

Bacillus subtilis SKU48-2에 의한 풋마름병 발병 억제

김지태 · 김신덕*
서경대학교 생물공학과

Suppression of Bacterial Wilt with *Bacillus subtilis* SKU48-2 Strain. Kim, Ji-Tae and Shin-Duk Kim*.
Department of Biological Engineering, Seokyeong University, Seoul 136-704, Korea – Bacterial populations from the rhizosphere were obtained and the efficacy of the bacterial wilt suppression, root colonizing ability and resistance to three kinds of chemical pesticides were assayed. According to these results, SKU48-2 was selected as a potential biological agent to control the bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. SKU48-2 strain at 10^8 CFU/ml inoculum was able to suppress the bacterial wilt up to 60% in greenhouse trials. Also, the resistance of SKU48-2 to chemical pesticides make possible to use in combination with chemical pesticides for the control of bacterial wilt. Three different powder formulations of SKU48-2 were developed. The shelf-life of powder formulations was effective up to 6 months of storage. Unformulated bacterial suspension could not be stored for 2 weeks, at which time cell viability was completely lost. According to 16S rDNA sequence data, the SKU48-2 stain was identified as *Bacillus subtilis*.

Key words: *Ralstonia solanacearum*, bacterial wilt disease, biocontrol agent, *Bacillus subtilis*

서 론

풋마름병균 *Ralstonia solanacearum*은 주로 고온 다습한 열대와 아열대 지역을 중심으로 다양한 작물에 발병하여 막대한 경제적 손실을 초래하였으나, 근래에는 지구 온난화 현상에 의해 온대기후 지역에서도 자주 발병되어 그 피해가 점점 심각해지고 있다[20]. 우리나라 경우도 기온 상승 등의 원인에 의해 특히 장마가 끝난 뒤 발생이 빈번해져 많은 피해가 발생되고 있다. 그람음성의 호기성 세균인 *R. solanacearum*은 수개의 편모가 있어 운동성이 있으며, 식물 뿌리의 상처를 통해 식물체에 침투하여 발병을 유발하는데 [18] 기주식물 없이도 토양이나 물속에서 5년까지 생존이 가능하여 [19] 경제적 방제법 만으로는 방제가 어렵고 토양 혼중제 사용이 효과적이나 경제적인 문제뿐만 아니라 토양 내 유용한 미생물 모두를 제거시키는 단점이 있다[4]. 또한 풋마름병균은 식물체 도관 조직에서 증식하여 [14] 화학농약의 경엽 살포만으로는 효과가 미약하므로 토양처리에 의해 병원균의 생존 자체를 불가능하게 하거나, 생존하더라도 활동하지 못하도록 환경조건을 개선하고 저항성 품종의 개발과 더불어 길항미생물을 이용한 생물학적 방제가 시급한 실정이다.

화학농약의 오랜 사용에 따른 생태계 파괴, 농산물의 잔류 독성 및 내성균의 출현[10] 등의 문제로 인해 무독성 및

저 독성의 환경 친화적인 농약 개발의 필요성이 크게 대두됨에 따라 다양한 길항균을 선발하고 이용하기 위한 노력을 경주하여 왔다. 그러나 길항균을 이용한 미생물 제제의 경우 활성스펙트럼이 좁고, 포장에서의 효과가 환경요인에 따라 변이가 심하며 [16], shelf life 즉 저장 시 충분한 생균밀도가 유지되는 기간이 짧고, 토양 내 잔류 농약에 의한 영향으로 미생물제제의 효과가 감하여지는 등의 문제점이 상업화의 걸림돌로 작용하고 있다. 생물학적 방제제와 화학 농약의 혼용 방법이 농약의 사용량을 줄여 환경오염의 피해를 줄이면서, 미생물 방제제를 독자적으로 사용한 경우보다 식물병 방제의 효율을 높일 수 있는 방안으로 제시된 바 있다 [8].

본 연구에서는 풋마름병 방제제 개발을 위하여 1) *R. solanacearum*에 대해 *in vitro* antibiosis 활성을 나타낸 균주를 대상으로 *in vivo* pot 실험을 실시하여 강한 풋마름병 발병억제 활성을 보인 균주를 선발하였다. 2) 세균성 식물병 방제용으로 널리 사용되는 화학농약 3종에 대하여 강한 내성을 가져 화학농약과의 혼용이 가능한 길항균주를 최종 선발하였으며, 3) 담체 사용에 따른 선발 균주의 생균밀도 변화를 측정하여 미생물 제제화의 기초를 마련하고자 하였다.

재료 및 방법

병원균 확보 및 배양

풋마름병에 감염된 고추와 토마토 각각에서 분리한 *R. solanacearum* 균주는 20% glycerol을 포함하는 tryptic soy broth(TSB, Difco)에 고정하여 -80°C 에 보관하면서, 0.005%

*Corresponding author

Tel: 82-2-940-7171, Fax: 82-2-919-0345

E-mail: sdkim@skuniv.ac.kr

tetrazolium chloride(TZC) 평판배지에 28에서 2일간 배양하여 실험에 사용하였다. 병원균에 의한 풋마름병 발병 확인은 식물체의 잎이 녹색을 유지하면서 마르고 줄기를 잘라 물에 담그면 줄기에서 세균 액이 나오고 세균 액을 TZC plate에서 배양하였을 때 주위는 우유 빛에 안쪽은 선홍색으로 자라는 특성 등을 통해 검정하였다[6].

균주의 분리

수년간 풋마름병이 발생하지 않은 지역에서 재배한 고추와 토마토 근권 토양에서 미생물을 분리하였다. 뿌리에서 털어낸 흙 1 g를 멸균수로 진탕 후 정지하여 상등액 1 mL을 취해 순차적으로 희석하여 TSA(tryptic soy agar, Difco)와 NA(nutrient agar) 평판 배지에 도말하여 28°C에서 2일간 배양하여 서로 다르다고 생각되는 single colony를 분리하였다. 분리한 colony는 TSB 배지를 이용하여 28°C에서 72시간 배양하여 6,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 균체를 회수하였다. 회수한 균체를 멸균수에 현탁하여 600 nm에서 OD=1(10^9 cfu/mL)로 맞추어 그대로 또는 희석하여 실험에 사용하였다.

Colonization assay

2% sodium hypochlorite 용액으로 2분간 처리하여 표면 살균한 고추와 토마토 종자를 1% water agar plate에 올려 놓고 각 종자 주위에 균체 현탁액 1 mL(10^9 cfu/L)씩 점적한 후, 뿌리 성장촉진 효과와 뿌리 주위에 균주의 집락형성 여부를 28°C에서 10일간 관찰하였다. 대조군의 경우는 균체 현탁액 대신 멸균된 TSB를 종자 주위에 처리하였으며 각 처리 당 종자 10개씩 3번 반복실험 하였다.

Antibiosis 균주 선발

풋마름병균에 대한 길항 균주를 paper disc diffusion method 로 선발하였다. TZC plate에 *R. solanacearum* broth를 함유한 top agar를 분주하여 균힌 bioassay 용 plate에 배양액 20 μ L을 점적한 paper disc(직경 10 mm)를 올려 놓고 30°C에서 24시간 배양하여 나타난 생육 저지환의 크기로 활성도를 나타내었다.

풋마름병 발병 억제효과

선발균주에 의한 풋마름병 발병 억제효과는 종자처리와 토양관주 2가지 방법으로 검정하였다. 종자 처리는 토마토(서광 품종)와 고추(부강 품종)종자에 Ownley 방법[12]에 의해 미생물을 코팅하였다. 즉 균체를 0.02 M phosphate buffer(pH 7.0)용액에 10^9 cfu/mL 농도로 현탁시킨 후 동량의 2% methyl cellulose(Sigma, St. Louis U.S.A.)를 첨가한 박테리아 현탁액을 종자와 잘 혼합하여 무균상태로 실온에서 건조시켰다. 지름 10 cm 포트에 바로키 상토(한국농자재 주식회사)를 180 g 채우고 박테리아를 코팅한 종자와 코

팅하지 않은 종자들을 각각 파종한 다음 25-35°C로 유지되는 하우스에서 재배하여 4 엽기가 되었을 때 칼로 뿌리에 상처를 내고 *R. solanacearum* 현탁액 30 mL(10^7 CFU/mL)을 관주처리 하여 발병을 유도하였다. 토양처리 방법은 종자를 파종한 후 고추와 토마토가 4 엽기가 되었을 때 선발균주 배양액을 희석하여 포트 당 30 mL(10^9 CFU/mL)씩 분주하고, 이틀 후 위와 같은 방법으로 병원균을 처리하여 발병을 유도하였다. 종자 처리만 행한 경우와 토양처리만 행한 경우 및 종자처리와 토양처리를 병행한 경우에 있어서 선발균주에 의한 발병 억제효과를 6주간 관찰하였다. 대조구는 선발균주 처리 없이 *R. solanacearum* 현탁액 만 처리하였으며, 각 처리 당 10본씩 3회 반복 실험하였다. 풋마름병 발병률은 식물이 아주 싱싱한 경우는 0, 잎이 약간 시든 경우(25% 미만)경우는 1, 중간 정도(50% 미만) 시든 경우는 2, 심하게 시든(75% 정도) 경우는 3, 완전히 고사한 경우를 4로 등급을 정하였으며, 발병 억제율은 {(대조구의 발병률-처리구의 발병률)/대조구의 발병률} \times 100으로 계산하였다.

검정활성균주의 기존 사용 농약에 대한 내성 검정

고추와 토마토 재배 농가에서 풋마름병 방제를 위해 가장 빈번하게 사용되는 화학 농약으로 조사된 부라마이신(동부하이텍), 악리마이신(성보화학), 아그렙토(경농) 3종을 배지 1 L당 500 mg/L 또는 700 mg/L 첨가한 plate상에서 선발균주의 생육 여부를 통해 선발균주의 내성을 확인하였다.

고형 제제화와 shelf life 측정

TSB 배지로 28°C에서 48시간 배양한 균주 현탁액을 담체와 혼합 하였다. 담체로는 미생물 보존에 널리 사용되는 talc, peat와 vermiculite를 이용하였다. 균체 현탁액(10^9 CFU/mL) 400 mL에 멸균한 talc, peat 또는 vermiculite 1 kg과 응집제로 carboxymethyl cellulose 10 g을 혼합하고 CaCO_3 15 g를 넣어 pH를 중성으로 맞춘 다음 무균상태로 실온에서 수분함량이 20% 이하가 되도록 건조시켜 폴리에틸렌 백에 넣어 보관하며 일주일 간격으로 생균밀도를 측정하였다[21]. 생균밀도는 시료 1 g을 멸균수 9 mL에 현탁시킨 후 상등액을 10^{-6} , 10^{-7} 로 희석하여 TSA 배지에 도말하여, 24시간 배양하여 균체수를 계수하였다.

선발 균주의 동정

선발 균주의 동정을 위하여 형태적, 배양적 특성 및 생화학적 특성을 조사하였으며, 16S rDNA 염기서열을 분석하였다. 순수 분리한 균주 SKU48-2로 부터 DNA를 추출하여 PCR primer는 universal primer 27F; 5'-AGAGTTTGA-TCMTGGCTCAG-3'와 1492R;5'-TACGGYTACCTTGTT-ACGACTT-3' 를 이용하여 증폭한 후 염기서열을 분석하여 Genebank database를 이용하여 유사도를 분석하였다

결과 및 고찰

길항균주의 선발

효과적인 토양성 식물병 방제를 위해서, 도입된 길항균이 뿌리에 정착 되는 것이 아주 중요하므로 고추와 토마토의 근권 토양에서 분리한 균주를 대상으로 식물 뿌리 주위 agar에 뿌옇게 집락을 형성하며 대조구에 비해 10% 이상 뿌리의 성장을 촉진시키고 또한 *in vitro*에서 *R. solanacearum* 균주에 대해 강한 antibiosis(저해환의 크기가 26 mm 이상)를 나타내는 TS1-2, TS1-3, SKU47-2와 SKU48-2의 4개 균주를 1차 선발하였다(Table 1).

풋마름병 발병억제 효과

식물 뿌리에 대한 성장 촉진 효과가 있고 근착능력이 양호하며, 풋마름병균에 대해 *in vitro* antibiosis를 나타내는 균주를 1차 선발한 다음 선발 균주를 대상으로 식물체에서 풋마름병 발병억제 효과를 검정하기 위해 포트실험을 행하였다. 선발 균주에 의한 풋마름병 발병 억제 효과는 종자처리와 토양관주 방법으로 검정하였다. 발병억제효과는 선발균주 현탁액을 종자에 코팅처리, 토양에 관주처리 그리고 종자처리와 토양처리를 병행하여 활성균주의 처리 없이 *R. solanacearum* 만 처리한 대조구에 대한 발병 억제율로 나타내었다. 대조구의 경우 *R. solanacearum* 처리 후 고추와 토마토 모두 3~4일 후 일부 시들음 증세가 나타나기 시작하며 토마토가 고추보다 빠르게 병이 진행되어 고추의 경우는 보통 7~8일, 토마토는 평균 5~6일정도면 완전 고사되는 것으로 확인되었다. 각 처리마다 토마토와 고추를 각각 10주 씩

Table 1. The root elongation effects of the selected strains on the pepper plant and the antibiosis against *R. solanacearum*.

Treatment	root elongation effect		antibiosis activity inhibition zone (mm)
	Root length (mm)	root elongation rate (%) ¹	
control	58.0 a		
TS1-2	64.3 ab	10.8	17
TS1-3	64.5 ab	11.2	13
SKU47-2	65.9 b	13.7	19
SKU48-2	66.0 b	13.9	20

¹ Data represent mean of 10 replications of each treatment. Mean root length in millimeters was measured at 10 days after treatment. An equal number of plants was treated with TSB medium as control. Means followed by the same letter within a column are not significantly different (P<0.05) as determined by Tukey's test. Root elongation rate = {(root length of treatment group-root length of control)/root length of control}×100 Inhibitory effects of the culture broth on the growth of *R. solanacearum* were determined by placing 10 mm paper disc containing 20 µL of the culture broth on TSA plates spreaded with *R. solanacearum* and measuring the inhibition zone after 24 hr incubation at 30°C.

3번 반복 실험하여 SAS ver 9.1.3을 이용하여 ANOVA 분석을 행하였으며 처리에 따른 차이는 Turkey's test 다중비교 방법으로 검정하였다(Table 2). 전반적으로 선발균주에 의한 풋마름병 방제 효과가 고추에 있어서 토마토 보다 약간 높게 나타났다(Fig. 1). 특히 SKU48-2 균주의 경우 방제효과가 대조구에 비해서 종자처리에 의해 고추는 46%, 토마토는 44% 좋게 나타났으나 통계적 유의성은 없었다. 반면에 토양처리와 종자+토양처리 시에는 고추의 경우는 70%, 토마토의 경우는 64~67%의 높은 발병 억제율(P<0.05)을 나타내었다. 이러한 결과는 선발균주의 식물뿌리에 집락형성에 따른 병원균과의 경쟁(niche)에 의한 발병억제보다 항생물질에 의한 병원균 저해활성이 더 효과적인 것으로 생각된다.

Table 2. Suppression of bacterial wilt of tomato and pepper plants by the antagonistic strains.

treatment	pepper		tomato	
	disease severity	biocontrol efficacy (%)	disease severity	biocontrol efficacy (%)
control (pathogen only)	3.8 a		3.9 a	
seed treatment¹				
TS1-2	2.3 ab	39.4	2.2 b	43.6
TS1-3	3.0 ab	21.1	2.0 b	48.7
SKU47-2	2.3 ab	39.5	2.5 ab	38.5
SKU48-2	2.1 ab	44.7	2.1 b	46.1
soil treatment²				
TS1-2	1.5 b	60.5	1.9 b	51.3
TS1-3	1.6 b	57.9	1.8 b	53.8
SKU47-2	1.5 b	60.5	1.5 b	61.5
SKU48-2	1.1 b	71.1	1.4 b	64.1
seed+soil treatment³				
TS1-2	1.4 b	63.2	1.6 b	59.0
TS1-3	1.5 b	60.5	1.5 b	61.5
SKU47-2	1.3 b	65.8	1.5 b	61.5
SKU48-2	1.1 b	71.1	1.3 b	66.7

Data represent means of 10 replications of each treatment. The experiment was repeated triplicate. Means followed by the same letter within a column are not significantly different (P<0.05) as determined by Tukey's test. Disease severity was rated 14 days after inoculation with *R. solanacearum*. Scale 0-4 where 0: healthy, no symptom; 1: approximately 25% of the plant wilted; 2: 50% of the plant wilted; 3: more than 75% of the plant wilted; 4: dead plant Biocontrol efficacy is based on comparisons to the nonbacterized but pathogen-challenged controls. Biocontrol efficacy=([disease incidence of control-disease incidence of treatment group]/disease incidence of control)×100 ¹ Pepper and tomato seeds were coated with the selected bacterial cell suspension and planted. ² Plants were grown in potting soil and was drenched with bacterial cell suspension. ³ The methods of seed treatment and soil drench were described in the materials and methods.

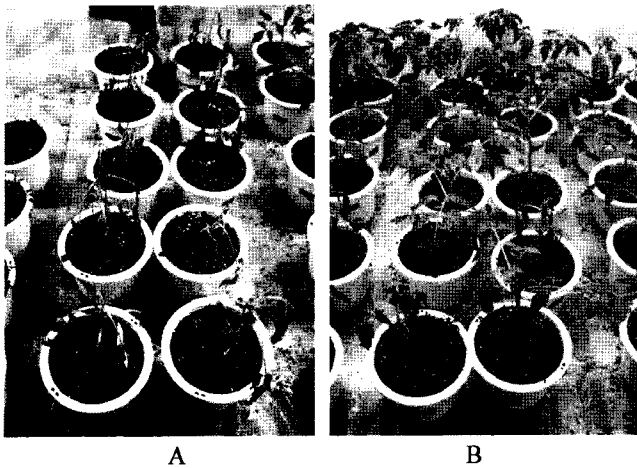


Fig. 1. Efficacy of SKU48-2 strain on the suppression of bacterial wilt of tomato. A. nontreated plants, B. plants treated with SKU48-2 strain through both seed coating and soil drench.

식물생장을 촉진시켜 plant growth promoting rhizobacteria (PGPR)로 지칭되는 근권 미생물들은 항생물질 생산에 의한 antibiosis, sideropher 생산에 의한 Fe 이온에 대한 경쟁, 식물 뿌리 표면의 colonization, 분해효소 생산, 기주 방어체계 (host defense system)의 활성화 그리고 식물생장 촉진효과로 병원균에 대한 노출시기 단축 등의 여러 복합적인 기작에 의해 식물병원균의 발병을 억제함이 알려져 토양 유래 병원균(soil born pathogen)의 발병을 억제하는 생물농약으로의 개발가능성이 크게 부각되고 있다[2, 3, 7, 13, 15]. Bacillus 속은 포자를 형성할 수 있을 뿐만 아니라 broad spectrum을 갖는 항생물질을 생산하기 때문에 병원균에 대해 방제효과가 뛰어나며 특히 종자처리에 의해 식물뿌리에 근착되어 토양 유래병원균을 억제한다고 보고된 바 있다[11]. 그러나 본 실험에서 최종 선발된 PGPR 균주, SKU48-2에 의한 풋마름병 발병억제 기작은 선발균주의 식물뿌리에 집락형성에 의한 병원균과의 경쟁(niche)에 의한 발병억제 기작과 항생물질에 생산에 의한 병원균 저해에 의한 것으로 생각되나 보다 명확히 하기 위하여 근권, 근면에서의 생균밀도 변화를 측정하였다. SKU48-2 선발균주를 코팅 처리한 종자를 pot 에 심은 다음 경과일수에 따라 식물을 뿌리째 뽑아 흙을 털어낸 후 뿌리째 멸균수 200 mL에 2~3시간 담갔다가 상등액을 TSA 배지에 도말하여 집락수를 계수하였다. 10⁹ cell을 종자에 코팅하여 바로 심은 경우 경과 일수에 따라 근권 근면에서의 처리균주의 감소가 일어나 3주 후 즉 보통 3~4엽기 발병 유도 시점에는 10³~10² CFU로 감소하였다. SKU48-2 균주의 경우 식물뿌리에 집락형성이 이루어지기는 하나 근착율이 높지 않은 것으로 나타났다(Fig. 2). 또한 균체 배양액과, 원심 분리하여 균체와 배양 상등액을 분리하여 각각 토양 처리하였을 때 균체 배양액과 원심 분리한 배양 상등액 처리가 균체 현탁액(10⁹ CFU/mL) 처리한 경우 보다 높은 발병 억제율을 나타냄이 확인되었다(자료 미

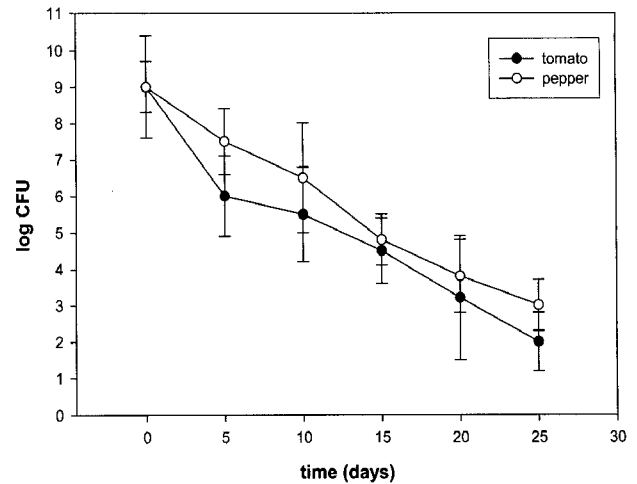


Fig. 2. Survival of SKU48-2 strain in the rhizoplane+rhizosphere of tomatoes and peppers. Values are the mean of 3 replications.

제시). 이상의 결과를 종합해 볼 때 SKU48-2 균주에 의한 풋마름병 발병억제 기작은 식물뿌리에 집락형성에 의한 병원균과의 경쟁(niche)에 의한 발병억제보다 항생물질 생산에 의한 direct antibiosis에 의한 병원균 저해인 것으로 생각된다.

국민소득 향상에 따라 깨끗하고 안전한 먹거리에 대한 관심이 커져 무농약 혹은 저농약 작물에 대한 소비자의 요구가 높아짐에 따라 화학농약 사용을 줄이거나 대체하고자 하는 노력이 많이 이루어지고 있다. 고추의 경우 탄저병을 야기하는 *Colletotrichum gloeosporioides*와 역병을 야기하는 *Phytophthora capsici*에 대해 높은 길항력을 나타내는 *Pseudomonas* sp.[9]와 *Bacillus* sp.[5]에 대한 보고와 줄기 썩음병을 야기하는 *Rhizoctonia solani*의 길항균에 대한 보고[1] 등 식물 병원성 곰팡이에 대한 생물학적 방제에 대해서는 연구가 많이 이루어지고 있으나, 상대적으로 세균성 식물병에 대한 연구가 미비한 실정이다. 특히 기후 온난화에 따라 고추와 토마토에서 국내 발병률이 매년 증가하고 있는 *Ralstonia solanacearum*에 의한 풋마름병에 대한 생물학적 방제제 개발이 시급하다. *Bacillus* sp.는 액체 배양 시 빠른 성장, 고온에 대한 내성과 포자 형성 등에 의해 생물농약으로서의 개발 가능성이 높은 균주로 iturin, surfactin과 bacillomycin 등의 antifungal substance 생산에 의한 곰팡이 유래 식물병 방제에 대한 연구가 행하여졌으나[17], antibacterial 물질 생산에 의한 세균성 토양병에 대한 방제 연구는 이루어지지 않았으나 본 연구에서 개발된 PGPR 균주로서의 *Bacillus subtilis* SKU48-2 균주는 항생물질 생산에 의해 병원균을 저해하는 것으로 밝혀졌으며 배양액으로부터 활성물질의 분리 정제가 진행 중에 있다.

선발균주의 농약에 대한 내성 조사

세균성 식물병 방제용으로 농가에서 사용되고 있는 농약

Table 3. Resistance of the selected strains to the chemical pesticides.

Strains	Buramycin		Agrepto		Agrymycin	
	500 µg/mL	700 µg/mL	500 µg/mL	700 µg/mL	500 µg/mL	700 µg/mL
TS1-2	-	-	-	-	-	-
TS1-3	+	-	-	-	-	-
SKU48-2	+	+	+	+	+	+
SKU7-2	+	-	-	-	-	-

+ : Resistance - : Susceptible

50 µL of the selected culture suspension (10⁹ CFU/mL) was dropped on the TSA plates containing different concentrations of agrochemicals. After 24 h incubation at 28°C, plates were inspected visually to determine the growth.

을 대상으로 *R. solanacearum*에 대한 방제효과를 검정하여 농약 3 종(부라마이신, 악리마이신과 아그레pto)를 선발하였고 이들 농약에 대한 활성균주(TS1-2, TS1-3, SKU47-2와 SKU48-2)의 내성을 조사하였다. TS1-2, TS1-3와 SKU47-2 균주들은 500 µg/mL 농도의 농약을 첨가한 배지에서는 대조구와 유사한 생육을 나타냈으나, 700 µg/mL의 농약 첨가 배지에서는 전혀 생육을 보이지 않았다. 반면 SKU48-2 균주의 경우 농약 3종 모두에 대해 강한 내성을 가져, 700 µg/mL 농도의 농약 첨가 배지에서도 양호한 생육을 보여 풋마름병 방제제 개발 후보 균주로 최종 선발하였다(Table 3).

환경 친화적 방제 필요성이 최근에 크게 대두되고 있으나, 여전히 작물의 안정적 생산을 위해서 유기합성 농약의 사용이 꾸준히 증가되고 있는 실정이다. 화학농약 사용을 줄이기 위한 방편으로 화학농약 내성 PGPR 균주와 화학농약의 병용이 하나의 대안이 될 수 있겠다. *Rhizoctonia solani*에 의한 모잘록병 방제를 위해 길항균과 flutolanil의 병용이 보고된 바 있다.[8] 농약과의 혼용 가능성이 확인된 SKU48-2 균주에 대해, 실제 포장에서 단독처리와 화학 농약과의 혼용처리에 따른 방제 효과 검정이 계획 중이다.

고체 담체를 이용한 제제화와 생균 밀도 변화

talc, peat 및 vermiculite 각각에 10⁹ CFU/g이 되도록 균체를 섞은 다음 시간 경과에 따른 생균밀도의 변화를 조사하기 위해 일주일 간격으로 시료 현탁액을 단계적으로 희석하여 TSA 배지에 도말하여 colony 수를 계수하였다. 사용된 담체 talc, vermiculite와 peat 모두의 경우 4주까지는 균체수가 증가하는 추세를 보이다가 이후 서서히 감소하였으나 6개월 까지 10⁶ CFU/g이 유지된 반면에 고체 담체를 사용하지 않은 균체 현탁액의 경우는 2주 후부터 생균밀도가 급격히 감소하여 4주 후부터는 거의 생균이 확인되지 않았다(Fig. 3). 담체를 사용한 고형 제제화에 의해 미생물 제제 개발 시 가장 큰 걸림돌인, 생균의 짧은 shelf-life가 6개월까지 개선됨이 확인되었다.

선발균주의 동정

선발균주 SKU48-2는 호기성의 그람 양성 간균으로 포자

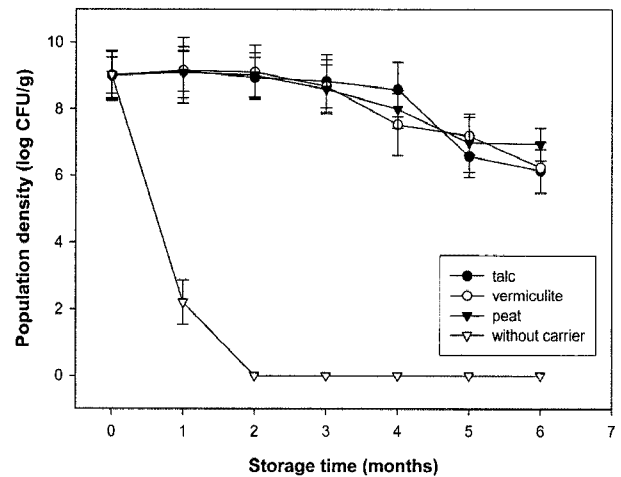


Fig. 3. Effects of different formulations on the population density of SKU48-2 strain. Population density of strain SKU48-2 is expressed as log cfu/g inoculated formulation. Number of cfu was obtained by the method described in the materials and methods. Values are the mean of three replications.

를 형성하며, catalase 생산이 확인되었고 또한 16S rDNA의 염기서열을 분석하고 GenBank database에 등록된 정보를 대상으로 BLAST search(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)한 결과 SKU48-2 균주는 *Bacillus subtilis*와 99% 유사성을 보여 *Bacillus subtilis* SKU48-2로 명명하였다.

요 약

근권 미생물을 대상으로 뿌리에서의 집락 형성 실험, 풋마름병 방제 효과 그리고 화학 농약에 대한 내성을 검정하여 SKU48-2 균주를 선발하였다. SKU48-2 균주는 균체 현탁액(10⁸ CFU/mL)을 처리 하였을 때 60% 이상의 풋마름병 방제 효과를 나타내었으며, 형태적, 생화학적 특성과 16S rDNA sequence 분석 결과 *Bacillus subtilis* SKU48-2로 동정되었다. 선발 균주 SKU48-2는 화학 농약에 대해 강한 내성을 가져 토양 내 잔류 농약에 의해 영향을 받지 않을 뿐만 아니라, 화학 농약과의 혼용에 의해서 저농약 사용이 가능하고 미생물제제 단독 사용 시 보다 높은 방제 효과를 기

대할 수 있다. SKU 48-2 균주가 액상의 배양액 상태에서는 4주 만에 생균밀도가 급격히 감소한 반면, talc, vermiculite 와 peat 등의 담체 사용 시는 생균밀도가 6개월 간 유지됨 이 확인되어 고품 제제화의 기초를 마련하였다.

감사의 글

통계 분석에 도움을 주신 정형기 교수님께 감사드립니다.

REFERENCES

- Asaka, O. and M. Shoda. 1996. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with bacillus subtilis RB 14. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 4081-4085.
- Bakker, P., L. Ran, C. Pieterse, and L. Van Loon. 2003. Understanding the involvement of rhizobacteria-mediated induction of systemic resistance in biocontrol of plant diseases. *Can. J. Plant pathol.* **25**: 5-9.
- Cook, R. J., L. S. Thomashow, D. M. Weller, D. Fujimoto, M. Mazzola, G. Banger, and D. S. Kim. 1995. Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**: 4197-4201.
- Curl, E. A. 1988. The role of soil microfauna in plant-disease suppression. *CRC in Plant Sci.* **7**: 175-196.
- Jung, H. K., and S. D. Kim. 2003. Purification and characterization of an antifungal antibiotic from *Bacillus megaterium* KL 39, a biocontrol agent of red-pepper *Phytophthora* blight disease. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 235-241.
- Kim, J. T., H. B. Cho, and S. D. Kim. 2005. Suppression of bacterial wilt with fluorescent Pseudomonads, TS3-7 strain. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **48**: 296-300.
- Kloepper, J., J. Leong, M. Teintze, and M. Schroth. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth promoting rhizobacteria. *Nature* **286**: 885-886.
- Kondoh, M., M. Hirai, and M. Shoda. 2001. Integrated biological and chemical control of damping-off caused by *Rhizoctonia solani* using *Bacillus subtilis* RB14-C and flutolanil. *J. Biosci., Bioeng.* **91**: 173-177.
- Lee, E. T., and S. D. Kim. 2000. Selection and antifungal activity of antagonistic bacterium *Pseudomonas* sp. 2112 against red-pepper rotting phytophthora capsici. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 334-340.
- 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.
- Ownley, B. H., D. M. Weller, and L. S. Thomashow. 1992. Influence of *in situ* and *in vitro* pH on suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Phytopathol.* **82**: 178-184.
- Ramamoorthy, V., R. Viswanathan, T. Raguchander, V. Prakasam, and R. Samilyappan. 2001. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and disease. *Crop Prot.* **20**: 1-11.
- Schell, M. A. 2000. Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory network. *Annu. Rev. Phytopathol.* **38**: 263-292.
- Silva, H. S. A., R. Romeiro, D. Macagna, B. Halfeld-Vieira, M. Pereira, and A. Mounter. 2003. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. *Biol. Control* **29**: 288-295.
- Shoda, M. 2000. Bacterial control of plant diseases. *J. Biosci. Bioeng.* **89**: 515-521.
- Spadaro, D. and M. Gullino. 2005. Improving the efficacy of biocontrol agents against soilborne pathogens. *Crop Prot.* **24**: 601-613.
- Tans-Kersten, J., H. Huang, and C. Allen. 2001. *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. *J. Bacteriol.* **183**: 3589-3605.
- Van Elsas, J. D., P. Kastelein, V. Bekkum, J. Van der Wolf, P.M. de Vries, and L. Van Overbeek. 2000. Survival of *Ralstonia solanacearum* biovar 2, the causative agent of potato brown rot in field and microcosm soils in temperate climates. *Phytopathol.* **90**: 1358-1366.
- Van Elsas, J. D., P. Kastelein, P. M. de Vries, and L. Van Overbeek. 2001. Effects of ecological factors on the survival and physiology of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 in irrigation water. *Can. J. Microbiol.* **47**: 842-854.
- Vidyasekaran, P. and M. Muthuamilan. 1995. Development of formulation of *Pseudomonas fluorescens* for control of chickpea wilt. *Plant Dis.* **79**: 780-782.

(Received Mar. 12, 2008/Accepted June 7, 2008)