



인삼모잘록병원균에 항균활성을 갖는 *Bacillus* 균의 분리 및 특성조사

박경훈 · 박홍우 · 이성우 · 이승호 · 명경선 · 이상엽¹ · 송재경¹ · 김영탁² · 박경수² · 김영옥*국립원예특작과학원 인삼특작부, ¹국립농업과학원 농업미생물과, ²농우바이오 종자검정팀

Isolation and Characterization of *Bacillus* Species Having Antifungal Activity Against Pathogens of Ginseng Damping Off

Kyeong Hun Park, Hong Woo Park, Seong Woo Lee, Seung Ho Lee, Kyung Sun Myung, Sang Yeob Lee¹, Jaekyeong Song¹, Young Tak Kim², Kyoung Soo Park² and Young Ock Kim*

Department of Herbal Crop Research, National Institute of Horticultural and Herbal Science, RDA, Eumseong 27709, Korea

¹Agricultural microbiology division, National Institute of Agricultural Science, RDA, Wanju 55365, Korea²Seed Certification Team, Quality Assurance Division, Nongwoo Bio CO., LTD. 12655, Korea

(Received on October 24, 2016. Revised on November 19, 2016. Accepted on November 23, 2016)

Abstract This study was performed to select potentially available biological control agent from soil bacteria for prevention of ginseng damping off. More than five hundred strains were isolated from ginseng rhizosphere soil. By testing antifungal activity, we have selected three soil bacteria strains and their ability to produce antibiotics and lytic enzymes such as cellulase, protease and pectate lyase was examined. Also, the presence of genes for biosynthesis of lipopeptide such as fengycin, bacillomycin D, surfactin, iturin A, and zwittermixin A was investigated in selected strains. All three strains produced cellulase, protease, and xylanase. Moreover, these strains had gene for biosynthesis of bacillomycin D, surfactin, and iturin A. ES1 and ES3 strains were identified *Bacillus methylotrophucus* and ES2 was confirmed *Bacillus amyloliquefaciens* using phylogenetic analysis on the basis of 16S rRNA gene sequences. In field test, control value of ES1, ES2 and ES3 treatment was 32.4%, 46.8% and 36.7%, respectively. This results indicate that antagonistic microbes with high ability of antifungal and lytic enzyme activity can be used as a useful biological control agent to control ginseng damping off.

Key words Antifungal activity, *Bacillus*, biological control, damping off

서 론

모잘록병은 전 세계적으로 온실, 유묘장, 정원, 산림을 포함한 작물을 재배하는 포장에서 발생하는 중요한 토양전염성 병으로, 종자와 유묘 생산 등에 큰 피해를 끼치는 것으로 알려져 있다. *Botrytis cinerea*, *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Phythium* spp. 및 *Phytophthora* spp.가 인삼 모잘록병원균으로 보고되었으며(Bardin and Huang, 2001; Stephens et al., 1982; Tainyu and Weiqun, 1992), 국내에서 인삼잘록병을 일으키는 병원균으로 *R. solani* AG2-1과 *P. ultimum*과

*P. debaryanum*이 확인되었다(Bae et al., 2006). *R. solani* Kühn은 온실과 포장에서 유묘생산에 가장 큰 피해를 끼치는 병원균으로 알려져 있으며 오이, 토마토를 포함한 다양한 원예작물과 인삼 및 약용작물에 모잘록 증상, 시들음 및 뿌리썩음 증상 등을 일으킨다(Asaka and Shoda, 1996). *R. solani*는 토양 속에서 오랫동안 생존 가능하며 새롭게 출현하는 유묘에 피해를 끼치는 것으로 알려져 있다(Abbasi et al., 2004).

인삼은 종자로 번식 하나 파종하기 전에 개갑과정이 필요하고, 개갑과정과 유묘 생장 중에 다양한 병원균에 노출될 가능성이 높다(Proctor and Bailey, 1987). 종자를 가을에 파종 할 경우, 6개월 동안 토양 속에 존재하다가 병원균에 노

*Corresponding author
E-mail: kyo9128@korea.kr

출되면 이듬해 봄에 모잘록 증상을 일으킨다(Proctor and Laitt, 1995). 인삼 모잘록병은 유묘출현이 저온에서 지연되거나, 과도한 벚짚 멀칭으로 토양에 습도가 높거나 온도가 낮을 때 문제가 되는 것으로 알려져 있다(Hudelson and Parke, 1995). 광범위한 약효를 갖는 살균제의 종자 처리는 모잘록병을 억제하는데 효과적이나, 인축독성, 농약잔류로 인한 토양 및 수질오염 등의 문제를 일으킬 수 있으며, 살균제의 장기간 사용은 약제저항성 균주 초래 및 토양내 근권 미생물상을 단순화 시킬 수 있다(Leisso et al., 2009). 또한 살균제와 화학비료의 무분별한 사용으로 인한 농약잔류 문제 및 농산물 안전성 문제는 친환경 농산물에 대한 소비자의 관심을 증가시켜 왔다.

특히, 미생물제제를 이용한 식물병의 친환경방제 연구가 다양하게 이루어지고 있다(Berendsen et al., 2012; Yang et al., 2014). 식물병원균에 대한 생물적 방제제로 자주 활용되고 있는 *Bacillus* 속 균주는 fengycin, iturin A 등의 다양한 항진균 물질을 생성하는 것으로 확인되었으며, 일부 종에서 형성된 항생물질은 생물방제제로 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다(Alvarez et al., 2012).

이를 위해 미생물을 기반으로 한 생물농약이 토양전염성 및 뿌리 병해를 방지하기 위하여 개발되어 왔으나(Fravel, 2005; Hass and Defago, 2005), 인삼모잘록병 방제에 관한 생물적 방제 연구는 매우 미흡한 실정이다. 따라서, 본 연구는 인삼 예정지 및 근권토양으로부터 인삼모잘록병에 항균활성을 갖는 길항균을 분리하여 균주특성을 파악하고 생물방제제를 개발하고자 수행하였다.

재료 및 방법

균주분리

인삼 모잘록병을 일으키는 병원균에 대해 항균활성을 갖는 미생물을 분리하기 위해서 전국 인삼 재배지로부터 10~20 cm 깊이의 근권 토양을 채집하였다. 채집한 근권 토양 10 g에 멸균생리 식염수 90 ml를 첨가하여 180 rpm으로 진탕배양기에서 30분간 진탕 후 십진희석하여 King's B Agar (peptones 20 g, magnesium sulphate 10.5 g, buffers 1.5 g, agar 15 g/L)에 100 µl를 도말하고 20°C에서 5일간 배양하였다. 형태적으로 차이를 보이는 단일 집락을 순수분리하고 모잘록병원균에 항균활성 검정을 위한 공시균주로 사용하였다.

항균활성 검정

선발 균주의 항균활성을 확인하기 위해, 2014년에 충북 음성군 모잘록병 발생 포장에서 분리 동정하여 병원성이 확인된 *R. solani* 균주 2개와 *P. ultimum* 균주 2개를 사용하였다. 각각의 병원균은 PDA (glucose 20 g, potato extract 4 g,

agar 15 g/L)에서 20°C, 5일 간 배양하고 6 mm cork borer를 이용하여 균사 조각을 절단한 후 PDA 중앙에 치상하였다. 선발한 균주는 LB broth (tryptone 10 g, yeast extract 5 g, sodium chloride 10 g/L)에서 30°C, 200 rpm으로 1일간 배양한 후 배양액 10 µl을 PDA 배지 위에 점적하였다. 배지가 충분히 마를 때까지 10분 간 풍건한 후 20°C에서 병원균과 5일간 대치 배양하고 균사 생육 억제 정도를 조사하였다.

선발 균주의 동정

선발된 균주를 동정하기 위하여 그람염색, API kit (bioMerieux, France) 동정 및 16S rRNA 유전자 분석을 수행하였다. 각각의 균주는 LB Agar에 접종하여 30°C에서 1일간 배양 한 후 단일 균총을 LB 배지에 접종하여 30°C에서 1일간 배양 하였다. 8,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 균체를 수확하였으며, QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Germany)를 사용하여 수확한 균체에서 DNA를 분리하였다. Universal primer 인 27F와 1492R를 이용하여 Kim et al. (2012)의 방법에 따라 PCR을 수행하였다. 증폭된 PCR 산물은 Takara Minibest DNA Fragment Purification Kit (TAKARA, Japan)을 이용하여 정제하였으며, 염기서열은 Macrogen Co. (Korea)에 의뢰하여 분석하였다. 표준균주의 염기서열은 미국 국립생물정보센터에서 운영 중인 서버 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)를 통해서 다운받아, seqman (DNASTAR, USA) 프로그램을 이용하여 정렬하였다. 정렬된 염기서열 분석은 MEGA 4.0 프로그램(Tamura et al., 2011)을 사용하였으며, Neighbor-joining 알고리즘을 이용하여 계통도를 작성하였고, bootstrapping을 1000회 반복으로 실시하여 견고성을 확인하였다.

선발 균주의 항균물질 생합성 유전자 확인

선발된 균주들이 항균물질을 생성하는지를 확인하기 위하여, Athukorala et al. (2009) 이 수행한 PCR 검출법을 이용하여 항균물질 생합성에 관여하는 유전자를 검출하였다.

Bacillomycin D, fengycin, iturin A, surfactin 및 zwittermicin A 생합성 유전자를 증폭하기 위하여 Table 1과 같은 특이 프라이머를 사용하였다. PCR 반응은 AccuPower® PCR PreMix (Bioneer, Korea) premix에 1 µl의 genomic DNA와 각각의 10 pmol 프라이머를 넣은 다음 멸균수로 최종 부피가 20 µl가 되게 조정하고 PCR을 수행하였다. PCR 분석은 C1000 Thermal cycler (Bio-Rad, USA)를 이용하여 denaturation (95°C, 2분), 30회 반복으로 denaturation (95, 30초), annealing (60°C, 40초), extension (72°C, 30초) 순으로 반응하였고, 최종 extension 반응은 72°C에서 5분간 실시하였다. PCR이 완료된 후 2 µl의 증폭 산물을 1.5% agarose gel에 100 V로 1시간 전기영동을 하였으며, LodingSTAR

Table 1. Characteristics of primers used for the detection of genes involve in biosynthesis of antibiotics bacillomycin D, fengycin, iturin A, surfactin, and zwittermicin A

Antibiotic	Primer	Sequence (5'-3')	Product (bp)
Bacillomycin D	BACCIF	GAA GGA CAC GGC AGA GAG TC	875
	BACCIR	CGC TGA TGA CTG TTC ATG CT	
Fengycin	FENDIF	TTT GGC AGC AGG AGA AGT TT	964
	FENDIR	GCT GTC CGT TCT GCT TTT TC	
Iturin A	ITUIF	GAT GCG ATC TCC TTG GAT GT	647
	ITUIR	ATC GTC ATG TGC TGC TTG AG	
Surfactin	SUR3F	ACA GTA TGG AGG CAT GGT C	441
	SUR3R	TTC CGC CAC TTT TTC AGT TT	
Zwittermicin A	ZWITF2	TTG GGA GAA TAT ACA GCT CT	779
	ZWITR1	GAC CTT TTG AAA TGG GCG TA	

(DYNEBIO, KOREA)로 염색한 후 각각 DNA의 증폭여부를 확인하였다.

선발 균주의 용해효소 활성능 조사

선발한 균주들의 용해효소 활성 능력을 조사하기 위해서 0.2% NaN₃가 첨가된 0.8% agarose 배지를 기본배지로 사용하였다. 펙틴분해효인 pectate lyase와 polygalacturonase 생성능을 확인하기 위하여 0.8% agarose 배지에 1% polygalacturonic acid (PGA)를 첨가하였다. 섬유소 분해효소인 cellulase 생성능을 조사하기 위하여 0.8% agarose 배지에 1% carboxymethyl cellulose를 첨가하였으며, xylanase 생성능을 확인하기 위하여 1% oat spelts xylan을 첨가하여 실험에 사용하였다. 단백질 분해(protease)를 확인하기 위해 기본배지에 1% skim milk를 첨가하였다. 각각의 선택배지를 멸균한 다음 90 mm 페트리 디쉬에 분주하고 공시한 균주들은 LB broth (tryptone 10 g, yeast extract 5 g, sodium chloride 10 g/L)에서 30°C, 150 rpm으로 1일간 배양하였으며 각 균주의 배양액을 선택배지 중앙에 50 µl씩 접종한 다음 30°C에서 2일간 배양하면서 투명한의 크기로 용해효소 활성정도를 측정하였다(Gerhardt et al., 1981).

포장검정을 위한 접종원의 준비

포장 방제를 위한 병원균의 접종원 준비는 Yu et al. (1989)의 방법을 개선하여 이용하였다. 도정되지 않은 호밀 종자를 하루 동안 물에 불리고, 121°C에서 3회 멸균한 다음 *R. solani* 균총을 10개씩 접종하였다. 병원균을 접종한 호밀은 25°C에서 2주간 동안 배양하며, 병원균이 균일하게 자라게 이틀에 한번씩 흔들어 섞어주었다. 2주 동안 호밀에서 배양된 접종원은 실온에서 풍건한 후 실험에 사용하였다.

포장방제 효과검정

포장방제효과 검정은 충북 음성군 소이면에 위치한 묘포에서 수행하였다. 선발된 길항균 3종의 배양액을 6 log

CFU/ml 농도로 조정하여 개감된 인삼 종자에 1시간 침지처리 하고 이틀간 풍건하였다. 길항균이 침지 처리된 인삼 종자는 1칸당 1800개씩 파종한 후, 병원균이 접종된 이병호밀을 묘포 1칸(1.8 m×0.9 m=1.62 m²)당 50 g씩 접종하고 마사토를 이용하여 2 cm 두께로 복토하였다. 약제대조구로는 모잘록병 방제에 사용되는 fludioxonil을 종자에 분의처리 하여 파종하였다. 추가적인 길항균 처리는 인삼종자 출아 전인 3월 30일부터 1주일 간격으로 6 log CFU/ml 농도로 칸당 10 L씩 5회 처리 하였으며, 방제효과 조사는 최종처리 후 7일 이후에 아래와 같이 계산하였다.

$$\text{방제가(\%)} = \left(1 - \frac{\text{길항균 처리구의 발병주율}}{\text{무처리구의 발병주율}}\right) \times 100$$

결과 및 고찰

균주분리

인삼 모잘록병원균에 항균활성을 갖는 길항미생물을 선발하기 위하여 인삼 재배 토양 및 근권에서 채집한 토양시료로부터 콜로니 형태 및 균총의 색이 다른 500 균주를 선발하였으며, 선발한 균주를 대상으로 일차적으로 *R. solani* AG2-1 KACC 40123와 *Pythium* sp. KACC 40581을 대상으로 길항력을 검정하였다. 선발한 균주 중에서 총 52개의 균주가 모잘록병원균에 길항효과를 가지는 것으로 확인되었으며, 이 중에서 *R. solani* AG5 KACC 40146 균주를 대상으로 추가로 군사 생육억제를 확인하였다. 1차 선발한 균주 중 52개의 균주가 모잘록병원균에 항균활성을 가지고 있었으며, 이 중에서 항균활성이 높은 *Bacillus* 종 3 균주(ES1, ES2, ES3)를 최종적으로 선발하였다. 최종 선발한 균주 3종을 대상으로 항균활성 특성 및 생화학 특성을 분석하였다.

선발 균주의 항균활성 검정

인삼모잘록병원균에 대한 항균활성 검정은 병원성이 다르

Table 2. Antifungal activity of the *Bacillus* spp. against damping-off pathogens

Strain	Clear zone diameter (mm)			
	<i>R. solani</i> CB1	<i>R. Solani</i> CB3	<i>P. ultimum</i> CB3	<i>P. ultimum</i> CB7
ES1	+++ ^{c)}	+++	++ ^{b)}	++
ES2	++	++	++	+ ^{a)}
ES3	+++	+++	++	++

A degree of inhibition of fungal growth by tested strains. ^{a)}+, inhibition zone of 1~5 mm; ^{b)}++, 6~10 mm; ^{c)}+++ , >11 mm. Measure the size of clear zone around the 10 µl drop of the strain culture medium.

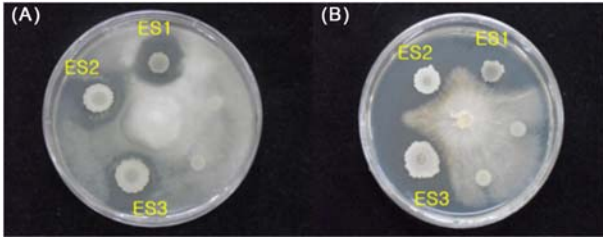


Fig. 1. Inhibition of mycelium growth of *Pythium ultimum* (A) and *R. solani* (B) by tested strains ES1, ES2, and ES3.

게 확인된 *R. solani* 2종과 *P. ultimum* 2종에 대하여 수행하였다. 대치배양을 통하여 균사 생장 억제 효과를 조사한 결과, Table 2와 같이 공시한 모든 병원균에 대하여 항균활성을 나타내었다. ES1 균주는 *P. ultimum*보다 *R. solani* 균에 높은 항균활성을 나타냈으며, ES3 균주는 *P. ultimum* 균에 대하여 더 높은 항균활성을 가지고 있었다. 또한, ES1 균주는 배지의 표면과 내부로 들어가 신장하는 *R. solani*의 기질 균사의 생육을 완전히 저해하는 것으로 확인되었다(Fig. 1). 선발한 길항균의 생육 적은은 30°C이지만 인삼모잘록병원균의 생육 적은인 20°C에서도 높은 항균활성이 확인되었다. 모잘록병의 효과적인 방제를 위해서는 병원균의 생육 적은에서 항균효과가 높은 길항균을 선발하는 것이 필수적이며, 저온에서 높은 항균활성을 유지하는 것은 인삼모잘록병의 생물적 방제를 위하여 매우 중요하다. 따라서, 본 연구에서 선발한 균주들은 향후 처리방법 개발 등을 통하여 인삼모잘록병의 방제를 위한 생물적 방제제로서 활용가능하다고 판단된다.

분리 균주의 동정

인삼모잘록병의 생물적 방제를 위하여 분리한 균주들은 그람 양성으로 확인되었으며 API 50CHB kit를 이용한 동정한 결과 선발한 3개의 균주들은 *B. subtilis*와 *B. amyloliquefaciens*로 구분할 수 없었으며, ES1, ES2, ES3는 *B. subtilis*/*amyloliquefaciens* 동정되었으며 각각 99.6%, 98.6%, 97.6%의 상동성을 보였다. 이러한 결과로 미루어 볼 때, API 50CHB kit를 이용하여 *Bacillus* 종을 동정 할 경우 *B. subtilis*와 *B. amyloliquefaciens*의 동정을 위하여 추가적인 실험이 필요할 것으로 판단된다. 선발한 균주의 정확한 동

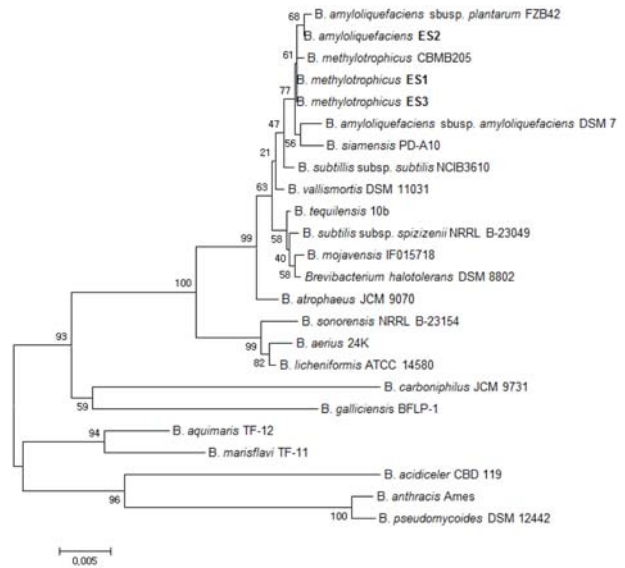


Fig. 2. Neighbour joining tree based on nearly 16S rRNA gene sequences showing the phylogenetic relationships between strains ES1, ES2, and ES3, and the species of the genus *Bacillus*. The numbers at the nodes are the percentages indicating the level of bootstrap support based on 1,000 resampled data set. Bar, 0.005 substitutions per nucleotide position.

정을 위하여 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석한 후 NCBI Blast에서 비교한 결과, ES1과 ES3균주는 *B. methylotrophicus* CBMB205 (GenBank No. EU194897)과 99%의 높은 상동성을 보였으며, ES2 균주는 *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42와 99%의 높은 상동성을 보였다. 또한, 16S rRNA 염기서열을 바탕으로 한 계통수 분석 결과, 선발한 균주들은 *B. amyloliquefaciens*와 *B. methylotrophicus*와 높은 유연 관계를 가지고 있는 것으로 확인되었으며, 계통수의 안정성을 나타내는 Bootstrap 값도 비교적 높은 68%와 61% 확인되었다(Fig. 2). 다양한 식물병원균의 생물적 방제제로 활용되는 *Bacillus* 속 균주들은 토양 및 식물체 근권에서 서식하여 식물 병원균에 항균활성 및 식물의 성장을 촉진하는 것으로 보고되었다(Cawoy et al., 2011). 근권 토양에서 분리한 *B. amyloliquefaciens* B94 균주가 다양한 식물병원균에 항균효과를 가지는 항진균 물질을 생산하는 것으로 보고되었으며(Yu et al., 2002), Madhaiyan et al. (2010)은 벼의 근권에서 분리한 *B. methylotrophicus*는 의한

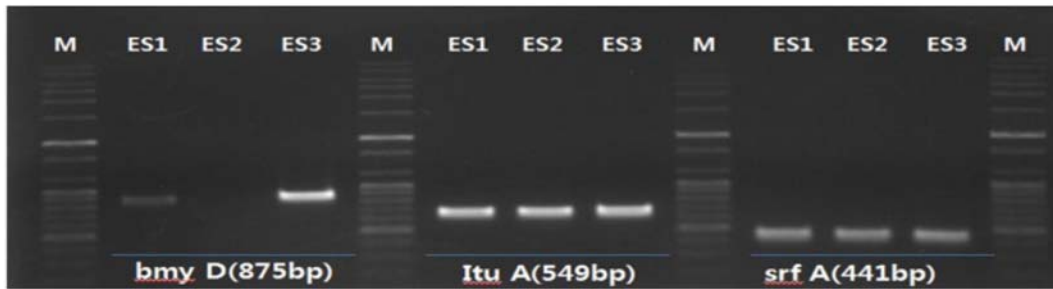


Fig. 3. PCR detection of antifungal activating gene corresponding to bacillomycin D (bmy D), iturin A (ituA), and surfactin (srfA), M : 100 bp ladder.

Table 3. Enzyme production of the culture filtrate of the *Bacillus* strains

Strain	Clear zone diameter (mm)				
	Cellulase	Pectatelyase	Polygalacturonase	Protease	Xylanase
ES1	5.88 ± 0.36	4.72 ± 0.39	-	11.37 ± 0.58	8.22 ± 0.14
ES2	3.41 ± 0.24	-	-	4.96 ± 0.32	6.73 ± 0.23
ES3	5.66 ± 0.29	4.53 ± 0.36	-	10.84 ± 0.20	8.53 ± 0.66

식물생육 촉진효과를 확인하였다. 기존에 보고된 Kim et al. (2012)의 연구에서처럼 표준균주와 길항균주의 계통도 분석을 이용한 근연종의 유연관계 분석은 식물병원균의 생물적 방제를 위한 길항균의 선발 및 분류학적 위치를 연구하는데 유용하게 사용될 수 있을 것으로 판단된다.

선발 균주의 항균물질 생합성 유전자 확인

Fengycin, bacillomycin, surfactin, iturin A과 같은 항진균 물질 생합성유전자를 PCR로 증폭하는 기술은 미생물이 생성하는 항균물질을 화학적으로 분석하지 않고 쉽게 확인할 수 있는 방법으로 길항균의 항균활성 기작을 연구하는데 유용하게 사용되고 있다(Yu et al., 2002; Khabbaz et al., 2015). 선발한 모든 균주에서 *Bacillus* 속 균주들이 생성하는 iturin A와 surfactin을 생합성하는 유전자가 존재하는 것으로 확인 되었으며, ES2 균주를 제외한 2 균주에서 bacillomycin D를 생성하는 유전자가 검출되었으며, 모든 균주에서 fengycin과 zwittermicin의 생합성 유전자는 검출되지 않았다(Fig. 3). *Bacillus* 속 균주들이 생산하는 surfactin, bacillomycin, iturin A, zwittermicin A, fengycin과 같은 리포펩타이드 계통의 항생물질은 식물병원균에 대한 생물방제제로서 보고되어왔다(Besson et al., 1977; He et al., 1994; Horowitz et al., 1991; Kim et al., 2004; Yu et al., 2002). 특히, iturin 과 fengycin은 다양한 식물병원균에 대하여 강력한 항진균 활성과 생장억제효과를 가지고 있는 것으로 알려져 왔다(Kim et al., 2004; Yu et al., 2002). 국내에서 iturin, fengycin과 surfactin과 같은 리포펩타이드는 *Colletotrichum gloeosporioides*에 의한 탄저병을 방제하는데 사용되어 왔다(Kim et al., 2010). 본 연구에서 최종 선발한 균주에서 리포펩타이드 계통의 항생물질을 생합성하는 유전자가

검출되어 향후 인삼모잘록병 방제를 위한 생물방제제로 활용가치가 있을 것으로 생각된다.

선발 균주의 용해효소 활성능 조사

길항균이 생산하는 용해 효소 활성능을 분석한 결과, 최종 선발한 3균주 모두 Table 3과 같이 cellulase, protease와 xylanase를 생산하는 것으로 확인되었으며, *B. amyloliquefaciens* ES2 균주를 제외한 두 균주에서 pectate lyase를 분비하였다(Fig. 4). *Bacillus* 속 균주들은 항생물질이외에도 cellulase, protease 등과 같은 다양한 종류의 효소를 생성하여, 식물병원균의 생장을 저해하는 것으로 보고되었으며, 이들 균주들이 생산하는 세포벽 분해효소는 식물병원균의 세포벽을 용해하는데 작용하는 것으로 알려져 있다(Chi et al., 2011; Pant et al., 2015). 길항균이 분비하는 용해효소는 작물과 병원균과의 상호작용을 통해 병 발생을 돕거나 억제하며, 미생물의 근권 정착 및 식물의 면역반응 등을 통해 식물의 생육에도 영향을 끼치는 것으로 확인되었다(Berendsen et al., 2012). 특히, 미생물이 분비하는 protease는 식물의 방어기작을 조절하여 식물병원균에 대한 유도저항성을 가지는 것으로 보고되었다(Xia, 2004; Cheng et al., 2015). 본 연구에서 최종선발 된 ES1, ES3 균주는 cellulase, pectate lyase, protease와 xylanase를 모두 분비하는 것으로 확인되었고, 활성능 또한 매우 우수한 것으로 조사되었다. 특히, 식물병원균의 세포벽이 cellulose로 구성되어 있는 것을 고려해 볼 때, ES1과 ES3 균주들이 생산하는 cellulase가 병원균의 세포벽을 분해하여 병원균의 생장을 억제하는 것으로 생각된다. 선발 균주가 분비하는 용해효소가 식물병원균 및 인삼에 끼치는 영향을 분석하기 위하여 향후 포트실험 및 접종 실험이 수반되어야 할 것으로 판단되며, 이를 통하여 정확

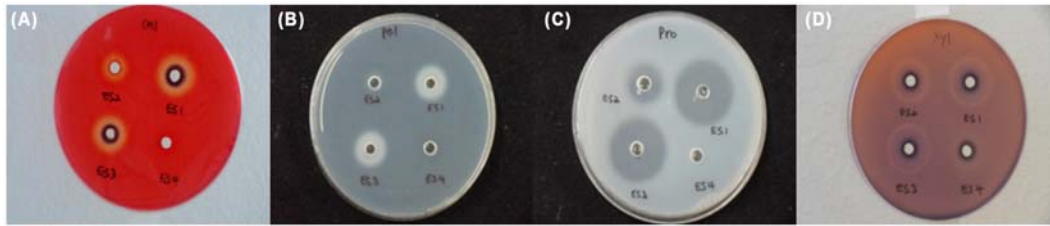


Fig. 4. Colony appearances showing lytic enzyme activities of *Bacillus* strains isolated. (A); Cellulase, (B); Pectate lyase, (C); Protease, (D): Xylanase.

한 활성기작 및 억제 조건 등을 확인 할 수 있을 것으로 생각된다.

포장방제 효과검정

모잘록병의 포장방제 효과는 *R. solani* 균을 접종한 이병 포장에서 수행하였다. 선발한 길항균 3균주를 1년생 묘삼에 침치 및 관주처리 한 결과, ES1, ES2, ES3 처리구에서는 방제가 각각 32.4%, 46.8%, 36.7%로 확인되었으며, 대조약제인 fludioxonil 분의 처리구에서 75.2%의 방제효과를 보였다(Fig. 5). 병원균을 접종한 이병포장에서 4월 중순 이후 부터 출아 후 땅에 접한 지체부위가 암갈색으로 마르면서 쓰러지는 증상을 보였으며 주변이 점차 원형으로 퍼져가는 증상을 보였다(Fig. 6). 무처리구에서의 발병주율이 47.7%, 약제대조구 발병주율이 11.8%인 것을 감안할 때 길항균 처

리구의 방제효과는 비교적 높은 것으로 판단된다. 인삼에서 *R. solani*에 의한 모잘록병은 인삼종자가 출아하는 4월 중하순에 시작하여 5월말까지 발생하는 것으로 알려져 있으며 (Cho et al., 2007), 모잘록병의 효과적인 방제를 위하여 길항균을 출아 전 근권에 처리하여 근권내에 길항균의 밀도를 유지시키는 것이 중요하다고 생각된다. 포장방제 실험에서 인삼 종자의 파종 깊이가 깊어질수록 모잘록병의 발생이 심해진다는 Yu et al. (1990)의 보고처럼, 파종깊이를 고려하여 포장방제 효과가 수행되어야 할 것으로 생각되며, 향후 제형화 및 길항균의 근권 정착효과 등을 포함한 방제효과를 높일 수 있는 추가적인 연구가 수행된다면 인삼모잘록병 방제를 위한 생물농약으로 활용 가능할 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ009951 2016) 지원에 의해 수행되었습니다.

Literature Cited

Abbasi, P. A., K. L. Conn and G. Lazarovitis (2004) Suppression of *Rhizoctonia* and *Phythium* damping off of radish and cucumber seedlings by addition of fish emulsion to peat mix or soil. Canadian J. Plant Pathol. 26:177-187.
 Alvarez, F., M. Castro, A. Pncipe, G. Borioli, S. Fischer, G. Mori and F. Jofir (2012) The plant associated *Bacillus amyloliquefaciens* strains MEP218 and ARP23 capable of producing the cyclic lipopeptides iturin or surfactin and

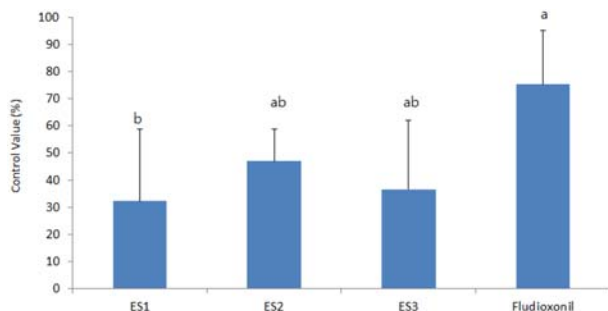


Fig. 5. Effect of antifungal bacteria treatment on damping off caused by *Rhizoctonia solani* in the field of ginseng seedling. Treatments with the same letter are not significantly different at the 5% level by Duncan's multiple range test.

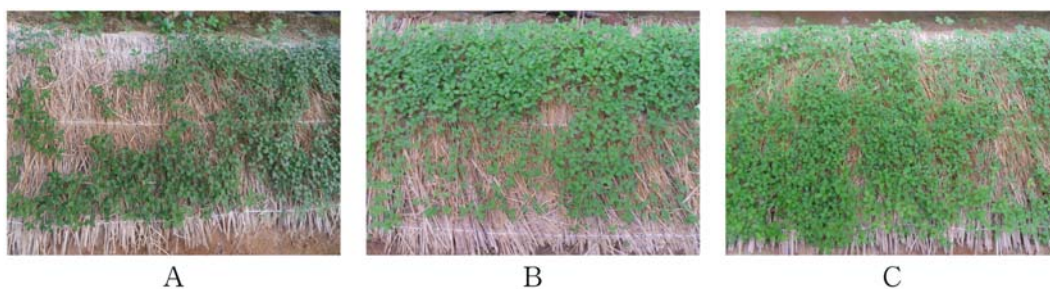


Fig. 6. Effect of antagonistic microbe application on damping off of 1 year-old ginseng seedling inoculated *Rhizoctonia solani*. A, cotnrol; B, treatment plot of *Bacullus amyloliquefaciens* ES2; C, treatment plot of fludioxonil.

- fengycin are effective in biocontrol of sclerotinia stem rot diseases. *J. Appl. Microbiol.* 112:159-174.
- Asaka, O. and M. Shoda (1996) Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *Applied and Environmental Microbiology.* 62:4081-4085.
- Athukorala, S. N., W. G. D. Fernando and K. Y. Rashid (2009) Identification of antifungal antibiotics of *Bacillus* species isolated from different microhabitats using polymerase chain reaction and MALDI-TOF mass spectrometer. *Can. J. Microbiol.* 55:1021-1032.
- Bardin, S. D. and H. C. Huang (2001) Survey of damping off diseases of sugar beet in southern Albert in 2000. *Can. Plant Dis. Surv.* 81:136-137.
- Bae, Y. S., B. Y. Park, T. J. An, B. Y. Yeon, S. W. Lee and N. S. Seong (2006) Selection of potential fungicides for control of ginseng seedling damping off and research on fungicide application for disease control in farms. *Treat. of Crop Sci.* 7:679-698.
- Berendsen, R. L., C. M. Pieterse and P. A. Bakker (2012) The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci.* 17:478-486.
- Besson, F., F. Peypoux, G. Michel and L. Delcambe (1977) Structure of bacillomycin L, an antibiotic from *Bacillus subtilis*. *Eur. J. Biochem.* 77:61-67.
- Cawoy, H., W. Bettioli, P. Fickers and M. Ongena (2011) Pesticides in the Modern World-Pesticides use and management. *Bacillus* based biological control of plant disease. InTech, Croatia, pp. 273-302.
- Cheng, Z., J. Li, Y. Niu, X. Zhang, O. Z. Woody, Y. Xiong, S. Djonovic, Y. Millet, J. Bush, B. J. McConkey, J. Sheen, and F. Ausubel (2015) Pathogen secreted proteases activate a novel plant immune pathway. *Nature.* 521:213-216.
- Chi, W. J., D. Y. Park, U. Temujin, J. Y. Lee, Y. K. Chang and S. K. Hong (2011) Identification of a cellulase producing marine *Bacillus* sp. GC-1 and GC-4 isolated from coastal seawater of Jeju island. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* 39:97-103.
- Cho, D. H., H. S. Cho, J. S. Shin and D. W. Park (2007) Control of damping-off and ginseng seedlings incited by *Rhizoctonia solani*. *Korean J. Ginseng Res.* 13:114-118.
- Fravel, D. R. (2005) Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual Review of Phytopathology.* 43:337-359.
- Gerhardt, P., R. G. E. Murray, R. N. Costilow, E. W. Nester, W. A. Wood, N. R. Krieg and G. B. Phillips (1981) General Characterization of Lipid Inclusions Using Sudan Black B. In: *Manual of Methods for General Bacteriology*, Smibert, R. M. and N. R. Krieg (Eds.). American Society for Microbiology, Washington, DC., pp: 409-433.
- Haas, D. and G. Defago (2005) Biological control of soil borne pathology by fluorescent pseudomonas. *Nature Reviews Microbiol.* 3:307-319.
- He, H., L. A. Silo-Suh and J. Handelsman (1994) Zwittermixin A, an antifungal and plant protection agent from *Bacillus cereus*. *Tetrahedron Lett.* 35:2499-2502.
- Horowitz, S. and W. M. Griffin (1991) Structural analysis of *Bacillus licheniformis* 86 surfactant. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 7:45-52.
- Hudelson, B. D. and J. L. Parke (1995) Etiology of a seedling root rot of American ginseng in Wisconsin. Simon Fraser University Press. pp. 133-140.
- Khabbaz, S. E., L. Zhang, L. A. Caceres, M. Sumarah, A. Wang and P. A. Abbasi (2015) Characterization of antagonistic *Bacillus* and *Pseudomonas* strains for biocontrol potential and suppression of damping off and root rot disease. *Ann Appl. Biol.* 166:456-471.
- Kim, B. Y., T. D. Zucci, H. P. Fiedler and M. Goodfellow (2012) *Streptomyces cocklensis* sp. nov. dioxamycin producing actinomycetes. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* 62(2) : 279-283.
- Kim, B. Y., J. H. Ahn, H. Y. Weon, J. K. Song, S. I. Kim and W. G. Kim (2012) Isolation and characterization of *Bacillus* species possessing antifungal activity against Ginseng root rot pathogens. *Korean J. Pestic. Sci.* 16:357-363.
- Kim, P. I., H. Bai, D. Bai, H. Chae, S. Chung, Y. Kim, R. Park and Y. T. Chi (2004) Purification and characterization of a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis* CMB26. *J. Appl. Microbiol.* 97:942-949.
- Kim, P. I., J. Rye, Y. H. Kim and Y. T. Chi (2010) Production of biosurfactant lipopeptide iturin A, fengycin and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletorichum gloeosporioides*. *J Microbiol Biotechnol.* 20:138-145.
- Leisso, R., P. Miller and M. Burrows (2009) The influence of biological and fungicidal seed treatment on chickpea damping off. *Canadian J. Plant Pathol.* 31:38-46.
- Madhaiyan, M., S. Poonguzhali and T. M. Sa (2010) *Bacillus methylotrophucus* sp. nov., a methanol-utilizing, plant growth promoting bacterium isolated from rice rhizosphere soil. *Int J Syst Bacteriol.* 60:2490-2495.
- Pant, G., A. Prakash, J. V. P. Pavani, S. Bera, G. V. N. S. Deviram, A. Kumar, M. Panchpuri and R. G. Prasuna (2015) Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. *J Taibah Univ. Sci.* 9:50-55.
- Proctor, J. T. A. and W. G. Bailey (1987) Ginseng : industry, botany, and culture. *Hortic. Rev.* 9:188-236.
- Proctor, J. T. A. and D. Louttit (1995) Stratification of American ginseng seed. embryo growth and temperature. *Korean J. Ginseng Sci.* 19:171-174.
- Stephens, C. T., L. J. Herr and A. F. Schmitthenner (1982) Characterization of *Rhizoctonia* isolates associated with damping off of bedding plants. *Plant Dis.* 66:700-703.
- Tainyu, Z. and C. Weiqun (1992) A preliminary study of seed pathology of *Panax quinquefolius*. *Korean J. Ginseng Sci.* 16:244-245.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei and S. Kumar (2007) MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis(MEGA) software version4.0. *Mol Bio Evol.* 24:1596-1599.

- Yang, H. J., S. J. Jeong, S. Y. Jeong and D. Y. Jeong (2014) Screening of antagonistic bacteria having antifungal activity against various Phytopathogens. *Kor. J. Mycol.* 42:333-340.
- Yu, G. Y., J. B. Sinclair, G. L. Hartman and B. L. Bertagnolli (2002) Production of Iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biology and Biochemistry.* 955-963.
- Yu, Y. H., D. H. Cho and S. H. Ohh (1989) Effect of tolcoposmethyl on damping-off ginseng seedlings incited by *Rhizoctonia solani*. *Korean J. Ginseng Res.* 13:114-118.
- Yu, Y. H., D. H. Cho, I. H. Lee and S. H. Ohh (1990) Effect of seedling depth on severity of damping-off ginseng seedling caused by *Rhizoctonia solani*. *Korean J. Ginseng Res.* 14:432-436.
- Xia, Y. (2004) Proteases in pathogenesis and plant defense. *Cellular Microbio.* 6:905-913.

● ●

인삼모잘록병원균에 항균활성을 갖는 *Bacillus* 균의 분리 및 특성조사

박경훈 · 박홍우 · 이성우 · 이승호 · 명경선 · 이상엽¹ · 송재경¹ · 김영탁² · 박경수² · 김영옥*

국립원예특작과학원 인삼특작부, ¹국립농업과학원 농업미생물과, ²농우바이오 종자검정팀

요 약 인삼 모잘록병을 일으키는 병원균의 생물적 방제제 개발을 위하여 인삼 근권 토양으로부터 500종의 미생물을 분리하였다. 인삼모잘록병원균을 대상으로 항균활성을 검정한 결과, 항균활성이 우수한 균주 3종을 선발하였다. 선발한 균주를 대상으로 항생물질과 세포벽분해효소 생성능력을 조사하였으며, fengycin, bacillomycin D, surfactin, iturin A와 zwittermicin A와 같은 리포펩타이드 생합성 유전자 유무를 조사하였다. ES1과 ES3 균주에서 iturin A와 surfactin 생합성 유전자를 확인하였으며, 세포벽 분해효소 생성능을 확인한 결과 선발한 모든 균주에서 cellulase, pectate lyase, protease를 생성하였다. 16S rRNA 염기서열 분석에 기반하여 계통도를 분석한 결과 ES1 균주와 ES3 균주는 *Bacillus methylotrophicus*로 확인되었으며, ES2는 *B. amyloliquefaciens*로 동정되었다. 포장실험 결과 ES1, ES2, ES3 처리구에서 각각 32.4%, 46.8%, 36.7%의 방제효과를 보였다. 이러한 결과로부터 항균활성과 세포벽 분해효소 생성능이 우수한 길항균주를 선발하였으며, 향후 포장실험과 제형화 개발 등을 통해 인삼모잘록병 방제를 위한 생물적 방제제로 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

색인어 항균활성, *Bacillus*, 생물적 방제, 모잘록병

