

식물병원균 *Pseudomonas syringae*에 대한 생물방제균 *Bacillus* sp. BT182-3의 분리 및 특성

김광현 · 김위중 · 이광배*
동의대학교 미생물학과 · 대구보건대학 보건위생과*

Isolation and Characterization of *Bacillus* sp. BT182-3 for Biocontrol Against a Plant Pathogenic *Pseudomonas syringae*

Kwang-Hyeon Kim · Wi-Jong Kim · Kwang-Bae Lee*
Dept. of Microbiology, College of Natural Science, Donggeui University, Pusan 614-714, Korea
Dept. of Health Hygiene, Taegu Health College, Taegu 702-260, Korea*

Abstract

For a microbial control of a plant pathogenic *Pseudomonas syringae*, *Bacillus* sp. strain BT182-3 was isolated. The strain BT182-3 had a growth inhibition against *P. syringae* not only on agar plate but also on cultured broth.

After heat treatment at 40°C and 80°C for 30min, the lytic substance from the strain BT182-3 had about 52% remaining activity and 17% remaining activity, respectively. The optimal pH and temperature of the lytic substance was 6.0 and 28°C, respectively.

Germination ratio of healthy radish seeds was 87% at 25°C for 5 days in 0.8% saline, and that of the radish seeds infected with *P. syringae* was 67%, while that of the radish seeds treated with cultured broth of the strain BT182-3 was 90%. The 5-days healthy radish seedlings were 3.90cm at high and the seedlings infected with *P. syringae* were 3.06cm at high, while the seedlings treated with cultured broth of the strain BT182-3 were 4.30cm at high.

The growth of the radish seedlings infected with *P. syringae* was inhibited after cultivation for 40days on pots, while the growth of the infected radish seedlings with *P. syringae* was recovered at stem length, root length and total weight at the same as the healthy seedlings after treatment of a lytic substance from the strain BT182-3.

I. 서 론

농작물이 경작하는 동안에 건강하게 생육되는 것은 농업 생산면이나 효율적인 면에서 아주 중요한 요인이 된다. 그러나, 동일한 작물을 연작하는

경우에는 토양에 식물병원균이 증가되어 작물이 질병에 걸리는 가능성이 점차 증가되며¹⁾, 이로 인해 생산량이 감소되고 상품의 가치도 크게 손상되는 수가 많다. 따라서 식물에 질병을 일으키는 미생물은 방제되어야 하며 이들 미생물을 방제하기

위해서는 주로 두 가지 방법이 알려져 있다^{2,3)}. 이 중 한 가지는 길항미생물을 이용하는 방법이고⁴⁾, 다른 한 가지는 숙주의 저항성을 증가시키는 방법이다⁵⁾.

일반적으로 토양 내에는 여러 가지의 미생물들이 평형을 유지하고 있으며, 이 평형은 식물병원균의 증식에도 중요한 영향을 미치고 있다. 이들 미생물들 중에서도 식물병원균에 대해 생육억제를 일으키는 길항미생물은 생물학적 방제에 아주 유망한 방법 중에 하나이며, 그 활용성에도 기대가 크다¹⁻⁵⁾. 이들 길항미생물 중에는 항생물질을 분비하여 식물병원균의 생육을 억제시키는 효과를 이용하여, 농업용 항생물질로 개발코자하는 시도는 오래 전부터 시작되었다^{6,7-9)}. 그 중에서도 kasugamycin, polyoxin, validamycin 등은 이미 실용화되어 독성이 강한 일부 유기합성계 농약을 대체하고 식량증산에 이바지해 왔다. 또한, 길항미생물 중에는 Bacteriocin과 같이 세균에 의해서 생산되는 살균성 단백질로서, 같은 종 혹은 근연관계에 있는 종에 대해서 치사성을 가지는 단백질도 있다¹⁰⁾.

지금까지의 유기합성 농약은 적은 양으로도 효과가 좋고 가격이 저렴한 제품의 개발에 주력해 왔으나, 최근 환경문제와 더불어 농작물의 잔류독성문제가 커다란 사회문제로 부각되고 있고, 기존의 많은 유기합성계 농약들이 암유발의 가능성 또는 잔류독성 규제방침에 따라 그 사용량이 점차 제한되어질 전망이다. 일반적으로 식물병원균을 방제하기 위해 사용되는 화학농약이나 항생제계통은 그 사용범위가 상당히 넓은 반면 인체에 위해하고 저항성을 가진 병원균의 출현율을 증가시키고 있는 실정이어서 최근에는 사용속주 범위는 좁지만 이러한 결점을 보완할 수 있는 생물학적 방제에 관한 관심이 고조되고 있다¹¹⁻¹³⁾.

따라서 본 실험의 목적은 생물학적 방제의 일환으로 무에 고사병을 유발하는 *Pseudomonas syringae* KCTC1832¹⁴⁾의 생육을 억제하기 위한 *Bacillus*속 균주를 토양에서 분리하고 그 특성을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 사용균주 및 배지조성

식물병원균인 *Pseudomonas syringae* KCTC 1832는 한국과학기술원 유전자은행에서 구입하고, 배지는 nutrient broth(pH 7.0)가 사용되었다.

2. 길항세균의 선별

P. syringae KCTC1832에 대한 길항세균의 분리는 Kim 등의 방법¹⁵⁾에 따라 토양(1g)을 채취하여 10 ml의 증류수에 희석시킨 후 80 °C에서 10분간 가열하여 포자가 형성되지 않은 균주는 제거시키고, 28 °C에서 3일간 nutrient배지에서 배양하여 포자가 형성되는 *Bacillus*균을 대상으로 본 실험을 행하였으며, 포자형성 유무는 위상차현미경으로 관찰하였다.

2.1 *P. syringae*에 대한 길항세균의 분리

Isaacson과 Kirschbaum이 기술한 중층법¹⁶⁾에 따라 먼저 분리된 *Bacillus*속의 균주들은 nutrient 한천배지에 접종하고 26°C에서 하룻밤(16시간) 배양시켰다. 이후, 별도로 0.7%한천이 함유된 nutrient soft한천배지(5.8 ml)에서 미리 하룻밤 배양된 *P. syringae*균체(200 µl)를 상기의 배양된 *Bacillus*속 nutrient한천배지의 윗면에 균일하게 도포한 후 26°C에서 16시간 배양하였다. 그 결과 colony주위에 일정한 투명대(clear zone)를 형성한 *Bacillus* colony들을 *P. syringae*에 대한 길항세균으로 확정하여 분리하였다.

2.2 *P. syringae*에 대한 용균활성 측정

먼저 고체배지에서 분리된 길항세균의 액체배양액(3 ml)과 대수증식기에 도달한 *P. syringae*균체(0.06-0.1 g)가 함유된 nutrient broth(3 ml)를 혼합하였다. 이들 혼합물은 26°C로 유지하면서 *P. syringae*균체가 용균되는 현상을 A₅₈₀ nm에서 흡광도로 나타내었으며, 이때 *P. syringae*균체에 대한 용균활성은 A₅₈₀ nm의 값이 0.1이 감소될 때 1 unit로 하였다.

3. *P. syringae*에 대한 용균성 물질의 조제

상기 2.1에서 가장 길항효과가 큰 *Bacillus* BT 182-3균주의 배양액을 황산암모늄으로 포화시키고, 형성된 침전물을 10 mM 인산완충액(pH 7.0)으로 투석(4 °C)시킨 후 생성된 침전물은 배양액의 1/10이 되도록 0.8% NaCl이 함유된 1/15M 인산완충액(pH 7.0)에 용해시켜서 *P. syringae*균체에 대한 용균성 물질로 사용하였다.

4. 용균성 물질의 성질

4.1 열에 대한 안정성

조제된 용균성 물질(6 ml)을 각각 40, 60, 및 80 °C에서 30분 동안 열처리를 행하고, 즉시 얼음에 넣어 급냉각시킨 후 열처리로 실험되고 남은 용균성 물질의 잔존활성을 측정하였다.

4.2 용균성 물질의 작용 pH

조제된 용균성 물질(3 ml)에 각각 pH 5.0, 6.0, 7.0이 되도록 초산완충액(pH 5.0; 3 ml)이나 인산완충액(pH 6.0과 7.0; 3 ml)을 넣고 26 °C의 항온기에서 본 용균물질이 *P. syringae*균체를 용균시키는 정도를 흡광도 A580 nm에서 측정하였다.

5. In vivo상에서 길항세균의 효과

5.1 무의 발아에 미치는 길항세균의 효과

샤레에 멸균된 여과지를 깔고 30개/샤레의 무 (*Raphanus sativus*) 씨앗을 넣고 *Bacillus* BT 182-3균주의 용균물질(5 ml)이 함유된 용액에 대상 균주 *P. syringae*의 균체를 혼합하여 여과지에 고무 부어 흡수시킨 후 상온(25°C)에 약 5일간 두면서 무의 발아율 및 생육상태를 조사하였다. 이때 대조구는 *P. syringae*의 균체만을 멸균된 생리식염수에 현탁하여 발아율을 측정하는 그룹과, 멸균된 생리식염수만을 사용하여 발아율을 측정하는 그룹 등 두 구획으로 나누어 실험하였으며, 샤레 내의 수분이 증발하여 씨앗이 건조되는 것을 방지하기 위해 멸균증류수를 2-3일에 1회씩(3 ml) 가하였다.

5.2 무의 생육에 미치는 길항세균의 효과

원형 pot(직경 18.0 cm, 높이 12.0 cm)에 멸균된 부식토 300 g을 넣고, 4-5 cm정도 자란 무의 유식물을 각 pot당 10포기씩 심었다. 여기에 1) 병원균 *P. syringae*의 균체(9.6×10^8 cells/ml)를 혼합하여 무의 유식물에 감염시키고 10일 간격으로 용균성 물질(단백질 농도: 1mg/ml) 30 ml씩 4회 투여하여, 3일에 1번씩 수도물을 공급하면서 상온(25°C)에서 40일간 생육시키고 식물의 생육상태(성장기, 무게)를 측정하였다. 이때 대조구로는 2) 병원균 *P. syringae*의 균체(1.4×10^8 /ml)만을 멸균된 생리식염수에 현탁시켜서 무의 유식물에 감염시키고 10일 간격으로 병원균의 균체를 4회 투여하여 무의 생육억제에 대한 결과를 조사하였으며, 또한 3) 무처리로 무의 유식물을 40일 동안 생육시킨 건강한 무의 생육을 조사하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 고체배지에서 *Bacillus* sp. BT182-3의 *P. syringae*에 대한 생육저해

토양에서 분리된 *Bacillus* 중에서도 *Bacillus* sp. BT182-3가 0.7%의 soft agar배지상에서 병원균인 *P. syringae* KCTC1832에 대해 가장 크게 생육저지대를 형성하였다(Fig. 1.). 이는 *Bacillus* sp. BT

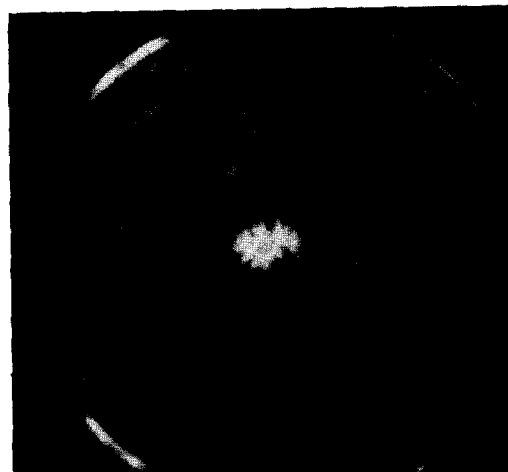


Fig. 1. Antagonism of *Bacillus* sp. BT182-3 against *P. syringae* KCTC1832.

182-3이 *P. syringae* KCTC1832에 대한 항생물질을 생성하기 때문인지, siderophore작용에 의한 것인지, 또는 용균효소를 분비하는지는 알 수 없지만 본 실험에서 BT182-3균주가 식물병원균 *P. syringae* KCTC1832에 대해 길항작용을 하는 것은 확인되었다.

2. *P. syringae* 에 대한 용균활성 측정

P. syringae KCTC1832에 대한 *Bacillus* sp. BT182-3균주의 용균활성이 용액상태에서 검토되었다. 그 결과 Table 1.에서 보는바와 같이 BT182-3균주의 배양 여액은 작용 18시간 이후부터 *P. syringae* KCTC1832의 균체에 대해 현저한 용균 현상을 나타내었다. 또한 염석투석으로 10배 농축된 용액 역시 작용 18시간 이후부터 *P. syringae* KCTC1832에 대해 용균현상이 나타났으나, 10배 농축하였지만 용균활성은 24시간 반응에서 약 2.8 배 정도만이 증가되었다.

또한, 본 BT182-3균이 생산하는 용균성 물질은 투석막(MW7,000)을 통과하지 못한 것으로 생각되며, 대수증식기의 균체를 사용한 실험에서 용균현상이 나타나는 특징이 있다.

3. 용균성 물질의 성질

3.1 용균성 물질의 작용온도

본 용균성 물질의 최적 작용온도를 알아보기 위해 pH7.0에서 각 온도별로 *P. syringae* 균을 적용시켰다. 그 결과 Table 2.에서 보는 바와 같이 28℃ 이상에서 반응 6시간 이후부터 용균작용이 Table 1. Lytic activity of the strain BT182-3 against *P. syringae* KCTC1832.

Reaction Time (hr)	Lytic activity (Unit)*	
	Filtration	Dialysis
0	0.0	0.0
6	0.0	0.0
18	0.9	2.4
24	1.0	2.8

*The lytic activity of *Bacillus* sp. BT182-3 against *P. syringae* KCTC1832 was determined at 28℃.

Table 2. Optimal temperature of lytic substance from the strain BT182-3

Reaction Time (hr)	Lytic activity (Unit)*			
	20℃	28℃	40℃	50℃
0	0.0	0.0	0.0	0.0
6	0.0	0.0	0.0	0.0
18	0.0	2.2	1.2	0.8
24	0.0	2.8	1.8	1.4

*The lytic activity was determined at pH 7.0.

나타났으나, 이중에서도 특히 28℃에서 용균작용이 가장 강하게 나타났으며, 50℃에서 용균활성은 28℃에서 용균활성의 약 1/2로 감소되었다. 따라서 본 *Bacillus*속 BT182-3가 생산하는 용균성 물질은 토양에 직접 투여하여도 열에 비교적 안정하여 어느 정도 효과가 있으리라고 사료되지만, 식물병원균인 *P. syringae* KCTC1832를 방제하기 위해서는 본 *Bacillus*속 BT182-3균주로부터 용균성 물질의 제제화를 위해서는 별도로 연구가 더 진행되어야 할 것으로 생각된다.

3.2 용균성 물질의 작용 pH

용균성 물질의 작용최적 pH를 검토하기 위해 Table 2.에서 용균온도로 나타난 28℃조건에서 각 pH별로 용균활성을 조사하였다. 그 결과 Table 3.에서 보는 바와 같이 pH 6.0에서 용균성 물질의 활성이 가장 강하게 나타났으며, 이것은 Table 2.의 실험조건인 pH 7.0의 조건에 비해 약 10 unit가 더 강한 것이다.

Table 3. Optimal pH of lytic substance from the strain BT182-3

Reaction Time (hr)	Lytic activity (Unit)*		
	pH 5.0	pH 6.0	pH 7.0
0	0.0	0.0	0.0
6	0.0	0.0	0.0
18	1.7	2.9	2.0
24	2.0	4.0	3.0

*The lytic activity was determined at 28℃.

Table 4. Heat stability of lytic substance from the strain BT182-3

Reaction Time (hr)	Remaining Lytic Activity (%) [*]			
	control	40°C	60°C	80°C
0	0	0	0	0
6	0	0	0	0
18	17.5	0	0	0
24	65.5	34.5	17.2	0
30	100	51.7	34.5	17.2

^{*}The lytic substance was heated for 30min at 40°C, 60°C and 80°C, respectively.

3.3 열에 대한 안정성

용균성 물질의 열에 대한 안정성을 조사한 결과는 Table 4와 같다. 즉, 대조구로서 열처리를 행하지 않고 식물병원균인 *P. syringae* KCTC 1832를 30시간 동안 용균시킨 활성도의 값을 100 %로 하고 각 온도에서 열처리시킨 후 잔존활성을 산출한 결과, 40°C에서는 약 50%가, 60°C에서는 약 35%가, 80°C에서는 약 17%의 활성이 남아 있었다.

4. In vivo상에서 무의 생육에 미치는 영향

4.1 무의 발아에 미치는 길항세균의 효과

생리식염수가 함유된 여과지를 샤페에 넣고 무 종자를 발아시켰다. 그 결과 Table 5와 Fig. 2에서 보는바와 같이 발아 실험이 시작된 날로부터 5일이 경과된 후에 발아율과 생육(길이 및 무게)에

서 뚜렷한 차이를 나타내었다. 즉, 식물병원균인 *P. syringae*가 투여된 종자는 생육이 대조구에 비해 평균 키가 약 1.0cm정도 작았으나, BT182-3이 투여된 처리구에서는 대조구에 비해 평균 약 0.4cm가 더 컸다. 이는 BT182-3균주의 길항작용이 무의 발아촉진은 물론 성장에도 다소 영향을 미쳤으리라고 생각된다.

4.2 Pot시험에서 길항세균이 무의 생장에 미치는 영향

식물병원균인 *P. syringae*로 감염시킨 무의 유 식물에 대한 길항세균의 영향을 조사하였다. Table 6. 및 Fig. 3.에서 보는바와 같이 길항세균인 BT182-3균주의 균체나 그 대사물을 투여시킨

Table 5. Growth and germination ratio of radish seeds in 0.8% saline

Sample	Growth Germination Ratio(%)	Growth length(cm)	Total Weight(g)
Control	87%	3.90	1.23
1	67%	3.06	1.02
2	90%	4.30	1.57

Radish seeds were incubated at 25°C for 5 days for germination. The 30 radish seeds were introduced into a petri dish which contained a filterpaper wetted 0.8% saline. Symbols: Control; Healthy seeds (1.32g/30seeds), 1; Seeds infected with *P. syringae* (1.38g/30seeds), 2; Seeds treated with cultured broth of strain BT182-3 after infection with *P. syringae*(1.35g/30seeds).

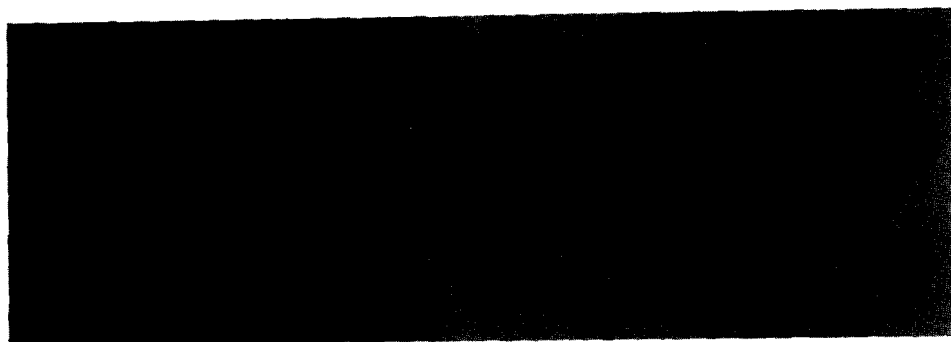


Fig. 2. The 5 days-grown radish seedlings after germination. Symbols; 1: Seedlings treated with cultured broth of strain BT182-3 after infection with *P. syringae*, 2: Healthy seedlings, 3: Seedlings infected with *P. syringae*

Table 6. Efficacy of the strain BT182-3 against *P. syringae* on growth of radish plants

Sample	Growth	Stem length (cm)	Root length (cm)	Total weight (g)
Control		19.2	10.6	50.2
1		18.0	10.1	41.0
2		19.9	11.9	53.3
3		20.3	12.8	62.5

P. syringae & the strain BT182-3 were treated with 4 times at 10days interval. The experiment were performed on pot during 40days(from 26, March to 6, May) in 1998. Symbols: 1; Infected with *P. syringae*, 2; treated with cells of the strain BT182-3 after infection of *P. syringae*, 3; treated with cultured broth of the strain BT182-3 after infection with *P. syringae*.



Fig. 3. Growth of radish plants on pot after treatment of the strain BT182-3 against *P. syringae*. Symbols; 1: Healthy radish plants, 2: Radish plants infected with *P. syringae*, 3: Radish plants treated with cultured broth of strain BT182-3 after infection with *P. syringae*.

구에서는 줄기의 길이, 뿌리의 길이 및 전체 무게 모두가 감염시킨 무의 유식물에 비해 생장이 회복되었다. 또한 Fig. 3에서 보는바와 같이 pot실험에서도 *P. syringae*으로 감염시킨 구가 가장 생장이 나았으며, 본 길항세균이 처리된 구는 식물병원균인 *P. syringae*에 의한 감염이 회복되었다. 따라서 본 BT182-3균주는 실제로 field에서도 *P. syringae*가 감염된 무의 생육을 정상적으로 회복시켜 *P. syringae*에 의한 피해가 없이 미생물농약으로 개발될 가능성이 있을 것이라고 생각된다.

IV. 결 론

식물병원균인 *Pseudomonas syringae* KCTC

1832를 미생물학적으로 방제하기 위해 *Bacillus*속의 BT182-3균주가 분리 선별 되었다.

1. BT182-3균주는 *P. syringae*에 대해 고체한천배지에서 colony주위에 투명대를 형성하여 생육을 억제하였다.
2. BT182-3균주의 용균성 물질은 60℃에서 30분간 열처리를 행하였어도 그 활성은 52%가 남아있었으며, 80℃에서 30분간 열처리에서도 17%의 활성이 남아 있었다.
3. 용균성 물질의 반응최적온도와 최적 pH는 각각 28℃과 6.0였다.
4. 식물병원균 *P. syringae*가 감염된 무의 종자 발아는 대조구에 비해 발아율이 극히 불량하

였으나, 용균성 물질을 첨가한 그룹에서는 발아율이 회복되었다. 또한 화분에 무를 심어서 40일간 생육되는 과정 중에 그 생장을 조사한 결과 *P. syringae*에 감염된 무에 비해 용균성 물질을 첨가한 무는 건강한 무처럼 생장이 왕성하였다.

감사의 글

이 논문은 1998년 동의대학교 기초과학연구소 연구비로 수행되었음.

참 고 문 헌

1. Baker, R.: Mechanisms of biological control of soil-borne plant pathogens, *Annu. Rev. Phytopathol.* 6, 263-294, 1968.
2. Cook, R. J.: Biological control of plant pathogens: theory to application, *Phytopathol.* 75, 25-29, 1985.
3. Henis, Y., and I. Chet: Microbial control of plant pathogens. *Adv. Appl. Microbiol.* 19, 85-111, 1975.
4. Kim, Y. S., H. E. Lim, and S. D. Kim: *Bacillus subtilis* YB-70 as a biocontrol agent of *Fusarium solani* causing plant root-rot. *J. Microbiol. Biotech.*, 4, 68-74, 1994.
5. Barker, R.: Biological control of plant pathogens: definitions, In *Biological control in agricultural IPM systems*. Edit by M. A. Hoy and D. C. Herzog, Academic Press, Inc., New York. 25-39, 1985.
6. Kim, S. U., J. W. Lee, S. H. Lee, and S. H. Bok. Identification of bacteria having antifungal activity isolated from soils and its biological activity. *Kor. J. Appl. Biotechnol.* 19, 337-342, 1991.
7. He, H., L., A. Silo-Suh, B. J. Lethbridge, S. J. Raffel, J. Clardy, and J. Handelsman. Zwittermicin A, an antifungal and plant protection agent against *Bacillus cereus*. *Tetrahedron Lett.* 35, 2499-2502, 1994.
8. Hoefte, H., and H. R. Whitely, Suppression of *Pythium ultimum*-induced damping-off cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, pyoluteorin. *Phytopathol.* 70, 712-715, 1980.
9. Vanneste, J. L., J. Yu, and S. V. Beer. Role of antibiotic production by *Erwinia herbicola* EH252 in biological control of *Erwinia amylovora*. *J. Bacteriol.*, 174, 2785-2796, 1992.
10. Kim, K. C., C. S. Yuk, and D. H. Do, Molecular cloning of bacteriocin gene and biological control of plant pathogen. *J. Microbiol. Biotech.* 4, 68-74, 1990.
11. Kim, S. S., G. J. Joo, J. Y. Uhm, Y. J. Kim, and I. K. Rhee. Antifungal activity of *Bacillus* sp SS279 and biocontrol of apple white rot fungus, *Botryosphaeria dothidea*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 5, 527-536, 1997.
12. Choi, J. K., Y. S. Kim, E. T. Lee, and S. D. Kim, Urease gene transfer of antagonistic *Bacillus subtilis* YB-70 and increased antagonistic effect, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25, 30-36, 1997.
13. Kim, Y. S., J. K. Son, D. C. Moon, and S. D. Kim, Isolation and structure determination of antifungal antibiotics from *Bacillus subtilis* YB-70, a powerful biocontrol agent. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25, 62-67, 1997.
14. Preston, G., H. C. Huang, S. Y. He, and A. Collmer. The HrpZ proteins of *Pseudomonas syringae* pvs. *syringae*, *glycinea*, and tomato are encoded by an operon containing *Yersinia ysc* homologs and elicit the hypersensitive response in tomato but not soybean. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8, 717-732, 1995.
15. Kim, K. H., K. B. Lee, and D. M. Shin.

1998. Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strain AF6 producing an antifungal substance and a mosquitocidal delta-endotoxin simultaneously. *Kor. J. Sanitation*. 13, 40-46, 1998.
16. Isaacson, D. M., and J. Kirschbaum : Assays of antimicrobial substance. *In* manual of industrial microbiology and biotechnology. Demain, A. L., and N. A. Solomon (edit). American Society for Microbiology. Washington D.C., 410-435, 1986.