

식물 병원성 곰팡이에 길항작용을 갖는 다양한 *Bacillus sp.*의 균주 분리와 특성에 관한 연구

김희숙¹, 김지윤¹, 이송민¹, 박혜정¹, 이상현², 장정수^{1*}, 이문현¹

¹(주)엔젤 식품연구소

²신라대학교 바이오산업학부 제약공학전공

Received: April 1, 2019 / Revised: May 29, 2019 / Accepted: June 3, 2019

Isolation and Characterization of Various Strains of *Bacillus sp.* having Antagonistic Effect Against Phytopathogenic Fungi

Hee Sook Kim¹, Ji-Youn Kim¹, Song Min Lee¹, Hye-Jung Park¹, Sang-Hyeon Lee², Jeong Su Jang^{1*}, and Mun Hyon Lee¹

¹Food Research Center, Angel Co., Ltd., Busan 46988, Republic of Korea

²Major in Pharmaceutical Engineering, Division of Bioindustry, Silla University, Busan 46958, Republic of Korea

This study was carried out to examine the antagonistic effect against phytopathogenic fungi of isolated strains from soil samples collected from Busan, Changwon, and Jeju Island: *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum*, *Corynespora cassiicola*, *Fusarium sp.*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici*, and *Sclerotinia sclerotiorum*. According to results of our studies, isolated strains showed an antagonistic effect against phytopathogenic fungi. Such an antagonistic effect against phytopathogenic fungi is seen due to the production of siderophores, antibiotic substances, and extracellular amylase, cellulase, protease, and xylanase enzyme activities. Extracellular enzymes produced by isolated strains were significant, given that they inhibited the growth of phytopathogenic fungi by causing bacteriolysis of the cell wall of plant pathogenic fungi. This is essential to break down the cell wall of plant pathogenic fungi and thus help plant growth by converting macromolecules, which cannot be used by the plant for growth, into small molecules. In addition, they are putative candidates as biological agents to promote plant growth and inhibit growth of phytopathogenic fungi through nitrogen fixation, indole-3-acetic acid production, siderophore production, and extracellular enzyme activity. Therefore, this study suggests the possibility of using *Bacillus subtilis* ANGa5, *Bacillus aerius* ANGa25, and *Bacillus methylothrophicus* ANGa27 as new biological agents, and it is considered that further studies are necessary to prove their effect as novel biological agents by standardization of formulation and optimization of selected effective microorganisms, determination of their preservation period, and crop cultivation tests.

Keywords: Antagonistic effect, biological control, extracellular enzyme, plant growth promoting rhizobacteria, siderophore

서론

식물은 극심한 기온 변화와 건조, 염분과 같은 다양한 환경 스트레스뿐만 아니라 병원성 미생물의 공격과 같은 생물 스트레스에 노출되어 있으며, 이러한 병원성 미생물로부터 식물을 보호하기 위하여 농약 처리와 같은 화학적 방제 방법, 물리적 방법 및 생물학적 방법 등이 연구되어 왔다. 그

중에서도 생물학적 방법은 병원균과 같은 서식지에서 양분 및 생장에 대해 경쟁하거나 대사산물로써 병원균에 대한 항생 효과를 가지는 물질을 합성 및 분비하여 직·간접적으로 병원균의 생장을 저해하여 식물의 생장에 도움을 주는 식물 생장 촉진 근권세균(PGPR, plant growth promoting rhizobacteria)을 이용하는 방법이다[1, 2].

근권에는 수많은 종류의 미생물이 서식하고 있으며, 세균과 식물 병원성 곰팡이에 효과가 있는 biocontrol agent (BCA)로서 잠재적으로 효과가 있는 미생물이 존재한다. 이 근권 미생물들은 식물 병원성 곰팡이에 저항성을 유도하여 병원성 미생물의 침입 및 이상 기온과 같은 환경 스트레스

*Corresponding author

Tel: +82-51-852-3636, Fax: +82-51-852-4477

E-mail: jeongsu25@naver.com

© 2019, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

에 대해 식물이 견딜 수 있도록 유도 전신 내성(ISR, induced systemic resistance)을 일으켜 병원성 미생물로부터 식물을 보호하는 중요한 역할을 한다[3]. 이 유도 전신 내성은 식물의 생장에 대한 약해 없이 면역반응을 유도하기 때문에 농업에 지속 가능한 농법으로 새롭게 조명되고 있다[4]. 특히 근권 미생물은 항진균 활성 및 세포벽 분해 효소를 생산하는 균주가 다수 존재하며, 영양요구성이 단순하여 glucose, 무기염, 아미노산만을 요구하며, 활발한 물질대사를 수행하는 것으로 알려져 있다[5].

Bacillus 속 균주는 식물의 생장에 도움을 주는 PGPR로 BCA로서 처음으로 성공적으로 사용되었으며[6], 내성 포자를 지닌 그람양성 세균으로 배양이 용이한 특성을 가지고 있어 화학 농약을 대체할 생물학적 방제제로서 중요한 미생물로 주목받고 있다. *Bacillus* 속 균주는 수많은 항진균성 물질 및 세포벽을 분해하는 효소인 amylase, cellulase, protease 등을 생성하며, fengycin, iturin, surfactin과 같은 lipopeptide biosurfactant들은 다양한 생물학적 활성을 나타내어 식물 병원성 곰팡이에 강력한 항균 활성을 보여 식물 병원성 곰팡이의 생육을 억제한다. 또한 *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea*와 같은 식물 병원성 곰팡이의 성장과 발아를 억제하기 위해서 alkyls, alcohols, esters, ketones, phenols, 그리고 heterocyclics에 속하는 volatile organic compound를 생성하여 식물의 면역을 유도한다는 사실이 보고되어 있다[7-9].

따라서, 본 연구에서는 부산, 창원, 제주도 일대에서 채취한 토양과 뿌리로부터 식물 병원성 곰팡이(잿빛 곰팡이를 유발하는 *Botrytis cinerea* KACC 40574, 탄저병을 유발하는 *Colletotrichum acutatum* KACC40801, 잎 마름병을 유발하는 *Corynespora cassiicola* KACC 44719, 시들병을 유발하는 *Fusarium* sp. KACC 40241, 고추역병을 유발하는 *Phytophthora capsici* KACC 40180, 뿌리 썩음병을 유발하는 *Rhizoctonia solani* AG-2-1 KACC 40124, 균핵병을 유발하는 *Sclerotinia sclerotiorum* KACC 40457)에 대해 길항 능력을 갖는 미생물을 분리하고, 세포외 효소 생성능 및 생리학적 특성 분석을 통한 우수한 미생물을 선별하여 생물학적 방제제로써 사용이 가능한 새로운 미생물을 탐색하고자 하였다.

재료 및 방법

미생물 분리

다양한 환경에서 우수한 균주를 탐색을 위하여 부산, 창원, 제주도 일대의 토양을 채취하여 미생물을 분리하였다. 채취한 토양 시료는 증류수 9 ml에 각 토양 1 g을 멸균된 생리 식염수에 현탁 후 Bennet agar (BA, 1% glucose, 0.2% peptone,

0.1% beef extract, 0.1% yeast extract), glucose minimal salts agar (GMSA, 0.2% glucose, 1% yeast extract, 0.2% KH_2PO_4 , 0.3% K_2HPO_4 , 0.01% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0002% MnSO_4), potato dextrose agar (PDA, DifcoTM), tryptic soy agar (TSA, DifcoTM) plate에 도말하여 균을 분리하였다. 또한 뿌리 주변으로부터 근권 미생물의 분리를 위해 계면활성제인 Tween 80와 표백제인 perchloric acid (1%)를 처리하여 표면 미생물을 제거하였다. 그 후 BA, GMSA, PDA, TSA에 2일간 30°C에서 배양하여 순수분리하였다[10]. 모든 실험은 10-55°C에서 배양한 후 각 실험방식에 따라 식물 병원성 곰팡이 길항능 조사, 항균 활성, siderophore 생성능, 질소고정능, IAA 생성능, 세포외 효소 활성능을 조사하였다.

분리 균주의 동정

분리 균주의 동정을 위하여 16S rRNA 유전자 분석을 실시하였으며, 균체를 TSB에 접종하여 30°C에서 2일간 배양 후 균체를 회수하였다. 회수한 균체의 DNA는 Wizard[®] Genomic DNA purification kit (Promega, USA)를 이용하여 추출하였다. 16S rRNA 유전자 구간을 증폭시키기 위해서 universal primer인 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')와 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')를 사용하여 PCR로 30 cycles (94.0°C-5분, 55.0°C-30초, 72.0°C-1분)을 실행하였다(TP600, Takara Bio Inc., Japan). 증폭된 PCR 산물은 PCR/Gel combo kit (Cat. No. 3412, NucleoGen, Korea)를 사용하여 정제하였다. 정제된 PCR 산물은 1% agarose gel을 이용하여 확인하였다. 염기서열 분석은 Solgent Co., Ltd. (Korea)에 의뢰하였으며, 염기서열은 NCBI의 BLASTN을 통해 등록된 균주와 상동성을 비교하였다.

분리 균주의 온도에 따른 생장조건 분석

분리된 균주들의 온도에 따른 생장 조건을 확인하기 위해, 30 ml의 TSB 배지에 균주 0.5%를 접종하여 0-60°C에서 8일간 진탕 배양하여 24시간 간격으로 분광광도계 (Spectrophotometer, Multiskan GO, Thermo Scientific, Finland)를 이용하여 600 nm에서 측정하였다.

식물 병원성 곰팡이에 대한 길항작용 조사

분리한 균주들의 식물 병원성 곰팡이에 대한 길항작용을 조사하기 위하여 *Botrytis cinerea* KACC 40574, *Colletotrichum acutatum* KACC40801, *Corynespora cassiicola* KACC 44719, *Fusarium* sp. KACC 40241, *Phytophthora capsici* KACC 40180, *Rhizoctonia solani* AG-2-1 KACC 40124, *Sclerotinia sclerotiorum* KACC 40457 등으로 총 7 균주를 대상으로 검정하였다. 식물 병원성 곰팡이에 대한 길항작용

은 PDA를 이용한 well diffusion 법을 이용하였으며, PDA 배지에 분리 균주를 접종하여 검정 균주와 25°C에서 대치 배양하였다. 식물 병원성 곰팡이과 유용 미생물 간의 거리를 측정하여 억제율(inhibition rate)로 환산하였다.

$$\text{Inhibition rate (\%)} = \frac{(R-r)}{R} \times 100$$

R: 식물병원성 곰팡이와 분리 균주 사이의 거리(mm)

r: 식물병원성 곰팡이의 성장 반경(mm)

분리 균주의 항균 활성 조사

분리한 균주들의 세균성 미생물에 대한 항균 활성을 조사하기 위해서 *Bacillus cereus* KCCM 11204, *Staphylococcus aureus subsp. aureus* KCCM 11335, *Vibrio parahaemolyticus* KCCM 11965, *Listeria monocytogenes* KCCM 43155, *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43894, *Clostridium perfringens* ATCC 13124, *Yersinia enterocolitica* ATCC 23715 등으로 총 7 균주를 대상으로 검정하였다. 병원성 미생물에 대한 항균 활성은 TSA를 이용한 well diffusion 법을 이용하였으며, *B. cereus*는 30°C에서, 그 외 나머지 병원성 미생물은 37°C에서 각각 배양하였다. *C. perfringens*의 경우에는 CO₂ 배양기(VS-9160C, Vision scientific Co., Ltd.)와 가스팩을 이용하여 혐기적 조건하에서 배양하였다. 항균활성은 균체 주위에 형성된 생육 저지대(clear zone)의 확인 유무에 따라 양성, 음성 판단하였다.

Siderophore 생성능

유용미생물에 의해 생산되는 철(Fe) 성분과 결합 물질인 siderophore의 생산 여부를 확인하기 위해서 chrome azurol S (CAS) blue agar plate assay 이용하여 시험하였다[11]. 50 ml 증류수에 CAS 60 mg을 녹이고, 10 mM HCl 용액 10 ml에 2.7 mg의 FeCl₃·6H₂O를 녹였다. 그 후 73 mg의 hexadecyltrimethylammonium bromide를 증류수 40 ml에 녹인 후 3가지 용액을 모두 혼합하여 고압 멸균하였다. 다음 증류수 900 ml에 Luria-Bertani broth (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, pH 6.8)를 혼합한 뒤 고압 멸균하여, 50°C로 식힌 후 CAS 염료 용액과 혼합하여 CAS 평판 배지를 준비하였다. CAS 평판 배지에 접종하여 배양한 후 orange halo zone 형성 유무를 관찰하였다.

질소 고정능 조사

질소 고정세균 분리용 nitrogen free bromothymol blue (NFB, 0.5% (HOOCCH₂CH(OH)COOH, 0.05% K₂HPO₄, 0.001% MgSO₄·7H₂O, 0.002% NaCl, 0.005% FeSO₄·7H₂O, 0.0002% Na₂MoO₄, 0.001% MnSO₄·7H₂O, 0.001% CaCl₂,

0.4% KOH, 0.2% bromothymol blue (in 0.5% alcohol), 0.175% agar, pH 6.8) 배지를 이용하였다. 분리용 NFB 배지는 무기염과 탄소원만 들어 있고 질소원이 결핍된 배지로서 대기 중의 질소를 고정할 능력이 있는 균주만이 성장할 수 있는 선택배지이다[12]. NFB 배지에 전배양된 균주를 접종하여 30°C에서 4일간 배양하면서 배지 색이 파란색으로 색깔이 변할 경우 양성으로 판단하였다.

Indole-3-acetic acid (IAA) 생성능 조사

식물성 호르몬인 IAA 생산능을 평가하기 위해 0.1%의 L-tryptophane을 첨가한 King's B (2% proteose peptone, 0.25% K₂HPO₄, 0.6% MgSO₄, 1.5% glycerol) 배지에 분리된 균을 접종하여 30°C에서 2일간 배양한 후 배양액을 4°C에서 원심분리하여 상등액을 분리하였다. 그 후 원심분리한 상등액은 Salkowski's reagent (35% HClO₄ 50 ml, 0.5 M FeCl₃ 1 ml)와 1:2 (v/v)의 비율로 혼합한 다음 상온에서 30분간 정치하였다. 발색되는 정도는 분광광도계를 이용하여 530 nm에서 측정하였다. 표준물질로 IAA를 이용하여, 위와 같은 동일한 방법으로 실험한 후 검량선을 작성하여 시료의 농도를 환산하였다[13].

세포의 효소 활성

Amylase 활성은 Miller [14]의 방법을 일부 변형하여 시험을 진행하였다. Starch가 함유된 nutrient broth에 균주를 접종하여 30°C에서 2일간 배양 후 원심분리(3000 rpm, 4°C, 10분) 하였다. 배양 상등액은 1% starch solution (50 mM sodium phosphate buffer)과 1:1로 혼합하여 반응시켰다. 그 다음 color reagent solution과 혼합하여 100°C에서 열처리 후 얼음에 냉각시켰다. 그 후 분광광도계를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 1 unit은 상기의 시험조건 하에서 starch로부터 1 µg의 D-maltose에 상응하는 환원당을 생성하는 효소량으로 나타내었다. Cellulase 활성은 Shin과 Cho의 방법[15]을 일부 변형하여 시험을 진행하였다. Carboxymethyl cellulose (CMC)를 함유한 nutrient broth에 균주를 접종하여 30°C에서 2일간 배양 후 원심분리(3000 rpm, 4°C, 10분) 하였다. 원심분리한 상등액은 1% CMC (50 mM sodium phosphate buffer)를 혼합하여 50°C에서 10분간 반응시킨 후 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 시약을 첨가하여 100°C에서 10분간 열처리 후 냉각시켰다. 흡광도는 분광광도계를 이용하여 540 nm에서 측정하였다. 효소의 활성의 1 unit은 상기의 시험조건 하에서 CMC로부터 1 µg의 glucose에 상응하는 환원당을 생성하는 효소량으로 정의하였다. Protease의 활성은 Oh 등[16]의 방법을 일부 변형하여 시험을 진행하였다. Skim milk가 함유된 nutrient broth에 균주를 접종하여 30°C에서 2일간 배양 후 원심분리(3000

rpm, 4°C, 10분) 하였다. 원심분리한 상등액은 0.65% casein (50 mM sodium phosphate buffer)를 혼합한 뒤 37°C에서 10분간 반응시켰다. 그 후 0.44 M trichloroacetic acid를 첨가하여 37°C에서 30분간 단백질을 응고시켰다. 응고된 단백질을 0.45 µm filter를 이용하여 여과한 후 여과액과 3배 희석된 Folin-Ciocalteu's phenol reagent를 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 흡광도는 분광광도계를 이용하여 660 nm에서 측정하였다. 효소활성의 1 unit은 상기의 시험 조건 하에서 1 µg의 tyrosine을 유리시키는 효소의 양을 환산하여 나타내었다. Xylanase의 활성은 Shin과 Cho의 방법 [15]을 일부 변형하여 시험을 진행하였다. Beechwood xylan을 함유한 nutrient broth에 균주를 접종하여 30°C에서 2일간 배양 후 원심분리(3000 rpm, 4°C, 10분) 하였다. 원심분리한 상등액은 1% xylan (50 mM acetic acid buffer)과 혼합하여 50°C에서 10분간 반응시켰다. 그 다음 DNS 시약을 첨가하여 100°C에서 10분간 열처리 후 냉각시켰다. 흡광도는 분광광도계를 이용하여 540 nm에서 측정하였다. 1 unit은 상기의 시험조건 하에서 xylan으로부터 1 µg의 D-xylose에 상응하는 환원당을 생성하는 효소량으로 나타내었다.

생화학특성 조사

균주가 분비하는 효소의 특성 분석은 API ZYM kit (Biomérieux, France)를 이용하여 분석하였으며, suspension medium (2 ml)에 분리 균주를 풀어 McFarland standard (Biomérieux, France)의 5 McFarland로 탁도를 맞춰 검체를 준비하였다. 그 다음 각 큐플에 검체를 접종하여 37°C에서 4시간 배양 후 ZYM A와 ZYM B 시약을 한 방울씩 떨어뜨렸다. 5분 후 판독표에 따라 결과를 확인하였다.

통계분석

모든 분석은 3회 이상 수행하였으며, 평균±표준편차 (Mean ± SD)로 표현하였다. 평균값의 유의한 차이는 SPSS (version 20.0 for Windows, SPSS Inc., USA)를 이용한 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)의 Duncan's multiple

comparisons를 사용하였다. 유의성 검증은 신뢰구간 $p < 0.05$ 에서 분석하였다.

결과 및 고찰

미생물의 분리

일반적으로 중성과 약산성 토양 조건에서 토착미생물의 생장이 유리하며, 외부에서 도입된 미생물도 중성과 약산성 조건에서 잘 정착하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 중성과 약산성 토양을 중심으로 미생물을 분리하고자 하였다[17]. 미생물의 분리는 부산 야산의 토양 및 들풀 뿌리, 부산 대저 토마토 밭의 토양 및 토마토 뿌리, 부산 기장 배 밭의 토양 및 배나무 뿌리, 창원 야산의 토양 및 들풀 뿌리, 창원 텃밭의 토양 및 고추 뿌리, 제주 공원의 토양 및 들풀 뿌리, 제주도 해안가 인근 해변의 토양 및 들풀 뿌리 등 7곳에서 이루어졌으며, 토양 및 근권 뿌리로부터 816종 미생물을 순수 분리하였다(Table 1). 1차적으로 7종의 식물 병원성 곰팡이에 모두 길항능을 가지는 26종 균주를 선발하였으며, 최종적으로 활성이 높은 6균주를 선발하였다.

미생물 동정

2차 선별된 26가지 균주의 16S rRNA 유전자염기서열을 BLASTN에서 분석한 결과 *Bacillus subtilis* 8종, *Bacillus velezensis* 7종, *Bacillus tequilensis* 6종, *Bacillus methylotrophicus* 3종, *Bacillus megaterium* 1종, *Bacillus aerius* 1종으로 판명되었으며, 26종 모두 *Bacillus* sp.로 확인이 되었다. *B. subtilis* 8종, *B. velezensis* 7종, *B. tequilensis* 6종, *B. methylotrophicus* 3종, *B. megaterium* 1종, *B. aerius* 1종에서 species마다 활성이 높은 균주 1종씩 최종 선별하였다. 최종 선별된 균주는 *Bacillus megaterium* ANGa3, *Bacillus subtilis* ANGa5, *Bacillus velezensis* ANGa7, *Bacillus tequilensis* ANGa22, *Bacillus aerius* ANGa25, *Bacillus methylotrophicus* ANGa27로 명명하였다. *Bacillus* sp.는 처음 미생물제제로써 이용이 되어왔으며,

Table 1. Information of soil and root samples.

Sample	pH ¹⁾	Sampling date	Isolate location	Number of isolated bacteria
Soil, wild herb root	5.22 ± 0.13	March 14, 2017	Busan	100
Soil, wild herb root	6.02 ± 0.01	May 13, 2017	Changwon	87
Soil, red pepper root	6.00 ± 0.03	May 13, 2017	Changwon	99
Soil, tomato root	6.78 ± 0.10	June 01, 2017	Busan	133
Soil, pear root	5.44 ± 0.21	June 01, 2017	Busan	137
Soil, wild herb root	7.15 ± 0.10	June 10, 2017	Jeju	117
Soil, wild herb root	7.01 ± 0.24	June 10, 2017	Jeju	143

¹⁾Data are mean ± SD of at least three replicates.

특히 *Bacillus* 속 균주로부터 생성되는 circulin, colistin 및 polymyxin과 같은 항생물질은 그람 양성균 및 그람 음성균 뿐만 아니라 식물 병원성 곰팡이에 대해서도 활성을 가지며, 항생물질 외에도 세포벽을 분해하는 효소, siderophore 등 식물 병원성 곰팡이의 증식을 최소화 또는 예방하기 위한 물질을 생성한다[18]. 따라서, 선별된 균주를 이용하여 식물 병원성 곰팡이의 생장 억제를 확인하고자 하였다.

분리 균주의 온도에 따른 성장조건 분석

저온 또는 고온의 극한의 기온 변화가 지속적으로 일어나고 있으며[19], 식물은 저온, 토양의 수분 부족, 높은 염분 농

도, 가뭄, 고온과 같은 환경 스트레스 조건에 의해서 생장과 발달이 저해된다[20]. 식물은 0–15°C의 온도에서 저온 스트레스를 받으며, 이는 세포막의 구조와 조성의 변화 및 대사 과정 등의 변화를 통해 노화가 가속되며, 병원성 미생물에 감수성이 증가하여 생장이 억제된다[21]. 또한 식물은 생식 기간에 고온에 노출되면 작물의 생산량이 많이 감소한다[22]. 따라서, 분리 균주를 다양한 온도 조건에서 배양하여 24시간 간격으로 분리 균주의 성장을 확인하였다. 측정 결과, 5°C 이하에서는 모든 균주가 성장하지 못하였으나, 10°C에서는 ANGa3, ANGa5, ANGa25의 성장을 확인할 수 있다. 또한 15°C 이상 50°C 이하에서는 모두 성장을 확인할 수 있

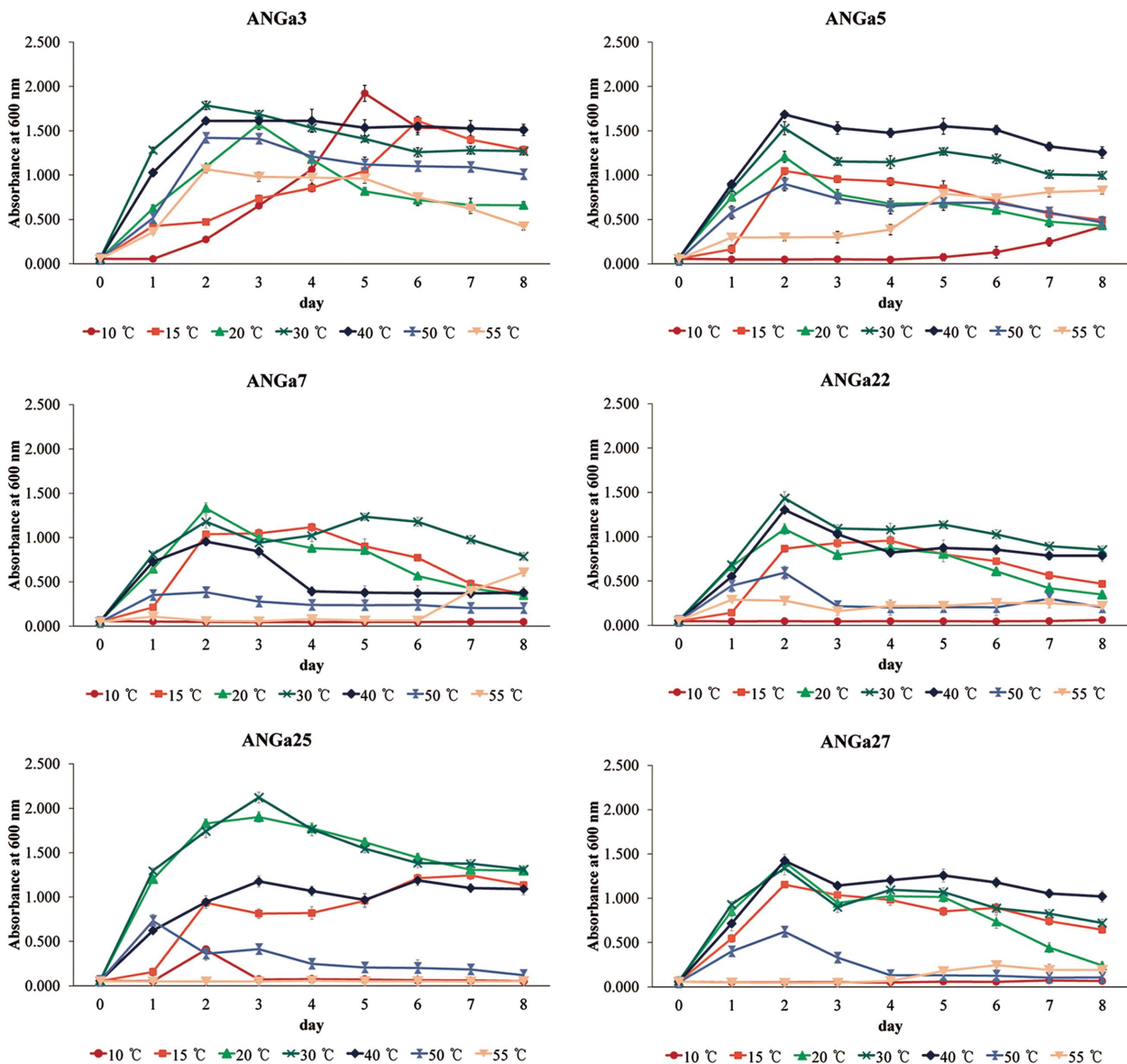


Fig. 1. Growth curves of isolated strains at various temperature. Data are mean \pm SD of at least three replicates.

었으며, 55°C에서는 ANGa25를 제외한 ANGa3, ANGa5, ANGa7, ANGa22, ANGa27에서 성장을 확인할 수 있었다. 그러나, 60°C 이상의 온도에서는 6개의 균주 모두 성장을 확

인할 수 없었다(Fig. 1). 이는 15–55°C 구간 내에서 식물 재배 시 저온, 고온과 같은 비생물적 스트레스에도 내성을 부여하여 식물의 성장을 촉진하는 역할을 할 수 있을 것으로

Table 2. Antifungal inhibitory activity against phytopathogens by strains isolated from soil.¹⁾

Strain	Temperature (°C)	Inhibition rate (%)					
		Group 1		Group 2			Group 3
		ANGa3	ANGa5	ANGa7	ANGa22	ANGa27	ANGa25
<i>Botrytis cinerea</i>	10 °C	19.75 ± 2.71 ^a	37.35 ± 3.18 ^a	8.83 ± 4.14 ^a	7.13 ± 2.41 ^a	6.37 ± 3.15 ^a	5.94 ± 2.40 ^a
	20 °C	30.98 ± 2.14 ^b	55.56 ± 6.36 ^b	45.83 ± 4.17 ^c	55.01 ± 5.48 ^b	50.00 ± 4.17 ^b	64.10 ± 5.25 ^c
	30 °C	31.36 ± 4.62 ^b	57.14 ± 4.76 ^b	63.49 ± 5.50 ^d	58.51 ± 3.71 ^b	58.23 ± 1.48 ^c	66.60 ± 4.19 ^c
	40 °C	53.56 ± 3.30 ^c	77.38 ± 3.15 ^c	34.78 ± 4.35 ^b	56.40 ± 5.69 ^b	71.67 ± 4.90 ^d	38.79 ± 5.42 ^b
	50 °C	47.95 ± 3.66 ^c	59.38 ± 2.39 ^b	27.78 ± 5.32 ^b	54.17 ± 4.17 ^b	45.38 ± 2.49 ^b	37.68 ± 5.02 ^b
<i>Colletotrichum acutatum</i>	10 °C	45.83 ± 4.17 ^a	51.58 ± 3.43 ^a	4.55 ± 0.21 ^a	4.23 ± 0.10 ^a	11.97 ± 2.88 ^a	13.85 ± 4.56 ^a
	20 °C	51.39 ± 2.41 ^{ab}	53.18 ± 2.76 ^a	76.09 ± 1.88 ^d	71.38 ± 5.61 ^d	67.15 ± 2.21 ^c	65.73 ± 6.22 ^b
	30 °C	51.58 ± 6.50 ^{ab}	53.69 ± 3.34 ^a	76.55 ± 0.62 ^d	73.81 ± 5.41 ^d	75.86 ± 4.45 ^d	76.09 ± 4.19 ^c
	40 °C	56.34 ± 2.09 ^b	67.29 ± 2.45 ^b	62.71 ± 4.82 ^c	61.99 ± 7.15 ^c	82.73 ± 3.28 ^e	56.93 ± 6.82 ^b
	50 °C	47.95 ± 0.55 ^{ab}	52.78 ± 2.41 ^a	51.39 ± 2.41 ^b	50.13 ± 4.36 ^b	34.83 ± 1.52 ^b	15.10 ± 2.01 ^a
<i>Corynespora cassiicola</i>	10 °C	38.10 ± 5.10 ^a	53.78 ± 1.45 ^a	4.48 ± 0.11 ^a	7.07 ± 2.52 ^a	39.38 ± 1.42 ^a	6.28 ± 2.81 ^a
	20 °C	40.58 ± 2.51 ^a	60.69 ± 6.06 ^{abc}	78.00 ± 3.96 ^c	63.89 ± 4.81 ^{bc}	64.00 ± 5.98 ^c	54.55 ± 4.55 ^b
	30 °C	44.57 ± 7.69 ^a	67.32 ± 7.65 ^c	80.01 ± 2.41 ^c	66.67 ± 6.73 ^c	68.97 ± 8.56 ^{cd}	80.63 ± 2.05 ^c
	40 °C	47.95 ± 3.66 ^a	63.13 ± 3.81 ^{bc}	78.43 ± 2.99 ^c	62.50 ± 4.17 ^{bc}	74.64 ± 2.36 ^d	53.75 ± 1.37 ^b
	50 °C	43.06 ± 4.81 ^a	56.22 ± 1.10 ^{ab}	66.67 ± 4.17 ^b	55.56 ± 6.36 ^b	54.55 ± 3.96 ^b	7.79 ± 2.63 ^a
<i>Fusarium sp.</i>	10 °C	16.67 ± 4.17 ^a	49.21 ± 7.27 ^a	6.36 ± 3.15 ^a	8.73 ± 3.75 ^a	31.82 ± 4.55 ^a	13.10 ± 2.70 ^b
	20 °C	18.06 ± 2.41 ^a	63.67 ± 5.66 ^{bc}	77.71 ± 3.55 ^d	61.62 ± 4.37 ^d	71.17 ± 5.82 ^c	42.77 ± 2.73 ^c
	30 °C	21.44 ± 4.38 ^a	71.93 ± 4.03 ^c	84.34 ± 2.95 ^d	78.50 ± 2.12 ^e	74.24 ± 5.25 ^c	38.14 ± 5.89 ^c
	40 °C	49.28 ± 7.33 ^c	66.11 ± 4.86 ^{bc}	56.28 ± 5.48 ^c	51.52 ± 9.46 ^c	88.14 ± 8.82 ^c	36.59 ± 1.57 ^{bc}
	50 °C	40.32 ± 4.66 ^b	60.87 ± 4.35 ^b	41.83 ± 6.37 ^b	30.56 ± 2.41 ^b	51.66 ± 4.87 ^b	15.56 ± 1.63 ^a
<i>Phytophthora capsici</i>	10 °C	42.27 ± 5.12 ^b	18.17 ± 7.90 ^a	4.55 ± 0.17 ^a	14.76 ± 2.42 ^a	21.57 ± 7.09 ^a	ND ²⁾
	20 °C	53.69 ± 3.34 ^c	36.94 ± 4.65 ^{ab}	78.00 ± 3.96 ^b	27.17 ± 2.35 ^b	25.04 ± 3.11 ^{ab}	5.81 ± 2.19 ^a
	30 °C	70.85 ± 4.62 ^d	47.83 ± 5.90 ^b	80.01 ± 2.41 ^b	30.81 ± 2.58 ^b	43.94 ± 2.62 ^c	6.14 ± 2.93 ^a
	40 °C	52.46 ± 2.50 ^c	20.42 ± 7.56 ^a	78.43 ± 2.99 ^b	27.27 ± 3.71 ^b	31.80 ± 3.98 ^b	5.68 ± 2.61 ^a
	50 °C	31.82 ± 4.55 ^a	19.79 ± 7.14 ^a	66.67 ± 4.17 ^{ab}	16.67 ± 2.14 ^a	29.29 ± 3.50 ^{ab}	ND
<i>Rhizoctonia solani</i>	10 °C	35.43 ± 3.24 ^a	38.89 ± 2.41 ^a	10.35 ± 2.87 ^a	8.33 ± 4.17 ^a	34.27 ± 9.17 ^a	10.14 ± 2.51 ^a
	20 °C	40.28 ± 2.41 ^{ab}	45.05 ± 1.36 ^{ab}	55.93 ± 4.41 ^b	52.18 ± 3.77 ^b	39.03 ± 1.62 ^a	47.89 ± 2.08 ^c
	30 °C	45.65 ± 9.22 ^b	46.32 ± 11.63 ^{ab}	58.90 ± 6.42 ^c	54.35 ± 9.22 ^b	52.24 ± 2.27 ^b	53.03 ± 9.46 ^c
	40 °C	41.63 ± 5.66 ^{ab}	56.85 ± 5.97 ^b	42.33 ± 5.19 ^b	51.39 ± 6.36 ^b	52.97 ± 3.30 ^b	37.68 ± 2.51 ^b
	50 °C	38.46 ± 2.29 ^{ab}	43.72 ± 3.56 ^{ab}	16.21 ± 2.77 ^a	47.95 ± 3.66 ^b	38.07 ± 8.40 ^a	12.79 ± 3.23 ^a
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	10 °C	24.60 ± 2.37 ^a	30.28 ± 4.14 ^a	13.78 ± 4.33 ^a	4.35 ± 0.19 ^a	4.77 ± 0.23 ^a	12.94 ± 2.98 ^a
	20 °C	52.38 ± 4.76 ^c	35.21 ± 2.12 ^{ab}	54.04 ± 5.38 ^c	41.10 ± 6.42 ^b	46.97 ± 2.62 ^c	54.69 ± 2.38 ^c
	30 °C	34.95 ± 0.70 ^b	40.55 ± 4.25 ^b	54.69 ± 2.38 ^c	43.80 ± 3.45 ^b	50.00 ± 3.94 ^{cd}	72.73 ± 6.43 ^d
	40 °C	33.09 ± 4.78 ^b	61.21 ± 2.10 ^c	56.36 ± 2.36 ^c	41.67 ± 4.17 ^b	53.03 ± 2.62 ^d	32.27 ± 2.53 ^b
	50 °C	24.87 ± 3.76 ^a	36.87 ± 3.81 ^b	45.31 ± 2.38 ^b	37.50 ± 4.17 ^b	13.10 ± 2.70 ^b	14.00 ± 4.34 ^a

¹⁾ Data are mean ± SD of at least three replicates. Significantly different at $p < 0.05$; different letters indicate significant differences among samples.

²⁾ ND : Not detected.

기대된다. 선별한 6 균주를 생육 가능 온도 범위에 따라서 다음과 같이 group 1은 10–55℃, group 2는 15–55℃, group 3은 10–50℃로 생육온도 범위에 따라 3 group으로 구별하여 분류하였으며, 모든 실험은 1×10^6 CFU/ml 접종하여 10–55℃에서 배양 후 시험을 진행하였다.

식물 병원성 곰팡이에 대한 길항작용 조사

분리 균주의 식물 병원성 곰팡이에 대한 길항작용을 조사하기 위하여 식물 병원성 곰팡이 7종을 이용하여 시험을 진행하였다. 성장 저해 활성은 PDA 배지에 대치배양법을 통해 생육 저지대를 측정하여 활성 여부를 판단하였다. 연구 결과는 Table 2에 나타내었다. 먼저, group1의 ANGa3과 ANGa5를 비교했을 때, ANGa5가 *P. capsici*를 제외한 식물 병원성 곰팡이에 대한 억제율이 ANGa3보다 우세한 것으로 확인하였다. 또한 ANGa3의 경우에는 *B. cinerea*, *C. acutatum*, *C. cassiicola*, *Fusarium* sp.에서는 40℃에서 높은 억제율을 보였으며, *P. capsici*, *R. solani*는 30℃에서, *S. sclerotiorum*은 20℃에서 억제율이 높게 나타났다. ANGa5의 경우에는 주로 30–40℃에서 억제율이 높은 것을 확인하였다. Group 2의 경우에는 7가지의 식물 병원성 곰팡이에 대한 길항능력이 상대적으로 ANGa22가 떨어졌으며, ANGa7과 ANGa27이 활성이 비슷한 수준을 확인할 수 있었다. Group 2의 경우에는 10℃에서 균주의 성장이 일어나지 않음에도 불구하고, 식물 병원성 곰팡이에 대한 길항능력을 나타내었는데, 이는 10℃에서 배양한 균주를 식물 병원성 곰팡이에 대한 길항작용을 조사하기 위해 25℃에서 진행하였기 때문에 일부 온도의 영향을 받은 것으로 판단된다. Group 3의 경우, ANGa25가 *Fusarium* sp.와 *P. capsici*를 제외한 나머지 식물 병원성 곰팡이에 대해 50% 이상의 높은 억제율을 보였으며, 그 중에서도 *C. cassiicola*에 대해서 80.6% 높은 억제율을 보였다. 또한 대부분 20–30℃에서 억제율이 높은 것을 확인할 수 있

었다. *Bacillus* 속 균주의 경우 수많은 항진균성 물질을 생성하는데, 그 중에서도 항생물질은 미생물의 성장 및 발달을 억제하며, 병원성 미생물의 세포벽 합성을 억제시켜 세포막 구조에 영향을 주거나 리보솜 소단위의 개시복합체 형성을 억제하는 작용 메커니즘을 갖는다[23]. Yeo 등[5]의 연구에 의하면, *Fusarium oxysporum* KACC 40052균에 대해 길항 효과를 가지는 *B. subtilis* YK-5 균주를 궁중무 및 벼를 대상으로 재배한 결과 무처리구에 비해 경엽수, 줄기 및 뿌리의 길이가 약 60% 이상 증가하는 결과를 나타내었으며, 이 결과를 통해 분리 균주가 식물 생장에 도움을 줄 것으로 판단된다. 따라서, 식물 병원성 곰팡이의 생장억제 외에도 다양한 생물 검정을 통해 생물학적 방제제로서의 기능성을 추가로 확인하고자 하였다.

분리 균주의 항균 활성 검정

분리 균주에서 세균에 대한 항균 활성을 알아보기 위해서 병원성 미생물 7종을 이용하여 시험을 진행하였으며, 그 결과를 Table 3에 나타내었다. *B. cereus*에 대해서 ANGa3을 제외한 모든 분리 균주에서 항균활성을 나타내었으며, *S. aureus*에 대해서는 ANGa3, ANGa5, ANGa22 균주에서 항균활성을 나타내었다. 또한 ANGa22 균주는 *V. parahaemolyticus*에 대해서도 항균 활성을 나타내었으며, 그 외에도 ANGa7, ANGa25, ANGa27에서 *Y. enterocolitica*에 대해서 항균 활성을 나타내었다. 시험 결과, 항균 활성이 크게 두드러지지지는 않았지만 6가지 균주에서 모두 항균 물질을 생성하는 것을 확인할 수 있었다. Kindoli 등[24]의 연구에 의하면 청국장에서 분리한 *B. subtilis* W42가 *B. cereus*와 *L. monocytogenes*에 활성을 나타내며, 이는 분리 균주인 *Bacillus* sp.의 결과와도 일치하는 것을 확인하였다. 따라서 분리 균주가 곰팡이 및 세균에 대한 길항능을 나타낼 것으로 판단된다.

Table 3. Antibacterial inhibitory activity against the pathogens by strains isolated from soil.¹⁾

Bacterial	Clear zone					
	Group 1		Group 2		Group 3	
	ANGa3	ANGa5	ANGa7	ANGa22	ANGa27	ANGa25
<i>Bacillus cereus</i>	-	+	+	+	+	+
<i>Clostridium perfringens</i>	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> O157:H7	-	-	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	-	+	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	-	-	+	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-	+	-	+	+

¹⁾ - : no activity, + : activity.

Table 4. Ability of siderophore production, nitrogen fixation and IAA production from isolated strains at various temperature.

Ability	Temperature (°C)	Strains					
		Group 1		Group 2			Group 3
		ANGa3	ANGa5	ANGa7	ANGa22	ANGa27	ANGa25
Siderophore production ¹⁾	10°C	-	-	-	-	-	-
	20°C	+	+	+	+	+	+
	30°C	+	+	+	+	+	+
	40°C	+	+	+	+	+	+
	50°C	+	+	+	+	+	+
	55°C	-	-	-	+	-	-
Nitrogen fixation ²⁾	10°C	+	+	-	-	-	-
	20°C	+	+	+	+	+	+
	30°C	+	+	+	+	+	+
	40°C	+	+	+	+	+	+
	50°C	+	+	+	+	+	+
	55°C	W	-	-	+	-	-
IAA production ³⁾	10°C	5.16 ± 0.30 ^b	4.47 ± 0.04 ^a	ND ⁴⁾	ND	ND	6.20 ± 0.23 ^b
	20°C	8.42 ± 0.22 ^d	15.35 ± 0.25 ^b	3.83 ± 0.08 ^c	6.74 ± 0.07 ^a	5.63 ± 0.35 ^b	11.07 ± 0.40 ^c
	30°C	16.00 ± 0.47 ^e	24.36 ± 0.17 ^d	2.48 ± 0.09 ^b	33.61 ± 2.39 ^b	5.90 ± 0.17 ^b	6.56 ± 0.26 ^b
	40°C	6.23 ± 0.07 ^c	23.29 ± 0.14 ^c	2.36 ± 0.12 ^{ab}	6.73 ± 0.08 ^a	6.08 ± 0.04 ^b	6.64 ± 0.17 ^b
	50°C	4.37 ± 0.22 ^a	4.52 ± 0.11 ^a	2.29 ± 0.07 ^a	5.84 ± 0.02 ^a	3.71 ± 0.17 ^a	5.31 ± 0.14 ^a
	55°C	4.28 ± 0.15 ^a	4.10 ± 0.23 ^a	2.21 ± 0.11 ^a	5.62 ± 0.16 ^a	3.34 ± 0.22 ^a	ND

¹⁾ - : no activity, + : activity.

²⁾ Nitrogen fixation ability determined by color change of NFB broth. - : no activity, + : activity, W : weakly activity.

³⁾ Absorbance was measured with a spectrophotometer at 530 nm. Significantly different at $p < 0.05$; different letters indicate significant differences among samples.

⁴⁾ ND : Not detected.

Siderophore 생성능

지금까지 알려진 모든 미생물은 특정 *Lactobacilli*를 제외하고는 필수적으로 철이 필요하다[25]. 철은 자연에서 풍부하지만, 철의 생체이용률은 호기성 조건과 중성 pH 조건하에서는 낮은 가용성 때문에 토양에서 극히 제한된다. 근권 미생물이 생성하는 철 이온 특이 결합 물질인 siderophore 생성은 식물 성장을 촉진 및 식물 병원성 곰팡이의 성장을 억제하는 역할로 알려져 있다[26]. 시험 결과, Table 4와 같이 siderophore 활성을 나타냈으며, 대부분 10°C, 55°C를 제외한 20-50°C에서 siderophore 생성능을 확인할 수 있었으며, ANGa22의 경우에는 55°C에서도 siderophore 생성능을 확인할 수 있었다. 이는 ANGa3, ANGa5, ANGa7, ANGa22, ANGa25, ANGa27에 의해 생성되는 siderophore가 직접적으로는 난용성 Fe(OH)₃를 Fe³⁺의 형태로 변화시켜 식물이 재흡수 할 수 있도록 하여 식물 성장촉진을 야기하며, 간접적으로 근권 주위의 Fe³⁺을 식물 및 유용 미생물이 흡수할 수 있도록 하여 결과적으로, 식물 병원성 곰팡이의 Fe³⁺ 흡수를 방해하여 생육하는 것을 억제할 수 있을 것으로 기대된다[27, 28].

식물성장촉진 활성

식물 병원성 곰팡이에 대한 길항 능력 외에도 식물의 성장을 촉진하는 능력을 확인하기 위해서 질소 고정능과 IAA 생성능을 확인하였다. 대기 중의 질소는 공기 중에 가장 많이 존재하지만, 생물체가 이용할 수 없는 N₂의 형태로 존재하여 이용성이 현저히 떨어지므로 질소 고정능을 가지는 균주를 분리하고자 하였다[29]. 먼저 분리 선별된 균주에 대하여 질소원이 결핍된 무기염과 탄소원만 들어 있는 선택배지인 NFB 배지에서 질소 고정화 실험을 하였으며, 질소 고정능은 푸른색으로 변화했거나 균주의 성장을 보고 양성 판정하였다. Group 1의 ANGa3과 ANGa5를 비교하면, ANGa3은 10-55°C에서 모두 활성을 나타냈으며, ANGa5의 경우에는 10-50°C에서 활성을 나타내는 것을 확인하였다(Table 4). Group 2의 ANGa7과 ANGa27는 20-50°C에서 질소고정능을 나타냈으며, ANGa22의 경우에는 20-55°C에서 활성을 나타내었다. Group 3의 경우에는 20-50°C에서 질소고정능을 확인할 수 있었다. 또한 10-55°C에서 IAA 생성능을 확인한 결과, Group 1의 ANGa3과 ANGa5의 경우에는 10-55°C의

범위에서 IAA 생성능을 나타냈으며, ANGa3보다는 ANGa5가 IAA 생성능이 높았다(Table 4). Group 2의 ANGa7, ANGa22, ANGa27의 경우에는 10℃에서 성장을 하지 않았기 때문에 10℃를 제외한 20–55℃의 범위에서 IAA 생성능을 확인하였으며, 3 균주 중에서는 ANGa22가 가장 높은 활성을 보였다. Group 3인 ANGa27의 경우에는 균주 성장범위인 10–50℃에서 IAA 생성능을 확인할 수 있었다. 따라서, Group 1에서는 식물 병원성 곰팡이에 대한 길항작용이 우세했던 ANGa5를 선정하였으며, Group 2에서는 ANGa7과 ANGa27이 병원성 곰팡이에 대한 길항작용, siderophore 생성능 및 질소고정능의 활성이 비슷했지만 ANGa27이 IAA 생성능이 높았기 때문에 group 2에서는 최종 ANGa27를 선정하였다. 따라서, 각 group에서 최종 ANGa5, ANGa25, ANGa27를 선정하였다. 최종 선정된 균주를 혼합 배양하여 IAA 생성능에 대한 시너지 효과를 확인하고자 하였으며, 그 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 시너지 효과를 확인 결과, group 1의 ANGa5와 group 2의 ANGa27를 혼합 배양한 경우 약 1.68배의 시너지 효과를 확인할 수 있었으며, group 2의 ANGa27과 group 3의 ANGa25를 혼합배양 한 경우에는 약 2.40배의 시너지 효과를 확인할 수 있었다. IAA 생성능에 관한 Jung 등[30]의 연구에 의하면 IAA를 생산하는 *B. licheniformis* K11를 접종하였을 때 녹두, 완두, 배추 생육이 각 약 160%, 150%, 130% 높은 결과를 나타내었다. 또한 Yun과 Cheng [31]의 연구에 의하면, *Pantoea* sp.를 10⁸ pfu/ml의 농도를 맞춰 100 ml를 접종하였을 때 어린 상추 식

물 재배 시 생체량(fresh weight) 및 상층부 길이생장(shoot length)이 증가하는 결과를 보여주었다. 따라서, 분리 균주가 식물생장 호르몬인 IAA를 생성함으로써 뿌리 성장 강화 및 영양섭취를 용이하게 하여 식물 성장을 촉진할 것으로 기대된다.

효소적 특성

Bacillus 속에서 분리되는 진균 외벽 가수분해효소는 식물 병원성 곰팡이의 세포벽을 분해하는 용균작용을 수행한다고 보고되고 있으며, 여러 종류의 세포의 효소들에 의한 식물 병원성 곰팡이 생장을 저해하는 방법이 널리 사용되고 있다 [32]. 따라서, 본 실험에서는 최종 선별된 균주를 대상으로 amylase, cellulase, protease, xylanase 생성능을 조사하였다. 분리 균주 세포외 효소를 분비하는 것으로 확인하였다 (Table 5). ANGa5의 경우에는 amylase, cellulase, protease, xylanase 활성이 각 225.58 U/ml, 92.29 U/ml, 34.80 U/ml, 294.05 U/ml로 전반적으로 활성이 높게 나왔다. ANGa25의 경우에는 amylase 활성은 나타내지 않았으며, cellulase, protease, xylanase 활성이 각 14.74 U/ml, 6.22 U/ml, 524.65 U/ml로 xylanase의 활성이 선별한 균주 가운데 가장 높게 나타내었다. ANGa27의 경우에는 amylase, cellulase, protease, xylanase 활성이 각 121.11 U/ml, 66.48 U/ml, 53.53 U/ml, 358.59 U/ml로 나타났으며, 식물 병원성 곰팡이의 세포벽이 주로 cellulose로 구성되어 있어 용균작용이 일어날 것으로 생각된다[33]. 결과적으로 분리 균주가 생성하는 amylase, cellulase, protease, xylanase에 의해서 식물 병원성 곰팡이 세포벽의 용균작용이 일어남에 따라 세포벽을 분해하여 식물 병원성 곰팡이의 생장을 저해할 것으로 보이며, 또한 이용할 수 없는 고분자의 물질을 저분자의 물질로 변화시켜 식물이 이용할 수 있도록 하여 성장하는데 도움을 줄 것으로 생각된다. 이 외에도 균주가 갖는 효소적 특성을 확인하기 위해서 API ZYM kit를 이용하여 측정하였으며, ANGa5, ANGa25, ANGa27의 효소적 특성을 확인한 결과를 Table 5에 나타냈다. 공통적으로 alkaline phosphatase, esterase (C4), esterase lipase (C8), leucine arylamidase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase의 효소반응에 대해서 양성반응을 보였다. 또한 ANGa5의 경우에는 α -galactosidase, β -glucuronidase, α -glucosidase, β -glucosidase에 대해서도 활성을 나타내었다. ANGa25의 경우에는 lipase (C14), acid phosphatase, n-acetyl- β -glucosaminidase에 활성을 나타내었다. 마지막으로 ANGa27의 경우에는 trypsin, acid phosphatase와 약하게 α -glucosidase, β -glucosidase의 활성도 나타내었다. Yang 등[34]과 Choi 등[35]의 연구와 비교해보면, *Bacillus* sp. 균주들이 공통적으로 alkaline phosphatase, esterase (C14), esterase lipase (C8), leucine arylamidase,

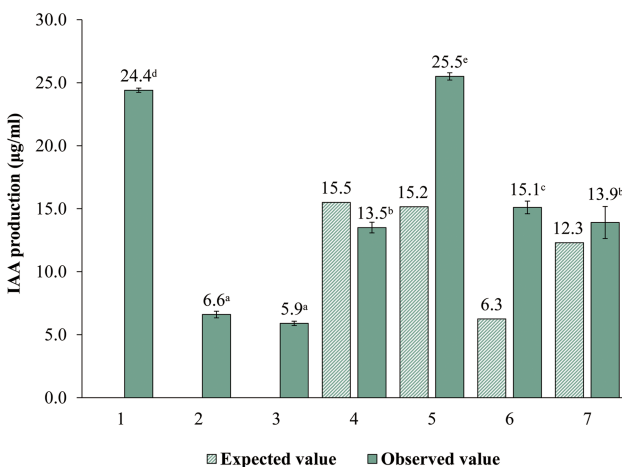


Fig. 2. Comparison of IAA production through co-culture of isolated strains. (1) ANGa5, (2) ANGa25, (3) ANGa27, (4) ANGa5 + ANGa25, (5) ANGa5 + ANGa27, (6) ANGa25 + ANGa27, (7) ANGa5 + ANGa25 + ANGa27. Absorbance was measured with a spectrophotometer at 530 nm. Data are mean \pm SD of at least three replicates. Significantly different at $p < 0.05$; different letters indicate significant differences among samples.

Table 5. Confirmation of extracellular enzyme activity and biochemical characterization of strains *Bacillus* sp. by API ZYM kit.

	Characteristics	Strains		
		ANGa5	ANGa25	ANGa27
Extracellular enzyme ¹⁾	Amylase	225.58 ± 14.30 ^b	ND ²⁾	121.11 ± 11.13 ^a
	Cellulase	92.29 ± 7.41 ^c	14.74 ± 0.38 ^a	66.48 ± 3.48 ^b
	Protease	34.80 ± 2.36 ^b	6.22 ± 2.62 ^a	53.53 ± 2.95 ^c
	Xylanase	294.05 ± 16.78 ^a	524.65 ± 17.19 ^c	358.59 ± 16.90 ^b
API ZYM ³⁾	Alkaline phosphatase	+	++	+
	Esterase(C4)	++	+	+
	Esterase lipase(C8)	++	++	++
	Lipase(C14)	-	+++	-
	Leucine arylamidase	+++	+++	W
	Trypsin	-	-	+
	Acid phosphatase	-	+++	+
	Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	+	+++	+
	α-galactosidase	+	-	-
	β-glucuronidase	W	-	-
	α-glucosidase	+++	-	W
	β-glucosidase	+++	-	W
N-acetyl-β-glucosaminidase	-	++	-	

¹⁾ Data are mean ± SD of at least three replicates. Significantly different at $p < 0.05$; different letters indicate significant differences among samples.

²⁾ ND : Not detected.

³⁾ - : negative, W: weakly positive, +: positive, ++: moderate positive, +++: strong positive.

acid phosphatase, α-glucosidase 및 β-glucosidase 활성을 가지는 것을 확인하였다. Phosphatases의 효소적 특성을 갖는 경우 그람 양성균의 세포벽의 일부 구성 성분인 teichoic acid의 형성을 저해한다. 또한 esterase와 lipase 효소의 경우에는 그람 양성, 음성균의 중요 성분인 지질과 관련이 있으며, leucine arylamidase은 단백질 합성과 관련하여 부정적인 영향을 미친다. 그 외 효소인 galactosidase, glucosidase, glucuronidase 등은 carbohydrate의 형성을 저해시키며, 또한 에너지 섭취에 부정적인 영향을 준다[36]. 따라서, 3가지 균주 모두 식물 병원성 곰팡이에 대한 진균 외벽 가수분해 효소를 지닌 균주로 식물 병원성 곰팡이의 성장을 저해하여 방제 효과를 나타낼 것으로 기대된다.

요약

본 연구에서 부산, 창원, 제주도 일대에서 채취한 토양으로부터 분리한 균주를 이용하여 식물 병원성 곰팡이에 대해서 길항작용을 나타내는 것을 확인하였으며, 또한 분리 균주의 경우 세균성 균주에 대해서도 길항작용을 나타내는 것을 확인하였다. 이러한 길항작용은 *Bacillus* 속이 생산하는 2차 대사산물인 siderophore, 항생물질, 세포 외 효소 활성 등에

의해서 식물 병원성 곰팡이에 대한 길항작용을 나타내는 것으로 보이며, 특히 분리 균주로부터 생산되는 세포 외 효소는 식물 병원성 곰팡이의 세포벽에 용균작용 일으킴에 따라 세포벽을 분해하여 식물 병원성 곰팡이의 성장을 저해할 것으로 생각된다. 또한 질소 고정능 및 IAA 생성능을 통해 식물 성장 촉진 및 식물 병원성 곰팡이 성장을 억제시킬 수 있는 생물학적 제제로서 식물재배에 도움을 줄 것으로 기대된다. 최종 선별된 *Bacillus subtilis* ANGa5, *Bacillus aerius* ANGa25, *Bacillus methylotrophicus* ANGa27를 이용하여 식물 병원성 곰팡이 방제 및 식물 성장촉진활성을 가지는 새로운 생물학적 제제로서 이용 가능성을 제시한다.

Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

References

1. Yoo SJ, Sang MK. 2017. Induced systemic tolerance to multiple stresses including biotic and abiotic factors by rhizobacteria. *Res. Plant Dis.* **23**: 99-113.
2. Strange RN, Scott PR. 2005. Plant disease: a threat to global food

- security. *Annu. Rec. Phytopathol.* **43**: 83-116.
3. Lu X, Zhou D, Chen X, Zhang J, Huang H, Wei L. 2017. Isolation and characterization of *Bacillus altitudinis* JSCX-1 as a new potential biocontrol agent against *Phytophthora sojae* in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Plant Soil* **416**: 53-66.
 4. Conrath U, Beckers GMJ, Flors V, Garcia-Agustin P, Jakab G, Mauch F, et al. 2006. Priming: getting ready for battle. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **19**: 1062-1071.
 5. Yeo SH, Yook YM, Kim HS. 2009. Isolation and characterization of plant growth promoting rhizobacterium *Bacillus subtilis* YK-5 from soil. *KSBB J.* **24**: 334-340.
 6. Bais HP, Fall R, Vivanco JM. 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of arabidopsis roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiol.* **134**: 307-319.
 7. Kang BR, Kim YH, Nam HS, Kim YC. 2017. Correlation between biosurfactants and antifungal activity of a biocontrol bacterium, *Bacillus amyloliquefaciens* LM11. *Res. Plant Dis.* **23**: 177-185.
 8. Montesinos E. 2007. Antimicrobial peptides and plant disease control. *FEMS Microbiol. Lett.* **270**: 1-11.
 9. Li XY, Mao ZC, Wu YX, Ho HH, He YQ. 2014. Comprehensive volatile organic compounds profiling of *Bacillus* species with biocontrol properties by head space solid phase microextraction with gas chromatography-mass spectrometry. *Biocontrol Sci. Technol.* **25**: 132-143.
 10. Jung BK, Lim JH, An CH, Kim YH, Kim SD. 2012. Selection and identification of phytohormones and antifungal substances simultaneously producing plant growth promotion rhizobacteria from microbial agent treated red-pepper field. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **40**: 190-196.
 11. Ali SS, Vidhale NN. 2013. Bacterial siderophore and their application : A review. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* **2**: 303-312.
 12. Um YR, Kim BR, Jeong JJ, Chung CM, Lee Y. 2014. Identification of endophytic bacteria in *Panax ginseng* seeds and their potential for plant growth promotion. *Korean J. Med. Crop Sci.* **22**: 306-312.
 13. Leveau JHJ, Lindow SE. 2005. Utilization of the plant hormone indole-3-acetic acid for growth by *Pseudomonas putida* strain 1290. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 2365-2371.
 14. Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
 15. Shin PY, Cho SJ. 2011. Cellulase and xylanase activity of compost-promoting bacteria *Bacillus* sp. SJ21. *Korean J. Soil Sci. Fert.* **44**: 836-840.
 16. Oh DG, Jang YK, Woo JE, Kim JS, Lee CH. 2016. Metabolomics reveals the effect of garlic on antioxidant- and protease-activities during Cheonggukjang (fermented soybean paste) fermentation. *Food Res. Int.* **82**: 86-94.
 17. Cao P, Shen SS, Wen CY, Song S, Park CS. 2009. The effect of the colonization of *Serratia plymuthica* A21-3 in rhizosphere soil and root of pepper in different soil environment. *Res. Plant Dis.* **15**: 101-105.
 18. Beneduzi A, Ambrosini A, Passaglia LMP. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genet. Mol. Biol.* **35**: 1044-1051.
 19. Hansen J, Sato M, Ruedy R. 2012. Perception of climate change. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**: 2415-2423.
 20. Mahajan S, Tuteja N. 2005. Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Arch. Biochem. Biophys.* **444**: 139-158.
 21. Satake T, Koike S. 1983. Sterility caused by cooling treatment at the flowering stage in rice plants : I. The stage and organ susceptible to cool temperature. *Jpn. J. Crop Sci.* **52**: 207-213.
 22. Forni C, Duca D, Glick BR. 2017. Mechanisms of plant response to salt and drought stress and their alteration by rhizobacteria. *Plant Soil* **410**: 335-356.
 23. Maksimov IV, Abizgil'dina RP, Pusenkova LI. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria as alternative to chemical crop protectors from pathogens (review). *Appl. Biochem. Microbiol.* **47**: 333-345.
 24. Kindoli S, Lee HA, Kim JH. 2012. Properties of Bac W42, a bacteriocin produced by *Bacillus subtilis* W42 isolated from Choeng-gukjang. *J. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 1092-1100.
 25. Ahemad M, Kibret M. 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *J. King Saud Univ. Sci.* **26**: 1-20.
 26. Han JH, Shim HS, Shin JH, Kim KS. 2015. Antagonistic activities of *Bacillus* spp. strains isolated from tidal flat sediment towards anthracnose pathogens *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* in South Korea. *Plant Pathol. J.* **31**: 165-175.
 27. Mori K, Lee HT, Rapoport D, Drexler IR, Foster K, Yang J, et al. 2005. Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. *J. Clin. Invest.* **115**: 610-621.
 28. Neilands JB. 1981. Iron absorption and transport in microorganisms. *Annu. Rev. Nutr.* **1**: 27-46.
 29. Whang KS. 2001. Taxonomic characteristics of nitrogen-fixing oligotrophic bacteria from forest soil. *Korean J. Microbiol.* **2**: 114-119.
 30. Jung HK, Kim JR, Woo SM, Kim SD. 2007. Selection of the auxin, siderophore, and cellulase-producing PGPR, *Bacillus licheniformis* K11 and its plant growth promoting mechanisms. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **50**: 23-28.
 31. Yun CY, Cheng YH. 2016. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria *Pantoea* species as a plant growth promoting rhizobacteria. *J. Life Sci.* **26**: 1163-1168.
 32. Kim YS, Kim SW, Kabir L, Lee YS. 2016. Evaluation of rhizobacterial isolates for their antagonistic effects against various phytopathogenic fungi. *Korean J. Mycol.* **44**: 36-47.
 33. Kim YS, Lee MS, Song JG, Lee IK, Yun BS. 2011. Screening of multifunctional bacteria with biocontrol and biofertilizing effects. *Korean J. Mycol.* **39**: 126-130.
 34. Yang H-J, Jeong S-J, Jeong S-Y, Jeong DY. 2014. Screening of antagonistic bacteria having antifungal activity against various phytopathogens. *Korean J. Mycol.* **42**: 333-340.
 35. Choi SM, Park MH, Jung TS, Moon KH, Kim KM, Kang JS. 2011. Characterization of *Bacillus mojavensis* KJS-3 for industrial applications. *Arch. Pharm. Res.* **34**: 289-298.
 36. Adelantado C, Shiva C, Arosemena L, Costa-Batlloiri L, Calvo MA. 2007. Enzymatic mechanisms related to antimicrobial activity of *Rutaceae* extracts. *J. Biol. Sci.* **7**: 71-73.