

식물 생육 촉진 및 식품 병원성 진균에 대한 항진균 활성을 갖는 길항 미생물의 탐색

서지원^{ID} · 정수지^{ID} · 김진원^{ID} · 류명선^{ID} · 박세원^{ID} · 양희종^{ID} · 정도연*^{ID}

(재)발효미생물산업진흥원

Antagonistic *Bacillus* having plant growth-promoting abilities and antifungal activity against phytopathogenic fungi

Ji-Won Seo^{ID}, Su-Ji Jeong^{ID}, Jin Won Kim^{ID}, Myeong Seon Ryu^{ID}, Se Won Park^{ID}, Hee-Jong Yang^{ID}, and Do-Youn Jeong*^{ID}

Microbial Institute for Fermentation Industry (MIFI), Sunchang 56048, Republic of Korea

(Received November 25, 2022; Revised December 26, 2022; Accepted December 26, 2022)

Lately, the development of microorganism-based biocontrol agents (BCAs) has been suggested as a remarkable alternative to chemical pesticides. In this present study, a total of 157 bacterial strains were isolated, identified, and investigated for availability as a biocontrol agent from farmlands in Jeollabuk-do, Korea. Among the isolated microorganisms, six biocontrol agent candidates that showed superior extracellular enzyme activities (EEA) were selected for further experiments. SRCM 121380 strain was finally selected as a biocontrol agent from additional bioactivity screening experiments such as anti-phytopathogenic fungal, siderophore, indole-3-acetic acid (IAA), and plant growth-promoting (PGP) activity. SRCM 121380 was identified as *Bacillus* sp. by 16S rRNA gene sequencing analysis, additionally, its sugar fermentation and enzyme properties were investigated. These results suggested that *Bacillus* sp. SRCM 121380 could be a promising biocontrol agent with superior anti-phytopathogenic fungal and plant growth-promoting properties.

Keywords: *Bacillus* sp., antagonistic bacteria, antifungal activity, phytopathogen, plant grow-pronoting

식물에서 다양하게 나타나는 식물질병은 작물의 품질을 저하시킬 뿐만 아니라 연간 농작물의 수확량을 감소시켜 전세계

적으로 약 4천만 달러 이상의 경제적 손실이 나타나고 있는 것으로 알려졌다(Choi *et al.*, 2020). 식물 질병을 방제하기 위해 1800년대 식물질병 방제제로 비소 화합물과 항진균제 도입 이후, 과거 약 50여년 동안 수많은 화학농약이 개발 및 사용되어 왔으며, 이로 인해 각종 질병이나, 영양분 결핍 등과 현상들이 줄어들면서 농업의 생산성은 지속적으로 높아졌다(Lee *et al.*, 2015). 그러나 화학농약의 오남용에 기인한 생태계 교란과 작물의 안전성, 토양 영양 불균형 및 수질오염 등에 대한 부정적 영향이 문제 시 되고 있어 우리나라를 포함한 선진각국에서는 유기농산물 및 농업환경지표 등에 대한 신규 지표를 제정하여 화학농약을 줄이는 친환경 농업정책을 적극적으로 추진하고 있으며, 친환경 농산물에 대한 국민적 수요가 증대되면서 친환경적 생물학적 방제제인 미생물에 대한 이목이 집중되고 있다(Jung *et al.*, 2013).

생물학적 방제제의 일반적인 생리작용은 미생물의 특징, 항생작용, 기생과 포식 및 경쟁관계 등으로 요약될 수 있으며 (Fravel, 1988), 대부분 농업환경 혹은 토양 유래 세균 및 곰팡이류가 식물질병을 제어하는 미생물로 활용되어지고 있다 (Oh *et al.*, 2021). 생물학적 방제제로 사용되는 미생물들은 식물 병원성 진균에 대한 항진균 활성과 식물에 직·간접적인 영향을 주어 식물질병에 대한 길항력을 갖는데 이러한 미생물을 식물 생육 촉진 근권 세균(plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR)이라고 하며, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Burkhol-*

*For correspondence. E-mail: jdy2534@korea.kr;
Tel.: +82-63-653-2035; Fax: +82-63-635-9590

deria, *Bacillus* 등이 식물 성장 촉진 근권 세균으로 보고된 것으로 알려져 있다(Kim *et al.*, 2021; Oh *et al.*, 2021).

PGPR은 식물병원균의 세포가 원형질을 상실하고 세포벽이 효소에 의해 분해되는 현상인 용균작용과 미생물이 생성하는 항생물질이나 siderophore에 의해 식물병원균의 생육을 저해시키는 항생작용 및 길항작용 등의 특성이 있다고 알려져 있다(Han *et al.*, 1999). 특히, siderophore 생성에 따른 길항작용은 식물질병의 전염성을 약화시키며, 식물의 근권정착력을 촉진시켜 작물의 성장 및 수확량 증대에 매우 효과적이다(Lee *et al.*, 2013). 또한, 식물생장 호르몬인 auxin, cytokinin, gibberellin 등을 생성한다. Indoleacetic-3-acid (IAA)는 대표적인 식물 성장 호르몬으로서 식물의 줄기, 뿌리 끝에서 합성되어 식물 병원성 균주에 대한 길항능력 및 식물 성장 촉진 및 조절 등에 관여하는 물질에 대한 다양한 연구결과가 보고되어지고 있다(Kim *et al.*, 2019b).

식물 성장 촉진 근권 세균 중 하나인 *Bacillus* 속은 사람에게 비 병원성으로 amylase, protease, cellulase 등의 효소를 생성하고(Yang *et al.*, 2014), 식물질병을 유발시키는 병원성 곰팡이에 대한 항진균 효과를 지닌 biocontrol agent (BCA)로써 처음 이용되었으며, 내생 포자를 지닌 그람양성균으로 배양이 용이한 특성을 가지고 있어 현재까지도 생물학적 방제제로서 화학농약을 대체할 중요한 미생물로 주목받고 있다(Kim *et al.*, 2019a). 생물학적 방제제로 가장 많이 보고된 *Bacillus subtilis*의 경우 우리나라뿐만 아니라 국제적으로도 사람과 동물에 대한 안전성이 입증되어 널리 사용되어지고 있으며, 미국의 Agraquest사, Gustafson사, Becker underwood사에 의해 *B. subtilis*를 이용한 생물학적 방제제를 개발되어, 현재 종자처리제 및 엽면살포제 등 식물 질병 방제에 활용되고 있다(Yoon *et al.*, 2012).

따라서 본 연구에서는 연작 피해 없는 전라북도 내의 농업환경 및 토양에서 생물학적 방제제로 사용 가능한 미생물을 1차로 분리하고, 식물 병원성 진균에 대한 항진균 활성, siderophore 생성능 및 식물 생육 등 다양한 연구를 통해 국내 토종 미생물의 생물학적 방제제로서의 소재 가능성을 타진하였다.

재료 및 방법

미생물의 분리 및 배양

전라북도 내 연작 피해가 없는 밭 및 논 토양 25종의 시료 수집 후 4°C에서 보관하였다. Yang *et al.* (2014)의 방법에 따라 시료 1 g을 0.85% 멸균 식염수 9 ml에 단계 희석한 후 희석액

100 µl을 LB 배지(Luria-Bertani, Difco™)에 도말 후 30°C에서 24시간 동안 배양하고, 형태학적 차이에 따라 선별하여 순수 분리하였다. 순수 분리한 균주의 경우 -80°C에 보관하여 다음 실험에 사용하였다.

세포외 효소 활성 측정

균주 세포외 효소 중 amylase, protease, cellulase 활성 검증을 위해 well diffusion 방법으로 측정하였다. 효소 활성 기질로는 특이적으로 반응하는 성분을 이용하였다. Amylase는 1% soluble starch (JUNSEI chemical Co. Ltd.), protease는 2% skim milk (Difco™), cellulase는 1% carboxymethyl cellulose (CMC, JUNSEI chemical Co. Ltd.)에 1.5% agar를 첨가하여 평판 배지를 제조하였다. 활성 측정을 위한 균주는 LB 액체 배지(Luria-Bertani, Difco™)에 접종한 다음 30°C에서 24시간 동안 진탕 배양 후 13,000 rpm으로 원심분리 후 상등액을 0.45 µm syringe filter (Sartorius)로 여과하였다. 여과액을 100 µl씩 직경 6 mm well에 분주 후 30°C에서 24시간 동안 반응시켜 투명 환의 직경을 측정하였다.

항진균 활성 측정

분리주의 항진균 활성은 식물 병원성 곰팡이 유발 균주를 이용하여 측정하였다. 인삼 뿌리썩음병을 유발하는 *Cylindrocarpon destructans* KACC 41077, 인삼 잘록병을 유발하는 *Rhizoctonia solani* AG-2-2(IV) KACC 40123, 고추 역병을 유발하는 *Phytophthora cactorum* KACC 40166, 고추 균핵병을 유발하는 *Sclerotinia sclerotiorum* KACC 41065, 잣빛곰팡이 *Botrytis cinerea* KACC 40573 균주에 대한 항진균 활성은 Yang *et al.* (2014)의 방법에 따라 potato Dextrose agar (PDA, Difco™) 배지를 이용한 well diffusion 방법으로 측정하였으며, PDA 배지에 분리 균주 상등액 100 µl과 식물 병원성 곰팡이를 대치하여 25°C에서 5일간 배양 후 생육 저지대(clear zone)의 크기에 따라 항진균 활성을 조사하였다.

Siderophore 생성능 측정

Ryu *et al.* (2019)의 방법에 따라 증류수 50 ml에 60 mg chromeazurole S (CAS, Sigma aldrich Co. Ltd.), 10 mM HCl 용액 10 ml에 2.7 mg FeCl₃·6H₂O (Sigma aldrich Co. Ltd.), 증류수 40 ml에 72.9 mg hexadecyltrimethylammonium bromide (HDTMA, Sigma aldrich Co. Ltd.) 녹여 준비하였다. 3종 시약은 빛이 들어가지 않도록 혼합하여 blue dye 용액 제조 후 고압 멸균한 다음 증류수 750 ml에 100 ml 10X Minimal Media 9

salt (MM9 salt solution), 32.24 g PIPES (Sigma aldrich Co. Ltd.), 15 g agar (Difco™) 혼합한 용액 (pH 6.8)을 고압 멸균하여 적정 온도로 식힌 후 30 ml 10% casamino acid (Difco™)와 10 ml의 20% glucose (Sigma aldrich Co. Ltd.), 혼합하여 CAS 배지를 제조하여 blue dye 용액을 첨가하여 blue agar CAS 배지를 제조하였다. 제조한 배지에 균주 배양액 20 µl를 접종하였으며, 대조균은 LB 배지를 접종하여 30°C에서 48시간 배양 후 orange halo zone을 확인하였다.

Indole-3-acetic acid (IAA) 생성능 측정

식물 생육 호르몬인 IAA 생성능 측정은 Kim et al. (2019a)의 방법에 따라 선별 균주를 0.1% L-tryptophane (Sigma aldrich Co. Ltd.) 첨가한 King' B medium (MB cell) 접종 후 30°C에서 24시간 진탕 배양하여 13,000 rpm으로 원심 분리한 상등액을 시료로 이용하였다. Salkowski reagent (35% HClO₄ 50 ml, 0.5M FeCl₃ 1 ml)과 시료 2:1(v/v) 비율로 혼합하여 30분간 반응 후 UV/VIS spectrophotometer (SPECORD200, Analytik Jena)로 530 nm에서 측정하였다. 표준 물질로 IAA를 이용하여, 위와 동등한 방법으로 검량선을 작성하여 시료의 농도를 환산하였다.

식물 생육 촉진 측정

선별 균주 접종에 따른 식물 생육 촉진 효과를 측정하기 위한 식물 모델로 페레니얼 라이그라스(*Lolium perenne*)를 이용하였다. 페레니얼 라이그라스 종자를 1차로 70% 에탄올로 1분간 표면 소독하였으며, 10% (v/v) 유효염소를 포함하는 차아염소산나트륨(NaOCl, Daejung Chemical)으로 10분간 진탕하여 진균류 및 세균 오염에 의한 종자의 성장 저해를 방지하였다(Teixeira da Silva et al., 2016). 소독된 종자는 멸균수를 사용하여 3회 수세하고 건조 후 사용하였다. 멸균된 페레니얼 라이그라스 종자에 선별 균주를 각각 접종하고 0.5% agar가 포함된 Hoagland's No. 2 basal salt mixture 배지(Sigma aldrich Co. Ltd.)에서 2주간 배양 후 줄기(Shoot length) 및 뿌리(Root length)의 생육을 측정하였다. Hoagland 배지에 12개의 페레니얼 라이그라스 종자를 배양하였으며, Teixeira da Silva et al. (2016)의 방법에 따라 난괴법(Randomized block design) 3반복으로 각 배양 플레이트를 배치하고 25 ± 2°C 온도 및 18/6 h (Light/dark cycle) 조건으로 배양기를 이용하여 실험을 실시하였다. 균주 접종에 따른 페레니얼 라이그라스의 유묘활력지수(Seedling vigor index, SVI) 변화는 발아율과 줄기 및 뿌리 생육 결과를 이용하여 측정하였으며, 무첨가균을

대조균으로 비교 분석하였다(Zhao et al., 2021). 페레니얼 라이그라스 생육 결과의 통계처리를 위하여 SAS 9.1 (SAS) 프로그램을 사용하여 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 실시하고 사후검정은 Duncan's multiple range test (DMRT)의 방법을 이용하여 $p < 0.05$ 유의수준에서 비교하였다.

선별 균주 동정 및 phylogenetic tree 작성

선별 균주의 16S rRNA 염기서열 분석을 위해 universal 프라이머인 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3')을 사용하여 유전자를 증폭 후 (주마크로젠에 의뢰하여 염기서열을 분석하였다. 분석 결과는 national center for biotechnology information (NCBI)의 BLAST를 이용하여 서열 일치도가 높은 표준 균주의 16S rRNA 염기서열을 확보하여 계통도를 작성하였다. 계통도 분석은 Tamura-Nei 모델에 기초한 maximum likelihood 방법을 사용하여 분석하였다(Tamura and Nei, 1993). 계통수의 각 분지에 대한 신뢰도 산출을 위하여 bootstrap 분석을 1,000회 반복 수행하여 견고성을 확인하였다.

최종 선별 균주의 생태학적 특성 분석

최종 균주의 생태학적 분석을 위해 당 이용성, 효소 활성 분석을 진행하였다. 최종 균주의 당 이용성 분석을 위해 API 50 CHB kit (BioMerieux)를 이용하여 측정하였다. 균주를 kit medium에 현탁하여 각 큐플에 분주 후 30°C에서 24시간, 48시간 동안 배양하여 각각 당 이용성을 확인하였다. 효소 활성은 API ZYM kit (BioMerieux)를 이용하여 측정하였다. 균주를 5 ml suspension medium (BioMerieux)에 탁도 5~6 mcfarland (BioMerieux)로 조정하고, 현탁액을 ZYM kit의 각 큐플에 접종하여 30°C에서 4시간 배양하였다. 분석 결과 확인을 위해 ZYM A, B 시약을 각각 큐플에 떨어뜨려 5분간 반응 후 효소 활성 정도를 측정하였다.

결과 및 고찰

미생물의 분리 및 배양

일반적으로 중성과 약산성 토양의 경우 미생물의 생장이 유리하며 토양에서 분리한 *Bacillus* 속은 식물병원균에 대한 항진균 활성 및 우수한 식물성장촉진능 연구 결과가 보고되었다(Yeo et al., 2009). 따라서 본 연구에서는 전라북도 내 연작 피해가 없는 논, 밭 토양시료 약 15종을 수집하여 집락 형태학

Table 1. Extracellular enzyme activities of the isolated strains

Strains	Clear zone diameter (mm)		
	Amylase	Protease	Cellulase
SRCM 121380	12	26	15
SRCM 122352	15	19	9
SRCM 122353	15	18	14
SRCM 122354	- ^a	26	9
SRCM 122355	9	19	8
SRCM 122356	18	19	-

^a-, no formation of clear zone or no activity.

적 차이가 있는 미생물 157종을 순수 분리하였다. 분리 균주는 LB 액체배지에 24시간 배양 후 다음 연구에 사용하였다.

세포외 효소 활성 측정

Bacillus 속에서 생성하는 효소는 식물 병원성 곰팡이의 성장 억제에 관여하는 것으로 알려져 있으며, protease의 경우 식물 병원성 곰팡이에 대한 유도 저항성을 갖으며, 세포벽을 구성하는 cellulose 분해하는 cellulase로 인한 용균 작용으로 식물 병원성 곰팡이의 생육을 억제하는 효과를 지닌다고 알려져 있다(Kim *et al.*, 2019a). 따라서 선별 균주 157종 대상으로 amylase, protease, cellulase에 대한 세포외 효소 활성을 분석하였다. amylase, protease, cellulase 중 2종 이상 효소 활성을 보인 6종 균주를 1차 선별하였다(Table 1). 선별 균주 6종 중 SRCM 121380, 122352, 122353, 122355 4종은 amylase, protease, cellulase 활성을 보이며, 특히 SRCM 121380 균주의 경우 protease, cellulase 효소 활성이 가장 우수하여 식물성 병원

성 곰팡이에 대한 용균 작용으로 성장 억제에 효능이 있을 것으로 판단되며 고분자 물질을 저분자 물질로의 분해를 통해 식물 생장에 도움을 줄 것으로 사료된다.

항진균 활성 측정

식물 질병을 유발하는 것으로 알려져 있는 병원성 곰팡이 5종을 대상으로 항진균 활성을 측정하였다. 식물 병원성 곰팡이의 경우 인삼 뿌리썩음병을 유발하는 *Cylindrocarpon destructans* KACC 41077, 인삼 잘록병을 유발하는 *Rhizoctonia solani* AG-2-2(IV) KACC 40123, 고추 역병을 유발하는 *Phytophthora cactorum* KACC 40166, 고추 균핵병을 유발하는 *Sclerotinia sclerotiorum* KACC 41065, 잣빛곰팡이 *Botrytis cinerea* KACC 40573 균주를 이용하여 항진균 활성을 측정하였다. SRCM 121380, 122353, 122353, 122355 균주의 경우 식물 병원성 곰팡이 5종에 대해 항진균 활성을 지님을 확인하였으며, 특히 SRCM 121380 균주는 모든 식물 병원성 곰팡이 항진균 활성이 우수하였다(Table 2). Chung *et al.* (2006)의 연구결과에 따르면 *B. subtilis* 균주를 활용하여 인삼 병원성 곰팡이인 *Cylindrocarpon destructans* 균주와 *Rhizoctonia solani* 균주에서 각각 6 mm, 3 mm 내외의 활성을 보였으며, Kim *et al.* (2012)의 연구에서는 *Bacillus amyloilquefaciens* 균주가 *Rhizoctonia solani* 균에 대해 10 mm 이상의 항진균 활성 갖는 것으로 보고하였다. 또한, Yang *et al.* (2014)의 연구 결과를 보면 *B. subtilis* 균주의 경우 인삼 뿌리썩음병 유발하는 *Cylindrocarpon destructans*, 고추 역병을 유발하는 *Phytophthora cactorum*, 고추 균핵병을 유발하는 *Sclerotinia sclerotiorum*, 잣빛곰팡이 *Botrytis*

Table 2. Activity of antifungal against the phytopathogens, siderophore, and IAA of collected bacterial isolates

Strains	SRCM 121380	SRCM 121352	SRCM 121353	SRCM 121354	SRCM 121355	SRCM 121356
<i>Cylindrocarpon destructans</i> KACC 41077	+++	+++	+++	+++	+++	++
<i>Rhizoctonia solani</i> AG-2-2(IV) KACC 40123	+++	++	+++	++	+++	-
<i>Phytophthora cactorum</i> KACC 40166	+++	++	+++	++	+++	-
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> KACC 41065	+++	++	++	-	+++	-
<i>Botrytis cinerea</i> KACC 40573	+++	++	++	-	++	-
Production of siderophore ^b	+	-	+	+	-	-
IAA production (µg/ml)	17.01	7.07	8.45	7.23	8.61	8.61

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

^b+, production of siderophore.

*cinerea*에 대한 항진균 활성을 지님을 확인하였다. 따라서 선별 균주 5종의 경우 앞서 보고된 *Bacillus* 균주에 비해 항진균 활성이 우수함을 확인하였으며 추가적인 연구를 통해 생물학적 제제로 응용 가능할 것으로 사료된다.

Siderophore 생성능 측정

Siderophore의 경우 미생물에서 생성을 통해 철 이온 복합체 형성을 통해 병원성 곰팡이의 성장을 억제시키는 것으로 알려져 있다(Jung et al., 2012). 따라서 선별 균주 대상으로 siderophore 생성능을 CAS 배지를 통해 확인하였다. 그 결과 SRCM 121380, 122353, 122354 균주의 경우 높은 활성을 확인하였다(Table 2). Lee et al. (2021)의 연구 결과를 보면 *Bacillus* 속의 경우 siderophore를 생성하며 이를 통해 병원성 진균에 대한 항진균 활성을 나타낸다고 보고하였다. 따라서 SRCM 121380, 122353, 122354 균주의 경우 siderophore를 생성하여 $Fe(OH)_3$ 를 Fe^{3+} 로 가용화하여 식물 생육을 도우며 병원성 진균 생육을 경쟁적 길항작용으로 억제할 수 있을 것으로 기대한다(Kim et al., 2019a).

Indole-3-acetic acid (IAA) 생성능 측정

대표적인 식물성장 호르몬인 IAA는 세균에서 다양한 경로를 통해 생성되어 식물 생육 촉진에 관여하는 것으로 알려져 있다(Kim and Song, 2012). IAA 생성능 측정 결과 선별 균주 모두 5 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 생성능을 보였으며, SRCM 121380 균주의 경우 17.01 $\mu\text{g/ml}$ 생성능을 나타내는 것을 확인하였다(Table 2). 따라서 본연구에서의 SRCM 121380 균주의 경우 IAA 생성능이 우수함을 확인하였으며 이를 통해 식물 생육 촉진에 기여할 수 있을 것으로 판단된다.

식물 생육 촉진 측정

식물 생육 변화를 확인하기 위해 페레니얼 라이그라스에 선별 균주를 접종하여 2주간 배양하고 종자 발아, 줄기, 뿌리 길이 변화를 측정하였으며, 측정 결과를 이용하여 유효활력지수를 계산하였다. 줄기 생육 결과 대조구 5.99 cm, SRCM 121380은 7.36 cm, SRCM 122352은 7.1 cm, SRCM 122353은 6.85 cm, SRCM 122354은 6.33 cm, SRCM 122355은 7.25 cm, SRCM 122356은 7.04 cm로 선별 균주 모두 대조구에 비해 생육이 촉진되었다(Fig. 1). 또한, 뿌리 생육 결과 대조구 4.93 cm, SRCM 121380은 5.99 cm, SRCM 122352은 6.58 cm, SRCM 122353은 5.71 cm, SRCM 122354은 4.9 cm, SRCM 122355은 5.6 cm, SRCM 122356은 6.03 cm로 SRCM 122354를 제외한

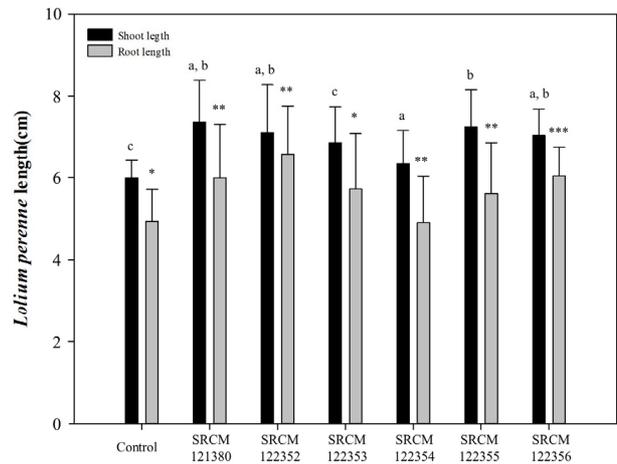


Fig. 1. Influence of inoculation with selected strains on *Lolium perenne* shoot length (A) and root length (B). Bars represent standard deviations; means followed by the same letter are not different according to the Duncan's multiple range test ($p < 0.05$, $n = 12$).

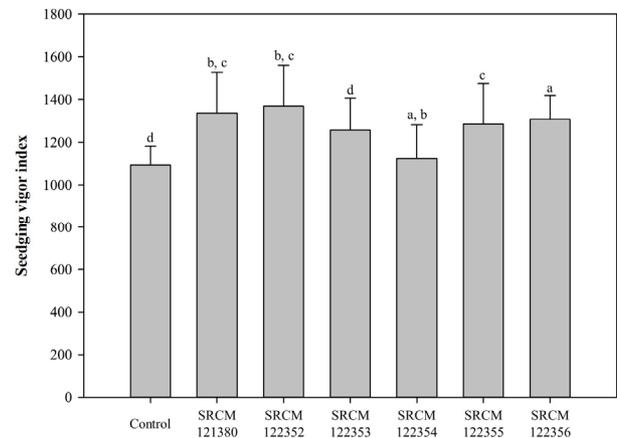


Fig. 2. Vigor index for *Lolium perenne* growth as affected by inoculation with selected strains. Values followed by the same superscripted letters are not significantly different ($p < 0.05$) according to the Duncan's Multiple Range test.

균주는 대조구에 비해 생육이 촉진되었다(Fig. 1). 줄기 생육의 경우 SRCM 121380, SRCM 122355 균주의 경우 대조구에 비해 22.94%, 21% 이상의 생육을 보였으며, 뿌리생육의 경우 SRCM 121380, SRCM 122352, SRCM 122356 균주의 경우 대조구에 비해 21.45%, 33.44%, 22.29% 이상의 생육을 보였다.

유효활력지수 분석 결과에서도 대조구 1092.5, SRCM 121380은 1335.83, SRCM 122352은 1369.16, SRCM 122353은 1257.5, SRCM 122354은 1123.33, SRCM 122355은 1285.83, SRCM 122356은 1307.5로 5종 모두 대조구에 비해 증가함을 확인하였다(Fig. 2). 특히, SRCM 121380, SRCM 122352 균주의 경우 대조구에 비해 22.27%, 25.32%로 높은 유효활력지수

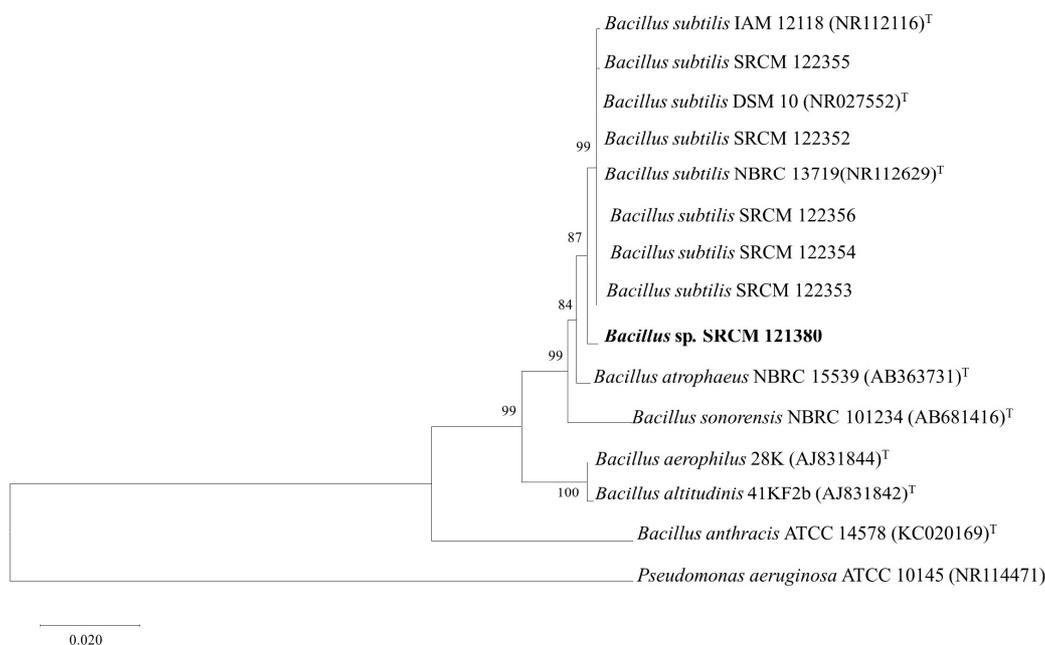


Fig. 3. Phylogenetic tree based on neighbor-joining method showing relationships between strain SRCM 121380 and members of the genus *Bacillus*. The percentage numbers at the nodes are the levels of bootstrap support (> 60%) based on maximum-likelihood analyses of 1,000 resampled data sets. Bar, 0.0005 nucleotide substitution per position.

Table 3. Carbohydrates assimilation test of SRCM 121380 using API 50 CHB kit

Enzyme ^a	SRCM 121380	Enzyme	SRCM 121380
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 4. Enzymatic activities test of SRCM 121380 using API ZYM kit

Enzyme ^a	SRCM 121380
Alkaline phosphatase	-
Esterase (C4)	+
Esterase (C8)	+
Lipase (C14)	+
Leucine arylamidase	+
Valine arylamidase	-
Crystine arylamidase	-
Trypsin	+
α -chymotrypsin	+
Acid phosphatase	-
Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	+
α -galactosidase	-
β -galactosidase	-
β -glucuronidase	-
α -glucosidase	+
β -glucosidase	-
N-acetyl- β -glucosaminase	-
α -mannosidase	-
α -fucosidase	-

^a+, utilized; -, not utilized.

를 보였다.

Yeo et al. (2009)의 연구 결과 보면 *B. subtilis* 균주를 통해 궁중 무 및 벼를 대상으로 식물 생육 촉진 연구 결과 60% 정도 촉진시켰으며, Lee et al. (2020)의 연구에서는 고추를 통한 연구 결과 발아 14일 차 측정 결과 대조구의 경우 47.2%에 비해 96.3%로 약 49% 정도 생육을 촉진시켰음을 확인하였다. 식물 생육은 세균이 생성하는 IAA와 같은 식물 생육 호르몬을 통해 식물 세포 분열 및 확장을 촉진하며 이를 통해 생육에 도움을 주는 것으로 보고된 바와 같은 결과를 확인하였다(Spaepen et al., 2007). 따라서 식물 생육 촉진 효과를 보인 선별 균주 5종 중 항진균 활성, siderophore 생성능, IAA 생성능 및 식물 생육 촉진에 우수한 SRCM 121380 균주를 최종 선별하였다.

최종 선별 균주 동정 및 phylogenetic tree 작성

최종 선별 균주인 SRCM 121380의 16S rRNA 분석을 통해 유전자 염기서열 분석하였으며, 염기서열을 토대로 maximum likelihood method를 사용하여 phylogenetic tree를 작성하였다(Fig. 3). 계통수의 신뢰도를 확보하기 위해 bootstrap 분석은 1,000회 실시하여 신뢰성을 향상시켰다. 최종적으로 활성이 우수한 *Bacillus* sp. SRCM 121380 (NCBI Accession No. OQ079996)로 선별하였다.

미생물학회지 제58권 제4호

최종 선별 균주의 생태학적 특성 분석

SRCM 121380 균주의 당 이용성을 확인하기 위해 API 50 CHB kit를 이용하여 측정한 결과 L-Arabinose, D-Ribose, D-xylose, D-glucose 등 17종의 당을 이용하는 것을 확인하였다(Table 3). 또한, API ZYM kit를 이용하여 효소 특성을 측정한 결과 esterase, lipase, leucine arylamidase, trypsin, α -chymotrypsin, naphtol-AS-BI-phosphohydrolase, α -glucosidase 활성을 확인하였다(Table 4). Esterase, lipase의 경우 그람 음성, 양성 균 포자에 중요한 구성성분인 지질과 관련 있으며, leucine arylamidase의 경우 단백질 동화 과정에 영향을 주는 것으로 알려져 있다(Kim et al., 2020). 따라서 SRCM 121380 균주의 경우 가수분해 효소 활성을 통해 식물 병원성 곰팡이의 생육을 억제할 수 있는 생물학적 방제제로 활용될 것으로 기대된다.

적 요

최근 다양한 문제로 인해 화학적 농약을 대체하기 위해 미생물을 활용한 생물학적 방제에 대한 관심이 대두되고 있다. 따라서 본 연구에서는 생물학적 방제제로서 이용 가능한 미생물을 확보하기 위해 전라북도 내 밭 및 논 토양에서 157종을 확보하였으며 분리 균주 대상으로 세포의 효소 활성 우수 균주 6종을 선별하였다. 선별한 6종을 대상으로 식물 병원성 곰팡이에 대한 항진균, siderophore, indole-3-acetic acid (IAA), 식물 생육 촉진능이 가장 우수한 SRCM 121380 균주를 최종 균주로 선별하였다. 최종 균주에 대해 16S rRNA 염기서열 분석을 통해 *Bacillus* sp. SRCM 121380으로 명명하였으며, 당 발효 및 효소 특성을 조사하였다. 이러한 결과를 토대로 SRCM 121380의 경우 식물 병원성 진균에 대한 항진균 활성 및 식물 생육 촉진 활성을 지니 생물학적 방제제로서의 잠재적 가치가 있을 것으로 판단된다.

감사의 말

본 연구는 2022년도 정부(농림축산식품부)의 재원으로 농축산식품 마이크로바이옴 통합 바이오뱅크 구축 사업의 지원을 받아 수행된 연구입니다.

Conflict of Interest

The authors have no conflict of interest to report.

References

- Choi S, Yoo JY, Park SJ, Park MJ, Lee OM, and Son HJ.** 2020. Isolation and characterization of siderophore-producing bacteria with various plant growth-promoting abilities as a potential biocontrol agent. *J. Environ. Sci. Int.* **29**, 925–933.
- Chung KC, Kim CB, Kim DK, and Kim BJ.** 2006. Isolation of antagonistic bacteria against major diseases in *Panax ginseng* CA Meyer. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* **14**, 202–205.
- Fravel DR.** 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. *Ann. Rev. Phytopathol.* **26**, 75–91.
- Han KH, Lee CU, and Kim SD.** 1999. Antagonistic role of chitinase and antibiotic produced by *Promicromonospora* sp. KH-28 toward *F. oxysporum*. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **27**, 349–353.
- Jung JH, Kim SW, Kim YS, Lamsal K, and Lee YS.** 2013. Inhibition effects against plant pathogenic fungi and plant growth promotion by beneficial microorganisms. *Korean J. Mycol.* **41**, 118–126.
- Jung TK, Kim JH, and Song HG.** 2012. Antifungal activity and plant growth promotion by rhizobacteria inhibiting growth of plant pathogenic fungi. *Korean J. Microbiol.* **48**, 16–21.
- Kim BY, Ahn JH, Weon HY, Song J, Kim SI, and Kim WG.** 2012. Isolation and characterization of *Bacillus* species possessing antifungal activity against ginseng root rot pathogens. *Korean J. Pestic. Sci.* **16**, 357–363.
- Kim HS, Kim JY, Lee SM, Park HJ, Lee SH, Jang JS, and Lee MH.** 2019a. Isolation and characterization of various strains of *Bacillus* sp. Having antagonistic effect against phytopathogenic fungi. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **47**, 603–613.
- Kim JY, Kim HS, Lee SM, Park HJ, Lee SH, Jang JS, and Lee MH.** 2020. Plant growth promoting and disease controlling activities of *Pseudomonas geniculata* ANG3, *Exiguobacterium acetylicum* ANG40 and *Burkholderia stabilis* ANG51 isolated from soil. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **48**, 38–47.
- Kim SK, Son JS, Kwon DK, and Ghim SY.** 2019b. Induced systemic resistance in plants by *Bacillus* sp. isolated from Dok-do Islands. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **47**, 596–602.
- Kim WJ and Song HG.** 2012. Interactions between biosynthetic pathway and productivity of IAA in some rhizobacteria. *Korean J. Microbiol.* **48**, 1–7.
- Kim JA, Song JS, Jeong MH, Park SY, and Kim YS.** 2021. Biocontrol of rice diseases by microorganisms. *Res. Plant Dis.* **27**, 129–136.
- Lee GJ, Han JH, Shin JH, Kim HT, and Kim KS.** 2013. Antifungal activity of *Bacillus* sp. GJ-1 against *Phytophthora capsici*. *Korean J. Mycol.* **41**, 112–117.
- Lee SM, Kim JY, Kim HS, Oh KY, Lee KH, Lee SH, and Jang JS.** 2021. Characterization of potential plant growth-promoting Rhizobacteria as biological agents with antifungal activity, plant growth-promoting activity, and mineral solubilizing activity. *J. Life Sci.* **31**, 641–653.
- Lee YR, Lee SM, Jang EY, Hong CO, Kim KK, Park HC, Lee SM, Kim YG, and Son HJ.** 2015. Isolation and characterization of *Bacillus* strain as a potential biocontrol agent. *J. Life Sci.* **25**, 1408–1414.
- Lee YY, Lee Y, Kim YS, Kim HS, and Jeon Y.** 2020. Control of red pepper anthracnose using *Bacillus subtilis* YGB36, a plant growth promoting Rhizobacterium. *Res. Plant Dis.* **26**, 8–18.
- Oh KY, Kim JY, Lee SM, Kim HS, Lee KH, Lee SH, and Jang JS.** 2021. Plant growth-promoting activity characteristics of *Bacillus* strains in the Rhizosphere. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **49**, 403–412.
- Ryu MS, Yang HJ, Jeong SJ, Seo JW, and Jeong DY.** 2019. Screening of antagonistic bacteria having antifungal activity against brown spot and sheath rot of rice. *Korean J. Mycol.* **47**, 259–269.
- Spaepen S, Vanderleyden J, and Remans R.** 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol. Rev.* **31**, 425–448.
- Tamura K and Nei M.** 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* **10**, 512–526.
- Teixeira da Silva JA, Kher MM, and Nataraj M.** 2016. Biotechnological advances in *Vitex* species, and future perspectives. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* **14**, 335–348.
- Yang HJ, Jeong SJ, Jeong SY, and Jeong DY.** 2014. Screening of antagonistic bacteria having antifungal activity against various phytopathogens. *Korean J. Mycol.* **42**, 333–340.
- Yeo SH, Yook YM, and Kim HS.** 2009. Isolation and characterization of plant growth promoting rhizobacterium *Bacillus subtilis* YK-5 from soil. *KSBB J.* **24**, 334–340.
- Yoon MY, Seo KH, Lee SH, Choi GJ, Jang KS, Choi YH, Cha BG, and Kim JC.** 2012. Antifungal activity of benzoic acid from *Bacillus subtilis* GDYA-1 against fungal phytopathogens. *Res. Plant Dis.* **18**, 109–116.
- Zhao X, Joo JC, and Kim JY.** 2021. Evaluation of heavy metal phytotoxicity to *Helianthus annuus* L. using seedling vigor index-soil model. *Chemosphere* **275**, 130026.