

## 생물농약개발을 위한 활성미생물의 분리동정에 관한 연구

이장훈<sup>†</sup> · 강병곤 · 권혁구 · 정준오 · 남윤구  
호서대학교 환경안전공학부 환경공학과

### Isolation and Identification of Activated Microorganisms for Biocide Development

Jang Hoon Lee<sup>†</sup> · Byeong Kon Kang · Hyuk Ku Kwon · Joon Oh Jung · Youn Ku Nam

College of Environment & Safety Engineering, Hoseo University, Asan 336-795, Korea

(Received December 28, 2004; Accepted March 7, 2005)

#### ABSTRACT

An anti-fungal material produced by *actinomycetes* was isolated from domestic soil. This *actinomycetes* was identified as *Streptomyces albogriseus* by 16S rDNA sequence. YEME (yeast extract 4 g, malt extract 10 g, glucose 4 g, D.W 1l, pH 7.00.2) medium was used for production of anti-fungal materials. *S. albogriseus* was cultured in a shaking incubator for 2 weeks at 150 rpm and 25°C. An anti-fungal material produced by *S. albogriseus* was identified at 340 nm by uv/vis- spectrometer and it showed powerful anti-fungal activity. This is the first report that secondary metabolite produced by *S. albogriseus* showed an activity against phytopathogenic fungi such as *Collectrichum coccodes*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium cucumerinum*, *Didymella bryoniae*.

**Keywords:** biocide, isolation, identification, *actinomycetes*, Antifungal activity

#### I. 서 론

현재의 농업은 기하급수적으로 늘어나는 인구에 따른 식량난의 해결이라는 시급한 과제에 직면해 있다. 따라서 농작물을 안전하게 잘 키우는 일이 중요하며, 농작물의 재배와 성장 중에 피해를 주는 병해, 충해 및 잡초 등을 제거해야만 안정적이고 최대한 많은 수확 생산량을 기대할 수 있다. 이 수확 생산량을 증대시키는 해결책의 하나로 화학농약의 사용량을 증대시켜 왔다.

이러한 무차별하고 과도한 화학농약의 사용으로 인한 독성, 환경오염 및 자연생태계의 악영향, 약제에 대한 내성 및 저항성 출현 등의 부작용은 토양과 하천은 물론 지하수까지 오염시켜 환경생태계 파괴라는 결과를 초래하고 있으며,<sup>1,3)</sup> 농산물의 잔류독성과 농약 중독은 인간의 건강에도 상당한 악영향을 직접적으로 미치고 있다.<sup>4,6)</sup> 따라서 이러한 화학농약의 극심한 피해를 줄이기 위한 일환으로 생물학적 방제에 대한 연구가 활발

히 진행되고 있다.<sup>7,8)</sup>

이 생물학적 방제는 자연에 존재하면서 생물체 자신인 미생물(곰팡이, 세균, 바이러스)이나 미생물이 생산하는 활성물질을 이용하는 것으로 나눌 수 있으며, 살균제, 살충제, 제초제, 생장조절제, 상해방지제 등으로 활용되며 생화학 농약, 미생물 농약, 기타 생생적 방제제로 구분되어 천적 외에 사상균, 곤충 기생성 선충류, 미생물 활용 농약 등 모두 광의의 생물학적 방제 즉 생물농약 실용화 범위에 속한다. 이 생물학적 방제는 동물, 식물, 미생물 및 천연물에서 유래한 물질을 이용해 병해충을 방지하는 것으로 화학농약과 다르게 효과가 늦게 나타나고, 효과 있는 농약 한가지만으로 전체를 해결하려는 단순 방제가 아니라 농작물의 재배학적 특성과 병해충 발생 과정 등을 충분히 파악, 관찰한 다음 적용하는 종합방제 방법이다.

특히 방선균은 토양 속에 다양하게 존재하는 그람양성균으로 항생물질, 생리활성물질, 비타민, 다양한 생체 효소 등의 생산에 이용되는 중요한 산업 미생물이다.<sup>9)</sup> 따라서 본 연구에서는 저병해지역 경작지의 토양시료로부터 방선균을 분리하여 작물에 병해를 일으키는 곰팡이에 대한 항진균 효과를 조사하고자 하였다.

<sup>†</sup>Corresponding author : College of Environment & Safety Engineering, Hoseo University  
Tel: 82-41-540-5741, Fax: 82-41-540-5748  
E-mail : jhlee@office.hoseo.ac.kr

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 시료 채취

본 실험에서는 토양속에 광범위하게 분포되어 있는 것으로 알려진 길항성 방선균을 선별하기 위하여 충남 지역 20지점과 충북 10지점의 충청남북도 농경지대의 저병해 경작지 토양에서 300여점의 토양시료를 깊이 10 cm에서 채취하여 건조된 토양을 균원 시료로 본 실험에 이용하였으며 채취된 시료는 5°C 이하로 보관하면서 필요시 사용하였다.

### 2. 실험 방법

#### 1) 균의 분리 및 보존

충청남북도 30지점에서 채취한 300여점의 토양시료를 100°C에서 60분 동안 열처리 한 다음 1 g을 멸균 생리식염수 10 ml에 넣어 20분간 진탕 교반 하였다. 방선균 분리용 배지인 Bennett's agar, Bacto-Actinomycete Isolation agar(AIA) 배지에 도말한 후 25±1°C에서 2~3주간 배양하면서 나타난 사상형태의 방선균 집락을 분리하였다. 집락의 형태, 색 등 형태적 차이에 따라 분리하여 광학현미경상에서 전형적인 방선균 형태를 나타낸 23균주를 1차로 선별한 후 생화학적 특성을 조사하여 방선균으로 확인하였다. 균주의 보존에 사용된 고체배지 및 액체 배지는 ISP(International Streptomyces Project) 기준에 따라 ISP No. 2 배지인 yeast extract-malt extract를 사용하였다. 고체 배지의 경우 2% 한천(BDH, Co. U.K)을 첨가하여 만들었으며 배지는 121°C에서 15분간 고압증기 멸균하여 사용하였다. 이때 glucose는 따로 여과멸균하여 첨가하였다. 액체 배양은 한천을 제외한 YEME 배지를 1000 ml 삼각 플라스크에 300 ml를 넣고 진탕배양 하였다. 이때 조건은 150 rpm 30°C로 하였다. 순수 분리된 균주는 고체 한천배지에서 30°C로 7일간 배양한 다음 Tween 80 (Sigma) 0.1% 용액을 처리하여 포자를 수확하였다. 수확한 포자는 원심 침전(3000 rpm, 15 min)시킨 후 증류수로 세 번 세척한 다음 20% glycerol 용액에 현탁시킨 후 -20°C에서 보관하였으며 그 밖에는 사면배지에 계대 배양하였다.

#### 2) 전자 현미경을 이용한 형태 관찰

분리균주를 YEME 배지에 도말하여 28°C에서 14일간 배양한 후 8% glutaraldehyde 용액으로 1일 고정시키고 포자 형성이 잘된 부분을 채취하여 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>가 들어 있는 밀폐용기에 넣어 -20°C에서 3일간 건조하고 알곤 가스 chamber 속에서 gold coating한 다음 주사전자현미경으로 포자사슬을 관찰하였다.

#### 3) 항진균성 검정

분리된 방선균의 이차대사산물이 작물병원성 진균에 대한 생장 억제효과를 갖는지를 검사하기 위해 paper disc method에 따라 Potato Dextrose agar plate에 가지에 검은점뿌리썩음병(Black dot root rot)과 고추 탄저병(Anthracnose)의 원인균 *Collectrichum coccodes* KACC40227와 감자, 고구마, 인삼, 화훼등 잿빛곰팡이병(Gray mold) 원인균의 *Botrytis cinerea* KACC40573와 오이, 참외, 호박 등에 검은별무늬병(Scab)의 원인균 *Cladosporium cucumerinum* KACC40576와 수박(Gummy stem rot), 오이, 참외, 호박(Gummy stem blight) 등의 작물에 당굴마름병(Black rot)을 발생시키는 작물 병원성 진균 *Didymella bryoniae* KACC40900와 일반적 병원성 진균류인 *Aspergillus niger* ATCC 31656, *Fusarium solani* KACC 40384, *Paecilomyces* sp., *Trichophyton metagrophytes* ATCC 9129을 접종하고 plate의 중앙에 25배로 농축시킨 배양액을 적신 paper disc를 놓고 25°C에서 5~7일간 배양하였다. 이때 관찰되는 생육저지환의 유무와 크기를 측정하여 활성을 조사하여 항진균성을 검사하였다.

#### 4) 항진균성 항균물질의 특성조사

##### (1) pH에 의한 특성 조사

길항방선균이 생성하는 항진균성 항균물질의 pH에 따른 안정성을 검토하기 위하여 방선균 배양액 1ml를 ethyl acetate로 추출하여 3차 증류수에 녹여 1N HCl과 1N NaOH로 pH1~pH13까지 각각 조정된 다음 4°C에서 17시간 동안 전처리 후 다시 pH7로 조정하여 *B. cineria*의 포자를 접종한 45 ml의 PDB 배지에 5 ml씩 첨가하여 30°C에서 2일간 진탕배양 하였으며, 이를 미리 건조시켜 중량을 측정한 Whatman No2 여과지로 배양된 병원성진균을 여과하여 80°C에서 건조 후 증가된 중량을 측정하는 생육균체량 측정법으로 pH에 따른 길항활성의 변화를 검증하였다.

##### (2) 온도에 의한 특성 조사

온도에 대한 안정성은 각각 40, 60, 80, 100, 121°C 온도에서 30분간 처리한 후 항진균성 활성감소를 생육균체량 측정법으로 조사하였다.

##### (3) 배양시간에 따른 항균물질 생산성 조사

분리된 균주의 배양시간에 따른 항진균성 항균물질의 최적생산 조건을 조사하기 위해 종 배양한 균주의 1%를 YEME 배지에 접종하여 2시간, 4시간, 6시간, 8시간, 10시간, 12시간, 14시간, 16시간의 배양시간에 따라 병원성균에 대한 저해물질의 생산에 따른 변화를 조사하였다.

##### 5) 분리된 균주의 항진균성 길항기작 확인

Cellulase 생산성 확인은 Detecting Cellulolytic Activity of Bacteria(DCAB) 배지(Tabl. 9.)에 균을 접종하여 30°C에서 3일 배양한 다음 0.1% congo red를 배양 배지 위에 부어 30분 동안 처리한 후 버리고, 다시 1.0M NaCl을 배양배지 위에 부어 15분간 방치하면서 colony 주위에 변색 환(halo)형성 유무를 확인하였다.<sup>10)</sup>

Chitinase 생산성 확인은 chitin-minimal 배지를 사용하여 길항균과 대조균을 접종하여 30°C에서 3일 배양 후 chitin 분해환의 유무를 확인하였다.<sup>11)</sup>

Siderophore 생산성 확인은 chrome azurol S(CAS) blue agar 배지에 길항균을 대조균과 접종하여 30°C에서 3일 배양한 다음 철이 제거되면서 균주 위에 형성되는 오렌지색의 환(halo)을 확인하였다.<sup>12)</sup>

항생물질 생산성 확인은 길항균을 King's broth에서 3일 동안 진탕 배양한 다음 10,000×g에서 15분간 원심분리 후 회수한 상등액을 Amicon Centriprep 10 (MW 10,000)을 이용하여 고분자와 저분자로 분리하고 또한 많은 항생물질이 열에 안정함을 감안하여 80°C에서 30분간 열처리 후 길항력을 측정하였다.<sup>11)</sup>

6) 균주의 동정

분리된 방선균중 활성이 높은 균주의 동정을 위해 다음과 같은 방법을 사용하였다.

(1) 16S rDNA 염기배열 분리

Genomic DNA는 Pitcher 등<sup>13)</sup>의 방법에 따라 추출했으며 YEME 배지에서 배양한 균체에 100 μl의 TE buffer(pH 8.0)와 lysozyme(50 mg/ml; Sigma)를 처리한 다음 37°C에서 overnight시켰다. 원심분리 후 상층액만 분리한 다음 chloroform-isoamyl alcohol(25:1, v/v)로 추출하였고 chromosomal DNA는 isopropanol로 침전시킨 후 70% ethanol(v/v)로 세척한 다음 진공 건조시켰다. 이 DNA 시료를 90 μl의 TE buffer(pH 8.0)와 10 μl의 RNase A(10 mg/ml; Sigma)를 첨가한 후 37°C에서 2시간 동안 반응시키고 phenol/chloroform을 처리하여 추출한 뒤 0.8M lithium chloride가 포함된 ethanol을 3배 용량으로 첨가하여 침전시켰다. 70% ethanol로 세척하고 건조시킨 다음 16S ribosomal DNA sequencing에 사용하였다.

(2) 16S ribosomal DNA sequencing

분리 균주의 16S ribosomal DNA sequencing은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 본 실험 균주의 chromosomal DNA를 분리한 다음 16S rRNA sequencing에 사용하는 universal한 primer인 27F(5'-AGAGTTTGTATCATGGCTCAG-3')와 1492R(5'-GGATCCTTGTACGACTT-3') primer를 사용하여 94°C에서

1분간 denaturation, 60°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분 30초 동안 polymerization시키는 조건에서 PCR로 증폭하였다. 증폭된 PCR 결과물을 0.8% agarose gel electrophoresis를 수행한 후 약 1400 bp의 16S ribosomal DNA를 분리 정제하여 ABI PRISM 3700 DNA Analyzer를 이용하여 염기서열을 분석하였다. 그 결과는 BLASTN 프로그램을 이용하여 GENE BANK 와 RDP(RNA database project)의 ribosomal RNA sequencing과 비교하여 동정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 활성미생물의 분리

충청남북도에서 채취한 시료로부터 미생물을 분리한 결과 Actinomyces 23주가 확인되었다.

분리된 균주 중 길항성 방선균을 확인하기 위해 액체 배지에 배양한 후 항진균 활성물질의 생성을 유도하여 방선균을 선정한 결과 23주 중 3균주가 생리활성이 우수하였는데 이 균주를 Actino-H1, Actino-H2, Actino-H3으로 명명하였고, 생리활성을 확인한 결과가 Fig. 1 과 같았으며 그중 Actino-H1이 가장 생리활성이 우수하여 본 연구의 활성미생물로 사용하였다.

2. 항균물질 생산균주의 형태적 특성

식물병원성 진균에 대한 항진균 효과가 가장 좋은 항생물질을 생산하는 ActinoH1 균주를 Bergey's manual 에 준하여 동정한 결과는 Table 1과 같았다. 가장 활성이 강한 방선균 Actino-H1의 YEME 배지에서 25°C

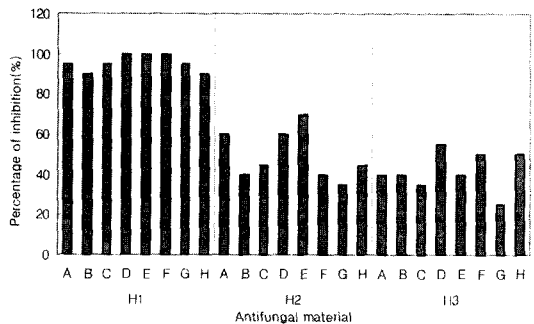
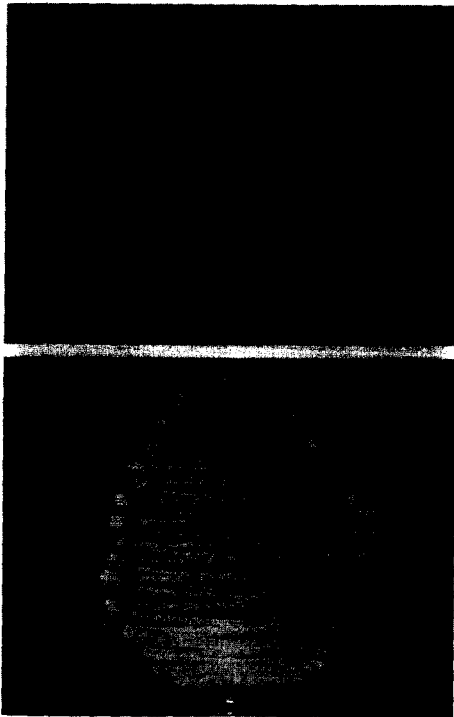


Fig. 1. Inhibition effects of antifungal materials by Actinomycetes isolated from soil samples.

- A: Collectrichum coccodes      B: Botrytis cinerea
  - C: Cladosporium cucumerinum      D: Didymella bryoniae
  - E: Aspergillus niger      F: Fusarium solani
  - G: Paecilomyces sp.      H: Trichophyton metagrophytes
- H1, H2, H3: Antifungalmaterial produced by Actinomycetes

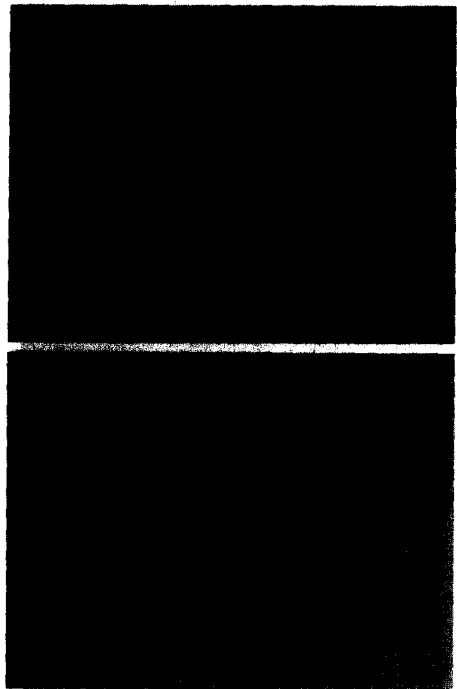
**Table 1.** Diagnostic characteristics of the genera *Streptomyces*

Characteristics	<i>Streptomyces</i>
Colony size	Discrete
Substrate mycelium	+
Spores	+
Sporangium	-
Motile spores	-
Aerial mycelium	+
Chains of arthrospores	+
Arthrospores in verticils	-
Spore surface spiny	+
Motile spores	-
Sugars in cell hydrolysates :	
Arabinose, galactose, xylose	-

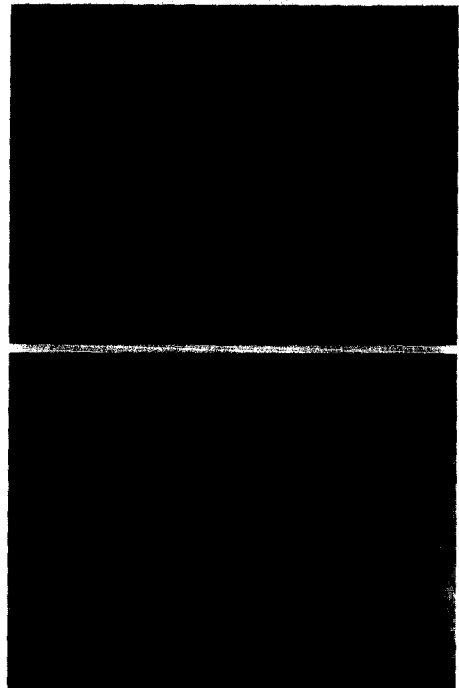


**Fig. 2.** Colony morphology of Actino-H1 isolated in soil (YEME-medium, 25°C, 72 h).

에서 72시간 배양하여 형성된 집락의 형태를 Fig. 2와 같이 나타냈다. 또한 집락의 형태, 색 등 형태적 차이에 따라 분리하여 광학현미경상에서 전형적인 방선균 형태를 나타낸 균주를 광학현미경으로 관찰한 결과는 Fig. 3과 같았다. 관찰된 본 균주의 특성은 포자형태가 Smooth하고 포자 사슬이 Rectiflexibles하게 나타났으며, 방선균 내의 세포벽 성분인 diaminopimelic



**Fig. 3.** Photographs of Actino-H1 isolated in soil (YEME-medium, 25°C, 72 h, light microscope, 1000X).



**Fig. 4.** Scanning electron micrograph of isolated Actino-H1 (YEME-medium, 25°C, 1 week).

acid(DAP)의 구성성분은 LL-DAP로 구성되어 있음을 확인하였으며, 또한 Lechevalier에 의한 방법<sup>14)</sup>으로 세포내 당의 특징을 조사한 결과 *Streptomyces*속의 특징인 당이 C의 형태로 특이한 당을 확인할 수 없었다. 그러므로 *Streptomyces* sp.의 형태적 특성과 일치됨을

알 수 있었다. 또한 분리한 균주의 형태학적 특성을 조사하기 위해 방선균의 포자형성 및 형태 확인용 배지인 Inorganic salts starch agar 배지를 이용하여 5일 동안 28°C에서 배양시킨 후 주사형 전자현미경(SEM)으로 관찰한 결과 Fig. 4와 같은 형태로 나타났다.

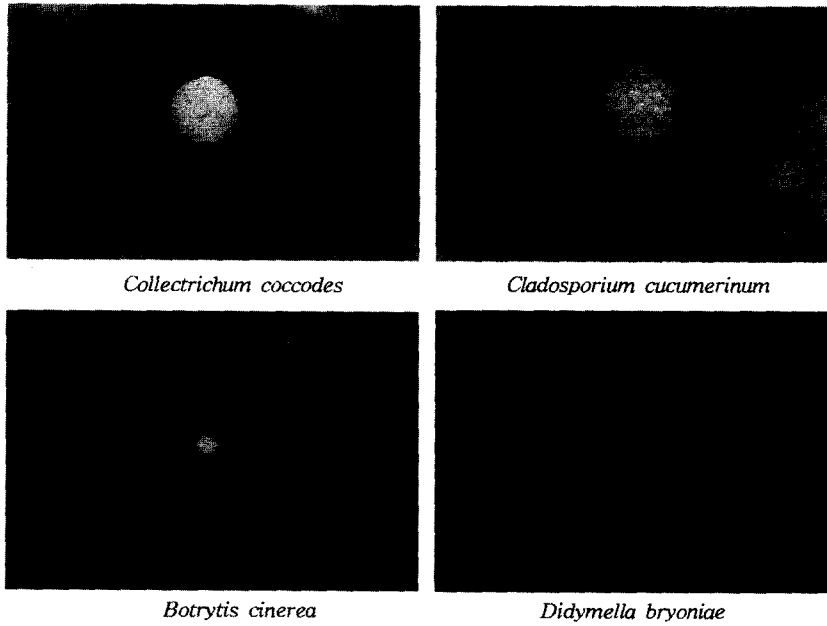


Fig. 5. Photographs of Anti-fungal test with Crude extract produced by Actino-H1 isolated from soil.

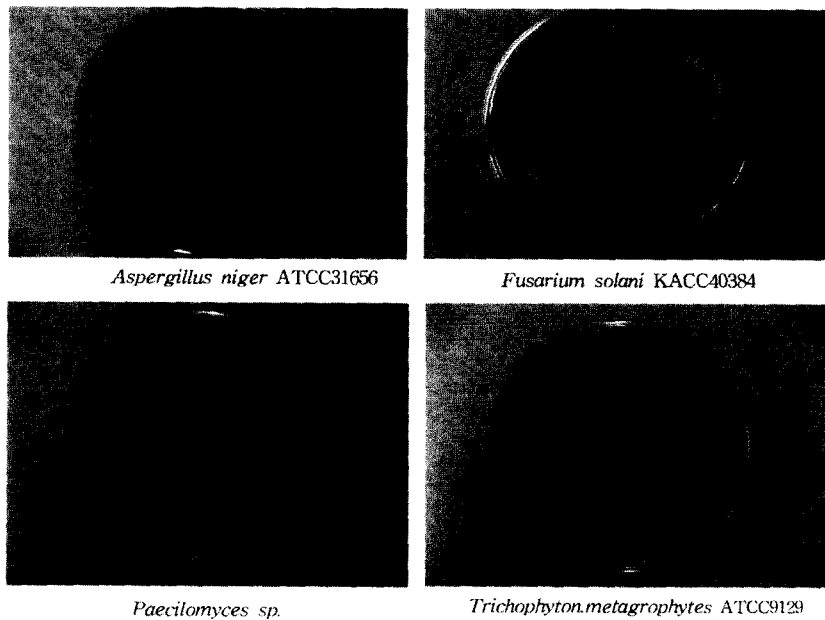


Fig. 6. Photographs of Anti-fungal test with Crude extract produced by Actino-H1 isolated from soil.

**3. 항진균성 물질 확인**

본 연구에서도 항진균물질중 *Streptomyces*에 대한 연구를 하여 항균력을 확인하고자 paper disc법을 이용하여 확인한 결과 Fig. 5과 6에서와 같이 disc 주변에는 병원성 진균들이 성장하지 않도록 항균작용을 나타낸 것을 관찰할 수 있었다.

분리된 방선균 중 Actino-H1, Actino-H2, Actino-H3의 이차대사산물을 이용하여 작물 병원성 진균인 *Collectrichum coccodes* KACC 40227, *Botrytis cinerea* KACC 40573, *Cladosporium cucumerinum* KACC 40576, *Didymella bryoniae* KACC 40900에 대한 항균력을 확인한 결과 Actino-H1이 항진균력이 매우 우수한 것으로 나타났다(Fig. 5).

또한 Actino-H1, Actino-H2, Actino-H3의 이차대사산물이 일반적 병원성 진균류인 *Aspergillus niger* ATCC 31656, *Fusarium solani* KACC 40384, *Paecilomyces* sp. *Trichophyton. metagrophytes* ATCC 9129에도 항균력이 있는 것으로 조사 되었으며 가장 우수한 균주는 Actino-H1임을 다시 한번 확인할 수 있었다(Fig. 6).

**4. 항진균성 항균물질의 특성조사**

가. 항진균성 항균물질의 pH 안정성

ActinoH1이 생산하는 항진균성 항균물질을 1N HCl 과 1N NaOH 용액을 사용하여 pH 1~13로 조정하고 4v에서 17시간 동안 전처리한 다음 pH7.0으로 중화한 뒤 잔존한 항진균 활성을 생육균체량 측정법으로 조사한 결과는 Fig. 7과 같았다. 본 항균물질은 알칼리성 조건에서보다 상대적으로 산성 조건에서 매우 안정한 것으로 보아 산성화되어 있는 우리나라 토양에서 실제적 방제기작이 가능한 것으로 조사 되었다.

나. 항진균성 항균물질의 열 안정성

ActinoH1이 생산한 항진균성 항균물질을 40°C,

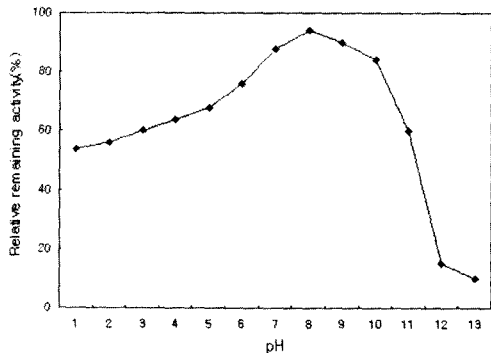


Fig. 7. pH stability of antifungal compound produced by Actino-H1.

Table 2. Thermal stability of the antifungal compound produced by Actino-H1

Temperature (°C)	Relative remaining inhibition (%)
40	95.4
60	90.2
80	55.1
100	0.0
121	0.0
None	100.0

60°C, 80°C, 100°C, 121°C에서 30분간 열처리한 후 *B. cineria*에 대한 항진균 활성을 생육균체량 측정법으로 조사한 결과를 Table 2와 같았다. 본 항균물질은 열에 비교적 안정하여 80°C까지 30분 동안 열처리하여도 50% 이상의 항균활성을 유지하는 것으로 조사되어 비교적 열에 안정한 성질이 있음을 확인할 수 있었다.

다. 배양시간에 따른 항균물질 생산성 조사

ActinoH1 균주의 배양시간에 따른 항진균성 항생물질의 최적생산 조건을 조사하기 위해 종 배양한 균주의 1%를 접종하여 배양시간에 따라 저해물질의 생산에 따른 변화를 조사하여 본 결과 Fig. 3과 같이 나타났다. ActinoH1 균주를 14일 이상 배양할 경우 항진균성 항생물질의 생산율이 90% 이상 증가하였다. 균체의 성장률은 10일 배양했을 때 균체의 건조중량이 가장 높게 나타났다. 균체의 성장률과 항생물질 생산과의 관계를 비교하였을 때 균체의 생장은 배양 후 10일에 가장 높은 증가를 보인 반면 항생물질 생산은 14일 배양했을 때 가장 높게 나타난 결과로 보아 균체의 성장 후 2차대사에 의해 항균물질이 생성된 것으로 생각된다.

**5. 항균물질 생산균주의 동정**

분리된 방선균 Actino-H1의 16S rDNA 의 염기서열은 Fig. 8과 같았다. 이를 BLASTN 프로그램을 이용하여 GENE BANK와 RDP(RNA database project)의 ribosomal RNA sequencing과 비교한 결과 Fig. 9에서와 같이 *Streptomyces albobrisesus*로 동정 되었다.

```

UTAGCATGGA AGTGGAAACGA TGAACCTCTT TGGGGAGGGG ATTACTGAGC AACGGGTGAG
TAACACCTGG GGAATCTGCC CTTCACCTCG GGACAAGGCC TGGAAACGGG GTCATAATACC
GGATATGACA CGGGGTGGCA TGATCTGGTT GTGGAAAGCT CCGGCGCTGA AGGATGAGCC
CGGGCCCTAT CAGCTTCTTG GTGAGGTAGT GGTTCACCAA GCGGAGCAGC GGTAGCGGGC
CTAGAGGGG GACCGGCCAC ACTGGGACTG AGACACGGCC CAGACTCTTA CGGGAAGGAC
CAGTGGGGAA TATTGCACAA TGGGGCAAG CTTGATGCAG CGAGCGCGCG TGAGGGATGA
CGGCTTGG GTTGTAAACC TCTTTCAGCA GGGAGAAGC GAGAGTGAC GTACCTTCAG
AAGAAGGCC GGC1AACTAC GTGCCAGCAC CGCGGTAAT ACCTAGGGCC GAGGCTTGT
CGGAATTAT TGGGGTAAA GAGCTGTGAG CGGCTTCTC ACCTGGGATG TGAAGGCCG
GGCTTAACC CGGGCTCTCG ATTGGATACG GCGAGGCTAG AGTTGGGTAG GGGAGATGGG
AATTCCTGGT GTAGCGGTGA AATGGCAGA TATCAGGAGG AACACCGGTG GCGAAGCGG
ATLCTGGGC CGATACTGAC GCTGAGGAGC GAAAGCGTGG GGAGCGAACA GGATTAGATA
CCCTGGTACT GCACGCGCTA AACCTGGGA ACTAGCTGTG GCGGACATTC CAGCTGTCTC
GTGCGGAGC TAACGCAATTA AGTTCGC
    
```

Fig. 8. The 16S rDNA sequence of isolated *S. albobrisesus*.

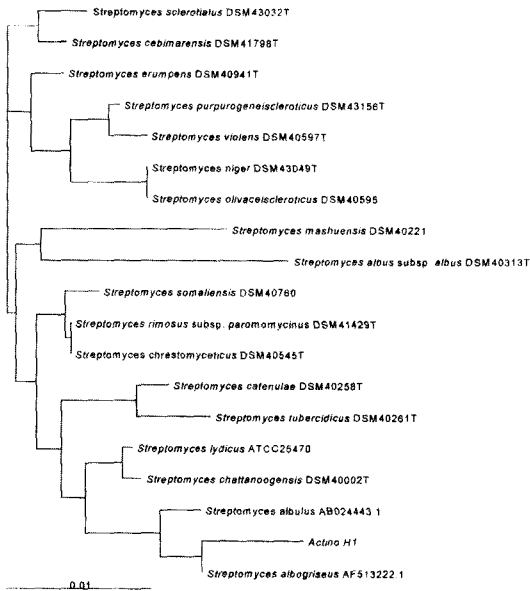


Fig. 9. Neighbor-joining tree based on 16S rDNA sequences.

6. 분리된 방선균주의 항진균성 길항기작

현재까지 보고된 생물방제균이 생산하는 항진균성 물질에 관한 연구는 *Streptomyces*<sup>15-17)</sup> *Pseudomonas*,<sup>11,18,19)</sup> *Bacillus*,<sup>12,20,21)</sup> *Clostridium*,<sup>22)</sup> *Micromonospora*,<sup>23)</sup> *Aspergillus*<sup>24)</sup> 등의 균주가 생산하는 Concanamycin, Bafilomycin, Azolomycin, Polyoxin, Chloroflavinon, Crisamicin 등의 항생물질이나 *Bacillus*,<sup>25)</sup> *Serratia*<sup>12)</sup> 균주가 생산하는 chitinase가 있으며 또한 *Pseudomonas*<sup>12,26)</sup> 균주가 생산하는 siderophore에 의한 항진균성 물질이 있다. 본 연구에서 분리된 균주의 방제기작이 길항미생물이 분비하는 chitinase와 같은 외막가수분해 효소들에 의해 식물병원균의 세포벽 성분을 분해시키는 용균 작용인지 혹은 철이온(Fe<sup>3+</sup>) 결합물질인 siderophore에 의해 식물병원균의 생육을 억제하는 경쟁적 길항작용인지 또는 항진균성 항생물질에 의해 식물병원균의 생육을 억제하는 길항작용인지를 조사하였다. 그 결과 외막가수분해효소인 chitinase, cellulase 및 siderophore 생산성은 없었다. 열처리한 배양상등액에 대한 cell mass test를 시행한 결과 항균능력이 우수한 것으로 보아 본 실험균주의 길항기작은 항생물질인 것으로 조사되었다.

V. 결 론

총 300여점의 토양시료로부터 집락의 형태, 색 등 외부의 형태에 따라 분리된 23주의 방선균으로부터 항진균 활성 물질을 생산하는 방선균을 선별하였다.

분리된 방선균의 16S rDNA의 염기서열을 조사한 결과 *S. albobrisesus*로 동정되었다. YEME 배지에 분리된 *S. albobrisesus*을 접종하여 72시간 배양 후 배양액으로부터 ethyl acetate로 추출한 항균물질을 SpectronicGenesys™2PC로 조사한 결과 340 nm의 흡광도를 가졌다. 분리된 항균물질은 작물 병원성 진균인 *Collectrichum coccodes* KACC 40227, *Botrytis cinerea* KACC 40573, *Cladosporium cucumerinum* KACC 40576, *Didymella bryoniae* KACC 40900에 대해 모두 뛰어난 항균효과를 나타내었으며 광범위항진균 또한 *Aspergillus niger* ATCC 31656, *Fusarium solani* KACC 40384, *Paecilomyces* sp. *Trichophyton. metagrophytes* ATCC 9129에도 항균력이 있는 것으로 조사 되었다. 항균물질의 pH안정성을 시험한 결과 알칼리성 조건보다 산성조건에서 매우 안정한 물질인 것으로 조사되어 열 안정성을 조사한 결과 80°C에서 30분간 열처리하여도 50% 이상의 항균활성을 유지하였다. Actino-H1 균주의 배양시간에 따른 항균물질 생산성을 조사한 결과 배양 10일에 균체의 성장률이 가장 높게 나타났으나 항균물질의 생산물은 배양 14일에 가장 우수하였다. 열처리한 배양 상등액에 대한 cell mass test로 Actino-H1의 항진균성 길항기작을 조사한 결과 Actino H1이 생산하는 항진균성 물질은 항생물질인 것으로 조사되었다.

감사의 글

이 논문은 2004학년도 호서대학교 학술연구조성비에 의한 연구 결과이며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 이규승 : 농업 생태계에 대한 잔류농약의 영향평가. 한국환경농학회지 16(1), 80-93, 1997.
2. 오윤근, 김정호 : 유기염소계 잔류농약이 제주도 연안 해양환경에 미치는 영향. 한국수질보전학회지, 13(3), 317-324, 1997.
3. 김승현, 이영득, 하원숙, 노희명 : 비포화 무기성 다공매질에서 잔류농약의 계면거동 및 지하수 오염현상 연구. 대한환경공학회지, 20(11), 1545-1553, 1998.
4. Shim, TH, Lee, TJ, Kim, KC, Ryu, MJ, Jung, EH and Lee, HK. : Survey on the contents of residual pesticide in the agricultural products on Kangweon-Do. Kor. J. Food Hygiene, 7(4), 149-156, 1992.
5. Lee, MG and Lee, SR. : Assessment of oncogenicity from pesticide residues in Korean food. Kor. J. Food Sci. Technol., 27(6), 871-877, 1995.
6. Tae Jeon Kim : Lignin을 分解하는 *Streptomyces* strains

- 에 의한 페놀화합물의 分解. 한국위생학회지, **26**(3), 86-91, 2000.
7. Siegel, M and Sisler, HD. : Antifungal compounds, *Interactions in Ecological System*. Marcel Dekker, Inc., New York, **2**, 277, 1977.
  8. 최종규, 손현석, 조경태 : B-시클로덱스트린(B-Cyclodextrin)의 결합 특성과 벤젠의 생물학적 분해에의 적용에 대한 연구. 한국환경위생학회지, **28**(5), 65-70, 2002.
  9. 김창진, 이강현, 아끼라 시마즈, 권오성, 박동진 : 토양 특성에 따른 다양한 희소방선균의 분리. 산업미생물학회지, **23**(1), 36-42, 1995.
  10. Suak Hwan Park, Moon Shik Zong : 抗生物質에 對한 *Actinobacillus actinomycetem-comitans*의 感受性 및 糖類添加가 細菌의 成長에 미치는 效果. 한국환경위생학회지, **16**(2), 127-133, 1990.
  11. Lee, D. S., Kim, H. K. and Park, M. Y. : Combination of colony fotation and congo red reaction for detecting intra- and extra- cellular cellulolytic activities. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **12**, 305-309, 1984.
  12. Lee, E. T. : Antifungal mechanisms and genetic development of antagonistic bacterium on the phytopathogenic fungi. Ph. D. Thesis. Yeungnam University. 1999.
  13. Pitcher, D. G., Saunders, N. A. and Owen, R. J. : Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett. Appl. Microbiol.*, **8**, 151-156, 1989.
  14. Lechevalier, H. A. and Lechevalier, M. P. : The chemotaxonomy of *actinomycetes*, pp.227-291. In A. Dietz and D. W. Thayer. (ed.), *Actinomycete taxonomy*, special publication 6. Socoety for Industrial microbiology, Arlington. 1980.
  15. Bae, J. Y., Kwon, H. J. and Suh, J. W. : Isolation structural determination of antifungal antibiotic from *Streptomyces hygroscopicus* MJM1004. *J. Kor. Soc. Agric. Chem. Biotechnol.*, **42**, 271-276, 1999.
  16. Lim, S. D., Yoon, S. K., Lee, M. S., Yoon, W. H. and Kim, C. H. : Isolation and identification of *Streptovorticillium* sp. NA-4803 producing antifungal substance. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 664-670, 1996.
  17. Suh, J. W., Lim, Y. H., Kim, S. H., Hyun, B. C., Kim, C. O., Yon, C. S., Lee, D. K., Kim, K. P., Jung, J. K. and Lee, C. H. : Biological properties and structural analysis of novel antifungal antibiotics Af-011A. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **21**, 564-569, 1993.
  18. Kim, H. R. : Antifungal antibiotics of antagonistic bacterium *Bacillus* sp. YH-16 against *Fusarium solani* causing plant root rot. MS. Thesis. Yeungnam University 1994.
  19. Lee, N. W., Kim, C. S., Do, J. H., Jung, I. C., Lee, H. W. and Lee, D. H. : Isolation and identification of *Bacillus* sp. LAM 97-44 producing antifungal antibiotics. *J. Kor. Soc. Agric. Chem. Biotechnol.*, **41**, 208-212, 1998.
  20. Kim, C. J., Lee, I. K., Yun, B. S. and Yoo, I. D. : Concanamycin B, active substance against *Phytophthora capsici* produced by *Streptomyces neyagawaensis* 38D10 Strain. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **21**, 322-328, 1993.
  21. Kim, S. U., Lee, S. Y., Kim, S. K., Son, K. H., Kim, Y. K., Moon, S. S. and Bok, S. H. : Isolation and characterization of antifungal compound produced by *Aspergillus candidus* F1484. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 574-578, 1996.
  22. Hong, S. H., Kim, M. J., Park, Y. B., Lee, J. K. and Ha, J. H. : Identification of the antibiotic producing *Clostridium* sp. KH-431 and purification of the antibiotic. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **21**, 41-46, 1993.
  23. Yeo, W. H., Yun, B. S., Whang, K. S., Lee, C. O. and Yu, S. H. : An isochromanquinone compound produced by *Micromonospora* sp. SA-264. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 321-326, 1996.
  24. Kim, S. S., Joo, G. J., Uhm, J. Y., Kim, Y. J. and Rhee, I. K. : Antifungal activity of *Bacillus* sp. SS279 and biocontrol of apple white rot fungus, *Botryosphaeria dothidea*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **25**, 527-536, 1997.
  25. Kim, K. Y. and Kim, S. D. : Biological control of *Pyricularia aryzae* blast spot with the antibiotic substances produced by *Bacillus* sp. KL-3. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **25**, 396-402, 1997.
  26. Lim, H. S. : Genetic development of siderophore-producing *Pseudomonas fluorescens* GL20 as a biological control agent. Ph. D. Thesis. Yeungnam University. 1997.