

**Bacillus sp. AB02를 이용한 식물 병원균에 대한 생물검정**김근기 · 김용철<sup>1</sup> · 최영환<sup>1</sup> · 신태순<sup>1</sup> · 박기도<sup>2</sup> · 강위금<sup>2</sup> · 최용락<sup>3</sup> · 박현철\*부산대학교 생명응용과학부, <sup>1</sup>부산대학교 생명자원과학부, <sup>2</sup>농촌진흥청 작물과학원 영남농업연구소, <sup>3</sup>동아대학교 생명자연과학부

Received April 10, 2008 / Accepted May 3, 2008

**Biological Control of Plant Pathogens by *Bacillus* sp. AB02.** Keun Ki Kim, Yong Chul Kim<sup>1</sup>, Young Whan Choi<sup>1</sup>, Ki Do Park<sup>2</sup>, Ui Gum Kang<sup>2</sup>, Yong Lark Choi<sup>3</sup> and Hyeon Cheal Park\*. *School of Applied Life Science and* <sup>1</sup>*School of Resources and Life Science, Pusan National University, Miryang 627-706, Korea,* <sup>2</sup>*Yeongnam Agricultural Research Institute, National Institute of Crop Science, RDA. Miryang 627-803, Korea,* <sup>3</sup>*Department of Biotechnology, Faculty of Natural Resources and Life Science, Dong-A University, Busan 604-714, Korea* - In the greenhouse fields for fruits and vegetables during the winter in Korea, there are serious damages by the sclerotium diseases due to the low temperature and humidity. This study was carried out to select an antagonistic agent for the biological control of the sclerotium diseases. The 55 antagonistic agents were selected from the rhizosphere in soil where the fruits and vegetables were cultivated in the green house fields, and strain AB02 among the tested isolates was estimated to be the strongest antagonist against the sclerotium disease. Using strain AB02, the antifungal spectrum was tested against 5 different plant pathogens. According to the results of the test, strain AB02 showed the high antagonistic effect against *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum*. For the experiment of biological control against the sclerotium disease, it was estimated the suppression effect and the control effect by the strain in the pot experiment using the green perilla. According to the result of the pot experiments, the suppression effect was 40% and the control effect was 62%, respectively. For the stimulation effect of the tested plant growth by strain AB02 compared to the control, it was improved as 120% for the total length, 141% for the liveweight, 121% for the total number of leaves, 185% for the leaf area, and 327% for the liveweight of the root, respectively. Strain AB02 showing the antagonistic effect against the sclerotium disease and the stimulation effect for the plant growth was identified as *Bacillus* sp.

**Key words :** Biological control, pathogens, plant growth promoting, *Bacillus*

**서 론**

미생물을 이용한 생물검정 개발은 친환경농산물에 대한 소비자의 요구와 잔류 농약의 위해성으로 인해 크게 발전을 하고 있다. 다양한 미생물을 분리하여 각종 식물병원균에 대한 생물검정을 실시하여 제제화의 기초 자료로 활용하고 있고[17], 균과 작물의 특성에 맞게 제제화하여 농작물 재배에 직간접적 이용으로 많은 효과를 얻고 있다. 미생물제제에는 사용균주와 활성에 따라 다양하게 분류하고 있으며, 몇가지 균주를 혼합한 혼용제제도 사용되어지고 있다. 유산균, 광합성세균, 곰팡이 및 효모 등을 이용한 퇴비부숙제[19]는 퇴비 부숙을 촉진하고 각종 생리활성 물질을 생성하는 효과가 있으며, 질소고정균[25]과 광합성세균 및 mycoplasma 등을 이용한 토양개량제는 불균형과 오염된 토양의 토질개선으로 연작에 의한 병해를 감소시키고 수량을 증대시키는 효과를 나타내는 토양 개량제가 대표적이다. 길항미생물제제로는 *Bacillus thuringiensis*균을 이용한 살충활성과 항균활성을 갖

는 미생물제제를 비롯하여[10], 선충포식균, 방선균, 항균물질 생성 곰팡이 등을 이용한 많은 제품이 개발되어져 있으며, 곰팡이와 세균성 병원균에 대한 농약효과 및 저항성을 증가시켜주는 기능을 갖고 있다. 그리고 광합성세균 및 유산균들을 이용하여 식물생육 촉진, 뿌리의 활력 유지, 잎 수와 표면적 증가, 열매의 착색 증가, 당도 증진 등의 활성을 갖는 생리활성제도 있다. 그 외 수확 후 관리 및 유통에서의 선도 유지, 오염물질과 부산물의 악취 제거 등의 목적으로 축산업 및 환경정화 등에 많은 미생물제제가 활용되어지고 있다. 미생물제제의 소비는 소비자들의 인식변화와 농업환경의 변화 등으로 더욱 증가하게 될 것이다.

*Bacillus*속 균주를 이용한 미생물제제는 세균의 생육안정성으로 인해 생물학적 방제에 많이 이용되고 있으며, 다양한 작물재배에 이용되고 있다. *Bacillus*속 균주가 생산하는 길항물질에 의한 잿빛곰팡이병을 비롯한 다양한 역병에 대한 방제 효과[5,14,16,21] 및 열안정성 항균단백질과 peptide성 길항물질에 의한 길항효과[14,16,18], 제제화를 위한 대량배양과 영양원 조절에 의한 길항활성의 증대활성에 대한 보고도 있었다[8]. *Bacillus*속 균주 중에는 항진균 활성[2]을 갖는 것도 있으며, *B. subtilis*의 건조포자를 종자에 피막화하면 인삼

\*Corresponding author

Tel : +82-55-350-5547, Fax : +82-55-350-5549

E-mail : hcpark@pusan.ac.kr

근부균인 *Fusarium solani*에 대한 생물학적 방제효과를 나타낸다는 보고도 있었다[1]. *Bacillus*속 균주는 병원균에 대한 항균활성과 작물의 생육을 촉진하는 효과[9]를 나타내기도 하고, 식물병원균의 생리대사에 변화를 주어 병원균의 생육을 억제하는 활성도 갖고 있다[15].

잎들깨의 재배에 있어 많은 피해를 주는 병해는 녹병, 잿빛곰팡이병, 균핵병을 들 수 있고, 이러한 병들을 방제하기 위하여 농약을 사용하거나 병의 내성을 극복하기 위해서 유전자나 약제의 혼용을 권장하고 있으나 현장에서는 적용이 어려운 실정이다. 엽채류 재배에서 균핵병은 *Sclerotinia sclerotiorum*에 의해 발생하는 다범성 병해로 잿빛곰팡이병과 같이 저온 다습한 환경에서 발생하기 쉬우며, 시설재배 엽채류에 많은 피해를 준다. 이는 양상추, 상추, 양배추, 셀러리, 잎들깨 등 국화과나 십자화과 식물들에 많이 발생하며, 동절기 시설재배에 심각한 피해를 주는 실정이다. *B. megaterium*을 이용한 들깨 균핵병의 생물학적 방제효과[22], *B. stearothermophilus*의 상추 균핵병원균에 대한 길항활성[4], 마늘 흑색썩음균핵병의 생물학적 방제에 *B. subtilis*와 *Trichoderma harzianum*의 이용[20] 등에 대한 보고가 있다.

본 연구에서는 잎들깨 재배에 있어 문제가 되는 병해를 미생물을 이용한 생물학적 방제법의 개발을 위해, 균핵병의 병원균인 *S. sclerotiorum*에 대한 길항력을 갖는 균을 분리, 동정했으며, 분리한 길항균 AB02를 잿빛곰팡이병원균인 *Botrytis cinerea* 등 주요 식물병원균에 대한 항균활성과 잎들깨에 대한 생물학적 방제효과 및 생육촉진 효과를 검정하였다.

## 재료 및 방법

### 길항세균의 분리

잎들깨 재배지로부터 병징을 나타내는 식물체와 정상 식물체, 그리고 토양을 채취하여 길항균분리의 시료로 사용하였다. 식물체 줄기와 잎의 절편과 토양을 멸균증류수로  $10^{-1}$  ~  $10^{-9}$ 까지 희석하는 material dilution agar methods로 Potato Dextrose Agar (PDA, Difco, USA)와 Nutrient Agar plate (NA, Difco, USA)에 배양(30°C)하면서 근접 미생물의 생육을 저해시키는 수종의 곰팡이와 세균을 1차 분리하였다[11]. 그 중 균핵균에 항균활성이 큰 균주를 AB02 균주로 명명하고 단일 colony가 얻어질 때까지 NA배지로 계대배양을 하면서 순수 분리하여 실험에 이용했다. 분리한 균주는 항균력 검정 및 동정을 위하여 계대배양과 냉동보존으로 유지·보존하였다.

### 길항세균의 항균 스펙트럼

순수 분리한 AB02 균주를 이용해 잎들깨 재배에 피해를 많이 주는 주요병원균, 잿빛곰팡이 병원균인 *B. cinerea*, 균핵병원균인 *S. sclerotiorum*, 모잘록병원균인 *Pythium ultimum*,

줄기썩음병원균인 *Rhizoctonia solani* 및 시들음병원균인 *Fusarium oxysporum* 등에 대해 PDA plate 대치배양법으로 항균력을 조사하였다. 배지는 1/5 strength PDA로 각 병원균과 AB02 균주를 동시에 접종하여 28°C에서 1-6일간 배양한 후 저해 정도를 측정하여 항균 스펙트럼을 조사하였다[12].

### 길항세균의 생육 특성

길항균의 생육곡선을 조사하기 위하여 AB02 균주를 BHI 배지(Brain Heart Infusion, Difco, USA)에서 24시간 동안 전배양을 한 다음 NB배지에 본 배양을 하면서 660 nm에서 36시간 동안 흡광도를 측정했다. 초기 5시간은 매시간 측정을 하고, 그 이후에는 30분마다 흡광도를 측정했다.

### 병발생의 억제와 방제 효과

병발생의 억제효과는 잎들깨의 식물체와 pot에 길항균을 먼저 처리하고, 균핵병원균을 주기적으로 처리하여 균핵병의 발생을 관찰하였다. 병발생은 잎과 입병에 병반의 형성과 식물체의 고사로서 판정하였고, 병발생의 억제와 방제효과는 김 등[7]의 보고된 방법을 토대로 실시하였다. AB02 균주를 NB에 22시간 진탕배양하여  $10^6$  cfu/ml이 되도록 현탁액을 조제하여 6엽기의 잎들깨 30 ml/pot씩 처리를 하였다. 길항균을 먼저 처리하고, PDA에서 7일간 배양한 균핵병원균 *S. sclerotiorum*을 pot에 접종하여 병 발생의 여부로 억제효과를 검정했다. 방제효과는 *S. sclerotiorum*을 PDA에서 7일간 배양한 균사 절편을 잎들깨의 식물체에 먼저 접종하여 발병시킨 다음, 길항균 AB02 균주를 1일 간격으로 3일 동안 처리하여 병 발생 방제효과를 검정하였다.

### 길항세균의 들깨 생육 촉진 효과

길항균 AB02 균주를 이용한 병 억제와 방제효과 검정 실험에서 control보다 길항균만을 처리한 처리구에서 잎들깨의 생육이 촉진되는 현상이 나타남으로써, AB02 균주가 잎들깨 생육에 미치는 영향을 조사하였다. 잎들깨 종자를 발아를 시키고 유묘까지 생육이 일정한 것을 선택하여 검정 pot에 이식을 하고 10일 후에 길항균 AB02 균주를  $1 \times 10^6$  cfu/ml의 농도로 조절한 후 엽면살포의 방법으로 길항균을 처리하였으며, 생육은 growth chamber를 25°C로 16시간, 15°C로 8시간의 주기로 온도와 광을 조절하며 식물체를 관리했다. 식물의 생육조사는 길항균의 엽면살포 25일 후에 실시하였다.

### 길항세균의 동정

분리한 AB02를 동정하기 위하여 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology를 이용하여 생리, 생화학적인 특성을 조사하였고[3], 분자유전학적 분류를 위하여 genomic DNA를 추출하여 PCR을 수행하여 증폭시키고, 자동염기서열분석기(ABI 377, Perkin Elmer Biosystems Co., USA)를 사

용하여 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열은 NCBI의 등록 염기서열과 비교하여 분석하였다.

### 결과 및 고찰

#### 길항세균의 분리

잎들개 시설재배지로부터 균핵병의 병징을 나타내는 식물체를 채취하여 균핵병 발생특징을 보았다(Fig. 1). Fig. 1A는 균핵병이 발생한 잎들개의 전초사진으로 잎은 진한갈색으로 마른 것을 볼 수 있고, 병징이 심한 식물체는 줄기가 말라서 갈라진 것을 확인 할 수 있으며, 줄기 하단부는 초기에 붉은색을 띄다가 갈색으로 변하면서 고사하는 것을 관찰할 수 있었다. Fig. 1B는 줄기를 절개하여 내부를 관찰한 사진으로 검은 갈색의 균핵이 형성되어져 있는 것을 확인할 수 있었다. 균핵병이 발생한 잎들개 시설재배지에서 잎들개 뿌리, 줄기, 잎 그리고 시설 재배지 토양으로부터 다수의 균을 분리했다. 분리한 균들을 *B. cinerea*, *S. sclerotiorum*, *P. ultimum*, *F. oxysporum* 및 *R. solani*에 대해 plate 대치배양법으로 항균력을 조사하여 55종의 길항세균을 분리하였다. 분리한 균 중에 잎들개 생육에 피해를 주는 잣빛곰팡이균과 균핵병원균에 길항활성이 뛰어난 균주를 AB02로 명명하고 본 실험에 이용했다. Fig. 2의 경우는 분리한 길항세균들을 이용하여 *S. sclerotiorum*



Fig. 1. Symptom of sclerotinia rot in the perilla (A) and stem (B).

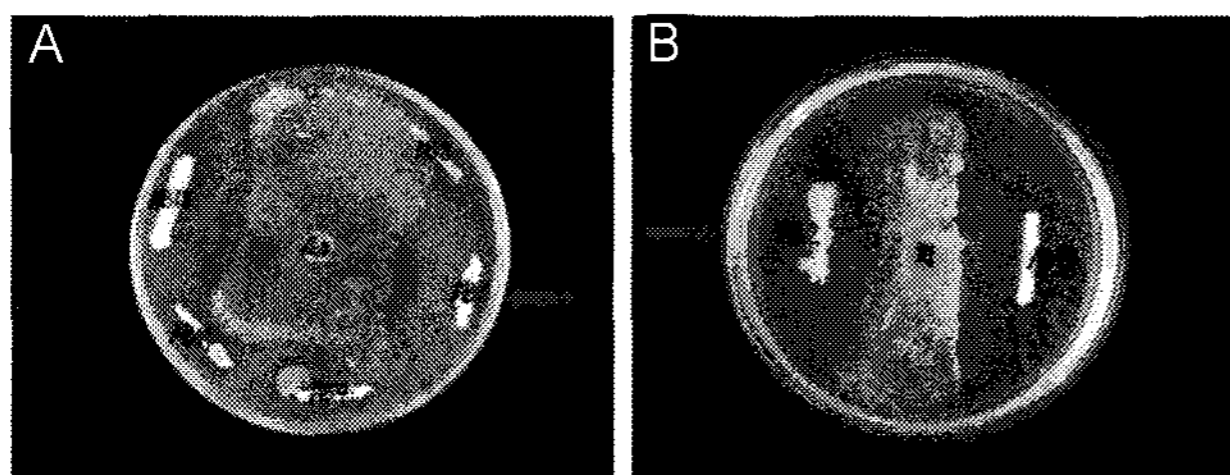


Fig. 2. Growth inhibition of *S. sclerotiorum* (A) and *B. cinerea* (B) by antagonistic bacterium AB02. The arrow is indicated of AB02.

(A)과 *B. cinerea* (B)에 대한 항균효과를 나타낸 사진으로, 순수 분리한 균들의 *S. sclerotiorum*에 대한 항균력을 조사한 것으로서 10시방향의 AK17 균주[13]와 4시 방향(화살표)의 AB02 균주가 항균력이 강한 것을 확인 할 수 있었고(Fig. 2A), *B. cinerea*에 대한 대치배양으로 두 균의 항균력을 관찰하였다(Fig. 2B). 그 결과, 균을 접종하지 않은 부분과 균을 접종했다라도 항균활성이 없는 곳과는 달리 AB02 균주와 AK17 균주를 접종한 부분에서는 전혀 병원균의 생육이 나타나지 않는 것을 볼 수 있다.

#### 길항세균의 항균 스펙트럼

토양에서 분리한 길항균 AB02를 들개 주요병원균인 *B. cinerea* 및 *S. sclerotiorum*과 기타 병원균인 *P. ultimum*, *F. oxysporum*, *R. solani*을 이용하여 plate 대치배양법으로 항균력을 조사하였다(Table 1). 그 결과 잎들개 주요 병원균인 잣빛곰팡이병원균과 균핵병원균에 대해 항균활성이 뛰어났으며, 잣빛곰팡이균에 대해서는 초기생육을 강하게 억제하는 것을 관찰할 수 있었다. 균핵병의 피해를 많이 받는 고추, 상추, 양상추, 양배추 등의 과채류의 균핵병방제를 위해 분리한 AB02 균주를 이용하여 미생물제제를 개발한다면 병 방제에 크게 도움이 되리라 생각된다. 시들음병원균에 대해서도 항균활성을 나타내었고, *Bacillus* sp.가 잔디 large patch 병원균인 *R. solani*에도 효과가 있다는 보고[6]가 있어 골프장에 문제가 되는 *Rhizoctonia* 방제에도 사용할 수 있을 것이다. 잎들개 뿐만이 아니라 다른 엽채류에도 피해를 주는 병원균에 효과가 탁월하므로 시설하우스재배지의 연작으로 인한 병의 다발을 막을 수 있고, 높은 습도에 의한 특이환경에 따른 병원성 곰팡이의 피해를 줄일 수 있다. 시설재배지 뿐만 아니라 일반 노지에도 AB02 균주를 이용하여 생물학적 방제 시스템을 구축하면 화학농약의 사용을 줄일 수 있고, 병해에 의한 피해를 막을 수 있으며 청정 농산물의 생산이 가능할 것으로 기대된다.

분리한 길항세균 AB02 균주를 이용한 미생물제제를 개발하기 위한 1차적인 방법으로 생균을 이용하는 방법과 배양액만을 이용하는 방법으로 검정을 행했다. 생균을 이용한 제제화를 위한 최적조건 확립을 위하여 배양시간에 따른 균에

Table 1. Antifungal spectrum of plant pathogens by isolated antagonistic bacteria AB02

Pathogenic strain	Inhibition zone
<i>B. cinerea</i>	+++
<i>F. oxysporum</i>	+
<i>S. sclerotiorum</i>	++++
<i>P. ultimum</i>	+
<i>R. solani</i>	++

Inhibition zone; ++++: > 20 mm, +++: > 15 mm, ++: > 10 mm, +: > 5 mm

대한 항균활성을 검토한 결과, 20시간이상 배양한 것을 사용할 때가 항균활성과 재현성이 가장 뛰어났다. 생균을 제거하고 배양여액을 희석하여 처리한 경우는 다소 항균활성이 줄어드는 것으로 관찰되었다. 배양여액을 사용한 경우에는 48시간 정도 배양한 후에 사용하는 것이 좋았고, 배양액을 50배 희석하여 사용하여도 항균활성이 나타났다. 생균으로 사용할 경우는 하루정도 배양한 다음 냉소에 보관하면서 사용하면 항균활성이 유지되었고, 유통을 위해서는 포자를 형성시켜 제제화하는 것이 좋을 것으로 사료된다. AB02 균주를 배양한 다음 배양여액을 유기용매로 추출하고, 추출물을 이용한 항균활성 조사에서도 항균활성이 우수하게 나타나 항균의 주체는 항균물질로 판단되어진다. 그리고 배양여액을 열처리하여 항균활성을 조사했을 때는 항균활성이 다소 차이는 있는 것을 확인하였는데 이는 효소 및 peptide성 물질도 항균작용에 관여하는 것으로 여겨진다. 이 등[18]도 고추탄저병원균에 대해 항균력을 나타내는 *Bacillus sp.*를 분리하여 항균 단백질의 항균활성까지 확인하였다. 사멸기 이후의 배양여액에서의 항균효과 상승은 균이 용해되면서 균체 내에 축적되어진 항균물질의 노출에 의한 것으로 보여진다.

**균핵병 발생 억제와 방제 효과**

길항균 AB02를 이용해 *S. sclerotiorum*에 의한 균핵병 발생 억제효과를 검정하였다. 식물체에 *S. sclerotiorum* 포자액을 처리하고 3일이 경과하면 병징이 나타나기 시작하며, 병원균 처리 7일 후에는 발병이 100% 진행되어 9일 후에는 식물체가 완전히 고사된다(Fig. 3). 반면 식물체에 AB02 균주를 먼저 처리하고, 1일 후부터 3일 동안 *S. sclerotiorum*을 처리한 결과 3일째까지 병발생이 관찰되지 않았고, 병원균을 처리한 4일째부터 병징이 나타나기 시작하여 9일 후에는 60%까지 병이 진행되어 40%의 발병 억제효과를 나타내는 것을 알 수 있었다(Fig. 3). 이는 *Burkholderia sp.* AK-17균을 이용한 실험

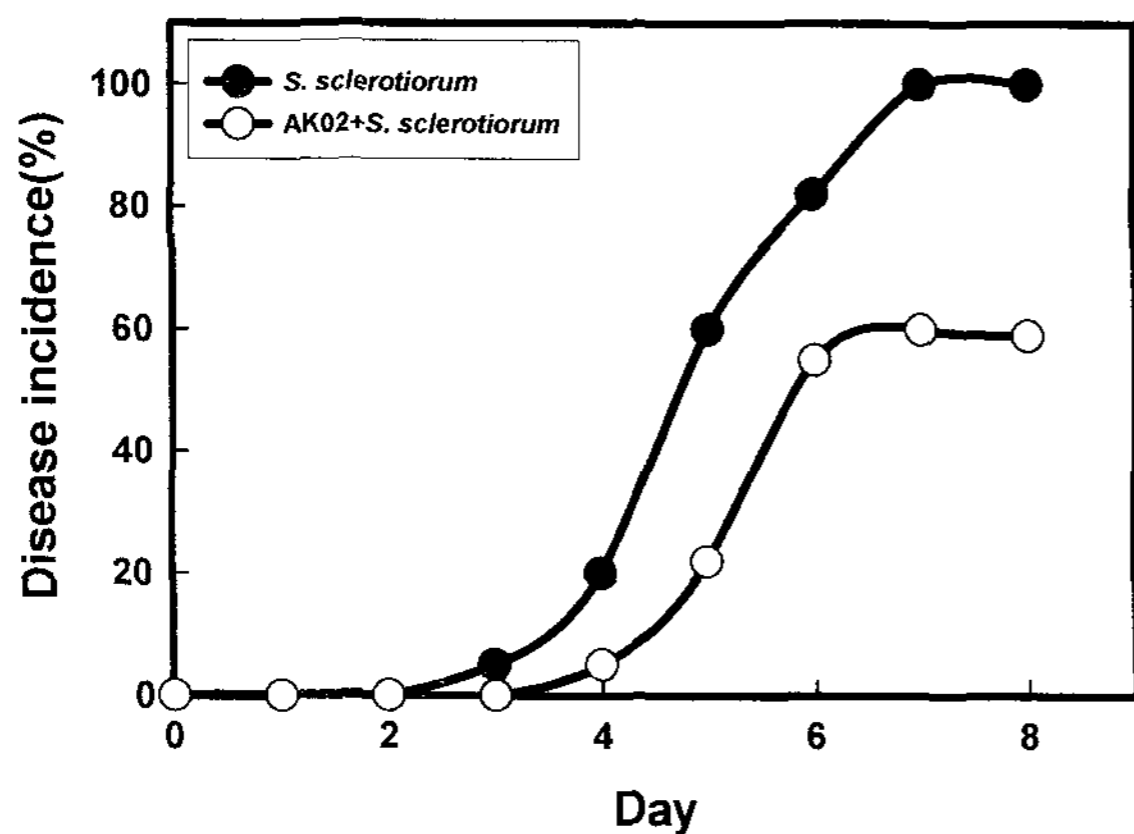


Fig. 3. Preventive effect of antagonistic bacterium AB02 on the incidence of sclerotinia rot on perilla in a growth chamber.

에서의 55%의 병 발생 억제효과와 비교하면 활성이 떨어짐을 알 수 있다[13]. 하지만 10일 이후에는 더 이상 병징의 진전이 없었고, 새로 나는 잎에서도 병의 발생이 없었으며, 4주 간에 걸쳐 병징의 진전을 관찰했지만 더 이상의 진전은 없었으므로 결국 AB02 균주에 의한 균핵병 발생 억제효과를 볼 수 있었다.

균핵병원균을 처리한 후 3일이 지나면 잎에서 병징이 나타나기 시작하는데 이때부터 AB02 균주를 처리하여 균핵병 방제효과를 검증하였다. 병징이 나타날 때부터 3일간 길항균을 처리한 결과 처음 병징이 발생한 이후 7일째까지 38%의 발병율을 나타냈지만 그 이후부터는 병징이 진행되지 않았다(Fig. 4). 병원균만 처리한 pot에서는 균핵병 발생 억제 실험 때와 같이 식물체가 7일 만에 전부 고사하였으나(Fig. 3, 4), AB02 균주를 처리한 pot에서는 14일까지 생육을 관찰했지만 새로운 잎에서의 병징 발생과 확산은 확인되지 않았다. Fig. 4는 2주 동안의 생육을 확인한 결과이지만, 4주 동안 계속 생육을 시키면서 잎들개의 생육상태를 확인한 결과 병징을 확인할 수 없었으며, 초기 생육에는 대조구보다 생육이 늦었지만 2주후부터는 정상적인 생육을 하였다. 이 결과로부터 AB02 균주가 균핵균의 생장에 영향을 미쳐 균핵병 발생 억제와 방제활성을 갖는 것을 확인했다.

AB02 균주를 이용해 만든 미생물제제를 이용해 균핵병 발생의 억제와 방제효과를 검정한 결과를 Fig. 5에 나타냈다. Fig. 5의 A는 무처리, B는 AB02 제제만을 처리했고, C는 *S. sclerotiorum*만 처리했으며, D는 *S. sclerotiorum*을 먼저 처리한 후에 AB02제제를 처리하였다. 그리고 E는 AB02 제제를 먼저 처리하고, *S. sclerotiorum*을 처리하여 생육을 확인했다. *S. sclerotiorum*만을 처리한 C에서는 식물체가 전부 감염되어 잎이 떨어지고 갈색으로 변했으며, 고사되어져 가는 것을 확인할 수 있었다. 9일 후에는 식물체 모두 완전히 고사를 하고 말았다. D pot는 병원균을 먼저 처리하여 병징이 나타날 때

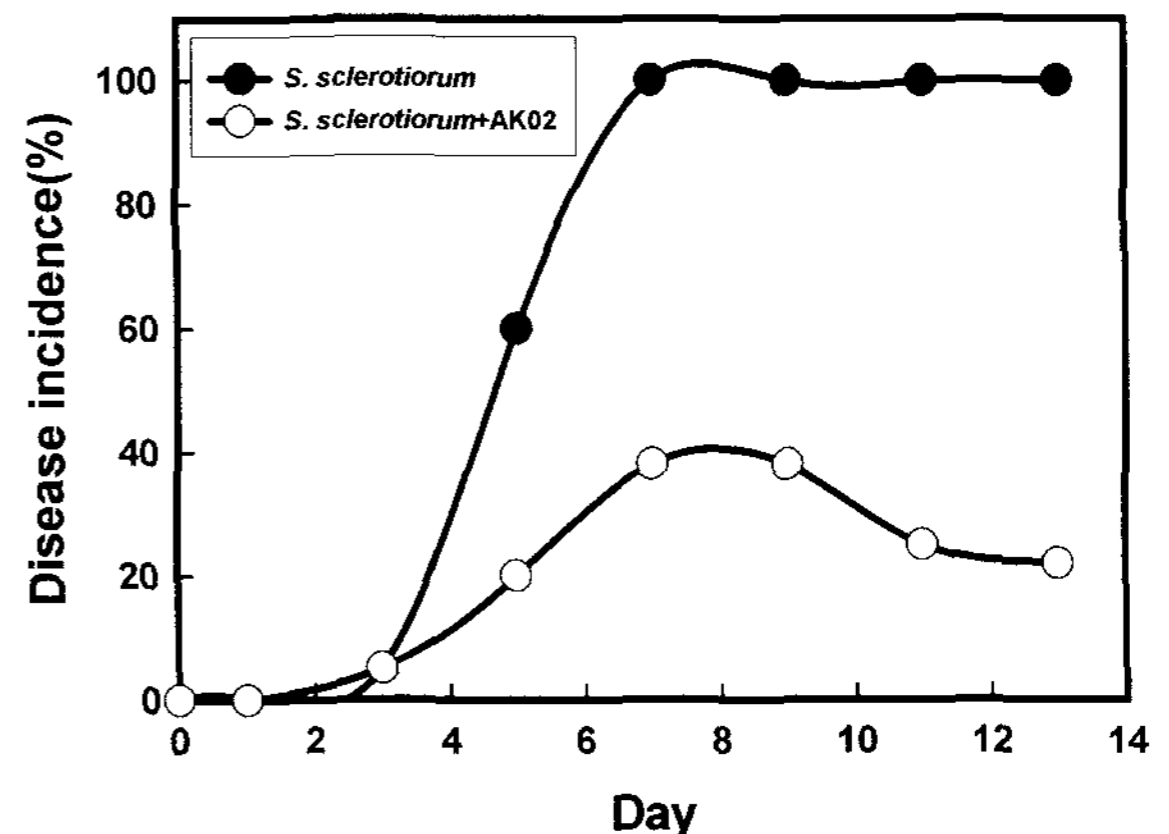


Fig. 4. Curative effect of antagonistic bacterium AB02 on the incidence of sclerotinia rot on perilla in a growth chamber.

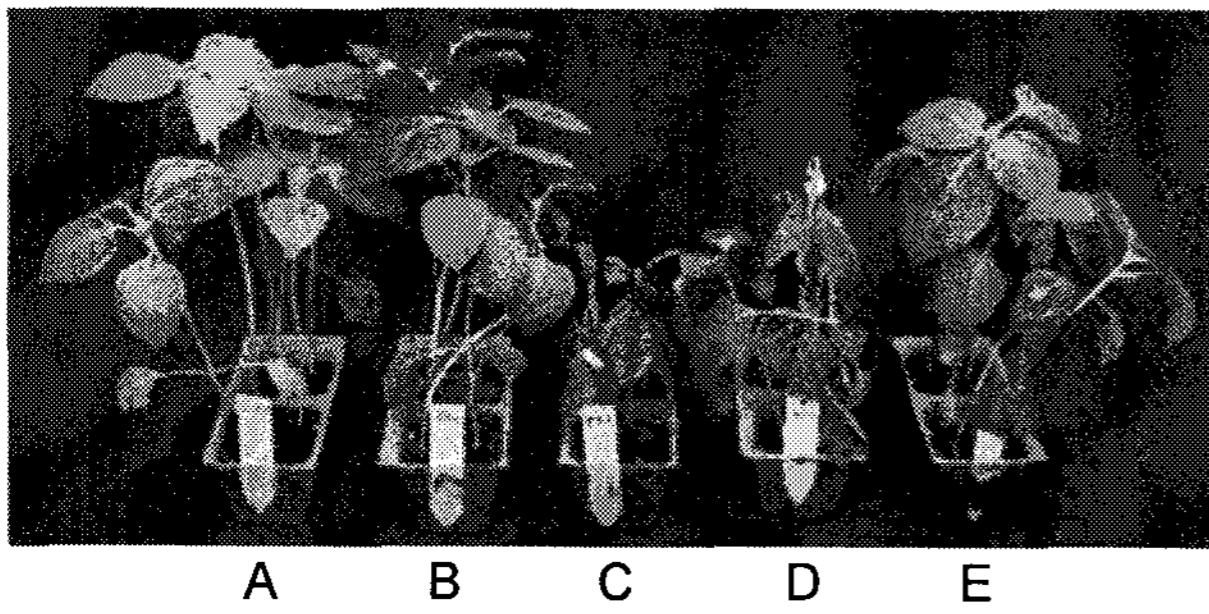


Fig. 5. Antagonistic effect of antagonistic bacterium AB02 on perilla growth treated with *S. sclerotiorum*. A: Control, B: Treated of AB02, C: Treated with *S. sclerotiorum*, D: Treated with *S. sclerotiorum* and then AB02, E: Treated with AB02 and then *S. sclerotiorum*.

AB02 제제를 3일간 처리하여 병발생을 확인했는데, 병징이 나타난 잎은 나중에 떨어지거나 AB02 제제처리 직전의 상태로 더 이상의 진전이 없었고 새로운 잎은 병징을 확인할 수 없었다. AB02 제제를 먼저 처리하고 병원균을 처리한 E pot에서는 일부 병징이 진행되는 것도 있었지만 정상적인 생육을 하는 식물체도 확인할 수 있었다. 그리고 AB02 제제만을 처리한 pot에서는 control보다도 월등하게 생육이 촉진되는 것을 엽수와 전장에서 확인할 수 있어 AB02 제제가 식물 생육촉진활성도 있는 것으로 확인되어 졌다. 이 실험의 결과로 잎들개 외에도 균핵병이 문제가 되는 과채류의 시설재배에 적용시켰을 경우 병발생 억제와 방제 효과를 거둘 수 있을 것이다.

**식물의 생육 촉진 효과**

길항균 AB02를 이용한 생물학적 방제 실험에서 AB02 제제만을 처리한 pot에서 control보다 잎들개의 생육이 촉진되어지는 것을 확인할 수 있어, AB02 제제를 이용한 들개의 생육촉진효과를 조사한 결과는 Table 2, 3, 4와 같다. AB02 제제를 처리할 때 배지성분이 잎들개의 생육에 영향을 미칠 수 있기 때문에, 균에 의한 효과만을 확인하기 위해서 배지성분을 균배양 때와 같이 조제하여 처리한 것을 medium이라 하였다. Table 2는 잎들개의 전장, 줄기 직경, 줄기 생체중량, 줄기의 건물 중량을 비교한 것으로서, 전장은 길항균 AB02 제제 처리구가 control보다 120%의 신장 촉진효과가 있었고,

Table 2. Effect of foliar spray of strain AB02 on the stem growth in perilla (*Perilla ocymoides* L. cv. Leafy perilla)

	Plant height (cm) <sup>y)</sup>	Stem diameter (mm)	Stem fresh weight (mg)	Stem dry weight (mg)
Control	4.1 b <sup>x)</sup>	1.50 b	107 c	13.9 b
Medium	4.5 ab	1.60 ab	134 bc	21.5 a
Strain AB02	4.9 a	1.79 ab	155 a	19.6 a

<sup>x)</sup>Means separation within columns by DMRT, *p*=0.05.

<sup>y)</sup>Plants growth was measured at 25 days after foliar spray.

배지성분을 처리한 것보다는 110%의 신장 촉진효과가 있었다. 줄기의 직경도 119% 증가되었고, 생체중량은 control보다 149% 증가하였고, 배지성분을 처리한 medium보다는 116% 증가하였다. 건물 중량도 무처리에 비해 AB02 제제를 처리한 것은 141% 증가하였다. AB02 제제처리로 잎들개의 지상부 생육이 촉진되어진 것을 알 수 있어, 식물체의 양호한 생육으로 병원균에 대한 저항성의 효과도 있으며 수확량의 증가로 농민의 수익 증대 효과도 가져올 수 있다. Table 3에서는 잎들개의 엽수, 엽면적, 잎의 생체 중량과 건물 중량 그리고 엽록소 수를 비교 조사하였다. 그 결과 엽수는 길항균 처리구가 무처리에 비해 121%, 배지성분 처리구에 비해 129% 증가하여, AB02 제제를 처리함으로써 한 작기 재배기간 동안에는 보다 많은 수확량의 증대효과를 가져올 수 있을 것이다. 배지성분을 처리한 것에서 생체 중량과 건물 중량이 증가함에도 불구하고 엽의 수는 control보다 적었다. 엽면적은 AB02 제제 처리구는 무처리에 비해 185%, 배지성분 처리구 보다는 162% 증가하였다. 잎의 생체중량과 건물 중량은 AB02 제제 처리구가 control보다는 각각 191% 및 180% 증가하였고, 배지성분 처리구보다는 생체 중량과 건물 중량이 각각 162%와 157% 증가하였다. 이 결과로서 AB02 제제를 작물재배에 이용하면 생물비료로서 탁월한 효과를 나타내고 토양의 염류집적 등의 토양오염을 막을 수 있어 토질개선에 큰 효과를 가져 올 수 있다. AB02 제제를 처리한 pot에서 생체 중량과 건물 중량이 증가한 것은 같은 품종으로서 광합성 효율이 같다고 볼 때 엽수가 많고, 엽 면적이 넓어 광합성량이 증가하여 생체 중량과 건물 중량이 증가한 것으로 여겨진다. 잎들개의 재배에서는 잎의 수량에 따라 농민의 수확이

Table 3. Effect of foliar spray of strain AB02 on the leaf growth in perilla (*Perilla ocymoides* L. cv. Yupsil perilla)

	Leaf number <sup>y)</sup>	Leaf area (cm <sup>2</sup> )	Leaf fresh weight (mg)	Leaf dry weight (mg)	Chlorophyll contents (SPAD value)
Control	6.2 ab <sup>x)</sup>	22.0 b	414 b	61.2 c	20.7 b
Medium	5.8 b	25.1 b	488 b	69.8 bc	23.1 ab
Strain AB02	7.5 a	40.6 a	789 a	109.9 a	24.8 a

<sup>x)</sup>Means separation within columns by DMRT, *p*=0.05.

<sup>y)</sup>Plants growth was measured at 25 days after foliar spray.

Table 4. Effect of foliar spray of strain AB02 on the root growth in perilla (*P. ocymoides* L. cv. Yupsil perilla)

	Root fresh weight (mg) <sup>y)</sup>	Root dry weight (mg)
Control	150 c <sup>x)</sup>	25.1 c
Medium	177 b	37.4 ab
Strain AB02	491 a	50.3 a

<sup>x)</sup>Means separation within columns by DMRT, *p*=0.05.

<sup>y)</sup>Plants growth was measured at 25 days after foliar spray.

증가하게 되고, 잎의 생육이 빠르므로 수확시기를 앞당겨 출하를 함으로써 타 농가에 비해 높은 수익을 가져올 수 있을 것이다(Table 3).

뿌리의 생육상태를 조사한 것은 Table 4에 나타났다. 잎들개 식물체 지상부의 생육의 정도가 좋다는 것은 지하부의 생육정도를 추측할 수 있는데, 뿌리의 생체 중량은 무처리에 비해 327% 증가하였고, 배지성분만 처리한 것보다도 277%나 높은 증가를 보였다. 하지만, 이전의 실험에서는 잎들개의 뿌리가 세균이어서 정량화에 어려움이 있었다[13]. 건조 중량에서는 무처리보다 200%, 배지성분 처리구보다 135% 무거운 것으로 나타났다. AB02 제제를 처리하여 작물의 생육이 촉진되어지는 경우는 근권에 생존하는 병원균에 대한 항

균효과에 의한 근권의 생육환경 변화로 생육이 촉진되어지고, AB02 균주가 생육하면서 분비하는 물질에 의해서도 생육이 촉진되어지는 것으로 여겨진다. 미생물의 2차대사산물에 의한 식물의 촉진효과는 근권에 생육하는 세균[23]과 곰팡이[24]의 대사산물에 의한 경우를 볼 수 있다. 길항균 AB02를 농가에서 직접 사용하게 되면 식물 생육 촉진에 의한 수확량 증가의 효과를 가져올 수 있고, 각종 병원균 방제에 사용하는 화학농약을 줄일 수 있어 농민의 건강과 토양보호, 환경보전의 효과도 함께 가져올 수 있다.

### 길항균의 동정

AB02 균주를 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology를 이용한 생리, 생화학적인 특성을 조사결과 Gram staining에서 양성이었으며 막대형의 호기성균이었다. Catalase, Oxydase, arginine dihydrolase 및 nitrate reductase 등을 가지고 있고, starch, casein, gelatin, cellulose 분해능을 가지고 있었다(Table 5). 분자유전학적 분류를 위해 추출한 DNA로 PCR을 수행한 결과 710 bp 정도의 증폭된 DNA 단편을 확인할 수 있었으며, 16S rDNA 부분 염기서열을 NCBI GenBank에서 유전자 간 상관성을 알아본 결과 AB02 균주는 *Bacillus*와 99% 상동성을 보여 *Bacillus* sp.로 동정하였다.

### 요 약

겨울철 과채류 시설 재배 단지에서는 저온 다습하여 균핵병 발생이 많아 피해가 심각하기 때문에, 미생물을 이용한 생물학적 방제법으로 균핵병을 방제하고자 길항균을 분리하였다. 시설 재배 토양으로부터 길항세균 55종을 분리하였으며, 분리한 길항세균 중에 가장 활성이 뛰어난 균주를 AB02 균주로 명명하고 이를 이용하여 식물병원균 5종에 대한 항균 스펙트럼을 조사하였다. 그 결과 잣빛곰팡이병원균인 *Botrytis cinerea*와 균핵병원균인 *Sclerotinia sclerotiorum*에 항균효과가 뛰어났다. AB02 균주의 균핵병에 대한 생물학적 방제실험을 위해 들깨 pot 실험으로 병발생 억제효과와 병 방제효과를 조사했다. 그 결과 균핵병 발생 억제효과는 40%로 나타났고, 병 방제효과는 62%로 아주 높게 나타났다. AB02 균주의 식물 생육 촉진 효과는 전장이 120%, 생체중량이 141% 증가되었으며, 엽수와 엽면적은 각각 121%와 185%의 생육 촉진 효과를 보였다. 그리고 뿌리 생육조사에서는 생체 중량이 무처리보다 327% 증가하였다. 항균활성과 식물 생육 촉진 활성을 갖는 AB02 균주를 동정한 결과, *Bacillus* sp.로 확인되었다.

### 감사의 글

본 연구는 농림부 농림기술개발사업의 지원에 의해 이루어진 것임.

Table 5. Physiological properties and carbon utilization of strain AB02

Content	Characteristic
Catalase	+
Oxidase	+
Motility	+
Shape	rod
Gram Staining	+
Indol production	+
Methyl red test	-
Citrate utilization	-
O/F test	o/a/n
Arginine dihydrolysis	+
Starch hydrolysis	+
Casein hydrolysis	+
Gelatin hydrolysis	+
Cellulose hydrolysis	+
King's B medium	-
Nitrate reductase	+
Glucose utilization	+
Arabinose utilization	+
Lactose utilization	+
Sucrose utilization	-
Maltose utilization	+
Fructose utilization	+
Sorbitol utilization	+
Mannitol utilization	+
$\beta$ -Alanine utilization	-

## References

- Chang, J. W. and S. D. Kim. 1995. Seed coating for the application of biocontrol agent *Bacillus subtilis* YBL-7 against phytopathogens. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 243-248.
- Chang, H. W., Y. L. Choi, W. H. Joo, Y. H. Choi, H. K. Do and C. W. Hwang. 2004. The antifungal activity and growth promotion effects of *Bacillus* sp. LP03, TBM40-3 on Pohang Buchu (Leeks). *J. Life Sci.* **14**, 859-862.
- Claus, D. and R. C. W. Barkeley. 1986. Genus *Bacillus*, pp. 1104-1139, In Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe and J. G. Holt (eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 2, The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Hwang, J. Y., C. K. Shim, K. Y. Ryu, D. H. Choi and H. J. Jee. 2006. Selection of *Brevibacillus brevis* B23 and *Bacillus stearothersophilus* B42 as biological control agents against sclerotinia rot of lettuce. *Res. Plant Dis.* **12**, 254-259.
- Jeong, H. G. and S. D. Kim. 2003. Purification and characterization of an antifungal antibiotic from *Bacillus megaterium* KL 39, a biocontrol agent of red-papper phytopathora blight disease. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 235-241.
- Joo, W. H., S. J. Han, Y. L. Choi and Y. K. Jeong. 2004. Antifungal compound produced by *Bacillus* sp. TBM912. *J. Life Sci.* **14**, 193-197.
- Kim, C. S., J. P. Lee, J. H. Song, E. K. Lim, S. J. Chung, Chung, S. Y. Chung and B. J. Moon. 2001. Development of biofungicide for control of gray mold rot of eggplant caused by *Botrytis cinerea* and bioassay in the greenhouse condition. *J. Life Sci.* **11**, 235-241.
- Kim, G. H., S. O. Oh, J. S. Hur, K. J. Yum and Y. J. Koh. 2006. Optimum cultivation conditions for mass production of an antagonistic bacterium *Bacillus subtilis* BD0310 for development of a microbial agent controlling gray blight of tea plants. *Res. Plant Dis.* **12**, 85-90.
- Kim, J. H., Y. H. Choi and G. J. Joo. 2001. Plant growth-promoting effects of antagonistic *Bacillus* sp. YJ-3 against *Fusarium* wilt of watermelon-root stock gourd. *Kor. J. Environ. Agri.* **20**, 57-62.
- 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.
- Kim, K. K., J. G. Kang, S. S. Moon and K. Y. Kang. 2000. Isolation and identification of antifungal N-butylbenzenesulphonamide produced by *Pseudomonas* sp. AB2. *J. Antibiot.* **53**, 131-136.
- Kim, K. K., K. H. Park, S. S. Moon and K. Y. Kang. 1997. Isolation and structure identification of antifungal substance from *Aspergillus terreus*. *Agri. Chem. Biotechnol.* **40**, 593-596.
- Kim, K. K., Y. K. Kim, H. J. Son, Y. W. Choi and K. Y. Kang. 2005. Biological control of perilla culture by *Burkholderia* sp. AK-17. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* **48**, 34-39.
- Kim, S. K., N. K. Lee, T. S. Jeong, Y. K. Kim, J. J. Choi and S. H. Bok. 1991. Structure determination of antifungal KRF-001 produced by *Bacillus subtilis* subsp. krichtiensis. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 598-603.
- Knox, O. G. G., K. Killham and C. Leifert. 1999. Effect of increased intrate availability on the control of plant pathogenic fungi by the soil bacterium *Bacillus subtilis*. *Appl. Soil Ecology.* **15**, 227-231.
- Lee, H. J., K. H. Park, J. H. Shim, R. D. Park, Y. W. Kim, H. Hwangbo, J. Y. Cho, Y. C. Kim and K. Y. Kim. 2005. Isolation and identification of low molecular weight compounds produced by *Bacillus subtilis* HJ927 and their biocontrol effect on the late blight of pepper (*Capsicum annuum* L.). *J. Soil Sci. Fert.* **38**, 25-31.
- Lee, J. H., B. K. Kang, H. K. Kwon, J. O. Jung and Y. K. Nam. 2005. Isolation and identification of activated microorganisms for biocide development. *Kor. J. Env. Hlth.* **31**, 31-38.
- Lee, M. H., I. C. Park, Y. S. Yeo, S. J. Kim, S. H. Yoon, S. C. Lee, T. Y. Chung and B. S. Koo. 2006. Characterization of antimicrobial proteins produced by *Bacillus* sp. N32. *Kor. J. Pesticide Sci.* **10**, 56-65.
- Lee, Y. H. and S. R. Park. 2001. Isolation and characteristics of composting-promoting-bacteria. *Korean J. Soil Sci. Fert.* **34**, 394-400.
- Lee, S. Y., S. B. Lee, Y. K. Kim and S. J. Hwang. 2006. Biological control of garlic white rot accused by *Sclerotium cepivorum* and *Sclerotium* sp. using *Bacillus subtilis* 122 and *Trichoderma harzianum* 23. *Res. Plant Dis.* **12**, 81-84.
- Moon, B. J., C. S. Kim, J. H. Song, H. J. Kim, J. P. Lee, H. C. Park and D. B. Shin. 2002. Biological control of gray mold rot of perilla caused by *Botrytis cinerea* II. Formulation of antagonistic bacteria and its control effect. *Res. Plant Dis.* **8**, 184-188.
- Moon, B. J., H. J. Kim, J. H. Song, K. Y. Lee, J. W. Baek and S. J. Chung. 2004. Biological control of perilla sclerotinia rot caused by *Sclerotinia sclerotiorum* using *Bacillus megaterium* N4. *J. Life Science* **14**, 761-769.
- Siddiqui, Z. A. 2004. Effects of plant growth promoting bacteria and composed organic fertilizers on the reproduction of *Meloidogyne incognita* and tomato growth. *Bioresource Technol.* **95**, 223-227.
- Shivanna, M. B., Meera, M. S. and Hyakumachi, M. 1996. Role of root colonization ability of plant growth promoting fungi in the suppression of take-all and common root rot of wheat. *Crop Protect.* **15**, 497-504.
- Solaiman, A. R. M. and M. G. Rabbani. 2006. Effects of *Rhizobium* inoculant, compost, and nitrogen on nodulation, growth, and yield of pea. *Korean J. Crop Sci.* **51**, 534-538.