Korean Journal of Environmental Agriculture

Korean J Environ Agric. 2021;40(1):20-32. Korean
Published online 2021 March 19. https://doi.org/10.5338/KJEA.2021.40.1.3

Online ISSN: 2233-4173
Print ISSN: 1225-3537

Research Article

Open Access

Streptomyces sp. J46의 세균성구멍병원균 *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*에 대한 항균 활성

이정은, 임다정, 김인선*

전남대학교 농화학과

Antibacterial Activity of *Streptomyces* sp. J46 against Bacterial Shot Hole Disease Pathogen *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*

Jeong Eun Lee, Da Jung Lim and In Seon Kim* (Department of Agricultural Chemistry, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea)

Received: 2 March 2021/ Revised: 8 March 2021/ Accepted: 12 March 2021

Copyright ⓒ 2021 The Korean Society of Environmental Agriculture
This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ORCID
In Seon Kim
https://orcid.org/0000-0003-1061-6848

Abstract

BACKGROUND: Bacterial shot hole of stone fruits is a seriuos plant disease caused by *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (Xap). Techniques to control the disease are required. In this study, microorganisms with antibacterial activity were isolated to develop as a microbial agent against the bacterial shot hole.

METHODS AND RESULTS: An isolate with the strongest activity among the isolates was identified as *Streptomyces avidinii* based on 16S rRNA gene sequence analysis and designated *Streptomyces* sp. J46. J46 showed suppression of bacterial leaf spot with a control value of 90% at 10 times-diluted cell free supernatant. To investigate antibacterial metabolites produced by J46, the supernatant of J46 was extracted with organic solvents, and the extracts were subjected to chromatography works. Antibacterial metabolites were not extractable with organic solvents. Both reverse and normal phase techniques were not successful because the metabolites were extremely water soluble. The antibacterial metabolites were not volatiles but protein compounds based on hydrolysis enzyme treatment.

CONCLUSION: Our study suggests that *Streptomyces* sp. J46 may be a potential as an microbial agent against bacterial shot hole. Further study to identify the metabolites is required in more detail.

Key words: Bacterial Shot Hole, Biocontrol, *Streptomyces*, *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, Plant Pathogen

*Corresponding author: In Seon Kim
Phone: +82-62-530-2131; Fax: +82-62-530-2139;
E-mail: mindzero@jnu.ac.kr

서 론

세균성구멍병은 복숭아, 자두 등의 핵과류를 대상으로 고온 다습한 지역에서 발생하는 식물병으로서 4월부터 발생하여 장마기인 7월에 발병의 최성기에 이른다. 세균성구멍병은 병든 식물조직에서 겨울을 지난 병원균이 봄에 적절한 온도와 습도 조건에서 분출되어 바람이나 빗물에 의해 전염된다. 이는 잎, 과실, 가지에 발생하는 병으로 특히 과실에 발병하면 작은 반점으로 시작하여 갈색으로 변하고 불규칙한 모양으로 갈라지게 되어 상품가치가 저하되고 경제적 피해가 크다[1].

세균성구멍병을 일으키는 병원균으로는 *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni, Pseudomonas syringae, Erwinia nigrifluens* 등이 있다. 특히 *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (이하 'Xap')는 잎의 기공을 통해 들어가 높은 습도가 24-48시간 동안 유지되면 잎의 감염이 10-14일 이내에 유도된다[2, 3]. Xap은 1903년에 미국에서 최초로 보고되었으며

최근에는 아시아, 아프리카, 유럽 등 전역에 퍼져있다[4]. 우리나라에서 세균성구멍병에 대한 발병기록은 1928년에 처음 보고되었으며 2000년도에 Xap와 함께 *Erwinia nigrifluens*가 원인 세균이라고 구명되었다[5]. 최근 들어 우리나라에서 Xap에 의한 복숭아 세균성구멍병으로 인한 작물의 피해 보고되고 있으나 이를 제어하기 위한 Xap에 대한 연구가 미비하다.

세균성구멍병의 방제를 위한 방법으로는 감염된 가지를 제거하여 불로 태우거나 비와 바람에 전염이 일어날 수 있으므로 방풍구를 설치하는 등이 있다[6]. 화학적 방제법은 dithianon, oxytetracycline, validamycin, streptomycin, oxolinic acid 등의 살균제를 사용하거나 6-6식 보르도액과 4-8식 혹은 4-12식의 보르도액을 살포한다. 하지만, 살균제의 사용량이 증가함에 따라 몇몇 작용점 특이적 침투이행성 살균제에 대한 저항성이 발생하고 이로 인한 약효의 감소가 보고되고 있다[7]. 살균제 중 보르도액은 복숭아 재배지역에 광범위하게 사용되고 있으나 시기별로 사용농도 등이 달라 약해를 입는 사례가 발생하고 있다[8]. 또한, 최근 기후변화로 인한 환경적 요인으로 세균성구멍병원균의 피해가 지속적으로 증가할 것으로 예측되고 있다[9]. 따라서 세균성구멍병을 효율적으로 방제하기 위한 다양한 제제 개발이 필요하다.

방선균은 2차 대사산물의 다양한 기능으로 인하여 산업적으로 가치 있는 미생물로 인식되고 있다. 의약분야에서 상업적으로 사용되고 있는 항생물질의 75%와 농업분야에서 이용되고 있는 항생물질의 60%가 방선균에서 유래한 물질로 생산되고 있다[10]. 대표적인 예로서 *Streptomyces kasugaensis*로부터 분리된 항생제 kasugamycin은 벼 도열병 방제제로 개발되었으며 인축 및 어독성이 낮아 다양한 제품으로 개발되어 사용되고 있다[11]. 또한, *Streptomyces griseochromogenes*에서 분리된 blasticidin-S는 벼 도열병 약제로 현재까지 사용되고 있으며 항암 및 항바이러스 효과도 보고되었다[12, 13]. Polyoxin은 *Streptomyces cacaoi* var. *asoensis*에서 분리된 물질로 병원균의 세포벽 키틴질의 합성을 저해한다고 알려져 있으며 식물병원균에 억제효과를 나타낸 것으로 보고되고 있다[14, 15]. 이러한 연구는 방선균에서 유래한 대사산물의 탐색에 관한 연구는 잠재적 가치가 매우 높다는 것을 의미한다.

이에 본 연구에서는 세균성구멍병을 방제하는 미생물제제를 개발하기 위해 항세균 활성을 지닌 방선균을 분리하고, 분리된 균주가 보유한 항세균 활성의 특성을 시험하였다. 또한, 분리된 미생물의 배양액을 이용하여 세균성구멍병에 대한 방제제로서 가능성을 시험하였다.

재료 및 방법

방선균의 분리 및 동정

방선균을 분리하기 위해 전남대학교 수목원에서 깊이 30 cm 이내의 토양을 채취하여 음건하였다. 음건 후 토양 시료 1.0 g을 멸균된 증류수 50 mL에 첨가하여 현탁시킨 후 현탁액 100 μL를 cycloheximide (50 mg/L)와 nalinixic (10 mg/L)가 포함된 humic acid vitamin (HV) agar 배지에 평판도말한 다음 30℃에서 48시간 동안 배양하였다. 방선균의 분리에 사용된 HV agar는 humic acid 1 g/L, KCl 1.7 g/L, Na_2HPO_4 0.5 g/L, $MgSO_4$ 0.5 g/L, $CaCO_3$ 0.02 g/L, $FeSO_4$ 0.01 g/L, VB stock solution 1 mL/L (V_{B1}, V_{B2}, V_{B6}, niacin, D-calcium pantothenate, inositol, 4-aminobenzoic acid 50 mg, biotin 25 mg, 100 mL distilled water)와 agar 15 g/L로 구성하였다. 배양 후 육안상 형태적으로 다른 균을 선발한 다음 각각의 분리균을 Bennett 배지(D-glucose 10 g/L, yeast extract 2 g/L, peptone 2 g/L, beef extract 1 g/L)에서 28℃와 200 rpm 조건에서 96시간 동안 진탕배양하였다. 항세균 활성은 배양액을 이용하여 *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (이하 'Xap')에 대해 조사하였다. 항세균 활성시험에서 우수한 활성을 보인 균주를 선발한 다음 16S-rRNA 염기서열 분석을 통하여 동정하였다[16].

항세균 활성 시험

항세균 활성 시험은 paper disc 확산법으로 수행하였다[17]. Xap을 tryptic soy broth (TSB)에서 30℃와 150 rpm 조건으로 24시간 동안 진탕배양한 다음 배양액의 일부를 멸균수로 희석하여 OD_{600}값 0.1이 되게 맞춘 후 TSA 에 1.0%(v/v) 수준이 되게 접종하였다. 상기에서 분리한 균주의 배양액을 멸균된 paper disc (Advantec, Japan)에 30 μL씩 분주한 후 TSA에 배치하였다. 배치 후 30℃에서 48시간 동안 배양시킨 다음 paper disc를 중심으로 형성된 Xap의 생장억제환의 반경을 측정하였다.

항세균 물질의 물리화학적 안정성 시험

분리된 균주가 생산하는 항세균 물질의 pH에 대한 영향을 알아보기 위하여 배양액의 상징액을 6N HCl과 6N NaOH를 사용하여 pH를 2.0, 4.0, 6.0, 9.0, 11.0으로 조정한 후 24시간 동안 실온에서 방치하였다. 방치 후 배양액의 pH를 7.0으로 중화시킨 후 항세균 활성을 조사하였다. 이때 대조구는 배양 후 pH를 조정하지 않은 배양액의 상징액이었다. 균주가 생산하는 항세균 물질의 온도변화에 대한 영향을 조사하기 위해 배양액의 상징액을 0, 20, 40, 60, 80℃에서 24시간 동안, 100℃에서 2시간 동안, 그리고 120℃에서 15분 동안 방치 후 실온으로 식힌 다음 상징액의 항세균 활성을 조사하였다. 이때 대조구는 상기와 같이 얻은 배양액의 상징액이었다.

배양배지에 따른 항세균 활성 시험

균주의 배양배지에 따른 항세균 활성을 조사하기 위해 Table 1에서 보여준 바와 같이 기존에 알려진 방선균 배지의 조성을 변경하여 배양하였다. 배양 후 균의 상징액을 이용하여 상기와 같이 항세균 활성을 조사하였다. 대조구는 Bennett 배지에서 배양한 균주의 상징액이었다.

Table 1. Growth medium composition of the isolate J46

Medium	Composition (g/L)
M1	Beef extract 10, Polypeptone 10, Glucose 15, Glycerol 10, $CaCO_3$ 4.0
M2	Soluble starch 10, Glucose 20, Soybean meal 25, Beef extract 1, Yeast extract 4.0, NaCl 2.0, K_2HPO_4 0.25, $CaCO_3$ 2.0
M3	Soluble starch 10, Glucose 20, Molasses 5.0, Yeast extract 5.0, Peptone 5.0, $CaCO_3$ 2.0
M4	Soluble starch 10, Soybean meal 15, Yeast extract 2.0, $CaCO_3$ 4.0

세균성구멍병에 대한 방제효능 시험

Xap이 일으키는 세균성구멍병에 대한 균주의 방제효능시험은 detached leaf assay 방법으로 수행하였다[18]. 복숭아나무의 신초(6-9 cm)를 채취하여 습도가 유지되는 플라스틱 상자에 넣고 신초를 멸균수로 3회 표면 세척하였다. 세척 후 잎을 실온에서 건조시킨 다음 상기에서 얻은 균주의 상징액에 5초 동안 침지하였다. 침지 후 한천배지에 1시간 동안 방치한 다음 멸균된 핀셋을 이용해 잎의 표면에 상처를 만들었다. 상기에서 얻은 병원균 Xap의 희석액을 상처부위에 처리한 후 온도 28℃와 광주기 16L:8D에서 5일 동안 배양하였다. 대조구는 유효성분이 oxytetracycline과 streptomycin인 살균제 아그리마이신(성보화학)을 사용하였다. 발병률과 방제효능은 다음과 같은 (식1)과 (식2)로 산출하였다.

$$\text{발병률}(\%) = 100 \times (\text{발병 수}/\text{상처를 입은 수}) \quad \text{(식1)}$$

$$\text{방제가}(\%) = 100 - (100 \times \text{처리구의 발병률}/\text{무처리구의 발병률}) \quad \text{(식2)}$$

식물병원균에 대한 스펙트럼 활성 조사

식물병원균인 세균 13종과 진균 6종을 대상으로 균주의 스펙트럼 활성을 시험하였다. 식물병원성 세균은 *Acidovorax avenae* subsp. *cattlyae* (갈반병), *Acidovorax konjaci* (잎마름병), *Agrobacterium tumefaciens* (근두암종병), *Burkholderia glumae* (이삭마름병), *Clavibacter michiganensis* supsp. *michiganensi* (시들음병, 궤양병), *Pectobacterium carotovara* supsp. *carotorova* (무름병), *Pectobacterium chrysanthemi* (무름병), *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (궤양병), *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* (각반병), *Xanthomonas euvesicatoria* (점무늬병), *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri 24-20* (감귤궤양병), *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (잎마름병), *Ralstonia solanacerum* (시들음병)이었으며 균에 따라 TSA와 TSB에서 배양하였다. *P. syringae* pv. *actinidiae*와 *Xanthomonas*속은 28℃에 배양하였으며 나머지 세균은 30℃에서 배양하였다. 항세균 활성은 상기와 같은 방법으로 수행하였다. 식물병원성 곰팡이는 *Rhizoctonia solani* (잎집무늬마름병), *Phytophthora capsici* (고추역병), *Fusarium oxysporum* (시들음병), *Glomerella cingulata* (탄저병), *Alternaria brassicola* (검은무늬병), *Botrytis cinerea* (잿빛곰팡이병)이었으며 potato dextrose agar (PDA)에서 배양하였다. 항진균 활성 조사는 균주의 처리에 따른 균사의 생장억제를 관찰하여 수행하였다. 곰팡이 균사체로부터 2 cm 떨어진 PDA위에 방선균의 상징액 30 μL를 포함한 paper disc을 올려 놓은 후 배양한 다음 균사의 생장저해를 관찰하여 수행하였다.

항세균 물질의 추출 및 정제

상기에서 분리한 균주가 생산하는 항세균 물질의 유기용매 추출성을 시험하기 위해 배양액을 8000 rpm에서 15분 동안 원심분리하여 균체를 제거하였다. 원심분리 후 얻어진 상징액은 동일한 부피의 ethyl acetate (EtOAc)로 2회 분배추출하였다. 추출 후 얻어진 수용액층을 pH 2.0 조건에서 EtOAc로 추출하였으며 얻어진 수용액층을 다시 *n*-butanol로 추출하였다. 각각 얻어진 유기용매층과 수용액층을 이용하여 항세균 활성 조사하였다.

균주가 생산하는 항세균 물질을 구명하기 위해 배양액을 칼럼 크로마토그래피법으로 정제하였다. 정제 전에 배양액의 색소를 제거하기 위해 활성탄 교반을 수행하였다. 이를 위해 균주의 배양액을 원심분리 후 균체를 제거하여 얻은 상징액에 6N HCl을 가하여 pH를 2.0로 조정하였다. 상징액에 활성탄을 10% (w/v) 수준으로 첨가하여 20분 동안 교반한 다음 감압여과를 통해 pH 2.0 조건의 증류수, pH 9.0 조건의 acetone 및 methanol (MeOH) 순으로 용출하였다.

C18 칼럼 정제를 위해 상기와 같이 활성탄 교반으로 얻어진 활성분획을 C18 SPE 카트리지에서 용출시켰다. 용출용매는 H_2O와 MeOH의 혼합용매로서 10:0 → 8:2 → 6:4 → 4:6 → 2:8 → 0:10 (v/v, H_2O:MeOH) 순으로 용출하였다. 각각의 용출액들은 항세균 활성의 시험에 이용하였다. 또한, 상기와 같이 활성탄 교반으로 얻어진 활성분획을 coconut charcoal SPE을 이용하여 용출시킨 다음 pH 2.0 조건의 물, pH 9.0 조건의 acetone 및 MeOH 순으로 용출시켜 항세균 활성을 조사하였다.

ODS 칼럼 정제를 위해 상기와 같이 활성탄 교반으로 얻어진 활성분획을 C18 SPE 칼럼에 통과시킨 후 100 g ODS (6nm S-75 μm, YMC GEL, Japan)가 충진된 유리 칼럼에서 정제하였다. 용출용매는 100% (v/v) H_2O이었으며 용출액을 동결건조 후 항세균 활성 조사와 LC/MS (Shimadzu 10AD HPLC/API 2000) 분석을 수행하였다.

Thin layer chromatography (TLC) 분석을 위해 상기에서 얻은 C18 SPE 칼럼의 용출물을 순상 TLC (Silica gel 60 F_{254}, 20 × 20 cm, Merck)로 분석하였다. 전개용매는

$CHCl_3$:MeOH:H_2O (55:36:9, v/v/v)이었으며 0.5% (v/v) 수준의 *p*-anisaldehyde를 분사하여 120℃ 조건의 오븐에서 발색시켰다. 또한 역상 TLC (PLC Silica gel 60 RP-18 F_{254}s, 20 × 20 cm, Merck) 분석에 사용된 전개용매는 MeOH:H_2O (30:70, v/v)이었으며 전개 후 *p*-anisaldehyde를 분사하여 발색시켰다. 발색 후 육안으로 관찰된 spot을 긁어 모은 다음 50%(v/v) MeOH 수용액으로 추출한 후 항세균 활성을 조사하였다. 상기 coconut charcoal SPE 칼럼에서 활성을 보인 용출액은 질소농축 후 TLC 분석을 수행하였다. 이때 전개용매는 MeOH:EtOAc (70:30, v/v)이었다. 전개 후 *p*-anisaldehyde를 분사하여 발색시켰다.

한편, HPLC를 이용한 활세균활성물질의 정제를 위해 상기에서 얻은 C18 SPE 칼럼의 용출물을 HPLC (Dionex P680, Germering, Germany) 분석을 통해 단리하였다. 칼럼은 Kinetex C18 column (100 × 4.6 nm, 2.6 μm, 100Å)와 Asahipak NH2P-50 4E column (250 × 4.6 mm, 5 μm, 100Å)을 사용하였고 이동상은 acetonitrile (ACN)과 증류수로서 ACN의 비율은 50%(v/v)이었으며 유속은 0.2 mL/min이었다. 검출기는 photodiode array (PDA)이었으며 파장은 210, 240, 270, 310 nm이었다. 활성물질의 단리를 위해 시료를 HPLC에 주입 후 매분 단위로 분취한 후 분취액은 상기와 같이 항세균 활성조사에 이용하였다.

휘발성 물질 조사

균주가 생산하는 항세균 물질이 휘발성 물질인지 조사하기 위해 대치배양을 이용한 항세균 활성과 고상미세추출법을 이용한 항세균 활성을 시험하였다. 균주가 생산하는 휘발성 물질이 Xap의 생장에 미치는 영향을 알아보기 위하여 I-plate petri-dish (SPL Life Science, Korea)를 사용하여 Xap의 생장억제를 시험하였다. I-plate petri-dish 한쪽에는 Bennett agar를 첨가하여 균주를 1%(v/v) 수준으로 접종하였다. 다른 한쪽에는 TSA를 첨가한 다음 상기에서 얻은 병원균 Xap를 희석하여 OD_{600} 0.1로 맞춘 후 희석액을 1%(v/v) 수준으로 접종하였다. 접종 후 28℃에서 48시간 동안 배양하였으며 대조구는 배양액을 접종하지 않은 Bennett 배지이었다.

고상미세 추출법(Solid Phase Microextraction, SPME)

Serum 유리병(150 mL)에 상기에서 얻은 균주의 배양액(20 mL)을 넣은 다음 고무마개로 완전하게 밀봉하였다. 밀봉 후 50℃ 조건의 교반기에서 혼합한 다음 PS/DVD fiber (Supelco, USA)가 장착된 미세추출 주사기를 배양액 바로 윗부분에 배치하였다. 미세추출 주사기를 1시간 동안 배치한 후 휘발성 물질을 흡착시킨 다음 흡착된 물질을 MeOH로 추출하여 항세균 활성에 이용하였다.

활성물질의 단백질성 조사

균주가 생산하는 항세균 물질이 단백질성 물질인지 시험하기 위해 상기에서 얻은 추출물을 화학적 방법으로 침전 후 가수분해 하였다. 유기용매를 이용한 단백질의 침전은 -20℃에 보관한 acetone 1.0 mL를 균주의 상징액(200 μL)에 넣고 혼합한 후 -20℃에 10분 동안 방치시킨 다음 8000 rpm과 4℃에서 10분 동안 원심분리하여 수행하였다. 원심분리 후 상징액을 제거한 다음 침전물을 10 mM phosphate buffer에 재용해시킨 후 항세균 활성을 조사하였다. Ammonium sulfate에 의한 단백질의 침전을 얻기 위하여 균체를 제거한 상징액을 4℃에 보관한 후 ammonium sulfate를 조금씩 첨가하며 교반하였다. Ammonium sulfate의 최종 농도가 80% (w/v) 수준이 되도록 첨가한 후 4℃에서 60분 동안 교반한 다음 8000 rpm과 4℃에서 10분 동안 원심분리하여 침전물을 얻었다. 단백질성 물질의 효소적 가수분해를 위해 상기에서 얻은 균주의 상징액에 pepsin, RNase, DNase를 최종농도 1,000 mg/L수준이 되도록 처리하였다. 처리 한 후 실온에서 12시간 동안 가수분해 시킨 다음 반응액을 이용하여 항세균 활성을 조사하였다.

통계처리

병원균 Xap에 대한 항세균 활성은 IBM SPSS 프로그램(version 23.0, USA)의 One-way ANOVA와 Tukey 사후검증방법을 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

방선균의 분리 및 동정

토양시료를 방선균 선택 배지인 humic acid agar에 도말하여 배양한 후 방선균의 특성을 보이는 64개 균을 분리하였다 (Table 2). 분리한 균 중에서 *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (Xap)에 대해 항균활성이 가장 우수한 균주를 선발하여 16S rRNA로 염기서열 분석을 수행한 결과 *Streptomyces avidinii*와 94%수준의 상동성을 보였다(Fig. 1). 이에 선발된 균주를 *Streptomyces* sp. J46 (J46)으로 명명하였다. J46의 탄소원 이용성에 기초한 생화학적 특성을 조사한 결과 L-arginine, L-phenylalanine, Tween 80, 4-hydroxy benzoic acid, L-serine, N-acetyl-D-glucosamine, L-threonine, glycogen, glycyl-L-glutamic acid에 대한 이용성이 높았다(Table 3). 한편, J46은 pyruvic acid methyl ester, L-asparagine, Tween 40, D-cellobiose, α-ketobutyric acid 등을 탄소원으로 이용할 수 있었다. J46과 상동성이 가장 높은 *S. avidinii*은 단백질 streptavidin을 생산한다고 알려져 있으며 streptavidin은 딱정벌레목과 나비목에 대한 살충활성이 보고되었다[19, 20]. 본 연구에서 분리한 J46은 예비실험에서 해충에 대한 살충활성을 보유하고 있지 않았다. 이러한 결과는 J46이 *S. avidinii*와 16S rRNA 유전자 서열상 상동성이 높지만 서로 상이한 균주라는 것을 의미하였다.

J46의 배양시간에 따른 항균활성

배양시간에 따른 J46의 생장과 paper disk 확산법에 기반한 항균활성을 조사한 결과 Fig. 2와 같았다. 배양 후 24시간까지 항균활성이 관찰되지 않았으며 균주가 성장하면서 36

Table 2. Antibacterial activity of the isolates against *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*

Isolate	Activity[1)]	Isolate	Activity
1	·	33	·
2	·	34	·
3	·	35	·
4	+	36	·
5	+	37	·
6	+	38	+
7	·	39	·
8	+	40	++
9	·	41	+
10	·	42	·
11	·	43	++
12	·	44	·
13	+	45	+
14	·	46	++++
15	+	47	·
16	·	48	·
17	·	49	·
18	+	50	·
19	·	51	·
20	·	52	·
21	·	53	·
22	·	54	·
23	·	55	·
24	·	56	·
25	·	57	·
26	·	58	·
27	+	59	·
28	·	60	·
29	·	61	·
30	+	62	·
31	·	63	·
32	+	64	·

[1)] Inhibition zone (mm): +(0.10~0.20), ++(0.21~0.50), +++(0.51~0.80), ++++(>0.81).

Table 3. Biochemical characteristics of the isolate J46 based on carbon utilization

Carbon source	Carbon utilization[1)]
β-Methyl-D-Glucoside	-
D-Galactonic acid	-
L-Arginine	++
Pyruvic acid methyl ester	+
D-Xylose	-
D-Galacturonic acid	-
L-Asparagine	+
Tween 40	+
Erythritol	-
2-Hydroxy benzoic acid	-
L-Phenylalanine	++
Tween 80	++
D-Mannitol	-
4-Hydroxy benzoic acid	++
L-Serine	++
α-Cyclodextrin	-
N-Acetyl-D-glucosamine	++
γ-Hydroxybutyric acid	-
L-Threonine	++
Glycogen	++
D-Gulcosamine acid	-
Itaconic acid	-
Glycyl-L-Glutamic acid	++
D-Cellobiose	+
Glucose-1-Phosphate	-
α-Ketobutyric acid	+
Phenylethyl-amine	-
α-D-Lactose	-
D,L-α-Glycerol phosphate	-
D-Malic acid	-
Putrescine	-

[1)] ++: >OD_{690} 0.7, +: OD_{690} 0.4~0.7, -: <OD_{690} 0.4.

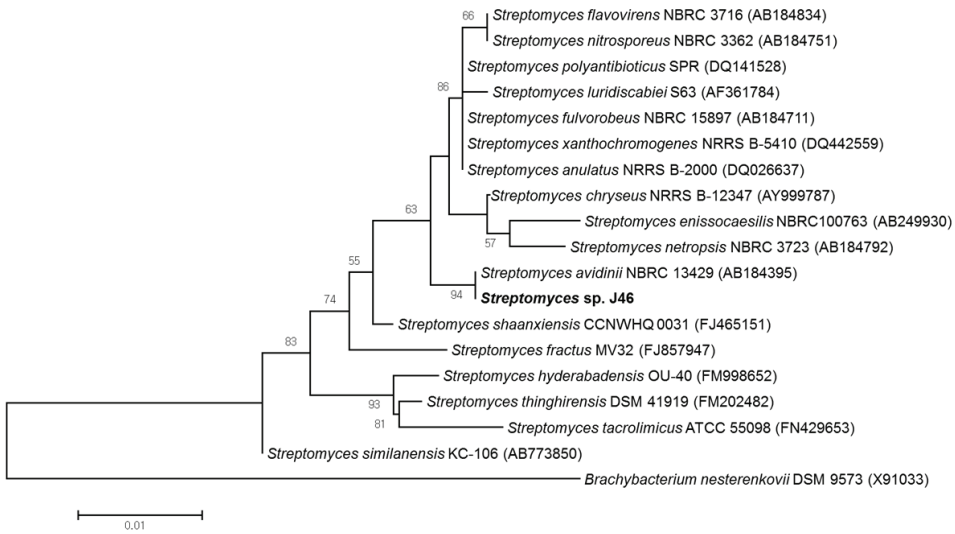

Fig. 1. Phylogenetic tree of the isolate J46 based on 16S rRNA gene sequences analyses. The numbers on the tree represent similarities between the strains.

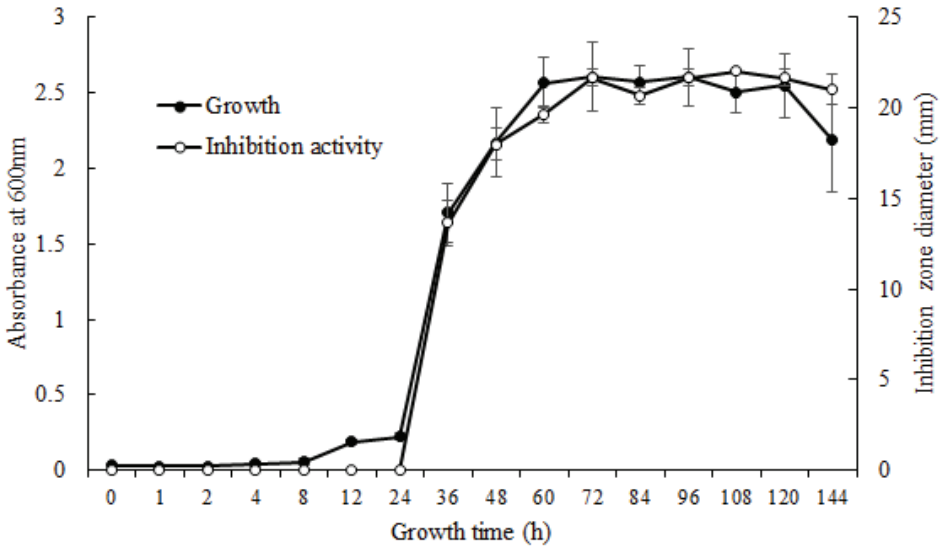

Fig. 2. Growth (●) and inhibition activity (○) of the isolate J46 against *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. The values indicate means ± SD of triplicates.

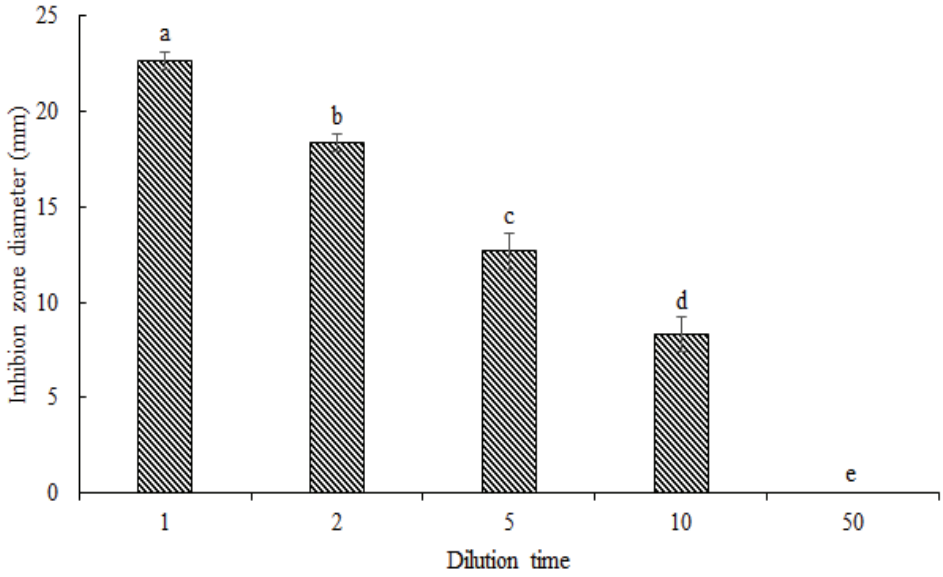

Fig. 3. Antibacterial activity of cell free supernatant of the isolate J46. The data means average values of triplicates. The different letters over the columns are significantly different each other by Duncan's multiple range test ($P < 0.05$).

시간 이후부터 항균활성이 현저하게 증가하였다. 또한, J46 상징액의 희석배수별 항균활성을 조사한 결과 10배 희석하였을 때 inhibition zone이 8.33 mm수준의 활성이 관찰되었다(Fig. 3). 이는 J46이 생장하면서 Xap에 대한 항균물질을 생산함을 의미하였다. 현재까지 Xap의 생장을 억제하며 세균성구멍병을 방제한다고 알려진 미생물은 *Pseudomonas aeruginosa* strain LV와 비병원성 *Xanthomonas campestris* strain AZ98101과 AZ98106이 보고되어 왔으며[21. 22] Xap에 대한 *Streptomyces* 속 방선균의 항균활성은 본 연구에서 최초로 보고한다.

J46이 생산하는 항균물질의 물리화학적 안정성

J46이 생산하는 항균물질의 물리화학적 안정성을 조사하기 위하여 pH와 온도 변화에 따른 항균활성을 조사하였다. J46의 상징액을 pH 2.0에서 11.0까지 조정한 후 항세균 활성을 조사한 결과 모든 pH 조건에서 활성이 유사하였다(Table 4). 이러한 결과는 균주가 생산하는 항세균 활성물질이 pH 변화에도 안정하다는 것을 의미하였다.

J46의 상징액을 서로 다른 온도조건에 방치한 후 항균활성을 조사한 결과 0℃와 40℃에서 활성이 유사하였으며 60℃에서 활성이 감소하였고 80℃이상에서는 활성이 관찰되지

Table 4. Effects of changes in pH on the antibacterial activity of the isolate J46 against *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*

pH	Inhibition zone diameter (mm)[1),2)]
2.0	16.00 ± 0.82a
4.0	14.67 ± 0.47ab
6.0	14.33 ± 1.25ab
9.0	13.00 ± 0.82b
11.0	15.33 ± 0.47ab

1) The values are means ± SD of triplicate.
2) The data with the same letter in are not significantly different (P<0.05).

Table 5. Effects of changes in temperature on the antibacterial activity of the isolate J46 against *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*

Temperature (℃)	Inhibition zone diameter (mm)[1),2)]
0	12.67 ± 0.58a
20	12.33 ± 0.58a
40	12.00 ± 0.00a
60	9.00 ± 0.00b
80	-[3)]
100	-
120	-

1) The values are means ± SD of triplicate.
2) The data with the same letter are not significantly different (P<0.05).
3) Inhibition zone was not observed.

않았다(Table 5). 또한, 상징액을 감압농축 한 다음 항균활성을 조사한 결과 활성이 관찰되지 않았다. 따라서 활성물질을 추출하고자 상징액을 농축할 때는 감압조건이 아닌 장시간 동안 질소가스로 농축을 해야만 하였다. 이러한 결과는 J46이 생산하는 항세균 활성물질이 압력변화와 80℃ 이상의 온도에서 화학적인 안정성이 낮다는 것을 의미하였다. 따라서 J46을 이용한 식물병 방제용 제제를 개발할 때는 온도와 압력 조건에 유의해야 한다는 것을 제안할 수 있었다.

배지조성이 J46의 항균활성에 미치는 영향

J46의 최적배지를 조사하기 위해 배양배지가 Xap에 대한 항균활성에 영향을 미치는지 시험하였다. 방선균용 배양배지로 알려진 M1, M2, M3, M4배지(Table 1)를 이용하여 항균활성을 조사한 결과 M4 배지와 Bennett 배지에서 활성이 관찰되었으며 M1, M2, M3배지에서는 항균활성이 관찰되지 않았다(Fig. 4). 이러한 결과를 통해 균주 J46의 최적 배양배지는 M4 배지와 Bennett 배지임을 확인할 수 있었다. 미생물제제를 개발할 때 활성을 극대화하기 위해 최적 배지조성은 매우 중요하다. 본 연구에서는 J46의 최적 배지로서 가격이 비교적 저렴한 M4를 제안할 수 있었다.

J46의 식물병에 대한 방제효능

J46의 세균성구멍병에 대한 방제효능을 시험하기 위해 복숭아 잎에 처리된 병원균 Xap의 발병에 대한 J46의 억제효과를 조사하였다. J46의 상징액을 병원균이 처리된 복숭아 잎에 10배 희석하여 처리한 결과 약 90% 수준의 발병억제 효과가 관찰되었다(Fig. 5). J46의 병원균에 대한 억제효과는 대조구로 사용된 합성농약 아그리마이신의 권장농도로 처리한 결과와 매우 유사하였다. 이러한 결과는 J46이 Xap에 대한 미생물방제제로 활용될 수 있음을 의미하였다.

또한, J46의 항세균 및 항진균 적용성 범위(spectrum)를 조사하기 위하여 식물병원성 세균 13종 및 곰팡이 6종에 대한 항균활성을 시험하였다. J46은 고추와 토마토에 세균점무늬병을 일으키는 *Xanthomonas euvesicatoria*와 감귤궤양병을 일으키는 *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*에 대하여 강한 항세균 활성을 나타내었다(Table 6). J46의 항세균 활성은 상징액의 희석배수에 비례하여 관찰되었으며, *X. axonopodis* pv. *citri*에 대한 항균활성이 세균성구멍병 Xap에 대한 항균활성보다 높게 관찰되었다(Fig. 6). 이러한 결과를 통해 J46은 세균성구멍병과 감귤궤양병의 방제에 효과적으로 적용될 수 있을 것으로 기대되었다.

J46이 생산하는 활성물질의 추출 및 정제

J46이 생산하는 항균물질을 구명하기 위해 배양액을 원심분리한 후 상쟁액을 유기용매로 추출하였다. 추출 결과 ethyl acetate, pH 2.0 조건에서 ethyl acetate 및 *n*-butanol로 추출하였을 경우 모두 추출물에서 항균 활성이 관찰되지 않았다(Table 7). 이에 반해 유기용매 추출 후 남은 수용액층에서 22.33 mm 수준의 병원균 생장의 억제가 관찰되었다. 이러한 결과는 J46이 생산하는 항균물질은 유기용매 추출성보다 수용성이 매우 강하다는 것을 의미하였다.

J46이 생산하는 항균물질을 정제하기 위해 칼럼 크로마토그래피 과정을 수행하였다. 크로마토그래피를 수행하기 전에 먼저 활성탄을 이용하여 배양액에 함유된 색소를 제거하기 위해 J46의 상징액을 pH 2.0으로 조절한 다음 활성탄을 10% (w/v) 수준으로 첨가한 후 20분 동안 교반하였다. 교반 후 상징액을 pH 2.0 조건의 증류수, pH 9.0 조건의 acetone 및 methanol (MeOH) 순으로 여과한 후 항균활성을 조사하였다. 조사결과 증류수를 이용한 여과액에서 항균활성이 관찰되었으며 acetone과 MeOH을 이용한 여과액에서는 항균활성이 관찰되지 않았다(Table 8). 항균활성을 보인 여과액의 색은 투명하였고 acetone 여과액에서 배지의 색이 관찰되었다. 이러한 결과는 활성탄이 유기물을 흡착하는 특성을 지니고 있어 J46의 배지에서 유래된 색소물질을 제거하였음을 의미하였다. 따라서 배양의 상징액에 활성탄을 첨가하여 교반한 경우 색소성 유기물을 제거하면서 항균물질을 정제할 수 있음을 알 수 있었다. 또한, J46의 상징액을 C18 SPE 칼럼에서 정제한 결과 시료를 칼럼에 넣자마자 용출되었으며 MeOH의 농도를 증가시키는 분획에서는 항균활성이 관찰되지 않았다(Table 9). 이러한 결과는 J46이 생산하는 항균물질은 C18

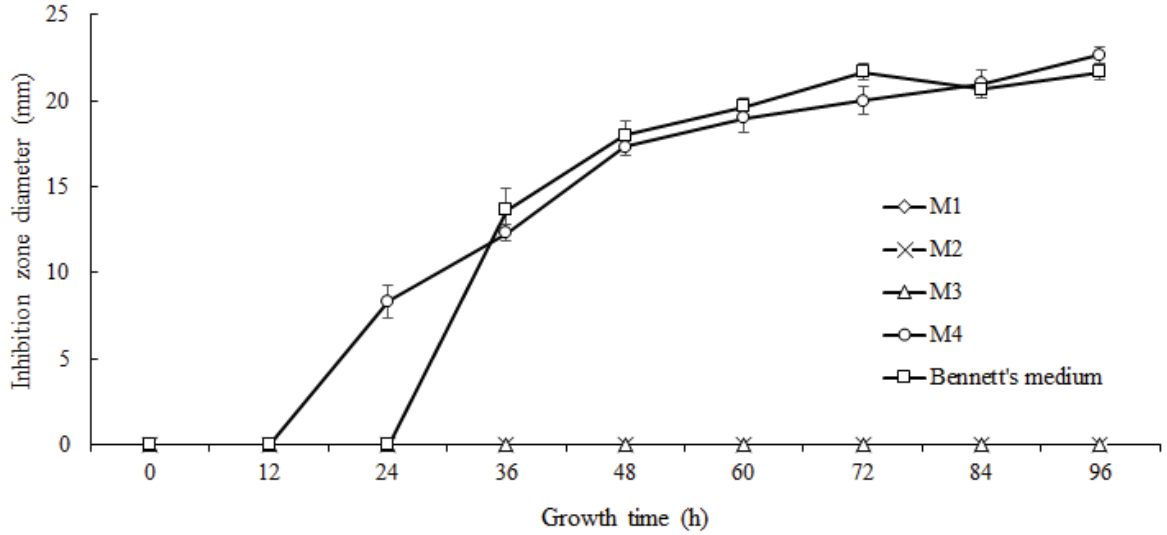

Fig. 4. Antibacterial activity of supernatant of the isolate J46 cultivated on M1 (◇), M2 (×), M3 (△), M4 (○) and Bennett (□) medium. The values indicate means ± SD of triplicate.

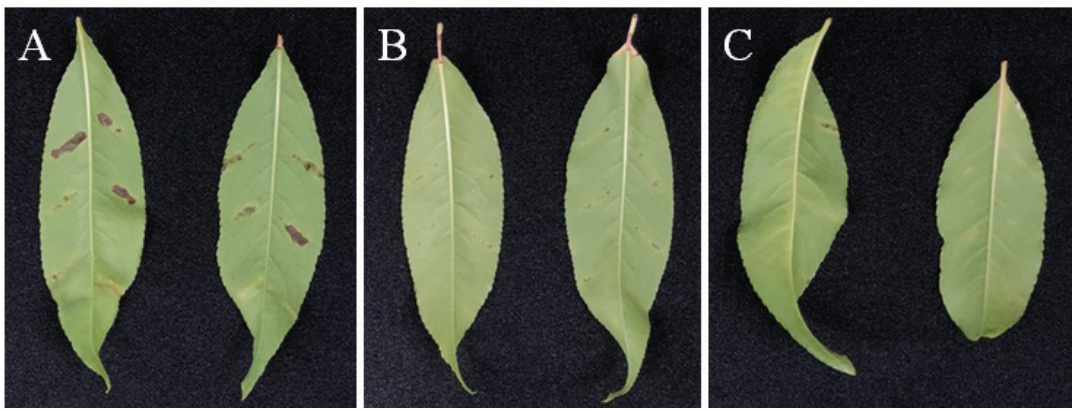

Fig. 5. Symptoms of bacterial leaf spot on detached peach leaves treated with water (A), a commercial fungicide at a recommendation dose (B), and 10 times-diluted J46 supernatant (C) at 5 days after inoculation of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni.*

Table 6. Antibacterial activity of the isolate J46 supernatant against plant pathogens

Plant pathogens	Inhibition activity[1)]
Acidovorax avenae subsp. *cattlyae*	-
Acidovorax konjaci	-
Agrobacterium tumefaciens	-
Burkholderia glumae	-
Clavibacter michiganensis supsp. *michiganensis*	-
Pectobacterium carotovara supsp. *carotorova*	-
Pectobacterium chrysanthemi	-
Pseudomonas syringae pv. *actinidiae*	-
Pseudomonas syringae pv. *lachrymans*	-
Xanthomonas euvesicatoria	+++
Xanthomonas axonopodis pv. *citri*	+++
Xanthomonas oryzae pv. *oryzae*	-
Ralstonia solanacerum	-

[1)] Relative inhibition rates (%): +(31~50), ++(51~70), +++(≧71).

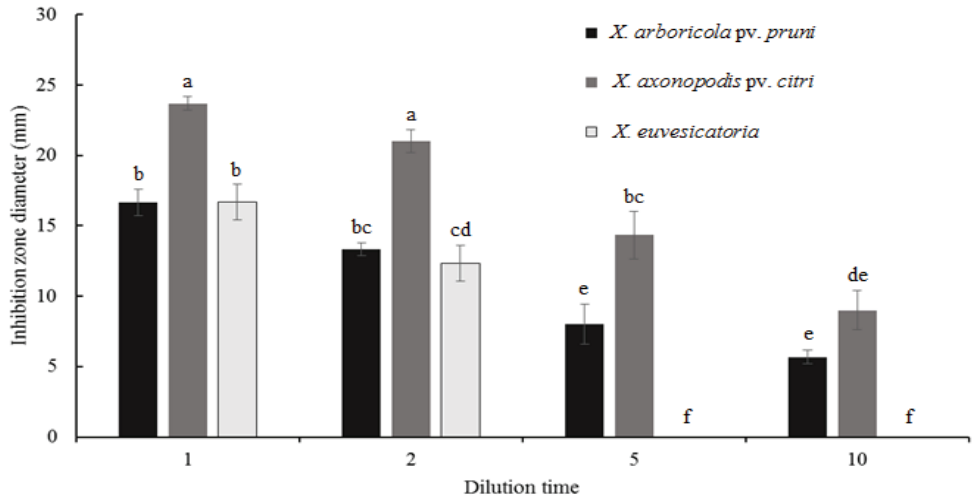

Fig. 6. Antibacterial activity of cell free supernatant of the isolate J46 against plant pathogenic bacteria. The values indicate means ± SD of triplicate. Different letters indicates different mean value significantly by Duncan's multiple range test (P<0.05).

Table 7. Antibacterial activity of the organic extracts of cell free supernatant of the isolate J46 against *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*

Organic extract	Inhibition zone diameter (mm)[1)]
Control	20.00 ± 0.82
Ethyl acetate	-[2)]
Ethyl acetate (pH 2.0)	-
n-Butanol	-
Aqueous	22.33 ± 0.47

[1)] The values are means ± SD of triplicate.
[2)] Inhibition zone was not observed.

Table 8. Antibacterial activity of the fractions of the isolate J46 supernatant filtered though activated charcoal adsorbent

Solvent	Inhibition zone diameter (mm)[1)]
H_2O (pH 2.0)	21.00 ± 0.82
Acetone (pH 9.0)	-[2)]
MeOH	-

[1)] The values are means ± SD of triplicate.
[2)] Inhibition zone was not observed.

Table 9. Antibacterial activity of the fractions of the isolate J46 supernatant eluted from SPE C18 cartridge column

Fraction No.	Elution solvent	Inhibition zone diameter (mm)[1)]
1	H_2O:MeOH (10:0, v/v)	16.00 ± 0.82
2	H_2O:MeOH (8:2, v/v)	-[2)]
3	H_2O:MeOH (6:4, v/v)	-
4	H_2O:MeOH (4:6, v/v)	-
5	H_2O:MeOH (2:8, v/v)	-
6	H_2O:MeOH (0:10, v/v)	-

[1)] The values are means ± SD of triplicate.
[2)] Inhibition zone was not observed.

Table 10. Antibacterial activity of the fractions of the isolate J46 supernatant eluted from SPE coconut charcoal cartridge column

Solvent	Inhibition zone diameter[1),2)]
Supernatants before SPE	19.33 ± 1.25a
H_2O (pH 2.0)	-[3)]
Acetone (pH 9.0)	6.67 ± 1.25b
MeOH	7.00 ± 0.82b

[1)] The values are means ± SD of triplicate.
[2)] The data with the same letter are not significantly different (P<0.05).
[3)] Inhibition zone was not observed.

칼럼에서 분배 및 흡착되지 않고 그대로 용출될 수 있는 수용성 물질이라는 것을 의미하였다.

상기에서처럼 활성탄을 이용하여 얻은 항균물질 시료를 coconut charcoal SPE 카트리지 칼럼에서 다시 정제를 시도하였다. 시료를 칼럼에 넣고 pH 2.0 조건의 물, pH 9.0 조건의 acetone 및 MeOH 순으로 용출시켜 항균활성을 조사한 결과 pH 9.0 조건의 acetone 및 MeOH 분획에서 항균활성이 관찰되었다. 하지만 칼럼에서 용출되는 과정에서 항균활성이 매우 감소하였으며 이는 coconut charcoal SPE 카트리지 칼럼은 적절한 정제방법이 아니다는 것을 알 수 있었다(Table 10). 한편, silica gel 칼럼을 이용한 항균물질의 정제는 항균물질이 유기용매에 전혀 추출되지 않고 물에만 용해되는 수용성이기 때문에 수행이 불가능하였다.

J46의 상징액에 존재하는 항균물질의 추가적인 정제를 C18 SPE 카트리지 칼럼보다 일반적인 유리칼럼을 이용하여 수행하였다. 이를 위해 상기와 같이 활성탄을 이용한 교반과 C18 SPE에서 얻은 활성물질을 ODS 유리칼럼에서 정제한 다음 항균활성이 관찰된 용출액(물)을 동결건조하였다. 동결건조 후 이를 증류수에 재용해하였을 때 항균활성이 관찰되었다. 한편, 항균물질이 함유된 J46의 상징액을 ODS 칼럼에서 정제할 때도 컬럼에 넣자마자 활성분획물이 곧바로 용출되었으며 이는 C18 SPE를 이용한 정제과정에서 보였던 결과와 동일하였다. 이러한 결과는 역상 크로마토그래피를 활용한 정제방법이 효율적이지 않음을 의미하였다.

J46의 상징액을 상기에서와 같이 SPE 칼럼에서 용출시킨 후 수용성 용출액을 실온에서 질소가스로 농축한 다음 TLC 및 HPLC 분석을 통해 항균 물질의 정제를 시도하였다. J46의 용출액을 TLC 분석에서 발색이 확인된 부분과 더불어 TLC plate를 일정한 간격을 두고 긁어 모아 MeOH를 함유한 수용액으로 추출한 후 추출액의 항균활성을 조사한 결과 활성이 관찰되지 않았다(Fig. 7). 또한, HPLC 분석에서 시료 용매가 검출되는 시간대와 유사한 매우 짧은 머무름 시간에 검출되었으며 매 1분마다 용출액을 받아 항균활성을 조사한 결과 활성이 전혀 관찰되지 않았다(Fig. 8). 이러한 결과는 J46의 상징액에 존재하는 항균물질의 정제를 위해 역상 및 순상 크로마토그래피법이 효율적이지 않다는 것을 다시 확인해 주었다.

J46이 생산하는 활성물질의 휘발성

J46의 배양액이 온도변화 조건에서 항균활성이 감소하는 결과(Table 5)를 통해 항균물질이 휘발성일 수 있다고 판단하고 이를 알아보기 위해 J46이 휘발성 항균물질을 생산하는지 조사하였다. 대치배양법을 통해 균주가 생산하는 휘발성 물질의 항세균 활성을 조사한 결과 대조구와 유사하였다(Fig. 9). 또한, J46이 생산하는 휘발성 물질을 고상미세추출법으로 추출한 다음 추출물의 항균활성을 조사한 결과 활성이 관찰되지 않았다(Fig. 10). 이러한 결과를 통해 J46이 생산하는 항균물질은 화학적으로 휘발성과 연관성이 적다는 것을 알 수 있었다.

J46이 생산하는 활성물질의 단백질성

상기에서 서술한 바와 같이 J46이 생산하는 항균물질이 유기용매 추출성이 아님을 알았으며 균주가 생산하는 효소가 병원균의 생장을 저해하였을 것으로 추측되었다. 이에, J46이 생산하는 항균물질이 단백질성인지 조사하기 위해 단백질의 침전과 가수분해 과정을 거친 후 항균활성을 조사하였다. J46의 배양액을 원심분리한 후 상징액에 acetone을 첨가하여 침전물을 얻었다. 침전물을 10 mM phosphate buffer로 재용해한 다음 항균활성을 조사한 결과 Table 11에서 보여준 바와 같이 항균활성이 관찰되지 않았다. 또한, ammonium sulfate를 이용하여 침전시킬 경우 시약의 농도에 상관없이 침전물이 관찰되지 않았다. 이러한 결과를 통해 항균물질이 단백질성이 아닐 것을 간접적으로 알 수 있었으며 추가적으로 단백질 가수분해효소를 상징액에 처리한 다음 상징액의 항균활성을 조사하였다. 단백질 가수분해효소인 pepsin, RNase, DNase를 J46 상징액에 처리한 후 항균활성을 조사한 결과 가수분해효소 처리에 상관없이 항균활성이 유사하였다(Fig. 11). 이와 같이 단백질 침전법에 의한 항균활성과 단백질 가수분해효소 처리에 의한 항균활성 시험의 결과를 통해 J46이 생산하는 항균물질은 단백질성이 아니라는 것을 간접적으로 확인할 수 있었다.

이상의 결과에서 보았듯이 다양한 추출과 정제과정을 통해서도 J46이 생산하는 항균물질이 무엇인지는 구명할 수 없었지만 J46은 세균성구멍병 뿐만 아니라 다른 식물 병원균을 방제할 수 있는 미생물제제로서 활용될 수 있을 것으로 기대되었다. J46이 생산하는 항균물질의 화학적인 구조를 구명하기 위해 향후 추가적인 연구가 필요하다.

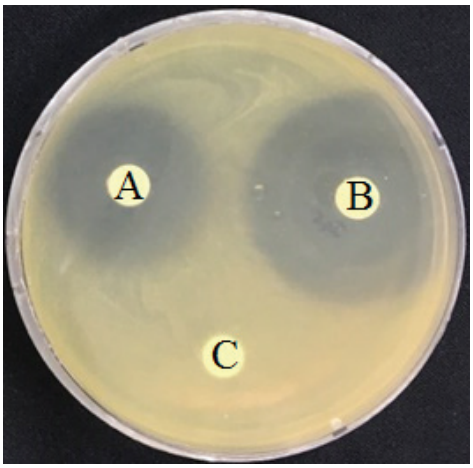

Fig. 7. Antibacterial activity of J46 samples obtained from SPE column (A), cell free supernatant of the isolate J46 (B) and TLC plate (C).

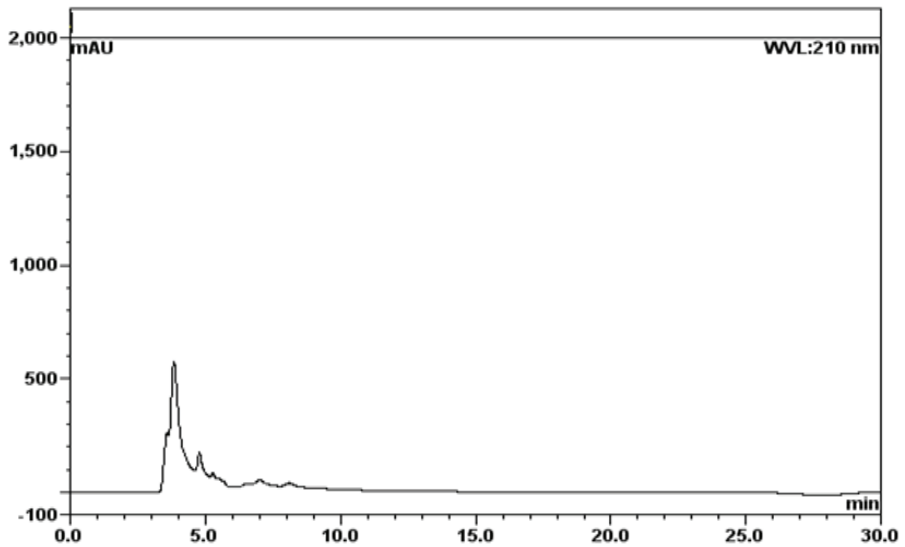

Fig. 8. Typical HPLC chromatogram of J46 supernatant eluted from C18 SPE cartridge column.

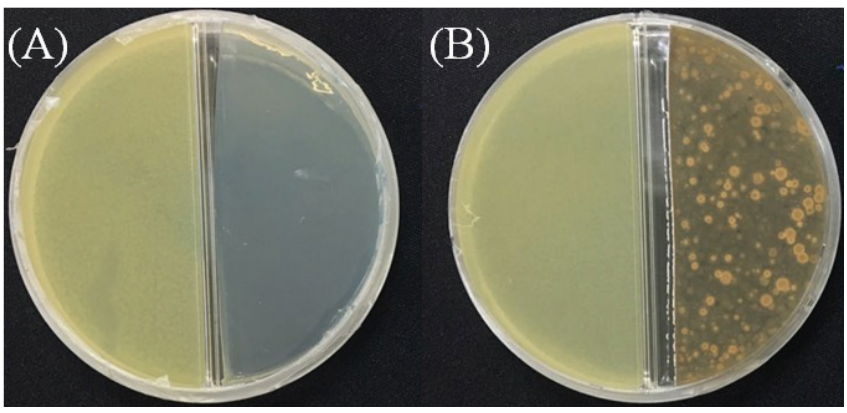

Fig. 9. Effects of volatiles produced by the isolate J46 against Xap. A: Bennett agar, B: J46 (right) and Xap (left).

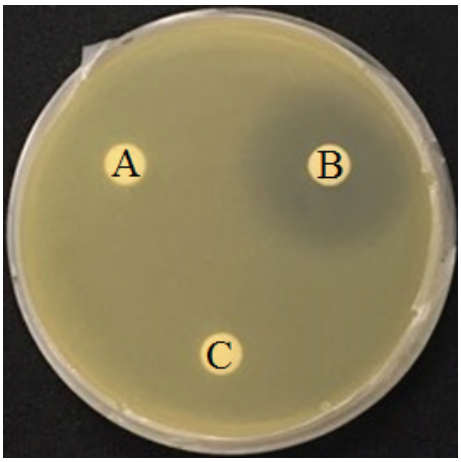

Fig. 10. Antibacterial activity of J46 volatiles adsorbed on PS/DVD fiber. A: solvent, B: cell free supernatant, C: Volatile extracts adsorbed on PS/DVD fiber.

Table 11. Antibacterial activity of acetone precipitates of cell free supernatant of the isolate J46 against *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*

Sample	Inhibition zone diameter (mm)[1)]
Control	14.67 ± 0.47
Acetone precipitation	-[2)]

[1)] The values are means ± SD of triplicate.
[2)] Inhibition zone was not observed.

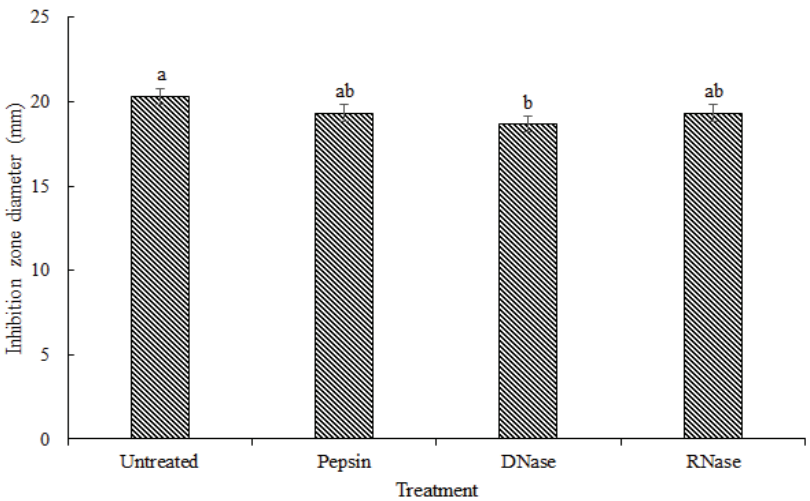

Fig. 11. Effects of protease on the antibacterial activity of cell free supernatant of the isolate J46. The different letters over the columns are significantly different each other by Duncan's multiple range test (P<0.05).

Note

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Zotchev SB (2012) Marine actinomycetes as an emerging resource for the drug development pipelines. Journal of Biotechnology, 158, 168-175. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.06.002.
2. Miles WG, Daines RH and Rue JW (1977) Presymptomatic egress of *Xanthomonas pruni* from infected peach leaves. Phytopathology, 67, 895-897.

3. Rolfs FM (1915) Bacterial disease of stone fruits. Cornell University Agriculture Experimental Station Memoir, 8, 381-436.
4. Kim SY, Kwon TY, Kim IS, Choi SY, Choi CD, Em JY (2001) Protection of peach trees from bacterial shot hole with bordeaux mixture spray during the postharvest season. Research in Plant Disease, 7, 37-41. https://doi.org/10.5423/RPD.2008.14.3.182.
5. Choi J, Lee E and Park Y (2000) Shot hole of peach and Japanese plum caused by *Xanthomonas campestris pv. pruni* and *Erwinia nigrifluens* in Korea. Research in Plant Disease, 6, 10-14.
6. EPPO/OEPP. 2006. Data sheets on quarantine pests. *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni.* http://www.eppo.org/QUARANTINE/listA2.htm.
7. Kim CH (2000) Review of fungicide resistance problems in Korea. Korean Journal of Pesticide Science, 4, 1-10.
8. Ritchie D (2004) Copper-containing fungicides/bactericides and their use in management of bacterial spot on peaches. Southeast Regional Newsletter, 4, 1-3.
9. Atkinson NJ and Urwin PE (2012) The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. Journal of Experimental Botany, 63, 3523-3543. https://doi.org/ 10.1093/jxb/ers100.
10. Miyadoh S (1993) Research on antibiotic screening in Japan over the last decade: a producing microorganism approach. Actinomycetologica, 7, 100-106. https://doi.org/10.3209/saj.7-100.
11. Umezawa H (1965) A new antibiotic, kasugamycin. The Journal of Antibiotics, 18, 101-103.
12. Takeuchi S, Hirayama K, Ueda K, Sakai H and Yonehara H (1958) Blasticidin S, a new antibiotic. The Journal of Antibiotics, 11, 1-5.
13. Timoshchuk VA, Kulinkovich LN, Olimpieva TI, Boreko EI and Vladyko GV (1988) Synthesis of nucleosides of uronic acids V. synthesis and antivirus activity of nucleosides of D-xyluronic acid. Pharmaceutical Chemistry Journal, 22, 41-49.
14. Endo A and Misato T (1969) Polyoxin D, a competitive inhibitor of UDP-N-acetylglucosamine: chitin N-acetylglucosaminyltransferase in *Neurospora crassa.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 37, 718-722. https://doi.org/10.1016/0006-291X(69)90870-5.
15. Isono K, Nagatsu J, Kawashima Y and Suzuki S (1965) Studies on polyoxins, antifungal antibiotics: Part I. Isolation and characterization of Polyoxins A and B. Agricultural and Biological Chemistry, 29, 848-854. https://doi.org/10.1080/00021369.1965.10858475.
16. Kim IS, Ryu JY, Hur HG, Gu MB, Kim SD, Shim JH (2004) Sphingomonas sp. strain SB5 degrades carbofuran to a new metabolite by hydrolysis at the furanyl ring. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 2309-2314. https://doi.org/10.1021/jf035502l.
17. Herrmann Jr EC, Gabliks J, Engle C and Perlman PL (1960) Agar diffusion method for detection and bioassay of antiviral antibiotics. Experimental Biology and Medicine, 103, 625-628. https://doi.org/10.3181/00379727-103-25617.
18. Randhawa PS and Civerolo EL (1985) A detached-leaf bioassay for *Xanthomonas campestris pv. pruni.* Phytopathology, 75, 1060-1063. https://doi.org/10.1094/Phyto-75-1060.
19. Suter M, Cazin Jr J, Butler JE and Mock DM (1988) Isolation and characterization of highly purified streptavidin obtained in a two-step purification procedure from *Streptomyces avidinii* grown in a synthetic medium. Journal of Immunological Methods, 113, 83-91. https://doi.org/10.1016/0022-1759(88)90384-5.
20. Morgan TD, Oppert B, Czapla TH and Kramer KJ (1993) Avidin and streptavidin as insecticidal and growth inhibiting dietary proteins. Entomologia Experimentalis et Applicata, 69, 97-108. https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1993.tb01733.x.
21. Da Silva Vasconcellos FC, De oliveira AG, Lopes-Santos L, Cely MVT, Simionato AS, Pistori JF and Andrade G (2014) Evaluation of antibiotic activity produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain against *Xanthomonas arboricola pv. pruni*. Agricultural Sciences, 5, 71-76. https://doi.org/10.4236/AS.2014.51008.
22. Kawaguchi A, Inoue K and Inoue Y (2014) Biological control of bacterial spot on peach by nonpathogenic *Xanthomonas campestris* strains AZ98101 and AZ98106. Journal of General Plant Pathology, 80, 158-163. https://doi.org/10.1007/s10327-014-0506-6.