

식물병원균에 대한 *Bacillus vallismortis* 1A 균주의 항진균 활성

이미혜 · 김수진¹ · 이창묵² · 장재선³ · 장해중 · 박민선⁴ · 구본성⁵ · 윤상홍² · 여윤수^{1*}

여주군 농업기술센터 기술 지원과, ¹국립농업과학원 농업유전자원센터, ²국립농업과학원 농업생명자원부, ³가천의과학대학교 식품영양학과, ⁴아주대학교 생화학교실, ⁵국립농업과학원 한식세계화연구단

Antifungal Activity of *Bacillus vallismortis* 1A against Phytopathogen

Mi-Hye Lee, Soo-Jin Kim¹, Chang-Muk Lee², Hai-Joong Chang, Jae-Seon Jang³,
Min-Seon Park⁴, Bon-Sung Koo⁵, Sang-Hong Yoon², and Yun-Soo Yeo^{1,*}

Dept. of Technical Support, Yeojugun Agricultural Technology Center, Yeosu 469-800, Korea

¹National Agrobiodiversity Center, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea

²Dept. of Agricultural Bio-resources, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea

³Dept. of Food and Nutrition, Gachon University of Medicine and Science, Incheon 406-799, Korea

⁴Dept. of Biochemistry and Molecular Biology, Ajou University School of Medicine, Suwon 443-749, Korea.

⁵Dept. of Korean Food Research for Globalization, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea

In order to isolate novel oligotrophic bacteria exhibiting antifungal activities, soils were collected from pepper-cultivated fields of Yeongyang, Jecheon, Nonsan, Eumsong and Goesan area in Korea. From soils in pepper cultivated area, a total of 9,354 strains were isolated as oligotrophic bacteria by the R2A dilution method. Among 9,354 oligotrophic bacteria candidates, 1A strain was selected by screening against *Phytophthora capsici* causing phytophthora blight of hot pepper in the greenhouse and field. The strain was identified as *Bacillus vallismortis* based on its 16S rDNA sequence and key characteristics as compared with those of authentic cultures of *B. vallismortis*(KACC 12149) and *B. mojavensis*(KACC 12096). The strain showed broad spectrum of antibiotic activity *in vitro* test, as revealed in its strong inhibitory activity to the genera *Phytophthora*, *Collectotrichum*, *Botrytis* and *Fusarium*, but not to *Rhizoctonia* and *Magnaporthe*. In pot experiments, infection rate of hot pepper in the non-treated pots was about 89%, while it was only 29% in the pots treated with 1A strain. The result indicated *B. vallismortis* 1A is a potential biocontrol agent for phytophthora blight of hot pepper

Key words: Biological control, Oligotrophic bacteria, Phytophthora blight

서 론

유기합성농약, 화학비료의 오남용으로 인하여 농업 생태계가 파괴되고, 작물의 잔류독성 및 농약에 저항성을 지닌 내성균 출현 등으로 인한 화학적 방제의 문제점이 대두되면서 기존의 화학적 방제에서 생물학적 방제 체계로의 변화가 일어나고 있다(Lee, 1997). 최근 OECD회원국을 중심으로 유기합성 농약의 생산량을 감축하는 규제책이 시행되고 있으며, 정부정책 또한 이러한 흐름에 발맞춰 2013년까지 농약 화학비료 사용량 40% 절감 정책을 펼치고 있다(Kim et al.,

2005). 안전한 먹거리생산에 대한 소비자의 의식과 욕구가 증대되면서 친환경농업과 자연생태계를 보존하고 농업환경을 되살리는 미생물을 이용한 친환경농법에 대한 관심이 점점 커지고 있다.

미생물을 농업적으로 이용하려는 시도는 인류가 농사를 짓기 시작한 수천 년부터 시작되어 왔으나 본격적으로 농업에 미생물을 이용한 시기는 1900년대 이후부터 활발히 연구되기 시작했다. 미생물을 이용한 미생물 농약은 미생물 자체를 직접 이용하거나 미생물이 생산하는 2차 대사산물들을 이용하여 병원균을 방제 하는 것이다(Alexanda et al., 2004; Alison et al., 1991). 기존의 유기합성 농약에 비하여 미생물농약은 환경 친화적이며, 병원균에 대하여 방제 효과가 있는 미생물의 대사산물은 그 구조가 다양하고 쉽게 분

접수 : 2008. 9. 19 수리 : 2008. 10. 14

*연락처 : Phone: +82312991875,

E-mail: ysyseo@rda.go.kr

해되며, 내성균 출현의 빈도가 유기합성농약에 비하여 출현빈도가 낮은 등의 장점이 있어 천연물질을 이용한 무공해 살균제 개발 및 길항미생물을 이용한 생물학적 방제에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 현재 우리나라에서는 2001년 미생물농약, 2005년에 생화학농약에 대한 등록규정이 마련됨에 따라 이에 대한 연구가 활발하게 진행되어 현재 다수의 미생물 농약이 등록되어 시판되고 있다.

다양한 환경만큼 다양한 대사기능을 지닌 미생물들을 농업적으로 유용하게 이용하고 있으나 다양한 미생물의 존재에 비하면 일부 미생물만이 이용되고 있는 실정이다. 실제로 미생물을 분리하여 이용되는 것은 1% 미만이다. 현재 진행되고 있는 미생물분리 연구는 고농도 영양조건에서 급속히 증식하는 미생물이 대부분 이었는데 저농도 영양조건하에서 더디게 증식하는 세균이 자연환경 중에 다수 존재한다는 사실이 밝혀지면서 담수, 해수 및 토양 등 자연생태계에 분포해 있는 저영양 세균(oligotrophic bacteria)에 대한 연구가 활발히 전개되고 있다(Ohata et al., 1980; Whang et al., 1988; Kim et al., 2005). 이들 저영양성 세균은 분리하기도 어렵고 설사 분리되었다 하더라도 배양이 잘되지 않거나 배양중에 소멸되어 버리는 경우가 많기 때문에 분류 또는 생리적 특성에 대한 연구가 미흡한 실정이다(Nikitin et al., 1985).

토양전염을 통한 식물병원성 진균의 피해 중 고추 역병은 우리나라 고추작물에 수량감소에 심각한 피해를 일으키는 토양병원성 진균병으로 배수시설이 불량한 지역에서 자주 발생되고 있으며 특히 장마시작을 전후하여 전국적으로 삽시간에 번지기 때문에 방제가 매우 어려운 식물병 중의 하나라 하겠다. 매년 고추 연작지에서 고추역병의 발병률은 꾸준히 증가하고 있으며 이들의 방제를 위해 다양한 화학농약이 주로 사용되고 있다. 그러나 앞서 언급한 화학농약을 이용한 문제점인 잔류독성과 저항성 병원균의 출현, 생태계의 부정적 영향, 유기농산물에 대한 소비자의 의식변화에 따른 요구증가 등으로 인해 그 사용량이 점차 감소되고 있다(Akihiro et al., 1992; Yoo et al., 1998).

이와 같은 이유로 고추역병(*Phytophthora capsici*)을 방제하기 위한 방법으로 길항미생물을 이용한 생물학적 방제 등이 시도되고 있고, 길항력을 나타내는 길항미생물의 연구보고와 각종 식물병원성 곰팡이에 대한 생물학적 방제에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다(Jung et al., 1981).

본 연구는 고추 역병 발생지역의 건전토양으로부터 분리된 저영양세균 중 고추역병에 대하여 항균력을 지닌 저영양세균을 선발하여 계통분류학적 특성을 검토하고 향후 식물병원균에 대한 생물학적 방제 등에

활용하기 위한 기초 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

토양 시료 채취, 배지조성 및 microbial strain 식물병의 길항세균을 분리하기 위하여 경북 영양, 충북 제천, 충북 괴산, 충남논산 지역 고추밭 토양에서 역병이 발병되지 않은 고추의 근권토양을 대상으로 하여 시료를 채취하고 polyethylene vinyl bag에 넣은 후 실험실로 운반하였다. 배지는 저영양세균의 분리용으로 저영양배지인 R2A 배지와 지시균 배양용으로 PDA 배지(Potato Dextrose Agar)를 각각 사용하였으며, R2A배지의 조성은 Yeast extract, 0.5g; Proteose peptone, 0.5g; Casamino acids, 0.5g; Glucose, 0.5g; Soluble starch, 0.5g; Na-pyruvate, 0.3g; K_2HPO_4 , 0.3g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05g; distilled water, 1000ml이며 pH 7.0-7.2로 조정하였다. 또한, 선발된 길항균의 생리, 생화학적 실험을 위한 표준균주로서 *B. vallismortis* KACC 12149, *B. mojavensis* KACC 12096와 지시균인 *P. capsici* KACC 40483, *Colletotrichum gloeosporioides* KACC 40003, *Botrytis cinerea* KACC 40573, *Fusarium oxysporum* KACC 40052, *Rhizoctonia solani* KACC 40109, *Pyricularia grisea* KACC 40425 등을 한국농용미생물보존센터 (KACC)로부터 분양 받아 사용하였다.

저영양 세균 분리 및 in vitro 항균력 검정 수집된 토양시료 1g에 멸균수 9ml를 넣고 실온에서 30분간 shaking 한 후 10^{-3} 과 10^{-4} 별로 희석 하여 R2A 배지에 도말 하였고 28°C에서 1주일간 배양하여 성장하는 세균만을 분리하였다. 분리된 저영양 세균은 20% 글리세롤이 첨가된 R2A배지에 넣어 -70°C에 넣어 보관하여 사용하였다.

분리된 저영양 세균들 중에 식물병원성 진균의 항균력을 가진 세균을 선발하기 위해 PDA배지 상에서 3일정도 배양된 식물 병원성 진균에 일정간격을 두고 저영양 세균(109 CFU/ml)을 1 μ 씩 loading 한 후 28°C 항온기에서 3일간 대치배양 하면서 inhibition zone 형성여부를 관찰하였다.

선발된 저영양 세균의 동정

생리 화학적 방법에 의한 동정 선발된 저영양 세균의 생리, 생화학적 특성을 조사하기 위해 API 20NE와 API 50CH를 이용하였다. 28°C 항온기에서 잘 배양된 균의 single colony를 0.85% NaCl의 40ml에 현탁하여 API 20NE test를 수행하였다.

50종의 탄소원이 포함된 API 50CH는 각각 표준방법에 의거하여 생화학적 검사를 실시하였다. API의

각 당 이용별로 노란색 혹은 초록색의 색깔변화를 보이는데 노란색인 경우는 각 당을 이용할 수 있다는 것을 보이는 표시이며, API에서 제공하는 웹(www.API.com)의 database를 통해 분석하였다. 이를 토대로 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 색인을 이용하여 동정하였다(Holt et al., 1994).

16S rDNA 염기서열 분석 Chromosomal DNA 분리는 benzyl chloride 방법으로 수행하였다(Miyagawa et al., 1993). 균체에 500 μ l의 TE buffer(100mM Tris HCl, 40mM EDTA pH 8.0)를 첨가하여 잘 현탁시킨 후 100 μ l의 10% sodim dodecyl sulfate(SDS)와 300 μ l의 benzyl chloride(Katayama chemicals Co.)를 첨가하여 50°C에서 30분간 반응시켰다. 균체에 10 μ l의 3M sodium acetate(pH 5.2)를 첨가하여 잘 혼합한 후 4°C, 13000 rpm에서 15분간 원심분리하여 분리된 상등액을 새로운 tube로 옮기고 동량의 phenol/chloroform/ isoamylalcohol (25:24:1) 혼합액을 첨가하고 inversion 후 4°C, 13,000 rpm에서 15분간 원심분리 하였다. 분리된 상등액에 chloroform/ isoamylalcohol (24:1) 첨가하여 2회 처리하였다. 최종적으로 얻어진 상등액에 동량의 2-propanol을 첨가한 후 30분간 정치하여 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA를 70% ethanol로 세척한 다음 진공건조 시켰다. 최종적으로 50 μ l의 멸균수를 첨가하여 DNA를 추출하여 전기영동(Mupid-21, Cosmo Bio Co.)으로 확인하였다. DNA 농도와 순도를 측정하기 위하여 spectrophotometer로 260nm와 280nm에서 흡광도를 측정하였다.

분리한 DNA로부터 16S rRNA gene을 증폭하기 위하여 fD1(5'-AGAGTTT GATCCTGGCTCAG-3')과 rP2(5'-ACGGCTACCTGTTACGA CTT-3') primer를 이용하여(Zhu et al., 1993; Au, 1995) 94°C에서 5분간 변성시킨 뒤 94°C에서 1분, 30°C에서 1분30초, 72°C에서 2분간, 34 cycle로 PCR을 수행하였다. PCR 증폭산물 중 1.5~1.6kb에 해당하는 단편을 0.8% agarose gel, 0.5XTAE buffer에서 100V, 25mA로 30분간 전기영동하여 ethidium bromide에 15분간 염색하여 UV에서 확인하고 Qiagen PCR Purification Kit(Qiagen Inc.)로 정제하였다.

정제한 16S rDNA를 주형으로 ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems)를 사용하여 염기서열을 결정하였다. Sequencing PCR은 BigDye 5 μ l, 3.2 μ M 27F(5'-AGAGTTTGTGAT CCTGGCTCAG-3) primer 1 μ l, 16S rDNA sample 1 μ l (90ng)에 총량이 20 μ l가 되도록 멸균된 3차 증류수를 sequencing PCR tube에 넣

고 잘 혼합한 다음 조건에 따라 cycle sequencing 반응을 실시하였다. 96°C에서 30초, 43°C에서 30초, 60°C에서 4분간, 25 cycle로 수행하였다. 이렇게 얻어진 PCR 산물에 -20°C에 보존된 100% ethanol 50 μ l와 3M sodium acetate(pH 5.2) 2 μ l를 첨가한 후 13,000 rpm에서 30분간 침전시켰다. 250 μ l의 70% ethanol을 이용하여 세척한 다음 건조시킨 후 TSR(template suppression reagent) 20 μ l를 첨가하여 95°C에서 2분 동안 denaturation 한 후 얼음 위에서 냉각시켰다. ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems)를 사용하여 16S rDNA를 sequencing하였다.

염기서열의 상동성은 DDBJ/NCBI/GenBank database의 Blast program을 이용하여 비교하였으며 각 염기서열의 alignment는 DNA Plus version 3.0 sequence alignment program(Scientific and Educational Software)을 이용하여 병렬로 정렬하였고, MEGA version 3.0 근린 결합법에 의거하여 저영양세균의 계통분류학적 위치를 결정하였다(Saitou et al., 1987).

B. vallismortis 1A 균주의 고추역병 억제효과 선발 균주에 의한 고추역병 억제효과는 토양관주 방법으로 검정하였다. 고추역병의 포자형성을 유도하기 위하여 oat meal agar에서 1주일 동안 배양하고 다시 1주일 동안 광처리를 하여 유주자낭의 형성을 유도하였다. 유주자낭으로부터 유주자를 나출 시키기 위해 4°C에서 30분간 저온 처리 하였다. 또한, 선발된 *B. vallismortis* 1A 균주는 R2A 액체배지에 single colony를 접종한 후 shaking incubator(180 rpm, 28°C)에서 5일간 배양 하였다. Cell harvest를 위해 원심분리(5,000 rpm, 15분)를 하여 상등액을 버리고 10 mM MgSO₄ buffer로 resuspension 하였다.

한편, 고추 역병효과를 관찰하기 위하여 원예상태에 고추종자(금당)을 60일 동안 경상북도 영양고추시험장 유리온실에서 생육 시켰으며 접종은 선발된 *B. vallismortis* 1A 균주(10⁹ CFU/ml)를 pot(4 cm X 4 cm X 4.5 cm)당 4ml씩 고추토양에 직접 분주 하였고 3일 후 고추역병 유주자(10⁴ spores/ml)를 4ml씩 토양에 접종하여 고추역병 발병을 유도하였으며 발생정도를 25일간 조사 하였다.

결과 및 고찰

토양으로부터 저영양 세균의 분리 본 실험에 사용된 저영양 세균은 영양분이 극히 적은 환경에서 생육가능한 것 즉, 배지 1리터당 미량의 유기탄소원을 함유한 배지에서 증식 가능한 세균을 말한다(Ohta et

al.,1980; Ishida, Y. and H. Kadota, 1981; Whang et al.,1998). 지역별로 수집된 토양시료를 평판희석법으로 저영양 배지인 R2A 배지에 배양한 결과 총 9,354 균주가 분리되었으며 분리된 저영양 세균에 대한 고추역병(*P. capsici*) 길항력 검정은 대치배양으로 실시하였다. 분리된 전체 저영양세균 중 1차 대치배양한 결과 고추역병에 대하여 371개의 저영양세균이 고추역병원균에 대하여 생육이 저해되는 것을 관찰 할 수 있었다(Table 1). 특히, 영양, 제천 고추밭 토양에서는 고추역병에 강한 활성을 가지는 저영양 세균이 3-4균주가 분리 되었으나 논산 토양인 경우에는 강한 활성을 가지는 균주가 전혀 없었다. 이는 토양시료 채취시 고추역병이 포장에서 많이 발생하는 장마철 이후부터 9월 중순에 걸쳐 수집된 반면 논산토양인 경우 5월경 수집 된 것으로 고추역병이 크게 발병 되기 전 수집 된 시료 때문 것으로 사료된다. 따라서 고추역병에 강한 항균력을 가지는 균주를 분리하기 위해서는 고추역병이 심하게 발병되는 시기에 시료수집을 하여야 함을 알 수 있었다.

식물병원성 진균에 대한 항균 spectrum 고추역병에 강한 활성을 가지는 11개 저영양 세균중 대표적인 5균주에 대하여 고추역병 이외의 중요한 식물병원성 진균 즉 고추작물의 수확량에 피해를 입히는 고추탄

저병원(*Colletotrichum gloeosporioides*), 딸기 잿빛곰팡이병(*Botrytis cinerea*), 토마토 시들음병(*Fusarium oxysporum*), 인삼 잘록병(*Rhizoctonia solani*), 벼 도열병(*Pyricularia grisea*) 등 식물병원균에 대한 항균활성을 조사하였다(Table 2). 대부분의 선발 균주들은 고추역병에 대하여는 강한 활성을 나타냈으나 다른 식물병원균에는 약한 활성을 보였다. 그러나 1A균주인 경우 벼도열병, 모 잘록병을 제외하고는 고추역병, 고추탄저병, 시들음병, 잿빛곰팡이병등에 강한 활성을 나타냈다.

선발 길항균주의 동정 고추역병 뿐 만 아니라 다른 식물병원균에 길항력을 가지는 1A 균주에 대하여 분류 동정을 실시하였다. 주사전자현미경으로 관찰한 결과 1A 균주는 전형적인 *Bacillus* 속에서 볼 수 있는 간상형 모양과 내열성 포자가 관찰되었으며, 그람염색결과 gram positive, 운동성을 가졌으며, *Bacillus* 배지인 TSB 배지에서 관찰되는 형태적 특징인 묽고 끈적하게 자라는 것을 볼 수 있었다(Table 3). 분자생물학적 동정은 1A 균주의 genomic DNA로부터 약 1.5kb 크기의 16S rDNA를 PCR로 증폭하여 순수 정제하고 sequencing 후 Blast search 비교 분석 하였으며 그 결과 *B. vallismortis*와 99%의 유연관계를 나타내었다. 계통분류학적 분석결과는 Fig. 1 에서 보는

Table 1. Antifungal activity of oligotrophic bacteria isolates obtained from rhizosphere soil of pepper plants against *Phytophthora capsici* causing phytophthora blight.

Areas obtained	No of isolates with activity of inhibition diameter [†]				
	++++	+++	++	+	None
Yeongyang	3	12	31	103	2,859
Jechon	4	8	20	68	1,900
Nonsan	0	2	4	12	1,769
Eumsong	2	5	12	37	1,454
Goesan	2	5	12	29	1,372
Total	11	32	79	249	9,354

[†] Suppressive effects of fungal growth by oligotrophic bacterial strains was measured according to the diameter of clear zone caused by inhibition of fungal growth; += 1-2 and ++=3-4 and +++=5-6 and ++++=7mm or above

Table 2. Antifungal activity of oligotrophic bacteria strains plant pathogenic fungal under *in vitro* conditions.

Indicator strain	Degree of inhibitor clear zone activity [†]				
	1A	6C	2A	4F	9H
<i>Phytophthora capsici</i>	++++	++++	++++	++++	++++
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	+++	+	+	-	+
<i>Botrytis cinerea</i>	+++	+	++	++	++
<i>Fusarium oxysporum</i>	+++	+	++	+	++
<i>Rhizoctonia solani</i>	++	+	+	-	-
<i>Magnaporthe grisea</i>	+	+	-	-	-

[†] Suppressive effects of fungal growth by oligotrophic bacterial strains was measured according to the diameter of clear zone caused by inhibition of fungal growth; += 1-2 and ++=3-4 and +++=5-6 and ++++=7mm or above

바와 같이 1A 균주는 *B. vallismortis*, *B. mojavensis*과

가장 유연관계가 밀접한 하나의 소그룹을 형성하였고, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. akibai* 와도 유사한 것으로 나타났다. 최종적으로 생리, 생화학적 특성을 표준균주인 *B. vallismortis* KACC 12149, *B. mojavensis* KACC 12096와 비교하여 조사 하였다. 생화학적 특성은 potassium nitrate, esculin, gelatin, 4-nitrophenyl-D-galactopyranoside를 가수분해하는 양성 반응을 보였으며, L-tryptophane, D-glucose, L-arginine, urea의 효소반응에는 음성반응을 보였다. 탄소원 이용성은 mannose, mannitol, N-acetylglucosamine, maltose, gluconate등의 당을 이용하였다 (Table 3). 따라서, 표준균주와 비교하여 보면 1A 균주는 *B. vallismortis*와 거의 같은 반응을 보였으나 *B. mojavensis*와는 urea, N-acetylglucosamine, maltose 등에서 확연히 다른 반응을 보여서 최종적으로 1A 균주는 *B. vallismortis*로 동정 되었고 *B. vallismortis* 1A 균주로 명명하고 최종선발 하였다.

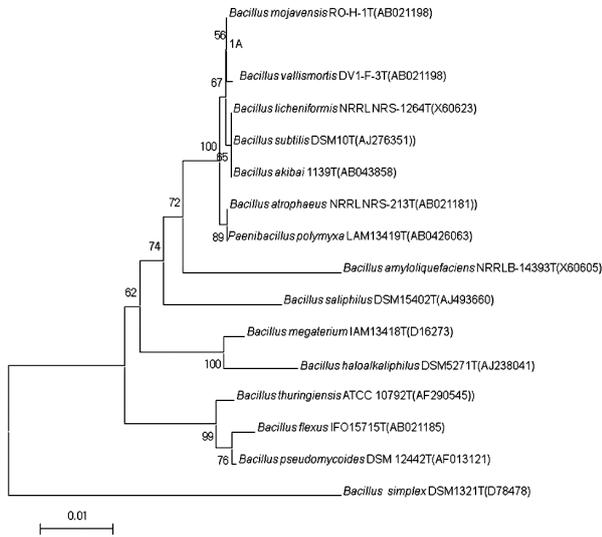


Fig. 1. Neighbour-joining tree based on 16S rDNA sequences showing the phylogenetic position of 1A strain and selected *Bacillus* species. Bootstrap values of 1000 analyses are shown at the branch points. The scale bar represent 1 nucleotide substitution per 1,000 nucleotides of 16S rDNA sequence.

***B. vallismortis* 1A 균주의 고추역병 억제효과** 대치 배양으로 선발된 길항미생물인 1A 균주가 고추역병에 대해 토양 내에서 실제로 그 생물학적 방제력이

Table 3. Morphological and biochemical characteristics of the strain.

Characteristics	1A	<i>B. vallismortis</i> KACC12149	<i>B. mojavensis</i> KACC12096
Morphological			
Motility	Rod	Rod	Rod
Gram staining	+	+	+
Sporefoemation	+	+	+
Aerobic growth	+	+	+
Biocheminal			
Potassium nitrate	+	+	+
L-tryptophane	-	-	-
D-glucose	-	-	-
L-arginine	-	-	-
Urea	-	-	+
Esculim	+	+	+
Gelatin	+	+	+
4-nitrophenyl-D-galactopyranoside	+	+	+
D-glucose	+	+	+
L-arabinose	-	-	-
D-mannose	+	+	+
D-mannitol	+	+	+
N-acetyl-glucosamine	+	+	-
D-mannitol	+	+	-
Potassium gluconate	+	+	+
Capric acid	-	-	-
Adipic acid	-	-	-
Malic acid	+	+	+
Trisodium citrate	-	-	-
Phenylacetic acid	-	-	-

+, positive, -, negative

있는지 확인하기 위해 기주식물로는 고추를 대상으로 하여 in vivo test를 실시하였다. 60일 정도 자란 고추 유묘에 *B. vallismortis* 1A(109 CFU/ml) 4ml을 토양관 주 접종하고 3일후 고추역병의 포자 현탁액(104 spores/ml) 4ml 접종 하였으며 대조구로는 10mM MgSO₄를 처리하여 25일간 고추역병 발생을 조사 하였다. 전형적인 고추역병 증상으로 고추의 전반부가 고사되어 적갈색을 띄며 잎은 마르고 줄기부분은 말라 딱딱해지는 현상을 볼 수 있었는데 특히 대조구인 경우 접종 후 5일부터 고추역병이 나타나기 시작해서 7일 이후에는 급격히 이병율이 올라가서 15일째는 76%, 25일째는 87%까지의 이병율을 보였다(Fig. 2). 반면에 *B. vallismortis* 1A를 처리한 구에서는 접종후 10일 까지도 5.4%의 낮은 이병율을 보였으며 10일 이후에도 완만하게 29%까지 이병율을 보여 고추역병에 대한 탁월한 방제효과가 있음을 알 수 있었다.

미생물농약 이용 가능한 대표적인 3개 균주인 *Bacillus*, *Trichoderma*, *Pseudomonas* 중 미생물농약으로 기능이 뛰어난 것은 *Bacillus*이다. *Bacillus*는 진균의 세포벽을 분해하는 효소인 cellulase, amylase, glucanase 등을 생산할 뿐만 아니라(Grau et al., 2001; Phister et al., 2004) inturin, sufractin과 bacillomycin 등의 항진균성 항생물질 역할을 하는 이차대사산물도 생산한다(Vanittanakam et al., 1986; Hiraoka et al., 1992; Tsuge et al., 1996; Roongsawang et al., 2002; Spadaro et al., 2005). *Bacillus* sp.는 일반적으로 다른 균주에 비해 액체배양 시 빠른 증식과 고온에 대한 내성과 포자 형성 등으로 인한 토양 침투시 안정적으로 작물에 근착할 수 있어 미생물농약으로서의 개발 가능성이 높다.

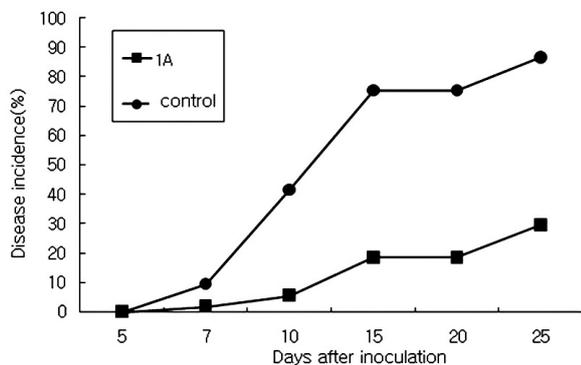


Fig. 2. Disease progress curve for disease severity and incidence of *Phytophthora* blight of pepper treated by MgSO₄ buffer(as control) and potential, antagonistic bacterium, 1A strain, in the greenhouse. Suppressive effects of oligotrophic bacterial strain against infection by *Phytophthora capsici* on 9-week-old pepper plants in green house.

요 약

항진균성 활성을 가지는 저영양세균을 분리하기 위하여 토양시료는 경북 영양, 충북 제천, 충북 음성, 충북 괴산, 충남 논산 등지의 고추 밭에서 수집하였고 R2A배지를 이용하여 평판희석법으로 9,354여 균주의 저영양세균을 분리하였다. 분리된 저영양세균중 고추역병에 강한 활성을 가지는 1A 균주를 선발 하였으며 16S rDNA 와 표준균주(*B. vallismortis*, *B. mojavensis*)를 이용한 생리, 생화학적 실험으로 *B. vallismortis*로 최종동정 되었다. 1A균주는 *Rhizpctonia*, *Magnaporthe* 균을 제외하고 *Phytophthora*, *Collectotrichum*, *Botrytis*, *Fusarium* 균등에서 폭넓게 강한 활성을 나타내었다. 고추 유묘검정에서 대조구가 89%정도의 발병율을 보인 반면에 1A 처리구에서는 29%의 발병율을 나타내어 고추역병의 길항균으로써의 미생물제제 가능성이 있는 것으로 판단된다.

사 사

본 연구는 농업생명공학연구원 기본연구사업(05-4-11-16-1, 08-4-12-9-1)지원에 의해 이루어 졌으며 이에 감사를 드립니다.

인 용 문 헌

- Akihiro, O., A Takashi, and S. Makoto. 1992. Production of antifungal antibiotic, iturin in a solid state fermentation by *Bacillus subtilis* NB22 using wheat bran as a substrate. *Biotechnol. Lett.* 14:817-821.
- Alexandra, K., and X. H. Chen. 2004. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *J. Bacteriol.* 184:1084-1096.
- Alison J. V., W. K. Roberts, and C. P. Selityennikoff. 1991. A new family of plant antifungal proteins. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4:315-323.
- Grau, A., C. Juan, J. C. Gomez-Fernandez, F. Peypoux, and A. Ortiz. 2001. Aggregational behavior of aqueous dispersions of the antifungal lipopeptide iturin A. *Peptides.* 22:1-5.
- Hiraoka. H. O., Asaka, T. Ano, and M. Shoda. 1992. Characterization of *Bacillus subtilis* RB14, Coproducer of peptide antibiotics iturin A and surfactin. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 38:635-640.
- Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J.T. Staley, and S. T. Williams. 1994. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* 9th. Williams & Wilkins, U.S.A
- Ishida, Y., and H. Kadota. 1981. Growth patterns and substrate requirements of naturally occurring obligate oligotrophs. *Microbiol. Ecol.* 7:123-130.
- Jung, H. K., and S. D. Kim. 2003. Purification and characterization

- of an antifungal antibiotic from *Bacillus megaterium* KL39, a biocontrol agent of red -pepper *Phytophthora* blight disease. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31:235-241.
- Kim, S. J., M. Y. Kim, B. S. Koo, S. H. Yoon, Y. S. Yeo, I. C. Park, Y. J. Kim, J. W. Lee, and K. S. Whang. 2005. Isolation and phylogenetic characterization of chitinase producing oligotrophic bacteria. *Kor. J. Microbiol.* 41: 293-299.
- Lee, K.S. 1997. Evaluation on the effects of pesticide residues to agroecosystem in Korea. *Kor. J. Environ. Agric.* 16:80-93.
- Mahaffe, W.F., and P. A. Backman. 1993. Effects of seeds factors on spermosphere and rhizosphere colonization of cotton by *Bacillus subtilis* GB03. *Phytochemistry.* 83:1120-1125.
- Nikitin, D.I., and K.V. Chumakov. 1985. The functional of role of oligotrophic microorganisms. In V.Jensen(ed.), *Microbial communities in soil.* FEMS symposium. 33:177-189.
- Ohta, H., and T. Hattori. 1980. Bacteria sensitive to nutrient broth medium in terrestrial environments. *Soil Sci. Plant Nutr.* 26:99-107.
- Phister, T. G., D. J. O' Sullivan, and L. L. McKay. 2004. Identification of bacilysin, chlorotetaine, and iturin A produced by *Bacillus* sp. strain CS93 isolated from Pozol, a Mexican fermented maize dough. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:631-634.
- Roongsawang, T., T. Kameyama, M. Haruki, and M. Morikawa. 2002. Isolation and characterization of a halotolerant *Bacillus subtilis* BBK-1 which produces three kinds of lipopeptides: bacillomycin L, plipastatin, and surfactin. *Extremophiles.* 6:499-506.
- Saitou, N., and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.
- Spadaro, D., and M. Gullino. 2005. Improving the efficacy of biocontrol agents against soilborne pathogens. *Crop Prot.* 24:601-613.
- Tsuge, K., T., Ano, and M. Shoda. 1996. Isolation of a gene essential for biosynthesis of the lipopeptide antibiotics plipastatin B1 and surfactin in *Bacillus subtilis* YM8. *Arch. Microbiol.* 165:243-251.
- Vanittanakam, N., and W. Loeffler. 1986. Fengycin ? a novel antifungal lipopeptide antibiotics produced by *Bacillus subtilis* F29-3. *J. Antibiotics (Tokyo)* 39:888-901.
- Wang, J., J. Liu, X. Wang, J. Yao, and Z. Yu. 2004. Application of electrospray ionization mass spectrometry in rapid typing of fengycin homologues produced by *Bacillus subtilis*. *Lett. Appl. Microbiol.* 39:98-102.
- Whang, K., and T. Hattori. 1988. Oligotrophic bacteria in rendzina a forest soil. *Antonie van Leewenhoek.* 54:19-36.
- Yoo. J. K., K. H. Ryu, J. H. Kwon, and S. S. Lee. 1998. Fungicidal?activity of oriental medicinal plant extracts against plant pathogenic fungi. *Agric. Chem. Biotechnol.* 41:600-604.
- Zhu, H., F. Qu, and L. Zhu. 1993. Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride. *Nucleic Acids Res.* 21:5279-5280.