

고추탄저병균 *Colletotrichum gloeosporioides*의 방제를 위한 길항 미생물의 분리 및 항진균 활성

박성민 · 정혁준 · 유대식*

계명대학교 미생물학과

Received February 6, 2006 / Accepted March 21, 2006

Screening of an Antagonistic Bacterium for Control of Red-pepper Anthracnose, *Colletotrichum gloeosporioides*. Park, Sung Min, Hyuck Jun Jung and Tae Shick Yu*. Department of Microbiology, Keimyung University, Daegu 701-704, Korea – *Bacillus* sp. KMU-991 was isolated from Oslo city soils at Norway and shown a strong antifungal activity on red-pepper anthracnose, *Colletotrichum gloeosporioides*. *Bacillus* sp. KMU-991 produced a maximum level of antifungal substrate under aerobic incubation at 30°C, 180 rpm for 48 hours in TSB medium (initial pH 7.0) containing 1.0% mannitol and 1.0% ammonium chloride. Precipitate of culture broth by 30~60% ammonium sulfate precipitation exhibited strong antifungal activity against *C. gloeosporioides* KACC 40804. Butanol extract of cultured broth also shown fungal growth inhibitory activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* KACC 40537, *Rhizoctonia solani* AG-4 KACC 40142, *Botrytis cinerea* KACC 40573, *Colletotrichum orbiculare* KACC 40808, and *Phytophthora cambivora* KACC 40160 by agar diffusion method.

Key words – Anthracnose, *Colletotrichum gloeosporioides*, antifungal activity

서 론

고추탄저병은 고추역병과 더불어 고추의 최대 병해중의 하나로 잎, 줄기, 과실 등에 발생하여 수량감소의 직접적인 원인으로 작용한다. 해마다 발생정도에 차이를 나타내지만 온도가 높고 비가 많은 해에 발생이 심한 것으로 알려져 있다. 예로 강수량의 높았던 2000년에 경북과 전북에서 폭발적으로 발생하여 평균 42%의 발병율을 나타내었으나, 강수량이 적었던 1999년과 2001년에는 발병율이 각각 0.6%와 0.3%로 극히 적었다. 고추탄저병으로 인하여 매년 10% 이상이 수확시기에 감염되어 농가에 큰 피해를 일으키며 국내에서는 자낭균류인 *Colletotrichum*속의 속하는 5종이 분리 동정된 바 있으며, 이 중에서도 *C. gloeosporioides*가 고추탄저병을 유발하는 강력한 병원균으로 보고된 바 있다. 유묘기에 탄저병은 잎과 줄기에 발생한다. 유묘기탄저병 초기에는 수침상의 반점이 커지면서 원형의 갈색 반점을 형성하며 줄기에 발생하면 병환부가 구부러지며 심하게 발생하면 낙엽이 진다. 병반 위에는 작은 소립이 형성되기도 한다. 그리고 탄저병에 의한 피해의 95% 이상을 차지하는 과일탄저병은 과일에만 병을 일으켜 보다 많은 피해를 야기한다. 과일탄저병은 미숙과와 성숙과 모두 발생하며 발생 초기에는 살색의 움푹 들어간 증상으로 시작하여 점차 확대되면서 병무늬 위에 흑색 소립이 형성된다. *C. coccodes*는 유묘기에, *C. gloeosporioides*는 과실에

탄저병을 야기하며 *C. acutatum*, *C. dematium*, *Glomerella cingulata* 등도 알려져 있다. 포자의 크기는 15.4~18.7×3.8~4.2 μm의 원통형이며, 온도가 높고 상대습도가 높을 때에는 과실에 발생된 무늬 위로 홍색의 포자로 된 점질물이 흘러나온다. 병원균의 포자는 끈끈한 점질물에 싸여 있으므로 바람에 의한 비산이 불가능하고 비바람, 폭풍우, 태풍 등 외부의 물리적인 힘에 의하여 전파된다. 안개와 이슬도 병원균의 포자 형성을 촉진하며 병든 과실에서 흘러내린 물방울로도 전파되며, 종자전염의 대표적인 균으로 병든 과실의 종자 내외부에 흡착하여 전염된다. 전염원은 이병잔사에 섞여 토양 속에서 월동하며 지표면에 노출된 분생포자가 지표 가까운 고추 과실에 비산되어 식물체로 전파된다. 병원균의 생육온도는 4~35°C로 최적온도는 28~32°C이며 고온다습 할 때와 강우 시에 발생이 많다. 또한 질소질의 과용이 발병을 촉진시키기도 한다고 알려져 있다[10,17,21].

현재까지 국내에서 진행된 고추탄저병에 대한 연구는 주로 살균제 및 병원성에 대한 고추의 저항성에 관한 것이 대부분이었으며[4,25], 병원균의 생태학적 특성에 관한 연구가 일부 보고되어 있으나[16] 미생물을 이용한 연구는 지속적으로 증가하고 있다[1,4,6,7,20]. 화학농약의 사용에 따른 토양 내의 잔류농약에 의한 토양의 오염 및 생태계의 파괴의 문제가 지속적으로 제기되고 있으며[13,16,18] 이러한 문제점들을 해결하기 위하여 다양한 천연물질을 이용한 항진균제의 개발과 연구[2,22,23]가 진행되어지고 있으며 토양에서 *Bacillus* sp.[3,9,11,12,24], *Pseudomonas* sp.[14,15]와 *Streptomyces* sp.[19] 등과 같은 미생물을 분리하여 항생물질과 미생물제

*Corresponding author

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

E-mail : tsyu@kmu.ac.kr

제의 개발을 위한 연구들이 지속적으로 이루어지고 있다.

이에 본 연구에서는 고추탄저병을 야기하는 *C. gloeosporioides*에 대하여 강한 항진균 활성을 나타내는 균주를 분리하여 길항균주가 생산하는 항진균 물질의 생산조건을 검토하고 고추탄저병을 방제할 수 있는 미생물제제의 개발을 위한 가능성을 조사하였다.

재료 및 방법

길항균주의 분리 및 선발

노르웨이 Oslo시 지역의 토양시료 10 g을 멸균수 90 ml에 넣어 37°C에서 10분간 진탕배양 후, *Bacillus*속의 균주들을 분리하기 위하여 80°C에서 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 도말하여 37°C에서 3일간 배양한 후, 증식한 균주들을 분리하였다. 증식한 균주들을 순수 분리한 후, 고추탄저병균인 *Colletotrichum gloeosporioides* KACC 40804를 방제할 수 있는 균주를 선발하기 위하여 PDA(potato dextrose agar, 2.0% dextrose, 0.4% potato starch, 1.5% agar, pH 5.6±0.2) plate에서 대치배양(pairing culture)을 실시하여 *C. gloeosporioides*의 생육을 저해하는 균주들을 일차적으로 선발하였다. 선발한 균주들을 대상으로 가장 높은 생육저지대를 형성하는 균주를 선발하기 위하여 작물병원성 곰팡이를 직경 6 mm 크기의 culture disc에 접종하여 24°C에서 24시간 배양한 후, 6 cm 떨어진 곳에 선별한 균주를 획선 접종하고 24°C에서 7일간 배양하면서 생육저지대를 조사하였다. 공시균주인 *C. gloeosporioides*는 농촌진흥청 농업생명공학연구원 한국농용 미생물보존센터(Korean Agricultural Culture Collection, KACC)에서 분양 받아 사용하였다.

분리균주의 동정

항진균 활성을 나타내는 선발균의 분류학적 위치를 검토하기 위하여 형태학적, 배양학적, 생화학적 특성을 조사하였으며, 도출된 결과를 Bergey's manual of systematic bacteriology[8]와 비교한 후, 그 결과를 바탕으로 API kit (bioMerieux, France)을 선택하여 동정하였다.

항진균 물질의 생산

항진균 물질의 생산을 위한 기본배지를 선택하기 위하여 LB broth (1.0% tryptone, 0.5% yeast extract, 1.0% sodium chloride), NB (nutrient broth, 0.5% peptone from meal, 0.3% meat extract), PDB (potato dextrose broth, 2.0% dextrose, 0.4% potato starch), TSB (trypticase soybean broth, 1.7% digest of casein, 0.3% soytone, 0.5% sodium chloride, 0.25% dextrose), 그리고 YM broth (yeast malt 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. LB broth에 단일 콜로니를 접종하고 30°C에서 24시간 배양하여 전배양액을 제조하였으며, 각각의 삼각플라스크에 전배양액 100 µl를 접종한 후, 30°C, 180 rpm에서 24시간 배양하였다. 항진균 활성을 조사하기 위하여 각각의 배양액을 10,000 rpm, 10분간 4°C에서 원심분리 하여 균체를 침전시킨 후, agar diffusion method를 이용하여 공시균주를 미리 접종하여둔 PDA plate에 상등액 20 µl를 점적한 paper disc (Ø 6 mm)를 얹고, 24°C에서 7일간 배양하면서 항진균 활성을 조사하였다.

항진균 물질의 생산에 대한 배양온도 및 pH의 영향

배양온도의 변화에 따른 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.

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 기본배지에 각각 1.0%씩 첨가하고 가장 높은 항진균 활성을 나타낸 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, beef extract, bactopectone, bactotryptone, corn steep liquor (CSL), malt extract, polypeptone, urea, 그리고 yeast extract를 각각 1.0%씩 첨가하고 pH를 조정하여 동일한 방법으로 조사하였다.

항진균 물질생산에 미치는 배양시간의 영향

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

조정제한 항진균 물질의 활성

선발된 균주의 항진균 활성을 조사하기 위하여 앞에서 조사되어진 항진균 물질 생산배지 300 ml을 제조하고 선발된 균주를 앞에서 조사한 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 12 시간 정치하면서 항진균 물질을 침전시켜 4°C에서 10,000 rpm, 20분간 원심분리 하여 회수하였다. 회수한 물질을 소량의 100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)로 현탁하고 4°C에서 24 시간 동안 투석하였다. *C. gloeosporioides*의 포자현탁액 (5.52×10^6 spores/ml)을 50 ml의 PDB에 접종하고 동량의 회수한 물질을 각각 첨가하여 항진균 활성을 조사하였으며 대조구에는 동량의 Tris-HCl buffer (pH 8.0)를 첨가하였다.

다양한 작물병원성 곰팡이를 대상으로 하여 선발된 균이 나타내는 항진균 활성을 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°C 이하에서 감압농축 한 후, 항진균 활성을 조사하였다. 조사한 작물 병원성 곰팡이는 토마토 시들음병을 야기하는 *Fusarium oxysporum* KACC 40037, 마른썩음병을 야기하는 *F. oxysporum* KACC 40052, 벼 잎집무늬마름병을 야기하는 *Rhizoctonia solani* AG-1(IA) KACC 40101, 참외 줄기썩음병을 야기하는 *R. solani* AG-4 KACC 40142, 사과나무 역병을 야기하는 *Phytophthora camvibora* KACC 40160, 토마토에 질병을 야기하는 *Fusarium oxysporum* KACC 40537, 장미 잭빛곰팡이병을 야기하는 *Botrytis cinerea* KACC 40573, 참외 탄저병을 야기하는 *Colletotrichum orbiculare* KACC 40808, 수박 덩굴썩음병을 야기하는 *F. oxysporum* KACC 40902, 수박에 질병을 야기하는 *Monosporascus cannonballus* KACC 40940, 잠두 붉은점무늬병을 야기하는 *Botrytis fabae* KACC 40962, 보리에 질병을 야기하는 *Fusarium graminearum* KACC 41040, 그리고 *Botrytis aclada* KACC 41297 등을 사용하였다.

결과 및 고찰

길항균주의 선별 및 동정

토양시료로부터 분리된 균주 중에서 육안관찰, 형태 및 증식양상이 서로 구별되어지는 43 균주를 일차적으로 선별하였다. 고추탄저병을 야기하는 *C. gloeosporioides* KACC 40804에 대한 길항균주를 선별하기 위하여 PDA plate에서 대치배양 하여 24°C에서 배양하면서 생육을 저해하는 것으로 판단되어지는 8 균주를 일차적으로 선별하였다. 선별된 균주 중에서 *C. gloeosporioides*에 대하여 가장 높은 생육저지대를 나타내는 균주를 최종적으로 선별하고 KMU-991이라 명명하였다. KMU-991는 그람양성의 rod form으로 내생포자를 형성하였으며 형성된 집락은 원형으로 점질성의 물질을 생산하는 mucoid type이었고, 표면은 smooth하였으나 광택은 나타내지 않았다. KMU-991은 호기성 세균으로 catalase, gelatin liquefaction, 그리고 nitrate reduction 등에 양성반응을

나타내었으며, Bergey's manual of systematic bacteriology와 비교한 결과 *Bacillus* sp.로 분류되었다(Table 1). API 50 CHB 균 동정 kit을 사용하여 50가지의 당에 대한 생화학적 특성을 조사한 후, API 20E kit의 결과와 함께 API LABplus(V.3.3.3)프로그램으로 확인한 결과, *Bacillus amyloliquefaciens*와 99.8%의 상동성을 나타내었으나 16s rDNA sequence와 같은 보다 정확한 비교 자료가 부족하여 *Bacillus* sp. KMU-991로 명명하였다(Table 2).

기본배지를 선별하기 위하여 LB broth, NB, PDB, TSB, 그리고 YM broth를 대상으로 항진균 활성과 균의 생육을 조사한 결과 TSB를 사용한 경우에 18 mm로 가장 높은 항진균 활성을 나타내었으며 다른 배지의 경우 TSB와 비교하였을 때 83% 이하의 활성을 나타내었다. 균의 증식은 TSB에서 가장 양호한 것으로 조사되었다. NB의 경우에 항진균 활성은 TSB의 67%를 나타내었으나 생육은 88%로 생육과 항진균 활성의 상관관계는 없는 것으로 판단되었다(Table 3).

온도 및 pH에 따른 항진균 물질의 생산

배양온도에 따른 항진균 물질의 생산과 생육을 조사하기 위하여 TSB를 기본배지로 하여 *Bacillus* sp. KMU-991을 24, 30, 37, 그리고 45°C에서 180 rpm, 24시간 배양한 결과, Table 4와 같이 30°C에서 가장 양호한 항진균 활성을 나타내었다. 30°C를 제외한 다른 배양온도에서는 항진균 활성이 다소 미비한 것으로 조사되었으며, 37°C의 경우에는 균의 생육은 30°C와 비슷하였으나 활성은 미비한 것으로 나타났으며 24°C에 비하여도 미비한 항진균 활성을 나타내었다. 이러한 결과를 미루어볼 때 *Bacillus* sp. KMU-991가 생산하는 항진균 물

Table 1. Morphological and physiological characteristics of KMU-991

Characteristics	KMU-991
Morphological:	
Colonies form	White-yellowish, smooth
Endospores produced	+
Gram staining	+
Motility	+
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

Table 2. Biochemical characteristics (carbohydrates utilization) of *Bacillus* sp. KMU-991

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 *Bacillus* sp. KMU-991

Media	Growth (OD660nm)	Inhibition zone (∅ mm)
LB	1.70	15
NB	1.75	12
PDB	0.62	13
TSB	1.99	18
YM	1.43	10

Bacillus sp. KMU-991 was incubated at 30°C, 180 rpm for a day. *C. gloeosporioides* KACC 40804 was incubated at 24°C for 7 days and antifungal effect was assayed by agar diffusion method of 20 ml bacterial culture broth.

Table 4. Effect of growth temperature for producing of anti-fungal substrate

Temperature(°C)	Growth (OD660nm)	Inhibition zone (∅ mm)
24	1.69	14
30	2.30	18
37	2.28	13
45	1.83	8

질은 균의 생육에 따른 영향을 받는 것이 아니라 온도에 대한 영향을 받는 것으로 판단하였으며 이 결과는 특정 온도에서만 항진균 물질을 생산한다고 보고한 박 등의 결과[24]와 유사하였다. 24°C와 45°C에서도 양호한 생육을 하는 것으로 조사되었으나 45°C의 경우 24°C와 비교하여 항진균 활성이 미비한 것으로 미루어 보아 *Bacillus* sp. KMU-991이 생산하는 항진균 물질은 열에 대한 안정성이 약한 것으로 판단되었다.

pH의 변화에 따른 항진균 물질의 생산과 생육에 대한 영향을 조사한 결과, pH 7.0에서 가장 양호한 항진균 활성을 나타내었으며 8.0에서도 비슷한 수준의 항진균 활성을 나타내었다. 하지만, 중성 pH인 7.0과 8.0을 제외한 나머지 pH 범위에서는 항진균 활성이 28%이상 감소하는 것으로 조사되었다. 이러한 결과는 pH 3.0~10.0에서 전반적으로 양호한 항진균 물질을 생산한다고 보고한 정 등의 보고[11]와는 상이하였다. 생육은 pH 5.0~8.0 사이에서 가장 양호하게 조사되었으며, pH 3.0에서는 증식하지 못하는 것으로 조사되었다(Table 5).

항진균 물질의 생산에 미치는 다양한 탄소원의 영향

Bacillus sp. KMU-991이 생산하는 항진균 물질의 생산에 미치는 탄소원의 영향은 Table 6과 같다. 첨가한 10종의 탄

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

pH	Growth (OD660nm)	Inhibition zone (∅ mm)
3	-	-
4	1.20	10
5	2.25	12
6	2.19	14
7	2.30	18
8	2.13	17
9	1.68	14
10	1.45	10

Table 6. Effect of various carbon sources for producing of anti-fungal substrate

Carbon sources	Growth (OD660nm)	Inhibition zone (∅ mm)
Control	1.91	18
Arabinose	2.23	23
Fructose	1.89	21
Glucose	1.92	21
Glycerol	1.97	22
Lactose	2.16	23
Maltose	2.19	19
Mannitol	2.19	24
Soluble starch	2.26	23
Sorbitol	2.27	21
Sucrose	2.20	16

소원 중에서 mannitol을 첨가하였을 때 가장 양호한 항진균 활성을 나타내었으며 전반적으로 첨가된 탄소원에 의하여 항진균 활성이 증가되는 것으로 조사되었다. 그러나 maltose의 경우에는 탄소원을 첨가하지 않은 대조구와 비교할 때 거의 차이를 나타내지 않았으며, sucrose의 경우에 mannitol을 첨가하였을 때와 비교하여 23%, 대조구와 비교하였을 때 11%의 항진균 활성이 저해되는 것으로 조사되었다. 이러한 결과는 탄소원으로 mannitol을 첨가하였을 때 가장 양호한 항진균 활성을 나타내었으나 sucrose를 첨가하였을 때 대조구보다 낮은 항진균 활성을 나타내었다고 보고한 이 등의 보고[14]와는 동일하였다. 생육의 경우에는 arabinose, soluble starch, 그리고 sorbitol을 첨가하였을 때 가장 양호한 증식을 하는 것으로 조사되었으며, 첨가한 탄소원 중에서 항진균 활성이 가장 낮게 조사된 sucrose의 경우에도 증식은 양호한 것으로 조사되었다. Glucose와 glycerol을 첨가한 경우에는 대조구와 비교할 때 균의 생육은 큰 차이를 나타내지 않았으나 항진균 활성은 약간 상승한 것으로 조사되었다. 이러한 결과를 바탕으로 균의 증식과 항진균 물질의 생산은 서로 상관관계에 있지 않다는 것을 확인할 수 있었다.

항진균 물질의 생산에 미치는 질소원 및 배양시간의 영향

항진균 물질의 생산과 생육에 미치는 질소원의 영향을 조사하기 위하여 기본배지에 탄소원으로 1.0% mannitol을 첨가한 후, 각각의 질소원을 1.0%씩 첨가한 결과 Table 7과 같았다. 질소원으로 ammonium chloride를 첨가하였을 때 가장 양호한 항진균 활성을 나타내었으며 polypeptone을 첨가한 경우에도 유사한 정도의 항진균 활성을 나타내었다. 그러나 앞서 조사한 탄소원의 경우와는 다르게 첨가한 유, 무기의 질소원에 의하여 전반적으로 항진균 활성이 감소하는 것으로 조사되었으며, 특히 beef extract를 첨가한 경우에는 ammonium sulfate를 첨가한 경우와 비교할 때 61%의 항진

균 활성을 나타내었고 대조구와 비교할 때에도 67%의 항진균 활성을 나타내었다. 생육의 경우에는 전반적으로 양호한 생육을 하는 것으로 조사되었으며 corn steep liquor를 첨가한 경우에 가장 양호한 생육을 하는 것으로 조사되었다.

배양일수에 따른 항진균 활성과 생육을 조사하기 위하여 본배지인 TSB에 1.0% mannitol과 1.0% ammonium chloride를 첨가한 후, pH를 7.0으로 조정하여 1~3일간 조사한 결과 2일간 배양하였을 때 가장 높은 항진균 활성을 나타내었으나 배양일수에 따른 항진균 활성의 큰 차이는 나타내지 않았으며, 증식은 1일째가 가장 높게 조사되었다(Fig. 1).

항진균 물질의 조정제 및 항진균 spectrum

Bacillus sp. KMU-991이 생산하는 항진균 물질을 조정제하여 액체배양을 통한 *C. gloeosporioides*의 생육에 미치는 영향을 조사하였다. 앞에서 조사된 조건으로 배양액을 제조하여 2일간 *Bacillus* sp. KMU-991을 배양하고 배양액을 0~30%와 30~60%의 ammonium sulfate로 각각 포화시킨 후 투석하여 조정제 물질을 최종적으로 회수하였다. 회수한 물질을 50 ml PDB에 동량 첨가하고 24°C, 150 rpm으로 7일간 배양한 후 건조중량을 측정한 결과 배양액에 30~60% ammonium sulfate 침전물을 처리한 경우에 0.3 g의 건조중량을 확인하였으며 대조구로 동량의 Tris-HCl buffer (pH 8.0)를 처리한 경우와 0~30% ammonium sulfate 침전물을 처리한 경우 0.7 g의 건조중량을 확인하였다. 따라서 30~60%의 ammonium sulfate 침전물을 처리하여 회수하는 경우에 항진균 물질을 회수할 수 있다는 것을 확인할 수 있었으며 이 경우에 *C. gloeosporioides*의 생육은 대조구와 비교할 때 57% 저해를 받는 것으로 조사되었다.

다양한 작물병원성 곰팡이에 대한 *Bacillus* sp. KMU-991의 항진균 활성 spectrum을 조사하기 위하여 butanol을 이용하여 항진균 물질을 회수하여 사용하였다. 위와 같은 조건

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

Nitrogen sources	Growth (OD _{660nm})	Inhibition zone (Ø mm)
Control	2.40	24
Ammonium chloride	2.38	27
Ammonium phosphate	2.28	17
Ammonium sulfate	2.38	20
Beef extract	2.41	16
Corn steep liquor	2.47	20
Malt extract	2.32	23
Bactopeptone	2.36	20
Polypeptone	2.44	26
Bactotryptone	2.37	22
Urea	2.26	23
Yeast extract	2.38	18

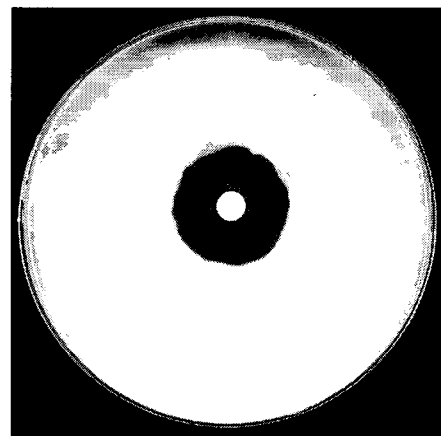


Fig. 1. Fungal growth inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* by *Bacillus* sp. KMU-991 cultured broth (incubated for 2 days).

Table 8. Antifungal effect of butanol extract of *Bacillus* sp. KMU-991 cultured broth

Plant pathogenic fungi	Inhibition zone (\emptyset mm)
<i>Botrytis cinerea</i> KACC 40573	24
<i>Colletotrichum orbiculare</i> KACC 40808	24
<i>Didymella bryoniae</i> KACC 40669	18
<i>Fusarium oxysporum</i> KACC 40037	16
<i>Fusarium oxysporum</i> KACC 40052	15
<i>Fusarium oxysporum</i> KACC 40537	21
<i>Phytophthora cambivora</i> KACC 40160	22
<i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 KACC 40101	15
<i>Rhizoctonia solani</i> AG-4 KACC 40142	22
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> KACC 41065	20

으로 *Bacillus* sp. KMU-991를 배양한 후, 배양액 중에 존재하는 항진균 물질을 butanol을 이용하여 회수한 후 agar diffusion method로 확인한 결과, 다양한 작물병원성 곰팡이에 대하여 높은 항진균 활성을 나타내는 것을 확인하였다. 특히 *F. oxysporum* f. sp. *radicus-lycopersici* KACC 40537, *R. solani* AG-4 KACC 40142, *B. cinerea* KACC 40573, *C. orbiculare* KACC 40808, 그리고 *P. cambivora* KACC 40160에 대하여 양호한 항진균 활성을 나타내었으며, 또한 다른 작물병원성 곰팡이에 대하여도 항진균 활성을 확인 할 수 있었다(Table 8). 이러한 결과들을 바탕으로 하여 작물병원성 곰팡이에 대한 미생물제제로 *Bacillus* sp. KMU-991을 이용할 수 있을 것이라는 가능성을 확인할 수 있었으며 실용적인 고추탄저병의 생물학적 방제제 개발을 위한 포장실험, 제형개발 등의 다양한 조사를 진행할 예정이다.

요 약

노르웨이의 Oslo시 지역의 토양시료로부터 분리된 *Bacillus* sp. KMU-991를 이용하여 고추탄저병균인 *Colletotrichum gloeosporioides* KACC 40804에 대한 항진균 활성을 위한 배양 조건을 조사하였다. 항진균 물질의 생산은 기본배지로 TSB를 사용하였으며 탄소원으로 1.0% mannitol과 질소원으로 1.0% ammonium chloride를 첨가하였을 때 가장 높은 항진균 활성을 나타내었다. 배양조건으로는 30℃, 180 rpm, 48시간 배양하였을 때 가장 높은 항진균 활성을 나타내었다. 30~60% ammonium sulfate 침전물을 첨가하였을 때 가장 양호한 항진균 활성을 나타내었으며 butanol을 이용하여 배양액 중에 존재하는 항진균 물질을 회수하여 다양한 작물병원성 곰팡이에 대한 spectrum을 조사한 결과 *B. cinerea* KACC 40573, *C. orbiculare* KACC 40808, *F. oxysporum* f. sp. *radicus-lycopersici* KACC 40537, *P. cambivora* KACC 40160, 그리고 *R. solani* AG-4 KACC 40142 등에 대하여도 높은 항진균 활성을 나타내었다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부의 지역혁신 인력양성사업의 연구결과로 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Bae, M. 1978. Present status and future of antibiotics for agriculture. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 141-148.
- 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.
- Chang, J. Y., H. H. Lee, I. C. Kim and H. C. Chang. 2001. Characterization of a bacteriocin produced by *Bacillus licheniformis* cy2. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **30**, 410-414.
- Chang, S. H. and B. K. Chung. 1985. Studies on the varietal resistance and effects of nutrients for fungal growth of pepper anthracnose disease caused by *Colletotrichum dematium* f. sp. *capsium*. *Kor. J. Mycol.* **13**, 227-233.
- Cho, 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.
- Cho, S. J., S. K. Lee, B. J. Cha, Y. H. Kim and K. S. Shin. 2003. Detection and characterization of the *Cloeosporium gloeosporioides* growth inhibitory compound irurin A from *Bacillus subtilis* strain KS03. *FEMS Microbiol. Lett.* **223**, 47-51.
- Chung, B. K. and S. B. Lee. 1986. Effects of conidial number and nutrition on the germination of conidia in *Colletotrichum dematium* f. sp. *capsium* causing red pepper anthracnose. *Kor. J. Plant Prot.* **25**, 41-46.
- 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.
- Jeon, Y. H., S. P. Chang, I. Hwang and Y. H. Kim. 2003. Involvement of growth-promoting *Rhizobacterium Paenibacillus polymyxa* in root rot of stored korean ginseng. *J. Microbiol. Biotechnol.* **13**, 881-891.
- Jung, B. K. and S. H. Chang. 1984. An etiological study on the anthracnose fungus of pepper caused by *Colletotrichum dematium* in Korea. *Kor. J. Mycol.* **12**, 153-157.
- 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-peper phytophthora blight disease. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 235-241.
- Kim, J. Y., E. A. Bae, M. J. Han and D. H. Kim. 1999. Inhibitory activity of *Bacillus licheniformis* AJ on the growth of diarrheal pathogens. *J. Appl. Pharm.* **7**, 385-389.
- 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.
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. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 334-340.
 15. 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. of the Environmental Sciences.* **11**, 33-40.
 16. Lee, K. S. 1997. Evaluation on the effects of pesticide residues to agroecosystem in Korea. *Kor. J. Environ. Agric.* **16**, 80-93.
 17. Oh, I. S., M. S. In, I. S. Woo, S. K. Lee and S. H. Yu. 1998. Anthracnose of pepper seedling caused by *Colletotrichum coccodes*(wallr.) hughes. *Kor. J. Mycol.* **16**, 151-156.
 18. 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.
 19. 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.
 20. Paik, S. B. and D. W. Kim. 1995. Screening for phyllospherical antagonistic microorganism for control of red-pepper anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*). *Kor. J. Mycol.* **23**, 190-195.
 21. Park, K. S. and C. H. Kim. 1992. Identification, distribution and etiological characteristics of anthracnose fungi of red pepper in Korea. *Kor. J. Plant Pathol.* **8**, 61-69.
 22. 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.
 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. 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.
 25. Park, W. M., Y. S. Lee, S. H. Kim and Y. H. Ko. 1988. Biochemical investigation of resistance of green pepper fruit to *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. *Kor. J. Plant Pathol.* **4**, 290-296.