

과제구분	기본연구		수행시기	전반기	
연구과제 및 세부과제	연구분야 (Code)	수행 기간	과제책임자 및 세부책임자		
친환경 생물농약 개발	작물보호 IC1901	'09~'11	환경농업연구과	김성일	
1) 친환경인삼재배를 위한 토양병 생물적 방제기술 개발	작물보호 IC1901	'09~'11	환경농업연구과	김성일	
2) 고추역병방제용 기능성 상토개발	작물보호 IC1901	'09~'11	환경농업연구과	김성일	
3) 원예작물 병방제용 미생물제개발	작물보호 IC1901	'10~'11	환경농업연구과	김성일	
색인용어	인삼토양병, 고추역병, 잿빛곰팡이병, 유용미생물, 생물적방제, 기능성퇴비				

## ABSTRACT

The beneficial microorganisms(BM) present in the rhizoplane can reduce pathogenic activity of soil borne pathogen. They can accomplish these tasks by competing with the pathogens for nutrient sources, producing antibiotic metabolites that inhibit the growth of the pathogens, microparasitic cell wall destruction by lytic enzyme producing and physically eliminating the pathogens from the plant by occupying the space and sites first. The biological control applies to the use of microbial antagonists to suppress diseases and the organism that suppresses the pest or pathogen is referred to as the Biological Control Agent (BCA). The undesirable problems caused by the widespread use of chemicals in agriculture has been a subject of public concern and scrutiny due to the potential harmful effects on the environment. As an promising non-chemical alternative methods to control plant diseases, the biological control of plant diseases with BCA has been considered a viable alternative method to resolve the problems caused by the chemical fungicide use. The EM not always naturally present in plant environment can be introduced in an attempt to control diseases. This can be done by application of organic materials that contain natural microbial populations such as composts or natural microbial populations added to them including natural organic fertilizers with microbial supplements. Fungal plant pathogens are very diverse and cause diseases on different parts of plants such as root, stem, leaf, fruit, etc. The purpose of this study was to applicate of biological control strategies for controlling fungal diseases on root and atmosphoric parts of plants.

## I . Biocontrol technique development against soil-borne disease of ginseng for environment affinitive ginseng cultivation.

The economically important pathogens isolated from ginseng root and crown areas are as follows; *Fusarium solani* and *Cylindrocarpon* isolated from root-rot, *Cylindrocarpon* root rot, caused by *Cylindrocarpon destructans* (Zins) Scholten, and rusty root, a disorder of unknown cause, are two factors that limit ginseng cultivation. Epidemiological and other information on these problems is lacking and no control measures are available. The isolates of *C. destructans* were recovered from diseased roots and grew well at 20°C. Mycelial growth in broth culture, conidial germ tube length, secondary branching of germ tubes, spore production and PPO production by *C. destructans* was found to be enhanced by Fe. *Phytophthora* ; The first symptom of *Phytophthora* root rot is a wilting plant. Affected root surfaces have a brown discoloration and the interior vascular ring of the root will be darkened. The rest of the root interior, which should be creamy white, will appear beige. In later stages, the root will feel soft and rubbery, have a foul, rotten odor, and will eventually disintegrate. *Rhizoctonia spp.* causes damping-off of seedlings and isolated in warm to hot temperatures and moderate moisture levels. The fungi is found in all ginseng growing soils. Infected plants often have slightly sunken lesions on the stem at or below the soil line. Transfer of the fungi to the germination room or greenhouse is easily accomplished by using outdoor gardening tools inside or vice versa. *Pythium spp.* causes damping-off of seedlings and foot rot of cuttings. It is isolated in cool, wet, poorly-drained soil. Infection results in wet odorless rots. When severe, the lower portion of the stem can become slimy and black. Usually, the soft to slimy rotted outer portion of the root can be easily separated from the inner core. *Sclerotinia spp.* is most important soil borne disease in 6 year old ginseng growing field. The most characteristic symptoms are sudden wilting of leaves, a root rot and a basal stem canker. Generally, wilting is first observed in ginseng growing area in late spring, but infected plants can be observed in the seedling stage. At first, wilted plants are scattered in the field, but later they are commonly found in series within rows. This disease usually appears in patches within the field. Because plants can wilt within several weeks from the time of infection, the onset of symptoms in the field appears rapid.

*Streptomyces0104* was gram positive, spore-forming bacteria found in soil. They are characterized by their tough, leathery, frequently pigmented colonies and their filamentous growth. *Streptomyces0104* is chemoheteroorganotrophs, growing best at 25°C and pH 8-9. It uses complex organic materials as carbon and energy sources and are involved in the breakdown of these products in the soil. This degradative ability makes these bacteria pivotal in the production of fertile soil for agriculture. It also gives soil its

characteristic smell by the production of a class of volatile low molecular weight compounds called geosmins. The 16S rRNA gene sequences of *S. griseus*0104 was determined by direct sequencing and a 16S rRNA gene phylogenetic tree of these strains, related streptomycetes and representative strains of the genus streptomycetes was constructed. The gene sequence for *Streptomyces*0104 matches the database entries for *Streptomyces griseus*ATCC25497<sup>T</sup>.

*Streptomyces*0104 did not sporulate on PDA, NA, LB, CM, Bennett's medium, YM and submerged culture. *Streptomyces*0104 grew well on the PDMN medium (PD broth 1 L, MgSO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O Agar 20g, D.W. 1 L) prepared in our lab after inoculum (NB 8g, cellulose 5g, sugar 20g, D.W 1 L) smeared on that. The hydrophobic spores floated on water surface and could not harvest and we use 0.1% surfactant. The spores harvested after washing in distilled water freeze dried.

The microorganismic fungicide made by mixing *Streptomyces*0104 spore and its metabolite effectively inhibited mycelial growth of *sclerotinia* in vitro. In field test, it effectively prevented *sclerotinia* root rot spread after irrigation by 5 L on 90×180cm.

## II . Beneficial potting soil manufacturing process to prevent phytophthora late blight of pepper

Phytophthora blight, caused by *Phytophthora capsici*, seriously developed in heavy rainfall season. On pepper, infection of the stem near the soil line is common. Stem lesions start as dark, water-soaked areas which become brown to black and result in girdling, wilting and plant death. *P. capsici* may also cause root rot and foliar blight on pepper. On leaves, small, water soaked lesions expand and turn a light tan colour. White moldy growth may be seen on leaves during wet periods. Rapid blighting of leaves and shoots may occur. Pepper fruit can also be infected through the fruit stalk. Fruit rot appears as dark green, water-soaked areas that become covered with a white to gray mold. Infected fruit dries, becomes shrunken and wrinkled, and remains attached to the stem. As the *P. capsici* is a soilborne pathogen, management is difficult. The overwintered oospores in soil or in plant debris can infect any time. Oospores are resistant to desiccation and cold temperatures, and can survive in the soil for many years. In the spring, oospores germinate to produce sporangia and zoospores and sporangia germinate to directly infect host tissue.

To prevent *P. capsici* invasion in pepper growing field, we studied on antagonistic microorganism added potting soil manufacturing method. The compost prepared by cow dung and rice straw mixing have a more sufficient nutrient source than commercial potting soil. The EC value of compost was 24.7 and seed germination rate was very

low. To overcome this problem, the compost mixed with peat moss as same volum. The composted organic matter added potting soil have a sufficient moisture capturing capacity and seed germination rate and root growth increased. The organic potting soil(OPS) made by mixing the composted potting soil and mass cultured antagonistic microorganisms, *Trichoderma hamatum*0577, *Pseudomonas putida*, *Bacillus subtilis*. The pepper grew in OPS had prevented from Phytophthora blight efficiently. The disease incidence of the plot which planted with seedling grown in commercial potting soil was 93.5%, and that of the plot which planted with seedling grown in OPS decreased to 26.5%. The pepper grew in OPS had efficiently protected from phytophthora blight and the protection rate of OPS using was about 50.9%, in field test.

### Ⅲ. Microorganismic fungicide production to control ginseng and horticultural crop disease

To develop biocontrol method against fungal diseases which harmful to atmospheric plant part on ginseng and vinyl house horticultural plants. The antagonistic microorganisms, *Bacillus poymixa*, *Pseudomonas synxanxa*, *Streptomyces griseus* were selected to control *Botrytis cinerea*, *Phytophthora capsici*, *Fulvia fulva*. The extract from 3 antagonist's cellwall with 30% liquor or vinegar had antifungal activity in vitro.

The endospore forming *B. subtilis* cultured by submerged fermentation, the *B. subtilis* growing medium was mixture of PD broth and nutrient broth. In 200 L fermenter, the culture time was 21hr and the cell harvest weight was 11g per 1 L.

*Streptomyces griseus* cultured in 200 L fermenter. limitations to *S. griseus* growth are pH, nutrient source, the amount of oxygen supply and impellor speed. The concentration of dissolved oxygen and oxygen transfer rates are controlled by aeration and impellor rpm. and the dissolved oxygen content of the media in the *bioreactor* was measured with an oxygen probe. Impellor velocity, ranging from 300-1000 rpm, allowed us to determine the optimal speed at which the greatest oxygen transfer rate was achieved in the *bioreactor* solution with minimal *bacterial* shearing. The standard curves for determining cell concentration were generated by measuring the optical density and the cell growth optimized by dextrin supply and the total weight harvested from 150 L culture was 11 kg. The extract from *P. synxanxa* cellwall with 30% liquore had effective antifungal activity against tomato leaf mold.

#### 1. 연구목표

토양에 서식하는 미생물자원을 이용한 식물병방제는 농산물소비자들의 안전농산물 요구에 부응할 수 있는 환경친화적인 농사법개발의 기초가 되어, 국내외적으로 연구가 활발히 진행되고 있

으며 미국 등 선진농업국에서는 다양한 제품이 개발되어 사용되고 있다. 친환경 작물보호제로 사용이 가능한 미생물농약은 화학농약에 비하여 개발비용이 저렴하고, 제품생산과정에서 환경오염의 위험이 적어 화학농약개발 기반이 갖춰지지 않은 우리나라 농약산업개발에 중요한 연구분야이다. 본 연구는 농가소득 주요작물인 인삼, 고추, 시설재배작물에 발생하는 주요 식물병원균을 효과적으로 방제하기 위해 대상병원균에 대해 길항능력이 있는 균주를 수집하여 제형화는 기술을 개발함으로써 우리나라 생물농약개발산업에 기여하고자한다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 친환경인삼재배를 위한 토양병 생물적방제기술 개발

#### (1) 인삼근부병원균 분리

인삼재배농가에서 채취한 이병주의 줄기, 뿌리에서 분리한 병원균을 보존하면서 형태 및 배양배지상에서의 생육상황을 관찰하여 분리

#### (2) 길항균 분리·동정

기내실험에서 인삼근부병원균의 균사생장 억제력있는 균주를 선발하여 형태적 특성과 유전적 유연관계를 분석하여 동정

#### (3) 길항균 대량배양 및 제형화

보존 중인 길항균주 중 활용성이 있는 균주를 미생물농약으로 개발하기 위한 공장규모 생산기술개발을 개발하고 농가보급을 위한 제형기술개발

#### (4) 인삼토양병 방제연구

생산된 미생물제품을 병피해가 발생한 종가에서 방제효과조사

### 나. 고추역병방제용 기능성 상토개발

- (1) 고추 역병은 토양전염 병원균인 *Phytophthora capsici*에 의해 장마철 고온기에 병을 일으켜 화학농약으로 방제가 어려워 이를 방제하기 위한 생물적방제기술개발
- (2) 길항미생물을 이용한 효과적인 토양병방제를 위해 고추근권에 길항균이 정착할 수 있도록 도와주는 고추육묘용 상토를 개발
- (3) 고추 역병균을 효과적으로 방제하는 길항균을 퇴비를 발효시켜 개발한 상토에 접종하기 위해 분말상태로 생산
- (4) 농가현지 실험 전 단계로 인공적으로 병을 일으킨 상태에서 방제효과 조사
- (5) 고추역병피해가 심한 농가현지에서 병방제효과시험

### 다. 원예작물 병방제용 미생물제개발

- (1) 인삼과 시설재배채소의 지상부에 피해를 주는 잣빛곰팡이병, 역병, 잎곰팡이병을 방제하기 위해 길항력이 있는 토착미생물자원 확보

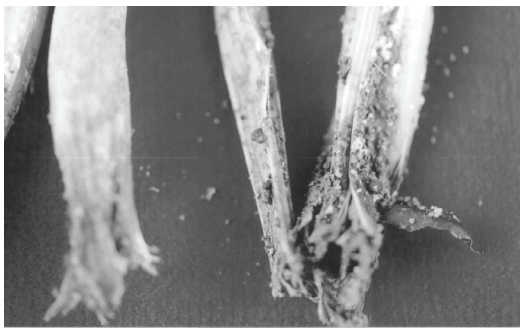
- (2) 길항균의 세포벽에 흡착한 항균물질을 대량으로 수확하기 위해 발효기법을 이용한 공장형 균체배양기술개발
- (3) 생산된 항균물질의 피해현장 방제효과조사

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 친환경인삼재배를 위한 토양병 생물적방제기술 개발

##### 시험 1. 인삼뿌리썩음병원균 분리

- 인삼재배지에서 뿌리에 손상을 주는 병원균으로 유주자낭을 형성하는 균으로 *Phytophthora sp.*, *Pythium sp.*와 포자를 형성하지 않고 균사체덩어리를 형성하는 *Rhizoctonia sp.*는 어린묘 재배지에서 분리되고, *Fusarium sp.*와 *Cylindrocarpon sp.*는 지하부 뿌리썩음 병반에서 분리되었다. 농가에서 고년근재배시 피해를 주는 죽병이라고 불리는 토양병원균 *Sclerotinia sclerotiorum*은 주로 중삼과중 후 3년부터 발생하기 시작하고, 발병된 인삼은 줄기가 조기에 시들어죽고, 뇌두와 동체를 썩게하고(그림 1, 2) 전염속도가 빨라 홍삼 가공용 인삼재배를 위해 해결해야 할 중요한 병원균이었다.



(A)

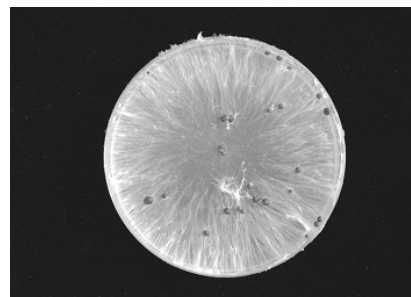


(B)

그림 1. *S. sclerotiorum*에 의한 인삼썩음병 (A) 지체부에 형성된 균핵 (B) 동체 표면에 형성된 균체 덩어리



(A)



(B)

그림 2. (A) 균핵채취 (B) 순수분리한 균핵의 PDA평판배지 상 생육

### 시험 2. 인삼균핵병 방제용 길항균 분리·동정

인삼에 피해를 주는 곰팡이병원균의 생장을 억제하는 길항력이 있는 방선균 *Streptomyces* 0104의 동정을 위해 방선균의 16S DNA 염기서열을 분석을 위한 DNA를 추출하고, 16S DNA PCR증폭을 실시하였다. 증폭된 PCR 산물을 정제하여 염기서열을 분석한 염기서열 (1,393bp)은 DDBJ/NCBI/Genebank와 Ribosomal Database Project II의 database에서 상동성 검색을 수행한 결과, *Streptomyces* 속의 종을 포함하는 계통학적 그룹에 속하는 균주로서 *Streptomyces griseus* ATCC 25497<sup>T</sup>(D63872)와 97%의 유연관계를 나타내어 *Streptomyces griseus*로 확인되었다(그림 3).

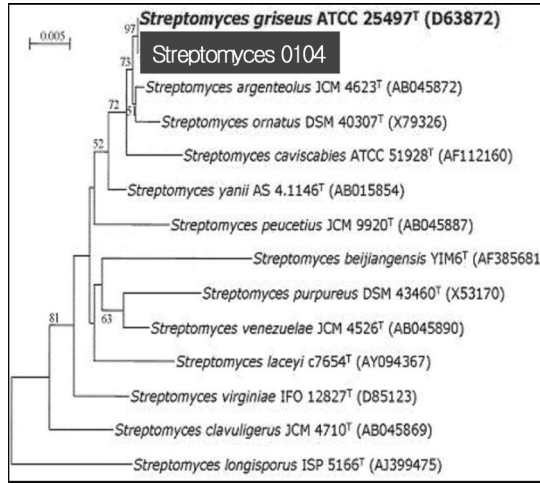


그림 3. 16S rRNA 유전자분석에 의한 *Streptomyces*0104의 유연관계분석

### 시험 3. 원재생산을 위한 포자생산용 배지조성

*Streptomyces* 0104는 포자를 생산하는 방선균(그림 4)이나 액체배양에서 포자전환이 전혀 되지 않았다(표 1). 제품생산을 위해 필요한 포자를 대량배양하기 보존균주에서 수확하여 세척한 포자를 NCS배지 (NB 8g, cellulose 5g, sugar 20g, D.W 1 L)에 현탁하여 접종원으로 하고, 감자배지에 인산과 미량영양원을 첨가한 PDMN(PD broth 1 L, MgSO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O Agar 20g, D.W. 1 L)배지에 접종원을 0.1ml 씩 도말접종한 후 30℃ 배양기에서 10일간 배양한 후 포자를 수확하였다.



그림 4. Chitin agar배지에 배양한 *Streptomyces*0104의 형태관찰

표 1. *Streptomyces*0104의 액체배지 내 포자형성유무 조사

Medium*	Culture time (hr)	Optical density (A600)	pH	Glucose (g/L)	sporulation
LB	48	-	-	-	ND
	72	-	-	-	
	192	1.5	8.4	-	
CM	48	-	-	-	ND
	72	-	-	6.89	
	192	-	-	6.9	
Bennett's	48	7.0	6.38	8.1	ND
	72	8.0	6.39	6.02	
	192	7.5	6.9	0	
YM	48	11.0	7.3	2.54	ND
	72	12	7.4	0	
	192	11	7.89	0	
MBY	48	8.9	6.28	0.01	ND
	72	9.0	7.14	0	
	192	8	8.29	0	

\*Composition of each medium(Bennett's-1% glucose, 0.1% Yeast extract, 0.2% Bacto peptone, 0.1% Beef extract, MBY-1% glucose, 0.2% Meat extract, 0.4% Bacto peptone, 0.2% MgSO<sub>4</sub>, 0.5% NaCl, 0.2% Yeast extract, YM-1% glucose, 0.3% Yeast extract, 0.5% Bacto peptone, 0.3% Malt extract, 0.02% CaCl<sub>2</sub>, CM-1% glucose, 1.2% Malt extract, 0.06% Bacto peptone, LB-1% tryptone peptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl)

#### 시험 4. *Streptomyces*0104의 제형화

고체배지에서 수확한 포자는 10% 탈지분유에 동결건조하고, *Streptomyces*0104가 생산한 항균물질은 30% 주정으로 추출한 후 감압농축하여 건조하였다. 준비된 포자와 항균물질을 증량제와 혼합하여 입상수화제로 생산하였으며, 생산된 제품은 2,000배 희석액에서 균핵병원균의 성장을 억제하였다(그림 5)

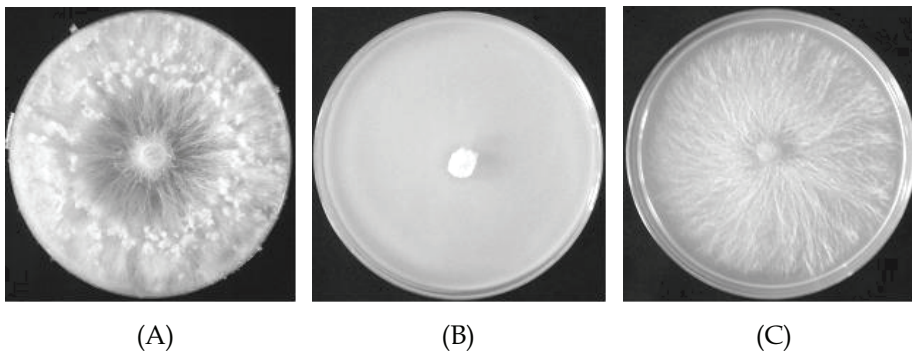


그림 5. *Streptomyces*0104의 균핵병원균에 대한 균사생장억제능 (A) 무처리-정상생육 (B) *Streptomyces*0104 2,000배 희석 (C) Polyoxin 2,000배 희석

### 시험 5. 인삼균핵병 방제효과

인삼균핵병방제를 위해 g당  $10^9$  spores 밀도로 제조한 입상수화제(그림 6)를 1,000배로 희석하여 칸(90×180cm)당 5 L씩 년2회(봄 싹트기 전과 가을 낙엽진 후) 관주처리한 결과 균핵병(그림 7)의 확산을 효과적으로 방제하여 정상적인 수확(그림 8)을 하였다.



그림 6. 인삼균핵병방제용 입상수화제

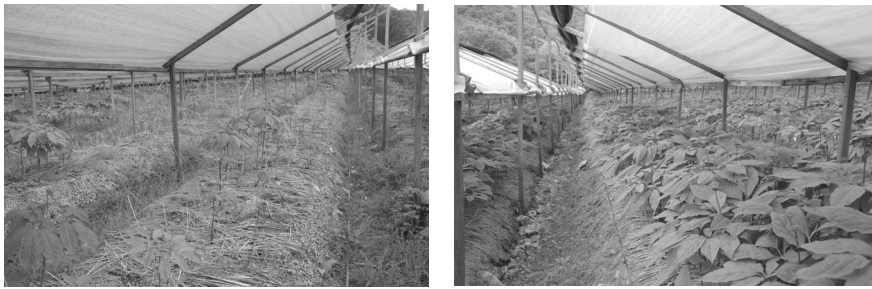


그림 7. 인삼균핵병 피해(좌), 입상수화제 처리에 의한 정상생육(우)



그림 8. 인삼균핵병 방제용 입상수화제 처리농가 수확전경

### 나. 고추역병방제용 기능성 상토개발

#### 시험 1. 발효퇴비를 이용한 고추육묘용 상토제조

우분과 볏짚을 혼합한 후 수분을 포습시킨 후 15일 간격 5회 뒤집기를 실시하여 발효시킨 퇴비는 내부온도가 45℃로 안정화되었고, 볏짚도 분해되어 쉽게 부숴져 상토로 사용할 수

있었다. 발효퇴비는 비료성분이 풍부하였으나 파종시 발아가 되지 않고, 가식한 어린묘의 생육이 매우 불량하였다. 이를 해결하기 위해 발토양이나 피트모스와 1:1 섞어 만든 상토는 육묘용 시판상토와 비교하여 NPK함량이 높으나(표 1)고추 종자발아율과 어린묘 생육이 양호하였다(그림 1). 정식묘 육묘를 위해 50구 연결포트에 가식한 후 상토종류별 관수주기를 조사한 결과 퇴비상토에 피트모스를 같은 부피로 섞어 준비한 상토가 보습율이 높고 뿌리자람이 양호하였다(표 2).

표 1. 발효퇴비를 이용한 고추육묘용 상토의 비료성분 분석

육묘상토	pH (1:5)	EC (dS/m)	Ca (mg/kg)	K (mg/kg)	Mg (mg/kg)	Na (mg/kg)	T-N % of wt.	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg/kg)
발효퇴비	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
발효퇴비+발토양 (1:1)	8.0	6.2	10.7	7.6	3.7	2.0	0.6	4772
피트모스+발효퇴비 (1:1)	7.6	18.0	13.3	16.0	6.2	7.3	1.2	9271
시판상토	4.9	7.7	10.2	3.2	4.9	6.6	0.2	513

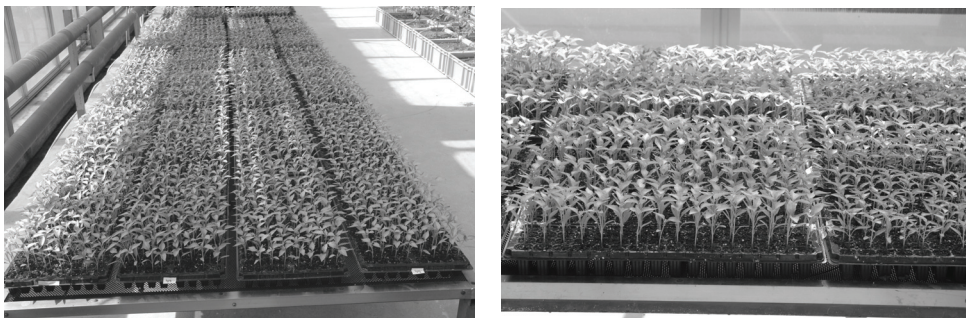


그림 1. 발효퇴비를 이용한 육묘상토 고추어린묘 생육조사(128구 가식용)

표 2. 본발 정식용 고추육묘상토 보습력조사\*

고추육묘상토	관수주기(일)
시판상토	5
발효퇴비	2
발효퇴비+Peat moss(1:1,v/v)	6
발효퇴비+벤토나이트(3:1,v/v)	3
발효퇴비+규조토(3:1,v/v)	3

\*파종 30일 후 50구 정식용고추묘 육묘기간 중 관수주기(일)

## 시험 2. 상토첨가용 미생물제제 생산

고추역병균에 대해 기생력이 확인된 2종의 *Trichoderma*(그림 2) 중 *T. hamatum* 0577의 포자 수율이 높아 제제생산에 용이하였으며, 복합균으로 사용하고자 하는 *Pseudomonas putida*와 *Bacillus subtilis*에 대한 길항작용에 의한 저해 정도가 약하였다.

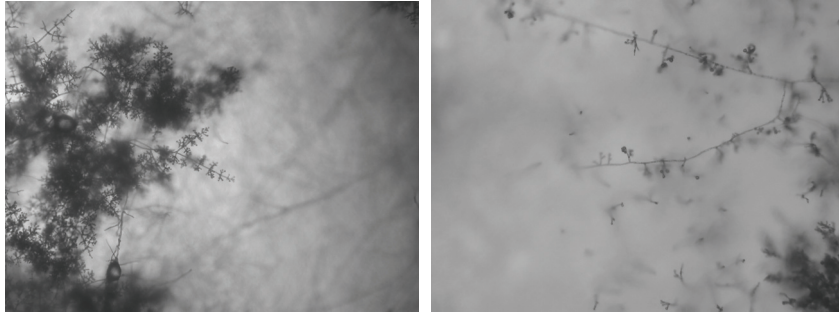


그림 2. 고추역병균 균사에 기생작용을 하는 *Trichoderma*(좌-*T. hamatum*0577, 우-*T. viride*)

육묘상토로 사용하기 위해 발효시킨 퇴비에 첨가할 길항균을 제형화하기 위해 *T. hamatum*0577은 PDA 평판배지에 접종한 후 25°C 광조건 하에서 페트리디쉬 내부에 수분이 생기지 않도록 관리하면서 15일 배양하고, 형성된 포자는 멸균한 0.1% 세제로 수확하였으며, 4겹의 가아지에 통과시켜 균사를 제거한 다음 원심분리하여 수확하였다. 수확한 포자는 10% 탈지분유에 현탁한 후 동결건조하였다. *Pseudomonas putida*는 King's B medium(proteose peptone 20g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 6g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.5g, glycerol 15ml, D.W 1 l)에 배양하고 *Bacillus subtilis*는 NY medium(Beef extract 3g, peptone 5g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5g, D.W. 1 l, 50ml 10% glucose, 1ml 1M MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, pH 7.2)에 배양한 후 3회 원심분리세척(8,000rpm)하고 동결건조하였다. 미생물제형물은 세포농도는 10<sup>9</sup>cfu/g로 조정하였다(표 3). 고추역병을 방제하기 위한 기능성상토는 발효퇴비와 피트모스를 1:1(v/v)로 섞어 준비한 고추 육묘상토 1kg당 미생물제형물을 1g비율로 첨가하여 골고루 혼합하여 준비하였다.

표 3. 퇴비첨가용 길항균주 제형물 생산

길항균주	배양방법	배양배지	동결건조보조제	cfu/g
<i>T. hamatum</i> 0577	고체배양	PDA	탈지분유	10 <sup>9</sup>
<i>P. putida</i>	액체배양	KB	NB+myo-inositol	10 <sup>9</sup>
<i>B. subtilis</i>	액체배양	NY	NB+myo-inositol	10 <sup>9</sup>

## 시험 3. 기능성상토의 고추역병방제효과시험

접종원 : 포트내에서 고추역병발생과 기능성퇴비상토의 병방제효과 실험을 위해 보존 중인 고추역병균은 PDA 배지에 28°C에서 배양한 후 V-8juice 액체에 배양하여 균사체를 수확하였다. 토양에 접종할 고추역병균 접종원은 수확이 끝난 후 고추대를 5cm 길이로 잘라 PD broth

에 담근 상태로 1시간 동안 고압증기살균하고 준비한 고추역병균 균체를 접종하여 그림 3과 같이 유주자가 생길 때까지(약 15일)배양하였다.

팟트시험 : 장마철 노지에서 왜그너 팟트에 고추재배지 토양을 담은 다음 시판상토와 기능성상토에서 육묘한 묘를 팟트당 병원균접종원 1개와 묘 1주를 동시에 심고 병방생정도를 시험한 결과 발병율은 시판상토에서 93.5%이고, 기능성발효퇴비상토에서는 26.5%로 방제효과가 71%였다(표 4). 병원균을 접종한 후 노지토양에 정식하였을 때 발병율은 시판상토 49.6%, 기능성상토 12.1%로 방제효과가 있음이 확인되었다(표 5).

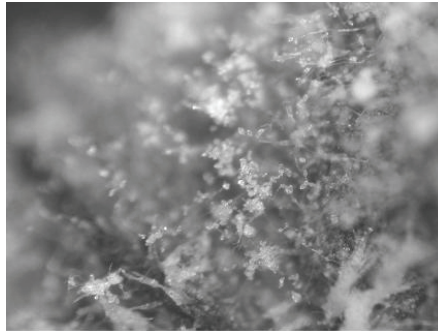


그림 3. 고추역병균 접종원

표 4. 고추역병균 인공접종 후 기능성상토 역병방제효과(팟트시험)

상 토	20주당 발병주			평균(발병율%)
	1반복	2반복	3반복	
시판상토	16	20	20	18.7(93.5)
기능성상토	3	7	6	5.3(26.5)
방 제 가	-	-	-	71.6%



그림 4. 고추역병균 인공접종 후 기능성상토 역병방제효과 포장실험(좌-시판상토 육묘정식구, 우-기능성상토 육묘정식구)

표 5. 고추역병균 인공접종 후 기능성상토 역병방제효과(포장실험)

상 토	시험구당 발병율(%)			평 균
	1반복	2반복	3반복	
시판상토	48.6	67.5	32.7	49.6
기능성상토	12.3	7.4	16.7	12.1
방 제 가	-	-	-	75.6

포장시험 : 2010년 홍고추 생육기인 8월에 잦은 강우와 일조부족으로 고추역병피해가 컸다. 발병된 고추는 지재부에서 부터 병반이 진행되고 방제를 하지않은 고추는 줄기 잎 열매에 병이 진전되어 수확이 불가능하였다(그림 5). 시판상토로 육묘한 고추묘를 정식한 처리구의 발병율은 88.3%, 기능성상토 처리구는 43.3%로 50.9%의 방제효과가 있었다(표 6).

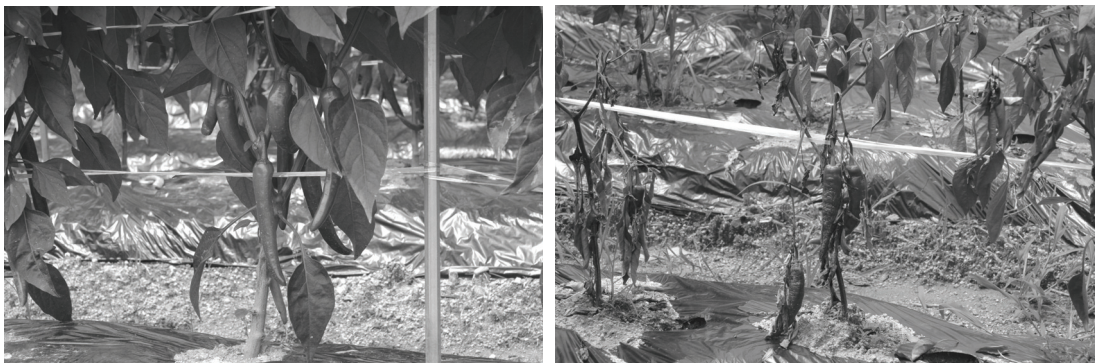


그림 5. 고추역병 발생상황(좌-건강주, 우-발병주)

표 6. 고추역병 발생 농가 기능성상토육묘에 의한 고추역병방제효과

상 토	20주당 발병주			평균(발병율%)
	1반복	2반복	3반복	
시판상토	16	20	17	17.6(88.3)
기능성상토	6	12	8	8.6(43.3)
방제가				50.9%

#### 다. 원예작물 병방제용 미생물제개발

##### 시험 1. 길항균주 배양여액의 항균활성검정

시설원예작물과 인삼의 지상부에 피해를 입히는 주요 곰팡이병원균에 대한 생물적방법개발을 위해 잿빛곰팡이병(*Botrytis cinerea*), 역병(*Phytophthora capsici*), 토마토잎곰팡이병(*Fulvia fulva*)에 대해 생장억제 길항력이 있는 *Bacillus poymixa*, *Pseudomonas synxanxa*, *Streptomyces griseus*를 액체배양하여 균체를 수확 한 후 30% 주정과 현미식초로 항균물질을 추출하여 공시병원균에 대한 항균력을 조사하였다. 첨가한 처리구 별로 항균력을 기내에서 조사한 결과 역병은 *B. polymixa*, 잿빛곰팡이병

은 *Streptomyces* sp., 잎곰팡이병은 *P. synxantha* 소주추출물과 *B. polymixa* 현미식초 추출물에 의해 효과적으로 방제되었다(표 1).

표 1. 길항균 대사산물 항균력조사

길항균주	병원균	저지원(mm)		
		균체	30도 소주	현미식초
<i>Pseudomonas. synxantha</i>	갯빛곰팡이	++	++++	+
	역 병	+	++	++
	잎곰팡이병	+++	++++	+
<i>B. polymixa</i>	갯빛곰팡이	+++	+++	+++
	역 병	++++	++++	+++
	잎곰팡이병	+++	+++	++++
<i>Streptomyces</i> sp.	갯빛곰팡이	++	++	++++
	역 병	+++	+++	++
	잎곰팡이병	+++	++++	++

※ 지지거리 : + - 2mm, ++ - 4mm,, +++ - 6mm, ,++++ - 8mm,이상

### 시험 2. 길항균 *Bacillus subtilis*의 균체대량배양을 위한 액체배양 최적화

*B. subtilis*균주는 일반적으로 내생포자를 형성하는 그람양성세균의 배양적 특성을 나타냈다. 발효조건은 pH는 6.5로 조절하였고 배양온도는 30°C, 공기공급은 1vvm, 교반속도는 100-1200rpm까지 올려주고, DO 20% 이상 유지하면서 5L jar fermenter에서 배양하였다. 접종용 종균 배양은 30°C, 140rpm의 조건인 항온진탕기에서 12시간 배양하여 본 양의 10%(v/v)으로 접종하였다. 배양기간 중 세포 수 증가는 OD(optical density)와 탄소원의 섭취량을 측정하여 판단하였다. 발효시간에 따른 특성을 볼수 있는 pH, 온도, DO, rpm등의 요소들을 실시간으로 확인하였으며, 발효기에서 배양과정 중 시간별로 시료를 채취하여 400배 광학현미경으로 관찰한 결과 배양 31일 후 내생포자가 형성되었고(그림 1), 생장곡선은 배양 24시간 후에 최대치를 나타내고 탄소영양원으로 공급된 glucose는 배양 10시간 후 고갈되었다(그림 2).

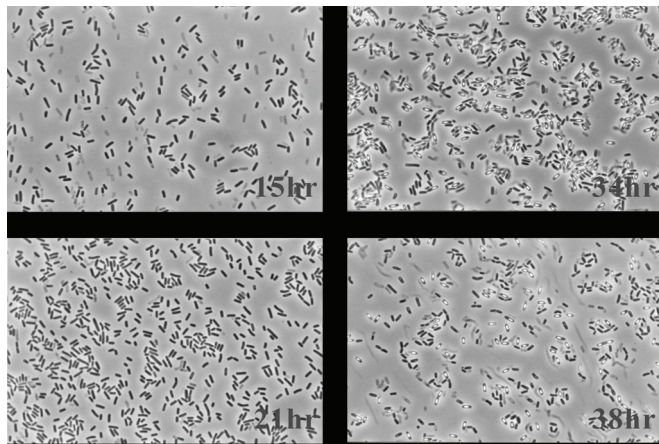


그림 1. *B. subtilis*의 배양기간별 내생포자형성을

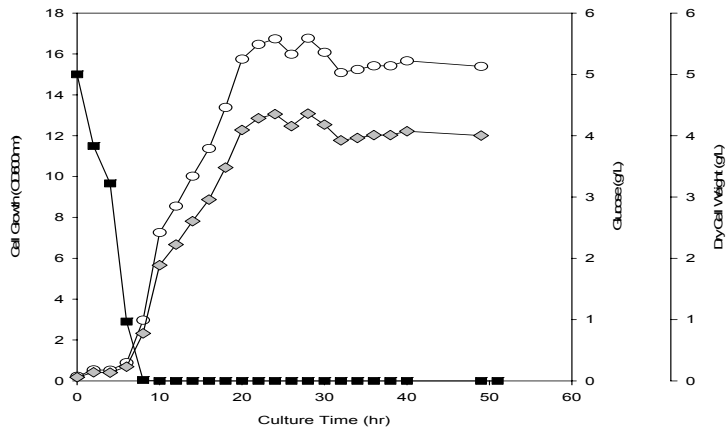


그림 2. 5 L jar fermenter에서 *B. subtilis*의 성장양상(○-○), glucose 흡수(■-■), 균체건물중(◇-◇)

균체 대량증식은 감즙액배지와 NB를 섞어 준비한배지를 200 L 발효조에 160 L 넣고 멸균한 다음 접종원을 10% 수준으로 접종하여 배양하였다. 발효조 배양조건은 30°C, pH 6.5로 조절하고 발효조 내의 용존산소(DO)는 aeration과 agitation을 이용하여 20%이상으로 유지하였으며, 배양 중 발효조내 압력은 0.2bar로 유지하였다. 그 결과 그림 3과 같이 세포의 성장은 배양 하루만에 OD값이 40으로 최대생장기에 이르렀고 세포건조 중량은 배지 1 L 당 약 11g 정도가 생산되었다(그림 3).

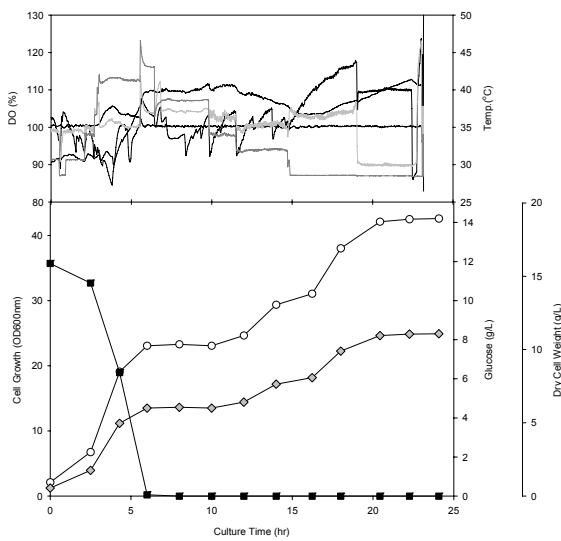


그림 3. 200 L 발효기에서 *B. subtilis*의 대량배양

### 시험 3. 길항균 *Streptomyces griseus*의 균체대량배양을 위한 액체배양 최적화

*Streptomyces griseus*의 균체대량배양을 위한 배양조건을 5 L jar fermenter에서 수행하였다. 액체배양을 위한 접종원은 보존균을 평판배지에 접종하여 3일 배양한 단일집락을 취하여 1000 L baffled flask 배지를 200ml 분주하여 준비한 접종원 배지에 접종하여 30°C, 200rpm에서 20시간동안 배양한 후 발효기배양의 접종원으로 사용하였다. 사용된 배지는 3% dextrin, 0.1% MgSO<sub>4</sub>, 2% yeast extract, 0.5% soybean meal, 0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.3% NaCl, 0.3% CaCO<sub>3</sub>를 사용하였다. 5 L jar fermenter에 배양액을 3 L 하여 배양이 끝난 후 잔여배양액은 2.6 L로 시료와 폭기로 400ml의 배양액이 농축되었다. 배양 후 40시간에 최대 O.D.값이 50이 나왔고 시간이 지날수록 탄소원의 고갈로 인해서 세포용해가 일어나 그 값이 급격하게 떨어졌다. 배양 중 DO는 20%이상으로 유지시켜주기 위해 교반기를 300rpm에서 1000rpm까지 서서히 증가시켜주었다(그림 4).

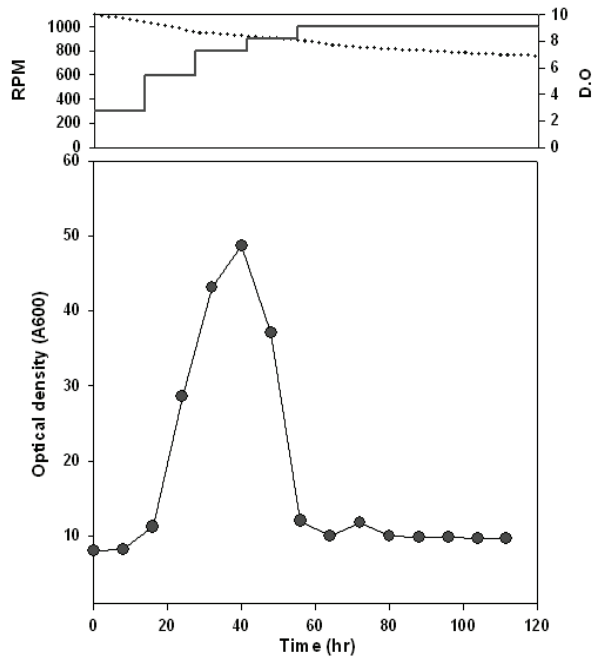


그림 4. *S. griseus*의 5 L jar fermenter 회분식 배양

배양기간 중 40시간, 90시간, 115시간 후에 시료를 채취하여 400배 광학현미경으로 관찰할 결과 균사길이가 짧아지고 O.D. 값이 낮아지는 것(그림 5)으로 보아 영양분 소진에 의한 세포분해로 추측되었다. 충분한 산소공급과 교반으로 진탕배양 보다 O.D.값이 최대 5배 이상향상되어 균체수확량이 증가하였으며, 40시간 후에 탄소원의 고갈로 인해 발효가 원활히 진행되지 못하여 배양된 균체수확량은 71.7g으로 제품화를 위한 경제성이 낮아 탄소원인 dextrin의 함량을 증가시켜 더 단위 부피 당 균체수확량 증대연구가 필요하였다.

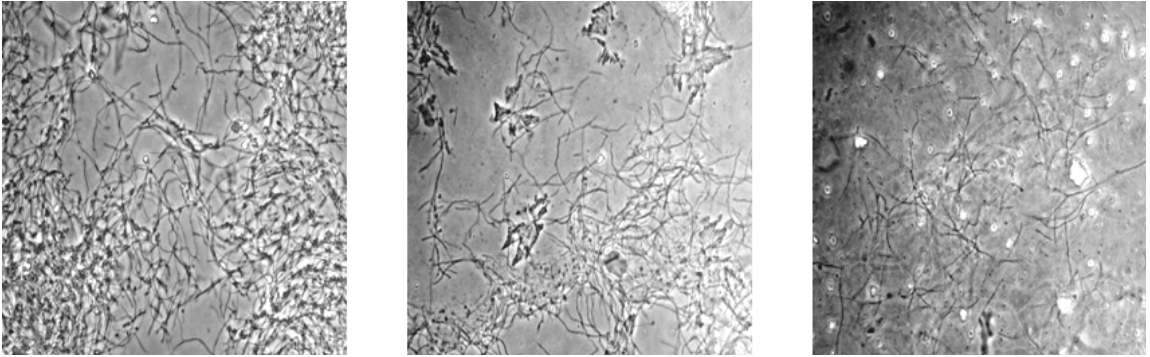


그림 5. Dextrin을 이용한 5L jar fermenter 회분식 배양기간 중 균사생육상태 (왼쪽부터 배양 후 40시간, 90시간, 115시간)

*S. griseus*의 균체수확량을 높이기 위해 사용된 배지는 앞선 실험에서와 같게 사용하였으나 dextrin만 3%에서 5%로 증가시켜 동일한 방법으로 실험을 하였다. 배양 41시간 후 O.D. 값 67로 3% dextrin 회분식 배양시 O.D. 값 47 보다 향상되어 수확한 균체량은 398.4g으로 28 배 증수되었다(그림 6).

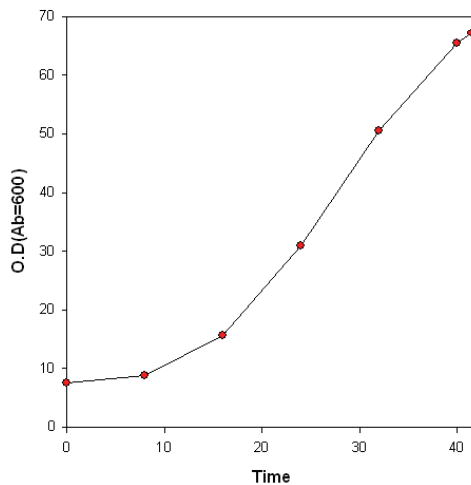


그림 6. 5% dextrin 첨가 후 *S. griseus* 균체성장곡선

공장형 대량배양을 위해 200 L 발효조에 배지를 150 L 넣어 멸균하였으며, 배양온도는 30°C, pH는 암모니아수 (28%)로 집중전 7.0로 조정하고, dextrin 함량은 3%에서 8%로 증가시켰으며, 기본배지는 0.1% MgSO<sub>4</sub>, 2% yeast extract, 0.5% soybean meal, 0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.3% NaCl, 0.3% CaCO<sub>3</sub>를 사용하였다. 배양이 진행되면서 pH가 떨어지기 시작하는 18시간 이후에 균체는 지수적증가기에 이르렀으며, DO값이 떨어짐에 따라 교반속도와 폭기량을 증가시켰다. 배양 후 45시간에 O.D.값이 56.5로 최대치에 도달하였고 pH는 7.7로 상승하였다. 이 시기에 성장곡선은 정체기에 이르러 균체수확시기였다. 45시간 배양 후 균체 수확량은 11kg이었다(그림 7).

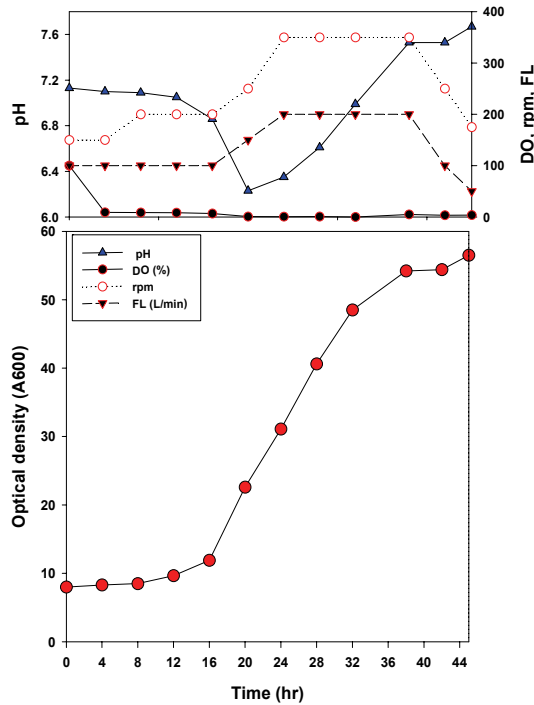


그림 7. 200 L 발효조에서 *S. griseus*의 대량배양

#### 시험 4, *P. synxantha* 생산 항균물질의 토마토잎곰팡이병 방제실험

King's B액체배지에 배양하여 수확한 *P. synxantha* 균체 100g을 30% 과일담금용 소주 1L에 현탁한 후 밀봉하고 실내에서 5일간 진탕하였다. 진탕 후 원심분리(10,000rpm, 30분)하여 균체를 제거하고 0.25 $\mu$ m membrane filter로 걸러 무균처리한 후 항균활성을 조사하였다. 토마토잎곰팡이병원균(*Fulvia fulva*)은 발병된 잎에서 포자를 채취하여 PDA배지에 접종하여 단포자분리법으로 순수분리한 다음 광조건하에서 배양하여 형성된포자를 실험재료로 사용하였다. 잎곰팡이병원균에 대한 포자발아억제능은 고온멸균한 PDA 배지를 50 $^{\circ}$ C로 식힌 다음 배지 100ml 당 *P. synxantha* 추출물을 각각 1, 0.5, 0.2, 0.1ml씩 넣어 섞은 다음 패트리디쉬에 분주하였다. 준비된 평판배지에 잎곰팡이병원균 포자를 접종하여 배양한 결과 2일 후부터 포자가 발아하였으며 무처리구에서의 발아율 52.3%에 비해 100배희석 처리구에서 발아율 13.5%로 방제효과가 75%로 높았다(표 2). 토마토잎곰팡이병은 봄에 정식하는 반촉성재배하우스와 7월에 정식하는 억제재배하우스에서 가장 피해를 많이주는 곰팡이병으로 무농약재배 농가에 피해를 주고 있다. 본 실험에서 준비한 *P. synxantha*항균물질은 발병초기부터 100배로 희석하여 7일 간격으로 엽면살포한 결과 효과적으로 방제되어 상위엽으로 병반이 확산되는 것을 방제하였다(그림 8).

표 2. *P. synxantha* 소주추출물의 잎곰팡이병원균 포자발아억제효과

배양일수	희석배율		포자발아율(%)		
	100배	200배	500배	1,000배	무처리
2일후	0	0	13.2	12.4	12.5
3일후	0	3.7	28.7	22.6	26.2
5일후	12.6	26.5	36.4	28.7	48.7
7일후	13.2	27.3	48.7	36.4	52.3



그림 8. 토마토잎곰팡이병 피해엽

#### 4. 적 요

인삼재배지에서 지재부와 뿌리에 병을 일으켜 경제적 손실을 유발하는 병원균 중 *Fusarium* spp. 와 *Cylindrocarpon* spp.는 지하부에서부터 진행되는 뿌리썩음 병반에서 분리되고, 수분과잉이나 두병원균에 의한 황증은 그 원인을 밝히기가 어려웠고 피해도 심하였다. *Cylindrocarpon* spp.는 토양에서는 분리가 어려웠으나 뿌리병반부위를 채취하여 20℃에서 배양하면 갈색의 균사생장이 확인되었다. 이병은 철분이 풍부한 농가포장에서 피해가 심하였다. *Phytophthora* spp.피해를 입은 인삼은 초기에 지상부가 시들고 뿌리표면은 갈색으로 변색되고 뿌리도관부는 길게 변하였으며, 뿌리내부가 하얀크림상태로 변하여 베이지색으로 보인다. 나중에는 뿌리가 몽그러지고 썩는 냄새를 풍기며 뿌리가 없어진다. *Rhizoctonia* spp.는 모든 인삼밭에서 분리되고 어린묘에 작록병을 일으키며 대체로 고온에서 병을 일으키는 반면 *Pythium* spp.는 저온, 다습한 중삼재배지에서 관찰되었다. 농가에서 죽병이라 부르는 *Sclerotinia* spp.에 의한 병은 6년근 재배지에서 심하게 발생하고 특이할 만한 병징은 갑자기 잎이 줄기 지재부에 암종이 생긴다. 대부분 병징은 늦은 봄에 관찰되고 심한 농가에서는 줄줄이 시들어 병이 확산되었다. *Streptomyces*0104는 그람양성의 포자를 형성하는 균으로 배지상에서 공중균사가 발달하고, 생육온도 범위가 넓은 균으로 30℃에서 생육이 왕성하였다.

이 균은 알칼리성 배지에서 잘자라고 다양한 유기영양원을 분해하여 토양에서 유기물 순환을 원활하게 한다. 이러한 분해력이 기름진 농토를 만들어주는 중추역할을 한다. 또한 흙 고유의 냄새도 이 균이 발산하는 휘발물질의 냄새이다. 분자생물학적으로 동정한 결과 *Streptomyces*0104는 *Streptomyces griseus*로 확인되었다. *Streptomyces*0104는 다양한 배지상에서 포자를 형성하지 않았으나 무기영양원과 감자추출물을 혼합한 배지에서 포자형성이 활발하여 제형화하는데 경제성이 높았으며 제형물을 희석하여 인삼균핵병포장에 관주한 결과 효과적으로 방제하였다.

고추에 발생하는 역병은 장마철에 심하게 발생하여 고추 지재부가 검게 병들고 결국 시들어 죽게하였다. 병반은 지배부에서 시작하여 줄기, 잎, 열매에 진행되어 방제를 하지 못한 농가의 고추는 수확전 고사하였다. 병원균인 *P. capsici*는 토양병으로 방제가 어렵고 난포자는 월동하여 이른 봄 수분과 온도가 높아짐에 따라 발아하여 유주자를 형성하고 식물에 침투한다. 본 연구에서 우분을 발효시켜 만든 퇴비에 3종의 길항균을 첨가하여 만든 상토에서 기른 고추묘를 심은 결과 고추역병이 효과적으로 방제되어 그 방제가는 50.9%이었다.

인삼과 시설재배 원예작물에 피해를 주는 3종의 병원균에 길항력이 있는 토착미생물들은 세포벽에 항균물질이 흡착되어 있었으며 이러한 항균물질들은 식초나 소주에 쉽게 용출되었다. 공시한 길항균주들은 모두 발효기에서 액체배양이 되었으며 40시간 이내에 배양이 완료되어 제품생산비가 저렴하고, *P. synxanxa*에서 추출한 항균물질은 토마토재배농가에 피해를 주는 잎곰팡이병을 효과적으로 방제하였다.

## 5. 인용문헌

- Abdel-Kader M.M. 1997. Field application of *Trichoderma harzianum* as biocide for control bean root rot disease. Egypt. J. Phytopathol., **25**: 19-25.
- Carisse O, Bernier J & Benhamou N, 2003. Selection of biological agents from composts for control of damping-off of cucumber caused by *Pythium ultimum*. Can J Plant Pathol **25**, 258-267.
- Churchill, B.W. 1982. Mass production of microorganisms for biological control. Pages: 139-156. In: Biological Control of Weeds with Plant Pathogens. Charudattan, R. and Walker, H.L. (eds.). John Wiley & Sons, New York,
- Coley-Smith, J.R.; Ridout, C.J.; Mitchell, C.M. and Lynch, J.M. 1991. Control of bottom rot disease of lettuce (*Rhizoctonia solani*) using preparations of *Trichoderma viride*, *T. harzianum* or tolclofos-methyl. Plant Pathol., **40**: 359-366.
- Duffy, B.K., A. Simon and D.M. Weller, 1996. Combination of *Thicorderma Koningii* with *Pseudomonas fluorescens* for control of take-all on wheat. Phytopathology **86**:188. 194.
- Ghisalberti, E.L. and Rowland, G.Y. 1993. Antifungal metabolites from *Trichoderma harzianum*, J. Nat. Prod., **56**: 1799-1804.
- Kenney, D.S., M.S. Reddy and J.W. Kloepper, 1999. Commercial potential of biological

preparation for vegetable transplants. *Phytopathology* 89: S39.

Kwok OCH, Fahy PC, Hoitink HAJ & Kuter GA, 1987. Interactions between bacteria and *Trichoderma hamatum* in suppression of *Rhizoctonia* damping-off in bark composted media. *Phytopathology* 77, 1206-1212.

Lewis, J.A. and Lumsden R.D. 2001. Biocontrol of damping-off of greenhousegrown crops caused by *Rhizoctonia solani* with a formulation of *Trichoderma spp.* *Crop Protection*, 20: 49-56.

McGrath, M. T., and Fox, G. M. 2009. Evaluation of biofungicides for managing foliar diseases in organically-produced tomato, 2008. *Plant Disease Management Reports* 3: V127. Online publication. doi: 10.1094/PDMR03.

Naseby, D.C.; Pascual, J.A. and Lynch, J.M. 2000. Effect of biocontrol strains of *Trichoderma* on plant growth, *Pythium ultimum* populations, soil microbial communities and soil enzyme activities. *J. App. Microbiol.*, 88: 161-169.

Pierson, E.A and D.M. Weller, 1994. Use of mixtures of fluorescent pseudomonas to suppress take-all and improve the growth of wheat. *Phytopathology* 84: 940-947.

Yedidia, I.; Benhamou, N. and Chet, I. 1999. Induction of Defense Responses in Cucumber Plants (*Cucumis sativus* L.) by the Biocontrol Agent *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 1061-1070.

## 6. 연구결과 활용

연도(년차)	활용구분	제 목
2010년(3년차)	기술이전	방선균을 이용한 인삼균핵병방제
2011년(4년차)	학회발표	토양병방제효과를 가지는 <i>Streptomyces</i> 의 분류·동정

## 7. 연구원편성

구 분	소 속	직 급	성 명	수행업무	참여년도		
					'09	'10	'11
책 임 자	환경농업연구과	농업연구사	김성일	과제총괄업무	○	○	○
공동연구자	"	"	최준근	자료수집	○	○	○
"	"	"	문윤기	연구지원	○	○	○