

송이 자실체 기저부 토양으로부터 항균활성을 가지는 KM1-15 균주의 분리 및 분류학적 특성

김윤지¹ · 황경숙^{1,2*}

¹목원대학교 미생물생태자원연구소, ²생명산업학부

송이 자실체 기저부 토양으로부터 분리한 268균주를 대상으로 식물병원성 곰팡이 7균주(*Alternaria panax*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici*, *Pythium ultimum*, *Rizoctonia solani*)에 대해 항균활성을 검토한 결과 인삼점무늬병원균(*Alternaria panax*)과 인삼탄저병원균(*Colletotrichum gloeosporioides*)에 강한 항균활성을 나타내는 KM1-15균주가 선발되었다. KM1-15 균주의 16S rDNA 염기서열(1,311 bp)을 결정하여 계통학적 위치를 검토한 결과, *Bacillus koguryoae*^T (AY904033)와 99.6%의 상동성을 나타내었다. API 50CHE Kit를 사용하여 당 분해능에 대해 *Bacillus koguryoae*^T (AY904033)와 비교·검토한 결과 KM1-15 균주는 L-arabinose, cellobiose, inulin, D-turanose 양성반응을 나타내는 생리학적 특성이 확인되었다. 주요 지방산으로는 15:0 anteiso (35.78%), 17:0 anteiso (17.97%)를 함유하였으며, 13:0 iso 3-OH, 14:0 iso 3-OH, 15:0 iso 3-OH, 그리고 17:0 iso 3-OH와 같은 다양한 분지형 지방산을 함유하는 특성을 나타내었다. 퀴논종으로는 MK-7 (100%)을 가지고, G+C함량은 43.7%를 나타내었다. 또한 protein과 starch에 대한 가수분해능이 탁월하여 KM1-15 균주는 병해충 방제제 및 토양개량제로 매우 유용하게 활용될 것으로 사료된다.

Key words □ antibiotic activity, forest soil, pine mushroom, plant pathogene

송림토양 생태계의 주요 구성원인 송이버섯과 균근에 관한 연구는 활발하게 진행되어온 반면 토양세균군집에 대한 연구는 매우 미흡한 실정이다(19, 23, 25). 공동연구자는 선행연구에서 송이 자생균락 토양으로부터 직접 DNA를 추출하고 16S rDNA-ARDRA (Amplified rDNA Restriction Analysis) 지문분석법을 이용하여 송이 자생균락 토양내 세균군집 구조를 해석한 결과 기존의 배양 방법으로는 분리가 곤란한 난배양성 세균(VBNC; viable but non-culturable) 군집인 Acidobacteria 계통군이 85% 이상 차지하고 있음을 밝힌 바 있다. 또한 송이 자생균락 토양 내 세균수 측정 결과 통상농도의 육즙(NB) 배지보다 희석 육즙 배지(DNB)에서 5~10배 높은 세균수가 측정되어 송이 자생균락 토양에는 저영양성 세균이 다수 존재해 있는 것으로 추정되었다(4).

송이버섯은 다당류 성분인 β -1,4-16-glucans를 91.8% 함유하고 있어 항암 활성능이 다른 버섯과 비교하여 가장 강한 효과를 나타내는 것으로 보고되었다(1). 또한 송이버섯 내에는 독특한 방향성분인 glifolin, coriorin, illudin 등 테트로이드 화합물 및 방향족 화합물이 함유되어 있어 식물병원성 곰팡이인 복숭아 탄저병원균 *Alternaria alternaria*와 인삼 뿌리썩음병원균 *Cylindrocarpon destructans*, 그리고 편도선염을 일으키는 병원성 세균인 *Streptococcus* sp.에 대해 항균 효과가 있는 것으로 보고되었다(6, 7, 11).

본 연구에서는 송이버섯이 자생하고 있는 토양 내에 항균 활

성능이 탁월한 토착 세균군집이 분포해 있을 것으로 추정되어 송이 자실체 기저부 토양으로부터 토착세균을 분리하기 위하여 선행연구에서 나타난 결과를 바탕으로 저영양배지를 이용한 배양법을 통해 토양세균의 순수분리를 시도하였다. 분리된 이들 저영양성 토양세균을 대상으로 농작물의 대표적인 식물병원성 곰팡이(*Alternaria panax*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici*, *Pythium ultimum*, *Rizoctonia solani*)에 대한 항균활성을 검토하고 우수 균주를 선발하여 분류학적 특성을 검토하였다.

재료 및 방법

토양시료의 채취 및 처리

경북 안동시 녹전면 내정리 용두산의 송림 내 송이 자생균락을 조사지로 선정하였다. 용두산 송이 자생균락 내 송이 자실체 기저부 토양으로부터 시료를 채취하고 polyethylene vinyl bag과 bottle에 넣어 실험실로 운반하여 12시간 이내에 실험하였다. 각 토양 시료는 1 g씩 정량하여 99 μ l의 멸균수에 넣고 homogenizer (Ace AM-7, Nikon Seiki Co.)로 15,000 rpm에서 2분간 충분히 분산시킨 다음 9 ml의 멸균수에 순차적으로 희석하여 사용하였다(16).

토양 세균의 분리

토양세균의 배양 배지로 통상농도의 육즙영양배지(Nutrient

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-42-829-7598, Fax: 82-42-829-7599
E-mail: kswhang@mokwon.ac.kr

Broth, NB)를 10^{-2} 배로 희석한(Diluted Nutrient Broth: DNB) 저영양 배지를 사용하였다. 순차적으로 희석한 토양시료 1 ml를 DNB 평판배지에 넣고 혼합 배양하여, 28°C에서 50일 이상 장기간 배양한 후 DNB 평판배지상에 형성된 세균을 순수분리하였다(16).

식물병원균에 대한 항균활성검정

송이 자실체 기저부 토양으로부터 순수분리된 균주들의 식물병원균에 대한 항균활성능을 검토하기 위하여 대표적인 식물병원성 곰팡이 표준균주를 한국농업미생물자원센터(KACC)로부터 분양받아 사용하였다. 본 실험에 사용된 균주는 인삼점무늬병원균(*Alternaria panax*, KACC 42141), 갯빛곰팡이병원균(*Botrytis cinerea*, KACC 40963), 인삼탄저병원균(*Colletotrichum gloeosporioides*, KACC 40003), 시들음병원균(*Fusarium oxysporum*, KACC 41088), 고추역병원균(*Phytophthora capsici*, KACC 40476), 인삼모잘록병원균(*Pythium ultimum*, KACC 40705), 그리고 오이모잘록병원균(*Rizoctonia solani*, KACC 40117)으로 Table 1에 표기하였다. 항균활성검정은 *in vitro* 항균활성 확인법을 이용하여 PDA (Potato Dextrose Agar, Difco) 배지에 상기의 식물병원균을 각각 접종한 후 분리균주를 대치배양하여 균체 주위에 형성된 생육저지대(growth inhibitor clear zone)의 크기에 따라 항균활성 수준을 결정하였다(2).

분리균주의 생리학적 및 생화학적 특성 조사

분리균주의 생리학적 및 생화학적 특성 조사를 위해 API 50 CHE Kit (BIOMERIEUX, France)를 이용하여 49개 당 분해능을 조사·비교하였으며(24, 28), 고분자 화합물 protein, starch, cellulose, lipid, 그리고 chitin에 대한 가수분해능을 측정하였다. 모든 측정 실험에는 0.02% beef extract, 0.01% NaCl, 0.02% peptone, 0.01% yeast extract를 기초배지로 사용하였다. Protein 가수분해능을 측정하기 위해 1% (w/v) skim milk를 첨가하였고, starch 가수분해능은 0.5% soluble starch를 첨가하였으며, 지시약

으로 I_2 -KI solution을 사용하였다(5, 15). Cellulose 분해능 측정에는 0.4% (w/v) carboxy methyl cellulose를 첨가하였으며, 지시약으로 0.1% Congo red 용액을 사용하였고, lipase 가수분해능을 측정하기 위해 1% (w/v) glyceryl tributyrat (TBN)가 함유된 gum arabic solution를 첨가하였다(14). 그리고 chitin 가수분해능은 1% (w/v) wet colloidal chitin을 첨가하여 사용하였다(2). 상기의 각 기질을 첨가한 배지에 분리균주를 접종하여 28°C에서 7일간 배양한 후 형성된 투명환의 크기에 따라 각 고분자 화합물에 대한 가수분해능을 평가하였다(2, 9).

균체지방산 조성 분석

균체지방산 분석을 위하여 TSB (Trypticase Soy Broth)를 10^{-1} 배로 희석하고 agar 1.5% 첨가한 평판배지에 균체를 접종하고 28°C에서 3일간 배양한 후 대수기의 균체를 회수하였다. 회수한 균체 약 50 mg (wet weight)을 teflon-lined screw cap tube (13×100 mm, pyrex)에 옮긴 후, Ikemoto & Miyagawa의 방법(18, 27)에 의해 균체지방산을 methyl ester화 시켜 추출하였다. 지방산 methyl ester의 분석에는 Microbial Identification System (MIDI; Microbial ID, Inc., Newark, USA)을 이용하여 분석하였다.

Quinone 분석

Isoprenoid quinone 분자종의 동정은 Collins 등의 방법(17)을 이용하여 건조균체로부터 지질혼합물을 추출하고, 이를 silica-gel TLC plate에 전개하여 표준물질과 동일한 R_f 를 갖는 band를 확인, 채취하여 정제하였다. 이 quinone 혼합물을 Collins 등의 방법(17)에 따라 각각의 표준물질과 함께 HPLC를 이용하여 각각의 분자종을 동정하였다(8, 9).

DNA G+C 함량 측정

정제된 DNA를 증류수에 용해시켜 농도를 350~500 µg/ml로 조정한다. 농도를 조정한 DNA용액 20 µl를 microtube에 취하여 100°C에서 10분간 유지한 후, 얼음 안에서 급속히 냉각하여 변성시키고 20 µl의 nuclease P1을 첨가하여 50°C에서 1시간 반응하고 20 µl의 alkaliphosphatase 용액을 첨가하여 37°C에서 1시간 반응 후 조제한 시료를 HPLC (LC-10AD vp, Shimazu, Tokyo, Japan)로 분석하였다(8, 26).

주사전자현미경(SEM)을 이용한 세포형태 관찰

주사전자현미경 관찰은 plate에 형성된 콜로니를 중심으로 배지를 도려낸 후 2.5% glutaraldehyde에 넣어 4°C에서 15~24시간 동안 전고정한 후, 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)로 10분씩 3회 세척한 다음 1% osmium tetroxide를 넣어 4°C에서 2시간 동안 후고정 한다. 고정된 세균을 50% ethanol에서 100% ethanol까지 순차적으로 탈수시킨 후 50% Isoamyl acetate (isoamyl acetate:alcohol=1:1)로 10분 동안 복분해 시키고, 100% Isoamyl acetate로 5분 동안 침지시킨 다음 Critical Point Dryer (CPD 030)로 임계점에서 건조시킨다. 건조된 시료를 시료대에 흡착시킨 후 Sputter Coater (SCK 005)를 이용하여 금으로 coating하여

Table 1. Plant pathogenic fungi used in this study

Plant pathogenic fungi	Nature of a disease
<i>Alternaria panax</i> (KACC42141)	Foliar blight and black rot
<i>Botrytis cinerea</i> (KACC40963)	Gray mold rot
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (KACC40003)	Anthrachnose
<i>Fusarium oxysporum</i> (KACC41088)	Fusarium wilt
<i>Phytophthora capsici</i> (KACC40476)	Phytophthora blight
<i>Pythium ultimum</i> (KACC40705)	Damping off
<i>Rizoctonia solani</i> (KACC40117)	Damping off

주사전자현미경으로 관찰하였다(9).

분리 균주의 16S rDNA PCR 증폭

순수 배양된 단일 colony를 주형으로 사용하여 직접 PCR 증폭을 하였다. *E. coli* 16S rDNA 부분의 conserved sequence를 기초로 한 27F; 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' primer와 1492R; 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGC-3' primer를 이용하였다(20, 22). PCR은 27 Forward primer, 1 µl; 1492 Reverse primer, 1 µl; *EF-Taq* polymerase (Solgent co., Korea), 0.25 µl; dNTP, 1 µl; 10× buffer, 5 µl; band doctor, 5 µl; H₂O, 36.75 µl를 0.2 ml PCR tube에 넣고 잘 혼합한 후 94°C에서 5분간 반응한 다음 94°C에서 denaturation 1분, 55°C에서 annealing 1분, 72°C에서 extension 1분을 30회 반복하고, 72°C에서 10분간 final extension의 조건으로 PCR (GeneAMPR PCR System 9700, Applied Biosystems) 반응을 실시하였다. PCR 증폭산물은 전기영동 (Mupid-21, Gel documentation system, Bio-Rad)하여 추출 여부를 확인하였다.

분리 균주의 16S rDNA 염기서열 분석

정제한 16S rDNA를 주형으로 ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems)를 사용하여 염기서열을 결정하였다. Sequencing PCR은 BigDye 1.3 µl, T7 primer 1 µl, 16S rDNA sample 1 µl (100 ng), 2× buffer 3.4 µl에 멸균 증류수 13.3 µl를 잘 혼합한 후 cycle sequencing 실시하였다. PCR 산물은 100% ethanol 50 µl와 3 M sodium acetate (pH 5.2) 2 µl를 첨가한 후 22,040×g에서 25분간 침전시키고, 250 µl의 70% ethanol로 세척하여 건조시킨 후 HiDi Formamide 20 µl를 첨가하여 95°C에서 2분 동안 denaturation한 후 얼음위에서 냉각시키고 ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems)를 사용하여 16S rDNA (500~580 bp) 염기서열을 결정하였다(8).

분리 균주의 계통도 작성

결정된 16S rDNA 염기서열의 homology는 DDBJ/ NCBI/

GenBank database의 BLAST program을 이용하여 비교하였다. 각 염기서열의 상동성은 alignment CLUSTAL X algorithm를 이용하여 병렬로 정렬하였으며 계통도의 작성은 근린 결합법에 의거하여 결정하였다(29).

결과 및 고찰

분리균주의 식물병원균에 대한 항균활성 검토

송이 자생균락 토양 내에는 저영양성 세균이 다수 분포해 있다는 선행 연구의 결과(4)를 바탕으로 본 연구에서는 송이 자체 기저부 토양으로부터 세균을 분리하기 위해 저영양배지를 이용하여 총 268균주를 순수분리하였다. 이들 분리균주들을 식물병원성 곰팡이인 인삼점무늬병원균(*Alternaria panax*), 잣빛곰팡이병원균(*Botrytis cinerea*), 인삼탄저병원균(*Colletotrichum gloeosporioides*), 시들음병원균(*Fusarium oxysporum*), 고추역병균(*Phytophthora capsici*), 인삼모잘록병원균(*Pythium ultimum*), 오이모잘록병원균(*Rizoctonia solani*)과 각각 대치배양을 통해 길항력을 검토하였다. 항균활성 검토 결과 KM1-15균주가 인삼점무늬병원균(*Alternaria panax*)과 인삼탄저병원균(*Colletotrichum gloeosporioides*)에 대해 가장 강한 항균력을 나타내는 것으로 최종 선발되었다(Fig. 1). 특히, *Alternaria panax*와 *Colletotrichum gloeosporioides*는 인삼에 병을 일으키는 병원균으로, 본 연구에서 선발된 KM1-15균주는 국내 토양에서 분리한 토착세균으로 인삼 병 방제제에 활용가치가 높을 것으로 사료된다.

KM1-15 균주의 16S rDNA 염기서열 분석

KM1-15균주에 대하여 16S rDNA 염기서열(1,311 bp)을 결정하여 계통학적 위치를 검토하였다. 16S rDNA 염기서열 결과를 NCBI/ RDP/ GenBank의 database와 상동성 비교를 한 후 계통수를 작성한 결과 *Bacillus* 속에 속하였으며, *Bacillus koguryoae*^T (AY904033)와 가장 가까운 유전적 거리를 나타내었다(Fig. 2) (21). 또한 *Bacillus* 속에 속하는 근연종들과 KM1-15 균주의 유사도를 조사한 결과, *Bacillus koguryoae*^T (AY904033)와 99.62%의 가장 높은 상동성을 나타내었다. KM1-15 균주의 염기서열

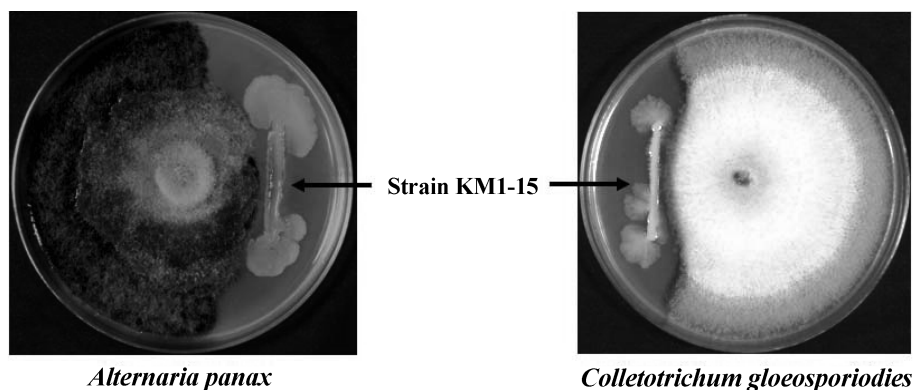


Fig. 1. Antibiotic activity of strain KM1-15 to *Alternaria panax* and *Colletotrichum gloeosporioides*.

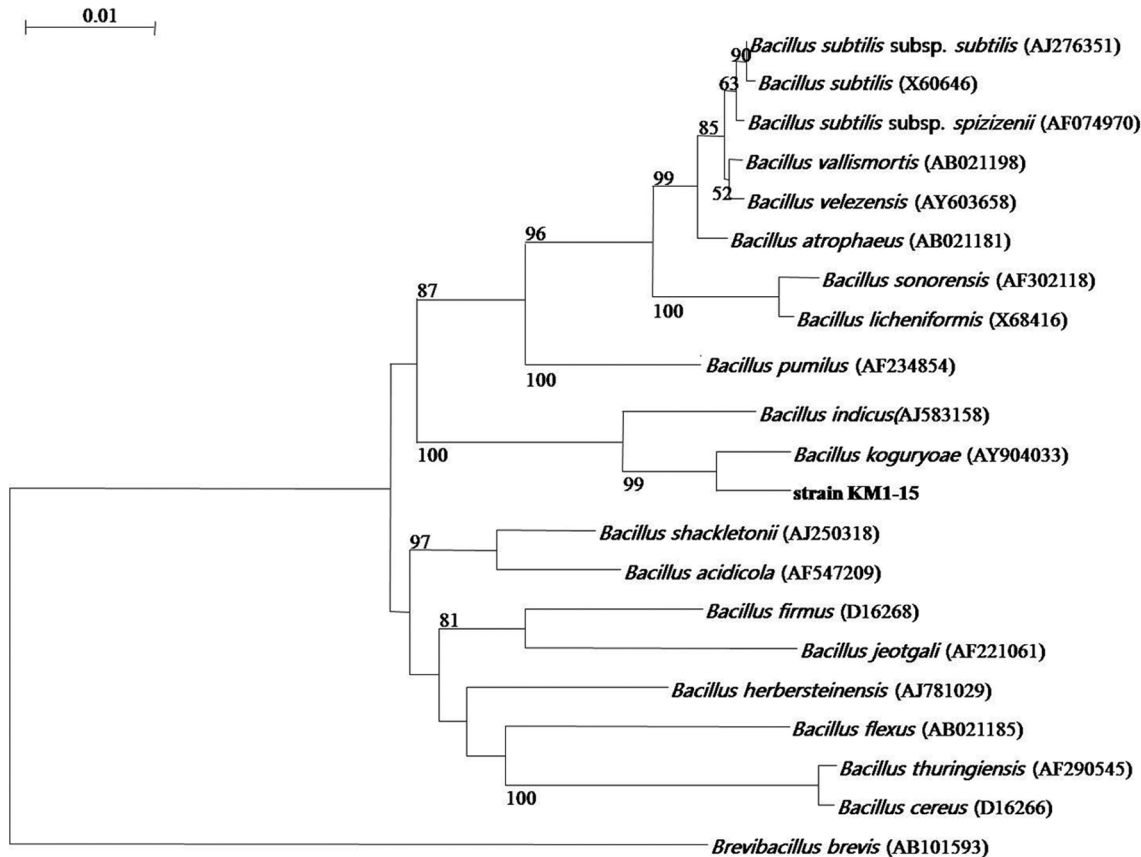


Fig. 2. Phylogenetic relationships of strain KM1-15 and genera *Bacillus* based on similarities of 16S rDNA. The phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining method. Bootstrap values are shown at nodes. Scale bar, 1 nucleotide substitutions in 100 bases.

(1,311 bp)은 GenBank에 accession no. AB298532로 등록하였다.

KM1-15 균주의 화학분류

분리균주 KM1-15의 지방산 methyl ester에 대한 균체지방산을 분석한 결과, 주요 지방산으로 15:0 anteiso (35.78%)와 17:0 anteiso (17.97%)를 함유하였으며, KM1-15 균주와 근연관계에 위치해 있는 *Bacillus* 속에 속하는 표준균주들과 균체지방산 성분을 비교한 결과, 13:0 iso 3-OH, 14:0 iso 3-OH, 15:0 iso 3-OH, 그리고 17:0 iso 3-OH와 같은 다양한 분지형 지방산을 함유하는 독특한 특성을 나타내었다. 또한 유전학적으로 가장 유사했던 *Bacillus koguryoae*^T의 경우, 주요지방산이 15:0 iso와 15:0 anteiso로 KM1-15 균주와 차이를 보였으며, 다른 *Bacillus* 속 표준균주들과도 같은 결과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과는 지방산의 높은 변이성 때문으로 같은 *Bacillus* 속에 속하더라도 배양조건에 따라 지방산 성분이 달라질 수 있어 상기와 같은 차이가 보여지는 것이며, 이는 지방산으로는 정확한 동정이 어렵다는 것을 시사한다(30).

Isoprenoid quinone 종의 분석결과, KM1-15 균주는 menaquinone을 함유하고 있었으며 HPLC에 의한 정량분석 결과, MK-7이 100%로 검출되어 표준균주들과 같이 주요 퀴논종으로 동정되었

고, G+C 함량은 43.7%로 측정되었다(Table 2).

KM1-15 균주의 형태학적 특성

인삼점무늬병원균(*Alternaria panax*)과 인삼탄저병원균(*Colletotrichum gloeosporioides*)에 대해 강한 길항력을 나타낸 KM1-15 균주의 콜로니형태와 세포형태 특성을 조사하였다. DNB 평판배지에 형성된 콜로니의 특징은 연한 노란색의 불규칙적인 형태의 콜로니가 관찰되었고, 전자현미경하에서 세포형태를 관찰한 결과 약 0.7×2.3 μm의 간균임이 관찰되었다(Fig. 3).

KM1-15 균주의 생리학적 및 생화학적 특성

고분자화합물 protein, starch, cellulose, lipid, 그리고 chitin에 대한 가수분해능을 측정한 결과, protein 가수분해능 검정 배지에 나타난 투명한 크기는 8 mm이었으며, starch의 경우 9 mm로 protein과 starch에 대한 가수분해능이 우수한 특징을 나타냈다(Fig. 4). API 50CHE Kit를 이용하여 KM1-15 균주의 당 분해능을 조사한 결과, glycerol, L-arabinose, ribose, D-xylose, glucose, fructose, mannose, mannitol, sorbitol, α-methyl-D-glucoside, amygdalin, arbutin, esculin, salicin, cellobiose, maltose, melibiose, sucrose, trehalose, inulin, raffinose, starch, glycogen, gentiobiose,

Table 2. Some characteristics of strain KM1-15 and related *Bacillus* species

Strain	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Branched chain fatty acid											
i-14:0	1.63		26.7	1.13	2.46		0.98	1.44	0.15	1.31	0.7
i-15:0	3.69	18.0	31.8	29.27	30.5	24.6	22.33	15.02	30.01	28.87	56.9
i-16:0	6.56		15.6	2.36	4.4	4.06	2.56	3.1	3.49	4.42	0.4
i-17:0	3.55			9.59	9.01	14.43	8.92	4.97	8.64	6.99	5.2
ai-15:0	35.78	26.0	15.4	40.19	36.48	37.5	42.51	51.36	37.31	37.75	23.4
ai-17:0	17.97	6.9		9.38	7.06	12.07	12.53	14.83	12.37	11.3	3.5
i-17:1 w5c	0.62										
i-17:1 w7c				0.51	1.67	1.55	3.45	1.99		1.23	
Fi-15:1	0.51										
16:1 cis 5									1.28		
i-17:1 cis 7									0.65		
3OH i-13:0	0.73										
3OH i-14:0	0.54										
3OH i-15:0	0.54										
3OH i-17:0	0.71										
Quinone system	MK-7	MK-7	MK-7	MK-7	MK-7	MK-7	MK-7	MK-7	MK-7	MK-7	MK-7
G+C content (mol%)	43.7	41.2	45	41.5-47.5	43-44.35	43	43	41-43	46	46	40

* Data from Ko *et al.*, 2006

Strains: 1; KM1-15, 2; *B. koguryoae*, 3; *B. cibi*, 4; *B. subtilis*, 5; *B. amyloliquefaciens*, 6; *B. vallismortis*, 7; *B. mojavensis*, 8; *B. atrophaeus*, 9; *B. sonorensis*, 10; *B. licheniformis*, 11; *B. pumilus*

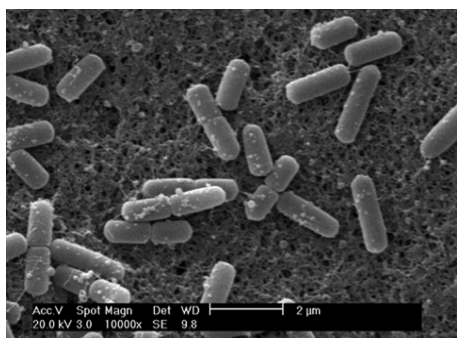


Fig. 3. Scanning electron micrograph (SEM) of strain KM1-15.

그리고 D-turanose를 분해하는 특성을 나타내었다(Table 3). 계통학적으로 매우 유사한 *Bacillus koguryoae*의 경우 galactose, inositol, N-acethyl-glucosamine, xylitol, gluconate, 5-keto-gluconate에 양성반응을 나타내었으나, KM1-15 균주는 음성반응을 나타내었다. 반면 KM1-15의 경우 L-arabinose, cellobiose, inulin, D-turanose에는 양성반응을 나타내었으나, *B. koguryoae*는 음성반응을 보여 계통학적으로는 매우 유사하지만 표현형적 특성에는 차이가 있음을 확인할 수 있었다.

본 연구에서 송이 자실체 기저부 토양으로부터 분리된 KM1-15 균주는 인삼에 병을 일으키는 인삼점무늬병원균(*Alternaria*

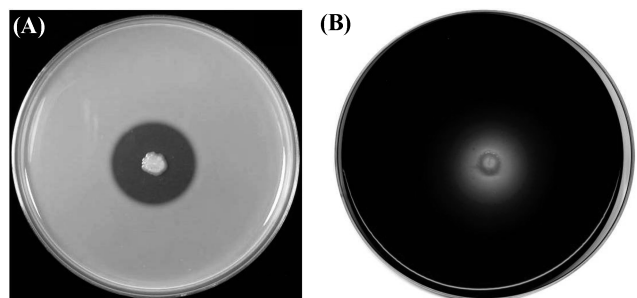


Fig. 4. Hydrolysis of protein (A) and starch (B) by strain KM1-15.

panax)과 인삼탄저병원균(*Colletotrichum gloeosporioides*)에 가장 뛰어난 항균력을 나타내었다. 인삼점무늬병을 일으키는 *Alternaria panax*는 바람에 의하여 전염되는 대표적인 공기전염성으로 전국 어디에서나 많이 발생하며 전염 속도가 빠른 것이 특징이다. 인삼 점무늬병은 잎에 불규칙한 흑색의 반점이 형성되고 검은색으로 변색되면서 줄기가 서 있는 상태로 말라 죽게 하는데 모종삼 줄기는 매우 짧기 때문에 병원균이 잎에 오염되면 줄기를 통해 쉽게 뇌두와 뿌리로 내려가 검은색으로 부패 시킨다. 인삼탄저병은 전국적으로 모종밭에서 피해가 가장 심한 병이며 병을 일으키는 *Colletotrichum gloeosporioides*는 포자가 끈적끈적한 점액물질에 쌓여 형성되었다가 점액물질이 빗물에 의해 녹

Table 3. Carbohydrate fermentation of strain KM1-15 by API 50CHE Kit

Carbohydrates	Strain KM1-15	Type strain of <i>B. koguryoae</i>
Glycerol	+	+
Erythritol	-	-
D-Arabinose	-	-
L-Arabinose	+	-
Ribose	+	+
D-Xylose	+	+
L-Xylose	-	-
Adonitol	-	-
β -Methyl-D-xylopyranside	-	-
Galactose	-	+
Glucose	+	+
Fructose	+	+
Mannose	+	+
Sorbose	-	-
Rhamnose	-	-
Dulcitol	-	-
Inositol	-	+
Mannitol	+	+
Sorbitol	+	+
α -Methyl-D-mannopyranside	-	-
α -Methyl-D-glucoside	+	+
N-Acethyl-glucosamine	-	+
Amygdalin	+	+
Arbutin	+	+
Esculin	+	+
Salicin	+	+
Cellobiose	+	-
Maltose	+	+
Lactose	-	-
Melibiose	+	+
Sucrose	+	+
Trehalose	+	+
Inulin	+	-
MeleZitose	-	-
Raffinose	+	+
Starch	+	+
Glycogen	+	+
Xylitol	-	+
Gentiobiose	+	+
D-Turanose	+	-
D-Lyxose	-	-
D-Tagatose	-	-

Table 3. Continued

Carbohydrates	Strain KM1-15	Type strain of <i>B. koguryoae</i>
D-Fucose	-	-
L-Fucose	-	-
D-Arabitol	-	-
L-Arabito	-	-
Gluconate	-	+
2-Keto-gluconate	-	-
5-Keto-gluconate	-	+

* Data from Ko *et al.*, 2006

+ ; Fermented, - ; Not fermented.

아서 지표면을 따라 흐르는 물에 의해 이동된다.

우리나라 대표적 약용작물인 인삼은 한 곳에서 3~5년 재배해야 하는 특성을 지니기 때문에 병해에 의한 피해와 생육불량이 발생하는 등 연작장해의 문제를 가지고 있다(13). 특히 한국에서 발생하는 주요 병원균들은 *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Phytophthora*, *Cylindrocarpum*, *Fusarium*, *Sclerotinia*, *Erwinia*, *Pseudomonas* 등이 있으며, 대부분 토양 전염성으로 병을 일으키는 것으로 보고되었다(13). 이러한 문제 때문에 토양훈증제 처리에 의한 화학적 방제가 실시되고 있지만 지속적인 효과가 약할 뿐만 아니라 토양생태계 파괴를 초래할 수 있다. 환경에 대해 부담을 적게 주면서 생산성 향상과 작물의 안정성을 높일 수 있는 고품질 친환경 미생물제제의 필요성이 더욱 커지고 있다(3, 10, 11, 12). 본 연구를 통해 송이 자실체 기저부 토양으로부터 분리된 KM1-15 균주는 인삼 병원균에 대한 항균활성능이 탁월하고 고분자화합물의 분해능이 우수하여 친환경 병해충 방제제 및 토양개량제로의 활용에 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 말

본 논문은 2007년도 농촌진흥청 바이오그린21사업(2005030134384) 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 강창율, 심미자, 최웅칠, 이영남, 김병각. 1981. 한국산 담자균류의 항암성분에 관한 연구. 한국생화학회지 14, 101-112.
- 고영희 외. 1991. 생체활성물질 탐색을 위한 미생물의 분리에 관한 연구 (I). 과학기술처 연구보고서 BSG70110-295-303.
- 김성욱 외. 2000. 항진균 생물농약 소재를 개발하기 위한 길항미생물 *Bacillus*의 육종. 과학기술부 연구보고서 BSNB 1060-200034-3.
- 김윤지, 황경숙. 2007. 송이 자생균락 토양 내 난배양성 세균균집의 계통학적 특성. *Korean J. Microbiol.* 43, 201-209.
- 김태운, 김정희, 김경남, 민승기. 2003. 김치에서 단백질 분해효소활성 균주분리 및 동정. 한국식품과학회지 35, 666-670.

6. 민태진, 김은미, 이선경, 배강규. 1995. 버섯중 항균물질의 검색 및 개발에 관한 연구-버섯중 항진균활성 물질의 검색(I). *Korean J. Mycol.* 23, 14-27.
7. 민태진, 김은미, 유선호. 1996. 한국산 버섯추출물의 항진균 및 항세균활성 검색 (II). *Korean J. Mycol.* 24, 25-37.
8. 박진숙, 황경숙, 천종식. 2005. 미생물의 분류 동정 실험법, 월드사이언스.
9. 양창술, 김종식 역. 2002. 토양미생물 실험법. 월드사이언스.
10. 이병대, 박훈. 2004. *Bacillus subtilis* B-4228의 인삼 근부 병 억제효과. *고려인삼학회지* 28, 67-70.
11. 이은탁, 김상달. 2001. *Phytophthora capsici*를 길항하는 *Pseudomonas fluorescens* 2112가 생산하는 항진균 항생물질 2,4-diacetylphloroglucinol. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 29, 37-42.
12. 정희경, 류재천, 김상달. 2005. 진균성 식물병해 방제를 위한 항생물질 생산 길항미생물의 복합제제화. *J. Korean. Soc. Appl. Biol. Chem.* 48, 40-47.
13. 조대휘, 박규진, 유연현, 오승환, 이호자. 1995. *Cylindrocarpum destructans* (Zinssm.) Scholten에 의한 連作地 2年根 人蔘의 根腐病 發病 特性. *Korean J. Ginseng Sci.* 19, 175-180.
14. 최원석, 배동훈. 2004. 토양으로부터 분리한 균주로부터 섬유소 분해효소생산. *신소재 연구논집* 12, 181-192.
15. 최원석, 배동훈. 2004. 토양 미생물로부터 전분 가수분해 효소의 생산과 그 특성. *신소재 연구논집* 12, 65-75.
16. 황경숙, 유승현. 1995. 유기영양분 농도에 따른 토양세균의 증식양상과 통상 및 편성 저영양세균의 분리. *Korean J. Microbiol.* 21, 319-324.
17. Collins, M.D. and D. Jones. 1981. Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implications. *Microbiol. Rev.* 45, 316-354.
18. Ikemoto, S., M. Kuraishi, K. Komagata, R. Azuma, R. Suto, and H. Murooka. 1978. Cellular fatty acid composition in *Pseudomonas* species. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 24, 199-213.
19. Ito, T. 1994. The present status of *Matsutake* production technique in Japan. *Kor. J. Mycol.* 9, 219-222.
20. Johnson, J.L. 1994. Similarity analysis of rRNAs. In P. Gerhardt, R.G.E. Murray, W.A. Wood, and N.R. Krieg (eds.). *Methods for general and molecular bacteriology*, p. 683-700. American Society for Microbiology, Washington, D.C., USA.
21. Ko, K.S., W.S. Oh, M.Y. Lee, J.H. Lee, H. Lee, K.R. Peck, N.Y. Lee, and J.H. Song. 2006. *Bacillus infantis* sp. nov. and *Bacillus idriensis* sp. nov., isolated from a patient with neonatal sepsis. *IJSEM* 56, 2541-2544.
22. Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (eds.). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, pp. 115-175. John Wiley and Sons, Chichester, UK.
23. Lee, C.-Y., O.-P. Hong, M.-J. Jung, and Y.-H. Han. 1997. Effect of carbon sources and vitamins on mycelial growth of *Tricholoma matsutake* DGUM 26001. *Kor. J. Mycol.* 25, 226-232.
24. Macfaddin, J.F. 1984. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*, 2nd ed. Williams & Wilkins, USA.
25. Makoto Ogawa. 1981. Mycorrhiza in the Pine forest-The ecological study of Matsutake as a microorganism. *Kor. J. Mycol.* 9, 225-227.
26. Mesbah, M., U. Premachandran, and W.B. Whitman. 1989. Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39, 159-167.
27. Miyagawa, E., R. Azuma, and T. Suto. 1979. Cellular fatty acid composition in Gram-negative obligately anaerobic rods. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 25, 41-51.
28. Roh, H.J., Y.S. Shin, K.S. Lee, and M.K. Shin. 1996. Effect of water extract of green tea on the quality and shelf life of cooked rice (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.* 28, 417-420.
29. Thomson, J.D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W; improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.
30. Venkateswaran, K., D.P. Moser, M.E. Dollhopf, D.P. Lies, D.A. Saffarini, B.J. MacGregor, D.B. Ringelberg, D.C. White, M. Nishijima, H. Sano, J. Burghardt, E. Stackebrandt, and K.H. Nealson. 1999. Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 705-724.

(Received November 27, 2007/Accepted February 24, 2008)

ABSTRACT : Isolation and Taxonomical Characterization of Strain KM1-15 with Antibiotic Activity from Pine Mushroom (*Tricholoma matsutake*) Basal Soil

Yun-Ji Kim¹ and Kyung-Sook Whang^{1,2*} (¹Institute of Microbial Ecology & Resources, ²Department of Biotechnology, Mokwon University, Daejeon 302-729, Republic of Korea)

Two hundred and sixty-eight bacterial strains were isolated from pine mushroom (*Tricholoma matsutake*) basal soil. In the course of screening for antifungal activity against seven plant pathogenic fungi (*Alternaria panax*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici*, *Pythium ultimum*, *Rizotonia solani*) of isolates, strain KM1-15 showed strong antibiotic activity against *Alternaria panax* and *Colletotrichum gloeosporioides*. In determining its relationship on the basis of 16S rDNA sequence, KM1-15 strain was most closely related to *Bacillus koguryoae*^T (AY904033) (99.62%). When assayed with the API 50CHE Kit, unlike *Bacillus koguryoae*, it is positive for utilization of L-arabinose, cellobiose, inulin, and D-turanose. Results of cellular fatty acid analysis showed that major cellular fatty acids were 15:0 anteiso (35.78%) and 17:0 anteiso (17.97%). In particular, hydroxyl fatty acids such as 13:0 iso 3-OH, 14:0 iso 3-OH, 15:0 iso 3-OH, and 17:0 iso 3-OH were only restricted to strain KM1-15. DNA G+C content was 43.7 mol% and quinone system was MK-7 (100%) in strain KM1-15.