

온천수로부터 분리한 항진균세균의 특성 및 감마선(Co^{60}) 조사를 이용한 돌연변이체 유기

이영근* · 김재성 · 송인근 · 정혜영 · 장화형¹

한국원자력연구소 · R · 방사선응용연구팀, ¹배재대학교 바이오의약연구센터

다양한 식물병원성 진균을 방제하기 위하여 온천수로부터 1종의 동물병원성 진균과 12종의 식물병원성 진균에 항진균 활성을 갖는 고온성 세균을 분리하였으며 *Bacillus subtilis* YS1으로 동정되었다. 분리 균주의 감마선(Co^{60})에 대한 감수성 조사 결과, D_{10} value는 2.08 kGy로 20 kGy의 방사선량에서도 생존 가능한 방사선 저항성 균주였다. 방사선 조사를 이용하여 5종의 돌연변이체를 유기하였으며, 이 중 *B. subtilis* YS1-1009 돌연변이체는 *Botryoshaeria dothidea*에 대한 항진균 활성의 증가 및 4종의 식물병원성 진균에 대하여 항진균 활성이 감소하는 종특이적 항진균 활성 변화를 나타내었다. 또한 상용농약인 tebuconazole에 대하여 저항성을 나타내었으며 17종의 다른 농약에 대해서도 전체적으로 야생형 균주에 비해 저항성이 증가하였다. *B. subtilis* YS1-1006 돌연변이체는 copper hydroxide에 저항성을 나타내었으며, *B. subtilis* YS67 돌연변이체는 항진균 활성이 소실된 tryptophan 및 proline 또는 uracil 및 arginine 영양요구성 돌연변이체였다. 이러한 결과로부터 극한 환경에서 분리한 본 분리균주는 환경친화적으로 진균에 의한 식물병을 방제할 수 있으며 방사선을 이용한 돌연변이체 유기는 기능성 균주의 개량이나 작용기작 연구를 위한 돌연변이체의 획득에 매우 효과적인 방법이라 사료된다.

Key words □ *Bacillus subtilis*, gamma radiation, mutant

최근 들어 극한 환경에 서식하는 미생물을 이용하려는 연구가 제약, 환경오염방제 등의 여러 분야에서 활발히 진행되고 있다. 이들 극한성 미생물들은 새로운 생물공학의 유용한 자원임과 동시에 생물 물질들이 극한 조건에서 안정화할 수 있는 기작을 연구하는데 독특한 모델이 될 수 있다(1,18). 극한성 미생물은 크게 고온과 저온(thermophile과 psychrophile), pH (acidophile과 alkaliphile), 염류집적환경(halophile)에 서식하는 세 그룹으로 구분하고 있으며 극한 환경에서 생명을 유지하는 기작에 대해선 잘 알려지지 않았다. 이들의 연구는 산업적으로 유용한 새로운 미생물 산물과 생물공정을 제공할 것이다. 이러한 극한성 미생물을 대상으로 Mawadza 등은(19) 짐바브웨의 두 온천지역 Chireszi (43°C)와 Chimanimani (55°C)에서 셀룰라제 분비 미생물을 분리한 바 있으며, Phobe 등(21)이 극고온성 세균으로부터 항진균 활성을 갖는 화합물의 특성을 보고한 바 있다. 그러나 근래에 중요시되고 있는 항진균 활성 세균을 이용한 생물학적 제어에 이들 극한 환경에서 분리된 세균의 응용에 대한 보고는 미미한 실정이다. 현재까지 보고된 항진균 활성 균주는 대부분 *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Agrobacterium*, *Burkholderia* 등의 세균과 *Trichoderma*, *Gilocladium*, *Fusarium*과 같은 진균으로부터 유래한 것으로 토양세균이나 식물병이 발병된 식물로부터 분리되었다(8,16). *Pseudomonas* 등을 포함한 많은 기능

성 미생물들은 방사선에 민감하여 방사선 수준이 낮은 환경에서도 생물학적 복원 기능에 제한을 받을 수 있는 것으로 알려지고 있다(27). 이에 반해 극한 환경으로부터 분리된 미생물은 일반 자연환경으로부터 분리된 미생물에 비하여 방사선에 대한 저항성이 높을 가능성이 있다. 또한 방사선 저항성 미생물을 분리하여 방사선을 조사함으로써 방사선 저항성 및 항진균 활성이 변화된 돌연변이체를 유기한다면 실제 환경에의 적응성을 증가시킬 수 있다.

진화상에서 돌연변이는 DNA 복제와 복원의 과정에서 불완전성의 피할 수 없는 결과로(24), Radman (23)은 다양성이 생존을 위한 것이고 돌연변이가 다양성을 일으키는데 필요하다면, 돌연변이는 진화과정에서 긍정적으로 선택된다고 보고하였다. 생물들은 감마선과 같은 이온화방사선에 노출되게 되면 세포내 DNA에서 다양한 돌연변이가 야기된다(3,11,12). 1927년 이온화 방사선이 돌연변이원으로 알려진 이래(20) 다양한 경우의 DNA 손상에 의한 돌연변이 기작이 알려졌으며, 기능성 균주의 개량 및 돌연변이체 유기에 유용한 물리적 방법으로 보고되었다(15).

본 연구는 극한 환경인 온천수로부터 항진균 활성을 갖는 세균을 분리하여 항진균 활성 스펙트럼을 조사하고, 이들 균주로부터 방사선 조사를 이용하여 항진균 활성이 변화된 돌연변이체를 유기하고자 하였다. 돌연변이체 중 활성이 증가된 돌연변이체는 개량 균주로 이용하고 항진균 활성이 결여된 돌연변이체는 분리 균주의 항진균 활성 기작을 규명하는데 이용하고자 하였다.

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 042-868-8056, Fax: 042-862-6980
E-mail: yklee@kaeri.re.kr

재료 및 방법

항진균 활성 세균의 분리 및 동정

극한 환경인 유성온천에서 채취한 원수를 영양한천배지와 R2A 배지에 도말하여 37°C에서 3일간 배양하였다. 이후 형태적으로 특징적인 균주들을 항진균 활성을 갖는 후보 균주로 이용하였다. 후보 균주들은 *Candida albicans*를 대상으로 1차적으로 항진균 활성을 검정한 후, 12종의 식물병원성 균주들을 대상으로 항진균 활성을 검정하여 항진균 활성 세균을 분리하였다. 항진균 활성 spectrum을 조사하기 위하여 이용된 *C. albicans* 1종과 식물병원성 진균 12 종은 본 연구실에서 보관 관리해온 균주와 한국농업과학기술원 농용미생물보존센터(KACC)로부터 기증받은 균주를 사용하였다.

분리된 항진균 세균에 대하여 일차적으로 Gram stain을 시행한 후, MIDI system을 이용한 FAME (fatty acid methyl ester) 분석을 통하여 동정하였다.

방사선 감수성 분석 및 돌연변이체 유기

전배양된 항진균 세균 1 ml를 microfuge tube에 넣고 0 kGy에서 25 kGy의 방사선을 조사한 후, NA배지에 도말하여 37°C에서 48시간 배양하였다. 각 구간별 생균수로 감수성을 조사하고 95%의 치사율을 보이는 방사선 조사선량에서 생존한 균체를 *C. albicans*가 미리 도말된 NA 배지에 접종하여 1일 배양 후, 형태적 특징 및 항진균 활성에 변화를 보이는 특징적인 균주를 돌연변이체로 유기된 후보 균주로 선정하였다. 이후, 액체 배양을 한 후, 세균 배양액을 각 50 µl 씩 paper disc에 접종하여 37°C에서 1일동안 배양한 후, 야생형 균주에 대하여 항진균 활성이 변화된 균주를 방사선 조사에 의해 유기된 돌연변이체로 선정하였다.

영양요구성 돌연변이체 분리

야생형 균주 및 방사선조사를 통해 유도된 돌연변이체를 각각 GM63 최소배지에 접종하여 37°C에서 배양한 후, 미생장 균주를 Table 1 (7)과 같이 각각의 영양원을 GM63 최소배지에 첨가하여 제조한 영양요구주 선별 배지에 접종하여 37°C에서 3일간 배양한 후, 영양요구성을 판별하였다.

항진균 활성 측정 및 식물병원성 곰팡이에 대한 항진균 스펙트럼

최종 선별된 항진균 활성 세균 및 돌연변이체를 대상으로 공

시 식물병원성 진균류 12종과 1 종의 동물병원성 진균에 대한 항진균 활성도와 활성 스펙트럼을 분석하기 위하여 agar plug 형태로 병원성 진균류를 각각 PDA 배지의 중앙에 접종한 후, 전배양된 항진균 세균의 배양액을 paper disk (Advantec, Toyo) 접종 방법으로 *in vivo* 길항실험을 행하였다. disk의 가장 자리에서부터 투명 억제대까지의 길이를 측정하여 상대적인 항진균 활성도를 조사하였다.

유기물 분해능 및 농약저항성

- 지방분해능(lipolytic activity)

Sierra (26)의 방법을 변형하여 tween80을 함유하는 고체배지(peptone 10 g, CaCl₂ 0.1 g, agar 15 g, tween80 1 ml/l)에 균주를 접종하고 25°C에서 3일간 배양한 후, 균체 주위에 불투명한 결정체가 나타나면 지방 분해능이 있는 것으로 결정하였다.

- 전분 분해능(amylose activity)

Soluble starch가 함유된 배지(starch 5 g, peptone 10 g, CaCl₂ 0.5 g, MgCl₂ 5 g, MgSO₄ 2 g, KCl 1 g, FeSO₄ 0.001 g/l, agar 1.5%)에서 25°C로 3일간 배양한 후, 균체에 Gram's iodine 용액을 첨가하여 균체 주위에 투명대의 형성 여부를 관찰하였다.

- 섬유소 분해능(cellulolytic activity)

Carboxymethylcellulose (CMC) 배지(CMC 5 g, MgSO₄ 2 g, CaCl₂ 0.5 g, KCl 1 g, FeSO₄ 0.001 g/l, agar 1.5%)에서 25°C에서 5일간 배양한 후, 0.5% congo red 용액을 균체에 처리하여 투명대 형성 여부를 관찰하였다.

-β-glucosidase 활성

Esculin (6,7-dihydroxycoumarin 6-glucoside)가 함유된 배지 [Esculin 3 g, Czapek soln. (NaNO₃ 40 g, KCl 10 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g/l) 50 ml, 2% K₂HPO₄ 50 ml, 1% ZnSO₄ · 7H₂O 1 ml, 0.5% CuSO₄ · 5H₂O 1 ml, ferric citrate 0.2 g/l, agar 1.5%]에서 25°C로 5일간 배양한 후, 균체 주위에 black zone이 형성되는지를 관찰하였다.

- Lignin 분해능

Poly R-478 dye (Sigma)가 첨가된 배지 [KH₂PO₄ 0.6 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g, K₂HPO₄ 0.4 g, ammonium tartrate 0.22 g, sorbose 4 g, poly R-478 0.2 g, mineral soln. (CaCl₂ · 2H₂O 7.4 g, ferric citrate 1.2 g, ZnSO₄ · 7H₂O 0.7 g, MnSO₄ · 5H₂O, CoCl₂ · 6H₂O 0.1 g, thiamine · HCl 10 mg/l) 10 ml, agar 1.5%, pH 4.5]에서 25°C로 5일간 배양한 후, 균체 주위에 투명환의 형성 여부를 관찰하였다(10).

Table 1. Composition of auxotrophs media

	Sol 1	Sol 2	Sol 3	Sol 4	Sol 5
Sol 6	adenosine	guanine	cysteine	methionine	thiamine
Sol 7	histidine	leucine	isoleucine	lysine	valine
Sol 8	phenylalanine	tyrosine	tryptophan	threonine	proline
Sol 9	glutamine	asparagine	uracil	aspartic acid	arginine
Sol 10	thymine	serine	glutamic acid	dipicolinic acid	glycine
Sol 11	pyridoxine	nicotinic acid	biotin	pantothenate	alanine

-농약 저항성

농경지에서 가장 높은 빈도로 사용되는 농약을 조사하여 살균제 11종, 살충제 7종, 제초제 2종 등 20 종의 농약을 선정하여 특급시약(순도 75%이상)을 동부한농(주)으로부터 제공받아 용도에 따라 구별하여 사용하였다. 농약에 대한 저항성 분석은 경작지에서 사용되는 농도의 농약이 첨가된 NA 배지에서 세균배양액 50 μ l을 paper disc에 접종한 후, 30°C에서 3일간 배양하여 성장 여부를 측정하였다.

결과 및 고찰

항진균 활성 세균의 분리 및 동정

유성온천의 원수에서 분리한 세균들 중, 일차적으로 동물병원성 진균인 *C. albicans*에 항진균 활성을 나타내는 고온성 YS1 균주를 선별하였다. YS1 균주의 항진균 활성 스펙트럼을 조사한 결과, 12종의 식물병원성 진균에 대하여 높은 항진균 활성을 보였다(Fig. 1). YS1 균주는 그람양성 간균으로 fatty acid profile 분석 결과, *Bacillus subtilis*로 동정되었다. *B. subtilis*는 기존에 항진균 활성을 갖는 세균으로 보고(14)되어 있으나, 극고온성 세균으로부터 항진균 활성을 갖는 화합물의 특성이 보고된(21) 외에는 극온 환경으로부터 항진균 활성 세균이 분리된 보고는 전무하다. 본 분리 균주는 55°C의 온천원수에서 분리된 것으로 30-55°C의 다양한 온도 조건에서 생장이 가능하여 응용성이 매우 클 것으로 기대된다.

방사선 감수성 분석 및 돌연변이체 유기

50 Gy에서 25 kGy에 걸쳐 여러 선량의 방사선을 조사한 결과, *B. subtilis* YS1 야생형 균주는 20 kGy의 방사선 조사선량에서도 생존하였으며 D_{10} value는 2.08 kGy였다(Fig. 2). Bender 등(4)에 의하면 소혈청 내의 mycoplasma 및 세균의 불활성화를 위한 Co^{60} 선원의 방사선량 조사에서 *B. subtilis*에 대한 멸균선량은 18 kGy이며, 15 kGy의 조사선량을 실질적인 불활성화 선

량으로 보고한 바 있다. 이는 본 분리 균주가 온천에서 성장하는 고온성 세균으로 극한 환경에 적응하여 방사선 저항성이 증가한 것으로 판단된다. 방사선 감수성 결과를 기초로 하여 10 kGy의 방사선 조사에서 생존한 균주중에서 야생형 균주 *B. subtilis* YS1에 비해 *C. albicans*에 대한 항진균 활성 정도가 변화된 돌연변이체 *B. subtilis* YS1-1006과 *B. subtilis* YS1-1009 균주를 유기하였다. *B. subtilis* YS1-1006 및 *B. subtilis* YS1-1009의 식물병원성 진균 8종에 대한 항진균 활성 정도는 Table 2에 나타

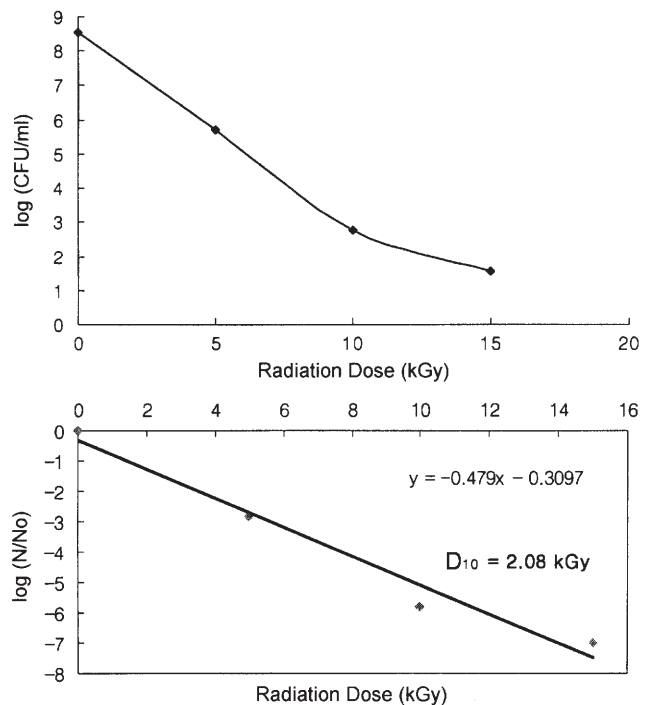


Fig. 2. Radiation sensitivity of *Bacillus subtilis* YS1 isolated from hot spring. D_{10} value is $-1/\text{slope}$.

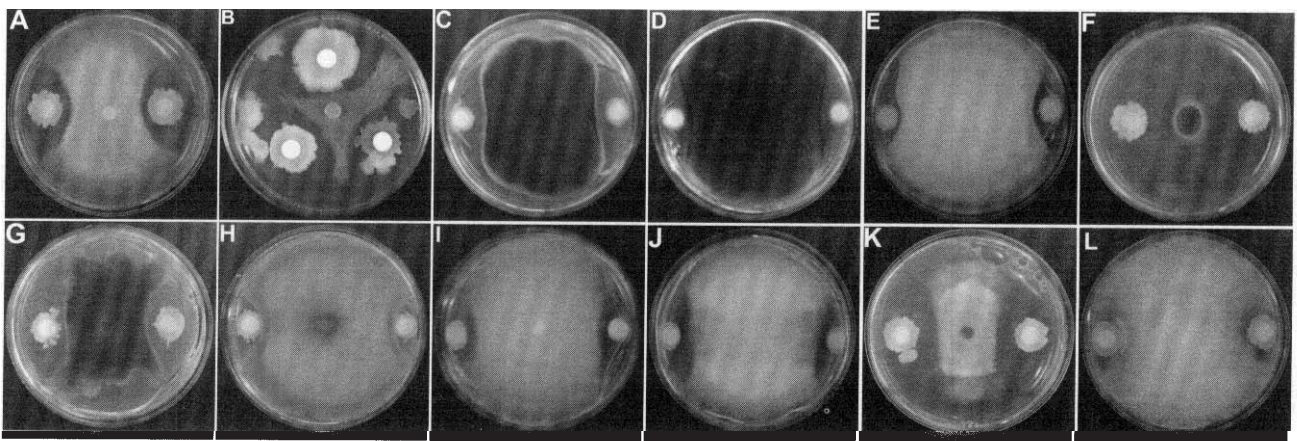


Fig. 1. Antifungal spectrum of *Bacillus subtilis* YS1.

A, *Rhizoctonia solani*; B, *Rhizoctonia solani* (BP); C, *Alternaria solani*; D, *Alternaria alternata*; E, *Phytophthora capsici*; F, *Colletotrichum gloeosporioides*; G, *Mycosphaerella melonis*; H, *Fusarium oxysporum*; I, *Botrytis cinerea*; J, *Phythium ultimum*; K, *Botryoshaeria dothidea*; L, *Sclerotinia sclerotiorum*.

Table 2. Antifungal spectra of radiation-induced *B. subtilis* YS1 mutants against several plant pathogenic fungi

Plant pathogenic fungi	Antifungal activities of <i>B. subtilis</i> YS1 mutants	
	YS1-1006	YS1-1009
<i>Rhizoctonia solani</i>	++ (= wt)	++ (= wt)
<i>Rhizoctonia solani</i> (BP)	+ (= wt)	+ (< wt)
<i>Fusarium oxysporum</i>	+ (< wt)	+ (< wt)
<i>Mycospherella melonis</i>	+ (= wt)	+ (< wt)
<i>Alternaria solani</i>	+ (= wt)	+ (= wt)
<i>Phythisum ultimum</i>	+ (< wt)	+ (< wt)
<i>Botryoshaeria dothidea</i>	+ (= wt)	+ (> wt)
<i>Phyricularia oryzae</i>	+ (= wt)	+ (< wt)

Degree of inhibition; + (≤ 10 mm), ++(>10 mm), wt means YS1 wild type strain

내었다. *B. subtilis* YS1-1009 돌연변이체는 *Botryoshaeria dothidea*에 대해 야생형에 비하여 항진균 활성이 증가하였으나 *Rhizoctonia solani*와 *Alternaria solani*의 두 진균을 제외한 5종의 식물병원성 진균에 대하여 항진균 활성이 감소하였다. 또한 영양 요구주 돌연변이체인 *B. subtilis* YS-67은 *C. albicans*에 대한 항진균 활성을 상실하였다. 감마선 조사를 이용한 *B. subtilis*의 항생제 생산 증강 돌연변이체 유기는 이전에 보고된 바 있으나(2), 항진균 활성이 증강되거나 상실된 다양한 돌연변이체 유기는 전무하다. 이러한 결과로부터 방사선 조사를 이용한 돌연변이체 유기는 매우 유용한 방법으로 판단된다.

영양요구성 돌연변이체 분리

방사선 조사 후 생존한 *B. subtilis* YS1을 무작위로 300 colony를 선별하여 최소배지인 GM63 배지에서 생존하지 못하는 2개의 colony (YS25, YS67)를 선별할 수 있었다. *B. subtilis* YS1과 이 두 돌연변이체를 GM63 최소배지, NA 배지 및 11 종류의 영양요구주 선별 배지(Table 1)에 접종하여 배양한 결과, *B.*

subtilis YS1은 영양요구주 선별 배지 중 Sol 2와 Sol 10 배지에서 서만 생존하지 못하였다(Table 3). 따라서, *B. subtilis* YS1은 Sol 2와 Sol 10의 공통적인 영양원인 serine에 대한 민감성 세균임을 알 수 있었다. *B. subtilis* YS25와 *B. subtilis* YS67은 최소배지에서 생존하지 않았고 완전배지인 NA 배지에서 생존하였다. 영양 요구주 선별배지에서 *B. subtilis* YS25는 Sol 3와 Sol 8 배지에서 서만 생존하였다. Sol 3과 Sol 8의 공통 영양원은 tryptophan으로 *B. subtilis* YS25는 tryptophan 요구주임을 알 수 있었다. *B. subtilis* YS67은 Sol 3, Sol 5, Sol 8과 Sol 9에서만 생존하였다. *B. subtilis* YS67은 arginin과 uracil 또는 proline과 tryptophan이 동시에 첨가된 영양배지에서만 생존할 수 있었다. *B. subtilis* YS25와 YS67의 영양요구성을 재조사한 결과도 동일하였다(Table 4).

이상의 결과를 통해 방사선을 이용하여 *B. subtilis* YS1 균주에서 영양요구성 돌연변이체를 유도함으로써 방사선 저항성 미생물의 경우에도 방사선에 의해 유전적인 변화가 유도될 수 있음을 확인하였다. 이들의 돌연변이체의 방사선 감수성이 대조군에 비해 월등한 차이가 있다면 방사선 저항성 관련 인자의 탐색에도 유용할 것이다. 특히, 영양요구주 선별 배지인 Sol 9에서 생존하는 미생물은 *pyrA* 유전자 돌연변이체인 것으로 알려져 있으며(7), *Eschericia coli*는 pyrimidine 생합성에 관여하는 유전자들이 염색체상에 흩어져 있으나 *B. subtilis*의 경우에 *pyr* operon을 구성하고 있어 구성 유전자 중 하나의 변화에 의해서도 operon 구성 유전자 대부분이 작동할 수 없게 된다. YS1의 경우에 *pyr* 유전자들이 operon을 형성하는 지에 관한 정보는 없으나 이의 영양요구주인 *B. subtilis* YS67에서 DNA의 전구물질인 pyrimidine의 합성에 관여하는 유전자에 변화가 있다는 것은 방사선에 대한 저항성에 있어서 변화가 초래되었을 가능성이 높을 것으로 사료된다. 물론, *pyrA* 유전자 발현에 UTP의 농도가 일차적인 원인이므로 *B. subtilis* YS67의 경우에 uracil을 요구하지만 uracil 단독첨가 만으로는 *B. subtilis* YS67의 성장을 촉진하지 못하므로(Table 4) 또 다른 유전자들이나 기존에 알려지지 않은 생체기작으로써 DNA 합성과 회복에 관여하는 유전자(들)의 작동과 밀접한 관련 인자에 변화가 초래되었을 가능성도 있을 것이다.

Table 3. Auxotrophs *B. subtilis* YS1 induced by gamma radiation

Strain	LA	GM63	Sol 1	Sol 2	Sol 3	Sol 4	Sol 5	Sol 6	Sol 7	Sol 8	Sol 9	Sol 10	Sol 11
YS1	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
YS25	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
YS67	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-

Table 4. Growth of the auxotrophs on required nutrient-added media

Strain	Tryptophan	Uracil	Arginine	Proline	Arginin Tryptophan	Proline Uracil	Uracil Arginine	Proline Tryptophan
YS1	+	+	+	+	+	+	+	+
YS25	+	-	-	-	+	-	-	+
YS67	-	-	-	-	-	-	+	+

Table 5. Extracellular enzyme activities of *B. subtilis* YS1 and its mutants upon soil media

Strains	Enzyme activities				
	β -glucosidase	SA ^a	LA	CA	ligninase
YS1	+	—	++	—	+
YS1-1006	+	—	+	—	+
YS1-1009	++	—	++	—	++

^aSA: amylase activity; LA: lipolytic activity (fatty acid esterase); CA: cellulolytic activity (cellulase), ^bEnzyme activity; +: good, ++: very good, -: negative.

Table 6. Resistant patterns of *B. subtilis* YS1 and its mutants against pesticides

Pesticides	YS1	YS1-1006	YS1-1009
Benomyl	+++	++	+++
Flusilazole	++	++	+++
Tebuconazole	—	—	++
Oxadixyl	+++	+++	++
Edifenphos	+++	+++	+++
Mancozeb	++	++	++
Pencycuron	+++	+++	++
Azoxystrobin	+++	+++	+++
Copper hydroxide	—	++	—
Isoprothiorane	++	+	+
Iprobenphos	++	+	+
Chlorfenaphy	++	+	+
Imidacloprid	+++	++	++
Carbofuran	+++	++	+++
Fenpyroximate	++	++	++
Chlorpyrifos	+++	++	+
Fenobucarb	—	—	—
Diazinon	+++	+++	++
Butachlor	++	++	++
Glyphosate	+++	++	++

—: no resistance; +: mild, ++: good, +++: excellent-resistance

유기물 분해능

B. subtilis YS1 및 그 돌연변이체 균주들은 섬유소 분해능과 아밀라제 분해능이 나타나지 않았으나 일반적으로 식물 기원의 난분해성 탄수화물인 lignin을 분해하는 ligninase 효소활성을 보였다(Table 5). Priest (22)에 의하면 *Bacillus* 종들은 세포의 다당류 가수분해효소를 생산하나 결정성 섬유소를 분해하지 못하는 불완전한 섬유소 분해효소 체계를 가지고 있다. 섬유소를 포도당으로 분해하는데는 4가지의 특징적인 효소, endo-1,4- β -glucanase, cellobiohydraz, β -glucosidase와 glucan 1,4- β -gluco-

sidase가 필요하며(6) 이들의 상호작용으로 섬유소가 완전히 분해될 수 있다(5,17,28). 세균성 섬유소분해효소는 몇몇 혐기성 세균은 잘 깨지지 않는 cellulosome 이라는 다효소복합체 cluster와 연계된 다량의 섬유소 분해효소를 분비한다(9). 상대적으로 적은 양의 섬유소 분해효소를 분비하는 다른 세균들은 cellobiohydrazase가 결합되어 있는 것으로 알려지고 있다.

B. subtilis YS1은 자연계에 가장 많이 존재하는 섬유소에 대한 분해능은 없으나 두 번째로 많이 존재하는 리그닌에 대한 분해능은 우수하였다. 농경지와 산림으로부터 나오는 리그노셀룰로오스 생체량은 매년 1.6×10^8 톤으로 다른 자원에 비해 상대적으로 저렴하고 풍부하다(13). 또한 목재 구성원의 생물학적 분해는 효소 반응과정으로 알려져 있으며 당단류로의 전환은 매우 간단한 과정이다. 최근에 이르러 섬유소분해효소 활성이 결여되었으나 리그닌 분해효소의 활성이 있는 고온성 세균은 펄프 등의 제지 산업에 이용도가 매우 크다(25). 이를 통해 본 연구에서 분리된 *B. subtilis* YS1 균주는 식물병 방제 뿐만 아니라 유기물 분해능을 이용한 다기능적 환경친화형 토양개량제, 퇴비부숙제, 환경정화제 등으로 이용될 수 있을 뿐만 아니라 펄프 등의 제지산업 공정에도 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

농약 저항성

항진균 활성 세균의 농약에 대한 저항성 분석은 20종의 농약이 각각 첨가된 NA배지상에서 조사하였다(Table 6). 그 결과, *B. subtilis* YS1 및 돌연변이 균주 모두 17종의 상용 농약에 대해서 모두 저항성을 나타냈으며 농약이 첨가된 고체배지에서 높은 생장을 보였다. tebuconazole에 대해서는 *B. subtilis* YS1의 돌연변이체인 *B. subtilis* YS1-1009 균주가 저항성을 나타냈으며, copper hydroxide에 대해서는 *B. subtilis* YS1-1006 돌연변이 균주만이 저항성을 보였다. 그러나 살충제인 fenobucarb에 대해서는 모든 균주들이 저항성이 없는 것으로 조사되었다.

우수한 항진균 활성을 가진 균주라도 농약의 잔류독성에 민감하면 실제 경작지에서 제 기능을 수행할 수 없게 된다. 본 연구에서 분리한 *B. subtilis* YS1 및 돌연변이체들은 농약에 대한 저항성 조사 결과, 실제 농경지에 적용시, 토양에 잔존하는 잔류농약과 무관하게 우수한 항진균 활성을 나타낼 것으로 사료된다. 또한 이들 균주들을 이용하여 토양의 활성회복과 환경오염 정화에도 기여할 것으로 생각된다. 그러나 유기물 분해능 결과로 보아 제한적인 기질 특이성이 있기 때문에, 실제 환경오염의 정화를 위해서는 다양한 환경오염원에 대한 균주의 혼합적용이 어려울 수 있다. 이를 위해 환경오염원 분해유전자의 종내 혹은 종간의 전달특성을 효과적으로 이용하여 다양한 분해능을 갖는 균주를 개발해 낸다면 환경 자정능력을 충분히 배가시킬 수 있을 것으로 사료된다.

아울러 *B. subtilis* YS1의 돌연변이체인 YS1-1006과 YS1-1009 균주가 야생형과는 달리 copper hydroxide와 tebuconazole에 대해 저항성을 나타내는 것으로 보아 방사선 조사를 이용한 돌연변이체 유기는 보다 효과적인 균주 개량에 기여할 수 있음을 입증하였다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부의 원자력연구개발사업의 일환으로 수행되었음.

참고문헌

1. Aguilar, A. 1989. European laboratories without walls on extremophiles. p. 1-5. In M.S. DaCosta, J.C. Duarte and R.A.D. Williams (ed.), Microbiology of Extreme Environments and Its Potential for Biotechnology. Elsevier, London.
2. Ahmad, M.S., G.A. Shaukat, and M.A. Malik. 1987. Higher antibiotic yielding mutants of *Bacillus subtilis* by gamma radiation. *Nucleus* 24, 23-26.
3. Becker, D. and M. Sevilla. 1993. The chemical consequences of radiation damage to DNA. *Adv. Radiat. Biol.* 17, 121-180.
4. Bender, E., J. Fritzsche, M. Baer, and W. Nordheim. 1989. Experiments for inactivation of mycoplasmas and bacteria in calf sera, using ^{60}Co irradiation. *Archiv Fuer experimentelle Veterinaermedizin* 43, 783-788.
5. Bhat, M.K. and S. Bhat. 1997. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnol. Adv.* 15, 583-620.
6. Cai, Y.J., J.A. Buswell, and S.T. Chang. 1994. Production of cellulases and hemicellulases by the straw mushroom, *Volvariella volvacea*. *Mycol. Res.* 98, 1019-1024.
7. Davis, R.W., D. Botstein, and J.R. Roth. 1980. A manual for genetic engineering: Advanced bacterial genetics. p. 207-210. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.
8. Fravel, D.R., W.J. Connick, and J.A. Lewis. 1998. Formulation of microorganisms to control plant diseases. p. 187-202. In H.D. Burges(ed.), Formulation of microbial biopesticides, beneficial microorganisms and nematodes and seed treatments. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, London.
9. Gilbert, H.J. and G.P. Hazlewood. 1993. Bacterial cellulases and xylanases. *J. Gen. Microbiol.* 139, 187-194.
10. Glenn, J.K. and M.H. Gold. 1983. Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycetes *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 1741-1747.
11. Halliwell, B. and O.I. Aruoma. 1991. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian cells. *FEBS Lett.* 281, 9-19.
12. Hutchinson, F. 1985. Chemical changes induced in DNA by ionizing radiation. *Prog. Nucl. Acids Res. Mol. Biol.* 32, 115-154.
13. Jefferies, T.W. 1983. Utilization of xylose by bacteria, yeasts, and fungi. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 27, 1-32.
14. Knox, O.C.G., K. Killham, and C. Leifert. 2000. Effects of increased nitrate availability in the control of plant pathogenic fungi by the soil bacterium *Bacillus subtilis*. *Appl. Soil Ecol.* 15, 227-231.
15. Lee, Y.-K., H.-H. Chang, J.-S. Kim, J.K. Kim, and K.-S. Lee. 2000. Lignocellulolytic mutants of *Pleurotus ostreatus* induced by gamma-ray radiation and their genetic similarities. *Rad. Phys. Chem.* 57, 145-150.
16. Lumsden, R.D., J.A. Lewis, and D.R. Fravel. 1995. Formulation and delivery of biocontrol agents for use against soilborne plant pathogens. p.166-182. In F.R. Hall and J.W. Barry(ed.), Biorational pest control agents formulation and delivery. American Chemical Society, Washington, D.C.
17. Lusta, K.A., I.K. Chung, I.W. Sul, H.S. Park, and D.I. Shin. 1999. Characterization of an extracellular cellulose-hydrolysing enzyme complex from a thermotolerant strain of *Aspergillus* sp. *J. Microbiol. Biotechnol.* 9, 873-876.
18. Magnien, E., A. Aguilar, P. Wragg, and D. De Nettancourt. 1989. European laboratories without walls: a new tool for biotechnology R&D in the community. *Biofutur* 84, 17-30.
19. Mawadza, Chrispen, R. Hatti-Kaul, R. Zuvauya, and B. Mattiasson. 2000. Purification and characterization of cellulase produced by two *Bacillus* strains. *J. Biotechnol.* 83, 177-187.
20. Muller, H.J. 1927. Artificial transmutation of the gene. *Science* 66, 84-87.
21. Phoebe, C.H. Jr., F.G. Albert, K. van Tabk, J.V. Cabrera, H.J. Correia, Y. Guo, J. Lindermuth, W. Galbraith, and C.P. Selitrennikoff. 2001. Extremophilic organisms as an unexplored source of antifungal compounds. *J. Antibiotics* 54, 56-65.
22. Priest, F.G. 1977. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriol. Rev.* 41, 711-753.
23. Radman, M. 1999. Mutation: Enzymes of evolutionary change. *Nature* 401, 866-809.
24. Radman, M., F. Taddei, and I. Matic. 2000. Evolution-driving genes. *Res. Microbiol.* 151, 91-95.
25. Rani, D.S and K. Nand. 2000. Production of thermostable cellulase-free xylanase by *Clostridium absonum* CFR-702. *Process Biochem.* 36, 355-362.
26. Sierra, G. 1957. A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek* 23, 15-22.
27. Thornley, M.J. 1963. Radiation resistance among bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 26, 334-345.
28. Wood, T.M. and V. Garcia-Campayo. 1990. Enzymology of cellulose degradation. *Biodegradation* 1, 147-161.

(Received September 24, 2001/Accepted November 5, 2001)

ABSTRACT : Characteristics of Antifungal Bacterium, *Bacillus subtilis* YS1 and It's Mutant Induced by Gamma Radiation

Young-Keun Lee*, Jae-Sung Kim, In-Geun Song, Hye Young Chung and Hwa-Hyoung Chang¹ (Radioisotope · Radiation Application Team, Korea Atomic Energy Research Institute, Taejon 305-353, Korea, ¹Research Center of Biomedical Resources, Paichai University, Taejon 302-735, Korea)

Antifungal bacterium, *Bacillus subtilis* YS1 was isolated from Yusong hot spring. YS1 strain showed broad antifungal spectrum against 12 kinds of plant pathogenic fungi and *Candida albicans*, animal pathogen. From the gamma (Co^{60}) radiation sensitivity test, D_{10} value was 2.08 kGy and it survived above 20 kGy of radiation dose. Several mutants were induced by gamma radiation. Among them, YS1-1009 mutant showed resistance against tebuconazole of herbicide, increased activity against *Botryosphaeria dothidea* and ligninase activity. YS67 mutant was antifungal deficient auxotrophic mutants($\text{trp}^- \text{pro}^-$ or $\text{arg}^- \text{ura}^-$). From this result, it suggested that gamma irradiation could be a useful method for mutant induction.