pH는 큰 차이 없이 pH5에서 8까지 유사하게 생육하여, 토양산도와 큰 상관없이 두 병원균이 모두 발생할 수 있을 것으로 생각된다(그림1, 2).

표 2. 상추 균핵병과 시들음병의 온도별 균사생육

구 분		온 도(°C)					
		10	15	20	25	30	35
균핵병원균	균사생장(mm)	6.5	21.7	39.6	47.9	8.4	-
시들음병원균	균사생장(mm)	2.17	16.3	26.2	37.1	34.1	9.29

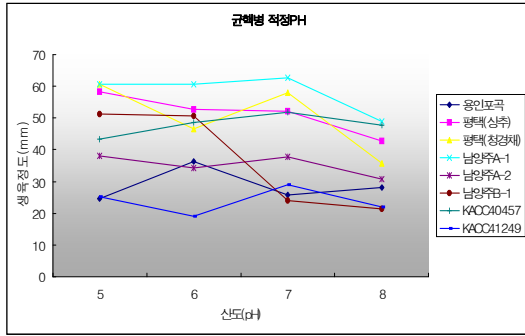


그림 1. 균핵병원균의 pH별 균사생육

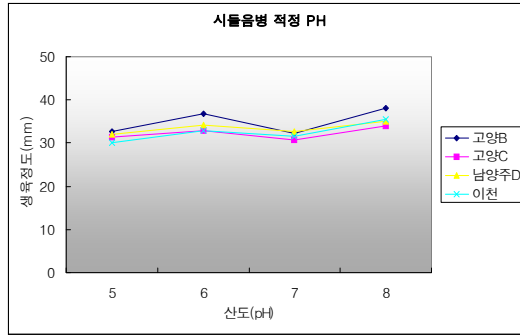


그림 2. 시들음병원균의 pH별 균사생육

나. 길항미생물 분리 및 선발

분리된 균핵병원균과 시들음병원균에 대해 상추 재배지 분리 220균주를 대상으로 PDA 배지에서 1주일 간 대치 배양을 통해 균사생육 억제효과가 좋은 균주를 선발하였다. 그 중 95, 110, 214 세 균주는 두 병원균에 대해 모두 10mm 이상의 높은 저지대를 형성하며 항균효과를 보였다. (표 3, 그림 3).

표 3. 선발된 길항균주의 병원균별 항균효과

균주번호	균사생장저지대(mm)	
	균핵병	시들음병
B7	++	+++ ^J
95	+++	+++
110	+++	+++
214	+++	+++

J; +++: 저지대 10mm 이상, ++: 저지대 5-10mm미만, +: 5mm미만



그림 3. 균핵병원균과 시들음병원균에 대한 길항균의 항균효과



그림 4. 항균효과가 없는 균주(대조)

다. 길항균의 포트내 길항력 검정

1차 선발된 3 균주에 대해 직경 100mm 포트에 정식하여 재배한 5-6엽기의 상추에 배양된 미생물을 엽면에 살포하고 1일 후 균핵병원균을 엽면에 접종하고 1주일 후 발병정도를 조사한 결과 GG95 균주는 무처리의 평균 발병도 4.8%에 비하여 1.3%로 방제가 72.9%의 우수한 방제효과를 나타내어 균핵병원균에 대한 우수 길항균으로 최종 선발하였다(표 4).

표 4. 선발 미생물의 상추 경엽처리에 의한 포트 내 균핵병 방제효과

구 분	발 병 도 ¹⁾										방제가 (%)	
	1반복	2반복	3반복	4반복	5반복	6반복	7반복	8반복	9반복	10반복		평균
GG95	1	0	0	0	2	0	1	2	2	5	1.3	72.9
GG110	3	1	3	3	0	0	2	2	1	1	1.6	66.7
GG214	2	2	0	6	1	0	6	0	1	0	1.8	62.5
베노밀	1	0	0	0	2	1	1	1	0	5	1.1	77.1
무처리	5	4	5	6	5	4	6	5	5	3	4.8	-

1) ; 발병도 1:병반크기1-10mm, 2:11-20mm, 3:21-30mm, 4:31-40mm, 5:41-50mm, 6:51mm 이상

라. 길항미생물 동정

상추의 균핵병과 시들음병에 대해 길항력을 가진 GG95 균주를 16s rRNA 염기서열 분석을 통해 NCBI blast 검색으로 유전적 동정한 결과 *Bacillus subtilis strains*와 99%의 상동성을 보였으며, 전자현미경 검정결과 간균 형태로 전형적인 바실러스 모양이었다(그림 5). 생화학적 특성검사를 위한 VITEK compact의 BCL 카드의 검정결과 또한 *B. subtilis strains*으로 동정되었다(표 5). 이에 분리된 동정균을 *B. subtilis* GG95로 명명하였고, 이 균을 농업생명공학연구원 한국농용미생물보존센터에 기탁번호 : KACC91430P로 기탁하여 특허출원 하였다.



그림 5. *B. subtilis* GG95의 전자현미경 관찰

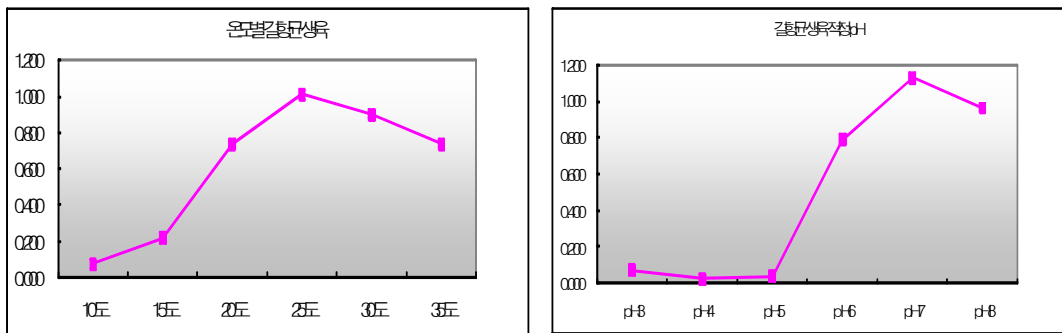
표 5. *B. subtilis* GG95의 생화학적 특성

효소	반응	효소	반응	효소	반응	효소	반응	효소	반응	효소	반응
β -자일로시다제	+	라이신	-	아스파테이트	-	루이신	-	페닐알라닌	-	L-프롤린	-
β -갈락토시다제	-	L-피롤리도닐	+	α -갈락토시다제	+	알라닌	-	티로신	(-)	β -N-아세틸-글루코사민다제	-
알라케프로아릴아미다제	-	사이클로렉스트린	-	D-갈락토스	-	글라이코진	+	미오-이노시톨	+	메틸-A-D-글루코피라노사이드	+
엘만	-	메틸-D-자일로사이드	-	α -만노시다제	-	말토트리오스	+	글라이신	-	D-만니톨	+
D-만노즈	+	D-엘레디토즈	-	N-아세틸-D-글루코사민	(-)	팔라티노즈	+	L-람노즈	-	β 글루코시다제	+
β 만노시다제	-	포스포릴코린	-	피루베이트	+	α 글루코시다제	-	D-타가토즈	-	D트리할로즈	+
이눌린	-	D-글루코스	+	D-리보즈	+	푸트레신	-	NaCl6.5%	+	카나마이신	-
올린도마이신	-	에스콜린하이드로라제	+	테트라졸리움레드	+	플로마이신	-				

마. 길항미생물 최적배양 조건

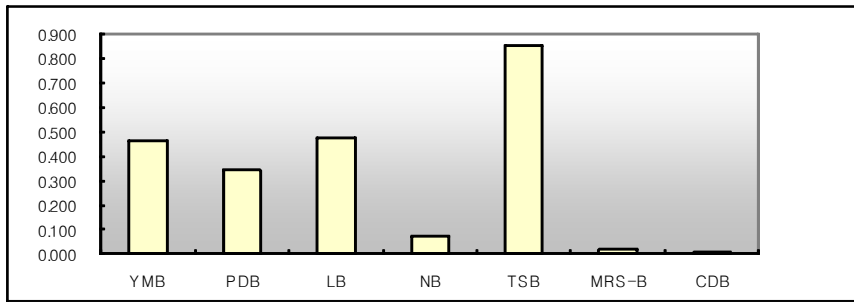
길항미생물 GG95에 대한 배양적 특성을 조사한 결과 25°C, pH 7에서 24시간 배양하였을 경우 600nm의 파장에서 OD값 1.0 이상으로 가장 잘 배양되었으며, 적정 배지선발을 위해 배지 종류별 25°C에서 배양한 결과, 미생물의 증식율은 TSB 배지에서 180rpm으로 24시간 배양하였을 경우 OD값이 가장 높았다(그림 6, 7).

그림 6. *B. subtilis* GG95의 온도 및 산도 조건에 따른 OD값 변화



↓ : 180rpm, 24시간 배양 OD 600nm 측정

그림 7. 배지 및 배양조건에 따른 *B. subtilis* GG95의 OD값



↓: OD 600nm 측정

B. subtilis GG95 배양에 적절한 영양원은 전분을 탄소원으로 이용하였을 경우 배양이 가장 잘 되었고 균핵병에는 푸룩토스, 시들음병에는 말토스를 탄소원으로 이용하였을 경우 항균력이 가장 좋았다. 질소원으로 펩톤을 이용하였을 때 균핵병에 대한 항균활성이 가장 좋았고 트립톤 이용한 경우 시들음병균에 대한 항균활성이 가장 좋았다(표 6, 7). 무기염류의 경우 표 8과 같이 MgCl₂를 배지의 영양원으로 이용하였을 때 균의 배양이 잘 되었고 항균력은 CaCl₂와 MgSO₄·7H₂O를 이용한 경우 가장 항균활성이 크게 나타났다.

표 6. 탄소원에 따른 *B. subtilis* GG95의 균성장과 항균력

탄소원	arabinose	fructose	glucose	glycerol	lactose	maltose	mannitol	starch	sorbitol	sucrose
균성장*	0.147	0.222	0.173	0.056	0.034	0.179	0.056	0.841	0.051	0.064
균핵병 억제대**	6.5	8.5	6.5	5.5	5.0	3.0	7.0	5.0	4.5	5.5
시들음병 억제대	-	3	7	5.5	2.0	9.0	5.0	4.0	1.0	3.0

*; 600nm 흡광도, ** 단위 : mm

표 7. 질소원에 따른 *B. subtilis* GG95의 균성장과 항균력

질소원	Ammonium chloride	beef extract	ammonium phosphate	bacto peptone	ammonium sulfate	bacto tryptone	corn steep	malt extract	yeast extract
균성장*	0.662	0.736	0.651	0.924	0.659	1.252	0.769	0.018	0.318
균핵병 억제대**	7.0	4.5	8.0	13.0	6.0	6.5	3.5	7.0	4.5
시들음병 억제대	3.0	3.5	3.0	6.5	4.5	7.5	-	1.0	-

*; 600nm 흡광도, ** 단위 : mm

표 8. 무기염류에 따른 *B. subtilis* GG95의 균성장과 항균력

무기염류	MgSO ₄ ·7H ₂ O	NH ₄ Cl	NaCl	K ₂ HPO ₄	CaCl ₂	LiCl	KCl	MgCl ₂	ZnSO ₄	CaCO ₃
균성장*	0.76	0.40	0.91	0.57	0.52	0.93	0.96	1.06	0.04	2.24
균핵병 억제대**	5.5	4.0	0.0	9.0	10.0	0.0	4.0	3.5	0.0	4.0
시들음병 억제대	5.0	3.0	0.0	2.0	1.5	3.0	1.0	3.0	2.0	2.0

*; 600nm 흡광도, ** 단위 : mm

바. *B. subtilis* GG95의 균핵병, 시들음병 포장 예방효과

비닐하우스에 상추를 정식한 후 1×10⁸cfu/ml 농도의 길항미생물 배양액을 포기당 10ml씩 3회 관주하고 균핵병원균을 접종한 후 1주일 이후부터 균핵병의 발병정도를 조사한 결과 GG95를 처리한 경우 평균 발병주율이 2%로 농약처리 3.4%보다 발병주율이 낮았으며 방제가 88%로 베노밀 처리구와 비등한 효과를 보였다(표 9).

표 9. *B. subtilis* GG95의 균핵병 포장 방제효과

구분	발병주율(%)				방제가(%)
	A반복	B반복	C반복	평균(%)	
GG95	0	2.9	3.0	2.0	88.0
베노밀	3.0	2.9	4.0	3.4	80.0
무처리	27.3	22.9	0	16.7	-

4. 결과요약

상추의 문제병해인 균핵병과 시들음병에 대한 미생물 방제제 개발을 위하여 병해 발생 포장에서 미생물을 분리, 길항미생물을 선발하여 균의 특성을 조사하고 예방효과를 검정한 결과는 다음과 같다.

- 가. 경기도 주요 상추 재배지 균핵병은 10월부터 발생하여 이듬해 5월까지 발생하였으며 12월에는 40%까지 발생하였다. 시들음병은 3월 이후부터 9월까지 발생하였으며 발생기간 중 심한포장은 30~95%까지 큰 피해를 주고 있었다.
- 나. 균핵병과 시들음병에 모두 항균효과가 있는 길항균주를 대치배양을 통해 1차 선발하고, 포트 검정에서 72%의 방제가를 나타낸 GG95를 최종 선발하였다.
- 다. 선발된 길항균주를 생화학반응과 16s rDNA분석을 통해 동정한 결과 *Bacillus subtilis*로 동정

되었고 *B. subtilis* GG95로 명명하였다.

- 라. *B. subtilis* GG95의 배양특성을 조사한 결과 25–30°C, pH 7–8, TSB배지에서 24시간 배양조건에서 배양이 잘 되었으며, 영양원으로 starch, tryptone, yeast, MgCl₂을 이용하였을 때 생육이 좋았다.
- 마. 영양원에 따른 항균활성은 glucose, starch, peptone, CaCl₂, LiCl을 이용하였을 때 항균효과가 좋았다.
- 바. *B. subtilis* GG95의 상추 균핵병에 대한 병균 접종 포장검정 시험결과 방제가 88%로 화학살균제인 베노밀과 비등한 효과를 나타내었다.

5. 인용문헌

- 김근기, 김용철, 최영환 등. 2008. *Bacillus* sp. AB02를 이용한 식물 병원균에 대한 생물검정. J. of Life Science. 18(6): 858–864.
- 김완규, 조원대, 지형진. 1999. 온실재배 박과 채소작물에서의 균핵병 발생. Kor. J. Microbiology 27(3) 198–205.
- 김진영. 2010. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*에 의한 상추시들음병의 발생특성과 방제. 충남대학교 대학원 박사학위논문.
- 김한우, 이광렬, 백정우, 문병주 등. 2004. 결구상추 균핵병(*Sclerotinia sclerotiorum*)에 대한 길항세균의 분리 및 동정. Res. Plant Dis. 10(4):331–336.
- 문병주, 김현주, 송주희 등. *Bacillus megaterium* N4에 의한 들깨 균핵병(*Sclerotinia sclerotiorum*)의 생물학적 방제. J. of Life Science. 14(5) 761–769.
- 박성민, 정혁준, 김현수, 유대식. 206. 덩굴마름병균인 *Didymella bryoniae*의 생물학적 방제를 위한 길항세균의 분리 및 특성. Kor. J. Microbiology 42:135–141.
- 신동범, 이준탁. 1987. 상치 시설재배지에서의 균핵병 발생생태에 관한 연구. Korean J. Plant Pathol. 34(4) : 252–260.
- 황지영, 심창기, 류경열, 최두희, 지형진. 2006. 상추 균핵병 생물적방제를 위한 *Brevibacillus brevis* B23과 *Bacillus stearothermophilus* B42의 선발 Res. Plant Dis. 12(3): 254–259.
- Mordue, J.E.M and P. Holliday. 1976. *Sclerotinia sclerotiorum*. CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria. No. 513
- Simon P. Budge and Hohn M. Whipps. 2000. Potential for Integrated Control of *Sclerotinia sclerotiorum* in Glasshouse Lettuce Using *Coniothyrium Minitans* and Reduced Fungicide Application. Phytopathology 91(2) 221–227.
- Whipps, J. M. and Gerlagh, M. 1992. Biology of *Coniothyrium minitans* and its potential for use in disease biocontrol. Mycol. Res. 96: 897–907

6. 연구결과 활용제목

- 신규한 바실러스 서브틸리스 균주 및 이를 포함하는 식물의 균핵병 및 시들음병 예방용 미생물 제제('08. 특허출원)

7. 연구원편성

세부과제	구 분	소 속	직 급	성 명	수행업무	참여년도		
						07	08	09
1) 시설상추 병해 방제용 유용미생물 효과 검정	책임자	농업기술원 환경농업 연구과	농 업 연구사	이현주	세부과제 총괄	○	○	○
	공동연구자			김진영	미생물 조사	○	○	○
				홍순성	작물관리	○	○	○
				이진구	문헌 조사	○	○	○