

Bacillus subtilis B-4228의 인삼 근부병 억제효과

이병대[#] · 박 훈^{*}

[#](주)바이오리진 생물자원연구소, ^{*}중앙대학교 인삼산업연구센터
(2003년 11월 28일 접수, 2004년 2월 27일 수리)

Control Effect of *Bacillus subtilis* B-4228 on Root Rot of *Panax ginseng*

Byung Dae Lee[#] and Hoon Park^{*}

[#]Bioresource research center, Biorigin Inc., Yongin,
^{*}Korea Ginseng Institute, Chung-Ang University, Anseung
(Received November 28, 2003, Accepted February 27, 2004)

Abstract : *Bacillus subtilis* B-4228 selected from ginseng field soil for prevention of rusty root was tested for the control of ginseng root rot. In petri-plate dual culture, mycelial growth of *Cylindrocarpon destructans* was inhibited by B-4228 and hyphal swelling of *C. destructans* was occurred. In pot experiment with *C. destructans*-contaminated soil B-4228 dipping of ginseng seedling showed significant preventive effect of root rot ($p=0.01$), percent healthy root 82% and 20% for treatment and control, root rot rate 6% and 50.4%, respectively.

Key words : *Bacillus subtilis*, ginseng root rot, *Cylindrocarpon destructans*.

서 론

인삼재배의 가장 큰 문제는 연작장해 때문에 예정지를 찾기가 어렵다는 것이다. 예정지란 인삼을 심지 않은 땅을 지칭하는 말로서 옛날에는 재작 연한이 30년 이상으로 되어있었으나 전매공사에서는 15년 이상이라는 경험적설이 있었다. 한 국민삼연초연구소 설립이후에 병원균의 생리적인 면을 검토하여 7년 이상이라는 설이 있어왔으나 입증된 바는 없는 것 같다. 일부 재작이 가능한 밭도 있으나 대부분 재작 연한이 7년 이상이어야 선정하게 된다. 이렇게 재작 연한을 두어야 하는 가장 큰 이유는 인삼을 재작 할 경우 근부병에 의한 피해 및 생육불량 등의 연작장해가 발생한다는 것이다.

연작장해로 인해 나타나는 주요 현상은 뿌리의 동체부위에서 나타나는 흑갈색의 뿌리썩음 증상이며 관련 병원균은 *Cylindrocarpon destructans*로 보고되어있다.^{1,2,3} 정¹⁾ 이 용인과 강화에서 인삼 근부병원균인 *C. destructans*에 의해 발병하였음을 국내에 처음으로 보고하였고 이후로 이 병원균을

연작장해 증상인 근부병의 원인균으로 보고하였다.²⁾ 오 등⁴⁾은 이 병의 전형적인 흑색 이병조직으로부터 *C. destructans*를 분리하고 병원성을 확인하였다. 이로써 이 병원균에 대한 관심이 높아지게 되었으며 초작지의 구둑이 점점 어려워지면서 재작을 가능케 하기 위한 근본적 대책으로서 근부병원균의 방제 방법에 관한 연구의 일환으로 근부 병원균의 기초적 생리, 생태연구가 진행되어 왔다.^{5,6,7,8,9,10)}

인삼의 근부병에 의한 경제적 손실을 극복하기 위해 경제적 측면에서 답전 윤환의 논삼재배법이 실시되고있고 토양훈증제 처리에 의한 화학적 방제가 실시되고 있으나 인삼 근부병 원인균인 *C. destructans*는 토양중에서 후막포자를 형성하여 불리한 조건에서도 장기간 생존이 가능하므로 근본적 방제가 어렵다. 또한 토양훈증제의 사용은 토양내에 존재하는 유해미생물은 물론 유용미생물까지 사멸시키므로 토양생태계의 파괴를 초래할 수 있고 식품안정성 및 환경오염 등의 문제를 일으킬 수 있다. 따라서 이러한 문제점을 해결하고자 토양의 근본적 구조를 개선하고 지속적 효과를 나타내는 친환경적 인삼 근부병의 방제대책으로 생물학적 방제가 시도되었다. 정 등¹¹⁾은 토양의 길항방선균을 증식시키기 위한 토양 개량제 처리 시험을 하였으며 정 등¹²⁾은 *Fusarium solani*에

[#]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 031-670-5396; (팩스) 031-670-5397
(E-mail) bdlee37@hanmail.net

대해 길항력을 나타내는 방선균을 분리 동정하였다. 이후로 인삼 근부병에 길항력을 나타내는 길항미생물을 분리 동정하고 선발하는 연구가 계속해서 이루어졌다.^{13,14)}

본 연구는 토양병원균의 생물학적 방제를 통해 인삼재배에서 가장 큰 문제점인 연작장애를 극복하고 청정인삼을 생산함과 동시에 이에 사용될 길항미생물의 실용화연구를 위해 수행되었다.

재료 및 방법

1. 공시 길항미생물과 이병토양

공시 길항미생물 *Bacillus subtilis* B-4228은 생명공학연구소에서 충청남도 금산의 인삼재배토양으로부터 분리 동정하였으며 포장시험을 통해 인삼 적변 억제효과가 확인되어 특허출원 되었다. pot 실험을 위해서 수원 지역의 인삼재배포장 중 *C. destructans*에 오염되어 인삼 근부병이 심하게 발병된 포장의 토양을 채취하여 사용하였다.

2. 공시 길항미생물과 *C. destructans*의 배양

공시 길항미생물 B-4228의 현탁액 제조를 위해 TSA(tryptic soy agar)에 도말하여 28°C 항온기에서 3일간 배양한 후 멸균된 cell scraper를 사용하여 colony를 모은 다음 멸균증류수를 사용하여 10⁸ cfu/ml 농도의 현탁액을 제조한 후 길항세균 접종원으로 사용하였다. 인삼의 이병조직으로부터 분리한 *C. destructans*의 균총을 PDA(potato dextrose agar)에 이식한 다음 20°C 항온기에서 20일 동안 배양한 후 실험에 사용하였다.

3. *C. destructans*에 대한 공시 길항미생물의 길항효과 조사

Proteose peptone을 0.5% 첨가한 PDA를 8.7cm petri-dish에 20ml씩 분주하여 식힌 후 배양기의 1/4되는 지점에 멸균된 5 mm의 cork borer로 떼어낸 *C. destructans*의 균총을 이식하고 반대편 1/4되는 지점에는 멸균된 8 mm의 paper disc에 길항세균 현탁액 50 µl을 묻혀 이식하였다. 접종한 petri-dish는 25°C 항온기에서 배양하면서 7일 간격으로 1개월 동안 길항세균과 *C. destructans* 사이에 형성된 저지대의 폭을 측정하고 광학현미경을 통해 *C. destructans*의 균사형태를 관찰하였다.

4. 공시 길항미생물의 인삼 근부병 억제효과

공시 균주 B-4228의 근부병억제효과를 확인하기 위한 pot 실험을 위해 파종 후 1년 동안 자란 건전한 묘삼을 가을에 수확하여 플라스틱 용기에 담고 적정 수분을 함유한 깨끗한

모래를 덮은 다음 0~-1°C의 냉장고에 보관하면서 실험에 사용하였다. 길항미생물 현탁액(10⁸ cfu/ml)에 묘삼을 30분간 침지한 다음 약 20분간 음건한 후 2L의 이병토양이 채워진 pot(15x20cm)에 각10주씩을 이식하였다. 처리에 대한 대조구로 멸균증류수에 동일시간 침지하여 이식하였으며 각 처리는 5반복으로 실시하였다. 이식 후 25°C의 실온에서 45일간 재배한 다음 병에 걸리지 않은 인삼의 뿌리수를 세어 건전균을 측정하고, 개체 인삼별 전체뿌리부위에 대한 뿌리썩음비율을 측정하여 근부병 이병율을 조사하였다.

5. 인삼 근부병원균의 분리 동정

뿌리썩음 증상을 보이는 이병조직을 1% NaOCl에 30초간 침지하여 표면 살균하고 멸균수로 세척한 다음 여지로 물기를 제거하였다. 처리된 이병조직을 물한천배지에 치상하여 15°C 항온기에서 배양하면서 *C. destructans*를 분리하였다. 분리된 *C. destructans*의 분류 동정을 위해 PDA에 배양하면서 균사의 배양형태 및 색깔을 관찰하였고 광학현미경을 이용하여 대, 소형분생포자와 후막포자 등의 형태적 특징을 관찰하여 오 등⁴⁾의 결과와 비교하였다.

결과 및 고찰

1. *C. destructans*에 대한 공시 균주 B-4228의 길항효과

*C. destructans*를 공시 균주 B-4228과 대치배양한 결과 *C. destructans*의 균사생장을 강하게 억제하였으며 배양 1개월 후에도 균사의 생장억제가 지속되어 길항력이 장기간 유지되는 것으로 나타났다. 생장이 억제된 *C. destructans*의 균사를 광학현미경을 통하여 관찰한 결과 hyphal swelling에 의한 비정상적인 기형균사를 볼 수 있었으며 분생자경 또한 swelling에 의한 비정상적인 형태를 보였고 정상적인 분생자경의 길이보다 짧은 모양이었다(Fig. 1). 이는 *Bacillus subtilis*가 신규 Iturin group의 항균활성물질 Iturin A를 생산한다고 하였는데¹⁵⁾ 본 실험에 사용된 공시 균주 B-4228이 생산하는 항균활성물질에 의한 균사의 생장억제 또는 기형화 현상으로 생각되어진다. 따라서 공시 균주 B-4228에 의한 *C. destructans*의 생장억제에 관련된 기작을 구명하고자 생산하는 항균활성물질에 대한 구조동정과 아울러 근부병방제를 위한 후보물질로서의 이용가능성에 대한 연구가 더 이루어져야 할 것으로 사료된다.

2. 공시 길항미생물의 인삼근부병 억제효과

*C. destructans*에 의해 오염된 이병토양을 이용한 pot시험 결과, 무처리구에서는 흑갈색의 전형적인 뿌리썩음병 증상이

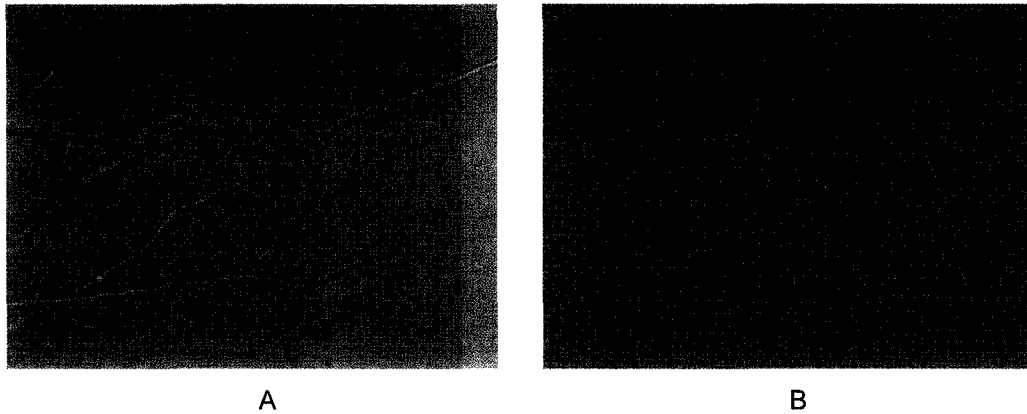


Fig. 1. Growth inhibition of *C. destructans* by *Bacillus subtilis* B-4228. (A) Normal hyphae (x400); (B) Hyphal swelling (x400).

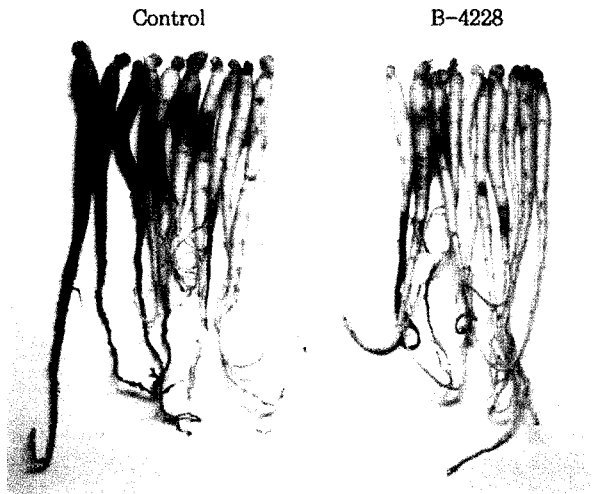


Fig. 2. Effect of *Bacillus subtilis* B-4228 on the control of ginseng root rot.

거의 모든 뿌리에서 확인되었으며 뿌리의 일부 혹은 전체가 완전히 부패되기도 하였다. 공시 균주 B-4228의 처리구에서는 무처리구와 비교해서 경미한 뿌리썩음 증상이 나타나거나 뿌리전체가 건전한 상태를 유지하여서 뛰어난 근부병억제효과가 확인되었다(Fig. 2). 건전근율(근부병에 걸리지 않은 뿌리수의 비율)을 조사한 결과, 무처리구의 경우는 20%였으나 공시 균주 B-4228의 처리구는 82%로 높게 나타났고, 이병율(개체 인삼에 대한 뿌리썩음 이병정도의 총합비율)은 무처리의 경우 50.4%였으나 공시 균주 B-4228의 처리구는 6.0%로 낮게 나타났다(Fig. 3).

Bacillus 속을 이용한 미생물농약이 이미 외국에서 개발되어 단독 또는 화학농약과의 혼합제로 사용되고 있으며¹⁶⁾ 국내에서는 조 등¹⁷⁾이 *Bacillus subtilis*를 이용하여 *Rhizoctonia solani*에 의한 배추의 발병억제효과를 보고하였다. 문 등¹⁸⁾은

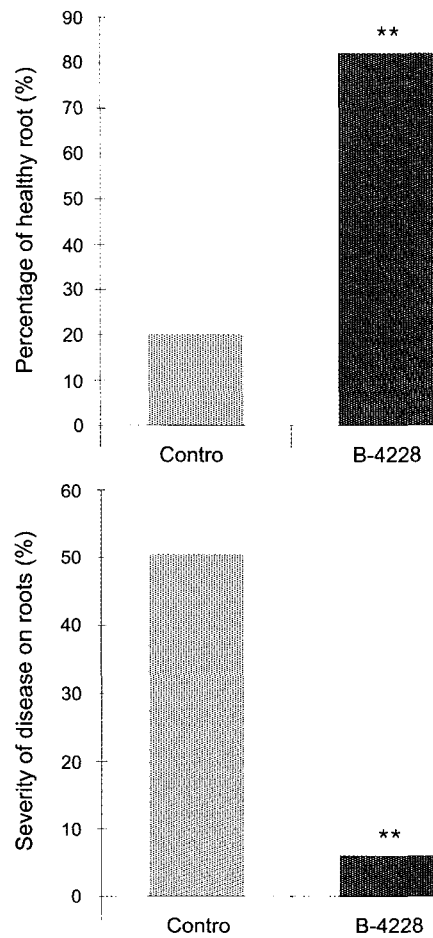


Fig. 3. Effect of *Bacillus subtilis* B-4228 on the control of ginseng root rot caused by *C. destructans*. Untreated or treated one-year-ginseng roots with *Bacillus subtilis* B-4228 were planted in an infested field soil with *C. destructans*. Data were collected 45 days after treatment. (**: significant at P=0.01)

*Bacillus licheniformis*를 이용하여 들깨 잿빛곰팡이병의 방제 효과에 대해보고 하였으며 정 등¹⁹⁾은 *Bacillus* spp.를 이용하

여 수확 후 저장중의 인삼뿌리 썩음병에 대한 생물학적 방제를 시도하였다. 공시 균주 B-4228는 인삼의 뿌리표피에서 분리되는 아미노산과 당 등을 이용하면서 증식하고 근권에 안정적으로 정착하여 인삼과의 상호작용을 통해 뿌리의 발달을 촉진하는 side-effect가 기대되며 내생포자(endospore)를 형성하므로 액제, 분제, 수화제 등 여러 형태의 안정적 제형화가 가능하므로 제형에 따른 방제기를 밝히는 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

요 약

인삼 근부병의 생물학적 방제를 위해 인삼 재배토양으로부터 분리된 길항미생물 *Bacillus subtilis* B-4228을 사용하여 방제효과를 검증하였다. 공시 균주 B-4228과 *C. destructans*의 대치배양결과, *C. destructans*의 균사가 비정상적인 형태로 팽창하였으며 강한 성장억제력을 보였다. *C. destructans*에 의해 오염된 이병토를 이용한 pot 시험결과, 건전근율이 무처리구에서 20%였으나 공시 균주 B-4228의 처리구는 82%로 높게 나타났고, 이병율(개체 인삼에 대한 뿌리썩음 이병 정도의 총합비율)은 무처리의 경우 50.4%였으나 공시 균주 B-4228의 처리구는 6.0%로 낮았다.

인용문헌

1. 정후섭.: 인삼의 병해. *생약학회지* 3(2), 73 (1972).
2. Chung, H. S. : Studies on *Cylindrocarpon destructans* (Zins.) Scholten causing root rot of ginseng. Rept. *Tottori Mycol. Inst. (Japan)* 12, 127 (1975).
3. 정후섭, 인삼의 병, 한국식물보호연구논고, *한국식물보호학회*, 107 (1979).
4. 오승환, 유연현, 김기황, 조대휘.: 인삼 토양 병해충 방제 및 농약개발 연구. 인삼연구보고서(재배분야), *한국인삼연구초연구소*, p. 121 (1992).
5. 조대휘, 박규진, 유연현, 오승환, 이호자.: *Cylindrocarpon destructans* (Zinssm.) Scholten 에 의한 연작지 2년근 인삼의 근부병 발병 특성. *고려인삼학회지* 19, 175 (1995).
6. 박규진, 조대휘, 유연현, 오승환.: 재작지에서 2년생 인삼의 뿌리썩음병 진단과 근권 미생물 밀도변화. *한국식물병리학회지* 13(5), 262 (1997).
7. 조대휘, 안일평, 유연현, 오승환, 이호자.: 배양기간, 온도, pH가 인삼 근부병균 *Cylindrocarpon destructans* (Zinssm.) Scholten의 군사생육에 미치는 영향. *고려인삼학회지* 19, 181 (1995).
8. 조대휘, 유연현, 오승환, 이호자.: 인삼 근부병균 *Cylindrocarpon destructans* (Zinssm.) Scholten의 포자 생성에 미치는 배양기간, 온도, pH의 영향. *고려인삼학회지* 20, 88 (1996).
9. 유성준, 조진웅, 조재성, 유승헌.: 인삼 뿌리썩음병균(*Cylindrocarpon destructans*) 후막포자의 형성 및 발아에 영향을 주는 물리화학적 요인. *한국식물병리학회지* 12(4), 422 (1996).
10. 조대휘, 유연현, 오승환, Jennifer L. Parke.: 미국삼(*Panax quinquefolium*)에서 분리한 뿌리썩음병균 *Cylindrocarpon destructans*의 후막포자 생성 및 분리. *J. Ginseng Res.* 22(4), 304 (1998).
11. Chung, H. S. and Kim, C. H. : Biological control of Ginseng root rots with soil amendments. Proc. 2nd Int. *Ginseng Symposium*, Korea Ginseng Res. Inst., Seoul, Korea, p. 67 (1978).
12. Chung, Y. R., Chung, H. S. and Ohh, S. H. : Identification of *Streptomyces* species antagonistic to *Fusarium solani* causing Ginseng root rot. *Kor. J. Microbiol.* 20, 73 (1982).
13. 심재욱, 이민웅.: 인삼근부 병원균, *Fusarium solani* 및 *Cylindrocarpon destructans*에 길항적인 *Streptomyces* species의 분류동정. *Kor. J. Mycol.* 19(1), 66 (1991).
14. 김선익, 유성준, 김홍기.: 인삼병의 생물학적 방제를 위한 길항세균의 선발. *한국식물병리학회지* 13(5), 342 (1997).
15. Steve, L., Jim, C., Ray, Q., Tracey, D. and Roger, F. : Biopesticides, 5th ed., CPL Scientific Information Services Limited, United Kingdom, 286 (1999).
16. Fravel, D. R., Connick Jr, W. J. and Lewis, J. A. : Formulation of microbial biopesticides. In: Formulation of microorganisms to control plant diseases, ed. by H. D. Burges, Kluwer Academic Publishers, p.187 (1998).
17. 조의규, 김원규, 조원대, 이은종 : *Rhizoctonia solani*에 대한 *Bacillus subtilis*의 길항적 인 효과. *농시논문집(식환·균이·농가)*, 7(1), 79 (1985).
18. 문병주, 김철승, 송주희, 김현주, 이재필, 박현철, 신동범 : 들깨 잿빛곰팡이병의 생물학적 방제 II. 미생물농약의 제조 및 그 방제효과. *Res, Plant Dis.* 8(3), 184 (2002).
19. 정후섭, 정은선, 이용환.: Biological control of postharvest root rots of ginseng. *한국식물병리학회지* 14(3), 268 (1998).