

## *Bacillus* sp. CS-52를 이용한 고추 탄저병 (*Colletotrichum gloeosporioides*) 방제 특성

권정자<sup>1,2†</sup> · 이중복<sup>1†</sup> · 김범수<sup>1</sup> · 이은호<sup>1</sup> · 강경묵<sup>1</sup> · 심장섭<sup>2</sup> · 주우홍<sup>3</sup> · 전춘표<sup>4</sup> · 권기석<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>안동대학교 생명자원과학과, <sup>2</sup>청송군 농업기술센터, <sup>3</sup>창원대학교 생물학과, <sup>4</sup>안동과학대학교 의약품질분석과

### Biological Control of Anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) in Red Pepper by *Bacillus* sp. CS-52

Joung-Ja Kwon<sup>1,2†</sup>, Jung-Bok Lee<sup>1†</sup>, Beam-Soo Kim<sup>1</sup>, Eun-Ho Lee<sup>1</sup>, Kyeong-Muk Kang<sup>1</sup>,  
Jang-Sub Shim<sup>2</sup>, Woo-Hong Joo<sup>3</sup>, Chun-Pyo Jeon<sup>4</sup>, and Gi-Seok Kwon<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Bioresource Sciences, Andong National University, Andong 760-749, Republic of Korea

<sup>2</sup>Cheongsong Agricultural Technology Center, Gyeongbuk 763-802, Republic of Korea

<sup>3</sup>Department of Biology, Changwon National University, Kyungnam 641-713, Republic of Korea

<sup>4</sup>Department of Medicine Quality Analysis, Andong Science College, Andong 760-709, Republic of Korea

(Received May 27, 2014 / Accepted August 4, 2014)

This study was carried out in order to develop a biological control of anthracnose of red pepper caused by fungal pathogens. In particular, this study focuses on the *Colletotrichum* species, which includes important fungal pathogens causing a great deal of damage to red pepper. Antagonistic bacteria were isolated from the soil of pepper fields, which were then tested for biocontrol activity against the *Colletotrichum gloeosporioides* anthracnose pathogen of pepper. Based on the 16S rRNA sequence analysis, the isolated bacterial strain CS-52 was identical to *Bacillus* sp. The culture broth of *Bacillus* sp. CS-52 had antifungal activity toward the hyphae and spores of *C. gloeosporioides*. Moreover, the substances with antifungal activity were optimized when *Bacillus* sp. CS-52 was grown aerobically in a medium composed of 0.5% glucose, 0.7% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.3% NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 0.01% MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, and 0.15% yeast extract at 30°C. The inhibition of spore formation resulting from cellulase, siderophores, and indole-3-acetic acid (IAA), were produced at 24 h, 48 h, and 72 h, respectively. *Bacillus* sp. CS-52 also exhibited its potent fungicidal activity against anthracnose in an *in vivo* test, at a level of 70% when compared to chemical fungicides. These results identified substances with antifungal activity produced by *Bacillus* sp. CS-52 for the biological control of major plant pathogens in red pepper. Further studies will investigate the synergistic effect promoting better growth and antifungal activity by the formulation of substances with antifungal activity.

**Keywords:** *Bacillus* sp. CS-52, *Colletotrichum gloeosporioides*, antagonistic microorganism, antifungal activity, red pepper anthracnose

한국에서 고추는 시설재배로 연중 생산되고 있으며, 노지에 서는 5월 중하순부터 재배하여 가을에 수확한다. 최근 매년 전국의 고추 생산량이 감소하고 있는 추세이며, 특히 2007년 이후 재배면적당 생산량이 계속해서 줄어들고 있다. 그 이유는 병해로 인한 수량의 감소로 매년 강수량과 바람 등의 기후 변화에 따라 탄저병과 역병으로 인하여 크게 발병할 경우는 탄저병에 의해 10%-80%, 역병에 의해 100%까지 수량이 감소할 수 있다고 보

고되었다(Badadoost, 2009).

국내에서 고추에 발생하는 병해는 26종이며, 고추의 주요 생산 제한 요인 중 하나인 탄저병은 오래 전부터 알려진 주요 병으로 우리 나라 뿐만 아니라 전 세계적으로 많은 작물에 큰 피해를 주고 있다(Okayama and Tsujimoto, 1994). 고추 탄저병균 간의 분류학적 특성은 분생포자 형태, 강모(Seta), 균총 색깔, 균사생장과 병원성의 특징에 따라 *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. acutatum*, *C. coccodes*, *C. dematium*과 *Glomerella cingulata*로서 모두 5종이 분리 동정되어 국내에서 보고되고 있다(Park and Kim, 1992). 특히, 경북 북부지역에서 발병하는 고추 탄저병균은 *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*과 *C. coccodes*로 3개 종이 보고되었으며, 그 중에

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work.

\*For correspondence. E-mail: gskwon@andong.ac.kr; Tel.: +82-54-820-5909; Fax: +82-54-820-6252

서도 *C. gloeosporioides*가 우점하는 종으로 보고되고 있다(Kwon and Lee, 2002; Im and Lee, 2004). *C. gloeosporioides*는 청고추와 홍고추에 대한 병원성과 분생포자 형태의 배양적 특성에 따라 G와 R계통으로 분리하고 있다. G계통은 청고추와 홍고추에서 탄저병을 일으키고, PDA 배지상에 분생포자를 형성하며, 자낭반과 강모(Seta)는 형성하지 않고, 분생포자는 한쪽 끝이 좁거나 둥글고, 균총의 색깔은 흰색에서 회색빛을 형성한다. 또한, R계통은 붉은 고추에서 병징을 나타내며, PDA 배지에서 분생포자와 자낭반을 형성하고 양끝이 둥글고 무딘 분생포자를 형성하며 균총의 색깔은 회색 내지 어두운 색을 나타낸다고 보고되었다(Farley, 1967; Kim et al., 1986).

현재까지 국내에서 진행된 고추탄저병에 대한 연구는 주로 살균제 및 병원성에 대한 고추의 저항성에 관한 것으로 대부분이 병원균에 대한 길항성을 나타내는 미생물을 이용하여 방제가 확인하는 실정이다. 길항미생물을 이용하는 생물학적 방제는 세포벽을 분해하는 용균작용을 보이는 *Bacillus* sp. (Kim and Kim, 1997; Kim et al., 1997; Woo et al., 2007), *Penicillium* sp. (Imamura et al., 2000), *Pseudomonas* sp. (Jung and Kim, 2004)와 *Streptomyces* sp. (Lee et al., 1990; Jeong et al., 2004) 등이 생산하는 항생물질에 의해 직접 식물병원균의 생육을 저해하는 항생작용과 식물병원균에 기생하면서 식물에 대한 진균의 병원성을 억제하는 기생작용이 있다(Lee et al., 2004). 또한, 생육공간에서 영양분과 같은 생육에 필요한 인자를 경쟁함으로써 병원균의 생육 및 증식을 억제하는 경쟁적 길항작용(Scher and Baker, 1982; Neilands, 1984; Paulitz and Loper, 1991; Ping and Boland, 2004; Jung et al., 2006)과 미생물이 생산하는 exopolysaccharide (EPS), lipopolysaccharide (LPS), salicylic acid (SA), hydrogen cyanide (HCN), 2,3-butanediol 등의 물질들에 의해서 식물의 면역기능을 활성화하여 병에 대한 저항성을 유도하는 유도저항성 작용 등을 들 수 있다(Liu et al., 1995; Lee, 1997; Ping and Boland, 2004). 이와 같이 토양 내 미생물들의 상호작용에 의한 생물학적 방제 기작을 활용하여 현재까지 종합적 방제법의 일환으로 활발히 연구가 수행되어 오고 있다(Cook, 1990; Lee et al., 1990, 1999; Handelsman and Stabb, 1996).

본 연구에서는 경북 북부 청송지역에서 발생빈도가 높은 고추탄저병 균주 중 *C. gloeosporioides*에 대하여 강한 항진균 활성을 나타내는 균주를 분리하여, 길항균주가 생산하는 항진균 물질의 생산조건을 검토하고 고추탄저병을 방제할 수 있는 미생물제제의 개발을 위한 가능성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 길항균주의 분리 및 선발

다양한 고추재배 지역으로부터 채취한 토양 균원 시료로부터 10 g을 멸균수 90 ml에 넣어 30°C에서 24시간 진탕배양 후 LB (Luria Bertani, Difco, USA) agar 배지에 단계희석법으로 도말하여 30°C에서 3일간 배양한 후 증식한 균주들을 선별 분리하였다. 선별 분리된 균주들을 순수 분리한 후, 1차 스크리닝으로 고추탄저병을 방제할 수 있는 균주를 선발하기 위해 PDA (Potato Dextrose Agar, Difco) plate에서 대치배양을 하여, *C. gloeosporioides*

의 생육을 저해하는 균주들을 일차적으로 선발하였다. 고추 탄저병 병원균인 *C. gloeosporioides*는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업유전자원센터(Korea Agricultural Culture Collection, KACC)로부터 *C. gloeosporioides* KACC 40003 분양 받아 사용하였다.

1차 선별된 균주로부터 고추탄저병 저해 활성이 우수한 균주를 선발하기 위해 LB 액체 배지에 선발 균주를 접종한 뒤 48시간, 30°C에 진탕배양 한 후, 배양액을 8,000 rpm, 15분간 원심분리하여, 배양상등액을 이용하여 paper disc diffusion 방법으로 항진균 활성을 보이는 균주 중 활성이 우수한 균주를 최종적으로 분리하여 본 연구에 사용하였다.

### 길항세균 배양학적 특성 및 생장 특성

최종 선별된 길항균의 배양시간에 따른 생장 및 항진균 활성물질의 생산특성을 조사하기 위하여 Davis 최소배지[0.5% glucose, 0.7% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.01% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.01% yeast extract]에 균주를 접종하고 30°C, 120 rpm으로 진탕배양하여 생육활성은 600 nm에서 흡광도를 측정하여 균주의 배양학적 특성을 조사하였다.

### 길항세균의 동정

최종 선별된 항진균 활성을 나타내는 균주의 정확한 분류학적 동정을 위하여 주사전자현미경 검경을 통해 형태학적인 특성과 16S rRNA 유전자 염기서열을 통하여 계통 분류를 확인하였다.

### 길항세균의 항진균성 활성물질의 생산

길항균이 생산하는 항진균성 활성물질에 의한 고추 탄저병균 생육의 길항정도를 측정하기 위해 먼저 길항세균을 Davis 최소배지에 30°C에서 2일간 전 배양한 후 8,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후, paper disc diffusion method를 이용하여 1×10<sup>6</sup> conidium/ml로 *C. gloeosporioides*가 접종되어진 PDA plate에 상등액 100 μl를 점적한 paper disc (Ø8 mm)를 올려, 28°C에서 5일간 배양하여 항진균 활성을 조사하였다.

### 항진균성 활성물질 생산에 대한 탄소원, 질소원 및 무기염류의 영향

탄소원의 첨가에 따른 항진균성 활성물질의 생산에 대한 영향을 조사하기 위하여 Davis 최소배지에 탄소원으로 glucose를 제외시키고 7종의 탄소원인 mannose, glucose, fructose, sucrose, lactose, maltose와 starch를 각각 0.5%씩 첨가하여 탄소원에 따르는 최적화를 통해 항진균활성을 조사하였다. 또한 최적배지 조성 선택에 있어 항진균활성이 가장 우수한 탄소원을 선택하여 0.5%, 1.0%, 1.5%와 2.0%를 각각 첨가하여 항진균활성이 가장 높은 탄소원 농도를 선정하여 최적배지의 조성 농도로 설정하였다.

질소원에 따르는 최적화를 위해 Davis 최소배지에서 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 제외시키고, 13종의 질소원인 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, NaNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, peptone, tryptone, malt extract, soytone, yeast extract, casamino acid를 각각 0.1% 첨가하여 항진균활성을 조사하였다. 최적배지 조성 선택에 있어 항진

활성이 가장 우수한 질소원을 선택하여 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%와 0.5%를 각각 첨가하여 항균활성이 가장 높은 질소원 농도를 선정하여 최적배지의 조성 농도로 설정하였다.

무기염의 경우  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 제외시키고  $CoCl_2$ ,  $FeCl_2$ ,  $CaCl_2$ ,  $MgSO_4$ ,  $MnSO_4$ ,  $KCl$ 를 각각 0.01% 첨가하여 각각에 대한 항진균성 활성물질 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 또한 최적배지 조건 선택에 있어 항균활성이 가장 우수한 무기염을 선택하여 0.01%, 0.05%, 0.10%, 0.15%와 0.2%를 각각 첨가하여 항균활성이 가장 높은 무기염 농도를 선정하여 최적배지의 조성 농도로 설정하였다.

항진균 활성은 선발된 균을 각각의 배지 조건에서 30°C, 3일간 120 rpm으로 진탕배양하여 배양액을 8,000 rpm에서 15분간 원심 분리한 후 상등액을 이용하여 항진균 활성능을 조사하였다.

#### 길항세균 배양액의 pH 및 온도에 대한 안정성

최종 선발된 길항세균 배양액의 pH에 대한 안정성은 최적화된 배지에 분리 균주를 1% (v/v) 접종한 후, 30°C에서 2일간 120 rpm으로 진탕 배양하여 상등액을 pH 3, 5, 7, 9 그리고 11로 조정하여 pH 변화에 따른 항진균 활성을 조사하였다.

온도에 대한 안정성은 상등액을 온도 -20, -4, 0, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 70 그리고 90°C에서 15분 동안 처리하고, 110과 121°C에서 15분간 고압 열처리하여 각각의 온도에 따른 안정성을 조사하였다.

#### 탄저병균에 대한 포자발아 저해능

길항균주의 탄저병원균에 대한 포자발아저해능을 조사하기 위하여 *C. gloeosporioides* 포자현탁액 ( $1 \times 10^6$  conidium/ml)과 길항균주 배양 상등액을 50배 희석하여 1:1의 비율(최종 100배 희석)로 96-well plate에 함께 분주한 후 24시간 동안 배양한 다음 배양된 병원균의 생장 정도를 흡광도(660 nm)로 측정하였으며, 저해율은 다음과 같이 나타내었다(Wedge *et al.*, 2001).

$$\text{저해율}(\%) = [100 - (\text{처리구 흡광도}/\text{대조구 흡광도})] \times 100$$

#### 항진균활성 물질인 siderophore, cellulase와 indole-3-acetic acid (IAA) 생성능

길항균주의 siderophore의 생산여부 측정은 CAS (chrome azurol S) blue agar plate assay에 의하여 측정하였다. 길항균주를 접종하고 30°C에서 3일간 배양하면서, 시간변화에 따라 나타나는 colony 주위에 orange halo zone의 생성으로 조사하였다. 생산된 siderophore의 측정은 CAS liquid assay에 의하여 배양된 길항균주 상등액에 CAS assay solution를 첨가하여 흡광도 630 nm에서 측정하여 siderophore의 활성을 조사하였다(Schwyn and Neilands, 1987; Crosa, 1989; Bergeron and McManis, 1991).

Cellulase의 생산능 측정은 1% CMC (Carboxymethyl cellulose, Junsei, Japen)를 첨가한 배지에 길항균주를 접종 배양한 후 이를 이용하여 DNS 방법으로 조사하였다(Miller, 1959).

대표적인 식물생장 호르몬인 IAA의 생성능은 Tang과 Bonner 방법(1947)에 의해 확인하였고, IAA의 생산량을 알아보기 위해

IAA의 전구물질인 L-tryptophan을 0.1% 첨가한 최소배지에 선발된 균주를 접종하고 30°C에서 3일간 배양하였다. 배양시간에 따라 생성되는 IAA를 조사하기 위해, 배양액을 8,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 salkowski reagent (5% perchoric acid 100 ml, 0.05 M ferric chloride 2 ml)와 혼합하여 30분간 반응시킨 후 반응액의 색상이 분홍색으로 전환된 것을 IAA 생성 능이 있는 것으로 결정하였다.

#### 길항세균의 탄저병에 대한 기내 항진균 실험

길항세균의 고추 과실에 대한 항진균활성을 검증하기 위해 습실용기를 만들어 기내검정을 실시하였다. 직접 제작한 습실용기 (28 cm × 23 cm × 9 cm)에 고추 과실을 처리구별로 용기에 각각 10개씩(청고추 5개, 홍고추 5개) 담고, 고추 탄저병 포자 현탁액( $3.4 \times 10^5$  conidium/ml)을 고추 과실에 가는 바늘을 이용해 상처 접종으로 처리하였다. 고추 표면의 물기가 마른 다음 젤라틴 1.5%의 희석수가 첨가된 길항세균 배양액을 100배 희석하여 각각의 시료에 스프레이 후 뚜껑을 닫고, 25°C 항온기에서 6일간 관찰한 후 병반 유무를 확인하여 나타나지 않는 열매의 수를 방제가로 산출하였다.

$$\text{병발병 억제력}(\%) = \frac{[(\text{길항미생물 무처리구 발병률} - \text{길항미생물 처리구 발병률}) / \text{길항미생물 무처리구 발병률}] \times 100$$

## 결과 및 고찰

#### 길항균주의 분리 및 선발

고추탄저병에 대해 강한 항진균활성을 갖는 길항세균을 분리 및 선발을 위해 총 100여 점의 토양시료로부터 균주를 분리하였고, 분리 균주 중 항진균 활성을 조사하여 1차적으로 5종의 균주를 선발하였다. 선발된 5종(#31, #43, #52, #61, #72) 모두 탄저병에 대하여 높은 항진균 활성을 각각 8.8 mm, 7.4 mm, 9.7 mm, 4.4 mm와 7.1 mm로 각각 나타났으며, 이들 중 항진균력이 가장 높게 나타난 #52을 최종 선발하여 CS-52로 명명 후 실험에 사용하였다.

#### 길항세균의 동정

최종 선발된 길항세균의 동정을 위하여 분리 균주인 CS-52을 LB배지를 이용하여 30°C에서 순수 배양한 후 생화학적 특성을 조사한 결과 내생포자를 형성하는 Gram-positive로 세포크기는 2.5-3.0 × 1.5 μm으로 짧은 간균으로 조사되었다. 16S rRNA 유전자염기서열을 이용한 동정 결과 1,382 bp의 염기서열을 얻어 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 BLAST를 이용하여 유전자 상동성 검색한 결과를 기반으로 *Bacillus* sp. 와 99%의 유연관계를 보여 *Bacillus* sp. CS-52로 명명하였으며 다른 균주들과의 유연관계를 Fig. 1에 나타내었다.

#### 항진균 활성물질의 생산을 위한 영향 및 최적조건

*Bacillus* sp. CS-52가 생산하는 항진균 물질의 생산에 미치는 탄소원의 영향은 Table 1과 같다. 7종의 탄소원 중에서 glucose를

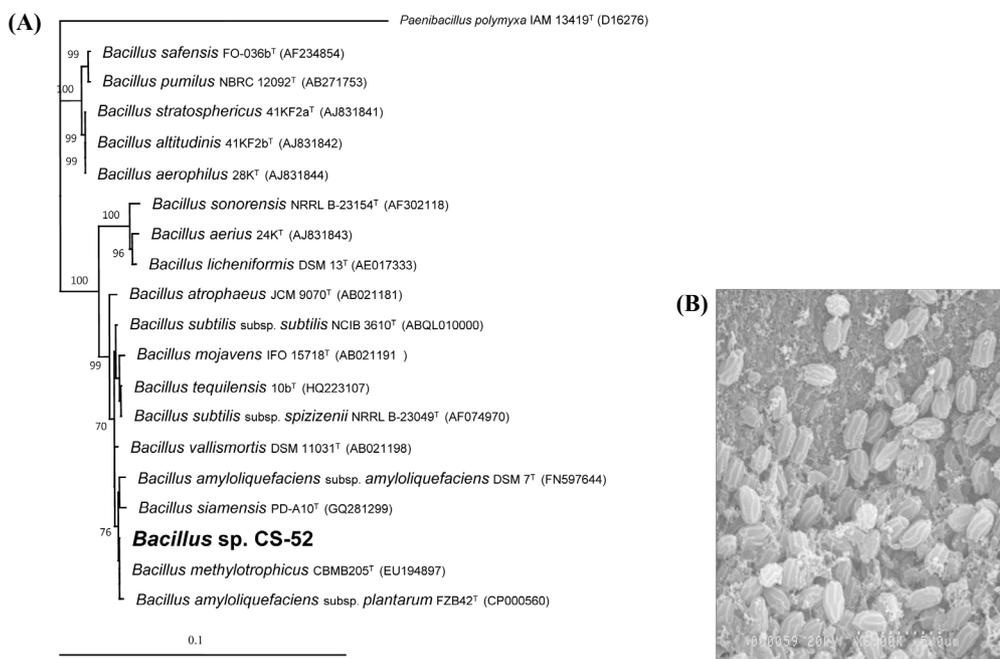
**Table 1.** Effects of various sources, nitrogen sources and mineral salt sources on the antifungal activities from *Bacillus* sp. CS-52

Carbon sources	Antifungal activity (Ø mm)	Nitrogen sources	Antifungal activity (Ø mm)	Salt sources	Antifungal activity (Ø mm)
Control	0	Control	0	Control	0
Maltose	6.7	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4.8	CoCl <sub>2</sub>	1.6
Mannose	6.4	KNO <sub>3</sub>	5.24	FeCl <sub>2</sub>	8.7
Lactose	6.2	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5.2	CaCl <sub>2</sub>	8
Glucose	7.85	NaNO <sub>3</sub>	5.15	KCl	9.5
Sucrose	6.5	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	7.7	MgSO <sub>4</sub>	10.2
Fructose	7.5	NH <sub>4</sub> Cl	5.8	MnSO <sub>4</sub>	12
Starch	5.4	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	5.2		
		Yeast extract	9.8		
		Peptone	7.5		
		Tryptone	5.9		
		Soytone	7.49		
		Malt extract	6.0		
		Casamino acid	6.19		

첨가하였을 때 가장 양호한 항진균 활성을 나타냈으며, 전반적으로 탄소원에 대해서는 항진균 활성이 큰 차이가 없는 것으로 조사되었다. 그러나 항생물질 생산성과 경제성을 고려한다면 대량배양 시 최적 탄소원으로 7.85 mm의 항진균 활성을 보인 glucose를 최적 탄소원으로 사용하는 것이 적합할 것으로 보인다. 최적배지 조성을 위한 Glucose의 0.5%, 1%, 1.5%와 2%에서 각각 배양한 결과 0.5%에서 8.4 mm로 가장 높은 활성을 보였으며,

1%, 1.5%와 2% glucose농도에서는 7.84 mm, 8.25 mm와 8.15 mm로 각각 조사 되었다. 또한 Kim 등(1997)도 항진균 활성 물질의 생산성이 glucose에서 가장 우수하다고 보고하였다.

Davis 최소배지를 기본으로 하여 질소원의 영향에 따른 항진균 활성을 조사한 결과 Table 1과 같았다. 다양한 질소원에서 생육활성 및 항진균 활성을 보였으나, 특히 유기질소원에서 의존적인 생육활성과 항진균 활성을 보이는 것으로 조사되었다. 무기



**Fig. 1.** (A) Neighbor-joining tree based on almost-complete 16S rRNA gene sequences, showing phylogenetic relationships between strain CS-52 and species from *Bacillus* genus. Numbers at nodes indicate levels of bootstrap support (%) based on 1,000 resampled datasets; only values above 70% are given. Bar, 0.1 substitutions per nucleotide position. (B) Scanning electron microscopic photograph of strain CS-52 ( $\times 6,000$ ).

질소원에서는 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>를 첨가 하였을 때 항균활성이 7.7 mm로 나타났으며, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>의 최적배지조성에 따르는 농도에 조사한 결과 항진균활성이 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%와 0.5%에서 각각 7.7 mm, 7.8 mm, 9.0 mm, 7.8 mm와 6.0 mm로 각각 조사되어 0.3% 첨가 시 가장 높은 항진균 활성을 보이는 것으로 조사되었다.

Davis 최소배지에서 유기질소원을 yeast extract 0.01% 첨가 시 9.8 mm로 가장 높은 항진균 활성을 나타내었다. 최적배지농도 조성을 위해 yeast extract의 첨가 농도에 따라 조사한 결과 0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.15%와 0.2%에서 6.0 mm, 8.2 mm, 9.0 mm, 11.8 mm와 11.0 mm로 각각 조사되어 yeast extract 0.15%를 최적배지의 유기질소원 농도로 설정하였다. 일반적으로 길항세균의 성장과 항진균 활성물질 생산능이 무기질소원보다 유기질소원에서 높게 나타나는 결과는 *Bacillus* sp.이 생산하는 항생물질의 다른 보고들과 유사한 결과이다(Kim *et al.*, 1997; Jeong *et al.*, 2002).

무기염에 대한 항진균 활성 물질의 생산성을 조사한 결과 *Bacillus* sp. CS-52은 Table 1에서와 같이 MnSO<sub>4</sub>를 첨가하여 배양하였을 때 항진균 억제활성이 12 mm로 가장 높게 나타났다. 그 외 FeCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, KCl과 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O에서도 각각 높은

항진균력을 보였으며, 이러한 결과로 보아 *Bacillus* sp. CS-52을 미생물 제제화하여 현장에 이용한다면 이미 토양에 잔재하고 있는 비료 성분을 이용하여 높은 항진균 물질을 생산하여 병해 방제 효과가 있을 것으로 사료된다. 이러한 결과는 Jeong와 Kim (2003)의 보고에서 KCl, MgCl<sub>2</sub>, NaCl, BaCl<sub>2</sub> 첨가시 항진균물질의 생산이 양호하다는 결과와 유사한 것으로 보인다.

**최적배지 조건에서 *Bacillus* sp. CS-52의 항진균 활성**

*Bacillus* sp. CS-52 균주가 생산하는 항진균물질의 최적 배지 조성은 0.5% glucose, 0.7% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.3% NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 0.01% MnSO<sub>4</sub>와 0.15% yeast extract로 각각 조사되었다. 이러한 최적배지 조건에서 최적 pH와 최적 온도 그리고 배양시간에 따른 성장 및 항진균 활성물질의 생산특성을 조사한 결과 Fig. 2와 같이 18-24시간 사이에 정체를 보이는 것으로 나타났으나, 시간이 지남에 따라 2차 증식을 보였으며 배양 36시간에 가장 높은 OD<sub>600</sub> 값 1.5로 조사되었으며, 최대 항진균활성은 지속적으로 증가하다 배양시간 60시간에 13.3 mm로 최대치를 보이다 감소하는 것으로 조사되었다. 이러한 결과로 보아 *Bacillus* sp. CS-52은 대수성장기를 지나 생산되는 2차 대사산물에 의해 항진균 활성을 나타냄을 추정할 수 있다. 이러한 결과는 Hwang과 Kim (1995)에 의해 보고된 결과와 유사하게 나타났으며, 항진균성 활성을 나타내는 길항 세균은 주로 2차 대사산물을 산출함으로써 활성을 나타냄을 추정 할 수 있다(Suzi, 1992).

***Bacillus* sp. CS-52 균주 배양액의 pH 및 온도에 대한 안정성**

항진균 활성을 보이는 *Bacillus* sp. CS-52 배양액의 pH에 대한 안정성에 대한 실험 결과 Fig. 3에서와 같이 배양액이 고추 탄저병에 대한 억제력이 pH 3-11까지 넓은 범위에서 나타났다. 이러한 결과는 우리나라 토양의 특성인 산성에서 보다 더 안정한 균주로 항진균 활성을 유지 할 수 있을 것으로 사료된다. 또한 *Bacillus* sp. CS-52 배양액의 온도에 대한 안정성을 조사한 결과 Fig. 3에서 같이 30℃에서도 가장 높은 안정성을 보였으며, 저온과 고온의 넓은 범위에서도 매우 안정적으로 조사되었으며, 특히 고압 열처리한 배양액에서도 항균활성을 보였다. Naclerio 등(1993)의 보고

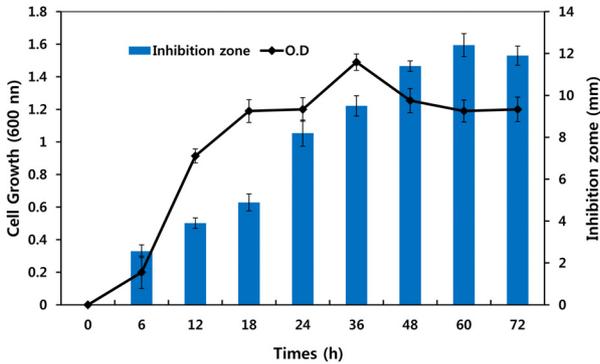


Fig. 2. Antifungal activity of *Bacillus* sp. CS-52 culture broth against *C. gloeosporioides* according to cultivation time. Data are expressed as means ± SE, n=3.

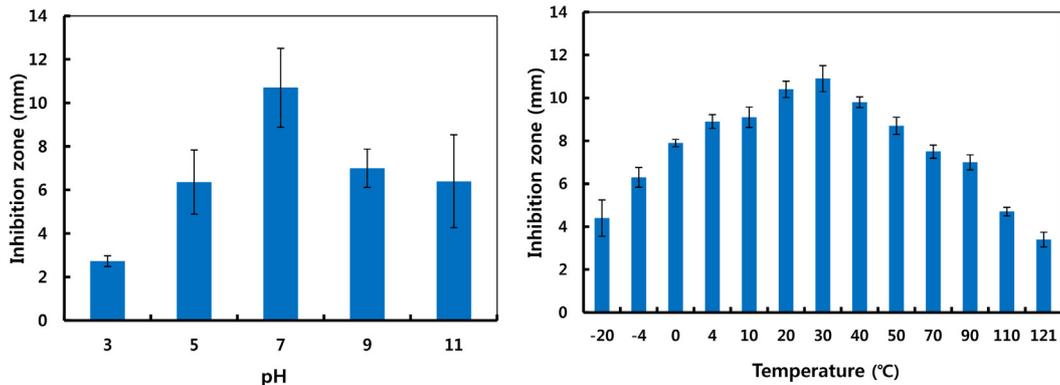
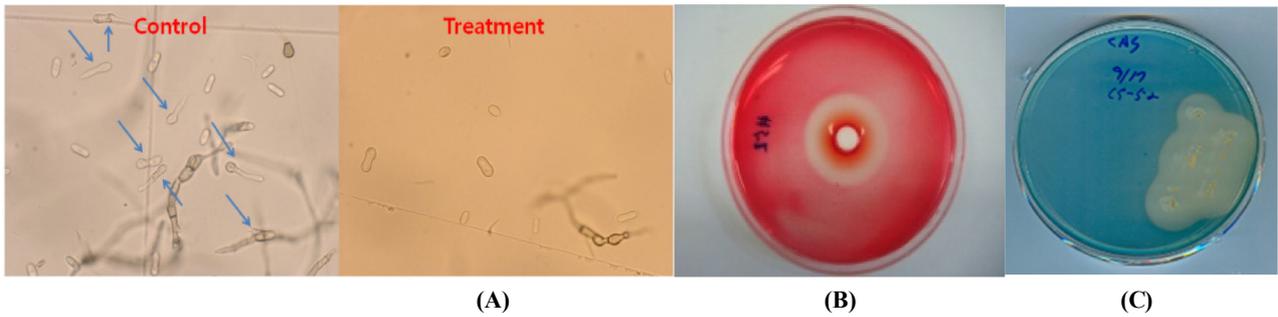


Fig. 3. Effects of *Bacillus* sp. CS-52 culture broth on antifungal activity in various range of pH and temperatures showing stability of the activity. Data are expressed as means ± SE, n=3.



**Fig. 4.** *Bacillus* sp. CS-52 culture broth of fungal spore germination inhibition activity, and production of siderophore and cellulase [Arrows: *C. gloeosporioides* spore, (A) Spore germination inhibition activity, (B) Confirmation of orange halo zone by *Bacillus* sp. CS-52 in selection media of CAS blue agar, (C) Confirmation of halo zone by congo-red staining of LB agar plates containing carboxymethyl-cellulose (CMC)].

에 의하면 *Bacillus cereus*에서 생산된 cerein의 경우 pH 3.0에서 12.0까지 넓은 범위에서 안정하다고 보고된 바 있다. 이러한 결과로 보아 *Bacillus* sp. CS-52 배양액을 토양에 살포하였을 때 여름철과 겨울철 온도 변화에 따라 토양 내에서도 안정적으로 사료되어 현장에서 고추 탄저병 방제효과가 우수할 것으로 사료된다.

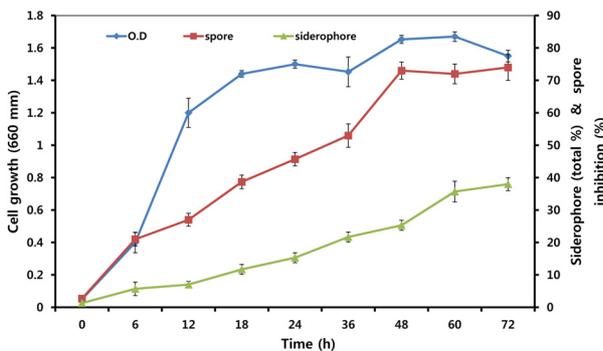
**탄저병균에 대한 포자발아 저해 및 항진균활성 물질 siderophore, cellulase 와 indole-3-acetic acid (IAA) 생성능**

길항세균 *Bacillus* sp. CS-52가 생산하는 항진균 활성물질이 고추 탄저병원균의 포자 발아 억제능 조사결과, Fig. 4A와 5에서와 같이 최대 생육기 48시간 이후 탄저병원균인 *C. gloeosporioides*에 대한 포자 발아 억제율 72%로 가장 높게 나타났으며, 최종 배양시간 까지 높은 활성을 유지하였다. 또한 *Bacillus* sp. CS-52가 CAS agar plate에서 orange halo zone을 형성하여 siderophore 생산 균주임을 확인하였다(Fig. 4B). 이러한 물질은 철 이온 특이 결합물질로서 식물병원균의 생육을 저해하는 경쟁적 길항작용을 함과 동시에 식물이 이용할 수 없는 철을 가용화 시켜 식물

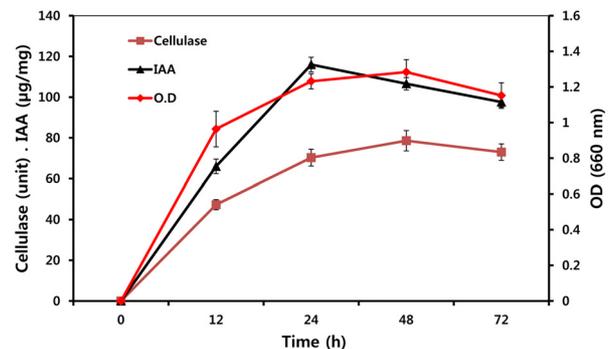
성장에 도움이 된다. *Bacillus* sp. CS-52가 생산하는 siderophore의 총 생산량을 조사결과 Fig. 5에서와 같이 최종배양 72시간까지 지속적으로 증가되는 것으로 조사되었다. *Bacillus* sp. CS-52가 높은 항진균 활성을 나타내기 위해서는 길항물질과 더불어 siderophore를 최대 생산 할 수 있는 조건에 대해 조사가 필요할 것으로 사료된다.

항진균 활성 효소 물질을 조사하기 위하여 CMC가 첨가된 plate에 *Bacillus* sp. CS-52를 4일간 배양 후, congo red 시약을 스프레이하여 반응 후 투명환을 조사한 결과 *Bacillus* sp. CS-52 주위에 넓게 형성된 투명환을 통해 cellulase의 생산을 확인하였다(Fig. 4C). 보다 더 정확한 cellulase의 생산량을 알아보기 위해 배양액을 12시간 간격으로 채취한 뒤 DNS환원법으로 측정된 결과 Fig. 6에서와 같이 *Bacillus* sp. CS-52의 성장에 따라 cellulase가 생성됨을 알 수 있었다. 이러한 결과는 고추 탄저병 뿐 만 아니라, 세포막이 cellulose와  $\beta$ -glucan으로 구성된 고추 역병에 대해서도 우수한 방제 효과가 있을 것으로 사료된다.

*Bacillus* sp. CS-52 균주 배양액의 식물생장 촉진물질의 생산을 조사한 결과 Fig. 6에서와 같이 배양시간 24시간 일 때 187  $\mu$ g/mg IAA를 생산하는 것으로 나타났으며, *Bacillus* sp. CS-52 균주는 고추 탄저병원균에 대하여 항진 활성이 우수하고 식물 뿌리의 신장 등 작물의 생육을 촉진하는 PGPR (plant growth promoting



**Fig. 5.** Production of siderophore and inhibition of spore germination by *Bacillus* sp. CS-52 according to cultivation time. Data are expressed as means  $\pm$  SE, n=3. (Siderophore units: For A630 measurement, use the minimal medium as a blank, and use the minimal medium plus CAS assay solution as reference. The sample should have a lower reading than the reference. Siderophore units are defined as  $[(Ar - As)/Ar] \times 100 = \% \text{ siderophore units}$ . Ar, Absorbance of the CAS solution plus the medium; As, Absorbance of the CAS solution plus the culture supernatant of the respective sample).



**Fig. 6.** Production of cellulase and IAA by *Bacillus* sp. CS-52 according to cultivation time. Data are expressed as means  $\pm$  SE, n=3 (Cellulase unit: One unit of cellulase defined as the amount of enzyme releasing 1  $\mu$ mol of reducing sugar per min).

**Table 2.** Disease control effect by *Bacillus* sp. CS-52 against *C. gloeosporioides* on red pepper at wetting treatment chamber

Treatment	Dilution	Disease rate (%)	Note
A		0	
B	X100	100	Contamination test chamber
C		30	
D	X1,000	50	

A, Water treatment control

B, Positive control, *C. gloeosporioides* treatmentC, *Bacillus* sp. CS-52 culture broth with *C. gloeosporioides* treatmentD, Pesticide (ace<sup>®</sup>) with *C. gloeosporioides* treatment

rhizobacterium) 균주로 식물생장 촉진형 생물방제제로서의 활용이 가능할 것으로 사료된다.

#### *Bacillus* sp. CS-52의 탄저병에 대한 기내 항진균 활성

처리구별 습실 용기를 확인 해 본 결과 Fig. 7에서 물만 처리한 처리구에서는 청고추, 홍고추 모두가 표면이 깨끗하게 병반이 이병된 흔적을 찾아 볼 수 없었으며, 반면 고추 탄저균 처리구에서는 모두가 고추표면에 이병되었음을 관찰하였다. 길항미생물과 탄저병원균 처리구에서는 청고추에서 3개가 이병되었으며, 화학농약과 탄저병원균 처리구에서는 홍고추 1개와 청고추

4개가 이병된 것으로 나타났다. 또한 양성대조구인 화학농약 처리구의 방제가는 50%로 조사되었으며, *Bacillus* sp. CS-52 배양액 처리구에서 70%로 화학농약 처리구 보다 높게 나타났다 (Table 2). 습실용기 내에서 탄저균에 대한 실험은 항온기 내에서 온도 및 습실용기 내에서의 습도 유지가 병원균의 이병조건에 알맞은 환경을 제공 되었으므로 탄저균의 활동성이 활발해져 탄저균 실험에서 다소 방제력이 차이가 있었다고 판단된다. 탄저병 실험에서 방제능력은 70% 정도로 검정되었으며 이는 고추 탄저병원균에 대한 미생물제제로서의 산업적 연구·개발 가치가 높은 친환경 농자재로 활용 가능한 미생물자원이라 보인다.

최근 기후 변화로 인하여 작물병해를 일으키는 병원균의 변화와 이를 제어하기 위한 다양한 화학농약 및 생물농약이 지속적으로 많은 연구자들에 의해 보고·개발 되어왔다. 하지만 친환경농자재 또는 생물농약의 경우 산업화와 현장적용을 위한 균주의 대량생산을 위한 최적 배지 조성의 완성을 통해 업체나 지역 농업기술센터에서 쉽게 배양하여 사용하는 것이 중요하다. 본 연구에서 분리된 *Bacillus* sp. CS-52 균주를 다양한 탄소원, 질소원과 무기염의 종류에 따라 배지조성의 최적 농도를 확립하여 항진균활성을 조사하고, 이를 기반으로 지속적 살포를 통한 현장에 적용이 가능성을 보이니 향후 탄저병원균의 종류에 따른 연구가 필요할 것으로 사료된다.



**Fig. 7.** Biological control effect by *Bacillus* sp. CS-52 culture broth against *C. gloeosporioides* on red pepper at wetting treatment chamber [Anthracnose disease was observed by *C. gloeosporioides* at 6 days, 25°C after inoculation. Arrows: Susceptible reaction of *C. gloeosporioides*. (A) Negative control, water treatment, (B) Positive control, *C. gloeosporioides* treatment, (C) *Bacillus* sp. CS-52 broth with *C. gloeosporioides* treatment, (D) Pesticide(ace<sup>®</sup>) with *C. gloeosporioides* treatment]. Typical symptoms were developed on accessions of *Capsicum* spp. by pin-prick wound inoculation.

## 적요

본 연구에서는 고추재배 지역의 오염지 토양으로부터 탄저병 원균인 *Colletotrichum gloeosporioides*에 대하여 항진균 활성이 우수한 균주를 분리하였다. 분리 균주의 생화학적 특성을 조사한 결과 내생포자를 형성하는 Gram-positive이며, 세포크기는  $2.5 \sim 3.0 \times 1.5 \mu\text{m}$ 으로 짧은 간균으로 siderophore, cellulase와 IAA (Indole-3-acetic acid)을 생산하였다. 16S rRNA 유전자염기서열 분석 결과 *Bacillus* sp.와 99%의 상동성을 나타내어 *Bacillus* sp. CS-52로 명명하였다. *Bacillus* sp. CS-52의 항진균 활성 물질을 생산하기 위한 배양 최적 조건은 0.5% glucose, 0.7%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.2%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.3%  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 0.01%  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.15% yeast extract, pH 7과  $30^\circ\text{C}$ 로 조사되었으며, 최적화된 배양 조건에서 36시간에 최대 성장을 보이며, 고추 탄저병원균에 대하여 60시간 배양조건에서 가장 높은 13.3 mm의 항진균 활성을 보였다. 포자발아억제력은 48시간에 가장 높은 억제력이 보였고, siderophore는 최종배양시간 72시간까지 생성됨을 확인하였다. 식물생장조절물질 IAA와 활성효소인 cellulase의 경우 배양시간 24시간에 최대 생성됨을 확인하였으며, *C. gloeosporioides*에 대한 실내에서의 항진균활성 검증결과 화학농약 보다 더 높은 70%의 방제가를 나타내었다. 향후 *Bacillus* sp. CS-52 균주와 배양액을 이용하여 생물학적 친환경방제제로의 제품화가 가능할 것으로 사료된다.

## 감사의 말

본 연구는 농림축산식품부 생명산업기술개발(112004-3)에 의해 이루어진 것이며, 이에 감사드립니다.

## References

- Babadoost, M. 2009. *Phytophthora blight (Phytophthora capsici)* of pepper and its management. The 2009 KSPP Fall Meeting and the 1<sup>st</sup> Japan-Korea Joint Symposium.
- Bergeron, R.J. and McManis, J.S. 1991. Synthesis of catecholamide and hydroxamate siderophore. In Winkelmann, G. (eds.), CRC Handbook of Microbial Iron Chelates, pp. 271-307. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Cook, R.J. 1990. Twenty-five years of progress towards biological. pp. 1-4. In Hornby, D. (eds.), Biological control of soil-borne plant pathogens, CAB International, Wallingford, UK.
- Crosa, J.H. 1989. Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria. *Micorbiol. Rev.* **53**, 517-530.
- Farley, J.D. 1967. Survival of *Collectotrichum coccodes* in soil. *Phytopathology* **66**, 640-641.
- Handelsman, J. and Stabb, E.V. 1996. Biocontrol of soilborne plant pathogens. *Plant Cell.* **8**, 1855-1869.
- Hwang, B.K. and Kim, C.H. 1995. Phytophthora blight of pepper and its control in Korea. *Plant Dis.* **79**, 221-227.
- Im, J.H. and Lee, D.G. 2004. Red pepper anthracnose : *Colletotrichum gloeosporioides*, its cultural variations and pathogenicity. *Res Plant Dis.* **10**, 203-208.
- Imamura, N., Ishikawa, T., Ohtuka, T., Yamamoto, K., Dekura, M., Fukami, H., and Nishida, R. 2000. An antibiotic from *Penicillium* sp. covering the cocoon of the leaf-rolling moth, dactyloglyphattonica. *Biosci. Biochem.* **64**, 2216-2217.
- Jeong, H.G. and Kim, S.D. 2003. Purification and characterization of an antifungal antibiotic from *Bacillus megaterium* KL 39, a biocontrol agent of red-papper phytophthora blight disease. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 21-25.
- Jeong, D.H., Park, K.D., Kim, S.H., Kim, K.R., Choi, S.W., Kim, J.T., Choi, K.H., and Kim, J.H. 2004. Identification of *Streptomyces* sp. producing antibiotics against phytopathogenic fungi and its structure. *J. Microbiol. Biotechnol.* **14**, 212-215.
- Jeong, Y.K., Shin, M.J., Joo, W.H., and Choi, J.S. 2002. Structural analysis of the antifungal antibiotic from *Bacillus* sp. YJ-63. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 21-25.
- Jung, H.K. and Kim, S.D. 2004. Selection and antagonistic mechanism of *Pseudomonas fluorescens* 4059 against phytophthora blight disease. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **32**, 312-316.
- Jung, H.K., Kim, J.R., Woo, S.M., and Kim, S.D. 2006. An auxin producing plant growth promoting rhizobacterium *Bacillus subtilis* AH18 which has siderophore-producing biocontrol activity. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 396-402.
- Kim, W.G., Cho, E.K., and Lee, E.J. 1986. Two strains of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. causing anthracnose on pepper fruits. *Korean J. Plant Pathol.* **2**, 107-113.
- Kim, K.Y. and Kim, S.D. 1997. Biological control of *Pyricularia aryzae* blast spot with the antibiotic substances produced by *Bacillus* sp. KL-3. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 396-402.
- Kim, Y.S., Son, J.K., Moon, D.C., and Kim, S.D. 1997. Isolation and structure determination of antifungal antibiotics from *Bacillus subtilis* YB-70. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 62-67.
- Kwon, C.S. and Lee, S.G. 2002. Occurrence and ecological characteristics of red pepper anthracnose. *Res. Plant Dis.* **8**, 120-123.
- Lee, M.W. 1997. Root colonization by beneficial *Pseudomonas* spp. and bioassay of suppression of *Fusarium wilt* of radish. *Kor. J. Mycol.* **25**, 10-20.
- Lee, Y.S., Choi, J.W., Kim, S.D., and Baik, H.S. 1999. Isolation of antagonistic bacteria to *Phytophthora capsici* for biological control of phytophthora blight of Red Pepper. *Kor. J. Life Science* **9**, 1-7.
- Lee, I.K., Kim, C.J., Kim, S.D., and Yoo, I.D. 1990. Antifungal antibiotic against fruit rot disease of red pepper form *Streptomyces parvullus*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 142-147.
- Lee, S.Y., Lee, S.B., Kim, Y.K., and Kim, H.G. 2004. Effect of agrochemicals on mycelial growth and spore germination of a hyperparasite, *Ampelomyces quisqualis* 94013 for controlling cucumber powdery mildew. *Kor. J. Pesti. Sci.* **8**, 71-78.
- Liu, L., Kloepper, J.W., and Tuzun, S. 1995. Induction of systemic resistance in cucumber by plant producing plant growth promoting rhizobacteria: duration of protection and effect of host resistance on protection and root colonization. *Phytopathology* **85**, 1064-1068.
- Miller, G.L. 1959. Use of the dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* **31**, 426-428.
- Naclerio, G., Ricca, E., Sacco, M., and de Felice, M. 1993. Antimicrobial activity of a newly identified bacteriocin of *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 4314-4316.
- Neilands, J.B. 1984. Siderophores of bacteria and fungi. *Microbiol. Sci.* **1**, 9-14.
- Okayama, K. and Tsujimoto, A. 1994. Occurrence of strawberry anthracnose caused by *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spaulding et Schrenk and pathogenicity of the fungus. *Ann. Phytopath. Soc.* **60**, 617-623.

- Park, K.S. and Kim, C.H.** 1992. Identification, distribution and etiological characteristics of anthracnose fungi of red pepper in Korea. *Korean J. Plant Pathol.* **8**, 61-69.
- 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.
- Ping, L. and Boland, W.** 2004. Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* **9**, 263-266.
- Scher, F.M. and Baker, R.** 1982. Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium wilt* pathogens. *Phytopathology* **72**, 1567-1573.
- Schwyn, B. and Neilands, J.B.** 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* **160**, 47-56.
- Suzi, T.** 1992. Biological control of soil borne disease with antagonistic microbes. Prov. '92 agric BioTech Symp. On New Bio Pesticides. 55-76.
- Tang, Y.W. and Bonner, J.** 1947. The enzymatic inactivation of indole acetic acid I. Some characteristics of the enzyme contained in pea seedlings. *Arch. Biochem.* **13**, 17-25.
- Wedge, D.E., Curry, K.J., Boudreaux, J., Pace, P., and Smith, B.J.** 2001. A microtiter assay demonstrates sensitivity and resistance profiles for *Botrytis cinerea* isolates from Louisiana strawberry farms. *Adv. Strawberry Res.* **20**, 27-33.
- Woo, S.M., Woo, J.U., and Kim, S.D.** 2007. Purification and characterization of the siderophore from *Bacillus licheniformis* K11, a multi-functional plant growth promoting rhizobacterium. *Kor. J. Microbial. Biotechnol.* **35**, 128-134.