

RESEARCH ARTICLE

벼 깨씨무늬병 및 잎집썩음병에 항진균 활성을 갖는 길항 미생물의 탐색

류명선, 양희종, 정수지, 서지원, 정도연*

(재)발효미생물산업진흥원

Screening of Antagonistic Bacteria Having Antifungal Activity against Brown Spot and Sheath Rot of Rice

Myeong Seon Ryu, Hee-Jong Yang, Su-Ji Jeong, Ji-Won Seo, Do-Youn Jeong*

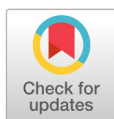
Microbial Institute for Fermentation Industry (MIFI), 61-27, Minsongmaeul-gil, Sunchang-eup, Sunchang-gun, Jeollabuk-do 56048, Korea

*Corresponding author: jdy2534@korea.kr

ABSTRACT

Brown spot and sheath rot of rice are caused by fungal pathogens such as *Curvularia lunata*, *Cochliobolus miyabeanus*, and *Sarocladium oryzae*, and cause losses such as reduced rice yield and quality, which is an enormous problem with serious long-term effects. To search biological control agents of phytopathogenic fungi, five kinds of useful *Bacillus*-like isolates which are excellent in extracellular enzyme activity and produce siderophore were selected from paddy soil of Sunchang in Korea. The selected isolates were tested for excellent antifungal activity against three of the phytopathogenic fungi that frequently occur in rice, and JSRB 177 strain had the most excellent antifungal activity. Based on the experimental results, JSRB 177 is finally selected as a candidate for biological control and identified to *Bacillus subtilis* through 16S rRNA sequence analysis. In addition, physiological characteristics of JSRB 177 confirmed by analysis of carbohydrate fermentation patterns and enzyme production ability. Based on the above results, JSRB 177 is expected to be used as a biological control agent for the rice pathogenic fungi. In the future, further studies related to industrialization such as port test and establishment of mass production process are needed.

Keywords: Antagonistic bacteria, *Bacillus subtilis*, Biological control agents, Brown spot, Sheath rot



OPEN ACCESS

pISSN : 0253-651X
eISSN : 2383-5249

Kor. J. Mycol. 2019 September, 47(3): 259-69
<https://doi.org/10.4489/KJM.20190030>

Received: May 31, 2019

Revised: July 02, 2019

Accepted: July 11, 2019

© 2019 THE KOREAN SOCIETY OF MYCOLOGY.



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서론

쌀은 1일 평균 30억명이 넘는 사람들이 섭취하는 세계에서 가장 중요한 작물 중 하나이며, 특히 한국인에게서는 무엇보다 중요한 주 식재료 중 하나로 국내 쌀의 생산량 및 품질은 벼의 품종, 재배

방법, 병해충 발생 및 기상 환경의 변화 등 여러 요인에 의해 영향을 받는 것으로 알려져 있다[1]. 특히 재배 및 저장 기간 중 발생하는 품질 저하는 바이러스, 세균, 곰팡이 및 해충 등과 같은 외부 유해 인자에 의한 영향이 매우 크며, 병해의 피해는 단순한 수확량의 감소로 인한 농가의 심각한 손실 유발 이외에도 벼에 직접적으로 발생하는 주요 식물 병원성 곰팡이가 생산하는 데옥시니발레놀(Deoxynivalenol, DON), 니발레놀(Nivalenol, NIV), 제랄레논(Zearalenone, ZEA) 등의 곰팡이 독소와 같은 2차 대사 산물에 의해 사람과 동물에 치명적인 중독증을 유발하는 것으로 알려져 있다[2]. 일반적으로 벼에서 발생하는 병원성 곰팡이 대부분은 잎이나 이삭에 질병을 일으켜 수확량 감소에 큰 문제점으로 자리잡고 있고, 특히 가장 큰 피해를 주는 것으로 알려진 병원균으로는 *Cochliobolus miyabeanus*, *Bipolaris oryzae*, *Curvularia lunata* 등이 국외에서 알려져 있으며[3,4], 국내에서는 *C. lunata*가 깨씨무늬병으로 인한 이삭의 마름 현상을 일으키는 병원균으로써 이삭 수 감소로 인한 수확량 저하 및 청미나 갈변미 증가로 쌀의 품질 저하 등을 야기하여 벼 이삭마름병을 유발한다고 보고되었다[5]. 또한, *Sarocladium oryzae*로 인해 발병하는 벼 잎집썩음병은 3~85%의 수확량 손실과 종자의 생존력 및 영양을 감소시키는 종자 전염병으로 국내 및 벼 재배 국가에서 큰 피해를 주는 질병으로 직접적인 수확량 감소와 관련되어 농업에 피해를 주기 때문에 유기합성 농약을 기초로 한 화학적 방법을 이용한 방제를 수행하고 있다[6].

유기합성 농약은 각종 식물 병해의 효과적인 방제 및 소비자의 기호와 고품질화 요구에 따른 저가의 고품질 농산물 생산을 가능하게 함으로써 농업의 생산량 증대 및 고품질화를 이룰 수 있는 효과적인 방제제로 사용되고 있다[7]. 하지만 최근에는 빈번하고 광범위한 유기합성 농약의 살포로 인해 환경오염, 인축 독성 및 저항성 식물 병해충 발현 등 많은 문제가 초래되고 있으며, 동물 대상의 연구에서 발암성, 생식 독성, 만성신경독성 등과 같은 만성 건강 장애에 대한 결과가 보고되면서 인간에게도 기능 장애나 암 등 만성 질환이 발생할 가능성이 있다는 점에서 안전성에 대한 문제가 제기되고 있다[8,9]. 이러한 문제점이 발생하면서 소비자의 불안감이 증대됨에 따라 최근에는 유기합성 농약을 대체할 친환경적 방제 수단으로 저항성 품종의 도입, 경종적 방제법, 천연물 농약 사용, 미생물을 이용한 생물학적 방제 등 다양한 연구들이 진행되고 있는 추세이다[7].

최근에는 환경친화적 방제 방법 중 유용미생물을 활용한 생물학적 방제에 대한 다양한 연구가 진행되고 있으며, 병원성 곰팡이의 세포벽을 분해하는 용균 작용[10], 미생물이 생성하는 항생물질에 의해 식물 병원균의 생육을 저해하는 항생 작용[11], 식물 병원균에 기생을 통한 병원성 곰팡이의 생육 저해 작용[12], 미생물 성장에 필요한 인자를 병원균과 경쟁을 통해 증식을 억제하는 경쟁적 길항 작용[13], 미생물이 생산하는 2차 대사산물(exopolysaccharide, lipopolysaccharide, salicylic acid 등)으로 인한 식물의 면역 기능 활성화를 통한 유도 저항성 작용[14] 등이 대표적으로 알려져 있다. 특히, *Bacillus* 속은 진균의 성장을 저해하거나 사멸시키는 항생물질인 bacillomycin D, fengycin, iturin A, surfactin 등[15]과 cellulase와 chitinase를 생산하여 병원성 진균의 세포벽을 용해시키는 것으로 알려져 있으며, 중금속 내성을 지녀 식물 성장에 도움을 주는 plant growth promoting rhizobacteria (PGPR)로 화학 농약을 대체할 수 있는 새로운 생물 방제를 위한 대표적인 미생물로 주목받고 있다[16].

따라서 본 연구는 순창군 내 연작 피해가 없는 논 토양으로부터 다양한 효소 활성을 갖는 미생물을 1차 선별하고, 벼에 주로 발병하는 병원성 곰팡이 3종에 대한 길항 능력과 siderophore 생성

능 등 기능성 및 특성 분석을 통한 국내 토종 미생물의 생물학적 방제를 위한 소재로서의 가능성을 검증하고자 하였다.

재료 및 방법

유용 미생물의 분리 및 배양

전라북도 순창군 내 연작 피해가 없는 논 토양 및 벼 뿌리 등 20종의 시료를 수집하여, 4°C에서 보관하면서 다양한 유용 미생물을 분리하기 위한 균원 시료로 사용하였다. 각각의 수집한 시료 1 g을 멸균 식염수(0.85% NaCl) 9 mL에 단계 희석 후 희석액 100 μ L을 LB 배지(Luria-Bertani, Difco™, MI, USA)에 도말하여 30°C에서 24시간 배양하고, 각각의 배지에서 미생물의 형태학적 차이를 이용하여 선별 후 순수 분리를 통하여 균주를 선별하였다. 순수 분리된 각각의 분리주는 다음 연구에 사용하기 위해 -80°C에 보관하여 사용하였다.

세포외 효소 활성 측정

분리주의 세포외 효소 활성 측정은 섬유소 분해효소(cellulase), 단백질 분해효소(protease), 전분 분해효소(amyase), 글루코사이드 분해효소(β -glucosidase)를 대상으로 실시하였다. Cellulase, protease, amyase 효소 활성 측정을 위해 각각의 효소와 특이적으로 반응하는 기질 성분 carboxylmethyl cellulose (CMC, JUNSEI chemical Co. Ltd., Tokyo, Japan), skim milk (Difco™, MI, USA), soluble starch (JUNSEI chemical Co. Ltd., Tokyo, Japan)를 각각 1%, 2%, 1% 함유한 고체 평판 배지를 제조하여 well diffusion 방법을 통해 측정하였다. 각 분리주의 세포외 효소 활성 측정을 위하여 단일 콜로니를 LB 액체 배지에 접종한 후 30°C에서 2일간 진탕 배양하고 13,000 rpm에서 30분간 원심분리하고 배양 상등액을 회수하여 분석에 사용하였다. 각각의 효소 활성 측정 배지에 분리주 각각의 배양 상등액을 0.45 μ m syringe filter (Sartorius, Frankfurt, Germany)로 제균한 뒤 100 μ L를 직경 6 mm의 well에 분주하여 30°C에서 18시간 반응시킨 후 각각의 분해능을 투명환의 직경을 측정하여 조사하였다. β -glucosidase 활성의 측정은 1% esculin (Difco™, MI, USA)과 0.5% ferric ammonium citrate (JUNSEI chemical Co. Ltd., Tokyo, Japan)를 첨가하여 제조한 LB 고체 배지에 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후 콜로니 주변에 생기는 검정색 환의 형성 유무를 판별하여 측정하였다.

Siderophore 생성능 측정

선별 균주의 siderophore 생성능의 측정은 Louden 등[17]의 방법에 따라 blue agar CAS assay로 측정하였다. 60 mg의 chromeazurol S (CAS, Sigma aldrich Co. Ltd., MO, USA)를 50 mL의 증류수, 2.7 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma aldrich Co. Ltd., MO, USA)를 10mM HCl 용액, 72.9 mg hexadecyltrimethylammonium bromide (HDTMA, Sigma aldrich Co. Ltd., MO, USA)를 증류수 40 mL에 녹여 빛이 투과하지 않게 하고, 각각의 3종의 용액을 혼합하여 blue dye 용액을 제조하여 멸균하였다. 다음으로 750 mL의 증류수에 100 mL MM9 salt solution, 32.24 g PIPES (Sigma aldrich Co. Ltd., MO, USA), 15 g agar (Difco™, MI, USA)를 혼합하여 pH 6.8로 적정한 후 고압 멸균하고 50°C로 냉각한 후 30 mL의 10% casamino acid (Difco™, MI, USA)와 10 mL의 20% glucose (Sigma aldrich Co. Ltd., MO,

USA)를 혼합하여 CAS agar 용액을 제조하였다. 앞서 준비한 blue dye 용액을 거품이 생성되지 않게 CAS agar 용액을 서서히 첨가하면서 혼합하고 petri-dish에 분주해 blue agar CAS 고체 배지를 제조하였다. 제조한 고체 배지에 각각의 선별 균주 배양액 20 μ L를 접종하고 30°C에서 2일간 배양한 후 orange halo zone의 형성 여부를 관찰하여 siderophore의 생성 여부를 판단하였으며, 대조구로 LB 액체 배지를 사용하여 측정하였다.

벼에 발생하는 식물 병원성 곰팡이에 대한 항진균 활성 측정

벼에서 발생하는 대표적인 병해인 벼 깨씨무늬병과 벼 잎집썩음병에 대한 항진균 활성을 측정하기 위해 깨씨무늬병 원인균인 *C. miyabeanus*와 깨씨무늬병으로 인해 유발되는 이삭마름병의 원인균 *C. lunata*, 잎집썩음병의 발병 원인균인 *S. oryzae* 3종을 대상으로 실시하였다. *C. miyabeanus* ATCC 44560과 *C. lunata* KACC 40392에 대한 항진균 검증은 Ryu 등[18]의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 각각의 2종 병원성 진균을 0.1% tween80 (Sigma aldrich Co. Ltd., MO, USA) 15 mL에 혼합하여 0.8% soft potato dextrose agar (PDA, Difco™, MI, USA)에 접종한 뒤 well diffusion 방법으로 분주 후 25°C에서 7일간 배양하고 형성된 생육 저지대(clear zone)의 크기를 측정하여 확인하였다. *S. oryzae* ATCC 64086에 대한 항진균 활성의 검증은 Kang 등[16]의 방법에 따라 대치 배양을 통한 well diffusion 방법을 이용하여 측정하였으며, 대치 배양은 PDA 배지에 분리 균주의 배양 상등액 100 μ L를 6 mm의 well에 분주하고 검정 균주를 대치하여 25°C에서 7일간 배양하고 형성된 생육 저지대(clear zone)의 크기를 측정하여 확인하였다.

선별 균주의 동정 및 계통도 분석

최종 선별 균주의 16S rRNA 염기서열 분석을 위하여 universal 프라이머인 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')[19]를 사용하여 유전자를 증폭 후 증폭된 PCR 산물은 QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, CA, USA)를 사용하여 정제하고 (주)마크로젠에 의뢰하여 염기서열을 해독하였다. 염기서열의 chromatogram을 이용하여 gap을 최소화 한 뒤 National Center for Biotechnology Information (NCBI)에서 서열의 일치도가 높은 표준 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열을 확보하고 이를 이용한 계통도를 작성하였다. 작성된 계통도의 분석은 MEGA 7.0.26 program을 사용하여 분석하였으며, Tamura-Nei 모델에 기초한 Maximum Likelihood 방법[20]으로 분석을 실시하고, 산출한 각각의 계통수에서 각 분지에 대한 통계학적 신뢰도를 확보하기 위하여 bootstrap 분석을 1,000회 반복 실행하여 계통도의 견고성을 확인하였다.

최종 선별 균주의 생리학적 특성 분석

최종 선별 균주의 생화학적 특성 중 당 발효 특성은 API 50 CHB kit (Biomérieux, Marcy-L'Etoile, France)를 이용하여 측정하였다. 분리 균주를 지시약이 포함된 kit medium에 현탁하여 각각의 strip에 분주한 후 24시간에서 48시간동안 배양하며 당 발효능을 확인하였다. 또한, API ZYM kit (Biomérieux, Marcy-L'Etoile, France)를 사용하여 선별 균주가 분비하는 효소의 특성을 확인하였다.

결과 및 고찰

미생물의 분리

토양 내 *Bacillus* sp.는 PGPR 식물 병원균에 대한 항진균 활성 및 항생물질을 생성하여 식물 성장에 도움을 주고, 중금속에 대한 내성을 갖는 유용한 미생물로 알려져 있다[16]. 따라서, 국내 벼에서 빈번하게 발생하는 식물 병원성 곰팡이에 대한 항진균 활성을 갖는 균주를 선별하기 위하여 순창군 내 연작 피해가 없는 논 토양 및 벼 뿌리 등 20종을 수집하여 유용 미생물을 분리하기 위한 균원 시료로 사용하였으며, 형태학적 특성을 육안으로 확인하여 약 200여 종의 *Bacillus* 계열 미생물을 순수분리하였다.

분리 균주의 세포외 효소 활성

앞서 선별한 약 200여 종의 분리주를 대상으로 protease, cellulase, amylase 및 β -glucosidase 4종에 대한 세포 외 효소 활성을 측정하였다. 측정 결과 10mm 이상의 protease, cellulase 및 amylase에 대한 효소 활성을 모두 지니고 있는 10종을 1차로 선별하였고, 또한 이들 중 β -glucosidase의 활성을 보유한 JSRB 46, JSRB 66, JSRB 101, JSRB 177, JSRB 179 등 총 5종의 균주를 1차로 선별하였다(Table 1). 일반적으로 가장 많이 사용되고 있는 생물학적 방제 방법 중 하나는 미생물이 생산하는 세포외 효소(protease, cellulase, amylase, lipase 등)와 같은 진균 외벽 가수분해 효소에 의해 식물 병원균의 세포벽을 분해는 용균작용으로 병원성 진균의 성장을 저해하는 방법이 이용되고 있으며, 대표적인 세포외 효소 활성 미생물로는 세균과 방선균이 알려져 있다[21]. 특히, 병원성 난균류의 세포벽이 cellulose로 구성되어 있으므로 JSRB 177, JSRB 179, JSRB 185와 같은 cellulase 고생산 균주들의 경우, 균주가 생산하는 cellulase로 인하여 세포벽의 분해가 촉진되고, 이를 통해 식물 병원균을 방제할 수 있는 잠재적 가능성을 갖는 우수 후보 미생물로서 적합함을 확인할 수 있었다.

분리 균주의 siderophore 생성능

Siderophore는 가용성이며 저분자 물질로 철 이온과 친화성이 높은 2차 대사산물로서 철 이온을 세포 내로 수송하여 미생물의 생육에 사용된다. 하지만 일반적인 토양에는 미생물 생육에 필

Table 1. Extracellular enzyme activities of the isolated strains

Strains	Clear zone diameter (mm)			β -glucosidase activity
	Protease	Cellulase	α -Amylase	
JSRB 22	10.0	9.0	11.0	- ^a
JSRB 46	10.0	7.0	10.0	+
JSRB 58	11.0	10.0	9.0	-
JSRB 66	15.0	11.0	13.0	+
JSRB 97	12.0	9.0	9.0	-
JSRB 101	9.0	8.0	18.0	+
JSRB 177	15.0	13.0	15.0	+
JSRB 179	14.0	12.0	12.0	+
JSRB 185	11.0	11.0	10.0	-
JSRB 193	10.5	10.0	11.0	-

^a, No formation of clear zone or no activity.

요한 철분 성분이 풍부하지 않아 모든 토양 미생물간의 경쟁적 요인으로 작용하기도 한다. 따라서, 이러한 철 이온의 경쟁으로 인해 타 미생물의 생장이 억제되기도 하며, 이러한 기작을 이용하여 siderophore 생산 미생물을 이용한 생물 방제 연구도 다양하게 진행되고 있다[13,22]. 따라서 선별 5종 분리주의 siderophore 생성능을 CAS를 사용한 정성적 방법으로 확인한 결과 분리주 모두 siderophore를 생성하는 것으로 확인되었다(Table 2). 이는 *B. subtilis* AH18 균주가 생성한 siderophore에 의해 고추 역병균에 강한 방제 효과를 갖는다는 보고[23]와 고추 흰가루병에 대한 방제 효과를 보이는 *B. subtilis* R2-1이 siderophore를 생성한다는 보고[24]에 미루어보아 선별한 5종의 *Bacillus* 후보균 또한 siderophore 생성으로 인한 생물학적 방제제로서의 효과를 가질 것으로 기대된다.

벼의 병원성 곰팡이에 대한 항진균 활성

식물 근권 부위에 존재하고 있는 미생물의 경우 근권 부위에서 양분 및 수분의 흡수를 촉진하여 식물 생장에 관여하고, 미생물이 생성하는 cellulase나 chitinase와 같은 세포의 효소로 인하여 근권 내 존재하는 병원성 미생물과 병해충의 발생을 억제함으로써 작물의 생육을 조절하는 역할을 수행하여 식물 병원균과 길항 관계가 있음이 보고되었다[25]. 따라서, 앞서 선별한 세포의 효소 활성이 우수한 5종의 분리주를 대상으로 벼에서 빈번하게 발생하며 생산에 영향을 주는 3종의 병원성 곰팡이에 대한 항진균 활성을 측정하였다. 항균 배지에서 대치배양을 통한 생육저지대 측정법으로 조사한 결과, 선별 분리 균주 5종 모두 벼 깨씨무늬병의 원인균 *C. miyabeanus*, 깨씨무늬병으로 인해 유발되는 이삭마름병의 원인균 *C. lunata*, 잎집썩음병의 원인균 *S. oryzae* 등 3종에 대한 항균 활성을 갖고 있었다(Table 2). 이는 *B. subtilis*가 벼 도열병균의 완전세대 균인 *Magnaporthe grisea* PB1에 대한 10 mm의 저해 활성을 보였다는 보고[26], 벼 잎집무늬마름병균의 균핵에서 분리한 *B. subtilis* SJ-2가 벼의 도열병균 *Pyricularia oryzae*와 문고병 원인균 *Rhizoctonia solani*, 깨씨무늬병 원인균인 *Bipolaris maydis*와 *C. miyabeanus*에 대하여 10 mm 이상의 저해 활성을 보였다는 보고[27]와 일치하였다. 일반적으로 식물 병원성 유해균에 대한 생물학적 방제제로 사용되는 균주로는 *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *B. licheniformis*, *B. brevis* 등이 이용되고 있으며, 특히 *B. subtilis*의 항균 활성에 대한 연구가 가장 많이 보고되고 있다. 하지만 최근까지의 연구 결과 대부분이 벼 이외의 작물에 대한 보고이고, 실질적으로 한국인에게 가장 밀접한 식량 자원인 벼의 생물학적 방제에 대한 연구 결과는 다소 미흡한 실정이다[28]. 따라서 앞서 선별한 5종의 분리주 중 JSRB 177 균주의 경우 앞서 보고된 연구 결과들과 비교하여도 우수한 항진균 활성을 갖고 있

Table 2. Production of siderophore and antifungal inhibitory activity against the phytopathogens by selected strains

Fungi	Clear zone diameter				
	JSRB 46	JSRB 66	JSRB 101	JSRB 177	JSRB 179
<i>Sarocladium oryzae</i> ATCC 64086 ^a	++	++	++	+++	++
<i>Curvularia lunata</i> KACC 40392 ^a	++	++	+	+++	++
<i>Cochliobolus miyabeanus</i> ATCC 44560 ^a	+	+	++	++	+
Production of siderophore ^b	+	+	+	+	+

^a+, A degree of inhibition of fungal growth by tested strains: +, inhibition zone of 1~10 mm; ++, 11~20 mm; +++, >20 mm.

^b+, Production of siderophore

는 것으로 확인되어, 벼의 식물 병원성 유해균 억제를 위한 생물학적 방제제로써 활용하기 위한 균주로 최종 선별하였다.

분자생물학적 동정 및 계통도

최종 선별한 JSRB 177 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열 분석 결과를 이용하여 NCBI nucleotide BLAST search를 수행하였으며, GenBank에 등록된 표준 균주와 염기서열의 상동성을 비교 분석 하였다. 염기 서열의 alignment 분석에 사용한 parameter 및 option의 값은 protein weight matrix로 Gonnet series를 사용하였으며, gap opening 15, gap extension 6.66, delay transition weight은 0.5로 설정하였고, gap penalty 5, K-tuple size 2, top diagonals 4, window size 4로 설정하여 진행하였다. 그 결과 최종 선별한 JSRB 177 (1537 bp, NCBI Accession No. MN121128)는 *Bacillus subtilis* DSM 10^T (AJ276351) 및 NRRL B-23049^T (AF074970)와 99.8%, 99.4%의 유사성을 나타내었다. 16S rRNA 유전자 염기서열을 토대로 Maximum Likelihood method를 사용하여 계통수를 작성하였고(Fig. 1), 계통수의 신뢰도 확보를 위해 bootstrap 분석을 1,000회 실시하여 신뢰성을 향상시켰다. 최종 식물 병원성 곰팡이의 생물학적 방제제를 위한 유용 미생물로 적합한 JSRB 177 균주는 *Bacillus subtilis* JSRB 177로 동정하였다.

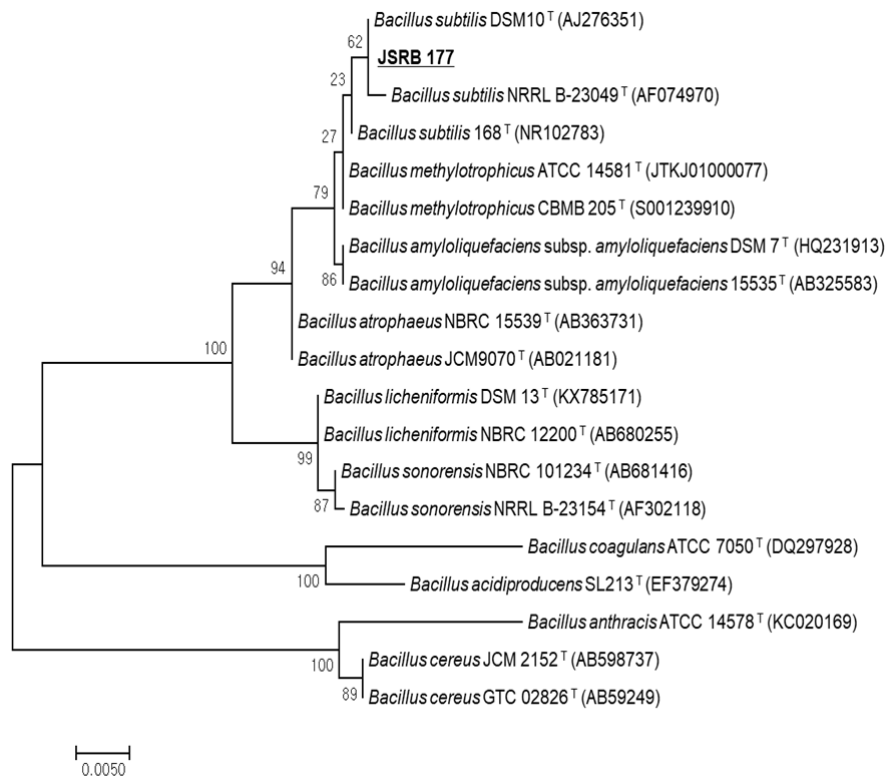


Fig. 1. Phylogenetic tree based on nearly complete 16S rRNA gene sequences of strain JSRB 177 and *Bacillus* type strains. JSRB 177 showed the phylogenetic position similar to *B. subtilis* type strains. GenBank accession numbers are given in parentheses. Branching pattern was generated by maximum likelihood method. Bar, 0.005 substitutions per nucleotide position. Bootstrap values are expressed as percentages of 1,000 replicates.

최종 선별 균주의 생리학적 특성

최종 선별 균주의 생리학적 특성을 확인하기 위하여 먼저 API 50 CHB kit를 이용하여 JSRB 177의 당 이용성에 대한 측정을 실시하였다. 실험 결과 JSRB 177은 glycerol, glucose, fructose, mannose, mannitol, sorbitol 등 29종의 당을 이용할 수 있었으며, rhamnose, fucose, tagatose 등 20종의 당은 사용하지 못하는 것을 확인하였다(Table 3). 또한, API ZYM kit을 이용하여 JSRB 177이 생산하는 효소에 대한 측정 결과 esterase C4와 esterase C8에 대하여 강한 활성을 갖고 있었으며, 이외 α , β -glucosidase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase에 대한 활성 또한 갖고 있음을 확인하였다(Table 4). 특히 미생물에서 유래한 esterase가 기질에 대한 특이성, 내 알칼리성, 유기용매 내성, 내열성과 광학적 선택성 등의 특성을 갖고 있어 안정적인 소재로 인정되면서 다양한 산업 분야에 사용되고 있고, 항균 활성이 월등히 뛰어난 levofloxacin을 생전환하는데 사용된다고 보고되고 있어[29] 항균 활성에 대한 추가 효과 또한 기대된다.

Table 3. Carbohydrates assimilation of *Bacillus subtilis* JSRB 177 by API 50 CHB kit

Enzyme ^a	JSRB 177	Enzyme	JSRB 177
Control	-	Esculin	+
Glycerol	+	Salicin	+
Erythritol	-	D-Cellobiose	+
D-Arabinose	-	D-Maltose	+
L-Arabinose	+	D-Lactose	+
D-Ribose	+	D-Melibiose	+
D-Xylose	+	D-Saccharose	+
L-Xylose	-	D-Trehalose	+
D-Adonitol	-	Inulin	+
β -Methyl-D-xyloside	-	D-Melezitose	-
D-Galactose	-	D-Raffinose	+
D-Glucose	+	Starch	+
D-Fructose	+	Glycogen	+
D-Mannose	+	Xylitol	-
L-Sorbose	-	Gentiobiose	+
L-Rhamnose	-	D-Turanose	+
Dulcitol	-	D-Lyxose	-
Inositol	+	D-Tagatose	-
D-Mannitol	+	D-Fucose	-
D-Sorbitol	+	L-Fucose	-
α -Methyl-D-mannoside	-	D-Arabitol	-
α -Methyl-D-glucosamine	+	L-Arabitol	-
N-Acetyl glucosamine	+	Potassium Gluconate	+
Amygdalin	+	Potassium 2 keto-gluconate	-
Arbutin	+	Potassium 5 keto-gluconate	-

^a+, utilized; -, not utilized.

Table 4. Enzymatic activities of *Bacillus subtilis* JSRB 177 by API ZYM kit

Enzyme ^a	<i>Bacillus subtilis</i> JSRB 177
Alkaline phosphatase	-
Esterase (C4)	+++
Esterase (C8)	++
Lipase (C14)	-
Leucine arylamidase	-
Valine arylamidase	-
Crystine arylamidase	-
Trypsin	-
α -chymotrypsin	-
Acid phosphatase	-
Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	+
α -galactosidase	-
β -galactosidase	-
β -glucuronidase	-
α -glucosidase	++
β -glucosidase	+
N-acetyl- β -glucosaminase	-
α -mannosidase	-
α -fucosidase	-

^a +, utilized; -, not utilized.

적요

벼의 깨씨무늬병과 잎집썩음병의 원인균인 *Cochliobolus miyabeanus*와 *Sarocladium oryzae*에 의해 발병되며, 깨씨무늬병이 이삭에 발생할 경우 *Curvularia lunata*에 의해 이삭마름병이 추가로 발병하게 되고 한국인의 주식인 쌀의 수확량 감소 및 쌀의 품질 저하와 같은 손실을 초래하여 세계적으로 벼 재배 국가에서는 큰 문제로 장기적으로는 심각한 문제를 초래한다. 따라서, 이러한 식물 병원성 곰팡이의 생물학적 방제를 위해 순창군 논 토양에서 세포외 효소 활성이 우수하고 siderophore를 생산하는 유용 미생물 5종을 선별하였다. 5종의 선별 미생물은 벼의 식물 병원성 곰팡이 3종에 대하여 우수한 항진균 활성을 갖고 있었으며, 특히 JSRB 177 균주는 가장 우수한 활성을 지녀 최종 균주로 선별되었다. 최종 선별된 JSRB 177 균주는 16S rRNA 염기서열 분석을 통하여 *Bacillus subtilis*로 동정되었으며, 최종적으로 JSRB 177의 당 이용성 및 효소 생산에 대한 분석을 통하여 생리학적 특성을 확인하였다. 향후 포트 시험 및 생산 공정 확립 등 산업화에 연관된 추가 연구가 필요하지만 앞선 결과를 토대로 JSRB 177 균주는 벼 병원성 곰팡이에 대한 생물학적 방제를 위한 소재로 높은 활용이 기대된다.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by Traditional Culture Convergence Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Science and ICT (NRF-2016M3C1B5907049).

REFERENCES

1. Lee AS, Cho YS, Kim IJ, Ham JK, Jang JS. The quality and yield of early maturing rice varieties affected by cultural practices in Gangwon plain region. *Korean J Crop Sci* 2012;57:233-7.
2. Lee T, Lee SH, Kim LH, Ryu JG. Occurrence of fungi and *Fusarium mycotoxins* in the rice samples from rice processing complexes. *Res Plant Dis* 2014;20:289-94.
3. Tann H, Soytong K. Biological control of brown leaf spot disease caused by *Curvularia lunata* and field application method on rice variety IR66 in Cambodia. *Agrivita* 2016;39:111-7.
4. Yeo WH, Lee HS, Kim YK, Shim HS, Jee HJ, Nam KW. Overwintering of the pathogen and factors affecting disease development of rice brown spot caused by *Cochliobolus miyabeanus*. *Res Plant Dis* 2004;10:112-6.
5. Yeh WH, Park YH, Kim LY, Taik JS, Nam YJ, Shim HS, Kim YK, Yeon BY. Comparisons of inorganic amounts in paddy field soil, rice straw and grain with severity of brown spot caused by *Cochliobolus miyabeanus*. *Res Plant Dis* 2009;15:41-5.
6. Ayyadurai N, Kirubakaran SI, Srisha S, Sakthivel N. Biological and molecular variability of *Sarocladium oryzae*, the sheath rot pathogen of rice (*Oryza sativa* L.). *Curr Microbiol* 2005;50:319-23.
7. Park YH, Lee YS. Biological control of plant diseases and biodegradation of pesticides by *Gliocladium virens*. *Plant Pathol J* 1996;12:255-65.
8. Keifer MC, Mahurin RK. Chronic neurologic effects of pesticide overexposure. *Occup Med* 1997;12:291-304.
9. Shelia HZ, Mary HW, Aron B. Pesticides and cancer. *Occup Med* 1997;12:269-89.
10. Han KH, Lee CU, Kim SD. Antagonistic role of chitinase and antibiotic produced by *Promicromonospora* sp. KH-28 toward *F. oxysporum*. *Korean J Appl Microbiol Biotechnol* 1999;27:349-53.
11. Kim KY, Kim SD. Biological control of *Pyricularia oryzae* blast spot with the antibiotic substances produced by *Bacillus* sp. KL-3. *Korean J Appl Microbiol Biotechnol* 1997;25:396-402.
12. Lee SY, Lee SB, Kim YK, Kim HG. Effect of agrochemicals on mycelial growth and spore germination of a hyperparasite, *Ampelomyces quisqualis* 94013 for controlling cucumber powdery mildew. *Kor J Pesti Sci* 2004;8:71-8.
13. Lim HS, Lee JM, Kim SD. A plant growth-promoting *Pseudomonas fluorescens* GL20: Mechanism for disease suppression, outer membrane receptors for ferric siderophore, and genetic improvement for increased biocontrol efficacy. *J Microbiol Biotechnol* 2002;12:249-57.
14. Ping L, W Boland. Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci* 2004;9:263-6.
15. Sansinenea E, Ortiz A. Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. *Biotechnol Lett* 2011;33:1523-38.
16. Kang DW, Ryu IH, Han SS. The isolation of *Bacillus subtilis* KYS-10 with antifungal activity against plant pathogens. *Kor J Pesti Sci* 2012;16:178-86.
17. Loudon BC, Haarmann D, Lynne AM. Use of blue agar CAS assay for siderophore detection. *J Microbiol Biol Edu* 2011;12:51-3.
18. Ryu MS, Yang HJ, Kim JW, Jeong SJ, Jeong SY, Eom JS, Jeong DY. Potential probiotics activity of *Bacillus* spp. From traditional soybean pastes and fermentation characteristics of

- Cheonggukjang. Korean J Food Preserv 2017;24:1168-79.
19. De Lillo A, Ashley FP, Palmer RM, Munson MA, Kyriacou L, Weightman AJ, Wade WG. Novel subgingival bacterial phylotypes detected using multiple universal polymerase chain reaction primer sets. Oral Microbiol Immunol 2006;21:61-8.
 20. Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Mol Biol Evol 1993;10:512-26.
 21. Yang HJ, Jeong SJ, Joeng SY, Jeong DY. Screening of antagonistic bacteria having antifungal activity against various phytopathogens. Kor J Mycol 2014;42:333-40.
 22. Lee MW. Root colonization by beneficial *Pseudomonas* spp. and bioassay of suppression of *Fusarium* wilt of radish. Kor J Mycol 1997;25:10-20.
 23. Woo SM, Kim SD. Structure identification of siderophore AH18 from *Bacillus subtilis* AH18, a biocontrol agent of *Phytophthora* blight disease in red-pepper. Korean J Microbiol Biotechnol 2008;36:326-35.
 24. Kim YK, Hong SJ, Shim CK, Kim MJ, Choi EJ, Lee MH, Park JH, Han EJ, An NH, Jee HJ. Functional analysis of *Bacillus subtilis* isolates and biological control of red pepper powdery mildew using *Bacillus subtilis* R2-1. Res Plant Dis 2012;18:201-9.
 25. Tominaga Y, Tsujisaka Y. Purification and some prosperities of two chitinase from *Streptomyces sorientalis* which lyse *Rhizopus* cell wall. Agric Biol Chem 1976;40:2325-33.
 26. Zhang CX, X Zhao, YX Jing, T Chida, H Chen, SH Shgen. Phenotypic and biological properties of two antagonist *Bacillus subtilis* strain. World J Microbiol Biotechnol 2008;24:2179-81.
 27. Kim BS, Kwang YC. Antifungal effects on plant pathogenic fungi and characteristics of antifungal substances produced by *Bacillus subtilis* SJ-2 isolated from sclerotia of *Rhizoctonia solani*. Plant Pathol J 1995;11:165-72.
 28. Chung EJ, Hossain MT, Khan A, Kim KH, Jeon CO, Chung YR. *Bacillus oryzicola* sp. nov., an endophytic bacterium isolated from the roots of rice with antimicrobial, plant growth promoting, and systemic resistance inducing activities in rice. Plant Pathol J 2015;31: 152-64.
 29. Kim HK, Na HS, Park MS, Oh TK, Lee TS. Occurrence of ofloxacin ester-hydrolyzing esterase from *Bacillus niacin* EM001. J Mol Catal B: Enzym 2004;27:237-41.