

식물병원성 진균을 억제하는 근권세균의 항진균능과 식물생장촉진능

정택경 · 김지현 · 송홍규*

강원대학교 자연과학대학 생명과학과

Antifungal Activity and Plant Growth Promotion by Rhizobacteria Inhibiting Growth of Plant Pathogenic Fungi

Taeck-Kyung Jung, Ji-Hyun Kim, and Hong-Gyu Song*

Department of Biological Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Republic of Korea

(Received January 9, 2012 / Accepted March 15, 2012)

Since many pesticides cause various health and environmental problems, alternative measures to replace them are needed, and the bacteria producing the antifungal substances can be one of them. In this study, several rhizobacteria were isolated and their antifungal activities against some important plant pathogenic fungi were examined. *Pseudomonas otitidis* TK1 and *Paenibacillus peoriae* RhAn32 inhibited the growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* and *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* by 49.8% and 45.6%, and 45.1% and 48.3%, respectively compared to those of the control. *P. peoriae* RhAn32 also decreased the growth of *F. oxysporum* f. sp. *raphani* by 37.5%. This growth inhibition might be due to the production of antifungal substances, such as siderophore, hydrogen cyanide and chitinase, which were produced by these rhizobacteria. *P. otitidis* TK1 also produced plant growth hormones indole acetic acid and indole butyric acid at 293.41 µg/mg protein and 418.53 µg/mg protein, respectively. When *P. otitidis* TK1 and *B. cereus* TK2 were inoculated together with *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* to the 4 weeks grown tomato seedlings and incubated additional 8 weeks, the stem lengths of tomato increased up to 45.7% and 55.3% and root lengths were raised to 64.9% and 60.8%, respectively than those of the control group. The wet weights increased by 118% and 182%, respectively compared to the control group.

Keywords: antifungal substances, plant growth promotion, plant pathogenic fungi, rhizobacteria

전 세계적으로 화학비료와 유기합성농약의 사용으로 농업 생산성이 증가하고 노동력과 시간을 줄이게 되었지만 이들의 사용으로 인해 발생하는 잔류 독성, 토양의 산성화, 먹이사슬에 미치는 영향, 수질 오염, 식물병원균의 농약 저항성 획득 등 환경에 심각한 부작용이 나타나며 이로 인해 야생 동식물 및 인간의 생존과 건강이 위협받고 있다(Kim *et al.*, 2008). 이에 따라 유기합성농약의 사용량을 줄이는 활동이 늘어나고 있으며 '92 Rio 환경회의'에서 유기합성농약의 사용량을 2004년까지 50% 감소하는 국가 간의 협약이 체결되었다. 근래 지속가능한 환경 친화적 농업에 관심이 점차 늘어나고 있으며 유기합성농약의 대안으로 생물학적 방제법에 관심이 점차 높아지고 있는데, 비록 현재 생물학적 방제법이 전 세계 농약시장에서 차지하는 비중은 낮지

만 토양세균이 분비하는 식물병원균의 세포벽 분해 효소와 항진균성 물질 등에 대한 연구가 활발히 진행 중이다(Han *et al.*, 1999; Kremer and Souissi, 2001; Meena *et al.*, 2001).

식물의 근권에 존재하는 일부 세균들은 식물생장을 촉진하는 것으로 알려졌는데 이들은 auxin, gibberellins, cytokinin 등의 호르몬을 분비하여 식물이 이를 흡수하여 생장에 이용할 수 있다(Kende and Zeevaart, 1997). 한편 근권세균들은 항생물질 생성을 포함한 다양한 방법으로 식물병원성 진균을 억제하기도 한다. 토양에 철이 1-6% 존재하지만 철 이온의 용해상수가 극히 낮아 손쉽게 이용할 수 없기 때문에 철을 이용하기 위해 토양생물들이 경쟁을 하게 된다(Bashan and de-Bashan, 2005). 특정 근권세균에 의해 생산된 siderophore는 식물병원성 진균에서 생산된 siderophore 보다 철과의 친화성이 높아 철이온과 복합체를 형성한 다음 세균세포 내로 들어간다. 이는 병원성 진균의 포자형성과 발아관 신장을 억제하며 증식을 막는다(Niranjan *et al.*,

*For correspondence. E-mail: hgsong@kangwon.ac.kr; Tel.: +82-33-250-8545; Fax: +82-33-251-3990

2005) 동시에 식물에게 철을 공급하여 식물체내의 철 농도를 증가시킨다(Rroco *et al.*, 2003). 한편 일부 세균이 생성하는 hydrogen cyanide (HCN)는 식물병원성 진균의 생장이나 발아를 저해하는 것으로 알려지고 있다(Voisard *et al.*, 1989). Chitin은 진균의 세포벽을 구성하는데 이를 분해하는 효소인 chitinase가 식물병원성 진균의 생육을 억제하기 때문에 chitinase 또한 항진균성 물질로 작용할 수 있다(Ordentlich *et al.*, 1988).

이제까지 항진균능을 가진 근권세균의 식물생장촉진능에 대해서는 크게 강조하지 않았는데(Ams *et al.*, 2002; Kanchana Devi *et al.*, 2007) 본 연구에서는 친환경농업에서 미생물제로 사용하기 위해 5가지의 중요한 작물병원성 진균에 대해 항진균능을 가지면서 동시에 식물생장촉진능을 나타내는 근권세균 균주를 선별하고자 하였다.

재료 및 방법

근권세균 분리 및 항진균능 조사

붉은서나물(*Erechtites hieracifolia*), 개망초(*Erigeron annuus*), 지침개(*Hemistepta lyrata*)와 옥수수(*Zea mays*)의 근권으로부터 채취한 토양 시료 1 g을 0.9% saline 용액 9 ml에 넣고 30분간 150 rpm에서 교반한 상등액을 연속 희석하여 potato dextrose agar (PDA; Difco Lab, USA)에 도말하여 30°C에서 배양하였다. 자라난 집락을 순수분리될 때까지 계대배양하여 분리된 77개의 균주를 대상으로 항진균능을 확인하였다. 식물병원성 진균의 생장억제를 확인하기 위하여 PDA 배지에 식물병원성 진균을 미리 배양하여 균사체로 덮인 배지 조각(1×1 cm)을 잘라 새 PDA 평판배지 한쪽 끝에 올려놓고 반대쪽 끝에는 분리균주의 배양액을 희석 접종하여 30°C에서 배양하였다. 자라난 진균의 균사체가 균주 미접종 대조군의 희석까지 다 다르면 생장한 넓이를 실험군과 대조군을 비교하여 분리균주의 항진균능 여부를 확인하였다. 항진균능 조사를 위해 사용된 식물병원성 진균은 토마토 시들음병 병원체인 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, 수박 덩굴쪄짐병을 일으키는 *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*, 무 시들음병 병원체 *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*, 고추 탄저병 병원체 *Colletotrichum gloeosporioides*와 잎 마름병을 일으키는 *Rhizoctonia solani*이었다.

Han 등(1999)의 방법을 변형시켜 공동배양 시 진균의 생장저해를 비교하였는데 Potato dextrose broth 40 ml에 식물병원성 진균 균사체로 덮인 PDA 배지 조각(1×1 cm)을 접종한 뒤 진균의 생장저해를 뚜렷하게 보이는 균주를 1×10^7 cell/ml이 되도록 접종하고 7일간 혼합 배양하였다. 혼합배양액을 원심분리(3,000×g, 15 min)하여 진균 균사체만을 회수하고 동결건조시킨(-80°C, 12 h) 후 건조중량을 측정하여 균주 접종에 의한 식물병원성 진균의 생장 저해능을 비교하였다.

항진균능이 우수한 균주들을 선별하여 g-DNA를 추출하고 PCR을 수행한 후 (주)마크로젠에 의뢰하여 얻은 약 1,400 bp의 16S rRNA 유전자 염기서열을 EzTaxon server 2.1 (Chun Lab., Korea)을 이용하여 NCBI 등록 균주들과 비교하여 동정하였다.

항진균성 물질 생성능

Siderophore: Chrome azurol S (CAS) agar plate assay (Schwyn and Neilands, 1987)를 통해서 먼저 siderophore 생성이 확인된 분리균주를 40 ml King's B 배지(KB: protease peptone 20 g, glycerol 10 ml, KH₂PO₄ 1.5 g, MgSO₄ · 7H₂O 1.5 g, pH 7.2, 증류수 1 L)에 넣고 선 배양 후, 배양액의 OD₆₀₀이 1.0이 되도록 보정하였다. 그 후 KB 배지 36 ml에 4 ml씩 보정된 균주를 접종하여 배양하면서(150 rpm, 30°C) 24시간 간격으로 siderophore를 정량분석하였다. 균주 배양액 15 ml를 conical tube에 넣고 원심분리하고(3,000×g, 30 min) 상등액을 pH 2.9로 보정한 뒤, 동량의 ethyl acetate를 혼합하여 extraction shaker (Recipro shaker RS-1, JEIO TECH)로 추출하였다(300 rpm, 30 min). 추출된 용액을 다시 원심분리하고(3,000×g, 30 min) 상층의 ethyl acetate 5 ml과 Hathway 반응용액(증류수 100 ml에 0.1 M HCl을 이용하여 만든 0.1 M FeCl₃ 용액 1 ml과 0.1 M potassium ferricyanide 1 ml을 첨가) 5 ml을 20분 반응시킨 후 분광광도계를 이용하여 OD₇₀₀을 측정하였다. Dihydroxy benzoic acid를 이용하여 얻은 표준 곡선을 이용하여 측정치로부터 siderophore를 정량하였다.

Chitinase 활성: 분리균주를 0.2% chitin-peptone 배지(glucose 5 g, peptone 5 g, colloidal chitin 2 g, K₂HPO₄ 1 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g, NaCl 5 g, 증류수 1 L) 40 ml에 접종하고 선 배양 후, OD₆₀₀이 1.0이 되도록 보정한 뒤 같은 배지 36 ml에 4 ml씩 배양액을 접종한 뒤 4일 동안 배양하였다(150 rpm, 30°C). 배양액을 원심분리하고(3,000×g, 20 min), 상등액 0.25 ml과 0.1% colloidal chitin 0.5 ml, 1 mM sodium phosphate buffer (pH 5.3) 0.3 ml을 각각 혼합하여 50°C에서 4시간 동안 반응시켰다. Chitinase 활성은 dinitrosalicylic acid 방법을 이용하여 chitin이 분해되어 생성된 glucose의 양을 정량하였다(Mauch *et al.*, 1988).

Hydrogen cyanide: 멸균된 5×1 cm의 여과지(Whatman No. 1)와 10% alkaline picrate 용액(2.5% sodium carbonate, 0.5% picric acid, 증류수 1 L)을 준비한다. 여과지를 20초간 10% alkaline picrate 용액에 적신 뒤 상온에서 24시간 동안 건조시킨다. 정성분석을 위해 LA 고체배지(tryptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 10 g, glycine 4.4 g, agar 15 g, 증류수 1 L)의 절반을 균주로 도말한 뒤 도말이 안 된 일정 거리에 염색된 여과지를 천장에 붙이고 parafilm으로 밀봉하고 30°C에서 4일 동안 여과지의 색 변화를 관찰한 뒤 균주를 선별하였다. 선별된 분리균주를 tryptone soy broth (TSB)에 접종하고 선 배양한 뒤 분광광도계를 이용하여 OD₆₀₀이 1.0이 되도록 보정하였다. TSB 36 ml에 4 ml 균주를 접종하여 4일간 배양하였다(150 rpm, 30°C). 5×1 cm의 여과지(Whatman No. 1)를 10% alkaline picrate 용액에 적신 뒤 상온에서 24시간 동안 건조시키고 배양 4일째의 TSB에 매달아서 48시간 동안 색 변화를 관찰하였다. 색이 변한 여과지를 꺼내서 멸균된 conical tube에 넣고 증류수 10 ml를 첨가하여 10분 동안 300 rpm에서 섞어준 뒤, 원심분리하고(3,000×g, 20 min) 상등액의 흡광도를 각각 625 nm와 510 nm에서 측정하였다.

IAA와 IBA 생성능 조사

항진균능이 있는 균주를 식물생장호르몬인 auxin 중 대표적인

indole acetic acid (IAA)와 indole butyric acid (IBA)의 전구물 질인 L-tryptophan을 첨가하지 않은 nutrient broth (NB) 배지에 선 배양하여 OD₆₀₀이 1.0이 되도록 보정하였다. 그 뒤 L-tryptophan을 3 mM을 넣은 NB 배지 36 ml에 분리균주 4 ml를 접종하여 배양하였다(150 rpm, 30°C). 배양 24시간 간격으로 IAA와 IBA를 측정하였는데, 배양액에서 1 ml를 취한 다음 원심분리하고(3,000×g, 20 min), 상등액 0.5 ml과 Salkowski 용액(H₂SO₄ 150 ml, H₂O 250 ml, 1.5 M FeCl₃·6H₂O 7.5 ml) 2 ml를 혼합하여 상온에서 30분간 반응시킨 다음 Infinite[®] 200 PRO multimode reader (Tecan, Austria)를 이용하여 IAA는 530 nm, IBA는 450 nm에서 흡광도를 측정하였고, 표준 IAA와 IBA를 사용하여 얻은 표준곡선을 이용하여 정량하였다. 균주의 단백질량을 측정하기 위해 위 실험의 원심분리 후 남은 침전물에 1 ml의 증류수를 혼합한 뒤 그 중 0.1 ml를 Bradford reagent 1 ml과 30분간 반응시킨 후 595 nm에서 흡광도를 측정하였고, bovine serum albumin을 사용하여 얻은 표준곡선을 이용하여 정량하여 IAA와 IBA의 생성량을 단백질 대비 값으로 나타내었다.

균주의 토마토 생장촉진 실험

분리균주 *P. otitidis* TK1과 *B. cereus* TK2의 항진균능과 식물 생장 촉진능을 확인하기 위해 토마토(*Lycopersicon esculentum*)를 대상으로 재배실험을 실시하였다. 2 mm 체로 친 토양을 121°C에서 15분간 멸균한 후 60°C oven에서 24시간 건조시켜 크기가 동일한 pot에 200 g씩 균일하게 담았다. 95% ethanol에서 1분, 0.85% sodium hypochlorite에서 10분간 소독하고 멸균 증류수로 2-3회 세척한 토마토 종자[‘제우스42’, 세미니스코리아 (주)]를 plant growth chamber [12시간은 광조건(30°C, 3500 lux), 12시간은 암조건(25°C)]에서 3-4일간 발아시켰다. 발아된 유묘를 각 pot에 5개씩 이식하고 30 g의 토양으로 복토하였다. 실험군에 사용할 근권 세균은 NB 배지에 72시간 동안 배양한(30°C, 150 rpm) 후, 원심분리(3,000×g, 30 min)하여 0.1 M MgSO₄ 완충액으로 두 번 세척하고, 현미경과 hemocytometer로 계수하여 배양액의 균주 개체수가 1×10⁷ CFU/ml이 되도록 보정하여 7일 간격으로 20 ml씩 각 pot에 접종하였다. 항진균능을 확인하기 위해 PDA 배지에서 자란 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*를 1×1 cm 크기로 PDB 배지에 접종하여 7일간 배양한(30°C, 130 rpm) 후 homogenizer로 마쇄하고 원심분리(3,000×g, 30 min)하여 상등액을 제거하고 20% (wet w/v)의 균질화된 균사체 접종물을 준비하였다.

토마토 유묘는 triplicate의 미접종 대조군과 균주 접종 실험군으로 준비해서 plant growth chamber [30°C, 12시간 주기의 광조건(3500 lux)과 암조건(25°C)]에서 8주간 배양하였다. 매일 증류수 20 ml를 pot 받침대에 주어 토양에 의해 흡수되도록 하였고, 5 ml를 표층 토양에 직접 처리하였다. 실험 종료 후 토마토 줄기의 길이와 뿌리의 길이 그리고 습윤중량을 측정하였다.

통계 처리

실험에서 얻은 결과의 유의성을 확인하기 위하여 Analysis of Variance (ANOVA, SPSS ver. 12.0K)를 이용하여 통계처리하여 결과의 유의성 여부를 표시하였으며, 사후분석은 Bonferroni

test를 수행하였다.

결 과

균주의 분리동정

붉은서나물 근권토양에서 분리된 균주 TK1과 TK2, 개망초 근권토양에서 분리된 균주 Rh2와 Rh7, 지참개 뿌리 안에서 분리된 균주 EnA9와 옥수수 근권 토양에서 분리된 RhAn18와 RhAn32 균주를 16S rRNA 유전자 염기서열을 이용하여 동정한 결과 TK1은 *Pseudomonas otitidis*와 99.708%, TK2는 *Bacillus cereus*와 99.735%, EnA9는 *Brevibacterium frigiditolerans*와 99.867%, Rh2와 Rh7는 *Pseudomonas koreensis*와 각각 97.521%와 99.519%, RhAn18은 *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*과 99.658%, RhAn32는 *Paenibacillus peoriae*와 99.663%의 상동성을 나타내었다.

분리균주 7개를 대상으로 PDA 배지에서 식물병원성 진균 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *F. oxysporum* f. sp. *niveum*, *F. oxysporum* f. sp. *raphani*, *Colletotrichum gloeosporioides*와 *Rhizoctonia solani*의 생장 억제력을 조사하였다. *P. otitidis* TK1은 *R. solani*를 제외한 4개 진균의 생장을 억제하였고 *B. cereus* TK2는 *F. oxysporum* f. sp. *raphani*를 제외한 4개 진균의 생장을 저해하였다. *B. frigiditolerans* EnA9는 *F. oxysporum* f. sp. *niveum*의 생장만을 억제하였으며, *P. koreensis* Rh2와 Rh7은 *F. oxysporum* f. sp. *niveum*와 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*의 생장을 저해하였다. *B. inaquosorum* RhAn18은 *F. oxysporum* f. sp. *niveum*과 *R. solani*를 제외한 3개의 진균의 생장을 억제하였으며, *P. peoriae* RhAn32는 5개의 진균을 모두 저해하였다.

항진균성 물질 생성능 조사

CAS agar plate assay를 통해서 siderophore의 생성을 정성적으로 탐색한 결과 활성을 나타낸 7개 균주를 대상으로 siderophore 생성능을 조사한 결과 배양 4일째에 *P. otitidis* TK1과 *B. cereus* TK2가 각각 3.21 mM/ml과 2.35 mM/ml로 높은 생성능을 나타내었다(Fig. 1). HCN 생성의 정성분석 결과 *P. koreensis* Rh2와 Rh7 균주만이 HCN을 생성하는 것으로 나타났으며 이를 다시 정량분석한 결과 두 균주가 각각 0.46 mg/ml와 0.40 mg/ml의 HCN을 생성하였다. 분리균주를 chitin-peptone 평판배지에 배양한 결과 *B. cereus* TK2, *B. frigiditolerans* EnA9와 *P. peoriae* RhAn32가 집락을 형성하여 chitin을 이용하는 것으로 나타났다. 이 균주들의 chitinase 활성을 측정할 결과 *B. cereus* TK2에서는 활성이 나타나지 않았으며 *B. frigiditolerans* EnA9와 *P. peoriae* RhAn32는 각각 1558.9 μM glucose/min/mg protein와 1436.7 μM glucose/min/mg protein의 활성을 나타내었다.

분리균주의 항진균능

식물병원성 진균의 생장 저해능과 항진균성 물질 생성능이 우수한 균주 TK1과 RhAn32를 선발하여 PDB 배지에 식물병원성 진균과 동시에 접종하여 진균의 생장저해를 조사한 결과 *P. otitidis* TK1과 *P. peoriae* RhAn32는 *F. oxysporum* f. sp. *niveum*의 건

조중량을 대조군에 비해 각각 49.8%와 45.6%를 감소시켰고 통계분석 결과 유의성이 있었다(Fig. 2). 또한 *P. otitidis* TK1과 *P. peoriae* RhAn32는 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*의 건조중량을 대조군에 비해 각각 45.1%와 48.3%를 감소시켰고 통계분석 결과 유의성의 경계수치였다(Fig. 3). *P. peoriae* RhAn32도 *F. oxysporum* f. sp. *raphani*의 건조중량을 대조군에 비해 37.5% 감소시켰으며 통계적 유의성이 있었다($P < 0.05$).

IAA와 IBA 생성 측정

항진균능이 확인된 균주에서 IAA와 IBA 생성을 측정한 결과 배양 2일째에 *P. otitidis* TK1 균주에서 293.4 $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein으로 가장 높은 IAA 생성을 나타내었고 *B. inaquosorum* RhAn18 균주가 78.0 $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein으로 두 번째로 높은 IAA를 생성하였다(Fig. 4). 또한 *P. otitidis* TK1 균주는 1일째에 418.5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein로 가장 높은 IBA 생성을 나타내었고 Rh7 균주는 3일째에 230.6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein로 두 번째로 높은 IBA를 생성하였다.

균주의 토마토 성장촉진

P. otitidis TK1과 *B. cereus* TK2의 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*에 대한 항진균능을 확인하기 위해 4주 자란 토마토 유묘를 대상으로 진균을 접종하여 8주간 소규모 pot 실험을 수행한 결과 *P. otitidis* TK1과 *B. cereus* TK2를 접종한 포트에서 자란 토마토의 줄기 길이는 진균 처리 비접종 대조군(8.1 cm)에 비해 각각 45.7% (11.9 cm)와 55.3% (12.6 cm) 증가하였고, 뿌리 길이는 진균 처리 대조군(7.4 cm)에 비해 각각 64.9% (12.2 cm)와 60.8% (11.9 cm) 증가하였다(Fig. 5). 습윤 중량은 진균 처리 대조군(0.1 mg)에 비해 각각 118% (0.2 mg)와 182% (0.3

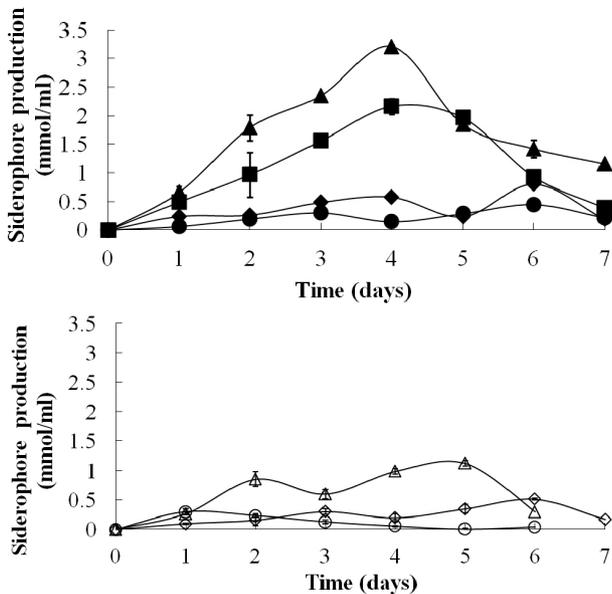


Fig. 1. Siderophore production by isolates *P. otitidis* TK1 (▲), *B. cereus* TK2 (■), *P. koreensis* Rh2 (●), *P. koreensis* Rh7 (◆), *B. frigiditolerans* EnA9 (◇), *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* RhAn18 (△), and *Paenibacillus peoriae* RhAn32 (○) in King's B medium.

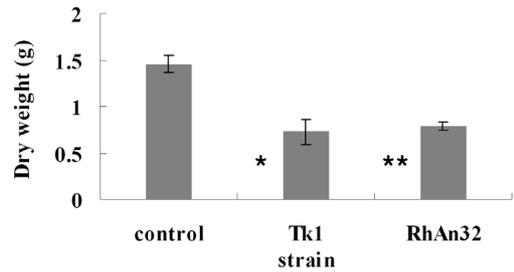


Fig. 2. Growth inhibition of *F. oxysporum* f. sp. *niveum* by coinubation with 1×10^7 cells/ml of *P. otitidis* TK1 and *P. peoriae* RhAn32 for 7 days in potato dextrose broth medium (**: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$).

mg) 증가하였다. ANOVA를 수행한 결과 이 수치는 모두 통계적으로 유의한 결과였다($p < 0.05$).

고찰

생물학적 방제법에 이용되는 미생물은 근권, 근면, 그리고 엽권에서 독립생활을 하거나 공생을 하며 식물에게 유용한 물질을 분비하는 미생물로 정의하고 있는데, 식물생장촉진 호르몬을 분비하거나 식물병원성 진균과 세균에 대해 해로운 대사물질을 생산하여 성장을 저해하여 식물에게 좋은 효과를 나타낸다(Bashan and de-Bashan, 2005; Niranjana *et al.*, 2005). 본 연구에서는 항진균능을 발휘하는 근권세균을 분리하여 환경친화적인 미생물제로 사용할 수 있는지에 대해 조사하였다. 분리균주 중 5가지 주요 식물병원성 진균에 대한 생장 저해가 우수한 7개 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석한 결과 모든 균주에서 기존에 보고된 표준 균주들과의 상동성이 97% 이상 나타났는데, 종 수준까지 정확하게 분류하기 위해서는 DNA-DNA hybridization을 수행할 필요가 있다.

PDA 한천배지에서 5가지의 식물병원성 진균에 대한 생장 저해는 균주에 따라 약간씩 달랐으며 *P. peoriae* RhAn32, *P. otitidis* TK1과 *B. cereus* TK2가 가장 넓은 저해범위를 나타내었다. 이들의 항진균성 물질 생성능을 조사하였는데 siderophore 생성능은 *P. otitidis* TK1 (Fig. 1)이 *Pseudomonas* spp.의 100–230 μM (Alexander and Zuberer, 1991)이나 *Bacillus* sp. RFO41의 약 40 $\mu\text{M}/\text{ml}$ (Lee and Song, 2008) 보다도 월등히 높

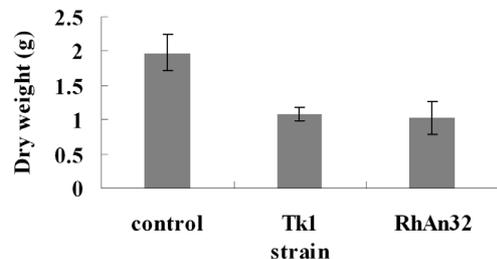


Fig. 3. Growth inhibition of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* by coinubation with 1×10^7 cells/ml of *P. otitidis* TK1 and *P. peoriae* RhAn32 for 7 days in potato dextrose broth medium.

은 결과이다. Siderophore의 생성량은 철의 농도에 관련되어 있으므로(Ams et al., 2002) 기존의 배지에 더 많은 철을 첨가한다면 7개의 균주 모두 siderophore의 생성량이 증가될 것으로 예상된다. 미생물에서 생성된 siderophore가 진균의 철 이용을 억제하여 성장을 저해시키는 동시에 식물에 철을 공급하여 식물생장을 촉진시킬 수 있기 때문에(Niranjan et al., 2005) 높은 siderophore 생성능을 보이는 균주와 철을 같이 첨가한다면 식물생장에 더욱 좋은 결과가 기대된다. HCN은 *P. koreensis* Rh2와 Rh7 균주만이 생성하였는데 이들의 생성능은 *Alcaligenes latus*의 약 5 µg/ml보다 크게 높은 수치인데(Kanchana Devi et al., 2007) 5 µg/ml의 농도만으로도 농작물 해충을 거의 100% 죽일 수 있으므로 *P. koreensis* Rh2와 Rh7을 고밀도 배양 등에 의한 HCN 농축을 통해 토양내의 선충류 등으로 인한 농작물의 피해가 많은 곳에 사용한다면 좋은 효과를 얻을 것으로 기대된다. 하지만 시험관내에서보다 토양은 복잡한 요소들이 많기 때문에(Kremer and Souissu, 2001) HCN의 생성에 영향을 미치는 요소들에 대해서도 추가적인 연구가 필요하다. Chitin과 β-glucan은 진균 세포벽의 주요 성분이기 때문에 chitinase와 1,3-β-glucanase가 식물병원성 진균에 대한 방어 역할을 할 수 있다(Mauch et al., 1988). 본 연구에서 *B. frigiditolerans* EnA9와 *P. peoriae* RhAn32의 chitinase 활성은 *Pseudomonas fluorescens* MDU8 (Nagarajkumar et al., 2004)와 *Bacillus* sp. PS2 (Lee and Song, 2008)의 약 80 µmol/min/mg protein의 glucose 생성량보다 18배에서 20배 정도로 월등히 높은 수치를 보였다.

분리균주들 중 식물병원성 진균의 성장 저해능과 항진균성 물질 생성능이 우수한 균주 *P. otitidis* TK1과 *P. peoriae*

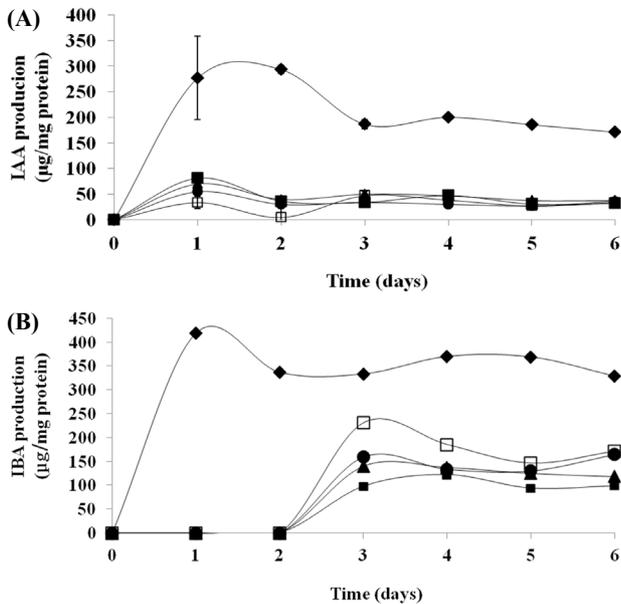


Fig. 4. IAA (A) and IBA (B) production by *P. otitidis* TK1 (◆), *B. cereus* TK2 (▲), *B. frigiditolerans* EnA9 (●), *P. koreensis* Rh2 (□), *P. koreensis* Rh7 (◇) and *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* RhAn18 (○) in nutrient broth medium.

RhAn32의 항진균능을 진균과의 공동배양을 통해 정량분석한 결과 세 종류의 *Fusarium oxysporum*의 성장을 유의성 있게 저해하였으며(Figs. 2 and 3), *Rhizoctonia solani*와 *Colletotrichum gloeosporioides*도 대조군에 비해 성장을 뚜렷하게 억제시켰지만 통계분석 결과 유의성 있는 수치를 얻지 못했는데, 만약 이들도 replicate의 수를 증가시키면 유의성 있는 결과를 얻을 수 있을 것으로 예상된다. *P. otitidis* TK1과 *P. peoriae* RhAn32는 *Bacillus* sp. RFO41이 *F. oxysporum*의 성장을 45.8% 저해시킨 수치보다 약간 높거나 유사하였다(Lee and Song, 2008). *Promicromonospora* sp. KH-28이 *F. oxysporum*과 *Phytophthora capsici*의 성장을 각각 74%와 50% 저해시켰다는 보고가 있지만(Han et al., 1999) 이는 20배로 농축된 chitinase를 접종한 결과이다. *P. otitidis* TK1은 특히 높은 siderophore의 생성능으로 식물병원성 진균의 성장을 뚜렷하게 억제시킨 것으로 추정되며(Fig. 1), *P. peoriae* RhAn32는 siderophore 뿐만 아니라 chitinase의 높은 활성 때문인 것으로 추정된다(Fig. 1). 한편 다른 항진균성 물질인 β-1,3-glucanase, cellulase나 phenazine 등에 대해서도 추가적인 연구가 필요하다.

P. otitidis TK1은 7개 균주 중 식물생장을 조절하는 호르몬인

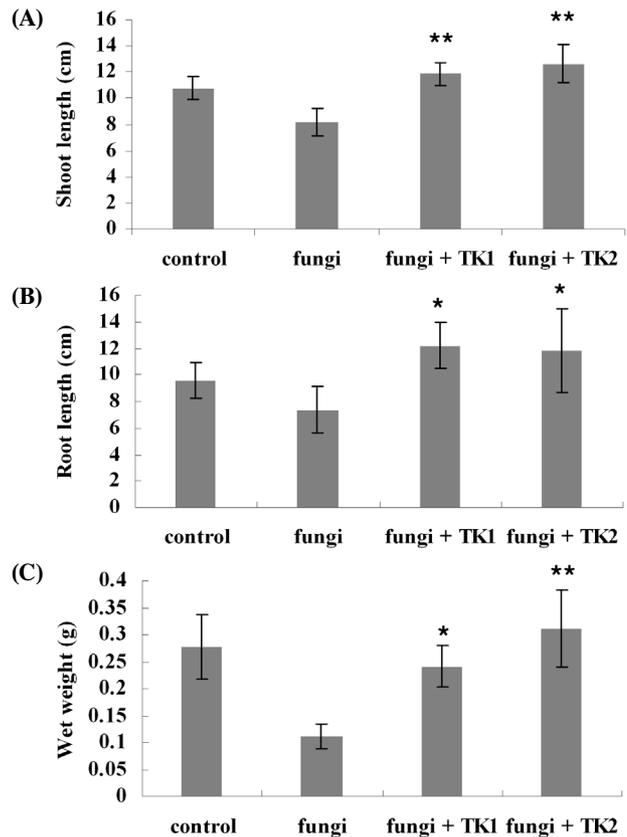


Fig. 5. Shoot length (A), root length (B) and wet weight (C) of the tomato plants grown for 8 weeks after inoculation of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (fungi) together with *P. otitidis* TK1 (fungi+TK1) or *B. cereus* TK2 (fungi+TK2). Control was not inoculated either fungi or bacteria. The asterisk (*), (***) means statistically significant difference ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively).

IAA와 IBA의 생성능이 가장 높았다(Fig. 4). *Rhodopseudomonas* KL9의 IAA 생성능보다는 약간 낮았지만(Koh and Song, 2007) *P. oitidis* TK1은 항진균성을 갖고 있기 때문에 식물병원성 진균의 피해를 막는다는 장점이 있다. 균주들에 의한 항진균성과 식물생장촉진을 실제 식물에서 확인하기 위해 토마토 병원체인 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*를 접종한 토마토 유묘에 *P. oitidis* TK1과 *B. cereus* TK2를 접종하여 소규모 재배실험을 수행한 결과 줄기 길이와 뿌리 길이, 습윤중량 모두 진균 처리 비접종 대조군에 비해 접종한 실험군에서 유의성 있게 증가하였다(Fig. 5). 특히 균주 접종 시 토마토 유묘의 줄기와 뿌리 길이는 진균을 처리하지 않은 대조군에 비해서도 증가하였는데 이 균주들은 식물병원성 진균을 억제하는 동시에 식물생장촉진능도 우수한 것으로 나타났다.

본 연구 결과 *P. oitidis* TK1등은 유기합성농약을 대체하면서 식물생장을 촉진하는 미생물체로서의 적용이 가능할 것으로 기대된다. 그러나 본 연구에서 측정된 항진균성 물질 이외의 다른 항진균성 물질의 생성도 측정할 필요가 있으며, 실제 재배 규모에서의 항진균능을 확인하기 위한 장기적 포장실험 등이 추가적으로 진행되어야 할 것이다.

적요

여러 식물의 근권에서 세균 균주들을 분리하여 이들의 항진균성 물질 생성능을 조사하였다. 분리균주 중 *Fusarium oxysporum*을 포함한 5가지 주요 식물병원성 진균에 대한 생장 저해가 우수한 7개 균주를 16S rRNA 유전자 염기서열로 동정하였다. 이들 중 *Paenibacillus peoriae* RhAn32, *Pseudomonas oitidis* TK1과 *Bacillus cereus* TK2가 가장 넓은 생장 저해범위를 나타내었으며 항진균성 물질 중 siderophore 생성능은 *P. oitidis* TK1이 3.21 mM/ml로 가장 높았고 HCN은 *Pseudomonas koreensis* Rh2와 Rh7 균주만이 생성하였으며 *Brevibacterium frigiditolerans* EnA9와 *P. peoriae* RhAn32는 각각 1558.9와 1436.7 μ M glucose/min/mg protein의 높은 chitinase 활성을 나타내었다. *P. oitidis* TK1과 *P. peoriae* RhAn32의 항진균능을 진균과의 공동배양을 통해 정량분석한 결과 세 종류의 *Fusarium oxysporum*의 생장을 유의성 있게 저해하였다. *P. oitidis* TK1은 식물생장을 촉진하는 호르몬인 auxin의 생성능도 가장 높았는데 이 균주를 4주 자란 토마토 유묘에 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*와 동시에 접종하여 8주간 재배하였을 때 줄기와 뿌리 길이 및 습윤 중량이 비접종 대조군에 비해 각각 45.7, 64.9와 118%로 유의성 있게 증가하였다. 따라서 이 균주들은 유기합성농약을 대체하면서 식물생장을 촉진하는 미생물체로서의 적용이 가능할 것으로 기대된다.

감사의 말

본 연구는 환경부 Eco-STAR Project의 수생태복원사업 지원으로 수행되었습니다.

참고문헌

- Alexander, D.B. and Zuberer, D.A. 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biol. Fertil. Soils* 12, 39-45.
- Ams, D.A., Maurice, P.A., Hersman, L.E., and Forsythe, J.F. 2002. Siderophore production by an aerobic *Pseudomonas mendocina* bacterium in the presence of kaolinite. *Chem. Geol.* 188, 161-170.
- Bashan, Y. and de-Bashan, L.E. 2005. Plant growth promoting, pp. 103-115. In Hillel, D. (ed.), *Encyclopedia of soils in the environment*. Elsevier, Oxford, UK.
- Han, K., Lee, C., and Kim, S. 1999. Antagonistic role of chitinase and antibiotic produced by *Promocromonospora* sp. KH-28 toward *F. oxysporum*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27, 349-353.
- Kanchana Devi, K., Seth, N., Kothamasi, S., and Kothamasi, D. 2007. Hydrogen cyanide producing rhizobacteria kill subterranean termite *Odontotermes obesus* (Rambur) by cyanide poisoning under *in vitro* conditions. *Curr. Microbiol.* 54, 74-78.
- Kende, H. and Zeevaart, J. 1997. The five "Classical" plant hormones. *Plant Cell* 9, 1197-1210.
- Kim, S., Choe, W., Baik, Y., and Kim, W. 2008. Monitoring of pesticide residues and risk assessment of agricultural products consumed in south Korea. *Kor. J. Soc. Food Sci. Nutr.* 37, 1515-1522.
- Koh, R.-H. and Song, H.-G. 2007. Effects of application of *Rhodopseudomonas* sp. on seed germination and growth of tomato under axenic conditions. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17, 1805-1810.
- Kremer, R.J. and Souissi, T. 2001. Cyanide production by rhizobacteria and potential for suppression of weed seedling growth. *Curr. Microbiol.* 43, 182-186.
- Lee, K.-H. and Song, H.-G. 2008. Production of antifungal materials by *Bacillus* sp. which inhibit growth of *Phytophthora infestans* and *Fusarium oxysporum*. *Kor. J. Microbiol.* 44, 258-263.
- Mauch, F., Hadwiger, L.A., and Boller, T. 1988. Antifungal hydrolases in pea tissue: II. Inhibition of fungal growth by combination of chitinase and β -1,3-glucanase. *Plant Physiol.* 88, 936-942.
- Meena, B., Marimuthu, T., Vidhyasekaran, P., and Velazhahan, R. 2001. Biological control of root rot of groundnut with antagonistic *Pseudomonas fluorescens* strains. *Z. Pflanzenk. Pflanzen.* 108, 369-381.
- Nagarajkumar, M., Bhaskaran, R., and Velazhahan, R. 2004. Involvement of secondary metabolites and extracellular lytic enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* in inhibition of *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen. *Microbiol. Res.* 159, 73-81.
- Niranjana, S.R., Shetty, H.S., and Reddy, M.S. 2005. Plant growth promoting rhizobacteria: Potential green alternative for plant productivity, pp. 197-216. In Siddiqui, Z.A. (eds.), *PGPR: Biological and biofertilization*. Springer, Dordrecht, Netherlands.
- Ordentlich, A., Elad, Y., and Chet, I. 1988. The role of chitinase of *Serratia marcescens* in biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathol.* 78, 84-88.
- Roco, E., Kosegarten, H., Harizaj, F., Imani, J., and Mengel, K. 2003. The importance of soil microbial activity for the supply of iron to sorghum and rape. *Eur. J. Agro.* 19, 487-493.
- Schwyn, B. and Neilands, J.B. 1987. Universal CAS assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* 160, 47-60.
- Voisard, C., Keel, C., Haas, D., and Defago, G. 1989. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. *Embo. J.* 8, 351-358.