

작물병원 진균에 대하여 항균 활성을 보이는 *Paenibacillus polymyxa* DY5의 동정 및 특성

김효윤¹ · 원항연² · 김완규³ · 유관희^{4*}

¹안동대학교 자연과학대학 생명과학과, ²농촌진흥청 국립농업과학원 유전자원센터,
³농촌진흥청 농업과학원 농업미생물과, ⁴상지대학교 이공과대학 생명과학과

Identification and Characterization of *Paenibacillus polymyxa* DY5 with Antifungal Activity against Crop Pathogenic Fungi

Hyo Yoon Kim¹, Hang Yeon Weon², Wan Gyu Kim³ and Kwan Hee Yoo^{4*}

¹Department of Biology, Andong University.

²National Agrobiodiversity Center, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon, 441-707, Korea.

³Agricultural Microbiology Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon, 441-707, Korea.

⁴Department of Life Science, Sangji University, Wonju 220-702, Korea.

(Received November 23, 2009. Accepted December 17, 2009)

ABSTRACT: A Gram-positive, rod-shaped bacteria named DY5 was isolated from a peat sample collected from Daeam mountain in Korea. The culture filtrate of the bacterial isolate DY5 showed a broad spectrum of antifungal activity on various crop pathogenic fungi such as *Trichoderma koningii*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* AG-1(IA). For the identification of the DY5, morphological, biochemical, API 50 CHB test, analysis of fatty acid and molecular phylogenetic approaches were performed. The DY5 was found to be a member of the genus *Paenibacillus* on the basis of morphological and biochemical analysis. The 16S rRNA of DY5 showed high similarity(98%) with *Paenibacillus polymyxa*. On the basis of these results, the DY5 was identified as *Paenibacillus polymyxa*. Antifungal substance of the DY5 would be mild alkaline protease molecule. The DY5 seems to have a great potential to be a biocontrol agent against various crop pathogens.

KEYWORDS: Antifungal substance, Biocontrol agent, Crop pathogens, *Paenibacillus polymyxa*, 16S rRNA

농작물 생산 증대는 인류의 생존을 위해 중대한 과제이다. 경제작물을 비롯하여 저장 곡류 및 과일 등에 막대한 손실을 초래하는 병충해를 효과적으로 방제하는 것은 농업 생산성 향상을 위해 매우 중요하다. 현재 수많은 종류의 다양한 병충해 방제용 유기합성화학 약제가 각 나라마다 등록되어 있다(이 등, 2008; Wheeler, 2002).

오늘날 사용되고 있는 유기합성농약은 주로 유기인산 ester계, carbamate계, pyrethroid계, 염소계 유기합성화합물들이다. 세계적으로 이러한 유기합성농약이 대량으로 사용되어 식량증산이 현저히 증대되었으나, 지나치게 남용하여 그 폐해 또한 심각하다(이 등, 2008; Takama, 2008).

유기합성농약은 살충효과가 강하고, 가격이 저렴하여 경제성이 뛰어나다. 그러나 해충에 대한 방제효과가 일시적이고, 환경에서 자연적으로 분해가 잘되지 않고, 먹이연쇄에 의해 먹이사슬 상위생물체내에 축적, 인축독성을 유발하기 때문에

이를 방지하기 위한 제도적인 규제들이 점차 강화되고 있다(Bale et al., 2008; Hiroshi, 1996).

또한 지구의 오염, 생태계 파괴, 잔류독성으로 인한 환경오염, 지하수 및 식수오염 등의 문제가 제기되고 있다. 특히 2, 4, 5 - Trichlorophenoxy acetic acid는 38주, aldrin, chlordane, lindane 등은 15년 동안이나 잔류되고 있어 심각한 토양오염을 유발하며(Casida, 2009; Hiroshi, 1995), 농약의 장기간 사용으로 화학 살충제에 저항성을 나타내는 해충도 등장하였으며(Barvo and Soberon, 2008), 유기염소계 및 유기인계 유기합성농약은 정상적인 대사기능을 방해하는 환경성 내분비교란물질(환경호르몬)로 작용하여 심각한 문제를 야기하고 있다(Bretveld et al., 2006).

이러한 문제점을 극복하기 위한 새로운 방법으로 환경과 조화를 이루는 저항성 품종 개발, 경종적 방제, 생물학적 방제제로 이용되는 미생물 농약 등의 개발에 대한 연구가 수행되었다(Bai and Shaner, 2004; Montesinos, 2003).

오늘날 유기합성농약을 가급적 적게 사용하고, 보다 안전

*Corresponding author <E-mail : khyoo@sangji.ac.kr >

하며 자연계에서 생분해능이 좋은 살충성물질과 해충에 병원성을 갖는 길항미생물 또는 이들이 생산하는 항생물질을 이용하려는 생물적 방제법에 대한 연구가 지속적으로 이루어지고 있다(이 등, 2008; Fravel, 2005).

미생물 살충제로는 곤충 virus인 *Baculovirus*(Cheng and Lynn, 2009), 세균(*Bacillus thuringiensis*: BT)의 독소단백질(길 등, 2007; 남 등, 2004; 이 등, 2006; Rosas-Garcia, 2009), 진균류(Fernandes and Bittencourt, 2008; Lacey and Shapiro-Ilan, 2008) 및 동충하초(남 등, 2004; Holder and Keyhani, 2005; Vu *et al.*, 2008) 등을 이용한 생물적 방제에 관한 연구가 진행되었으며, 진균을 이용한 토양선충의 방제(Jegathambigai *et al.*, 2008), 중복기생 방법을 이용한 식물성 병원균인 진균의 방제(신, 1994)와 버섯의 항진균 및 항세균성 물질의 탐색(Gilardoni *et al.*, 2007; Quang *et al.*, 2006) 등에 대해 연구되었다.

생물농약은 전체 농업용 화학물질의 약 1%를 점유하고 있다(Fravel, 2005). 유럽 및 지중해 작물 보호기구(European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO))의 2008년 보고서인 Standards on Safe use of Biological Control - PM 6/3(3) - Version 2008, List of biological control agents widely used in the EPPO region에 의하면 2008년 시점으로 약 100종의 생물종이 상품화 되어 생물학적인 방제의 목적으로 유럽지역에서 널리 사용되고 있다(EPPO, 2009).

생물적방제제로 이용되는 미생물농약은 현지의 기후 풍토나 토양환경 조건 등, 생태계 환경에 크게 영향을 받으므로, 해당 지역 환경에 따른 활성의 차이가 크다고 알려져 있다. 따라서 우리나라 기후나 토양환경에 맞는 생물농약의 개발이 절실히 필요하다. 최근 일부 외국 제조회사나 특허 전문기업들이 우리나라 제조업체에 지나친 특허료를 징수하고, 지적소유권 분쟁을 일으키는 사례가 많으며, 이러한 상황에서 우리 고유의 농업 원천기술의 확보는 매우 중요하다. 본 연구에서는 국내 기후와 환경에 적합하고 미생물농약으로 사용할 수 있는 새로운 항진균물질 생산균주를 선별하고 동정하였으며, 새로운 미생물농약으로서의 가능성에 대한 기초자료를 확보하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 채집

강원도 양구군에 위치한 대암산 용늪 주변에서 산림이 잘 보존되어 있는 활엽수림의 50 장소를 선정하여, 멸균된 시약스폰으로 2-5 cm 깊이의 토양을 약 50-100 g 채취하였다. 채취된 토양을 멸균된 비닐봉지에 넣어 Ice box에 보관하여 실험실로 옮겨 4 냉장고에 보관하면서 항균물질을 생산하는 균주를 분리하기 위한 실험재료로 사용하였다.

실험 균주 및 배지

순수 분리된 *Paenibacillus polymyxa* DY5의 항균활성

Table 1. Fungi tested in this study

Isolate No.	Fungi
KACC40779	<i>Trichoderma koningii</i>
KACC40896	<i>Colleotrichum gloeosporioides</i>
KACC40037	<i>Fusarium oxysporium</i>
KACC40457	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
KACC40101	<i>Rhizoctonia solani</i> AG-1(IA)

을 알아보기 위하여 국립농업과학원에서 분양받은 5종의 작물병원균을 실험균주로 사용하였다(Table 1).

실험에 사용한 배지는 균 보존배지로 Nutrint agar(NA), Potato dextrose agar(PDA) 배지를 사용하였고, 길항균주를 분리하기 위한 배지로 선택배지(Selective media)를 사용하였으며, 세균의 증균용 배지로 Nutrint broth(NB), Brain heart infusion(BHI), Muller hinton(MH) 배지를, 진균의 증균용 배지로 Potato dextrose broth(PDB) 배지를 사용하였다.

실험균주의 순수 분리

채취한 토양 1 g을 멸균증류수 9 ml에 넣고 30분간 150 rpm으로 교반하여 얻은 상등액을 80°C에서 10 분간 열처리 하였다. 이 상등액을 1,000 배로 희석한 다음, 희석액 0.1 ml을 선택배지(SM: 4 µg/ml penicillin G 5 µg/ml polymixin B sulfate)에 도말하고 28°C에서 48 시간 배양하였다. 선택배지에서 성장한 각각의 집락을 백금으로 취하여 NB 배지에 1 백금이 접종하여 30°C에서 48시간 배양한 후, 배양액의 일부는 균의 동정에 사용하였고, 남은 일부는 항균물질 생산여부를 확인하는데 사용하였다.

항균물질 활성 측정(디스크 확산법)

PDA 배지 중앙에 작물병원균을 접종한 후, 접종한 병원균의 상, 하, 좌, 우로 1 cm 떨어진 곳에 멸균된 paper disk(직경 6 mm)를 놓고, disk 위에 48시간 배양된 배양여과액을 50 µl 떨어뜨린 다음 27°C에서 48시간 배양한 후, 성장억제대(투명환)의 직경을 측정하여 항균물질의 활성을 조사하였다.

항균물질 생산균주의 동정

항균물질 생산균주의 형태적 특성을 알아보기 위하여 NA 배지에 24 시간 배양한 균주를 그람염색 하여 균의 크기, 모양 및 parasporal cystal 형성 등의 형태학적 특성을 조사하였으며, 전자현미경(SEM; Hitachi S 0570, Japan)을 이용하여 균의 형태를 검정하였다.

생화학적 특성을 알아보기 위하여 API 20E kit(Bio Merieux Co, France) 시험과 API 50 CHB kit(Bio Merieux Co, France) 시험을 시행하였다. API kit 시험을 위하여 BHI 액체배지에 균주를 접종한 후 35°C에서 18-24시간 배양한 배양액을 사용하였으며, API 50 CHB kit와 API 20E kit의 사용은 제조사의 표준적인 실험방법에 따라 실험하였다. 실험 결과는 30°C에서 2일간 배양한 후 판독하였다.

항균물질 생산균주를 동정하기 위하여 16S rRNA 염기서열 분석(Baker *et al.*, 2003)과 지방산분석(Yoon *et al.*, 2003)을 시행하여 균을 동정하였다.

항균물질 생산균주의 동정은 *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*(David and Castenhol, 2001)와 *The Genus Bacillus*(Gordon *et al.*, 1973)의 분류기를 이용하여 속을 결정하였다. 아울러 16S rRNA 유전자염기서열 결과와 Reva 등(2001)의 호기성 포자형성 균의 분류기에 따라 균주를 동정하였다.

항균물질의 온도에 대한 안정성 분석

항균물질의 온도에 대한 안정성을 알아보기 위하여, 항진균물질을 10°C에서 60°C까지 10°C간격으로 각각의 온도에서 30분 반응시킨 후, 디스크확산 법으로 성장억제대의 직경을 측정하여 온도에 대한 안정성을 조사하였다.

항균물질의 pH에 대한 안정성 분석

항균물질의 pH에 따른 안정성을 알아보기 위하여, acetate buffer(pH 3-5), phosphate buffer(pH 6-8), Tris buffer(pH 9-11)를 사용하였다.

각각의 buffer 50 µl와 항균물질이 포함된 배양여과액 50 µl를 혼합한 다음 30°C에서 30분 반응시킨 후 디스크확산 법으로 성장억제대의 직경을 측정하여 pH에 대한 안정성을 조사하였다.

단백질 분해효소에 대한 영향

항균물질의 단백질 분해효소에 대한 영향을 알아보기 위하여 25 µg/ml, 50 µg/ml, 75 µg/ml, 100 µg/ml의 proteinase K 용액을 제조하였다.

각각의 proteinase K 용액 50 µl와 동량의 항진균물질을 혼합한 다음 30°C에서 30, 60, 90, 120분 반응시킨 후, 디스크확산 법으로 성장억제대의 직경을 측정하여 단백질 분해효소에 대한 영향을 조사하였다.

항균물질의 적용실험

Paenibacillus polymyxa DY5 균주가 생산하는 항균물질을 생물농약으로 사용할 수 있는지를 알아보기 위하여 느타리버섯 푸른곰팡이 병을 유발하는 *Trichoderma koningii* 균을 사용하여 적용실험을 하였다.

느타리버섯 종균을 접종하여 7일간 배양시켜 느타리버섯 균사체가 성장한 4개의 병배지에 아무것도 처리하지 않은 것(A), *Trichoderma koningii*를 처리한 것(B), 항균물질을 포함하고 있는 배양여과액을 처리한 것(C), *Trichoderma koningii*와 항진균물질을 포함하고 있는 배양여과액을 함께 처리한 것(D) 등 4개의 실험 구를 설정하여 22°C에서 10일간 더 배양하여 균사체를 성장시켰다.

균사체를 성장시킨 병 배지를 15°C에서 14일간 배양하여, 균사체가 병 배지의 3/4 이상으로 자랐을 때 균 굵기를

시행하고, 상대습도가 90% 이상이고 통기가 잘 되는 15°C 배양기에서 배양하여 자실체 형성에 미치는 영향을 조사하여, *Paenibacillus polymyxa* DY5 균주가 생산하는 항균물질을 생물농약으로 사용할 수 있는지를 알아보았다.

결과 및 고찰

항균물질 생산균주의 분리

선택배지(penicilline G 4 µg/ml, polymyxin B sulfate 5 µg/ml)를 이용하여, 항진균물질을 생산하는 총 11 균주를 분리하였으며, 이 균주를 DY1에서 DY11로 명명하였다. 분리한 11균주 중 DY5 균주가 작물병원균에 대한 성장억제 효과가 가장 높은 것으로 나타났다. DY5 균주를 배양한 후 원심분리하여 얻은 상등액을 느타리버섯 푸른곰팡이병균(*Trichoderma koningii*), 시들음병균(*Fusarium oxysporum*), 탄저병균(*Colletotrichum gloeosporioides*), 균핵병균(*Sclerotinia sclerotiorum*), 잎집무늬마름병균[*Rhizoctonia solani* AG-1(IA)]이 접종된 PDA 평판배지에 50 µl씩 떨어뜨린 후 디스크확산 법으로 27°C에서 48시간 배양 후, 성장억제대(투명환)를 조사한 결과, DY5 균주는 5종의 진균 생장에 강한 억제력을 나타냈다(Fig. 1).

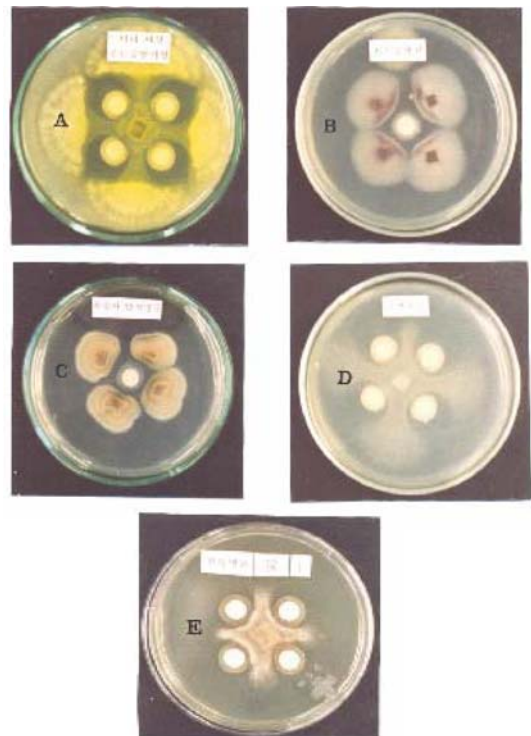


Fig. 1. Antagonistic effects of the isolated DY5 against five crop pathogenic fungi. Antagonistic effects are shown by the inhibition zones formed around disk papers on the PDA cultures.

A, *Trichoderma koningii*; B, *Fusarium oxysporum*; C, *Colletotrichum gloeosporioides*; D, *Sclerotinia sclerotiorum*; E, *Rhizoctonia solani* AG-1(IA).

Table 2. Morphological and biochemical characteristics of the bacterial isolate DY5

Test items	Results	Test items	Results
Cell diameter > 1.0 μm	-	Egg-yolk lecithinase	-
Gram stain	+	Formation of indole	-
Catalase	+	Hemolysis of blood agar plate	-
Anaerobic growth	-	Sporangium swollen	+
Oxidase	-	Parasporal crystal	-
Dihydrolase of grainine	-	Motility	-
β -Galactosidase	+	Ortho-nitro-phenyl-b-D-galactopyranoside	+
Arginine dihydrolase	-	Lysine decarboxylase	-
Ornithin decarboxylase	-	Citrate utilization	-
H ₂ S production	-	Urase	-
Tryptophane deaminase	-	Indol production	+
Voges-Proskauer	+	Gelatinase	+

분리균주의 동정

형태 및 생화학적 특성 분석에서 DY5 균주의 크기는 1 μm 이상이었으며, catalase 및 β -galactosidase 효소활성도 검사에서 양성반응을 나타냈다 (Table 2). 그람염색반응을 통하여 그람양성균으로 확인되었으며 (Fig. 2A), 혐기성조건 성장여부, egg-yolk lecithinase 활성도, hemolysis 여부, 운동성, oxidase 활성도 반응 등에서 모두 음성으로 나타났다 (Table 2), 위상차현미경 및 SEM으로 검정한 결과 타원형의 내성포자(endospore)를 형성하는 간균임을 확인하였다 (Fig. 2B, 2C).

또한, 항균물질 생산균주를 동정하기 위하여 당으로부터 산생성능을 알아보는 API 50 CHB test를 시행하였다. API 50 CHB test를 시행하여 49 종류의 당으로부터 산생성능을 조사한 결과 L-arabinose 등 24 종의 당에는 양성반응을 나타냈으나, erythritol 등 25 종의 당에는 음성반응을 나타냈다 (Table 3). API 50 CHB test 결과를 이용하여 균주를 동정한 결과 DY5 균주는 *Bacillus circulans* 에 89.6%, *Paenibacillus polymyxa* 에 98.8%의 유사도를 나타냈다. 장내세균 인지를 알아보기 위하여 API 20E test를 한 결과 ONPG(Ortho-nitro-phenyl-b-D-galactopyranoside) test, IND(Indol production) test, VP(Voges - Proskauer) 시험, GEL(Gelatinase) 반응에서는 양성반응을 나타냈으며, ADH(Arginine dihydrolase) test, LDC(Lysine decarboxylase) test, ODC(Ornithin decarboxylase) test, CIT(Citrate utilization) test, H₂S 생성반응, URE(Urase) test, TDA(Tryptophane deaminase) 반응에는 음성반응을 나타내어 (Table 2) DY5 균주는 장내세균이 아닌 것으로 판별되었다.

지방산 분석

세포내 지방산 분석에서 DY5 균주 내에는 주로 iso-branched fatty acid와 ante iso-branched fatty acid로 구성되어 있으며, 그 중 C_{15:0} ante iso-fatty acid가 65.09%로 가장 높은 함유량을 보이며, C_{15:0} iso-fatty acid를 6.85%, C_{16:0} iso-

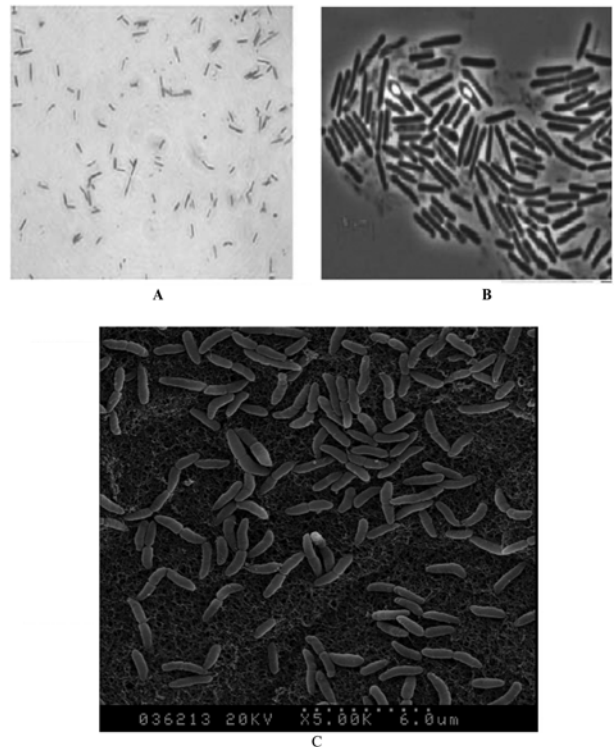


Fig. 2. Microphotographs of the bacterial isolate DY5. A, Gram stain($\times 1,000$); B, phase-contrast($\times 2,000$); C, scanning electron microscope($\times 5,000$).

fatty acid를 6.76% 함유하고 있음을 확인하였다 (Table 4). 균주 내 지방산 조성 분석결과 분리균주 DY5는 다른 Gram 양성 균들의 특징인 iso-type과 ante iso-type 지방산이 주요 구성성분이었으며, ante iso-type이 iso-type에 비해 큰 비중을 차지하고 있음을 확인하였다. 이들 지방산 조성을 MIDI library에서 동정한 결과 DY5 균주는 *Paenibacillus* 속 (genus)에 속하는 균주로 확인되었다. 이 결과는 Yoon 등 (2003)이 *P. kribbensis* 와 *P. terrae* 균주의 세포내 지방산 분석에서 anteiso C_{15:0}이 주요 지방산으로 구성되어 있다는

Table 3. Acid production of the isolate DY5 from carbohydrates (API 50 CHB)

Carbohydrate source	Utilization	Carbohydrate source	Utilization
Glycerol	-	Salicin	+
Erythritol	-	Celibiose	+
D-arabinose	-	Maltose	+
L-arabinose	+	Lactose	+
Ribose	+	Melibiose	+
D-xylose	+	Sucrose	+
L-xylose	-	Trehalose	+
Adonitol	-	Inulin	+
β -Methyl-D-Xylose	-	Melezitose	-
Galactose	+	Raffinose	+
Glucose	+	Starch	+
Fructose	+	Glycogen	+
Mannose	+	Xylitol	-
Sorbose	-	Gentiobiose	+
Rhamnose	-	D-turRanose	+
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	-
Amygdalin	+	2-Keto-Gluconate	-
Arbutin	+	5-Keto-Gluconate	-
Esculin	+		

보고와 일치하고 있다.

16S rRNA 분석을 통한 계통분석

PCR 로 얻은 1,445 bp의 16S rRNA 유전자염기서열 (Fig. 3)은 NCBI BLAST 검색 결과 *Paenibacillus polymyxa* 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열(accession number AY 359632)과 98% 이상의 유사성을 나타내었다. 계통분석 결과 DY5 균주는 *P. polymyxa*, *P. jamilae*, *P. peoriae*, *P. kribbensis*와 유연관계가 매우 높은 것으로 나타났다. 이상의 형태 및 생리생화학 시험에 기반 한 분류키 검색(Reva et al., 2001) 등, 계통분류학적 결과를 종합하여 DY5 균주는 기존의 *Paenibacillus polymyxa* DSM36 균주와 98% 이상의 유사성을 나타내는 새로운 균주로 판명되었다.

*Paenibacillus*는 새로운 속으로 1993년 Ash 등의 연구에서 제안된 이후 많은 연구가 이루어지지 않은 균주로, 발효된 쏘 세지(Piuri et al., 1998), 폐수(Aguilera, 2001), 부엽토(Elo et al., 2001), 토양(Yoon et al., 2003), 멀치 짓갈(Mah et al., 2003),

Table 4. Cellular fatty acid composition of the isolate DY5

Fatty acid	Composition (%)
Straight-chain saturated	
C _{14:0}	2.29
C _{16:0}	6.76
C _{15:0}	0.00
Mono-unsaturated	
C _{16:1} ω 7c alcohol	0.45
C _{16:1} ω 11c	1.44
Branched saturated	
iso-C _{14:0}	2.14
iso-C _{15:0}	6.85
iso-C _{16:0}	6.20
iso-C _{17:0}	2.65
iso-C _{17:1} ω 10c	0.32
anteiso-C _{15:0}	65.09
anteiso-C _{17:0}	5.81

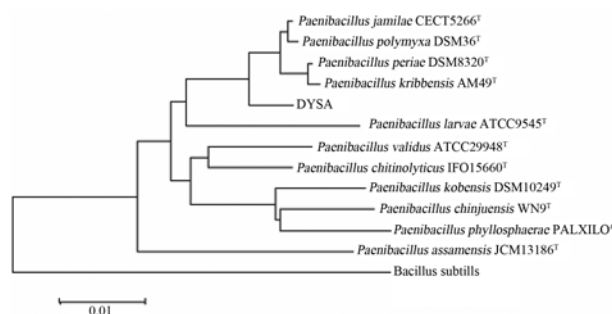


Fig. 3. Phylogenetic dendrogram constructed from a comparative analysis of 16S rRNA gene sequences showing the relationships between the isolate DY5 and related species of the genus *Paenibacillus*.

강어귀 습지(Bae et al., 2009) 등에서 분리되었다. 이 균주가 다양한 생태적 환경에서 분리된 것으로 보아, 이 세균의 생태적 환경에 대한 조사가 더 이루어져야 될 것이다.

발효소세지에서 분리된 *Paenibacillus polymyxa*는 항균 활성을 보였으며(Piuri et al., 1998), *Paenibacillus polymyxa* SCE2는 인체병원균에 억제력을 보였고(Seldin et al., 1999), 식품에서 분리된 *Paenibacillus*는 식중독균에 항균력을 보여 주었다(Girardin et al., 2002). *Paenibacillus peoriae* strain NRRL BD-62는 식물병원균들에 광범위한 항균력을 보여 주었으며(Weid et al., 2003), 식물의 근권에서 분리된 *Paenibacillus brasiliensis* Sa3는 식물병원균 *Cryptococcus neoformans*에 저항성을 가진 항균물질을 생산하였다(Fortes et al., 2008). 새로운 종류의 항생물질과 polymyxin을 동시에 생산하는 *Paenibacillus polymyxa* strain이 분리 동정되었으며(He et al., 2007), 두 가지 종류의 peptide 항생제를 동시에 생산하는 *Paenibacillus alvei* NP75가 보고되었다

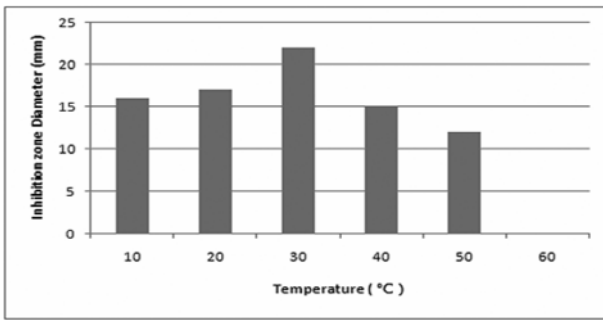


Fig. 4. Effect of temperature on the stability of antifungal substance of the isolate DY 5. The antifungal activity against *Trichoderma koningii* was measured after incubation of the antifungal substance for 30 min at different temperatures.

(Anandaraj *et al.*, 2009).

항균물질의 특성

Paenibacillus polymyxa DY5 균주에서 생산되는 항균물질의 온도에 대한 안정성을 조사한 결과 30°C에서 30분 반응시켰을 때, 최대 활성인 22 mm의 억제 환을 나타냈으며, 40°C와 50°C에서도 활성이 있는 것으로 나타났다. 하지만 60°C에서는 전혀 활성이 나타나지 않아(Fig. 4), 이 물질은 열에 불안정한 저온 및 중온 성 물질로 판단된다.

pH에 대한 안정성을 조사한 결과 pH 3, 4, 5에서는 항진균활성이 전혀 나타나지 않았으나, pH 6, 7, 8, 9에서는 30분 동안 반응 시 pH 9에서 23 mm의 최대 억제 환을 나타낸 것으로 보아(Fig. 5) 이 물질은 호 알칼리성(Alkalophilic) 물질로 판단된다.

단백질 분해효소에 대한 영향을 조사한 결과 *Paenibacillus polymyxa* DY5가 생산하는 항균물질은 proteinase K의 용해농도가 25 µg/ml, 50 µg/ml, 75 µg/ml, 100 µg/ml로 높아질수록 활성이 낮아지는 것으로 나타났다(Fig. 6). 이 실험결과로 *Paenibacillus polymyxa* DY5 균주가 생산하는 항진균물질은 단백질성 물질로 판단된다.

항균물질의 적용시험

항균물질이 실제로 느타리버섯 푸른곰팡이병원균인 *Trichoderma koningii*에 대해 방제효과가 있는지를 알아보기 위하여 적용실험을 시행한 결과, Fig. 7에서와 같이 *Trichoderma koningii*를 접종 한 배지(Fig. 7B)를 제외하고, 아무것도 처리하지 않은 배지(Fig. 7A), 배양여과액을 첨가한 배지(Fig. 7C), *Trichoderma koningii*와 배양여과액을 같이 첨가한 배지(Fig. 7D)에서는 느타리버섯 자실체가 형성되었다. 이는 *Paenibacillus polymyxa* DY5 균주가 생산한 항균물질이 *Trichoderma koningii*의 성장을 억제했기 때문인 것으로 생각되며, *Paenibacillus polymyxa* DY5 균주가 생산하는 항균물질은 생물농약으로 사용될 수 있을 것으로 판단된다.

항균활성을 갖는 *Paenibacillus polymyxa*는 국내에서는 거

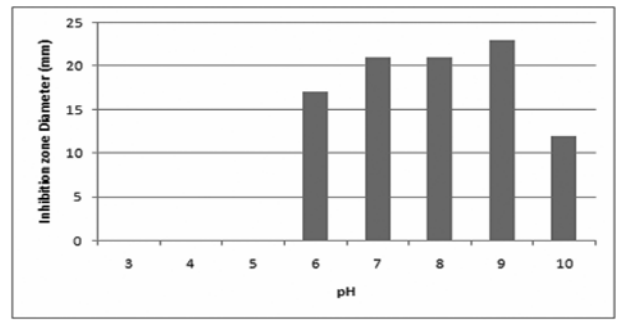


Fig. 5. Effect of pH on the stability of antifungal substance of the isolate DY 5. The antifungal activity against *Trichoderma koningii* was measured after incubation of the antifungal substance for 30 min at different pH.

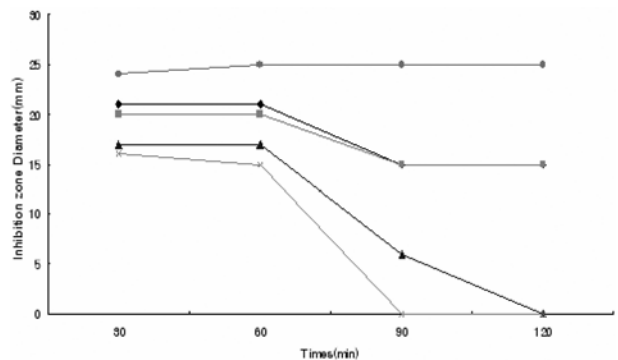


Fig. 6. Inhibition of the antifungal substance by proteinase K produced from the isolate DY5. Reaction was carried out at 27°C for 48hrs. ◆ : 25 mg/ml, ■ : 50 mg/ml, ▲ : 75 mg/ml, × : 100 mg/ml, ● : none.

의 분리되지 않았다. 본 연구에서 분리·동정된 *Paenibacillus polymyxa* DY5가 생산하는 항균물질은 작물병원균에 강한 활성을 나타냈으며(Fig. 1), 생물농약 적용실험 결과, 느타리버섯 푸른곰팡이병을 유발하는 *Trichoderma koningii*에 대해 강한 성장억제력을 나타내어 앞으로 생물농약으로 개발될 잠재력을 가진 것으로 판단된다.

적요

대암산 용늪 토양에서 작물병원성 진균에 대하여 항균활성을 갖는 새로운 균주 DY5를 분리하고, 동정하였다. DY5 균주는 푸른곰팡이병원, 시들음병원, 탄저병원, 균핵병원, 잎집무늬마름병균에 강한 성장 억제효과를 나타냈으며, 위상차현미경과 SEM으로 관찰한 결과, 타원형의 내성포자(endospore)를 형성하는 그람양성 간균임을 확인하였다. API 50 CHB test의 산생성능, 형태적 및 생화학적 실험결과를 분석하여 균주를 동정한 결과, DY5 균주는 *Bacillus circulans*와 *Paenibacillus polymyxa*에 가장 가까운 근연성을 나타내었다. 세포내 지방산 조성 분석을 통하여 동정한 결과, DY5 균주는 *Paenibacillus* 속에 속하는 균주로 확인되었다. DY5의 16S

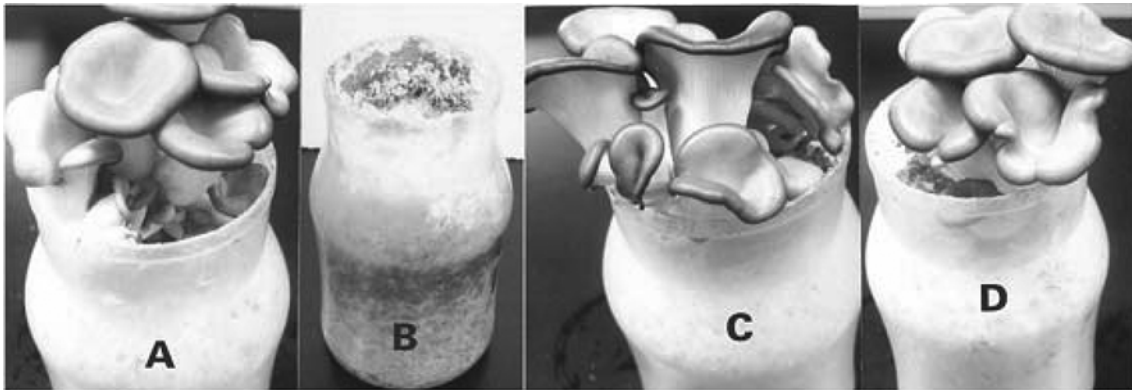


Fig. 7. *In vivo* antifungal activity of *Paenibacillus polymyxa* DY5 on the production of fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus*. A, non-treated(control); B, *Trichoderma koningii* inoculated; C, *Paenibacillus polymyxa* DY5 filtrate treated; D, *Trichoderma koningii* inoculated, and *Paenibacillus polymyxa* DY5 filtrate treated.

rRNA 염기서열은 *Paenibacillus polymyxa* 균주와 98% 이상의 유사성을 나타내었다. 본 연구에서 분리 동정된 이 *Paenibacillus polymyxa* DY5가 생산하는 항균물질은 중온성이며, 호알칼리성이고, 단백질성 물질로 판단되며, 작물 병원균에 강한 활성을 나타내 앞으로 생물농약으로 개발될 잠재력을 가진 균으로 판단된다.

참고문헌

김미라, 김다아, 최수연, 백승경, 김진수, 김대용, 황인천, 유용만. 2007. 국내에서 생산된 *Bacillus thuringiensis* 살충제의 특성. *농약과학회지*. 11(3):210-215.

남성희, 정이연, 홍인표, 지상덕, 박해철, 이진근, 이명렬, 장승중. 2004. 동충하초 자원의 효율적 이용에 관한 고찰. *한국잡사학회 한국잡사학회지*. 46(1):18-22.

서미자, 백채훈, 강미형, 이진휘, 이두구, 이규성, 윤영남, 유용만. 2009. 토양에서 분리한 곤충병원성세균 *Bacillus thuringiensis*의 흑명나방과 벼애나방에 대한 실내살충효과검정 및 생물학적 특성에 미치는 영향. *한국응용곤충학회지*. 48(1):101-108.

신현동. 1994. 우리나라에서 흰가루병균을 침해하는 중북기생균의 분리 및 동정. *한국균학회지*. 22:355-365.

이상계, 최기현, 이영수, 오경석, 오정훈, 최성원. 2006. 국내에서 신발한 *Bacillus thuringiensis* sp. *Aizawai* 균주의 주요 나방류 해충에 대한 살충활성 및 배양 특성. *농약과학회지*. 10(2):131-137.

이왕유, 김주희, 최인영. 2008. 식물 병의 생물방제의 장점과 단점 및 종합적 방 제. *전북대학교 농업과학기술연구소 농업생명과학연구*. 39(2):66-76.

Aguilera, M., M. Monteoliva-Sanchez, A. Suarez, V. Guerra, C. Lizama, A. Bannaser and A. Ramos Cormenzana. 2001. *Paenibacillus jamilae* sp. nov., an exopolysaccharide-producing bacterium able to grow in olive-mill waste water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:1687-1692.

Anandaraj, B., A. Vellaichamy, M. Kachman, A. Selvamankandan, S. Pegu and V. Murugan. 2009. Co-production of two new peptide antibiotics by a bacterial isolate *Paenibacillus alvei* NP75. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379(2):179-185.

Ash, C., F. G. Priest and M. D. Collins. 1993. Molecular identification of rRNA group 3 *Bacilli* using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Antonie van*

Leeuwenhoek. 64:253-260.

Bae, J. Y., K. Y. Kim, J. H. Kim, K. Lee, J. C. Cho and C. J. Cha. 2009. *Paenibacillus aestuarii* sp. nov., isolated from an estuarine wetland. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2009. Aug. 4. [Epub ahead of print].

Bai, G. and G. Shaner. 2004. Management and resistance in wheat and barley to fusarium head blight. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42:135-161.

Baker, G. C., J. J. Smith and D. A. Cowan. 2003. Review and reanalysis of domain-specific 16S primers. *J. Microbiol. Methods*. 55:541-545.

Bale, J. S., J. C. van Lenteren and F. Bigler. 2008. Biological control and sustainable food production. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 363(1492), 761-776.

Bravo, A. and M. Soberón. 2008. How to cope with insect resistance to Bt toxins? *Trends Biotechnol.* 26(10):573-579.

Bretveld, R. W., C. M. Thomas, P. T. Scheepers, G. A. Zielhuis and N. Roeleveld. 2006. Pesticide exposure: the hormonal function of the female reproductive system disrupted? *Reprod Biol. Endocrinol.* 4, 30.

Casida, J. E. 2009. Pest toxicology: the primary mechanisms of pesticide action. *Chem. Res. Toxicol.* 22(4):609-619.

Cheng, X. W. and D. E. Lynn. 2009. Baculovirus interactions *in vitro* and *in vivo*. *Adv. Appl. Microbiol.* 68:217-239.

David, R. B. and R. N. Castenhol. 2001. *Bergey's manual systematic bacteriology*. Springer, press 2nd ed. New York, 721.

Elo, S., I. Suominen, P. Kampfer, J. Juhanoja, M. Salkinoja-Salonen and K. Haahtela. 2001. *Paenibacillus borealis* sp. nov., a nitrogen fixing species isolated from spruce forest humus in Finland. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:535-545.

EPPO, 2009. http://archives.eppo.org/EPPOStandards/biocontrol_web/bio_list.htm#text.

Fernandes, E. K. and V. R. Bittencourt. 2008. Entomopathogenic fungi against South American tick species. *Exp. Appl. Acarol.* 46(1-4):71-93.

Fortes, T. O., D. S. Alviano, G. Tupinambá, T. S. Padrón, A. R. Antonioli, C. S. Alviano and L. Seldin. 2008. Production of an antimicrobial substance against *Cryptococcus neoformans* by *Paenibacillus brasiliensis* Sa3 isolated from the rhizosphere of *Kalanchoe brasiliensis*. *Microbiol. Res.* 163(2):200-207.

Fravel, D. R. 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43:337-359.

- Gilardoni, G., M. Clericuzio, S. Tosi, G. Zanoni and G. Vidari. 2007. Antifungal acylcyclopentenenediones from fruiting bodies of *Hygrophorus chrysodon*. *J. Nat. Prod.* 70(1):137-139.
- Girardin, H., C. Albagnac, C. Dargaignaratz, C. Nguyen-The and F. Carlin. 2002. Antimicrobial activity of foodborne *Paenibacillus* and *Bacillus* spp. against *Clostridium botulinum*. *J. Food Prot.* 65(5):806-813.
- Gordon, R. E., W. C. Haynes and C. H. Pany. 1973. *The Genus Bacillus. Agriculture Handbook No. 427.* Agriculture Research Service, U. S. Department of Agriculture, Washington D. C.
- He, Z., D. Kisla, L. Zhang, C. Yuan, K. B. Green-Church and A. E. Yousef. 2007. Isolation and identification of a *Paenibacillus polymyxa* strain that coproduces a novel lantibiotic and polymyxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(1):168-178.
- Hiroshi, H. 1995. Trend of characteristics of recently developed insecticides and problems on their use. *Agri. Tech.* 50(10):433-450.
- Hiroshi, H. 1996. Characteristics of newly developed insecticides and problems on their use. *Plant protection* 50(11):446-450.
- Holder, D. J. and N. O. Keyhani. 2005. Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*(*Cordyceps*) to substrata. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(9):5260-5266.
- Jegathambigai, V., M. D. Karunaratne, A. Svinningen and G. Mikunthan. 2008. Biocontrol of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* damaging queen palm, *Livistona rotundifolia* using *Trichoderma* species. *Commun Agric. Appl. Biol. Sci.* 73(4):681-687.
- Kumar, S., K. Tamura and M. Nei. 2004. MEGA3; Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics.* 5:150-163.
- Lacey, L. A. and D. L. Shapiro-Ilan. 2008. Microbial control of insect pests in temperate orchard systems: potential for incorporation into IPM. *Annu. Rev. Entomol.* 53:121-144.
- Mah, J. H., Y. H. Chang and H. J. Hwang. 2003. *Paenibacillus tyraminigenes* sp. nov. isolated from Myeolchi-jeotgal, a traditional Korean salted and fermented anchovy. *Int. J. Food Microbiol.* 127(3):209-214.
- Montesinos, E. 2003. Development registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. *Int. Microbiol.* 6(4):245-252.
- Piuri, M., C. Sanchez-Rivas and S. M. Ruzal. 1998. A novel antimicrobial activity of a *Paenibacillus polymyxa* strain isolated from regional fermented sausages. *Lett. Appl. Microbiol.* 27(1):9-13.
- Quang, D. N., T. Hashimoto and Y. Asakawa. 2006. In edible mushrooms: a good source of biologically active substances. *Chem. Rec.* 6(2):79-99.
- Reva, O. N., I. B. Sorokova and V. V. Smirnov. 2001. Simplified technique for identification of the aerobic spore-forming bacteria by phenotype. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:1361-1371.
- Rosas-García, N. M. 2009. Biopesticide production from *Bacillus thuringiensis*: an environmentally friendly alternative. *Recent Pat. Biotechnol.* 3(1):28-36.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.
- Seldin, L., F. S. de Azevedo, D. S. Alviano, C. S. Alviano and M. C. de Freire Bastos. 1999. Inhibitory activity of *Paenibacillus polymyxa* SCE2 against human pathogenic micro-organisms. *Lett. Appl. Microbiol.* 28(6):423-427.
- Takayama, C. 2008. History of insecticides and the transition of their production and sales. *Chudoku Kenkyu.* 21(2):123-131.
- Von der Weid, I., D. S. Alviano, A. L. Santos, R. M. Soares, C. S. Alviano and L. Seldin. 2003. Antimicrobial activity of *Paenibacillus peoriae* strain NRRL BD-62 against a broad spectrum of phytopathogenic bacteria and fungi. *J. Appl. Microbiol.* 95(5):1143-1151.
- Vu, V. H., S. I. Hong and K. Kim. 2007. Selection of entomopathogenic fungi for aphid control. *J. Biosci. Bioeng.* 104(6):498-505.
- Wheeler, W. B. 2002. Role of research and regulation in 50 years of pest management in agriculture. Prepared for the 50th anniversary of the Journal of Agricultural and Food Chemistry. *J. Agric. Food. Chem.* 50(15):4151-4155.
- Yoon, J. H., H. M. Oh, B. D. Yoon, K. H. Kang and Y. H. Park. 2003. *Paenibacillus kribbensis* sp. nov. and *Paenibacillus terrae* sp. nov. bioflocculants for efficient harvesting of algal cells. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53:295-301.