

진균성 식물병해 방제를 위한 항생물질 생산 길항미생물의 복합제제화

정희경 · 류재천 · 김상달*

영남대학교 자연자원대학 응용미생물학과

A Multi-microbial Biofungicide for the Biological Control against Several Important Plant Pathogenic Fungi

Hee-Kyoung Jung, Jae-Cheon Ryoo and Sang-Dal Kim*

Department of Applied Microbiology, College of Natural Resources, Yeungnam University,
Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do, 712-749, Korea

Received November 17, 2004; Accepted February 16, 2005

In order to develop a multi-microbial biofungicide against several important plant pathogenic fungi, strains were isolated from the phtophthora blight suppressive red-pepper field soil of Gyeongsangbuk-do, Korea. Strains AY1, AY6, AB1, BB2 and F4, which had strong antagonistic ability against *Phytophthora capsici* and *Fusarium oxysporum*, were selected for their involvement with strains of biocontrol fungicide. There were no antagonism among the selected strains and were compatible for making the biofungicide. Their antagonistic mechanisms, except for strain BB2, were an antibiosis by the production of antibiotic, while BB2 produced not only an antibiotic but also cellulase as an antagonistic mechanism against blight causing *P. capsici*. They were identified as *Halobacterium* sp. AB1, *Xenorhodus* sp. AY1, *Bacillus* sp. AY6, *Bacillus* sp. BB2, *Zymomonas* sp. F4 by various cultural, biochemical test and Biolog™ System 4.0. The highest levels of antifungal antibiotic could be produced after 48 hrs of incubation under the optimal medium which were 0.1% galactose, 0.1% NaNO₂, 5 mM Na₂HPO₄ (pH 5.5). The cultured multi-microbial biofungicide showed strong biocontrol activity against bacterial wilt disease and fusarium wilt disease in cucumber and tomato fields.

Key words: biocontrol, microbial agent, *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum*

서 론

화학비료와 맹독성 화학농약의 과다사용으로 토양의 산성화 및 부영양화 등 농업환경의 오염이 갈수록 심해지고 있으며, 특히 화학농약의 과다 사용은 토양, 수질은 물론이고 농산물까지 오염시키면서 생태계를 파괴하고 있다. 지속가능한 개발을 위한 기본원칙인 리우선언과 의제21의 공식화는 기존의 농업방식을 환경과 경제의 연결개념인 친환경농업으로 변화시켰다. 따라서 작물의 병해방제도 화학농약 대신하는 생물학적 방제법으로 바뀌었고, 이를 위해 토양 내 서식하는 길항미생물을 이용하는 방제연구가 계속 되고 있다.^{1,8)}

식물근부병균 등 여러가지 식물병원성 진균에 대한 길항미생물을 이용한 생태학적 방제법에는 다음과 같이 크게 3가지 형태로 구분될 수 있다. 첫째는 *Streptomyces* sp.,^{9,10)} *Trichoderma* sp.,^{11,12)} *Serratia* sp.,^{13,14)} *Pseudomonas* sp.,^{15,16)} *Bacillus* sp.¹⁷⁾

등이 분비하는 진균외벽 가수분해효소에 의한 식물병원균의 세포벽을 분해시키는 용균작용(degradative parasitism), 둘째로는 *Streptomyces*,¹⁸⁾ *Bacillus subtilis*,¹⁹⁾ *Pseudomonas* sp.³⁾ 등이 생산하는 항진균성 항생물질에 의해 직접 식물병원균의 생육을 저해시키는 항생작용(antibiosis), 셋째는 plant growth-promoting rhizobacteria(PGPR)가 분비하는 철(Fe³⁺)성분 특이결합물질인 siderophore에 의해 식물병원균의 생육을 저해하는 경쟁적 길항작용(competitive antagonism)을 이용한 생물방제방법이 있다.²⁰⁾ 그러나 많은 길항미생물에 의한 식물병해 방제의 연구에도 불구하고 이들 유용 길항미생물을 제제화하거나 이를 직접 농가에 시험하여 그 효과를 검증한 연구는 아직 드물다. 또한 유통되고 있는 기존 미생물제제는 효과가 느리고 높지 못하며, 환경적 토양에서는 근권 내 정착이 기대만큼 잘 이루어지지 못한다.

따라서 본 연구에서는 실제 자연농업을 수행하고 있는 경북 지역의 저병해 경작지 토양을 분리원으로 하여 식물진균병의 방제력이 우수한 길항미생물들을 분리한 후, 단일 균주에 의한 미생물방제제가 아닌 복합 길항미생물에 의한 미생물제제로 개발하고 이를 산업적 규모에서 대량 생산하고, 그 시제품을 이

*Corresponding author

Phone: 82-53-810-2395; Fax: 82-53-810-4663

E-mail: sdkim@yumail.ac.kr

용해 시금치입고병(갈록병), 오이만화병(덩굴쫄기병) 과 방울토마토위조병(시드름병)을 대상으로 농가의 포장 내에서 실제 방제효과를 조사하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

토착길항미생물의 선발과 배양. 토양 내 우점능, 토착능, 복귀능이 강한 길항미생물을 선발하기 위해 경북지역의 자연농법을 시행하고 있는 저병해 경작지 토양을 분리원으로 하여, 멸균 생리식염수에 현탁, 희석하고, 이를 nutrient agar 배지에 접종하여 30°C에서 1일간 분리배양한 균주들의 대상으로 Potato dextrose agar(PDA)배지에 고추역병의 원인균인 *P. capsici*를 멸균된 cork borer를 이용하여 6 mm disc size로 접종 후 3 cm 떨어진 거리에 분리된 세균을 희석 접종하여 30°C에서 대치배양(pairing culture) 하여 균사 생장의 억제력을 확인 후 길항능이 우수한 미생물들을 최종 선발하였다.²⁾

길항미생물의 진균 생육저해능 검증. 선발된 길항미생물의 고추역병균 *P. capsici*에 대한 방제능 및 길항물질 생산능은 균체량측정법(cell mass test)을 통하여 조사하였다. 균체량 측정법은 45 ml의 potato dextrose broth(PDB)에 *P. capsici*의 유주자를 접종한 후, 여기에 세균여과 필터로 잔존 세균을 제거한 길항미생물의 배양여액 5 ml 첨가하여, 30°C에서 72시간 진탕배양하였다. 그 후 이를 미리 건조시켜 중량을 측정된 Whatman No. 2 여과지로 시험구별로 배양된 병원성 진균을 여과, 수집하여 80°C에서 건조시킨 후, 배양된 균체중량을 측정하여 억제력을 검증하였다.

길항균주의 *P. capsici* 방제기작 조사. 선발된 길항균주가 생산하는 억제물질이 항생물질인지 또는 효소단백질인지를 알아보기 위하여 길항균주를 nutrient broth에 진탕배양 후, 각 배양상층액을 항생물질이 열에 안정하며 지용성임을 감안하여 80°C에서 20분간 열처리한 후 잔존 항생력을 확인하고 *n*-butanol에 길항물질을 전이시켜 그 길항능을 균체량 측정법으로 조사하였다.^{4,5)} 선발된 각 길항균주의 진균세포벽 가수분해효소 생산능 조사를 위하여 먼저 cellulase 생산능은 nutrient agar에 1% carboxyl methyl cellulose(CMC)를 함유한 CMC NA 배지에 각 선발 균주를 멸균 이쑤시개로 접종 한 후, 2일간 30°C에서 배양 후 congo red 지시약을 이용하여 확인하였다. Chitinase 생산능은 CMM 배지²⁾에 각 선발 길항 균주를 이쑤시개로 접종하고, 2일간 30°C에서 배양 후 clear zone 생성을 확인하였다.

길항균주의 동정. 토착길항균주의 분류학적 동정을 위해 각종 생화학적, 형태학적, 배양학적 검사 및 Biolog™ System 4.0 세균동정시스템으로 수행하고, 이를 바탕으로 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology색인을 이용하여 최종 동정하였다.²¹⁾

배지조성에 따른 길항물질의 생산조건 조사. 길항물질 생산에 미치는 탄소원의 영향의 조사를 위해 K_2HPO_4 0.7%, KH_2PO_4 0.2%, glucose 0.1%, sodium citrate 0.05%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01%의 조성으로 이루어진 최소영양배지에 glucose를 제외시키고 6종의 탄소원(lactose, glycerol, galactose, maltose, fructose)을 0.1%씩 첨가하였다. 선발된 각 균주를 nutrient broth에 12시간 배양한 전 배양액을 0.2%농도

로 각각 접종하고 30°C에서 3일간 배양한 후 원침상징액을 이용하여 균체량법으로 길항물질 생산을 조사하였다. 또한 상기 최소영양배지에 ammonium sulfate를 제외시키고 앞의 결과에서 선택된 탄소원을 0.1% 농도로 넣어준 후 6종의 무기 및 유기질소원(urea, peptone, tryptone, $(NH_4)_2SO_4$, yeast extract, $NaNO_3$)을 0.1%씩 첨가하여 탄소원의 경우와 동일한 방법으로 길항물질 생산에 미치는 질소원이 영향을 조사하였다. 마지막으로 앞서 결정된 탄소원과 질소원을 첨가하고 무기염을 제외한 상기 최소영양배지에 8종의 무기염($FeCl_3 \cdot 6H_2O$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, Na_2HPO_4 , $CaCO_3$, $CaCl_2$, $NaCl$, K_2HPO_4 , KCl)을 5 mM 농도로 넣어주어 길항물질 생산에 미치는 영향을 조사하였다.^{2,3)}

배양시간에 따른 균의 생육과 길항물질 생산성 조사. 선발된 균주들의 전배양액을 nutrient broth에 0.1%로 접종하고 2시간마다 배양액을 회수하여 균의 생육은 spectrophotometer를 이용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 균에 대한 길항물질 생산능은 균체량 측정법으로 조사하였다.^{2,4)}

pH, 배양온도에 따른 생육과 길항물질 생산성. 초기 pH에 따른 각 길항균주의 성장도와 길항물질 생산성을 검토하기 위하여 길항균주를 nutrient broth 5 ml에 접종하여 30°C 12시간 전 배양한 후, 이를 pH 4.0에서 pH 8.0까지 각각 조정된 nutrient broth에 접종하여 30°C, 24시간 배양 후 균성장도와 그 길항력을 검토하였다. 배양온도가 각 길항균주들의 생육과 길항물질 생산성에 미치는 영향을 검토하기 위하여 길항균주의 전배양액을 nutrient broth 50 ml에 동량을 접종하고 20°C에서 50°C까지의 온도범위에서 24시간 배양 후 균 성장도와 길항물질 생산능을 검토하였다.^{1,4)}

결과 및 고찰

길항미생물의 선발. 경북지역에서 자연농업을 시범적으로 시행하는 고추역병 저병해 경작지 토양에서 분리한 토착미생물을 대상으로 고추역병균 *P. capsici*와 시드름병균 *F. oxysporum*과 대치배양을 실시하여 그 저해거리를 측정된 결과, 길항능을 가지는 균주 25개를 분리할 수 있었다(Table 1). 이 중 길항능이 우수한 균주 AB1, AY1, AY6, BB2, F4를 수화성 혼합 미생물 제제를 제조할 목적으로 최종 선발하였다.

상기 선발된 길항균주 5종이 복합미생물제제 제조과정에서 서로 공존 배양될 수 있음을 조사하기 위해 각 길항균주가 도말된 배지에 다른 4종의 균주를 toothpick하여 clear zone의 생성 유무를 확인 한 결과 서로의 저해능은 없었으며 상호공생이 가능함을 확인하고 복합제제를 제조할 수 있음을 확인하였다.

선발된 균주의 길항기작 규명. 항진균성 항생물질을 각 선발 균주가 우수하게 생산하는지 여부를 조사를 위해 각 균주의 배양상징액을 열처리하거나 또는 butanol로 추출한 후 *P. capsici*를 대상으로 균체량 측정법으로 길항물질 생산능을 측정된 결과, 항진균항생물질 생산성 길항미생물에 대한 기존의 연구들^{6,8)}과 유사하게 AB1, AY1, AY6, F4 균주는 열처리나 butanol 추출 후에도 그 길항력이 크게 감소되지 않은 것으로 보아 이들의 길항물질 열에 안정하고 비극성용매에 전이가 가능한 항생

Table 1. The inhibition activity of the isolated bacteria from local soil

Strain	Inhibition rate (%)*	
	Fusarium oxysporum	Phytophthora capsici
AL2	31.8	18.2
AL4	18.2	27.3
AY1	36.4	45.5
AY2	31.8	27.3
AY3	40.9	50.0
AY6	36.4	27.3
AY7	18.2	22.7
AB1	50.0	50.0
AB3	27.3	18.2
BY1	31.8	0
BY5	22.7	27.3
BB1	22.7	18.2
BB2	27.3	27.3
BB5	31.8	13.6
CY4	22.7	27.3
F4	55	35.0

*% Inhibition = [1-(mycelial growth of treatment/mycelial growth of control)] × 100

물질이었다. 반면 BB2는 열처리나 butanol 추출물의 활성과 배양상징액만의 항진균능과 비교한 결과 약 반으로 감소되는 결과로 미루어보아 항생물질 외에 다른 기작의 길항물질을 생산하는 것으로 추정되었다(Table 2).

따라서 선발균주 AB1, AY1, AY6, F4, BB2를 대상으로 식물병원성 진균의 세포벽 가수분해능을 colloidal chitin, carboxyl methyl cellulose를 기질로 하여 분해능을 측정한 결과, BB2는 항생물질 생산능 이외에 cellulase 생산능을 나타내어 고추역병균의 세포외벽을 가수분해 할 수 있는 다기능적 길항능을 가지고 있음을 확인하였다.

Table 2. Characteristics of the antifungal substance from antagonistic bacteria which can suppress *Phytophthora capsici*

Strain	Treatment	Inhibition rate (%)
AB1	*No treatment	77.0
	<i>n</i> -Butanol extract	66.8
	**Heat treatment	71.0
AY1	No treatment	84.0
	<i>n</i> -Butanol extract	78.2
	Heat treatment	76.3
BB2	No treatment	79.3
	<i>n</i> -Butanol extract	43.5
	Heat treatment	39.1
F4	No treatment	86.0
	<i>n</i> -Butanol extract	67.2
	Heat treatment	72.2
AY6	No treatment	76.0
	<i>n</i> -Butanol extract	68.2
	Heat treatment	75.1

*No treatment; culture broth

**Heat treatment; at 80°C (30 min)

선발된 길항균주의 동정. 선발된 균주 AB1, AY1, AY6, BB2, F4의 형태학적 특성을 관찰하고 배양학적, 생화학적 특성을 조사한 결과 각각 *Halobacterium* sp., *Xenorhadus* sp., *Bacillus* sp., *Bacillus* sp., *Zymomonas* sp.로 동정되었다. 따라서 각 균주를 *Halobacterium* sp. AB1, *Xenorhadus* sp. AY1, *Bacillus* sp. AY6, *Bacillus* sp. BB2, *Zymomonas* sp. F4로 명명하였다(Table 3-6).

Bacillus sp. AY6, *Bacillus* sp. BB2는 spore 생성능을 가져 미생물제제가 실제토양 환경내에서 물리화학적 영향을 다소 받더라도 spore형성으로 유효균주의 안정성에 도움이 될 것이라 생각되며 spore 형성을 유도하여 고형화된 입체로 생산할 수

Table 3. Identification of BB2 and AY6 on their physiological and biochemical characteristics

	BB2	<i>Bacillus globisporus</i>	AY6	<i>Bacillus coagulans</i>
Gram stain	+	+	+	+
Rod-shaped	+	+	+	+
Endospore produced	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+
Voges-Proskauer test	-	-	+	+
Acid form D-Glucose	+	+	+	+
L-Arabinose	-	-	-	d
D-Xylose	-	-	-	d
D-Mannitol	+	+	+	d
Gas from glucose	-	-	-	-
Hydrolysis of Casein	+	+	+	d
Gelatin	+	+	-	-
Starch	+	+	+	+
Utilization of citrate	-	-	-	d
Nitrate reduced to nitrite	+	d	-	d
Formation of indole	-	-	-	-
Biolog system™ 4.0		<i>Bacillus</i> sp.		<i>Bacillus</i> sp.

*Symbols: -, 90% or more of strain are negative; +, 90% or more of strains are positive; d, 11-89% of strain are positive.

Table 4. Identification of AY1 on its physiological and biochemical characteristics

	AY1	<i>Xenorhadus</i> sp.
Gram stain	-	-
Straight rods	+	+
Motility	+	+
Oxidase	-	-
Metyl red test	NG	-
Voges-Proskauer test	-	-
Utilization of citrate	-	d
Hydrolysis of Casein	+	NG
Gelatin	-	d
Acid form D-Glucose	NG	[+]
D-Xylose	NG	-
D-Mannitol	-	-
ONPG	-	-
Formation of indole	-	-
Hydrolysis of urea	-	[-]
Biolog system™ 4.0		<i>Xenorhadus</i> sp.

*Symbols: -, negative 90% or more of strains are positive; +, 90% or more of strains are positive; [+], positive for 75%-89%; [-], positive for 26 to 74% of strains; NG, no growth.

Table 5. Identification of AB1 on its physiological and biochemical characteristics

	AB1	<i>Halobacterium saccharovorum</i>
Gram stain	-	-
Morphology Rods Cocci	+	D
Motility	+	D
Oxidase	+	D
Catalase	+	+
Gelatin hydrolysis	-	-
Starch hydrolysis	-	-
NO ₃ ⁻ to NO ₂ ⁻	+	+
H ₂ S production	+	+
Indole production	-	-
Casein	-	ND
Citrate	-	ND
Fluorescens	-	ND
Urea	-	ND
Biolog system™ 4.0		<i>Halobacterium</i> sp.

*Symbols: -, negative 90% or more of strains are positive; +, 90% or more of strains are positive; ND, No determination.

있는 가능성도 보였다. *Halobacterium* sp. AB1는 균의 생리적 특성상 염 농도에 저항능을 나타내므로 간척지를 이용한 농토에서도 본 제제의 사용이 가능할 것으로 생각된다.

선발 길항균주의 배양시간, 온도, pH에 따른 길항물질 생산성 조사. 배양시간에 따른 각 길항균주의 길항물질 생산성을 *P. capsici*의 균체량 측정법을 이용하여 2시간 단위로 검토했던 결과 *Halobacterium* sp. AB1, *Bacillus* sp. AY6, *Bacillus* sp. BB2은 배양시간의 경과에 따라 그 길항능이 증가되어 20시간 이후에 최대치에 도달하였다. 그러나 *Xenorhadus* sp. AY1의 경우에는 다소 늦게 30시간이 지나 길항능이 최대치에 도달하였으며 *Zymomonas* sp. F4는 48시간이 지나 길항물질 생산능이

Table 6. Identification of F4 on its physiological and biochemical characteristics

	F4	<i>Zymomonas mobilis</i>
Gram stain	-	-
Oxidase	-	-
Catalase	+	+
H ₂ S production	+	d
Acid from D-Glucose	+	+
L-Arabinose	+	-
D-Mannitol	-	-
D-Xylose	+	-
Hydrolysis of urea	-	-
Formation of Indole	-	-
Hydrolysis of gelatin	-	-
Biolog system™ 4.0		<i>Zymomonas</i> sp.

*Symbols: -, negative 90% or more of strains are positive; +, 90% or more of strains are positive; d, 11-89% of strains are positive.

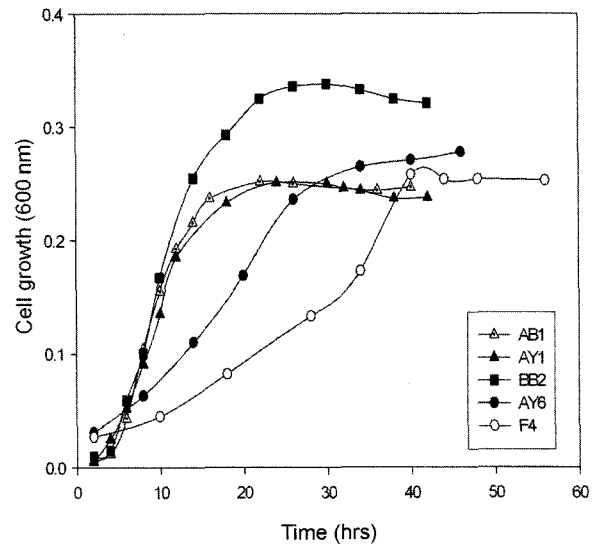


Fig. 1. Time profiles of cell growth from *Halobacterium* sp. AB1, *Xenorhadus* sp. AY1, *Bacillus* sp. BB2, *Bacillus* sp. AY6, *Zymomonas* sp. F4.

크게 나타났다(Fig. 1, 2).

배지의 초기 pH에 따른 균 성장도와 길항물질 생산성은 길항균주 *Zymomonas* sp. F4를 제외하고 보편적으로 *Xenorhadus* sp. AY1, *Halobacterium* sp. AB1, *Bacillus* sp. AY6, *Bacillus* sp. BB2들은 pH 6.0 또는 pH 7.0에서 생육이 좋았다. 특히 *Bacillus* sp. BB2는 높은 pH와 낮은 pH에서도 광범위하게 생육을 보여 산성화된 토양뿐만 아니라 알칼리성을 보이는 유기농 자재와의 혼용 시에도 충분한 생육을 보일 것으로 생각된다. 또한 *Zymomonas* sp. F4 경우는 오히려 pH 5에서 월등한 생육능을 보임으로 인하여 낮은 pH에서 우수하게 생육하여 충분한 서식능을 보일 것이라 예상된다.

본 길항균주 5종들은 모두 낮은 pH 또는 높은 pH에서 모두 배지의 pH를 중성으로 유도하고 있으며, pH 5.0-8.0 범위에서는 균의 생육이나 길항물질생산능이 크게 감소하지는 않았다. 또한 산성 pH 영역에서 5종 균주 모두 중성화로 유도할 수 있

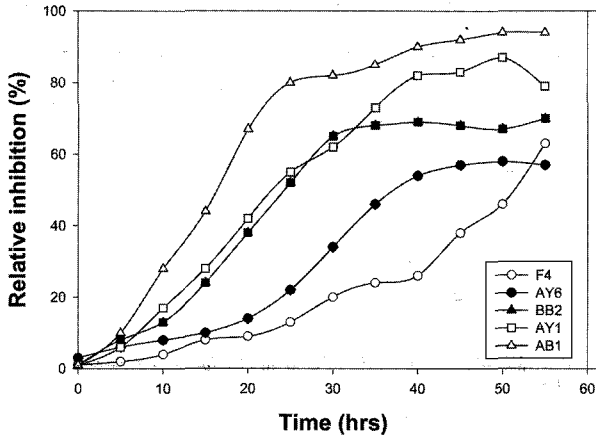


Fig. 2. Time profiles on the production of antifungal antibiotic from *Halobacterium* sp. AB1, *Xenorhadus* sp. AY1, *Bacillus* sp. BB2, *Bacillus* sp. AY6, *Zymomonas* sp. F4.

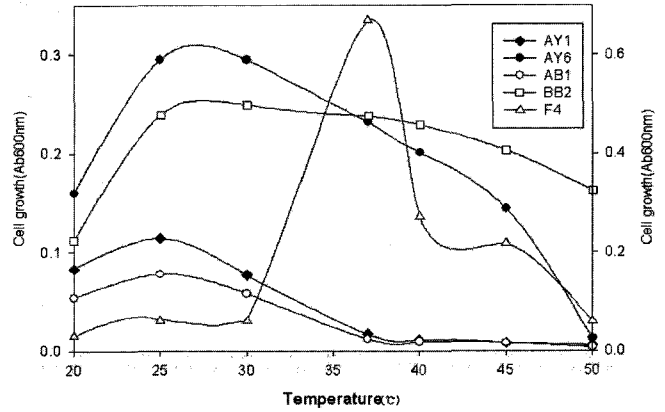


Fig. 3. Effect of temperature on the cell growth. Left Y Axis: *Xenorhadus* sp. AY1, *Bacillus* sp. AY6, *Halobacterium* sp. AB1, *Bacillus* sp. BB2, Right Y Axis: *Zymomonas* sp. F4.

었는데, 이것은 산성화된 우리나라 토양의 개량에도 본 복합 균주들의 사용시 상당한 이점을 발휘할 것이라 추정된다.

상기 실험결과를 바탕으로 5종의 균주의 그 길항물질 생산능이 pH 5.0 또는 pH 6.0에서 최대치인 것은 감안하여 길항균주들간의 복합배양시 pH 5.5를 맞추어 배양하였다(Table 7).

배양온도에 따라 *Halobacterium* sp. AB1, *Bacillus* sp. AY6, *Bacillus* sp. BB2, *Xenorhadus* sp. AY1, *Zymomonas* sp. F4를 20°C에서 50°C까지 5°C 단위로 배양온도를 구분하여 24시간 배양 후 균주성장도를 측정된 결과 *Zymomonas* sp. F4를 제외하고 보편적으로 균성장은 25°C가 좋았다.

Zymomonas sp. F4는 다소 고온성 균주로 50°C에서도 그 생육을 충분히 유지했으며 40°C에서 생육의 최대를 보였으며, 반면 *Bacillus* sp. BB2는 저온 및 고온에도 광범위한 균 생육을 보였다. 이 결과를 토대로 본 연구에서는 복합균주의 배양을 위해 *Zymomonas* sp. F4의 균 생육이 다소 약하지만 5종의 균주에 가장 보편적인 30°C를 배양온도로 결정하였다(Fig. 3).

선발된 길항균주의 영양원에 따른 길항물질 생산성 조사. 최소영양매지에 탄소원, 질소원, 무기염을 단계별로 제외한 후 다양한 탄소원, 질소원, 무기염을 첨가하며 그 길항물질 생산성을

조사한 결과 *Halobacterium* sp. AB1, *Bacillus* sp. AY6, *Bacillus* sp. BB2, *Xenorhadus* sp. AY1, *Zymomonas* sp. F4들의 복합균주를 동시 혼합배양 시에 탄소원으로는 galactose, 질소원으로는 NaNO₂가 가장 좋은 효과를 보였으며, 무기질소원들은 전반적으로 길항균주들이 잘 이용하였으며 유기질소원 첨가 경우 오히려 그 길항물질 생산능은 감소하였다(Fig. 4, 5).

무기염을 제외한 상기 최소영양매지에 앞서 결정된 탄소원 galactose와 질소원인 NaNO₂를 각각 첨가하고 8종의 무기염을 첨가하여 그 길항물질 생산성을 검토한 결과 FeCl₃ · 6H₂O, CaCl₂, MgSO₄ · 7H₂O는 오히려 첨가시 길항물질 생산능이 감소되었으며, Na₂ · HPO₄ 첨가시에 그 생산능이 상당히 증가되었다(Fig. 6).

선발된 균주들의 방제범위 조사. 선발된 길항균주 5종, 즉 *Halobacterium* sp. AB1, *Bacillus* sp. AY6, *Bacillus* sp. BB2, *Xenorhadus* sp. AY1, *Zymomonas* sp. F4의 각종 식물병원성 진균에 대한 길항력 범위 antifungal spectrum을 조사하기 위하여 탄저병균 *Colletotrichum gloeosporioides*, 근부병균 *Fusarium solani*, 시들음병균 *Fusarium oxysporum*, 역병균 *Phytophthora capsici*, 근부병균 *Rhizoctonia solani*, 균핵병균 *Sclerotinia*

Table 7. pH effect on the cell growth and antifungal ability of antagonistic bacteria

		pH				
		4	5	6	7	8
<i>Xenorhadus</i> sp. AY1	Cell growth*	0.067	0.105	0.113	0.267	0.206
	Inhibition rate(%)	39	70	64	60	59
<i>Bacillus</i> sp. AY6	Cell growth*	0.008	0.31	0.302	0.293	0.152
	Inhibition rate(%)	8	48	67	50	40
<i>Halobacterium</i> sp. AB1	Cell growth*	0.048	0.11	0.131	0.299	0.03
	Inhibition rate(%)	54	79	32	23	11
<i>Bacillus</i> sp. BB2	Cell growth*	0.006	0.262	0.274	0.286	0.284
	Inhibition rate (%)	7	59	57	54	54
<i>Zymomonas</i> sp. F4	Cell growth*	0.035	0.082	0.037	0.032	0.016
	Inhibition rate(%)	37	39	62	65	53

*Observance at 600 nm

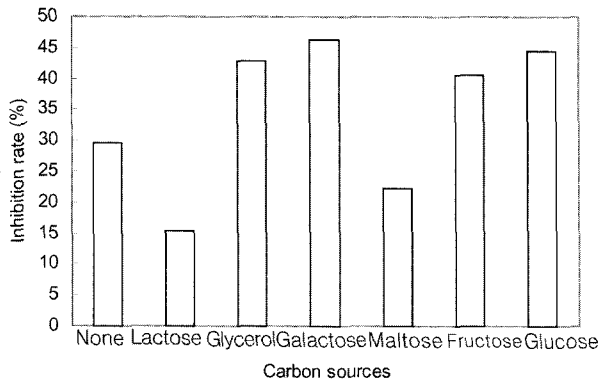


Fig. 4. Effect of carbon sources for the production of antifungal substance from multi-antagonistic bacterial fungicide.

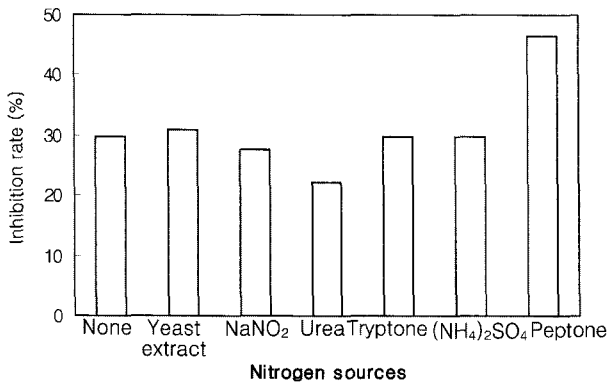


Fig. 5. Effect of nitrogen sources for the production of antifungal substance from multi-antagonistic bacterial fungicide.

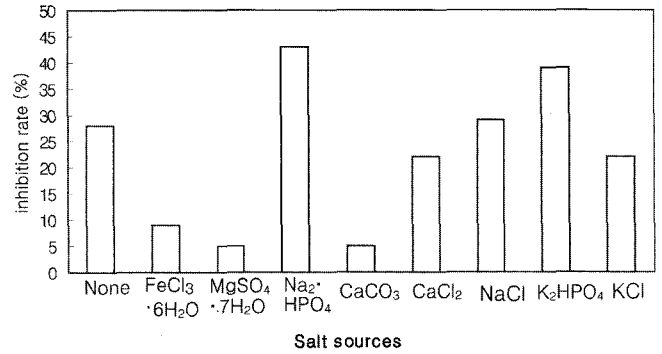


Fig. 6. Effect of salt sources for the production of antifungal substance from multi-antagonistic bacterial fungicide.

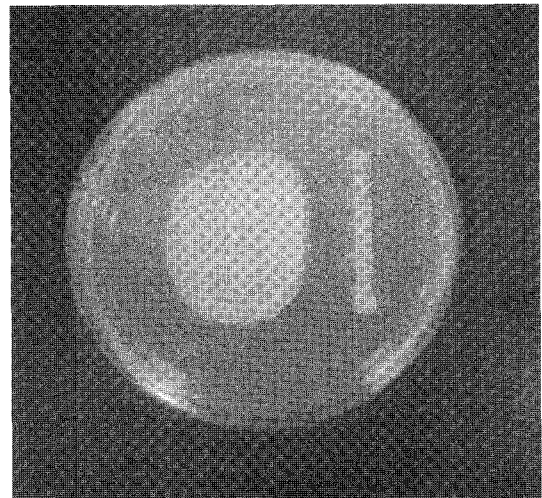


Fig. 7. The antagonistic activity of the multi-microbial fungicide against *Phytophthora capsici*. Left: *Phytophthora capsici*, Right: Multi-microbial fungicide.

*sclerotiorum*에 대한 그 방제율을 발육균체량법으로 조사한 결과, 중요한 식물병원균들에 대해 광범위하게 길항력을 나타내었다. 이 결과는 본 제제가 고추역병에 대한 방제용으로 뿐만 아니라 다른 진균성 병해 방제용으로도 사용이 가능하다고 보여진다(Table 8).

복합 미생물제제 생산을 위한 발효공정. 1톤 규모의 발효탱크에 혼합 미생물의 생육을 위한 영양원과 길항물질 생산능의 증가를 위한 부형제를 첨가 후 5종의 균주 *Halobacterium* sp. AB1, *Bacillus* sp. AY6, *Bacillus* sp. BB2, *Xenorhadus* sp. AY1, *Zymomonas* sp. F4 전배양액을 첨가하고 발효공정 단계에 맞춰 생산 후 수시간 안정화하고, 이 배양액을 사용해 *P. capsici*에 대하여 길항물질 생산능을 측정된 결과 단일 균주에

의한 길항물질 생산능에 비해 복합 미생물제제가 길항물질 생산능이 더 상승되었으며, 특히 길항물질 생산능의 지속력이 상당히 우수하였다(Fig. 7).

농가포장에서의 복합미생물제제 시행을 통한 병해방제. 복합 균주를 집중 배양해서 생산된 미생물 제제를 500배 희석의 비율로 27°C 물에 희석하여 흑설탕을 0.1%되게 첨가하여 24시간 동안 배양한 후 오이 덩굴쪄짐병, 방울토마토 시드름병, 시금치 잘록병의 방제를 목적으로 오전에 관주와 오후에 엽면시비를 3일 간격으로 3회 수행하였다. 그 결과 오이 덩굴쪄짐병 경우 1

Table 8. Antifungal spectrum of antagonistic bacteria against various plant pathogenic fungi

Strain	Inhibition rate (%)					
	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Phytophthora capsici</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>
<i>Halobacterium</i> sp. AB1	+++	+	++	++	+++	++
<i>Xenorhadus</i> sp. AY1	+	+	+	++	+++	++
<i>Bacillus</i> sp. AY6	+	+	+	+	+++	+++
<i>Bacillus</i> sp. BB2	++	+++	-	+	+++	++
<i>Zymomonas</i> sp. F4	+	+	+	++	+++	++

Symbols: +++, 100~80% inhibition, ++, 79~50% inhibition, +, 50~10% inhibition, -, no inhibition.

Table 9. *In vivo* field test of spinach with the multi-microbial fungicide against damping-off disease of *R. solani*

	Leaf propagation (number)	Leaf length (cm)	Amount of harvest (kg/10a)	Rate of disease (%)
Treatment of microbial fungicide	19.7	7.4	1221	6
No treatment	16.9	5.8	730	32

Fig. 8. *In vivo* field test of cucumber with multi-microbial fungicide against *Fusarium* wilt disease of *F. oxysporum*. A: No treatment, B: Treatment of the multi-microbial fungicide. (water : agent = 500 : 1)

차 처리 후 더 이상의 병반의 확산이 없이 무처리 대조구에 비해 18%정도 밖에 발병되지 않았으며 토양의 pH 측정된 결과 토양의 pH가 산성 pH에서 중성으로 pH가 조정되었다(Fig. 8). 방울토마토 시드름병의 경우도 1차 처리 후 토마토의 시들음병 현상이 무처리구 발병을 대비 30%로 현저히 감소되었으며, 3차 시비 수행 후 시간의 경과에 따라 병의 재발은 없었으며 그 후 열매수확 및 토마토의 생육상태가 상당히 양호하였다(Fig. 9). 또한 본 복합미생물제제를 시금치에 처리한 결과, 무처리구와 비교시 시금치 잘록병의 발병율을 크게 감소시켰으며, 시금치의 생육도도 수확량 기준으로 1.7배 정도 촉진시켰다(Table 9).

따라서 본 복합미생물제제의 사용으로 길항미생물을 이용한 생물학적 방제법의 개발성공으로 환경친화적이며 병해방제의 지속성을 가지게 되어 실제 재배지에 증수의 효과 및 병해 예방을 가능하게 하며 우리나라 농가에 경제적 이득을 분명히 줄 수 있을 것이라 생각한다.

초 록

진균성식물병을 생물학적으로 방제할 수 있는 미생물제제의 개발을 위하여 경북 지역의 저병해 경작지 토양에서 고추역병균 *Phytophthora capsici*과 시들음병균 *Fusarium oxysporum*에 강력한 길항능을 가지며 균주 상호간에 공생이 가능한 AY1, AY6, AB1, BB2, F4, 5종의 균주를 선발하였다. 이들의 *P. capsici*에 대한 길항기작은 모두 내열성 저분자의 항균성 항생물질 생산에 의한 것이었으며, 이 중 BB2균주는 항생물질 생산능뿐만 아니라 고추역병균의 세포외벽 가수분해효소인

Fig. 9. *In vivo* field test of tomato with the multi-microbial fungicide against *Fusarium* wilt disease of *F. oxysporum*. A: No treatment, B: Treatment of the multi-microbial fungicide. (water : agent = 500 : 1)

cellulase도 생산하여 다기능 길항기작을 보유하고 있었다. 선발된 5종 균주는 *Halobacterium* sp. AB1, *Xenorhadus* sp. AY1, *Bacillus* sp. AY6, *Bacillus* sp. BB2, *Zymomonas* sp. F4로 각각 동정되었으며, 이들은 0.1% galactose, 0.1% NaNO₂, 5 mM Na₂HPO₄가 포함된 배지에서 pH 5.5의 조건에서 48시간 배양했을 때 길항물질 생산능이 매우 우수하였고, 이 배양액을 1톤 규모의 발효탱크에 접종하고 대량배양 후 복합 미생물제제로 생산하였으며, 생산된 시제품의 액상 미생물제제는 경북 영천 지역의 농가의 시험포장에서 3일 간격으로 3회 처리 해 본 포장시험에서 오이덩굴쫄림병, 방울토마토시드름병의 방제와 시금치잘록병의 방제 및 생육촉진에 탁월한 효과가 있었다.

Key words: 생물방제, 미생물제제, *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum*

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린 21(과제번호:105649)에 의해 수행된 과제로 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

- Hong, S. H., Lam, J. S., Park, Y. B. and Ha, J. H. (1990) The optimum culture condition for the production of antibiotics KG-1167B produced by *Clostridium* sp. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 292-265.
- Yun, K. H., Lee, E. T. and Kim, S. D. (2001) Identification and antifungal antagonism of *Chryseomonas luteola* 5042 against *Phytophthora capsici*. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **29**, 186-193.

3. Lee, E. T. and Kim, S. D. (2001) An antifungal substance, 2,4-diacetylphloroglucinol, produced from antagonistic bacterium *Pseudomonas fluorescens* 2112 against *Phytophthora capsici*. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **29**, 37-42.
4. Kim, Y. S., Song, J. K., Moon, D. C. and Kim, S. D. (1997) Isolation and structure determination of antifungal antibiotics from *Bacillus subtilis* YB-70, a power biocontrol agent. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 62-37.
5. Kim, K. Y. and Kim, S. D. (1997) Biological control of *Pyricularia oryzae* blast spot with the antibiotic substance produced by *Bacillus* sp. KL-3. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 396-402.
6. Kim, D. W., Do, K. S. and Choi, S. W. (2001) Antagonistic search for biological control of fusarium wilt in cymbium genus. *J. Kor. Hort. Sci.* **42**, 581-586.
7. Lim, H. S. and Kim, S. D. (1994) The production and enzymatic properties of extracellular chitinase from *Pseudomonas stutzeri* YPL-1, as a biocontrol agent. *J. Microbiol. Biotechnol.* **4**, 134-140.
8. Paik, S. B. and Kim, D. W. (1995) Screening for phyllospherical antagonistic microorganism for control of Red-pepper anthracnose. *Kor. J. Mycol.* **23**, 190-195.
9. Tominaga, Y. and Tsujisaka, Y. (1976) Purification and some properties of two chitinase from *Streptomyces orientalis* which lyse *Phizopus* cell wall. *Agric. Biol. Chem.* **40**, 2325-2333.
10. Okazaki, K., Kato, F., Watanabe, N., Yasuda, S., Masui, Y. and Hayakawa, S. (1995) Purification and properties of two chitinase from *Streptomyces* sp. J-13-3. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**, 1586-1587.
11. Hadar, Y., Chet, I. and Heins, Y. (1979) Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with wheat bran culture of *Trichoderma harizianum*. *Phytopathology* **69**, 64-68.
12. Harman, G. E., Chet, I. and Barker, R. (1980) *Trichoderma hamatum* effects on seed and seedling disease induced in radish and pea by *Phythium* spp. or *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* **70**, 1167-1172.
13. Ordentlich, A., Elad, Y. and Chet, I. (1988) The role of chitinase of *Serratia marcescens* in biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* **78**, 84-88.
14. Tom, R. A. and Carroad, P. A. (1998). Effect of reaction condition on hydrolysis of chitin by *Serratia marcescens* QMB 1466 chitinase. *J. Food Sci.* **46**, 646-647.
15. Lim, H. S. and Kim, S. D. (1990) Antifungal mechanism of *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 for biocontrol of *Fusarium solani* causing plant root rot. *J. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 81-88.
16. Lim, H. S. and Kim, S. D. (1994) The production and enzymatic properties of extracellular chitinase from *Pseudomonas stutzeri* YPL-1, as a biocontrol agent. *J. Microbiol. Biotechnol.* **4**, 134-140.
17. Watanabe, T., Oyanagi, W., Suzuki, K. and Tanaka, H. (1990) Chitinase system of *Bacillus circulans* WL-12 and importance of chitinase A1 in chitin degradation. *J. Bacteriol.* **172**, 4017-4022.
18. Takeuchi, S., Hirayama, K., Ueda, K., Sasaki, H., and Yonehara, H., (1958) Blasticidin S, a new antibiotic. *J. Antibiot.* **11**, 1-5.
19. Loeffler, W. Tschen, J. S., Venittanakom, N., Kugler, M., Knorrp, E., Hsieh, T. F. and Wu, T. G. (1986) Antifungal effects of bacilysin and fengymycin from *Bacillus subtilis* F-29-3: a comparison with activities of other *Bacillus* antibiotics. *J. phytopathology* **115**, 204-213.
20. Paulitz, T. C., and Loper, J. E. (1991) Lack of a role for fluorescent siderophore production in the biological control of *Phythium* damping-off of cucumber by a strain of *Pseudomonas putida*. *Phytopathology* **81**, 930-935.
21. Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. Staley, J. T. and Williams, S. T. (1994) In *Bergey's manual of determinative bacteriology*. (9th ed.), Williams Wikins.