

잣빛 곰팡이병원균 *Botrytis cinerea*에 대한 *Bacillus* sp. KMU-1011의 항진균활성

박성민 · 김현수 · 유대식*
계명대학교 미생물학과

Antifungal Activity of *Bacillus* sp. KMU-1011 Against Gray Mold Causing *Botrytis cinerea*. Park, Sung Min, Hyun Soo Kim, and Tae Shick Yu*. Department of Microbiology, Keimyung University, Daegu 701-704, Korea – We isolated a bacterium which produces antifungal substances from the Lake of Saimaa soils in Finland. The isolated strain was identified as *Bacillus* sp. and shown a strong antifungal activity on plant pathogenic fungi. *Bacillus* sp. KMU-1011 produced maximum level of antifungal substances under incubation aerobically at 24°C for 48 hours in nutrient broth containing 1.0% glucose and 1.0% polypeptone at 180 rpm and initiated pH adjusted to 6.0. Precipitate of culture broth by 30~60% ammonium sulfate precipitation exhibited strong antifungal activity against *Botrytis cinerea* KACC 40573 by dry cell weight. Chloroform extract of cultured broth also shown fungal growth inhibitory activity against *C. gloeosporioides* KACC 40804, *D. bryoniae* KACC 40669, *F. oxysporum* KACC 40037, *F. oxysporum* KACC 40052, *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* KACC 40537, *F. oxysporum* KACC 40902, *M. cannonballus* KACC 40940, *P. cam-bivora* KACC 40160, *R. solani* AG-1 KACC 40101, *R. solani* AG-4 KACC 40142, and *S. sclerotiorum* KACC by agar diffusion method.

Key word: *Botrytis cinerea*, antifungal activity, *Bacillus* sp. KMU-1011

서 론

잣빛 곰팡이병(Gray mold)은 전 세계적으로 발생되어지며 노지 및 시설재배지에서 흰가루병과 함께 큰 피해를 유발하는 대표적인 식물병원성 질병이다. 잣빛 곰팡이병원균인 *Botrytis cinerea*는 불완전균류에 속하며 분생자, 분생포자 및 균핵을 형성한다. 현재까지 *B. cinerea*의 완전세대는 국내에서 보고되지 않았으나, 외국에서 *B. fukiana*로 알려져 있다. 분생자경은 갈색이며 직립 밀생하고 최고 2 μm 까지 성장하고 끝부분에 작은 돌기가 형성되며 돌기의 끝에 많은 분생포자가 형성된다. 분생포자는 무색의 타원형 또는 계란형으로 크기는 10~11 \times 6~7.5 μm 의 분생포자를 형성하며 균핵은 흑색의 부정형으로 나타난다. 균의 발육온도는 5~30°C로 넓은 편이며, 최적온도는 20°C 전후이다. 포자 형성온도는 8~20°C이며 최적 포자 형성온도는 15°C이다[1, 2].

잣빛 곰팡이병은 주로 전정부위 등의 전단면에 감염되어 발병되어지고, 잎, 가지, 꽃 그리고 과실에 발생한다. 감염된 잎의 경우 변색하여 수축되고 많은 잣빛의 분생포자가 형성되며 가지에서는 전정부위로부터 침입이 야기되어 상·하부로 병반이 진전되면서 가지가 부패하고 많은 분생포자가 형

성된다. 꽃의 경우 개화를 마친 꽃잎에 발생하기 시작하여 암꽃의 꽃잎이 먼저 물러지고 대형의 원형 반점이 나타나며, 진전되면 꽃이 변색되고 많은 분생포자에 뒤덮여 피사하게 된다. 과실의 경우 과피의 털에 부착하여 담갈색 내지 갈색의 세로줄무늬 모양의 상처를 발생시켜 외관을 손상시키며, 저장과실의 경우 처음에는 과육이 변색하고 심하면 과실전체가 부패한다. 저온저장 중에 과실이 연화되는 것을 보면 열매꼭지(과경부)를 중심으로 발병하는데 부패과육은 부정형의 원형병반을 나타낸다[3, 4].

일반적으로 잣빛 곰팡이병은 비교적 저온 다습한 조건일 때 피해가 큰 병으로서, 노지의 작물보다는 시설 재배지의 작물에 특히 많이 발생하는데 이것은 외부의 온도가 낮기 때문에 환기를 잘 하지 않고 밤에는 피복을 하여 하우스내의 습도가 높게 유지되기 때문이다. 또한 다른 작물병원성 곰팡이의 경우처럼 시설재배의 보편적 특징인 연작을 하기 때문에 병반부에 남아서 균사나 균핵으로 월동하며 이듬해 발아하여 많은 분생포자가 생기며 비산하여 전염되어진다. 잣빛곰팡이는 빠르게 내성을 획득하기 때문에 정기적으로 화학농약을 살포하여 발병을 억제한다. 따라서 화학농약에 대한 작물의 노출이 많은 편이며 이로 인하여 토양의 황폐화와 작물에 잔류하는 농약 등의 문제가 야기되어지고 있다[5-7]. 이러한 화학농약에 의한 여러 문제점들을 해결하기 위하여 천연물질을 이용한 다양한 항진균제의 개발 및 연구[8, 9]가 진행되어지고 있으며, *Bacillus* sp.[10-14], *Pseudomonas*

*Corresponding author

Tel: 82-53-580-5252, Fax: 82-53-580-5164

E-mail: tsyu@kmu.ac.kr

sp.[15]와 *Streptomyces* sp.[16, 17] 등과 같은 미생물을 이용하여 항생물질과 미생물 제제의 개발을 위한 노력들이 지속적으로 이루어지고 있다.

이에 본 연구에서는 잣빛 곰팡이병을 야기하는 *B. cinerea*에 대하여 강한 항진균 활성을 나타내는 균주를 분리하고 길항균주가 생산하는 항진균 물질의 생산조건을 검토하여 잣빛 곰팡이병을 방제할 수 있는 미생물제제의 개발을 위한 기초를 마련하고자 한다.

재료 및 방법

균주선별 및 사용배지

핀란드의 Lappeenranta 지역에 위치하는 Saimaa 호수의 토양시료 10 g을 멸균수 90 ml에 넣고 37°C water bath에서 10분간 진탕배양 후, 50°C water bath에서 30분간 열처리를 하였다. LB agar(1.0% tryptone, 0.5% yeast extract, 1.0% sodium chloride, 1.5% agar, pH 7.0 ± 0.2)배지에 단계희석법으로 도달하여 37°C에서 3일간 배양한 후, 증식한 균주들을 분리하였다. 증식한 균주들을 순수 분리한 후, 잣빛 곰팡이병의 원인균인 *Botrytis cinerea* KACC 40573을 방제할 수 있는 균주를 선별하기 위하여 PDA(potato dextrose agar, 2.0% dextrose, 0.4% potato starch, 1.5% agar, pH 5.6 ± 0.2)배지에서 대치배양(pairing culture)을 실시하여 *B. cinerea*의 생육을 저해하는 균주들을 일차적으로 선별하였다. 선별한 균주들을 대상으로 가장 높은 생육저지대를 형성하는 균주를 선별하기 위하여 작물병원성 곰팡이를 직경 6 mm 크기의 culture disc로 접종하여 24°C에서 24시간 배양한 후, 3 cm 떨어진 곳에 선별한 균주를 획선 접종하고 24°C에서 7일간 배양하면서 생육저지대를 조사하였다. 공시균주인 *B. cinerea*는 농촌진흥청 농업생명공학연구원 한국농용미생물보존센터(Korean Agricultural Culture Collection, KACC)에서 분양 받아 사용하였다.

분리균주의 동정

항진균 활성을 나타내는 선별균의 분류학적 위치를 검토하기 위하여 형태학적, 배양학적, 생화학적 특성을 검토하였으며, 도출된 결과는 Bergey's manual of systematic bacteriology[18]를 참고하였으며, API kit(bioMerieux, France)을 이용하여 동정하였다.

항진균 물질의 생산

항진균 물질의 생산을 위한 기본배지를 선택하기 위하여 LB broth(1.0% tryptone, 0.5% yeast extract, 1.0% sodium chloride, pH 7.0 ± 0.2), nutrient broth(NB, 0.5% peptone from meal, 0.3% meat extract), potato dextrose broth(PDB, 2.0% dextrose, 0.4% potato starch), trypticase soybean broth(TSB, 1.7% digest of casein, 0.3% soytone,

0.5% sodium chloride, 0.25% dextrose), 그리고 yeast malt broth(YM broth, 0.3% yeast extract, 0.3% malt extract, 0.5% peptone, 1.0% dextrose)를 제조하여 pH를 7.0으로 조정 한 후, 121°C에서 15분간 멸균하여 사용하였다. 전배양액은 24시간 전에 LB broth에 단일 콜로니를 접종하여 사용하였으며 각각의 삼각플라스크에 전배양액 100 µl를 접종한 후, 30°C, 180 rpm에서 24시간 배양하였다. 선발균의 생육은 spectrophotometer(Shimadzu, Japan)를 이용하여 660 nm에서 조사하였으며, 항진균 활성의 조사를 위하여 24°C에서 15일간 *B. cinerea*를 배양한 후, plate에 멸균수 10 ml를 가하여 3.8×10⁶ spores/ml로 포자 현탁액을 제조하여 4°C에 보관하면서 사용하였다. 제조한 포자 현탁액 0.1 ml를 PDA에 첨가하여 plate를 만든 후, 각각의 배양액을 12,000 rpm, 4°C에서 10분간 원심분리하고 상등액 20 µl를 paper disc(Ø 6 mm)에 침지하여 건조한 후, PDA plate에 얹어 24°C에서 7일간 배양하여 조사하였다.

항진균 물질의 생산에 미치는 배양온도 및 pH의 영향

배양온도의 변화에 따른 영향을 조사하기 위하여 앞에서 조사된 기본배지에 전배양한 선발균을 접종한 후, 24, 30, 37, 그리고 45°C에서 180 rpm, 24시간 배양하여 생육 및 항진균 활성을 조사하였다.

초기 pH의 변화에 따른 영향을 조사하기 위하여 기본배지의 pH를 3.0에서 10.0으로 각각 조정하여 동일한 방법으로 배양하여 조사하였다.

항진균 물질의 생산에 대한 탄소원 및 질소원의 영향

탄소원의 첨가에 따른 항진균 물질의 생산에 대한 영향을 조사하기 위하여 arabinose, fructose, glucose, glycerol, lactose, maltose, mannitol, soluble starch, sorbitol, 그리고 sucrose를 앞에서 조사된 기본배지에 1.0% 첨가하고 앞에서 조사된 pH로 조정 한 후 사용하였다.

질소원의 영향을 조사하기 위하여 앞에서 조사된 탄소원 1.0%를 기본배지에 첨가한 후, 질소원으로 ammonium chloride, ammonium phosphate, ammonium sulfate, bactopectone, bactotryptone, beef extract, corn steep liquor(CSL), malt extract, polypeptone, urea, 그리고 yeast extract를 각각 1.0%씩 첨가하고 pH를 조정하여 동일한 방법으로 조사하였다.

항진균 물질의 생산에 대한 배양일수의 영향

24~72시간동안 선별한 길항균주를 배양한 후, 24시간마다 배양액을 sampling 하여 배양시간에 따른 항진균 활성을 조사하였다.

조정제한 항진균 물질의 활성

선발된 균주의 항진균 활성을 조사하기 위하여 앞에서 조

사되어진 항진균 물질생산배지 300 ml을 제조하고 선발된 균주를 앞에서 조사한 최적배양조건에서 배양한 후, 10,000 rpm, 4°C에서 20분간 원심분리를 하여 상등액을 회수하였다. 항진균 활성을 나타내는 물질을 회수하기 위하여 회수한 배양액에 ammonium sulfate를 각각 0~30%와 30~60% 농도로 첨가한 후, 4°C에 12시간동안 정치하면서 항진균 물질의 침전을 유도하여 10,000 rpm, 4°C에서 20분간 원심분리 하여 회수하였다. 회수한 물질을 소량의 100 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)로 현탁한 후, 4°C에서 24시간 동안 투석하여 사용하였다. 공시균주인 *B. cinerea* KACC 40573의 포자현탁액을 50 ml의 PDB에 접종하고 동량의 회수한 물질을 각각 첨가하여 항진균 활성을 조사하였으며 대조구에는 동량의 Tris-HCl buffer(pH 8.0)를 첨가하였다.

항진균 Spectrum

다양한 작물병원성 곰팡이를 대상으로 하여 선발된 균이 나타내는 항진균 활성을 조사하였다. 항진균 활성을 조사하기 위하여 앞의 실험과 동일한 조건으로 200 ml 배양한 후, 배양액을 원심분리 하여 균체를 제거하고 상등액에 2배 volume의 chloroform을 첨가하여 항진균 물질을 용매층으로 이행시키고 용매를 회수하여 50°C 이하에서 감압농축한 후, 항진균 활성을 조사하였다. 조사한 작물 병원성 곰팡이는 공시균주로 사용한 *B. cinerea* KACC 40573을 포함하여 잡두 붉은점무늬병을 야기하는 *Botrytis fabae* KACC 40962, 고추 탄저병을 야기하는 *Colletotrichum gloeosporioides* KACC 40804, 참외 탄저병을 야기하는 *Colletotrichum orbiculare* KACC 40808, 수박 등의 박과작물에 덩굴마름병을 야기하는 *Didymella bryoniae* KACC 40669, 보리 질병을 야기하는 *Fusarium graminearum* KACC 41040, 토마토 시들음병을 야기하는 *Fusarium oxysporum* KACC 40037, 글라디올러스 마른썩음병을 야기하는 *Fusarium oxysporum* KACC 40052, 토마토 질병을 야기하는 *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* KACC 40537, 수박 덩굴썩음병을 야기하는 *Fusarium oxysporum* KACC 40902, 수박 질병을 야기하는 *Monosporascus cannonballus* KACC 40940, 사과나무 역병을 야기하는 *Phytophthora camvibora* KACC 40160, 벼 잎집무늬마름병을 야기하는 *Rhizoctonia solani* AG-1(IA) KACC 40101, 참외 줄기썩음병을 야기하는 *Rhizoctonia solani* AG-4 KACC 40142, 그리고 고추 균핵병을 야기하는 *Sclerotinia sclerotiorum* KACC 41065를 사용하였다.

결과 및 고찰

길항균주의 선별 및 동정

토양시료로부터 분리된 균주 중에서 육안관찰, 형태 및 증식양상이 서로 구별되어지는 56 균주를 순수분리 하였다. 갯

빛 곰팡이병을 야기하는 *B. cinerea* KACC 40573에 대한 길항균주를 선별하기 위하여 PDA plate에서 대치배양 하여 24°C에서 배양하면서 생육을 저해하는 것으로 판단되어지는 11 균주 일차적으로 선별하였다. 선발된 균주 중에서 *B. cinerea*에 대하여 가장 높은 생육저지대를 나타내는 균주를 선별하여 최종적으로 KMU-1011이라 명명하였다. KMU-1011는 그람 양성의 rod form으로 포자를 형성하였으며 형성된 집락은 원형으로 표면은 smooth하였으며 매끈한 광택을 나타내었다. KMU-1011은 호기성 세균으로 catalase, gelatin liquefaction, 그리고 nitrate reduction은 양성반응을 나타내었으나, citrate utilization, indole test, production of oxidase, voges-proskauer test는 음성으로 조사되었다. 이러한 결과를 바탕으로 Bergey's manual of systematic bacteriology를 이용하여 비교한 결과, *Bacillus* sp.로 분류되었다(Table 1). 이 결과를 바탕으로 *Bacillus* sp.를 동정하는데 이용되어지는 API 50 CHB 동정 kit을 사용하여 50가지의 당에 대한 생화학적 특성을 조사한 후, API 20E kit을 이용하여 획득한 결과와 함께 API LABplus(V. 3. 3. 3, bioMerieux, France)프로그램으로 확인한 결과, *Bacillus amyloliquefaciens*와 97.7%의 상동성을 나타내었다. 그러나 보다 정확한 동정 결과를 얻을 수 있는 16s rDNA sequences 등의 결과와 비교하지 못하여 최종적으로 *Bacillus* sp. KMU-1011로 명명하였다(Table 2).

기본배지의 선별을 위하여 LB broth, NB, PDB, TSB 그리고, YM broth를 이용하여 항진균 활성과 균의 생육을 조사한 결과 NB에서 13 mm로 가장 양호한 항진균 활성을 나타내었으며 다른 배지를 사용한 경우에도 전반적으로 양호한 항진균 활성을 나타내었다. 생육의 경우에는 TSB에서 가

Table 1. Morphological and physiological characteristics of selected strain KMU-1011.

Characteristics	KMU-1011
Morphological:	
Colonies form	White-yellowish, smooth
Gram staining	+
Shape of a cell	rod
Mobility	+
Endospores produced	+
Physiological:	
Citrate utilization	-
Gelatin liquefaction	+
Indole test	-
Nitrate reduction	+
Production of catalase	+
Production of oxidase	-
Voges-Proskauer test	-
20°C	Growth
37°C	Growth
52°C	Growth

Table 2. Biochemical characteristics(carbohydrates) of *Bacillus* sp. KMU-1011.

Characteristics	Result	Characteristics	Result
Glycerol	-	Salicine	+
Erythritol	-	Cellobiose	+
D-Arabinose	-	Maltose	+
L-Arabinose	+	Lactose	+
Ribose	+	Melibiose	+
D-Xylose	+	Sucrose	+
L-Xylose	-	Trehalose	+
Adonitol	-	Inuline	-
β-Methyl-xyloside	-	Melezitose	-
Galactose	-	D-Raffinose	+
D-Glucose	+	Amidon	+
D-Fructose	+	Glycogene	-
D-Mannose	+	Xylitol	-
L-Sorbose	-	Gentiobiose	+
Rhamnose	-	D-Turanose	-
Dulcitol	-	D-Lyxose	-
Inositol	+	D-Tagatose	-
Mannitol	+	D-Fucose	-
Sorbitol	+	L-Fucose	-
α-Methyl-D-mannoside	-	D-Arabitol	-
α-Methyl-D-glucoside	+	L-Arabitol	-
N-acetyl glucosamine	-	Gluconate	-
Amygdaline	+	2-Keto-gluconate	-
Arbutine	+	5-Keto-gluconate	-
Esculine	+		

장 양호한 것으로 조사되었으며 PDB의 경우에는 OD 0.63으로 가장 미비하게 조사되었으나 항진균 활성은 10 mm로 생육과 비교할 때 양호한 항진균 활성을 나타내는 것으로 조사되었다(Table 3).

온도 및 pH에 따른 항진균 물질의 생산

배양온도에 따른 항진균 물질의 생산과 생육을 조사하기 위하여 NB를 기본배지로 하여 *Bacillus* sp. KMU-1011을 각각 24, 30, 37, 그리고 45°C에서 180 rpm, 24시간 배양한 결과, Table 4와 같이 24°C에서 가장 높은 항진균 활성을 나타내었다. 조사한 온도의 범위에서 전반적으로 양호한 항진균 활성을 나타내었으나 배양온도가 높아질수록 항진균 활성과 생육의 정도가 감소하는 것으로 볼 때 *Bacillus* sp. KMU-1011의 생육과 항진균 물질의 생산은 온도에 어느 정도 영향을 받는 것으로 판단되었다. 특히 45°C의 경우 24°C와 비교할 때 31%의 항진균 활성이 감소하였으며 생육은 35% 감소한 것으로 조사되었다. 이러한 결과는 30°C에서 높은 항진균 물질을 생산한다고 보고한 박 등의 결과[13]보다 낮은 온도를 나타내었다.

pH의 변화에 따른 항진균 물질의 생산과 생육을 조사한 결과, pH 6.0에서 가장 양호한 항진균 활성을 나타내었으며

Table 3. Antifungal effect in different culture broth of *Bacillus* sp. KMU-1011.

Media	Growth (OD660 nm)	Inhibitory zone (Ø mm)
LB broth	1.83	12
NB	1.67	13
PDB	0.63	10
TSB	2.23	12
YM broth	1.21	12

Bacillus sp. KMU-1011 was incubated at 30°C, 180 rpm for a day, *B. cinerea* KACC 40573 was incubated at 24°C for 7 days and antifungal effect was assayed by agar diffusion method.

Table 4. Effect of different growth temperature for producing of antifungal substrate.

Temperature (°C)	Growth (OD660 nm)	Inhibitory zone (Ø mm)
24	1.77	16
30	1.69	13
37	1.23	13
45	1.15	11

(Fig. 1) pH 5.0~8.0의 범위에서 전반적으로 양호한 항진균 활성을 나타내었다. pH 9.0에서는 pH 6.0과 비교할 때 67%의 항진균 활성만을 나타내었으며 pH 3.0, 4.0, 그리고 10.0에서는 생육하지 못하였다. 생육의 경우에 pH 7.0에서 가장 양호한 것으로 조사되었으며 pH 8.0에서도 거의 동일한 생육을 나타내었다. pH 5.0의 경우에 생육은 미비하였으나 양호한 항진균 활성을 나타내었고 pH 8.0의 경우에 양호한 생육을 하는 것으로 조사되었으나 항진균 활성은 pH 5.0과 비교할 때 미비한 것으로 조사되었으며 pH 3.0~10.0에서 전반적으로 양호한 항진균 물질을 생산한다고 보고한 정 등의 보

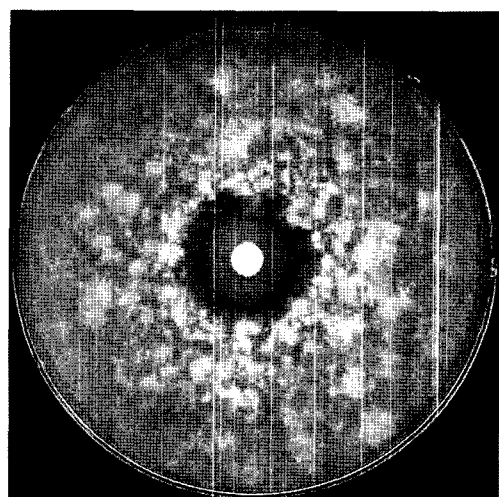


Fig. 1. Inhibitory zone of *Botrytis cinerea* by cultured broth of *Bacillus* sp. KMU-1011.

고[19]와는 상이하였다. 또한 이러한 결과를 바탕으로 *Bacillus* sp. KMU-1011이 생산하는 항진균 물질은 생육의 정도와 상호관련이 없는 것으로 판단하였다(Table 5).

항진균물질의 생산을 위한 최적조건

Bacillus sp. KMU-1011이 생산하는 항진균 물질의 생산에 미치는 탄소원의 영향을 조사한 결과 Table 6과 같다. 첨가한 10종의 탄소원 중에서 glucose를 첨가하였을 때 가장 양호한 항진균 활성을 나타내었으며 fructose, glucose, maltose, mannitol, sorbitol, 그리고 sucrose를 첨가하였을 때 탄소원을 첨가하지 않은 대조구보다 항진균 활성이 10% 증가하는 것으로 조사되었다. 그러나 glycerol, lactose, 그리고 soluble starch를 첨가하였을 때 항진균 활성이 감소하였으며 glycerol을 첨가한 경우 항진균 활성은 대조구와 비교하여 28% 그리고 glucose를 첨가한 경우와 비교하여 35% 활성이 감소한 것으로 조사되었으며 생육은 대조구와 비교할 때 30% 저해되는 것으로 조사되었다. 생육의 경우에는 sorbitol을 첨가한 경우에 136%의 증가를 나타내었으며 glycerol과 lactose를 제외한 다른 탄소원에 의하여 생육은 증가하는 것으로 조사되었다.

항진균 물질의 생산과 생육에 미치는 질소원의 영향을 조

사하기 위하여 기본배지에 탄소원으로 1.0%의 glucose를 첨가한 후, 각각의 질소원을 1.0%씩 첨가한 결과는 Table 7과 같았다. 질소원으로 polypeptone을 첨가하였을 때 25 mm로 가장 양호한 항진균 활성을 나타내었으며 첨가한 질소원에 의하여 전반적으로 항진균 활성이 증가하는 것으로 조사되었다. 그러나 bactopectone의 경우에는 대조구와 비교할 때 항진균 활성이 10% 감소하는 것으로 조사되었다. 생육의 경우에는 전반적으로 양호한 생육을 하는 것으로 조사되었으며 corn steep liquor를 첨가한 경우에 가장 양호한 생육을 하는 것으로 조사되었다. Urea의 경우에 OD 0.82로 가장 미비한 생육을 하는 것으로 조사되었으나 항진균 활성은 21 mm로 양호한 것으로 조사되었다. 이 결과로부터 균의 생육과 항진균 활성은 상호관련이 없는 것을 확인 할 수 있었다.

배양일수에 따른 항진균 활성과 생육을 조사하기 위하여 기본배지인 NB에 1.0% glucose와 1.0% polypeptone을 첨가한 후, pH를 6.0으로 조정하여 1~3일간 배양하면서 조사한 결과, 2일 배양하였을 때 가장 양호한 항진균 활성을 나타내었으나 배양일수에 따른 항진균 활성의 큰 차이는 나타나지 않았으며, 증식은 3일째가 가장 높게 조사되었다.

항진균 물질의 조정제 및 항진균 Spectrum

Bacillus sp. KMU-1011이 생산한 항진균 물질을 조정제 하여 액체배양을 통한 *B. cinerea*의 생육에 미치는 영향을 조사하기 위하여 NB를 기본배지로 하여 탄소원으로 1.0% glucose와 질소원으로 polypeptone을 첨가하고 pH를 6.0으로 조정하여 배지를 제조한 후, 24°C, 180 rpm으로 2일간 배양하여 사용하였다. 배양액을 회수하여 0~30%와 30~60%의 ammonium sulfate로 항진균 물질의 침전을 유도한 후, 투석하여 염을 제거하여 조정제 물질을 회수하였다. 50 ml의 PDB에 회수한 물질을 동량 첨가하고 *B. cinerea*의 포자 현탁액 0.1 ml을 접종하여 24°C, 150 rpm으로 7일간 배양한 후 건조중량을 측정하여 결과, 대조구 0.34 g과 비교하여

Table 5. Effect of different initial pH for producing of antifungal substrate.

pH	Growth (OD660 nm)	Inhibitory zone (Ø mm)
3	-	-
4	-	-
5	0.52	16
6	1.36	18
7	1.90	16
8	1.87	15
9	1.39	12
10	-	-

Table 6. Effect of various carbon sources for producing of antifungal substrate.

Carbon sources	Growth (OD660 nm)	Inhibitory zone (Ø mm)
Control	1.50	18
Arabinose	1.86	18
Fructose	1.61	19
Glucose	1.81	20
Glycerol	1.05	13
Lactose	1.36	16
Maltose	1.60	19
Mannitol	1.79	19
Soluble starch	1.84	15
Sorbitol	2.04	19
Sucrose	1.81	19

Table 7. Effect of various nitrogen sources for producing of antifungal substrate.

Nitrogen sources	Growth (OD660 nm)	Inhibitory zone (Ø mm)
Control	1.90	20
Ammonium chloride	2.07	24
Ammonium phosphate	1.82	23
Ammonium sulfate	1.89	23
Bactopectone	2.02	18
Bactotryptone	2.01	22
Beef extract	1.96	22
Corn steep liquor	2.43	21
Malt extract	1.96	22
Polypeptone	2.36	25
Urea	0.82	21
Yeast extract	2.37	23

Table 8. Antifungal effect of chloroform extract of *Bacillus* sp. KMU-1011 cultured broth.

Plant pathogenic fungi	Inhibitory zone (Ø mm)
<i>Botrytis cinerea</i> KACC 40573	26
<i>Botrytis fabae</i> KACC 40962	18
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> KACC 40804	15
<i>Colletotrichum orbiculare</i> KACC 40808	24
<i>Didymella bryoniae</i> KACC 40669	26
<i>Fusarium graminearum</i> KACC 41040	-
<i>Fusarium oxysporum</i> KACC 40037	14
<i>Fusarium oxysporum</i> KACC 40052	14
<i>Fusarium oxysporum</i> KACC 40537	11
<i>Fusarium oxysporum</i> KACC 40902	15
<i>Monosporascus cannonballus</i> KACC 40940	20
<i>Phytophthora cambivora</i> KACC 40160	22
<i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 KACC 40101	17
<i>Rhizoctonia solani</i> AG-4 KACC 40142	18
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> KACC 41065	26

0~30% ammonium sulfate를 처리한 경우에는 0.33 g으로 회수한 물질에 의한 생육저해를 거의 나타내지 않았으나, 30~60% ammonium sulfate를 처리한 경우에 0.22 g으로 회수한 물질에 의하여 35% 정도의 생육이 저해되었다는 것을 알 수 있었다.

다양한 작물병원성 곰팡이에 대한 *Bacillus* sp. KMU-1011의 항진균 활성 spectrum을 조사하기 위하여 chloroform을 이용하여 항진균 물질을 회수한 후 agar diffusion method를 이용하여 조사한 결과, 다양한 작물병원성 곰팡이에 대하여 높은 항진균 활성을 나타내는 것을 확인 할 수 있었다. 특히 *C. gloeosporioides* KACC 40804, *D. bryoniae* KACC 40669, *F. oxysporum* KACC 40037, *F. oxysporum* KACC 40052, *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* KACC 40537, *F. oxysporum* KACC 40902, *M. cannonballus* KACC 40940, *P. cambivora* KACC 40160, *R. solani* AG-1 KACC 40101, *R. solani* AG-4 KACC 40142, 그리고 *S. sclerotiorum* KACC 41065에 대하여 양호한 항진균 활성을 나타내었다(Table 8). 이러한 결과들을 바탕으로 하여 작물병원성 곰팡이에 대한 미생물제제로 *Bacillus* sp. KMU-1011을 이용할 수 있을 것이라는 가능성을 확인할 수 있었으며, 실용적인 생물학적 방제제 개발을 위한 포장실험, 제형개발 등의 다양한 조사를 진행할 예정이다.

요 약

핀란드의 Lappeenranta 지역에 위치하는 Saimaa 호수가 의 토양시료로부터 분리된 *Bacillus* sp. KMU-1011를 이용하여 많은 작물에 잿빛 곰팡이병을 유발하는 *Botrytis cinerea* KACC 40573에 대한 항진균 활성을 위한 배양조건을 조사

하였다.

항진균 물질의 생산을 위한 기본배지로 nutrient broth를 사용하였으며 탄소원으로 1.0% glucose와 질소원으로 1.0% polypeptone를 첨가하였을 때 가장 높은 항진균 활성을 나타내었다. 배양조건으로는 24°C, 180 rpm, 48시간 배양하였을 때 가장 높은 항진균 활성을 나타내었다.

Ammonium sulfate를 30~60% 첨가하여 항진균 물질을 회수하였을 때 가장 양호한 항진균 활성을 나타내었으며, chloroform을 이용하여 배양액 중에 존재하는 항진균 물질을 회수하여 다양한 작물병원성 곰팡이에 대한 spectrum을 조사한 결과, 잿빛곰팡이병, 고추 탄저병, 참외 탄저병, 수박 등의 박과작물의 덩굴미름병, 토마토 시들음병, 글라디올러스 마른썩음병, 토마토 질병, 수박 덩굴썩김병, 수박 질병, 사과나무 역병, 벼 잎집무늬미름병, 참외 줄기썩음병, 그리고 고추 균핵병에 대하여 양호한 항진균 활성을 나타내는 것으로 조사되었다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부의 지역혁신 인력양성사업의 연구결과로 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Nobre, S. A. M., A. M. Luiz, S. G. M. Eduardo, V. C. Luciano, and S. D. Paula. 2005. Selection of *Clonostachys rosea* isolates from brazilian ecosystems effective in controlling in *Botrytis cinerea*. *Biol. Control*. **34**: 132-143.
- Santos, A., A. Sanchez, and D. Marquina. 2004. Yeasts as biological agents to control *Botrytis cinerea*. *Microbiol. Res.* **159**: 331-338.
- Raposo, R., V. Gomez, T. Urrutia, and P. Melgarejo. 2001. Survival of *Botrytis cinerea* in southeastern spanish greenhouses. *Eur. J. Plant Pathol.* **107**: 229-236.
- Sutton, J. C. 1994. Biological control of strawberry diseases. *Adv. Straw. Res.* **13**: 1-12.
- Lee, K. S. 1997. Evaluation on the effects of pesticide residues to agroecosystem in Korea. *Kor. J. Environ. Agric.* **16**: 80-93.
- Oh, Y. K. and J. H. Kim. 1997. Effects of residual organochlorine pesticides in the coastal environment on the Cheju Island. *J. KSWQ*. **13**: 317-324.
- Kim, S. H., Y. D. Lee, W. S. Ha, and H. M. Ro. 1998. A study on the transport phenomena of hydrophobic pesticides influenced by the interfaces of groundwater in unsaturated inorganic porous media. *Environ. Eng. Res.* **20**: 1545-1553.
- Park, R. D., K. J. Jo, Y. Y. Jo, Y. L. Jin, K. Y. Kim, J. H. Shim, and Y. W. Kim. 2002. Variation of antifungal activities of chitosans on plant pathogens. *J. Microbiol. Biotechnol.* **12**: 84-88.
- Park, S. M., H. J. Jung, S. H. Han, S. H. Yeo, Y. W. Kim, H.

- G. Ahn, H. S. Kim, and T. S. Yu. 2005. Antifungal activity of extract from *Xanthium Strumarium* L. against plant pathogenous Fungi. *J. Life Sci.* **15**: 692-695.
10. Jeon, Y. H., S. P. Chang, I. Hwang, and Y. H. Kim. 2003. Involvement of growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* in root of stored korean ginseng. *J. Microbiol. Biotechnol.* **13**: 881-891.
 11. An, K. N., W. J. Jung, D. H. Chae, R. D. Park, T. H. Kim, Y. W. Kim, Y. C. Kim, G. S. Cha, and K. Y. Kim. 2003. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of cucumber by *Bacillus cereus* KJA-118. *Kor. J. Soil Sci. Fert.* **36**: 247-255.
 12. Kim, J. Y., E. A. Bae, M. J. H, and D. H. Kim. 1999. Inhibitory activity of *Bacillus licheniformis* AJ on the growth of diarrheal pathogens. *J. Appl. Pharm.* **7**: 385-389.
 13. Park, S. M., S. H. Han, and T. S. Yu. 2005. Culture conditions and antifungal activity of *Bacillus licheniformis* KMU-3 against crop pathogenic fungi. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **33**: 112-116.
 14. Chang, J. Y., H. H. Lee, I. C. Kim, and H. C. Chang. 2001. Characterization of a bacteriocin produced by *Bacillus licheniformis* cy2. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **30**: 410-414.
 15. Lee, E. T. and S. D. Kim. 2000. Selection and antifungal activity of antagonistic bacterium *Pseudomonas* sp. 2112 against red-pepper rotting *Phytophthora capsici*. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 334-340.
 16. Oh, Y. J. 1992. Studies on the optimization of media composition and cultural conditions for kasugamycin production by *Streptomyces kasugansis*. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 583-587.
 17. Bae, M. 1978. Present status and future of antibiotics for agriculture. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 141-148.
 18. Holt, J. G., N. R. Kring, P. H. A. Sneath, J. T. Staley, and S. T. Williams. 1994. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 9th, Williams & Wilkins, U.S.A
 19. Jung, H. K. and S. D. Kim. 2003. Purification and characterization of an antifungal antibiotic from *Bacillus megaterim* KL 39, a biocontrol agent of red-paper phytophthora blight disease. *Kor. J. Mircobiol. Biotechnol.* **31**: 235-241.

(Received Dec. 8, 2005/Accepted Mar. 8, 2006)