The Korean Journal of Microbiology, Vol. 42, No. 2, June 2006, p. 135-141
Copyright©2006, The Microbiological Society of Korea

덩굴마름병원균인 *Didymella bryoniae*의 생물학적 방제를 위한 길항세균의 분리 및 특성

박성민 · 정혁준 · 김현수 · 유대식*
계명대학교 미생물학과

덩굴마름병균인 *Didymella bryoniae* KACC 40669에 대하여 높은 항진균 활성을 나타내는 *Brevibacillus* sp. KMU-391은 Russia의 Sanktpeterburg지역의 토양 시료로부터 분리하였다. *Brevibacillus* sp. KMU-391이 생산하는 항진균 물질은 *D. bryoniae*의 생육을 강하게 억제할 수 있었으며 TSB를 기본배지로 하여 탄소원으로 1.0% sucrose와 1.0%의 polypeptone을 첨가한 후 pH를 7.0으로 조정하여 30°C에서 180 rpm으로 2일간 배양하였을 때 가장 높은 항진균 활성을 나타내었다. 배양액에 30~60%의 ammonium sulfate를 처리하여 *Brevibacillus* sp. KMU-391이 생산하는 항진균 물질을 회수한 후 *D. bryoniae*를 액체배양을 통한 항진균 활성을 조사한 결과 대조구와 비교하여 41%의 생육을 저해하는 것으로 확인되었다. 또한 butanol을 이용하여 항진균 물질을 회수한 후, 다양한 작물병원성 곰팡이를 대상으로 항진균 활성 spectrum을 조사한 결과 조사, 장미 잿빛곰팡이병, 잠두 붉은점무늬병, 고추 탄저병, 참외 탄저병, 수박 등의 박과작물의 덩굴마름병, 보리 질병, 토마토 시들음병, 글라디올러스 마른썩음병, 토마토 질병, 수박 덩굴쪼김병, 수박 질병, 사과나무 역병, 벼 잎집무늬마름병, 참외 줄기썩음병, 그리고 고추 균핵병에 대하여 높은 항진균 활성을 나타내었다. 이러한 결과를 바탕으로 *Brevibacillus* sp. KMU-391을 이용하여 작물병원성 곰팡이에 대한 생물농약으로서의 응용 가능성을 확인 할 수 있었다.

Key words □ **antifungal activity, black rot, *Brevibacillus* sp. KMU-391, *Didymella bryoniae***

덩굴마름병(Black rot, Gummy stem blight)은 수박, 참외, 메론, 그리고 호박과 같은 박과작물 및 오이에서 발생되는 전형적인 진균성 작물병으로 경기도 이남의 온화한 지역에서 발병되며 시설 및 노지재배에 관계없이 발생한다. 육모기의 떡잎에서부터 생육기간에 걸쳐 발병하여 많은 피해를 주고 있으며 6월 하순에서 7월 상순경에 많이 발생되고 잎, 줄기, 과실, 그리고 열매자루에서 발생한다. 덩굴마름병의 병원균은 *Didymella bryoniae*가 대표적으로 알려져 있으며 발병이 시작되면 줄기에는 처음 회갈색의 불규칙한 병반이 형성되고 심하면 그루전체가 고사한다. 잎에는 처음 황갈색의 작은 반점이 나타나고 점차 진전되면 큰 원형의 부정형 병반으로 확대되며 병반상에는 흑색의 소립점(병자각)이 형성되고 열매와 열매자루에서는 배꼽부분이 갈색으로 변색되고 열매 전체가 마르고 썩는다(27).

*D. bryoniae*는 자낭균문에 속하고, 자낭포자와 병포자를 형성하며 자낭각은 표피 밑에 생기고 흑색 준구형 또는 편구형이다. 토양 속에서 월동하며 양호한 생육환경이 되면 식물체로 침입하여 병을 야기한다. 생육온도는 5~36°C이며 생육최적온도는 20~24°C이다(8).

바람을 통하여 비산되어진 포자에 의하여 2차 감염이 야기되어지고 비교적 다습한 조건에서 병든 식물체의 표면에서 포자를 형성한다. 발병초기에 화학농약을 살포하여 초기방제를 하고 있으나, 약제의 살포만으로 효과적인 방제가 불가능하다고 알려져 있으며 발병 즉시 식물을 제거하여 소각하여야 한다. 그러나 작물에 발병되어지면 작물을 제거하기 보다는 다량의 약제의 살포를 통하여 발병의 억제를 유도하고 있다. 따라서 다량의 화학농약을 사용할 수밖에 없으며 이로 인하여 내성 병원균의 출현과 토양 생태계의 교란을 야기하며 토양 중 잔류하는 화학농약에 의한 토양의 황폐화가 촉진되어지고 있다(11, 17).

소비자들의 무농약 혹은 저농약 작물에 대한 요구가 높아짐에 따라 화학농약의 사용을 줄이거나 대체하고자 하는 노력을 많이 하고 있으나 화학농약을 대체할 방법의 개발은 매우 어려운 실정이며, 가장 대표적인 대체방법 중 하나인 미생물을 이용한 제제의 경우에도 우수한 균의 분리 및 확보가 매우 어렵다. 그러나 현재 자연에 존재하는 다양한 천연의 물질을 이용하여 작물 병원성 곰팡이를 방제하고자 하는 연구들이 지속적으로 진행되고 있으며(2, 21, 23), 길항 미생물을 분리하여 농업용 항생물질로 사용하고 자 하는 연구도 진행 중에 있다. 예로 고추탄저병을 야기하는 *C. gloeosporioides*를 방제 할 수 있는 균주에 대한 보고(5, 19)와 고추역병을 야기하는 *Phytophthora capsici*에 대한 높은 길항력을 나타내는 *Pseudomonas* sp.(14)와 *Bacillus* sp.(6)에 대한 보고도 있다. 또한 사과탄저병과 겹무늬썩음병을 방제하기 위한 연구들(10,12)과 잿빛곰팡이병을 방제하기위한 연구도 진행되고 있으며(25, 26). 박과 작물에 탄저병을 야기하는 *Colletotrichum orbiculare* 방제에 대한 보고(13)와 줄기썩음병을

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-53-580-5252, Fax: 82-53-580-5164
E-mail: tsyu@kmu.ac.kr

야기하는 *Rhizoctonia solani*에 대한 보고도 있다(1, 20, 22, 24). 이 외에도 다양한 작물병원성 곰팡이를 길항할 수 있는 균주의 개발이 보고되어지고 있다(4, 7, 9, 15, 16, 18, 28).

따라서 본 연구에서도 덩굴마름병의 방제를 목적으로 덩굴마름병을 강하게 억제하는 길항균주를 선발하고 그 길항균주가 생산하는 항진균 물질의 생산조건을 검토하여 덩굴마름병방제 미생물 제제화 및 농업용 항생물질 제제화의 기초를 마련 하고자 한다.

재료 및 방법

균주의 분리

항진균 활성을 가지는 균주를 분리하기 위하여 Russia의 Sanktpeterburg지역의 토양을 사용하였다. 시료 30 g을 270 ml의 멸균수에 넣고 shaking incubator로 10분간 진탕하여 시료가 잘 섞이도록 교반한 후, 80°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. 증식한 균주들을 순수 분리한 후, 덩굴마름병원균인 *Didymella bryoniae*를 방제할 수 있는 균주를 선발하기 위하여 PDA (potato dextrose agar, 0.4% potato starch, 2.0% dextrose, 1.5% agar) plate에서 대치배양(pairing culture)을 실시하여 *D. bryoniae*의 증식을 억제하는 균주들을 일차적으로 선발하였다. 공시균주로 사용한 *D. bryoniae* KACC 40669는 농업진흥청 농업생명공학연구원 한국농용미생물보존센터(Korean Agricultural Culture Collection, KACC)에서 보유중인 덩굴마름병원균 중 병원성을 나타내는 균주를 분양받아 사용하였다.

균주의 선발 및 항진균 활성 측정

분리균주를 대치배양한 후, 일차적으로 *D. bryoniae*의 증식을 억제하는 것으로 확인된 균주들을 대상으로 가장 높은 생육저지대를 형성하는 균주를 최종적으로 선발하기 위하여 *D. bryoniae*를 직경 6 mm 크기의 culture disc로 PDA에 접종하고 24°C에서 24시간 배양한 후, 6 cm 떨어진 곳에 일차적으로 선발한 균주들을 획선 접종 하여 24°C에서 7일간 배양하면서 *D. bryoniae*에 대한 발육 억제를 조사하였다.

*D. bryoniae*에 대하여 가장 높은 생육억제를 나타내는 균주를 최종적으로 선발한 후, 항진균 활성을 조사하였다. 선발한 균주의 콜로니를 LB broth (1.0% tryptone, 0.5% yeast extract, 1.0% sodium chloride)에 접종하여 30°C, 180 rpm의 조건으로 24시간 배양한 후, 상등액을 12,000 rpm에서 10분간 4°C로 원심분리 하여 균체를 침전시켰다. Agar diffusion method를 수행하기 위하여 *D. bryoniae*를 접종하여둔 PDA plate에 상등액 20 μl를 침지한 paper disc(직경 6 mm)를 얹고, 24°C에서 7일간 배양하면서 항진균 활성을 조사하였다.

선발균의 동정

항진균 활성을 나타내는 선발균의 분류학상 위치를 검토하기 위하여 형태학적, 배양학적, 생화학적 특성을 검토하였으며, 도출된 결과는 Bergey's manual of systematic bacteriology(3)를 참고하였으며 API kit (bioMerieux, France)을 이용하여 동정하였다.

항진균 물질의 생산을 위한 생육조건

기본배지에 따른 선발균의 항진균 물질의 생산과 생육을 조사하기 위하여 LB broth, YM broth (Yeast malt broth, 0.3% yeast extract, 0.3% malt extract, 0.5% peptone, 1.0% dextrose), NB (Nutrient broth, 0.5% peptone from meal, 0.3% meat extract), PDB (potato dextrose broth, 0.4% potato starch, 2.0% dextrose), 그리고 TSB (trypticase soybean broth, 1.7% digest of casein, 0.3% soytone, 0.5% sodium chloride, 0.25% dextrose)를 제조하여 pH를 7.0으로 조정한 후, 121°C에서 15분간 멸균하여 사용하였다. 전배양액은 24시간 전에 LB broth에 단일 콜로니를 접종하여 30°C에서 배양하여 준비하였으며 각각의 삼각플라스크에 전 배양액 0.5%를 접종한 후, 30°C, 180 rpm에서 24시간 배양하였다. 선발균의 생육은 spectrophotometer (Shimadzu, Japan)를 이용하여 660 nm에서 조사하였으며 항진균 활성을 조사하기 위하여 24°C에서 15일간 *D. bryoniae*를 배양하고 배양한 plate에 멸균수 10 ml을 가하여 8.75×10^6 spores/ml로 포자 현탁액을 제조하여 4℃에 보관하면서 사용하였다. 제조한 포자 현탁액 0.1 ml을 PDA에 첨가하고 각각의 배양액을 12,000 rpm, 4°C에서 10분간 원심분리 한 상등액 20 μl를 paper disc에 침지하여 건조한 후 PDA에 얹고 24°C에서 7일간 배양하여 조사하였다.

배양온도 및 초기 pH에 따른 항진균 활성 및 생육

선발균의 항진균 활성과 생육에 대한 배양온도의 영향을 조사하기 위하여 앞에서 조사된 기본배지에 전배양한 선발균을 접종한 후 24, 30, 37, 그리고 45°C에서 180 rpm으로 24시간 배양하여 균의 생육 및 항진균 활성을 조사하였다.

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

탄소원 및 질소원에 따른 항진균 활성 및 생육

선발균의 항진균 활성과 생육에 대한 탄소원의 영향을 조사하기 위하여 앞에서 조사된 기본배지를 대조구로 하여 arabinose, fructose, glucose, glycerol, lactose, maltose, mannitol, soluble starch, sorbitol, 그리고 sucrose를 각각 1.0%씩 첨가한 후, 앞에서 조사된 초기 pH로 조정하여 사용하였다. 전배양액을 접종하여 앞에서 조사된 최적 배양온도에서 180 rpm의 조건으로 24시간 배양한 후 균체의 증식과 항진균 활성을 조사하였다.

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

항진균 활성에 미치는 배양일수의 영향

24~72시간동안 선발된 균주를 배양한 후, 24시간마다 배양액을 sampling하여 배양시간에 따른 항진균 활성을 조사하였다.

항진균 물질의 조정제

선발된 균주의 항진균 활성을 조사하기 위하여 앞에서 조사되어진 항진균 물질 생산배지 300 ml을 제조하고 선발된 균주를 앞에서 조사된 최적조건에서 배양한 후, 10,000 rpm, 4°C에서 20분간 원심분리를 하여 상등액을 회수하였다. 항진균 활성을 나타내는 물질을 회수하기 위하여 ammonium sulfate를 0~30%와 30~60% 농도로 첨가한 후, 4°C에서 12시간 정치하면서 항진균 물질의 침전을 유도하여 4°C에서 10,000 rpm, 20분간 원심분리하여 회수하였다. 회수한 물질을 소량의 100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)로 현탁한 후 4°C에서 24시간 동안 투석하여 사용하였다. *D. bryoniae*의 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 가지는 항진균 활성의 spectrum을 조사하였다. 항진균 활성을 조사하기 위하여 앞의 실험과 동일조건으로 200 ml 배양한 후, 배양액을 원심분리 하여 균체를 제거하고, 상등액에 2배 volume의 butanol을 첨가하여 항진균 물질을 용매층으로 이행시키고 용매를 회수하고 50°C이하에서 감압농축 한 후, 항진균 활성을 조사하였다. 조사한 작물 병원성 곰팡이는 장미 잿빛곰팡이병을 야기하는 *Botrytis cinerea* KACC 40573, 잠두 붉은점무늬병을 야기하는 *Botrytis fabae* KACC 40962, 고추 탄저병을 야기하는 *Colletotrichum gloeosporioides* KACC 40804, 참외 탄저병을 야기하는 *Colletotrichum orbiculare* KACC 40808, 수박 등의 박과 작물에 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 덩굴쪼김병을 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 *Scleotinia scleotiorum* KACC 41065를 사용하였다.

결과 및 고찰

균주의 선발 및 동정

토양시료로부터 분리된 균주 중에서 육안관찰, 형태 및 증식양상이 서로 다른 23 균주를 선발하였다. 덩굴마름병을 야기하는 *D. bryoniae* KACC 40669에 대한 길항균주를 선발하기 위하여 PDA plate에 선발된 각각의 균을 획선 접종하여 배양하면서 *D. bryoniae*의 생육을 억제하는 8균주를 일차적으로 선발하였다. 선발된 균주를 각각 대치배양 하여 24°C에서 7일간 배양하면서 *D. bryoniae*의 생육을 가장 많이 저지하는 균주를 최종적으로 선발하고 KMU-391이라 명명하였다(Fig. 1). KMU-391은 그람양성의 rod form으로 내생포자를 형성하고 형성된 집락은 원형으로 점질성의 물질을 생산하는 mucoid type이였으며 표면은 smooth하였다. KMU-391은 호기성 세균으로 catalase, gelatin liquefaction, citrate utilization, 그리고 nitrate reduction 등을 하는 것으로 조사되었으며 Bergey's manual of systematic bacteriology와 비교한 결과, *Bacillus* sp.로 분류되었다(Table 1). API 50 CHB kit을

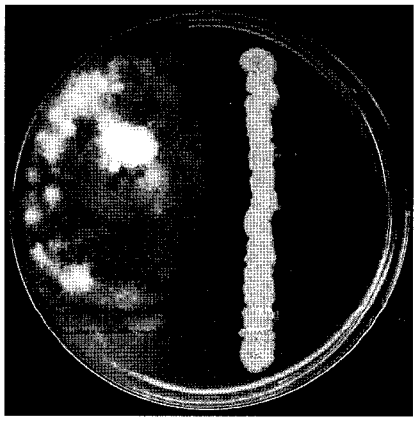

Fig. 1. Growth inhibition of *Didymella bryoniae* by *Brevibacillus* sp. KMU-391 on PDA.

Table 1. Morphological and physiological characteristics of KMU-391

Characteristics	KMU-391
Morphological:	
Colonies form	White-yellowish, smooth
Endospores produced	+
Gram staining	+
Motiility	+
Shape of a cell	rod
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

사용하여 50가지의 당에 대한 생화학적 특성을 조사한 후, API 20E kit의 결과와 함께 API LABplus (V. 3. 3. 3)프로그램으로 확인한 결과, *Brevibacillus brevis*와 94.3%의 상동성을 나타내었으나 16S rDNA sequence와 같은 보다 정확한 결과와 비교하지 못하여 *Brevibacillus* sp. KMU-391로 명명하였다(Table 2).

온도 및 pH에 따른 항진균물질의 생산

대치배양을 통하여 *D. bryoniae*에 대한 *Brevibacillus* sp. KMU-391의 항진균 활성을 확인한 후, LB broth에서 *Brevibacillus* sp. KMU-391을 24시간 배양하여 paper disc를 이용한 agar diffusion method로 항진균 활성을 조사한 결과 inhibitory zone을 형성하였다. LB broth를 이용하여 전배양한 후, 항진균 물질의 생산을 위한 기본배지를 선택하기 위하여 LB broth, YM broth, NB, PDB, 그리고 TSB를 이용하여 각각의 배지에서 24시간 배양한 후 항진균 활성을 조사한 결과, 항진균 활성은 TSB에서 20 mm로 가장 높게 나타났으며 NB와 YM broth에서도 18 mm으로 조사되었다. *Brevibacillus* sp. KMU-391의 생육은 TSB에서 가장 양호하였으며 NB와 LB broth에서도 양호한 것으로 조사되었다(Table 3). 그러나 YM broth의 경우에 양호한 항진균 활성을 나타내었으나 생육은 다른 배지에 비하여 낮게 나타나는 것으로 볼 때 항진균 활성과 생육의 상호관계는 없는 것으로 판단되었으며 이 결과는 박 등(22)의 결과와 유사하였다.

Table 2. Biochemical characteristics(carbohydrates) of *Brevibacillus* sp. KMU-391

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	+		

TSB를 기본배지로 하여 배양 온도에 따른 *Brevibacillus* sp. KMU-391의 항진균 활성을 조사한 결과, Table 4와 같이 30°C에서 가장 높은 항진균 활성을 나타내었으며 37, 45, 그리고 24 °C 순으로 조사되었다. *Brevibacillus* sp. KMU-391의 생육은 37 °C에서 가장 양호하였으며 30, 24, 그리고 45°C 순으로 조사되었다. 가장 양호한 항진균 활성과 생육을 나타내는 온도는 달랐으나 전반적으로 양호한 생육과 항진균 활성을 나타내었으며 이러한 결과는 40°C 이상의 온도에서 균체의 생육과 활성이 급격하게 감소한다고 보고한 정(7)과 이 등(18)의 결과와는 상이하였으나 30°C에서 가장 양호한 항진균 활성을 나타내었다고 보고한 박 등(20)의 결과와는 유사하였다.

배양초기 pH에 따른 *Brevibacillus* sp. KMU-391의 항진균 활성과 생육을 조사하기 위하여 기본배지인 TSB의 pH를 3.0~10.0으로 각각 조정하여 조사한 결과 pH 7.0에서 가장 양호한 항진균 활성을 나타내었다. pH 7.0과 비교하였을 때 pH 6.0과 8.0은 각각 90%의 항진균 활성을 나타내었으며 4.0, 5.0, 그리고 9.0에서는 80% 이상의 항진균 활성을 나타내었다. 생육은 pH 5.0과 6.0에서 가장 양호한 것으로 조사되었으며 alkali인 pH 9.0과 10.0과 비교할 때 약산성인 5.0과 6.0에서 보다 양호한 항진균 물질을 생산하는 것으로 조사되었으며 산성 pH의 조건에서 보다 높은 항진균 활성을 가진다고 보고한 이 등(15)의 결과와 유사하였다. 그러나 pH 3.0에서는 증식을 하지 못하였으며(Table 5), 이러한 결과는 양호한 항진균 물질을 생산하지만 좁은 pH 범위를 가지다고 보고한 *B. licheniformis* KMU-3(22)과는 상이하였으나 pH 4.0에서 10.0 사이에서 전반적으로 양호한 생육과 항진균 물질을 생산한다고 보고된 *Bacillus* sp. FF-9(20)의 결과와는 유사하였다.

Table 3. Antifungal activity with different culture broth

Media	Growth (OD_{660})	Inhibitory zone (∅ mm)
LB	1.90	17
NB	1.75	18
PDB	0.64	14
TSB	2.11	20
YM	1.31	18

LB, Luria-Bertani broth; NB, Nutrient broth; PDB, Potato dextrose broth; TSB, Trypticase soybean broth; YM, Yeast malt broth.
Brevibacillus sp. KMU-391 was incubated at 30°C, 180 rpm for a day, *D. bryoniae* KACC 40669 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 (OD_{660})	Inhibitory zone (∅ mm)
24	2.01	16
30	2.19	20
37	2.26	18
45	1.94	17

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

pH	Growth (OD_{660})	Inhibitory zone (∅ mm)
3	-	-
4	1.67	16
5	2.23	17
6	2.23	18
7	2.16	20
8	1.90	18
9	1.75	16
10	1.32	12

항진균 물질의 생산에 미치는 다양한 탄소원의 영향

Brevibacillus sp. KMU-391가 생산하는 항진균 물질의 생산에 미치는 탄소원의 영향을 조사한 결과는 Table 6와 같다. 탄소원 중에서 sucrose를 첨가하였을 때 23 mm로 가장 높은 항진균 활성을 나타내었으며 arabinose, maltose, 그리고 mannitol을 첨가한 경우에도 대조구에 비하여 높은 항진균 활성을 나타내었다. 그러나 fructose, glucose, glycerol, lactose, 그리고 soluble starch를 첨가한 경우 가장 양호한 항진균 활성을 나타낸 sucrose와 비교하였을 때 70% 이상의 항진균 활성을 나타내었으나 sorbitol을 첨가하였을 때에는 50%의 항진균 활성을 나타내었다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 *Brevibacillus* sp. KMU-391에 의한 항진균 물질의 생산은 탄소원에 대한 기질 특이성을 가지는 것으로 판단되었으며 sucrose를 첨가하였을 때 가장 양호한 항진균 활성을 나타낸다고 보고한 김 등(10)의 결과와 유사하였다. 생육의 경우 sucrose를 첨가한 경우에도 양호한 생육을 나타내었으나 다른 실험구와 비교할 때 상대적으로 낮은 생육을 하는 것으로 나타났으며 이와는 반대로 항진균 활성이 가장 낮게 조사된 sorbitol의 경우에는 양호한 증식을 하는 것으로 조사되었다.

항진균 물질의 생산에 미치는 질소원 및 배양일수의 영향

기본배지인 TSB에 탄소원으로 1.0% sucrose를 첨가한 후 다양한 질소원을 첨가하여 항진균 물질의 생산에 미치는 영향을 조사하였다. Table 7에서와 같이 첨가한 11 종류의 유, 무기 질소원 중에서 유기질소원인 polypeptone, bactotryptone, 그리고 malt extract에서 대조구보다 높은 항진균 활성을 나타내었으며 polypeptone을 첨가한 경우에 가장 양호한 것으로 나타났다(Table 7). 다른 질소원들의 경우에도 polypeptone이 나타내는 항진균 활성의 87% 이상은 유지하였다. 그러나 탄소원으로 sorbitol을 첨가하였을 때 50% 정도의 항진균 활성을 나타낸 것처럼 질소원의 첨가에 의하여 항진균 활성의 급격한 감소를 나타내는 것은 없는 것으로 조사되었다. 생육의 경우 corn steep liquer를 첨가한 경우에 가장 양호한 생육을 하였으며 ammonium chloride와 yeast extract를 첨가한 경우에도 양호한 생육을 하는 것으로 조사되었다.

배양일수에 따른 *Brevibacillus* sp. KMU-391의 항진균 활성을 조사하기 위하여 기본배지에 탄소원으로 1.0% sucrose와 질소원으로 1.0% polypeptone을 첨가하여 1~3일간 30°C에서 180 rpm으로 배양하면서 조사한 결과 배양일수에 따른 항진균 활성의 차이는 거의 나타나지 않았으나 배양 2일째 가장 양호한 활성을 나타내었다(Fig. 2). 생육의 경우에 배양 3일째 가장 양호한 생육

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

Carbon sources	Growth (OD_{660})	Inhibitory zone (∅ mm)
Control	2.04	19
Arabinose	2.25	21
Fructose	2.13	18
Glucose	1.94	19
Glycerol	2.21	17
Lactose	2.32	18
Maltose	1.94	21
Mannitol	2.30	21
Soluble starch	2.24	18
Sorbitol	2.17	12
Sucrose	1.96	23

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

Nitrogen sources	Growth (OD_{660})	Inhibitory zone (∅ mm)
Control	2.08	22
Ammonium chloride	2.28	21
Amonium phosphate	2.10	21
Ammonium sulfate	1.96	21
Bactopeptone	2.10	23
Bactotryptone	1.66	24
Beef extract	2.13	20
Corn steep liquor	2.30	22
Malt extract	2.07	24
Polypeptone	2.21	25
Urea	2.18	20
Yeast extract	2.27	20

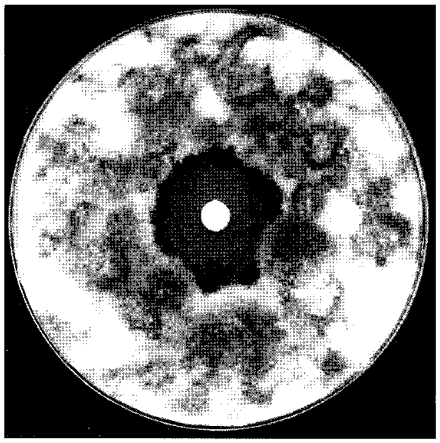

Fig. 2. Inhibitory zone of *Didymella bryoniae* by cultured broth of *Brevibacillus* sp. KMU-391.

을 하는 것으로 조사되었으나 배양 1일째와 비교하였을 때 큰 차이를 나타내지는 않는 것으로 판단되었다.

항진균 물질의 조정제 및 항진균 spectrum

Brevibacillus sp. KMU-391가 생산하는 항진균 물질을 회수하기 위하여 기본배지인 TSB에 탄소원 및 질소원으로 1.0% sucrose와 1.0% polypeptone을 첨가하고 pH를 7.0으로 조정한 후, 30°C 2일간 배양하였다. 회수한 배양액에 0-30%와 30-60%의 ammonium sulfate를 첨가한 후, 원심분리하여 침전물을 회수하고 회수액을 4°C에서 24시간 투석하여 탈염하였다. 항진균 활성을 조사하기 위하여 회수한 용액(6 ml) 중 96 μl를 50 ml의 PDB배지에 첨가하고 대조구에는 100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)를 첨가한 후, *D. bryoniae*의 포자 현탁액 100 μl를 접종하여 24°C, 150 rpm으로 7일간 배양하면서 조사한 결과, 대조구와 0~30% ammonium sulfate로 회수한 경우에는 배양 중 큰 차이를 나타내지는 않았으나 30-60% ammonium sulfate로 회수한 경우에는 배양 중 포자의 생육이 상대적으로 늦었으며 포자의 크기도 상대적으로 작게 형성되었다. *D. bryoniae*를 회수하여 50°C에서 2일간 건조한 후 중량을 측정하여 항진균 활성을 조사한 결과 배양액에 30-60% ammonium sulfate를 처리한 경우에 건조중량이 0.5 g으로 대조구와 비교하여 41%정도의 생육을 저해 받은 것으로 조사되었으나 0-30% ammonium sulfate를 처리한 경우에는 0.84 g으로 대조구의 0.85 g과 비교할 때 거의 유사하였다. 이러한 결과로부터 30-60% ammonium sulfate를 처리하여 항진균 물질을 회수할 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

다양한 작물병원성 곰팡이에 대한 *Brevibacillus* sp. KMU-391의 항진균 활성의 spectrum을 조사하기 위하여 위와 동일한 조건에서 *Brevibacillus* sp. KMU-391을 배양하였다. Butanol을 이용하여 배양액으로부터 항진균 활성물질을 회수한 후, agar diffusion method로 항진균 spectrum을 조사한 결과 항진균 활성을 조사한 *Botrytis cinerea* KACC 40573, *Botrytis fabae* KACC 40962, *Colletotrichum gloeosporioides* KACC 40804, *Colletotrichum orbiculare* KACC 40808, *Didymella bryoniae* KACC 40669, *Fusarium graminearum* KACC 41040, *Fusarium oxysporum* KACC 40037, *Fusarium oxysporum* KACC 40052, *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* KACC 40537, *Fusarium oxysporum* KACC 40902, *Monosporascus cannonballus* KACC 40940, *Phytophthora camvibora* KACC 40160, *Rhizoctonia solani* AG-1 (IA) KACC 40101, *Rhizoctonia solani* AG-4 KACC 40142, 그리고 *Scleotinia scleotiorum* KACC 41065에 대하여 항진균 활성을 나타내었으며(Table 8) 덩굴마름병에 대한 실용적인 생물학적 방제제 개발을 위한 포장실험, 제형개발 등의 다양한 조사를 진행할 예정이다.

Table 8. Antifungal effect of butanol extract of *Brevibacillus* sp. KMU-391 cultured broth

Plant pathogenic fungi	Inhibitory zone (∅ mm)
Botrytis cinerea KACC 40573	26
Botrytis fabae KACC 40962	21
Colletotrichum gloeosporioides KACC 40804	24
Colletotrichum orbiculare KACC 40808	25
Didymella bryoniae KACC 40669	27
Fusarium graminearum KACC 41040	16
Fusarium oxysporum KACC 40037	11
Fusarium oxysporum KACC 40052	13
Fusarium oxysporum KACC 40537	25
Fusarium oxysporum KACC 40902	19
Monosporascus cannonballus KACC 40940	21
Phytophthora cambivora KACC 40160	24
Rhizoctonia solani AG-1KACC 40101	19
Rhizoctonia solani AG-4KACC 40142	26
Sclerotinia scleotiorum KACC 41065	26

감사의 말

본 연구는 산업자원부의 지역혁신 인력양성사업의 연구결과로 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 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 cucumber by *Bacillus cereus* KJA-118. *Korean J. Soil. Sci. Fert.* 36, 247-255.
2. Banos, S. B., M. H. Lopez, E. B. Molina, and C. L. Wilson. 2003. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. *Crop Protection.* 22, 1087-1092.
3. Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley, and S. T. Williams. 1994. Bergey' Manual of Systematic Bacteriology. 9th. Williams&Wilkins. U.S.A.
4. Huang, X., B. Tian, Q. Niu, J. Yang, L. Zhang, and K. Zhang. 2005. An extracellular protease from *Brevibacillus laterosporus* G4 without parasporal crystals can serve as a pathogenic factor in infection of nematodes. *Res. Microbiol.* 156, 719-727.
5. Jo, S. J., B. J. Cha, and K. S. Shin. 2004. Effect of culture parameters on the production of growth inhibitory substance of *Colletotrichum gloeosporioides* from *Bacillus subtilis*. *Kor. J. Mycol.* 32, 138-141.
6. Jung, H. K. and S. D. Kim. 2003. Purification and characterization of an antifungal antibiotic from *Bacillus megaterium* KL 39, a biocontrol agent of red-pepper Phytophthora blight disease. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31, 235-241.
7. Jung, H. K., J. C. Ryoo, and S. D. Kim. 2005. A multi-microbial biofungicide for the biological control against several important plant pathogenic fungi. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 48, 40-47.
8. Kothera, R. T., A. P. Keinath, R. A. Dean, and M. W. Farnham. 2003. AFLP analysis of a worldwide collection of *Didymella bryoniae*. *Mycol. Res.* 107, 297-304.
9. Kim, G. S. and Y. B. Seu. 2004. Isolation of polyene antifungal antibiotics against gummy stem light caused by *Didymella bryoniae*. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 32, 238-242.
10. Kim, J. M., M. W. Lee, and Y. H. Han. 1998. Antifungal activity of *Pseudomonas* sp. DGUM 5051 against apple bitter-rot causing fungus, *Glomerella cingulata*. *Kor. J. Mycol.* 26, 458-465.

11. 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. *J. of KSEE.* 20, 1545-1553.
12. Kim, S. S., G. J. Joo, J. Y. Uhm, Y. J. Kim, and I. K. Rhee. 1997. Antifungal activity of *Bacillus* sp. SS279 and biocontrol of apple white rot fungus, *Boryosphaeria dothidea. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25, 527-536.
13. Kwack, M. S., S. G. Park, Y. C. Jeun, and K. D. Kim. 2002. Selection and efficacy of soil bacteria inducing systemic resistance against *Colletotrichum orbiculare* on cucumber. *Mycobiology.* 30, 31-36.
14. 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. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28, 334-340.
15. Lee, J. H., B. K. Kang, H. K. Kwon, J. O. Yung, and Y. K. Nam. 2005. Isolation and identification of activated microorganisms for biocide development. *Kor. J. Env. Hlth.* 31, 31-38.
16. Lee, K. M., O. M. Lee, M. S. Cha, E. H. Park, G. T. Park, H. J. Son, and S. J. Lee. 2002. Production and characteristics of environment friendly antimicrobial substance by *Pseudomonas aeruginosa* EL-KM. *J. Environ. Sci.* 11, 33-40.
17. Lee, K. S. 1997. Evaluation on the effects of pesticide residues to agroecosystem in Korea. *Kor. J. Environ. Agric.* 16, 80-93.
18. Lee, N. W., C. S. Kim, J. H. Do, I. C. Jung, H. W. Lee, and D. H. Yi. 1998. Isolation and identification of *Bacillus* sp. LAM 97-44 producing antifungal antibiotics. *Agric. Chem. Biotechnol.* 41, 208-212.
19. Paik, S. B. and D. W. Kim. 1995. Screening for phyllospheral antagonistic microorganism for control of red-pepper anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*). *Kor. J. Mycol.* 23, 190-195.
20. Park, J. C., J. H. Yoo, J. Y. Cha, M. S. Kim, and Y. S. Cho. 2004. Isolation, identification and optimal culture condition of *Bacillus* sp. FF-9 having antifungal activity on the turf grass pathogens caused by *Rhizoctonia solani* AG II-II. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 47, 373-378.
21. 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.
22. 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.
23. 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. of Life Science.* 15, 692-695.
24. Ryu, J. S., S. D. Lee, Y. H. Lee, S. T. Lee, D. K. Kim, S. J. Cho, S. R. Park, D. W. Bae, K. H. Park, and H. D. Yun. 2000. Screening and identification of an antifungal *Pseudomonas* sp. that suppresses balloon flower root rot caused by *Rhizoctonia solani. J. Microbiol. Biotechnol.* 10, 435-440.
25. Santos, A., A. Sanchez, and D. Marquina. 2004. Yeasts as biological agents to control *Botrytis cinerea. Microbiol. Res.* 159, 331-338.
26. Sergio, A. M., L. A. Maffia, E. S. G. Mizubuti, L. V. Cota, and P. S. Dias. 2005. Selection of *Clonostachys rosea* isolates from brazilian ecosystems effective in controlling *Botrytis cinerea. Biol. Control.* 34, 132-143.
27. Skarshaug, A. J. 1981. Centrum development in *Didymella bryoniae. Amer. J. Bot.* 68, 1096-1103.
28. Utkhede, R. and C. Bogdanoff. 2003. Influence of lysozyme, yeast, azoxystrobin, and myclobutanil on fungal diseases of cucumbers grown hydroponically. *Crop Protection.* 22, 315-320.

(Received April 17, 2006/Accepted June 12, 2006)

ABSTRACT : Isolation and Optimal Culture Conditions of *Brevibacillus* sp. KMU-391 against Black Root Pathogens Caused by *Didymella bryoniae*

Sung Min Park, Hyuck Jun Jung, Hyun Soo Kim, and Tae Shick Yu* (Department of Microbiology, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea)

We isolated a bacterium which produces antifungal substances from the Sanktpeterburg soils at Russia. The isolated strain was identified as *Brevibacillus* sp. and shown a strong antifungal activity on plant pathogenic fungi. *Brevibacillus* sp. KMU-391 produced maximum level of antifungal substances under incubation aerobically at 30°C for 48 hours in trypticase soybean broth containing 1.0% sucrose and 1.0% polypeptone at 180 rpm and initiated pH adjusted to 7.0. Precipitate of culture broth by 30~60% ammonium sulfate precipitation exhibited strong antifungal activity against *Didymella bryoniae* by dry cell weight. Butanol extract of cultured broth also shown fungal growth inhibitory activity against *Botrytis cinerea* KACC 40573, *Botrytis fabae* KACC 40962, *Colletotrichum gloeosporioides* KACC 40804, *Colletotrichum orbiculare* KACC 40808, *Didymella bryoniae* KACC 40669, *Fusarium graminearum* KACC 41040, *Fusarium oxysporum* KACC 40037, *Fusarium oxysporum* KACC 40052, *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* KACC 40537, *Fusarium oxysporum* KACC 40902, *Monosporascus cannonballus* KACC 40940, *Phytophthora camvibora* KACC 40160, *Rhizoctonia solani* AG-1(IA) KACC 40101, *Rhizoctonia solani* AG-4 KACC 40142, and *Scleotinia scleotiorum* KACC 41065 by agar diffusion method.