

최      종  
연구보고서

# 시설참외 병충해의 미생물학적 방제

Microbial Control of Pests in  
Oriental Melon

주 관 연구 기 관  
경 북 대 학 교

협 동 연구 기 관  
성 주 과 채 류 시 험 장

농 립 부



# 최 종 보 고 서

2000년도 농림기술개발사업에 의하여 완료한 **시설채외 병충해의 미생물학적 방제**에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

- 첨부 : 1. 최종보고서 10부  
2. 최종보고서 디스켓 1매

2000년 10월 일

주 관 연 구 기 관 : 경북대학교

총괄연구책임자 : 박 완 (인)

주관연구기관장 :

농 립 부 장 관 귀 하

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “시설참외 병충해의 미생물학적 방제” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2000년 10월 일

주관연구기관명 :	경	북	대	학	교
총괄연구책임자 :	박				완
연 구 원 :	홍		순		덕
연 구 원 :	진		익		렬
연 구 원 :	김		광		현
연 구 원 :	서		영		배
연 구 원 :	정		민		철
연 구 원 :	백		상		규
연 구 원 :	김		병		천
협동연구기관명 :	과	채	류	시	협
협동연구책임자 :	최		성		국
연 구 원 :	신		용		습
연 구 원 :	김		동		근
연 구 원 :	연		일		권

# 요 약 문

## I. 제 목 : 시설참외 병충해의 미생물학적 방제

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

소득 증가에 따른 식생활의 고급화 및 다양화로 식품 소비형태의 변화가 나타나고, 이러한 변화는 식량작물 생산 및 경지 이용에 큰 영향을 주고 있다. 작물별로 재배면적을 보면 식량작물은 지속적인 감소추세에 있는 반면 수익성이 높은 과채류등은 상대적으로 증가하는 경향을 보이고 있다.

과채류 재배농가의 증가와 함께 노지에 비해 생산시기의 확대와 생산성 증가, 기후환경에 의한 피해 방지 등의 장점을 가지고 있는 시설재배가 급격하게 증가하고 이에 따른 부작용도 나타나기 시작했다.

경북 성주지역에서 대량 재배하는 참외의 경우 시설재배 생산에 있어서 가장 큰 문제점은 연작재배에 따라 주년 발생하는 병충해이다. 병충해의 방제가 완전하지 않은 경우에는 시설재배지에 집중적으로 발생하여 화학농약의 과도한 사용을 유발하고 이에 따른 환경과피 및 생태계의 변화 등의 부작용을 초래하고 있다.

이러한 병충해 중에서 충해로 뿌리혹선충이 그리고 병해로는 곰팡이 (*Mycosphaerella melonis*, *Ascochyta cucumis*)에 의한 만고병이 기주 범위가 광범위하고 번식 속도와 감염 전파 속도가 매우 빠른 특성을 가져 매년 성주지역 참외 생산의 가장 심각한 장애로 나타나고 있다.

뿌리혹선충은 토양 속에서 참외의 뿌리에 감염하게 되며 뿌리 내에 기생하여 작물에 피해를 주고 있으며, 이는 수확 이후에 토양에 존재하여 연작을 불가

능하게 하는 주요원인으로 작용하고 있다. 현재는 이에 대한 해결책으로 복토가 행해지고 있으나 이는 매년 다량의 토양을 필요로 할뿐만 아니라 토양지표의 증가를 가져오고 있다. 또한 곰팡이에 의한 병해의 경우 노지와 달리 고온 다습한 조건이 형성되기 쉬운 시설채외를 비롯한 다양한 과채류의 시설재배지에서 매우 광범위하게 나타난다.

현재 병충해에 대한 저항성 품종이 미진한 참외에서 발생시거나 생리적 특성이 특이한 뿌리혹선충과 곰팡이에 대한 방제체제가 미 확립되어 있는 상황에서 불가피한, 과도한 화학적 방제는 농민들의 직접적인 농약중독 등 심각한 부작용을 유발하고 있다. 이의 대책이라고 할 수 있는 살충성 및 살진균성 미생물제제를 이용한 생물 방제 기술은 공해를 유발하지 않고 병충해에 대해 선택적으로 작용하고 토양의 건진성을 높여 장기적인 농업을 가능하게 하는 환경 친화적 메카니즘을 이용하는 방제 기술이지만 아직 국내의 수준은 초보적인 단계에 불과하다.

본 연구는 단편적인 하나의 병충해에 대한 방제 기술 연구가 아니라 곰팡이와 뿌리혹선충에 대한 항균활성, 항충활성 미생물에 대한 탐색, 그리고 이러한 유용미생물 유래의 생리활성물질에 관한 생화학적 분석과 같은 미생물학적 방제에 대한 종합적인 접근을 추진하였다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 과제에서 수행한 주요 연구내용 및 범위를 요약하면 다음과 같다.  
 제 1 세부과제 : 뿌리혹선충 방제 활성 미생물의 탐색

연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
1 년차 : 항 뿌리혹 선충활성 <i>Bacillus thuringiensis</i> 의 선별 및 보존	1. 성주지역 시설 참외 재배지에 존재하는 뿌리혹 선충의 분리 및 보존, 지속적 확보 2. 자연계에 존재하는 <i>Bacillus thuringiensis</i> 의 선택적 분리 및 보존 3. 항 선충 활성 검정 방법의 최적화 4. 항 선충 활성 <i>Bacillus thuringiensis</i> 의 선별 5. 분리된 <i>Bacillus thuringiensis</i> 의 동정
2 년차 : 항 선충활성 <i>Bacillus thuringiensis</i> 및 toxin의 생리, 생화학적 연구	1. 항 선충 활성 <i>Bacillus thuringiensis</i> 의 생리 생화학적 연구 2. 항 선충 활성 <i>Bacillus thuringiensis</i> 의 배양 최적화 3. <i>Bacillus thuringiensis</i> 의 toxin생성 조건의 최적화 4. <i>Bacillus thuringiensis</i> toxin의 분리 5. <i>Bacillus thuringiensis</i> toxin의 생화학적 특성연구 6. 모의 포장 실험을 통한 항 선충활성에 대한 연구
3 년차 : 항 선충 활성 <i>Bacillus thuringiensis</i> toxin의 현장 적용 가능성에 대한 연구	1. <i>Bacillus thuringiensis</i> 의 대량 배양 및 독소의 대량 확보 2. 실용화를 위한 Bt의 살 선충 효과 및 특성 검토 3. <i>Bacillus thuringiensis</i> 의 모의 포장실험

제 2 세부과제 : 만고병 방제 생리 활성 물질의 탐색

연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
1. 방선균 유래 항 만고병 항생물질의 탐색	1. 참외 병해 유발 곰팡이의 분리 및 보존 2. 항진균활성 검정 방법 개선
2. 세균성 항 만고병 항생 물질의 탐색	3. 항진균활성 미생물의 분리 및 보존 4. 분리균주들로부터 항진균 활성 검토

## IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

### 제 1 절 연구개발 결과

시설 참외 재배 농가에 막대한 피해를 주고 있는 참외 뿌리혹선충과 참외 만고병을 미생물학적인 방법으로 방제할 목적으로 자연계로부터 항 선충 활성 및 항 진균 활성 미생물을 분리하였다. 뿌리혹선충에 대해서는 포자형성 세균인 *Bacillus thuringiensis* 균주를 대상으로 항 뿌리혹선충 활성 미생물을 분리하고, 그 균주의 생리 생화학적 특성, Bt 독소 생성 배양 조건의 최적화, Bt 독소의 분리와 그 생화학적 특성, 및 뿌리혹선충에 대한 항 선충 활성의 pot 실험, 모의 포장 실험 등을 수행하여 그 현장 적용 가능성을 살펴 보았다. *Didymella bryoniae*를 원인균으로 하는 참외 만고병에 대해서는 항 만고병 미생물을 세균과 방선균으로부터 각각 선별 분리하였다. 이들 분리된 균주들을 동정하고 이들이 생성하는 활성물질의 생산조건을 검토하고, 각 균주가 생성하는 활성물질을 분리, 정제하여 항 진균작용의 기작 등 그 특성의 일부도 조사하였으며, 일부는 구조확인을 거쳐 생물농약으로 이용할 수 있는 가능성을 검토하여 보았다. 이상의 결과를 과제별로 요약하면 다음과 같다.

#### 가. 제 1 세부과제 : 뿌리혹선충 방제 활성 미생물의 탐색과 관련된 연구 개발 결과

1. 성주 지역의 시설재배 참외의 토양에서 분리한 뿌리혹선충은 *Meloidogyne arenaria*가 대부분이고 *M. incognita*도 어느 정도 관찰되었다.
2. 배지에 따른 포자 형성세균의 분리 효율을 조사한 결과 NAPGCY, NAAC, NA 배지 순서로 분리되었다. 또한 위상차 현미경으로 결정성 내독소를 생성하는 콜로니를 조사해 본 결과 NAPGCY 배지에서 약14%, NAAC 배지와 NA 배지에서 각각 약 8%와 7%의 콜로니가 확인되었다.
3. 분리한 *Bacillus thuringiensis* 균주 중에서 항 선충성 외독소를 생성하는

- 균주도 분리할 수 있었으며, 이는  $\beta$ -exotoxin이거나 그 유연 물질로 생각된다.
4. *Bacillus thuringiensis* 균주 중에서 항 선충 활성이 있는 균주 Bt17과 Bt79를 분리하였다. 분리된 두 균주 중에서 Bt17 균주가 Bt79 균주에 비해 활성이 더 강한 것으로 나타났다.
  5. Bt17 균주가 생성하는 항 뿌리혹선충 활성 물질의 대부분은 내독소인  $\delta$ -endotoxin이며, 소량의 외독소를 생성하였다.
  6. 분리한 Bt 17 균주와 Bt79 균주의 생리 생화학적인 특성을 조사하고, 편모의 항원성을 조사한 결과 Bt17 균주는 serotype 3인 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*로, Bt79 균주는 serotype 50인 *B. thuringiensis* subsp. *navarrensensis*로, 두 균주는 혈청형이 서로 다른 subspecies에 속함을 알 수 있다.
  7. serotype 50에 속하는 *B. thuringiensis* subsp. *navarrensensis* 균주 중에서 항 선충 활성을 나타내는 균주는 Bt79가 최초라고 생각된다.
  8. Bt17 내독소에 대한 특이적인 항체를 제조하여 ELISA법에 의한 Bt 내독소 정량법을 처음으로 개발 하였다.
  9. 이 균주의 내독소 생산조건을 검토하여 탄소원, 질소원, 인산염, 무기 이온의 최적 조건을 확립 하였고, 독소 생성 최적 pH는 6에서 8 사이로 나타났고, aeration이 좋을수록 포자 생성이 증가되었다.
  10. 이 균주의 독소 생성량은 액체배양의 경우 보다 고체배양의 경우가 약 10배 정도 높은 것으로 확인되었다.
  11. Jar fermentor를 이용한 배양은 2 vvm, 300 rpm, 30°C의 조건에서 균의 생육은 1일 후 최대가 되었으나 포자의 수는 4일 후부터 최대치에 도달하였다.
  12. 반고체 배지의 조성은 미강 9 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.05 g, glucose 0.5 g, 규조토 1 g, H<sub>2</sub>O 5 ml의 비율로 만든 배지가 좋았으며, 여기에 종균을 접종하여 30°C에서 6일간 배양하여 건조한 제제는 1 g당  $1.6 \times 10^8$  개의 포자가 포함되었다.
  13. 내독소 결정의 용해도는 pH 11.5 ~ 12.5 사이에서 약 37 ~ 50% 까지 용해되나 독소의 분해가 많이 일어나고 생물학적 활성도 떨어져, 용해도가 약 14 ~ 24% 정도인 pH 10.0 ~ 10.5 사이가 최적 조건이었다.
  14. Bt17 균주와 같은 편모 항원성을 나타내는 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* BtHD1 균주는 뿌리혹선충에 대하여 전혀 독 작용을 나타내지 않는데

비해, Bt17, Bt79 균주는 다 같이 독성을 나타내었다. 이들 중 Bt17의 LC<sub>50</sub>은 43 ug/ml로 Bt79 균주의 125 ug/ml에 비해 약 3배 정도 강하게 나타났다.

15. 모기 유충에 독성을 나타내는 Bti 균주는 185 ug/ml의 Bt 독소 농도에서 적혈구를 완전히 용해시키는 용혈활성을 보이는데 반하여 Bt17과 Bt79 균주는 BtHD1과 함께 용혈활성을 나타내지 않았다.

16. Bt17 균주와 BtHD1은 같은 *B. thuringiensis* subsp. *krustaki*에 속하는 균주로 대부분 공통적인 독소 항원을 갖고 있으나 약 130 K 크기의 내독소 단백질에서 항원성의 차이가 나타나며, 또 면역전기영동의 양상도 약간 상이하게 나타나, Bt17이 생성하는 독소는 나방에 대해 살충활성을 가진 것으로 알려진 BtHD1의 독소와는 다른 새로운 독소임을 알 수 있었다.

17. ELISA를 이용하여 토양 중에 존재하는 독소의 정량법을 확립할 수 있었다.

18. Bt17 균주의 내독소의 항 선충활성을 실내 멸균 토양 pot에서 실험한 결과 선충 감염구는 거의 고사 상태인데 비하여 Bt17 균주를 함께 시용한 실험구는 선충 비감염구인 대조구의 약 80% 정도의 생육 상황을 나타내었고, 항 선충 효과는 약 30% 정도의 제어 효과가 있음을 알 수 있었다.

19. Bt17의 가용성 제제를 사용하였을 경우, 멸균 토양에서도 항 선충 활성이 나타나지 않았으며 제제의 성상에 따라 효능에 차이가 나타나는 것으로 생각되었다.

20. 멸균 토양에서 Bt17의 액성 제제를 사용하였을 경우는 가용성 제제를 사용한 경우에 비해서 항 선충 활성이 나타나는 것을 볼 수 있었다.

21. Bt17의 고형화 제제를 사용한 경우에는 비록 작물의 생육에는 큰 차이를 보이지 않았으나, 약 28% 정도의 항 선충 활성이 나타났다. 멸균 토양에서의 결과를 종합해 보면 가용성 제제는 항 선충 활성이 보이지 않았으나, 액성 및 고형화 제제는 어느 정도 뿌리혹선충의 제어 효과가 있음을 알 수 있었다.

22. Bt17의 액성 제제를 비 멸균 토양에 사용하였을 경우, 뿌리혹의 수는 무처리구에 비해 감소하였으나 난낭의 형성은 무처리구와 비슷한 결과를 보여 주었다.

23. Bt17의 고형화 제제는 무 처리구에 비해 약 79.3%의 선충 피해 활성을 보여 비 멸균 토양에서도 고형화 제제는 어느 정도 활성을 나타내는 것으로 생각

된다.

24. 멸균 토양과 비 멸균 토양에서의 Bt17 균주의 항 선충 활성 결과를 종합해 보면 Bt 제제의 성상에 따라 어느 정도 활성의 차이가 나타남을 알 수 있었다. Bt의 고형화 제제는 멸균, 비 멸균 토양을 막론하고 어느 정도 활성을 나타내는 것 같으며, 액성 제제는 멸균 토양에서는 효과가 있는 것으로 보이나 비 멸균 토양에서는 확실하지 않으며, 가용화 제제는 생각과는 달리 비 멸균 토양은 물론 멸균 토양에서도 거의 활성이 나타나지 않았다.

25. Bt 독소는 멸균 토양에서는 어느 정도 안정성을 나타내나 비 멸균 토양에서는 대단히 불안정한 것을 볼 수 있었다.

26. 액성 제제의 Bt 독소는 대형 pot에서 멸균 감염 토양 및 비 멸균 감염 토양의 Bt 독소 처리구와 무처리구 사이에 유의의적인 차이를 볼 수 없었다. 다만 Bt 독소 처리구의 뿌리는 무 처리구의 뿌리에 비하여 그 부패 정도가 훨씬 경미하였다.

27. 고형화 제제의 Bt 독소는 대형 pot 실험에서, 대체적으로 무 처리구에 비해 좋은 생육을 보여 주었으며, 84 일간 재배한 후 참외의 수확량을 보면 Bt 처리구는 무 처리구에 비해 2 ~ 3.5 배 정도의 수확량을 보였다. 그리고 Bt 독소에 의한 뿌리혹 형성 제어율을 보면 26%에서 51%의 범위에서 제어 효과가 나타남을 볼 수 있으나, 멸균 토양구와 선충단 처리구에 비해 뿌리혹의 생성으로 인한 뿌리 무게의 증가는 처리구, 무 처리구 모두 비슷한 경향을 보여 Bt 독소의 선충에 대한 직접적인 방제 효과는 앞으로 더욱 검토해야 할 사항으로 생각되었다.

#### 나. 제 2 세부과제 : 만고병 방제 생리 활성 물질의 탐색

1. 토양으로부터 분리한 약 1000여 균주 중에서 *D. bryoniae*에 항 진균 활성을 나타내는 세균 *Pseudomonas* sp. ADB 2 균주를 최종 선별하였다.

2. *Pseudomonas* sp. ADB 2 균주는 *D. bryoniae*뿐 아니라 *Botritis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporium*에 대해서도 비교적 강한 항 진균 활성을 나타내었다.

3. *Pseudomonas* sp. ADB 2 균주의 항 진균 활성 생성은 대수 증식기에 급격하게 증가하며 약 18 시간 후에 최고 생산성을 나타낸 후 24 시간 이후에 약간 감소하는 양상을 나타내고 있다.
4. *Pseudomonas* sp. ADB 2의 항 진균 활성은 주로 siderophore의 활성에 의존하는 것으로 나타났으며, siderophore 합성은 철에 의해 영향을 받았다.
5. *Pseudomonas* sp. ADB 2 균주의 항 진균 활성 물질을 TLC로 분리하여 CAS assay로 활성을 측정하면 Rf치 0.12의 spot에서 가장 강력한 활성이 관찰되었으며 이는 ADB 2의 siderophore일 것이라고 추정되었다.
6. ADB 2의 siderophore는 포자 발아 및 발아관의 형성을 저해하였다.
7. 또 방선균을 대상으로 *D. bryoniae*에 항 진균 활성을 나타내는 80223 균주를 선별하였다.
8. 이 균주의 항 진균성 활성 물질의 생산조건을 검토하여 탄소원, 질소원, 인산염, 무기 이온의 최적 조건을 확립하였다.
9. 이 균주의 활성 물질의 생산은 pH 7.0 중성 부근에서, 30°C에서 가장 높았다.
10. 방선균 80223 균주의 항 진균 활성 물질은 ethyl acetate 추출, silica gel column chromatography, 조제용 역상 HPLC column으로 정제하여 retention time이 26 분인 C-1 화합물을 오렌지색 결정 형태로 순수하게 얻을 수 있었다. 또 각각 40분, 48분의 retention time을 가진 C-2, C-3 화합물을 노란색 분말형태로 순수하게 얻었다.
11. <sup>1</sup>H-NMR, IR 데이터의 분석을 통하여 C-2 화합물이 flavofungin과 같은 물질임을 알 수 있었다.
12. <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR spectra의 데이터 분석을 통하여 C-3 화합물이 polyene macrolide계 항생물질로 filipin pentaene chromophore 구조를 가진 fungichromin임을 밝혔으며 C-1 화합물은 아직까지 그 구조를 밝혀내지 못하였다.

## 제 2 절 활용에 대한 건의

시설 참외 병충해의 미생물학적 방제를 위한 이 연구를 수행하는 과정 동안 갖게된 여러 정보, 연구 재료, 연구 결과의 활용 방안을 다음 몇 가지로 생각해 보았다.

1. 활성 미생물의 탐색을 위하여 자연계로부터 막대한 수의 *Bacillus thuringiensis* 균주를 비롯해서 방선균, 세균 등을 분리, 수집, 보존하여 방대하고 다양한 미생물의 stock을 구축할 수 있었다. 이들 미생물을 이용하여 다양한 기주 작물에 대한, 또 다양한 병, 해충에 대한 활성 미생물의 탐색 재료로 활용할 수 있을 것이다.
2. 이 연구 과정을 통하여 확립한 항 뿌리혹선충 활성 미생물의 검색 시스템은 앞으로도 지속적으로 항 선충 활성 미생물을 분리하는 선별계로 활용할 수 있을 것이다.
3. 항 선충 활성 Bt 독소에 대해 제작한 항체는 항 선충 활성 특이적인 Bt 독소의 검출, 정성, 정량, 분석 및 이와 유사한 독소를 가진 다른 항 선충 미생물의 신속한 분리에도 활용할 수 있을 것이다.
4. 항 선충 활성을 가진 Bt 독소는 뿌리혹선충의 생명현상을 규명하는 분야에 활용될 수 있을 것이다. 이를 통하여 선충의 치사작용을 나타내는 표적분자를 동정할 수 있다면 새로운 항 선충 활성 assay system의 개발 및 새로운 항 선충 제제의 개발에 활용할 수 있을 것이다.
5. 활성 미생물의 생리적, 분류적 연구를 통하여 활성 탐색의 선택성, 신속성을 가져올 수 있을 것이다.
6. 항 선충 활성 미생물 *Bacillus thuringiensis* 균주는 참외의 뿌리혹선충에 대해 선택적 독성을 가지는 환경 친화성 무공해 미생물 제제로 활용할 수 있을 것이다.
7. Bt 제제는 기존의 방제 방법과의 혼합 이용 방안을 통하여 방제의 효율성을 증대할 수 있을 것이다.
8. 이 Bt 제제는 참외 이외에도 뿌리혹선충의 피해를 입고 있는 다른 경제성

작물에도 활용할 수 있을 것이다.

9. 이를 위해서는 장기간에 걸쳐 반복적인 야외 포장실험으로 실용성 검증과 실제 농민에 의한 효능검증 과정을 통하여 실제적인 시용방법의 확립이 필요할 것으로 생각된다. 이와 함께 각 지역 토양 중의 선충 밀도의 실 시간 모니터링도 필요할 것으로 생각된다.

10. 이런 과정을 통하여 효능의 검증이 이루어진다면 벤처기업화를 통한 선충 방제제로 보급할 수 있을 것이다.

### 제 3 절 과제와 관련된 발표실적

1. Antifungal activity of a *Pseudomonas* culture extract as a biocontrol agent against a gummy stem blight - causing *Didymella bryoniae*. 경북대학교 석사 논문집 (1999)

2. Screening of antifungal antibiotics against gummy stem blight caused by *Didymella bryoniae*. 경북대학교 석사 논문집 (1999)

3. 시설참외의 뿌리혹 선충에 살충력이 있는 *Bacillus thuringiensis*의 분리 및 특성. 1999년 한국산업 미생물학회 추계학술대회 및 바이오벤처포럼, p170, (1999)

4. 뿌리혹선충 방제를 위한 *Bacillus thuringiensis* 제제의 효과. 2000년 한국산업미생물학회 추계학술대회, p288, (2000)

## SUMMARY

**The first subject : Isolation of microbial control agents for root-knot nematodes**

Root-knot nematode, *Meloidogyne* sp. has world-wide distribution and is a major pest of various crop plants. In recent years, continuing environmental problems associated with the use of nematicides have introduced a sense of urgency into the search for alternative methods of nematode management. Biological control of this pest may be a cheaper and safer alternative to the use of chemical nematicides. Various *Bacillus* species have been recognized as insecticidal pathogens, with *B. thuringiensis* being the most widely used commercially available bacterium for insect control. Initially, the use of BT pesticides was restricted to a narrow range of *Lepidopteran* pests, such as gypsy moth, but recent investigations have expanded the range of insects controlled by this bacterium.

In this study, we succeeded in isolation of two strains of *B. thuringiensis*, which possess the potential as a microbial control agent for plant-parasitic nematodes. The physiological and biochemical characteristics of the two isolates of *B. thuringiensis*, designated Bt17 and Bt79, were investigated. The biochemical and immunological properties of the toxins from these two isolates were also investigated. We optimized the culture condition to produce toxin from the strain. An isolate of Bt17 was evaluated for efficacy in controlling plant-parasitic nematodes. These results are summarized as follows.

1. Two strains of *Bacillus thuringiensis* possessing nematocidal activity were isolated and designated Bt17 and Bt 79. The nematocidal activity of Bt17 appeared to be higher than that of Bt79.
2. Nematicidal compound produced by Bt17 was mainly composed of  $\delta$ -endotoxin and some additional exotoxin.
3. The physicochemical and serological characteristics of Bt17 and Bt79 were investigated. Bt17 was determined as *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* which is serotype 3, whereas Bt79 was determined as *B. thuringiensis* subsp. *navarrensensis* corresponding to serotype 50, demonstrating that these two strains are serologically different.
4. Among serotype 50 *B. thuringiensis* subsp. *navarrensensis*, Bt79 is the first strain reported to possess nematocidal activity
5. Polyclonal antibody against Bt17  $\delta$ -endotoxin was raised in rabbit. The quantification method for  $\delta$ -endotoxin by ELISA using the polyclonal antibody was developed.
6. The optimum conditions for the production of  $\delta$ -endotoxin by Bt17 was investigated. The production of  $\delta$ -endotoxin reached a maximum at pH 6-8, and is proportion to the aeration. In addition, the production of  $\delta$ -endotoxin by solid culture appeared to be 10 times higher than that of liquid culture.
7. The optimum conditions for the production of  $\delta$ -endotoxin by Bt17 in Jar fermentor scale (5 liter) was 2 vvm/aeration, 300 rpm/agitation, 30°C, and pH 7.2. Under these conditions, the cell growth reached a maximum in 1 day and the amount of toxin production was maximum after 4 days.
8. The composition of semisolid media was rice bran 9 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.05 g, glucose 0.5 g, diatomous earth 1 g, and  $\text{H}_2\text{O}$  5 ml. When the semisolid

culture following 6 day cultivation at 30°C was completely dried, 1 g of the dried matters appeared to contain  $1.6 \times 10^8$  spores.

9. Although the solubility of the  $\delta$ -endotoxin crystal was 37 - 50% at pH 11.5 - 12.5, the biological activity of the endotoxin deteriorated due to the instability of the endotoxin. The optimum condition for solubilizing the  $\delta$ -endotoxin was pH 10.0 - 10.5 showing 14 - 24% solubility.

10. While *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* BtHD1, which is indiscriminated from Bt17 in the serological characteristics of flagella antigen, did not show any toxic effect on root-knot nematodes, both Bt1 and Bt79 did show strong nematocidal activity. The  $LC_{50}$  of Bt17 against nematodes was 43  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and that of Bt79 was 125  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , indicating that the toxicity of Bt17 is 3 times higher than that of Bt79.

11. Bti strain showing a toxic effect on mosquito larvae was able to induce the lysis of rat erythrocytes at a concentration of 185  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . However, both Bt17 and Bt79 as well as BtHD1 possessing a toxicity to gypsy moth failed to induce the lysis of rat erythrocytes.

12. The comparison of the electrophoretic patterns of individual endotoxins of Bt17 and BtHD1 revealed that although they had several common toxin antigens, only Bt17 endotoxin appeared to contain a 130 kDa unique toxin antigen. In addition, the immunoelectrophoretic pattern of each endotoxin was not equal. These indicate that the endotoxin of Bt17 is a novel toxin different from the endotoxin of BtHD1, which is known to be toxic to gypsy moth.

13. ELISA was successfully developed to quantitate the presence of the Bt endotoxin in the soils.

14. When the nematocidal effect of Bt17 was investigated using in-door pot

containing sterilized soils, the oriental melon infected with nematodes became withered to death. Under the same conditions, when Bt17 was applied to the soils, the growth of the plant appeared to be 80% of the control plant and its inhibitory effect on nematodes was approximately 30%.

15. The solubilized product of Bt17 did not show the nematicidal effect when it was applied to the sterilized soils.

16. In the pot test using sterilized soils, the suspended product of Bt17 showed better nematicidal effect than that of solubilized product.

17. When the solidified product of Bt17 was applied to the sterilized soils, the growth of the plant was not changed significantly but its inhibitory effect on nematodes appeared to be 28%. Taken together these results indicated that both suspended and solidified products have the inhibitory effect on root-knot nematodes of the oriental melon in the sterilized soils.

18. When the suspended products of Bt17 was applied to the nonsterilized soils, the number of root-knot appeared to decrease as compared to control. However, the number of egg sac formed in the root was similar with the level of control.

19. Since the inhibitory effect of the solidified products of Bt17 was approximately 79.3% in the pot test using nonsterilized soils, the solidified products was thought to be effective in the nonsterilized soils as was in the sterilized soils.

20. The solidified products of Bt17 was effective on nematodes in both sterilized and nonsterilized soils, whereas the suspended products was effective only in the sterilized soils. The solubilized products did not show the nematicidal activity irrespective of sterilization conditions of the soils.

21. Bt17 toxin was stable in the sterilized soils, whereas it is unstable the

nonsterilized soils.

22. When the effect of the suspended products of Bt17 was investigated using large-scale pots containing either sterilized soils or nonsterilized soils, the positive effect in terms of the plant growth and nematicidal activity was not detectable regardless of using sterilized soils or nonsterilized soils. However, the decay in the root area of the treated plant was much less than that of the control.

23. When the effect of the solidified products of Bt17 was investigated using large-scale pots, it induced better growth of the plant as compared to control, and it increased the yield 2 ~ 3.5 folds after 84 day cultivation. Under the same conditions, its inhibitory effect on the root-knot galling was approximately 26 ~ 51%. On the other hand, since the increase in the weight of the root area by the formation of the root-knot by nematodes appeared to be similar between the plant treated with the solidified products and the control, it is likely that the direct inhibitory effect of the Bt-toxin on the root-knot nematodes needs to be determined further.

**The second subject : Isolation of inhibitory substance to *Didymella bryoniae* causing gummy stem blight of the oriental melon**

Two bacterial strains, *Pseudomonas* sp. and *Streptomyces* sp., which have an inhibitory effect on *Didymella bryoniae* causing gummy stem blight of the oriental melon were isolated. The antifungal substance of *Pseudomonas* sp. appeared to be a siderophore that can bind tightly with Fe ion. The antifungal substance produced by *Streptomyces* sp. was among

polyene macrolides. These results are summarized as follows.

1. By screening approximately 1000 bacterial strains obtained from the soil samples in the rural area of Kyungpook province, two bacterial strains, *Pseudomonas* sp. ADB-2 and *Streptomyces* sp. 80223 possessing an inhibitory effect on *Didymella bryoniae* that causes gummy stem blight of the oriental melon were isolated.
2. *Pseudomonas* sp. ADB-2 showed a strong inhibitory activity on various fungi including *D. bryoniae*, *Botritis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, and *Fusarium oxysporium*.
3. The antifungal substance of *Pseudomonas* sp. appeared to be a siderophore that can bind tightly with Fe ion.
4. The siderophore of *Pseudomonas* sp. ADB-2 appeared to inhibit the germination of the fungal spores as well as the formation of germinating tube.
5. The optimum condition of the production of antifungal substance by *Streptomyces* sp. 80223 was determined.
6. The antifungal substance produced by *Streptomyces* sp. 80223 was purified by ethyl acetate extraction, silica gel column chromatography, and reverse phase HPLC. The purified substance was examined by a serial instrumental analysis such as NMR, IR, Mass spectrum and UV, and was determined as a polyene macrolide antibiotics.

## CONTENTS

Chapter 1. Introduction .....	28
1-1. Objective and necessity .....	28
1-2. Contents and Scopes .....	30
Chapter 2. Isolation of microbial control agents for root-knot nematodes .....	31
2-1. Introduction .....	31
2-2. Materials and methods .....	33
1. Isolation and cultivation of <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	33
a. Isolation .....	33
b. Cultivation .....	34
c. Isolation of anti-nematodal strains .....	37
2. Anti-nematodal activity test .....	37
a. Test of toxicity against egg and 2nd-stage juveniles of root-knot nematodes .....	37
b. Assay of exo-toxin of <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	39
c. Assay of endo-toxin of <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	39
3. Propagation and isolation of root-knot nematodes .....	39
a. Propagation of root-knot nematodes .....	39
b. Isolation and identification .....	40
c. Isolation and hatch of eggs of root-knot nematodes .....	40
4. Isolation of endo-toxin of <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	41
5. Preparation of antibody against endo-toxin .....	42
6. Solubility of endo-toxin .....	43
7. SDS-PAGE of endo-toxin .....	43
8. Ouchterlony test .....	43
9. Immuno-electrophoresis .....	44

10. Western blotting .....	44
11. Hemolysis test .....	45
12. Assay of endotoxin by ELISA .....	45
2-3. The status of root-knot nematodes in Sungju area .....	46
2-4. Isolation of <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	53
1. Effect of medium on the isolation of <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	53
2. Isolation of antinematodal <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	55
a. Isolation of antinematodal strains producing exotoxin .....	55
b. Isolation of antinematodal strains producing endotoxin .....	59
2-5. Physiological and biochemical characteristics of the isolated strain .....	64
1. Physiological characteristics .....	64
2. Assimilation of carbon sources .....	66
3. Serotyping .....	70
4. Resistance to agrochemicals .....	73
2-6. Condition for toxin production .....	75
1. Development of assay method of toxin by ELISA .....	75
2. Effect of nutrients on the production of toxin .....	76
a. Carbon sources .....	76
b. Nitrogen sources .....	79
c. Yeast extract .....	80
d. Phosphate .....	81
e. Mineral ions .....	82
3. Effect of physico-chemical factors on the production of toxin .....	83
a. Initial pH .....	83
b. Aeration .....	84
4. Production of toxin by liquid medium and agar plate medium .....	85
5. Jar fermentor culture .....	87

a. Effect of aeration .....	87
b. Jar fermentor culture .....	88
6. Semi-solid culture .....	89
2-7. Biochemical characteristics of antinematodal Bt toxin .....	91
1. Effect of pH on the solubility of Bt toxin .....	91
2. LC <sub>50</sub> of Bt17 and Bt79 toxins .....	93
3. Hemolytic activity test of Bt17 and Bt79 toxins .....	93
4. SDS-PAGE pattern of Bt17 toxin .....	94
5. Immunological analysis of Bt17 toxin .....	95
a. Preparation of antibody against Bt17 toxin .....	95
b. Immunoblot .....	96
c. Immunoelectrophoresis .....	97
6. Assay of Bt toxin in soil .....	98
2-8. Greenhouse trial of the antinematodal activity of Bt17 ....	102
1. Pot experiment with sterilized soil .....	102
2. Pot experiment with nonsterilized soil .....	110
3. Effect of preparations of Bt toxin on the antinematodal activity in sterilized and nonsterilized soil .....	112
a. Preparations of Bt toxin .....	112
b. Antinematodal activity of Bt17 toxin preparations in sterilized soil .....	113
c. Antinematodal activity of Bt17 toxin preparations in nonsterilized soil .....	117
4. Stability of Bt toxin in the sterilized and nonsterilized soil	122
5. Large-scale pot experiment .....	126
a. Large-scale pot experiment 1 .....	126
b. Large-scale pot experiment 2 .....	132
2-9. Conclusion .....	139

Chapter 3. Screening of antifungal agent for gummy stem blight	
caused by <i>Didymella bryoniae</i> .....	145
3-1. Introduction .....	145
3-2. Characteristics of gummy stem blight caused by	
<i>Didymella bryoniae</i> .....	147
1. Symptom of gummy stem blight .....	147
2. The spore of <i>Didymella bryoniae</i> .....	149
3. Blooming time and occurrence of gummy stem blight .....	153
4. Removal of flowers and infection of gummy stem blight .....	154
5. Gummy stem blight in Sungju area .....	154
3-3. Antifungal bacteria for gummy stem blight .....	156
1. Materials and methods .....	156
a. Strain and cultivation .....	156
b. Isolation of antifungal bacteria .....	157
c. Identification of antifungal bacteria .....	159
d. Identification of antifungal activity .....	159
e. Isolation of siderophore .....	160
f. Recovery of iron-deficiency .....	162
g. Test of germination .....	162
2. Results .....	162
a. Isolation of antifungal bacteria .....	162
b. Identification of ADB2 strain .....	166
c. Time-course of bacterial growth and antifungal activity .....	168
d. The mode of antifungal activity of ADB2 .....	169
e. Siderophore activity .....	171
f. Isolation of siderophore .....	173
g. Recovery of iron-deficiency .....	174
h. Inhibition of spore germination .....	175
3. Discussion .....	177

3-4. Antifungal <i>Streptomyces</i> sp. for gummy stem blight .....	178
1. Materials and methods .....	178
a. Materials .....	178
b. Isolation of <i>Didymella bryoniae</i> .....	179
c. Isolation and cultivation of actinomycetes .....	179
d. Isolation of antifungal actinomycetes .....	181
e. Measurement of microbial growth .....	184
f. Physico-chemical and spectral analysis .....	184
2. Results .....	184
a. Isolation of antifungal actinomycetes .....	184
b. Condition for production of antifungal antibiotics .....	189
c. Purification of antifungal antibiotics .....	197
d. Physico-chemical properties of antifungal antibiotics .....	200
e. Structural analysis .....	202
3. Discussion .....	215
3-5. Conclusion .....	216
Chapter 4. General conclusions .....	219
References .....	229

# 목 차

제 출 문 .....	1
요 약 문 .....	2
SUMMARY .....	12
CONTENTS .....	18
목차 .....	23
제 1 장 서론 .....	28
제 1 절 연구개발의 목적 및 중요성 .....	28
제 2 절 연구개발의 내용 및 범위 .....	30
제 2 장 뿌리혹선충방제 활성 미생물의 탐색 .....	31
제 1 절 서설 .....	31
제 2 절 재료 및 방법 .....	33
1. 항 뿌리혹 선충 활성 <i>Bacillus thuringiensis</i> 의 분리 및 배양 ·	33
가. <i>Bacillus thuringiensis</i> 의 분리 .....	33
나. <i>Bacillus thuringiensis</i> 의 배양 .....	34
다. 항 선충 활성 균주의 분리 .....	37
2. 뿌리혹선충에 대한 독성 시험 .....	37
가. 알 및 2령 충에 대한 독성 시험 .....	37
나. <i>B. thuringiensis</i> 가 생성하는 외독소의 활성 측정 .....	39
다. <i>B. thuringiensis</i> 가 생성하는 내독소의 활성 측정 .....	39
3. 뿌리혹선충의 증식 및 분리 .....	39
가. 뿌리혹선충의 증식 .....	39
나. 뿌리혹선충의 분리 및 동정 .....	40
다. 뿌리혹선충의 알의 분리 및 부화 .....	40
4. 내독소의 분리 .....	41
5. 내독소에 대한 항체 제작 .....	42

6. 내독소의 용해성 .....	43
7. 내독소의 SDS-PAGE .....	43
8. Ouchterlony Test .....	43
9. 면역전기영동 .....	44
10. Western blotting .....	44
11. 용혈성 시험 .....	45
12. ELISA에 의한 내독소 생성량의 측정 .....	45
제 3 절 성주 시설침외 단지의 뿌리혹선충 .....	46
제 4 절 <i>Bacillus thuringiensis</i> 균주의 분리 및 선별 .....	53
1. 배지에 따른 <i>Bacillus thuringiensis</i> 의 분리 효율 .....	53
2. 항 뿌리혹선충 활성 <i>Bacillus thuringiensis</i> 선별 .....	55
가. 외독소 의한 항 뿌리혹선충 활성균의 선별 .....	55
나. 내독소 의한 항 뿌리혹선충 활성균의 선별 .....	59
제 5 절 균주의 생리 생화학적 특성 .....	64
1. 균주의 생리적 특성 .....	64
2. 균주의 탄소원 이용성 .....	66
3. 균주의 편모 항원성 .....	70
4. 선별된 균주의 약제에 대한 내성 검토 .....	73
제 6 절 <i>Bacillus thuringiensis</i> 독소 생산 조건의 최적화 .....	75
1. ELISA를 이용한 독소 정량법의 확립 .....	75
2. 독소의 생산에 미치는 영양소의 영향 .....	76
가. 탄소원의 영향 .....	76
나. 질소원의 영향 .....	79
다. Yeast extract의 영향 .....	80
라. 인산염의 영향 .....	81
마. 금속 이온의 영향 .....	82
3. 독소의 생산에 영향을 미치는 물리화학적 요인 .....	83
가. 초기 pH의 영향 .....	83
나. 통기량에 의한 영향 .....	84

4. 액체배지와 고체배지에 의한 독소 생산 .....	85
5. Jar fermentor 배양 .....	87
가. 통기량의 효과 .....	87
나. Jar fermentor 배양 .....	88
6. 반고체 배양에서의 포자 생성 .....	89
제 7 절 항 선충 활성 Bt 내독소의 생화학적 특성 .....	91
1. pH에 따른 Bt 내독소의 용해성 .....	91
2. Bt17 및 Bt79 균주가 생성하는 내독소의 항 선충 활성 (LC <sub>50</sub> ) ..	93
3. Bt17 및 Bt79 균주가 생성하는 내독소의 용혈성 시험 .....	93
4. Bt17 균주 내독소의 SDS-PAGE .....	94
5. Bt17 균주 내독소의 면역학적 분석 .....	95
가. Bt17 균주의 내독소에 대한 항체 제작 .....	95
나. Immuno blot .....	96
다. Immunoelectrophoresis .....	97
6. 토양 중의 Bt 내독소의 안정성 및 정량법의 확립 .....	98
제 8 절 Bt17 균주의 항 선충 활성 pot 실험 .....	102
1. 1차 pot 실험 (멸균 토양) .....	102
2. 2차 pot 실험 (감염 토양) .....	110
3. 멸균 토양과 비 멸균 토양에서 Bt 제제의 성상에 따른 항 선충 활성 .....	112
가. Bt 제제의 성상 .....	112
나. 멸균 토양에서 Bt17 제제의 항 선충 활성 .....	113
다. 비멸균 토양에서 Bt17 제제의 항 선충 활성 .....	117
4. 멸균 토양과 비 멸균 토양에서 Bt 독소의 안정성 .....	122
5. Bt 독소의 모의 포장실험 .....	126
가. 1차 모의 포장실험 .....	126
나. 2차 모의 포장 실험 .....	132
제 9 절 결론 .....	139

제 3 장 만고병 방제 생리활성물질의 탐색 .....	145
제 1 절 서설 .....	145
제 2 절 만고병 원인균의 특징 .....	147
1. 만고병에 의해 식물조직에 나타나는 현상 .....	147
2. 만고병 병원체 포자의 특징 .....	149
3. 개화시기에 따른 만고병의 발병 .....	153
4. 화기제거에 따른 만고병 감염 .....	154
5. 성주지역 참외의 만고병 발생양상 .....	154
제 3 절 세균성 향 만고병 항생물질의 탐색 .....	156
1. 재료 및 방법 .....	156
가. 사용 균주 및 배양방법 .....	156
나. 항 진균 활성 세균의 분리 .....	157
다. 항 진균 활성 세균의 동정 .....	159
라. 항 진균 활성의 동정 .....	159
마. siderophore의 분리와 검출 .....	160
바. 철 결핍의 회복 실험 .....	162
사. 포자 발아 시험 .....	162
2. 결과 .....	162
가. 항 진균 활성 세균의 분리 .....	162
나. ADB 2의 동정 .....	166
다. 배양시간에 따른 균의 생육과 항 진균 활성의 변화 .....	168
라. ADB 2 균주가 생성하는 항 진균성 물질의 작용 양상 .....	169
마. siderophore의 활성 검정 .....	171
바. siderophore의 분리 .....	173
사. 철 결핍의 회복능 .....	174
아. siderophore의 포자 발아 저해능 .....	175
3. 고찰 .....	177

제 4 절 방선균 유래 항 만고병 항생물질의 탐색 .....	178
1. 재료 및 방법 .....	178
가. 재료 .....	178
나. 만고병균의 분리 .....	179
다. 방선균의 분리 및 배양 .....	179
라. 항 진균 활성 방선균의 분리 .....	181
마. 균의 생육도 측정 .....	184
바. Physico-chemical and spectral analysis .....	184
2. 결과 .....	184
가. 항 진균 활성 방선균의 분리 .....	184
나. 항 진균성 활성 물질 생성의 최적 조건 .....	189
다. 항 진균 활성 물질의 분리정제 .....	197
라. 항 진균 활성 물질의 물리화학적 성상 .....	200
마. 항 진균성 물질의 구조 분석 .....	202
3. 고찰 .....	215
제 5 절 결론 .....	216
제 4 장 종합 결론 .....	219
참 고 문 헌 .....	229

# 제 1 장 서론 .....

## 제 1 절 연구개발의 목적 및 중요성

소득 증가에 따른 식생활의 고급화 및 다양화로 식품 소비형태의 변화가 나타나고, 이러한 변화는 식량작물 생산 및 경지 이용에 큰 영향을 주고 있다. 작물별로 재배면적을 보면 식량작물은 지속적인 감소추세에 있는 반면 수익성이 높은 과채류 등은 상대적으로 증가하는 경향을 보이고 있다.

과채류 재배농가의 증가와 함께 노지에 비해 생산시기의 확대와 생산성 증가, 기후환경에 의한 피해 방지 등의 장점을 가지고 있는 시설재배가 급격하게 증가하고 이에 따른 부작용도 나타나기 시작했다.

경북 성주지역에서 대량 재배하는 참외의 경우 시설재배 생산에 있어서 가장 큰 문제점은 연작재배에 따라 주년 발생하는 병충해이다. 병충해의 방제가 완전하지 않은 경우에는 시설재배지에 집중적으로 발생하여 화학농약의 과도한 사용을 유발하고 이에 따른 환경파괴 및 생태계의 변화 등의 부작용을 초래하고 있다.

이러한 병충해 중에서 충해로 뿌리혹선충이 그리고 병해로는 곰팡이 (*Mycosphaerella melonis*, *Ascochyta cucumis*)에 의한 만고병이 기주 범위가 광범위하고 번식 속도와 감염 전파 속도가 매우 빠른 특성을 가져 매년 성주지역 참외 생산의 가장 심각한 장애로 나타나고 있다.

뿌리혹선충은 토양 속에서 참외의 뿌리에 감염하게 되며 뿌리 내에 기생하여 작물에 피해를 주고 있으며, 이는 수확 이후에 토양에 존재하여 연작을 불가능하게 하는 주요원인으로 작용하고 있다. 현재는 이에 대한 해결책으로 복토가 행해지고 있으나 이는 매년 다량의 토양을 필요로 할뿐만 아니라 토양지표의 증가를 가져오고 있다. 또한 곰팡이에 의한 병해의 경우 노지와 달리 고온

다습한 조건이 형성되기 쉬운 시설채의를 비롯한 다양한 과채류의 시설재배지에서 매우 광범위하게 나타난다.

현재 병충해에 대한 저항성 품종이 미진한 참외에서 발생시거나 생리적 특성이 특이한 뿌리혹선충과 곰팡이에 대한 방제체제가 미 확립되어 있는 상황에서 불가피한 과도한 화학적 방제는 농민들의 직접적인 농약중독등 심각한 부작용을 유발하고있다. 이의 대책이라고 할 수 있는 살충성 및 살진균성 미생물제제를 이용한 생물 방제 기술은 공해를 유발하지 않고 병충에 대해 선택적으로 작용하고 토양의 건전성을 높여 장기적인 농업을 가능하게 하는 환경 친화적 메카니즘을 이용하는 방제 기술이지만 아직 국내의 수준은 초보적인 단계에 불과하다.

본 연구는 단편적인 하나의 병증에 대한 방제 기술 연구가 아니라 곰팡이와 뿌리혹선충에 대한 항균활성, 항충활성 미생물에 대한 탐색, 그리고 이러한 유용미생물 유래의 생리활성물질에 관한 생화학적 분석과 같은 미생물적 방제에 대한 종합적인 접근을 추진하였다.

## 제 2 절 연구개발의 내용 및 범위

본 과제는 뿌리혹선충 방제 활성 미생물의 탐색과 만고병 방제 생리 활성 물질의 탐색 2개의 세부과제로 구성되어 있으며, 연차별 개발목표, 수행한 주요 연구내용 및 범위를 요약하면 다음과 같다.

### 제 1 세부과제 : 뿌리혹선충 방제 활성 미생물의 탐색

연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
1 년차 : 항 뿌리혹 선충 활성 <i>Bacillus thuringiensis</i> 의 선별 및 보존	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 성주지역 시설 참외 재배지에 존재하는 뿌리혹 선충의 분리 및 보존, 지속적 확보</li> <li>2. 자연계에 존재하는 <i>Bacillus thuringiensis</i>의 선택적 분리 및 보존</li> <li>3. 항 선충 활성 검정 방법의 최적화</li> <li>4. 항 선충 활성 <i>Bacillus thuringiensis</i>의 선별</li> <li>5. 분리된 <i>Bacillus thuringiensis</i>의 동정</li> </ol>
2 년차 : 항 선충활성 <i>Bacillus thuringiensis</i> 및 toxin의 생리, 생화학적 연구	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 항 선충 활성 <i>Bacillus thuringiensis</i>의 생리 생화학적 연구</li> <li>2. 항 선충 활성 <i>Bacillus thuringiensis</i>의 배양 최적화</li> <li>3. <i>Bacillus thuringiensis</i>의 toxin생성 조건의 최적화</li> <li>4. <i>Bacillus thuringiensis</i> toxin의 분리</li> <li>5. <i>Bacillus thuringiensis</i> toxin의 생화학적 특성연구</li> <li>6. 모의 포장 실험을 통한 항 선충활성에 대한 연구</li> </ol>
3 년차 : 항 선충 활성 <i>Bacillus thuringiensis</i> toxin의 현장 적용 가능성에 대한 연구	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. <i>Bacillus thuringiensis</i>의 대량 배양 및 독소의 대량 확보</li> <li>2. 실용화를 위한 Bt의 살 선충 효과 및 특성 검토</li> <li>3. <i>Bacillus thuringiensis</i>의 모의 포장실험</li> </ol>

### 제 2 세부과제 : 만고병 방제 생리 활성 물질의 탐색

연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 방선균 유래 항 만고병 항생물질의 탐색</li> <li>2. 세균성 항 만고병 항생물질의 탐색</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 참외 병해 유발 곰팡이의 분리 및 보존</li> <li>2. 항진균활성 검정 방법 개선</li> <li>3. 항진균활성 미생물의 분리 및 보존</li> <li>4. 분리균주들로부터 항진균 활성 검토</li> </ol>

## 제 2장 뿌리혹선충방제 활성 미생물의 탐색

### 제 1 절 서설

뿌리혹선충이 토양 내에 존재하면 숙주 식물의 뿌리에 기생하여 숙주식물의 영양분을 섭취함으로써 작물의 수확량이 감소될 뿐만 아니라, 선충의 2령 유충이 숙주식물의 뿌리에 침투할 때 토양 중에 있는 부생선충의 침입과 식물병원균에 의한 2차적인 감염으로 식물의 생육에 지장을 초래하기도 한다. 이뿐만 아니라 뿌리혹선충은 작물의 수확 이후에도 토양 중에 남아 있어 작물의 연장을 불가능하게 하는 주요 원인으로 작용하고 있다. 이와 같이 뿌리혹선충에 의한 농작물의 피해는 오래 전부터 알려져 왔으며, 우리나라에서도 이미 보고된 바가 있다. 이처럼 식물 기생 선충에 의한 피해가 농작물의 수확량이 감소되는 원인 중의 한 가지로 알려짐에 따라 더욱 선충 방제의 중요성이 인식되고 있다. 이들 중 뿌리혹선충의 기주식물로서는 종에 따라 다소 차이가 있으나 대체로 참외, 콩, 배추, 당근, 상추, 토마토, 감자, 담배, 백지, 작약, 인삼, 포도나무 등 700여종 이상이 알려져 있으며, 현재 우리나라에서는 4 종의 뿌리혹선충, 즉, *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. hapla*, *M. arenaria* 의 존재가 알려져 있으며, 그에 따른 피해도 점차 증가하고 있다.

특히 최근에는 원예작물의 재배농가가 증가됨에 따라 뿌리혹선충에 의한 피해는 더욱 심각해지고 있는데, 대부분의 경우 화학약제 투입으로 방제하고 있는 실정이다. 그러나 화학약제의 투입에 의한 뿌리혹선충의 방제는 환경오염뿐만 아니라 토양내의 유용미생물의 무분별한 살균작용에 따른 피해가 가중되어 토양을 점차로 척박하게 하는 원인이 된다. 이와 같은 이유로 선충 구제를 위한 새로운 방법의 일환으로 최근에는 미생물에 의한 뿌리혹선충의 방제가 연구되기 시작하였다.

최근까지 뿌리혹선충에 대한 생물학적 방제 효과가 입증된 미생물로서는

*Bacillus penetrans*, *Paecilomyces lilacinus*, *Arthrobotrys oligospora*, *Hirsutella rhossiliensis*, *Arthrobotrys conoides* 등이 알려져 있으나, 이들 대부분은 곰팡이들이다. *Bacillus penetrans*는 분류학적으로도 논의가 많은 절대 기생균으로 토양 내에서 생육이 불가능하여 숙주인 기생선충과 혼합하여 사용해야 함으로 배양상에서부터 문제점을 가지고 있다.

포자 형성 세균인 *Bacillus thuringiensis*는 결정성 단백질인 내독소를 생성하는데, 이는 농업과 임업 분야에 심각한 문제로 대두되고 있는 나방류와 보전 위생에 관계되는 모기나 파리 등 및 딱정벌레류에 이르기까지 넓은 범위의 해충의 장내에서 분해, 활성화되어 치사적인 독작용을 나타내어 생물학적 방제에 많이 이용되고 있다. 최근에는 이들 해충 이외에도 더욱 넓은 해충에 대해서 *Bacillus thuringiensis*가 독 작용을 나타내는 것으로 밝혀지고 있어 이 균의 이용 범위가 점점 더 확대되고 있는 실정이다.

성주를 중심으로 하는 경상북도 지역은 시설 참외 재배지로 유명한데 전국 생산량의 약 70%를 차지하고 있을 정도이다. 그러나 이 지역은 지속적인 연작 재배로 말미암아 병충해가 주년 발생하고 또한 집중적으로 발생하는 경향을 가져 병충해 방제가 불충분할 때에는 피해 정도가 엄청나게 큰 특징을 가지고 있다. 이러한 병충해 중에 뿌리혹선충에 의한 피해가 가장 심각한 문제로 대두되고 있다.

그래서 이 연구에서는 시설 참외 재배에 막대한 피해를 주고 있는 뿌리혹선충을 미생물학적인 방법으로 방제할 목적으로 토양 내에서 생육이 가능하여 지속적인 효과를 기대할 수 있고, 뿌리혹선충의 알이나 유충을 죽일 수 있는 미생물을 포자형성 세균인 *Bacillus thuringiensis* 균주를 대상으로 선별하려고 시도하였다. 그 결과 뿌리혹선충에 강한 살충력이 있는 균주를 분리하였기에 그 균주의 생리 생화학적 특성, 균주 및 Bt 독소 생성 배양 조건의 최적화, Bt 독소의 분리와 그 생화학적 특성, 및 뿌리혹선충에 대한 항 선충 활성의 pot 실험, 모의 포장 실험 결과 등을 보고하고자 한다.

## 제 2 절 재료 및 방법

### 1. 항 뿌리혹 선충 활성 *Bacillus thuringiensis*의 분리 및 배양

#### 가. *Bacillus thuringiensis*의 분리

항 뿌리혹 선충 활성을 나타내는 Bt toxin을 분리하기 위하여 성주, 고령 달성, 김해 지역 등을 중심으로 경남, 북 일원의 다양한 기원의 토양 균원 시료로부터 먼저 포자 형성 세균을 집적하는 방법을 사용하면서 몇 가지의 선택배지를 이용하여 *B. thuringiensis* 균 분리의 효율성을 높이고자 하였다. 이 연구에서는 토양에서 Nutrient Agar (NA) 배지와 NA 배지에 sodium acetate를 첨가한 Nutrient Agar Acetate (NAAC) 배지, 또 NA 배지에 penicillin G와 CCY salt를 첨가한 NAPGCY 배지를 사용해 *B. thuringiensis* 균 분리의 효율성을 검토하여 NAPGCY 배지가 분리 효율이 가장 좋게 나타나 주로 NAPGCY 배지를 이용하여 균주를 분리하였다. 이들 배지의 조성은 Table 2-1에 나타내었다.

균의 분리는 상법을 따랐으며 그 대강은 아래와 같다. 토양 시료 0.25g을 10 ml의 증류수가 든 18 mm 시험관에 넣은 다음 포자 형성균이 아닌 대부분의 영양세균을 죽이기 위해서 10분 동안 80℃로 열처리를 행하고 냉각시켰다. 냉각된 토양 부유액 100  $\mu$ l는 Table 2-1에 나타낸 각각의 배지에  $10^3$ 배까지 희석 도말하고, 28℃에서 48시간 동안 배양시킨 후 육안으로 콜로니를 계측하여 토양 g당 존재하는 포자형성 세균의 수로 나타내어 분리 효율을 측정하고 그 이후에는 적절하게 희석한 토양시료로부터 출현한 colony를 위상차 현미경으로 결정성 단백질을 확인하고 colony를 분리하였다. 나뭇잎 등의 시료로부터 균주를 분리할 때는 한천평판배지 위에 살짝 찍어서 배양시킨 후 형성

된 colony를 같은 방법으로 분리하였다. 분리할 당시에는 우선 그람 양성균으로 포자를 형성하고, 간균이며 결정성 내독소를 생산하는 균주를 *Bacillus thuringiensis* 균주로 간주하였다.

최종 선별된 균주의 형태학적 관찰은 위상차 현미경으로 행하였으며, 생화학적 특성의 검토는 Bergey's manual of systematic Bacteriology 및 Simbert와 Krieg의 방법에 따라 행하였으며, 편모 항원에 의한 응집반응 시험은 Pauda 등의 방법 및 De Barjac과 Frachon의 방법에 의거하여 조사하였다. 이 때 *Bacillus thuringiensis*의 동정용 표준균주와 각 표준균주의 편모에 대한 항 혈청은 일본 Kyushu 대학 생물방제 연구소의 M. Ohba 박사로부터 분양받았다.

분리한 균주들의 일반적인 배양이나 보존을 위한 배지는 Peptone Yeast extract Glucose (PYG) 배지를 사용하였고, 균주의 보존은 -80°C glycerol 보존, 10% DMSO 보존을 하였고 보통은 사면배지에 배양하여 4°C에 보존하면서 사용하고 2개월에 한 번씩 계대배양하였다.

#### 나. *Bacillus thuringiensis*의 배양

위의 방법에 따라 분리한 *Bacillus thuringiensis* 균주로부터 항 뿌리혹 선충 활성을 지닌 Bt toxin을 생산하기 위한 배양용 배지는 Tryptone Yeast extract Glucose (TYG) 배지를 사용하였다. 액체배양의 경우 10 ml의 TYG 배지를 함유한 25 ml용 삼각 flask에 Bt 균주를 1백금이 접종하여 28°C에서 하룻밤 동안 진탕배양한다 (전 배양). 그후 전 배양액 1 ml (배지의 1%)를 100 ml의 TYG 배지(trypitone 0.5%, yeast extract 0.5%, glucose 1%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1%, pH7.2)를 함유한 250 ml용 삼각 flask에 접종하여 28°C에서 진탕배양 (130rpm) 한다. 대량배양의 경우는 5 L 용 Jar fermentor (한국 발효기 주식회사)에 2 L의 TYG 배지를 넣고 121°C에서 20 분간 살균한 후 하룻밤 배양한 전 배양액을 1% 농도로 접종하여 300 rpm의 교반속도로 교반하며 공기는 2 vvm으로 공급

하며 28℃에서 배양하였다.

고체배양의 경우는 TYG 한천배지에 상기의 전 배양액을 10% 농도가 되게 잘 혼합하여 사각병 (7x14cm) 또는 페트리 접시에 넣어 28℃에서 배양하였다.

Table 2-1. The composition of the media for isolation and cultivation of *B. thuringiensis*

NA Medium.

Ingredient	Composition
Beef extract	3 g
Peptone	5 g
Agar	15 g
Distilled water	1 L
pH	7.0

NAAC Medium

Ingredient	Composition
Beef extract	3 g
Peptone	5 g
Na acetate. 3H <sub>2</sub> O	16.3 g
Agar	15 g
Distilled water	1 L
pH	7.0

### NAPGCY Medium

Ingredient	Composition
Beef extract	3 g
Peptone	5 g
Penicillin G	1000 IU
CCY salt <sup>a</sup>	5 ml
Agar	15 g
Distilled water	1 L
pH	7.0

<sup>a</sup> CCY salt : [MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O(0.5mM); MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O(0.01mM); FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O (0.05mM); ZnCl<sub>2</sub>(0.05mM); CaCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O(0.2mM); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(13mM); K<sub>2</sub>HPO<sub>2</sub>(26mM); glutamine (20mg/L); acid casein hydrolysate(1g/L); enzymatic casein hydrolysate (1g/L); enzymatic yeast extract(0.4g/L); glycerol(0.6g/L)]

### PYG Medium

Ingredient	Composition
Peptone	5 g
Yeast extract	5 g
Glucose	10 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
Distilled water	1 L
pH	7.2

## TYG medium

Ingredient	Composition
Tryptone	5 g
Yeast extract	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
Glucose	10 g
Distilled water	1 L
pH	7.0-7.4

### 다. 항 선충 활성 균주의 분리

토양으로부터 분리된 *B. thuringiensis* 균주를 TYG 평판배지에서 포자가 충분히 형성되도록 배양시킨 후 멸균된 증류수 1 ml에 약  $1 \times 10^7$  cell이 되도록 현탁하고, 여기에 25℃에서 부화시킨 뿌리혹선충의 2령 유충을 약  $10^2$  마리 정도 투여하여 경시적으로 광학현미경으로 관찰하여 유충의 운동 능력을 상실시키는 균주를 뿌리혹선충에 치사력이 있는 활성 균주로 선별하였다.

## 2. 뿌리혹선충에 대한 독성 시험

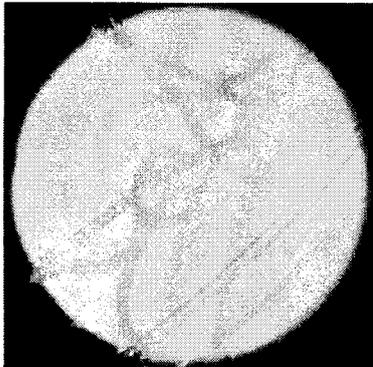
### 가. 알 및 2령 충에 대한 독성 시험

뿌리혹선충에 대한 독성 시험 중에서 선충의 알을 사용한 경우는 선충 난낭에서 분리한 선충 알 약 1,000여 개와 *B. thuringiensis*가 생성한 독소 물질과

혼합하여 멸균된 소형 cap tube에 넣어 25℃에서 10 일 동안 배양하면서 경시적으로 알의 부화되는 상태를 현미경으로 직접 검경하였다. 이 때 알 내부에서 2령 유충의 형상이 관찰되면 부화된 알로 간주하였으며, 그 이외는 미분화된 알로 산출하였다.

또 선충의 유충을 사용하는 경우는 선충의 알을 미리 25℃에서 부화시킨 다음 하루가 지나지 않은 운동성이 강한 2령 중을 *B. thringiensis*의 균체, 내독소 또는 외독소와 혼합하여 25℃에서 처리하면서 경시적으로 유충의 운동성을 조사하여 운동성을 상실한 유충을 사멸한 선충으로 간주했다 (Fig. 2-1)

A.



B

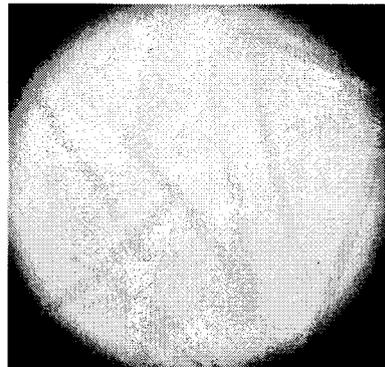


Fig. 2-1. Morphology of *M. incognita* on phase contrast microscope magnified  $\times 100$

A; Living larvae in tap water

B; Dead larvae after *B. thringiensis* culture broth treatment for 18hrs at room temp.

#### 나. *B. thuringiensis*가 생성하는 외독소의 활성 측정

*B. thuringiensis* 균주가 세포 외로 분비하는 외독소  $\beta$ -exotoxin의 항 선충 활성은 다음과 같이 측정하였다. 순수 분리한 각 균주를 TYG 배지에서 28℃, 5일간 진탕 배양시켰다. 배양액은 15,000 rpm, 30분간 원심 분리하여 배양 상층액을 균체 및 내독소( $\delta$ -endotoxin)로부터 분리하여 121℃에서 20분간 고압살균하여 생성된 침전물은 다시 원심분리에 의하여 제거하여 그대로 사용하거나 경우에 따라 진공농축하여 사용하였다. 이 용액에 미리 부화시킨 뿌리혹 선충을 투여하여 광학현미경으로 유충의 생사를 관찰하였다.

#### 다. *B. thuringiensis*가 생성하는 내독소의 활성 측정

TYP 배지에서 28℃, 5일간 배양시킨 배양액을 원심분리에 의해 배양 상층액을 제거한 균체 침전물을 PBS 완충액 또는 증류수로 3회 세척하여 잔존하는 외독소를 제거하였다. 이렇게하여 얻은 균체 침전물을 일정 농도로 완충액 또는 증류수에 현탁하여 이 액의 항 선충 활성을 측정하였다.

### 3. 뿌리혹선충의 증식 및 분리

#### 가. 뿌리혹선충의 증식

모래와 흙을 1:1의 비율로 혼합하고 이를 고압멸균(120℃, 20분)한 다음 pot ( $\Phi$ 10x13cm)에 멸균된 토양을 넣고 토마토 씨앗을 파종하였다. 이때 사용된 토마토는 *Lycopersicon pimpinellifolium*(김해종묘 산)이 사용되었다. 파종 8일 후 본 잎이 2~3엽이 나온 묘종은 멸균된 토양이 들어있는 다른 pot ( $\Phi$ 155x24cm)에 이식하였다. 그 후 일주일 이 지나서 뿌리혹선충의 알을 1 ml당

1,000개가 되도록 희석한 용액 5 ml를 각 토마토 뿌리 부근에 접종하였다. 뿌리혹선충의 알이 접종된 토마토는 25℃에서 60일간 생육시켰다. 일반적으로 이들 선충들은 비특이적으로 식물체의 뿌리에 기생하므로 pot를 이용한 단일 종의 선충을 지속적으로 생육시켜서 본 실험을 행하였다.

#### 나. 뿌리혹선충의 분리 및 동정

위와 같이 토마토를 사용하여 증식시킨 pot 내의 토양이나 토마토 뿌리, 또는 성주지역의 시설참외 단지 중에서 뿌리혹선충의 피해가 많은 시설참외 단지의 토양 및 참외의 뿌리에서 선충을 분리하였다. 선충의 수컷은 Cavaness와 Jensen에 의한 Centrifugal sugar floatation (C.S.F) method로 분리하고, 70℃로 가열한 고정액(formalin 100 ml, glycerin 10 ml, D.W 890 ml)으로 고정한 후 Seinhort's rapid glycerin method로 표본을 만들어 광학현미경으로 선충의 두부 모양과 stylet모양을 중심으로 뿌리혹선충의 종을 동정하였다.

또한 뿌리혹선충의 암컷은 흑이 형성된 참외뿌리를 1 cm정도로 잘라서 혼합기에 넣고 물을 약간 가한 다음 저속으로 3분 동안 갈아서 50 µm체에 붓고 수도물로 행군 다음 이것을 샐레에 부어서 물체현미경으로 암컷을 선별하였다. 선별된 선충의 암컷은 45% lactic acid에 보관하면서 1마리씩 plastic판 위에 올려놓고 해부칼로 선충의 미부를 잘라서 내용물을 조심스럽게 제거하고 주위를 적당하게 절단한 다음 slide glass 위에 glycerin을 한 방울 놓고 여기에 10개 정도 perineal pattern을 광학현미경으로 조사하여 종을 동정하였다.

#### 다. 뿌리혹선충의 알의 분리 및 부화

뿌리혹선충의 알은 감염된 참외의 뿌리 또는 위와 같이 증식시킨 토마토 뿌리를 수집하여, C.S.F method의 변법에 따라 분리하였다. 즉, 감염된 뿌리는

토양을 제거하기 위해 흐르는 물에 충분히 세척한 후 약 1 cm 정도의 크기로 절단하였다. 절단된 뿌리는 0.5% sodium hypochloride (NaOCl) 200 ml가 들어 있는 500 ml들이 등근 flask에 약 50 g정도 넣고 고무마개로 막아 3분간 심하게 흔들어서 뿌리를 살균함과 동시에 뿌리의 난낭(egg sac)에서 알이 터져나오도록하였다. 그 후 이들 뿌리혹선충의 알이 함유된 0.5% NaOCl용액은 500 mesh의 체에 200 mesh를 중첩하여 충분한 증류수를 통과 시켜서 난낭에 함유된 NaOCl을 제거하였다. 뿌리가 들어있는 flask는 물을 채워 한곳에 보관해 두고, 200 mesh의 체는 500 mesh의 체에서 분리시키고 500 mesh의 체에 남아있는 알은 서서히 흐르는 물로 씻어 NaOCl을 완전히 제거 한 다음, 원심관에 넣고 약 0.5 g 정도의 kaolin과 혼합하여 3,000 rpm에서 4분간 원심분리하였다. 그후 상층액은 제거하고 침전물에 설탕용액 (s=1.18)을 가하여 3,000 rpm에서 2분간 다시 원심분리하였다. 이때 선충 알이 함유된 상층액은 500 mesh의 체에 붓고 흐르는 물에서 설탕액이 완전히 제거될 때까지 수세한 다음 채취병에 모아 실험에 사용하였다. 실험에 사용하지 않는 선충의 알은 0.9% saline이 함유된 용액에 넣고 냉장고(4℃)에 보관하였다.

선충 알을 부화는, 0.5% NaOCl로 10분간 표면 살균 처리하고 멸균된 증류수로 충분히 수세한 알은 멸균된 생리식염수가 함유된 인산 완충액에 넣고, 25℃의 항온기에서 부화시켜 운동성이 강한 2령유충을 독성물질의 활성측정 등에 사용하였다.

#### 4. 내독소의 분리

TYG 액체 배지 또는 고체 배지 상에서 포자가 형성될 때까지 28℃에서 배양한 *B. thuringiensis*로부터 Cheung과 Hammock의 방법에 따라 내독소를 분리하였다. 즉, 배양된 균체와 결정성 내독소를 15,000 rpm, 30분간 원심분리하여 모았다. 이 균체와 내독소를 함유하고 있는 혼합 pellet은 0.01% Triton

X-100용액이 함유된 멸균수에 적당히 현탁하여 설탕 밀도 구배법으로 8,500 x g에서 30분간 원심분리하여 내독소층을 조심해서 분리하였다. 분리된 내독소는 설탕을 제거하기 위해 0.01% Triton X-100용액으로 3회 씻은 후 위상차 현미경으로 그 순도를 관찰하고, 10 mM EDTA용액에 내독소를 현탁시키거나, lyophilization시켜서 -20℃에 동결 보존하였다. 분리한 내독소의 양은 단백질 양으로 나타내었다.

#### 5. 내독소에 대한 항체 제작

위와 같이 분리한 내독소에 대한 항체의 제작은 Cheung과 Kim의 방법에 따라 행하였다. 즉, 내독소를 0.1N NaOH용액으로 37℃에서 2 시간 동안 용해한 후, 용해되지 않고 남아 있는 잔사의 내독소는 13,000 x g에서 15분간 원심분리하여 제거시켰다. 항원으로 사용할 용해액에 진한 초산용액을 첨가하여 pH 9.0으로 조정하고 단백질 양으로 2 mg/ml의 항원 용액 0.5 ml와 complete freund adjuvant(Sigma Chem Co.) 0.5ml를 잘 혼합하여 토끼에 피하 주사하였다. 1주일 후에 다시 2 mg/ml 항원과 incomplete freund adjuvant를 동일 양으로 혼합하여 주사하고, 1주일 간격으로 2~3회 더 주사하였다. 최종 booster 주사한 후로부터 1 주일이 지나서 토끼로부터 내독소에 대한 항혈청을 함유한 혈액을 채취하여 응고시킨 다음 1,000 x g에서 30분간 원심분리하여 항혈청을 분리시킨 후 56℃에서 비동화시켰다. 비동화시킨 항혈청은 Johnstone과 Thorpe의 방법에 따라  $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 로 염석시키고, 생성된 항혈청의 침전은 소량의 20mM PBS buffer (pH6.8)에 용해시켜 동일한 완충액으로 평형화시킨 DEAE-cellulose ion exchange column chromatography를 행하여 항체를 정제한 다음 -30℃에 보존하였다. 보존된 항체는 내독소 단백질(항원)과 Ouchterlony test, Immuno-electrophoresis, ELISA 및 Western blotting에 사용되었다.

## 6. 내독소의 용해성

*B. thuringiensis* subsp. var. *kurstaki* HD-1과 *Bacillus thuringiensis* BT17 및 BT79 균주로부터 분리한 내독소 단백질을 pH별로 처리를 하여 용해도 및 SDS-PAGE pattern을 비교하였다. pH별 buffer 조제는 acid [2.711 ml  $H_3PO_4$ (85%) + 2.361 ml  $CH_3COOH$ (99%) + 2.47g  $H_3BO_3$ ]와 alkali(0.2N NaOH)를 적당 양씩 섞어서 pH가 8.5, 9.0, 9.5, 10.0, 10.5, 11.0, 11.5, 12.0, 12.5가 되도록 하여서 사용을 하였다. 각각의 균주의 내독소 단백질을 1 mg씩 취하여 eppendorf tube에 넣고, 각 pH 별 buffer를 150  $\mu$ l씩 가하여 37°C에서 2시간 용해를 시킨 후 상온에서 원심분리(13,000rpm, 10분)를 행하고 그 상청액을 취하여 단백질 정량 및 SDS-PAGE를 행하였다. 내독소 단백질 농도의 결정은 Lowry method로 행하였으며, 이 때 표준 단백질은 bovine serum albumin을 사용하였다.

## 7. 내독소의 SDS-PAGE

배양 균체로부터 분리 조제한 내독소 단백질은 10 mM dithiothreitol을 함유한 50 mM  $Na_2CO_3$  용액에 현탁하여, 37°C에서 1 시간 동안 용해시킨 다음 상온에서 원심분리(13,000rpm, 10분)를 행한 후 용해된 내독소 단백질을 시료로 사용하였다. 이때 SDS-PAGE는 Laemmli 방법으로 행하였다. 즉, 10% separating gel, 5% stacking gel을 사용하였으며 전기영동 후 Coomassie brilliant blue R-250로 30분 동안 염색하였다.

## 8. Ouchterlony Test

분리된 내독소 단백질 2 mg씩을 각각 0.1N NaOH 440  $\mu$ l를 가하여 37°C

water bath에서 2 시간 동안 용해를 시킨 후 상온에서 원심분리(13,000rpm, 10 분)를 행하여 그 상청액을 항원으로 사용하였다. 또한 0.9% NaCl과 0.01%  $\text{NaN}_3$ 가 함유된 1% agarose gel은 1/15 M PB buffer(pH 7.2)에 용해시키고 slide glass상에 고화시킨 후 agarose gel의 중앙에 hole을 만들었다. 중앙의 hole을 중심으로 동일한 거리를 두고 주위에 대칭이 되도록 6개의 hole을 파고, 중앙의 hole에는 항체 20  $\mu\text{l}$ 를 주입하고, 나머지 6개의 hole에는 항원 용액 20  $\mu\text{l}$  씩을 주입하였다. 그 후 항원과 항체가 함유된 slide glass는 수분이 함유된 chamber내에 넣은 후 냉장고에서 48 시간 동안 방치시킨 후 침강선의 형성을 육안으로 관찰하였다.

## 9. 면역전기영동

0.1%  $\text{NaN}_3$ 가 함유된 0.2 M Tris-HCl (pH 8.6) buffer에 1% agarose gel을 용해시키고, slide glass에 용해된 agarose gel 4 ml을 부어서 굳힌 다음 한쪽 끝에 나란히 2개의 hole을 파고 각각의 내독소 단백질 용액(항원)을 30  $\mu\text{l}$ 씩 주입시켰다. 그 후 slide glass가 buffer에 잠기지 않도록 agarose gel 양 끝에 Whatman filterpaper로 양쪽 전극이 있는 buffer tank에 연결시켜서 10 mA로 고정하여 전기영동을 행하였다. 전기영동이 끝난 다음 agarose의 2개의 hole의 중심에서 hole 에 수직이 되게 도랑을 파고 거기에 항체를 100  $\mu\text{l}$  주입을 한 후 수분이 함유된 chamber내에 방치하면서 4°C에서 4일간 침강선의 형성을 육안으로 관찰하였다.

## 10. Western blotting

분리한 내독소를 알카리에 용해하고, 15% SDS-polyacrylamide gel상에서 전기영동한 후 SDS-PAGE를 행한 내독소는 nitrocellulose membrane에 70 V

에서 7 시간 동안 electrotransfer시켰다. 그 후 Bio-Rad사의 안내서에 따라 blocking solution에 nitrocellulose membrane을 1시간 동안 침지시키고, 조제한 항체 IgG 1,000배 희석액과 2시간 반응시켰다. 이어서 conjugate solution에 1시간 반응시킨 후 color solution 으로 발색을 시켰으며 이때 사용된 효소는 peroxidase antirabbit-antibody가 함유된 immunoblot kit (Bio-Rad product)로서 antirabbit conjugated peroxidase가 사용되었다.

## 11. 용혈성 시험

96well의 microplate를 이용하여 단계적으로 희석한 내독소 단백질 용액과 극 미량의 적혈구만을 혼합하여 37°C에서 일정한 시간동안 방치를 한 후 육안으로 용혈성을 측정하였다. 먼저 쥐의 혈액을 채취하여 멸균된 0.85% 생리식염수로 상온에서 3000 rpm에서 10 분동안 원심분리를 하여 혈구를 4회 반복하여 세척하였다. 세척한 혈구는 1% (v/v)가 되도록 멸균된 0.85% 생리식염수에 현탁하였다. 1% 혈구 용액 100  $\mu$ l는 단계적으로 2배 희석된 내독소 단백질 용액이 들어있는 microplate well에 가하여 잘 혼합한 후 37°C에서 방치를 하며 육안으로 100% 용혈성을 나타내는 내독소 단백질의 농도를 측정하였다.

## 12. ELISA에 의한 내독소 생성량의 측정

BT균주의 내독소 생성이 고체 배지와 액체 배지에서 차이가 있는지를 검토하였다. 즉, 액체 배양은 10ml PYG broth가 들어있는 L-tube에 1%를 접종하여 28°C에서 배양 1일부터 6일까지 배양을 하면서 배양 첫날의 균체 농도를 기준으로 하여 흡광도를 맞춘 후 총균수 및 80°C에서 30분간 열처리를 한 후 포자 수와 toxin 생성에 관하여 조사를 하였다. 또한, 고체 배양은 PYG plate(직경 9.5cm)에 BT 균주의 전배양액을 액체 배양에 접종한 양과 동일한 양으로

접종하고 28℃에서 배양 1일부터 6일까지 배양을 하면서 균체의 농도를 액체 배양을 한 균체의 흡광도 값과 동일하게 맞춘 후 총균수 및 80℃에서 30분간 열처리를 한 후 포자 수와 toxin 생성에 관하여 조사를 하여, 고체 배양과 액체 배양에서 내독소의 생성량을 측정하였다. 이를 측정하기 위해 Voller 등의 방법에 따라 0.1 N NaOH에 용해된 독소단백질은 microplate의 well에 250  $\mu$ l씩 넣고 4℃에서 하룻밤 동안 흡착시켰다. 그후 well은 3회 washing buffer (pH7.2)로 씻은 후 정제된 항체 (1 : 2,000희석액)를 가하여 25℃에서 3시간 방치한다. 그후 다시 well은 3회 washing buffer (pH7.2)로 씻은 후 goat-antirabbit immunoglobulin alkaline phosphatase conjugate (1 : 8,000)를 가하여 25℃에서 3시간 동안 반응시킨다. 이때 기질은 p-nitrophenylphosphate를 10% diethanolamine buffer (pH9.8)에 용해하고 ELISA (Enzyme linked immunoassay) Reader로 405 nm에서 측정하였다.

### 제 3 절 성주 시설참외 단지의 뿌리혹선충

경북 성주 지역은 사질 토양으로 작물의 생육이 빨라 조기 수확이 가능하고 반 축성 재배법으로 연장 재배가 가능한 장점을 가지고 있으나 건조하기 쉽고 비료의 유실이 많으며 병의 발생이 많은 단점을 가지고 있다. 이러한 병충해 중에서 뿌리혹선충에 의한 피해가 심각한 실정이다. 뿌리혹선충은 참외의 뿌리 내에 기생하여 식물체 호르몬 생성 기작을 교란시켜 그 결과 세포분열 이상으로 인한 혹을 형성시켜 양분의 이동 통로를 막고 양분을 탈취하여 식물체의 생장이 불량해지고 시들어 죽기도 한다(Fig 2-2). 뿌리혹선충은 또 수확 이후에 토양에 존재하여 연작을 불가능하게 하는 주요 요인으로 작용하고 있다. 1995년의 경우 300 ml당 300~620마리의 선충으로 매우 높은 밀도를 보여주고 있었으며, 1998년과 1999년 성주 참외 재배지의 선충밀도 변화는 Fig 2-3.와 같이 연

중변화하고 있으며 겨울철에도 그 수가 일정하게 유지되어 다음해 증식기에 크게 증가하여 참외의 생산성을 떨어뜨리고 있었다.



Fig. 2-2. Root knot of melon isolated in Sung-ju.

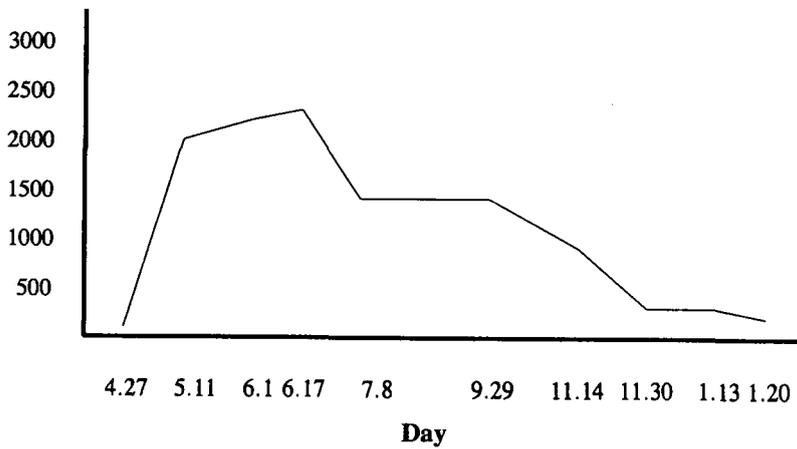


Fig. 2-3. 참외 재배지의 선충 밀도 변화 (1998~1999)

이 들 시설재배 참외의 토양 및 참외 뿌리에서 분리한 뿌리혹선충을 그 형태적 특징등을 근거로 하여 동정한 결과 주로 *Meloidogyne arenaria*와 *M. incognita*가 분포하고 있었고,(Fig 2-4, 2-5, 2-6) 성주이외의 지역에서는 *Meloidogyne arenaria*를 주로 하여 *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne hapla* 등의 선충이 관찰되었다. (Table 2-2)

뿌리혹선충에는 여러 가지의 종이 있으나, 현재 국내에 존재하는 것으로 보고된 것은 4종으로 고구마뿌리혹선충인 *Meloidogyne. incognita*, 당근뿌리혹선충인 *Meloidogyne hapla*, 땅콩뿌리혹선충인 *Meloidogyne arenaria*과 자바니카뿌리혹선충인 *Meloidogyne javanica*이다. 이들의 분류는 유충길이, 암컷의 perenial pattern, 기주식물반응 등으로 구분한다. (Table 2-3, 2-4)

Table 2-2. 뿌리혹 선충의 종분포

지역	선충	race	점유율
성주*	<i>Meloidogyne arenaria</i>	race 2	76%
	<i>Meloidogyne incognita</i>	race 1	24%
기타	<i>Meloidogyne arenaria</i>	race 1	3%
		race 2	52%
	<i>Meloidogyne incognita</i>	race 1	19%
		미확인	13%
	<i>Meloidogyne hapla</i>		13%

\* 성주지역에서 발견된 뿌리혹선충중에 *Meloidogyne arenaria* race 1과 *Meloidogyne incognita* race 2,3,4는 발견되지 않았다.

Table 2-3. 형태적 특징에 의한 뿌리혹선충의 동정

종	유충길이(mm)		동정에 필요한 특징
	평균	범위	
<i>Meloidogyne incognita</i>	0.376	0.360 ~0.393	perineal pattern, female의 excretory pore는 구 침절구의 반대편에 위치
<i>Meloidogyne javanica</i>	0.370	0.340 ~0.400	perineal pattern, female의 excretory pore는 두 부에서 구침절구 2.5배에 위치
<i>Meloidogyne arenaria</i>	0.470	0.450 ~0.490	larvae length가 가장 길다. female의 excretory pore는 두부에서 구침길이 2.0배에 위치

Table 2-4. Root knot nematode identification according to host plants

Species and race	Host Plants					
	Tabacco NC 95	Cotton Deltapine 16	Pepper California Wonder	Watermelon Charleston Gray	Peanut Florrunner	Tomato Rutgers
<i>Meloidogyne incognita</i> Race1	-	-	+	+	-	+
<i>Meloidogyne incognita</i> Race2	+	-	+	+	-	+
<i>Meloidogyne incognita</i> Race3	-	+	+	+	-	+
<i>Meloidogyne incognita</i> Race4	+	+	+	+	-	+
<i>Meloidogyne arenaria</i> Race1	+	-	+	+	+	+
<i>Meloidogyne arenaria</i> Race2	+	-	-	+	-	+
<i>Meloidogyne javanica</i>	+	-	-	+	-	+
<i>Meloidogyne hapla</i>	+	-	+	-	+	+

A



B

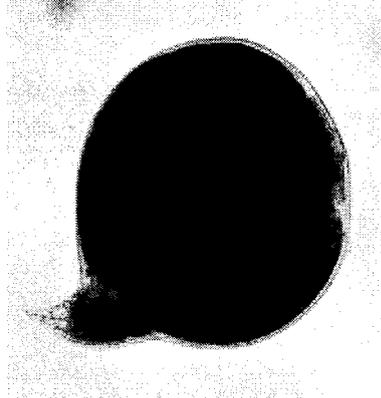


Fig. 2-4. Root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*).

A; second stage larva, B; female adult

A



B



Fig. 2-5. Perineal pattern shape of *Meloidogyne* species

A; *Meloidogyne arenaria*, B; *Meloidogyne incognita*

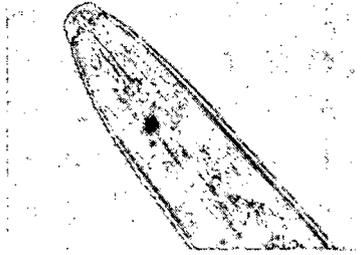


Fig. 2-6. *Meloidogyne arenaria* 수컷 두부사진(광학현미경)

이들 선충의 알을 난낭(Fig. 2-7)으로부터 분리하여 시험관 내에서 부화율을 측정해본 결과 종에 관계없이 대개 같은 정도로 부화가 되었으며 10 일간의 배양으로 약 90% 이상이 부화됨을 알 수 있었다. 토양에서 직접 선충을 분리할 경우 이질적인 상태의 선충이 혼합된 상태로 분리될 확률이 높기 때문에, 이후 항 선충 활성을 측정할 경우 사용하는 선충은 토양에서 직접 분리하지 않고 이처럼 선충알로부터 직접 부화시켜 사용하였다 (Table 2-5).



Fig. 2-7. The egg sac of root knot nematode.

Table 2-5. Egg hatch of root-knot nematodes <sup>a</sup>

	Nematode	Incubation time(day)								
		2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ratio of egg hatch(%)	<i>M. incognita</i>	0	12.4	16.8	19.7	30.0	60.1	85.1	86.2	92.1
	<i>M. hapla</i>	0	12.0	15.7	18.8	25.3	55.9	84.7	89.2	94.7

<sup>a</sup> Nematode Eggs were hatched in PBS buffer(pH7.0) at 25°C.

## 제 4 절 *Bacillus thuringiensis* 균주의 분리 및 선별

### 1. 배지에 따른 *Bacillus thuringiensis*의 분리 효율

생리활성 물질을 생산하는 미생물을 분리하기 위해서는 많은 수의 다양한 미생물을 대상으로 시험하는 것이 목적 미생물을 분리할 수 있는 확률이 높아 지게 된다. 따라서 짧은 시간 안에 많은 수의 *B. thuringiensis*를 효율적으로 분리하기 위해 배지 조건을 검토할 필요가 있을 것으로 생각된다. 균원 시료로부터 *B. thuringiensis* 균주 분리를 효율적으로 수행하기 위하여 몇 가지의 방법이 제시되었다. Travers 등은 시료를 acetate로 전처리 하여 *Bacillus*를 선택적으로 분리하는 독특한 방법을 개발하여 이용하였으며, J. Massie 등은 탄소원으로 acetate를 사용하여 *Bacillus sphaericus*를 선별적으로 분리하는 방법을 기술하였다. 또한 최근에는 Johnson 등은 *B. thuringiensis*를 분리하는데 enrichment 배양으로 효과를 보았다고 보고했다.

이와 같은 *B. thuringiensis* 균주 분리를 위한 몇 가지의 선별방법을 참고

하여, 이 연구에서도 토양에서 *B. thuringiensis* 균주의 분리를 원활하게 하기 위하여 sodium acetate (NAAC) 배지와 일반적으로 사용하는 nutrient (NA) 배지 및 Johnson 등이 보고한 enrichment 배지인 NAPGCY 배지를 사용해서 *B. thuringiensis*의 분리효율을 비교 검토하였다.

그 결과 Table 2-6에서 보는 바와 같이 NAPGCY 배지에서 포자형성 세균이 토양 g당  $4.8 \times 10^8$  cells로서 가장 많이 증식하였으며, NAAC 배지와 NA 배지에서는 각각  $9.2 \times 10^7$  cells,  $3.6 \times 10^7$  cells 순서로 균이 증식이 이루어졌다. NAPGCY 배지에서 가장 많은 수의 세균이 증식된 것은 NAPGCY 배지가 enrichment 배지로서 특히 CCY salt의 첨가가 포자 형성세균의 증식을 아주 왕성하게 촉진시킨 결과라고 생각된다.

또한 위상차 현미경으로 결정성 내독소를 생성하는 콜로니를 조사해 본 결과 NAPGCY 배지에서 약14%, NAAC 배지와 NA 배지에서 각각 약 8%와 7%의 콜로니가 확인되었다. 이들 콜로니는 물론 내독소와 lecitinase를 동시에 생산하는 *B. thuringiensis*로서 lecitinase를 생성하지 않는 *B. thuringiensis*균의 수는 배제되었다. 일반적으로 *B. cereus*는 *B. thuringiensis*와 그 생화학적 특성이 아주 유사하며, *B. cereus*는 결정성 내독소를 생산하지 않지만, lecitinase는 생산한다고 알려져 있다.

따라서 lecitinase만 생성하는 균주나 내독소 만을 생산하는 균주들이 분리되는 빈도가 양쪽 모두를 생산하는 균주에 비해 약 2배 가량 많은 콜로니가 얻어졌음을 볼 때 lecitinase를 생성하지 않는 콜로니에는 *B. thuringiensis* 이외에도 *B. cereus* 등도 많이 존재하고 있음을 시사하고 있다.

Table 2-6. Effect of medium on the isolation of *Bacillus thuringiensis* from soil.

Items / medium	NAPGCY	NAAC	NA
No. of total bacteria cell (colony / g soil)	4.8x10 <sup>8</sup>	9.2x10 <sup>7</sup>	3.6x10 <sup>7</sup>
No. of colony producing lecithinase	23 / 95 (25.15%)	24 / 139 (17.3%)	16 / 97 (16.5%)
No. of colony producing crystal	22 / 95 (23.2%)	18 / 139 (13.7%)	14 / 97 (17.5%)
No. of colony producing lecithinase and crystal simultaneously	13 / 95 (13.7%)	11 / 139 (7.9%)	7 / 97 (7.2%)

Medium NAPGCY was indicated nutrient agar containing pencillin G(20IU) and CCY salt, medium NAAC was nutrient agar containing Na-acetate, and medium NA was nutrient agar only. For lecithinase activity, *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* was used as positive control.

## 2. 항 뿌리혹선충 활성 *Bacillus thuringiensis* 선별

### 가. 외독소에 의한 항 뿌리혹선충 활성균의 선별

다양한 토양 균원 시료로부터 분리한 *Bacillus thuringiensis*를 대상으로 TYG 액체배지에서 5일간(28℃, 150 rpm) 진탕배양한 시험균의 배양액을 각각 0.05 ml씩 실온에서 부화시킨 선충의 2령 유충에 가하여 실온에 방치하면서 광학현미경(60x)으로 관찰하여 치사활성이 있는 균주를 1 차 분리하고 (Table 2-7), 이 들 균주를 다시 순수분리, 배양, 회석 등의 방법을 도입하여 2 차 (Table 2-8), 3 차 (Table 2-9)시험을 반복하여 치사활성의 재현성이 있는 균주

Bt50을 최종적으로 분리하였다. 이는 Levinson 등이 보고한  $\beta$ -exotoxin이거나 그 유연 물질로 생각된다 (자료 생략).

Table 2-7. The 1st screen of nematocidal activity from cultured broth of *B. thuringiensis*<sup>a</sup>

Isolate	Nematocidal Activity			Isolate	Nematocidal Activity		
	1day	2day	3day		1day	2day	3day
Bt 4	+	+	+	Bt 35	+	+	+
Bt 9	+	+	+	Bt 36	+	+	+
Bt 11	+	+	+	Bt 38	+	+	+
Bt 14	+	+	+	Bt 40	+	+	+
Bt 17	+	+	+	Bt 48	+	+	+
Bt 21	+	+	+	Bt 49	+	+	+
Bt 22	+	+	+	Bt 50	+	+	+
Bt 25	+	+	+	Bt 51	+	+	+
Bt 26	+	+	+	Bt 54	+	+	+
Bt 27	+	+	+	Bt 57	+	+	+
Bt 28	+	+	+	Bt 59	+	+	+
Bt 30	+	+	+	Bt 60	+	+	+
Bt 31	+	+	+	Bt 63	+	+	+
Bt 34	+	+	+	Bt 67	+	+	+
Control	-	-	-	Control	-	-	-

<sup>a</sup>Nematocidal activity was tested in mixture of 0.5 ml distilled water containing nematodes and 0.05 ml cultured broth of *B. thuringiensis*

Table 2-8. The 2nd screen of nematocidal activity from cultured broth of 1st screened cells<sup>a</sup>

Isolate	Nematocidal Activity			Remark
	1day	2day	3day	
Bt 4	+	+	+	
Bt 17	+	+	+	
Bt 21	+	+	+	
Bt 26	+	+	+	
Bt 48	+	+	+	
Bt 49	+	+	+	Egg destroy
Bt 50	+	+	+	
Bt 54	+	+	+	
Bt 57	+	+	+	
Bt 60	+	+	+	Egg destroy
Bt 63	+	+	+	
Control	-	-	-	

<sup>a</sup>;Nematocidal activity was tested in mixture of 1.0 ml distilled water containing nematodes and 0.1 ml cultured broth.

Table 2-9. The 3rd screen of nematocidal activity from cultured broth without cells<sup>a</sup>

Isolate	Nematocidal Activity			Remark
	1day	2day	3day	
Bt 4	±	±	±	1/3 dead
Bt 17	±	±	±	1/2 dead
Bt 21	-	-	-	
Bt 26	-	-	-	
Bt 48	±	±	±	1/3 dead
Bt 49	-	-	-	
Bt 50	+	+	+	4/5 dead
Bt 54	±	±	±	1/2 dead
Bt 57	-	-	-	
Bt 60	-	-	-	
Bt 63	-	-	-	
Control 1	-	-	-	
Control 2	-	-	-	

<sup>a</sup>;Nematocidal activity was tested in mixture of 1.0 ml distilled water containing nematodes and 0.1 ml of supernatant of cultured broth from 2nd screened bacterial strains. Control 1: tap water, Control 2: TYG media.

#### 나. 내독소 의한 항 뿌리혹선충 활성균의 선별

다양한 토양 균원 시료로부터 분리한 *Bacillus thuringiensis*를 TYG 한천 배지에서 5일간(28℃) 정치 배양한 균체를 실온에서 부화시킨 선충의 2령 유충에 1백금이 씩 가하여 잘 현탁한 후 실온에 방치하면서 광학현미경(60×)으로 관찰하여 치사활성이 있는 균주를 1 차로 선별하고 (Table 2-10), 이 들 균주를 다시 순수분리, 배양, 회석 등의 방법을 도입하여 2 차 (Table 2-11), 3 차 (Table 2-12) 시험을 반복하였다. 이 때 2 차 시험부터는 배양액 중에 공존할 수 있는 외독소에 의한 치사활성을 제거하기 위하여 배양균체를 증류수로 3회 세척하여 외독소의 혼입을 가능한 방지하려고 하였다. 이러한 과정을 거쳐 치사활성이 재현성 있게 나타나는 균주를 2주 분리하고 각각 Bt17, Bt79로 명명하였다. 분리된 두 균주 중에서 Bt17 균주가 Bt79 균주에 비해 활성이 더 강한 것으로 나타나 앞으로 Bt17 균주를 중심으로 실험을 진행하였다.

Table 2-10. The 1st screen of nematocidal activity from mixture of cells and  $\delta$ -endotoxin<sup>a</sup>

Isolate	Nematocidal Activity			Remark
	1day	2day	3day	
Bt 7	+	+	+	
Bt 17	+	+	+	
Bt 17-1	+	+	+	
Bt 26	-	+	+	
Bt 31	+	+	±	
Bt 46	-	±	±	
Bt 63	±	+	+	
Bt 79	±	+	+	
Bt 82	+	-	-	
Bt 86	+	+	±	
Bt 92	+	+	+	yellow color
Bt 104	+	+	+	
Bt 113	+	+	+	yellow color
Bt 114	+	+	+	yellow color
Bt 118	+	+	+	
Bt 125	+	+	+	
Bt 138	+	+	+	
Bt 166	+	+	+	
Bt 167	+	+	+	yellow color
Bt 169	+	+	+	
Control	-	-	-	

<sup>a</sup>Nematocidal activity was tested in mixture of 1.0ml distilled water containing nematodes and 0.1ml cultured broth with bacteria cells. Control : PBS (pH7.0).

Table 2-11. The 2nd screen of nematocidal activity of mixture of cells and  $\delta$ -endotoxin after washing 3 times with distilled water<sup>a</sup>

Isolate	Nematocidal Activity			Remark
	1day	2day	3day	
Bt 17	+	+	+	
Bt 79	+	+	+	
Bt 92	-	+	+	yellow color
Bt 114	-	-	±	yellow color
Control	-	-	-	

<sup>a</sup>;Nematocidal activity was tested in mixture of 1.0ml distilled water containing nematodes and 0.1ml cultured broth with bacteria cells. The mixture of bacteria cells and  $\delta$ -endotoxin was washed with distilled water 3 times, and then nematocidal activity was detected. Control : PBS(pH7.0).

Table 2-12. The 3rd screen of nematocidal activity of the mixture of cell and  $\delta$ -endotoxin after washing 3 times with distilled water<sup>a</sup>

Isolate	Nematocidal Activity			Remark
	1day	2day	3day	
Bt 17	+	+	+	
Bt 79	±	±	±	
Bt 92	-	-	±	yellow color
Bt 114	-	-	±	yellow color
Control	-	-	-	

<sup>a</sup>;Nematocidal activity was tested in mixture of 1.0ml D.W. and 0.1ml cultured broth containing bacteria cells. The mixture of bacteria cells and  $\delta$ -endotoxin was washed with distilled water 3 times, and then nematocidal activity was detected. Control : PBS buffer(pH7.0).

Bt17 균주가 생성하는 내독소를 단계적으로 희석하여 그 독력을 측정하는 결과는 Table 2-13과 같다. 표에서 볼 수 있는 것처럼 Bt17 균주가 생성하는 독소는 희석 배율이 높아질수록 그에 비례해서 독력이 떨어짐을 볼 수 있어 이는 진정한 항 선충 활성을 갖는 독소의 작용에 의한 것임을 알 수 있다. 또 이들 균체를 그대로 사용한 경우와 증류수로 세척한 후의 독력에는 약간의 활성 차이를 볼 수 있는 데, 이는 Bt17 균주가 외독소도 소량 분비하고 있는 것으로 보이나, 항 선충 활성의 주성분은 이 균주가 생성하는 내독소로 생각된다.

이를 확인하기 위하여 Bt17 균주가 생성하는 항 뿌리혹선충 활성 물질의 세포 내 국제성을 살펴보았다. Table 2-14에서 보는 것처럼 이 균주의 항 선충 활성의 대부분은 세포 내에 존재하는 내독소임을 알았으며, 소량 세포 밖으로 분비되는 외독소를 생성함을 알 수 있었다. 일반적으로 *Bacillus thuringiensis* 속의 균주는 단백질성의 내독소인  $\delta$ -endotoxin을 생성하나 아 종에 따라 외독소를 분비하는 사실이 알려져 있다. Bt17 균주도 이러한 균종처럼 소량의 외독소를 분비하는 균주로 생각된다.

Table 2-13. Nematocidal activity of delta- endotoxin from the strain Bt17<sup>a</sup>

Samples \ Feeding Time(Day)	Mortality(%)			Remark
	1	2	3	
Delta-endo Toxin				
x1	70	100	100	100%치사
x2	40	60	60	60%치사
x4	0	30	30	30%치사
x8	0	20	20	20%치사
x10	0	0	0	0
x20	0	0	0	0
Complex(Toxin+Cell) after washing	70	80	80	80%치사
Complex(Toxin+Cell) without washing	100	100	100	100%치사
Control(PBS buffer)	0	0	0	0

<sup>a</sup>;Mortality was expressed as protein concentration of  $\delta$ -endotoxin from the strain Bt17. The protein concentration of native  $\delta$ -endotoxin was 160  $\mu\text{g}$ /ml, and the 2nd stage larva of *Meloidogyne hapla* was used

Table 2-14. Cellular localization of nematocidal toxin from strain Bt17<sup>a</sup>

Cultured Fraction of the strain Bt17	Mortality(%) after 24hr
Supernatant	23.4
Delta-endotoxin	94.5
Complex of cells and delta-endotoxin	98.7
Supernatant + Complex of cells and delta-endotoxin	100
Control	5.5

<sup>a</sup>;The strain Bt17 was cultured in TYG medium at 30°C for 5days in shaking incubator. The 200 ug/ml delta-endotoxin was introduced into the 2nd larva of nematode for toxicity test. PBS buffer was used as control group.

이처럼 토양에서 분리한 포자 형성 세균 중 내독소에 의한 뿌리혹선충의 2령 유충에 독성이 있는 항 선충 활성을 가지는 Bt17 균주의 형태학적인 특징을 위상차현미경으로 조사해 본 결과 Fig 2-8.에서 보는 바와 같이 이 균주는 포자와 내독소를 생성하는 전형적인 *Bacillus thuringiensis*의 한 균주임을 알 수 있었다.

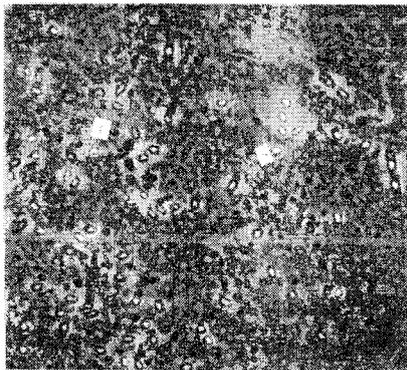


Fig. 2-8. Morphology of *Bacillus thuringiensis* strain Bt17 on phase contrast microscope (Magnification, X 1000).

Symbols: s, endospore; t, endotoxin

## 제 5 절 균주의 생리 생화학적 특성

### 1. 균주의 생리적 특성

선별된 *B. thuringiensis* Bt17 균주와 Bt79 균주의 특성을 다각적으로 분석하여 기지의 *B. thuringiensis*와 비교하였다. 항 뿌리혹선충 활성을 나타내는 분리균 Bt17 균주와 Bt79 균주 및 독소의 물질, 균주 특허 등을 위해서, 또 분리균의 현장 적용화를 위한 취급의 용이성 등을 위해 분리균의 생리, 생화학적 특성의 조사를 통한 정확한 동정 및 신규성 검토가 요구된다. 항 뿌리혹선충 활성을 나타내는 Bt17 균주와 Bt79 균주의 생리 생화학적 성질의 검토는 Bergey's manual of systematic Bacteriology와 Simbert와 Krig의 방법에 따라 행하였다. 이 때 표준 균주로 BtHD1을 사용하였다. 그 결과 Table 2-15에서 보는 바와 같이 Bt17은 표준 균주 BtHD1의 생리 생화학적 성질이 동일하였으며 Bt79는 acetoin 생성에서만 차이를 보였다.

Table 2-15. Biochemical properties of *B. thuringiensis* strains

Biochemical Properties	<i>B. thuringiensis</i> strains		
	BtHD1	BT17	BT79
Morphology	Rod-shape	Rod-shape	Rod-shape
Endospore formation	+	+	+
Motile	+	+	+
Gram stain	+	+	+
Parasporal crystal	+	+	+
Growth at pH5.7(Nutrient broth)	+	+	+
Catalase	+	+	+
Lipase(olive oil)	+	+	+
Nitrate reduced to nitrite	+	+	+
Anaerobic growth	+	+	+
Lecithinase	+	+	+
Arginine dehydrogenase	+	+	+
Lysine decarboxylase	-	-	-
Ornithin decarboxylase	-	-	-
Urease	-	-	-
Tryptophan deaminase	-	-	-
H <sub>2</sub> S production	-	-	-
Indole production	-	-	-
Acetoin production	-	-	+
Gelatin liquification	+	+	+
Glucose fermentation	-	-	-
Oxidative utilization;			
L-mannitol	-	-	-
Sorbitol	-	-	-
Rhamnose	-	-	-
Sucrose	-	-	-
Melibiose	-	-	-
Amygdalin	-	-	-
D-xylose	-	-	-
L-arabinose	-	-	-
D-glucose	-	-	-

Note: Reference; *B.thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD1(type strain),  
+,positive; -,negative

## 2. 균주의 탄소원 이용성

표준 균주인 *B.thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD1과 선충에 치사력을 가진 *Bacillus thuringiensis* BT17 및 BT79 균주들의 탄소원 이용성에 따른 생리적인 특성을 검토하였다. 이는 미생물 자동 동정 시스템 (Biolog)을 이용한 Biolog사의 안내서에 따라 각 균주의 탄소원에 대한 이용성을 검토하였다. 즉 먼저 각 균주들은 1% glucose가 함유된 BUGM 한천배지(Biolog사)에서 2회 계대 배양을 하였다. 그 후 멸균된 0.85% 생리식염수에 계대 배양한 각 균주를 각각 현탁시켜서 optical density(35-42%; Transmitter by Biolog Co.)를 조절하여 균체 농도를 일정하게 하였다. 현탁된 균체는 GP microplate (Biolog Co.)의 각 well에 150  $\mu$ l씩 주입하고, 28℃에서 24 시간 동안 반응을 시켜서 microplate에 부착된 탄소원의 이용성에 따라 생성된 발색의 정도를 측정하였다. 그 결과를 Table 16에 정리하였으며 이를 기초로 세균에 대한 Data Base에서 대비하여 본 결과 80% 이상의 유사성으로 *B. thuringiensis*로 나타났다. 세 균주 모두 전체적으로 대단히 유사했으며 Bt17과 BtHD1은 L-glutamic acid와 adenosine-5'-monophosphate 이용성에서 차이를 보일 뿐이다.

Table 2-16. Carbone source utilization of *Bacillus thuringiensis* strain BT79 & BT17.

carbon source \ strain	Bt 17	Bt HD-1	Bt 79
1. water	-	-	-
2. $\alpha$ -cyclodextrin	-	-	-
3. $\beta$ -cyclodextrin	v	v	v
4. dextrin	+	+	+
5. glycogen	v	v	v
6. inulin	-	-	-
7. mannan	v	v	v
8. tween 40	-	-	-
9. tween 80	-	-	-
10. N-acetylglucosamine	+	+	v
11. N-acetylmannosamine	v	-	v
12. amygdalin	-	-	-
13. L-arabinose	-	-	-
14. D-arabitol	-	-	-
15. arbutin	-	-	-
16. cellobiose	v	v	v
17. D-fructose	+	+	+
18. L-fructose	-	-	-
19. D-galactose	-	-	-
20. D-galacturonic acid	-	-	-
21. gentiobiose	+	v	v
22. D-gluconic acid	v	v	v
23. $\alpha$ -D-glucose	+	+	+
24. m-inositol	-	-	-
25. $\alpha$ -D-lactose	-	-	-
26. lactulose	-	-	-
27. maltose	+	+	+
28. maltotriose	+	+	+
29. D-mannitol	-	-	-
30. D-mannose	+	v	+

carbon source \ strain	Bt 17	Bt HD-1	Bt 79
31. D-merezitose	-	-	-
32. D-melibiose	v	-	-
33. $\alpha$ -methyl -D-galactoside	-	-	-
34. $\beta$ -methyl -D-galactoside	-	-	-
35. 3-methyl glucose	+	v	+
36. $\alpha$ -methyl-D-glucoside	-	-	-
37. $\beta$ -methyl-D-glucoside	v	v	v
38. $\alpha$ -methyl -D-mannoside	-	-	-
39. palatinose	v	v	v
40. D-psicose	+	v	v
41. D-raffinose	-	-	-
42. L-rhamnose	-	-	-
43. D-ribose	+	-	v
44. salicin	-	v	-
45. sedoheptulosan	-	-	-
46. D-sorbitol	-	-	-
47. stachyose	-	-	-
48. sucrose	v	v	v
49. D-tagatose	-	-	-
50. D-trehalose	+	+	+
51. turanose	+	+	+
52. xylitol	-	-	-
53. D-lactic acid	v	-	-
54. acetic acid	-	-	-
55. $\alpha$ -hydroxybutyric acid	v	v	-
56. $\beta$ -hydroxybutyric acid	v	-	-
57. $\gamma$ -hydroxybutyric acid	-	-	-
58. $\rho$ -hydroxyphenyl acetic acid	-	-	-
59. $\alpha$ -ketoglutaric acid	v	-	-
60. $\alpha$ -ketovaleric acid	+	v	v
61. lactamide	-	-	-
62. D-lactic acid -methyl ester	+	v	v

carbon source \ strain	Bt 17	Bt HD-1	Bt 79
63. L-lactic acid	+	+	v
64. D-malic acid	-	-	-
65. L-malic acid	v	-	-
66. methyl pyruvate	+	v	v
67. methyl succinate	-	-	-
68. propionic acid	-	-	-
69. pyruvic acid	+	+	+
70. succinamic acid	-	-	-
71. succinic acid	v	-	-
72. N-acetyl -L-glutamic acid	v	v	v
73. alaninamide	v	-	-
74. D-alanine	v	-	v
75. L-alanine	+	v	v
76. L-alanyl-glycine	+	+	v
77. L-asparagine	+	v	v
78. L-glutamic acid	+	-	v
79. glycyl -L-glutamic acid	+	+	+
80. L-pyroglutamic acid	-	-	-
81. L- serine	+	v	v
82. 80. putrescine	-	-	-
83. 2,3-butenediol	-	-	-
84. glycerol	v	v	v
85. adenosine	+	+	v
86. 2'-deoxy adenosine	+	v	v
87. inosine	+	+	v
88. thymidine	+	v	v
89. uridine	+	+	v
90. adenosine -5'-monophosphate	+	-	v
91. thymidine -5'-monophosphate	v	-	v
92. uridine -5'-monophosphate	+	+	v
93. fructose-6-phosphate	v	-	-
94. glucose-1-phosphate	-	-	-
95. glucose-6-phosphate	v	-	-
96. D-L- $\alpha$ -glycerol phosphate	-	-	v

### 3. 균주의 편모 항원성

*B. thuringiensis*는 편모 항원성에 따라 현재 55종으로 분류되고 있다. 이들 55종의 항 혈청을 대상으로 분리한 균주의 편모 항원에 따른 항 혈청에 의한 응집반응을 Paudua 등의 방법 및 De Barjac과 Frachon의 방법에 의거하여 행하였다. 각각의 표준 *B. thuringiensis* 균주에 대한 항 혈청과 Bt17 균주와 Bt79 균주의 편모 항원과 응집반응을 조사한 결과 Table 2-17에서 보는 바와 같이 Bt17 균주는 표준 균주로 사용한 BtHD1과 같이 serotype 3인 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*의 편모에 대한 항체와 유일하게 응집반응이 형성되었다. 한편 Bt79 균주는 serotype 50인 *B. thuringiensis* subsp. *navarrensensis*의 편모에 대한 항체와 응집반응이 형성되었다. 따라서 Bt 17 균주와 Bt79 균주는 혈청형이 서로 다른 subspecies에 속함을 알 수 있다.

표준 균주로 사용한 BtHD1과 Bt17 균주는 동일한 serotype 3에 속하지만 BtHD1 균주는 나방에 대한 살충성은 있으나 뿌리혹선충에 대한 활성이 없으며, Bt17 균주는 항 선충 활성을 나타내, Bt가 나타내는 활성과 혈청형은 직접적인 상관관계가 있는 것은 아닐 것으로 생각된다. 따라서 목적으로 하는 활성균을 분리하고자 할 경우 언제나 자연계로부터 새로이 활성 균주의 분리를 시도할 필요가 있을 것으로 생각된다. Bt 17 균주는 BtHD1 균주가 없는 항 선충 활성, 독소 항원성의 차이, 생리 생화학적 특성에서도 약간의 차이를 보여 새로운 균주로 생각된다. 또 Bt79 균주는 serotype 50에 속하지만 아직 이 혈청형이 생성하는 내독소에 대한 연구는 이루어져 있지 않고 있어 이 균주는 serotype 50에 속하는 균주 중에서 항 선충 활성을 나타내는 최초의 균주로 분리된, 새로운 균주로 볼 수 있을 것이다.

Table 2-17. H agglutination of strain Bt17 and Bt79 with antisera of *Bacillus thuringiensis* serotype

Serotype	Subspecies	BtHD1	Bt17	Bt79
1	<i>thuringiensis</i>	-	-	-
2	<i>finitimus</i>	-	-	-
3	<i>kurstaki</i>	+	+	-
4	<i>kenyae</i>	-	-	-
5	<i>galleria</i>	-	-	-
6	<i>entomocidus</i>	-	-	-
7	<i>aizawai</i>	-	-	-
8	<i>morrisoni</i>	-	-	-
9	<i>tolworthi</i>	-	-	-
10	<i>darmstadiensis</i>	-	-	-
11	<i>kyushuensis</i>	-	-	-
12	<i>thompsoni</i>	-	-	-
13	<i>parkistani</i>	-	-	-
14	<i>israelensis</i>	-	-	-
15	<i>dakota</i>	-	-	-
16	<i>indiana</i>	-	-	-
17	<i>tohokuensis</i>	-	-	-
18	<i>kumamotoensis</i>	-	-	-
19	<i>tochiensis</i>	-	-	-
20	<i>yunnanensis</i>	-	-	-
21	<i>colmeri</i>	-	-	-
22	<i>shandongensis</i>	-	-	-

Serotype	Subspecies	BtHD1	Bt17	Bt79
23	<i>japonensis</i>	-	-	-
24	<i>neoleonensis</i>	-	-	-
25	<i>coreanensis</i>	-	-	-
26	<i>silo</i>	-	-	-
27	<i>mexicanensis</i>	-	-	-
28	<i>jegathesan</i>	-	-	-
29	<i>amagiensis</i>	-	-	-
30	<i>medellin</i>	-	-	-
31	<i>toguchini</i>	-	-	-
32	<i>cameroun</i>	-	-	-
33	<i>leesis</i>	-	-	-
34	<i>konkukiensis</i>	-	-	-
35	<i>seoulensis</i>	-	-	-
36	<i>malaysiensis</i>	-	-	-
37	<i>andaluciensis</i>	-	-	-
38	<i>oswaldocruzi</i>	-	-	-
39	<i>brasiliensis</i>	-	-	-
40	<i>huazhongensis</i>	-	-	-
41	<i>sooncheon</i>	-	-	-
42	<i>jinghongiensis</i>	-	-	-
43	<i>gyiyangiensis</i>	-	-	-
44	<i>higo</i>	-	-	-
45	<i>roskilgiensis</i>	-	-	-
46	<i>chanpasis</i>	-	-	-
47	<i>wratislaviensis</i>	-	-	-
48	<i>balearica</i>	-	-	-
49	<i>muju</i>	-	-	-
50	<i>navarrensis</i>	-	-	+
51	<i>xiaguangiensis</i>	-	-	-
52	<i>kim</i>	-	-	-
53	<i>asturiensis</i>	-	-	-
54	<i>poloniensis</i>	-	-	-
55	<i>palmanyolensis</i>	-	-	-

Symbols: Reference: *B.thuringiensis* subsp. *kurstaki*(type strain), +:positive, -:negative.

#### 4. 선별된 균주의 약제에 대한 내성 검토

항 선충 활성을 갖는 Bt 제제의 사용 방안은 Bt 균주의 직접적인 살포와 Bt toxin의 시용으로 나누어 생각할 수 있다. Bt 균주를 직접 사용하기 위해서는 균주의 토양 내에서 증식능력의 유지 여부와 함께 영농기간 중 병충해 방제를 위해 사용될 것으로 예상되는 여러 농약에 대한 저항성 유무가 중요한 요인의 하나로 생각된다.

여기서 Bt 균주의 살포시 혹은 살포 후의 독력 유지 능력의 검토 및 살포 방법의 기초적 자료를 확보하기 위해, 성주 지역에서 참외 재배시 주로 사용되고 있는 농약 10 여 가지를 선택해서 항 선충 활성의 *Bacillus thuringiensis* Bt17 균주의 증식에 미치는 영향을 살펴 보았다.(Table 2-18)

TYG 액체 배지에 시험할 각각의 농약을 사용 권장량에 따라 일정량을 첨가하고 Bt 17 균주를 접종하여 하룻밤 진탕 배양한 후의 세포수를 측정하였다. 배양액을 serial dilution하고 그 액을 TYG 한천 평판 배지에 도말하여 24시간 후에 출현하는 콜로니 수를 계측하여 colony forming unit (CFU)로 나타내었다.

Table 2-18. The Effect of agricultural chemicals on the growth of Bt 17

구분	종류	농도(mg/ml)	세포수(CFU/ml)
대조구		0	$9 \times 10^8$
살충제	선충탄	0.25	$2.6 \times 10^9$
	코니도수화제	0.5	$9 \times 10^6$
살균제	바이코수화제	0.5	$< 1 \times 10^4$
	벤레이트수화제	0.75	$< 1 \times 10^4$
	알리에테수화제	2.0	$< 1 \times 10^4$
	오티바엑상수화제	0.05	$2.5 \times 10^9$
	일품수화제	1.0	$< 1 \times 10^4$
	트리후민수화제	0.5	$< 1 \times 10^4$
	포름만수화제	2.0	$< 1 \times 10^4$
	포리옥신수화제	1.0	$1.5 \times 10^7$
	웨나리유제	0.04	$< 1 \times 10^4$

Bt 17 균주는 살충 살균제에 관계없이 전체적으로 생육 저해를 받는 것으로 나타나나 예상대로 살충제에 비해 살균제에 의한 저해효과가 더욱 크게 나타났다. 아직 기초적인 자료이긴 하지만 이 결과를 토대로 생각하면 농약을 사용하는 일반 농가에서는 Bt 균주의 직접 살포에 의한 선충 방제는 어려울 것으로 생각되나 농약을 사용하지 않는 유기농의 경우 토양에서 균의 증식능이 확인된다면 사용 가능성 여부는 앞으로 더 검토할 여지가 있을 것이다.

## 제 6 절 *Bacillus thuringiensis* 독소 생산 조건의 최적화

### 1. ELISA를 이용한 독소 정량법의 확립

Bt 균주의 배양 중 생성되는 독소의 양을 정량적으로 측정하는 길은 배양 조건의 확립, 독소의 토양 중의 거동의 파악 등을 위해 필수적으로 요구되는 상황이다. 이에 따라 Bt의 내독소를 순수 분리하여 항 선충성 Bt 독소 특이적 항체를 제작하여, 이 항체를 이용하여 ELISA법으로 독소량을 정량적으로 측정할 수 있는 방법을 개발하였다. Fig 2-9에서 볼 수 있는 것처럼 독소 0.01  $\mu\text{g}$ 에서 1  $\mu\text{g}$ 에 이르는 약 100배에 이르는 농도의 범위에서는 독소의 양이 증가함에 따라 흡광도도 비례적으로 증가함을 알 수 있어 이 범위 안에서 독소의 정량적 측정이 가능하게 되었다. 기존의 독소 측정법은 포자수의 측정 혹은 단백질 양의 측정 등의 간접적인 측정법이었으나, 이 실험에서 확립한 방법은 직접적으로 독소를 측정할 수 있다는 점에서 Bt 독소의 정량법을 진일보 시켰다고 할 수 있을 것이다.

그러나 실험의 목적에 따라 이 실험에서는 포자수의 측정 또는 단백질의 정량 등을 병행하여 독소의 생성량을 측정하였다.

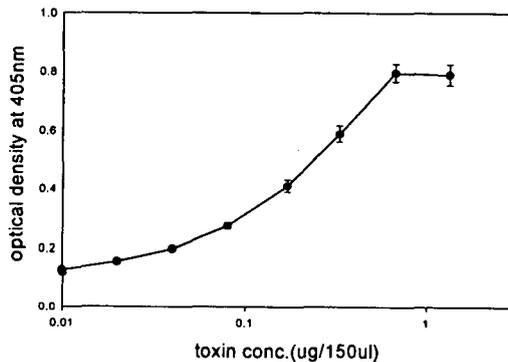


Fig. 2-9. Quantitative analysis of delta-endotoxin of *B. thuringiensis* by ELISA method.

## 2. 독소의 생산에 미치는 영양소의 영향

### 가. 탄소원의 영향

Toxin 생성에 최적인 탄소원과 탄소원의 양을 조사하기 위해 TYG배지에 첨가되는 glucose의 양을 달리했을 때와 glucose가 아닌 다른 탄소원으로 starch와 이탄당인 sucrose와 maltose를 사용한 배지에서 균의 생육과 spore의 생육을 조사하였다.

배지에 첨가되는 탄소원의 양은 각각 0.1%, 0.5%, 1%, 2%로 하였고, 30℃, 140 rpm에서 6일간 배양한 후 600 nm에서 흡광도를 측정하여 균의 생육정도를 나타내고, 포자는 65℃에서 15분간 열처리 후 TYG 평판배지에 희석 도말하여 나타난 colony 수를 측정하였다(Fig. 2-10, 2-11, 2-12, 2-13).

탄소원으로 glucose가 사용되었을 때는 glucose의 양이 증가하면 균의 수도 증가하였으나 포자의 수는 감소하여 glucose의 양이 0.1%일 때 포자가 가장 많이 생성되었고, starch가 탄소원으로 사용되었을 때는 균의 생육과 포자의 생성은 비례하여 starch가 많을수록 포자가 많이 생성되었다. 이탄당인 sucrose가 탄소원으로 사용되었을 때는 균의 생육은 다른 탄소원에 비해 감소하였으나 포자의 생성은 차이를 보이지 않았고, maltose가 사용되었을 때는 glucose와 비슷한 양상을 나타내었다. 실험에 사용한 탄소원 중에서 starch가 독소 생성의 간접적인 지표가 될 수 있는 포자 생성에서 약간 좋은 성적을 보였으나 전체적으로 큰 차이를 나타내지는 않았다.

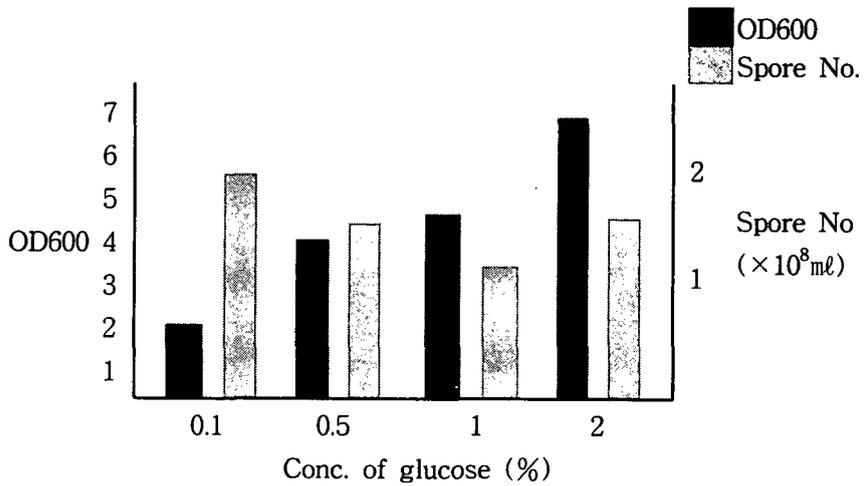


Fig. 2-10. Effect of glucose concentration on growth and spore production of *B. thuringiensis*. Basal medium was composed of 0.5% tryptone, 0.5% yeast extract, and 0.1%  $K_2HPO_4$ .

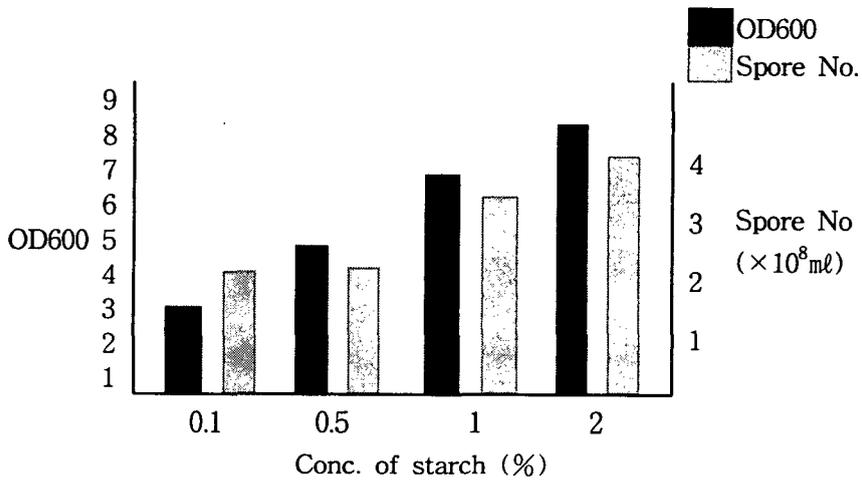


Fig. 2-11. Effect of starch concentration on growth and spore production of *B. thuringiensis*. Basal medium was composed of 0.5% tryptone, 0.5% yeast extract, and 0.1%  $K_2HPO_4$ .

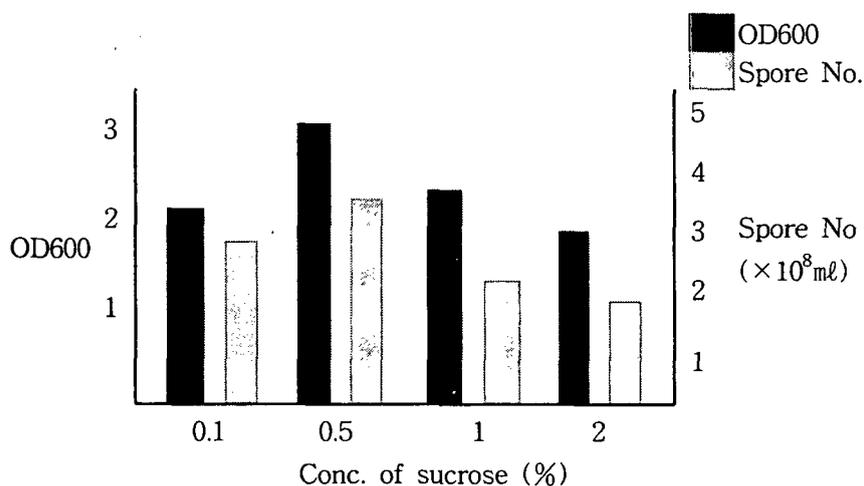


Fig. 2-12. Effect of sucrose concentration on growth and spore production of *B. thuringiensis*. Basal medium was composed of 0.5% tryptone, 0.5% yeast extract, and 0.1%  $K_2HPO_4$ .

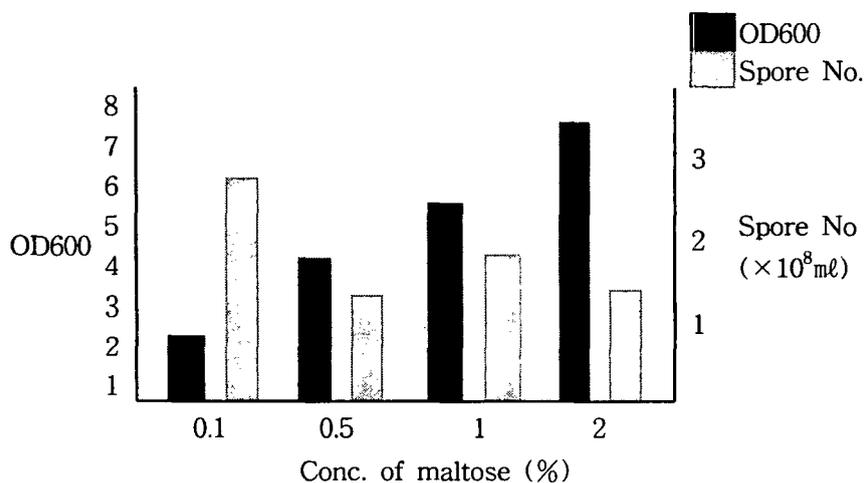


Fig. 2-13. Effect of maltose concentration on growth and spore production of *B. thuringiensis*. Basal medium was composed of 0.5% tryptone, 0.5% yeast extract, and 0.1%  $K_2HPO_4$ .

나. 질소원의 영향

질소원의 종류에 따라 Bt 독소 생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 무기태 및 유기태의 질소원을 사용하여 포자의 생성 정도를 조사하였다. TYG배지에 trypton을 대신하여 0.5%의  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ , peptone, tryptone을 첨가하여 Bt를 배양한 결과  $\text{NO}_3^-$  형태의 질소원은 다른 질소원에 비해 균의 생육과 포자의 생성이 모두 불량한 것으로 나타났고 나머지 질소원은 비슷한 경향을 나타내었다 (Fig 2-14). 이 중에서 tryptone의 농도를 달리하여 배양한 후 포자수를 측정한 결과는 Fig. 2-15와 같다.

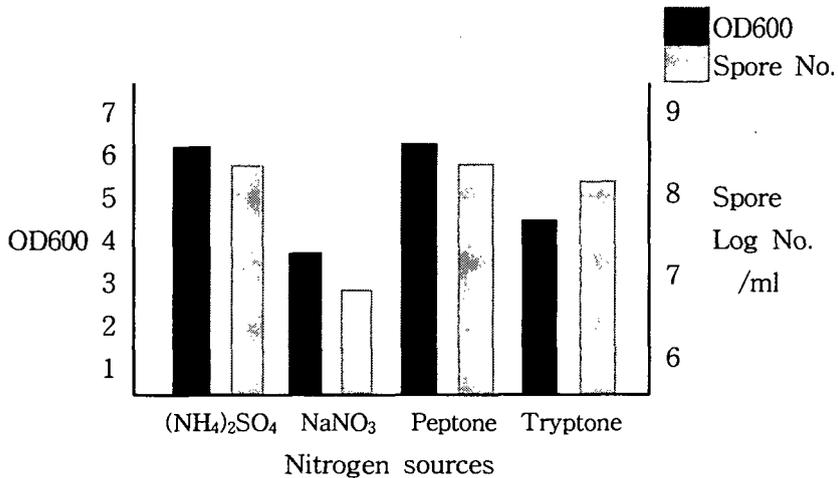


Fig. 2-14. Effect of nitrogen sources on the growth and spore production of *B. thuringiensis*.

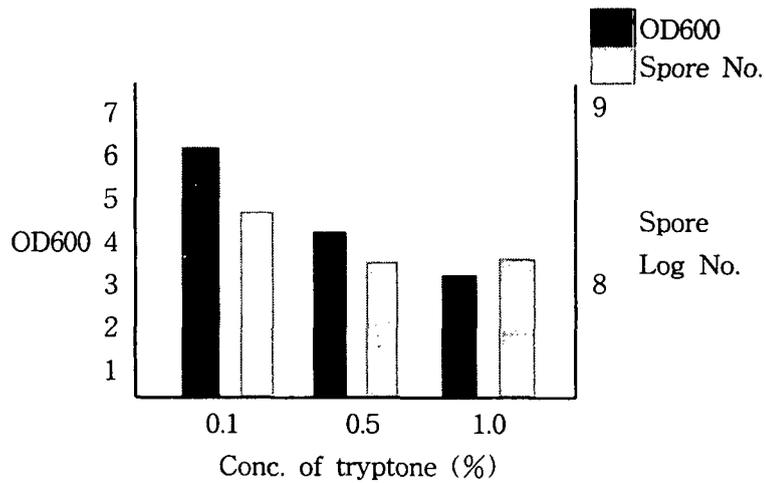


Fig. 2-15. Effect of tryptone concentration on the growth and spore production of *B. thuringiensis*. Basal medium was composed of 1.0% glucose, 0.5% yeast extract, and 0.1%  $K_2HPO_4$ .

#### 다. Yeast extract의 영향

일반적으로 균의 생육인자 (growth factor)로 잘 사용되고 있는 yeast extract가 독소생성에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 2-16과 같다. Yeast extract의 농도가 낮을 때 균의 생육이 우수했으며 포자의 생성은 농도에 큰 영향을 받지 않았다.

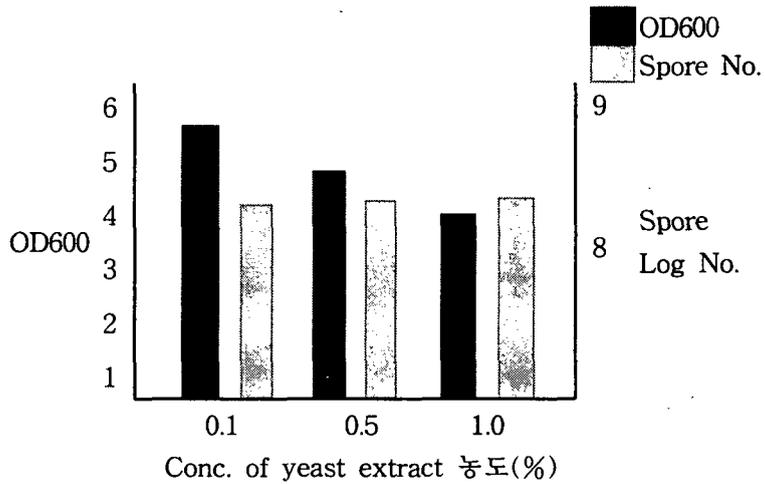


Fig. 2-16 Effect of yeast extract concentration on growth and spore production of *B. thuringiensis*. Basal medium was composed of 1.0% glucose, 0.5% tryptone, and 0.1%  $K_2HPO_4$ .

#### 라. 인산염의 영향

독소생성에 관여하는 인산염의 영향을 조사하기 위해 TYG 배지에 각기 다른 농도로  $K_2HPO_4$ 를 첨가하고 포자의 생성을 조사한 결과 Fig. 2-17과 같이  $K_2HPO_4$ 양이 0.5%일 때 균의 생육과 포자의 생성이 가장 우수한 것으로 나타났다.

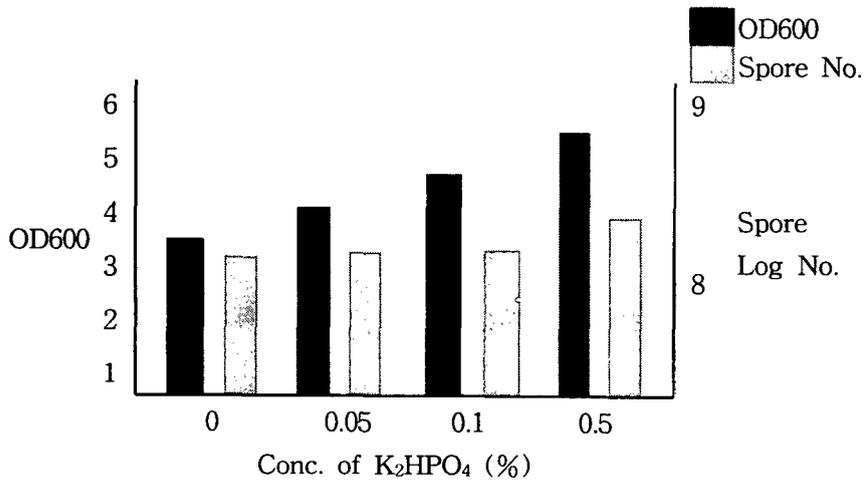


Fig. 2-17. Effect of K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> concentration on growth and spore production of *B. thuringiensis*. Basal medium was composed of 1.0% glucose, 0.5% tryptone, and 0.5% yeast extract.

마. 금속 이온의 영향

독소의 생성에 미치는 금속이온의 영향을 조사하기 위해 금속 이온을 각각 1 mM 농도로 첨가한 TYG 배지에서 균주를 진탕 배양한 후 배양액의 포자수를 측정하였다. 6일 후 배양액에서 포자의 생성은 Co<sup>++</sup>에 의해서 크게 저해 되었으며, Cu<sup>++</sup>에 의해서 약간 감소되었으나, 다른 금속 이온간에는 큰 차이를 볼 수 없었다 (Table 2-19).

Table 2-19. Effect of mineral ion on spore production of *B. thuringiensis*.

mineral ion	No. of spore/ml
none	$9.0 \times 10^7$
Ca <sup>++</sup>	$1.0 \times 10^8$
Co <sup>++</sup>	$1.2 \times 10^8$
Cu <sup>++</sup>	$6.0 \times 10^8$
Mg <sup>++</sup>	$1.2 \times 10^8$
Mn <sup>++</sup>	$1.0 \times 10^8$
Fe <sup>++</sup>	$1.2 \times 10^8$
Zn <sup>++</sup>	$1.0 \times 10^8$

### 3. 독소의 생산에 영향을 미치는 물리화학적 요인

#### 가. 초기 pH의 영향

Bt 독소 생산에 미치는 배지의 초기 pH의 영향을 조사하기 위해 0.1 N HCl 또는 NaOH를 사용하여 TYG 배지의 pH를 조절하여, 균의 생육을 시간별로 조사하고 6일 후 포자의 수를 측정하였다. pH 5에서는 균의 생육과 포자의 생육이 감소하였고, pH 6에서 8 사이에서는 큰 차이가 나타나지 않았다 (Fig. 18, Table 2-20).

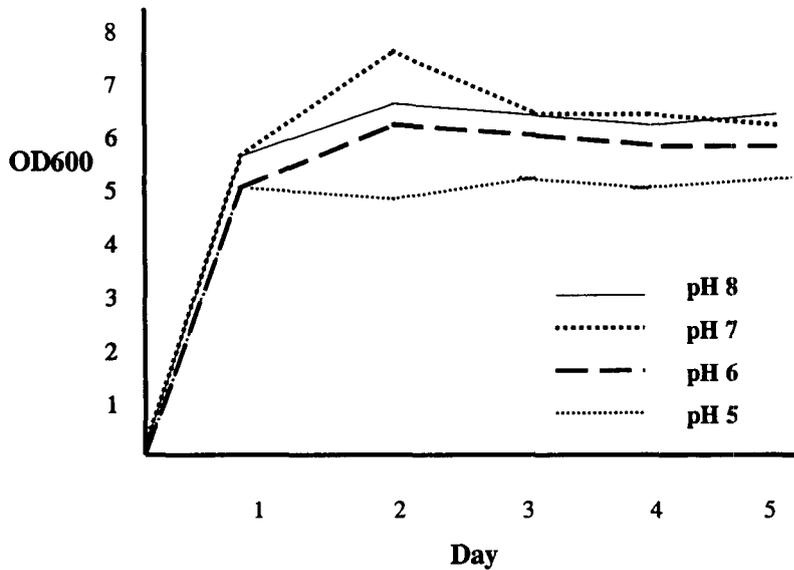


Fig. 2-18. Growth curve of *B. thuringiensis* 17 at different initial pH. Basal medium was composed of 1.0% glucose, 0.5% tryptone, 0.5% yeast extract, and 0.1%  $K_2HPO_4$ .

Table 2-20. Effect of the initial pH of medium on the Bt spore production

pH	5	6	7	8
Spore No.	$1.2 \times 10^8$ /ml	$2.1 \times 10^8$ /ml	$2.3 \times 10^8$ /ml	$2.9 \times 10^8$ /ml

#### 나. 통기량에 의한 영향

포자의 형성은 배지중의 산소의 양과도 관계가 있다고 알려져 있다. Bt 17 균주에서 산소의 공급과 포자의 생육과의 관계를 조사하기 위해, 500 ml의 삼각 flask에 각각 25 ml, 50 ml, 100 ml, 200 ml의 배지를 넣어 5일간 진탕 배양한 후 배양액의 포자 수를 측정하였다.

Bt 17 균주의 포자 생성도 aeration의 영향을 받아서 aeration이 잘될수록 포자생성이 증가되어서 배지의 양이 가장 적게 들어간 조건 즉 aeration이 가장 잘된 배양조건에서 포자가 가장 많이 만들어지고 배지의 양에 비례하여 포자의 생성수가 줄어들었다 (Fig 2-19).

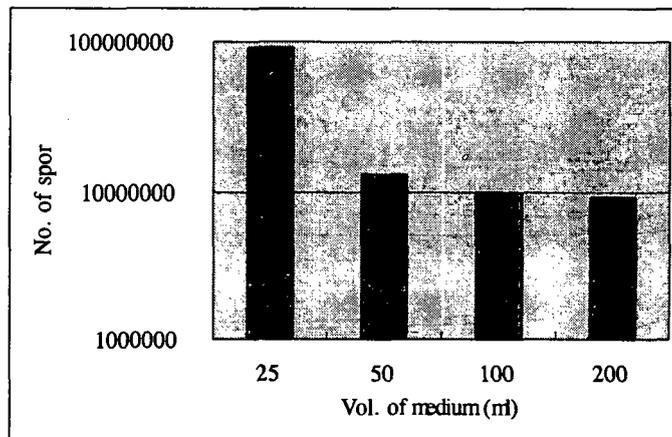


Fig. 2-19. The relation between spore production and aeration

#### 4. 액체배지와 고체배지에 의한 독소 생산

액체배지와 고체배지에서 균의 생육과 포자, toxin 생성의 상호 관계를 조사하기 위해, 10 ml의 TYG 배지를 함유한 25 ml용 삼각 flask에 Bt17 균주를 1백금이 접종하여 28°C에서 하룻밤 동안 종균 배양하고, 그후 종균 배양액 1 ml를 100 ml의 TYG 배지가 함유된 250 ml Erlenmeyer flask에 접종하여 28°C에서 진탕배양 (130 rpm) 하면서 액체배양에서 toxin의 생성을 조사하고, 상기의 종균 배양액 2 ml를 20 ml의 TYG 한천배지가 함유된 사각병(7 × 14 cm)에 접종하여, 28°C에서 배양하면서 고체배양에서 toxin의 생성을 ELISA로 조사하였다.

세포수당 포자생성량, 혹은 독소 생성량은 액체의 경우 보다 고체의 경우가

약 10배 높은 것으로 확인되었다.( Table 2-21, Fig. 2-20) 이는 아마, 포자 생성과 독소 생성이 밀접한 관련을 가짐으로 생기는 결과로 보인다. 즉 포자 생성은 수분함량이 높은 경우 그 생성이 저해됨으로, 수분함량이 상대적으로 많은 액체배지가 포자와 독소의 생성이 낮은 것으로 해석된다. 따라서 독소의 효율적인 생산을 위해서는 액체 배양보다도 고체 배양을 하는 것이 한층 더 효과적이라고 생각된다.

Table 2-21. The amount of total cell, spore, toxin in the solid agar media and liquid media

Media Day	Solid agar media			Liquid media		
	No. of total cell	No. of spore	toxin ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	No. of total cell	No. of spore	toxin ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
1	$5.6 \times 10^6$	$6.4 \times 10^3$	7	$3.8 \times 10^5$	$6 \times 10$	0
2	$9.6 \times 10^8$	$1.52 \times 10^7$	1185	$4.7 \times 10^6$	$5.2 \times 10^2$	0
3	$1.32 \times 10^{10}$	$2.66 \times 10^8$	2478	$1.6 \times 10^7$	$9.5 \times 10^4$	0
4	$2.62 \times 10^{10}$	$2.06 \times 10^9$	4206	$1.77 \times 10^8$	$1.55 \times 10^6$	6
5	$2.03 \times 10^{12}$	$4.7 \times 10^9$	4412	$2.75 \times 10^9$	$7.1 \times 10^6$	274
6	$2.37 \times 10^{12}$	$5.5 \times 10^9$	4451	$6.9 \times 10^9$	$1.35 \times 10^7$	340
7	$2.36 \times 10^{12}$	$6.1 \times 10^9$	4398	$1.88 \times 10^{10}$	$1.78 \times 10^7$	861
8	$2.58 \times 10^{12}$	$5.9 \times 10^9$	4428	$1.72 \times 10^{10}$	$5.4 \times 10^7$	1027
9				$2.27 \times 10^{10}$	$9.1 \times 10^7$	1672
10				$3.5 \times 10^{10}$	$6.7 \times 10^7$	1730

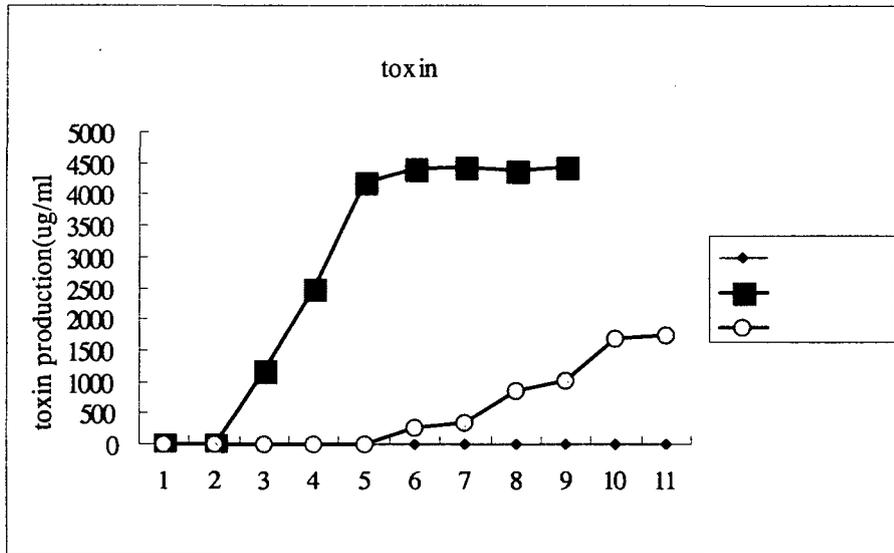


Fig. 2-20. The relation between toxin production and growth of *B. thuringiensis* in solid agar media and liquid media. The bacteria were cultivated at 30°C in TYG medium which was composed of 1.0% glucose, 0.5% tryptone, 0.5% yeast extract, and 0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7.2).

## 5. Jar fermentor 배양

### 가. 통기량의 효과

상기 실험에서 액체 배양보다 고체 배양이 독소 생성이 훨씬 효율적임을 알았으나, 실제 대량의 독소를 얻는 데는 고체 배양은 한계가 있기 마련이다. 따라서 대량 배양을 위해서는 액체 배지를 사용하는 fermentor를 이용할 수밖에 없을 것이다. 그래서 fermentor에서 효율적인 배양을 위한 조건을 검토하기 위하여 특히 대량 배양에서 가장 문제가 되는 통기량의 영향을 조사하였다.

5 l 크기의 Jar fermentor에 2 l의 TYG 배지를 넣어 120°C에서 30 분간 멸균한 후 종배양액을 1%되게 접종하고 교반속도를 300 rpm으로 고정하고 공기 주

입량을 1 vvm과 2 vvm으로 각각 주입하며 30℃에서 3일간 배양한 후의 균의 생육 및 포자의 수를 측정하였다. 균의 생육에는 두 실험구가 큰 차이를 보이지 않았지만 포자의 수는 2vvm의 공기가 주입된 경우가 월등히 많이 형성되었다.(Fig 2-21)

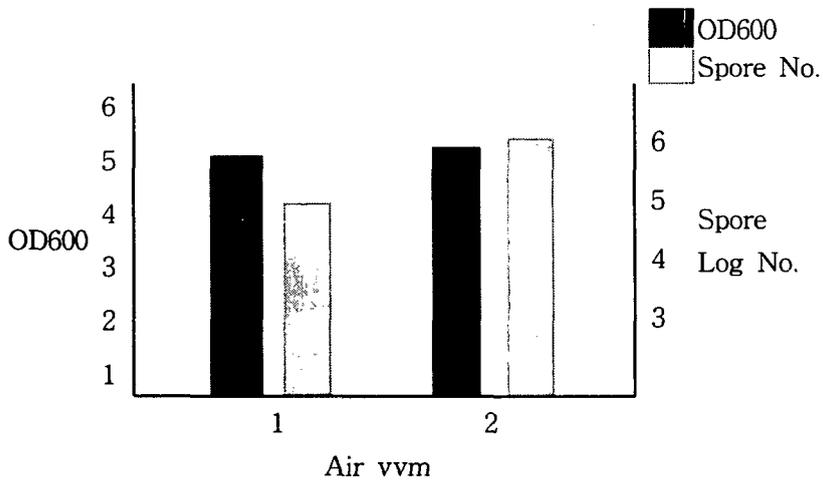


Fig. 2-21. Effect of aeration on the growth and spore production of *B. thuringiensis* in jar fermentor. The bacteria were cultivated at 30℃ for 3 days in TYG medium which was composed of 1.0% glucose, 0.5% tryptone, 0.5% yeast extract, and 0.1%  $K_2HPO_4$  (pH 7.2).

#### 나. Jar fermentor 배양

Jar fermentor에서 배양 시간에 따른 생육 경과를 변화를 조사하기 위해 위와 같은 조건으로 2 vvm, 300 rpm, 30℃의 조건에서 포자수의 변화와 균의 생육을 시간별로 측정하였다. 균의 생육은 1일 후 최대가 되었으나 포자의 수는 조금씩 증가하여 4일 후부터 최대치에 도달하였다 (Fig. 2-22).

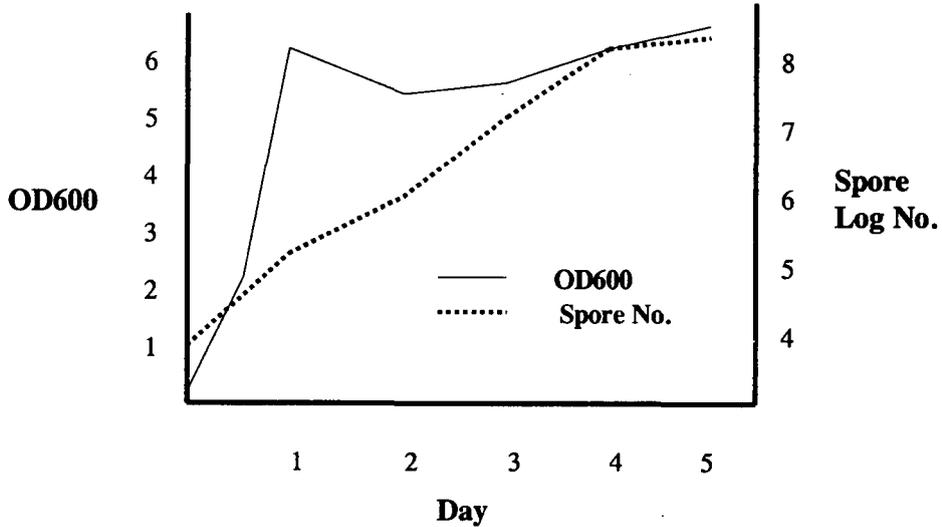


Fig. 2-22 Growth and spore production of Bt 17 in jar fermentor. The bacteria were cultivated at 30°C for 5 days in TYG medium which was composed of 1.0% glucose, 0.5% tryptone, 0.5% yeast extract, and 0.1%  $K_2HPO_4$  (pH 7.2).

#### 6. 반고체 배양에서의 포자 생성

Bt 균주의 독소 생성은 액체 배지보다 고체 한천평판 배지에서 훨씬 더 효율적임을 알았으나 고체 배양의 경우 대량 배양의 어려움으로 실제 독소 생산의 수단으로 사용하기 어려운 점이 많다고 생각된다. Bt 균주의 실제 적용을 위해서는 낮은 가격으로 Bt를 제제화 해야 할 필요성이 있다. fermentor를 이용

한 대량 배양의 경우도 고가의 배지를 사용해야 하는 문제가 있으므로 이를 해결하기 위한 수단으로 값 싼 원료로서 대량 배양이 가능하고 그 위에 독소의 생성효율도 뛰어난 배양법을 찾아야 할 필요가 있을 것이다. 그래서 Bt의 제제화를 위해 고품질의 증량제 및 배지로 국내에서 쉽게 구할 수 있는 미강을 사용하여 Bt 독소의 생산을 시도하였다.

증량제로 미강과 규조토를 이용하여 여러 조합으로 배지를 만들고 배양한 결과 미강을 사용할 경우에는 질소원으로 유기태의 질소를 사용하지 않고 무기태의 질소를 사용하더라도 독소의 생성이 우수함을 알았다. 그리하여 다음과 같은 조성을 가진 반고체 배지를 사용하여 Bt 균주를 배양하였다. 즉, 미강 9 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.05 g, glucose 0.5 g, 규조토 1 g,  $\text{H}_2\text{O}$  5 ml의 비율로 만든 반고체 배지를 멸균하고 여기에 10배 희석된 종균배양액 8 ml를 접종하여 30°C에서 6일간 배양하고, 이 배양체를 실온에서 건조하여 분말형태의 Bt 제제를 만들었다. 이와 같은 반고체 배지배양에 의하여 1 g당  $1.6 \times 10^8$  개의 포자가 포함된 Bt 제제를 만들 수 있었다.

## 제 7 절 항 선충 활성 Bt 내독소의 생화학적 특성

### 1. pH에 따른 Bt 내독소의 용해성

*Bacillus thuringiensis* 균주는 증식이 진행됨에 따라 포자를 형성하게 되는데 이 때 내독소인 delta-endotoxin이 세포 내에서 불용성의 결정형으로 생성된다. 이들은 곤충의 장내에 들어가 장내의 알카리 환경에서 가용화되어 곤충에 치사작용을 나타낸다. 이들 결정성 독소의 분리 정제 등에는 가용화가 필요하기 때문에 Bt17, Bt79 균주가 생성하는 내독소의 용해 특성을 조사하여 독소의 효율적인 분리 방법을 확립하고자 하였다. 각각의 pH 용액에 Bt 균주가 분비하는 내독소 단백질 1 mg을 각 첨가하여 37°C에서 2시간 용해를 시킨 후 상온에서 원심분리(13,000rpm, 10분)를 행하고 그 상청액을 취하여 단백질 정량 및 SDS-PAGE를 행한 결과는 Table 2-22, Fig. 2-23과 같다. 내독소 결정의 용해도는 pH가 증가함에 따라 증가하여 pH 11.5 ~ 12.5 사이에서 약 37 ~ 50% 까지 용해되나 SDS-PAGE에서 볼 수 있는 것처럼 분해가 많이 일어나고 생물학적 활성도 더 떨어지는 것으로 나타나 용해도가 약 14 ~ 24% 정도인 pH 10.0 ~ 10.5 사이가 최적 조건임을 알았다.

Table 2-22. The solubility of delta-endotoxin of Bt17 strain at different alkaline solution <sup>a</sup>

pH	Solubility (%)
8.5	3.97
9.0	4.56
9.5	7.43
10.0	13.85
10.5	23.5
11.0	28.4
11.5	36.92
12.0	48.52
12.5	49.6

<sup>a</sup> 1 mg of delta-endotoxin of Bt17 strain was solubilized at each pH solution for 2 h at 37°C

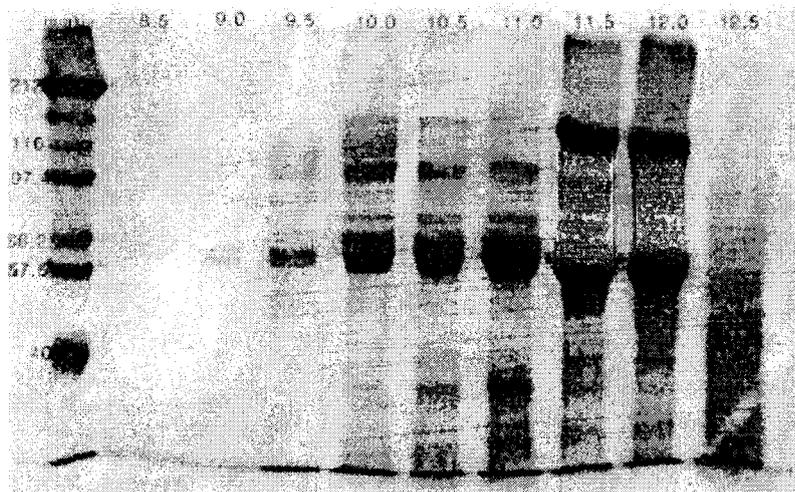


Fig. 2-23. SDS-PAGE pattern of solubilized delta-endotoxin of Bt17 strain at indicated pH solution.

## 2. Bt17 및 Bt79 균주가 생성하는 내독소의 항 선충 활성 (LC<sub>50</sub>)

Bt17 균주 및 Bt79 균주가 생성하는 내독소의 항 선충 활성을 알아보기 위하여 선충의 알에서 부화시킨 2령 유충에 대한 항 선충 활성을 Reed와 Muench의 방법에 따라 각 독소의 LC<sub>50</sub>을 측정하였다. 이 때 대조군으로 나방에 대해 활성을 나타내며 Bt17 균주와 유사한 생화학적 특성을 지니고 있는 BtHD1 균주와, 모기 유충에 대해 독성을 나타내는 Bti 균주를 함께 실험에 사용하였다. 그 결과 Table 2-23에서 보는 바와 같이 Bti 및 Bt17과 매우 비슷한 성질을 지니고 있는 BtHD1 균주는 뿌리혹선충에 대하여 전혀 독 작용을 나타내지 않는 데 비해 이 실험에서 분리한 Bt17 균주와 Bt79 균주는 다같이 독성을 나타내었다. 이들 중 Bt17의 LC<sub>50</sub>은 43  $\mu\text{g/ml}$ 로 Bt79 균주의 125  $\mu\text{g/ml}$ 에 비해 약 3배 정도 강하게 나타났다.

Table 2-23. Nematocidal activity of delta-endotoxin from Bt17

Protein	LC <sub>50</sub>	LC <sub>90</sub>
Bt HD1	none	none
Bt17	43 $\pm$ 5 $\mu\text{g/ml}$	74 $\pm$ 6 $\mu\text{g/ml}$
Bt79	125 $\pm$ 8 $\mu\text{g/ml}$	223 $\pm$ 5 $\mu\text{g/ml}$
Bti	none	none

LC<sub>50</sub> of the toxic crystals of the strain Bt17 & Bt79 against the 2nd stage larva of *Meloidogyne hapla* was determined by method of Reed and Muench(1938). Mortality was expressed as protein concentration of  $\delta$ -endotoxin from the strain Bt17 & Bt79.

## 3. Bt17 및 Bt79 균주가 생성하는 내독소의 용혈성 시험

Bt17 및 Bt79 균주가 생성하는 내독소가 흑시 적혈구를 용해하는 용혈활성을 나타내는가를 알기 위하여 rat의 적혈구를 사용하여 이들의 용혈활성을 조사하였다. 단계적으로 희석한 내독소 단백질 용액과 적혈구만를 혼합하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 일정한 시간동안 방치를 한 후 육안으로 용혈성을 측정하였다. Table 2-24에서 보는 것처럼 모기 유충에 독성을 나타내는 Bti 균주는 185  $\mu\text{g/ml}$ 의 Bt 독

소 농도에서 적혈구를 완전히 용해시키는 용혈활성을 보이는데 반하여 Bt17과 Bt79 균주는 BtHD1과 함께 용혈활성을 나타내지 않았다. 선충에 대해서만 특이적으로 독성을 나타내는 Bt17과 Bt79 균주의 독소는 이로 미루어 보아 선충 이외의 인축이나 유용 곤충 등에 대해서는 무독성의 안정성이 높은 생물학적 제재로 개발될 가능성이 높을 것으로 생각된다.

Table 2-24. Hemolytic activity of delta-endotoxin from BT17 against red blood cells of rat.

<i>B. thuringiensis</i> strain	Hemolytic activity ( $\mu\text{g/ml}$ )
Bti	185
HD1	none
BT17	none
BT79	none

The titer for hemolytic activity was expressed at the lowest protein concentration showing 100% lysis of red blood cells of rat.

#### 4. Bt17 균주 내독소의 SDS-PAGE

Bt17 배양 균체로부터 분리 조제한 내독소 단백질을 10 mM dithiothreitol 을 함유한 50 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  용액에 현탁하여, 37°C에서 1 시간 동안 용해시킨 다음 상온에서 원심분리(13,000rpm, 10분간)를 행한 후 용해된 내독소 단백질을 시료로 이때 SDS-PAGE를 행하였다. 이 때 BtHD1 균주를 대조로 사용하여 영동 양상을 분석한 결과 Bt17 균주는 BtHD1과 전체적인 양상은 매우 유사하여 공통의 독소 단백질은 갖고 있음은 물론이지만 그 외 BtHD1에서 검출되지 않는 약 130 K 크기의 단백질이 보이는 등 독소의 영동상이 약간 상이한 것으로 보아 (Fig. 2-24), Bt17 균주의 독성은 그 활성은 물론 단백질의 양상으로 보아도 새로운 타입의 Bt 독소로 생각된다. 이 130 K 단백질이 항 선충 활성을 나타내는 것인가는 앞으로 규명할 문제로 생각된다.

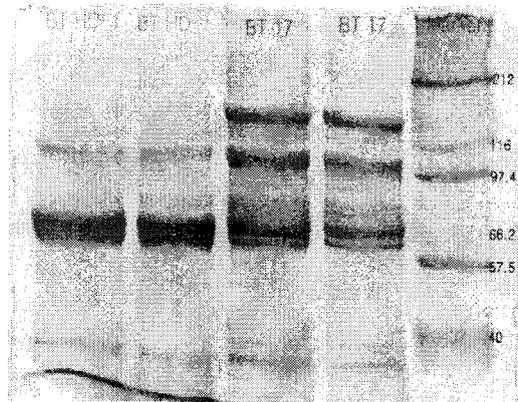


Fig. 2-24. SDS-PAGE pattern of  $\delta$ -endotoxin

## 5. Bt17 균주 내독소의 면역학적 분석

### 가. Bt17 균주의 내독소에 대한 항체 제작

Bt17 균주의 내독소에 대한 항체의 제작은 Cheung과 Kim의 방법에 따라 행하였다. 즉, 내독소를 alkaline 용액으로 가용화 시켜 토끼에 주사하여 항체를 형성시켰다. 면역된 토끼로부터 내독소에 대한 항혈청을 함유한 혈액을 채취하여 상법에 따라 항혈청을 분리하였다. 항혈청은 Johnstone과 Thorpe의 방법에 따라 염석, DEAE-cellulose ion exchange column chromatography를 거쳐 항체를 정제하고  $-30^{\circ}\text{C}$ 에 보존하면서 사용하였다. 정제한 항체는 이중확산 면역 침강법인 Ouchterlony test로 검사한 결과 (Fig. 2-25), Bt17 균주의 내독소에 대한 특이적인 항체임을 알 수 있었고 이 항체를 이용하여 ELISA, immuno blot 등을 수행할 수 있었다.



Fig. 2-25. Ouchterlony test of solubilized parasporal inclusions of strain Bt17. The centre well contained 20 $\mu$ l of a rabbit antisera raised against solubilized inclusion proteins of strain Bt17. Each surrounded wells are solubilized inclusion proteins of strain Bt17.

#### 나. Immunoblot

분리 정제한 Bt17 내독소에 대한 항체를 이용하여 Bt17 균주와 BtHD1 균주로부터 각각 분리한 내독소의 항원성을 조사하기 위하여 immuno blot을 수행하였다. 각각의 균주로부터 분리한 독소 단백질을 용해한 후 SDS-polyacrylamide gel상에서 전기영동으로 단백질을 분리하고 nitrocellulose membrane에 transfer 하여 Bt17 특이적 항체와 반응시킨 결과는 Fig. 2-26과 같다. Fig. 25에서 보는 것처럼 Bt17 균주와 BtHD1 균주는 대부분 공통적인 독소 항원을 갖고 있는 것으로 나타났으나 약 130 K 크기의 내독소 단백질에서 항원성의 차이가 나타났다. 즉 Bt17 균주는 이 항원 단백질을 갖고 있는데 비하여 BtHD1 균주에서는 찾아볼 수 없었다. 따라서 항 선충 활성을 갖고 있는 Bt17 균주의 내독소 단백질은 활성이 없는 BtHD1 균주의 내독소 단백질과는 다른 독소 단백질일 가능성이 높다고 할 수 있을 것이다.

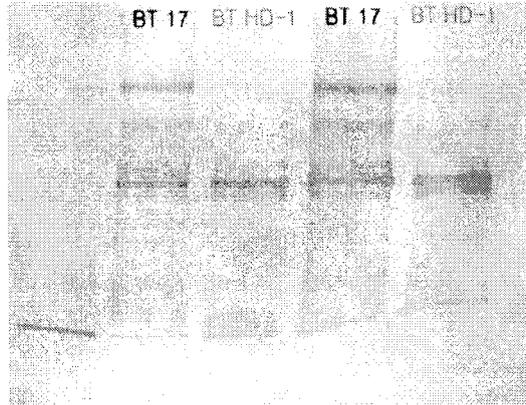


Fig. 2-26. Immunoblot of  $\delta$ -endotoxin of Bt17

#### 다. Immunoelectrophoresis

Bt17 균주와 BtHD1 균주의 내독소의 항원성의 차이 여부를 면역 전기 영동법으로 조사하였다. 양 쪽 항원을 모두 Bt17 균주의 내독소를 사용했을 경우에는 형성된 면역침강선이 동일한 양상을 보이고 있는데 비하여 (Fig. 2-27), 양 항원을 Bt17 독소와 BtHD1의 독소를 사용하면 Fig. 2-28에서 보는 것처럼 공통 항원이 존재함과 동시에 다른 항원의 존재로 인한 침강선의 모양에 차이가 나타났다. 이를 통해 Bt17 균주와 BtHD1 균주는 같은 *B. thuringiensis* subsp. *krustaki*에 속하지만 Bt17이 생성하는 독소는 나방에 대해 살충활성을 가진 것으로 알려진 BtHD1의 독소와는 다른 새로운 독소임을 알 수 있었다.

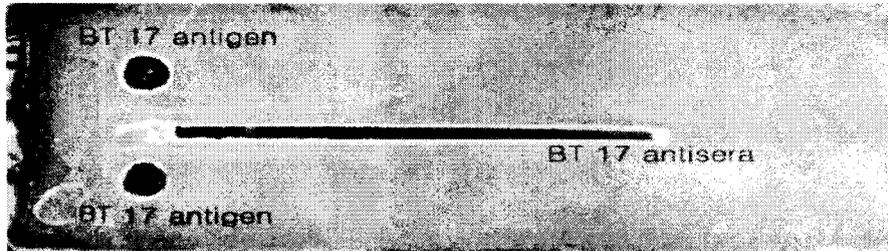


Fig. 2-27. Immuno-electrophoresis pattern of solubilized parasporal inclusions of strain Bt17. Each well contained solubilized parasporal inclusions of strain Bt17. The throughes contained antisera against solubilized parasporal inclusions of strain Bt17.

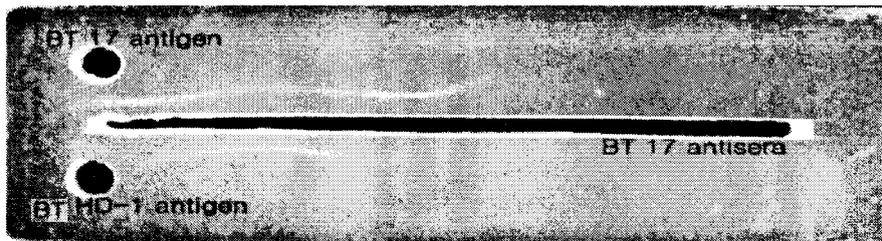


Fig. 2-28. Immuno-electrophoresis pattern of solubilized parasporal inclusions of strain Bt17 and BtHD-1. Up-well contained solubilized parasporal inclusions of strain Bt17, down-well contained solubilized parasporal inclusions of strain BtHD-1. The throughes contained antisera against solubilized parasporal inclusions of strain Bt17.

#### 6. 토양 중의 Bt 내독소의 안정성 및 정량법의 확립

Bt toxin을 토양 중에 살포했을 경우 토양 내에서 잔류기간, 흡착능, 안정성 등을 측정하기 위해서는 토양 중의 독소의 양을 정량할 수 있는 방법이 필요하다. 토양 중의 독소의 정량법에 대해서는 아직 보고된 바도 없기 때문에 새로 고안 할 수밖에 없는 실정이다. 이 실험에서는 ELISA법에 의해 토양 중의 독소

를 정량적으로 검출할 수 있는지를 다음과 같은 방법으로 몇 가지 조건에서 시도해 보았다.

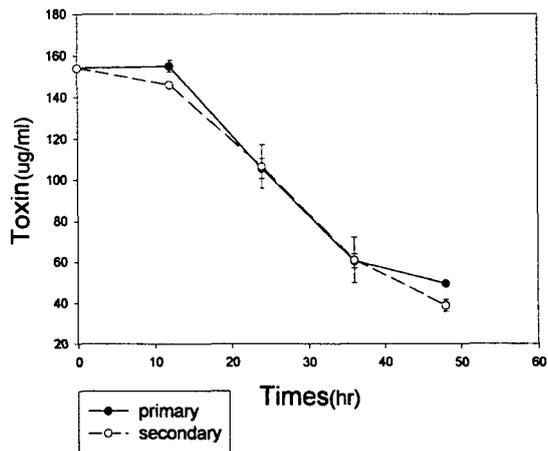
즉, 일정량의 토양에 동결건조 시킨 Bt17 toxin 일정량을 혼합하여 각 온도에서 방치하면서 일정 시간마다 일정량의 토양을 취하여 50mM carbonate buffer (pH10.8)로 37°C에서 1시간 동안 독소 단백질을 추출하고, 추출 용액 중의 독소 단백질을 ELISA법으로 정량하였다. ELISA에 의한 Bt toxin의 측정은 Voller 등의 방법에 따라 용해된 독소단백질은 microplate의 well에 250 $\mu$ l씩 넣고 4°C에서 하룻밤 동안 흡착시켰다. 그후 well은 3회 washing buffer (pH7.2)로 씻은 후 정제된 항체 (1:2,000 희석액)를 가하여 25°C에서 3 시간 방치한다. 그후 다시 well은 3회 washing buffer (pH7.2)로 씻은 후 goat-antirabbit immunoglobulin alkaline conjugate (1:8,000)를 가하여 25°C에서 3 시간 동안 반응시킨다. 이때 기질은 p-nitrophenylphosphate를 10% diethanolamine buffer (pH9.8)에 용해하고 ELISA(Enzyme linked immunoassay) Reader로 405nm에서 측정하였다. 이렇게 해서 각 2 반복으로 2회에 걸쳐 실험한 결과를 Table 2-25와 Fig. 2-29에 나타내었다.

Table 2-25. Assay of Bt17 toxin in soil by ELISA

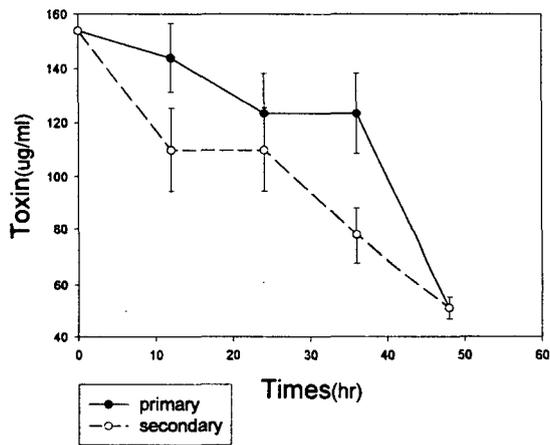
단위 :  $\mu$ g/ml

시간	25°C				30°C				35°C			
	1차		2차		1차		2차		1차		2차	
0	154	154	154	154	154	154	154	154	154	154	154	154
12	153	157	115	146	135	153	99	121	166	143	105	113
24	109	102	99	114	113	134	98	90	151	140	105	105
36	58	63	69	53	87	82	85	71	96	84	66	64
48	50	49	41	37	54	48	51	51	31	24	17	17

### Fate of toxin in soil at 25C



### Fate of toxin in soil at 30C



Fate of toxin in soil at 35C

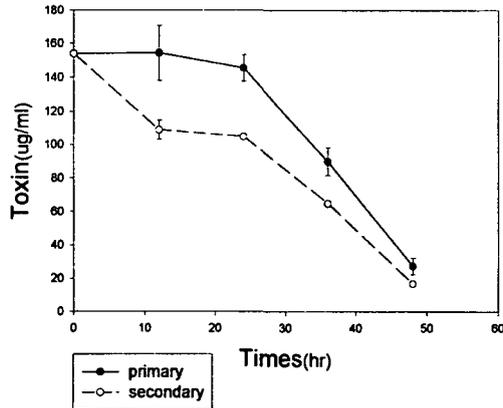


Fig. 2-29. Decrease of Bt toxin in soil at different temperature

이 결과를 보면 시간의 경과에 따라 용출되는 독소량이 감소되는 것을 볼 수 있는데 이는 독소의 안정성의 문제인지 흡착능, 용출도의 문제인지, 데이터의 정확한 해석은 앞으로 더욱 검토해 보아야 하지만, 앞으로 토양 중의 독소의 양을 용출하지 않고 in situ로 측정할 수 있는 방법을 고안할 수 있다면 어느 정도 해석이 가능하리라 생각된다. 그러나 이 결과는 토양 중의 독소의 정량성에는 어느 정도 신뢰성을 보여 주고 있음을 볼 수 있었다.

이 결과를 단순히 해석하면 토양 중의 독소는 시간이 경과함에 따라 그 양이 감소하고 있는데 이는 토양 중에 존재하는 미생물들에 의해 독소 단백질이 분해되는 것으로도 볼 수 있을 것이다. 작물의 생육범위 내의 온도 하에서는 독소의 안정성에 미치는 온도의 영향은 크게 차이가 나타나지 않고 있는 것같이 보이는데 이는 미생물상의 다양성을 반영하고 있는 것으로도 해석할 수 있을 것이다.

## 제 8 절 Bt17 균주의 항 선충 활성 pot 실험

### 1. 1차 pot 실험 (멸균 토양)

시험관 내에서 참외의 뿌리혹선충에 대해 항 선충 활성을 나타내는 Bt17 균주가 실제 현장에서도 항 선충 활성을 나타낼 것인지를 알아보기 위하여 먼저 첫 단계로 pot 실험을 수행하였다. 1차 pot 실험에서는 Bt17 균주의 토양 내에서 활성을 보기 위하여 토양을 멸균하여 오직 뿌리혹선충과 Bt17 균주만 있는 조건하에서 실험을 진행하였다.

참외의 생육은 Walters 등이 기술한 바와 같이 흙과 모래를 1:1로 섞은 토양을 멸균 처리하고 (120°C, 약 20분), pot(φ8×9cm)에 멸균 토양 약 300 g을 넣어 참외(품종 등록 번호 VM-PV-1) 씨앗을 파종하였다. 참외 모종의 본 잎이 2~3 잎 되었을 때 *M. hapla* 알을 뿌리 부근에 약 5,000개 정도 되도록 접종시킨 후 Bt17 처리구와 무처리구, 또 대조구로 뿌리혹선충을 감염시키지 않은 다음의 3 그룹으로 나누었다.

- ① Control : 무처리 Group (Pot : 20개)
- ② Sample1 : 감염된 Group (Nematode egg만 투여함; 5,000 egg/root)  
(Pot : 20개)
- ③ Sample2 : Bt17처리 Group (5,000 egg/root + 0.25g BT17 cells/root)  
(Pot : 20개)

(파종일시, 1999년 3월 26일 ; 접종일시, 1999년 4월 6일)

이 들 pot를 실내에서(약 20~25°C) 참외를 성장시키면서 외관상의 변화를 관찰하였다. 선충 감염 4 일 후 (Fig. 2-30)에는 차이를 보이지 않던 각 그룹들은 20 일 (Fig. 2-31)이 지나면서 선충 감염구 (Sample 1, A)는 지상부의 생육이 약간의 차이를 나타내기 시작하여 30 일 (Fig. 2-32), 50 일 (Fig. 2-33) 등

시간이 지날수록 차이가 점점 커지기 시작하여 70 일 (Fig. 2-34) 경과 후에는 확연한 차이를 보여 선충 감염구는 거의 고사 상태인데 비하여 Bt17 균주를 함께 사용한 실험구 (Sample 2, B)는 선충 비감염구인 대조구 (Control, C)의 약 80% 정도의 생육 상황을 나타내었다(Table 2-26, Table 2-27). 70 일 경과 후의 뿌리의 발달 상황도 지상부의 생육과 비슷한 경향을 보여 Bt17 균주의 처리구는 무처리구에 비하여 뿌리의 생육 상황이 훨씬 양호하였다 (Fig. 2-35). 생육 70 일 후의 이들 작물의 초장, 뿌리 무게 및 선충의 알 수, 난낭 수, gall의 수와 토양 중의 2령 유충의 수를 계측한 결과를 보면 Bt17 사용구는 작물의 생육은 건전 그룹에 대해 약 80% 정도의 생육 상태를 보이고, 항 선충 효과는 약 30% 정도의 제어 효과가 있음을 알 수 있었다 (Table 2-27).

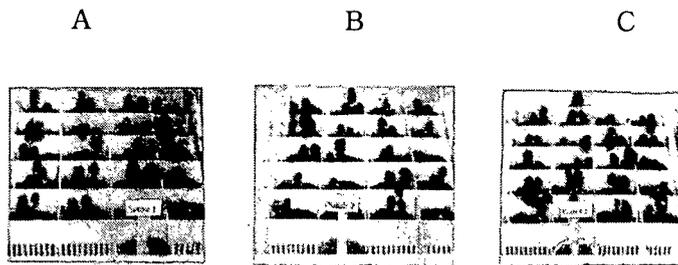


Fig. 2-30. Oriental melon after 4 days in pots infected with nematode

- A : nematode infected plants
- B : infected plants with Bt17 cell treatment
- C : healthy plants

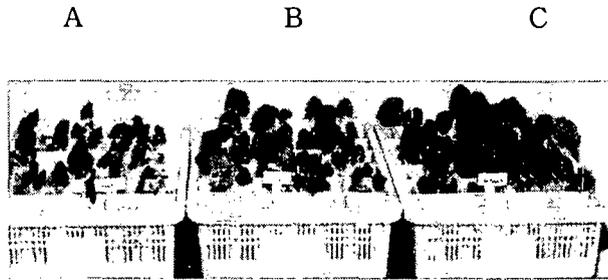


Fig. 2-31. Oriental melon after 20 days in pots infected with nematode

- A : nematode infected plants
- B : infected plants with Bt17 cell treatment
- C : healthy plants



Fig. 2-32. Oriental melon after 30 days in pots infected with nematode

- A : nematode infected plants
- B : infected plants with Bt17 cell treatment
- C : healthy plants

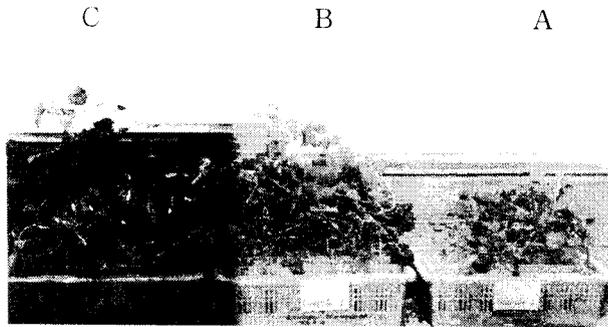


Fig. 2-33. Oriental melon after 50 days in pots infected with nematode

- A : nematode infected plants
- B : infected plants with Bt17 cell treatment
- C : healthy plants

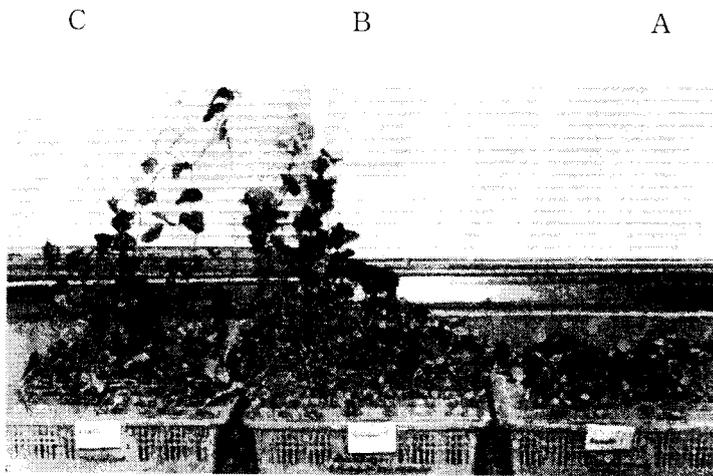
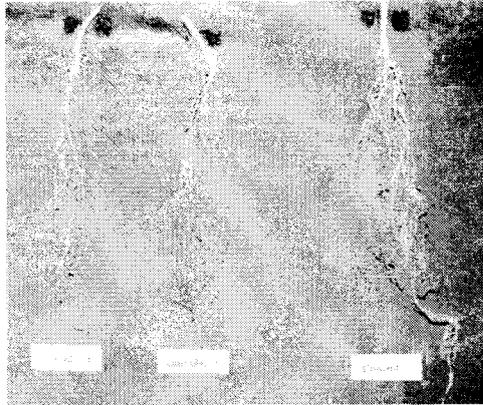


Fig. 2-34. Oriental melon after 70 days in pots infected with nematode

- A : nematode infected plants
- B : infected plants with Bt17 cell treatment
- C : healthy plants



A                      B                      C

Fig. 2-35. The root of oriental melon after 70 days in pots infected with nematode

- A : nematode infected plants
- B : infected plants with Bt17 cell treatment
- C : healthy plants

Table 2-26. Nematode infected oriental water melon after 70 days

Pot No.	Height (cm)			Weight of root (g)			No. of gall		
	S1	S2	C	S1	S2	C	S1	S2	C
1	37	51	75	2.16	2.62	2.81	18	11	-
2	32	46	80	2.11	2.46	2.26	27	12	-
3	31	93	87	2.03	2.68	2.47	19	15	-
4	45	57	73	2.08	2.27	3.40	24	17	-
5	33	68	77	2.06	2.24	2.67	23	19	-
6	32	54	68	2.10	2.49	2.43	25	21	-
7	29	74	69	2.06	2.78	2.56	24	22	-
8	41	32	58	2.11	2.16	2.89	16	18	-
9	27	95	84	2.14	2.38	2.67	25	21	-
10	28	107	59	2.04	2.33	2.75	17	13	-
11	21	52	61	2.15	2.56	2.70	21	11	-
12	45	75	68	2.10	2.26	2.61	26	14	-
13	21	92	96	2.09	2.57	2.64	23	17	-
14	24	73	64	2.26	2.64	2.67	26	18	-
15	17	91	81	2.21	2.28	2.68	31	8	-
16	29	48	76	2.29	2.80	2.59	28	12	-
17	23	47	77	2.08	2.76	2.89	32	13	-
18	D	67	84	0	2.59	3.57	0	9	-
19	D	59	69	0	2.87	2.67	0	15	-
20	D	71	78	0	2.69	2.58	0	14	-
Mean	29.7	67.6	74.2	2.12	2.52	2.72	23.8	15.0	-

Pot No.	No. of egg sac			No. of larvae 100g soil			No. of egg per root		
	S1	S2	C	S1	S2	C	S1	S2	C
1	69	46	-	278	208	-	2862	2004	-
2	58	47	-	306	167	-	2314	1854	-
3	49	51	-	265	214	-	2216	1746	-
4	56	39	-	243	240	-	2221	1214	-
5	57	28	-	267	154	-	1927	1352	-
6	64	41	-	367	192	-	1785	1227	-
7	82	61	-	242	187	-	2361	1326	-
8	81	58	-	312	209	-	2458	1525	-
9	78	62	-	321	247	-	1957	1716	-
10	69	49	-	189	157	-	2647	1925	-
11	74	52	-	275	187	-	2226	1618	-
12	69	64	-	317	212	-	2048	1352	-
13	59	46	-	296	163	-	2124	1427	-
14	63	42	-	287	117	-	2312	1543	-
15	65	57	-	316	157	-	1947	1620	-
16	74	69	-	318	126	-	1857	1842	-
17	82	53	-	276	141	-	2470	1921	-
18	0	27	-	0	168	-	0	1716	-
19	0	39	-	0	204	-	0	1519	-
20	0	43	-	0	196	-	0	1624	-
Mean	67.6	48.7	-	286.5	182.3	-	2218.9	1603.5	-

S1; infected plants(5,000 eggs/root)

S2; infected plants with Bt 17 cell treatment

C; healthy plants

D; dead plants.

Table 2-27. Several effects on the oriental melon and *M. hapla* reproduction after treated with Bt17

Treatment		Height (cm)	Weight of root (g)	No. of gall	No. of egg sac	No. of larvae 100g soil	No. of egg per root
Sample 1	A	35.0	2.09	22.67	58.8	287.7	2220.8
	B	31.8	2.1	21.5	75.5	276	2281.2
	C	20.8	2.2	28	68.6	298.6	2142
	Mean	29.20	2.13	24.05	67.63	287.43	2214.66
Sample 2	A	63.3	2.5	16.7	44.7	194.6	1531.7
	B	75.1	2.4	16	53.3	184.6	1586.6
	C	63.8	2.7	11.8	48	165.3	1707
	Mean	67.40	2.53	14.83	48.66	181.50	1608.43
Control	A	75.6	2.7	-	-	-	-
	B	70.0	2.7	-	-	-	-
	C	77.5	2.8	-	-	-	-
	Mean	72.80	2.70	-	-	-	-
L.S.D (5%)		12.03	0.19	5.03	10.90	21.57	131.08
Control effect (%)		87.7	70.1	38.3	28.0	36.8	27.3
Total control effect		48.03%					

S1; infected plants(5,000 eggs/root)

S2; infected plants with Bt 17 cell treatment

C; healthy plants

D; dead plants.

최소 유의차검정 (L.S.D); DMRT program 이용하였고, DMRT통계처리를 위해 Sample당 20반복 실험한 내용을 ABC 3반복으로 작성하였음.

$$1) \text{ Control effect of plant height \& weight} = \frac{\text{Sample 1} - \text{Sample 2}}{\text{Control} - \text{Sample 1}} \times 100 (\%)$$

$$2) \text{ Control effect of gall, egg sac, larvae number \& egg number} = \frac{\text{Sample 1} - \text{Sample 2}}{\text{Sample 1}} \times 100 (\%)$$

## 2. 2차 pot 실험 (감염 토양)

Bt17 균주의 포장 적용시 항 선충활성을 알아보기 위하여 성주 지역의 뿌리혹선충 감염 토양을 사용하여 성주 과채류 시험장에서 실험한 결과는 다음과 같다.

### 실험 조건

실험시작: 1999년 7월 6일

포트크기: 직경 13 cm 토분 (휴량 = 800ml, 약 930 g

토양내 선충의 수 = 620 J2/100 g soil

7월 6일 접목하지 않은 참외 묘(3엽기)를 포트에 직접 심음

반복: 5반복

Table 2-28. Several effects on the oriental melon and nematode reproduction after treated with Bt17

Sample	Plant wt	Root wt.	Number of root gall/root
1	57.2 a	15.4 abc	711 b
2	57.0 a	12.3 bc	4 c
3	58.5 a	18.9 a	683 b
4	50.6 a	17.0 ab	1041 a

1;Nematode infected soil

2;Nematode infected soil + nematocidal agent

3;Nematode infected soil + Bt 17 33mg/soil100g

4;Nematode infected soil + Bt 17 66mg/soil100g

Table 2-28에서 보는 것처럼 선충 감염 토양을 사용한 5 반복의 실외 포트 실험의 결과는 Bt17 균주의 항 선충 활성의 유의성을 찾기 어려웠다. 실내 실험과 실외실험의 여러 조건의 차이(Table 2-29)로 단정적인 결론을 내리기는 어려우나, 우선 실외실험의 경우는 선충감염 토양 자체가 멸균 토양구의 지상 생육부의 차이가 없어 실험의 결과 해석에 문제가 있는 것으로 생각되며 앞으로 더욱 더 정밀한 실험이 필요할 것으로 생각한다.

Table 2-29. 실내 포트실험과 실외포트실험의 차이점

포트실험 차이점	1차 pot	2차 pot
토양 처리	멸균	비멸균
선충 감염 방법	충난 (5,000/300 g)	2령 유충 (1,800 / 300 g)
실험 장소	실내	실외
Bt 제제 성상	생 균체	건조 분말

### 3. 멸균 토양과 비 멸균 토양에서 Bt 제제의 성상에 따른 항 선충 활성

1, 2차 pot 실험을 통하여 멸균 토양과 비 멸균 토양에서 항 선충 활성의 결과가 상이하게 나타나서 이에 대한 확인과 그 내용의 일단을 알기 위하여 다음 몇 가지 실험을 수행하였다.

#### 가. Bt 제제의 성상

pot 실험에 사용한 Bt 제제는 편의상 다음 3 종류로 나누어 사용하였다.

##### o 고형화 제제 (Solidified product)

한천 평판배지에 균을 접종하여 배양한 다음 그대로 동결 건조하여 분말화시킨 후 0.01% 계면활성제인 Triton X-100에 현탁하여 사용하였다.

##### o 액성 제제 (Suspended product)

액체 배지에 접종하여 배양한 후 원심 분리에 의해 균체 및 내독소를 모아 그대로 현탁시켜 사용하거나, 균체 및 내독소를 아세톤으로 처리하여 건조시킨 분말 상태의 제제를 0.01% Triton X-100에 현탁하여 사용하였다.

##### o 가용성 제제 (Solubilized product)

액성 제제와 마찬가지로 액체 배지에 접종 배양한 균체 및 독소를 원심 분리에 의해 모은 후 알칼리성  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  용액에 가용화 시켜 원심 분리에 의해 가용화된 상청액을 분리하여 pH를 조절하여 사용하였다.

나. 멸균 토양에서 Bt17 제제의 항 선충 활성

1) 가용성 제제의 항 선충 효과

실험 조건

토양 : 성주 감염 토양 멸균 (120°C, 20 분)

포트크기 : 직경 10 cm 토분

선충난 : 약 6,000개 / pot (1,500 / 100 g soil)

기주 식물 : 접목하지 않은 금싸라기 은천 참외 묘(3엽기)

시험구 (각 5반복) :

(1) 멸균 토양

(2) 감염 토양 : 선충난 감염 + 무처리

(3) Bt 처리구 : 선충난 감염 + Bt17 습균체 0.05 g의 가용성 제제 / pot

Table 2-30. Several effects on the oriental melon and nematode reproduction after treated with solubilized Bt17 product

Sample	Stem length(cm)	Stem weight(g)	Root length(cm)	No. of egg sac	Inhibition ratio(%)
1	37 ± 10	13.5 ± 5.5	18.8 ± 3	0	100
2	37.6 ± 1.8	12.9 ± 1.8	17.4 ± 3.1	57.4±29.6	0
3	23.3 ± 6.5	11 ± 5	16.2 ± 2.6	62.2±43.1	- 8.4

1: Sterilized soil without nematode

2: Nematode infected nonsterilized soil

3: Nematode infected nonsterilized soil treated with Bt 17

67일간 재배한 후의 결과를 정리한 Table 2-30.에서 보는 것처럼 Bt17의 가용성 제제를 사용하였을 경우, 멸균 토양에서도 항 선충 활성이 나타나지 않았으며 이러한 결과는 가용화 pH와 중화 후 토양에서 pH의 변화로 인한 이차적인 작용의 결과인지 알 수 없으나 오히려 지상부의 생육도 오히려 다른 실험구에 비해 좀 떨어지는 것 같았다.

## 2) 액성 제제의 항 선충 효과

### 실험 조건

토양 : 성주 감염 토양 멸균 (120℃, 20 분)

포트크기 : 직경 10 cm 토분

선충난 : 약 6,000개 / pot (1,500 / 100 g soil)

기주 식물 : 접목하지 않은 금싸라기 은천 참외 묘(3엽기)

시험구 (각 5반복) :

(1) 멸균 토양

(2) 감염 토양 : 선충난 감염 + 무처리

(3) Bt 처리구 : 선충난 감염 + Bt17 습균체 0.05 g의 액성 제제 / pot

Table 2-31. Nematocidal activity of suspended-Bt17 products on oriental melons in sterilized soil

Plant part		Sample			
		1	2	3	
Stem	Weight(g)	10.1	3.7	9.2	
	Weight(g)	1.5	1.4	3.2	
Root	Number of galls	Galls / root	0	40	35
		Galls / root / g	0	29	11
	Number of egg saccs	Egg saccs / root	0	23	11
		Egg saccs/root/g	0	16	3

1: Sterilized soil without nematode,  
 2: Sterilized soil with nematode,  
 3: Sterilized soil with nematode & Bt17.

36 일간 재배한 후의 결과를 정리한 Table 2-31.에서 보는 것처럼 Bt17의 액성 제제를 사용하였을 경우는 가용성 제제를 사용한 경우에 비해서 항 선충 활성이 나타나는 것을 볼 수 있었다. 아직 그 이유는 알 수 없으나 Bt 제제의 성상에 따라 항 선충 활성에 크게 영향을 미침을 알 수 있었다.

### 3) 고형화 제제의 항 선충 효과

#### 실험 조건

토양 : 성주 감염 토양 멸균 (120℃, 20 분)  
 포트크기 : 직경 10 cm 토분  
 선충난 : 약 14,400개 / pot (3,700 / 100 g soil)  
 기주 식물 : 영광 토마토 묘종

시험구 (각 5반복) :

(1) 멸균 토양

(2) 감염 토양 : 선충난 감염 + 무처리

(3) Bt 처리구 : 선충난 감염 + Bt17 습균체 0.05 g의 고형화 제제 / pot

Table 2-32. Several effects on the tomato and nematode reproduction after treated with solidified Bt17 product in sterilized soil

Sample	Stem length(cm)	Stem weight(g)	Root length(cm)	Root weight(g)	No. of egg sac	Inhibition ratio(%)
1	77.4±7.2	72.4±17.5	19.8±2.1	26.7±6.1	0	100
2	71.2±7.1	56.8±5.3	15.3±1.8	18.8±2.8	203±150	0
3	73.6±5.6	59.0±7.9	15.4±2.6	19.6±7.6	147±96	28

1: Sterilized soil without nematode

2: Sterilized soil with nematode

3: Sterilized soil with nematode and Bt17.

실험 과정 중의 사정으로 기주 식물을 참외 대신 토마토로 사용하여 Bt17 고형화 제제의 항 선충 활성을 보았다. 67 일간 재배한 후의 결과를 정리한 Table 2-32에서 보는 것처럼 Bt17의 고형화 제제를 사용한 경우에는 비록 작물의 생육에는 큰 차이를 보이지 않았으나, 약 28% 정도의 항 선충 활성이 나타났다. 멸균 토양에서의 결과를 종합해 보면 가용성 제제는 항 선충 활성이 보이지 않았으나, 액성 및 고형화 제제는 어느 정도 뿌리혹선충의 제어 효과가 있음을 알 수 있었다.

다. 비멸균 토양에서 Bt17 제제의 항 선충 활성

1) 가용성 제제의 항 선충 효과

실험 조건

토양 : 성주지역 감염 토양

포트크기 : 직경 10 cm 토분

선충 : 2령 충 약 200 마리 / 100 g 토양 (200 J2 / 100 g soil)

기주 식물 : 접촉하지 않은 금싸라기 은천 참외 묘(3엽기)

시험구 (각 5반복) :

(1) 멸균 토양

(2) 감염 토양 : 감염 토양 + 무처리

(3) Bt 처리구 : 감염 토양 + Bt17 습균체 0.05 g의 가용성 제제 / pot

Table 2-33. Several effects on the oriental melon and nematode reproduction after treated with solubilized Bt17 product in nematode infected nonsterilized soil

Sample	Stem length(cm)	Stem weight(g)	Root length(cm)	Root weight(g)	No. of egg sac	Inhibition ratio(%)
1	48.0±10.3	16.7±3.8	21.8±2.1	5.2±0.6	0	100
2	45.6±6.3	11.0±1.4	18.2±2.0	3.1±0.6	148±74	0
3	43.8±2.4	11.7±1.3	17.0±2.1	4.4±1.3	144±15	2.7

1: Sterilized soil without nematode

2: Nematode infected nonsterilized soil

3: Nematode infected nonsterilized soil treated with Bt17

비 멸균 선충 감염토에서 Bt17 균주의 가용화 제제를 처리하여 61 일간 재배한 후의 결과를 Table 2-33에 정리하였다. Bt17의 가용성 제제를 사용하였을 경우, 멸균 토양에서와 같이 비 멸균 토양에서도 항 선충 활성이 나타나지 않았다. Bt17 균주의 가용성 제제는 토양의 멸균 여부와는 상관없이 토양 중에 투여되었을 경우 활성을 나타내지 못함을 알았다.

## 2) 액성 제제의 항 선충 효과

### 실험 조건

토양 : 성주지역 감염 토양

포트크기 : 직경 10 cm 토분

선충 : 2령 충 약 200 마리 / 100 g 토양 (200 J2 / 100 g soil)

기주 식물 : 영광 토마토 묘종

시험구 (각 5반복) :

(1) 멸균 토양

(2) 감염 토양 : 감염 토양 + 무처리

(3) Bt 처리구 : 감염토양 + Bt17 습균체 0.05 g의 액성 제제 / pot

Table 2-34. Nematocidal activity of suspended-Bt17 products on the tomatoes in nonsterilized soil.

Plant part		Sample	1	2	3
Stem	Diameter(cm)		2.2	2.2	2.0
	Length(cm)		115.0	128.5	133.5
	Weight(g)		87.5	95.9	91.2
Root	Weight(g)		13.2	12.6	4.2
	Number of galls	Galls / root	3,904	2,857	0
		Galls / root / g	300	238	0
	Number of egg sacs	Egg sacs / root	187	214	0
		Egg sacs/root/g	13.5	16.9	0

- 1; Nematode infection in sterilized soil  
 2; Nematode infection in sterilized soil & Bt17 treatment  
 3; Sterilized soil without nematode.

토마토를 기주 식물로 하여 63 일간 재배한 후의 결과를 정리한 Table 2-34.에서 보는 것처럼 Bt17의 액성 제제를 사용하였을 경우, 뿌리혹의 수는 무처리구에 비해 감소하였으나 난낭의 형성은 무처리구와 비슷한 애매한 결과를 보여 주었다. 전체적으로 보면 가용화 제제에 비하여 미약한 정도의 효과는 있는 듯 하나 현재로서는 단정할 수 없으며 앞으로 많은 반복 실험을 통하여 검토해볼 필요가 있을 것으로 생각된다.

### 3) 고형화 제제의 항 선충 효과

#### 실험 조건

토양 : 성주지역 감염 토양

포트크기 : 직경 10 cm 토분

선충 : 2령 충 약 270 마리 / 100 g 토양 (270 J2 / 100 g soil)

기주 식물 : 접목하지 않은 금싸라기 은천 참외 묘종 (3엽)

시험구 (각 4반복) :

- (1) 멸균 토양
- (2) 감염 토양 : 감염 토양 + 무처리
- (3) 선충탄 처리구 : 감염 토양 + 선충탄 처리
- (4) Bt 처리구 : 감염 토양 + Bt17 습균체 0.05 g의 고형화 제제 / pot

Table 2-35. Several effects on the oriental melon and nematode reproduction after treated with solidified Bt17 product in nematode infected nonsterilized soil

Sample	Stem weight(g)	Root weight(g)	No. of gall	Inhibition ratio(%)
1	56.1±8.9	16.1±3.8	0	100
2	13.5±5.0	4.0±0.5	381±196	0
3	19.2±7.9	5.0±2.1	8±11	98
4	18.6±7.3	3.3±1.2	79±27	79.3

1;Sterilized soil without nematode

2;Nematode infected nonsterilized soil

3;Nematode infected nonsterilized soil treated with nematocidal agent

4;Nematode infected nonsterilized soil treated with Bt17

50 일 후 일부 실험구가 고사되기 시작하여 62 일만에 뿌리를 채취하여 분석하였으나 난방이 완전히 형성되지 않아 감염의 정도를 뿌리 흑의 수로 판정하였다. 따라서 결과의 해석에는 문제가 있을 수도 있으나 Bt 처리구는 무처리구에 비해 약 79.3%의 선충 저해 활성을 보여 비 멸균 토양에서도 고행화 제제는 어느 정도 활성을 나타내는 것으로 생각된다. (Table 2-35)

멸균 토양과 비 멸균 토양에서의 Bt17 균주의 항 선충 활성 결과를 종합해보면 Bt 제제의 성상에 따라 어느 정도 활성의 차이가 나타남을 알 수 있었다. Bt의 고행화 제제는 멸균, 비 멸균 토양을 막론하고 어느 정도 활성을 나타내는 것 같으며, 액성 제제는 멸균 토양에서는 효과가 있는 것으로 보이나 비 멸균 토양에서는 확실하지 않으며, 가용화 제제는 생각과는 달리 비 멸균 토양은 물론 멸균 토양에서도 거의 활성이 나타나지 않았다. 그래서 이 가용화 제제의 활성을 *in vitro*에서 한 번 더 확인하여 보았으나 Table 2-36.에서 보는 것처럼 가용화 제제는 *in vitro*에서는 항 선충 활성이 있음을 확인 할 수 있었다. 따라서 토양이라는 환경 하에서는 이유는 알 수 없으나 가용화 상태의 Bt는 항 선충 활성을 발현할 수 없는 것으로 생각된다.

그리고 전체적으로 멸균 토양에 비해 비 멸균 토양에서 활성이 떨어지는 것으로 보여 토양에서의 Bt 독소의 안정성을 살펴보기로 하였다.

Table 2-36. Nematocidal activity of solubilized-Bt17 products *in vitro*

Time Sample	0hr			7hr			18hr		
	Alive	Dead	Motility (%)	Alive	Dead	Motility (%)	Alive	Dead	Motility (%)
Control	85	1	1.1	89	3	3.3	79	15	16.0
Bt17	87	1	1.1	55	32	36.8	0	88	100

Nematocidal tests were done in 16well-microplate, after fresh eggs of *M. incognita* were hatched in wells of 96well-microplate. Samples were contained the solution, [50mM Na-carbonate : (100mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 100mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ( pH7.0)) : tap water = 1 : 2 : 3].

#### 4. 멸균 토양과 비 멸균 토양에서 Bt 독소의 안정성

멸균 토양과 비 멸균 토양에서 Bt 독소의 토양 흡착, 토양 내에서 안정성 등 토양 내에서 거동을 알아보기 위하여 토양 칼럼을 만들어 단백질의 흡착, 용출성을 조사하였다.

3 ml 주사기에 토양 2 g으로 토양 칼럼을 만든 후 증류수 3 ml로 칼럼을 세척하고, 여기에 일정량의 단백질을 주입하여 빠져 나오는 용액과, 다시 1 ml의 증류수로 칼럼을 세척하여 나오는 용액을 합하여 단백질의 양을 280 nm에서의 흡광도와 Lowry법에 의해 정량하고 독소 단백질은 이 실험에서 확립한 ELISA법으로 정량하였다. 이 때 사용한 토양은 모래, 모래 + 흙 (1 : 1), 흙의 세 종류로 나누어 실험하였다.

먼저 실험 조건을 결정하기 위하여 bovine serum albumin 단백질을 시료로 하여 이의 흡착 용출을 조사하였다. 1 mg / 1 ml의 단백질 1 ml를 토양 칼럼에 첨가하여 용출되는 양을 조사한 결과 Table 2-37에서 보는 것처럼 모래

칼럼에서는 약 90%가, 모래 + 흙 (1 : 1)의 혼합 칼럼에서는 87%, 흙 단독 칼럼에서는 72%의 단백질이 용출되어 모래, 혼합 토양, 흙의 순서로 흘러나왔다. 토양의 성상에 따라 흡착 용출량의 상대적 차이는 있었지만 정량적으로 단백질의 흡착 용출량을 측정할 수 있음을 알았다.

이를 근거로 Bt 독소의 토양 내의 거동을 같은 방법으로 추적하여 보았다. 먼저 각각의 토양 시료를 멸균 (120℃, 20 분)과 비 멸균 구로 나누어 칼럼을 만들고 가용화한 독소 단백질을 첨가한 후 28℃에 두면서 시간별로 단백질을 용출하여 정량하였다. Total protein의 용출 경향을 보면 멸균 구나 비 멸균구를 가리지 않고 모래, 혼합토양, 흙에서 방치 기간이 길어짐에 따라 단백질의 용출량이 약간 증가되는 경향을 보이고 있다. 이는 미생물이 증식할 수 있는 온도에서 칼럼을 처리함으로써 미생물의 증식에 의한 것인지는 단정할 수 없지만 대체로 비 멸균 칼럼이 약간 더 높은 경향을 나타내고 있다. 이에 비해 독소 단백질의 용출 경향은 멸균 토양과 비 멸균 토양에서 많은 차이를 나타내고 있다. 즉 멸균 시험구에서는 모래, 혼합 토양, 흙의 종류에 따라 상대적인 용출량의 차이는 있지만 5 일간의 처리기간 동안 처리기간에 관계없이 거의 같은 양의 용출 경향을 보이고 있다. 그러나 비 멸균 시험구에서는 3 개의 시험구 모두 처리시간과 함께 독소의 용출량이 급격히 감소하고 있음을 볼 수 있다(Fig. 2-36, 2-37, 2-38). 이는 비 멸균 토양 중에 혼존하고 있는 토양 미생물들에 의해 독소 단백질이 분해된 결과 항원성을 상실해 ELISA로 독소 단백질이 검출되지 않았을 가능성도 생각해 볼 수 있을 것이다. 실제, 상대적으로 미생물의 집단이 풍부할 것으로 생각되는 흙, 혼합 토양, 모래 시험구의 순서로 독소 단백질의 감소 정도가 큰 것으로 나타나 이러한 생각을 뒷받침하고 있다고 볼 수 있을 것이다.

이 실험에서 볼 수 있는 것처럼 Bt 독소는 멸균 토양에서는 어느 정도 안정성을 나타내나 비 멸균 토양에서는 대단히 불안정한 것을 볼 수 있다. Bt 제제가 멸균 토양에서는 어느 정도 항 선충 활성을 보이지만 비 멸균 토양에서는

그 활성이 미약하거나 거의 없는 것처럼 보이는 것은 비 멸균 토양에서 Bt 독소의 불안정성이 그 한 이유가 될 수 있을 것이다.

Table 2-37. Absorption of bovine serum albumin in soil

Sample (2.0g)	Soil pH	단백질 주입전 토양 세척	Protein (2mg /ml)	단백질 주입후 토양 세척	통과된 총량 (ml)	Outlet Effluent Protein			
						A <sub>280</sub>	Lowry method		
							μg/ml	홀러나온 총단백질량 의 평균 (μg/ml)	
①	Control	5.4	3ml	1ml	1ml	19.6	0.115	0	0
		5.4	3ml	1ml	1ml	19.5	0.131	0	
	Sample	5.4	3ml	1ml	1ml	19.4	0.469	904.32	<b>900.69 (90%)</b>
		5.4	3ml	1ml	1ml	20.2	0.462	918.72	
		5.4	3ml	1ml	1ml	19.5	0.464	879.04	
②	Control	5.4	3ml	1ml	1ml	20.5	0.578	14.37	<b>16.04</b>
		5.4	3ml	1ml	1ml	20.5	0.594	17.71	
	Sample	5.4	3ml	1ml	1ml	19.5	0.718	994.24	<b>882.46 (86.6%)</b>
		5.4	3ml	1ml	1ml	20.5	0.740	809.92	
		5.4	3ml	1ml	1ml	20.5	0.728	843.23	
③	Control	5.4	3ml	1ml	1ml	20.5	0.767	27.07	<b>26.58</b>
		5.4	3ml	1ml	1ml	19.6	0.772	26.09	
	Sample	5.4	3ml	1ml	1ml	19.0	0.786	780.48	<b>746.24 (72%)</b>
		5.4	3ml	1ml	1ml	19.0	0.825	761.60	
		5.4	3ml	1ml	1ml	20.0	0.824	696.64	

①; Sand only

②; Sand : Soil = 1:1

③; Soil only

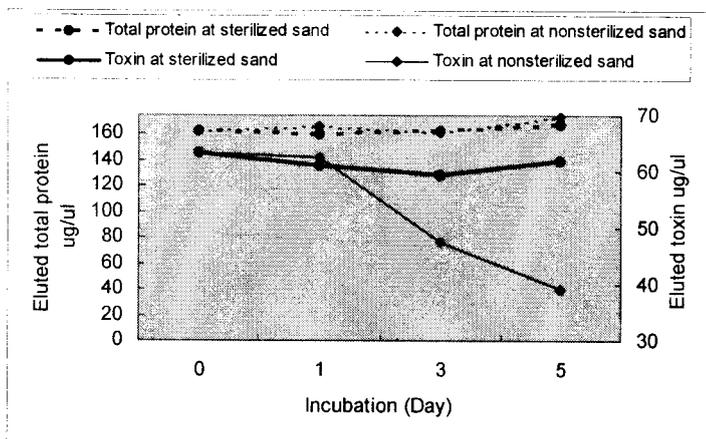


Fig. 2-36. Elution profile of total protein and Bt toxin of Bt17 strain from sand column at 28°C

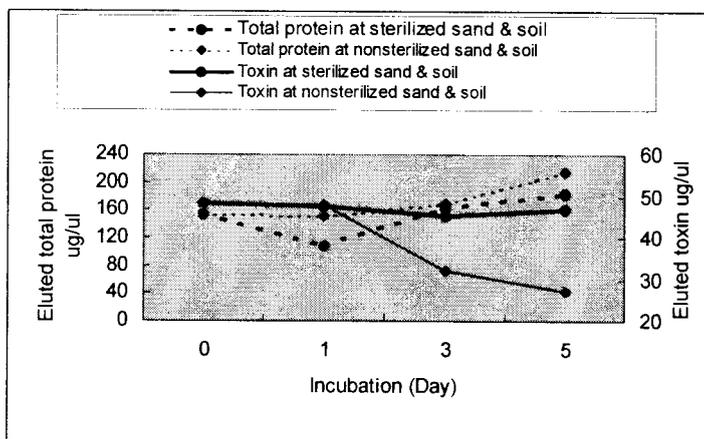


Fig. 2-37. Elution profile of total protein and Bt toxin of Bt17 strain from sand plus soil column at 28°C

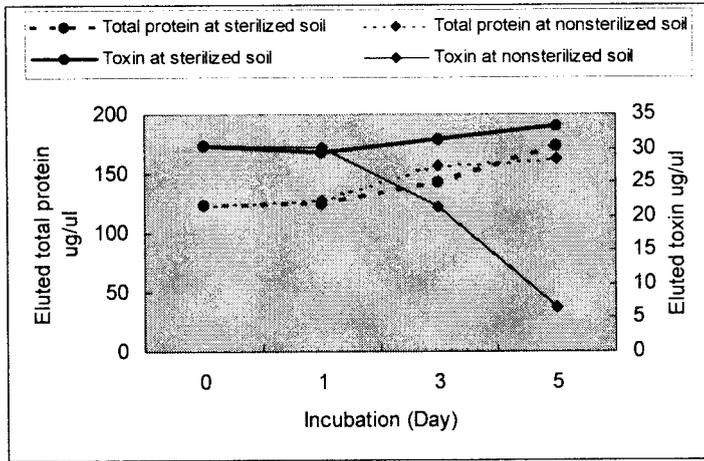


Fig. 2-38. Elution profile of total protein and Bt toxin of Bt17 strain from soil column at 28°C

## 5. Bt 독소의 모의 포장실험

### 가. 1차 모의 포장실험

Bt 제제를 실제 시설 재배지에 적용하기 위한 전단계로 대형의 pot를 사용하여 멸균 토양구와 비 멸균 토양구로 나누어 Bt 액성 제제형 독소의 항 선충 활성을 조사하였다. 이 번에는 실제 농가에서 사용하는 방식대로 대목에 접목한 참외를 사용하여 결가지를 절단하여 2 줄기만 남겨두고 재배하면서 아래와 같은 조건으로 실험하였다.

#### 실험 조건

토양 : 김해 감염 토양

포트크기 : 48 X 32 X 19 cm

선충 : 2령 충 약 650 마리 / 100 g 토양 (650 J2 / 100 g soil)

선충난 : 약 1,500 / 100 g soil

기주 식물 : 호박 대목에 접목한 금싸라기 은천 참외 묘

시험구 (4 포기/ pot ; 대조구, 각 2 반복 ; 시험구, 각 6반복) :

(1) 멸균 토양

(2) 멸균 감염 토양

: 멸균 토양 + 선충난 감염 + 무처리

(3) Bt 처리 멸균 감염 토양

: 멸균 감염 토양 + Bt17 습균체 2.0 g의 액성 제제 / pot

(4) 비 멸균 감염 토양

: 비 멸균 토양 + 선충난 감염 + 무처리

(5) Bt 처리 비 멸균 감염 토양

: 비 멸균 감염 토양 + Bt17 습균체 2.0 g의 액성 제제 / pot

Table 2-38. Several effects on the oriental melon after treated with suspended Bt product

Sample	After 23 days	After 34 days		After 48 days	
	Stem length (cm)	Stem length (cm)	Plant weight (g)	Stem length (cm)	Plant weight (g)
1	85.1±14.1	160.0±21.1	235.5	224.3±59.6	351.63
2	87.3±27.2	166.5±35.7	224.1	189.3±25.2	68.25 (leaf dried)
3	76.3±20.0	152.2±23.1	217.9	212.4±37.6	219.05
4	52.4±17.7	122.0±42.1	171.5	176.3±52.2	218.34
5	44.9±11.0	84.4±15.9	107.1	188.0±30.4	141.35

1;Sterilized soil ,2;Sterilized soil infected with nematode

3;Sterilized soil infected with nematode and treated with Bt

4;Nonsterilized soil infected with nematode

5;Nonsterilized soil infected with nematode and treated with Bt

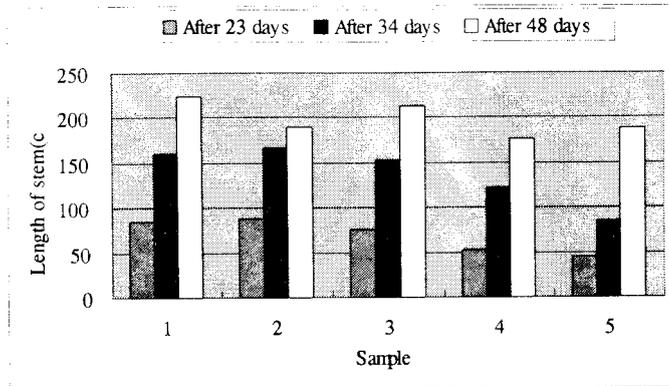


Fig. 2-39. Several effects on the oriental melon after treated with suspended Bt17 product

- 1: Sterilized soil
- 2: Sterilized soil infected with nematode
- 3: Sterilized soil infected with nematode and treated with Bt17
- 4: Nonsterilized soil infected with nematode
- 5: Nonsterilized soil infected with nematode and treated with Bt17

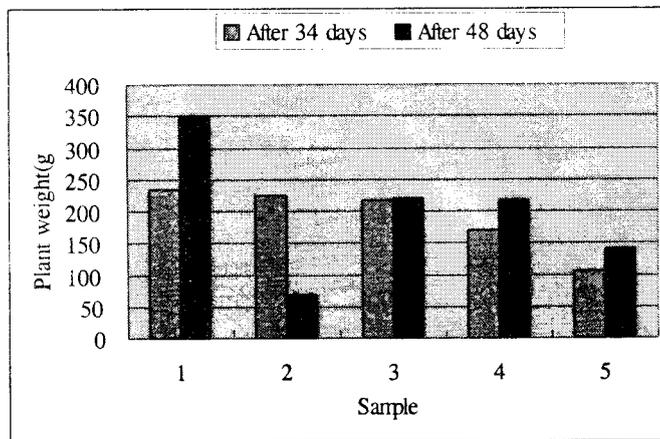


Fig. 2-40. Several effects on the oriental melon after treated with suspended Bt17 product

- 1: Sterilized soil
- 2: Sterilized soil infected with nematode
- 3: Sterilized soil infected with nematode and treated with Bt17
- 4: Nonsterilized soil infected with nematode
- 5: Nonsterilized soil infected with nematode and treated with Bt17

액성 제제의 Bt 독소를 사용해 대형 pot에서 실험한 결과, 작물의 생육상태는 멸균 토양에서 자라난 작물에 비해 시험구의 생육은 전부 불량하였다. 멸균 감염 토양을 사용한 경우, Bt 독소 처리구와 무처리구 사이에 유의의적인 차이를 볼 수 없었으며 비 멸균 감염토양의 경우도 Bt 처리구는 나중에 어느 정도 생육이 회복되었으나 무 처리구에 비해 오히려 생육이 떨어지는 듯이 보였으나 전체적으로는 큰 차이를 볼 수 없었다(Table 2-38, Fig. 2-39, 2-40참조). 뿌리혹과 난낭을 계수한 결과도 일부 시험구의 뿌리의 부패로 인하여 정확한 데이터를 낼 수 없어 뚜렷한 결론을 내리기 어려웠으나 (Table 2-39, Fig. 2-41, 2-42), 소형 pot 보다 실제 포장에 더 가까운 대형 pot를 사용한 실험에서는 최소한 액성 제제의 Bt 독소는 항 선충 활성을 나타내지 못하는 것처럼 보였다. 다만 뿌리의 상태를 살펴보면 (Fig. 2-43) 대체적으로 Bt 독소 처리구의 뿌리는 뿌리혹의 형성은 많이 되었으나 Bt 무 처리구의 뿌리가 심하게 썩은 데 비하여 그 정도가 훨씬 덜 하였다.

Table 2-39. Several effects on the oriental melon and nematode reproduction after treated with suspended Bt17 product

Sample	After 34 days					After 48 days				
	Root weight (g)	No. of gall	gall/ root weight	No. of egg sac	Egg sac / root weight	Root weight (g)	No. of gall	gall/ root weight	No. of egg sac	Egg sac/ root weight
1	20.55	0	0	0	0	9.08	0	0	0	0
2	15.35	4912	320	2917	190	18.30	9,150	500	7686	420
3	24.9	9959	400	5925	238	51.2	20029	391	15894	310
4	23.03	28327	1230	1842	80	50.78	19,804	390	6601	130
5	21.3	7666	360	2075	97	29.7	12218	411	6381	215

- 1: Sterilized soil
- 2: Sterilized soil infected with nematode
- 3: Sterilized soil infected with nematode and treated with Bt17
- 4: Nonsterilized soil infected with nematode
- 5: Nonsterilized soil infected with nematode and treated with Bt17

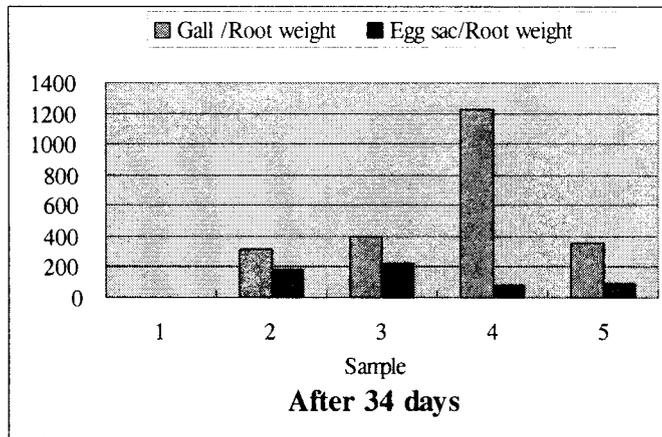


Fig. 2-41. Nematode reproduction after 34 days in soils treated with suspended Bt17 product

- 1: Sterilized soil
- 2: Sterilized soil infected with nematode
- 3: Sterilized soil infected with nematode and treated with Bt17
- 4: Nonsterilized soil infected with nematode
- 5: Nonsterilized soil infected with nematode and treated with Bt17

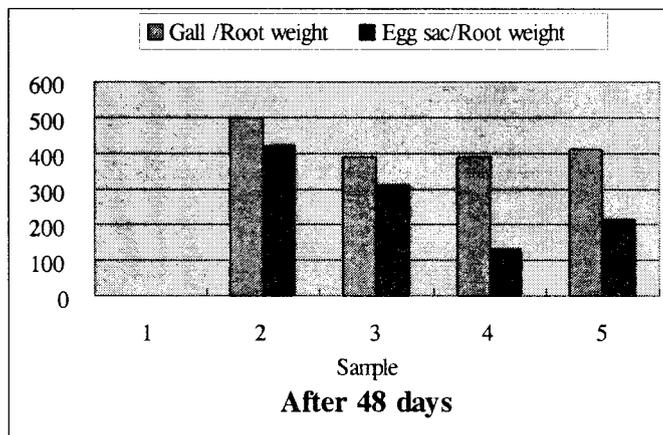


Fig. 2-42. Nematode reproduction after 48 days in soils treated with suspended Bt17 product

- 1: Sterilized soil
- 2: Sterilized soil infected with nematode
- 3: Sterilized soil infected with nematode and treated with Bt17
- 4: Nonsterilized soil infected with nematode
- 5: Nonsterilized soil infected with nematode and treated with Bt17

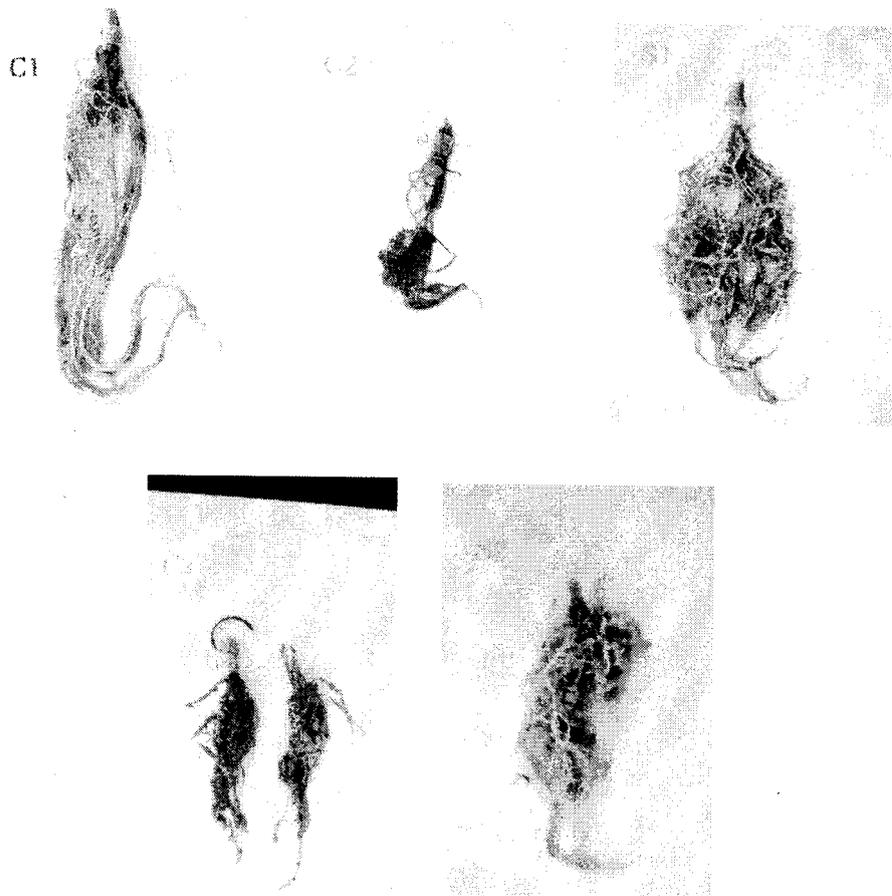


Fig. 2-43. The root of oriental melons after 62 days in nematode infected soils treated with suspended Bt17

C1: Sterilized soil

C2: Sterilized soil infected with nematode

S1: Sterilized soil infected with nematode and treated with Bt17

C3: Nonsterilized soil infected with nematode

S2: Nonsterilized soil infected with nematode and treated with Bt17

## 나. 2차 모의 포장 실험

대형 pot의 선충 감염 토양에서 Bt 독소의 고형화 제제를 사용하여 독소의 항 선충 활성을 조사하였다. 이번에는 참외를 수확할 수 있을 때까지 재배하여 그 수확량도 비교하고자 하였다. 참외는 결가지를 절단하여 2 줄기만 남겨두고 재배하면서 아래와 같은 조건으로 실험하였다.

### 실험 조건

토양 : 김해 감염 토양

포트크기 : 48 X 32 X 19 cm

선충 : 2령 충 약 400 마리 / 100 g 토양 (400 J2 / 100 g soil)

기주 식물 : 금싸라기 은천 참외 묘

시험구 (2 포기/ pot ; 각 3 반복) :

(1) 멸균 토양

(2) 선충탄 처리구

(3) 무처리구

(4) Bt 0.2 g 처리구 : 감염 토양 + Bt17 0.2 g의 고형화 제제 / pot

(5) Bt 1.0 g 처리구 : 감염 토양 + Bt17 1.0 g의 고형화 제제 / pot

(6) Bt 40 ml 처리구 : 감염 토양 + Bt17 배양액 40 ml / pot

(7) Bt 200 ml 처리구 : 감염 토양 + Bt17 배양액 200 ml / pot

전체적으로 Bt 처리구는 줄기의 길이와 잎의 수가 무 처리구에 비해 좋은 생육을 보여 주었으며 멸균 토양에서 자란 건전 작물과 같은 정도의 생육을 보이는 시험구도 있었다. 특히 배양액을 그대로 사용한 경우 초장과 잎 수가 건전구 보다는 좋은 생육을 보이는 경우도 있었다. 그리고 84 일간 재배한 후 참외의 수확량을 보면 Bt 처리구는 무 처리구에 비해 2 ~ 3.5 배 정도의 수확량을 보였고, 선충탄 처리구에 비해서도 좋은 수확량을 보였으며 멸균구와 비슷한 수확량을 보인 시험구도 있었다 (Table 2-40, Fig. 2-44, 2-45, 2-46).

Table 2-40. Several effects on the oriental melon after treated with suspended Bt17 product and Bt culture broth

Sam ple	After 60 days		After 70 days		After 84 days			
	Stem length (cm)	No. of node	Stem length (cm)	No. of node	Stem length (cm)	No. of node	Fruit weight /plant	No of fruit
1	73.8±9.2	18.9±1.7	94.7±10.4	21.1±1	145.6±14.8	30.9±1.6	85.2	7
2	69.6±25.7	17.9±1.6	89.0±16.4	19.5±1.9	144.5±19	33.0±3	24.5	1
3	63.6±7.8	18.0±1.8	84.7±9.9	22.8±1.7	112.3±9.9	29.1±2.3	57.6	10
4	69.6±10.1	18.7±1.3	83.5±11.8	22.9±1.5	103.2±13.6	26.1±2.1	87.9	3
5	73.4±9.4	19.3±1.8	93.3±9.4	24.6±1.8	125.1±8.1	32.0±1.9	47.4	4
6	70.5±10.7	18.7±5.0	89.5±9.7	21.2±1.8	122.1±10.8	29.3±2.9	86.2	8
7	79.7±6.2	20.0±1.1	102.8±6.5	23.3±1.9	151.1±14.2	35.3±3.5	68.8	8

1: Sterilized soil

2: Nonsterilized nematode infected soil treated with nematocidal agent

3: Nonsterilized nematode infected soil

4: Nonsterilized nematode infected soil treated with Bt17 100mg

5: Nonsterilized nematode infected soil treated with Bt17 500mg

6: Nonsterilized nematode infected soil treated with Bt17 20ml

7: Nonsterilized nematode infected soil treated with Bt17 100ml

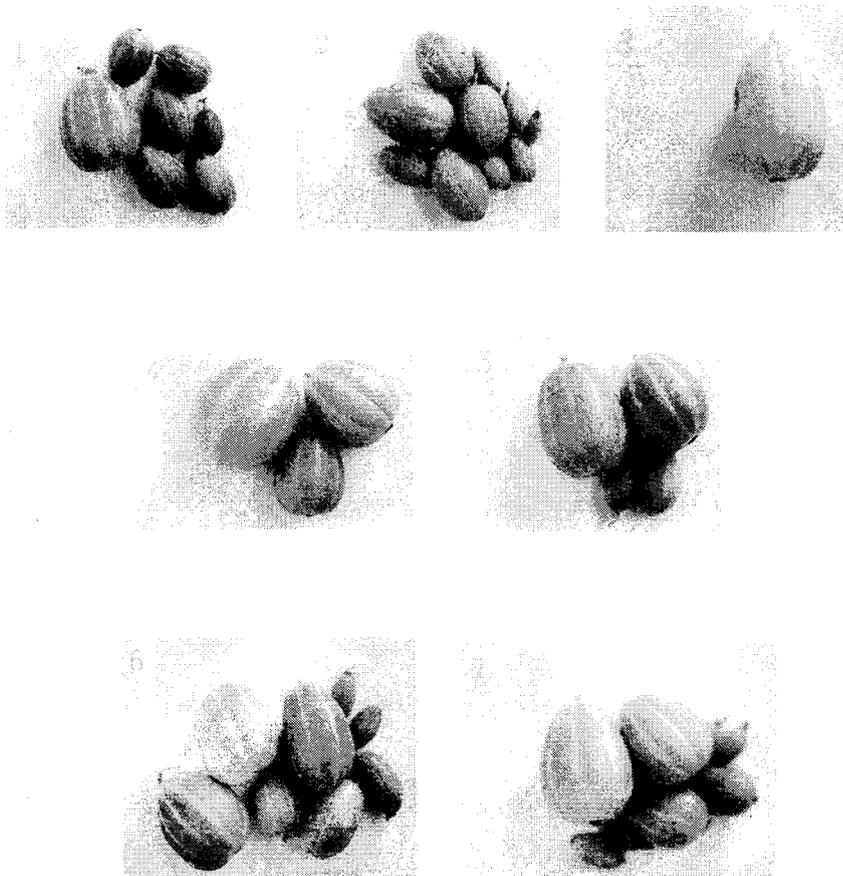


Fig. 2-44. The fruit of oriental melon in nematode infected soils after treated with solidified Bt17 product and Bt17 culture broth

1;Sterilized soil

2;Nonsterilized nematode infected soil treated with nematocidal agent

3;Nonsterilized nematode infected soil

4;Nonsterilized nematode infected soil treated with Bt17 100mg

5;Nonsterilized nematode infected soil treated with Bt17 500mg

6;Nonsterilized nematode infected soil treated with Bt17 20ml

7;Nonsterilized nematode infected soil treated with Bt17 100ml

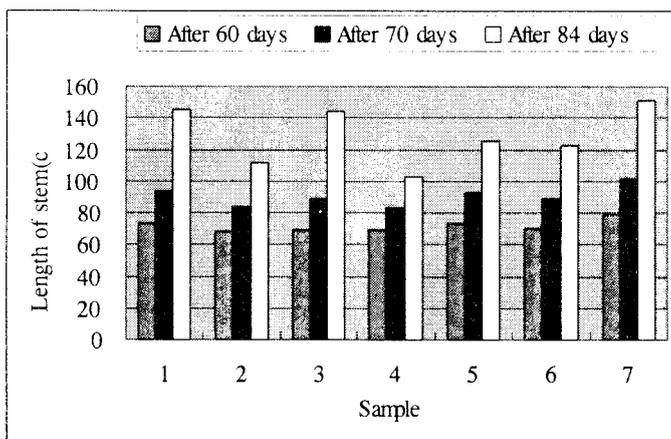


Fig. 2-45. The stem of oriental melon in nematode infected soils after treated with solidified Bt17 product and Bt17 culture broth

1: Sterilized soil

2: Nonsterilized nematode infected soil treated with nematocidal agent

3: Nonsterilized nematode infected soil

4: Nonsterilized nematode infected soil treated with Bt17 100mg

5: Nonsterilized nematode infected soil treated with Bt17 500mg

6: Nonsterilized nematode infected soil treated with Bt17 20ml

7: Nonsterilized nematode infected soil treated with Bt17 100ml

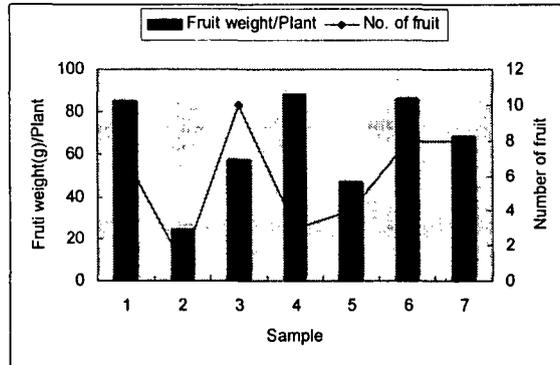


Fig. 2-46. The fruit of oriental melon in nematode infected soils after treated with solidified Bt17 product and Bt17 culture broth  
 1;Sterilized soil ,2;Nonsterilized nematode infected soil treated with nematocidal agent  
 3;Nonsterilized nematode infected soil  
 4;Nonsterilized nematode infected soil treated with Bt17 100mg  
 5;Nonsterilized nematode infected soil treated with Bt17 500mg  
 6;Nonsterilized nematode infected soil treated with Bt17 20ml  
 7;Nonsterilized nematode infected soil treated with Bt17 100ml

또 84 일 수확 후 뿌리의 상태를 보면 난랑의 경우는 처리구와 무 처리구 사이에 특별한 차이를 볼 수 없었으나, 뿌리혹의 형성은 처리구가 무 처리구에 비해 조금 감소하는 경향을 볼 수 있었다. Bt 독소에 의한 뿌리혹 형성 제어율을 보면 26%에서 51%의 범위에서 제어 효과가 나타남을 볼 수 있으나, 멀균 토양구와 선충탄 처리구에 비해 뿌리혹의 생성으로 인한 뿌리 무게의 증가는 처리구, 무 처리구 모두 비슷한 경향을 보여 Bt 독소의 선충에 대한 직접적인 방제 효과는 앞으로 더욱 검토해야 할 사항으로 생각된다(Table 2-41, Fig. 2-47)

Table 2-41. Several effects on the oriental melon and nematode production in infected soils after treated with solidified Bt17 product and Bt17 culture broth

Sample	Root weight(g)	No. of gall	No. of gall/ Root weight(g)	No. of egg sac	No. of egg sac/ Root weight(g)
1	10.0±3.6	0	0	0	0
2	12.7±4.6	0	0	0	0
3	42.0±12.6	8414±1550	198	3215±459	76
4	37.5±5.6	4096±2175	109	3500±1050	93
5	51.0±12.6	5355±945	104	3045±987	59
6	38.0±10.1	6216±4284	163	2700±1256	71
7	41.2±6.2	5928±552	143	3748±892	90

1: Sterilized soil

2: Nonsterilized nematode infected soil treated with nematocidal agent

3: Nonsterilized nematode infected soil

4: Nonsterilized nematode infected soil treated with Bt17 100mg

5: Nonsterilized nematode infected soil treated with Bt17 500mg

6: Nonsterilized nematode infected soil treated with Bt17 20ml

7: Nonsterilized nematode infected soil treated with Bt17 100ml

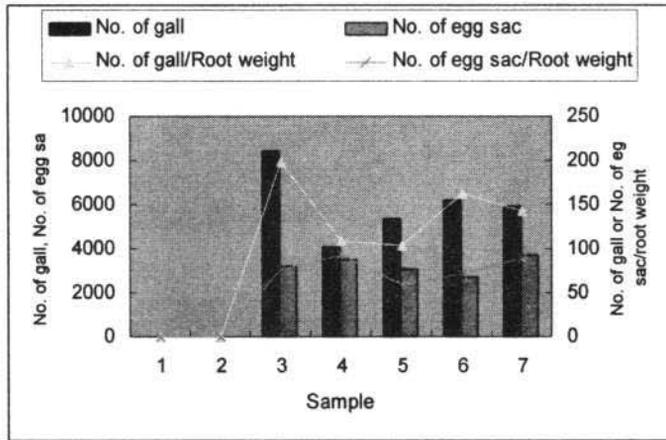


Fig. 2-47. Several effects on nematode production in infected soils after treated with solidified Bt17 product and Bt17 culture broth

1: Sterilized soil

2: Nonsterilized nematode infected soil treated with nematocidal agent

3: Nonsterilized nematode infected soil

4: Nonsterilized nematode infected soil treated with Bt17 100mg

5: Nonsterilized nematode infected soil treated with Bt17 500mg

6: Nonsterilized nematode infected soil treated with Bt17 20ml

7: Nonsterilized nematode infected soil treated with Bt17 100ml

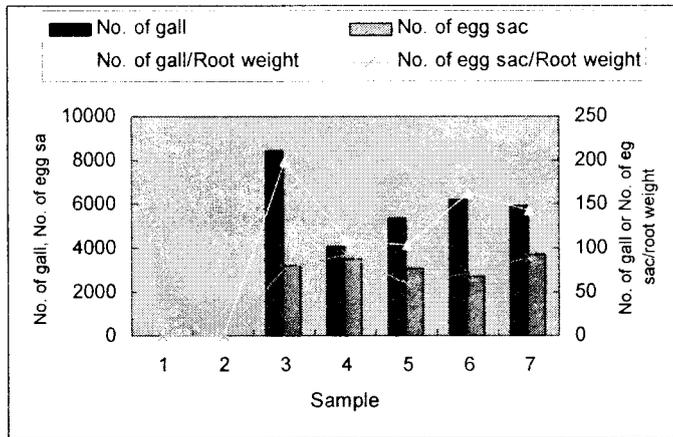


Fig. 2-47. Several effects on nematode production in infected soils after treated with solidified Bt17 product and Bt17 culture broth

1: Sterilized soil

2: Nonsterilized nematode infected soil treated with nematocidal agent

3: Nonsterilized nematode infected soil

4: Nonsterilized nematode infected soil treated with Bt17 100mg

5: Nonsterilized nematode infected soil treated with Bt17 500mg

6: Nonsterilized nematode infected soil treated with Bt17 20ml

7: Nonsterilized nematode infected soil treated with Bt17 100ml

## 제 9 절 결론

이 연구에서는 시설 참외 재배에 막대한 피해를 주고 있는 뿌리혹선충을 미생물학적인 방법으로 방제할 목적으로 포자형성 세균인 *Bacillus thuringiensis* 균주를 대상으로 항 뿌리혹선충 활성 미생물을 분리하고, 그 균주의 생리 생화학적 특성, Bt 독소 생성 배양 조건의 최적화, Bt 독소의 분리와 그 생화학적 특성, 및 뿌리혹선충에 대한 항 선충 활성의 pot 실험, 모의 포장 실험 등을 수행하였다. 이상의 결과를 정리하면 다음과 같다.

1. 성주 지역을 중심으로 이들 시설재배 참외의 토양 및 참외 뿌리에서 분리한 뿌리혹선충을 그 형태적 특징 등을 근거로 하여 동정한 결과 성주 지역에서는 *Meloidogyne arenaria*를 주로 하여 *M. incognita* 등의 선충이 관찰되었다.

2. 배지에 따른 포자 형성세균의 분리 효율을 조사한 결과 NAPGCY 배지에서 세균이 토양 g당  $4.8 \times 10^8$  cells로서 가장 많이 분리되었으며, NAAC 배지와 NA 배지에서는 각각  $9.2 \times 10^7$  cells,  $3.6 \times 10^7$  cells 순서로 분리되었다. 또한 위상차 현미경으로 결정성 내독소를 생성하는 콜로니를 조사해 본 결과 NAPGCY 배지에서 약 14%, NAAC 배지와 NA 배지에서 각각 약 8%와 7%의 콜로니가 확인되었다.

3. 분리한 *Bacillus thuringiensis* 균주 중에서 항 선충성 외독소를 생성하는 균주도 분리할 수 있었으며, 이는  $\beta$ -exotoxin이거나 그 유연 물질로 생각된다.

4. 뿌리혹선충의 2령 유충을 대상으로 한 치사활성을 지표로 하여 항 선충 활성이 있는 균주를 2주 분리하고 각각 Bt17, Bt79로 명명하였다. 분리된 두 균주 중에서 Bt17 균주가 Bt79 균주에 비해 활성이 더 강한 것으로 나타났다.

5. Bt17 균주가 생성하는 항 뿌리혹선충 활성 물질의 대부분은 세포 내에 존재하는 단백질성의 내독소인  $\delta$ -endotoxin임을 알았으며, 소량 세포 밖으로 분비되는 외독소를 생성함을 알 수 있었다.

6. 분리한 Bt 17 균주와 Bt79 균주의 당 이용성 등의 생리 생화학적인 특성을 조사한 결과 이들 균주는 포자와 내독소를 생성하는 전형적인 *Bacillus*

*thuringiensis*의 한 균주임을 알 수 있었다.

7. Bt 17 균주와 Bt79 균주의 생리 생화학적 특성은 대단히 유사했으나, 편모의 항원성을 조사한 결과며 Bt17 균주는 serotype 3인 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*로, Bt79 균주는 serotype 50인 *B. thuringiensis* subsp. *navarrensensis*로, 두 균주는 혈청형이 서로 다른 subspecies에 속함을 알 수 있다.

8. Bt79 균주는 serotype 50에 속하지만 아직 이 혈청형이 생성하는 내독소에 대한 연구는 이루어져 있지 않고 있어 이 균주는 serotype 50에 속하는 균주 중에서 항 선충 활성을 나타내는 최초의 균주로 분리되었다고 생각된다.

9. Bt 17 균주는 살충 살균제에 관계없이 전체적으로 생육 저해를 받는 것으로 나타나나 예상대로 살충제에 비해 살균제에 의한 저해효과가 더 크게 나타났다. 따라서 농약을 사용하는 일반 농가에서는 Bt 균주의 직접 살포에 의한 선충 방제는 어려울 것으로 생각되나 농약을 사용하지 않는 유기농의 경우 앞으로 더 검토할 여지가 있을 것이다.

10. ELISA Bt 내독소 정량법을 개발하여 기존의 포자수의 측정, 단백질 양의 측정 등과 같은 간접적인 방법에서 직접적으로 독소를 측정할 수 있는 길을 제시하였다.

11. 이 균주의 독소 생산에 탄소원은 큰 영향을 미치지 않았으며, 질소원은 질산태를 제외한 암모니아태와 유기태의 질소가 좋았다. Yeast extract의 농도는 큰 영향이 없었으며,  $K_2HPO_4$ 는 0.5%일 때 독소의 생성이 좋았다. 금속 이온의 영향은  $Co^{++}$ 에 의해서 크게 저해 되었으며,  $Cu^{++}$ 에 의해서 약간 감소되었으나, 다른 금속 이온간에는 큰 차이를 볼 수 없었다.

12. 이 균의 독소 생성 최적 pH는 6에서 8 사이로 나타났고, aeration이 좋을수록 포자 생성이 증가되었다.

13. 세포수 당 포자 생성량, 혹은 독소 생성량은 액체배양의 경우 보다 고체배양의 경우가 약 10배 높은 것으로 확인되었다. 따라서 독소의 효율적인 생산을 위해서는 액체 배양보다도 고체 배양을 하는 것이 한층 더 효과적이라고 생각된다.

14. Jar fermentor를 이용한 독소의 생성은 2 vvm의 공기가 주입된 경우가 1 vvm에 비해 월등히 많이 형성되었다. 2 vvm, 300 rpm, 30℃의 조건에서 균의

생육은 1일 후 최대가 되었으나 포자의 수는 조금씩 증가하여 4일 후부터 최대치에 도달하였다.

15. 반고체 배지의 조성은 미강 9 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.05 g, glucose 0.5 g, 규조토 1 g,  $\text{H}_2\text{O}$  5 ml의 비율로 만든 배지가 좋았으며, 여기에 종균을 접종하여 30°C에서 6일간 배양하여 건조한 제제는 1 g당  $1.6 \times 10^8$  개의 포자가 포함되었다.

16. 내독소 결정의 용해도는 pH가 증가함에 따라 증가하여 pH 11.5 ~ 12.5 사이에서 약 37 ~ 50% 까지 용해되나 분해가 많이 일어나고 생물학적 활성도 더 떨어지는 것으로 나타나 용해도가 약 14 ~ 24% 정도인 pH 10.0 ~ 10.5 사이가 최적 조건임을 알았다.

17. Bt17 균주와 같은 편모 항원성을 나타내는 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* BtHD1 균주는 뿌리혹선충에 대하여 전혀 독 작용을 나타내지 않는데 비해, Bt17, Bt79 균주는 다같이 독성을 나타내었다. 이들 중 Bt17의  $\text{LC}_{50}$ 은 43  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 Bt79 균주의 125  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에 비해 약 3배 정도 강하게 나타났다.

18. 모기 유충에 독성을 나타내는 Bti 균주는 185  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 Bt 독소 농도에서 적혈구를 완전히 용해시키는 용혈활성을 보이는데 반하여 Bt17과 Bt79 균주는 BtHD1과 함께 용혈활성을 나타내지 않았다. 선충에 대해서만 특이적으로 독성을 나타내는 Bt17과 Bt79 균주의 독소는 이로 미루어 보아 선충 이외의 인축이나 유용 곤충 등에 대해서는 무독성의 안정성이 높은 생물학적 제재로 개발될 가능성이 높을 것으로 생각된다.

19. Bt17 균주는 BtHD1과 전체적인 양상은 매우 유사하여 공통의 독소 단백질은 갖고 있음은 물론이지만 그 외 BtHD1에서 검출되지 않는 약 130 K 크기의 단백질이 보이는 등독소의 영동상이 약간 상이한 것으로 보아 Bt17 균주는 새로운 타입의 Bt 독소로 생각된다.

20. Bt17 균주의 항 선충 내독소에 대한 항 혈청을 염석, DEAE-cellulose ion exchange column chromatography를 거쳐 정제하고, 정제한 항체는 이중확산면역 침강법인 Ouchterlony test로 검사한 결과 Bt17 균주의 내독소에 대한 특이적인 항체임을 알 수 있었고 이 항체를 이용하여 ELISA, immuno blot 등을 수행할 수 있었다.

21. Bt17 균주와 BtHD1 균주는 대부분 공통적인 독소 항원을 갖고 있는 것으로

로 나타났으나 약 130 K 크기의 내독소 단백질에서 항원성의 차이가 나타났다. 즉 Bt17 균주는 이 항원 단백질을 갖고 있는데 비하여 BtHD1 균주에서는 찾아볼 수 없었다. 따라서 항 선충 활성을 갖고 있는 Bt17 균주의 내독소 단백질은 활성이 없는 BtHD1 균주의 내독소 단백질과는 다른 독소 단백질일 가능성이 높다고 할 수 있을 것이다. 또 면역전기영동을 통해 Bt17 균주와 BtHD1 균주는 같은 *B. thuringiensis* subsp. *krustaki*에 속하지만 Bt17이 생성하는 독소는 나방에 대해 살충활성을 가진 것으로 알려진 BtHD1의 독소와는 다른 새로운 독소임을 알 수 있었다.

22. ELISA를 이용한 토양 중에 존재하는 독소의 정량법을 확립할 수 있었다.

23. Bt17 균주의 내독소의 항 선충활성을 실내 멸균 토양 pot에서 실험한 결과 선충 감염구는 거의 고사 상태인데 비하여 Bt17 균주를 함께 시용한 실험구는 선충 비감염구인 대조구의 약 80% 정도의 생육 상황을 나타내었고, 항 선충 효과는 약 30% 정도의 제어효과가 있음을 알 수 있었다.

24. 선충 감염 토양을 사용한 실외 포트 실험의 결과는 Bt17 균주의 항 선충 활성의 유의성을 찾기 어려웠다.

25. Bt17의 가용성 제제를 사용하였을 경우, 멸균 토양에서도 항 선충 활성이 나타나지 않았으며 제제의 성상에 따라 효능에 차이가 나타나는 것으로 생각되었다.

26. Bt17의 액성 제제를 사용하였을 경우는 가용성 제제를 사용한 경우에 비해서 항 선충활성이 나타나는 것을 볼 수 있었다.

27. Bt17의 고형화 제제를 사용한 경우에는 비록 작물의 생육에는 큰 차이를 보이지 않았으나, 약 28% 정도의 항 선충 활성이 나타났다. 멸균 토양에서의 결과를 종합해 보면 가용성 제제는 항 선충 활성이 보이지 않았으나, 액성 및 고형화 제제는 어느 정도 뿌리혹선충의 제어 효과가 있음을 알 수 있었다.

28. Bt17의 가용성 제제를 사용하였을 경우, 멸균 토양에서와 같이 비 멸균 토양에서도 항선충 활성이 나타나지 않았다. Bt17 균주의 가용성 제제는 토양의 멸균 여부와는 상관없이 토양 중에 투여되었을 경우 활성을 나타내지 못함을 알았다.

29. Bt17의 액성 제제를 비 멸균 토양에 사용하였을 경우, 뿌리혹의 수는 무처

리구에 비해 감소하였으나 난낭의 형성은 무처리구와 비슷한 애매한 결과를 보여 주었다.

30. Bt17의 고형화 제제는 무 처리구에 비해 약 79.3%의 선충 저해 활성을 보여 비 멸균 토양에서도 고형화 제제는 어느 정도 활성을 나타내는 것으로 생각된다.

31. 멸균 토양과 비 멸균 토양에서의 Bt17 균주의 항 선충 활성 결과를 종합해 보면 Bt 제제의 성상에 따라 어느 정도 활성의 차이가 나타남을 알 수 있었다. Bt의 고형화 제제는 멸균, 비 멸균 토양을 막론하고 어느 정도 활성을 나타내는 것 같으며, 액성 제제는 멸균 토양에서는 효과가 있는 것으로 보이나 비 멸균 토양에서는 확실하지 않으며, 가용화 제제는 생각과는 달리 비 멸균 토양은 물론 멸균 토양에서도 거의 활성이 나타나지 않았다.

32. 멸균 토양과 비 멸균 토양에서 Bt 독소의 안정성을 토양 컬럼을 사용하여 조사한 결과 시간이 경과함에 따라 비멸균 토양 중의 독소는 빠르게 실활되는 것으로 나타나, Bt 독소는 멸균 토양에서는 어느 정도 안정성을 나타내나 비 멸균 토양에서는 대단히 불안정한 것을 볼 수 있었다. Bt 제제가 멸균 토양에서는 어느 정도 항 선충 활성을 보이지만 비 멸균 토양에서는 그 활성이 미약하거나 거의 없는 것처럼 보이는 것은 비 멸균 토양에서 Bt 독소의 불안정성이 그 한 이유가 될 수 있을 것이다.

33. 액성 제제의 Bt 독소를 사용해 대형 pot에서 실험한 결과, 멸균 감염 토양 및 비 멸균 감염 토양에서 Bt 독소 처리구와 무처리구 사이에 유의의적인 차이를 볼 수 없어, 소형 pot 보다 실제 포장에 더 가까운 대형 pot를 사용한 실험에서는 최소한 액성 제제의 Bt 독소는 항 선충 활성을 나타내지 못하는 것처럼 보였다. 다만 Bt 독소 처리구의 뿌리는 뿌리혹의 형성은 많이 되었으나 Bt 무처리구의 뿌리가 심하게 썩은 데 비하여 그 정도가 훨씬 덜 하였다.

34. 고형화 제제의 Bt 독소를 사용해 대형 pot에서 실험한 결과, 전체적으로 Bt 처리구는 무처리구에 비해 좋은 생육을 보여 주었으며, 84 일간 재배한 후 참외의 수확량을 보면 Bt 처리구는 무 처리구에 비해 2 ~ 3.5 배 정도의 수확량을 보였고, 선충탄 처리구에 비해서도 좋은 수확량을 보여 주었다. 또 84 일 수확 후 뿌리의 상태를 보면 난낭의 경우는 처리구와 무 처리구 사이에 특별한 차이

를 볼 수 없었으나, 뿌리혹의 형성은 처리구가 무 처리구에 비해 조금 감소하는 경향을 볼 수 있었다. Bt 독소에 의한 뿌리혹 형성 제어율을 보면 26%에서 51%의 범위에서 제어 효과가 나타남을 볼 수 있으나, 멸균 토양구와 선충단 처리구에 비해 뿌리혹의 생성으로 인한 뿌리 무게의 증가는 처리구, 무처리구 모두 비슷한 경향을 보여 Bt 독소의 선충에 대한 직접적인 방제 효과는 앞으로 더욱 검토해야 할 사항으로 생각되었다.

## 제 3 장 만고병 방제 생리활성물질의 탐색

### 제 1 절 서설

참외재배에 있어서 대표적 병해로는 곰팡이인 *Didymella bryoniae*에 의한 만고병이 기주범위가 광범위하고 번식 속도와 감염 전파 속도가 매우 빠른 특성을 가져 매년 성주지역 참외 생산의 가장 심각한 장애로 나타나고 있다. 곰팡이에 의한 병해의 경우 노지와 달리 고온 다습한 조건이 형성되기 쉬운 시설참외를 비롯한 다양한 과채류의 시설 재배지에서 매우 광범위하게 나타난다. gummy stem blight, leaf spot, 그리고, black of rot의 원인인 *Didymella bryoniae*는, 방출되고 난 후 짧은 기간동안 생존하는 conidia와 ascospore를 생산한다. 이 균은 chlamydospore의 형태로 질병에 감염된 식물 유체나, 혹은 종자에 붙어서 또는 종자 내에서 겨울을 난다. 그리하여, 포자나 감염된 씨앗은 1차적인 감염요인이라 할 수 있다. 뒤이어 대량으로 생성된 conidia는 바람에 날려 멀리까지도 퍼져 경작지의 2차 감염을 초래한다. 그 후 pycnidiospores는 gummy substance에서 유래되는데 이는 물이 뭍으로써 pycnidiospore가 짧은 거리에 분산되는데 적합하게 되어 있다. 이들 포자의 생성과 감염은 습도와 온도에 의해 많은 영향을 받는다. 이슬, 비, 혹은 관개로부터 나온 습윤한 안개는 포자의 발아에 필수적이다. 감염하는데 필요한 최적의 온도는 15~25도 정도이다. 특히 온실에서의 낮은 밤 기온은 잎에서 물방울이 스며 나오는 원인이 되어 잎 위에서 응축되게 된다. 그리하여 이때 진균이 감염하게 되는 것이다. 과일에의 감염은 보통 과일에 난 상처를 통하거나 마른 꽃을 통해 일어난다.

Gummy stem blight는 뿌리를 제외한 식물체의 모든 부분에서 일어난다. 잎의 증상은 짙은 노란색 혹은 붉은 갈색으로 상해가 다양한 모양으로 나타난다. 상해는 잎의 가장자리에서 시작되어 잎의 엽신(blade)으로 빠르게 확산되

어서 잎이 말리고(curling) 쪼그라들어서(shriveling) 전체 잎이 죽게끔 된다. 근접하여 돋보기로 검사할 때 여드름 같은 구조(pycnidia)가 잎의 상해부분에서 발견된다. 과일의 증상은 작물사이에서 매우 다양하다. Winter squash는 과일과 늙은 잎에서 일차적으로 증상을 나타내는 경향이 있다. 잎에서는 잎의 가장자리와 연계된 검은색에 가까운 갈색 반점이 잎의 중앙 쪽으로 진행된다. 과일에서의 상해는 어느 곳으로도 발전될 수 있는데 먼저 포자의 노란 덩어리가 흘러나오는 pycnidia로 물이 잘 스며드는 부분에서 발전된다. 종자는 종종 작은 검은색 pycnidia로 점재된다. 나중에 그 점은 하얀색 균사체와 작은 검은색 자실체 구조로 뒤덮히게 된다. 보통 감염은 토지에서 일어나서 덩굴이 물에 침지된 양상으로 줄기가 쪼개지며 갈색빛갈의 궤양을 일으키게 된다. 온실에서 키운 오이의 과실부분의 부패는 보통 미성숙한 과실의 꽃 부분에서 시작된다. 상해는 딱딱하고 잘랐을 때 어두운 갈색에서 검은색으로 된다. 이따금 상해는 과일의 한 면으로 번져서 과일이 갈고리처럼 굽게 된다 *D. bryoniae*는 watermelons, cucumber, cantaloupe의 줄기와 잎을 공격하고, squash와 pumpkin의 열매를 공격한다. 작물이 온실에서 재배되어질 경우, 밤 동안에도 높은 상대습도가 유지되기 때문에 gummy stem blight에 의해 심각하게 손상을 받는다. 그 뿐 아니라 이 질병은 노지 경작지에서도 매우 심각한 피해를 일으킨다.

운이 좋으면 이런 병은 초기에 잡을 수 있는데 감염된 식물을 제거하고 즉시 살 진균제를 처리하고 관개시설을 바꾸어서 물이 튀는 양을 최소화해야한다. 초기에 이 병을 잡지 못하고 놓치게되면 많은 식물에 확산되어 식물이 죽게된다. 이 *D. bryoniae*는 남캘리포니아에서 bromomyl과 Thiothanate-methyl에 저항성 균주가 알려진 이래 우리 나라에서도 bromomyl과 Thiothanate-methyl에 저항성을 나타내고 항 진균제에도 저항성을 나타내는 것이 알려지고 있다. 따라서 만고병에 대항할 수 있는 새로운 항 진균제의 개발이 계속적으로 이루어질 필요가 있다.

이 연구에서는 다양한 미생물을 대상으로 *Didymella bryoniae*를 원인균으로 하는 만고병을 방제할 수 있는 미생물 대사산물을 이용한 생물학적 방제 방법을 찾고자하는 목적으로 토양으로부터 대량의 미생물을 분리하여 항 만고병 미생물을 탐색하고 선별을 거쳐 이들이 생산하는 대사산물을 조사하여 최종적으로 chemical modification까지를 염두에 두어 극성이 낮은 저분자량의 생리활성물질을 생산하는 균주로 추정되는 미생물을 선별하고 이들을 대량 배양하여 활성물질을 분리, 정제, 구조확인을 거쳐 생물농약으로 이용할 수 있는 가능성을 찾고자하였다.

## 제 2 절 만고병 원인균의 특징.

### 1. 만고병에 의해 식물조직에 나타나는 현상.

덩굴마름병 혹은 줄기마름병이라고도하는 Gummy stem blight는 자낭균에 속하는 진균인 *Didymella bryoniae*에 의해 유발된다. 발생부위는 잎, 줄기, 열매인데 잎과 줄기에서 먼저 발병한다. 줄기의 병징은 감염초기에 약간 진한 녹색을 띄며 움푹하게 들어가서, 줄기방향으로 균열이 생기며 갈라지기 시작하여 분홍색 즙액이 누출되며, 후기로 갈수록 감염줄기가 변색되어 누른빛을 띄다가 갈색으로 변한다.(Fig. 3-1)

잎의 병징은 두 가지로 나타나는데 잎가부터 발생하기 시작하여 엽맥을 따라 전형적인 삼각형의 대형병반을 형성하는 것(Fig. 3-2)과 잎 중앙근처에 원형의 윤문을 형성하는 경우도 있다. 열매의 병징은 열매의 꽃자리부터 갈변하기 시작하여 점차 확대되어 열매 중앙부위로 진전된다.

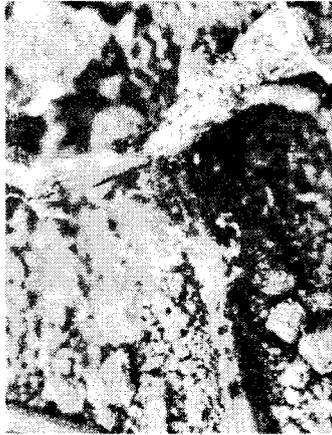


Fig. 3-1. Stem of oriental melon infected with Gummy stem blight



Fig. 3-2. A leaf of oriental melon infected with Gummy stem blight

## 2. 만고병 병원체 포자의 특징.

만고병은 원인균의 포자가 씨앗에 붙어있거나 바람에 날리면서 다른 곳으로 이동하면서 전파되어 2차 감염을 일으키는 경우가 많은데 성주지역에서 분리한 *Didymella bryoniae*의(Fig. 3-3) 포자특성을 조사한 것은 다음과 같다.

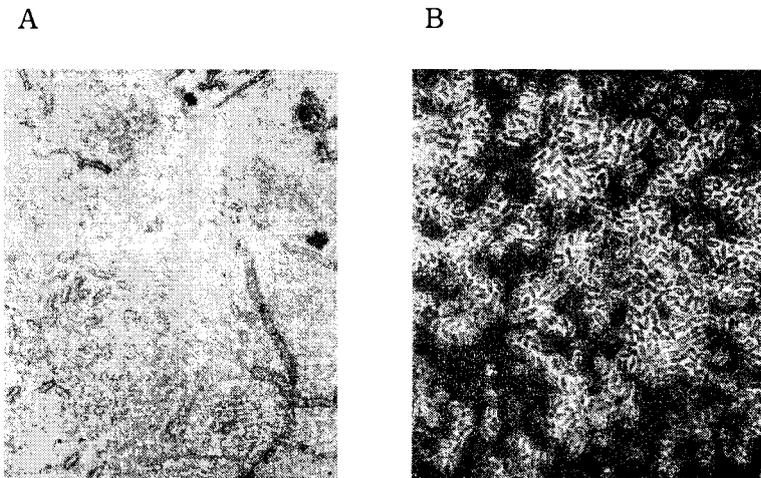


Fig. 3-3. Microphotography of *Didymella bryoniae*  
A,ascospore; B,small spore

병원균의 유성세대와 무성세대에서 대형포자와 소형포자가 나타났으며(Table 3-1) 포자를 pH가 상이한 감자한천 배지와 줄기에 접종하여 배양한 후에는 소형포자가 대형포자로 형태적 변이가 나타났다(Table 3-2). 배지의 종류와 광원에 따른 무성세대포자의 형성과(Table 3-3) 배지의 종류와 광원에 따른 유성세대포자에서 대형포자와 소형포자의 발생여부를 조사한 결과는 Table 3-4와 같다.

Table 3-1. The character of *Didymella bryoniae* spore

포자형태	포자크기( $\mu\text{m}$ )		격막 수	줄기 병징 길이 (cm)
	무성세대	유성세대		
대형포자	8.5~10.75×2.75~3.75	15~15.75×5~5.1	1	6~7
소형포자	5~6×2.5~2.75	15~15.75×5~5.2	0	6~7
Ascochyta stage in CMI	6~13×3~5	14~18×4~7	1	—

Table 3-2. 소형무성포자의 형태적 변이

포자형태	감자한천배지*				줄기접종	
	pH5	pH6	pH7	pH8	생체 줄기	살균 줄기
대형포자	대형	대형	대형	대형	대형	대형
소형포자	소형	2격막 대형	1격막 대형	소형	대형	대형

\* 배양 2개월 후에 조사한 것임

Table 3-3. 광원과 배지종류에 따른 무성세대포자의 형성

광원처리방법	배지종류	포자형태	
		대형포자	소형포자
연속형광	감자한천	6	1
	V8배지	22	1
	줄기 한천	122	17
3일 암처리 후 연속형광	감자한천	36	1
	V8배지	20	1
	줄기 한천	120	3
근자외선광	감자한천	91	1
	V8배지	68	15
	줄기 한천	171	3
3일 암처리 후 근자외선광	감자한천	127	1
	V8배지	171	5
	줄기 한천	107	11
암처리	감자한천	1	0.7
	V8배지	1	0.5
	줄기 한천	1	0.7

Table 3-4. 광원과 배지종류에 따른 유성세대포자의 형성

광원처리방법	배지종류	포자형태	
		대형포자	소형포자
연속형광	감자한천	+	-
	V8배지	+	+
	줄기한천	+	+
3일 암처리 후 연속형광	감자한천	+	+
	V8배지	+	+
	줄기한천	+	+
근자외선광	감자한천	+	-
	V8배지	+	-
	줄기한천	+	-
3일 암처리 후 근자외선광	감자한천	+	-
	V8배지	+	+
	줄기한천	+	+
암처리	감자한천	-	-
	V8배지	+	+
	줄기한천	-	+

3. 개화시기에 따른 만고병의 발병.

열매의 병징은 열매의 꽃자리에서부터 나타남으로, 발병과 작물의 개화시기 간의 관계를 알아보기 위하여 개화를 전후로 하여 과실수의 화기에 *Didymella bryoniae*를 접종한 후 감염율을 조사한 결과 개화전에 감염율이 가장 높은 것으로 나타났다.(Table 3-5)

Table 3-5. 개화시기에 따른 덩굴마름병의 화기감염

구 분	과실수			감염율 (%)
	접 종	감 염	비 감 염	
개 화 전	20	18.8a	1.2	93.3
개 화 시	20	14.3b	5.7	71.6
낙 화 후	20	10.5c	10	53.3

DMRT 5%, c.v. ....5.12

4. 화기제거에 따른 만고병 감염.

개화전에 감염율이 가장 높은 것으로 나타나서 암꽃 혹은 암술을 제거한 후의 감염율을 조사한 결과는 Table 3-6 과 같이 나타났다.

Table 3-6. 화기제거에 따른 덩굴마름병의 감염정도

구 분	과실수			감염율 (%)
	접 종	감 염	비 감 염	
암꽃제거	20	14.2b	5.8	70.8
암술제거	20	17.2a	2.8	85.8
무 제 거	20	18.3a	1.7	91.7

DMRT 5%, c.v. ....8.18

5. 성주지역 참외의 만고병 발생양상.

만고병의 발생정도를 파악하기 위해 참외의 잎, 줄기, 원줄기, 열매부위의 피해정도를 95 ~ 96년에 성주지역 2개 면에서 조사한 결과는 다음과 같다.(Table 3-7, 3-8) 이 결과를 토대로 성주지역내의 월중 최적 발생시기를 분석한 결과 육묘기, 정식기를 포함하여 6월 하순까지 발생하며 4월 상순에는 가장 발생이 심하다(Table 3-9). 만고병의 발생부위는 잎과 줄기에 먼저 나타나고, 식물체의 고사는 6월 하순부터 시작하여 작물 생육후기까지 계속된다.

Table 3-7. 벽진면 3개소의 월별 만고병 발생양상

월별 발생정도 (%)	만고별 발생 병소			
	잎	원줄기	줄기	열매
2월	0	6.6	0	0
3월	1.1	6.7	18.0	0
4월 상순	2.3	30.0	38.5	0
4월 중하순	0.9	30.0	11.5	3.5
5월	1.5	30.0	0	0
6월	0	30.0	0	0
7월 상순	0	30.0	0	0

Table 3-8. 월향면 3개소의 월별 만고병 발생양상

월별 발생정도 (%)	만고별 발생 병소			
	잎	원줄기	줄기	열매
2월	4.8	3.3	0	0
3월	0.8	1.7	0.5	0
4월 상순	1.6	20.0	3.7	0
4월 중하순	3.1	23.3	3.4	6.0
5월	2.0	23.3	0	0
6월	0	23.3	0	0
7월 상순	0	23.3	0	0

Table 3-9. 성주지역 만고병 발생시기

월별 발생정도 (%)	만고병 발생 병소			
	잎	원줄기	줄기	열매
2월	*	*		
3월	*	*	*	
4월 상순	*	*	**	
4월 중하순	*	**	**	**
5월	**	*		
6월		*		
7월 상순		*		*

\*\* : 발생최적기

### 제 3 절 세균성 향 만고병 항생물질의 탐색

#### 1. 재료 및 방법

##### 가. 사용 균주 및 배양방법

참외의 만고병을 일으키는 *Didymella bryoniae* 균주를 위시하여 *Botritis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*는 항 진균 활성 세균을 분

리하기 위한 표적 균주로 사용되었다. 이들 균주는 Potato Dextrose Agar (PDA, Difco co.) 배지에서 계대배양 하면서 사용하였다. 항 진균 활성 세균을 분리하기 위하여 성주를 중심으로 대구와 경북지역 일원에서 채취한 토양을 균 원 시료로 하여 상법에 따라 분리하였다. 즉 토양시료를 적당히 희석하여 Nutrient Agar (NA, Merck co.), Yeast extract Peptone Dextrose Agar (YPDA), Brain Heart Infusion Agar (BHIA) 배지에 도말하여 25, 30, 37°C에서 각각 배양하여 출현하는 집락으로부터 Single Colony Isolation으로 순수분리 하였다. 분리한 세균들은 사면배지에 접종 배양한 후 4°C에 보관하며 실험에 사용하였고, 필요한 경우 -70°C에서 glycerol 보존하였다. 분리한 세균들의 항 진균 활성을 측정할 경우에는 PDA 배지를 사용하여 30°C에서 배양하였다.

#### 나. 항 진균 활성 세균의 분리

*Didymella bryoniae*를 30°C PDA 배지에서 3-5일 배양하여 얻은 포자를 현탁하여, 이 포자 현탁액 0.1 ml ( $10^{4-5}$  개 포자)를 PDA 배지에 도말하고, 분리된 세균 균주를 그 위에 획선하여 30°C에서 배양후 나타나는 생육저지대로 항 진균 활성 균주를 1차 선별하였다. 1차 선별된 균주들은 Nutrient Broth (NB, Difco co.) 배지를 사용하여 30°C, 24시간 배양 후, 원심분리(5000rpm, 10분)에 의해 균체를 제거하고 얻은 상청액을 가열, Ultrafiltration Disk Membrane (Sigma, MW 10,000)으로 여과, 또는 여과 후 가열 등의 처리를 하였다. 이들 처리한 배양 상청액의 항 진균 활성을 Agar Hole Diffusion 방법으로 측정하였다 (Fig. 3-4). 높은 항 진균 활성을 나타내는 균주를 최종적으로 선별하여 30°C, NB 배지에서 키우면서 30 시간 동안 세포 증식과 항 진균 활성을 추적하였다. 세포 증식은 660nm에서 흡광도로 측정했으며 항 진균 활성은 Agar Hole Diffusion 방법으로 측정하였다.

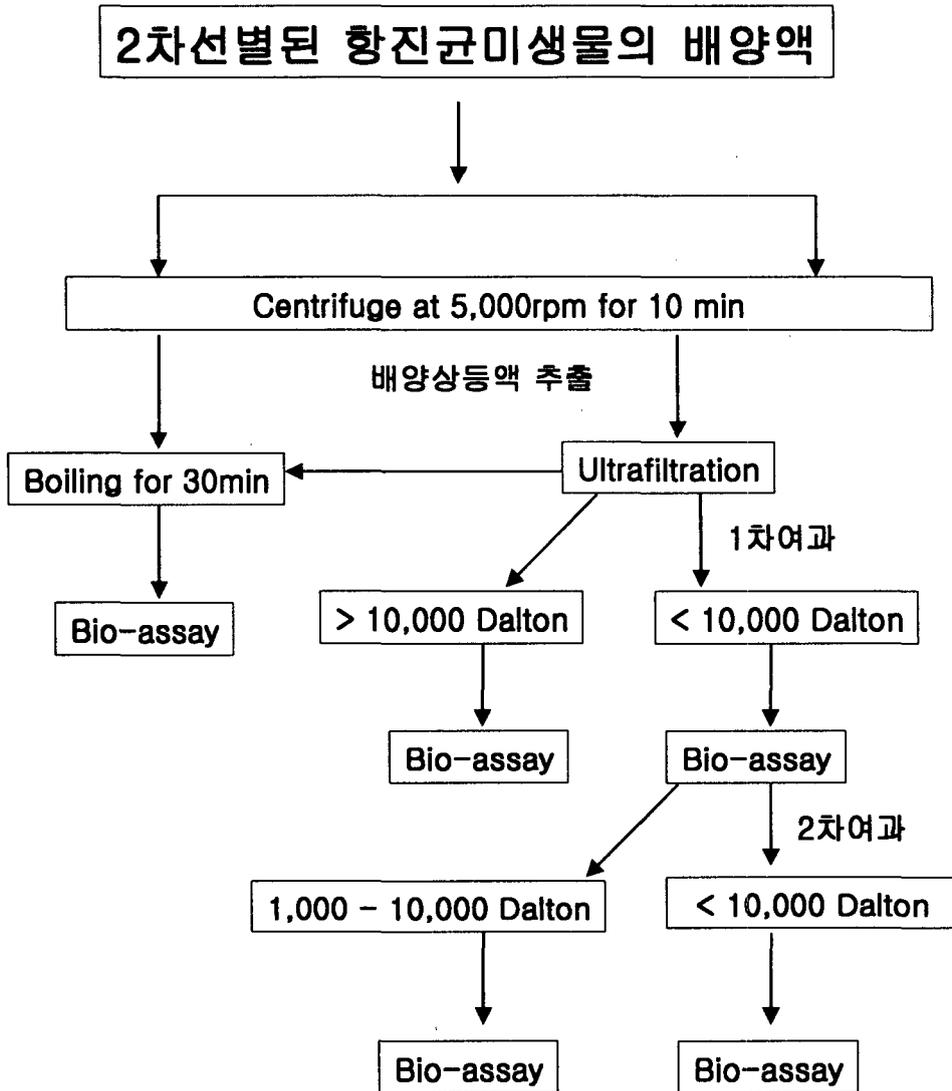


Fig. 3-4. Screening method for antifungal substance

#### 다. 항 진균 활성 세균의 동정

항 진균 활성 세균의 동정은 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology와 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology의 방법에 준해서 형태학적, 생화학적, 생리학적 특성을 조사하였다. 이와 함께 API 20NE kits도 병용하여 동정을 수행하였다.

#### 라. 항 진균 활성의 동정

##### 1) Chitinase assay

항 진균 활성 세균의 chitinase의 생성을 위해 30℃, Chitin-Peptone (CP, 0.5% glucose, 0.2% peptone, 0.2% chitin, 0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.05% NaCl, pH 6.8) 배지에서 40 시간 동안 배양하였다. 배양액을 12000 rpm, 20 분간 원심분리에 의해 균체를 제거하고 얻은 배양 상청액에 ammonium sulfate를 완전 포화되게 첨가 후 4℃에서 하룻밤 동안 침전시켰다. 침전된 물질을 원심분리를 통해 모은(12000 rpm, 12 분) 후 소량의 완충액에 용해하고 투석에 의하여 ammonium sulfate를 완전히 제거시킨 후 chitinase assay를 위한 효소원으로 사용하였다. chitinase의 활성은 Chitin-Peptone Agar plate 상에서 Agar Hole Diffusion 방법에 의해 생성되는 투명환의 크기로 측정하였다. 또 이와 함께 chitin의 분해에 의해 생성되는 환원당의 정량으로 직접 chitinase의 활성을 측정하였다. 즉 0.3 ml의 1 M sodium acetate buffer (pH 5.3), 0.5 ml colloidal chitin (0.1% stock solution), 그리고 0.2 ml 효소액을 포함하는 1 ml의 반응액을 37℃에서 한 시간동안 반응시켰다. 이 때 생성되는 환원당의 양은 Somogyi-Nelson 방법으로 정량하였다.

## 2) Siderophore assay

항 진균 활성 균주의 siderophores의 생성을 위해 시험 균주를 철이 결핍된 Succinate Minimal Medium (SMM, 0.6%  $K_2HPO_4$ , 0.3%  $KH_2PO_4$ , 0.1%  $(NH_4)_2SO_4$ , 0.02%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.4% succinic acid, pH7.0)에서 30°C, 40 시간 배양하였다. 이 배양 상청액에 Ferric chloride를 첨가한 후 불용성의 iron salts는 3000 rpm, 5 분 동안의 원심분리를 통해 제거하고, 상청액의 흡광도를 spectrophotometer를 이용해 435 nm에서 측정했다.

siderophore의 기능적 assay를 위해 Chrome Azurol S Assay(CASA)를 사용하였다. 과도한 인산염은 이 반응을 저해하기 때문에 SMM 대신에 T medium (per liter; NaCl 5.8g, KCl 3.7g,  $CaCl_2$  0.113g,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  0.1g,  $NH_4Cl$  1.1g,  $KH_2PO_4$  0.272g,  $Na_2SO_4$  0.142g, Trizma base 12.1g)을 사용하였다. 시험 균주는 1 g/L  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 를 함유한 T medium, 30°C에서 배양하였다. 세균 증식과 CAS assay는 12시간 간격으로 관찰하였다. CAS assay는 0.5 ml의 배양 상청액에 0.5 ml CAS 용액과 10  $\mu$ l shuttle solution (0.2M 5-Sulfosalicylic acid)과 혼합하여 소실되는 푸른색의 정도를 630 nm에서 측정하였다. A630에서 흡광도를 측정하기 위해, Tris-Cl buffer는 blank로써 사용하고, Tris-Cl buffer · CAS solution · shuttle solution의 mixture를 reference(r)로 사용한다. Siderophore units는 Siderophore unit(%)=  $\left[ \frac{Ar-As}{Ar} \right] * 100$ 으로 나타내었다.

### 마. siderophore의 분리와 검출

항 진균 활성을 나타내는 siderophore 생산균을 30°C에서 40 시간 동안 SMM에서 배양한 후 원심분리 (10000 rpm, 20 분)로 균체를 제거한 배양 상청액을 ethyl acetate로 추출하였다. 진공 증발 농축으로 유기용매를 제거한 시료를 적은 양의 methanol에 용해해서 Silicagel TLC plate (Merck co. Silicagel

60 F<sub>254</sub>)를 사용한 Thin Layer chromatography (TLC)를 수행하였다. 이 때 전개는 chloroform-acetic acid-ethanol (90:5:2.5) 전개용매를 사용하였다. spot은 UV, iodine vapor, ninhydrin, 0.1M FeCl<sub>3</sub>-HCl 용액 등으로 검출하였다. 검출된 각 spot는 plate로부터 각각 분리하여 methanol로 2번 용출 시킨 후, 진공 증발 건조시켜 CAS assay 등을 행하였다(Fig. 3-5).

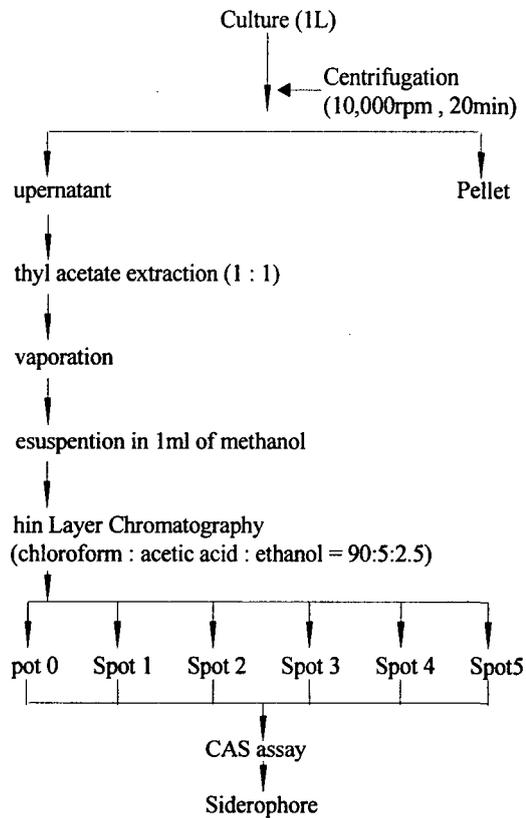


Fig. 3-5. Isolation procedure of siderophore produced by ADB 2 strain

#### 바. 철 결핍의 회복 실험

시험균을 1 mg/ml EDTA를 포함하는 SMM 한천 배지 상에  $10^6$  cells/ml 되도록 도말하고 그 위에 TLC spot 추출액을 침지한 filter paper disks를 얹는다. 이 평판배지는 30℃에서 48 시간 배양하고 disk 주위의 균의 증식 여부를 확인하였다.

#### 사. 포자 발아 시험

일정량의 배양 추출액을 같은 용량의 포자 현탁액 ( $1 \times 10^5$ /ml)과 혼합하여 0.5% 한천 PDA 배지와 함께 오목 slides glass의 wells내에 주입하여 cover glass로 잘 밀봉하여 30℃에서 3 일 간 배양한 후 광학 현미경으로 포자의 발아 비율과 발아관(germ-tube)의 길이를 관찰하였다.

## 2. 결과

#### 가. 항 진균 활성 세균의 분리

토양으로부터 분리한 약 1000여 균주 중에서 1차 선별과정 (Fig. 3-6)을 거쳐 *D. bryoniae*에 항 진균 활성을 나타내는 14 균주를 선별할 수 있었다. 이들 14 균주의 배양 상청액을 가열, 여과 등의 처리를 거쳐 2차 선별을 행한 결과 대부분의 균주가 가열에 의해 그 활성을 상실하는 것으로 나타나 거의 모두가 단백질성 항 진균활성 물질일 가능성이 높다고 생각된다. 이들 중에서 *D. bryoniae*뿐 아니라 *Botritis cinerea*, *Rhizoctonia solani*에 대해서도 비교적 강한 활성을 나타내고 또 이들 균에 대하여는 약간의 내열성도 갖고 있는 것으로 보이는 균주 No. 2를 최종적으로 선택하였으며 (Table 3-10), Fig. 3-7에 PDA

배지 상에서 이 균주의 *D. bryoniae*와 *Botritis cinerea*에 대한 항균 활성의 양상을 볼 수 있다. 이하 이 균주를 ADB 2로 명명하였다.

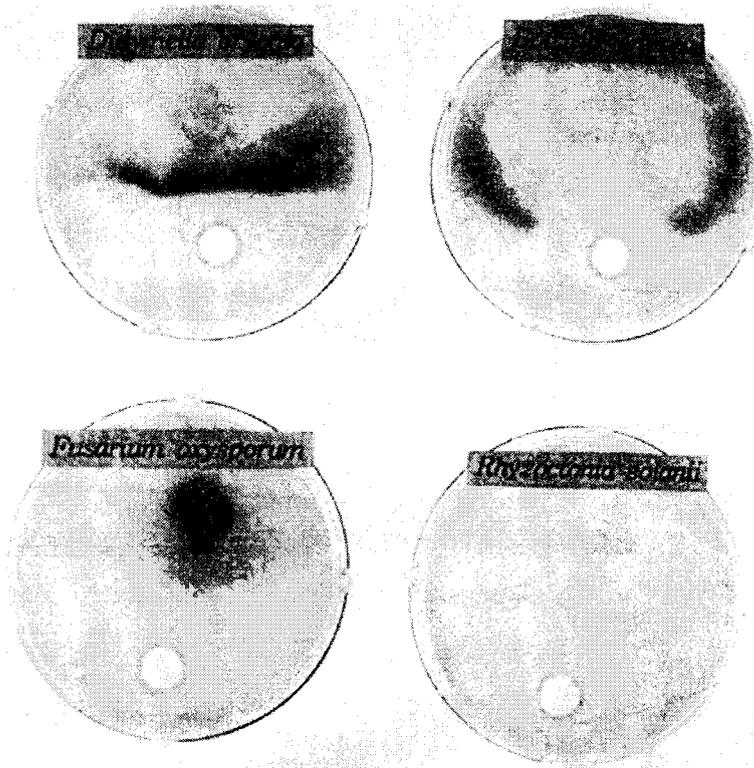


Fig. 3-6. First screening of antifungal bacteria

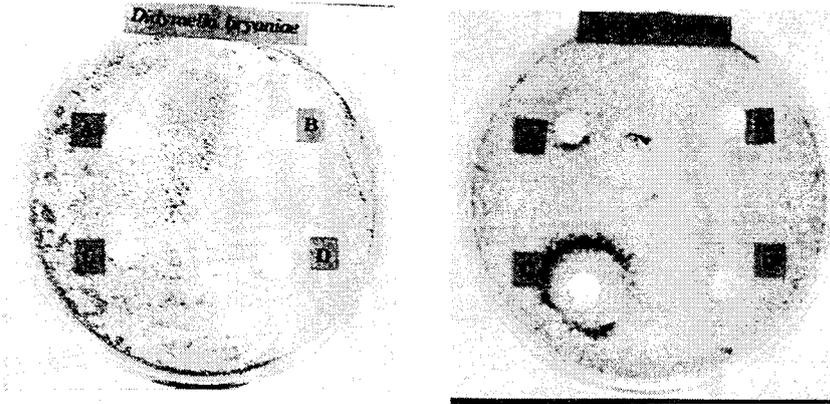


Fig. 3-7. Antifungal effect of the strain ADB2 against phytopathogenic fungi on the PDA plate.

A : Antifungal activity of the strain ACB2 against *Didymella bryoniae*.

B : Antifungal activity of the strain ADB2 against *Botritis cinerea*.

Table 3-10. Antifungal activity of strains from soil

Stain No.	1	2	4	6	7	8	9	29	30	42	44	45	47	50	
<i>Didymella bryoniae</i>	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	B	++	++	+++	++	+++	+++	++	+	++	++	+++	+	++	+++
	C	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	D	+	+++	++	+++	++	+++	+++	+	++	++	+++	+	+	++
<i>Botritis cinerea</i>	A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	
	B	+	+	++	++	++	++	+	++	+	+	+	++	++	
	C	-	++	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	
	D	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	++	
<i>Rhizoctonia solani</i>	A	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	
	B	++	++	+++	+++	++	++	+++	++	+++	++	+++	+++	++	
	C	-	+	-	++	-	-	-	-	-	++	-	++	-	
	D	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	
<i>Fusarium oxysporum</i>	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	B	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	D	++	+	++	+	-	-	-	-	-	-	-	+	++	++

※The diameter was measured after 24 hours incubation

- : Diameter of inhibition zone = 0, + :  $0 < \text{Diameter} \leq 10\text{mm}$ ,

++ :  $10\text{mm} < \text{Diameter} \leq 20\text{mm}$  , +++ : Diameter  $> 20\text{mm}$

※A : \*Filtered ( $> 10\text{KDa}$ ), boiling for 30min : (+)-Chemical antifungal activity

B : Filtered, No boiling : (+)-Proteineous antifungal activity ( $< 10\text{KDa}$ )

C : No filtered, boiling for 30min : (+)-Chemical antifungal activity

D : No filtered, No boiling : (+)-Proteineous antifungal activity

(broad range)

\*Membrane pore size : 10,000

#### 나. ADB 2의 동정

항 진균 활성 균주로 선별한 ADB 2의 형태학적, 생리 생화학적 특성들은 Table 3-11에 정리하였으며, 전자현미경 사진을 Fig. 3-8에서 볼 수 있다. ADB 2 균주는 그람음성, 운동성, 호기성이고 간균 형태를 취하고 있다. 또 catalase 양성, oxidase 양성, arginine decarboxylase 활성도 가지고 있다. 이러한 결과를 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology를 참고로 하고 또 API 20NE kits를 사용한 실험 결과를 종합하여 보면 ADB 2는 *Pseudomonas* 속 *aureofaciens*일 것으로 추정되나 확실한 동정 결과를 알기까지 잠정적으로 *Pseudomonas* sp. ADB 2로 명명하기로 한다.

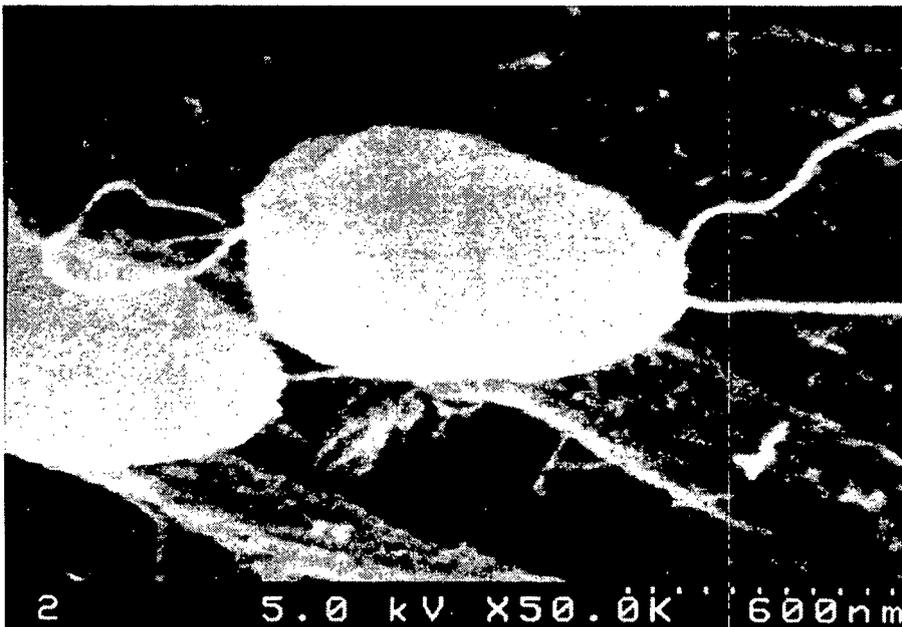


Fig. 3-8. Scanning electron micrography of the isolated strain *Pseudomonas* sp. ADB 2

Table 3-11. Morphological and physiological characteristics of the isolated strain ADB 2

Characteristics	ADB 2
Gram stain	-
Cell shape	rod
Motility	+
Spore	-
O <sub>2</sub> requirement	aerobic
$\beta$ -galactosidase	+
Arginine decarboxylase	+
Lysine decarboxylase	-
Ornithine decarboxylase	-
Citrate	+
H <sub>2</sub> S production	-
Urease	-
Tryptophane deaminase	-
Indole production	-
Voges-Proskauer	-
Gelatin hydrolysis	+
Acid from D-glucose	+
Utilization of carbon sources	
Mannitol	+
Inositol	-
Sorbitol	-
Rhamnose	-
Sucrose	-
Melobiose	+
Adipate	-
Arabinose	+
Mannose	+
N-acetyl-glucosamine	+
Maltose	-
Gluconate	+
Malate	+
Oxidase	+
Catalase	+
Nitrate reduction	-

다. 배양시간에 따른 균의 생육과 항진균 활성의 변화

배양시간에 따른 균의 생육과 항진균 활성의 생성은 Fig. 3-9와 같다. 항진균 활성은 균의 생육속도와 거의 비슷하게 대수 증식기에 급격하게 증가하며 약 18 시간 후에 최고 생산성을 나타낸 후 균의 생육과 함께 24 시간 이후에 약간 감소하는 양상을 나타내고 있다. 이로 미루어 이 활성은 아주 저분자의 활성 물질 보다는 약간의 중합체일 가능성이 높을 것으로 생각된다.

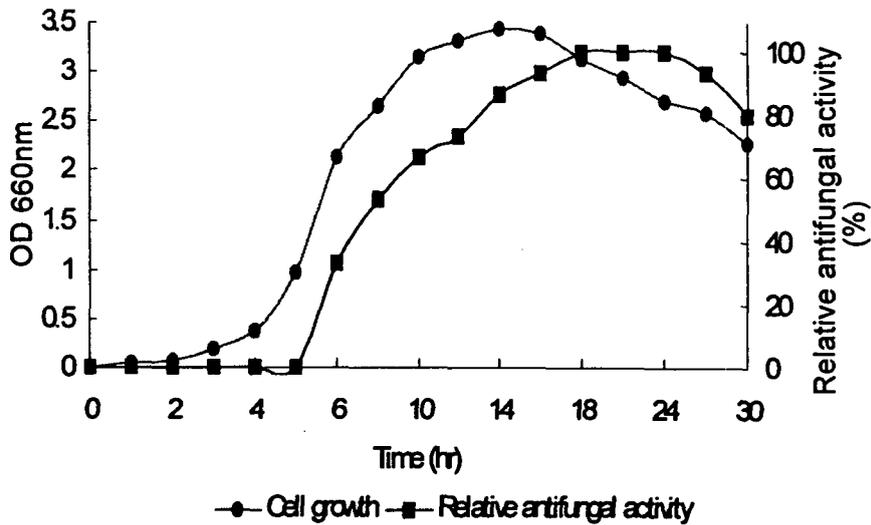


Fig. 3-9. Profiles on the growth and antifungal activity in strain ADB 2

## 라. ADB 2 균주가 생성하는 항 진균성 물질의 작용 양상

Table 3-10에서 볼 수 있는 것처럼 ADB 2 균주가 생성하는 항 진균성 물질은 열에 상당히 불안정하므로 전형적인 항생물질에 의한 항 진균 활성을 나타낼 가능성은 높지 않다고 할 수 있다. 그래서 그 다음으로 생각할 수 있는 고분자 물질에 의한 활성 가능성을 알아보기 위하여 chitinase의 활성과 siderophore 활성을 측정하였다. ADB 2 균주를 Chitin-Peptone Agar 배지 상에서 배양하였으나 Chitin의 분해에 의한 투명환의 형성을 관찰할 수 없었으며, 이 균주의 배양 여액으로부터 chitin의 분해에 의한 환원당의 생성도 관찰되지 않아 이 균주는 chitinase 생성에 의한 항 진균 활성은 아닌 것으로 생각된다 (자료 생략).

다음으로 siderophore의 생산에 의한 항 진균 활성을 나타내는지를 조사하기 위해 siderophore 생성균 *Pseudomonas fluorescens* KCTC 1767과 비 생산균 *Bacillus subtilis* KCTC 1659와 함께 ADB 2의 siderophore 생성 여부를 조사하였다. Fig. 3-10 에서 보는 바와 같이 *B. subtilis* KCTC 1659는 전혀 siderophore를 생성하지 않으나, ADB 2는 *Pseudomonas fluorescens* KCTC 1767과 마찬가지로 siderophore를 생성함을 볼 수 있었다. 따라서 ADB 2의 항 진균 활성은 siderophore의 활성에 의존하는 것으로 생각할 수 있다. 그러나, ADB 2의 항 진균 활성은 siderophore를 상대적으로 조금 더 높게 생성하는 *P. fluorescens* KCTC 1767 균주 보다 높게 나타나 (자료 생략), ADB 2의 항 진균 활성이 전적으로 siderophore에만 의존하는 것은 아닐 가능성도 있을 것이다.

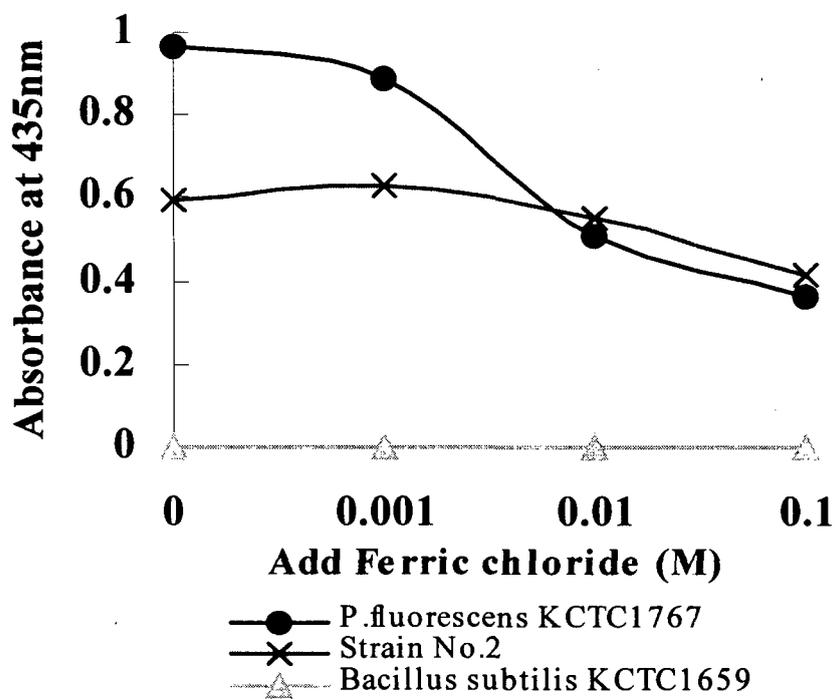


Fig. 3-10. Siderophore production of the strain ADB 2

#### 마. siderophore의 활성 검정

분리한 ADB 2 균주는 과량의 철을 함유하고 있는 T 배지에서보다 철 결핍의 T 배지에서의 생육정도가 훨씬 낮으며, 또 철 결핍의 T 배지에서는 황록색의 형광색소를 생산하지만 철을 함유한 T 배지에서는 형광색소를 생산하지 않는다. CAS assay는 iron-dye complex를 사용하여 siderophore의 활성을 검정하는 실험계로, iron-dye complex보다 철에 대해 더 높은 친화력을 가지는 siderophore는 iron-dye complex로부터 철을 제거할 수 있다. 따라서 색소의 색깔이 청색으로부터 적황색으로 변화하게 된다.

ADB 2 균주를 철 결핍의 T 배지에서 배양하였을 때는 CAS assay에서 청색으로부터 적황색으로 색깔의 변화를 육안으로도, 630nm에서 흡광도의 변화로도 관찰할 수 있었다. 그러나, 철을 함유한 T 배지의 배양액에서는 CAS 반응이 관찰되어지지 않아 청색이 그대로 유지되었다(Fig. 3-11). 따라서 이는 siderophore 생산이 철 결핍 배지에서 더 증가한다는 것을 의미한다. 즉, 철을 함유하고 있는 T 배지에서는 균의 생육은 증가하지만 siderophore 생산 정도는 현저히 감소되었다. 그리고 철 결핍의 배지 상청액에서 402 nm에서 특징적인 spectrum peak가 나타나는데 이 402 nm에서의 peak는 철 함유 배지의 배지의 배양액에서는 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 siderophore 합성은 철에 의해 영향을 받고 있음을 확실히 보여 주고 있다.

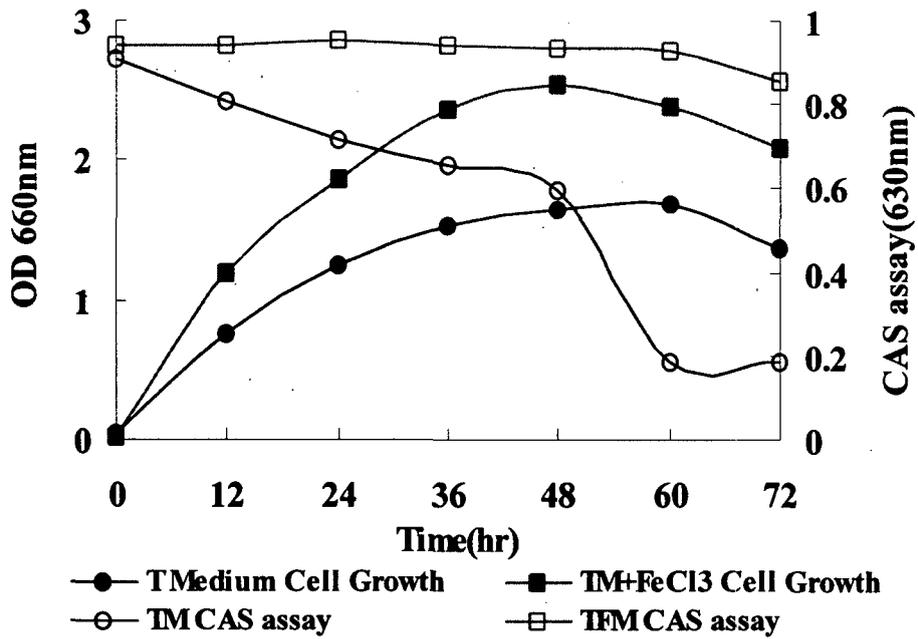


Fig. 3-11. Cell growth and CAS reactivity level of the strain ADB 2 in a T medium and in a T medium containing FeCl<sub>3</sub>.

바. siderophore의 분리

ADB 2 균주의 배양 상청액을 ethyl acetate로 추출 농축하여 TLC plate상에서 전개 분리하여 siderophore를 분리하고자 했다. TLC plate에 나타난 5개의 spot 중에 0.1M FeCl<sub>3</sub>-HCl 용액의 발색 시약에 의해 확인할 수 있는 spot의 Rf치는 각각 0.12, 0.3, 0.54로 나타났다. 5개의 spot를 각각 분리하여 1 ml methanol로 추출하여 그 추출용액의 일부를 취해 10mM Tris-Cl buffer (pH 6.8)와 혼합하여 CAS assay를 행하였다. CAS assay에서 가장 강력한 활성은 Rf치 0.12의 spot에서 관찰되었으며 이는 *Pseudomonas* sp. ADB 2의 siderophore일 것이라고 추정된다 (Table 3-12).

Table 3-12. Rf values and Siderophore unit(%) of separated spots on TLC plate

Spot number	Rf value	Siderophore unit(%)
0	0	3.70
1	0.12	65.53
2	0.3	0.53
3	0.54	9.30
4	0.64	5.70
5	0.86	7.30

## 사. 철 결핍의 회복능

ADB 2 균주가 생산하는 siderophore의 철 결핍에 대한 회복능을 조사하기 위하여 한천배지에 킬레이트 시약 EDTA를 첨가하였다. EDTA는 철과 결합하여 미생물이 증식하는데 필요한 철의 이용을 막게되어 미생물의 증식이 억제된다. 이럴 경우 오직 Ferri-siderophores 또는 고농도의 철 이온만이 이러한 증식저해작용을 회복시킬 수 있다. 그렇다면 Ferri-siderophore의 형태로 정제된 siderophore를 함유한 disk의 주위에 있는 균의 성장을 가능하게 해줄 것으로 예상된다. SM agar 배지상에 접종된 균들은 증식을 위해 필요한 철 이온을 EDTA에 결합된 형태의 철 이온을 획득하는 것이 불가능하므로 증식이 일어나지 않는다. 그러나 Ferri-siderophore를 함유하고 있는 용액 주변의 균들은 용액이 철을 주변의 균으로 공급하기 때문에 증식이 가능하게 된다. TLC에서 분리한 spot을 사용하여 실험한 결과 균의 증식은 spot 1 (Rf, 0.12) 용액을 함유하고 있는 disk 주위에서 관찰되었다 (Fig. 3-12). 이와 같은 결과는 ADB 2 균주는 그들의 siderophore를 이용하여 철 결핍으로부터 회복될 수 있음을 의미하고 있다. 이와 같은 철 이온의 획득 능력은 진균의 생육에도 필요한 철 이온을 진균 주변의 환경으로부터 획득하여 진균의 철 이온 결핍을 촉진할 것으로 생각된다. 따라서 진균의 증식을 억제하는 항 진균 할성을 나타내는 것으로 보인다.

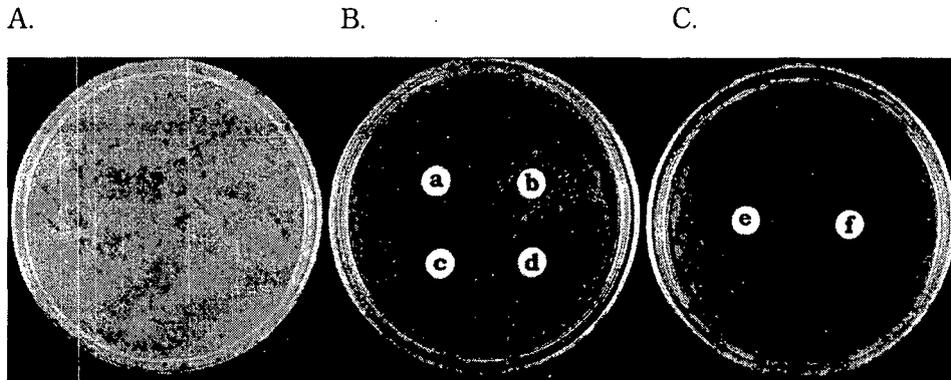


Fig. 3-12. Reversal of iron starvation in iron-deficient succinate minimal medium containing EDTA.

The growth of the isolated strains which were only laid in SM agar medium(A). Filter paper disks were overlaid with the extracted spot solutions in SM agar medium containing EDTA(B, a : spot number 0, b : spot number 1, c : spot number 2, d : spot number 3, e : spot number 4, f : spot number 5).

#### 아. siderophore의 포자 발아 저해능

철 이온을 획득할 수 있는 siderophore의 활성이 실제 *D. bryoniae*의 생육을 억제하는 효과를 나타내는지 알아보기 위하여 ADB 2의 배양 상청액, TLC에서 분리한 siderophore 용액을 사용하여 *D. bryoniae*의 포자 발아 및 발아관 형성 실험을 행하였다. Fig. 3-13에서 보는 바와 같이 PDA 배지 상에서 *D. bryoniae* 균주를 이들 용액과 함께 30°C, 3일 동안 배양한 결과, 배양 상청액과

함께 처리된 곰팡이 포자는 발아되지 않았고 siderophore 용액을 처리한 경우도 포자는 거의 발아되지 않았지만 배양 상청액 보다는 다소 활성이 떨어짐을 보았다. 이는 앞서서도 언급한 바와 같이 ADB 2의 항 진균 활성은 다만 siderophore의 활성에만 의존하는 것은 아닐 것으로 판단된다. 포자의 발아와 함께 발아관의 형성도 관찰되지 않는 것으로 보아 ADB 2의 siderophore는 포자 발아 및 발아관의 형성 저해에 관여하고 있음을 알 수 있었다.

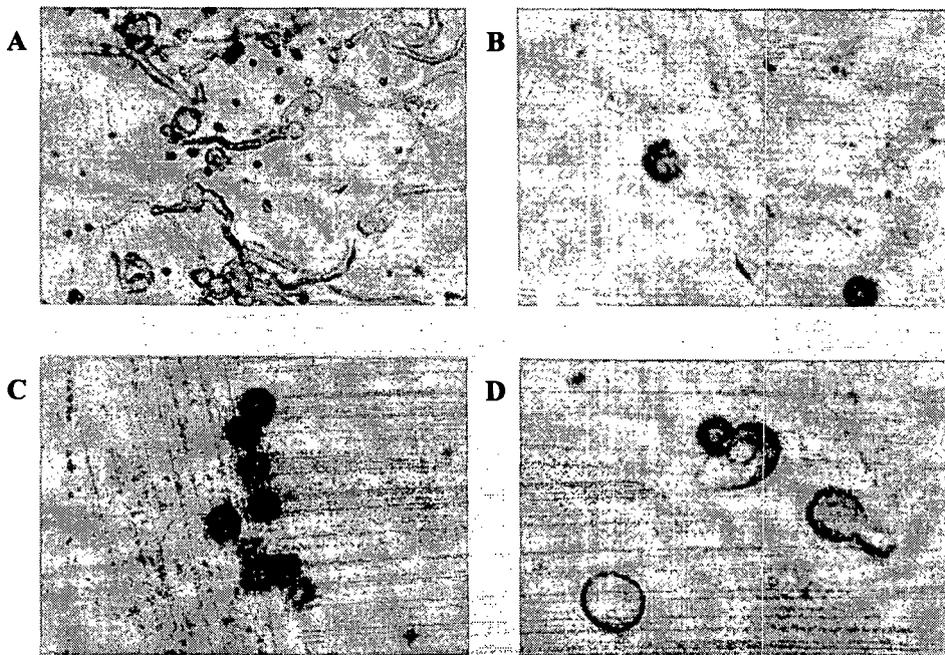


Fig. 3-13. Microscopic photograph of *D. bryoniae* treated with siderophore (spot no. 1) of the strain ADB 2. Spores of *D. bryoniae* were grown on a PDA for 3 days.

- A: Without culture extract of the strain ADB 2 (10x20)
- B: Without culture extract of the strain ADB 2 (10x100)
- C: With 10% culture extract of the strain ADB 2 (10x100)
- D: With 10% spot no. 1 solution of the strain ADB 2 (10x100)

### 3. 고찰

토양 유래 식물병원체에 대한 생물학적 방제(biological control)는 우리 인간에게나 환경에 유해하다고 알려져 있는 화학 살충제에 대한 유력한 대안책이라고 할 수 있다. 수많은 종류의 길항 작용을 하는 미생물들은 병징이 억제되어지는 토양에서 증가하는 것으로 알려져 있는데 이러한 병징을 억제하는 주요 미생물들로서 *Trichoderma*, *penicillium*, *Sporidesmium*와 같은 진균류나, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*와 같은 세균류가 많이 알려져 있다. 길항 작용은 주로 antibiosis, exploitation(predation, fungal hyphae의 lysis), competition 등에 의해 이루어지고 있는 것으로 보인다. 미생물들 사이에서의 이루어지는 경쟁은 주로 carbohydrate, nitrogen, 그리고 기타 growth factor와 같은 영양소 쟁탈에 의한 것이 많다. siderophore를 생산할 수 있는 미생물은 생산균에 iron에 대한 경쟁력을 부여하며 이는 이들 주변에 있는 미생물들로 하여금 철 이온의 결핍을 일으켜 그 들에 대해서 증식 억제작용을 억제하게 한다. 철 이온은 상대적으로 풍부한 요소이지만,  $Fe^{3+}$ 는 천연 상태의 pH에서는 불용성의 ferric hydroxide로써 침전되므로 미생물 생장에 이용되는 효율은 낮다. 자연 상태하의 pH에서 uncomplexed ferric ion의 최대농도는  $10^{-18}M$ 보다 더 높지 않다고 알려져 있다. 이러한 iron stress를 극복하기 위하여, 많은 세균들과 진균류들은 siderophore를 생성 분비하여 고도로 안정된 형태이며 수용성인  $Fe^{3+}$  복합체를 형성하고 있다. 형광성의 *Pseudomonas*의 siderophores는  $Fe^{3+}$  착화합물에 대해 높은 친화성을 지니고 있어 이 균이 필요로 하고 있는 철 이온의 흡수를 아주 특이적으로 촉진시키는데 이는 세포막 결합성 siderophore receptors에 siderophore를 결합시킴으로써 이루어진다. 이러한 고 효율성의 철 이온 흡수 기작은 식물 병원성 진균의 철 이온 흡수 기작과 경쟁할 것으로 생각되며, 그 결과 진균의 증식에 심각한 장애를 주는 철 결핍 환경이 만들어질 것으로 생각된다.

만고병을 일으키는 *D. bryoniae*를 방제할 수 있는 수단의 하나로 이 연구에서는 *D. bryoniae*에 대하여 항 진균작용을 나타내는 균주를 분리, 선별 동정하였으며 이 균은 *D. bryoniae*뿐 아니라 *Botritis cinerea*, *Fusarium oxysporium*과 *Rhizoctonia solani* 등에 대해서도 항 진균작용을 나타내었다. 이 균의 항 진균작용은 siderphore의 작용에 의한 것임을 밝혔으며 그를 분리 정제하여 그 특성의 일부도 조사하여 *D. bryoniae* 방제를 위한 생물학적 제재로서 가능성을 살펴보았다..

## 제 4 절 방선균 유래 항 만고병 항생물질의 탐색

### 1. 재료 및 방법

#### 가. 재료

곰팡이와 박테리아 배양용 배지는 Sigma-Aldrich Chemical Co.에서 구입했다. 그 외 다른 시약들도 일반 시약상사로부터 특급 또는 일급 시약을 구입하여 사용하였다.

Flash column chromatography는 Merck Kieselgel 60 silica (Germany)를 사용했다. 분석을 위한 TLC(thin layer chromatography)는 코팅된 silica gel plate (aluminium sheet 20×20cm, Silica gel 60 F<sub>254</sub>, Merck Art. No. 1.05554, Germany)를 이용하여 하였다.

모든 HPLC용 시약은 Merck에서 구입하였다. 모든 유기용매는 Merck와 Duck-san Chemical companies (Korea)에서 구입하였다.

#### 나. 만고병균의 분리

만고병과 black rot 증상을 가진 잎과 줄기와 과실은 성주 지역의 온실에서 키운 참외로부터 수집하였다. 각각의 식물체에서 얻은 잎과 줄기 부분은 폴리에틸렌 비닐 봉지에 각각 나누어 담아서 저온 상태로 실험실까지 운반하였다. 조직 단편은 0.5% sodium hypochlorite 용액으로 30 ~ 60초 동안 처리하여 표면을 소독한 후 QPDA (one-quarter-strength potato dextrose agar) 배지에 넣어, 실온 (22℃ ~ 25℃)에서 12 시간의 광 노출 조건하에서 배양시켰다. 조직 단편에서 자라난 *D. bryoniae*의 콜로니는 QPDA 배지에 옮겨 4℃에서 보존하였다.

#### 다. 방선균의 분리 및 배양

토양으로부터 방선균을 분리하기 위하여 방선균의 증식을 촉진하는 것으로 알려진 humic acid를 함유한 배지 Humic acid-Vitamin (HV) 배지를 주로 사용하여 상법에 따라 분리하였으며, 분리된 방선균의 보존에는 Bennet 한천 배지를 사용하였다. 분리한 방선균주로부터 항 진균성 물질을 생산하기 위하여 각 방선균의 포자를 100 ml의 액체 배지가 들어있는 500 ml Erlenmyer flask에 한 백금이 접종하여 30℃에서 왕복진탕으로 5 일간 배양하였다. 이 때 사용한 배지는 Glucose-Soluble starch-Soybean meal (GSS) 배지를 사용하였다. 이들 배지의 조성은 Table 3-13, 3-14, 3-15에 나타내었다.

대량발효(scale-up fermentation)는 1 L Erlenmyer flask 에 Seed 배지와 동일하게 만든 배지 0.3 L에 50 ml의 seed culture (1% glucose, 0.5% polypeptone, 0.5% yeast extract, 0.003%  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )를 접종하고 rotary shaker를 이용해서 180 rpm, 30℃, 5일 동안 배양하였다.

Table 3-13. Medium for isolation of *Actinomycetes* (HV-agar medium)

Ingredient	Composition
Humic acid(in 0.2N-NaOH)	1 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g
KCl	1.7 g
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.01 g
CaCO <sub>3</sub>	0.01 g
Cycloheximide	0.05 g
Agar	18 g
B-Vitamins <sup>1)</sup>	1 ml
D.W.	1000 ml
pH	7.2

1) 0.5 mg of Thiamine-HCl, Riboflavin, Niacin, Pyridoxine-HCl, Inositol Ca-Pantothenaet, P-Amino-benzoic acid and 0.2 mg of Biotin in 1 ml

Table 3-14. Medium for preservation of *Actinomycetes*

(Bennet-agar medium)

Ingredient	Composition
Yeast extract	1 g
Beef extract	1 g
N.Z amine typeA	2 g
Glucose	10 g
Agar	15 g
D.W.	1000 ml

Table 3-15. Medium for test *Actinomycetes* (GSS medium)

Ingredient	Composition
Soluble starch	10 g
Glucose	20 g
Soybean meal	25 g
Beaf extract	1 g
Yeast extract	4 g
NaCl	2 g
CaCO <sub>3</sub>	2 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.25 g
D.W.	1000 ml
pH	7.2

#### 라. 항 진균 활성 방선균의 분리

자연계로부터 분리 소장하고 있는 방선균을 대상으로 Paper Disc Method로 항 진균 활성을 나타내는 방선균을 1차 선별하였다.

Paper Disc Method는 Petri dish에 PDA 배지에 전 배양한 곰팡이 시험균의 포자 현탁액을 1% agar와 잘 혼합하여 증충하여 검정 plate로 사용하였다. 여기에 30 °C에서 5 일간 배양한 방선균 배양액 일정량을 8 mm의 paper disc에 흡수시키고 풍건 후 검정 plate 위에 올려놓고 27 °C에서 2 일간 배양시켜 생육 저지환을 형성하는 방선균을 1차 선별하고 생육 저지환의 크기로 항균 역가를 임의적으로 1 ~ 5로 나타내었다. 여기서 이를 다시 편의상 포자 발아만

저해하는 것을 group I, 투명환을 형성하는 것을 group II로 구분하였다 (Fig. 3-14).

1차 선별과정에서 항 진균 활성을 나타내는 방선균의 항 진균 활성을 재확인하기 위해 1차와 동일한 방법으로 2차 선별을 하였다. 2차 선별과정을 통하여 선별한 균주는 삼각 플라스크(500 ml)를 사용하여 100 ml의 배지에 배양하고 배양액을 유기용매 butanol과 ethyl acetate로 각각 추출하였다. 이 배양 추출물을 역시 paper disc method로 활성검정을 실시하여 활성물질이 ethyl acetate 또는 butanol 까지 넘어오는 균주를 선별하여 pH 안정성, 열 안정성, 활성탄 흡착여부, ion exchange resin의 선택성 등을 검토하여 항 진균 활성 균주로 최종 선별하였다. 이 개략적인 과정을 Fig. 3-15에 도시하였다.

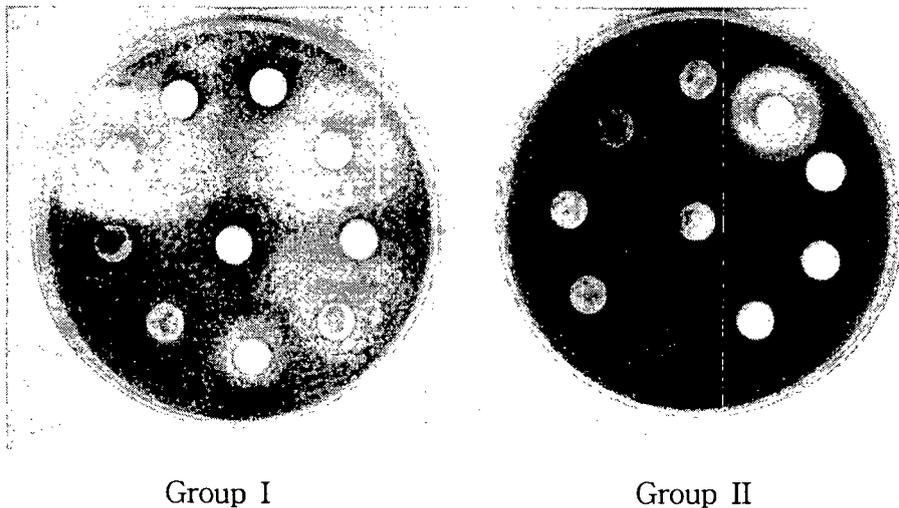


Fig. 3-14. Screening method of antifungal Actinomycetes.

Group I : Spore Inhibition

Group II : Clear Zone

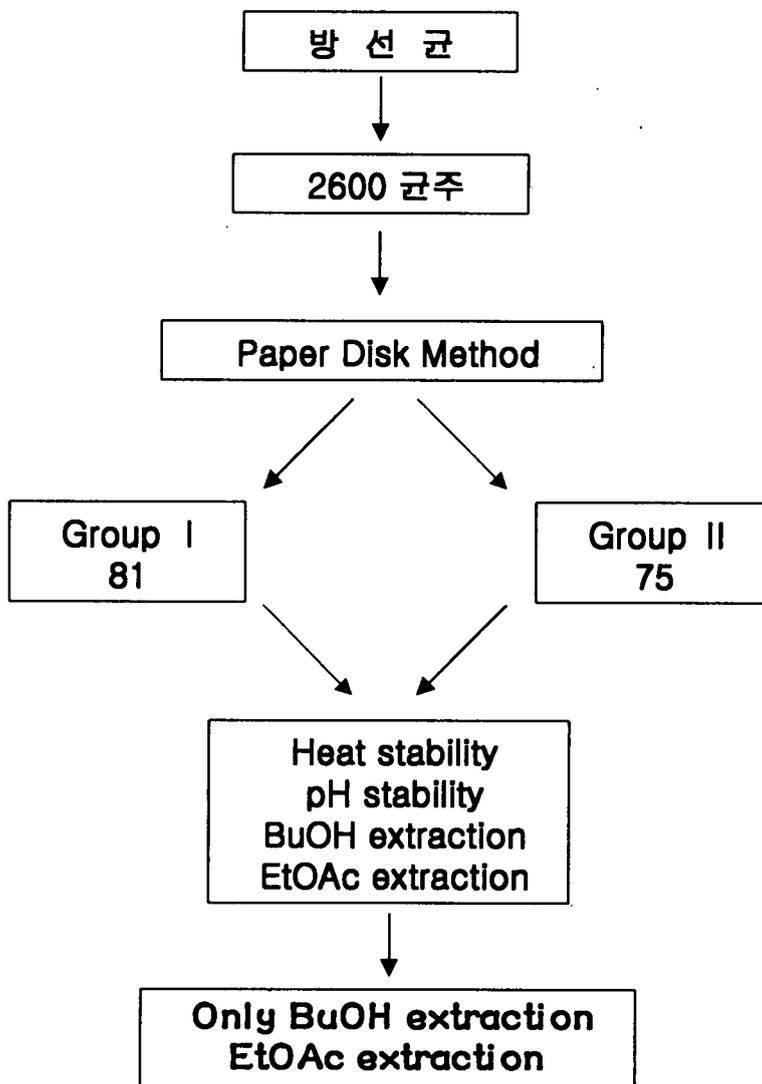


Fig. 3-15. Antifungal activity screening method.

#### 마. 균의 생육도 측정

균의 증식도는 배양액 1 ml을 5000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 packed cell volume (PCV)을 측정하거나 dry cell weight (DCW)를 측정하였다. DCW의 측정은 일정량의 배양액을 원심 분리하여 균체를 모은 후 같은 부피의 증류수로 두 번 씻은 후 얻은 pellet을 100°C에서 1 시간동안 말린 다음 그 무게를 측정하였다.

#### 바. Physico-chemical and Spectral analysis

UV spectrum은 methanol에 시료를 녹여서 Hewlett Packard spectrophotometer를 이용하여 측정하였다. IR spectrum은 KBr cell을 사용해 Jasco International infrared spectrophotometer를 이용하여 측정하였다.  $^1\text{H}$ - ,  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra는 시료를  $\text{CD}_3\text{OD}$ 에 녹여서 Broker ARX-400을 이용하여 측정하였다. 분자량은 LC-MS 혹은 FAB-MS spectrophotometer를 사용하여 결정하였다.

## 2. 결과

### 가. 항 진균 활성 방선균의 분리

1차 선별과정에서 방선균 약 2,600여 균주 중 156 균주가 활성을 나타내었으며, 그중 57 균주를 다시 2차로 30 균주를 선별하여 다음 3차 선별을 행하였다. 2차 선별과정에서 활성을 나타낸 30 균주 중에서 활성물질의 유기용매 추출 과정을 거쳐 ethyl acetate 까지 넘어오는 5 균주와 butanol에 추출되는 6 균주를 선별하여 이들의 열 안정성, pH 안정성, 활성탄 흡착여부, ion exchange resin의 선택성 등을 검토하여 최종적으로 80223 균주를 선별하였다. Table 3-16에 그 결과의 일부를 정리하였다.

Table 3-16. Screening of antifungal actinomycetes strains

act. st.No	1st	2nd	3rd	act. st.No	1st	2nd	3rd	act. st.No	1st	2nd	3rd
71939	-			80023	-			80059	-		
71940	1			80024	-			80060	-		
71941	-			80025	-			80061	-		
71942	-			80026	-			80062	-		
71943	-			80027	-			80063	-		
71944	-			80028	-			80064	-		
71945	-			80029	-			80065	-		
71946	-			80030	-			80066	-		
71947	-			80031	-			80067	-		
71948	-			80032	2			80068	-		
71949	-			80034	-			80069	-		
71950	-			80035	-			80070	-		
71951	-			80036	-			80071	-		
80001	-			80037	2			80072	-		
80002	-			80038	3			80073	-		
80003	3			80039	-			80074	-		
80004	-			80040	-			80075	-		
80005	-			80041	-			80076	-		
80006	-			80042	-			80077	-		
80007	-			80043	-			80078	-		
80008	-			80044	-			80079	-		
80009	-			80045	-			80080	-		
80010	-			80046	3			80081	-		
80011	-			80047	2			80082	-		
80012	-			80048	-			80083	-		
80013	-			80049	1			80084	-		
80014	-			80050	-			80085	-		
80015	1			80051	-			80086	-		
80016	-			80052	-			80087	-		
80017	-			80053	-			80088	-		
80018	-			80054	-			80089	-		
80019	-			80055	-			80090	-		
80020	-			80056	-			80091	-		
80021	-			80057	-			80092	-		
80022	-			80058	-			80093	-		

act. st.No	1st	2nd	3rd	act. st.No	1st	2nd	3rd	act. st.No	1st	2nd	3rd
80094	-			80129	-			80164	-		
80095	-			80130	-			80165	3	+	-
80096	-			80131	-			80166	-		
80097	-			80132	-			80167	-		
80098	3	-		80133	-			80168	-		
80099	-			80134	-			80169	-		
80100	-			80135	-			80170	-		
80101	-			80136	-			80171	-		
80102	-			80137	3	+	-	80172	-		
80103	-			80138	-			80173	-		
80104	-			80139	-			80174	-		
80105	-			80140	-			80175	-		
80106	-			80141	-			80176	-		
80107	-			80142	-			80177	-		
80108	-			80143	-			80178	-		
80109	-			80144	-			80179	-		
80110	-			80145	2			80180	-		
80111	-			80146	-			80181	-		
80112	-			80147	-			80182	-		
80113	-			80148	-			80183	-		
80114	-			80149	-			80184	-		
80115	-			80150	-			80185	-		
80116	-			80151	-			80186	-		
80117	-			80152	-			80187	-		
80118	-			80153	-			80188	-		
80119	-			80154	-			80189	-		
80120	2			80155	-			80190	-		
80121	-			80156	-			80191	5	-	
80122	3	-		80157	-			80192	-		
80123	-			80158	-			80193	-		
80124	-			80159	-			80194	4	-	
80125	-			80160	-			80195	-		
80126	-			80161	-			80196	-		
80127	-			80162	-			80197	-		
80128	-			80163	-			80198	-		

act. st.No	1st	2nd	3rd	act. st.No	1st	2nd	3rd	act. st.No	1st	2nd	3rd
80199	-			80234	-			80269	-		
80200	-			80235	-			80270	-		
80201	-			80236	-			80271	-		
80202	-			80237	-			80272	3	-	
80203	-			80238	-			80273	-		
80204	-			80239	-			80274	-		
80205	-			80240	-			80275	-		
80206	-			80241	-			80276	-		
80207	-			80242	-			80277	-		
80208	3	+++	B+/E+	80243	-			80278	-		
80209	-			80244	-			80279	-		
80210	3	++++	B+/E+	80245	-			80280	-		
80211	-			80246	-			80281	-		
80212	-			80247	3	-		80282	-		
80213	-			80248	-			80283	-		
80214	-			80249	-			80284	-		
80215	-			80250	-			80285	-		
80216	-			80251	3	-		80286	-		
80217	-			80252	-			80287	-		
80218	-			80253	3	-		80288	-		
80219	-			80254	-			80289	-		
80220	-			80255	-			80290	-		
80221	-			80256	-			80291	-		
80222	-			80257	-			80292	-		
80223	4	+++	B+/E+	80258	-			80293	-		
80224	-			80259	-			80294	-		
80225	-			80260	-			80295	-		
80226	-			80261	-			80296	-		
80227	-			80262	-			80297	-		
80228	-			80263	-			80298	-		
80229	-			80264	-			80299	-		
80230	-			80265	-			80300	-		
80231	-			80266	-			80301	-		
80232	-			80267	-			80302	-		
80233	-			80268	-			80303	-		

act. st.No	1st	2nd	3rd	act. st.No	1st	2nd	3rd	act. st.No	1st	2nd	3rd
80304	-			80339	-			80374	-		
80305	-			80340	-			80375	-		
80306	-			80341	-			80376	-		
80307	-			80342	-			80377	-		
80308	-			80343	-			80378	-		
80309	-			80344	-			80379	-		
80310	-			80345	-			80380	-		
80311	-			80346	-			80381	-		
80312	-			80347	-			80382	-		
80313	-			80348	-			80383	1		
80314	-			80349	-			80384	-		
80315	-			80350	-			80385	-		
80316	-			80351	-			80386	-		
80317	-			80352	-			80387	-		
80318	-			80353	1			80388	5		
80319	-			80354	-						
80320	-			80355	-						
80321	-			80356	-						
80322	-			80357	-						
80323	-			80358	-						
80324	-			80359	-						
80325	-			80360	-						
80326	-			80361	-						
80327	-			80362	1						
80328	-			80363	-						
80329	-			80364	-						
80330	-			80365	-						
80331	-			80366	2						
80332	-			80367	-						
80333	-			80368	-						
80334	-			80369	-						
80335	-			80370	-						
80336	-			80371	-						
80337	-			80372	-						
80338	-			80373	-						

group I

group II

1st : culture broth  
 2nd : tube culture &  
 flask culture  
 3rd : solvent extraction  
 B-butanol  
 E-ethyl acetate

## 나. 항 진균성 활성 물질 생성의 최적 조건

### 1) 탄소원의 영향

항 진균성 활성 물질 생산에 미치는 탄소원의 효과를 조사하기 위해 기본 배지에 (soybean meal 2.0%, yeast extract 0.4%, beef extract 0.1%, CaCO<sub>3</sub> NaCl 0.25%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.025%) 각각의 탄소원을 1%의 농도로 넣고 28℃, 180 rpm에서 4일간 배양하여 균의 증식과 활성 물질의 생산성을 조사한 결과는 Table 3-17과 같다. 대부분의 탄소원에서 균의 증식과 활성 물질의 생성은 이루어졌으나 균의 증식은 soluble starch와 potato starch에서 가장 좋았고, 활성 물질의 생성은 xylose, raffinose, glucose에서 배양했을 때 높은 활성을 보였다. 고가의 raffinose를 제외하고 glucose와 xylose의 농도를 변화시키면서 활성 물질의 생산능을 조사한 결과는 Fig. 3-16과 같다. 각각 3.0% glucose와 2.0% xylose를 사용하여 배양했을 때 균주의 증식과 활성 물질의 생산능이 가장 높게 나타났다. 그러나 전체적으로 탄소원의 종류와 농도를 달리해도 큰 차이점은 없었다.

Table 3-17. Effect of carbohydrates as carbon sources on the antibiotics production

Carbon source	Final pH	D.C.W (mg/ml)	Relative activity (%)
None	8.2	6.8	25
Dextrin	7.9	9.0	86
Galactose	7.8	6.4	45
Glycerine	7.4	8.4	60
Glucose	7.9	8.1	90
Potato starch	7.9	9.9	70
Raffinose	8.4	6.8	95
Soluble starch	7.8	10.2	78
Sorbose	8.2	6.4	45
Sucrose	8.2	6.6	70
Xylose	7.5	8.1	100
Fructose	8.0	7.8	60

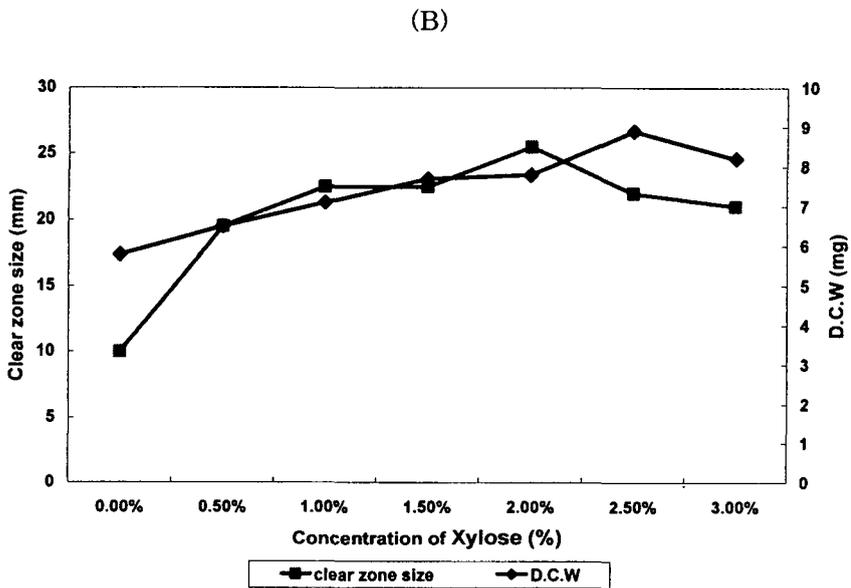
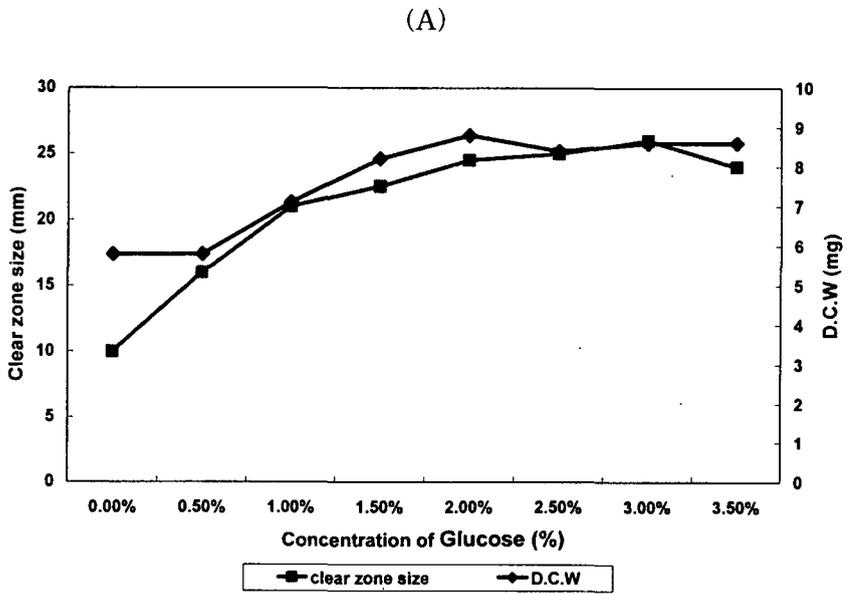


Fig. 3-16. Effect of glucose (A) and xylose (B) concentration on the antibiotics production.

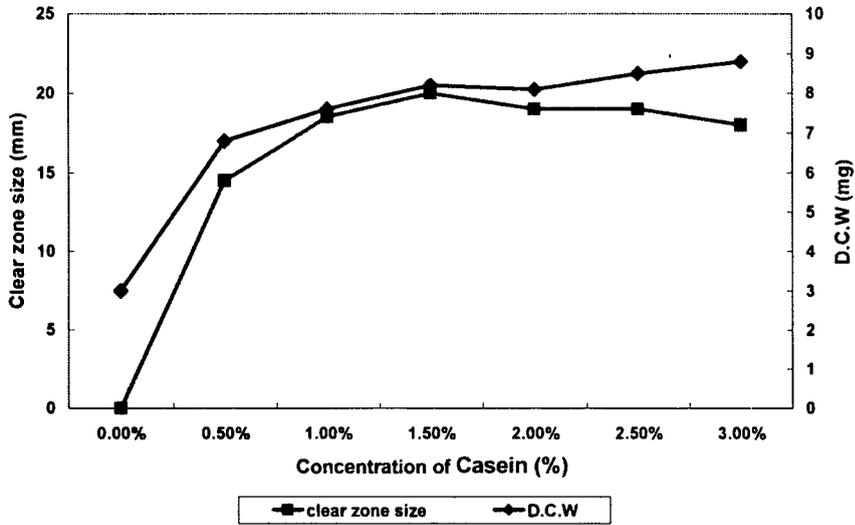
## 2) 질소원의 영향

항 진균성 활성 물질 생산에 대한 질소원의 효과를 조사하기 위해 질소원이 없는(glucose 1%, soluble starch 1%, CaCO<sub>3</sub> 0.2%, NaCl 0.25%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.025%) 기본배지에 각각의 질소원을 1%의 농도로 첨가하고 28℃, 180 rpm 4 일 동안 배양하여 균의 증식과 활성 물질의 생산성을 조사한 결과는 Table 3-18과 같다. 활성 물질의 생산은 질소원의 종류에 따라 그 생산성이 크게 차이가 남을 볼 수 있다. casein, soybean meal, polypeptone과 같은 복합적인 질소원을 사용할 때 상대적으로 높은 생산성을 나타냈으나 urea 및 무기 질소원에서는 활성 물질의 생산성이 극히 낮았다. 이는 질소원이 항생제를 생산하는데 있어서 중요한 역할을 함을 보여준다. 활성 물질 생성 효과가 뛰어난 casein과 soybean meal의 농도에 따른 균주의 증식과 활성 물질 생산성을 조사하였다. 최대 생산성을 보인 casein과 soybean meal의 농도는 각각 2.0%와 1.5%이었다 (Fig. 3-17).

Table 3-18. Effect of nitrogen sources on the antifungal antibiotic production

Nitrogen source	Final pH	D.C.W (mg/ml)	Relative activity (%)
None	7.2	4.4	0
Beef extract	7.2	8.2	68
Casein	7.3	8.6	100
Soybean meal	7.2	7.5	85
Polypeptone	7.6	4.8	80
Yeast extract	7.2	7.2	65
Malt extract	7.3	5.3	48
Urea	9.4	4.3	0
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6.1	5.8	0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6.3	4.0	25
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	7.4	3.8	0
NH <sub>4</sub> Cl	4.3	2.2	0

(A)



(B)

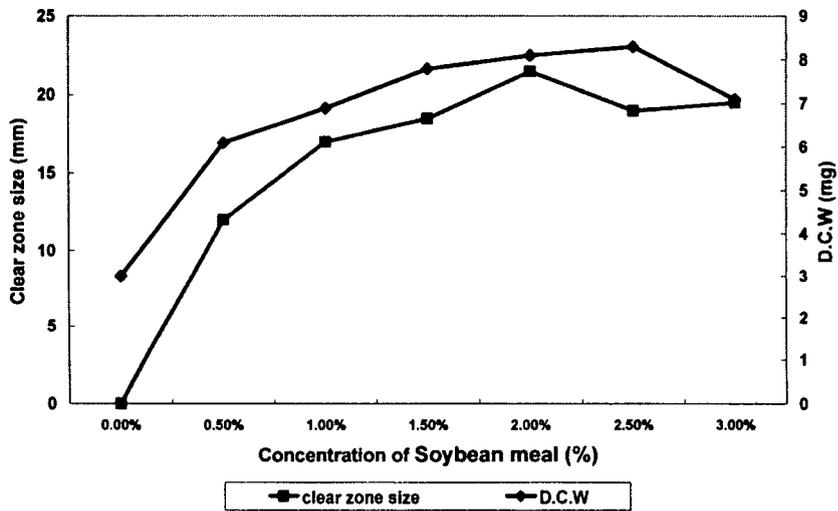


Fig. 3-17. Effect of casein (A) and soybean meal (B) concentration on the antibiotics production.

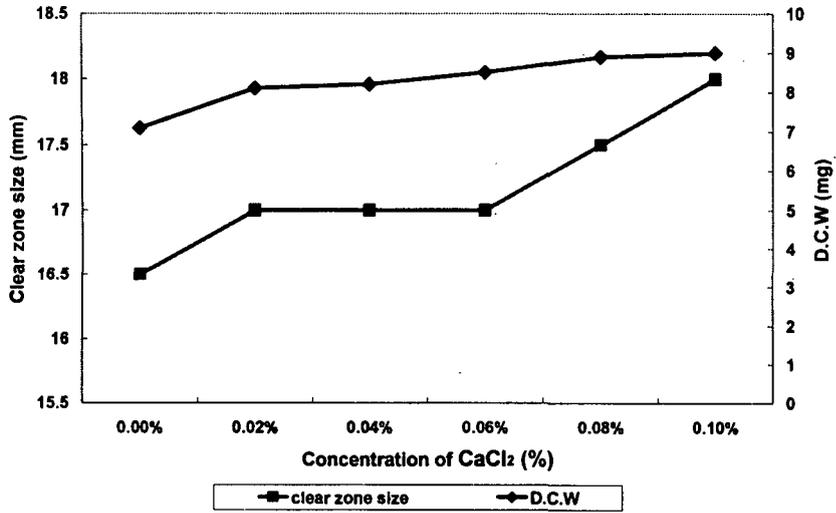
### 3) 무기염의 영향

무기염이 활성 물질의 생산에 끼치는 영향을 조사한 결과는 Table 19에 나타난 바와 같이  $\text{CuSO}_4$ 와  $\text{CoCl}_2$ 는 활성 물질의 생산을 완전히 저해하였다. 활성 물질의 생산에 효과적으로 나타난  $\text{CaCl}_2$ 의 최적 농도를 조사한 결과 0.12% 부근으로 나타났다. 또 이와 함께 항생제 생산을 증가시키는  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 의 최적 농도는 0.02% 이었다 (Fig. 3-18).

Table 3-19. Effect of various salt and metal ions on the antifungal antibiotic production

Compound	Final pH	D.C.W (mg/ml)	Relative activity (%)
None	6.7	8.1	70
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	7.6	9.7	70
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	7.4	9.5	95
$\text{MgSO}_4$	9.4	8.1	85
$\text{CuSO}_4$	7.3	7.3	0
$\text{FeSO}_4$	6.7	6.8	50
$\text{CaCl}_2$	7.4	5.3	100
$\text{CoCl}_2$	7.0	9.7	0
$\text{ZnCl}_2$	6.8	7.1	90

(A)



(B)

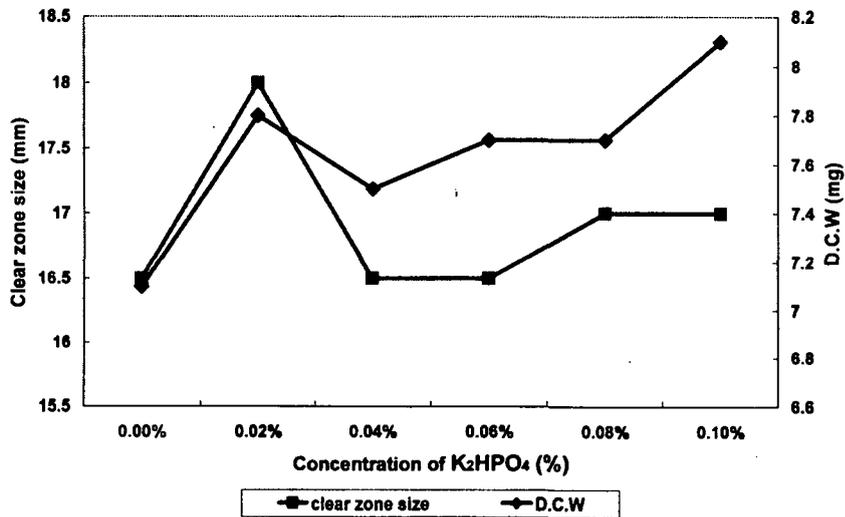


Fig. 3-18. Effect of  $\text{CaCl}_2$  (A) and  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (B) concentration on the antibiotics production.

#### 4) 온도 및 pH 영향

미생물에 의한 항생물질의 생산에 중요한 요소인 배양 온도와 pH의 영향을 조사하였다. 1N HCl 혹은 1N NaOH를 이용하여 배지의 pH가 3.0~10.0 되게 조절하여 배양하였다. 그 결과 pH 7.0 중성 부근에서 균의 증식 및 활성 물질의 생성이 가장 높게 나타났다. pH 3, 4 정도의 산성영역, pH 10의 강 알칼리 영역에서는 활성 물질도 생산되지 않았고 균도 증식하지 않았다. pH 5~9에서는 상대적으로 균의 성장은 좋았으나 pH 5에서 항생제의 생산은 좋지 않았다 (자료 생략).

활성 물질 생산을 위한 최적온도를 조사한 결과 물질의 생산과 균의 증식은 각각 15~30°C에서 상대적으로 좋았으며 30°C에서 가장 좋았음을 보여주었으나 40~45°C의 고온에서는 균의 증식과 물질 생산능이 급격하게 감소하였다 (자료 생략). 일반적으로 대사 산물은 처음부터 끝까지 일정 온도 하에서 생산되기 때문에 좋은 생육 온도의 범위에서 좋은 대사 산물의 생산량도 높게 나타나지만 균 생육의 최적 온도가 항생물질 생산 최적 온도와 다른 경우도 종종 볼 수 있다. 따라서 균의 생육과 항생제 생산에 미치는 온도의 영향은 각각 나누어서 고려해야 하는데 이 실험에서는 균의 생육 최적 온도와 항생제 생산의 최적 온도는 거의 비슷하였다.

#### 다. 항 진균 활성 물질의 분리정제

항 진균 활성 물질의 분리정제 과정은 Fig. 3-19와 같다. 방선균 80223 균주의 배양액을 8000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 얻은 배양 상청액과 균체를 각각 ethyl acetate로 3번 추출하여 ethyl acetate층을 진공상태에서 농축하였다. 이렇게 하여 얻어진 농축 잔사물은 silica gel column chromatography를 2번 행하였다. 먼저 column(40×200nm)을 hexane-EtOAc와 EtOAc-MeOH의 solvent

system으로 용출 하였다. chromatography의 용출은 hexane : EtOAc의 비율을 1 : 5에서 1 : 20으로 단계적으로 하였고 그 후에 EtOAc : MeOH 5 : 1로 용출 하였다. 그리고 두 번째 column chromatography (10 × 150 mm)는 CHCl<sub>3</sub>-MeOH-acetonitrile 5 : 1 : 1 용매로 용출 하였는데 여기에서 활성이 있는 fraction을 얻을 수 있었다. 각 fraction은 TLC와 UV (265nm)로 검출하였다.

활성 fraction을 모아 진공상태에서 농축시켜 노란 색의 분말을 얻었다. 그 분말을 소량의 methanol에 용해시켜 photodiode array detector가 있는 조제용 역상 HPLC column (20 mm × 250 mm, J'sphere ODS-H80)으로 정제하였다. 이 column을 70% MeOH로 분당 150 ml의 유속으로 용출시켰으며, 265nm의 UV로 검출하였다. 그 결과 retention time이 26 분인 C-1 화합물을 오렌지색 결정 형태로 순수하게 얻을 수 있었다. 또 각각 40분, 48분의 retention time을 가진 C-2, C-3 화합물을 노란색 분말형태로 순수하게 얻었다.

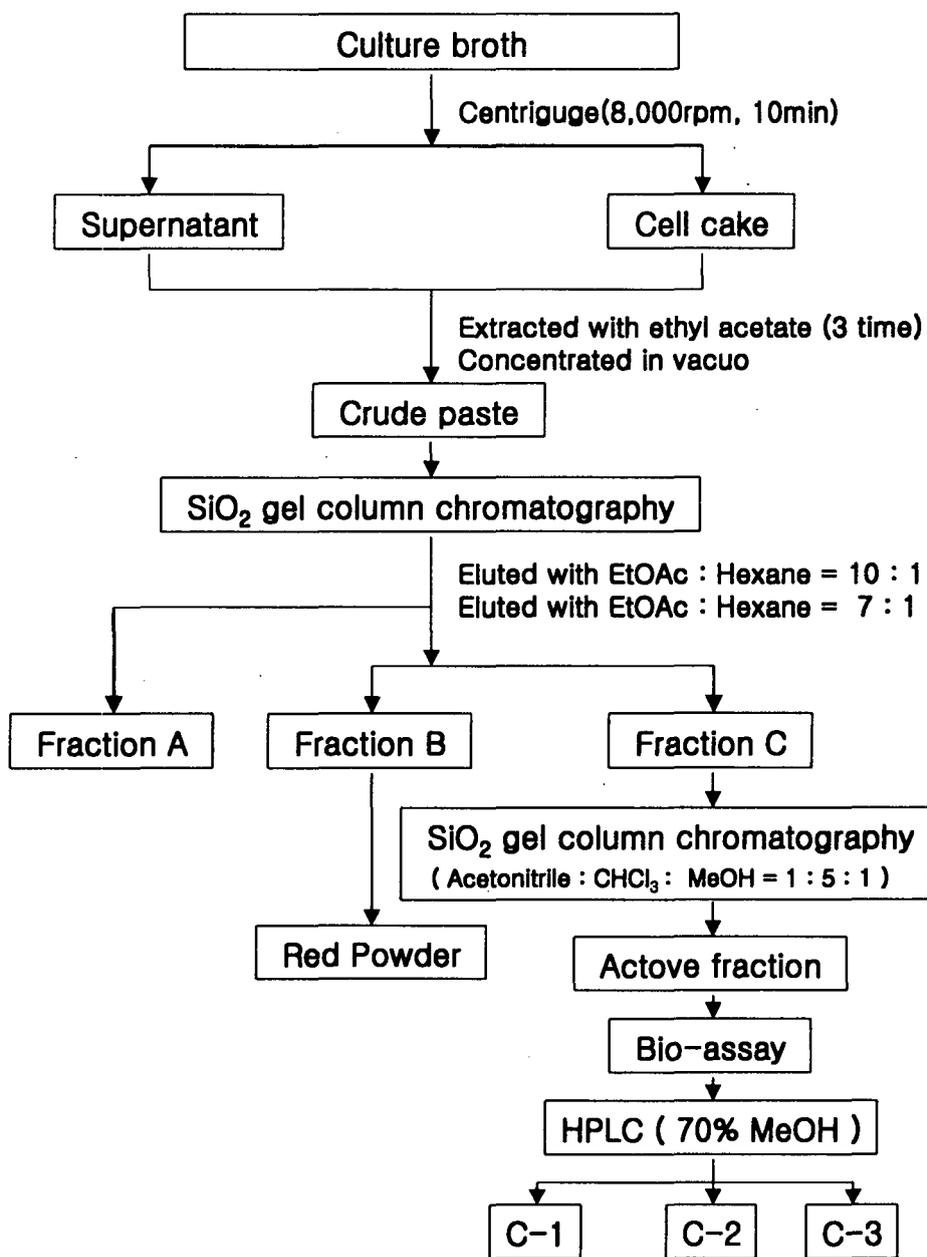


Fig. 3-19. Isolation procedure of antifungal antibiotics.

#### 라. 항 진균 활성 물질의 물리화학적 성상

정제된 항 진균성 물질의 여러 물리화학적 성상은 Table 3-20에 종합하여 정리해 놓았다. 정제된 물질의 용해성은 methanol, ethanol과 acetone에 대해서는 가용성, ethyl acetate와 chloroform에서는 조금 용해되며, hexane, diethyl ether와 물에는 불용성이었다.

C-1 화합물의 UV spectra는 methanol 용액 하에서 254 nm 근처에서 최대 흡수 peak를 보였고, 320 nm에서 shoulder를 나타내었다 (Fig. 3-21). C-2 화합물의 UV spectra는 methanol 용액에서 288, 305, 320, 344, 358 nm에서 최대 흡광도를 보였고(Fig. 3-23), C-3 화합물은 308, 320, 342, 360 nm에서 최대 흡광도를 보였다 (Fig. 3-28).

C-1, C-2, C-3 화합물의 분자량은 LC-MS, 혹은 Fab-MS spectrophotometer를 이용하여 각각 358.4, 650, 670으로 결정되었다 (Fig. 3-20, 3-22, 3-27).

여러 가지 용매계를 사용하여 전개한 TLC plate 상에서 C-1, C-2, C-3 화합물은 특정의 R<sub>f</sub> 치를 갖는 단일 spot으로 나타났다.

또 <sup>1</sup>H-NMR 또는 <sup>13</sup>C-NMR spectra의 데이터는 Fig. 3-25, 3-29, 3-30에 나타내었다.

Table 3-20. Physico-chemical properties of C-1, C-2 and C-3

	C-1	C-2	C-3
Appearance	Orange crystal	Yellow powder	Light yellow powder
UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm	265	288, 305, 320, 344, 358	300, 308, 320, 342, 360
Molecular weight	358.5	650	670
Solubility :			
Soluble	MeOH, EtOH, BtOH	MeOH, EtOH, BtOH	MeOH, EtOH, BtOH
Slightly soluble	CHCl <sub>3</sub> , EtOAc	CHCl <sub>3</sub> , EtOAc	CHCl <sub>3</sub> , EtOAc
insoluble	H <sub>2</sub> O, Hexane	H <sub>2</sub> O, Hexane	H <sub>2</sub> O, Hexane
Rf value (TLC)			
EtOAc			
:MeOH(4:1)	0.56	0.61	0.64
CHCl <sub>3</sub> :MeOH:Acetonitrile(5:1:1)	0.34	0.37	0.39
HPLC Rt (min)	25.8	40.2	47.9

## 마. 항 진균성 물질의 구조 분석

### 1) C-2 화합물의 구조

C-2 화합물의 물리화학적 특성에 관한 데이터로부터 C-2는 flavofungin과 비슷한 성질을 갖고 있음을 알게되었다. 정말로 C-2가 flavofungin인지 아닌지 결정하기 위해 C-2의 NMR spectra와 IR spectra를 flavofungin의 spectra와 비교하였다.

일반적으로 polyene 계열의 항생물질의 NMR 구조 해석은 구조적으로 동일한 부분이 반복적으로 출현하는 polyene계열 화합물의 특성상 매우 어려운 작업이다. Bognar에 의해서 밝혀진 flavofungin의  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - NMR spectra의 화학적 전위(chemical shift)를 참고로 하여 몇 가지의 spectral data, 특히  $^1\text{H}$ -NMR (Fig. 3-25), IR (Fig. 3-24) 데이터의 분석을 통하여 C-2 화합물이 flavofungin (Fig. 3-26)과 같은 물질임을 알 수 있었다.

### 2) C-3 화합물의 구조

C-3 화합물의 물리화학적인 특성에 관한 데이터로부터 C-3가 fungichromin 혹은 filipins와 유사한 것으로 보여졌다. C-3 화합물이 정말 fungichromin 혹은 filipins인지 아닌지를 결정하기 위해 C-3의 NMR spectra와 IR spectra를 fungichromin, filipins의 spectra와 비교하였다.

M. E. Bergy 와 T. E. Eble에 의해 밝혀진 filipin complex의  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - NMR spectra의 화학적 전위 결과를 참고로 하여, 몇 가지의 spectral data, 특별히  $^1\text{H}$ -NMR (Fig. 3-29),  $^{13}\text{C}$ - NMR (Fig. 3-30) spectra 의 데이터 분석을 통하여 C-3 화합물이 fungichromin (Fig. 3-31)으로 결론 내렸으며 그리고 다른 filipin complex가 소량 불순물의 형태로 존재하고 있음을 알 수 있었다.

UV 265 nm 부근에서 최대 흡수 peak를 갖는 C-1 화합물은 소량 밖에 얻을 수 없어서 아직까지 그 구조를 밝혀내지 못하고 있는 중이다.

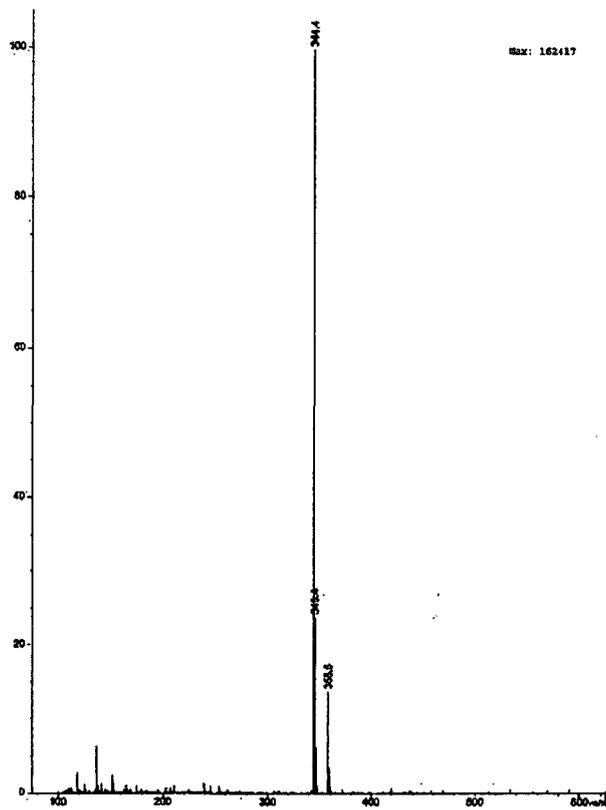


Fig. 3-20. Mass spectrum of compound C-1

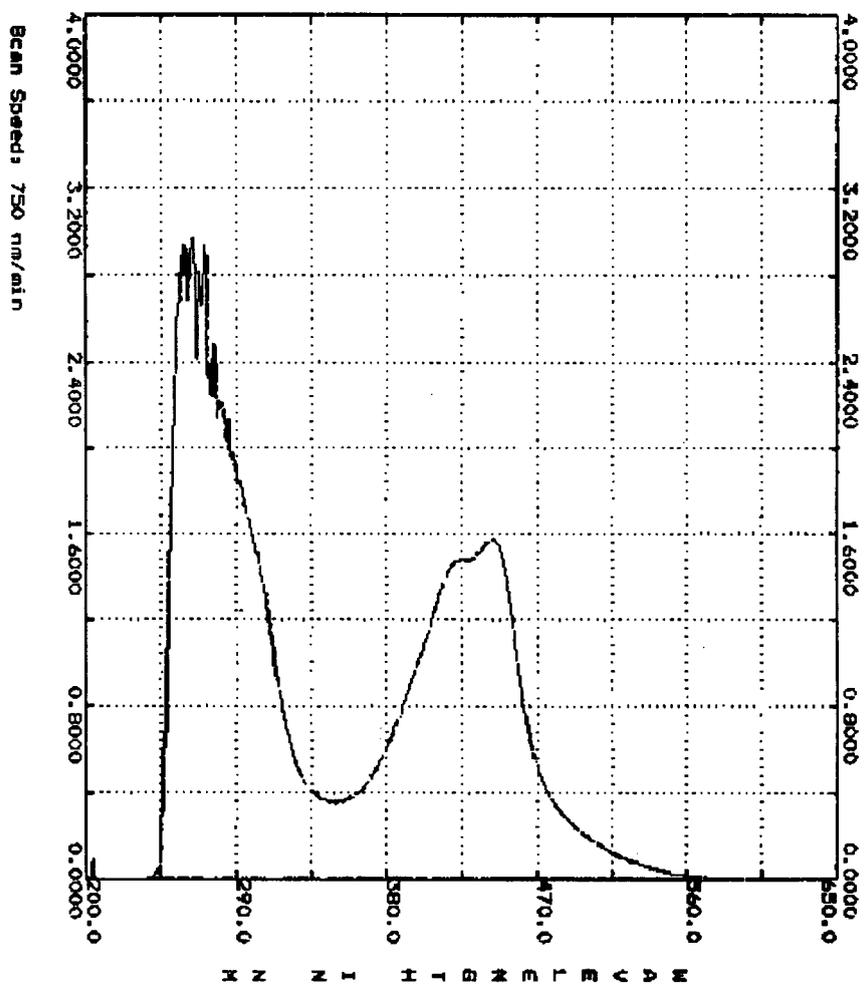


Fig. 3-21. UV spectrum of compound C-1

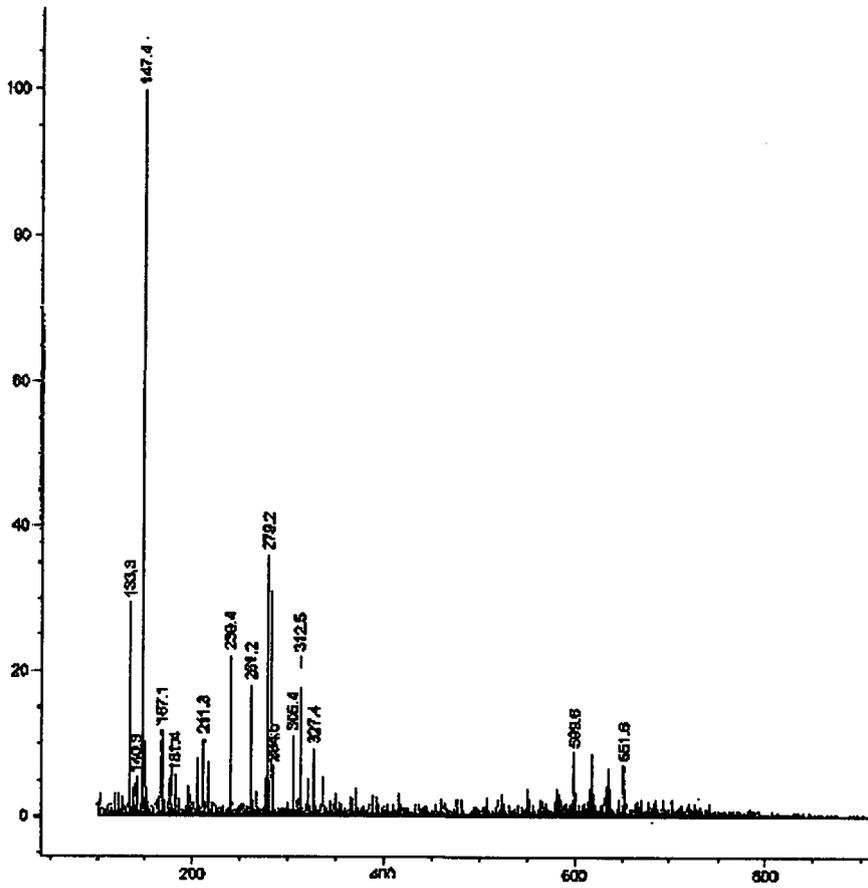


Fig. 3-22. Mass spectrum of compound C-2

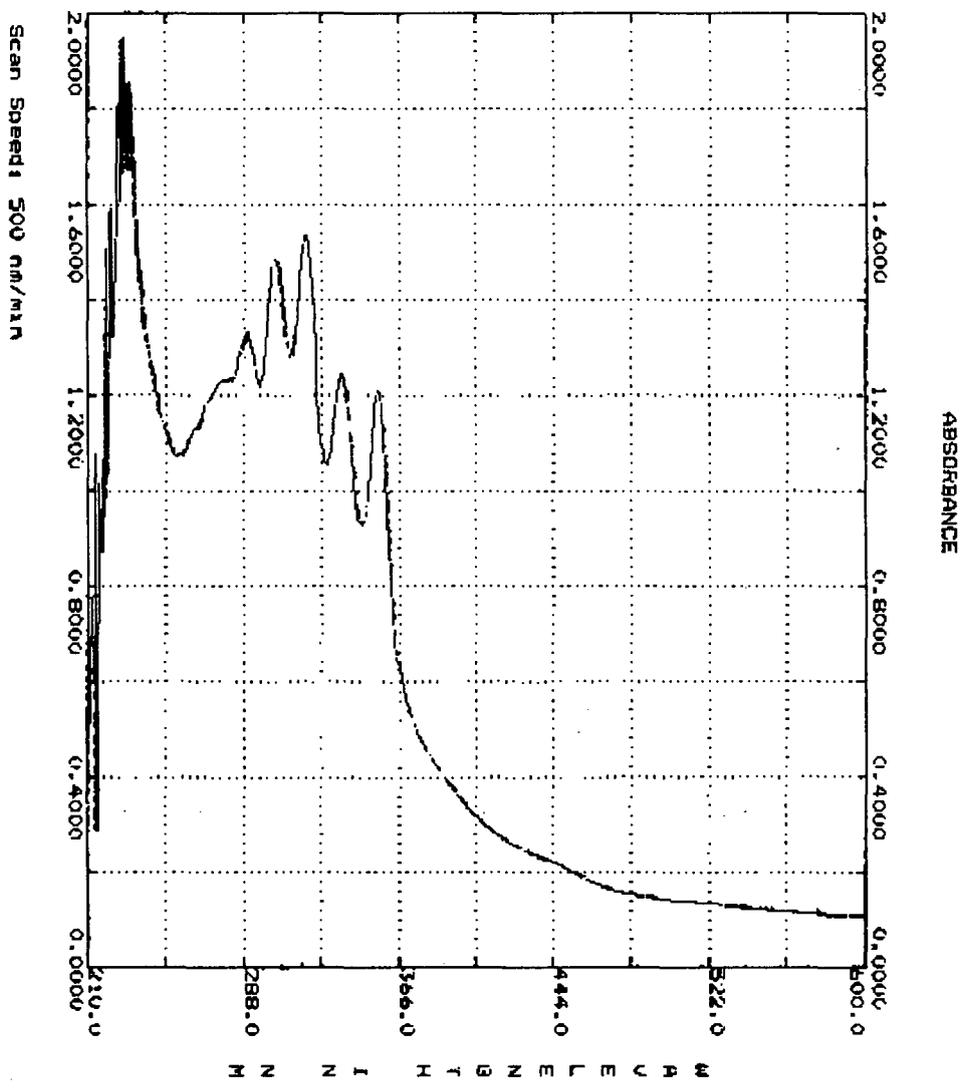


Fig. 3-23. UV spectrum of compound C-2

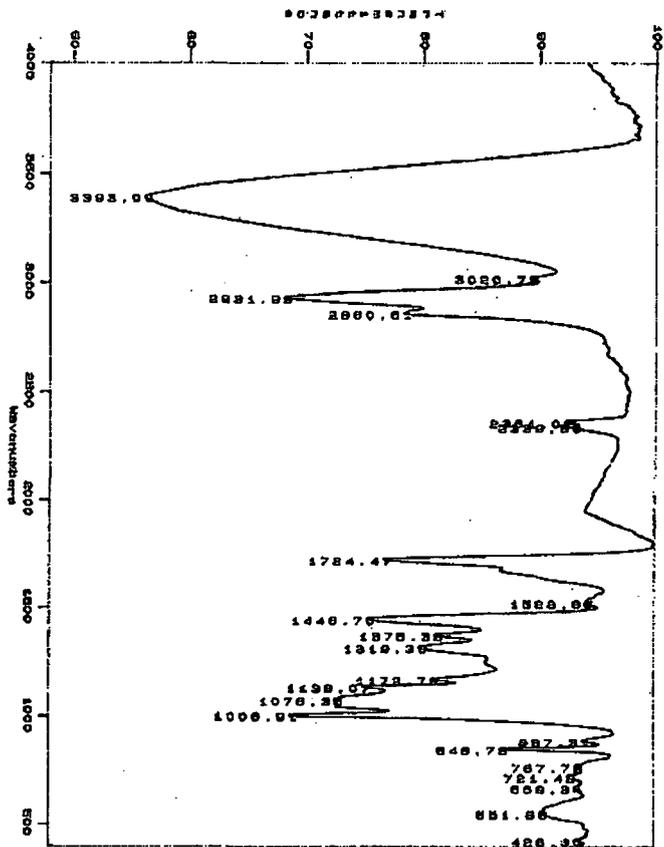


Fig. 3-24. IR spectrum of compound C-2

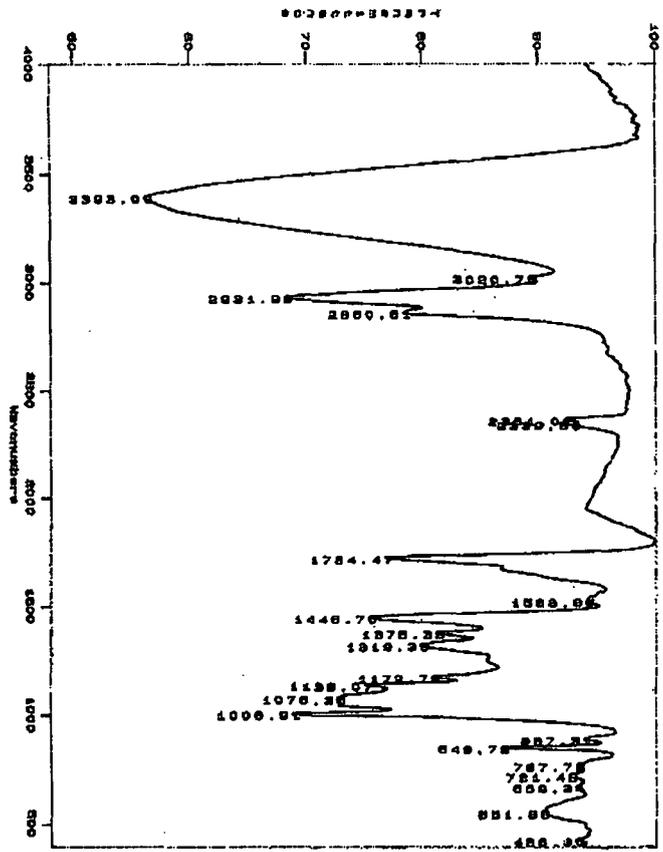


Fig. 3-25. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of compound C-2

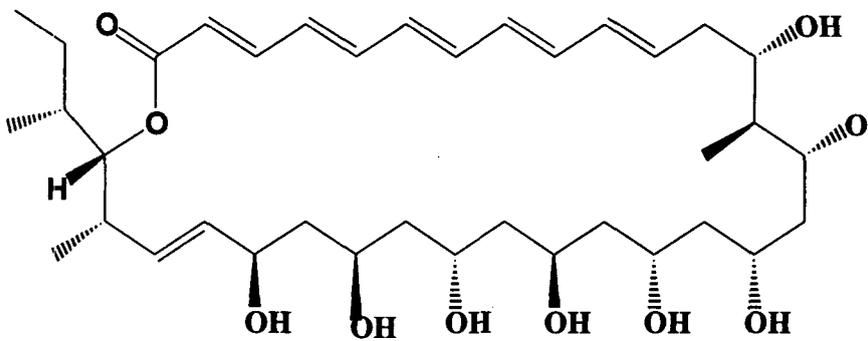


Fig. 3-26. Structure of Flavofungin

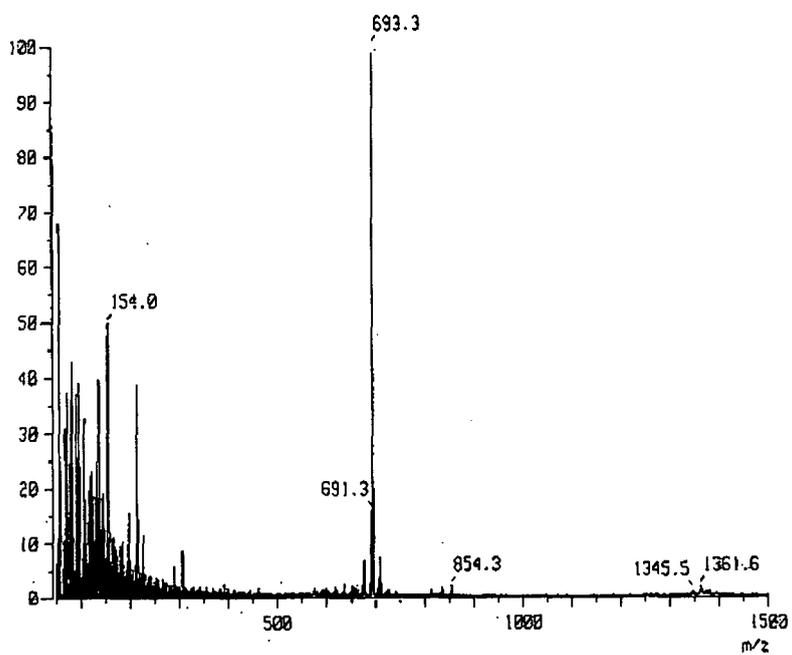


Fig. 3-27. Fab-MS spectrum of compound C-3

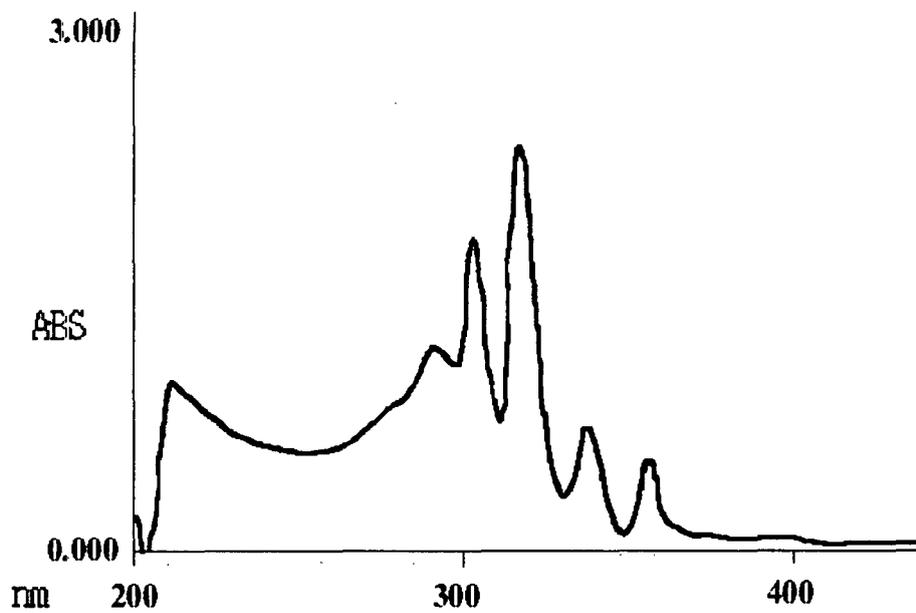


Fig. 3-28. UV spectrum of compound C-3

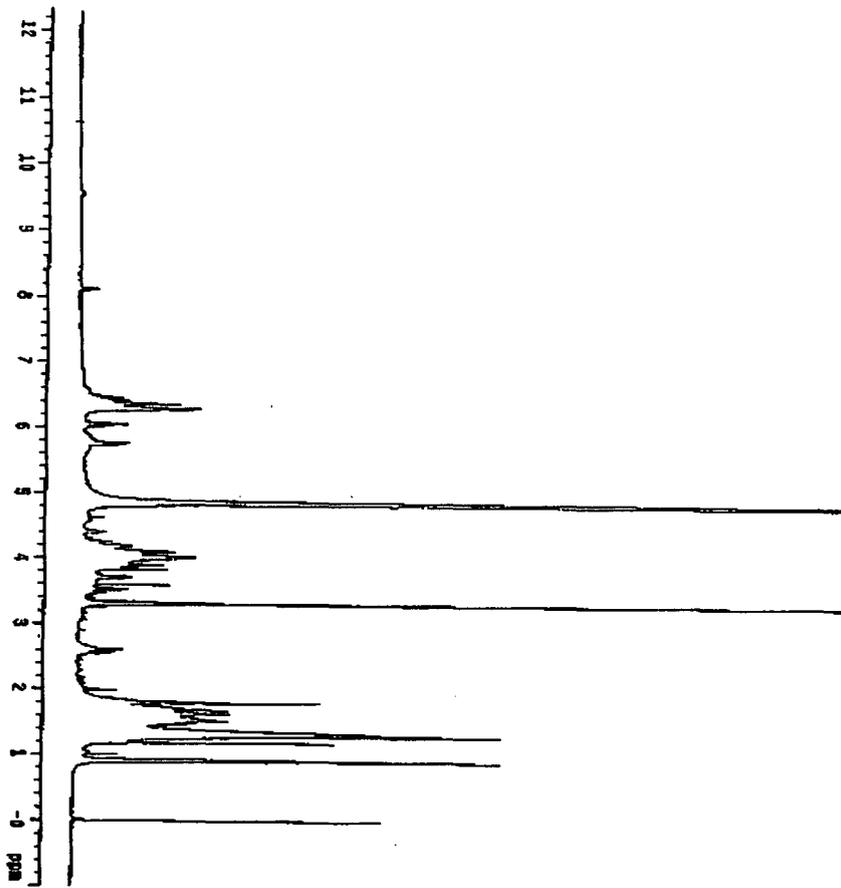


Fig. 3-29.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of compound C-3

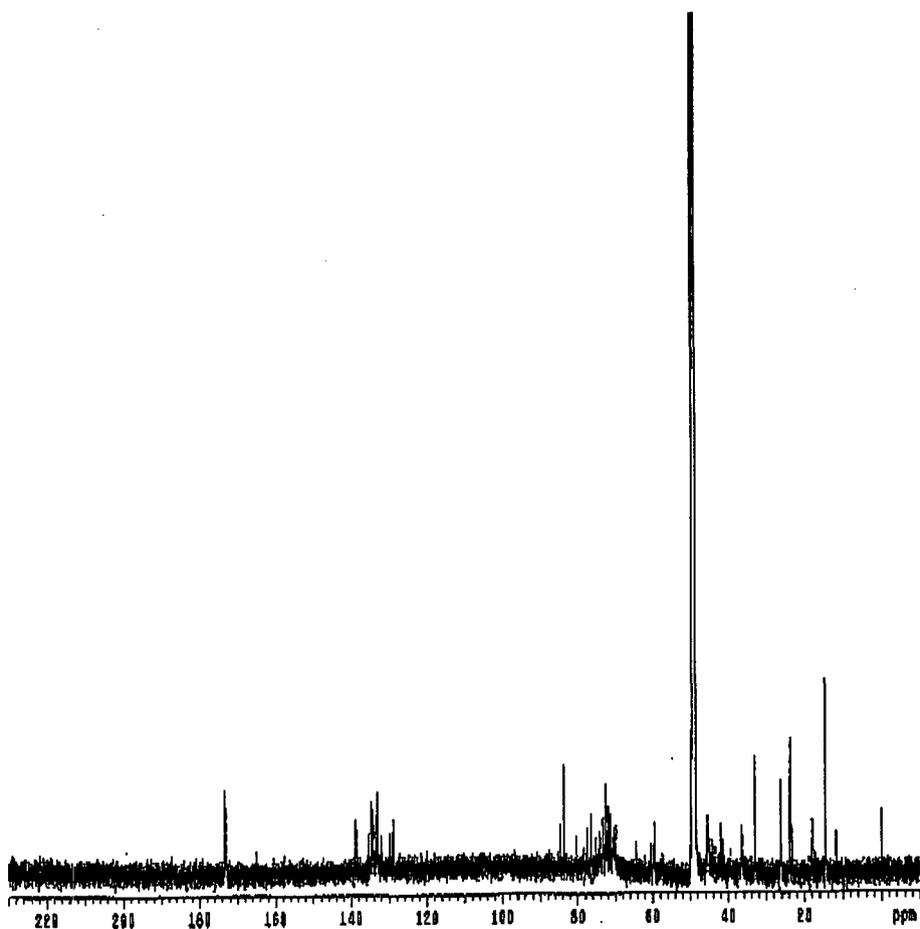
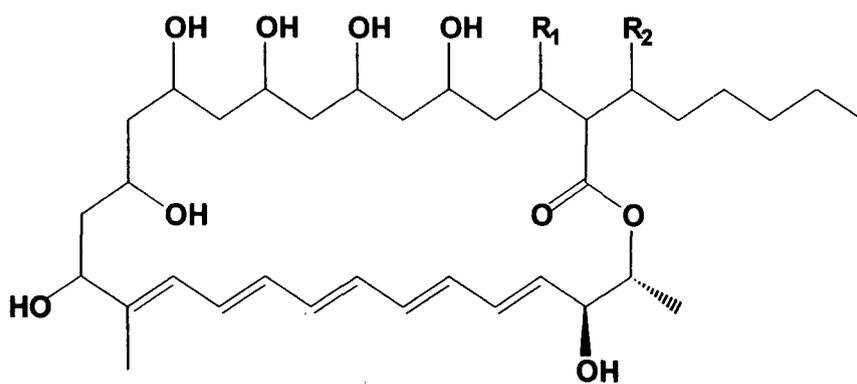
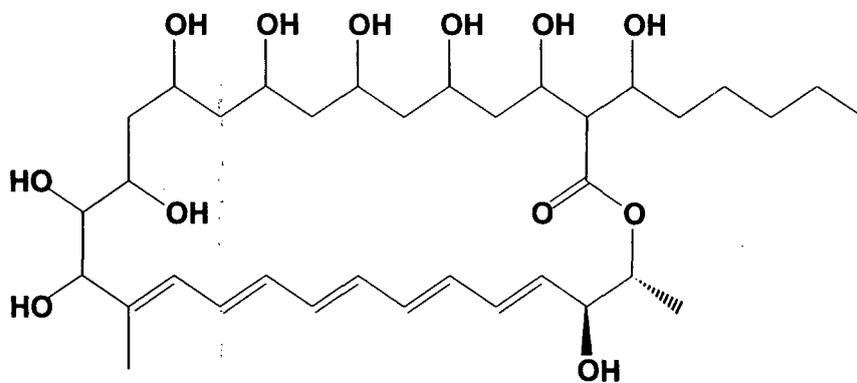


Fig. 3-30.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound C-3



**Filipin 2 :  $R_1=OH, R_2=H$**

**Filipin 3 :  $R_1=H, R_2=OH$**

Fig. 3-31. Structure of fungichromin and filipins

### 3. 고찰

Polyene macrolide계 항생물질은 강력한 항 진균, 항 바이러스 활성을 나타내는 수많은 천연 화합물들이 polyene macrolide계 물질에 속해 있다. 이 중에는 이미 항 진균 요법제로 성공적으로 사용되고 있는 것도 알려져 있다. 이 계열의 물질은 sterol을 포함하고 있는 생체막의 투과성을 선택적으로 변화시켜 항생작용을 나타내게 된다.

항 진균성 항생물질인 fungichromin 결정은 전형적인 filipin pentaene chromophore 구조를 가진 최소 8 종류의 화합물의 혼합체로 발견되었다. 이 실험에서 우리들도 방선균 80223 균주로부터 이 화합물을 결정상태로 분리할 수 있었다. flavofungin, fungichromin, filipin 등은 약 200여 종류의 화합물질이 알려져 있는 macrocyclic polyene계 항생물질에 속하며, 이 들은 주로 방선균 *Streptomyces* 속에 의해 생성되며 항 진균성, 항 원생동물 활성을 나타내는 것이 많다. 이 들 화합물들은 모두 구조적으로는 macrocyclic lactone의 환상구조 안에 5개의 conjugated double bond 의 사슬을 가지는 동시에 hydroxyl 그룹을 가진 포화된 영역도 갖고 있다. 이 들은 대체로 포유동물 세포에 독성을 나타내며 그 작용 양상이 비 특이적이며 불안정한 화합물이다. 예를 들면 열이나 빛이 있는 어떤 조건하에서 filipin의 생물학적 활성과 UV 최대 흡수 피크가 동시에 사라져 버리는 경우도 알려져 있다. 뿐만 아니라 진한 methanol이나 ethanol 용액 상태로 4°C에 두게되면 급격한 분해가 일어나게 된다.

그러나 이러한 그들의 독성이나 불안정성, 또 다른 많은 종류의 항 진균성 항생물질의 개발에도 불구하고 amphotericin B나 nystatin 같은 polyene계의 항생물질은 아직도 사람의 진균증 감염 치료에서 최고의 치료제로 남아 있다. 또한 sterol에 결합하는 특성을 갖고 있는 polyene계 화합물은 고 콜레스테롤 치료제로, 항 암 또는 항 바이러스 활성으로 현재도 많은 주목을 받고 있다. 그리고 앞으로, cholesterol 에 대한 ergosterol, 또 동물세포에 대한 진균 세포에 대한

작용 선택 특이성이 증가된 유연 화합물의 설계 및 합성을 통하여 독성이 경감된 항 진균제의 개발이 기대되며 이는 도전해볼 만한 가치가 있는 목표라고 생각된다.

## 제 5 절 결론

다양한 미생물을 대상으로 *Didymella bryoniae*를 원인균으로 하는 참외 만고병을 방제할 수 있는 항 만고병 미생물을 세균과 방선균으로부터 각각 선별 분리하였다. 이들 분리된 균주들을 동정하고 이들이 생성하는 활성물질의 생산조건을 검토하였다. 각 균주가 생성하는 활성물질을 분리, 정제하여 항 진균작용의 기작 등 그 특성의 일부도 조사하였으며, 일부는 구조확인을 거쳐 생물농약으로 이용할 수 있는 가능성을 검토하여 보았다. 이상의 결과를 정리하면 다음과 같다.

1. 토양으로부터 분리한 약 1000여 균주 중에서 *D. bryoniae*에 항 진균 활성을 나타내는 세균 *Pseudomonas* sp. ADB 2 균주를 최종 선별하였다.
2. *Pseudomonas* sp. ADB 2 균주는 *D. bryoniae*뿐 아니라 *Botritis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporium*에 대해서도 비교적 강한 항 진균 활성을 나타내었다.
3. *Pseudomonas* sp. ADB 2 균주의 항 진균 활성 생성은 균의 생육속도와 거의 비슷하게 대수 증식기에 급격하게 증가하며 약 18 시간 후에 최고 생산성을 나타낸 후 균의 생육과 함께 24 시간 이후에 약간 감소하는 양상을 나타내고 있다. 이로 미루어 이 활성은 아주 저분자의 활성 물질 보다는 약간의 중합체일 가능성이 높을 것으로 생각된다.
4. *Pseudomonas* sp. ADB 2의 항 진균 활성은 주로 siderophore의 활성에 의존하는 것으로 나타났다.

5. *Pseudomonas* sp. ADB 2 균주를 철 함유 배지에서 배양했을 때는 402 nm에서의 peak는 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 siderophore 합성은 철에 의해 영향을 받고 있음을 보여 주고 있다.

6. *Pseudomonas* sp. ADB 2 균주의 항 진균 활성 물질을 TLC로 분리하여 CAS assay로 활성을 측정하면 Rf치 0.12의 spot에서 가장 강력한 활성이 관찰되었으며 이는 ADB 2의 siderophore일 것이라고 추정된다. 이와 같은 결과는 ADB 2 균주는 그들의 siderophore를 이용하여 철 결핍으로부터 생육이 회복될 수 있음을 의미하고 있다. 이와 같은 철 이온의 획득 능력은 진균의 생육에도 필요한 철 이온을 진균 주변의 환경으로부터 획득하여 진균의 철 이온 결핍을 촉진할 것으로 생각된다. 따라서 진균의 증식을 억제하는 항 진균 활성을 나타내는 것으로 보인다.

7. ADB 2의 siderophore는 포자 발아 및 발아관의 형성 저해에 관여하고 있음을 알 수 있었다.

8. 또 방선균 약 2,600여 균주를 대상으로 항 진균성 균주의 선별을 시도하여, 이들이 생성하는 활성물질의 유기용매 추출과정을 거쳐 ethyl acetate 까지 넘어오는 5 균주와 butanol에 추출되는 6 균주를 선별하여 이들의 열 안정성, pH 안정성, 활성탄 흡착여부, ion exchange resin의 선택성 등을 검토하여 최종적으로 80223 균주를 선별하였다.

9. 대부분의 탄소원에서 균의 증식과 활성 물질의 생성은 이루어졌으나 균의 증식은 soluble starch와 potato starch에서 가장 좋았고, 활성 물질의 생성은 xylose, raffinose, glucose에서 배양했을 때 높은 활성을 보였다.

10. casein, soybean meal, polypeptone과 같은 복합적인 질소원을 사용할 때 상대적으로 높은 생산성을 나타냈으나 urea 및 무기 질소원에서는 활성 물질의 생산성이 극히 낮았다. 이는 질소원이 항생제를 생산하는데 있어서 중요한 역할을 함을 보여준다. 활성 물질 생성 효과가 뛰어난 casein과 soybean meal의 농도에 따른 균주의 증식과 활성 물질 생산성을 조사하였다. 최대 생산성을 보인 casein과 soybean meal의 농도는 각각 2.0%와 1.5%이었다

11.  $\text{CuSO}_4$ 와  $\text{CoCl}_2$ 는 활성 물질의 생산을 완전히 저해하였다. 활성 물질의 생산에 효과적으로 나타난  $\text{CaCl}_2$ 의 최적 농도를 조사한 결과 0.12% 부근으로 나

타났다. 또 이와 함께 항생제 생산을 증가시키는  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  의 최적 농도는 0.02% 이었다.

12. pH 7.0 중성 부근에서 균의 증식 및 활성 물질의 생성이 가장 높게 나타났다. pH 3, 4 정도의 산성영역, pH 10의 강 알카리 영역에서는 활성 물질도 생산되지 않았고 균도 증식하지 않았다. pH 5~9에서는 상대적으로 균의 성장은 좋았으나 pH 5에서 항생제의 생산은 좋지 않았다.

13. 활성 물질 생산과 균의 증식은 각각 15~30°C에서 상대적으로 좋았으며 30°C에서 가장 좋았음을 보여주었으나 40~45°C의 고온에서는 균의 증식과 물질 생산능이 급격하게 감소하였다.

14. 방선균 80223 균주의 항 진균 활성 물질은 ethyl acetate 추출, silica gel column chromatography, 조제용 역상 HPLC column으로 정제하여 retention time이 26 분인 C-1 화합물을 오렌지색 결정 형태로 순수하게 얻을 수 있었다. 또 각각 40분, 48분의 retention time을 가진 C-2, C-3 화합물을 노란색 분말형태로 순수하게 얻었다.

15.  $^1\text{H-NMR}$ , IR 데이터의 분석을 통하여 C-2 화합물이 flavofungin과 같은 물질임을 알 수 있었다.

16.  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  spectra의 데이터 분석을 통하여 C-3 화합물이 polyene macrolide계 항생물질로 macrocyclic lactone의 환상구조 안에 5개의 conjugated double bond 의 사슬과 hydroxyl 그룹으로 된 filipin pentaene chromophore 구조를 가진 fungichromin으로 결론 내렸으며 그리고 다른 filipin complex가 소량 불순물의 형태로 존재하고 있음을 알 수 있었다. 그러나 UV 265 nm 부근에서 최대 흡수 peak를 갖는 C-1 화합물은 소량 밖에 얻을 수 없어서 아직까지 그 구조를 밝혀내지 못하고 있는 중이다.

## 제 4 장    종합 결론

시설 참외 재배 농가에 막대한 피해를 주고 있는 참외 뿌리혹선충과 참외 만고병을 미생물학적인 방법으로 방제할 목적으로 자연계로부터 항 선충 활성 및 항 진균 활성 미생물을 분리하였다. 뿌리혹선충에 대해서는 포자형성 세균인 *Bacillus thuringiensis* 균주를 대상으로 항 뿌리혹선충 활성 미생물을 분리하여 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*인 Bt17 균주와 *B. thuringiensis* subsp. *navarrensis*인 Bt79 두 균주를 선별할 수 있었다. 이들 균주의 생리 생화학적 특성, Bt 독소의 분리와 그 생화학적 특성, 면역학적인 특성을 조사하여 이들이 항 선충 활성을 가진 새로운 Bt 균주임을 밝혔다. 그리고 이 균주의 Bt 독소 생성 배양의 최적 조건을 결정하고 균의 대량 배양을 통하여 다량의 독소를 확보하여 뿌리혹선충에 대한 항 선충 활성의 pot 실험, 및 모의 포장 실험 등을 수행하였다. 이 독소는 멸균 토양에서는 항 선충 활성을 나타내지만 비 멸균 토양에서는 Bt 제제의 성장에 따라 활성의 차이가 나타났다. 이 독소의 멸균 토양과 비 멸균 토양에서 안정성을 보면 비 멸균 토양에서는 대단히 불안정한 것을 알 수 있는데 이가 비 멸균 토양에서 활성이 잘 나타나지 않는 이유 중의 하나로 생각되었다. 대형 포트를 사용하는 모의 포장 실험에서는 항 선충 활성은 뚜렷하게 관찰할 수 없었지만 작물의 생육이나 수확에는 어느 정도 효과가 나타나 앞으로 계속적인 연구를 통하여 현장 가능성을 살펴 볼 필요가 있을 것으로 생각되었다.

*Didymella bryoniae*를 원인균으로 하는 참외 만고병에 대해서는 항 만고병 미생물을 세균과 방선균으로부터 각각 선별 분리하였다. *Pseudomonas*에 속하는 세균의 항 진균성 물질은 siderophore로 밝혀졌으며 강한 철 이온의 탈취력을 지니고 있었다. 방선균이 생성하는 항 진균성 물질은 NMR, IR, Mass spectrum, UV 해석 등을 통해 polyene macrolide계에 속하는 항생물질로 밝혀

졌다. 이상의 결과를 과제별로 요약하면 다음과 같다.

가. 제 1 세부과제 : 뿌리혹선충 방제 활성 미생물의 탐색과 관련된 연구 개발 결과

1. 성주 지역을 중심으로 이 들 시설재배 참외의 토양 및 참외 뿌리에서 분리한 뿌리혹선충을 그 형태적 특징 등을 근거로 하여 동정한 결과 성주 지역에서는 *Meloidogyne arenaria*를 주로 하여 *M. incognita* 등의 선충이 관찰되었다.

2. 배지에 따른 포자 형성세균의 분리 효율을 조사한 결과 NAPGCY 배지에서 세균이 토양 g당  $4.8 \times 10^8$  cells로서 가장 많이 분리되었으며, NAAC 배지와 NA 배지에서는 각각  $9.2 \times 10^7$  cells,  $3.6 \times 10^7$  cells 순서로 분리되었다. 또한 위상차 현미경으로 결정성 내독소를 생성하는 콜로니를 조사해 본 결과 NAPGCY 배지에서 약14%, NAAC 배지와 NA 배지에서 각각 약 8%와 7%의 콜로니가 확인되었다.

3. 분리한 *Bacillus thuringiensis* 균주 중에서 항 선충성 외독소를 생성하는 균주도 분리할 수 있었으며, 이는  $\beta$ -exotoxin이거나 그 유연 물질로 생각된다.

4. 뿌리혹선충의 2령 유충을 대상으로 한 치사활성을 지표로하여 항 선충 활성이 있는 균주를 2주 분리하고 각각 Bt17, Bt79로 명명하였다. 분리된 두 균주 중에서 Bt17 균주가 Bt79 균주에 비해 활성이 더 강한 것으로 나타났다.

5. Bt17 균주가 생성하는 항 뿌리혹선충 활성 물질의 대부분은 세포 내에 존재하는 단백질성의 내독소인  $\delta$ -endotoxin임을 알았으며, 소량 세포 밖으로 분비되는 외독소를 생성함을 알 수 있었다.

6. 분리한 Bt 17 균주와 Bt79 균주의 당 이용성 등의 생리 생화학적인 특성을 조사한 결과 이들 균주는 포자와 내독소를 생성하는 전형적인 *Bacillus thuringiensis*의 한 균주임을 알 수 있었다.

7. Bt 17 균주와 Bt79 균주의 생리 생화학적 특성은 대단히 유사했으나, 편모

의 항원성을 조사한 결과며 Bt17 균주는 serotype 3인 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*로, Bt79 균주는 serotype 50인 *B. thuringiensis* subsp. *navarrensensis*로, 두 균주는 혈청형이 서로 다른 subspecies에 속함을 알 수 있다.

8. Bt79 균주는 serotype 50에 속하지만 아직 이 혈청형이 생성하는 내독소에 대한 연구는 이루어져 있지 않고 있어 이 균주는 serotype 50에 속하는 균주 중에서 항 선충 활성을 나타내는 최초의 균주로 분리되었다고 생각된다.

9. Bt 17 균주는 살충 살균제에 관계없이 전체적으로 생육 저해를 받는 것으로 나타나나 예상대로 살충제에 비해 살균제에 의한 저해효과가 더 크게 나타났다. 따라서 농약을 사용하는 일반 농가에서는 Bt 균주의 직접 살포에 의한 선충 방제는 어려울 것으로 생각되나 농약을 사용하지 않는 유기농의 경우 앞으로 더 검토할 여지가 있을 것이다.

10. ELISA Bt 내독소 정량법을 개발하여 기존의 포자수의 측정, 단백질 양의 측정 등과 같은 간접적인 방법에서 직접적으로 독소를 측정할 수 있는 길을 제시하였다.

11. 이 균주의 독소 생산에 탄소원은 큰 영향을 미치지 않았으며, 질소원은 질산태를 제외한 암모니아태와 유기태의 질소가 좋았다. Yeast extract의 농도는 큰 영향이 없었으며,  $K_2HPO_4$ 는 0.5%일 때 독소의 생성이 좋았다. 금속 이온의 영향은  $Co^{++}$ 에 의해서 크게 저해 되었으며,  $Cu^{++}$ 에 의해서 약간 감소되었으나, 다른 금속 이온간에는 큰 차이를 볼 수 없었다.

12. 이 균의 독소 생성 최적 pH는 6에서 8 사이로 나타났고, aeration이 좋을수록 포자 생성이 증가되었다.

13. 세포수 당 포자 생성량, 혹은 독소 생성량은 액체배양의 경우 보다 고체배양의 경우가 약 10배 높은 것으로 확인되었다. 따라서 독소의 효율적인 생산을 위해서는 액체 배양보다도 고체 배양을 하는 것이 한층 더 효과적이라고 생각된다.

14. Jar fermentor를 이용한 독소의 생성은 2 vvm의 공기가 주입된 경우가 1

vvm에 비해 월등히 많이 형성되었다. 2 vvm, 300 rpm, 30°C의 조건에서 균의 생육은 1일 후 최대가 되었으나 포자의 수는 조금씩 증가하여 4일 후부터 최대치에 도달하였다.

15. 반고체 배지의 조성은 미강 9 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.05 g, glucose 0.5 g, 규조토 1 g,  $\text{H}_2\text{O}$  5 ml의 비율로 만든 배지가 좋았으며, 여기에 종균을 접종하여 30°C에서 6일간 배양하여 건조한 제제는 1 g당  $1.6 \times 10^8$  개의 포자가 포함되었다.

16. 내독소 결정의 용해도는 pH가 증가함에 따라 증가하여 pH 11.5 ~ 12.5 사이에서 약 37 ~ 50% 까지 용해되나 분해가 많이 일어나고 생물학적 활성도 더 떨어지는 것으로 나타나 용해도가 약 14 ~ 24% 정도인 pH 10.0 ~ 10.5 사이가 최적 조건임을 알았다.

17. Bt17 균주와 같은 편모 항원성을 나타내는 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* BtHD1 균주는 뿌리혹선충에 대하여 전혀 독 작용을 나타내지 않는데 비해, Bt17, Bt79 균주는 다 같이 독성을 나타내었다. 이들 중 Bt17의  $\text{LC}_{50}$ 은 43 ug/ml로 Bt79 균주의 125 ug/ml에 비해 약 3배 정도 강하게 나타났다.

18. 모기 유충에 독성을 나타내는 Bti 균주는 185 ug/ml의 Bt 독소 농도에서 적혈구를 완전히 용해시키는 용혈활성을 보이는데 반하여 Bt17과 Bt79 균주는 BtHD1과 함께 용혈활성을 나타내지 않았다. 선충에 대해서만 특이적으로 독성을 나타내는 Bt17과 Bt79 균주의 독소는 이로 미루어 보아 선충 이외의 인축이나 유용 곤충 등에 대해서는 무독성의 안정성이 높은 생물학적 제제로 개발될 가능성이 높을 것으로 생각된다.

19. Bt17 균주는 BtHD1과 전체적인 양상은 매우 유사하여 공통의 독소 단백질은 갖고 있음은 물론이지만 그 외 BtHD1에서 검출되지 않는 약 130 K 크기의 단백질이 보이는 등 독소의 영동상이 약간 상이한 것으로 보아 Bt17 균주는 새로운 타입의 Bt 독소로 생각된다.

20. Bt17 균주의 항 선충 내독소에 대한 항 혈청을 염석, DEAE-cellulose ion exchange column chromatography를 거쳐 정제하고, 정제한 항체는 이중확산

면역 침강법인 Ouchterlony test로 검사한 결과 Bt17 균주의 내독소에 대한 특이적인 항체임을 알 수 있었고 이 항체를 이용하여 ELISA, immuno blot 등을 수행할 수 있었다.

21. Bt17 균주와 BtHD1 균주는 대부분 공통적인 독소 항원을 갖고 있는 것으로 나타났으나 약 130 K 크기의 내독소 단백질에서 항원성의 차이가 나타났다. 즉 Bt17 균주는 이 항원 단백질을 갖고 있는데 비하여 BtHD1 균주에서는 찾아볼 수 없었다. 따라서 항선충 활성을 갖고 있는 Bt17 균주의 내독소 단백질은 활성이 없는 BtHD1 균주의 내독소 단백질과는 다른 독소 단백질일 가능성이 높다고 할 수 있을 것이다. 또 면역전기영동을 통해 Bt17 균주와 BtHD1 균주는 같은 *B. thuringiensis* subsp. *krustaki*에 속하지만 Bt17이 생성하는 독소는 나방에 대해 살충활성을 가진 것으로 알려진 BtHD1의 독소와는 다른 새로운 독소임을 알 수 있었다.

22. ELISA를 이용한 토양 중에 존재하는 독소의 정량법을 확립할 수 있었다.

23. Bt17 균주의 내독소의 항 선충활성을 실내 멸균 토양 pot에서 실험한 결과 선충 감염구는 거의 고사 상태인데 비하여 Bt17 균주를 함께 시용한 실험구는 선충 비감염구인 대조구의 약 80% 정도의 생육 상황을 나타내었고, 항 선충 효과는 약 30% 정도의 제어효과가 있음을 알 수 있었다.

24. 선충 감염 토양을 사용한 실외 포트 실험의 결과는 Bt17 균주의 항 선충 활성의 유의성을 찾기 어려웠다.

25. Bt17의 가용성 제제를 사용하였을 경우, 멸균 토양에서도 항 선충 활성이 나타나지 않았으며 제제의 성상에 따라 효능에 차이가 나타나는 것으로 생각되었다.

26. Bt17의 액성 제제를 사용하였을 경우는 가용성 제제를 사용한 경우에 비해서 항 선충활성이 나타나는 것을 볼 수 있었다.

27. Bt17의 고형화 제제를 사용한 경우에는 비록 작물의 생육에는 큰 차이를 보이지 않았으나, 약 28% 정도의 항 선충 활성이 나타났다. 멸균 토양에서의 결

과를 종합해 보면 가용성 제제는 항 선충 활성이 보이지 않았으나, 액성 및 고형화 제제는 어느 정도 뿌리혹선충의 제어 효과가 있음을 알 수 있었다.

28. Bt17의 가용성 제제를 사용하였을 경우, 멸균 토양에서와 같이 비 멸균 토양에서도 항선충 활성이 나타나지 않았다. Bt17 균주의 가용성 제제는 토양의 멸균 여부와는 상관없이 토양 중에 투여되었을 경우 활성을 나타내지 못함을 알았다.

29. Bt17의 액성 제제를 비 멸균 토양에 사용하였을 경우, 뿌리혹의 수는 무처리구에 비해 감소하였으나 난낭의 형성은 무처리구와 비슷한 애매한 결과를 보여 주었다.

30. Bt17의 고형화 제제는 무 처리구에 비해 약 79.3%의 선충 저해 활성을 보여 비 멸균 토양에서도 고형화 제제는 어느 정도 활성을 나타내는 것으로 생각된다.

31. 멸균 토양과 비 멸균 토양에서의 Bt17 균주의 항 선충 활성 결과를 종합해 보면 Bt 제제의 성상에 따라 어느 정도 활성의 차이가 나타남을 알 수 있었다. Bt의 고형화 제제는 멸균, 비 멸균 토양을 막론하고 어느 정도 활성을 나타내는 것 같으며, 액성 제제는 멸균 토양에서는 효과가 있는 것으로 보이나 비 멸균 토양에서는 확실하지 않으며, 가용화 제제는 생각과는 달리 비 멸균 토양은 물론 멸균 토양에서도 거의 활성이 나타나지 않았다.

32. 멸균 토양과 비 멸균 토양에서 Bt 독소의 안정성을 토양 컬럼을 사용하여 조사한 결과 시간이 경과함에 따라 비멸균 토양 중의 독소는 빠르게 실효되는 것으로 나타나, Bt 독소는 멸균 토양에서는 어느 정도 안정성을 나타내나 비 멸균 토양에서는 대단히 불안정한 것을 볼 수 있었다. Bt 제제가 멸균 토양에서는 어느 정도 항 선충 활성을 보이지만

비 멸균 토양에서는 그 활성이 미약하거나 거의 없는 것처럼 보이는 것은 비 멸균 토양에서 Bt 독소의 불안정성이 그 한 이유가 될 수 있을 것이다.

33. 액성 제제의 Bt 독소를 사용해 대형 pot에서 실험한 결과, 멸균 감염 토양

및 비 멸균감염 토양에서 Bt 독소 처리구와 무처리구 사이에 유의미적인 차이를 볼 수 없어, 소형 pot 보다 실제 포장에 더 가까운 대형 pot를 사용한 실험에서는 최소한 액성 제제의 Bt 독소는 항 선충 활성을 나타내지 못하는 것처럼 보였다. 다만 Bt 독소 처리구의 뿌리는 뿌리혹의 형성은 많이 되었으나 Bt 무처리구의 뿌리가 심하게 썩은 데 비하여 그 정도가 훨씬 덜 하였다.

34. 고히화 제제의 Bt 독소를 사용해 대형 pot에서 실험한 결과, 전체적으로 Bt 처리구는 무처리구에 비해 좋은 생육을 보여 주었으며, 84 일간 재배한 후 참외의 수확량을 보면 Bt 처리구는 무처리구에 비해 2 - 3.5 배 정도의 수확량을 보였고, 선충탄 처리구에 비해서도 좋은 수확량을 보여 주었다. 또 84 일 수확 후 뿌리의 상태를 보면 난낭의 경우는 처리구와 무처리구 사이에 특별한 차이를 볼 수 없었으나, 뿌리혹의 형성은 처리구가 무처리구에 비해 조금 감소하는 경향을 볼 수 있었다. Bt 독소에 의한 뿌리혹 형성 제어율을 보면 26%에서 51%의 범위에서 제어 효과가 나타남을 볼 수 있으나, 멸균 토양구와 선충탄 처리구에 비해 뿌리혹의 생성으로 인한 뿌리 무게의 증가는 처리구, 무처리구 모두 비슷한 경향을 보여 Bt 독소의 선충에 대한 직접적인 방제 효과는 앞으로 더욱 검토해야 할 사항으로 생각되었다.

## 제 2 세부과제 : 만고병 방제 생리 활성 물질의 탐색

1. 토양으로부터 분리한 약 1000여 균주 중에서 *D. bryoniae*에 항 진균 활성을 나타내는 세균 *Pseudomonas* sp. ADB 2 균주를 최종 선별하였다.

2. *Pseudomonas* sp. ADB 2 균주는 *D. bryoniae*뿐 아니라 *Botritis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporium*에 대해서도 비교적 강한 항 진균 활성을 나타내었다.

3. *Pseudomonas* sp. ADB 2 균주의 항 진균 활성 생성은 균의 생육속도와 거의 비슷하게 대수 증식기에 급격하게 증가하며 약 18 시간 후에 최고 생산성을

나타낸 후 균의 생육과 함께 24 시간 이후에 약간 감소하는 양상을 나타내고 있다. 이로 미루어 이 활성은 아주 저분자의 활성 물질보다는 약간의 중합체일 가능성이 높을 것으로 생각된다.

4. *Pseudomonas* sp. ADB 2의 항 진균 활성은 주로 siderophore의 활성에 의존하는 것으로 나타났다.

5. *Pseudomonas* sp. ADB 2 균주를 철 함유 배지에서 배양했을 때는 402 nm에서의 peak는 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 siderophore 합성은 철에 의해 영향을 받고 있음을 보여 주고 있다.

6. *Pseudomonas* sp. ADB 2 균주의 항 진균 활성 물질을 TLC로 분리하여 CAS assay로 활성을 측정하면 Rf치 0.12의 spot에서 가장 강력한 활성이 관찰되었으며 이는 ADB 2의 siderophore일 것이라고 추정된다. 이와 같은 결과는 ADB 2 균주는 그들의 siderophore를 이용하여 철 결핍으로부터 생육이 회복될 수 있음을 의미하고 있다. 이와 같은 철 이온의 획득 능력은 진균의 생육에도 필요한 철 이온을 진균 주변의 환경으로부터 획득하여 진균의 철 이온 결핍을 촉진할 것으로 생각된다. 따라서 진균의 증식을 억제하는 항 진균 활성을 나타내는 것으로 보인다.

7. ADB 2의 siderophore는 포자 발아 및 발아관의 형성 저해에 관여하고 있음을 알 수 있었다.

8. 또 방선균 약 2,600여 균주를 대상으로 항 진균성 균주의 선별을 시도하여, 이들이 생성하는 활성물질의 유기용매 추출과정을 거쳐 ethyl acetate 까지 넘어오는 5 균주와 butanol에 추출되는 6 균주를 선별하여 이들의 열 안정성, pH 안정성, 활성탄 흡착여부, ion exchange resin의 선택성 등을 검토하여 최종적으로 80223 균주를 선별하였다.

9. 대부분의 탄소원에서 균의 증식과 활성 물질의 생성은 이루어졌으나 균의 증식은 soluble starch와 potato starch에서 가장 좋았고, 활성 물질의 생성은 xylose, raffinose, glucose에서 배양했을 때 높은 활성을 보였다.

10. casein, soybean meal, polypeptone과 같은 복합적인 질소원을 사용할 때 상대적으로 높은 생산성을 나타냈으나 urea 및 무기 질소원에서는 활성 물질의 생산성이 극히 낮았다. 이는 질소원이 항생제를 생산하는데 있어서 중요한 역할을 함을 보여준다. 활성 물질 생성 효과가 뛰어난 casein과 soybean meal의 농도에 따른 균주의 증식과 활성 물질 생산성을 조사하였다. 최대 생산성을 보인 casein과 soybean meal의 농도는 각각 2.0%와 1.5%이었다

11.  $\text{CuSO}_4$ 와  $\text{CoCl}_2$ 는 활성 물질의 생산을 완전히 저해하였다. 활성 물질의 생산에 효과적으로 나타난  $\text{CaCl}_2$ 의 최적 농도를 조사한 결과 0.12% 부근으로 나타났다. 또 이와 함께 항생제 생산을 증가시키는  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 의 최적 농도는 0.02% 이었다.

12. pH 7.0 중성 부근에서 균의 증식 및 활성 물질의 생성이 가장 높게 나타났다. pH 3, 4 정도의 산성영역, pH 10의 강 알카리 영역에서는 활성 물질도 생산되지 않았고 균도 증식하지 않았다. pH 5~9에서는 상대적으로 균의 성장은 좋았으나 pH 5에서 항생제의 생산은 좋지 않았다.

13. 활성 물질 생산과 균의 증식은 각각 15~30℃에서 상대적으로 좋았으며 30℃에서 가장 좋았음을 보여주었으나 40~45℃의 고온에서는 균의 증식과 물질 생산능이 급격하게 감소하였다.

14. 방선균 80223 균주의 항진균 활성 물질은 ethyl acetate 추출, silica gel column chromatography, 조제용 역상 HPLC column으로 정제하여 retention time이 26 분인 C-1 화합물을 오렌지색 결정 형태로 순수하게 얻을 수 있었다. 또 각각 40분, 48분의 retention time을 가진 C-2, C-3 화합물을 노란색 분말형태로 순수하게 얻었다.

15.  $^1\text{H-NMR}$ , IR 데이터의 분석을 통하여 C-2 화합물이 flavofungin과 같은 물질임을 알 수 있었다.

16.  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  spectra의 데이터 분석을 통하여 C-3 화합물이 polyene macrolide계 항생물질로 macrocyclic lactone의 환상구조 안에 5개의 conjugated

double bond 의 사슬과 hydroxyl 그룹으로 된 filipin pentaene chromophore 구조를 가진 fungichromin으로 결론 내렸으며 그리고 다른 filipin complex가 소량 불순물의 형태로 존재하고 있음을 알 수 있었다. 그러나 UV 265 nm 부근에서 최대 흡수 peak를 갖는 C-1 화합물은 소량 밖에 얻을 수 없어서 아직까지 그 구조를 밝혀내지 못하고 있는 중이다.

## 참 고 문 헌

1. Adams, P.B., and W.A. Ayres. 1980. Factors affecting parasitic activity of *Sporidesmium sclerotivorum* on sclerotia of *Sclerotinia minor* in soil. *Phytopathology* 70: 366-368.
2. Adams, P.B., and W.A. Ayres. 1982. Biological control of *Sclerotinia* lettuce drop in the field by *Sporidesmium sclerotivorum*. *Phytopathology* 72: 485-488.
3. Agrios, G.N. 1997. Plant diseases caused by fungi. in Plant pathology (4th ed.), pp.245-406, *Acad. press* (London).
4. Al-Hazmi, A.S., D.P. Schmitt, and J.N. Sasser. 1982. The effect of *Artheobotrys conoides* on *Meloidogyne incognita* population densities in corn influenced by temperature, fungus inoculum density and time of fungus introduction in the soil. *J. Nematol.* 14: 168-174.
5. A preliminary report on the effects of *Bacillus thuringiensis* var. *thueingiensis berliner* on the development of the free living stages of some cattle nematodes. *J. Parasitol.* 47: 41.
6. A rapid method for the transfer of nematode from fixative to anhydrous glycerine. *Nematologica* 8: 29.
7. Aronson, A.L., W. Beckman, and P. Dunn. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbial. Rev.* 50: 1-24.
8. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiol. Rev.* 50: 1.
9. Barker, K.P., P.B. Shoemaker, and L.A. Nelson. 1976. Relationship of initial population densities of *Meloidogyne incognita* and *M. hapla* to yeild of tomato. *J. Nematol.* 8: 232-239.
10. Bavide, R.G. and R.A. Zorilla. 1983. Evaluation of a fungus, *P. lilacinus*(Thom) Samson, for the biological control of the potato cyst nematode *Globoderrostochiensis* woll as compared with some nematosides. *Phil. Agr.* 66: 397-404.
11. Bergeson, G.B. 1959. The influence of temperature on the survival of some species of the genus *Meloidogyne*, in the absence of a host.

*Nematologica*. 4: 244-354.

12. Bergy, M.E. and T.E. Eble. 1968. The filipin complex. *biochemistry* 7(2): 653-659

13. Bine, L.W., K.P. Bottjer, and S.S. Gill. 1985. *Trichostrongylus coluriformis*: egg lethality due to *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. *Experimental Parasitol.* 60: 314-322.

14. Biological control of *Meloidogyne javanica* with *Bacillus penetrans*. *Phthopathol.* 74: 55.

15. Biological control of nematode pests by natural enemies. *Ann. Rev. Phthopathol.* 18: 415.

16. Biological control of plant-parasitic nematodes, *Ann. Rev. Phthopathol.* 24: 453.

17. Bird, A.F. and H.R. Wallace. 1995. The influence of temperature on *Meloidogyne hapla* and *M. javanica*. *Nematologica*. 11: 581-589.

18. Bognar, B., O. Brown, W.J.S. Lockley, S. Makleit, T.P. Toube, B.C.L. Weedon, and K. Zsupan 1970. The structure of flavofungin. *Tetrahedron lett.* 7: 471-474

19. Cabanillas, E. and K.P. Barker. 1989. Impact of *Paecilomyces lilacinus* inoculum level and application time on control of *Meloidogyne incognita* on tomato. *J. Nematol.* 21: 115-120.

20. Caveness, F.E. and H.J. Jensen. 1955. Modification of the centrifugal floatation technique for the isolation and concentration of nematode and their eggs from soil and plant tissue. *Proc. Helminth Soc. Wash.* 16: 87-89.

21. Characteristics and efficacy of a sterile Hyphomycete (ARF18), a new biocontrol agent for *Heterodera glycine* and other nematodes, *J. Nematol.* 23: 275.

22. Cheung, P.Y. and B.D. Hammock. 1985. Microlipid-droplet encapsulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* delta-endotoxin for control of mosquito larvae. *Appl. Microbiol. Microbiol.* 50: 984-988.

23. Choi, Y.E. 1984. Workshop on plant parasitic nematodes, Pp. 51-55. Institute of Agricultural Science. Kyungpook National University. Korea

24. Chu, Min., I. Truumees, R. Mierzwa, J. Patel, R. Pradip, D. Mohindars,

- and T.M. Chan. 1998. A new potent antifungal agent from *Actinoplanes* sp.. *Tetrahedron Lett.*, **39** : 7649-7652.
25. Ciordia H. and W.E. Bizzel. 1961. A preliminary report on the effects of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis berliner* on the development of the free living stages of some cattle nematodes. *J. Parasitol.* **47**: 41-41.
26. Cook, R.J. and K.F. Baker. 1983. Components of Biological Control. in The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens, pp. 57-83, The American Phytopathological society.
27. Cook, R.J. 1985. Biological Control of Plant Pathogens: Theory to Application. *Phytopathology* **75**: 25-29.
28. Davison, J. 1988. Plant beneficial bacteria. *Bio/Technology* **6**: 282-286.
29. De Barjac, H. and E. Frachon. 1990. Classification of *Bacillus thuringiensis*. *Entomophaga*. **35**: 233-240.
30. De Weger, L.A., R. van Boxtel, B. van der Burg, R.A. Gruters, F.P. Geels, B. Schippers, and B. Lugtenberg. 1986. Siderophores and outer membrane proteins of antagonistic, plant growth-stimulating, root-colonizing *Pseudomonas* spp. *J. Bacteriol.* **165**: 585-594.
31. Devidas, P. and L.A. Rehberger. 1992 The effects of exotoxin(thuringiensin) from *Bacillus thuringiensis* on *Meloidogyne incognita* and *Caenorhabditis elegans*. *Plants and Soils* **145**: 115-120.
32. Dunn, M.T., R.M. Sayre, A. Carrell, and W.P. Wergin. 1982. Coloization of nematode egg by *Paecilomyces lilacinus*(Thom) Samson as observed with scanning electron microscope. *Scanning electron microscope* **111**: 1351-1357.
33. Eayre, C.G., B.A. Jaffe, and E.L. Zehr. 1987. Supression of *Criconebella Xenoplax* by the nematophagous fungus *Hirsutella rhossiliensis*. *Plant Disease* **71**: 832-834.
34. Goodfellow, M. and Minikin D.E. Chemical method in bacterial systematics. *Academic Press*.
35. Hadisoeganda, W.W. and J.N. Sasser. 1982. Resistance of tomato, bean, southern pea, and garden pea cultivars to root-knot nematodes based on host suitability. *Plant Disease* **66**: 145-150.

36. Harman, G.E., B. Latorre, E. Agosin, R.S. Martin, D.G. Riegel, P.A. Nielsen, A. Tronsmo and R.C. Pearson. 1996. Biological and Integrated Control of Botrytis Bunch Rot of Grape Using *Trichoderma* spp. *Biological Control* 7: 259-266.
37. Hartman, K.M. and J.N. Sasser. 1985. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal-pattern morphology, Pp. 69-77. In Barker, K.R., C.C. Carter, and J.N. Sasser(eds.), *An Advanced Treatise on Meloidogyne*, Vol.2, Raleigh: North Carolina State University Graphics.
38. Hiroshi Noguchi, P.H. Harrison, , Kunizo Arai, T.T. Nakashima, L.A. Trimble, and J.C. Vederas 1988. Biosynthesis and full NMR assignment of fungichromin, a polyene antibiotic from *Streptomyces cellulosa*. *J. Am. Chem. Soc.* 110 : 2938-2945.
39. Hukuhar, T. 1972. Role of *Bacillus thuringiensis* on the larval survivability and egg hatching of *Meloidogyne* spp., the causative agent of root knot disease. *J. Invertebr. Pathol.* 20: 377-378.
40. Hwang, J.Y. and K.H. Kim. 1987. Characteristics of hemilysin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 15: 425-429.
41. Igarashi Masayuki, Naoko Kinoshita, Takako Ikeda, May Kameda, Masa Hamada and Tomio Takeuchi. 1997. Resormycin, a novel herbicidal and antifungal antibiotic produced by a strain of *Streptomyces platensis*. *J. Antibiotics*, 50(12): 1020-1025
42. Infectivity of *Bacillus penetrans* in plant-parasitic nematodes. *J. Nematol.* 9: 40.
43. In vivo parasitism of *Meloidogyne javanica* by an oviparasitic Fungus, *Paecilomyces lilacinus*. *Nematol. Medit.* 18: 141.
44. Jackson, A.J., D.R. Walters and G. Marshall. 1997. Antagonistic Interactions between the Foliar Pathogen *Botrytis fabae* and Isolates of *Penicillium brevicompactum* and *Cladosporium cladosporioides* on Faba Beans. *Biological Control* 8: 97-106.

45. Jaffee, B.A. and E.I. Zehr. 1985. Parasitic and saprophytic abilities of the nematode-attacking fungus *Hirsutella rhossiliensis*. *17*: 341-345.
46. Jatara, P. 1986. Biological control of plant-parasitic nematodes. *Ann. Rev. Phthopathol.* **24**: 453-489.
47. Johnson, H.A. and N.T. Powell. 1969. Influence of root-knot nematodes on bacterial wilt development in flue-cured tobacco. *Phytopathol.* **59**: 486-491.
48. Jones, C.R. and D.A. Samac. 1996. Biological control of fungi causing alfalfa seedling damping-off with a disease-suppressive strain of *Streptomyces*. *Biological Control* **7**: 196-204.
49. Jones, G.H., R.K. Noel, H.A.S. Peter, T.S. James and T.W. Stanley. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed.
50. Junker, B., Z. Mann, P. Gailliot, K. Byrne, and J. Wilson. 1998. Use of soybean oil and ammonium sulfate additions to optimize secondary metabolite production. *Biotech. & Bioengin.*, **60**(5):581-589.
51. Kapat, A., G. Zimand and Y. Elad. 1998. Effect of two isolates of *Trichoderma harzianum* on the activity of hydrolytic enzymes produced by *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **52**: 127-137.
52. Keinath, A.P., M.W. Farnham, and T.A. Zitter. 1995. Morphological, Pathological, and Genetic Differentiation of *Didymella bryoniae* and *Phoma* spp. Isolated from Cucurbits. *Phytopathology* **85**: 364-369.
53. Keinath, A.P. 1995. Fungicide timing for optimum management of gummy stem blight epidemics on watermelon. *Plant Disease*, **79**(4): 354-358.
54. Keinath, A.P. 1996. Soil amendment with cabbage residue and rotation to reduce gummy stem blight and increase growth and yield of watermelon. *Plant Disease*, **80**(5): 564-570.
55. Keinath, A.P. 1998. Resistance to bonomyl and Thiophanate-methyl in *Didymella bryoniae* from South California and New York. *Plant Disease*, **82**(5): 479-454.
56. Kerry, B.R. 1990. An assessment of progress toward microbial control of plant-parasitic nematode. *Suppl. J. Nematol.* **22**: 621-631.

57. Kim, G.D. and R.D. Riggs. 1991. Characteristics and efficacy of a sterile Hypfomecete(ARF18), a new biocontrol agent for *Heterodera glycine* and other nematodes. *J. Nematol.* 23: 275-282.
58. Kim, Y.S., H.S. Lim, and S.D. Kim. 1994. *Bacillus subtilis* YB-70 as a biological control agent of *Fusarium solani* causing plant root-rot. *J. Microbiol. Biotechnol.* 4: 68-74.
59. Krieg, N.R., and J.G. Holt. 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology, 9th ed., vol. 1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
60. Larena, I. and P. Melgarejo. 1996. Biological control of *Monilinia laxa* and *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* by a lytic enzyme-producing *Penicillium purpurogenum*. *Biological Control* 6: 361-367.
61. Lee, D.H. 1985. Pathogenicity of *Didymella bryoniae* on the Seedlings of Cucurbits. *Korean J. Plant Pathol.* 1: 173-177.
62. Lee, K.B., K.H. Kim, and Y.H. Kim. 1994. Characteristics of *Bacillus thuringiensis* strain BtTH109 is toxic against root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Kor. J. Appl. Microbiol.* 22: 227-232.
63. Levinson, B.L., K.J. Kasyan, S.S. Chiu, T.C. Currier, and J.M. Gonzalez, Jr. 1990. Identification of  $\beta$ -exotoxin production, plasmids encoding  $\beta$ -exotoxin, and a new exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by using high-performance liquid chromatography. *J. Bacteriol.* 172: 3172-3179.
64. Lim, H.S. and S.D. Kim. 1990. Antifungal mechanism of *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 for biocontrol of *Fusarium solani* causing plant root rot. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.* 18: 81-88.
65. Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. *Molecular cloning(a laboratory manual)*, Pp. A1. 2th ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
66. Mankau, R. and N. Prasad. 1977. Infectivity of *Bacillus penetrans* in plant-parasitic nematodes. *J. Nematol.* 9: 40-45.
67. Mankau, R. 1980. Biological control of nematode pests by natural enemies. *Ann. Rev. Phthopathol.* 18: 415-440.
68. Mari, M., M. Guizzardi and G.C. Pratella. 1996. Biological Control of Gray

- Mold in Pears by Antagonistic Bacteria. *Biological Control* 7: 30-37.
69. Meagher, J.W. and P.T. Jenkins. 1970. Interaction of *Meloidogyne hapla* and *Verticillium dahliae* and the control of wilt in strawberry. *Australia Jour. Exp. Agric and Animal Husbandry*.
70. Melendez, P.L. and N.J. Powell. 1967. Histological aspects of the Fusarium wilt-root knot complex in flue-cured tobacco. *Phytopathol.* 57: 286-292.
71. Microlipid-droplet encapsulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* delta-endotoxin for control of mosquito larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 984.
72. Modification of the centrifugal flotation technique for the isolation and concentration of nematode and their eggs from soil and plant tissue. *Proc. Helminth Soc. Wash.* 16: 87.
73. Mukhopadhyay, T., Nadkarni, S. R., Patel, M.V., Bhat, R.G., Desokan, K.R., Ganguli, B.N., and Rupp, R.H. 1998. Macclafungin, anew antifungal nacrocylic lactone from *actinomycete* sp. Y-8521050. *Tetrahedron*, 54: 13621-13628.
74. Nam, J.Y., H.K. Kim, K.H. Son, S.U. Kim, B.M. Kwon, M.Y. Han, Y.J. Chung, and H.B. Song 1998. Actinomycin D, C<sub>2</sub> and VII, inhibitor of GRB2-SHC interaction produced by *Streptomyces*. *Bioorg. & Med. chem. lett.*, 8: 2001-2002.
75. Neilands, J.B. 1995. Siderophores : Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. *J. Biol. Chem.* 270: 26723-26726.
76. Nelson, N. 1944. A photometric adaption of Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153: 375-380.
77. Nran, T.C. 1982. Relationship between *Meloidogyne hapla* density and damage to carriots in organic soils. *J. Nematol.* 14: 50-56.
78. Olthof, T.H.A. and T.W. Potter. 1977. Effect of population densities of *M. hapla* on growth and yield of tomato. *J. Nematol.* 9: 296-300.
79. Orion, D. and J. Krikun. 1976. Response of Verticillium-resistance and Verticillium-susceptible tomato varieties to inoculation with the nematode

- Meloidogyne javanoca* with *Verticillium dahliae*. *Phytopathol.* 4: 41-44.
80. Paudua, L.E., M. Ohba, and K. Aizawa. 1978. Serological and bacteriological studies of three isolates of *Bacillus thuringiensis* serotype 10. Pp 169-180. In K. Taguchi(ed.), *Annual Reports of ICME*, Osaka University, Japan.
81. Payne, S.M. 1980. Synthesis and utilization of siderophores by *Shigella flexneri*. *J. Bacteriol.* 143: 1420-1424.
82. Payne, S.M. 1994. Detection, isolation, and characterization of siderophore. *Methods Enzymol.* 235: 329-344.
83. Pirt, S.J., S.M.A. Pickett, A.M. Pickett, E.J. Vandamme, and C.W. Bird. 1981. Antibiotics from the Newly isolated *Streptomyces elizabethii*. I. Production of apolyene antifungal agent (Elizabethin) and actinomycin in shake flask cultures : *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 31: 167-177.
84. Role of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* on the larval survivability and egg hatching of *Meloidogyne* spp., the causative agent of root knot disease. *J. Invertrbr. Patho.* 20: 377.
85. Sasser, J.N. 1977. Worldwide dissemination and importance of the root-knot nematodes(*Meloidogyne* spp.) *J. Nematol.* 9: 26-29.
86. Sasser, J.N. 1989. Plant parasitic nematodes. Department of plant pathology and consortium for international crop production. P. 115
87. Schreiber, S.L. and M.T. Goulet. 1987. Stereochemical studies of the skipped-polyol polyene macrolide class : Determination of mycoticin A and B. *Tetrahedron lett.* 38(48) : 6001-6004.
88. Seinhorst, J.W. 1959. A rapid method for the transfer of nematode from fixative to anhydrous glycerine. *Nematologica* 8: 29-32.
89. Shiring, E.B. and D. Gottlieb, 1968. Cooperative descriptions of type culture of *Streptomyces* II. species description from first study. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 18
90. Shohei Sakuda, Ursula guce-Bigol, Mutsuhiri Itoh, Takashi Nishimura and Yasuhiro Yamada 1996. Novel linear polyene antibiotics : linearmycins. *J. Chem. Soc., Perkin trans.*, 1: 2315-2319.

91. Sigmund, J.M., and Hirsch, C.F. 1998. Fermentation studies of rustimicin production by a *micromonospora* sp.. *J. Antibiotics*, **51**(9): 829-836.
92. Smibert, R.M. and N.R. Krieg. 1981. General characterization, Pp 417-418. *In* P. Gerhardt(ed.), *Manual method for general bacteriology*, American Society for Microbiology.
93. Sneath. P.H.A. 1986. Endospore-forming gram-positive rods and cocci, Pp 1104-1135. *In* J.G. Holt(ed.), *Bergey's manual of systemetic Bacteriology*. Vol. 2, Williams and Wilkins.
94. Stirling, C.R. 1984. Biological control of *Meloidogyne javanica* with *Bacillus petetrens*. *Phytopathol.* **74**: 55-60.
95. Stirling, C.R. and R. Mankau. 1979. Mode of parasitism of *Meloidogyne* and other nematode egg by *Daetyrella oviparasitica*. *J. Nematol.* **11**: 282-288.
96. Strippoli, V., F.D. D'Auria, N. Simonetti, D. Basti, and T. Bruzzese. 1997. *In vivo* and *in vitro* antifungal activity of the polyene derivative SPA-S-753 aganst encapsulated form of *Cryptococcus neoformans*. *Infection*, **25**: 27-31.
97. Taylor, A.L. 1967. Introduction to research on plant nematology. No. PLiCP/5. Food and agriculture organization at the United Nation, Rome 00100, Italy.
98. Teintze, M., and J. Leong. 1981. Structure of Pseudobactin A, a second siderophore from plant growth promoting *Pseudomonas* B10. *Biochemistry* **20**: 6457-6462.
99. The effects of endotoxin(thuringiensin) from *Bacillus thuringiensis* on *Meloidogyne incognita* and *Caenorhabditis elegans*. *Plants and Soil.* **145**: 115.
100. *Trichostrongylus coluriformis*: egg lethality due to *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. *Experimantal Parasitol.* **60**: 314.
101. Tunlid, A. and S. Jansson. 1991. Protease and their involvement in the infection and immobilization of nematodes by the nematophagous fungus *Artheobotrys oligospora*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 2868-2872.
102. Vidhyasekaran, P., K. Sethuraman, K. Rajappan and K. Vasumathi. 1997. Powder Formulations of *Pseudomonas fluorescens* to Control Pigeonpea Wilt.

*Biological Control* 8: 166-171.

103. Vrain, T.C. 1982. Relationship between *Meloidogyne hapla* density and damage to carrots in organic soils. *J. Nematol.* 14: 50-56.

104. Walters, S.A., T.C. Wehner, and K.R. Barker. 1992. Effects of root decay on the relationship between *Meloidogyne* spp. gall index and egg mass number in cucumber and horned cucumber. *Suppl. J. Nematol* 24: 707-711.

105. Whitfield, G.B., T.S. Brock, D.A. Ammann, D. Gottlieb, and H.E. Carter. 1955. Filipin, an antifungal antibiotic :Isolation and properties. *J. Am. Chem. Soc.* 77: 4799-4801.

106. Xu Ping, Akeda, Y., Fujita, Ken-ichi, Tanaka, T. and Taniguchi, M. 1998. The mode of action of AKD-2C, an antifungal antibiotic from *Streptomyces* sp. OCU-42815. *J. Antibiotics*, 51(9): 852-856.

107. Zari E.A. and D.S. Bhatti. 1990. In vivo parasitism of *Meloidogyne javanica* by an oviparasitic Fungus, *Paecilomyces lilacinus*. *Nematol. Medit.* 18: 141-143.

108. *Bacillus thuringiensis* subsp. *indiana* BITH109의 토마토 뿌리혹선충에 대한 치사 효과. *한국산업미생물학회지.* 22(6): 679.

109. 경제작물에 영향을 미치는 뿌리혹선충에 관한 연구. *한국식물보호학회지.* 17: 88.

110. 김광윤, 김광용. 1978. 하우스 채소작물 병해충 발생소장조사. *원시농시연보*: 690-703.

111. 김지인, 한상찬. 1990. 시설재배작물의 식물기생선충 발생상황 조사. *농시논문집(작물보호편)* 32(2): 36-45.

112. 김희규, 추호열, 박중춘, 조정재, 엄성균. 1086. 진주근교의 시설 원예 재배 환경과 병해충 발생에 관한 연구. 4. 주요병해충 발생 양상. *경상대 농연보* 20: 49-57.

113. 농촌진흥청. 1993. 통계자료.

114. 모기유충에 대한 살충력이 있는 *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* 73E10-2의 delta-endotoxin의 화학적 처리에 따른 안정성. *한국산업미생물학회지.* 19(3): 308.

115. 모기유충에 살충력이 있는 *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis*

- 73E10-2의 내독소의 용혈성 인자의 정제. *한국산업미생물학회지*. 19(3): 303.
116. 모기유충에 살충력이 있는 *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* 73E10-2 내독소의 면역학적 성질. *한국산업미생물학회지*. 18(3): 301.
117. 모기유충에 대한 살충성 *Bacillus thuringiensis* H9B 균주의 특성. *한국산업미생물학회지*. 21(5): 393.
118. 박상근. 1988. 우리 나라 시설원예의 현황과 문제점. *시설원예연구*. 3-11.
119. 박소득. 1992. 약용작물에 기생하는 선충 종류 및 방제에 관한 연구. 경북대학교 농학박사 학위 논문 79pp.
120. 손일수, 정연태, 윤을수. 1993. 영남지역의 시설수박, 참외 실태와 토양 특성. *농시논문집*. 135(1): 295-300.
121. 이병일, 정후섭, 임선욱. 1993. 채소의 연작장해에 관한 연구. *채소연작장해실태*. *서울대 농학연구*: 119-128.
122. 최동로, 최영연. 1992. 시설원예에 있어서 식물 기생 선충 조사. *한국식물보호학회지*. 21(1): 8-14.
123. 최영연. 1977. 뿌리혹선충(*Meloidogyne incognita*)에 대한 토마토 품종 저항성 및 화학적 방제에 관하여. *경북대학교 논문집* 24: 419-422.
124. 최영연, 추호열. 1978. 경제작물에 영향을 미치는 뿌리혹 선충에 관한 연구. *한국식물보호학회지* 4: 50-56.
125. 최영연, 추호열. 1979. 경제작물에 영향을 미치는 뿌리혹선충에 관한 연구. *한국식물보호학회지* 17: 89-98.
126. 최영연. 1992. 식물선충학. 향문사.
127. 추호열, 이상명, 김하규, 최영연. 1990. 뿌리혹선충 *Meloidogyne incognita* 가 오이덩굴쫄김병 발생에 미치는 영향. *한식명리*. 6(3): 412-416.
128. 토마토 뿌리혹선충 *Meloidogyne incognita*에 치사력이 있는 *Bacillus thuringiensis* BITH109 균주의 분리 및 특징. *한국산업미생물학회지*. 22(3): 227.
129. 한상찬. 1993. 당근뿌리혹선충(*Meloidogyne hapla*)에 의한 약용 작물의 피해해석 농업과학논문집 36(산학협동): 153-158.
130. 三井康, 1985. 連作障害(土壤線蟲, 環境技術 1,414) 318-329.