

방사선유도 돌연변이체 *Bacillus lentimorbus* WJ5a17에 의한 Pythium Root rot의 방제

이영근* · 김재성 · 장병일 · 장유신 · 이호용¹

한국원자력연구소 방사선이용연구부, ¹상지대학교 생명과학과

Biological Control of Pythium Root Rot by Radiation Induced Mutant, *Bacillus lentimorbus* WJ5a17

Young-Keun Lee*, Jae-Sung Kim, Byung Il Jang, Yu-Sin Jang and Ho Yong Lee¹

Radiation Utilization Research Division, Korea Atomic Energy Research Institute, Taejon, Korea

¹Department of Biological Science, Sang Ji University, Wonju, Korea

Abstract - To control pythium root rot, *Bacillus lentimorbus* WJ5a17 with high anti-fungal activity against *Pythium ultimum* was induced from *B. lentimorbus* WJ5 by gamma radiation (⁶⁰Co). The biocontrollers of FWJ5 and FWJ5a17 were formulated (1.0×10^{11} CFU g⁻¹) with *B. lentimorbus* WJ5 and WJ5a17, respectively. The population density of FWJ5 and FWJ5a17 maintained highly up to 1.0×10^9 CFU g⁻¹ in nursery and field soils until 30 days after treatment. *P. ultimum* spores germination were inhibited 71.0% and 81.4% by FWJ5 and FWJ5a17, respectively. Pythium root rot of red pepper, Chinese cabbage and radish were significantly ($p < 0.05$) controlled by one time treatment of FWJ5 and FWJ5a17.

Key words : *Bacillus lentimorbus* WJ5, biocontroller, mutant, *Pythium ultimum*

서 론

최근의 농업 정책은 환경 친화적인 농법을 강조하고 있으며 이에 따라 농업환경오염의 주 오염원인 식물의 병해방제기법에 대해서 보다 환경 친화적인 기술이 보급되도록 추진하고 있는 실정이다. 즉, 자연환경 및 농업 생산 환경의 보전 뿐만 아니라 인체에 안전한 농산물의 생산을 위해서 기존의 화학농약을 대체할 수 있는 생물학적방제방법이 필요하게 되었으며 다양한 효과를 지닌

여러 종류의 생물농약의 개발과 사용이 시급하게 되었다.

식물의 전염성병 중 진균에 의한 병해는 매우 다양하며 특히, 토양유래병원성 진균은 토양을 통해 전염하므로 일시에 전 재배 면적에서 식물에 병을 발생시키며 조기에 병 발생 여부를 발견하기가 매우 어렵다. 토양유래전염성병을 일으키는 대표적인 진균으로는 *Pythium*, *Phytophthora*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Verticillium*, *Sclerotium*, *Plasmodiophora* 그리고 *Sclerotinia*속의 종들이 알려져 있다(Kim and Kim 2002; Mao *et al.* 1998). 특히, *Pythium*속 진균은 식물의 뿌리에 감염되며 150여종 이상의 채소 및 과수 작물을 침해하는 것으로 알

* Corresponding author: Young-Keun Lee, Tel. 042-868-8056, Fax. 042-862-6980, E-mail. yklee@kaeri.re.kr

려져 있다(Mao *et al.* 1997; Yang *et al.* 2002). *Pythium*속 진균에 의한 뿌리썩음병은 지표면의 줄기가 수침상으로 썩고 감염부위가 말라 가는 실처럼 되기도 하며, 뿌리의 중간부위나 지표의 관부에서 물에 데친 것 같은 큰 부정형 병반을 형성하게 되어 식물의 생장을 치명적으로 억제한다. 현재까지 *Pythium*속 진균에 의한 뿌리썩음병의 방제약제로는 식물 침투성 살균제인 metalaxyl이 주로 이용되나 식물체 침투성이므로 식물 종류에 제한적이고 특히, 배추와 무의 경우에는 metalaxyl 사용이 제한되지 않고 있다(농업과학기술원 2000). 화학농약의 대안으로 미생물농약을 이용한 *Pythium*속 진균에 의한 식물병 방제에 대한 연구는 Lewis와 Larkin(1998)이 가지와 고추에 *Cladorrhynchium feocundissimum*을, Yang 등(2002)이 오이에 *Bacillus stearothermophilus* YC4194를, Li 등(2002)이 오이와 콩에 *Burkholderia ambifaria* BC-F를 이용하여 생물학적 방제를 시도해 50% 이상의 방제효과를 보여서 *Pythium*속 진균 방제에 있어서 미생물농약의 활용가능성은 높은 것으로 보고 되었다. 그러나 자연에서 확보한 미생물농약 균주는 화학농약을 대체할 정도로 식물병 방제효과를 나타내지 못해 보다 항진균 활성이 높은 신 균주를 발굴하거나 균주의 개량이 필요한 실정이다. 미생물의 항진균 활성을 증진하기 위한 균주 개량방법으로 돌연변이체의 유도가 있다. 방사선의 한 종류인 감마선에 의해서 세포내 DNA에 돌연변이가 야기된다(Hutchinson 1985; Becker and Sevilla 1993). 감마선은 균주개량 및 돌연변이체 유도에 유용한 물리적 방법으로 보고 되었다(Lee *et al.* 2000, 2001, 2002; Chung *et al.* 2002; Chang *et al.* 2003).

본 연구에서는 항진균 활성이 있는 *Bacillus lentimorbus* WJ5에 방사선(감마선)을 조사하여 야생형보다 항진균 활성이 증강된 돌연변이체를 유도하고 이를 제제화하여 작물의 *Pythium ultimum*에 의한 뿌리썩음병의 방제효과를 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 방사선이용 돌연변이체 유도 및 항진균 활성 검증

항진균 활성이 있는 야생형 균주 *Bacillus lentimorbus* WJ5를 국내의 울진지역 토양에서 분리한 후 동정하였다(FAME, API, 16S rDNA 분석, Table 1). NB (nutrient broth, Difco, USA) 배지에 접종해서 37°C에서 18시간 전 배양한 후 1.5 ml Eppendorf tube에 1 ml씩 분주하여 95%의 치사선량으로 이온화 방사선(감마선, ⁶⁰Co irradi-

Table 1. Identification of *Bacillus lentimorbus* WJ5 isolated from Uljin seaside soil

Identification	% Homology	Method
<i>Bacillus lentimorbus</i>	75.3	FAME
<i>Panibacillus macerans</i>	49.0	FAME
<i>Bacillus subtilis</i>	61.0	API
<i>Bacillus lentimorbus</i>	99.9	16S rDNA

ator, Atomic Energy of Canada Ltd., dose rate : 920 Gy hr⁻¹)을 조사하였다. 방사선 조사 후 생존한 균체를 대상으로 농촌진흥청 농업생명공학연구원 한국농용미생물보존센터(KACC)로부터 분양 받은 뿌리썩음병원성진균인 *Pythium ultimum* KACC 40705에 대한 항진균 활성을 조사하였다. PDA (potato dextrose agar, Difco, USA) 배지에 *P. ultimum*을 agar plug상태로 접종하고 대상균주의 액체 배양액 20 µl (1.0 × 10⁷ CFU ml⁻¹)를 paper disc (8 mm diameter, Toyo Roshi Kaishi Ltd., Japan)에 접종하여 27°C에서 3일간 대치배양 후 길항활성대의 형성을 측정하였다.

2. 미생물제제 제조 및 토양 내 잔류 생존력 조사

미생물제제 제조는 Bernhard 등(1998)과 Lewis와 Lumsden (2001)의 방법을 변용하여 수행하였다. 항진균 세균을 48시간동안 NB 배지에 배양한 후(WJ5: 1.5 × 10¹⁰ CFU ml⁻¹, WJ5a17: 1.6 × 10¹⁰ CFU ml⁻¹) 균체만을 회수하여 멸균된 증량제(Filler/Carrier)와 영양원(Polymer/Nutrients)을 혼합하고 40°C에서 건조하였다. 건조한 원제에 전착제(Sticker/Binder), 자외선 차단제(UV protectants)와 계면활성제(Adhesion aids)를 첨가하여 완성된 제제로 사용하였다. 미생물제제 내 균체의 생존능을 측정하기 위해서 4°C와 상온에서 보관하면서 10일과 30일에 생존균체수를 조사하였다. 토양 내 잔류 생존력 조사는 멸균된 일반 밭 토양과 상토(원예용 상토 5호, (주)부농) 각 100 g에 미생물제제 1 g을 혼합하여 상온에서 보관하면서 10일과 30일 경과 후 세균의 생존수를 조사하였다.

3. 미생물제제의 *Pythium ultimum*의 포자발아 억제시험

B. lentimorbus WJ5와 *B. lentimorbus* WJ5a17을 제형화한 미생물제제(F WJ5와 FWJ5a17)의 *P. ultimum* 포자의 발아 억제효과를 확인하였다. Getha와 Vikineswary(2002)의 방법을 변용하여 *P. ultimum*을 V8(V8 vegetable juice, Campbell soup Co., USA) agar 배지에서 3

일간 배양한 후 포자형성을 유도하였다. 포자를 PDB 배지로 회수(1.6×10^4 spore ml^{-1})하여 slide glass에 10 μ l 씩 3점으로 접종하고 여기에 미생물제제를 멸균증류수로 100배 희석하여 10 μ l 씩 접종하였다. 27°C 항온기에서 포자의 발아를 유도하였으며, 12시간 후 *P. ultimum*의 포자발아율을 조사하였다.

4. 미생물제제의 작물종자 발아촉진 및 초기 생육에 미치는 영향조사

미생물제제 (FWJ5와 FWJ5a17)가 작물 종자의 발아에 미치는 영향과 성장 촉진 효과 유무를 조사하기 위하여 pot당 상토 50 g에 미생물제제를 멸균증류수로 100배 희석하여 10 ml을 혼합하였다. 고추, 배추와 무 씨앗을 pot당 1개씩 파종한 후 각 작물의 생육상황을 조사하였다. 실험을 수행하는 동안 온도는 28~30°C, 습도는 70~80%로 유지하였으며 관수는 pot 아래쪽으로부터 자연적으로 흡수되도록 하였다. 모든 실험구는 각각 25 반복으로 수행하였다. 초장은 지표부분부터 가장 긴 길이로, 엽수는 잎의 길이가 1 cm 이상 되는 것을 온전한 잎으로 간주하고 계수하였다.

5. 미생물제제를 이용한 *Pythium ultimum*의 뿌리썩음병 방제

작물은 파종 후 15일 동안 재배한 생육초기의 작물과 30일 동안 재배한 생육중기의 작물을 사용하였다. 뿌리썩음병을 일으키는 *P. ultimum*과 미생물제제 FWJ5와 FWJ5a17을 각각 고추, 배추와 무에 처리하여 뿌리썩음병 방제효과를 아래와 같은 방법으로 조사하였다. Bagnasco 등(1998)과 Mao 등(1997)의 방법을 응용하여 *P. ultimum*을 10 ml의 V8 agar 배지에 3일간 배양하여 포자형성을 유도하였다. 3 kg의 상토당 10 ml의 *P. ultimum* 배양체를 혼합한 다음 직경 15 cm의 pot에 300 g씩 분주하여 *P. ultimum* 감염상토 pot를 만들었다. 상토에서 재배한 고추, 배추와 무를 각 감염상토 pot당 1주씩 이식하였다. 미생물제제는 물로 100배 희석하여 작물 이식 직후 pot당 5 ml씩을 작물의 근부에 1회 처리하였다. 온도 28~30°C, 습도 70~80%의 온실에서 관수는 pot 아래쪽으로부터 자연적으로 흡수되도록 하여 20일간 재배한 후 생육과 발병상황을 조사하였다. 실험구는 대조구(C), *P. ultimum* 처리 대조구(PU), 제제성분 처리구(PUFC), 미생물제제 FWJ5 처리구(PUFWJ5)와 미생물제제 FWJ5a17 처리구(PUFWJ5a17)였다. 통계검정은 student's *t* test로 하였다.

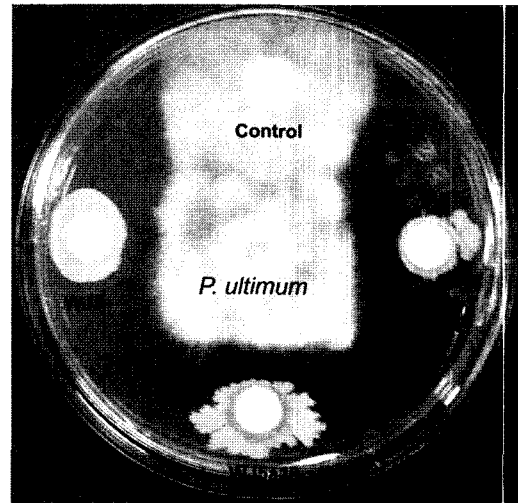


Fig. 1. Antifungal activities of *Bacillus lentimorbus* WJ5 and its gamma ray induced mutants, *B. lentimorbus* WJ5a17 and *B. lentimorbus* WJ5a18, against plant pathogenic fungus *Pythium ultimum* KACC 40705. Control: nutrient broth.

결과 및 고찰

1. 방사선을 이용한 항진균 활성증강 돌연변이체 *B. lentimorbus* WJ5a17 유도

항진균 활성이 있는 야생형 균주 *B. lentimorbus* WJ5를 LD₉₅의 방사선 조사선량(13.5 kGy)으로 감마선을 조사하여 뿌리썩음병원성진균 *P. ultimum*에 대한 항진균 활성이 야생형보다 증강된 돌연변이체를 선별하였다(Fig. 1). 항진균 활성대의 최단 거리의 크기를 측정할 결과 *B. lentimorbus* WJ5는 5.7 mm였으나 *B. lentimorbus* WJ5a17은 6.8 mm였으며, *B. lentimorbus* WJ5a18은 5.7 mm였다. 본 연구에서는 *B. lentimorbus* WJ5a17을 방사선이용 항진균 활성 증강 돌연변이체로 선택하여 이후 실험에 사용하였다. 방사선(감마선)을 이용한 항진균 활성 증강 돌연변이체 유도에 관한 기존의 연구로는 Ahmad와 Shaukat (1987)가 *B. subtilis*에서 항생제 생산 증강 돌연변이체를 유도한 결과가 있으며, 본 연구진에 의해서도 *B. subtilis* YS1, *B. circulans* K1과 *Burkholderia gladioli* K4로부터 항진균 활성이 증강되거나 상실된 돌연변이체를 감마선을 이용하여 유도한 결과가 있다(Lee *et al.* 2001; Chung *et al.* 2002). 이러한 결과에 의하면 감마선을 이용할 경우 특이적으로 특정 병원성진균에 대해서만 항진균 활성이 증강된 돌연변이체들을 유도할 수 있었다. 이들 돌연변이체를 이용함으로써 항

진균 관련 유전자 연구, 항진균 활성의 기작연구나 항진균성 물질 생산 연구시 유용하게 이용될 수 있을 것으로 사료된다. 따라서 방사선을 이용한 항진균 활성이 증강된 돌연변이체 유도는 특정 식물병원성 진균에 대한 항진균 세균의 개량에 유용함을 알 수 있으며, 다양한 기능성 세균의 개량에도 좋은 방법으로 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

2. 미생물제제의 저장성 및 토양 내 잔류 생존력

항진균 활성 균주를 작물의 뿌리썩음병 방제에 활용하기 위해 미생물제제를 제조하여 *B. lentimorbus* WJ5 제제는 FWJ5로, 식물병원성 진균에 대한 항진균 활성이 증강된 돌연변이균주 *B. lentimorbus* WJ5a17 제제는 FWJ5a17로 명명하였으며 균체 수는 1.0×10^{11} CFU g^{-1} 이었다.

제조한 FWJ5와 FWJ5a17의 저장성과 토양 내 잔류 세포 생존력을 비교 조사한 결과는 Table 2와 같았다. PDB 상태로 보관한 대조구(PWJ5와 PWJ5a17)는 접종 세포 수(1.0×10^{11} CFU ml^{-1})에 비해 저장 10일째에 생존세포수가 급격히 감소하여 상온에서는 감소율이 각각 2.36 log (CFU ml^{-1})와 1.54 log (CFU ml^{-1})였고, 4°C에서는 감소율이 각각 3.98 log (CFU ml^{-1})와 3.89 log (CFU ml^{-1})였으나, 미생물제제 (FWJ5와 FWJ5a17)는 초기 세포 수(1.0×10^{11} CFU g^{-1})와 큰 차이 없이 4°C와 상온에서 감소율이 0.43 log (CFU g^{-1}) 이하로 4.0×10^{10} CFU g^{-1} 이상의 세포수를 유지하였다. 저장 30일째의 감소율은 접종 세포 수에 비해 PDB 상태에서 4°C와 상온에서 모두 3.71 log (CFU ml^{-1}) 이상으로 급격히 감소하였다. 그러나 미생물제제의 경우 30일째에도 4.0×10^9 CFU g^{-1} 이상의 생존세포수를 유지하였다. 따라서 미생물제제가 균주의 저장 측면에서 더욱 효율적임을 알 수 있었다. 또한, 미생물제제인 FWJ5a17이 FWJ5보다 비록 유의한 차이는 없으나 생존율이 더 높은 경향을 나타내어 항진균 활성세균의 개량에 있어서 방사선(감마선)을 이용하는 것이 유용함을 입증하였다.

미생물제제를 토양에 처리한 후 세포 생존력을 측정 한 결과 (Table 2) 10일 후 상토에서의 생존세포수의 감소율은 FWJ5와 FWJ5a17에서 각각 1.70과 1.42 log (CFU g^{-1})였으나 일반토양에서는 각각 1.24~1.18 log (CFU g^{-1})였으며 30일 후의 상토는 FWJ5와 FWJ5a17이 각각 2.02와 1.62 log (CFU g^{-1})인데 비해 일반토양은 각각 1.42와 1.18 log (CFU g^{-1})였다. 따라서 상토보다 일반토양에서 유의적 차이는 없으나 세포 생존력이 높은 경향을 보였으며 FWJ5a17이 FWJ5보다 높은 생존력을 보임을 확인하였다. 이상의 결과로 보아 방사선 유도 돌연변이체가 야생형에 비해 자연적응력이 높은 것으로 판단된다. 이는 *B. lentimorbus* WJ5와 *B. lentimorbus* WJ5a17 균주가 토양에서 효과적으로 생존할 수 있음을 보여준다.

Yang 등 (2002)은 *B. stearothersophilus* YC4194를 미생물 제제화하여 오이를 과중한 상토에 접종 후 근권에서 균체밀도를 조사한 결과 접종시의 5.0×10^8 CFU g^{-1} 에서 1.0×10^6 CFU g^{-1} 으로 감소(감소율: 2.70 log (CFU

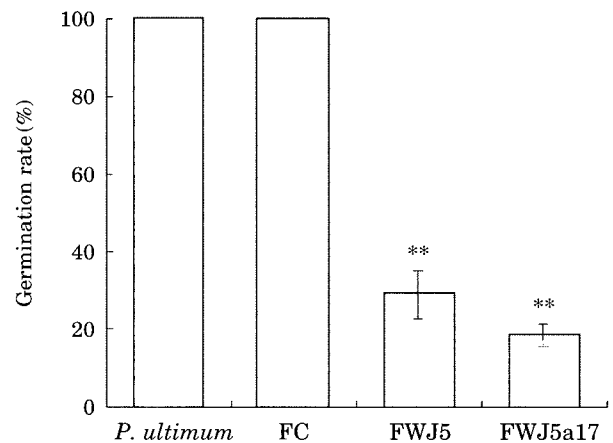


Fig. 2. Effect of biocontrollers containing *Bacillus lentimorbus* WJ5 (FWJ5) and *B. lentimorbus* WJ5a17 (FWJ5a17) on the germination of *Pythium ultimum* spores. *P. ultimum*; *P. ultimum* spore, FC: Formulation control. Bars represent standard error of mean, n=3. **: p<0.01.

Table 2. Cell viability (log(CFU ml^{-1})) in biocontrollers after 10- and 30-day of storage

Strains	4°C		Room temperature		Field soil		Nursery soil	
	10-day	30-day	10-day	30-day	10-day	30-day	10-day	30-day
PWJ5	3.98	4.65	2.36	3.71	1.56	1.95	1.76	2.02
PWJ5a17a	3.89	5.00	1.54	3.89	1.38	1.64	1.51	1.88
FWJ5	0.43	1.14	0.19	0.90	1.24	1.42	1.70	2.02
FWJ5a17	0.24	0.39	0.09	0.64	1.03	1.18	1.42	1.62

PWJ5: *Bacillus lentimorbus* WJ5 in PDB, PWJ5a17: *B. lentimorbus* WJ5a17 in PDB, FWJ5: *B. lentimorbus* WJ5 in formulation, FWJ5a17: *B. lentimorbus* WJ5a17 in formulation.

g⁻¹)됨을 확인하였다. Dyke와 Prosser (2000)는 *Pseudomonas fluorescens*를 회수하여 phosphate buffered saline 로 현탁한 후 토양에 접종하여 생존력을 측정한 결과 초기 세포 수는 1.0 × 10⁷ CFU g⁻¹이었으나 시일이 경과 할수록 감소되어 접종 30일 경과 후에는 9.0 × 10⁴ CFU

g⁻¹ 이하로 급격히 감소(감소율: 2.05 log (CFU g⁻¹))되었 음을 보고하였다. 이에 비해 본 연구에 사용된 WJ5와 WJ5a17은 PDB에 현탁되었거나 미생물제제화한 모든 경우에 상토와 일반 밭 토양에서 30일 후 생존세포수의 변화율이 1.18~2.02 log (CFU g⁻¹)범위를 나타내므로 B.

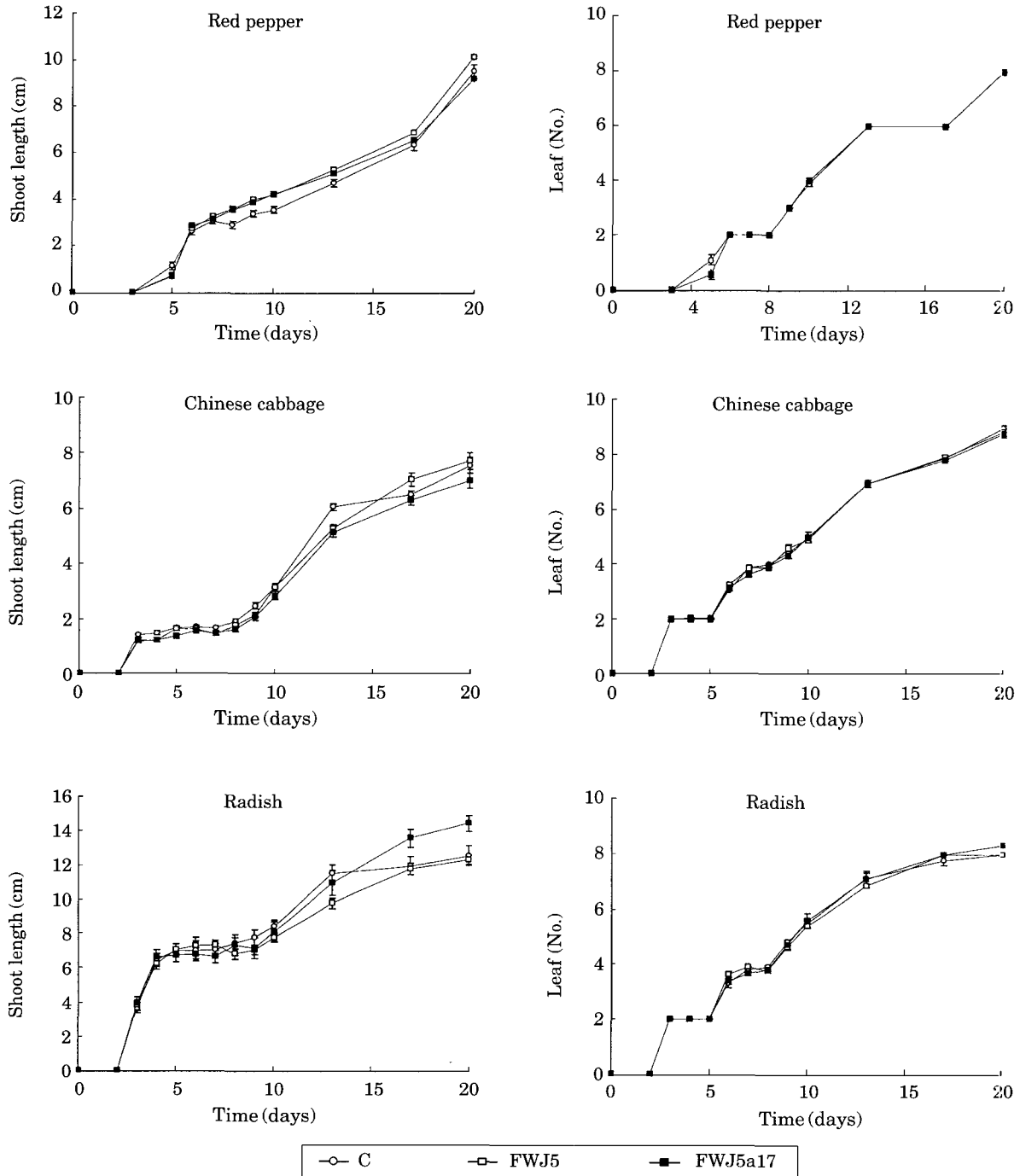


Fig. 3. Effects of biocontrollers on the early growth of red pepper, Chinese cabbage and radish. C; control, FWJ5; formulant of *Bacillus lentimorbus* WJ5, FWJ5a17; formulant of *B. lentimorbus* WJ5a17, Bars represent standard error of mean. n = 25.

stearotherophilus YC4194나 *P. fluorescens*보다 토양 적응성이 높음을 알 수 있었다. 이상의 결과로 보아 *B. lentimorbus* WJ5와 WJ5a17균주의 보관에 있어서 미생물제제 상태가 유리하며 미생물제제를 희석하여 1.0×10^9 CFU g^{-1} 이 되도록 토양에 처리하여도 30일간 1.0×10^7 CFU g^{-1} 이상의 세포가 생존이 가능한 것을 알 수 있었다.

3. 미생물제제의 *P. ultimum* 포자발아 억제 효과

*P. ultimum*의 포자발아에 대하여 *B. lentimorbus* WJ5 제제 (FWJ5)는 71.0%, *B. lentimorbus* WJ5a17 제제 (FWJ5a17)는 81.4%의 높은 발아억제 효과를 나타냈다 (Fig. 2). 미생물제제에 사용된 원제들은 *P. ultimum* 포자 발아에 억제효과를 보이지 않았다. FWJ5에 비해서 FWJ5a17의 경우 *P. ultimum* 포자발아에 대한 억제효과가 10.4% 더 높았으나 유의한 차이를 보이지는 않았다. Yang 등(2002)은 *Pythium aphanidermatum* 포자의 발아가 *B. stearotherophilus* YC4194에 의해서 80% 정도 감소되었다고 보고하였다. 이에 비해 본 연구에 사용된 *B. lentimorbus* WJ5와 *B. lentimorbus* WJ5a17 제제는 비록 대상 병원성미생물은 다르지만 유사한 저해효과를 지녔음을 알 수 있었다.

4. 미생물제제의 작물종자 발아 및 초기 생장에 미치는 영향

B. lentimorbus WJ5 제제 (FWJ5)와 *B. lentimorbus* WJ5a17 제제 (FWJ5a17)의 작물종자 발아 및 생장에 미치는 효과를 검증한 결과는 다음과 같다. 고추, 배추와 무는 파종 후 2일부터 발아하기 시작하였다. 고추씨앗은 대조구(C), FWJ5 처리구 및 FWJ5a17 처리구에서 각각 100, 100 및 96% 발아하였고, 배추는 각각 80, 92 및 92%, 무는 각각 84, 88 및 84% 발아하였다. 이와 같은 발아율은 작물의 씨앗을 상품으로서 판매하고자 할 때 기준발아율인 고추 65% 이상, 배추 75% 이상, 무 70% 이상을 만족시킨 것으로(농림부 2000) 본 연구에서 제조한 미생물제제가 작물의 발아를 억제하지 않음을 알 수 있었다. 미생물제제에 의한 각 작물의 발아이후 초기 성장 저해유무를 확인하기 위하여 초장과 엽수를 조사한 결과에서도 생육조사를 수행한 전 구간에서 대조구와 유의한 차이가 없었다(Fig. 3). 따라서 본 실험에서 사용한 미생물제제는 고추, 배추와 무의 종자 발아와 초기생장에 있어 유해한 영향을 주지 않음을 알 수 있었다. 길항 미생물 중에는 식물생장촉진 근권 미생물(PGPR, plant growth-promoting rhizobacteria)의 효과를 보이는 경우

도 있으나(Hwang 2002; Kloepper *et al.* 1980) 본 연구에 사용된 *B. lentimorbus* WJ5와 WJ5a17은 PGPR효과를

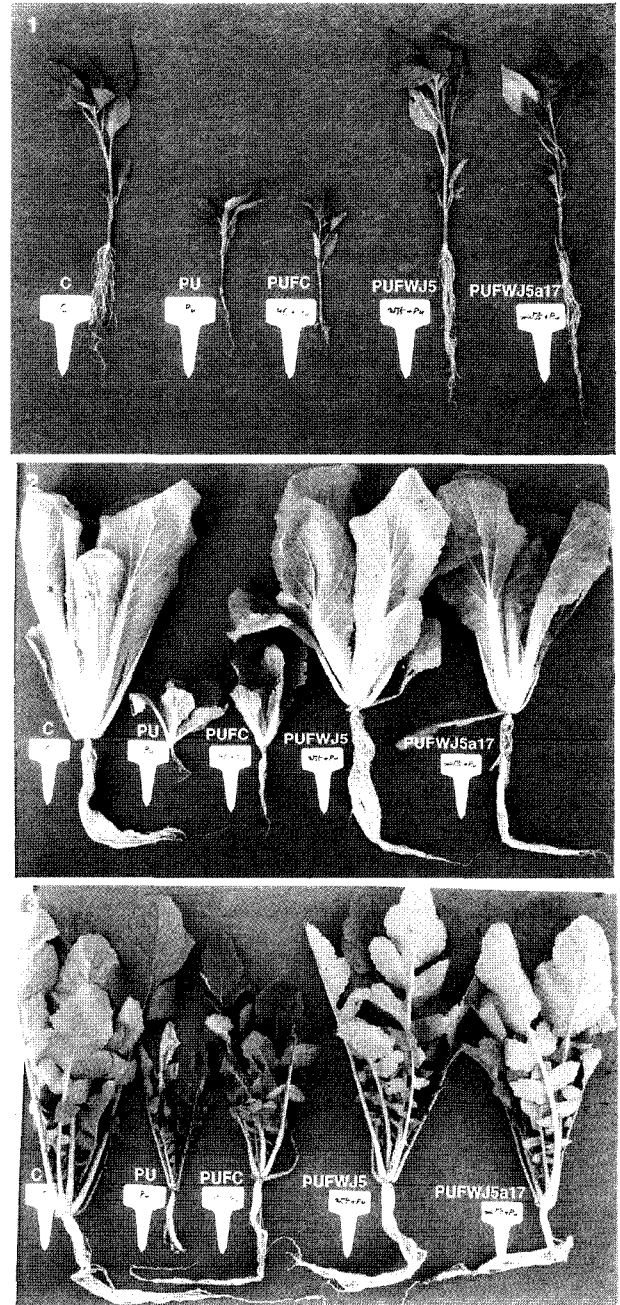


Fig. 4. Suppression of pythium root rot caused by *Pythium ultimum*. 15-day-old red pepper (1), Chinese cabbage (2) and radish (3) were transplanted to the nursery soil, *P. ultimum* inoculated and biocontrol treated. C: untreated control, PU: *P. ultimum*, PUFc: *P. ultimum* and formulation control, PUFWJ5: *P. ultimum* and formulant of *Bacillus lentimorbus* WJ5, PUFWJ5a17: *P. ultimum* and formulant of *B. lentimorbus* WJ5a17.

나타내지는 않는 것으로 판단된다.

5. 미생물제제를 이용한 뿌리썩음병 방제

*P. ultimum*을 상토에 접종한 후 미생물제제를 처리하였을 때 작물의 발병상황을 조사한 결과는 다음과 같다. Fig. 4와 같이 처리 20일 후 *P. ultimum*처리 대조구 (PU)와 제제성분 처리구(PUFC)에서는 모든 작물에서 뿌리가 암갈색으로 썩은 부위가 관찰되었으며, 뿌리와 줄기의 생육이 저조하였다. 미생물제제를 처리한 PUFWJ5구와 PUFWJ5a17구에서는 어떠한 뿌리썩음병 징을 관찰할 수 없었다. 이러한 결과는 본 연구에서 사용된 미생물제제의 처리에 의해 *P. ultimum*의 뿌리썩음병을 매우 효과적으로 방제할 수 있음을 보인 것이다.

15일 동안 재배한 생육초기 작물별 생육에 미치는 *P. ultimum*과 미생물제제 처리효과를 조사한 결과는 Fig. 5에 보였다. 고추의 경우는 PU구와 PUFC구에서의 평균 초장은 각각 9.0과 8.8 cm이었으나 미생물제제를 처리한 PUFWJ5구와 PUFWJ5a17구의 평균초장은 각각 18.3과 13.2 cm로 미생물제제를 처리하지 않은 처리구보다 유의성 있는($p < 0.05$) 생육의 차이를 관찰할 수 있었다. 대조구의 15.5 cm와는 유의한 차이가 없었다. 배추는 PU구와 PUFC구에서의 평균 초장은 각각 7.8과 8.5 cm이었고, PUFWJ5구와 PUFWJ5a17구의 평균초장은 각각 24.5와 22.8 cm로 미생물제제를 처리하지 않은 처리구보다 매우 유의성 있는($p < 0.01$) 생육의 차이를 관찰할 수 있었다. 대조구의 23.7 cm와는 유의한 차이가 없었다. 무의 초장을 조사한 결과 PU구와 PUFC구에서의 평균 초장은 각각 20.3과 21.8 cm이었고, PUFWJ5구와 PUFWJ5a17구의 평균초장은 각각 28.3과 32.2 cm로 미생물제제를 처리하지 않은 처리구보다 PUFWJ5a17구에서 유의성 있는($p < 0.05$) 생육의 차이를 관찰할 수 있었다. 따라서, 생육초기 작물에 미치는 *P. ultimum*의 감염에 의한 생육장해효과를 미생물제제 FWJ5와 FWJ5a17에 의해 효율적으로 억제될 수 있음을 알 수 있었다.

30일 동안 재배한 생육중기의 작물별 생육에 미치는 *P. ultimum*과 미생물제제 처리효과를 조사한 결과(Fig. 6) 고추는 PU구와 PUFC구에서의 평균 초장은 각각 27.5와 31.0 cm이었으나 미생물제제를 처리한 PUFWJ5구와 PUFWJ5a17구의 평균초장은 각각 36.8과 39.5 cm로 미생물제제를 처리하지 않은 처리구보다 유의성 있는($p < 0.05$) 생육의 차이를 관찰할 수 있었다. 대조구의 39.7 cm와는 유의한 차이가 없었다. 배추의 초장을 조사한 결과 PU구와 PUFC구에서의 평균 초장은 각각 28.0과 28.5 cm이었고, PUFWJ5구와 PUFWJ5a17구의 평균 초장은 각각 32.3과 33.2 cm로 미생물제제를 처리하지

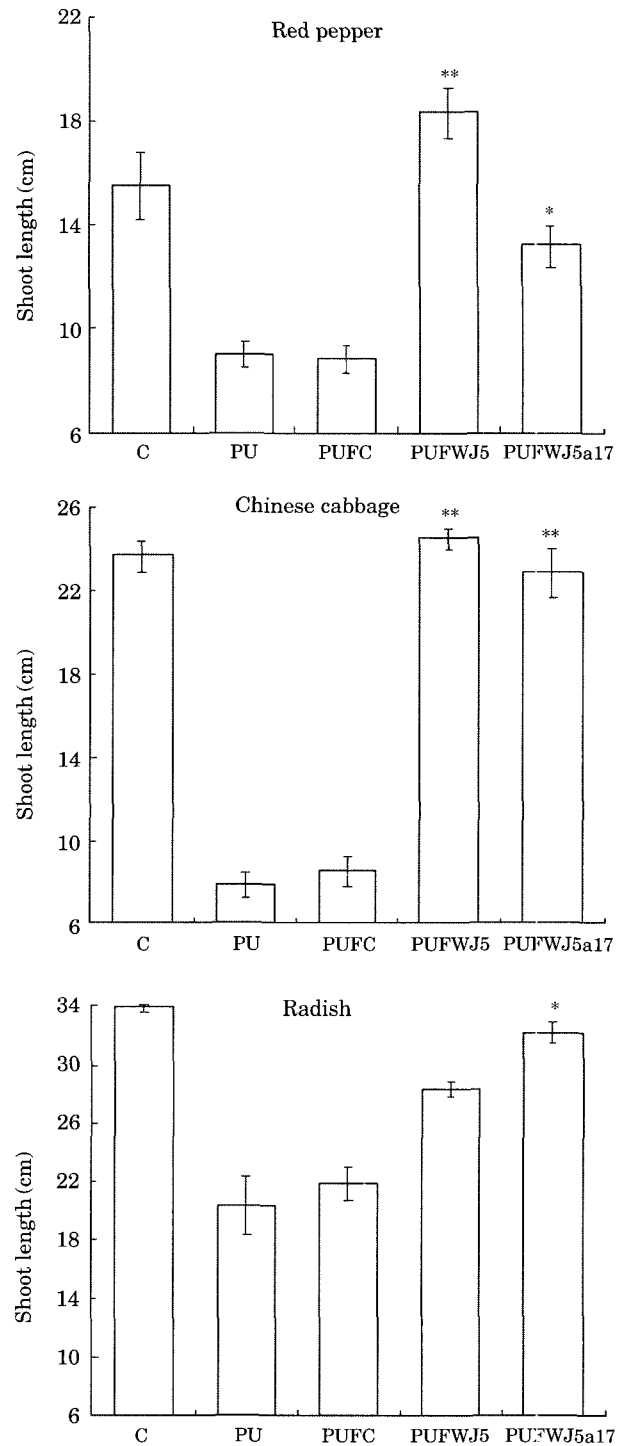


Fig. 5. Effect of biocontrollers on the shoot length of red pepper, Chinese cabbage and radish on which *Pythium ultimum* was infected. C: untreated control, PU: *P. ultimum*, PUFC: *P. ultimum* and formulation control, PUFWJ5: *P. ultimum* and formulation of *Bacillus lentimorbus* WJ5, PUFWJ5a17: *P. ultimum* and formulation of *B. lentimorbus* WJ5a17. Bars represent standard error of mean, $n = 3$. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$.

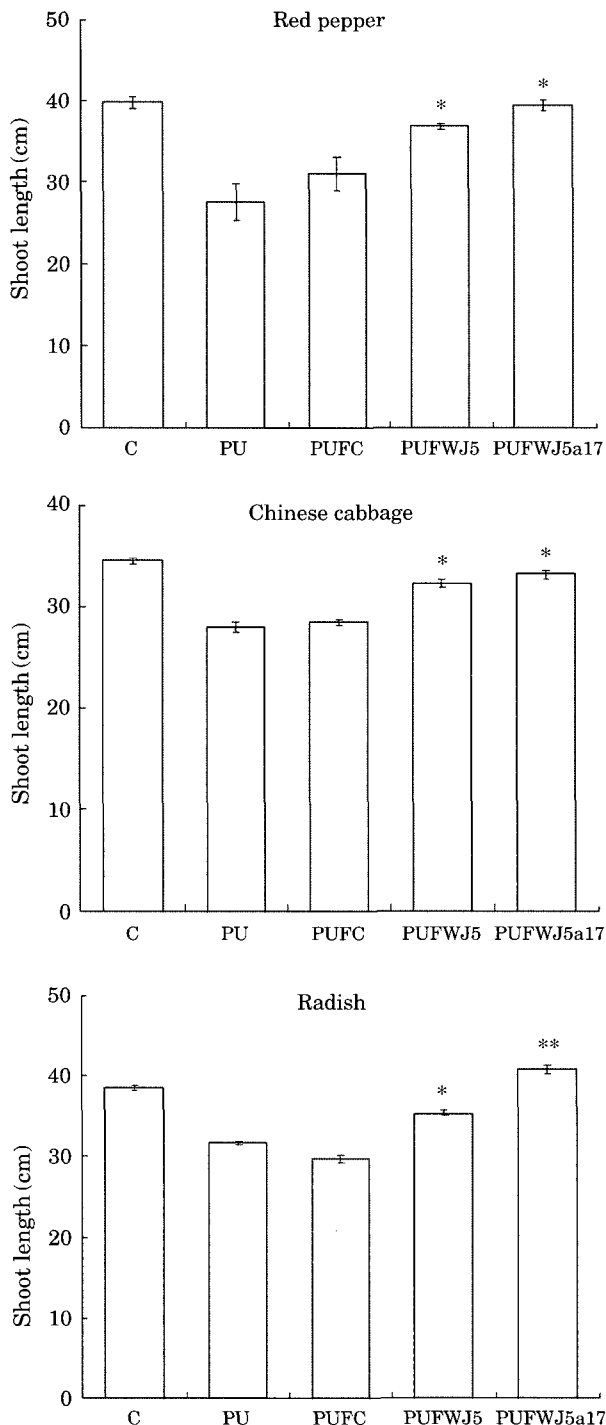


Fig. 6. Effect of biocontrollers on the shoot length of red pepper, Chinese cabbage and radish infected by *Pythium ultimum* at 30-day-old. C: untreated control, PU: *P. ultimum*, PUF: *P. ultimum* and formulation control, PUFWJ5: *P. ultimum* and formulation of *Bacillus lentimorbus* WJ5, PUFWJ5a17: *P. ultimum* and formulation of *B. lentimorbus* WJ5a17. Bars represent standard error of mean, n = 3. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$.

않은 처리구보다 유의성 있는 ($p < 0.05$) 생육의 차이를 보였다. 대조구의 34.5 cm와는 유의한 차이가 없었다. 무의 초장을 조사한 결과 PU구와 PUF구에서의 평균 초장은 각각 31.7과 29.7 cm이었고, PUFWJ5구와 PUFWJ5a17구의 평균초장은 각각 35.3과 40.8 cm로 미생물제제를 처리하지 않은 처리구보다 유의성 있는 ($p < 0.05$) 생육의 차이를 관찰할 수 있었다. 대조구의 38.5 cm와는 유의한 차이가 없었다. *P. ultimum*의 뿌리썩음병은 생육 중기에 감염될 경우 병징 효과는 심하지 않은 것으로 알려져 있는데(고 등 1998), 본 연구에서 생육중기 작물에서 *P. ultimum*의 감염에 의해 생육이 저해됨을 확인할 수 있었으며, 본 연구에서 개발한 미생물제제 FWJ5와 FWJ5a17을 적용하였을 때 유의성 있게 ($p < 0.05$) 뿌리썩음병 감염을 방제할 수 있음을 확인하였다.

Li 등(2002)은 *Burkholderia ambifaria* BC-F를 이용하여 오이와 완두콩에서 *Pythium*에 의한 뿌리썩음병 감염을 90% 이상 차단하였으며, Lewis와 Larkin(1998)은 진균인 *Cladorrhinum foecundissimum*을 제제화하여 고추에서 50% 정도의 발병억제효과를 얻었으며, Yang 등(2002)은 *B. stearothermophilus* YC4194로 오이에서 50% 정도의 발병억제 효과를 보았다. Koch(1999)는 *Trichoderma harzianum*을 이용한 SUPRESIVIT와 TRI 002, *T. viride*를 이용한 ECOFIT, *Gliocladium virens*를 이용한 SOILGARD, *Talaromyces flavus*를 이용한 PROTUS 등 미생물제제 상품 5종을 이용하여 오이에서 *P. ultimum*에 의한 뿌리썩음병의 방제효과를 검증한 결과 단지 *G. virens*를 사용한 SOILGARD만이 방제효과를 나타내었다고 하였다. 이러한 연구결과를 비교해 볼 때 본 연구에서 사용된 *B. lentimorbus* WJ5와 이의 방사선이용 항진균 활성 증강 돌연변이체 균주인 WJ5a17은 고추, 배추와 무에서 *P. ultimum*에 의한 뿌리썩음병을 매우 효율적으로 방제하는 균주됨을 확인할 수 있었고, 이를 이용한 미생물제제는 생물학적인 방제제로서의 활용성이 유망한 것으로 생각된다.

적 요

*Pythium ultimum*에 의한 뿌리썩음병을 생물학적으로 방제하기 위하여 이에 대한 항진균 활성이 있는 세균 *Bacillus lentimorbus* WJ5를 방사선 (^{60}Co)을 조사하여 보다 더 강한 항진균 활성을 가지는 돌연변이체 *B. lentimorbus* WJ5a17을 유도하였다. *B. lentimorbus* WJ5와 WJ5a17을 각각 활용한 미생물제제 FWJ5와 FWJ5a17을 조제하였으며 균체수는 1.0×10^{11} CFU g^{-1} 이었다. 미

생물제제는 저장 30일째에도 항진균 세균이 5.0×10^{10} CFU g^{-1} 이상 생존하였고, 상토와 밭 토양에서는 1.0×10^7 CFU g^{-1} 이상의 생존세포수를 유지하였다. 또한 *P. ultimum*의 포자발아를 *B. lentimorbus* WJ5 제제 (FWJ5)가 71.0% 억제하였고, *B. lentimorbus* WJ5a17 제제 (FWJ5a17)는 81.4% 억제하였다. 미생물제제인 FWJ5와 FWJ5a17은 고추, 배추와 무의 종자 발아와 초기생장에 유해한 영향을 주지 않을 뿐만 아니라, 작물 생육초기와 중기에 1회 처리하였을 경우에도 *P. ultimum*에 의한 뿌리썩음병징의 발생을 유의하게 ($p < 0.05$) 억제하였기에 매우 효과적인 생물학적 제어제임을 알 수 있었다.

사 사

본 연구는 과학기술부의 원자력연구개발사업의 일환으로 수행되었음.

참 고 문 헌

- 고영진, 신현동, 안경구, 이순구, 이종규, 차병진, 차재순. 1998. 식물병리학 제4판. 월드사이언스.
- 농림부. 2000. 종자관리요강. 농림부고시 제2000-54호.
- 농업과학기술원. 2000. 채소 병해의 진단과 방제. pp. 15-61. In 채소병해충 진단과 방제, 아카데미서적.
- Ahmad MS and GA Shaukat. 1987. Higher antibiotic yielding mutants of *Bacillus subtilis* by gamma irradiation. Nucleus 24:23-26.
- Bagnasco P, LDL Fuente, G Gualtieri, F Noya and A Arias. 1998. Fluorescent *Pseudomonas* spp. as biocontrol agents against forage legume root pathogenic fungi. Soil Biol. Biochem. 30:1317-1322.
- Becker D and M Sevilla. 1993. The chemical consequences of radiation damage to DNA. Adv. Radiat. Biol. 17:121-180.
- Bernhard K, PJ Holloway and HD Burges. 1998. A catalogue of formulation additives: function, nomenclature, properties and suppliers. pp. 333-381. In Formulation of Microbial Biopesticides (Burges HD ed.). Kluwer Academic Publishers.
- Chang H-H, Y-K Lee, J-S Kim, K-S Lee and KS Cho. 2003. Mutation spectrum of manganese (II) peroxidase gene in the *Pleurotus ostreatus* mutants induced by gamma radiation. J. Microbiol. 41:52-57.
- Chung H-Y, Y-K Lee, J-S Kim, KS Cho and Y-B Lee. 2002. Mutant induction of several antifungal bacteria by gamma radiation (^{60}Co). Kor. J. Environ. Agric. 21: 216-222.
- Dyke MIV and JI Prosser. 2000. Enhanced survival of *Pseudomonas fluorescens* in soil following establishment of inoculum in a sterile soil carrier. Soil Biol. Biochem. 32: 1377-1382.
- Getha K and S Vikineswary. 2002. Antagonistic effects of *Streptomyces violaceusniger* strain G10 of *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense race 4: Indirect evidence for the role of antibiosis on the antagonistic process. J. Ind. Microbiol. Biotech. 28:303-310.
- Hutchinson F. 1985. Chemical changes induced in DNA by ionizing radiation. Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol. 32:115-154.
- Hwang BK. 2002. Studies of resistance of pepper to Phytophthora blight and its control. Res. Plant Dis. 8:131-145.
- Kim C-H and Y-K Kim. 2002. Present status of soilborne disease incidence and scheme for its integrated management in Korea. Res. Plant Dis. 8:146-161.
- Kloepper JW, MN Schroth and TO Miller. 1980. Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. Phytopathol. 70:1078-1082.
- Koch E. 1999. Evaluation of commercial products for microbial control of soil-borne plant disease. Crop Prot. 18: 119-125.
- Lee Y-K, H-H Chang, J-S Kim, JK Kim and K-S Lee. 2000. Lignocellulolytic mutants of *Pleurotus ostreatus* induced by gamma-ray radiation and their genetic similarities. Radiat. Phy. Chem. 57:145-150.
- Lee Y-S, Y-J Ryu, J-S Cho, T-H Lim and T-H Chang. 2001. Effect of phosphorous acid on control of phytophthora blight of red pepper. Kor. J. Environ. Agric. 20: 180-185.
- Lee Y-K, H-H Chang, J-S Kim, YS Jang and HY Lee. 2002. Gamma radiation induced mutational spectrum of laccase gene in *Pleurotus ostreatus*. Kor. J. Environ. Agric. 20:316-324.
- Lewis JA and RP Larkin. 1998. Formulation of the biocontrol fungus *Cladorrhinum foecundissimum* to reduce damping-off diseases caused by *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum*. Biol. Control. 12:182-190.
- Lewis KA and RD Lumsden. 2001. Biocontrol of damping-off of greenhouse-grown crops caused by *Rhizoctonia solani* with a formulation of *Trichoderma* spp. Crop Prot. 20:49-56.
- Li W, DP Roberts, PD Dery, SLF Meyer, S Lohrke, RD Lumsden and KP Hebbar. 2002. Broad spectrum antibi-otic activity and disease suppression by the potential biocontrol agent *Burkholderia ambifaria* BC-F. Crop

Prot. 21:129–135.

- Mao W, JA Lewis, PK Hebbar and RD Lumsden. 1997. Seed treatment with a fungal of a bacterial antagonist for reducing corn damping-off caused by species of *Pythium* and *Fusarium*. Plant dis. 81:450–454.
- Mao W, JA Lewis, RD Lumsden and KP Hebbar. 1998. Bio-control of selected soilborne diseases of tomato and pepper plants. Crop Prot. 17:535–542.

Yang HS, HB Sohn and YR Chung. 2002. Biological control of pythium damping-off of cucumber by *Bacillus steatothermorphilus* YC4194. Res. Plant Dis. 8:234–238.

Manuscript Received: May 28, 2003
Revision Accepted: June 23, 2003
Responsible Editorial Member: Saywa Kim
(Yongin Univ.)