

자연과학편

사과 탄저병 방제를 위한 길항미생물 분리*

조정일** · 한철주** · 안병렬*** · 박진형**** · 박흥섭****

조선이공대학 식품공업과**, 농촌진흥청 농업경영과***, 전남대학교 농과대학 원예학과****

Isolation of Antagonistic Microorganism for Biological Control to Apple Diseases, Bitter Rot

Cho Jung-Il** · Hahn Cheol-Joo** · Ahn Pyong-Ryol*** · Park Jin-Hyung**** · Park Heung-Sub****

Dept. of Food Technology, Chosun College of Science and Technology, Kwangju 501-759, Korea**

Farm Management Bureau, Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea***

Dept. of Horticulture, Chonnam University Kwangju 500-757, Korea****

SUMMARY

In order to acquire microbial agents that can be utilized for biological control of bitter rot(*Glomerella cingulata*), the major airborne disease to apple, the effective microorganisms were isolated, tested for antagonistic activity to the pathogen. Through the screening of more than 1,000 species of microorganisms collected in nature, 11 species of antagonists were selected. On of the 11 species, one species designated as CH1141 demonstrated outstanding activity. The bacterial strain, CH1141 exerted antagonistic efficiency of 65% on *Glomerella cingulata*. The CH1141 was identified as a bacterial strain to *Bacillus subtilis* based on morphology, culture conditions, and physio-biochemical characteristics.

Keywords : *Glomerella cingulata*, Antagonistic microorganism, CH1141, Biological control, Apple,

* 본연구는 1996년도 농림수산부 특정연구과제(현장애로기술과제)의 연구비로 수행된 연구의 일부임.

I. 緒 言

탄저병은 사과나무를 중심으로 약 300여 종의 식물에 발생하는 병해로서 7월 하순에서 8월 사이 고온 다습한 환경에서 발병 위험성이 높은 병이다.¹⁾ 최근에 이르러 농산물에서의 잔류 농약의 존재나 그 독성에 대한 위험이 일반인의 관심이 되고 있고,²⁾ 수출입시의 검역에서도 문제시 되고 있어 보건 당국에서도 그에 대한 규제를 강화하고 있다. 특히 과실은 그것을 생식하기 때문에 더욱 문제가 되며, 농약을 사용하지 않거나 최소한으로 사용한 무공해 또는 저공해 과실에 대한 요구가 점차로 커지고 있다. 게다가 농약 사용 또한 약제 저항성 병원균의 발생으로 약효를 잃고 그 사용에 제한이 따르게 되었다. 이에 대한 대안으로 저장 병해에 대한 생물학적 방제가 관심을 끌게 되었다. 생물학적 방제의 성공 가능성이 Wilson 등³⁾에 의해 언급되어졌으며, 그 기술이 발달이나 최근의 연구 경향⁴⁾ 등이 종합 고찰되었다. 이러한 생물학적 방제에 대한 연구에서는 *Pseudomonas*, *Bacillus* 등의 세균,⁵⁾ *Trichoderma* 등의 곰팡이⁶⁾ 그리고 *Debaryomyces*, *Cryptococcus*, *Candida* 등의 효모⁷⁾ 가 주로 이용되고 있고, 이러한 생물학적 방제의 효율 향상과 다른 방제법과의 혼용이 검토되고 있다.⁸⁾

본 연구는 사과에서 발생하는 탄저병의 병원균을 분리 및 수집하고, 분리된 사과 탄저병원균에 대해 길항력이 우수한 항균성 세균을 자연계로부터 분리하고자 하였다.

II. 材料 및 方法

1. 자연계로부터 길항미생물의 분리

전남지방의 영암, 장성 등의 과수원 및 농경지 토양의 지표로부터 5~20cm 토양을 채취하여 희석평판법 및 토양평판법³⁾을 이용하여 단일 균주를 분리하였다. 또한 사과 병원균에 대한 열면길항균을 분리하기 위하여 병에 걸리지 않은 깨끗한 과실의 잎으로부터 미생물을 분리하였다. 유용미생물 분리방법³⁾은 채취한 시료를 tris-Cl buffer solution(pH 7.5) 100ml에 넣고 진탕배양을 10분 정도 실시한 후 배지내에 들어있는 미생물을 생리식염수(0.85%, NaCl)로 희석하여 영양한천배지[nutrient agar(NA) plate]에 희석하여 농도별로 도말하였다. NA plates는 30°C 항온배양기(incubator SW-901)에서 24~36시간 정도 배양한 후 균주를 분리하여 사면배지에 보관하였다. 분리된 미생물은 영양한천배지에 접종하고 배양하여 단일 colony를 형성시켜 병원균과의 길항력 실험에 사용하였다.

2. 사과 탄저병균의 분리 및 수집

사과 탄저병 병반으로부터 병원균을 분리하기 위하여 전남지방의 주요 사과재배단지를 현지

답사하면서 병징 및 표징별로 병반을 채집하여 병원균을 분리하였다.⁴⁾ 또한 농촌진흥청 농업과학기술원(NASTI; National Agricultural Science and Technology Institute) 및 원예연구소(HI; Horticultural Crop Institute of Research and Development)로부터 사과병원균을 분양받아 본 실험실에서 분리한 병원균과 비교 및 검토하였다.

병원균을 분리하기 위하여 채집된 병반을 20°C, 상대습도 90% 이상의 항온항습실에서 3일간 습실처리후 이병조직을 70% ethanol 및 5% sodium hypochlorite(NaOCl)로서 표면살균하고 병원균 선택용 배지[potato dextrose agar(PDA) medium + streptomycine 200 µl/ml, pH 3.0]에 병반조직을 올려 놓고 25°C 항온배양기에서 2~3일간 배양하여 균총(colony)을 형성시켜 병원균을 분리하였다(Fig. 1).

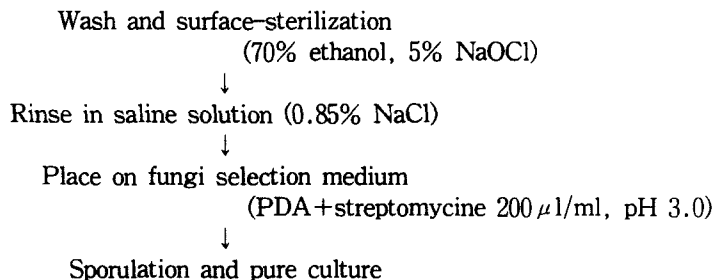


Fig.1. Isolation of fungal apple pathogen from apple tree

3. 길항미생물 선발 및 동정

PDA 평판배지 중앙에 병원균을 접종하여 25°C 내외의 배양기에서 24시간 정도 배양한 후 그 주변에 분리한 균주를 양쪽에 접종하여 25°C 내외의 온도에서 7일 정도 배양하면서 저지대(inhibition zone)를 형성하는 균주를 길항균으로 선발하였다. PDA 평판배지에서 병원균과 7일간 대치배양하면서 각각 성장한 병원균 균총(colony)의 직경을 측정하여 무처리구와 비교하여 성장저지율을 백분율로 나타내어 길항력을 비교하였다. 길항력 실험은 병원성 사상균의 생육에 좋은 PDA 배지를 이용하였고, incubator내의 배양온도 역시 25°C 정도로 곰팡이의 성장에 양호한 온도로 배양하여 병원성 사상균의 생육에 적합한 환경조건에서 병원균에 대한 길항력이 우수한 세균성 균주를 분리하였다.

길항미생물의 동정은 사과병원균에대해서 길항력이 우수한 CH1141을 동정하기 위하여, Bergey's manual of systematic bacteriology,⁵⁾ Microbiological method,⁶⁾ The procaryotes⁷⁾ 등의 방법에 의하여 미생물의 형태적 성질, 배양적 특성 및 생리 생화학적 성질 등을 검토하였다. 공식 대조균주로서 *Bacillus subtilis*는 American Type Culture Collection(ATCC)(Rockville, Maryland, USA)에서 분양받았다.

① 형태적 특성

Doetch법⁸⁾에 의해서 Gram 염색 및 형태를 관찰하였고, 미생물의 편모염색 및 운동성은 Gray법과 현적슬라이드법으로 하였다. 미생물의 포자는 malachite green으로 염색하여 내생포 자형성 유무와 포자위치를 현미경을 이용하여 관찰하였다.

② 배양적 성질

완전배지(CM ; complete medium)배지에서 각 온도별 균의 성질을 관찰하였고, YDC배지에 균을 접종하여 colony의 색을 관찰하였다. 또한 KB배지에 kanamycin, tetracycline 및 chloramphenicol 등을 첨가하여 미생물의 항생제에 대한 저항성을 관찰하였다.

③ 생리적 성질

Oxidase test, gelatin 가수분해, starch hydrolysis, arginin dihydrolase, urease, Tween 80 hydrolysis, catechol ortho cleavage, PHB accumulation, 탈질작용, sucrose로 부터 levan형성 및 탄소원 자화성 등을 조사하였다.

Ⅲ. 結果 및 考察

1. 자연계로부터 미생물의 분리

유효 길항미생물을 자연계로부터 분리하기 위하여 전국각지에서 수집된 시료를 실험방법에서와 같이 처리하여 단일균주를 1,000여종 분리하였다. 분리된 미생물은 영양한천배지에 접종하여 균총을 형성시킨 후 냉장보관 하면서 병원균과의 길항력 실험에 사용하였다.

2. 사과 병원미생물 분리 및 수집

전남지방의 주요 사과단지인 영암군 신북면 갈곡리 평안농장을 현지 답사하면서 병징 및 표징별로 병반을 채집하여 사과의 병해인 탄저병의 병원균을 분리하였다(표 1).

Table 1. List of pathogen isolated from infected apple tree.

Pathogen	Korean name	Common name	Source
<i>Glomerella cingulata</i>	탄저병균	bitter rot	this study, NASTI*, HI**

NASTI* : National Agricultural Science and Technology Institute

HI** : Horticultural Crop Institute of Research and Development

3. 탄저병에 대한 길항미생물의 선발

전남 장성과 영암군의 사과 생산단지를 중심으로 토양이나 잎에서 분리한 미생물 1,000여종 가운데 사과 탄저 병원균에 대한 길항미생물을 선발한 결과는 <표 2>에 나타내었다. Table 2에서 보는 바와 같이 CH1141은 사과 탄저병원균에 대한 저지율이 65%로 나타났다. CP1141은 본 실험에서 분리한 사과 탄저병원균에 대해 길항력이 가장 우수한 미생물인 것으로 나타났다. 본 연구에서 분리한 CH1141은 다른 식물병원균에 대하여도 길항력이 있을 것으로 생각된다. 따라서 더욱 더 이 연구를 진행시켜 CH1141이 분비하는 길항물질을 분리 정제하여 길항물질 본체를 구명하는 연구를 하여할 것으로 사료된다.

Table 2. Zone of inhibition*(%) of the each antagonists against apple pathogen, *Glomerella cingulata* on PDA media for 7 days at 28°C.

Pathogen	Isolated microorganisms	CH	CH	CH	CH	CH	CH	CH	CH	CH	CH	
		1130	1132	135	140	1141	1142	1145	1147	1150	1152	1155
<i>Glomerella cingulata</i>		13	27	40	30	65	41	14	40	49	27	45

$$\text{Zone of inhibition}*(\%) = \frac{NT-T}{NT} \times 100$$

NT ; colony diameter of no treatment(mm), T ; colony diameter of treatment(mm)

4. 길항균 살포에 의한 탄저병 곰팡이의 억제효과

길항균을 살포하였을 때 탄저병 곰팡이에 대한 길항력을 검토하기 위해, PDA배지에 *G. cingulata*를 접종하여 24시간 배양한 후 완전영양배지(nutrient broth ; NB)에서 24시간 배양한 길항균을 0.5ml 살포하였다. 길항균이 살포된 *G. cingulata*를 25°C 배양기에서 7일간 배양하여 길항균을 무처리한 대조구와 비교하였다. <그림 2>에서 보는 바와 같이 탄저병 병원균에 본 연구에서 분리한 길항균 CH1141의 배양액을 살포하여 25°C에서 일주일간 배양하였을 때 탄저병 병원균인 *G. cingulata*의 생육이 95%이상 억제되었다. 따라서 본 연구에서 분리한 길항균을 이용하여 사과과실에서 발생하는 탄저병을 방지 할 수 있을 것으로 기대된다.

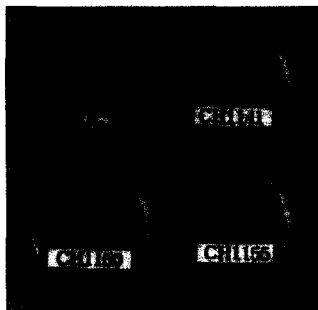


Fig.2. Growth inhibition of *Glomerella cingulata* by antagonistic bacteria. *G. cingulata* were grown on PDA at 24hrs and treated by antagonist, isolated antagonist CH1141, CH1150, CH1155.

5. 길항균의 동정

사과병원균에 대해서 길항력이 가장 우수한 균주인 CH1141을 동정하기 위하여 미생물의 형태적 성질, 배양적 특성 및 생리화학적 성질 등을 검토한 결과는 <표 3, 4>와 같으며, 길항미생물의 동정을 실시한 결과 *Bacillus subtilis*로 동정되었다.

Bacillus subtilis CH1141은 약간의 운동성을 갖는 호기성 및 혐기성 단간균으로 4℃와 42℃에서 생육하지 않고 포자를 형성하는 Gram 양성균으로서 젤라틴 액화능과 starch 분해능은 있었고, catalase가 양성, citrate는 양성, nitrate reduction은 양성, indole 검사는 음성이었다. Methyl red 반응은 음성, VP반응은 약하게 나타났으며, H₂S생성은 K/A이었고 당 분해능은 포도당, xylose, mannitol arabinose가 양성으로 나타났다. 본 연구에서 분리한 균주와 비교 균주인 *Bacillus subtilis*을 비교 검토한 결과 형태학적, 생리적 및 생화학적 특성이 거의 동일한 것으로 보였다.

이러한 결과를 토대로 Bergey's manual of systematic bacteriology, microbiological method 등에 기술된 분류 기준에 따라 CH1141 균주는 *Bacillus subtilis* 또는 그 유연균으로 추정되었다.

Table 3. Characteristics of antifungal bacteria CH1141.

Characteristics	Strain	<i>Bacillus subtilis</i>	CH1141
Cell diameter > 1.0µm		-	-
Spores round		-	-
Endospore		+	+
Gram stain		+	+
Form		rod	rod
Sporangium swollen		-	d(+/-)
Parasporal crystals		-	-
Catalase		+	+
Voges-Proskauer test		+	+
pH in V-P broth			
< 6		d(+/-)	d(+/-)
> 7		-	-
Acis from			
D-Glucose		+	+
L-Arabinose		+	+
D-Xylose		+	-
D-Mannitol		+	+
Gas from glucose		-	-
Hydrolysis of			
Casein		+	+
Gelatin		+	+
Starch		+	+

Symbols :-, 90% or more are negative ; +, 90% or more are positive ; d, 11~89% are positive

Table 4. Characteristics of antifungal bacteria CH1141.

Characteristics \ Strain	Bacillus subtilis	CH1141
Utilization of Citrate	+	+
Propionate	-	-
Degradation of tyrosine	-	-
Deamination of phenylalanine	-	+
Egg-yolk lecithinase	-	d(+/-)
Formation of Indole	-	-
Dihydroxyacetone	ND	ND
NaCl and KCl required	-	-
Allantoin or urate required	-	-
Growth at pH 6.8, nutrient broth	+	+
5.7	+	+
Growth in NaCl 2%	+	+
5%	+	+
7%	+	d(+/-)
10%	ND	ND
Growth at 5°C	-	-
10°C	d	d
30°C	+	+
40°C	+	+
50°C	d	d
55°C	-	-
65°C	-	-
Growth with Lysozyme present	d	d

Symbols : -, 90% or more are negative ; +, 90% or more are positive ; d, 11~89% are positive ; ND, no data available.

IV. 摘 要

사과나무에서 발생하는 탄저병에 대한 길항미생물을 찾기 위하여 자연계로부터 유용미생물을 분리하고 사과 탄저 병원균에 대한 길항력 검정과 균주를 동정한 결과는 다음과 같다. 자연계로부터 얻은 1,000여종의 미생물중에서 탄저병원균에 대하여 길항력이 우수한 미생물을 1차적으로 11종 선발하였으며, 이 중에서 가장 길항력이 뛰어난 미생물 CH1141을 최종적으로 선발하

였다. 길항미생물 CH1141은 분리한 탄저병원균에 대하여 65%의 높은 생장억제력을 보였다. 길항력이 우수한 CH1141의 형태적 성질, 배양적 특성 및 생리 생화학적 성질 등을 조사하여 비교 검토한 결과 *Bacillus subtilis*와 유사한 균으로 동정되었다.

주요어 : 사과, *Glomerella cingulata*, *Bacillus subtilis*, 길항미생물, CAP1141

引用文獻

1. 박종성. 1996. 제2장 진균병. 향문사. pp.342-344.
2. Howell, C.R. and Stipanovic, R.D. 1979. Control of *Rhizoctonia solani* on Cotton seedings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. *Phytopathology* 69 : pp.480~482.
3. 古俗航平等. 微生物の探索・分離・育種. 1985. 第1章 珍しい微生物の探索と應用(分離法利用). CMC. pp.1-24.
4. Fox. R.T.V., 1993. Principles of Diagnostic Techniques in Plant Pathology. Chapter 3. Isolation of Pathogens and Their Preliminary Identification. CAB International. pp.37-66.
5. Krieg, N.R. and J.G. Holt. 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology, Williams and Wilkins, Baltimor.
6. Collins, C.H. and P.M. Lyne. 1984. Microbiological method(5th ed), Butterworths, London.
7. Starr, M.P., H. Stolp, H.G. Truper and H.G. Schlegel. 1981. The prokaryotes : A handbook and identification of bacteria. Springer-Verag, Berlin, Heidelberg, New York.
8. Doetch, R.I. 1987. Determinative methods of light microscopy in manual of methods for general bacteriology ed. by Gerhardt etc., American Society for Microbiology. p.30.
9. 김성일, 이상범, 최용문. 1995. 사과나무 날개무늬병의 생물학적 방제를 위한 길항균분리 동정. RDA *J. Agri. Sci.*('94 Post Doc.) 37 : 29-42.