

Bacillus sp. NAAS-1을 이용한 고추 탄저병 생물학적 방제

유재홍* · 박인철 · 김완규

농촌진흥청 국립농업과학원 농업미생물과

Biocontrol of Anthracnose of Chili Pepper by *Bacillus* sp. NAAS-1

Jae Hong Yoo*, In Cheol Park and Wan Gyu Kim

Agricultural Microbiology Division, National Academy of Agricultural Science,
Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea

(Received 12, November 2012., Revised 10, December 2012., Accepted 11, December 2012)

ABSTRACT: *Bacillus* sp. NAAS-1 isolated from the field of Chili pepper was tested for biocontrol activity against anthracnose pathogen of Chili pepper caused by *Colletotrichum acutatum*. The antifungal activity of *Bacillus* sp. NAAS-1 culture broth was compared with synthetic fungicide containing carbendazim (40%) and kasugamycin (3.45%). *Bacillus* sp. NAAS-1 showed a similar fungicidal activity against the anthracnose pathogen at the concentration of 50 µL/mL in comparison to the fungicide containing carbendazim (40%) and kasugamycin (3.45%) using a cup method. *Bacillus* sp. NAAS-1 also exhibited its potent fungicidal activity against the anthracnose in *vivo* test at the concentration of 50 µL/mL when compared to the fungicide containing carbendazim (40%) and kasugamycin (3.45%)

KEYWORDS : Anthracnose, *Bacillus* sp., Biocontrol, Chili pepper, *Colletotrichum acutatum*

서 론

고추탄저병은 고추역병과 더불어 우리나라 고추 생산에 커다란 저해요인 중의 하나로 고추열매에 직접적이고 치명적인 피해를 일으킨다(Park and Kim, 1992; Shin *et al.*, 1999).

최근 국내에서는 품종에 따라 차이가 있기는 하지만, 평균 30~40%의 탄저병 이병율이 나타나며, 심한 경우 발생율이 60~70%에 이르러 상품성을 저하시키고 농가 소득에 큰 피해를 입히고 있어, 건전 고추 생산 및 수량감소를 초래하는 피해를 주고 있는 실정이다(Park, 2001). 고추 탄저병을 일으키는 병원균은 5종의 *Colletotrichum* 균에 의한 것으로 보고되어 있으며, *Colletotrichum acutatum* J.H Simmonds 주요 병원균인 것으로 알려져 있다(Kang *et al.*, 2005).

고추 탄저병 방제를 위하여 현재 대부분 유기합성농약을 사용하고 있다(Park *et al.*, 2004). 이에 따른 유기합성 농약사용의 증가로 농업생산비 증가는 물론 농약에 의한 환경오염이 사회문제로 대두되고 있어, 생물농약의 개발은 매우 시급한 실정이다.

본 연구에서는 고추의 생산량 증대 및 상품성 향상기술을 개발하고자 국내 토양으로부터 고추탄저병균의 생장을

억제하는 미생물을 분리, 동정하였으며, 분리균의 고추 탄저병 방제효과를 검정하여, 고추의 상품성 및 생산성을 증대시킬 수 있는 생물학적 방제에 대하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

항진균 물질 생산 균주의 분리

수원시 근교 고추밭 토양으로부터 분리한 균주를 NB 액체배지(meat extract 0.3%, peptone 0.5%)에 백금이로 1회 접종하고, 30°C에서 5일 동안 진탕배양 하였다. 배양액을 12,000 × g에서 20분간 원심분리한 후 고추탄저병균(*Colletotrichum acutatum* KACC 40032)을 대상으로 사용하여 paper disc method로 배양 상등액의 항균활성을 측정하였다. 분리미생물의 배양액을 원심분리하여 균체와 상등액으로 분리한 후 균체는 버리고, 상등액을 pore size 0.45 µm milipore filter에 통과시켜 균체를 완전히 제거한 다음, 상등액 70 µL를 항생물질 검정용 filter paper(φ 8 mm)에 주입하였다. 28°C 항온 배양기에서 7일 동안 배양 후, 분리균 중에서 대상균에 대하여 가장 좋은 활성을 나타내는 균주를 선발하였다.

항진균 물질 생산 균주의 동정

균주의 동정은 Bergey's manual of determinative bacteriology(Buchanan, 1974), Microbiological methods

*Corresponding author <E-mail : yj7915@Korea.kr>

(Collins and Lyne, 1976) 및 Bergey's manual of systematic bacteriology(Sneath, 1989) 등에 수록되어 있는 일반적인 세균동정법에 따라 수행하였다.

분리 균주 배양

NB 배지 20 mL를 첨가한 100 mL 삼각 플라스크에 사면 배양한 분리 균주를 백금으로 1회 접종한 후, 30°C에서 72시간 진탕배양하여 정지기에 도달한 균주를 본 실험의 종균으로 사용하였다.

항진균 활성의 측정

실험실내에서 항진균활성의 측정은 공시한 고추탄저병균 3균주 *Colletotrichum acutatum*(KACC 40042), *Colletotrichum acutatum*(KACC 40689) 및 *Colletotrichum acutatum*(KACC 40691)를 대상균으로 사용하여 cup method로 행하였다. PDA배지(Difco Co.) 15 mL를 멸균한 후 45~50°C로 냉각하고, 여기에 고추탄저병균 현탁액 0.5mL를 접종하여 30°C에서 48시간 배양한 후 중층하였다. 이와 같이 만든 평판 배지의 표면에 cup(내경 6 mm, 외경 8 mm, 높이 10 mm)을 올려 놓고, 분리균주의 배양 상등액을 넣어 30°C에서 48시간 동안 배양한 후 형성된 생육 저지환의 직경을 측정하였다.

고추 탄저병 포자발아 및 부착기 형성 억제

항진균 효과 미생물 배양액의 탄저병균의 포자발아 억제에 대한 효과검정은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 고추탄저병균 분생포자현탁액(100 conidia/mL) 900 µL를 혼합하여, 혼합액을 30 µL씩 둥근 홈이 난 slide에 넣고, 습도를 유지하기 위하여 살균수로 포화시킨 필터페이퍼를 넣은 페트리디쉬에 슬라이더 글라스를 옮겨 놓았다. 25°C 배양기에서 배양하면서 현미경으로 slide glass 당 다섯 부위씩 포자 발아율과 부착기의 형성율을 조사하였다. 무처리구는 포자액과 살균수만을 혼합하여 처리하였고, 모든 처리구는 4반복으로 3회 수행하였다. 탄저병균의 포자를 분획하여 포자현탁액에, 분리 미생물의 배양액을 농도

별로 처리하여 포자 발아와 부착기 형성을 락토 페놀(0.1% cotton blue)로 염색하여, 광학 현미경으로 관찰 하였다(Kim *et al.*, 1999).

고추과실에서의 탄저병 발생 억제

탄저병 접종원은 탄저병에 걸린 병든 과실로부터 직접 포자를 채취하여 사용하였다. 탄저병균의 접종포자현탁액은 5×10^6 conidia/mL의 농도로 조절하였다. 고추과실은 PR 마니파 품종으로서, 1% NaOCl을 이용하여 표면 살균하였다. 살균수로 3회 이상 행구어 상온에서 건조시킨 후 병 방제 효과 검증실험에 사용하였다. 의료용 사혈기를 이용하여 크기와 깊이가 일정한 상처를 고추 3군데에 내었고, 또는 병원균을 상처에 접종한 후 14일간 배양하면서 탄저병균에 의한 병반형성을 조사하였다.

결과 및 고찰

고추 탄저병 억제 미생물 분리 및 항진균 활성

고추 탄저병원균인 *Colletotrichum acutatum*(KACC 40042), *Colletotrichum acutatum*(KACC 40689) 및 *Colletotrichum acutatum*(KACC 40691) 3균주에 대한 분리 미생물 배양액의 균사생장 억제효과를 검증 한 결과, Fig. 1에 나타난 바와 같이 선발 미생물의 배양액은 전 공시균주에 대하여 균사 생장 억제효과를 나타내었으며, 고추재배 농가에서 많이 사용하고 있는 합성 농약인 항진균제(carbendazim 40% + kasugamycin 3.45%, 0.001 g/mL)와 대등한 억제 효과를 나타내었다.

항진균물질 생산균주의 동정

*Colletotrichum acutatum*의 생육을 억제하는 선발미생물의 생리학적 특성 결과를 조사한 결과, 일반적인 *Bacillus* 속 세균의 특성을 나타냈으며(Table 1), 일반적인 내염농도보다 높은 8% 염농도 이상에서도 생육이 가능하고, tyrosine의 가수분해 음성을 나타내어 현재까지 보고된 *Bacillus* sp.과는 다소 다른 특성을 나타 내었다.

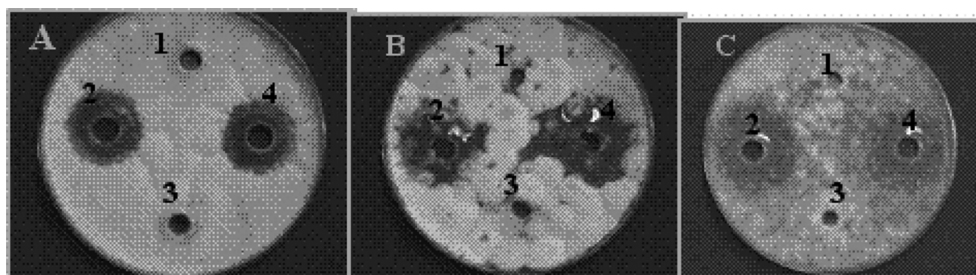


Fig. 1. Culture broth effect of *Bacillus* sp. NAAS-1 mycelial growth of anthracnose pathogen of Chili pepper *in vitro*. A, *Colletotrichum acutatum* KACC 40063; B, *Colletotrichum acutatum* KACC 40690; C, *Colletotrichum acutatum* KACC 40484. 1, Control (Culture medium); 2, Fungicide[(carbendazim (40%) + kasugamycin (3.45%), 0.001g/mL)]; 3, *Bacillus* sp. 1 culture broth; 4, *Bacillus* sp. NAAS-1 culture broth. The amount of 50 mL of each culture broth was applied.

Table 1. Biological characteristics of *Bacillus* sp. NAAS-1 isolated from soil

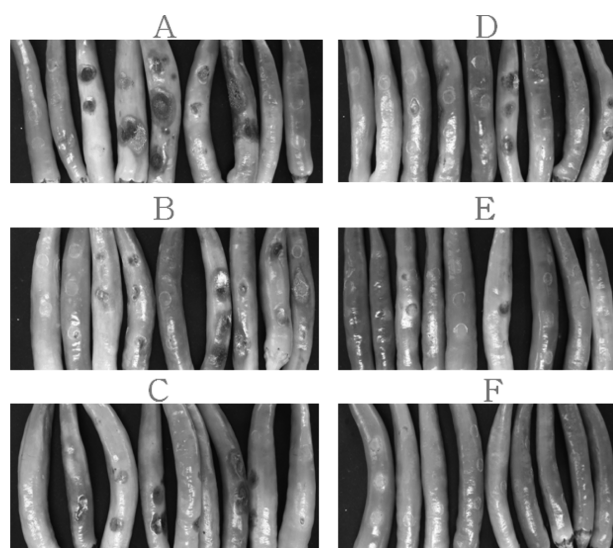
Chaaracteristics	<i>Bacillus</i> sp. NAAS-1	<i>Bacillus</i> sp. ^{a)}
Growth temperature	20~50°C	20~40°C
Range of growth pH	4~10	5~10
Limitaton of growth NaCl	< 8%	< 6%
Catalase	+	+
Oxidase	-	-
Urase	+	+
Lipase	-	-
α -galactosidase	+	+
Arginine dehydrogenase	-	-
Phenylalanine deaminase	-	-
Hydrolysis: starch	+	+
casein	+	+
cellulose	-	-
esculine	+	+
Formation of indole	-	-
Formation of H ₂ S from TSI agar medium	-	-
Formation of levan from sucrose	+	+
Formation of NH ₃ from peptone	+	+
Formation of NH ₃ from arginine	+	+
Gelatin liquefaction	+	+
Use of citrate	-	-
Use of propionate	+	+
Test of methylred	+	+
Reduction of nitrate	+	+
Denitrogenation	+	+
Milk clot	-	-
Peptonisation	+	+
Blood hemolysis	-	-
O-F test	fermentation	fermentation
Degradation of tyrosine	-	+

^{a)}Buchanan and Gibbson (1974).**항진균 활성 및 고추과실에서의 탄저병 억제**

Table 2에는 본 실험에서 항진균 물질을 생산하는 미생물을 분리하기 위해 선발한 *Bacillus* sp. 1 균주와 NASS-1 균주의 배양액을 고추과실에 처리한 후 나타난 항진균 효과를 통계처리하여 나타낸 결과이다. *Bacillus* sp. 1 균주의 배양액, NASS-1 균주를 배양하기 위한 배지를 처리하였을 때는 탄저병균이 100% 발병하였는데, NASS-1 균주배양액을 75% 희석하여 처리한 경우는 70% 이상의 발병이 억제되고, 50% 희석하여 처리하였을 때는 탄저병균의 발병을 크게 억제하는 효과를 나타내었다. 고추 과실에 합성농약과(0.001 g/mL, 0.01 g/mL), NASS-1 균주의

Table 2. Effect of *Bacillus* sp. NAAS-1 culture filtrate on occurrence of anthracnose on pepper fruits infected with *Colletotrichum acutatum*

Treatment ^{a)}	No. of lesions ^{b)}	DMRT
Control 1	6.667±0.333	a
Control 2	4.667±1.586	a
NAAS-1 Culture filtrate (1/2)	0.333±0.333	b
NAAS-1 Culture filtrate (1/4)	1.333±0.667	b
NAAS-1 Culture filtrate (1/10)	2.667±0.882	ab

^{a)}Control 1; Culture medium, Control 2; *Bacillus* sp. 1 culture broth.^{b)}Number of lesions produced on three fruits of Chili pepper. Three Chili pepper fruits were used for pathogenicity tests in three replicates. Three points of each fruits were inoculated with the anthracnose pathogen. Number of lesions produced on the fruits were measured at 14 days after artificial inoculation.**Fig. 2.** Effect of culture broth of *Bacillus* sp. NAAS-1 on occurrence of anthracnose on pepper fruits *in vivo*. A, Control (distilled water); B, culture medium; C, Treatment of Fungicide [(carbendazim (40%) + kasugamycin (3.45%), 0.001g/ml)]; D, Treatment of NAAS-1 culture broth (100 µL/mL), E, Treatment of NAAS-1 culture broth (250 µL/mL); F, Treatment of NAAS-1 culture broth (500 µL/mL).

배양액(100 µL/mL, 250 µL/mL, 500 µL/mL)을 처리한 후 발병된 탄저병균의 병반을 조사한 결과, NASS-1 균주의 배양액 500 µL/mL 처리 하였을 때 고추 과실에 탄저병균의 병반이 전혀 나타나지 않았다(Fig. 2). 많은 연구자들이 생물학적 방제제를 개발하기 위해 *Bacillus* sp.를 이용하여 많은 연구를 수행 하였으며(Kim *et al.*, 2003; Lim and Choi, 2006), 일부 다국적 기업들은 이미 Galltrol A(*Agrobacterium radiobactor*), Norbac(*Agrobacterium radiobactor*), AQ 10(*Ampelomyces quisqualis*), Epic (*Bacillus subtilis*), Kodiak(*Bacillus subtilis*), Serenade

Table 3. Effect of *Bacillus* sp. NAAS-1 culture filtrate on conidial germination and appressorial formation of *Colletotrichum acutatum*

Treatment (dilution)	Conidial germination (%)	Appressorial formation (%)
Control ^{a)}	92.9±4.1	63.5±1.6
Culture filtrate (1/10)	80.9±5.8	0
Culture filtrate (1/100)	85.1±5.9	0.3±0.6
Culture filtrate (1/1000)	82.8±6.0	39.7±13.8

^{a)}Control: culture medium.

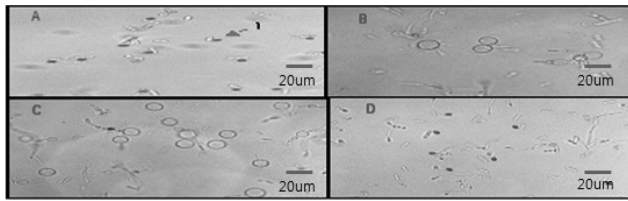


Fig. 3. Effect of *Bacillus* sp. NAAS-1 culture filtrate on conidial germination and appressorial formation of *Colletotrichum acutatum*. A, Control; B, Culture broth filtrate diluted 1 to 10; C, Culture broth filtrate diluted 1 to 100; D, Culture broth filtrate diluted 1 to 1000.

(*Bacillus subtilis*), Deny(*Burkholderia cepacia*), Aspire (*Candida oleophila*), Primastop(*Gliocladium catenulatum*), Actinovate (*Streptomyces lydicus*), Mycostop(*Streptomyces griseoviridis*), Plant Shield(*Trichoderma harzianum*), Trichodex (*Trichoderma harzianum*), and SoilGard (*Trichoderma virens*2를 미생물 제제로서 개발하여 사용하고 있다 (Gutterson, 1990).

고추 탄저병 포자발아 및 부착기 형성 억제

NASS-1 균주의 배양액을 10배, 100배, 및 1000배로 희석하여 탄저병균의 포자 현탁액에 처리하여 포자 발아와, 부착기 형성에 미치는 영향을 조사한 결과, NASS-1 균주의 배양액(1/10 희석)은 포자 발아에는 영향을 나타내지 않았으나 부착기 형성을 99%이상 억제 하였다(Table 3). 이는 일반적으로 *Bacillus subtilis*가 생산하는 Iturin의 작용기작과는 다른 기작을 가지고 있음을 알 수 있었다 (Klich *et al.*, 1994). Iturin은 peptide로 이루어진 강력한 항진균 물질서 50~100ppm의 농도에서도 항진균 효과를 나타내는 것으로 보고되었다(Klich *et al.*, 1994). NASS-1 균주의 배양액에서 생산되는 부착기 형성저해에 관여하는 대사물질을 분리하여 구조를 동정하여 Iturin과는 다른 계통의 물질로 확인된다면 새로운 진균병 억제 미생물제로 사용가능 할 것으로 추정된다. Fig. 3에는 NASS-1 균주의 배양액을 10배, 100배, 및 1000배 희석하여 고추탄저병균의 포자 현탁액에 처리하여 부착기 형성 저해효과를 나타낸 결과로서 10배 희석액과, 100배 희석액을 처리

하였을 때 탄저병균의 부착기 형성을 저해하였다. 본 실험 결과와 같이 *B. subtilis*는 lytic enzyme을 생산하여 부착기 형성을 저해한다고 연구를 보고된 바 있다(Korsten and De Jager, 1995).

적 요

고추포장의 토양에서 분리한 *Bacillus* sp. NAAS-1 *Colletotrichum acutatum*에 대한 생물학적 방제 활성을 검정 하였다 이 분리균주를 일종의 작물보호제인 카벤다짐·가스가마이신 수화제와 비교하여 검정한 결과, 기준사용량 농도(50 µL/mL)와 비슷한 항진균 활성을 나타냈다. 또한 생물 검정 결과, 공시 작물보호제의 기준사용량 농도(50 µL/mL)에서 보다 고추 탄저병균의 발병억제효과가 높게 나타나내었다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ008544)에서 연구비 지원으로 수행된 결과이며, 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

- Buchanan, R. E. and Gibbson N. E. 1974. Bergey's manual of determinative bacteriology, pp. 529-550. 8th ed. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Collins, C. H. and Lyne P. M. 1976. Microbiological methods. pp. 169-180. Butterworths, London.
- Gutterson, N. 1990. Microbial fungicides: recent approaches to elucidating mechanisms. *Critical reviews in biotechnology* 10:69-91.
- Kang, B. K., Min, J. Y., Kim, Y. S., Park, S. W., Bach, N. V. and Kim, H. T. 2005. Semi-selective medium for monitoring *Colletotrichum acutatum* causing pepper anthracnose in the field. *Research in Plant Disease* 11:21-27.
- Kim, H. S., Park, J., Choi, S. W., Choi, K. H., Lee, G. P., Ban, S. J., Lee, C. H. and Kim, C. S. 2003. Isolation and characterization of *Bacillus* strains for biological control. *Journal of microbiology* 41:196-201.
- Kim, K. D., Oh, B. J. and Yang, J. 1999. Differential interactions of a *Colletotrichum gloeosporioides* isolate with green and red pepper fruits. *Phytoparasitica* 27:97-106.
- Klich, M. A., Arthur, K. S., Lax, A. R., and Bland, J. M. 1994. Iturin A: A potential new fungicide for stored grains. *Mycopathologia* 127:123-127.
- Korsten, L. and De Jager, E. S. 1995. Mode of action of *Bacillus subtilis* for control of avocado postharvest pathogens. *South Africa Avocado Grower's Association Yearbook*. 18:124-130.
- Lim, T. H., and Choi, Y. H. 2006. Response of several fungicides of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates obtained from persimmons in Sangju. *Research in Plant Disease* 12:99-102.
- Park, H. G. 2001. Breeding of anthracnose-resistant lines by interspecific hybridization in chile pepper (*Capsicum* spp.). *Research*

- in Agriculture and Life Science*. 5:40-42.
- Park, K. S. and Kim, C. H. 1992. Identification, distribution and etiological characterization of anthracnose fungi of red pepper in Korea. *Korean Journal of Plant Pathology* 8:61-69.
- Park, K. S., Kim J. C., Choi, S. Y., Park, S. D. and Lee, S. G. 2004. Plant diseases of safflower (*Carthamus tinctorius*) and their chemical control. *Research in Plant Disease* 10:159-166.
- Shin, H. J., Chen, Z. J., Hwang, J. M. and Lee, S. G. 1999. Comparison of pepper anthracnose pathogens from Korea and China. *The plant pathology journal* 15:323-329.
- Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe and J. G. Holt. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore.