

## 토양 방선균 *Streptomyces* sp. MG 121의 항균활성 및 고추 생육에 미치는 효과

임태현 · 조성현<sup>1</sup> · 김진호<sup>2\*</sup>

(주)삼호유비농생명과학연구소, <sup>1</sup>효성오앤비, <sup>2</sup>상주대학교 생명자원과학대학 식물자원학과

### Effects of *Streptomyces* sp. MG 121 on Growth of Pepper Plants and Antifungal Activity

Tae Heon Lim, Sung-Hyun Cho<sup>1</sup> and Kim Jin Ho<sup>2\*</sup>

Research Institute of Agri-Bio Science, SAMHOUB Co., Ltd., Sangju 742-130, Korea

<sup>1</sup>Hyusung ONB Co., Ltd., Songchondong, Daedeak-Gu, Daejeon 306-812, Korea

<sup>2</sup>Department of Plant Resources, Sangju National University, Sangju 742-711, Korea

(Received on July 2, 2007)

The microorganisms with the antifungal activity against *Phytophthora capsici* and *Colletotrichum acutatum* and the plant growth promotion activity were screened from forest soils of Moon-gyeong (Juheul Mountain), Gyeongsangbuk-do. One of the isolates, strain MG 121 showed antifungal activity against *P. capsici* and *C. acutatum* and possessed phosphate solubilization activity was selected to development biocontrol agent. The strain MG 121 was identified as *Streptomyces* sp. by analysis of 16S rDNA. On the test with pepper fruits, the strain inhibited disease incidences of late blight and anthracnose over 80%. In greenhouse test, plant height, the number of leaf, fresh weight and roots length of pepper plants upon treatment of culture suspension of *Streptomyces* sp. MG 121 were significantly higher than those without the bacterial cells. In addition, strain MG 121 was capable to solublize rock-phosphate after incubation for 144 hours in potate dextrose broth. The concentration of soluble phosphate in PDB amended with 0.5% rock-phosphate was increased up to 765 µg/ml.

**Keywords :** Antifungal activity, *Colletotrichum* spp., *Phytophthora capsici*, *Streptomyces*

*Phytophthora capsici*와 *Colletotrichum* spp. 등의 병원성 곰팡이에 의한 병은 고추 수확량을 제한하는 주요 요인이며, 연 평균 5% 정도가 역병에 의한 손실로 추정되고 있다(Jee 등, 2000). 협소한 경지면적에 의한 연작과 수량 증대를 위한 다비 및 밀식재배 등의 재배방법은 역병과 탄저병의 방제에 어려움을 초래하고 있다(Agrios, 1997; Jee 등, 2000).

곰팡이에 의한 주요 식물 병의 방제는 화학적 살균제에 의존하고 있으나 균의 생리적 특성, 재배조건 및 살균제 연용에 따른 저항성 균 출현에 따른 약효 저하로 어려움을 겪고 있다(Bus 등, 1991; Delp, 1988). 저항성 품종 이용, 재배방법의 개선, 미생물을 이용한 생물적 방제

및 천연물 이용 방법 등이 합성농약의 문제점을 극복하고 안정적인 농산물 생산을 위한 방제수단으로 연구가 활발히 진행되고 있다(Baker 등, 1983; Becker, 1993; Chet와 Inbar, 1994; Joo 등, 2002; Lim 등, 2000; Lim, 2005). 특히 식물과 미생물 유래 천연물질은 활성성분의 직접적인 이용뿐만 아니라 신농약 개발을 위한 선도물질과 신규 작용점 연구 분야에 이용가치가 높다(Katz와 Demain, 1977; Lange 등, 1993).

따라서 산림 토양으로부터 분리한 방선균의 역병균과 탄저병에 대한 길항력과 고추의 초기 생육에 미치는 영향 등을 조사하여 농업적 활용을 위한 기초자료를 얻고자 본 연구를 수행하였다.

\*Corresponding author  
Phone) +82-54-530-5202, Fax) +82-54-530-5202  
E-mail) kimjh@sangju.ac.kr

### 재료 및 방법

미생물의 분리 및 보관. 유용 미생물을 분리하기 위한

시료는 작물의 재배과정 중에 투여되는 미생물을 배제하기 위하여 문경 주출산 일원의 비경작 산림 토양을 채집하여 사용하였다. 미생물은 시료를 60°C에서 3시간 건조 후 살균수로 3단 희석한 후 200  $\mu$ l를 취하여 방선균 분리용 배지(Difco™ Actinomycete Isolation Agar)에 도말하고 28°C의 배양기에 배양하면서 전형적인 방선균의 균총을 형성하는 균을 분리하여 4°C의 냉장고에 보관하며 사용하였다. 병원균은 이병식물체로부터 직접 분리하여 실험에 사용하였다.

**항균활성.** 고추 역병 및 탄저병균에 대한 항균활성은 Potato dextrose agar(Becton Dickinson Microbiology System, Sparks, USA) 배지에 분리균을 접종하여 28°C에서 7일간 정치 배양하고 chloroform으로 1시간 훈증 처리 후 병원균을 접종하였다. 병원균이 접종된 plate는 역병균과 탄저병균을 각각 25°C와 28°C에서 5일간 배양한 후 항균활성과 현미경을 통한 병원균 균사의 변형 여부를 확인하였다.

휘발성 물질에 의한 항균활성은 분리균과 역병원균을 양분된 plate에 7일간 동시 배양 후 병원균의 균총( $\phi$  5 mm)을 새로운 배지에 치상하여 각각 25°C와 28°C에서 5일간 배양 후 균총의 직경을 측정하여 조사하였으며, 대조구는 병원균을 단독으로 계대배양하였다. 고추열매를 이용한 항균활성은 분리 미생물을 YMB(Yeast extract 3.0 g, Malt extract 3.0 g, Peptone 5.0 g, Dextrose 10.0 g, dH<sub>2</sub>O 1 l)을 이용하여 28°C에서 7일간 150 rpm으로 진탕배양하였다. 대상 병원균의 포자를 수확하여 농도를 10<sup>5</sup> spores/ $\mu$ l로 조절한 후 선발 미생물 배양액과 1:1로 혼합하였고, 병원균의 농도는 5 $\times$ 10<sup>4</sup> spores/ $\mu$ l, 선발 미생물의 농도는 5 $\times$ 10<sup>6</sup> cfu/ml 되도록 조절하여 접종원으로 사용하였다. 준비된 접종원 50  $\mu$ l를 멸균한 paper disk에 접종하여 cork borer로 상처 낸 열매에 접종하고 습도가 유지되도록 처리된 20 cm $\times$ 25 cm $\times$ 5 cm 크기의 플라스틱 box에 옮겨 25°C와 28°C에서 7일간 배양한 후 병원균에 의한 감염율과 병반의 크기를 측정하였다.

**불용태 인산의 가용화.** 인산가용화 능력은 PDA를 기본배지로 하여 CaCl<sub>2</sub>와 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>의 최종농도를 0.5%가 되도록 첨가하여 제조한 검정용 배지의 중앙에 분리균주를 접종하고 28°C에서 7일간 배양한 후 균총 주변의 투명대 형성여부로 검정하였다. 또한 PDB 배지 50ml에 인광석(총 인산 : 30.9%) 0.5%를 첨가하여 28°C에서 진탕배양기(190~200 rpm)로 6일간 배양하면서 24시간 간격으로 배양 상정액을 취하여 유리인산의 농도를 마나도몰리브덴 산법으로 비색정량하여 인산가용화 활성을 최종 검정하였다(Lee, 2001).

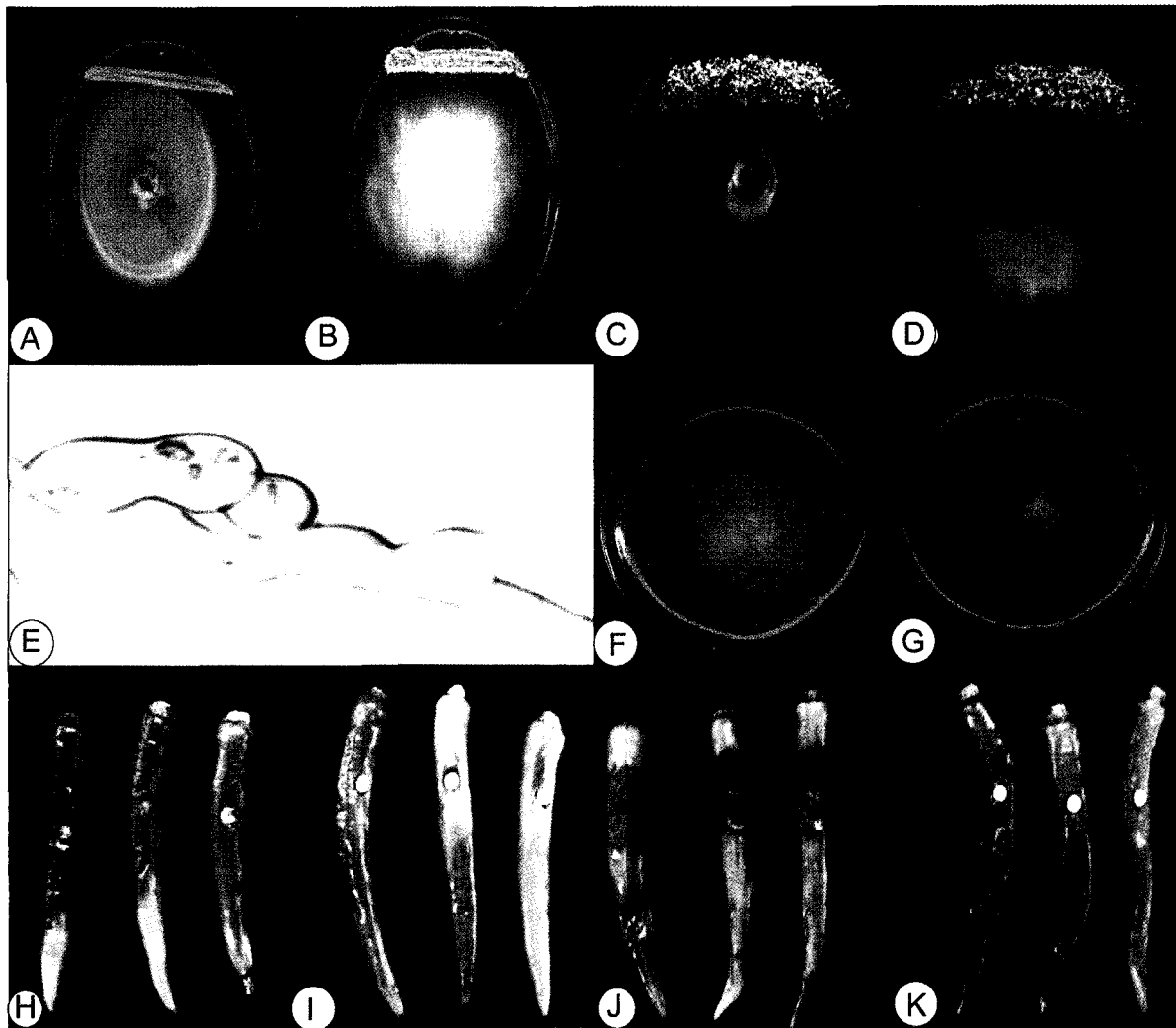
**식물생육촉진 효과.** 선발 미생물의 식물생육촉진 효과

는 YMB를 이용하여 28°C, 150 rpm/min 및 pH 6.8의 조건으로 7일간 배양 한 균체를 포함한 배양액의 원액과 10배 희석액을 7일 간격으로 3회 엽면살포하여 검정하였다. 고추는 2007년 2월 1일에 최아시킨 고추(품종: 한여름)를 과중하여 실시하였다. 2007년 04월 06일까지 66일간 재배 후 총 신장과 엽수를 조사하였다. 대조구는 증류수와 균주 배양용 배지를 사용하였다. 토양은 일반 밭 토양과 피트모스를 1:1 비율로 혼합하여 2회 멸균 후 사용하였다. 시험구 배치는 난괴법 3반복으로 하였다.

**동정.** 최종 선발된 미생물 동정은 16S rDNA의 염기서열 분석을 통하여 수행하였다. 선발 균주의 chromosomal DNA를 분리한 후 primer 518F(5'-CCAGCAGCCGCGGTAA TACG-3')와 800R(5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3) primer를 사용하여 94°C에서 1분간 denaturation, 60°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분 30초 동안 polymerization시키는 조건에서 PCR로 증폭하였다. 증폭된 PCR 결과물을 0.8% agarose gel electrophoresis를 수행한 후 분리 정제하여 ABI PRISM 3700 DNA Analyzer를 이용하여 염기서열을 분석하였다. 분석된 염기서열은 BLASTN 프로그램을 이용하여 GENE BANK의 RDP(RNA database project)를 활용하여 분석하였다.

## 결과 및 고찰

**미생물 분리 및 항균활성.** 문경 주출산의 산림 토양 10개 시료로부터 총 400여 균주를 분리하였다. 분리 미생물 중 MG 121을 고추역병균과 탄저병균에 대한 항균활성에 기초하여 최종 선발하였다(Fig. 1A~G). 대치배양에 의한 고추역병에 대한 항균활성은 접종원을 중심으로 MG 121 균주 방향으로 생육이 이루어지지 않아 강한 것으로 나타났다. 탄저병에 대한 항균 활성 또한 대조구와 비교하여 높은 것으로 나타났다(Fig. 1C&D). 또한 MG 121 균주와 인접한 병원균의 균사는 팽윤현상이 초래되어 정상적인 생육이 이루어지지 않은 것으로 나타났다(Fig. 1E). 이러한 균사 팽윤 현상은 탄저병균보다 역병균에서 뚜렷하게 나타났다. 양분된 plate에서 병원균과 동시 배양 후 검정한 휘발성 물질에 의한 항균활성은 30.2%로 나타났다(Fig. 1F&G). 이러한 항균활성은 acetic acid 등의 약산성 휘발성 물질에 의한 세포질의 산성화에 따른 것으로 추측된다(Kim 등, 2007). 고추 열매를 이용한 역병 및 탄저병 억제효과를 검정한 결과, 병원균 단독처리구의 경우 접종된 모든 과일에서 병반이 형성되었으나, 병원균과 선발된 MG 121 균주를 혼합 처리한 경우 상처부위에 국부적인 병반만이 형성되었다(Fig. 1H~K, Table 1).



**Fig. 1.** Antifungal activity of *Streptomyces* sp. MG 121 to *C. acutatum* and *P. capsici*. **A, B & F:** Control, **C & D:** Antifungal activity to *C. acutatum* (**C**) and *P. capsici* (**D**) by compounds diffused into growth medium, **E:** Swelling of mycelium of *P. capsici* by *Streptomyces* sp. MG 121, **G:** Antifungal activity by volatile compound from the strain MG 121. **H & J:** Pepper fruits treated with  $5 \times 10^4$  spores/ $\mu$ l spores of *P. capsici* and *C. acutatum*, **I & K:** Pepper fruits treated with the strain MG121 and the pathogens.

**Table 1.** Effects of *Streptomyces* sp. MG 121 on late blight by *Phytophthora capsici* and anthracnose by *Colletotrichum acutatum* on pepper fruits

Treatment	No. of inoculated fruit		No. of infected fruit		Control value (%) <sup>a</sup>		Lesion size (mm) <sup>b</sup>		Control value (%) <sup>c</sup>	
	<i>P.</i>	<i>C.</i>	<i>P.</i>	<i>C.</i>	<i>P.</i>	<i>C.</i>	<i>P.</i>	<i>C.</i>	<i>P.</i>	<i>C.</i>
	<i>capsici</i>	<i>acutatum</i>	<i>capsici</i>	<i>acutatum</i>	<i>capsici</i>	<i>acutatum</i>	<i>capsici</i>	<i>acutatum</i>	<i>capsici</i>	<i>acutatum</i>
Pathogen only	60	60	60	60	-	-	60.6 ± 4.32	37.8 ± 3.21	-	-
Pathogen + Culture suspension <sup>d</sup>	60	60	10	12	83.3	80.0	5.8 ± 0.21	2.8 ± 0.54	92.1	92.6

<sup>a</sup>Control value (%) = [(No. of infected fruit on pathogen only – No. of infected fruit on pathogen+Culture suspension)/No. of infected fruit on pathogen only] × 100.

<sup>b</sup>Lesion size was mean of lesion size on infected fruits.

<sup>c</sup>Control value (%) = [(Lesion size of infected fruit on pathogen – Lesion size of infected fruit on pathogen+Culture suspension)/Lesion size of infected fruit on pathogen] × 100.

<sup>d</sup>Culture suspension contained bacterial cells ( $5 \times 10^6$ cfu/ml).

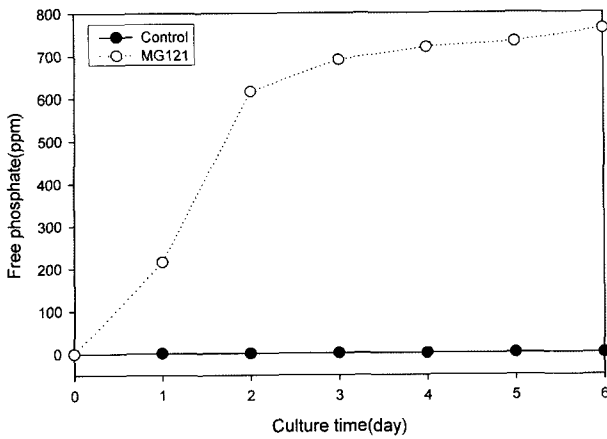


Fig. 2. Changes in soluble phosphate concentration during the cultivation of *Streptomyces* sp. MG121 (●: Control, ○: MG 121).

**불용태 인산 가용화.** 분리한 400여 균주 중 1차 불용태 인산의 가용화 활성을 검정한 결과, MG 121 균주를 포함한 3균주가 가용화 활성을 보였다. 인광석(총 인산 :

30.9%) 0.5%를 첨가한 PDB 배지에 선발 균주를 접종한 후 배양시간에 따른 유리인산의 농도로 불용태 인산의 가용화 활성을 측정한 결과, 24시간 후 유리인산의 농도는 215 µg/ml이었으며 48시간 후의 농도는 616 µg/ml이었다. 배지 내 유리인산의 농도는 배양초기인 48시간 후까지 급격히 증가하였으나, 72시간 후 완만히 증가하여 144시간 후에는 762 µg/ml까지 증가하였다(Fig. 2). 이는 이 (2001)가 보고한 토양 내 불용태 인산의 주요 분해균인 *Penicillium* sp.에 비하여 높은 것으로 MG 121 균주의 토양내 안정한 정착과 생육을 위한 제형화를 통한 토양 내 불용태 인산의 가용화와 이로 인한 식물체의 생육을 촉진할 수 있을 것으로 생각된다(Lee, 2001; Lifschitz 등, 1987).

**생육촉진효과.** 선발된 MG121 균주의 배양 원액과 10배 희석의 엽면살포에 의한 고추 유묘 생육에 미치는 효과를 검정한 결과(Table 2), 대조구와 배양 배지 처리구의 초장은 각각 16.08 cm와 16.32 cm로 조사되었다. 배양 원액 처리구의 경우 18.02 cm로 두 대조구에 비하여 각

Table 2. Growth-promoting effects of *Streptomyces* sp. MG 121 on pepper plants in pot experiments

Treatment	Method of treatment	Height (cm)	No. of leaf	Fresh weight (g)		Length (cm) of root
				Shoot	Root	
Control (Water)		16.08c	17.2c	7.47c	4.48c	14.30c
Culture Medium	Foliar spray	16.32c	17.5c	7.98bc	4.97bc	14.97bc
Culture solution with bacterial cells (10 <sup>8</sup> cfu/ml)		18.02a	19.3a	9.02a	6.21a	15.41a
Culture solution with bacterial cells (10 <sup>7</sup> cfu/ml)		17.60ab	18.8ab	8.26b	5.83a	15.01ab

In a column, means followed by the same letter are not significantly different at 5% level by DMRT.

2	tggtcaggacgaacgctggcggcgtgctaacacatgcaagtcgaacgatgaagccctt	61
62	cggggtgattagtggaacgggtgagtaacacgtgggcaatctgcccttactctggg	121
122	acaagccctggaacgggtctaataccggataaacctcctgcctgcatggcgggggt	181
182	aaaagctccggcggtgaaggatgagcccgcgccctatcagcttgttggtgggtaatggc	241
242	ctaccaaggcgacgacgggtagccggcctgagagggcgaccggccacactgggactgaga	301
302	cacgcccagactcctacgggagcgagcagtggggaatattgcacaatggcgaaaagcct	361
362	gatgcagcgacgcccgtgagggatgacggcctcgggtgtaaacctttcagcaggg	421
422	aagaagcgaagtgacgggtacctgcagaagaagcggcctaactacgtgccagcagccg	481
482	cgtaatactagggcgcaagcgttgcgggaattattgggcgtaaaagagctcgtagggc	541
542	gcttgcgctcggatgtgaaagccggggcctaaccgggtctgcattcgatacgggc	601
602	aggctagagtgtgtaggggagatcggaattcctggtgtagcggtgaaatgcgcagatat	661
662	caggaggaacaccggtggcgaaggcggatctctgggccattactgacgctgaggagcga	721
722	agcgtgggagcgaacaggattagataccctggtagtcaccgcgtaaacgttgggaact	781
782	aggtgttggcgacattccacgtcgtcggtgcgcagctaacgcattaagttccccgctg	841
842	gggagtacggccgcaaggcctaaactcaaggaattgacggggcccgcaaacgagcgg	901
902	agcatgtggcctaattcgacgcaacgcgaagaaccttaccaggcttgacatataccgga	961
962	aacggccagagatggtcggcccttgtggtcggtatacaggtggtgcatggctgtcgtca	1021
1022	gctcgtgctgtagatggtggttaagtcggcaacgagcgcaacccttctgtgtgtg	1081
1082	ccagcatgccctcggggtgatggggactcacaggagactgcccgggtcaactcggagga	1141
1142	aggtggggacgacgtcaagtcacatgccccttattgtcttgggctcacacgtgctacaa	1201
1202	tggccggtacaatgagctcggatcggcgaggcggagcgaatctcaaaaagccggtctca	1261
1262	gttcggtgggtctgcaactcgacccatgaaatcggagttgtagtaatcgcatc	1321
1322	agcattgctcgggtgaatacgttccc	1347

Fig. 3. 16S rDNA Sequences of *Streptomyces* sp. MG 121.

각 12.1%와 10.4% 정도 큰 것으로 나타났다. 배양여액의 10배 희석액 처리로 두 대조구에 비해 9% 이상 증가한 것으로 나타났다. 엽수의 경우 대조구에 비해 배양원액의 경우 10.3%, 10배 희석액의 경우 7.4%정도 많은 것으로 나타났다. 식물생육촉진은 미생물에 의한 배양 배지 또는 토양의 유기 질소원의 분해에 따른 무기 질소원 공급과 미생물 대사산물에 의한 것으로 생각된다(Lee, 2001; Lim, 2005).

**동정.** 선발 균주의 chromosomal DNA를 분리한 후 primer 518F (5'-CCAGCAGCCGCGTAATACG-3')와 800R (5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3) primer를 이용하여 증폭된 16S rDNA의 염기서열을 분석하여 BLASTN 프로그램을 이용하여 GENE BANK와 RDP(RNA database project)의 ribosomal RNA sequencing과 비교한 결과, *Streptomyces* sp. 3469와 99%의 상동성을 보였으며 *Streptomyces griseus*와는 98%의 상동성을 보였다(Fig. 3). 이에 따라 선발된 균주는 *Streptomyces* sp. MG 121로 명명하였다.

## 감사의 글

이 연구는 산업자원부의 지역산업기술개발과제 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## 요 약

비경작 산림 토양으로부터 고추 역병균과 탄저병균에 대한 항균활성, 불용태 인산의 가용화 및 식물체 초기생육촉진 효과를 보이는 방선균을 분리하였다. 선발된 미생물의 16S rDNA 염기서열을 분석한 결과, *Streptomyces* sp.로 동정되었다. *Streptomyces* sp. MG 121 균주는 고추 열매를 이용한 역병과 탄저병을 80% 이상 억제하였다. MG 121균주 배양액의 식물체 염면살포는 식물체의 초기생육을 10% 이상 촉진시키는 것으로 나타났다. 불용태 인산의 가용화 활성을 측정한 결과, 유리인산의 농도는 144시간 후 762 µg/ml까지 증가하였다.

## 참고문헌

- Agrios, G. N. 1997. *Plant Pathology*. Academic Press, Inc., New York. 635 pp.
- Baker, C. J., Stavely, J. R., Thomas, C. A., Saser, M. and MacFall, J. S. 1983. Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Uromyces phaseoli* and on development of rust pustules on bean leaves. *Phytopathology* 73: 1148-1152.
- Becker, J. O. 1993. Control of soil-borne pathogens with living bacteria and fungi: status and outlook. *Pestic. Sci.* 37: 355-363.
- Bus, V. G., Bongers, A. J. and Risse, L. A. 1991. Occurrence of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* resistant to benomyl, thiabendazole, and imazail on citrus fruit from different geographic origins. *Plant Dis.* 75: 1098-1100.
- Chet, I. and Inbar, J. 1994. Biological control of fungal pathogens. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 48: 37-43.
- Delp, C. J. 1988. *Fungicide resistance in North America*, pp. 133. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minn.
- Jee, H. J., Cho, W. D. and Kim, C. H. 2000. Phytophthora disease in Korea. RDA. 226 pp.
- Joo, G. J., Lee, I. H. and Kim, J. H. 2002. Chitinase production and Isolation of *Serratia plymuthica* AL-1 antagonistic to white rot fungi from *Allium fistulosum* roots. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 30: 135-141.
- Katz, E. and Demain, A. 1977. The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible functions. *Bacteriol. Rev.* 41: 449-474.
- Lange, L., Breinholt, J., Rasmussen, F. W. and Nielsen, R. I. 1993. Microbial fungicide-the natural choice. *Pestic. Sci.* 39: 155-160.
- Kim, H. L., Jung, B. N. and Sohn, B. K. 2007. Production of weak acid by anaerobic fermentation of soil and antifungal effect. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17: 691-694.
- Lee, T. G. 2001. Development of a biofertilizer using phosphate-solubilizing fungus, *Penicillium* sp. PS-113., pp 116. Thesis of Ph. D. Dae University.
- Lim, T. H., Lee, J. M., Chang, T. H. and Cha, B. J. 2000. Antifungal activity and identification of an Actinomycetes strain isolated from mummified peaches. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28: 161-166.
- Lim, T. H. 2005. Antifungal activity of *Streptomyces griseofuscus* 200401 against pathogens causing late blight and anthracnose on pepper. *Korean J. Pestic. Sci.* 9: 102-107.
- Lifschitz, R., Kleopfer, J. W., Kozlowshi, M., Simonson, C., Carlson, J. and Tipping E. M. 1987. Growth promotion of canola seedlings by a strain of *Pseudomonas putida* under gnotobiotic conditions. *Can. J. Microbiol.* 51: 251-255.
- Powel, K. A. and Fox, F. M. 1993. Technical and commercial aspects of biocontrol products. *Pestic. Sci.* 37: 315-321.