

길항세균 *Bacillus amyloliquefaciens* A-2를 이용한 토마토 잎곰팡이병 방제용 미생물 제제

공현기 · 전옥주 · 최기혁 · 이광렬 · 백정우 · 김현주¹ · 센틸쿠마 무루가이안 · 문병주 · 이선우*
동아대학교 응용생물공학과, ¹국립식물검역원 조사분석과

Formulation of *Bacillus amyloliquefaciens* A-2 and Its Efficacy to Control Tomato Leaf Mold Caused by *Fulvia fulva*

Hyun Gi Kong, Ock-Joo Chun, Ki Hyuck Choi, Kwang Youll Lee, Joung-Woo Baek,
Hyun Ju Kim¹, Senthilkumar Murugaiyan, Byung Ju Moon and Seon-Woo Lee*

Dept. of Applied Biology, Dong-A University, Busan 604-714, Korea

¹National Plant Quarantine Service, Incheon 400-340, Korea

(Received on January 22, 2010)

This study was performed to develop a formulation using an antagonistic bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* A-2 to control tomato leaf mold caused by *Fulvia fulva*. *B. amyloliquefaciens* A-2 was grown in a medium with rice oil and mixed with various carrier and additives. One of the formulations, A2-MP, showed the best disease control value among the tested formulations. The disease control value of A2-MP at 100-fold and 500-fold diluted treatment was not significantly different from that of chemical fungicide triflumizole in a growth chamber. Although disease control effect was decreased by serial diluted treatment of the prepared A2-MP, 1,000-fold diluted treatment of A2-MP still showed high disease control value of 72.0%. For the green house experiments, the disease control values of A2-MP was indicated as 79.4% which is similar to that of chemical fungicide, triflumizole showing 79.6%. When the disease control activity of the formulation A2-MP was compared in tomato production conditions, disease control values of 100-fold diluted A2-MP and 3,000 fold diluted triflumizole exhibited 60%, 81.6%, respectively. The disease control efficiency by A-2MP was 73% of the disease control value of chemical fungicide. The formulation A-2MP maintained the stable bacterial viability and disease control activity when stored at 4°C. This result suggested that A-2MP developed from *B. amyloliquefaciens* A-2 could be used to control tomato leaf mold.

Keywords : *Bacillus amyloliquefaciens*, Biocontrol formulation, *Fulvia fulva*, Tomato leaf mold

가지과에 속하는 토마토(*Solanum lycopersicum*)는 가공 용에서 생식용에 이르기 까지 다양한 품종이 개발되어 있어 전세계적으로 가장 많이 재배되고 있는 채소류인데 우리나라에서는 주로 생식용으로 재배되고 있다. 최근에 국내에는 당도가 높고 먹기에 편한 방울토마토의 수요증가로 재배가 증가하며 시설재배에서도 고추, 오이 만큼 그 생산이 높은 편이다. 그러나 최근 토마토 시설재배의 증가와 함께 연작과 하우스 내의 다습조건으로 노지에서 큰 문제가 되지 않았던 잎곰팡이병의 발생이 증가함으로써

토마토 생산량과 품질이 저하되고 있는 실정이다.

식물병원균 *Fulvia fulva*에 의한 토마토 잎곰팡이병은 토마토 시설재배에서 발생하는 대표적인 병해로 토마토 시설재배지에서 발병이 증가되는 것으로 알려져 있다 (Kishi, 1962). 토마토 잎곰팡이병은 주로 시설내 온도가 22~24°C이며 밤과 낮의 온도차가 크면 발생이 심하며 90% 이상 과습시 급속히 발병된다. 특히 수확기에 생육이 불량할 때 대량 발병하여 큰 피해를 주는 병이다(Abiko 와 Ishii, 1986; Alderman와 Beute, 1986). 병반은 초기에 잎 표면의 한 부분에 담황색으로 변하면서 선명하지 않은 병반이 생긴다. 병세가 진전되면 잎 뒷면에는 곰팡이가 담갈색, 갈색, 회백색으로 변하면서 병반은 점점 확대되어 원형 내지 부정형의 반점을 형성하게 된다. 이병은

*Corresponding author
Phone) +82-51-200-7551, Fax) +82-51-200-7505
Email) seonlee@dau.ac.kr

아랫잎 부터 순차적으로 발생하며 병세가 심하면 잎 전체에 소형의 작은 병반이 많이 발생하여 잎이 말라 죽는다. 이러한 병세가 계속 진전되면 과실비대가 늦고 조기 착색의 원인이 되기도 한다(Ozaki와 Shirakawa, 1996).

토마토 잎곰팡이병을 유발하는 병원균은 *Cladosporium fulvum*으로 명명되었으나, 그 후 *F. fulva*로 재명명되어 현재 이 두 학명을 함께 사용하고 있다(Curtis 등, 1994; Kishi와 Abiko, 1976; Lindhout 등, 1989). 병원균은 시설내의 골조, 자재 등의 표면에 부착해 있거나 피해 잔재물 또는 종자의 표면에 부착해 있다가 바람에 의해 날려 잎에 부착해서 침입한다. 분생포자는 저녁부터 아침사이에 잎에 생긴 이슬에 의해 쉽게 발아하여 기공으로 침입된다. 침입한 균은 2주 정도의 잠복기를 경과한 후에 발병한다. 생육 후기에 토마토를 수확하는 시기에는 많은 양분을 필요하므로 토마토의 생육이 쇠약해 발병하기 쉽다(Knogge, 1996; 조 등, 2004).

토마토 잎곰팡이병은 ‘감복’, ‘모모타로요크’, ‘로꾸산마루’, ‘아플로’, ‘첼시 미니’ 등 저항성 품종을 재배하거나 가벤다·가스신 수화제등 등록된 몇가지 화학농약을 이용하여 방제할 수 있으나 최근에는 화학농약이 지니고 있는 저항성 유발이나 환경에 대한 관심으로 인하여 친환경적 대체 기술에 대한 관심이 증가하고 있다. 최근에는 길항미생물을 이용해 독성이 낮고 잔류성이 없으며 인체에 무해한 친환경적 농약의 개발 및 실용화가 더욱 촉진되고, 상업적으로도 판매되고 있다(Guba, 1938; Jones 등, 1991; 오 등, 1996). 식물병을 방제하기 위하여 미생물 농약을 개발할 때 우수한 미생물 균주의 선발과 함께 적절한 제제의 개발이 중요하다. 현재 미생물 제제 개발에서 활성성분인 미생물, 병원균의 효력이 환경에 따라 변화가 심하게 나타나므로 길항능력을 그대로 유지시키는 제제화에 대한 기술개발이 점점 중요한 요인으로 제시되고 있다(Fravel 등, 1998; Lumsden 등, 1995).

Bacillus spp.는 그 미생물이 가진 몇가지 독특한 특성으로 인해서 최근 생물학적 방제 미생물로 관심을 받게 되었으며, 미생물 제제 및 미생물 농약으로 활발히 개발되고 있다. 특별히 항균활성이 우수한 cyclic lipopeptide 류가 다수 생산되어 직접적인 방제효과도 우수하지만 불량한 환경에서 견딜 수 있는 내생포자를 생산하므로 미생물 농약으로 개발하기 위한 연구의 주 대상인 미생물이다(Emmert와 Handelman, 1999). 실제로 *Bacillus subtilis*를 이용한 Kodiak이나 Serenade는 미생물 살균제로 개발되어 종자처리제나 엽면살포제로서 식물병 방제에 활용되고 있다(Schisler 등, 2004). 더불어 길항력이 우수한 *B. amyloliquefaciens* 균주를 이용한 생물학적 방제 연구도 광

범위하게 연구되어지고 있는데, Souto 등(2004)은 *B. amyloliquefaciens*와 매우 근연종인 *Bacillus* sp.이 생산하는 항진균물질을 보고한 바 있다.

현재 국내에는 미생물농약들 중에서 아직까지 토마토 잎곰팡이병에 대해 뚜렷한 약제가 공시된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 토마토 잎곰팡이병에 대한 길항력이 우수한 균주로 선발되어 16S rRNA 유전자와 DNA gyrase 유전자의 염기서열로 동정된 *B. amyloliquefaciens* A-2균주(전, 2005)를 이용하여 제제화하고 생육상에서 우수한 방제효과를 보인 미생물 제제를 선발하였다. 또한 선발된 미생물 제제를 플라스틱 하우스 내 토경재배지와 자연발생 농가에서 토마토 잎곰팡이병에 대한 방제효과를 검증하였다.

재료 및 방법

사용균주. 본 연구의 병원 진균인 *F. fulva* TF13 균주(전, 2005)는 통상 25°C의 온도에 potato dextrose broth (PDB)나 potato dextrose agar(PDA) 배지에 배양하여 연구에 이용하였다. 길항미생물인 *B. amyloliquefaciens* A-2(전, 2005)는 통상 30°C의 온도에서 nutrient broth(NB)나 nutrient agar(NA)에서 배양하였다.

미생물 제제 제조를 위한 전달매체. 제형화 선발을 위한 전달매체로서 구슬형의 타피오카 전분, 옥수수 전분, 변성전분, 썬크리미, 썬사이즈, 썬슈퍼젤, 썬프리젤 등을 사용하여 수화제형으로 제조하였다. 그러나 구슬형의 타피오카 전분이 물에 대한 용해성이 떨어지고 살포기의 입구를 막는 등의 단점이 있어 이를 보완하기 위해 물에 대한 용해도도 높고 증량제의 효과도 있는 가루형의 타피오카와 썬크리미, 설탕 등을 혼합하여 제형화를 시도하였다. 본 연구의 제제화 기술에 사용된 변성전분과 타피오카 전분은 가격 면에서도 저렴하고 산업경쟁력이 있으며, 자외선 차단 및 부착정도와 증량제로서의 기능도 있어 이를 전달매체로 선발하였다.

미생물 제제 준비. 이전 연구에서(전, 2005) 길항균 A-2 배양에 최적으로 선발된 현미유배지(K₂HPO₄, 0.05%; MgSO₄·7H₂O, 0.05%; MnCl₂·4H₂O, 0.0005%; CaCl₂·2H₂O, 0.0005%, FeSO₄, 0.0025%, 현미유, 3.0%; yeast extract, 0.5%) 4를 71 발효조에 넣고 *B. amyloliquefaciens* A-2 균주를 접종하였다. 종균 배양은 동일한 배지에서 밤새 배양한 길항세균 A-2균주를 400 ml을 접종하였다. 배양시 발생하는 거품을 제거하기 위해 10배 희석한 antiform 용액(DB-110A, Dowcorning)을 10 ml(0.25%) 첨가하여 배양(35°C, 350 rpm, 1.5 atm, pH 6~7)하면서, 24시간 간격

Table 1. Compositions of various wettable powder type formulations using commercial additives, carriers and *Bacillus amyloliquefaciens* A-2 cultures

Formulation	Composition per liter of bacterial culture broth
A-2A	Corn starch, 400 g; modified starch, 100 g
A-2B	Corn starch, 400 g; olive oil, 50 ml; white sugar, 25 g
A-2C	Sun creamy, 80 g
A-2D	Sun size, 80 g
A-2E	Sun supersel, 80 g
A-2F	Sun fregel, 400 g
A-2G	Tapioca starch, 400 g; modified starch, 100 g
A-2H	Tapioca starch, 400 g; olive oil, 50 ml; sucrose, 25 g
A-2I	Tapioca starch, 400 g; sun fregel 400 g
A-2J	Tapioca starch, 400 g; sucrose 100 g
A-2K	Tapioca starch, 400 g
A-2L	Corn starch, 400 g
A2-M	Boiled tapioca starch, 400 g; olive oil, 50 ml; sucrose, 25 g
A2-MP	Grinded tapioca starch, 400 g; olive oil, 50 ml; sucrose, 25 g
A2-O	Sun creamy, 80 g

으로 72시간까지 희석평판법으로 생균수를 측정하였다. 이 배양액에 각종 전분을 전달매체로 첨가하고 영양원으로 설탕과 오일을 첨가하고 혼합하여 수화제형 제제들을 제조에 이용하였다(Table 1). 혼합물을 55°C건조기에서 3일간 건조한 후 분쇄기에서 분쇄하여 200 mesh 체로 거른 수화제형의 제제를 최종 제제화하고 4°C에 보관하면서 방제실험에 이용하였다.

토마토 식물체와 병원균 접종. 토마토 잎곰팡이 병에 대해 감수성품종으로 알려진 서광(상품명: 주이코 102) 품종을 공시하여 플러그포트에 파종한 후 3~4엽이 되었을 때 지름 10 cm 포트에 정식하여 온실(25±5°C)에서 키운 뒤 1화방이 형성되기 직전의 식물체를 생육실과 온실내 포트검정을 통한 병 방제 검점에 사용하였다.

병원균 접종원을 위해서는 이전에 확립된 접종량 및 방법을 따라 수행하였다(전, 2005). 먼저, PDA배지에서 전배양한 *F. fulva* TF13 균주의 균사절편(직경 1 mm) 12개를 300 ml의 PDB배지에 접종하여 4일간 진탕배양(25°C, 150 rpm)한 후 균사를 걸러내어 세척 후, 이를 분쇄기로 10초간 균사를 마쇄한 후 현탁액의 농도를 A₅₅₀=0.4이 되도록 PDB배지로 조정하여 이용하였다. 준비된 접종원은 파종 후 5주된 토마토 성체식물에 골고루 분무살포한 후 100% 상대습도의 생육실에 보관하였으며, 각 처리구는 5주씩 3반복으로 수행하였다. 병원균 접종 5일 후 이병엽률을 조사하여 방제가로 환산하였다. 이병엽률은 농약의

등록시험 기준과 방법에 따라 다음과 같이 환산하였다. 본 연구에서 실시된 실험은 반복수별 방제효과를 평균하여 통계분석을 실행하였다. 통계분석은 유의수준 P=0.05로 던컨의 다중비교검정법을 사용하였다.

$$\text{이병엽률(\%)} = \frac{(\text{발병수} \times \text{계수})}{4 \times \text{엽수}} \times 100$$

계수 : 0- 무발병

- 1- 병반면적을 5% 이하
- 2- 병반면적을 5.1~20%
- 3- 병반면적을 20.1~40%
- 4- 병반면적을 40.1% 이상

생육상에서의 미생물 제제 방제효과 검정. 준비된 수화제형 12종(A2-A, A2-L)을 1차로 100배 희석하여 방제효과를 검정하였다. 희석은 수화제 분말 1g을 100 ml의 수돗물에 현탁한 후 포트에 파종후 5주된 토마토 잎의 앞, 뒷면에 30 ml씩 분무기로 골고루 살포하였다. 대조구인 무처리구는 수돗물만 분무하였고 화학농약 트리후미졸(Triflumizole)(상품명: 트리후민 수화제, 원제(active ingredient, 30% w/w)) 대조구는 3,000배 희석액을 분무기로 분무처리하였다. 2차로 준비된 A-2M, A-2MP, A-2O의 처리도 동일한 방법으로 수행하였다. 처리된 식물체는 생육상에서 유지하면서 24시간 후 준비된 병원균을 전술한 바와 같이 분무접종하였다. 이후 식물체는 상대습도 90%, 온도 20±2°C의 생육실에 유지하면서 병원균 접종 5일 후에 이병엽률을 조사하고 방제가로 환산하여 방제가가 가장 높은 제제를 선발하였다. 방제가의 환산은 아래의 방법으로 수행하였다.

$$\text{방제가(\%)} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

A: 병원균 단독 처리구의 이병엽률, B: 처리구의 이병엽률

토마토 잎곰팡이병 방제용으로 최종 선발된 수화제제인 A2-MP 제제인 경우에는 생육실 포트재배에서의 방제효과를 희석배수별로 검정하였다. 수화제제 A2-MP 제제를 각각 100, 500, 1000배로, 화학농약 트리후민 수화제는 3,000배로 희석하여 포트 재배한 7주된 토마토 잎의 앞·뒷면에 1주당 30 ml씩 골고루 처리하고 전술한 바와 동일하게 방제효과를 검정하였다.

온실내 토경재배에서의 방제효과 검정. 선발된 제제의 방제효과를 검정하기 위해 공시된 토마토 품종(서광)을 플러그포트에 파종하여 4주 된 유묘를 하우스 내에 한 주

당 간격을 20 cm로 하여 재식한지 15주된 토마토 식물체를 본 연구에 사용하였다. 병원균 접종원 제조는 앞서 명시한 생육실 포트재배에서의 잎곰팡이병 방제효과 검정과 동일하였으며, 준비된 토마토 식물체에 병원균 TF13 균주의 접종원을 60 ml/을 처리하였다. 실험은 처리구당 12주 씩, 3반복, 완전임의배치법으로 실시하였다. 약제처리는 1주일 간격으로 총 3회 처리하였으며, 마지막 약제처리 후 1주일 뒤 발병율을 조사하여 방제가로 환산하였다.

자연발병 농가 실증시험. 2007년 1월 말경 토마토 잎곰팡이병이 자연 발생하기 시작한 경상남도 김해시 대저동 소재의 농가의 플라스틱 하우스를 임대하였으며, 품종은 서건을 2006년 9월 15일에 파종하고 45일 후인 11월 1일에 재식하였으며 130~140일 후에 첫 수확 하였다. 생육실 포트검정과 하우스 내 토경재배 검정을 통하여 선발된 수화제제 A2-MP 제제를 화학농약과 비교하여 토마토 잎곰팡이병 자연발병 농가에서 방제효과를 검정 하였다. 처리방법은 미생물농약 수화제제 A2-MP 제제를 농도별과 처리 횟수별로 나누어서 실험을 실시하였다. 최초 약제는 2007년 2월 2일에 살포하였고, 최종 살포 1주일 후인 2007년 2월 23일에 발병률을 다음과 같이 발병도로 계산하여 방제가로 환산하였다.

$$\text{발병도}(\%) = \frac{(\text{발병 엽수} \times \text{계수})}{7 \times \text{조사 엽수}} \times 100$$

계수 0 - 발병무

- 1 - 병반면적률 0~20%
- 3 - 병반면적률 20~50%
- 5 - 병반면적률 50~70%
- 7 - 병반면적률 70% 이상

$$\text{방제가}(\%) = \frac{A - B}{A} \times 100$$

A: 자연 발병도, B: 처리구의 발병도

각 처리구는 평균면적(25 cm×56 cm) 6주씩 3반복, 완전임의배치법으로 실시하였다. 이때 사용된 화학농약은 등록 고시된 트리후미졸 3,000배를 사용하였다(한국농약공업협회, 2007).

미생물 제제의 저장 안정성. 선발된 미생물 제제의 저장 안정성을 조사하기 위해 제제 A2-MP를 실온과 4°C에서 각각 보관하면서 매달 동일한 날짜에 제제에 포함되어 있는 A-2균주의 생균수를 NA배지에서 희석평판법으로 조사하여 미생물농약의 안정성을 조사하였다. 또한 4°C와 실온에서 보관 중이던 A2-MP 제제를 토마토 포트상에서 잎곰팡이병에 대한 방제효과 실험을 실시하였다.

결 과

생육상 검정을 통한 우수 제제 선발. 준비한 12종의 제제를 100배 희석액으로 생육상에서 검정한 결과 토마토 잎곰팡이병 방제효과가 가장 높았던 제제는 A-2H로 방제효과가 82.6%로 우수하였으며 A-2G 제제와 A-2B 제제의 방제가가 각각 73.3%, 72.2%로서 서로 유의차가 없이 높았으며, 3,000배 희석처리한 화학농약 트리후민 수화제의 68.9%와 유사하였다(Fig. 1). 반면 대다수의 전분만을 포함한 제제들은 60% 이하의 방제가를 나타내었다.

그러나, 선발된 A2-H 제제는 80%의 높은 방제가를 보였으나, 식물체에 처리시 분무기의 막힘 현상이 있었다. 때문에 A2-H 제제의 주재료인 구슬형 타피오카를 끊여

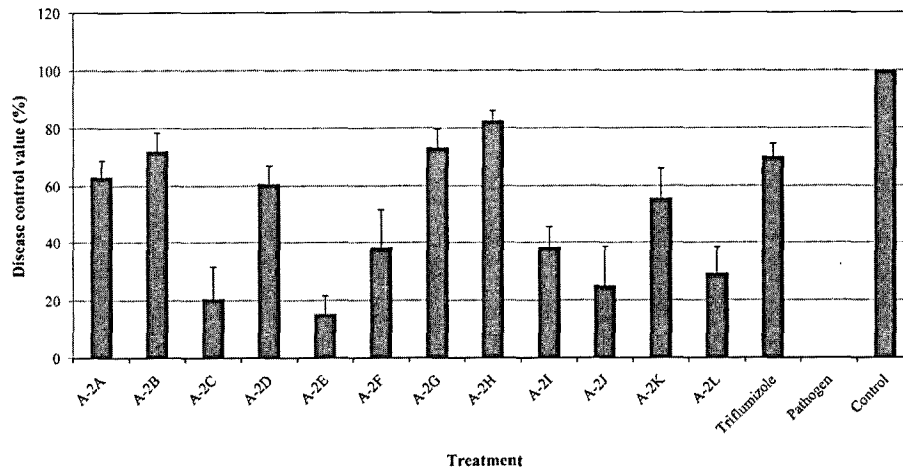


Fig. 1. Effect of various formulations of *Bacillus amyloliquefaciens* A-2 on the control of tomato leaf mold caused by *Fulvia fulva* on tomato plants in the growth chamber. Pathogen and control indicate artificial inoculation of *F. fulva* and no treatment, respectively. Error bars represent the standard deviation of the means of three replications.

Table 2. Disease control effects of formulations and chemical fungicide against tomato leaf mold caused by *Fulvia fulva* TF13 in a growth chamber

Treatment	Disease control value (%) ^X
A2-H	80.1 ± 3.8 b ^Y
A2-M	77.8 ± 2.2 b
Triflumizole	70.2 ± 1.2 b
Pathogen	0 c
Control	100 a

^XThe disease control value of each treatment was evaluated by rating the disease severity five days after *Fulvia fulva* inoculation. Each disease control value represents the mean ± standard deviations of three replicates.

^YMeans in the same column followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$) based on Duncan's multiple range test.

Table 3. Disease control effects of 3 formulations using *Bacillus amyloliquefaciens* A-2 and chemical fungicide against tomato leaf mold caused by *Fulvia fulva* in a growth chamber

Treatment	Disease control value (%) ^X
A2-M	85.4 ± 3.1 b ^Y
A2-MP	88.0 ± 4.6 ab
A2-O	67.6 ± 4.9 c
Triflumizole	88.8 ± 3.7 ab
Pathogen	0 d
Control	100 a

^XThe disease control value of each treatment was evaluated by rating the disease severity five days after *Fulvia fulva* inoculation. Each disease control value represents the mean ± standard deviations of three replicates.

^YMeans in the same column followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$) based on Duncan's multiple range test.

A2-M 제제를 추가 제제화하고, A2-H 제제와 화학농약인 트리후민을 대조구로하여 방제효과를 비교 검정하였다. 그 결과, A2-H 제제와 A2-M 제제의 방제가는 각각 80.1%, 77.8%로 유의차 없이 높았으며, 대조구인 화학농약의 70.2%와도 유의차가 없었다(Table 2). A2-M 제제의 제제화시 첨가되는 기존의 구슬형의 타피오카 대신 분말형태의 타피오카를 이용하여 제조한 A2-MP 제제를 A2-M 제제 및 A2-O 제제와 방제효과를 비교하였다. 그 결과, A2-M과 A2-MP 제제의 방제가는 각각 88.4%와 89.0%로 서로 유의차 없이 우수하였으며 특히, A2-MP 제제는 화학농약의 88.8%와도 유의차가 없었고 A2-O 제제의 67.6%보다 월등히 우수하였다. 결론적으로 대조구인 화학농약과 유의차 없이 방제가가 높고 제제화의 효율성을 고려하여 A2-MP 제제를 최종 우수제제로 선발하였다(Table 3).

Table 4. Disease control effects of A-2MP formulation and chemical fungicide against tomato leaf mold caused by *Fulvia fulva* in the plastic house

Treatment	Disease control value (%) ^X
A2-MP (100-fold)	79.4 ± 4.1 b ^Y
A2-MP (500-fold)	72.6 ± 6.4 b
Triflumizole	79.6 ± 3.0 b
Pathogen	0 c
Control	100 a

^XThe disease control value of each treatment was evaluated by rating the disease severity five days after *Fulvia fulva* inoculation. Each disease control value represents the mean ± standard deviations of three replicates.

^YMeans in the same column followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$) based on Duncan's multiple range test.

방제효과가 가장 우수하여 최종 선발된 A2-MP제제를 희석배수별로 처리하여 가장 적합한 처리농도를 선발하고자 하였다. 그 결과 100배, 500배, 1000배에서 각각 84.3%, 79.4%, 72.0%로 희석배수가 높아질수록 방제가가 다소 감소하였으나 서로간의 유의차는 없었으며, 특히, 100배와 500배 처리구에서는 화학농약 처리구인 90.8%에 비해 방제가가 낮기는 하나 유의차가 없이 매우 효과가 우수하였다(data not shown). 따라서 경제성을 고려해 볼 때 500배의 농도로 살포되어도 적합할 것으로 조사되었다.

온실 내 토경재배에서의 방제효과. 생육실 포트 검정에서 최종 선발된 *B. amyloliquefaciens* A-2 균주의 수화제제 A2-MP 제제를 공시하여 온실 내 토경 재배한 토마토에서 잎곰팡이병에 대한 방제효과를 검정하였다. 그 결과, A2-MP 제제의 100배 희석 처리구가 각각 79.4%로 우수하였다. 반면, 500배 희석처리구에서는 72.6%를 보여 100배 처리 구와는 서로간의 유의차는 없지만 방제가가 다소 낮아 진 것이 확인되었다. 한편, 화학농약 트리후미줄 처리구는 79.6%의 방제가로 모든 처리구와 유의차는 없었다(Table 4).

자연발병 농가에서 방제효과. 2007년 1월 말경 잎곰팡이병이 자연발생하기 시작한 경상남도 김해시 토마토 재배포장에서 선발제제인 수화제 A2-MP 제제를 각각 3주 동안 매1주마다 살포횟수별로 처리하고 화학농약 트리후미줄(Triflumizole)과 방제효과를 비교 검정한 결과, 평균 병발병을 62.2%일 때 A2-MP 제제의 경우 1회와 2회 처리에서는 각각 25.1%, 22.8%로 유의차가 없이 낮았으나, 지속적인 3회 처리에서는 60.0%로 화학농약 트리후미줄 처리구의 81.6%와 유의차가 있었으나 화학농약 대비 73% 이상의 방제가가 인정되었다. 따라서 매주 1회

Table 5. Disease control effects of A-2MP treated three different times against tomato leaf mold with one week interval in the production condition

Treatment	Disease control value (%) ^x
A2-MP (1 time)	25.1 ± 10.6 c ^y
A2-MP (2 times)	22.8 ± 9.0 c
A2-MP (3 times)	60.0 ± 11.1 b
Triflumizole	81.6 ± 14.2 a
Control	0 d

^xThe disease control value of each treatment was evaluated by rating the disease severity in the tomato production condition under average 62.2% of natural disease incidence. Each disease control value represents the mean ± standard deviations of three replicates.

^yMeans in the same column followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$) based on Duncan's multiple range test.

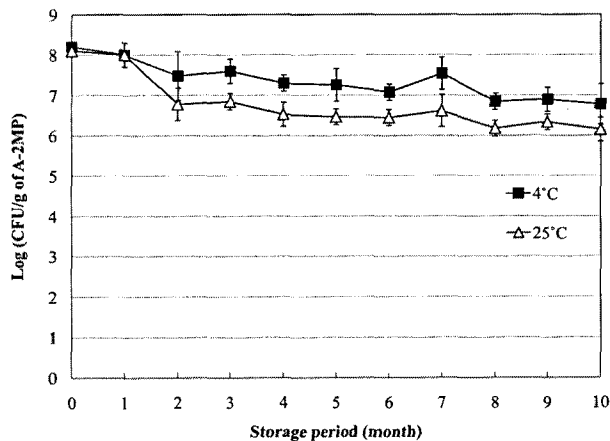


Fig. 2. Bacterial viability evaluated by dilution plate count of *Bacillus amyloliquefaciens* over time from A-2MP formulation stored at 4°C and 25°C. The Y axis indicates CFU per gram of dry weight of A-2MP. Error bars represent the standard deviation of the means of three replications.

씩 3주간 처리하는 것이 화학농약과 동일하지는 않으나 미생물 제제로서 활용할 만한 방제가를 보여 효과적인 처리 횟수로 밝혀졌다(Table 5).

미생물 제제의 저장안정성. 선발된 수화제제 미생물농약 A2-MP제제를 저장온도 및 저장기간에 따른 안정성을 조사한 결과, A2-MP 제제의 2006년 6월의 초기 세균수는 제제 1 g 당 1.6×10^8 cfu이었으며, 11개월 후인 2007년 4월의 4°C와 실온에서의 세균밀도는 제제 1 g 당 각각 6.0×10^6 cfu와 1.4×10^6 cfu이었다. 이는 초기의 세균수보다는 낮아졌으나 여전히 높은 밀도의 세균수가 유지되고 있었으며, 이때 실온과 4°C 보관에 따른 세균의 밀도 차이는 없었다(Fig. 2). 4°C와 실온에서 보관 중이던 A2-MP 제제를 잎곰팡이병에 대한 토마토 포트상에서 방제

효과를 검정한 결과, 4°C와 실온보관 제제를 100배 희석 후 처리한 결과 각각의 방제가는 83.0%와 83.1%로 높게 나왔으며, 서로간의 유의차는 없었다(data not shown). 따라서 제제를 장기간 보관하여도 안정성이 매우 높음을 확인하였다.

고찰

식물병을 방제하기 위한 우수한 미생물 제제의 개발은 길항력이 우수한 미생물의 선발과 함께 효율적인 제형화 기술의 개발을 필요로 한다. 본 연구에서는 길항력이 우수한 것으로 인정된 *B. amyloliquefaciens* A-2 균주를 이용하여 토마토 잎곰팡이병 방제를 위한 미생물 제제를 개발하였다. 본 연구에서는 이미 길항세균 *B. amyloliquefaciens* A-2 균주의 대량배양용 배지로 기초배지에 현미유 3.0%와 yeast extract 0.5%를 첨가한 현미유배지를 이용하였는데 이는 이전 연구를 통해 미생물의 생균수 및 방제효과를 고려하여 선발하였다(전, 2005). 이때, yeast extract를 0.5%를 첨가한 경우가 첨가하지 않은 경우보다도 세균밀도가 증가되었다. 현미유는 우리나라에서 생산되는 미강과 쌀눈을 이용해 생산되는 식용유로써 전체 성분은 지방 18.4% 당질 38.3% 섬유 7.8% 회분 8.9% 비타민B 12.5 ml/로서, 균주의 생육을 위한 효과적인 영양원으로 이용되는 것으로 생각된다(김 등, 2004).

미생물 제제의 제조에 있어서는 길항균의 부착 및 보호를 위해 보호제, 영양분 등을 첨가하여 액상, 유상, 분말 등의 여러 가지 제제가 시도될 수 있는데 특정 제제를 활용하여 길항균을 통한 방제효과를 높이며 안정적인 방제효과가 유지되도록 개발하는 것이 필수적이다. 미생물 살충제인 *B. thuringiensis*의 제제화에서는 강우와 햇빛으로부터 *B. thuringiensis*균을 보호하기 위해 전분류와 밀기울을 사용하였으며, 식물체에서 활성도를 조사한 결과, 균주의 밀도가 일정하게 유지된다는 보고가 있다. 그리고 생물농약의 제조에 있어서 corn flour, corn starch, sugar, corn oil 등을 사용하여 제제화시 식물 앞에서의 밀도도 유지되었고, 강우와 햇빛에도 보호된다는 보고가 있었다(Tamez-Guerra 등, 2000).

본 연구에서는 타피오카 전분, 옥수수 전분, 썬크리미, 당, 오일류를 이용하여 제제를 만들고, 토마토 잎곰팡이병을 대상으로 방제 실험을 한 결과 비교적 높은 방제효과를 보이는 제제를 선발할 수 있었다. 구슬형 타피오카 전분을 이용한 A-2H 제제가 우수하였으나 분무가 어려운 문제로 인하여 이를 개량하기 위한 연구를 수행하였다. 끓인 타피오카 전분으로 만든 A2-M 제제의 경우 방

제효과는 좋았으나 전분을 끓여야 하기 때문에 제제에 번거로움이 있었다. 분말상의 타피오카 전분으로 만든 A2-MP 제제를 방제효과 검정한 결과 방제효과가 매우 높았고, 변성전분을 첨가하지 않아도 전착제의 역할을 하였으며 전분을 끓이는 등의 2차 제제과정이 생략되어 제제화하기 편리하였다. 타피오카 전분은 열대작물인 타피오카의 뿌리에서 채취한 식용녹말로 천연 타피오카 파우더를 위생적으로 처리한 천연전분이다. 점도가 높고 부드러운 식감을 가지고 있으며 비타민C와 칼슘이 풍부하여 신체에 많은 에너지를 공급해 준다. 면류 및 제과, 제빵에 적용 시 품질개선이 될 수 있으며, 그밖에 식품의 부형제 및 결착제로 사용되는 우수한 천연전분이다(안, 2005). 본 연구에서 사용된 분말형과 끓인 타피오카는 기존의 구슬형의 타피오카로 만든 A2-H의 침전물이 남는 결점을 보완하기 위해 사용하였으며 분말형을 이용하여 만든 제제 A2-MP가 다른 전분을 이용하여 만든 제제에 비하여 위에서 언급된 효과 뿐만 아니라 제제화 과정에서의 편리함과 제제 완료 후의 회수율에서 보다 더 유용하였다.

개발된 미생물농약을 이용하여 포트재배의 토마토 잎곰팡이병에 대해 방제 검정한 결과 A2-MP가 선발되었고, 이는 화학농약에 3,000배 희석에 비해 100배나 500배 희석에서 방제효과가 유지되었는데 이는 다른 미생물 제제들이 공통적으로 가지고 있는 문제로서 1,000배 이상 희석하여 방제효과를 확보하는 것은 어려웠다. 본 연구에서는 실증 농가에서 토마토 잎곰팡이병이 자연발생한 하우스를 대상으로 실험을 실시하였는데 A-2MP를 1주 간격으로 3회 처리하면 60% 수준의 방제가 가능한 것으로 나타났다.

미생물 제제는 사용하는 순간까지 적어도 1년 이상은 미생물의 생명력이 유지되어 살아있는 기능을 발휘해야 하므로 *Bacillus*속의 경우 포자를 형성하여 스트레스에 저항하며 장기간 생존할 수 있으므로 제제로 개발하기 유용한 미생물이다. 그러나 세균의 성장을 안정적으로 유지하기 위해서는 길항세균의 치사량을 낮추기 위해 여러 종류의 물질을 첨가하여 안정성에 있어 유리하게 조정해 주어야 한다. 일정기간이 지나면 미생물수가 효과 발현에 필요한 생존을 이하로 되거나 사멸되면 방제효과는 당연히 감소할 것이다. 따라서 제제에서 미생물의 생존율을 검정하여 저장 안정성 검정을 확인하는 것은 미생물 제제 선택에서 필수적이다. 본 연구결과 개발된 A-2MP는 4°C에서 보관하면 실온 보관에 비해 저장 안정성이 높은 것으로 나타났으며 방제효과도 잘 유지하는 것으로 나타났다. 따라서 본 연구 결과가 저렴한 원료를 이용하여 제조한 미생물 제제 A-2MP를 토마토 잎곰팡이병 방제에

활용될 수 있음을 제시한다.

요 약

토마토 시설재배에서 증가하는 토마토 잎곰팡이병을 방제할 미생물 제제를 병원균 *Fulvia fulva*에 길항력이 강한 미생물 *Bacillus amyloliquefaciens* A-2 균주를 이용하여 개발하기 위해 본 연구를 수행하였다. 미생물 A-2 균주를 현미유가 첨가된 배지에서 대량 발효배양하고 각종 전달매체와 첨가제를 혼합하고 건조하여 제조된 미생물 제제들의 효과를 검정하였다. 제조된 제제 A-2H가 방제효과가 가장 우수하였으나 처리에서 단점으로 인해 이를 보완하며 효과가 동일한 제형인 A-2MP를 선발하였다. 선발된 A-2MP는 100배, 500배 희석처리 후 생육상에서 토마토에 처리한 경우 화학농약과 대등한 방제효과를 나타내었다. 더욱이 1,000배 희석처리에서도 화학농약보다 효과가 감소하였으나 72% 정도의 방제효과를 보였다. 토마토를 토경재배한 온실에서 A-2MP의 방제효과를 검정한 결과 100배 희석 처리구의 경우 79.4%의 방제효과를 나타내 화학농약 트리후미졸 처리구의 79.6%의 방제효과와 차이가 없었다. A-2MP 제제를 62.2%의 자연발병한 농가의 온실에서 방제효과 검정한 결과 100배 희석액을 일주일 간격으로 3회 처리한 경우 60%의 방제가로 화학농약 방제가 81.6%보다 낮았으나 화학농약 효과의 73% 수준으로 나타났다. 한편, A-2MP제제를 4°C나 25°C 보관한 경우 모두 10개월동안 생균수 및 방제효과가 안정적으로 유지되었다. 본 연구결과는 저렴한 원료와 길항균 *B. amyloliquefaciens* A-2 균주를 활용한 A2-MP제제가 토마토 잎곰팡이병 방제용으로 쓰일 수 있음을 보여준다.

감사의 글

본 논문은 2008년도 동아대학교 학술조성비에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Abiko, K. and Ishii, M. 1986. Influence of temperature and humidity on the outbreak of tomato leaf mold (by *Cladosporium fulvum*). *Bull. Veg. Orn. Crop. Res. Stn.* (Japanese) 14: 133-140.
- Alderman, S. C. and Beute, M. K. 1986. Influence of temperature and moisture on germination and germ tube elongation of *Cercospora arachidicola*. *Phytopathology* 76: 715-719.
- 안기정. 2005. 타피오카 전분을 첨가한 절편의 품질 특성. 한국

- 조리학회 11: 179-189.
- 조원대, 김완규, 지형진, 최홍수, 이승돈, 김충희, 유재기, 고현관, 이승환, 최준열, 이관석. 2004. 채소 병해충 진단과 방제. 아카데미서적. pp. 78.
- 전옥주. 2005. 토마토 잎곰팡이병(*Fulvia fulva*) 방제 미생물농약의 개발. 동아대학교 석사논문.
- Curtis, M. D., Gore, J. and Oliver, R. P. 1994. The phylogeny of the tomato leaf mould fungus *Cladosporium fulvum* syn. *Fulvia fulva* by analysis of rDNA sequences. *Curr Genet.* 25: 318-322.
- Fravel, D. R., Connick Jr., W. J. and Lewis, J. A. 1998. Formulation of microorganisms to control plant diseases. In: *Formulation of microbial pesticides: Beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments*, eds by H. D. Burges, pp. 187-202. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Knogge, W. 1996. Fungal infection of plants. *Plant Cell* 8: 1711-1722.
- Emmert, E. A. B. and Handelsman, J. 1999. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiol. Lett.* 171: 1-9.
- Guba, E. F. 1938. Tomato leaf mold as influenced by environment. *Mass. Agric. Exp. Stn. Bull.* 350: 1-24.
- Jones, J. B., Stall, R. E. and Zitter, T. A. 1991. *Compendium of Tomato Disease*. APS Press. Minnesota. 73 pp.
- 김성현, 부우평란, 이기택. 2004. 현미유를 이용한 기능성 유지의 효소적 합성 및 콜레스테롤, 고지방 식이가 생쥐의 간 ACAT활성에 미치는 영향. *한국식품영양과학회지* 33: 803-809.
- Kishi, K. and Abiko, K. 1976. Studies on the physiological specialization of *Cladosporium fulvum* Cooke. II. Racial identification of isolates collected from 11 prefectures in Japan from 1971 to 1973. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 42: 497-499.
- Kishi, K. 1962. Studies on the physiological specialization of *Cladosporium fulvum* Cooke. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 27: 189-196.
- Lindhout, P., Korta, W., Cislik, M., Vos, I. and Gerlagh, T. 1989. Further identification of races of *Cladosporium fulvum* (*Fulvia fulva*) on tomato originating from The Netherlands, France and Poland. *Neth. J. Plant Pathol.* 95: 143-148.
- Lumsden, R. D., Lewis, J. A. and Fravel, D. R. 1995. Formulation and delivery of biocontrol agents for use against soilborne plant pathogens. In: *Biorational pest control agents formulation and delivery*, eds. by F. R. Hall and J. W. Barry, pp. 162-182. American Chemical Society, Washington DC, USA.
- 오연이, 박은우, 조일규, 강창성, 김성기, 양장석. 1996. 토마토 잎에 집적된 Triflumizole 잔류량의 온도에 따른 경시적 동태와 잎곰팡이병균에 대한 약효. *한국식물병리학회지* 12: 307-314.
- Ozaki, K. and Shirakawa, T. 1996. Pathogenic races of *Fulvia fulva* in Iwate Prefecture. *Ann. Rep. Plant Prot. North Jpn.* 47: 62-64.
- Tamez-Guerra, P., McGuire, M. R., Behle, R. W., Shasha, B. S. and Galn Wong, L. J. 2000. Assessment of microencapsulated formulations for improved residual activity of *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* 93: 219-225.
- Schisler, D. A., Slininger, P. J., Behle, R. W. and Jackson, M. A. 2004. Formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant diseases. *Phytopathology* 94: 1267-1271.
- Souto, G. I., Correa, O. S., Montecchia, M. S., Kerber, N. L., Pucheu, N. L., Bachur, M. and Garcia, A. F. 2004. Genetic and functional antifungal metabolites partially identified as iturin-like compounds. *J. Appl. Microbiol.* 97: 1247-1256.