

Bacillus stearothermophilus YC4194에 의한 *Pythium* 모잘록병의 생물학적 방제

양현숙 · 손황배 · 정영륜*

경상대학교 응용생명과학부 미생물학전공(BK21), 기초과학연구소

Biological control of *Pythium* damping-off of cucumber by *Bacillus stearothermophilus* YC4194

Hyun Sook Yang, Hwang Bae Sohn and Young Ryun Chung*

Division of Applied Life Sciences(BK21) and Research Institute of Natural Science,
Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

(Received on November 26, 2002)

In vitro and *in vivo* activities of a biocontrol agent, *Bacillus stearothermophilus* strain YC4194 was evaluated for the control of *Pythium* damping-off of cucumber. *B. stearothermophilus* YC4194 inhibited germination of cystospores and formation of zoosporangia of *Pythium aphanidermatum* *in vitro*. Incorporation of a bentonite and talc based formulation (10^9 cfu/g) of *B. stearothermophilus* YC4194 to the nursery soils (10 g/l soil) resulted in a significant ($p=0.01$) reduction in the disease severity of cucumber damping-off after inoculation with *P. aphanidermatum*. The control efficacy of *B. stearothermophilus* YC4194 formulation was not different from that of the fungicides, dimethomorph, metalaxyl, ethaboxam. When the cucumber plants were transplanted to the soil inoculated with *P. aphanidermatum* zoospores, the *B. stearothermophilus* YC4194 maintained the high population density in rhizosphere soil upto 10^7 cfu/g until 15 days after treatment.

Keywords : *Pythium*, Biological control, Inhibition of zoosporangia and cystospores germination

식물 병원균광이 중 토양 전염 병원균은 땅속의 뿌리, 괴경 또는 땅가 부분의 줄기 등을 침입하여 곡류, 채소, 화훼류 등 여러 종류의 작물에 광범위하게 병을 일으켜 많은 피해를 가져온다. *Pythium* spp.와 *Phytophthora* spp.는 운동성이 있는 유주포자를 형성하는 반 수생균으로 물 속에서 증식하고 물을 따라 전파된다(Agrios, 1997). 유주자는 최적의 환경조건에서 약 24시간 동안 운동성을 가지며 5분 이내에 식물체를 침입할 수 있고, 식물체 침입 12시간 이내에 무성세대 생활환(asexual life cycle)을 완성하며, 2차 전염원이 대량으로 증식된다. 유주자낭 형성 후 1~3시간이 지나면 유주자는 성숙되어 물 속으로 방출된다(지형진, 2000). *Pythium* spp.는 거의 모든 채소 및 과수 작물을 침해하는데 외국에서는 150여종 이상의 기주 작물이

보고되어 있다. 그러나, 국내의 *Pythium* 연구는 벼 육묘상에 나타나는 모 잘록병(Moon, 1996)과 잔디에 발생하는 병해(Kim, 1997)에 대해서는 연구가 잘 되어 있으나, 기타 일반 작물에 대한 연구는 아직까지 많이 이루어지지 못했다. 잘록병을 일으키는 *Pythium* 종류는 *P. aphanidermatum*, *P. debaryanum*, *P. dissotocum*, *P. intermedium*, *P. irregulare*, *P. myriotylum*, *P. sylvaticum*, *P. ultimum* 등이 있다(지형진, 2000). 그 중 *Pythium aphanidermatum*은 오이, 고추, 토마토, 가지 등 여러 작물에 모잘록병을 일으키는 고온성 병원균으로 노지에서는 6월 초순부터 발생되어 장마기에 주로 증식, 전파되고 8, 9월에 발생이 가장 심하며 연작지 하우스 재배에서는 연중 발생한다. 이 균이 침입하면 파종한 종자가 발아되지 못하거나 발아되어도 땅 위로 나오지 못하고 그대로 썩어버리며, 어린 식물의 경우 땅가에 접한 줄기 부분을 공격하여 식물체를 쓰러지게 만든다. 이 병의 방제는 주로 합성 화학 살균제에 의존하고 있으나 이에 따른 문제점으로 인해 생물학적 방제 연구가 최근

*Corresponding author

Phone)+82-55-751-5945, FAX)+82-55-759-0187

E-mail)yrchung@nongae.gsnu.ac.kr

국내외에서 이루어지고 있다. 따라서 본 연구에서는 *P. aphanidermatum*의 생물학적 방제를 위해 분리된 *B. stearothermophilus* YC4194에 의한 *in vitro*와 *in vivo*에서의 억제효과를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

길항미생물과 병원균. *Bacillus stearothermophilus* YC4194는 0.1 TSA(tryptic soy agar)와 PDA(potato dextrose agar) 상에서 *Pythium*의 성장을 효과적으로 억제하는 길항세균으로 고구마의 근권 토양에서 분리하여 동정하였고, -70°C 에 보관하며 사용하였다(김충환, 2000). 사용 전 0.1 TSA에서 30°C , 24시간 배양하였다. 병원균 *Pythium aphanidermatum*은 경상대학교 농생물학과에서 분리하여 보관 중인 균주를 분양받아 V8 agar 배지(V8 juice 100 ml, CaCO_3 1 g, agar 18 g, D.W. 900 ml)에 배양하면서 사용하였다. 높은 병원성을 유지하기 위하여 발병된 줄기를 채취하여 표면 살균 후 병원균을 V8 agar 배지 상에서 재분리하여 사용하였다.

유주포자낭 형성과 피낭포자 발아 억제. V8 agar 배지에 배양한 *P. aphanidermatum*을 수술용 칼로 약 8 mm 크기의 균사절편을 만들어 5개씩 petri dish에 나누고 살균수를 첨가한 후 형광등 아래에서 유주자낭 형성을 유도하였다. 길항세균의 작용을 알아보기 위해 0.5 TSB 배지에 3일간 배양한 길항균을 0.1M MgSO_4 solution에 현탁시키고 10^8 cfu/ml이 되도록 하여 현탁액 3 ml을 살균수와 함께 처리하였다. 그리고, 상등액은 현탁액과 같은 방법으로 3 ml을 처리하여 유주자낭 형성을 유도하였고, 2시간 간격으로 24시간 관찰하였다(Shen, 2002b). 형성 비율은 살균수 처리 24시간 후를 100으로 하여 결정하였다.

유주자낭이 다량으로 형성된 균사조각에서 유주자낭을 분리하여 4°C 에서 1시간 가량 저온처리하고 실온으로 옮겨 1시간 후 유출된 유주자는 4겹의 거즈로 거른 후 vortexing을 통해 유주자에 부착된 편모를 탈락시켰다. 피낭포자 현탁액(10^4 spores/ml) 발아 억제효과는 유리 slide에 세균 현탁액(10^8 cfu/ml), 상등액과 동일 양으로 처리하였고, 발아를 촉진하기 위하여 영양분으로 glucose 100 ppm을 첨가하기도 하였다. 30°C 에서 습도가 유지되도록 하여 배양하였으며, 2시간 간격으로 발아율을 관찰하였다(Shen, 2002b).

길항균 제제 및 방제효과. *B. stearothermophilus* YC4194 균주를 0.5 TSB 50 ml에 접종하여 30°C 에서 24시간 동안 진탕 배양한 것을 seed culture로 사용하였고, 본 배양은 2 l Erlenmeyer flask에 0.5 TSB 500 ml를 넣어 30°C

로 3일간 진탕 배양(180 rpm)하였다. 배양액을 7,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 제거한 후 가라앉은 균체를 수확하였다. 수확된 균체를 10 ml 멸균 증류수와 진탕시킨 후 bentonite, talc, zeolite 4 g과 균체를 잘 섞은 후 넓은 유리 plate에 얇게 깔아 30°C 에서 3일간 건조시켰다. 그 후 건조된 덩어리를 모아 막자 사발을 이용하여 곱게 갈아 냉장고에 보관하며 사용하였다(Singh, 1999). 이때 제제 1 g당 균 밀도는 10^9 집락수(colony forming unit)정도였다. 모 잘록병 방제효과는 실내 식물 생육상 실험에서 기주 식물로 오이(신젠타종묘(주), 청미삼척)를 이용하였다. 1×10^5 개/ml의 *P. aphanidermatum* 유주자낭을 시중에서 판매되는 원예용 상토 1 l에 100 ml씩 접종하고 polyvinyl bag 내에서 잘 섞어 30°C 로 2일간 둔 후 75 mm 사각 플라스틱 pot에 파종하여 10일 동안 재배하였으며, 이 때 상토가 마르지 않도록 하였다. 그리고 각 제제별로 상토 1 l에 10 g을 섞어 주었다(Shen, 2002a). 발병 정도는 발아 비율과 발아된 식물의 감염비율로 조사하였으며, 유의성은 Duncan's multiple range tests로 결정하였다.

화학살균제와 방제효과 비교. 길항균은 talc와 bentonite로 제제화 한 것을 병원균 접종 시 상토 1 l에 10 g을 접종하였다. 제제와 병원균을 섞은 상토에 오이를 파종한 직후 현재 시중에서 판매 중인 화학 살균제 dimethomorph(주식회사 동방아그로), metalaxyl(주식회사 경농), ethaboxam(주식회사 미성)을 생산자의 사용 추천 농도에 맞게 희석하여 pot에 각각 5 ml씩 분주하였다. 30°C 온실에서 10일 동안 재배하면서 방제효과를 비교하였다.

근권 토양의 길항균 밀도 변화. 오이를 파종한 후 0, 3, 6, 9, 12, 15일 동안 재배 후 오이 뿌리와 근처에 있는 흙을 조심스럽게 30°C 에서 30분간 진탕한 후 토양찬회석평판법으로 희석하여 희석액 0.1 ml을 swollen chitin 배지($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, ZnSO_4 0.001 g, MnCl_2 0.001 g, K_2HPO_4 0.7 g, KH_2PO_4 0.3 g, swollen chitin 0.1%(w/v), pH 7.0, Agar 15 g, D.W. 1 l) 전면에 골고루 도말하였다. 30°C 에서 3일 동안 배양한 후 투명한 이 형성된 colony수를 세어 대조구와 밀도를 비교하였다(Singh, 1999).

결과 및 고찰

유주포자낭 형성과 피낭포자 발아 억제. *In vitro*에서 *B. stearothermophilus* YC4194에 의한 *P. aphanidermatum*의 유주포자낭 형성 억제는 살균수만 처리한 경우 2시간 후부터 형성되기 시작하여 8시간 후에는 유주자낭이 90%

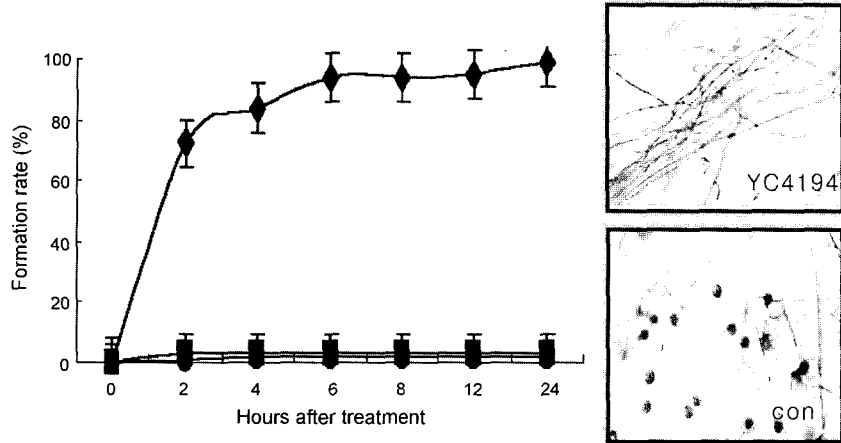


Fig. 1. Effect of *Bacillus* sp. YC4194 inoculation on the zoosporangia formation of *P. aphanidermatum*. Many zoosporangia were formed in distilled water inoculated with only mycelial discs of the pathogen (con). No zoosporangia were produced in the mixture inoculated with *Bacillus* (YC4194) and the pathogen.

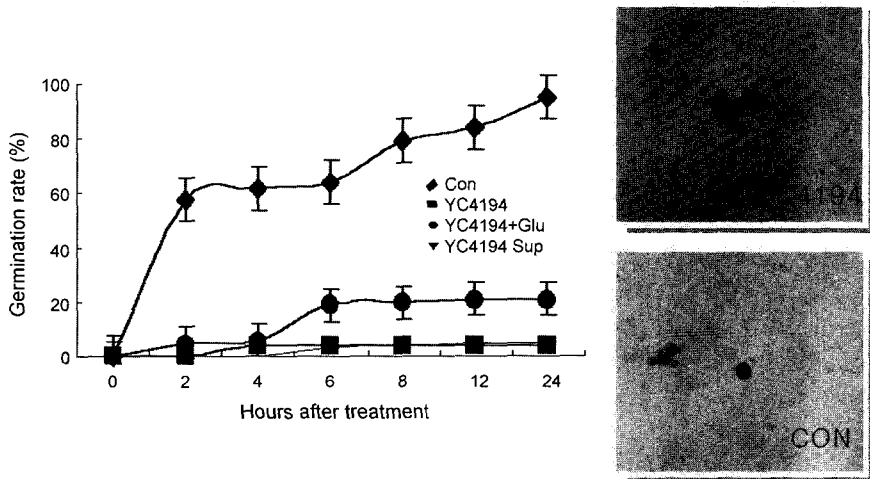


Fig. 2. Effect of *Bacillus* sp. YC4194 on the cyst germination of *P. aphanidermatum*. Cyst did not germinate in distilled water inoculated with only mycelial discs of the pathogen(con). The germinated cyst in the mixture inoculated with *Bacillus* (YC4194) and the pathogen.

이상 형성된 반면 YC4194와 상등액을 처리한 petri dish에서는 24시간이 지나도 거의 형성되지 못하였다(Fig. 1). 유주자낭 형성 억제제는 *Pythium* spp.에 의한 다양한 식물병의 방제 기작 중 직접적인 방제 기작 중 하나로 제안되고 있다(Zhou, 1993).

또한 *P. aphanidermatum*의 피낭포자 발아 억제도 유주자낭 형성 억제제와 유사하였다. 살균수만 처리한 대조구에서는 2시간 후 약 60%, 6시간 후에는 90% 이상 발아되었으나 YC4194를 직접 처리한 곳과 상등액을 처리한 곳에서는 12시간이 지나도 5% 내외로 발아가 현저하게 억제되었다. YC4194와 glucose 100 ppm을 함께 처리한 곳에서 2시간 후 약 20%가 발아되었지만 그 후 시간이 지

나도 더 이상 발아되지 않았다(Fig. 2). 발아에 필요한 영양분이 있어도 크게 영향을 주지 못하는 것으로 볼 때 항생물질과 같은 물질에 의한 발아 억제임을 유추할 수 있었다(Heungens, 2000).

길항균 제제의 방제효과. 제제 종류별로 talc, zeolite, bentonite, talc + zeolite, talc + bentonite, zeolite+bentonite로 만들어 병원균과 함께 섞어 오이를 파종하여 방제효과를 관찰하였다. 그 결과 talc, zeolite, bentonite는 45~55%의 방제가를 보인 반면, 두 보조제를 섞어서 사용한 talc + zeolite, talc + bentonite, zeolite + bentonite는 58~70%의 방제가를 보였다. 그러나, 제제 종류별로 유의성 있는 차이를 보이지는 않았다(Fig. 3).

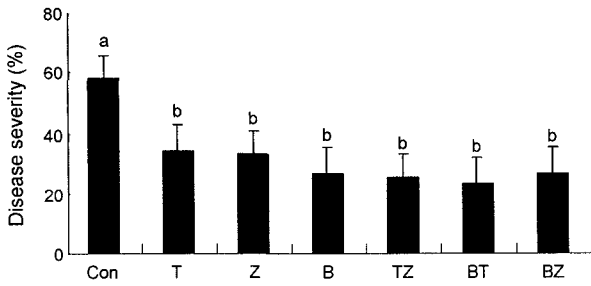


Fig. 3. Effect of formulation components of *Bacillus* sp. YC4194 on the severity of *Pythium* damping-off of cucumber. Con; untreated control, T; talc plus antagonist, Z; zeolite plus antagonist, B; bentonite plus antagonist, TZ; talc plus zeolite plus antagonist, BT; talc plus bentonite plus antagonist, ZB; zeolite plus bentonite plus antagonist.

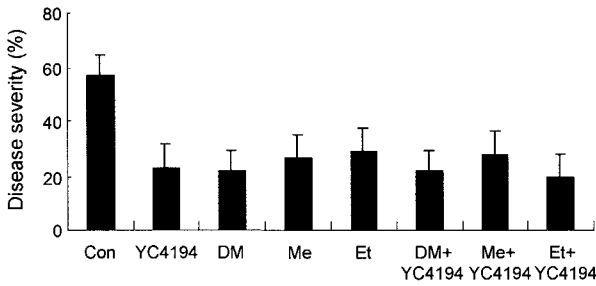


Fig. 4. Comparison of the control efficacy of *Bacillus* sp. YC4194 and commercial fungicides against *Pythium* damping-off of cucumber. Con; untreated control, DM; Dimethomorph, Me; Metalaxyl, Et; Ethaboxam.

화학 살균제와의 효과 비교. 길항균 제제를 상토 1 l 에 10 g을 병원균과 함께 처리한 후 오이를 파종하고 화학 살균제인 dimethomorph, metalaxyl, ethaboxam을 분주하여 발병 억제효과를 관찰하였다(Fig. 4). 길항균 제제만 처리했을 때 59%의 방제율을 보였고, 화학살균제도 이와 비슷한 방제율을(50~62%) 나타내었다. 화학 살균제와 함께 처리했을 경우도 비슷한 방제율을 보였으나 2가지 동시 처리에 의한 상승효과는 없었다. 그러나, ethaboxam의 경우 YC4194와 함께 처리되었을 때(64%), 단독으로 작용하는 것(50%)보다 더 높은 방제율을 보였으나 유의성 있는 차이는 없었다.

근권에서의 밀도변화 오이를 파종한 후 3일 간격으로 근권의 상태를 채취하여 밀도조사를 하였다(Fig. 5). 길항균 제제만 처리한 곳에서는 9일 후 10^8 cfu/g으로 유지되던 것이 12일 후 10^7 cfu/g으로 줄어들었고, 15일째는 10^6 cfu/g으로까지 그 밀도가 줄었다. 반면, 병원균을 함께 처리한 곳에서는 12일까지 10^8 cfu/g으로 유지되었으며 15일이 지난 후 10^7 cfu/g으로 줄어들었다. 이것은 병원균 처

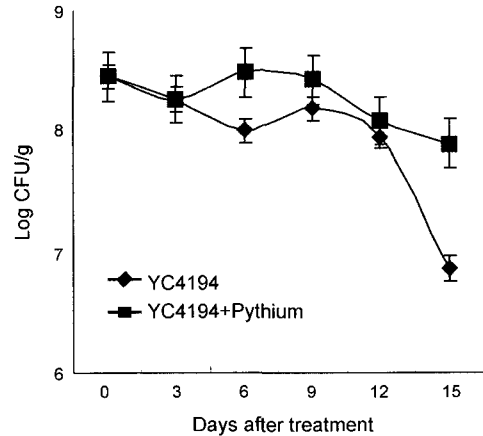


Fig. 5. Population change of *Bacillus* sp. YC4194 in the rhizosphere of cucumber with/without *P. aphanidermatum*.

리 시 기주 식물에서의 영양분 누출에 의해 길항균의 밀도가 높게 유지되는 것으로 생각되었다. 본 밀도 조사 및 발병 억제 실험은 상토에서 수행되었으므로 향후 미생물 제제로서의 개발 가능성을 보다 확실히 알기 위해 포장에서의 실험을 수행할 필요가 있다.

요 약

Bacillus stearothermophilus YC4194는 *in vitro*와 *in vivo*에서 병원균 *Pythium aphanidermatum*에 대한 억제 효과를 보였다. *In vitro* 실험에서 *P. aphanidermatum*의 유주포자낭 형성과 피낭포자 발아를 억제하였을 뿐 아니라 식물체에 직접 길항균 제제 처리 시 50% 이상의 방제율을 보였다. 그리고 다른 화학 살균제와 비슷한 방제효과를 보여 미생물 제제로서의 개발 가능성을 보여주었다.

감사의 말씀

이 연구는 농림기술특정과제(번호 102003-03-1-SB010) 연구비와 2000년-2002년 교육부 BK21 프로그램 지원으로 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

Agrios, G. N. 1997. *Plant Pathology*. Academic press., New York. pp.266-27.

Heungens, K. and Parke, J. L. 2000. Zoospore homing and infection events: Effects of the biocontrol bacterium *Burkholderia cepacia* AMMDR1 on two oomycete pathogens of pea(*Pisum sativum* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 5192-

- 5200.
- 지형진, 조원대, 김충희. 2000. 한국의 식물역병. 농업과학기술원. pp.35.
- Kim, J. W. and Park, E. W. 1997. *Pythium* spp. isolated from turfgrasses at golf courses in Korea. *The Korean J. Mycology* 25: 276-290.
- 김충환. 2000. *Fusarium oxysporum*에 대한 길항세균 YC-300 균주의 분리 동정 및 세포벽 분해 효소 chitinase 유전자의 분리와 염기서열. 경상대학교 박사학위 논문.
- Moon, B. J., Schneider, R. W. and Park, H. C. 1996. Biological control of seed and seedling rot caused by *Pythium arrhenomanes* in water-seeded rice. *Korean J. Plant Pathol.* 12: 407-414.
- Shen, S. S., Kim, J. W. and Park, C. S. 2002a. *Serratia plymuthica* strain A21-4: a potential biocontrol agent against *Phytophthora* blight of pepper. *Plant Pathol. J.* 18: 138-141.
- Shen, S. S., Choi, O. H., Lee, S. M. and Park, C. S. 2002b. *In vitro* and *in vivo* activities of a biocontrol agent, *Serratia plymuthica* A21-4, against *Phytophthora capsici*. *Plant Pathol. J.* 18: 221-224.
- Singh, P. P., Shin, Y. C., Park, C. S. and Chung, Y. R. 1999. Biological control of *Fusarium* wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. *Phytopathology* 89: 92-99.
- Zhou, T. and Paulitz, T. C. 1993. *In vitro* and *in vivo* effects of *Pseudomonas* spp. on *Pythium aphanidermatum*: zoospore behavior in exudates and on the rhizoplane of bacteria-treated cucumber roots. *Phytopathology* 83: 872-876.