

Rhizoctonia solani AGII-II에 대한 항진균 활성을 가지는 Bacillus sp. FF-9의 분리 · 동정 및 최적 배양조건

박진철 · 유지현 · 차재영 · 김민석 · 조영수*

동아대학교 응용생명공학부 생명공학과

(2004년 9월 6일 접수; 2004년 12월 2일 수리)

잔디병 유발균 *Rhizoctonia solani* AGII-II에 대한 강한 항진균 활성을 가지는 균주를 토양에서 분리 · 동정하고 최적 배양조건을 확립하였다. 분리된 균주를 16S rDNA sequence로 동정한 결과 *Bacillus* sp.로 *Bacillus* sp. FF-9로 명명하였다. *Bacillus* sp. FF-9 균체의 생육은 LB배지를 사용하여 30°C에서 24시간 진탕배양한 결과 6시간 이후부터 급격히 증가하여 12시간째 가장 높은 생육을 나타내었다. 피검균인 *Rhizoctonia solani* AGII-II에 대한 최대 항진균 활성은 18시간째에 나타났으며, 최적 온도는 30°C, 최적 pH는 8.0에서 가장 높은 항진균 활성을 나타내었다. 탄소원과 질소원 실험에서는 1% lactose와 1% yeast extract에서 높은 항진균 활성을 나타내었고, 미량원소 첨가에 따른 항진균 활성은 0.15% K₂HPO₄에서 가장 높은 항진균 활성을 나타내었다.

Key words: 항진균 활성, *Bacillus* sp., *Rhizoctonia solani* AGII-II

서 론

오늘날 농업은 화학비료나 농약의 과다사용, 염류의 집적현상 등을 초래하여 농가의 소득저하, 작물의 품성저하 등이 현저히 나타나고 있다.¹⁾ 따라서, 화학비료나 농약의 사용을 줄이거나 대체 할 수 있는 생물학적 처리가 대두되고 있으며²⁾ 특히, 토양 생태계의 변화나 생물학적 방제의 기술이 미생물에 의해 가능하다는 것이 국내외 여러 연구자들에 의해 입증되어지고 있다.^{3,4)} 지금까지의 농약은 화학농약에 의존 과다사용 되어 농약에 대한 내성 병원성 미생물 출현의 문제점이 제기되고 있으며, 많은 연구자들에 의해 여러 가지 환경으로부터 화학농약을 대체할 수 있는 생물학적 방제 기술의 개발을 위해 많은 길항미생물을 분리하고 사용하기 위한 노력을 하고 있다.⁵⁾

토양 전염 병원성 진균으로는 탄저병 원인균인 *Colletotrichum gloeosporioides*,⁶⁾ 식물의 상처부위를 통해 감염 또는 전염되어 썩는 부패병원균인 *Fusarium oxysporum*,⁷⁾ 근부병원균인 *Rhizoctonia solani*,⁸⁾ 흑색썩음균핵병원균인 *Sclerotium cepivorum*,⁹⁾ 식물역병균인 *Phytophthora capsici*,¹⁰⁾ 세균성 병원균으로 연부병원 *Erwinia carotovora*¹¹⁾ 등이 있으며, 이들 식물 병원균들은 작물의 안정적 생산에 제한요인이 되고 있다.¹²⁾ 이러한 식물 병원균들의 방제를 위해 여러 종류의 농약이 사용되고 있으나, 특히 토양 전염 병원균들은 눈에 잘 보이지 않는 땅 속의 뿌리 또는 괴경 등이 침입부위이므로 효과적인 방제가 어렵다. 또한, 독성 농약의 과다 사용으로 인한 환경오염이 문제가 되고 있어 효과적이면서 자연 친화적인 방제 방법의 개발이 요구되고 있다.¹³⁾

최근 생물학적 방제방법에 대한 연구가 활발히 진행되면서 우수한 항진균 활성을 가지는 미생물의 분리가 많이 이루어지

고 있으며 특히, *Bacillus* sp.와 *Streptomyces* sp.에서 진균에 대한 강한 항진균 활성을 가진다는 결과가 보고되고 있다.¹⁴⁾ 이 중 *Bacillus* sp.는 대부분이 인간에게 비병원성이고, 쉽게 유전자 조작이 가능하며 배양이 용이한 특성을 가지고 있다. 더욱이, 내생포자의 형성으로 오랜기간 유지 및 보존이 용이하고 항생물질 생산과 내생포자 형성 등의 이유로 생물학적 방제의 재료로서 다른 균에 비해 광범위하게 이용되고 있다. 특히, *B. brevis*,¹⁵⁾ *B. cereus*,¹⁶⁾ *B. macerans*,¹⁷⁾ *B. pumilis*,¹⁸⁾ *B. subtilis*¹⁷⁾ 등이 이용되었으며, *Bacillus subtilis*에 관한 연구가 가장 많이 보고되고 있다.¹⁹⁾

따라서 본 연구에서는 채소작물의 모잘록병, 벼 잎집 무늬 마름병, 황색 마름병, 잔디의 갈색화 등 여러 가지의 식물병을 유발하며, 특히 잔디의 생육상에서 나타나는 많은 식물병 유발균 중 대부분을 차지하고 있는 *Rhizoctonia solani* AGII-II^{13,20,21)}에 대한 강한 항진균 활성을 가지는 균주를 분리하여 그 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

균주의 분리. 토양으로부터 항진균 활성을 가지는 균주를 분리하기 위하여 경상남도 거제시 해금강 일대의 저병해 경작지 토양시료를 채취하였다. 이를 0.85% NaCl 멸균수에 현탁, 희석한 후 LB(Tryptone 1%, Yeast extract 0.5%, NaCl 0.15%) 고체 평판배지에 도말하여, 30°C에서 2일간 배양한 후 순수 독립 colony만을 일차적으로 분리하였다. 1차 분리된 균주를 LB 액체배지에서 30°C, 24시간 진탕 배양하고, 잔디 병원균으로 잘 알려진 피검균 *Rhizoctonia solani* AGII-II의 포자 현탁액을 도말한 PDA(Potato Dextrose Agar) 평판배지에 도말하여 30°C, 3~4일간 배양한 후 가장 우수한 포자의 생육억제 활성을 나타내는 균주를 최종적으로 선별하여 본 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 균주의 항진균 활성을 유지하기 위해 LB 배지에서

*연락처

Phone: 82-51-200-7586, Fax: 82-51-200-7505
E-mail: choys@daunet.donga.ac.kr

계대 배양하면서 사용하였다.

균주의 동정. 선발된 균주의 동정을 위해서 16S rDNA의 부분염기서열을 분석하였다. 그리고 이 균주를 2% glutaraldehyde (0.1% MgSO₄ 함유 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2)로 24시간 동안 실온에서 전 고정한 다음 0.1 M cacodylate buffer(pH 7.2)로 2시간 동안 세척하고, 0.2 M cacodylate buffer(pH 7.4)에 1% 농도가 되게 녹인 osmic acid(OsO₄) 용액으로 4°C에서 24시간 동안 처리하여 고정시켰다. 고정된 sample에서 용액을 제거한 뒤에 50, 70, 80, 90 및 95% 에탄올에서 각각 10분간 2회씩 탈수시켰다. 탈수한 뒤에 sample을 임계점 건조기에서 건조하고 platinum coating 한 다음 주사 전자 현미경(SEM, JSM-6700F, JEOL, Tokyo, JAPAN)으로 형태를 관찰하였다.^{22,23)}

배양시간에 따른 균체 생육 및 항진균 활성 측정. 선발된 균주의 배양시간에 따른 균체의 생육과 항진균 활성을 측정하기 위하여 LB 액체배지에서 30°C, 24시간동안 180 rpm으로 진탕 배양한 전배양액을 동일한 배지에 2% 접종하고 3시간 간격으로 36시간 동안 spectrophotometer(UVmini-1240, Shimadzu, Kyoto, JAPAN)로 660 nm에서 균체의 생육을 측정하였다. 선발된 균주의 항진균 활성을 측정하기 위해 피검균인 *Rhizoctonia solani* AGII-II를 28°C에서 7일간 배양하고 배양한 plate에 0.85% NaCl 멸균수 10 ml/를 가하여 10⁴~10⁵ spores/ml로 포자액을 제조하여 4°C에 보관하면서 사용하였다. 조제된 포자액 0.1 ml을 PDA배지에 도말하고 선발된 균주의 배양액을 12,000 rpm으로 15분간 원심분리한 상등액 50 µl를 paper disk(8 mm)법²⁴⁾으로 측정하였다.

배양온도와 초기 pH에 따른 균체 생육 및 항진균 활성 측정. 배양온도의 변화에 따른 영향을 검토하기 위하여 LB 액체배지에 전배양액을 2% 접종한 후 20, 30, 40 및 50°C에서 180 rpm으로 18시간 배양하여 균체의 생육 및 항진균 활성을 측정하였다. 초기 pH의 변화에 따른 영향은 LB 액체배지를 pH 4.0~10.0으로 각각 조정하여 동일한 방법으로 배양한 후 균체의 생육 및 항진균 활성을 측정하였다.

탄소원에 따른 균체 생육 및 항진균 활성 측정. 탄소원 종류에 따른 영향을 검토하기 위하여 LB 배지의 탄소원으로 glucose, galactose, maltose, lactose 및 sucrose를 각각 1% 농도로 넣고 배양액 초기 pH를 8.0으로 조정하였다. 전배양액을 2% 접종한 후 30°C에서 180 rpm으로 18시간 배양하여 균체의 생육 및 항진균 활성을 측정하였다. 또한, 첨가한 탄소원 중 균체의 생육 및 항진균 활성이 가장 우수한 탄소원을 각각 1, 2, 3, 4 및 5% 농도로 첨가하여 균체의 생육 및 항진균 활성에 미치는 탄소원 농도를 결정하였다.

질소원에 따른 균체 생육 및 항진균 활성 측정. 질소원 종류에 따른 영향을 검토하기 위하여 앞의 결과에서 선택된 탄소원을 최적 농도로 넣어주고 LB 배지의 조성 중 tryptone 대신에 peptone, soytone, yeast extract, malt extract, beef extract 등의 유기 질소원과 (NH₄)₂SO₄, NH₄Cl 등의 무기 질소원을 각각 1% 농도로 넣고 배양액 초기 pH를 8.0으로 조정하였다. 전배양액을 2% 접종한 후 30°C에서 180 rpm으로 18시간 배양하여 균체의 생육 및 항진균 활성을 측정하였다. 측정된 질소원 중 균체의 생육 및 항진균 활성이 가장 우수한 질소원을 각각 1,

2, 3, 4 및 5% 농도로 첨가하여 균체의 생육 및 항진균 활성이 가장 우수한 질소원의 농도를 결정하였다.

무기염류에 따른 균체 생육 및 항진균 활성 측정. 무기염류에 따른 영향을 검토하기 위하여 앞서 결정된 탄소원과 질소원을 최적의 농도로 첨가하고 LB 배지 조성 중 NaCl 대신에 MgSO₄, K₂HPO₄, KH₂PO₄, FeSO₄ 및 CaCl₂을 각각 0.15% 농도로 첨가하고 배양액 초기 pH를 8.0으로 조정하였다. 전배양액을 2% 접종한 후 30°C에서 180 rpm으로 18시간 배양하여 균체의 생육 및 항진균 활성을 측정하였다.

항균 spectrum. 선발된 균주의 항진균 활성 및 항균 활성을 측정하기 위하여 잔디 병원균으로 잘 알려진 *Rhizoctonia cerealis*(잎마름병), *Rhizoctonia oryzae*(흰마름병), *Rhizoctonia solani* AGI-1A(갈색마름병), *Rhizoctonia solani* AGII-II(갈색퍼짐병), *Colletotrichum gramminicola*(탄저병), *Pythium* spp.(피시움 클라이트병), *Erwinia carotovora* KCCM32003(연부병), *Salmonella typhimurium* KCTC 2514 총 8종을 한국잔디연구소와 유전자원센터(KCTC)로부터 분양받아 계대 배양 후 사용하였다. 항균 실험은 paper disk법을 이용하여 disk 주변의 저지환의 생성유무와 지름을 반복 측정하여 각 피검균에 대한 항균 spectrum을 실시하였다.

결과 및 고찰

균주의 분리 및 동정. 경상남도 거제시 해금강 일대의 저병해 경작지 토양시료로부터 분리된 균주들 중 항진균 활성을 가지는 균주를 분리하기 위하여 피검균인 *Rhizoctonia solani* AGII-II의 포자 현탁액이 도말된 PDA 배지에 도말하여 항진균 활성을 가지는 균주를 선별하였고, 이들 선별된 균주들을 LB 액체배지에서 30°C, 24시간 배양하여 paper disk법으로 항진균 활성이 가장 우수한 균주를 최종적으로 선별하여 본 실험에 사용하였다(Fig. 1). 최종 선별한 항진균 활성을 가지는 균주를 동정하고자 전자현미경으로 관찰한 결과(Fig. 2), 분리된 균주는 전형적인 간균의 형태를 취하고 있었으며 세포의 크기는 2.0×0.8 µm이었다. 한편 분리된 균주의 16S rDNA 부분 염기서열 569 bp를 결정한 결과(Fig. 3), *Bacillus amyloliquefaciens* 99.47%, *Bacillus atrophaeus* 99.26%, *Bacillus vallismortis* 99.12%, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* 98.94%의 높은 유사도를 나타내었다. 이상의 방법으로 동정한 결과 *Bacillus* sp.로 동정되었기에 본 연구자들에 의해 *Bacillus* sp. FF-9으로 명명되었다.

배양시간에 따른 균체 생육 및 항진균 활성의 변화. LB 배지에서 배양시간에 따른 *Bacillus* sp. FF-9의 생육과 항진균 활성을 검토한 결과, Fig. 4에서와 같이 균체의 생육은 6시간 이후부터 급격히 증가하여 배양 12시간에서 가장 높은 생육을 나타내었으며 그 이후부터 점차적으로 감소하다가 일정한 수치를 나타내었다. 항진균 활성은 3시간 이후부터 증가하기 시작하여 배양 18시간째에 최대 활성을 나타내었다. 결과적으로 항진균 활성 물질은 균체의 생육에서 대수성장기 이후에 급격히 증가하기 시작하여 그 이후에 최대 생산량을 나타내었다. 대수성장기 이후에 분비되는 항진균성 물질은 영양원이 고갈된 상태에서

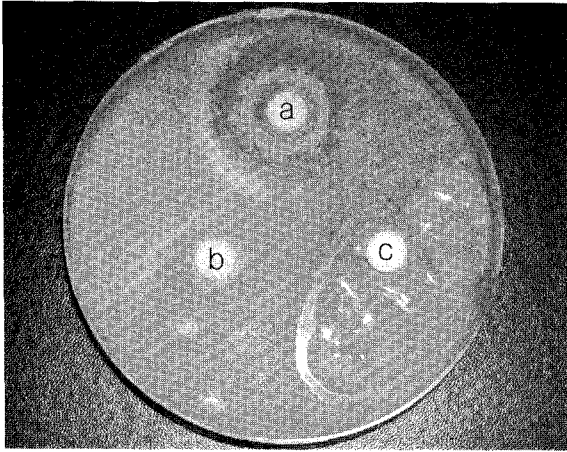


Fig. 1. Antifungal activity of *Bacillus* sp. FF-9 against *Rhizoctonia solani* AGII-II. a: supernatant, b: cell pellet, c: culture broth.

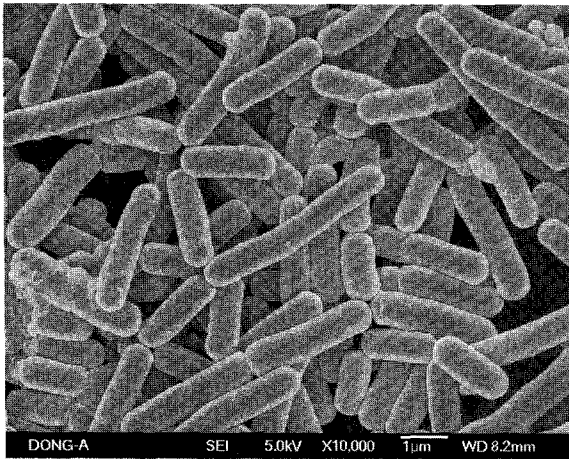


Fig. 2. Scanning electron micrograph of the isolated *Bacillus* sp. FF-9 ($\times 10,000$).

생산되기 때문에 일반적인 생육시기별로 보면 정지기 때 축적된다고 한다.^{25,26)}

배양온도에 따른 균체 생육 및 항진균 활성 비교. *Bacillus* sp. FF-9의 온도에 따른 균체의 생육 및 항진균 활성을 검토하기 위하여 LB 배지에 전배양액을 접종하고 20, 30, 40 및 50°C에서 배양한 결과는 Fig. 5와 같다. 균체의 생육과 항진균 활성은 20°C에서 40°C까지 비교적 넓은 범위에서 높게 나타났으며, 30°C에서 항진균 활성이 가장 높게 나타났다. 하지만

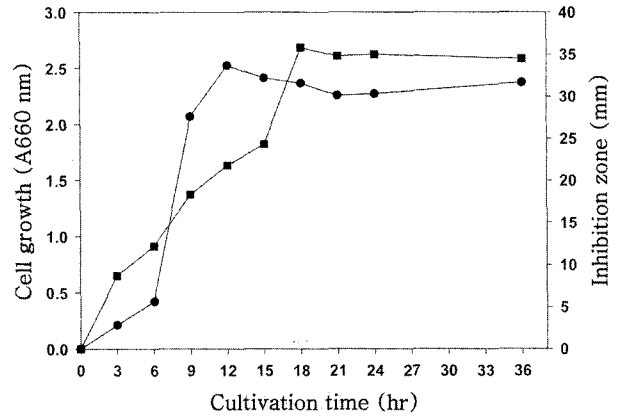


Fig. 4. Profiles of the cell growth and the antifungal activity by *Bacillus* sp. FF-9 during cultivation. -●-: Cell growth, -■-: Antifungal activity.

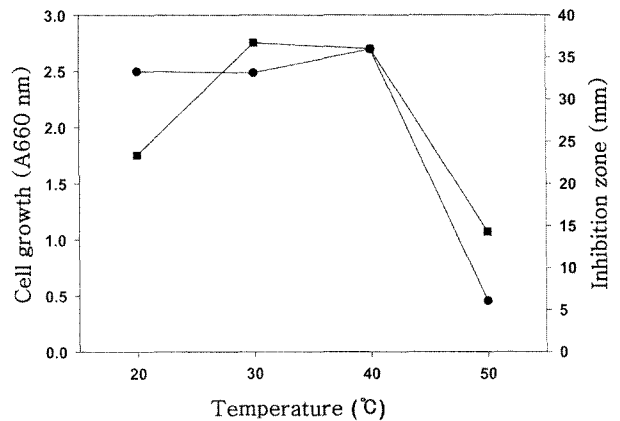


Fig. 5. Effect of temperature on the cell growth and the antifungal activity by *Bacillus* sp. FF-9. -●-: Cell growth, -■-: Antifungal activity.

40°C 이상의 온도에서는 균체의 생육과 항진균 활성이 급격하게 감소하였다. 김 등⁴⁾은 *Bacillus* sp.의 경우 25~30°C의 배양 온도에서 항진균 활성이 높다고 보고하였고, 정 등²⁷⁾은 *Bacillus megaterium*의 경우 30°C에서 항진균 활성이 높다고 보고하여 유사한 결과를 나타내었다. 따라서 본 연구에서 분리된 *Bacillus* sp. FF-9 균주를 제제화하여 시비시 우리나라 경작시기의 기후 조건에서 그 항진균 활성 및 생육을 충분히 유지 할 것으로 추정된다.

초기 pH에 따른 균체 생육 및 항진균 활성 비교. *Bacillus*

```

5'-ACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCT
TGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGC
CTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTG
TCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGTACCCTTACA
GATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGG
CGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAG
ACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATG
GACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGTGATGAAGTTTTTCGGAT
CGTAAAGTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGC
ACCTTGACGGTACCTAACAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGC
CGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAG
GGCTCGCAGGCGGTTTCTT-3'
    
```

Fig. 3. 16S rDNA partial sequence (569 bp) of the isolated *Bacillus* sp. FF-9.

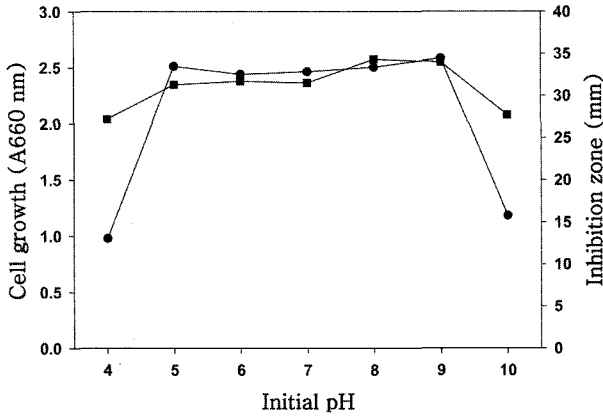


Fig. 6. Effect of initial pH on the cell growth and the antifungal activity by *Bacillus* sp. FF-9. -●-: Cell growth, -■-: Antifungal activity.

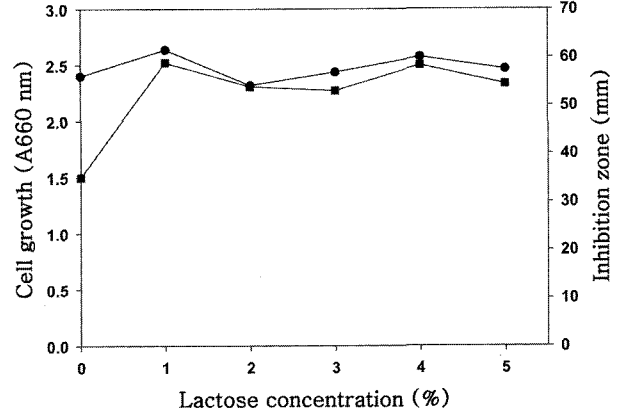


Fig. 7. Effect of lactose concentration on the cell growth and the antifungal activity by *Bacillus* sp. FF-9. -●-: Cell growth, -■-: Antifungal activity.

Table 1. Effect of various carbon sources on the cell growth and the antifungal activity by *Bacillus* sp. FF-9

Carbon source	Cell growth (Absorbance at 660 nm)	Inhibition zone (mm)
Glucose	2.6427	4.3
Galactose	2.6821	3.6
Maltose	2.6409	4.3
Lactose	2.6449	5.4
Sucrose	2.7159	4.0

The medium contained 1.0% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.15% NaCl, and the carbon sources were added at a concentration of 1.0% (w/v).

Table 2. Effect of various nitrogen sources on the cell growth and the antifungal activity by *Bacillus* sp. FF-9

Nitrogen source	Cell growth (Absorbance at 660 nm)	Inhibition zone (mm)
Tryptone	2.6501	6.5
Peptone	2.2801	6.6
Soytone	2.7466	6.6
Yeast extract	2.4250	6.7
Malt extract	2.2798	6.5
Beef extract	2.0959	6.5
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.3326	5.6
NH ₄ Cl	1.0875	5.0

The medium contained 1.0% lactose, 0.5% yeast extract, 0.15% NaCl, and the nitrogen sources were added at a concentration of 1.0% (w/v).

sp. FF-9의 초기 pH에 따른 균체의 생육 및 항진균 활성을 검토하기 위하여 LB 배지의 pH를 4.0~10.0으로 각각 조정하여 배양한 결과는 Fig. 6과 같다. 균체의 생육과 항진균 활성은 초기 pH 5에서 pH 9까지 비교적 넓은 범위에서 높게 나타났으며, 이러한 pH범위는 주 등²⁸⁾의 *Bacillus ehimensis*에 의한 시험보다 넓은 범위에서 항진균 활성을 나타내었다.

탄소원에 따른 균체 생육 및 항진균 활성 비교. 탄소원의 종류에 따른 *Bacillus* sp. FF-9의 생육 및 항진균 활성을 검토하기 위하여 LB 배지의 탄소원으로 glucose, galactose, maltose, lactose 및 sucrose를 첨가하여 배양한 결과는 Table 1과 같다. 균체의 생육과 항진균 활성은 탄소원을 첨가한 모든 배양액에서 비교적 양호하게 나타났으며, sucrose를 사용했을 때 균체의 생육이 가장 높게 나타났다. 특히 항진균 활성은 lactose를 사용했을 때 가장 높게 나타내어 lactose의 농도를 1, 2, 3, 4 및 5%로 첨가하여 균체의 생육 및 항진균 활성을 검토한 결과(Fig. 7), lactose의 농도를 1%로 첨가하였을 때 균체의 생육과 항진균 활성이 가장 높게 나타났다. 이는 김²⁹⁾이 보고한 결과와 마찬가지로 탄소원의 첨가시 적정농도 이상에서는 catabolite repression으로 인해 항생물질 생산성이 오히려 감소하는 경향을 나타내었다.

질소원에 따른 균체 생육 및 항진균 활성 비교. 질소원의 종류에 따른 *Bacillus* sp. FF-9의 생육 및 항진균 활성을 검토하기 위하여 LB 배지의 질소원으로 tryptone 대신 peptone, soytone, yeast extract, malt extract, beef extract 등의 유기 질소원과 (NH₄)₂SO₄, NH₄Cl 등의 무기 질소원을 첨가하여 배양

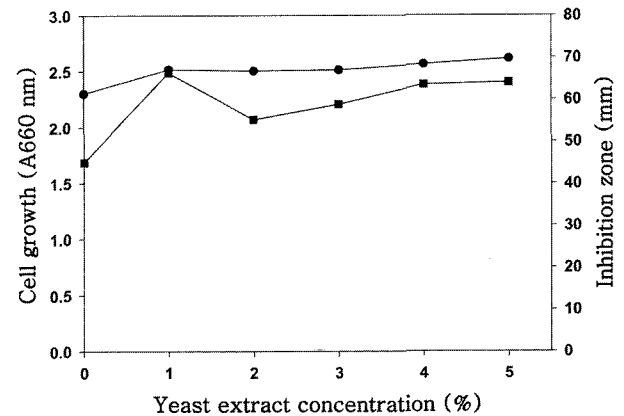


Fig. 8. Effect of yeast extract concentration on the cell growth and antifungal activity by *Bacillus* sp. FF-9. -●-: Cell growth, -■-: Antifungal activity.

한 결과는 Table 2와 같다. 균체의 생육은 유기 질소원인 soytone에서 가장 높게 나타났으며, 무기 질소원인 NH₄Cl에서는 가장 낮았다. 항진균 활성도 대체적으로 유기 질소원이 무기 질소원 보다 높게 나타났으며, 특히 yeast extract에서 가장 높게 나타내어 yeast extract의 농도를 1, 2, 3, 4 및 5%로 첨가하여 균체의 생육 및 항진균 활성을 검토하였다(Fig. 8). 균체의 생육은 yeast extract의 농도가 증가함에 따라 약간 증가

Table 3. Effect of various salts on the cell growth and the antifungal activity by Bacillus sp. FF-9

Salt	Cell growth (Absorbance at 660 nm)	Inhibition zone (mm)
NaCl	2.4527	6.7
MgSO ₄	2.5455	6.9
K ₂ HPO ₄	2.4216	7.3
KH ₂ PO ₄	2.3253	6.4
FeSO ₄	2.7950	7.1
CaCl ₂	2.4209	6.6

The medium contained 1.0% lactose, 1.0% yeast extract, and the salts were added at a concentration of 0.15% (w/v).

Table 4. Antifungal spectrum of Bacillus sp. FF-9 against various plant pathogenic fungi

Test fungi	Antifungal activity
<i>Rhizoctonia cerealis</i>	++
<i>Rhizoctonia oryzae</i>	++
<i>Rhizoctonia solani</i> AGI-1A	++
<i>Rhizoctonia solani</i> AGII-II	+++
<i>Colletotrichum graminicola</i>	++
<i>Pythium</i> spp.	++
<i>Erwinia carotovora</i> KCCM 32003	-
<i>Salmonella typhimurium</i> KCTC 2514	-

-: non inhibition zone

+: diameter of inhibition zone 0<x≤20 mm

++: diameter of inhibition zone 20 mm<x≤40 mm

+++ : diameter of inhibition zone 40 mm<x

하는 경향을 나타내었지만, 항진균 활성은 1% 농도에서 가장 높게 나타내어 탄소원에서와 같이 적정농도 이상에서는 저해를 받는 경향을 나타내었다. 이렇게 항진균 활성에 있어서 가장 큰 영향을 미치는 질소원으로 정 등²⁷⁾은 yeast extract가 우수하였다고 하였으며, 이 등¹⁹⁾도 질소원으로 yeast extract 등이 가장 높은 항진균 활성 효과가 있었다고 보고하여 본 연구에서 분리된 *Bacillus* sp. FF-9 균주와 유사한 결과를 나타내었다.

무기염류에 따른 균체 생육 및 항진균 활성 비교. 미량성분으로서 무기염류의 종류에 따른 *Bacillus* sp. FF-9의 생육 및 항진균 활성을 검토하기 위하여 LB 배지 조성 중 NaCl 대신에 MgSO₄, K₂HPO₄, KH₂PO₄, FeSO₄ 및 CaCl₂를 첨가하여 배양한 결과는 Table 3과 같다. 균체의 생육과 항진균 활성은 MgSO₄, K₂HPO₄ 그리고 FeSO₄가 가장 좋은 효과를 보였다. 특히 K₂HPO₄는 다른 무기염류에 비해 균체의 생육은 그리 높지 않지만 항진균 활성은 가장 높게 나타냄으로써 K₂HPO₄가 항진균 활성에 촉진적인 작용을 하는 것으로 사료되며, 또한 식물생장인자로 토양에 많이 시비하는 비료성분이어서 토양에 충분히 잔류하고 있으므로 본 연구에서 분리된 *Bacillus* sp. FF-9 균주가 쉽게 이용하여 항진균 활성을 나타낼 것으로 추정된다.

항진균 spectrum. 선발된 *Bacillus* sp. FF-9 균주가 8종의 잔디에 관련된 병원성을 나타내는 병원균에 대한 항진균 활성 및 항균 활성을 검토하여 spectrum을 작성한 결과는 Table 4와 같다. *Bacillus* sp. FF-9 균주는 피검균으로 사용했던 진균들에 모두 억제력을 나타내었고 특히 *Rhizoctonia solani* AGII-II에서

우수한 항진균 활성을 나타내었다. 하지만 세균병(*Erwinia carotovora*, *Salmonella typhimurium* KCTC 2514)에는 항균 활성을 나타내지 않았다. 따라서 방제범위가 넓은 진균성 잔디병 원균의 방제균으로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

- Suzui, T. (1992) In *New Biopesticides*. pp. 55-76.
- Leong, J. (1986) Siderophores, their biochemistry and possible role in biocontrol of plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **24**, 187-209.
- Baker, R. (1968) Mechanisms of biological control of soilborne plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **6**, 263-294.
- Kim, S. S., Joo, G. J., Uhm, J. Y., Kim, Y. J. and Rhee, I. K. (1997) Antifungal activity of *Bacillus* sp. SS279 and biocontrol of apple white rot fungus, *Botryosphaeria dothidea*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 527-536.
- 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.
- Freeman, S., Katan, T. and Shabi, E. (1996) Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from avocado and almond fruits with molecular and pathogenicity tests. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1014-1020.
- So, I. Y. and Kim, H. M. (1980) On the occurrence and control of the rhizome rot of the common ginger caused by *Fusarium oxysporum* f. *zingiberi*. *Kor. J. Microbiol.* **18**, 172-179.
- Joo, Y. K. and Han, J. H. (1994) Antagonism of *Pseudomonas* spp. against *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. *Kor. Turfgrass Sci.* **8**, 47-52.
- Joo, G. J., Lee, I. H. and Kim, J. H. (2002) Chitinase production and isolation of *Serratia plymuthica* AL-1 antagonistic to white rot fungi from *Allium fistulosum* roots. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 135-141.
- Yun, G. H., Lee, E. T. and Kim, S. D. (2001) Identification and antifungal antagonism of *Chryseomonas luteola* 5042 against *Phytophthora capsici*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**, 186-193.
- Zink, R. T., Kemble, R. J. and Chatterjee, A. K. (1984) Transposon Tn5 mutagenesis in *Erwinia* subsp. *carotovora* and *E. carotovora* subsp. *atroseprica*. *J. Bacteriol.* **157**, 809-814.
- Lockwood, J. L. (1988) Evolution of concepts associated with soilborne plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **26**, 93-121.
- Lee, J. H. and Lee, E. Y. (2003) Screening of potent biofungicide for the growth inhibition of soilborne pathogenic fungi, *Rhizotonia solani*. *Kor. J. Life Science* **13**, 355-358.
- Kim, K. Y. and Kim, S. D. (1997) Biological control of *Pyricularia oryzae* blast spot with the antibiotic substances produced by *Bacillus* sp. KL-3. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 396-402.
- Bapat, S. and Shah, A. K. (2000) Biological control of fusarial wilt of pigeon pea by *Bacillus brevis*. *Can. J. Microbiol.* **46**, 125-132.
- Silo-Suh, A. L., Benjamin, J. L., Sandra, J. R., Haiyin, H., Jon, C. and Handelsman, J. (1994) Biological activities of two

- fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2023-2030.
17. Sharga, B. M. (1997) *Bacillus* isolated as potential biocontrol agents against chocolate spot on faba beans. *Can. J. Microbiol.* **43**, 915-924.
 18. Leifert, C., Li, H., Chidburee, S., Hampson, S., Workman, S., Sigeo, D., Epton, H. A. S. and Harbour, A. (1995) Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumilus* CL45. *Can. J. Microbiol.* **41**, 247-252.
 19. Lee, J. P. and Moon, B. J. (2001) Cultural characteristics of antagonistic bacterium, *Bacillus licheniformis* N1 against *Botrytis cinerea*. *Kor. J. Life Science* **11**, 173-180.
 20. Chet, I. and Baker, R. (1981) Isolation and biocontrol potential of *Trichoderma Hamatum* from soil naturally suppressive of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* **71**, 286-290.
 21. Elad, Y., Chet, I., Boyle, P. and Henis, Y. (1983) Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*. Scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. *Phytopathology* **73**, 85-88.
 22. APHA, AWWA, WEF. (1992) In *standard methods for the examination of water and wastewater* (18th ed.) Washington D.C.
 23. Lee, Y. S., Yoo, J. S., Chung, S. Y., Park, C. S. and Choi, Y. L. (2003) Microbial immobilization, characterization and isolation of nitrogen oxidizing bacteria. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **46**, 7-11.
 24. Kavanagh, F. (1975) Antibiotic assays. *Method Enzymol.* **43**, 53-76.
 25. Kim, S. I., Kim, I. C. and Chang, H. C. (1999) Isolation and identification of antimicrobial agent producing microorganism and sensitive strain from soil, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **28**, 526-533.
 26. Zuber, P., Nakano, M. M. and Marahiel, M. A. (1993) In *Peptide antibiotics*. Abraham, L. Sonenshein, J. A., Hoch, R. L. (eds.), *American Society Microbiology*, pp. 897-916.
 27. Jung, H. K. and Kim, S. D. (2003) Purification and characterization of an antifungal antibiotic from *Bacillus megaterium* KL39, a biocontrol agent of red-pepper phytophthora blight disease. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 235-241.
 28. Joo, G. J. and Kim, J. H. (2002) Optimization of large scale culture conditions of *Bacillus ehimensis* YJ-37 antagonistic to vegetables damping-off fungi. *Kor. J. Life Science* **12**, 242-249.
 29. Kim, Y. S. (1992) Biocontrol bacteria, *Bacillus subtilis* YB-70 producing the antifungal antibiotics and genetic improvement, MS Thesis, Yeungnam University, Korea.

Isolation, Identification and Optimal Culture Condition of *Bacillus* sp. FF-9 Having Antifungal Activity on the Turf Grass Pathogens Caused by *Rhizoctonia solani* AGII-II

Jin-Chul Park, Ji-Hyun Yoo, Jae-Young Cha, Min-Seok Kim and Young-Su Cho* (Department of Biotechnology, Faculty of Applied Bioscience, Dong-A University, Busan, 604-714, Korea)

Abstract: In this study, established soil-borne *Bacillus* sp. FF-9 with strong antifungal activity was isolated for identification and to determine optimal culture condition. By using 16s rDNA sequencing method, FF-9 of the selected bacteria was identified as genus *Bacillus* sp.. *Bacillus* sp. FF-9 was cultured at 30°C, for 24 h in the LB medium. Cell growth increased quickly after 6 h and the highest cell growth was indicated at 12 h. The most antifungal activity against *Rhizoctonia solani* AGII-II appeared at 18 h and the optimal temperature and pH were 30 and pH 8.0, respectively. A testing of carbon and nitrogen sources showed the highest antifungal activity at 1% lactose and 1% yeast extract Furthermore an addition of salt showed the most antibiotic activity in the 0.15% K₂HPO₄.

Key words: antifungal activity, *Bacillus* sp., *Rhizoctonia solani* AGII-II

*Corresponding author