

들깨 잿빛곰팡이병의 생물학적 방제 II. 미생물농약의 제조 및 그 방제효과

문병주* · 김철승 · 송주희 · 김현주 · 이재필 · 박현철¹ · 신동범²
동아대학교 생명자원과학대학, ¹밀양대학교 농학부, ²농업과학기술원 작물보호부

Biological control of Gray Mold Rot of Perilla Caused by *Botrytis cinerea* II. Formulation of Antagonistic Bacteria and Its Control Effect

Byung Ju Moon*, Choul Soung Kim, Ju Hee Song, Hyun Ju Kim, Jae Pil Lee,
Hyeon Cheal Park¹ and Dong Bum Shin²

Faculty of Natural Resources and Life Science, Dong-A University, Busan 604-714, Korea

¹Faculty of Agriculture, Miryang National University, Miryang 627-702, Korea

²Crop Protection, National institute of Agricultural Science and Technology, Suwan 441-707, Korea

(Received on August 9, 2002)

An antagonistic bacteria, *Bacillus licheniformis* N1 strain which effectively inhibited mycelial growth of gray mold rot pathogen, *Botrytis cinerea* was isolated from the rhizosphere of perilla crop. Powder soy formulation by *B. licheniformis* N1 strain as a biocontrol agent was developed for the first time and estimated its control effect on perilla leaves in this study. First of all, for the mass production of antifungal metabolites of *B. licheniformis* N1 strain in flask liquid culture, the most effective carbon and nitrogen source were selected as glucose and tryptone, respectively. For the formulation, vegetative biomass of *B. licheniformis* N1 strain from 5-day-old liquid culture in nutrient broth added glucose and tryptone was mixed with soy flour, rice flour, glucose, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, and $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, and dried and pulverized. In plastic house test, powder soy formulation effectually controlled gray mold rot as the control value of 93.1%, was more effective than chemical fungicide, benomyl showing the control value of 86.1%. Thus, development of powder soy formulation of *B. licheniformis* N1 will aid large-scale application of biological control in field trials.

Keywords : *Bacillus licheniformis* N1, *Botrytis cinerea*, gray mold rot, powder soy formulation, biological control, perilla

오이, 토마토, 가지, 딸기, 수박, 참외, 호박, 고추, 상추 등 각종 농작물에 기생할 뿐만 아니라 기타 식물 잔사에서도 부생적으로 번식하며 거의 모든 농작물에 심한 피해를 가져오는 다범성균인 잿빛곰팡이병균은 최근 그 소비가 증가되고 있는 들깨에도 심하게 발생하여 큰 피해를 주고 있음이 보고된 바가 있다(김기청, 1999; 문병주, 1999; 문 등, 1998). 따라서 그 방제 대책이 시급히 요청되고 있는데 최근에 농약의 잔류독성 및 환경오염 문제가 크게 부각되면서 유기합성 농약의 성장세가 크게 둔화되고 있으며, 이에 반해 환경 친화적인 미생물농약의 개발에 대한 연구가 활기를 띠고 있다. 그 예로 약 40여

종의 미생물농약 제품이 전세계적으로 각종 식물병의 방제용으로 시판되고 있으며, 우리나라에서도 *Bacillus subtilis* 를 이용한 딸기 잿빛곰팡이병의 미생물농약의 개발이 보고되었으나, 미생물농약으로서 품목이 고시되지 않고 있는 실정이다(Fravel 등, 1998; 복성해, 1992).

이에 본 연구에서는 *Botrytis cinerea*에 의한 들깨 잿빛곰팡이병의 생물학적 방제를 위해 본 병균에 대한 우수 길항균으로 확인된 *Bacillus licheniformis* N1 균주(Son 등, 2002)를 체제화하여 미생물농약을 만들고 이의 방제 효과를 구명하고자 한다.

재료 및 방법

공시병원균 및 길항세균. 이 실험에 병원균으로 공시

*Corresponding author

Phone)+82-51-200-7554, Fax)+82-51-200-6993

E-mail)bjmoon@mail.donga.ac.kr

한 *Botrytis cinerea* LVF12 균주는 1997년과 1998년에 부산시 강동지역의 들깨 재배하우스내에서 잎마름 증상 및 줄기 정단부의 잘록 증상을 띠는 들깨로부터 순수 분리하여 병원균의 특성과 병원성 검정 결과를 통해 들깨 잿빛곰팡이병균으로 확인된 균주이다(문 등, 1998). 또한 길항균으로 공시한 *Bacillus licheniformis* N1 균주는 경남 김해지역의 들깨잎과 근권토양에서 분리하여 공시 병원균의 균사 생장과 분생포자 발아억제 효과가 높았으며 또한 생균에 의한 발병예방 및 치료효과가 뛰어난 것으로 확인된 균주이다(Son 등, 2002).

길항력에 미치는 탄소원 영향. 길항세균을 제제화하여 미생물농약을 만들기 위해서는 길항력을 제고할 수 있는 탄소원과 질소원을 구명하여 길항세균을 대량배양해야 한다. 먼저 공시한 길항세균에 의한 잿빛곰팡이병균의 균사생장 억제효과가 어느 탄소원에서 영향이 큰가를 조사하기 위해 NB(Nutrient broth, Difco, USA) 배지에 콩가루 1.0%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.005%를 첨가하고 여기에 공시 탄소원을 각각 1.0%씩 첨가하여 멸균한 다음 길항세균을 접종하고 30°C에서 160 rpm으로 5일간 진탕배양하여 원심분리하였다. 이 상등액을 0.22 μm milipore filter로 여과한 후 5.0 mm paper disk에 50 μl 를 적신 다음 PDA배지에 병원균과 paper disk를 치상하고 대치배양하여 병원균의 균사생장 억제효과를 저지대로 표시하였다. 공시한 탄소원은 glucose, fructose, lactose, maltose, galactose, starch, sorbitol, inositol, glycerol 등 9종이었다.

길항력에 미치는 질소원 영향. 공시한 길항세균에 의한 잿빛곰팡이병균의 균사생장 억제효과가 어느 질소원에서 영향이 큰가를 조사하기 위해 NB배지에 glucose 1.0%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.005%를 첨가하고 여기에 공시 질소원을 각각 0.5%씩 첨가하여 멸균한 다음 길항세균을 접종하고 30°C에서 160 rpm으로 5일간 진탕배양하여 원심분리하였다. 이 상등액을 여과하고, 대치배양하여 병원균의 균사생장 저지대를 조사하였는데, 방법은 앞서의 탄소원의 영향에서와 동일하게 하였으며, 공시한 질소원은 $(NH_4)_2SO_4$, casamino acid, tryptone, malt extract, yeast extract 등 5종이었다.

공시길항세균의 제제화. *B. licheniformis* N1 균주의 제제화를 위해 NB 배지에 길항력 제고에 효과적인 것으로 확인된 glucose 1.0%와 tryptone 0.5%(Table 1, 2)를 첨가하고 N1 균주를 접종하여 71 발효기에서 30°C, 300 rpm으로 3일간 배양하였다. 배양액 1 l에 예비실험에서 콩가루, 쌀가루, 옥수수전분, 밀가루 등 여러 종류의 고분자 재료 중 방제효과가 확인된 콩가루 200 g, 쌀가루 200 g,

Table 1. Effects of various carbon sources in the culture media on the mycelial growth inhibition of *Botrytis cinerea* LVF12 by antagonistic bacterium, *Bacillus licheniformis* N1 on the PDA at 25°C

Carbon sources (1.0%) ^a	Inhibition zone (mm)
Glucose	5.3
Fructose	-
Lactose	-
Maltose	-
Galactose	-
Starch	3.2
Sorbitol	2.3
Inositol	2.1
Glycerol	-

^aEach carbon source(1.0%) was added in NB media of 1 L with corn flour of 1.0%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ of 0.05% and $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ of 0.005%.

Table 2. Effects of various nitrogen sources in the culture media on the mycelial growth inhibition of *Botrytis cinerea* LVF12 by antagonistic bacterium, *Bacillus licheniformis* N1 on the PDA at 25°C

Nitrogen sources (0.5%) ^a	Inhibition zone (mm)
$(NH_4)_2SO_4$	-
Casamino acid	-
Tryptone	4.5
Malt extract	2.3
Yeast extract	2.8

^aEach nitrogen source(0.5%) was added in NB media of 1 L with glucose of 1.0%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ of 0.05% and $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ of 0.005%.

glucose 4.0 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 g 및 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.02 g을 첨가하여 잘 섞은 다음 철판에 얇게 깔고 55°C에서 48시간 동안 건조한 후 블라인더로 분쇄하여 공시 길항세균을 수화형 미생물농약인 Soy제제로 만들었다.

미생물농약 Soy제제의 방제효과 검정. *B. licheniformis* N1 균주의 Soy제제에 의한 들깨 잿빛곰팡이병의 방제효과를 플라스틱 하우스내에서 풋트 검정하였다. NA(Nutrient agar, Difco, USA) 배지에서 배양한 N1균주를 살균수에 부유한 생균부유액(10^7 cells/ml), NB배지에서 5일간 배양한 N1균주의 배양액(10^7 cells/ml), 부추 잿빛곰팡이병의 방제 약제로 품목 고시된 벤지미다졸계, 베노밀 수화제 2000배 희석액(농약공업협회, 2000) 및 N1균주의 Soy제제 50백액(4×10^8 cells/ml)을 분무접종하여 비교하였다. 이들을 각각 풋트에 재식한 10엽기의 들깨잎 앞뒷면에 충분히 살포하고 건조한 후(2 hr)에 10% 토마토 주스(상품명 : 가야 토마토농장)에 10^7 conidia/ml로 조정된 잿빛곰팡이 병원균 LVF12 균주의 분생포자 부유액을 잎 앞뒷면에 골고루 살포하였으며, 상대습도 90%이상, $20 \pm 2^\circ C$

의 하우스내에 보관하면서 7일 후 발병도를 조사하고 방제가로 환산하였는데 방제가는 다음과 같이 계산하였다(농약공업협회, 1997). 또한 들깨는 잿빛곰팡이병균에 대한 감수성이 높은 것으로 확인된 광양품종을 사용하였으며(Son 등, 2002), 5포트씩 5반복으로 3회 평균하였다.

$$\text{방제가(\%)} = \frac{\text{병원균 단독처리의 발병도} - \text{병원균과 미생물농약등 조합처리의 발병도}}{\text{병원균 단독처리의 발병도}} \times 100$$

결 과

길항력에 미치는 탄소원과 질소원의 영향. 공시한 탄소원 또는 질소원이 첨가된 NB배지에 길항세균 *B. licheniformis* N1 균주를 5일간 진탕배양한 후 그 여과액에 침지한 paper disk와 병원균을 대치배양하여 병원균의 균사생장 억제효과를 조사한 결과 공시한 탄소원중에서는 glucose가 5.3 mm의 저지대를 보여 가장 높은 효과를 보였으나 fructose, lactose, maltose와 galactose에서는 전혀 균사생장 억제효과가 없었다(Table 1). 공시한 질소원 중에서는 tryptone에서 4.5 mm의 저지대를 보여 가장 효과적이었고 다음은 yeast extract와 malt extract 이었으나 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 와 casamino acid에서는 전혀 균사생장 억제효과가 없었다(Table 2).

미생물농약 Soy제제의 방제효과 검정. *B. licheniformis* N1 균주를 길항력 제고에 효과가 확인된 glucose와 tryptone을 첨가한 NB배지에 대량배양하고 그 배양액을 이용하

Table 3. Suppressive effects of formulation, bacterial suspension of *Bacillus licheniformis* N1 and benomyl against gray mold rot of perilla in a plastic house

Treatments	Disease incidence (%)	Control value (%)
B suspension ^a	24.3	70.4b ^f
N suspension ^b	7.9	90.4a
Benomyl ^c	11.4	86.1a
Soy formulation ^d	5.7	93.1a
Control ^e	82.1	0c

^aBacterial suspension(10^7 cells/ml) was adjusted with sterilized water after 1 day incubation on NA media.

^bBacterial suspension(10^7 cells/ml) after 5 days incubation in NB media.

^cChemical fungicide(WP) was diluted 2000 times.

^dBio-fungicide(WP) containing *Bacillus licheniformis* N1(4×10^8 cells/ml).

^e*Botrytis cinerea* LVF12(10^7 conidia/ml) alone.

^fMeans followed by the same letters are not significantly different by DMRT at 0.05 level.

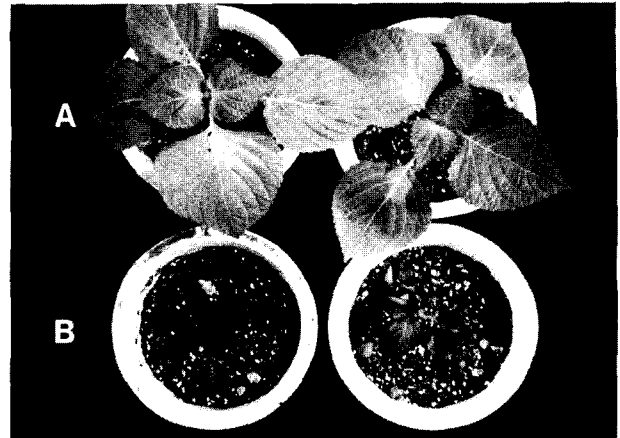


Fig. 1. Suppressive effects of Soy formulation of *Bacillus licheniformis* N1 against gray mold rot of perilla caused by *Botrytis cinerea* LVF12. A, Soy formulation of *B. licheniformis* N1 plus *B. cinerea* LVF12; B, *B. cinerea* LVF12 alone.

여 만든 수화형 미생물농약 Soy제제의 본 병원균에 대한 방제효과를 플라스틱 하우스내에서 포트 검정하였다. 그 결과 Soy제제의 방제가는 93.1%로서 유의성은 없었으나 NB배지 배양액 처리 90.4%, 베노밀 수화제 처리 86.1% 보다 높았으며, N1균주의 생균부유액 처리에서는 70.4%의 방제가를 보였다(Table 3, Fig. 1).

고 찰

일반적으로 길항균의 효율적인 항균활성물질 생산을 위해서는 탄소원, 질소원 및 미량원소들을 선별하고 이들을 이용해 최대의 생산물을 얻도록 하는 것이 미생물농약 개발에 있어서 매우 중요하다(동부한농화학, 1999). 이를 위해 본 연구에서는 길항세균 *Bacillus licheniformis* N1 균주의 항균물질 생산을 위해 최적의 탄소원과 질소원으로 각각 glucose와 tryptone을 선별하여 그 효과를 검정하였는데, 이는 *Botrytis cinerea* 및 여러 병원균에도 길항력이 우수하였던 *B. subtilis*의 항균물질 생산에 glucose와 tryptone을 이용한 연구 결과와 일치하였다(복성해, 1993). 이 등(1998)은 대량배양용 배지를 NB, Glucose M63, LB 등으로 공시하고 여기에 각각 탄소원과 질소원을 첨가하여 길항균의 항균물질 생산 정도를 조사하였는데, NB배지가 가장 항균활성이 높다고 보고하여 본 연구에서도 대량배양용으로 NB배지를 이용하여 길항력에 미치는 탄소원과 질소원의 영향을 조사하였다. 이후 대량배양용 배지의 종류를 다양하게 공시하여 항균물질 생산을 위한 최적조건을 확립하는 연구가 지속적으로 수반되어야 할 것이다.

또한, 본 연구에서 미생물살균제 개발을 위한 제제화에

천연고분자재료인 콩가루와 쌀가루를 전착제로 선발하였다. 복(1992)은 *Bacillus*속균의 전착제로 콩가루와 감자전분을 사용하였고, *Trichoderma harzianum*에는 콩가루와 쌀전분을 이용하였는데 이들은 높은 고정화와 수분흡착도를 나타낸다고 보고하였다. 복(1993)은 *B. subtilis*의 제제 개발에서 고분자물질을 세가지로 나누어 실험하였는데, 콩가루 등이 포함된 단백질고분자는 제제의 강도 및 표면 부착력이 우수할 뿐만 아니라 팽윤도가 적어 분무기를 잘 통과하였으며, 찹쌀가루 등이 포함된 탄수화물고분자는 물과 섞었을 때 부피가 증가하여 분무기 사용에 난점을 초래한 반면, 혼합고분자는 단백질고분자보다 길항균의 생존과 증식효과가 우수하였다. 그 후 이 등(1998)도 역시 콩가루와 전분을 전착제로 선발하여 그 효과를 증명하기도 하였다. 따라서 앞선 타 연구 결과들과 비교해 볼 때, 본 연구에서 전착제로 사용된 천연고분자물질인 콩가루와 쌀가루는 단백질과 탄수화물고분자로서 상기의 혼합고분자의 장점을 지닌 것으로 사료된다.

이외에, 고분자재료에 첨가된 glucose는 병원균보다 길항균에 상대적으로 유용하게 작용하는 영양원으로 제제의 효과를 증진시키며, 미량원소 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 는 길항균의 생장에 작용하는 무기영양 염류로 효력 증진제 역할을 한다. 이는 정 등(1993)의 미생물농약 개발과 복(1993)의 무공해 생물농약 개발 그리고 이 등(1998)에 의한 미생물 살균제 개발 등의 연구에서와 마찬가지로 무기염류가 효력증진제로 사용된 결과와 동일하다.

제제의 방제효과 검정에서 Soy제제의 방제가는 93.1%로 이전의 Son 등(2002)이 보고한 *B. licheniformis* N1 균주의 예방·치료효과 검정에서 100%의 방제가를 나타낸 결과와 다소 차이를 보이는데, 이는 Son 등에 의한 실험은 생육상내에서 풋트 검정한 것이고, 본 실험은 플라스틱 하우스내에서 풋트 검정한 결과로 배양조건에 의한 다소의 차이로 생각된다.

또한 미생물 농약이 상품화하여 실용화되기 위해서는 반드시 보관상의 안정성 조사가 이루어져야 하며 이는 매우 중요한 필수요건이다. Vidhyasekaran 등(1995)은 *Fusarium udum*의 콩시들음병 방제를 위한 *Pseudomonas fluorescens*의 제제화에 talc와 peat를 첨가하여 오랫동안 저장 안정성이 유지되도록 하였으며, *F. oxysporum*에 의한 콩시들음병 방제에도 talc와 peat를 사용하여 *P. fluorescens*의 제제가 저장안정성에 효과적이었음을 보고하였다(Vidhyasekaran, 1997). 본 개발 Soy제제는 보조제를 첨가하지 않았음에도 불구하고 실온에서 3개월 이상 보관시 미생물의 세균수(CFU/ml)가 일정하게 유지되었던 바, 이를 제제화하여도 보관상 큰 어려움은 없을 것으로 사료

되나 장기간 보존을 위한 보조제 사용에 관한 실험 등이 추후 보완되어야 할 것이다.

요 약

*Botrytis cinerea*에 의한 들깨 잿빛곰팡이병의 생물학적 방제를 위해 선발한 *Bacillus licheniformis* N1 균주를 제제화하여 미생물농약을 제조하고 이의 방제 효과를 검정하였다. N1균주의 길항력에 미치는 탄소원과 질소원의 영향을 실험한 결과 탄소원으로는 glucose, 질소원으로는 tryptone이 가장 높은 효과를 보였다. 또한 N1 균주를 이들 glucose와 tryptone을 첨가한 NB배지에 대량배양하고 그 배양액에 콩가루, 쌀가루, glucose, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 및 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 를 첨가하여 수화형 미생물농약 Soy제제로 제조하고, 이 병원균에 대한 방제효과를 하우스내에서 풋트 검정한 결과 방제가가 93.1%로서 유의성은 없으나 베노밀 수화제에 의한 86.1%보다 높았다.

감사의 말씀

이 논문은 1998년도 동아대학교 학술연구조성비(일반과제)에 의하여 연구되었습니다.

참고문헌

- 복성해. 1992. 딸기 회색곰팡이병 방제용 생물농약의 개발. 과학기술처 연구보고서. 91pp.
- 복성해. 1993. 무공해 생물농약·미생물 살균제 GEF-1의 생산공정 최적화, 전달체계 및 제제기술개발. 과학기술처 연구보고서. 62pp.
- 동부한농화학 농업기술연구소. 1999. *Bacillus thuringiensis*(BT). 143pp.
- Fravel, D. R., Connick Jr, W. J. and Lewis, J. A. 1998. Formulation of microbial biopesticides. In : *Formulation of microorganisms to control plant diseases*, ed. by H. D. Burges, pp. 187-202. Kluwer Academic Publishers.
- 정영륜, 신원교, 강수웅. 1993. 시설원에 작물의 잿빛곰팡이병 방제용 미생물농약 개발. 경남농촌진흥원 연구보고서. 24pp.
- 김기청. 1999. 박과작물병의 진단과 방제이론. 전남대학교출판부. 702pp.
- 이기성, 김균연, 강태섭. 1998. 생물학적 제어와 환경보전을 위한 미생물살균제의 상업적 개발. 농림부 연구보고서. 113pp.
- 문병주. 1999. 낙동강 유역 일들깨 품질과 생산성 제고 및 생화력을 위한 기술개발에 관한 연구·들깨병의 병원균 분리동정, 발병생태 및 생물학적 방제기술개발. 농림부 연구보고서. 277pp.
- 문병주, 노성환, 손영준, 강형석, 이재필, 김병섭, 정대수. 1998.

- Botrytis cinerea*에 의한 들깨 잿빛곰팡이병의 발생. 한식병지 14(5): 467-472.
- 농약공업협회. 1997. 농약관련법령 및 유관법령집. 343pp.
- 농약공업협회. 2000. 농약사용지침서. 823pp.
- Son, Y. J., Lee, J. P., Kim, C. S., Song, J. H., Kim, H. J., Kim, J. W., Kim, D. H., Park, H. C. and Moon, B. J. 2002. Biological control of gray mold rot of perilla caused by *Botrytis cinerea* I. Resistance of perilla cultivars and selection of antagonistic bacteria. *J. Plant Pathol.* 18(1): 36-42.
- Vidhyasekaran, P. and Muthamilan, M. 1995. Development of formulations of *Pseudomonas fluorescens* for control of chickpea wilt. *Plant Dis.* 79: 782-786.
- Vidhyasekaran, P., Sethuraman, K. Rajappan, K. and Vasumathi, K. 1997. Powder formulations of *Pseudomonas fluorescens* to control pigeonpea wilt. *Biological control* 8: 166-171.