

감마선(⁶⁰Co) 조사에 의한 항진균 세균의 돌연변이체 유도

정혜영 · 이영근* · 김재성 · 조규성 · 이영복¹⁾

한국원자력연구소, RI·방사선응용연구팀, ¹⁾충남대학교 농업생명과학대학 원예학과
(2002년 7월 18일 접수, 2002년 9월 5일 수리)

Mutant Induction of Several Antifungal Bacteria by Gamma Radiation (⁶⁰Co)

Hye-Young Chung, Young-Keun Lee*, Jae-Sung Kim, Kyu Seong Cho and Young-Bok Lee¹⁾ (Radioisotope-Radiation Application Team, Korea Atomic Energy Research Institute, Taejeon, 305-353, Korea, ¹⁾ Department of Horticulture, Chungnam National University, Taejeon, 305-764, Korea)

ABSTRACT : In order to evaluate the antifungal activity of bacteria against plant pathogenic fungi, 8 bacteria were isolated from mushroom compost, hot spring, seaweed, and forest soil and mutants from them were induced by LD₉₅ gamma radiation(⁶⁰Co). *Bacillus circulans* K1, *Burkholderia gladioli* K4 and *Bacillus subtilis* YS1 showed wide antifungal spectrum against 12 kinds of plant pathogenic fungi. From the radiation sensitivity test, *B. gladioli* K4 was very sensitive to gamma radiation and its D₁₀ value was 0.11 kGy. Antifungal activities of *B. circulans* K1-1004 and *B. subtilis* YS1-1009, which were induced by the radiation of ⁶⁰Co increased against *Botryosphaeria dothidea*. The mutant strains, *B. subtilis* YS1-1006 and *B. subtilis* YS1-1009 were resistant to tebuconazole and copper hydroxide. SAR535, SAR5108, and SAR5118 mutated from *Streptomyces* sp. SAR01 were antifungal activity deficient mutants against 5 kinds of plant pathogenic fungi compared to wild strain, so that they could be supposed to be model strains for studying antifungal mechanism. It is suggested that various functional types of mutants could be induced by gamma radiation and applied usefully.

Key words: antifungal activity, bacteria, gamma radiation, mutant

서 론

합성 농약의 대량 사용으로 환경 문제가 증가됨에 따라 식물병 방제에 대한 대안이 요구되고 있으며¹⁾, 효과적인 생물학적 조절자로서 fluorescent *Pseudomonas*와 다른 세균들을 이용하는 방법 등이 연구되어²⁾, Nogall, Dagger G 및 GloCard 등의 생물농약이 실용화되고 있다^{3,4)}. 그러나 이러한 생물농약은 환경에 적용하는데 있어 유전적 변이성이 크며⁵⁾, 환경조건이 달라짐에 따라 세균의 집락화도 달라지기 때문에⁶⁾ 전체적으로 합성농약을 대신할 수는 없다. 이를 극복하기 위해서는 항진균 생물의 생태, 유전적 조절 및 기능을 완전히 이해하여야 한다^{6,7)}. 기능성 세균의 유전적 조절 및 그 기능을 이해하고 아울러 기능성 세균의 활성을 증진하기 위한 균주 개량에는 돌연변이체의 유도가 필요하다.

기존의 EMS(ethylmethane sulfonate), EtBr (ethidium

bromide), MNNG(*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine) 등의 화학적 돌연변이원을 이용한 돌연변이체 유도에 있어 이들 화학물질 등은 강력한 돌연변이원이나 인체에 매우 해로운 암 유발원으로 알려져 있으며, UV를 이용한 돌연변이체 유도는 그 효율이 낮은 것으로 알려져 있다. 최근 들어 이온화방사선은 일회용 의료기기의 멸균에 가장 일상적인 멸균 수단으로 이용되어지고 있으며⁸⁾, UV나 X-ray의 특성과는 달리 감마선은 투과력이 크고 선량의 강도가 커 조작의 시행횟수를 최대한 줄일 수 있어 시간과 경제적 효과 또한 뛰어나다. 생물들은 감마선과 같은 이온화방사선에 노출되면 세포내 DNA에서 다양한 돌연변이가 야기된다^{9,11)}. 1927년 이온화 방사선이 돌연변이원으로 알려진 이래¹²⁾ DNA 손상에 의한 돌연변이 기작의 일부가 알려졌으며, 균주개량 및 돌연변이체 유도에 유용한 물리적 방법으로 보고되었다¹³⁾.

본 연구는 다양한 환경으로부터 분리한 세균들로부터 항진균 활성을 갖는 세균을 분리하고 이온화방사선을 이용한 돌연변이체 유도를 통하여, 항진균 활성 기작의 이해와 균주 개량을 도모하고자 수행하였다.

*연락처:

Tel: +82-42-868-8056 Fax: +82-42-862-6980

E-mail: yklee@kaeri.re.kr

Table 1. Antifungal spectra of 8 isolates from various environments

Plant pathogenic fungi	Antifungal activities of isolated strains							
	K1	K3	K4	YS1	SAR01	J5171	J5272	J5274
<i>Rhizoctonia solani</i>	+	+	+	+	NT	+	+	+
<i>Rhizoctonia solani</i> (BP)	+	+	+	+	NT	NT	NT	NT
<i>Fusarium oxysporum</i>	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Mycospharella melonis</i>	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Alternaria solani</i>	+	+	+	+	-	+	+	-
<i>Botrytis cinerea</i>	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Phythium ultimum</i>	+	-	+	+	-	-	-	-
<i>Pyricularia grisea</i>	+	+	+	NT	+	-	-	-
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Phytophthora capsici</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pyricularia oryzae</i>	+	+	+	NT	NT	NT	NT	NT
<i>Alternaria alternata</i>	NT	NT	NT	+	+	+	+	+

+ : inhibition, - : non inhibition, NT: no test.

재료 및 방법

항진균 세균의 분리 및 동정

버섯폐배지, 삼립토양, 온천수 및 해조류로부터 시료를 채집하여 4°C에 보관하였다. 온천수는 각 100 µL를 NA (nutrient agar, Difco, USA) 및 R2A(Difco, USA) 배지에 도말하였다. 삼립토양, 해조류 및 버섯폐배지는 멸균식염수 10 mL에 1 g을 넣어 2시간 교반한 후 침전시켰다. 이 중에서 상등액 100 µL를 NA 및 R2A 배지에 도말한 후 3일간 37°C, 30°C 및 25°C에서 배양하였다. 이후 형태적으로 특징적인 균주들을 순수분리하여 항진균 활성 탐색을 위한 후보 균주로 이용하였다. 후보균주들은 *Candida albicans*를 대상으로 1차적으로 항진균 활성을 검정한 후, 12종의 식물병원성 균주들을 대상으로 항진균 활성을 검정하였다. 항진균 활성 spectrum을 조사하기 위한 식물병원성 진균 12종은 농촌진흥청 농업과학기술원 농용미생물보존센터(KACC)로부터 기증받은 균주를 사용하였다. 분리된 항진균 세균에 대하여 일차적으로 Gram stain을 시행한 후, FAME(fatty acid methyl ester, MIDI system)분석을 통하여 동정하였고 일부 균주는 API 20NE kit(bioMerieux, France)를 이용하여 분석하였다.

분리 균주의 방사선 감수성 및 돌연변이체 유도

전배양된 각 실험 균주 50 µL를 NB(nutrient broth, Difco, USA) 배지 15 mL에 접종하여 37°C에서 overnight 배양한 후, 1.5 mL Eppendorf tube에 1 mL씩 분주하여 방사선(⁶⁰Co irradiator, AECL, dose rate : 920 Gy/hr)을 조사하였다. 방사선이 조사된 각 시료를 평판희석법을 이용하여 NA 배지에

접종하여 37°C에서 3일간 배양한 후, 대조균주와 세포수를 비교하여 각 선량 구간별 생존 세포수(cfu)를 계수하였다. 1차 결과에 따라 방사선 조사선량을 달리하여 재조사한 후, 동일 방법으로 콜로니를 계수하였다. 대조균주의 세포수에 대한 각 조사 구간별 균주의 생존 세포수를 비교하여 멸균선량을 구하였고 방사선감수성(D₁₀)을 조사하였다. 95%의 치사율을 보이는 방사선 조사선량에서 생존한 균체를 *C. albicans*가 미리 도말된 NA 배지에 접종하여 1일 배양 후, 형태적 특징 및 항진균 활성에 변화를 보이는 균주를 돌연변이체로 유도된 후보균주로 선정하였다. 선발된 후보균주의 각 세균 배양액 50 µL를 paper disc에 접종하여 37°C에서 1일 동안 배양한 후, 야생형 균주와 비교하여 항진균 활성이 변화된 균주를 방사선 조사에 의해 유도된 돌연변이체로 최종 선정하였다.

유기물 분해능 및 농약 저항성

각종 유기물의 분해능을 조사하기 위하여 지방분해능 (lipolytic activity), 당 분해능(amylase activity), 섬유소 분해능(cellulolytic activity), β-glucosidase 활성 및 lignin 분해능을 분석하였다^{14,16}.

농경지에서 높은 빈도로 사용되는 살균제 11종, 살충제 7종, 제초제 2종 등 20종의 농약을 선정하여 농약원제(순도 75% 이상)를 동부한농(주)으로부터 제공받아 용도에 따라 구별하여 사용하였다. 농약에 대한 저항성 분석은 경작지에서 살포되는 농도(Table 6)의 농약이 첨가된 NA 배지에서 세균배양액 50 µL를 paper disc에 접종한 후, 30°C에서 3일간 배양하여 성장 여부를 측정하였다.

Table 2. D_{10} values and sterilization dose of gamma radiation of the bacteria isolated from various environments

Strain	D_{10} value (kGy)	Sterilization dose(kGy)
K1(<i>Bacillus circulans</i>)	1.93	18
K3(<i>Bacillus circulans</i>)	2.36	22
K4(<i>Burkholderia gladioli</i>)	0.11	1
YS1(<i>Bacillus subtilis</i>)	2.08	20
J5171(<i>Bacillus cereus</i>)	0.49	10
J5272(<i>Bacillus cereus</i>)	1.89	6
J5274(<i>Bacillus cereus</i>)	0.42	3
SAR01(<i>Streptomyces</i> sp.)	NT	6

NT: no test.

결과 및 고찰

균주 분리 및 동정

다양한 환경으로부터 분리한 세균 중 1차적으로 *C. albicans*에 대한 항진균 활성을 갖는 8종의 세균을 분리하였다. 즉, 버섯폐배지로부터 K1, K3, K4, 온천수로부터 YS1, 해조류로부터 SAR01, 지리산의 삼림토양으로부터 J5171, J5272, J5274 등 총 8종의 균주를 선별하였다. FAME 분석을 통하여 SAR01 균주는 *Streptomyces* sp.(57.5% 상동), K4 균주는 *Burkholderia gladioli*(41.1% 상동), YS1 균주는 *Bacillus subtilis* (83.9% 상동)로 동정되었으며, API 20NE kit를 이용한 생화학 적 동정 분석을 통하여 K1 및 K3 균주는 *Bacillus circulans* (78.8%, 75.0% 상동), J5171, J5272 및 J5274는 *Bacillus cereus* (99.8%, 99.9%, 99.8% 상동)로 각각 동정되었다.

항진균 활성 스펙트럼

8종의 항진균 세균의 항진균 활성 스펙트럼을 조사한 결과, *B. circulans* K1과 *B. gladioli* K4 균주 및 *B. subtilis* YS1 균주는 시험한 식물 병원성 진균 모두에 대해 매우 높은 항진균 활성을 보였고, *B. circulans* K3 균주는 *Phythium ultimum* (모잘록병)을 제외한 12종의 식물병원성 진균에 항진균 활성을 나타냈다(Table 1). 그러나 삼림토양으로부터 분리한 *B. cereus* J5171, J5272 및 J5274 균주는 5~6종의 식물병원성 진균에 대해서만 항진균 활성을 가졌으며, *Streptomyces* sp. SAR01 균주 또한 7종의 진균에 대해서 항진균 활성을 보였다. 현재까지 *Pseudomonas* sp. 와 *Bacillus* sp. 균주가 식물병원성 진균을 효과적으로 제어하는 것으로 보고되었다^{17,18}. *Streptomyces*의 경우 *Rhizoctonia*나 *Pythium* 등의 방제용으로 항진균 물질이나 유전자 연구가 많이 진행되었다^{19,20}. *Burkholderia*의 경우도 *Fusarium*과 *Rhizoctonia* 등의 방제용으로 국한되어 연구되고 있다²¹. 일반적으로, 작물의 병해는 특정 병원성 진균에 의해 특이적으로 발병하는데, 작물의 생장기를 통틀어 볼 때 여러 종류의 병원성 진균에 의한 감염위험에 노출되게 마련이다. Mao 등(1998)이 *B. cepacia*를 이용하여 *R. solani*, *P.*

ultimum, *S. rolfisii* 및 *F. oxysporum*의 복합 병원성 진균체에 대한 토마토와 고추의 잘록병 방제 연구를 하는 등 광범위 제제의 개발을 시도하였다²². 따라서 버섯폐배지와 온천수로부터 분리한 K1, K3, K4 및 YS1 균주들이 기존에 알려진 항진균 활성을 갖는 세균에 비해 비교적 넓은 활성 스펙트럼을 갖고 있어서 곰팡이에 의한 다양한 농작물의 병해 방제에 이용될 수 있으며, 광범위 항균성 미생물 제제로 개발된다면 실용화 가능성이 높다고 여겨진다.

분리 균주의 방사선 감수성

분리된 8종의 항진균 활성 균주의 감마선에 대한 감수성 조사 결과, K4 균주는 1.0 kGy의 방사선량하에서 생존하지 못하였으나, K1, K3 및 YS1 균주는 18 kGy의 조사선량에서도 생존하였으며, 특히 YS1 균주와 K3 균주는 20 kGy의 방사선량에서도 생존하였다(Table 2, Fig. 1). 그러나 같은 *Bacillus* 속에 속하는 J5171, J5272 및 J5274 균주의 멸균 선량은 각각 10, 6 및 3 kGy로 K1, K3 및 YS1 균주의 멸균선량에 크게 미치지 못하였다(Table 2, Fig. 1). 8종의 분리 균주 중 *Bacillus* 속에 속하는 6종의 균주가 *B. gladioli* K4와 *Streptomyces* sp. SAR01 균주에 비해 더 높은 방사선 저항성을 보이는 것은 포자의 형성과 관련이 깊은 것으로 판단된다. Farkas(1998)는 비포자 형성 식품오염 미생물들에 대한 방사선 감수성을 조사하였는데, *Aeromonas hydrophila*는 0.14~0.19 kGy의 D_{10} 값으로 낮은 방사선 저항성을 보였고, *E. coli* O157의 경우 0.26 kGy, *Salmomella* sp. 의 경우 0.67 kGy로 비교적 높은 방사선 저항성을 보였다고 보고 하였다²³. 본 연구에서도 *B. gladioli* K4 균주는 D_{10} 값이 0.11 kGy로 방사선에 매우 민감하였으나 *B. cereus* J5171과 J5274 균주를 제외한 다른 *Bacillus* 속의 균주들은 D_{10} 값이 1.89 kGy 이상으로 방사선 저항성이 높음을 알 수 있다. 이와 같은 결과는 미생물 제제 제조시 증량제, 전착제 및 영양원물질과 함께 첨가되는 자외선 차단제의 첨가 여부 및 그 양을 결정하는데 매우 중요한 간접적 지표가 될 것으로 사료된다.

돌연변이체 유도 및 항진균 활성 스펙트럼의 변화

8종의 분리 균주 중 *B. circulans* K1, *B. subtilis* YS1 및 *Streptomyces* sp. SAR01 균주에 대하여 LD₉₅의 방사선량에서 항진균 활성의 변화를 갖는 돌연변이체를 유도하였다(Table 3, 4). *B. circulans* K1 균주로부터 유도한 4종류의 돌연변이체는 *B. dothidea*에 대해 야생형 균주에 비해 항진균 활성이 증가되었으며 특히 K1-1004 돌연변이체는 식물병원성 진균에 대하여 종 특이성에 의존하는 형태로 활성 정도가 증가 또는 감소하였다. *B. subtilis* YS1-1009 돌연변이체는 K1-1004 돌연변이체와 같은 양상으로 *B. dothidea*에 대해 야생형에 비하여 항진균 활성이 증가하였으나 *R. solarii*와 *A. solarii*의 두 진균을 제외한 5종의 식물병원성 진균에 대하여 항진균 활성이 감소하였다. 방사선 조사를 이용한 *B. subtilis*의 항생제 생산 증강 돌연변이체 유도는 보고된 바 있으나²⁴, 항진균 활성이 증강

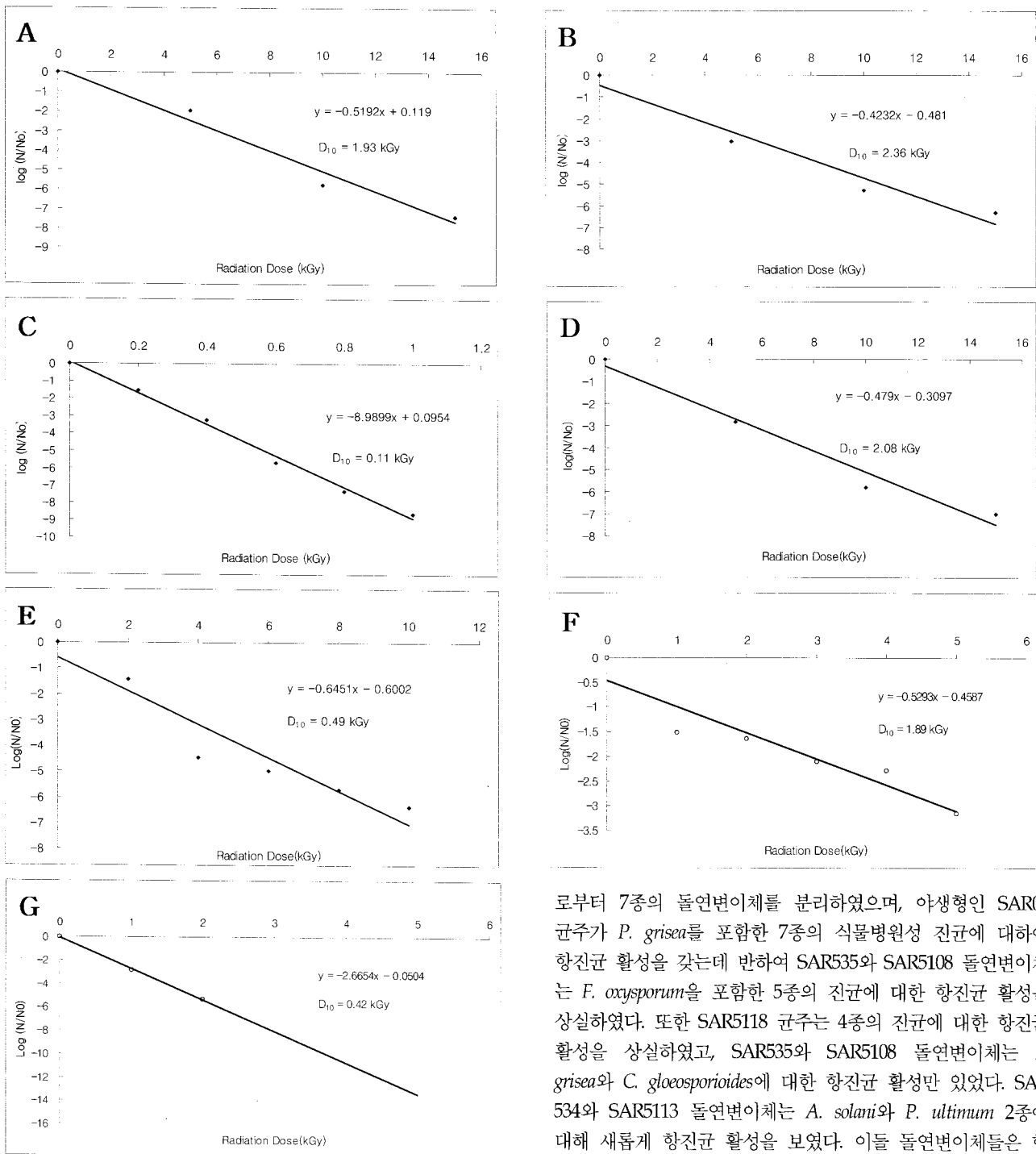


Fig. 1. Radiation sensitivities of antifungal bacteria isolated from various environments. A, *B. circulans* K1; B, *B. circulans* K3; C, *B. gladioli* K4; D, *B. subtilis* YS1; E, *B. cereus* J5171; F, *B. cereus* J5272; G, *B. cereus* J5274.

되거나 상실된 다양한 돌연변이체 유도에 관한 보고는 없다. 이들 돌연변이체를 이용하면 직접적인 항진균 관련 유전자 연구나 간접적으로 항진균성 물질 생산 연구시 유용하게 이용될 수 있을 것으로 사료된다. *Streptomyces* sp. SAR01 균주

로부터 7종의 돌연변이체를 분리하였으며, 야생형인 SAR01 균주가 *P. grisea*를 포함한 7종의 식물병원성 진균에 대하여 항진균 활성을 갖는데 반하여 SAR535와 SAR5108 돌연변이체는 *F. oxysporum*을 포함한 5종의 진균에 대한 항진균 활성을 상실하였다. 또한 SAR5118 균주는 4종의 진균에 대한 항진균 활성을 상실하였고, SAR535와 SAR5108 돌연변이체는 *P. grisea*와 *C. gloeosporioides*에 대한 항진균 활성만 있었다. SAR 534와 SAR5113 돌연변이체는 *A. solani*와 *P. ultimum* 2종에 대해 새롭게 항진균 활성을 보였다. 이들 돌연변이체들은 항진균 활성의 기작을 연구하는데 매우 유용할 것으로 기대되며, 특히 종 특이적 항진균 활성 기작의 연구에 이용될 수 있다. 방사선을 이용하여 *Bacillus* sp.에 대한 돌연변이체 균주 유도 연구가 활발하여 자외선 차단 역할을 하는 melanin을 분비하는 돌연변이체 유도 연구²⁵⁾, inosine 생산 균주 유도 연구²⁶⁾ 등이 보고되었으며 항세균물질 생산 돌연변이체 균주 유도 연구는 Ahmad 등(1987)이 유일하게 보고하였으나²⁴⁾ 항진균성 돌연변이체 균주 유도에 관한 보고는 본 연구가 최초이다. 이러한 결과로부터 방사선 조사를 이용한 항진균 활성을

Table 3. Antifungal spectra of radiation-induced mutants of *B. circulans* K1 and *B. subtilis* YS1 against plant pathogenic fungi

Plant pathogenic fungi	K1 mutants				YS1 mutants	
	K1-1001	K1-1002	K1-1003	K1-1004	YS1-1006	YS1-1009
<i>Rhizoctonia solani</i>	+ (=)	+ (=)	+ (=)	+ (< wt)	++ (= wt)	++ (= wt)
<i>Rhizoctonia solani</i> (BP)	+ (=)	+ (< wt)	+ (< wt)	+ (< wt)	+ (= wt)	+ (< wt)
<i>Fusarium oxysporum</i>	+ (=)	+ (< wt)	+ (=)	+ (< wt)	+ (< wt)	+ (< wt)
<i>Mycospharella melonis</i>	+ (> wt)	+ (=)	+ (=)	+ (>wt)	+ (= wt)	+ (< wt)
<i>Alternaria solani</i>	+ (=)	+ (=)	+ (=)	+ (> wt)	+ (= wt)	+ (= wt)
<i>Phythium ultimum</i>	+ (=)	+ (=)	+ (=)	+ (=)	+ (< wt)	+ (< wt)
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	+ (> wt)	+ (> wt)	+ (> wt)	++ (> wt)	+ (= wt)	+ (> wt)
<i>Pyricularia oryzae</i>	+ (< wt)	+ (< wt)	+ (=)	+ (=)	+ (= wt)	+ (< wt)

Degree of inhibition : +(\leq 10 mm), ++($>$ 10 mm), wt means wild type strain.

Table 4. Changes of antifungal activities between SAR01 and its mutants

Plant pathogenic fungi	Antifungal activities of SAR01 and its mutants							
	SAR01	534	535	536	5108	5112	5113	5118
<i>P. grisea</i>	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>C. gloeosporioides</i>	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>A. solani</i>	-	+	-	+	-	-	+	-
<i>F. oxysporum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. cinerea</i>	+	+	-	+	-	-	+	+
<i>A. alternata</i>	+	+	-	-	-	-	+	-
<i>P. capsici</i>	+	+	-	+	-	+	+	+
<i>P. ultimum</i>	-	+	-	-	-	-	+	-
<i>M. melonis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. dothidea</i>	+	+	-	+	-	+	+	+
<i>S. sclerotiorum</i>	+	+	-	+	-	+	+	-

+ : positive, - : negative

Table 5. Extracellular enzyme activities of mutants and wild type strains of *B. circulans* K1 and *B. subtilis* YS1 upon solid media

Strains	Enzyme activities				
	β -glucosidase	SA ^{a)}	LA	CA	ligninase
K1	++	-	+	-	-
K1-1001	+	-	-	-	-
K1-1002	+	-	+	-	-
K1-1003	+	-	+	-	-
K1-1004	+	-	+	-	-
YS1	+ ^{b)}	-	++	-	+
YS1-1006	+	-	+	-	+
YS1-1009	++	-	++	-	++

^{a)}SA: amylase activity; LA: lipolytic activity(fatty acid esterase).

CA: cellulolytic activity(cellulase).

^{b)}Enzyme activity(+ : good, ++ : very good, - : negative).

갖는 균주의 돌연변이체 유도는 특정 식물병원성 진균에 대한 항진균 세균의 개량에 유용함을 알 수 있으며, 다양한 기생성 세균의 개량에도 좋은 방법이 될 것으로 생각된다.

야생형 균주와 돌연변이체 균주간의 유기물 분해능 및 농약 저항성 비교

방사선조사에 의해 *B. circulans* K1에서 유도된 K1-1001, K1-1004와 *B. subtilis* YS1에서 유도된 YS1-1006과 YS1-1009 돌연이체는 항진균 활성의 변화와 더불어 유기물 분해능 및 농약 저항성이 변화하였다. K1-1001 돌연변이체는 지방 분해 효소의 활성이 소실되었으나, YS1-1009 돌연변이체의 경우 야생형 균주에 비해 유기물 분해능이 증가하였다(Table 5). 따라서 이 K1-1001 돌연변이체는 방사선에 의해 지질대사능력이 소실된 것으로 야생형인 *B. subtilis* K1 균주의 지질대사의 합성 경로 및 분자생물학적 특성을 이해하는데 이용될 수 있으며, YS1-1009 돌연변이체는 지질분해능이 증가된 것으로 보아 미생물 제제 제조시 환경적응성이 높을 것으로 사료된다.

B. subtilis YS1과 돌연변이체 균주들은 17종의 상용 농약에 대해서 저항성을 나타냈으며 농약이 첨가된 고체배지에서

Table 6. Resistant patterns of mutants and wild type strains of *B. circulans* K1 and *B. subtilis* YS1 against pesticides

Pesticides(ppm)	K1	K1-1001	K1-1002	K1-1003	K1-1004	YS1	YS1-1006	YS1-1009
Benomyl(250)	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	+++
Flusilazole(20)	+++	++	+++	+++	++	++	++	+++
Tebuconazole(250)	-	-	-	-	-	-	-	++
Oxadixyl(250)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
Edifenphos(300)	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
Mancozeb(1,000)	++	++	++	++	++	++	++	++
Pencycuron(250)	++	++	++	+++	++	+++	+++	++
Azoxystrobin(100)	++	++	++	++	++	+++	+++	+++
Copper hydroxide(800)	-	-	-	-	-	-	++	-
Isoprothiorane(400)	+++	++	+++	+++	++	++	+	+
Iprobenphos(50)	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+
Chlorfenaphy(50)	+++	++	++	+++	++	++	+	+
Imidacloprid(50)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
Carbofuran(300)	+++	++	++	++	++	+++	++	+++
Fenpyroximate(25)	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++
Chlorpyrifos(200)	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	+
Fenobucarb(500)	-	-	-	-	-	-	-	-
Diazinon(30)	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	++
Butachlor(50)	+++	++	+++	+++	++	++	++	++
Glyphosate(50)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++

- : no resistance, + : mild-, ++ : good-, +++ : excellent-resistance.

높은 생장을 보였다(Table 6). Tebuconazole에 대해서는 *B. subtilis* YS1의 돌연변이체인 *B. subtilis* YS1-1009 균주가 저항성을 나타냈으며, copper hydroxide에 대해서는 *B. subtilis* YS1-1006 돌연변이 균주만 저항성을 보였다. 그러나 살충제인 fenobucarb에 대해서는 모든 균주들이 저항성이 없는 것으로 나타났다. 본 연구결과로 보아 위의 농약에 대한 저항성 증가 혹은 농약 분해능 보유 돌연변이 균주를 유도하는 연구가 수행되어 보완된다면 항진균 활성 돌연변이체 균주의 미생물 제제화 및 토양환경 적응이 더욱 용이해질 것으로 사료된다.

이상의 결과로 볼 때, 방사선을 이용한 돌연변이체 유도로 각종 기능성 균주의 개량이 가능하고, 항진균성 결핍 돌연변이 균주를 이용하여 항진균 기작 연구가 용이하며 유기물 분해능 및 농약 저항성이 뛰어나며 항진균 활성을 보유하고 있는 균주를 사용한 미생물 농약제제의 개발이 기대된다.

요 약

항진균 세균의 특성 및 기능변화 가능성을 조사하기 위하여 버섯폐배지, 온천수, 해조류 및 삼림토양으로부터 식물병원성 진균에 대한 8 종의 항진균 활성 균주를 분리하였고 감

마선(⁶⁰Co)을 이용하여 LD₉₅ 에서 돌연변이체를 유도하였다. *Bacillus circulans* K1, *Burkholderia gladioli* K4와 *Bacillus subtilis* YS1은 12 종의 식물병원성 진균에 대해 항진균 활성을 보였다. 이들 균주의 방사선감수성 조사결과 *B. gladioli* K4는 감마선에 대한 높은 감수성을 보였으며, D₁₀ 값은 0.11 kGy 였다. 감마선에 의해 유도된 K1-1004와 YS1-1009는 *Botryosphaeria dothidea*에 대해 항진균 활성이 증가되었다. *B. subtilis* YS1의 돌연변이체인 YS1-1006과 YS1-1009는 tebuconazole과 copper hydroxide에 대해 농약 저항성을 나타냈다. SAR535, SAR5108 과 SAR5118 돌연변이체는 야생형 균주인 *Streptomyces* sp. SAR01에 비해 5 종의 식물병원성 진균에 대해 항진균 활성이 없었다. 연구결과, 방사선을 이용하여 다양한 기능의 돌연변이체 유도가 가능하였다. 이를 이용하여 항진균 활성 관련 유전자 연구 및 균주개량이 가능할 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 과학기술부의 원자력연구개발사업의 일환으로 수행되었음.

참고문헌

1. Weller, D. M. (1988) Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria, *Annu. Rev. Phytopathol.* 26, 379-407.
2. O'Sullivan, D. B. and O'Gara, F. (1992) Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens, *Microbiol. Rev.* 56, 662-676.
3. Cook, R. J. (1993) Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens, *Annu. Rev. Phytopathol.* 31, 53-80.
4. Ryder, M. (1994) Key issues in the deliberate release of genetically manipulated bacteria, *FEMS Microbiol. Ecol.* 15, 130-145.
5. Parekh, S., Vinci, V. A. and Strobel, R. J. (2000) Improvement of microbial strains and fermentation processes, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54, 287-301.
6. Weller, D. M. and Thomashow, L. S. (1994) *Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganisms*, New York, VCH, p.1-18.
7. Ellis, R. J., Timms-Wilson, T. M., Beringer, J. E., Rhodes, D., Renwick, A., Stevenson, L. and Bailey, M. J. (1999) Ecological basis for biocontrol of damping-off disease by *Pseudomonas fluorescens* 54/96, *J. Appl. Microbiol.* 87, 454-463.
8. Pourahmad, R. and Pakravan, R. (1997) Radiosterilization of disposable medical devices, *Radiat. Phys. Chem.* 49, 285-286.
9. Becker, D. and Sevilla, M. (1993) The chemical consequences of radiation damage to DNA, *Adv. Radiat. Biol.* 17, 121-180.
10. Halliwell, B. and Aruoma, O. I. (1991) DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian cells, *FEBS Lett.* 281, 9-19.
11. Hutchinson, F. (1985) Chemical changes induced in DNA by ionizing radiation, *Prog. Nucl. Acids Res. Mol. Biol.* 32, 115-154.
12. Muller, H. J. (1927) Artificial transmutation of the gene, *Science* 66, 84-87.
13. Lee, Y. K., Chang, H. H., Kim, J. S., Kim, J. K. and Lee, K. S. (2000) Lignocellulolytic mutants of *Pleurotus ostreatus* induced by gamma-ray radiation and their genetic similarities, *Rad. Phys. Chem.* 57, 145-150.
14. Glenn, J. K. and Gold, M. H. (1983) Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycetes *Phanerochaete chrysosporium*, *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 1741-1747.
15. Lee, Y. K., Kim, J. K., Song, I. G., Chung, H. Y. and Chang, H. H. (2001) Characteristics of antifungal bacterium, *Bacillus subtilis* Y51 and its mutant induced by gamma radiation, *Kor. J. Microbiol.* 37, 305-311.
16. Sierra, G. (1957) A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates, *Antonie van Leeuwenhoek.* 23, 15-22.
17. Wang, S. L., Shih, I. L., Wang, C. H., Tseng, K. C., Chang, W. T., Twu, Y. K. Ro, J. J. and Wang, C. L. (2002) Production of antifungal compounds from chitin by *Bacillus subtilis*, *Enz. Micro. Tech.* 31, 321-328.
18. Yu, G. Y., Sinclair, J. B., Hartman, G. L. and Bertagnolli, B. L. (2002) Production of iturin A by *Bacillus amylo-liquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*, *Soil Biol. Biochem.* 34, 955-963.
19. Jones, C. R. and Samac, D. A. (1996) Biological control of fungi causing alfalfa seedling damping-off with a disease-suppressive strain of *Streptomyces*, *Biol. Con.* 7, 196-204.
20. Sabaratnam, S. and Traquair, J. A. (2002) Formulation of a *Streptomyces* biocontrol agent for the suppression of *Rhizoctonia* damping-off in tomato transplants, *Biol. Con.* 23, 245-253.
21. Peix, A., Mateos, P. F. Barrueco, C. R., Molina, E. M. and Velazquez, E. (2001) Growth promotion of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by a strain of *Burkholderia cepacia* under growth chamber conditions, *Soil Biol. Biochem.* 33, 1927-1935.
22. Mao, W., Lewis, J. A., Lumsden, R. D. and Hebban, K. P. (1998) Biocontrol of selected soilborne diseases of tomato and pepper plants, *Crop Protec.* 17, 535-542.
23. Farkas, J. (1998) Irradiation as a method for decontaminating food, a review, *Inter. J. Food Microbiol.* 44, 189-204.
24. Ahmad, M. S. and Shaukat, G. A. (1987) Higher antibiotic yielding mutants of *Bacillus subtilis* by gamma irradiation, *The Nucleus* 24, 23-26.
25. Saxena, D., Ben-Dov, E., Manasherob, R., Barak, Z., Boussiba, S. and Zaritsky, A. (2002) A UV tolerant mutant of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* producing melanin, *Curr. Microbiol.* 44, 25-30.
26. Yutang, Q., Qingshan, S., Liangqiu, L. and Xiaoping, L. (1995) Studies on the selection and cultivation of high inosine producing strain GMI-741 by irradiation of sup 6 sup 0 Co gamma rays, *Acta Agric. Nucl. Sin.* 9, 175-178.