

과제구분	기본연구	수행시기		전반기	
중장기 Code	B	RIMS Code		20070201035025	
연구과제 및 세부과제		연구분야 (Code)	수행 기간	연구실	책임자
토마토포تما름병 생물적방제를 위한 농산부산물 이용기술개발		작물보호 LS0603	'04 ~'08	강원도원 환경농업연구과	김성일
색인용어	토마토포تما름병, 발효퇴비, 유용미생물, 연작장애, 입상수화제, 입제				

ABSTRACT

In Korea, the most important tomato disease is bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. The pathogen is soilborne disease, it survived in soil for 3~5 years independently and disseminated through soil and flooding waters. When it enters roots through wounds by root-knot nematode or natural openings, it multiplies throughout the vascular system and finally destroys xylem. The only method to control tomato bacterial wilt (TBW) is to use chemical fumigant, there is no commercial pesticide available for control of it. But the fumigant treatment in soil is difficult. As a promising method to control soilborne disease, biological control is considered as an alternative or a supplemental way of reducing the chronic threat of TBW. There has been a large body of literature describing potential uses of antagonistic microorganisms as agents managing *R. solanacearum* in vitro.

In our study, TBW disease suppression has been achieved by applying the *S. griseus* as the form of spores, mycelia, or combinations of the two in growth chambers and greenhouses. To enhance biocontrol effect in soil, compost amendment is necessary. Compost made by livestock manure fermentation processing is a valuable soil amendment for preparing healthy growing fields. It not only supplies macro and micronutrients for plant growth, but also is a source of organic matter. 70 to 80% of the phosphorus and 80 to 90% of the potassium will be available from compost the first year after application. Increasing soil organic matter improves soil tilth, increases the water holding capacity of sandy soils, improves drainage in clay soils, provides a source of slow release nutrients, and promotes beneficial soil organisms. Many researchers have made an effort to change soil microflora to provide advantages for soilborne disease control. Bacterization means inoculating a microbial culture into a diseased soil, and such inoculation sometimes results in an effective control of soilborne disease.

Among the antagonists which inhibited *R. solanacearum* growing by antibiotics in vitro, we selected *Streptomyces griseus* as an antagonistic agent to control TBW. The spores harvested on agar plates added to rice bran-chitin mixture and formulated as granule, and water soluble granule (WG) formulated with chitosan-sugar. Pellet is formulated for soil amendment or compost inoculant. The compost mixed with pellet suppressed TBW in tomato growing greenhouse.

Key words : tomato bacterial wilt, fermented compost, Beneficial microorganism, soil disorder, water soluble granule, pellet

1. 연구목표

토마토 뿌리로 침입하여 목질부를 손상시켜 짧은기간 내에 식물전체를 고사시키는 토마토 풋마름병(Bacterial wilt)은 *Ralstonia solanacearum*에 의해 발병된다. 이 병원균은 운동성을 갖는 세균류로 토양 내에 3~5년 장기간 독자적으로 생존이 가능하고, 지온이 내려가는 겨울철에는 식물잔재물이나 잡초에 효과적으로 살아남아 월동한다. 병의 확산경로는 발병된 농가에서 사용한 농기계에 붙어있는 흙이나 먼지를 통한 병원균유입이나 오염된 하천, 강, 수로의 물을 통해 유입되어 병이 발생한 지역에서는 피해면적이 매년 확산되고 있다. 감염된 밭에서는 관수나 비에 의한 지표수 흐름이나 시설하우스내 관수자재와 토양사이의 수막의 흐름에 따라 근접한 식물체에 빠르게 전염되어 피해정도가 심하게 나타나는 특징이 있다.

발병된 농가에서는 다양한 방법으로 토마토풋마름병 방제를 위해 방제에 노력하고 있으나 그 효과는 미흡한 실정이다. 가장 널리 이용되고 있는 방법으로 저항성대목을 이용한 점목묘 정식방법은 농가에서 육묘가 어렵고, 실생과 대목구입에 필요한 종자비 이중부담으로 어려움을 겪고 있다. 풋마름병방제용 농약으로 등록된 토양훈증소독제는 처리기간이 한달 이상으로 길고, 지온이 낮은 겨울철 농한기에는 처리효과가 낮아 사용에 어려움을 겪고 있다. 열수소독기는 처리시 노동력과 처리시간이 과다하게 소요되어 사용에 어려움이 있다. 이러한 방제법들은 방제효과가 일정하지 않아 일부 농가에서는 과수나 벼에 등록된 농약을 남용하여 경제적 부담을 안고, 지력을 약하게 하는 악순환을 겪고 있다.

시설재배는 제한된 공간에서 같은 작물을 수년~수십년간 연작함으로써 염류집적, 병해충 밀도증가, 미량요소결핍, 화학비료에 의존한 토양관리로 지력저하, 수량 및 품질의 저하 등과 같은 장애요인이 발생하고 있다. 이를 해결할 수 있는 가장 희망적인 방법은 퇴비를 사용하는 것이다. 퇴비는 지력손상을 방지하여 지속적으로 농사를 지을 수 있게 하고, 토양물리성을 개선하여 보습이나 배수가 원활히 이루어지게 하여 뿌리의 활력을 증대시키고, 토양내 유효영양소의 유실을 막고 지속적 식물에 공급하는 등의 중요한 역할을 한다. 토양에 유익한 퇴비는 토양에 뿌려지기 전에 발효과정을 거쳐 식물이 흡수할 수 있는 상태로 준비하는 과정이 필요하다. 퇴비발효는 수분, 온도, 혐기 및 호기상태, 퇴비재료의 C/N율 등의 조건을 고루 제공하여 우리가 원하는 상태로 만들기 위한 과정이다. 퇴비를 이용하여 토양병을 방제하는 방법으로 퇴비제조시 유용미생물을 이용하는 방법이 다양하게 연구되어지고 성공사례가 보고되고 있다. 이러한 토양병방제를 위한 기능성퇴비제조를 위해서는 방제하고자 하는 병원균의 생장을 억제하고 사멸시킬 수 있는 유용미생물이 준비되어 있어야 한다. 유용미생물은 토양 자체가 가지고 있는 정균작용에 의한 병방제기능이 길항미생물의 기능에 의한다는 이론을 정립하는 과정에서 확인된 것으로 친환경미생물농약개발에 광범위하게 이용되고 있다.

본 연구의 최종목표는 토마토풋마름병원균에 길항력이 뛰어난 유용미생물을 토양에서 찾아내어 제형화하고, 토마토풋마름병방제용 기능성퇴비 제조 방법을 개발하고자한다. 개발된 유용미생물은 농가보급을 위해 균주를 대량배양하여 실온에서 장기보관이 보관이 가능한 상태로 가공하고, 퇴비에 처리하였을 때 정착, 증식, 방제효과등과 같은 일련작용이 원활하게 이루어질 수 있도록 제형화하여 제품을 생산하는 기술을 개발하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 유용미생물 균주선발

풋마름병원균의 생장을 억제하는 미생물은 근권이나 자연상태의 토양에서 선택배지를 이용하여 분리하고, 분리보존한 균주들은 풋마름병원과 대치배양법으로 길항능력이 확인된 균주를 선발하여 유용균주로 사용하였다. 이들의 길항작용은 항균작용, 영양경쟁관계, 효소분해능 등을 기내실험으로 확인하고, 토양내에서의 방제기작은 유리온실에서 풋트실험으로 조사하였다.

나. 유용미생물 제형화기술개발

선발된 유용미생물은 사용이 용이한 제품으로 개발하기 위해 대량배양을 위한 배지조성, 배양방법, 수확조건, 원제생산방법 등을 연구하였다. 제품생산을 위한 원제는 장기간보관이 가능하고 생산과정에서 변질이 되지 않도록 가공하는 방법을 정립하고, 생산된 제품은 퇴비제조과정에서 첨가하여 목적하는 풋마름병방제효과가 있는지 여부를 확인하였다.

다. 토마토폏마름병방제용 기능성퇴비제조 및 농가실증실험

우분을 이용하여 풋마름병방제용 기능성퇴비를 생산하는 방법을 연구하기 위해 준비한 농산부산물들은 수분, 온도, 혐기 및 호기조건, C/N율을 최적조건으로 하여 속효성발효퇴비로 만들고, 여기에 유용미생물재료를 첨가하여 준비된 기능성퇴비의 항균력 향상 효과를 확인하였다. 본원과 농가에서 만든 풋마름병방제용 기능성퇴비는 하우스에 살포하여 토마토폏마름병방제효과를 확인하였다.

라. 입제, 입상수화제 체계처리 토마토폏마름병방제효과 경제성분석

토마토폏마름병방제를 위해 개발한 입제와 입상수화제의 상품가치를 확인하기 위해 병피해 정도가 다른 농가를 선택하여 발정리기부터 정식기까지 체계처리하여 확인된 병방제효과 대비 자재구입비의 경제성을 분석하였다.

3. 주요 결과

가. 토마토폏마름병 피해현황

토마토시설재배농가들이 해결책을 마련해주기를 바라는 애로사항은 토양전염병인 풋마름병에 대한 방제대책마련이었다. 병이 발생한 농가는 매년 피해면적이 늘어나 발전체가 고사하여 토마토농사를 포기하거나(그림 1) 양액재배시설로 전환하였다. 국내에 등록된 풋마름병방제제는 훈증소독제 한 품목만이 등록되었으나 처리기간이 30일 이상 소요되고, 높은 지온과 수분공급이 필요하고, 살포 후 밀폐를 위해 비닐 덮기 작업 등 어려움이 있어 농가에서 사용을 기피하고 있다(그림 2). 그 외의 방법들로 열수소독이나, 등록되지 않은 농약관주 등 여러 방법을 사용하고 있으나 방제효과가 거의 없었다. 풋마름병 방제를 위해 대부분 농

가가 저항성대목에 실생을 접한 접목묘를 재배하고 있으나 발병되었던 농가토양은 재배년수가 길어짐에 따라 토양 내 병원균밀도가 증가되어 접목묘에도 병이 심하게 발생하여 병을 방제하기위한 새로운 기술개발이 절실히 요구되고 있다.



그림 1. 토마토폏마름병피해농가



그림 2. 토양훈증소독

뾰마름병원균에 감염된 토마토는 기온이 낮은 축성재배지에서는 생육속도가 느리고 수확후기 기온이 높아짐에 따라 주간에는 신초부위가 시들고 야간에는 회복되는 증세가 반복되어 수량 및 맛이 떨어지고, 기온이 높은 5월~7월초에 정식하여 재배하는 억제작형의 농가에서는 정식 후 15일 이내에 병이 발생하여 전체가 시들어 죽는다. 뾰마름병의 진단은 시들어죽은 토마토 줄기를 잘라 물에 담그면 손상된 목질부에서 우유빛 ooze가 흘러나오는 것으로 판단하였다(그림 3). 병원균은 줄기표면을 1% Sodium hypochloride로 소독한 다음 TZC선택배지에 접종하여 배양하면 집락의 가장자리가 우유색깔을 띄고 중앙부위에 연한붉은색을 띄는 전형적인 병원성 뾰마름병원균으로 확인하였으며, 분리한 균주를 보관하면서 그램염색, Catalase test, 세균동정기(Biolog)를 이용하여 동정한 결과 *Ralstonia solanacearum*으로 동정되었다(그림 4).



그림 3. 토마토폏마름병 진단



그림 4. 폏마름병원균

나. 길항균주 선발

① 유용균주선발

본 연구에서는 토마토폏마름병(*Ralstonia solanacearum*)을 환경친화적인 방법으로 방제할 수 있는 기술을 개발하고자하였다. 폏마름병원균에 대한 길항균은 토양에서 분리한 균주들을 PDA와 NA를 1:1로 섞어 준비한 Plate에 7일간(세균류-28℃, 방선균류-25℃) 배양하고, 형성된 집락에서 배지와 함께 균체를 cork borer로 떼어내어 glass-petri dish로 옮긴 후 Chloroform으로 균체를 사멸시켜 저지원 조사시료로 준비하였다. 무름병과 폏마름병 병원균은 nutrient broth에 접종하여 16시간 진탕배양(30℃, 140rpm)하여 멸균수로 3회 세척하여(10,000rpm, 10min)균체를 수확하여 O.D. 0.4가 되게 0.85% 생리식염수에 현탁하였다. 준비한 병원균현탁액은 고압증기멸균 후 40℃로 식힌 0.3% nutrient agar배지 100ml에 5ml씩 접종하여 균질화한 후 basal agar배지 위에 분주하여 bacterial lawn을 준비하고, 준비된 저지원 조사 시료를 Bacterial lawn 위에 Plate 당 2개씩 정치하여 배양한 후 형성

된 저지원형성(halo)유무로 길항균을 판정하였다. 풋마름병원균 이외의 병원균에 대한 길항작용을 확인하기 위해 곰팡이병원균에 대한 길항균 분리는 분리보존 중인 균주를 PDA-NA(1:1)배지에 그림 5(우)와 같이 접종하여 3일간 배양한 후 *F. oxysporum*을 접종배양하여 저지원을 형성하는 균주를 길항균으로 분류보존하였다(그림 2). 각 균주들에 대한 동정은 그램염색 후 미생물동정시스템(biolog)을 이용하고자 냉동보관(-20℃)하였다.

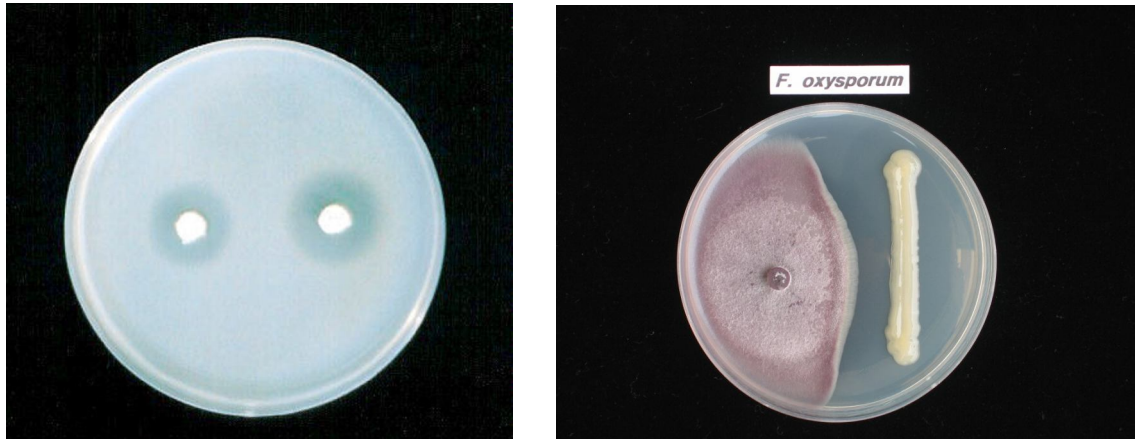


그림 5. 길항균선발시험

② 유용균주 동정 및 길항작용

*Pseudomonas*속 5종은 King's medium B배지에서 형광색소를 생산하는 균주들을, *Bacillus*속 3종은 근권토양을 멸균수에 현탁하여 90℃ autoclave에 30분간 열처리한 후 Nutrient agar 배지에 접종하여 형성된 집락으로부터 endospore를 형성하는 균주들을, *Streptomyces*는 Lokood's chitin agar배지에서 공중균사를 형성하고 cutin분해능이 있는 균주들을 수집하여 미생물동정장치(Bio-log), 미생물분류체계(Bergey's manual of Bacteriology, The prokaryote- second edition), 유전적 유연관계(한국농용미생물보존센터)를 참고로 동정한 균주들이다(표 1).

표 1. 보존균주 길항작용 및 방제대상병

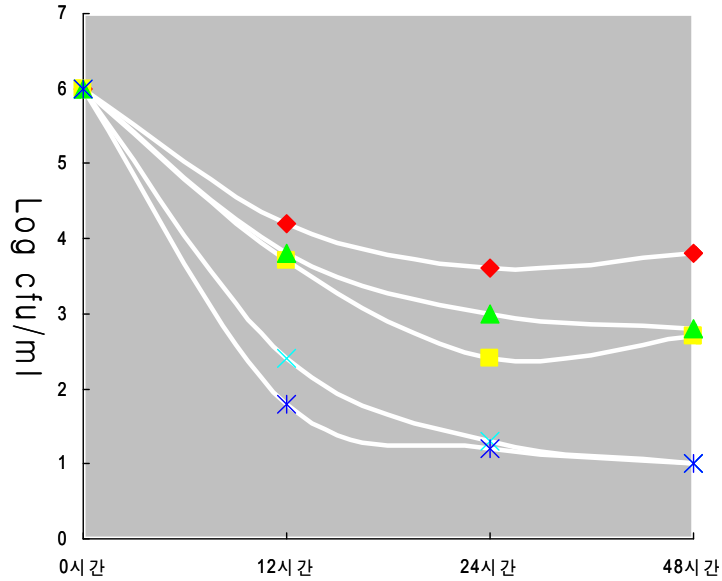
보존균주	길항작용	방제대상병
<i>P. fluorescens</i>	풋마름병, 무름병. 반신위조병	항균물질
<i>P. putida</i>	풋마름병, 무름병. 반신위조병	항균물질
<i>B. subtilis</i>	풋마름병, 무름병. 반신위조병	항균물질
<i>B. polymyxa</i>	풋마름병, 무름병. 반신위조병	항균물질
<i>B. licheniformis</i>	풋마름병, 무름병. 반신위조병	항균물질
<i>Streptomyces</i> A2-1	풋마름병, 무름병. 반신위조병	항균물질
<i>Streptomyces</i> 5	풋마름병, 무름병. 반신위조병	항균물질

각 균주들의 길항작용으로 *P. fluorescens*, *P. putida*, *B. subtilis*, *B. polymyxa*, *B. licheniformis*, *S. griseus* 6균주들은 항균물질생산능이 있어 3종 병원균에 대한 길항력이 확인되었다(표 1). *S. griseus*는 표면이 매끈한 포자를 형성하고 배지조성에 따라 회색 또는 백색을 띄었다(그림 6).



그림 6. *S. griseus* 포자전자현미경관찰

길항균주들이 생산한 항균물질의 항균력을 확인하기 위해 24시간 배양한 풋마름병원균을 멸균수에 10^6 cfu/ml(OD 4.8, 600nm)이 되도록 희석하였다. 각 길항균주들이 생산한 항균물질은 *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*의 n-butanol 조추출물은 methanol로, *P. putida*의 methanol 조추출물은 50% methanol로 유화시키고, *Streptomyces griseus* 증류수 조추출물은 물에 녹여 시료를 준비하였다. 준비된 각 시료는 풋마름병원균을 희석액에 1/1,000(w/v)농도로 넣어 준 다음 30℃에서 진탕배양하면서 풋마름병원균 밀도감소를 각 배양기간별로 시료를 채취한 후 Basal medium(Dextrose 10g, Peptone 10g, Casamino acid 1g, agar 18g, D.W.1ℓ)에 접종배양하여 살아남은 균수를 조사하였다. 길항균주 4종 모두 항균작용으로 토마토폏마름병원균의 생균수가 감소하였으며 특히 *S. griseus*의 조추출물은 oxolinic acid와 비슷한 역할을 보여 생산된 항균물질은 풋마름병원균방제에 그 역할이 큰 것으로 확인되었다(그림 6). 항균력이 있는 *S. griseus*의 조추출물을 C18 column에 통과시켜 추출한 분획 중에는 Oxolinic acid나 Streptomycin을 원제로 제조한 농약보다 낮은 농도에서 항균력을 보였다(표 2).



■-*B. licheniformis*, ▲-*P. putida*, ◆-*B. amyloliquefaciens*, × * -Oxolinic acid

그림 6. 길항균 조추출물의 토마토포트마름병원균 살균효과

표 2. 길항미생물생산 항균력 조사

길항균주	공시시료	MIC	저지원(mm)
<i>Streptomyces</i> A2-1	C18 column	1000ppm	2
<i>Streptomyces</i> A5	C18 column	500ppm	2
Oxolinic acid	일 품	1500ppm	3
Streptomycin	삼공농용신	1500ppm	3

각 길항균주들의 종자처리에 의한 근권정착능을 조사하기위해 *P. putida*와 *P. fluorescens* 는 K.B broth에 24시간 배양한 후 원심분리(8,000rpm, 10min)하여 균체와 배양여액을 분리하였다. 균체는 Phosphate buffer(0.1M, pH 6.8)로 3회 세척한 후 물에 10^6 cfu/ml 농도로 시료를 준비하였다. 배양여액은 0.45 μ m membrane filter에 통과시켜 잔류하는 균체를 제거하여 통과된 배양여액은 10배 희석하여 시료로 준비하였다. *Streptomyces*는 사면배지에 15일 배양하여 포자를 수확하였고, 배양여액은 Nutrient broth에 10일간 배양한 후 균체를 제거하여 준비하였다. 토마토종자처리는 종자를 세척한 후 준비된 각 시료에 12시간 침지한 후 상토를 채운 162구 트레이에 파종하여 발아율을 조사하였다. 무처리구의 종자발아율은 96.3%로 높았다. 길항균처리에 의한 발아율 증진효과는 관찰되지 않았으며 *Streptomyces*처리구의 경우 배양7일 후 발아세는 86.3%로 무처리구에 비해 낮게 관찰되었다(표 3).

표 3. 길항균주 토마토밭아촉진효과조사

길항균주	발아율(%)		발아세(7일)
	균체	배양여액	
<i>Streptomyces</i> A2-1	94.3	92.7	86.3 ^a
<i>Streptomyces</i> A5	95.7	96.3	87.2 ^a
<i>P. putida</i>	95.3	96.7	92.3 ^b
<i>P. fluorescens</i>	97.2	95.3	92.3 ^b
무처리	96.3		94.0 ^b

※ 실내실험

다. 길항균주 근권 및 토양내정착력조사

① 토마토폏마름병 피해농가토양 길항균처리에 의한 병원균밀도 감소효과 및 토양 내 정착능

길항균주들 중 토양내 정착능이 높고, 풋마름병밀도 억제능력 있는 길항균주를 선발하여 퇴비제조시 첨가재료로 사용하기 위해 이에 대한 조사를 실시하였다. 토양시료는 토마토폏마름병으로 고사한 토마토 근권토양으로 채취한 시료토양은 뿌리 잔재물을 제거한 후 풋트에 분배하고 판매용 푸대거름을 80g씩 뿌려 골고루섞어주고 길항균주들을 토양에 10^5 cfu/g.soil 농도로 접종하였다. 시험구는 5일 간격으로 관수하여 관리하면서 표층으로부터 10cm이내의 토양을 채취하여 희석한 후 풋마름병원균 선택배지(TZC)에 접종하여 병원균밀도변화를 조사하였다. 채취한 토양은 5월 중순에 정식하여 6월말에 병이 발생된 것으로 토양 1g당 병원균밀도는 100cfu로 높았으며 26일 후에는 1,000,000cfu로 크게 증가하였다. 길항균 처리구에서는 초기에는 병원균밀도가 증가하였으나 처리 19일 후부터 밀도가 감소하였고 26일 후에 *P. fluorescens*처리구에서는 100cfu이하로 감소하였다(표 4). 처리한 길항균의 토양내 정착능은 시험구의 토양을 희석하여 각 길항균주 선택배지에 접종하여 밀도변화를 조사하였으며 무처리구의 길항균 밀도는 방선균밀도조사용 chitin배지를 사용하였다. *Pseudomonas* 처리구는 처리 12일 후 길항균밀도가 증가하였으나 19일 후에는 감소하였다. 방선균은 처리 5일 후 밀도증가가 관찰되었으며 *Streptomyces* A2-1처리구는 무처리구에 비해 방선균밀도가 높았다(그림 7).

표 4. 길항균처리에 의한 발병지 토양 풋마름병원균 밀도변화

길항균주	길항균접종전	처리 5일후	처리 12일후	처리 19일후	처리 26일후
<i>P. putida</i>	1.75	3.88	2.75	1.13	1.75
<i>P. fluorescens</i>	1.25	2.63	3.50	1.88	0.75
<i>Streptomyces</i> A2-1	1.63	3.75	3.13	3.00	1.25
control	2.00	2.88	2.38	3.63	6.00

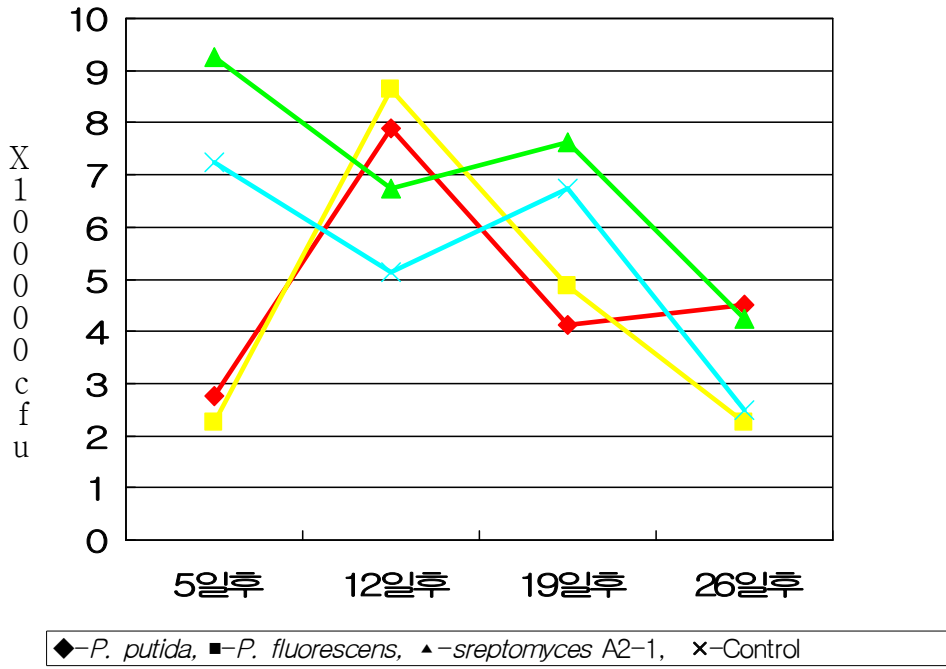


그림 7. 토양 처리 길항균 발병지 토양 내 정착능 조사

다. 풋마름병방제를 위한 기능성퇴비제조 연구추진용 길항균주 제형화

① *S. griseus* 균체생산

토양내 정착력이 뛰어난 *Streptomyces A2-1*는 *S. griseus*로 동정되었으며 기존보고된 균주들과 98%이상 유전적유연관계를 가지고있다. *S. griseus*는 배양기간이 길어 필요시 시료준비에 어려움이 발생하였다. 이를 해결하기 위해 살아있는 *S. griseus*를 단위 무게당 고밀도 상태로 장기간 보관할 수 있는 기술개발을 개발하여 시험재료로 사용할 수 있게 하고자 하였다. 대량배양을 위한 액체배양시 Nutrient broth에서는 균사생장하고 장기배양시에도 포자로 전환되지 않고 수확한 균사체를 동결 건조한 결과 모두 사멸되었다(그림 8).

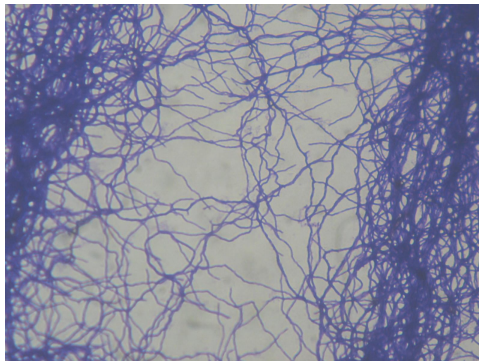


그림 8. *S. griseus*의 Nutrient broth내 균사생장

② 액체배양배지 조성별 균사분체 생산력

많은 연구자들이 사용한 방선균을 분리하거나 포자유도연구에서 제시한 배지조성을 응용하여 *S. griseus* 포자대량배양을 시도하였으며 각 배지조성은 한천을 첨가하지 않은 방선균선택배지(egg albumin agar-EAB, Chitin agar-CB, PHSP), 곰팡이배양배지(Potato Dextrose agar-PD), 세균배양배지(Nutrient agar-NB)를 이용하였다. 액체배양은 broth를 배지로 공시하였으며(표 5), 20ℓ 배양병에 각 액체배지를 18ℓ씩 분주하여 121℃, 1시간 동안 고압증기살균하였다. 균주접종은 시험관 사면고체배지(Potato Dextrose agar)에 접종하여 28℃ 배양기에서 15일 배양하여 형성된 포자를 수확하여 멸균수에 세척한 후 액체배지 1mℓ당 10⁴spores 농도로 접종하였다. 배양온도는 25℃와 28℃에서 폭기, 교반하면서 배양하였다(그림 9).

표 5. 액체배지조성표

액체배지명	배지조성분
EAB	Dextrose 1g, K ₂ HPO ₄ 0.5g, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.2g, Fe(SO ₄) ₃ 0.01g, Egg albumin 0.25g, pH6.8
CB	colloid chitin 2.5g, KH ₂ PO ₄ 0.7g, KH ₂ PO ₄ 0.5g, MgSO ₄ 0.5g, FeSO ₄ 0.01g, ZnSO ₄ 0.001g
PD	200g/1ℓ 증류수 감자끓인액, Dextrose 20g
NB	Peptone 5g, Beef extract 8g
PHSB	PD broth, KH ₂ PO ₄ 0.7g, KH ₂ PO ₄ 0.5g, MgSO ₄ 0.5g, FeSO ₄ 0.01g, ZnSO ₄ 0.001g

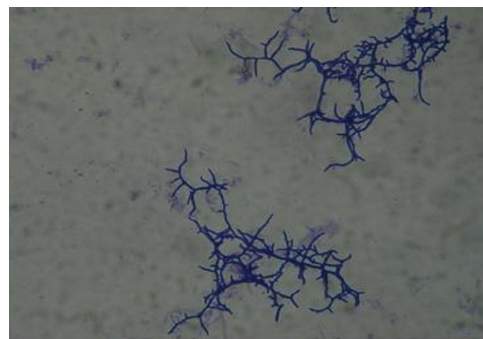


그림 9. *S. griseus* 액체배양

각 액체배지에 배양한 *S. griseus*는 배양초기 균사생장이 왕성하였으나 포자전환은 이루어지지 않았으며 배양기간이 15일 이상 지나면 그림 9와 같이 균사단편이 형성되었다. 균사단편의 생산량은 Chitin broth에서 5일 후에 최대수확량(10⁹cfu/mℓ)에 도달하였으며(그림 10)

배양된 균사단편을 수확하여(5,000rpm, 10min) 세척한 후 skim milk, 감자분쇄물, beef extract + myo-Inositol 현탁액에 넣어 동결건조시키면 균은 생존하여 분말상태로 생산이 가능하였다.

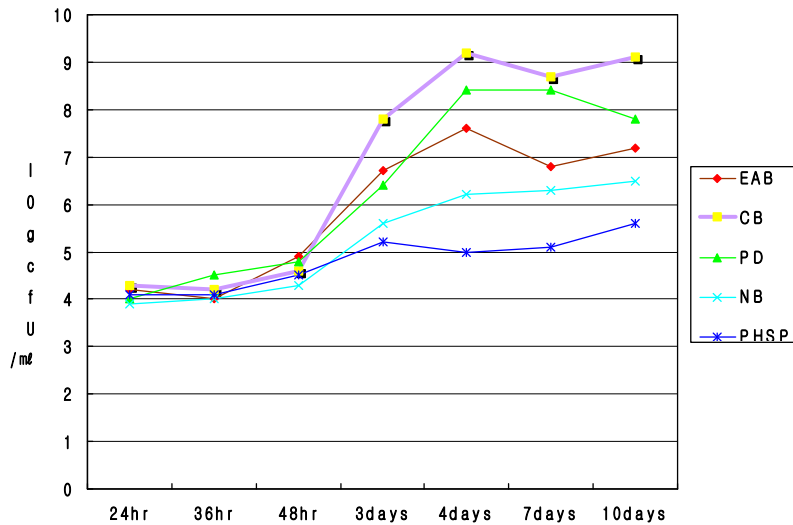


그림 10. 배지조성별 *S. griseus* 성장곡선

③ 고체배양

액체배양시 사용한 5종의 배양배지에 agar 20g을 첨가하여 고압멸균 시킨 후 9cm Petri dish에 분주한 후 10^4 spores/ml 농도로 준비한 *S. griseus* 포자현탁액을 0.1ml씩 접종한 후 bead를 사용하여 도말접종하였다. 고체배지에 배양한 *S. griseus*는 초기 흰색의 균사생장을 하고, 포자형성기에는 콜로니 표면으로부터 회색빛을 띤다. 배지조성에 따라 포자형성시기는 다르게 관찰되었으며 25°C 배양시 PDA배지에 Chitin agar배지의 무기영양원을 첨가한 배지(PHSB)에서 포자형성이 가장(접종 5일 후)빠르게 진행되었으며 10일 후에는 배지 1ml 당 10^6 spores를 수확할 수 있었다(표 6).

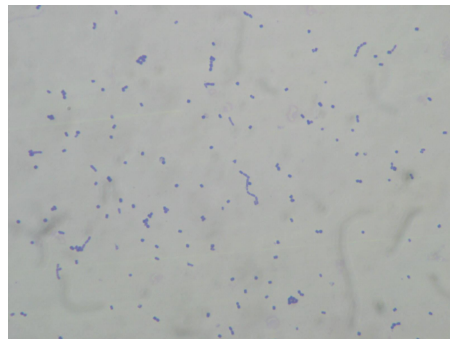


그림 11. *S. griseus* 포자

표 6. *S. griseus* 포자형성소요기간

고체배지	포자형성소요일수(일)	spores/ml
EAB agar	22	2×10^5
CB agar	18	4×10^4
PDA	12	1×10^4
NA	25	3×10^4
PHSBA	10	2×10^6

배양온도 25°C

멸균수에 포자를 현탁한 접종원을 고체배지에 도말접종하여 25°C에서 배양하면 수확된 포자수가 2×10^6 spores/ml였다. 제품개발용 원제로 사용할 때 생산비부담이 커 Plate당 포자수확량을 높일 필요가 있었다. 포자수확량증대를 위해 *S. griseus* 배양온도를 높여 초기 성장속도를 높여주고 배지표면에서의 영양분공급을 증대시키기 위해 접종액에 설탕과 Nutrent broth를 첨가한 용액에 포자를 현탁하여 접종원으로 준비하고 30°C에서 배양하면서 포자수확량을 조사하였다. 설탕과 nutrient broth를 혼합한 접종액에 포자를 현탁하면 증류수처리시보다 포자수확량이 100배 이상 증가하였다(그림 12).

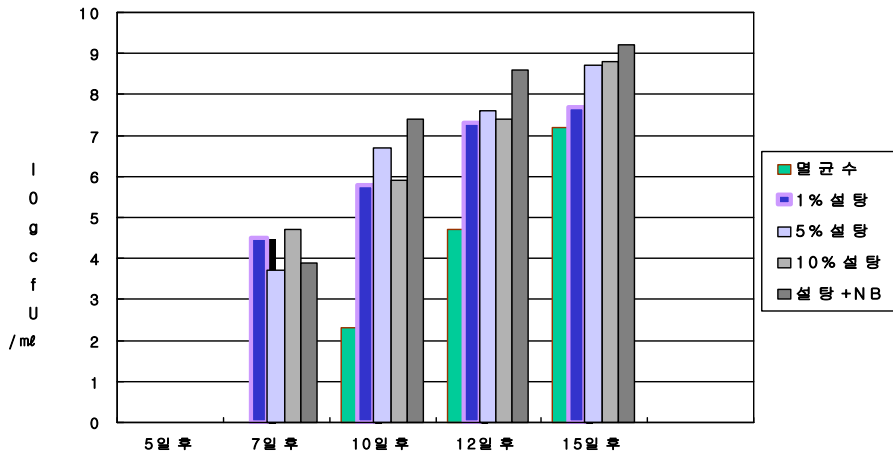


그림 12. 접종원 영양공급에 의한 포자수확량증대효과

④ 원제생산

1% 세제로 수확한 포자현탁액은 500ml 원심분리관에 담아 원심분리(3,000rpm, 10min)하여 상층액은 버리고 가라앉은 포자에 멸균수를 부어 진탕기로 현탁시킨 후 400mesh 체에 통과시켜 배지부스러기, 균사체, 연쇄상 포자체 등을 제거하였다. 체로 걸러 통과된 단리된 포자는 3회 원심분리하여 대사산물이나 세제성분을 완전히 제거하고(100,000배 이상) 최종 수확된 포자는 15ml conical centrifuge tube를 이용하여 물기를 제거하였다. 수확된

포자는 보호제(skim milk 300g, 증류수 100ml)에 현탁시켜 동결건조 하였다. 동결건조는 보호제에 현탁한 포자를 1ℓ 가지달린플라스크에 200ml씩 분주하여 -55℃ deep freezer에 12시간 이상 동결시킨 후 7mmtorr 진공동결건조기에서 건조시켰다. 동결건조 후 수확한 시료는 멸균된 비닐봉지에 넣어 잘게 부순 후 200mesh 체에 통과시켜 최대한 미세한 입자로 마쇄하여 준비한 다음 입제와 입상수화제 생산원제로 사용하였다(그림 13).



그림 13. *S. griseus* 원제

⑤ 퇴비혼화처리용 입제생산

*S. griseus*를 퇴비에 쉽게 첨가할 수 있게하기 위해 펠렛형태로 입제화하였다. 입제 제조 시 사용된 부재료는 방선균생장촉진을 위한 C/N율을 고려한 농산부산물 2종, 초기 정착력을 촉진시켜주는 당류, 방선균의 효소활성을 돕는 키틴질을 결체광물질인 벤토나이트와 6:4(무게비)로 섞어준 다음 *S. griseus* 포자원제를 첨가하고 수분을 공급하여 반죽하였다. 반죽한 재료는 역회전과립제조기(지름 3mm)로 성형한 다음 45℃ 강제환기식 건조기에서 건조하였다. 생산된 제품은 생균밀도 10⁵spores/g가 되도록 조정하였다(그림 14).



그림 14. 퇴양혼화처리용 입제

다. 토마토포름병방제용 기능성퇴비제조 및 농가실증시험

① 농산부산물에 대한 *S. griseus* 정착력조사

길항균주 중 토마토포름병에 대한 방제효과가 좋은 *S. griseus*를 기능성퇴비제조를 위한 접종원으로 사용하기 위해 농산부산물에 대한 정착능을 조사하였다. 각 시료는 물에 적신 후(40%) 버섯병재배용 병에 넣어 고압멸균 후 식힌 다음 *S. griseus* 원제를 접종하고 28℃에서 15일간 배양하였다. 배양 후 배지에 멸균수를 넣고(700ml, 3회)교반한 후 400mesh 채에 통과시켜 포자를 수확하여 배지 무게당 생산된 포자수를 조사하였다. 생산된 포자수는 벧짚>마늘짚>버섯폐배지 순으로 높았으며 침출물에 대한 균체성장 속도는 마늘짚>버섯폐배지>벧짚 순으로 높았다(표 7).

표 7. *Streptomyces* A2-1의 농산부산물 및 각 침출물에 대한 정착능

부 산 물	log cfu/10g 건조물	균체건물주(mg/100ml)
벧 짚	8.7	102.3
버섯 폐 배 지	6.4	243.5
마 늘 짚	7.3	524.7

버섯폐배지에 길항균 *Trichoderma* sp.나 *S. griseus*를 각각 접종하여 퇴비더미를 1.2×1.2×1.4m (가로×세로×높이)로 쌓아 40일간 2회 뒤집기 하여 관리한 후 물로 추출하여 침출액을 건조하여 분말을 만든 다음 희석하여 항균력을 조사한 결과 두 균주 처리구의 퇴비에서 항균력이 확인되었다.

Trichoderma sp.는 많은 연구자들이 곰팡이병원균에 대한 기생작용에 의한 길항작용을 주로 언급하고, 일부 연구자들은 추가적인 작용으로 항균물질생산능력이 있다고 하였다. 본 연구의 결과 세균류에도 항균활성능이 확인되어 이에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다(표 8).

표 8. 길항균주 버섯폐배지 처리에 의한 항균력향상효과

발효전처리	저지원(mm) ^b
무 처 리	-
<i>Trichodrma</i> sp.	2
<i>S. griseus</i>	4

^b건조추출물 희석배수-1,000ppm

② 퇴비제조시 *S. griseus*첨가에 의한 풋마름병방제 기능성향상조사

농가에서 주로 사용하고 작물생장에 좋은 우분의 풋마름병방제를 위한 퇴비의 기능성향상

을 위해 탄소원이 풍부한 농산부산물 4종과 *S. griseus* 입제를 첨가하여 퇴비를 제조하였다. 제조과정이 끝난 퇴비를 물에 침지(1:5,w/w)하여 침출한 후 건조하였다. 건조추출물은 100배 희석하여 항균력을 조사한 결과 첨가된 농산부산물에 따라 양파껍질>벼짚>마늘짚>버섯폐배지 순으로 항균력이 증가되었다(표 10).

표 9. *S. griseus*, 농산부산물 첨가에 의한 우분발효퇴비 풋마름병방제 기능성향상효과

퇴비제조재료	침출물 항균력(mm)
벼짚+우분	3.2
마늘짚+우분	2.3
양파껍질+우분	3.7
버섯폐배지+우분	2.1
우분	1.3

③ 토마토폏마름병 피해농가 기능성퇴비 처리효과

토마토폏마름병으로 피해를 보고 있는 농가들의 토양을 채취하여 병원균밀도를 정밀하게 조사하기 위해 채취한 토양은 5:1로 멸균수에 희석한 후 1,000배로 농축하였다. 농축된 토양희석액은 TZC평판배지 10개에 0.2mℓ씩 접종하여 10개 plate에 형성된 집락수를 1g토양 내 병원균밀도수로 환산하여 밀도를 계산하였다. 병원균의 밀도가 높을 수록 풋마름병 발생율이 높았으며 병이 심한 농가토양의 병원균 밀도는 토양 1g당 10,000cfu로 이고 전체 병발생율은 83%로 높아 농사를 포기하였다(표 10).

표 10. 토마토폏마름병 피해농가 병원균밀도조사

조사농가	병원균밀도(log cfu/g.soil)	발병율(%)
피해농가1	2.4	38
피해농가2	2.1	23
피해농가3	2.2	17
피해농가4	4.3	83

퇴비제조를 위해 구입한 우분과 버섯재배농가에서 구한 버섯폐배지를 5:1(부피비)로 섞어 퇴비제조재료로 준비하였다. 속효성발효는 짧은 기간 내에 퇴비를 발효시키기 위해 수분, 온도, 산소공급관리해주는 제조방법으로, 퇴비재료는 15일 간격으로 3회 뒤집기하여 충분한 예비발효를 시킨 다음 1톤 당 입제 20kg을 골고루 섞은 다음 포크레인으로 뒤집기 작업을 하여 방선균을 고르게 접종하고 비닐로 덮어 보온하면서 후발효를 시켰다(그림 14). 준비된 퇴비의 톤당 주요비료성분은 성분량기준으로 칼슘 12.9kg, 가리 25.4kg, 마그네슘 5.3kg,

질소 19kg, 인산 15.1kg으로 비료성분이 골고루 분포하였다(표 11). 퇴비살포량은 하우스 (7×90m) 1동당 경운기 트레일러 2대 분량(약 1톤)씩 살포한 후 경운 및 골만들기 작업을 하였다. 봄작기 정식은 2007년 2월초에 하였으며 4농가 모두 풋마름병발생은 0%였으며, 여름작기에 병원균밀도가 비교적 낮았던 시험농가 2, 3는 병발생을 되지 않았고, 병원균밀도가 높았던 시험농가 1, 4에서는 병발생율이 14%, 46%로 각각 낮아졌다.% 정식후에는 *S. griseus* 분말수화제를 2회 관주처리 하였다. 그결과 봄작기와 여름작기에 토마토풋마름병 발생율은 0%로 정상수확을 하였다.



[퇴비뒤집기작업]



[풋마름병 방제농가하우스]

그림 14. 입제첨가 기능성퇴비 농가현지적용

표 11. 속성발효퇴비의 비료성분분석

	pH (1:5)	EC (dS/m)	Ca (mg/kg)	K (mg/kg)	Mg (mg/kg)	Na (mg/kg)	T-N % of wt.	P ₂ O ₅ mg/kg
퇴 비	8.7	24.7	12.9	25.4	5.3	6.6	1.9	15153
발토양	6.4	0.4	10.7	0.5	0.4	0.2	0.1	217

40여일 간 발효시켜 준비한 퇴비에 *S. griseus* 입제를 첨가하여 준비한 퇴비를 살포한 결과 4농가 모두 고온기에 병발생율이 낮아지고 농가 2, 3농가는 발병주가 관찰되지 않았다. 풋마름병에 걸린 토마토는 전체가 고사하고, 수확된 토마토도 맛과 저장성이 떨어져 상품가치가 없었다. 퇴비제조에 드는 비용은 퇴비구입비 26,000원/톤, 포크레인 사용료 2,500원/톤×3회=7,500원, *S. griseus*입제구입비 60,000원을 총 93,500원으로 시판용 포대거름 200,000원/톤에 비해 비용이 적게 들었다. 병방제에 의한 소득증대효과를 환산하기 위해 수량과 가격을 조사한 결과 병이 발생하지 않은 토마토는 6단 수확하여 2.5주당 10kg을 수확하였으며 평균 토마토가격은 7,000원/10kg이었다. 이를 기준으로 병방제에 의한 실소득증대효과를 환산한결과 재배면적 0.5ha 당 8,790,000원~14,700,000원이었다.

표 12. 토마토폏마름병 피해농가 체계처리에 의한 소득증대효과

시험농가	발병율(%)		병방제소득증대효과 (원/15,000주)	입제구입비 (원)	실소득 증대효과(원)
	2006년	2007년			
1	38	14	12,600,000	60,000	11,730,000
2	23	0	9,660,000	60,000	8,790,000
3	17	0	7,140,000	60,000	6,300,000
4	83	46	15,540,000	60,000	14,700,000

속효성발효를 통해 준비한 발효퇴비를 이용하여 가식용육묘상토로 사용한 결과 발효퇴비는 EC와 염성분 함량이 높아(표 11) 가식 후 10일부터 고사하기 시작하여 정식기인 15일 후에는 32%가 고사하였다. 고사하지 않은 묘도 뿌리가 삭아 정식묘로 사용할 수 없었다. 발효퇴비를 흙이나 비료성분을 첨가하지 않은 피트모스에 1:1(V/V)부피로 섞어준 상토에서는 생육이 불량하였으나 정식이 가능하였고(그림 15) 정식 후에는 시판상토 가식묘보다 모살이를 하지 않았다.

표 13. 발효퇴비이용 육묘상토 토마토가식묘 묘소질

상토조제(1:1, 부피비)	가식 후 고사율(%)			
	10일	15일	30일	50일
발효퇴비+피트모스	0	0	0	3
발효퇴비+발토양	0	0	6	7
발효퇴비	12	32	47	70
피트모스	0	0	0	0



그림 15. 발효상토 가식묘 뿌리생육

4. 적 요

우리나라에서 가장 중요한 토마토의 병은 *Ralstonia solanacearum*에 의한 풋마름병이다. 이병은 토양병으로 토양과 물에 의해서 전염된다. 뿌리혹선충이 가해하여 생긴 상처나 식물 조직의 열려있는 부위를 뿌리로 침입하고, 식물체내에 침입한 병원균은 도관부에서 증식하여 목질부를 손상시킨다. 토마토폏마름병을 방제하는 유일한 방법은 훈증처리제 이외의 방제약제는 없다. 따라서 생물적 방제만이 이병의 위협으로부터 막아줄 수 있다. 많은 연구자들이 근권미생물들이 시험조건하에서 풋마름병원균에 길항력이 있는 길항균주 등이 있다고 보고하였다. 본 연구에서는 방선균의 포자, 균사를 풋트와 비닐하우스에 처리하여 토마토폏마름병을 방제하였다. 토양에서 생물적 방제효과를 높여주려면 퇴비 살포가 필요하다. 가축분을 발효과정을 거쳐 만든 퇴비는 건강한 발을 만드는데 중요하다. 퇴비는 식물이 자라는데 필요한 필수영양원은 물론 미량영양소를 공급해 줄 뿐만아니라 유기물질원이 된다. 퇴비에 있는 비료성분 중 인산은 70~80%, 칼륨은 80~90%가 살포한 당해년도에 이용된다. 토양내 유기물이 증가하면 토양의 물리성을 향상시켜 토성에 따라 보습력과 배수력을 증가시켜 비료성분의 손실을 막아주고 유용한 토양미생물이 증식 할 수 있게 해주기 때문이다. 많은 연구자들이 토양병을 방제하는데 유리하게 하기 위해 토양미생물상을 바꾸려고 한다. 미생물을 접종하는 것은 병든 토양에 미생물을 접종하는 것을 말하는데 이러한 처리는 가끔 성공한다. 토마토폏마름병원균에 길항력이 있는 균주중 *S. griseus* 를 토마토폏마름병방제용 미생물농약으로 개발하는 원제로 사용하였으며 수확된 포자는 토양처리용 입제와 재배기간 관주하는 입상수화제로 개발하였다.

5. 인용문헌

- 농경과원예. 2002. 고추역병 발생상습지역 은행잎 부숙퇴비시용효과 규명, 봉화군농업기술센터 (이광희)
- 송기원, 박상근, 이동아, 정현재. 1971. 토양수분과 고추의 낙화 및 낙과관계, 원시연보
- 정인명, 강보구, 정해유. 1989. 연작지 토양축적 인산 재활용. 충북연보
- 김경희, 서정식. 1985. 고추연작지 토양개량효과. 강원연보.
- 신철우, 박준규, 윤정희, 1986. 연작재배지의 석회질퇴비의 토양개량 효과. 농업기술연구소.
- 곽병규, 박선도. 1988. 토양개량제 효과, 경북연보.
- 박은호, 노영팔, 정연태. 1986. 고추연작지 제오라이트 처리 효과, 영남작시.
- Anuratha,C.S., Gnaanamanickam, S.S. Biological control of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum* in India with antagonistic bacteria. Plant and soil, 124(1990), 109-116.
- Asprias, R.B/ De La Cruz, A. Potential biological control of bacterial wilt in tomato and potato with *Bacillus polymyxa* Fu6 and *Pseudomonas fluorescens*. In: Bacterial wilt disease in Asia and the South Pacific, (Ed.: Perseley , G.J.). ACIAR proceeding No.13. Canberra, Australia, 1986, 89-92.

- Bagnasco, P., Fuente, D.L., Gualtieri, G., Noya, F., Kloepper, J.W., Leong, J., Tteintze, M., Schroth, M.N. 1980. *Pseudomonas siderophore* : a mechanism explaining disease suppressive soil. *Curr. Microbiol.*, 4, 317–320.
- Bir6, S., I. Bekesi, S. Vitaliis, and G. Szab6. 1980. A substance effecting differentiation in *Streptomyces griseus*. Purification and properties. *Eur. J. Biochem.* 103:359–363.
- Ensign, J. C. 1978. Formation, properties, and germination of actinomycete spores. *Annu. Rev. Microbiol.* 32:185–219.
- Field, J.A. et al. 1985. Effects of anaerobically digested poultry manure on soil phosphorus absorption and extractibility. *J. of Environ. Qual.* 14: 105–107.
- Hardisson, C., and M. B. Manzanal. 1976. Ultrastructural studies of sporulation in *Streptomycetes*. *J. Bacteriol.* 127:1443–1454.
- Hirsch, C. F., and J. C. Ensign. 1976. Nutritionally defined conditions for germination of *Streptomyces viridochromogenes* spores. *J. Bacteriol.* 126:13–23.
- Kroodsma, I.W. 1986. Treatment of livestock manure: Air drying and composting poultry manure. In: *Odour prevention and Control of Organic Sludge and Livestock Farming*, The Netherlands, pp. 166–174.
- Kumar, M. Control of bacterial wilt of potatoes in naturally infested soil by bacterial antagonist. *J. Plant disease and protection*, 104(1997), 362–369.
- Lane, T.H. and Bates, T.E. 1982. Sampling and chemical analysis of manure. In: *The Manure Management Handbook*, Ont. Soil and Crop Imp. Ass., Ont. Min. of Agriculture and Food, Ont. Agricultural College, Canada, pp. B2–1 to B2–2.
- Lazano, J.C/ Sequeira, L. Differentiation of races of *Pseudomonas solanacearum* by leaf infiltration technique. *Phytopathology*, 60(1970), 833– 838.
- Leloir, L. F., and C. E. Cardini. 1957. Characterization of phosphorus compounds by acid ability. *Methods Enzymol.* 3:840–850.
- McVittie, A. 1974. Ultrastructural studies on sporulation in wild-type and white colony mutants of *Streptomyces coelicolor*. *J. Gen. Microbiol.* 81:291–302.
- Muyla, K./ Watanabe, M./ Goto,M./ Takikawa,Y./ Tsuyumu, S. Suppression of bacterial wilt disease of tomato by root dipping with *P. fluorescens* pfg 32. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, 62(1996), 134–140.
- Simon, A./ Ridge, E.H. The use of ampicillin in a simplified selective medium for isolation of fluorescent *pseudomonas*. *J. Appl. Bacteriol.*, 37(1974), 459–460.
- Sorensen, J. The rhizosphere as a habitat for soil microorganisms. In: *Modern microbiology* (Eds.: Elsas, J.D.V./ Trevors, J.T./ Wellington, E.M.H.). New York, 1997, 21–45.
- Stewart, R.B. Some plant disease occurring in Keffa Province, Ethiopia. Ethiopia,

College of Agriculture Alemaya, 1956. Sunaina,V./ Kishore,V./ Shekhowat,G.S./ Wildermuth, H. 1970. Development and organization of the aerial mycelium in Strepto-mycetes coelicolor. J. Gen. Microbiol. 60:43-50.

6. 연구결과 활용

연도 (연차)	활용구분	제 목
2006년도 (2년차)	영농활용	토마토청고병방제를 위한 퇴비 및 저항성대목사용효과

7. 연구원 편성

구 분	소 속	직 급	성 명	수행업무	참여년도
					08
책 임 자	강원도농업기술원	지방농업연구사	김성일	과제 총괄	03~08
공동연구자	강원도농업기술원	농 업 연 구 관	강안석	연구지원	07~08
공동연구자	강원도농업기술원	지방농업연구사	최준근	자료분석	07~08
공동연구자	강원도농업기술원	지방농업연구사	문윤기	문헌수집 및 조사	07~08