

## 고추 역병 방제를 위한 저영양 길항세균 7F 균주의 동정

김동관<sup>1</sup> · 여윤수<sup>2</sup> · 권순우<sup>2</sup> · 장길수<sup>3</sup> · 이창묵 · 이미혜<sup>4</sup> · 김수진<sup>2</sup> · 구본성 · 윤상홍\*  
농촌진흥청 국립농업과학원 기능성물질 개발과, <sup>1</sup>건국대학교 의약연구소, <sup>2</sup>농촌진흥청 국립유전자원센터,  
<sup>3</sup>경상북도 영양고추시험장, <sup>4</sup>농촌진흥청 여주 농업기술센터

### Identification of the Oligotrophic Bacteria Strain 7F Biocontrolling Phytophthora Blight Disease of Red-pepper

Dong Gwan Kim<sup>1</sup>, Yun-Soo Yeo<sup>2</sup>, Soon-Wo Kwon<sup>2</sup>, Kil-Su Jang<sup>3</sup>, Chang-Muk Lee, Mi-Hye Lee<sup>4</sup>,  
Soo-Jin Kim<sup>2</sup>, Bon-Sung Koo and Sang-Hong Yoon\*

Dept. of Functional Materials Development, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-707, Korea

<sup>1</sup>Research Center for Drugs, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

<sup>2</sup>National Agrobiodiversity Center, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-857, Korea

<sup>3</sup>Youngyang Pepper Experiment Station, Gyeongbuk Provincial RDA Youngyang 764-803, Korea

<sup>4</sup>Dept. of Technical Support, Yeosu-gun Agricultural Technology Center, Yeosu 469-800, Korea

(Received on January 15, 2010)

A total of 10,753 oligotrophic bacteria were isolated from the cultivated soils of red-pepper infected by *Phytophthora* blight disease in various regions of Korea (Chungju, Anmyon, Taean, Andong, Eumsung and Goesan). Seven bacteria isolates among these collected resources were selected by the first screening of *in vitro* antagonistic assay against major several plant pathogenic fungi including *Phytophthora capsici*. Finally, strain 7F was selected by pot assay for a possible biological control agent against *Phytophthora* blight disease of pepper seedling in the greenhouse. Strain 7F was identified as *Bacillus subtilis* on the basis of its 16S rDNA sequence analysis and as standardized biochemical characteristics assay kits such as API20 NE. In the experiment of *P. capsici* zoospore infected red-pepper on the pot test, infection rate of red-pepper with non-treatment to *Phytophthora* blight disease was 87%, while the rate was only 6% in the pot treated with strain 7F. This result indicated that the *Bacillus subtilis* strain 7F will be useful as a potential biocontrol agent for *Phytophthora* blight disease of red-pepper.

**Keywords :** Antagonistic bacteria, Biological control, *Bacillus subtilis*, Oligotrophic bacteria, *Phytophthora* blight

*Phytophthora capsici*는 크로미스타게의 난균문에 속하는 운동성이 있는 유주자를 형성하고 물을 따라 전파된다. 고추 역병은 배수가 불량한 지역에서 자주 발생되고 노지에서는 6월 초순부터 발생되어 장마기에 주로 증식·전파되고 7~8월에 발생이 가장 심하며, 연작지 하우스 재배에서는 연중 발생되고 있다. 특히, 장마시작을 전후하여 전국적으로 급속히 확산되어 번지기 때문에 방제가 매우 어려운 대표적 식물 병들 중의 하나로 알려져 있다. 주로 고추, 가지 등의 가지과 작물과 수박, 참외, 오이 등

의 박과 작물을 침해하여서 수확량에 심각한 피해를 초래하기 때문에 이들의 방제를 위해 다양한 화학농약이 주로 사용되고 있다. 그러나 화학농약사용에 의한 잔류 독성 문제점 때문에 그 사용량을 점차 줄이고 있으나(Akihiro 등, 1992; Yoo 등, 1998), 무엇보다도 이 병은 일단 감염되면 효과적인 뚜렷한 방제 방법이 없는 실정이다. 더욱이 최근 생태환경의 중요성이 사회적으로 부각됨에 따라 실제 토양에서 방제 효과가 있는 새로운 생물농약에 대한 수요가 증가되고 있다. 최근에는 식물체 추출물에서 항진균성 물질을 분리하여 항진균성을 관찰하며(Jang 등, 2001; Cho 등, 2006; Choi 등, 2004), 특히 고추 역병균(*Phytophthora capsici*)에 대한 연구가 많이 이루어지고 있

\*Corresponding author  
Phone) +82-31-299-1691, Fax) +82-31-299-1672  
Email) shy3556@korea.kr

다(Shen 등, 2007; Jung 등, 2003).

자연계에 존재하는 전체 미생물 종들 중에서 실제로 미생물을 분리하여 이용하는 종은 1% 미만이고 나머지 99%에 이르는 다양한 미생물들은 인간의 실생활에 이용을 못하고 있는 실정이다. 이러한 미생물들을 농업적으로 이용하고자 하는 많은 노력들이 진행되고 있고, 현재까지 진행된 미생물분리 연구는 고농도 영양조건에서 급속히 증식하는 미생물이 대부분이었는데 저 농도 영양조건하에서 느리게 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 등, 1980; Whang 등, 1988; Kim 등, 2005). 그러나 국내에서는 이들 저영양성 세균을 대상으로 기능성 물질 또는 길항균을 선발하거나 이들의 분류 또는 생리적 특성에 대한 연구는 미진한 실정이다.

따라서 본 연구는 기존의 용이하게 배양되는 미생물 자원으로부터 선발하지 않고 아직 탐색이 미진한 저영양에서 자라는 미생물 자원을 대상으로 고추 역병의 생물학적 방제에 실질적 효과가 있는 신규 길항균을 선발하고자 하였으며 저영양 길항균의 동정 및 계통분류학적 특성을 검토하고 향후 식물병원균에 대한 생물학적 방제 등에 활용하기 위한 목적으로 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

**사용 배지 및 균주.** 저영양 세균의 분리를 위해 R2A 배지와 곰팡이 배양용 배지로는 PDA(Potato Dextrose Agar) 배지를 각각 사용하였으며, R2A 배지의 조성은 Yeast extract, 0.5 g; Proteose peptone, 0.5 g; Casamino acids, 0.5 g; Glucose, 0.5 g; Soluble starch, 0.5 g; Na-pyruvate, 0.3 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.3 g; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.05 g; distilled water, 1000 ml이며 pH 7.0-7.2로 조정하였다. 또한, 선발된 길항균의 생리, 생화학적 실험을 위한 표준균주로써 *Bacillus subtilis*(KACC 10854)와 식물병원성 병원균인 *P. capsici*(KACC 40483), *Colletotrichum gloeosporioides*(KACC 40003), *Botrytis cinerea*(KACC 40573), *Fusarium oxysporum*(KACC 40052), *Rhizoctonia solani*(KACC 40109), *Magnaporthe grisea*(KACC 40425) 등을 한국농업미생물자원센터(KACC)로부터 분양받아 사용하였다.

**저영양 세균 분리 및 in vitro 길항력 검정.** 고추 역병에 대한 길항세균을 분리하기 위하여 역병이 발생한 충북 충주, 음성, 괴산, 충남 안면, 태안, 경북 안동 지역 고추밭을 대상으로 역병이 발병되지 않은 개체의 근권 토양을 채취하여 polyethylene vinyl bag에 넣은 후 실험실

로 운반하였다. 수집된 토양시료 1 g에 멸균수 9 ml을 넣고 실온에서 30분간 shaking 한 후 10<sup>-3</sup>과 10<sup>-4</sup> 별로 희석하여 R2A 배지에 도말하였고 28°C에서 1주일간 배양하여 성장하는 세균만을 분리하였다. 분리된 저영양 세균은 20% 글리세롤이 첨가된 R2A 배지에 넣어 -70°C에 넣어 보관하여 사용하였다. 식물병원성 진균에 대해 항균력을 가진 저영양 세균을 선발하기 위해 PDA배지 상에서 3일 정도 배양된 식물 병원성 곰팡이의 말단부에 1 cm 간격을 두고 분리 선별된 각 세균배양액(10<sup>9</sup> CFU/ml)을 1 µl 씩 loading 한 후 28°C 항온기에서 3일간 대치배양 하면서 성장저지대 형성 여부를 관찰하였다.

**생화학적 분석에 의한 균 동정.** 선발된 저영양 세균의 생리, 생화학적 특성을 조사하기 위해 API 20NE kit를 이용하였다. Tryptic Soy Agar plate에서 균을 streaking하고 28°C 항온기에서 배양된 균의 집락들을 0.85% NaCl 40 ml에 현탁하여 API 20 NE kit(Biomérieux, Inc.) test를 수행하였고 그 결과를 API에서 제공하는 웹(www.API.com)의 database를 통해 분석하였다. 이를 토대로 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 색인을 이용하여 동정하였다(Holt 등, 1994).

**16S rDNA 추출 및 증폭.** Chromosomal DNA 분리는 benzyl chloride 방법으로 수행하였다(Miyagawa 등, 1993). 균체에 TE buffer(100 mM Tris HCl, 40 mM EDTA pH 8.0) 500 µl를 첨가하여 현탁시킨 후 10% sodim dodecyl sulfate(SDS) 100 µl와 benzyl chloride(Katayama chemicals Co.) 300 µl를 첨가하여 50°C에서 30분간 반응시켰다. 이 후 4°C, 13,000 rpm에서 15분간 원심 분리한 상등 액에 3M sodium acetate(pH 5.2) 10 µl를 첨가하여 잘 혼합한 후 2회에 걸쳐 phenol/chloroform/isoamylalcohol(25:24:1) extraction을 수행하였다. 최종적으로 얻어진 상등 액에 동량의 2-propanol을 첨가한 후 4°C, 30분간 원심분리하여 DNA를 침전시키고 70% ethanol로 2회 세척한 다음 진공건조시켰다. 최종적으로 50 µl의 멸균수를 첨가하여 DNA를 용해하였으며 0.8% agarose gel에서 전기영동(Mupid-2, TAKARA Co.)하여 확인하였다. DNA 농도와 순도를 측정하기 위하여 spectrophotometer로 260 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. 분리한 DNA로부터 16S rDNA gene을 증폭하기 위하여 fD1(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')과 rP2(5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') primer를 이용하여(Zhu 등, 1993; Au, 1995) 94°C에서 5분간 변성시킨 뒤 94°C에서 1분, 30°C에서 1분30초, 72°C에서 2분간, 34 cycle로 PCR을 수행하였다. PCR 증폭산물 중 1.5~1.6 kb에 해당하는 단편을 0.8% agarose gel, 0.5×TAE buffer에서 100 V로 30분간 전기영동한 후 ethidium bromide

용액에서 15분간 염색하여 UV 램프에서 확인하고 Qiagen PCR Purification Kit(Qiagen Inc.)로 정제하였다. 분리된 DNA는 사용자 설명서에 따라 PCR 2.1 Topo TA Vector system(Invitrogen)에 subcloning하였다.

**16S rDNA 연관관계 분석.** 염기서열 분석은 ABI 3700 (Perkin Elmer, Co.) 기기를 이용하였는데 준비된 clone을 template vector 내부에 포함된 M13 Forward, M13 Reverse primer를 제작한 뒤, Big Dye 2 u $\mu$ l, 5x 완충액 1 u $\mu$ l, primer (1.6 pmol/u $\mu$ l) 1 u $\mu$ l, template(250~500 ng) 6 u $\mu$ l를 PCR tube 에 넣고 혼합한 후 PCR(ABI 9700)하였다. PCR 조건은 95°C 10분 후 denaturation 96°C 10초, annealing 50°C 5초, extension 60°C 4분 조건으로 25 cycle을 수행하고 termination 72°C 10분, soaking 4°C로 하였다. 그 중 10 u $\mu$ l를 1.5 ml EP tube에 옮기고 3 M sodium acetate(pH 7.6) 1 u $\mu$ l와 얼음냉각한 100% 에탄올 25 u $\mu$ l를 넣고 얼음에 20 분간 방치 후 13,000 rpm에서 15분 원심분리하여 DNA를 침전시켰다. 상등 액을 버리고 70% cold 에탄올 100 u $\mu$ l로 두 번 세척한 후 상온에서 건조시켰다. 이후 TSR(template suppression reagent) 20-25 u $\mu$ l로 재 현탁하여 95°C에서 2분간 반응시키고 얼음에서 식힌 뒤, 마지막으로 automatic DNA sequencer로 fragment sequencing하였다. 염기서열의 상동성은 DDBJ/NCBI/GenBank database의 Blast program 을 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 저영양 세균의 계통분류학적 위치를 결정하였다(Saitou 등, 1987).

**고추 역병 생물 검정.** 선발균주에 의한 고추 역병 억제 효과는 토양관주 방법으로 검정하였다(Cho 등, 2006). 고추 역병 병원균의 포자형성을 유도하기 위하여 oat meal agar에서 1주일 동안 배양하고 다시 1주일 동안 광 처리를 하여 유주자낭의 형성을 유도하였다. 유주자낭으로부터 유주자를 나출시키기 위해 4°C에서 30분간 저온 처리하였다. 또한, 선발된 *B. subtilis* 7F 균주는 R2A 액체배지에 single colony를 접종한 후 shaking incubator(180 rpm, 28°C)에서 5일간 배양하였다. Cell harvest를 위해 원심분리(5,000 rpm, 15분)를 하여 상등 액을 버리고 10 mM MgSO<sub>4</sub> buffer로 10<sup>9</sup> CFU/ml이 되도록 재 현탁하였다. 한편, 고추 역병 억제효과를 검정하기 위한 고추 유묘는 원예 상토에 고추종자(‘금당’)를 60일 동안 경상북도 영양 고추시험장 유리온실에서 생육시켰다. 접종은 선발된 *B. subtilis* 7F 균주(10<sup>9</sup> CFU/ml)를 pot(4 cm×4 cm×4.5 cm) 당 4 ml씩 줄기 옆 토양에 직접 분주 하였고 3일 후 고

추 역병균 유주자(10<sup>4</sup> spores/ml)를 4 ml씩 토양에 접종하여 고추 역병 발병을 유도하였다. 이후 고추 역병 발생 정도를 25일간 조사하였다.

## 결과 및 고찰

**고추 역병에 대한 저영양 길항균의 선발.** 본 실험에 사용된 저영양 세균은 영양분이 극히 적은 환경에서 생육 가능한 것 즉, 배지 1리터당 미량의 유기 탄소원을 함유한 배지에서 증식 가능한 세균을 말한다(Ohta 등, 1980; Ishida와 Kadota, 1981; Whang 등, 1988). 이러한 저영양 길항균은 그 자체로서 매우 많은 미생물의 범주를 포함하기 때문에 신규 길항균을 찾을 확률이 높다. 또한, 미생물 재제로 개발될 경우 주 영양분의 농도가 매우 낮아 생산 단가가 낮아지는 장점이 있기 때문에 경제성 또한 높을 것으로 예측이 된다. 지역별로 수집된 고추 근권 토양 시료를 평판희석법으로 저영양 배지인 R2A 배지에 도말한 결과, 총 10,753 균주가 분리되었으며 분리된 저영양 세균의 고추 역병균(*P. capsici*)에 대한 길항력 검정은 대치 배양법으로 실시하였다. 분리된 전체 저영양 세균들을 대치 배양하여 길항균을 1차 선발한 결과 고추 역병에 대하여 366개의 저영양 세균이 고추 역병 균 생육을 저해하였다(Table 1). 특히, 안면, 태안 고추밭 토양에서는 고추 역병에 대해 역가 +++이상의 강한 활성을 가지는 15~26균주가 분리 되었으나 음성, 안동 토양인 경우에는 강한 활성을 가지는 균주가 7~9균주 밖에 분리되지 않았다. 이는 안면, 태안 고추밭의 경우, 토양시료 채취 시 고추 역병이 포장에서 많이 발생하는 장마철 이후부터 9월 중순에 걸쳐 수집된 반면에, 안동, 음성 토양의 경우 고추 역병이 크게 발병되기 전인 5월경 시료가 수집되었기 때문인 것으로 생각된다. 따라서 고추 역병에 강한 길항력을 가지는 균주를 분리하기 위해서는 고추 역병이 심하게 발병되는 시기에 시료를 수집하는 것이 선발율을 높일 수 있다고 판단된다.

**선발 길항균의 항균 spectrum.** 고추 역병에 강한 활성을 가지는 저영양 세균 중 대표적인 7 균주에 대하여 고추 역병균 이외의 중요한 식물병원성 진균인 고추 탄저병균(*C. gloeosporioides*), 딸기 잿빛곰팡이병균(*B. cinerea*), 토마토 시들음병균(*F. oxysporum*), 인삼 갈록병균(*R. solani*), 벼 도열병균(*M. grisea*) 등에 대한 항균활성을 조사하였다(Table 2). 선발 균주들은 고추 역병에 대하여는 강한 활성을 나타냈으나, 다른 식물병원균에 대해서는 다양한 항균활성을 보였다. 특히 12H 균주인 경우에는 고추 탄저병에는 활성이 전혀 나타나지 않았으나 7F 균주는 고

**Table 1.** Regional distribution of antifungal oligotrophic bacteria

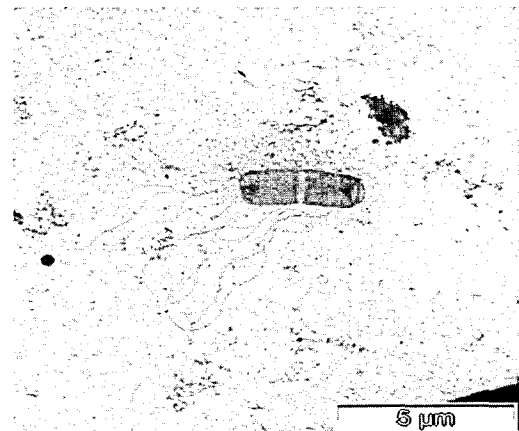
Areas obtained	Number of isolates by the diameter of clear zone formation <sup>a</sup>				
	+	++	+++	++++	None
Chungju	4	4	-	100	2859
Anmyon	10	5	11	68	1876
Taeon	12	14	3	52	2072
Andong	4	5	23	-	1454
Eumsung	2	5	12	-	1372
Goesan	4	6	15	-	1630
Total	36	40	110	180	10387

<sup>a</sup>A degree of fungal growth suppression by oligotrophic bacterial strains was measured according to the diameter of clear zone caused by fungal growth inhibition: +: 1~2, ++: 3~4, +++: 5~6 and ++++: 7 mm or above.

추 탄저병 뿐만 아니라 잣빛곰팡이병, 시들음병에도 강한 활성을 나타내었다. 12H를 제외한 대부분의 선발 균주들은 고추 역병과 고추 탄저병에 대하여 길항력을 보였으며, 10H와 7E는 이 외의 균주에 대해서는 거의 길항력을 나타내지 않았다. 또한 12D 균주는 처리를 하지 않은 인삼 갈록병과 벼 도열병을 제외하고는 나머지 모든 시험 병원균주에 대하여 강한 길항력을 보였다.

**7F 균주의 동정.** 고추 역병뿐만 아니라 다른 식물병원균에 대해서도 길항력을 보이는 7F 균주에 대하여 동정을 실시하였다. 전자현미경으로 관찰한 결과 이 균주는 전형적인 *Bacillus*속에서 볼 수 있는 간상형 외형을 보이고 있었으며 편모도 관찰되었다(Fig. 1). 그람염색 결과 gram positive로 밝혀졌으며, TSB 배지에서 자랄 때 점액성 물질을 콜로니 표면에 형성하였다. 분자생물학적 동정은 genomic DNA로부터 약 1.5 kb 크기의 16S rDNA를 PCR로 증폭하여 순수 정제하고 27F primer를 이용하여 sequencing 후 Blast search하여 비교 분석한 결과, Fig. 2에서 보는 바와 같이 계통분류학적으로 *B. subtilis*와 가장 유연관계가 밀접한 것으로 조사되었다. 이러한 결과를 바탕으로 생리, 생화학적 특성을 표준균주인 *B. subtilis* KACC

10854와 비교하여 조사하였다. 생화학적 특성은 potassium nitrate, esculin, gelatin, 4-nitrophenyl-D-galactopyranoside를 가수분해하는 양성반응을 보였으며, L-tryptophane, D-glucose, L-arginine, urea의 효소반응에는 음성반응을 보였다. 탄소원 이용성은 mannose, mannitol, N-acetylglucosamine, maltose, gluconate 등의 당을 이용하였다



**Fig. 1.** Transmission Electron Microscopy feature of *Bacillus subtilis* strain 7F. White box indicates reference bar.

**Table 2.** Antifungal aspects of the selected oligotrophic bacteria to the major plant fungal disease

Indicator strains	Degree of clear zone formation <sup>a</sup>						
	12D	12H	4A	7F	10H	7E	3C
<i>Phytophthora capsici</i>	++++	++++	+++	+++	+++	++++	+++
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	+++	-	++++	++++	+++	+++	+++
<i>Botrytis cinerea</i>	++++	++	++	++	-	-	+++
<i>Fusarium oxysporum</i>	++++	++	+++	++	-	-	+++
<i>Rhizoctonia solani</i>	NT	+	NT	++	-	-	++
<i>Magnaporthe grisea</i>	NT	+	NT	-	+	-	+

<sup>a</sup>A degree of fungal growth suppression by oligotrophic bacterial strains was measured according to the diameter of clear zone caused by fungal growth inhibition: +: 1~2, ++: 3~4, +++: 5~6 and ++++: 7 mm or above. NT and - means Not Treated and no effect, respectively.

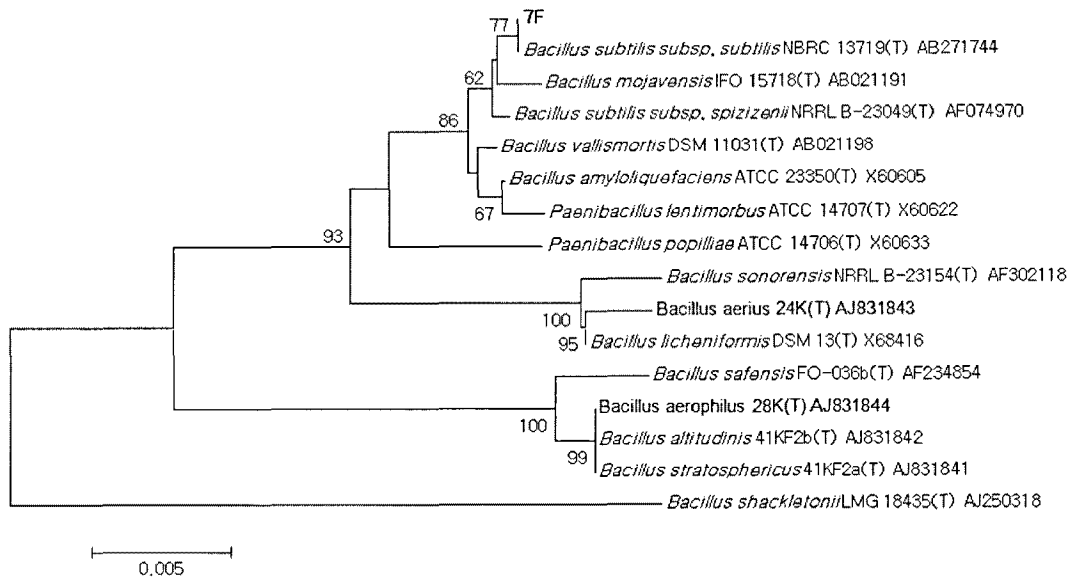


Fig. 2. Neighbor joining phylogenetic tree analysis of *Bacillus subtilis* strain 7F using 16S rDNA sequences.

(Table 3). 따라서 표준균주와 비교하여 보면 7F 균주는 표준균주인 *B. subtilis*와 대부분의 생화학적 반응이 일치 하였으므로 이 균주를 최종적으로 *B. subtilis* 7F로 명명 하였다.

***B. subtilis* 7F 균주의 in vivo 방제 효과 검정.** 대치배 양으로 선발된 길항미생물인 7F 균주가 고추 역병에 대해 토양 내에서 실제로 그 생물학적 방제력이 있는지 확인하기 위해 기주식물인 고추를 대상으로 하여 *in vivo* test를 실시하였다. 60일 정도 자란 고추 유묘에 *B. subtilis* 7F( $10^9$  CFU/ml) 4 ml을 토양관주 접종하고 3일 후 고추 역병균의 포자 현탁액( $10^4$  spores/ml) 4 ml을 접종하였으며 대조구로는 10 mM  $MgSO_4$ 를 처리하여 25일간 고추 역병 발생 여부를 조사하였다. 전형적인 고추 역병 증상은 고추의 줄기 하단부가 고사되어 적갈색을 띠며 잎은 마르고 줄기부분은 말라 딱딱해지는 현상이 나타나는데 특히 대조구인 경우 접종 후 5일부터 고추 역병이 나타나기 시작해서 7일 이후에는 급격히 이병율이 올라가서 15일째는 76%, 25일째는 87%까지의 이병율을 보였다(Fig. 3). 반면에 *B. subtilis* 7F를 접종한 처리구에서는 접종 후 20일 까지도 전혀 고추 역병의 병징이 나타나지 않았으며 25일에서야 6% 미만의 낮은 이병율을 보여 고추 역병에 대해 탁월한 방제효과가 있음을 알 수 있었다. *Bacillus* 속의 일부는 진균의 세포벽을 분해하는 효소인 cellulase, amylase, gluconase 등을 생산할 뿐만 아니라(Grau 등, 2001; Phister 등, 2004) iturin, surfactin과 bacillomycin 등의 항진균성 lipo-cyclopeptide계의 항생물질을 생산한다고 알려져 있다(Maget-Dana 등, 1994; Bais 등, 2004; Tsuge 등, 1996;

Table 3. Comparison of Physiological and biochemical properties of the *Bacillus subtilis* strain 7F with *B. subtilis* standard strain KACC10854

Characteristics	7F	KACC10854
Potassium nitrate	+	+
L-tryptophan	-	-
D-glucose (fermentation)	-	-
D-glucose (assimilation)	+	+
L-arginine	-	-
Urea	-	-
Esculin ferric citrate	+	+
Gelatin	+	+
4-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside	+	+
L-arabinose	+	+
D-mannose	+	+
D-mannitol	+	+
N-acetylglucosamine	+	+
D-maltose	+	+
Potassium gluconate	+	+
Capric acid	-	-
Adipic acid	-	-
Malic acid	+	+
Trisodium citrate	+	+
Phenylacetic acid	-	-

Roongsawang 등, 2002; Spadaro 등, 2005). 본 연구를 통하여 선발된 *B. subtilis* 7F 균주는 일반적으로 다른 세균에 비해 액체 배양 시 빠른 증식은 물론, 극한 환경조건

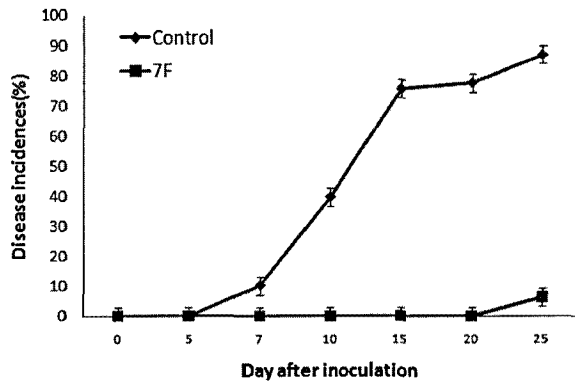


Fig. 3. Biocontrol effects of the *Bacillus subtilis* strain 7F to *Phytophthora* blight disease. All values were mean  $\pm$  S.D (n=3).

하에서도(온도변화, 영양불량, pH 등) 포자 형성능으로 인한 생존력이 뛰어나므로 토양 침투시 안정적으로 작물에 근착할 수 있다. 또한 본 연구의 7F 균주는 매우 낮은 영양성분 농도에도 잘 자라므로 인공 대량배양 시 생산경비 측면에서 대폭적 절감효과가 있어 미생물농약으로서의 개발 가능성을 높여준다. 또한 이 균의 항 역병 효과의 원인 물질을 분리, 동정할 경우 새로운 biopesticides의 선도물질 개발이 기대된다.

## 요 약

고추 역병이 발생한 충주, 안면, 태안, 안동, 음성 그리고 괴산지역의 고추밭 토양에서 전체 10,753균주의 저영양 미생물을 분리하였다. 이들 중 *Phytophthora capsici*를 포함하여 식물체의 주요 병원성 곰팡이에 대해 길항작용을 보이는 균주들을 일차적으로 선발하였다. 최종적으로는 온실 고추유묘 검정을 통해 고추 역병에 대해 탁월한 방제가를 보이는 7F 균주가 선발되었다. 이 균주는 16S rDNA염기서열 분석과 API20 NE 키트를 통한 생리, 생화학적 분석을 통하여 *Bacillus subtilis*로 동정되었다. 고추 역병균 포자를 처리한 고추 유묘 화분 검정에서, 처리 25일 후 대조구는 고추 역병 이병 비율이 87%에 이르는 반면에 7F 균주를 처리한 처리구에서는 단지 6%의 이병율을 보였다.

## 감사의 글

본 연구는 농업생명공학연구원 경상연구사업(과제번호 08-4-12-9-1)지원에 의해 이루어 졌으며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Akihiro, O., Takashi, A. and Makoto, S. 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.
- Bais, H. P., Fall, R. and Vivanco, J. M. 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiol.* 134: 307-319.
- Cho, J. Y., Choi, G. J., Lee, S. W., Lim, H. K., Jang, K. S., Lim, C. H., Cho, K. Y. and Kim, J. C. 2006. *in vivo* Antifungal Activity Against Various Plant Pathogenic Fungi of Curcuminoids Isolated from the Rhizomes of *Curcuma longa*. *Plant Pathol. J.* 22: 94-96.
- Choi, G. J., Jang, K. S., Kim, J. S., Lee, S. W., Cho, J. Y., Cho, K. Y. and Kim, J. C. 2004. *in vivo* Antifungal Activities of 57 Plant Extracts Against Six Plant Pathogenic Fungi. *Plant Pathol. J.* 20: 184-191.
- Grau, A., Gomez-Fernandez, J. C. Peypoux, F. and Ortiz, A. 2001. Aggregational behavior of aqueous dispersions of the antifungal lipopeptide iturin A. *Peptides.* 22: 1-5.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T. and Williams, S. T. 1994. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 9th. William and Wilkins Baltimore Ltd., U.S.A.
- Ishida, Y. and Kadota, H. 1981. Growth patterns and substrate requirements of naturally occurring obligate oligotrophs. *Microbiol. Ecol.* 7: 123-130.
- Jang, K. S., Kim, H. M. and Chung, B. K. 2001. Purification and Antifungal Activities of an Antibiotic Produced by *Gliocladium virens* G1 Against Plant Pathogens. *Plant Pathol. J.* 17: 52-56.
- Jung, H. K. and Kim, S. D. 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., Kim, M. Y., Koo, B. S., Yoon, S. H., Yeo, Y. S., Park, I. C., Kim, Y. J., Lee, J. W. and Whang, K. S. 2005. Isolation and phylogenetic characterization of chitinase producing oligotrophic bacteria. *Kor. J. Microbiol.* 41: 293-299.
- Maget-Dana, R. and Peypoux, F. 1994. Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: biological and physicochemical properties. *Toxicology.* 87: 151-74.
- Nikitin, D. I. and Chumakov, K. V. 1985. The functional role of oligotrophic microorganisms. In V.Jensen(ed.), *Microbial communities in soil. FEMS Symposium.* 33: 177-189.
- Ohta, H. and Hattori, T. 1980. Bacteria sensitive to nutrientbroth medium in terrestrial environments. *Soil Sci. Plant Nutr.* 26: 99-107.
- Phister, T. G., O'Sullivan, D. J. and McKay, L. L. 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., Kameyama, T., Haruki, M. and Morikawa, M. 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 Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Shen, S. S., Piao, F. Z., Lee, B. W. and Park, C. S. 2007. Characterization of Antibiotic Substance Produced by *Serratia plymuthica* A21-4 and the Biological control Activity against Pepper *Phytophthora* Blight. *Plant Pathol. J.* 23: 180-186.
- Spadaro, D. and Gullino, M. 2005. Improving the efficacy of biocontrol agents against soilborne pathogens. *Crop Prot.* 24: 601-613.
- Tsuge, K., Ano, T. and Shoda, M. 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.
- Whang, K. and Hattori, T. 1988. Oligotrophic bacteria in rendzina a forest soil. *Antonie van Leeuwenhoke.* 54: 19-36.
- Yoo, J. K., Ryu, K. H., Kwon, J. H. and Lee, S. S. 1998. Fungicidal of oriental medicinal plant extracts against plant pathogenic fungi. *Agric. Chem. Biotechnol.* 41: 600-604.
- Zhu, H., Qu, F. and Zhu, L. H. 1993. Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride. *Nucleic Acids Res.* 21: 5279-5280.