

최      중  
연구보고서

꽃마름병 방제제의 개발

Development of biocontrol agent for the  
management of bacterial wilt.

연구기관

서경대학교

농   립   부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “꽃마름병 방제제의 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005년 10월 14일

주관연구기관명 : 서 경 대 학 교

총괄연구책임자 : 김 신 덕

연 구 원 : 조 홍 범

연 구 원 : 성 필 제

연 구 원 : 고 영 진

연 구 원 : 권 재 원

연 구 원 : 김 지 태

협동연구기관명 : 한국바이오케미칼

협동연구책임자 : 신 정 균

# 요 약 문

## I. 제 목

꽃마름병 방제제의 개발

## II. 연구 개발의 목적 및 필요성

농업생산성의 향상과 에너지 절약형 재배기술의 개발이 시급히 요구되고 있는 가운데 작물보호의 측면에서 이용되는 농약류의 사용이 날로 증가하고 있는 실정이다. 현재 국내에서 유통되고 있는 농약의 대부분은 외국으로부터 원자재 수입에 의하여 생산되는 유기합성 농약이다. 유기합성 농약은 약효가 우수하고, 값이 저렴하며, 오랫동안 보관 저장이 가능하나 그동안 무차별한 남용으로 인해 지하수 및 토양오염, 농산물 중의 잔류독성 그리고 생태계에 영향을 끼치는 환경파괴 문제가 심각할 뿐 아니라, 약효에 대한 저항성 병원균의 출현 등으로 인해 농약으로서의 가치가 감소하는 반면에 새로운 무독성 및 저 독성 농약개발의 필요성이 전 세계적으로 급격히 증가하는 추세이다. 저 독성, 무공해의 새로운 농약활성을 가진 생물농약 시장은 매년 증가하고 있으나, 물질특허의 도입 및 선진각국의 보호주의 장벽으로 기술이전이 엄격히 제한되고 있으므로 국내 기술에 의한 생물농약에 대한 자체개발 요구가 증폭되고 있다. 따라서 생물학적 방제제의 개발은 전량 수입되고 있는 유기합성 농약의 수입대체 효과와 더 나아가서는 경제적으로 많은 외화획득의 기회를 제공할 수 있을 수 있을 것이다.

꽃마름병균 *Ralstonia solanacearum*은 감자, 토마토, 고추, 담배, 바나나 등 200여종의 작물에 꽃마름병(청고병, bacterial wilt)을 유발시켜 막대한 경제적 손실을 초래하는 식물 병원균으로 고온 다습한 상태에서 발병이 잘 이루어져 주로 열대와 아열대의 따뜻한 지역을 중심으로 피해가 속출하였으나, 근래에는 온

대기후 지역에서도 자주 발병되어 그 피해가 점점 심각해지고 있다. 우리나라의 경우는 불과 5~6년 전까지만 해도 크게 문제되지 않았으나 최근 기온의 상승 등 여러 원인에 의해 발생이 빈번해져 피해가 막대해졌다. 풋마름병균은 기주식물 없이도 토양이나 물속에서 5년 까지 생존이 가능하기 때문에 경종적 방제법만으로는 방제가 어려운 실정이다. 유기합성 농약은 약효가 우수하고, 값이 저렴하며, 오랫동안 보관이 가능하다는 장점이 있지만 풋마름병균과 같은 토양 병원균에 대한 방제에 유기합성농약의 경엽 살포는 거의 효과가 없을 뿐만 아니라 토양 및 지하수 오염 등 환경오염을 유발시키므로 저 독성의 환경 친화적인 생물학적 방제제의 개발이 시급한 실정이다.

환경오염과 독성문제가 크게 부각되면서 화학농약의 대안으로 생물학적 방제제로서의 미생물 사용에 대한 관심이 높아지고 있으나 미생물 제제의 경우 활성스펙트럼이 좁고, 포장에서의 효과가 환경요인에 따라 변이가 심할 뿐만 아니라, shelf life 즉 저장 시 충분한 생균밀도가 유지되는 기간이 짧다는 문제점이 상업적 이용에 걸림돌로 작용하고 있다. 특히 단일 병원균에 대한 단일 길항미생물 제제를 사용하면 이 미생물이 모든 토양 조건에서 그리고 병원균의 모든 race에 대해 활성을 나타내기가 힘들므로 재현성 있는 결과를 기대하기가 어려운 것이 사실이다. 따라서 변이가 특히 심한 풋마름병균 *Ralstonia solanacearum*의 효과적 방제를 위한 전략으로 높은 밀도의 단일 미생물 제제보다 발병억제 기작과 뿌리 근착을 위한 최적조건(온도, pH, 습도 등)이 서로 다르면서 서로에 대해 친화적인 미생물들의 복합제의 개발이 필요하다

길항 미생물을 이용한 토양 병원균 방제를 위하여 전 세계적으로 다양한 길항균을 선발하고 이용하기 위한 노력을 경주하여 왔으나, 그 효과는 작물별, 지역별, 그리고 병원균에 따라 효과가 상이하게 나타나는 문제점이 있다. 이를 보다 효과적으로 해결하기 위하여 우리나라에서 재배되는 고추와 토마토에 발병하는 풋마름병균에 대한 길항효과가 뛰어난 토착 길항 미생물을 이용한 방제제의 개발은 풋마름병 방제의 효과를 증대시키고 이로 인한 고부가가치의 무공해 작물 생산으로 농가 수입 향상에 이바지 할 것이다.

본 연구 개발의 목적은 1) 풋마름병균에 대해 길항 효과가 뛰어난 토양

미생물을 mode of action - based screening을 통해 선발하고, 선발 균주에 대해 *in vivo* 상에서 발병 억제 효과를 검증하여 우수 균주에 대한 대량배양 조건의 확립을 통해 실용화를 위한 제제화 공정을 개발한다. 2) 형태적, 생리적 특성에 있어서 다양한 변이를 나타내는 풋마름병균을 보다 효과적으로 방제하기 위해서 단일 미생물제제와 더불어 서로 다른 작용기작을 갖는 선발균주들의 복합제제를 개발한다. 3) 최종적으로 풋마름병 방제 효과를 나타내는 복합 미생물 생균제제에 초기 방제의 효과를 증진시키기 위한 생리활성물질과 함께 식물 성장 촉진제가 함유된 환경 친화적인 복합미생물 제제를 개발하는 것이다.

### III. 연구 개발 내용 및 범위

본 연구는 고추와 토마토 등 가지과 작물에 빈번하게 발생하여 큰 피해를 입히는 풋마름병을 효과적으로 방제하기 위한 미생물제제를 개발하려는 연구이며 다음과 같이 연구를 수행하였다.

#### 1절 풋마름병균에 대한 길항 미생물의 분리, 동정 및 작용기작 연구

풋마름병 방제제 개발을 위해서 여러지역에서 채취한 토양에서 분리한 토양 미생물과 고추와 토마토의 뿌리에서 분리한 rhizobacteria를 대상으로 antibiotics 생산, siderophore 생산, 식물 뿌리 성장 촉진과 뛰어난 근착 능력, 그리고 식물 성장 호르몬 분비 등의 작용기작에 입각한 screening을 통해 활성 균주를 1차로 선발한 후 2차로 *in vivo* pot assay를 통하여 풋마름병 발병 억제 효과를 나타내는 우수 활성 균주를 선발하고 선발 균주에 대해 antimicrobial spectra를 조사하였으며, 16S rDNA sequence에 의해 균주동정을 실시하였다.

## 2절 토양 미생물이 생산하는 풋마름병균 저해 활성 물질의 분리 및 정제

생물농약 개발을 위한 신규 선도물질을 확보하기 위하여, 신규성이 높다고 판단되는, 저해 활성물질이 대해서는 분리, 정제 및 신규성 여부를 확인하였으며, 미생물 복합제제에 초기 방제 효과 증진을 목적으로 첨가하는 생리활성물질 생산 균주의 경우에는 생리활성 물질의 부분적인 정제와 특성조사, 다른 구성 활성 균주에 대한 antibiosis 여부 등의 기초조사를 거친 상태에서 그대로 사용하는 것이 경제적이다. 따라서 crude extract 상태로 다른 기작의 생균과 혼합 사용할 균주의 활성물질에 대해서는 부분적인 추출 정제 및 특성 조사를 실시하였다.

## 3절 길항 세균 SKU-78에 의한 풋마름병 방제 및 제제화 연구

토마토와 고추의 근권토양에서 분리한 미생물을 대상으로 뿌리의 생장 촉진 효과가 크고 뿌리에 colonization이 수월한 균주를 선발하여 pot 실험에서 종자 coating 처리와 토양 관주 처리 모두에서 강한 풋마름병 발병 억제 효과를 보이는 SKU-78 균주를 실용화 대상 균주로 선발하고 농가 포장에서의 방제효과를 확인하였으며, 생화학적 특성조사와 16S rDNA sequence 분석에 의해 *Bacillus sp.* SKU-78 균주로 동정하였다.

## 4절 Fluorescent siderophore 생산균주, TS3-7에 의한 풋마름병 발병 억제

토마토와 고추의 근권 토양에서 분리한 균주 중에서 식물 뿌리에 colonization이 잘되며 siderophore를 생산하는 균주로 선발된 활성균주들에 대해 *in vivo* pot 실험을 실시하여 가장 강한 풋마름병 발병억제 활성을 보인 균주

TS3-7을 선발하였다. TS3-7 균주는 fluorescent siderophore를 생산하는 균주로 in vitro plate에서는 전혀 항균 활성을 나타내지 않았으나, 종자와 토양처리 모두에서 강한 발병 억제효과를 나타냈으며 특히 고추의 경우에 더 큰 방제효과를 나타내었다.

16S rDNA 염기서열 분석과 배양 및 생화학적 특성에 의거하여 TS3-7 균주에 대해 동정을 실시하였으며 생균 안정성 제고를 위한 최적의 carrier를 선정하고 carrier 내 시간에 따른 생균밀도를 측정하였으며, 실용화 가능성을 타진하였다.

## 5절 풋마름병 방제용 복합 미생물 제제의 제조와 포장 효과 검증

미생물 제제가 갖는 활성스펙트럼이 좁고, 포장에서의 효과가 환경요인에 따라 변이가 심할 뿐만 아니라, shelf life 즉 저장 시 충분한 생균밀도가 유지되는 기간이 짧다는 문제점을 해결하기 위한 방안으로 여러 미생물의 복합제제 개발을 시도하였다. 변이가 특히 심한 풋마름병균 *Ralstonia solanacearum*의 효과적 방제를 위해서는 높은 밀도의 단일 미생물 제제보다 발병억제 기작과 뿌리근착을 위한 최적조건(온도, pH, 습도 등)이 서로 다르면서 서로에 대해 친화적인 미생물들의 복합체를 구성하여 복합체들에 대한 풋마름병 방제효과를 온실에서의 pot assay와 농가 대형 비닐하우스 포장에서 확인하였으며, 생균의 밀도 유지를 위한 제제화 연구가 이루어졌다.

## 6. 선발균주의 실용화를 위한 대량 배양 기술 확립 및 제제화

길항미생물을 이용한 생물 방제제의 실용화를 위한 대량 배양기술을 확립하였다. root colonization이 아주 잘 되고 뿌리 성장을 촉진시키며 in vivo pot 실험과 농가 포장 실험에서 탁월한 방제 효과를 보인 SKU-78 균주에 대한 대량배양 조건을 확립하고 실용화를 위한 제제화를 시도하였다

## IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

### - 연구개발 결과

## 1절 풋마름병균에 대한 길항 미생물의 분리, 동정 및 작용기작 연구

### 1. 활성균주의 1차 선별 : mode of action based screening

풋마름병 발병 억제 효과를 보이는 길항 미생물은 (1)항생물질 생산에 의한 antibiosis 기작, (2)siderophore를 생산함으로써 Fe ion competition을 유도하는 기작, (3)근권에서의 root colonization competition에 의한 기작, (4)식물 성장을 촉진시킴으로써 병원균 노출 시기 단축 등의 기작에 의하며, 균주에 따라서 한 가지, 또는 2가지 이상의 복합적 기작에 의해 발병이 억제될 수 있음이 밝혀졌다. (Bakker et.al. 2003) 따라서 본 연구에서는 mode of action based screening을 실시하여 보다 효율적으로 활성 균주를 선별하고 선별된 활성균주들을 작용기작 별로 분류하여 복합 미생물 제제 개발을 위한 기초 자료로 활용하였다.

#### 가. Antibiosis group

여러 토양에서 분리된 균주 중에서 *in vitro* plate assay에 의해 159종의 활성균주가 *Ralstonia solanacearum* 병원균에 대해 antibiosis를 나타냈으며 그 중에서 특히 활성이 강한 균주 TS1-2, TS1-3, A27-3, A47-2, A48-2, A100-1, A253-16, A254-10, A256-10, A256-11, A256-12, A256-18 등 총 18종 균주를 1차로 선별하였다.

#### 나. Siderophore 생산 group

수년간 풋마름병이 발생하지 않은 지역의 토마토와 고추의 근권에서 분리한 근권 미생물 298종 중에서 CAS agar plate를 이용한 chromogenic assay를 통하여 강력한 siderophore 생산 균주인 TS1-2, TS1-3, TS1-5, TS3-7, TS3-9,

TS5-8, TS6-4, TS6-8, TP1-1, TP1-2, TP1-8, TP2-5, TP3-1, TP3-4, TP5-4 등 15종의 균주를 1차 선발하였다. TS1-2, TS1-3 균주의 경우에는 항생물질도 생산하는 것으로 나타났다.

#### 다. Root colonization competition group

확보된 298종의 근권 미생물 중, TS1-5, TS1-7, TS3-7, TS4-3, TS6-4, SKU-7, SKU-65, SKU-78, SKU-132, SKU-134, SKU-155 등 11종 균주는 뿌리에 근착이 용이하였으며, 뿌리의 생장을 10 % 이상 촉진시켜 선발되었다.

#### 라. Plant growth hormone 생산 group

Salkowski's reagent를 이용한 발색반응을 통하여 옥신 생산 균주로 선발된 20종의 균주에 대해 shoot elongation 효과가 우수한 A361-5와 A354-6 을 최종 선발하고, *in vivo* pot assay를 통하여 선발 균주의 성장 촉진 효과를 확인하였다.

## 2. 작용기작에 의거 선발된 균주의 *in vivo* pot assay에 의한 2차 선발

생리활성물질 생산하는 균주 중 가장 강한 활성을 나타낸 균주 18 중, siderophore 생산 균주 15종과 뿌리 성장 촉진 효과와 뿌리에 집락형성이 용이한 11종 활성균주를 대상으로 *in vivo* pot assay를 실시하였다.

생리활성 물질 생산 균주로 A27-3, A47-2, A48-2, A100-1, A254-10, A253-16, A256-10, A256-11, TS1-2, TS1-3 등의 10균주, root colonization과 root elongation 효과를 보이는 균주로는 TS1-5, TS4-3, TS6-4, SKU-65, SKU-78, SKU-134 균주 6종, siderophore 생산 균주로는 TS1-2, TS1-3, TS1-5, TS3-7, TS3-9, TP1-2, TP2-5, TP3-4, TP5-4의 9개 균주들이 강한 활

성을 나타내 풋마름병 방제제 개발을 위한 후보 균주로 2차 선발되었다.

### 3. 선발균주의 antimicrobial spectrum 조사와 균주 동정

선발균주의 antimicrobial spectrum을 조사하였다. *Ralstonia solanacearum* 과 동시에 다른 식물 병원균에 대하여 항균 활성을 갖는 미생물에 의해 풋마름병뿐만 아니라 동시에 다른 식물병의 방제에도 효력이 있는 미생물 제제 개발을 시도하였다. 특히 풋마름병과 초기 증상이 비슷한 고추 역병균에 활성을 갖는 균주를 선발하여 초기용 방제제를 개발하고자 하였다. 우수 선발 균주의 16S rDNA sequence를 분석하여 동정한 결과 10 균주가 *Bacillus* 속에 속하였으며, 4균주가 *Glacial ice bacterium*, *Pseudomonas* 속이 2종 그리고 속명이 밝혀지지 않은 균주가 4종이었다

## 제2절 토양 미생물이 생산하는 풋마름병균 저해 활성 물질의 분리 및 정제

생물농약 개발을 위한 신규 선도물질의 확보와 동시에 생균-복합제제에 조추출물 형태의 혼합 목적으로 풋마름병균 *Ralstonia solanacearum* 에 대해 강한 저해 활성 물질을 생산하는 균주 A100-1, A27-3, A256-10, A256-11, A253-16, A47-2 균주가 생산하는 활성물질의 추출 정제 및 특성조사를 실시하였다.

### 1. A100-1이 생산하는 활성물질의 분리, 정제 및 특성 연구

풋마름병균을 강하게 저해하는 생리활성 물질을 생산균주 A100-1의 배양액에서 ethyl acetate extraction, silica gel chromatography, Sephadex LH-20 chromatography를 행한 후 최종적으로 HPLC를 실시하여 활성물질 40mg을 분리 정제하였다.

정제된 활성물질 A100-1는 methanol, butanol, acetone, ethyl acetate, chloroform등에는 잘 녹았으나, 물과 hexane에는 녹지 않았다. 발색 반응 시 Orcinol Ferric chloride 에는 양성반응이지만 ,4-dimethylaminobenzaldehyde, Aniline-diphenylamine, ninhydrin, Dragendorff's reagent, Antimony trichloride 에는 음성 이었다 활성물질은 UV  $\lambda_{max}$ 가 234, 272 와 284에 나타났으며, mass spectrum으로 확인된 분자량 1065인 물질이다.

*Ralstonia solanacearum* 외에 *Phytophthora parasitica*, *Phytophthora capsic*, *Botrytis cinerea*의 fungal pathogen에 대해 강한 항균력을 나타내었으며, 16S rDNA sequence 분석에 의해 *Bacillus amyloliquefaciens* strain으로 동정되었다.

## 2. A27-3이 생산하는 활성물질의 분리, 정제 및 특성 연구

활성물질은 A27-3 균주의 배양액으로부터 butanol extraction, silica gel chromatography, sephadex LH-20 chromatography를 거쳐 최종적으로 HPLC 를 이용하여 최종적으로 분리하였다.

정제된 A27-3 활성물질은 methanol, butanol, acetone, ethyl acetate 등에는 잘 녹았으나 chloroform, hexane에는 녹지 않았다. 4-dimethylaminobenzaldehyde-HCl, Orcinol ferric chloride, Ninhydrin에서 양성 반응을 보인 반면 Ferric chloride, aniline-diphenylamine, Dragendorff's reagent, antimony trichloride에는 음성 반응을 보였다. 풋마름병균과 *Escherichia coli* 와 fungal pathogen인 *Phytophthora parasitica*, *Phytophthora capsici*, *Penicillium* sp., *Rhizopus stonifer*, *Botrytis cinerea*에 대해 항균 활성을 보였다. 분리된 물질은 209nm, 274nm 에서  $\lambda_{max}$ 를 나타내었다 A27-3 균주는 *Bacillus subtilis* 균주로 동정되었다.

### 3. A47-2가 생산하는 활성물질의 분리, 정제 및 특성 연구

활성물질을 배양액으로부터 ethyl acetate extraction과 silica gel column chromatography를 용매계를 달리하며 반복 시행한 후 활성물질을 chloroform : methanol (1:1)을 전개용매로 하여, thin layer chromatography를 행한 결과 rf 0.8에 single band로 나타났다.

활성물질은 orcinol ferric chloride에 positive, aniline-diphenylamine, ninhydrine, Dragendorff's reagent등에는 negative로 반응하였다. antimicrobial spectrum 조사 결과 *Staphylococcus aureus*, *Phytophthora parasitica*, *Phytophthora capsici*에서 항균 활성을 나타냈으며, UV  $\lambda_{max}$ 가 210, 234, 272, 284nm에 나타났다. A47-2 균주는 *Arthrobacter* sp.로 동정되었다.

### 4. A256-10이 생산하는 활성물질의 분리 및 정제

A256-10균주가 생산하는 활성 물질은 배양 상등액을 감압 농축하여 HP-20 column에서 70 % acetone 용액으로 용출 시킨 후 chloroform 추출에 이어 hexane-methanol로 추출하여 methanol층을 silica gel chromatography, sephadex LH-20 chromatography, solid phase extraction을 거쳐 HPLC로 분리하였다.

활성물질은 methanol, acetone, ethyl acetate, chloroform에 녹고 hexane에는 녹지 않았다. ferric chloride, orcinol ferric chloride, aniline-diphenylamine, ninhydrin와 antimony trichloride에서 양성 반응을 나타내었으며, 4-dimethylaminobenzaldehyde-HCl과 Dragendorff's reagent에서 음성 반응을 나타내었다.

이 물질의 UV absorption spectrum은  $\lambda_{max}$  가 223.4nm과 275nm에서 나타났으며 0.1N NaOH첨가 시에  $\lambda_{max}$ 가 223.4nm에서 212.6nm로 blue shift 되었다. mass spectrometry 결과 순수하게 정제된 물질의 분자량이 920임을 알 수 있었으며, 16S rDNA sequence 분석으로 A256-10 균주는 *Bacillus* sp.로

동정되었다.

#### 5. A256-11이 생산하는 활성물질의 분리 및 정제

활성 물질의 분리는 배양 상등액을 butanol로 extraction 한 다음, HP-20 adsorption chromatography, silica gel chromatography와 sephadex LH-20 chromatography를 행한 다음 최종적으로 HPLC를 이용하여 분리하였다.

분리된 물질은 Ferric chloride, Ninhydrin에는 양성반응을 나타내고, 4-dimethylaminobenzaldehyde-HCl, Orcinol ferric chloride, Dragendorff's reagent 등에는 반응하지 않아 phenol과 amino 기를 가졌으나 alkaloid 계통의 물질이 아님을 알 수 있다.

#### 6. A253-16이 생산하는 활성물질의 분리 및 정제

활성물질 분리는 배양 상등액을 ethyl acetate 추출한 후 silica gel chromatography와 TLC로 분리한 활성 물질은 orcinol ferric chloride, antimony trichloride에 양성 반응하였으며, antimicrobial spectrum 결과 *Phytophthora parasitica*, *Phytophthora capsici*에 아주 강한 항균 활성을 나타내었다.

활성 band의 UV  $\lambda_{max}$ 는 204, 232, 270, 280에서 나타났다.

#### 7. A254-10이 생산하는 활성물질의 분리 및 정제

활성물질이 산과 열에는 안정하였으나 알칼리 조건에서는 불안정한 물질로 ethyl acetate extraction과 silica gel chromatography를 통해 분리하였으며, ferric chloride, orcinol ferric chloride, antimony trichloride에 양성으로 반응하였으며, UV spectrum을 조사한 결과 210, 234 nm에서  $\lambda_{max}$ 가 나타났다.

### 3절 풋마름병균의 길항 세균 SKU-78의 동정 및 특성 연구

#### 1. 길항 세균 SKU-78의 분리

TSA 평판 배지를 이용하여 고추와 토마토 근권에서 분리한 총 161 종의 미생물 중에서 대조구에 비해 10% 이상의 뿌리 생장 촉진 효과를 보이면서 뿌리 주위 agar에 뿌옇게 집락형성이 이루어지는 6개 균주에 대하여 종자처리와 토양 관주 처리를 병행한 포트실험을 실시하여 고추와 토마토 둘 다에 대해 풋마름병 방제효과가 가장 뛰어난 SKU-78 균주를 선발하였다.

#### 2. 길항 세균 SKU-78의 풋마름병 발병억제 효과

pot 실험에서 SKU-78 균주는 종자에 코팅처리 방법이나 토양에 관주처리 방법 모두에서 방제효과가 있었으나 토양처리 방법이 종자처리 방법 보다, 종자 또는 토양의 단독 처리보다는 종자처리와 토양처리를 병행한 경우에 방제효과가 높아 60% 이상의 발병 억제율을 나타내었다.

풋마름병이 크게 확산된 포장에 SKU-78 균주의 현탁액을 토양 처리하는 것에 의해 토양에서의 *R. solanacearum*의 밀도가 점차 감소하였고 풋마름병 증상의 시들음도 완전히 회복됨이 나타나 생물농약으로서의 개발 가능성을 확인하였다.

#### 3. SKU-78 균주의 특성.

SKU-78 균주는 *in vitro* plate 상에서는 풋마름병균에 대해 항균활성을 나타내지 않으나, *in vivo* test에서는 강한 풋마름병 억제 활성을 나타내므로 SKU-78 균주는 병원균에 직접 작용하는 것이 아니고 식물 뿌리에 근착되어 토

양성 병원균에 대한 식물에 저항성을 유발(induced systematic resistance)시킴으로 발병을 억제하는 것으로 판단된다.

고추의 경우 역병과 풋마름병의 발병 초기증상이 유사하여 진단이 불가능하여 초기 방제의 어려움이 있는데, SKU-78 균주는 *in vivo*에서 강한 풋마름병 발병 억제효과를 나타낼 뿐만 아니라 고추 역병균에 대해서는 강한 항균활성을 나타내므로 역병과 풋마름병 모두의 초기 방제제로 사용 가능할 뿐만 아니라 extracellular phytase 활성을 가져 불용성 인산을 가용화 시킬 수 있는 근권 미생물로 토양 내 가용성 인산 부족 시 식물생장을 촉진할 수 있는 미생물 인산 비료로서 농업 생산성을 높일 수 있는 균주이다

#### 4. SKU-78 선발균주의 동정.

SKU-78 균주는 Gram 양성의 간균이며, 열에 대해 강한 내성을 지닌 고온성 균으로 생화학적 특성에 의해 *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens* group으로 분류되었으며 또한 16S rDNA의 염기서열을 분석하고 Database를 이용하여 유사도를 조사한 결과 *Bacillus amyloliquefaciens*와 유사성을 보여 *Bacillus* sp. SKU-78로 명명하였다.

### 4절 Fluorescent siderophore 생산균주, TS3-7에 의한 풋마름병 발병 억제

#### 1. TS3-7 균주 선발 및 활성 검정

고추와 토마토의 근권 토양에서 분리한 287균주 중에서 뿌리 주위 agar에 뿌렇게 집락을 형성하고 대조구에 비해 10% 이상 뿌리의 성장을 촉진시키는 균주 15종에 대해 CAS를 사용한 정성적인 chromogenic assay를 실시하여

TS3-7, TS1-5 TS6-4, TS1-2, TS1-3의 다섯 균주가 CAS plate에서 orange halo zone을 형성하여 siderophore 생산균주로 확인되었다. 분리된 siderophore 생산 균주의 풋마름병 발병억제 효과를 검정하기 행한 포트실험에서 TS3-7 균주가 가장 강한 활성을 나타내었으며 종자처리와 토양처리를 병행한 경우 고추는 80%, 토마토의 경우는 65% 이상의 강한 발병 억제율을 나타내었다.

*in vitro* plate 상에서 TS 3-7 균주와 *R. solanacearum* 균주는 서로에 대해 antagonistic activity를 나타내지 않았으므로 직접적인 antibiosis에 의하지 않고, siderophore 생산을 통해 근권에서 병원균과 Fe(III)에 대해 경쟁하여 병원균의 증식을 억제한 것으로 보인다.

## 2. 선발 균주의 생균밀도 유지 측정

생균제제의 안정성을 도모하기 위한 담체로 vermiculite 사용 시 22주까지  $10^7$ CFU/ml의 생균밀도가 유지됨이 관찰되었다

## 3. 선발 균주의 동정.

선발균주 TS3-7은 형태적, 배양적 및 생화학적 특성을 조사하고 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology를 참조한 결과 *Pseudomonas fluorescence-putida* 그룹으로 분류되었으며 또한 16S rDNA의 염기서열을 분석하고 Database를 이용하여 유사도를 분석한 결과 *Pseudomonas fluorescence* 와 유사성을 보여 *Pseudomonas* sp. TS 3-7로 명명하였다.

## 5절 풋마름병 방제용 복합 미생물 제제의 제조와 포장 효과 검정

### 1. 선발균주를 이용한 복합 미생물 제조

1차로 mode of action based screening을 실시하여 활성균주를 선발하고, 선발된 균주에 대해 2차로 *in vivo* pot assay를 실시하여 선발된 균주들을 대상으로 서로 다른 작용기작 (antibiosis, iron competition, systematic resistance 유발 등)에 의해 발병을 억제시키며, 또한 선발된 균주 서로 간의 길항활성을 나타내지 않으며, 기존에 널리 보급 사용되고 있는 농약 (Boramycin (동부한농화학(주)), Agrymycin(성보화학 주식회사), Agrepto(주식회사 경농) 700 ppm 농도에서 내성을 갖는 조건 등을 충족시키는 균주들로 조합된 15 종류의 mixture을 제조하여 mixture의 풋마름병 방제 효과가 단일 균주 처리와 비교하였을 때 pot 상에서 즉 단일 조건하에서 차이는 인정되지 않았으나, 실제 포장의 복잡한 조건하에서는 mixture 사용에 의해 보다 지속적인 효과를 기대할 수 있겠다.

### 2. 복합제제의 풋마름병 방제효과 검정

*in vivo* pot assay를 통하여 풋마름병 발병 억제 효과가 뛰어난 미생물 복합체, A (TS3-7 +A253-16 + SKU-78 + B361-5)와 복합체 B (TS1-5 +A100-1 + SKU-78)조합에 대해서 농가 포장에서의 방제효과를 검정한 결과 60%의 효과를 나타내었다. 미생물 제제는 이미 발병이 진행된 상태에서의 방제 목적으로 보다는 사전에 예방 목적으로 사용 시 더 높은 효과를 기대할 수 있겠다. 혼합제에 대해 약해 실험을 실시한 결과 약해가 없는 것으로 판명되었다.

### 3. 생균 안정성 제고를 위한 carrier 및 amendment 선발

8개의 균주를 이용하여 talc와 vermiculite 담체 이용에 따른 생균밀도의 변화를 측정된 결과, 3주 이후에 Talc의 생균수가 급격하게 줄어드는 반면 vermiculite에서는 22주까지 평균적으로  $10^7$  CFU/ml 의 균체수가 유지되어 Talc에 비해 vermiculite가 균체의 장기 보관에 유리함이 확인되었다.

유독 SKU-78균주는 carrier 내에서 생균수가 급격히 감소하였으므로 SKU-78 균주의 경우에는 액상 수화제 형태에 장기 보존을 위한 amendment 첨가를 시도하였고 그 외의 균주는 22주까지 대부분  $10^7$ CFU/ml의 생균 밀도가 유지되므로 carrier 사용의 고상 형태로 장기적인 저장 및 유통이 가능하겠다.

## 6. 선발균주의 실용화를 위한 대량 배양 기술 확립 및 제제화

root colonization이 아주 잘 되고 뿌리 성장을 촉진시키며 *in vivo* pot assay와 포장실험에서 탁월한 방제 효과를 보인 균주 *Bacillus sp.* SKU-78의 산업화를 위한 대량배양조건을 확립하였다.

### 1. 대량배양을 위한 산업용 배지 조성

경제성이 있는 탄소원과 질소원으로 각각 corn starch와 soybean meal을 선발하였으며 30°C ~ 35°C의 배양온도에서 생육이 뛰어났으며, 150~250rpm 범위의 교반속도에서 최대 세균 밀도의 증가가 이루어졌다

## 2. 발효기에서의 배양적 특성 조사

산업용 배지조성을 확립하였고, 아울러 온도, 교반속도, pH 및 기질의 차이에 따른 성장 속도와 길항능력 등의 결과를 바탕으로 발효기에서의 대량배양조건을 확립하였다. 5 % soybean meal 배지에 2% corn starch를 첨가한 배지에서 pH 5.0으로 하여 48 시간 발효조건에서 가장 균체 성장이 이루어졌으며, 혐기성 호기적 발효에 별 차이가 나타나지 않았다.

### - 활용에 대한 건의

A100-1과 A256-10 균주가 생산하는 풋마름병균 저해활성 물질의 물리화학적 성질, 분자량, spectrum 결과 등을 토대로 Data base를 조사한 결과 본 물질들이 보고된 바 없음이 확인되어 새로운 선도물질로의 개발 가능성이 높은 물질이다. 두 물질의 분자량이 각각 1065와 920으로 구조가 다소 복잡한 물질이나 완전한 구조 분석이 이루어지면 신규 활성 물질에 대한 특허 출원이 가능하겠다.

길항 세균 균주 SKU-78는 풋마름병이 크게 발생된 농가 포장에 처리한 결과 시들음이 완전히 회복되어 생물농약으로서의 개발 가능성이 확인된 바 있으나, 이 균주에 의한 풋마름병 방제 능력을 환경이 상이한 다양한 조건에서 여러 차례 포장 실험을 수행하여 지속적으로 재현성 있는 효과를 입증하는 것이 필요하겠으며, 대량생산을 위한 배지 조성 및 발효 조건에 대한 연구, carrier와 amendment의 선발 등에 의해 6개월 까지 생균밀도가 유지됨을 확인하였으나, 실용화를 위해서는 생균제제의 shelf life의 개선이 필수적이며, 이를 위한 amendment에 대한 연구가 필요하겠다. SKU-78 균주의 지속적인 효과가 입증되면 균주 및 대량배양 및 제제화 공정에 대한 국내외 특허 출원이 가능할 것이다.

또한 SKU-78 균주는 병원균에 직접 작용하는 것이 아니고 뿌리에 근착되어 식물체에 저항성을 유도(ISR)하는 기작에 의해 발병을 억제하고 TA 3-7균주는 siderophore 생산을 통한 iron competition에 의해 풋마름병 발병 억제 효과를 나타내는 균주이다. 이와 같은 발병 억제 기작을 갖는 길항 미생물은 넓은 활성 스펙트럼을 갖는 특징이 있으므로 여러 식물병원균에 대한 방제 효과 검정 후 복합 식물병 방제제로 개발이 가능하겠다.

서로 다른 발병 억제 기작을 가지며, 서로 compatible 하고 기존 사용 농약에 대해 내성을 지닌 균주들로 구성된 복합제제 A와 복합제제 B의 풋마름병 방제 효과를 발병된 농가 대형 비닐하우스에 처리하여 확인하였으나, 미생물 제제는 치료제 보다는 예방제로서의 효과가 크므로 좀 더 다양한 환경조건에서의 풋마름병 예방제로서의 효과에 대한 검정이 필요하다. 또한 농약 내성균들로 구성된 생균제제이므로 화학 농약과 혼용해서 사용하는 것에 의해 환경오염의 피해를 줄이면서 방제효과를 극대화 시키는데 활용될 수 있을 것이다.

본 연구 결과에서 도출된 풋마름병 방제 활성 미생물의 분리와 방제효과 및 대량배양 조건 확립과 제제화 공정에 대한 연구 결과는 국내 학술회의에서는 발표된 바 있고, 국내 및 국제 학술지에 이미 게재되었거나 게재 중에 있으며 특허 출원이 준비 중이다. 본 연구 결과인 풋마름병균에 대한 길항효과가 뛰어난 토착 길항 미생물을 이용한 방제제의 개발로 인하여 풋마름병 방제의 효과를 증대시키고 이로 인한 고부가가치의 무공해 작물 생산으로 농가 수입 향상에 이바지 할 것이다.

## SUMMARY

The biological control of plant pathogens is of paramount importance nowadays in response to the increasing public concern for the environment and health. However, strategies for biological control of bacterial wilt is still in a developmental stage. Bacterial wilt, caused by *Ralstonia solanacearum*, is one of the most severe diseases of economically important crops such as tomato, pepper, potato and banana. Unfortunately, due to the capacity to survive in soil and water habitats for considerable periods of time, it is difficult to eradicate *Ralstonia solanacearum*.

The mechanisms involved in disease suppression by antagonistic strains are diverse; production of secondary metabolites which directly inhibit the pathogen, iron-chelating siderophores, plant growth promotion by rhizobacteria leading to disease escape by shortening the time that a plant is in a susceptible state, and an induced systemic resistance, defined as a state of increased defensive capacity developed by the plant, stimulated through diverse agents,

In order to develop biocontrol agents against *Ralstonia solanacearum*, the potential biocontrol strains were screened on the basis of mode of action. Strains were selected according to their pathogen-inhibition zones on artificial media, siderophore production and root colonizing abilities. Active and long-term colonization of the root surface of the plant is generally considered prerequisites for successful suppression of soilborne disease by rhizobacteria directly through production of antimicrobial substances or competition for space, nutrients and ecological niches, and indirectly through induction of systemic resistance.

The selected strains on the basis of mode of action can suppress bacterial wilt disease when applied to roots or seeds of crop plants.

Soil drench of strain suspension resulted in improved suppression than seed treatment. Seed treatment followed by soil drench application resulted in great reduction of bacterial wilt disease symptoms up to 70 %.

The strains showing strong inhibitory activities against *Ralstonia solanacearum*, were selected by paper disk method and the purification of active compounds from the producing cultures were carried out.

The active compound 100-1 produced by strain 100-1 was purified by ethylacetate extraction, silica gel chromatography, Sephadex LH-20 chromatography and HPLC. 100-1 compound was soluble in methanol, butanol, acetone chloroform, but insoluble in hexane and water. The compound exhibited activity against plant fungal pathogen, *Phytophthora parasitica*, *Phytophthora capsic*, and *Botrytis cinerea*. The compound was positive to Orcinol Ferric chloride. and negative to 4-dimethylaminobenzaldehyde, Aniline-diphenylamine, ninhydrin, Dragendorff's reagent and Antimony trichloride. UV spectrum of this compound showed a maximum peak at 234, 272 and 284 nm. The molecular weight was determined to be 1065 by mass spectrum.

The active compound produced by A 27-3 strain was isolated by butanol extraction, silica gel chromatography, Sephadex LH-20 chromatography and HPLC. The purified compound was soluble in methanol, butanol and acetone, but insoluble in hexane and chloroform. The color reaction of this compound with 4-dimethylaminobenzaldehyde-HCl, Orcinol ferric chloride and Ninhydrin appeared to be positive, but reaction with ferric chloride, aniline-diphenylamine, Dragendorff's reagent and antimony trichloride to be negative. This compound showed antimicrobial activity against *Escherichia coli*, and fungal pathogen, *Phytophthora parasitica*, *Phytophthora*

*capsici*, *Penicillium* sp., *Rhizopus stonifer* and *Botrytis cinerea*.

The active compound produced by A 47-2 strain was purified by ethylacetate extraction, silica gel chromatography and thin layer chromatography. The compound was analyzed by TLC with solvent system : chloroform-methanol, 1:1 and detected at an *rf* value of 0.8 by UV absorption. This compound was positive to Orcinol Ferric chloride and negative to 4-dimethylaminobenzaldehyde, Aniline-diphenylamine, ninhydrin and Dragendorff's reagent. The compound showed antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Phytophthora parasitica*, *Phytophthora capsici*. UV spectrum of this compound showed a maximum peak at 210, 234, 272 and 284nm. A 42-2 strain was identified to be *Arthrobacter* sp.

The active compound produced by A256-10 was purified by Diion HP 20, silica gel chromatography, Sephadex LH-20 chromatography, solid phase extraction (C<sub>18</sub> reverse phase) and HPLC. The purified compound was soluble in methanol, butanol, acetone and chloroform but insoluble in hexane. The color reaction of this compound with antimony trichloride, aniline-diphenylamine, orcinol ferric chloride and Ninhydrin appeared to be positive, but reaction with ferric chloride, Dragendorff's reagent and 4-dimethylaminobenzaldehyde-HCl to be negative. UV spectrum of this compound showed a maximum peak at 223.4 and 275nm. Peak at 223.4 nm was shifted to 212.6nm by NaOH addition. A 256-10 strain was identified to be *Bacillus subtilis*.

The active compound produced by A256-11 strain was purified by butanol extraction, HP-20 adsorption chromatography, silica gel chromatography, Sepadex LH-20 chromatography, and HPLC. The compound was positive to ferric chloride and ninhydrin and negative to antimony trichloride, aniline-diphenylamine, orcinol ferric chloride.

Six stains of plant growth promoting rhizobacteria were selected

through germinating seed assay and root colonization assay. Among them, SKU-78 strain induced significant suppression of bacterial wilt disease in tomato and pepper plants. Seed treatment followed by soil drench application with this strain resulted in over 60% reduction of bacterial wilt disease compared with the control. It was suggested that SKU-78 strain activated the host defense systems in plants, based on lack of direct antibiosis against pathogen. According to Bergey's Manual of Systemic Bacteriology and 16S rDNA sequence data, SKU-78 stain was identified as *Bacillus* sp. SKU-78.

Among the root colonizing and plant growth promoting bacteria isolated from the bacterial wilt suppressive soil, five strains were detected to produce siderophores by CAS agar assay. The most effective isolate, TS3-7 strain induced significant suppression of bacterial wilt disease in tomato and pepper plants. Seed treatment followed by soil drench application with this strain resulted in over 80% reduction of bacterial wilt disease compared with the control. Significant disease suppression by TS3-7 strain was related to the production of siderophore. Besides iron competition, induction of resistance of the host plant with siderophore was suggested to be another mode of action that suppress bacterial wilt, based on the lack of direct antibiosis against pathogen *in vitro*. According to Bergey's Manual of Systemic Bacteriology and 16S rDNA sequence data, TS3-7 stain was identified as *Pseudomonas* sp. TS3-7.

The efficacy of the selected individual biocontrol strain and strain combinations was assessed. TS3-7 strain suppress bacterial wilt by effectively competing for iron through the production of siderophore. SKU-78 strain induced systematic resistance against bacterial wilt. A 253-16 strain showed strong antibiosis against *Ralstonia solanacearum*. Strain B361-5 produced plant growth hormone. When TS3-7, SKU-78, A253-16 and B361-5 were mixed through soil together, disease suppression was enhanced

significantly compared to individual strain, suggesting that combining biocontrol strains can lead to more effective biocontrol of bacterial wilt.

Also, pesticide tolerant isolates were selected to develop the integrated system of biological and chemical control. Combined treatment with the biocontrol agent and an pesticide reduced disease more than treatment with either biocontrol agent or pesticide alone

Environmental conditions involving both chemical factors (substrate concentration, media design) and physical factors (temperature, incubation time, pH and aeration) were optimized economically.

# CONTENTS

SUMMARY(Korean) . . . . .	3
SUMMARY . . . . .	21
CONTENTS . . . . .	27
CONTENTS(Korean) . . . . .	33
Chapter 1. Synopsis of the Research Project . . . . .	37
Chapter 2. Present situation of the research and technical . . . . .	40
Chapter 3. Scope of the research and obtained results . . . . .	50
Section 1. Isolation and identification of antagonistic strains against bacterial wilt and researches on the mode of action . . . . .	50
1. Introduction . . . . .	50
2. Materials and Methods . . . . .	51
a. Isolation of microorganism from soil samples . . . . .	51
1) Isolation and culture condition of soil microorganism . . . . .	51
2) Isolation of rhizobacteria . . . . .	52
3) Selection of ACC(1-aminocyclopropane-1-carboxylate) deaminase active strains . . . . .	54
b. screening of antagonistic strain against bacterial wilt based on the mode of action . . . . .	56
1) Selection of strains producing the bioactive compounds against <i>Ralstonia solanacearum</i> . . . . .	56
2) Selection of siderophore producing microorganism . . . . .	57
3) Root colonization and elongation assay. . . . .	57
4) Selection of plant growth hormone producing strains . . . . .	58
c. <i>in vivo</i> pot assay on the suppression of bacterial wilt . . . . .	58
d. Antimicrobial spectra of the selected strains . . . . .	59
e. Identification of selected strains . . . . .	59
3. Results and discussion . . . . .	60
a. soil sampling and isolation of soil microorganism . . . . .	60
b. screening of antagonistic strains against bacterial wilt based on the mode of action . . . . .	60
1) Antibiosis mechanism group . . . . .	61
2) Siderophore producing group . . . . .	61
3) Root colonization competition and root elongation group . . . . .	62
4) Plant growth hormone producing group . . . . .	63
c. <i>in vivo</i> pot assay on the suppression of bacterial wilt . . . . .	66
d. Antimicrobial spectra of the selected strains . . . . .	71
e. Identification of selected strains . . . . .	73
Section 2. Purification and characterization of bioactive compounds produced by antagonistic strains . . . . .	93
1. Introduction . . . . .	93

2. Materials and method	94
a. Cultivation of selected strains	94
b. Preliminary experiments for purification of bioactive compounds	94
c. Antimicrobial spectrum of active compounds	95
d. physico-chemical property of active compounds	96
e. Instrumental analysis	97
1) UV spectrometry	97
2) HPLC	97
3) Mass spectrophotometry	97
4) <sup>1</sup> H NMR spectrophotometry	97
3. Results and discussion	98
a. Purification and characterization of active compound produced by A100-1	98
1) Preliminary experiment	98
2) Purification of active compound produced by A100-1	98
3) Physico-chemical property of A100-1	101
4) Identification of A100-1 strain	105
b. Purification and characterization of active compound produced by A27-3	106
1) Preliminary experiment	106
2) Purification of active compound produced by A27-3	106
3) Physico-chemical property of A27-3	109
4) Identification of A27-3 strain	112
c. Purification and characterization of active compound produced by A47-2	113
1) Preliminary experiment	113
2) Purification of active compound produced by A47-2	113
3) Physico-chemical property of A47-2	116
4) Identification of A47-2strain	118
d. Purification and characterization of active compound produced by A256-10	119
1) Preliminary experiment	119
2) Purification of active compound produced by A256-10	119
3) Physico-chemical property of A256-10	123
4) Identification of A256-10 strain	128
e. Purification and characterization of active compound produced by A256-11	129
1) Preliminary experiment	129
2) Purification of active compound produced by A256-11	129
3) Physico-chemical property of A256-11	132
4) Identification of A256-11strain	134
f. Purification and characterization of active compound produced by A253-16	135

1) Preliminary experiment	135
2) Purification of active compound produced by A253-16	135
3) Physico-chemical property of A253-16	138
4) Identification of A253-16 strain	140
g. Purification and characterization of active compound produced by A254-10	141
1) Preliminary experiment	141
2) Purification of active compound produced by A254-10	141
3) Physico-chemical property of A254-10	144
4) Identification of A254-10 strain	146
Section 3. Isolation, Identification and characterization of SKU-78 strain, antagonist against <i>Ralstonia solanacearum</i>	147
1. Introduction	147
2. Materials and methods	148
a. Isolation and maintenance of the pathogen	148
b. Isolation and cultivation of rhizobacteria	148
c. Germinating seed assay	148
d. Seed bacterialization treatment	149
e. Pot assay	149
f. Field assay	150
g. Antimicrobial activity of SKU-78	150
h. Identification of SKU-78	151
3. Results and discussion	151
a. Selection of antagonistic strains against bacterial wilt	151
b. Culture of selected strains	152
c. Suppression effect of selected strains	153
1) Pot treatment	153
2) Field treatment	154
d. Antimicrobial spectrum of SKU-78 strain	157
e. Identification of SKU-78 strain	157
1) Morphological properties of SKU-78 strain	157
2) Biochemical properties of SKU-78 strain	158
3) Heat tolerance	159
4) Analysis of 16s rDNA sequence	160
Section 4. Suppression of bacterial wilt by fluorescent siderophore producing microorganism, TS3-7	162
1. Introduction	162
2. Materials and methods	163
a. Isolation and maintenance of the pathogen	163
b. Isolation of rhizobacteria	163
c. Colonization assay	164
d. Selection of siderophore producing microorganism	164
e. Antimicrobial spectrum of TS3-7 strain	165

f. Seed treatment by the selected strain	165
g. <i>in vivo</i> pot assay	165
h. Assessment of bacterial cell density	166
i. Identification of TS3-7 strain	166
j. Characterization of siderophore	167
3. Results and discussion	167
a. Isolation of antagonistic strains	167
b. Fluorescent siderophore producing strain	167
c. Suppression effect of bacterial wilt by TS 3-7	170
e. Antimicrobial spectrum of TS3-7	172
f. Assessment of bacterial cell density	173
g. Identification of TS 3-7 strain	176
1) Cultural characteristics	176
2) 16S rDNA sequence	177
h. Characterization of siderophore produced by TS3-7	178
Section 5. Rhizobacteria based bioformulations for suppression of bacterial wilt and field test	179
1. Introduction	179
2. Materials and method	180
a. Agrichemicals resistance of selected strains	180
b. Antagonism between selected strains	181
c. Suppression of bacterial wilt by mixtures of selected strains in Pot assay	181
d. Suppression of bacterial wilt by mixtures of selected strains under field condition	181
e. Selection of carrier and amendment to increase viability	182
1) Selection of carrier	182
2) Selection of amendment	182
3. Results and discussion	182
a. Agrichemicals resistance of selected strains	182
b. Antagonism between selected strains	185
c. Suppression of bacterial wilt by mixtures of selected strains in Pot assay	187
d. Suppression of bacterial wilt by mixtures of selected strains under field condition	192
e. Selection of carrier and amendment to increase viability	194
1) Selection of carrier	194
2) Selection of amendment	196
Section 6. Scale up fermentation technology of selected strain	198
1. Introduction	198
2. Materials and methods	198
a. Media selection and cultural condition for mass production	198
1) Selection of media and cultural condition	198
2) Cultural condition for fermenter	199

b. Selection of carrier and amendment to increase viability . . . . .	201
1) Selection of carrier . . . . .	201
2) Selection of amendment . . . . .	201
3) efficacy of liquid formulation . . . . .	201
3. Result and discussion . . . . .	202
a. Media selection and cultural condition for mass production . . . . .	202
b. Selection of carrier and amendment to increase viability . . . . .	208
c. Selection of carrier and amendment to increase viability . . . . .	214
Chapter 4. Attainability of the research goal and contributions to related fields . . . . .	215
Chapter 5. Application of research results . . . . .	217
Chapter 6. References . . . . .	218

# 목 차

요 약 문	3
SUMMARY	21
CONTENTS	27
목 차	33
제 1 장 연구개발과제의 개요	37
제 2 장 국내외 기술개발 현황	40
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	50
1절 풋마름병균에 대한 길항 미생물의 분리, 동정 및 작용기작 연구	50
1. 서론	50
2. 재료 및 방법	51
가. 공시 토양으로부터 미생물의 분리	51
1) 토양 미생물의 분리 및 배양	51
2) 근면, 근권 미생물 분리	52
3) ACC(1-aminocyclopropane-1-carboxylate) deaminase activity 활성 균주 선발	54
나. 작용기작에 입각한 풋마름병균 길항 미생물의 선발	56
1) antibiosis 기작에 의한 풋마름병균 저해균주의 선발	56
2) siderophore 생산 균주의 선발	57
3) root colonization and elongation assay	57
4) Plant growth hormone 생산 균주의 선발	58
다. <i>in vivo</i> pot assay 에 의한 풋마름병 발병 억제효과 검정	58
라. 선발균주의 antimicrobial spectrum 조사	59
마. 선발균주의 동정	59
3. 실험 결과 및 고찰	60
가. 공시토양 채취 및 토양미생물의 분리	60
나. 작용기작에 의한 풋마름병균 길항 미생물의 선발	60
1) Antibiosis 기작 group	61
2) Siderophore 생산 group	61
3) Root colonization competition 과 root elongation group	62
4) Plant growth hormone 생산 group	63
다. 작용기작 별 선발 활성 균주의 <i>in vivo</i> pot assay에 의 한 풋마름병 억제 활성 검정	66
라. 선발균주의 antimicrobial spectrum	71
마. 선발 균주의 동정	73
2절 토양 미생물이 생산하는 풋마름병균 저해 활성 물질의 분리 및 정제	93
1. 서론	93
2 재료 및 방법	94
가. 선발균주의 배양	94

나. 생리활성 물질 분리를 위한 선행 실험	94
다. 활성물질의 항균 spectrum조사	95
라. 활성물질의 이화학적 특성조사	96
마. 활성물질의 기기 분석	97
1) UV spectrometry	97
2) HPLC	97
3) Mass spectrophotometry	97
4) <sup>1</sup> H NMR spectrophotometry	97
3. 결과 및 고찰	98
가. A100-1이 생산하는 활성물질의 분리, 정제 및 특성 연구	98
1) 예비실험 결과	98
2) 활성물질 100-1의 분리 정제	98
3) A100-1 활성물질의 이화학적 특성	101
4) A100-1의 균주 동정	105
나. A27-3이 생산하는 활성물질의 분리, 정제 및 특성 연구	106
1) 예비실험 결과	106
2) A27-3 활성물질의 분리 정제	106
3) A27-3 활성물질의 이화학적 특성	109
4) A27-3의 균주 동정	112
다. A47-2가 생산하는 활성물질의 분리, 정제 및 특성 연구	113
1) 예비실험 결과	113
2) A47-2 활성물질의 분리 정제	113
3) A47-2 활성물질의 이화학적 특성	116
4) A47-2의 균주 동정	118
라. A256-10이 생산하는 활성물질의 분리 및 정제	119
1) 예비실험 결과	119
2) A256-10 물질의 분리 정제	119
3) A256-10 활성물질의 이화학적 특성	123
4) A256-10의 균주 동정	128
마. A256-11이 생산하는 활성물질의 분리 및 정제	129
1) 예비실험 결과	129
2) A256-11 물질의 분리·정제	129
3) A256-11의 이화학적 특성	132
4) A256-11의 균주 동정	134
바. A253-16이 생산하는 활성물질의 분리 및 정제	135
1) 예비실험 결과	135
2) A253-16 물질의 분리·정제	135
3) A253-16 활성물질의 이화학적 특성	138
4) A253-16의 균주 동정	140
사. A254-10이 생산하는 활성물질의 분리 및 정제	141
1) 예비실험 결과	141
2) A254-10 활성물질의 분리 정제	141
3) A254-10의 이화학적 특성	144

4) A254-10의 균주 동정	146
3절 풋마름병균의 길항 세균 SKU-78의 동정 및 특성연구	147
1. 서론	147
2. 재료 및 방법	148
가. 병원균 확보 및 배양	148
나. 근권 미생물의 분리 및 배양	148
다. Germinating seed assay	148
라. 종자 처리	149
마. 포트실험	149
바. 포장실험	150
사. SKU-78균주의 antimicrobial activity	150
아. 선발 균주의 동정	151
3. 결과	151
가. 활성균주의 선발	151
나. 선발균주의 배양	152
다. 선발균주에 의한 발병 억제 효과	153
1) 포트 실험	153
2) 포장 실험	154
라. SKU-78 균주의 항균활성	157
마. SKU-78 선발균주의 동정	157
1) 형태학적 특성	157
2) 생화학적 특성	158
3) 온도 내열성 검토	159
4) 16s rDNA sequence 분석	160
4절 Fluorescent siderophore 생산균주, TS3-7에 의한 풋마름병 발병 억제	162
1. 서론	162
2. 재료 및 방법	163
가. 병원균 확보 및 배양	163
나. 근권 미생물의 분리	163
다. colonization assay	164
라. Siderophore 생산균주 선발	164
마. 선발 균주의 풋마름병균에 대한 in vitro 길항 활성 검증	165
바. 선발 균주에 의한 종자 코팅 처리	165
사. in vivo pot assay	165
아. 선발 균주의 생균밀도 유지 측정	166
자. 선발 균주의 동정	166
차. 선발 균주가 생산하는 Siderophore의 characterization	167
3. 결과 및 고찰	167
가. 활성균주의 분리	167
나. Fluorescent siderophore 생산	167
다. 풋마름병 발병억제 효과	170
라. TS 3-7 균주의 풋마름병균에 대한 길항작용	172

마. TS 3-7 균주의 항균활성	172
바. 생균 밀도유지	173
사. 선발균주의 동정	176
1) 배양적 특성	176
2) 16S rDNA sequence	177
아. 선발 균주가 생산하는 Siderophore의 characterization	178
5절 꽃마름병 방제용 복합 미생물 제제의 제조와 포장 효과 검정	179
1. 서론	179
2. 재료 및 방법	180
가. 활성균주의 농약 내성 검정	180
나. 선발된 균주간의 길항작용 여부 확인	181
다. Pot 실험에 의한 선발균주 mixture의 꽃마름병 방제 효과 검정	181
라. 포장에서의 복합제제의 꽃마름병 억제 효과 검정	181
마. 생균 안정성 제고를 위한 carrier 및 amendment 선발	182
1) Carrier 선발	182
2) Amendment 선발	182
4. 결과 및 고찰	182
가. 선발균주의 농약 내성 조사	182
나. 선발된 균주간의 길항성 여부 확인	185
다. 선발균주를 이용한 복합 미생물 제조 및 <i>in vivo</i> pot 실험을 통한 꽃마름병 방제효과 검정	187
라. 포장에서의 복합제제의 꽃마름병 억제 효과 검정	192
마. 생균 안정성 제고를 위한 carrier 및 amendment 선발	194
1) carrier 선발	194
2) Amendment 선발	196
6절 선발균주의 실용화를 위한 대량 배양 기술 확립	198
1. 서론	198
2. 재료 및 방법	198
가. 대량배양을 위한 산업용 배지 선택과 발효 조건 분석	198
1) 산업용 배지 선택과 배양조건	198
2) 발효기에서의 배양특성 분석	199
나. 생균 안정성 제고를 위한 carrier 및 amendment 선발	201
1) Carrier 선발	201
2) Amendment 선발	201
3) 액상 수화제의 제조 및 효과검정	201
3. 결과 및 고찰	202
가. 선발 균주의 대량배양조건 확립	202
나. 발효기에서의 배양적 특성 조사	208
다. SKU-78 균주의 안정성 제고를 위한 carrier 및 amendment 선발	214
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	215
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	217
제 6 장 참고문헌	218

## 제 1 장 연구 개발 과제의 개요

농업생산성의 향상과 안전 다수확 재배를 목표로 한 새로운 기술의 개발이 시급히 요구되고 있는 가운데 작물보호의 측면에서 이용되는 농약류의 사용이 날로 증가하고 있는 실정이다. 현재 국내에서 유통되고 있는 농약의 대부분은 외국으로부터 원자재 수입에 의하여 생산되는 유기합성 농약이다. 유기합성 농약은 약효가 우수하고, 값이 저렴하며, 오랫동안 보관 저장이 가능하나 그동안 무차별한 남용으로 인해 지하수 및 토양오염, 농산물 중의 잔류독성 그리고 생태계에 영향을 끼치는 환경파괴 문제가 심각할 뿐 아니라, 약효에 대한 저항성 병원균의 출현 등으로 인해 농약으로서의 가치가 감소하고 대신에 새로운 무독성 및 저독성 농약개발의 필요성이 전 세계적으로 급격히 증가하는 추세이다. 특히 살균제는 전체 농약시장의 약 20%를 차지하고 있으며, 많은 경우 발암성이 강한 물질들이 많아 새로운 생물학적 방제제 개발을 통해 대체할 필요성이 절실히 요청된다. 전 세계 미생물농약의 시장 규모는 2000년 기준으로 약 100억\$로 전년도 대비 11.1~15.4%의 성장률을 보였으며 이중 살균제는 54억\$로 전년도 대비 14.5%의 성장률을 나타내 앞으로는 높은 성장률이 지속될 것으로 예상된다.

선진국들에 의한 생물농약 신제품 개발과 등록이 빠른 속도로 진행되어 토양전염에 의해 발생하는 식물병 방제용 미생물 살균제가 40여개 등록된 상태로 생물농약 시장은 매년 증가하고 있으나, 물질특허의 도입 및 선진각국의 보호주의 장벽으로 기술이전이 엄격히 제한되고 있으므로 국내 기술에 의한 생물농약에 대한 자체개발 요구가 증폭되고 있다. 따라서 생물학적 방제제의 개발은 경제적으로 전량 수입되고 있는 농약류의 수입대체 효과와 더 나아가서는 수출에 따른 많은 외화획득의 기회를 제공할 수 있을 것이다.

*Ralstonia solanacearum*에 의해 발병되는 풋마름병은 고추뿐만 아니라, 토마토, 가지, 등의 가지과 작물과 담배, 감자 등을 주요 기주로 하여 파프리카, 바나나 등 기주 범위가 매우 크며 기주 없이도 토양에서 5년 이상 다년간 생존

이 가능하기 때문에 전 세계적으로 막대한 수량 손실을 일으키는 병이다. 원래 풋마름병은 고온 다습한 아열대지방을 중심으로 주로 발병되어졌으나 근래에 와서는 지구온난화에 따른 기온 상승으로 온대지방에서도 발병이 빈번해졌다. 우리나라의 경우 주로 남부지방을 중심으로 장마 후 발병이 보고되었으나, 요즘에는 중부지방에도 발생이 잦아져 막대한 피해를 입히는 식물병이다. 풋마름병균과 같은 토양 병원균에 대한 방제는 유기합성농약으로는 거의 효과가 없을 뿐만 아니라 유독한 유기합성농약의 살포는 토양 및 지하수 오염 등 환경오염을 유발시키므로 저 독성의 환경 친화적인 생물학적 방제제의 개발이 시급한 실정이다.

길항 미생물을 이용한 토양 병원균 방제를 위하여 전 세계적으로 다양한 길항균을 선별하고 이용하기 위한 노력을 경주하여 왔으나, 그 효과는 작물별, 지역별, 그리고 병원균에 따라 상이하게 나타나는 문제점이 있다. 따라서 우리나라에서 재배되는 가지과 작물, 특히 고추와 토마토에 발병하는 풋마름병균에 대한 길항효과가 뛰어난 유용 미생물을 분리하여 우리나라 토착 길항미생물을 이용한 방제제 개발이 매우 필요하다.

*Ralstonia solanacearum*의 발병기작이나 생태에 대해 연구되어진 바는 많으나, 이에 대한 확실한 방제법이나 방제제는 아직까지 개발되어있지 않다. 풋마름병균의 방제 방법으로는 벼 재배를 이용한 윤작 또는 가지과 작물이 아닌 작물들을 돌려짓기 하여 토양 내 *R. solanacearum*의 밀도를 낮추거나, 훈증제에 의한 토양 소독방법, 그리고 농용 항생제 등의 약제처리 방법 등이 있으나 풋마름병균은 기주식물 없이도 토양이나 물속에서 5년 까지 생존이 가능하기 때문에 경종적 방제법 만으로는 방제가 어려우며, 또한 토양소독 방법은 방제 효과가 뛰어나나 경제적인 문제가 있고, 농용 항생제의 사용은 항생제 내성 증가의 문제가 있으며, 유기합성 농약은 약효가 우수하고, 값이 저렴하며, 오랫동안 보관이 가능하다는 장점이 있지만 지하수 및 토양오염, 농산물중의 잔류독성 그리고 생태계 파괴 등의 문제가 있다. 더구나 풋마름병균은 식물체의 도관조직 속에서 증식하므로 약제의 경엽 살포로는 조직 속에까지 약효가 미치지 못하여 효과를 기대할 수 없기 때문에, 토양처리에 의해 병원균의 생존 자체를 불가능하게 하거나, 생존하더라도 활동하지 못하도록 환경조건을 개선하고 저항성 품종의 개발과 더불어

어 길항미생물을 이용한 생물학적 방제가 시급한 실정이나 풋마름병의 생물학적 방제는 아직 초보적인 단계이다.

풋마름병의 원인균인 *Ralstonia solanacearum*는 그 형태적, 생리적 특성에 있어서 다양한 변이를 나타내므로 단일 미생물농약으로는 시기와 장소에 상관없이 지속적인 효과를 기대하기가 어렵다. 따라서 풋마름병 방제를 위한 미생물 제제는 기존의 단일 길항 미생물을 이용한 생균제제 뿐만 아니라 서로 다른 작용기작을 갖는 길항미생물의 복합 생균제제에 초기 방제에 기여할 생리활성물질을 첨가한 고효율 복합제제의 개발이 필요하겠다.

본 연구 개발의 목적은 1) 풋마름병균에 대한 길항 효과가 우수한 토양 미생물을 mode of action -based screening을 통해 선발하고, 2) 활성이 우수한 균주들에 대한 in vivo assay를 실시하여 실용화 대상 균주를 선발하고 3)서로 다른 작용기작을 갖고, 기존의 화학 농약에 대해 내성을 가지며, 또한 서로 간에 길항성을 나타내지 않는 선발균주들로 구성된 생균 복합체의 발병억제 효과를 검증하여 실용화 연구를 하며 , 4) 선발 미생물의 대량생산 공정을 확립하고, 제제화 방법을 확립하고자 하였다. 본 연구를 통하여 새로운 풋마름병 방제제 개발 기술의 확립과 실용화로 선진국에 대한 기술 의존도를 줄일 수 있으며 대외 경쟁력을 갖출 수 있으며, 개발된 복합미생물제제는 유기 합성 농약을 복합미생물 제제로 대체함으로써 농산물의 안전성을 향상시키고, 환경오염을 경감시키는 환경 친화적 농업 기반 조성에 기여할 것으로 생각된다.

## 제 2 장 국내외 기술 개발 현황

환경에 대한 사회적 관심이 높아지고 구미 선진국에서 농약 잔류기준을 강화하고 유독성 농약사용량에 대한 규제가 전 세계적으로 확산되는 추세 속에서 선진국을 중심으로 미생물을 이용한 생물학적 방제 연구가 빠르게 진행되고 있다. 지금까지 연구된 미생물 종류들을 살펴보면 대부분이 *Agrobacterium* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., 등의 세균과 방선균 *Streptomyces* sp. 그리고 곰팡이로 *Gliocladium virens*, *Trichoderma* sp. 등을 들 수 있다. 이 분야 연구는 1980년대 이후 특히 활발하게 전개되어 새로운 신제품 개발, 등록이 빠른 속도로 진행되고 있으며, 현재 50여개에 달하는 미생물 살균제들이 등록된 상태이다 (아래 표 참조) 대부분의 제품들이 토양전염에 의해 발생하는 특히, *Fusarium*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Phytophthora* 등에 의해 발생하는 식물병 방제용이다. 그러나 이들 제품들은 아직 큰 시장을 점유하지 못하고 있는 실정이다.

지금까지 가장 성공적인 연구로는 *Agrobacterium radiobacter* 가 생산하는 agrocin을 이용한 *Agrobacterium tumefaciens*라는 토양세균에 의해 발생하는 식물 뿌리의 crown gall 예방을 들 수 있겠다. 또 다른 성공적인 연구가 진행되고 있는 분야는 미국 U.S.D.A 연구팀에 의한 *Pseudomonas fluorescens*을 이용한 밀의 뿌리썩음병 방제연구이다. 밀의 뿌리에 부착해서 생활하는 근권 미생물로서 밀의 뿌리질병을 일으키는 곰팡이 *Gaeumannomyces graminis*에 강력한 길항작용을 보이는 *Pseudomonas fluorescens* strain이 생산하는 phenazine계 항생물질 및 2,4-diacetylphloroglucinol 이란 항생물질(Keel et. al, 1992) 에 의한다는 것을 밝혀냈으며, *Pseudomonas fluorescens* strain을 밀의 종자에 처리하여 파종하여 밀의 수확량이 10~20% 증가함을 확인 바 있다. 그러나 실제 포장 실험에서는 어떤 때는 병 방제 효과가 좋았으나, 어떤 때는 방제효과가 거의 없어 효능의 일관성이 적었으며, 또한 지역에 따라 효능의 편차가 심하게 나타나 제품성능의 불규칙성을 보여주었다. 이를 해결하기 위하여 *Pseudomonas* sp.의

2,4-diacetylphloroglucinol 유전자의 발현을 극대화시킴으로서 앞에서 보여준 밀 뿌리썩음병 방제효과의 불규칙성을 극복하는데 성공하였다. (Thomashow et. al, 1993, Thomashow et. al., 1994) 또한 2,4-diacetylphloroglucinol 생산에 관여하는 유전자를 분리하여 2,4-diacetylphloroglucinol를 생산하지 못하는 *Pseudomonas fluorescens*에 삽입하여 생물적 방제 능력을 향상시키는 연구도 진행되었다. 이 밖에도 *Pseudomonas syringae* 및 *Pseudomonas copacia*를 이용한 각종 식물병 방제제 개발 연구가 활발한 편이나 아직 상업적 이용은 저조한 편이다.

1980 년대에 식물생장을 촉진시키는 plant growth promoting rhizobacteria가 식물병을 방제할 수 있다고 알려진 이 후 이를 이용한 생물학적 방제제 연구가 활발히 진행되어 왔다. 토양병 방제제로 개발된 *Bacillus subtilis* GB03를 땅콩 및 목화 종자에 처리하여 안정적인 효능을 보인 것으로 보고 된 바 있다. *Bacillus subtilis*는 여러 가지 특징 때문에 많은 연구가들의 관심을 모았다. *Bacillus subtilis*는 포자형성 토양세균으로서 제품의 보관성 및 대량생산방법에 있어 유리한 점이 있다. 특히 *Bacillus subtilis*는 *Saccharomyces cerevisiae* 및 *Lactobacillus* sp. 등과 더불어 미국 식품 의약국(FDA)에 의해 인체 및 환경에 무해한 미생물로 인정받고 있어 안전한, 환경 친화적인 농산물 생산에 기여할 수 있는 유익한 미생물이라 할 수 있다.

주로 가지과 작물에 발병하여 막대한 피해를 입히고 있는 풋마름병의 원인균인 *Ralstonia solanacearum*는 그 형태적, 생리적 특성에 있어서 다양한 변이를 나타내므로 실험실 조건에서는 그 효과가 인정된 몇몇의 길항균들이 실제 포장에서는 효과를 인정받지 못하고 있다. 기온의 상승으로 남부지방을 중심으로 장마철이 지난 후 주로 발생하던 풋마름병이 전국적으로 확대되어 막대한 피해를 입히고 있는 사정을 감안할 때 시기와 장소에 상관없이 지속적인 효과를 나타낼 수 있는 토착 길항미생물을 이용한 생물학적 방제 기술이 시급하게 요구되는 상황이다.

병원균에 대해 직접 antibiosis를 나타내지 않으나, 식물 뿌리에 근착되어 식물의 방어 시스템을 활성화시켜, 병원균에 대한 저항성 (induced systematic resistance)유도시키는 비병원성 미생물이 알려졌다. 비병원성 근권 미생물에 의

해 식물체에 일단 방어 시스템이 활성화되면 곰팡이, 세균, 바이러스 등 다양한 병원균에 대해 저항성을 갖게 되며 또한 ISR을 유발시킨 미생물이 감소하여도 상당히 오랫동안 저항성이 지속된다고 알려져 있으므로 차세대 생물학적 방제제는 식물성장을 촉진 시키면서 토양 병원균에 대해 억제 능력을 가질 뿐만 아니라, 식물체내 systemic한 방어 체계, ISR을 유발시킴으로 다양한 병원균에 대해 방제효과를 갖는 plant growth promoting rhizobacteria (PGPR)을 이용함이 바람직하겠다.

Table 1. Commercial biocontrol products for use against plant diseases.

Product	Biocontrol organism	Target	Crop	Source
AQ10 Biofungicide	<i>Ampelomyces quisqualis</i> isolate M-10	powdery mildew	apples, cucumber, grapes,ornamentals, strawberries, tomatoes	Ecogen, Inc. Langhorne, PA USA
ANTI-FUNGUS	<i>Trichoderma</i> spp.	<i>Sclerotinia</i> , <i>Phytophthora</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Pythium</i> spp., <i>Fusarium</i> , <i>Verticillium</i>	flowers,strawberries, riestrees, vegetables	Grondorts- mettingen DeCuester BELGIUM
Aspire*	<i>Candida oleophila</i> I-182	<i>Botrytis</i> spp., <i>Penicillium</i> spp.	Citrus, pome fruit	Ecogen, Inc. Langhorne, PA USA
Bactophyte	<i>Bacillus subtilis</i>		vegetables	RUSSIA
Binab T,W*	<i>Trichoderma harzianum</i> (ATCC 20476) and <i>Trichoderma Polysporum</i> (ATCC 20475)	pathogenic fungi that cause wilt, take-all, root rot, and internal decay of wood products and decay in tree wounds	flowers, fruit, ornamentals, turf, and vegetables	Bio-Innovation AB SWEDEN also Binab USA, Madison, WI
Biofox C	<i>Fusarium oxysporum</i> (nonpathogenic)	<i>Fusarium oxysporum</i> <i>Fusarium moniliforme</i>	basil, carnation, cyclamen, tomato	S.I.A.P.A. ITALY

Product	Biocontrol organism	Target	Crop	Source
Bio-Ag 22G,* Bio-Trek 22G*	Trichoderma harzianum KRL-AG2	Pythium spp., Rhizoctonia solani, and Fusarium spp., Sclerotinia homeocarpa	vegetables, turf, and greenhouse crops	Wilbur-Ellis Fresno, CA USA
Bio-Save 10*	Pseudomonas syringae ESC-10	Botrytis cinerea, Penicillium spp., Mucor pyroformis, Geotrichum candidum	citrus and pome fruit	EcoScience Corp. Worcester, MA USA
Bio-Save 11*	Pseudomonas syringae ESC-11	Botrytis cinerea, Penicillium spp., Mucor pyroformis, Geotrichum candidum	citrus and pome fruit	EcoScience Corp. Worcester, MA USA
BlightBan A506*	Pseudomonas fluorescens A506	frost, Erwinia amylovora	almond, apple, cherry, peach, pear, potato, strawberry, tomato	Plant Health Technologies Boise, ID USA
Blue Circle*	Burkholderia (Pseudomonas) cepacia type Wisconsin	Fusarium, Pythium, lesion, spiral, lance, and sting nematodes	vegetables	CTT Corp. Carlsbad, CA
Coniothyridin	Coniothyrium minitans	Sclerotinia sclerotiorum	sunflower	RUSSIA
Conquer	Pseudomonas fluorescens	Pseudomonas tolassii	mushrooms	Mauri Foods AUSTRALIA

Product	Biocontrol organism	Target	Crop	Source
Dagger G*	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pythium ultimum</i> , <i>Rhizoctonia solani</i>	cotton seed treatment	Ecogen, Inc. Langhorne, PA USA
Deny(formerly PRECEP)*	<i>Burkholderia cepacia</i> type Wisconsin (see Blue Circle)	<i>Rhizoctonia</i> , <i>Pythium</i> , <i>Fusarium</i> and disease caused by lesion, spiral, lance and sting nematodes	alfalfa, barley, beans, clover, cotton, peas, grain, sorghum, vegetable crops, and wheat	CTT Corp. Carlsbad, CA USA
Epic*	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Fusarium</i> spp., <i>Alternaria</i> spp., and <i>Aspergillus</i> spp. that attack roots	cotton, legumes	Gustafson, Inc. Dallas, TX USA
Fusaclean	<i>Fusarium oxysporum</i> (nonpathogenic)	<i>Fusarium oxysporum</i>	asparagus, basil, carnation, cyclamen, gerbera, tomato	Natural Plant Protection Nogueres, FRANCE
Galltrol-A*	<i>Agrobacterium radiobacter</i> Strain 84	crown gall disease caused by <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	fruit, nut, and ornamental nursery stock	AgBioChem Inc., Orindi, CA USA
GlioGard* (see SoilGard)				
Intercept*	<i>Burkholderia cepacia</i> ( <i>Pseudomonas cepacia</i> )	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Fusarium</i> spp., <i>Pythium</i> sp.	maize, vegetables, cotton	Soil Technologies Corp. Fairfield, IA USA

Product	Biocontrol organism	Target	Crop	Source
Kodiak*, Kodiak HB*, Kodiak AT*	Bacillus subtilis	Rhizoctonia solani, Fusarium spp., Alternaria spp., and Aspergillus spp. that attack roots	cotton, legumes	Gustafson, Inc. Dallas, TX USA
Mycostop*	Streptomyces griseoviridis strain K61	Fusarium spp., Alternaria brassicola, Phomopsis spp., Botrytis spp., Pythium spp., and Phytophthora spp. that cause seed, root and stem rot, and wilt disease	field, ornamental, and vegetable crops	Kemira Agro Oy Helsinki, FINLAND
Nogall, Diegall	Agrobacterium radiobacter	Agrobacterium tumefaciens	trees	Bio-CareTechnology Pty. Ltd. Somersby, AUSTRALIA
Norbac 84C*	Agrobacterium radiobacter strain K84	crown gall disease caused by Agrobacterium tumefaciens	fruit, nut, and ornamental nursery stock	New Bioproducts, Inc. Corvallis, OR USA
Phagus	bacteriophage	Pseudomonas tolaasii	Agaricus spp. Pleurotus spp.	Natural Plant Protection Nogueres, FRANCE

Product	Biocontrol organism	Target	Crop	Source
Polygandron	Pythium oligandrum	Pythium ultimum	sugarbeet	Vyskumny ustav rastlinnej [Plant Production Institute] Piestany, SLOVAK REP.
Promot	Trichoderma spp.	various fungi	fruit, vegetables	J.H.Biotech Inc. Ventura, CA USA
PSSOL	Pseudomonas solanacearum (nonpathogenic)	Pseudomonas solanacearum	vegetables	Natural Plant Protection Nogueres, FRANCE
Rotstop, P.g. uspension	Phlebia gigantea	Heterobasidium annosum	trees	Kemira Agro Oy Helsinki, FINLAND
SoilGard * (formerly GlioGard)	Gliocladium virens GL-21	damping-off and root rot pathogens especially Rhizoctonia solani and Pythium spp.	ornamental and food crop plants grown in greenhouses, nurseries, homes, and interiorscapes	Grace-Sierra Co. Columbia, MD USA
Supresivit	Trichoderma harzianum	various fungi		Borregaard and Reitzel DENMARK
System 3*	Bacillus subtilis GB03 and chemical pesticides	seedling pathogens	barley, beans, cotton, peanut, pea, rice, soybean	Helena Chemical Company Memphis, TN USA

Product	Biocontrol organism	Target	Crop	Source
Trichopel, Trichoject, Trichodowels, Trichoseal	Trichoderma harzianum and T.viride	Armillaria, Botryosphaeria, Chondrostereum, Fusarium, Nectria, Phytophthora, Pythium, Rhizoctonia		Agrimm Technologies, Ltd. Christchurch, NEW ZEALAND
T-22G* and T-22HB*	Trichoderma harzianum Rifai strain KRL-AG2	Pythium spp., Rhizoctonia solani, Fusarium spp., and Sclerotinia homeocarpa	bean, cabbage, corn, cotton, cucumber, peanut, potato, sorghum, soybean, sugar beet, tomato, turf, and greenhouse ornamentals	TGT, Inc. Geneva, NY USA
T-35	Trichoderma harzianum	Rhizoctonia solani, Fusarium spp.	cucumber, tomato	Makteshim ISRAEL
Trichodermin-3	Trichoderma lignorum	Fusarium sp.	field crops, vegetables	RUSSIA BULGARIA
Trichodex	Trichoderma harzianum	Primarily Botrytis cinerea, also Colletotrichum spp., Fulvia fulva, Monilia laxa, Plasmopara viticola, Pseudoperonospora cubensis, Rhizopus stolonifer, Sclerotinia sclerotiorum	cucumber, grape, nectarine, soybean, strawberry, sunflower, tomato	Makteshim Chemical Works, Ltd. Beer Sheva, ISRAEL

Product	Biocontrol organism	Target	Crop	Source
TY	Trichoderma sp.	Rhizoctonia solani, Sclerotium rolfsii, Pythium sp.	field crops, vegetables	Mycontrol ISRAEL
Vaminoc	mycorrhizal fungi	Botrytis spp. Pythium spp.	cucumbers	Biological Crop Protection, Ltd. Ashford, Kent UK
Victus*	Pseudomonas fluorescens strain NCIB 12089	Pseudomonas tolaasii that causes bacterial blotch disease	mushrooms	Sylvan Spawn Laboratory Kittanning, PA USA

## 제 3장 연구개발수행 내용 및 결과

### 1절 풋마름병균에 대한 길항 미생물의 분리, 동정 및 작용기작 연구

#### 1. 서론

토양 병원균인 풋마름병균에 대한 방제를 위하여 유기합성 농약을 살포하는 것은 심각한 토양과 지하수의 오염을 초래하기 때문에 길항미생물을 이용한 생물학적 방제가 유일한 대안이라 하겠다. 길항 미생물은 크게 세균, 방선균과 곰팡이로 나눌 수 있으며 이들에 의한 발병억제 기작은 (1) 미생물의 2차 대사산물인 생리활성 물질에 의한 병원균의 저해 (antibiosis 기작) (2) sideropher 생산에 의한 Fe 이온에 대한 경쟁(Amyrosi et al. 2000), 즉 미생물들이 성장의 제한요인이 되는 철(iron)을 효과적으로 얻기 위해 분비하는 물질인 Siderophore 생산균주(Dale et al. 2002; Meyer et al. 2002)와 식물 병원균과 철 경쟁을 유발시켜 병원균의 토양 내 철 이용을 제한함으로써 병원균에 의한 발병 억제, (3) 토양 유래의 병원균 억제에 가장 중요한 요건이라 할 수 있는 식물 뿌리의 근착 능력(Bharathi et al. 2004)이 강한 근권 미생물에 의한 식물 뿌리 표면의 colonization 경쟁 (Landa et al. 2002) (5) 기주 방어 체계(host defense system)의 활성화(van Loon et al. 1998) (6) 식물생장 촉진효과(Peix et al. 2001)로 병원균에 대한 노출시기 단축 등의 여러 복합적인 기작에 의해 식물병원균의 발병을 억제함이 알려졌다.(Bkker et al. 2003)

본 연구에서는 논, 밭, 산림, 그리고 갯벌 등 토양형이 서로 상이한 지역의 토양을 균 분리원으로 하여 세균과 방선균을 분리하였으며, 또한 수년간 풋마름병 발생이 보고되지 않은 지역의 고추와 토마토의 뿌리로부터 근권 미생물을 분리한 다음 분리한 균주를 대상으로하여 보다 효과적인 방법인 작용기작에 의

거한 screening 으로 풋마름병균에 대한 길항균을 1차 선발하였다. 각 작용기작 별로 선발된 균주 중에 특히 강한 활성을 보인 균주에 대하여 2차로 *in vivo* pot assay를 실시하여 강한 풋마름병 발병 억제 효과를 보이는 균주들을 실용화를 위한 우수 균주로 선발하였으며, 선발 균주에 대해 16 rDNA sequence 분석으로 균주 동정을 실시하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 공시 토양으로부터 미생물의 분리

#### 1) 토양 미생물의 분리 및 배양

토양 시료 1g을 2~3시간 풍건하여 멸균수로  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  그리고  $10^{-4}$ 로 희석한 후, Bennet media, glucose minimal salts media, PDA plate (배지 조성 Table 1-1)에 각각  $200\mu\text{l}$ 씩을 도말하고 Bennet media는 28℃에서 3일간, glucose minimal salts media는 30℃에서 1일간, PDA배지는 28℃에서 4일간 배양한 후 나타난 single colony를 가용성 색소의 생성 유무, spore의 형성유무 및 형태 등을 관찰하여 각기 다르다고 판단되는 균주를 보존용 slant에 계대한 후 이를 사용하여 액체배양을 실시하였다. 방선균의 경우는 glucose soluble starch medium(GSS)에 접종하여 150 rpm에서 5일간 배양하고 세균의 경우는 glucose minimal salts broth에 접종하여 130rpm, 30℃에서 24시간, 곰팡이는 PDB에 접종하여 120rpm, 28℃에서 10일간 배양하여 회수한 배양액으로 활성을 검정하였다.

## 2) 근면, 근권 미생물 분리

수년간 풋마름병이 발생하지 않은 지역에서 재배한 잘 자란 고추와 토마토를 뿌리째 뽑아 흙을 털어낸 다음 근권 미생물은 뿌리에 붙어 있는 흙만 따로 털어내어 멸균수로 진탕 후 정치하여 상등액 1 ml을 취해 순차적으로 희석하고, 근면 미생물은 멸균수에 뿌리를 2~3시간 담구었다가, 상등액을 멸균수로  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  그리고  $10^{-4}$ 로 희석하여 tryptic soy agar(TSA) 배지와 bennet media에  $200\mu\text{l}$ 씩 도말하여 bennet media는  $28^{\circ}\text{C}$ 에서 3일간, TSA배지는  $28^{\circ}\text{C}$ 에서 1일간 배양한 후 나타난 single colony를 보존용 slant 에 계대하여 액체배양에 사용하였다.

Table 1-1. Composition of media

media	composition	
Bennet media	glucose	10g
	peptone	2g
	beef extract	1g
	yeast extract	1g
	agar	20g
	distilled water	1 <i>l</i>
	pH7.3	
glucose minimal salts media	glucose	2g
	yeast extract	10g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2g
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3g
	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.1g
	MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.02g
	distilled water	1 <i>l</i>
GSS media	soluble starch	10g
	glucose	20g
	meat extract	1g
	yeast extract	4g
	NaCl	2g
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.05g
	soybean meal	25g
	distilled water	1 <i>l</i>
pH 7.3		
TZC media	peptone	10g
	casamino acid	1g
	glucose	5g
	TTC (stock : 0.5%)	10ml
	distilled water	1 <i>l</i>

### 3) ACC(1-aminocyclopropane-1-carboxylate) deaminase activity 활성 균주 선발

ACC deaminase enzyme은 ethylene의 전구물질인 ACC를 분해시킴으로써 발아 후 높은 ethylene level에 의한 root elongation inhibition을 막을 수 있기 때문에, ACC deaminase enzyme을 생산하는 미생물들은 plant growth을 촉진시킬 뿐만 아니라 식물병원균에 대한 식물체의 저항성을 증가시킬 수 있다고 보고된 바 있다. 따라서 생물학적 방제제로 개발하기 위한 미생물을 좀 더 효과적으로 선발하기 위해, ACC deaminase enzyme 생산 균주를 Glick 등의 방법에 의해 screening 하였다.

Table 1-12. Composition of media used to screen ACC deaminase activity

media	composition	
PAF medium	proteose peptone	10g
	casein hydrolysate	10g
	anhydrous MgSO <sub>4</sub>	1.5g
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.5g
	glycerol	10ml
	distilled water	1 l
DF salt minimal medium	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4g
	MgSO <sub>4</sub>	0.2g
	FeSO <sub>4</sub>	1.0mg
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10.0µg
	MnSO <sub>4</sub>	10.0µg
	ZnSO <sub>4</sub>	70µg
	CuSO <sub>4</sub>	50µg
	MoO <sub>3</sub>	10µg
	glucose	0.2%
	gluconic acid	0.2%
	citric acid	0.2%
distilled water	1 l	
King's B medium	proteose peptone	20g
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.5g
	glycerol	15ml
	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	6g
	Agar	15g
	distilled water	1 l
Nutrient Broth(NB)	beef extract	3g
	peptone	5g
	distilled water	1 l

1g의 토양시료를 멸균된 PAF medium 50ml에 넣어 30℃에서 120rpm으로 24시간 교반시킨 다음 1ml을 취하여 새로운 PAF medium 50 ml에 접종하여 30℃ 120rpm에서 24시간 교반시킨 다음, 1ml을 취해 멸균한 DF Salt minimal medium (N-source로 2g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 첨가) 에 접종하여 30℃ 120rpm에서 24시간 교반시킨다. 다시 1ml을 취하여 멸균된 DF medium(0.3g/l ACC를 유일한 N source로 첨가)에 접종하고 위와 같은 조건에서 교반시킨 다음 일 백금이를 교체 DF Salt minimal medium (3mM ACC 첨가)에 도달하여 28℃에서 48시간 배양한 후 나타난 single colony를 King's B agar slant에 옮겨 28℃에서 24hr 동안 배양하여 보관하며 액체 배양에 사용하였다.

## 나. 작용기작에 입각한 풋마름병균 길항 미생물의 선발

여러 토양 시료에서 분리한 균주를 대상으로 mode of action based screening을 행하여 활성균주를 1차로 선발하였다.

### 1). antibiosis 기작에 의한 풋마름병균 저해균주의 선발

풋마름병 저해 생리 활성 물질을 생산하는 균주 선발은 *in vitro* paper disk method로 행하였다. 세균은 130rpm, 30℃로 glucose minimal salts broth에 24시간, 방선균은 230rpm, 28℃로 GSS broth에 5일, 곰팡이는 120rpm, 28℃에서 10일간 PDB에 배양, 그리고 근권 미생물은 130rpm, 30℃에서 24시간 이상 TSB 배지에서 각각 배양한다. TZC plate에 *Ralstonia solanacearum* broth를 함유한 top agar를 분주하여 굳힌 bioassay 용 plate에 배양액을 함유한 paper disk (직경 10mm)를 올려놓고 30℃에서 24시간 배양하여 나타난 생육 저지환의 크기를 측정하였다. disc의 diameter를 제외한 저지환의 크기에 따라 3등급 ( 1등급:13mm 이상, 2등급: 9~12mm, 3등급: 8mm 이하 ) 으로 활성도를 나타내었다.

## 2). siderophore 생산 균주의 선발

siderophore 생산 균주를 Schwyn과 Neilands의 siderophore detection 방법인 Chrome Azurol Sulfonate (CAS, Sigma) assay (Schwyn et al. 1987)로 선발하였다. 증류수 50 ml에 CAS 60.5 mg을 녹인 다음 10 ml의 1 mM  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (10 mM HCl용액)을 넣고 천천히 저으면서 72.9 mg의 HDTMA(Hexadecyltrimethylammonium bromide)를 증류수 40 ml에 녹인 용액을 첨가시켜 고압 멸균하여 진한 청색염료 용액을 준비한 다음  $\text{H}_2\text{O}$  750 ml, 10X MM9 salt 100 ml, agar 15 g, Pipes 30.24 g, 10% casamino acid 용액 30 ml, carbon source와 vitamin 등을 혼합한 용액(pH 6.8)을 고압 멸균하여 50°C로 식힌 후 준비해 둔 CAS 염료용액을 거품이 나지 않도록 첨가하여 plate에 분주하여 제조한 CAS 평판배지에 배양액 20  $\mu\text{l}$ 를 점적하고 30°C에서 2일간 배양한 후 주위에 orange halo zone 의 생성을 확인하였다. 또한 탈철화 배지인 King's B 배지에서 배양한 후 형광성 여부를 확인하였다.

## 3). root colonization and elongation assay.

고추(부강 품종)와 토마토(서광 품종) 종자를 구입하여 2% sodium hypochloride 용액으로 2분간 처리하여 표면 살균한 후 멸균수로 여러 번 행구어 사용하였다. 1% water agar plate에 고추 또는 토마토 종자를 올려놓고 각 종자 주위에 열배로 희석한 균체 현탁액 1 ml씩 점적한 후, 28°C growth chamber에서 뿌리 생장과 뿌리 주위의 균주의 집락형성을 10 일간 관찰하였다. 대조군의 경우는 균체 현탁액 대신 멸균된 TSB를 종자 주위에 처리하였다. 각 처리 당 종자 6개씩 3번 반복실험 하였다.

#### 4). Plant growth hormone 생산 균주의 선발

배양여액 내 auxin 농도 측정과 germination test로 식물생장 hormone 생산 균주를 선발하였다.

##### 가) 배양여액 내 auxin 농도 측정

TSB 배지로 30℃에서 120rpm으로 24시간 배양한 후 배양액을 원심 분리하여 얻은 상등액에 Salkowski's reagent(concentrated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 150ml; distilled water, 250ml; 0.5 M FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O ,7.5ml)를 1:4의 비율로 첨가하여 vortexing하고 20분간 상온에서 반응시킨 다음 535nm에서 흡광도를 측정하여 standard curve와 비교하여 배양여액 내 옥신의 농도를 계산하였다.

##### 나) Germination test

발아가 빠른 열무를 발아시험 공시작물로 선정하였다. 열무의 씨앗은 5% sodium hypochloride 용액에 약 10분간 담가둔 뒤 증류수로 충분히 행구어 사용하였다. 직경 9 cm의 petri-dish에 멸균한 여지를 깔고 균주 배양 상등액을 멸균수로 1/2, 1/10 로 희석시킨 용액으로 여지를 충분히 흡수시킨 다음 공시작물의 종자 6립을 여지 위에 놓고 27 °C에서 발아시키며 대조구와 비교하며 줄기의 성장을 관찰하였다.

#### 다. *in vivo* pot assay 에 의한 풋마름병 발병 억제효과 검증

지름 10 cm 포트에 바로커 상토(한국농자재 주식회사)를 180 g 채우고 종자를 파종한 다음 25-35℃로 유지되는 하우스에서 재배하여 4 엽기가 되었을 때 선발균주 현탁액을 포트 당 30 ml(10<sup>9</sup> CFU/ml)씩 분주하고, 이틀 후 뿌리에 상처를 낸 다음 *R. solanacearum* 현탁액을 30 ml(10<sup>7</sup> CFU/ml)씩 관주하여 발병을 유도하였다. 선발된 PGPR 균주에 의한 발병 억제효과를 4 주간 관찰하였다. 대조구는 선발균주 처리 없이 *R. solanacearum* 현탁액 만 처리하였으며, 각 처리 당 10 본 씩 3 회 반복 실험하였다. 풋마름병 발병률은 식물이 아주 싱싱한

경우는 0, 잎이 약간 시든(25% 미만) 경우는 1, 중간정도(50 % 미만) 시든 경우는 2, 심하게(75 % 정도) 시든 경우는 3, 완전히 시들어 고사한 경우를 4로 등급을 정하였으며, 발병 억제율은 {(대조구의 발병률-처리구의 발병률)/대조구의 발병률} x 100 으로 계산하였다.

#### 라. 선발균주의 antimicrobial spectrum 조사

선발 균주가 생산하는 활성물질의 평균 spectrum을 paper disk method 로 다음과 같은 실험균주에 대해 조사하였다. test organism 으로는 그람양성균 주로 *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, 그람 음성균주로 *Escherichia.coli*, *Salmonella gallinarum* , yeast인 *Saccharomyces cerevisiae*, fungi인 *Phytophthora capsici*, *Phytophthora parasitica*, *Botrytis cineria*, *Penicillium sp.*, *Rhizopus stonifer* 을 사용하였다.

#### 마. 선발균주의 동정

여러 발병억제기작에 의해 선발된 균주들을 동정하기 위하여 16S rDNA 를 elution 하고 정제하여 PCR(sequencing primer인 519r을 이용함으로써 1500bp중에 0~519bp 까지만을 증폭시킴)을 실시하였다. Buffer 교환을 통해 PCR product를 정제한 후 ABI PRISM™ BioDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit를 통해 sequencing한 결과를 BLAST에서 GeneBank data(<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST>)를 이용하여 균주를 동정하였다.

### 3. 실험 결과 및 고찰

#### 가. 공시토양 채취 및 토양미생물의 분리

경기 고양, 양평, 을왕리, 강원 춘천, 황성, 충북 옥천, 경남 의령 등의 논, 밭, 산림, 갯벌등의 토양으로부터 세균 총 3308 strains, 방선균 총 192 strains, 곰팡이 총 138 strains이 분리되었다. 수 년간 풋마름병 발생이 보고되지 않은 지역, 하남, 고양, 여주, 옥천, 의령, 진주 그리고 해남 지역 70개 site에서 채배된 토마토와 고추로부터 근권·근면 미생물 총 298 strains이 분리되었다. 분리된 rhizobacteria 중 ACC deaminase 활성을 갖는 균주 21주를 분리하여 그중 활성이 큰 균주를 선발하여 root elongation assay를 실시하였다.

#### 나. 작용기작에 의한 풋마름병균 길항 미생물의 선발

풋마름병 발병 억제 효과를 보이는 선발균주의 작용기작은 (1)항생물질 생산에 의한 antibiosis 기작, (2)siderophore를 생산함으로써 Fe ion competition을 유도하는 기작, (3)근권에서의 root colonization competition에 의한 기작, (4)식물 성장을 촉진시킴으로써 병원균 노출 시기 단축에 의한 발병억제 기작으로 설명할 수 있으며, 균주에 따라서 한 가지, 또는 2가지 이상의 복합적 기작에 의해 발병을 억제함이 밝혀졌다. 따라서 본 연구에서는 mode of action based screening을 실시하여 활성 균주 선발을 보다 효율적으로 할 수 있었을 뿐만 아니라, 활성균주들을 작용기작 별로 분류하여 복합 미생물 제제 개발을 위한 기초 자료로 활용하였다. 아래와 같이 활성균주를 작용기작별로 크게 4 group으로 분류하였다.

## 1) Antibiosis 기작 group

선발된 활성균주 중에 159종이 *Ralstonia solanacearum* 병원균에 대한 antibiotics 생산에 의해 발병을 억제함이 밝혀졌으며 그 중에서 가장 활성이 강한 1 group에 해당하는 균주 TS1-2, TS1-3, A27-3, A47-2, A48-2, A100-1, A253-16, A254-10, A256-10, A256-11, A256-12, A256-18 등 총 18종에 대해서 2차로 *in vivo* pot assay에 의해 풋마름병 방제효과를 검정하였다(Figure 1-1).



Figure 1-1. Antibiosis of *Ralstonia solanacearum* by the selected strains.

## 2) Siderophore 생산 group

siderophore를 생산하는 균주의 선발은 CAS를 사용한 정성적인 chromogenic assay로 하였다. CAS agar plate에 well을 만들어 배양액을 넣고 30℃에서 2일간 배양하면 siderophore 생산 균주는 강한 킬레이트인 siderophore가 CAS 용액의 Fe(III)과 결합하여 푸른색이 오렌지색으로의 변화로 확인할 수 있다. 토양에서 분리된 298주의 근권 세균 중에서 53주 균주가 CAS blue agar에서 orange halo zone을 보여 siderophore 생산 균주로 확인되었으며 halo zone의 크기가 큰 균주 TS1-2, TS1-5, TS3-7, TS3-9, TP1-2등 15종의 균주를 1차 선발하여 *in vivo* pot assay를 통하여 활성을 2차로 검정하였다. TS1-2, TS1-3 균주의 경우에는 siderophore와 더불어 항균물질도 생산하는 것으로 나타났다. (Fig.1- 2)

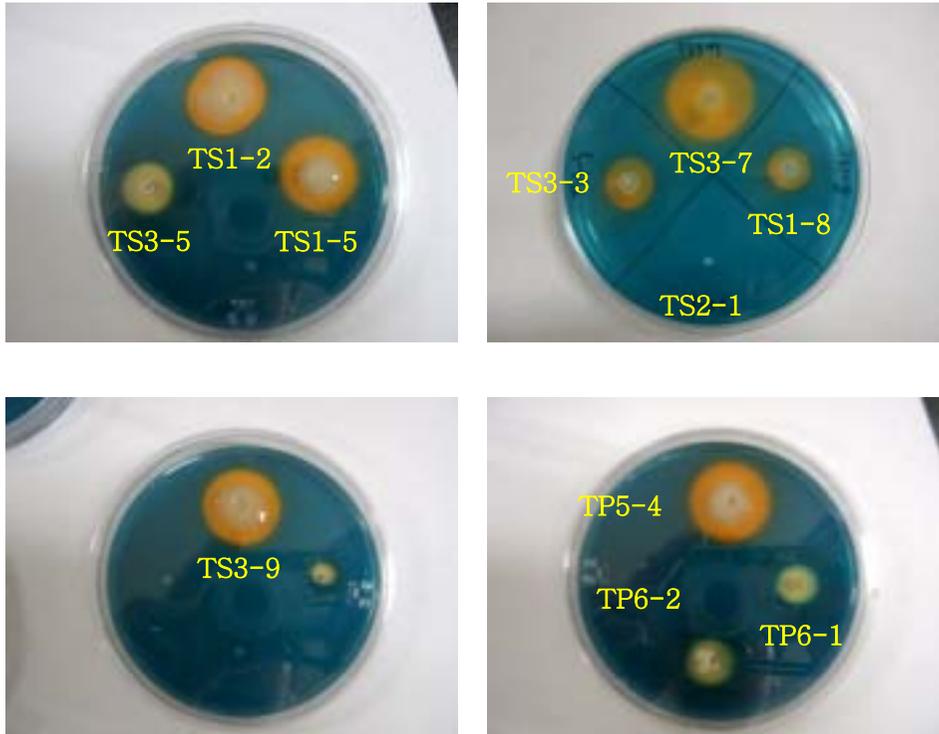


Figure 1-2. Orange halo zone of siderophore producing strains on CAS blue agar

### 3) Root colonization competition 과 root elongation group

TSA 평판 배지를 이용하여 토마토와 고추의 근권에서 분리한 298종의 근권 미생물 중에서 ACC deaminase 활성을 갖는 균주와 siderophore 생산 균주를 대상으로 root elongation assay를 행한 결과 뿌리 주위의 agar에 뿌렇게 집락을 형성하고 대조구에 비해 10 % 이상 뿌리의 성장을 촉진시키는 11개 균주 TS1-5, TS1-7, TS2-7, TS4-3, TS6-4, SKU-7, SKU-65, SKU-78, SKU-132, SKU-134, SKU-155를 선발하였다.(Table 1-3.)

Table 1-3. Effects of the selected plant growth promoting rhizobacteria strains on root elongation of pepper plant

Strains	SKU-7	SKU-65	SKU-78	SKU-132	SKU-134	SKU-155
Root elongation rate (%)	10.3	10.2	15.2	10.3	14.2	12.8
Strains	TS1-5	TS1-7	TS2-7	TS4-3	TS6-4	
Root elongation rate (%)	12.6	11.4	10.8	10.2	13.8	

Mean root length in millimeters was measured at 10 days after treatment. An equal number of plants was treated with sterile distilled water as control.

Root elongation rate = {(root length of treatment group-root length of control)/root length of control}x100

#### 4) Plant growth hormone 생산 group

Salkowski's reagent를 이용한 발색반응을 통하여 0.02mM 이상의 옥신을 생산하는 10종의 균주 B312-2, B319-8, B321-3, B321-6, B354-6, B359-14, B359-15, B361-5, B361-7, B368-9를 1차로 선발하였다. auxin 생산균주로 선발된 10종 균주의 배양액을 EtOAc로 추출하여 농축한 다음 TLC를 Chloroform: MeOH: water=85: 14: 1의 용매계로 행하여 표준물질 indole acetic acid (IAA)와 같은 Rf 0.4에 선발된 10종 모두 동일한 band를 나타내어 auxin 생산을 확인하였다. 이중 종자 처리에 의해 식물의 성장 촉진 능력이 우수한 두 종(B361-5, B354-6)을 최종 선발하였다. (Fig. 1-2). auxin 생산 균주로 열무에 대하여 줄기 성장 촉진 효과가 뛰어난 선발균주 B361-5, B354-6균주에 대해 고추에 대한 성장촉진효과를 *in vivo* pot 실험으로 검증하였다. 종자를 파종한 다음 4 엽기가 되

있을 때 선발균주 현탁액을 포트 당 30 ml ( $10^9$  CFU/ml)씩 분주하고 성장 촉진 효과를 4 주간 관찰하였다. 대조구는 선발균주 처리 없이 물 만 주었으며, 10 분 씩 3 회 반복 실험하였다. plant growth hormone을 생산하는 균주로 최종 선발된 B361-5, B354-6 균주에 대해서는 배양조건의 확립 및 타 group의 선발 균주간의 길항성 여부를 파악하여 미생물 복합 제제 개발 연구에 이용되었다. (5 장의 연구 결과 참조)



(a)



(b)



(c)

Figure 1-3. The shoot elongation assay.

(a) control; (b) treated with B354-6; (c) treated with B361-5.



Figure 1-4. Plant growth assay. left lane: treated with B361-5; center lane : treated with B354-6; right lane : control

이상과 같이 작용기작 별로 가장 강한 활성을 갖는 길항 미생물을 선발 하여(Table 1-4), *in vivo* pot assay를 통해 풋마름병 발병 억제 효과를 나타내는 균주를 2차로 선발하였다.(Figure 1-5.)

Table1-4. Grouping of the selected potential strains on the basis of the mode of action

mechanism	The selected potential strains
antibiosis	A27-3, A31-1, A47-2, A48-2, A100-1, A253-16, A254-10, A256-10, A256-11, A256-12, A256-18, TS1-2, TS1-3, D27, D134, B72-3, B107-1, B110-5
siderophore	TS1-2, TS1-3, TS1-5, TS3-7, TS3-9, TS5-8, TS6-4, TS6-8, TP1-1, TP1-2, TP1-8, TP2-5, TP3-1, TP3-4, TP5-4
root colonization	TS1-5, TS1-7, TS3-7, TS4-3, TS6-4, SKU-7, SKU-65, SKU-78, SKU-132, SKU-134, SKU-155
plant growth hormone	B354-6, B361-5

#### 다. 작용기작 별 선발 활성 균주의 *in vivo* pot assay에 의한 풋마름병 억제 활성 검정

생리활성물질 생산을 통해, 즉 antibiosis 기작에 의해 풋마름병균에 대해 억제 활성을 갖는 균주 중 가장 강한 활성을 나타낸 균주 18 중, 선발된 siderophore 생산 균주 15종, 그리고 뿌리 성장 촉진 효과와 뿌리에 집락형성 여부를 확인하는 실험을 통해 선발된 11종 활성균주들에 대해 *in vivo* pot assay를 통하여 발병억제 효과를 검정하였다. 선발균주 현탁액을 토양에 관주처리하고 발병억제효과를 활성균주의 처리 없이 *R. solanacearum* 만 처리한 대조구에 대한

발병 억제율로 나타내었다. *R. solanacearum* 처리 후 고추는 평균적으로 9일 후에 발병증세를 보였고, 토마토는 평균 5일정도만에 발병증세를 보였으며, 발병 후에도 토마토가 고추보다 빠르게 병이 진전됨을 관찰할 수 있었다. 각 처리마다 토마토와 고추를 각각 10주 씩 3번 반복 실험하여 평균값을 구하였다. 생리활성 물질 생산에 의해 antibiosis 작용 기작으로 풋마름병균에 대해 저해활성을 갖는 균주 중에서 A27-3, A47-2, A48-2, A100-1, A254-10, A253-16, A256-10, A256-11, TS1-2, TS1-3의 10개의 균주가 특히 강한 방제효과를 나타냈고, root colonization과 root elongation 효과를 보이는 균주 중에서는 TS1-5, TS4-3, TS6-4, SKU-65, SKU-78, SKU-134 균주 6종이 최종적으로 선발되었으며, siderophore 생산 균주로는 TS1-2, TS1-3, TS1-5, TS3-7, TS3-9, TP1-2, TP2-5, TP3-4, TP5-4의 9개 균주들이 최종적으로 풋마름병 방제제 개발 실용화를 위한 후보 균주로 선발되었다. (Table1-5.) (Fig.1-6,7)

Table 1-5. Suppression of bacterial wilt of tomato and pepper plants by the selected strains

Suppression mechanism	Strains	Biocontrol efficacy (%) <sup>a</sup>	
		Pepper	Tomato
Root colonization	TS1-5	37.5	20.3
	TS4-3	35.0	15.2
	TS6-4	47.5	30.8
	SKU-65	42.5	25.9
	SKU-78	42.5	31.3
	SKU-134	32.5	10.8
Siderophore production	TS1-2	57.5	50.3
	TS1-3	35.0	15.2
	TS1-5	47.5	30.8
	TS3-7	75.1	60.0
	TS3-9	42.5	31.3
	TP1-2	45.3	20.8
	TP2-5	32.9	23.6
	TP3-4	51.1	15.9
Antibiosis	TP5-4	43.7	38.6
	A27-3	68.8	52.4
	A48-2	47.5	30.2
	A79-2	34.2	18.8
	A100-1	72.4	58.8
	A253-16	69.1	47.2
	A256-10	63.3	52.7

<sup>a</sup> Data represent means of 10 replications of each treatment. The experiment was repeated three times. Plants were grown in potting soil and was drenched with bacterial cell suspension and 2 days later *R. solanacearum* was inoculated. Disease severity was rated 10 days after inoculation with *R. solanacearum*. Biocontrol efficacy is based on the comparisons to the nonbacterized but pathogen-challenged controls.



(a)

(b)

(c)



(d)



(e)

Figure1-6. Suppressive effects on the bacterial wilt disease by the selected strains

(a)control (b)TS1-2 (c)TS1-5 (d)TS3-7 (e)TS3-9



(a)



(b)



(c)



(d)



(e)



(f)

Figure 1-7. Suppressive effects on the bacterial wilt disease by the selected strains

(a)A48-2 (b)A100-1 (c)A253-16 (d)TP1-2 (e)TP3-4 (f)B361-5

## 라. 선발균주의 antimicrobial spectrum

풋마름병균에 대한 길항활성 외에 다양한 식물 병원균에 대해 항균 활성을 갖는 선발균주 단독 또는 mixture를 이용한 생물농약 개발을 위한 기초 자료로 선발균주의 antimicrobial spectrum을 조사한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.(Table 1-6.).

특히 고추의 경우 역병과 풋마름병의 발병 초기증상이 유사하여 진단이 불가능하여 초기 방제의 어려움이 있는데 풋마름병뿐만 아니라 고추 역병균에 대해서는 강한 항균활성을 나타내므로 역병과 풋마름병 모두의 초기 방제제로 사용 가능한 균주를 선발하였다.

Table 1-6. Antimicrobial spectrum of active compound

	G <sup>-</sup> bacteria		G <sup>+</sup> bacteria		Yeast		Fungi			
	<i>Salmonella gallinarum</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Phytophthora parasitica</i>	<i>Phytophthora capsici</i>	<i>Penicillium</i> SP.	<i>Rhizopus stromboli</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
A27-3	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-
A47-2	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-
A48-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A100-1	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
A253-16	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
A254-10	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
A255-10	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
A255-11	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TS1-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TS1-3	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
TS1-5	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TS3-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TS3-9	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TS4-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TS5-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TP1-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TP2-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TP3-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TP5-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SKU-65	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
SKU-78	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
SKU-134	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B361-5	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+
B354-6	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+

마. 선발 균주의 동정

발병 억제 효과가 우수한 균주의 16S rDNA sequence를 분석하여 동정한 결과는 다음과 같다. (Table 1-7.)

1) 16S rDNA sequence and similarity of A47-2

TAGTTAGCCGGCGCTTCTTCTGCAGGTACCGTCACTTTCGCTTCTTCCCTACTGA AAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCCCTCACGCGCGTGCCTGCATCAGGCT TGCGCCCATTTGTGCAATATCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGT CTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTCACCCTCTCAGGCCGGCTACCCGTCGTCGCCTTGG TGAGCCATTACCTACCAACAAGCTGATAGGCCGCGAGTCCATCCAAAACCACAA AAAGCTTTCCACCCCCACCATGCGATGAGGAGTCATATCCGGTATTAGACCCAG TTTCCCAGGCTTATCCCAGAGTTAAGGGCAGGTTACTCACGTGTTACTCACCCGT TCGCCACTAATCCCCGGTGCAAGCACCGGATCATCGTTGACTTGCATGTGTTAA GCACGCCGCCAGCGTTCATCTGAGCGGNNNNNNCNAACCNCTAAA		
Source	Length	Identities
Arthrobacter sp. 'SMCC G980'	1333	468/469 (99%)
Arthrobacter sp. 'SMCC G963'	1327	468/469 (99%)
Arthrobacter sp. pfB10	790	469/470 (99%)
Arthrobacter sp. 12E 16S ribosomal RNA gene	1336	469/470 (99%)
Arthrobacter globiformis gene for 16S rRNA	1517	467/469 (99%)
A.globiformis small subunit ribosomal RNA	1531	467/469 (99%)
Arthrobacter sp. strain R1_6_cr	475	466/467 (99%)

2) 16S rDNA sequence and similarity of A48-2

GCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCGCCCTATTTGAACGGCACTT  
 GTTCTTCCCTAACAAACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCGGC  
 GTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTA  
 GGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTGGGCTA  
 CGCATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTC  
 CATCTGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTTATGTCTGAACCATGCGGTTTCAGAC  
 AACCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTACAGGCAGGT  
 TACCACGTGTTACTCACCCGTCCGCGCTAACATCAGGGAGCAAGCTCCCATCTG  
 TCCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCTTGAGCGNGNNCC  
 NAAACTCTAAA

Source	Length	Identities
Bacillus sp. DF49 16S ribosomal RNA gene	1425	493/493 (100%)
Bacillus sp. DF12 16S ribosomal RNA gene	1424	493/493 (100%)
Bacillus subtilis 16S ribosomal RNA gene	959	493/493 (100%)
Bacillus subtilis strain CC-KM2-1	1035	493/493 (100%)
Bacillus subtilis strain B1144	1541	493/493 (100%)
Bacillus sp. Bch1 16S ribosomal RNA gene	1545	493/493 (100%)
Bacillus sp. PP19-H3 gene for 16S rRNA	1472	493/493 (100%)
Bacillus sp. gene for 16S rRNA strain PM3	1523	492/493 (99%)
Bacillus sp. DF27 16S ribosomal RNA gene	1424	492/493 (99%)
Bacillus sp. DF15 16S ribosomal RNA gene	1424	492/493 (99%)

3) 16S rDNA sequence and similarity of A253-16

GNTTAGNCCGGTGGCTTTTATCTCGTGGTTNGGGGTAACGGTTCAAAGGCCGNTC  
 NCNCNNTTTNATGGTAANGGGGACCTCTGTCTCTCTCCNNTNTAAAGTGAGTCT  
 TATCAATATCGCAGAGACNCTCTCTCTNNACACTACNCCGCGCGATGGTGTGTGC  
 NTGCAGAGGCATCTTCGCCGCTCACTATGTGCCAANAATATNCCCANATGTGTGT  
 GCTCTCCGCGAGGGAGAGCTGTGACGCGCTGTCTCACAGTCCAGATGTGTACGTG  
 CATANTACCTCCTCACAACGCAGGGTANAGGATATCGCGCGCTTG  
 TGTGTAGAGCACGTACCCTCNACCAAACCTANAGTATATNTGCACCTAGGCGTCAC  
 ACTGTATAGAGTGAGAGGGCCCGAAAGGCACCCTCTGTATNTCTCCNGCCAGTGA  
 CGGTATGCGAGNATNANCGNCGTTNCCNANNGTATCCNCCAGNTACCAGGAGA  
 GATTCCTAGGNGTTACTCACNCGTCNGTCGCTCTCAAGAGAAGTAAAGCTTCNNT  
 GTACCGCNTCGACTTGCATGTGTCNAGGNTGTGNGGNCNGNGGNNCAATCTGAGC  
 CAGNNTTCAAACCTCTAAGNNNCNANACTCTAA

Source	Length	Identities
Pseudomonas sp. 16S rRNA gene, clone NB1-f	1502	69/79 (87%)
Gamma proteobacterium WCIF2	611	68/79 (86%)
Pseudomonas sp. 22-Ab	1457	67/79 (84%)

4) 16S rDNA sequence of A254-10

```
TTNGTTNNTCTTCTTNTNTGNTTCNTNGTNTCGNNTGNNTACAACNGGNGTNAANC
TTACCNCCACNCCGCACCTGGCENNNGGNGTGTNAAAAGGTNGAGTCNNCCNCGCNTNT
GGTGTNTGCCAGTTTAANGCNCCCCCTGAGACNANNAATNGCGNTCGGNGTGNANC
NNCCTNTTNTNCCTNCCAATAATATNNAGNNTCCGTNCNNTGGGTTTTNTATNTCN
NNCCTCTCNCCNATNCCTTCTCNCTCCCGCCGNNNCTCCCCCTCNTCNNNNNTTACTT
NTCNNNCCTNGGCNGTNCCTGATGNTNNTCCNTCTNAATATTTAANNATGAGTTNA
TAATAGNNTANNACANTTNNCTTNNNGNTNNTNNCNGNTGTNTANNAGGNTAGNAC
AAATTATNCNTTNNNGCGNNNATCTTNCGGCTNNTCTGNAGNNATATNGGTNNGNA
NGCGGNNNNCNANNNNNTGTNNTTGGNNNGGNNNNGNGNANAANGNACAACCATAA
NNNGTTNGGCNTNNNGGTNGNNNNGGNNNCCGNGNNNGCTNNANGNGNNGTTTGNT
GANCNTNGGNNCNNNNGGGAGNGNNTTNNCAANCCTNTGNGNACCNTTTANNNNCTT
CNNTGNGNNTCNTTNGNNTNCCNATNTNAACCCNCCNCGCTCCTNTATTNTGAN
CNANANCNATGCTTCCCNNGCCNGTGCNCNGNNNGTCCCTCNCNNNTCTNTCCAGAT
NNNCNTNNTCTNTTANAGNAANTCNCNTCGNNTNTANNTNCGNCANTNNCGNNGT
NATNANTGNNNGGCNNANAAANNTANAACNCNAANNNCCNTTGTCAATCATANTGNA
NNANGATTGAANCANGANCGAANACCNNNCTNAACAGATCATNCTCTNTANATCAG
CTANCCNNTGGTATCCTNNCNCANANTNCANCNCATAATATGNTNCCNGCTCATA
CNCACGNTNGNATNNNCCNCTNCTNTCACNTNTCCACTCGNTANCNGATCTNCNTAC
NCCACNGCANCCNTGTCCTACNTATTCNNTANNNCNNTATATTTCTCTCTNNTATAT
ANNNATANNTTCGTCTCNTCGCENNNTGATNCNTNTANGGATCNNNTNTTGGNGANCA
CNGCTTTTGTNCGNNNGANAANANNTANNGCNANNNANGGATGNGCGNANANGAAN
GNTNATTNNGNNTANNCNNAGNNANCCANANCAACTNNTATACCCNNNCGNTGNGTT
ANGTCTCCNGTGANACCGNCGTATGTCATNTCNNTTATCNGTAANCNTATANTNTG
TTATATNNCATCACGGCGCNCNCGCTNANGNCNGTANATNTTTNNGCCGCNNGCNCG
NTCNTACGNNCNCNGCNTGTNANCTCGACNAGCCATNATTGNTANATANTCTTCCCT
TCCCGCTCGAGAGGNTNCNATNTCGCCGGNCGCGCGTGTGCTNNGNNGTTGTAGTTNA
NANCNAGNGNGGTGTGANCTNCGTTANAGGNNAGNCNCNCCGCCTTTTNTGNTCCCG
NNNTTTANTTANGNGCAANNGANATGGATTAGGNGNTTGNAANCNGNTAATACGTN
ANTATCATANTANTTNAANGNCCNCCNCTNCTNTNNTTTNTTNCNTANNCNCCNCCC
CNCNCCCCTGTGATTACCTAATCCANTTNNANCNCTATTGTACNCCGTATAGNTCNCA
NNNGTNGCGAGNNCCNGGCNACATTATTCNCCGTTTACGNCTTNTNAACNCNTACC
NGTTNNTTTTTTACTNNCACGTGNCGCCGNAC
```

5) 16S rDNA sequence and similarity of A256-10

CCGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCGCCCTATTTGA  
 ACGGCACTTGTCTTCCCTAACAAACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCAC  
 TCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTG  
 CCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCCTCTCA  
 GGTTCGGCTACGCATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCG  
 CCGCGGGTCCATCTGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTTATGTCTGAACCATGC  
 GGTTCAGACAACCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTA  
 CAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACATCAGGGAGCAAGC  
 TCCCATCTGTCCGCTCGACTTGCAATGATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCTCTGA  
 GNGGGNTNCNNNAACCTCNAAA

Source	Length	Identities
Bacillus sp. DF49 16S ribosomal RNA gene	1425	500/500 (100%)
Bacillus sp. DF12 16S ribosomal RNA gene	1424	500/500 (100%)
Bacillus subtilis 16S ribosomal RNA gene	959	500/500 (100%)
Bacillus subtilis strain CC-KM2-1	1035	500/500 (100%)
Bacillus subtilis strain B1144	1541	500/500 (100%)
Bacillus sp. Bch1 16S ribosomal RNA gene	1545	500/500 (100%)
Bacillus sp. PP19-H3 gene for 16S rRNA	1472	500/500 (100%)
Bacillus sp. gene for 16S rRNA, strain:PM3	1523	499/500 (99%)
Bacillus sp. DF27 16S ribosomal RNA gene	1424	499/500 (99%)
Bacillus sp. DF15	1424	499/500 (99%)

6) 16S rDNA sequence and similarity of A256-11

CNGTAGTTAGCCGTGGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCGCCCTATTTG  
AACGGCACTTGTTCCTTCCCTAACAAACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCA  
CTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCT  
GCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGGGGGGCCGATCACCCCTCTC  
AGGGCGGCTACGCATCGNCGCCTTGGTGANGCGTTACCTCACCAACTAGCTAATG  
NGCCGCGGGNCCATCTGGAAGTGGGAGCCGAAGCCACCTTTTATGNTTGAACCAT  
GNGGGTCAAACAANCNTCCGGNATTAGCCCCGGGTTNCCGGAGNTTATCCCAGNN  
CTTACAGNGNNNGGTACCCACGGGCTACCCNCCCGNNCCTCCGCTAANAATCAGN  
GGAGNGNAGTTTTCCATNGTGNNCTNTCNNTTGGCNTGTNATNAGGCGNCNCCC  
CCCCTTCNTTTNTNNNNNGNGCNTNGGNCNNNGNCTCTANAGNNGNGGNTNTCCN  
NCCCNTNGNGCGTCNGNCACGTCNGANCCNCGNCCTNNGCTNNANGAACGTCN  
TTGNGTNTNAANTCCNGTNAGCNATGGNCTTNGGNGCINNCCCNNNCGCTTGG  
CNTGNCNNNGNACTGCCGTNGNATGNGGAGCATNTNCNTNGCNCNCCGCGNINN  
AACTGANNATGTTANCGGGAGNGNNGNCCCCCGCNGTCGNGCTNCGCNTATNA  
AGNNTCGGANCCCGGCGTGCTGTTANNATNGCNTTGTGTGNTATTGTTCTTTTCG  
TTCCCCGCCGCCCTNNGCCACNTNTCCNCCCCACCGCCTCNCNCTNTNCNCTC  
CTTNCGTNTTTTNTCGCCNCATCNNTNTNTNCCTCTNCTCNCCTTANAGANTT  
NGTNTNACANCTNGTAGNNCNGNTATGNTNNNGNGGTGNGGTNNNNTCNANC  
TANTCNTGGANTGCGCNGGGNANNCTNNNNGCNGNNGGTNTNGTAGTGTGTC  
NAGNNGATACGTNTGCTGNNNACTTNTCCTCTATNTGTATTTGTCTNNTGTNTG  
NTCNACTGGNGTTNGATGCTGNGTCANCGNCGNTCCGNG

Source	Length	Identities
Bacillus subtilis strain CICC 10158	1483	363/383 (94%)
Bacillus amyloliquefaciens strain CMB01	1527	363/383 (94%)
Bacillus subtilis strain HJ11	1482	363/383 (94%)
Bacillus sp. Ni49 16S ribosomal RNA gene	560	363/383 (94%)
Bacillus sp. Ni45 16S ribosomal RNA gene	560	363/383 (94%)
Bacillus subtilis strain ATCC9799	1422	363/383 (94%)
Bacillus subtilis strain CICC10079	1461	363/383 (94%)
Bacillus subtilis strain CICC10080	1501	363/383 (94%)
Bacillus subtilis strain CICC10264	1498	363/383 (94%)
Bacillus subtilis strain CICC10075	1463	363/383 (94%)

7) 16S rDNA sequence and similarity of TS1-2

CCGNTAGTTGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCGCCCTATTTGA ACGGCACTTGTTCCTCCCTAACAAACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCAC TCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTG CCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCCTCTCA GGTTCGGCTACGCATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCG CCGCGGGTCCATCTGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTTATGTCTGAACCATGC GGTTKANACAACCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTA CAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACATCAGGGAGCAAGC TCCCATCTGTCCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCTCTGA GCGGGNNNNNNAANCTCNNA		
Source	Length	Identities
Bacillus sp. DF49 16S ribosomal RNA gene	1425	492/493 (99%)
Bacillus sp. DF27 16S ribosomal RNA gene	1424	492/493 (99%)
Bacillus sp. DF15 16S ribosomal RNA gene	1424	492/493 (99%)
Bacillus sp. DF12 16S ribosomal RNA gene	1424	492/493 (99%)
Bacillus polyfermenticus 16S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 1, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	2364	492/493 (99%)
Bacillus subtilis 16S ribosomal RNA gene	959	492/493 (99%)
Bacillus subtilis strain CC-KM2-1	1035	492/493 (99%)
Bacillus subtilis strain B1144	1541	492/493 (99%)
Bacillus subtilis gene for 16S rRNA, strain: Tg	1543	492/493 (99%)
Bacillus sp. Bch1 16S ribosomal RNA gene	1545	492/493 (99%)

8) 16S rDNA sequence and similarity of TS1-3

CCGNTAGTTGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCGCCCTATTTGA  
 ACGGCACTTGTCTTCCCTAACAAACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCAC  
 TCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTG  
 CCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCCTCTCA  
 GGTTCGGCTACGCATCGTCGCCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCG  
 CCGCGGGTCCATCTGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTTATGTCTGAACCATGC  
 AACCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTACAGGCAGGT  
 TACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACATCAGGGAGCAAGCTCCCATCTG  
 TCCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCCCTGAGCGNGNNCC

Source	Length	Identities
Bacillus sp. DF49 16S ribosomal RNA gene	1425	484/493 (98%)
Bacillus sp. DF27 16S ribosomal RNA gene	1424	484/493 (98%),
Bacillus sp. DF15 16S ribosomal RNA gene	1424	484/493 (98%)
Bacillus sp. DF12 16S ribosomal RNA gene	1424	484/493 (98%)
Bacillus polyfermenticus 16S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 1, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	2364	484/493 (98%)
Bacillus subtilis 16S ribosomal RNA gene	959	484/493 (98%)
Bacillus subtilis strain CC-KM2-1 16S ribosomal RNA gene	1035	484/493 (98%)
Bacillus subtilis gene for 16S rRNA	1541	484/493 (98%)
Bacillus subtilis gene for 16S rRNA	1543	484/493 (98%)
Bacillus sp. Bch1 16S ribosomal RNA gene	1545	484/493 (98%)

9) 16S rDNA sequence and similarity of TS1-5

GCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACCGCCCTATTCGAACGGTACTT  
 GTTCTTCCCTAACAAACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCGGC  
 GTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCTACTGCTGCCTCCCGTA  
 GGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCCGGTA  
 CGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCATTACCTCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTC  
 CATCTGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTTATGTTTGAACCATGCGGTTCAAAC  
 AAGCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCAGTCTTACAGGCAGGT  
 TACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACATCAGGGAGCAAGCTCCCATCTG  
 TCCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCCCTGAGCGGGNNNC  
 CNAANCTCTAA

Source	Length	Identities
Bacillus subtilis 16S ribosomal RNA gene	1535	493/493 (100%)
Bacillus subtilis strain N10	1534	493/493 (100%)
Bacillus sp. CK8 partial 16S rRNA gene	1179	494/496 (99%)
Bacillus subtilis isolate SUF3	1516	492/493 (99%)
Bacillus mojavensis JF-2 16S ribosomal RNA gene	1529	492/493 (99%)
Bacillus subtilis strain ATCC 6633	1507	489/489 (100%)
Brevibacterium halotolerans, type strain LMG 21660T	1513	487/487 (100%)
Bacillus subtilis strain BZ15	1467	487/487 (100%)
Bacillus subtilis strain MA12	1458	487/487 (100%)
Bacillus subtilis strain MO2	1504	486/486 (100%)

10) 16S rDNA sequence and similarity of TS1-7

TTCTCNGGTACCGTCACCTTGAGAGCAGTTACTCTCCCAAGCGTTCTTCCCTGGC  
AACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCGCATTGCTCCGTCAG  
GCTTTCGCCAATTGCGGAAGATTCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCG  
TGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTTCGGCTACGCATCGTCGCCT  
TGGTGAGCCGTTACCCACCAACTAGCTAATGCGCCGAGGCCATCCCAAGTGA  
CAGATTGCTCCGTCTTCCAGTTTCCTTCAGGCGAAGAAAACA ACTATTCGGTAT  
TAGCTACCGTTTCCGGTAGTTGTCCCAAACCTTGAGGGCAGGTTGCCTACGTGTTA  
CTCACCCGTCCGCCGCTAAGCATCAAAGAAGCAAGCTTCTTATCAACTCCGCTCG  
ACTTGCATGTATTAGGCATGCCGCCAGCGTTCGTCTGAGCGGGTTCCNAAACTN  
CTAA

Source	Length	Identities
Paenibacillus sp. CC-SB818D1	951	480/484 (99%)
Paenibacillus sp. ROO32A 16S ribosomal RNA gene	1470	478/485 (98%)
Paenibacillus sp. IDA5358	1538	477/484 (98%)
Paenibacillus sp. pfB33	717	477/484 (98%)
Paenibacillus amylolyticus gene strain KT5501	1508	477/484 (98%)
Paenibacillus amylolyticus, isolate p14	1511	472/484 (97%)
Paenibacillus sp. MCRI 9 gene for 16S rRNA	538	472/484 (97%)
Bacillus sp. FE1 gene for 16S rRNA	1465	470/474 (99%)

11) 16S rDNA sequence and similarity of TS3-7

CGAGACGTGAGGTCCACTTCCTGATTTCCAAGGCCGCGCAACTGGTGATGGCCACC  
GAGACGGACGTGGCGCTGCCGCCAAGGTGCAGATGATGCAAGCCTTCCTCACCGA  
GTACACCGGTGCGGCGGCAGGGCAGATCAAGGTCTATGGCAAGGAAGATTGGATG  
TCGCCGGTTCGCCTCGGGCTCCGGCGCGCCGGCGGCGATGGTGGTGGTGCCGTGTTC  
CACCGGGACCTTGTCGGCGATTGCCACGGGCGCCTGCAACAACCTGATCGAACGCG  
CGGCGGATGTGACGCTCAAAGAGCGCCGCCAGTTGATCCTGGTGCCACGCGAAGCG  
CCGTATTCGAGCATTACCTGGAGCACATGCTCAAGTCGTCGANCCNCANGGTAA  
CCAACNNNNNNNNNTNTCNNGAGAANCNNNNNTTCTCNTCTANNGCTCNANTT  
GNANGNGNTNNGNCNGNNNNNNNNNTNNNANCNNGACCATGNNNNNANNTTN  
TA

Source	Length	Identities
<i>Pseudomonas fluorescens</i> PfO-1	6438405	323/370 (87%)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5	7074893	314/358 (87%)
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 section 3 of 21	299991	308/363 (84%)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato str. DC3000	6397126	308/366 (84%)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> B728a	6093698	303/363 (83%)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> 1448A	5928787	141/168 (83%)
Synthetic construct <i>Pseudomonas aeruginosa</i> clone FLH041026.01F PA4019 gene	630	93/104 (89%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1, section 379 of 529	11721	93/104 (89%)
<i>Ralstonia solanacearum</i> GMI1000 chromosome	188050	51/59 (86%)

12) 16S rDNA sequence and similarity of TS3-9

CATTCGTGGCTTCTGGTTAGGTACCGTCAGGTGCCGCCCTATTTGAACGGCACTT  
 GTTCTTCCCTAACAAACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCGGC  
 GTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTA  
 GGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTA  
 CGCATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTC  
 CATCTGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTTATGTCTGAACCATGCGGTTTCAGAC  
 AACCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTACAGGCAGGT  
 TACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACATCAGGGAGCAAGCTCCCATCTG  
 TCCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCTGAGCCATGATC  
 AAACCTCTGAT

Source	Length	Identities
Bacillus sp. Bch1 16S ribosomal RNA gene	1545	496/498 (99%)
Bacillus subtilis 16S ribosomal RNA gene	1546	496/498 (99%)
Bacillus subtilis gene for 16S rRNA, strain: B1144	1541	495/497 (99%)
Bacterium Te90R 16S ribosomal RNA gene	1506	495/498 (99%)
Bacterium Te22R 16S ribosomal RNA gene	1515	495/498 (99%)
Bacillus sp. SXQ-2004 16S ribosomal RNA gene	1513	495/498 (99%)
Bacterium Te87R 16S ribosomal RNA gene	1508	491/494 (99%)
Bacterium Te70R 16S ribosomal RNA gene	1515	495/498 (99%)
Bacillus licheniformis strain HK-1 16S rRNA gene	1424	495/498 (99%)
Bacillus amyloliquefaciens 16S rRNA gene	535	494/498 (99%)

13) 16S rDNA sequence and similarity of TP1-8

ATCGTGGCTTCTGGTAGGTACCGTCAGGTGCCGCCCTATTTGAACGGCACTTGTT  
 CTTCCCTAACAAACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCGGCGTT  
 GCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGA  
 GTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCCTCTCAGGTCGGCTACGC  
 ATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCAT  
 CTGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTTATGTCTGAACCATGCGGTTCAAACAAC  
 CATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTACAGGCAGGTTAC  
 CCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACATCAGGGAGCAAGCTCCCATCTGTCC  
 GCTCGACTTGCAATGATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCTTGAGCCATGTCCAA  
 ACTCTAAATGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTA  
 CTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGAAACCCCC  
 TAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT  
 CGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTCGC  
 CACTGGTGTGCGTCCACATCTCTACACATATCACCGCTACACGTAGGAATTCCAC  
 TCCTCCTC

Source	Length	Identities
Bacillus subtilis 16S ribosomal RNA gene	1546	490/493 (99%)
Bacterium Te22R 16S ribosomal RNA gene	1515	489/493 (99%)
Bacterium Te90R 16S ribosomal RNA gene	1506	488/492 (99%)
Bacterium Te35R 16S ribosomal RNA gene	1504	483/486 (99%)
Bacterium Te70R 16S ribosomal RNA gene	1515	489/493 (99%)
Bacterium Te87R 16S ribosomal RNA gene	1508	478/480 (99%)
Bacillus licheniformis strain HK-1 16S rRNA gene	1424	488/492 (99%)
Bacterium Te85R 16S ribosomal RNA gene	1516	479/481 (99%)
Bacterium Te84R 16S ribosomal RNA gene	1520	488/493 (98%)
Bacillus subtilis gene for 16S rRNA	1543	478/479 (99%)

14) 16S rDNA sequence and similarity of TP3-4

CGAGTCAGTGCTTCTTCTGCGGGTACGTCAATCGATGAGGTTATTAACCTCACCG  
 CCTTCCTCCCCGCTGAAAGTGCTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCACACACGCGGC  
 ATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTA  
 GGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGGCTGGTCATCCTCTCAGACCAGCT  
 AGGGATCGTCGCCTAGGTGAGCCGTTACCCACCTACTAGCTAATCCCATCTGGGC  
 ACATCTGATGGCATGAGGCCCGAAGGTCCCCACTTTGGTCTTGCGACGTTATGC  
 GGTATTAGCTACCGTTTCCAGTAGTTATCCCCCTCCATCAGGCAGTTTCCAGAC  
 ATTACTACCCGTCCGCCGCTCGTCACCCGAGAGCAAGCTCTCTGTGCTACCGCTC  
 GACTTGCATGTGTTAGGCCTGCCGCCAGCGTTCAATCTGAGCCATGATCAAACCTC  
 ATA

Source	Length	Identities
Klebsiella sp. strain zmvsvy 16S ribosomal RNA gene	1504	490/493 (99%)
Klebsiella sp. strain zmno 16S rRNA gene	1504	489/493 (99%)
Klebsiella sp. PN2 gene for 16S rRNA	1532	488/492 (99%)
Klebsiella sp. P2 gene for 16S rRNA	1533	483/486 (99%)
Klebsiella sp. strain zlmy 16S rRNA gene	1498	489/493 (99%)
Klebsiella sp. CBNU-34-2 16S ribosomal RNA	1494	478/480 (99%)
Klebsiella pneumoniae 16S ribosomal RNA gene	800	488/492 (99%)

15) 16S rDNA sequence of SKU-7

```
TTTNNTCGCNCCNTTNTCTTANACNAAANTANGNNNGGCANANNNGANNNCAGT
GCNACNNAGGAGCANNNTTNTNGGTNACGNCGCTTNNAAAGACNNNCACNCNAN
NGNGGNTNAGAGNGNAGCNGGTGAGCGTNTNTCCCCNNANGAAAAANNAGNNN
GCAGCNCNAAGAGAANNNTGNACANATANAATAATNANNNGGCNGNGGNNNGA
ANGNNAGNTGNGTTAGGACGANTCNGNCNTGNTNNGTTGTTTCNCCNATGANAN
AANANNAACANNNTACCNNCNAAAAGAGNTTTCGNATATNTTTCNCNTCTNTT
NTNCNTANTNANNNCNGGNAGATAGGAGGTAGACGGCNAGCNNNGAGAGNGNCC
CNCGTGAGTGGATCNCNTTATGNTTGNANANGNTATNTCNNACTGCGGNTGGN
NNTNNGGTTANNTNATTGNNCANGAGNTNNGNAGGTGGGGTATATAGTCGCGNG
GNGGNNATNACTTCANNTAANTCTCTAAGTATNCNAATGGATCTNGNTGNNNNG
NTGNGNNGGNGNGGNNNNNTNGNNNGGNGGAGNGNATANCCGATCTTNACANAC
CNGGTGAGGGNAGCNTCACNNCGNCNAGTGNNNNNTCNNTNNGNTGNATANANN
AGNATAGGAAGGANNNTTACNCACGNTTNNCGCNTCNTCCNNNNNNCGNCNANC
NNNATNNANANNCGTAGCTGTCAATCACCTGATNNAANNACNNAATGGTATCA
GTTTNTCTNNNNANAGGCCNGGNGNGGGANNGGNCANNANATATAGGTCNNANN
NAATGGAGNGGNAGANGGNGGCNTAGAGAGNNGNGNNGCNCNCNNNTANGGAGG
TNCGNCNNNNNTGATNGTNGANCAGACNGTAGANGGTGAAGCANNNNCANCGGT
ATATCNNNGACGNNANCNANGAGAAGACNTGGNGNNAAGCCGTTAATNGGANC
TACTTATNNCCGNATGTGACNTNANATGNNCATANNNGCCNGATCCNCCNNNAG
GANATANGCGCGNGNTGNNCGGCCANATAACNNTNNATTNANAGNGNCNATATG
ANAACAAANAGNNTAAGCCNANGNNTNNCNCNATGTATAGNTGNNGNACNNTGC
GGTACCTNATNTGGGGGNTTCGTNTNTNGGTNTTGATGCNGNTAGNNNCTGGCT
GTNGGNTNNTCCNAGANTTNTCTNGTGTNTGCNTGGGAAGNNANNNTNTATAAG
GTCNGNTATANCCNGNCCNNNNNCANTCNTTNNNTTNTGNNANCGNANTNNNCNG
NNNTNGTNCNTTAGANCANTGGNCCGGTATANNCCNCCNCCNGTNNCTTGTNANCG
CGTNGCTGTGNNTTGTGTGTNCGTGCTANNTCGTGNGGGTCNCTTNTGGNTNGCG
CGTTNTCNAGTGTCGTTNTNTATCNGNCAGCCGANNNTAGGNCCGTANGGCGAC
GCGATGGNGCNTNATNTATCNTCCCTNANNTAACGCGAATATNNANATTGGNAT
NTAGNCGCAAGAATGAANNANGNTGANNNNGGGGNGGNTAANTGANGGTAGGGN
GNGANAGCCGAACGGGANNNCAGNGANAANAGACNNATTAATCCNCATAGACAN
NNGANGNAGATNTNCNATGNTATNTCCCNATTNCANATNNATNNCGACAATNNA
NATTANGAANGAATAGCGGNA
```

16) 16S rDNA sequence and similarity of SKU-65

GTCGTGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCGCCCTATTTGAACGGCACTTG  
 TTCTTCCCTAACAAACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCGGCG  
 TTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCCTAG  
 GAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTAC  
 GCATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCC  
 ATCTGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTTATGTCTGAACCATGCGGTTCAAACA  
 ACCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTACAGGCAGGTT  
 ACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACATCAGGGAGCAAGCTCCCATCTGT  
 CCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCTGAGCCATGATCA  
 AACTCTGATTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGT  
 ACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCC  
 CCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACAGCGTGTACTACCAAGGTATCTAATCCTG  
 TTCGCTCTCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTC  
 GCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTTCACGCTACACGTGGGAATTCCA  
 CTCT

Source	Length	Identities
Bacillus subtilis 16S ribosomal RNA gene	1546	501/501 (100%)
Bacterium Te90R 16S ribosomal RNA gene	1506	500/501 (99%)
Bacterium Te22R 16S ribosomal RNA gene	1515	500/501 (99%)
Bacillus polyfermenticus 16S ribosomal RNA gene	2364	500/501 (99%)
Bacterium Te70R 16S ribosomal RNA gene	1515	500/501 (99%)
Bacillus licheniformis strain HK-1	1424	500/501 (99%)
Bacillus subtilis strain C2	1511	500/501 (99%)
Bacterium Te84R 16S ribosomal RNA gene	1520	499/501 (99%)
Bacterium Te40R 16S ribosomal RNA gene	1499	497/499 (99%)
Bacillus subtilis strain BFAS	1519	499/501 (99%)

17) 16S rDNA sequence and similarity of SKU-132

CATCGTGCTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACAAGCAGTTACTCTTGTACTTGT  
TCTTCCCTAACAAACAGAGTTTTACGACCCGAAAGCCTTCATCACTCACGCGGCGT  
TGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGG  
AGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCCTCTCAGGTCGGCTATG  
CATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCACCGCGGGCCCA  
TCTGTAAGTGATAGCCGAAACCATCTTTCAATCATCTCCCATGAAGGAGAAGATC  
CTATCCGGTATTAGCTTCGGTTTCCCGAAGTTATCCCAGTCTTACAGGCAGGTTG  
CCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACGTCATAGAAGCAAGCTTCTAATCA  
GTTTCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCATCCTGAGCCATGA  
TCAAACCTCTAA

Source	Length	Identities
Bacillus sp. R3 16S ribosomal RNA gene	1455	499/499 (100%)
Bacillus sp. TW4 gene for 16S ribosomal RNA	1008	498/499 (99%)
Bacillus sp. AS-35 16S ribosomal RNA gene	1519	497/498 (99%)
Bacillus sp. No.49 gene for 16S rRNA	1542	496/497 (99%)
Bacillus sp. No.54 gene for 16S rRNA	1542	496/497 (99%)
Bacillus sp. NK7 16S ribosomal RNA gene	1514	497/499 (99%)
Bacillus sp. NK13 16S ribosomal RNA gene	1514	497/499 (99%)
Bacillus sp. Bt176 OTU1 small subunit rRNA	1518	497/499 (99%)

18) 16S rDNA sequence and similarity of SKU-155

CGTCGTGGCTTCTGGTTAGGTACCGTCAGGTGCCGCCCTATTTGAACGGCACTTG  
 TTCTTCCCTAACAAACAGATCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCGGCG  
 TTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAG  
 GAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTTCGGCTAC  
 GCATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCC  
 ATCTGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTTATGTCTGAACCATGCGGTTCAAACA  
 ACCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTACAGGCAGGTT  
 ACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACATCAGGGAGCAAGCTCCCATCTGT  
 CCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCCTGAGCCATGATCA  
 AACTCTGAATGTGCGGCACCCCACCCATTCTTTTGATGATCATTCTTGCGCCCGT  
 ACTCCCCAAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTATCTGCAGTACTAATGGGGCGGAAAC  
 CCCCCTAATCGCTTATCTCTCATTGTTCTACTGCGTGAGTTTCAGGGGTATCTAA  
 ACCCGGCTCTACTTCTCGATCACTTTCGCTACTCACCGTAAGTTAGAGAACAACA  
 TAGTCGCCTGTTTCTCTTGGTGTCTTCCACATCTCTACGCCTATTCACCGCTCAC  
 CATGCGACTCTCACTC

Source	Length	Identities
Bacillus subtilis 16S ribosomal RNA gene	1546	496/498 (99%)
Bacterium Te90R 16S ribosomal RNA gene	1506	495/498 (99%)
Bacterium Te22R 16S ribosomal RNA gene	1515	495/498 (99%)
Bacillus polyfermenticus 16S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 1, and 23S rRNA gene, partial sequence	2364	495/498 (99%)
Bacterium Te87R 16S ribosomal RNA gene	1508	491/494 (99%)
Bacterium Te70R 16S ribosomal RNA gene	1515	495/498 (99%)
Bacillus licheniformis strain HK-1	1424	495/498 (99%)
Bacillus subtilis strain C2 16S rRNA gene	1511	495/498 (99%)
Bacterium Te84R 16S ribosomal RNA gene	1520	494/498 (99%)
Bacterium Te40R 16S ribosomal RNA gene	1499	492/496 (99%)

sequence를 분석하여 Database를 이용하여 동정한 결과를 Table1-7.에 정리하였다.

Table 1-7. Phylogenetic analysis of the selected strain by 16S rDNA sequences

Selected strains	Significant alignments	Antagonistic mechanism
A47-2	<i>Arthrobacter</i> sp. 'SMCC G980'	
A48-2	<i>Bacillus</i> sp. DF49 16S ribosomal RNA gene	
A50-2	<i>Glacial ice bacterium</i> G200-SD1	
A60-1	<i>Glacial ice bacterium</i> G200-SD1	
A66-6	<i>Bacillus subtilis isolate</i> BS-2	
A79-1	<i>Bacillus subtilis isolate</i> BS-2	
A79-2	<i>Glacial ice bacterium</i> G200-SD1	
A253-16	<i>Pseudomonas</i> sp. 16S rRNA gene, clone NB1-f	antibiosis
A254-10	unidentified	
A256-10	<i>Bacillus</i> sp. DF49 16S ribosomal RNA gene	
A256-11	<i>Bacillus subtilis</i> strain CICC 10158	
A256-12	<i>Bacillus</i> sp. Bch1	
A256-18	unidentified	
TS1-2	<i>Bacillus</i> sp. DF49 16S ribosomal RNA gene	
TS1-3	<i>Bacillus</i> sp. DF49 16S ribosomal RNA gene	
TS1-5	<i>Bacillus subtilis</i> 16S ribosomal RNA gene	
TS1-7	<i>Paenibacillus</i> sp. CC-SB818D1	siderophore 생산
TS2-7	unidentified	
TS3-7	<i>Pseudomonas fluorescens</i> PfO-1	
SKU-78	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	ISR

1차와 2차 assay 결과 최종 우수 균주로 선발된 균주들을 16 S rDNA sequence로 동정한 결과 *Bacillus* 속, *Pseudomonas* 속, *Glacial ice bacterium* 등이 동정되었으며 속명이 밝혀지지 않은 균주 4종이 있었다. 몇 개의 균주들은 PCR에 사용한 primer에 의해 증폭되지 않아 동정되지 않았다

## 제2절 토양 미생물이 생산하는 풋마름병균 저해 활성 물질의 분리 및 정제

### 1. 서론

1980년대에 들어서 유기합성 살균제 사용의 부작용에 대한 사회적 관심이 고조됨과 동시에 구미 선진국에서 농약의 잔류기준을 더욱 강화하고 사용량도 제한하고 있다.(Zehnder, G.W, *et al.*,1999) 유기합성 농약은 약효가 우수하고, 값이 저렴하며, 오랫동안 보관, 저장이 가능한 반면 그 동안 무차별한 남용으로 인해 사람들에게 농약 중독현상이 나타나고, 지하수 및 토양오염, 농산물중의 잔류독성 그리고 생태계에 영향을 끼치는 환경과피가 발생하고 있다.(Backman, P. A. *et al.*, 1997) 이러한 부작용을 막기 위하여 환경을 보존하고 동시에 농업을 살리기 위한 대안으로 저독성 생물학적 제제 개발의 필요성이 크게 대두되고 있다.

미생물 유래의 생리활성물질은 쉽게 분해되어 잔류독성의 위험이 없기 때문에 미생물 발효산업이 발달된 미국, 일본 등이 중심이 되어 기술 축적이 이루어졌고 이 축적된 기술을 바탕으로 생물농약 개발 상품화가 진행되고 있다.(Bakker, P., *et al.*, 2003) 미생물이 생산하는 이차 대사산물인 생리활성물질 중에서 농약으로 이용되고 있는 것으로는 주로 방선균 *Streptomyces*가 생산하는 Blasticidin-S, Kasugamycin, Validamycin 등이 있다.(Parret, A.H.A., *et al.*, 2000) 물질특허 도입에 따른 선진 각국에서의 물질 보호와 관련해서 기술이전의 회피는 물론 막대한 기술료의 지불을 요구하고 있어 우리나라에서도 생물농약 개발을 위한 신규 생리활성 물질에 대한 독창적인 연구가 절실히 요구되는 상황이다.

본 연구에서는 생물농약 개발을 위한 신규 선도물질의 확보와 동시에 생균-복합제제 개발을 위해 생리활성 물질의 부분적인 정제와 특성조사를 거친 crude extract 상태로 다른 기작의 생균과 혼합 사용할 목적으로 풋마름병균 *Ralstonia solanacearum* 에 대해 강한 저해 활성 물질을 생산하는 미생물로 선

발된 균주 A100-1, A27-3, A256-10, A256-11, A253-16, A47-2 균주가 생산하는 활성물질의 추출 정제 및 특성조사를 실시하였다.

## 2 재료 및 방법

### 가. 선발균주의 배양

1차로 *in vitro* plate 상에서 풋마름병균 *Ralstonia solanacearum* 에 대해 강한 저해 활성을 나타내는 균주로 선발되고 2차로, *in vivo* pot assay 에서도 풋마름병 발병을 강력하게 억제하는 균주들을 선발하여 액체 배양 배지 GSS(soluble starch 10g, glucose 20g, Bacto soytone 25g, beef extract 1g, yeast extract 4g, NaCl 2g,  $K_2HPO_4$  0.05g/ $\ell$ , pH 7.3)에서 28℃에서 200rpm으로 2 일간 배양한 배양액을 접종원으로 하여 액체배양 배지에 2% 접종하여 5일간 진탕 배양하였다.

배양액을 6000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 배양상등액과 균체를 분리하여 활성을 검정한 후 활성이 있는 분획을 활성물질의 분리용 시료로 사용하였다.

### 나. 생리활성 물질 분리를 위한 선행 실험

*in vitro* inhibition assay와 *in vivo* pot assay에서 선발된 균주가 생산하는 생리활성물질의 분리에 앞서 물질의 열과 pH에 대한 안정성, 유기용매 추출여부, 활성탄의 흡착여부등의 예비실험을 실시하였다.

#### 1) pH와 열에 대한 안정성 조사

원심분리한 배양 상등액 2ml을 pH 3, 7 및 10으로 조정한 후 95℃에서 10분간 가열하여 식히고 pH를 중성으로 맞춘 후 활성을 검정하여 활성물질의 pH와 열에 대한 안정성을 조사하였다.

## 2) 활성탄 흡착 여부 조사

각 실험관에 배양상등액 2 ml 씩을 넣고 1 N HCl과 1N NaOH를 사용하여 pH를 2, 7, 10으로 조정한 후 활성탄 1g 씩을 넣고 흡착시킨 후 pH 2의 시료는 1N acetic acid의 70 % acetone으로, pH 10의 시료는 1N NH<sub>4</sub>OH의 70% acetone으로 pH 7의 경우는 70 % acetone으로 각각 용출하였다. 용출된 시료에서 acetone을 제거하고 증화하여 assay를 실시하여 활성탄에 흡착여부를 조사하였다.

## 3) 유기용매에 의한 추출성 여부 확인

배양상등액을 1N HCl과 1N NaOH로 pH를 2, 7, 10으로 조정한 후 동량의 butanol과 ethylacetate로 추출하여 물층과 함께 assay하여 생리활성물질의 유기용매로의 이행도를 조사하였다.

## 다. 활성물질의 항균 spectrum조사

선발된 균주가 생산하는 활성물질의 신규성 여부를 판단하는데 하나의 지표가 되는 항균 spectrum을 G<sup>+</sup> bacteria, G<sup>-</sup> bacteria, yeast, fungi 등의 test organism (Table 2-1)을 이용하여 paper disk method로 조사하였다.

Table 2-1. Microorganisms used to test antimicrobial spectrum

Microorganism	
G <sup>-</sup> bacteria	<i>Salmonella gallinarum</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Escherichia coil</i>
G <sup>+</sup> bacteria	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacilus subtilis</i>
Yeast	<i>Saccharomyces cerevisae</i>
Fungi	<i>Phytophthora capsici</i> <i>Phytophthora parasitica</i> <i>Penicillium sp.</i> <i>Botrytis cinerea</i> <i>Rhyzopus stronifer</i>

#### 라. 활성물질의 이화학적 특성조사

##### 1) 용해성

활성물질 0.5mg을 시험관에 각각 넣은 후 H<sub>2</sub>O, methanol, ethanol, chloroform, ethylacetate, diethyl ether, benzene hexane 등의 용매를 100 $\mu$ l 처리하여 활성물질의 용해여부를 조사하였다.

##### 2) TLC에서의 R<sub>f</sub>

활성물질의 정제 정도와 여러 용매조건에서의 R<sub>f</sub> 값을 조사하기 위하여 silica gel TLC (silica gel 60 F<sub>254</sub>, Merck)를 실시하여 band의 위치는 I<sub>2</sub> vapor와 UV light로 확인하였다.

### 3) 발색반응

활성물질의 특성을 알아보기 위하여 4-dimethylamino-benzaldehyde-HCl, ferric chloride, orcinol ferric chloride, aniline-diphenylamine, ninhydrine, Dragendorff's reagent, antimony trichloride와 같은 spray reagent를 이용하여 발색반응여부를 알아보았다.

### 마. 활성물질의 기기 분석

#### 1) UV spectrometry

Shimazu UV 160 A spectrophotometer를 사용하여 200~400 nm에서의 absorption spectrum을 측정하였다.

#### 2) HPLC

HPLC는 water 사의 510 pump와 UV detector 486을 사용하였다.

#### 3) Mass spectrophotometry

Applied Biosystems Inc사의 Voyager-DE STR Biospectrometry Workstation으로 측정하였다.

#### 4) $^1\text{H}$ NMR spectrophotometry

$\text{CDCl}_3$ 를 용매로 하여 Bruker사의 AVANCE 600 FT-NMR(600MHz)로 spectrum을 측정하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. A100-1이 생산하는 활성물질의 분리, 정제 및 특성 연구

##### 1) 예비실험 결과

A100-1 균주가 생산하는 저해활성물질의 특성 즉 pH와 열 안정성, 용매에 대한 추출성, 그리고 charcoal. diaion HP-20 resin에 대한 흡착성 여부를 조사한 결과 활성물질은 pH와 열에 대해 불안정한 것으로 판단되었으며, butanol과 ethyl acetate에 모두 추출되어 유기용매층에서 활성을 나타내었다. charcoal과 HP-20에 대한 흡착성 실험결과 흡착은 이루어지나, 탈착이 용이하게 이루어지지 않음을 알 수 있었다.

##### 2) 활성물질 100-1의 분리 정제

생산균주 A100-1의 배양시간에 따른 균 생육, pH 변화, 활성물질 생산성을 조사하여 최적 배양조건을 확립하였다. 그림(Fig.2-1)에 나타난 바와 같이 균 생육은 2일째부터 크게 증가하여 5일째에 최고에 달하였으며 생리활성 물질의 생산도 배양 이틀째부터 서서히 증가하다가 배양 5일째 균 생육과 더불어 최고치를 나타내었다. pH의 변화는 배양 3일째부터 증가하기 시작하여 7일째 8.05까지 증가하였다.

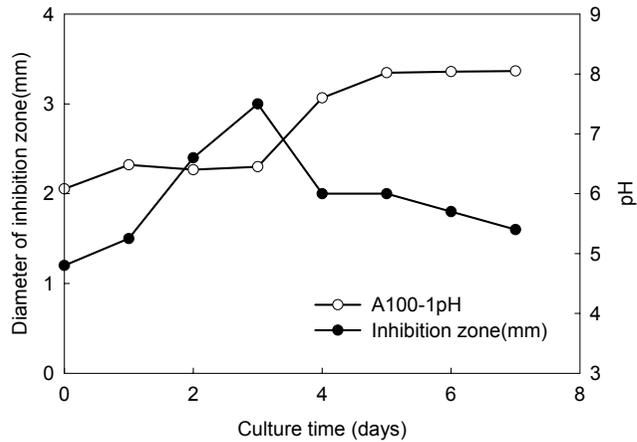


Figure 2-1. Fermentation profile for the production of active compound by A100-1 strain.

배양액으로부터 활성물질의 분리 정제는 Scheme(Fig. 2-2)에 나타내었다. 활성물질 분리를 위해 10 l를 배양하여 원심분리하여 회수한 균체를 acetone으로 추출한 후 acetone을 날려 보내고 배양여액과 합쳐 농축하였다. Ethyl acetate로 4회 추출한 다음 활성분획인 ethyl acetate층을 건조시킨 후 소량의 methanol에 녹여 silica gel chromatography (60 mesh, Merck, 30mm×50cm column)를 chloroform-methanol을 이용한 gradient solvent system으로 행하여 활성분획, 20~31을 얻었다. 활성분획들을 합쳐서 농축한 후 sephadex LH-20 column을 methanol을 용매로 전개시켜 활성 확인결과 38~49의 활성분획을 얻을 수 있었으며 이를 감압 건조시킨 후 HPLC ( $\mu$ Bondapak<sup>TM</sup> C18 3.9×300mm column)를 이용하여 최종적으로 분리하였다. MeOH : H<sub>2</sub>O = 52 : 48의 isocratic solvent system을 사용하여 순수한 활성물질 40 mg을 얻었다. UV 232 nm에서 detection하였고 HPLC profile은 Fig. 2-3 과 같다.

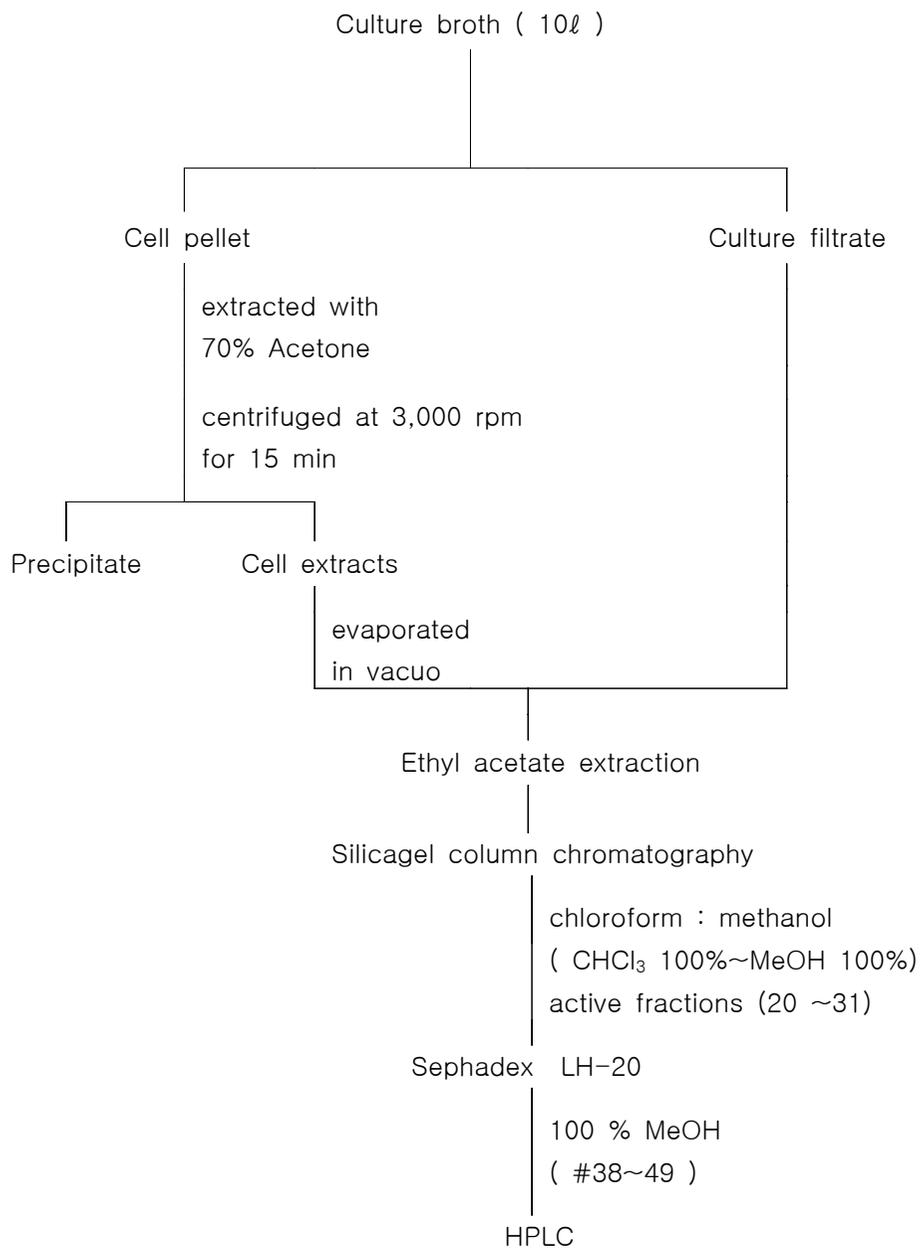


Figure 2-2. Isolation procedure of the active compound from A100-1 strain

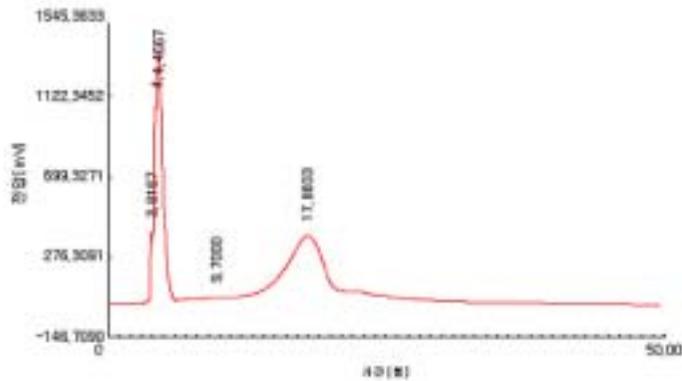


Figure 2-3. HPLC profile of the active compound produced by A100-1 strain

### 3) A100-1 활성물질의 이화학적 특성

정제된 활성물질 100-1은 methanol, butanol, acetone, ethyl acetate, chloroform등에는 잘 녹았으나, 물과 hexane에는 녹지 않았다. 여러 용매 조건 하에서 TLC plate 상에 single band로 순도를 확인하였다. butanol: methanol: water (4: 1: 2)에서 0.52, butanol: methanol: water (2: 1: 2)에서 0.65, propanol: 1N NH<sub>4</sub>OH(7:3)에서 0.4, chloroform: methanol(1: 2)에서 0.74의 Rf 값을 나타내었다 (Fig. 2-4). 또한 여러 발색 시약으로 발색 반응을 검정해 본 결과 Table 2-1과 같은 결과를 얻었다. ferric chloride 와 orcinol ferric chloride에서 positive 반응을 나타내어 sugar residue를 포함하는 것으로 추정된다.

순수하게 정제된 A100-1 물질의 antimicrobial spectrum을 조사한 결과 Table 2-2와 같이 식물 병원균인 *hytophthora parasitica*, *Phytophthora capsic*, *Botrytis cinerea*의 세 종의 곰팡이에 항균 작용을 나타내어 복합 식물병 방제제의 개발 가능성을 나타내었다.

활성 물질의 UV 특성은 methanol 용매에서  $\lambda_{max}$ 가 234, 272 와 284 에서 나타났으며 산 알칼리에 의한  $\lambda_{max}$ 의 변화는 일어나지 않았다 (Fig.2-5). mass spectrum의 결과 (Fig. 2-6) 분자량이 1065로 추정된다.

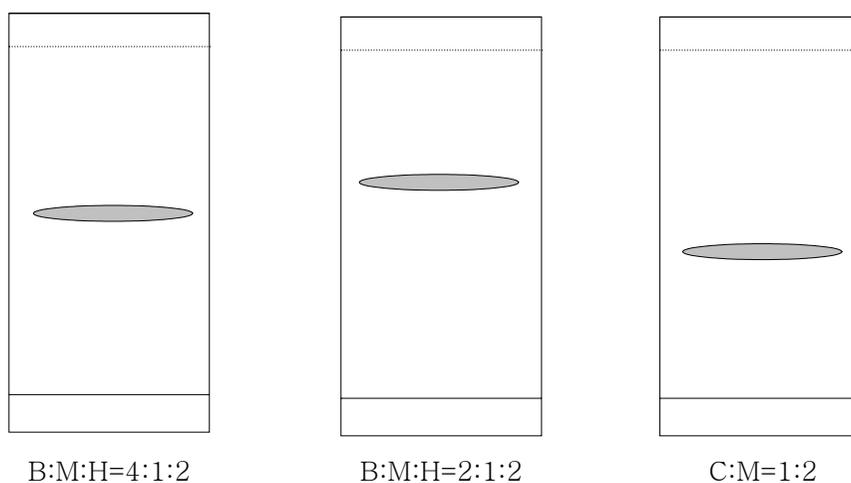


Figure 2-4. Separation of the A100-1 active compound by TLC

Table 2-1. Color reactions of the active compound with spray reagents

Spray reagents	Color
4-dimethylaminobenzaldehyde-HCl	-
Ferric chloride	+
Orcinol ferric chloride	+
Aniline-diphenylamine	-
Ninhydrine	-
Dragendorff's reagent	-
Antimony trichloride	-

Table 2-2. Antimicrobial spectrum of A100-1 active compound

Test Organism	Active compound
<i>Salmonella gallinarum</i> (G <sup>-</sup> )	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (G <sup>-</sup> )	-
<i>Escherichia coli</i> (G <sup>-</sup> )	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (G <sup>+</sup> )	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (yeast)	-
<i>Phytophthora parasitica</i> (fungi)	+
<i>Phytophthora capsici</i> (fungi)	+
<i>Penicillium</i> sp. (fungi)	-
<i>Rhizopus strombifer</i> (fungi)	-
<i>Botrytis cinerea</i> (fungi)	+

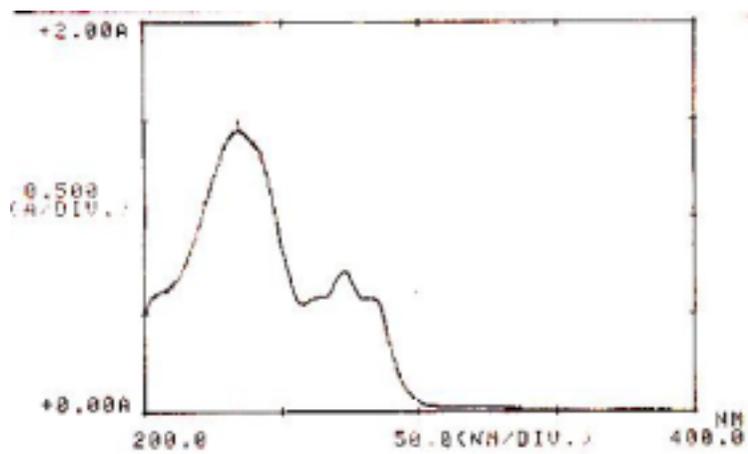


Figure 2-5. UV spectrum of A100-1 active compound

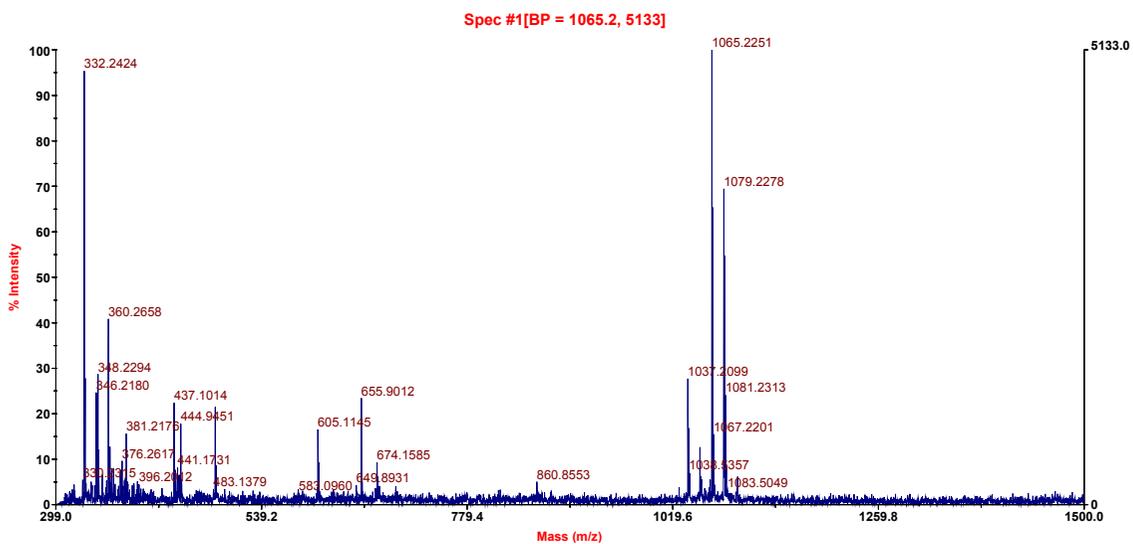


Fig. 2-6 Mass spectrophotometry of A100-1 active compound

4) A100-1의 균주 동정

16S rDNA sequencing 결과를 Gene Bank Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에서 조회한 결과 (Table 2-3) A100-1균주는 *Bacillus sp.*로 동정되었다.

Table 2-3. Identification of A100-1 strain

Source	Length	Identities
Bacillus sp. DF49 16S rRNA gene	1425	715/733 (97%)
Bacillus sp. DF14 16S rRNA gene	1411	715/733 (97%)
Bacillus sp. DF12 16S rRNA gene	1424	715/733 (97%)
Bacillus sp. MI-ab 16S rRNA gene	1384	715/733 (97%)
Bacillus sp. L-83 16S rRNA gene	1373	715/733 (97%)
Bacillus sp. YNUCC0002 16S rRNA gene	1497	715/733 (97%)
Bacillus amyloliquefaciens strain ES-2 16S rRNA gene	1423	715/733 (97%)
Bacillus subtilis 16S ribosomal RNA gene	959	715/733 (97%)
Bacillus subtilis strain CC-KM2-1 16S ribosomal RNA gene	1035	715/733 (97%)
Bacillus sp. LBM 1024 16S ribosomal RNA gene	1522	715/733 (97%)

## 나. A27-3이 생산하는 활성물질의 분리, 정제 및 특성 연구

### 1) 예비실험 결과

A27-3균주가 생산하는 저해활성물질의 pH와 열에 대한 안전성, 유기용매에 의한 추출성, 그리고 charcoal, diaion HP-20 resin에 대한 흡착성 여부를 조사한 결과 활성물질은 염기성에서는 안전하지만 산성과 열에는 약한 것으로 판단되었으며, butanol로 추출이 가능하였으나 chloroform과 ethylacetate 에는 추출되지 않았다. charcoal과 HP-20에 대한 흡착성 실험결과 흡착 이루어지지 않음을 알 수 있었다.

### 2) A27-3 활성물질의 분리 정제

활성물질 생산균주 A27-3의 배양시간에 따른 균 생육, pH 변화, 활성물질 생산을 조사하여 최적 배양조건을 확립하였다. Fig. 2-7 에 나타난 바와 같이 2일 째부터 활성물질 생산이 증가하여 4일째에 최대치를 나타내었으며 pH는 서서히 증가하였다.

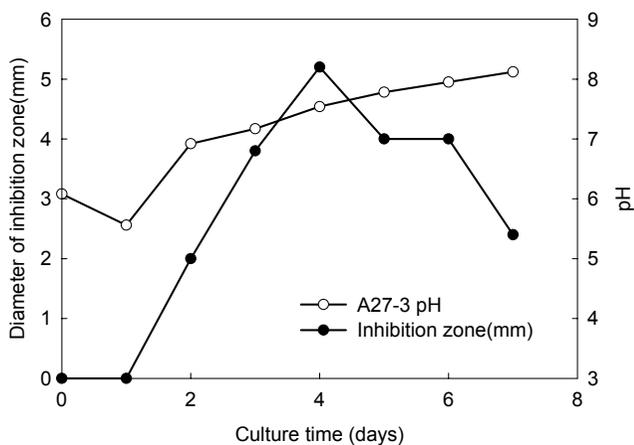


Figure 2-7. Fermentation profile for the production of active compound by A27-3 strain.

배양액으로부터 활성물질의 분리·정제는 scheme( Fig.2-8 )에 나타내었다. 활성물질의 분리를 위해 4일간 배양한 배양액 10 ℓ를 원심분리 하여 회수한 배양여액을 농축한 후 butanol로 5회 추출하였다. 활성분획인 butanol 층을 감압농축 시킨 후 소량의 methanol에 녹여 silica gel chromatography (60 mesh, Merck, 30mm×50cm column)를 행하였다. Ethyl acetate 와 methanol을 이용한 gradient solvent system으로 용출하여 활성분획, 11~15를 얻은 후 농축하여 Sephadex LH-20 column을 100% methanol로 행하여 4mℓ씩 분획하였다. 각 분획들을 농축하여 활성을 확인한 결과 31~42의 활성 분획을 얻어 HPLC ( $\mu$  Bondapak™ C18 7.8×300mm column)를 이용하여 최종적으로 분리하였다. MeOH : H<sub>2</sub>O = 65 : 35의 isocratic solvent system을 사용하여 순수한 활성물질 30mg을 얻었다. UV 210nm에서 detection하였고 이물질에 대한 HPLC profile은 Fig. 2-9와 같다.

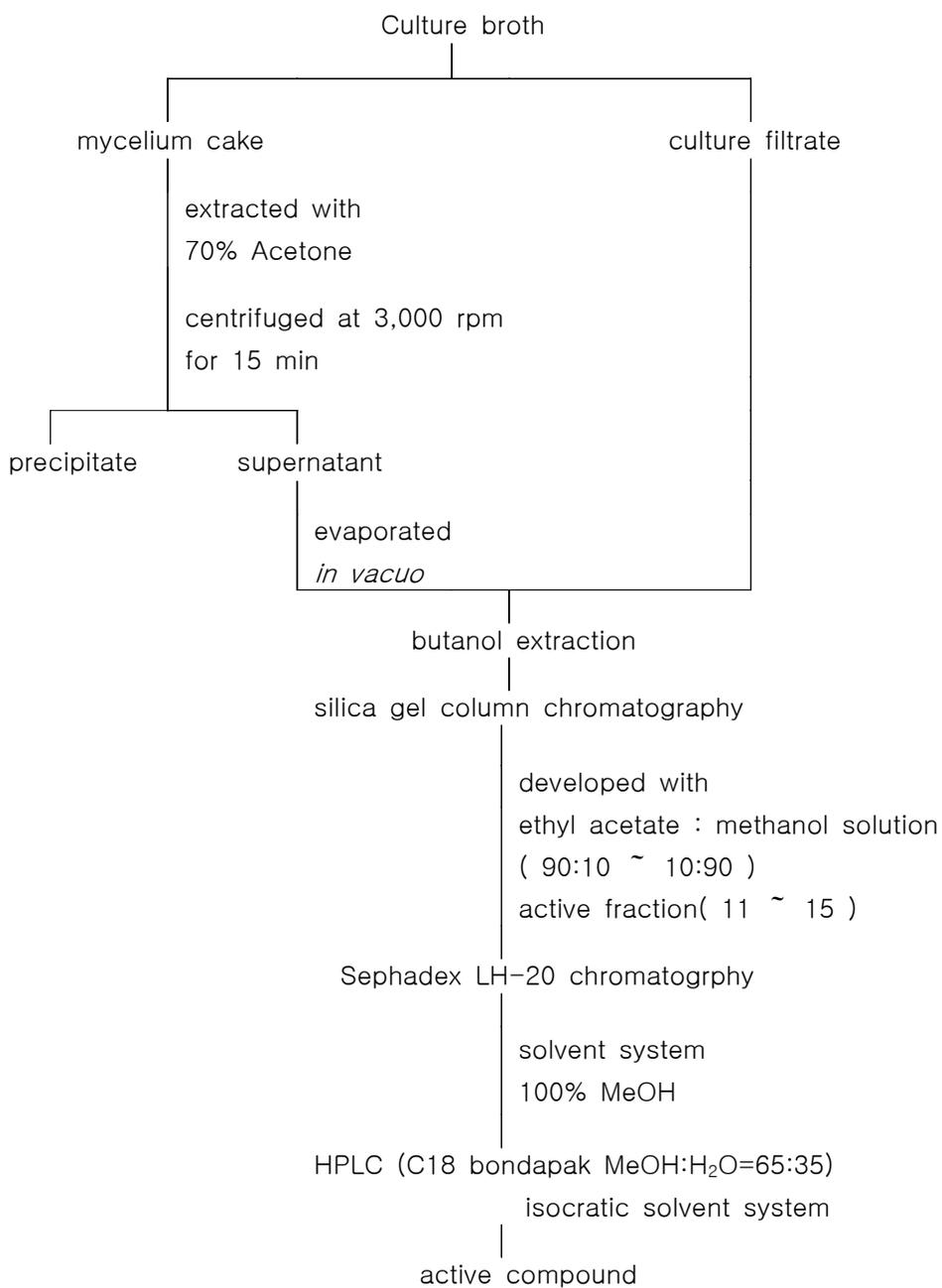


Figure 2-8. Isolation procedure of the active compound from A27-3 strain

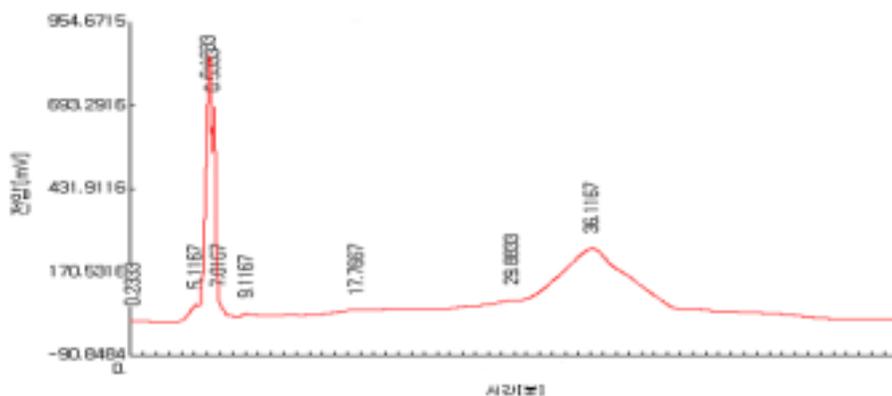


Figure 2-9. HPLC profile of the active compound produced by A27-3 strain

### 3) A27-3 활성물질의 이화학적 특성

정제된 A27-3 활성물질은 methanol, butanol, acetone, ethyl acetate 에는 잘 녹았으나 chloroform, hexane에는 녹지 않았다. 분리된 물질을 TLC 상에서 확인한 결과 Rf 값은 solvent system이 butanol: methanol: water(4: 1: 2)에서 약 0.54 , ethyl acetate : methanol(5 : 1)에서 0.63, chloroform: methanol( 2 : 1 )에서 약 0.72를 나타내었다(Fig.2-10) 또한 이 물질을 여러 발색 시약으로 발색 반응을 검정해 본 결과 Table 2-4와 같이 Ehrlich's reagent (4-dimethylamino benzaldehyde-HCl), Orcinol ferric chloride, Ninhydrin에서 양성 반응을 보였다.(Table 2-4)

A27-3 물질의 Antimicrobial spectrum 측정 결과 Gram negative인 *Escherichia coli* 그리고 곰팡이인 *Phytophthora parasitica*, *Phytophthora capsici*, *Penicillium* sp., *Rhizopus strombifer*, *Botrytis cinerea*에서 항균 활성을 보였다.(Table 2-5)

분리된 물질의 UV spectrum을 조사한 결과 209nm, 230 (sh), 274nm 에서  $\lambda_{max}$ 를 나타내었다 (Fig. 2-11)

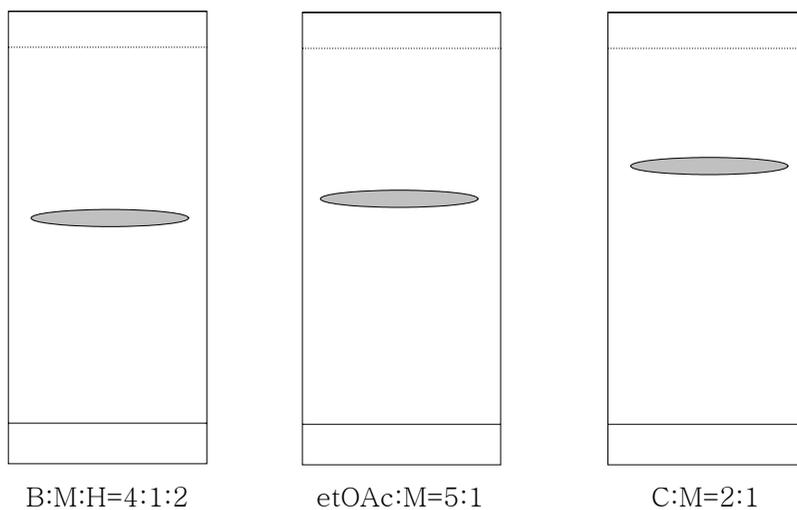


Figure 2-10. Chromatographic behavior of A27-3 on TLC plate.

Table 2-4. Color reactions of the A27-3 active compound with spray reagents

Spray reagents	Color
4-dimethylaminobenzaldehyde-HCl	+
Ferric chloride	-
Orcinol ferric chloride	+
Aniline-diphenylamine	-
Ninhydrin	+
Dragendorff's reagent	-
Antimony trichloride	-

Table 2-5. Antimicrobial spectrum of A27-3 active compound

Test Organism	Active compound
<i>Salmonella gallinarum</i> (G <sup>-</sup> )	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (G <sup>-</sup> )	-
<i>Escherichia coli</i> (G <sup>-</sup> )	+
<i>Staphylococcus aureus</i> (G <sup>+</sup> )	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (yeast)	-
<i>Phytophthora parasitica</i> (fungi)	+
<i>Phytophthora capsici</i> (fungi)	+
<i>Penicillium</i> sp. (fungi)	+
<i>Rhizopus stonifer</i> (fungi)	+
<i>Botrytis cinerea</i> (fungi)	+

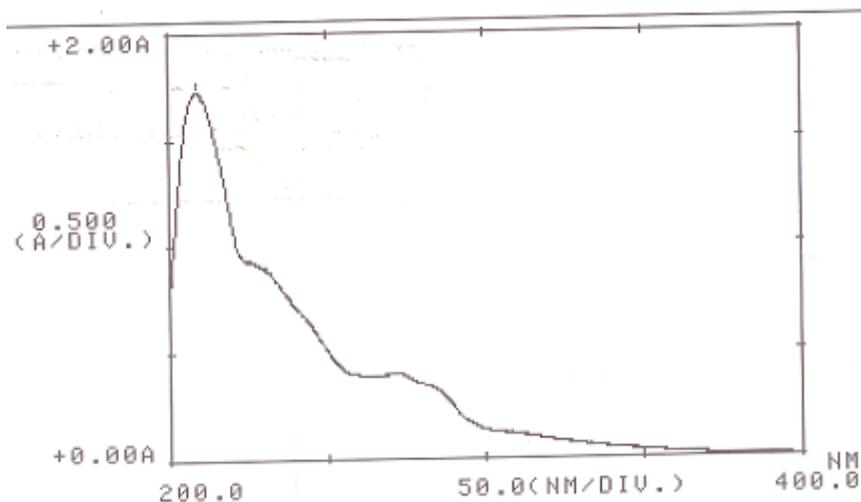


Figure 2-11. UV spectrum of A27-3 active compound

$\lambda_{\text{max}}$  = 209nm, 230nm (sh), 274nm

4) A27-3의 균주 동정

16S rDNA sequencing 결과를 Gene Bank Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에서 조회한 결과 *Bacillus* sp.로 동정되었다.(Table 2-6)

Table 2-6. Identification of A27-3

Source	Length	Identities
Bacillus sp. CK8 partial 16S rRNA gene	1179	491/503 (97%)
Bacillus subtilis strain JH5 16S ribosomal RNA gene	1418	488/500 (97%)
Bacillus subtilis 16S ribosomal RNA gene	1535	488/500 (97%)
Bacillus subtilis strain DF11 16S ribosomal RNA gene	1424	488/500 (97%)
Bacillus subtilis WL-6 16S ribosomal RNA gene	1521	488/500 (97%)
Bacillus subtilis	202089	488/500 (97%)
Bacillus subtilis 16S ribosomal RNA gene	1917	488/500 (97%)
Bacillus subtilis strain N10 16S ribosomal RNA gene	1534	488/500 (97%)
Bacillus subtilis 16S ribosomal RNA gene	1514	488/500 (97%)
Bacillus subtilis strain IDCC1105 16S ribosomal RNA gene	1508	488/500 (97%)

## 다. A47-2가 생산하는 활성물질의 분리, 정제 및 특성 연구

### 1) 예비실험 결과

A47-2 균주의 저해활성물질 예비실험 결과 산과 열에 안정한 것으로 판단되며 ethyl acetate로 추출이 가능하였다. 또한 diaion HP-20에 흡착되고 70% acetone 용액으로 용출되었다..

### 2) A47-2 활성물질의 분리 정제

A47-2균주의 배양시간에 따른 활성물질 생산성과 pH변화는 Fig. 2-12에 나타난 바와 같이 배양 48시간부터 활성이 서서히 증가하여 5일째에 최고치에 도달했으며, pH는 12시간 이후 거의 변함이 없었다. 배양액으로부터 활성물질의 정제 과정은 Fig. 2-13과 같다.

활성물질의 분리를 위하여 10ℓ를 배양하여 원심분리하고 회수한 균체를 70% acetone으로 추출하여 acetone을 증발시킨 후 배양액과 합쳐 농축하였다. 동량의 Ethyl acetate로 5번 추출한 후 활성이 있는 Ethyl acetate 층을 감압 농축한 후 소량의 methanol에 녹여 silica gel column chromatography를 행하였으며, ethyl acetate - methanol을 사용하여 gradient solvent system으로 용출하여 활성분획(#82~86)을 얻었다. 활성 fraction들을 모아서 감압농축 후 4℃로 유지시키며 ethyl ether로 precipitate 을 시켜 제거하고 상등액을 농축하여 다시 silica gel chromatography를 ethyl acetate를 용매로 실시하여 10ml씩 분획하여 활성분획 7~12를 얻었다.

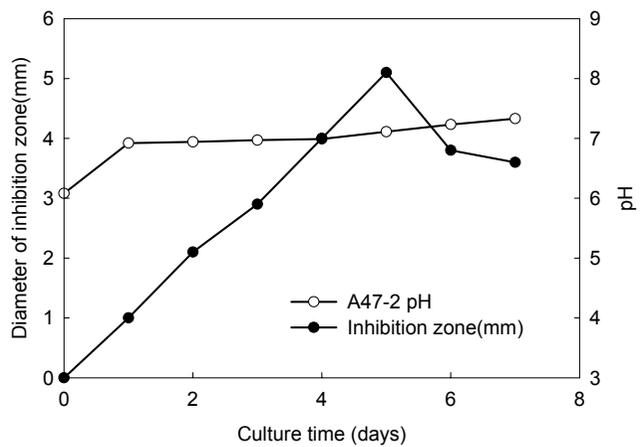


Figure 2-12. Fermentation profile for the production of active compound by A47-2 strain.

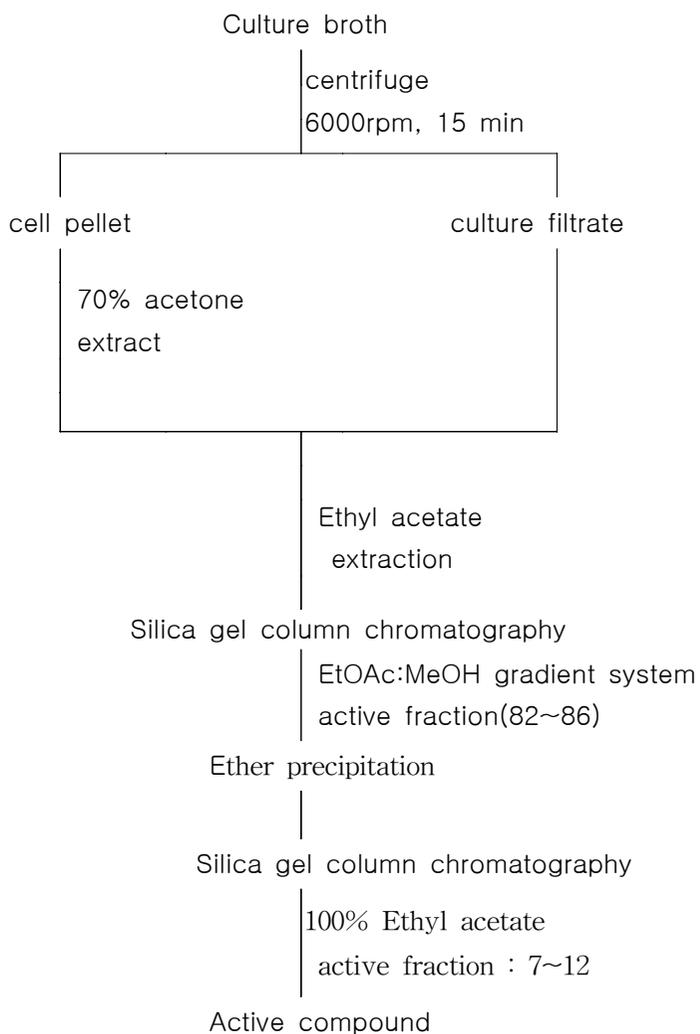


Figure 2-13. Isolation procedure of the active compound from A47-2

### 3) A47-2 활성물질의 이화학적 특성

활성분획들을 모아 chloroform : methanol (1:1)을 전개용매로 하여, thin layer chromatography (TLC)를 행한 결과 single band로 나타났으며 0.8의 Rf값을 나타내었다. (Fig. 2-14) 또한 이 물질의 발색반응 결과 orcinol ferric chloride 에 positive, aniline-diphenylamine, ninhydrin, Dragendorff's reagent등에는 negative하게 나타났다(Table 2-7). antimicrobial spectrum 조사 결과 gram positive의 *Staphylococcus aureus*, 곰팡이인 *Phytophthora parasitica*, *Phytophthora capsici*에서 항균 활성을 나타냈다.(Table 2-8)

활성물질 UV 특성을 조사한 결과  $\lambda_{max}$  meOH가 210, 234, 272, 284 nm에 나타났으며 산, 알칼리에 의한 변화는 관찰되지 않았다. (Fig. 2-15)

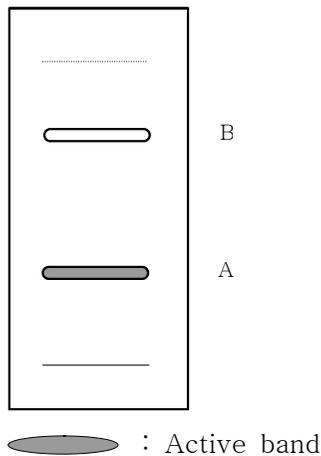


Figure 2-14. Separation of the A47-2 active compound by TLC

Solvent system - chloroform : methanol ( 1 : 1 )

Table 2-7. Color reactions of the A47-2 active compound with spray reagents

Spray reagents	Color
4-dimethylaminobenzaldehyde-HCl	-
Ferric chloride	-
Orcinol ferric chloride	+
Aniline-diphenylamine	-
Ninhydrine	-
Dragendorff's reagent	-
Antimony trichloride	-

Table 2-8. Antimicrobial spectrum of A47-2 active compound

Test Organism	Active compound
<i>Salmonella gallinarum</i> (G <sup>-</sup> )	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (G <sup>-</sup> )	-
<i>Escherichia coli</i> (G <sup>-</sup> )	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (G <sup>+</sup> )	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (yeast)	-
<i>Phytophthora parasitica</i> (fungi)	+
<i>Phytophthora capsici</i> (fungi)	+
<i>Penicillium</i> sp. (fungi)	-
<i>Rhizopus stromifer</i> (fungi)	-
<i>Botrytis cinerea</i> (fungi)	-

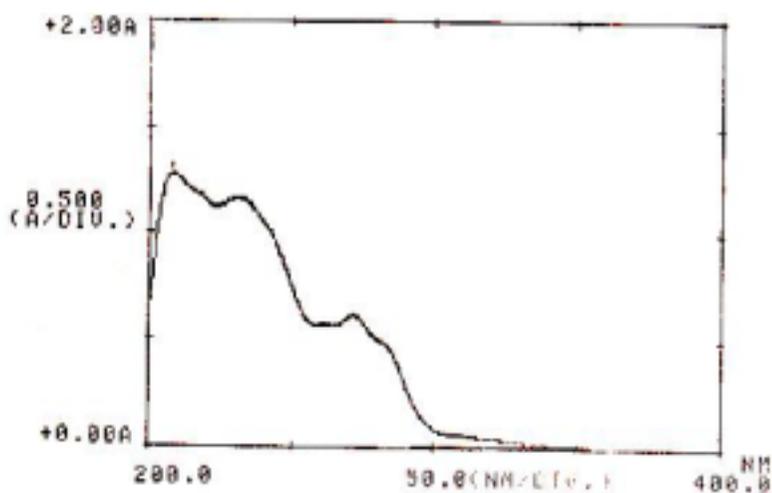


Figure 2-15. UV spectrum of A47-2 active compound

4) A47-2의 균주 동정

16S rDNA sequencing 방법에 의해 A47-2 균주는 *Arthrobacter* sp.로 동정되었다. (Table 2-9)

Table 2-9. Identification of A47-2

Source	Length	Identities
<i>Arthrobacter</i> sp. 'SMCC G980'	1333	468/469 (99%)
<i>Arthrobacter</i> sp. 'SMCC G963'	1327	468/469 (99%)
<i>Arthrobacter</i> sp. pfB10	790	469/470 (99%)
Uncultured actinobacterium clone A3-11	634	469/470 (99%)
Soil bacterium S79D1 16S ribosomal RNA gene	527	469/470 (99%)
<i>Arthrobacter</i> sp. 12E 16S ribosomal RNA gene	1336	469/470 (99%)
Uncultured bacterium clone O-CF-1	1380	467/469 (99%)
<i>Arthrobacter globiformis</i> gene for 16S rRNA	1517	467/469 (99%)
<i>A. globiformis</i> small subunit ribosomal RNA	1531	467/469 (99%)
<i>Arthrobacter</i> sp. strain R1_6_cr	475	466/467 (99%)

## 라. A256-10이 생산하는 활성물질의 분리 및 정제

### 1) 예비실험 결과

A256-10 균주가 생산하는 생리활성 물질은 균체에는 존재하지 않고 배양액에만 활성 있는 것으로 확인되었고 활성물질은 비교적 열이나 pH에 대해 안정한 것으로 판단되었다. 유기용매에 대한 추출성을 조사한 결과 butanol과 chloroform로 추출이 가능하였으며 Diaion HP-20 resin에 대한 흡착성 여부를 조사한 결과 70% acetone 용액으로 용출되었다.

### 2) A256-10 물질의 분리 정제

A256-10 균주의 배양일수에 따른 pH변화와 활성물질의 생산성을 조사하여 최적배양 조건을 확립하였으며(Fig.2-16) 4일째에 활성물질 생산이 최대였고 pH는 이틀째부터 서서히 증가하여 7일째에는 7.15까지 증가하였다. 정제 과정은 scheme(Fig. 2-17)에 나타내었다.

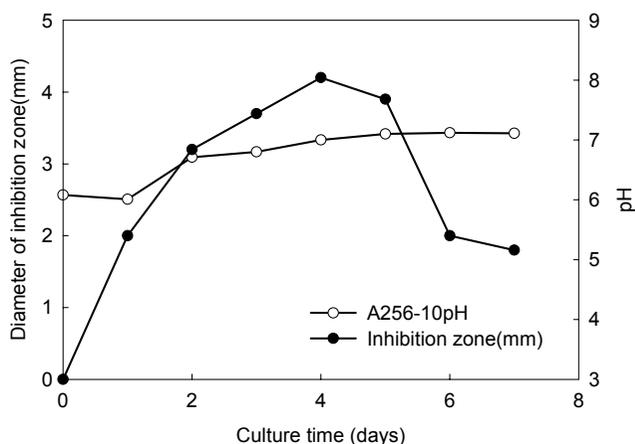


Figure 2-16. Fermentation profile for the production of active compound by A256-10 strain.

A256-10균주가 생산하는 활성 물질 분리에는 seed culture를 통해 배양한 배양액 4ℓ를 6000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 얻은 상등액을 사용하였으며 배양 상등액을 감압 농축하여 HP-20 column에 흡착시킨 후 50% methanol 용액으로 washing하고 70% acetone 용액으로 활성물질을 용출 시켰다. 활성 용출액을 감압 농축하여 chloroform으로 추출하고 감압 건조시킨 후 methanol에 녹여 hexane으로 추출하여 활성이 있는 methanol층을 모아 농축한 후 silica gel chromatography를 하였다. 용매계는 chloroform - methanol를 사용하여 gradient solvent system으로 총 280개의 분획을 받았으며 251~264 분획에서 활성이 나타났다. 활성 분획들을 모아 Sephadex LH-20 chromatography를 행하였으며 methylene chloride : methanol = 1 : 1 용매계를 사용하여 10ml씩 59개의 분획을 받았다. 1~9, 25~27, 45~59 분획에서 활성이 나타나 A256-10 균주가 최소한 3개의 활성물질을 생산함을 알 수 있었다.

가장 활성이 센 45~59 활성 분획를 합쳐서 감압 농축한 후 solid phase extraction (waters sep pak C<sub>18</sub>)을 100% H<sub>2</sub>O~100% methanol로 methanol 함량을 10 % 씩 증가시키며 행하였다. 활성 확인결과 methanol : water = 60 : 40 과 70 : 30에서 활성을 보였다. 이 활성 물질을 감압 농축하여 TLC( solvent system ; chloroform : methanol = 7 : 3)를 행하여 활성 band ( rf 0.33 )를 긋어 chloroform으로 추출한 다음 최종적으로 HPLC를 이용하여 순수한 형태로 분리하였다. HPLC는 reverse phase C<sub>18</sub> μbondapak column(3.9×300mm column)을 사용하여 methanol : water = 60 : 40 의 용매조건으로 UV 232nm에서 detection 하였다. Fig. 2-18과 같은 HPLC profile을 얻었으며 각 peak에 대하여 *in vitro* inhibition assay를 행한 결과 retention time이 10분인 peak 물질에 활성이 있어 분취하여 정제된 시료를 얻어 이화학적 특성조사와 구조분석을 위한 MS spectroscopy 와 NMR spectrometry를 실시하였다.

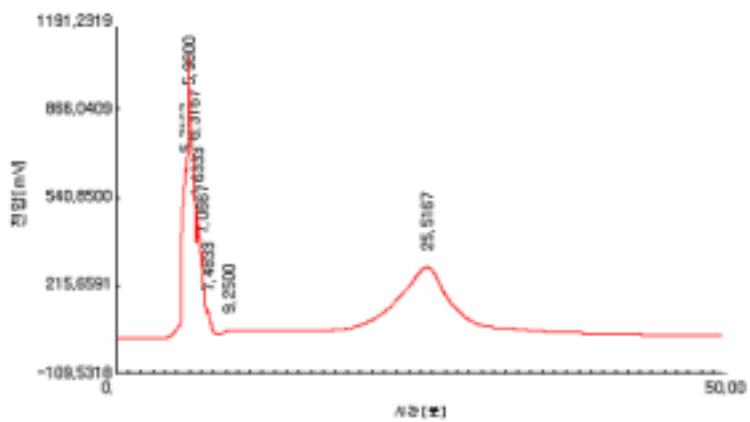


Fig. 2-18 HPLC profile of the A256-10 active compound

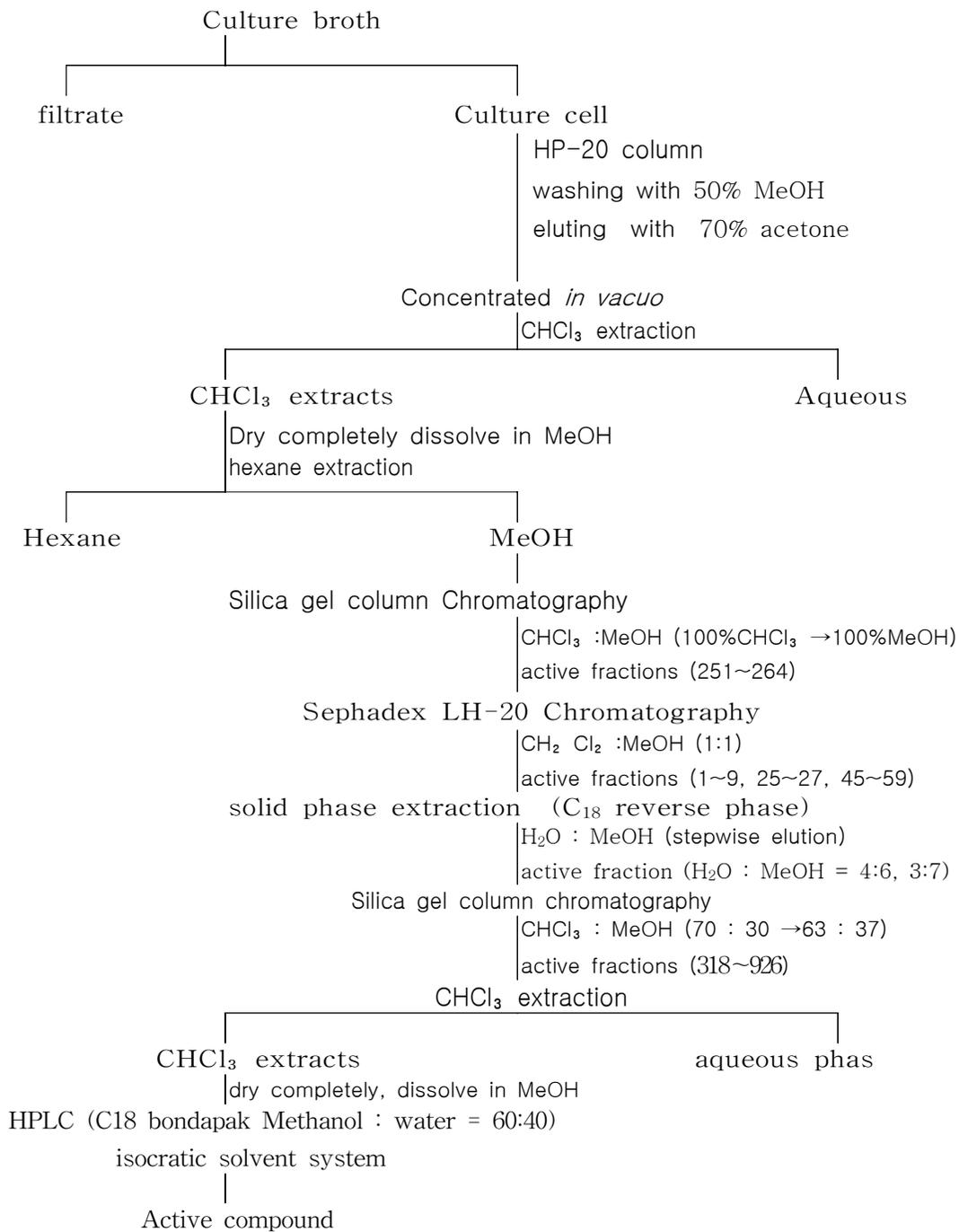


Fig 2-17. Isolation procedure of the active compound produced by A256-10.

### 3) A256-10 활성물질의 이화학적 특성

A256-10 활성물질은 methanol, acetone, ethyl acetate, chloroform에 soluble 하고 hexane에는 insoluble하였다.

활성물질의 TLC 상에서의 Rf 값은 chloroform : methanol = 1 : 1 solvent system에서 약 0.8, chloroform : methanol = 7 : 3 에서는 약 0.33을 나타내었다. (Fig. 2-19) 또한 TLC를 행한 후 여러 가지 발색시약에 대한 반응을 조사한 결과 ferric chloride, orcinol ferric chloride, aniline-diphenylamine, ninhydrine와 antimony trichloride에서 positive 반응을 나타내었다. (Table 2-10)

UV absorption spectrum을 조사한 결과  $\lambda_{\max}$  는 223 nm 와 275 nm에서 나타났다. 산. 알칼리 첨가에 의한  $\lambda_{\max}$  의 변화를 보면 NaOH 첨가 시에  $\lambda_{\max}$ 가 223.4nm에서 212.6nm로 blue shift 되었으나 산 첨가시에는 변화가 없었다. (Fig. 2-20, 21)

HPLC를 이용하여 최종적으로 순수하게 분리된 A256-10에 대해 Mass spectrum 결과 분자량이 920으로 추정되었다. (Fig. 2-22)

$^1\text{H}$  NMR spectrophotometry의 결과는 Fig. 2-23과 같다.

HPLC purified A256-10 활성물질은 Table2-11과 같이 풋마름병균에 대한 저해 활성 외에 antifungal activity도 나타내었다.

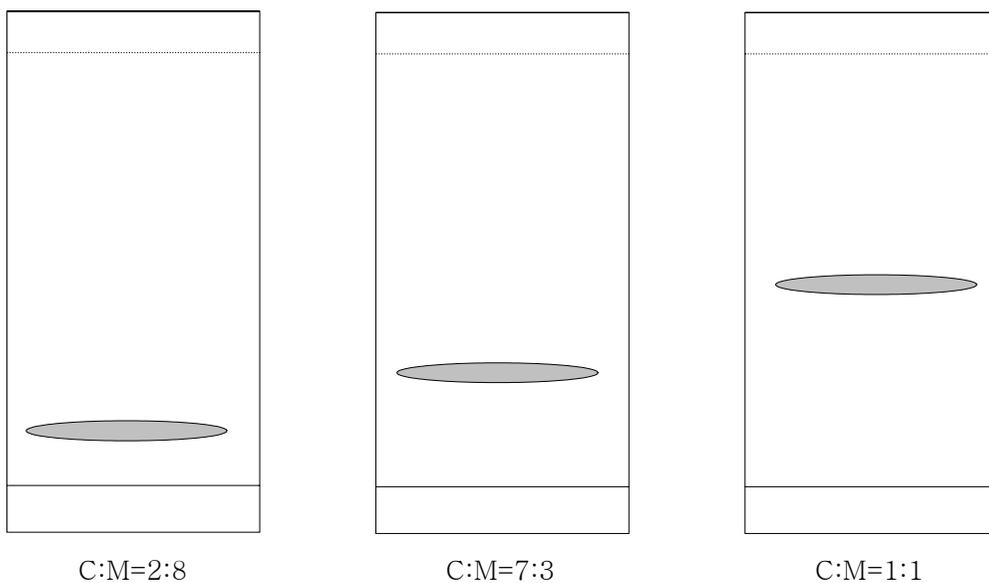


Figure 2-19. Separation of the A256-10 active compound by TLC

Table 2-10. Color reactions of the A256-10 active compound with spray reagent

Spray reagents	Color
4-dimethylaminobenzaldehyde-HCl	-
Ferric chloride	+
Orcinol ferric chloride	+
Aniline-diphenylamine	+
Ninhydrine	+
Dragendorff's reagent	-
Antimony trichloride	+

Table 2-11. Antimicrobial spectrum of A256-10 compound

Test Organism	Active compound
<i>Salmonella gallinarum</i> (G <sup>-</sup> )	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (G <sup>-</sup> )	-
<i>Escherichia coli</i> (G <sup>-</sup> )	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (G <sup>+</sup> )	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (yeast)	-
<i>Phytophthora parasitica</i> (fungi)	+
<i>Phytophthora capsici</i> (fungi)	+
<i>Penicillium</i> sp. (fungi)	-
<i>Rhizopus stromifer</i> (fungi)	-
<i>Botrytis cinerea</i> (fungi)	+

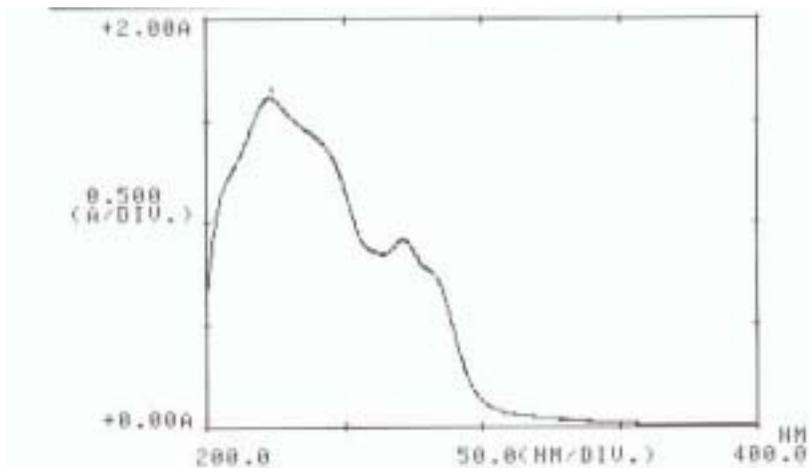


Fig. 2-20. UV spectrum of the 256-10 active compound  
(active compound was dissolved in methanol)

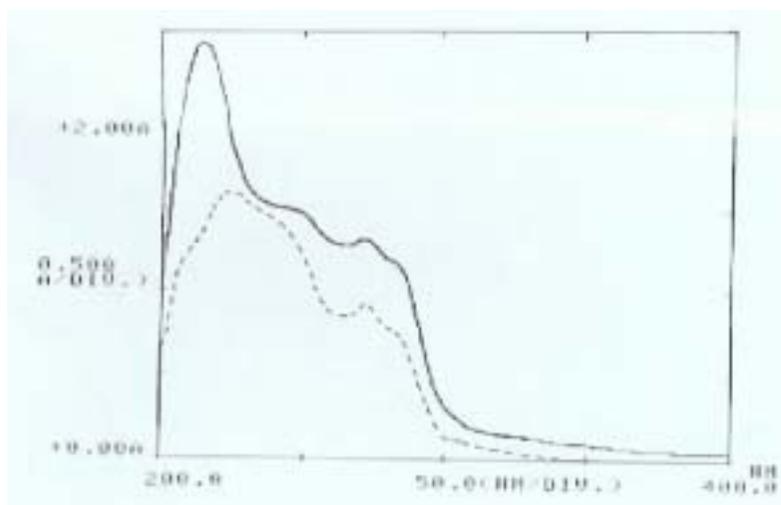


Fig. 2-21 UV spectrum of the 256-10 active compound,  
— : 0.1N NaOH ; --- : 0.1N HCl was added.  
(active compound was dissolved in methanol)

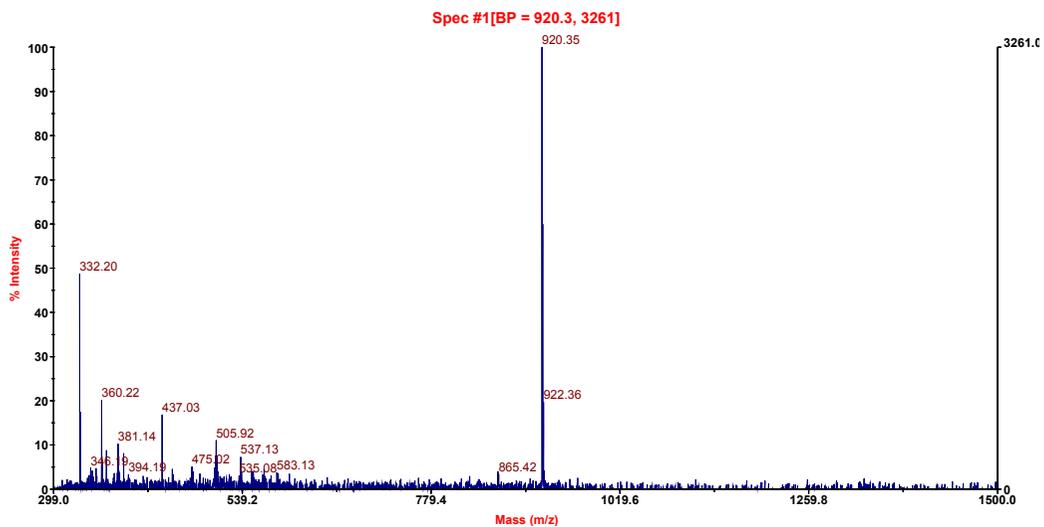


Fig. 2-22 Mass spectrophotometry of the 256-10 active compound

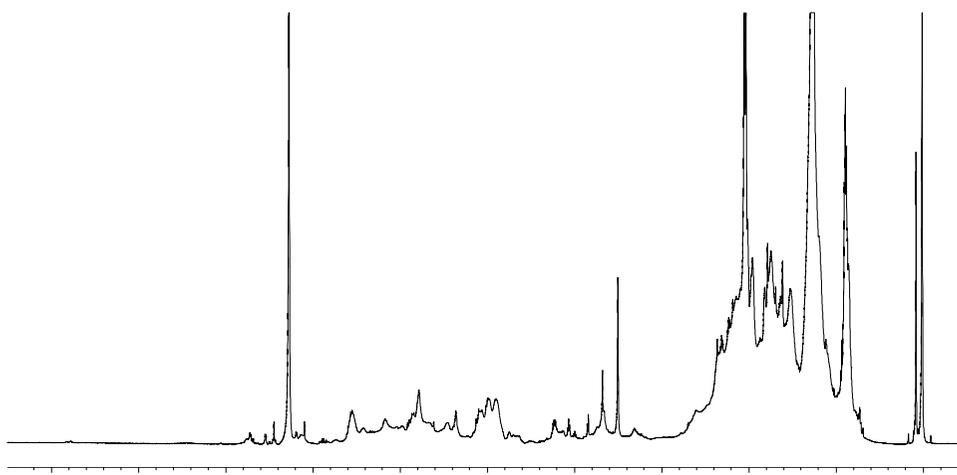


Fig. 2-23 <sup>1</sup>H NMR spectrophotometry of the 256-10 active compound

4) A256-10의 균주 동정

16S rDNA sequence 분석으로 A256-10 균주는 *Bacillus* sp.로 동정되었다.

Table 2-12. Identification of A256-10 strain.

Source	Length	Identities
Bacillus sp. DF49 16S ribosomal RNA gene	1425	500/500 (100%)
Bacillus sp. DF12 16S ribosomal RNA gene	1424	500/500 (100%)
Bacillus subtilis 16S ribosomal RNA gene	959	500/500 (100%)
Bacillus subtilis strain CC-KM2-1	1035	500/500 (100%)
Bacillus subtilis strain B1144	1541	500/500 (100%)
Bacillus sp. Bch1 16S ribosomal RNA gene	1545	500/500 (100%)
Bacillus sp. PP19-H3 gene for 16S rRNA	1472	500/500 (100%)
Bacillus sp. gene for 16S rRNA, strain:PM3	1523	499/500 (99%)
Bacillus sp. DF27 16S ribosomal RNA gene	1424	499/500 (99%)
Bacillus sp. DF15	1424	499/500 (99%)

이상의 A256-10 물질의 physico-chemical 성질과 biological activity 결과를 종합해 볼 때, 새로운 물질일 가능성이 아주 높다고 판단되어 이 물질의 완전한 구조 분석을 실시하여 새로운 생리활성 선도 물질로의 개발이 바람직하겠다.

## 마. A256-11이 생산하는 활성물질의 분리 및 정제

### 1) 예비실험 결과

A256-11 균주가 생산하는 생리활성 물질은 균체에는 존재하지 않고 배양액에만 활성이 있는 것으로 확인되었고 활성물질은 열과 산에 대해서는 안정하였지만 염기에는 불안정하였다. 유기용매에 대한 추출성을 조사한 결과 butanol과 chloroform로 추출이 가능하였으며 Diaion HP-20 resin에 대한 흡착성 여부를 조사한 결과 70% acetone+0.1N NH<sub>4</sub>OH 용출액에 활성이 있었다.

### 2) A256-11 물질의 분리 · 정제

A 256-11균주의 최적배양조건 확립을 위해 배양일수에 따른 활성물질의 생산성과 pH의 변화를 조사하였으며(Fig 2-24), 4일째에 활성물질의 생산이 가장 많았고 pH는 이틀째부터 증가하여 7일째에는 7.82까지 증가하였다. 배양액으로부터 활성물질의 정제는 scheme (Fig. 2-25)에 나타내었다.

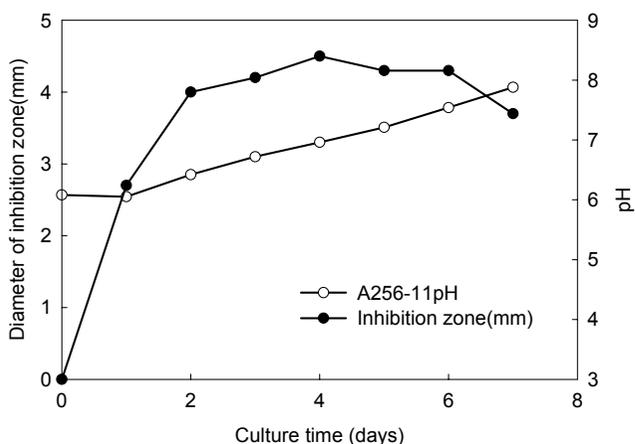


Figure 2-24. Fermentation profile for the production of active compound by A256-11 strain.

활성 물질의 분리를 위해 seed culture를 통해 얻은 4L의 배양액을 3,500 rpm에서 30분간 원심 분리하여 상등액 만을 활성 물질 분리에 사용하였으며 동

량의 butanol로 5회 extraction 한 다음 감압 농축하여 HP-20 adsorption chromatography를 행하였다. 50 % acetone 용액으로 column을 washing 한 후 70% acetone +0.1N NH<sub>4</sub>OH 용액으로 용출한 다음 감압 농축하여 silica gel chromatography를 chloroform - methanol gradient solvent system으로 50ml씩 총 72개의 분획을 얻었으며, 13~14, 30~33, 36~72에서 활성이 나왔다. 이 중에서 36~72분획을 모두 합친 후 침전물들을 제거하기 위하여 소량의 methanol에 ethyl acetate를 조금씩 넣어 침전을 시켰고 원심 분리하여 상등액 (A)와 precipitate로 나누고 precipitate는 methanol에 녹는 물질 (B)와 녹지 않는 물질 (C)로 나누었다. 활성을 확인해 본 결과 (A)에서 활성이 나왔으며 (B)에서도 약간의 활성이 나타났다. 시료 (A)를 chloroform extraction을 하였으며 각각의 층을 감압 농축하여 활성을 확인하였고 양쪽 모두에서 활성을 보여 chloroform층은 sephadex LH-20 chromatography를 행하였고 aqueous층은 silica gel chromatography를 하였다. Sephadex LH-20 chromatography는 methylene chloride : methanol = 9:1로 시행하였고 분획은 10ml씩 15개의 분획을 받았으며 활성은 4~9와 methanol washing 층에서 나타났다. Silica gel chromatography는 chloroform - methanol을 사용하여 gradient solvent system으로 10ml씩 분획을 받았으며 각 분획들을 감압 농축하여 활성을 측정한 결과 19~58에서 활성이 나타났으며 최종적으로 HPLC(reverse phase C18 $\mu$  bondapak column 3.9 $\times$ 300mm)를 이용하여 분리하였다 (Fig. 2-26).

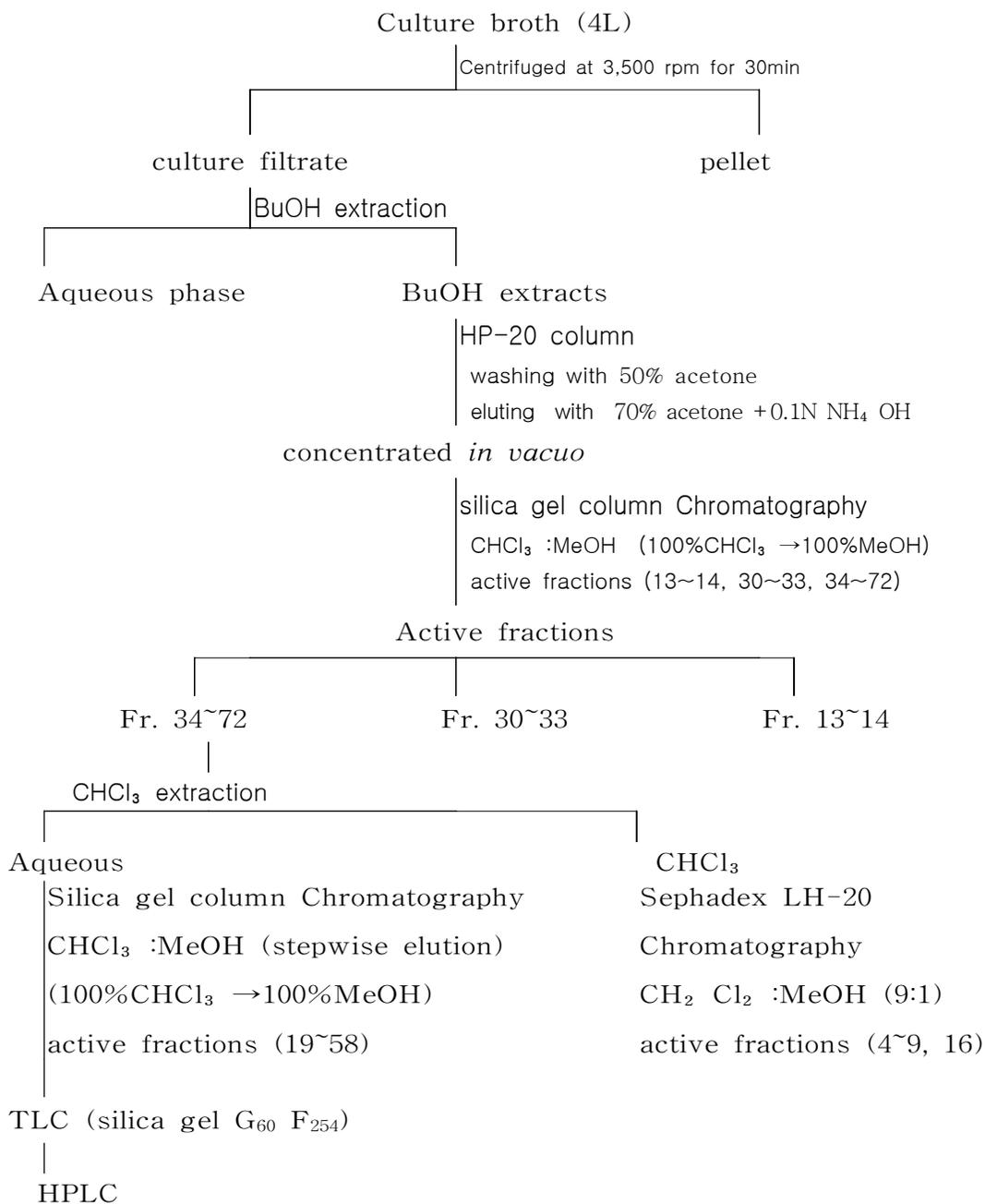


Figure 2-25. Isolation of the active compound produced by A256-11 strain

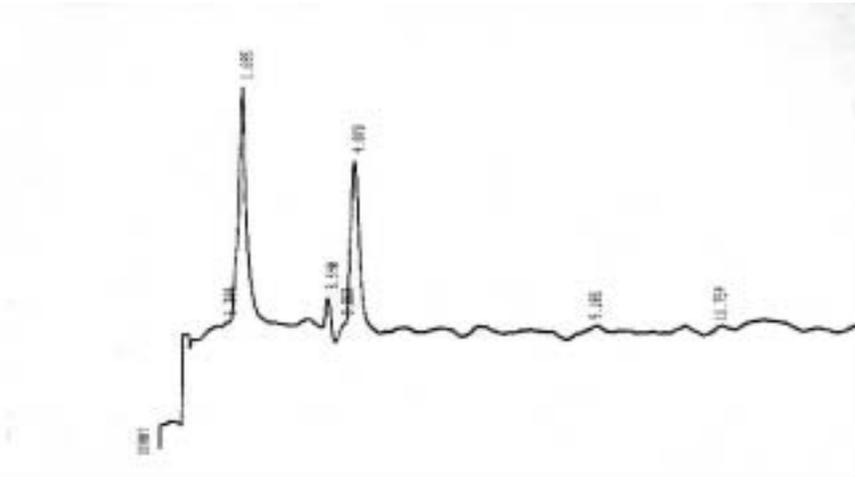


Figure 2-26. HPLC profile of the active compound produced by A256-11 strain

### 3) A256-11의 이화학적 특성

이 물질의 발색반응 조사 결과 Ferric chloride, Ninhydrine에서 positive로, 그 외 4-dimethylaminobenzaldehyde-HCl, Orcinol ferric chloride 등에서는 negative로 나타났다.(Table2-13) Antimicrobial spectrum 조사 결과는 5 종의 곰팡이 모두에서 항균 활성이 나타났으며, 그 외의 gram positive, gram negative 균주에서는 활성이 전혀 나타나지 않았다.(Table2-14)

Table 2-13. Color reactions of the A256-11 active compound with spray reagent

Spray reagents	Color
4-dimethylaminobenzaldehyde-HCl	-
Ferric chloride	+
Orcinol ferric chloride	-
Aniline-diphenylamine	-
Ninhydrin	+
Dragendorff's reagent	-
Antimony trichloride	-

Table 2-14. Antimicrobial spectrum of A256-11 compound

Test Organism	Active compound
<i>Salmonella gallinarum</i> (G <sup>-</sup> )	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (G <sup>-</sup> )	-
<i>Escherichia coli</i> (G <sup>-</sup> )	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (G <sup>+</sup> )	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (yeast)	-
<i>Phytophthora parasitica</i> (fungi)	+
<i>Phytophthora capsici</i> (fungi)	+
<i>Penicillium</i> sp. (fungi)	+
<i>Rhizopus stromifer</i> (fungi)	+
<i>Botrytis cinerea</i> (fungi)	+

4) A256-11의 균주 동정

16S rDNA sequence 분석에 의해 *Bacillus sp.* strain으로 동정되었다. (Table 2-15)

Table 2-15. Identification of A256-11 strain

Source	Length	Identities
Bacillus subtilis strain CICC 10158	1483	363/383 (94%)
Bacillus amyloliquefaciens strain CMB01	1527	363/383 (94%)
Bacillus subtilis strain HJ11	1482	363/383 (94%)
Bacillus sp. Ni49 16S ribosomal RNA gene	560	363/383 (94%)
Bacillus sp. Ni45 16S ribosomal RNA gene	560	363/383 (94%)
Bacillus subtilis strain ATCC9799	1422	363/383 (94%)
Bacillus subtilis strain CICC10079	1461	363/383 (94%)
Bacillus subtilis strain CICC10080	1501	363/383 (94%)
Bacillus subtilis strain CICC10264	1498	363/383 (94%)
Bacillus subtilis strain CICC10075	1463	363/383 (94%)

## 바. A253-16이 생산하는 활성물질의 분리 및 정제

### 1) 예비실험 결과

A253-16 균주가 생산하는 저해활성물질의 pH와 열 안정성, 용매에 대한 추출성, 그리고 diaion HP-20 resin에 대한 흡착성 여부를 조사한 결과 활성물질은 산과 염기성 양쪽에서 모두 불안정 하였으며 열에 대해서도 불안정한 것으로 판단되었다. Butanol과 ethyl acetate에 모두 추출이 가능하였고 HP-20에 대한 흡착성 실험결과 흡착은 이루어지나, 탈착이 용이하게 이루어지지 않았다.

### 2) A253-16 물질의 분리 · 정제

생산균주 A253-16의 배양시간에 따른 pH 변화, 활성물질 생산성을 조사하여 최적 배양조건을 확립하였다. Fig.2-28에 나타난 바와 같이 antibacterial compound의 생산은 배양 이틀째부터 서서히 증가하다가 배양 6일째 균 생육과 더불어 최고치를 나타내었다. pH의 변화는 배양 1일째부터 증가하기 시작하여 7일째 7.15까지 증가하였다. 6일 간 배양한 A253-16의 배양액으로부터 활성물질의 분리는 scheme (Fig. 2-29)에 나타내었다.

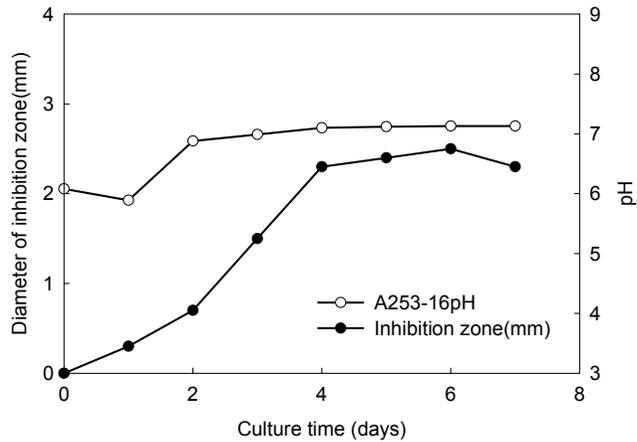


Figure 2-28. Fermentation profile for the production of active compound by A253-16 strain.

활성물질 분리 실험을 위해 4ℓ를 배양하여 3000rpm에서 40분간 원심분리하여 상등액만을 실험에 사용하였다. 상등액을 감압 농축하여 동량의 ethyl acetate로 5번 추출한 후 추출액을 감압 농축하여 silica gel chromatography를 실시하였다. chloroform-methanol 을 사용하여 gradient solvent system으로 50 ml씩 분획하여 총 64분획 중 39~64에서 활성이 나타났다. 활성분획들을 모아서 농축한 후 TLC를 chloroform : methanol(1 : 1)의 solvent system으로 행한 결과 3개의 band로 나타났으며 각 band를 methanol로 추출하여 활성을 확인한 결과 band의  $r_f = 0.48$ 의 band에 활성이 있었다.

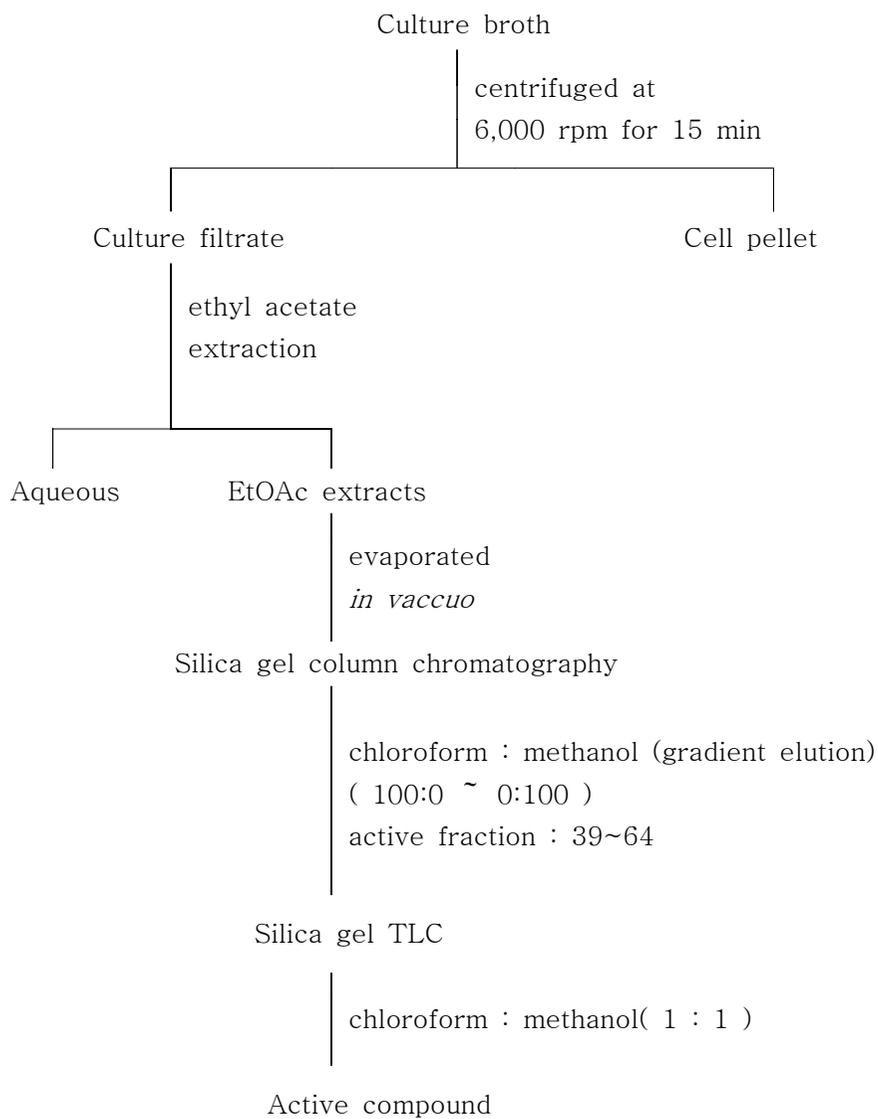


Figure 2-29. Isolation of the active compound produced by A253-16 strain

### 3) A253-16 활성물질의 이화학적 특성

활성분획을 농축하여 chloroform : methanol ( 1 : 1 ) solvent system에서 TLC를 행한 결과 3개의 band로 분리되었으며 각 band를 추출하여 활성을 확인한 결과 Rf값이 0.48인 band에서 활성이 확인되었다.(Fig. 2-30) 이 시료의 발색반응 실험 결과 Orcinol ferric chloride, Antimony trichloride 에 positive 반응이 나타내 당을 포함하는 terpene 계통의 물질로 추정된다. (Table 2-16),

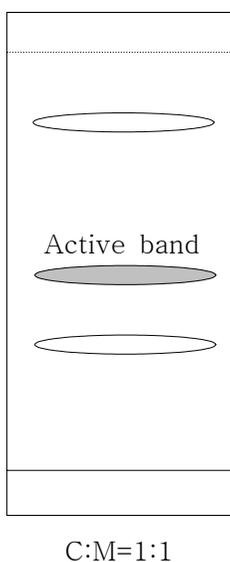


Figure2-30. Separation of the A253-16 active compound by TLC

Table 2-16. Color reactions of the A253-16 active compound with spray reagent

Spray reagents	Color
4-dimethylaminobenzaldehyde-HCl	-
Ferric chloride	-
Orcinol ferric chloride	+
Aniline-diphenylamine	-
Ninhydrine	-
Dragendorff's reagent	-
Antimony trichloride	+

Table 2-17. Antimicrobial spectrum of A253-16 compound

Test Organism	culture broth	Active compound
<i>Salmonella gallinarum</i> (G <sup>-</sup> )	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (G <sup>-</sup> )	-	-
<i>Escherichia coli</i> (G <sup>-</sup> )	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (G <sup>+</sup> )	-	-
<i>Ralstonia solanacearum</i> (G <sup>+</sup> )	+	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (yeast)	-	-
<i>Phytophthora parasitica</i> (fungi)	+++	-
<i>Phytophthora capsici</i> (fungi)	+++	-
<i>Penicillium</i> sp. (fungi)	-	-
<i>Rhizopus strombifer</i> (fungi)	-	-
<i>Botrytis cinerea</i> (fungi)	-	-

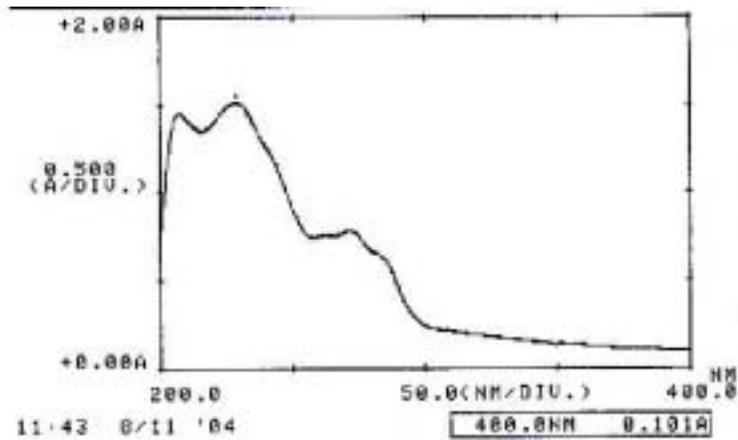


Figure 2-31. UV spectrum of A253-16 active compound

활성 band의 UV 특성을 조사한 결과 methanol에서  $\lambda_{max}$ 는 204, 232, 270, 280에서 나타났다.(Fig. 2-31)

A253-16 균주 배양액은 풋마름병균에 대한 저해 활성 뿐 만아니라 *Phytophthora parasitica*, *Phytophthora capsici*에 아주 강한 항균 활성 나타내었으나, TLC purified 시료는 풋마름병균에만 활성을 나타내고, 역병균에 대한 활성은 나타나지 않았다.(Table 2-17) A253-16 균주는 단일 물질로 정제하는 것보다 배양액을 유기용매로 추출한 다음 농축하여 제제화 시켜 다양한 식물병 방제제로 개발하는 것이 바람직하겠다.

#### 4) A253-16의 균주 동정

16S rDNA sequencing 결과 *Pseudomonas sp.*로 동정되었다. (Table 2-18)

Table 2-18. Identification of A253-16 strain.

Source	Length	Identities
<i>Pseudomonas sp.</i> 16S rRNA gene, clone NB1-f	1502	69/79 (87%)
<i>Pseudomonas sp.</i> 22-Ab	1457	67/79 (84%)

## 사. A254-10이 생산하는 활성물질의 분리 및 정제

### 1) 예비실험 결과

A254-10이 생산하는 활성물질의 선행실험 결과 산과 열에는 안정하였으며 유기용매에 대한 추출성을 조사한 결과 butanol과 ethyl acetate로 추출이 가능하며 ethyl acetate가 더욱 효율적인 것을 알 수 있었다. diaion HP-20 에는 흡착 되지 않았다.

### 2) A254-10 활성물질의 분리 정제

A254-10균주의 최적 배양조건을 확립하기 위하여 배양일수에 따른 pH의 변화와 활성물질의 생산성을 조사하였다(Fig. 2-32). 이틀째부터 급격히 활성이 증가하였으며 5일째에 활성이 최대에 달하였다. pH의 변화는 이틀째부터 활성의 증가에 따라 비슷한 비율로 증가하였으며 7일째에 8.07까지 증가하였다. A254-10균주의 균체에서는 활성이 나타나지 않아서 배양액만을 물질분리 실험에 사용하였다. 배양액으로부터 활성물질의 분리 과정은 scheme (Fig. 2-33) 나타내었다.

예비실험 결과를 바탕으로 활성물질의 분리를 위해 seed culture를 통한 배양액 4ℓ를 원심분리 하여 얻어진 상등액을 사용하였다. 상등액을 감압 농축하여 동량의 ethyl acetate로 5회 추출하여 silica gel chromatography를 chloroform - methanol gradient solvent system을 사용하여, 용출하였다. 각 분획들을 50mℓ씩 분획하였으며 활성분획 42~60을 얻었다.

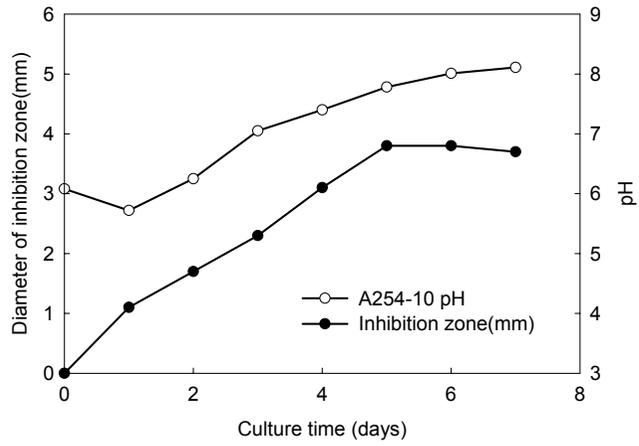


Figure 2-32. Fermentation profile for the production of active compound by A254-10 strain.

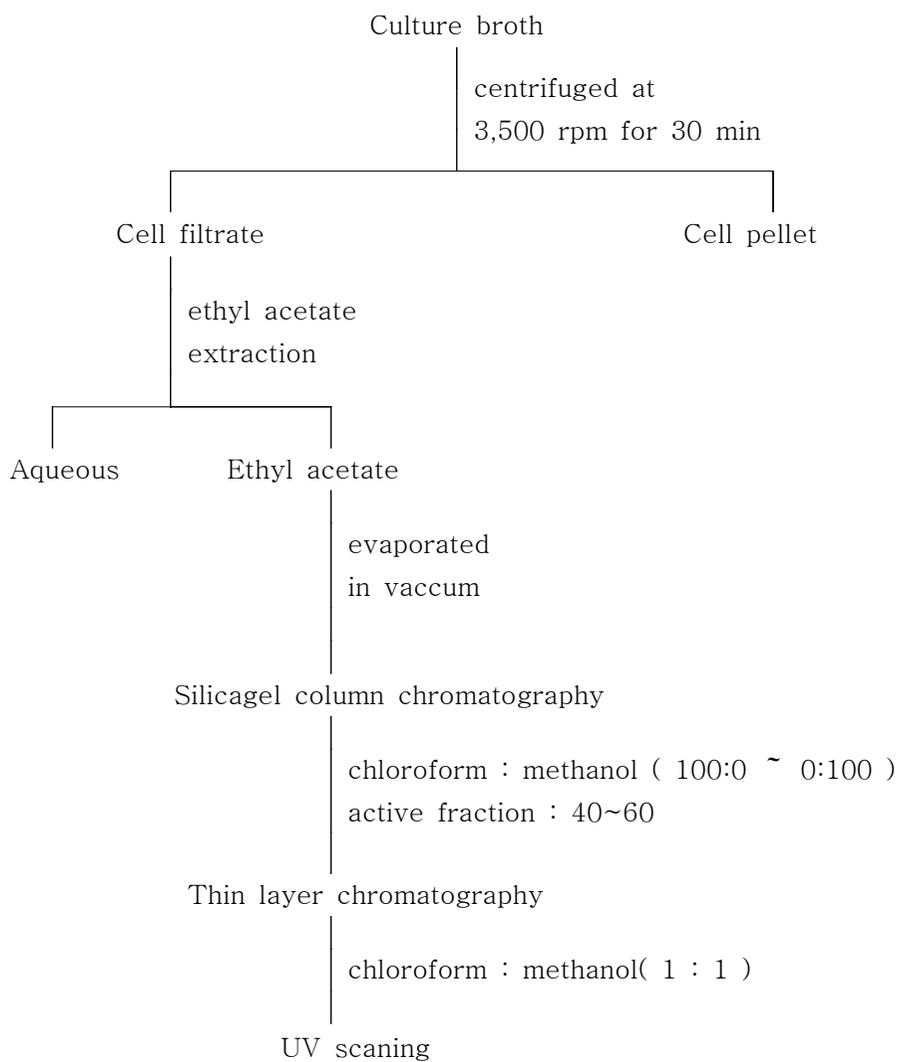


Figure 2-33. Isolation procedure of the active compound from A254-10

### 3) A254-10의 이화학적 특성

현재까지 분리된 시료를 이용하여 발색반응 실험을 한 결과 Ferric chloride, Orcinol ferric chloride, Antimony trichloride의 세 reagent에서 반응이 나타났으며(Table 2-19), antimicrobial spectrum은 *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Phytophthora parasitica*를 비롯한 곰팡이 전부에서 항균 활성이 나타났다. (Table 2-20) 또한 UV spectrum 조사 결과 210, 234에서  $\lambda_{max}$ 가 나타났다.(Fig. 2-34)

Table 2-19. Color reactions of the A254-10 active compound with spray reagent

Spray reagents	Color
4-dimethylaminobenzaldehyde-HCl	-
Ferric chloride	+
Orcinol ferric chloride	+
Aniline-diphenylamine	-
Ninhydrine	-
Dragendorff's reagent	-
Antimony trichloride	+

Table 2-20. Antimicrobial spectrum of A254-10 compound

Test Organism	Active compound
<i>Salmonella gallinarum</i> (G <sup>-</sup> )	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (G <sup>-</sup> )	-
<i>Escherichia coli</i> (G <sup>-</sup> )	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (G <sup>+</sup> )	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (yeast)	+
<i>Phytophthora parasitica</i> (fungi)	+
<i>Phytophthora capsici</i> (fungi)	+
<i>Penicillium</i> sp. (fungi)	+
<i>Rhizopus stromboli</i> (fungi)	+
<i>Botrytis cinerea</i> (fungi)	+

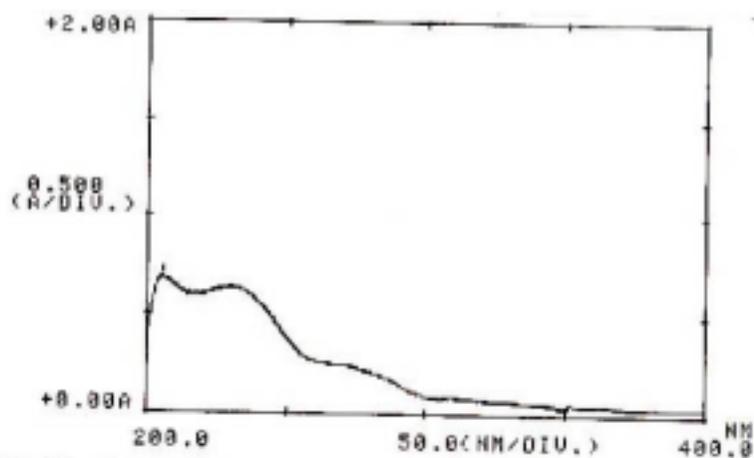


Figure 2-34. UV spectrum of A254-10 active compound

4) A254-10의 균주 동정

16S rDNA sequencing 에 의한 균주 동정이 이루어 지지 않았다. 이 균주의 동정을 위해서 생화학적 특성 등의 세밀한 조사가 필요할 것으로 사료된다. A254-10의 sequencing 결과는 다음과 같다.

```
TTGTTTCTTCTTTTGTTCGTTCGTGTACAACGGGTAACCTTACCCCACC  
CGCACCTGGCGGGTGTAAAAGGTGAGTCCCCGCTTGGTGTTGCCAGTTTA  
AGCCCCCTGAGACAAAATGCGTTCGGGTGACCCTTTTCTCCTCCAATAATA  
TAGTCCGTCTGGGTTTTTATTCCCTCTCCCATCCTTCTCCCTCCCGCCGC  
TCCCCCTCTTACTTTCCCTGGCGTCCCTGATGTTCCTCTAATATTTAAA  
TGAGTTATAATAGTAACATTCTTGTTCGTGTTAAGGTAGACAAATTAT  
CTTGCGATCTTCCGGCTTCTGAGATATGGTGAGCGGCATGTTTGGGGGG  
GAAAGACAACCATAAGTTGGCTGGTGGGCCGGGCTAGGGTTTGTGACTG  
GCGGGAGGTTCAACCTTGGACCTTACTTCTGGTCTTGTCCATTAACCCC  
CCGCTCCTTATTTGACAACCATGCTTCCC GCCGTGCCGGTCCCTCCTCTC  
CAGATCTCTCTTTAAGAATCCTCGTTATCGCATCGGTATATGGGCAAAA  
TAAACCAACCTTGTCATCATATGAAGATTGAACAGACGAAACCCCTAAC  
AGATCATCTCTTAATCAGCTACCCTGGTATCCTCCAATCACCATAATAT  
GTCCGCTCATACCACGTGATCCCCTTCACTTCCACTCGTACGATCTCTAC  
CCACGCACCTGTCCTACTATTCTACCTATATTCTCTCTTATATAATATT  
CGTCTCTCGTGATCTTAGGATCTTTGGGACACGCTTTTGTTCGGAAAAAT  
AGCAAGGATGGCGAAGAAGTATTGTACAGACCAACAACCTTATACCCCGT  
GGTTAGTCTCCGTGAACCGCGTATGTCATTCTTATCGTAACTATATTGT  
TATATCATCACGGCGCCCGCTAGCGTAATTTTGCCGCGCCGTCTACGCCG  
CTGTACTCGACAGCCATATTGTAATATCTTCCCTTCCCGCTCGAGAGGTC  
ATTGCGCCGGCGCGCGTGTGCGTGGTTGTAGTTAACAGGGGTGTGACTCGT  
TAAGGAGCCCCGCCTTTTGTCCCGTTTATTAGGCAAGAAATGGATTAGG  
GTTGAACGTAATACGTATATCATATATTAAGCCCTCTTTTTTTCTACC  
CCCCCCCCCCTGTGATTACCTAATCCATTACCTATTGTACCCGTATAG  
TCCAGTGCGAGCCGGCACATTATCCCGTTTACGCTTTAACCTACCGTTT  
TTTTTACTCACGTGCGCCGAC
```

### 3절 풋마름병균의 길항 세균 SKU-78의 동정 및 특성 연구

#### 1. 서론

식물생장을 촉진시켜 plant growth promoting rhizobacteria(PGPR)로 지칭되는 근권 미생물이 초기에는 수확량을 늘리기 위해 사용되었으나 PGPR 균주들이 여러 복합적인 기작에 의해 식물병원균의 발병을 억제함이 알려지면서 (Ramamoorthy et.al. 2001; kloepper et.al 1980) 최근에는 토양 유래 병원균(soil borne pathogen)의 발병을 억제하는 생물농약으로의 개발 가능성이 크게 부각되고 있다.(Bakker et.al. 2003)

본 연구에서는 고추와 토마토 근권에서 분리한 미생물 중에서 종자발아 실험과 뿌리 집락형성 실험(colonization assay)(E. Kay et al. 2002) 방법에 의해 선발된 PGPR 균주 6종에 대해 *in vivo* 포트실험을 실시하여, 종자처리와 토양처리 모두에서 뛰어난 풋마름병 방제효과를 나타낸 균주를 단독 또는 복합제제 개발을 위한 후보 균주로 선발하였다. 특히 SKU-78균주의 경우 풋마름병에 대한 직접적인 antibiosis 활성은 없으나, 뿌리 근착 능력이 뛰어나고 뿌리 성장 촉진 효과를 나타내었으며, pot를 이용한 *in vivo* assay에서 탁월한 발병 억제 효과를 나타내어 SKU-78 균주에 대한 대량배양 조건을 확립하고 대량배양을 통해 제형화를 시도하였으며, 직접 포장에 사용하여 풋마름병 억제효과를 검증하였다. 선발 균주 SKU-78에 대해 16S rDNA 염기서열 분석과 더불어 생화학적 특성조사를 통해 균주를 *Bacillus* sp. SKU-78로 동정하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 병원균 확보 및 배양.

본 실험에서 사용된 *R. solanacearum*은 농업과학기술원에서 분양받은 균주와 풋마름병에 감염된 고추와 토마토에서 분리한 균주를 사용하였다. 시험균주는 20% glycerol을 포함하는 tryptic soy broth(TSB, Difco)에 고정하여  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 보관하면서, 0.005% tetrazolium chloride(TZC) 평판배지에  $28^{\circ}\text{C}$ 에서 2일간 배양하여 실험에 사용하였다.

### 나. 근권 미생물의 분리 및 배양

여주와 이천 지역의 하우스에서 재배한 고추와 토마토 근권 토양에서 미생물을 분리하였다. 멸균된 핀셋을 이용하여 뿌리에서 떨어진 흙 1 g를 멸균수로 진탕 후 정지하여 상등액 1 ml을 취해 순차적으로 희석하여 일정량의 희석액을 TSA(tryptic soy agar, Difco) 평판 배지에 도말하여  $30^{\circ}\text{C}$ 에서 2일간 배양하여 single colony를 분리하였다. 분리한 colony는 TSB(tryptic soy broth) 배지로  $30^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간 배양한 다음 6,000xg에서 15분간 원심분리하여 균체를 회수하였다. 회수한 균체를 멸균수에 현탁하여 600 nm에서  $\text{OD}=1(10^9 \text{ cfu/ml})$ 로 맞추어 그대로 또는 희석하여 실험에 사용하였다.

### 다. Germinating seed assay.

고추(부강 품종)와 토마토(서광 품종) 종자를 구입하여 2% sodium hypochlorite 용액으로 2분간 처리하여 표면 살균한 후 멸균수로 여러 번 행구어 사용하였다. 1% water agar plate에 고추 또는 토마토 종자를 올려놓고 각 종자

주위에 열배로 희석한 균체 현탁액 1 ml씩 점적한 후, 28℃ 생장고에서 뿌리 생장과 뿌리 주위의 균주의 집락형성을 10 일간 관찰하였다. 대조군의 경우는 균체 현탁액 대신 멸균된 TSB를 종자 주위에 처리하였다. 각 처리 당 종자 6개씩 3번 반복실험 하였다.

#### 라. 종자 처리.

Ownley 방법에 의해 선발 균주를 토마토와 고추 종자에 처리하였다.(Ownley et.al. 1992) TSB 배지를 이용하여 선발균주를 30℃에서 24 시간 배양한 후 6,000xg에서 15 분간 원심분리하여 회수한 균체를 0.02 M phosphate buffer (pH 7.0) 용액에 현탁시킨 후 동량의 2% methylcellulose(Sigma, St. Louis)를 첨가한 박테리아 현탁액을 종자와 잘 혼합하여 무균상태로 실온에서 건조시키는 방법으로 종자에 박테리아를 코팅하였다.

#### 마. 포트실험.

선발균주에 의한 풋마름병 발병 억제효과는 종자처리와 토양관주 2 가지 방법으로 검정하였다. 지름 10 cm 포트에 바로키 상토(한국농자재 주식회사)를 180 g 채우고 박테리아를 코팅한 종자와 코팅하지 않은 종자들을 각각 파종한 다음 25-35℃로 유지되는 하우스에서 재배하여 4 엽기가 되었을 때 칼로 뿌리에 상처를 내고 *R. solanacearum* 현탁액 30 ml ( $10^7$  CFU/ml)을 관주처리 하여 발병을 유도하였다. 토양처리 방법은 종자를 파종한 후 고추와 토마토가 4 엽기가 되었을 때 선발균주 현탁액을 포트 당 30 ml( $10^9$  CFU/ml)씩 분주하고, 이틀 후 뿌리에 상처를 낸 다음 *R. solanacearum* 현탁액을 30 ml( $10^7$  CFU/ml)씩 관주하였다. 종자 처리만 행한 경우와 토양처리만 행한 경우 및 종자처리와 토양처

리를 병행한 경우에 있어서 선발된 PGPR 균주에 의한 발병 억제효과를 4 주간 관찰하였다. 대조구는 선발균주 처리 없이 *R. solanacearum* 현탁액 만 처리하였으며, 각 처리 당 10 분 씩 3 회 반복 실험하였다. 풋마름병 발병률은 식물이 아주 싱싱한 경우는 0, 잎이 약간 시든(25% 미만) 경우는 1, 중간정도(50 % 미만) 시든 경우는 2, 심하게(75 % 정도) 시든 경우는 3, 완전히 시들어 고사한 경우를 4로 등급을 정하였으며, 발병 억제율은 {(대조구의 발병률-처리구의 발병률)/대조구의 발병률} x 100 으로 계산하였다.

#### 바. 포장실험.

풋마름병이 발병한 경남 고성군의 방울토마토(TM8) 재배 하우스에 선발균주 현탁액을 2차에 걸쳐 처리하고 처리에 따른 토양의 *R. solanacearum* 밀도의 변화 및 풋마름병의 회복 여부를 조사하였다. 선발 균주 현탁액 1차 처리 시에는 40 배 희석한 균체 현탁액을 토양 처리하였으며, 그로부터 10일 후 200배 희석한 균체 현탁액을 2차로 처리하였다.

#### 사. SKU-78균주의 antimicrobial activity

배양액을 원심분리(1500rpm, 20분) 후 상등액을 취하여 filtering(0.45 $\mu$ m membrane filter, Adventec)한 여액을 항세균 및 항진균 활성 측정에 사용하였다. paper disk에는 30 $\mu$ l 침하고, hole에는 70 $\mu$ l를 주입하여 실험균주에 대한 감수성을 검사하였다.

## 아. 선발 균주의 동정

### 1) 생리. 생화학 실험

선발 균주의 동정을 위하여 형태학적, 배양적 특성 및 생화학적 특성을 Manual of Methods for General Bacteriology와 Bergey's Manual of Systemetic Bacteriology에 의거하여 결정하였다. 세포와 포자의 형태, catalase, oxidase, urease, protease, lipase, nitrate reductase, amylase와 cellulase 등의 여러 효소의 생산 여부, 탄소원의 이용, citrate 이용, Voges-Prokauer 반응 등을 조사하였다.

### 2) 16S rDNA sequence 분석

TSA 배지에서 1일 동안 배양한 SKU-78 cell에서 chromosomal DNA를 분리한 다음 분리한 DNA를 1 volume의 isopropanol로 precipitate 시킨 후 70% ethanol를 washing하여 건조시킨 후 primer 519r를 사용하여 PCR amplification 시켰다. PCR amplification은 16S rDNA을 10x Taq polymerase buffer, primers(519r), dNTP (각각 0.125  $\mu$ M), 0.25 mM  $MgCl_2$ 를 포함하는 reaction mixture의 최종 volume을 증류수로 20 $\mu$ l로 맞추고 Taq polymerase를 첨가하여 PCR을 수행하였다. Amplified DNA를 agarose gel electrophoresis 후 ethidium bromide를 이용하여 UV fluorescence로 관찰하고 DNA analyzer (Applied Biosystems)를 사용하여 sequencing 한 후 data base를 이용하여 동정하였다.

## 3. 결 과

### 가. 활성균주의 선발.

TSA 평판 배지를 이용하여 고추와 토마토 근권에서 분리한 총 161 종의 미생물 중에서 대조구에 비해 10% 이상의 뿌리 성장 촉진 효과를 보이면서

뿌리 주위 agar에 뿌영계 집락형성이 이루어지는 6개 균주, TS1-7, TS1-5, SKU-78, TS6-4, SKU-134, SKU-155를 선발하였다(Table 3-1).

Table 3-1. Effects of the selected plant growth promoting rhizobacteria strains on root elongation of pepper plant

Strains	TS1-7	TS6-4	SKU-78	TS1-5	SKU-134	SKU-155
Root elongation rate (%)	11.4	13.8	15.2	12.6	14.2	10.8

Mean root length in millimeters was measured at 10 days after treatment. An equal number of plants was treated with sterile distilled water as control.

Root elongation rate =  $\{(\text{root length of treatment group} - \text{root length of control}) / \text{root length of control}\} \times 100$

#### 나. 선발균주의 배양

SKU-78 균주를 TSB(tryptic soy broth) 배지로 30℃에서 배양하며 배양시간에 따른 균성장과 pH 변화를 조사하였다. Fig. 3-1에 나타난 바와 같이 SKU-78 균주는 배양 20시간 만에 균체 밀도가 최대에 도달하였으며, pH는 20시간까지는 감소하다 그 이후 점차 증가하였다.

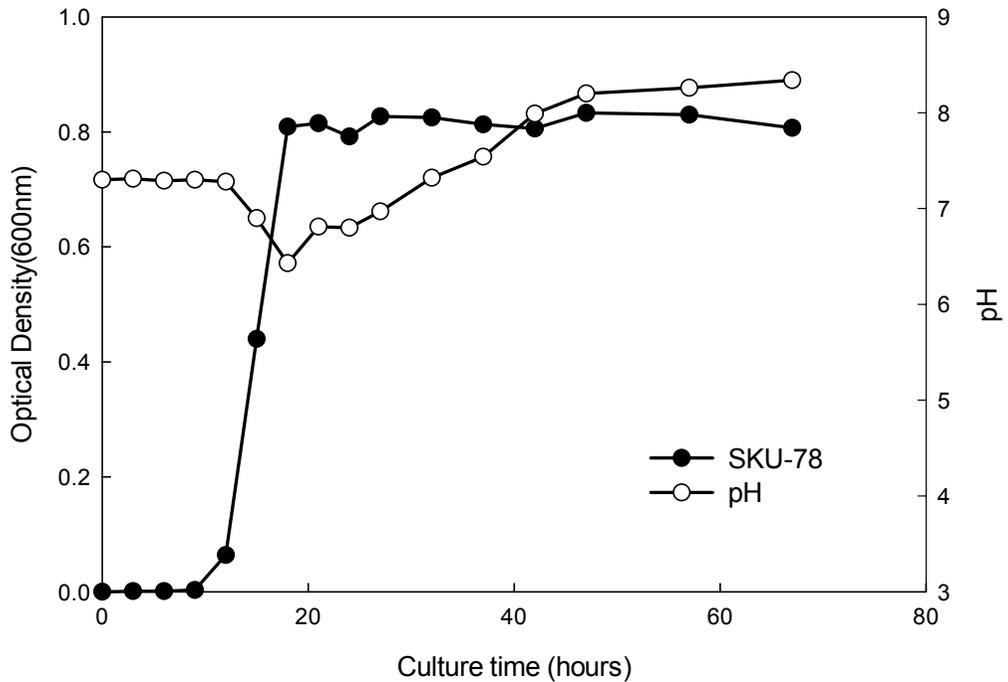


Figure 3-1. Cell growth curve of SKU-78 strain.

#### 다. 선발균주에 의한 발병 억제 효과.

##### 1) 포트 실험

뿌리 성장 촉진 효과와 뿌리에 집락형성 여부를 확인하는 실험을 통해 선발된 6개 활성균주의 발병억제 효과를 검정하기 위해 종자처리, 토양처리, 종자와 토양 병행 처리를 포트실험으로 행하였다. Ownley 방법으로 박테리아를 종자에 코팅한 경우 종자 당  $10^8$ - $10^9$  CFU의 미생물 밀도가 유지됨이 serial dilution plating에 의해 확인되었으며, 2% methylcellulose와 0.02 M phosphate buffer 혼합액만으로 처리한 대조군에서는 박테리아가 검출되지 않았다. 선발균

주 현탁액을 종자에 코팅처리, 토양에 관주처리, 그리고 종자처리와 토양처리를 병행한 경우의 발병억제효과를 활성균주의 처리 없이 *R. solanacearum* 만 처리한 대조구에 대한 발병 억제율로 나타내었으며, 각 처리마다 토마토와 고추를 각각 10주 씩 3번 반복 실험하여 평균값을 구하였다(Table 3-2). 모든 활성균주에 있어서, 토양처리 방법이 종자처리 방법 보다 발병억제 효과가 좋고, 종자 또는 토양의 단독 처리보다 종자처리와 토양처리를 병행한 경우에 방제효과가 높게 나타났다. 특히 SKU-78 균주의 경우 종자처리와 토양처리를 병행한 경우 60% 이상의 발병 억제율을 나타내었다.(Fig. 3-2)

## 2) 포장 실험

선발된 활성균주 중 포트실험에서 고추와 토마토 둘 다에 대해 풋마름병 방제효과가 가장 뛰어난 SKU-78 균주에 대해 포장실험을 실시하였다. 풋마름병에 감염된 토마토 포장에 SKU-78 균체 현탁액을 40 배 희석하여 처리하였으며 1차 처리 10일 후 배양액을 200 배 희석하여 다시 2차 처리를 실시하였고, 10일 간격으로 토양 내 *R. solanacearum*의 밀도의 변화, 그리고 발병 식물체의 회복여부를 조사하였다. SKU-78 균주의 현탁액을 토양에 처리하는 것에 의해 토양에서의 *R. solanacearum*의 밀도가 점차 감소함을 알 수 있었으며(Table 3-3), 2차 처리 후 20일이 경과한 후에 발병식물체가 확연하게 회복됨을 알 수 있었다 (Fig.3-3).

Table 3-2. Suppression of bacterial wilt of tomato and pepper plants by PGPR strains

Strains	Biocontrol efficacy (%) <sup>a</sup>					
	Seed treatment <sup>b</sup>		Soil application <sup>c</sup>		Seed + Soil treatment	
	Pepper	Tomato	Pepper	Tomato	Pepper	Tomato
TS 1-5	17.6	10.3	37.5	20.3	52.3	50.5
TS 1-7	23.5	15.4	35.0	15.2	50.1	49.7
SKU-78	41.2	28.2	47.5	30.8	69.4	62.5
TS 6-4	35.3	23.1	42.5	25.9	59.3	42.1
SKU-134	41.2	15.4	42.5	31.3	60.2	44.7
SKU-155	11.8	12.8	32.5	10.8	47.5	23.2

<sup>a</sup> Data represent means of 10 replications of each treatment. The experiment was repeated three times. Disease severity was rated 10 days after inoculation with *R. solanacearum*. Biocontrol efficacy is based on comparisons to the nonbacterized but pathogen-challenged controls.

<sup>b</sup> Pepper and tomato seeds were coated with the selected bacterial cell suspension and planted.

<sup>c</sup> Plants were grown in potting soil and was drenched with bacterial cell suspension.



Figure 3-2. Suppression effect of bacterial wilt by SKU-78 and SKU-134 strains. (a) SKU-78 (b) SKU-134, Right lane : control

Table 3-3. Survival of *Ralstonia solanacearum* in soil after application of SKU-78 strain

Days after treatment	CFU/g of fresh soil <sup>a</sup>
0 day (first treatment)	$5 \times 10^7$
10 days (second treatment)	$2 \times 10^4$
20 days	$1 \times 10^3$
30 days	$1 \times 10^3$
40 days	$1 \times 10^3$

<sup>a</sup> Value for bacteria was determined on King's B medium. Value is mean of three replicates.



(a) Before treatment



(b) After treatment

Fig. 3-3. Efficacy of SKU-78 strain in suppression of bacterial wilt of tomato.

(a) spread of *R. solanacearum* infection, (b) showed healthy growth after treatment of SKU-78 strain in contrast with the appearance of severe wilt symptoms in non-treated tomato plants (a).

라. SKU-78 균주의 항균활성.

SKU-78 균주의 항균활성을 paper disk method로 조사한 결과 Gram 음성균인 *Salmonella gallinarum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, Gram 양성균인 *Ralstonia solanacearum*, *Staphylococcus aureus*, yeast 인 *Saccharomyces cerevisiae* 모두에 대해 저해 활성이 없으나, 식물병원균 fungi인 *Phytophthora parasitica*, *Phytophthora capsici*, *Botrytis cinerea*에 대해서는 강한 활성을 나타내었다.( table 3-4 )

Table 3-4 Antimicrobial spectrum of SKU-78 strain

Test strains	Activity
Gram negative Bacteria	
<i>Escherichia coli</i>	-
<i>Salmonella gallinarum</i>	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Gram positive Bacteria	
<i>Staphylococcus aureus</i>	-
Fungi	
<i>Phytophthora capsici</i>	+
<i>Phytophthora parasitica</i>	+
<i>Penicillium</i> sp.	-
<i>Botrytis cinerea</i>	+

## 마. SKU-78 선발균주의 동정.

### 1) 형태학적 특성

nutrient 한천 평판배지에서의 colony 형태는 원형이었고, 색깔은 크림색이었으며 표면은 광택이 나면서 매끄러운 상태였다. 시간이 경과함에 따라 pellicle을 형성함이 관찰되었다.

### 2) 생화학적 특성

catalase, oxidase, urease, protease, lipase, nitrate reductase, amylase와 cellulase 등의 여러 효소의 생산 여부, 탄소원의 이용, citrate 이용, Voges-Prokauer 반응 등을 조사하였다. (Table 3-5) SKU-78 균주는 amylase, protease 그리고 glucanase 등의 고분자 가수분해 효소를 분비함과 동시에 또한 extracellular phytase 활성도 나타내었다.

Table 3-5. Characterization of SKU-78 strain

<b>Morphological characteristics</b>	
Gram reaction	+
Motility	-
<b>Biochemical characteristics</b>	
Catalase reaction	+
Gas production from glucose	+
H <sub>2</sub> S production	-
Methyl red test	-
Voges Proskauer	+
Oxidase reaction	-
Urease activity	+
Citrate utilization	+
Nitrate reduction to nitrite	+
Amylase activity	+
Protease activity	+
Cellulase activity	+
Lipase activity	+
Phytase activity	+

### 3) 온도 내열성 검토

기본배지(glucose 4%, pepton 1%, yeast extract 0.2%)에서 성장한 SKU-78균 60,80, 100℃의 온도에서 1시간 동안 노출시킨 후 균의 사멸 정도를 확인한 결과 열에 대해 강한 내성을 지닌 고온성 균으로 판명되었다.

Table 3-6. colony count after heat treatment

control	60℃	80℃	100℃
2.5 x 10 <sup>7</sup>	3.2 x 10 <sup>8</sup>	1.5 x 10 <sup>7</sup>	0.5 x 10 <sup>7</sup>

#### 4) 16s rDNA sequence 분석

SKU-78 균주의 16S rDNA sequence를 분석하고 Data base를 이용하여 기존 균주와 similarity를 분석하였다.

Table 3-7. 16S rDNA sequencing and similarity analysis of SKU-78

CTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTG TAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTG AACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGG ACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGA TGCGTAGCCNACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAG TCTGACGGAGCAACGCCNCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCT CTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGG TACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC GTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCG GTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTG GAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAA		
Source	Length	Identities
Bacillus amyloliquefaciens strain Ba-S13 16S ribosomal RNA gene	1421	584/586 (99%)
Bacillus sp. DF48 16S ribosomal RNA gene	1409	584/586 (99%)
Bacillus sp. DF15 16S ribosomal RNA gene	1424	584/586 (99%)
Bacillus polyfermenticus 16S ribosomal RNA gene	2364	584/586 (99%)
Bacillus subtilis strain MO4 16S ribosomal RNA gene	1504	584/586 (99%)
Bacillus sp. WL-3 16S ribosomal RNA gene	1518	584/586 (99%)
Bacillus sp. EBI3 16S ribosomal RNA gene	676	584/586 (99%)
Bacillus subtilis strain BS-S3 16S ribosomal RNA gene	1458	584/586 (99%)
Bacillus sp. CR-179 partial 16S rRNA gene	1453	584/586 (99%)
Bacillus sp. TMW 2.480 partial 16S rRNA gene	1506	584/586 (99%)

SKU-78 균주는 Gram 양성균의 간균으로, 생화학적 특성에 의해 *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens* group으로 분류되었으며 또한 16S rDNA의 염기서열을 분석하고 Database를 이용하여 유사도를 조사한 결과 SKU-78 균주는 *Bacillus amyloliquefaciens*와 유사성을 보여 *Bacillus* sp. SKU-78로 명명하였다.

이상에서 SKU-78 균주는 *in vivo* pot 실험에서 종자 coating 처리와 토양 관주 처리 모두에서 강한 풋마름병 발병 억제 효과를 보였으며, 풋마름병이 크게 확산된 포장에 처리한 결과 풋마름병 증상의 시들음이 완전히 회복됨이 나타나 생물농약으로서의 개발 가능성이 확인되었다. SKU-78 균주에 의한 풋마름병의 발병억제 기작이 정확하게 밝혀지진 않았지만 *in vitro* plate 상에서 풋마름병균에 대해 저해활성을 나타내지 않으므로 직접적인 antibiosis에 의하는 것은 아니고 PGPR 균주가 식물 뿌리에 근착되어 토양 유래 병원균에 대한 식물의 저항성을 유도하는 이른바 induced systematic resistance(ISR) (Van Loon et.al. 1998)에 의하는 것으로 추정된다.

고추의 경우 역병과 풋마름병의 발병 초기증상이 유사하여 진단이 불가능하여 초기 방제의 어려움이 있는데, SKU-78 균주는 *in vivo*에서 강한 풋마름병 발병 억제효과를 나타낼 뿐만 아니라 고추 역병균에 대해서는 강한 항균활성을 나타내므로 역병과 풋마름병 모두의 초기 방제제로 사용 가능할 뿐만 아니라 extracellular phytase 활성을 가지고 있어 불용성 인산을 가용화 시킬 수 있으므로 토양 내 가용성 인산 부족 시 식물생장을 촉진하는 효과도 기대할 수 있다

SKU-78 균주의 미생물제제로의 실용화를 위하여, SKU-78 균주에 대한 대량배양 조건을 확립하고 균주 활성의 안정성 제고를 위한 carrier 및 amendment를 선별하고 제제화를 시도하였다.( 6절 결과 참조)

## 4절 Fluorescent siderophore 생산균주, TS3-7에 의한 풋마름병 발병 억제

### 1. 서론

세계적으로 풋마름병에 의한 농작물의 생산 감소가 증가하고 있으며, 우리나라에서도 특히 장마가 지나간 후 고온 다습한 상태에서 발생이 빈번해져 전국적으로 피해가 막대한 실정이나 이에 대한 확실한 방제법이나 방제제는 아직까지 개발되어있지 않다. (Vasse, J et.al. 1995) 풋마름병균은 기주식물 없이도 토양이나 물 속에서 5년 까지 생존이 가능하기 때문에 (Van Elsas et.al. 2001) 경종적 방제법 만으로는 방제가 어렵고, 더구나 풋마름병균은 식물체의 도관조직 속에서 증식하므로 약제의 경엽 살포로는 조직 속에까지 약효가 미치지 못하여 효과를 기대할 수 없기 때문에, 토양처리에 의해 병원균의 생존 자체를 불가능하게 하거나, 생존하더라도 활동하지 못하게 막을 수 있는 길항미생물을 이용한 생물학적 방제가 시급한 실정이다.

길항미생물을 이용한 풋마름병의 생물학적 방제제 개발을 위하여 본연구실에서는 풋마름병 발병 억제 길항 미생물이 생산하는 이차 대사산물인 생리활성물질의 분리 정제 연구(2절 결과)와 root colonization competition 과 induced systematic resistance(ISR) 유발에 의한 풋마름병 발병억제(3절 결과) 연구에 이어 본장에서는 병원균과의 Fe(III)에 대해 경쟁하여 병원균의 증식을 억제하는 siderophore 생산 균주에 의한 풋마름병 발병 억제에 관한 연구를 하였다.

수년간 풋마름병 발생이 보고 되지 않은 지역 내 토마토와 고추의 근권 토양에서 분리한 균주 중에서 식물 뿌리에 colonization이 잘 되며 siderophore를 생산하는 균주에 대해 *in vivo* pot 실험을 실시하여 가장 강한 풋마름병 발병억제 활성을 보인 균주 TS3-7을 선발하여, 16S rDNA 염기서열 분석과 배양 및 생화학적 특성에 의거하여 TS3-7 균주에 대해 동정을 실시하였으며, 실용화의 가능성을 확인하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 병원균 확보 및 배양.

본 실험에서 사용된 *R. solanacearum*은 풋마름병에 감염된 고추와 토마토에서 분리하였다. 시험균주는 20% glycerol을 포함하는 tryptic soy broth(TSB, Difco)에 고정하여  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 보관하면서, 0.005% tetrazolium chloride(TZC) 평판배지에  $28^{\circ}\text{C}$ 에서 2일간 배양하여 실험에 사용하였다. 병원균에 의한 풋마름병 발병 확인은 일차적으로 식물체의 잎이 녹색을 유지하면서 하나 둘씩 말라가다가 결국은 모든 잎이 마르는 증상으로 확인하였고, 발병된 식물체의 줄기를 잘라 물에 담그면 줄기에서 우유빛의 세균액이 나오는 증상과 세균액을 TZC plate에서 배양하였을 때 주위는 우유빛에 안쪽은 선홍색으로 자라는 특성 등을 통해 이차적으로 검정하였다. (Schell, 2000)

### 나. 근권 미생물의 분리.

수년간 풋마름병이 발생하지 않은 지역에서 재배한 고추와 토마토 근권 토양에서 미생물을 분리하였다. 뿌리에서 털어낸 흙 1 g를 멸균수로 진탕 후 정지하여 상등액 1 ml을 취해 순차적으로 희석하여 TSA(tryptic soy agar, Difco) 평판 배지에 도말하여  $30^{\circ}\text{C}$ 에서 2일간 배양하여 single colony를 분리하였다. 분리한 colony는 TSB(tryptic soy broth) 배지로  $30^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간 배양한 다음  $6,000\times\text{g}$ 에서 15분간 원심분리하여 균체를 회수하였다. 회수한 균체를 멸균수에 현탁하여 600 nm에서  $\text{OD}=1(10^9 \text{ cfu/ml})$ 로 맞추어 그대로 또는 희석하여 실험에 사용하였다.

#### 다. colonization assay.

1% water agar plate에 표면 살균한 고추와 토마토 종자를 올려놓고 각 종자 주위에 열배로 희석한 균체 현탁액 1 ml 씩 점적한 후, 28°C 생장고에서 뿌리 생장과 뿌리 주위에 균주의 colonization 여부를 10 일간 관찰하였다. 대조군의 경우는 균체 현탁액 대신 멸균된 TSB를 종자 주위에 처리하였다. 각 처리 당 종자 6개씩 3번 반복실험 하였다.

#### 라. Siderophore 생산균주 선발.

siderophore 생산 균주를 Schwyn과 Neilands의 siderophore detection 방법인 Chrome Azurol Sulfonate(CAS, Sigma) assay로 선발하였다. 증류수 50 ml에 CAS 60.5 mg을 녹인 다음 10 ml의 1 mM  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (10 mM HCl용액)을 넣고 천천히 저으면서 72.9 mg의 HDTMA(Hexadecyltrimethylammonium bromide)를 증류수 40 ml에 녹인 용액을 첨가시켜 고압 멸균하여 진한 청색염료 용액을 준비한 다음  $\text{H}_2\text{O}$  750 ml, 10X MM9 salt 100 ml, agar 15 g, Pipes 30.24 g, 10% casamino acid 용액 30 ml, carbon source와 vitamin 등을 혼합한 용액(pH 6.8)을 고압 멸균하여 50°C로 식힌 후 준비해 둔 CAS 염료용액을 거품이 나지 않도록 첨가하여 plate에 분주하여 제조한 CAS 평판배지에 배양액 20  $\mu$ l를 점적하고 30°C에서 2일간 배양한 후 주위에 orange halo zone의 생성을 확인하였다. 또한 탈철화 배지인 King's B 배지에서 배양한 후 형광성 여부를 확인하였다.

#### 마. 선발 균주의 풋마름병균에 대한 *in vitro* 길항 활성 검증.

50°C의 TSA 배지에 *R. solanacearum* 1 loop를 접종하여, plate에 부어 균한 다음 선발균주를 streaking 하여 30°C에서 24시간 배양한 후 두 균주간의 생육저해 여부를 확인하였다.

#### 바. 선발 균주에 의한 종자 코팅 처리.

Ownley 방법에 의해 선발 균주를 토마토(서광품종)와 고추(부강품종) 종자에 처리하였다. TSB 배지를 이용하여 선발균주를 30°C에서 24 시간 배양한 후 6,000xg에서 15 분간 원심분리하여 회수한 균체를 0.02 M phosphate buffer(pH 7.0) 용액에 현탁시킨 후 동량의 2% methylcellulose(Sigma, St. Louis)를 첨가한 박테리아 현탁액을 종자와 잘 혼합하여 무균상태로 실온에서 건조시키는 방법으로 종자에 박테리아를 코팅하였다.

#### 사. *in vivo* pot assay.

선발균주에 의한 풋마름병 발병 억제효과는 종자처리와 토양관주 2가지 방법으로 검증하였다. 지름 10 cm 포트에 바로커 상토(한국농자재 주식회사)를 180 g 채우고 박테리아를 코팅한 종자와 코팅하지 않은 종자들을 각각 과종한 다음 25-35°C로 유지되는 하우스에서 재배하여 4 엽기가 되었을 때 칼로 뿌리에 상처를 내고 *R. solanacearum* 현탁액 30 ml ( $10^7$  CFU/ml)을 관주처리 하여 발병을 유도하였다. 토양처리 방법은 종자를 과종한 후 고추와 토마토가 4 엽기가 되었을 때 선발균주 현탁액을 포트 당 30 ml( $10^9$  CFU/ml)씩 분주하고, 이틀 후 위와 같은 방법으로 병원균을 처리하여 발병을 유도하였다. 종자 처리만 행한 경우와 토양처리만 행한 경우 및 종자처리와 토양처리를 병행한 경우에 있어서 선

발균주에 의한 발병 억제효과를 4주간 관찰하였다. 대조구는 선발균주 처리 없이 *R. solanacearum* 현탁액 만 처리하였으며, 각 처리 당 10 분 씩 3 회 반복 실험 하였다. 풋마름병 발병률은 식물이 아주 싱싱한 경우는 0, 잎이 약간 시든(25% 미만) 경우는 1, 중간정도(50 % 미만) 시든 경우는 2, 심하게(75 % 정도) 시든 경우는 3, 완전히 시들어 고사한 경우를 4로 등급을 정하였으며, 발병 억제율은  $\{(대조구의 발병률 - 처리구의 발병률) / 대조구의 발병률\} \times 100$  으로 계산하였다.

#### 아. 선발 균주의 생균밀도 유지 측정.

King' B 배지로 30℃에서 48 시간 배양한 TS3-7균주 현탁액을 담체와 혼합 하였다. 담체로는 미생물 보존에 널리 사용되는 talc와 vermiculite를 이용하여, Vidhyasekaran과 Muthuamilan 방법을 변형하여 행하였다. 균체 현탁액( $10^9$  CFU/ml) 400 ml에 멸균한 talc 또는 vermiculite 1 kg과 응집제로 carboxymethyl cellulose 10 g을 혼합하고  $CaCO_3$  15 g를 넣어 pH를 중성으로 맞추는 다음 무균상태로 실온에서 수분함량이 20% 이하가 되도록 건조시켜 폴리에틸렌 백에 넣어 보관하며 일주일 간격으로 생균밀도를 측정하였다. 생균밀도는 시료 2 g을 멸균수 18 ml에 현탁시킨 후 상등액을  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ 로 희석하여 King's B 배지에 도말하여, 24시간 배양하여 형광을 내는 균체수를 계수하였다.

#### 자. 선발 균주의 동정.

선발 균주의 동정을 위하여 형태학적, 배양적 특성 및 생화학적 특성을 Manual of Methods for General Bacteriology와 Bergey's Manual of Systemetic Bacteriology에 의거하여 결정하였다. 또한 16S rDNA 염기서열을 분석하고 Database를 이용하여 유사도를 분석하였다.

### 차. 선발 균주가 생산하는 Siderophore의 characterization

선발균주를 탈철화 배지인 casamino acid medium(0.25% casamino acid, 0.2mM MgCl<sub>2</sub>, pH7.5) 100ml에 배양(200rpm, 25°C, 24hr)하여 siderophore의 분비를 증가시켰다. 배양 후 배양액을 7500rpm으로 15분간 원심분리하고 상등액의 pH를 1~2가 되도록 조정 한 뒤 ethylacetate 추출을 2회 행하였다. 추출 후 물층의 용액을 Whatman #1 paper로 water : acetic acid : acetone(90:10:1)의 solvent system으로 chamber를 saturation 시키지 않은 상태에서 paper chromatography를 행하였다. 전개가 끝난 paper를 UV 아래에서 확인하고, band가 나타난 부위를 반으로 잘라 하나는 iron reagent(0.1M FeCl<sub>3</sub> in 0.1N HCl)로, 남은 하나는 iron reagent와 0.1M potassium ferricyanide를 1:1로 혼합한 용액으로 발색실험을 하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 가. 활성균주의 분리.

TSA 평판 배지를 이용하여 고추와 토마토의 근권 토양에서 분리한 287 균주 중에서 뿌리 주위 agar에 뿌영계 집락을 형성하고 대조구에 비해 10% 이상 뿌리의 성장을 촉진시키는 균주 15종을 선발하였다.

### 나. Fluorescent siderophore 생산.

siderophore를 생산하는 균주의 선발은 CAS를 사용한 정성적인 chromogenic assay로 하였다 CAS agar plate에 well을 만들어 배양액을 넣고 30°C에서 2일간 배양하면 siderophore 생산 균주는 강한 킬레이트인 siderophore

가 CAS 용액의 Fe(III)과 결합하여 푸른색이 오렌지색으로의 변화로 확인할 수 있다. 뿌리에 근착이 잘되고 뿌리 성장을 촉진시키는 선발균주 15종 가운데 TS3-7, TS1-5 TS6-4, TS1-2, TS1-3의 다섯 균주가 CAS plate에서 orange halo zone을 형성하여 siderophore 생산균주로 확인되었다. 또한 TS 3-7 균주는 King's B 배지에서 형광을 나타내어(Fig.4-1), TS3-7 균주가 fluorescent siderophore(Fig.4-2)를 생산함이 확인되었다.

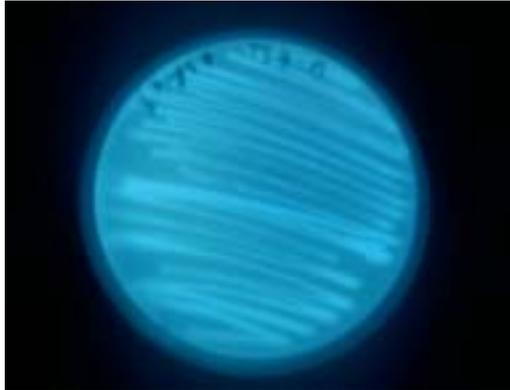


Figure 4-1. TS3-7 strain fluoresces on King's medium B under UV

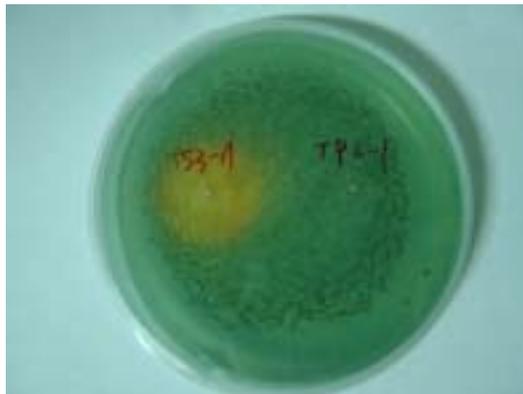


Figure 4-54 Production of an orange halo by TS3-7 on CAS agar plate

#### 다. 풋마름병 발병억제 효과.

분리된 siderophore 생산 균주의 발병억제 효과를 검증하기 위해 종자처리, 토양처리, 종자와 토양 병행 처리를 포트실험으로 행하였다. Ownley 방법으로 박테리아를 종자에 코팅한 경우 종자 당  $10^8$ - $10^9$  CFU의 미생물 밀도가 유지됨이 단계적 희석방법에 의해 확인되었으며, 2% methylcellulose와 0.02 M phosphate buffer 혼합액만으로 처리한 대조군에서는 박테리아가 검출되지 않았다. 선발균주 현탁액을 종자에 코팅처리, 토양에 관주처리, 그리고 종자처리와 토양처리를 병행한 경우의 발병억제효과를 활성균주의 처리 없이 *R. solanacearum* 만 처리한 대조구에 대한 발병 억제율로 나타내었다. *R. solanacearum* 처리 후 고추는 평균적으로 9일 후에 발병증세를 보였고, 토마토는 평균 5일정도만에 발병증세를 보였으며, 발병 후에도 토마토가 고추보다 빠르게 병이 진전됨을 관찰할 수 있었다. 각 처리마다 토마토와 고추를 각각 10주 씩 3번 반복 실험하여 평균값을 구하였다(Table 4-1).

모든 활성균주에 있어서, 토양처리 방법이 종자처리 방법 보다 발병억제 효과가 좋고, 종자 또는 토양의 단독 처리보다 종자처리와 토양처리를 병행한 경우에 방제효과가 높게 나타났다. 특히 TS3-7 균주는 가장 강한 활성을 지닌 균주로 종자처리와 토양처리를 병행한 경우 고추는 80%, 토마토의 경우는 65% 이상의 강한 발병 억제율을 나타내었다.

Table 4-1. Suppression of bacterial wilt of tomato and pepper plants by PGPR strains

Strains	Biocontrol efficacy (%) <sup>a</sup>					
	Seed treatment <sup>b</sup>		Soil application <sup>c</sup>		Seed + Soil treatment	
	Pepper	Tomato	Pepper	Tomato	Pepper	Tomato
TS1-2	47.6	40.3	57.5	50.3	68.5	65.9
TS1-3	23.5	15.4	35.0	15.2	50.1	49.7
TS1-5	41.2	35.0	47.5	30.8	55.0	40.4
TS3-7	60.0	55.2	75.1	60.0	80.0	65.0
TS6-4	41.2	15.4	42.5	31.3	60.2	44.7

<sup>a</sup> Data represent means of 10 replications of each treatment. The experiment was repeated three times. Disease severity was rated 14 days after inoculation *R. solanacearum*. Biocontrol efficacy is based on comparisons to the nonbacterized but pathogen-challenged controls.

<sup>b</sup> Pepper and tomato seeds were coated with the selected bacterial cell suspension and planted.

<sup>c</sup> Plants were grown in potting soil and was drenched with bacterial cell suspension.

라. TS 3-7 균주의 풋마름병균에 대한 길항작용.

*in vitro* plate 상에서 TS 3-7 균주와 *R. solanacearum* 균주는 서로에 대해 antagonistic activity를 나타내지 않았다.

마. TS 3-7 균주의 항균활성.

TS 3-7 균주의 항균활성을 paper disc method로 조사한 결과 Gram 음성균인 *Salmonella gallinarum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, Gram 양성균인 *Ralstonia solanacearum*, *Staphylococcus aureus*, yeast인 *Saccharomyces cerevisiae*, fungi인 *Phytophthora parasitica*, *Phytophthora capsici*, *Botrytis cinerea* 모두에 대해 저해 활성을 나타내지 않았다.(Table4-2)

Table 4-2. Antimicrobial spectrum of TS3-7 strain

Test strains	Activity
Gram negative Bacteria	
<i>Escherichia coli</i>	-
<i>Salmonella gallinarum</i>	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Gram positive Bacteria	
<i>Staphylococcus aureus</i>	-
Fungi	
<i>Phytophthora capsici</i>	-
<i>Phytophthora parasitica</i>	-
<i>Penicillium</i> sp.	-
<i>Botrytis cinerea</i>	-

선발된 TS3-7 균주는 *in vitro* plate 상에서 풋마름병원균에 대해 저해활성을 전혀 나타내지 않으므로 직접적인 antibiosis에 의하지 않고, siderophore 생산을 통해 근권에서 병원균과 Fe(III)에 대해 경쟁하여 병원균의 증식을 억제하는 것으로 보인다.

#### 바. 생균 밀도유지.

talca와 vermiculite 각각에  $9 \times 10^8$  CFU/g이 되도록 균체를 섞은 다음 시간 경과에 따른 생균밀도의 변화를 조사하기 위해 일주일 간격으로 시료 현탁액을 단계적으로 희석하여 King'B 배지에 도말하여 형광을 내는 colony 수를 계수하였다(Fig.4-3). 실험결과 Vermiculite에서는 4주정도까지 거의 변화가 없다가 이후 조금씩 균체 수가 줄어 22주 후에는  $10^7$ CFU/ml이 되었다.  $10^7$ CFU/ml이라는 수치는 대부분의 생균제제의 균체수와 같으며, 더 오랜 기간 측정해야 하지만 충분한 유통기한을 가질 것으로 여겨진다. Talca와 같은 경우에는 2주만에  $10^8$ CFU/ml이 되었으며 22주 후에는  $10^6$ CFU/ml까지 균체수가 낮아졌다. 이 수치 또한 미생물제제에 있어서 제한 요인이 될 만큼 낮은 수치는 아니나, vermiculite에 비교하여 가격 면에서나 생균 유지 면에서나 뒤떨어지기 때문에 미생물 제제로 활용시 vermiculite의 사용이 유리할 것으로 기대된다.(Table4-3, Fig.4-4)

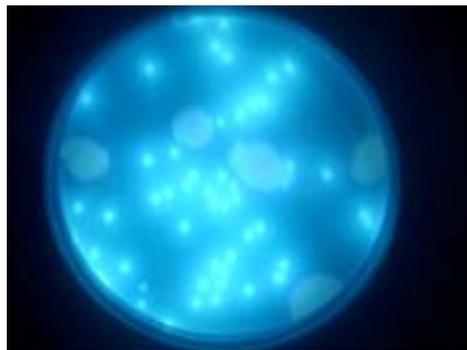


Figure 56-3. Colony count of fluorescent Pseudomonads TS3-7 strain under UV light

Table 4-3. Effects of carriers on population density of TS3-7 strain

Sample time(weeks)	log cfu/g <sup>a</sup>	
	talc based formulation	vermiculite based formulation
0	9.28	9.28
2	8.09	9.21
4	7.99	9.18
6	7.66	8.62
8	7.53	8.59
10	7.22	8.31
12	7.04	8.12
14	6.82	7.99
16	6.49	7.63
18	6.11	7.32

<sup>a</sup> Population density of strain TS3-7 is expressed as log cfu/g inoculated formulation.

Number of cfu were obtained by the method described in the materials and methods. Values are the mean of three replicatio

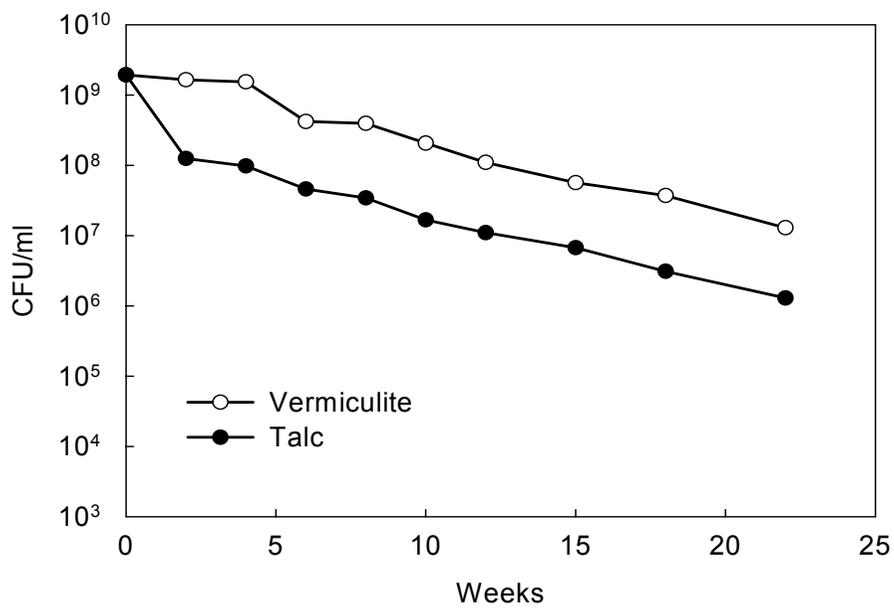


Figure 4-4 .Effects of different carrier on population density of TS3-7 strain

## 사. 선발균주의 동정.

### 1) 배양. 생화학적 특성

선발균주 TS3-7을 동정하기위하여 형태적, 배양적 및 생화학적 특성을 조사한 결과 (Table 4-4) Gram-negative의 간균이며, 이동성을 갖으며, catalase, oxidase 활성을 갖으며, O/F test에 음성을 나타내었다. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology를 참조하여, *Pseudomonas fluorescence-putida* 그룹으로 분류하였다.

Table 4-4.. Taxonomical studies of the strain TS 3-7

<b>Morphological characteristics</b>		
Gram reaction	-	
Motility	+	
<b>Biochemical characteristics</b>		
Catalase reaction	+	
Oxidase reaction	+	
Gas production from glucose	-	
H <sub>2</sub> S production	-	
O/F test	oxidation	
Indole production	-	
Urease activity	-	
Hydrolysis of starch	+	
	gelatine	-
Utilization of	glucose	+
	mannose	-
	lactose	-
	maltose	+
	sucrose	-
	arabinose	-
	inositol	-
	mannitol	-
	citrate	+

2) 16S rDNA sequence

16S rDNA의 염기서열을 분석하고 Database를 이용하여 유사도를 분석한 결과 *Pseudomonas fluorescence* 와 87% 의 유사성을 보여 *Pseudomonas* sp. TS 3-7로 명명하였다.(Table 4-5)

Table 4-5. 16S rDNA sequence of TS3-7 strain and homology analysis

CGAGACGTGAGGTCCACTTCCTGATTTCCAAGGCCGCGCAACTGGTGATGGCCACCG AGACGGACGTGGCGCTGCCGCCAAGGTGCAGATGATGCAAGCCTTCCTCACCGAGT ACACCGGTGCGGCGGCAGGGCAGATCAAGGTCTATGGCAAGGAAGATTGGATGTCG CCGGTGCGCTCGGGCTCCGGCGCGCCGGCGGCGATGGTGGTGGTGCCGTGTTCCACCG GGACCTTGTCGGCGATTGCCACGGGCGCCTGCAACAACCTGATCGAACGCGCGGCGG ATGTGACGCTCAAAGAGCGCCGCCAGTTGATCCTGGTGCCACGCGAAGCGCCGTATT CGAGCATTACCTGGAGCACATGCTCAAGTCGTCGANCCNCANGGTAACCAACNNN NNNNNNTNTCNGAGAANCNNNNNTTCTCNTCTANNGCTCNANTTGNANGNGNT NNNGNCNGNNNNNNNNNTNNNANCNNGACCATGNNNNNANNTTNTA		
Source	Length	Identities
<i>Pseudomonas fluorescens</i> PfO-1	6438405	323/370 (87%)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5	7074893	314/358 (87%)
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 section 3 of 21	299991	308/363 (84%)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato str. DC3000	6397126	308/366 (84%)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> B728a	6093698	303/363 (83%)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> 1448A	5928787	141/168 (83%)
Synthetic construct <i>Pseudomonas aeruginosa</i> clone FLH041026.01F PA4019 gene	630	93/104 (89%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1, section 379 of 529	11721	93/104 (89%)
<i>Ralstonia solanacearum</i> GMI1000 chromosome	188050	51/59 (86%)

#### 아. 선발 균주가 생산하는 Siderophore의 characterization

paper chromatography결과 그림(Fig.4-5)과 같이  $RF = 0.9$  지점에 Band가 형성되었다. Band를 반으로 잘라 iron reagent(0.1M  $FeCl_3$  in 0.1N HCl), iron reagent : 0.1M potassium ferricyanide = 1:1 용액으로 발색실험을 한 결과 iron reagent 에서는 band가 주황색을 나타내었고, iron reagent : 0.1M potassium ferricyanide = 1:1 용액에서는 짙은 파란색을 나타내었다.

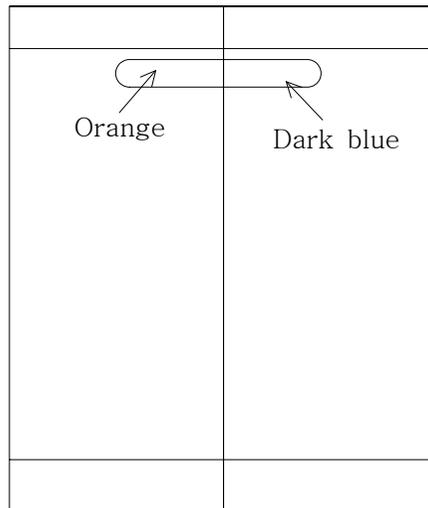


Figure 4-5. Separation of the siderophore by TLC and color reactions test

# 5절 풋마름병 방제용 복합 미생물 제제의 제조와 포장 효과 검증

## 1. 서론

환경오염과 독성문제가 크게 부각되면서 화학농약의 대안으로 생물학적 방제제로서의 미생물 사용에 대한 관심이 높아지고 있으나 미생물 제제의 경우 활성스펙트럼이 좁고, 포장에서의 효과가 환경요인에 따라 변이가 심할 뿐만 아니라, shelf life 즉 저장 시 충분한 생균밀도가 유지되는 기간이 짧다는 문제점이 상업적 이용에 걸림돌로 작용하고 있다(Berndt Gerhardson., *et al.*, 2002) 특히 단일 병원균에 대한 단일 길항미생물 제제를 사용하면 이 미생물이 모든 토양 조건에서 그리고 병원균의 모든 race에 대해 활성을 나타내기가 힘들므로 재현성 있는 결과를 기대하기가 어려운 것이 사실이다.(Ching-Hong Yang, *et al.*,2000)

변이가 심한 풋마름병원 *Ralstonia solanacearum*의 효과적인 방제를 위해서는 높은 밀도의 단일 미생물 제제보다 발병억제 기작과 뿌리 근착을 위한 최적조건(온도, pH, 습도 등)이 서로 다르면서 서로에 대해 친화적인 미생물들의 복합체 구성과 생균의 밀도 유지를 위한 제제화 연구가 더욱 중요하겠다.(Brian E. Grey, *et al.*, 2001) 복잡한 biotic 그리고 abiotic interaction에 의해 실제 농업 현장에서의 생물학적 방제제의 효과가 일정하지 않으며, 특히 토양성 병원균의 방제는 더욱 어렵다. 발병이 이루어지는 rhizosphere가 식물의 성장에 따라, 또한 복잡한 토양 미생물 간의 상호작용, 그리고 토양내 수분 등 물리적 조건에 따라 변하는 다이나믹한 환경 조건이므로 단일 미생물의 단일 작용기작에 의한 방제 보다는 복합 미생물 제제에 의해서 다양한 토양조건과 기후, 기존 미생물의 영향에도 안정적인 방제효과를 기대할 수 있을 것이다.(Georg S. Raupach, *et al.*,1998)

본 연구실에서는 1차, 2차년도 연구를 통해 작용기작에 의거하여 풋마름병의 발병을 억제할 수 있는 미생물을 전국에서 수집한 토양과 수년간 풋마름병

발생이 보고되지 않은 지역에서 채취한 토마토와 고추의 근면과 근권 세균을 분리하여 1차로 mode of action based screening을 실시하여 활성균주를 선발하고, 선발된 균주에 대해 2차로 *in vivo* pot assay를 실시하여 미생물 제제 개발의 후보 균주로 선발하였다. 특히 실용화의 가능성이 높다고 판단되는 균주들에 대해서는 포장시험을 거쳐 풋마름병 방제 효과를 심도 있게 평가한 바 있다. 본 장에서는 서로 다른 작용기작 (antibiosis, iron competition, systematic resistance 유발 등), 배양조건, 균주들 간의 길항작용 여부, 기존에 널리 보급 사용되고 있는 농약에 대한 내성 등을 고려하여 분리 보유하고 있는 활성균들을 몇 개의 조합으로 나누어 복합제제를 제조하고, *in vivo* pot assay를 통하여 풋마름병 발병 억제 효과가 뛰어난 미생물 복합제를 선정한 다음 선발 복합제제에 대해 농가 포장에서의 효과 검정 실험을 실시하였으며, 선발된 균주에 대하여 생균 안정성 제고를 위한 carrier 및 amendment 선발과 제제의 형태에 따른 효과를 검정하기 위하여 액상과 고상의 형태로 제제화를 시도하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 활성균주의 농약 내성 검정

길항미생물 제제 사용 시 토양 내 잔류 농약에 의한 영향으로 미생물제제의 효과가 감하여질 수도 있으며, 또한 경우에 따라서는 생물학적 방제제와 화학 농약의 혼용에 의해서 농약의 사용량을 줄임으로서 환경오염의 피해를 줄이면서 미생물 방제제를 독자적으로 사용한 경우보다 효율적인 방제를 기대할 수 있기 때문에 선발된 활성 균주의 농약에 대해 내성 여부를 확인하였다

선발된 활성균주들의 농약에 대한 내성을 검정하기 위하여 배지에 농약 Buramycin(동부한농화학(주)), Agrymycin(성보화학주식회사), Agrepto(주식회사경농)를 각각 500ppm, 700ppm씩 첨가한 plate상에서 생육 여부를 관찰하였다.

## 나. 선발된 균주간의 길항작용 여부 확인

미생물 복합 제제에서 구성 균주간의 경쟁으로 인한 사멸 등의 피해를 고려하여 각 균주간의 길항성 여부를 확인하였다. TSA 배지에 각 선발균주를 loop로 살짝 찍듯이 접종하여 14시간 30℃에서 배양하여 성장을 확인한 뒤 배지 위에 water agar 4ml과 시험 균주 배양액 1ml을 섞어서 부어준 후 다시 30℃에서 배양하여 inhibition zone의 생성 유무를 관찰하였다.

## 다. Pot 실험에 의한 선발균주 mixture의 풋마름병 방제 효과 검정

작용기작이 다르며, 서로에 대해 길항성이 없는 활성 균주들을 혼합하여 복합제제를 제조하였다. 선발균주를 적합한 액체 배지에 접종하여 각각 배양한 후 각 균주 당  $9 \times 10^8$  CFU/ml 씩을 포함하는 세균 현탁액 400ml을 토양에 관주 처리한 후 이틀 후 풋마름병균을 처리하여 복합제제에 의한 발병 억제 효과를 검정하였다.

## 라. 포장에서의 복합제제의 풋마름병 억제 효과 검정

1차 *in vivo* pot assay에서 활성이 강한 복합제제에 대해 포장실험을 실시하였다. 경남 고성군 고성읍 덕선리에 위치한 풋마름병에 감염된 토마토(마이도꾸) 포장에 대해 선발된 복합제제에 의한 풋마름병 발병의 회복 정도와 복합제제에 대한 약해검사를 실시하였다. 발병 억제율 조사는 발병된 토마토에 시험 균주 배양액을 500배 희석한 혼합액을 3일 간격으로 3회 토양 관주 처리한 다음 그로부터 7일 경과한 후 발병 증상이 나타나지 않는 식물체수를 조사하였다. 각 실험군 당 120주를 사용하여 3반복 실시하였다. 경엽 및 과일에 대한 약해 유무 조사는 약제 처리 후 3일, 7일, 14일 후 달관 조사를 통해 시행하였다.

## 마. 생균 안정성 제고를 위한 carrier 및 amendment 선발

### 1) Carrier 선발

제제화를 위한 담체로 많이 사용되어지는 talc나 vermiculite, peat, lignite 중에서 경제적인 면에서 유리한 talc와 vermiculite를 사용하여 생균밀도 유지 정도를 측정하였다.(Vidhyasekaran et al.1997) Talc와 vermiculite를 고압 멸균한 후 선발된 미생물의 배양액( $9 \times 10^8$  CFU/ml의 현탁액 400ml)을 버무려 밀봉하고 멸균상태로 보관하며 일정 기간마다 colony forming unit(CFU)을 측정하여 균체 밀도의 변화를 측정하여 효과적인 담체를 선발하였으며, 또한 선발된 담체 내에서 시간에 따른 선발 균주의 생균밀도의 변화를 측정하여 미생물 복합체의 shelf-life를 측정하였다. CFU측정은 멸균수로 serial dilution 한 후 각 평판배지에 도말하여 측정하였다. 형광성 siderophore를 분비하는 TS3-7과 같은 경우에는 탈철화 배지인 king's B plate에 도말하여 UV를 쬐어 형광을 내는 colony를 계수하였다.

### 2) Amendment 선발

TSB (Tryptic Soy Broth, Difco) 배지에 선발균주를 접종하여 진탕배양(30°C, 120rpm)하고 24시간 후 배양액을 원심분리하여 균체를 취하고 멸균수로 현탁하여 세균 현탁액을 만든 뒤 PPG, mineral, chitosan, glycerol을 각각 5%씩 넣어 vermiculite에 버무려 mixture를 제조하였다. 각각의 균체수의 변화를 조사하여 대조구에 비해 어느정도 생균 보존 능력에 효과적인지를 검정하였다.

## 4. 결과 및 고찰

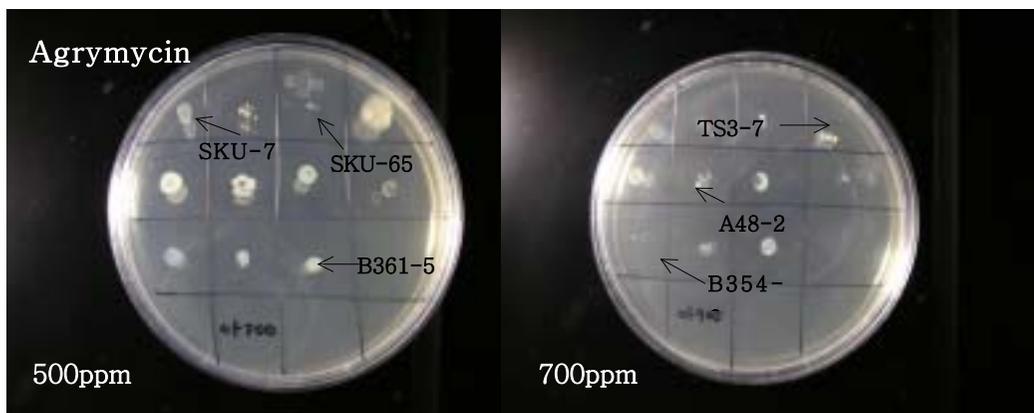
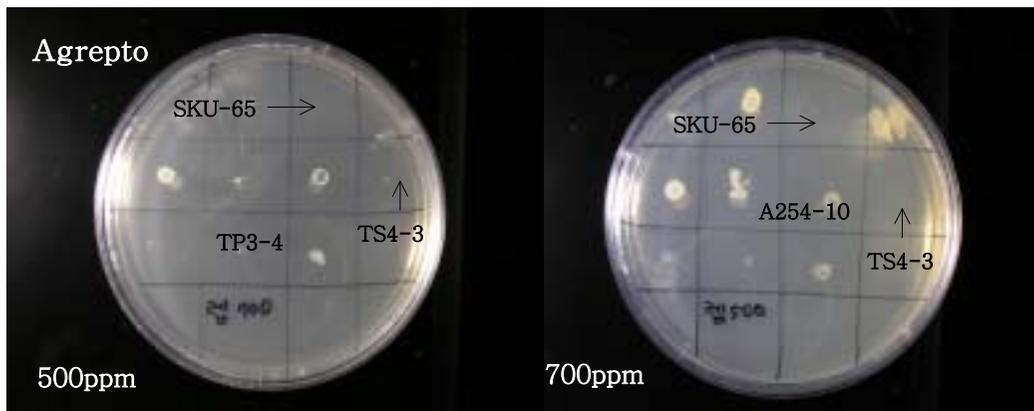
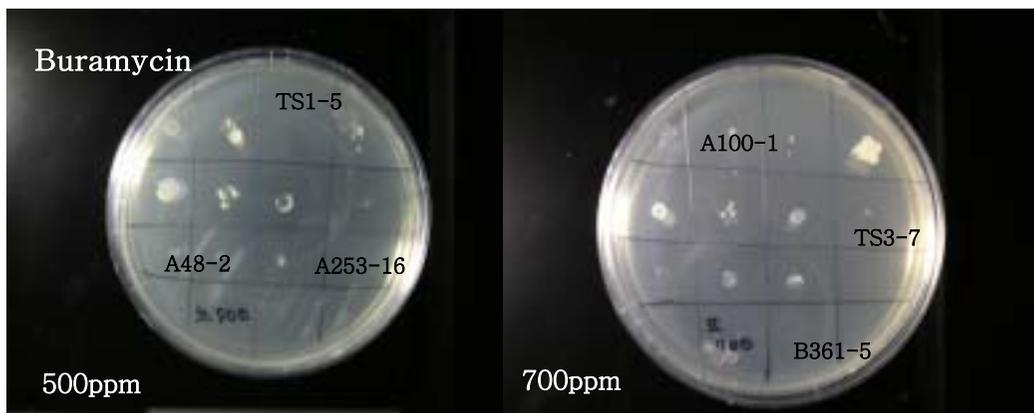
### 가. 선발균주의 농약 내성 조사

선발된 활성균주들의 농약에 대한 내성을 검정한 결과 TS1-3, TS4-3, SKU-65, B354-6, A27-3 등 10개 균주가 500ppm의 농약 첨가 배지에서 생육을 보이지 않았다. 따라서 이 균주들을 제외하고 남은 선발 균주들을 대상으로 길항성을 조사하여 각 기작별로 혼합하여 혼합 제제를 제조 하였다.

Table 5-1. Resistance of the selected strains to the chemicals.

O : Resistance X : Susceptible

Strains	Buramycin		Agrepto		Agrymycin	
	500ppm	700ppm	500ppm	700ppm	500ppm	700ppm
TS1-2	o	o	o	x	o	o
TS1-3	x	x	o	x	x	x
TS1-5	o	x	o	o	o	o
TS3-7	o	o	o	x	o	o
TS4-3	o	o	x	x	x	x
TS6-4	x	o	x	x	x	x
TS3-9	o	x	o	o	o	o
TP1-2	o	o	o	o	o	o
TP2-5	x	x	x	x	x	x
TP3-4	o	o	x	x	o	x
TP5-4	o	o	o	x	o	o
SKU-65	o	x	x	x	x	x
SKU-78	o	o	o	o	o	o
SKU-134	o	o	o	x	o	o
A27-3	x	x	x	o	x	o
A47-2	x	o	x	x	x	x
A48-2	o	o	o	o	o	o
A100-1	o	o	o	o	o	x
A253-16	o	o	o	o	o	o
A254-10	x	x	x	x	o	x
A256-10	o	o	x	x	o	x
A256-11	x	x	o	x	x	x
B354-6	x	o	x	o	o	x
B361-5	o	o	o	o	o	o



## 나. 선발된 균주간의 길항성 여부 확인

총 12종의 3차 선발균주 간의 길항성 여부를 시험한 결과 균주 대부분이 서로에 대해 길항작용을 일으키지 않았으나 (Table5-1. Fig.5-2,3) 몇몇 균주간에 길항성을 보였다. 따라서 서로 길항작용을 나타내는 균주의 혼용을 피해 복합제를 제조하여 *in vivo* pot 실험을 통한 풋마름병 방제효과를 검정하였다.

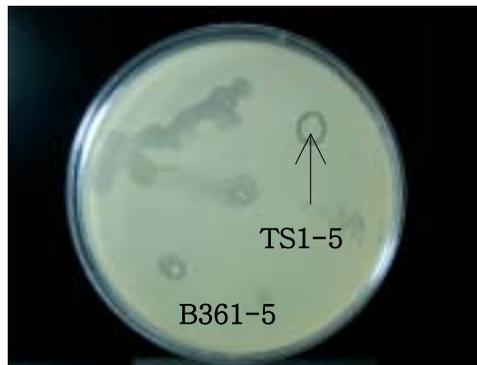


Figure 5-2. Antagonism between B361-5 and TS1-5

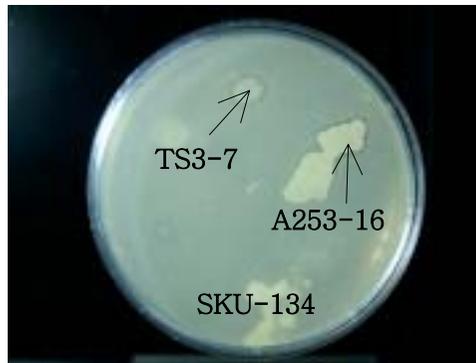


Figure 5-3. Antagonism between SKU-134 and TS3-7, A253-16

Table5-2. Antagonism between the selected strains

	B361-5	TS1-2	TS1-5	TS3-7	TS3-9	TP1-2	TP5-4	A48-2	A100-1	A253-16	SKU-78	SKU-134
B361-5	·	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
TS1-2	-	·	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
TS1-5	-	+	·	-	+	-	-	-	-	-	-	+
TS3-7	-	-	-	·	-	+	+	-	-	-	-	-
TS3-9	-	-	-	-	·	+	-	-	+	-	-	+
TP1-2	-	-	-	+	+	·	-	+	-	-	-	+
TP5-4	-	-	+	-	-	-	·	-	-	+	+	-
A48-2	-	-	-	-	-	-	-	·	-	-	-	-
A100-1	-	-	-	-	+	+	-	-	·	-	-	-
A253-16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	·	-	+
SKU-78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	·	-
SKU-134	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	·

- : no antagonistic activity      + : antagonistic activity

다. 선발균주를 이용한 복합 미생물 제조 및 *in vivo* pot 실험을 통한 풋마름 병 방제효과 검정

길항성 검정을 통해 서로 다른 억제 기작을 가지며 서로에 대해 길항성이 없는 균주를 다음과 같은 조합 (Table 5-3.)으로 구성된 mixture을 제조하였다. 구성 균주들 각각에 대하여, 배양시간에 따른 균 생육, pH 변화, 활성물질의 생산 등을 조사한 결과 (Fig. 5-4)를 토대로 하여 각각 배양한 후 4 엽기의 토마토와 고추에 관주하고 이를 후 *Ralstonia solanacearum* 처리하여 mixture에 의한 발병억제를 검정하였다.(Table 5-4)

Table 5-3. List of mixtures composed of the selected strains

Mixture no.	Siderophore 생산균주	Antibiotics 생산균주	Root colonozation	식물 호르몬 생산균주
①		A48-2		
②	TS1-2	A100-1	SKU-78	B361-5
③		A253-16		
④		A48-2		
⑤	TS1-5	A100-1	SKU-78	.
⑥		A253-16		
⑦		A48-2		
⑧	TS3-7	A100-1	SKU-78	B361-5
⑨		A253-16		
⑩		A48-2	SKU-78	
⑪	TS3-9	A253-16	SKU-78	.
⑫		A48-2	SKU-78	
⑬	TP1-2	A253-16	SKU-78	B361-5
⑭		A48-2	SkU-134	
⑮	TP5-4	A100-1	SkU-134	B361-5



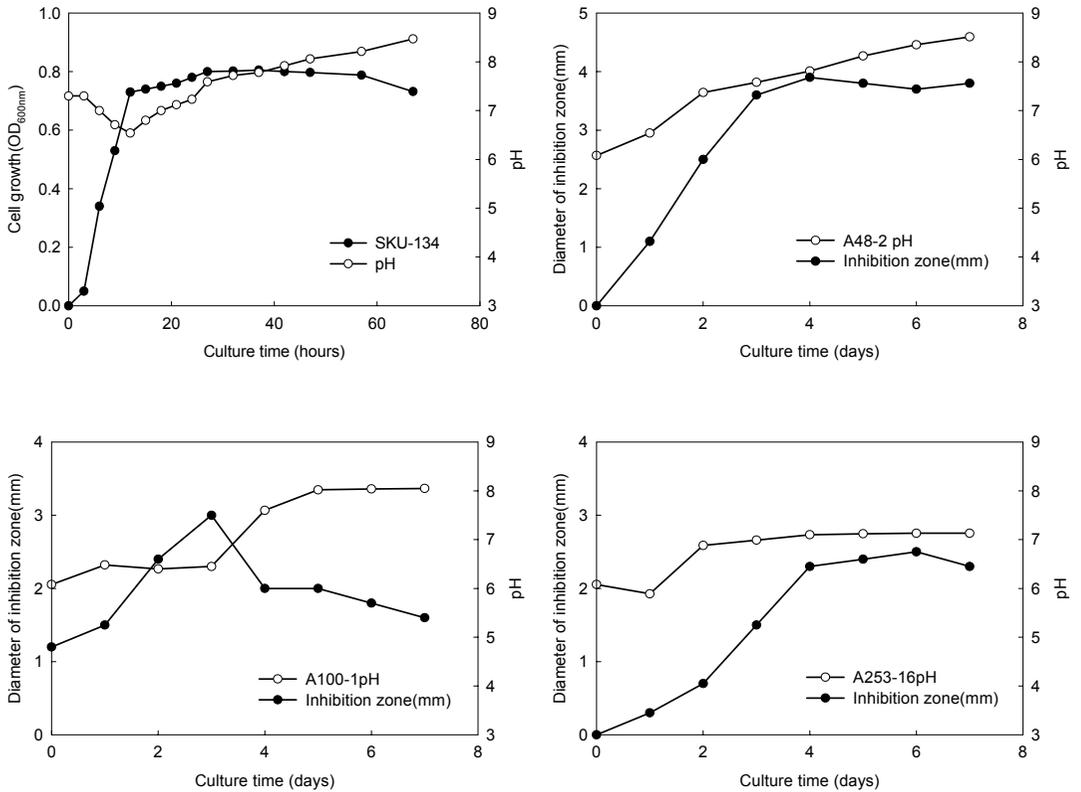


Figure. 5-3. Growth and production curve of selected strains

고추와 토마토에 각 4회 실시한 실험 결과 TS1-5 + A100-1 + SKU-78 조합은 고추와 토마토에서 각각 45%, 50%의 억제율을 보였고, TS3-7 + A253-16 + SKU-78 + B361-5 조합은 고추와 토마토에서 각각 55%, 60%의 활성을 보였다. 반면 TS3-9, TP1-2, TP5-4가 첨가된 조합에서는 억제율이 20% 정도로 낮았다. (Figure 5-5.)

Table 5-4. Suppressive effects on the bacterial wilt disease by the strain mixtures

균주명 (조합)		발병 억제율	
		고추	토마토
Mixture	無처리군(대조군1)	100%	100%
No.	control( <i>Ralstonia solaracearum</i> only, 대조군2)	67.5%	100%
①	TS1-2 + A48-2 + SKU-78 + B361-5	40%	45%
②	TS1-2 + A100-1 + SKU-78 + B361-5	50%	35%
③	TS1-2 + A253-16 + SKU-78 + B361-5	42.5%	32.5%
④	TS1-5 + A48-2 + SKU-78	52.5%	42.5%
⑤	TS1-5 + A100-1 + SKU-78	65%	70%
⑥	TS1-5 + A253-16 + SKU-78	50%	42.5%
⑦	TS3-7 + A48-2 + SKU-78 + B361-5	47.5%	32.5%
⑧	TS3-7 + A100-1 + SKU-78 + B361-5	50%	42.5%
⑨	TS3-7 + A253-16 + SKU-78 + B361-5	75%	70%
⑩	TS3-9 + A48-2 + SKU-78	35%	40%
⑪	TS3-9 + A253-16 + SKU-78	30.5%	37.5%
⑫	TP1-2 + A48-2 + SKU-78 + B361-5	47.5%	37.5%
⑬	TP1-2 + A253-16 + SKU-78 + B361-5	45%	40%
⑭	TP5-4 + A48-2 + Sku-134 + B361-5	40%	35%
⑮	TP5-4 + A100-1 + Sku-134 + B361-5	45%	37.5%



(a)



(b)



(c)



(d)



(e)



(f)

Figure 5-5. Suppressive effects on the bacterial wilt disease by the mixtures (a)control; treatment: (b) Mixture No.②; (c) Mixture No.④; (d) Mixture No. ⑥; (e) Mixture No.⑦; (f) Mixture No.⑨

#### 라. 포장에서의 복합제제의 풂마름병 억제 효과 검정

pot 실험 결과 가장 활성이 강한 TSI-5+SKU-78+A100-1(A그룹)과 TS3-7+B361-5+SKU-78+A253-16(B그룹)을 대상으로 포장 실험을 실시하였다. 포장 실험 결과 A그룹은 56.5%의 방제 효과를 보였으며 B그룹은 62.7%의 방제 효과를 보였다.(Fig.5-6) 또한 두 약제의 약해 조사 결과 특별한 약해 증상은 나타나지 않았다. (Table 5-5, Table 5-6)

Table 5-5. Effects of the selected strain mixtures on disease suppression in the field

Treatments	disease incidence (%)				DMRT 0.05	Control efficiency (%)
	Exp.1	Exp.2	Exp.3	Average		
A (TSI-5+SKU-78+A100-1)	3.7	2.5	2.1	2.7	a	56.5
B(TS3-7+B361-5+SKU78+A253-16)	3.8	3.6	0.0	2.5	a	62.7
Control	6.2	5.5	6.7	6.2	b	

Table 5-6. Results of harmful effect research of selected strains mixture

Treatment	Plant	약해 정도(0~5)		비고
		기준량	배량	
A (TSI-5+SKU-78+A100-1)	Tomato(TM8)	0	0	약해 없음
B(TS3-7+B361-5+SKU78+A253-16)	Tomato(TM8)	0	0	약해 없음



(a)



(b)



(c)

Figure 5-6. Suppression effect of bacterial wilt in field assay

## 마. 생균 안정성 제고를 위한 carrier 및 amendment 선발

### 1) carrier 선발

각 8개의 균주를 이용하여 실험한 결과 그림 (Fig.5-7,8)과 같이 3주정도까지는 talc와 vermiculite 사이에 큰 차이가 없었으나, 3주 이후로는 Talc에서의 생균수가 급격하게 줄어드는 것을 볼 수 있었다. 반면 vermiculite에서는 22주 까지 평균적으로  $10^7$  CFU/ml 의 균체수를 유지하였다. 따라서 Talc에 비해 vermiculite가 균체의 장기 보관에 유리함이 확인되었다.(Table 5-7)

유독 SKU-78균주는 vermiculite carrier 내에서 생균수가 급격히 감소하였으므로 SKU-78 균주의 경우에는 액상 수화제 형태에 장기 보존을 위한 amendment 첨가를 시도하였고 그 외의 균주는 22주까지 대부분  $10^7$ CFU/ml의 생균 밀도가 유지되므로 carrier 사용의 고상 형태로 장기적인 저장 및 유통이 가능하겠다.

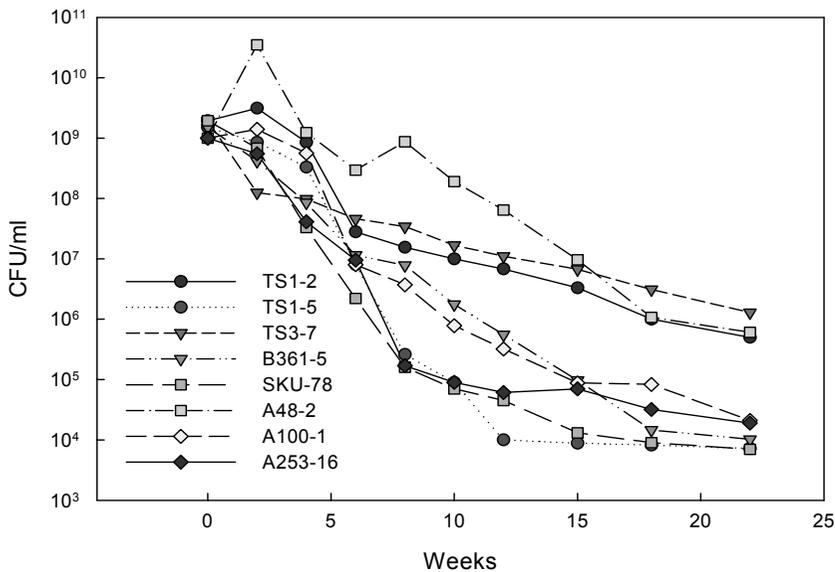


Figure 5-7. Change of bacterial density in talc

Table 5-7. Change of bacterial density in talc and vermiculite ( $\times 10^8$  CFU/ml)

Carrier	Strains	Weeks											
		0	2	4	6	8	10	12	15	18	22		
Talc	TS1-2	19.400	31.200	8.500	0.280	0.155	0.100	0.068	0.033	0.010	0.005		
	TS1-5	15.00	8.500	3.300	0.08	0.0026	0.0009	0.0001	0.000088	0.000082	0.000072		
	TS3-7	19.40	1.25	0.98	0.46	0.342	0.167	0.100	0.067	0.031	0.0129		
	B361-5	15.00	4.15	0.85	0.115	0.078	0.0176	0.00555	0.00097	0.000146	0.000102		
	SKU-78	19.40	6.800	0.330	0.022	0.0016	0.0007	0.00045	0.000131	0.00009	0.00007		
	A48-2	10.0	350.0	12.30	2.94	8.710	1.90	0.643	0.0963	0.0107	0.00607		
	A100-1	10.0	14.0	5.60	0.08	0.037	0.0078	0.0032	0.00088	0.00083	0.00021		
	A253-16	10.0	5.50	0.41	0.095	0.0017	0.0009	0.00061	0.0007	0.00032	0.00019		
	TS1-2	19.400	47.5	10.5	0.30	0.255	0.480	0.316	0.303	0.34	0.065		
	TS1-5	15.00	11.5	6.7	2.75	0.36	2.01	1.95	1.46	0.92	2.7		
Vermiculite	TS3-7	19.40	1.65	15.4	4.20	3.95	2.07	1.10	0.567	0.371	0.129		
	B361-5	15.00	11.5	5.5	2.15	1.98	1.76	2.75	2.20	1.46	2.07		
	SKU-78	19.40	8.50	3.30	0.35	0.0026	0.0009	0.00245	0.00079	0.0026	0.0065		
	A48-2	10.0	350	123	36.50	27.10	21.0	14.30	8.63	10.7	6.07		
	A100-1	10.0	13.0	7.60	0.80	0.25	0.18	0.34	0.83	0.55	0.62		
	A253-16	10.0	5.50	2.10	0.75	0.17	0.029	0.81	0.80	0.42	0.36		

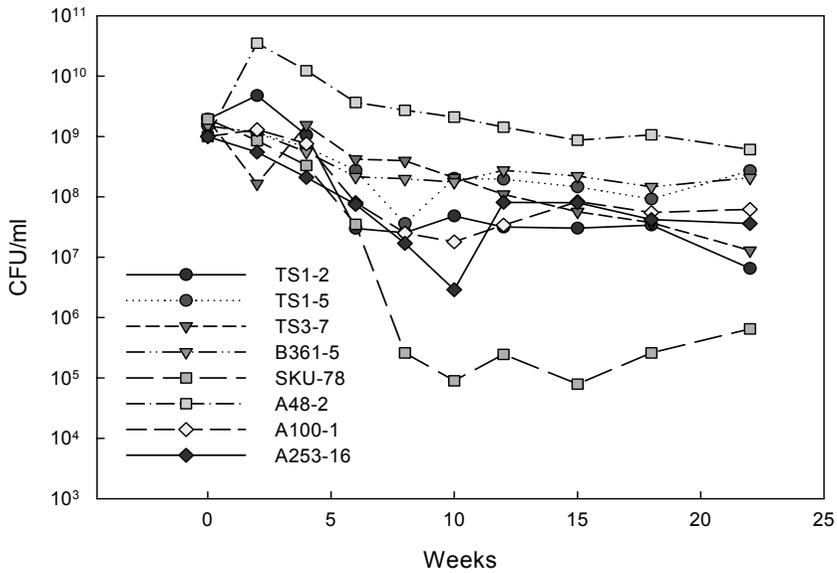


Figure 5-8. Change of bacterial density in vermiculite

## 2) Amendment 선발

PPG, mineral, chitosan, glycerol을 각각 5%씩 배양액에 넣어 10주 후의 균체수의 변화를 조사하여 대조구와 비교하여 효과를 검정하였다. 대조군(Fig. 5-8)과 비교해 보았을 때, Chitosan의 경우 균체수가 저하되는 것으로 관찰되었고, PPG와 mineral의 경우 큰 변화를 보이지 않았다. Glycerol의 경우에 균체수 면에서 대조군에 비해 보다 안정적인 균체의 변화를 나타내었으며 본래 균체수가 많이 감소하였던 SKU-78의 균체수의 보존에 효과적임을 확인할 수 있었다.

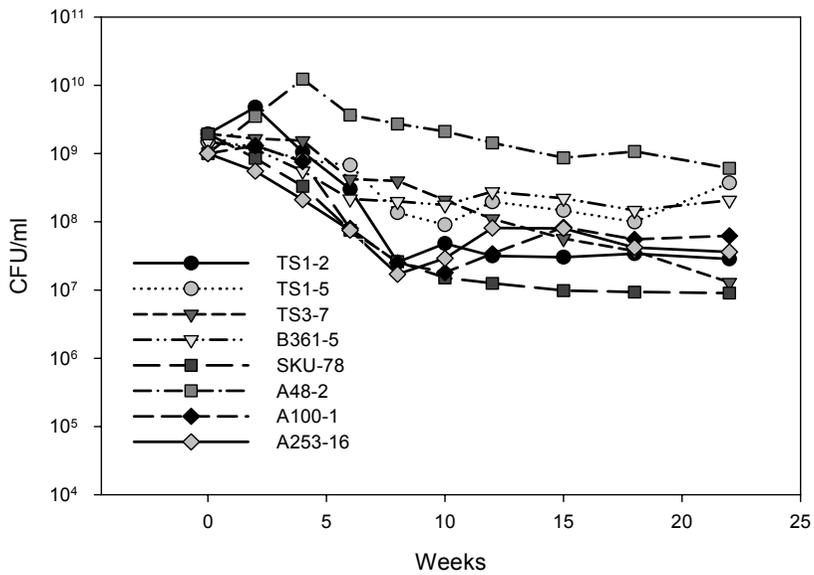


Figure 5-8. Change of bacterial density in vermiculite with 5% glycerol



Figure 5-9. Examples of pre-product

## 6절 선발균주의 실용화를 위한 대량 배양 기술 확립

### 1. 서론

고추와 토마토의 근권에서 colonization이 아주 잘 되며, pot를 이용한 검정에서 강한 풋마름병 예방효과를 나타내었으며, 실제 풋마름병이 만연한 포장에 처리하였을 때 더 이상 발병이 확산되지 않았으며, 시들음 증상이 회복되는 등 뚜렷한 방제 효과를 보였던 선발 균주 *Bacillus sp.* SKU-78 (제 3절 실험 결과)를 생물농약으로의 실용화를 위한 대량배양 기술 개발 연구를 시행하였다. 경제성이 있는 탄소원, 질소원을 선발하여 산업용 배지조성을 확립하였고, 더불어 배양온도, 교반속도, pH 및 기질의 차이에 따른 생장 속도와 길항능력 등의 결과를 바탕으로 발효기에서의 대량배양조건을 확립하였다.

### 2. 재료 및 방법

#### 가. 대량배양을 위한 산업용 배지 선택과 발효 조건 분석

##### 1) 산업용 배지 선택과 배양조건

선발된 균주를 산업적으로 대량 생산하기 위한 다양한 배지조성과 배양 조건을 분석하였다. 경제성 있는 탄소원과 질소원을 선발하기 위해 사용한 기질 목록과 운전 조건은 [Table 6-1]과 같다. 탄소원 선발 시 질소원으로는 1% yeast extract, 질소원 선발 시 탄소원은 1% 옥수수 전분을 사용하였고, 선발대상 기질 농도 역시 각 1% 농도를 적용하였다. 공시 배지양은 200ml로 하였고, 접종원은 nutrient broth(NB, DIFCO)에서 20시간 배양(35℃, 160rpm)한 배양액 2 ml을 사용하였다.

Table 4-1. List of substrates and operating conditions

<u>Carbon source</u>	<u>Nitrogen source</u>	<u>Temperature</u>	<u>RPM</u>	<u>pH</u>
glucose	soy flake	25°C ~ 35°C	100 ~ 250rpm	pH 5.0 ~ pH9.5
corn starch	biji flour			
white sugar	rice bran			
black sugar	wheat bran			
yellow sugar	soy meal			
ethanol	soy milk			
glycerol	casein			
lactose	tryptone			
fructose	yeast extract			
sucrose	malt extract			
maltose	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>			

## 2) 발효기에서의 배양특성 분석

### 가) 발효를 위한 배양조건

대량배양을 위한 기질 선발 시험 결과를 바탕으로 30L 발효기 (Korbiotech, Korea)에서 SKU-78 균주의 최적 발효 조건(온도, 교반속도, pH 등)을 검토하였다. 공시배지는 5% 콩가루배지 20L로 하였고, 접종원은 nutrient broth에서 20시간 진탕배양(35°C, 160rpm)한 배양액 400ml을 사용하였다.

### (1) 배양적온

SKU-78 균주의 배양적온을 조사하기 위해 5% 콩가루배지에서 30°C와 35°C로 pH는 보정하지 않고, 300rpm, 1.2vvm으로 48시간 배양하면서 pH와 DO 변화 및 균체수의 변화를 조사하였다.

## (2) 교반속도

5% 콩가루배지에서 30℃로 pH는 보정하지 않은 상태에서 교반속도를 300rpm과 400rpm으로 조절하여, 각각 48시간 SKU-78균주를 배양하면서 pH와 DO 변화 및 균체수의 변화를 조사하였다.

## (3) pH의 영향

5% 콩가루배지에서 초기 pH를 1N HCl과 1N NaOH를 사용하여 초기 pH 5.5로 보정한 배지와 pH를 보정하지 않은 배지를 발효 중 계속 pH 7.0으로 유지하여 각각 30℃, 300rpm, 120시간 동안 SKU-78균주를 배양하면서 pH와 DO 변화 및 SKU-78 균주의 밀도 변화를 조사하였다. 밀도는 4시간 간격으로 발효액 20ml씩 회수하여 멸균수로 10배, 100배 희석하여 분광광도계에서 흡광도(660 nm)를 조사하였다. 흡광도가 가장 높은 시료를 NB배지에서 10단계 평판 희석법으로 균체수를 측정하였다.

### 나) 발효기에서의 선발기질 배양특성

선발된 몇 종의 기질을 30L 발효기에 적용하여 대상균주의 균체수 및 pH, DO의 변화를 관찰하였으며 적용기질 조성 목록은 [Table 6-2]와 같다. 공시 배지량은 20L로 하였고, 접종원은 전과 동일하였다.

Table 6-2. Composition of substrates

Substrates	Culture condition	Test
5% soy flake + 5% corn starch 2% soy flake + 2% 보리맥아 2% soy flake + 2% 보리맥아 + 2% corn starch 2% wheat bran + 2% corn starch 2% wheat bran + 2% 찹쌀 soy milk 1L + 2% corn starch	30℃, 300rpm, 48h	change of population size, pH, and DO

## 나. 생균 안정성 제고를 위한 carrier 및 amendment 선발

선발된 균주 SKU-78에 대하여 생균 안정성 제고를 위한 carrier 및 amendment 선발과 제제의 형태에 따른 효과를 검증하기 위하여 액상과 고상의 형태로 제제화를 시도하였다.

### 1) Carrier 선발

30분씩 2일간 가압멸균한 talc와 vermiculite에  $9 \times 10^8$  CFU/ml의 세균 현탁액 400ml을 섞은 뒤 멸균상태로 보관하고 매 2주일마다 CFU를 측정하였다.

### 2) Amendment 선발

TSB (Tryptic Soy Broth, Difco) 배지에 선발균주 SKU-78을 접종하여 진탕배양(30°C, 120rpm)하였다. 24시간 후 배양액을 원심분리하여 균체를 취하고 멸균수로 현탁하여 세균 현탁액을 만든 뒤 PPG, mineral, chitosan, glycerol을 각각 5%씩 넣어 무첨가한 것과 길항능력 및 균체수의 변화를 조사하였다.

### 3) 액상 수화제의 제조 및 효과검정

액상 수화제는 균체수를  $9 \times 10^8$  CFU/ml로 1ℓ를 배양한 후 선발된 부형제인 glycerol을 5% 첨가하여 제조하고 균체수의 변화를 조사하였으며, 활성 측정 시에는 20배 희석하여 관주하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 선발 균주의 대량배양조건 확립

1차년도에 분리된 균주로 2차년도에 pot assay와 field assay를 통해 아주 강한 발병억제활성이 검정되었으며, 균주 동정결과 *Bacillus sp.* SKU-78로 동정된 균주에 대해 산업적 제제화 공정을 위한 대량배양 조건을 확립하였다.

#### 1) 대량배양을 위한 산업용 배지 조성

##### 가) 탄소원 선발

탄소원을 달리하여 SKU-78 균주를 배양한 결과, 24시간째에는 검은설탕, 과당, 노란설탕, 옥수수전분, 정제자당(sucrose)을 첨가한 배지에서 균의 생장이 좋았고, 48시간 배양에서는 옥수수전분과 유당에서 생장이 높았으며, 정제자당과 검은 설탕, 노란 설탕에서도 비교적 균의 생장이 양호하였다(Fig. 6-1A). 따라서, 염가이면서도 탄소원으로서 장시간 길항균의 생육에 효과가 높은 옥수수전분을 탄소원으로 선발하였다.

##### 나) 질소원 선발

질소원의 경우 24시간째에서는 미강, 콩가루를 첨가한 배지에서 균의 생장이 좋았고, 48시간 배양에서는 미강, 콩가루, 비지가루와 대두박, yeast extract에서 균의 생장이 좋았다. 120시간 배양에서도 역시 미강, 콩가루, 비지가루, 대두박에서 균의 생장이 높았으므로(Fig. 6-1B) 상대적으로 염가인 콩가루와 미강을 질소원으로 선발하였다.

##### 다) 배양적온 및 교반속도

25℃, 30℃, 35℃의 조건에서 균주의 생장을 비교하였을 때 30℃와 35℃의 생육이 유사하였고(Fig. 6-2), 교반속도 역시 150~250rpm 범위 내에서 세균 밀도 증가에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(Table 6-3).

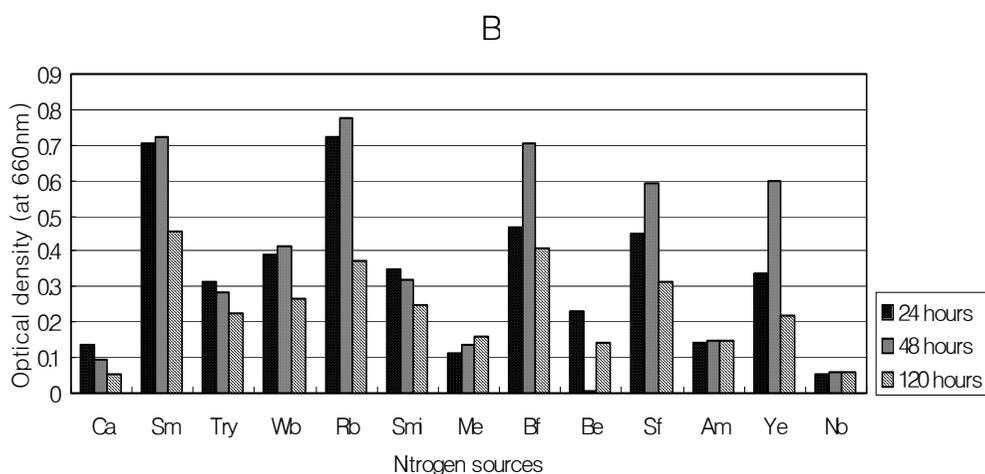
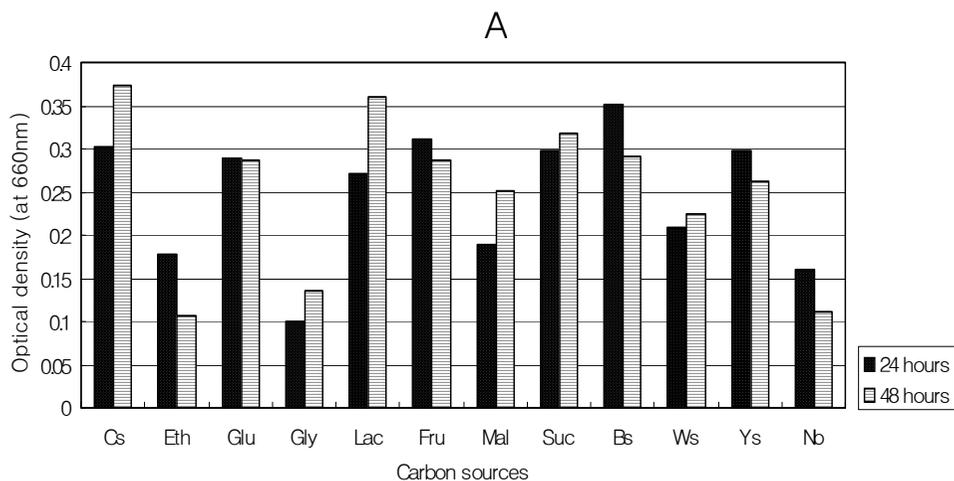


Figure 6-1. Effects of carbon sources(A) and nitrogen sources(B) on cell growth of SKU-78 at 30°C, 160 rpm in flask culture.

Cs: Corn starch; Eth: Ethanol; Glu: Glucose; Gly: Glycerol; Lac: Lactose; Fru: Fructose; Mal: Maltose; Suc: Sucrose; Bs: Black sugar; Ws: White sugar; Ys: Yellow suagr; Nb Nutrient broth; Ca: Casein; Sm: Soy meal; Try: Tryptone; Wb: Wheat bran; Rb: Rice bran; Sni: Soy milk; Me: Malt extract; Bf: Biji flour; Be: Beef extract; Sf: Soy flake; Am:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; Ye: Yeast extract; Nb: Nutrient broth.

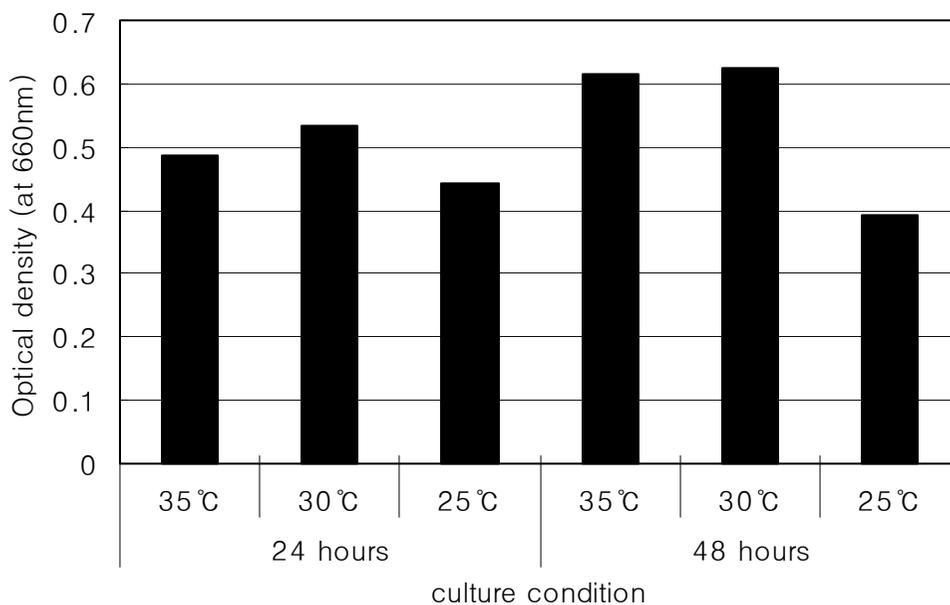


Figure 6-2. Effect of incubating temperature on the Population density of SKU-78 strain.

SKU-78 strain was cultured on NB media at 160 rpm in flask culture.

Table 6-3. Effects of shaking speed on cell growth of SKU-78 at 30°C in NB media

Incubation time (hours)	Shaking speed (rpm)			
	100	150	200	250
20	0.36 <sup>a</sup>	0.40	0.44	0.47
24	0.39	0.41	0.45	0.50
48	0.89	1.23	1.27	1.28

<sup>a</sup>Cell growth was checked by optical density at 660nm.

라) pH의 영향

NB배지와 비지배지내의 pH를 다양하게 조정하여 길항세균에 생장에 미치는 pH의 영향을 조사한 결과, NB 배지에서 24시간 배양하였을 경우, 세균 밀도는 초기 pH를 5.0으로 보정 하였을 때가 가장 높았고, 48시간 배양에서는 초기 pH를 5.5로 보정하였을 때가 가장 높았다. 콩가루배지에서는 24, 48시간 배양 시 모두 초기 pH를 5.0으로 보정 하였을 때 세균밀도가 가장 높았다(Table 6-4). NB 배지내의 초기 pH를 5.0에서 9.5까지 0.5 간격으로 증가시켜 보정 하였을 경우, 48시간 후의 pH의 변화는 6.6에서 7.5로 증가되는 경향을 보였다. 콩가루배지에서는 최종 pH가 6.5에서 5.3으로 산성화되는 경향을 보여주었다(Table 6-4).

Table 6-4. Effect of initial pH on cell growth of SKU-78 and changes in pH during incubation

Initial pH	Optical density (at 660nm)					
	NB medium			soybean medium		
	Incubation time (hours)		Final pH*	Incubation time (hours)		Final pH
24	48	24		48		
5	0.12 <sup>b</sup>	0.03	6.63	0.24 <sup>c</sup>	0.50	6.58
5.5	0.08	0.09	7.15	0.12	0.39	6.51
6	0.07	0.02	7.26	0.04	0.27	6.53
6.5	0.05	0.02	7.30	0.10	0.08	6.60
7	0.06	0.02	7.39	0.05	0.25	6.11
7.5	0.06	0.02	7.35	0.17	0.10	6.61
8	0.05	0.01	7.35	0.04	0.33	5.74
8.5	0.05	0.02	7.58	0.05	0.26	5.75
9	0.07	0.02	7.49	0.13	0.36	5.69
9.5	0.06	0.03	7.45	0.19	0.32	5.33

\*Final pH was checked after 48 hours incubation.

<sup>b</sup>Optical density was checked 10 times dilution samples.

<sup>c</sup>100 times dilution samples.

NB and soybean media were used.

마) 배양기질의 선발

배양 기질에 따른 SKU-78 균주의 균체 밀도 변화를 측정된 결과 기질만으로 배양했을 경우보다 기질에 탄소원으로 옥수수전분을 첨가하여 배양한 경우가 모든 기질에 있어서 효과적이었으며, 사용 기질 중에서 soybean meal이 가장 효과적으로 나타났다.(Table 6-5).

선발된 기질 soybean meal에 옥수수전분, 검은설탕, 찹쌀 등의 탄소원 첨가에 따른 균 성장 촉진 효과를 검정하였다. 5% 콩가루배지에 여러 종류의 탄소원을 첨가하여 24, 48 120시간 배양한 결과 탄소원으로 옥수수전분을 첨가한 경우에 세균 밀도가 가장 높았다(Fig. 6-6) (Table 6-7).

Table 6-5. Effects of various substrates on cell growth of SKU-78 strain with or without 2% corn starch

Substrates (5%)	Cell density ( $\times 10^8$ CFU/ml) <sup>a</sup>	
	Substrate Only	Each substrate + 2% corn starch
Fish meal	9.0 ab <sup>b</sup>	<b>9.9 ab</b>
Sweet rice drink	4.0 abc	5.3 abc
Soy sauce residue	0.1 c	0.1 c
Apple peel	0.1 c	0.2 c
Orange peel	0.1 c	0.1 c
Rice flour	3.6 abc	5.2 abc
Rice bran	4.8 abc	<b>8.8 ab</b>
Wheat bran	8.0 ab	5.2 abc
Biji flour	7.5 ab	<b>8.3 abc</b>
Sesame oil cake	4.8 abc	5.2 abc
Malt	7.3 ab	<b>9.4 ab</b>
Rice straw	2.5 bc	2.4 bc
Soy bean meal	11.9 a	<b>13.2 a</b>
NB	0.9 c	1.2 c

<sup>a</sup>Cell density was measured by colony count on a Nutrient agar plate after dilution with sterilized water.

<sup>b</sup>Means followed by the same letter are no significantly different according to Duncan's multiple range test(P=0.05%).

Table 6-6. Effects of selected substrates on cell growth of SKU-78 strain with or without 2% corn starch

Substrates	Con. (%)	Cell density ( $\times 10^8$ CFU/ml)*	
		Substrate Only	Each substrate + 2% corn starch
soy bean meal	5	3.6	11.2
	10	25.0	30.3
	15	36.7	45.5
	20	63.3	<b>80.3</b>
Wettable biji	5	1.8	3.7
	10	1.1	4.3
	15	4.3	15.1
	20	12.6	22.5
Rice bran	5	4.2	11.5
	10	25.3	39.2
	15	30.7	50.8
	20	42.2	66.4
Dry biji	5	4.1	12.1
	10	27.3	31.7
	15	40.5	45.2
	20	<b>68.2</b>	79.6
Malt	5	2.5	4.5
	10	10.5	11.3
	15	12.5	14.2
	20	17.5	20.6

\*Cell density was measured by colony count on a Nutrient agar plate after dilution with sterilized water.

Table 6-7. Effects of addition of corn starch to 5% Soy ben meal medium on cell growth of SKU-78 strain

5% Soy flake with	Optical density (at 660nm)			
	24 hours		48 hours	
	10 times dilution	100 times dilution	10 times dilution	100 times dilution
Corn starch 1%	1.09	0.19	1.05	0.13
3%	1.24	0.23	1.13	0.41
5%	1.26	0.34	1.34	0.28
Glucose 3%	0.56	0.12	0.85	0.15
Soluble starch 3%	0.56	0.1	0.45	0.04
5% Soy flake only	0.57	0.12	0.97	0.17

## 나. 발효기에서의 배양적 특성 조사

### 1) 발효를 위한 배양 조건

#### 가) 배양적온

5% 콩가루 배지에서 30℃와 35℃로 배양하였을 때 pH와 DO는 비슷한 경향을 보였으나, DO값이 0에 도달하는 시간이 30℃에서는 11시간째 35℃에서는 17시간이었고, DO값이 0에서 증가하는 시간은 반대로 30℃에서는 42시간이었고, 35℃에서는 48시간이었다. 초기 세균의 증가는 비슷하게 진행되었고, 20시간째에 최대 밀도에 도달하였다. 최대밀도일 때에는 30℃에서 배양하였을 때가 35℃보다 약간 높았다. 40시간 이후 35℃에서는 밀도가 감소하였고, 30℃에서는 계속 증가되었다(Fig. 6-3).

#### 나) 교반속도

교반속도를 300 rpm과 400 rpm으로 배양하였을 때 pH, DO와 세균밀도 변화는 비슷한 경향을 보였다. 교반속도를 증가함으로써 세균의 증식 속도가 조금 빨라졌고, 사멸 속도도 또한 조금 빨라졌다(Fig. 6-4).

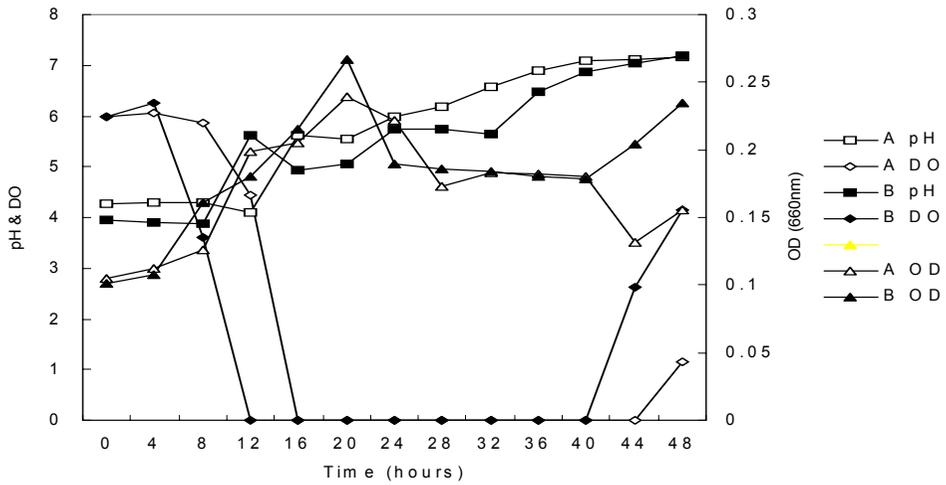


Figure 6-3. Time course of pH, DO and cell growth of SKU-78 strain in 5% soy bean meal medium at 35°C(A) and 30°C(B).

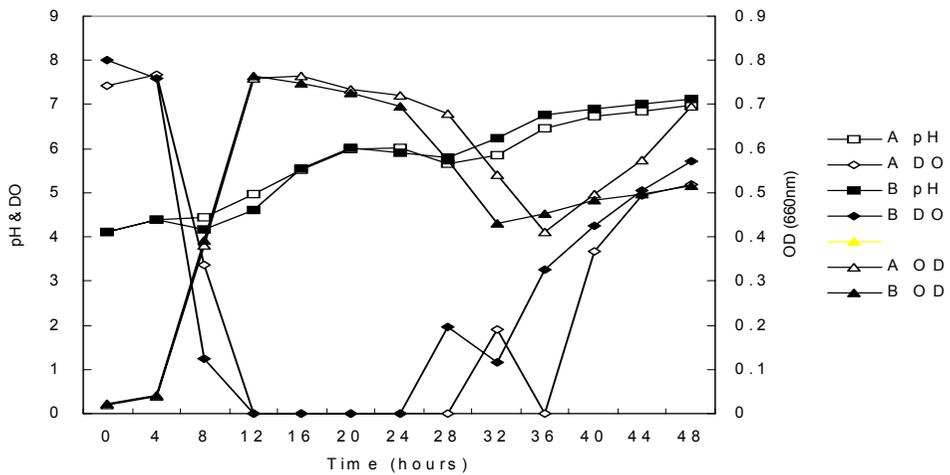


Figure 6-4. Time course of pH, DO and cell growth of SKU-78 strain in 5% soy bean meal medium with different agitation speed, 300rpm(A) and 400rpm(B) at 30°C.

#### 다) pH의 영향

pH의 영향을 조사한 결과 pH를 조절하지 않았을 때와 초기 pH를 5.5로 보정하였을 때는 다른 경향을 보였으나, 시간이 경과함에 따라 알카리화 되어 발효 48시간 이후에 pH가 각각 6.96과 6.41이었다. DO는 pH를 조절하지 않았을 때 가장 먼저 0에 도달하여 약 17시간 정도 지속되었으나, 발효 공정 내내 pH를 7로 일정하게 유지시킨 경우에는 35시간이 경과 후에 약 0.2로 수치가 떨어졌다. 세균밀도를 보면 pH를 조절하지 않을 때가 pH를 조절하였을 때 보다 세균의 최대 밀도에 도달하는 시간이 짧고, 세균의 밀도도 높았다(Fig. 6-5).

#### 라) 접종원과 배양시간의 영향

접종원의 배양시간을 달리하여 5% 콩가루배지에서 발효하였을 때, pH는 배양초기 11시간까지는 10시간 배양된 접종원을 사용했을 때 더 높았으나, 12시간째부터는 6시간 배양된 접종원을 사용했을 때 pH가 빨리 증가하였다. 배양 48시간째는 6시간, 10시간과 20시간 배양된 접종원에서 각각 7.18, 6.98과 6.41로 pH가 각각 증가하였다. DO는 10시간 배양된 접종원에서 가장 먼저 0으로 떨어지고, 계속 유지되었다. 6시간 배양된 접종원은 23시간이후 DO가 증가하였다. 세균의 최대 밀도에 도달하는 시간은 6, 10시간 배양된 접종원 둘 다 16시간째에 최대에 도달하였으나, 6시간 배양된 접종원에서는 이후에도 밀도가 계속 유지되었으나, 10시간 배양된 접종원에서는 급속히 감소하였다(Fig. 6-6).

#### 마) 발효기에서의 콩가루와 옥수수전분을 이용한 발효

콩가루 5%와 옥수수전분 5%로 발효했을 때 pH는 계속 서서히 증가되었고, DO는 8시간 이후 계속 0으로 유지되었다. 세균 밀도는 20시간째 최대였고, 이후 약간 감소되고 계속 유지되었다. 세균이 최고밀도에 도달하는 시간은 20시간째였고, 세균의 최고 밀도는  $1.2 \times 10^{14}$  CFU/ml이었다(Fig. 6-7).

#### 바) 콩가루와 옥수수전분을 이용한 혐기적, 호기적 발효

콩가루와 옥수수전분 배지를 이용하여 혐기적 또는 호기적으로 발효하였을 때 DO의 변화와 세균의 생장은 유사한 경향을 보였으나, pH변화는 혐기적으로 발효하였을 때는 초기 6에서 4 이하로 감소되다가 계속 4이하로 유지되었으나, 호기적 발효에서는 초기에는 큰 변화가 없었으나, 21시간 이후부터 증가하였다. 세균의 최대 밀도에 도달하는 시간은 혐기적 발효에서 약 4시간 가량 빨리

도달하였다(Fig.6-8). 혐기적 발효하였을 때 세균의 최고 밀도는  $1 \times 10^{12}$ CFU/ml 이었고, 호기적 발효에서의 최고 밀도는  $1.4 \times 10^{12}$ CFU/ml였다.

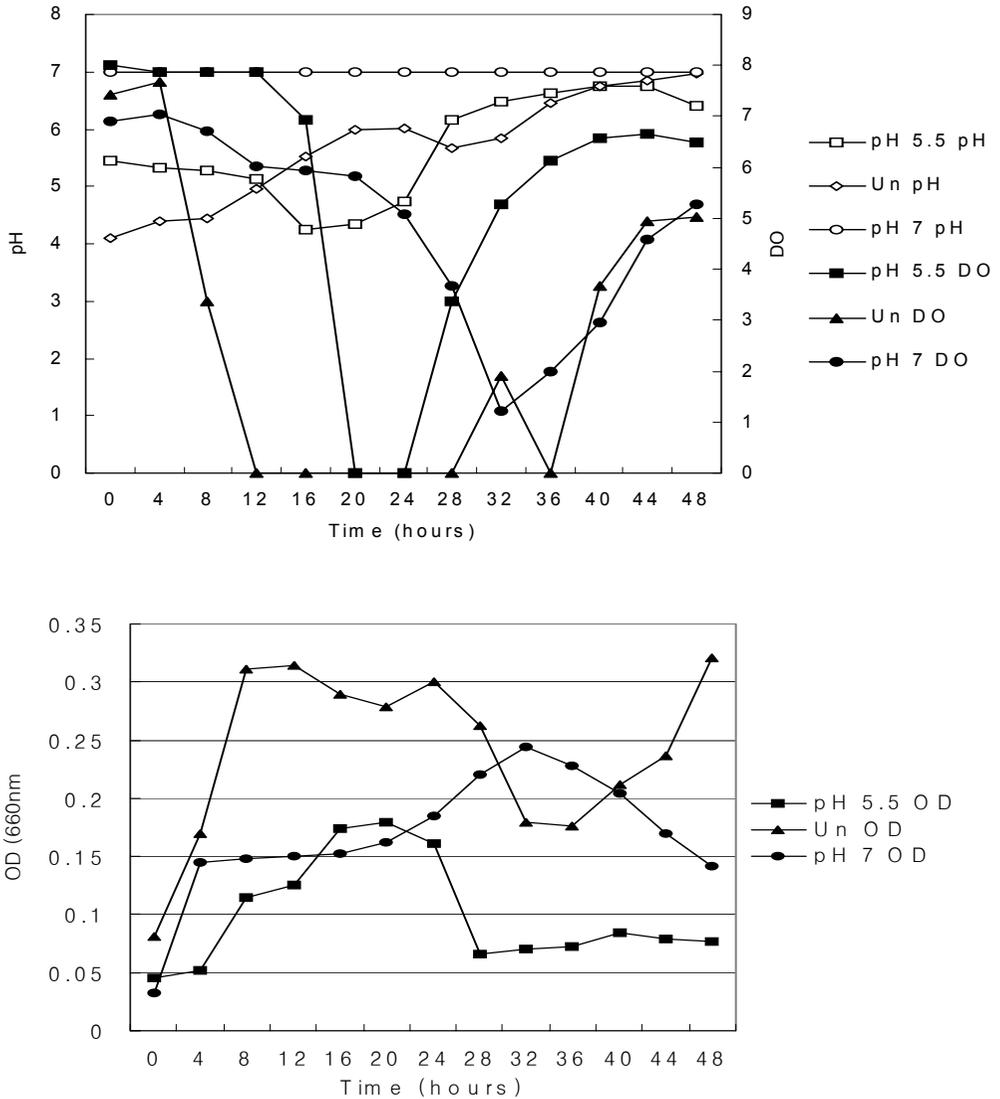


Figure 6-5. Time course of pH, DO and cell growth of SKU-78 in 5% soy bean meal medium with 3 different pH at 30°C

A: Initial pH adjusted at 5.5; B: not controlled pH; C: pH controlled at 7 during fermentation

processing.

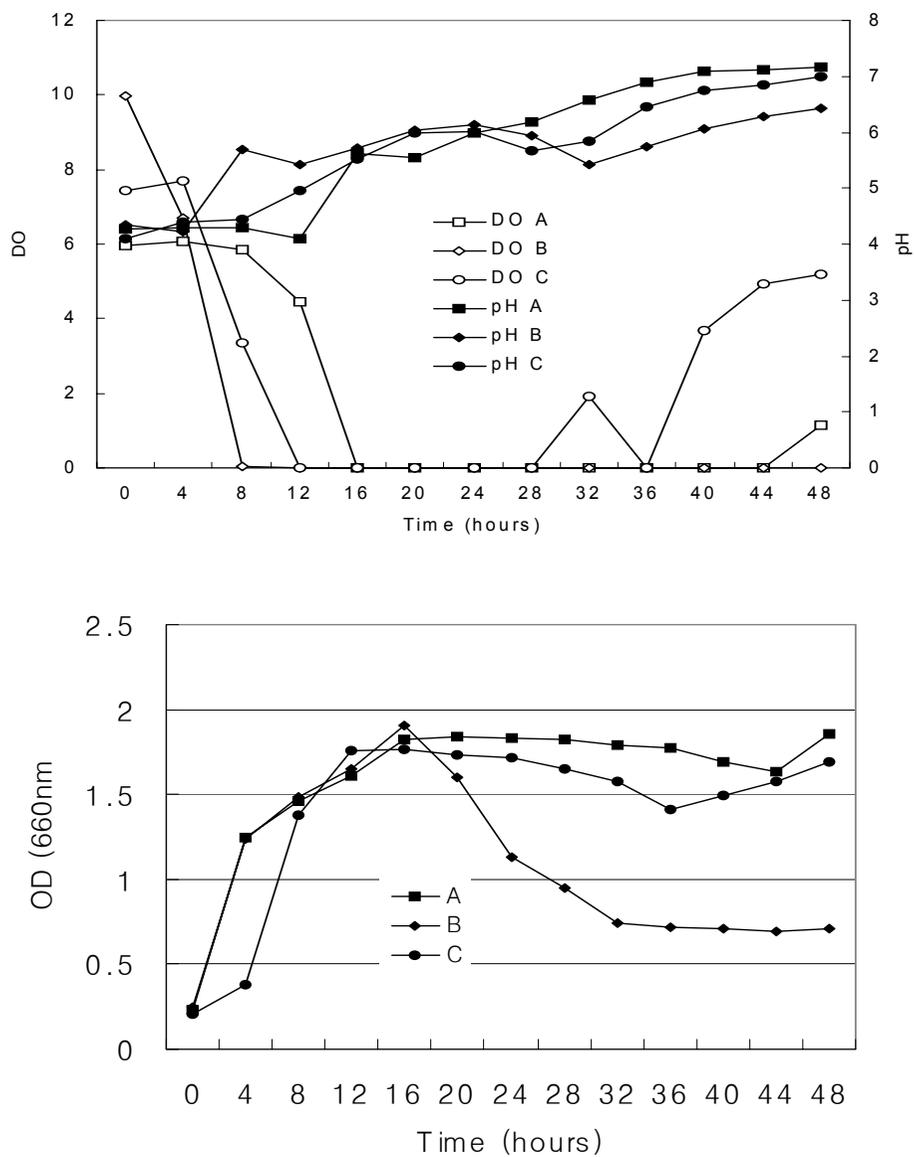


Figure 6-6. Time course of pH, DO and cell growth of SKU-78 in 5% soy bean meal medium with 3 different inoculum ages

A: 6 hours old; B: 10 hours old; C: 20 hours old inoculum.

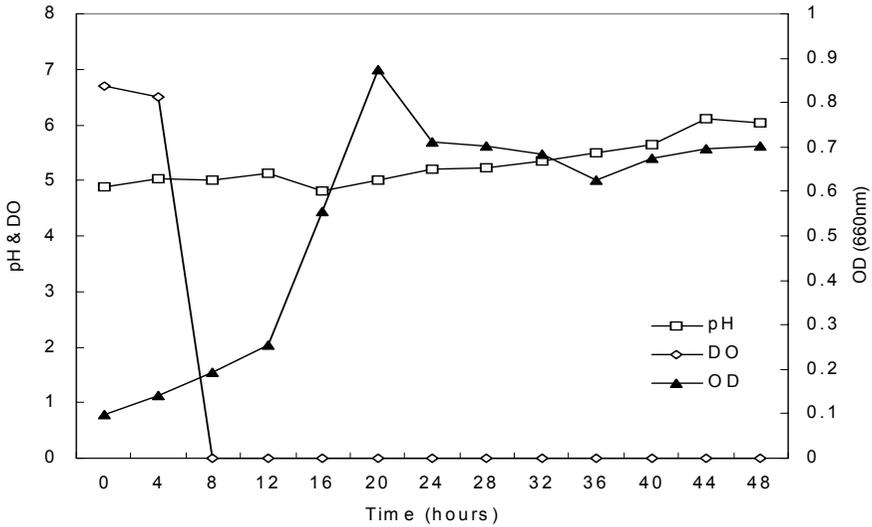


Figure 6-7. Time course of pH, DO and cell growth of SKU-78 in 5% soy bean meal with 5% corn starch at 30°C, 300 rpm

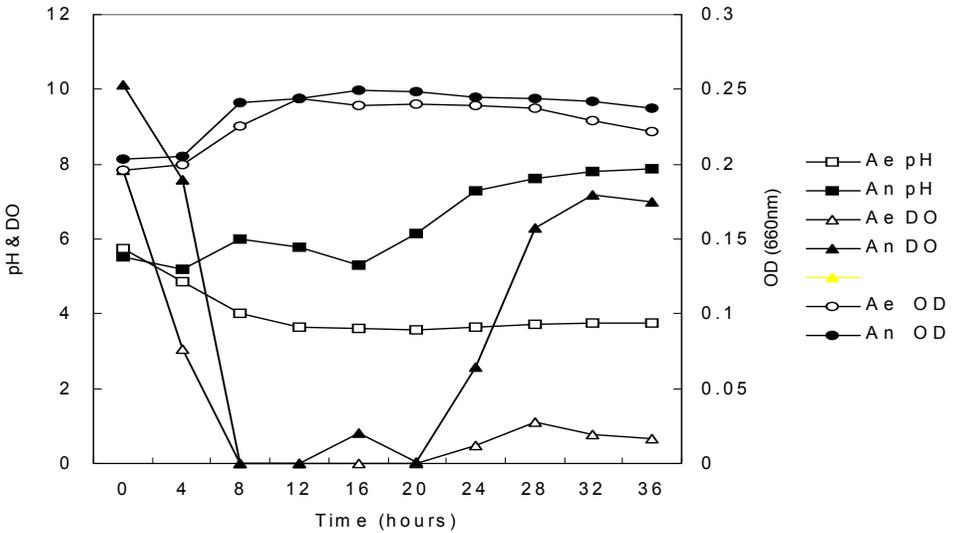


Figure 6-8. Time course of pH, DO and cell growth of SKU-78 in 2% soy bean meal medium with anaerobic and aerobic condition at 30°C, 300 rpm  
 Upper: Anaerobic fermentation; Middle: Aerobic fermentation; Bottom: Cell growth.

#### 다. SKU-78 균주의 안정성 제고를 위한 carrier 및 amendment 선별

SKU-78 균주의 미생물 제제화를 위하여 talc와 vermiculite에 대해 carrier로의 사용가능성을 검토하였다. talc와 vermiculite에 각각  $9 \times 10^8$ CFU/g가 되도록 SKU-78균체를 섞은 다음, 시간 경과에 따른 균체수의 변화를 serial dilution 방법으로 TSA 평판배지에 도말하여 측정하였다. Talc와 vermiculite 모두의 경우 4주까지는 균체의 수가 증가하는 추세를 보였다. 특히 talc의 경우에는 균체수의 변동이 심하여 4주 경과 시에는 균체수가 10배 정도 증가하였으나 8주 이후에는 거의 생균이 확인되지 않았다. 반면에 Vermiculite 사용 시 대부분의 균주가 처음 4주까지는 균체수가 증가하는 것으로 나타났으나 4주 이후부터 서서히 감소하는 경향을 보여 carrier를 이용한 고상 보다는 glycerol을 첨가한 액상 수화제의 사용이 바람직하겠다( 제 5절 결과 참조).(Fig. 6-9).



Fig. 6-9. Example of biocontrol agent using SKU-78 strain

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

본 연구에서는 풋마름병 방제제 개발을 위해서 여러 지역에서 채취한 토양에서 분리한 토양 미생물과 풋마름병 발생이 수년간 보고되지 않은 지역에서 재배한 고추와 토마토의 뿌리에서 분리한 rhizobacteria를 대상으로 풋마름병 발병 억제 활성을 갖는 균주를 screening 하였다. 보다 효율적인 screening을 위하여 mode of action based screening, 즉 antibiotics 생산, siderophore 생산, 식물 뿌리 성장 촉진과 뛰어난 근착 능력, 그리고 식물 성장 호르몬 분비 등의 작용기작에 입각한 screening을 통해 활성 균주를 1차로 선발한 후 2차로 *in vivo* pot assay를 통하여 풋마름병 발병 억제 효과를 나타내는 우수 활성 균주를 선발하여 각 작용기작 별로 선발 균주를 grouping 하였다.

생리활성 물질 생산에 의해 풋마름병균을 저해하는 활성균주의 배양액으로부터 활성 물질의 분리를 시도하였다. 생물농약 개발을 위한 신규 선도 물질을 확보하기 위하여, 신규성이 높다고 판단되는, 저해 활성물질이 대해서는 분리, 정제 및 신규성 여부를 확인하였으며, 미생물 복합제제에 초기 방제 효과 증진을 목적으로 첨가하는 생리활성물질 생산 균주의 경우에는 생리활성 물질의 부분적인 정제와 특성조사, 다른 구성 활성 균주에 대한 antibiosis 여부 등의 기초조사를 거친 상태에서 사용할 목적으로 부분적인 추출 정제 및 특성조사를 실시하였다.

토마토와 고추의 근권 토양에서 분리한 미생물을 대상으로 뿌리의 성장 촉진 효과가 크고 뿌리에 colonization이 수월한 균주로서 pot 실험에서 강한 풋마름병 발병 억제 효과를 보이는 SKU-78 균주에 대해서 농가 포장에서의 방제 효과를 확인하여 풋마름병 방제제로서의 실용화 가능성을 확인하였다. 또한 SKU-78 균주의 대량 배양 조건을 확립하였으며, carrier를 사용한 고상 형태 보다는 amendment를 첨가한 액상으로 제제화 한 경우에 생균 밀도가 높게 유지됨을 확인 하였다.

식물 뿌리에 colonization이 잘되며 또한 siderophore를 생산하는 균주로서 *in vivo* pot 실험에서 강한 풋마름병 발병억제 활성을 보인 균주 TS3-7은 *in vitro* plate에서는 전혀 항균 활성을 나타내지 않았으나, Fe 에 대한 경쟁으로 병원균을 억제하여 *in vivo* assay에서는 강한 발병 억제효과를 나타내었다. 특히 고추의 경우에 더 큰 방제효과를 확인할 수 있었으며, 나타내었다. 생균 안정성 제고를 위한 carrier로 vermiculite 사용에 의해 22주 까지 생균밀도가  $10^7$  CFU/ml 이 유지되어 carrier 사용에 의한 고상으로 제제화 하였다. SKU-78 균주와 TS 3-7 균주는 단일 균주로 풋마름병에 강한 억제력을 나타내는 유용균주로 선발되었지만 이들의 발병 억제 기작이 규명됨으로써( ISR 유도과 siderophore 생산) 풋마름병균 뿐만 아니라 다른 식물병원균에 대한 방제제로의 사용 가능성이 확인되었다.

본 연구에서는 풋마름병에 활성을 갖는 단독 길항균에 의한 생물방제제의 개발 뿐만 아니라, 미생물 제제가 갖는 활성스펙트럼이 좁고, 포장에서의 효과가 환경요인에 따라 변이가 심하다는 문제점을 해결하기위한 방안으로 여러 미생물의 복합제제 개발을 시도하였다. 변이가 특히 심한 풋마름병균 *Ralstonia solanacearum*의 효과적 방제를 위해서는 높은 밀도의 단일 미생물 제제보다 발병억제 기작이 서로 다르면서 서로에 대해 친화적인 미생물들의 mixture을 만들어 농가 대형 비닐하우스 포장에서 뚜렷한 풋마름병 방제 효과를 확인하였다.

## 제 5 장 연구개발 결과의 활용 계획

본 연구를 통하여 개발된 풋마름병 방제 길항 미생물제제는 농약회사나 종묘회사에서 종자코팅제나 토양처리제로 생산하여 풋마름병 방제제로 활용될 수 있을 뿐만 아니라 연구 과정을 통하여 도출된 미생물 농약 개발 전략을 모델로 폐해가 심각한 세균성 무름병 등의 타 식물병 방제제 개발이 가능하겠다.

본 연구로 개발된 길항미생물제제가 기존 화학 농약에 대해 내성을 지닌 균주들로 이루어졌으므로 화학 농약과 혼용에 의해 생물방제제의 단점, 즉 활성 스펙트럼이 좁고 환경조건과 병원균 race에 따라 효능의 편차가 크다는 단점을 보완할 수 있음과 동시에 화학농약 사용량을 반으로 줄임으로 환경파괴를 줄이는 효과를 기대할 수 있다.

따라서 본 연구결과는 생물농약 산업에서 활용할 수 있는 기술이며, 또한 본 연구 과정에서 배출되는 대학원생 연구 인력은 생물농약 산업체에 큰 기여를 할 것이다.

## 제 6장 참고문헌

A. Peix, P.F. Mateos, C. Rodriguez-Barrueco, E. Martinez-Molina, and E. Velazquez, (2001) Growth promotion of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by a strain of *Burkholderia cepacia* under growth chamber conditions, *Soil Biol. Biochem.* **33**, p.1927-1935

A. V. Sturz and B. R. Christie, (2003) Beneficial microbial allelopathies in the root zone: the management of soil quality and plant disease with rhizobacteria, *Soil and Tillage Research*, **72**, p.107-123

Adriane M. F. Milagres, Angela Machuca, and Diovana Napoleao. (1999) Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S(CAS) agar plate assay. *J. Microbiol. Methods.* **37**, 1-6

Backman, P. A., Wilson, M. and Murphy, J. F. (1997) In *Environmentally safe approaches to crop disease control*, CRC Lewis Publishers, Boca Raton, FL, pp. 95-109.

Bakker, P., Ran, L., Pieterse, C. and Van Loon, L. (2003) Understanding the involvement of rhizobacteria-mediated induction of systemic resistance in biocontrol of plant disease. *Can. J. Plant Pathol.* **25**, 5-9

Ben J. Duijff, Ghislaine Recorbet, Peter A. H. M. Bakker, Joyce E. Loper Philippe Lemanceau (1999) Microbial Antagonism at the Root Level Is Involved in the Suppression of Fusarium Wilt by the Combination of Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 and *Pseudomonas putida* WCS358. *The American Phytopathological Society* **89**, No.11, 1073-1079

Benhamou, N., Kloepper, J. W., Quadt-Hallman, A. and Tuzum, S. (1996) Induction of defense-related ultrastructural modifications in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria. *Plant Physiol.* **112**, 919-929

Berndt Gerhardson, (2002) Biological substitutes for pesticides. *TRENDS*

*in biotechnol.* **20** No.8 338-343

Bernhard Schwyn, J.B. Neiland (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* **160**, 47-56

Blanca B. Landa, Olga V. Mavrodi, Jos M. Raaijmakers, Brian B. McSpadden Gardener, Linda S. Thomashow, and David M. Weller, (2002) Differential Ability of Genotypes of 2,4-Diacetylphloroglucinol-Producing *Pseudomonas fluorescens* Strains To Colonize the Roots of Pea Plants, *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, No.7. 3226-3237,

Brian E. Grey and Todd R. Steck (2001) The Viable But Nonculturable State of *Ralstonia solanacearum* May Be Involved in Long-Term Survival and Plant Infection *Appl. Environ. Microbiol.* p. 3866-3872

C. AMVROSI, L. LEONI, L. PUTIGNANI, N. ORSI, and P. VISCA, (2000) Pseudobactin Biogenesis in the Plant Growth-Promoting Rhizobacterium *Pseudomonas* Strain B10: Identification and Functional Analysis of the L-Ornithine N<sup>5</sup>-Oxygenase(*psbA*) Gene, *J. Bacteriol.*, Nov. p.6233-6238

C. M. J. Pieterse, S. C. M. Van Wees, J. Ton, J. A. Van Pelt, and L. C. Van Loon, (2002) Signalling in Rhizobacteria-Induced Systemic Resistance in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Biol.* **4**, p.535-544

Charles D. Cox and Rex Graham, (1979) Isolation of an Iron-Binding Compound from *Pseudomonas*, *J. Bacteriol.*, Jan. p.357-364

Ching-Hong Yang and David E. Crowley, (2000). Rhizosphere Microbial Community Structure in Relation to Root Location and Plant Iron Nutritional Status, *Appl. Environ. Microbio.*, Jan. p.345-351

Chunquan Chen, Richard R. Belanger, Nicole Benhamou and Timothy C. Paulitz, (2000) Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*, *Physiological and Molecular Plant Pathology* **56**, p.13-23

M. De Boer, P. Bom, F. Kindt, J.J.B. Keurentjes, I. Van der Sluis, L.C. Van Loon and P.A.H.M. Bakker, (2003) Control of Fusarium wilt of radish by combining *Pseudomonas putida* strains that have different disease-suppressive mechanisms, *Phytopathol.* **93** , pp. 626–632.

E. Boopathi and K. Sankara Rao (1999) A Siderophore from *Pseudomonas putida* type A1 : structural and biological characterization, *Biochimica et Biophysica Acta* 30-40

E. Kay, F. Bertolla, T.M. Vogel, P. Simonet, (2002) Opportunistic Colonization of *Ralstonia solanacearum*-Infected Plants by *Acinetobacter* sp. and Its Natural Competence Development, *Microb Ecol* **43**, p.291–297

Elsorra E. Idriss, Oliwia Makarewicz, Abdelazim Farouk, Kristin Rosner, Ralf Greiner, Helmut Bochow, Thomas Richter and Rainer Borriss, (2002) Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect. *Microbiol.* **148**, 2097–2109

Fravel, D.R., Connick, W.J., Jr., and Lewis, J.A. (1996) Formulation of microorganisms to control plant diseases. In: *Formulation of Microbial Biopesticides, Beneficial Microorganisms and Nematodes*(H.D.Burges, ed.). Chapman and Hall, London.

Garima Bhatt and Timothy P. Denny, (2004) *Ralstonia Solanacearum* Iron Scavenging by the Siderophore Staphyloferrin B Is Controlled by PhcA, the Global Virulence Regulator, *J. Bacteriol.*, Dec. p.7896–7904

Geoffrey W. Zehnder, Changbin Yao, John F. Murphy, Edward R. Sikora and Joseph W. Kloepper, (2000) Induction of resistance in tomato against cucumber mosaic cucumovirus by plant growth-promoting rhizobacteria, *BioControl* **45**: 127–137.

Geoffrey W.Zehnder, John F.Murphy, Edward J. Sikora and Joseph W. Kloepper, (2001) Application of rhizobacteria for induced resistance, *European J. Plant Pathol.* **107** 39–50,

Georg S. Raupach and Joseph W. Klopper (1998) Mixture of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Enhance Biological Control of Multiple Cucumber Pathogens. *The American Phytopathological Society*. **88**, No.11 1158-1164

Gholson J. Lyon and Tom W. Muir, (2003) Chemical Signaling among Bacteria and Its Inhibition, *Chemistry & Biology*, **10**, 1007-1021,

Giuliano Bernal, Andres Illanes and Luigi Ciampi, (2002) Isolation and partial purification of a metabolite from a mutant strain of *Bacillus sp.* with antibiotic activity against plant pathogenic agents, *Electro. J. Biotechnol.* **5**, No. 1,

Guido V Bloemberg and Ben JJ Lugtenberg (2001) Molecular basis of plant growth promoting and biocontrol by rhizobacteria. *Plant biol.* **4**, 343-350

Harsh Pal Bais, Ray Fall, and Jorge M. Vivanco, (2004) Biocontrol of *Bacillus subtilis* against Infection of Arabidopsis Roots by *Pseudomonas syringae* Is Facilitated by Biofilm Formation and Surfactin Production, *Plant Physiol.*, **134**, pp.307-319

Hoitink and Boehm, (1999) H.A.J. Hoitink and M.J. Boehm, Biocontrol within the context of soil microbial communities, a substrate-dependent phenomenon, *Annu. Rev. Phytopathol.* **37** 427-446

J.W. Kloepper, R. Rodriguez-Ubana, G.W. Zehnder, J.F. Murphy, E. Sikora and C. Fernandez, (1999) Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases, *Australasian Plant Pathol.* **28**, p.21-26

Jean-Marie Meyer, Valerie A. Geoffroy, Nader Baida, Louis Gardan, Daniel Izard, Philippe Lemanceau, Wafa Achouak, and Norberto J. Palleroni, 2002. Siderophore Typing, a Powerful Tool for the Identification of Fluorescent and Nonfluorescent Pseudomonads, *Appl.*

*Environ. Microbiol.*, **68** p. 2745–2753,

Jesus Mercado-Blanco, Koen M. G. M. van der Drift, Per E. Olsson, Jane E. Thomas-Oates, Leendert C. van Loon and Peter A. H. M. Bakker, (2001). Analysis of the *pmsCEAB* Gene Cluster Involved in Biosynthesis of Salicylic Acid and the Siderophore Pseudomonine in the Biocontrol Strain *Pseudomonas fluorescens* WCS374, *J. Bacteriol.*, p. 1909–1920

Jetiyan, K. and Kloepper, J. W. (2002) Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant disease. *Biol. Control* **24**, 285–291

Jetiyan, K., Tuzun, S. and Kloepper, J. W. (1997) In *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria—Present Status and Future prospects*, Nakanishi printing, Sapporo, Japan, pp. 265–268.

Jian-Hua Guo, Hong-Ying Qi, Ya-Hui Guo, Hong-Lian Ge, Long-Ying Gong, Li-Xin Zhang, and Ping-Hua Sun, (2004) Biocontrol of tomato wilt by plant growth-promoting rhizobacteria, *Biological Control* **29** 66–72

Jo Handelsman and Eric V. Stabb (1996) Biocontrol of Soilborne Plant Pathogens. *Plant Cell*, **8**, 1855–1869

Julie Tans-Kersten, Yanfen Guan, and Caitilyn Allen (1998) *Ralstonia solanacearum* Pectin Methyltransferase Is Required for Growth on Methylated Pectin but Not for Bacterial Wilt Virulence. *Appl. Environ. Microbiol.* p. 4918–4923

K. E. Nelson, C. Weinel, I. T. Paulsen, R. J. Dodson, H. Hilbert, V. A. P. Martins dos Santos, D. E. Fouts, S. R. Gill, M. Pop, M. Holmes, L. Brinkac, M. Beanan, R. T. DeBoy, S. Daugherty, J. Kolonay, R. Madupu, W. Nelson, O. White, J. Peterson, H. Khouiri, I. Hance, P. Chris Lee, E. Holtzapple, D. Scanlan, K. Tran, A. Moazzez, T. Utterback, M. Rizzo, K. Lee, D. Kosack, D. Moestl, H. Wedler, J. Lauber, D. Stjepandic, J. Hoheisel, M. Straetz, S. Heim, C. Kiewitz, J. Eisen, K. N. Timmis, A. Dusterhoft, B. Tumbler and C. M. Fraser, (2002). Complete genome

sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440, *Environ. Microbiol.* **4(12)**, p.799-808

Kanchalee Jetiyanon and Joseph W. Kloepper (2002) Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant diseases. *Biological control* **24**, 285-291

Kevin P. Smith, Jo Handelsman, and Robert M. Goodman, (1999) Genetic basis in plants for interactions with disease-suppressive bacteria, *Agricultural Sciences*, **96**, 4786-4790,

Kloepper, J., Leong, J., Teintze, M. and Schroth, M. (1980) Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature* **286**, 885-886.

L. C. van Loon, P. A. H. M. Bakker, and C. M. J. Pieterse, (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria, *Annu. Rev. Phytopathol.* **36**, 453-83

Leo S. van Overbeek, Mike Cassidy, Jacek Kozdroj, Jack T. Trevors and Jan D. van Elsas, (2002) A Polyphasic approach for studying the interaction between *Ralstonia solanacearum* and potential control agents in the tomato phytosphere, *J. Microbiol. Methods* **48**, 69-86

Lim, Ho-Seong and Sang-Dal Kim (1997) Role of Siderophore in Biocontrol of *Fusarium solani* and Enhanced Growth Response of Bean by *Pseudomonas fluorescens* GL20. *J. Microbiol. Biotechnol.* **7**, 13-20

Linda S Thomashow, (1996) Biological control of plant root pathogens, *Biotechnol.*, **7**, p. 343-347

Loper, J. E., and J. W. Kloepper. (2001) Role of iron in rhizobacteria-mediated induced systemic resistance of cucumber. *Phytopathol.* **91** 593-598.

Lumsden, R.D., Lewis, J.A. and Fravel, D.R. (1995) Formulation and delivery

of biocontrol agents for use against soilborne plant pathogens. Pages 166–182 in: *Biorational Pest Control Agents – Formulation and Delivery* (F.R. Hall and J.W. Barry, eds.). American Chemical Society, Washington, D.C.

M. Gita Bangera, Linda S. Thomashow, (1999) Identification and Characterization of a Gene Cluster for Synthesis of the Polyketide Antibiotic 2,4-Diacetylphloroglucinol from *Pseudomonas fluorescens* Q2-87, *J. Bacteriol.*, **181**, No.10 p.3155–3163,

M.Vestberg, S. Kukkonen, K. Saari, P. Parikka, J. Huttunen, L. Tainio, N. Devos, F. Weekers, C. Kevers, P. Thonart, M.-C. Lemoine, C. Cordier, C. Alabouvette, and S. Gianinazzi, (2004) Microbial inoculation for improving the growth and health of micropropagated strawberry, *Appl. Soil Ecol.* **27**, p.243–258

Mercado-Blanco, J., Van Der Drift, K., Olsson, P., Thomas-Oates, J., Van Loon, L. and Bakker, P. (2001) Analysis of the pmsCEAB gene cluster involved in biosynthesis of salicylic acid and the siderophore Pseudomonine in the biocontrol strain *Pseudomonas Fluorescens* WCS374. *J. Bacteriol.* **183**. 1909–1920

Merja Manninen and Tiina Mattila-Sandholm, (1994) Methods for the detection of *Pseudomonas* siderophores, *J. Microbiol. Methods*, **19**, p. 223–224

Moussa S. Diarra, Julia A. Dolence, E. Kurt Dolence, Ihab Darwish, Marvin J. miller, Francois Malouin, and Mario Jacques (1996) Growth of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Is Promoted by Exogenous Hydroxamate and Cathecol Siderophores. *Appl. and Environm. Microbiol.* **62**, no.3 853–859

N.K. Arora, S.C. Kang and D.K. Maheshwari, (2001) Isolation of siderophore-producing strains of *Rhizobium meliloti* and their biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina* that causes charcoal rot of groundnut, , *Current Science*, **81**, No. 6,

- Ownley, B. H., Weller D. M. and Thomashow, L. S. (1992) Influence of *in situ* and *in vitro* pH on suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. tritici by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Phytopathol.* **82**, 178-184
- P. Vidhyasekaran, K. Sethuraman, K. Rajappan, and K. Vasumathi (1997) Powder Formulations of *Pseudomonas fluorescens* to Control Pigeonpea Wilt. *Biological control* **8**, 166-171
- P.A.H.M. Bakker, L.X. Ran, C.M.J. Pieterse, and L.C. van Loon, (2003) Understanding the involvement of rhizobacteria-mediated induction of systemic resistance in biocontrol of plant diseases, *Can. J. Plant Pathol.* **25**: 5-9
- Parke, J. (1991) In *the rhizosphere and plant growth, Root colonization by indigenous and introduced microorganism*, Kluwer Academic Publishers, pp. 33-42.
- Parret, A.H.A. and De Mot, R. (2000) Bacteriocin production by rhizosphere-colonizing fluorescent *Pseudomonas*. In: *Proceedings of the 5th International PGPR Workshop*. Cordoba, Argentina.
- Pieterse, C. M. J, Van Wees S. C. M, Hoffland, E., Van Pelt J. A. and Van Loon L. C. (1996) Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell* **8**, 1225-1237.
- R. Bharathi, R. Vivekananthan, S. Harish, A. Ramanathan and R. Samiyappan, (2004) Rhizobacteria-based bio-formulations for the management of fruit rot infection in chillies, *Crop Protection*, **23**, Issue 9, p. 835-843
- Ramamoorthy, V., Viswanathan, R., Raguchander, T., Prakasam, V. and Samiyappan, R. (2001) Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and disease. *Crop Prot.* **20**, 1-11.

Ranjeet K. Tokala, Janice L. Strap, Carina M. Jung, Don L. Crawford, Michelle Hamby Salove, Lee A. Deobald, J. Franklin Bailey, and M. J. Morra, (2002) Novel Plant-Microbe Rhizosphere Interaction Involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the Pea Plant(*Pisum sativum*), *Appl. Environ. Microbiol.*, p. 2161-2171

Robert C. Anderson and Donald E. Gardner, (1999). An Evaluation of the Wilt-Causing Bacterium *Ralstonia Solanacearum* as a Potential Biological Control Agent for the Alien Kahili Ginger (*Hedygium gardnerianum*) in Hawaiian Forests, *Biological Control* **15**, p.89-96

S.E. WILHITE, R.D. LUMSDEN AND D.C. STRANEY, (2001) Peptide Synthetase Gene in *Trichoderma virens*, *Appl. Environ. Microbiol.*, p. 5055-5062

Schell, M. A. (2000) Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory network. *Annu. Rev. Phytopathol.* **38**, 263-292

Scher, F. M. and Bakker, R. (1982) Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to fusarium wilt pathogens. *Phytopathol.* **72**, 1567-1573.

Schwyn, B. and Neiland, J. B. (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* **160**, 47-56

Shamil Validov, Olga Mavrodi, Leonardo De La Fuente, Alexander Boronin, David Weller, Linda Thomashow and Dmitri Mavrudi. (2005) Antagonistix activity among 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. *FEMS Microbiology Letters* **242**, 249-256

Shouan Zhang, M. S. Reddy, and Joseph W. Kloepper, (2002) Development of Assays for Assessing Induced Systemic Resistance by Plant Growth-Promoting Rhizobacteria against Blue Mold of Tobacco, *Biological Control* **23**, p.79-86

Shu-Wei Yang, Ling Xu, Ronald Mierzwa, Ling He, Joseph Terracciano, Mahesh Patel, Vincent Gullo, Todd Black, Wenjun Zhao, Tze-Ming Chan and Min Chu, (2004) Two novel antibiotics, Sch419558 and Sch419559, produced by *Pseudomonas fluorescens* : effect on activity by overexpression of RpoE, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **12**, Issue 12, p.3333-3338

Sung Heui Shin, Yong Lim, Shee Eun Lee, Nam Woong Yang and Joon Haeng Rhee, (2001) CAS agar diffusion assay for the measurement of siderophores in biological fluids, *J. Microbiological Methods*, **44**, Issue 1, 89-95

Suzanne E. Dale, Amanda Doherty-Kirby, Gilles Lajoie, and David E. Heinrichs (2004) Role of Siderophore Biosynthesis in Virulence of *Staphylococcus aureus*: Identification and Characterization of Gene Involved in Production of Siderophore. *INFECT. IMMUS.* p. 29-37

Teruo Nonomura, Yoshinori Matsuda, Miki Bingo, Maiko Onishi, Kazuhiko Matsuda, and Hideyoshi Toyoda, (2001) Algicidal effect of 3-(3-indolyl)butanoic acid, a control agent of the bacterial wilt pathogen, *Ralstonia solanacearum*. *Crop Prot.* **20**, 935-939

Ultan F Walsh, John P Morrissey and Fergal O'Gara, (2001) *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation, *Biotechnol.* **12**, 289-295

Uwe Conrath, Corne M.J.Pieterse and Brigitte Mauch-Mani, 2002. Priming in plant-pathogen interactions, *TRENDS in Plant Science* **7**. No. 5

V. Ramamoorthy, R. Viswanathan, T. Raguchander, V. Prakasam and R. Samiyappan, 2001. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases, *Crop Prot.* **20**, Issue 1, 1-11

Van Elsas, J. D., Kastelein, P., de Vries, P. M. and Van Overbeek, L. S. (2001) Effect of ecological factors on the survival and physiology of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 in irrigation water. *Can. J. Microbiol.* **47**, 842-854.

Van Elsas, J. D., Kastelein, P., Van Bekkum, Van der Wolf, J. M., de Vries, P. M. and Van Overbeek, L. S. (2000) Survival of *Ralstonia solanacearum* biovar 2, the causative agent of potato brown rot in field and microcosm soils in temperate climates. *Phytopathology* **90**, 1358-1366.

Van loon L., Bakker P. and Pieterse M. (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **36**, 453-483.

Vasse, J., Grey, P. and Trigalet, A. (1995) Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. *J. Gen. Microbiol.* **8**, 241-251.

Vidyasekaran, P. and Muthuamilan, M. (1995) Development of formulation of *Pseudomonas fluorescens* for control of chickpea wilt. *Plant Dis.* **79**, 780-782.

Zehnder, G.W., Yao, C., Murphy, J.F., Sikora, E., Kloepper, J.W., Schuster, D., and Polston, J. (1999) Microbe-induced resistance against pathogens and herbivores: Evidence for effectiveness in agriculture. In: *Induced Plant Defenses Against Pathogens and Herbivores: Biochemistry, Ecology, and Agriculture*. APS Press, St. Paul, MN.