

벼 근권에서 분리한 방선균의 다양성과 항균 활성

이혜원 · 안재형 · 원항연 · 송재경 · 김병용*

농촌진흥청 국립농업과학원 농업미생물과

Diversity and Antimicrobial Activity of Actinomycetes Isolated from Rhizosphere of Rice (*Oryza sativa* L.)

Hye-Won Lee, Jae-Hyung Ahn, Hang-Yeon Weon, Jaekyeong Song, Byung-Yong Kim*

Division of Agricultural Microbiology, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-853, Korea

(Received on November 14, 2013. Revised on November 28, 2013. Accepted on December 10, 2013)

Abstract Various microorganisms live in soil, of which those colonizing rhizosphere interact with nearby plants and tend to develop unique microbial communities. In this study, we isolated diverse actinomycetes from rhizosphere of rice (*Oryza sativa* L.) cultivated in fertilized (APK) and non-fertilized (NF) paddy soils, and investigated the diversity and antimicrobial activity of them. Using four kinds of selective media, 152 isolates were obtained from the soil samples and identified by determining 16S rRNA gene sequence. All of the isolates showed 99.0%~100.0% similarities with type strains and were classified into six genera: *Dactylosporangium*, *Micromonospora*, *Kitasatospora*, *Promicromonospora*, *Streptomyces* and *Streptosporangium*. Most of the isolates, 143 isolates, were classified into the genus *Streptomyces*. Additionally, many isolates had antimicrobial activity against plant pathogens, especially *Magnaporthe oryzae* (rice blast pathogen) in fungi. These findings demonstrated that rice rhizosphere can be a rich source of antagonistic actinomycetes producing diverse bioactive compounds.

Key words Actinomycetes, Rice rhizosphere. Antimicrobial activity

서 론

호기성 그램 양성 세균인 방선균은 토양 환경에 널리 분포하는 주요한 토양 미생물 분류군이다. 토양 환경에서 서식하는 방선균의 수와 종은 토양의 온도, pH, 유기물함량, 경작상태, 통기 및 습도 등에 영향을 받는다(Goodfellow, 2010). 방선균은 풍부한 이차 대사산물들을 생산하는 것으로 잘 알려져 있으며, 다양한 기능성을 가지고 있어 식품, 환경 및 농산업 분야에도 널리 활용될 수 있는 유용한 생물소재 자원이다(Morales et al., 2007; Jog et al., 2012). 지금까지 발견된 항생물질 중의 75% 이상이 방선균에서 유래되었고, 항암제, 면역조절제, 유용효소 등 다양한 생리활성물

질의 약 64% 정도가 방선균에서 유래된 것으로 보고되어 있다(Brady, 2005). 이러한 특성으로 방선균을 활용해서 식물 병을 억제하고 식물 성장을 촉진시키는 다양한 연구들이 보고되고 있다(El-Tarabily et al., 2010; Ruanpanun et al., 2010; Kinkel et al., 2012).

식물 근권은 식물의 뿌리가 직접적으로 토양과 접촉하는 영역으로, 식물 뿌리와 토양 미생물의 직·간접적인 상호작용이 다양하게 이루어지고 있는 곳이다(Dennis et al., 2009). 근권에 서식하는 미생물은 식물로부터 유래된 뿌리 삼출물 속의 키틴, 셀룰로즈, 펙틴과 같은 양분에 쉽게 접할 수 있고 일부는 이를 통해 빠르게 성장하여 군집을 형성한다. 이러한 근권 미생물들은 식물 근권 부위에서 양분과 수분의 흡수를 촉진하여 식물 뿌리의 신장에 관여하며, 근권 내 병원성 유해미생물 및 병해충의 발생을 억제함으로써 작물의 생육을 조절하는 매우 중요한 역할을 수행한다(Zhang et al., 2012). 이들 미생물들은 식물과도 활발한 상호작용을

*Corresponding author

Tel: +82-31-290-8475, Fax: +82-31-290-8488

E-mail: greg6044@gmail.com

한다. 예를 들어 식물 뿌리에서는 다양한 방향족 화합물, 당, 아미노산, 유기산, 탄수화물과 같은 물질들이 분비되어 특정 근권 미생물의 군집 형성을 결정짓기도 한다(Dennis et al., 2009). 즉, 식물의 근권 속 미생물 군집이 단순히 무작위적으로 형성되는 것이 아니라 식물 스스로에게 유익한 미생물들을 선별하는 기능이 작용하고 있음을 유추할 수 있다(Berg and Smalla, 2009; Ladygina and Hedlund, 2010). 따라서 근권 토양은 작물의 생육에 도움을 주는 미생물의 분리원으로서 유용가치가 매우 높으며, 이와 같은 관점에서 다양한 연구가 이루어져 왔다. 최근에는 근권 미생물 전체를 통일된 군집으로 간주하여 식물의 성장 건전성을 근권 미생물의 군집구조와 연결시켜 파악하고, 미생물 군집을 조작하여 식물의 성장을 변화시키려는 새로운 연구들이 시도되고 있다(Berendsen et al., 2012; Bulgarelli et al., 2012; Chaparro et al., 2012)

벼(*Oryza sativa* L.)는 아시아 전역에서 널리 재배되며, 세계적으로 매우 중요한 핵심적인 식량작물이다. 벼의 생산성을 증대시키기 위하여 다양한 농법의 개량 및 육종이 오랜 기간 동안 끊임없이 이루어져 왔다(Knief et al., 2012). 현대에 이르러서는 벼와 같은 주요 식량 작물의 병해충 방제에 유기합성 농약을 기본으로 하는 화학방제 시스템을 널리 이용하였는데, 이는 효과가 빠르고 좋으며, 비용이 적게 드는 장점이 있다. 그러나 화학 농약의 오남용, 독성, 환경 오염 및 자연생태계에 미치는 악영향과 약제내성의 출현 등에 의한 약효감소 등 부작용이 증가하고 있다는 사실이 점차 사회적으로 논란을 일으키고 있다. 따라서 이를 극복할 수 있는 대안으로 환경오염을 최소화하면서 지속적인 농업이 가능한 친환경 농업이 제시되었다. 자연 상태에 존재하는 토착미생물을 이용하여 만드는 미생물 제제를 이용한 친환경 농업은 생태계에 영향을 주지 않으면서도 병, 해충을 억제하며, 농작물의 성장을 촉진하는 기능이 있다(Prez-Garca et al., 2011). 따라서 친환경 농업과 차별화된 고품질의 안전농산물 생산을 위해서 유용한 토착 미생물을 새롭게 발굴하여 활용하는 것은 매우 중요한 접근방법이다.

본 연구에서는 벼 근권에 존재하는 방선균의 다양성과 기능성을 조사하기 위해서, 근권으로부터 가능한 한 많은 방선균을 직접 분리하였다. 분리된 방선균들을 대상으로 계통학적 방법으로 다양성을 조사하였다. 또한 식물병원성 곰팡이와 세균들을 대상으로 항균활성을 분석하여, 유용한 균주를 확보하여 친환경 농업에 활용 가능한 생물소재로서 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

시료 채취 및 처리

본 연구에 이용할 벼 근권 토양 시료를 채취하기 위해서

경기도 수원시 서둔동 소재 국립농업과학원 장기 연용 시험 포장(37° 16' N, 126° 59' E)을 선정하였다. 시험 포장은 1954년 이후로 각기 다른 조합의 비료 성분을 구획(6.3 × 8.3 m)별로 사용하여 왔으며, 이들 처리구 중 3요소구(APK)와 무비구(NF)에서 시료를 채취하였다. 공시 토양의 특성, 공시품종, 경종 개요 등은 기존 연구에 자세히 기술되어 있다(Yeon et al., 2007; Kim et al., 2012a). 시료를 채취한 시기는 2012년 2월이었으며 각 시험 포장 안에서 세 군데를 무작위적으로 선택하여 벼(삼광벼, *Oryza sativa* L.)의 뿌리를 근권 토양과 함께 채취하였다. 채취한 벼의 뿌리를 3회에 걸쳐 멸균 증류수로 세척한 후 최종적으로 세척한 증류수를 원심분리하여 근권 토양을 분리하였다. 같은 시험 포장에서 분리한 근권 토양과는 혼합하여 실험을 위한 재료로 사용하였다

방선균의 선택적인 배양 및 분리

각각의 토양 시료 2 g에 멸균 생리식염수(0.85% NaCl) 18 ml을 첨가하고 30분간 충분히 현탁하여 10⁻¹로 희석하였다. 항온수조에서 55°C, 20분간 처리 후 멸균 생리식염수로 10배 단위로 10⁻⁷까지 단계적으로 희석(serial dilution)하였다. 희석액 중 10⁻²~10⁻⁷까지 6개의 희석액을 선택배지에 100 µl씩 도말하였다. 선택배지는 Humic-acid vitamin agar (HV), Starch casein agar (SCA), *Streptomyces* isolation media (SIM), Tap water-yeast extract agar (TWYE)를 사용하였다. 도말한 배지를 28°C에서 14일 동안 배양하였고, 배지상에 형성된 콜로니중 방선균으로 추정되는 것을 무작위로 선별하여 oatmeal agar 배지에 계대하였다. 계대된 균주들은 14일간 더 배양하여 개별 콜로니들을 최종적으로 순수 분리하였다.

분리균주의 Genomic DNA 추출 및 16S rRNA 유전자 서열분석

계대배양하여 순수 분리한 방선균 균주들을 Tryptic Soy Broth (TSB) 3 ml에 3일간 배양하여 PureHelix™ Genomic DNA Prep Kit (NanoHelix, Korea) 로 genomic DNA를 추출하였다. 추출한 genomic DNA를 주형으로 하여 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1492R (5'-AAGGA GGTGATCCAGCCGC-3') primer를 사용한 PCR 반응을 실시하였다. PCR 반응물의 조성은 10 µM의 forward primer 0.5 µl, 10 µM의 reverse primer 0.5 µl, 10X buffer 2.5 µl (Inclone, Korea), 10 mM의 dNTP (Inclone, Korea) 0.5 µl, 5 U/µl의 Taq polymerase (Inclone, Korea) 0.25 µl, 1.10 g/ml의 dimethyl sulphoxide (DMSO; Sigma-Aldrich) 1.25 µl, H₂O 18.5 µl, DNA 시료 (20 ng/µl)를 PCR tube에 넣고 혼합하였다. PCR 반응은 95°C, 5분간 initial denaturation 후에, 30 cycle 반복수행으로 95°C에서 1분 denaturation, 55°C

에서 45초 annealing, 72°C에서 1분 extension 수행한 후 72°C에서 5분간 final extension하는 조건으로 실시하였다. 증폭된 PCR 산물은 정제 후에 Genotech사 (Korea)에 의뢰하여 염기서열을 결정하였고, EzBioCloud (<http://www.ezbiocloud.net>; Kim et al., 2012b)에서 표준균주들과 염기서열의 상동성을 비교하였다.

염기서열 분석 및 계통수 작성

순수 분리한 방선균의 16S rDNA 염기서열을 분석하여 표준균주와 비교하였다. EzBioCloud에서 염기서열이 표준균주와 99.0% 이상의 상동성을 나타낸 서열들만을 선별하여 계통분석을 수행하였다. 표준균주들의 계통도를 작성하기 위해서 EzBioCloud로 부터 염기서열을 얻어 CLASTAL W (Thompson et al., 1997)를 사용하여 alignment를 수행하였다. 계통수의 작성은 MEGA program version 4.0 (Tamura et al., 2007)을 사용하였고, 알고리즘으로 UPGMA (Sneath and Sokal, 1973) 방법을 사용하였다.

분리 균주의 항균활성능 분석

분리한 균주들의 항균 활성능을 조사하기 위하여 식물병원성 곰팡이 및 세균들을 대상으로 검정하였다. 식물병원성 곰팡이는 상추 균핵병균(*Sclerotinia sclerotiorum* KACC 40457), 고추 탄저병균(*Colletotrichum acutatum* KACC 40804), 호박 덩굴마름병균(*Didymella bryoniae* KACC 40938), 잭빛곰팡이균(*Botrytis cinerea* KACC 40573), 시들

음병균(*Fusarium oxysporum* KACC 40037), 벼 도열병균(*Magnaporthe oryzae* KACC 40435), 오이 잘록병균(*Pythium ultimum* KACC 40705), 벼 깨씨무늬병균(*Bipolaris oryzae* KACC 41025), 뿌리썩음병균(*Fusarium solani* KACC 44891), 인삼 잘록병균(*Rhizoctonia solani* KACC 40123) 등으로 총 10균주이다. 곰팡이의 항균활성 검정은 Potato Dextrose Agar (PDA; Difco) 배지에 검정균주를 각각 접종한 후 분리된 방선균 균주를 대치배양하여 균체 주위에 형성된 생육저지대 (clear zone) 의 크기에 따라 항균 활성을 측정하였다.

세균은 *Xanthomonas oryzae* KACC 10331, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* KACC 11130 등을 사용하였다. 세균의 항균활성 검정은 LB broth 배지(Difco)에 검정균주 배양액 1 ml을 각각 접종하여 분주한 후에 분리균주와 대치 배양하여 균체 주위에 형성된 생육저지대의 크기에 따라 항균활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

벼 근권에서 분리한 방선균의 동정

본 연구에서 벼 근권 토양으로부터 분리된 방선균 전체 균주의 수는 152균주였으며, 각 균주들의 16S rRNA 유전자 염기서열은 표준균주 27종과 99.0%~100.0%의 높은 상동성을 나타내는 것으로 확인되었다(Fig. 1). 표준균주 27종은 각각 *Streptomyces* 속(20종), *Micromonospora* 속(3종),

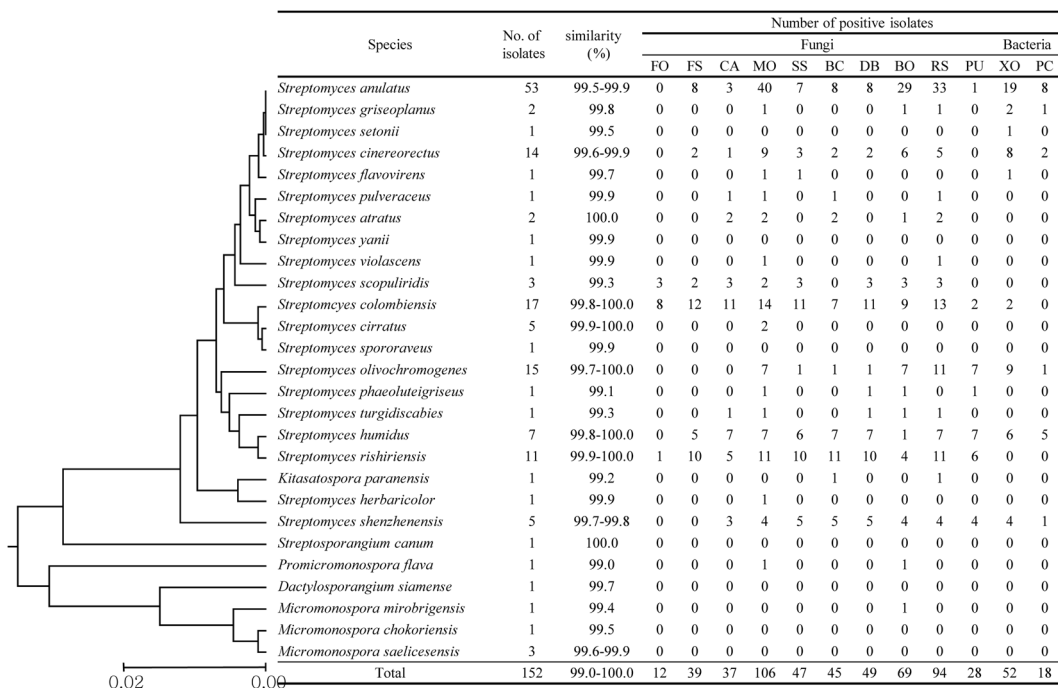


Fig. 1. Phylogenetic diversity and antimicrobial activities of isolates from the rice rhizosphere. FO, *F. oxysporum*; FS, *F. solani*; CA, *C. acutatum*; MO, *M. oryzae*; SS, *S. sclerotiorum*; BC, *B. cinerea*; DB, *D. bryoniae*; BO, *B. oryzae*; RS, *R. solani*; PU, *P. ultimum*; XO, *X. oryzae*; PC, *P. carotovorum*.

Table 1. Representative actinobacterial strains isolated from rhizosphere of rice cultivated in the fertilized paddy soil (APK)

| Isolation media | Total no. of isolates | Species | No. of isolates |
|--------------------------------------|-----------------------|---------------------------------------|-----------------|
| HV | 2 | <i>Streptomyces colombiensis</i> | 2 |
| | | <i>Streptomyces anulatus</i> | 7 |
| SCA | 19 | <i>Streptomyces cinereorectus</i> | 3 |
| | | <i>Streptomyces cirratus</i> | 1 |
| | | <i>Streptomyces flavovirens</i> | 1 |
| | | <i>Streptomyces griseoplanus</i> | 1 |
| | | <i>Streptomyces herbaricolor</i> | 1 |
| | | <i>Streptomyces olivochromogenes</i> | 1 |
| | | <i>Streptomyces rishiriensis</i> | 1 |
| | | <i>Streptomyces setonii</i> | 1 |
| | | <i>Streptomyces shenzhenensis</i> | 1 |
| | | <i>Streptomyces turgidiscabies</i> | 1 |
| | | SIM | 38 |
| <i>Streptomyces rishiriensis</i> | 7 | | |
| <i>Streptomyces humidus</i> | 5 | | |
| <i>Streptomyces cinereorectus</i> | 4 | | |
| <i>Streptomyces yanii</i> | 1 | | |
| <i>Streptomyces spororaveus</i> | 1 | | |
| <i>Streptomyces shenzhenensis</i> | 1 | | |
| <i>Streptomyces olivochromogenes</i> | 1 | | |
| <i>Streptomyces colombiensis</i> | 1 | | |
| <i>Kitasatospora paranensis</i> | 1 | | |
| TWYE | 43 | <i>Streptomyces anulatus</i> | 13 |
| | | <i>Streptomyces colombiensis</i> | 9 |
| | | <i>Streptomyces shenzhenensis</i> | 3 |
| | | <i>Streptomyces scopuliridis</i> | 3 |
| | | <i>Streptomyces olivochromogenes</i> | 3 |
| | | <i>Streptomyces cinereorectus</i> | 3 |
| | | <i>Streptomyces humidus</i> | 2 |
| | | <i>Streptomyces atratus</i> | 2 |
| | | <i>Streptomyces violascens</i> | 1 |
| | | <i>Streptomyces rishiriensis</i> | 1 |
| | | <i>Streptomyces phaeoluteigriseus</i> | 1 |
| | | <i>Micromonospora mirobrigensis</i> | 1 |
| | | <i>Promicromonospora flava</i> | 1 |

Dactylosporangium 속(1종) *Kitasatospora* 속(1종), *Promicromonospora* 속(1종), *Streptosporangium* 속(1종) 등의 6개 속(genus)으로 분류되었다. 이 중 *Streptomyces* 속에 속하는 것이 전체 분리 균주의 94%에 해당하는 143균주이었다. 그 외에 *Micromonospora* 속에 5균주(3%)가 속하였고, 나머지 4속에는 각각 1균주 밖에 분리되지 않았다. 특히 *Streptomyces* 속의 균주 중에서는 *S. anulatus* 종에 포함되는 균주가 53균주로 가장 많았으며 그 외에 *S. colombiensis*, *S. olivochromogenes*, *S. cinereorectus*, *S. rishiriensis*에 해당

되는 균주들이 10균주 이상으로 많았다. *Streptomyces*가 근권 방선균중에서 우점종으로 분리된 이번 연구 결과는 이전에 보고된 다른 연구와도 일치하는 결과이다(Lee et al., 2006; Tian et al., 2007). 그러나 이전의 결과들에서는 *S. bungoensis*, *S. caviscabies*, *S. canus*, *S. galbus*, *S. olivochromogenes*, *S. spororaveus*, *S. tauricus* 등의 종들이 우점종으로 보고되었으나, 본 연구에서는 *S. olivochromogenes*를 제외한 대부분의 우점종이 이전에 보고되지 않은 종들이었다. 특히, *S. anulatus*에 포함되는 균주가 이전

Table 2. Representative actinobacterial strains isolated from rhizosphere of rice cultivated in the non-fertilized paddy soil (NF)

| Isolation media | Total no. of isolates | Species | No. of isolates |
|-----------------|-----------------------|--------------------------------------|-----------------|
| HV | 2 | <i>Streptomyces colombiensis</i> | 2 |
| | | <i>Streptomyces anulatus</i> | 4 |
| | | <i>Streptomyces olivochromogenes</i> | 4 |
| SCA | 14 | <i>Streptomyces cirratus</i> | 3 |
| | | <i>Streptomyces colombiensis</i> | 1 |
| | | <i>Streptomyces griseoplanus</i> | 1 |
| | | <i>Streptomyces pulveraceus</i> | 1 |
| | | <i>Streptomyces anulatus</i> | 11 |
| | | <i>Streptomyces olivochromogenes</i> | 6 |
| SIM | 29 | <i>Streptomyces cinereorectus</i> | 4 |
| | | <i>Streptomyces colombiensis</i> | 2 |
| | | <i>Streptomyces rishiriensis</i> | 2 |
| | | <i>Micromonospora saelicesensis</i> | 2 |
| | | <i>Streptomyces cirratus</i> | 1 |
| | | <i>Streptosporangium canum</i> | 1 |
| | | <i>Streptomyces anulatus</i> | 2 |
| | | <i>Dactylosporangium siamense</i> | 1 |
| TWYE | 5 | <i>Micromonospora chokoriensis</i> | 1 |
| | | <i>Micromonospora saelicesensis</i> | 1 |

연구들과는 달리 전체 *Streptomyces* 중에서도 가장 많이 존재하여 벼 근권 내 방선균에서는 가장 우점하고 있는 종으로 확인되었다.

분리원 및 분리배지에 따른 방선균 다양성 비교

근권 토양 분리원을 3요소구(APK)와 무비구(NF)로 나누어서 분석한 결과 3요소구와 무비구로부터 분리된 방선균은 각각 102균주와 50균주였다(Table 1, 2). 16S rRNA 유전자 분석을 통해 동정한 결과, 3요소구와 무비구로부터 분리된 균주들은 각각 22종과 12종의 표준균주와 높은 상동성을 나타내어, 분리 균주의 다양성에 있어서 3요소구가 두 배 정도 높았다. 두 분리원에서 공통적으로 나타난 종은 7종이었으며, 각각 *S. anulatus*, *S. cinereorectus*, *S. cirratus*, *S. colombiensis*, *S. griseoplanus*, *S. olivochromogenes*, *S. rishiriensis* 등으로 모두 *Streptomyces* 속에 포함되었다. 분리배지에 따라 비교해 보았을 때, HV 배지로부터는 두 분리원에서 각각 두 균주만이 분리되었고, 이들 균주들은 모두 *S. colombiensis*와 높은 상동성을 나타냈다. SCA, SIM 배지로부터 분리된 균주는 두 분리원간에 비교적 큰 차이가 없었지만, TWYE의 경우에는 뚜렷한 차이를 보였다. 즉, HV 배지는 벼 근권 방선균 분리배지로서는 적절한 배지가 아니며, TWYE 배지는 분리원에 따라서 매우 큰 차이를 보이는 선택배지라고 판단되었다. 또한 분리원이나 분리배지와 관계없이 *S. anulatus*와 상동성이 높은 균주들이 가장 많

이 분리되었다. 따라서 이런 결과는 적절한 분리원을 대상으로 여러가지 선택배지를 사용해야 다양한 방선균의 선택적 분리 배양이 가능하다는 점을 보여준다.

분리균주의 항균 활성

전체 분리된 방선균 152균주를 대상으로 여러 가지 식물 병원성 곰팡이에 대한 항균활성을 검정하였다(Fig. 1, 2). 전체 검정균주 10개 중 벼 도열병균(*Magnaporthe oryzae* KACC 40435)에 항균활성을 나타내는 균주가 전체 152균주 중 106균주(70%)로 가장 많았으며, 인삼 갈록병균(*Rhizoctonia solani* KACC 40123)에 항균활성을 보이는 균주가 94균주(62%), 벼 깨씨무늬병균(*Bipolaris oryzae* KACC 41025)에 항균활성을 보이는 균주가 69균주(45%)로 그 뒤를 이었다(Fig. 2). 반면 항균효과를 상대적으로 적게 보였던 검정균주는 오이 갈록병균(*Pythium ultimum* KACC 40705)과 시들음병균(*Fusarium oxysporum* KACC 40037)으로 항균활성을 나타낸 분리 균주는 각각 12균주(8%)와 28균주(18%) 이었다. 흥미로운 점은 분리된 균주들이 가장 큰 항균 활성을 보인 *M. oryzae* KACC 40435, *B. oryzae* KACC 41025 이 모두 벼에서 직접 병을 일으키는 병원성 균주들이라는 점이다. 검정균주로 활용한 인삼 갈록병균(*R. solani* KACC 40123)도 인삼에서 분리된 균주이기 는 하지만, *R. solani* 균이 벼에 감염하여 벼 잎집무늬마름병을 유발하는 곰팡이로도 알려져 있다. 즉, 벼 근권에서 분리한 방

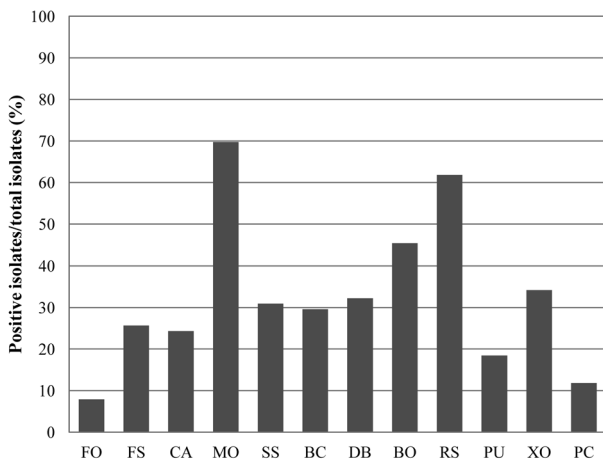


Fig. 2. The proportion of isolates with antagonistic activity against each pathogenic microorganism.

FO, *F. oxysporum*; FS, *F. solani*; CA, *C. acutatum*; MO, *M. oryzae*; SS, *S. sclerotiorum*; BC, *B. cinerea*; DB, *D. bryoniae*; BO, *B. oryzae*; RS, *R. solani*; PU, *P. ultimum*; XO, *X. oryzae*; PC, *P. carotovorum*.

선균들이 벼와 관련된 병원균들에 대해서 높은 항균 활성을 보이는 것은, 이들 미생물들이 벼 생육과정에서 병을 억제하는 기능을 수행할 수 있음을 보여주는 간접적인 증거라고 할 수 있을 것이다.

항진균 활성 분석과 마찬가지로 전체 방선균 152균주를 대상으로 식물 병원성 세균(*Xanthomonas oryzae* KACC 10331, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* KACC 11130)에 대한 항세균 활성을 조사하였다(Fig. 1, 2). 벼 흰잎 마름병을 유발하는 병원성 세균인 *X. oryzae* KACC 10331 균주에 대해서 활성(34%)을 보이는 경향이 *P. carotovorum* KACC 11330 에 대한 활성(12%)보다 크게 나타났다. 이를 통해 볼 때 벼 근권 내에 서식하는 방선균이 벼에 감염하는 유해 곰팡이 및 세균의 발생을 억제시키는 효과를 나타내고 있을 가능성이 높다고 판단된다.

분리 균주의 분류학적 위치와 항균 활성능의 연관성 분석

같은 종에 해당하는 분리 균주들을 대상으로, 항균활성을 나타내는 균주수를 계산하여 균주들의 분류학적 위치와 항균활성능의 연관성을 분석하였다(Fig. 1). 가장 많이 분리된 *S. amulatus* 종(53 균주)의 경우 곰팡이 항균활성은 *M. oryzae*, *R. solani*, *B. oryzae*에 항균활성을 나타내는 균주의 수가 가장 많았고, *F. oxysporum*, *P. ultimum*에는 항균활성을 나타내는 균주의 수가 각각 0개, 1개로 가장 낮았다. 세균 항균활성의 경우 *X. oryzae*과, *P. carotovorum* 에 항균활성을 나타내는 균주가 각각 19개, 8개로 대체로 적었다. 이 결과는 전체 분리 균주 152균주의 경향성과 대체로 일치하는 결과이다. 전체 검정균주에 우수한 항균활성을 나타낸 균주들은 *S. humidus*, *S. shenzhenensis*에 포함되는 균주들

이었으며, *S. colombiensis*, *S. rishiriensis*, *S. scopuliridis*로 분류된 균주들은 항진균 활성은 높았으나, 항세균 활성은 낮았다. *S. humidus*, *S. rishiriensis*, *S. scopuliridis* 등의 분류군에 대해서는 항균활성 효과 및 항생물질에 대한 기존의 여러 보고들이 있다. *S. humidus*는 Dihydrostreptomycin이라는 항생물질을 생산하는 새로운 종으로서 최초로 발견되었으며(Tatsuoka et al., 1957), 근래에는 *Collectotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* 등의 식물병원성균에 항균활성을 나타내는 *S. humidus* S5-55가 보고된 바 있다(Hwang et al., 2001). *S. rishiriensis* 로부터는 Coumermycin A₁, Lactonamycin 등의 항생물질이 보고되었다(Matsumoto et al., 1999; Li et al., 2002). *S. scopuliridis* 종은 bacteriocin을 다양하게 생산하는 *Streptomyces* 종으로 처음 보고되었으며, *S. scopuliridis* RB72^T 균주는 식물에 병을 유발하는 곰팡이 및 세균의 조절기능과 생장증대효과를 나타내는 것으로 밝혀졌다(Farris et al., 2011).

결과적으로 *Streptomyces* 속의 균주들이 다른 속에 해당하는 균주들보다 항균활성이 더 높았고, *Streptomyces* 속 내에서도 몇몇 특정 종에 속하는 분리 균주들이 항균 활성이 높은 것을 조사하였다. 이 결과들은 분리 균주들의 분류학적 위치와 항균 활성능이 일정 정도 연관성이 있음을 제시한다. 이러한 사실은 이전에 보고된 다른 연구결과에서도 이미 확인된 바 있다(Anzai et al., 2008). 따라서 본 연구를 통해 분리된 미생물들 중에서 높은 항균 활성을 갖는 균주들은 다양한 생리활성 물질을 생산할 가능성이 높고, 추후에 유용한 미생물 제제로 활용될 가능성이 충분하다고 판단된다.

감사의 글

이 논문은 농촌진흥청 국립농업과학원(PJ90712704)의 재원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다. 논문을 검토해주시고 부족한 점을 지적해주신 심사자들도 깊이 감사드립니다.

Literature Cited

- Anzai, K., M. Ohno, T. Nakashima, N. Kuwahara, R. Suzuki, T. Tamura, H. Komaki, S. Miyadoh, S. Harayama and K. Ando (2008) Taxonomic distribution of *Streptomyces* species capable of producing bioactive compounds among strains preserved at NITE/NBRC. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80(2):287-295.
- Brdy, J. (2005) Bioactive microbial metabolites: A personal view. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 58(1):1-26.
- Berendsen, R. L., C. M. Pieterse and P. A. Bakker (2012) The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci.*

- 17(8):478-486.
- Berg, G. and K. Smalla (2009) Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* 68(1):1-13.
- Bulgarelli, D., M. Rott, K. Schlaeppli, E. V. L. van Themaat, N. Ahmadinejad, F. Assenza, P. Rauf, B. Huettel, R. Reinhardt and E. Schmelzer (2012) Revealing structure and assembly cues for arabidopsis root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature* 488(7409):91-95.
- Chaparro, J. M., A. M. Sheflin, D. K. Manter and J. M. Vivanco (2012) Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility. *Biol. Fert. Soils* 48(5):489-499.
- Dennis, P. G., P. R. Hirsch, S. J. Smith, R. G. Taylor, E. Valsami-Jones and A. J. Miller (2009) Linking rhizoplane pH and bacterial density at the microhabitat scale. *J. Microbiol. Methods* 76(1):101-104.
- El-Tarabily, K. A., G. E. S. J. Hardy and K. Sivasithamparan (2010) Performance of three endophytic actinomycetes in relation to plant growth promotion and biological control of *Pythium aphanidermatum*, a pathogen of cucumber under commercial field production conditions in the united arab emirates. *Eur. J. Plant Pathol.* 128(4):527-539.
- Farris, M. H., C. Duffy, R. H. Findlay and J. B. Olson (2011) *Streptomyces scopuliridis* sp. nov., a bacteriocin-producing soil streptomycete. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61(9):2112-2116.
- Goodfellow, M. (2010) Selective isolation of actinobacteria. In: *Manual of industrial microbiology and biotechnology* R. H. Baltz, Demain A. L., Davies, J. E., (Ed.). ASM Press, Washington, DC: pp: 13-27.
- Hwang, B. K., S. W. Lim, B. S. Kim, J. Y. Lee and S. S. Moon (2001) Isolation and in vivo and in vitro antifungal activity of phenylacetic acid and sodium phenylacetate from *Streptomyces humidus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(8): 3739-3745.
- Jog, R., G. Nareshkumar and S. Rajkumar (2012) Plant growth promoting potential and soil enzyme production of the most abundant streptomycetes spp. from wheat rhizosphere. *J. Appl. Microbiol.* 113(5):1154-1164.
- Kim, M. S., Y. H. Kim, S. S. Kang, H. B. Yun, and B. K. Hyun (2012a) Long-term application effects of fertilizers and amendments on changes of soil organic carbon in paddy soil. *Korean J. Soil. Sci. Fert.* 45(6):1108-1113.
- Kim, O. S., Y. J. Cho, K. Lee, S. H. Yoon, M. Kim, H. Na, S. C. Park, Y. S. Jeon, J. H. Lee, H. Yi, S. Won and J. Chun (2012b) Introducing eztaxon-e: Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62(Pt 3):716-721.
- Kinkel, L. L., D. C. Schlatter, M. G. Bakker and B. E. Arenz (2012) *Streptomyces* competition and coevolution in relation to plant disease suppression. *Res. Microbiol.* 163(8):490-499.
- Knief, C., N. Delmotte, S. Chaffron, M. Stark, G. Innerebner, R. Wassmann, C. von Mering and J. A. Vorholt (2012) Metaproteogenomic analysis of microbial communities in the phyllosphere and rhizosphere of rice. *ISME J.* 6(7):1378-1390.
- Ladygina, N. and K. Hedlund (2010) Plant species influence microbial diversity and carbon allocation in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* 42(2):162-168.
- Lee, G. S., J.-C. Lee, U.-G. Kang, C.-Y. Park and C.-J. Kim (2006) Fluctuation of rhizosphere microflora in paddy rice by long-term fertilization. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 49(3):175-179.
- Li, S.-M., L. Westrich, J. Schmidt, C. Kuhnt and L. Heide (2002) Methyltransferase genes in *Streptomyces rishiriensis*: New coumermycin derivatives from gene-inactivation experiments. *Microbiology* 148(10):3317-3326.
- Matsumoto, N., T. Tsuchida, H. Nakamura, R. Sawa, Y. Takahashi, H. Naganawa, H. Iinuma, T. Sawa, T. Takeuchi and M. Shiro (1999) Lactonamycin, a new antimicrobial antibiotic produced by *Streptomyces rishiriensis* MJ773-88K4. II. Structure determination. *J. Antibiot. (Tokyo).* 52(3):276.
- Morales, D. K., W. Ocampo and M. M. Zambrano (2007) Efficient removal of hexavalent chromium by a tolerant *Streptomyces* sp. affected by the toxic effect of metal exposure. *J. Appl. Microbiol.* 103(6):2704-2712.
- Prez-Garcia, A., D. Romero and A. De Vicente (2011) Plant protection and growth stimulation by microorganisms: Biotechnological applications of bacilli in agriculture. *Curr. Opin. Biotechnol.* 22(2):187-193.
- Ruanpanun, P., N. Tangchitsomkid, K. D. Hyde and S. Lumyong (2010) Actinomycetes and fungi isolated from plant-parasitic nematode infested soils: Screening of the effective biocontrol potential, indole-3-acetic acid and siderophore production. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26(9):1569-1578.
- Sneath, P. H. A. and R. R. Sokal, 1973. *Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification.* San Francisco, C.A.: W.H. Freeman.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei and S. Kumar (2007) MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24(8):1596-1599.
- Tatsuoka, S., T. Kusaka, A. Miyake, M. Inoue, H. Hitomi, Y. Shiraiishi, H. Iwasaki and M. Imanishi (1957) Studies on antibiotics. Xvi. Isolation and identification of dihydrostreptomycin produced by a new *Streptomyces*, *Streptomyces humidus* nov. sp. *Pharmaceutical bulletin* 5(4):343.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin and D. G. Higgins (1997) The clustal x windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25(24):4876-4882.

Tian, X., L. Cao, H. Tan, W. Han, M. Chen, Y. Liu and S. Zhou (2007) Diversity of cultivated and uncultivated actinobacterial endophytes in the stems and roots of rice. *Microb. Ecol.* 53(4):700-707.

Yeon, B. Y., H. K. Kwak, Y. S. Song, H. J. Jun, H. J. Cho, and C. H. Kim (2007) Changes in rice yield and soil organic matter content under continued application of rice straw

compost for 50 years in paddy soil. *Korean J. Soil. Sci. Fert.* 40(6):454-459.

Zhang, J., J. Liu, L. Meng, Z. Ma, X. Tang, Y. Cao and L. Sun (2012) Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from wheat roots by wheat germ agglutinin labeled with fluorescein isothiocyanate. *J. Microbiol.* 50(2):191-198.

벼 근권에서 분리한 방선균의 다양성과 항균 활성

이혜원 · 안재형 · 원항연 · 송재경 · 김병용*

농촌진흥청 국립농업과학원 농업미생물과

요 약 토양에 서식하는 다양한 미생물 중에서 식물 근권에 서식하는 미생물들은 식물과 상호작용하며 독특한 군집을 형성한다고 알려져 있다. 본 연구에서는 비료 연용 논토양과 무비 논토양에서 재배된 벼(*Oryza sativa* L.)의 근권으로부터 배양적 접근을 통해 다양한 방선균을 분리하여 항균활성을 조사하였다. 방선균의 선택적 배양을 위해서 4종류의 선택 배지를 이용하였고, 전체 152균주를 분리할 수 있었다. 분리된 균주들의 분류를 위해서 16S rRNA 유전자의 염기서열을 결정하여 표준균주와의 상동성을 비교하였다. 모든 균주들이 기존에 보고된 표준균주들과 99.0~100.0%의 높은 상동성을 나타내었으며, *Dactylosporangium*, *Micromonospora*, *Kitasatospora*, *Promicromonospora*, *Streptomyces*, *Streptosporangium* 등의 6개 속(genus)로 분류되었다. 그 중 *Streptomyces* 속에 포함되는 균주가 143균주 (94%)로 가장 많았다. 항균활성을 조사한 결과 대다수의 분리 균주들이 식물병원균에 항균성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 특히 벼 도열병균(*Magnaporthe oryzae*)에 우수한 항균활성을 보였다. 이와 같은 연구 결과는, 벼의 근권이 다양한 방선균을 분리할 수 있는 우수한 분리원이며, 분리된 방선균에서 다양한 생리활성 물질을 생산할 수 있음을 제시하여 준다. 또한 추후 연구를 통해 친환경 농업을 위한 유용한 미생물 제제로 활용할 수 있을 것으로 기대한다.

색인어 벼근권, 방선균, 항균성, actinomycetes, rice rhizosphere, antimicrobial activity