

오이 흰가루병에 대한 *Bacillus subtilis* KB-401의 방제 효과

남명훈* · 최재필 · 김형조¹ · 이재준 · 임근환 · 김영권 · 김흥태¹ · 전용철²

고려바이오(주), ¹충북대학교 농업생명환경대학 식물학과, ²제주대학교 생명자원과학대학 식물자원환경과

(2010년 2월 12일 접수, 2010년 2월 22일 수리)

Controlling Activity of *Bacillus subtilis* KB-401 Against Cucumber Powdery Mildew Caused by *Sphaerotheca fusca*

Myunghyeun Nam*, Jaepill Choi, Hyung Jo Kim¹, Jaejun Lee, Keunhwan Lim, Young Gwon Kim, Heung Tae Kim¹ and Yong-Chull Jeun²

KOREABIO Co., LTD, ¹Department of Plant Medicine, College of Agriculture, Life and Environmental Sciences, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea ²Department of Agriculture, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

Abstract

Disease control efficacy was evaluated with use of *Bacillus subtilis* KB-401 against cucumber powdery mildew in a greenhouse and fields. *B. subtilis* KB-401 showing inhibitory effect on mycelial growth of various phytopathogenic fungi was formulated for the evaluation. The formulated biofungicide of *B. subtilis* KB-401 was less effective at 1,000 times dilution rate than that at 250 or 500 times dilution rate. The powdery mildew was successfully controlled by the biofungicide at the early stage of disease development. The field performance of the biofungicide was conducted in Asan and Cheonan city. Three or four consecutive applications of the biofungicide at 500 dilution rate with 10-day intervals resulted in considerable efficacy of disease control as high as 83.3%.

Key words biological control, *Bacillus subtilis*, cucumber powdery mildew

서론

친환경 농산물에 대한 소비자들의 관심이 증가하면서 생물적 방제를 통해서 식물병을 방제할 수 있는 다양한 후보 미생물의 선별과 새로운 생물농약 개발의 필요성이 증가하고 있다. 특히 식물병에 대한 생물적 방제제로 많이 사용하고 있는 *Bacillus subtilis*는 다양한 식물병에 대해서 실험실과 온실 실험뿐만 아니라 포장에서도 우수한 효과가 있다고 알려져 있다(Scherm 등, 2004; Lee 등, 2006; Fernando 등, 2007). 감귤류의 병 방제에 있어서도 *B. subtilis*는 *Penicillium digi-*

tatum, *Geotrichum candidum*, *Phomopsis citri* 등과 같은 병원성 곰팡이를 방제하기 위해서 사용되었다(Singh과 De-verall, 1984; Sharma 등, 2009). *B. subtilis* S1-0210은 *B. cinerea*의 균사 생육을 저해하였는데, 병원균의 균사가 만곡 되고 선단이 팽윤되며 생장이 억제되었다(Hang 등, 2005). 토양에서 분리한 *B. subtilis* KB-401 균주도 감귤 검은점무늬병균인 *Diaporthe citri*의 균사생장과 포자발아를 억제하였는데, Hang 등(2005)이 관찰하였던 것과 동일하게 균사 선단에서 균사가 팽윤되는 현상을 관찰할 수 있었다(남 등, 2009). *B. subtilis* KB-401은 식물병원균에 대한 균사 생장 억제 실험에서 *D. citri*뿐만 아니라 담자균문에 속하는 *Rhizoctonia solani*와 난균문에 속하는 *Pythium sp.*의 균사 생

*연락처 : Tel. +82-31-353-7807, Fax. +82-31-353-8247
E-mail: pigfood72@hanmail.net

장을 아주 강하게 억제하였을 뿐만 아니라, 자낭균류에 속하는 *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Fusarium* 등과 난균문인 *Phytophthora capsici*의 균사 생육도 억제하였다(남 등, 2009). 이 결과로부터 *B. subtilis* KB-401의 작용 범위는 매우 넓어서, 진정균류와 유사균류에 속하는 다양한 식물병원균의 균사 생장을 억제한다는 것을 알 수 있었다.

흰가루병은 많은 작물에 발생하여 작물의 수량과 품질을 저하시키는 원인이 되고 있으며, 다양한 흰가루병균 중에서 시설 채소를 재배하는 하우스에서 가장 문제가 되는 병원균으로 알려져 있는 것이 *Sphaerotheca*속 흰가루병균이다(Elad 등, 1996). 특히 김해, 고령, 상주 등에서 재배하는 참외에서 흰가루병의 발생 정도는 각각 7, 9, 4%를 상회하였으며, 배에서도 3% 이상의 병 발생을 나타냈다(명 등, 2005). 이처럼 흰가루병의 발생 정도는 발병 환경에 따라서, 또는 기주식물에 따라서 차이가 있지만, 지속적으로 발생하여 농업생산성을 위협하는 주요 식물병이다. 하지만 흰가루병균은 활물기생균이기 때문에 다른 병원성 곰팡이와 달리, 살균제의 방제 효과를 실내 검정 방법으로 조사할 수 없었다. 따라서 본 실험에서는 다양한 식물 병원성 곰팡이의 균사 생육을 억제하는 것으로 밝혀진 *B. subtilis* KB-401이 오이 흰가루병 발생을 억제할 수 있을지의 여부를 포장에서 직접 조사하고자 오이 재배 온실과 충남 아산시와 천안시의 오이 재배 하우스에서 방제효과시험을 수행하였다. 또한 미생물 제제의 처리 시기와 처리 간격이 병 방제 효과에 미치는 영향을 구명하기 위하여 충남 당진군의 오이 재배 하우스에서 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

선발 미생물의 제형화

선발한 *B. subtilis* KB-401을 포장에서 실험하기 위해서 100 ppm의 polyoxyethylene tridecyl ether를 분산제로, 100 ppm의 EFKA-UVALINK ADP를 자외선 차단제로, 그리고 0.5%의 sodium-2-pyrrolidone carboxylate를 보습제 등으로 첨가하여, 수화제 형태로 제형화하여 사용하였다. 이 때 수화제에서 *B. subtilis*의 농도는 1×10^8 개 mL^{-1} 로 조절하였다. 이처럼 제제한 *B. subtilis* KB-401을 사용하여 오이 재배 하우스에서 흰가루병에 대한 방제 효과를 직접 검정하였다.

오이 흰가루병에 대한 농도별 발병억제효과 검정

충남 당진군 순성면 소재의 오이 시설하우스에서 난괴법 3반복으로 실험하였으며, 처리구의 모든 반복에서 30주의 오

이를 사용하였다. 시험에 사용한 미생물 제제는 발생초기인 2007년 9월 10일부터 250배, 500배, 1000배로 희석하여 10일 간격으로 총 3회 처리하였으며, 발병 조사는 마지막으로 미생물 제제를 처리하고 10일 후에 최상위엽에서부터 총 10개의 오이 잎에 발생한 흰가루병의 발병 지수를 조사하였다. 발병 지수는 흰가루병이 발병하지 않았을 때 0, 엽당 병반면적률이 1에서 5%의 발병 지수를 1로 하고, 병반면적률이 5.1에서 25% 정도일 때의 발병지수를 2, 25.1에서 50%일 경우를 3, 50% 이상일 때를 4로 결정하였다. 조사한 오이 한 주의 발병도는 아래 식을 이용하여 구하고 무처리구의 발병도와 비교하여 방제가를 계산하였다. 포장에서의 대조 살균제로는 Cyflufenamid와 Hexaconazole의 합제(a.i. 4.5%, SC)를 2000배로 희석하여 사용하였다.

$$\text{발병도 (\%)} = \frac{\sum (\text{발병지수} \times \text{계수})}{4N} \times 100$$

발병지수	0: 발병무
	1: 엽당 병반면적률 1 - 5%
	2: 엽당 병반면적률 5.1 - 25%
	3: 엽당 병반면적률 25.1 - 50%
	4: 엽당 병반면적률 50.1% 이상
	N: 병반면적률을 조사한 잎 수

$$\text{방제가(\%)} = \left(1 - \frac{\text{미생물 제제 처리구의 발병도}}{\text{무처리구의 발병도}}\right) \times 100$$

미생물 제제의 처리 시기와 처리 간격이 방제효과에 미치는 영향

충남 당진군 합덕읍 소재의 시설하우스에서 난괴법 3반복으로 설계하였으며, 모든 처리구의 반복에는 30주의 오이를 사용하였다. 미생물 제제는 병 발생의 시기를 달리하여 처리하였는데, 포장에서 병 발생 정도가 1% 미만이 되는 발생 초기와, 5%에서 10% 사이의 발병도를 보이는 발병 중기, 그리고 25%의 발병도를 보이는 발병 후기로 임의로 구별하여, 각각의 시기에 오이의 잎에 충분히 묻도록 미생물 제제를 총 4회 살포하였다. 각각의 발병 시기에 미생물 제제를 처리할 때에는 처리 간격을 5일, 7일, 10일 간격으로 조정하여 처리하였으며, 발병 조사는 각 처리구마다 마지막 처리를 하고 10일 후에 위와 같은 방법으로 잎에서의 발병도를 조사하여 방제가를 계산하였다. 미생물 제제를 처리하고 나타나는 약해는 미생물 제제를 1차 처리하고 3, 5, 7일 후에 오이 잎에 나타

나는 약해를 육안으로 조사하였다.

포장에서 *B. subtilis* KB-401의 효과 검정

충남 아산시 배방면과 천안시 성환읍의 오이 재배 하우스에서 수화제로 제형화한 *B. subtilis* KB-401의 흰가루병 방제 효과를 시험하였다. 병이 발생하기 시작하는 초기에 아산시의 오이 재배 하우스에서는 10일 간격으로 총 4회를, 그리고 천안시에서는 동일한 간격으로 총 3회를 경엽처리하였다. 이 때 대조 살균제로는 Cyflufenamid와 Hexaconazole의 합

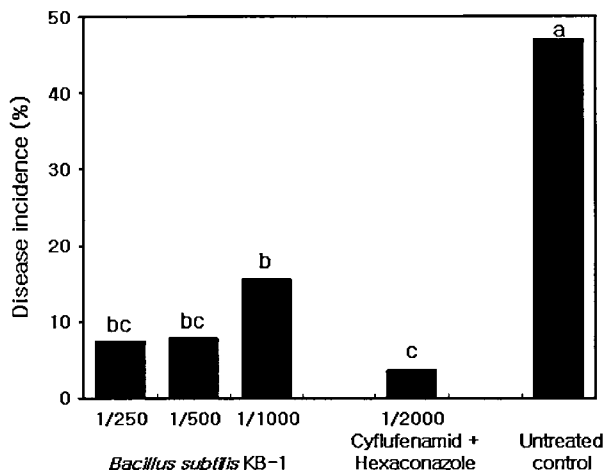


Fig. 1. Effect of dilution rates of the formulated biofungicide of *Bacillus subtilis* KB-401 on disease incidence of cucumber powdery mildew caused by *Sphaerotheca fusca* in a greenhouse.

제(a.i. 4.5% SC)와 Triflumizole(a.i. 30% WP)을 사용하였다. 각 실험은 오이 재배 하우스에서 난괴법 3반복으로 실험구를 배치하여 수행하였으며, 각 반복 당 오이는 30주씩을 사용하였다. 발병 조사는 두 포장 모두에서 미생물 제제를 마지막 처리한 날로부터 10일 후에 위에서 설명한 방법으로 발병도를 조사하여 방제가를 계산하였다.

결과 및 고찰

B. subtilis KB-401의 처리 농도에 따른 오이 흰가루병 방제 효과

최종적으로 *B. subtilis* KB-401을 처리하고 10일 후에 조사한 무처리구에서의 흰가루병 발병도는 47.1%로, 시험에 사용한 시료의 효과를 판단하기에 충분한 발병도를 보였다(Fig. 1). 대조약제로 처리한 Cyflufenamid와 Hexaconazole의 합제 처리구에서는 3.6%의 발병도를 보여, 오이 흰가루병에 대하여 92.4%의 방제효과를 보였다. 제형화한 *B. subtilis* KB-401을 농도별로 경엽 처리한 처리구에서의 발병도와 방제가를 보면, 250배로 희석하여 처리한 경우 발병도는 7.4%이었으며 이에 따라 방제가는 84.3%로 나타났다. 500배와 1000배로 희석하여 미생물 제제를 처리한 처리구에서도 발병도와 방제가가 7.9%와 83.2%, 그리고 15.6%와 66.9%로 나타났다. 세 가지의 처리 농도에서 1000배로 희석하여 처리하였을 때의 방제 효과는 다른 두 처리 농도에 비하여 저조하였으며,

Table 1. Effect of numbers of application trial and application intervals on disease control efficacy of the formulated biofungicide of *Bacillus subtilis* KB-401 against cucumber powdery mildew caused by *Sphaerotheca fusca*

Treatment	Disease-developing stage ^a	Period ^b (days)	Disease incidence (%)	Control efficacy (%)
<i>Bacillus subtilis</i> KB-401	the early stage	5	16.0 d ^c	79.4
		7	16.5 d	78.8
		10	14.5 de	81.4
	the middle stage	5	31.0 c	60.2
		7	32.1 c	58.7
		10	36.2 c	53.5
	the latter stage	5	46.4 b	40.4
		7	48.8 b	37.3
		10	54.0 b	30.6
control	-	-	77.8 a	-

^a; Disease-developing stages were divided into three stages as followings; the early stage, less than 1% of disease incidence; the middle stage, 5 - 10% of disease incidence; the latter stage, more than 25% of disease incidence.

^b; Period indicated the application interval (days) of the formulated biofungicide of *Bacillus subtilis* KB-401.

^c; In a column, means followed by the same letter are not significantly different 5% level by Duncan's multiple range test.

Table 2. Field performance of the formulated biofungicide of *Bacillus subtilis* KB-401 against cucumber powdery mildew caused by *Sphaerotheca fusca* in the greenhouse located in Asan city and Cheonan city

Location	Treatment	Dilution point	Disease incidence (%)	Control value (%)
Asan city				
	<i>Bacillus subtilis</i> KB-401	500	8.8 b*	83.8
	Cyflufenamid/Hexaconazole SC	2000	4.7 b	91.3
	Triflumizole WP	2000	4.1 b	92.4
	Untreated control		54.3 a	
Cheonan city				
	<i>Bacillus subtilis</i> KB-401	500	10.4 b	83.4
	Cyflufenamid/Hexaconazole SC	2000	3.3 c	94.7
	Triflumizole WP	2000	3.1 c	95.0
	Untreated control		62.5 a	

*; In a column, means followed by the same letter are not significantly different 5% level by Duncan's multiple range test.

250배와 500배 희석 처리구의 결과에서는 유의성 있는 차이가 나타나지 않았기 때문에 농가에서 직접 사용하는 경우 경제성을 고려하여 500배의 희석 농도가 적합할 것으로 생각한다.

Bacillus subtilis KB-401의 처리 시기와 간격이 오이 흰가루병에 대한 방제효과에 미치는 영향

무처리구에서 오이 흰가루병의 발병도는 77.8%로 *B. subtilis* KB-401의 효과를 판단하기에 충분하였다(Table 1). 미생물 제제를 흰가루병이 발생하기 시작한 초기에 처리한 경우에 방제 효과가 78.8%에서 81.4%로 나타났다. 하지만 미생물 제제를 처리하는 시기가 늦어질수록 방제가 역시 감소하였으며, 포장에 이미 흰가루병이 발생하여 발병도가 25% 이상일 경우에는 미생물 제제의 방제가가 40.4%에서 30.6%로 매우 저조하였다. 병 발생 시기별로 미생물 제제를 5일, 7일, 10일간으로 처리 간격을 다르게 하여 처리하였을 때, *B. subtilis* KB-401의 흰가루병에 대한 방제 효과 간에는 통계적인 유의성이 인정되지 않았다. 이 결과는 포장에서 *B. subtilis* KB-401를 사용하여 오이 흰가루병을 방제하기 위해서는 처리하는 간격보다는 포장에서 흰가루병이 발생하기 직전에 예방 처리를 하거나, 또는 병이 발생하기 시작하는 초기에 처리하는 것이 방제에 성공할 수 있는 방법이라는 것을 보여 주고 있다. 흰가루병을 방제하기 위해서는 미생물농약뿐만 아니라 화학농약에 있어서도 병이 발생한 후에 처리하는 치료적인 개념의 살균제 처리보다는, 병이 발생하기 전 또는 발병 초기에 처리하는 것이 효과적이다(Keinath와 DuBose, 2004).

오이 흰가루병에 대한 지역별 발병억제효과 검증

Bacillus subtilis KB-401의 오이 흰가루병에 대한 방제 효과를 충남 아산시와 천안시에 위치하는 오이 재배 하우스에서 실험하였다. 앞의 실험 결과를 바탕으로 미생물 제제는 500배로 희석하여 10일 간격으로 처리하였다. 아산시의 오이 재배 하우스의 경우에는 미생물 제제와 대조 살균제를 총 4회 처리하였으며 천안의 경우에는 3회 처리하였다. 아산시와 천안시의 오이 시설하우스에서 미생물 제제와 살균제를 처리하지 않은 무처리구에서의 흰가루병 발병도는 각각 54.3%와 62.5%로, 실험에 사용한 미생물 제제의 활성을 정확하게 파악하는데 충분한 발병도를 보여 주었다(Table 2). 두 하우스 모두 대조 살균제로 처리한 Cyflufenamid/Hexaconazole 합제와 Triflumizole의 흰가루병 방제가는 91.3과 92.4%, 그리고 94.7과 95.0% 이었다. *B. subtilis* KB-401을 제형화한 미생물 제제 역시 두 곳에서 각각 83.8%와 83.4%의 방제가를 보여 흰가루병 방제에 충분한 가능성이 있음을 보여주었다. 특히 총 4회 처리한 아산시의 하우스 포장과 3회 처리한 천안시의 하우스 포장 간에 방제 효과에 큰 차이가 없는 것을 보아, 흰가루병이 발생하기 전 혹은 발생 초기에 *B. subtilis* KB-401을 처리한다면 10일 간격으로 3회 처리해도 흰가루병의 방제가 가능할 것으로 생각한다. 하지만 3회 처리 후에 혹은 4회 처리 후에 미생물 제제를 처리하지 않고 계속적으로 발병 상황을 조사하지 않았기 때문에, 미생물 제제를 계속적으로 사용하지 않았을 때, 그 효과가 얼마만큼 계속적으로 유지될지는 정확하게 예측할 수 없다. 따라서 포장에서 더욱 안정적으로 *B. subtilis* KB-401을 사용하기 위해서는 미생물 제제의 지속성에 대한 실험 등이 보완되어야 할 것으로 생각한다.

또한 식물병 방제제로 사용되는 *B. subtilis*의 효과를 더 안정화시키기 위해서 무기염, 항산화제, 호흡억제제 등과 혼합하여 사용하기도 하며, 종합적 방제를 수행하기 위해서 살균제와의 병행도 검토하는 것이 좋다(Nofal과 Haggag, 2006). 본 연구에서 개발한 KB-401 균주도 그 활성을 높이고, 사용 범위를 확대하기 위해서는 다양한 방법을 고려해야 할 것으로 본다.

감사의 글

본 연구는 지식경제부에서 시행한 공통핵심기술개발사업(401004)과 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업(5060032-03-1-CG000)의 지원에 의해 수행되었으며 지원에 감사드립니다.

>> 인 / 용 / 문 / 헌

- Elad, Y., N. E. Malathrakis and A. J. Dik (1996) Biological control of Botrytis-incited diseases and powdery mildews in greenhouse crops. *Crop Prot.* 15:229~240.
- Fernando, W. G. D., S. Nakkeeran, Y. Zhang and S. Savchuk (2007) Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary by *Pseudomonas* and *Bacillus* species on canola petals. *Crop Prot.* 26:100~107.
- Hang, N. T. T., S-O. Oh, G. H. Kim, J-S. Hur and Y. J. Koh (2005) *Bacillus subtilis* S1-0210 as a biocontrol agent against *Botrytis cinerea* in strawberries. *Plant Pathol. J.* 21:59~63.
- Keinath, A. P. and V. B. DuBose (2004) Evaluation of fungicides for prevention and management of powdery mildew on watermelon. *Crop Prot.* 23:35~42.
- Lee, J. P., S-W. Lee, C. S. Kim, J. H. Son, J. H. song, K. Y. Lee, H. J. Kim, S. J. Jung and B. J. Moon (2006) Evaluation of formulations of *Bacillus licheniformis* for the biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis cinerea*. *Biological control* 37:329~337.
- Nofal, M. A. and W. M. Haggag (2006) Integrated management of powdery mildew of mango in Egypt. *Crop Prot.* 25:480~486.
- Scherm, H., H. K. Ngugi, A. T. Savelle and J. R. Edwards (2004) Biological control of infection of blueberry flowers caused by *Monilinia vaccinii-corymbosi* Bio;ogical control 29:199~206.
- Sharma, R. R., D. Singh and R. Singh (2009) Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control* 50:205~221.
- Singh, V. and B. J. Deverall (1984) *Bacillus subtilis* as a control agent against fungal pathogens of citrus fruit. *Tran. Br. Mycol. Soc.* 83:487~490.
- 남명훈, 신진호, 최재필, 홍석일, 김영권, 김흥태 (2009) 감귤 검은점 무늬병균의 생육을 저해하는 근권 세균의 분리 및 동정. *농약과학회지* 13:332~335.
- 명인식, 박경석, 홍성기, 박진우, 심홍식, 이영기, 이상엽, 이승돈, 이수현, 최홍수, 최효원, 허성기, 신동범, 나동수, 예완해, 조원대 (2005) 2004년 주요 농작물 병해 발생개황. *식물병연구* 11:89~92.

오이 흰가루병에 대한 *Bacillus subtilis* KB-401의 방제 효과

남명훈* · 최재필 · 김형조¹ · 이재준 · 임근환 · 김영권 · 김흥태¹ · 전용철²

고려바이오(주), ¹충북대학교 농업생명환경대학 식물외과학과, ²제주대학교 생명자원과학대학 식물자원환경과

요 약 다양한 식물병원균의 균사 생육을 억제하는 *Bacillus subtilis* KB-401을 수화제의 형태로 제제하여, 오이를 재배하는 하우스에서 오이 흰가루병에 대한 방제 효과를 실험하였다. *B. subtilis* KB-401을 제형화한 미생물 제제는 1000배로 희석하여 처리하였을 때, 250배와 500배로 희석하여 살포한 처리구보다 오이 흰가루병에 대한 방제 효과가 저조하였다. 하지만 250배와 500배 희석액 처리구의 방제효과는 통계적으로 유의성 있는 차이가 없었다. *B. subtilis* KB-401의 미생물제제는 흰가루병이 발생하기 전 또는 발생 초기에 처리하여야만 우수한 방제효과를 나타냈으며, 발병 중기 혹은 후기에 사용할 경우에는 방제효과가 크게 감소하였다. 미생물 제제를 처리하는 간격은 오이 흰가루병 방제효과에 영향을 없었다. 충남 아산시 의 오이 재배 하우스에서 *B. subtilis* KB-401의 미생물 제제를 500배로 희석하여 10일 간격으로 3회 처리하였을 때 83.8%의 병 방제 효과를 얻었다.

색인어 생물적 방제, *Bacillus subtilis*, 오이 흰가루병