

Isolation and Characterization of *Bacillus* Strain as a Potential Biocontrol Agent

Ye-Ram Lee, Sang-Mee Lee, Eun-Young Jang, Chang-Oh Hong, Keun-Ki Kim, Hyeon-Cheal Park, Sang-Mong Lee, Young-Gyun Kim and Hong-Joo Son*

Department of Life Science & Environmental Biochemistry/Life and Industry Convergence Research Institute, Pusan National University, Miryang 627-706, Korea

Received July 22, 2015 / Revised August 20, 2015 / Accepted August 20, 2015

In this study, to retain a stable bacterial inoculant, *Bacillus* strains showing antifungal activity were screened. The improved production, antifungal mechanism, and stability of the antifungal metabolite by a selected strain, AF4, a potent antagonist against phytopathogenic *Botrytis cinerea*, were also investigated. The AF4 strain was isolated from rhizospheric soil of hot pepper and identified as *Bacillus subtilis* by phenotypic characters and 16S rRNA gene analysis. Strain AF4 did not produce antifungal activity in the absence of a nitrogen source and produced antifungal activity at a broad range of temperatures (25-40°C) and pH (7-10). Optimal carbon and nitrogen sources for the production of antifungal activity were glycerol and casein, respectively. Under improved conditions, the maximum antifungal activity was 140±3 AU/ml, which was higher than in the basal medium. Photomicrographs of strain AF4-treated *B. cinerea* showed morphological abnormalities of fungal mycelia, demonstrating the role of the antifungal metabolite. The *B. subtilis* AF4 culture exhibited broad antifungal activity against several phytopathogenic fungi. The antifungal activity was heat-, pH-, solvent-, and protease-stable, indicating its nonproteinous nature. These results suggest that *B. subtilis* AF4 is a potential candidate for the control of phytopathogenic fungi-derived plant diseases.

Key words : Antifungal activity, *Bacillus subtilis*, biological control, PGPR

서 론

1800년대 살충제로 비소화합물과 향진균제로 보르도액이 도입된 이후, 과거 50년 동안 수많은 합성농약이 개발 및 사용됨으로써 농업은 비약적으로 발전하였다. 농업생산성은 각종 질병이나 건조, 염해, 영양분 결핍 등 환경 스트레스에 의하여 저하된다[19]. 농작물의 질병은 화학농약을 사용하거나 육종이나 유전공학적 방법을 통하여 스트레스 저항성 품종을 개발함으로써 통제할 수 있다. 이러한 전략을 “good agricultural practice”라고 하며, 지속가능한 농업 생산성 향상에 크게 기여하고 있다[18].

그러나 최근 화학농약의 오남용에 기인한 토양과 수질 등의 환경오염 때문에 몇몇 국가에서는 그 사용을 규제하고 있다. 화학농약의 무분별한 사용은 생태계에 악영향을 미칠 뿐만 아니라 농약 저항성 식물병원성 미생물과 해충 출현에 의한 효능 감소 등의 부작용을 초래하기도 한다[8]. 우리나라를 포함한 선진각국에서는 화학농약의 사용을 줄이는 친환경농업

정책을 적극 추진하고 있으며, 친환경 농산물에 대한 국민적 수요는 날로 증대되고 있다. 이에 따라 화학농약의 부작용을 최소화시킬 수 있는 환경친화적인 생물학적 방제(biological control), 특히 식물병원성 균주의 생육을 억제하는 미생물에 대한 연구가 많이 진행되고 있다.

지금까지 연구된 생물방제에 이용될 수 있는 미생물의 특성은 *Streptomyces* sp., *Trichoderma* sp., *Bacillus* sp. 등이 생성하는 곰팡이 세포성분 분해효소에 의한 용균작용[3], *Pseudomonas* sp., *Streptomyces griseus* 등이 생산하는 향진균 물질에 의한 항생작용[13, 23], 미생물이 생성하는 Fe³⁺ 결합물질인 siderophore에 의한 경쟁적 길항작용[4] 및 미생물이 식물체에 집락화하여 병원미생물의 감염을 억제하는 전신유도저항성[6] 등으로 구분할 수 있다. 이처럼 식물병원성 곰팡이의 생육을 억제하는 많은 미생물이 분리되었지만, 특히, 식물의 근권(rhizosphere), 내생(endophytic) 또는 부착(epiphytic) 미생물은 식물의 고유한 자생 미생물군을 교란시키지 않는 특성을 가지고 있기 때문에 생물농약으로서 뛰어난 후보가 될 수 있다[18]. 또한 내생포자를 형성하는 *Bacillus* 속 균주는 열악한 환경에서도 안정성을 유지할 수 있기 때문에 생물방제균으로서 큰 장점을 가진다[15, 20]. 따라서 본 연구에서는 다양한 농작물의 근권 토양으로부터 *Bacillus* 속 균주를 분리하여 식물병원성 곰팡이에 대한 향진균 활성 및 식물생육촉진 활성을 조사함으로써 생물학적 방제에 이용될 수 있는 새로운 토착 미생물자원을 확보하고자 하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-55-350-5544, Fax : +82-55-350-5549

E-mail : shjoo@pusan.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

재료 및 방법

실험균주 분리 및 동정

경남 밀양 일원의 경작지 토양, 각종 농작물의 근권 토양 등을 채집한 후, *Bacillus* 속 균주를 분리하기 위하여 80°C, 30분 동안 가열처리하였다. 이렇게 처리된 각 시료 1 g을 멸균된 0.75% NaCl 용액에 첨가하여 10분 동안 진탕한 후, 단계적으로 희석하였다. 각 희석액을 nutrient agar 평판배지에 접종하여 30°C에서 배양함으로써 각 균주를 순수분리하였다. 순수분리된 균주들 중 갯빛곰팡이병균인 *Botrytis cinerea*에 대한 항진균 활성을 보유한 균주를 선정하기 위하여 potato dextrose agar (PDA) 평판배지에 대치배양을 실시한 후, *B. cinerea*의 생육을 저해하는 균주를 실험균주로 선정하였다.

실험균주를 동정하기 위하여 Manual of methods for general bacteriology [10]에 준하여 표현형적 특성을 조사하였다. 또한, 16S rRNA 유전자의 염기서열을 분석함으로써 계통학적 동정을 실시하였다. 16S rRNA 유전자를 증폭하기 위하여 사용된 primer는 *E. coli* 16S rRNA 유전자의 보존 서열을 기초로 하여 합성된 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') primer와 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') primer이었다[14]. 16S rRNA 유전자의 염기서열을 결정 한 후, GenBank에 등록된 다른 유사균주들과 비교하였다. 또한 염기서열을 Clustal X (version 1.81)를 이용하여 정렬한 후, MEGA4 프로그램을 이용하여 각 균주들의 계통분류학적 위치를 결정하였다.

곰팡이 포자 현탁액의 조제 및 항진균 활성 측정법

*B. cinerea*를 PDA 평판배지에 접종하여 28°C에서 6일간 배양하였다. PDA 배지 표면에 1% Tween 80 용액을 적하하여 포자를 회수한 후, 멸균된 거즈를 이용하여 균사체를 제거하여 포자현탁액을 조제하였다. 항진균 활성을 측정하기 위하여 포자의 농도를 1.4×10^5 spore/ml가 되도록 조정하였다.

항진균 활성은 다음과 같이 측정하였다. 배양액을 10,000 g에서 30분간 원심분리한 후, 0.45 µm 세균 여과막을 이용하여 제거하였다. 피검균주의 포자현탁액이 도말된 PDA 평판배지에 cork borer를 이용하여 직경 0.8 cm의 구멍을 뚫은 후, 제거된 배양 상등액 200 µl를 분주하였다. 30°C에서 48시간 동안 배양한 후, 생육저지대의 직경을 측정하였다. 항진균 활성 (arbitrary unit; AU)은 다음 식에 의하여 산출하였다[2].

$$AU/ml = [\text{clear zone diameter (mm)} / \text{sample volume (}\mu\text{l)}] \times 1,000$$

항진균 물질 생산을 위한 조건 검토

본 실험에 사용된 기본배지의 조성은 sucrose 2%, (NH₄)₂SO₄ 0.1%, KH₂PO₄ 0.08%, Na₂HPO₄ 0.1%, MgSO₄ 0.01%, MnCl₂ 0.0004%, CaCl₂ 0.0005%, FeSO₄ 0.0025%, yeast extract 0.1% (pH 7)이었다. 항진균 물질 생산에 영향을 미치는

배지성분을 조사하기 위하여 탄소원(fructose, glucose, glycerol, lactose, maltose, sorbitol, sucrose), 질소원(bactopeptone, beef extract, casein, corn steep liquor, polypeptone, tryptone, yeast extract, (NH₄)₂SO₄, NH₄NO₃, KNO₃), 초기 pH (pH 4-11) 및 배양온도(10°C-45°C)에 따른 항진균 활성을 조사하였다. Nutrient broth에서 30°C, 200 rpm으로 18시간 동안 배양한 전배양액을 2% 접종하였으며, 다른 언급이 없는 한 30°C, 200 rpm에서 48시간 동안 배양한 후, 항진균 활성을 조사하였다.

배양 상등액의 안정성 조사

실험균주를 최적배지에서 배양한 후, 제거된 배양 상등액의 pH를 2-11로 각각 조정하여 4°C에서 24시간 동안 방치하였다. 시료들을 pH 7로 다시 조정한 후, 항진균 활성을 조사하였다. 제거된 배양 상등액을 열처리(40-100°C × 1시간, 121°C × 15분)한 후, 실온으로 냉각시켜 항진균 활성을 조사하였다. 또한 배양 상등액을 각종 유기용매(acetic acid, acetone, acetonitrile, dichloromethane, propanol, methanol, ethanol, chloroform, hexane)와 1:1 (v/v)로 혼합하여 실온에서 24시간 동안 방치 및 100°C에서 60분간 열처리하여 유기용매를 휘발시킨 후, 항진균 활성을 조사하였다. 배양 상등액에 proteinase K 및 pepsin을 0.5 mg/ml의 농도로 처리하여 37°C에서 4시간 동안 반응시킨 후, 항진균 활성을 조사하였다.

항진균 기작 조사

*B. cinerea*에 대한 *B. subtilis* AF4의 항진균 효과는 위상차 현미경과 주사전자현미경을 이용하여 관찰하였다. 즉 PDA 평판배지에 *B. subtilis* AF4와 *B. cinerea*를 대치배양한 후, 균사 생육이 저해된 부분과 저해되지 않은 부분을 현미경으로 관찰하여 균사의 형태 변화를 조사하였다.

식물생육촉진 활성 조사

실험균주의 siderophore 생성능은 Chrome azurol S assay [21], indole-3-acetic acid 생성능은 Tang과 Bonner의 방법 [24], ammonification은 Dey 등[7]의 방법, 식물병원성 곰팡이 세포성분 분해효소(chitinase, cellulase, pectinase, protease, amylase, lipase)의 활성은 Gerhardt 등[10]의 방법에 의하여 정성분석하였다. 또한 다양한 식물병원성 곰팡이(*Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora ultimum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Colletotrichum gloeosporioides*)를 대상으로 PDA 평판배지에 대치배양을 실시한 후, 생육저지대 생성 유무를 조사하였다.

결과 및 고찰

실험균주 분리 및 동정

농경지 토양 및 각 농작물의 근권 토양으로부터 *B. cinerea*의

생육을 저해하는 35 균주를 분리하였다. 그 중 고추의 근권 토양으로부터 분리된 AF4 균주가 *B. cinerea*에 대해 가장 큰 생육 저지대를 나타내어 최종 실험균주로 선정하였다. AF4 균주는 그람 양성세균으로 내생포자를 형성하였으며, 운동성이 있는 간균이었다. Nutrient agar 평판배지에서 노적상(irregular)의 얇은(flat) 콜로니를 형성하였고, 콜로니는 불투명한 흰색이었다. Catalase는 생성하였으나 oxidase는 생성하지 못했다. 또한 glucose로부터 산을 생성할 수 있었고, nitrate를 환원시킬 수 있었으며, indole은 생성하지 못했다. 실험균주를 정확하게 동정하기 위하여 16S rRNA 유전자의 염기서열을 분석하여 NCBI GenBank에 등록된 각 표준균주와 비교한 결과, AF4 균주는 *Bacillus subtilis*와 99%의 상동성을 가지고 있었다. 16S rRNA 유전자의 구조에 근거하여 기존 *Bacillus* 속 균주와의 분자계통학적 유연관계를 파악하기 위하여 계통수(phylogenetic tree)를 작성한 결과, AF4 균주는 *B. subtilis*^T을 포함하는 계통학적 그룹에 포함됨을 알 수 있었다(Fig. 1).

항진균 물질 생산 최적조건

미생물에 의한 항진균 물질의 생산은 배지 속 탄소원과 질소원, 배지의 pH 및 배양온도에 크게 영향을 받는 것으로 알려져 있다[25]. 따라서 항진균 물질의 생산에 관여하는 배양변수를 조사하는 것은 매우 중요하다. 실험균주의 항진균 물질 생산에 대한 탄소원의 영향을 조사하기 위하여 기본배지에 각 탄소원을 2%씩 첨가하여 배양한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다. 실험에 사용된 모든 탄소원에서 항진균 물질의 생성이 이루어졌으며, 특히 glycerol을 첨가한 경우에 가장 높은 항진균 활성(112±2 AU/ml)을 나타내었다. 탄소원을 첨가하지 않은 경우에도 항진균 물질이 생성(80±2 AU/ml)되었는데, 이것은 기본배지 성분 중 질소원의 하나인 yeast extract에 기인하는 것으로 판단된다. 최적 탄소원인 glycerol의 농도를 0.5%에서 4%까지 각각 달리 조정하여 배양한 결과, glycerol의 농도 증가에 따라 항진균 물질의 생산은 증가하였으며, 2.5%에서 가장 높은 항진균 물질 생성이 이루어졌다(124±3

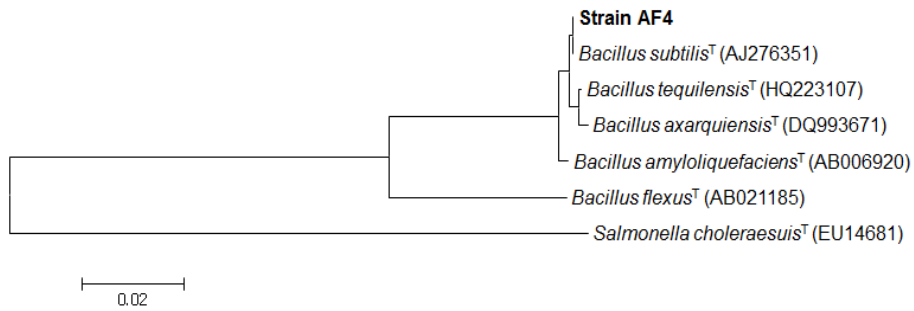


Fig. 1. Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the positions of isolate AF4 and type strains of some *Bacillus* spp.

Table 1. Influence of different carbon and nitrogen sources on antifungal activity of *B. subtilis* AF4

Carbon source (2.0%)	Cell growth (A ₆₆₀)	Antifungal activity (AU/ml)	Nitrogen source (0.2%)	Cell growth (A ₆₆₀)	Antifungal activity (AU/ml)
None	2.140±0.103	80±2	None	0.165±0.084	0±0
Fructose	2.674±0.095	98±5	(NH ₄) ₂ SO ₄ (0.1%) + yeast extract (0.1%)	3.340±0.137	122±2
Glucose	3.229±0.127	103±3	Bactopeptone	3.546±0.143	65±2
Glycerol			Beef extract	1.591±0.205	0±0
0.5%	1.894±0.094	95±3	Casein		
1.0%	2.047±0.144	102±4	0.1%	2.853±0.141	103±4
1.5%	2.376±0.173	105±2	0.2%	2.948±0.118	126±2
2.0%	2.929±0.099	112±2	0.3%	3.343±0.087	131±4
2.5%	3.012±0.083	124±3	0.4%	3.769±0.132	131±3
3.0%	3.071±0.153	124±4	0.5%	4.905±0.115	125±5
4.0%	3.035±0.075	100±2	Corn steep liquor	0.583±0.075	0±0
Lactose	1.117±0.088	95±3	Polypeptone	3.687±0.213	100±5
Maltose	1.985±0.096	95±4	Tryptone	3.091±0.157	102±2
Sorbitol	3.742±0.104	95±2	Yeast extract	5.024±0.117	105±4
Sucrose	3.387±0.085	100±3	(NH ₄) ₂ SO ₄	3.356±0.069	0±0
			NH ₄ NO ₃	4.552±0.082	65±4
			KNO ₃	0.351±0.044	58±5

AU/ml). 항진균 물질 생산에 최적인 탄소원은 세균에 따라 다른 것으로 알려져 있다. 즉, *B. subtilis* RB15-CS [16]와 *Pseudomonas fluorescens* 2-79 [22]는 glucose를 최적 탄소원으로 요구하는 반면, *B. subtilis* MO-1는 sucrose [12]를 요구하는 것으로 보고되어 있다.

실험균주의 항진균 물질 생산에 대한 질소원의 영향을 조사하기 위하여 각 질소원을 0.2%씩 첨가하여 배양한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다. 실험균주에 의한 항진균 물질 생산에는 질소원이 필수적임을 알 수 있었다. Corn steep liquor, (NH₄)₂SO₄를 제외한 모든 유, 무기질소원에서 항진균 물질이 생성되었다. 특히, 기본배지의 질소원인 0.1% (NH₄)₂SO₄ 및 0.1% yeast extract 혼합물(122±2 AU/ml)과 casein(126±2 AU/ml)을 첨가했을 때, 높은 항진균 물질의 생성이 이루어졌다. 따라서 casein의 농도를 0.1%에서 0.5%까지 각각 달리 조정하여 배양한 결과, 0.3%에서 가장 높은 항진균 물질 생성이 이루어졌다(131±4 AU/ml). 탄소원과 마찬가지로 질소원 역시 세균에 따라 항진균 물질 생성에 요구하는 종류가 다르다. 예를 들면, *B. subtilis* MO-01은 NH₄Cl [12]을, *B. subtilis*는 aspartic acid [1]를, *B. subtilis* RB14-CS는 대두분[16]을 최적 질소원으로 요구하는 것으로 보고되어 있다.

실험균주의 항진균 물질 생산에 대한 배양온도의 영향을 조사하기 위하여 15°C에서 45°C까지 각각 조정된 배양기에서 배양한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다. 20-45°C에서 항진균 물질이 생성되었으나 15°C의 경우에는 배양시간을 연장하여도 항진균 물질이 생성되지 않았다. 특히 30°C에서 배양한 경우, 가장 짧은 시간 내에 가장 높은 항진균 물질 생성이 이루어졌다(131±3 AU/ml). 많은 농작물 재배시의 토양 온도는 30°C 내외인 것으로 알려져 있다[17]. 따라서 본 실험균주는 실제 농작물 재배지에서 온도에 따른 영향을 받지 않을 것으로 판단된다.

실험균주의 항진균 물질 생산에 대한 배지 초기 pH의 영향을 조사하기 위하여 pH 4에서 11까지 각각 조정된 배지에서 배양한 결과는 Fig. 2에서 보는 바와 같다. pH 4-6 및 pH 11에서 균체는 생육할 수 없었고, 결과적으로 항진균 물질의 생성

Table 2. Influence of cultivation temperature on antifungal activity of *B. subtilis* AF4

	Culture time (day ^a)	Cell growth (A ₆₆₀)	Antifungal activity (AU/ml)
15°C	8	0.895±	0±0
20°C	6	1.677±	96±2
25°C	6	2.953±	105±4
30°C	2	3.495±	131±3
35°C	2	4.147±	130±5
40°C	2	2.641±	104±4
45°C	6	1.953±	98±6

^aIndicates the culture time of maximum antifungal activity.

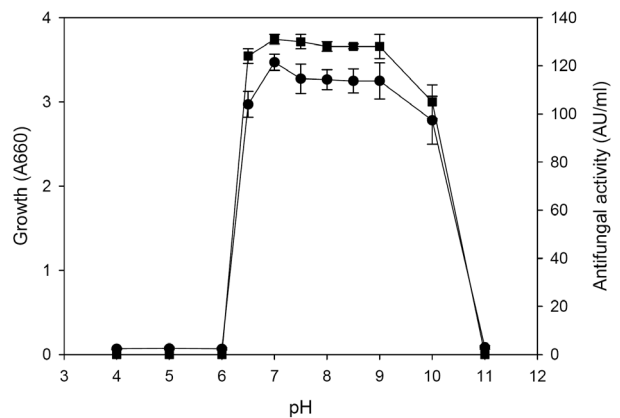


Fig. 2. Influence of initial pH on antifungal activity of *B. subtilis* AF4. ●, cell growth; ■, antifungal activity.

도 이루어지지 않았다. 반면, pH 7-10에서는 균체 생육과 항진균 물질의 생성이 모두 이루어졌으며, 그 중 pH 7에서 항진균 물질이 가장 많이 생성되었다.

상기에서 확립된 최적 조건 및 기본배지에 *B. subtilis* AF4를 접종하여 배양한 결과는 Fig. 3에서 보는 바와 같다. 최적배지에서 실험균주의 균체 생육은 48시간까지 증가하였으며, 그 후 96시간까지 정지기를 유지하였다. 항진균 활성은 60시간에

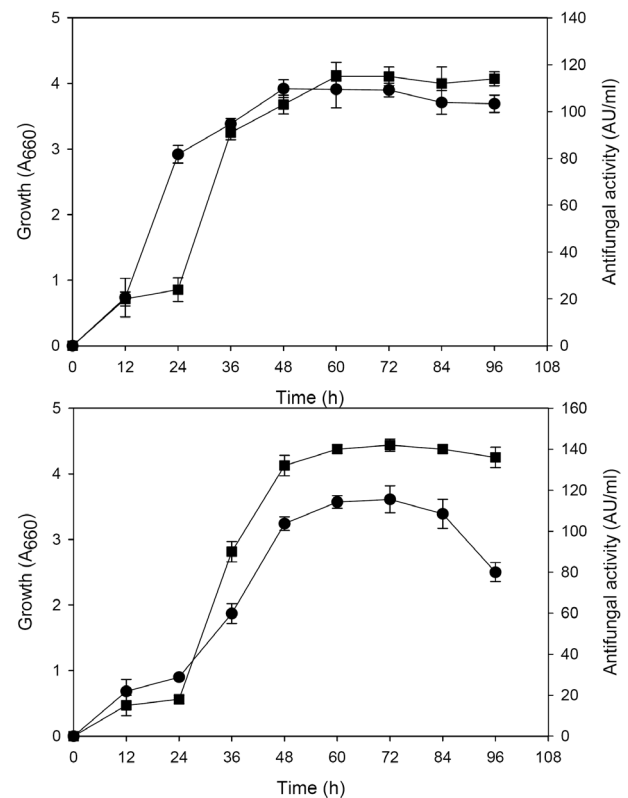


Fig. 3. Time courses of cell growth and antifungal activity by *B. subtilis* AF4 in improved (upper) and basal (lower) media. ●, cell growth; ■, antifungal activity.

가장 높았으며, 그 후 일정하게 유지되었다. 최적조건에서의 항진균 활성은 60시간에 140±3 AU/ml을 나타내어 기본조건 (115±4 AU/ml)보다 활성이 증가했음을 알 수 있었다.

배양 상등액의 안정성

실험균주 배양 상등액의 온도에 대한 안정성을 조사한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같다. 40℃에서 100℃의 범위에서 100% 활성을 나타내었으며, 121℃에서 15분의 열처리에도 불구하고 81%의 높은 활성을 나타내었다. 따라서 본 실험균주가 생성하는 항진균 물질은 열에 안정한 물질로 추정되었다. 실험균주의 배양 상등액은 pH 5, 6에서 100%, pH 8-11에서 90-93%의 활성을 나타내었으나 pH 4 이하의 산성 영역에서 활성은 크게 감소하였다. 또한 배양 상등액은 acetic acid를 제외한 모든 실험 용매에 대해 높은 활성을 나타내었으며, proteinase K 및 pepsin 처리 시에도 활성이 100% 유지됨을 알 수 있었다. 이러한 결과는 본 실험균주가 생성하는 항진균 물질은 bacteriocin이나 세포의 효소가 아니라 세포외로 분비되는 비단백질성 물질임을 시사한다. 향후, 생성된 물질의 구조를 파악해보아야 정확하게 알 수 있겠지만 현 실험결과만으로 판단내리면 iturin 계열의 항진균 물질인 것으로 판단된다 [5].

B. subtilis AF4의 항진균 기작

B. subtilis AF4가 B. cinerea의 군사 형태에 미치는 영향을 현미경으로 관찰한 결과는 Fig. 4에서 보는 바와 같다. B. ciner-

Table 3. Stability of supernatant from B. subtilis AF4 culture against heat, pH, solvent and protease treatments

Parameter	Relative activity (%)	Parameter	Relative activity (%)
pH		Solvent	
pH 2	60±3	Acetone	96±2
pH 3	60±2	Acetonitrile	100±0
pH 4	59±5	Dichloromethane	92±5
pH 5	100±0	Propanol	96±1
pH 6	100±0	Methanol	96±3
pH 7	100±0	Ethanol	100±0
pH 8	93±4	Chloroform	96±2
pH 9	90±6	Hexane	92±5
pH 10	90±3	Acetic acid	50±4
pH 11	90±5	Protease	
Heat		Proteinase K	100±0
40℃, 1h	100±0	Pepsin	100±0
50℃, 1h	100±0		
60℃, 1h	100±0		
70℃, 1h	100±0		
80℃, 1h	100±0		
90℃, 1h	100±0		
100℃, 1h	84±6		
121℃, 15min	81±4		

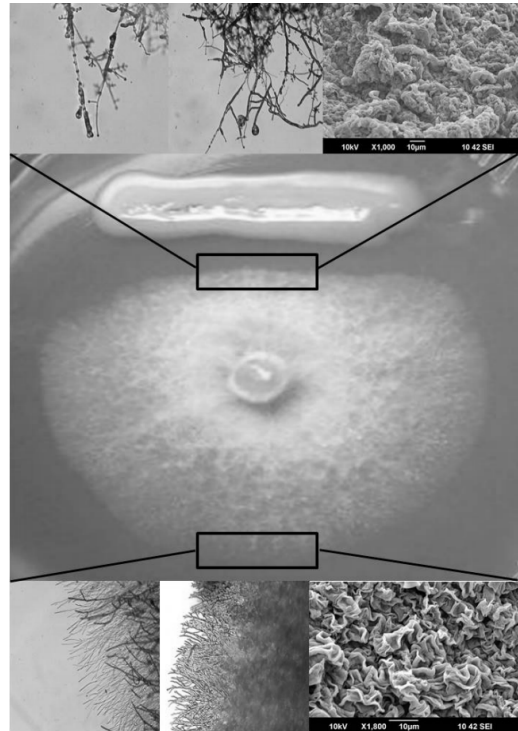


Fig. 4. Antifungal activity (middle) of B. subtilis AF4 against B. cinerea and deformations (upper) of B. cinerea hyphae in the presence of B. subtilis AF4 versus the control (lower).

ea는 B. subtilis AF4와 접촉하지 않았음에도 불구하고 생육이 억제되었는데, 이것은 실험균주가 세포외로 확산성 항진균 물질을 생성하였음을 의미한다. B. subtilis AF4 부재 하에 생육한 B. cinerea의 군사는 어떠한 비정상적 형태도 보이지 않았으나 B. subtilis AF4와 함께 대치배양된 B. cinerea의 군사는 군사의 수축, 군사 선단 및 중간 부위에 액포 형성, 군사 선단의 슬리밍(slimming) 등 많은 기형적 형태가 관찰되었다. 이러한 형태적 변화는 결국 세포 파열을 초래하여 군사 생육이 억제되는 것으로 판단되며, 이러한 결과는 Kishore 등[13] 및 Gethao와 Vikineswary [11]의 보고에서 확인된 바 있다.

B. subtilis AF4의 식물생육촉진 활성

B. subtilis AF4가 가지는 생리활성을 보다 구체적으로 조사하기 위하여 식물생육촉진 활성과 길항가능한 곰팡이의 종류를 조사하였다. 실험균주의 배양 상등액은 Nessler 시약과 Salkowsky 시약에 의하여 각각 노란색과 분홍색으로 변화됨에 따라 암모니아와 식물 성장호르몬인 indole-3-acetic acid를 생성할 수 있음을 알 수 있었다(Fig. 5). 암모니아는 휘발성 항진균 물질로 작용하며, indole-3-acetic acid는 열매의 형성과 뿌리의 신장에 관여하는 것으로 알려져 있다[7, 9]. 또한 본 실험균주는 식물세포성분 분해효소인 cellulase, protease, amylase, lipase를 생성할 수 있었으며, Alternaria panax,

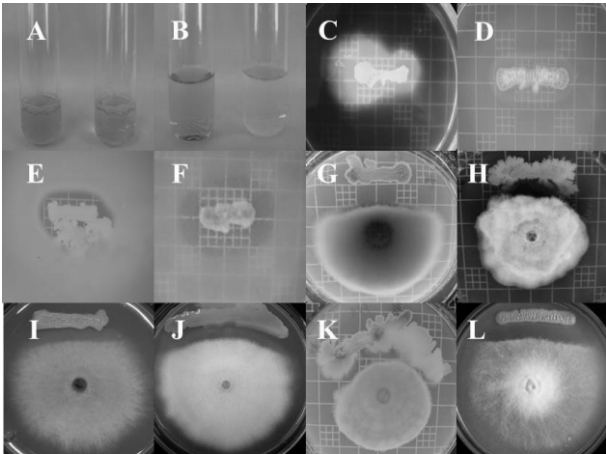


Fig. 5. Biochemical parameters showing biological activities of *B. subtilis* AF4. Ammonification (left) and control (right) in peptone water; B, indole-3-acetic acid production (left) and control (right) in King's B broth; C, amylase production; D, cellulase production; E, protease production; F, lipase production; antifungal activity against *Alternaria panax* (G), *Cylinderocarpon destructans* (H), *Colletotrichum gloeosporioides* (I), *Fusarium oxysporum* (J), *Phytophthora cactorum* (K) and *Pythium ultimum* (L).

Cylinderocarpon destructans, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora cactorum*, *Pythium ultimum* 등의 다양한 식물병원성 곰팡이의 생육을 저해할 수 있었다. 반면, 실험균주는 siderophore, chitinase를 생성할 수 없었고, 불용성 인산 가용화능도 없었다.

요약하면, 고추의 근권 토양에서 분리된 *B. subtilis* AF4는 넓은 pH와 온도 영역에서 *B. cinerea*에 대한 항진균 활성을 가지고 있었으며, 실험균주가 생성한 항진균 물질은 다양한 환경 스트레스에 대해 높은 안정성을 가지고 있었다. 또한 다양한 식물생육촉진 활성을 보유함과 동시에 항진균 스펙트럼 역시 넓었다. 앞으로 야외실험을 통하여 항진균 효과를 검증해야 하겠지만 본 실험균주는 환경친화적 미생물농약으로서의 잠재성을 가진 균주로 판단된다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)에 의하여 연구되었습니다.

References

- Besson, F., Chevanet, C. and Michel, G. 1987. Influence of the culture medium on the production of iturin A by *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* **3**, 767-772.
- Bhaskar, N., Sudeepa, E. S., Rashmi, H. N. and Tamil, S. A. 2007. Partial purification and characterization of protease of *Bacillus proteolyticus* CFR3001 isolated from fish processing waste and its antibacterial activities. *Bioresour. Technol.* **98**, 2758-2764.
- Botelho, G. R. and Mendonca-Hagler, L. C. 2006. Fluorescent Pseudomonads associated with the rhizosphere of crop - an overview. *Braz. J. Microbiol.* **37**, 401-416.
- Chaiharn, M., Chunhaleuchanon, S. and Lumyong, S. 2009. Screening siderophore producing bacteria as potential biological control agent for fungal rice pathogens in Thailand. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 1919-1928.
- Chitarra, G. S., Breeuwer, P., Nout, M. J. R., van Aelst, A. C., Rombouts, F. M. and Abee, T. 2003. An antifungal compound produced by *Bacillus subtilis* YM10-20 inhibits germination of *Penicillium roqueforti* conidiospores. *J. Appl. Microbiol.* **94**, 159-166.
- Choudhary, D. K. and Johri, B. N. 2009. Interactions of *Bacillus* spp. and plants - with special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiol. Res.* **164**, 493-513.
- Dye, R., Pal, K. K., Bhatt, D. M. and Chauhan, S. M. 2004. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiol. Res.* **159**, 371-394.
- Franken, P. 2012. The plant strengthening root endophytic *Piriformospora indica*: potential application and the biology behind. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **96**, 1455-1464.
- Garcia-Tabares, F., Herraiz-Tomico, T., Amat-Guerri, F. and Bilbao, J. L. G. 1987. Production of 3-indoleacetic acid and 3-indolelactic acid in *Azotobacter vinelandii* cultures supplemented with tryptophan. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 502-506.
- Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Costilow, R. N., Nester, E. W., Wood, W. A., Krieg, N. R. and Phillips, G. B. 1981. *Manual of methods for general bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Getha, K. and Vikineswary, S. 2002. Antagonistic effects of *Streptomyces violaceusniger* strain G10 on *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* race 4: Indirect evidence for the role of antibiosis in the antagonistic process. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 303-310.
- Gu, X., Zheng, Z., Yu, H., Wang, J., Liang, F. and Liu, R. 2005. Optimization of medium constituents for a novel lipopeptide production by *Bacillus subtilis* MO-01 by a response surface method. *Proc. Biochem.* **40**, 3196-3201.
- Kishore, G. K., Pande, S. and Podile, A. R. 2005. Biological control of collar rot disease with broad-spectrum antifungal bacteria associated with groundnut. *Can. J. Microbiol.* **51**, 123-132.
- Lane, D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing, pp. 115-175, In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley and Sons, New York.
- Li, W., Roberts, D. P., Dery, P. D., Meyer, S. L. F., Lohrke, S., Lumsden, R. D. and Hebbard, K. P. 2002. Broad spectrum antibiotic activity and disease suppression by the potential biocontrol agent *Burkholderia ambifaria* BC-F. *Crop Prot.* **21**, 129-135.

16. Mizumoto, S. and Shoda, M. 2007. Medium optimization of antifungal lipopeptide, iturin A, production by *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation by response surface methodology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **76**, 101-108.
17. Montealegre, J. R., Reyes, R., Perez, L. M., Herrera, R., Silva, P. and Besoain, X. 2003. Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato. *Electron. J. Biotechnol.* **6**, 115-127.
18. Palaniyandi, S. A., Yang, S. H., Zhang, L. and Suh, J. W. 2013. Effects of actinobacteria on plant disease suppression and growth promotion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 9621-9636.
19. Paul, D. and Lade, H. 2014. Plant-growth-promoting rhizobacteria to improve crop growth in saline soils: a review. *Agron. Sustain. Dev.* **34**, 737-752.
20. Sansinenea, E. and Ortiz, A. 2011. Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. *Biotechnol. Lett.* **33**, 1523-1538.
21. Schwyn, B. and Neilands, J. B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* **160**, 47-56.
22. Slininger, P. and Shea-Wilbur, M. 1995. Liquid-culture pH, temperature, and carbon (not nitrogen) source regulate phenazine productivity of take-all biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* 2 - 79. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**, 794-800.
23. Szeszak, F. and Szabo, G. 1967. Antibiotic production of hyphal fractions of *Streptomyces griseus*. *Appl. Microbiol.* **15**, 1010-1013.
24. Tang, Y. W. and Bonner, J. 1947. The enzymatic inactivation of indoleacetic acid I. Some characteristics of the enzyme contained in pea seedlings. *Arch. Biochem.* **13**, 17-25.
25. Vyas, P., Rahi, P., Chadh, B. S. and Gulati, A. 2014. Statistical optimization of medium components for mass production of plant growth-promoting microbial inoculant *Pseudomonas trivialis* BIHB 745 (MTCC5336). *Indian J. Microbiol.* **54**, 239-241.

초록 : 환경친화적 미생물농약으로서의 잠재성을 가진 세균의 분리 및 특성

이예람 · 이상미 · 장은영 · 홍창오 · 김근기 · 박현철 · 이상몽 · 김용균 · 손홍주*

(부산대학교 생명환경화학과/생명산업융합연구원)

화학농약의 오남용은 환경오염을 유발하고, 사람의 건강에 악영향을 미치므로 그 대안으로 미생물을 이용한 생물학적 방제에 대한 관심이 높아지고 있다. 본 연구에서는 환경에서 안정성을 유지할 수 있는 생물방제균을 확보하기 위하여 잣빛곰팡이병균인 *Botrytis cinerea*의 생육을 억제할 수 있는 *Bacillus* 속 균주를 탐색한 후, 선정된 균주의 항진균 물질 생산을 위한 조건, 항진균 기작 및 물리화학적 안정성에 대하여 조사하였다. 가장 높은 항진균 활성을 가진 균주는 고추의 근권 토양에서 분리된 AF4 균주였으며, 표현형적 특성 및 16S rRNA 유전자 염기서열에 근거하여 동정한 결과, *Bacillus subtilis*로 확인되었다. AF4 균주는 최적 탄소원으로 glycerol을, 최적 질소원으로 casein을 요구하였으며, 25-40°C 및 pH 7-10에서 항진균 활성을 나타내었다. 최적조건에서 항진균 활성은 140±3 AU/ml로, 기본배지보다 활성이 증가했음을 알 수 있었다. AF4 균주는 *B. cinereas* 군사를 형태적으로 변화 시킴으로써 항진균 효과를 나타내는 것으로 추정되었으며, 다양한 식물병원성 곰팡이의 생육을 억제할 수 있었다. 또한 AF4 균주가 생성하는 항진균 물질은 열, pH, 유기용매 및 단백질 분해효소 처리에도 항진균 활성을 유지하였으므로 대단히 안정한 물질인 것으로 판단되었다. 따라서 *Bacillus subtilis* AF4는 다양한 곰팡이유래 식물질병 방제에 적용가능성이 높은 균주임을 알 수 있었다.