

모잘록병의 생물학적 방제를 위한 유효 미생물 선발방법 및 효과

Screening and effect of antagonists  
for biological control of plant pathogen

이백석, 최성원\*, 최기현\*, 이재호\*, 김은기\*  
인하대학교 생물공학과, 그린바이오텍(주)\*  
전화 : (032) 860-7514, FAX : (032) 875-0827

Antagonistic *Bacillus* sp. #16 to phytopathogenic fungi were selected based on the growth rate, inhibition rate and surface tension reduction. Based on the 16S rRNA sequences, *Bacillus* sp. #16 is closely related to the *B. subtilis* DSM10. In the pot test, *Bacillus* sp. #16 show the most effective growth inhibition against damping-off disease of cucumber seedling.

서론

농작물의 대량생산을 위해 기존에 사용된 화학농약에 대한 내성균 발생함에 따라 빠른 방제효과를 얻기 위해 사용된 과도한 화학농약의 사용은 토양의 산성화를 유발하여 농업생산의 잠재력을 낮추며 토양에 존재하는 토착 길항미생물을 감소시켜 농작물의 생산성을 저하시킨다. 또한 강우시 수계에 유입되는 화학농약에 의한 부영양화의 촉진 및 독성 난분해성 물질의 연속적 축적에 의한 생물농축 피해가 많이 발생하고 있다. 특히 토양전염성 식물병의 방제는 기존 화학 살균제 사용이 거의 불가능하거나 방제효과가 극히 낮고 기존 화학농약에 대한 내성 병원균이 발생하여 사용량이 증가하고 있어 인체에 안전한 무공해 농산물을 생산하기 위해 미생물 농약 필요한 실정이다. 미생물농약은 비대상 생물체와 포유류에 대해 안전하고 환경적인 적합성 등으로 화학농약에 비해 상품등록이 상대적으로 용이한 편이다.

토양전염성 식물병의 방제를 위해 투여되는 길항미생물은 토양에 의한 자외선 차단과 수분 공급으로 생존율이 엽상부에 도입되는 미생물보다 우수하며 토양내 유기물 및 근분비물을 이용한 생장이 가능하다. 또한 토양전염성 식물병은 전염원이 재배 작물 토양에 있기 때문에 방제 대상이 분명하고 본 연구의 방제 대상균인 *Rhizoctonia solani*와 *Pythium aphanidermatum*은 균사로 전염되어 방제할 부위가 명확하다는 장점이 있다.

국내에서 미생물농약 부분 중 가장 큰 시장이 형성되어 있는 곰팡자 잔디병을 일으키는 *Pythium* sp. 및 *Rhizoctonia* sp.를 방제·억제하는 미생물농약에는 *Bacillus* sp. 계열의 균주가 많이 사용되고 있다.<sup>1)</sup>

한편 길항미생물을 선발하기 위해 사용된 기존의 방법들은 *in vitro* 상에서 길항력만을 고려하여 선발한 결과 *in situ* 상에서의 방제효과와 일치하지 않는 경우가 많이 발생하였다.

이를 보완하기 위해 식물체에서 직접 길항력을 측정하는 방법이 도입되었고 식물체에서 길항미생물의 성장여부를 확인하기 위해 식물체의 즙을 이용한 배지를 사용하였다.

미생물농약(제제)의 주요 구성 미생물은 *Bacillus* sp.로서 lipopeptide 계열의 항균물질이 생산되고 있으며 포자를 형성하여 토양 유래의 식물병원균에 대해 지속적인 방제·억제 효과를 나타낼 수 있다.<sup>2)</sup>

따라서 본 연구에서는 무병토양 및 퇴비로부터 분리한 길항후보균 90 여종을 식물병원균에

대한 길항력, 성장속도 및 표면장력 감소를 고려한 2차원적인 선정방법인 RPI (Relative Performance Indices) 기법을 이용한 길항미생물의 선발을 목적으로 하였다.

## 재료 및 방법

### 길항균 선발 및 배양

퇴비 및 무병토양에서 분리한 후보균 (#1 ~ #87), 공시 균주인 *Bacillus subtilis* ATCC21332, 미생물농약으로 시판중인 Kodiak 및 본 연구실에서 기존에 분리한 *B. subtilis* H6을 대상으로 길항균을 선정하였다. 길항균의 선정은 모잘록병을 유발하는 식물병원균인 *P. aphanidermatum*, *R. solani*에 대한 길항력, 생균수 및 표면장력 감소를 고려하였고 길항균 선정시 RPI (Relative Performance Indices) 기법을 도입하였다.<sup>2)</sup>

i) 식물병원균의 길항력에 대한 RPI<sub>efficacy</sub>

$$RPI_{\text{efficacy}} = [ \{ (x - \bar{x}) / \sigma \} - 2 ] 25$$

$x$  ; single observation value,  $\bar{x}$  ; average of all observations,

$\sigma$  ; standard deviation

ii) 후보균의 생균수에 대한 RPI<sub>kinetics</sub>

$$RPI_{\text{kinetics}} = [ \{ (x - \bar{x}) / \sigma \} + 2 ] 25$$

Efficacy는 PDA (Potato Dextrose Agar) plate에서 대칭배양하여 후보균들의 inhibition rate를 측정하였다 (Fig. 1).

$$\text{inhibition rate} = (\text{control} - \text{experiment}) / \text{control} \times 100$$

*P. aphanidermatum*의 경우 성장속도가 빨라 대칭배양시 후보균과의 거리를 5 cm로 하였고 (2일 배양) *R. solani*는 4 cm로 하였다 (3일 배양).

Kinetics는 후보균들을 15 mL test tube에 5 mL LBS배지 (soluble starch ; 10 g/L, tryptone ; 10 g/L, yeast extract ; 5 g/L, NaCl ; 5 g/L)에서 30°C, 16시간 1차 진탕 배양 후 30 mL test tube에 10 mL의 LBS에서 2차 진탕 배양 (30°C, 12 hr)하여 평판배지에 적절히 희석한 후 도말하여 생균수 값을 이용하였다.

계면활성제 생산 유무를 확인하기 위해 후보균을 각각 배양한 후 상등액을 분리하여 표면장력 (Surface Tensiomat21, Fisher)을 측정하였다.

균 생장에 대한 pH의 영향을 측정하기 위해 초기 pH를 3, 5, 7, 9, 11로 적정하여 배양한 후 생균수와 최종 pH를 측정하였고 균의 산소 요구도를 확인하기 위해 배지량을 변경한 후 생균수와 최종 pH를 측정하였다.

### 16S rRNA 분석을 이용한 동정

균체의 genomic DNA는 Giovannoni 등의 방법을 변형하여 추출하였다. 16S rRNA 유전자의 증폭에 이용된 primer는 eubacteria의 16S rRNA domain에 특이적으로 부착하여 증폭하는 27F (*E. coli* numbering 8~27 : 5'-AGAGTTTGTGATCMTGGCTCAG-3')와 1492R (*E. coli* numbering 1492~1510 : 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')을 사용하였다. 염기서열의 분석은 DNA sequencing system(ABI Prism 377 DNA sequencer, Perkin-Elmer)을 이용하여 실시하였다.

### Pot test

선발된 길항균주에 대하여 오이 모잘록병 방제효과를 검증하기 위해 오이 유묘(장일반백, 은성백다다기)에 *R. solani*와 *P. aphanidermatum*을 감염시킨 후 후보균을 처리하여 유묘의 이병주율, 방제가 및 성장 정도를 측정하였다. 대조 약제로 안타 유제를 사용하여 화학농약과 미생물농약의 효율을 비교하였다.

$$\text{Control value} = (\text{control} - \text{experiment})/\text{control} \times 100$$

## 결과 및 고찰

### 대칭배양

*P. aphanidermatum* 및 *R. solani*에 대한 대칭배양은 후보균을 희석하지 않은 대조구와 희석한 실험구에서 각각 균사길이를 측정하여 inhibition rate를 계산하였다. 후보균 중 *P. aphanidermatum*에 대한 inhibition rate는 일반적으로 작았고 가장 큰 값은 #49, #70의 27.1%였으며 *R. solani*에 대한 가장 큰 inhibition rate는 #43의 51.5%였다.

### 길항균 선발

길항균 선발시 미생물 성장, *P. aphanidermatum* 및 *R. solani*에 대한 inhibition rate와 표면장력 감소에 대한 각각의 RPI를 계산한 후 네 값의 평균값으로부터 우수균으로 #75, #16 균주를 선정하였다. #75, #16 균주를 각각 배양하여 생균수가 안정적인 #16 균주를 최종 선발하였다.

### 선발균 동정

결정된 염기서열을 GenBank 및 EMBL(European Molecular Biology Laboratory)등의 database와 비교하였다. #16번 균주 16S rRNA 1491개의 서열을 분석하였고 1491개 서열을 *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* DSM10과 비교한 결과 12개의 서열이 상이하여 99% 유사도를 보였다.

### Pot test

*R. solani*에 의한 모잘록병에 대하여 #16, #1 균주가 방제가 각각 40%, 35%로 우수하였고 *P. aphanidermatum*에 의한 모잘록병에 대하여 #16, #22 균주가 각각 67%로 우수한 방제가를 보였다. *In vitro* 상에서 최종 선발한 균과 pot test에서 최우수균으로 선정된 균이 동일하여 *in vitro* 상에서 현장 요소를 고려하여 균을 선발한 방법이 적절하다고 사료된다.

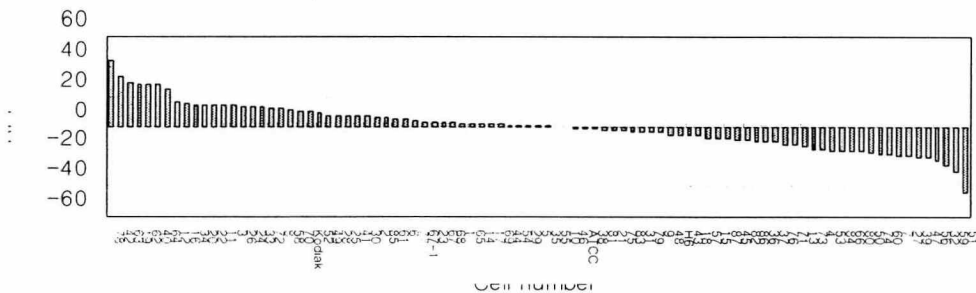


Fig. 1 Use of relative performance indices (RPI) to achieve a 2-dimensional assessment

of antagonistic organism based on growth(OD600) and efficacy of cells

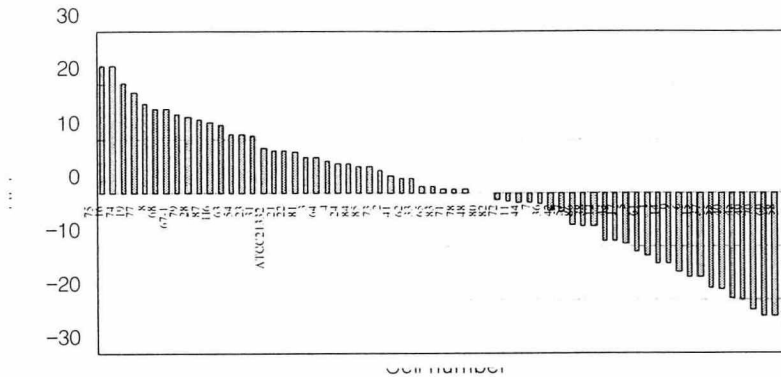


Fig. 2 Use of relative performance indices (RPI) to achieve a 2-dimensional assessment of antagonistic organism based on growth(viable cell number), efficacy of cells and surface tension reduction

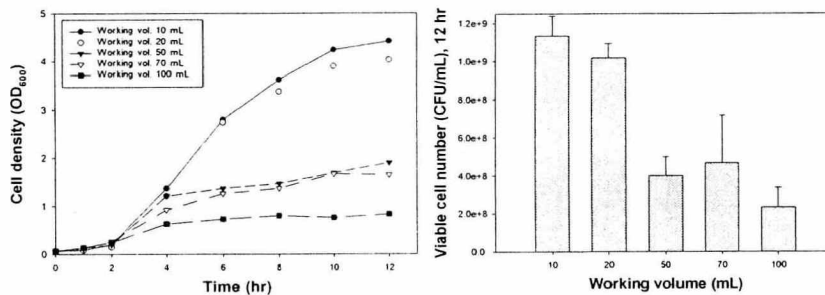


Fig. 3 Effect of working volume on cell growth

### 요약

식물의 토양전염병을 유발하는 *P. aphanidermatum* 및 *R. solani*에 대한 길항력, 성장속도 및 표면장력 감소를 고려한 RPI (relative performance indices) 기법을 이용하여 90 여개 후보균 중 #16 길항균을 선정하였다. 선정된 *Bacillus* sp. #16은 16S rRNA 서열을 분석한 후 GenBank에서 비교한 결과 *B. subtilis* DSM10과 99% 유사성을 보였다. 또한 pot test 결과 오이 모잘록병에 대해 우수한 방제가를 보였다.

### 참고문헌

1. Asaka O. and M. Shoda, "Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off tomato with *Bacillus subtilis* RB14" (1996), Appl. Environ. Microbiol., 62, 4081-4085