

11. Shin, Y. J., M. J. Jung, J. U. Park, W. H. Joo, and Y. K. Jeong (2000), Isolation and identification a bacterium producing antifungal antibiotic, *Kor. J. Food. Sci. Nutr.* **29**, 832-836.
12. Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley, and S. T. Williams. (1994), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 9th. Williams&Wilkins. USA.
13. Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson (1994), CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680.

검은별무늬병균 *Cladosporium cucumerinum* KACC 40576에 대한 길항균주 *Bacillus subtilis* KMU-13의 선발 및 항진균 활성

박성민 · ¹이준석 · ²박치덕 · 이정훈 · 정혁준 · †유대식
계명대학교 미생물학과, ¹KBC생명공학연구소, ²대구 신기술사업단 전통생물소재산업화센터
(접수 : 2005. 6. 21., 게재승인 : 2006. 1. 18.)

Selection and Antifungal Activity of Antagonistic Bacterium *Bacillus subtilis* KMU-13 against Cucumber scab, *Cladosporium cucumerinum* KACC 40576

Sung Min Park, Jun Seuk Lee¹, Chi Duck Park², Jung Hun Lee, Hyuck Jun Jung, and Tae Shick Yu†
Department of Microbiology, Keimyung University, Daegu 701-704, Korea
¹Korea Bio Chemical Co. Ltd., 1539-6 Dongdong-ri, Uiryoung 636-803, Korea
²Traditional Bio-Materials Industry Center, 711 Hosan-dong, Dalseo-gu, Daegu 704-230, Korea
(Received : 2005. 6. 21., Accepted : 2005. 1. 18.)

Bacillus subtilis KMU-13 was isolated from the Lillehammer forest soils at Norway and shown a strong antifungal activity on cucumber scab, *Cladosporium cucumerinum* KACC 40576. *B. subtilis* KMU-13 produced a maximum level of antifungal substance under incubation aerobically at 30°C, 180 rpm for 48 hours in LB broth containing 0.5% maltose and 0.5% bactopectone and initial pH adjusted to 6.0. Butanol extract of cultured broth was confirmed inhibitory zone by plate assay and Rf 0.64 value substance by thin layer chromatography (TLC) represented high antifungal activity against *C. cucumerinum* KACC 40576 and also shown fungal growth inhibitory activity against *Botrytis cinerea* KACC 40573, *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, and *S. sclerotiorum* KACC by agar diffusion method.

Key Words : *Bacillus subtilis* KMU-13, Antifungal effect, *Cladosporium cucumerinum*

서론

식물병원성 진균의 피해 중 검은별무늬병은 우리나라 오이재배지역에서 국부적으로 발생하여 큰 피해를 주는 병으로 1994년 충북 괴산, 경기 안성 등의 시설오이재배단지에서 발생하여 큰 피해를 나타내었고, 매년 계속하여 발생되어지고 있다. 오이 검은별무늬병을 일으키는 병원균은 *Cladosporium cucumerinum*으로 알려져 있으며, 이 균에 감염된 오이에서는 잎, 줄기, 신초 그리고 과실에 검은별무늬의 병반이 형성되고, 어린 잎이나 줄기에 감염되면 고사

되고 과실에 감염되면 흑색 병반위에 회색 곰팡이가 자라면서 곡과가 되어 상품성을 크게 떨어뜨리는 주요한 요인으로 작용한다.

*C. cucumerinum*은 불완전균에 속하는 곰팡이의 일종으로 분생자경과 분생포자를 형성하고 연갈색의 방추형 또는 난형의 포자를 형성하며, 1개의 격막을 가진 포자들이 많다. 포자의 크기는 4~25 × 2~6 μm이고 분생포자의 형성은 10~30°C이며 생육 온도는 2~35°C이고 최적 온도는 20°C 내외이다. 생육 pH 범위는 4~8로 pH의 생육에 대한 영향은 적은 것으로 알려져 있다.

*C. cucumerinum*은 병든 잎이나 줄기에서 균사나 분생포자 형태로 월동하여 1차 전염원이 되며 2차 전염원은 병반상에 형성된 분생포자가 바람에 비산되어 이루어지고 저온 다습한 환경에서 발생이 심하기 때문에 시설재배시 피해가 크고 노지재배 오이에서도 드물게 발생하기도 하

† Corresponding Author : Department of Microbiology,
Keimyung University, 701-704 Taegu, Korea
Tel : +82-53-580-5252, Fax : +82-53-580-5164
E-mail : tsyu@kmu.ac.kr

Sorbitol을 첨가한 경우에 가장 양호한 증식을 하는 것으로 조사되었으나 항진균 활성은 미비하여 앞의 실험과 동일하게 증식과 항진균 활성과의 관련성의 적다는 것을 다시 확인할 수 있었으며, glycerol을 첨가한 경우에는 증식은 하였으나 항진균 활성은 거의 나타나지 않았다.

질소원에 대한 *B. subtilis* KMU-13의 항진균 활성과 증식을 조사한 결과 bactopectone, tryptone, 그리고 polypeptone과 같은 peptone류를 첨가하였을 때 다른 질소원에 비하여 높은 항진균 활성을 나타내었다. 첨가한 질소원에 의하여 양호한 증식을 나타내었으며, polypeptone을 첨가한 경우가 가장 양호한 증식을 하는 것으로 조사되었다(Table 5).

Table 5. Effect of various nitrogen sources for producing of antifungal substrate

Nitrogen sources	Growth (OD660 nm)	Inhibitory zone (Ø mm)
Control	1.63	19
Beef extract	1.71	12
Malt extract	1.58	12
Bactopectone	1.37	21
Polypeptone	1.79	20
Tryptone	1.32	20
Urea	1.50	15
Yeast extract	1.78	15

Table 6. Effect of different initial pH for producing of antifungal substrate

pH	Growth (OD660 nm)	Inhibitory zone (Ø mm)
3.0	-	-
4.0	-	-
5.0	1.66	18
6.0	1.69	20
7.0	2.77	15
8.0	1.57	10
9.0	1.57	10
10.0	-	-

Table 7. Effect of different growth temperature for producing of antifungal substrate

Temperature (°C)	Growth (OD 660 nm)	Inhibitory zone (Ø mm)
20	0.18	8
30	1.59	21
37	1.44	18
45	0.98	12
50	-	-
55	-	-

배양 pH, 온도, 시간에 따른 항진균 물질의 생산성

pH에 따른 *B. subtilis* KMU-13의 항진균 물질 생산 및 증식을 조사한 결과, pH 3.0, 4.0 그리고 10.0에서는 증식하지 못하는 것으로 조사되었고, pH 6.0에서 가장 높은 항진균 활성을 나타내었다. 그러나, 배양액의 pH가 7.0~9.0인 경우에 비하여 5.0~6.0인 경우에 보다 높은 항진균 활성을 나타내는 것으로 볼 때 약산성과 중성의 조건일 때 보다 많은 항진균 물질이 생산된다는 것을 알 수 있었으며 pH 7.0에서 가장 양호한 증식을 하는 것으로 조사되었다(Table 6).

Table 7에서 나타난바와 같이 *B. subtilis* KMU-13의 증식

과 항진균 물질의 생산은 30°C에서 가장 우수한 것으로 조사되었으며, 50 및 55°C에서는 증식을 하지 못하였다. 30~45°C까지 항진균 물질의 생산성이 유지되며 균주의 생육 또한 양호한 것으로 보아 본 균주를 미생물제제로 사용할 경우에 겨울 하우스나 여름철 노지의 온도에서도 항진균 물질의 생산 및 균의 생육을 충분히 유지 할 것으로 판단되었다.

배양시간에 따른 *B. subtilis* KMU-13의 생육과 항진균 물질의 생산은 배양 후 48시간에 이르러 최고의 생산능을 나타내었다. 하지만, 24시간과 비교하였을 때 큰 차이를 나타내지는 않았다(결과미기재).

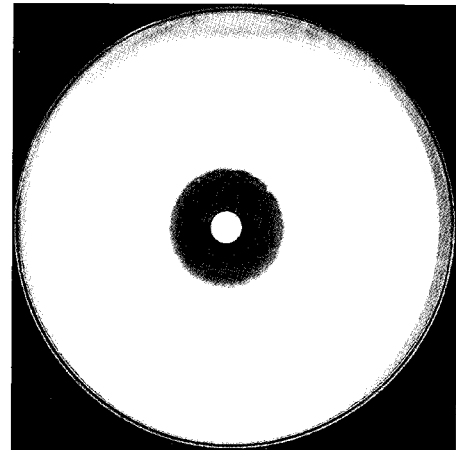


Figure 2. Inhibitory zone of *Cladosporium cucumerinum* by *B. subtilis* KMU-13.

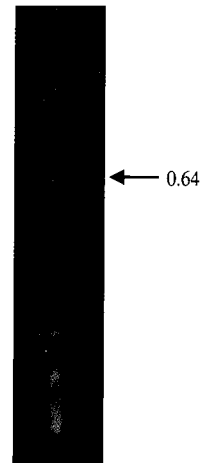


Figure 3. TLC analysis of butanol extract. The antifungal compounds were extracted with butanol and chromatographed on silica gel plate (Silica gel 60 F₂₅₄) with chloroform, methanol and butanol (7 : 2.5 : 0.5).

항진균 물질의 조정제

B. subtilis KMU-13으로부터 생산된 항진균 물질을 분리 및 정제하기 위하여 앞에서 조사한 항진균 물질 최대생산 배지 300mL에 *B. subtilis* KMU-13를 배양한 후, 배양액을 12,000 rpm에서 30min, 4°C로 원심분리하여 상등액 280

soytone, 0.5% sodium chloride, 0.25% dextrose)를 제조하여 pH를 7.0으로 조정후, 121°C에서 15분간 멸균하여 사용하였다. 전 배양액은 24시간 전에 LB broth에 단일 콜로니를 접종하여 30°C에서 배양하여 사용하였으며 각각의 삼각플라스크에 전 배양액 100 μ l를 접종한 후, 이들을 30°C, 180 rpm에서 24시간 배양하였다. Agar diffusion method를 실시하여 항진균 활성을 조사하였으며 균의 생육은 spectrophotometer (Shidazu, Japan)를 이용하여 660nm에서 조사하였다.

항진균 물질의 생산에 미치는 탄소원의 영향을 조사하기 위하여 탄소원으로 arabinose, fructose, glucose, glycerol, lactose, maltose, mannitol, soluble starch, sorbitol 그리고 sucrose를 0.5%씩 첨가하여 30°C에서 24시간 배양한 후, 배양액을 이용하여 agar diffusion method를 실시하였다.

질소원의 영향을 조사하기 위하여 앞서 조사된 탄소원 0.5%를 기본배지에 첨가한 후, 질소원으로 beef extract, malt extract, bactopectone, polypeptone, tryptone, urea 그리고 yeast extract를 0.5%씩 첨가하여 배지를 제조한 후 사용하였다.

항진균 물질의 생산에 미치는 pH, 온도 및 배양시간

pH가 항진균 물질의 생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 1 N HCl과 1 N NaOH를 이용하여 배지의 pH를 3.0~10.0으로 조정후, 전 배양액 100 μ l를 각각의 삼각플라스크에 접종하여 24시간 배양한 후 항진균 활성을 조사하였다.

배양온도에 따른 항진균 활성의 검토는 동일한 배지를 20, 30, 37, 45, 50, 그리고 55°C에서 180 rpm, 24시간 배양한 후 항진균 활성을 조사하였다.

배양시간에 따른 길항균주의 항진균 활성물질의 생산을 조사하기 위하여 앞에서 조사된 최적배지를 제조하여 100 μ l 전 배양액을 접종하여 1~3일간 배양하였고, 24시간마다 배양액을 회수하여 항진균 활성을 조사하였다.

항진균 물질의 조정제

길항균주로부터 생산된 항진균 물질을 조정제하기 위하여 앞에서 조사된 최적생산조건으로 300 mL 배양한 후, 배양액을 10,000 rpm, 4°C, 20분간 원심분리하였다. 상등액에 동량의 butanol을 첨가하여 항진균 물질을 용매층으로 이행시킨 후, 50°C 이하에서 감압농축하고 1/40 volume의 methanol에 녹여 사용하였으며 TLC (silica gel 60F₂₅₄, Merck) plate 이용하여 활성밴드를 조사하였다.

다양한 식물병원성 진균에 대한 항균 spectrum

조정제 수준의 항진균 물질을 이용하여 잣빛 곰팡이병을 야기하는 *B. cinerea* KACC 40573, 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 41065에 대한 항진균 활성을 조사하였다.

결과 및 고찰

균주의 선발 및 배양

Norway Lillehammer 근교 토양시료에서 일차적으로 58개의 콜로니를 분리하였으며, 이들을 대상으로 오이 검은별무늬병원균인 *C. cucumerinum*를 방제할 수 있는 것으로 조사된 6개의 콜로니를 선발하였다. 선발된 균주 중에서 *C. cucumerinum*에 대하여 가장 높은 생육저지대를 나타내는 균주를 선발하고 KMU-13이라 명명하였다.

Table 1. Morphological and physiological characteristics of selected strain KMU-13

Characteristics	KMU-13
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

선발 길항균주의 동정

KMU-13은 그람 양성의 rod form으로 내생포자를 형성하였으며 형성된 집락은 원형으로 표면은 smooth하였으며 매끈한 광택을 나타내었다. KMU-13은 호기성 세균으로 catalase, gelatin liquefaction, 그리고 nitrate reduction은 양성 반응을 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 사용하

여 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 subtilis*와 99.5%의 상동성을 나타내었다(Table 2).

보다 정확한 동정을 위하여 분리균주의 chromosomal DNA를 추출하고 16S rDNA 유전자 primer를 이용하여 PCR을 수행한 결과, 1400 bp 정도의 증폭된 DNA 단편을 확인할 수 있었으며, 이 DNA의 부분 염기서열을 분석한 결과는 Fig. 1에서 나타난 바와 같다. 16S rDNA 부분 염기서열을 NCBI GeneBank에 등록된 유사 균주와 비교, 분석한 결과, *B. subtilis*와 99%의 상동성을 나타내었다. 이러한 결과를 바탕으로 KMU-13을 최종적으로 *B. subtilis*로 명명하였다.

Table 2. Biochemical characteristics (carbohydrates) of *Bacillus* sp. KMU-13

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	-
β-Methyl-D-glucoside	-	L-Arabitol	-
N-acetyl glucosamine	-	Gluconate	-
Amygdaline	+	2-Keto-gluconate	-
Arbutine	+	5-Keto-gluconate	-
Esculine	+		

Table 3. Antifungal effect in different culture broth of *B. subtilis* KMU-1

Media	Growth (OD 660 nm)	Inhibitory zone (ø mm)
LB	1.37	17
PDB	0.04	-
TSB	1.59	8
YM	1.53	12

B. subtilis KMU-13 was incubated at 30°C, 180 rpm for a day, *C. cucumerinum* KACC 40576 was incubated at 24°C for 7 days and antifungal effect was assayed by agar diffusion method.

항진균 물질의 생산을 위한 최적배지조건

B. subtilis KMU-13에 의한 항진균 물질의 생산을 위한 배양조건을 조사하기 위하여 LB broth에서 전배양한 *B. subtilis* KMU-13을 배양한 후, LB broth, YM broth, PDB,

그리고 TSB에 접종하여 배양한 후, *C. cucumerinum*를 미리 접종하여 둔 PDA plate에 원심분리한 배양액을 침지한 paper disc를 얹고 항진균 활성을 관찰한 결과, Table 3에 나타난 바와 같이, LB broth에서 가장 높은 항진균 활성을 나타내었다. 가장 높은 증식을 나타낸 TSB와 양호한 증식을 하는 것으로 조사된 YM broth의 경우에는 증식의 정도에 비하여 항진균 활성이 높지 않은 결과로 미루어 증식과 항진균 물질의 생산과는 상호 연관이 미비한 것으로 판단되었으며, PDB의 경우 증식을 하지 못하였다.

```

GCGCTATCTGCAGTCGAGCGGACAGATGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAG
CGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATA
ACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATGTTGTCTGAACCGCATGTT
CAGACATAAAAGTGGCTTCGGCTACCACCTACAGATGGACCCGCGGCGC
ATTAGCTAGTTGGTGAAGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCG
ACCTGAGAGGGTGTACGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCC
TACGGGAGGACGAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGG
AGCAACGCGCGGTGAGTGATGAAGTTTTCCGATCGTAAAGCTCTGTTGT
TAGGGAAGAACAAGTGCCTTCAAATAGGCGGACCTTGACGGTACCTA
ACCGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG
TGGAAGCGTTGTCCGGAATTTGGCGTAAAGGCTCGCAGGCGGTTT
CTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAA
ACTGGGAACCTGAGTGCAGAAGAGGAGTGAATCCACGTGATGCGG
TGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACAGTGGCGAAGGCGACTCTCTG
GTCTGTAAGTGCAGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGCAACAGGATTAG
ATACCCTGGTAGTCCACGCGCTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAAAGGGT
TTCCGCCCTTAAATGCTGCAGCTAACGCATTTACCCTCCGCTGGGGA
GTACCGCCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCAAG
CGGTGGAGCATGTGGTTTAAATCGAAGCAACCGCAAGAACCTTACCAGT
CTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCTTCGGGGGCGAG
AGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGTGTGCTGAGATGTTGGG
TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGT
TGGGCACTCTAAGGTGACTGCGGTGACAAACCGGAGGAAGTGGGGATG
ACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGTACACACGTGCTACAAT
GGACAGAACAAAGGGGAGCGAAACCGGAGGTTAAGCCAATCCCACAAT
CTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAA
TCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGCCT
TGTACACACCGCCGTCACACCAGAGAGTTTGAACACCCGAGTGGTGGT
GAGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCCGAAGTGACAGATTGG
    
```

Figure 1. Partial nucleotide sequence of 16S rDNA from the isolated strain *Bacillus* sp. KMU-13.

Table 4. Effect of various carbon sources for producing of antifungal substrate

Carbon sources	Growth (OD660 nm)	Inhibitory zone (ø mm)
Control	1.54	16
Arabinose	1.65	16
Fructose	1.58	12
Glucose	1.66	12
Glycerol	1.29	-
Lactose	1.67	16
Maltose	1.46	19
Mannitol	1.60	14
Soluble starch	1.47	17
Sorbitol	1.72	13
Sucrose	1.55	10

다양한 탄소원을 이용하여 항진균 물질의 생산을 조사한 결과, Table 4에서 나타난 바와 같이 maltose를 첨가한 배지에서 가장 높은 항진균 활성을 나타내었고, arabinose, lactose 그리고 soluble starch를 첨가한 경우에도 항진균 활성을 나타내었다. 그러나, 다른 탄소원의 경우 대조구에 비하여 항진균 활성이 감소하는 것으로 조사되었다.

mL를 회수하고 동량의 butanol을 첨가하여 활성물질을 butanol층으로 이행시킨 후, 50°C 이하에서 감압농축 하였다. 감압농축된 추출물을 1/40 volume의 methanol에 현탁하고, agar diffusion method를 사용하여 항진균 활성을 확인한 결과, Fig. 2에서와 같이 매우 크고 선명한 clear zone을 형성하였고 그 항진균 효과는 4주 이상 지속되었다.

전개용매로 chloroform : methanol : butanol = 7 : 2.5 : 0.5을 사용하여 TLC로 분석하여본 결과, Fig. 3과 같이 UV 365 nm에서 여러 개의 밴드를 확인할 수 있었다. TLC plate 상에서 전개한 각각의 밴드를 회수하여 methanol에 녹이고, 50°C 이하에서 다시 감압 농축하여 항진균 활성을 검토한 결과, Rf 값이 0.64를 나타낸 밴드에서만 항진균 활성을 나타내는 것으로 조사되었다.

다양한 작물병원성 곰팡이에 대한 항진균 spectrum

다양한 작물병원성 곰팡이에 대한 *B. subtilis* KMU-13의 항진균 활성 spectrum을 조사하기 위하여 butanol을 이용하여 항진균 물질을 회수한 후 agar diffusion method를 이용하여 조사한 결과, 다양한 작물병원성 곰팡이에 대하여 높은 항진균 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. *B. cinerea* KACC 40573, *C. cucumerinum* KACC 40576, *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 *B. subtilis* KMU-13을 이용할 수 있을 것이라는 가능성을 확인할 수 있었으며, 실용적인 생물학적 방제제 개발을 위한 포장실험, 제형개발 등의 다양한 조사를 진행할 예정이다.

Table 8. Antifungal effect of chloroform extract of *B. subtilis* KMU-13 cultured broth

Plant pathogenic fungi	Inhibitory zone (\varnothing mm)
<i>Botrytis cinerea</i> KACC 40573	22
<i>Botrytis fabae</i> KACC 40962	15
<i>Cladosporium cucumerinum</i> KACC 40576	24
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> KACC 40804	18
<i>Colletotrichum orbiculare</i> KACC 40808	20
<i>Didymella bryoniae</i> KACC 40669	21
<i>Fusarium graminearum</i> KACC 41040	15
<i>Fusarium oxysporum</i> KACC 40037	10
<i>Fusarium oxysporum</i> KACC 40052	10
<i>Fusarium oxysporum</i> KACC 40537	18
<i>Fusarium oxysporum</i> KACC 40902	14
<i>Monosporascus cannonballus</i> KACC 40940	23
<i>Phytophthora cambivora</i> KACC 40160	20
<i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 KACC 40101	18
<i>Rhizoctonia solani</i> AG-4 KACC 40142	18
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> KACC 41065	22

요 약

오이검은별무늬병균인 *Cladosporium cucumerinum* KACC 40576에 대하여 높은 항진균 활성을 나타내는 KMU-13은 Norway Lillehammer 근교 토양시료에서 분리하였으며, 형태학적, 배양 및 생화학적인 특성을 조사한 결과와 16S rDNA 염기서열을 분석한 결과, *B. subtilis*로 판단되었다. *B. subtilis* KMU-13의 항진균 물질의 생산을 위한 최적조건은 LB broth를 기본배지로 하여 탄소원으로 0.5% maltose와 질소원으로 0.5% bactopectone을 첨가하였을 때 가장 높은 항진균 활성을 나타내었으며, 배양조건은 30°C, 180 rpm, 48시간이었고, 배양초기 pH는 6.0으로 조사되었다. TLC에서 Rf값이 0.64로 확인된 밴드에서만 항진균 활성을 가지는 것으로 조사되었으며 잣빛곰팡이병, 고추 탄저병, 참외 탄저병, 수박 등의 박과작물의 덩굴마름병, 토마토 시들음병, 글라디올러스 마른썩음병, 토마토 질병, 수박 덩굴썩음병, 수박 질병, 사과나무 역병, 벼 잎집무늬마름병, 참외 줄기썩음병, 그리고 고추 균핵병에 대하여 양호한 항진균 활성을 나타내는 것으로 조사되었다.

감 사

본 연구는 산업자원부의 지역혁신 인력양성사업으로 수행된 연구결과이며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Davison, J. (1998), Plant beneficial bacteria, *Biotechnology* **6**, 282-286.
- Lee, E. J., K. S. Kim, S. H. Hong, and J. H. Ha (1995), The mechanism of biological control of *Pseudomonas* spp. against *Fusarium solani* causing plant root-rot disease, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 91-97.
- 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. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 112-116.
- 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 pathogenic fungi, *JLS* **15**, 692-695.
- Oh, Y. J. (1992), Studies on the optimization of media composition and cultural conditions for kasugamycin production by *Streptomyces kasugansis*, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 583-587.
- Bae, M. (1978), Present status and future of antibiotics for agriculture, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **6**, 141-148.
- Reveni, M., H. Cohen, T. Zahavi, and V. Venzion (2000), Polar a potent polyxin B compound for controlling powdery mild in apple and nectarine trees, and grapevins, *Crop protection* **19**, 393-399.
- Edward, J. K., R. P. Adams, and K. K. Kartha (1990), Trehalase activity in plant tissue culture, *Phytochemistry* **29**, 2525-2528.
- Ko, B. S., T. Oritani, and K. Yamashita (1992), Synthesis and biological activity of 6-phenylgriseofulvin as analogs of antibiotic griseofulvin, *J. Kor. Agric. Chem. Soc.* **35**, 395-398.
- Kim, S. U., J. W. Lee, S. H. Lee, and S. H. Bok (1991), Identification of bacteria having antifungal activity isolated from solid and its activity, *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 337-342.

며 특히 이 시기에 강우가 잦은 날씨가 계속되면 피해는 더욱 증가한다. 이들의 방제를 위해서 주로 화학농약이 사용되어지고 있으나 화학농약을 처리하여도 완전한 방제가 어려운 실정이며 또한 화학농약은 그 독성과 저항성 병원균의 출현, 생태계의 부정적 영향, 유기농산물에 대한 소비자의 요구증가 등 심각한 폐해로 인해 그 사용량이 점차 감소되고 있다. 화학농약의 대체방안으로 생물농약이 대두되고 그 중 미생물의 길항작용(1-3)을 이용하여 생태학적으로 병원균의 활동을 억제하며 근권토양 중 식물병원균에 대한 길항미생물 분포나 밀도를 증가시키는 미생물농약이 출현하였다. 또한 식물 유래의 추출물을 이용한 자연 친화적인 농약의 개발(4)이 진행되고 있으며, 미생물을 이용한 항진균성 항생물질의 개발은 *Streptomyces*의 대사산물에서 베타열병 예방과 치료에 kasugamycin(5)과 blastidin S를 분리하여 실용화하였다(6). 이외 polyxin(7)과 validamycin(8), cyclohexamide, griseofulvin(9) 등이 실용화되어 독성이 강한 일부 유기합성계 농약을 대체하고 식량증산에 이바지해 왔다(10). 또한 특정세균을 이용한 생물학적 해충방제 개발도 많이 진전되어 미생물 농약으로 작물보호 분야에 도입되어 사용되었으며 농작물, 산림 및 인간건강 보호를 위해 성공한 미생물 살충제로 여러 시험지역에서는 기존의 화학 합성 농약을 미생물 살충제로 대체하고 있는 중이며, 이에 관한 연구도 세계적으로 매우 활발히 진행되어지고 있다. 항진균성 항생물질은 진균성 질병을 치료하기 위한 의약품 개발뿐만 아니라 식물병원균을 방제하며 분해성 물질로 잔류 독성의 염려가 상대적으로 적은 농약용 항생물질로도 많이 개발되어지고 있다(11).

따라서 본 연구에서는 항진균 항생물질을 생산하는 길항균주에 의한 오이 검은별무늬병의 방제를 목적으로 오이 검은별무늬병을 강하게 억제하는 길항균주를 선발하고 길항균주가 생산하는 항생물질의 생산조건을 검토하여 검은별무늬병방제 미생물제제화 및 농용항생물질 제제화의 기초를 마련 하고자 한다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 선발

Norway Lillehammer 근교 토양시료 30 g을 270 mL의 멸균수에 넣고 shaking incubator로 10분간 진탕배양한 후, 길항균주의 선발을 위해서 50°C water bath에서 30분간 열처리하고 LB agar (1.0% tryptone, 0.5% yeast extract, 1.0% sodium chloride, 1.5% agar) 배지에 접종하여 균주를 분리하였다. 분리된 균주들을 대상으로 오이 검은별무늬병원균인 *Cladosporium cucumerinum*를 방제할 수 있는 길항균주를 분리 및 선발하기 위하여 PDA (potato dextrose agar, 0.4% potato starch, 2.0% dextrose, 1.5% agar)에서 대치배양 (pairing culture)을 실시하여 억제거리를 형성하는 균주들을 일차적으로 분리하였다. 분리된 균주들을 대상으로 가장 높은 생육저지대를 형성하는 균주를 선발하기 위하여 작물병원성 곰팡이를 직경 6 mm 크기의 culture disc로 접종하여 24°C에서 24시간 배양한 후, 3 cm 떨어진 곳에 선별한

균주를 희석 접종하고 24°C에서 7일간 배양하면서 생육저지대를 조사하였다. 공시균주로 사용한 *C. cucumerinum* KACC 40576은 농업진흥청 농업생명공학연구원 한국농용미생물보존센터 (Korean Agricultural Culture Collection, KACC)에서 분양을 받아 사용하였다.

분리균주의 동정

항진균 활성을 나타내는 선발균의 분류학적 위치를 검토하기 위하여 형태학적, 배양학적, 생화학적 특성을 검토하였으며, 도출된 결과는 Bergey's manual of systematic bacteriology(12)를 참고하였으며, API kit (bioMerieux, France)을 이용하여 동정하였다.

항진균 활성 조사

선발한 길항균주의 배양액을 이용하여 *C. cucumerinum*에 대한 항진균 활성을 조사하였다. 분리한 균주 중에서 가장 큰 성장억제력을 나타내는 균주의 콜로니를 LB broth (1.0% tryptone, 0.5% yeast extract, 1.0% sodium chloride)에 접종하여 30°C, 24시간 배양한 후, 12,000 rpm에서 10분간 4°C로 원심분리하여 균체를 침전시키고 agar diffusion method로 *C. cucumerinum*를 접종하여둔 PDA plate에 상등액 20 μ l를 침지한 paper disc (ϕ 6 mm)를 얹고, 24°C에서 72시간 배양하면서 항진균 활성을 조사하였다.

DNA 추출 및 16S rDNA의 PCR 증폭

Wizard genomic DNA purification kit (Promega, USA)를 이용하여 분리균주의 chromosomal DNA를 분리하여 sequencing에 사용하였다. PCR을 위하여 Bioneer사의 AccuPower PCR PreMix tube에 DNA 1 μ l (약 40 μ g), 각각 1 μ l의 primers, 17 μ l의 멸균된 3차 증류수를 첨가하여 잘 섞었다. PCR은 initial denaturation 94°C, 3분; denaturation 94°C, 1분; annealing 55°C, 1분; extension 72°C, 3분의 조건으로 32 cycle을 실시한 후, final extension을 72°C에서 5분간 유지하여 증폭을 종결하였다. 16S rDNA의 증폭을 위하여 *E. coli* 16S rDNA 부분의 conserved sequence를 기초로 하여 합성된 universal primer인 27F (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3')와 1492R(5'-GGATACCTTGTTACGACTT-3')를 primer로 사용하였다.

16S rDNA의 PCR 산물은 Wizard SV Gel and PCR clean-up system (Promega, USA)를 이용하여 정제하였고 정제된 PCR 산물은 ABI PRISM 3700 DNA Analyzer를 이용하여 염기서열을 분석한 후, BLASTN 프로그램을 이용하여 GENE BANK의 ribosomal DNA sequence와 비교하여 동정하였다(13).

항진균 물질의 생산을 위한 배지조건

항진균 물질의 생산을 위하여 기본배지로 LB broth를 사용하였으며, 배지에 따른 항진균 물질의 생산을 조사하기 위하여 LB broth, YM broth (0.3% yeast extract, 0.3% malt extract, 0.5% peptone, 1.0% dextrose), PDB (potato dextrose broth, 0.4% potato starch, 2.0% dextrose), 그리고 TSB (trypticase soybean broth, 1.7% digest of casein, 0.3%