

점액세균 *Myxococcus* sp. KYC 1126을 이용한 고추 역병 생물학적 방제 효능

김성택 · 윤성철*

선문대학교 의생명과학과

Biocontrol Activity of *Myxococcus* sp. KYC 1126 against *Phytophthora* Blight on Hot Pepper

Sung-Taek Kim and Sung-Chul Yun*

Department of Biomedical Sciences, Sun Moon University, Asan 330-744, Korea

(Received on February 16, 2011; Revised on April 9, 2011; Accepted on April 15, 2011)

Bacteriolytic myxobacteria have been known to secrete various antifungal metabolites against several soil-borne phytopathogens including *Phytophthora*. Among the three isolates of *Myxococcus* spp., KYC 1126 and KYC 1136 perfectly inhibited the mycelial growth of *Phytophthora capsici* *in vitro*. In order to show the biocontrol activity on *Phytophthora* blight of hot pepper, we tried to find the best way of application of a myxobacterial isolate. Although KYC 1126 fruiting body was easily grown on the colony of *Escherichia coli* as a nutrient source, it did not control the disease when it was pre-applied in soil. Before the bioassay of a liquid culture filtrate of KYC 1126 was conducted, its antifungal activity was confirmed on the seedlings applying with the mixture of the pathogen's zoospore suspension and KYC 1126 filtrate. On greenhouse experiments with five and four replications, the control value of KYC 1126 on phyllosphere and rhizosphere was 88% and 36%, respectively. Whereas, the control value of dimetnomorph+propineb on phyllosphere was 100% and that of propamocarb on rhizosphere was 44%. There was a phytotoxicity of the myxobacterial filtrate when seedlings were washed and soaked for 24 hours. Gummy materials were covered with roots. And stem and petiole were constricted, then a whole seedling was eventually blighted.

Keywords : Antifungal metabolites, Bacteriolytic myxobacteria, *Myxococcus*, *Phytophthora capsici*

서 론

역병은 토양에서 월동하면서 장기간 생존하는(이 등, 2005) 토양 전염병으로 연작 재배시 토양 내 염류가 집적되면서 병원균 밀도가 증가하여 피해가 점차 심각해진다. 가장 효과적인 방제 방안인 화학 농약 사용은 발병이 심할수록 사용량이 증대되어 저항성 균이 출현하므로 역병 방제에 다른 대안이 필요하다(Hwang과 Kim, 1995). 포장에서 역병균의 분포는 지역별로 다양하며 다른 근권 미생물들에 비해 부생력이 약해 경쟁력이 떨어지므로(농업과학기술원, 2001; Song 등, 2002), 근권 길항 미생물을

이용한 생물학적 방제가 용이한 병원균 중 하나이다.

단세포 토착 미생물인 점액세균은 토양, 나무껍질, 썩은 식물체 등에 존재하는 그람 음성 활주 세균으로서 단세포임에도 독특한 군집 생활을 하며, 영양분이 고갈되거나 환경 조건이 불리해지면 다세포인 버섯 모양의 자실체를 형성한다. 형성된 자실체 내부에는 점액포자가 생성되며 이 과정에서 분비하는 2차 대사물질은 주위 미생물을 포획하거나 생체대분자를 분해한다(김 등, 2003; Shimkets 등, 1990). 점액세균이 생리활성물질을 분비하는 특성(Bull 등, 2002)은 신소재 유용물질로서 산업적인 연구가 최근 활발하다. 특히 토양에 선발된 점액세균을 정착시킴으로써 지속적으로 생리활성물질을 분비할 수 있는 환경을 조성한다면 건강한 발병억제 토양을 만들 수 있을 것이다. 자실체를 형성하기 위해서는 기내에서 충분한 영양배지에 있는 점액세균을 영양분이 없는 한천배지로 옮기는 방

*Corresponding author

Phone) +82-41-530-2282, Fax) +82-41-530-2939

Email) scyun@sunmoon.ac.kr

법을 사용한다(Wireman과 Dworkin, 1977).

점액세균은 몇몇의 토양전염성 병원균을 억제하거나 용해함으로써 식물병을 방제할 수 있다. Bull 등(2002)은 6종류의 bacteriolytic 점액세균(*Myxococcus coralloides*, *M. flavescens*, *M. fulvus*, *M. stipitatus*, *M. virescens*, *M. xanthus*)을 사용하여 8종류의 토양전염성 식물 병원균(*Pythium ultimum*, *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia* spp., *Sclerotinia minor*, *Verticillium dahliae*, *Verticillium albo-atrum*, *Cylindrocarpon* spp., *Fusarium oxysporum* f. sp. *apii*)의 균사 생장 저해 능력을 평가하였다. 그 중 *P. ultimum*, *P. capsici*, *Rhizoctonia* spp., *S. minor*의 생장이 크게 저해되었고 점액세균 중에서는 *M. coralloides*의 항진균 활성이 가장 뛰어났다. 또한 점액세균 분비 물질인 myxothiazole이 토마토 역병을 98% 방제한다고 보고하였다(김 등, 1998). 하지만 점액세균은 배양 조건이 까다롭고, 생육 속도가 느리며, 액체 배양 시 세포가 배양 용기 내부 표면에 붙어 응집하려는 성향을 보이는데 이러한 특성이 균주 조작이나 생장 측정을 정량화하기 어렵게 만들고, 독립된 세포로 존재하지 않기 때문에 돌연변이 균주나 형질전환 균주 선별이 곤란하다(이 등, 2003; 조, 2001). 이러한 까다로움으로 인해 길항제제로서 점액세균 활용이 보편화되지 못하고 있다.

따라서 본 연구는 기내에서 역병에 대한 길항력이 확인된 우리나라에서 분리된 *Myxococcus* spp. 균주들 중 생리활성물질 분비를 극대화하는 길항 점액세균의 생물방제 처리 방안을 찾기 위해 1) 자실체 생성을 극대화할 수 있는 방법을 찾아 자실체를 직접 고추묘 뿌리에 투입하거나, 2) 점액세균 액체 배양여액을 고추 근권 및 엽권에 처리하여 생물학적 방제 효과를 알아보았다. 이는 점액세균 배양추출물로 식물병의 길항능력을 검정했던 기존 보고(김 등, 1998)보다 좀 더 실용적인 점액세균 처리방법으로 점액세균의 길항력을 검정하고자 하였다. 궁극적으로 미생물 농약으로서 점액세균의 실용화 방안을 찾고자 연구를 실시하였다.

재료 및 방법

역병균 배양 및 유주자 현탁액. 한국농업미생물자원센터(Korean Agricultural Culture Collection; KACC)에서 분양받은 고추 역병균 *P. capsici* No. 40476을 V8A쥬스 한천배지(V8쥬스 100 ml, CaCO₃ 1 g, Agar 17 g, D.W. 900 ml)에 접종하여, 명 상태와 암 상태가 교대되는 25°C 항온기에서 5일 동안 배양하였다. 역병균의 유주자낭을 형성시키기 위해 역병균을 배양한 V8A쥬스 한천배지의

균사 부분을 약 1.0 mm×1.0 mm 크기의 육면체로 조각내어 멸균수 20 ml가 담긴 페트리 접시에 한천 조각을 10개씩 첨가한 후, 형광등이 조사된 25°C 항온기에서 5일 동안 액상 배양하였다. 유주자낭에서 유주자를 인위적으로 유출시켜 접종원으로 사용하고, 액상 배양된 유주자낭을 4°C에서 3시간 동안 저온 처리하고, 1시간 동안 25°C에 두었다(지 등, 1998). 유주자 유출의 관찰은 광학현미경 상에서 하였으며, 접종을 위한 유주자 현탁액 농도는 혈구계수기로 10⁴ zoospores/ml으로 맞추었다.

점액세균 배양. 점액세균은행에서 분양받은 *Myxococcus* spp. 세 균주인 KYC 1126, KYC 1136 그리고 KYC 2001을 CY 한천배지(Casitone 0.9 g, Yeast extract 0.3 g, CaCl₂·2H₂O 0.3 g, Agar 4.5 g, D.W. 300 ml)에서 32°C, 4일 동안 배양하였다(이 등, 2003). KYC 1126과 KYC 1136 두 균주는 2002년 충남 서산 토양에서 KYC 2001은 2004년 전북 진안 토양에서 분리한 점액세균이었다(<http://www.myxobank.or.kr>). 길항물질 생산을 위해 CY 한천배지에서 배양된 균총을 멸균된 시술용 칼로 조각낸 후, CYE 액체배지(Casitone 3 g, Yeast extract 1.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.3 g, 10 mM morpholinepropanesulphonic acid; MOPS pH7.6, D.W. 300 ml)에 접종하여 32°C에서 6일 동안 180 rpm으로 진탕배양 하였다(Shi와 Zusman, 1994).

기내에서 점액세균 길항 능력 평가. KYC1126, KYC 1136(정 등, 2008) 및 KYC 2001 등 세 가지 점액세균 균주의 *P. capsici* 균사 생장 억제 활성을 측정하기 위해 점액세균 병원균이 같이 성장할 수 있도록 고안된 PDCY 평판배지(Casitone 5, Yeast extract 1 g, CaCl₂·2H₂O 1 g, Potato dextrose 2.4 g, Agar 15 g, D.W. 1 l)를 사용하였다(정 등, 2008). 길항 능력 평가를 위해 CY 평판배지에서 배양한 점액세균을 PDCY 배지에 4일동안 순수배양한 후, 멸균된 주걱으로 긁어 대부분의 점액세균 균총을 제거하고 배양 분비물만 남은 한천배지에 역병균 균사 조각을 치상하여 역병균의 균사 생장을 7일간 측정하였다. 대조구로는 점액세균을 배양하지 않은 PDCY 배지였다. 균사 생장 측정은 3반복 시행하였으며, 각 반복 당 한 처리에 5개의 페트리 접시를 사용하였다.

점액세균 자실체 형성 방법 결정 및 자실체의 고추묘 근권 처리. 점액세균 자실체를 형성하기 위한 영양원으로 *Escherichia coli* C1a 균주를 사용하였다. LB 액체배지에서 배양한 *E. coli*를 원심 분리하여 *E. coli* 균체만을 얻고 이것을 121°C에서 15분 동안 사멸시킨 후, 0.1% CaCl₂·2H₂O이 함유된 한천배지에 *E. coli* 100 µl 도말 후 점액세균을 도말(방법 1), 0.1% CaCl₂·2H₂O이 함유된 한천배지 300 ml 제조시 *E. coli*를 1000 µl 첨가하여

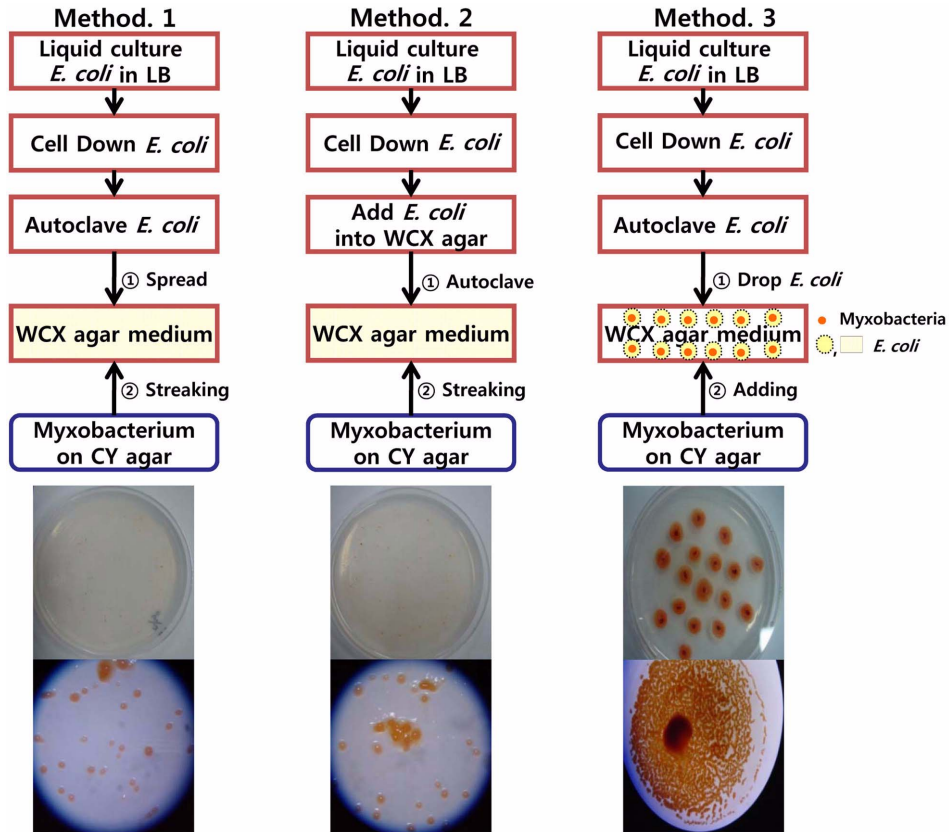


Fig. 1. Three different methods of formation fruiting body of myxobacteria KYC 1126. Two photos in each methods were the fruiting bodies on cultural media (**upper**) and colony of fruiting body $\times 40$ under stereoscopic microscope (**lower**).



Fig. 2. Preformed myxobacterial fruiting body was applied to soil before Phytophthora inocuation.

혼합 후, 점액세균을 도말(방법 2), 0.1% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 이 함유된 한천배지 위에 *E. coli*를 떨어뜨려 굳힌 후, 점액세균을 접종(방법 3) 등 3가지 방법(Fig. 1)으로 32°C 항온기에서 수일 동안 배양하여 자실체 형성 여부와 자실체가 형성된 양을 실체현미경으로 관찰하였다. 자실체의 고추묘 근권 처리는 한천배지 위에서 형성된 자실체를 멸균된 시약스푼으로 퍼내 고추 근권에 접종하였다(Fig. 2). 자실체 처리 후 역병균 유주자 현탁액을 관주 접종하여 역병을 발병시켰다. 역병균을 접종한 고추묘는 24시간 동안 습실처리 하였으며 자실체 근권 처리는 2회 반복 실험하였고 병 조사는 24시간 간격으로 실시하였다. 실험에 이용된 포트의 개수는 처리당 20개이며, 2-3일 간격으로 관주하였다. 발병율(incidence, %)은 병조사 시기별로 다

음과 같은 방법으로 측정하였다.

$$\text{발병율}(\%) = (\text{역병 발병 고추묘 개수}) / (\text{각 처리에 사용한 고추묘 개수}) \times 100$$

유주자 현탁액과 점액세균 KYC 1126 배양여액 혼합물의 역병방제 평가. 처리 1과 처리 2로 나누어 수행하였는데, 첫 번째 처리는 유주자 현탁액과 점액세균 배양여액을 먼저 혼합한 후, 고추묘 뿌리에 침지접종하여 방제 능력을 알아보았다. 역병균 유주자 현탁액과 점액세균 KYC 1126 액체배양여액을 1:1비율(v:v)로 섞어 이들이 충분히 반응할 수 있도록 12시간 동안 실온에 방치하여 혼합물을 만들었다. 6-10엽기 고추묘 뿌리의 흙을 털어내고 물로 행군 후, 준비한 혼합물에 1시간 동안 침지 접

중한 후, 지름이 9 cm 포트에 이식하여 24시간 동안 습실처리 하였다. 병 조사는 모든 고추묘에서 역병 증상이 보일 때까지 24시간 간격으로 측정하였으며, 실험은 3회 반복하여 실시하였다. 반복당 한 처리에 이용된 고추묘 개수는 15-20개이며, 2-3일 간격으로 관주하였다. 발병율(incidence)은 자실체 실험과 같은 방법을 사용하였다.

두 번째 처리(처리 2)는 점액세균 배양여액에 고추뿌리를 침지한 후, 역병 유주자 현탁액 접종한 것이었다. 6-10엽기 고추 뿌리의 흠을 털어내고 물로 행군 후 12시간 동안 점액세균 액체배양여액에 침지하였다. 점액세균 배양여액이 침지된 고추 뿌리를 유주자 현탁액에 1시간 동안 접종한 후, 지름이 9 cm인 포트에 이식하여 24시간 동안 습실 처리하였다. 병 조사와 관개방법, 반복당 식물체 개수는 처리 1과 동일하였으며, 실험은 3차례 반복하여 실시하였다.

온실 포트에서 점액세균의 고추 역병 길항능력 평가. 유리 온실에서 다보탑 품종 유묘를 50구 포트에 이식하여 8-10엽이 될 때까지 재배하였다. 실험에 사용한 고추묘의 뿌리는 토양에 정착할 수 있도록 접종 최소 4일 전에 지름 9 cm 포트에 이식하였다. 점액세균의 길항력 평가는 2009년 3월과 4월에 고추 근권과 엽권에 점액세균 배양여액을 처리한 후, 1일 후 병원균을 접종하여 발병을 측정하였다. 근권 평가는 점액세균 배양여액 50 ml을 고추 포트에 관주하고 1일 후, 역병균 유주자 현탁액 10 ml을 관주 접종한 것이었다. 엽권 평가는 점액세균 배양여액을 고추 경엽에 충분히 분무하고 1일 후, 역병균 유주자 현탁액을 균일하게 분무 접종한 것이었다. 이 두 방법으로 유주자를 접종한 고추 유묘는 온실에서 1일 동안 습실 처리하였다. 방제 대조구로는 근권 실험에서는 propamocarb (1.5 µl/ml)을 관주하였고 엽권 실험에서는 dimethomorph+propineb(2 mg/ml)을 분무하였으며 배양여액과 살균제는 각각 동일한 양을 사용하였다. 근권과 엽권 평가는 각각 4반복과 5반복으로 수행하였고 각 반복당 한 처리에서 20개의 고추 유묘를 사용하였다. 병 조사는 병원균 접종 후, 18일 동안 수행하였으며 2-3일 간격으로 관주하였다. 발병율(incidence)은 자실체 및 유주자 현탁액 실험과 같았고, 방제가(control value, %)는 다음과 같이 발병율을 기초로 계산되었다.

방제가(%)=(무처리 발병율-각 처리 발병율)/(무처리 발병율)×100

점액세균의 약해 탐색. 점액세균이 고추 유묘에 가하는 약해를 보고자 6-8엽기 고추 뿌리의 흠을 털고 물로 행군 후, 진탕 배양한 점액세균 배양여액에 24시간 동안

침지하였다. 약해 확인을 위한 24시간의 침지기간은 배양 여액 길항력 확인을 위한 침지 처리보다 2배 더 긴 기간이었다. 대조구는 고추 뿌리를 멸균수에 침지한 것으로서 고추의 생리적 상태는 동일하였다. 실험은 2 반복 시행하였으며 약해 측정은 침지 후 1일 간격으로 5일간 관찰하였다.

결 과

역병 길항 점액세균 선발. 역병균의 군사생장을 저해하는 점액세균의 균주를 선발하였다. 3가지 점액세균 균주들의 고추 역병균 군사 성장 저해 능력을 평가하고자 점액세균의 분비 산물만 남은 PDCY 고체 배지에 역병균을 접종한 후, 병원균 군사 성장을 측정된 결과 저해효능은 3가지 점액세균에서 모두 나타났다. KYC 1126과 KYC 1136은 *P. capsici* 군사 성장을 완벽히 저해하였고 KYC 2001은 89.2% 저해하였다(Fig. 3).

KYC 1126 자실체 형성 방법 및 고추묘 근권에 자실체 처리. 점액세균의 자실체는 3가지 방법 모두에서 형성되었으나 자실체 농도는 한천배지에 영양원을 방울로 하여 떨어트리는 방법(방법 3)이 가장 많았다. 그 다음은 한천배지 제조시 영양원을 첨가하는 방법(방법 2), 한천배지에 영양원을 도달하는 방법(방법 1) 순이었다(Fig. 1). 따라서 고추 역병 방제를 위한 자실체 준비는 영양원을 방울로 하여 떨어트리는 방법 3으로 실시하였다. 자실체가 형성되는 기간은 한천배지 제조시 영양원을 첨가하는 방법과 한천배지에 영양원을 도달하는 방법 둘 다 약 2주 소요되어 비슷했으나, 영양원을 방울로 하여 떨어트리는 방법은 위의 두 방법보다 3-4일 정도 자실체가 더

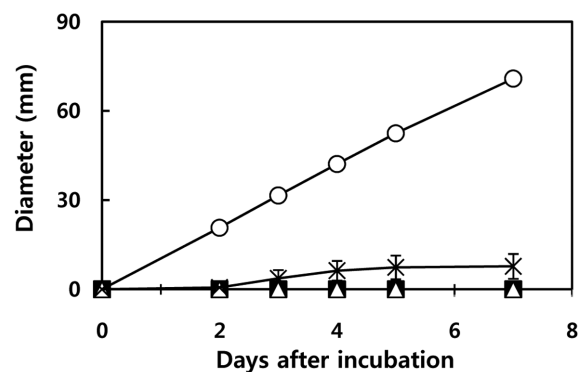


Fig. 3. Delay or inhibition of mycelial growth of *Phytophthora capsici* on PDCY agar plates by the three *Myxococcus* spp. KYC1126 (■), KYC 1136 (△) and KYC 2001 (×) as well as control (○). The mycelial growth was measured the colony diameter of pathogens until 7 days at 25°C. Data points were the averages of three replicates and standard errors of the estimates.

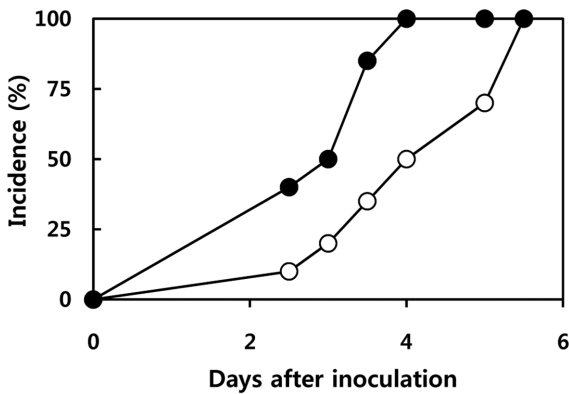


Fig. 4. *Phytophthora* Blight progress on the pots with (●) or without (○) fruting body of myxobacteria KYC 1126. Incidence was calculated as % of diseased plants among the all treated 20 plants in each treatment. Data points were the averages of two replications.

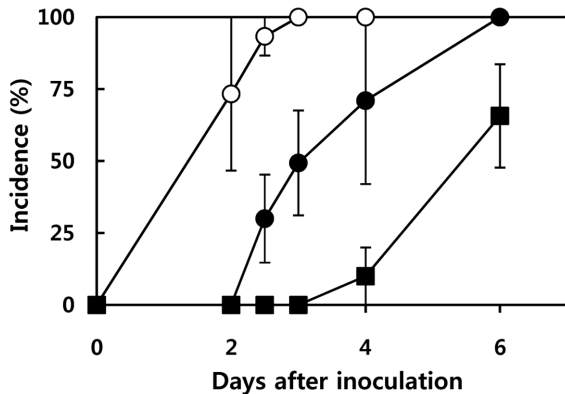


Fig. 5. Myxobacteria KYC 1126 culture filtrate was mixed with *Phytophthora* zoospores (Treatment 1, ■) or poured on seedlings then inoculated the zoospores (Treatment 2, ●). The control (○) was an inoculation of *Phytophthora* zoospores without the KYC 1126 filtrate. Incidence of the disease was % of diseased seedlings among 15–20 plants per treatments. Experiments were replicated three times.

늦게 형성되었다. 형성된 자실체는 주황색을 띄었으며, 자실체의 형태는 실체현미경으로 관찰할 수 있었다(Fig. 1).

형성된 자실체를 근권에 이식하고(Fig. 2) 역병균의 유주자 현탁액을 관주 접종하였으나, 4일 후 처리된 모든 묘에서 역병이 발병하여 자실체 처리는 방제 효과가 없었다. 오히려, 자실체를 고추묘 근권에 이식하는 과정에서 뿌리 건드림으로 인한 상처로 대조군 보다 역병이 1–2일 더 빠르게 진전되었다(Fig. 4).

유주자 현탁액과 점액세균 KYC 1126 배양여액 혼합물의 역병방제 평가. 유주자 현탁액과 점액세균 배양여액을 혼합한 후, 고추뿌리에 침지 접종한 처리 1과 점액세균 배양여액에 고추뿌리를 침지한 후, 역병 유주자 현

탁액 접종한 처리 2로 고추역병에 대한 길항력을 확인하였다. 두 처리 모두에서 역병은 지연되었으나, 최종적으로는 모든 처리에서 역병이 발생하였다(Fig. 5). 최초 역병 발생은 대조구가 48–63시간, 처리 2가 60–97시간, 그리고 처리 1이 93–155시간으로 처리 1에서 역병 최초 발생이 가장 늦었다. 대조구에 비해 최초 역병 발생은 처리 1이 45–107시간, 처리 2는 12–49시간 발병이 지연되었다. 또한 대조구 고추묘가 모두 발병될 때로부터 각 처리의 고추묘가 모두 발병한 시간의 차이로 발병지연시간을 계산하면 처리 1은 121–232시간, 처리 2는 42–69시간 발병이 지연되었다. 점액세균 배양여액 처리는 최초 역병 발생을 0.5–4.5일 지연시켰고, 역병이 모든 묘에서 발병하는데 소요되는 기간을 2–9.6일 지연시켰으며, 처리 2 보다 처리 1에서 고추 역병 발병 지연 효과가 높게 나타났다(Fig. 5).

온실 포트에서 고추 역병 생물학적 방제 평가. 온실에서 고추묘를 포트에 키워 역병에 대한 점액세균의 길항력을 검증하였다. 고추 역병 방제력 검증은 KYC1126 배양여액을 고추 유묘를 엽권에 분무 처리한 것과 근권에 관주처리한 두 가지 방법이 실시되었다. 18일 동안 간헐적으로 발병을 조사한 결과, 역병 최초 발병일은 근권과 엽권 모두 4일 전후였다. 무방제 대조구의 역병 발병률은 근권처리 방법보다 엽권처리 방법에서 다소 빠르게 진전되었다(Fig. 6A, B). 접종 18일 후 발병률은 엽권에서 대조구가 100%, KYC 1126이 12.0%, 살균제인 dimethomorph+probineb가 0.0%였고 근권에서는 대조구가 98.8%, KYC1126이 63.8%, 살균제인 propamocarb가 56.3%였다(Fig. 6). 이를 방제가로 환산하면, 엽권에서 방제가는 KYC 1126이 88.0%, 살균제가 100%였고, 근권에서 최종 방제가는 KYC 1126이 35.9%, 살균제가 43.5%였다(Fig. 6C, D).

점액세균의 약해. 고추 뿌리에 점액세균 배양여액을 24시간 침지한 결과 약해가 발생하였다. 3일 후에는 처리한 모든 고추에서 약해의 증상은 동일하게 나타났다. 약해 증상은 뿌리가 미끄러운 점액물질로 뒤덮이면서 썩어가고 있었으며(Fig. 7A, B), 줄기는 잘록하게 들어가 잎을 지탱하지 못하고(Fig. 7C), 잎은 말려 들어가 시들어(Fig. 7D) 전반적으로 생장이 중지되었다.

고찰

본 연구에서 고추 역병 방제제의 재료로 사용한 용균성 점액세균인 *Myxococcus* sp. KYC 1126은 토양 서식 미생물이므로 토양 병원균인 역병균과 함께 토양에서 장기간 서식이 가능하다. 또한 길항제제로 많이 이용되는

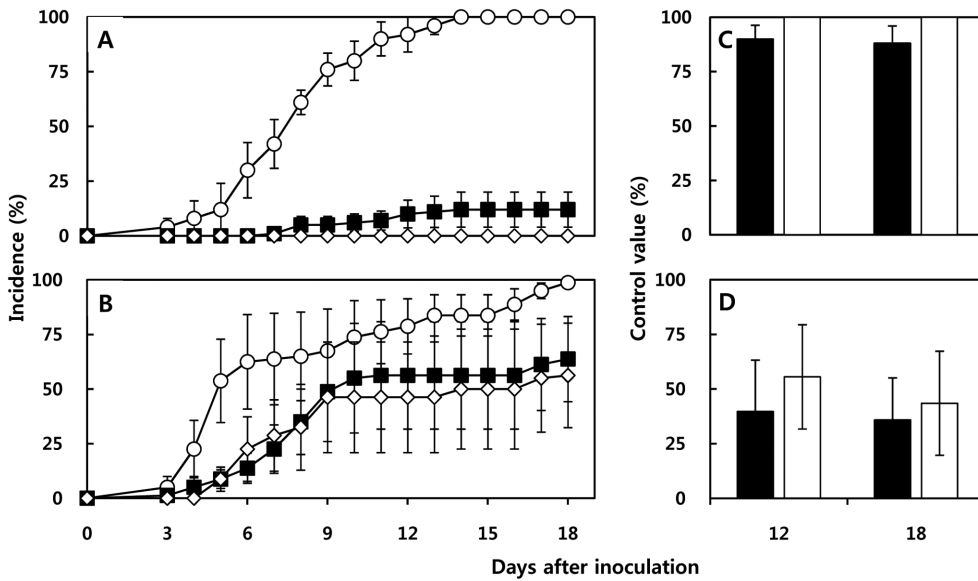


Fig. 6. Phytophthora blight progressive curve of hot pepper among the three treatments, untreated control (○), myxobacteria KYC1126 (■) and fungicide (◇) in the greenhouse. The suspension of zoospores were sprayed and poured 24 hours after phyllosphere (A) and rhizosphere (B) treated with the culture filtrates of myxobacteria KYC1126, respectively. Data points were the average of five (A) and four (B) experiments. Control values of phytophthora blight of phyllosphere (C) and rhizosphere (D). Myxobacteria culture filtrate (■) and fungicides (□) were compared at 12- and 18-day after Phytophthora inoculation. Data bars were the average of five (C) and four (D) experiments and standard errors of the estimates.

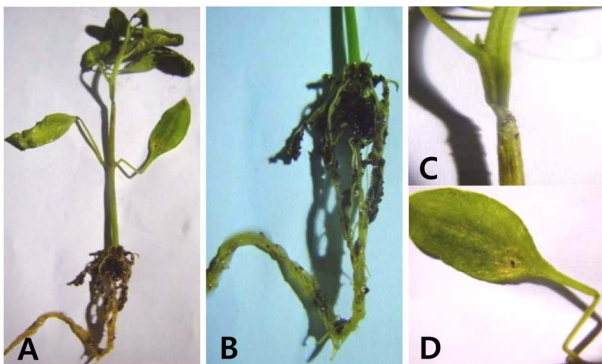


Fig. 7. Phytotoxicity of myxobacterium KYC 1126 on pepper seedlings. Gummy materials were on the root (A, B). In addition, stem (C) and petiole (D) were constricted.

기존의 방선균이나 *Bacillus*에 비해 독특하고 다양한 종류의 항생 물질을 분비하는 점도 점액세균의 장점이다. 미생물을 이용하여 식물병을 방제하는 방법은 미생물 자체를 이용하는 방법, 미생물이 생산하거나 분비하는 대사 물질 또는 항생물질을 이용하는 방법, 미생물과 미생물의 혼합 또는 미생물과 새로운 물질의 혼합을 이용한 방법 등으로 다양하다(Porter와 Fox, 1993). 본 연구는 점액세균 자실체 형성을 유도하여 외부환경에 안정적이면서 생리활성물질 분비를 기대한 자실체 생균을 직접 뿌리에 처리한 것과 점액세균이 분비하는 대사물질 혹은 항생물질을

이 존재하는 액체 배양여액을 처리한 것 두 가지 중 점액세균의 길항력은 액체 배양여액 처리가 더 컸다.

점액세균의 자실체가 영양세포로 되려면 충분한 영양분을 필요로 하기 때문에 포장에 존재하는 역병균을 먹이로 삼을 가능성을 갖고 실험을 실시하였다. 특히 집중된 자실체 형태의 점액세균이 토양 내에 정착하여 항생물질과 가수분해 효소를 지속적으로 분비한다면 포장에서 역병균에 대한 길항력이 유지되리라 기대하였다. 점액세균 자실체 형성 방법 중 *E. coli* 콜로니를 떨어뜨려 영양분을 공급하는 방법(방법 3)에서 자실체 농도가 가장 높았던 이유는 영양분이 가장 풍부한 방법이었기 때문이다. 인위적으로 많은 양의 자실체를 형성시켜 토양에 이식하는 방법은 역병 방제 효과가 없었다(Fig. 4). 아마도 점액세균의 자실체가 영양세포를 형성하는 과정에서 토양으로 분비하는 생리활성물질이 충분하지 못했거나 포트 환경에 정착하지 못한 것이라고 판단된다.

토양을 배제하고 역병균과 점액세균을 직접 접촉시킨 혼합물을 고추뿌리를 침지한 결과 점액세균 액체배양여액에 존재하는 생리활성물질이 역병균에 길항력을 보이는 것은 확실하다. 본 연구에서 가장 효과적이고 현실적인 점액세균을 이용한 생물학적 방제 방안은 엽면에 배양여액을 직접 살포하는 것이었다. 특히 다른 연구에서처럼 점액세균의 항생물질을 추출하는 복잡한 과정을 거치

지 않고 생균의 액체배양여액을 사용함으로써 항균활성 물질을 다량 확보할 수 있었고 이를 온실의 고추묘에서 엽권과 근권에서 각각 5회 및 4회 반복 실험이 가능하였다. 한편, 항생물질 추출 과정은 생리활성 물질의 소실될 우려가 크고, 추출로 얻을 수 있는 양이 미량이기 때문에 생산 비용이 많이 소요된다. 점액세균의 액체 배양은 추출항생 물질 생산에 따른 위에서 언급한 단점을 극복할 수 있었다.

KYC1126은 *P. capsici*의 균사 생장을 100% 억제하였다. 한편, Bull 등(2002)은 KYC1126과 같은 점액세균 속인 *M. fulvus*가 *P. capsici*의 균사 생장을 상당히 저해한다고 보고하였다. 한편, 고추 역병과 같은 속인 *Phytophthora*가 일으키는 토마토 역병을 *M. fulvus*에서 추출된 myxothiazol을 유묘에 경엽 처리하여 97.7%의 방제가를 얻었다(김 등, 1998). 본 연구에서는 액체배양 여액을 사용한 점이 토마토 역병 연구와는 달랐지만 점액세균 경엽처리로 고추 역병 유주자 접종 10일째에 93.5%로 방제하였다. 다른 길항미생물인 *Streptomyces griseofuscus*는 *P. capsici*의 균사 생장을 76.2%로 저해하였다(Lim, 2005). 그 외에도 *Chryseomonas luteloa*(윤 등, 2001), *Bacillus megaterium*(정과 김, 2003) 그리고 *Bacillus luciferensis*(Kim 등, 2009)이 고추 역병균에 길항력이 있다는 보고가 있었다.

KYC1126은 2002년 충남 서산 토양에서 분리된 점액세균이다. 따라서, KYC1126의 역병 방제가는 근권처리가 엽권처리보다 더 높을 것이라고 예상하였다. 그런데, 근권의 방제가는 35.9%로 엽권의 88.0%보다 낮았다. 살균제 방제가 또한 근권은 43.5%로 엽권의 100%보다 낮았다. 점액세균의 생존이 지속적으로 유지되리라 여겼던 근권 환경에서 방제가가 오히려 엽권보다 낮았던 이유는 근권에서는 점액세균이 정착하지 못하였거나 항진균 물질이 분해되었던 반면 역병균은 토양에 장기간 서식하면서 고추묘 뿌리에서 지속적으로 감염을 시도했으리라 추정된다. 반면 역병균은 엽권에서 오랫동안 생존할 수 없으므로 앞에서 병원균과 길항균인 점액세균의 접촉은 정확히 두 미생물을 처리한 시점에서만 일회적으로 발생하며, 이 때 점액세균 길항능력이 발휘되었기 때문에 방제가가 높았을 것이다. 살균제 방제기도 점액세균보다는 다소 높지만 엽권과 근권에서의 양상이 비슷한 것으로 보아 어떤 방법으로 방제 효능을 검증하는가가 생물검정의 성패를 좌우할 수 있다. 생물방제에서 길항능력은 지속적이라기 보다는 기회적으로 발휘되며, 특히 환경요인이 방제능을 좌우한다는 것(Pal와 Gardener, 2006)을 본 실험에서도 확인할 수 있었다.

KYC1126 배양여액을 엽권에 분무 처리하는 과정에서 균 독성과 용균에 의한 약해는 고추묘와 성체에서 관찰되지 않았다. 반면 근권 접종 실험에서 고추묘 뿌리를 배양여액에 24시간 이상 침지시 약해가 발생하였다. 액체배양 침지기간을 의도적으로 2배 길게하여 인위적으로 발생시킨 약해이긴 하나, 관주 처리 과정에서 약해가 발생할 가능성이 있다. 따라서 토양 관주 접종시 고추가 충분히 성장한 후 접종하는 것이 좋으며 이에 대한 연구가 앞으로 진행 되어져야 할 것이다.

본 연구는 점액세균의 생리적인 특성을 이용하여 환경친화적인 식물병 방제의 가능성을 제시할 수 있었다. 기존 길항미생물과는 전혀 다른 새로운 생리활성 항진균 물질을 분비하는 점액세균을 생물적 방제에 효과적으로 이용하기 위해서는 액체배양 여액의 대량확보를 통한 지속적인 예방 살포를 포장에서 검증하는 실험이 향후에 필요하다. 그런데 점액세균은 생장이 느리며, 균주에 따라서는 배양 조건이 까다로워(조, 2001) 산업 규모의 발효 공정으로 생리활성물질을 대량 생산하기 어렵다. 이를 극복하기 위해서는 2-3배 빠르게 성장하면서 생리활성물질을 분비하는 호열성 점액세균의 유전자를 형질전환하는 기술이나(Gerth와 Miller, 2005), 옥수수 침출분말, 옥수수 글루텐, 대두분말 등 주변에서 쉽게 이용할 수 있는 친환경 재료를 탄소원으로 사용하여 수율을 높일 수 있는 저렴한 발효 공정 연구를 통해 대량생산 기술을 확보하는 것이 중요하다. 향후 대량생산이 가능해진다면 앞으로 점액세균의 생물학적 방제 역할은 더욱 커지리라 기대된다.

요 약

점액세균은 토양에서 식물 병원균의 활성을 억제하는 2차 대사산물을 분비하는데, 이들은 기존의 길항균들의 항생물질과는 전혀 다른 생리활성물질이므로 생물방제에 활용이 기대되는 미생물이다. 고추 역병 생물학적 방제를 위해 토양 미생물인 점액세균의 길항능력을 기내에서 검증한 후, 자실체 및 액체배양 여액을 엽권과 근권에 처리하여 온실에서 생물 검정하였다. 점액세균 생리활성 물질이 남아있는 PDCY 배지에 역병균을 접종한 결과 점액세균 *Myxococcus* spp. 세 균주 중 KYC 1126과 KYC 1136은 균사생장을 완벽히 저해하였다. 토양 내 점액세균 생리활성물질 분비를 극대화하기 위해 기내에서 다량의 자실체 형성을 위해 먹이인 *E. coli*를 먼저 배양 후 점액세균 KYC 1126을 치상하는 방법을 확립하였다. 이 방법으로 토양에 자실체를 먼저 투입하고 역병을 관주접종한 결과 방제 효과가 없었다. 한편 시험관에서 역병균 유주포

자 현탁액과 점액세균 CYE 액체배양여액을 혼합한 후 고추 뿌리에 침지 접종한 결과 역병 발병을 지연시켜 배양여액의 길항능력을 확인하였다. 점액세균 배양여액을 엽권에 살포하거나 근권에 침지한 방제가는 각각 88%와 40%로서 dimethomorph+propineb의 100%와 propamocarb의 44%에 버금가는 결과였다. 배양여액을 기존 처리의 약 2배인 24시간 이상 뿌리에 침지하면 약해가 발생하였는데, 그 증상은 고추 묘에서 줄기가 잘록해지고 잎이 말려 들어가며 점액성의 물질이 뿌리를 덮어 썩는 것이었다. 선발된 점액세균 KYC 1126의 대량 생산 방안이 확보되면, 배양여액을 엽권에 예방적으로 정기 살포함으로써 고추 역병의 생물학적 방제를 달성할 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

- 김병섭, 안중웅, 조광연. 1998. 점액세균 KR025의 분리 동정 및 생리활성물질의 탐색. *Kor. J. Plant Pathol.* 14: 345-349.
- 김용석, 배우철, 백성진. 2003. Myxobacteria의 생리활성 물질. *한국미생물생명공학회지* 31: 1-12.
- 농업과학기술원. 2001. 한국의 식물역병. 정부간행물등록번호: 1111-1390093-000063-01.
- 윤경현, 이은탁, 김상달. 2001. 고추역병균 *Phytophthora capsici*의 생육을 저해하는 *Chryseomonas luteola* 5042의 선발과 항균성 길항작용. *한국미생물생명공학회지* 29: 186-193.
- 이봉수, 이차율, 조경연. 2003. 분산 돌연변이 점액세균의 분리. *한국미생물생명공학회지* 31: 342-347.
- 이용세, 장태현, 류연주, 박정용, 임태현. 2005. 온실에서 길항미생물 *Trichoderma hazianum* DYMC 처리에 의한 고추 역병 억제 효과. *한국환경농학회지* 24: 409-415.
- 정진우, 이차율, 윤성철, 조경연. 2008. 고추탄저균 성장 억제 점액세균의 탐색. *한국미생물생명공학회지* 36: 21-27.
- 정희경, 김상달. 2003. 고추역병균 *Phytophthora capsici*를 방제하는 길항균주 *Bacillus megaterium* KL39의 선발과 길항물질. *한국미생물생명공학회지* 31: 235-241.
- 조경연. 2001. Myxobacteria의 군집생활, 자실체형성 및 생리활성물질의 생산. *생물산업* 14: 11-16.
- 지형진, 조원대, 최용철. 1998. 국내산 야채쥬스의 역병균 영양생장 및 생식생장용 배양기 이용. *한국식물병리학회지* 14: 299-302.
- Bull, C. T., Shetty, K. G. and Subbarao, K. V. 2002. Interactions between myxobacteria, plant pathogenic fungi, and biocontrol agents. *Plant Dis.* 86: 889-896.
- Gerth, K. and Miller, R. 2005. Moderately thermophilic Myxobacteria: novel potential for the production of natural products isolation and characterization. *Environ. Microbiol.* 7: 874-880.
- Hwang, B. K. and Kim, C. H. 1995. Phytophthora blight of pepper and its control in Korea. *Plant Dis.* 79: 221-227.
- Kim, H. S., Sang, M. K., Myung, I. S., Chun, S. C. and Kim, K. D. 2009. Characterization of *Bacillus luciferensis* strain KJ2C12 from pepper root, a biocontrol agent of Phytophthora blight of pepper. *Kor. J. Plant Pathol.* 25: 62-69.
- Lim, T. H. 2005. Antifungal activity of *Streptomyces griseofuscus* 200401 against pathogens causing late blight and anthracnose on pepper. *Pestic. Sci.* 9: 102-107.
- Pal, K. K. and Gardener, B. M. 2006. Biological control of plant pathogens. The plant health instructor DOI:10.1094/PHI-A-2006-117-02.
- Porter, N. and Fox, F. M. 1993. Diversity of microbial products discovery and application. *Pestic. Sci.* 39: 161-168.
- Shimkets, L. J. 1990. Social and developmental biology of the myxobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 54: 473-501.
- Shi, W., Khler, T. and Zusman, D. R. 1994. Motility and chemotaxis in *Myxococcus xanthus*. *Methods Mol. Genet.* 3: 258-269.
- Song, J. Y., Yoo, S. J. and Kim, H. G. 2002. Distribution and alteration of mating type of *Phytophthora capsici* population from red pepper in Korea. *Kor. J. Mycol.* 30: 152-156.
- Wireman, J. W. and Dworkin, M. 1977. Developmentally induced autolysis during fruiting body formation by *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* 129: 798-802.