

참다래 꼭지썩음병을 일으키는 *Diaporthe actinidiae*을 억제하는 길항성 *Bacillus* sp. #72의 분리 및 동정

조 정 일 · 조 자 용* · 박 용 서** · 양 승 렬*** · 허 복 구****
조선이공대학 식품공학과 · 남도대학 약용자원원예개발과* · 목포대학교 응용생명과학부** ·
순천대학교 식물생산과학부*** · (재)나주시천연염색문화재단****

Screening and Identification of Antifungal *Bacillus* sp. #72 against the Pathogenic Stem-end Rot of Kiwi Fruit

Cho, Jung Il · Cho, Ja Yong* · Park, Yong Seo** · Yang, Seung Yul*** · Heo, Buk Gu****
Dept. of Food Technology, Chosun College of Science and Technology, Gwangju, Korea
Dept. of Medicinal Resources & Horticulture Development, Jeonnam Provincial College, Damyang, Korea
Div. of Applied Bioscience, Mokpo National Univ., Muan, Korea**
Div. of Plant Science and Production, Suncheon Nat'l. Univ., Suncheon, Korea***
Naju Foundation of Natural Dyeing Culture, Naju, Korea****

ABSTRACT

This study was conducted to select and screen for an antifungal bacterial strain showing pathogen inhibitory activity against *Diaporthe actinidiae*, which causes stem-end rot in kiwi fruit. Four bacterial strains were isolated which strongly inhibit *Diaporthe actinidiae* from among two hundred and fifty bacterial strains screened from the soil where kiwi fruit were grown. By co-culturing bacterial strain #72 and the pathogen causing the stem-end rot of kiwi fruit, bacterial strain #72 showed 81.0% antifungal activity against *Diaporthe actinidiae*. Bacterial strain #72 was identified to be from the genus *Bacillus* sp. based on morphological and biochemical characterization. The bacterialization of culture broth for *Bacillus* sp. #72 which was sterilized at 121°C for 15 minutes and than purified by 0.45µm membrane filter showed almost all of the antagonistic activity against *Diaporthe actinidiae*. We have also confirmed that *in vitro* treatment of *Bacillus* sp. #72 cultured in SD+B+P(sugar 5%, soy sauce 3%, beef extract 0.2%, peptone 0.2%) medium efficiently inhibited the growth of *Diaporthe actinidiae* responsible for stem-end rot in kiwi fruit.

Key words: fruit disease, identification, culture broth, biological control,
effective microorganism

I. 서론

참다래나무(*Actinidia deliciosa*)는 다래과 다래속에 속하는 중국 원산의 덩굴성인 낙엽성 아열대 과수로 국내에서 재배되기 시작한지 십수년이 되었다(Jang et al. 2004; Park et al. 1994). 다른 과수에 비해 병충해 발생이 적어 재배가 용이한 편이며, 소비도 증가해 이제 난지형 과수로 국내에 정착하게 되었다. 그런데 재배면적이 증가함에 따라 수년전부터 이를 가해하는 병해충의 종류도 점차 증가하고 있다. 그 중에서 참다래 꼭지썩음병(stem-end rot)은 주로 전남 서남부 지역에서 많이 발생하며, 참다래의 저장, 수송, 유통 및 소비과정 등 과실의 성숙 과정 중에 과병부에서 발생하는 수확 후 병해(post-harvest disease)로 우리나라에서는 Lee 등(2001)과 Hur 등(2002)에 의해 처음으로 보고되었다. 참다래 꼭지썩음 병원균에 감염되어 발병되면 과피가 연모로 덮인 연성의 연한색으로 변하게 된다. 병해가 진전되면 과병부에서 물기가 많은 삼출물이 생기고, 백색의 균사가 알맹이 모양으로 형성되어 물방울처럼 생겨 저장 중인 참다래 과실에 많은 피해를 발생시킨다(Hur et al. 2002; Lee et al. 2001).

참다래 꼭지썩음병은 이와 같이 식용부위인 과실에 발생하고, 출하 이후의 유통 및 소비과정 등에서도 발생하기 때문에 생산자들이 선별을 잘 하여도 발생시 소비자들이 생산자를 불신하게 하는 원인이 되기도 하므로 인체에 피해가 없는 생물학적 방제(Chang & Kim 1995; Chung et al. 1998; Kim et al. 1997) 등에 의한 예방법의 개발은 시급한 실정이다.

본 연구는 이와 같은 배경에서 전남 서남부 지역 참다래 농가의 토양에서 단일 균주 250종을 분리하여 참다래 꼭지썩음병에 대한 길항력이 우수한 균을 선발하기 위하여 실시하였다.

II. 연구방법

1. 꼭지썩음 병원균 및 유효미생물의 분리 저장중인 참다래(*Actinidia deliciosa*)에서 발생

하는 곰팡이성 병원균인 꼭지썩음병원균(果柄腐敗病, stem-end rot, *Diaporthe actinidiae*)을 분리하기 위하여 전남 보성, 완도, 장흥 및 해남 등 전남 서남부 지역의 참다래 재배 농가와 저장고에서 병징 및 표징별로 꼭지썩음병원균에 감염된 병반을 채집하여 병환부로부터 병원균의 포자를 분리하였다. 즉, 병반을 70% ethanol과 5% NaOCl로 표면살균한 후 0.85% 생리식염수로 세척하여 병원균 분리용 선택배지에 병반을 두고 25℃와 상대습도 90%의 조건에서 3일간 처리하여 발생된 병원균의 균사에서 꼭지썩음병을 유발시키는 병원균을 분리하였다. 분리된 꼭지썩음병원균을 참다래 과실에 재접종하여 참다래 꼭지썩음병과 동일한 병징(Hur et al. 2002; Lee et al. 2001)을 나타냄을 확인한 후 공식 병원균으로 이용하였다.

유효미생물은 전남 서남부지역의 참다래 과수원 지표 5-20cm 이하 부위에서 토양 시료를 채취한 다음 세균성 단일균주 250종을 분리하여 사면배지에서 보관하면서 꼭지썩음병원균에 대한 길항균 분리 실험에 사용하였다. 즉, 유효미생물의 분리는 참다래 과수원의 토양을 채취하여 1g의 토양을 100mL의 tris-HCl 완충액으로 30분간 진탕 배양하여 토양현탁액을 만든 후 0.85% 생리식염수로 $\times 10^3$ - 10^8 배로 희석하였으며, 이 중에서 200 μ l을 채취하여 nutrient agar 배지에 도말 접종하였고 30℃의 암실에서 30-36시간 정도 배양하여 형성된 세균성 단일 균주를 콜로니의 색깔과 형태에 따라 분리하였다.

2. 길항균의 선발과 동정

길항균의 선발은 참다래 과실에서 꼭지썩음병을 유발하는 병원균(*Diaporthe actinidiae*)과 세균성 단일균주의 대치배양을 실시하여 선발하였다. 대치배양은 감자한천배지[potato dextrose agar (PDA) medium] plate 중앙에 1 곰팡이를 먼저 접종하고 세균성 단일균주를 나중에 접종하여 3-5일 정도 배양한 후 저지대(inhibition zone)를 크게 형성하는 단일 균주들을 길항성 세균으로 선발하였다. 길항균의 항균작용은 병원균 균총(colony)에 대하여 형성된 길항균의 저지대를 측정 한 후 무처리구와 비교하여 "길항력(%)=무처리구 콜로

니 직경(mm)-길항균 저지대(mm)/무처리구 콜로니 직경(mm)×100"으로 계산하여 조사하였다.

길항균의 동정은 Krieg와 Holt(1984) 및 Milliams 등(1989)의 방법에 의하여 미생물의 형태, 배양 및 생리·생화학적 특성 등을 검토하여 동정을 실시하였다

3. 꼭지썩음병에 대한 길항균의 생장억제 및 방제효과

길항균 배양액이 꼭지썩음병의 생장억제에 미치는 영향 조사는 우선 길항균을 3일 동안 SD + B + P 배지(sugar 5%, soy sauce 3%, beef extract 0.2%, peptone 0.2%)에서 배양한 다음 배양액을 10,000rpm에서 8min. 동안 원심분리하여 cell을 제거하고, 배양액에 맞는 PDA와 혼합하여 121℃에서 15분간 멸균하였다. 또한, 길항균 배양액을 filter 처리하여 조제한 배지는 전체 배양액에 맞는 PDA(4배 농축)와 1/4의 배양상징액을 멸균한 후 0.45µm membrane filter로 여과한 3/4의 배양상징액을 혼합하여 조제하였다. 그 다음에는 조제된 배양액 배지를 plate에 부어 굳힌 다음 참다래 과실의 꼭지썩음병원균을 접종하여 25℃ incubator 안에서 7일간 배양시켜 실험한 결과를 PDA에 접종한 대조구와 비교하는 방법으로 실시하였다.

길항균의 배양액처리가 꼭지썩음병 방제에 미치는 영향은 참다래 과실에 꼭지썩음 병원균을 살포한 다음 길항균 종류별 배양액을 5×10⁷ cfu/mL의 농도로 희석하여 살포 후 생장상에서 참다래 과실을 보관하면서 처리 30일 후에 조사를 실시하였다. 길항균 처리에 따른 꼭지썩음병 방제 효과는 매우 심함(+++), 심함(++), 약간 발생(+) 및 비감염 및 병해발생 전무(-) 등으로 구분하여 조사하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 길항균의 선별과 동정

감자한천평판배지에서 참다래 과실에서 발생하는 꼭지썩음병원균과 3일내지 5일간 대치배양하면서 길항균을 선별한 결과 길항성 세균인 #72는 81% 정도로서 가장 높은 길항작용을 나타냈

고, 세균성 길항균 #61, #71은 80%의 길항작용을 나타내었으며, #63은 76%, #120은 72%의 길항작용을 보였다(Figure 1 및 Table 1). 이러한 결과는 사과 겹무늬썩음병 발병 억제효과가 높은 균주 *Bacillus* sp. SS279의 길항효과를 대치배양법으로 조사한 결과 *B. dothidea*에 대해서는 84%의 항균활성을 보였으며, 그 외의 *Rhizoctonia solani*, *Cercospora* sp. *Mycosphaellera melonis*, *Pythium ultimum*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici*과 같은 식물병원균에도 각각 70, 65, 63, 58, 54 및 46%의 높은 균사체 발육의 길항효과를 나타내었다는 Kim 등(1997)의 보고와 다소 유사한 결과를 나타내었다.

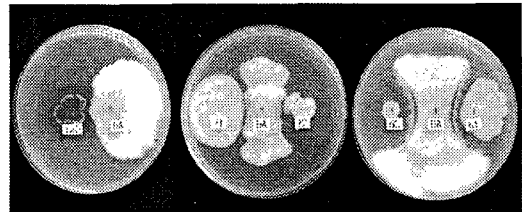


Fig. 1. Inhibitory effects of antifungal bacterial strains (#120, #71, #72, #63 and #61) against the stem-end rot of kiwi fruits, *Diaporthe actinidiae* (DA) on potato dextrose agar(PDA) plate for 3-5days at 25℃.

Table 1. The inhibition zone*(%) of each antifungal bacterial strains against the stem-end rot (*Diaporthe actinidiae*) of kiwi fruits.

Bacterial strains	Antifungal activity against stem-end rot (<i>Diaporthe actinidiae</i>)
#61	80% b ²
#63	76% bc
#71	80% b
#72	81% b
#120	72% c

*Zone of inhibition (%) = $\frac{NT-T}{NT} \times 100$
 [NT; colony diameter of no treatment (mm),
 T; colony diameter of treatment (mm)]

² Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

꼭지씩음병을 유발시키는 병원균인 *Diaporthe actinidiae*에 대하여 길항작용이 우수한 것으로 나타난 세균성 균주인 #72를 대상으로 미생물의 형태, 배양 및 생리 생화학적 특성 등을 검토하여 균주 동정을 실시한 결과 Table 2와 같이 나타났다. 즉, 분리한 *Bacillus* sp. #72는 세포 직경이 > 1.0µm 보다 큰 크기의 원형 단간균으로 내생포자의 형성이 가능하며, 호기성이었고 약간의 운동성을 보이는 Gram 양성균 이었다. 생장은 5°C 정도에서도 가능 하였으나 42°C 정도의 고온에서는 생육하지 않았다. 카제인과 젤라틴의 액화능은 양성이었고 starch 분해능도 있었으며, catalase가 양성, citrate는 양성, nitrate reduction은 양성, indole 검사는 음성이었다. Methyl red 반응은 음성, VP 반응은 약하게 나타났으며, H₂S 형성은 K/A이었고, 당 분해능은 포도당, arabinose, xylose 및 mannitol 등은 양성으로 나타났다. 이러한 결과를 토대로 Krieg와 Holt(1984) 및 Milliams 등(1989)의 분류기준에 따라 분류한 결과 #72는 *Bacillus* sp. 와 96.5%정도 유사한 *Bacillus* sp. 균주 또는 그 유연균주인 것으로 추정되어 *Bacillus* sp. #72 균주로 최종 동정하였다.

2. 꼭지씩음병에 대한 길항균의 생장억제 및 방제효과

참다래 꼭지씩음병원균에 대하여 항균작용이 우수하게 나타난 *Bacillus* sp. #72 배양액을 121°C 에서 15분간 멸균하여 꼭지씩음병원균과의 항균 작용을 조사한 결과 Figure 2와 같이 병원균의 생장 억제력이 100%정도인 것으로 나타났다. 그러므로 균주의 배양물질 내 항균물질은 가열로 인한 변성이 없는 non-protein 성분(Baker & Scher 1986; Thomashow & Weller, 1996)인 것으로 확인 되었으며, 보다 상세한 것은 향후 동정을 실시하여 구명해야 할 것으로 생각된다. 또한, 조제된 배양액을 plate에 부어 굳힌 다음 꼭지씩음병원균 (*Diaporthe actinidiae*)을 접종하여 7일 동안 25°C incubator 안에서 배양시켜 실험한 결과 참다래 꼭지씩음병원균에 대한 길항균 *Bacillus* sp. #72의 생장억제 작용은 100%로 현저히 높게 나타났다.

Table 2. Morphological and biochemical characteristics of antifungal bacterial strain #72.

Characteristics	<i>Bacillus subtilis</i>	Strain #72
Cell diameter > 1.0µm	^z -	-
Spores round	-	-
Endospore	+	+
Gram stain	+	+
Form	rod	rod
Sporangium swollen	-	-
Parasporal crystals	-	-
Catalase	+	+
Voges-Proskauer test	+	+
pH in V-P broth		
< 6	d(+/-)	d(+/-)
> 7	-	-
Acids from		
D-Glucose	+	+
L-Arabinose	+	+
D-Xylose	+	+
D-Mannitol	+	+
Gas from glucose	-	-
Hydrolysis of		
Casein	+	+
Gelatin	+	+
Starch	+	+
Utilization of Citrate Propionate	^z -	+
Degradation of tyrosine	-	+
Deamination of phenylalanine	-	-
Egg-yolk lecithinase	-	-
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%	+	+
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

^z -, 90% or more are negative; +, 90% or more are positive; d, 11-89% are positive; ND, no data available.

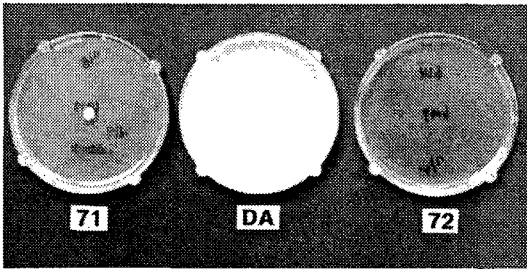


Fig. 2. Photographic growth inhibition of antifungal bacteria *Bacillus* sp. #72 by the cultural broth of antagonistic rhizobacteria which were filtered into 0.45 μ m membrane filter (71), and PDA medium plus 3/4 suspension solution of culture broth (72) against the stem-end rot, *Diaporthe actinidiae*(DA) of kiwi fruits on the PDA medium.

참다래 과실에 꼭지썩음 병원균을 살포한 다음 길항균 종류별 배양액을 5 \times 10⁷ cfu/mL의 농도로 희석하여 살포 후 성장상에서 보관하면서 처리 30일 후에 조사를 실시한 결과 대조구의 경우 참다래의 꼭지썩음병의 발생이 매우 심하였다 (Table 3). 반면에 세균성 균주 #63과 #120의 배

Table 3. Biological control activity of antagonistic bacterial strains against the stem-end rot (*Diaporthe actinidiae*) in kiwi fruits *in vitro*.

Inoculation of antagonistic bacterial strains	Occurrence of stem-end rot (<i>Diaporthe actinidiae</i>) in kiwi fruits
Control	+++ ^z
#61	-
#63	+
#71	-
#72	-
#120	+

^z Bio-control reactions of non-wounded and wounded plants were examined 30 days after and 5 days after inoculation of the antifungal strains and stem-end rot, respectively.

+++ : highly severe infection, ++ : severe infection, + : weak infection : - : no infection.

양액 살포처리에서는 꼭지썩음병증의 발생이 약간 나타나는 정도였으며, 세균성 균주 #61, #71 및 #72를 처리한 시험구에서는 꼭지썩음병의 발생이 거의 없는 것으로 조사되었다. 따라서 *Bacillus* sp. #72는 물론 세균성 균주 #61, #71 또한 생물농약의 개발 가능성이 높은 세균성 균주인 것으로 나타났다.

IV. 요약 및 결론

전남 서남부지역의 참다래 과실에서 발생하는 꼭지썩음병원균(stem-end rot, *Diaporthe actinidiae*)에 대한 길항균을 선발하여 특성을 조사하였다. 참다래 과수원 토양에서 분리한 총 250여종의 단일균주 중에서 길항작용이 우수한 균주를 1차적으로 4종 선발한 다음 이 중에서 참다래 꼭지썩음병원균에 대하여 길항작용이 81.0% 정도로 우수한 #72를 최종적으로 선발하였다. 분리한 균주 #72를 동정한 결과 *Bacillus* sp.와 유사한 균주로 동정되어 *Bacillus* sp. #72로 명명하였다. 121 $^{\circ}$ C에서 15분간 멸균처리한 *Bacillus* sp. #72의 멸균 배양액과 0.45 μ m membrane filter로 처리한 균부 배양액은 꼭지썩음병원균에 대해 100% 정도의 항균작용을 보였다. 참다래 과실에 꼭지썩음병원균을 접종한 다음 *Bacillus* sp. #72의 배양액을 처리하여 성장상에서 30일을 둔 결과 꼭지썩음병원균의 완전한 방제가 확인되었다.

참고문헌

Baker R, Scher FM(1986) Enhancing the activity of biological control agents. In Innovative Approaches to Plant Disease Control (I. Chet, Ed.). New York: Wiley. 1-18.

Chang JW, Kim SD(1995) Seed coating for the application of biocontrol agent *Bacillus subtilis* YBL-7 against phytopathogens. Kor J Appl Microbiol Biotechnol 23(2), 243-248.

Chung, KJ, Shim JS, Chung BK(1998) Biological control of grapevine crown gall. Kor J Pesticide Science 2(2), 97-101.

Hur JS, Kim HJ, Oh SO, Koh YJ, Kwak, YS(2002) Inhibitory effects of super reductive water on plant pathogenic fungi. The Plant Pathology J 18(5),

284-287.

Jang HG, Park YS, Kim TC, Cho JY, Kim CK, Heo BG, Park YJ(2004) Dyeability of silk and cotton fabrics by leaf extracts of kiwi fruit. *Kor J Hort Sci Technol* 22(3), 370-374.

Kim SS, Joo GJ, Uhm JY, Kim YJ, Rhee IK(1997) Antifungal activity of *Bacillus* sp. SS279 and biocontrol of apple white rot fungus, *Botryosphaeria dothidea*. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 25(5), 527-536.

Krieg NR, Holt JG(1984) *Bergey's manual of systematic bacteriology*. New York: Williams and Wilkins Co. 215-232.

Lee JG, Lee DH, Park SK, Hur JS, Koh YJ(2001) First report of *Diaporthe actinidiae*, the casual organism of stem-end rot of Kiwifruit in Korea. *The Plant Pathology J* 17(2), 110-113.

Milliams ST(1989) In *Bergey's Manual of systemic bacteriology*. New York: Williams and Wilkins Co. 2452-2492.

Park JD, Park IJ, Han KP(1994) Investigation of insect pests and injury characteristics of *Stathmopoda auriferella* on kiwi fruit tree. *Kor J Appl Entomol* 33(3), 148-152.

Thomashow LS, Weller DM(1996) Current concepts in the use of introduced bacteria for biological control: Mechanisms and antifungal metabolites. In: *Plant-microbe interactions*. New York: Chapman and Hall. 187-235.