

Bacillus subtilis S54 균주를 이용한 고추 역병과 탄저병의 생물학적 방제이건웅 · 김명준¹ · 박준식¹ · 채종찬 · 소병율² · 주재은 · 이귀재*전북대학교 생명공학부, ¹임실고추연구소, ²서남대학교 생명과학과**Biological Control of *Phytophthora* Blight and Anthracnose Disease in Red-pepper Using *Bacillus subtilis* S54**Gun Woong Lee, Myung Jun Kim¹, Jun Sik Park¹, Jong-Chan Chae, Byoung Yul Soh²,
Jae Eun Ju and Kui-Jae Lee*

Division of Biotechnology, Chonbuk National University, Iksan 570-752, Korea

¹Agricultural Technology Center, Imsil, Jeonbuk 566-801, Korea²Department of Life Science, Faculty of Natural Science, Seonam University, Namwon 590-711, Korea

(Received on November 30, 2010; Accepted on March 5, 2011)

Phytophthora blight and anthracnose disease caused by *Phytophthora capsici* and *Colletotrichum gloeosporioides* are the most important devastating diseases of red pepper plants, worldwide. Five different bacterial isolates were isolated from the red pepper rhizosphere and non-rhizosphere soil and subsequently tested for antagonistic activity against *P. capsici* and *C. gloeosporioides*. The area of the inhibition zone was taken as a measure for antagonistic activity. Among the 5 isolates tested, S54 exhibited a maximum antagonistic activity under *in vitro* and *in vivo* conditions. In greenhouse studies the isolate has successfully reduced the disease symptom. Protect value was 80.8% (*Phytophthora* blight) and 81.9% (Anthracnose disease), whereas the infection rate of control plants was 21.3% and 23.2%. Based on the 16S rDNA sequence and API 50CHB Kit analysis the most effective isolate was identified as *Bacillus subtilis*. The results of the study indicate that the strain S54 could be used as a potential biological control of *Phytophthora* blight and anthracnose disease of red pepper.

Keywords : *Bacillus subtilis*, Biological control, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Phytophthora capsici*

농촌인구의 감소 및 노령화 등에 따른 생산여건이 악화되어 우리나라에서 생산되는 고추는 품질이 우수함에도 불구하고 저가 수입물량의 증가로 인하여 고추산업이 위축되고 있다. 또한 고추의 지속적인 분지와 착생 특성으로 여러 번 많은 시간을 소요하여 계속적으로 수확하여야 한다(Cho 등, 2005). 계속적인 수확에 있어서 작물에 가장 크게 피해를 입히고 있는 병원균은 토양전염성 병원균인 역병균과 공기전염성 병원균인 탄저병으로 알려져 있다. 각각의 활동 영역이 다른 두 병원균을 제어하기에는 많은 노력과 시간이 필요하다. 이에 농가에서는 유기합성 농약의 무분별한 살포가 진행되어져 왔다. 이러

한 고추 병해 방제에 있어서 널리 사용되고 있는 유기합성 농약은 과다사용으로 인하여 저항균주의 출현과 작물과 토양 내에서 잔류독성의 문제를 야기시켜 토양, 수질은 물론 작물까지 오염시키면서 생태계를 파괴하고 있다(Yin, 2007). 이를 위하여 환경친화적인 방제방법인 유용미생물을 활용한 생물학적 방제가 활발하게 이루어지고 있으며, 이러한 유용미생물은 용균작용이나 항생작용, 경쟁적 길항작용 또는 알려지지 않은 어떠한 작용들에 의하여 식물병원균의 제어가 이루어지고 있다(Watanabe 등, 1990; Leoffler 등, 1986; Paulitz 등, 1991). 따라서 본 연구에서는 고추에 발병하는 역병과 탄저병에 길항하는 유용한 미생물을 분리하고 생물학적 방제제로의 효과를 평가하였다.

미생물과 병원균 분리. 생물학적 방제 이용 미생물을

*Corresponding author

Phone) +82-63-850-0836, Fax) +82-63-850-0834

Email) kuijael@jbnu.ac.kr

선발하기 위하여 근권 토양과 비근권 토양에서 시료를 채취하고 세균 분리는 채취한 토양 10 g에 멸균 생리식염수로 10⁻³까지 희석하고 이를 LB agar 배지에 300 µl씩 도말하여 30±1°C 암조건에서 24시간 배양하였다. 배양한 후 다시 2~3회 정도 계대 배양하여 균을 순수분리 하였으며, 병원균을 분리하기 위하여 고추 역병과 탄저병에 감염된 포장에서 고추뿌리와 잎, 고추 과실을 채취하고, 채취한 조직은 인산 완충액 200 ml에 넣고 교반하여 수세하였다. 수세한 다음 potato dextrose agar(PDA : potato dextrose broth 24g, agar 20 g per 1000 ml D.W.) 배지위에 치상하고, 28±1°C 암조건에서 배양한 후 균사가 자라면 다시 PDA에 이식하고 암조건에서 일주일동안 28±1°C에서 배양하였다.

접종원 준비 및 대치배양을 통한 길항 미생물 선발. 분리된 미생물과 병원균을 접종원으로 사용하기 위하여 액체배지(LB broth)에 36°C, 48시간 동안 180 rpm으로 진탕 배양하고 배양된 배지를 6,000 rpm으로 15분동안 원심분리한 뒤 인산 완충액으로 현탁하여 10⁸ cfu/ml이 되게 조정하였으며, 병원균은 PDA 배지에서 25°C, 7일 동안 배양하고 포자를 분리하여 heamocytometer를 이용, 희석하고 계수하여 10⁶ spore/ml로 맞추어 접종원으로 사용하였다. 분리된 미생물 중 길항 미생물을 선발하기 위하여 대치배양 방법(Yoshida 등, 2001)을 사용하여 PDA 평판 배지에서 역병과 탄저병 생장에 억제 능력이 있는지 검정하여 선발하였다. PDA를 미리 준비하고 cork borer를 사용하여 역병과 탄저병 균사를(1 cm 크기) 90 mm petridish를 사용하여 만들어진 PDA 배지 중앙에 치상하고 plate의 가장 자리에 멸균시킨 filter paper(치상한 병원균 균사와 같은 크기)를 병원균에서 30 mm 떨어진 4개의 점을 만들어 분리된 미생물들의 현탁액을 접종하고 48시간 동안 배양하였다. 48시간 동안 배양한 배지에서 성장한 병원균과 접종시킨 분리된 미생물들의 억제거리를 관찰함으로써 병원균의 생장억제능력을 가장 뛰어나게 보이는

미생물 5균주를 선발하였다. 그 중에서도 S54 균주는 11.5±0.1 mm와 11.5±0.2로 역병균과 탄저병원균을 동시에 가장 크게 억제함을 보여주었다(Table 1).

잎에 대한 발병 억제 실험. 고추 잎에서 병 억제 실험을 실시하여 병원균의 감염 예방을 위한 선발된 미생물의 능력을 평가하고, 선발된 미생물의 고추에 대한 병원성 여부도 판단하였다. 선발된 미생물과 병원균의 포자를 접종원으로 준비하고, 먼저 약 한달 정도된 고추의 잎(길이 약 5 cm)에 선발된 미생물을 분무하였다. 그 후 선발된 미생물을 분무한 잎 위에 병원균의 포자 현탁액을 분무하였다. 접종된 잎은 10일 동안 12시간 광/암 조건에서 20°C에서 배양하였다. 발병정도는 갈변한 잎의 부분에 따라 0-4단계(0: 무병징, 1: 1-12%, 2: 13-25%, 3: 26-50%, 4: 51-100%)로 평가하였다(Chiou와 Wu, 2001). 선발된 5종의 미생물에서 병원균에 대한 예방률을 나타내었으며 가장 높은 예방률을 보인 선발균주는 발병률이 약 37.5%인 S54로, 고추에 대한 병 억제 실험 결과는 대치배양의 억제거리 결과와 같은 결과를 나타내는 것으로 미루어볼 때 역병과 탄저병 모두에 대해 사용가능한 균주임으로 사료되었으며, 고추에 대한 병원성 또한 검출되지 않았다(Table 2).

생장지수 측정. 선발된 균주가 고추의 발아와 생장에 영향을 미치는지 알아보기 위하여 Seedling vigour index를 측정하였다. 종자를 30초 동안 1% sodium hypochlorite에 표면 살균하고, 증류수에 2~3회 수세한 후 종자에 선발된 길항미생물을 각각 접종하였다. 생장상에서 15일 동안 배양하면서 종자의 발아율을 기록한 다음 지상부와 뿌리의 길이를 측정하였다. 그리고 고추 종자의 발아와 생육에 도움을 주는 생장촉진역할을 하는지 조사하였다. 생장지수는 Abdul-Baki와 Anderson(1973)의 공식(생장지수=(뿌리 길이+지상부 길이)×발아(%))을 이용하여 계산하였다. 접종 7일 후 발아율은 85~95%였으며, 지상부와 뿌리 길이의 측정 결과는 대조구에 비하여 선발된 모든 길항 미생물이 고추 종자의 발아와 생장을 촉진하였다(Table 3).

선발균주의 고추 역병 및 탄저병 효과 검정. In vitro 실험을 바탕으로 고추 역병균과 탄저병원균에 우수한 뛰어난 길항능력을 가지고 생장촉진에도 효과가 있는 균주 S54를 최종적으로 선발하였고 실제로 토양과 작물에서 생물학적 방제제로써 효과가 있는지를 확인하기 위하여 비닐하우스 시설내에서 토양관주와 엽면시비를 통하여 방제력을 확인하였다. 접종원은 선발된 균주를 10⁸ cfu/ml로, 병원균은 10⁶ spore/ml로 조정한 후에 5 ml씩 근권과 엽면에 접종하여 발병을 유도하였으며, 처리기간은 6월부터 9월까지 15일 간격으로 실시하였다. 각 병원균에

Table 1. Dual culture assay results for antifungal bacteria

Culture No.	Dual culture assay test		Medium
	Zone in mm ^a		
	<i>P. capsici</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	
L19	11.0±0.2	11.0±0.1	PDA
L82	10.9±0.3	11.0±0.2	PDA
M46	10.7±0.1	10.8±0.3	PDA
S21	11.2±0.1	11.0±0.3	PDA
S54	11.5±0.1	11.5±0.2	PDA

^aMean±SE (n=3).

Table 2. Detached leaves assay results for antifungal bacteria

Culture No.	Detached leaves assay results			
	Detached leaves assay ^{a,b}		Infection (%) ^b	
	<i>P. capsici</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>P. capsici</i>	<i>C. gloeosporioides</i>
Control	3.5±0.1	3.6±0.2	87.5±2.5	90.0±5.0
L19	1.9±0.1	2.1±0.3	47.5±2.5	52.5±7.5
L82	2.1±0.2	2.2±0.3	52.5±4.3	55.0±6.6
M46	2.0±0.2	1.8±0.2	50.0±4.3	45.0±4.3
S21	1.6±0.3	1.8±0.1	40.0±6.6	45.0±2.5
S54	1.5±0.3	1.5±0.1	37.5±6.6	37.5±2.5

^aIn detached leaf assay disease severity was assessed based on 0-4 scale: 0, no symptoms; 1, 1-12%; 2, 13-25%; 3, 26-50%; 4, 51-100% of leaf were covered with brown lesions.

^bMean±SE (n=3).

Table 3. Seedling vigour and seed germination by antifungal bacteria

Culture No.	Shoot length ^a	Root length ^a	Germination (%)	Vigour index ^{a,b}
Control	1.61±0.05	7.35±0.02	85	761.52±5.22
L19	1.75±0.03	7.51±0.04	90	833.00±5.24
L82	1.81±0.05	7.65±0.04	85	804.31±6.64
M46	1.70±0.04	7.43±0.02	90	821.79±3.88
S21	1.88±0.03	7.70±0.07	95	909.63±8.76
S54	1.84±0.05	7.71±0.04	90	859.73±6.89

^aMean±SE (n=20).

^bVigour index=(shoot length+root length)×germination (%).

Table 4. Biocontrol effects of the *Bacillus subtilis* strain S54 to *Phytophthora* blight and Anthracnose disease

Culture No.	<i>Phytophthora</i> blight		Anthracnose	
	Disease incidence (%) ^a	Control efficiency (%)	Disease incidence (%) ^a	Control efficiency (%)
Control	21.3 a	-	23.2 a	-
S54	4.1 c	80.8	4.2 b	81.9

^aData followed by the same letter in each column are not significantly different based on Duncan's multiple range test ($P=0.05$).

대한 발생정도는 마지막 처리 20일 후에 조사하였다. 또한 방제가((병원균 처리구의 이병율-미생물 처리구의 이병율)/병원균 처리구의 이병율×100)의 환산은 계산식에 의하여 수행하였다. 그 결과 80.8%와 81.9%의 방제효과를 보였으며, 역병균과 탄저병원균에 대한 발병율은 21.3%와 23.2%로 방제력을 평가하기에 충분하였다(Table 4). 이러한 결과는 고추에서 가장 큰 피해를 입히는 역병과 탄저병에 대한 생물학적 방제제로써의 가능성을 나타내었다.

선발균주의 동정. 선발된 S54의 균주는 그람염색에서 gram positive로 나타났으며, LB agar plate에 균을 접종한 후 균체를 이용하여 API 50CHB kit(BioMerieux, France)로 생화학적 특성을 분석하였다. 또한 분자생물학적인 방

법으로 이용하여 DNA extraction kit(GeneAll)를 이용하여 genomic DNA를 추출한 후 universal primer인 27f(5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')와 1492r(5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')를 이용하여 16S rDNA 영역을 PCR 방법으로 증폭하고 염기서열을 분석한 후 NCBI Blast에서 비교 분석한 결과 *Bacillus subtilis*와 99%로 가장 유연관계가 밀접하였으며, API 50CHB kit의 분석결과도 *Bacillus subtilis*로 16S rDNA의 결과와 일치하였다. 동정된 *Bacillus* 속은 생물학적 방제제로 전 세계적으로 활발하게 연구되어지고 있으며, 이는 항균활성 lipopeptide 계열 물질의 생산과 극한 환경에서 살아갈 수 있는 내생포자의 생성이 그 이유라 할 수 있겠다. 이로써

*in vitro*와 *in vivo* 조건에서 실험한 결과를 바탕으로 평가하였을 때 분리된 *Bacillus subtilis* S54는 고추 역병과 탄저병을 동시에 예방할 수 있고, 발아율과 생장을 촉진하는 효과 또한 보유하고 있어 미생물제제로 가치가 충분하다고 판단되며, 농가 편의성을 고려한 제형화 기술개발과 살포방법등을 추가적으로 개발한다면 화학농약을 대체할 수 있는 현장적용 가능한 생물학적 방제제의 원료라 할 수 있겠다.

요 약

고추 역병과 탄저병은 *Phytophthora capsici*와 *Colletotrichum gloeosporioides*에 의해 발병되는 병으로 세계적으로 많은 피해를 입히는 중요한 병원균이다. 이러한 병원균의 방제를 위하여 근권과 비근권에서 각각의 병원균 생장을 억제하는 능력이 뛰어난 5균주를 선발하였다. 선발된 분리주 중 S54균주는 *in vitro*와 *in vivo* 조건 모두에서 가장 뛰어나게 병원균을 억제하였다. 하우스 실험에서도 역병과 탄저병 모두 80% 이상의 방제력을 보여주었다. 또한 S54균주의 동정을 위하여 16S rDNA 부분의 염기서열의 분석과 API 50CHB Kit를 실시하였으며, 그 결과 *Bacillus subtilis*로 동정하였다. 이러한 결과를 바탕으로 S54는 고추 역병과 탄저병을 방제할 수 있는 생물학적 방제제의 가능성을 보여주었다고 할 수 있다.

Acknowledgements

This study was carried out with the support of “On-Site Cooperative Agriculture Research Project (Project No.PJ006589)”, RDA, Republic of Korea.

참고문헌

- Abdul-Baki, A. A. and Anderson, J. D. 1973. Vigour determination in soyabean seed by multiple criteria. *Crop Sci.* 31: 630-633.
- Chiou, A. L. and Wu, W. S. 2001. Isolation, identification and evaluation of bacterial antagonists against *Botrytis elliptica* on Lily. *J. Phytopathol.* 149: 319-324.
- Cho, M. C., Chae, U., Cho, Y. S., Ko, K. D., Shin, Y. A., Kim, D. H. and Jung, J. W. 2005. The result of new pepper varieties evaluation at farmer's field. *Korean J. Hort. Sci. Technol.* (Suppl. I) 23: 38.
- Leoffler, W., Tschen, J. S., Venittanakom, N., Kugler, M., Knorpp, E., Hsieh, T. F. and Wu, T. G. 1986. Antifungal effects of bacilysin and fengycin from *Bacillus subtilis* F-29-3: a comparison with activities of other *Bacillus* antibiotics. *J. Phytopathol.* 115: 204-213.
- 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.
- 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.
- Yoshida, S., Hiradate, S., Tsukamoto, T., Hatakeda, K. and Shirata, A. 2001. Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves. *Phytopathology* 91: 181-187
- Yin, J. F., Zhang, W. H., Li, J. Q., Li, Y. H., Hou, H. L. and Zhou, X. Y. 2007. Screening and antagonistic mechanism of biocontrol agents against *Phytophthora* blight of pepper. *Acta Phytopathologica Sinica.* 37: 88-94.