

토양길항세균 *Bacillus* sp. KL-3의 대사산물을 이용한 벼도열병균 *Pyricularia oryzae*의 생물학적방제

김규영 · 김상달*

영남대학교 자연자원대학 응용미생물학과

Biological Control of *Pyricularia oryzae* Blast Spot with the Antibiotic Substances Produced by *Bacillus* sp. KL-3. Kyu-Young Kim and Sang-Dal Kim. Department of Applied Microbiology, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea - Biocontrol of plant pathogens provides an alternative means of reducing the incidence of plant diseases without the negative aspects of chemical pesticides. Nowadays, as the resistant fungi about the chemical fungicides have revealed and the concern of environment has increased, the biological control of phytopathogenic fungi by the antagonistic microorganisms is very much indispensable. For the selection of strong antagonistic bacterium for biological control agent of rice leafblast and cucumber gray mold rot, the antifungal strain KL-3 strain was selected among 120 strains isolated from the rhizosphere soils. And the strain was identified to be a species of *Bacillus subtilis* or closely related strain. In several biochemical and *in vitro* antibiotics tests, antifungal substances of *Bacillus* sp. KL-3 were presumed heat stable, micromolecular antibiotic substances. *In vivo* test and vinyl house field test, the antifungal substances of *Bacillus* sp. KL-3 represented excellent biocontrol ability against *Alternaria mali*, *Pyricularia oryzae*, and *Alternaria kichiana* as well as broad spectrum of other fungi. In particular, *Bacillus* sp. KL-3 strain showed more predominant activity than some chemical fungicides against fungi shown to resist chemical fungicides.

유기합성농약이 식량생산에 크게 기여해온 것은 사실이나 이들 화학농약의 남용에 따른 생태계파괴 등 심각한 피해가 속출하고 있는 바 세계적으로 화학농약사용에 대한 규제가 점차 강화되고 있다. 따라서 작물의 병·해충과 잡초의 방제를 위해 화학적 방제법이 아닌 무공해한 새로운 생물학적 방제법이 필요하게 되었고, 그 중에서도 생물농약의 개발이 시급해졌다. 지금까지는 생물농약이 전체 농약시장에서 차지하는 비율이 3% 이하로 미약하지만, 앞으로 연평균 성장율이 10%에 이를 것으로 예측되고 있는 바 농업용 항생물질을 중심으로하는 생물농약의 중요성이 점차 증가되고 있다(1). 농업용 항생물질로 가장 먼저 사용된 것은 1944년 의료용으로 발견된 streptomycin이 Mitchell 등에 의해 식물병원균에도 유효하다는 보고(2, 3)가 발표된 후 이를 주성분으로 한 phytomycin, accostreptomycin 등이 개발되었으며, 이를 계기로 항생물질을 농업용 살균제로 사용하려는 시도가 시작되었다(4). 이후의 농업용 항생제개발은 거의 대부분 일본에서 이루어 졌는데, Watanabe 등이 *Streptomyces blastmyces*의 대사산물에서 벼도열병에 선택적 효과가 있는 blastidin S를 분리하여 실용화하였고(5), 1964

년 *Streptomyces kasugaensis*의 대사산물중 항진균성 항생물질 kasugamycin을 분리하기도 하였다. 그외 실용화된 농업용 항진균성 항생제로는 polyoxin과 validamycin 등이 있으나(6), 이들 항생물질이 완전히 실용화 되기까지는 독성이나 대량사용 등 여러가지 문제점이 있으며, 또한 이들 대부분은 방선균이나 곰팡이를 생산균주로 하는 대사산물 이었다.

따라서 본 연구에서는 사과반점낙엽병균 *Alternaria mali*, 벼도열병균 *Pyricularia oryzae* 등 대표적 식물병원균의 생육을 강력히 억제하는 길항세균을 토양으로부터 분리, 선발, 동정한 후, 그 길항기작이 항진균성 항생물질에 의한 억제작용임을 확인하고, 조정제된 항진균성 항생물질을 이용하여 생물농약으로서의 활성검정을 실시하였다. 오이회색곰팡이균 *Botrytis cinerea*에 대해서는 기존화학농약에 내성을 나타내는 약제내성균주에 대한 활성검증을, 벼도열병균 *P. oryzae*와 벼잎집무늬마름병균 *Rhizoctonia solani*에 대해서는 *in vitro* 항균활성조사 및 식물체를 이용한 비닐하우스에서의 *in vivo* 포장실험을 통하여 그 방제효과를 확인함으로써 농업용 항생물질로 활용할 수 있는가의 가능성을 타진하였다.

*Corresponding author

Tel. 82-53-810-2395, Fax. 82-53-811-4319

E-mail: sdkim@yucc.yeungnam.ac.kr

Key words: Biological control, Antifungal antibiotics, *Pyricularia oryzae*, *Botrytis cinerea*

재료 및 방법

길항세균의 분리 및 시험식물병원균주

길항세균을 분리하기 위해 경북 경주지역 고추경작지의 저병해포장의 토양시료를 0.01 M phosphate buffer (pH 7.0)로 현탁 희석 한후 nutrient agar(NA, Difco)배지에 접종하여 30°C에서 2일간 배양하였으며, 식물병원균을 대상으로 억제력을 측정할 경우는 potato dextrose agar/nutrient agar(PDA/NA)배지(7) 즉, 0.8% nutrient broth와 1.5% potato dextrose broth(PDB, Difco), 1.5% agar를 함유한 배지를 사용하여 28°C에서 배양하였다. 시험병원균주는 한국화학연구소와 농촌진흥청 농업과학기술원에서 분양받거나 영남대학교에 소장하고 있는 11개 균주를 사용하였다. 식물병원균은 potato dextrose agar(PDA, Difco)배지를 이용하여 26~28°C에서 3일간 배양하여 사용하였으며, 억제력 측정시험에서는 PDB를 이용하여 160 rpm으로 진탕배양하였다.

유기합성농약

선발된 길항균주로부터 얻은 조정제 항생물질과의 활성 비교용으로 본 연구에서 사용한 유기합성농약 중에서, 약제 B는 유효성분으로 5-methyl-1,2,4-triazolo[3,4-b]benzothiazole 75%을 함유한 농약이며, 약제 K는 유효성분 S-benzyl-o,o-disopropyl phosphorothioate 48%을 함유한 농약이고, 또한 약제 H와 약제 P는 유효성분 (RS)-2-(2,4-dichlorophenyl)-1(1H-1,2,4-triazol-1-yl)hexan-2-ol과 1-(4-chlorobenzyl)-1-cyclopentyl-3-phenylurea을 각각 10%와 25% 함유한 시판 유기합성 살균제를 구입하여 사용하였다.

생육억제거리 측정

식물병원균에 대한 억제균의 생육억제능을 조사하기 위해 PDA/NA 평판배지의 좌측에 먼저 대상병원균을 접종하여 2일간 배양시킨 후 우측 4 cm의 간격에 선발된 길항세균을 획선 접종하여 28°C에서 대칭배양법으로 배양시키면서 서로간의 증식선단까지의 거리를 측정, 비교하였다.

균체 증식량 측정법에 의한 항균력 조사

길항균주의 배양물을 Amicon Centriprep® 10(MW 10,000)으로 분획한 저분자의 억제물질을 2.64% PDB에 10%되게 첨가하여, 미리 PDA plate에 배양한 식물병원균의 균사체를 멸균된 cork borer(φ 3 mm)로 균일하게 찍어내어 접종하고 28°C, 160 rpm에서 7일간 진탕배양한 뒤 Whatman No.2 filterpaper로 여과, 항량까지 건조하여 그 건조균체량을 측정하였다. 세균 배양액의 항생물질함유 분획(≤MW. 10,000)첨가구의 균체량과 함유하지 않은 대조구의 건조균체량을 비교하였다.

Agar hole diffusion 방법에 의한 항균력 조사

PDA plate에서 전배양된 식물병원균의 균사체를 직경 7 mm cork borer로 찍어 균총 디스크를 만든 후 PDA plate 배지의 중앙에 접종하여 28°C에서 배양하였다. 24시간 배양한 후 2.5 cm 간격으로 3개소에 직경 7 mm cork borer로 뚫어 조정제 항생물질의 투입구(원형의 agar hole)를 만들고 농도별로 항생물질을 첨가하여 3일 배양한 후 항생물질의 균사생장저지거리(mm)를 비교, 조사하였다.

Dendroid test에 의한 항균력조사

선발된 억제균의 배양액이나 조정제 항생물질을 각 농도별로 55°C의 PDA 20 ml에 혼합하여 petri dish에 plating하였다. 별도로 PDA를 직경 7 mm cork borer로 agar piece를 만들어 미리 준비된 PDA 평판배지의 중앙에 놓고 여기에 식물병원균을 접종시키고, 28°C에서 48시간 성장시킨 다음 균사의 뻗어나간 동심원의 직경을 측정하였다.

항생물질의 생산 및 조정제

항생물질의 생산을 위해서는 항생물질 생산용 배지(8) 중에 가장 보편적으로 사용되는 dextrose glutamine (DG)배지, 즉 1% dextrose, 0.5% DL-glutamic acid, 0.102% MgSO₄ · 7H₂O, 0.1% K₂HPO₄, 0.05% KCl 그리고 0.15% trace element solution(0.5% MnSO₄ · H₂O, 0.16% CuSO₄ · 5H₂O, 0.015% FeSO₄ · H₂O)으로 조제 (pH 6.2)하여 사용하였으며, 길항세균을 접종한 후 30°C에서 3일간 160 rpm으로 진탕배양하였다. 항진균성 항생물질이 균체내에 존재하고 있는지 또는 균체밖으로 분비되는지를 알아보기 위하여 균체의 분비 항생물질은 균 배양액을 9,500 rpm(11.9 g×1000, Himac CR 20B2)으로 원심분리하여 원침상등액을 그대로, 균체내 항생물질은 80% aqueous acetone으로 30°C에서 12시간 추출하여 각각의 항진균활성을 조사하였다. 또한 균체로부터의 acetone 추출액은 완전히 건조시키고, 원침상등액은 그대로 각종 유기용매를 사용하여 항진균성 항생물질의 전 용여부를 검토하고(9, 10) isoelectric precipitation 방법에 의해 원침상등액의 pH를 1~11까지 각각 조절하여 항생물질의 침전도를 조사하였다(11, 12). Ion 교환 chromatography(Amberlite XAD-4)를 이용한 추출방법도 조사하였다.

포트시험(Pot test)을 통한 생물방제력 조사

벼도열병 원형포트(직경 7.0 cm, 높이 7.6 cm)에 볏씨(품종:추청) 5립을 파종후 21일간(4엽기) 육묘하고, 조정제 항생물질을 농도별로 계면활성제(Tween-20)에 첨가하여 벼에 분무처리 하였다. Oat meal 한천배지상에서 *Pyricularia oryzae*(벼도열병균)의 포자를 형성시켜

열은 포자현탁액을 항생물질처리 1일 후에 분무접종 하였다. 접종상(온도: 25~28°C)에서 48시간 동안 정치후 벼도열병을 발병시켰으며(13), 약효평가는 균접종 7일후 엽상의 병반수를 조사하여 대조군과 비교하여 방제가를 산출하였다. 이때 엽상에 형성된 병반의 면적율(Disease severity)을 Kozaka의 standard diagram(14)에 준하여 병반면적율을 산출하였다.

$$\text{방제가(\%)} = \frac{\text{무처리구의 엽당병반수} - \text{처리구의 엽당병반수}}{\text{무처리구의 엽당병반수}} \times 100$$

벼문고병 원형포트에 볏씨(품종: 추청) 10립을 파종 후 21일간(4엽기) 육묘하고, 준비된 조정제 항생물질에 계면활성제(Tween-20)를 소량 첨가하여 벼에 분무처리 하였다. 항생물질처리 1일후 벼문고병의 접종원(*Rhizoctonia solani*)을 육묘된 기주식물의 가운데 부분에 놓고, 가볍게 banding한 후 접종상(온도: 29°C)에서 72시간 동안 정치후 벼문고병을 발병시켰으며, 약효평가는 균접종 5일후 엽의 피해도를 산출하여 대조군과 비교하여 방제가를 산출하였다.

$$\text{방제가(\%)} = \frac{\text{무처리구의 피해도} - \text{처리구의 피해도}}{\text{무처리구의 피해도}} \times 100$$

비닐하우스 포장시험에 의한 생물방제력 조사

오이회색곰팡이병 원형포트(직경 7.0 cm, 높이 7.6 cm)에 오이(품종: 만춘청장마디오이) 1주씩 심어 총 50주를 파종하여 일정시간이 지난후 3엽기의 오이를 비닐하우스에 정식하여 20일간 재배한 후 오이회색곰팡이병균(*Botrytis cinerea*)을 처리하고 조정제된 항생물질을 농도별로 작물표면에 분무처리 하였다. 28일간 비닐하우스(온도: 20~25°C)에서 재배하여 오이회색곰팡이병을 발병시켰으며, 약효평가는 처리 7일후 이병과수를 조사하여 대조군과 비교하여 방제가를 산출하였다.

$$\text{방제가(\%)} = \frac{\text{무처리구의 이병과수} - \text{처리구의 이병과수}}{\text{무처리구의 이병과수}} \times 100$$

결과 및 고찰

길항세균의 선발

식물병원균의 생육을 강력히 억제하는 길항균주를 분리하기 위해서 경북 일원의 토양으로 부터 일차로 토양 세균 120여 균주를 분리하고, 대표적 식물병원균인 벼도열병균 *Pyricularia oryzae*을 대상시험균주로 하여 그 생육억제능 즉, 길항력을 조사하였는데 우선 생육억제거리 측정법으로 측정하여 서로간의 colony선단에서 생육억

Table 1. Antifungal activities of the antagonistic bacteria against *Pyricularia oryzae*

Strains	Antifungal Activity		
	Fungal dry weight ^a	Fungal colony size ^b	Inhibition distance ^c
KL-3	50.5 (%)	20.4 (%)	12.8 (mm)
KL-15	44.2	16.2	10.3
KL-35	40.8	13.3	9.4
KL-47	38.7	10.9	7.8
KL-38	36.5	5.3	7.9
KL-19	33.2	5.3	5.9
KL-26	30.4	4.5	4.5
KL-30	30.2	4.0	4.6
KL-8	28.5	-	-
KL-12	26.4	-	-
KL-21	25.5	-	-
KL-44	20.2	-	-

The bacteria were grown in nutrient broth (NB) at 30°C for 48hr. ^aCompleted inhibition ratio (100%)-dry weight of *P. oryzae* cultured with bacterial culture filtrates relative to those cultured with water in potato dextrose broth (PDB) after 5 days of incubation at 28°C. ^bCompleted inhibition ratio (100%)-colony circle size of *P. oryzae* cultured with autoclaved-bacterial culture filtrates relative to those cultured with water on PDA plates after 5 days of incubation at 28°C. ^cDistance between the edges of the bacterial agar pieces (about 7 mm square) and fungal mycelium on PDA plates after 5 days of incubation at 28°C. The data values are the means from five replication.

제거리가 0.8 cm 이상인 길항균주 12종을 1차 선발한 후 Table 1과 같이 균체중량법에 의해 식물병원균의 생육을 30% 이상 억제할 수 있는 8개 균주를 2차 선발하였다. 이 균주들을 대상으로 Dendroid test법, 생육억제거리 측정법으로 Table 1에서 보는 것과 같이 항생물질 생산균주로 보이는 4개 균주중 항진균 활성이 가장 높은 KL-3을 최종 선발할 수 있었다.

길항세균의 동정

선발된 길항균 KL-3균주의 배양 및 형태학적 특성과 생리 및 생화학적 특성을 조사한 결과는 Table 2, Table 3과 같았으며, 선발된 길항균주를 배양상, 형태적, 생리적 특성등 각종 동정에 필요한 시험결과를 "Bergey's manual of systematic bacteriology"(15)와 "Manual of methods for general bacteriology"(16) 등의 분류동정표에 의해 고찰해 본 결과 선발된 길항균 KL-3은 *Bacillus subtilis*이거나 또는 그 근연종일 가능성이 가장 높았으며 그 다음 가능성은 *Bacillus brevis*와 유사하다고 동정할 수 있었다.

항생물질의 특성과 효소활성 조사

선발된 억제균 *Bacillus* sp. KL-3의 항생물질 특성을

Table 2. Morphological and cultural characteristics of the strain KL-3

Characteristics	Isolate KL-3	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus brevis</i>
Cell form	Rod	Rod	Rod
Gram staining	+	+	+
Strain showing gram-positive at least in young culture	+	+	+
Endospore formation	+	+	+
Anaerobic growth	-	-	-
Motile	+	+	+
pH in Voges-Proskauer broth <6	d	d	-
>7	+	-	+
Growth at pH 6.8, Nutrient broth	+	+	+
5.7, Nutrient broth	+	+	d
Growth in NaCl 2%	+	+	NA
5%	+	+	-
7%	+	+	-
10%	-	NA	-
Growth at 5°C	-	-	-
10°C	+	d	-
30°C	+	+	d
40°C	+	+	+
50°C	+	d	d
55°C	-	-	d
65°C	-	-	-

+, Positive, -, Negative, d; 11~89% of strains are positive, NA; Not available.

조사하기 위하여 선발균주의 배양여액을 100°C에서 15분간 열처리한 후 배양여액의 항진균성 총활성을 기준으로 잔존억제력을 측정하여 항진균성 활성을 백분율로 환

Table 3. Physiological, biochemical and nutritional characteristics of the strain KL-3

Characteristics	Isolate KL-3	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus brevis</i>
Catalase test	+	+	+
Oxidase test	+	+	+
Voges-Proskauer test	+	+	-
Acid from D-glucose	+	+	d
L-arabinose	d	+	-
D-xylose	d	+	-
D-mannitol	+	+	d
Gas from glucose	-	-	-
Hydrolysis of casein	+	+	+
gelatin	+	+	+
starch	+	+	+
Utilization of citrate	+	+	d
propionate	-	-	NA
Degradation of tyrosine	-	-	+
Deamination of phenylalanine	-	-	-
Formation of indole	-	-	-
Nitrate reduced to nitrite	+	+	d

+, Positive, -, Negative, d; 11~89% of strains are positive, NA; Not available.

Table 4. Characteristics of the antifungal substance produced from *Bacillus* sp. KL-3

Characteristics	Activity
Heat treated at 100°C for 15min	88%
Dialyzed solution ^a	10%
High MW substance (10 ↑) ^b	11%
Low MW substance (10 k ↓) ^b	92%
Chitinase (colloid chitin)	ND
β-1,3-Glucanase (laminarin)	ND
Cellulase (α-cellulose)	ND

Bacillus sp. KL-3 was grown in dextrose-glutamine (DG) medium at 30°C for 72 hr. ^aBacterial filtrate was dialyzed at 4°C for 48hr through a cellulose dialysis sack (molecular weight cutoff, 12,000). ^bBacterial filtrate was fractionated low molecular weight substance (MW 10,000) Amicon centriprep[®] 10. ND; No detection.

산해 본 결과 Table 4와 같이 처리전 배양상등액에 존재하는 억제능의 약 86~89%정도 활성을 나타내었다. chitin, laminarin(β-1,3-;β-1,6-glucan), cellulose을 기질로 하여 효소활성과 식물병원균 *P. oryzae* 생육억제능을 측정 한 결과 가수분해효소의 활성이 전혀 나타나지 않았다. 이로 미루어 보아 선발된 길항균 KL-3의 길항기작은 외막가수분해 효소와 같은 고분자성 물질이라기 보다는 분자량 10,000 이하의 저분자성으로 열에 매우 안정한 항생물질에 기인됨을 확인할 수 있었다.

항진균성 항생물질의 추출 및 조정제

선발된 길항균주 *Bacillus* sp. KL-3의 배양액을 원심 분리한 후 그 상등액과 균체내부물질의 항진균활성을 조사한 결과, 항진균성 활성의 거의 95% 이상의 활성이 배양상등액에 존재함을 확인하였다. 생산된 항생물질의 추출은 배양액을 pH 2.0으로 조정하여 침전시키고 원심분리한 침전물의 용해물을 n-BuOH로 전용시킨 후 감압농축하였고 농축시럽을 물에 녹인 후 chromatography로 조정제하였다. 각종 조정제방법 중 Amberlite XAD-4를 이용한 이온교환 chromatography의 흡착부분으로부터 항진균성 활성을 가지는 항생물질을 대부분 얻을 수 있었다(Data 생략).

항진균성 항생물질의 활성 및 spectrum

생물방제균 *Bacillus* sp. KL-3이 생산한 항진균성 항생물질의 항곰팡이 활성범위를 확인하기 위하여 항진균성 농약의 활성검정에 사용되는 식물병원균 11개 균주를 대상으로 그들에 대한 항진균활성을 조사한 결과 Table 5와 같이 *Alternaria mali*(사과반점낙엽병균)와 *Pyricularia oryzae*(벼도열병균)에 대해서 가장 항진균활성이 높았고, 감수성으로 나타난 8개의 시험균주중 *Physalospora baccae* (포도꼭지마름병균)과 *Botryosphaeria doth-*

Table 5. Antifungal spectrum of the crude antibiotic substance from *Bacillus* sp. KL-3 on the mycelial growth of phytopathogenic fungi

Plant Pathogens	Inhibition Distance (mm) ^a	
	30	10
	<i>Alternaria mali</i> (사과반점낙엽병균)	9
<i>Alternaria kikuchiana</i> (배검은무늬병균)	5	2
<i>Phytophthora capsici</i> (고추역병균)	0	-
<i>Physalospora baccae</i> (포도꼭지마름병균)	1	-
<i>Botryosphaeria dothidea</i> (사과검무늬썩음병균)	1	-
<i>Glomerella cingulata</i> (고추탄저병균)	5	0
<i>Pyricularia oryzae</i> (벼도열병균)	10	5
<i>Rhizoctonia solani</i> (벼잎집무늬마름병균)	3	1
<i>Fusarium moniliforme</i> (벼키다리병균)	0	-
<i>Rhizopus</i> sp. (벼입고병균)	0	-
<i>Botrytis cinerea</i> (오이회색곰팡이병균)	5	2

Bacillus sp. KL-3 was grown in dextrose-glutamine (DG) medium at 30°C for 72 hr. ^aInhibition distance between holes (about 7 mm square) containing 50 µl of crude antibiotic substance purified from KL-3 and fungal mycelium on PDA plates (5 days of incubation at 28°C).

idea (사과검무늬썩음병균)은 그 항균활성 정도가 가장 낮게 나타났다.

오이회색곰팡이병의 방제효과

In Vitro 항균활성조사 *Botrytis cinerea*에 의해 발병되는 회색곰팡이병은 오이, 딸기 등 채소류와 여러 종류의 화훼류에 발병되는 진균성 병해로 작물의 생육기간뿐만 아니라 이들의 저장, 운송중에 더욱 큰 피해를 주는 세계적으로 피해가 아주 심각한 병해로써 주로 습도가 높고 서늘한 기온(8~23°C)하에서 발병이 심한 것으로 알려져 있으며 1979년 이후 경작지의 여러작물에서 기존의 유기합성 농약에 대한 내성균이 출현되어 방제효과의 저하가 보고 되고 있다. 따라서 본 연구에서는 기존의 유기합성 농약에 저항성을 가지는 내성균주를 억제할 수 있는 새로운 생물농약으로의 대체가능성을 타진해 보았다. 이를 위해 기존의 회색곰팡이병 방제용 유기합성농약 dicar-

Table 6. Effect of three fungicide against cucumber gray mold rot caused by *Botrytis cinerea* (in vitro test)

Fungicide	Inhibition Distance (mm)					
	Dicarboximides ^S strain			Dicarboximides ^R strain		
	200 (ppm)	50	10	200	50	10
U*	0.1	0	0	0	0	0
S*	0.6	0.4	0	0	0	0
KL-3 ^a		0.3			0.3	

*Product code. ^a50 µl of the crude antibiotic substance purified from *Bacillus* sp. KL-3.

Table 7. Effect of fungicide against cucumber gray mold rot caused by *Botrytis cinerea* (in vivo vinyl house)

Fungicide	Conc. (mg/l)	Disease Severity (%)				Antifungal Ratio (%)
		I	II	III	Mean	
KL-3	50 ^a	27.2	29.6	26.5	27.7	7.0
U*	2000	4.1	6.2	5.3	5.2	82.6
S*	1000	2.5	3.0	2.8	2.7	90.7
Untreated	-	35.3	30.5	24.2	30.0	-

*Product code. ^a50 µl of the crude antibiotic substance purified from *Bacillus* sp. KL-3.

boximide계에 감수성인 *B. cinerea*균주와 dicarboximide계 저항성균주를 대상으로 agar hole diffusion 방법으로 그 활성정도를 조사하였다. 그 결과는 Table 6과 같이 기존의 유기합성 농약이 *B. cinerea* 저항성균주에 대해 활성이 낮게 나타난 것에 반해, *Bacillus* sp. KL-3이 생산하는 항진균성 항생물질은 *B. cinerea* 감수성 균주는 물론이고, dicarboximide계 저항성균주에 대해서도 항균활성이 확인되었다.

비닐하우스 포장실험 *B. cinerea*에 의한 오이회색곰팡이병에 대한 KL-3의 발병제어활성은 비닐하우스 포장 실험을 통하여 조사하였으며 그 결과는 Table 7과 Fig. 1과 같다. *B. cinerea*는 비닐하우스내의 무처리 발병율이 30%로 약효를 판정하기에 충분하게 발병하였으며, 실험에 사용된 항생물질 KL-3은 기존의 유기합성농약 제품 U, 제품 S에 비해 약효가 비교적 낮게 나타났다. 이 결과는 사용농도의 차이에 인한 것으로 생각되어진다. 또한 본 연구에서 사용한 항생물질 KL-3이 실제 포장에서도 활성을 나타낼 수 있음을 확인하였다.

벼잎집무늬마름병과 벼도열병의 방제효과

In vitro 항균활성조사 벼잎집무늬마름병은 최근 벼의 조기파종, 밀식재배와 질소시비량의 증대등으로 인하여 그 피해도가 점차 증가하고 있다. 아울러 벼도열병도 우리나라의 벼병해중 가장 피해가 심한 병해로써 과거 10년간에 도열병으로 인한 연평균 수확감소율은 7.3%로서 전체 벼병해의 피해율중 40%에 해당된다. 따라서 벼의 전체 병발생율중에서 두 병해로 인한 발생율은 60% 이상을 차지할 정도로 가장 심한 병해이다. 따라서 선발

Table 8. Effect of fungicides against leaf blast spot caused by *Pyricularia oryzae* (in vitro test)

Fungicide	Inhibition Distance (mm)		
	200 ppm	50 ppm	10 ppm
B*	0.6	0.4	0.2
K*	0.3	0.1	0
KL-3 ^a		0.5	

*Product code. ^a50 µl of the crude antibiotic substance produced from *Bacillus* sp. KL-3.

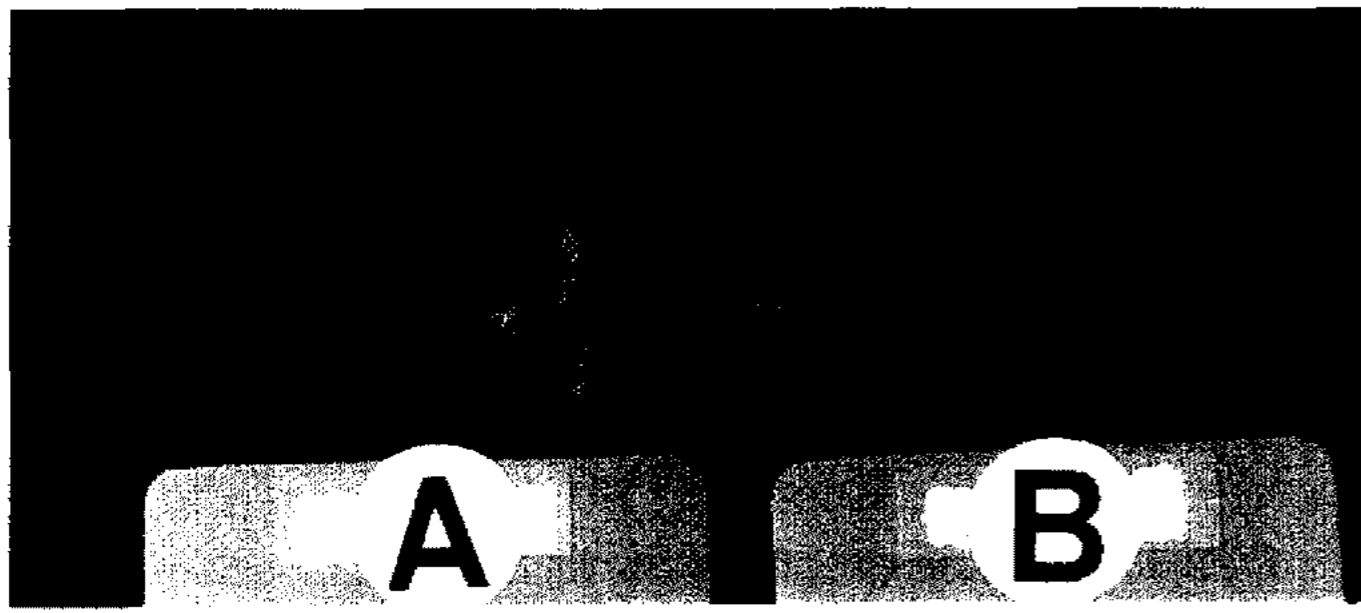


Fig. 1. Effect of the crude antibiotic substance KL-3 against cucumber gray mold rot caused by *Botrytis cinerea*. (A) Treated with antibiotic KL-3 (B) Untreated control

Table 9. Effect of fungicides against sheath blight caused by *Rhizoctonia solani* (in vitro test)

Fungicide	Inhibition Distance (mm)		
	200 ppm	50 ppm	10 ppm
H*	0.6	0.5	0.2
P*	0.5	0.3	0.1
KL-3 ^a		0.2	

*Product code. ^a50 µl of the crude antibiotic substance produced from *Bacillus* sp. KL-3.

시험에서 활성이 인정된 *Pyricularia oryzae*(벼도열병균) 과 기존의 시판유기합성농약과 군사생육저지율을 비교 조사하였으며, 선발시험에서 활성정도는 낮았지만 그 중요성을 인정하여 *Rhizoctonia solani*(벼잎집무늬마름병균)도 비교하였는데, 그 결과는 Table 8, Table 9와 같다. 이 결과와 같이 벼도열병의 경우에는 기존의 유기합성농약과 유사한 정도의 활성이 있었지만, 벼문고병에 대한 그 활성정도는 기존의 유기합성농약보다는 낮았다.

In vivo 포트 실험 선발시험에서 나타난 항균활성검정결과를 기초로 하여 *P. oryzae* 및 *R. solani*에 대하여 포트를 이용한 KL-3의 *in vivo* 발병제어실험을 실시하였

Table 10. Effect of fungicides against leaf blast spot caused by *Pyricularia oryzae* (in vivo pot test)

Fungicide	Conc. (ml/l)	Disease Severity (%)				Antifungal Ratio (%)
		I	II	III	Mean	
KL-3	50 ^a	11.8	13.1	9.2	11.3	32.3
	500	2.1	3.3	1.5	2.3	86.2
B*	375	3.6	4.2	3.8	3.9	76.6
	250	6.6	5.1	8.0	6.5	61.0
	125	8.2	6.7	10.5	8.4	49.7
	1000	4.3	4.0	3.7	4.0	76.0
K*	500	7.1	8.2	9.6	8.3	50.2
	375	7.8	11.2	8.2	9.0	46.1
	250	8.9	11.4	10.6	10.3	38.3
Untreated	-	17.1	15.6	17.4	16.7	-

*Product code. ^a50 µl of the crude antibiotic substance produced from *Bacillus* sp. KL-3.

Table 11. Effect of fungicides against sheath blight caused by *Rhizoctonia solani* (in pot test)

Fungicide	Conc. (mg/l)	Disease Severity (%)				Antifungal Ratio (%)
		I	II	III	Mean	
KL-3	50 ^a	14.7	16.9	15.2	15.6	5.0
H*	1000	1.9	3.2	2.6	2.5	84.3
P*	500	2.7	4.1	3.5	3.4	79.0
Untreated	-	16.4	17.9	15.1	16.4	-

*Product code. ^a50 µl of the crude antibiotic substance from *Bacillus* sp. KL-3.

으며, 활성을 비교할 대조약제로써는 현재 시중에 판매되고 있는 기존화학농약을 사용하였다. 특히 벼도열병에 대해서는 선발시험 결과 활성이 매우 높게 나타났으므로 기존 유기합성농약과의 활성정도를 비교하기 위하여 기존화학농약의 희석배수와 비교하여 실험을 수행하였다. 시험결과는 Table 10, Table 11 그리고 Fig. 2와 같이 우수한 방제력을 나타내었다. 벼도열병의 경우에는 실험에 사용된 항생물질이 배양액과 유사한 농도의 조정제된 항생물질임을 고려한다면 기존 유기합성농약과 거의 유사한 활성을 나타내었는데, 특히 약제 K와는 희석배수 4,000배에서 동등한 약효가 나타난 반면에, 약제B와는 다소 약효의 차이가 나타났다. 그러나 벼잎집무늬마름병

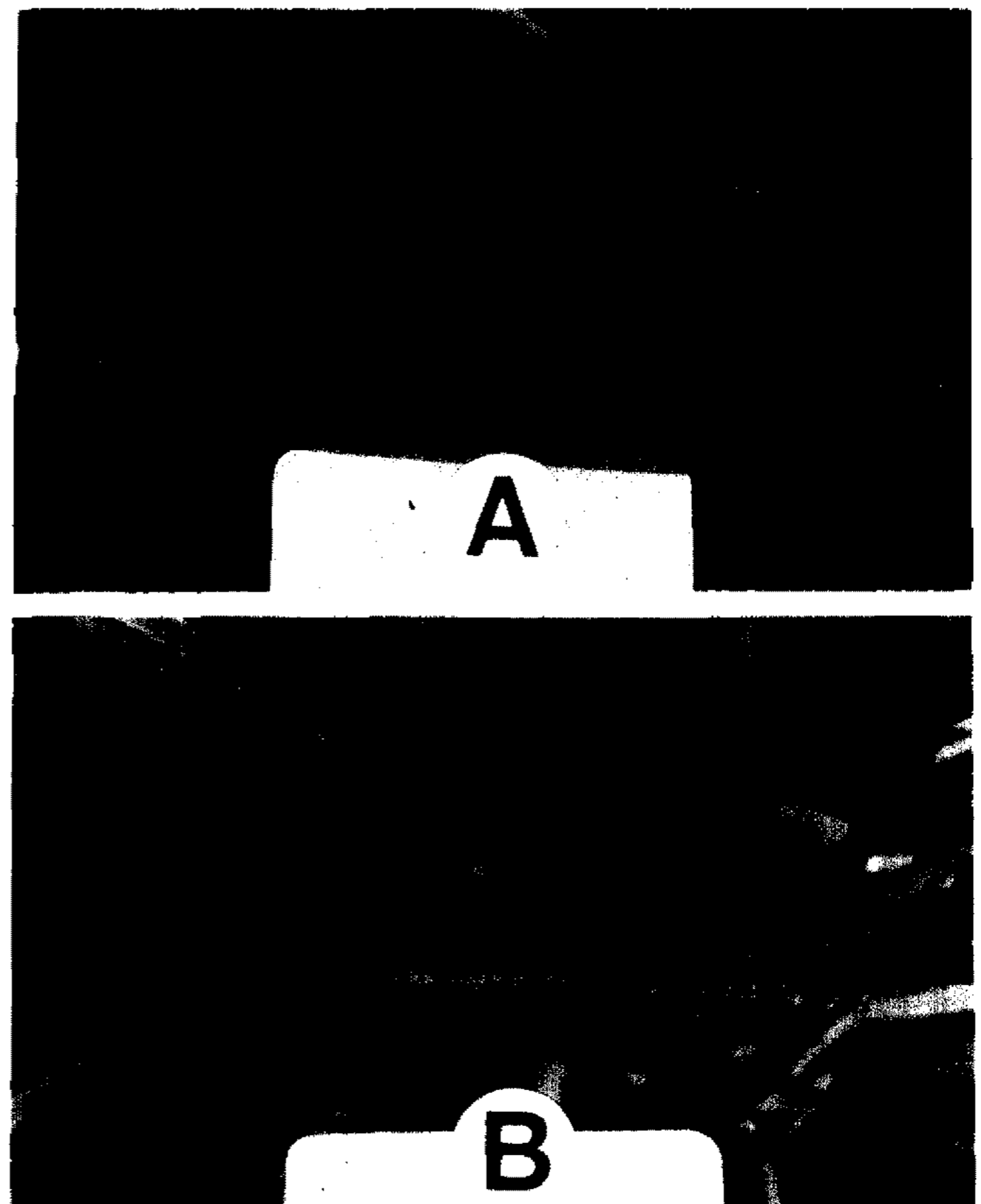


Fig. 2. Effect of the crude antibiotic substance KL-3 against leaf blast spot caused by *Pyricularia oryzae*. (A) Treated with antibiotic KL-3 (B) Untreated control

의 경우에는 *in vitro* 실험결과와 동일하게 활성이 인정되지 않았다.

요 약

생물농약개발의 기초단계로써 토양에서 분리한 생물방제균 *Bacillus* sp. KL-3이 생산하는 벼도열병균 및 오이회색곰팡이병균의 생육을 억제하는 항진균성 항생물질을 분리하고, 이 항생물질에 대한 *in vitro* 항균활성실험 및 *in vivo* 발병제어 활성실험을 실시하여 실제 식물에서의 활성유무를 검증하였고, 또한 비닐하우스 포장에서 기존 화학농약과의 약효차이를 비교하여 신규생물농약을 개발하는데 활용코자 하였다. *Bacillus* sp. KL-3의 식물병원균에 대한 생육억제기작은 chitinase, β -1,3-glucanase와 같은 고분자성 외막가수분해효소에 의한 기작이기 보다는 열에 안정하며 저분자성 물질인 항생물질에 의한 것을 확인할 수 있었다. 선발된 길항세균 *Bacillus* sp. KL-3로부터 항진균성 항생물질을 Amberite XAD-4를 이용한 이온 교환 chromatography에 의해 조정제할 수 있었으며, 식물체를 이용한 *in vivo* 활성을 통한 생물방제력 활성조사에서 그 활성을 확인할 수 있었다.

선발된 *Bacillus* sp. KL-3이 생산한 항생물질의 식물병원균에 대한 항진균성 활성 및 생물방제 효과는, 먼저 *in vitro* 항진균성조사에서 시험대상으로 선정한 식물병원균 11개의 균주중 8개의 시험균주에 대해 활성이 나타났으며, 그 중 사과반점낙엽병균(*Alternaria mali*)에 대해 가장 활성이 높았고, 포도꼭지마름병균(*Phylospora baccae*) 및 사과검무늬썩음병균(*Botryosphaeria dothidea*)에 대해서는 활성을 보인 균주중 제일 낮은 활성을 나타내었다. 또한 식물체를 이용한 *in vivo* 활성조사 경우 벼도열병균(*Pyricularia oryzae*)에서는 기존의 화학농약과 거의 동일한 활성이 인정되었고 오이회색곰팡이병균(*Botrytis cinerea*)을 대상으로 비닐하우스에서 포장시험을 실시한 결과 기존의 화학농약과 비교해 비교적 낮은 약효를 보였으나 상당한 방제력을 나타내었다. 따라서 본 연구에서 선발된 *Bacillus* KL-3 균주가 생산하는 항진균성 항생물질은 고농도로 정제할 수 있는 정제방법만 개선이 된다면 기존 화학농약의 약효에 접근하는 새로운 항진균성 생물농약으로 개발할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 *Bacillus* sp. KL-3이 생산하는 항진균성 항생물질의 규명에 대한 연구가 더욱 진정되어야 할 것으로 사료된다.

감사의 말

본 연구 내용중의 일부는 농림수산기술관리센타의 농

림수산기술개발 연구비로 지원되었으며 연구비지원에 감사드린다.

참고문헌

1. 鄭永浩, 朴英善, 農藥學. p: 12-20 (1990).
2. Mitchell, J. W., Zaumeter, W. J. and Anderson, W. P. Translocation of streptomycin in bean plant and its effect on bacterial blights. *Science*, **115**: 114-115 (1952).
3. Waksman, S. A., Bugie, E. and Reiley, H. C. Bacteriostatic and bacteriocidal properties of antibiotic substances with social reference to plant pathogenic bacteria. *Bull. Torrey Botan. Club*, **71**: 107-121 (1944).
4. 고영희. 방선균의 일주가 생산하는 항진균성 항생물질에 관한 연구. 서울대학교 대학원 박사 논문 (1982).
5. Takeuchi, S., Hirayama, K., Ueda, K., Sasaki, H. and Yonehara, H. BlasticidinS, a new antibiotic. *J. Antibiot., ser. A*, **11**: 1-5 (1958).
6. Isono, K. and Suzuki, S. The polyoxin, pyrimidine nucleoside peptide antibiotics inhibiting fungal cell wall biosynthesis *Heterocycles*. **13**: 333-351 (1979).
7. Yigal, E. and Ilan, C. Possible role of competition for nutrients in biocontrol of *Pythium* damping-off by bacteria. *Phytopathol.* **77**: 190-195 (1987).
8. Mckeen, C. D., Reilly, C. C. and Pusey, P. L. Production and partial characterization of antagonistic to *Monillinia fructicola* from *Bacillus subtilis*, *Phytopathol.* **76**: 136-139 (1986).
9. Poole, C. H. and Schuette, S. A. The column in liquid chromatography. In contemporary practice of chromatography. *Elsevier*. p213-271 (1984).
10. Weinstein, M. J. and Wagman, G. H. Antibiotics. isolation, separation and purification. *Elsevier*. (1978).
11. Yu, J. H. 새로운 산업미생물의 탐색. *Microorg. Ferment.* **11**: 1-17 (1987).
12. Green, A. A. and Hughes, W. L. *Method. Enz.* **1**: 67 (1955).
13. Ou, S. H. Fungus disease-foilage disease. In *rice disease*, 2nd (ed.). p: 109-246 (1984).
14. Kozaka, T. Recent advances in studies on horizontal resistance to blast disease of rice Japan. In Proceedings of a seminar on horizontal resistance to the blast disease of rice. P:101-116(1975)
15. Krieg, N. R. and Holt, J. C. *Bergey's Manual of systematic bacteriology*, Vol. 1, Williams and Wilkins Co., Baltimore (1984).
16. Gerhardt, P. *Manual of methods for general bacteriology*, *Am. Soci. Microviol. Washington*. (1980).
17. Shephand, M. C. Screening for fungicides. *Ann. Rev. Phytopath.* **25**:189-206 (1987).

(Received 30 December 1996)