

## *Phytophthora infestans*와 *Fusarium oxysporum*의 성장을 저해하는 *Bacillus* 분리균주들의 항진균성 물질 생성능

이강형 · 송흥규\*

강원대학교 자연과학대학 생명과학부

대표적인 식물병원성 곰팡이인 *Phytophthora infestans*와 *Fusarium oxysporum*의 성장을 저해하는 근권세균들을 토양에서 분리하여 동정하였으며 이 균주들이 분비하는 항진균성 물질인 siderophore,  $\beta$ -1,3-glucanase, hydrogen cyanide와 chitinase의 생성능을 조사하였다. 분리균주 중 *Bacillus* sp. RFO41은 *F. oxysporum*의 성장을 가장 효율적으로 억제하였으며, siderophore 생성능과  $\beta$ -1,3-glucanase의 활성이 가장 우수하였다. 또 다른 분리균주인 *Bacillus* sp. PS2는 *P. infestans*의 성장을 가장 많이 억제하였으며, chitinase 활성과 hydrogen cyanide 생성능이 가장 우수하였다. *F. oxysporum*과 *P. infestans*에 대한 항진균 효과는 근권세균이 생산하는 siderophore,  $\beta$ -1,3-glucanase, hydrogen cyanide와 chitinase의 활성에 따라 차이가 있음을 알 수 있었다.

**Key words** □ antifungal substances, plant pathogenic fungi, rhizobacteria

*Phytophthora infestans*와 *Fusarium oxysporum*은 토마토, 딸기, 감자 등 유용작물에 각각 역병(late blight)과 시들음병(wilt)을 유발하는 식물병원성 곰팡이 종류에 속한다(8). *P. infestans*와 *F. oxysporum*에 감염된 식물은 줄기와 잎이 갈색으로 변하며, 점점 시들어서 말라 죽는 증상이 나타난다. 이러한 증상은 보통 온실에서 많이 발생하는데, 그 원인은 높은 토양 온도(22~24°C)와 낮은 수분 포텐셜에 있다고 알려져 있다(11). 이와 같은 병원성 곰팡이의 성장을 억제하기 위해 관행농법에서는 여러 화학농약을 사용하지만, 최근 점차 증가하고 있는 친환경 농법에서는 미생물제 또는 그들이 생산하는 다양한 항진균성 물질을 처리하고 있다(19).

식물의 근권에 존재하는 토양세균들 중 일부는 곰팡이, 세균, 그리고 바이러스성 병원체에 대한 생물학적 방제능력을 갖고 있는 것으로 알려져 있는데 Fe(III)와 특이적으로 결합하여 식물병원성 곰팡이의 포자발아를 억제시키는 siderophore의 생산, 곰팡이의 성장을 저해시키는 항생물질과 작은 분자량을 가진 다양한 물질의 합성, 병원체를 저해하는 다양한 효소의 생산, 그리고 식물체 내에서 전반적인 저항성을 유도하는 등 다양한 기작을 통해 병원성 곰팡이로부터 식물을 보호할 수 있다(17). 또한 항진균성 근권세균은 식물생장 촉진을 유도할 수 있어 유용 작물의 생산성과 품질을 향상시킬 수 있다.

최근까지 알려져 있는 근권세균의 식물병원성 곰팡이에 대한 효과를 나타낸 연구를 보면, *Serratia plymuthica* IC14는 세포의 효소의 분비를 통해 *Botrytis cinerea*의 성장을 저해하며(15),  $\beta$ -

1,3-glucanase를 생산하는 *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908를 *Colletotrichum lagenarium*의 생장 조절에 적용시킨 연구결과도 있다(9). 또한 각점병을 유발하는 *Bipolaris sorokiniana*의 성장을 억제하기 위해 chitinase를 생산하는 *Stenotrophomonas maltophilia*를 이용한 보고가 있다(23). *Pseudomonas fluorescens*가 생합성하는 salicylic acid는 식물의 줄기, 뿌리 등에 존재하여 대상 식물의 전반적인 저항성을 증가시킬 수 있도록 유도한다고 알려져 있다(12). 이 밖에도 hydrogen cyanide, cellulase 및 protease 등에 의한 특정 식물병원성 곰팡이의 성장을 저해할 수 있는 항진균성 효과를 가진 근권세균에 대한 연구는 다양하다. 그러나 이들 연구는 근권세균이 생성하는 하나의 항진균성 물질을 대상으로 하고 있으며, 보다 넓은 범위에서 근권세균이 다양한 항진균성 물질을 생성할 수 있다는 연구는 부족한 실정이다.

본 연구에서는 *P. infestans*와 *F. oxysporum*의 성장을 저해하는 세균을 식물의 근권으로부터 분리하고, 각각의 분리 균주가 가지고 있는 다양한 항진균성 물질의 생성능을 조사하여 친환경적 미생물 농약으로서의 이용 가능성에 대한 기초 자료를 확보하고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 항진균성 효과를 나타내는 근권세균의 분리

다양한 근권으로부터 채취한 토양 시료 1 g을 0.9% saline 용액 9 ml에 넣고 30분간 150 rpm에서 교반한 상등액을 연속 희석하여 potato dextrose agar (PDA)에 도말할 시료로 준비하였다. 강원대학교 농업생명과학대학 식물병리학실험실에서 분양받은 *P. infestans*와 *F. oxysporum*을 Potato Dextrose Broth (PDB) 액체배지에 배양한 뒤, 이 배양액을 homogenizer로 3분간 균질화하여

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 82-33-250-8545, Fax: 82-33-251-3990  
E-mail: hgsong@kangwon.ac.kr

연속희석하고 이를 PDA에 일정량 도달한 다음, 토양 시료의 연속 희석액을 그 위에 다시 도달한다. 이와 같은 방법을 통해 식물병원성 곰팡이의 성장을 저해하는 토양 내 근권세균 4종류를 분리하였으며, 이를 PS2, PS4, RFO41, RFO42라 명명하였다. 한편 분리균주의 항진균성 물질 생성능과 항진균성 효과를 비교하기 위하여 *P. infestans*와 *F. oxysporum*의 성장을 억제하지 못하는 균주 PS5도 선별하였다.

### 분리균주의 동정

식물병원성 곰팡이의 성장을 억제하는 분리균주의 분류학적 위치를 확인하기 위해 형태학적 특징을 관찰하였고, 16S rDNA를 증폭하여 (주)솔젠트에 의뢰하여 염기서열 분석을 실시하였다. PCR primer는 universal primer 27F; 5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'와 1492R; 5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3'를 사용하였고, 16S rDNA sequencing에서 얻은 약 1,000 내지 1,300 bp의 염기서열을 Ribosomal Database Project의 sequence match program으로 분석하여 16S rDNA의 상동성을 비교하였다(13).

### 분리균주의 항진균성 물질 생성능

#### Siderophore

분리균주를 King's medium B (protease peptone 20 g, glycerol 10 ml,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.5 g, pH 7.2) 40 ml에서 48시간 동안 배양한다. 정성분석을 위해 배양액을 12,000×g에서 15분간 원심분리한 뒤, 상등액 0.5 ml과 chrom azurol S (CAS) reagent (10 mM hexadecyltrimethylammonium 6 ml, 1 mM  $\text{Fe}_2\text{Cl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1.5 ml, 2 mM CAS solution 7.5 ml, piperazine-N,N'-bis[2-ethanesulfonic acid] 4.3 g, 12 M HCl 6.25 ml을 혼합한 뒤 최종 부피가 1,000 ml이 되도록 증류수를 첨가) 0.5 ml을 20분 동안 반응시키고, 침전물이 나타나기 때문에 10,000×g에서 5분간 원심분리하여 400 nm에서 흡광도를 측정하였다(3, 18).

정량분석을 위해 배양 상등액의 pH를 2.9로 보정한 뒤, 상등액과 동량의 ethyl acetate로 추출하였다. 추출 용액을 50 ml conical tube에 나누어 담고 원심분리(3,000×g, 30 min)한 뒤 상층의 ethyl acetate 5 ml과 Hathway 반응용액(0.1 M의 HCl을 이용하여 만든 0.1 M의  $\text{FeCl}_3$  용액 1 ml과 0.1 M의 potassium ferricyanide 1 ml을 증류수 100 ml에 첨가) 5 ml과 반응, 20분 후에 700 nm에서 흡광도를 측정한 값을 dihydroxy benzoic acid를 이용하여 얻은 표준곡선에 대입하여 정량하였다(16).

#### Hydrogen cyanide

분리균주를 Tryptone Soy Broth (TSB) 40 ml에 접종하여 30 °C에서 4일간 배양하였다. 10×0.5 cm의 여과지(Whatman No. 3)를 10% alkaline picrate 용액에 적신 뒤 24시간 동안 상온에서 건조시키고, TSB에 매달아서 48시간 동안 배양하였다. 색이 변한 여과지를 꺼내서 새로운 conical tube에 넣고, 증류수 10 ml을 첨가하여 10분간 200 rpm에서 교반한 뒤, 원심분리하고 상등액의 흡광도를 625 nm에서 측정하였다.

#### β-1,3-Glucanase activity

분리균주를 0.2% laminarin-peptone 액체 배지(glucose 5 g, peptone

5 g, laminarin 2 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g, NaCl 5 g, 증류수 1 L)에 접종하여 30°C에서 4일간 배양한다. 분리균주의 배양액을 20분간 원심분리(12,000×g, 4°C)한 뒤, 상등액 0.25 ml과 1 mM phosphate buffer (pH 5.5) 0.3 ml, 그리고 0.2% laminarin 0.5 ml을 각각 혼합하여 40°C의 항온수조에서 2시간동안 반응시킨 후, dinitrosalicylic acid (DNS) method를 이용하여 laminarin이 분해되어 생성된 glucose의 양을 정량하였다. 또한 Bradford method를 이용하여 시료의 단백질량을 정량하였다(14).

#### Chitinase activity

분리균주를 0.2% chitin-peptone medium (glucose 5 g, peptone 5 g, colloidal chitin 2 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g, NaCl 5 g, 증류수 1 L)에 접종하여 30°C에서 배양한다. 분리균주의 배양액을 12,000×g, 4°C에서 20분간 원심분리한 뒤, 희석한 상등액 0.25 ml과 1 mM sodium phosphate buffer (pH 5.3) 0.3 ml, 그리고 0.1% colloidal chitin 0.5 ml을 각각 혼합하여 50°C에서 4시간동안 반응시키고, DNS method를 이용하여 chitin이 분해되어 생성된 glucose의 양을 정량하였다.

#### 병원성 곰팡이의 성장 저해능 조사

*P. infestans*와 *F. oxysporum*을 Potato Dextrose Broth (PDB) 배지에 접종하여 30°C에서 7일간 배양한다. homogenizer를 이용하여 배양체를 균질화하고 PDA 고체 배지에 5 ml을 접종하여 도달한 뒤, 7일간 선배양한다. 고체 배지에서 자란 *P. infestans*와 *F. oxysporum*을 10×10 mm의 크기로 절단하여 새로운 PDA 배지에 접종한다. 접종물을 기준으로 일정한 거리에 분리균주의 선배양액을 희석 접종하고 이것을 7일간 배양한 뒤, 분리균주에 의한 *P. infestans*와 *F. oxysporum*의 성장 저해능을 거리로 측정한다.

동량의 *P. infestans*와 *F. oxysporum*을 250 ml의 PDB 배지에 접종한 뒤, 분리균주의 선배양액을 각각  $1 \times 10^7$  cells/ml이 되도록 2.5 ml을 접종하여 7일간 배양한 뒤, 배양액으로부터 원심분리를 이용, *P. infestans*와 *F. oxysporum*의 균사체를 회수하여 건조중량을 측정, 분리균주의 접종에 의한 병원성 곰팡이의 성장 저해능을 조사하였다.

## 결과 및 고찰

### 분리균주의 동정

분리균주는 모두 그람 양성이며, 간균의 형태를 갖고 있었으며 16S rDNA를 증폭, 염기서열을 분석한 결과, PS2, PS4, PS5, RFO41과 RFO42 모두 *Bacillus subtilis* gcT (GenBank accession no.: AY913755)와 평균 99.69% 이상의 상동성을 나타냈다(결과 미제시). 보다 정확한 동정을 위해서는 각종 분자생물학적 및 생화학적 조사가 요구되며 본 연구에서는 이들 균주를 *Bacillus* sp. 균주번호로 표시하였다.

### 항진균성 물질 생성

다양한 항진균성 물질 가운데 먼저 siderophore의 생성능을 측정하였다. 본 연구에서 분리한 단일균주 5종은 모두 King's B 배지에서 siderophore를 생산하였으며, 그 중 *Bacillus* sp. PS5 이외

의 다른 4가지 균주들은 40  $\mu\text{M/ml}$  내외의 siderophore를 생산하였다(Fig. 1). Siderophore 중 catechol 계열의 siderophore 생산성은 RFO41 균주가 48시간에 최대 24.2  $\mu\text{M/ml}$ 을 나타냈으며, 이것은 PS5보다 약 4배 정도 높은 생산성을 나타내고 있다(Fig. 2). 그러나 이 결과는 David 등(2002)의 연구에서 배양액에 Fe-EDTA를 처리 후 *Pseudomonas mondocina*가 약 6 mM/L의 siderophore를 생성한 결과에 비해 매우 낮은 수준의 생산성을 보였다. 이는 균주 배양에 필요한 배지 내 Fe(III)의 농도에 따라 siderophore의 생성능에 차이가 있음을 조사한 보고(4)와 일치하며, 본 연구에서 이용한 배지에 Fe(III)를 첨가한다면, 더 많은 양의 siderophore의 생성을 유도할 수 있으리라 사료된다. Siderophore는 구조상 hydroxamate와 catechol 종류로 분류할 수 있으며, catechol 구조의 siderophore가 항진균성 효과를 나타내는 주된 물질로 알려져 있다. 이 종류에 포함된 또 다른 siderophore로는 *Pseudomonas* sp가 생산하는 pyrochelone, pseudobactins과 pyoverdines이 있으며, 식물의 병원체의 성장을 저해시키는 siderophore-positive 균주들이 이미 농업 환경에서 미생물 농약으로서의 역할을 수행하고 있다(21).

HCN은 식물병원성 곰팡이의 균사 성장 및 생존을 저해하는데 분리균주의 HCN 생성능 조사 결과 생성능이 가장 낮은 균주는

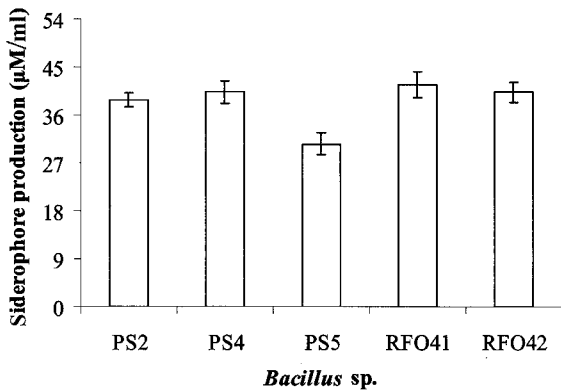


Fig. 1. Siderophore production by *Bacillus* isolates after 4 days of incubation in King's B medium.

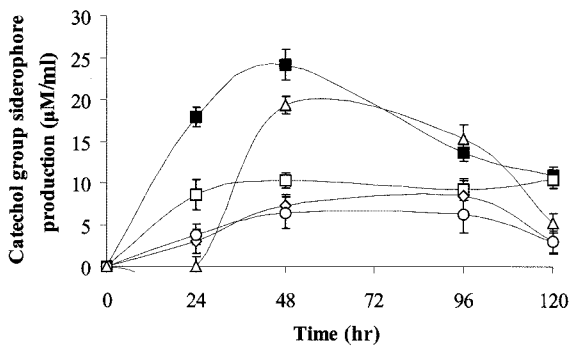


Fig. 2. Production of catechol group siderophore by *Bacillus* isolates in King's B medium. Symbols: (■) PS2, (◇) PS4, (○) PS5, (△) RFO41, (□) RFO42

Table 1. Quantitative assay of hydrogen cyanide production by isolated bacteria.

Isolates	Qualitative assay	Absorbance at 625 nm <sup>a</sup> (1 unit=0.001)
PS2	++	17±3
PS4	+	3±2
PS5	+	3±1
RFO41	++++	71±4
RFO42	+	7±3

<sup>a</sup> Data represent mean of four replications

*Bacillus* sp. PS5, 가장 높은 균주는 RFO41이었으며, 낮은 생성능을 보인 PS5의 HCN 생성능에 대해 상대적으로 비교한 결과를 Table 1의 qualitative assay로 나타내었다. 또한 분리균주가 생성하는 HCN에 의해 노란색의 alkaline picrate 용액이 갈색으로 변하는 정도를 파악하는 HCN의 정량분석을 시도한 결과, 625 nm의 흡광도에서 RFO41 균주가 가장 높은 HCN 생성능을 나타냈다. Meena 등(2001)은 약 10종의 *Pseudomonas fluorescens* (Pf)를 이용하여 HCN의 생성능을 나타내었는데, 가장 높은 HCN 생성능을 나타낸 Pf1 균주의 경우, 흡광도 625 nm에서 7.3 unit의 HCN을 생산하였다. 이와 비교해, 본 연구에서 분리한 *Bacillus* sp. PS2와 RFO41의 HCN 생성능이 매우 높음을 알 수 있다. 그러나 HCN의 경우, 병원성 곰팡이와 기주 식물의 종류에 따라 근권세균이 생산하는 HCN에 의해 생장이 저해되는 정도는 다르기 때문에 좀 더 다양한 기주 식물에 적용하여 지속적으로 연구할 필요가 있다(20). 또한 근권세균에 의한 HCN의 생성능은 glycine의 첨가 유무에 따라 크게 차이가 있는데(10), 이는 HCN이 미생물에 의한 glycine의 대사과정에서 주로 생성되기 때문에 각각의 분리균주에 의한 HCN의 최대 생성능을 조사하기 위해서는 추가로 연구가 진행되어야 할 것이다.

Chitin과  $\beta$ -1,3-glucan은 곰팡이의 세포벽의 주성분으로 이를 분해할 수 있는 chitinase와  $\beta$ -1,3-glucanase는 항진균성 효과를 나타낼 수 있다. 본 연구에서 분리균주는 모두  $\beta$ -1,3-glucanase의 생성능을 갖지만, 그 활성은 큰 차이를 나타내었다. 분리균주 PS2는 319.1  $\mu\text{M glucose min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ 의  $\beta$ -1,3-glucanase 생성능을 나타내는데 비해 PS5는 102.4  $\mu\text{M glucose min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ 의 생성능을

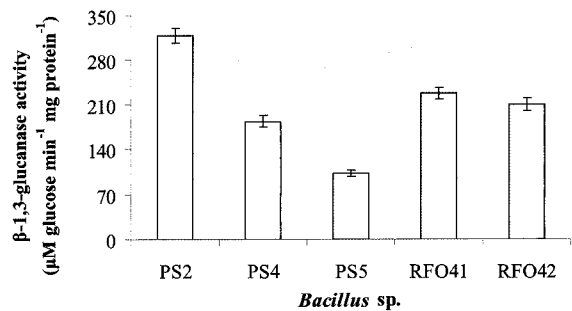


Fig. 3. Specific activity of  $\beta$ -1,3-glucanase of *Bacillus* isolates after 4-day incubation in 0.2% laminarin-peptone medium.

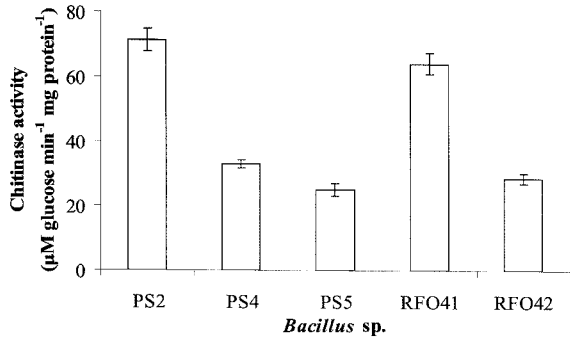


Fig. 4. Chitinase activity of *Bacillus* isolates in liquid culture containing 0.2% colloidal chitin.

보였다(Fig. 3). 한편 β-1,3-glucanase 활성 측정법과 유사한 방법으로 chitinase 활성을 측정한 결과 PS2와 RFO41은 동량의 colloidal chitin을 처리하였을 때 각각 71.2와 64.3 µM min<sup>-1</sup> mg protein<sup>-1</sup>의 glucose를 생성하였으며, PS5는 앞의 두 균주에 비해 약 2 내지 3배의 낮은 생성능을 나타냈다(Fig. 4).

RFO41의 세포외효소 활성은 Nagarajkumar 등(2004)이 연구한 *Pseudomonas fluorescens* MDU2의 β-1,3-glucanase 활성보다 50% 정도 더 높았으며, chitinase의 경우는 유사한 활성을 보였다(16). *Serratia plymthicar*가 생산하는 chitinase는 *Botrytis cinerea*의 포자 발아와 발아된 포자의 신장(생장 초기)을 억제할 수 있으며(5), *Bacillus cepacia*에 의한 β-1,3-glucanase는 chitinase보다 더 다양한 종류의 식물병원성 곰팡이(*Rhizoctonia solani*,

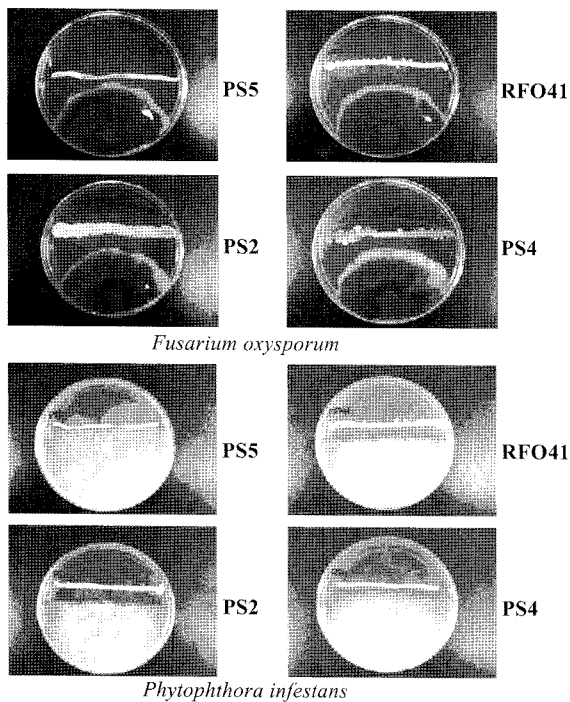


Fig. 5. Growth inhibition of *F. oxysporum* (upper stream) and *P. infestans* (lower stream) by *Bacillus* isolates in pairing culture on potato dextrose agar medium after 3 days of incubation.

*Sclerotium rolfsii*와 *Pythium ultimum*)의 세포벽을 파괴하여 생장을 억제시킬 수 있다(6). 또한 Inbar와 Chet (1991)은 chitinolytic enzyme를 분비하는 *Aeromonas caviae*를 분리하여 *R. solani*, *F. oxysporum* 등의 병원성 곰팡이에 의한 식물의 감염 정도를 감소시킨 연구 결과가 있다(7).

병원성 곰팡이의 생장 저해능 조사

PDA 배지에서 분리균주에 의한 식물병원성 곰팡이의 생장 저해를 조사하였는데 분리균주 *Bacillus* sp. PS5는 *P. infestans*의 생장을 거의 저해하지 못하였으며, PS2와 RFO41은 PS5에 비해 월등히 높은 항진균성 효과를 나타냈다(Fig. 5). *F. oxysporum*에 대한 실험 결과 또한 PS5는 병원성 곰팡이의 생장을 저해하지 못한 반면에 PS2, 특히 RFO41은 앞의 두 균주보다 우수한 생장 저해 효과를 나타내었다.

분리균주의 접종에 의한 병원성 곰팡이의 생장 저해정도를 PDB 배지에서 정량한 결과 PS5는 *P. infestans*와 *F. oxysporum*의 생장을 전혀 억제하지 못하였으며, RFO41은 *P. infestans*와 *F. oxysporum*의 생장을 21.6%와 45.8% 저해하였고, PS2는 30.4%와 16.5%의 건조중량을 감소시킨 결과를 나타냈다(Fig. 6). 그리고 PS4의 경우, Fig. 6에서와 같이 *P. infestans*와 *F. oxysporum*의 생장을 억제하는 것으로 나타났으나 비교균주인 PS5는 *P. infestans*의 생장을 거의 저해하지 못하였는데 PS4에 비해 항진균성 물질의 생성능이 낮기 때문인 것으로 추정되며(Fig. 1, 3, 4), 또 다른 항진균성 물질(cellulase, salicylic acid 등)의 작용도 예상할 수 있으므로 추가적인 항진균성 물질에 대한 연구를 수행해야 할 것이다.

한 등(1999)은 항진균성 방선균인 *Promicromonospora* sp. KH-28를 접종하여 각종 식물병원균에 대한 저해력의 차이를 조사하였으며, 특히 *F. oxysporum*의 생장 저해율은 약 74%로 높게 나타났다고 보고하였다. 이는 항진균성 물질 가운데 chitinase를 순수 분리, 정제하여 농축하고 이를 대상 식물병원성 곰팡이에 처리한 결과로서 본 연구에서 조사한 각각의 항진균성 물질 또한 추출, 정제 및 농축과정을 거쳐 처리한다면, 더욱 긍정적인 효과를 나타낼 수 있으리라 예상된다(2). 또한 식물병원성 곰팡

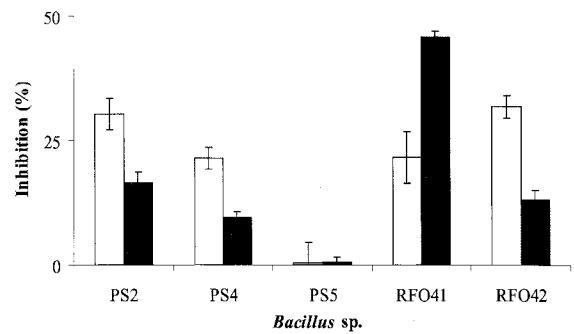


Fig. 6. Growth inhibition of *P. infestans* (open bar) and *F. oxysporum* (closed bar) by *Bacillus* isolates after 7 days of co-incubation in PDB medium.

이에 대한 길항작용이 있는 *B. subtilis* KMU-13을 이용하여 *Botrytis* sp., *Colletotrichum* sp., *Diacyrella* sp., *Monosporascus* sp. 등 다양한 작물 병원성 곰팡이를 대상으로 항진균성 효과를 나타낸 보고(1)를 통해서, 본 연구의 분리균주 또한 *P. infestans*와 *F. oxysporum* 이외의 병원성 곰팡이에 대한 길항작용을 나타낼 것이라고 판단할 수 있다.

본 연구 결과 식물병원성 곰팡이에 대한 미생물제제로 *Bacillus* 분리균주 중 PS2, RFO41에 대한 이용 가능성을 파악할 수 있었다. 분리균주들이 생산하는 항진균성 물질에 의한 *P. infestans*와 *F. oxysporum*의 생장 저해는 각 분리균주가 항진균성 물질을 생산할 수 있도록 배양 조건 등을 유도한 결과였다. 실제 농업 환경과 같이 여러 환경요인이 작용하고 있는 현장 조건에 의해 근권세균의 항진균성 물질의 생성능, 적용 균주의 개체군 및 활성 유지 등과 같은 요인이 제한을 받기 때문에 분리균주의 활성 및 개체수 변화와 항진균성 물질의 생성능에 대한 변화 양상 등을 지속적으로 관찰해야 할 것이며, pot test와 같이 식물 병원성 곰팡이의 외부 유출(포자 확산에 의한 기타 식물의 감염)을 조절할 수 있는 제한된 조건에서 다양한 기주 식물을 대상으로 접종 균주에 의한 병원성 곰팡이의 항진균성 효과를 입증해야 할 것이다. 또한, 식물 병원성 곰팡이의 생장을 저해할 수 있는 항진균성 물질은 본 연구에서 조사한 물질 이외에도 cellulase, salicylic acid 등이 있으므로(20), 이와 같은 항진균성 물질의 생성능을 추가적으로 조사하여 그 활성을 각각 파악할 필요가 있다.

## 감사의 말

본 연구는 환경부 Eco-STAR Project의 수생태복원사업 지원으로 수행되었습니다.

## 참고문헌

1. 박성민, 이준석, 박치덕, 이정훈, 정혁준, 유대식. 2006. 검은별무늬병균 *Cladospodium cucumerium* 40576에 대한 길항균주 *Bacillus subtilis* KMU-13의 선발 및 항진균 활성. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* 21, 42-48.
2. 한길환, 이창은, 김상달. 1999. 항진균성 방선균 *Promocromonospora* sp. HK-28이 생산하는 chitinase와 항생물질에 의한 시드름병균 *F. oxysporum*의 생육억제. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27, 349-353.
3. Bernhaed, S. and J.B. Neilands. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophore. *Anal. Biochem.* 160, 47-56.
4. David, A.M., A.M. Patricia, E.H. Larry, and H.F. Jennifer. 2002. Siderophore production by an aerobic *Pseudomonas mendocina* bacterium in the presence of kaolinite. *Chem. Geol.* 188, 161-170.
5. Frankowski, J., M. Lorito, F. Scala, R. Schmidt, G. Berg, and H. Bahl. 2001. Purification and properties of two chitinolytic enzymes of *Serratia plymuthica* HRO-C48. *Arch. Microbiol.* 176, 421-426.
6. Fridlender, M., J. Inbar, and I. Chet. 1993. Biological control of soilborne plant pathogens by a  $\beta$ -1,3-glucanase-producing *Pseudomonas cepacia*. *Soil Biol. Biochem.* 25, 1211-1221.
7. Inbar, J. and I. Chet. 1991. Evidence that chitinase produced by *Aeromonas caviae* is involved in the biological control of soil-borne plant pathogens by this bacteria. *Soil Biol. Biochem.* 23, 973-978.
8. Kim, K.J., S.H. Eom, S.P. Lee, H.S. Jung, S. Kamoun, and Y.S. Lee. 2005. A genetic marker associated with the A1 mating type locus in *Phytophthora infestans*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 15, 502-509.
9. Kim, P.I. and K.Ch. Chung. 2004. Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908. *Microbiol. Lett.* 234, 177-183.
10. Kremer, R.J. and S. Thouraya. 2001. Cyanide production by rhizobacteria and potential for suppression of weed seedling growth. *Curr. Microbiol.* 43, 182-186.
11. Leeman, M., J.A. Van Pelt, M.J. Hendrickx, R.J. Scheffer, P.A.H.M. Bakker, and B. Schippers. 1995. Biocontrol of Fusarium wilt of radish in commercial greenhouse trials by seed treatment with *Pseudomonas fluorescens* WCS374. *Phytopathol.* 85, 1301-1305.
12. Maurhofer, M., C. Reimann, P.S. Sacherer, S. Heeb, D. Haas, and G. Defago. 1998. Salicylic acid biosynthetic genes expressed in *Pseudomonas fluorescens* strain P3 improve the induction of systemic resistance in tobacco against tobacco necrosis virus. *Phytopathol.* 88, 678-684.
13. Maidak, B.L. J.R. Cole, C.T. Parker, Jr., G.M. Garrity, N. Larsen, B. Li, T.G. Lilburn, M.J. McCaughey, G.J. Olsen, R. Overbeek, S. Pramanik, T.M. Schmidt, J.M. Tiedje, and C.R. Woese. 1997. A new version of the RDP (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res.* 27, 171-173.
14. Meena, B., T. Marimuthu, P. Vidhyasekaran, and R. Velazhahan. 2001. Biological control of root rot of groundnut with antagonistic *Pseudomonas fluorescens* strains. *J. Plant Dis. Protect.* 208, 369-381.
15. Merav, K., O. Matianna, C. Ilan, and C. Leonid. 2003. Soil-borne strain IC14 of *Serratia plymuthica* with multiple mechanism of antifungal activity provides biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* disease. *Soil Biol. Biochem.* 35, 323-331.
16. Nagarajkumar, M., R. Bhaskaran, and R. Velazhahan. 2004. Involvement of secondary metabolites and extracellular lytic enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* in inhibition of *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen. *Microbiol. Res.* 159, 73-81.
17. Niranjana, S.R., H.S. Shetty, and M.S. Reddy. 2005. Plant growth promoting rhizobacteria: Potential green alternative for plant productivity, p. 197. In Z.A. Siddiqui (ed.), PGPR: Biological and Biofertilization. Springer, Dordrecht, Netherlands.
18. Raaska, L., L. Viikari, and T.M. Sandholm. 1993. Detection of siderophores in growing cultures of *Pseudomonas* spp.. *J. Indust. Microbiol.* 11, 181-186.
19. Welbaum, G., A.V. Struz, Z. Dong, and J. Nowak. 2004. Fertilizing soil microorganisms to improve productivity of agroecosystems. *Crit. Rev. Plant Sci.* 23, 175-193.
20. Weststeyn, W.A. 1990. Fluorescent pseudomonads strain E11-2 as biological agent for *Pythium* root rot in tulip. *Neth. J. Plant Pathol.* 96, 272-272.
21. Xu, G.W. and D.C. Gross. 1986. Selection of fluorescent pseudomonads antagonistic to *Erwinia carotocora* and suppressive of potato seed piece decay. *Phytopathol.* 76, 414-422.
22. Zhang, S., A.L. Moyne, M.S. Reddy, and J.W. Kloepper. 2002. The role of salicylic acid in induced systemic resistance elicited by

plant growth-promoting rhizobacteria against blue mold of tobacco. *Biological Control* 25, 288-296.

23. Zhang, Z. and G.Y. Yuen. 1999. The role of chitinase production by *Stenotrophomonas maltophilia* strain C3 in biological control of

*Bipolaris sorokiniana*. *Phytopathol.* 90, 384-389.

(Received September 8, 2008/Accepted September 26, 2008)

---

**ABSTRACT : Production of Antifungal Materials by *Bacillus* sp. Which Inhibit Growth of *Phytophthora infestans* and *Fusarium oxysporum***

**Kang-Hyeong Lee and Hong-Gyu Song\*** (Division of Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Republic of Korea)

Late blight, one of the most important disease in many agricultural crops, is caused by *Phytophthora infestans*. Fusarium wilt is a vascular disease of many plants caused by *Fusarium oxysporum*. Some bacteria isolated from rhizosphere were screened for their ability to inhibit the growth of *F. oxysporum* and *P. infestans*. Productions of siderophore,  $\beta$ -1,3-glucanase, hydrogen cyanide and chitinase by 4 isolated strains were examined. Among them, *Bacillus* sp. RFO41 most effectively inhibited the growth of *F. oxysporum*. The highest productions of siderophore and  $\beta$ -1,3-glucanase were shown in the culture of *Bacillus* sp. RFO41. *Bacillus* strain PS2 was most effective against *P. infestans*. PS2 showed the highest production of chitinase and hydrogen cyanide. A significant relationship was shown between the antagonistic effects of isolates against *F. oxysporum* and *P. infestans* and their production level of siderophore,  $\beta$ -1,3-glucanase, hydrogen cyanide, and chitinase.