

다양한 식물병원성 곰팡이에 항진균 활성을 갖는 길항미생물의 탐색

양희종 · 정수지 · 정성엽 · 정도연*

(재)발효미생물산업진흥원

Screening of Antagonistic Bacteria having Antifungal Activity against Various Phytopathogens

Hee-Jong Yang, Su-Ji Jeong, Seong-Yeop Jeong and Do-Youn Jeong*

Microbial Institute for Fermentation Industry (MIFI), Sunchang 595-804, Korea

ABSTRACT : The aim of this study was to isolate a potential multifunctional biocontrol agent from bacteria for control of multiple plant diseases as an alternative to fungicides. A total of 201 strains were isolated from soil undamaged by repeated cultivation in Sunchang and their ability to produce antibiotics, siderophores and extracellular enzymes such as protease, cellulase and amylase was investigated. Selected strain SCS3 produced cellulose, protease and amylase. This strain also produced siderophores and showed excellent antifungal activity against various phytopathogens. SCS3 was identified as *Bacillus subtilis* using 16S rRNA sequencing, and named *Bacillus subtilis* SCS3. Finally, physiological and biochemical characteristics of *B. subtilis* SCS3 were examined. From the results, *B. subtilis* SCS3 was found to be a useful multifunctional biocontrol agent against various phytopathogens.

KEYWORDS : Antagonistic bacteria, Antifungal activity, *Bacillus subtilis*, Biological control, Phytopathogen

서론

지금까지 농작물의 보호를 위하여 화학농약과 화학비료를 과다 사용하였으나, 최근 소비자의 건강에 대한 관심과 안전한 유기농 식품 및 친환경 농산물에 대한 수요 증가로 인하여 친환경 농업에 대한 관심이 높아지고 있어 환경의 피해가 적은 미생물제제를 이용한 식물병 방제 연구가 다양하게 이루어지고 있다[1]. 특히, 유기합성농약에 대한 저

항성 식물 병들이 발견되었고 화학비료의 과용으로 토양의 산성화와 부영양화로 이어지면서 이로 인한 피해는 현대 농업사회에서 또 다른 문제들로 나타나고 있다. 이런 문제점을 개선하기 위하여 유기합성농약을 대체할 후보 천연물 또는 미생물을 선발 및 적용에 대한 연구가 다양한 방향으로 진행되고 있다[2, 3].

미생물을 이용한 생물학적 방제는 미생물에 의해 식물병을 유발하는 미생물의 성장 및 감염의 조절을 통한 방법[4]과, 비 병원성 미생물을 사용하여 환경적으로 안전하고 식물 면역능을 증가시켜 식물병원균에 대한 내성을 증진하는 방법[5]으로 분류할 수 있다. 식물의 병은 크게 바이러스, 세균 및 진균에 의해서 유발되고 이 중 곰팡이에 의한 식물 병은 농업에 가장 큰 피해를 주고 있어 이를 제어 및 억제하는 방법은 가장 중요한 방법 중 하나로 손꼽히고 있다[6]. 대표적인 식물 병 유발 곰팡이는 *Oomycetes*, *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* 속에 속하는 곰팡이류들이 주를 이루고 있으며, 대부분의 식물 병은 *Ascomycetes* 속에 의해 일어나고 있으나 물곰팡이로 분류되고 있는 *Oomycete* 속의 *Phytophthora* 종과 *Phythium* 종도 일부 식물에서는 큰 피해를 주고 있다[7].

Kor. J. Mycol. 2014 December, 42(4): 333-340
<http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2014.42.4.333>
 pISSN 0253-651X • eISSN 2383-5249
 © The Korean Society of Mycology

*Corresponding author
 E-mail: godfiltss@naver.com

Received November 4, 2014
 Revised December 1, 2014
 Accepted December 9, 2014

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

식물의 뿌리 주변의 토양은 식물의 뿌리가 직접적으로 토양과 접촉하는 영역으로 식물 뿌리와 토양 미생물의 직간접적인 상호작용이 광범위하게 이루어지는 곳으로 다양한 토양 미생물이 서식하고 있다[8]. 특히 근권 미생물은 비근권 미생물에 비해 일반적으로 protein, cellulose, starch, 각종 당류, gelatin 등의 분해 활성과 탈질활성, 호흡활성이 매우 크며, 영양 요구성이 단순하여 glucose, 무기염, 아미노산만을 요구하는 생리적 특성을 지닌 세균이 다수 분포하고 있다[9]. 또한 식물 근권 부위에서 양분과 수분의 흡수를 촉진하여 식물의 뿌리신장에 관여하고, 근권내 다수 존재하는 병원성 유해미생물 및 병해충의 발생을 억제함으로써 작물의 생육을 조절하는 중요한 역할을 수행한다[10]. 이미 국외에서는 근권 미생물 전체를 하나의 집단으로 간주하여 식물의 성장과 미생물의 군집을 연결시키는 군집의 조작을 통하여 식물의 성장을 변화시키는 새로운 연구들이 진행되고 있으며[11, 12], 생물학적 방제의 효과에 대한 다양한 실험 방법으로 연구한 결과 모든 경우에서 병 유발 균은 다른 근권내 미생물과 길항 관계에 있음이 규명되었다[13-15].

식물 병에 대한 생물학적 방제제로 많이 사용되고 있는 *Bacillus* 속 균주는 식물의 성장에 도움을 주는 plant growth promoting rhizobacteria (PGPR)로 사람에게 비병원성이며, 내성 포자를 지닌 gram 양성 세균으로 유전자 조작이 가능하고 배양이 용이한 특성을 지니고 있다[16]. 또한, 식물 병원균에 대한 항진균 활성을 갖는 항생물질 및 효소를 생산하고[17], 항생물질과 중금속에 대하여 내성을 가지는 유용한 세균으로 알려져 있다[18]. *B. thuringiensis*, *B. licheniformis*, *B. brevis*, *B. cereus*, *B. subtilis* 등이 방제제로 주로 이용되고 있으며, 특히 *B. subtilis*는 특성이 가장 잘 규명된 rhizobacterium으로 화학 농약을 대체할 생물학적 방제제의 가장 중요한 미생물로 주목 받고 있으며[19], 이미 다양한 생물 방제제로 시판되고 있다. 이와 관련된 연구로는 *B. subtilis* S1-0210을 이용한 *Botrytis cinerea*의 균사 생육 억제활성[20], *B. subtilis* S54 균주를 이용한 고추 역병과 탄저병의 생물학적 방제 효과[21], *B. subtilis* R2-1 균주를 이용한 고추 흰가루병 방제 효과[22], 벼 도열병균(*Pyricularia oryzae*) 및 벼 잎진무늬마름병균(*Rhizoctonia solani*)에 대한 억제효과를 보이는 *B. subtilis* SJ-2의 특성[23] 등 *B. subtilis*를 이용한 다양한 방제제에 관한 연구가 보고되었다.

따라서 본 연구에서는 연작피해가 없는 순창군 내 토양으로부터 다양한 식물 병원성 곰팡이에 길항능력을 갖는 미생물을 1차 분리하고, 이들의 다양한 효소 생성능 및 siderophore 생성능 등 분석을 통하여 우수 미생물을 선별하고, 선별 분리주의 특성분석을 통하여 식물병원성 곰팡이의 방제에 사용 가능한 새로운 국내 토종 미생물을 탐색하고자 하였다.

재료 및 방법

미생물의 분리 및 배양

다양한 미생물의 분리를 위하여 연작피해가 없는 순창군 내 논과 밭의 토양 50종과 뿌리 30종을 채집하였고, 채집한 시료는 4°C에 보관하면서 균원 시료로 사용하였다. 채집한 시료는 증류수 9 mL에 각 토양 1 g을 첨가하여 10'까지 희석한 후 200 µL를 취하여 LB (Tryptone 1%, Sodium chloride 1%, Yeast extract 0.5%, Agar 1.5%)에 도말하고 30°C의 배양기에 배양하면서 균을 분리하였다. 분리 미생물은 백금이를 이용하여 LB 평판배지에 희선도말 한 후 30°C에서 2일간 배양하였다. 분리주의 생물활성을 조사하기 위하여 콜로니를 TSB (Tryptone soya broth, OXOID LTD., Hampshire, England) 배지에 접종한 후 30°C에서 2일간 배양한 다음 12,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 균체와 상등액으로 나누어 후 사용하였다.

세포외 효소의 활성능 및 활성범위 검정

분리 균주가 균체외로 방출하는 세포외 효소들 중 cellulase, protease, amylase의 활성 검증을 위하여 well diffusion 방법을 사용하였고, 각각의 효소와 특이적으로 반응할 기질 성분이 포함된 고체평판 선별배지를 사용하였다. 먼저 protease 생산능은 Vermelho 등[24]의 방법을 사용하였으며, skim milk를 기질로 선택하여 2%의 skim milk (Difco™, MI, USA)에 1.5%의 agar를 첨가한 skim milk agar 배지에 각 선별한 균주의 배양 상등액을 0.45 µm membrane filter (Sartorius, Frankfurt, Germany)로 제균한 뒤 100 µL씩을 준비한 well에 분주하였다. 25°C에서 24시간 반응시킨 후 분해능을 저지원(Clear zone)의 직경으로 조사하였다. Cellulase 생산능은 1% carboxymethyl-cellulose (CMC, JUNSEI chemical Co. Ltd., Tokyo, Japan)를 함유한 CMC agar 배지에 각 선별 균주의 배양 상등액을 제균한 후 100 µL씩을 준비한 well에 분주하고 25°C에서 24시간 반응시킨 후 Teather와 Wood의 congo red plate 방법[25]으로 cellulase의 생성능을 확인하였다. 또한, amylase 생산능은 starch를 기질로 사용하여 1%의 soluble starch (JUNSEI chemical Co. Ltd., Tokyo, Japan)를 함유한 starch agar 배지에 각 선별한 균주의 배양 상등액을 제균하고 100 µL씩을 준비한 well에 분주하였다. 25°C에서 24시간 반응시킨 후 lugol solution (Sigma aldrich, MO, USA)으로 염색한 뒤 분해능을 저지원(Clear zone)의 직경으로 조사하였다.

분리균주의 항진균 활성 분석

분리한 균주들의 항진균 활성을 조사하기 위하여 식물 병원성 곰팡이를 대상으로 검정하였다. 식물병원성 곰팡이는 감자 더듬이병(*Streptomyces scabies* KACC 20176), 인삼 근부병(*Pythium ultimum* KACC 40705), 고추 탄저병균

(*Colletotrichum acutatum* KACC 40042), 잭빛곰팡이균 (*Botrytis cinerea* KACC 40573), 인삼 뿌리썩음병균 (*Cylindrocarpum destructans* KACC 41077), 고추 균핵병균 (*Sclerotinia sclerotiorum* KACC 41065), 고추 역병균 (*Phytophthora cactorum* KACC 40166), 인삼 갈록병균 (*Rhizoctonia solani* AG-2-2(IV) KACC 40123), 뿌리썩음병균 (*Fusarium solani* KACC 40384), 인삼 점무늬병균 (*Alternaria panax* KACC 42141) 등으로 총 10 균주를 대상으로 수행하였다. 항진균능의 검정은 Kim 등[26]의 방법에 따라 Potato Dextrose agar (PDA, Difco™) plate를 이용한 well diffusion법을 이용하였으며, 배지에 분리 균주의 상등액 100 µL씩을 well에 분주하고 검정균주를 대치배양하여 균체 주위에 형성된 생육저지대(clear zone)의 크기에 따라 항진균 활성을 측정하였다.

Siderophore 생성능 분석

선별한 균주의 siderophore 활성은 Lee 등[27]의 방법에 따라 Chrome azurol sulfonate (CAS, sigma) assay를 사용하였다. 증류수 50 mL에 CAS 60 mg을 녹이고, 10 mM HCl용액 10 mL에 2.7 mg의 FeCl₃·6H₂O를 녹였다. 72.9 mg의 HDTMA (Hexadecyltrimethylammonium bromide)를 증류수 40 mL에 녹여 빛이 들어가지 않게 하고, 세 용액을 혼합하여 고압멸균 하였다. 다음으로 증류수 750 mL, 10X MM9 salt (10X Minimal Media 9 salt) 100 mL, agar 15 g, PIPES 30.24 g, 10% casamino acid 용액 30 mL, 20% glucose와 NaOH, vitamin 등을 혼합한 용액(pH 6.8)을 고압멸균한 후 50°C로 식힌 뒤 준비해 둔 CAS 염료용액을 거품이 나지 않도록 천천히 첨가하여 plate에 분주해 CAS 평판배지를 준비하였다. 제조한 CAS 평판배지에 배양액 20 µL씩 접종하였으며, 대조구로 LB 배지를 사용하였다. 30°C에서 2일간 배양한 후 orange halo zone 형성 유무를 관찰하여 siderophore 생산 여부를 확인하였다.

분리 균주의 동정

선별 균주의 동정을 위하여 16S rRNA 유전자 분석을 실시하였다. 먼저, 분리 균주의 동정을 위하여 균체를 NB (Nutrient broth, Difco™, MI, USA)에 접종하여 30°C에서 24시간 배양 후 원심분리하여 균체를 회수하였다. 회수한 균체의 DNA는 ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep kit (Zymo Research corp., CA, USA)를 사용하여 추출하였다. 16S rRNA 유전자를 증폭하기 위해서 universal primer인 27F와 1492R을 사용하여, Ki 등[28]의 방법을 따라 PCR 반응을 실시하였다. 증폭된 PCR 산물은 QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN, CA, USA)를 사용하여 정제하였다. 염기서열분석은 Cosmogenetech Co.(Seoul, Korea)에 의뢰하였다. 순수 분리한 분리균의 16S rRNA 염기서열은 Seqman (DNASTAR, Madison, USA) 프로그램을 이용하여 해석하였다. 염기서열은 NCBI database로부터 BLASTN pro-

gram과 EzTaxon-e 서버(<http://www.eztaxon.org>)를 통해서 다운로드 받아 표준 균주들의 16S rRNA 유전자 염기서열들을 얻은 다음 염기 서열들 간의 상호 비교를 위해 Clustal W 2.0 프로그램을 사용하였다. 계통도 분석은 균주들의 16S rRNA 유전자 염기서열들을 정렬하고 MEGA 3.0 프로그램[29]을 사용하여 계통도를 작성하였다. 계통도 작성은 Neighbor-joining 알고리즘[30]을 사용하였고, 1000회 반복으로 bootstrapping을 수행하여 계통도의 견고성을 확인하였다.

분리 균주의 형태학적 및 생리학적 특성 분석

분리균의 형태적 특성을 알아보기 위해서 Gram stain kit(Bio-rad, CA, USA)를 사용하여 제시된 방법에 따라 수행한 뒤 현미경을 이용하여 관찰하였다. 또한 분리 균주의 특성을 알아보기 위하여 형태학 및 생화학적 특성을 검토하여 Bergey's manual of determinative bacteriology[31] 및 Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th[32]에 준하여 분석하였다. 당발효 특성은 API 50CH kit(Biomérieux, Marcy-L'Etoile, France)을 이용하여 분석하였고, 선별 균주가 분비하는 효소의 특성 분석은 API ZYM kit (Biomérieux, Marcy-L'Etoile, France)를 사용하여 관찰하였다.

결과 및 고찰

미생물의 분리

토종 미생물의 분리는 순창군내 연작피해가 없는 논과 밭의 토양 50종 및 30종의 뿌리를 균원 시료로 하여 미생물 분리 배지에서 201종의 미생물을 순수 분리하였다. 분리한 균주는 1차적으로 LB 액체에 접종하여 2일간 배양 후 다음 연구에 이용하였다.

분리균주의 세포외 효소 활성

길항미생물을 이용하여 식물 근부병 등 여러 가지 식물병원성 진균의 생태학적 방제법 중 하나로 chitinase, β-1,3-glucanase, protease, cellulase, amylase, lipase 등 여러 종류의 세포외 효소들에 의한 식물병원성 진균의 생장을 저해하는 방법이 널리 사용되고 있다. 이러한 효소를 생산하는 대표적 미생물로는 *Bacillus* sp.와 *Streptomyces* sp. 등이 알려져 있고, 이들이 분비하는 진균 외벽 가수분해효소는 식물병원균의 세포벽을 분해시키는 용균작용(degradative parasitism)을 수행한다고 보고되고 있다[33,34]. 따라서 본 연구에서는 분리주 201종을 대상으로 protease, cellulase와 amylase 생성능을 조사하였다. 선별한 미생물 201종 중에서 15종의 분리주가 protease, cellulase, amylase를 세포 밖으로 분비하는 것으로 확인되었으며, 특히 SCS3 분리주가 3가지 효소를 모두 분비하며, 활성능 또한 매우 우수한 것으로 확인되었다(Table 1). 식물병원성 곰팡이의 세

Table 1. Extracellular enzyme activities of the isolated strains

Strains	Clear zone diameter (mm)		
	Protease (Neutral pH)	Cellulase	α -Amylase
SCS2	- ^a	-	14.2
SCS3	18.2	15.8	15.0
SCS28	18.8	-	12.4
SCS57	10.0	-	12.8
SCS90	-	12.5	15.0
SCS91	15.0	10.4	14.4
SCS102	14.8	9.4	13.8
SCS155	17.7	-	-
SCS171	12.2	14.4	-
SCS178	10.2	16.4	10.2
SCS181	13.6	18.8	-
SCS183	13.0	-	11.4
SCS189	18.4	-	10.8
SCS192	12.7	12.4	12.1
SCS199	-	12.1	13.4

^a-, No formation of clear zone.

포벽이 cellulose로 구성되어 있음을 감안할 때 이들 균들이 생산하는 cellulase의 작용으로 세포벽의 용균작용이 일어날 수 있고, 이를 통하여 식물병원성 곰팡이의 성장을 저해할 수 있는 다기능적 길항능을 가지고 있음을 확인하였다.

분리균주의 항진균 활성

세포외 효소활성 우수 균주 15종을 대상으로 항진균 활성을 알아보기 위해 식물병원성 곰팡이의 성장저해 여부

를 PDA 배지에 대치 배양을 통한 생육저지대 측정법으로 조사하였다. 선별 분리주 대부분은 10종의 식물병원성 곰팡이에 대하여 항진균 활성을 갖고 있었으며, 그 중 SCS3, SCS91, SCS102, SCS178, SCS192 5종이 다양한 식물병원성 곰팡이에 항진균활성을 갖고 있으면서, 활성능 또한 우수하였다(Table 2). *B. subtilis* AH18[35]은 고추역병균, *B. subtilis* B-4228[36]는 인삼 뿌리썩음병균에 활성을 보였다. 이외에도 다양한 *B. subtilis* 종에 의한 항진균 활성에 대한 연구 결과는 지속적으로 밝혀지고 있으며, 이는 식물 질병을 유발하는 대다수의 곰팡이에 *B. subtilis* 종이 생육 저해 활성을 갖는다는 보고와도 일치하는 결과임을 확인할 수 있다. 특히, 분리주 중 SCS3은 잣빛 곰팡이병을 유발하는 *Botrytis cinerea*, 뿌리썩음병을 유발하는 *Cylindrocarpon destructans*, 균핵병을 유발하는 *Sclerotinia sclerotiorum*, 역병을 유발하는 *Phytophthora cactorum*, 갈록병의 원인균인 *Rhizoctonia solani* 병원성 균주에 대하여 뚜렷한 길항력을 나타내었다. 이는 *B. subtilis*가 상추, 미나리, 포도의 균핵병을 유발하는 *S. sclerotium*에 대하여 10 mm의 저해활성을 보였고[37], *B. subtilis* 이외의 길항미생물 *B. coagulans*[38], *B. amyloliquetaciens*[39] 등의 결과와 비교하여도 우수한 저해 활성을 갖는 것으로 확인하였다. 따라서, 추후 다양한 생물 검정을 통하여 생물적 방제제로서의 가능성을 추가로 확인한다면 식물병원성 곰팡이 방제를 위한 제제로 응용 가능할 것으로 판단된다.

분리균주의 siderophore 생성능

Siderophore는 철 이온 특이 결합물질로서 식물병원균의 생육을 저해하는 길항작용을 수행하면서 동시에 식물이 이용할 수 없는 철을 가용화시켜 식물의 성장에 도움이 되는 것으로 알려져 있다[40]. 따라서 선별한 5종의 분리주를 대

Table 2. Production of siderophore and antifungal inhibitory activity against the phytopathogens by selected strains isolated from soil

Fungi	Clear zone diameter (mm)				
	SCS3	SCS91	SCS102	SCS178	SCS192
<i>Streptomyces scabies</i>	++ ^a	- ^b	+	+++	++
<i>Pythium ultimum</i>	-	++	-	-	++
<i>Colletotrichum acutatum</i>	-	-	-	++	++
<i>Botrytis cinerea</i>	+++	++	++	++	-
<i>Cylindrocarpon destructans</i>	+++	++	++	-	-
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	+++	++	-	-	++
<i>Phytophthora cactorum</i>	+++	++	+	-	-
<i>Rhizoctonia solani</i>	+++	++	+	++	-
<i>Fusarium solani</i> f. sp. pisi	++	++	++	+++	-
<i>Alternaria panax</i>	++	-	+	++	++
Production of siderophore	++	+	++	+	+

^a+, A degree of inhibition of fungal growth by tested strains: +, inhibition zone of 1~10 mm; ++, 11~20 mm; +++, >20 mm.

^b-, No formation of clear zone.

상으로 균체의 siderophore 생성능을 CAS를 사용한 정성적 chromogenic assay로 조사하였다. 선별한 5종의 균주 모두 siderophore 생성능을 보였으며, SCS3과 SCS102 균주는 다른 3종의 균주와 비교하여 더 우수한 생성능을 보였다 (Table 2). 이상의 결과를 바탕으로 하여 세포외 효소활성과 항진균활성, siderophore 생성능 모두에서 가장 우수한 결과를 나타낸 SCS3을 최종 분리 균주로 선정하였다.

분자생물학적 동정

최종 선별한 SCS3 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열 분석 결과를 이용하여 BLAST search 결과 SCS3는 *Bacillus subtilis*로 판명되었고, *Bacillus subtilis* SCS3으로 명명하였다. 또한 염기서열을 이용하여 Eztaxon serve에서 표준 균

주들과 상동성을 검색한 결과 SCS3 균주(1511 bp)는 *B. subtilis* NCDO 1769^T(X60646), *Bacillus licheniformis* DSM 13^T(X68416), *Bacillus pumilus* NCDO 1766^T(X68416) 등과 각각 100%, 99%, 97%의 유사성을 나타냈으며, 16S rRNA 유전자 염기서열을 토대로 하여 phylogenetic tree를 작성하여 Fig. 1에 나타내었다. *Bacillus* 속은 다양한 환경에서 포자를 생성하여 생존할 수 있어 환경에 따라 종 다양성이 매우 큰 세균으로 16S rRNA 염기서열에서 100%의 상동성을 나타내더라도 서로 다른 종으로 분류될 수 있기 때문에 [41] 추가적으로 생리 및 화학적 특성 분석을 수행하였다.

형태학 및 생리학적 특성

Bergey's manual of determinative bacteriology의 방법에

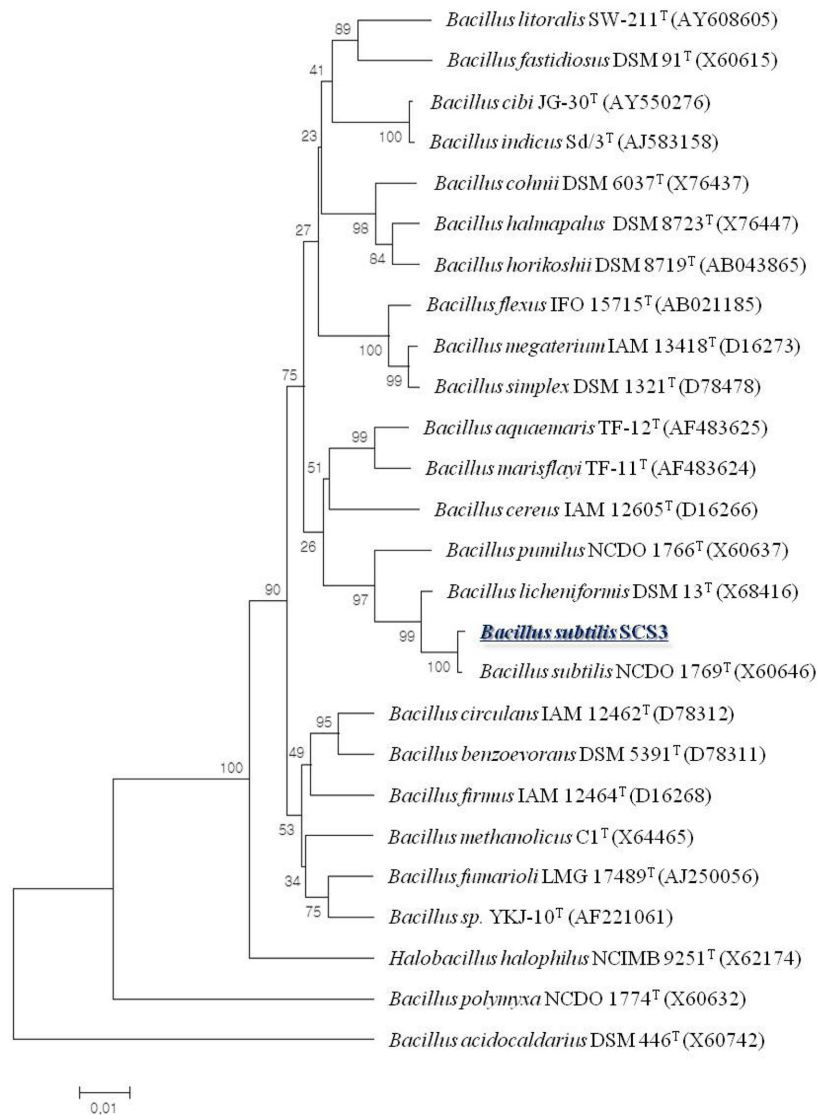


Fig. 1. Phylogenetic tree based on nearly complete 16S rRNA gene sequence of strain SCS3. All the sequences used here were from *Bacillus* type strains. *Bacillus* species and other related bacteria, based on 16S rRNA sequences. GenBank accession numbers are given in parentheses. The branching pattern was generated by the neighbor-joining method. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position. Bootstrap values are expressed as percentages of 1000 replicates.

따라 *B. subtilis* 표준 균주와 형태학 및 생화학적 특성을 비교분석한 결과는 Table 3에 나타내었다. 형태학적 특성에서는 운동성을 제외하고는 큰 차이를 보이지 않았으며, 배양학적 특성은 표준 균주와 동일하게 나타났다. 생화학적 특성은 nitrate reduction에서 차이를 보였고, 또한 lysozyme sensitivity에서는 SCS3 균주가 저항성을 지니는 특성을 보여 앞선 16S rRNA 동정결과에서는 100% *B. subtilis* 와 일치하였지만, 형태생리학적 특성에서는 일부 차이를 보여 표준 균주와는 다른 새로운 종이나 변이종일 가능성

Table 3. Morphological and physiological characteristics of isolated strain SCS3

Morphological Characteristics	SCS3	<i>Bacillus subtilis</i>
Gram staining/shape	+/R ^a	+/R
Motility	+	D ^b
Spores	+	+
Spore shape	X ^c	X
Spore position	U ^d	U
Cultural characteristics	SCS3	<i>Bacillus subtilis</i>
Growth in air	+	+
Growth anaerobically	+	D
Anaerobic growth in glucose broth	-	-
Growth at 45°C	+	+
Growth at 65°C	-	-
Growth at pH 5.7	+	+
Growth in 7% NaCl	+	+
Physiological characteristics	SCS3	<i>Bacillus subtilis</i>
Catalase reaction	+	+
Oxidase reaction	+	D
Urease reaction	-	d ^b
Acid from glucose	+	D
Oxidation/Fermentation test	Fermentation	Fermentation
Utilization of citrate	+	+
Voges-Proskauer test	+	+
Nitrate reduction	-	+
Formation of indole	-	-
Starch hydrolysis	+	+
Gelatin hydrolysis	+	+
Casein hydrolysis	+	+
Lecithovitellin(LV) test	-	-
Lysozyme sensitivity	r ^e	d

^aR, Rod-shaped (*bacillus*).

^bD, Different reactions in different species of the genus; d, Different reactions in different strains.

^cX, spore oval.

^dU, central spore.

^er, resistant.

도 제시하였다. API 50CH kit를 사용하여 분리주 SCS3의 당 대사능을 분석한 결과 Table 4와 같은 결과를 나타내었다. Glycerol, L-Arabinose, D-Ribose, D-glucose, D-Fructose, D-Mannose, Inositol, D-Mannitol, D-Sorbitol 등은 발효할 수 있으나, Erythritol, D-Arabinose, D-Xylose, L-Xylose, D-Adonitol 등에는 비 발효성을 나타내며 *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*로 동정되어 16S rRNA sequencing 결과와 일치하는 결과를 보였다. SCS3 균주가 분비하는 효소의 측정은 API ZYM kit를 이용하여 분석한 결과, alkaline phosphatase, esterase(C4), esterase(C8), leucine arylamidase, β-glucosidase 등의 효소반응에 대해서 양성반응을 보였다. 특히 API 50CH와 ZYM kit에서 cellobiose와 β-glucosidase 활성에 양성반응을 보여 선별한 균주 SCS3은 cellulose를 가수분해하여 glucose로 전환시킬 수 있는

Table 4. Carbohydrates assimilation of *B. subtilis* SCS3 by API 50 CHB kit

Enzyme ^a	SCS3	Enzyme	SCS3
Control	-	Esculin	+
Glycerol	+	Salicin	+
Erythritol	-	D-Cellobiose	+
D-Arabinose	-	D-Maltose	+
L-Arabinose	+	D-Lactose	-
D-Ribose	+	D-Melibiose	-
D-Xylose	-	D-Saccharose	+
L-Xylose	-	D-Trehalose	+
D-Adonitol	-	Inulin	-
β-Methyl-D-xyloside	-	D-Melezitose	-
D-Galactose	-	D-Raffinose	+
D-Glucose	+	Starch	-
D-Fructose	+	Glycogen	-
D-Mannose	+	Xylitol	-
L-Sorbose	-	Gentiobiose	+
L-Rhamnose	-	D-Turanose	-
Dulcitol	-	D-Lyxose	-
Inositol	+	D-Tagatose	-
D-Mannitol	+	D-Fucose	-
D-Sorbitol	+	L-Fucose	-
α-Methyl-D-mannoside	-	D-Arabitol	-
α-Methyl-D-glucosamine	+	L-Arabitol	-
N-Acetyl glucosamine	+	Potassium Gluconate	-
Amygdalin	+	Potassium 2 keto-gluconate	-
Arbutin	+	Potassium 5 keto-gluconate	-

^a+, utilized; -, not utilized.

Table 5. Enzymatic activities of strains *Bacillus subtilis* SCS3 by API ZYM kit

Enzyme ^a	<i>Bacillus subtilis</i> SCS3
Alkaline phosphatase	+
Esterase (C4)	+
Esterase (C8)	+
Lipase (C14)	-
Leucine arylamidase	+
Valine arylamidase	-
Crystine arylamidase	-
Trypsin	-
α-chymotrypsin	-
Acid phosphatase	w
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	w
α-galactosidase	-
β-galactosidase	-
β-glucuronidase	-
α-glucosidase	w
β-glucosidase	+
N-acetyl-β-glucosaminase	-
α-mannosidase	-
α-fucosidase	-

^a+, utilized; -, not utilized; w, weak positive.

효소 활성을 지닌 미생물로 판단되고, 따라서 식물병원성 균주에 대한 진균 외벽 가수분해 효소를 지닌 균주로 생물학적 방제에 유용하게 사용될 것으로 기대된다.

앞선 결과로부터 연관피해가 없는 순창군 토양으로부터 분리한 다수의 분리주 중에서 SCS3은 잣빛 곰팡이병, 뿌리 썩음병, 균핵병, 역병 등의 원인균인 식물병원성 곰팡이에 대하여 강한 길항작용을 나타내는 것을 확인할 수 있었고, 이러한 길항 작용은 siderophore 생성, cellulase, protease 등과 같은 세포외 효소 활성 등에 기인한 것으로 나타났다. 따라서 본 연구를 통해 분리한 *B. subtilis* SCS3은 다양한 병원성 곰팡이에 대하여 길항능력을 지니고 있으며, 이를 기반으로 하는 미생물 제제에 이용 가능성을 파악할 수 있었고, 앞으로 선별한 유산균의 배양 조건 최적화, 미생물 제제 개발을 통한 시험 포장에서의 검정 등과 같은 추가 연구를 수행한다면 새로운 생물학적 방제제로서의 가치가 있음을 확인할 수 있을 것으로 사료된다.

적 요

미생물을 이용한 생물학적 방제제의 개발을 위해 연관 피해가 없는 순창군 토양으로부터 다양한 미생물 201종을 분리하였고, 이들의 생물학적 활성을 조사하였다. 201종의 분리 세균 중에서 다양한 식물병원성 곰팡이에 대하여 항

균활성이 우수한 5종을 선별하였다. 5종의 분리주에 대하여 siderophore를 생산하며 cellulase, protease, amylase와 같은 곰팡이 세포벽 분해효소를 생산하는 능력이 가장 우수한 SCS3 균주를 최종 선별하였다. 최종 선별한 균주 SCS3의 형태학적, 생리학적 및 생화학적 특성을 조사하였고, 16S rRNA 염기서열의 분석에 의해 *B. subtilis* SCS3으로 명명하였으며, 염기서열 분석에 기반하여 계통수를 작성하였다. 이상의 결과로부터 *B. subtilis* SCS3은 식물병원성 곰팡이의 방제를 위한 생물학적 방제제로 유용하게 이용될 수 있을 것으로 생각한다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ009990)의 지원에 의해 이루어진 것입니다.

REFERENCES

- Jang CS, Lim JH, Seo MW, Song JY, Kim HG. Direct detection of *Cylindrocarpon destructans*, root rot pathogen of ginseng by nested PCR from soil samples. *Mycobiology* 2010;38:33-8.
- Kang DW, Ryu IH, Han SS. The isolation of *Bacillus subtilis* KYS-10 with antifungal activity against plant pathogens. *Kor J Pestic Sci* 2012;16:178-86.
- Guo R, Liu X, Li S, Miao Z. In vitro inhibition of fungal root-rot pathogens of *Panax notoginseng* by rhizobacteria. *Plant Pathol J* 2009;25:70-6.
- Heydari A, Misaghi IJ, McCloskey WB. Effect of three soil applied herbicide on populations of plant disease suppressing bacteria in the cotton rhizosphere. *Plant Soil* 1997;195:75-81.
- Schouten A, Van den Berg G, Edel-Hermann V, Steinberg C, Gautheron N, Alabouvette C, De Vos CH, Lemanceau P, Raaijmakers JM. Defense responses of *Fusarium oxysporum* to 2,4-DAPG, a broad spectrum antibiotic produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Mol Plant-Microbe Interact* 2004;17:1201-11.
- Ordentlich, A, Elad Y, Chet I. The role of chitinase of *Serratia marcescens* in biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 1988;78:84-7.
- Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M. *Introductory mycology*. 4th ed. New York: John Wiley & Sons; 2009.
- Dannis PG, Hirsch PR, Smith SJ, Taylor RG, Valsami-Jones E, Miller AJ. Linking rhizoplane pH and bacterial density at the microhabitat scale. *J Microbiol Methods* 2009;76:101-4.
- Yeo SH, Yook YM, Kim HS. Isolation and characterization of plant growth promoting rhizobacterium *Bacillus subtilis* YK-5 from soil. *Kor Soc Biotechnol Bioeng J* 2009;24:334-40.
- Zhang J, Liu J, Meng L, Ma Z, Tang X, Cao Y, Sun L. Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from wheat roots by wheat germ agglutinin labeled with fluorescein isothiocyanate. *J Microbiol* 2012;50:191-8.
- Berendsen RL, Pieterse CM, Bakker PA. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci* 2012;17:478-86.

12. Chaparro JM, Sheflin AM, Manter DK, Vivanco JM. Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility. *Biol Fertil Soils* 2012;48:489-99.
13. Elad Y, Baker R. Influence of trace amounts of cations and siderophore-producing *Pseudomonas* on chlamydiospore germination of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 1985;75:1047-52.
14. Van Dijk K, Nelson EB. Fatty acid competition as a mechanism by which *Enterobacter cloacae* suppresses *Pythium ultimum* sporangium germination and damping-off. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:5340-7.
15. Audenaert K, Pattery T, Cornelis P, Hofte M. Induction of systemic resistance to *Botrytis cinerea* in tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 role of salicylic acid, pyochelin and pyocyanin. *Mol Plant-Microbe Interact* 2002;15:1147-56.
16. Yoon MY, Seo KH, Lee SH, Choi GJ, Jang KS, Choi YH, Cha B, Kim JC. Antifungal activity of benzoic acid from *Bacillus subtilis* GDYA-1 against fungal phytopathogens. *Res Plant Dis* 2012;18:109-16.
17. Glick GR. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can J Microbiol* 1995;41:109-17.
18. Sanjay KS, Vinayak RT, Rakesh KJ, Surendra V, Satyendra KG. An antibiotic heavy metal resistant and halotolerant *Bacillus cereus* SIU1 and its thermoalkaline protease. *Microb Cell Fact* 2010;9:59.
19. Tjalsma H, Antelmann H, Jongbloed JD, Braun PG, Darmon E, Dorenbos R, Dubois JY, Westers H, Zanen G, Quax WJ, Kuipers OP, Bron S, Hacker M, van Dijk JM. Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: separating the "secrets" of the secretome. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004;68:207-33.
20. Thu Hang NT, Oh SO, Kim GH. *Bacillus subtilis* S1-0210 as a biocontrol agent against *Botrytis cinerea* in strawberries. *Plant Pathol J* 2005;21:59-63.
21. Lee GW, Kim MJ, Park JS, Chae JC, Soh BY, Ju JE, Lee KJ. Biological control of *Phytophthora blight* and anthracnose disease in red-pepper using *Bacillus subtilis* S54. *Res Plant Dis* 2011;17:86-9.
22. Kim YK, Hong SJ, Shim CK, Kim MJ, Choi EJ, Lee MH, Park JH, Han EJ, An NH, Jee HJ. Functional analysis of *Bacillus subtilis* isolates and biological control of red pepper powdery mildew using *Bacillus subtilis* R2-1. *Res Plant Dis* 2012;18:201-9.
23. Kim BS, Cho KY. Antifungal effects on plant pathogenic fungi and characteristics of antifungal substances produced by *Bacillus subtilis* SJ-2 isolated from sclerotia of *Rhizoctonia solani*. *Plant Pathol J* 1995;11:165-72.
24. Vermelho AB, Meirelles MNL, Lopes A, Petinate SDG, Chaia AA, Branquinha MH. Detection of extracellular proteases from microorganisms on agar plates. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1996;91:755-60.
25. Teather R, Wood PJ. Use of congo red polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl Environ Microbiol* 1982;43:777-80.
26. Kim MH, Ko HS, Yook YM, Kim HS. Isolation and characterization of microorganism with broad antifungal activity against phytopathogenic fungi. *Kor Soc Biotechnol Bioeng J* 2008;23:219-25.
27. Lee GJ, Han JH, Shin JH, Kim HT, Kim KS. Antifungal activity of *Bacillus* sp. GJ-1 against *Phytophthora capsici*. *Kor J Mycol* 2013;41:112-7.
28. Ki JS, Zhang W, Qian PY. Discovery of marine *Bacillus* species by 16S rRNA and rpoB comparisons and their usefulness for species identification. *J Microbiol Methods* 2009;77:48-57.
29. Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings Bioinf* 2004;5:150-63.
30. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987;4:406-25.
31. Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 2 New York: Wiliilams and Willkins Press; 1984.
32. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Wiliilams ST. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th ed. New York: Wiliilams willkins; 1994.
33. Tominaga Y, Tsujisaka Y. Purification and some prosperities of two chitinase from *Streptomyces sorientalis* which lyse *Phizopus* cell wall. *Agric Biol Chem* 1976;40:2325-33.
34. Watanabe T, Oyanagi W, Suzuki K, Tanaka H. Chitinase system of *Bacillus circulans* WL-12 and importance of chitinase A1 in chitin degradation. *J Bacteriol* 1990;172:4017-22.
35. Kim SD, Woo SM. Structural identification of Siderophore_{AH18} from *Bacillus subtilis* AH18, a biocontrol agent of *Phytophthora* blight disease in red-pepper. *Kor J Microbiol Biotechnol* 2008;36:326-35.
36. Lee BD, Park H. Control effect of *Bacillus subtilis* B-4228 on root rot of panax ginseng. *J Ginseng Res* 2004;28:1-7.
37. Zhang CX, Zhao X, Jing TX, Chida T, Chen H, Shen SH. Phenotypic and biological properties of two antagonist *Bacillus subtilis* strain. *World J Microbiol Biotechnol* 2008;24:1669-79.
38. Katska C, Krystyna T, Anna M. Antifungal activity of *Bacillus coagulans* against *Fusarium* sp.. *Acta Microbiol Pol* 2002;51:275-83.
39. Kim SD, Han OK, Lee ET. Chitinase of multifunctional antagonistic bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* 7079 against phytopathogenic fungi. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 2001;29:142-8.
40. Gerhardt GJ, Kim JC, Jang KS, Nam MH, Lee SW, Kim HT. Biocontrol activity of *Acremonium strictum* BCP against *Botrytis* disease. *Plant Pathol J* 2009;25:165-71.
41. Seki T, Chung CK, Mikami H, Oshima Y. Deoxyribonucleic acid homology and taxonomy of the genus *Bacillus*. *Int J Syst Bacteriol* 1978;28:182-9.