

고추 근권에서 분리한 *Bacillus subtilis* J-24의 검은
곰팡이병원균 *Alternaria alternata*에 대한 길항력 및 고추의
초기 생육에 미치는 영향

주길재 · 김학윤 · 허상선 · 우철주 · 이인구*

경북대학교 농업과학기술연구소 · 농화학과*

Seedling Growth of Red Pepper and Antagonism on *Alternaria alternata* Causing Black Rot by *Bacillus subtilis* J-24 isolated from Red Pepper Rhizosphere

Gil-Jae JOO · Hak-Yoon KIM · Sang-Sun HUR · Churl-Joo WOO · In-Koo RHEE*

Institute of Agricultural Science & Technology, Kyungpook National University

* Dept. of Agricultural Chemistry, Kyungpook National University

Abstract

Thirty bacteria were isolated from the red pepper rhizosphere. The isolates were screened for antagonism to *Alternaria alteranta* causing red pepper black rot. Antagonistic bacterium No. J-24 was selected among the isolated bacteria and was identified as *Bacillus subtilis* based on morphological and physiological characterisitics and MIDI system. *B. subtilis* J-24 showed antifungal activities against *A. alternata*(inhibition percentage, 99%), *Botrytis cinerea*, *Phytophthora capsici*, *Pythium ultimum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Stemphylium botryosum*. The growth of red pepper seedling was promoted as compared to control when the microbial inoculants was mixed in bed soil. In the mixed microbial inoculants bed soil, the leaf area of red pepper was increased of 15 percent, the hypocotyl weight 12 percent, the root length 12 percent, total dry weight 13 percent as compared to those grown in the genenal bed soil

Key words : antagonism, red pepper, *Alternaria alternata*, *Bacillus subtilis*

서 론

*Alternaria*속 진균은 농업환경에서 가장 많이

발견되는 곰팡이 중의 하나이며, 사물기생균으로 저온에서 자랄 수 있기 때문에 과일이나 야채의 수확후 저장에도 문제가 되는 병원균으로

잘 알려져 있다^{1,2)}. 또한 *Alternaria*속 진균은 농산물을 오염시키는 tenuazonic 같은 mycotoxin^{3,4)}을 생산하며, 다양한 종자나 식물에 기생하여 서식하기 때문에 각종 병해를 유발한다^{2,5,6)}. 특히 사과나무 점무늬나엽병(*Alternaria mali*), 감귤 후부병(*Alternaria citri*), 토마토 stem canker(*Alternaria alternata*), 감자 겹무늬병(*Alternaria solani*), 무 겹은무늬병(*Alternaria japonica*), 오이 잎마름병(*Alternaria cucumerina*), 팽기 겹은무늬병(*Alternaria alternata*) 등은 대표적인 *Alternaria*속 진균병이다. 최근 한국 산 고추와 함께 종자에서도 겹은 곰팡이병을 유발하는 *Alternaria*속 균주를 분리하였으며, 그들 중에서 고추와 함께 모두에서 우점종으로 나타난 것은 *Alternaria alteranta*로 보고되었다⁷⁾.

식물의 뿌리 분비물은 각종 아미노산과 당이 주이며, 기타 유기산, 비타민 등이 포함되고, 뿌리 이외의 부분에서도 분비된다. 그 성분이나 농도는 곳에 따라 또는 작물의 품종에 따라서 다르다. 이러한 분비물은 식물의 근권에서 기생균의 내구체를 특이하게 유도발아시키는 경향이 있다. 파속(*Allium*)의 식물들이 분비하는 수용성 alkyl cysteine sulphoxides는 흙 속에 확산되어 토양 미생물에 의해 휘발성 alkyl sulphides로 변환되며, 이것이 과 후부균핵 병원균인 *Sclerotium* sp. 및 *Alternaria* sp.의 균핵에 강한 발아유도 작용을 하므로서 파속 식물의 근부환경에 우점하게 되어 병이 발생된다. 이러한 후부균핵병원균인 *Sclerotium* sp. 및 *Alternaria* sp.는 여러 가지 작물에서도 비슷한 양상을 나타낸다고 한다⁹⁾. 그러므로 대상식물의 뿌리 주변 환경에 이미 적용하고 서식하는 균핵미생물을 분리하여 그들 중에서 병원성 미생물에 대한 길항력이 있는 균주를 선별하고 이를 이용한다면 대상식물의 뿌리 주변에서 발생되는 각종 병원균의 발아를 억제시킬 수 있을 것이다. 각종 식물은 재배기간 동안에 병원균이 뿌리부분

과 지상부에 전염될 뿐만 아니라 토양환경에 이미 병원균이 다량 서식하고 있을 경우 식물체는 병해를 입을 수가 많다. 특히 작물이 건강하지 않으면 저항성이 약해져서 뿌리로부터 병원균이 쉽게 침입할 수 있다. 그러므로 식물 뿌리 부근에 서식하는 병원균의 생육을 길항미생물로 억제시켜 각종 병해를 방제할 수 있고 재배환경을 개선하여 작물을 보호할 수 있을 것이다.

따라서 본 연구는 고추, 참깨 및 팽기 등의 *A. alternata*에 의한 병해를 생물학적으로 방제하기 위한 실험의 일환으로 *A. alternata*에 길항하는 미생물을 분리 동정하여 그 길항균의 특성을 조사하였으며 또한 고추의 각종 병원성 진균에 대한 길항력을 조사하였고 고추 균권에 이러한 길항미생물을 처리함으로써 식물생장활력증대의 부가적인 효과를 조사하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 공시균주

본 실험에 사용한 고추의 병원균인 겹은곰팡이병균(*Alternaria alteranta*), 짓빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*), 역병균(*Phytophthora capsici*), 절록병균(*Pythium ultimum*), 탄저병균(*Colletotrichum gloeosporioides*), 균핵병균(*Sclerotinia sclerotiorum*), 갈색무늬병균(*Cercospora capsici*), 그을음병균(*Cladosporium herbarum*), 시들음병균(*Fusarium oxysporum*), 겹무늬병균(*Stemphylium botryosum*) 등은 농촌진흥청 작물보호부와 한국과학기술원 유전자은행에서 분양받아 potato dextrose agar (PDA) 사면배지에 28°C에서 배양하여 실온에서 보관하며 본 실험에 사용하였다.

2. 고추 균권미생물의 분리

고추 뿌리 및 주변에 서식하는 균권미생물을 분리하기 위하여 고추 성장기의 뿌리 및 월동기 고추의 뿌리를 채취하여 살균 증류수로 씻어서 작게 조각낸 다음 50mM 인산완충액(pH 7.0)을 넣고 homogenizer로 마쇄하여 원심분리한 후 그 상등액을 균원시료로 사용하였다. 상기 균원시료액 1mL를 0.85% NaCl 용액으로 3단 회석한 뒤 NA 배지와 LBA 배지, PDA 배지, TSA 배지에 각각 100 μ L씩 도말하여 30°C로 3일간 배양하여 각각의 colony의 형태 및 색깔 등으로 분류하여 각기 다른 colony를 확보하고 현미경으로 형태상 순수성을 확인한 후 길항력 조사로 위한 균권미생물 시험균주로 사용하였다.

3. 병원성 진균에 길항하는 세균의 선발

*A. alteranta*에 길항하는 미생물의 선발은 *A. alteranta*와 분리 미생물을 대치배양하여 억제환(inhibition zone)을 생성하는 균주로 하였다. PDA 배지에서 자란 *A. alteranta*를 가로 x 세로 0.5cm 되게 절단하여 PDA 배지의 1/3 거리에 접종하고 반대편에는 길항력 조사를 위한 균주를 가장자리 1/3 거리에 접종하여 28°C에서 7일 이상 대치배양하여 생육억제환의 크게 생성하는 것을 길항균으로 판정하고 선별하였다.

4. 길항세균의 동정

분리된 길항미생물의 동정은 MIDI system (Microbial Co., Newark, Del.)을 이용하거나 일반 동정법을 이용하였다. 분리된 균주를 TSA배지에 도말하여 30°C에서 24시간 배양하여 loop로 10mg정도를 떠서 test tube 밑바닥에 옮긴 후, 1번 시약(sodium hydroxide 45g, methanol 15mL, dH₂O 150mL)을 각각 1mL씩 첨가하고 잘 혼합하여 100°C에서 5분간 반응시키고 다시 잘 섞

은 후, 100°C에서 25분간 반응시키고 2번 시약(6N HCl 325mL, methanol 275mL)을 2mL 넣고 80°C에서 10분간 반응 시켰다. 여기에 3번 시약(haxane 200mL, t-butyl methyl ether 200mL)을 1.25mL 넣고 10분간 진탕한 후 아래층 부분을 Pasteur pipet으로 제거하고 남은 위층에 4번 시약(sodium hydroxide 10.8g, dH₂O 900mL)을 3mL 첨가하여 5분간 부드럽게 섞은 후 포화 NaCl을 몇 방울 넣고 두 층이 분리되면 상정액을 injection sample로 이용하였다. 또한 일반적 세균의 동정을 위하여 분리균을 각종 배지에 접종하여 30~37°C에서 18시간 이상 배양하고 그 균락의 형태, 색깔 및 운동성을 현미경으로 관찰한 후 각각의 colony를 슬라이드에 도말하여 고정한 후 그람염색하였으며, 기타 형태학적, 배양학적, 생리·생화학적 특성은 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology의 방법⁸⁾에 준하여 실험한 후 분리균주를 동정하였다.

5. 고추 병원성 진균의 길항력 조사

고추병원균은 *Alternaria alteranta*, *Botrytis cinerea*, *Phytophthora capsici*, *Pythium ultimum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Cercospora capsici*, *Cladosporium herbarium*, *Fusarium oxysporum*, *Stemphylium botryosum* 등을 사용하였으며, 본 실험에서 길항력 조사는 균주간 거리에 억제환 생성 거리를 백분율(%)로 표시하였는데 이는 PDA 배지에 길항균과 병원성 진균(두 균주간 거리, 5 cm)을 접종하고 28°C, 7일 배양후 생성된 억제환의 크기를 길이 계산하여 나타내었다. 즉, 억제환의 길이(x cm) \div 두 균주간 길이(5 cm) \times 100(%)이다.

6. 고추 재배 및 생장 활력조사

고추의 공시품종은 '금탑'을 사용하였고, 상

토는 일반 시판 상토(홍농 바이오 상토)를 사용하여 미생물제제를 넣은 구와 넣지 않은 구로 나누어 3반복 실험하였다. 1999년 4월 20일, 16구 묘종상자에 바이오 상토를 충전하고 화종한 후 7주간 육묘하였다. 고추 유묘의 생육조사는 모가 출현한 42일 후 묘의 엽면적, 줄기길이, 뿌리길이, 전체무게 등을 조사하였다. 미생물제제는 분리된 길항 미생물(IL)을 담체(1kg, 코코피트, 펠라이트, 활성탄, 피트모스를 동량 혼합)와 혼합하여 제조하였다. 제조한 미생물제제는 상토 16kg 당 200g씩 혼합하여 사용하였다.

결과 및 고찰

1. 고추 뿌리에 서식하는 균권미생물의 분리

고추의 뿌리에 서식하고 있는 균권미생물은 마쇄한 고추 뿌리의 원심 상등액을 균원시료로 하여 NA 배지, LB 배지, PDA 배지 및 TSA 배지에 30°C로 3일간 배양하여 생성된 colony를 순수분리하였다. 순수분리한 각각의 colony를 상기배지에서 재분리하여 각각의 colony의 형태 및 색깔 등으로 분류하여 서로 다른 양상의 40여 colony를 확보하고 현미경으로 형태 및 배양 특성상 상이한 균주를 확인한 후 최종 30 균주를 분리하였다.

2. 균권미생물을 이용한 *A. alteranta*에 길항하는 미생물의 분리

분리한 고추 균권미생물 30종을 대상으로 *Alternaria alteranta*에 대치배양하여 길항하는 미생물을 분리한 결과, 30여종 분리주 중에서 No. J-24 균주가 가장 길항력이 우수하였다(그림 1). 분리주 No. J-24 이외에도 대부분 균주들이 약간의 길항력을 나타내었으나 분리주 No. J-24

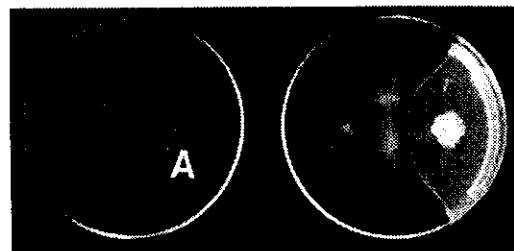


Fig. 1. Antagonistic effects of the isolated strain No. J-24 on the growth of *A. alternanta* as indicated by the inhibition zones formed around a colony.
A: *Alternaria alternata*.
B: the isolated strain No. J-24

균주가 *A. alternanta*에 생육억제 능력이 우수하였으며 억제환 경계선이 가장 뚜렷하여 길항균 공시균주로 사용하였다.

3. 길항균 No. J-24의 동정 및 특성

*A. alternanta*에 길항하는 길항균 No. J-24을 MIDI system으로 동정한 결과, *Bacillus subtilis* (similarity; 0.768)로 동정되었다. 또한 형태학적, 배양학적, 생리·생화학적 특성을 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology의 방법에 준하여 실험한 결과 Table 1과 같이 세포의 크기는 2.4 x 0.7 μm 이며 그람 양성의 간균으로 판정되었다. Catalase를 생성하며, citrate를 이용하며, gelatin을 액화시키며, 질산염 환원반응에서 양성으로 나타났으며, glucose, arabinose, xylose, mannitol 모두에서 산을 생성하였고, 탄수화물로는 inositol과 rhamnose를 이용하지 못하였으며 starch를 가수분해하였다. 이러한 특성으로 보아 거의 *Bacillus subtilis*이거나 유사한 균주로 동정되어 *Bacillus subtilis* J-24(그림 2)로 명명하였다.

*Bacillus subtilis*는 각종 진균의 길항미생물로 너무나 잘 알려져 있으며, *Alternaria*속 균주로서는 *Alternaria solani*, *Alternaria mali*, *Alternaria kaki*

Table 1. Characteristics of the isolated strains No. J-24.

Characteristics	Isolated strain No. J-24
Morphological charact.	
Form	Rod
Size	0.7-2.4 μm
Gram stain	+
Physiological charact.	
Catalase	+
Citrate utilization	+
Gelatin liquefaction	+
Nitrate reduction	+
Acid from	
Glucose	+
Arabinose	+
Xylose	+
Mannitol	+
Carbon assimilation of	
Glycerol	+
Inositol	±
Starch	+
Mannose	+
Fructose	+
Glucose	+
Lactose	+
Maltose	+
Sucrose	+
Arabinose	+
Rhamnose	-
Hydrolysis of	
Starch	+

+ : positive, - : negative, ± : intermediate

Table 2. Antagonistic effects of *B. subtilis* J-24 on the red pepper pathogens.

Phytopathogenic fungus	%, inhibition of mycelial growth ^a
<i>Alternaria alteranta</i> (검은 곰팡이병)	99
<i>Botrytis cinerea</i> (잿빛곰팡이병)	99
<i>Phytophthora capsici</i> (역병)	68
<i>Pythium ultimum</i> (질록병)	98
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (탄저병)	99
<i>Sclerotinia acerotiorum</i> (군핵병)	67
<i>Cercospora capsici</i> (갈색무늬병)	23
<i>Cladosporium herbarum</i> (그을음병)	85
<i>Fusarium oxysporum</i> (시들음병)	50
<i>Stemphylium botryosum</i> (겹무늬병)	94

^a Inhibition diameter was obtained from clear zone method with 3 replications. Each phytopathogenic fungi and *B. subtilis* J-24 were inoculated on PDA medium, the length between two strains were 5 cm. Observations were made 7 days after inoculation on PDA at 28°C. Inhibition percentage(%) = length of clear zone(χ cm) ÷ 5 cm x 100.

등에 대해서는 많이 알려져 있다^{9,10,11,12,13}. 그러나 *A. alteranta*에 대한 *B. subtilis*의 길항작용에 관한 연구는 아직 보고된 바 없는 실정이다.

4. *B. subtilis* J-24에 의한 고추 병원성 진균의 길항력 조사

길항미생물 *B. subtilis* J-24에 의한 각종 고추 병원성 진균의 길항력을 조사한 결과 Table 2와 같이 검은 곰팡이병원균(*Alternaria alternata*)에 대해서는 생육저지 효과가 99%로 나타났으며, 짧빛곰팡이 병원균(*Botrytis cinerea*)은 99%, 역병원균(*Phytophthora capsici*)은 68%, 질록병원균(*Pythium ultimum*)은 98%, 탄저병원균(*Colletotrichum gloeosporioides*)은 99%, 군핵병원균(*Sclerotinia acerotiorum*)은 67%, 갈색무늬병원균(*Cercospora*

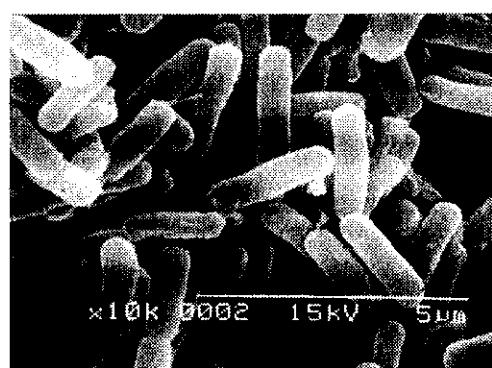


Fig. 2. Scanning electron microscopic photogram (x 10,000) of the *Bacillus subtilis* J-24.

capsici)은 23%, 그을음병원균(*Cladosporium herbarum*)은 85%, 시들음병원균(*Fusarium oxysporum*)은 50%, 겹무늬병원균(*Stemphylium botryosum*)은 94%의 생육저지효과를 나타내었다.

지금까지 *Alternaria* sp.에 대한 항진균 활성을 가지는 균주들을 살펴보면, Kang 등(1996)은 살충성 진균인 *Metarhizium anisopliae*가 겹동근 무늬병을 유발하는 *Alternaria solani*에 강한 항진균 활성을 나타내었다고 보고하였으며, 김 등(1995)은 *Fusarium graminearum*^{a)} *A. solani*에, *Erwinia* 속 세균으로 *A. parax*^{b)}, *Promicromonospora* sp. KH-28에 의한 *A. kikii*^{c)}의 항진균 활성조사 등이 있으나 *A. alternata*에 대한 길항균에 대해서는 알려져 있지않고 천연물 중에서 계피가 가장 효과가 인정됨을 보고^{d)} 한 경우는 있다.

5. *B. subtilis* J-24에 의한 고추 유묘의 생장 활력 조사

고추 유묘의 생장활력을 조사하기 위하여 일반 시판상토에 미생물제제를 넣은 구간과 넣지 않은 구간으로 나누어 3반복 실험한 결과, 그럼 3에서와 같이 미생물제제가 첨가된 상토가 일반 상토에서 보다 고추 유묘의 생장활력이 촉진되었다. Table 3에서와 같이 일반상토에서 7주 가량 재배한 고추 유묘의 개체당 엽면적은 평균

Table 3. Growth promoting effects of the red pepper by the mixed bed soil with the microbial inoculant.

	Leaf area (cm ² , plant ⁻¹)	Stem length (cm, plant ⁻¹)	Root length (cm, plant ⁻¹)	Total weight (g, plant ⁻¹) ^{e)}
Treated ^{f)}	35	15	15	0.28
Untreated check ^{g)}	24	12	12	0.21

^{a)} the mixed bed soil with the microbial inoculant, ^{b)} the general bed soil, ^{c)} dry weight of red pepper

24cm², 줄기 길이가 12cm, 뿌리 길이가 12cm로 나타난 반면에 미생물제제가 첨가된 상토에서의 엽면적은 평균 35cm²가, 줄기 길이가 15cm, 뿌리 길이가 15cm로 나타나 개체당 엽면적이 약 15%, 줄기 길이가 약 12%, 뿌리 길이가 약 12% 증가하였고 전체 건물량이 0.21g과 0.28g으로 약 13% 증가하여 고추유묘의 생장활력이 증가됨을 관찰하였다.

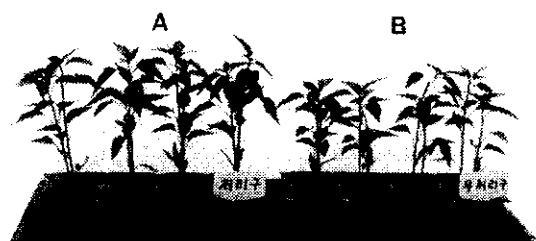


Fig. 3. Seedling growth of the red pepper as affected by the mixed bed soil with the microbial inoculant.
A: the mixed bed soil with the microbial inoculant, B: general bed soil

요약

고추의 뿌리에 서식하고 있는 균권미생물을 30여종 분리하여 고추 검은 곰팡이병원균 *A. alteranta*에 길항하는 미생물을 분리한 결과 분리주 No. J-24 균주가 가장 길항력이 우수하였으며 *Bacillus subtilis*로 동정되었다. *B. subtilis* J-24는 검은곰팡이병균(*Alternaria alternata*)에 대해서는 생육저지 효과가 99%로 나타났으며, 그 외 갯빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*), 역병균(*Phytophthora capsici*), 잘록병균(*Pythium ultimum*), 탄저병균(*Colletotrichum gloeosporioides*), 겹무늬병균(*Stemphylium botryosum*)에도 생육저지효과를 강하게 나타내었다. 고추 유묘의 생장활력은 미생물제제가 첨가된 상토가 일반 상토 보다

엽면적이 15%, 출기길이가 12%, 뿌리길이가 12% 증가하였고 전체 건물중이 약 13% 증가하여 고추유묘의 생장활력이 증가되었다.

참 고 문 헌

1. Harwig, J., P. M. Scott, D. R. Stoltz, and B. J. Blanchfield. 1979. Toxins of molds from decaying tomato fruit. *Appl. and Environ. Microbiol.* 38:267-274
2. Stinson, E. E., S. F. Osman, E. G. Heisler, J. Siciliano, and D. D. Bills. 1981. Mycotoxin production in whole tomatoes, apples, oranges, and lemons. *J. Agric. Food Chem.* 29:790-792
3. Griffin, G. F., F. S. Chu. 1983. Toxicity of the *Alternaria* metabolites alternariol, alternariol methyl ether, alternarene, and tenuazonic acid in the chicken embryo assay. *Appl. and Environ. Microbiol.* 46:1420-1422
4. Pero, R. W., H. Posner, M. Blois, D. Harvan and J. W. Spalding. 1973. Toxicity of metabolites produced by the *Alternaria*. *Environ. Health Persp.* 6:87-94
5. Logrieco, A., A. Bottalico, A. Visconti, and M. Vurro. 1988. Natural occurrence of *Alternaria*-mycotoxins in some plant products. *Microbiol. Alim. Nutr.* 6:13-17
6. Schroeder, H. W. and R. J. Cole. 1977. Nutral occurrence of alternariol in discolored pecans. *J. Agric. Food Chem.* 25:204-206
7. Lee, H. B., S. H. Yu. 1995. Incidence of *Alternaria* species in red pepper and sesame from Korea and their ability to produce mycotoxins. *Korean J. Plant Pathol.* 11:1-8
8. Sneath, P. H., N. S. Mair, M. E. Sharpe and J. G. Holt. 1984. *Bergey's Manual of Systemtic bacteriology*, Vol. 2 pp 1104-1207., Williams and Wilkins Press, New York.
9. Kang, S. K., Y. G. Park, D. G. Lee, and Y. H. Kim. 1996. Antifungal activities of *Metarhizium anisopliae* against *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, and *Alternaria solani*. *Korean J. Mycol.* 24:49-55
10. Kim, H. K., S. D. Kim. 1999. Selection and identification of *Promicromonospora* sp. KH-28 producing chitinase and antifungal antibiotic. *Korean J. Appl. Microbiol.* 27:191-196
11. 김병섭, 조광연. 1995. 벼 잎집무늬마름병균 (*Rhizoctonia solani*)의 균핵에서 분리한 *Bacillus subtilis* SJ-2의 식물 병원 곰팡이에 대한 항균 활성 및 항균 물질의 특성. *한국식물병리학회지* 11:165-172
12. 박홍섭, 조정일. 1996. 사과 주요 병해 방제를 위한 길항미생물 분리 및 동정. *한국유기농업학회지* 5:137-147
13. 김용기, 류재당, 이상엽, 류재기. 1997. 토양 병해 및 주요병해의 생물학적 방제연구 : 미생물 이용 과일 저장병해 방제연구. *농촌진흥청 시험연구사업보고서* pp.351-361
14. 김병섭, 김건우, 이종규, 이인원, 조광연. 1995. *Fusarium graminearum*이 생산하는 몇 가지 물질의 분리정제 및 항균활성. *한국식물병리학회지* 11:158-164
15. 김선익, 유성준, 김홍기. 1997. 인삼병의 생물학적 방제를 위한 길항세균의 선발. *한국식물병리학회지* 13:342-348
16. 김영호, 유연현, 오승환. 1996. *Alternaria alternata*에 항균력이 있는 천연물 조사. *한국식물병리학회* 12:66-71