

Multiplex PCR을 이용한 생물방제균 *Bacillus subtilis* AH18의 토양내 Genetic Monitoring

우상민 · 임종희 · 정희영 · 김상달*
영남대학교 응용미생물학과

Genetic Monitoring of Plant Growth Promoting Rhizobacterium (PGPR), *Bacillus subtilis* AH18 using Multiplex PCR in Field Soil. Woo, Sang-Min, Jong-Hui Lim, Hee Young Jeong and Sang-Dal Kim*.

Department of Applied Microbiology, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea – The genetic monitoring method was developed for the rapid detection of the PGPR and biocontrol agent, *B. subtilis* AH18 in red-pepper field soil by multiplex PCR using *sid*, *aec* and *cel* gene primers. The monitoring of *B. subtilis* AH18 in the soil was carried by amplified a 2,3-dihydro-2,3-dihydroxy benzoate dehydrogenase [EC: 1. 3. 1. 28] gene (*sid* - 794 bp : EF408238) which is a key enzyme of siderophore synthesis, an auxin efflux carrier gene (*aec* - 1,052 bp : EF408239) and a cellulase gene (*cel* - 1,582 bp : EF070194). The natural unsterilized soil was inoculated with *B. subtilis* AH18 to determine the sensitivity (1.8×10^5 cfu/g) of multiplex PCR for the rapid detection and then the strain was monitored successfully in rhizosphere or non-rhizosphere soil of red-pepper cultural soil. At 3 weeks after the treatment, density of the strain was monitored more abundantly in rhizosphere soil.

Key words : Genetic monitoring, multiplex PCR (polymerase chain reaction), *Bacillus subtilis* AH18, PGPR, biocontrol

서 론

최근 환경오염으로 인한 피해사례가 급증하면서 환경문제가 세계적인 관심사로 떠오르게 되었다. 특히 농업의 경우에는 유기합성 농약과 화학비료 사용량의 증가로 농업생태계가 파괴되고, 농산물의 잔류농약 과다 검출로 소비자의 건강을 위협하고 있다. 최근 농업분야에서도 환경에 친화적이며 지속 가능한 농업방식이 절실히 요구되고 있으며, 우리나라를 비롯한 전 세계적으로 많은 종류의 환경친화적 농법이 성행하고 있고, 그 중에서 미생물제제를 이용한 미생물 농법이 최근 연구, 개발되어 활용되어지고 있다[8, 10, 16, 18, 37, 38].

미생물농법이란 화학농약과 합성비료를 대신하여 식물의 생육이나 질병방제에 직·간접적으로 좋은 영향을 끼칠 수 있는 미생물제제를 개발하여 농업에 이용하는 친환경 농법을 말하며, 지금까지 연구되어진 미생물제제의 특성은 식물생장을 촉진하는 물질 생산[9, 15, 21, 26]하거나, 식물의 저항성을 유도[28, 33] 또는 항생물질, siderophore 그리고 식물병원성 진균의 세포벽을 분해하는 가수분해효소 등의 작용으로 식물병원성 미생물을 직접적으로 저해 및 억제함으

로 식물병원성 미생물을 방제[16, 17, 19, 37, 38]하는 특성이 있다. 그리하여 많은 과학자들이 유용 토착길항미생물을 분리, 선발, 제제화 하여 실제 농업에 활용을 시도하고 있다. 하지만, 토양이라는 많은 미생물이 살아가는 환경에서 사용한 미생물제제가 어떻게 우점하는지, 어디에 어느 정도로 분포하는지에 대한 신속하고 간편한 추적, 확인하는 monitoring 방법은 Green Fluorescent Protein (GFP) 유전자를 이용한 monitoring 방법[1, 5] 이외에 거의 찾아 볼 수 없다.

최근 polymerase chain reaction (PCR) 및 Real-Time PCR을 이용해 인간의 삶에 해로운 영향을 미치는 *B. anthracis*[3, 35], *B. cereus*[32], *C. botulinum*[22], *C. jejuni*[25], *F. nucleatum*[11], *Vibrio* spp.[27], *Y. enterocolitica*[13, 20] 등과 이로운 영향을 미치는 *B. thuringiensis*[2, 24] 등의 미생물들과 병원성 virus[7, 31] 뿐만 아니라 유전자재조합 콩[12]도 신속하고 간편하게 monitoring하는 방법이 개발, 널리 활용되고 있다.

지금까지 토양 내에 처리된 미생물제제의 사용주기 및 사용 농도의 적합성에 대해 확인할 수 있는 방법이 없었다. 그리하여 토양 내에 처리된 미생물제제균을 신속하고 간편하게 monitoring하는 새로운 방법을 개발하고자 PCR 및 multiplex PCR을 활용하여 개발하고자 하였다. 본 방법은 유전자 조작을 하지 않고 미생물제제균이 생산하는 특유의 물질을 조사하여 그 생산물질에 해당하는 유전자 중 key enzyme이 되는 유전자를 기초로 primers를 합성하고, 토양

*Corresponding author

Tel: 82-53-810-2395, Fax: 82-53-810-4663

E-mail: sdkim@yumail.ac.kr

내 DNA를 주형으로 PCR 및 multiplex PCR을 수행하면 key enzyme의 유전자가 증폭됨으로, 증폭여부에 따라 미생물제균의 존재여부를 확인할 수 있는 방법이다. 따라서 본 연구는 식물성장 촉진능과 생물방제능을 동시에 지닌 *B. subtilis* AH18을 토양내에서 monitoring하기 위해 primers를 제작하였으며, 이를 토대로 PCR 및 multiplex PCR을 수행하였다. 그리고 고추를 이식한 토양에서 PCR 및 multiplex PCR를 이용해 *B. subtilis* AH18을 monitoring하여, 민감성과 토양내 분포 등을 조사하여 보고하는 바이다.

재료 및 방법

사용 균주 및 유전자

본 연구에 사용된 균주는 정 등[9]에 의해 분리, 선발된 식물성장촉진호르몬인 auxin과 식물병원성진균의 생육을 억제하는 siderophore 그리고 식물병원성 진균의 세포벽을 용해하는 cellulase를 동시에 생산하는 plant growth promoting rhizobacterium(PGPR)인 *Bacillus subtilis* AH18[9, 36]을 사용하였다. PCR로 증폭된 유전자의 cloning용 host cell은 *Escherichia coli* DH5 α 를 사용하였으며, 유전자 cloning 및 DNA sequencing용 vector는 pUC 18, 19 vector를 이용하였다. 사용한 균주 및 plasmid는 Table 1과 같다.

균주의 배양 및 배지

B. subtilis AH18의 배양조건 확인은 nutrient medium (Difco Co. U.S.A.)을 사용하였으며, 액체배양은 전배양액을 0.1%(v/v) 접종하여 30°C에서 160 rpm으로 24시간 진탕배양 하였고, 균주 보존용 고체배양은 nutrient agar에 30°C 항

온기에서 24시간 배양하였다. *E. coli*의 배양은 LB(Luria-Bertani) medium(Difco Co. U.S.A.)을 사용하였으며, 형질 전환 시 heat shock 후 유도배양에 사용한 배지는 SOC medium(tryptone 2 g, yeast extract 0.5 g, 1 M NaCl 1 mL, 1 M KCl 0.25 mL, filter-sterilized Mg²⁺ stock(1 M MgCl₂·6H₂O, 1 M MgSO₄·7H₂O) 1 mL, filter-sterilized 2 M glucose 1 mL, total 1 L)을 사용하였다. 액체배양은 전배양액을 0.1% (v/v) 접종하여 37°C에서 160 rpm으로 24시간 진탕배양 하였고, 균주 보존용 고체배양은 LB agar에 37°C 항온기에서 24시간 배양하였다. 형질전환 균주의 배양 및 보관은 LB agar에 ampicillin(50 μ g/mL)이 첨가된 배지를 사용하였다.

식물 및 토양

본 연구에 사용한 식물로는 고추(*Capsicum annuum* L., 부춘-Seminis Korea Co., 오피온-Seoul Seed Co.)을 이용하였으며, 고추 이식용 pot는 홍농 3공 컵 포트(90.0×90.0×70.0 mm)를 사용하였다. 생물방제력 확인을 위한 식물이식용 토양은 TKS2(Floragard, Germany)를 autoclave(121°C, 30분)하여 사용하였으며, monitoring을 위한 식물이식용 토양은 경산지역의 경작지 밭 토양을 그대로 사용하였다.

Multiplex PCR의 template DNA 준비.

B. subtilis AH18의 chromosomal DNA 분리는 DNeasy Tissue Kit(QIAGEN Inc., U.S.A.)를 사용하였다. Colony-PCR시 주형은 본 균주를 nutrient broth에 30°C에서 48시간 배양 후 원심분리하여 균체만 모아 멸균 증류수로 2회 세척하여 멸균증류수로 일정량 희석하여 사용하였다. 토양권역별 monitoring을 위한 template DNA는 토양 내에서 PowerSoil™ DNA Kit(Mo Bio Laboratories, Inc., U.S.A.)를 이용하여 DNA를 분리하여 사용하였다. Rhizosphere구는 근권, 즉 식물뿌리에 묻어있는 흙에서 DNA를 분리하였으며, non-rhizosphere구는 rhizosphere 이외의 식물뿌리로부터 근권영역의 2배 가량 떨어져 있는 상부와 뿌리 하부위치의 흙에서, endophytic구는 식물뿌리에 묻은 흙(rhizosphere)을 멸균 증류수로 2회 수세 후 식물뿌리를 마쇄한 후 동일한 kit를 이용하여 template DNA를 분리하였다.

Monitoring을 위한 PCR primer 및 multiplex PCR 조건

PCR용 primers는 Table 2에 나타내었으며, *B. subtilis*[14]의 genomic sequences들을 기초로 제작하였다. 각 primer들은 *B. subtilis* AH18이 생산하는 것으로 확인된 auxin의 방출에 관여하는 auxin efflux carrier (*aec*), siderophore의 생합성에 관여하는 2,3-dihydro-2,3-dihydroxy benzoate dehydrogenase[EC:1. 3. 1. 28] gene (*sid*) 그리고 cellulase structure gene (*cel*)의 유전자를 포함하게 제작하였다. Multiplex PCR용 Taq DNA polymerase는 Prime Taq DNA polymerase

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study.

Strain or plasmid	Relevant characterization	Reference
<i>Bacillus subtilis</i> AH18	Plant growth promoting and antifungal activity could produce auxin and siderophore.	Jung, H. K., et. al., 2006.
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F ⁻ , ϕ 80d _{lac} ZM15, Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rK ⁻ , mK ⁺), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ -, <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> .	Fermentas, Canada.
pUC 18, 19	2,686 bp, Ap ^r , <i>lacZ</i> .	Fermentas, Canada.
pAL 5	1,062 bp fragment containing auxin efflux carrier gene in pUC 18.	This study.
pSH 7	794 bp fragment containing 2,3-dihydro-2,3-dihydroxy benzoate dehydrogenase[EC : 1. 3. 1. 28] gene in pUC 19.	This study.
pCM 41	1,582 bp fragment containing cellulase gene in pUC 18.	This study.

Table 2. Oligonucleotide primers used in this study.

Primers ¹	Sequence (5' → 3')	T _m (°C)	Amplified size
<i>aec-1</i>	TGT AAA GCT AAA GTA TAC GGA CAT AGG AT	61.0	794 bp
<i>aec-2</i>	GTC ACT GTT CAA ATT TCA AAC CTA AAG	58.9	
<i>sid-1</i>	GAA TTG ATG ATA TGA ATG CAA AGG GTA TAG AGG GAA AAA	66.4	1,062 bp
<i>sid-2</i>	CAC GCC TAA GGT CGC CCC GC	67.6	
<i>cel-1</i>	AGA AGT GTA GAG CCA AAA TGA TGC GAA GGA	65.4	1,582 bp
<i>cel-2</i>	CGG ACA TCG TTA CTG ATG TCC GCC	66.1	

¹*aec*: auxin efflux carrier gene, *sid*: siderophore synthesis gene, *cel*: cellulase structure gene.

(Genet Bio Co., Ltd., Korea)를 사용하였으며, PCR 조성은 template DNA 2 µL에 10× reaction buffer 5 µL, 각각의 10 pM primer 1 µL, dNTP(10 mM) 3 µL, Taq DNA polymerase(5 unit/µL) 0.5 µL와 멸균증류수 33.5 µL를 가하여 총 final volume 50 µL가 되도록 하였다. PCR 조건은 94°C 5분(pre-denaturation) 후 94°C 60초(denaturation), 60°C 60초(annealing), 72°C 90초(polymerization), 29 cycle를 수행한 후 72°C 5분(post-polymerization)을 행하였다.

Gene cloning, DNA sequencing 그리고 상동성 확인

각각의 PCR fragment들의 cloning방법은 우 등[36]의 방법과 동일하게 실시하였다. 형질전환 후 선별배지에 도말하여 white-colony를 분리하였으며, 분리된 균주를 colony-PCR을 통해 형질전환 균주를 선별하였다. 형질전환 균주에서 recombinant plasmid를 정제 후 Solgent Co., Ltd. Korea 사에 의뢰하여 sequencing 하였으며 sequencing 결과는 NCBI의 BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)에서 blast 및 blastx를 통해 비교 확인하였다. 그 결과는 GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>)에 등록하였다.

Bacillus spp.에서의 primers 특이성 확인

Bacillus spp. 에 해당되는 11종의 균주를 한국농업미생물생물자원센터(KACC, <http://kacc.rda.go.kr/>)에서 분양받아 제작된 3종의 primers를 대상으로 PCR 및 mutiplex PCR을 수행하였다. 11종의 균주에서 chromosomal DNA 분리하여 PCR 및 multiplex PCR을 위와 동일한 방법으로 수행하였다. 뿐만 아니라 11종의 균주를 대상으로 auxin, siderophore, 그리고 cellulase의 생산을 확인하였다. Auxin 생산은 정 등의 방법[9] 즉, L-tryptophan 0.1%를 첨가한 King's B broth(2% proteose peptone No. 3, 0.15% K₂HPO₄, 0.15% MgSO₄·7H₂O, 1.5% glycerol, pH 7.2)에 전배양액을 1%

(v/v) 접종하고 30°C에서 3일간 배양한 후 배양상등액 1 mL에 Salkowski시약(0.5 M FeCl₃·6H₂O 1 mL in 35% HClO₄ 50 mL) 2 mL를 첨가하고 30분간 반응시킨 후 spectrophotometer를 이용하여 535 nm에서 측정하여 확인하였다. Siderophore는 CAS(chrome azurol S) blue agar[9]와 CAS liquid assay[37]로 확인하였으며, cellulase는 위와 동일한 방법인 Congo red plate방법[36]과 DNS 방법[38]으로 확인하였다.

일반토양에서 multiplex PCR을 통한 *B. subtilis* AH18의 monitoring

일반토양 200 mL를 이용해 pot에 고추를 이식 후 *B. subtilis* AH18의 균체를 멸균증류수에 현탁하여 10⁷ cfu/pot 관주하였으며, 대조구는 *B. subtilis* AH18을 처리하지 않았다. 7일간 매일 10 mL의 멸균증류수를 주면서 관찰하였으며, 그 후 식물체를 뽑아 rhizosphere과 non-rhizosphere을 125 mg씩 혼합하여 PowerSoil™ DNA Kit(Mo Bio Laboratories, Inc., U.S.A.)를 사용해 total DNA를 분리하였다. 분리된 DNA를 template DNA로 사용하여 PCR 및 multiplex PCR을 수행 후 *B. subtilis* AH18을 확인하였다.

B. subtilis AH18의 처리 농도별 monitoring 민감도 확인

B. subtilis AH18의 토양내 monitoring 민감도 확인을 위하여 일반토양 250 mg에 *B. subtilis* AH18의 균체(1.8×10⁷ cfu)를 10배씩 희석하여 접종하였으며, 이를 24시간 후 위와 동일한 방법으로 토양내 total DNA를 분리하였다. 그리고 이를 대상으로 PCR 및 multiplex PCR을 수행하여 monitoring을 위한 민감성을 확인하였다. *B. subtilis* AH18의 균체 수 확인은 접종하여 남은 균체를 nutrient agar에 희석 도말하여 확인하였다.

고추가 이식된 토양 내에서 *B. subtilis* AH18의 분포확인

토양내 *B. subtilis* AH18의 분포를 확인하기위해 뿌리내부 내생부위(endophytic), 근권(rhizosphere), 그리고 비근권(non-rhizosphere)로 구분하여 확인하였다. 고추를 일반토양을 이용하여 위와 동일한 방법으로 이식하였으며, *B. subtilis* AH18을 10⁷ cfu/pot로 관주처리 하였으며, 20일간 매일 10 mL의 멸균증류수를 주면서 관찰하였다. 그 후 endophytic, rhizosphere, 그리고 non-rhizosphere로 구분하여 DNA를 분리하였으며, 이를 template DNA로 PCR 및 multiplex PCR을 수행하여 *B. subtilis* AH18의 토양내 분포위치를 확인하였다.

고추가 이식된 토양 내에서 *B. subtilis* AH18의 기간별 monitoring

일반토양에 처리된 *B. subtilis* AH18의 우점능 기간을 확인하기위해 위와 동일한 방법으로 고추를 이식하였으며, *B.*

subtilis AH18를 10⁷ cfu/pot를 처리하여 7일 주기로 5주간 rhizosphere의 토양을 분리하여, total DNA를 분리 후 PCR 및 multiplex PCR을 통해 *B. subtilis* AH18의 우점능 기간을 확인하였다.

결과 및 고찰

***B. subtilis* AH18의 PCR fragment 및 sequencing**

B. subtilis AH18의 chromosomal DNA를 정제하여 이를 주형으로 *Pfu* DNA polymerase를 이용해서 PCR을 수행하였으며, 그 결과 약 800 bp(*sid*), 1.0 kb(*aec*), 1.6 kb(*cel*)의 fragment를 확인하였고, 각 fragment를 insert로 pUC 18, 19 vector를 이용해서 host cell인 *E. coli* DH5a에 cloning하였으며, 그 결과 recombinant DNA pSH 7(pUC 19 + *sid* product), pAL 5(pUC 18 + *aec* product), pCM 41(pUC 18 + *cel* product)를 획득하였다.

각각의 recombinant plasmid를 정제하여 sequencing한 결과 *sid*(794 bp), *aec*(1,062 bp), *cel*(1,582 bp)의 sequences를 확인하였으며 NCBI의 Genbank에 등록하였다(Genbank accession *sid*: No. EF408238, *aec*: No. EF408239, *cel*: No. EF070194). 그리고 각 fragment의 sequence를 BLAST의 blastx를 통해 비교한 결과 *sid* gene는 *B. subtilis*[14]의 siderophore의 생합성 key enzyme인 2,3-dihydro-2,3-dihydroxy benzoate dehydrogenase [EC:1. 3. 1. 28]에 97%의 상동성을 나타내었으며(data not shown), *aec* gene는 *B. subtilis*[14]의 auxin efflux carrier와 99%, *B. licheniformis* ATCC 14580[30]의 auxin efflux carrier와 77%의 상동성을 나타내었고(data not shown), *cel* gene는 *Bacillus* spp. 들이 생산하는 cellulase와 98%이상 일치하였다(Fig. 1). 본 연구에 사용된 primer들을 이용하여 PCR을 수행 후 agarose gel 상에서 확인하면, 794 bp, 1,062 bp 및 1,582 bp의 PCR products를 확인할 수 있으며(Fig. 2), 이는 siderophore, auxin 및 cellulase의 생산하는 *B. subtilis* AH18이 존재함을 토양 내에서 그 고유의 특정유전자들을 확인함으로써, 미생 물체제로 투여한 미생물의 토양내 존재를 간접적으로 나타 내는 결과이다.

Multiplex PCR을 통한 *B. subtilis* AH18의 확인

B. subtilis AH18의 PCR을 통한 monitoring을 위해 합성 된 primers들로 PCR을 수행하여 확인하였으며, 이들 3종의 primer들을 동시에 넣은 multiplex PCR법으로 3종의 유전자 와 동일한 위치의 triplex band를 확인하였다(Fig. 2). 이는 별개의 유전자를 각각 PCR하는 대신에 동일시간 동일 공간 내에서 동시에 PCR 함으로써 한번의 PCR로 간편하고 정확 하게 *B. subtilis* AH18과 같이 토양 내 투입된 특정미생물 을 손쉽게 확인가능하다는 것을 의미한다. 뿐만 아니라 *B. subtilis* AH18을 cell 그대로 PCR의 template로 사용 시

ABK63475	1	MMFRPKRSDMKRSISIFITCLLITLLTMGGMLASPASAAGTKTPVAKNGQLS1KGTQLVN	60
AAK94871	1M.....	60
P23549	1	51
AAC02536	1I.....	51
AAV34758	1I.....	51
ABK63475	61	RDGKAVQLKGISSHGLQWYGEYVKNKDSLKMLRDDWGI TVFRAAMYTAGGGYIDNPSVKNK	120
AAK94871	61	120
P23549	52I.....	111
AAC02536	52I.....	111
AAV34758	52I.....	111
ABK63475	121	VKEAVEAAKELGIYVITDWHILNDGNPNQNKKEKAKEFFKEMSSLYGNTPNVITYEIANEPN	180
AAK94871	121	180
P23549	112	M.....	171
AAC02536	112	171
AAV34758	112QF.....	171
ABK63475	181	GOVNVKRDIKPYAEVIVSVIRKNOPONIIIVGTGTVSQQVNDAAADDQLKDNANMYALHFY	240
AAK94871	181ECD.....	240
P23549	172D.....	231
AAC02536	172	231
AAV34758	172	231
ABK63475	241	AGTHGQFLRDKANYALSKGAPIFVTEWGTSDASNGGVFLDQDSREHLKYLDSKTI SWNVW	300
AAK94871	241	300
P23549	232	291
AAC02536	232	291
AAV34758	232N.....	291
ABK63475	301	NLSDKQESSALKPGASKTGGWRLSDLSASGTFVRENI LGTKDSTKDI PETPAKDKPTQE	360
AAK94871	301R.....	360
P23549	292	351
AAC02536	292A.....	351
AAV34758	292S.....	351
ABK63475	361	NGISVQYRAGDGMNSNQIRPQLQIKNNGNTTVDLKDVITARYWYNKNGQNVDCDYAQL	420
AAK94871	361K.....F.....I.....	420
P23549	352	411
AAC02536	352K.....K.....F.....I.....	411
AAV34758	352K.....K.....F.....I.....	411
ABK63475	421	GCGNVTYKFVTLHKPKGADTYLELGFKNGLTAPGASTGNIQLRLHNDSDNSYAQSGDYS	480
AAK94871	421H.....	480
P23549	412	471
AAC02536	412H.....G.....	471
AAV34758	412H.....	471
ABK63475	481	FFKSNFTKTKKITLYDQGLI WGTEN	508
AAK94871	481	508
P23549	472	499
AAC02536	472	499
AAV34758	472S.....	499

Fig. 1. Sequence alignment of deduced amino acid sequences for *Bacillus* cellulase. The sequences shown here are ABK63475 from *B. subtilis* AH18, AAK94871 from *B. subtilis*, P23549 from *B. subtilis* BSE616, AAC02536 from *Bacillus* sp. 79-23, AAV34758 from *Bacillus* sp. HY2-3.

multiplex PCR을 통해 비교한 결과 DNA를 template로 사 용한 PCR 경우와 동일한 결과를 얻을 수 있었다(Fig. 3). 이 방법은 미생물의 template DNA를 정제하는 비용과 시간을 많이 줄여 효율적으로 PCR을 이용해 환경내 미생물을 신속 하고 간편하게 검출하는데 많은 활용될 것이다. Multiplex PCR은 PCR에 비해 특정 유전자를 동시에 증폭함으로써 다 른 미생물로 인한 비 특이적 증폭을 배제할 수 있으며,

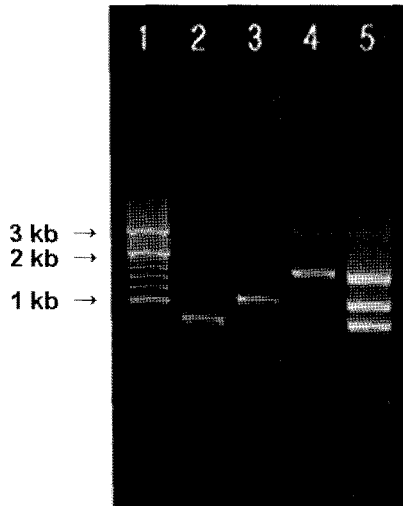


Fig. 2. Confirmation of *B. subtilis* AH18 using PCR and multiplex PCR. 1, 200 bp DNA ladder (Fermentas life sciences Co. Ltd); 2, siderophore synthesis gene (794 bp); 3, auxin efflux carrier gene (1,062 bp); 4, cellulase structure gene (1,582 bp); 5, multiplex PCR.

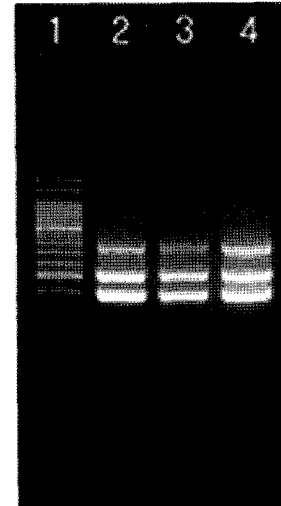


Fig. 3. Multiplex PCR fragments amplified from *B. subtilis* AH18 colony or chromosomal DNA. 1, 200 bp DNA ladder (TaKaRa biotechnology Co. Ltd); 2, 3, colony multiplex PCR; 4, chromosomal DNA multiplex PCR.

triplex band의 동시 증폭만이 토양내 *B. subtilis* AH18의 존재를 확인 할 수 있었다.

지금까지 많은 종의 PGPR균주들이 보고되었고, 이 중에서 *Bacillus* sp. 균주들만 수십 종에 달한다[6]. 그리하여 본 연구에 사용된 *B. subtilis* AH18균의 monitoring용으로 제작된 3쌍의 primers를 이용하여 11종의 *Bacillus* spp.의 chromosomal DNA를 대상으로 PCR 및 multiplex PCR 수행 결과 우리가 원하는 size의 band를 확인할 수 없었다. 뿐만 아니

라 phenotype에서 auxin, siderophore, 그리고 cellulase의 생산능이 확인된 3종의 *Bacillus subtilis*에 대해서도 어떠한 증폭도 확인되지 않았다(Table 3). 이로부터 본 연구에 사용된 3쌍의 primer는 *B. subtilis* AH18균주의 monitoring에 사용되며, 본 균주와 동일한 phenotype 및 genotype을 나타내는 균주 즉, auxin, siderophore, 그리고 cellulase를 생산하는 균주의 monitoring에도 활용될 것이다.

Table 3. Specificity of primer pairs designed for PCR and multiplex PCR on various *Bacillus* spp. strains.

Strains	Phenotype ¹			Genotype (PCR amplification) ²				
	Aux	Sid	Cel	aec	sid	cel	Multiplex	
<i>Bacillus cereus</i>	KACC 10097	-	-	+	-	-	-	-
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	KACC 10098	+	-	+	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	KACC 10111	+	+	+	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	KACC 10112	+	+	+	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	KACC 10113	+	+	+	-	-	-	-
<i>Bacillus</i> sp.	KACC 10156	+	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus licheniformis</i>	KACC 10476	+	+	+	-	-	-	-
<i>Bacillus megaterium</i>	KACC 10482	+	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus sphaericus</i>	KACC 10554	+	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus coagulans</i>	KACC 11248	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus mycoides</i>	KACC 12063	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus licheniformis</i> K11	KACC 91206P	+	+	+	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> AH18	this study	+	+	+	+	+	+	+

¹Aux: Auxin production was determined by Salkowski reagent (35% of perchloric acid, 1 mL 0.5 M FeCl₃ solution, total 50 mL), Sid: Siderophore production was determined by CAS (chrome azurol S) blue agar, Cel: Cellulase production was determined by congo red staining of nutrient agar plate containing CMC (carboxymethyl cellulose).

²aec: auxin efflux carrier primer, sid: siderophore synthesis primer, cel: cellulase structure gene primer.

+: positive result, -: negative result.

미 살균 일반경작지 토양에서의 *B. subtilis* AH18의 확인 및 민감성 확인

일반경작지토양에는 많은 종류의 미생물들이 존재하며 그 중에서 특정 유전자를 소유하고 있는 *B. subtilis* AH18을 확인하기 위해 토양에서 DNA를 각각 분리하여 PCR 및 multiplex PCR을 수행하였다. 그 결과 *B. subtilis* AH18을 투여한 토양에서만 *B. subtilis* AH18의 각각의 특정 고유유전자 band만 확인할 수 있었다(data not shown). 그리하여 multiplex PCR 실시결과 *B. subtilis* AH18을 투여한 토양에서는 3종의 특정 고유유전자의 triple band가 확인되었고, 균주를 투여하지 않은 토양에서는 primer dimer만 관찰되었다(Fig. 4). 이는 *B. subtilis* AH18을 투여 후 7일이 지난 후에도 토양내에서 사멸되지 않고 존재함을 의미하여, 3종의 primers들을 이용해 PCR 및 multiplex PCR을 하면 타 유사 토양미생물과 구분하여 *B. subtilis* AH18의 존재를 확인할 수 있었다. 이 방법은 향후 경작지 토양내에서 생물방제를 위해 처리된 미생물제제의 존재유무와 토양내 우점능력을 확인하는데 널리 활용될 것으로 사료된다.

또한 토양내에서 *B. subtilis* AH18의 민감성 확인을 위하여 PCR 및 multiplex PCR 수행 결과, 두 PCR 모두 동일하게 *B. subtilis* AH18가 토양내 $1.8 \pm 0.3 \times 10^5$ cfu/g 이상 존재 시 monitoring이 가능하였다(Fig. 5). 이는 지금까지 보고된 토양내 rhizobacteria의 10^5 cfu/g of root 농도 이상이 존재 시 유도저항성 및 방제능을 나타낸다는 보고처럼[23, 34], 본 균주의 PCR 및 multiplex PCR을 통한 monitoring 농도가 10^5 cfu/g 임을 생각할 때, 위의 primers를 이용한 monitoring 방법을 이용하면 경작지 토양내에서 유효농도의 미생물제제를 monitoring 할 수 있는 새로운 방법이라고 생각한다.

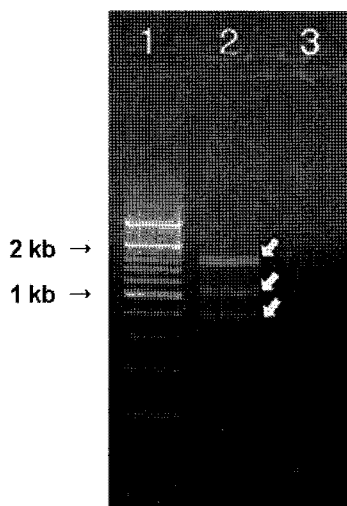


Fig. 4. Multiplex PCR detection of *B. subtilis* AH18 in DNA templates prepared from field soil. 1, 200 bp DNA ladder (Fermentas life sciences Co. Ltd); 2, inoculated soil; 3, non-inoculated soil.

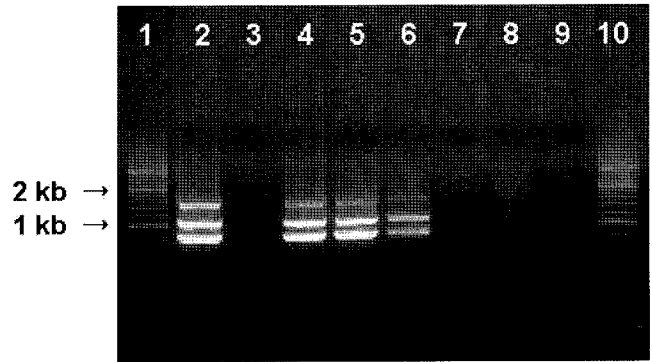


Fig. 5. Multiplex PCR sensitivity assay for detecting DNA of *B. subtilis* AH18 from field soil. 1, 10: 200 bp DNA ladder (Fermentas life sciences Co. Ltd); 2, chromosomal DNA multiplex-PCR (positive control); 3, non-inoculated soil (negative control); 4, inoculated soil ($1.8 \pm 0.3 \times 10^7$ cfu/g); 5, inoculated soil ($1.8 \pm 0.3 \times 10^6$ cfu/g); 6, inoculated soil ($1.8 \pm 0.3 \times 10^5$ cfu/g); 7, inoculated soil ($1.8 \pm 0.3 \times 10^4$ cfu/g); 8, inoculated soil ($1.8 \pm 0.3 \times 10^3$ cfu/g); 9, inoculated soil ($1.8 \pm 0.3 \times 10^2$ cfu/g).

고추가 이식된 토양 내에서 *B. subtilis* AH18의 분포확인 및 우점기간 확인

고추 식물체의 endophytic과 rhizosphere, 그리고 non-rhizosphere에서 DNA를 분리하여 PCR 및 multiplex-PCR을 수행하였다. 그 결과 rhizosphere와 non-rhizosphere에서 우점한 *B. subtilis* AH18의 triple band는 뚜렷이 확인할 수 있었지만, non-rhizosphere에서는 triple band 이외에 여러 다른 band도 확인 할 수 있었다. 이는 토양 내 수많은 미생물들의 존재를 나타내고 있으며 non-rhizosphere에서는 *B. subtilis* AH18이 우점을 하지 못하고 있는 것으로 사료된다. 즉, *B. subtilis* AH18은 식물체의 rhizosphere와 non-

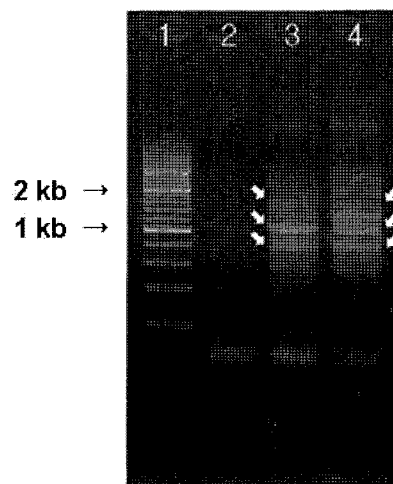


Fig. 6. Monitoring of *B. subtilis* AH18 distribution in DNA templates prepared from red-pepper cultural soil by multiplex PCR. 1, 200 bp DNA ladder (Fermentas life sciences Co. Ltd); 2, endophytic; 3, rhizosphere; 4, non-rhizosphere.

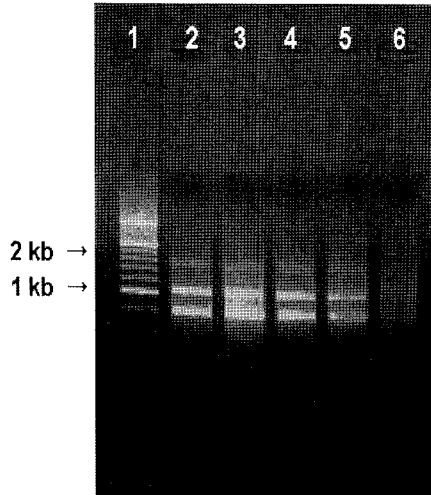


Fig. 7. Temporal monitoring of the presence or absence of *B. subtilis* AH18 in red-pepper cultural rhizosphere soil by multiplex PCR. DNA was extracted from red-pepper cultural rhizosphere soil within the plots at 0, 1, 2, 3, and 4 weeks. 1, 200 bp DNA ladder (Fermentas life sciences Co. Ltd); 2, 0 weeks; 3, 1 weeks; 4, 2 weeks; 5, 3 weeks; 6, 4 weeks.

rhizosphere에서 모두 triple band를 확인할 수 있으며(Fig. 6), 이는 *B. subtilis* 종들의 토양내에 널리 분포한다는 보고 [4, 29]와 동일하였다. 또한 *B. subtilis* AH18의 처리 기간별 monitoring을 위해 PCR 및 multiplex PCR 결과, 3주 동안은 토양내에서 유효미생물제제 농도인 10^5 cfu/g 이상이 확인됨으로 영양형 세포 이외에 포자형으로 변형된 세포수까지 감안한다면 충분한 밀도 이상으로 3주 이상 토양내 우점할 수 있는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 7). 이는 본 균주를 이용해서 미생물제제를 개발 사용한다면 영양형 세포의 기준으로 3주 간격으로 미생물제제의 처리 시 식물성장촉진능과 생물방제능을 유지할 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

식물성장촉진물질인 auxin을 비롯한 식물병원성진균을 방제하는 siderophore 그리고 식물병원성 진균의 세포벽을 분해하는 cellulase를 동시에 생산하는 생물방제균주 *B. subtilis* AH18의 토양내 monitoring을 위하여 각 생산물질에 관여하는 유전자를 기초로 primer(*sid*, *aec*, *cel*)를 제작하였다. Single PCR 및 multiplex PCR을 수행하여 800-bp(*sid*), 1000-bp(*aec*), 1600-bp(*cel*)의 DNA fragment를 확인하였으며, 각각의 fragment는 siderophore의 생합성 key enzyme인 2,3-dihydro-2,3-dihydroxy benzoate dehydrogenase[EC:1.3.1.28]gene (*sid* - 794 bp)이며, auxin efflux carrier gene (*aec* - 1052 bp), 그리고 cellulase gene(*cel* - 1582 bp)임을 확인하고, NCBI의 Genbank에 등록하였다(Genbank accession *sid*: No. EF408238, *aec*: No. EF408239, *cel*: No. EF070194). 또한 *B. subtilis* AH18을 처리한 일반 경작지 토양에서

multiplex PCR을 통하여 3종의 유전자에서 증폭된 triple band를 확인하였으며, 고추를 실제 토양을 이용해 Pot에 이식 후 고추의 rhizosphere와 non-rhizosphere에서 *B. subtilis* AH18의 존재를 확인할 수 있다. 뿐만아니라 본 균주를 고추가 이식된 Pot의 토양에 처리 후 monitoring시 민감도는 1.8×10^5 cfu/g이었고, monitoring 가능한 기간은 3주이상 확인할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 Biogreen 21 사업(과제번호:105649) 지원에 의하여 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Boldt, T. S., J. Sorensen, U. Karlson, S. Molin, and C. Ramos. 2004. Combined use of different *gfp* reporters for monitoring single-cell activities of a genetically modified PCB degrader in the rhizosphere of alfalfa. *FEMS Microbiol. Ecol.* **48**: 139-148.
- Bourque, S. N., J. R. Valero, J. Mercier, M. C. Lavoie, and R. C. Levesque. 1993. Multiplex polymerase chain reaction for detection and differentiation of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microb.* **59**: 523-527.
- Cheun, H. I., S. I. Makino, M. Watarai, J. Erdenebaatar, K. Kawamoto, and I. Uchida. 2003. Rapid and effective detection of anthrax spores in soil by PCR. *J. Appl. Microbiol.* **95**: 728-733.
- Demoz, B. T. and L. Korsten. 2006. *Bacillus subtilis* attachment, colonization, and survival on avocado flowers and its mode of action on stem-end rot pathogens. *Biol. Control.* **37**: 68-74.
- Gera, R., D. V. Pathak, and P. K. Sharma. 2003. Monitoring rhizosphesre colonization by *Azospirillum* using constitutively expressed *gfp* gene. *Ind. J. Microbiol.* **43**: 219-222.
- Glick, B. R., C. L. Patten, G. Patten, and D. M. Penrose. 1999. *Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria*. Imperial College Press. Canada.
- Hui, C. K., S. Bowden, H. Y. Bowden, A. Wong, S. Lewin, F. Rousseau, H. Mommeja-Marin, N. P. Lee, J. M. Luk, and S. Locarnini. 2006. Comparison of Real-Time PCR Assays for Monitoring Serum Hepatitis B Virus DNA Levels during Antiviral Therapy. *J Clin. Microbiol.* **44**: 2983-2987.
- Jung, H. K., J. C. Ryoo, and S. D. Kim. 2005. A multi-microbial biofungicide for the biological control against several important plant pathogenic fungi. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* **48**: 40-47.
- Jung, H. K., J. R. Kim, S. M. Woo and S. D. Kim. 2006. An auxin producing plant growth promoting rhizobacterium *Bacillus subtilis* AH18 which has siderophore-Producing biocontrol activity. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 94-100.

10. Kang, S. J., J. H. Kim, and G. J. Joo. 2005. Isolation of antagonistic bacteria against *Fusarium oxysporum* and physicochemical properties of compost mixed with microbial formulation. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* **23**: 342-350.
11. Kim, M. K., H. S. Kim, B. O. Kim, S. Y. Yoo, J. H. Seong, D. K. Kim, S. E. Lee, S. J. Choe, J. C. Park, B. M. Min, M. j. Jeong, D. K. Kim, Y. K. Shin, and J. K. Kook. 2004. Multiplex PCR using conserved and species-specific 16s rDNA primers for simultaneous detection of *Fusobacterium nucleatum* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **14**: 110-115.
12. Kim, M. Y., J. H. Kim, H. J. Kim, S. H. Park, G. J. Woo, and H. Y. Kim. 2003. Monitoring of genetically modified soybean and processed foods in Korean market using PCR. *J. Kor. Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **46**: 344-347.
13. Kim, Y. S., J. B. Kim, and Y. B. Eom. 2004. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains by a rapid and specific multiplex PCR assay. *J. Exp. Biomed. Sci.* **10**: 333-339.
14. Kunst F., N. Ogasawara, I. Moszer, A. M. Albertini, G. Alloni, V. Azevedo, M. G. Bertero *et al.* 1997. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature.* **390**: 249-256.
15. Kwon, D. H., J. H. Choe, H. K. Jeong, J. H. Lim, G. J. Ju, and S. D. Kim. 2004. Selection and identification of auxin-producing plant growth promoting rhizobacteria having phytopathogen antagonistic activity. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* **47**: 17-21.
16. Lee, E. T., and S. D. Kim. 2000. Selection and antifungal activity of antagonistic bacterium *Pseudomonas* sp. 2112 against red-pepper rotting *Phytophthora capsici*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 334-340.
17. Lee, I. K., C. J. Kim, S. D. Kim, and I. D. Yoo. 1990. Antifungal antibiotic against fruit rot disease of red pepper from *Streptomyces parvullus*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 142-147.
18. Lee, J. M., E. S. Do, S. B. Baik, and S. C. Chun. 2003. Effect of organic amendments on efficacy of biological control of seedling damping-off of cucumber with several microbial products. *Kor. J. Mycology.* **31**: 44-49.
19. Lee, J. M., H. S. Lim, T. H. Chang, and S. D. Kim. 1999. Isolation of siderophore-producing *Pseudomonas fluorescens* GL7 and its biocontrol activity against root-rot disease. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 427-432.
20. Lee, T. S., B. K. Park, and D. W. Oh. 2003. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in drinking water and vegetables by multiplex-PCR. *J. Kor. Soc. Food. Sci. Nutr.* **32**: 35-41.
21. Leonid, N. T., M. J. Lee, M. K. Lee, H. Park, and J. H. Yoon. 2000. Production of auxins and auxin-like compounds by ginseng growth-promoting Bacterium *Pseudomonas fluorescens* KGPP 207. *Agric. Chem. Biotechnol.* **43**: 264-268.
22. Lindstrom, M., M. Nevas, and H. Korkeala. 2006. Detection of *Clostridium botulinum* by multiplex PCR in foods and feces. *Method. Biotechnol.* **21**: 37-45.
23. Liu, L., J. W. Kloepper, and S. Tuzun. 1995. Induction of systemic resistance in cucumber by plant growth-promoting rhizobacteria: duration of protection and effect of host resistance on protection and root colonization. *Phytopathology* **85**: 1064-1068.
24. Mahadi, N. M., S. Hastowo, B. Lay, and D. H. Dean. 1998. Application of multiplex PCR for rapid determination of *cryI* gene profiles of new *Bacillus thuringiensis* isolates. *J. Microbiol. Biotechnol.* **8**: 517-522.
25. Martinez, I., E. Mateo, E. Churrua, C. Girbau, R. Alonso, and A. Fernandez-Astorga. 2005. Detection of *cdtA*, *cdtB*, and *cdtC* genes in *Campylobacter jejuni* by multiplex PCR. *Int. J. Med. Microbiol.* **296**: 45-48.
26. Oh, Y. J. 2000. Cultural conditions for the improvement in gibberellic acid productivity by a mutant of *Gibberella fujikuroi* ATCC 12616 - *Gibberella fujikuroi* G-36. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 152-155.
27. Panicker, G., D. R. Call, M. J. Krug, and A. K. Bej. 2004. Detection of pathogenic *Vibrio* spp. in shellfish by using multiplex PCR and DNA microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 7436-7444.
28. Ping, L. and W. Boland. 2004. Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Trends Pla. Sic.* **9**: 263-266.
29. Reva, O. N., C. Dixelius, J. Meijer, and F. G. Priest. 2004. Taxonomic characterization and plant colonizing abilities of some bacteria related to *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **48**: 249-259.
30. Rey M. W., P. Ramaiya, B. A. Nelson, S. D. Brody-Karpin, E. J. Zaretsky, M. Tang *et al.* 2004. Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. *Genome Biol.* **5**: R77.
31. Rhoads, J. A., K. S. Rhoads, J. A. Riesing, K. S. Pabich, E. K. Thamm, S. Zoulim, F. Thibault, V. Mullen, C. R. Pabich, E. K. Thamm, S. Zoulim, F. Thibault, V. and C. R. Mullen. 2006. Characteristics of a new automated real time PCR assay for monitoring HBV patients. *J. Clin. Virol.* **36**: S6.
32. Sergeev, N., M. Distler, M. Vatgas, V. Chizhikov, K. E. Herold, and A. Rasooly. 2006. Microarray analysis of *Bacillus cereus* group virulence factors. *J. Microbiol. Meth.* **65**: 488-502.
33. Sturtevant, D. B., and B. J. Taller. 1989. Cytokinin production by *Rhizobium japonicum*. *Plant physiology.* **39**: 1247-1452.
34. van Loon, L. C., P. A. H. M. Bakker, and C. M. Pieterse. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **36**: 453-483.
35. Wang, S. H., J. K. Wen, Y. F. Zhou, Z. P. Zhang, R. F. Yang, J. B. Zhang, J. Chen, and X. E. Zhang. 2004. Identification and characterization of *Bacillus anthracis* by multiplex PCR on DNA chip. *Biosens. Bioelectron.* **20**: 807-813.
36. Woo, S. M., H. K. Jung, and S. D. Kim. 2006. Cloning and characterization of a cellulase gene from a plant growth

- promoting rhizobacterium, *Bacillus subtilis* AH18 against phytophthora blight disease in red-pepper. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 311-317.
37. Woo, S. M., J. U. Woo, and S. D. Kim. 2007. Purification and characterization of the siderophore from *Bacillus licheniformis* K11, a multi-functional plant growth promoting rhizobacterium. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **35**: 128-134.
38. Woo, S. M. and S. D. Kim. 2007. Confirmation of non-siderophore antifungal substance and cellulase from *Bacillus licheniformis* K11 containing antagonistic ability and plant growth promoting activity. *J. Life. Science.* **17**: 983-989.

(Received Nov. 3, 2008/Accepted Jan. 22, 2009)