

## 항진균성 활성물질을 생성하는 토양방선균의 분리

권혁구\*, 강병곤\*, 이장훈

호서대학교 환경안전공학부 환경공학전공, \*(주)신일화학

## Isolation and Selection of Actinomycetes Producing Anti-fungal Materials

Hyuk-Ku Kwon\*, Byeong-Kon Kang\* and Jang-Hoon Lee

College of environment & safety engineering, Hoseo University, Asan 336-795, Korea  
\*Shinil Chemical & Livestock Co., LTD.

### ABSTRACT

Anti-fungal materials producing bacteria were isolated from soil by bennett's agar and actinomycete isolation agar medium. The bacteria were identified as synonym of Actinomycetes. Based on the data obtained from its morphological and colony characteristics. The medium for production of anti-fungal materials was YEME (yeast extract 4 g, malt extract 10 g, glucose 4 g, D.W 1 l, pH 7.0±0.2). The culture conditions were 30 °C, 7 days and 200 rpm in shaking incubator. No. 13, No. 15 and No. 28 strains were produced anti-fungal materials against fungal plant pathogens. Specially, The No. 28 strain showed a powerful biopesticide activity and broad spectrum effects of anti-fungal materials on *Collectrichum coccodes*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium cucumerinum*, *Didymella bryoniae*.

**Key words** : anti-fungal materials, actinomycetes, biopesticide

### 서론

현재의 농업은 기하급수적으로 늘어나는 인구에 따른 식량난의 해결이라는 시급한 과제에 직면해 있다. 따라서 생산량을 증대시키는 해결책으로 무차별한 화학농약의 사용을 증대시켜 왔다. 이러한 과도한 화학농약의 사용으로 토양과 하천은 물론 지하수까지 오염되어 환경생태계 파괴라는 결과를 초래하고 있으며(이규승 등, 1997; 오윤근 등, 1997; 김승현 등, 1998), 농산물의 잔류독성과 농약중독 등으로 인간의 건강에도 상당한 악영향을 미치고

있다(Shim *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1995). 따라서 이러한 화학농약의 극심한 피해를 줄이기 위한 일환으로 생물학적 방제에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(Siegel *et al.*, 1977).

생물학적 방제 중 미생물을 이용한 방제로는 토양미생물로부터 생성된 항생물질 또는 독소를 이용하여 병원균이나 해충을 죽이도록 하는 미생물 농약과 미생물자체의 길항작용을 이용하여 병원균의 감염으로부터 식물을 보호하고 간접적으로 식물 생육을 촉진하는 미생물비료 등이 있다. 미생물제제에 주로 이용되는 세균으로는 *Bacillus thuringiensis*가 가장 잘 알려져 있고(이형환 등, 1983; Chanpen *et al.*, 2000; Lachhab, 2001), 그외 *Acinetobacter*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Lactobacillus*,

※ To whom correspondence should be addressed.

Tel: +82-41-540-5387, E-mail: maple@office.hoseo.ac.kr

*Streptomyces*, *Promicromonospora* 등도 항진균 활성 물질을 생산하는 것으로 보고 되었다(이강표 등, 1990; 이인경 등, 1990; Sin *et al.*, 1995; 강신욱 등, 1998; 이은탁 등, 1999; Han *et al.*, 1999; Paola *et al.*, 2000). 곰팡이를 이용한 미생물농약의 가능성은 *Trechoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Metarhizium*, *Fusarium* 등이 보고되었다(Sivan *et al.*, 1989; Marx *et al.*, 1995; Mathivanan *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1999; Hao *et al.*, 1999; 박영일 등, 2000).

현재의 미생물 분리 및 배양기술로서는 자연계에 존재하는 전체 미생물의 약 10%만이 이용되고 있으므로 유용 미생물을 확보하고 이들의 기능을 확인하는 작업은 산업전반에도 큰 영향을 미칠 것으로 예상된다. 특히 방선균은 토양속에 다양하게 존재하는 그람양성균으로 항생물질, 생리활성물질, 비타민, 다양한 생체효소 등의 생산에 이용되는 중요한 산업 미생물이다(김창진 등, 1997).

따라서 본 연구에서는 토양시료로부터 방선균을 분리하여 작물에 병해를 일으키는 곰팡이에 대한 항진균 효과를 조사하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 사용된 병원균

작물병원균인 *Collectrichum coccodes* KACC 40227, *Botrytis cinerea* KACC40573, *Cladosporium cucumerinum* KACC40576, *Didymella bryoniae* KACC40900를 항진균 시험에 사용하였다. 모든 실험균주는 농용미생물 보존센터에서 분양받아 사용하였다.

### 2. 토양 방선균의 분리

전국 각지의 저병해 경작지 토양으로부터 길항성 방선균을 선별하기 위하여 채취한 근권토양시료를 100°C에서 60분 동안 열처리 한 다음 1g을 멸균생리식염수 10ml에 넣어 20분간 교반 하였다. 멸균수로 10단계 희석( $10^3 \sim 10^5$ )하여 0.1 ml를 방선균 분리용 배지인 Bennett's agar, Bacto-Actinomycete Isolation agar (AIA) 배지에 도말 한 후  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 2~3주간 배양하면서 나타난 사상형태의 방선균 집락을 분리하였다(김창진 등, 1995). 집

락의 형태, 색 등 형태적 차이에 따라 분리하여 광학현미경상에서 전형적인 방선균 형태를 나타낸 균주를 1차로 선별하여 AIA배지에 보관하면서 실험에 사용하였다(Goodfellow *et al.*, 1989).

### 3. 항진균 효과의 측정

항진균성 활성물질 생성능을 조사하기 위하여 분리된 균주를 YEME배지 (yeast extract 4 g, malt extract 10 g, glucose 4 g, D.W 1 l, pH 7.0 $\pm$ 0.2)에 접종하여 30°C에서 7일간 교반배양하였다. 배양액을 paper disc method에 따라 작물 병원성 곰팡이인 *Collectrichum coccodes*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium cucumerinum*, *Didymella bryoniae*에 대한 항진균 활성을 조사하였다

## 결과 및 고찰

### 1. 토양으로부터 방선균의 분리

우리나라 각지로부터 총 487점의 토양시료를 채취하였다. 토양시료 1g을 멸균생리 식염수에 희석한 후 Bennett's agar, Bacto-Actinomycete Isolation agar (AIA) 배지에 도말하여 배양 후 육안으로 보아 집락의 형태, 색 등 외부형태가 다른 방선균 98주를 분리 하였다. 분리된 균주를 액체배지에 배양하여 항진균 활성물질의 생성을 유도하여 배양액을 사용한 paper disc method에 의해 항진균 활성 물질을 생성하는 방선균 3주를 선정하였다. Fig. 1은 선정된 방선균주의 집락 형태를 보여주고 있다.

### 2. 선정된 균주가 생성한 물질의 항균 Spectrum

분리된 방선균의 이차대사산물이 작물병원성 진균에 대한 항진균 효과를 갖는지를 검사하기 위하여 YEME배지에서 증식시킨 다음 배양액을 Potato Dextrose agar에 작물병원균을 도포한 후 방선균 배양액을 사용하여 작물 병원성 진균에 대한 생장 억제효과를 시험하였다.

시험에 사용된 작물병원성 진균인 *Collectrichum coccodes*는 가지에 검은점뿌리썩음병 (Black dot root rot), 고추에 탄저병 (Anthracnose)을 발병하게 하고 토마토에 탄저병과 검은점뿌리썩음병을 일으

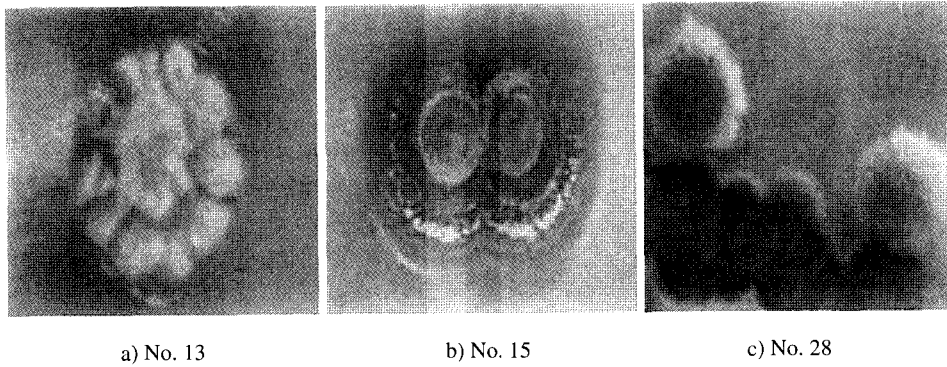


Fig. 1. Colony morphology of anti-fungal material producing actinomycetes isolated from soil.

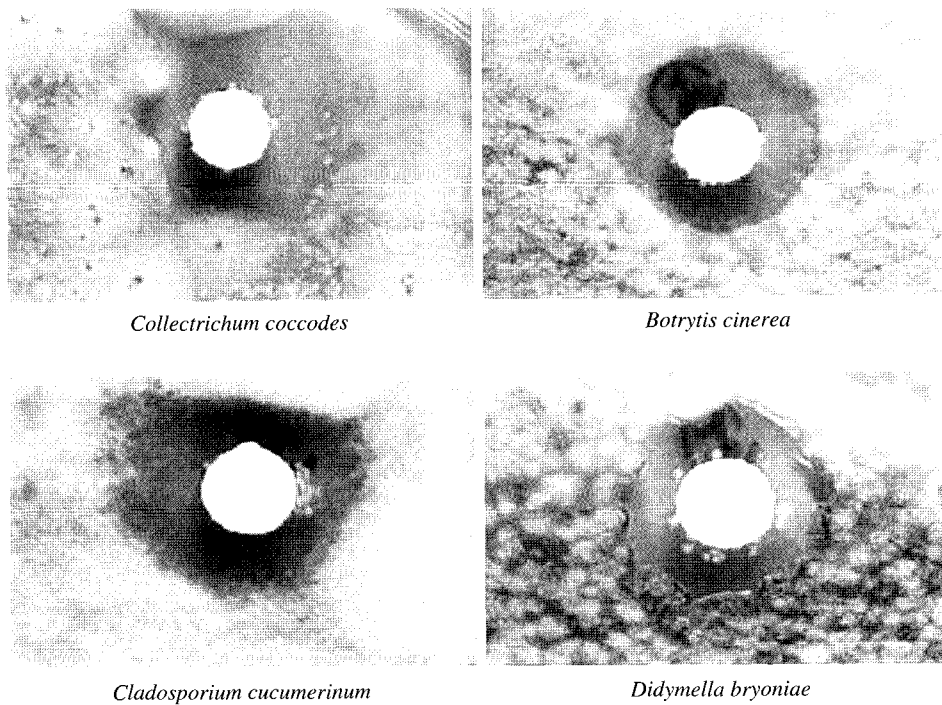
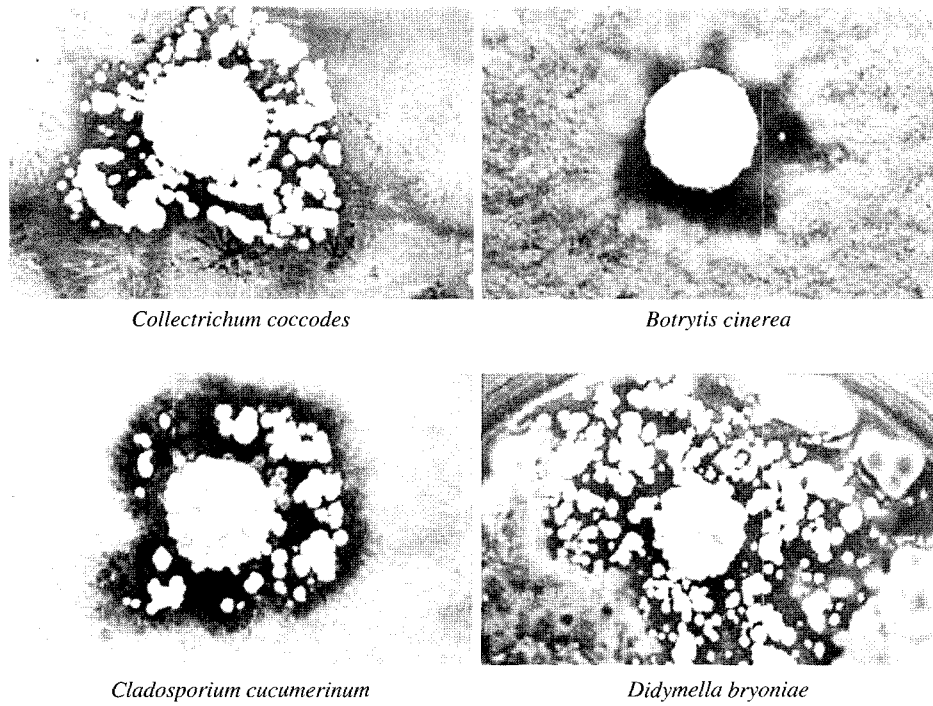


Fig. 2. Photographs of anti-fungal test with actinomycete No. 28 isolated from soil.

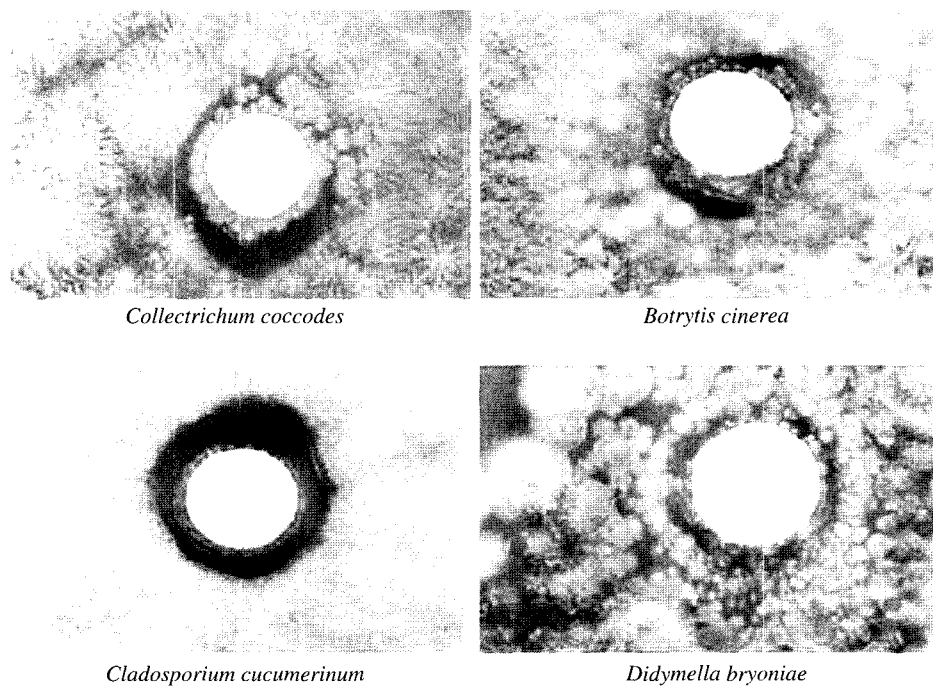
키는 원인균이며, *Botrytis cinerea*는 감자, 고구마, 강낭콩, 인삼, 가지 및 화훼 등에 잿빛곰팡이병(Gray mold)을 일으키는 원인균이다. 그리고 *Cladosporium cucumerinum*은 오이, 참외, 멜론, 호박 등에 검은별무늬병(Scab)의 원인균이고, *Didymella bryoniae*는 수박(Gummy stem rot), 오이, 참외, 멜론 그리고 호박(Gummy stem blight) 등의 작물에 덩

굴마름병(Black rot)을 발생시키는 작물 병원성 진균이다(농용미생물보존센터).

Figs. 2, 3, 4에서 보는 바와 같이 disc주변에는 병원성 진균들이 성장하지 않도록 항균작용을 나타낸 것을 관찰할 수 있었다. 분리된 방선균 중 No. 28의 이차대사산물은 작물 병원성 진균인 *Collectrichum coccodes*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium*



**Fig. 3.** Photographs of anti-fungal test with actinomycete No. 13 isolated from soil.



**Fig. 4.** Photographs of anti-fungal test with actinomycete No. 15 isolated from soil.

*cucumerinum*, *Didymella bryoniae*에 대한 항균력이 가장 우수한 것으로 나타났으며 (Fig. 2), 분리균 No. 15와 No. 13의 배양액도 항균력이 있는 것으로 조사 되었다 (Figs. 3, 4).

특히, 분리균 No. 28이 생성한 이차대사산물은 병원성 진균에 대한 우수한 broad spectrum을 가진 것으로 생각되며, 앞으로 미생물농약을 개발할 수 있는 잠재적 가능성이 매우 높은 균주인 것으로 조사되었다.

### 결 론

1. 총 487점의 토양시료로부터 집락의 형태, 색 등 외부의 형태에 따라 분리된 98주의 방선균으로부터 항진균 활성 물질을 생산하는 방선균을 3주 분리 하였다.

2. 항진균 활성물질을 생산하는 균주 중 No. 28 균주의 이차대사산물이 작물 병원성 진균인 *Colletrichum coccodes*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium cucumerinum*, *Didymella bryoniae*에 대해 모두 뛰어난 항균효과를 나타내어 broad spectrum 효과가 가장 우수하였고, 미생물농약으로의 개발가능성이 매우 높은 것으로 조사 되었다.

### 참 고 문 헌

강신욱, 정만재, 여익현, 김동호. Chitinase를 생산하는 *Pseudomonas vesicularis* KW-15의 분리 및 특성, 한국 키틴·키토산 연구회지 1998; 3(4): 303-312.  
 김승현, 이영득, 하원숙, 노희명. 비포화 무기성 다공매질에서 잔류농약의 계면거동 및 지하수 오염현상 연구, 대한환경공학회지 1998; 20(11): 1545-1553.  
 김창진, 이강현, 아끼라 시마즈, 권오성, 박동진. 토양 특성에 따른 다양한 회소방선균의 분리, 산업미생물학회지 1995; 23(1): 36-42.  
 김창진. 산업적 유용 미생물(IV) "산업적 유용 방선균의 분리 및 분류", 생물산업 1997; 10(2): 34-44.  
 농용미생물보존센터, [http://kacc.rda.go.kr/?menu=m3&gotourl=order/shop\\_cart.asp](http://kacc.rda.go.kr/?menu=m3&gotourl=order/shop_cart.asp)  
 박영일, 한영환. 녹강균 (*Metarhizium anisopliae*)의 최적 배양조건 및 효소활성, 한국미생물학회지 2000; 36(2): 97-102.  
 오윤근, 김정호. 유기염소계 잔류농약이 제주도 연안 해양

환경에 미치는 영향, 한국수질보존학회지 1997; 13(3): 317-324.  
 이강표, 김창남, 유주현, 오두환. *Aeromonas salmonicida* YA7-625에 의한 Chitinase의 생산 및 정제, 산업미생물학회지 1990; 18(6): 199-606.  
 이규승. 농업 생태계에 대한 잔류농약의 영향평가, 한국환경농학회지 1997; 16(1): 80-93.  
 이은탁, 김상달. Chitinase를 생산하는 길항미생물 *Serratia* sp. 3095의 선발과 *Fusarium* 속에 대한 항진균성, 한국농화학회지 1999; 42(3): 181-187.  
 이인경, 김창진, 김신덕, 유익동. *Streptomyces parvullus* 균주가 생산하는 항 고추 역병성 항생물질, 산업미생물학회지 1990; 18(2): 142-147.  
 이영환, 김기상. *Bacillus thuringiensis*을 이용한 미생물 살충제에 관한 연구, 산업미생물학회지 1983; 11(3): 223-231.  
 Chanpen W, Saranya T, Somsak P and Amaret B. Toxicity of Chitinase-Producing *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* HD-1 (G) toward *Plutella xylostella*, J. Inver. Pathol. 2000; 76: 270-227.  
 Goodfellow, M, Cross T and Lechevalier HA. Suprageneric classification of Actinomycetes. In S. T. Williams, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (eds.), Bergey's Manual of Systemic Bacteriology Vol. 4. Williams and Wilkins, Baltimore 1989.  
 Gun Lee D, Shin SY, Maeng CY, Jin ZZ, Kim KL and Hahm KS. Isolation and characterization of a novel anti-fungal peptide from *Aspergillus niger*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999; 263: 646-651 .  
 Han KH and Kim SD. Selection and identification of a antagonistic *Promicromonospora* sp. KH-28 producing chitinase and antifungal antibiotic, Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1999; 27(3): 191-196.  
 Hao JJ, Geng C, Xie W, Gong Z, Liu WY and Wang E. Isolation and characterization of viridin, a new 65 kDa antifungal protein from the mould *Trichoderma viride*, Biol. Chem. 1999; 380: 1243-1245.  
 Lachhab K, Tyagi RD and Valero JR. Production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides using wastewater sludge as a raw material: effect of inoculum and sludge solids concentration, Process Biochemistry 2001; 37: 197-208.  
 Lee MG and Lee SR. Assessment of oncogenicity from pesticide residues in Korean food, Kor. J. Food Sci. Technol. 1995; 27(6): 871-877.  
 Marx F, Haas H, Reindl M, Stoffler G, Lottspeich F and Redl B. Cloning, structural organization and regulation of expression of the *Penicillium chrysogenum* paf gene

- encoding an abundantly secreted protein with antifungal activity, *Gene* 1995; 167: 167–171.
- Mathivanan N, Kabilan V and Murugesan K. Purification, characterization, and antifungal activity of chitinase from *Fusarium chlamydosporum*, a mycoparasite to groundnut rust, *Puccinia arachidis*, *Can. J. Microbiol.* 1998; 44: 646–651.
- Paola L, Francesca V, Antonio E, Silvia L, Aldo C and Marco G. Purification and Characterization of novel Antifungal Compounds from the sourdough *Lactobacillus platarum* Strain 21B, *Appl. & Environ. Microbiol.* 2000; 66(9): 4084–4090.
- Shim TH, Lee TJ, Kim KC, Ryu MJ, Jung EH and Lee HK. Survey on the contents of residual pesticide in the agricultural products on Kangweon-Do, Kor. *J. Food Hygiene* 1992; 7(4): 149–156.
- Siegel M and Sisler HD. Antifungal compounds, *Interactions in Ecological System*, Marcel Dekker, Inc., New York 1977; 2: 277.
- Sin WC, Lee DS, Kim TH, Woo JH, Lee JM, Kim JG and Hong SD. Isolation and Characterization of *Acinetobacter* sp. WC-17 Producing Chitinase, *J. Microbiol. & Biotech.* 1995; 5(2): 80–86.
- Sivan A and Chet I. Degradation of fungal cell wall by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*, *J. Gen. Microbiol.* 1989; 135: 675–682.