

사과 겹무늬썩음병균에 대한 *Bacillus* sp. SS279의 항진균활성과 생물학적 방제

김삼선 · 주길재 · 엄재열¹ · 김영재² · 이인구*
경북대학교 농화학과 · ¹농생물학과, ²창원대학교 미생물학과

Antifungal Activity of *Bacillus* sp. SS279 and Biocontrol of Apple White Rot Fungus, *Botryosphaeria dothidea*. Sam-Sun Kim, Gil-Jae Joo, Jae-Youl Uhm¹, Young-Jae Kim² and In-Koo Rhee*. Department of Agricultural Chemistry, ¹Department of Agricultural Biology, College of Agriculture, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea, ²Department of Microbiology, Changwon National University, Changwon 641-773, Korea - From apple skin, we isolated a bacterial strain which strongly inhibited the growth of apple white rot fungus, *Botryosphaeria dothidea*. The isolated strain, designated as SS279, was identified to be the genus *Bacillus*. The antifungal activity of *Bacillus* sp. SS279 was found in the culture filtrate. The production of antifungal substances occurred during logarithmic phase and was the highest when cultures reached the stationary growth phase. The optimum ranges of temperature and pH for its production were 25-30°C and 4.5-9.0, respectively. The culture filtrate of *Bacillus* sp. SS279 exhibited a strong inhibitory effect on the spore germination and germ tube elongation of *B. dothidea*. Autoclaved culture filtrate of *Bacillus* sp. SS279 showed only a slight decrease in antifungal activity, indicating that the *Bacillus* sp. SS279 produce heat-stable antifungal substances. In *in vivo* bioassay, *Bacillus* sp. SS279 also showed antagonistic activity against apple white rot caused by *B. dothidea*.

자낭균류인 *Botryosphaeria dothidea*는 사과, 배, 복숭아 등을 포함하는 목본류 20과 34속을 침해하는 것으로 알려져 있다(1). 이 균에 의해 발병되는 사과 겹무늬썩음병은 현재 우리나라에서 발생되고 있는 사과 병해 중 가장 큰 경제적 피해를 주는 병해 중 하나이다(2). 사과 겹무늬썩음병의 병원균은 과실 뿐만 아니라 사과 나무 가지에도 기생하며, 가지에서의 병징은 사마귀 또는 궤양 증상을 나타낸다(3). 병원균은 이들 병반상에서 자낭포자와 병포자를 형성하여 1차 전염원이 된다(4). 자낭 포자는 주로 봄에 비산되는데, 그 수가 많지 않아 전염원으로서는 그다지 중요하지 않으며 주로 병포자에 의해 전염된다(5). 병포자는 병자각에서 형성되어 강우 시에 누출되며, 누출된 포자는 빗물에 씻겨 가지를 타고 흘러내리면서 사과 과실 표면에 부착되기도 하나, 주로 비가 올 때 발생하는 splash와 함께 바람을 타고 이동하여 과실 표면에 부착된다(6). 과실표면에 부착된 포자는 발아하여 과점을 통해서 침입하며, 병원균의 침입으로부터 병징이 나타나기까지의 소요 기간은 과실의 성숙도에 따라 달라지는데 6월 중순경에 감염된 사과는 8월 중순경 또는 그 이후에 발병되는데에 반해, 8월 이후에 감염된 과

실에서는 1개월 내에 발병된다(7). 이 병의 전염원인 포자의 분산기간과 그에 따른 기주의 감염 가능 기간이 매우 길어 병의 방제를 어렵게 하는 것으로 생각된다(7). 따라서 약제의 약효 지속기간이 약제의 살포 간격 보다 길 때에 한해서 충분한 방제 효과를 기대할 수 있다. 현재 우리나라의 사과 재배에 있어서, 약제의 살포 간격은 보통 10일인데 여름철의 장마 기간 중에는 그 간격이 지켜지기 어렵다(8). 따라서 겹무늬썩음병 방제를 위해서 8-10회나 약제를 살포해도 감염으로 인한 피해를 완전히 막을 수 없으므로, 약제에 의한 방제에는 한계가 있다. 만약 사과 겹무늬썩음병에 길항하는 미생물을 분리하여 과수원의 토양과 과수의 잎, 가지 및 과실표면 등에 서식시킬 수 있다면 사과 겹무늬썩음병균의 생물학적 방제가 가능할 것으로 생각된다. 이 연구에서는 사과의 과점(lenticel)부위에서 다수의 미생물을 분리하고 이들중 겹무늬썩음병균에 길항하는 미생물을 선발하여 배지 및 수확한 사과 표면상에서 이들의 길항능력을 검정하여 생물학적 방제 가능성을 검토하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

시용 균주

사과 겹무늬썩음병균 *B. dothidea* AF15는 경북 영천산 후지 사과로부터 직접 분리하여 경북대학교 농생물학과

*Corresponding author

Tel. 82-53-950-5718, Fax. 82-53-953-7233

E-mail: ikrhee@bh.kyungpook.ac.kr

Key words: Antifungal activity, *Bacillus*, *Botryosphaeria dothidea*, Biocontrol, Apple white rot

에 보존 중인 것을 사용하였다. *Fusarium oxysporum*, *Mycosphaellera melonis*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Cercospora* sp. 및 *Phytophthora capsici* 등의 식물 병원균은 농촌진흥청 농업과학기술연구원으로부터 분양받아 사용하였다.

사용배지 및 배양조건

*B. dothidea*의 배양을 위한 고체 배지로는 PDA배지를 사용하였으며 액체 배양을 위한 배지는 PDA에서 한천을 제외한 PD broth를 사용하였다. 고체 배양에서 *B. dothidea*의 배양은 PDA평판 중앙에 직경 5 mm의 함균(含菌) 한천 디스크를 이식하여 28°C에서 4일간 배양하였다. 분리 선발한 균주 SS279의 배양은 LB배지(pH 6.8) 20 ml을 넣은 100 ml 삼각플라스크에 종배양액 0.4 ml를 접종하여 28°C에서 120 strokes/min으로 24시간 진탕 배양하였다.

세균의 생육도 측정은 spectrophotometer(Hitachi model U-2000)로 600 nm에서 흡광도를 측정하여 나타내었다.

생물방제균의 분리 및 동정

사과 과피로부터 겹무늬썩음병균에 대한 항균력을 갖는 세균을 분리하기 위하여 경북 영천 및 안동지역의 출하직전의 후지사과의 과점(lenticel)부위를 직경 3 mm로 잘라 과육부위를 제거하였다. 잘라낸 10개의 과점부위를 살균된 생리식염수 5 ml에 넣어 볼텍스 믹서로 5분간 교반하여 적절히 희석한 후 potato dextrose agar (PDA)배지에 도말하여 대상 균을 분리하였다. 24 well plate(Corning Co.; Cat. No. 25820-24) test(9)를 통하여 *B. dothidea*의 포자 발아 억제능을 나타내는 세균을 1차 선발하고 대치배양(10)과 Dendroid test(11)에서 *B. dothidea*에 대해 강한 항균활성을 나타내는 세균을 2차 선발하여 최종적으로 사과에서 겹무늬썩음병 억제효과가 우수한 균주를 선발하였다. 분리된 균주의 동정은 "Bergey's manual of systematic bacteriology"(12)와 Methods for general and molecular bacteriology (13)에 의거하여 수행하였다. 균의 형태학적 관찰은 광학현미경(Olympus CH-2)과 주사형 및 투과형 전자현미경(Hitachi-S2300, Zeiss-109)으로 관찰하였다.

SS279의 항진균활성 측정(Dendroid test)

항진균활성은 아래와 같이 Dendroid test를 약간 변형하여 사용하였다(11). 분리된 SS279를 LB배지에서 24시간 배양한 배양액을 12,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 공경(孔徑) 0.45 µm membrane filter로 여과하였다. 이 제균한 여액 10 ml와 0.1 M acetate buffer(pH 5.4) 10 ml를 1.25배 농축한 PDA 80 ml에 혼합하여 평판배지로 사용하였다. 이 PDA 평판배지의 중앙에 *B. dothidea*

의 함균 한천 디스크(직경 5 mm)를 접종하여 28°C에서 4일간 배양하였다. 대조구는 제균한 배양여액을 섞지 않은 PDA배지를 사용하였다. 상대적인 항균활성은 아래식으로 나타내었다.

$$\text{항균 활성 (\%)} = \frac{\text{대조구의 콜로니 직경} - \text{실험구의 콜로니 직경}}{\text{대조구의 콜로니 직경}} \times 100$$

*B. dothidea*의 포자 현탁액 조제

PDA배지에서 종배양된 *B. dothidea*를 새로운 PDA배지에 접종하여 4일간 배양하여 병자각이 형성된 후 기중균사를 제거하고 실온에 6시간 방치한 후, 병자각에서 누출된 병포자괴를 해부현미경(Olympus, FHT-533, Japan) 하에서 백금선으로 20여개를 채취하였다. 이것을 살균 증류수 4 ml에 현탁하여 24 well plate test(9)에 사용하였다. 또한 PDA plate에서 생성된 포자덩어리 20여개를 1 ml의 0.1 M acetate buffer(pH 5.4)에 현탁하여 haematocytometer로 계측하고 포자현탁액의 농도가 10⁴/ml로 희석하여 실험에 사용하였다(14).

사과 겹무늬썩음병의 억제효과 조사

사과를 계면활성제로 세척하고 다시 10% hypochlorite 용액으로 씻은 후, 사과의 꼭지 주위의 3부위에 살균 이쭉시개 끝으로 2 mm깊이로 찔러 상처를 내고, LB 배지에서 28°C 24시간 배양한 *Bacillus* sp. SS279의 배양액 300 ml에 위에서 처리한 사과를 침지시켰다. 침지한 사과를 건져내어 풍건시키고, 사과의 상처 부위에 각각 포자 현탁액(10⁴/ml) 20 µl를 접종하여, 밀폐된 humid plastic chamber(57×36×21 cm³)에 28°C에서 약 10일 동안 보존하면서 사과 겹무늬썩음병의 발병여부 및 억제 정도를 조사하였다. 대조구로는 상처에 *B. dothidea* 포자만 접종한 것 및 상처내지 않고 포자 접종한 것으로 하여 위와 같은 조건에서 조사하였다.

결과 및 고찰

사과 겹무늬썩음병균에 항균활성을 나타내는 세균의 분리

사과의 과점부위에서 분리한 약 500여 균주로부터 24 well plate test를 통하여 *B. dothidea*의 포자 발아 억제능을 나타내는 균주를 100여주 선발하였다. 분리 선발된 100여주를 대상으로 항균활성과 사과에서 겹무늬썩음병 발병 억제효과가 가장 높은 균주 SS279를 최종적으로 선발하였다. 선발균주 SS279의 길항효과를 대치 배양법으로 조사한 결과, *B. dothidea*에 대해서는 84%의 항균활성을 보였으며 그외에 *Rhizoctonia solani*(배추 입고병), *Cercospora* sp.(오이반점병), *Mycosphaellera melonis*(수박

Table 1. Antagonistic activity detected by dual culture of *Bacillus* sp. SS279 against plant pathogenic fungi

Plant pathogenic fungi	Antagonistic activity (%)*
<i>Phytophthora capsici</i>	46
<i>Fusarium oxysporum</i>	54
<i>Pythium ultimum</i>	58
<i>Mycosphaellera melonis</i>	63
<i>Cercospora</i> sp.	65
<i>Rhizoctonia solani</i>	70
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	84

*A mycelial plug (ϕ 5 mm) of *B. dothidea* was placed on the center of PDA plate (ϕ 9 cm) and the *Bacillus* sp. SS279 was inoculated 1cm from the edge of the PDA plate by drawing a circle with cotton plug dipped into the overnight culture broth. The plates were kept at 28°C for 4 days. The antagonistic activities were represented by the relative inhibition of hyphal growth as compared with blank.

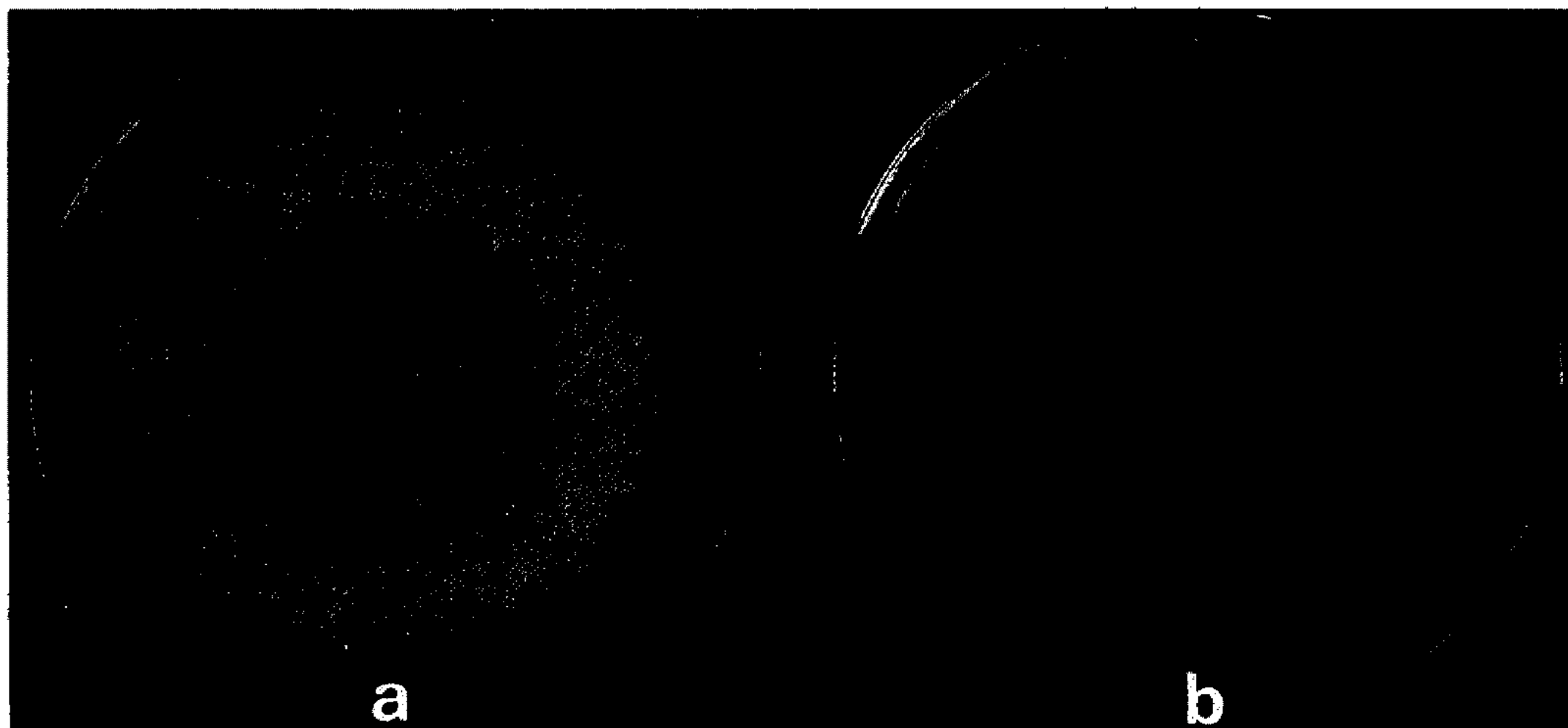
만고병), *Pythium ultimum*(고추 입고병), *Fusarium oxysporum*(오이 만할병), *Phytophthora capsici*(고추 역병) 과 같은 식물 병원균에도 각각 70, 65, 63, 58, 54 및 46%의 높은 균사체 발육의 길항효과를 나타내었다(Table 1). 대치배양에서 선발균주 SS279에 의한 *B. dothidea*의 발육억제 양상을 보면 한천평판의 가장자리에 접종한 균주 SS279가 배지표면에 퍼져자라 중앙에 접종한 *B. dothidea*의 균사체 주위를 둘러싸게 되면 균사체가 더 이상 발육하지 못하게 된다. 사과에서 겹무늬썩음병의 억제효과를 조사할 때에도 선발균주 SS279의 균체를 함유하는 배양액에 사과를 침지하여 병원균을 접종하여 병반의 진전억제효과를 조사하여 선발하였다. 그러므로 본 균주 SS279에 의한 *B. dothidea*에 대한 길항작용 및 사과 겹무늬썩음병 억제효과가 항균성 물질의 생산에 의한 것인지 생육경쟁에서 사과 겹무늬썩음병균의 생장을 억제하는지를 조사하기 위하여 배양여액과 균체를 파쇄한 후

Table 2. Antifungal activity of the heat treated culture filtrates and cell free extract of *Bacillus* sp. SS279 against *B. dothidea* AF15

Dendroid test	None	Culture filtrate			Cell free extract
		without heat-treat.	heat-treat. 80°C, 60min	heat-treat. 121°C, 10min	
Diameter of mycelial extension (mm)	84	20	20	38	83
Antifungal activity (%)	0	76	76	55	1

얻은 무세포추출액으로 항진균활성을 조사하였다. 아울러 열처리에 따른 생산된 항균성물질의 안정성을 함께 조사한 결과는 Table 2와 같다. 무세포 추출액은 20 ml LB배지(pH 6.8)에서 24시간 배양한 균체를 세척하고 이를 5 ml의 0.1 M acetate buffer(pH 5.6)에 현탁하여 초음파 파쇄기로 15분간 파쇄하고 13,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상징액을 사용하였다. 이 원심상징액을 공경 0.45 μ m의 membrane filter로 여과하여 배양여액을 사용한 경우와 동일하게 Dendroid test로 *B. dothidea*에 대한 항균력을 조사하였다.

무처리 배양여액은 76%의 생육 억제효과를 나타내었고 121°C에서 10분간 열처리한 배양여액에서도 55%의 생육억제효과를 나타내었으나 무세포 추출액은 *B. dothidea* AF15의 생육에 대한 억제효과가 없었으며, 배양액을 80°C에서 1시간 열처리했을 경우에는 전혀 항균력이 상실되지 않았다. *Bacillus* sp. SS279는 항진균성 물질을 생산하며, 이것은 고온에서 매우 안정하며 균체외로 분리된다는 것을 알수가 있었다. 본 항진균성 물질은 ninhydrin에 양성반응을 나타내고 유안염색에 침전하므로 고분자의 단백질성 항진균성 물질인 것으로 생각된다(데이타 미제시).

**Fig. 1. Growth inhibition of *B. dothidea* by *Bacillus* sp. SS279.**

B. dothidea was grown on PDA with(b) and without(a) 10% culture filtrate of *Bacillus* sp. SS279 at 28°C for 4 days.

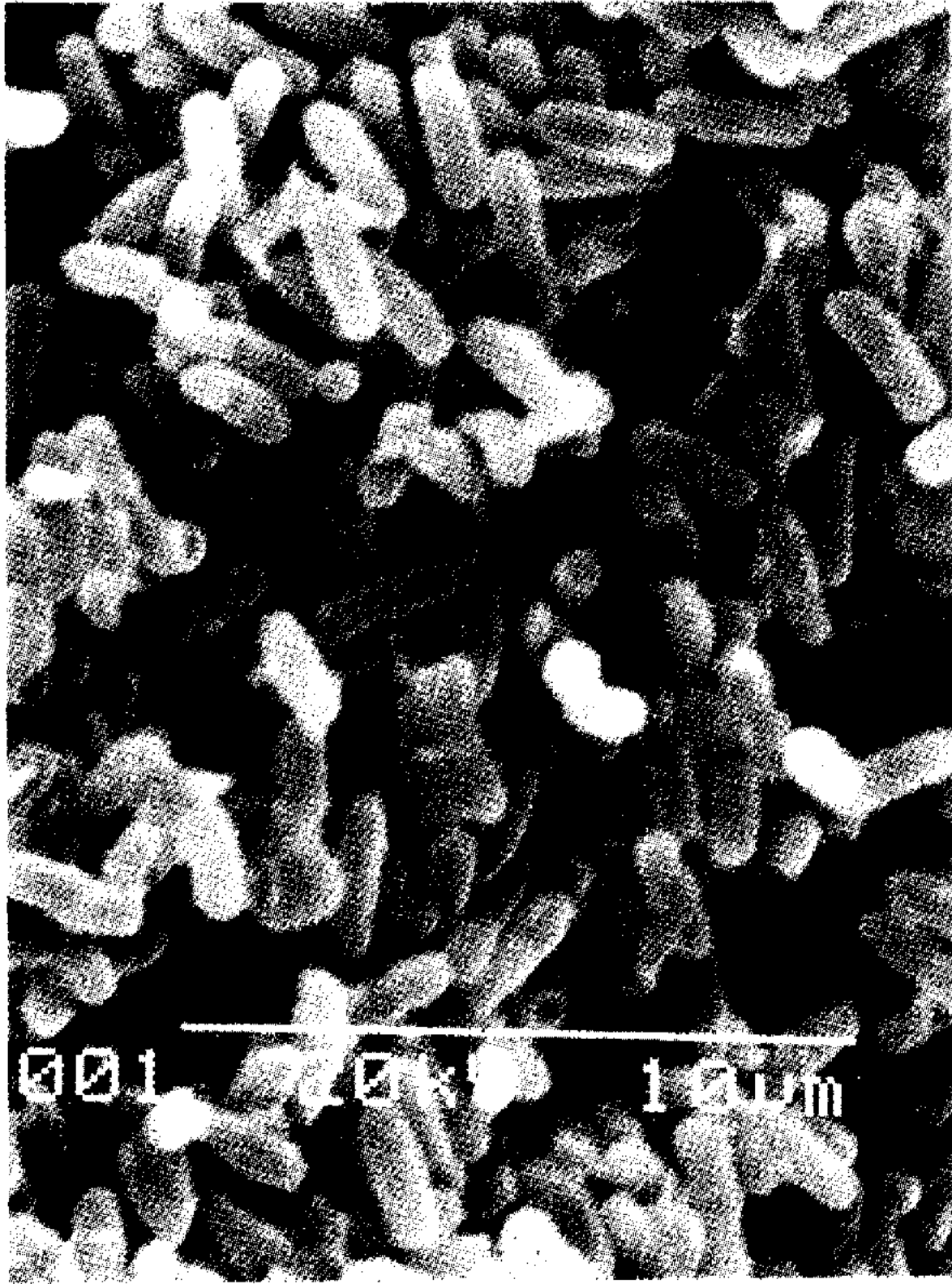


Fig. 2. Scanning electron micrograph of the isolated strain SS279($\times 4000$).

선발균주 SS279의 형태학적, 생리학적 특성 및 동정

선발 균주 SS279는 그람염색 결과 양성으로 판명되었고 주사형 전자현미경으로 4000배 확대하여 관찰한 결과 전형적인 간균의 형태를 취하고 있었으며 세포의 크기는 $2.2 \times 0.6 \mu\text{m}$ 이었다(Fig. 2). 15시간 배양한 SS279의 균체를 Phosphotungstic acid로 음성 염색하여 투과형 전자 현미경으로 관찰한 결과 양극에 편모를 가지고 있었

다. 선발균주 SS279의 형태학적, 생리학적 특성을 Table 3에 나타내었다. 이 균은 내열성 포자를 형성할 수 있었고 호기적 조건에서 생육하였으며, catalase를 생산하였다. Voges-Proskauer test 및 질산염 환원반응에서 양성 반응을 보였고, indole 생산능과 dihydroxyacetone 생성 능이 있었다.

Phenylalanine의 탈아미노 반응에서 음성을 나타내었으며, gelatin, starch를 분해할 수 있었고, arabinose, glucose, xylose 및 mannitol로부터 산을 생성하였으나, gas는 발생하지 않았다. 또한 glucose, fructose, lactose, maltose, mannose, mannitol, raffinose, sorbitol, sucrose, arabinose 및 xylose를 잘 이용하였고, inositol과 rhamnose는 거의 이용하지 못하였다. 이상의 결과로부터 선발균주 SS279는 *Bacillus subtilis*와 유사한 균주로 동정되었다(Table 3).

Bacillus sp. SS279에 의한 항진균성물질의 생산 조건

Bacillus sp. SS279의 항진균성 물질 생산에 미치는 온도의 영향을 15°C 에서부터 5°C 간격으로 55°C 까지 조사한 결과 균의 생장은 25°C 에서 가장 높았으나 항진균성 물질생산은 $20\text{-}35^\circ\text{C}$ 의 넓은 범위에서 이루어졌으며 특히 $25\text{-}30^\circ\text{C}$ 에서 가장 높았다. 또 항진균성 물질의 생산에 미치는 초기 pH의 영향을 LB배지를 사용하여 조사한 결과 *Bacillus* sp. SS279의 생육과 항진균성물질의 생산이 pH 4.5부터 pH 9.5의 넓은 범위에 걸쳐 높았다(데이터 미제시). LB배지(pH 6.8) 20 ml에 종배양액 2%를 접종하여 28°C 에서 진탕 배양하면서 배양시간별 균의 생육과 항진균성 물질생산을 조사한 결과는 Fig. 3과 같다. Dendroid test로 측정된 항진균 활성은 대수증식기 초기인 배양 6시간째부터 정지기 초기인 12시간 사이에 급격

Table 3. Morphological and physiological characteristics of the isolated strain SS279

Characteristics	SS279	Characteristics	SS279
Cell form	Rod	Acid from	
Cell size	$2.2 \times 0.6 \mu\text{m}$	D-glucose	+
Margin of colony	Irregularly notched	L-arabinose	+
Surface of colony	Smooth	D-xylose	+
Spore formation	+	D-mannitol	+
Motility (lateral flagella)	+	Gas from glucose	-
Gram strain	+	Gelatin hydrolysis	+
Catalase	+	Starch hydrolysis	+
Anaerobic growth	-	Deamination of	
Voges-Proskauer test		phenylalanine	-
at pH 5.7 in VP broth	+	Nitrate reduced to	
at pH 7.8 in VP broth	+	nitrite	+
Growth at pH 6.8/5.7		Formation of	
nutrient broth	+	indole	+
		dihydroxyacetone	+
		NaCl and KCl required	-

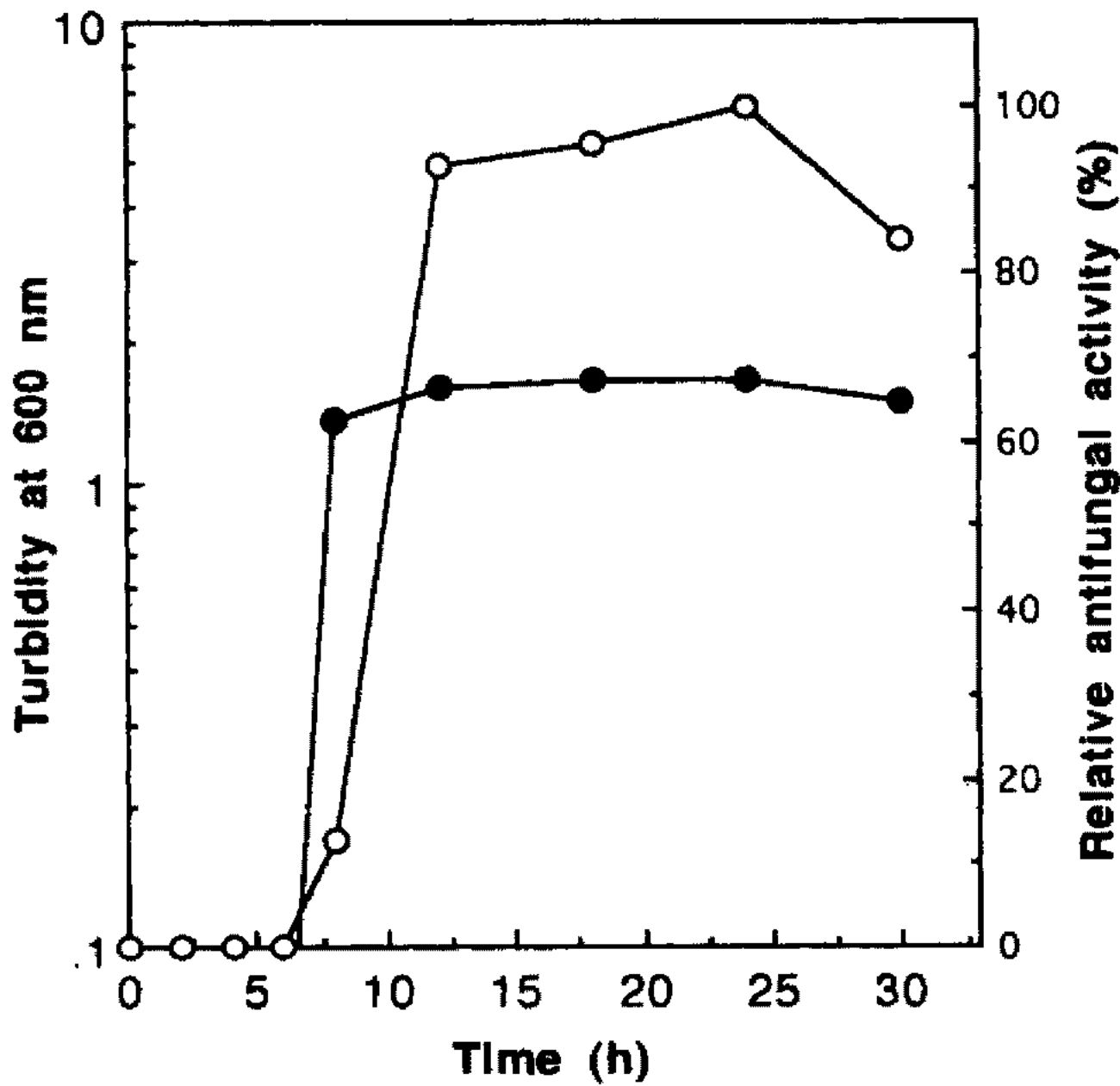


Fig. 3. Profiles on the growth and production of antifungal substances in *Bacillus* sp. SS279. ●, growth of *Bacillus* sp. SS279; ○, relative antifungal activity determined on PDA by Dendroid test against *B. dothidea*.

히 증가하여 배양 24시간째 최대치를 나타내었다.

Bacillus sp. SS279의 배양여액 처리에 의한 *B. dothidea*의 균사성장 및 포자 발아의 억제

Bacillus sp. SS279의 배양여액이 *B. dothidea*의 균사 성장 및 포자발아에 미치는 영향을 조사하였다. 10%의 *Bacillus* sp. SS279의 배양여액을 혼합한 PDA배지평판에 *B. dothidea* AF15를 접종하여 28°C에서 4일간 배양한 후, *B. dothidea*의 균사 선단부위를 1 cm² 크기로 잘라 광학현미경(×400)으로 관찰한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 배양여액을 혼합하지 않은 대조구의 *B. dothidea*의 균사는 가늘게 신장되었으며 균사에 뚜렷한 세포벽을 관찰할 수 있었고, 군데 군데 격막이 관찰되었다(Fig. 4A). 그러나 배양여액이 혼합된 PDA배지에서 성장한 *B. dothidea*는 균사가 일부 용균되어 있는 반면, 대부분의 균사는 팽윤되어 있고 많은 격막이 관찰되었으며 격막과 격막 사이가 잘록 잘록하게 간균이 연쇄상으로 붙어 있는 것과 같은 극히 비정상적인 형태를 나타내었다(Fig. 4B). *Bacillus* sp. SS279의 배양여액이 *B. dothidea*의 포자에 미치는 영향을 시간별로 조사한 결과는 Fig. 5와 같다. 대조구의 경우 *B. dothidea*의 포자는 3시간이 경과하면 거의 발아가 완료되고 발아관이 신장하기 시작하였으나(Fig. 5A), 상정액을 처리한 경우에는 처리 3시간째 대부분이 포자 선단에 germ bulb가 동그랗게 형성되었을 뿐만아니라(Fig. 5B), 포자발아율이 50%까지 떨어졌으며(데이터 미제시), Fig. 5D와 같이 일단 억제된 포자는 시간이 경과해도 발아가 되지 않았으나 초기에 발아된

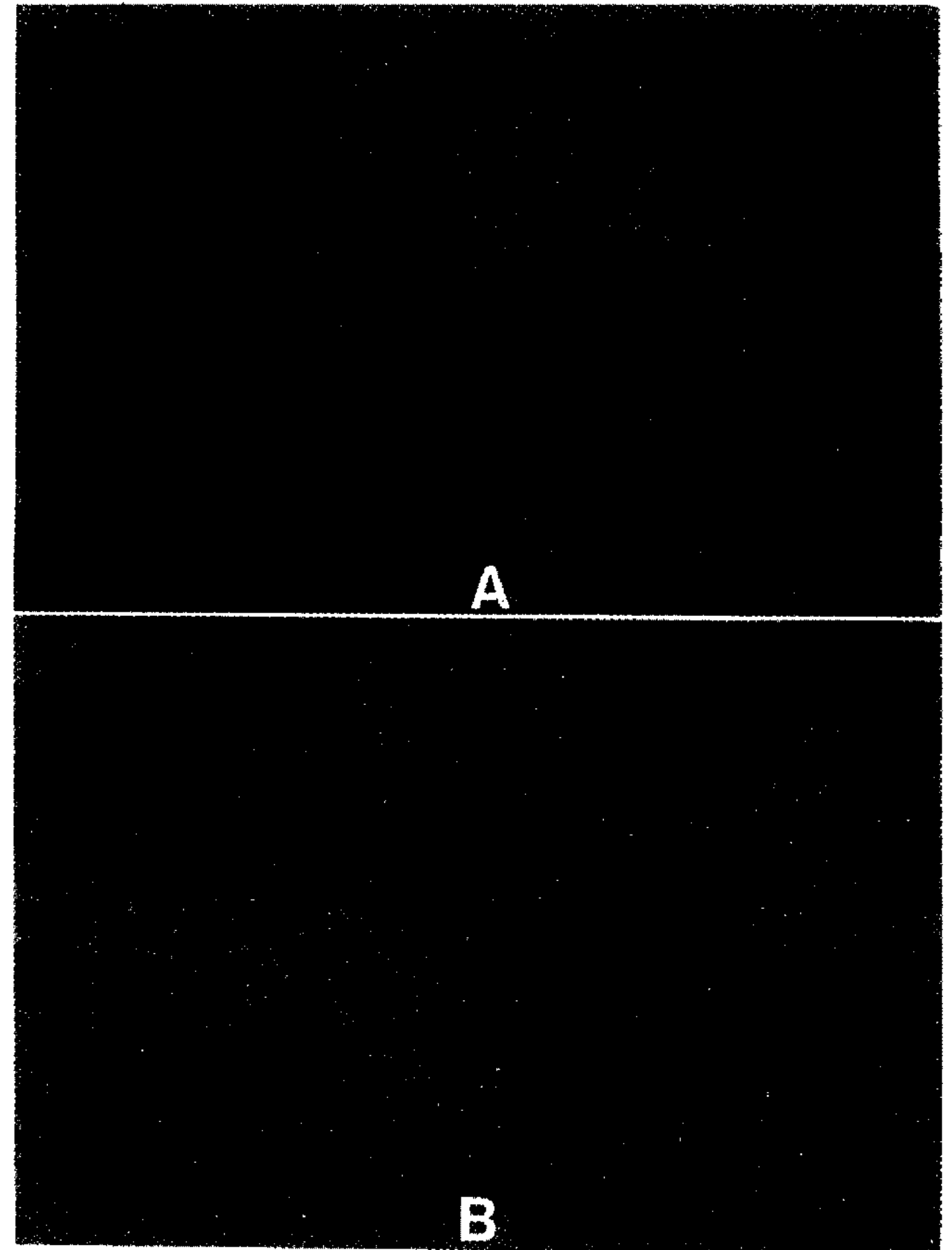


Fig. 4. Microscopic photograph of mycelia of *B. dothidea* which were grown with culture filtrate of *Bacillus* sp. SS279. *B. dothidea* was grown on PDA with (B) and without (A) 10% culture filtrate of *Bacillus* sp. SS279 for 4 days.

포자는 시간이 경과함에 따라 균사가 신장되었다.

본균에 의한 *B. dothidea*의 길항작용은 용균효소를 분비하여 세포벽을 용해하는 *Trichoderma*속 곰팡이들(15)이나 *Pseudomonas stutzeri* 등(16)의 작용과는 달리 대부분의 *Bacillus* sp.(17)와 같이 독성물질이나 항균성 물질의 분비에 의해 길항작용을 나타내는 것으로 생각된다.

In vivo bioassay에서 *Bacillus* sp. SS279 배양액의 항진균 효과

후지사과의 저장과정중 상처를 내지 않고 *B. dothidea*의 포자현탁액을 과피에 도말하였을 경우 발병빈도가 매우 낮고 발병기간이 20일 이상 걸리므로 실험 데이터를 얻기가 곤란하여 이쭉시개로 천자하여 접종하는 방법을 강구하였다.

Bacillus sp. SS279의 배양액에 사과를 침지한 후 상온에서 말린 사과에 살균된 이쭉시개로 찢어서 자상을 입힌 후 여기에 20 μl의 포자 현탁액(10⁴/ml)을 도말한 사과나 포자현탁액을 도말하지않는 사과에서는 접종 후 5일까지 병반의 직경이 3 mm이내이었으며 이것을 병반의 진전이 없는 것으로 간주하였다. *Bacillus* sp. SS279

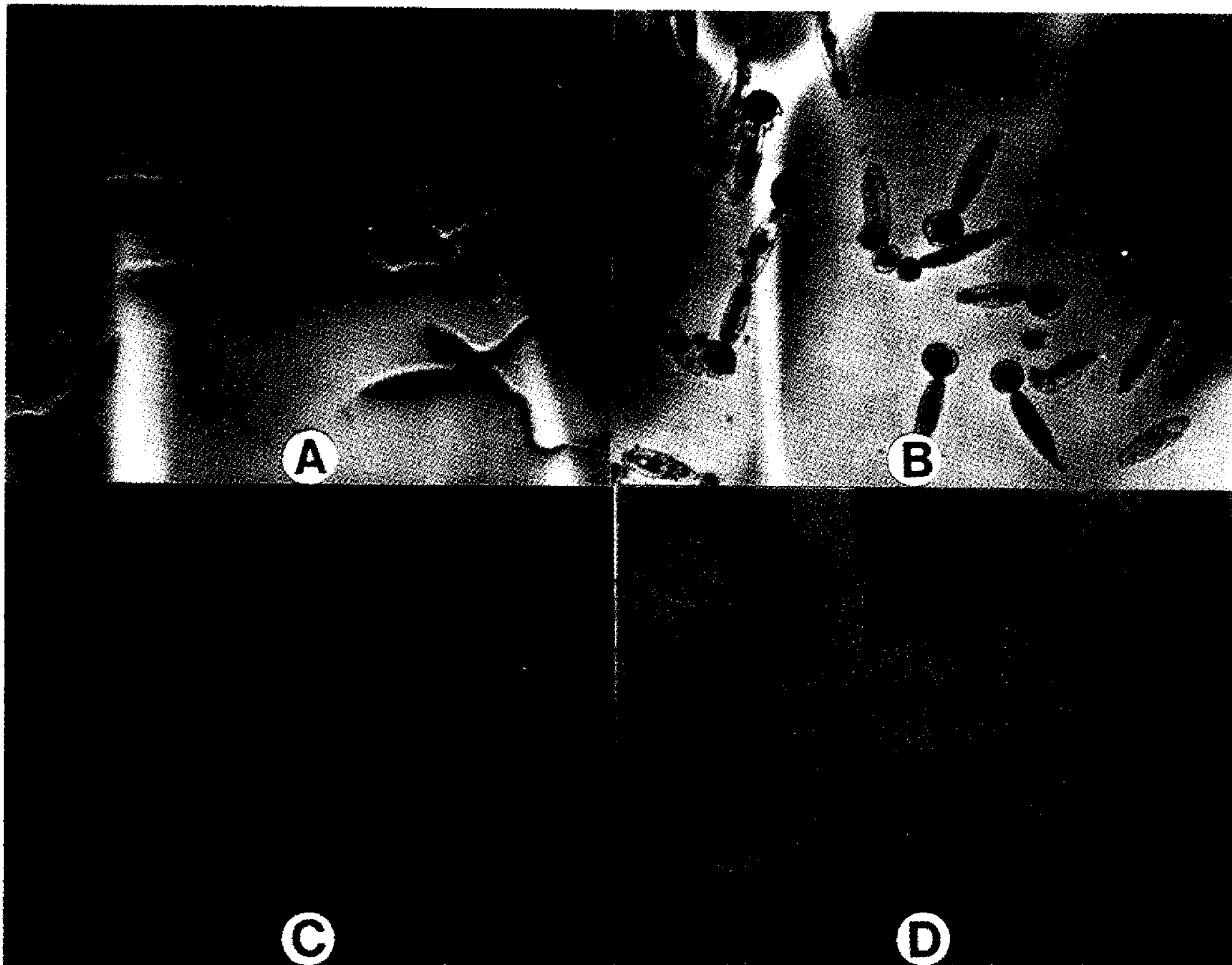


Fig. 5. Microscopic photograph of pycnidiospore germination of *B. dothidea* which were treated with culture filtrate of *Bacillus* sp. SS279.

Spores of *B. dothidea* was grown on PDA with (B, D) and without (A, C) 10% culture filtrate of *Bacillus* sp. SS279 for 3 (A, B) or 6 (C, D) hours.

의 배양액에 침지하지않고 이쑤시개로 천자하여 포자현탁액을 접종하였을 경우 접종 6일째 조사한 결과 100% 발병하였으며 병반의 직경이 18 mm 이상이었다. 배양액의 처리구에서는 접종 6일째 24 반복구에서 67%의 항균활성을 나타내었다. Fig. 6은 접종 후 6일째 과실 표면의 병반 크기와 과육내부의 부패 정도를 나타낸 결과로 절

단 단면(Fig. 6C, 6D)에 나타낸 바와 같이 사과 표면(Fig. 6A, 6B)에서 보다 과육부위에서 부패정도가 훨씬 심하였다. 시험구의 사과의 표면에서는 병반의 진행이 억제되었으나(Fig. 6A), *Bacillus* sp. SS279의 배양액이 침투되지 않은 과육 부분에서는 조직의 부패가 일부 진행되어 있었다(Fig. 6C).

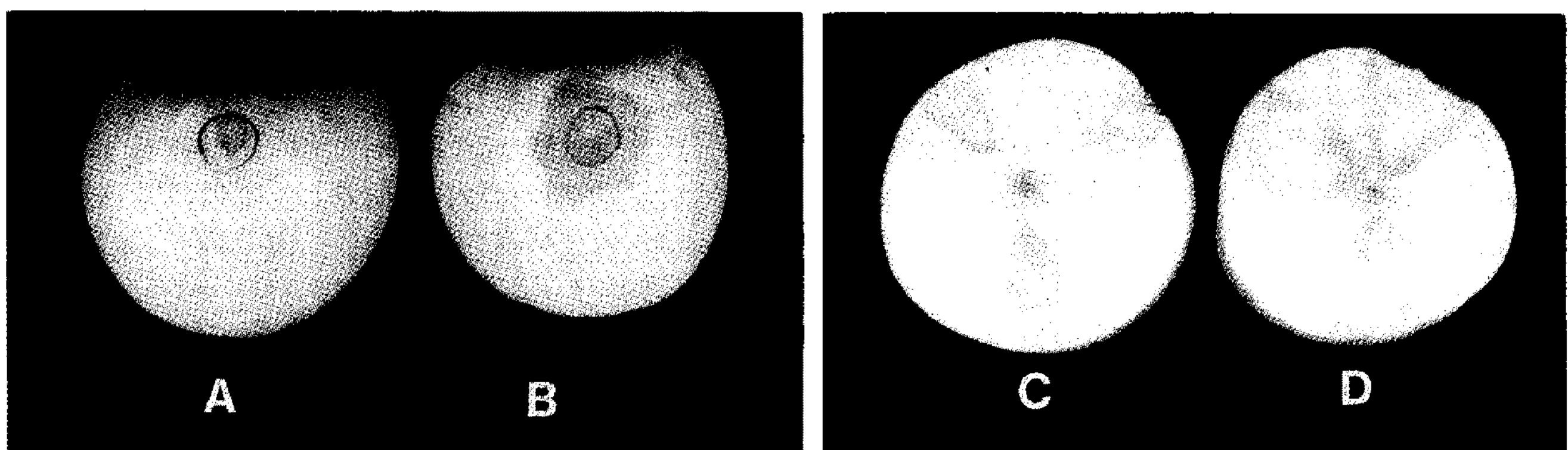


Fig. 6. *In vivo* suppressive effect by culture broth of *Bacillus* sp. SS279 against *B. dothidea*.

Apples were soaked with (A, C) and without (B, D) the culture broth of *Bacillus* sp. SS279. Three spots of upper edge per apple were picked with the tip of sterile tooth-pick and 20 μ l aliquot of spore suspension (10^4 /ml) of *B. dothidea* was placed at each spot. After air-drying the apples were incubated in the humid plastic chamber at 28°C for 6 days. A and B, apple surface; C and D, cutting section.

본 *Bacillus* sp. SS279는 사과의 과점으로부터 분리한 미생물이며 실제 사과 표면에서 겹무늬썩음병의 억제가 현저하게 나타나므로 사과의 저장 기간중 겹무늬썩음병에 대한 생물학적인 방제에 이용될 수 있을 것으로 생각된다. 앞으로 배양액을 직접 사과나무에 살포하여 겹무늬썩음병의 방제효과가 나타날 경우 생물학적 방제제로 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

사과 과피로부터 사과 겹무늬썩음병균 *Botryosphaeria dothidea*의 생육을 강력히 저해하는 SS279로 명명된 세균을 분리하고 동정한 결과, 이 균주는 *Bacillus* 속으로 동정되었다. *Bacillus* sp. SS279의 항진균 활성은 배양액에서 나타났으며 항진균성 물질의 생산은 생육대수기 초기에 시작되어 정지기에서 가장 높았다. 항진균성 물질의 생산을 위한 최적 온도와 pH는 각각 25-30°C와 4.5-9.0 범위였다. *Bacillus* sp. SS279의 배양액은 *B. dothidea*의 포자발아와 균사발육에 강력한 저해작용을 나타내었으며 배양액이 열처리되더라도 항진균활성이 조금밖에 파괴되지 않는 것으로 보아 항진균성 물질은 열에 매우 안정하다는 것을 알 수가 있었다. 사과에서의 발병 억제실험에서 *Bacillus* sp. SS279는 *B. dothidea*에 의해서 유발되는 사과 겹무늬썩음병 발병에 강한 길항작용을 나타내었다.

참고문헌

1. Creswell, T. C. and R. D. Milholland. 1988. Spore release and infection periods of *Botryosphaeria dothidea* on Blurry in North Carolina. *Plant Dis.* **72**: 342-346.
2. 김종천. 1982. 사과 부패병균의 동정 및 전염 경로에 관한 연구. 농촌진흥청 산학협동 연구 보고서 **23**: 1-51.
3. 林重昭. 1984. リンゴ輪紋病の發生生態と防除. 植物防疫. **38**: 19-22.
4. Sutton, T. B. 1981. Production and dispersal of ascospores and conidia of *Physalospora obtusa* and *Botryosphaeria dothidea* in apple orchards. *Phytopathology* **71**: 584-589.
5. Sutton, T. B. and J. V. Boyne. 1983. Inoculum availability and pathogenic variation in *Botryosphaeria dothidea*

- in apple production areas of North Carolina. *Plant Dis.* **67**: 503-506.
6. Sutton, T. B. 1990. White rot, Pp 17-19. In A. L. Jones and H. S. Aldwinckle(ed.), *Compendium of Apple and Pear Diseases*. APS Press, St. Paul, Minnesota.
7. 이두형. 1990. 사과 겹무늬썩음병의 병원균, 발생요인 및 방제대책. 경북 대학교 농업과학기술연구소 세미나 특집호, Pp 24-41.
8. 엄재열. 1993. 미국의 식물검역기준에 적합한 사과병해 방제체계 연구. 경상북도 용역연구 보고서, Pp 3-43.
9. Rosendahl, C. N. and L. W. Oison. 1992. An *in vivo* screening method for antifungal activity against the plant pathogen *Pythium ultimum*. *J. Phytopathology* **134**: 324-328.
10. Schiewe, A. and K. Mendgen. 1992. Identification of antagonists for biological control of the post harvest pathogens *Pezizula malicorticis* and *Nectria galligena* on apple. *J. Phytopathol.* **134**: 229-237.
11. 김용수. 1992. 생물방제균 *Bacillus subtilis* YB70이 생산하는 항진균성 항생물질 및 유전적 육종. 영남대학교 응용미생물학과 석사학위논문.
12. Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe and J. G. Holt. 1984. *Bergey's manual of Systematic bacteriology*, Vol. 2, Pp 1104-1207., Williams and Wilkins Press, New York.
13. Smibert, R. M. and N. R. Krieg. 1991. Phenotypic characterization, Pp 409-443. In Philipp Gerhardt *et al*(ed.), *Methods for General and Molecular Bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
14. Bazzalo, M. E., E. M. Heber and M. A. Delperomatinez. 1985. Phenolics compounds in stems of sunflower plants inoculated with *Sclerotinia sclerotiorum* and inhibitory effect on the fungus. *Phytopathology* **112**: 322-332.
15. Wells, H. D. 1988. *Trichoderma* as a biocontrol agent, Pp 71-82. In K. G. Kukerji and K. L. Garg (ed.), *Biocontrol of Plant Diseases*, Vol 1. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
16. Lim, H. S., Y. S. Kim and S. D. Kim. 1991. *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 genetic transformation and antifungal mechanism against *Fusarium solani*, an agent of plant root rot. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 510-516.
17. Zuber, P., M. M. Nakano and M. A. Marahiel. 1993. Peptide antibiotics, Pp 897-916. In A. L. Sonenshein *et al* (ed.), *Bacillus subtilis and Other Gram-Positive Bacteria*, American Society for Microbiology, Washington, D.C.

(Received 22 June 1997)

깊이에 따른 토양 방선균의 속 다양성 분포

김판경 · 권오성 · 임채영 · 박동진 · 김창진*

한국과학기술연구원 생명공학연구소

Genus Distribution of Soil Actinomycetes on Different Depth. Pan-Kyung Kim, Oh-Sung Kwon, Chae-Young Lim, Dong-Jin Park and Chang-Jin Kim* Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology, KIST, Taejeon 305-600, Korea. - A total 656 actinomycete strains were isolated from sixty soil samples collected at Chungnam province. The samples were randomly selected from five different soil types (paddy field, field, forest, grassland, and riverside) and three zones of different depths (surface, 10 cm, and 50cm deep). All of these isolates were identified to the level of genus based on morphological and physiological characteristics. As the results, 223, 242, and 191 strains were isolated from soil samples of surface, 10 cm and 50 cm deep, respectively. According to the soil depth, Nocardioforms, *Streptosporangium*, and *Nocardiosis* were dominant at surface, *Streptomyces* at surface and 10 cm deep, while *Micromonospora* and *Microbispora* were somewhat dominant at both 10 cm and 50 cm deep.

방선균은 의약, 농약, 식품산업 분야에 있어서 항생제, 항암제, 제초제, 살충제, 색소, 보존제등 수많은 생리활성 물질을 탐색하기 위한 재료로서 많이 이용되고 있다(1). 토양 시료를 전처리하여 방선균을 선택적으로 분리하고자 하는 연구로서는 저온 또는 고온에서 건열 또는 습열 처리하는 방법(2-4)이 있는데 이것은 포자 상태로 존재하는 방선균의 생육 특성을 이용한 것이다. 즉 시료를 열처리 하므로써 다른 미생물의 생육을 저해하고 방선균 포자의 발아를 촉진 시키는 것이다. 그 밖에 phenol, yeast extract, sodium dodesyl sulfate 등을 사용하여 화학적으로 전처리하는 분리 방법도 많이 보고되고 있다(5-7).

균 분리원에 따른 방선균의 분포에 관한 연구로서는 주로 토양 환경이나 특성에 관한 것이 많은데, 저자들도 국내에서의 여러 토양 특성과 환경에 따른 방선균 분포를 연구하여 발표한 바 있다(8-10). 한편 Woodruff(11)에 의하면 동일 지역 또는 동일 지점의 토양이라 하더라도 계절 변화와 같은 환경 요인에 따라서 큰 차이를 나타낼 뿐만 아니라 식물의 근권 토양과 비근권 토양의 차이도 현저하다고 하였다.

방선균의 수직적 분포에 관한 연구로서 Woodruff(11)에 따르면 방선균 종의 분포에 있어서는 수직적 차이가 수평적 차이보다 크다고 하였으며, 동일 지점의 지하 40 m까지 각 깊이별로 연구한 Takahashi(12)등에 의하면 방선균은 토양의 표층 부위에 대부분이 존재 하지만 수직적으로도 다양하게 분포하여 다른 깊이의 부위에서는

발견되지 않는 각 깊이별로 고유한 균주가 많이 존재한다고 하였다.

따라서 본 연구에서는 국내의 대표적 토양 환경인 논, 밭, 초지, 산림, 강가 토양에 있어서 토양 깊이별로 시료를 공시하고 방선균을 순수 분리하여 상호 비교해 봄으로써 토양 깊이에 따른 방선균의 속 다양성을 조사해 보고자 하였다. 이렇게 하므로써 국내 부존 토양 방선균의 속 다양성 분포에 관한 이해가 증진될 것이며 보다 더 다양한 방선균을 분리, 이용하게 되어 앞으로 방선균 유래의 유용한 생리활성물질이 더 많이 탐색될 것이다.

토양 시료, 방선균 분리 및 속 동정

실험에 사용한 방선균 분리용 토양 시료는 1994년 10월 중순에 대전과 청원군 지역의 산림, 초지, 밭, 논, 강가등 5가지 토양 환경별로 각각 4지점을 공시하고 각 지점의 표층, 지하 10 cm, 지하 50 cm의 3가지 깊이로 대별하여 채취하였다.

방선균 분리용 배지로서는 Bennet's agar 배지 (13) (glucose 10.0 g, yeast extract 1.0 g, bacto-peptone 2.0 g, beef extarct 1.0 g, 증류수 1 l)과 humic acid vitamin agar 배지(14) (humic acid 1.0 g, Na₂HPO₄ 0.5 g, KCl 1.71 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.05 g, FeSO₄ · 7H₂O 0.01 g, CaCO₃ 0.02 g, 증류수 1 l)를 사용하였는데 각각의 배지에 vitamin 용액(0.5 mg each of thiamine-HCl, riboflavin, niacin, pyridoxin-HCl, inositol, Ca-pantothenatë, p-aminobenzoic acid, and 0.25 mg of biotin)과 항생제 (cycloheximide 50 mg, nalidixic acid 20 mg)를 첨가하고 pH는 7.0으로 조절하여 방선균을 분리 하였으며 방선

*Corresponding author

Tel. 82-42-860-4332, Fax. 82-42-860-4595

E-mail: changjin@kribb4680.kribb.re.kr

Key words: Actinomycetes, Depth, Isolation, Distribution, Diversity

균 보존용 배지로서는 Bennet's agar 배지를 사용하였다.

방선균의 분리를 위해서는 멸균수 10 ml에 각 토양 시료 1 g 씩을 넣고 교반한 다음 순차적으로 10⁻³~10⁻⁴으로 희석하여 희석액 0.1 ml 씩을 방선균 분리 배지에 도말하여 28℃에서 1주 및 2주간 배양하였다. 각 배지상에 나타난 방선균을 Bennet's agar 배지 상에 옮기고 다시 일정기간 배양한 후 형태적 특징을 상호 비교하여 서로 상이한 균주를 분리하였다(15, 16).

순수 분리된 각 균주의 형태 및 화학적 특성을 조사하여 속명을 동정하였다. 즉 육안 및 광학 현미경(Nikon사, Labophot-2, long working distance 렌즈 장착)으로 기균사의 색상, 배면 색상, 수용성 색소의 생성 여부와 포자사슬등 분리된 방선균의 형태학적 특징(17)과 균주의 세포벽 성분인 diaminopimelic acid(DAP)의 형태를 조사하여 방선균 속 동정에 활용하였다. DAP 분석을 위해서는 Lechevalier(18)의 방법을 사용하였는데 충분히 생육된 일정량의 균체를 6N HCl로 가수분해한 후 thin layer chromatography(cellulose TLC, Merck 5715, 전개용매는 methanol-water-6NHCl-pyridine=80:26:4:10)상에서 LL-DAP 혹은 meso-DAP 형태인지를 확인하였다. 필요한 경우에는 Bergey's manual(19)과 ISP방법(20)에 준하여 기타의 생화학적 특징들을 조사하였고 이러한 결과를 종합하여 각 균주의 속명을 결정하였다. 그러나 menaquinone, phospholipid, mycolic acid등의 분석에 의해서 동정이 가능한 *Nocardia*, *Amycolata*, *Amycolatopsis*, *Pseudoamycolata*는 구별하지 않고 *Nocardia*군으로 종합하여 분류하였고 menaquinone, phospholipid등의 분석에 의해 동정이 가능한 *Nocardioopsis*와 *Saccharothrix*는 구별하지 않고 *Nocardioopsis*로 분류하였다. 그리고 본 실험에서와 같은 몇가지 방법에 의해 속명을 동정하기 어려운 균주들은 기타 균주로서 정리하였다.

토양 깊이에 따른 방선균의 속 다양성

분리된 방선균을 동정한 결과를 종합하고 토양 깊이와 방선균 속과의 관계를 비교하였다. 그 결과를 토양의 깊이에 따른 방선균의 속 다양성 분포 특성으로서 Table 1에

나타내었다. 전체적으로 공시된 60점의 토양 시료로부터 총 656주의 방선균이 분리되었는데, 각 토양 깊이별로 볼 때 지표에서는 223주, 지하 10 cm에서는 242주, 지하 50 cm에서는 191주가 분리되므로써 지하 50 cm에 비하여 지표층과 지하 10 cm의 토양에서 많은 방선균이 분리되었으며 특히 지하 10 cm에서 가장 많이 분리되었다. Takahashi(12)에 의하면 대부분의 방선균은 지하 1 m 이내에 존재하며 특히 지표면으로부터 10 cm 이내에 전체 방선균종의 80% 이상이 존재한다고 하였는데 본 연구결과에서는 지표층과 지하 10 cm 부위 뿐만 아니라 지하 50 cm의 토양 시료에서도 비교적 다양한 방선균이 분리되었다.

분리된 방선균을 각 속별로 비교해보면 분리된 총 656주 중에서 *Streptomyces*속이 전체 분리된 균주의 69.4%에 해당하는 455주, *Micromonospora*속이 11.4%에 해당하는 75주, *Nocardioform*이 7.0%에 해당하는 46주, *Streptosporangium*속이 1.8%에 해당하는 12주, *Actinomadura*속이 0.9%에 해당하는 6주, *Nocardioopsis*속과 *Microbispora*속이 각각 0.8%에 해당하는 5주씩, 기타 속이 7.9%에 해당하는 52주로 나타나 깊이에 크게 영향을 받지 않는 양상을 보였다. 그러나 깊이별로는 *Micromonospora*, *Microbispora*속의 경우 표층보다 지하 10 cm와 50 cm 토양에서 많이 분리되었고, *Streptomyces*속의 경우 지하 10 cm의 토양에서 가장 많이 분리되었다 그리고 *Nocardioform*, *Streptosporangium*, *Nocardioopsis*속은 표층에서 많이 분리되는 경향이였으며 기타 균주는 지하 50 cm 부위에서 상대적으로 많이 분리되었다. 이상의 결과를 모두 종합해 볼 때, 일반적으로 방선균 분리용 토양 시료의 채취에 주로 이용하고 있는 표층 뿐만 아니라 지하 50 cm 등 지하부의 토양을 이용하여 방선균을 분리하고 이를 이용하는 것이 수직적으로 다양하게 분포하는 부존 미생물 자원의 활용면에서 중요하리라 판단된다.

분리된 *Streptomyces*속 방선균의 형태적 특징

방선균 가운데 중요한 genus로써 각종 생리활성물질을 가장 많이 생산하고 있다고 알려진 *Streptomyces*속은 *retiflexibles*, *rectinaculiaperti*, *spirales*와 같이 포자연쇄

Table 1. Isolated actinomycetes on depth

Depth	Genus								Total
	<i>Stm</i>	<i>Mim</i>	<i>Noc</i>	<i>Sts</i>	<i>Acm</i>	<i>Ncp</i>	<i>Mib</i>	Oth	
Surface (%)	148 (66.4)	22 (9.9)	22 (9.9)	6 (2.7)	2 (0.9)	3 (1.3)	1 (0.4)	19 (8.5)	223
10 cm (%)	178 (73.6)	27 (11.2)	14 (5.8)	3 (1.3)	2 (0.8)	2 (0.8)	2 (0.8)	14 (5.8)	242
50 cm (%)	129 (67.5)	26 (13.6)	10 (5.2)	3 (1.6)	2 (1.0)	0 (0)	2 (1.0)	19 (9.9)	191
Total (%)	455 (69.4)	75 (11.4)	46 (7.0)	12 (1.8)	6 (0.9)	5 (0.8)	5 (0.8)	52 (7.9)	656

**Stm*; *Streptomyces*, *Mim*; *Micromonospora*, *Noc*; *Nocardioforms*, *Sts*; *Streptosporangium*, *Acm*; *Actinomadura*, *Ncp*; *Nocardioopsis*, *Mib*; *Microbispora*, *Oth*; other unidentified actinomycetes.

Table 2. Characteristics of spore chain types of isolated streptomycete strains

Depth	Spore chain type			Total
	<i>Rectiflexibiles</i>	<i>Retinaculiaperti</i>	<i>Spirales</i>	
Surface (%)	68 (45.9)	23 (15.5)	57 (38.5)	148
10 cm (%)	101 (56.7)	20 (11.2)	57 (32.0)	178
50 cm (%)	83 (64.3)	11 (8.5)	35 (27.1)	129
Total (%)	252 (55.4)	54 (11.9)	149 (32.7)	455

Table 3. Characteristics of aerial mass colors of isolated streptomycete strains

Depth	Aerial mass color					Total
	Gray	Red	Yellow	Green	White	
Surface (%)	105 (70.9)	5 (3.4)	9 (6.1)	4 (2.7)	25 (16.9)	148
10 cm (%)	108 (60.7)	7 (3.9)	17 (9.6)	4 (2.2)	42 (23.6)	178
50 cm (%)	71 (55.0)	5 (3.9)	14 (10.9)	10 (7.8)	29 (22.5)	129
Total (%)	284 (62.4)	17 (3.7)	40 (8.8)	18 (4.0)	96 (21.1)	455

형태 및 기균사의 색상이 다양하여 이것이 *Streptomyces* 속의 종을 결정하는데 중요하다. 본 연구에서도 분리된 방선균중 *Streptomyces*속 균주의 형태적 특징으로서 포자연쇄의 형태와 기균사의 색상을 토양 깊이별로 비교하여 Table 2와 Table 3에 각각 나타내었다.

전체적으로 포자연쇄의 형태에 있어서는 *rectiflexibiles* 형이 55.4%로 가장 많았으며, *retinaculiaperti* 형이 11.9%, *spirales* 형이 32.7% 이었다. 각 포자연쇄의 형태를 토양 깊이별로 비교해 보면 일반적으로 분리 빈도가 높은 것으로 알려진 *rectiflexibiles* 형은 토양 깊이가 깊어 질수록 분리 빈도가 높아지는 반면에 *retinaculiaperti*와 *spirales* 형은 토양 깊이가 깊어 질수록 분리 빈도가 낮아지는 경향이였다.

기균사의 색상에 있어서는 전체적으로 회색 계통이 62.4%로 가장 많이 분리되었다. 토양 깊이별로 비교해 보면 회색 계통은 표층 부위에서 분리 빈도가 높았으며 노랑, 녹색, 흰색 계통은 깊이가 깊어 질수록 높아지는 경향이였다. 통상적인 방법으로 방선균을 분리할 때 포자연쇄의 형태로는 *rectiflexibiles* 형이, 그리고 기균사의 색상으로는 회색 계통이 많이 분리된다. *Streptomyces*속 균주의 형태적 특징을 조사한 본 연구 결과를 미루어보면 다양한 *Streptomyces*속 균주를 분리하기 위해서도 표층뿐만 아니라 지하 50 cm 등 어느 정도 지하부의 토양을 이용하는 것이 유용할 것으로 보인다.

참고문헌

1. Tanaka, Y. and S. Omura. 1990. Metabolism and products of actinomycetes -an introduction. *Actinomycetol.* 4: 13-14.
2. Williams, S. T., M. Shamemullah, E. T. Watson and C. I. Mayfield. 1972. Studies on the ecology of actinomycetes

in soil. VI. The influence of moisture tension on growth and survival. *Soil Biol. Biochem.* 4: 215-225.

3. Athalye, M., J. Lacey and M. Goodfellow. 1981. Selective isolation and enumeration of actinomycetes using rifampicin. *J. Appl. Bacteriol.* 51: 289-297.
4. 김창진, 이강현, 권오성, 아끼라 시마즈, 유익동. 1994. 토양시료의 열처리에 의한 방선균의 선택적 분리. *산업미생물학회지* 22: 222-225.
5. Nonomura, H. 1988. Isolation, taxonomy and ecology of soil actinomycetes. *Actinomycetol.* 3: 45-54.
6. Nonomura, H. and M. Hayakawa. 1988. New methods for the selective isolation of soil actinomycetes. Pp.288-293. In: Y. Okami, T. Beppu and H. Ogawara(ed.), *Biology of Actinomycetes '88*. Japan Scientific Societies Press, Tokyo.
7. Hayakawa, M. 1990. Selective isolation methods and distribution of soil actinomycetes. *Actinomycetol.* 4: 103-112.
8. 김창진, 이강현, 아끼라 시마즈, 권오성, 박동진. 1995. 토양 특성에 따른 희소방선균의 분리. *한국산업미생물학회지* 23: 36-42.
9. 권오성, 박동진, 이찬용, 김창진. 1996. 제주도 토양 방선균의 속 다양성 분포. *산업미생물학회지* 24: 399-403.
10. 임채영, 권오성, 김판경, 박동진, 이동희, 김창진. 1996. 자연 동굴 토양 방선균의 속 다양성 분포. *한국산업미생물학회지* 24: 534-539.
11. Woodruff H. B. 1989. Fifty year's experience with actinomycete ecology. *J. Actinomycetol.* 3: 79-88.
12. Takahashi, Y., Y. Seki, Y. Tanaka and R. Diwa. 1990. Vertical distribution of microorganisms in soils. *Actinomycetol.* 4: 1-6.
13. Ronald, M. Atlas. 1993. Handbook of Microbiological Media. Pp.126. CRC press.
14. Hayakawa, M. and H. Nonomura. 1987. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil Actinomycetes. *J. Ferment. Technol.* 65: 501-509.
15. Rowbotham, T. J. and T. Cross. 1977. Ecology of *Rhodococcus coprophilus* and associated actinomycetes in fresh water and agricultural habitats. *J. Gen. Microbiol.* 100: 231-240.
16. 고영희, 민태익, 오태광, 윤병대, 이강현. 1991. 생체활성물질 탐색을 위한 미생물의 분리에 관한 연구(1). 과학기술처 연구보고서(BSG7110-295-3), Pp. 29-30. 한국과학기술연구원, 유전공학연구소.
17. 김창진. 1995. 계통분류학적 미생물탐색 기본기술 개발. 과학기술처 연구보고서 (BSN81550-738-3), Pp. 24-25.
18. Lechevalier, M. P and H. Lechevalier. 1970. Chemical composition as a criterion the classification of aerobic actinomycetes species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 16: 313-340.
19. Lechevalier, H. A. 1989. A practical guide to generic identification, Pp. 2344-2347. In S. T. Williams, M. E. Sharpe and J. G. Holt(ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 4, Williams & Wilkins, Baltimore.
20. Shirling, E. B. and D. Gottlieb. 1966. Methods for characterization of *Sreptomycetes species*. *Int. J. Syst. Bactriol.* 16: 313-340.

(Received 14 April 1997)