

## 멧돼지 대장으로부터 *Bacillus atrophaeus* MPL-01의 분리 및 항진균 활성의 특성

윤성조<sup>1</sup> · 노재영<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>엠티엘, <sup>2</sup>단국대학교 생명과학부

### Isolation of *Bacillus atrophaeus* MPL-01 from A Wild Boar and Characterization of Its Antifungal Activity

Sung-Jo Yun<sup>1</sup> and Jae-Young Rho<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>MPL, Cheonan 331-831, Republic of Korea

<sup>2</sup>School of Bio-science, Dankook University, Cheonan 330-714, Republic of Korea

(Received May 31, 2013 / Accepted June 19, 2013)

A bacterial strain MPL-01 was isolated from the large intestine of a wild boar. The strain was shown to have morphological, physiological and biochemical characteristics, fatty acids composition typical of *Bacillus*. The 16S rRNA gene sequence showed that the isolate formed distinct phyletic line that was most closely related to this of *Bacillus atrophaeus* (99.99%). It was proposed that the strain is classified as *B. atrophaeus* MPL-01. The strain MPL-01 exhibited the strongest antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*, the pathogen of anthracnose of chili peppers. The ethyl acetate extract of culture filtrate possessed not only the antifungal activity but also the bio-surfactant activity. Therefore, the strain MPL-01 could be a useful bacterium in the development of bio-control process against the pathogenic fungi.

**Keywords:** *Bacillus atrophaeus*, 16S rRNA, antifungal activity, biocontrol, wild boar

친환경 농산물 생산 증가에 따라서 농작물에 대한 생물학적 방제 또한 증가하였고, 천연물이나 미생물을 이용한 다양한 연구가 진행되고 있다(Tuleva *et al.*, 2002; Jang and Kim, 2011). 미생물에 의한 생물학적 방제는 환경 친화성, 낮은 독성, 저렴한 비용, 높은 선별성 및 특이성 등 여러 가지 장점을 가지고 있다(Tuleva *et al.*, 2002). 식물 병은 주로 바이러스, 세균, 진균에 의해 발생되며, 이 중 진균에 의한 피해가 가장 심각하고 작물의 생산성에 직접 영향을 주었다. 1960년대 이후 환경오염을 줄이고 식물병원성 진균에 의한 피해를 줄일 수 있는 화학 농약 대체 생물학적 제제를 개발하려는 시도가 이루어져 blasticidin, kasugamycin 등이 실제 방제에 적용되었다. 몇몇의 이차대사물질은 독성 등의 이유로 실용화하지 못하고 있는 실정이다(Larsen *et al.*, 1989; Hotta, 1996). 이러한 문제점 때문에 방선균 이외의 균을 이용한 식물병 방제제 개발이 시도되었다. 특히 *Bacillus* 속은 가장 많이 연구된 근권 세균으로 내생포자를 형성 보존성이 우수하고 제형화가 용이하여 화학 농약을 대체할 수 있는 주요한 미생물이며, 식물 병원균과 영양적 경쟁을 하거나, 항생물질을 생산하여 저항성을 유도한다(Punja and Utkhede, 2003). 이들이 생산하는

항진균 물질들이 다양하게 있으며 iturin (Besson *et al.*, 1990; Maget-Dana and Peypoux, 1994), bacillomycin (Tenoux *et al.*, 1991; Eshita *et al.*, 1995), mycosubtilin (Peypoux *et al.*, 1986; Besson and Michel, 1990), surfactin 등 약 10여 종류가 보고 되고 있다. 주요 생산균으로는 *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. polymixa*, *B. amyloliquefaciens*, *B. thuringiensis* 등이 있다. 이들은 생물계면활성제(biosurfactant)로 양친매성 물질이며 농업, 화장품, 의약품, 세제, 식품, 환경복원 등에 많이 이용되고 있다. 생물계면활성제의 장점은 독성이 없고, 생분해성이 강하여 친환경적이며, 선택성이 높으며 극한적인 조건에서도 효과적으로 작용한다는 것이다. 예를 들면, 생물계면활성제로 알려진 iturin A에 의한 효과적인 *Rhizoctonia solani* 억제 결과는 식물병 방제에 큰 잠재력을 갖고 있다고 할 수 있다(Yu *et al.*, 2002).

본 연구는 식물 병원성 진균에 항균 활성을 나타내는 *Bacillus* 속을 야생멧돼지에서 분리·동정하고 식물병원균에 대한 생물농약으로서의 가능성을 알아보고자 하였다. 먼저 야생멧돼지 장내에서 세균을 순수 분리한 후, 여러 식물 병원성 진균을 대상으로 길항력을 확인하였다. 주사전자현미경(Hitachi S4300 FESEM, Japan)으로 분리균의 형태와 크기를 관찰하였고 16S rRNA 염기서열을 분석하였다. 이와 함께 균체의 지방산분석 및 생리화학 분석을 통하여 균을 동정하였으며, 여러 식물병원 진균 중

\*For correspondence. E-mail: jyrho@dankook.ac.kr; Tel.: +82-41-550-3475; Fax: +82-41-558-3861

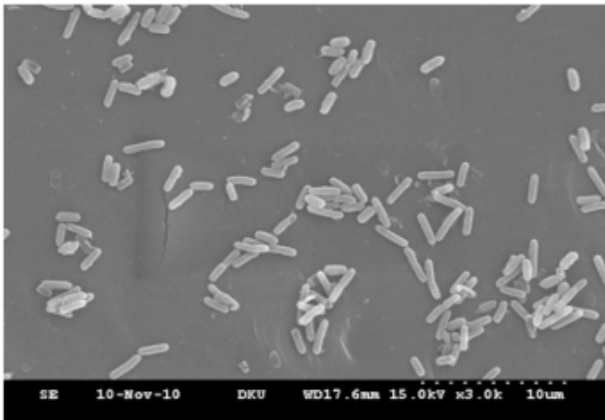
**Table 1.** Fatty acids composition of *B. atrophaeus* MPL-01 by MIDI Sherlock System

Strains	Fatty acids composition (%)				
	15:0 iso	15:0 anteiso	16:0 iso	17:0 iso	17:0 anteiso
<i>B. atrophaeus</i> MPL-01	18.00	45.72	3.76	7.83	14.68
<i>B. atrophaeus</i> KCCM 11495	18.54	45.79	3.20	8.06	16.84

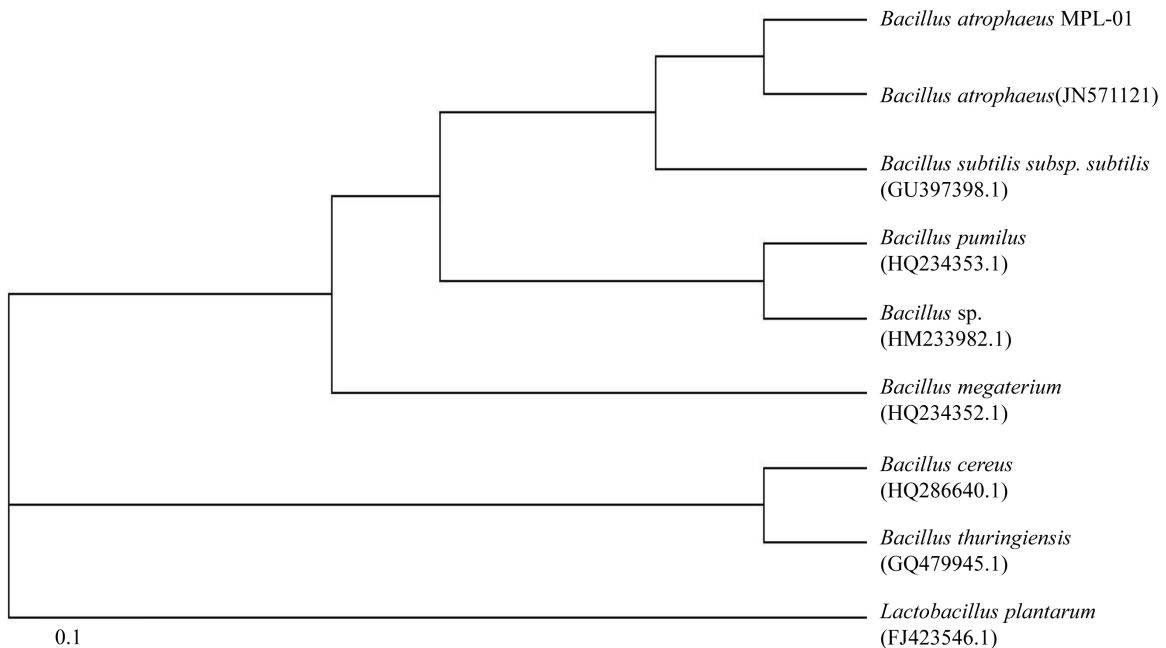
에서 특히 고추 탄저균에 대한 뛰어난 길항력을 확인하였고, 이와 관련된 물질 중의 하나인 생물계면활성제 생산을 확인하였다.

2008년 12월 경남 거창의 야산에서 포획된 수컷의 대장 내부에서 채취된 시료를 생리식염수(0.85%)에 희석한 다음 80°C 항온기에서 10분간 중탕 한 후 희석하여 nutrient agar (NA)에 도말, 30°C에서 24시간 배양 후 자란 단일 집락에서 식물병원성 진균에 대해 길항력을 보이는 균을 분리하였다. 분리균의 형태와

크기를 조사하기 위해 주사전자현미경 관찰 결과, 균은 전형적인 간균이었으며 그 크기는 0.8 μm × 3.2 μm로 확인되었다(Fig. 1). 분리균의 균체 지방산 조성 분석을 위하여 비교균주인 *B. atrophaeus* KCCM 11495와 함께 TSA 배지에서 30°C, 48시간 배양한 대수기의 균체를 회수하여 비누화 과정과 메틸화 시킨 후 추출하여 기체크로마토그래피(Agilent technologies 5890, USA), Microbial Identification System (MIDI; Microbial ID, Inc., USA)을 이용하여 분석하였다. 지방산 분석결과 15:0 iso는 18.0%, 15:0 anteiso는 45.72%, 16:0 iso는 3.76%, 17:0 iso는 7.83% 그리고 17:0 anteiso는 14.68%로 구성되어 표준 균주인 *B. atrophaeus* KCCM 11495와 유사한 양상을 나타내었다 (Table 1). 이와 함께 분리균주를 TSA에 배양 희석 후 API 50CH와 API 20E 검사키트를 이용하여 생화학적 동정을 완료하였다. 그 결과 분리균주 MPL-01은 *B. subtilis*로 분류되었고 (99.9%), 비교 균주인 *B. atrophaeus* KCCM 11495 역시 *B. subtilis*에 속하는 것으로 분류되었다(99%)(Table 2). 이러한 생리, 화학적 분류와 함께 계통분류를 위해 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 수행하였다. 분리균의 genomic DNA 추출은 DNeasy blood and tissue kit (Qiagen, USA)를 사용하여 수행되었다. 16S rRNA 유전자는 universal primer로써 27F (5'-AGAG TTTGATCCTG GCTCAG)와, 1492R (5'-GGTTACCTTGTT ACGACTT-3')를 사용한 PCR을 통하여 증폭하여 1,448 bp 산물



**Fig. 1.** Scanning electron micrograph of *B. atrophaeus* MPL-01.



**Fig. 2.** Phylogenetic tree derived from 16S rRNA gene sequence, indicating the position of *B. atrophaeus* MPL-01.

**Table 2.** Biochemical characterization of *B. atrophaeus*-MPL-01 using API 20E and API 50 CHB kits

Biochemical tests	MPL-01	KCCM 11495	Biochemical tests	MPL-01	KCCM 11495
Control	-	-	Starch	-	-
Glycerol	+	+	Glycogen	-	-
Erythritol	-	-	Xylitol	-	-
D-Arabinose	-	-	Gentiobiose	-	-
L-Arabinose	+	+	D-Turanose	-	-
D-Ribose	+	+	D-Lyxose	-	-
D-Xylose	-	+	D-Tagatose	-	-
L-Xylose	-	-	D-Fucose	-	-
D-Adonitol	-	-	L-Fucose	-	-
Methyl-β-D-Xylopyranoside	-	-	D-Arabitol	-	-
D-Galactose	-	-	L-Arabitol	-	-
D-Glucose	+	+	Gluconate	-	-
Fructose	+	+	2-Keto-gluconate	-	-
D-Mannose	+	+	5-Keto-gluconate	-	-
L-Sorbose	-	-	Beta-galactosidase	+	+
L-Rhamnose	-	-	Arginine dihydrolase	-	-
Dulcitol	-	-	Lysine decarboxylase	-	-
Inositol	+	+	Ornithine decarboxylase	-	-
D-Mannitol	+	+	Citrate	+	+
D-Sorbitol	+	+	Hydrogen sulfide	-	-
Methyl-α-D-mannopyranoside	-	-	Urease	-	-
Methyl-α-D-glucopyranoside	+	+	Tryptophane deaminase	-	-
N-Acetylglucosamine	-	-	Indole	-	-
Amygdalin	+	+	VP	+	+
Arbutin	+	+	Gelatinase	+	+
Esculin	+	+	Nitrate reduction	+	-
Salicin	+	+	Oxidation-Fermentation	+	+
D-Cellobiose	+	+	Catalase	+	+
D-Maltose	+	+	Caseinase	+	+
D-Lactose (bovine origin)	-	-	Amylase	+	+
D-Melibiose	-	-	Lipase	+	+
D-Saccharose (sucrose)	+	+	Range of growth		
D-Trehalose	+	+	Temperature 20-45°C	+	+
Inulin	-	-	pH 5-8	+	+
D-Melezitose	-	-	NaCl >0.1-8% (w/v)	+	+
D-Raffinose	-	-			

을 얻었다. Genotech (Korea)에 의뢰하여 이에 대한 염기서열을 결정하고 GenBank BlastN 결과 분리균주 MPL-01은 *B. atrophaeus* KCCM 11495와 99.99%의 상동성을 보였다. 또한 neighbor-joining method에 의하여 계통수(phylogenetic tree)를 작성한 결과 *B. subtilis*과는 분리된 독립적인 *B. atrophaeus* taxon에 속하는 것으로 나타났다(Fig. 2). 따라서 분리균주 MPL-01를 *B. atrophaeus* MPL-01로 명명하고 한국생명공학연구원에 국제특허 균주기탁하였다(KCTC 12329BP). *B. atrophaeus* MPL-01은 그람 양성, 호기성, 포자형성, 막대모양이고 운동성을 나타내며, 집락은 불투명하고, 부드러운데, 불규칙하다(자료 미제시). 특히 질소원을 함유하는 배지에서 배양 2-5일에 검정색소를 생성하는 *B. atrophaeus* 특유의 특성을 나타내었다(자료 미제시). *B. atrophaeus*는 이전에 검정갈색(brownish black) 색소를 생산하는 *B. subtilis*로써 "*B. subtilis* var. *niger*" 라고 불리기도 했으나 DNA relatedness group을 이용한 재분류에서 *B. subtilis*와는 다른 새로운 종으로 분류되어 명명되었다(Nakamura, 1989). 이후에 수행된 *B. subtilis* 근연 종들에 대한 분류에서도 *B.*

*atrophaeus*는 *B. subtilis*와 공유하는 많은 특성에도 불구하고 분명하게 다른 clade에 속한다고 보고되었다(Chun and Bae, 2000). 본 실험에서도 생리·생화학적 분류방법에 따르면 *B. atrophaeus* MPL-01와 *B. atrophaeus* KCCM 11495 모두 *B. subtilis*로 분류되었으나 16S rRNA 유전자 서열과 특유의 검정 색소 생산을 고려하면 *B. atrophaeus*로 명명하는 것이 적절하다고 생각된다.

이어서 분리균주 MPL-01의 항진균활성을 측정하였다. PDA 한천배지(potato dextrose agar, Difco)에 3일간 배양된 식물 병원균 한천 블록(0.5 cm × 0.5 cm)을 올려 놓은 다음, *B. atrophaeus* MPL-01를 TSB (tryptic soy broth, Merck) 배지에서 30°C 72시간 배양 후 배양액 40 μl를 직경 6 mm의 여과지 위에 점적, 25°C 6일간 배양하여 형성된 생장억제환을 기준으로 항진균 활성을 측정하였다. 고추 탄저병(*Colletotrichum acutatum*)에 대하여 15 mm의 가장 높은 항진균 활성을 보였고, 벼 도열병(*Magnaporthe grisea*), 배추 시들음병(*Fusarium oxysporum*), 밤나무 검은무늬병(*Alternaria alternata*), 딸기 잿빛곰팡이병(*Botrytis cinerea*) 순

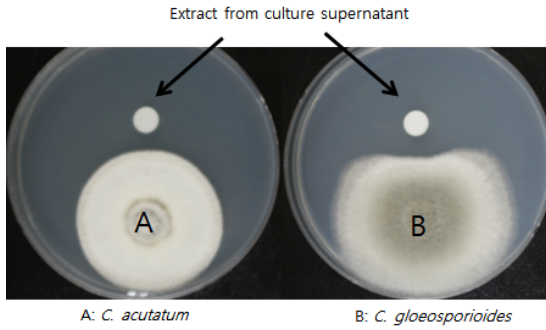


Fig. 3. Antifungal activity of the ethyl acetate extract of culture supernatant against *C. acutatum* and *C. gloeosporioides*.

으로 항진균 활성을 나타내었다(Table 3).

고추탄저병의 주요 원인균은 *C. acutatum*, *C. coccodes*, *C. gloeosporioides*, *C. dematium* 등인데 이들 중에 *C. acutatum*, *C. gloeosporioides*가 풋고추와 홍고추에 직접적으로 피해를 주는 것으로 알려져 있다. 이들을 대상으로 항진균 활성을 측정하고자 배양액으로부터 항생물질을 부분 정제하였다. *B. atrophaeus* MPL-01을 TSB에 1% (v/v)가 되도록 접종하고 30°C에서 3일간 진탕 배양한 뒤, 원심분리(6,000 × g, 20분) 후 상층을 회수하였다. 회수된 상층 배양액을 같은 양의 ethyl acetate와 혼합하여 항진균 물질을 추출한 다음 감압 농축하여 methanol에 녹여서 실험에 사용하였다. Ethyl acetate 추출물에 의해서 *C. acutatum*과 *C. gloeosporioides*의 생장이 억제된 것을 확인하였다(Fig. 3).

한편 *B. subtilis* 균주들은 생물계면활성제를 생산하고 이것에 의한 항진균활성이 보고된 바 있으므로(Besson et al., 1990), 분

Table 3. Antifungal activities against plant pathogenic fungi of *B. atrophaeus* MPL-01

Fungi	Antifungal activities
<i>Colletotrichum acutatum</i>	+++
<i>Magnaporthe grisea</i>	++
<i>Fusarium oxysporum</i>	++
<i>Alternaria alternata</i>	++
<i>Botris cinerea</i>	++

(+++): 10-20 mm, ++: 5-10 mm, +: below 5 mm)

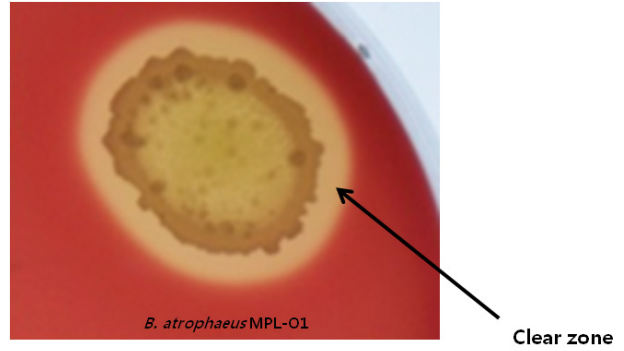


Fig. 4. Hemolytic activity of *B. atrophaeus* MPL-01.

리균주 MPL-01의 생물계면활성제 생산 여부를 확인하였다. 5% (v/v)의 양적혈구가 첨가된 blood agar에 접종 후 30°C, 24시간 배양한 다음 분리균 집락 주변에 투명환이 형성됨을 확인하였다(Fig. 4). 이것은 생물계면활성제에 의한 적혈구 용혈활성(hemolytic activity)으로 이전의 결과들과 일치한다(Zaragoza et al., 2010). 그리고 추출액의 생물계면활성을 확인하기 위하여 oil drop collapse 방법을 변형하여 시행하였다(Bodour and Miller-Maier, 1998; Kermanshahi and Peymanfar, 2012). 96 well microtiter plate에 미네랄오일을 100 µl를 넣은 다음 시료 10 µl를 처리하고 2분 후 해부 현미경에서 증류수 처리한 것과 drop의 크기를 비교하여 생물계면활성제 양상으로 판별하였다. Ethyl acetate 추출 원액은 오일전체에 유화되었으며 1000배 희석한 시료에서도 대조균인 물보다 drop 크기가 커져있어 많이 유화되었음을 보였다(Fig. 5). 이것은 이전에 보고된 유산균 배양액의 계면활성 보다 높은 것으로서 분리균주 MPL-01은 우수한 계면활성제 생산균으로 여겨진다(Kermanshahi and Peymanfar, 2012).

그러므로 본 실험에서 분리된 *B. atrophaeus* MPL-01는 고추탄저병 진균을 비롯한 여러 식물병원균에 대하여 항진균 활성을 나타내며 동시에 생물계면활성제를 생산하므로 친환경적 미생물 농약으로 개발될 가능성이 크다고 할 수 있다. 앞으로 이 균주가 생산하는 항진균 물질을 분리 정제하고, 구조 분석 등의 추가적인 연구를 수행하며, 항진균 물질과 계면활성제가 동일 물질을 밝혀야 할 것이다.

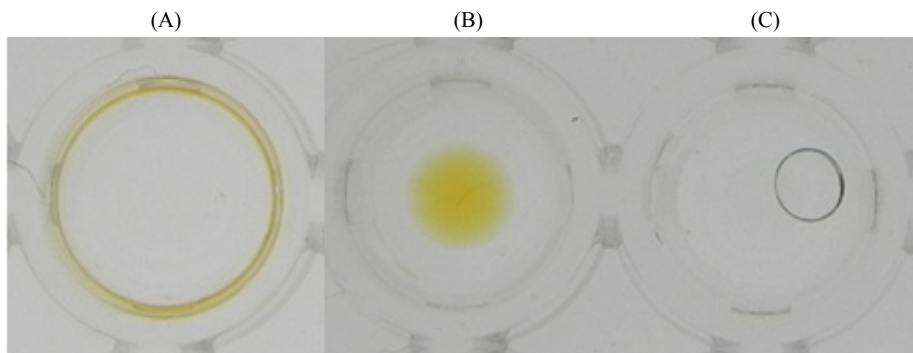


Fig. 5. Oil drop collapse test in the 96 well plate using the ethyl acetate extract. (A) undiluted ethyl acetate extract, (B) 1000X diluted ethyl acetate extract, (C) distilled water drop on the oily surface.

## 적요

멧돼지 대장에서 MPL-01 균주를 분리하여 균주의 형태학적, 생리·생화적 특성 및 지방산 조성을 분석하여 *Bacillus*임을 확인하였다. 16S rRNA 유전자 서열 분석 결과 MPL-01 균주는 *Bacillus atrophaeus*와 거의 일치하므로(99.99%) *B. atrophaeus* MPL-01로 명명하였다. MPL-01 균주는 고추 탄저병을 일으키는 *Colletotrichum acutatum*에 대하여 가장 강한 항진균 활성을 나타내었다. 배양액의 ethyl acetate 추출액에서 항진균 활성은 물론이고 계면활성도 확인하였다. 그러므로 *B. atrophaeus* MPL-01은 농작물 병원성 곰팡이 제어를 위한 bio-control 개발에서 유용하게 사용될 것이다.

## 참고문헌

- Besson, F., Hourdou, M.L., and Michel, G. 1990. Studies on the biosynthesis of iturin, an antibiotic of *Bacillus subtilis*, and a lipopeptide containing beta-hydroxy fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta.* **1036**, 101-106.
- Besson, F. and Michel, G. 1990. Mycosubtilins B and C: minor antibiotics from mycosubtilin producer *Bacillus subtilis*. *Microbios* **62**, 93-99.
- Bodour, A.A. and Miller-Maier, R.M. 1998. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant producing microorganisms. *J. Microbiol. Methods* **32**, 273-280.
- Chun, J. and Bae, K.S. 2000. Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* and related taxa based on partial *gyrA* gene sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* **78**, 123-127.
- Eshita, S.M., Roberto, N.H., Beale, J.M., Mamiya, B.M., and Workman, R.F. 1995. Bacillomycin Lc, a new antibiotic of the iturin group: isolations, structures, and antifungal activities of the congeners. *J. Antibiot.* **48**, 1240-1247.
- Hotta, K. 1996. Mechanism of multiple aminoglycoside resistance of kasugamycin-producing *Streptomyces kasugaensis* MB273 : involvement of two types of acetyltransferases in resistance to astromycin group antibiotics. *J. Antibiot.* (Tokyo) **49**, 682-688.
- Jang, Y.L. and Kim, Y.H. 2011. Biocontrol efficacies of *Bacillus* species against *Cylindrocarpon destructans* causing ginseng root rot. *Plant Pathol. J.* **27**, 333-341.
- Kermanshahi, R.K. and Peymanfar, S. 2012. Isolation and identification of *Lactobacilli* from cheese, yoghurt and silage by 16S rDNA gene and study of bacteriocin and biosurfactant production. *Jundishapur J. Microbiol.* **5**, 528-532.
- Larsen, S.H., Berry, D.M., Paschal, J.W., and Gilliam, J.M. 1989. 5-Hydroxymethyl blasticidin S and blasticidin S from *Streptomyces setonii* culture A 83094. *J. Antibiot.* **42**, 470-471.
- Maget-Dana, R. and Peypoux, F. 1994. Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: biological and physicochemical properties. *Toxicology* **87**, 151-174.
- Nakamura, L.K. 1989. Taxonomic relationship of black-pigmented *Bacillus subtilis* strains and a proposal for *Bacillus atrophaeus* sp. nov.. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**, 295-300.
- Peypoux, F., Pommier, M.T., Marion, D., Ptak, M., Das, B.C., and Michel, G. 1986. Revised structure of mycosubtilin, a peptidolipid antibiotic from *Bacillus subtilis*. *J. Antibiot.* **39**, 636-641.
- Tenoux, I., Besson, F., and Michel, G. 1991. Studies on the antifungal antibiotics: bacillomycin D and bacillomycin D methylester. *Microbios* **67**, 187-193.
- Tuleva, B.K., Ivanov, G.R., and Christovam N.E. 2002. Biosurfactant production by new *Pseudomonas putida* strain. *Z. Naturforsch.* **57**, 356-360.
- Yu, G., Sinclair, J.B., Hartman, G.L., and Bertagnolli, B.L. 2002. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biol. Biochem.* **34**, 955-963.
- Punja, Z.K. and Utkhede, R. 2003. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop disease. *Trends Biotechnol.* **21**, 400-407.
- Zaragoza, A., Aranda, F.J., Espuny, M.J., Teruel, J.A., Marqués, A., Manresa, A., and Ortiz, A. 2010. Hemolytic activity of a bacterial trehalose lipid biosurfactant produced by *Rhodococcus* sp.: evidence for a colloid-osmotic mechanism. *Langmuir* **26**, 8567-8572.