

발 간 등 록 번 호

11-1541000-000513-01

보안과제( ), 일반과제( ○ )

과제번호 107013-3

# 최적 균주컨소시엄을 통한 친환경 미생물방제제 개발 및 실용화

(Development of the consortium of antagonistic  
rhizobacteria for the environmental friendly agriculture)

친환경 미생물방제제의 맞춤형 컨소시엄 개발

(Development of the microbial consortium  
for the biological control agent)

맞춤형 친환경 미생물방제제의 현장적용

(Field application of the microbial consortium  
for the environmental friendly agriculture)

영남대학교

농림수산식품자료실



0005249

농 립 수 산 식 품 부

# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “최적 균주컨소시엄을 통한 친환경 미생물방제제 개발 및 실용화” 과제(세부과제 “친환경 미생물방제제의 맞춤형 컨소시엄 개발”, “맞춤형 친환경 미생물방제제의 현장적용” 에 관한 연구)의 보고서로 제출합니다.

2010년 5월 28일

주관연구기관명 : 영남대학교

주관연구책임자 : 김 상 달

세부연구책임자 : 김 상 달

연 구 원 : 임 종 희

연 구 원 : 정 희 영

연 구 원 : 안 창 환

연 구 원 : 김 요 환

협동연구기관명 : 경북농업기술원 영양고추시험장

협동연구책임자 : 장 길 수

연 구 원 : 박 기 춘

참 여 기 업 : (주) 대유

연 구 원 : 윤 상 희

연 구 원 : 남 옥 호



# 요 약 문

## I. 제 목

최적 균주컨소시엄을 통한 친환경 미생물방제제 개발 및 실용화

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

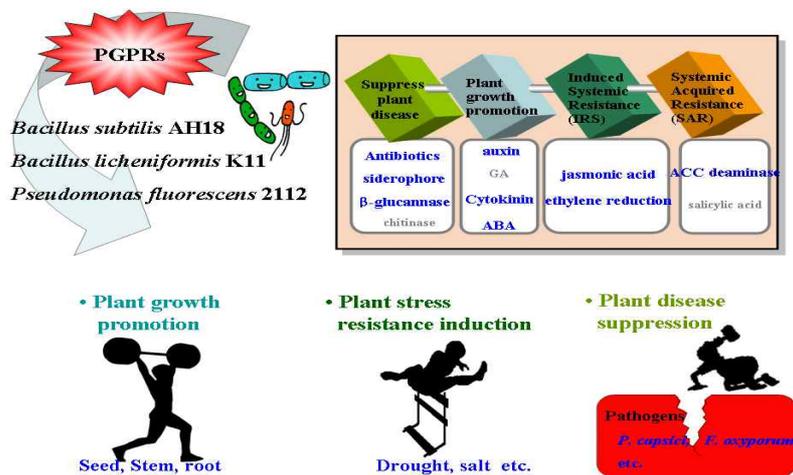
○ 근권미생물 중 직/간접으로 식물의 성장 및 병해 방지에 긍정적인 영향을 주는 미생물을 길항미생물이라 한다. 이들의 길항능력은 미생물이 갖는 능력에 따라 서식지 점령, 식물의 저항력 유도, 그리고/또는 항생능력에 의해 식물병원균의 생장을 억제하게 되는 길항효과라 할 수 있다. 식물병원균에 대한 길항능력을 보이는 근권미생물을 이용하여 친환경적으로 작물을 재배하고자 하는 생물학적 방제 및 유기농업의 움직임에 힘입어 최근 20년간 많은 길항미생물이 선별/선발 되었다. 그러나 선발된 미생물은 극히 일부만이 생물농약으로 상업화에 성공하였고, 그나마도 현장재현성이 떨어져 방제효과의 일관성이 없다는 현장애로점이 있는 실정이다.

○ 이것은 길항미생물을 개발할 당시 한 가지 길항 방법에 의한 방제능력을 검정하여 실험실 내에서의 환경에서만 효과를 검증하였기 때문에 다양한 실제 경작지 환경 속에서 요구되는, 길항력의 재현성이 확보된 방제능력을 발휘하지 못하였기 때문으로 분석된다. 즉, 방제능력이 한정적이기 때문에 다양한 조건의 환경 속에서는 그 한 가지 기작만으로는 다양한 방제 효과를 나타내기 힘들었던 것으로 사료된다. 또한, 실제 농가에서는 한 작물일지라도 다양하게 오는 병에 대해 골고루 방제되는 다기능 약제를 원하고 있는데, 특히 화학농약의 사용을 줄일 수 있는 친환경 농자재인 경우에는 한 가지 약제로 다양하게 방제될 수 있는 특정작물 전용 농자재를 갈망하고 있다.

○ 그러나, 시험실 연구 단계에서 길항미생물의 방제 효과를 검정할 때는 한 가지 병원균에 대한 방제효과를 보여주고 있기 때문에 작물단위로 농사를 짓는 현행 농업현장에서 광범위하게 사용되고 있지 못하고 있다. 또한 방제 효과도 병원균이 없는 대조구에 비해 얼마나 좋은지를 검정하기 때문에 현재 사용하고 있는 화학농약에 비해 얼마나 더 방제효과가 있는지에 대한 객관적인 판단 기준과 재현성의 효능검증이 없어 실제 농업현장에서 신뢰를 얻지 못하는 현장 애로점이 있다고 판단된다. 또, 현재 연구되거나 상품화 되고 있는 미생물제제는 하나 또는 두 개의 미생물 균주를 이용한 것이 대부분이고 3균주 이상 복합적인 미생물

균주를 사용한 제제라 할지라도 이들 사용 미생물균주간의 공생, 경쟁 등의 상호관계에 대한 연구가 전무한 실정인으로서 정확하고 지속적인 효능을 검증하는 것이 사실상 힘들다. 이 모든 사항은 생물농약으로 사용된 미생물제제가 광범위한 현장에의 적용 및 재현능을 방해하는 요소와 원인으로 지적될 수 있다.

○ 따라서 본 연구는, ①첫 째, 현재까지 본 연구진에 의해 개발된 항생능력과 식물생장촉진 능력이 뛰어난 10여종의 길항미생물들 중에서 항생능력, 토양 우점능력 및 식물저항성 등의 기작별 상호 보완형(기능상 시너지형) 길항미생물 균주의 맞춤형 컨소시엄을 개발하고자 한다. ②둘 째, 생물방제능이 탁월한 미생물균주들간의 상호 비경쟁적 상리공생관계 검증으로 유효 미생물균주의 맞춤형 컨소시엄 구성에 학문적인 근거를 제시하고 우수한 미생물균주의 컨소시엄 구성이 가능하도록 하며, 이미 개발되었거나 개발계획에 있는 다양한 미생물제제들의 컨소시엄 구성을 통해 이들의 생물방제능을 향상시키고 맞춤형 최적컨소시엄의 구성에 토대를 마련할 것이다. ③셋 째, 유효 길항미생물 균주 컨소시엄의 처리방법, 제제화 조성 및 제조법 확립을 통하여 농가 포장에서의 현장 재현성 향상을 위한 전달체계를 구명하며 지역 특유의 토양, 기후, 재배법 또는 병징의 특성에 맞는 활성지속형의 맞춤형 친환경 미생물제제를 개발하고 여러지역의 넓고 다양한 특성에 효과적으로 방제능을 발휘할 수 있는 친환경 미생물농약을 개발하고자 한다. ④넷 째, 우리나라 제2의 작물인 고추를 대상으로 하여 개발된 미생물제제가 고추에 가장 크게 문제시 되고 있는 역병에 얼마나 현장방제 효과가 좋은 지도 검정하여 작물단위로 처리할 수 있는 맞춤형 친환경 고추병 생물방제제를 상업화하고자 한다. ⑤마지막으로 이 모든 결과는 현장 적용성 향상 및 재현성을 확인하는 농가 포장실험을 거치고 (경상북도 농업기술원 영양 고추시험장) 일반 농가현장에서의 확인 시험을 하여 실제 소비자의 만족도도 조사할 계획에 있다. 본 연구는 이미 수년간의 연구를 통하여 미생물방제제로의 여러 가지 길항능력이 확인된 10 여종의 길항미생물을 생물농약화하여 실제 농가포장에 적용, 재현성을 확보하는 실험을 함으로써 새로운 기능 보완형 길항미생물을 활용한 맞춤형 친환경 미생물농약의 대규모 상업적 이용단계까지 진전되는데 필요한 필수적인 연구를 마무리하는 성격을 지니기도 한다.



<PGPR 컨소시엄을 이용한 친환경 미생물방제제의 개발>

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

구분	세부과제별	연구개발의 목표	연구개발의 범위
1차년도	친환경 미생물방제제의 맞춤형 컨소시엄 개발	선발균주들의 항생능력, 토양 우점능력 및 식물저항성의 기작별 상호 보완형 미생물 균주의 컨소시엄 구성	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 기확보된 10여종의 길항미생물중 주요 기작별 컨소시엄 구성               <ul style="list-style-type: none"> <li>가. 항생능력, siderophore 및 cellulase 생산능, auxin 생산능, 인산가용능 등의 각 기작별 상호보완 균주 컨소시엄</li> <li>나. 컨소시엄 균주의 고추역병 방제능 및 생장촉진능 비교 (단독처리 균주와 비교)</li> </ul> </li> <li>○ 기확보된 길항미생물의 상호 비경쟁적 상리공생 증식여부 조사               <ul style="list-style-type: none"> <li>가. 컨소시엄 균주들의 혼합배양을 통한 개별 균주의 증식 및 방제능 비교 (생균수 측정, 대치배양)</li> <li>나. 컨소시엄 균주들 중 경쟁관계 배제</li> <li>다. 상리공생 균주들의 컨소시엄 조건 조사</li> </ul> </li> </ul>
	맞춤형 친환경 미생물방제제의 현장적용	고추역병에 대한 농가포장 실험조건 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 길항미생물에 의한 고추역병 억제효과 검증 및 농가현장 발현조건 규명               <ul style="list-style-type: none"> <li>가. 시험방법                   <ul style="list-style-type: none"> <li>- 품종 : 고추(고은)</li> <li>- 재배방법 : 포트 재배</li> </ul> </li> <li>나. 처리내용 : ①육묘상 처리, ②정식 후 4회 관주, ③기비용 퇴비 혼용 처리, ④ 1+2+3처리 조합, 대조구(화학적 방제, 화학약제+미생물제제 혼용 처리, 무방제)</li> <li>다. 반복 : 완전임의비치 5반복</li> <li>라. 조사방법 : 농촌진흥청 생물농약의 등록 시험방법 및 등록신청서류 검토기준에 준함</li> <li>마. 실제농가 적용방법 및 재현성 검증</li> </ul> </li> </ul>

구분	세부과제별	연구개발의 목표	연구개발의 범위
2차년도	친환경 미생물방제제의 맞춤형 컨소시엄 개발	컨소시엄 길항미생물의 서식지 점령, 저항유도능 검증 및 화학농약과의 비교분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 컨소시엄 길항미생물들의 서식지 점령 및 저항유도능 검증               <ul style="list-style-type: none"> <li>가. 시험방법                   <ul style="list-style-type: none"> <li>- 품종 : 고추(대장부)</li> <li>- 근권미생물 접종 : <math>10^3</math>-<math>10^6</math> cfu/seed</li> <li>- 재배방법 : 포트 재배</li> </ul> </li> <li>나. 반복 : 완전임의배치 2 반복 (서식지 점령), 완전임의배치 4 반복 (저항유도능)</li> <li>다. 조사방법 : 근권당 살아있는 미생물의 수를 dilution plating하여 구한다.</li> </ul> </li> <li>○ 컨소시엄 길항미생물들의 고추역병 방제효과를 화학농약과 비교 분석               <ul style="list-style-type: none"> <li>가. 시험방법                   <ul style="list-style-type: none"> <li>- 품종 : 고추(대장부)</li> <li>- 근권 미생물접종 : <math>10^3</math>-<math>10^6</math> cfu/seed</li> <li>- 재배방법 : 포트 재배</li> <li>- 목표치 : 화학농약 처리구와 동등 또는 그 이상의 효과</li> </ul> </li> <li>나. 반복 : 완전임의배치 8 반복</li> <li>다. 조사방법 : 인위적 병원균 접종 후 미생물에 의한 방제효과율 검증</li> <li>라. TDC-PCR법 및 mutiplex-PCR에 의한 현장내 길항미생물의 모니터링</li> </ul> </li> </ul>
	맞춤형 친환경 미생물방제제의 현장적용	고추역병에 대한 미생물제제의 농가포장에서의 현장 재현성을 향상시키는 전달체계 등 처리방법 구명	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 길항미생물 처리 방법별 고추역병 억제효과의 농가포장 검증               <ul style="list-style-type: none"> <li>가. 시험방법                   <ul style="list-style-type: none"> <li>- 품종 : 고추(고은)</li> <li>- 재배방법 : 농가포장 2개소</li> </ul> </li> <li>나. 처리내용 : 미생물 제제 처리(포트처리, 정식전 퇴비 동반 처리, 4회 관주 처리, 복합처리), 화학적 방제, 대조구(역병 무방제)</li> <li>다. 반복 : 난괴법 3반복</li> <li>라. 조사방법 : 농촌진흥청 생물농약의 등록 시험방법 및 등록신청서류 검토기준에 준함</li> <li>마. 농가 적용방법확립 및 재현성 검증</li> </ul> </li> </ul>

구분	세부과제별	연구개발의 목표	연구개발의 내용
3차년도	친환경 미생물방제제의 맞춤형 컨소시엄 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 친환경 고추재배 농가용 생물농약을 위한 최적 컨소시엄구성 및 농가포장 시험결과에 따른 조정</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 선발된 미생물의 컨소시엄 구성여부와 구성조성 확립 및 경쟁관계 규명</li> <li>○ 농가현장 토양내 시용된 길항미생물의 유전학적 생태학적 모니터링 실험</li> </ul>
	맞춤형 친환경 미생물방제제의 현장적용	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 농가포장실험에 의한 고추역병 억제용 미생물농약의 효과확립 및 재배지 적용기술 개발</li> <li>○ 선발된 제제의 대상작물 확대적용 시험</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 생물방제용 미생물농약의 고추역병 억제효과와 경작토양 현장 검증 및 상용화 기술확립</li> <li>가. 시험방법 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 품종 : 고추(대장부)</li> <li>- 처리 : 화학적 방제 시기 4회 처리</li> <li>- 재배방법 : 농가재배 5곳 (경북도내)</li> </ul> </li> <li>나. 처리내용 : 1, 2년차에서 확립된 방법의 농가적용</li> <li>다. 반복 : 단구제</li> <li>라. 조사방법 : 농촌진흥청 생물농약의 등록 시험방법 및 등록신청서류 검토기준에 준함</li> <li>마. 생물농약 등록조건 확인 시험</li> <li>○ 선발제제화된 컨소시엄 미생물의 인삼 등의 토양병원균 억제확립 및 적용기술 개발</li> <li>가. 대상작목 : 고추, 인삼, 수박 등</li> <li>나. 처리방법 : 농가포장 3곳</li> <li>다. 반복 : 난괴법 3반복</li> </ul>

#### IV. 연구개발결과

○ 식물성장을 촉진하는 식물성장촉진근권세균(Plant growth promoting rhizobacteria, PGPR)은 식물의 근권에 서식하며 식물성장촉진호르몬에 의한 성장촉진효과 유도, 여러 가지 식물성장 조절 호르몬생산, 전신획득저항성(SAR)과 유도전신저항성(ISR)과 같은 식물의 방어기작의 유도, 식물병원균 방제 등의 역할을 한다. PGPR은 크게 식물병원균을 억제하여 간접적으로 식물의 생장에 영향을 주는 biological control PGPR과 식물성장을 촉진시키거나 종자발아 촉진, 작물생산성 증대 등의 효과를 가져오는 것으로 분류할 수 있다. 본 연구에서는 화학농약에 의존한 결과 현재 농업생태계에 부정적인 영향을 초래하는 기존 작물병 방제 방법을 탈피하고, 전세계적인 친환경적 작물재배의 흐름에 순응하고자 식물의 근권에 서식하는 PGPR 균주를 이용한 미생물방제제 개발로 환경친화적인 작물재배에 이용하고자 하였다.

또한, 개발된 미생물제제를 우리나라 제2의 경제작물인 고추에 초점을 맞추어 고추재배지역의 40% 이상에서 발병되어 30%이상의 경제적인 피해를 입히는 고추역병균인 *P. capsici*의 생물방제에도 활용하고자 하였다.

○ 그 결과 Table 5에서 보이는 것처럼 본 연구에서 사용된 PGPR균주 *B. subtilis* AH18, *B. licheniformis* K11과 *P. fluorescens* 2112는 매우 다양한 메커니즘을 가진 다기능 PGPR균주임을 알 수 있었다. 이미 연구된바와 같이 식물생장촉진호르몬인 auxin을 *B. subtilis* AH18은 IAA, IBA, IPA (1: 1.5: 2.6), *B. licheniformis* K11은 IBA를 생산하며, 식물생장 조절호르몬인 ABA와 JA도 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11이 모두 생산한다는 것을 HPLC 분석을 통하여 확인할 수 있었으며, 본 연구에 사용된 PGPR 균주들 모두 식물생장촉진호르몬인 cytokinin의 한 종류인 zeatin을 생산한다는 것을 알 수 있었고, 토양내의 불용성 인산염을 분해하는 인산 가용화능도 가진다는 것을 알 수 있었다.

Table 5. Mechanisms of plant growth promotion and drought stress resistance induction by the selected PGPRs.

Functions		<i>B. subtilis</i> AH18	<i>B. licheniformis</i> K11	<i>P. fluorescens</i> 2112
Plant growth regulation hormones	Auxin	IAA (175 kDa) IBA (203 kDa) IPA (189 kDa)	IBA (203 kDa)	—
	Cytokinin	—	+	—
	Jasmonic acid	+	+	—
	Abscisic acid	+	—	—
	Gibberellic acid	+	+	++
Antifungal activity	Siderophore	2,3-dihydroxybenzoyl-glycine-threonine (883 Da)	2,3-dihydroxybenzoic-threonine (808 Da)	Pyoverdin (1,958 Da)
	$\beta$ -1,4 glucanase	fungal cell degrading cellulase (55 kDa)	fungal cell degrading cellulase (54 kDa)	—
	Antibiotic	—	Iturin A gene (1.5 kbp)	2,4-DAPG (210 Da)
Plant stress resistance induction (ACC deaminase)	+	++	+	
	(0.9 $\mu$ M)	(4.3)	(2.6)	
Phosphate solubilization (calcium phosphate hydrolase)	++	++	+	
	(63ppm)	(59)	(17)	

○ 이와같은 결과로 볼 때, PGPR 균주 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11의 식물생장촉진 혹은 조절 호르몬들의 생산능과 인산 가용화능을 이용하여 작물의 성장촉진에 직접 혹은 간접적인 형태로 적용할 수 있으며, 실제 고추와 토마토에 적용시켜 본 결과 두 균주에 의한 식물생장촉진효과를 검증할 수 있었다. 특히 완두, 오이, 시금치, 고추, 토마토 등의 다양한 작물의 종자 발아능에서 상업용 auxin으로 판매되는 IAA에 비하여 낮은 농도로 더 높은 종자발아능이 있음을 확인할 수 있었다. 또한, 두 PGPR 균주들의 병용에 의하여 고추와 토마토의 성장촉진능에서 시너지효과를 나타냄도 알 수 있었다.

○ 다기능 PGPR 균주인 *B. subtilis* AH18, *B. licheniformis* K11과 *P. fluorescens* 2112는 생물방제능으로 *B. subtilis* AH18은 siderophore와  $\beta$ -1,4 glucanase, *B. licheniformis* K11은 항생물질 iturin, siderophore와  $\beta$ -1,4 glucanase, *P. fluorescens* 2112는 siderophore와 항생물질 2,4-DAPG의 기작을 가진다. 이들 PGPR 균주들간의 상호보완적인 생물방제능과 식물생장촉진능을 토대로 고추역병 방제용 미생물 방제제 consortium을 구성하였고, 구성된 컨소시엄을 8L 대량배양기를 통하여 농촌진흥청 생물농약 기준 3년 이상의 약효보증기간이 설정된 분제와 액제형태의 미생물제제를 개발할 수 있었다.

○ 또한, 개발된 미생물제제 컨소시엄을 실제 고추역병이 발병한 포장에 적용한 결과 80%이상의 방제능이 있음을 검증할 수 있었고, 3 종의 PGPR 균주들 *B. subtilis* AH18 (auxin, siderophore,  $\beta$ -1,4 glucanase genes), *B. licheniformis* K11 (siderophore, iturin,  $\beta$ -1,4 glucanase genes)과 *P. fluorescens* 2112 (2,4-DAPG, ACC deaminase genes)의 옥신과 생물방제물질, 스트레스 저항능 유도물질의 특이 유전자들의 primer들을 제작하여 *in situ* 포장 토양내 모니터링을 실시하였다. 그 결과 모든 PGPR 균주들을 미생물제제 처리 후 20일까지 모니터링 할 수 있었고, PGPR 균주 컨소시엄처리에 의한 고추역병균인 *P. capsici*의 감소현상도 ITS region의 primer를 이용하여 확인, 증명할 수 있었다. 이 같은 결과는 PGPR 균주를 이용한 미생물제제의 현장 토양내 고추역병 방제능 검증과 더불어 사용된 미생물제제를 구성하는 PGPR 균주들과 병원균의 토양내 생태학적인 동태 추적이 가능한 연구이다.

○ 한편, 다기능 PGPR균주 *B. subtilis* AH18, *B. licheniformis* K11과 *P. fluorescens* 2112를 이용하여 지구온난화에 따른 기후변화와 연작 및 화학농약의 과다사용으로 고추 경작지에서 흔히 발생할 수 있는 건조와 염 스트레스에 대한 고추의 저항성 유도를 검증해 보았다. 그 결과 30일의 건조 스트레스 조건과 50 mM 농도의 고염 스트레스 조건에서도 PGPR 균주 처리에 의해 모두 건조 및 고염 스트레스 반응이 매우 낮게 나타나는 식물 스트레스 저항성 유도능을 검증할 수 있었다. 또한, PGPR 균주 처리에 따른 고추의 건조스트레스 저항성 유도능에 대한 고추뿌리의 단백질과 전사수준에서의 발현차이를 조사한 결과, PGPR 균주 처리에 의해서 스트레스 저항성 유도 유전자인 *CaPR*-10 (pathogenesis-related protein 10), *ACCO* (ACC oxidase), *VA* (vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase), *Cadh*n (dehydrin-like protein), *sHSP* (small heat shock protein)의 발현 증가와 *ADK* (adenosine kinase isoform 1T) 유전자의 발현 감소를 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 고추 근권에 우점하고 있는 다기능 PGPR 균주가 식물 스트레스 저항성 유도 유전자들의 발현증가와 감소를 일으키고, 이에 따라 고추의 건조 스트레스 저항성이 유도됨을 증명하는 것이다.

○ 즉, 본 연구를 통하여 옥신생산성 고추 역병방제용 식물스트레스저항성 유도 PGPR 균주인 *B. subtilis* AH18, *B. licheniformis* K11과 *P. fluorescens* 2112를 고추의 친환경적인 재배를 위한 새로운 컨소시엄 미생물제제로 개발하여 실제 고추농가 현장포장시험에서 기존미생물제제보다 우수한 방제효과를 검증하였을 뿐만 아니라 토마토, 참외, 쌈배추와 멜론 등의 시설재배 적용하여 시판되는 미생물제제보다 뛰어난 생장촉진효과를 입증할 수 있었고, 또한, 고추 등의 여러 가지 작물의 재배환경에서 흔히 발생할 수 있는 건조 및 고염 스트레스 저항성을 유도할 수 있는 우수한 PGPR 균주임을 확인 할 수 있었다. 따라서, 본 연구는 친환경적 고추재배를 위하여 컨소시엄 미생물제제로 개발된 다기능 PGPR 균주들이 가지는 다양한 PGPR 기능들을 연구하여 포장시험에 적용해 봄으로써 녹색성장의 친환경미생물농법을 위한 새로운 PGPR의 개발과 다양한 작물에서의 적용시험에 모범적인 모델이 될 수 있을 것이라 생각한다.

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

### 1. 연구개발 성과

가. 특허 (출원 1건, 등록 1건)

- (1) 고추역병 방제 및 고추생육촉진용 길항미생물 조합 조성물 (출원번호 10-2009-026109)
- (2) 제올라이트를 이용한 바실러스 포자의 열 안정성 향상 방법 (등록번호 10-0931948)  
(바이오그린21사업과 공동실적)

나. 논문 (총 7건; SCI급 3건, 학술등재 2건, 투고준비 중 2건)

- (1) Biocontrol of phytophthora blight caused by *Phytophthora capsici* using *Bacillus subtilis* AH18 and *B. licheniformis* K11 formulations in red-pepper farming. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. (10월 게재).
- (2) Powder formulation using heat resistant endospores of two multi-functional PGPR *Bacillus* strains having phytophthora blight suppression and growth promoting functions. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. (8월 게재).
- (3) Jong-Hui Lim and Sang-Dal Kim (2009) Synergistic plant growth promotion by the indigenous auxins-producing PGPR *Bacillus subtilis* AH18 and *Bacillus licheniformis* K11. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 52(5), 531-538.
- (4) 박기춘, 임종희, 김상달, 이영근 (2009) 고추역병 길항미생물 *Bacillus subtilis* AH18과 *Bacillus licheniformis* K11의 토양미생물 생태에 미치는 영향. 한국응용생명화학회지 52(3), 121-125.
- (5) 임종희, 정희영, 김상달 (2009) 다기능 PGPR균주들의 기작별 상호보완형 컨소시엄 구성을 통한 고추역병 방제 및 고추생장촉진. 한국응용생명화학회지. 52(3), 116-120.
- (6) Genetic monitoring of multi-functional PGPRs and *Phytophthora capsici* in pepper farming

field. J. Microbial. Biotechnol. (투고준비 중).

- (7) Drought stress resistance induction by multi-functional PGPR *Bacillus licheniformis* K11. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. (투고준비 중).

다. 국제학술대회 발표 (7건)

- (1) Jong-Hui Lim and Sang-Dal Kim (2007) Drought stress reduction by plant growth promoting rhizobacterium *Bacillus licheniformis* K11 producing auxin and ACC deaminase. 2007 International Symposium & Annual Meeting of the Korean Society for Microbiology and Biotechnology.
- (2) Sang-Min Woo and Sang-Dal Kim (2007) Genetic monitoring of antagonistic bacterium *Bacillus subtilis* AH18 using multiplex PCR in field natural soil, and purification of catechol-siderophore produced by the strain. 2007 International Symposium & Annual Meeting of the Korean Society for Microbiology and Biotechnology.
- (3) Jong-Hui Lim and Sang-Dal Kim (2007) Biological control and salt-stress by Multi-functional Plant Growth Promoting rhizobacteria(PGPR) *Bacillus subtilis* AH18 and *Bacillus licheniformis* K11. 2008 International Symposium and Annual Meeting of the KSABC.
- (4) Jong-Hui Lim and Sang-Dal Kim (2008) Genetic Monitoring of Multi-functional PGPR *Bacillus subtilis* AH18 and *Bacillus licheniformis* K11 by Multiplex PCR and Real-time PCR in Field Soil. 2008 International Symposium & Annual Meeting of the Korean Society for Microbiology and Biotechnology.
- (5) Jong-Hui Lim and Sang-Dal Kim (2008) Plant Growth Promoting and Stress-Reduction by the Multi-Functional PGPR *Bacillus licheniformis* K11. Meeting of the International Union of Microbiological Societies 2008.
- (6) Jong-Hui Lim and Sang-Dal Kim (2008) Development of the Microbial Consortium for the Environmental Friendly Agriculture by the Antagonistic Rhizobacteria. 2008 International Symposium and Annual Meeting of the KSABC.
- (7) Jong-Hui Lim and Sang-Dal Kim (2009) Biological control of Phytophthora blight by multi-functional PGPR consortium and its genetic monitoring in field soil. 2008 International Symposium & Annual Meeting of the Korean Society for Microbiology and Biotechnology.

라. 국제세미나 발표 (1건, 8th International PGPR Workshop)

- (1) Drought stress resistance inducing and plant growth promotion by the multi-functional PGPR *Bacillus licheniformis* K11 in pepper plant

마. 교육 및 지도활용 (2건)

- (1) 친환경농업과 미생물(교재명: 화훼산업의 경쟁력 제고로 돈이되는 화훼농업, 2009, 구미 화훼시험장)

- (2) 토착유용미생물 선발 및 대량배양 방법(교재명: 농촌발전연구소 연구과제 보고회 및 한우교육, 2009, 영천농업기술센터)
- (3) 예천군농업기술센터 (친환경바이오센터) : 길항미생물 배양방법 및 농가보급기술
- (4) 영천군농업기술센터 (환경농업과) : 길항미생물 선발 및 처리기술
- (5) 경북농업기술원 (원예연구과) : 길항미생물 배양 및 현장적용 기술

바. 수상실적 (1건)

- (1) 제20회 과학기술우수논문상 (한국과학기술단체총연합회, 2010년 대한민국 과학기술연차대회)

2. 성과활용 계획

- (1) 다기능 PGPR균주들의 기작별 상호보완형컨소시엄 구성을 통한 고추역병 방제 및 고추 성장촉진용 맞춤형 컨소시엄 미생물제제
  - 비경쟁의 상호 상리공생관계가 검증된 3종의 다기능 PGPR균주로 구성된 다기작의 기능상 시너지형 컨소시엄미생물제제의 개발로 현장토양에서 병해방제 뿐만 아니라 작물의 성장촉진, 건조/고염 스트레스 저항성 유도, 인산가용화 등의 다양한 효능을 재현성있게 나타낼 수 있을 것이라 기대된다. 또한, 기존의 2종이상의 균주가 혼합된 복합미생물제제들은 각 균주들간의 상호관계에 대한 연구가 거의 전무한 상태에서 상품으로 출시되어 현장 재현성이 떨어지고 효과의 일관성이 부족한 경우가 대부분인 점을 고려할때 본 연구개발과제의 맞춤형 컨소시엄 미생물제제는 농가포장과 영양고추시험장의 시험포에서 현장 재현성을 검증하였으므로 상업화 성공 가능성이 매우 클 것이라 생각됨.
  - 참여기업 (주)대유와 기술이전을 통하여 상업용화 할 계획이다.
- (2) 열스트레스 내생포자를 이용한 *Bacillus* 균주 및 zeolite를 이용한 *Pseudomonas* 균주의 안정한 제제화 기술
  - *Bacillus* 균주의 내생포자를 이용한 제제화 방법과 *Pseudomonas*의 zeolite를 이용한 제제화 방법은 유효균수  $10^8$  CFU/ml 로 미생물농약등록기준에 의거 3년 약효보증 설정이 가능한 기술로 기존 미생물제제의 유효균수보다 최소 10배에서 최대 1,000 배 이상의 고농도 제제화 방법으로 미생물제제의 상업화와 농가의 미생물제제 확대사용에 기대가 크다.
  - 제제화 기술에 대한 특허를 출원할 계획이다.
- (3) Multiplex PCR 및 Real Time PCR을 이용한 생물농약용 미생물제제의 고추 재배 현장의 적응능 취약성 및 우점유지능 감소현상의 현장어로점 극복 및 재현성 향상 기술
  - 각 균주별 3종 이상의 특이유전자를 이용하는 multiplex PCR 기반 미생물제제의 경작지 토양내 간편신속 모니터링 기술은 미생물제제의 현장사용 후 사후관리체계 구축과 품질관리 및 재현성 향상에 적극 활용할 수 있는 기술이다.
  - 차후 농민이 간편용이하게 사용할 수 있는 키트 개발에 착수할 계획이다.

(4) 미생물제제의 홍보방안

- 본 연구를 통해 개발된 컨소시엄미생물제제는 먼저 농촌진흥청에서 시행 중인 “친환경유기농자재목록공시” 제도를 통해 친환경유기농업에 사용 가능한 농자재로 등록을 추진하여 검증된 농자재라는 인식을 심어 (주)대유의 기존 영업망(시판, 농협)을 통해 홍보한다. 또한, 기존 (주)대유의 제품홍보책자에 본 연구개발 컨소시엄미생물제제의 별도 코너를 신설하여 관련특허 및 연구논문에 대한 간략한 소개와 해설로 농민들에게 단일미생물로 구성된 기존제품과의 차별성과 복합균주의 사용으로 단일미생물의 단점을 상호보완할 수 있는 효과의 우수성을 보다 쉽게 이해할 수 있도록 할 것이다. 그리고, 단독 팜플렛도 별도 제작하여 (주)대유에서 정기적으로 시행 중인 대농민 교육 자료로 이용하여 적극적으로 홍보하고자 한다. 특히, 전국 규모의 농업박람회에 참가하여 부스를 통한 홍보 및 농민신문 광고 게재를 통하여 기존 제품과의 차별성을 적극적으로 홍보하고자 한다.

(5) 현장중심의 적용사례 확대 방안

- 본 연구를 통해 개발된 컨소시엄미생물제제는 복합균주의 사용으로 다양한 작물과 식물병에 항균활성을 나타내고, 특히 고추의 성장촉진, 건조/고염 스트레스 저항성 유도, 인산가용화 등의 효과가 탁월하다. 따라서 고추를 포함한 여러가지 작물에 대한 포장시험을 병행하여 활용범위를 확대하고자 한다. 특히, 고추 역병의 경우 (주)대유의 영업망을 이용하여 지역 간 고추 품종을 달리한 포장시험을 통해 효과를 재입증하고자 한다. 현재 계획 중인 포장시험은 아래와 같다. 현장적용 시험자료는 추후 사례집으로 정리하여 홍보자료로 사용하고자 한다.

분류	작물	포장주소 및 면적	포장주
과수류	사과	경북 청도군 풍각면 덕양리 1374-4번지, 5000평	허규석
	배	경북 상주시 공성면 장동리 651번지, 2000평	손상보
과채류	고추	경남 밀양시 상동면 안인리 768번지, 1500평	구연진
	토마토	경북 경주시 내남면 덕천2리 801번지, 3000평	이순길
	오이	경북 군위군 군위읍 무성2리 966번지, 2000평	김화섭
	딸기	경남 김해시 삼량진읍 삼량진 825-2번지, 3000평	김판곤
	참외	경북 성주군 초진면 동포리 898-13번지, 6000평	김해규
엽채류	상추	경북 경산시 하양읍 남하리 285번지, 각 10000평	임영수
	적겨자		
	쌈배추		

## SUMMARY

### (영문요약문)

Rhizobacteria, which inhabit the rhizosphere of various plants, can stimulate plant growth and disease suppression directly and/or indirectly. Several reports discussed the improvement of crop productivity with the biocontrol agents, instead of chemical fertilizers and agrochemicals. Additionally, by the reducing of environmental stresses such as drought, high salt, and heavy metals, PGPR lead to produce crops without losses. This study focused the plant promoting ability and environmental stress reduction by the selected multi-functional PGPR: *B. subtilis* AH18 and *B. licheniformis* K11, and involved on fungal plant disease by biocontrol ability of these strains. The selected PGPR *B. licheniformis* K11 and *B. subtilis* AH18 produced the auxins as well as antifungal cellulase, and siderophore. Both have mechanisms for the solubilization of insoluble phosphates.

An synergistic effect was seen in the growth of red pepper and tomato when the soils were treated with cells of both *Bacillus* strains. *B. subtilis* AH18 could produce JA, ABA of plant growth regulation hormones and *B. licheniformis* K11 produce JA, cytokinin as well as auxin. Red pepper and tomato were increased growth of roots, stem, and leaves up to 20% and suppressed fungal disease such as Phytophthora blight by the strains.

This research involved the best composition of mutual complementary bacterial consortium by each strains antagonistic function such as the production of antibiotic, siderophore, antifungal cellulase and solubilizing ability of insoluble phosphate.

Synergistic biocontrol effect between *B. subtilis* AH18 and *B. licheniformis* K11 was confirmed through co-treatment of two single culture for red-pepper Phytophthora blight suppression. *B. subtilis* AH18 and *B. licheniformis* K11 were formulated by producing endospores with enhanced heat resistance. The antifungal activity of two *Bacillus* formulators by heat-resistant endospores was maintained for 6 weeks at 54°C and 7 days at 0°C. In red-pepper field spreading outbreak of Phytophthora blight, the non-treated pepper were died above 40%, whereas *B. subtilis* AH18, *B. licheniformis* K11 and *P. fluorescens* 2112 co-treated (consortium treated) pepper plants could be survived up to 80%.

Plant tissues increase ethylene under the environmental stress. An increased concentration of ethylene in plants can cause inhibition of plant growth. The ACC deaminase produced by PGPR can reduce the plant's ethylene concentration by cleaving the ethylene precursor ACC ; consequently these can stimulate the growth of plants. *B. licheniformis* K11 have ACC deaminase activity for the reduction of environmental stress such as salt and drought. Untreated pepper and tomato were dead after fifteen days of

drought, whereas the PGPRs helped pepper plants to tolerate the drought stress. Even under the salt stress of 50mM NaCl, pepper plants could subsist when the pepper were treated with *B. licheniformis* K11. Difference of protein and RNA pattern in inoculated pepper were confirmed using 2-D PAGE and DD-PCR method under the drought condition for 30 days. As 2-D PAGE, 6 differentially expressed stress proteins were identified by the strains treated pepper; pathogenesis-related protein 10; adenosine kinase isoform 1T; vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase A1; dehydrin-like protein; early nodulin ENOD18; S-adenosylmethionine synthetase. Among the stress proteins, specific genes of *ACCO*, *CaPR-10*, *VA* (H<sup>+</sup>-ATPase), *sHSP* (small heat shock protein), *Cadh*n (*Capsicum* dehydrin-like protein), *ADK* (adenosine kinase) genes showed higher differences of transcription in the *B. licheniformis* K11-treated drought pepper compared toward the non-treated drought pepper. These results will lead to the development of microbial agent for organic farming by PGPR. Using the novel multiplex PCR and Real time PCR monitoring method, *B. subtilis* AH18 and *B. licheniformis* K11 could be detected until the 20 days after the inoculation in the field soil, *P. fluorescens* 2112 could be observed until 30 days. Pathogen *P. capsici* could be monitored to decrease on 20 days by treatment of 3 strains consortium until 50 days in field soil. The selected PGPR were able to increase the stress resistance of crops in drought and saline soil conditions as well as to suppress fungal disease of pepper. Treatment of PGPR can be applied to organic farming in the stressed and pathogen-vulnerable conditions.



## Contents

Summary in Korean .....	1
Summary in English .....	12
Contents in English .....	15
Contents in Korean .....	19
Chapter 1. Introduction .....	23
Section 1. Research purpose .....	23
Section 2. Necessity of research .....	24
Section 3. Content of research .....	28
Chapter 2. Present situation of international technical development .....	31
Section 1. Research trend in foreign country .....	31
Section 2. Research trend in Korea .....	32
Chapter 3. Research contents and results .....	35
Section 1. Development of microbial agent for the suppression of phytophthora blight by consortium composition of multi-functional PGPR .....	35
1. Introduction .....	35
2. Research contents and methods .....	36
가. Development of the microbial consortium by the antagonistic rhizobacteria .....	36
나. Complementary non-competitive mutualism of microbial consortium .....	37
다. Commercial mass culture condition and formulation .....	38
라. Development of liquid-type commercial agents and thermal stability test .....	39
마. Development of powder-type commercial agents and thermal stability test .....	40
바. Suppression of phytophthora blight by liquid-type commercial agents <i>in vivo</i> pot test .....	40
사. Simultaneous formulation of <i>B. subtilis</i> AH18 and <i>B. licheniformis</i> K11 .....	41
3. Research results .....	44

가. Development of the microbial consortium by the antagonistic rhizobacteria .....	44
나. Complementary non-competitive mutualism of microbial consortium .....	49
다. Commercial mass culture condition and formulation .....	51
라. Development of liquid-type commercial agents and thermal stability test .....	57
마. Development of powder-type commercial agents and thermal stability test .....	64
바. Suppression of phytophthora blight by liquid-type commercial agents <i>in vivo</i> pot test .....	72
사. Simultaneous formulation of <i>B. subtilis</i> AH18 and <i>B. licheniformis</i> K11 .....	73
아. Production and economic feasibility annalysis of commercial microbial agent product .....	81
4. Discussion .....	85

**Section 2. Application of PGPR consortium in pepper farming field .....** 86

1. Introduction .....	86
2. Research contents and methods .....	88
가. The effect of PGPR consortium on pepper growth promotion of raising seedling and suppression of phytophthora blight in greenhouse cultivation .....	88
나. The effect of PGPR consortium on pepper growth promotion of raising seedling in farming field .....	90
다. Suppression of phytophthora blight by microbial consortium .....	90
라. The effect of PGPR consortium on various crops growth promotion in greenhouse cultivation .....	91
3. Research results .....	92
가. The effect of PGPR consortium on pepper growth promotion of raising seedling and suppression of phytophthora blight in greenhouse cultivation .....	92
나. The effect of PGPR consortium on pepper growth promotion of raising seedling in farming field .....	103
다. Suppression of phytophthora blight by microbial consortium .....	108
라. The effect of PGPR consortium on various crops growth promotion in greenhouse cultivation .....	111
4. Discussion .....	123

**Section 3. Study of plant stress resistance induction and growth promotion by multi-functional PGPR** ..... 124

- 1. Introduction ..... 124
- 2. Research contents and methods ..... 126
  - 가. ACC deaminase activity of multi-functional PGPR ..... 126
  - 나. Purification and extraction of abscisic acid and cytokinin ..... 126
  - 다. Purification and extraction of jasmonic acid ..... 127
  - 라. Purification and extraction of gibberellic acid ..... 128
  - 마. Insoluble phosphate solubilization activity of multi-functional PGPR ..... 129
  - 바. Drought and high salt stress resistance induction by multi-functional PGPR ..... 129
  - 사. Differentially expressed genes and proteins identified under the drought stress in red-pepper plant ..... 130
- 3. Research results ..... 133
  - 가. ACC deaminase activity of multi-functional PGPR ..... 133
  - 나. Purification and extraction of abscisic acid and cytokinin ..... 134
  - 다. Purification and extraction of jasmonic acid ..... 135
  - 라. Purification and extraction of gibberellic acid ..... 137
  - 마. Insoluble phosphate solubilization activity of multi-functional PGPR ..... 138
  - 바. Drought and high salt stress resistance induction by multi-functional PGPR ..... 139
  - 사. Differentially expressed genes and proteins identified under the drought stress in red-pepper plant ..... 145
- 4. Discussion ..... 153

**Section 4. *In situ* monitoring of PGPR consortium for phytophthora blight suppression** ..... 155

- 1. Introduction ..... 155
- 2. Research contents and methods ..... 157
  - 가. Establishment of monitoring condition of PGPR consortium in soil ..... 157
  - 나. *In situ* monitoring of multi-functional PGPR in PGPR consortium treated field soil ..... 158
  - 다. Effects of soil microbial community by microbial agent ..... 160
  - 라. Statistical analysis ..... 160

3. Research results .....	161
가. Establishment of monitoring condition of PGPR consortium in soil .....	161
나. <i>In situ</i> monitoring of multi-functional PGPR in PGPR consortium treated field soil .....	167
다. Effects of soil microbial community by microbial agent .....	173
4. Discussion .....	178
<b>Chapter 4. Research achievement and its contribution .....</b>	<b>179</b>
<b>Chapter 5. Future application of the research .....</b>	<b>183</b>
<b>Chapter 6. Lish of international scientific information .....</b>	<b>187</b>
<b>Chapter 7. References .....</b>	<b>188</b>

# 목 차

요약문 .....	1
영문요약문 .....	12
영문목차 .....	15
목차 .....	19
제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	23
제 1 절 연구개발의 목적 .....	23
제 2 절 연구개발의 필요성 .....	24
제 3 절 연구개발의 범위 .....	28
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	31
제 1 절 국내 기술개발 현황 .....	31
제 2 절 국외 연구 현황 .....	32
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	35
제 1 절 다기능 PGPR 균주들의 컨소시엄 구성을 통한 고추역병 방제용 미생물제제 개발 .....	35
1. 서론 .....	35
2. 연구개발수행 재료 및 방법 .....	36
가. 기확보된 길항미생물들의 주요 기작별 컨소시엄 구성 .....	36
나. 컨소시엄내 길항미생물간의 상호 비경쟁적 상리공생 증식여부 조사 .....	37
다. 상업용 대량배양 조건 확립 및 제제화 .....	38
라. 액상 제제화 시제품 제작 및 저장 중 경시변화 시험 .....	39
마. 분말 제제화 시제품 제작 및 저장 중 경시변화 시험 .....	40
바. <i>In vivo</i> pot 실험을 통한 액상 시제품의 고추역병 방제능 검증 .....	40
사. <i>B. subtilis</i> AH18과 <i>B. licheniformis</i> K11의 동시제제화 .....	41
3. 연구개발수행 결과 .....	44
가. 기확보된 길항미생물들의 주요 기작별 컨소시엄 구성 .....	44
나. 컨소시엄내 길항미생물의 상호 비경쟁적 상리공생 증식여부 조사 .....	49
다. 상업용 대량배양 조건 확립 및 제제화 .....	51

라. 액상시제품 제작 및 경시변화 시험 .....	57
마. 분상시제품 제작 및 경시변화 시험 .....	64
바. <i>In vivo</i> pot 실험을 통한 액상 시제품의 고추역병 방제능 검증 .....	72
사. <i>B. subtilis</i> AH18과 <i>B. licheniformis</i> K11의 동시제제화 .....	73
아. 시제품 제작 및 단가분석을 통한 경제성 분석 .....	81
4. 고찰 .....	85

**제 2 절 다기능 PGPR 균주들의 컨소시엄의 현장적용 시험** ..... 86

1. 서론 .....	86
2. 연구개발수행 재료 및 방법 .....	88
가. 현지 시설재배 포장시험을 통한 맞춤형 컨소시엄미생물제제의 고추육묘 생육촉진능 및 고추역병 방제능 조사 .....	88
나. 현지 포장시험을 통한 맞춤형 컨소시엄미생물제제의 고추생육촉진능 조사 ..	90
다. 고추역병 발생 노지포장에서의 고추역병 방제능 검증 .....	90
라. 맞춤형 컨소시엄미생물제제의 대상작물 확대시험 .....	91
3. 연구개발수행 결과 .....	92
가. 현지 시설재배 포장시험을 통한 맞춤형 컨소시엄미생물제제의 고추육묘 생육촉진능 및 고추역병 방제능 조사 .....	92
나. 현지 포장시험을 통한 최적 길항 미생물 컨소시엄의 고추생육촉진능 조사 ·	103
다. 고추역병 발생 노지포장에서의 고추역병 방제능 검증 .....	108
라. 현지 시설재배포장시험을 통한 최적 길항미생물 컨소시엄의 기타 작물 생육촉진능 조사 .....	111
4. 고찰 .....	123

**제 3 절 다기능 PGPR균주에 의한 고추의 식물스트레스 저항능 유도 및**

**식물생장촉진물질 연구** ..... 124

1. 서론 .....	124
2. 연구개발수행 재료 및 방법 .....	126
가. 환경스트레스 저항능 유도물질 ACC deaminase 생산능 조사 .....	126
나. Abscisic acid (ABA), cytokinin의 추출 및 정제 .....	126
다. Jasmonic acid (JA)의 추출 및 정제 .....	127
라. Gibberellic acid (GA)의 추출 및 확인 .....	128
마. 인산 가용화능 조사 .....	129
바. <i>In vivo</i> pot 실험을 통한 건조 및 고염 스트레스 저항능 유도 .....	129

사. 고추의 건조 스트레스 저항능 단백질 및 전사체 발현양상 조사 .....	130
3. 연구개발수행 결과 .....	133
가. 환경스트레스 저항능 유도물질 ACC deaminase 생산능 조사 .....	133
나. ABA, zeatin의 추출 및 정제 .....	134
다. JA의 추출 및 정제 .....	135
라. GA의 추출 및 생산성 확인 .....	137
마. 인산 가용화능 조사 .....	138
바. <i>In vivo</i> pot 실험을 통한 건조 및 고염 스트레스 저항능 유도 검증 .....	139
사. 고추의 건조 스트레스 저항능 단백질 및 전사 주순에서의 발현양상 조사 ..	145
4. 고찰 .....	153
<b>제 4 절 고추역병 방제용 PGPR 컨소시엄의 <i>in situ</i> 현장 토양내 모니터링 .....</b>	<b>155</b>
1. 서론 .....	155
2. 연구개발수행 재료 및 방법 .....	157
가. 토양내 컨소시엄 구성 길항미생물들의 모니터링 조건 확립 .....	157
나. <i>In situ</i> 경작지 현장 토양내 시용된 컨소시엄 구성 길항미생물 모니터링 ..	158
다. 미생물제제가 토양 미생물상에 미치는 영향 .....	160
라. 통계분석 .....	160
3. 연구개발수행 결과 .....	161
가. 토양내 컨소시엄 길항미생물들의 모니터링 조건 확립 .....	161
나. <i>In situ</i> 현장 토양내 컨소시엄 구성 길항미생물들의 모니터링 .....	167
다. 미생물제제가 토양미생물상에 미치는 영향 .....	173
4. 고찰 .....	178
<b>제 4 장    목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....</b>	<b>179</b>
<b>제 5 장    연구개발 성과 및 성과활용계획 .....</b>	<b>183</b>
<b>제 6 장    연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....</b>	<b>187</b>
<b>제 7 장    참고문헌 .....</b>	<b>188</b>



# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 목적

근권미생물 중 직/간접으로 식물의 성장 및 병해 방지에 긍정적인 영향을 주는 미생물을 길항미생물이라 한다. 이들의 길항능력은 미생물이 갖는 능력에 따라 서식지 점령, 식물의 저항력 유도, 그리고/또는 항생능력에 의해 식물병원균의 생장을 억제하게 되는 길항효과라 할 수 있다.

식물병원균에 대한 길항능력을 보이는 근권미생물을 이용하여 친환경적으로 작물을 재배하고자 하는 생물학적 방제 및 유기농업의 움직임에 힘입어 최근 20년간 많은 길항미생물이 선별/선발 되었다. 그러나 선발된 미생물은 극히 일부만이 생물농약으로 상업화에 성공하였고, 그나마도 현장재현성이 떨어져 방제효과의 일관성이 없다는 현장애로점이 있는 실정이다.

이것은 길항미생물을 개발할 당시 한 가지 길항 방법에 의한 방제능력을 검정하여 실험실 내에서의 환경에서만 효과를 검증하였기 때문에 다양한 실제 경작지 환경 속에서 요구되는, 길항력의 재현성이 확보된 방제능력을 발휘하지 못하였기 때문으로 분석된다. 즉, 방제 능력이 한정적이기 때문에 다양한 조건의 환경 속에서는 그 한 가지 기작만으로는 다양한 방제 효과를 나타내기 힘들었던 것으로 사료된다. 또한, 실제 농가에서는 한 작물일지라도 다양하게 오는 병에 대해 골고루 방제되는 다기능 약제를 원하고 있는데, 특히 화학농약의 사용을 줄일 수 있는 친환경 농자재인 경우에는 한 가지 약제로 다양하게 방제될 수 있는 특정작물 전용 농자재를 갈망하고 있다.

그러나, 시험실 연구 단계에서 길항미생물의 방제 효과를 검정할 때는 한 가지 병원균에 대한 방제효과를 보여주고 있기 때문에 작물단위로 농사를 짓는 현행 농업현장에서 광범위하게 사용되고 있지 못하고 있다. 또한 방제 효과도 병원균이 없는 대조구에 비해 얼마나 좋은지를 검정하기 때문에 현재 사용하고 있는 화학농약에 비해 얼마나 더 방제효과가 있는지에 대한 객관적인 판단 기준과 재현성의 효능검증이 없어 실제 농업현장에서 신뢰를 얻지 못하는 현장 애로점이 있다고 판단된다. 또, 현재 연구되거나 상품화 되고 있는 미생물제제는 하나 또는 두 개의 미생물 균주를 이용한 것이 대부분이고 3균주 이상 복합적인 미생물균주를 사용한 제제라 할지라도 이들 사용 미생물균주간의 공생, 경쟁 등의 상호관계에 대한 연구가 전무한 실정 이어서 정확하고 지속적인 효능을 검증하는 것이 사실상 힘들다. 이 모든 사항은 생물농약으로 사용된 미생물제제가 광범위한 현장에의 적용 및 재현능을 방해하는 요소와 원인으로 지적될 수 있다.

따라서 본 연구는, ①첫 째, 현재까지 본 연구진에 의해 개발된 항생능력과 식물생장촉진능이 뛰어난 10여종의 길항미생물들 중에서 항생능력, 토양 우점능력 및 식물저항성 등의 기작별 상호 보완형(기능상 시너지형) 길항미생물 균주의 맞춤형 컨소시엄을 개발하고자 한다. ②둘 째, 생물방제능이 탁월한 미생물균주들간의 상호 비경쟁적 상리공생관계 검증으로 유효미생물 균주의 맞춤형 컨소시엄 구성에 학문적인 근거를 제시하고 우수한 미생물균주의 컨소시엄 구성이 가능하도록 하며, 이미 개발되었거나 개발계획에 있는 다양한 미생물제제들의 컨소시엄

구성을 통해 이들의 생물방제능을 향상시키고 맞춤형 최적컨소시엄의 구성에 토대를 마련할 것이다. ③셋 째, 유효 길항미생물 균주 컨소시엄의 처리방법, 제제화 조성 및 제조법 확립을 통하여 농가 포장에서의 현장 재현성 향상을 위한 전달체계를 구명하며 지역 특유의 토양, 기후, 재배법 또는 병징의 특성에 맞는 활성지속형의 맞춤형 친환경 미생물제제를 개발하고 여러 지역의 넓고 다양한 특성에 효과적으로 방제능을 발휘할 수 있는 친환경 미생물농약을 개발하고자 한다. ④넷 째, 우리나라 제2의 작물인 고추를 대상으로 하여 개발된 미생물제제가 고추에 가장 크게 문제시 되고 있는 역병에 얼마나 현장방제 효과가 좋은지도 검정하여 작물단위로 처리할 수 있는 맞춤형 친환경 고추병 생물방제제를 상업화하고자 한다. ⑤마지막으로 이 모든 결과는 현장 적용성 향상 및 재현성을 확인하는 농가 포장실험을 거치고 (경상북도 농업기술원 영양 고추시험장) 일반 농가현장에서의 확인 시험을 하여 실제 소비자의 만족도도 조사할 계획에 있다. 본 연구는 이미 수년간의 연구를 통하여 미생물방제제로의 여러 가지 길항능력이 확인된 10 여종의 길항미생물을 생물농약화하여 실제 농가포장에 적용, 재현성을 확보하는 실험을 함으로써 새로운 기능 보완형 길항미생물을 활용한 맞춤형 친환경 미생물농약의 대규모 상업적 이용단계까지 진전되는데 필요한 필수적인 연구를 마무리하는 성격을 지니기도 한다.

## 제 2 절 연구개발의 필요성

인류가 농업을 시작한 이래 20세기 후반의 약 50년 동안은 급격한 화학비료와 농약 의존형 농업 그리고 농업기계화에 의한 대형 기업농업이 관행화되면서 종자혁명과 녹색혁명이 일어났다. 하지만, 화학합성농약 및 화학비료로 대표되는 현행 관행농법은 자연생태계의 파괴와 질적 저하를 초래함으로써 녹색혁명이 흑색혁명으로 변질되었다. 따라서 자연파괴적이고 자연고갈적인 현재의 농업시스템은 지구촌과 인류의 삶의 질을 오히려 떨어뜨리게 되었고, 이에 따라 21세기 이후 및 미래의 농업은 친환경농업이 절실히 요구되고 있다. 지속가능한 친환경 유기농법은 자연과의 공생공영이라는 면에서는 옛날농법과 유사하지만 생산성 증대를 도모하는 현대과학기술과의 접목이라는 면에서 그 차이점이 뚜렷하다고 볼 수 있다.

흙, 물, 공기는 물론 식물의 뿌리와 엽면, 인체와 가축의 장내까지 다종다양하게 미생물이 존재하고 있지만 미생물의 작용성에 대하여 그동안 소홀히 했던 것이 사실이다. 지금까지 여러 가지 문제들이 미생물의 응용으로 해결된 산업적인 예를 살펴보더라도 무한한 가능성을 지니고 있다고 해도 과언이 아니다.

우리나라 작물의 재배포장 및 시설재배의 토양은 농약과 화학비료의 다년간에 걸친 과·남용으로 토양의 물리성, 화학성 및 생물성의 균형이 깨어져 있어 작물의 품질저하와 수확량 감소뿐만 아니라, 토양 심경소독을 위한 노동시간 증대 등으로 막대한 경제적 손실이 초래되고 있다. 더욱이 우리나라의 농산물시장은 국제적으로 개방되어가고 있고, 전세계적으로 농약과 화학비료에 의존하는 농법에서 친환경 미생물 농법으로 전환되어가고 있는 시기라 할 수 있다. 우리나라도 농약과 화학비료에 의존하는 농법을 극복하기 위해서 농약과 화학비료 의존형 농법을 지양하고 미생물 농법 기술을 정립하여 환경문제를 해결하고, 인류의 건강을 증진시키며,

고품질 농산물의 다수확 및 농가소득증대가 절실히 요구되고 있는 실정이다[정 등, 2007].

한편, 우리나라의 대표적인 경제 원예 작물인 고추는 총생산액이 2008년 기준으로 약 2조 3천억 원이며, 재배면적은 약 60,000 ha를 차지하는 채소 중에서 가장 경제성이 있는 작물로 우리나라에서 벼, 돼지, 소고기 다음으로 경제적으로 중요한 위치를 차지하는 농산물이다[Liu 등, 1995]. 특히 우리나라에서는 풋고추와 건고추의 두 가지 형태로 국민들의 먹거리에 이용되고 있으며, 다양한 형태로 가공 및 조리되어 거의 대부분의 음식에 사용되고 있다(Table 1).

**Table 1. The domestic production of red pepper in Korea.**

	Cultural area (ha)	Total production (ton)	Production amount (Billion \$)
Rice	979,717	4,768,368	8.53
<b>Pepper (Dried + Fresh)</b>	<b>60,842 (54,876+5,766)</b>	<b>414,135 (160,397+253,738)</b>	<b>2.30 (1.11+1.19)</b>
Chinese cabbage	37,203	2,325,330	0.63
Tomato	6,749	438,991	0.62
Garlic	31,766	374,980	0.53
Soybean	117,552	198,752	0.52
Radish	27,130	1,277,483	0.36
Korean melon	7,077	199,752	0.33
Pumpkin or squash	9,327	339,097	0.27
Barley	60,849	200,485	0.25

Korea National Statistical Office, 2008

고추는 가지과에 속하는 작물로 열대지방에서는 다년생, 온대지방에서는 일년생이다. 고추의 주요 재배종은 현재 상업용으로 가장 많이 재배되는 캡시쿰 안눔(*Capsicum annum*), 페루와 볼리비아에서 재배되는 캡시쿰 바카툼(*C. baccatum*), 멕시코 하바네로와 자메이카 스카치보닛과 같은 가장 매운 고추가 속하는 캡시쿰 치넨서(*C. chinense*), 안데스 로코토를 원형으로 하는 캡시쿰 푸베센스(*C. pubescens*), 매운 타바스코로 대표되는 캡시쿰 프루테센스(*C. frusscens*) 등이 있다[경상북도농업기술원 영양고추시험장, 2006]. 고추의 영명인 red pepper는 콜럼버스가 1493년 고추를 스페인으로부터 가져와 후추와 구분하여 명명하였다[경상북도농업기술원 영양고추시험장, 2006]. 또, 우리나라에서는 임진왜란이후에 담배, 호박과 함께 일본으로부터 도입되었다고 한다(Table 2).

우리나라에서 제2의 경제 원예작물인 고추는 많은 병해로 피해를 입고 있으며, 주요한 고추 병해로는 진균병, 세균병, 바이러스병을 포함하여 모두 30여종이 알려져 있다. 역병, 탄저병 등 일부 병해는 고추 재배에 큰 피해를 가져오고 있으며, 연작 장애의 원인으로도 작용한다[경상북도농업기술원 영양고추시험장, 2006]. 특히 고추역병은 매년 고추 연작지에서 병원균 밀도의 증가와 땅심의 감소로 고추 수확에 많은 피해를 주는 병으로 전 생육기간에 걸쳐 발생하고 뿌리, 줄기, 잎, 과실 모두에 병을 일으킨다[경상북도농업기술원 영양고추시험장, 2006]. 고추의 병해 중 가장 피해가 큰 병해인 역병은 일단 발병하면 방제가 어려우며, 노지포장에서는 정식 직후부터 발생하기 시작하여 장마 이후에 급격히 증가하여 9월 중순까지 발생하고 우리나라 고추 생산의 약 20%가 역병에 의해 피해를 받는다[경상북도농업기술원 영양고추시험장, 2006].

본 연구에서는 우리나라 대표적인 경제작물인 고추에 가장 큰 피해를 입히는 고추역병을 방제하기 위하여 고추 경작지의 토착미생물을 이용하고자 하였고, 많은 근권 토착미생물중 식물의 성장을 촉진시키는 근권세균으로 알려진 Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR)의 길항기작을 이용한 미생물방제제를 개발하고자 하였다.

Table 1. Classification and characterization of *Capsicum* sp.

Species	Characteristics	Plantations
<i>Capsicum annuum</i> var. <i>annuum</i> L.	-꽃 : 흰색 -꽃자루 : 마디당 1개, 방향은 하향이나 상향 품종도 있음 -종자 : 매끈하며 노란색	우리나라 등 아시아
<i>Capsicum vaccatum</i> var. <i>pendulum</i> Wild.	-꽃 : 꽃잎에 황색 또는 연녹색 점무늬를 가진 흰색 -꽃자루 : 마디당 1-2개, 방향은 상향 또는 하향 -종자 : 매끈하고 노란색	페루와 볼리비아
<i>Capsicum chinense</i> Jacq.	-꽃 : 흰색 -꽃자루 : 마디당 3-5개, 방향은 하향 -종자 : 노란색이고 가장자리에 주름이 있음	멕시코 자메이카 (가장 매운고추)
<i>Capsicum frutescens</i> L.	-꽃 : 광택이 있으며 흰색 또는 연녹색 -꽃자루 : 길고 가늘며, 마디당 2개, 방향은 상향 -종자 : 주름이 없고 노란색	안데스
<i>Capsicum pubescens</i> Ruiz and Pav.	-꽃 : 기부에 흰색을 가진 보라색 -꽃자루 : 마디당 1-2개, 방향은 상향 또는 하향 -종자 : 검정색, 주름이 있고 휘어져있음	매운 타바스코

식물의 근권에 서식하는 미생물 중에는 식물의 생육을 촉진하는 근권미생물(PGPR)이 존재하고[Kloepper 등, 2004; Belimov 등, 2001; Hopkins 등, 1999; Kloepper 등, 1989], 토양으로부터 auxin 등의 식물생장촉진 호르몬의 생성에 관계하는 많은 근권미생물들이 분리되고 있으며, 이들의 생화학적 연구가 상당히 진척되고 있다. 또, 식물병원균을 저해하는 물질을 생산하는 근권미생물에 대한 생물방제 연구도 많이 보고되고 있다[우, 2007; 우 등, 2007a; 우 등, 2007b; 우 등, 2006; 정 등, 2006a; 정 등, 2006b; 이 등, 2003; 이 등, 2001; 이 등, 2000; 이 등, 1999; 이 등, 1999; Georg 등, 1998]. 그러나 현재까지는 식물생장촉진과 식물병원균에 대한 저해에 관한 개별적인 연구는 많이 수행되어졌으나 이러한 기능들을 다양하게 가진 다기능 근권미생물에 대한 연구와 이들 근권미생물들 간의 병용 및 상호작용에 관한 연구는 보고되어진 사례가 거의 없다[Georg 등, 1998].

따라서 본 연구에서는 여기에 착안하여 식물의 생장을 촉진함과 동시에 식물병원균을 저해하는 물질 등을 생산하는 PGPR 균주들의 다양한 PGPR 기능들에 대하여 연구하고자 하였다. 또, 기 선발된 다기능 PGPR 균주들을 우리나라 주요 경제작물인 고추와 여러 가지 식물에 적용하여 식물생장촉진 작용과 더불어 식물병원균을 저해하는 생물방제 및 식물이 노출되는 건조, 고염 등의 스트레스에 대한 저항성 유도 기능 등을 조사하고, PGPR 균주들의 다기능을 포함하는 컨소시엄 형태의 미생물제제 개발을 통해 실제 고추 및 경제 원예작물 경작지에 적용함으로써 우리나라 친환경 농업의 경쟁력을 높일 수 있는 토대를 마련하고자 하였다 (Fig. 1).

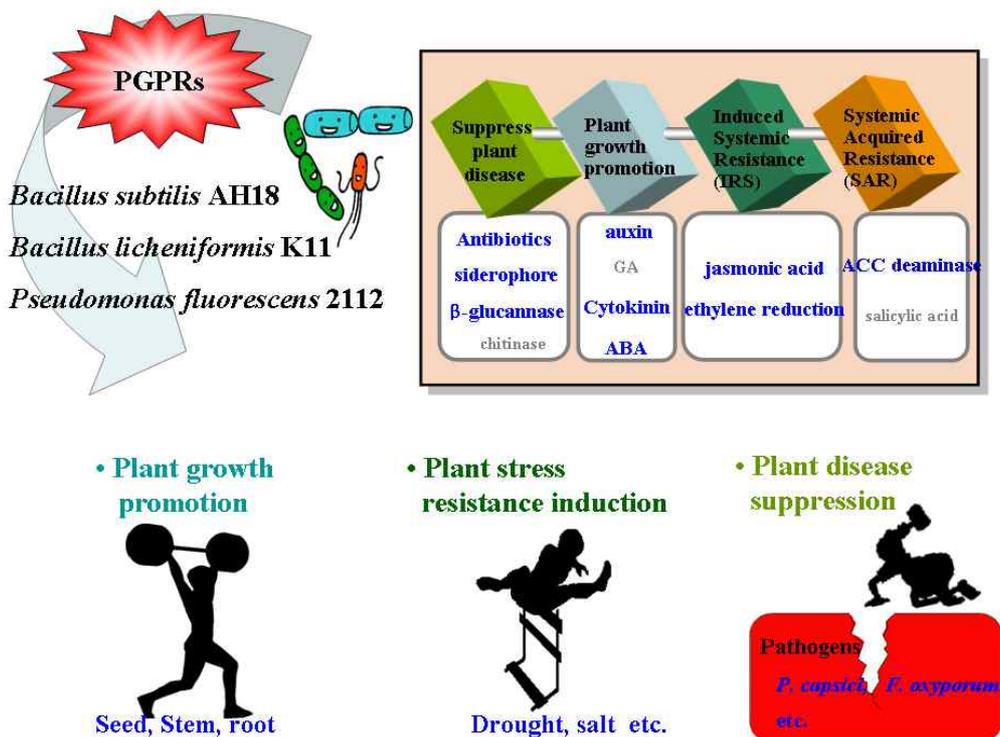


Fig. 1. PGPR consortium for red-pepper farming.

### 제 3 절 연구개발의 범위

본 연구진에 의해 이미 미생물농약의 효능이 입증되어 기 확보된 길항미생물들을 이용하여 이들 길항미생물들의 항생능력, 서식지 점령, 그리고 저항유도능의 다양한 방제기작들을 상호 보완하고 시너지 기능효과를 발휘하는 미생물균주의 최적 컨소시엄을 구성하고, 이들 길항미생물들 간의 상호 비경쟁적 상리공생관계를 확인, 조정함으로써 전통화학농약을 대체할 수 있을 정도의 우수한 효과를 가진 맞춤형 길항미생물들의 맞춤형 컨소시엄을 개발하고자 한다. 또, 개발된 미생물제제를 실내 실험, 노지 마이크로 포장실험, 그리고 실제 농가 실험을 통해 지역에 발생하는 고추역병을 보다 효과적으로 방제할 수 있는 미생물제제의 전달체계 확립하여 실제 현장적용능 및 재현성이 우수한 활성지속형의 맞춤형 생물방제제를 개발하고, 이들 개발된 미생물농약의 실제 고추농가에서의 노지포장시험을 통해 현장적용시의 사용방법개선과 현지농가 경작지내의 미생물농약 재현성 향상의 애로타개 기술을 개발하고자 한다.

구분	세부과제별	연구개발의 목표	연구개발의 범위
1차년도	친환경 미생물방제제의 맞춤형 컨소시엄 개발	선발균주들의 항생능력, 토양 우점능력 및 식물저항성의 기작별 상호 보완형 미생물 균주의 컨소시엄 구성	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 기확보된 10여종의 길항미생물중 주요 기작별 컨소시엄 구성               <ul style="list-style-type: none"> <li>가. 항생능력, siderophore 및 cellulase 생산능, auxin 생산능, 인산가용능 등의 각 기작별 상호보완 균주 컨소시엄</li> <li>나. 컨소시엄 균주의 고추역병 방제능 및 생장촉진능 비교 (단독처리 균주와 비교)</li> </ul> </li> <li>○ 기확보된 길항미생물의 상호 비경쟁적 상리공생 증식여부 조사               <ul style="list-style-type: none"> <li>가. 컨소시엄 균주들의 혼합배양을 통한 개별 균주의 증식 및 방제능 비교 (생균수 측정, 대치배양)</li> <li>나. 컨소시엄 균주들 중 경쟁관계 배제</li> <li>다. 상리공생 균주들의 컨소시엄 조건 조사</li> </ul> </li> </ul>
	맞춤형 친환경 미생물방제제의 현장적용	고추역병에 대한 농가포장 실험조건 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 길항미생물에 의한 고추역병 억제효과 검증 및 농가현장 발현조건 규명               <ul style="list-style-type: none"> <li>가. 시험방법                   <ul style="list-style-type: none"> <li>- 품종 : 고추(고은)</li> <li>- 재배방법 : 포트 재배</li> </ul> </li> <li>나. 처리내용 : ①육묘상 처리, ②정식 후 4회 관주, ③기비용 퇴비 혼용 처리, ④ 1+2+3처리 조합, 대조구(화학적 방제, 화학약제+미생물제제 혼용 처리, 무방제)</li> <li>다. 반복 : 완전임의비치 5반복</li> <li>라. 조사방법 : 농촌진흥청 생물농약의 등록 시험방법 및 등록신청서류 검토기준에 준함</li> <li>마. 실제농가 적용방법 및 재현성 검증</li> </ul> </li> </ul>

구분	세부과제별	연구개발의 목표	연구개발의 범위
2차년도	친환경 미생물방제제 의 맞춤형 컨소시엄 개발	컨소시엄 길항미생물의 서식지 점령, 저항유도능 검증 및 화학농약과의 비교분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 컨소시엄 길항미생물들의 서식지 점령 및 저항유도능 검정               <ul style="list-style-type: none"> <li>가. 시험방법                   <ul style="list-style-type: none"> <li>- 품종 : 고추(대장부)</li> <li>- 근권미생물 접종 : <math>10^3</math>-<math>10^6</math> cfu/seed</li> <li>- 재배방법 : 포트 재배</li> </ul> </li> <li>나. 반복 : 완전임의배치 2 반복 (서식지 점령), 완전임의배치 4 반복 (저항유도능)</li> <li>다. 조사방법 : 근권당 살아있는 미생물의 수를 dilution plating하여 구한다</li> </ul> </li> <li>○ 컨소시엄 길항미생물들의 고추역병 방제효과를 화학농약과 비교 분석               <ul style="list-style-type: none"> <li>가. 시험방법                   <ul style="list-style-type: none"> <li>- 품종 : 고추(대장부)</li> <li>- 근권 미생물접종 : <math>10^3</math>-<math>10^6</math> cfu/seed</li> <li>- 재배방법 : 포트 재배</li> <li>- 목표치 : 화학농약 처리구와 동등 또는 그 이상의 효과</li> </ul> </li> <li>나. 반복 : 완전임의배치 8 반복</li> <li>다. 조사방법 : 인위적 병원균 접종 후 미생물에 의한 방제효과율 검정</li> <li>라. TDC-PCR법 및 mutiplex-PCR에 의한 현장내 길항미생물의 모니터링</li> </ul> </li> </ul>
	맞춤형 친환경 미생물방제제 의 현장적용	고추역병에 대한 미생물제제의 농가포장에서의 현장 재현성을 향상시키는 전달체계 등 처리방법 구명	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 길항미생물 처리 방법별 고추역병 억제효과 의 농가포장 검증               <ul style="list-style-type: none"> <li>가. 시험방법                   <ul style="list-style-type: none"> <li>- 품종 : 고추(고은)</li> <li>- 재배방법 : 농가포장 2개소</li> </ul> </li> <li>나. 처리내용 : 미생물 제제 처리(포트처리, 정식전 퇴비 동반 처리, 4회 관주 처리, 복합 처리), 화학적 방제, 대조구(역병 무방제)</li> <li>다. 반복 : 난괴법 3반복</li> <li>라. 조사방법 : 농촌진흥청 생물농약의 등록 시험방법 및 등록신청서류 검토기준에 준함</li> <li>마. 농가 적용방법확립 및 재현성 검증</li> </ul> </li> </ul>

구분	세부과제별	연구개발의 목표	연구개발의 내용
3차년도	친환경 미생물방제제의 맞춤형 컨소시엄 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 친환경 고추재배 농가용 생물농약을 위한 최적 컨소시엄구성 및 농가포장 시험결과에 따른 조정</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 선발된 미생물의 컨소시엄 구성여부와 구성조성 확립 및 경쟁관계 규명</li> <li>○ 농가현장 토양내 시용된 길항미생물의 유전학적 생태학적 모니터링 실험</li> </ul>
	맞춤형 친환경 미생물방제제의 현장적용	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 농가포장실험에 의한 고추역병 억제용 미생물농약의 효과확립 및 재배지 적용기술 개발</li> <li>○ 선발된 제제의 대상작물 확대적용 시험</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 생물방제용 미생물농약의 고추역병 억제효과 경작토양 현장 검증 및 상용화 기술확립</li> <li>가. 시험방법 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 품종 : 고추(대장부)</li> <li>- 처리 : 화학적 방제 시기 4회 처리</li> <li>- 재배방법 : 농가재배 5곳 (경북도내)</li> </ul> </li> <li>나. 처리내용 : 1, 2년차에서 확립된 방법의 농가적용</li> <li>다. 반복 : 단구제</li> <li>라. 조사방법 : 농촌진흥청 생물농약의 등록 시험방법 및 등록신청서류 검토기준에 준함</li> <li>마. 생물농약 등록조건 확인 시험</li> <li>○ 선발제제화된 컨소시엄 미생물의 인삼 등의 토양병원균 억제확립 및 적용기술 개발</li> <li>가. 대상작목 : 고추, 인삼, 수박 등</li> <li>나. 처리방법 : 농가포장 3곳</li> <li>다. 반복 : 난괴법 3반복</li> </ul>

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 국내 기술개발 현황

1. 국내의 농업용 미생물제제는 그 동안 각 대학과 연구소 및 농자재 회사에서 활성 균주의 분리, 생태 및 배양조건, *in vitro*에서의 활성 검증 등을 통해 실제 대량생산이나 제제화 등에 의한 산업화가 이루어지고 있다. 초기에는 농촌진흥청의 농업과학기술원과 대학교를 중심으로 연구가 진행되었으나, 최근에는 그린바이오텍(주), (주)휴살림 등 여러 벤처기업과 동부한농화학(주), (주)경농 등 기존의 합성화학농약 회사들도 이 분야 연구와 실용화에 참여하고 있으며 한국생명공학연구원과 한국화학연구원, 농촌진흥청 등의 연구기관에서도 다양한 미생물제제의 실용화에 실적을 거두고 있다.

2. 하지만, 현재 국내의 제제화 기술이나 상품화 수는 외국에 비해 낮은 편이고, 국내 생물농약은 비미생물성 생물농약을 포함하여 2008년 기준으로 전체농약 중 1%에도 미치지 않게 31품목만이 등록되어 있으며, 미생물비료를 포함할 경우 수입품목과 합산하여도 231 품목에 그치고 있는 실정이다. 또한, 기존 미생물제제들이 단일균주이거나 목표불분명한 제품들이 많아 실제 농가에서의 효과는 재현성이 극히 불량하여 사용한 농가의 원성을 들을 경우가 많다.

표 1. 국내에서 유통되고 있는 친환경농자재 분류

등록형태		제형		희석배수		용량(ml 또는 g)	
구분	비율 (%)	구분	비율 (%)	구분	비율 (%)	구분	비율 (%)
미량요소비료	20.4	액제	67.4	≤500	6.8	250	3.2
미량요소복합비료	15.8	입제	10.4	800	11.4	500	31.2
4종 복합비료	10.4	분제	11.8	1,000	18.5	1,000	20.1
<b>미생물제</b>	<b>26.5</b>	기타	10.4	2,000≤	2.8	≤1,000	24.7
기타 (무등록, 부산물 등)	26.9			기타	60.5	기타	20.8

- 총 조사 제품수: 279품목 (2005년 기준)

3. 국내에서 생산 유통되는 친환경농자재 제품 수는 공식적인 통계는 아니지만, 식물영양제 500여종, 미생물제 200여종, 작물보호제 150여종 등 총 1,200여종 이상에 이르며, 생산업체수는 600-800여개소에 연간 매출액이 1,500 - 2,000 억원에 이르고 있는 것으로 추정되고 있으며, 미생물제제의 경우 전체 친환경농자재 중 가장 높은 비율인 26.5%를 차지하고 있다(농촌진흥청 농업과학기술원, 2005).

표 2. 국내미생물제제등록현황\*

(단위 : 품목수)

년도	2004	2005	2006	2007	2008
생산	113	123	138	179	193
수입	22	24	25	34	37
계	135	147	163	213	231

\* 최근 5년간 년도별 미생물비료 등록현황(누계), 한국환경정보연구센터 국정감사 농림수산식품위원회 2009.

4. 그리고, 국내미생물제제의 활용 용도에 있어서도 작물 생육촉진에 사용되는 것이 50%이고, 병해방제를 위한 용도로는 17%에 그치고 있다. 또한, 조사품목의 40%가 복수의 효과로 조사되었으므로 실제 병해경감 전용 미생물제제는 약 10%를 상회하는 수준으로 생각된다.

5. 한편, 이들 제품들은 대부분 비료나 농약으로 등록 후 판매되고 있으나 일부 미등록 제품은 제조자, 성분, 규격 등을 표시하지 않고 임의로 유통되고 있는 실정이다. 일부 미등록 불량 자재는 안정성이나 효과에 대한 검증 없이 유통되고 있으며 과대광고로 농민의 부담과 혼란을 가중시키고 민원발생의 소지가 되기도 한다(농촌진흥청 농업과학기술원, 2005).

## 제 2 절 국외 연구 현황

1. 독일은 유럽국가 중에서 가장 먼저 환경농업의 중요성을 인식하고 추진해온 국가이다. 1924년 루돌프 스타이너 박사가 제창한 역동유기농법(Bio-dynamic farming)에 근거하여 유기농산물인증단체 'Demeter'가 공식적으로 설립되면서 1970년부터 본격적으로 시작되었다. 1989년 저투입 조방적 농업정책의 결과 2002년 현재 유기농가는 경작면적의 4.1%정도이며, 단위면적당 수량은 일반농가에 비해 20~50% 적게 나타나지만 가격은 2배정도 비싸다. 그 유기농의 주된 농자재는 미생물제제이다.

2. 스위스 유기농업은 독일과 비슷한 배경을 갖고 있다. 1974년 유기농업연구소 FIBL이 설립되면서 유기농업에 관한 연구와 기술개발이 본격 추진되었다. 정부차원에서 1992년 농업법 개정 이후 1993년부터 친환경농업에 대해 직접지불제를 도입하여 현재 순수 유기농가는 전체면적의 10%를 차지하고 있다. 스위스 유기농산물 유통은 주로 소비자협동조합에서 주도하고 있고, 매출액은 1993년 10년간 10배이상 증가하는 등 최근 급속한 성장세를 보이고 있다.

3. 캐나다는 연중 기온 및 습도가 낮고, 일교차가 커서 병충해 발생 가능성이 매우 낮아 친환경농업이 용이한 나라이다. 1970년부터 유기농업을 시작하여 현재 세계5대 유기농업국가로 발전하고 있다. 1999년 유기농산물 판매수입액은 전체 농가 판매 수익 금액의 1.5%정도로 순수

유기재배 농가는 경지면적의 1.3%정도이다. 그러나 우리나라의 친환경 농산물의 인증 기준으로 환산하면 친환경 비중은 전체농산물 생산의 30%정도이다. 친환경농업은 대부분 3ha내의 소규모 가족 농으로 주도하고 있다. 대부분의 캐나다 유기농산물은 미국으로 수출하고 있으며, 일부는 일본과 유럽으로 수출하고 있다. 특히 최근에는 한국인의 취향에 맞는 후지사과와 배 그리고 체리를 개발 재배하고 있다. 브리티시 콜롬비아 주는 1989년 유기농작물에 대한 성분 등의 규정을 제정한 이후 유기농협회 중심으로 일반농가의 유기농업 전환을 적극 권장하고 주로 품질향상을 위한 기술, 자재보급과 시장유통기능 활성화 측면에서 적극지원하고 있다.

4. 미국은 1987년까지 일부 주정부 및 민간업체에서 각각의 자체적인 기준으로 유기식품 인증 제도를 운영해 왔으며, 1990년 유기농산물생산법의 제정으로 하위규정으로 유기식품 생산기준인 국가유기식품체정을 추진해왔다. 2000년 유기식품의 생산, 처리 및 가공 등에 대한 국가기준을 확정하였으며, 2002년부터 시행하고 있다. 2001년 유기농업의 경지면적은 0.23%에 불과하나 USDA에서는 2010년까지 그 비중을 10%로 높일 계획을 공포하였다. 미국은 2000년 80억불의 유기농산물 판매고를 기록하였고, 2001년 100억불, 2002년 120억불로 예상되는 연평균 30% 가까이 성장하고 있다. 미국은 유기농산물 만이 아니라 식물을 원료로 한 모든 가공품이 유기농산물을 원료로 개발되어 있다. 유기식품 명칭도 유기농축산물의 함유비율이 70%이상이어야 하며, 70~50%의 경우 유기적 식품, 50%이하일 경우 유기농 원료 함유식품 등으로 그 명칭을 달리 규정하고 있다.

5. 일본은 1961년 농업기본법제정 이후 농업생산성 향상과 농업근대화 계획을 추진하면서 농약과 화학비료의 사용 증대에 따른 피해가 발생하게 되었다. 이 과정에서 식품의 안정성에 대한 우려의 목소리가 높아 졌으며, 이에 따라 무농약, 무화학비료, 저 농약 재배운동이 일어나기 시작하였다. 그 이후 1971년 민간소비자단체와 유기농가들이 주축이 되어 일본유기농업연구회가 발족하면서 유기농업이란 용어가 처음 사용되었다. 1980년대 들어 유기농산물의 수요가 불특정 다수로 확대되었고, 이 과정에서 유기농산물 유통형태도 생소제휴(生消提携) 중심에서 점차 생협을 통한 직거래, 유통업체를 통한 판매, 시장 출하 등의 형태로 다변화되기 시작했다. 이때까지만 해도 국가차원의 특별한 친환경농업정책은 없었다. 일본에서 환경보존형농업이 농정의 한부분을 차지한 것은 1992년 신농업정책이 마련된 이후라 볼 수 있다. 1994년 환경보존형농업 추진본부가 환경보존형 농업추진의 기본원칙을 제정하면서 환경부하경감대책, 새로운 농법의 추진 및 지역 리사이클 촉진 등의 시책이 국가 및 현, 시정촌(市町村) 등 각 단계에서 다양하게 추진되었으나 농정의 중요비중을 차지하지 못했다. 일본은 아직도 민간 중심의 유기농업운동이 주축되고 있어 유기농가는 3,993호에 불과하고 전체 경지면적의 0.15%를 차지하고 있을 뿐이다. 2000년 10월 1일부터 JAS법에 의해 유기농산물 인증제도를 시행하고 있다. 등록유기인증기관은 2003년 2월 현재 65개 기관이며, 인증기준은 Codex 가이드라인과 거의 같다. 일본의 유기농산물 유통경로는 소비자 직거래형, 생협 제휴형, 전문유통기관 제휴형, 백화점, 수퍼제휴형, 농협출하형, 노천시장출하형 등으로 구분된다. 일본 또한 EM 등 미생물제제에 대한 유기농업이 주축이다.

6. 중국은 유기식품과 녹색식품 그리고 무공해식품으로 인증을 구분하여 시행하고 있다. 1994년 국가환경보호국에 유기식품개발센터를 설립하여 '95년 국가환경보호총국에서 유기식품표시

관리장정을 제정하였으며, 2001년 8월 9일부터 유기식품인증 관리방법을 반포하여 시행하기 시작했다. 녹색식품 표시제도는 1990년 5월 녹색식품개발계획에 따라 중국녹색식품관리센터를 설립운영하고 있으며, 일본, 미국, 유럽 등으로 수출되는 등 녹색식품에 대한 사회적인 인식이 높아지고 있다. 실제 중국에서는 유기차를 제외하고 국제기준의 순수 유기농산물의 생산이 아주 미비하여 통계상으로 2001년 현재 유기재배 농가는 2,910호에 불과하고 전체 경지면적의 0.06%정도이다.

표 3. 국내외 연구개발 현황

연구수행 기관		연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
한국	학교법인 고려중앙학원	식물병원 진균에 항균활성을 가지는 균주와 균주가 생성하는 항생물질 제조	특 허
	(주) 동부한농화학	병원성 진균에 대한 항진균 활성을 가지는 미생물, 이를 함유하는 항진균성 미생물 농약제 및 그의 제조방법	특 허
	(주) 바이오셀드	신규한 브레비바실러스속 미생물 균주를 이용한 퇴비부숙 효과와 항진균 활성이 있는 미생물 제제 및 그 제조방법	특 허
	영남대학교	식물병원진균에 항진균활성을 가지는 <i>Bacillus licheniformis</i> 균주의 분리.동정 항진균 물질의 생산조건 규명	특 허
	영남대학교	항진균 활성을 가지는 신규의 미생물 바실러스 섭틸리스 이비엠 3과 이를 함유하는 미생물 농약	특 허
	농업과학기술원	식물병 방제활성을 가지는 길항미생물	기술이전
중국	South China Agricultural University	<i>Colletrichum gloesporioides</i> 를 억제하는 2 사상균 선발	학회지 발표
	Fujian Agricultural and Forestry University	탄저병균을 억제하는 단백질을 세균으로부터 분리	학회지 발표
	Sichuan Academy of agricultural Sciences	<i>Colletrichum gloesporioides</i> 억제하는 <i>Bacillus</i> spp. 선발	학회지 발표
일본	University of the Ryukyus	망고의 탄저병 억제하는 <i>Penicillium</i> 선발	학회지 발표
멕시코	대학	<i>Colletrichum gloesporioides</i> 억제하는 미생물 선발	학회지 발표
인도	대학	식물에서 <i>Colletrichum gloesporioides</i> 억제하는 물질 추출	학회지 발표
미국	농무성	의약품 물질의 탄저병 방제 이용	상업화 시도중

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 다기능 PGPR 균주들의 컨소시엄 구성을 통한 고추역병 방제용 미생물제제 개발

#### 1. 서론

화학농약 대신에 미생물을 생물학적으로 이용하는 생물방제제를 농업현장과 연구에서 적극적으로 논의되어 오고 있다[Backer 등,1983]. 그러나 실제 농업에서의 도입에 가장 큰 장애물이 되고 있는 것은 생물학적 방제제가 화학 농약에 비해 효과와 재현성이 떨어진다는 것이 이용자들의 의견이다[Chet 등,1994; 임 등.,2006]. 이러한 불만을 극복하고 좀 더 일정한 효과를 나타내기 위해서는 서로 다른 방제기작이 있는 미생물을 컨소시엄의 형태로 제제화한 미생물방제제를 고안해 내자는 것이다[McSpadden-Gardener, 2004; 정 등, 2005; 임 등, 2009]. 그러나 두 가지 이상의 미생물을 한 제품으로 제제화하는 데는 각 균주들간의 경쟁의 문제가 있을 수 있어, 소비자의 손에 제품이 들어갔을 때 결국, 어느 한 종류의 미생물만 독점적으로 존재하거나 모두 사멸해 죽은 제제가 될 가능성이 다분히 있다[Burger and Jones, 1998; 이, 2001].

이에 첨가하여 모든 미생물제제가 6개월에서 1년간의 유통기간을 최소한 요구하고 있는데, 운송과 저장이 일어나는 동안 다변적인 환경조건에도 불구하고 휴면상태를 유지하여야만 한다 [김 등, 2001]. 내성포자를 형성하는 미생물제제의 경우는 최후의 제제화 단계에서 내성포자를 미세기공이 주를 이루고 대기공의 크기가 0.6mm 이하인 무기담체를 이용한다면, 발아에 필요한 습기가 효과적으로 제거되어 별다른 외부의 조치 없이 15-30°C 상온에서 6개월 이상 휴면상태를 유지할 수 있음이 밝혀졌다[Slininger 등, 1996; Jackson 등, 2003; 정 등. 2007].

그러나 이 방법도 초기에 도입되는 물의 양이 10% (v/w)을 넘지 말아야 하는 조건이 붙는데, 유통제품이 단위 그램 당 도입해야 할 미생물 수를 맞추려면 (통상  $10^8$ /g)배양과정에서 생산된 미생물의 농도에 따라 도입되는 물의 농도가 증가하는 경우가 많으며, 더군다나 두 가지 이상의 미생물을 한 제품으로 제제화 하는데는 물의 양이 필수적으로 증가하게 된다. 이런 상황 하에서 물의 양을 제거하기 위해 원심분리를 이용하거나 건조 단계를 새로이 추가해야만 한다. 이런 방법들은 실험적으로 간단히 시도될 수 있는 것들이나 산업현장에 도입하려면 첨가적으로 필요한 장치나 설비 또 시간적 소비가 있기 때문에 생산원가가 증가한다는 점에서 제품생산에 압박을 주게 된다. 본 연구에서는 비용적인 증가를 초래하지 않고도 유용한 두 가지 바실러스 균주의 포자를 한 제품으로 제제화하는 방법을 소개하고자 한다.

## 2. 연구개발수행 재료 및 방법

### 가. 기확보된 길항미생물들의 주요 기작별 컨소시엄 구성

#### (1) 개별균주의 기작별 상호보완형 컨소시엄 구성

본 연구에서는 이미 생물농약용으로 연구 개발된 길항미생물의 균주들(Table 1.1)을 이용하여 항생능력, siderophore 및 cellulase 생산능, auxin 생산능, 인산가용능 등의 각 기작별 상호보완형 미생물 균주의 컨소시엄 후보군을 구성하였다. 컨소시엄 후보군 구성을 위한 개별 균주의 조합은 고추역병균에 대한 방제력이 크고 식물생장촉진능이 우수한 개별균주들을 우선적으로 선별하였으며, 선별 및 확보된 개별 길항미생물 균주에 추가적이고 광폭적으로 길항 또는 성장촉진 기작이 보완될 수 있는 균주를 하나씩 조합해 보는 방법을 선택하여 최적의 컨소시엄을 개발하였다.

Table 1.1. The consortia candidates of the selected antagonistic strains by previous research.

Antagonistic strains	Antagonistic activity	References
<i>Bacillus licheniformis</i> K11	Antibiosis PGPR	Woo <i>et al.</i> , 2007
<i>Bacillus megaterium</i> KL39	Antibiosis	Jung <i>et al.</i> , 2003
<i>Bacillus subtilis</i> AH18	Antibiosis PGPR	Jung <i>et al.</i> , 2006
<i>Bacillus thuringiensis</i> BK4	Antibiosis	Jung <i>et al.</i> , 2003
<i>Chryseomonas luteola</i> 5042	Antibiosis	Yun <i>et al.</i> , 2001
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 2112	Antibiosis PGPR	Lee <i>et al.</i> , 2001
<i>Pseudomonas maltophilia</i> AM5	Antibiosis	Kim, 2004
<i>Serratia proteamaculans</i> 3095	Chitinase	Lee <i>et al.</i> , 1999

## (2) 구성된 컨소시엄의 *in vivo* pot 실험을 통한 고추역병 방제능 및 식물생장촉진능 비교

Table 1.1의 기 확보된 생물방제균을 대상으로 각 균주간의 기능보완형으로 조합한 후 컨소시엄 후보균에 대한 고추역병 방제능과 고추생장촉진능 실험을 실시하였다. 실험은 28°C, 50% 습도의 항온항습실에서 *in vivo* pot 실험을 실시하였다. 크기와 길이가 모두 같은 생육상태의 고추 pot에 고추역병균인 *P. capsici*의 포자를 관주접종하고 1일간 습실(28°C, 70% 습도)처리하고, 2일 후 컨소시엄 균주군 pot당  $10^8$  CFU/ml 처리하여 계속 생육시키면서 주기적으로 발병을 관찰하여 고추역병 방제능을 확인하였다. 또, 고추생장촉진능 실험은 방제능 실험과 동시에 실시하기 위해, 고추역병에 대한 방제능이 있는 고추 pot만을 골라 연속적으로 실시하였다. 방제능이 있는 pot(컨소시엄 처리구)에 다시 3일 배양한 컨소시엄 균주군의 균체만 회수한 후 증류수에 현탁하여 관주 접종하였으며, 동량의 증류수만을 처리한 고추 pot(역병균 무처리구)를 대조구로 하여 비교하였다. 컨소시엄 균주군들의 배양은 각각 단독으로 배양하는 것을 원칙으로 하였으며 배양 후 혼용 처리하였다. 상기 및 하기의 고추 pot에 사용된 흙으로 멸균된 상토를 사용하였으며, 모든 *in vivo* pot 실험은 3회 반복하여 실시하였다.

## (3) 일반 경작지 토양에서의 방제력 검증 : 최종 결정된 컨소시엄 구성균의 실내 pot 실험

고추역병에 대한 방제능이 강력하고 고추생장촉진능이 가장 우수한 최적 컨소시엄 구성균을 대상으로 일반 경작지 토양의 실내 pot 실험을 통해 고추역병 방제력 검증을 실시하였다. 일반적으로 멸균된 상토에서의 실험에서 성공하더라도 일반 토양에서의 방제력 검증이 미비하여 실제 포장 등에 적용하였을 때 성공하지 못하는 미생물제제가 많다. 특히, 실내 조건이더라도 일반 토양의 흙은 발병전의 고추역병균을 포함한 여러 가지 식물병원균이 포자 또는 유주자 상태로 존재하므로 실내 일반토양에서의 실험은 꼭 필요하리라 생각된다. 실험에 사용된 일반 토양은 경북 경산지역의 고추경작지 토양으로 하였으며 겉흙과 속흙을 골고루 섞고 파쇄하여 사용하였다. 방제력 검증 실험은 상기의 고추역병 방제력 실험과 동일한 방법으로 실시하였다.

## 나. 컨소시엄내 길항미생물간의 상호 비경쟁적 상리공생 증식여부 조사

컨소시엄으로 구성된 길항미생물들 간의 상호 비경쟁적 상리공생 여부를 조사하기 위하여 개별균주를 단독으로 배양한 후 조합시키는 단독배양법(single cultured)과 동시에 접종하여 함께 배양하는 동시배양법(co-cultured)을 실시하였다. 컨소시엄으로 선발된 두 고추역병 방제용 길항미생물 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11은 37°C, 72시간 배양하였고 각각 단독배양과 동시배양, 단독배양 후 혼용의 3가지 처리구로 나누어 방제능 실험과 성장촉진 실험을 실시하였다.

다. 상업용 대량배양 조건 확립 및 제제화

(1) 최적 배양시간 측정 및 대량배양용 탄소원, 질소원의 종류 및 농도 결정

컨소시엄 구성 길항미생물을 대량 배양하기 위하여 최적 배양시간 측정 및 탄소원과 질소원의 종류와 농도를 결정하고자 하였다. 실험은 Davis minimal medium ( $K_2HPO_4$  0.7 %,  $KH_2PO_4$  0.2 %,  $(NH_4)_2SO_4$  0.1 %, Glucose 0.1 %, Sodium citrate 0.05 %,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.01 %)를 기본 배지로 하여 탄소원의 종류와 농도를 우선적으로 결정한 후, 기본 탄소원을 고정시키고 질소원의 종류와 농도를 알아보았다. 탄소원 및 질소원은 미생물제제 기업인 (주)대유(경북 경산시 소재)에서 실제 미생물제제의 탄소원과 질소원으로 사용하고 있는 것을 사용하였는데, 탄소원으로는 포도당, 당밀, 옥수수전분, 쌀겨, 밀기울, 설탕을, 질소원으로는 옥수수 침지액, 대두박, peptone, yeast extract를 사용 하였다. 또한, 농도는 1, 2, 3, 4%로 나누어 실시하였고, 배양은 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11은 37°C에서 84시간동안, *P. fluorescens* 2112는 30°C에서 12시간동안 실시하면서 균생장과 방제능, 옥신생산능을 조사하였다.

(2) 컨소시엄 길항균주의 제제화

다기능 PGPR균주의 제제화는 Fig. 1.1의 제제화 방법에 따라 실시하였으며 각 단계별 방법은 아래와 같다.

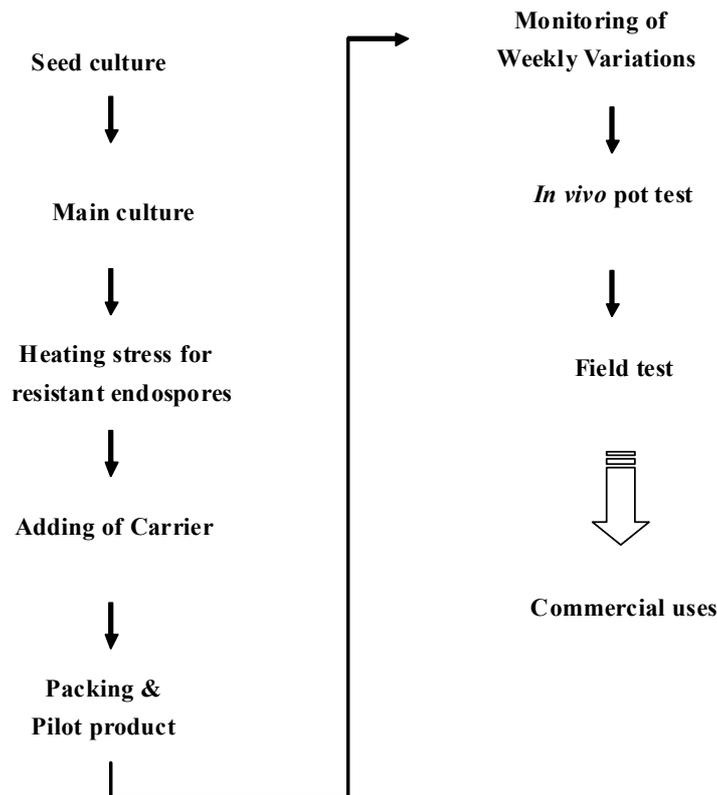


Fig. 1.1. Large scale producing of the consortium culture of antagonistic rhizobacteria for commercialization.

(가) 가열 스트레스를 이용한 내생포자 유도

*B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11의 제제화를 위하여 열 스트레스로 인한 포자 생성 최적 조건을 조사하였다. *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11에 열 스트레스를 가하여 포자를 생산하기 위해서 각 온도 별로 포자 유도 최적 시험을 실시하였다. 37°C에서 72시간동안 대량배양용배지에서 배양한 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11을 각각 37, 40, 45, 50, 55, 60°C에서 2시간 동안 열 스트레스를 가하여 포자 형성을 유도한 후, 포자생성 조건에서 포자를 생성하지 않고 영양형 세포로 남아있는 것을 제거하기 위하여 80°C에서 15분간 열처리 후 회석 도달하여 생성된 colony-forming unit (CFU)를 포자의 수로 조사하였다.

(나) Dipicolonic acid와 CaCl<sub>2</sub> 농도에 따른 내생포자 유도능

*B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11의 포자 형성을 증가시키기 위하여 dipicolonic acid와 CaCl<sub>2</sub>의 농도별 포자 유도능을 조사하였다. 첨가제로 사용한 dipicolonic acid와 CaCl<sub>2</sub>는 *Bacillus* 내생포자에 고농도로 나타나는 것으로 이들의 첨가가 내생포자 형성에 미치는 영향을 조사해 보았다. 무기염인 dipicolonic acid와 CaCl<sub>2</sub>는 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11의 포자 형성유도 과정 중 열스트레스를 가하는 시기에 첨가하였으며, 농도는 dipicolonic acid 경우 0.5, 1, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 × 10<sup>-5</sup>M을 첨가하였고, CaCl<sub>2</sub>는 0.7, 1.4, 2.1, 2.8, 3.5, 4.2 × 10<sup>-3</sup>M로 각각 처리하였다. 각각의 처리구를 80°C에서 15분간 처리하여 영양형세포를 제거 후 LB agar plate 상에서 colony forming unit (CFU)를 계측한 것을 포자수로 하였다.

라. 액상 제제화 시제품 제작 및 저장 중 경시변화 시험

*B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11, *P. fluorescens* 2112의 액상 제제화를 위하여 경시적 변화 시험을 하였다. 제제의 장기적 저장, 유통, 보관을 위하여 dipicolonic acid, CaCl<sub>2</sub> 최적 농도를 선택하여 제조한 액상 부재료를 첨가하였다. 시제품의 포장은 밀봉이 가능한 유리앰플 (25ml)에 담았다.

*B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11, *P. fluorescens* 2112의 액상제제화에 따른 경시적 변화를 추적하기 위하여 가열 안정성시험과 저온 안정성 시험을 실시하였다. 시험의 기준은 대한민국 농촌진흥청이 고시한 경시변화 시험기준과 방법에 따라서 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11은 54°C에서 6주간, *P. fluorescens* 2112는 45°C에서 8주, 54°C에서 6주간 가열 안정성시험을 실시하였으며, 0°C에서 7일간 저온 안정성 시험을 실시하였다. 시험 기간 중 생존한 포자수는 대조구와 처리구를 각각 80°C에서 15분간 처리하여 LB agar plate 상에서 CFU를 계측한 것으로 하였다. 시제품으로 제작한 포장용기를 각 처리구 당 6개씩 준비하여 1주마다 용기 내의 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11, *P. fluorescens* 2112 균체 수를 조사하였다. 대조구의 경우 부재료를 첨가하지 않은 배양액만으로 제제를 만들었다.

## 마. 분말 제제화 시제품 제작 및 저장 중 경시변화 시험

### (1) 분말제제화를 위한 무기담체의 선정

제제의 장기적 저장, 유통, 보관을 위하여 무기담체를 이용하였다. 무기담체는 여러 미생물제제기업으로부터 샘플을 제공받아 실험하였다. 제공받은 무기담체들 중 보존능이 우수한 무기담체를 선발하기 위해 각 균주마다 가열안정성 실험을 실시하였다. 포자생성균인 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11은 LB배지에서 37°C에서 4시간 배양한 배양액을 각 무기담체에 1:2 비율로 섞어 54°C에서 6주간 보관하여 1주 간격으로 희석도말로 포자수를 확인하였다. *P. fluorescens* 2112는 30°C에서 6시간 배양한 배양액을 각 무기담체에 1:2 비율로 섞어 1시간동안 45°C 가열스트레스를 가해 희석도말로 생존한 균체수를 확인하였다.

### (2) 분말 제제의 경시변화 시험용 시제품 제작 및 저장 중 경시변화 시험

*B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11, *P. fluorescens* 2112의 분말 제제화를 위하여 경시적 변화 시험을 하였다. 제제화 방법으로는 각각 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11, *P. fluorescens* 2112를 배양하여 선정한 무기담체에 1:2의 비율로 균을 넣는 방식으로 하였다. 시제품의 포장은 기업인 (주)대유에서 실제 제품의 포장에 사용하는 포장용지에 담았다.

*B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11, *P. fluorescens* 2112의 분말제제화에 따른 경시적 변화를 추적하기 위하여 가열 안정성시험을 실시하였다. 시험의 기준은 대한민국 농촌진흥청이 고시한 경시변화 시험기준과 방법에 따라 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11은 54°C에서 6주간 가열 안정성시험을 실시하였고 *P. fluorescens* 2112는 35°C에서 12주간 가열 안정성 시험을 실시하였다. 시험 기간 중 각 균의 생존성 확인은 주마다 희석도말을 하여 CFU를 계측한 것으로 하였다. *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11은 시제품으로 제작한 포장용지를 각 처리구 당 6개씩 총 6주분량을 준비하여 1주마다 포자 수를 조사하였고 *P. fluorescens* 2112는 각 처리구당 12개씩 총 12주 분량을 준비하여 1주마다 균체 수를 조사하였다. 대조구의 경우 제제화를 하지않은 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11, *P. fluorescens* 2112 배양액을 원심분리하여 상등액을 버리고 균체만 보관하는 방법으로 하였다.

## 바. *In vivo* pot 실험을 통한 액상 시제품의 고추역병 방제능 검증

6주간의 가열 안정성 시험 및 경시변화 시험이 끝난 액상 시제품을 사용하여 고추역병 방제능 실험을 실시하였다. 실험은 28°C, 50% 습도의 향온향습실에서 고추가 이식되어 있는 pot에서 실시하였다. 고추역병 방제능 실험과 성장촉진능 실험은 크기와 길이가 모두 같은 생육상태의 고추 pot에 고추역병균인 *P. capsici*의 유주자를 고추 포트당  $10^5$  CFU/ml를 관주접종하고 1일간 습실(28°C, 70% 습도) 처리하였으며, 2일 후 6주간의 가열안정성 시험이 끝난 액상 시제품을 처리(pot당  $10^8$  CFU/ml)하였으며, 고추를 계속 생육시키면서 주기적으로 발병을 확인하였다.

## 사. *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11의 동시제제화

이전의 연구에서 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11이 고추의 생장촉진과 고추역병 방제에서 두 미생물을 같이 처리했을 때 각각을 처리했을 때 보다 시너지효과가 있음이 밝혀졌다[임 등, 2009a]. 이러한 근거로 두 미생물을 컨소시엄의 형태로 제제화하고자 하였으나 두 미생물이 영양형 상태에서는 서로 경쟁을 하여 *B. subtilis* AH18이 독점적인 우위에 있게 되어 *B. licheniformis* K11은 전멸하게 된다. 따라서 포자가 발아할 수 있는 조건을 모두 제거해야만 두 *Bacillus* 종이 안정화되어 휴면상태로 6개월간을 유지할 수 있게 된다. 본 연구에서는 담체로 조절할 수 있는 양 보다 많은 양의 수분이 도입되고, 경쟁관계에 있는 두 종류의 *Bacillus* 종을 한 제품으로 동시에 제제화 하고자 할 때 적용할 수 있는 새로운 제제화 방법을 개발하였다.

### (1) Bacterial strains and growth condition

토양에서 분리된 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11은 이미 고추의 생장촉진 및 고추역병 방제능이 검증된 다기능(multi-functional) 식물생장촉진 근권세균(plant growth promoting rhizobacteria, PGPR)이다[정 등, 2006a; 2006b]. 두 *Bacillus* 종은 Luria-Bertani (LB; 1% bacto-trypton, 0.5% yeast extract, 1% NaCl) 혹은 0.1X LB 배지를 써서 37°C 에 배양하였다. CFU를 측정하기 위해 고체 배지를 사용할 경우는 1.5%의 한천을 첨가하였다. 두 가지 *Bacillus* 종은 모두, 15에서 52°C까지의 광범위한 온도에서 생육이 가능했으며 최적 온도는 37°C로 나타났다. 두 *Bacillus* 종의 경쟁관계를 규명하기 위해 같은 수의 *B. subtilis* AH18와 *B. licheniformis* K11을 50ml의 LB에 접종하고 시간에 따른 영양형 세포 수를 LB 희석도 말 방법으로 조사하였다. LB 배지에서의 두 *Bacillus*의 형태는 육안으로 확실히 식별할 수 있을 정도로 형태적 특성이 상이하야 두 미생물을 구별하는데 어려움이 없었다. 경쟁실험은 독립적으로 4번 반복하여 평균을 구해 생존곡선을 excel로 나타내었다.

### (2) Preparation of inorganic carriers

본 연구에서 사용된 무기담체는 미세기공을 다량함유하면서 대기공의 크기가 0.6 $\mu$ m 이하인 무기담체만을 사용하였는데, 이들은 온도변화가 있는 상온에서 6개월 이상 내성포자의 안정성 및 휴면을 유지하는데 탁월하였다는 이전의 실험결과에 의한 선택이었다[정 등, 2007]. 이들 담체는, 상업적으로 팔리고 있는 천연 제올라이트(백광 화학, 경주, 경북), 합성 제올라이트 NaA와 NaY(캠웰드텍, 대전)이었다. 모든 담체는 멸균하여 80°C에서 2일 동안 건조시켜 사용하였다. 담체의 pH를 측정하기 위해서는 1g을 10ml의 증류수에 넣어 10%의 slurry를 만든 후 pH meter (Corning, Lowell, MA)를 이용하여 측정하였다. 담체의 입자크기는 시료제공자들에 의해 밝혀진 바이다.

### (3) Production of *Bacillus* endospores by heat-treatment

열 스트레스를 이용한 포자 생성은 정 등(2007)이 발표한 방법을 변형하여 시행하였다. 먼저, *B. subtilis* AH18 와 *B. licheniformis* K11을 50ml의 LB에 각각 접종하고 37°C 에서 3일동안 배양하였으며, 배양 후 원심분리하여 균체만을 회수하여 54°C에서 1시간 열처리 후 열 스트레스 내생포자를 형성시켰다. 포자가 형성된 후, 남아 있는 영양형 세포는 80°C 에서 10분간 가열하여 모두 사멸시켰다. 이 과정 후 살아남은 내열성 포자의 농도는 통상  $10^9$  CFU/ml 였다.

### (4) Formulation procedures and stability assay of the formulation

위에서 생성한 포자배양액 두 가지 각각 1ml 씩을 담체 5g에 섞어 제제화를 하여 진공 플라스틱 포장 주머니(6 × 7cm) 를 만들어 1g씩이 든 제제화 포장 4개를 제조하였다. 각 포장의 수분 농도는 40%(v/w)였는데, 이 농도는 담체가 뭉치는 현상이나 caking이 일어나지 않았고 보슬보슬한 담체의 상태를 유지할 수 있을 정도였다. 모든 포장은 진공상태를 만들지는 않았지만 공기를 최대한 뺀 상태에서 입구를 마감하여 45°C 항온실에 두고 20일 간격으로 2개월까지 생존 포자의 개수를 희석도말 방법으로 조사하였다. 대조군은 액체상태의 포자 현탁액을 유리 시험관(1 × 10cm, diameter × length) 에 1ml씩 넣고 증발을 억제하기 위해 파라필름으로 입구를 막은 뒤 똑 같이 45°C 항온실에 두고 같은 방법으로 생존하는 포자수를 조사하였다. 모든 실험은 독립적으로 4반복 실시하였으며 SigmaPlot ver. 8.0를 이용하여 Log N/No versus time (days) 의 그래프로 생존의 추이를 나타내었다; 여기서 No는 초기에 투입된 포자의 농도를 나타내고 N은 특정 시간 후의 포자의 수를 나타낸다. 표준오차는  $P \leq 0.05$  수준에서 구하였다.

### (5) *In vivo* pot test

*B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11의 담체화된 제제의 고추역병 방제능과 고추생장촉진능을 검증하기 위해 28°C, 50% 습도의 식물배양실에서 고추(*Capsicum annum* L., 부춘-Seminis Korea Co.)가 이식되어있는 포트(90.0 × 90.0 × 70.0 mm)에서 실시하였다. 크기와 길이가 모두 같은 생육상태의 고추 포트에 고추역병균인 *Phytophthora capsici*의 zoospore를  $2 \times 10^4$  spores/pot CFU/mL 관주접종하여 1일간 습실(28°C, 70% 습도)처리하고, 2일 후 담체화된 미생물 제제를  $10^9$  CFU/pot 처리하여 계속 생육시키면서 주기적으로 발병을 확인하였다. 동량의 증류수만을 처리한 고추 포트(역병균 무처리구)와 담체만을 처리한 고추포트를 대조구로 하여 비교하였다. 성장촉진능 검증은 모든 고추 포트에 고추역병을 처리하지 않고 생육을 조사하였으며 대조구는 고추역병 방제능 실험과 동일하게 하였다. 고추 포트에 사용된 흙은 멸균된 상토 TKS 2(FloraGard Ltd., Oldenburg, Germany)를 사용하였고, 처리구당 30주의 고추를 사용하였으며, 3회 반복하였다.

(6) 처리균의 고추 근권내 우점능 조사

담체 제제의 토양 투입 후 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11의 고추 근권에서의 우점능을 확인하였다. 모든 실험은 담체 제제의 고추생장촉진능 실험과 동시에 수행하였고 제제 처리 후 고추 근권의 흙을 회수하여 15일까지 추적 확인하였다. 고추묘의 선발은 무작위적으로 하였으며, 모든 처리구당 2개씩 뽑아 뿌리 주위에 붙은 흙을 조심스럽게 털어내어 잘 섞어주었다. 회수한 흙은 하나로 혼합하여 다시 섞은 후 10g을 취하고, 두 *Bacillus* sp.의 colony가 육안 상으로 LB agar 에서 구별이 가능한 점을 이용하여 회석도말로 생균수를 측정하였다.

### 3. 연구개발수행 결과

#### 가. 기확보된 길항미생물들의 주요 기작별 컨소시엄 구성

##### (1) 개별균주의 기작별 상호보완형 컨소시엄의 구성 및 결정

다가능 PGPR 균주 *B. licheniformis* K11, *B. subtilis* AH18과 *P. fluorescens* 2112는 모두 고추역병균인 *P. capsici*를 비롯하여 토마토 시들음병균인 *Fusarium oxysporum*을 비롯한 다양한 식물진균병에 대한 넓은 항진균 스펙트럼을 가진 매우 우수한 PGPR 균주들이다(Table 1.2). 따라서, 고추역병에 대한 방제력이 가장 크고 옥신생산을 통한 식물생장촉진능 및 인산 가용화능이 있는 *B. subtilis* AH18 균주와 식물생장촉진능, 인산 가용화능, 식물 스트레스 경감효과가 있는 ACC deaminase 생산성 *B. licheniformis* K11의 두 균주를 기축 균주로 해서 타 균주를 조합 후보균으로 순열, 조합시키며 구성시킨 조합균을 대상으로 각종 실험을 수행한 후 최적의 컨소시엄 구성균을 결정하였다. 이들 두 균주에 Table 1.3에서 보는 것처럼 7개의 개별 길항미생물들을 서로 조합하여 길항미생물 컨소시엄 후보균으로 No. 1에서 No. 11까지 모두 11개 후보균을 구성하였다. 이들 두 균주는 모두 토양 유래의 *Bacillus* sp.로써 포자 형성을 통한 장기간 보존, 유통이 가능한 농업용 제제화가 가능하므로 상업적인 측면에도 매우 유리할 것이라 생각된다.

Table 1.2. Antifungal spectra of *B. licheniformis* K11, *B. subtilis* AH18 and *P. fluorescens* 2112 against plant fungal pathogens.

Pathogens	Plant Diseases	Suppression Rate (%)		
		Strain K11	Strain AH18	Strain P2112
<i>Phytophthora capsici</i>	Blight	91.5	93.5	90.0
<i>Fusarium oxysporum</i>	Fusarium wilt	93.2	92.1	70.5
<i>Corynespora assiicola</i>	Brown spot	66.8	55.5	65.5
<i>Botrytis cinerea</i>	Gray mold	89.2	92.6	62.3
<i>Rhizoctonia solani</i>	Sheath blight	92.6	96.2	66.5
<i>Pythium ultimum</i>	Damping off	51.1	68.8	55.6

Table 1.3. Consortia composition of the antagonistic rhizobacteria for inhibition of *P. capsici*.

Strains	<i>B. subtilis</i> AH18	<i>B. licheniformis</i> K11
<i>B. megaterium</i> KL39	No. 1	No. 6
<i>B. thuringiensis</i> BK4	No. 2	No. 7
<i>P. fluorescens</i> 2112	No. 3	No. 8
<i>S. proteamaculans</i> 3095	No. 4	No. 9
<i>C. luteola</i> 5042	No. 5	No. 10
<i>B. subtilis</i> AH18	-	No. 11
<i>B. licheniformis</i> K11	No. 11	-

(2) 각 컨소시엄 후보군의 *in vivo* pot 실험을 통한 질병 방제능 및 성장촉진능 비교

8개의 개별 생물방제 균주와 11개의 컨소시엄 후보군을 대상으로 고추역병 방제능과 고추생장촉진능 실험을 실시하였다. 그 결과 8개의 개별 균주 모두 50% 이상의 고추역병 방제능을 나타내었으며, 옥신 생산능도 발휘하였다. 특히, *B. subtilis* AH18, *B. licheniformis* K11과 *P. fluorescens* 2112 균주가 가장 우수한 역병 방제능과 옥신 생산능을 나타내었다(Fig. 1.2). 또한, 고추역병 방제능 시험에서는 6일째 컨소시엄 처리 후 컨소시엄을 처리하지 않은 고추묘에서는 병징이 나타나는 반면 컨소시엄 처리구에서는 50%이상의 방제능을 나타내었고, 이들 중 컨소시엄 후보군 No. 11의 방제능이 가장 높았다. 따라서, *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11의 조합인 컨소시엄 No. 11은 고추역병 방제능이 가장 탁월하다는 것을 알 수 있었다(Fig. 1.3, 1.4). 또, 모든 처리구에서 15일 후부터 컨소시엄 간의 성장촉진능을 확인할 수 있었고, Fig. 1.4에서 보는 것처럼 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11의 조합인 컨소시엄 후보군 No. 11 컨소시엄이 가장 좋은 식물생장 촉진능을 나타내었다. 비록, 고추역병균을 전혀 처리하지 않고 물만 처리한 대조구 만큼은 생육이 좋진 않았지만, 고추역병균의 접종으로 역병 발병이 유도되었음에도 불구하고 컨소시엄 후보군 처리구에서도 대조구와 비슷하게 생육이 왕성하게 진행됨을 볼 수 있었다. 이와 같은 결과는 고추역병 방제능 뿐만 아니라 고추 성장촉진능도 동시에 가지는 우수한 컨소시엄이라는 것을 보여주는 것이다.

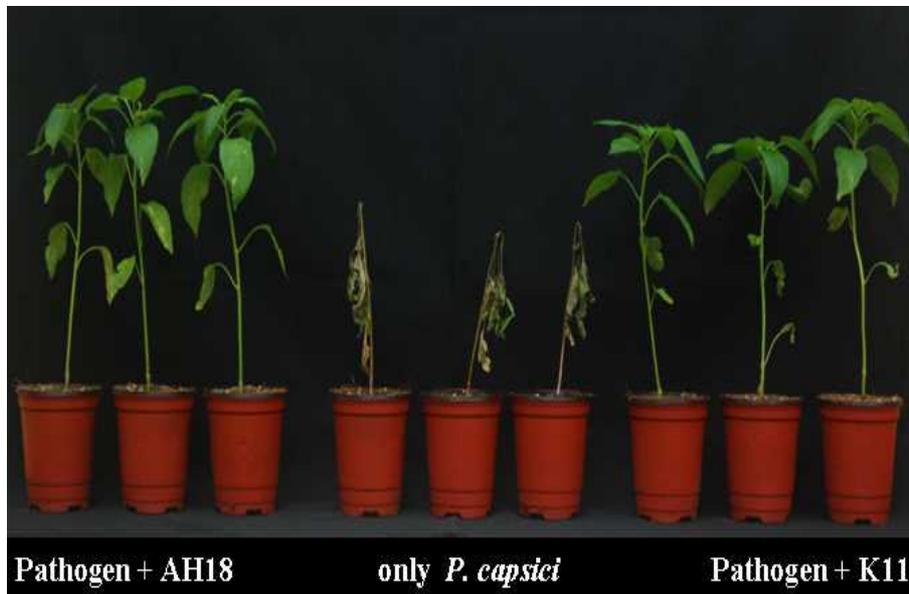
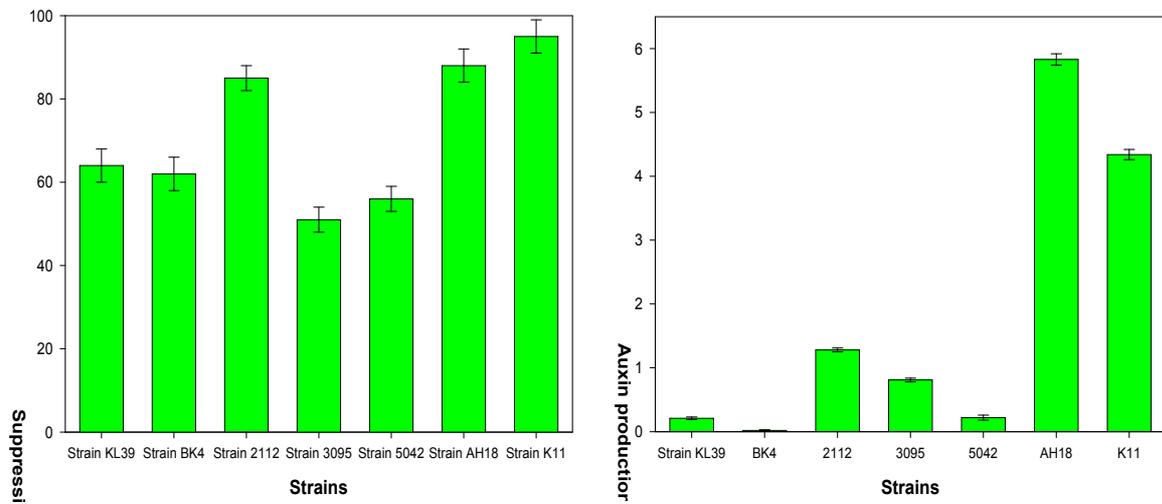


Fig. 1.2. Phytophthora blight suppression and auxin production by the selected antagonistic rhizobacteria.

Suppression of Phytophthora blight (%) = [(No. of total pepper plants) - (No. of infected pepper plants)] / (No. of total pepper plants) × 100. The plants were watered every 5 days with 50 ml of sterile water. Values are expressed as the means of three replicates, each containing 20 plants. IAA had been estimated absorbance at 540 nm with Salkowski test. Concentration of IAA means the highest value of IAA of 72 hr-culture. Standard errors were determined at  $P \leq 0.05$ .

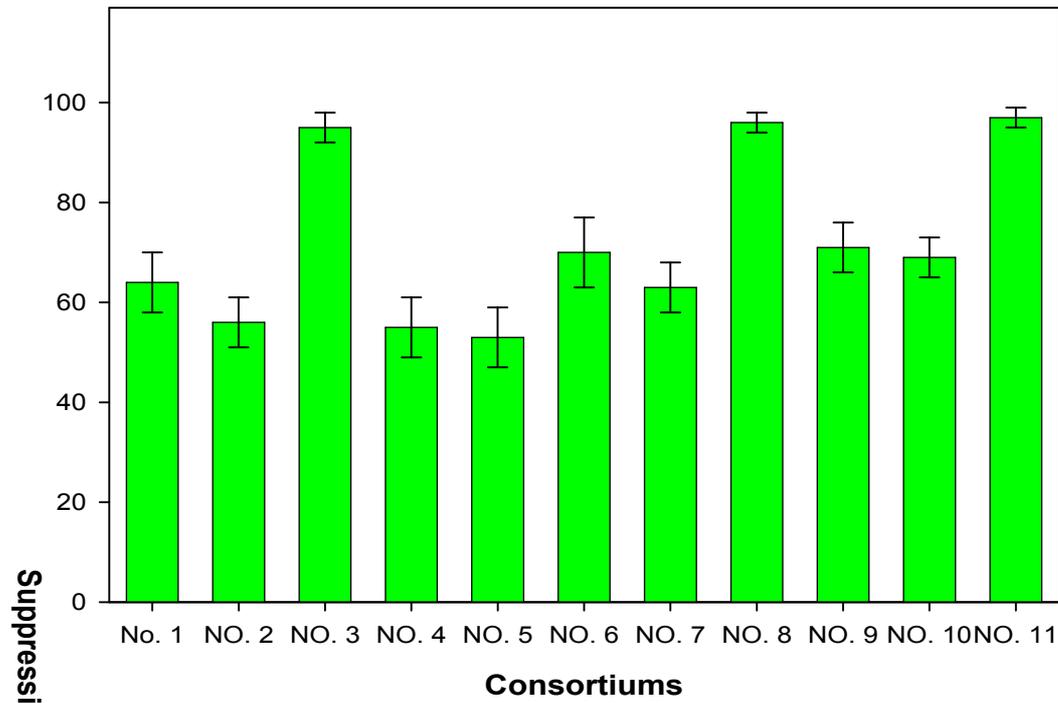


Fig. 1.3. Phytophthora blight suppression by various antagonistic consortia. Either *B. subtilis* AH18 or *B. licheniformis* K11 was mixed with one of the 5 different selected antagonistic strains. Values are expressed as the means of three replicates, each containing 20 plants. Standard errors were determined at  $P \leq 0.05$

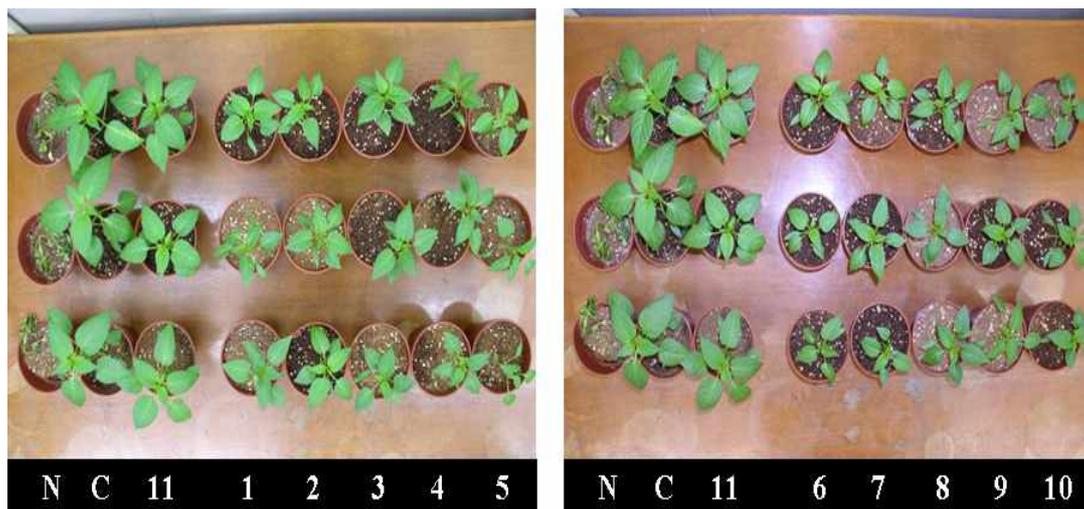


Fig. 1.4. Phytophthora blight suppression and plant growth promotion of red-pepper by the various antagonistic consortia.

N, treated with only *P. capsici*; C, treated with only water; No. 1 from No. 11, treated with *P. capsici* and consortia of antagonistic rhizobacteria.

Each PGPR strains of  $5 \times 10^7$  cells was treated. The plants were watered every 5 days with 50 ml of sterile water. The pictures were taken at the age of 15 days.

(3) 경작지 토양에서의 방제력 검증 : 최종 결정된 컨소시엄의 실내 pot 실험

최적 컨소시엄으로 구성된 No. 11 컨소시엄을 대상으로 일반 토양에서 실내 pot 검증 실험을 실시하였다. 멸균되지 않은 경작지 토양으로 채워진 pot상에서도 Fig. 1.5와 같이 병원균 접종 7일 후 고추역병에 대한 방제능이 역시 우수함을 알 수 있었다. 이러한 결과는 일반 경작지 토양상에 존재하는 수많은 병원성 또는 비병원성 세균이나 곰팡이 등의 정상 토양미생물 군집의 존재하에서도 컨소시엄 균주들이 우수한 역병 방제능을 보일 뿐만 아니라, 타 미생물과의 경쟁에서 이겨내면서 군집화도 잘 이룬다는 것을 증명하는 것이다. 그리고 멸균된 상토에서 우수한 고추역병 방제능과 성장촉진능을 보였을 뿐만 아니라, 일반 토양에서도 방제능이 뛰어난 것으로 확인되었으므로 지금까지 미생물제제가 실제 토양 내에서 불활성화되는 취약점을 극복할 수 있는 친환경 미생물제제로 농업현장 적용 성공 확률도 높을 것이라 생각된다.

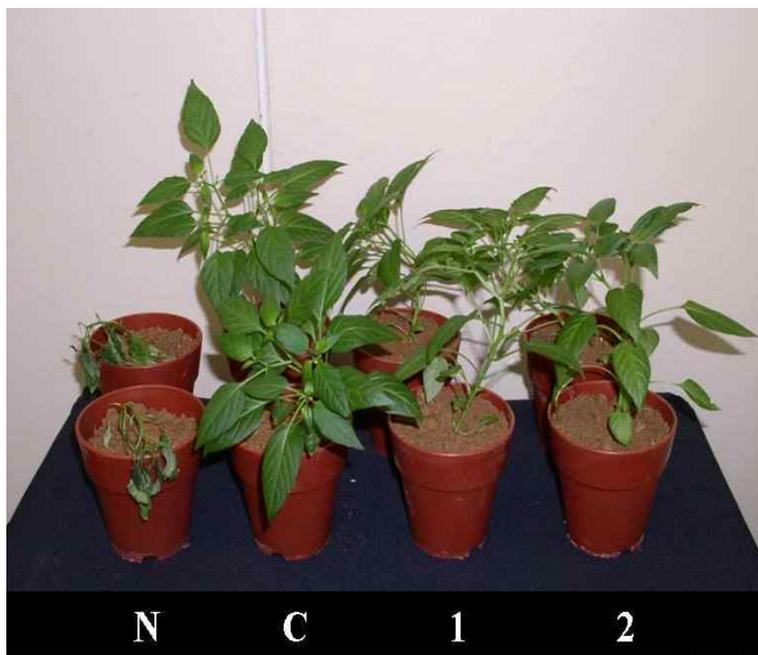


Fig. 1.5. Phytophthora blight suppression by the consortium No. 11 on the *P. capsici* infected field soil.

N, treated with only *P. capsici*; C, treated with only water; Pot 1 and 2, treated with *P. capsici* and consortium No. 11.

Each PGPR strains of  $5 \times 10^7$  cells was treated. After 20 days of treatment, the antifungal activity was determined. The pictures were taken at the age of 18 days.

## 나. 컨소시엄내 길항미생물의 상호 비경쟁적 상리공생 증식여부 조사

### (1) 배양방법에 따른 방제능 및 성장촉진능 조사

최적 컨소시엄인 No. 11 내 두 길항미생물들 간의 상호 비경쟁적 상리공생 여부를 조사하기 위하여, 개별 균주인 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11을 각각 단독으로 배양한 것과 두 균주를 동시에 접종하여 배양한 것, 그리고 단독으로 배양한 것을 접종 시에 혼용한 것을 각각 3가지 처리하여 역병 방제능과 성장촉진능을 조사하였다. 동시배양한 것은 단독을 배양한 것과 비교하였을 때 역병 방제능과 생육촉진능 모두 시너지 효과를 보이지 않았지만, 단독배양 후 혼용한 처리구에서는 시너지 효과가 크게 나타났다. 즉, 혼용 처리구에서는 높은 역병 방제능도 가지면서 뿌리, 줄기, 잎의 성장촉진효과에서 모두 단독배양 후 처리구 또는 동시배양 후 처리구에 비해 50% 이상 시너지 효과를 발휘하였다(Fig. 1.6, Table 1.4).



Fig. 1.6. Phytophthora blight suppression and plant growth promotion of red-pepper by the treatment of single cultured strain or co-cultured consortium.

N, treated with only *P. capsici*; C, treated with only water; 1, treated with *P. capsici* and sole cultured *B. subtilis* AH18; 2, treated with *P. capsici* and sole cultured *B. licheniformis* K11; 3, treated with mixture of *P. capsici* and sole cultured *B. subtilis* AH18 and sole cultured *B. licheniformis* K11; 4, treated with *P. capsici* and co-cultured consortium of *B. licheniformis* K11 and *B. subtilis* AH18. In single treatment cultured PGPR of  $10^8$  cells was treated sole. In mixing treatment sole cultured PGPR of  $5 \times 10^7$  cells was treated. The plants were watered every 5 days with 50 ml of sterile water.

Table 1.4. Growth promotion of red-pepper by the treatment of single cultured strain and co-cultured consortium.

Treatments	Fresh	Stem	Leaf	
	Weight (mg)	elongation (cm)	number (ea)	size (cm)
None	14±1.5	6.3±0.6	10±1	2.5×1.9
Water	97±1.1	11.3±0.8	13±1	4.5×1.9
AH18	38±1.2	7.4±0.8	11±1	3.1×2.1
K11	34±1.5	7.5±0.8	12±1	3.2×2.0
AH18+K11	82±1.2	10.9±0.6	15±1	4.2×3.1
co-cultured	37±1.1	7.6±0.8	11±1	2.8×1.9

The plants were watered every 5 days with 50 ml of sterile water. After 20 days of treatment, the growth promotion activity was determined. Values are expressed as the means of three replicates, each containing 20 plants. Standard errors were determined at  $P \leq 0.05$ .

## 다. 상업용 대량배양 조건 확립 및 제제화

### (1) 최적 배양시간 측정 및 대량배양용 탄소원, 질소원의 종류 및 농도 결정

컨소시엄 길항균주의 최적 배양시간 측정 및 대용량 배양용 탄소원과 질소원의 종류와 농도를 조사하였다. Davis minimal 배지에 6종의 탄소원을 1%로 하고 37°C, 84시간동안 배양하였으며 배양액은 6시간 간격으로 희석도말하여 생균수를 측정하였고, 배양 상등액은 IAA을 표품으로 하여 옥신생산량을 조사하였다. 먼저 탄소원으로 glucose를 사용하였을 때 *B. subtilis* AH18의 경우 배양 72시간째에서 생균수는  $6.8 \times 10^9$  CFU/ml, 옥신 생산량은 4.5 mg/ml로 가장 좋았고 농도는 2%일 때가 가장 높은 옥신 생산량과 많은 생균수를 나타내었다. *B. licheniformis* K11의 경우도 탄소원으로 glucose를 첨가하고 배양 72시간째에서 가장 많은 생균밀도와 높은 옥신 생산능을 발휘하였다. *P. fluorescens* 2112 역시 탄소원으로 glucose를 사용하였을 때 가장 많은 옥신 생산량을 나타내었고 배양 9시간째에서 가장 많은 생균수를 측정할 수 있었다(Fig. 1.7,1.8). 이러한 결과를 바탕으로 탄소원으로 2% glucose를 첨가하고 4종류의 질소원을 첨가하여 탄소원 실험과 동일한 방법으로 밀도와 옥신 생산능을 조사하였다. 그 결과 Fig. 3.9에서 보는 것처럼 두 길항미생물 *B. subtilis* AH18 및 *B. licheniformis* K11 모두 질소원으로 산업용 생산시 원가가 저렴한 옥수수침지액과 대두박이 거의 동일한 밀도와 높은 옥신 생산능을 나타냈다. 그러나 대두박의 경우 멸균시 기포가 많이 발생하고 잘 녹지 않는 등의 단점이 있어 질소원으로는 옥수수침지액으로 결정하였다.

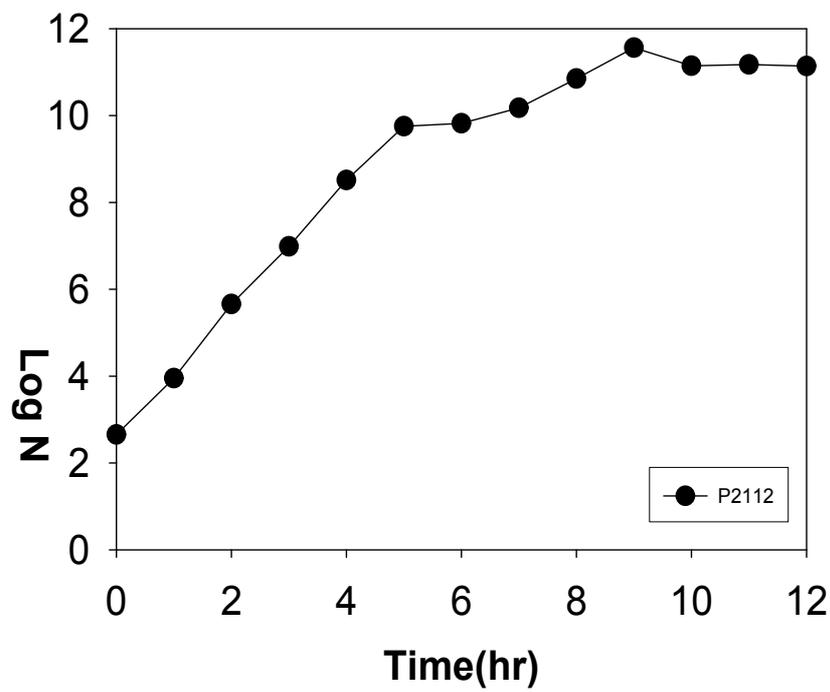
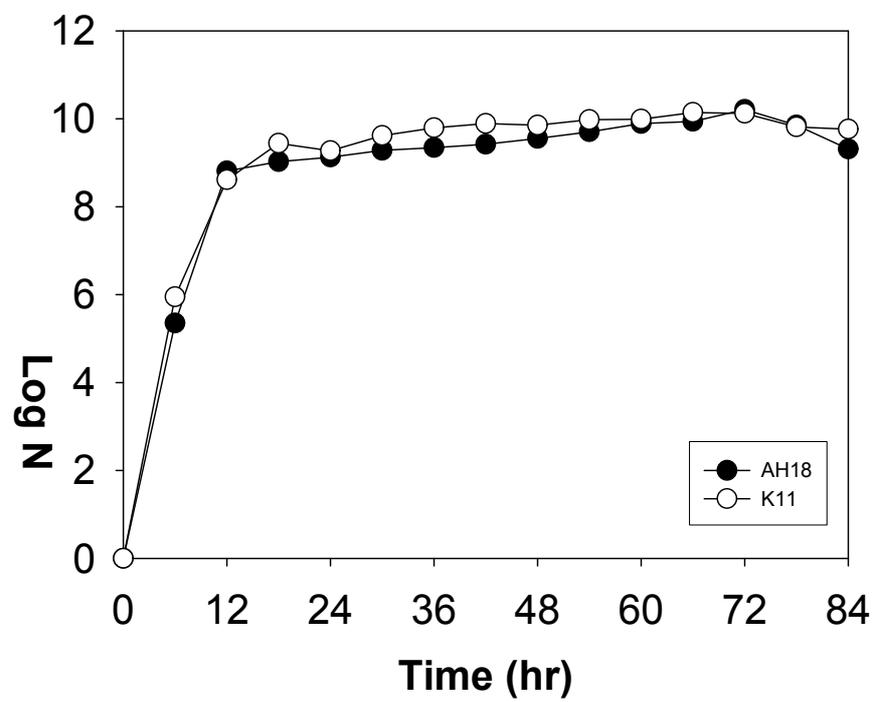


Fig. 1.7. Cell growth of PGPR strains on large scale fermentation.

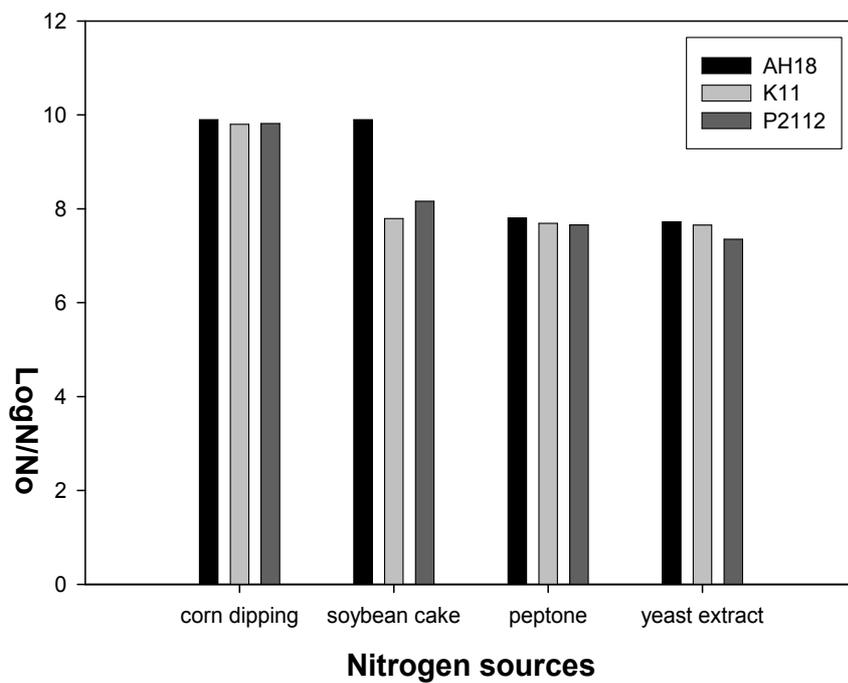
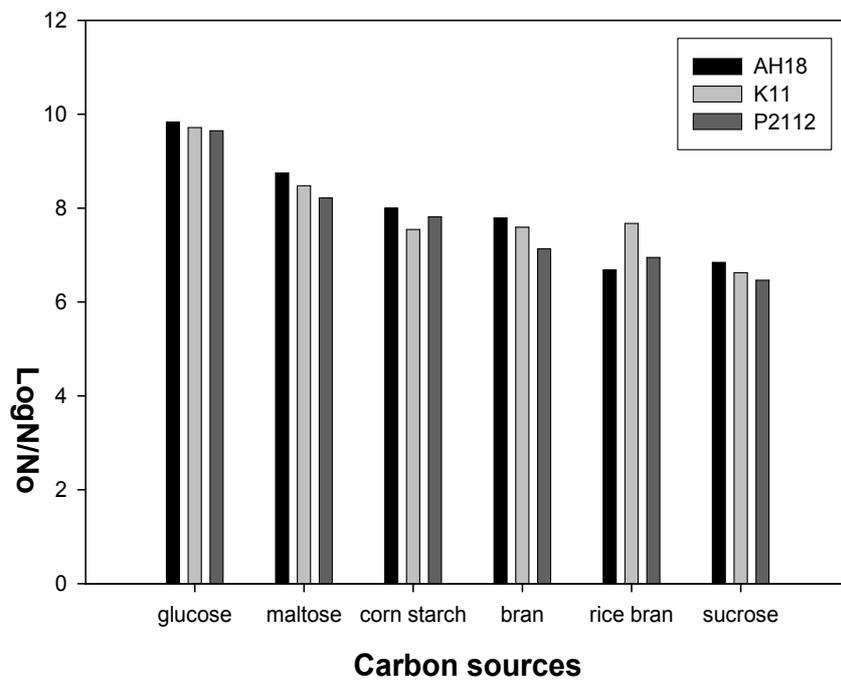


Fig. 1.8. Effects of various carbon and nitrogen sources on the growth of *B. subtilis* AH18, *B. licheniformis* K11 and *P. fluorescens* 2112.

## (2) 컨소시엄 길항균주의 제제화

### (가) 가열스트레스를 이용한 내생포자 유도

*B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11의 제제화를 위하여 가열스트레스로 인한 포자형성 시험을 실시한 결과 *B. licheniformis* K11의 경우도 이미 보고된 *B. subtilis* AH18의 가열 스트레스 이용 포자유도 조건[정 등, 2007]과 동일하게 55°C에서 가장 높은 포자형성능을 나타내었다(Fig. 1.9). 또한 배양시간별로 배양액에 55°C 가열스트레스를 주었을 때 배양시간 72시간째에서 가장 높은 포자형성능을 나타내었다. 따라서, *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11 모두 72시간 배양액에서 55°C 2시간 처리하여 형성된 안정한 가열 스트레스 포자를 액상 제제화에 이용하기로 하였다.

### (나) Dipicolonic acid와 CaCl<sub>2</sub> 농도에 따른 포자 유도능

액상 제제화를 위한 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11의 포자 유도능을 향상시키기 위하여 일반적으로 포자에 고농도로 존재하는 무기염인 dipicolonic acid와 CaCl<sub>2</sub>를 첨가하여 포자 유도능을 조사해보았다. Dipicolonic acid의 경우는 영양형 세포와는 달리 포자체에서 최고 12%까지 고농도로 존재하며, Ca<sup>2+</sup>과 염을 형성하여 포자의 내열성에 관여하는 물질이라 알려져 있다[Jang 등, 1995]. 본 실험에서는 *B. licheniformis* K11의 경우 dipicolonic acid를 여러 농도별로 처리해본 결과, Fig. 1.10과 같이 dipicolonic acid첨가에 의해 10배 이상의 포자 형성 촉진효과가 나타났다. 그러나, *B. subtilis* AH18의 경우에는 dipicolonic acid를  $2.5 \times 10^{-5}$  M 이상 첨가할 경우 오히려 포자형성을 저해시킨다는 것도 확인 할 수 있었다. 따라서 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11의 경우 포자형성시  $5.0 \times 10^{-6}$  M의 dipicolonic acid를 첨가하는 것이 가장 효율적인 것으로 조사되었다.

CaCl<sub>2</sub>를 농도별로 처리한 경우에도 Fig. 1.10의 결과에서처럼  $7.0 \times 10^{-4}$  M을 첨가하였을 때 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11 모두 가장 높은 포자 유도능을 나타내었다. 이와 같은 결과로 볼 때 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11에  $5.0 \times 10^{-6}$  M의 dipicolonic acid와  $7.0 \times 10^{-4}$  M의 CaCl<sub>2</sub>를 첨가하여 안정한 가열 스트레스 내생포자를 유도하는 것이 가장 효율적인 것으로 조사되었다.

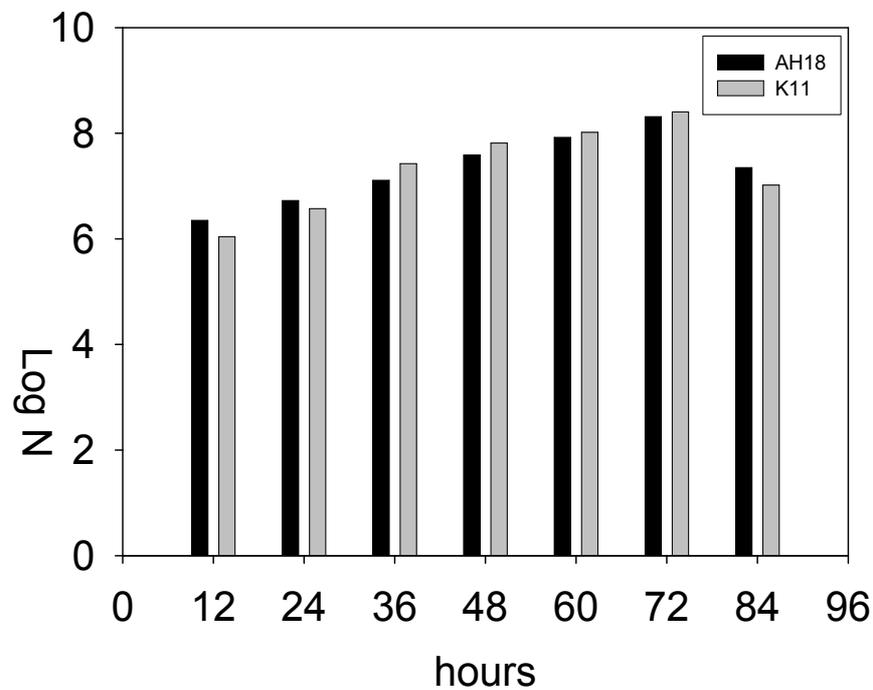
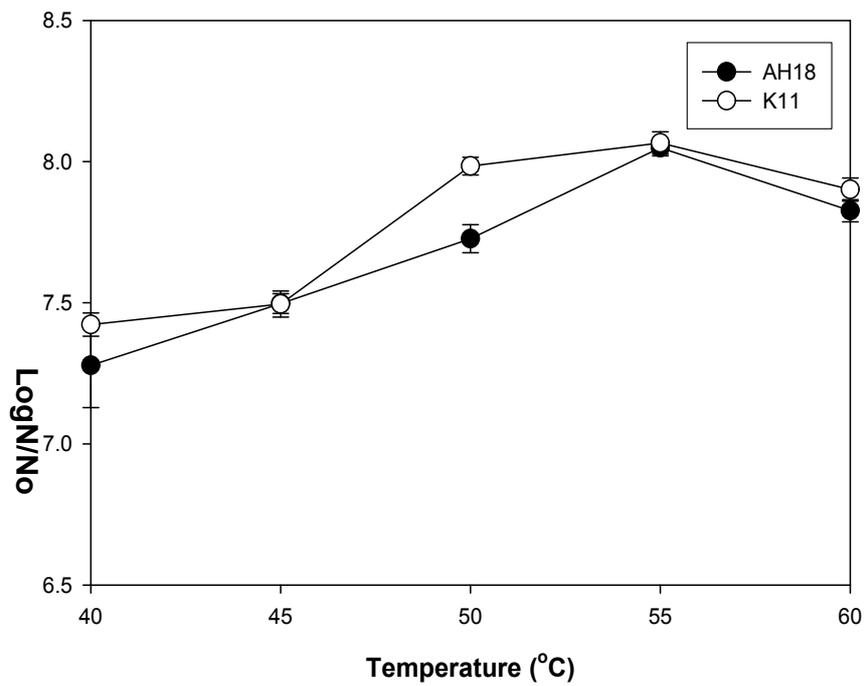


Fig. 1.9. The effect of heat stress on spore formation of *B. subtilis* AH18 and *B. licheniformis* K11. Values are means of 5 independent experiments. Standard errors were determined at  $P \leq 0.05$ .

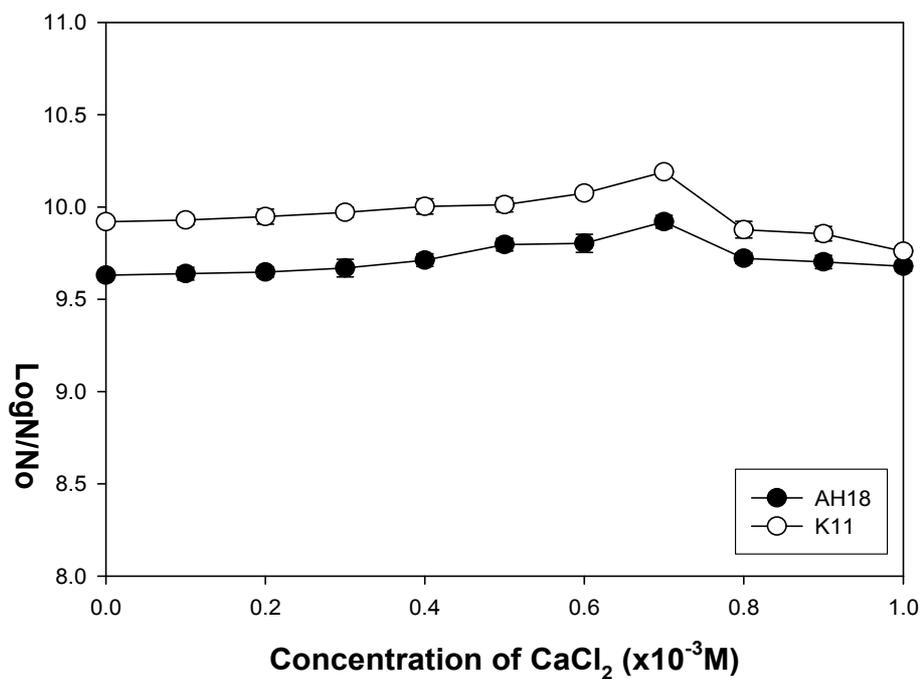
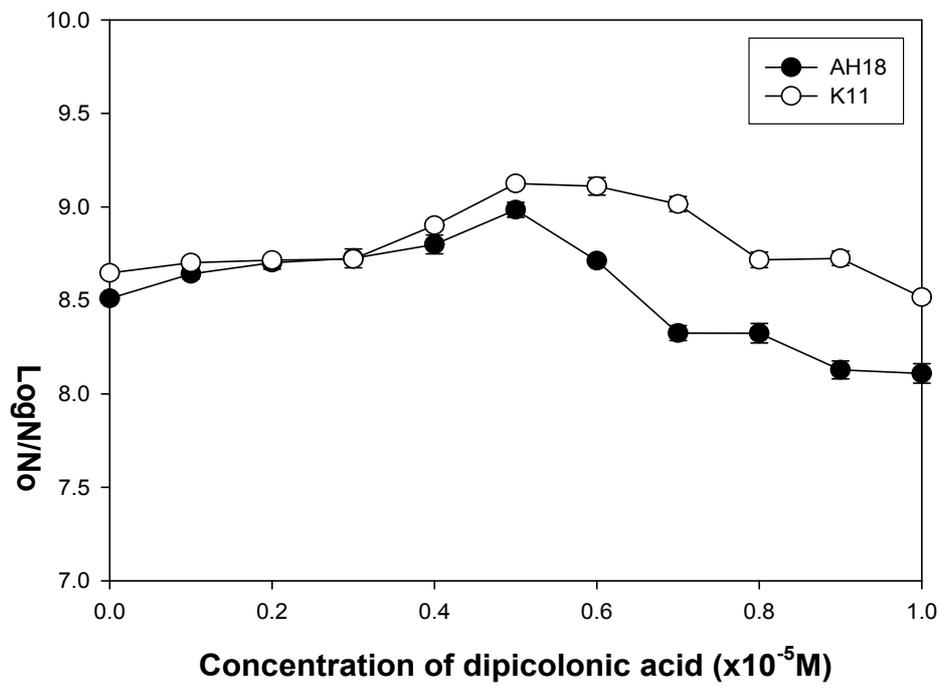


Fig. 1.10. The effect of CaCl<sub>2</sub> and dipicolonic acid on the spore formation of *B. subtilis* AH18 and *B. licheniformis* K11. Values are means of 5 independent experiments. Standard errors were determined at  $P \leq 0.05$ .

라. 액상시제품 제작 및 경시변화 시험

(1) 액상 제제의 경시변화 시험용 시제품 제작

최적 조합인 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11, *P. fluorescens* 2112 컨소시엄의 발효 조건과 제제화 조건에 대하여 조사해 보았다. 컨소시엄 길항미생물은 탄소원과 질소원으로 glucose와 옥수수침지액을 사용한 기본배지(Table 1.6)에 pH 6.8, 30°C, 180 rpm, 통기조건 0.8 vm에서 소포제 투입하면서 8 L fermentor (KF-8L, KoBioTech Co., Korea)를 이용하여 배양하였다. 이러한 대량발효 조건은 플라스크 배양을 참고하여 통기율과 소포제 투입 시기에 관한 실험만 실시한 후 최종 조건으로 결정하였다(Table 1.5).

배양 후 영양 세포를 열처리하여 사멸시키고, 포자 형성을 유도하는 spore 형성배지(Table 1.7)로 포자를 형성시켜 미생물을 제제화하였다. Spore 형성배지는 배양액과 첨가제의 비율이 8:2가 되도록 투입하였으며, 첨가제로 사용된 부재료는 미생물제제기업인 (주)대유에서 실제 상업용 미생물제제의 제제화를 위하여 사용하는 부재료를 조성에 따라 부재료 A, B, C 3종류로 구분하여 사용하였다(Table 1.7). 경시변화 시험용 시제품의 포장은 밀봉이 가능한 유리앰플(25 ml)에 담았다(Fig 1.11). 이렇게 경시변화 시험용으로 생산된 시제품(Fig. 1.12)는 가학 조건과 저온에서 경시변화를 측정하였다.

Table 1.5. Optimum conditions for on large scale fermentation.

Conditions	PGPR strains		
	AH18	K11	P2112
Time (hr)	72	72	9
Temperature (°C)	37	37	30
pH	7.0	7.0	7.0
Air ration (NI/min)	2	2	2
Agitation (rpm)	200	200	200

Table 1.6. Main culture media of large fermentation for microbial agent containing *B. subtilis* AH18 and *B. licheniformis* K11.

Materials	Amount (%)
glucose	2
corn dipping	2
Ammonium sulfate	1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.6
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.4
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.3
MnSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.05

Table 1.7. Additive materials for the formulation of microbial agent containing *B. subtilis* AH18 and *B. licheniformis* K11.

Additive materials			
	A(%)	B(%)	C(%)
culture medium	89	80	88.7
Glycerol	7	10	10
Tween 20	4	6	1
Na-propionate			0.3
Span		4	
Total	100	100	100

Endospores producing induction	
Dipicolonic acid	0.6 x 10 <sup>-5</sup> M
CaCl <sub>2</sub>	0.7 x 10 <sup>-3</sup> M



Fig. 1.11. Liquid formulation : Storage test for a commercial agents. Commercial culture of *B. subtilis* AH18, *B. licheniformis* K11 and *P. fluorescens* 2112 for pilot production. Blending of additive materials and packaging of *B. subtilis* AH18, *B. licheniformis* K11 and *P. fluorescens* 2112 for liquid-type pilot production.



Fig. 1.12. The pilot products of antagonistic microbial agent formulated with *B. subtilis* AH18, *B. licheniformis* K11 and *P. fluorescens* 2112.

## (2) 저장 중 경시적 생존율 변화 추적

저장, 유통 과정의 경시적 변화에 따른 포자의 안정성을 조사하기 위하여, 부재료를 처리하여 제작한 시제품과 부재료를 처리하지 않은 시제품의 포자 농도 변화를 고온 안정성 실험(54°C, 6주)과 저온 안정성 실험(0°C, 7일) 등으로 가학조건에서 추적해보았다.

고온 안정성 시험의 경우 Fig. 1.14와 같이 시험 6주간 *B. licheniformis* K11의 포자 개수가 대부분  $10^8$ CFU/ml 이상 안정하게 유지되는 것을 확인 할 수 있었으며, 제제화과정의 부재료 첨가가 포자의 안정성에 미치는 영향을 조사한 결과 부재료를 첨가한 경우와 부재료 첨가하지 않은 경우에서 모두 포자가 안정한 것으로 확인되었다. *B. subtilis* AH18의 경우 Fig. 1.13에서 보는것처럼 *B. licheniformis* K11과 동일한 양상으로 포자 개수가 대부분  $10^8$ CFU/ml 이상 안정하게 유지되는 것을 확인 할 수 있었으며, 부재료를 첨가하거나 하지 않은 경우의 포자 개수 차이가 거의 없었다. 따라서 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11의 가열 포자형성에 의한 제제화에서는 부재료 첨가는 포자의 안정성에 큰 영향을 미치지 않는다고 생각되며 가열 스트레스가 포자의 안정성에 매우 큰 역할을 하였다고도 생각된다. 그리고 *P. fluorescens* 2112의 경우 초기값  $10^{12}$ CFU/ml에서 45°C, 54°C에서 보존능을 확인하였지만 부재료 첨가 유무 상관없이 모든 시제품이 한주를 못버티고 전부 사멸하고 말았다.

0°C에서 7일간 저온 안정성 시험을 실시한 결과 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11의 경우 무처리구와 부재료 처리구에서  $10^{10}$  CFU/ml의 개수를 유지하였고 *P. fluorescens* 2112에서는 무처리구와 부재료 처리구에서  $10^8$  CFU/ml의 개수를 유지하였다(Fig. 1.15, 1.16, 1.17). 이 결과로 볼 때 저온균인 *P. fluorescens* 2112의 액상제제화는 저온에서만 가능하다고 보여진다. 이와 같은 고온 및 저온 안정성 시험 결과에서 가열처리로 내생포자를 유도하여 액상 제제화하는 경우 장기적 보관시 포자 안정성에 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11의 부재료 유무가 큰 영향을 끼치지 않는으나 부재료A에서 조금 더 좋은 안정성을 확인할 수 있었고 *P. fluorescens* 2112는 저온에서만 액상제제가 가능한 걸 확인할 수 있었다.

따라서 가학 저장시험인 고온 및 저온 안정성 시험결과로 미루어 볼 때, 농촌진흥청이 고시한 경시변화 시험기준에 의거하여 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11의 액상 시제품 모두 3년 저장 안정조건 설정이 가능하다고 생각되며 *P. fluorescens* 2112의 액상 시제품은 저온에서 1년 저장 안정조건 설정이 가능하다고 생각된다.

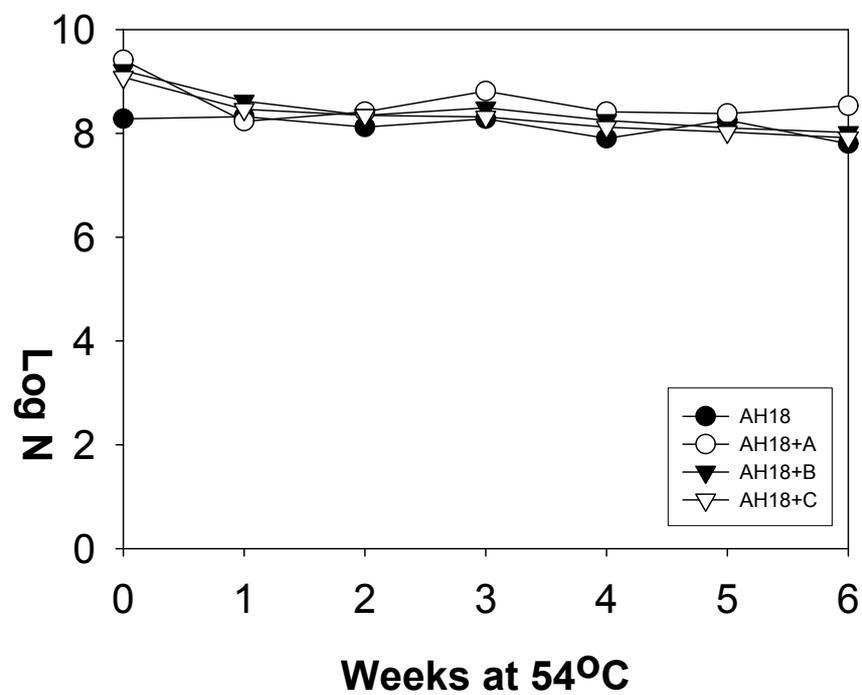


Fig. 1.13. Stability of pilot products at 54°C, 6 weeks-storage of *B. subtilis* AH18. Values are means of 5 independent experiments. Standard errors were determined at  $P \leq 0.05$ .

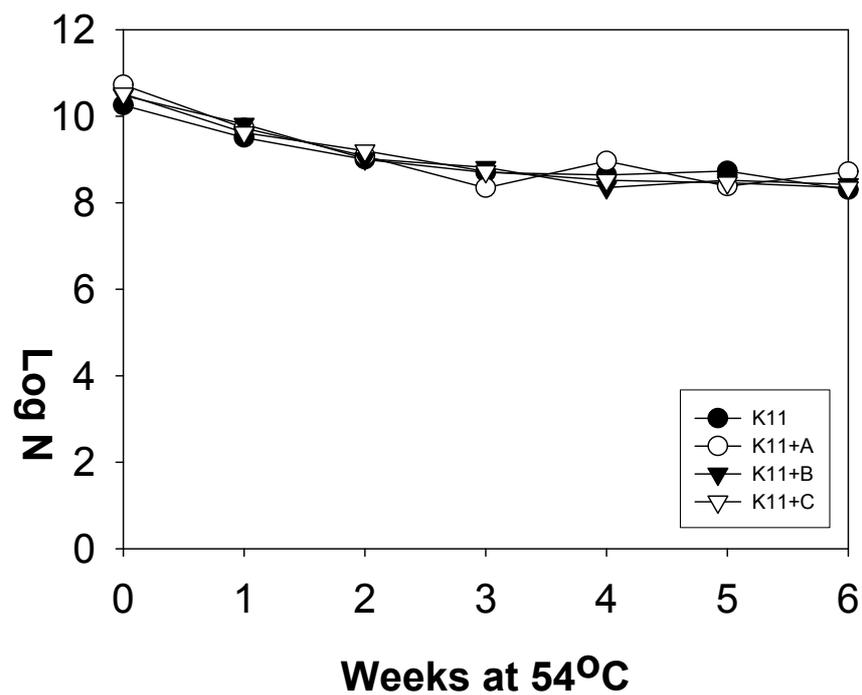


Fig. 1.14. Stability of pilot products at 54°C, 6 weeks-storage of *B. licheniformis* K11. Values are means of 5 independent experiments. Standard errors were determined at  $P \leq 0.05$ .

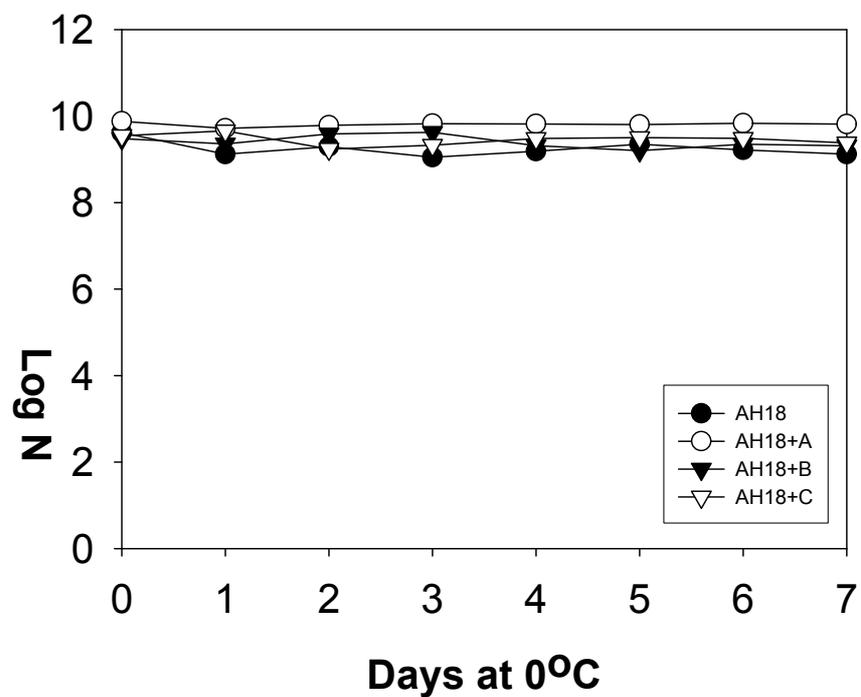


Fig. 1.15. Stability of pilot products at 0°C, 7 days-storage of *B. subtilis* AH18. Values are means of 5 independent experiments. Standard errors were determined at  $P \leq 0.05$ .

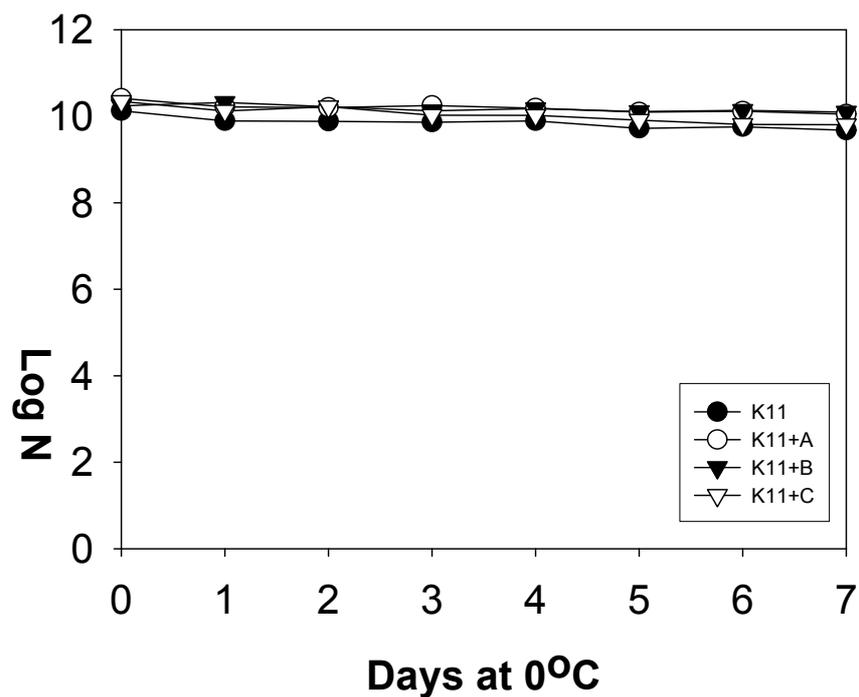


Fig. 1.16. Stability of pilot products at 0°C, 7 days-storage of *B. licheniformis* K11. Values are means of 5 independent experiments. Standard errors were determined at  $P \leq 0.05$ .

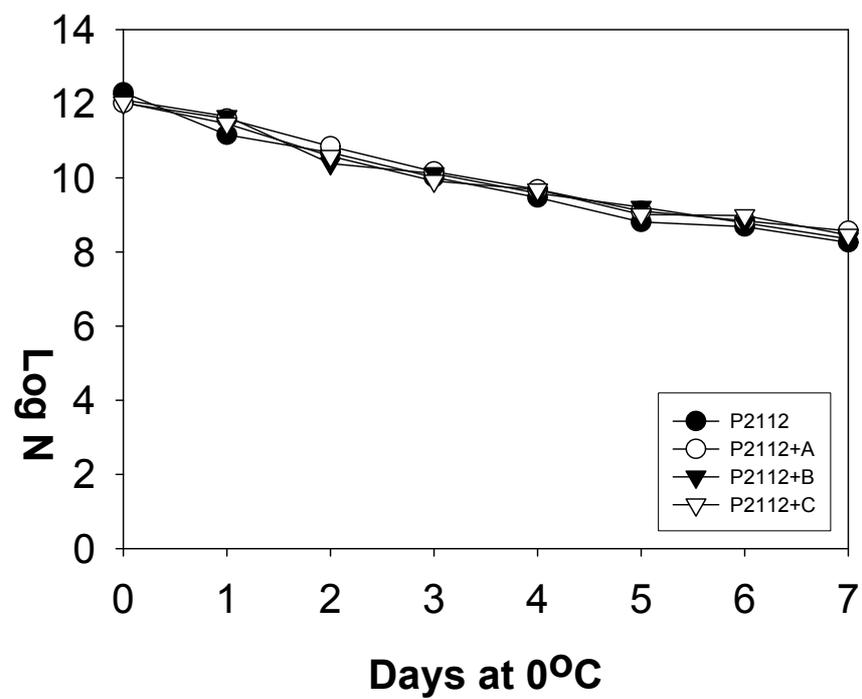


Fig. 1.17. Stability of pilot products at 0°C, 7 days-storage *P. fluorescens* 2112. Values are means of 5 independent experiments. Standard errors were determined at  $P \leq 0.05$ .

마. 분말시제품 제작 및 경시변화 시험

(1) 분말제제화를 위한 무기담체의 선정

분말제제화를 위한 무기담체를 선정하기 위해 가열안정성 시험을 실시하였다. *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11은 균주와 혼합한 무기담체를 54°C에서 6주동안 확인하여 최종적으로 무기담체 Zeolite, Illite를 선정하였다(Fig 1.18, 1.19). *P. fluorescens* 2112는 균주와 혼합한 무기담체를 45°C에서 1시간동안 가열스트레스 실험을 통해 최종적으로 무기담체 H1800, Zeolite, Illite를 선정하였다(Fig. 1.20). 선정한 무기담체인 Zeolite는 (주)대유로부터 공급받은 것이고, Illite는 (주)동창일라이트로부터 공급받았으며, H1800은 (주)세라이트코리아로부터 공급받았다. 선정한 무기담체들에 관한 정보는 Table 1.8에 나열하였다.

Table 1.8. Information of selected inorganic carriers.

		<b>Zeolite</b>	<b>Illite</b>	<b>H1800</b>
<b>Color</b>		Brown	Yellow	White
<b>Appearance</b>		Fine powder	Fine powder	Fine powder
<b>Bulk specific gravity</b>			2.6 g/ml	0.15 g/ml
<b>pH</b>		6.7-7.0	8.4	6.5-7.3
<b>Typical chemical analysis, Weight %</b>	<b>SiO<sub>2</sub></b>	71.13	52.01	77.4
	<b>Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	11.12	30.5	12.79
	<b>Na<sub>2</sub>O</b>	0.94	0.43	3.12
	<b>CaO</b>	1.34	0.01	0.56
	<b>Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	2.31	2.3	0.45
	<b>K<sub>2</sub>O</b>	2.11	7.26	5.41
	<b>TiO<sub>2</sub></b>	0.23	0.46	0.05
	<b>MgO</b>	1.35	0.25	0.17
	<b>SO<sub>3</sub></b>	0.12	-	-
	<b>LOI</b>	6.36	4.49	-
	<b>P<sub>2</sub>O<sub>5</sub></b>	-	0.02	-
	<b>MnO</b>	-	0.01	-

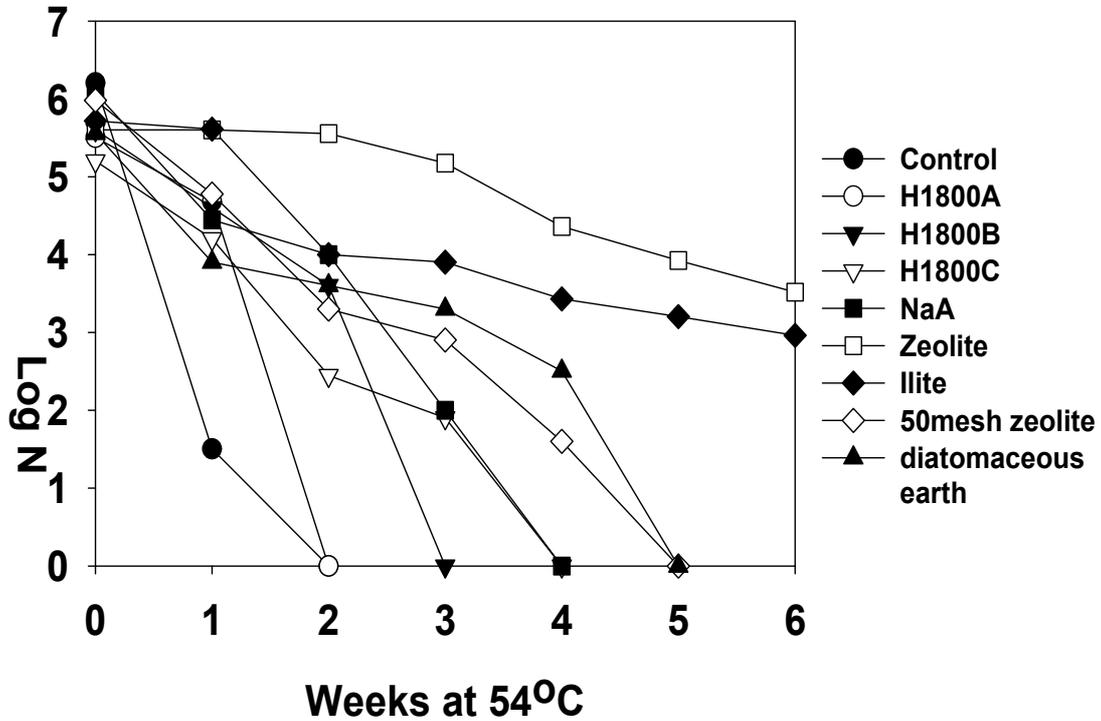


Fig. 1.18. Influence of inorganic carriers on the heat stability of endospores of *B. subtilis* AH18. The graph above shows the result of measurement on one week basis, keeping inorganic carriers during six weeks in 54°C.

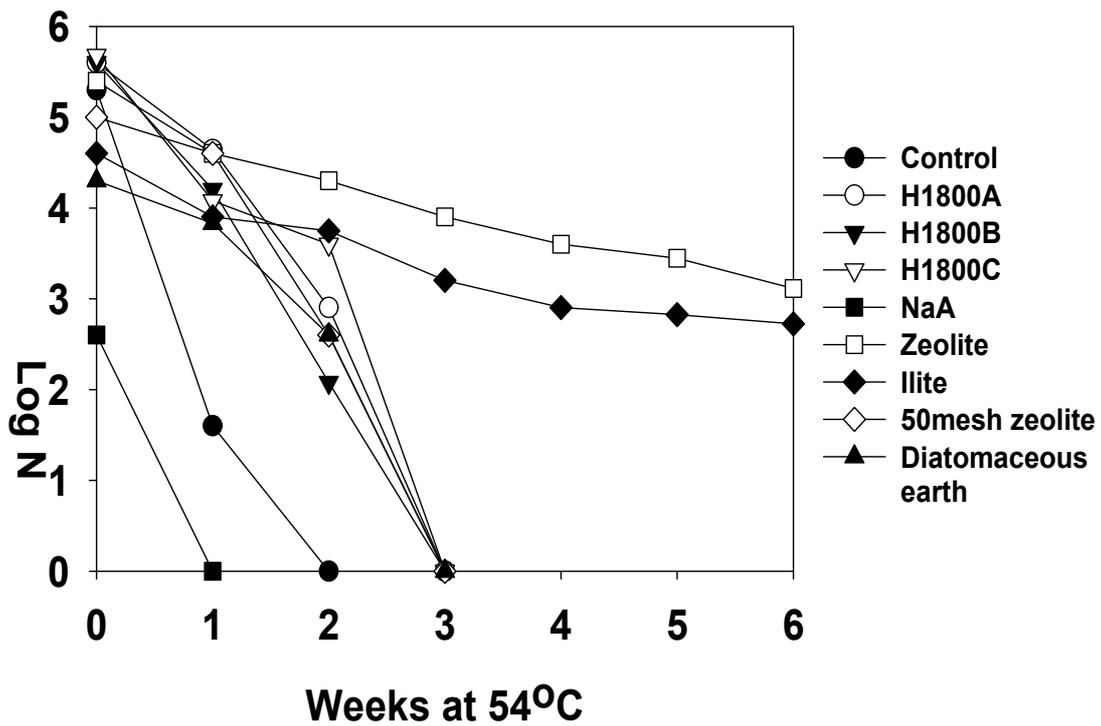


Fig. 1.19. Influence of inorganic carriers on the heat stability of endospores of *B. licheniformis* K11. The graph above shows the result of measurement on one week basis, keeping inorganic carriers during six weeks in 54°C.

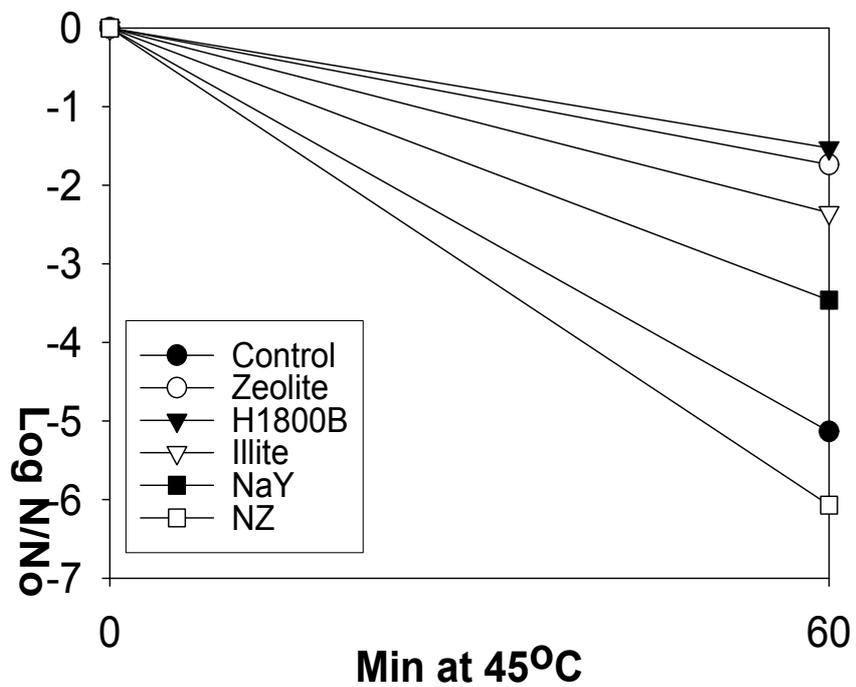
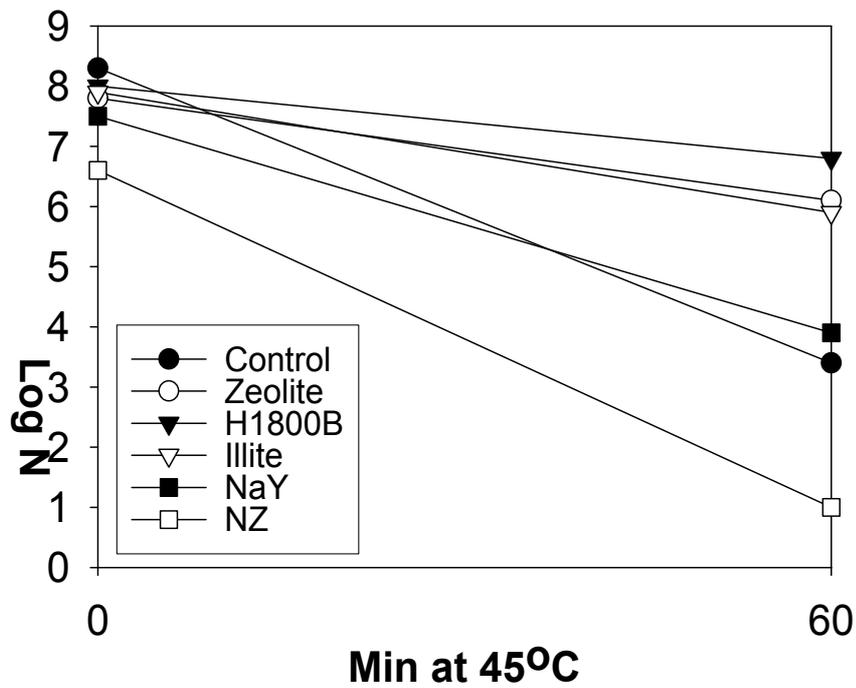


Fig. 1.20. Influence of inorganic carriers on the heat stability of *P. fluorescens* 2112. This graph shows a decrease of the number of *P. fluorescens* 2112 according to each carrier. We have examined with the way on one hour basis applying to heat stress drying on hour.

(2) 분말제제의 경시변화 시험용 시제품 제작

*B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11, *P. fluorescens* 2112가 배양된 액상상태에서 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11은 무기담체 Zeolite, Illite를, *P. fluorescens* 2112는 무기담체 H1800A, H1800B, H1800C, Zeolite, Illite 각각에 배양액과 무기담체가 1:2의 비율이 되도록 섞었다. 이러한 비율로 무기담체 1g당 500 $\mu$ g의 배양액이 들어가도록 하여 이를 멸균된 투명비닐에 1차 진공포장을 하고 빛과 외부로부터의 침입을 차단하기 위한 2차 진공포장을 행하였다(Fig. 1.21, 1.22).

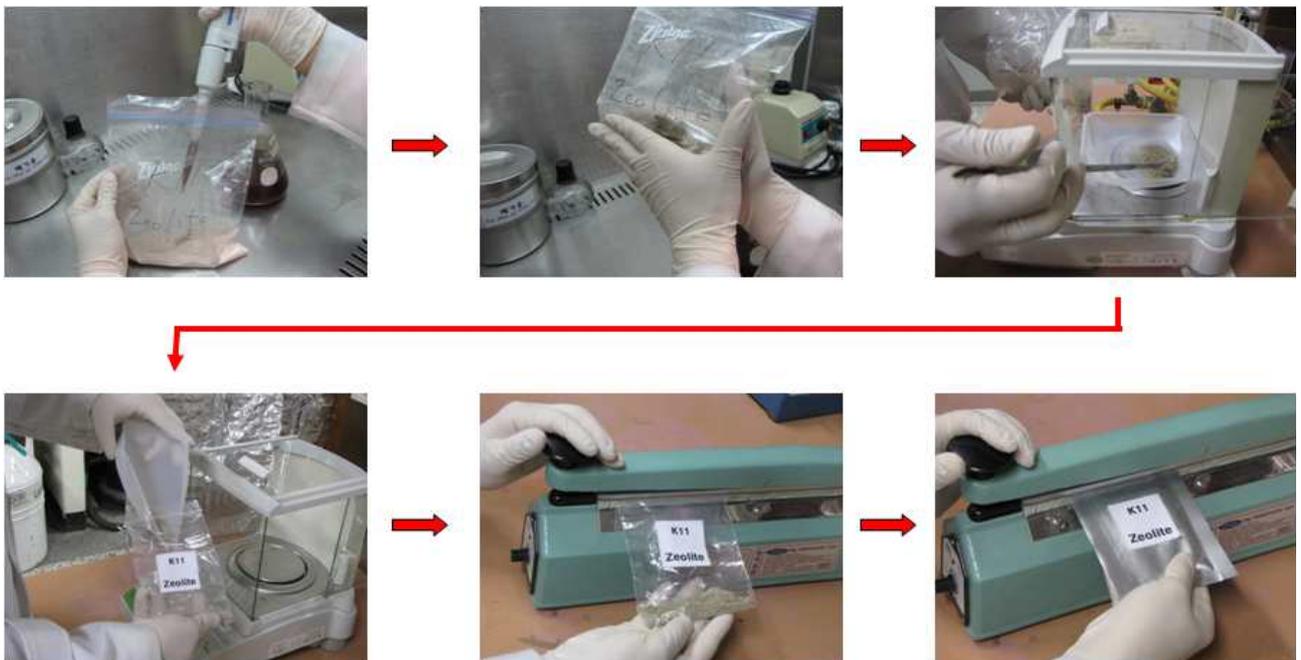


Fig. 1.21. Powder formulation : Storage test for a commercial agents. Attaching of carrier and packaging of *B. subtilis* AH18, *B. licheniformis* K11 and *P. fluorescens* 2112 for powder-type pilot production



Fig. 1.22. Storage test for a commercial agents. The carrier that microorganism and carrier was mixed in the ratio of one to two was packed and packed it again by one gram. At first, uncolored plastic bag was used and then, colored thick plastic bag was used.

### (3) 저장 중 경시적 생존율 변화 추적

저장, 유통 과정의 경시적 변화에 따른 균체의 안정성을 조사하기 위하여 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11은 시제품으로 제작한 포장용지에 밀봉한 분말무기담체에 균처리된 샘플 종류 당 6개씩 총 6주분량을, *P. fluorescens* 2112는 12주 분량을 준비하여 1주마다 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11, *P. fluorescens* 2112 시제품의 균 농도 변화를 고온 안정성 실험으로 가학조건에서 추적해보았다. 대한민국 농촌진흥청이 고시한 경시변화 시험기준에 따라 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11은 54°C에서 6주, *P. fluorescens* 2112는 35°C에서 12주의 조건으로 시행하였다.

고온 안정성 시험의 경우 *B. subtilis* AH18은 선정된 두 종류의 무기담체가 포자의 농도를 6주동안 약 100배가량 감소시켜 포자의 농도를 CFU  $10^8$  이상 유지시켰고 Control도 예상보다 크게 감소하지 않았다(Fig. 1.23). 이에 반해 *B. licheniformis* K11은 선정된 두 종류의 무기담체가 포자의 농도를 6주 동안 약 100배가량 감소시켜 포자의 농도를 CFU  $10^8$  이상 유지시켰지만 Control은 큰폭으로 감소하였다(Fig. 1.24). 이와 같은 결과는 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11이 동일한 포자 생성균이지만 고온 안정성능에서 차이를 보인다는 것을 나타낸다. 결과적으로 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11의 분말제제화에서 선정된 무기담체 Zeolite, Illite가 대한민국 농촌진흥청이 고시한 경시변화 시험기준을 충분히 만족시키는 결과를 나타내었다. 특히 Zeolite의 경우 단가가 저렴하고 구하는데 큰 어려움이 없어 생산비 절감에 큰 도움이 되리라 생각한다.

*P. fluorescens* 2112는 저온균이기에 54°C에서 6주동안 견디는 것이 불가능하여 35°C에서 12주동안 균의 농도변화를 관찰하였다. 포자를 생성하는 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11의 경우 포자생성으로 인해 장기간 고온에서의 보존이 수월하였지만, *P. fluorescens* 2112는 저온균이고 포자생성능이 없어 장기간 보존에 어려움을 겪었다. 총 5종류의 무기담체와 Control로 실험한 결과 Zeolite에서 가장 우수한 보존능을 나타내었다(Fig. 1.25). 초기에 무기담체와 균 배양액을 혼합하였을 시 Control에 비해 무기담체에서 약 CFU  $10^2 \sim 10^4$  가량 대폭으로 균이 줄어드는 것을 볼 수 있었으나 그 이후 전반적으로 Control에 비해 35°C에서의 보존능이 무기담체에서 더 우수하다는 결과를 얻을 수 있었다. 특히 Zeolite는 12주차까지 CFU값을  $10^8$ 을 유지함으로 저온균인 *P. fluorescens* 2112의 분말제제화에 최적의 무기담체임을 발견할 수 있었다.

저온 안정성 시험을 0°C에서 7일간 실시한 결과 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11의 경우 Control과 Zeolite, Illite 모두에서  $10^9$  CFU/ml 이상의 개수를 유지하였고 *P. fluorescens* 2112에서는 Control과 모든 무기담체에서  $10^{10}$  CFU/ml 이상의 개수를 유지하였다(Fig. 1.26, 1.27, 1.28). 모든 무기담체가 저온에서 높은 안정성을 보여주며 그 중 Zeolite가 좀더 나은 결과를 보여주었다.

각각 특성이 다른 세 균주인 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11, *P. fluorescens* 2112에서 공통적으로 사용할 수 있는 무기담체를 발견했다는 점에서 크게 고무적이다. 특히나 Zeolite는 쉽게 구할 수 있고 원가가 저렴하다는 장점을 가지고 있어 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11, *P. fluorescens* 2112의 분말제제화에 따른 상업화를 충분히 가능하게 할 것으로 보인다.

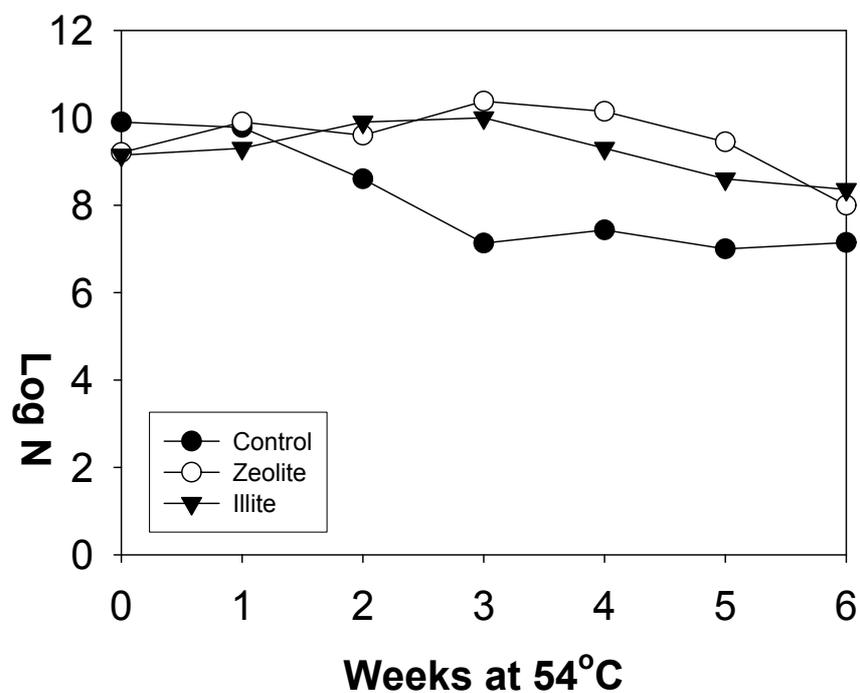


Fig. 1.23. Influence of inorganic carriers on the heat stability of endospores of *B. subtilis* AH18. The graph above shows the result of measurement on one week basis, keeping inorganic carriers during six weeks in 54°C.

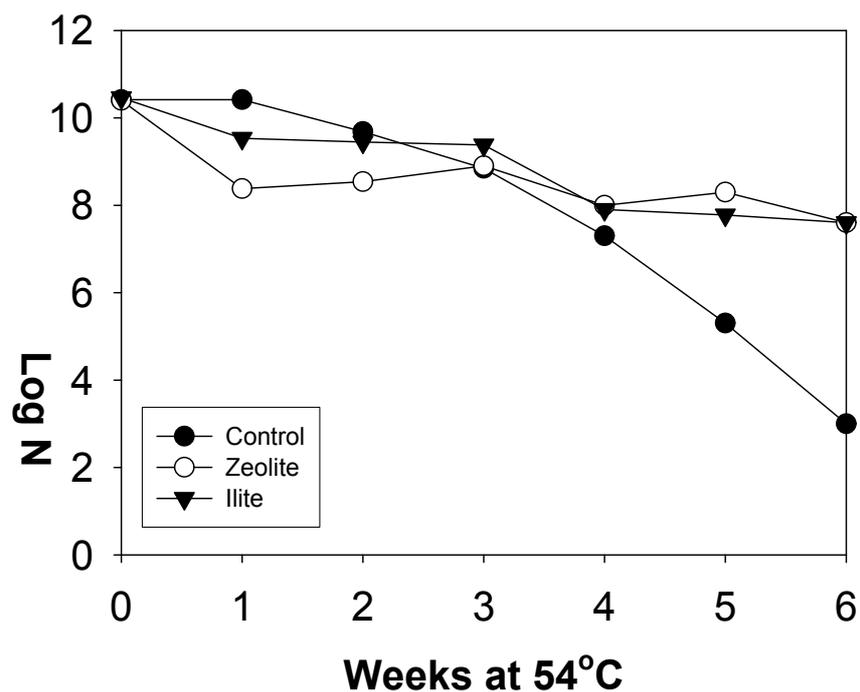


Fig. 1.24. Influence of inorganic carriers on the heat stability of endospores of *B. licheniformis* K11. The graph above shows the result of measurement on one week basis, keeping inorganic carriers during six weeks in 54°C.

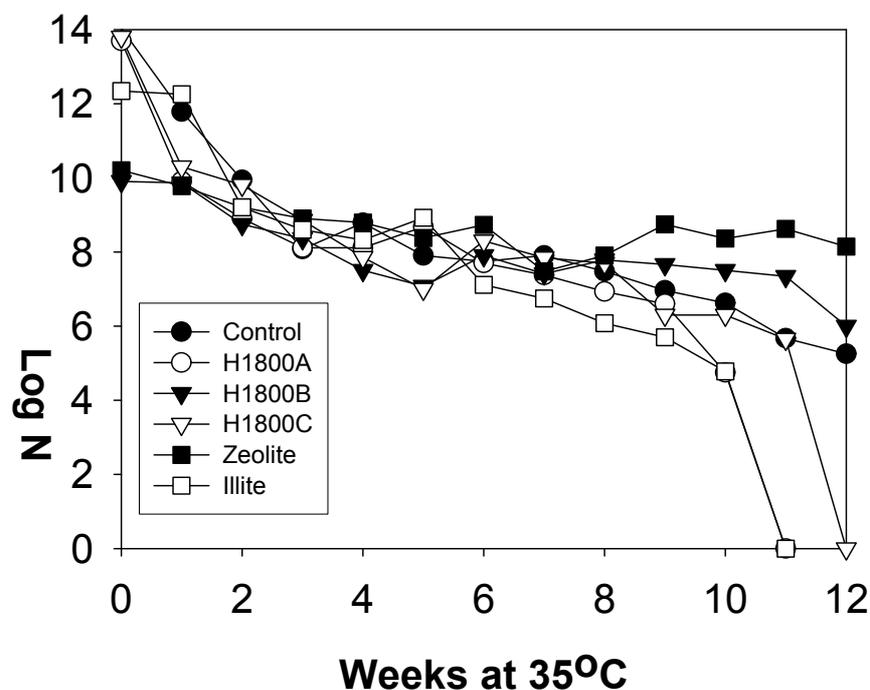


Fig. 1.25. Influence of inorganic carriers on the heat stability of *P. fluorescens* P2112. The graph above shows the result of measurement on one week basis, keeping inorganic carriers during twelve weeks in 30°C.

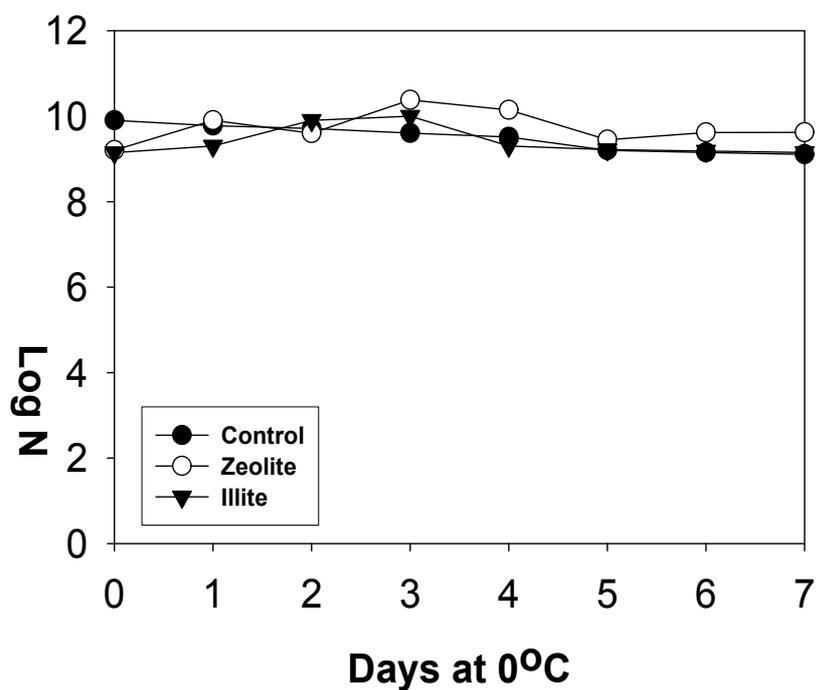


Fig. 1.26. Stability of pilot products at 0°C, 7 days-storage of *B. subtilis* AH18. Values are means of 5 independent experiments. Standard errors were determined at  $P \leq 0.05$ .

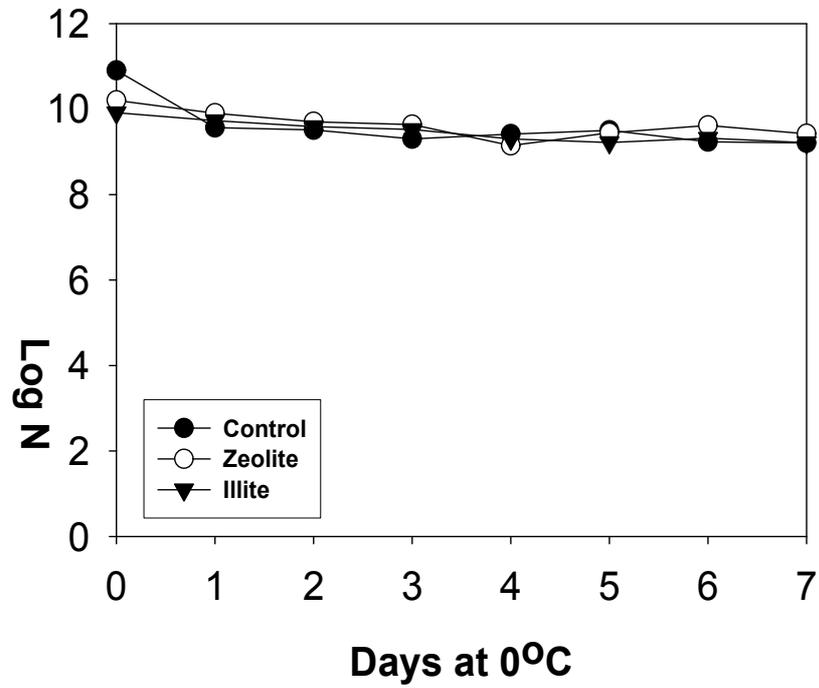


Fig. 1.27. Stability of pilot products at 0°C, 7 days-storage of *B. licheniformis* K11. Values are means of 5 independent experiments. Standard errors were determined at  $P \leq 0.05$ .

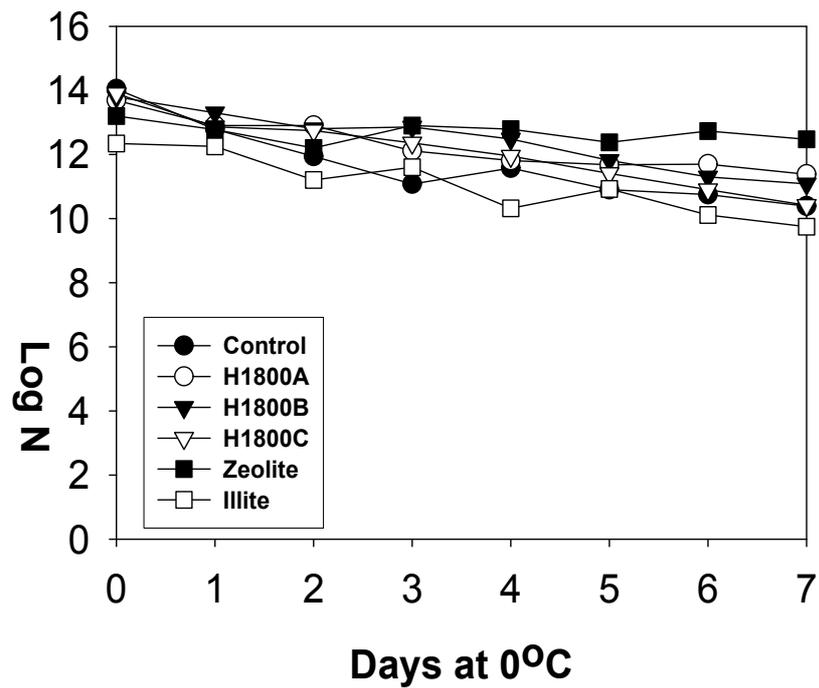


Fig. 1.28. Stability of pilot products at 0°C, 7 days-storage of *P. fluorescens* P2112. Values are means of 5 independent experiments. Standard errors were determined at  $P \leq 0.05$ .

바. *In vivo* pot 실험을 통한 액상 시제품의 고추역병 방제능 검증

고추역병균인 *P. capsici*를 관주접종한 고추묘에 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11의 액상 제제를 처리한 결과 Fig. 1.29과 같이 *B. subtilis* AH18 (B), *B. licheniformis* K11 (C)의 단독 처리구보다 두 종류의 제제를 병용하여 사용하였을 때 훨씬 방제력이 좋은 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 한 종류의 제제를 사용하는 것보다 두 종류의 제제를 사용하는 것이 시너지 효과를 나타낸다는 사실을 보여준다. 특히, 경시변화 추적의 고온 안정성 실험을 위하여 54°C에서 6주간 보관하여 가학조건으로 저장하였던 제제를 처리하였음에도 불구하고 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11 균주 모두 고추역병에 대한 방제능이 탁월하였으므로, 두 액상 시제품 모두 고온의 조건에서도 고추역병 방제능을 유지하고 있음을 알 수 있다. 따라서, 컨소시엄 No.11의 길항미생물 액상 제제는 3년의 약효설정이 가능한 고추역병 방제능이 우수한 길항미생물 제제라고 판단된다.

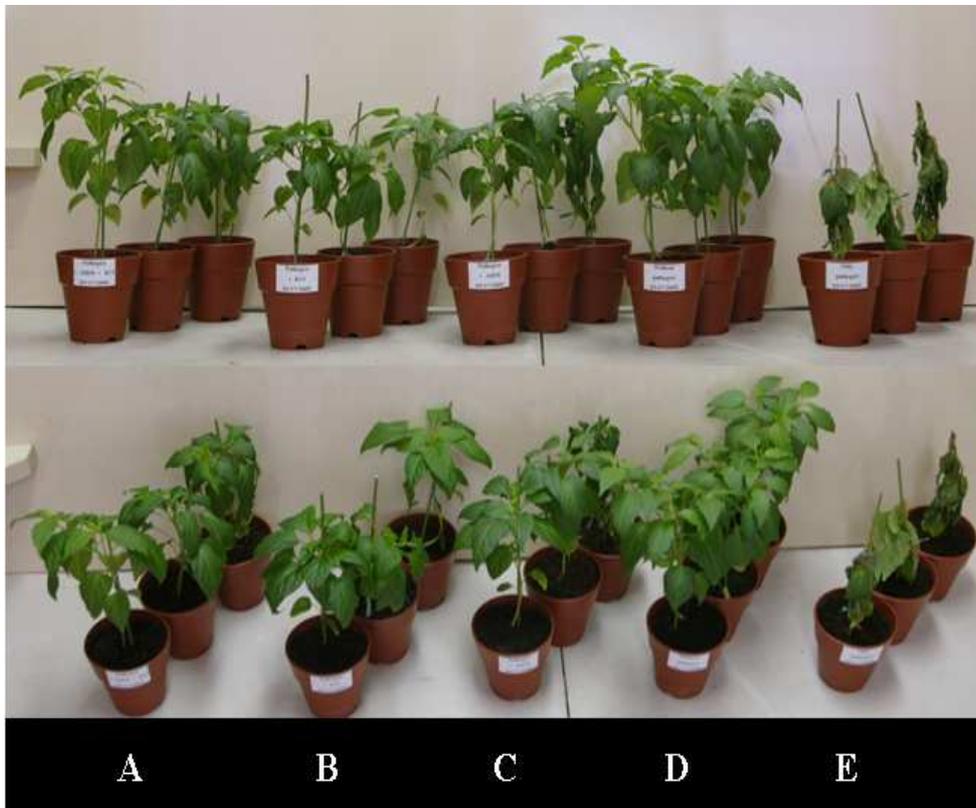


Fig. 1.29. Phytophthora blight suppression by high temperature tested pilot microbial agent (54°C, 6 weeks).

A, pathogen+AH18+K11; B, pathogen+K11; C, pathogen+AH18; D, without pathogen; E, only pathogen.

사. *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11의 동시제제화

(1) *B. subtilis* AH18 and *B. licheniformis* K11의 경쟁성

통상 제제화된 미생물제제는 저장과 유통이 이루어지는 동안 제제의 용기 내 미생물은 환경 조건이 생육에 이롭게 되면 증폭하다가 증폭을 억제하게 하는 제제화의 요인(제제화 기술의 포인트)으로 말미암아 다시 안정성을 찾거나 휴면상태로 돌아가는 것을 반복적으로 보이게 된다. 즉, 제제화 당시 포자만을 선발하여 제제화를 했어도 유통기간 중 발아를 하여 영양형 세포로 변화될 수 있다는 것이다. 본 연구에서는 두 가지 미생물을 투입하여 한 제제로 생산하고자 하는 목적이 있기 때문에 두 종류의 포자가 영양형 세포가 되었을 때 제품 안에서 일어날 수 있는 경쟁관계를 살펴보고자 했다. 통상 두 미생물을 LB 배지를 사용하여 37°C에서 50ml 진탕배양 하면 5시간 후 *B. subtilis* AH18도 *B. licheniformis* K11도  $10^8$ cfu/ml의 농도가 되면 정지기로 들어선다(result not shown). 그러나 이 두 종류의 *Bacillus* 세균을 초기농도가 같게 하여 한 배지에 동시에 접종하고 생존곡선을 그려보면,  $10^6$ cfu/ml의 농도가 될 때까지는 두 종 모두 생육이 왕성함을 알 수 있으나, 이 시점이 지나면 *B. licheniformis* K11의 생육은 현저히 저하되고(Fig. 1.30, 2-3h interval), *B. subtilis* AH18이  $5 \times 10^7$  정지기에 도달한 3시간 이후에는 배양액에서 완전히 사라지게 됨을 알 수 있었다. 이렇듯 영양형 세포의 상태로는 경쟁이 일어나서 한 균주가 원하는 밀도로 유지되기 어렵기때문에 만약, 포자로 휴면화 시킨다면 경쟁을 해소할 수 있을 것으로 사료되었다. 따라서, 분말 제제화를 포자를 이용하고 포자의 발아를 억제하여 안정화에 긍정적인 효과를 준다고 밝혀진 미세기공의 무기담체를 적용해 보기로 했다. 본 연구에서는, 쉽게 상업적으로 구할 수 있고 값이 싼 천연제올라이트 한 종, 합성제올라이트 2종을 제제화 담체 후보자로 선정하였다.

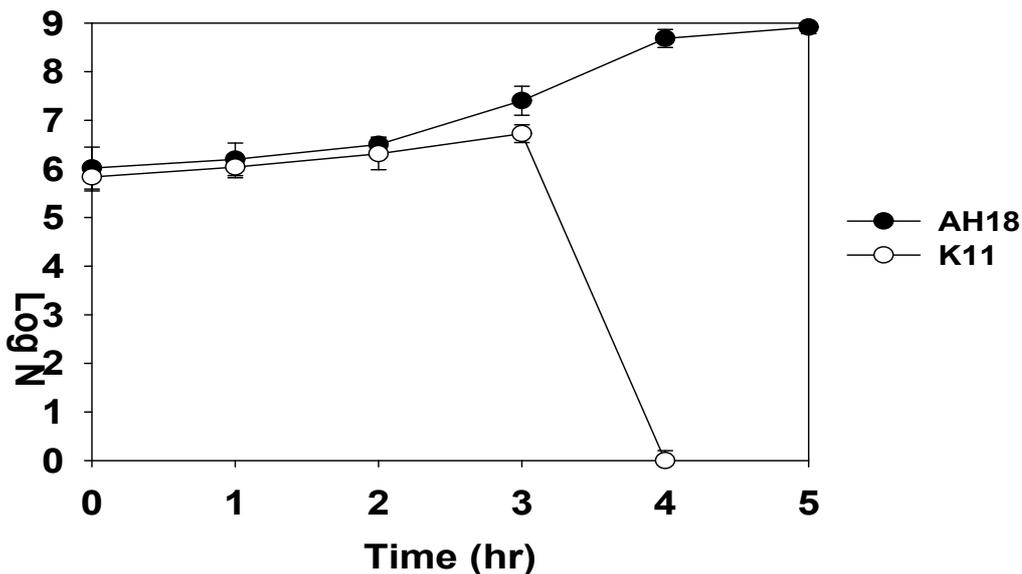


Fig. 1.30. Competition of *B. subtilis* AH18 and *B. licheniformis* K11 in LB broth. Note that the growth of *B. licheniformis* K11 is inhibited when the cell concentration of *B. subtilis* AH18 reaches  $5 \times 10^7$ cfu/ml. Values are means of 4 independent experiments.

## (2) Stability of endospore-carrier formulations at 45°C

담체와 포자를 혼합하여 만든 미생물제제가 두 *Bacillus* 종의 장기간 안정화에 기여할 수 있는지 알아보기 위해, 두 미생물의 성장이 왕성한 조건이고 우리나라 여름 철 시설 불량한 저장 창고의 악조건 온도인 45°C를 유지하면서 2달간의 개체 수 변이를 조사하였다. 제제화의 담체로 천연 제올라이트를 도입한 경우 제제화 이후 즉시 포자의 휴면상태가 깨지면서 20일까지 왕성한 세포의 증식이 일어나 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11은 각각  $10^3$ 배와  $10^2$ 배 증식했음을 알 수 있었다(Fig. 1.31B). 이는 *B. subtilis* AH18만을 제제화 했을 때 포자가 안정적으로 6개월간 밀도를 유지한 정 등(2007)의 결과와는 상이한 결론이며, 본 연구에서는 정 등(2007)에서보다 4배의 수분 함량이 제제화 내에 존재하고 있기 때문에 적용된 담체의 양 만으로 효과적인 수분을 포자로부터 배제할 수 없었던 이유라고 사료된다. 이 같은 포자의 발아는 같은 수분 조건 하에서 합성 제올라이트인 NaY도 포자의 휴면상태 유지에 도움을 주지 못하여, 포자가 발아하면서 20일 시점에서  $10^3$ 배 이상 *B. subtilis* AH18의 증식이 일어난 것으로 확인되었다(Fig. 1.31B). 일단 휴면상태가 깨지면서 *B. subtilis* AH18은 계속 성장하여 조사를 마친 60일째에는 최종적으로  $10^4$ 배 증폭된 상태였다. 그러나, 경쟁관계에서 열세를 차지했던 *B. licheniformis* K11은 *B. subtilis* AH18이 증식함에 따라 경쟁에서 뒤지면서 생존이 불가능해졌음을 알 수 있었다(Fig. 1.30과 Fig. 1.31B,C 비교). 즉, 20일 이후부터는 *B. subtilis* AH18이  $5 \times 10^7$ cfu/ml 이상으로 증식함에 따라, *B. licheniformis* K11의 생장이 억제 되어 개체 수는 계속적으로 줄어들고 마지막으로 관찰한 60일째에 눈으로 확인할 수 있는 *B. licheniformis* K11 세포가 LB 배지상에서 없었다(Fig. 1.31B,C). 이는 액체로 보존된 상태에서 두 미생물의 휴면이 깨지면서 *B. subtilis* AH18의 증식이 일어남에 따라 *B. licheniformis* K11이 경쟁에서 도태되어 나가는 대조군과 흡사한 양상을 보이고 있다(Fig. 1.31A). 한편, 두 포자를 합성제올라이트인 NaA로 제제화한 포장에서는 두 미생물 모두 양호한 안정성을 보여주어 마지막 60일째에서도 초기 투입된 밀도만큼의 생존 미생물을 확인할 수 있었다(Fig. 1.31D). 여기서 NaA담체의 어떤 물리성 때문에 40%의 수분 함량에도 포자의 휴면상태를 유지하게 하는지 알기 위해 pH를 측정하였다; 적용된 담체 중 NaA만이 강염기성을 나타내었고 다른 담체들은 pH 6.7 또는 pH 8.3에 속하는 약산성에서 약염기성의 물질이었다(Table 1.9).

환경이 중성이나 약염기성인 경우엔 일단 포자가 발아하면 증식을 억제할 수 있는 물리적 조건으로 작용하지 못하는 반면, NaA의 강한 염기성은 포자의 발아 및 증식을 억제하여 다시 포자로의 귀환을 촉진하는 환경을 조성하고 있었다고 사료된다. 이것을 확인하기 위해, 액체 상태의 포자를 여러 산도 하에 적용시키고 45일 간의 생존을 조사하였다. Fig. 1.32에서 보는 바와 같이, 산성인 pH 5.0에서는 두 *Bacillus*균주 모두 20일째까지는 완만하게 생존 세포 수가 감소하다가 *B. subtilis* AH18의 경우엔 40일이 되면서 모두 사멸하였고, *B. licheniformis* K11의 경우엔 60일째 대부분 사멸 하였다(Fig. 1.32A). 산도 pH 9.0에서도 여전히 같은 현상이 나타났다(results not shown). 그러나 강 염기성 상태(pH 11.0)인 경우는, 다른 생장의 기미 없이 두 포자의 수가 안정적으로 60일간 유지되고 있었음을 알 수 있었다(Fig. 1.32B). 이것은 Fig. 1.30과 Fig. 1.31에서 본 경쟁의 행태를 재현해 주고 있다고 볼 수 있다. 따라서 담체의 산도는 영양형 세포의 생육에는 불리한 pH 11.0이 되어야 오히려 휴면효과가 높음을 알 수 있었다. 이 실험의 결과는 앞서 강염기성의 담체를 이용하여 제제화 했을 때 포자가 안정적으로 유지되었던 Fig. 1.31C의 결과를 지지해 주고 있다고 사료된다.

Table 1.9. Selected physical characteristics of inorganic carriers employed

Carrier	Composition (wt.%)		Porosity (%)	Pore diameter ( $\mu\text{m}$ ) <sup>1</sup>	Total pore area( $\text{m}^2/\text{g}$ )	pH(10% slurry)	Particle size( $\mu\text{m}$ ) <sup>2</sup>	Source
Synthetic zeolite NaA	SiO <sub>2</sub>	49	74	0.084	75	11.15	3.2	Chemworld tech. Ltd.
	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	20						
	Na <sub>2</sub> O	11						
Synthetic zeolite NaY	SiO <sub>2</sub>	39	64	0.29	14	8.3	3.2	Chemworld tech. Ltd.
	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	34						
	Na <sub>2</sub> O	20						
Natural zeolite	SiO <sub>2</sub>	69.6	62	0.25	12	6.74	12	Baekwang Chemical Co.
	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	15.8						
	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1.89						
	Na <sub>2</sub> O	2.1						
	K <sub>2</sub> O	4.0						
	CaO	3.3						

<sup>1, 2</sup> Pore diameter and particle size were determined by suppliers.

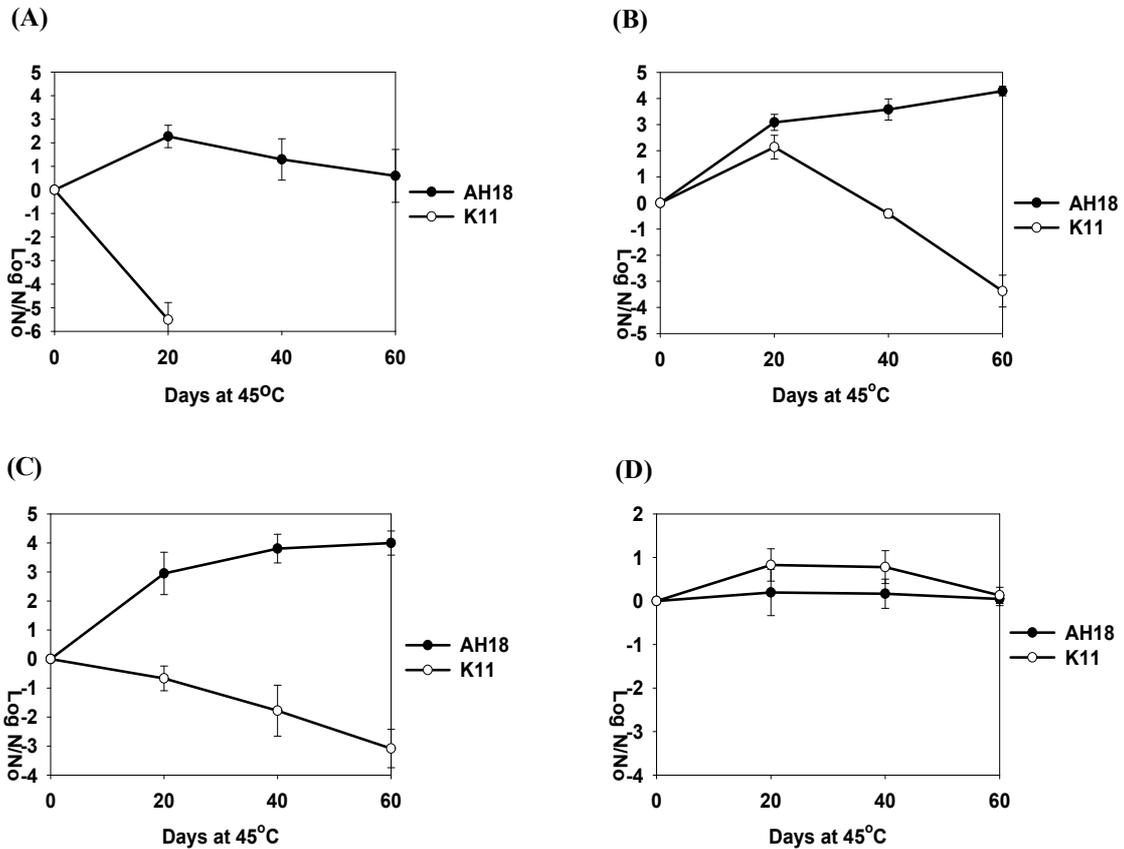


Fig. 1.31. Stability at 45°C of *B. subtilis* AH18 and *B. licheniformis* K11 formulated with different carriers. All formulations were kept at 45°C. (A) control, spores in liquid state, no carrier; (B) formulated with natural zeolite; (C) formulated with synthetic zeolite NaY; (D) formulated with synthetic zeolite NaA.

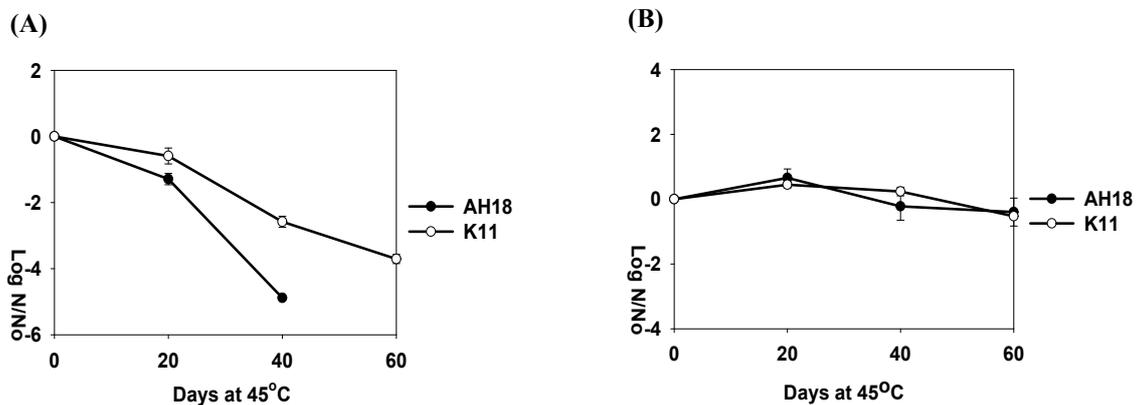


Fig. 1.32. Influence of pH in the stability of *B. subtilis* AH18 and *B. licheniformis* K11 in liquid state at 45°C. (A), pH 5.0; (B), pH 11.0. The endospore of *B. subtilis* AH18 and *B. licheniformis* K11 were treated dropwise with 50 mM NaOH or 50 mM HCl to achieve 5.0 and 11.0.

(3) *In vivo* pot test

두 *Bacillus* sp.를 강염기성의 담체인 NaA로 제제화한 것을 45°C, 60일 보관한 것을 사용하여 고추역병 방제능과 고추생장촉진능을 조사한 결과, 담체 제제를 처리한 것은 고추역병의 병징이 전혀 관찰되지 않았다(Fig. 1.33). 물 처리구는 물론 담체 NaA만을 처리한 고추의 경우 역병 처리 후 4일째부터 줄기 하단부분이 매우 짙은 갈색으로 변하면서 점차 줄기상단으로 번져갔으며 5일째부터는 잎이 시들면서 지상부 전체가 말라 죽는 전형적인 고추역병의 병징을 나타내었고(down panel of Fig. 1.33), 반면 *Bacillus* 담체를 처리한 것은 병징이 전혀 나타나지 않고 고추역병이 완벽하게 방제됨을 보여주었다. 또한, 고추의 성장촉진능도 물 처리구와 담체만 처리한 처리구보다 *Bacillus* 담체를 처리한 고추 포트에서는 줄기길이, 뿌리 길이, 생체중량 모두 20% 이상의 성장촉진효과를 나타내었다(Table 1.10, Fig. 1.34). 이러한 결과는 실제 미생물제제로 상품화하여 45°C의 악조건의 고온 보관상태에서도 담체 제제의 역병 방제능 및 성장촉진능이 실패하지 않았음을 증명하는 것으로, 새로운 미생물제제화 방법의 상업화에 충분히 이용할 수 있을 것이라 사료된다. 또, 두 *Bacillus* 종을 동시에 제제화하는 형태이므로 미생물제제 공정상 비용절감효과와 취급상 용이함을 기대할 수 있을 것이라 생각된다.

Table 1.10. Plant growth promotion by the formulated *B. subtilis* AH18 and *B. licheniformis* K11 on the growth of red-pepper

	Dry Weight (mg)	Stem elongation (cm)	Roots (cm)
Only water	46±1.2	7.4±0.9	4.8±0.5
Only synthetic zeolite NaA	47±0.7	7.5±0.5	4.9±0.6
formulated with synthetic zeolite NaA	56±1.9	8.6±1.2	6.1±0.4

The plants were watered every 5 days with 50 mL of sterile water. After 10 days of treatment, the growth promotion activity was determined. Values are expressed as the means of three replicates, each containing 30 plants. Standard errors were determined at  $P \leq 0.05$ .



Fig. 1.33. Phytophthora blight suppression by the formulated *B. subtilis* AH18 and *B. licheniformis* K11 on red-pepper. A, only water treatment; B, only synthetic zeolite NaA treatment; C, *Bacillus* spp. formulated with synthetic zeolite NaA treatment. The plants were watered every day with 50 ml of sterile water. The pictures were taken at 10 days.



Fig. 1.34. Plant growth promotion by the formulated *B. subtilis* AH18 and *B. licheniformis* K11 on red-pepper. A, only water treatment; B, only synthetic zeolite NaA treatment; C, *Bacillus* spp. formulated with synthetic zeolite NaA treatment. The plants were watered every day with 50 ml of sterile water. The pictures were taken at 10 days.

(4) 고추 근권우점능 조사

*Bacillus* 균주의 담체 제제를 고추묘에 처리한 후 고추근권의 뿌리를 회수하여 우점능을 확인한 결과 *B. subtilis* AH18의 경우  $5 \times 10^9$  CFU/g 수준으로 10일까지 초기농도를 유지하였으며, *B. licheniformis* K11은  $10^{-1}$ 배 감소하여 경우  $5 \times 10^8$  CFU/g을 유지하였다(Fig. 1.35). *B. licheniformis* K11의 경우 초기농도에 비하여 10일째부터  $10^{-1}$  배 정도 감소하였지만,  $10^8$  CFU/g의 높은 우점능을 나타내었다. 이와 같은 결과는 본 연구에 의해 개발된 담체제제내의 두 *Bacillus*가 고추 근권에 매우 잘 우점하는 것을 의미하며, 상기의 뛰어난 고추역병 방제 효과와 우수한 고추생육촉진 결과를 지지해주는 결과이다. 또한, *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11의 단독배양 후 혼합처리하였을 때 고추의 생장촉진과 역병방제능에서 시너지효과를 발휘하는 연구결과[임 등, 2009a; 2009b]를 뒷받침하는 또 하나의 증거를 제시하는 결과이다. 그리고, *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11은 *in vitro*의 영양분이 매우 한정된 환경 조건에서는 경쟁관계에 놓일 수 있지만, 실제 토양 속 고추근권의 한정되지 않은 영양환경조건과 넓은 서식지의 완충적인 환경에서는 경쟁관계에 놓여있지 않는다는 것을 간접적으로 증명하는 것이다.

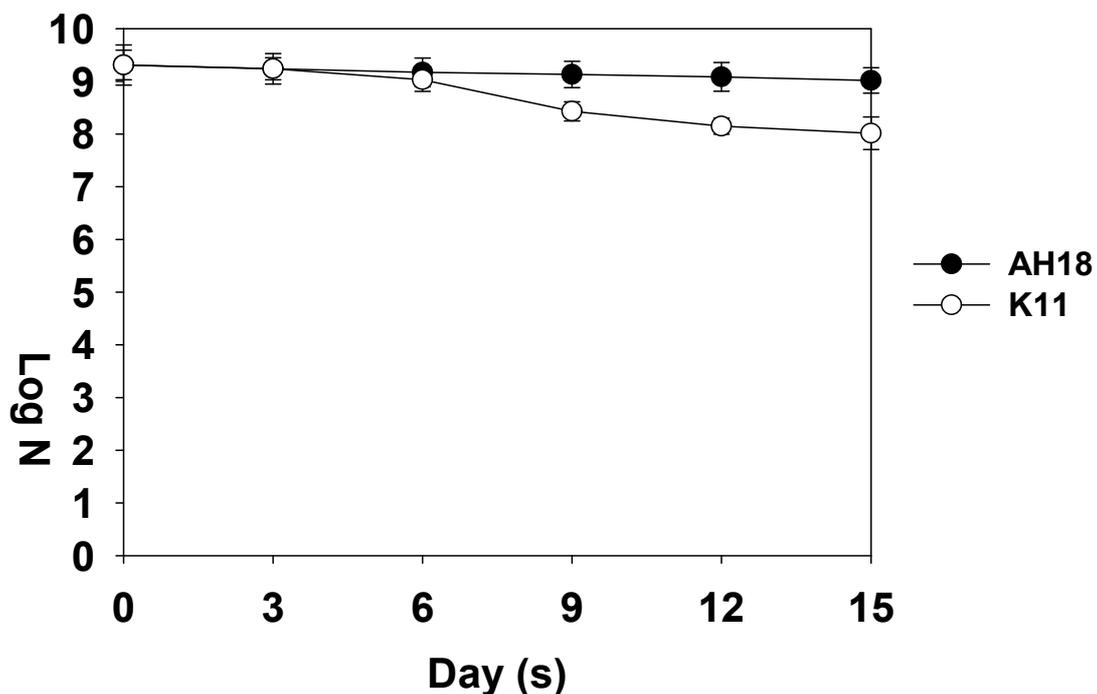


Fig. 1.35. Root colonization by the formulated *B. subtilis* AH18 and *B. licheniformis* K11 on red-pepper pot. The formulated *B. subtilis* AH18 and *B. licheniformis* K11 was resuspended in 10ml water and poured into pots. Each *B. subtilis* AH18 and *B. licheniformis* K11 strain of  $10^9$  cells was treated. The plants were watered every day with 50 ml of sterile water.

## 아. 시제품 제작 및 단가분석을 통한 경제성 분석

### (1) 시제품 제작

본 연구에서 수행한 경시변화 분석을 통해서 개발한 제제화 기술을 이용하여 *B. subtilis* AH18, *B. licheniformis* K11, *P. fluorescens* 2112를 제제화한 시제품을 제작하였다. 앞서 실험한 결과를 통해 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11은 동시제제화로 시제품을 제작하였고, *P. fluorescens* 2112는 단독으로 제제화하여 시제품을 제작하였다. 시제품은 분상과 액상 두가지 형태로 제작하였고, 경시변화 분석시험에서 사용되었던 배지와 배양방법을 이용하여 시제품을 제작하였다(Fig. 1.36, 1.37).

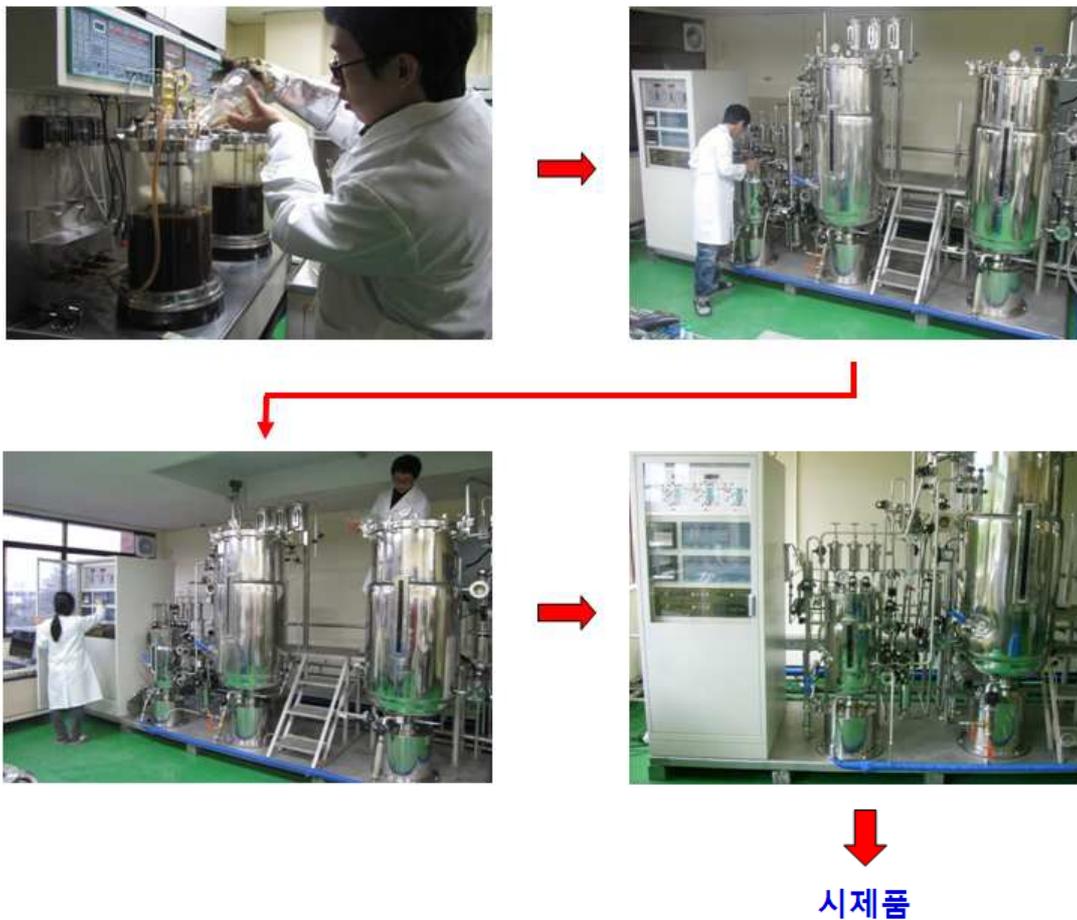


Fig. 1.36. Development of a commercial microbial agent product.



Fig. 1.37. Commercial microbial agent products by liquid type and powder type.

(2) 단가분석을 통한 경제성 분석

친환경 미생물방제제의 개발시 소요되는 경비를 종합하여 양산원가를 계산함으로써 양산 후 기존제품과의 경쟁력을 검토하여 보았다(Table 1.11, 1.12, 1.13, 1.14).

개발제제의 양산원가를 계산한 결과 액상제제의 경우 500mL 제품 기준으로 2,138원, 분상제제의 경우 500g 제품 기준으로 1,864원의 원가가 소요되는 것으로 나타났다. 계산에서 제외된 기술개발비와 기타 경비 등을 감안하였을 때 개발제제의 판매가격은 15,000원이 적당한 것으로 사료되며, 기존제품의 판매가격이 25,000원인데 비해 40%정도 저렴한 가격에 농가 공급이 가능하여 기존제품에 비해 가격경쟁력이 충분하다고 생각된다. 또한 기존제품의 경우 단일 미생물을 사용한 제제인 반면 개발제제는 복합균주의 사용으로 단일 미생물의 단점을 상호 보완하여 실용화 및 상용화 하였을 경우 기존제품과 비교하여 질적인 측면에서 우위를 차지할 수 있을 것으로 사료된다.

Table 1.11. The unit price of cultivation

항목명		조성비(%)	투입량(kg)	소요금액	kg당 단가
	당밀	2%	20	12,000원	600원
	옥수수침지액	2%	20	60,000원	3,000원
원료비	Ammonium sulfate	1%	10	1,650원	165원
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.4%	4	4,800원	1,200원
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.6%	6	46,800원	7,800원
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.3%	3	1,470원	490원
	MnSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.05%	0.5	390원	780원
	물	93.65%	-	-	-
소모 기자재비	2,000L fermentor	-	3일	1,050,000원	-
인건비	1인	-	3일	300,000원	-
<b>합계</b>				1,477,110원	-

※ 배양단가 : 739원/500mL

※ Fermentor 임대단가 - 경북대 상주캠퍼스 TIC 센터 기준

※ 단가분석 : (주)대유

Table 1.12. The unit cost of production for liquid commercial microbial agent.

항목명		조성비(%)	투입량(kg)	소요금액	kg당 단가
	글리세롤	10	100	140,000원	1,400원
원료비	Tween 20	1	10	32,000원	3,200원
	Na-propionate	0.3	3	15,000원	5,000원
	배양액	88.7	887	1,310,197원	1477.11원
포장제	스티커+병	-	2000개	850,000원	425원
소모 기자재비	2,000L mixer	-	1일	350,000원	-
인건비	1인	-	1일	100,000원	-
<b>합계</b>				2,797,197원	-

※ 배양단가(739원/500mL) + 제형화단가(1,399원/500mL제품) = 2,138원

※ 단가분석 : (주)대유

Table 1.13. The unit cost of production for powder commercial microbial agent.

항목명		조성비(%)	투입량(kg)	소요금액	kg당 단가
원료비	Zeolite	100	1000	250,000원	250원
	배양액	88.7	887	1,310,197원	1477.11원
포장제	포장지	-	2000개	240,000원	120원
소모 기자재비	Spray mixer	-	1일	350,000원	-
인건비	1인	-	1일	100,000원	-
<b>합계</b>				2,250,197원	-

※ 배양단가(739원/500mL) + 제형화단가(1,125원/500g제품) = 1,864원

※ 단가분석 : (주)대유

Table 1.14. Compare the price.

항 목	기존제품(500mL)	개발제품	
		액상제제(500mL)	분상제제(500g)
생산원가	-	2,138원	1,864원
판매가격	25,000원	15,000원	15,000원

※ 계산에서 제외된 기술개발비와 기타 경비 등을 감안하였을 때 개발제제의 판매가격은 15,000원이 적당한 것으로 사료됨.

※ 기존제품의 판매가격이 25,000원인데 비해 40%정도 저렴한 가격에 농가 공급이 가능.

※ 기존제품의 경우 단일 미생물을 사용한 제제인 반면 개발제제는 복합균주의 사용으로 단일 미생물의 단점을 상호 보완하여 실용화 및 상용화 하였을 경우 기존제품과 비교하여 질적인 측면에서 우위를 차지할 수 있을 것으로 사료됨.

※ 단가분석 : (주)대유

#### 4. 고찰

현재 우리나라에서 유통되고 있는 많은 미생물제제가 외부 환경변화에 강한 내성을 보이는 내성포자를 생성하는 *Bacillus* sp.를 주된 미생물로 적용하고 있다. 이것은 미생물제제가 소비자의 손에 들어갈 때까지 살아있어야 하므로 유통기간을 지나서도 생존할 수 있는 미생물을 적용하고자 하기 때문이다. 따라서 본 연구에서도 먹이고갈에 의해 자연적으로 형성된 포자보다 안정성이 높은 가열 스트레스 내성포자를 생산하여 다기능 PGPR 균주 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11의 액상 제제화를 실시하였다. 그 결과 농진청 미생물농약 기준으로 3년 이상의 약효보증이 가능한 미생물제제를 개발할 수 있었고, 실제 고추역병이 발병한 현장 포장에서도 1회 처리 후 65일간 80% 이상의 고추역병 방제효과를 거둘 수 있었다. 더욱이 고추역병 발병한 일반 노지포장에서 고추를 뽑아내고 재정식한 고추묘에서도 매우 높은 고추역병 방제능을 보임으로써 본 연구에서 개발한 미생물제제가 실제 농가 포장에 적용가능한 우수한 미생물제제라는 것을 입증할 수 있었다. 특히 본 연구에서 개발한 고추역병 방제용 미생물제제는 단일 균주가 아니라 2종 또는 3종의 복합 미생물로 구성된 컨소시엄 복합 미생물제제로, PGPR 균주들간에 경쟁이 없는 상리 혹은 편리공생관계에 있는 것들이다. 현재 시중에 판매되고 있는 복합 미생물제제들은 이러한 균주들간의 경쟁관계에 대하여 전혀 검토하지 않은 채 생산 배양되기 때문에, 저장 유통 및 포장 적용시 각 균주들의 길항관계 등 상호관계에 있어서의 문제점을 전혀 배제할 수 없고, 공생관계 여부도 거의 증명되지 못하고 있는 실정이다 [Georg 등, 1998].

그러나, 본 연구에서 사용한 PGPR 균주인 *B. subtilis* AH18, *B. licheniformis* K11과 *P. fluorescens* 2112는 성장촉진 및 성장조절기작(IAA, IBA, IPA, ABA, cytokinin, JA), 생물방제 기작(siderophore,  $\beta$ -glucanase, 2,4-DAPG, iturin)과 환경 스트레스 저항능 기작(ACC deaminase) 등의 매우 다양한 기작을 가진 상호 보완적인 PGPR 컨소시엄으로 고추역병 방제능 이외에도 고추 성장촉진 및 조절, 고추 재배지의 건조 및 고염스트레스 저항능 유도 등을 발휘할 수 있는 매우 다양한 기능의 미생물제제이다. 또한, PGPR 균주 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11의 주요 생물방제 기작 중 하나인  $\beta$ -glucanase 및 cellulase는 고추역병균 *P. capsici*의 cellulose로 이루어진 세포벽을 분해하는 효소로 작용할 수 있다. 그러나 식물의 세포벽의 cellulose는 pectin과 결합되어 있어서 cellulase만의 공격으로부터 분해되지 않기 때문에, PGPR 균주의 cellulase는 병원균인 *P. capsici*의 세포벽만을 분해하여 길항효과를 나타내게 된다. 또한, 본 연구에서 사용된 PGPR균주 모두 철이온의 선택적 결합물질인 siderophore를 생산하여 토양내의 철이온과 선택적으로 결합함으로써, 이를 chelate화하여 병원균의 철이온 흡수를 방해하게 되고, 따라서 식물 병원균을 간접적으로 고사시키는 기작을 나타낸다.

## 제 2 절 다기능 PGPR 균주들의 컨소시엄의 현장적용 시험

### 1. 서론

식물생장촉진 근권미생물(PGPR) 중 직·간접적으로 식물의 성장 및 병해 방지에 긍정적인 영향을 주는 미생물을 길항미생물이라 한다[Glick 등, 1999; Hall 등, 1996; Kloepper 등, 1989]. 이들의 길항능력은 미생물이 갖는 능력에 따라 서식지 점령[Demoz 등, 2006], 식물의 저항력 유도[Kloepper 등, 2004], 병원체의 파괴[김 등, 2009] 그리고/또는 항생능력[이 등, 2003]에 의해 식물병원균의 생장을 억제하게 되는 길항효과를 나타낸다. 식물병원균에 대한 길항능력을 보이는 근권미생물을 이용하여 친환경적으로 작물을 재배하고자 하는 생물학적 방제를 이용한 유기농업에 대한 욕구에 힘입어 최근 20년간 많은 길항미생물들이 선별·선발되었다[김 등, 2004]. 그러나 선발된 미생물 중 극히 일부만이 생물농약으로 상업화에 성공하였고, 그나마도 현장 재현성이 떨어져 방제효과의 일관성이 없다는 현장 애로점이 있는 실정이다.

이것은 길항미생물을 개발할 당시 한 가지 길항 방법에 의한 방제능력을 검증하여 실험실 내에서의 환경에서만 효과를 검증하기 때문에 다양한 실제 경작지 환경 속에서 요구되는, 길항력의 재현성이 확보된 방제능력을 발휘하지 못하기 때문인 것으로 분석된다[Georg 등, 1998]. 즉, 방제 능력이 한정적이기 때문에 다양한 조건의 환경 속에서는 그 한 가지 기작만으로는 다양한 방제 효과를 나타내기 힘든 것으로 사료된다. 또한, 실제 농가에서는 한 작물일지라도 다양한 병에 대해 골고루 방제되는 다기능 약제를 원하고 있는데, 특히 화학농약의 사용을 줄일 수 있는 친환경 농약인 경우에 한 가지 약제로 다양하게 방제될 수 있는 특정작물 전용 농약을 갈망하고 있다.

그러나, 실험실 연구 단계에서 길항미생물의 방제 효과를 검증할 때에는 일반적으로 한 가지 병원균에 대한 방제효과만을 대상으로 하고 있기 때문에 작물단위로 농사를 짓는 현행 농업 현장에서 광범위하게 사용되지 못하고 있다. 또한 방제 효과도 병원균이 없는 대조구에 비해 얼마나 좋은지만을 검증하기 때문에 현재 사용하고 있는 화학농약에 비해 얼마나 더 방제효과가 있는지에 대한 객관적인 판단 기준이 없어 실제 농업현장에서 신뢰를 얻지 못하는 현장 애로점이 있다고 판단된다. 또, 현재 연구되거나 상품화 되고 있는 미생물제제는 하나 또는 두 개의 미생물 균주를 이용한 것이 대부분이고 3균주 이상 복합적인 미생물 균주를 사용한 제제라 할지라도 이들 미생물 균주 간의 공생, 경쟁 등의 상호관계에 대한 연구가 전무한 실정이어서 정확하고 지속적인 효능을 검증하는 것이 사실상 힘들다. 이 모든 사항들은 생물농약으로 사용된 미생물 제제가 광범위한 농업 현장에의 적용 및 재현능을 방해하는 요소로 지적될 수 있다.

우리나라와 전 세계에 널리 분포하는 고추 역병은 원인균인 *P. capsici*에 의해서 발병하는 토양전염성 진균병으로 고추 전 생육기간에 걸쳐 발생하여 가장 심한 피해를 일으키는 대표적인 식물 질병이다[김 등, 2009; 우 등, 2008]. 고추역병균인 *P. capsici*는 세포벽이 glucan과 cellulose 등으로 이루어져있고[김 등, 2009] (Table 3.1), 물을 좋아하는 친수성 곰팡이로 강우량과 강우일수가 병발생에 영향을 미치며, 시설 하우스 내에서는 연중 발생하는 편이고, 한번 발생하면 급속하게 번지는 특성이 있다[김 등, 2009; 이 등, 2000]. 역병의 전염은 토양 속에 생

존하고 있던 이 균의 난포자가 환경이 적합하면 발아하여 유주자낭을 만드는데 이 속에 들어 있는 유주자가 1차 전염원으로 강우나 관수시 물을 따라 헤엄치며 식물체에 도달하여 역병을 일으키게 된다. 또한 물과 함께 토양 표면에 흩어져 있던 유주자는 빗방울에 의해 튀어올라 식물체의 지상부에 병을 일으키기도 한다[경상북도농업기술원 영양고추시험장, 2006]. 2차 전염은 1차 전염에 의하여 식물체 병반 표면에 형성된 유주자낭으로부터 유주자가 분출하여 강우나 관수시 물을 따라 이동하여 발생한다. 병원균의 유주포자는 다른 균과 달리 2-3시간 내에 식물체내로 침입이 가능하며, 환경이 적합하면 침입 후 1-2일 이내 병증상이 나타난다[경상북도농업기술원 영양고추시험장, 2006]. 따라서 강우가 빈번할 시 짧은 시간 안에 급격히 만연하게 된다. 또한 생육 조건이 부적절한 시기가 되면 내구체인 난포자를 만들어 토양내 혹은 식물 조직에 생존하며 토양 내에서 2-8년간 생존이 가능하기 때문에 연작장해의 주요 원인이 된다. 역병은 짧은 시간 내에 많은 면적에 피해를 주는 병으로, 한번 발생하면 방제가 어려운 병이다 [우 등, 2006]. 10년 전 2-3%에 그쳤던 지역의 고추역병 발생률이 2000년 이후 매년 10%대를 웃돌면서 고추재배 농가에 막대한 피해를 주고 있다[우 등, 2008; Lee 등, 2003]. 일단 병이 농가에 발생하면 20-30%의 작물에 피해가 나고 역병 발생으로 인한 수확 감소량은 500-1,000톤 이나 되며 이를 돈으로 환산하면 1,000 억 원 이상에 이를 것으로 추정[우 등, 2008]하고 있다. 따라서 본 연구에서는 고추재배에서 가장 큰 피해를 입히는 고추역병 방제용으로 개발된 다기능 PGPR 길항미생물들의 컨소시엄 미생물제제를 안동시, 영양군, 예천군 일대의 실제 농가에서 현장적용 가능성을 타진하고 실제 포장에서의 재현성 검증을 실시하고자 하였다.

## 2. 연구개발수행 재료 및 방법

가. 현지 시설재배 포장시험을 통한 맞춤형 컨소시엄미생물제제의 고추육묘 생육촉진능 및 고추역병 방제능 조사

상기의 제1절 컨소시엄미생물제제의 *in vivo* pot 실험을 통한 고추역병방제능 및 고추생장촉진능 검증에서 고추역병에 대한 방제력이 가장 크고 옥신 생산을 통한 식물생장촉진능 및 인산 가용화능이 있는 *B. subtilis* AH18 균주와 식물생장촉진능, 인산 가용화능 그리고 식물 스트레스 경감 효과가 있는 ACC deaminase 생산성 *B. licheniformis* K11의 두 균주 최적컨소시엄 No.11을 최종 고추역병 방제용 길항미생물 컨소시엄으로 선발하였다. 따라서, 본 연구에서는 컨소시엄 No.11을 대상으로 실제 고추 육묘시설재배 포장에서 고추육묘의 생육촉진능을 조사해보았다. 그리고 컨소시엄 No. 11에 사용된 두 균주 이외에 고추역병방제균주인 *P. fluorescens* 2112 균주를 추가 컨소시엄으로 조성하여 현지 육묘시설재배 포장내에서 고추육묘 생장촉진능을 조사해 보았다. 처리구는 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11의 조합구인 컨소시엄 NO.11과 *P. fluorescens* 2112의 혼합구, 상업용 미생물제제인 탐시드(*Paenibacillus polymyxa* AC1, 그린바이오텍), 상업용 화학제제인 인피니트(플루오피클라이드·프로파모카브 하이드로클로라이드 액상수화제, 바이엘크롭사이언스), 물처리구인 무처리구로 하였고, 각 미생물의 처리농도는 일반적인 미생물제제의 농가사용권장 농도와 실제 농가에서의 적용농도 등을 고려하여 탐시드를 포함하여 모두  $5.0 \times 10^6$  CFU/ml로 하여 처리하였고, 화학제제인 인피니트의 경우 회사의 추천량인 1000배 희석하였다. 고추육묘내 처리방법은 72공 포트내의 고추육묘를 각각의 처리구를 5L의 물에 희석한 후 침지하였다.

### (1) 고추육묘시설재배 포장에서의 고추생육촉진능 검증

고추역병 방제용 길항미생물 컨소시엄제제의 고추 육묘의 초기생육에 미치는 영향을 조사하기 위하여 경상북도농업기술원 영양고추시험장 내에 위치한 비닐하우스시설내에서 비저항성 품종 금당을 72공 포트에 10월 7일에 파종과 동시에 역병 미생물농약 탐시드(*P. polymyxa* AC1, 그린바이오텍), 인피니트(플루오피클라이드·프로파모카브 하이드로클로라이드 액상수화제, 바이엘크롭사이언스), 무처리 대조구와 함께 본 연구에서의 컨소시엄 No.11과 *P. fluorescens* 2112의 혼합구를 처리하였다. 역병 농약 인피니트의 경우 경북 영양 현지 포장에서 가장 많이 사용되고 있는 화학농약으로서 회사 추천량인 1000배 희석하여 사용하였으며, 미생물 농약인 탐시드와 컨소시엄제제 혼합구의 처리는 본 시험에서 *B. subtilis* AH18, *B. licheniformis* K11과 *P. fluorescens* 2112를 개별 단독 배양하여 1:1:1 (v:v:v)로  $5.0 \times 10^6$  CFU/ml로 희석하여 사용하였다. 대조구의 경우 동량의 물만 처리하였다. 각각의 처리구는 비닐하우스내 온상조건과 냉상조건으로 나누어 총 8종의 처리구를 사용하였으며, 처리방법은 72공 포트의 고추육묘를 침지하는 방식으로 하였으며 미생물농약, 화학농약, 조합구, 무처리구는 15일 간격으로 총 4회 처리하는 동시에 생육조사를 실시하였다.

(2) 고추육묘시설재배 포장에서의 균주컨소시엄별 초기생육촉진능 및 역병방제능 검증

고추역병 방제용 길항미생물 컨소시엄제제의 균주컨소시엄별 고추 육묘의 초기생육에 미치는 영향과 역병방제능을 조사하기 위하여 경상북도농업기술원 영양고추시험장 내에 위치한 비닐하우스시설내에서 역병저항성품종인 일당백골드와 비저항성품종 금당을 72공 포트에 파종하였다. 비저항성품종인 금당에는 무처리 대조구와 함께 처리구로 본 연구에서의 균주컨소시엄 혼합구와 인피니트(플루오피클라이드·프로파모카브 하이드로클로라이드 액상수화제, 바이엘크롭사이언스)를 3개의 포트에 반복처리하였다. 컨소시엄균주 처리의 경우 Table 2.1과 같이 처리하였으며 화학농약과 무처리구 및 컨소시엄 균주의 처리는 상기 실험의 조건과 동일하게 실시하였다.

각각의 처리구는 비닐하우스내 온상조건에서 12종의 처리구를 사용하였으며, 10일 간격으로 총 4회 처리하는 동시에 초기생육조사를 실시하였다. 그리고 시험시작 후 40일째 되는 시기에 역병저항성품종인 일당백골드를 포함한 모든 처리구에 고추역병균 *P.capsici*를  $10^3$  CFU/ml농도로 접종하여 고추역병 발병율을 통해 역병방제능을 조사하였다.

Table 2.1. Designs of various treatment type for red-pepper growth promoting activity.

Treatment	Treatment type
일당백골드(illdangbaekgold)	Only water treatment
Control	Only water treatment
Agrochemicals (인피니트, 바이엘)	Spray on the leaf (엽면살포)
Agrochemicals (인피니트, 바이엘)	Soil drench (토양관주)
<i>B. subtilis</i> AH18 + <i>B. licheniformis</i> K11 + <i>P. fluorescens</i> 2112	Spray on the leaf
<i>B. subtilis</i> AH18	Soil drench
<i>B. licheniformis</i> K11	Soil drench
<i>P. fluorescens</i> 2112	Soil drench
<i>B. subtilis</i> AH18 + <i>B. licheniformis</i> K11	Soil drench
<i>B. licheniformis</i> K11 + <i>P. fluorescens</i> 2112	Soil drench
<i>B. subtilis</i> AH18 + <i>P. fluorescens</i> 2112	Soil drench
<i>B. subtilis</i> AH18 + <i>B. licheniformis</i> K11 + <i>P. fluorescens</i> 2112	Soil drench

## 나. 현지 포장시험을 통한 맞춤형 컨소시엄미생물제제의 고추생육촉진능 조사

### (1) 영양지역 노지포장에서의 고추생육촉진능 검증

고추역병 방제용 길항미생물 컨소시엄제제의 고추 생육과 수량에 미치는 영향을 보기 위하여 고추 역병이 발생하지 않는 경북 영양군 영양읍 대천리 579-3에 위치한 영양고추시험장 노지 포장 1,000평에 5월 18일 정식과 동시에 농약 프리엔(프로파모카브 하이드로클로라이드 액상수화제, 동방아그로), 미생물 농약 탐시드(*P. polymyxa* AC1, 그린바이오텍), 무처리 대조구와 함께 본 연구에서 고추역병 방제용 최적 컨소시엄 No.11과 *P. fluorescens* 2112를 혼합 처리하였다. 고추 품종 조생부흥을 72공 포트에 2월 15일 파종한 다음 5월 18일 정식하였다. 정식시 미생물 제제 및 농약 프리엔을 희석하여 고추 포기마다 100ml씩 관주하였다. 대조 처리로 이용한 프리엔은 고추 역병용 화학농약으로 등록된 인피니트와 동일 성분의 제품이었다. 각 처리구는 육묘시설재배처리구와 동일한 희석배율로 사용하였다. 각 처리당 3반복으로 하여 난괴법으로 배치하였다. 8월 중순에 생육 조사를 실시하였고, 수량은 고추가 익어감에 따라서 세 번 수확하여 이를 합하여 계산하였다.

### (2) 예천지역 노지포장에서의 고추생육촉진능 검증

최적 컨소시엄제제 혼합구의 다양한 환경에서의 고추 생육과 수량에 미치는 영향을 조사하기 위해서 경북 예천군 용문면에 위치한 구계리와 죽림리의 노지포장 1,000평에 5월 4일 정식과 동시에 예천 현지에서 널리 사용되고 있는 화학방제인 아인산염 처리구, 미생물 농약 탐시드(*P. polymyxa* AC1, 그린바이오텍), 무처리 대조구와 함께 본 연구에서 고추역병 방제용 최적 컨소시엄 No.11과 *P. fluorescens* 2112의 혼합구를 처리하였다. 고추 품종은 역병저항성 품종인 독야청청을 72공 포트에 2월초 파종한 다음 5월 4일에 정식하였다. 정식과 동시에 아인산염의 경우 200 ppm 농도로 희석하여 사용하였으며, 탐시드와 최적 컨소시엄 혼합구 처리구 상기의 방법과 동일하게 처리하였다. 그리고 각 처리당 3반복으로 하여 난괴법으로 배치하였으며, 총 70일간 10일 간격으로 처리 후 생육조사를 실시하였다.

## 다. 고추역병 발생 노지포장에서의 고추역병 방제능 검증

고추역병 포장시험의 경우 인위적인 발병이나 발병지역이 산발적인 어려움으로 인하여 고추 역병 발병이 잦은 고추 포장을 선정하였다. 선정된 곳은 경북 안동시 서후면 금계2리 155번지(경작주, 변우영, )에 위치한 고추 포장이다. 고추 역병에 대해 선발된 길항 미생물의 역병 억제 효과를 포장 검증하기 위하여 고추 역병 발병이 심한 안동의 농가 포장에서 기존의 고추 식물체를 모두 제거하고 72공 포트에서 90일간 육묘한 홍심이 품종을 2008년 7월 15일 정식하였다. 정식 시 미생물 농약 탐시드(*P. polymyxa* AC1, 그린바이오텍) 처리구, 고추 역병 방제용 최적 컨소시엄 No.11 처리구와 컨소시엄 No.11 및 *P. fluorescens* 2112 처리구로 나누어 실시하였고, 대조구로서 무처리에는 처리구와 동일한 양의 물만 처리하였다. 각 처리구당 4반복으로 하였으며, 재식밀도는 3,300주/1000m<sup>2</sup> 이었고 처리구당 55m<sup>2</sup>의 면적을 이용하였

다. 탐시드는 1,000배 희석하여 주당  $10^8$  CFU/ml를 수돗물에 희석하여 100ml을 관주하였고, 컨소시엄 처리구는 *B. subtilis* AH18, *B. licheniformis* K11의 각각의 배양액을 1:1 (v:v)으로 혼합하여  $10^8$  CFU/ml를 100ml 수돗물에 희석하여 관주하였으며, 컨소시엄 및 *P. fluorescens* 2112 혼합처리구도 각각의 개별 단독배양액을 혼합하여  $10^8$  CFU/ml를 수돗물 100ml에 희석하여 관주하였다. 정식 후 10일 간격으로 65일까지 역병 발병 주수를 조사하였다. 감염여부는 육안으로 판단하여 잎이 시들거나 줄기 지체부가 갈변하면서 쓰러지는 증상으로 판단하였다.

#### 라. 맞춤형 컨소시엄미생물제제의 대상작물 확대시험

상기 실험에서 고추생육촉진능이 확인된 컨소시엄 No.11과 *P. fluorescens* 2112와의 추가 컨소시엄이 고추 이외의 기타작물에서의 생육촉진능을 조사하였다. 시험작물은 청고추, 토마토, 참외, 싹배추, 멜론을 대상으로 조사하였으며, 추가컨소시엄 처리구의 경우 500배와 1000배 희석하여 처리하였다. 대조구로서 (주)대유의 대유블로토와 마이크로빅을 대조약제로 사용하였으며, 대조구의 처리는 (주)대유의 추천량인 1,000배 희석하여 처리하였다. 청고추, 토마토, 참외, 싹배추의 경우 7일간격으로, 멜론의 경우 10일 간격으로 총 3회 관주처리 후 생육조사를 하였다.

### 3. 연구개발수행 결과

*P. fluorescens* 2112 균주는 2,4-DAPG (diacetylphloroglucinol) 항생물질과 siderophore를 생산하여 고추역병 방제능을 지닌 PGPR 균주로써, *in vivo* pot실험에서 컨소시엄 No. 3 (*B. licheniformis* K11 + *P. fluorescens* 2112) 및 No. 8 (*B. subtilis* AH18 + *P. fluorescens* 2112)이 고추역병 방제능이 80% 이상으로 나타났고(Fig. 1.3, 1.4), 최적 컨소시엄으로 선발된 컨소시엄 No. 11 (*B. licheniformis* K11 + *B. subtilis* AH18) 다음으로 높은 고추역병 방제능을 나타내었다. 더욱이 *Pseudomonas* sp.가 일반적으로 *Bacillus* sp.에 비하여 근권우점능이 뛰어난 것으로 알려져 있을 뿐만 아니라[Kloepper 등, 1989, Kloepper 등, 2004], *P. fluorescens* 2112가 생산하는 항생물질인 2,4-DAPG는 고추역병균인 *P. capsici*에 대한 저해능이 매우 강력한 것으로 보고되어지고 있다[이 등, 2001]. 또한 *P. fluorescens* 2112 균주는 최적 컨소시엄 균주인 *B. licheniformis* K11 및 *B. subtilis* AH18 균주들과 기작별로도 상호보완적이므로, 컨소시엄 No. 11에 *P. fluorescens* 2112를 추가한 3종의 길항미생물 균주로 컨소시엄을 구성하고, 이를 현장내 투입하여 *Bacillus* sp.로만 구성된 컨소시엄 No. 11과 고추역병 방제능을 비교해 보았으며, 나아가 *Bacillus* sp.과 *Pseudomonas* sp. 을 조합한 길항미생물 컨소시엄의 우수성과 가능성을 비교 연구해 보았다.

가. 현지 시설재배 포장시험을 통한 최적 길항미생물 컨소시엄의 고추육묘 생육촉진능 조사

#### (1) 고추육묘시설재배 포장에서의 고추생육촉진능 검증

*in vivo* pot 실험에서 우수한 고추생장촉진능을 나타낸 컨소시엄 No. 11에 *P. fluorescens* 2112를 추가한 3종의 길항미생물 균주의 컨소시엄의 고추육묘시설재배 포장시험을 경북농업기술원 영양고추시험장내 비닐하우스에서 실시하였다(Fig. 2.1). 온상 조건과 냉상조건 총 8종의 처리구에 15일 간격으로 컨소시엄, 인피니트, 탑시드 및 무처리구를 총 4회 처리하였다(Fig. 2.2). 고추의 생육은 15일 간격으로 측정하였다. 온상조건에서 뿌리의 길이를 측정한 결과 정식 15일이 지난 후 대조구와 화약농약 처리구의 경우 탑시드와 컨소시엄 처리구에 비하여 15%정도 높은 뿌리신장을 나타내었으며, 줄기의 경우 모든 처리구에서 유사하게 나타났다. 그러나 생육 30일이 지난 후 뿌리신장이 모든 처리구에서 유사하게 나타났으며, 줄기신장 역시 비슷한 수치를 나타내었다. 45일째에서 컨소시엄 처리구의 경우 타처리구에 비하여 뿌리신장을 확실한 개선효과를 나타내었으며, 10%이상의 상승효과를 나타내었다(Fig. 2.3). 줄기신장의 경우 미처리구와 인피니트 처리구에 비해 5%정도 작은 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2.4). 냉상조건의 경우 생육 15일째 모든 처리구에서의 뿌리신장과 줄기신장에서의 큰 차이를 확인할 수 없었다. 그러나 30일째 뿌리신장의 경우 인피니트 처리구의 경우 타 처리구에 비하여 50% 정도 상승효과가 있었으며 줄기신장 역시 타처리구에 비하여 20% 정도의 상승효과를 나타내었다. 45일째에도 뿌리신장의 경우 인피니트 처리구에 비해 30% 정도의 상승효과를 나타내었지만 줄기신장의 경우 무처리구에서 가장 높은 신장률을 나타내었으며 타 처리구에 비해 10%정도 높게 나타났었다(Fig. 2.5, 2.6). 이는 화학제제인 인피니트가 고추의 뿌리신장에 영향을 미친다고 생각이 된다. 60일째에서 컨소시엄처리구와 타처리구에서 확연한 엽색의 차이를 나타내었다(Fig.

2.7). 또한, 온상조건에서의 컨소시엄처리구와 대조구의 경우 화학농약처리구와 탐시드처리구에 비하여 생장이 5%정도 뛰어난 것을 확인할 수 있었다. 그러나 대조구의 경우 컨소시엄 처리구와 거의 같은 성장률을 나타내었지만 엽색을 비교하였을 때 컨소시엄 처리구가 탁월한 효과를 나타내는 것으로 확인되었다(Fig. 2.8). 냉상조건인 경우에는 모든 처리구에서 전반적으로 같은 성장률을 나타내었지만 온상조건과 같이 컨소시엄 처리구에서 엽색을 비교하였을 때 우수한 것으로 확인되었다(Fig. 2.9). 이는 고추 내 엽록소가 증가되었다고 생각되며, 고추의 광합성을 높여주어 고추생산물의 품질 상승과 비대효과에 크게 작용하리라 생각된다. 또한 작물의 특성상 줄기의 신장보다는 엽육의 색, 크기, 경직경 등이 고추생산량 및 품질을 크게 좌우하므로 본 연구의 최적 컨소시엄을 현장적용시 고품질의 고추생산이 가능하리라 생각된다.



Fig. 2.1. Field application of red-pepper growth promotion and phytophthora blight suppression.

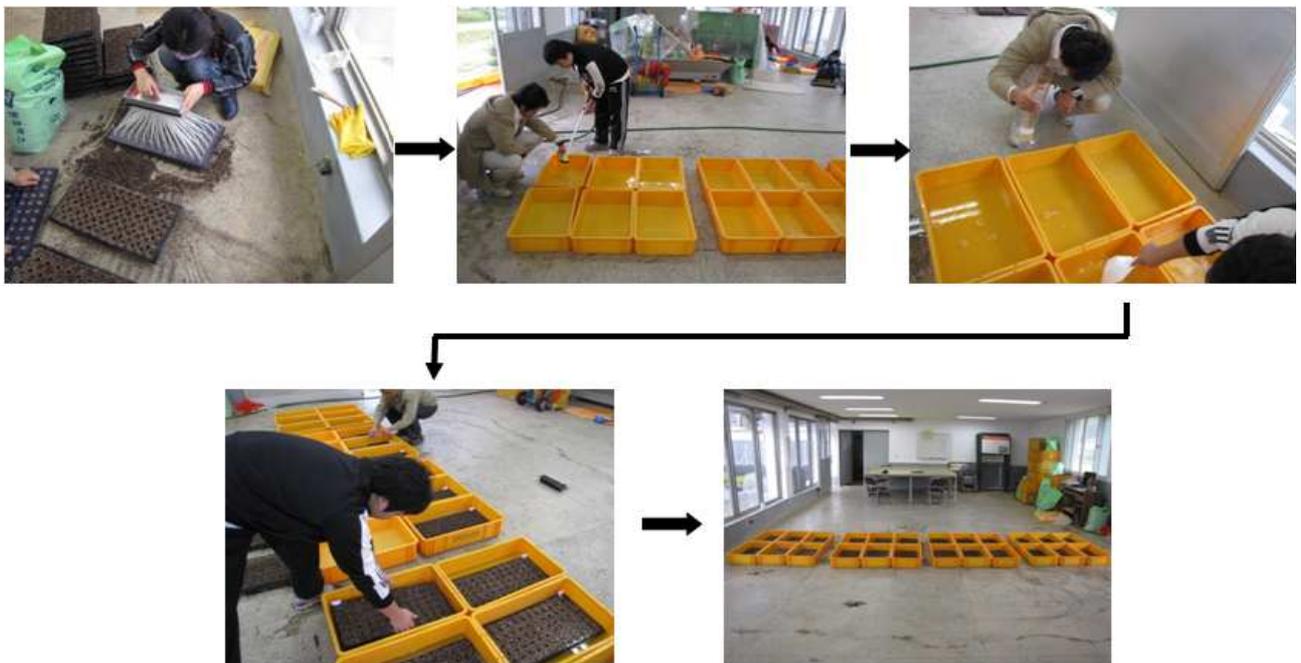


Fig. 2.2. Procedure of red-pepper seed coating and treatment of the microbial consortium and chemical pesticide.

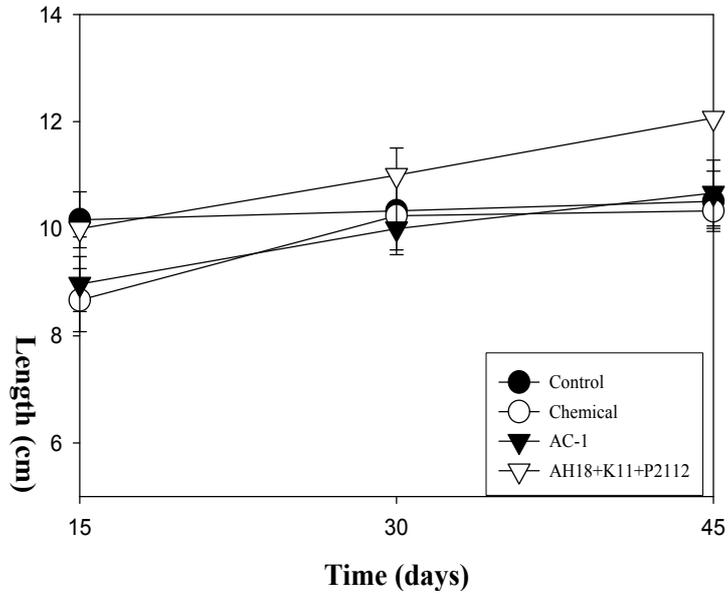


Fig. 2.3. The effects of a biological pesticide, a chemical pesticide and microbial consortium on red-pepper length of root on hotbed.

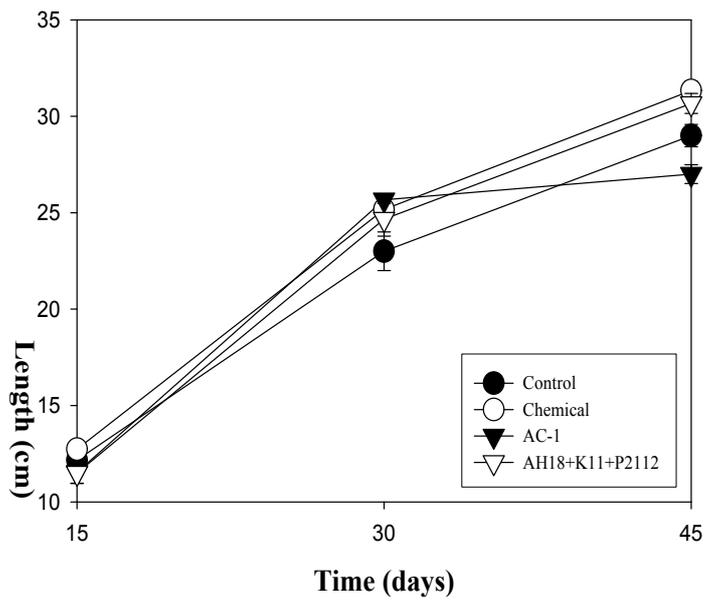


Fig. 2.4. The effects of a biological pesticide, a chemical pesticide and microbial consortium on red-pepper length of stem on hotbed.

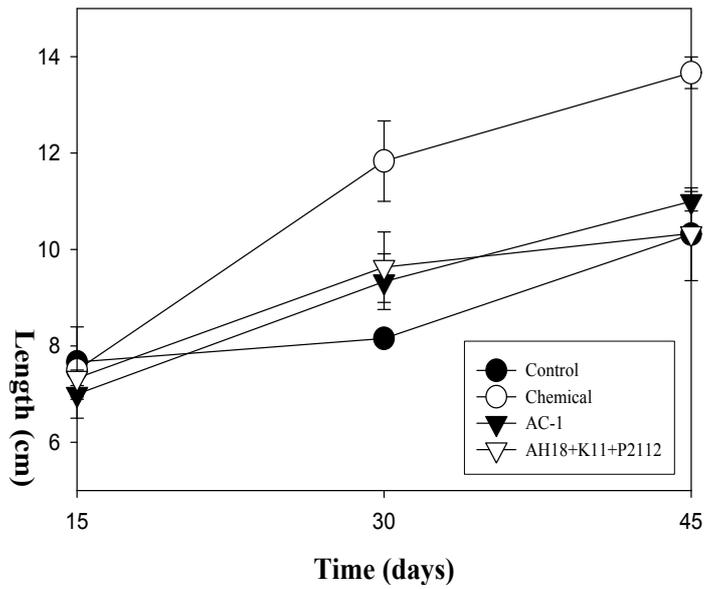


Fig. 2.5. The effects of a biological pesticide, a chemical pesticide and microbial consortium on red-pepper length of root on room temperature.

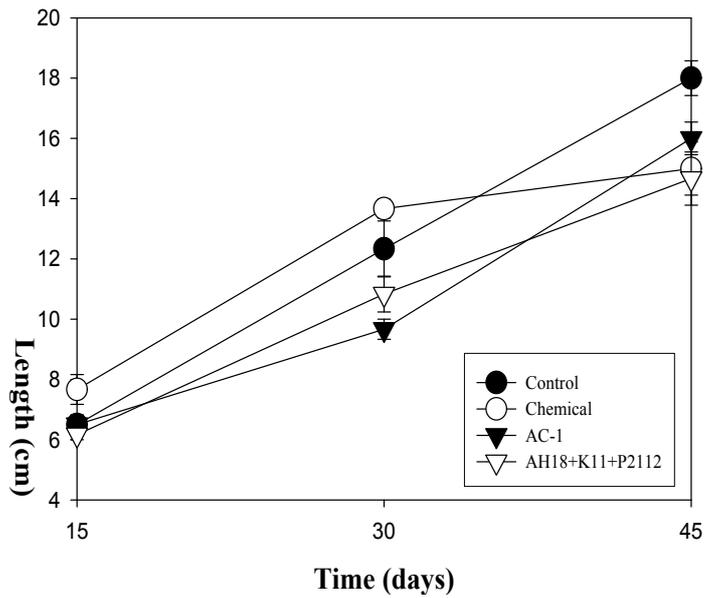


Fig. 2.6. The effects of a biological pesticide, a chemical pesticide and microbial consortium on red-pepper length of stem on room temperature.



Fig. 2.7. Leaf color of red-pepper treated by the consortium microbial agent.



Fig. 2.8. The plant growth promotion by the microbial consortium on the stem elongation of red-pepper on hotbed.



Fig. 2.9. The plant growth promotion by the microbial consortium on the stem elongation of red-pepper on room temperature.

## (2) 고추육묘시설재배 포장에서의 균주컨소시엄별 초기생육촉진능 및 역병방제능 검증

고추역병 방제용 길항미생물 컨소시엄제제의 균주컨소시엄별 고추육묘시설재배 포장시험을 경북농업기술원 영양고추시험장내 비닐하우스에서 실시하였다. 균주컨소시엄별 초기생육촉진능을 조사하기 위해 온상조건과 냉상조건 각각 12종의 처리구에 10일 간격으로 균주컨소시엄, 인피니트를 총 4회 처리하였고 10일 간격으로 고추의 생육을 측정하였다. 포장시험을 실시한 시기가 평년보다 기온이 낮아 온상 시험구에서도 20일 이후에야 생장을 측정할 수 있었다. 냉상 시험구의 경우 낮은 기온으로 인해 포장시험이 제대로 이루어지지 않았다. 그리고 균주컨소시엄별 역병방제능 검증을 조사하기 위해 초기생육측정이 완료된 40일째에 고추역병균 *P.capsici*를 접종하여 각 처리구별 역병발병율을 측정하였다.

먼저 처리방법에 따른 차이를 알아보기 위해 무처리구와 인피니트 엽면살포 처리구, 컨소시엄 *B. subtilis* AH18, *B. licheniformis* K11, *P. fluorescens* 2112 엽면살포 처리구, 인피니트 침지 처리구, 컨소시엄 *B. subtilis* AH18, *B. licheniformis* K11, *P. fluorescens* 2112 침지 처리구를 비교실험 하였다. 실험결과 산출된 데이터를 그래프로 나타냈을 때 뿌리길이, 줄기길이, 생체중량, 건조중량 모든 항목에서 컨소시엄 *B. subtilis* AH18, *B. licheniformis* K11, *P. fluorescens* 2112 침지 처리구가 가장 높은 생육촉진능을 나타내었다(Fig. 2.10). 이 결과로 비추어봤을 때 컨소시엄 *B. subtilis* AH18, *B. licheniformis* K11, *P. fluorescens* 2112의 효과를 증명함과 동시에 침지로 컨소시엄 균주를 처리할 때 가장 좋은 효과를 볼 수 있을 것이라 생각된다.

온상 시험구에서 처리구와 컨소시엄의 차이에 따른 초기생육촉진능을 관찰하기 위해 20일째부터 40일까지 초기생육을 측정한 결과 뿌리와 줄기의 길이에서는 컨소시엄 *B. subtilis* AH18, *B. licheniformis* K11, *P. fluorescens* 2112가 화학농약이나 무처리구보다는 향상된 것을 관찰할 수 있었지만 다른 컨소시엄에 비해 눈에 띄는 효과를 보여주지는 못하였다(Fig. 2.11, 2.12). 하지만 생체중량측정에서 컨소시엄 *B. subtilis* AH18, *B. licheniformis* K11, *P. fluorescens* 2112가 무처리구나 화학농약 처리구, 다른 컨소시엄에 비해 최대 약 35% 향상된 것을 관찰할 수 있었으며 건조중량 측정에서도 컨소시엄 *B. subtilis* AH18, *B. licheniformis* K11, *P. fluorescens* 2112가 무처리구나 화학농약 처리구, 다른 컨소시엄에 비해 약 20%가량 향상된 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2.13, 2.14). 또한 엽록소 측정에서도 20일째부터 40일까지의 측정된 데이터를 평균내어 오차범위 안에서 관찰했을 때 컨소시엄 *B. subtilis* AH18, *B. licheniformis* K11, *P. fluorescens* 2112이 무처리구나 화학농약 처리구, 다른 컨소시엄에 비해 약 15% 이상 높게 측정되었다(Fig. 2.15). 실제 고추의 재배 시 양질의 과실을 수확할 수 있는 조건으로 표면상으로 드러나는 뿌리나 줄기의 길이보다는 생체중량이나 건조중량, 엽록소의 함량이 실질적인 영향을 미치기 때문에 컨소시엄 *B. subtilis* AH18, *B. licheniformis* K11, *P. fluorescens* 2112 조합이 최적의 조합으로 보여지며, 실제 농가에 적용됐을 때 높은 초기생육증진 효과를 볼 수 있을 것으로 생각된다.

초기생육측정이 완료된 처리구들에 고추역병균을 접종하여 각 처리구별 역병방제능을 조사하였다. 각 처리구에 고추역병균 *P.capsici*를  $10^3$  CFU/ml로 접종하여 역병방제능을 조사한 결과 비저항성품종인 금당 무처리구에서는 예상했던바 대로 70%대의 저조한 역병방제능을 보였고, 역병저항성품종인 일당백골드에서는 역병이 전혀 나타나지 않아 매우 우수한 역병방제능을 나타내었다. 또한 화학농약인 인피니트 처리구에서는 엽면살포 방법으로 처리한 처리구의 경우

95% 이상의 역병방제능을 보였고 침지 방법으로 처리한 처리구는 역병이 나타나지않아 모두 우수한 역병방제능을 나타내었다. 인피니트 처리구에서 처리방법에 관계없이 우수한 역병방제능을 나타낸 것은 화학농약의 위력이 얼마나 치명적인지 실감케하는 것이었다. 비저항성품종인 금당의 균주컨소시엄 처리구들을 살펴보면 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11, *P. fluorescens* 2112를 단독으로 처리한 처리구들도 90%를 웃도는 역병방제능을 보여 무처리구에 비해 높은 역병방제능을 보여주었지만, 균주컨소시엄으로 구성된 처리구가 이보다 더 우수한 역병방제능을 보여주었다. 특히 세 균주 컨소시엄에서 가장 높은 역병방제능을 보여주어 컨소시엄 *B. subtilis* AH18, *B. licheniformis* K11, *P. fluorescens* 2112 조합이 역병방제에 있어서 최적의 조합임을 확인할 수 있었다.

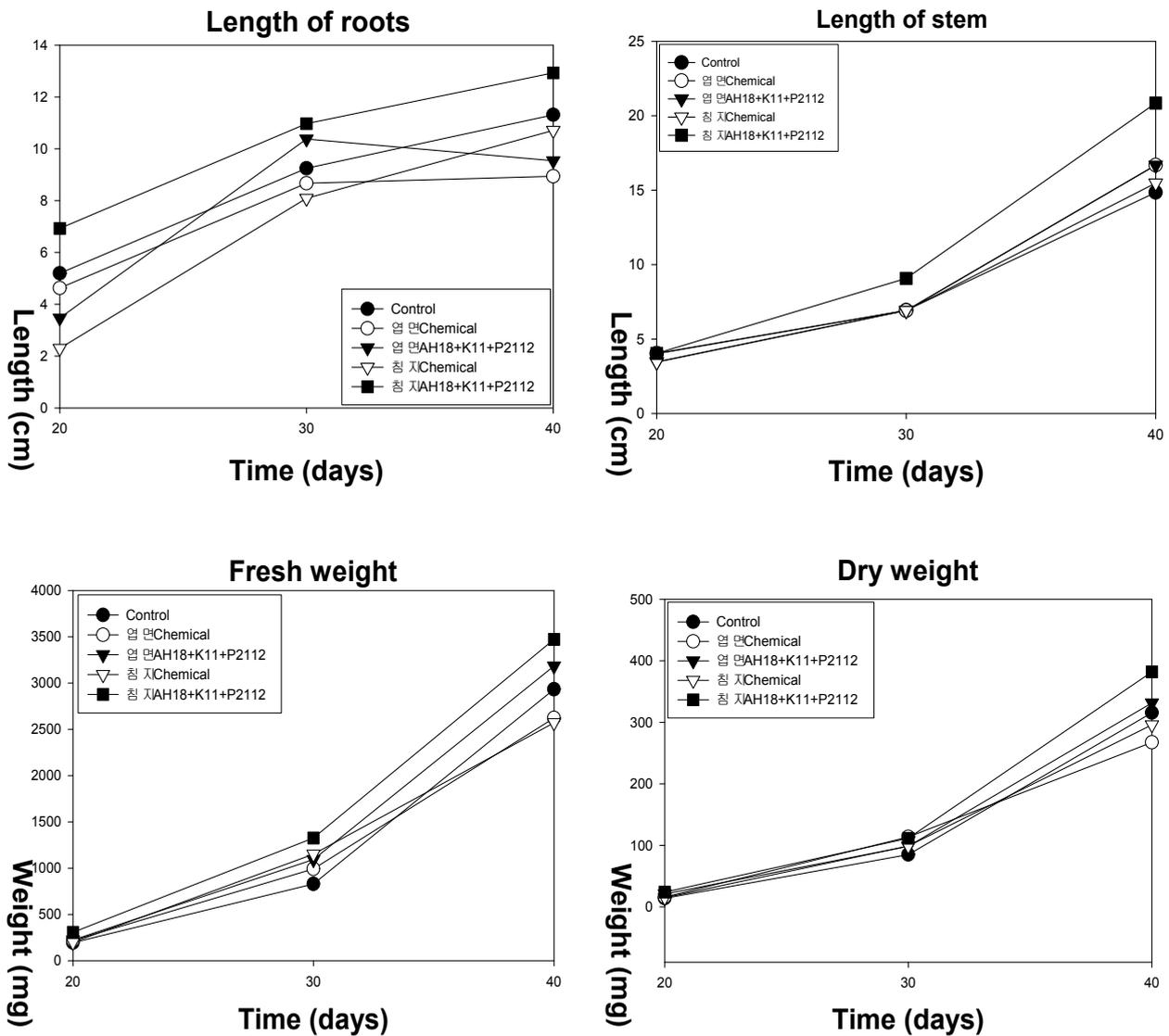


Fig. 2.10. The effects of treatment method on red-pepper on hotbed.

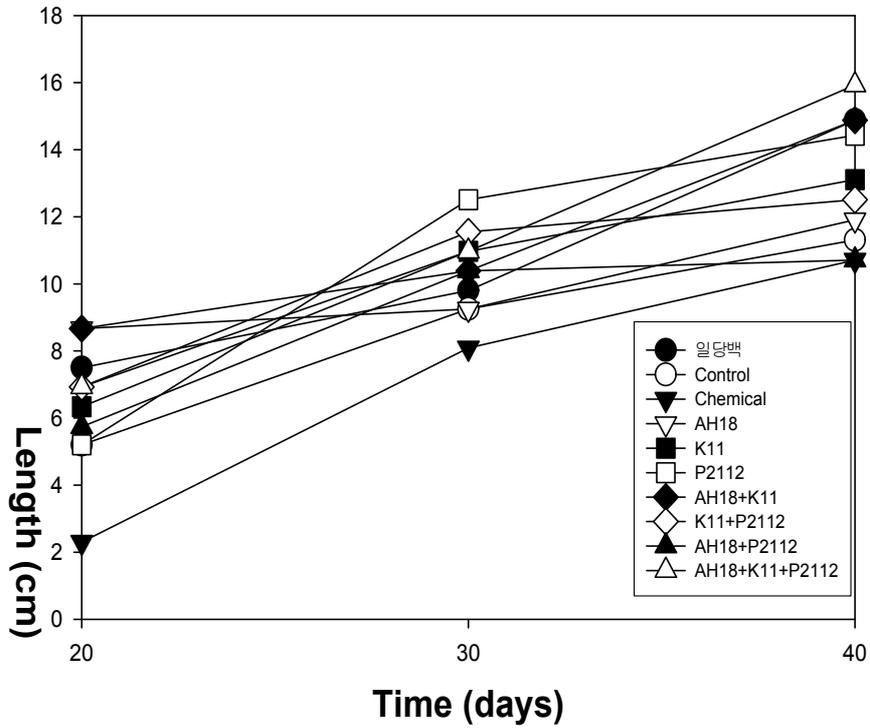


Fig. 2.11. Plant growth promoting activity by the consortium microbial agent on red-pepper length of root at hotbed

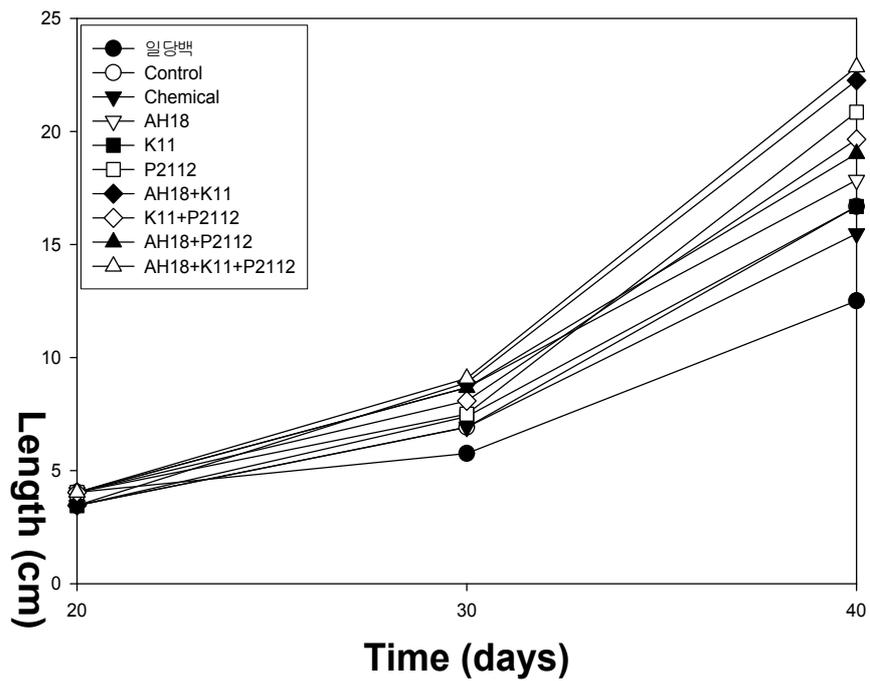


Fig. 2.12. Plant growth promoting activity by the consortium microbial agent on red-pepper length of stem on hotbed.

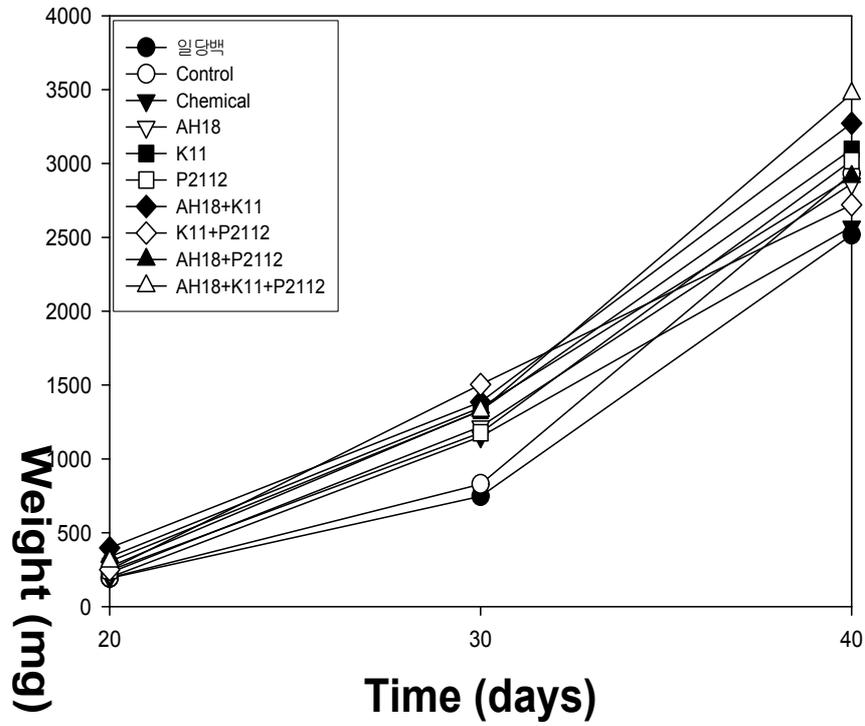


Fig. 2.13. Plant growth promoting activity by the consortium microbial agent on fresh weight of red-pepper on hotbed.

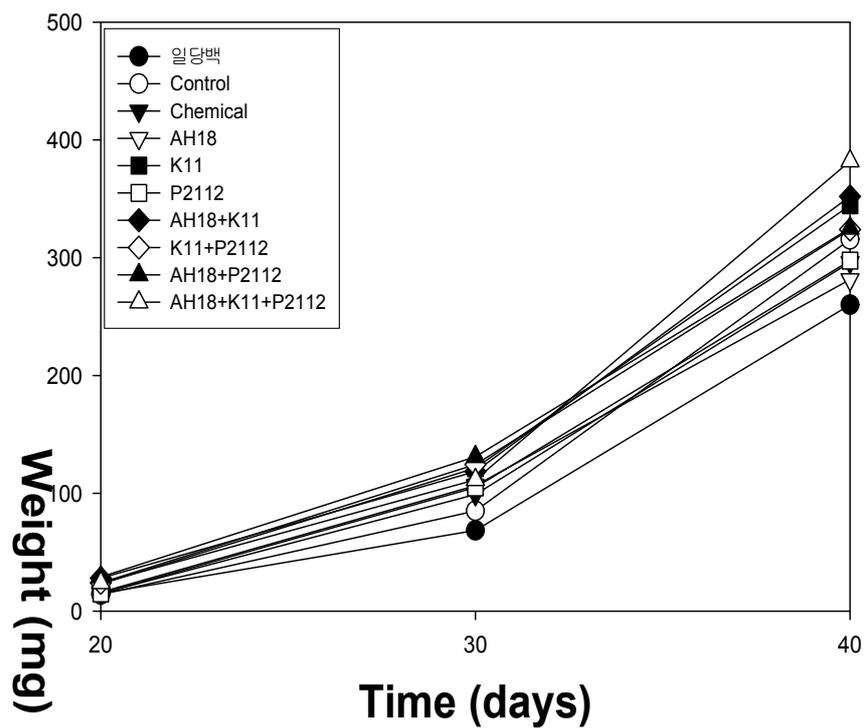


Fig. 2.14. Plant growth promoting activity by the consortium microbial agent on dry weight of red-pepper on hotbed.

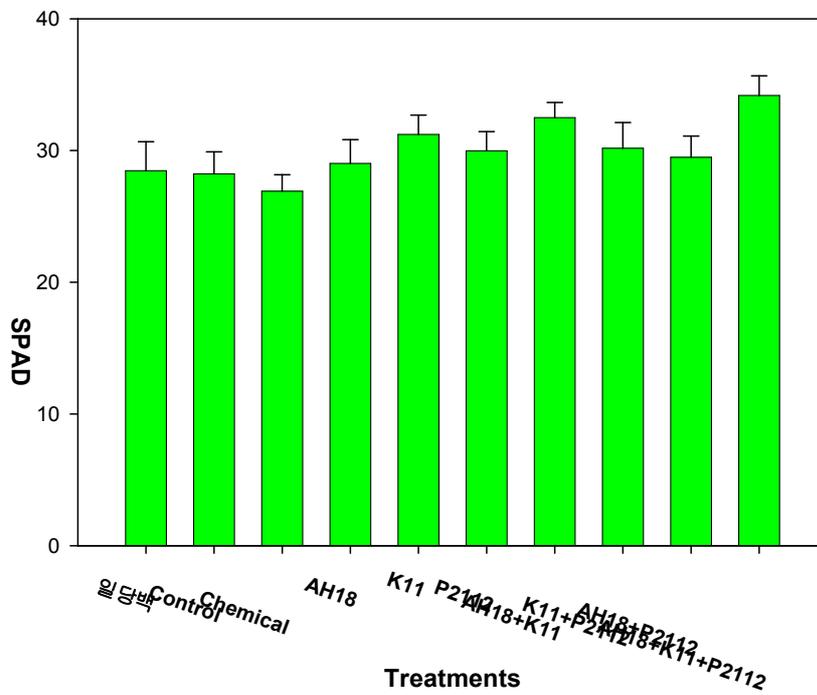


Fig. 2.15. The effects of a chemical pesticide and the selected consortia on chlorophyll of red-pepper on hotbed.

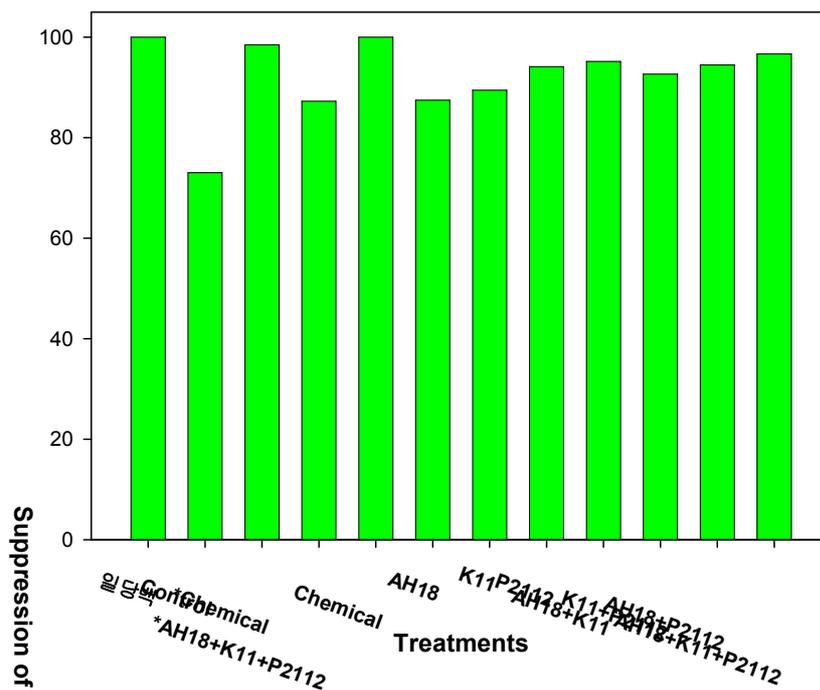


Fig. 2.16. Suppression of phytophthora blight by the selected consortia on hotbed. \*Chemical: foliage spray of chemical pesticide; \*AH18+K11+P2112: foliage spray of consortium *B. subtilis* AH18, *B. licheniformis* K11 and *P. fluorescens* 2112

나. 현지 포장시험을 통한 최적 길항 미생물 컨소시엄의 고추생육촉진능 조사

(1) 영양지역 노지포장에서의 고추생육촉진능 검증

고추역병 방제용 길항미생물 컨소시엄제제의 고추역병 방제 및 고추 생육과 수량에 미치는 영향을 보기 위하여 경북 영양군 영양읍 대천리 579-3에 위치한 영양고추시험장 노지 포장 1,000평에 고추를 정식하고 역병의 발병여부를 관찰하였다(Fig. 2.17). 하지만, 2008년의 건조하고 높은 기온의 기후조건 때문에 포장에서는 7월까지 역병이 전혀 발병하지 않았고, 실제로 고추수확기까지 역병은 발병하지 않았다. 따라서, 영양고추시험 노지 포장에서의 역병 방제능 조사가 불가하게 되었고, 영양 주변의 다른 고추역병 발병 포장을 확보함과 동시에 영양고추시험장 노지 포장에서는 고추생육촉진능만을 조사하기로 하였다.

미생물 농약 탐시드, 화학농약 프리엔, 그리고 미생물 복합제가 고추 초장에 미치는 효과를 8월 중순에 조사한 결과 프리엔을 처리한 시험구가 초장이 123cm로서 가장 낮은 탐시드 처리구의 115cm에 비하여 높았지만, 유의성있는 차이는 보이지 않아서 이들 농약 및 미생물 처리가 고추 초장에 영향을 미치지 않는 않았다(Fig. 2.18).



Fig. 2.17. Field application of red-pepper growth promoting in Daecheon-ri, Yeongyang-eup, Yeongyang-gun, Gyeongbuk, Korea

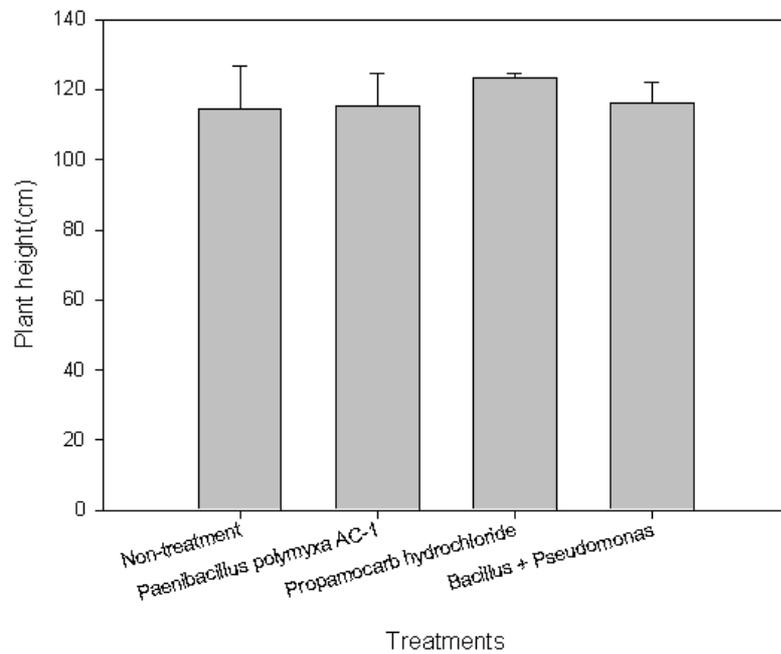


Fig. 2.18. The effects of a biological pesticide, a chemical pesticide and consortium microbial agent on red-pepper plant height.

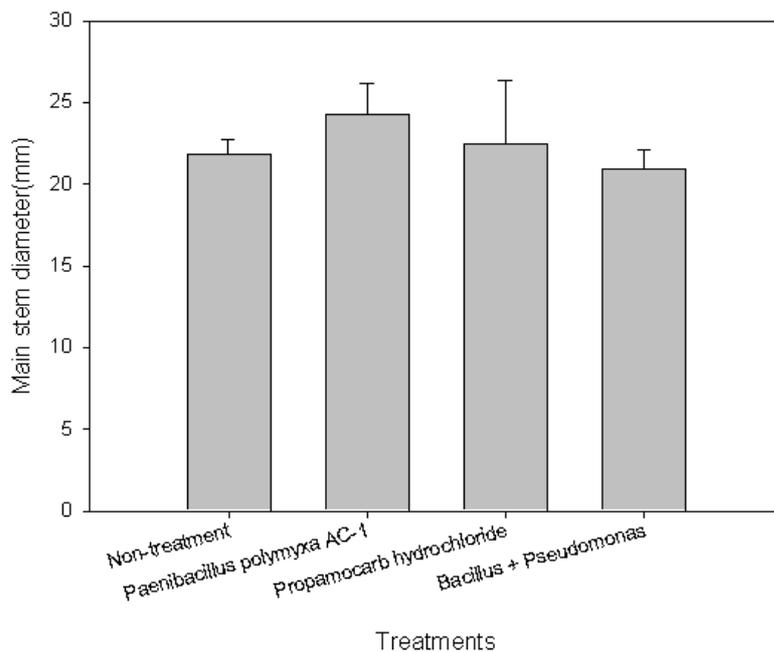


Fig. 2.19. The effects of a biological pesticide, a chemical pesticide and selected antifungal microorganisms on red-pepper plant main stem diameter.

미생물 농약 탐시드, 화학농약 프리엔, 그리고 미생물 복합제의 고추 주경장의 직경에 미치는 효과를 8월 중순에 조사한 결과 고추 주경장 직경이 처리간에 차이가 있었는데, 탐시드를 처리한 시험구는 24mm로서 가장 길었고, 복합 미생물 처리구는 21mm로서 가장 짧았다. 복합 미생물 처리구의 주경장 직경이 무처리구와는 차이가 없었지만 탐시드 처리구와의 차이는 유의성이 있었다. 따라서 탐시드는 경직경 증가에 영향을 미치고 복합미생물은 경직경을 감소시키는 경향이 있다고 생각된다(Fig. 2.19).

화학농약과 미생물 농약의 고추 측지 발생수에 미치는 영향을 보면 프리엔 처리구가 가장 많은 주당 11.8개로서 가장 많았고, 복합미생물 처리구가 10.1개로서 가장 적었다. 프리엔 처리구는 무처리 대조구 보다 유의성있게 많았고, 복합미생물 처리구는 무처리대조구보다 유의성 있게 적었다(Fig. 2.20).

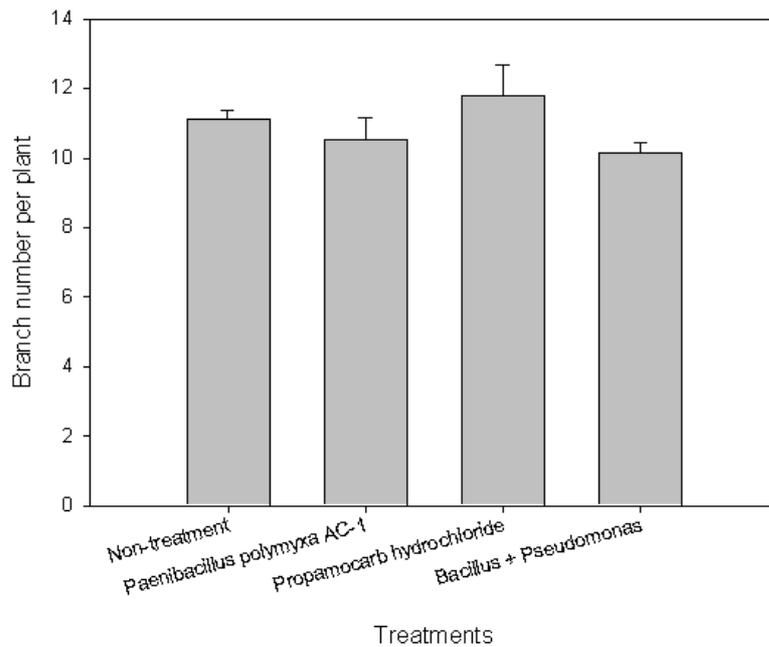


Fig. 2.20. The effects of a biological pesticide, a chemical pesticide and selected antifungal microorganisms on red-pepper plant branch number.

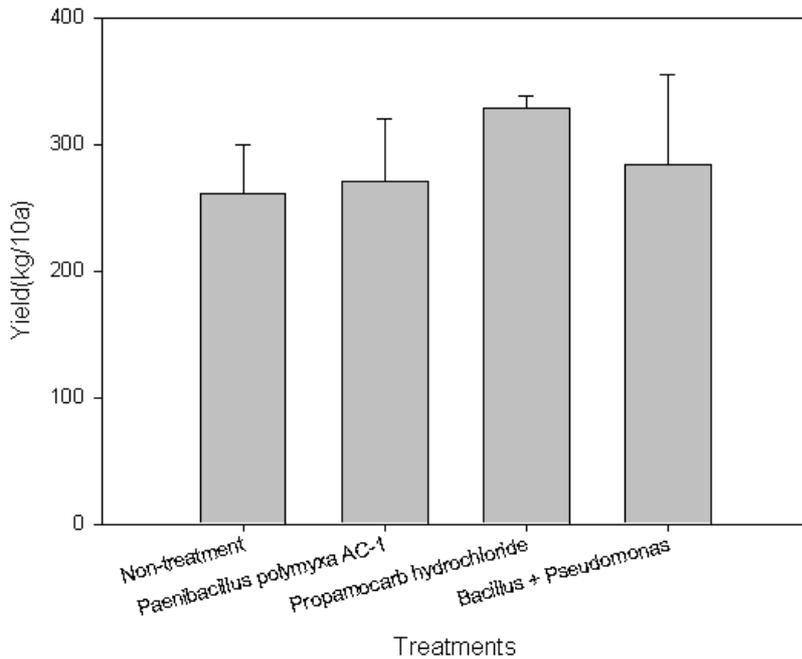


Fig. 2.21. The effects of a biological pesticide, a chemical pesticide and selected antifungal microorganisms on red-pepper yield.

화학농약 및 생물농약 처리가 고추 수량에 미치는 영향을 조사한 결과 복합미생물 처리는 고추 수량에 유의성있는 영향을 미치지 않았지만 프리엔 처리구는 무처리대조구에 비하여 수량이 유의성 있게 증가하였다. 복합 미생물 처리구는 평균 수량이 대조구에 비하여 유의성있게 많지만 않았지만 그 변이가 다른 처리보다 커서 수량증대에 기여할 가능성을 가지고 있었다 (Fig. 2.21). 분지수가 줄면서도 수량이 감소하지 않은 것은 마디수가 증가했을 가능성이 커 보인다.

## (2) 예천지역 노지포장에서의 고추생육촉진능 검증

최적 컨소시엄 균주의 다양한 환경에서의 고추생육촉진능을 조사하기 위하여 경북 예천군 용문면에 위치한 구계리와 죽림리의 노지포장에서 실시하였다(Fig. 2.22, 2.23). 화학제제 처리구의 경우 예천군에서 널리 사용하고 있는 아인산염을 화학농약대신 200ppm의 농도로 처리하였다. 미생물농약의 경우 탐시드를 사용하였으며 상기의 조건과 동일한 농도를 처리하였으며, 무처리구 역시 동일하게 처리하였다. 또한 다양한 고추 품종에서의 생육촉진능을 확인하기 위하여 역병저항성품종인 독야청청을 사용하였다. 70일째 생육조사를 한 결과 초장의 경우 타처리구에 반해 무처리구에서 5cm 정도 더 길었다. 그러나 컨소시엄 처리구의 경우 타처리구에 반해 경경이 5mm 이상 발달한 것을 확인할 수 있었다(Table 2.2). 이것은 고추의 경우 초장이 길어지게 되는 것은 재배상 불리한 특성이나 경경의 발달의 경우 뿌리발달에 영향을 주어 토양내 영양분의 흡수를 향상시키는 역할을 하기 때문에 본 연구에 의한 컨소시엄은 고추의 경경발달에 매우 효과적이라고 사료된다.



Fig. 2.22. Field application of red-pepper growth promoting in Jungnim-ri, Yongmun-myeon, Yecheon-gun, Gyeongbuk, Korea.



Fig. 2.23 Field application of red-pepper growth promoting in Gugye-ri, Yongmun-myeon, Yecheon-gun, Gyeongbuk, Korea.

Table 2.2. The effects of a biological pesticide, a chemical material and selected consortium No.11 on red-pepper plant growth.

구분	초장 (cm)	주경장 (cm)	경경 (mm)	분지수 (개/주지)	절간장 (cm)
무처리구	107.4	30.1	17.3	12.3	6.8
아인산염	101.5	28.2	17.1	12.1	6.1
AC-1	104.6	27.1	17.7	12.6	6.7
컨소시엄제제	102.8	26.7	17.9	12.5	6.9

다. 고추역병 발생 노지포장에서의 고추역병 방제능 검증

(1) 고추역병 발생 노지포장에서의 고추역병 방제능 검증

영양군과 안동시 일대를 살펴본 결과, 안동시 서후면에서 약 1,000평의 고추노지가 거의 대부분이 고추역병이 골고루 발병한 상태의 고추역병 발병 포장을 확보할 수 있었다. 포장에서 역병이 발병한 고추를 모두 제거하고 어린 고추묘를 이식하였으며, 고추역병을 발병시키면서 고추역병 방제능 검증 실험을 실시하였다(Fig. 2.24). 실제로 고추역병이 발병한 포장에 고추묘를 재이식한 상태이므로 컨소시엄 미생물제제의 고추역병 발병 억제능 또는 고추역병 방제능을 검증함에는 더할나위 없이 좋은 시험조건이라고 생각한다.

2008년 7월 15일 정식 시 최적 컨소시엄 미생물복합체(컨소시엄 No. 11: *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11) 또는 최종컨소시엄 미생물복합체(컨소시엄 No. 11과 *P. fluorescens* 2112)를 처리하고 물만 처리한 대조구와 비교하였다. 그 결과 대조구는 첫 조사일자에 13%의 발병율을 보였고, 이후 계속 발병율이 증가하여 이식 55일 후에는 20%, 65일 후에는 37%의 고추가 역병에 감염되었다. 이에 반하여 상업용 시판 미생물농약인 G사의 T제품 처리구는 이식 28일째에 5.6%의 낮은 발병율을 보였다가 그 후 계속 발병율이 증가하여 이식 48일째에 19.6%까지 감염되었으나 55일째에는 다시 낮아져서 15.5%의 고추가 역병에 감염되었으며, 마지막 조사일이었던 65일째에는 다시 감염율이 증가하여 29%의 고추가 감염되었다. 최적 컨소시엄 No. 11 (*B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11)을 처리한 시험구는 첫 조사일인 정식 28일째에 6.6%의 낮은 발병율을 보였다가 약간씩 발병율이 증가하여 65일째까지도 15%의 매우 낮은 발병율을 보여 물 처리의 대조구나 시판 상업용 미생물농약인 G사의 T제품의 처리구보다 감염율이 현격히 낮았다. 컨소시엄 No.11과 *P. fluorescens* 2112를 혼용 처리한 경우에는 첫 조사일인 정식 28일째에 8.3%의 낮은 발병율을 보였다가 약간씩 발병율이 증가하여 48일째에 최고의 발병율인 12.6%의 발병율을 보였으며, 그 후 약간 감소하여 55일째에는 10.6%, 65일째에는 11.7%의 감염율을 보였다(Fig. 2.25). 특히 마지막 조사일인 정식 후 65일째에는 미생물 컨소시엄 No.11의 단독처리구뿐만 아니라 컨소시엄 No.11과 *P. fluorescens* 2112의 혼용처리구

에서도 대조구와 비교하여 유의성있는 역병 억제 효과를 보여 본 연구에서 선발된 균주의 포장에서의 역병 억제력이 실제 농가에서도 효과가 있음을 실증하였다(Fig. 2.25, 2.26). 한편 시판 상업용 미생물농약인 G사의 T제품은 초기에 역병 발병을 억제하는 효과가 있었으나 그 효과는 지속되지 못했다. 초기 발병부터 다른 길항미생물 처리구보다 발병율이 계속 높았고 발병율도 계속 증가한 대조구에 비하여, 본 연구에서 선발된 길항미생물 최종컨소시엄(컨소시엄 No.11과 *P. fluorescens* 2112의 혼용)은 역병 발병억제 효과가 유의성있게 확연히 좋은 것으로 확인되었다.



Fig. 2.24. Red-pepper field attacked by outbreak of Phytophthora blight and re-plantation for field test of formulation PGPR consortia.

A, red-pepper field infected by Phytophthora blight; B and C, red-pepper field which was just re-planted.

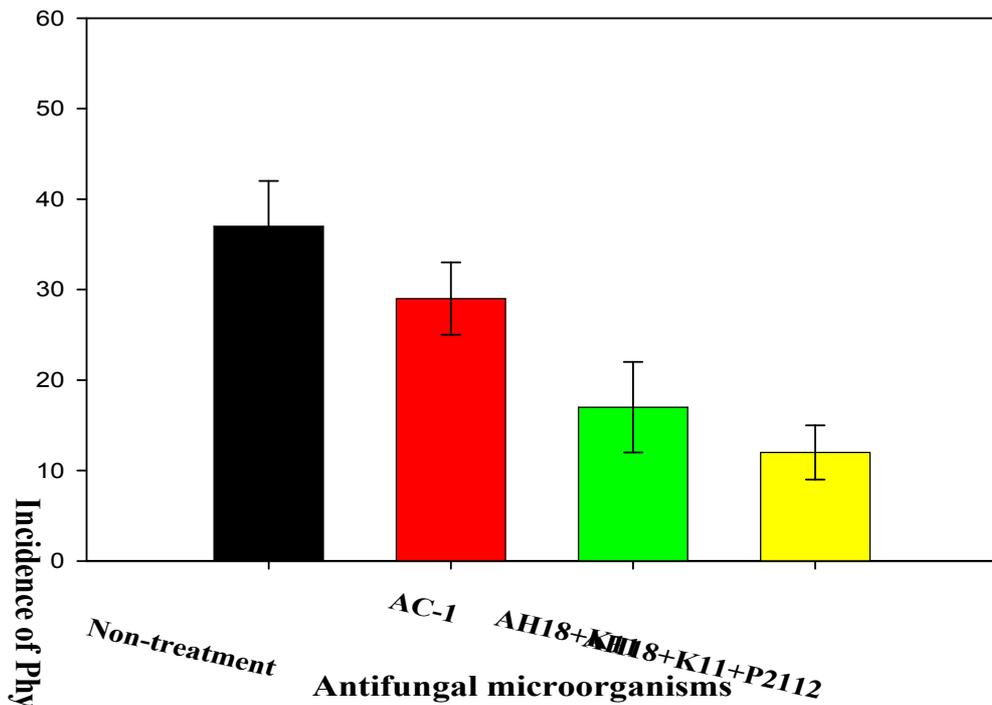


Fig. 2.25. Suppression of Phytophthora blight by the mixed microbial consortium in red-pepper field.

AC-1 : a commercial bio-fungicide

*B. subtilis* AH18, *B. licheniformis* K11, and *P. fluorescens* 2112 was treated as  $10^6$  cells per plant.

이상의 결과로부터 시판 미생물제제인 그린바이오텍의 탐시드 제품의 경우 초기 억제 효과만 기대되고 지속적인 효과는 기대하기 어렵지만, 컨소시엄 No. 11 (*B. subtilis* AH18 + *B. licheniformis* K11)은 초기 발병율도 낮고 그 후 역병 발병의 진전 억제 효과를 보여서 고추 역병 방제에 보다 효과적임을 알 수 있었다. 역병 억제 효과를 상승시키기 위하여 길항미생물인 컨소시엄 No.11과 *P. fluorescens* 2112를 혼용하여 동시에 처리한 결과, 초기에 역병 억제 효과는 컨소시엄 No. 11 단독 처리구와 그다지 차이가 없었지만, 정식 후 55일째평균 발병억제력이 컨소시엄 No. 11 단독 처리구보다 높게 나타났다. 실제 고추포장에서는 고추역병이 여름 최성기인 6-7월에 장마를 전후하여 주로 발병하지만, 본 실험에서는 포장에서 역병의 발병을 확인한 이후인 7월 15일에 정식하여 실험하였기 때문에 *P. fluorescens* 2112가 저온기에 역병 발병 진전을 억제하는 효과가 있다는 것을 간접적으로 알 수 있었다. 따라서, 컨소시엄 No.11의 단독처리가 비용과 역병 방제 효율 면에서 고추 역병 방제에 보다 효율적임을 확인 할 수 있었다. 다만 본 실험은 역병의 인위적 발병 유도도가 어려운 점을 고려하더라도 실험결과에서 반복간의 변이가 심하기 때문에 차후 연구에서는 역병 발병이 확인된 다수의 포장에서 재현 실험을 실시할 필요가 있다고 사료된다.

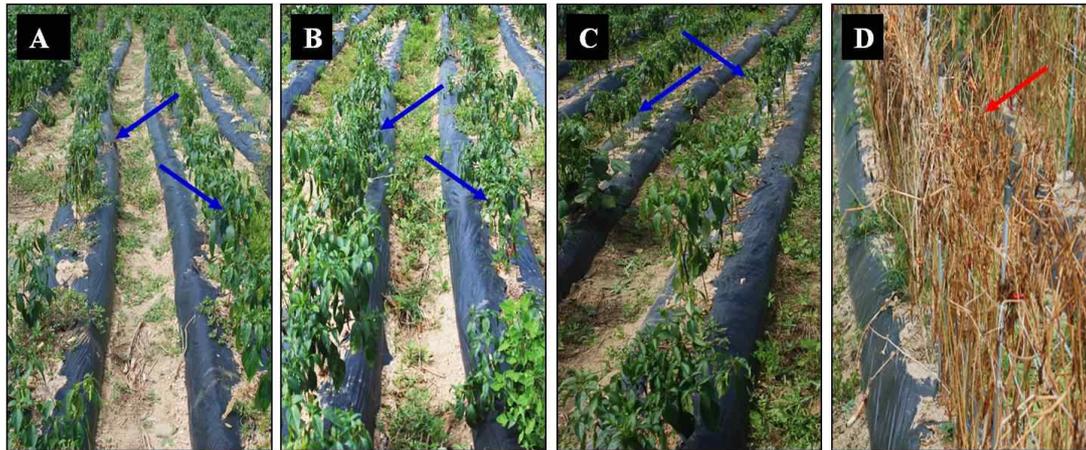


Fig. 2.26. Suppression of Phytophthora blight red-pepper field by the mixed microbial consortia.

The picture was taken after 65 days from initially one treatment of the mixed microbial consortia.

A, treated with two *Bacillus* consortium

B, treated with two *Bacillus* + *P. fluorescens* 2112 consortium

C, treated with commercial bio-fungicide

D, non-treated control

상기 경작지 현장 포장내의 길항미생물 컨소시엄 미생물제제의 고추역병 방제능 실험결과를 종합해 볼 때, 컨소시엄 No. 11의 단독 처리뿐만 아니라 컨소시엄 No.11과 *P. fluorescens* 2112의 혼용 처리는 역병 발병 자체를 억제 할 뿐만 아니라 역병 발병 후 병해의 진전 속도도 늦추었으며, 특히 *P. fluorescens* 2112의 혼용처리는 최고 발병이후 오히려 발병을 감소시키는 경향을 보였다. 따라서 이러한 복합 미생물제제 처리는 발병 그 자체의 예방뿐만 아니라 감염된 식물에서 질병의 진전을 억제하여 고추 수확량을 증대시킬 수 있을 것으로 사료된다. 최적 컨소시엄의 복합미생물제제(컨소시엄 No.11, *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11) 및 최종 컨소시엄의 복합미생물제제(컨소시엄 No.11과 *P. fluorescens* 2112)는 역병 억제효과면에서 기존의 상업용 미생물농약 G사의 T제품보다 효과가 컸다. 다만 G사의 T제품도 발병 후 병의 진전을 억제하는 효과는 본 실험에서 선발된 미생물만큼 컸다.

라. 현지 시설재배포장시험을 통한 최적 길항미생물 컨소시엄의 기타 작물 생육촉진능 조사

시설재배포장 및 노지포장에서 고추생육촉진능 및 고추역병 방제능에 뛰어난 효과를 나타낸 최적컨소시엄이 다른 농작물에서의 생육촉진능의 여부를 조사하였다. 시험작물은 청고추(경북 밀양일대), 토마토(경북 경주일대), 참외(경북 성주일대), 싹배추(경북 경산일대), 멜론(경남 함안 가야일대)을 대상으로 실시하였으며, 대조구로서 (주)대유의 대유블로토와 마이크로빅을 1000배 희석하여 사용하였다. 추가적으로 최적컨소시엄의 희석배수를 500배와 1000배로 사용하였으며 무처리구의 경우 동량의 물을 처리하였다. 그 결과 과채류 및 엽채류의 초장생육 결과를 보면, 컨소시엄처리구가 고추 1-2%, 토마토 0-2%, 참외 0-2%로 효과 미미하였고, 통계적

유의성도 확인할 수 없었다(Fig. 2.27-2.39, Table 2.3-2.6). 이는 무처리구가 관행처리구이기 때문에 시험포장에 밀거름이 시비된 상태에서 시험을 시행하였고, 또한 정식기가 다소 지난 유모기에 시험을 하였기에 개발제제처리구의 생육증진효과가 밀거름으로 인한 증진효과가 우세하여 감소하였기 때문이라 사료된다. 또한 생육에 미치는 영향이 미미한 것은 고추가 정식 후 약 1개월 이상 지난 시점에 처리하여 과실 착과비대기에 들었기 때문에 이때는 고추의 생육하기 때문에 그 효과가 미비하였다고 사료된다. 토마토의 경우 조사 시기가 2화방 과실이 착과 비대하는 시기이고 5화방까지 개화가 완료된 상태여서 그 효과가 미미하였다고 사료된다. 참외도 정식 약 4개월이 지난 후 처리하였기에 그 효과가 미미하였다고 사료된다. 엽채류인 쌈배추는 수확 할 시기가 되면 7일정도의 간격으로 연속해서 수확이 이루어지기 때문에 처리횟수도 2회 처리하였고, 생육증진 효과도 명확하게 확인할 수 없었다. 엽채류 및 과채류에 살포한 미생물 개발제제는 처리 후 육안으로 조사한 결과 약해가 인정되지 않았다.



Fig. 2.27. Field application of red-pepper growth promoting in Miryang-si, Gyeongsangnam-do, Korea.



Fig. 2.28. The effects of a biological pesticide, a chemical material and selected consortium No.11 on red-pepper plant growth.



Fig. 2.29. Field application of tomato growth promoting in Gyeongju-si, Gyeongbuk, Korea.



Fig. 2.30. The effects of a biological pesticide, a chemical material and selected consortium No.11 on tomato plant growth.



Fig. 2.31. Field application of oriental melon growth promoting in Seongju-gun, Gyeongbuk, Korea.



Fig. 2.32. The effects of a biological pesticide, a chemical material and selected consortium No.11 on oriental melon plant growth.



Fig. 2.33. Field application of chinese cabbage growth promoting in Gyeongsan-si, Gyeongbuk, Korea.



Fig. 2.34. The effects of a biological pesticide, a chemical material and selected consortium No.11 on chinese cabbage plant growth.

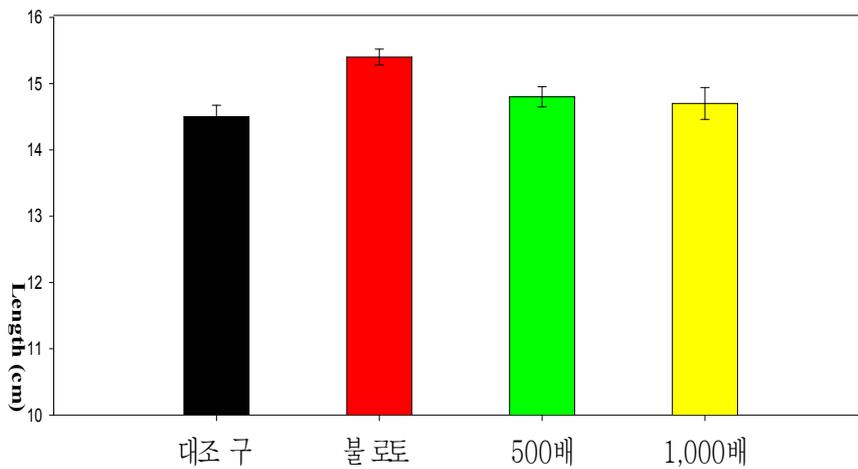


Fig. 2.35. The effects of a biological pesticide, a chemical material and selected consortium No.11 on red-pepper plant growth.

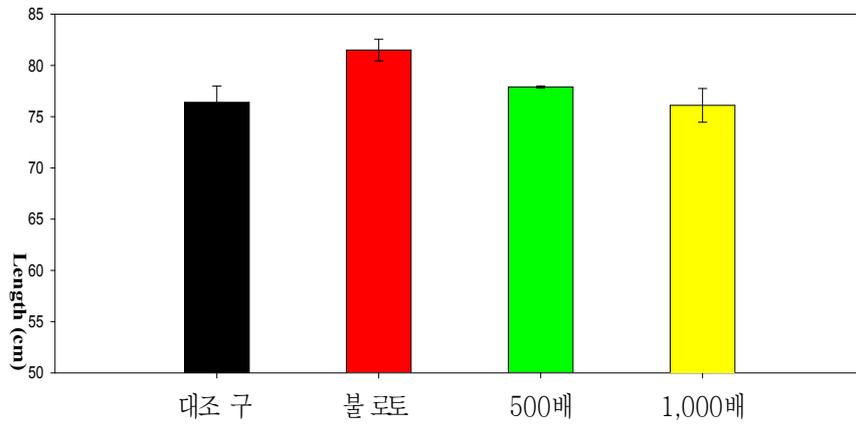


Fig. 2.36. The effects of a biological pesticide, a chemical material and selected consortium No.11 on tomato plant growth.

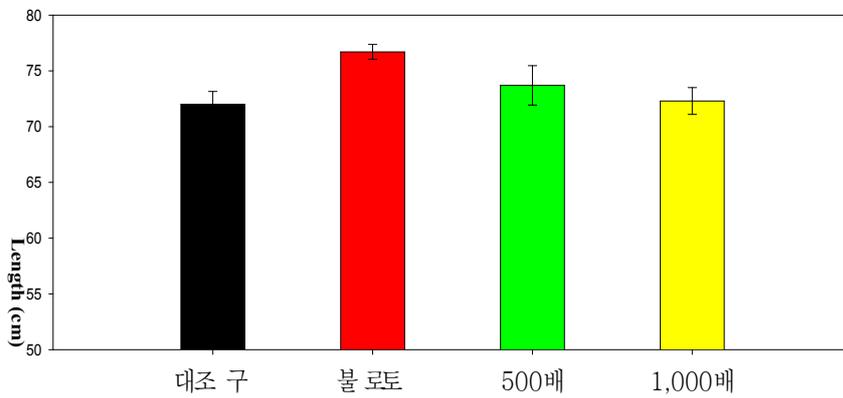


Fig. 2.37. The effects of a biological pesticide, a chemical material and selected consortium No.11 on oriental melon plant growth.

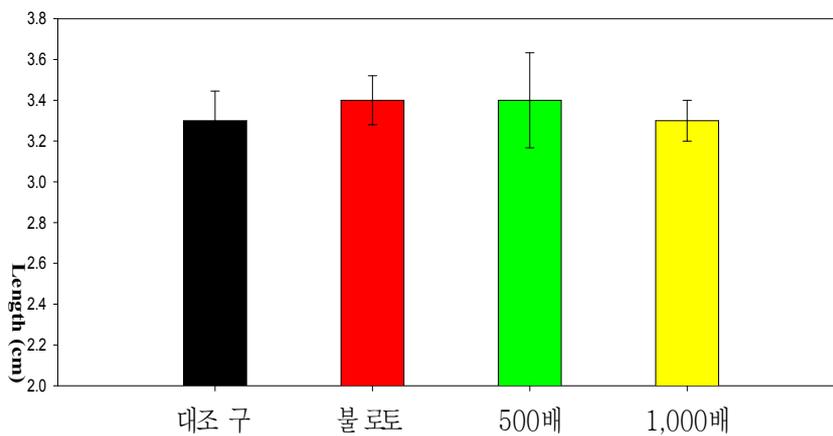


Fig. 2.38. The effects of a biological pesticide, a chemical material and selected consortium No.11 on chinese cabbage plant growth.

Table 2.3. The effects of a biological pesticide, a chemical material and selected consortium No.11 on red-pepper plant growth.

시험약제	초장생육 (cm)			
	1반복	2반복	3반복	평균
대조구	14.2	14.8	14.5	14.5
대유블로토	15.2	15.6	15.3	15.4
500배	14.5	14.9	15.0	14.8
1,000배	14.8	14.2	15.0	14.7

Table 2.4. The effects of a biological pesticide, a chemical material and selected consortium No.11 on tomato plant growth.

시험약제	초장생육 (cm)			
	1반복	2반복	3반복	평균
대조구	73.3	78.5	77.5	76.4
대유블로토	82.1	79.5	83.0	81.5
500배	77.7	78.0	78.0	77.9
1,000배	79.0	76.0	73.3	76.1

Table 2.5. The effects of a biological pesticide, a chemical material and selected consortium No.11 on oriental-melon plant growth.

시험약제	초장생육 (cm)			
	1반복	2반복	3반복	평균
대조구	70.0	74.0	72.0	72.0
대유블로토	76.0	78.0	76.0	76.7
500배	77.0	73.0	71.0	73.7
1,000배	73.0	70.0	74.0	72.3

Table 2.6. The effects of a biological pesticide, a chemical material and selected consortium No.11 on chinese cabbage plant growth.

시험약제	초장생육 (cm)			
	1반복	2반복	3반복	평균
대조구	3.0	3.3	3.5	3.3
대유블로토	3.5	3.6	3.2	3.4
500배	3.0	3.8	3.3	3.4
1,000배	3.2	3.5	3.2	3.3



Fig. 2.39. Field application of melon growth promoting in Gaya-eup, Haman-gun, Gyeongsangnam-do, Korea.



Fig. 2.40. The effects of a biological pesticide, a chemical material and selected consortium No.11 on melon plant growth.

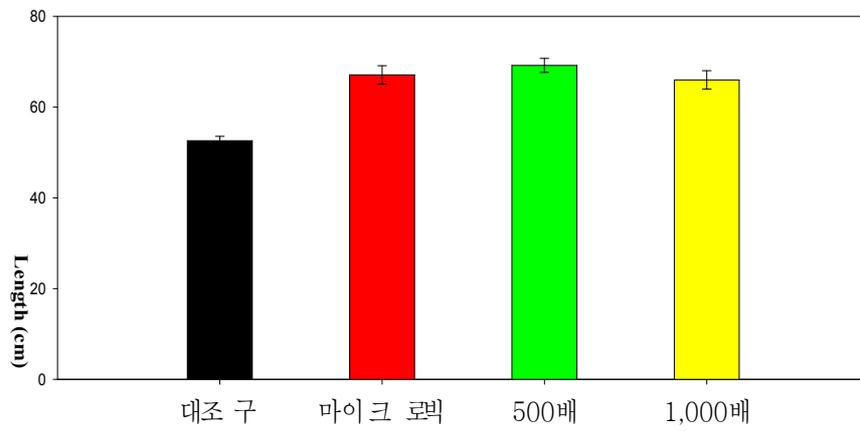


Fig. 2.41. The effects of a biological pesticide, a chemical pesticide and selected consortium No.11 on melon plant growth.

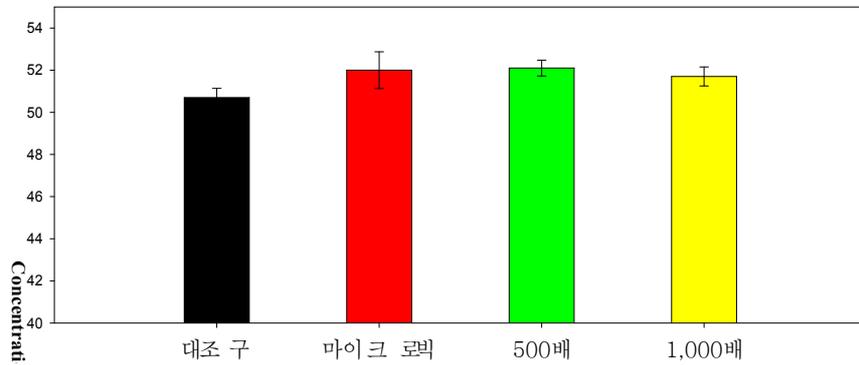


Fig. 2.42. The effects of a biological pesticide, a chemical pesticide and selected consortium No.11 on melon plant chlorophyll content.

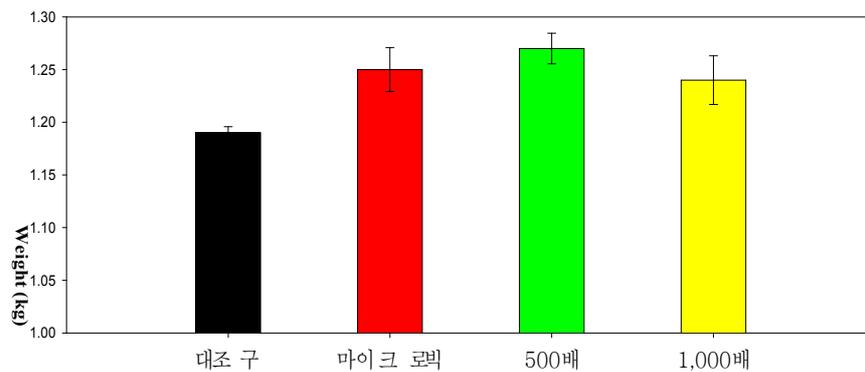


Fig. 2.43. The effects of a biological pesticide, a chemical pesticide and selected consortium No.11 on melon plant fruit weight.

Table 2.7. The effects of a biological pesticide, a chemical material and selected consortium No.11 on melon plant growth.

시험약제	초장생육 (cm)		
	초장(cm)	엽록소(SPAD)	과중(kg)
대조구	52.6	50.7	1.19
대유블로토	67.1	52.0	1.25
500배	69.2	52.1	1.27
1,000배	66.0	51.7	1.24

그러나 멜론의 경우 멜론에 농림미생물 개발제제를 관주처리하여 적심 전 초장생육을 조사한 결과 모든 처리구에서 무처리대비 증가를 보였다(Fig. 2.40-2.41, Table 2.7). 무처리 대비 농림미생물 개발제제 처리구가 25-32%의 생육증대효과를 보였다. 과중을 조사한 결과 최적컨소시엄처리구에서 엽록소수치도 증가하였으며, 과중 역시 4-5%정도 증대되었다(Fig. 2.42, 2.43, Table 2.7). 이러한 결과는 농림미생물 개발제제를 정식기에 처리함으로써 정식직후 지하부 생육을 증진시켜 뿌리활착이 증대되었기 때문에 초기생육이 왕성하였고, 그 영향으로 후기 과실 비대증진까지 효과를 미친것으로 사료된다. 엽내 엽록소 함량은 처리구간 별다른 차이를 보이지 않았다. 농림미생물 개발제제처리로 인한 식물체 엽 및 과실 등의 약해는 발생되지 않았다.

#### 4. 고찰

일반적으로 미생물제제는 그 효과는 주목할만하나 현장에서의 재현에 문제점을 보여왔고 현재 시중에 유통되고 있는 미생물제제들 역시 이 문제에서 자유롭지 못하다. 그런 점에서 볼 때 상기 실험결과에서 현장에서의 성장촉진능 및 역병방제능을 확인할 수 있었던 점은 매우 고무적인 성과라고 보여진다. 특히 특정 지역에서만 역병방제효과와 성장촉진효과를 보인 것이 아니라 포장시험을 실시했던 안동, 영양, 예천 세곳에서 모두 동일한 결과를 볼 수 있었다는 점은 본 연구에서 개발한 미생물 컨소시엄 제제의 상용화에 대한 높은 가능성을 보여준다고 생각된다. 또한 실내 포트실험에서 찾아낸 최적의 균주 컨소시엄 조합을 현장 포장시험에서도 입증한 점은 본 연구의 균주의 적용에 있어 실내 포트실험과 현장 포장시험과의 오차가 크지 않다는 걸 반영해 줄 수 있다고 본다. 그리고 실제 농가에서 고추의 생육촉진과 고추수량 증대에 가장 중점을 둔다는 점을 고려했을 때 본 연구의 미생물 컨소시엄 제제가 농가에 기여할 수 있는 부분이 크다고 본다. 무엇보다도 컨소시엄 제제 처리구와 타처리구의 비교대상 실험에서 육안으로 확인할 수 있을 정도로 확연한 엽색의 차이를 보여 이는 고추 내 엽록소가 증가되었다고 생각되며, 고추의 광합성을 높여주어 고추생산물의 품질 상승과 비대효과에 크게 작용하리라 생각된다(Fig 2.7-2.9). 또한 작물의 특성상 줄기의 신장보다는 엽육의 색, 크기, 경직경 등이 고추생산량 및 품질을 크게 좌우하므로 본 연구의 최적 컨소시엄을 현장적용시 고품질의 고추생산이 가능하리라 생각된다.

본 연구의 현장 포장시험에서 고추역병 방제능 및 성장촉진능을 확인할 수 있었지만 미생물제제의 특성상 현장적용에 일관성을 보이기 힘들다는 점을 고려했을 때 현장적용에 있어서 좀 더 세분화된 차후연구가 필요하다고 본다. 일반적으로 고추 농가의 화학방제 및 미생물방제 처리가 월 1회인 점을 감안할 때, 차후 연구에서는 처리 횟수 및 기간을 실제 농가사용에서의 처리방식에 의거하여 고추역병 방제능 및 고추성장촉진효과를 검증해야 할 것이다. 또, 우리나라의 다양한 토양 환경을 고려할 때 점질 토양 및 사질 토양 등의 토양 배수환경을 고려하여 본 연구에서 개발된 미생물제제를 다양한 토양 환경에서 실제 적용 실험을 통해 효과를 재검증해야 할 것이라 생각한다. 그리고 농가에서 궁극적으로 원하는 것이 고추의 수량증대이기에 이 부분에 있어서 그 가능성을 확인하였지만 다른 처리구들에 비교했을 때 효과를 확실히 입증하지 못하였기에 이 부분에 있어서 좀 더 추가연구가 필요하다고 본다. 또한, 본 연구에서 개발된 컨소시엄 균주의 폭넓은 적용을 위한 고추 이외의 기타 작물에서의 성장촉진 실험에서 만족스럽지 못한 결과를 얻은 점은 아쉬움으로 남는다. 기타 작물을 대상으로 실험했을 시 기존에 실험해왔던 고추와 생육적인 부분에 있어서 차이가 있는 것을 미리 파악하지 못한 점과 여러 복합적인 상황에 맞물려 실험을 원활히 진행하지 못하여 애당초 기대했던 결과를 얻지 못한 것으로 보고 있다. 차후실험에서 기타 작물들의 전반적인 생육을 미리 파악하여 그에 맞게 본 연구의 컨소시엄 균주를 적용한다면 기대했던 결과를 얻을 수 있을 것이라 생각한다.

# 제 3 절 다기능 PGPR균주에 의한 고추의 식물스트레스 저항능 유도 및 식물생장촉진물질 연구

## 1. 서론

식물은 생육지를 이동할 수 없는 고착생활을 한다. 따라서 온도, 토양, 수분, 대기, 빛 등의 피할 수 없는 환경적 변화가 식물의 생장에 매우 중요한 인자로 작용하고 있다[배 등, 2008]. 불가피한 환경스트레스에 노출되어 있는 식물에게 식물의 생장을 조절해 주는 요인은 식물생장조절물질 즉 식물호르몬이다. 식물의 생장에 있어 성장조절호르몬의 공급은 식물체 내의 내생 호르몬의 양과 물질대사, 작물의 생산력에 많은 영향을 미친다. 현재 각종 식물호르몬들의 생리적 기능 및 작용기작 등이 밝혀지면서, 성장조절제의 인위적인 개발이 활발해 지고 있는 추세이다. 또한, 인간 활동을 통해 발생하는 토양, 수질 및 대기오염 물질 또한 식물이 대처해야 하는 추가적인 환경요인도 있다. 환경 변인이 극단적으로 변하면 식물에게 스트레스가 되는 조건이 형성되어 식물의 생리와 발달 그리고 생존에 중요한 영향을 미칠 수 있다[박 등, 2006; Hopkins 등, 1999]. 일반적으로 식물이 노출되는 스트레스는 다른 생물체에 의해 일어나는 생물적(biotic) 스트레스와 물리학적 또는 화학적 환경의 변화에 의해 일어나는 비생물적(abiotic) 스트레스가 있다. 생물적 스트레스는 기생충이나 송충이 같은 벌레가 자신을 갉아 먹거나 식물에 세균, 바이러스나 곰팡이 등의 병원균의 침입에 의해 반응하는 스트레스이고, 비생물적 스트레스는 주로 환경적 변화에 따른 것으로 빛에 의한 것이나 수분의 과잉, 부족, 염분의 축적, 저온 혹은 고온 등의 온도에 의한 것들, 상처에 의한 것들에 의해 나타난다[신 등, 2005; Shimon 등, 2004; Hopkins 등, 1999; Minami 등, 1998; Shivanna 등, 1994]. 이러한 스트레스에 대한 식물의 반응은 단백질 및 유전자의 변화 또는 세포의 대사작용의 변화를 유발하여 생장율과 생산성의 변화를 가져온다[Minami 등, 1998]. 이런 다양한 환경스트레스에 내성이 강한 식물들은 여러 가지 식물생장조절 호르몬을 통하여 생육과 반응을 조절하거나 유전자 발현을 통하여 환경변화에 순응 할 수 있지만, 환경변화에 민감한 식물들은 그렇지 못하다. 따라서 식물의 생산성을 높이기 위해서는 근권미생물 등 외부 생물체에 의해 이들 식물의 스트레스 저항성을 유도해 주는 적극적인 방법이 필요하다고 생각된다. 이러한 식물의 여러 가지 환경스트레스에 반응하여 조절 작용하는 식물호르몬으로는 ethylene, abscisic acid, jasmonic acid 등이 있으며, 이들 호르몬들의 분비를 통하여 스트레스에 대한 방어기작을 작동시킨다[배 등, 2008; Bageshwar 등, 2005; 신, 2005; 안 등, 2004; Shimon 등, 2004; 정 등, 2003; 정 등, 2003; Hopkins 등, 1999; Minami 등, 1998; Shivanna 등 1994].

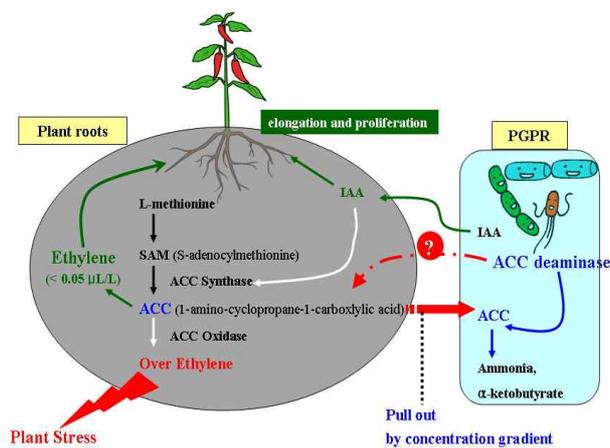
중금속에 의한 토양오염, 염 축적, 가뭄, 병원균의 공격 등 환경으로부터 여러 가지 스트레스를 받는 식물은 대사산물로 에틸렌을 합성하는데 이렇게 생산된 에틸렌은 식물의 성장을 제한하며 식물의 복원 효율을 저하시킨다[Glick 등, 1998; Deikman, 1997]. 식물성 호르몬의 일종으로 식물 성장에 영향을 미치는 중요한 요인 중 하나인 에틸렌은 스트레스에 의해 생성되는 것이외에도 식물의 성장, 특히 씨앗이 발아하여 성장하기 시작하는 성장 초기단계에도 빠른 속도로 생성된다[Grichko 등, 2001; Deikman, 1997]. 하지만, 일정 농도 이상으로 높게 생성되어 축적될 경우에는 식물 뿌리의 성장을 저해한다[Morgan 등, 1997]. 에틸렌이 생산되는 기작은 식

물 내 L-methionine이 S-adenosyl-L-methionine (SAM)을 거쳐 중간 대사산물인 ACC로 대사된 후, 최종산물 대사산물인 에틸렌으로 분해된다. 즉, L-methionine이 SAM synthetase에 의하여 SAM으로 전환되어지며, 이렇게 생성된 SAM은 다시 ACC synthase에 의해서 ACC와 5-methylthioadenosine으로 가수분해된다. 이렇게 생성된 ACC는 ACC oxidase에 의해 최종적으로 에틸렌, CO<sub>2</sub>, cyanide로 분해된다. 중간 대사산물이자 에틸렌의 전구체인 ACC는 다른 저분자의 유기물질들과 함께 뿌리삼출물로 배출된다[Morgan 등, 1997].

식물호르몬을 생산하는 일부 PGPR 균주들은 ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) deaminase를 생산한다는 사실이 보고되어 있다. ACC deaminase는 에틸렌의 전구체인 ACC를 분해하는 효소이다[Burd 등, 2000; Garcia-Pineda 등, 1999; Burd 등, 1998; Campbell 등, 1996]. 에틸렌은 식물생장 호르몬으로서 과량 분비시(스트레스 에틸렌) 오히려 식물생장을 억제하는 역할을 하여 식물에게 스트레스를 주기도 하는데, 이때 근권미생물이 ACC deaminase를 분비할 수 있다면 이 효소를 이용하여 작물 내 스트레스 에틸렌의 양을 조절할 수 있다[Ma 등 2003; Jacobson 등 1994].

이때 뿌리 표면에 접촉하여 서식하는 근권세균 중 ACC를 분해할 수 있는 효소, 즉 ACC deaminase 활성을 가진 PGPR이 존재하면 뿌리 삼출물 속의 ACC를 α-ketobutyrate와 ammonia로 분해한다[Penrose 등, 2001; Penrose 등, 2001]. 이렇게 ACC deaminase 활성을 갖는 PGPR에 의해 근권에서의 ACC가 분해되면, 식물 뿌리의 내부와 외부에서 ACC 농도차가 발생하게 되는데, 농도의 평형을 유지하기 위해 식물은 더 많은 양의 ACC를 체외로 배출하게 된다. 따라서 식물 내부에서의 ACC 농도가 감소되고, 결과적으로 생성될 수 있는 스트레스 에틸렌의 농도가 낮아지므로 식물의 성장을 향상시킬 수 있는 효과를 얻을 수 있다[Glick 등, 1998].

따라서, 본 연구에서는 다기능 PGPR균주들에 의한 스트레스 에틸렌을 감소시키는데 매우 중요한 ACC deaminase 생산능을 조사하여 고추의 건조 및 고염스트레스 저항능 유도를 검증하고자 한다. 또한, 다기능 PGPR 균주처리에 의해서 식물스트레스 저항능이 유도되었을 때 고추의 뿌리 조직에서 발현되는 단백질과 RNA의 전사수준에서 발현차이를 조사하여 컨소시엄으로 개발된 본 PGPR 균주들이 식물저항성 유도에 기여하는지 여부를 확인해 보고자 하였다.



Grick *et al.*, 1997.

Fig. 3.1. Plant stress reduction by PGPR producing ACC deaminase.

## 2. 연구개발수행 재료 및 방법

### 가. 환경스트레스 저항능 유도물질 ACC deaminase 생산능 조사

건조, 염 등 식물의 환경 스트레스 저항성 기작의 주요지표인 ACC deaminase 생산능을 조사하기 위해 먼저 LB broth에서 PGPR 균주들을 28°C, 24시간 배양하고 원심분리하여 균체를 회수하였다. 회수한 균체는 0.2 M phosphate buffer (pH 7.0)로 두 차례 깨끗하게 씻고 질소원으로 3 mM ACC만을 첨가한 DF salt minimal 배지[Honma 등, 1978]에 재접종하여 28°C에서 2일간 배양하였다. 대조구로는 질소원으로 아무것도 첨가하지 않은 배지와 질소원으로 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 첨가한 배지를 사용하여 600 nm에서 흡광도를 측정함으로써 ACC를 질소원으로 이용하는지 여부를 판단하였다[Honma 등, 1978]. 또, ACC deaminase 정량을 위하여 ACC가 분해되었을 때 생산된  $\alpha$ -ketobutyrate의 양을 정량하였다[Penrose 등, 2001; Penrose 등, 2001]. 정량을 위하여 선발된 ACC deaminase 생산성 다기능 PGPR 균주를 균체만 회수하고 기질인 5 mM ACC가 첨가된 DF salt medium에서 배양하였다. 배양 후 원심분리하여 상등액을 회수하여 Grick 등의 방법[Honma 등, 1978]에 따라  $\alpha$ -ketobutyrate의 양을 측정하고, 표준검량곡선을 작성하여 PGPR 균주의 ACC deaminase 생산능을 정량하였다.

### 나. Abscisic acid (ABA), cytokinin의 추출 및 정제

선발된 다기능 PGPR 균주 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11을 각각 LB broth에서 30°C, 3일간 배양하였다. 배양상등액은 Fig. 3.2와 같이 EtOAc를 이용하여 ABA, cytokinin의 대표적인 zeatin을 용매로 추출하였다. 각 단계에서 추출된 시료들은 감압농축기로 농축하였고, 남은 성장촉진호르몬 시료들은 1  $\mu$ l/ml 농도로 50% MeOH에 녹여 다음 단계의 시료로 사용하였다. 성장촉진호르몬의 정제는 Sephadex LH-20 gel filtration column chromatography와 HPLC로 하였다. 조정제된 시료들은 50% MeOH로 평형화된 Sephadex LH-20 column에 loading하였고 각각의 fraction은 0.5 ml/min의 flow rate로 5 ml씩 받았고, Salkowski test와 280 nm에서 흡광도를 측정하여 active fraction을 모으고, 동일 조건의 Sephadex LH-20 column에 다시 loading하여 active fraction을 취하였다. Sephadex LH-20 column chromatography에서 얻은 active fraction은 HPLC를 이용하여 시판 시약용 식물호르몬 표준물질들과 비교하였다. 표준물질인 ABA, zeatin은 Sigma-Aldrich사에서 구입하여 사용하였다. HPLC는 reverse-phase HPLC로 C18 column을 사용하였으며, flow rate는 1 ml/min 이고, 용매는 20% MeOH과 100% MeOH의 농도 구배로 용출하였다. 또, 농도 구배시 용매의 용출은 0-5 분간 20% MeOH, 6-36 분간 20-100% MeOH, 37-40 분간 100% MeOH로 하였다 [Karadeniz 등, 2006].

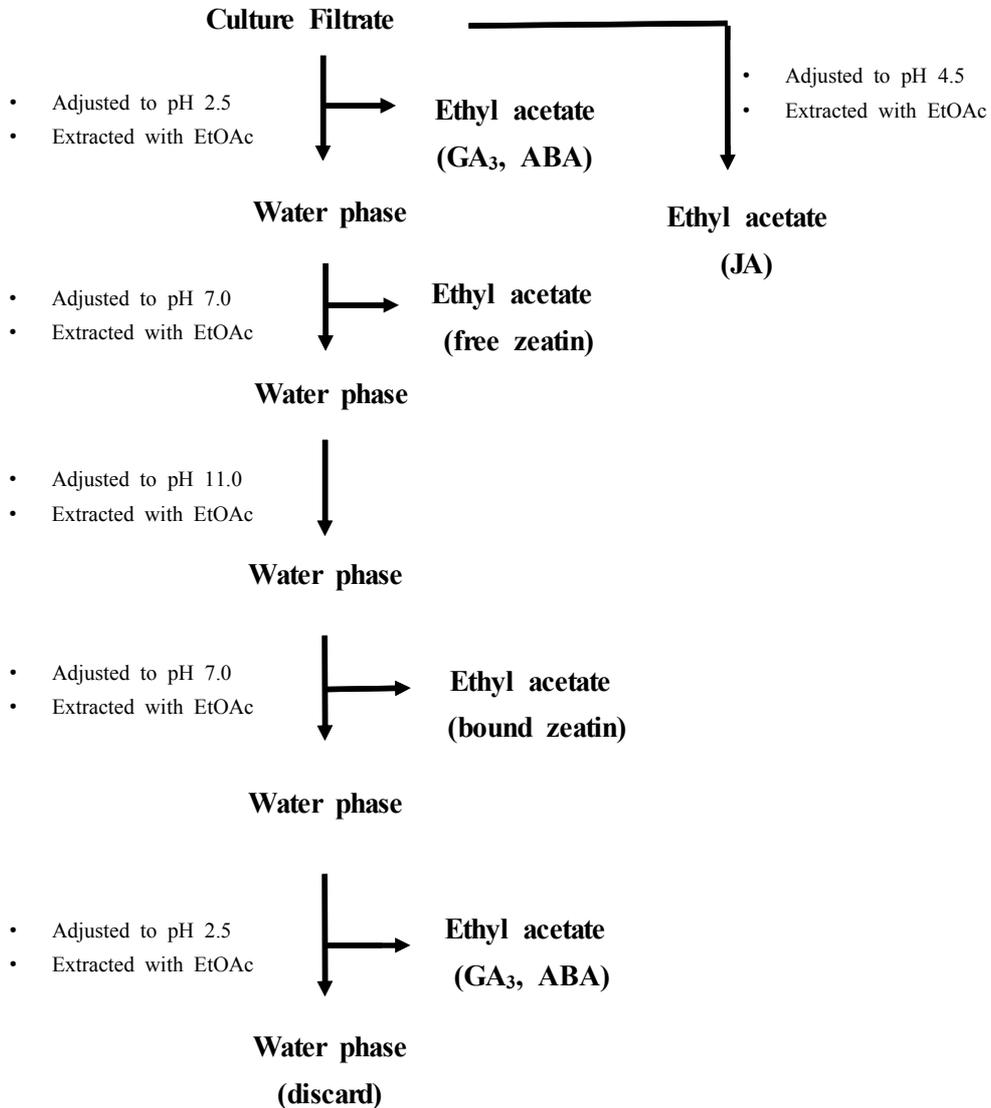


Fig. 3.2. Flow diagram for the purification of GA<sub>3</sub>, cytokinin and ABA.

#### 다. Jasmonic acid (JA)의 추출 및 정제

JA의 추출은 auxin, ABA, cytokinin 추출과 동일하게 배양한 다기능 PGPR 균주 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11의 배양 상등액을 시료로 사용하였다. 배양상등액을 7N HCl로 pH 4.5로 조정하고 다음 EtOAc를 동량으로 첨가하고 15분간 교반기에서 교반한 다음 JA가 함유된 EtOAc층을 분리하였다. 분리된 EtOAc층은 1/2 용량의 증류수로 3회 washing하고 감압 농축기로 농축하였다. 농축한 시료는 1  $\mu$ l/ml의 농도로 50% MeOH에 녹여 HPLC용 시료로 사용하였다. HPLC 분석은 reverse-phase HPLC로 C18 column을 사용하였으며, 0.5 ml/min flow rate로 용출하였다. 또, 용매의 종류와 용출조건은 ABA, cytokinin의 조건과 동일하게 하여 실시하였다.

라. Gibberellic acid (GA)의 추출 및 확인

다기능 PGPR균주들의 지베렐린 생산성 분석은 Holdbrook 등[Gutierrez-Manero 등, 2001; Cunningham 등, 1996; Costacurta 등, 1995]이 개발한 spectrophotometric method를 사용하였으며, 이 방법은 산성 조건에서 지베렐린(gibberellic acid)을 지베렐리닉 산(gibberellic acid)으로 전환시켜 254 nm에서 흡광도를 측정하는 방법이다. 지베렐린의 분석방법은 Fig. 3.3에서 나타난 순서대로 진행하였으며, 정량은 표준품인 GA3로 표준곡선을 작성하여 실시하였다.

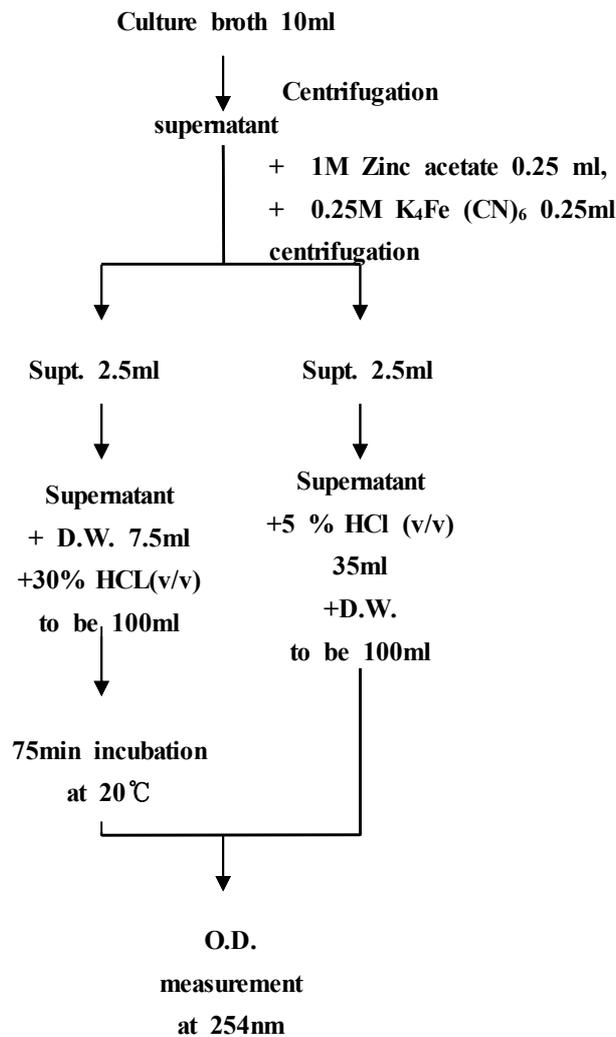


Fig. 3.3. Spectrophotometric method for the determination of geberellic acid.

#### 마. 인산 가용화능 조사

*B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11의 경우 37°C에서 4시간, *P. fluorescens* 2112는 30°C에서 6시간동안 LB medium에 전배양한 후 난용성 인산염인 tri-calcium phosphate를 0.5% 첨가한 sucrose minimal 배지(SM medium; sucrose 10 g, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0.27 g, KCl 0.2 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1 g, MnSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O 1 mg, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 mg, yeast extract 0.1g, per liter) 100 ml에 각각 1 ml 씩 접종하여 후 168시간까지 200 rpm으로 진탕배양하면서 배양 상등액 내의 유리 인산 농도를 측정하였다. 유리 인산의 양을 측정하기 위하여 각각의 배양액을 각 시간별 1 ml 씩 tube에 옮겨 담은 후 5,500 rpm, 5분간 상온에서 원심분리 후 0.2 ml 상등액을 회수하였다. 회수한 상등액에 Molybdate reagent (6N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 2.5% ammonium molybdate: 10% ascorbic acid: H<sub>2</sub>O= 1: 1: 1: 2) 0.8 ml를 첨가한 후 50°C에서 20분간 반응시키고 UV-Vis spectrophotometer를 이용하여 820 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 바. *In vivo* pot 실험을 통한 건조 및 고염 스트레스 저항능 유도

모든 실험은 고추와 토마토의 생육촉진능 실험과 동일하게 실시하였고, 실험실 수준에서 스트레스 환경을 인위적으로 조성하였다. 고추와 토마토 종자를 70% 에탄올과 종자소독액으로 소독하였다. 고추와 토마토 종자는 pot당 1개씩 심은 후, 5엽이 나올 때 까지 28°C, 50% 습도를 유지한 항온항습실에서 12시간 일장으로 5,000 lux의 빛을 쬐여 키웠다. 여기에 *B. subtilis* AH18, *B. licheniformis* K11과 *P. fluorescens* 2112를  $1 \times 10^8$  cells까지 배양한 배양액을 원심 분리하여 균체만을 회수하여 증류수 10 ml에 희석하여 pot당  $1 \times 10^8$  cells씩을 관주 접종하였으며, negative control은 동량의 증류수 10 ml만을 처리하였다. 식물에 건조 스트레스와 고염 스트레스를 인위적으로 적용시키기 위하여 건조스트레스 처리구에는 증류수를 포함하여 아무 것도 처리하지 않았고, 고염 스트레스 처리구는 50 mM NaCl을 50 ml 씩 5일마다 처리하였다. 한편, 대조구로 100 ml의 증류수만 처리한 물을 처리한 고추와 토마토를 positive control로 사용하였다. Positive control은 5일마다 50 ml의 증류수를 처리하였으며, 다른 모든 처리구는 건조상태 또는 고염상태로 잎과 줄기가 시들거나 말라가는 스트레스 반응을 보이는 현상이 나타날 때까지 관찰하였다. 모든 처리구는 20 포트로 하고 3반복하였다.

사. 고추의 건조 스트레스 저항능 단백질 및 전사체 발현양상 조사

(1) 건조 스트레스 저항능 단백질의 발현양상 조사

건조 스트레스 상태에서 고추와 토마토의 뿌리에서 발현되는 단백질의 발현양상을 조사하기 위하여 건조 스트레스 미처리구, 건조 스트레스 처리구, 건조 스트레스 + PGPR 균주 처리구의 고추와 토마토를 포트에서 분리하여 신속히 흙을 제거하고 액체질소로 미리 냉각 시켜둔 막자사발과 막자로 마쇄하였다. 이때 조직이 녹지 않도록 액체질소를 연속적으로 충분히 첨가하였다. 마쇄된 조직은  $-72^{\circ}\text{C}$ 에서 냉각시킨 tube에 담아 보관하였고, two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-D PAGE) 분석과 단백질 spot 의 동정은 제노마인 (Genomine(주), 포항)에 의뢰하여 실시하였다(Fig. 3.4).

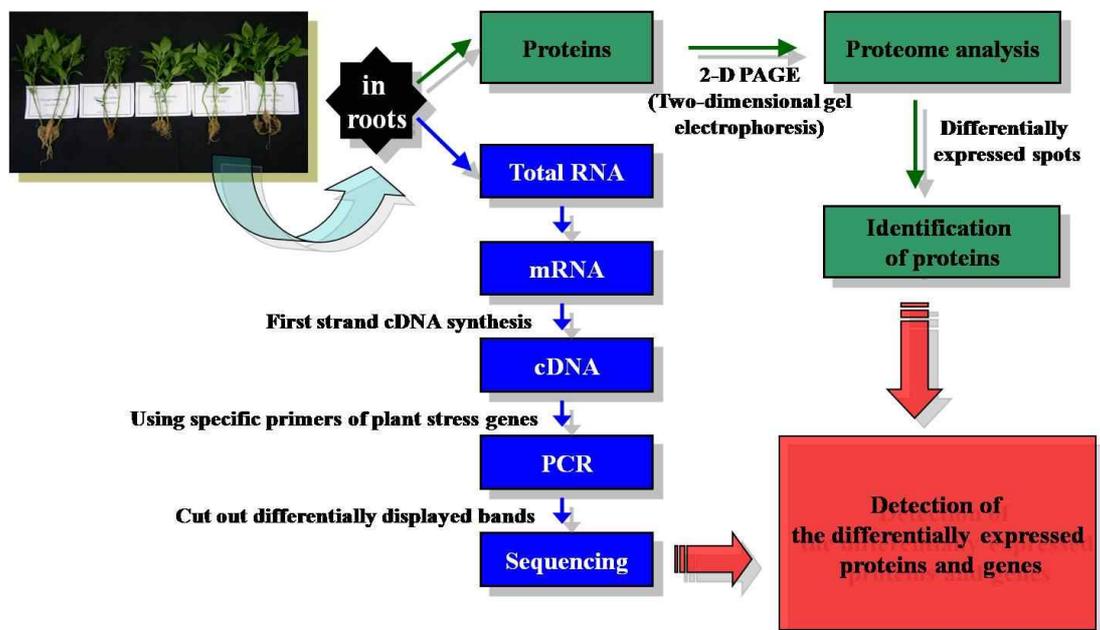


Fig. 3.4. Differentially expressed genes and proteins identified by PCR amplification and proteome analysis under the drought stress in red-pepper plant.

(2) 건조 스트레스 저항능 유전자의 전사체 발현 분석

(가) total RNA의 추출 및 정제

고추와 토마토의 뿌리 조직으로부터 total RNA 분리에는 TRIzol reagent (Invitrogen 사)를 사용하였다. 액체 질소를 이용하여 마쇄한 뿌리 조직 1 g에 5 ml의 TRIzol reagent를 첨가하여 1분간 vortex하고 상온에서 10분간 둔 후, 12,000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 15분간 원심 분리하였다. 상층부액을 새 tube로 옮겨 1 ml 당 chloroform을 0.2 ml을 첨가하고 15초 동안 vortex한 후, 다시 상온에서 5분간 반응시킨 후 12,000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 15분간 원심분리하였다. 다시 상층액을 새 tube로 옮겨 0.5 volume에 해당하는 isopropanol을 넣고 5초간 vortex한 후 상온에서 5분간

방치하여 RNA를 침전시켰다. 이를, 12,000 rpm, 4°C에서 10분간 원심분리하여 침전물을 회수한 후, 75% 에탄올 1 ml을 넣어 5초간 vortex하고, 12,000 rpm, 4°C에서 3분간 원심분리 하여 RNA 침전물을 세척하였다. 이렇게 얻어진 RNA 침전물은 에탄올을 완전히 말린 후 DEPC-ddH<sub>2</sub>O (0.1%, v/v) 20  $\mu$ l에 녹이고, 55°C에서 10분간 처리하여 RNA를 분리하였다. 추출된 total RNA는 전기영동을 통하여 RNA의 상태를 확인하고, Nanodrop (ND-1000, Thermo Scientific, Waltham, MA)을 이용하여 260 nm에서 RNA 양을  $\lambda$ 260 nm/ $\lambda$ 280 nm에서 RNA 순도를 측정하고 정량하였다.

#### (나) cDNA의 합성

건조 스트레스 상태의 고추 뿌리에서 분리된 total RNA는 Oligotex kit (Qiagen, Valencia, CA)를 사용하여 mRNA를 분리하였다. 분리된 mRNA는 RevertAid™ first strand cDNA synthesis kit (Fermentas Inc., Hanover, MD)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. cDNA를 합성하기 위하여 1  $\mu$ g의 mRNA에 OligoT primer 100 pmol을 첨가하고 65°C에서 10분간 변성시킨 후, RevertAid™ M-MuLV reverse transcriptase를 이용하여 first strand cDNA를 합성하였다.

#### (다) Primer 제작

고추의 건조 스트레스 저항성 유도에 관련된 유전자를 탐색하기 위하여 고추의 건조스트레스 관련 유전자들의 primer를 제작하였다. 우선, PGPR 균주 처리시 2-D PAGE 분석에서 발현 양상이 다르게 나타나는 8종류의 단백질을 기초로 National Center for Biotechnology Information (NCBI)에서 blast search를 통하여 유전자들을 확보하였으며, 여기에 고추의 건조 스트레스 저항성 유도에 관련된 유전자를 추가적으로 확보하였다. 확보된 유전자를 바탕으로 염기수가 20 mer정도가 되고, GC ratio 가 40-60% 정도 되는 forward 및 reverse primer를 제작하여 PCR에 사용하였다(Table 3.1).

Table 3.1. Primer sequences was designed based on drought stress genes in red-pepper.

Gene	Nucleotide Sequence	Protein Name	Accession No.
<i>CaPR-10*</i>	5'- ggttgtgcatcaggcatct -3' 5'- cttccttgggatgcatatcg -3'	pathogenesis-related protein 10 ( <i>Capsicum annuum</i> )	AF244121
<i>ACCO*</i>	5'- tgagtggccttcaactctc -3' 5'- gtcccgtctgtttgagcaat -3'	1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxydase ( <i>Capsicum annuum</i> )	AJ011109
<i>ADK*</i>	5'- catgggcaatccattactcg -3' 5'- atgaacattgacgccagcat -3'	adenosine kinase isoform 1T ( <i>Nicotiana tabacum</i> )	AY695050
<i>VA*</i>	5'- tgtcggaggtccgatgacta -3' 5'- cacgctgtccgtaagaaga -3'	vacuolar H <sup>+</sup> -ATPase A1 subunit isoform ( <i>Lycopersicon esculentum</i> )	AY177247
<i>Dhm*</i>	5'- accactggtgctaactgtgga -3' 5'- gectctcctgttcttcttg -3'	dehydrin-like protein ( <i>Capsicum annuum</i> )	AY225438
<i>Enod18*</i>	5'- tgagattgctgccacacaga -3' 5'- caatagtcactgggcatggg -3'	early nodulin ENOD18 ( <i>Vicia faba</i> )	AJ271815
<i>CABPR1</i>	5'- cgtaagatgtgggtcaatg -3' 5'- ccatacggacgttgcctct -3'	PR-1 protein ( <i>Capsicum annuum</i> )	AY560589
<i>PR-like</i>	5'- gagggtgttgcttgatgat -3' 5'- gggagtctttgcacttagc -3'	PR-protein-like gene ( <i>Capsicum annuum</i> )	AF525142
<i>sHSP</i>	5'- gcccaaaattcacctcaaga -3' 5'- tgcacctgaatgaatcaagc -3'	cytoplasmic small heat shock protein class I ( <i>Capsicum frutescens</i> )	AY284926

(라) Differential Display (DD) PCR 반응

합성한 cDNA를 template로 하여, 고추 건조스트레스 저항성 관련 유전자 primer로 PCR 반응을 수행하였다. PCR 반응액으로는 template 100 ng, 100 pmole primer (forward, reverse) 각 1  $\mu$ l, Taq DNA polymerase 20 unit, 10 $\times$  PCR reaction buffer, 5  $\mu$ l, 10 mM dNTP 1  $\mu$ l 를 사용하였으며, 반응조건은 94 $^{\circ}$ C 10분 1회, 94 $^{\circ}$ C 30초 - 50~60 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 30초 30회, 72 $^{\circ}$ C 5분 1회로 gradient PCR한 후 최적 annealing temperature를 찾고 다시 최적온도에서 PCR을 수행하였다. PCR 후 agarose gel 전기영동을 실시하여 증폭된 DNA를 확인하고, 이를 sequencing하여 얻은 염기서열은 GenBank에서 기존 보고된 건조 스트레스 유전자들과 상동성을 비교하였다.

### 3. 연구개발수행 결과

#### 가. 환경스트레스 저항능 유도물질 ACC deaminase 생산능 조사

본 실험에서는 환경 스트레스 반응의 지표물질인 에틸렌의 전구체 ACC (1-Amino cyclopropane-1-carboxylic acid)를 분해하는 ACC deaminase를 생산하는지 여부를 조사하였다. ACC 분해효소인 ACC deaminase를 생산하는 근권미생물은 식물 뿌리내의 에틸렌의 전구체인 ACC 농도를 감소시켜 결과적으로 스트레스 에틸렌의 합성 양을 줄이고 따라서 식물의 성장을 촉진시키는 작용을 한다[Glick 등, 1998]. ACC deaminase 생산성 조사 실험은 질소원으로 ACC만을 첨가한 배지에서 선발된 다기능 PGPR 균주들이 성장여부를 보고 판단하였다. 그 결과 선발된 다기능 PGPR 균주 모두 ACC만을 질소원으로 한 배지에서 생장이 가능했다. 하지만,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 질소원으로 한 배지에서의 생육에 비하여 현저하게 생장이 낮아 단지 ACC를 질소원으로 이용할 수 있다는 것만을 보여주었다. Fig. 3.5에서 볼 수 있듯이 ACC를 분해하여  $\alpha$ -ketobutyrate를 생산하는 ACC deaminase 생산능 정량에서 *B. licheniformis* K11 균주는 *B. subtilis* AH18과 *P. fluorescens* 2112에 비하여 높은 농도의 ACC deaminase 생산능 나타내었다.

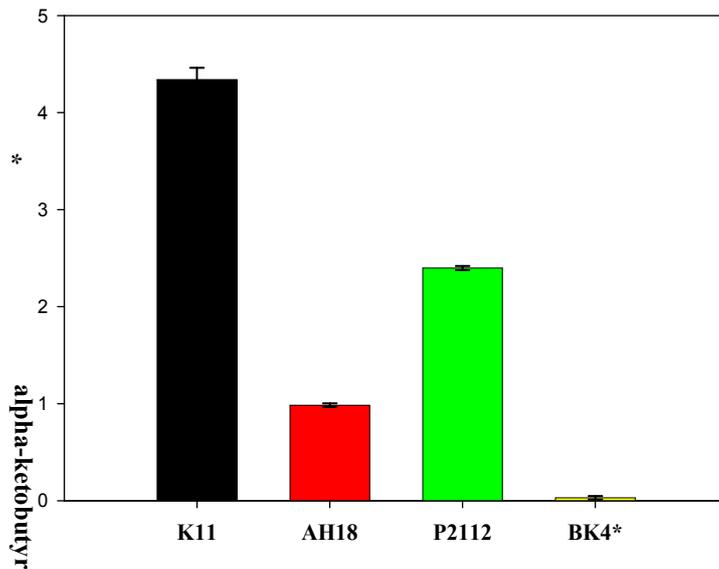


Fig. 3.5. ACC deaminase activity of the 3 PGPR strains.

Mearsurement of ACC deaminase activity.

The amount of  $\alpha$ -ketobutyrate ( $\mu\text{M}$   $\alpha$ -ketobutyrate/mg protein/hr) produced when the ACC deaminase cleaves ACC. The strain BK4 was negative control (no ACC deaminase activity).

## 나. ABA, zeatin의 추출 및 정제

다기능 PGPR 균주 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11의 식물생장조절호르몬을 정제하기 위하여 각 PGPR 균주들의 배양액들로부터 ABA, zeatin을 추출하였다. 추출된 시료들은 Sephadex LH-20 column chromatography와 HPLC를 통해 정제하였다. 각 PGPR 균주들의 배양 상등액을 EtOAc를 사용하여 ABA, zeatin 분획으로 분리하고 감압농축기로 농축하여 Sephadex LH-20 column chromatography를 통과시켰다. 분리된 분획들 중에서 Salkowski test와 UV spectrophotometer (ABA: 280 nm, zeatin: 254 nm)를 통해 활성분획들을 얻고, 이를 다시 감압농축하여 HPLC 시료로 사용하였다. HPLC 분석결과 다기능 PGPR 균주 *B. licheniformis* K11은 식물호르몬인 ABA를 생산하는 것을 확인하였다. Retention time은 19 min 이었다(Fig. 3.6). 한편, Fig. 3.7에서 볼 수 있듯이 HPLC 분석 결과 *B. subtilis* AH18은 cytokinin의 한 종류인 zeatin도 retention time 2.9 min에서 검출되었다.

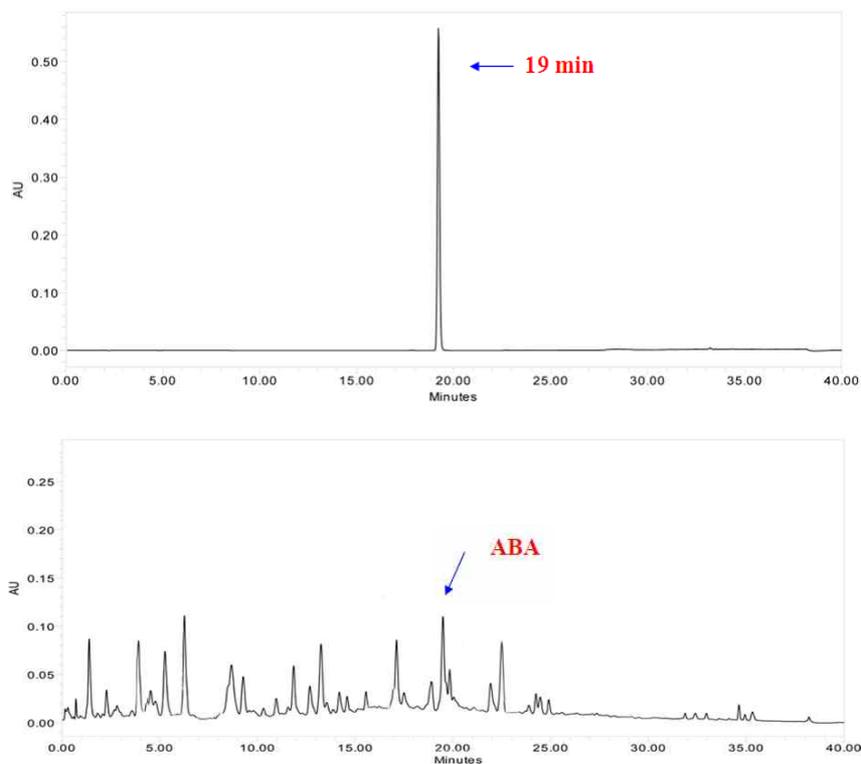


Fig. 3.6. HPLC chromatogram of abscisic acid partially purified from *B. licheniformis* K11.

UV detection of ABA were at 280 nm.

Standard : 100  $\mu\text{l}$ /ml (dissolved in methanol)

Column : Sunfire<sup>TM</sup> C18 5  $\mu\text{m}$  (4.6 mm $\times$ 150 mm)

Solvent : 1% acetic acid in 20% methanol, 100% methanol

Flow rate : 1 ml/min

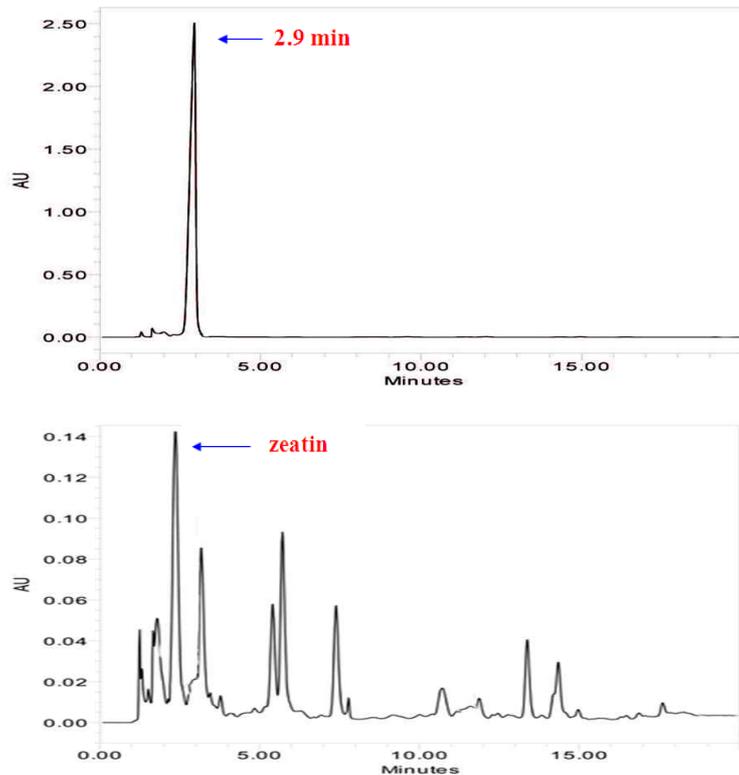


Fig. 3.7. HPLC chromatogram of cytokinin partially purified from *B. subtilis* AH18.

UV detection of zeatin was at 254 nm.

Standard : 100  $\mu\text{l/ml}$  (dissolved in methanol)

Column : Sunfire<sup>TM</sup> C18 5  $\mu\text{m}$  (4.6 mm $\times$ 150 mm)

Solvent : 1% acetic acid in 20% methanol, 100% methanol

Flow rate : 1 ml/min

#### 다. JA의 추출 및 정제

식물생장조절 호르몬인 JA는 일반적으로 고등식물인 식물체에서 생산되는 식물호르몬으로 병원균의 침입이나 기계적인 상해, 다양한 환경스트레스에 반응하여 식물에 내성을 갖도록 유도하는 유도체로 알려져 있다[배, 2008; 안, 2004]. 대부분의 JA 또는 Me-JA는 식물을 제외하고 균류에 의해서 생산되는 것이 대부분으로, PGPR인 세균에서 생산되는 것은 드물다 [Costacurta 등, 1995]. HPLC 분석결과 PGPR인 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11 균주 모두 retention time 3 min에서 뚜렷한 JA의 단일 peak를 관찰할 수 있었다(Fig. 3.8). 이것은 본 연구에서 사용한 PGPR 균주들이 JA를 생산하는 희귀한 세균이라는 점에서 의미가 있을 뿐만 아니라, 선발된 PGPR 균주인 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11을 토양내 적용시 다양하게 노출되어 있는 식물의 환경적, 기계적, 병원균에 의한 스트레스에 내성을 갖는데 크게 기여할 것으로 보인다.

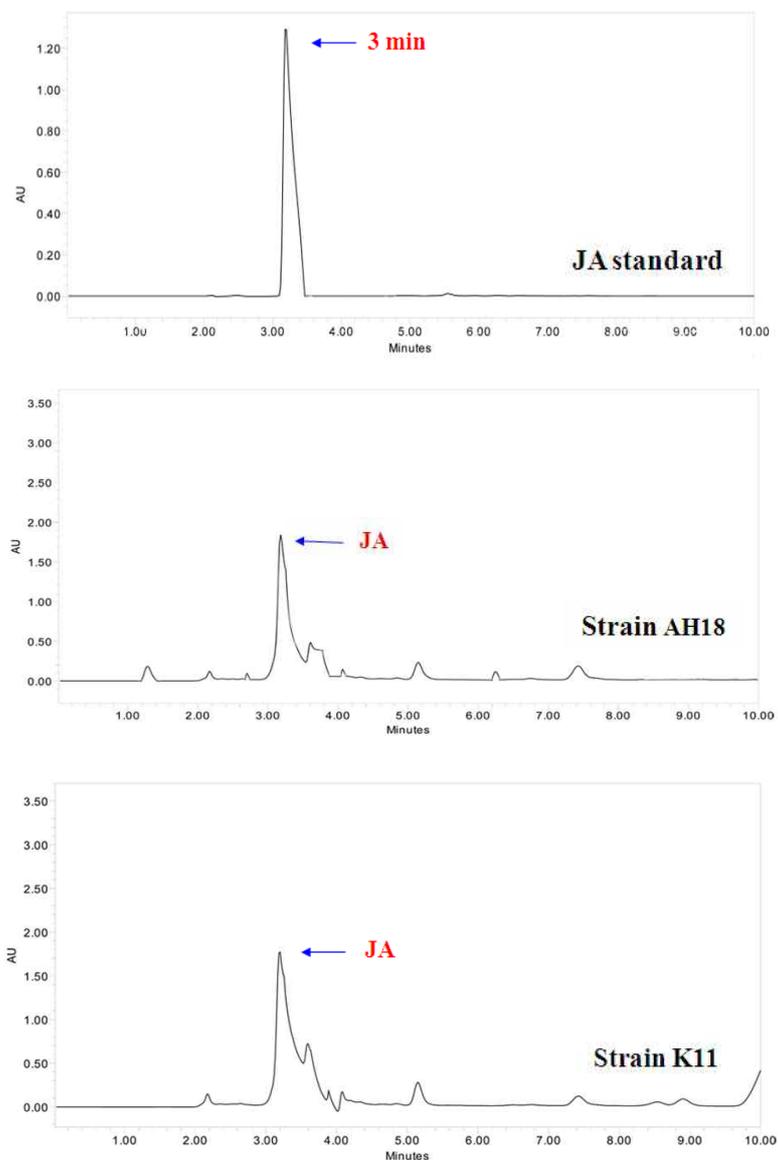


Fig. 3.8. HPLC chromatogram of jasmonic acid partially purified from *B. subtilis* AH18 and *B. licheniformis* K11.

UV detection of JA was at 210 nm.

Standard : 100  $\mu\text{l}/\text{ml}$  (dissolved in methanol)

Column : Sunfire<sup>TM</sup> C18 5  $\mu\text{m}$  (4.6 mm $\times$ 150 mm)

Solvent : 0.1% trifluoroacetic acid (dissolved in dH<sub>2</sub>O): acetonitrile = 6: 4

Flow rate : 1 ml/min

라. GA의 추출 및 생산성 확인

식물호르몬인 지베렐린은 줄기, 세포 신장, 종자 발아촉진, 휴면타파에 관여하는 호르몬이다 [Cunningham 등, 1996; Costacurta 등, 1995]. 지베렐린의 작용은 신장촉진작용, 종자발아촉진 작용, 개화촉진작용, 착과의 증가작용 등이 있다[Gutierrez-Manero 등, 2001; Cunningham 등, 1996; Costacurta 등, 1995]. Fig. 3.9에서 볼 수 있듯이 다기능 PGPR 균주인 *B. subtilis* AH18, *B. licheniformis* K11, *P. fluorescens* 2112는 모두 GA를 생산할 수 있다는 것을 Holbrook method를 통하여 확인할 수 있었고, 시판되는 시약 표품인 GA<sub>3</sub>를 이용하여 정량하였을 때, *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11은 각각 0.6 및 0.57 mg/ml를 생산할 수 있었으며, *P. fluorescens* 2112는 3.44 mg/ml의 GA을 생산할 수 있었다. 식물호르몬 GA는 종자의 발아시에 가장 많이 생성되는 식물호르몬으로 본 연구에 사용된 PGPR 균주들을 활용하여 종자의 발아 촉진효과를 거둘 수 있을 것이라 생각한다.

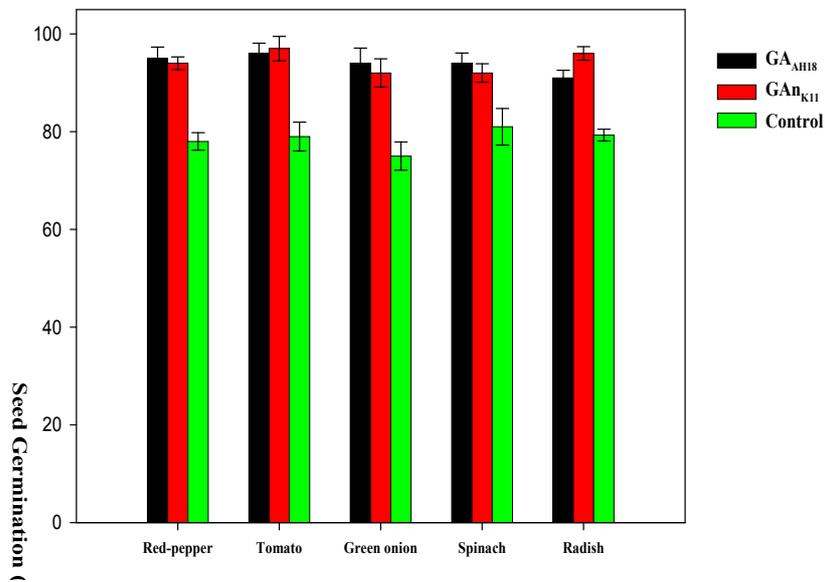


Fig. 3.9. GA production by *B. subtilis* AH18, *B. licheniformis* K11 and *P. fluorescens* 2112. GA production was estimated by measuring absorbance at 254nm using Holbrook method.

마. 인산 가용화능 조사

다기능 PGPR 균주인 *B. subtilis* AH18, *B. licheniformis* K11와 *P. fluorescens* 2112의 인산 가용화능을 molybdate reagent를 이용하여 조사한 결과, 세 균주 모두 난용성 인산염인 tri-calcium phosphate를 분해할 수 있었다. Fig. 3.10에서 보이는 것처럼 세 균주 중 *P. fluorescens* 2112의 인산 가용화능이 가장 좋았으며 *B. subtilis* AH18 및 *B. licheniformis* K11은 15 ppm 정도의 인산가용화능을 나타내었다. 인산은 가용성 무기 인산염 형태로 토양에 사용되는 식물의 필수 양분이지만, 많은 부분이 불용화되어 식물이 직접적으로 흡수할 수 없게 된다[이 등, 2006]. 이러한 인산의 특성은 화학비료 가격을 높일 뿐만 아니라 토양 비옥도면에서도 역효과를 낼 수도 있다. 따라서 다기능 PGPR 균주로 선발된 *B. subtilis* AH18, *B. licheniformis* K11와 *P. fluorescens* 2112를 토양에 투입하였을 때 난용성 인산염의 분해로 식물의 생장에 직접적인 영양원인 인(P)의 공급을 원활히 하여 성장촉진효과를 거둘 수 있을 것으로 생각된다.

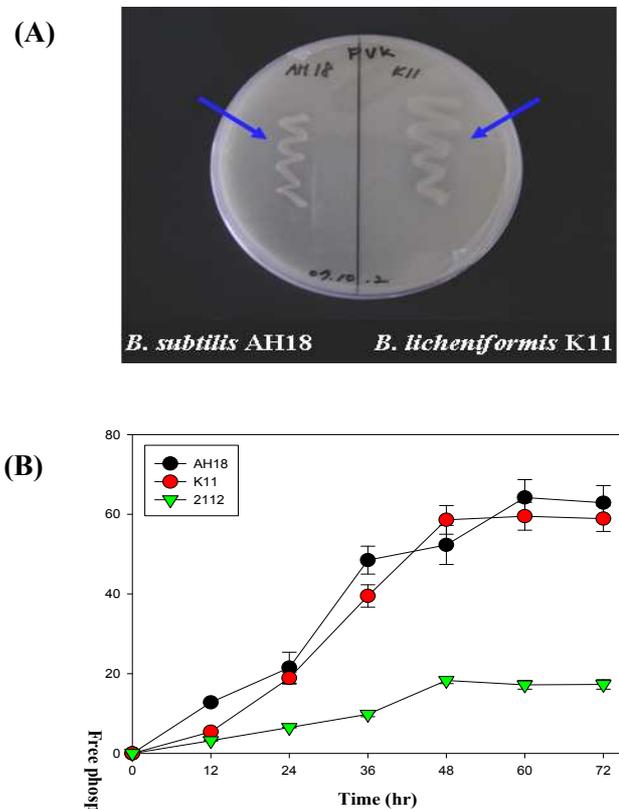


Fig. 3.10. Solubilization of insoluble phosphate by *B. subtilis* AH18, *B. licheniformis* K11 and *P. fluorescens* 2112.

A, qualitative test of insoluble phosphate solubilization by Pikovskaya's medium; B, qualitative test of insoluble phosphate solubilization by enzymatic test using molybdate reagent

바. *In vivo* pot 실험을 통한 건조 및 고염 스트레스 저항능 유도 검증

고추의 종자 발아, 줄기 및 뿌리의 성장촉진효과 실험 통한 고추역병방제능 검증실험에서 탁월한 효과를 발휘한 다기능 PGPR균주들을 건조와 고염의 환경스트레스에 노출되어있는 토양에서 고추의 건조 스트레스 저항성을 유도하는지를 알아보았다. 수분을 공급하지 않은 인위적 건조 스트레스와 50 ml NaCl을 3일 간격으로 처리한 고염스트레스 환경을 조성한 실내포트 실험에서 PGPR 균주들을 처리한 후 고추와 토마토의 생육상태를 조사하였다. 건조 스트레스 하에서 15일이 경과하였을 때 PGPR 균체 무처리 고추와 토마토의 경우 50%가 노랗게 말라 죽었으며, PGPR처리 고추와 토마토의 경우에는 모두 생육이 지속되고 있었다. 또한, 30일이 경과한 시점에서는 PGPR 무처리 고추와 토마토의 약 90%가 말라죽었고, 다기능 PGPR 균주를 처리한 고추와 토마토의 경우는 생존율이 100%였으며, 생육상태도 건조스트레스가 없는 환경에서 실험한 것과 비교하여볼 때 약 30% 정도 감소하는 경향을 보였지만, 비교적 양호한 편이었다(Fig. 3.11 - 15).

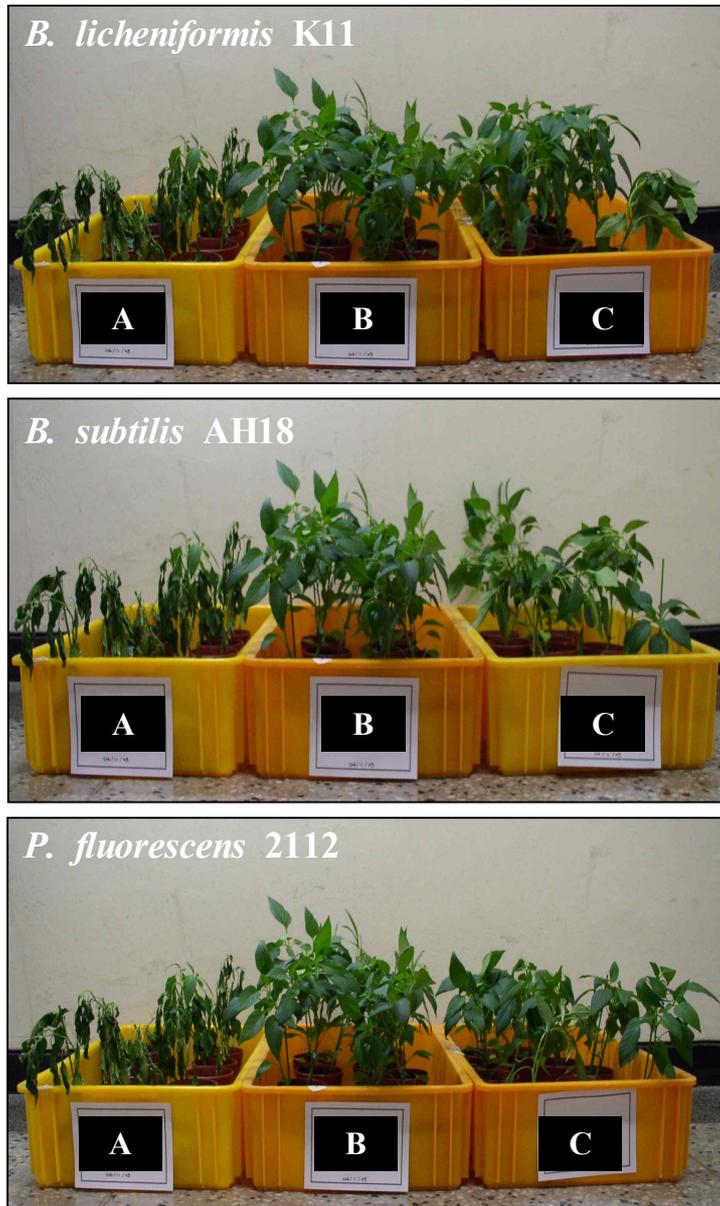


Fig. 3.11. Induction of drought stress resistance of red-pepper by the treatment of PGPRs. A, negative control (drought condition); B, positive control (watering condition); C, drought condition with the treatment of PGPRs ( $10^8$  cells/pot). The positive control was watered every 5 days with 50 ml of sterile water. The pictures were taken at the age of 30 days.



Fig. 3.12. Induction of drought stress resistance confirmed by stem and root development of red-pepper when treated with PGPRs.

Negative control, drought condition for 30 days; Positive control was watered every 5 days with 50 ml of sterile water; B AH18, *B. subtilis* AH18 ( $10^8$  cells/pot); P 2112, *P. fluorescens* 2112 ( $10^8$  cells/pot); B K11, *B. licheniformis* K11 ( $10^8$  cells/pot).

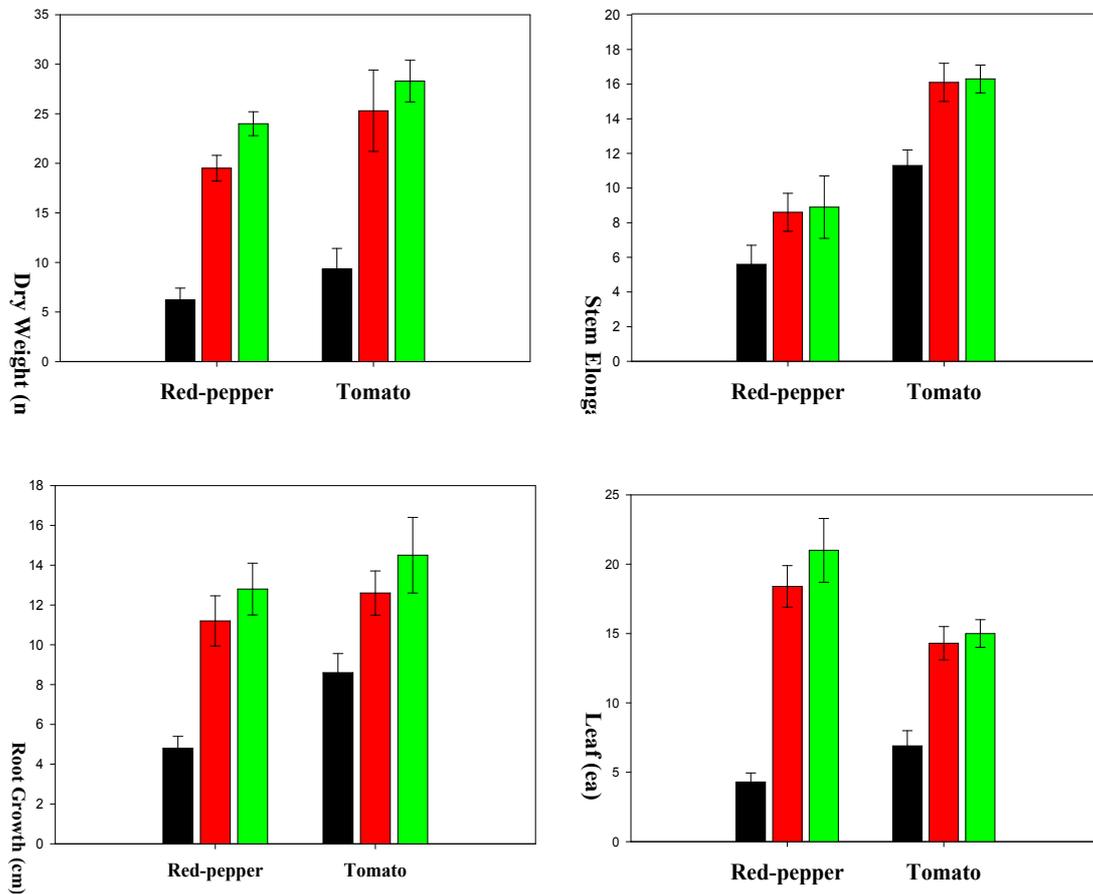


Fig. 3.13. Induction of drought stress resistance of red-pepper by the treatment of *B. licheniformis* K11.

■ : Drought\*, ■ : Drought + strain K11, ■ : Only water

The positive control were watered every 5 days with 50 ml of sterile water. Values are expressed as the means of three replicates, each containing 20 plants. Standard errors were determined at  $P \leq 0.05$ .

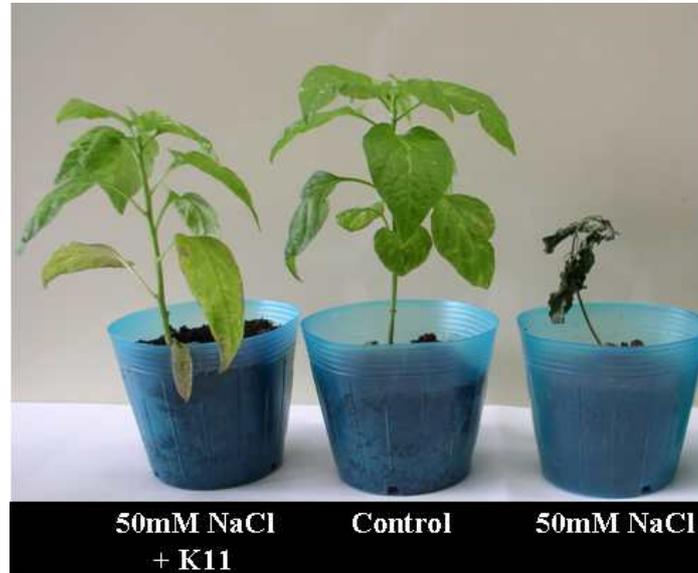


Fig. 3.14. Induction of salt stress resistance of red-pepper by the treatment of *B. licheniformis* K11.

Salt was treated with 50 ml of 50 mM NaCl every 5 days, and *B. licheniformis* K11 was treated with  $10^8$  cells/pot. The control was watered every 5 days with 50 ml of sterile water. The pictures were taken at the age of 25 days

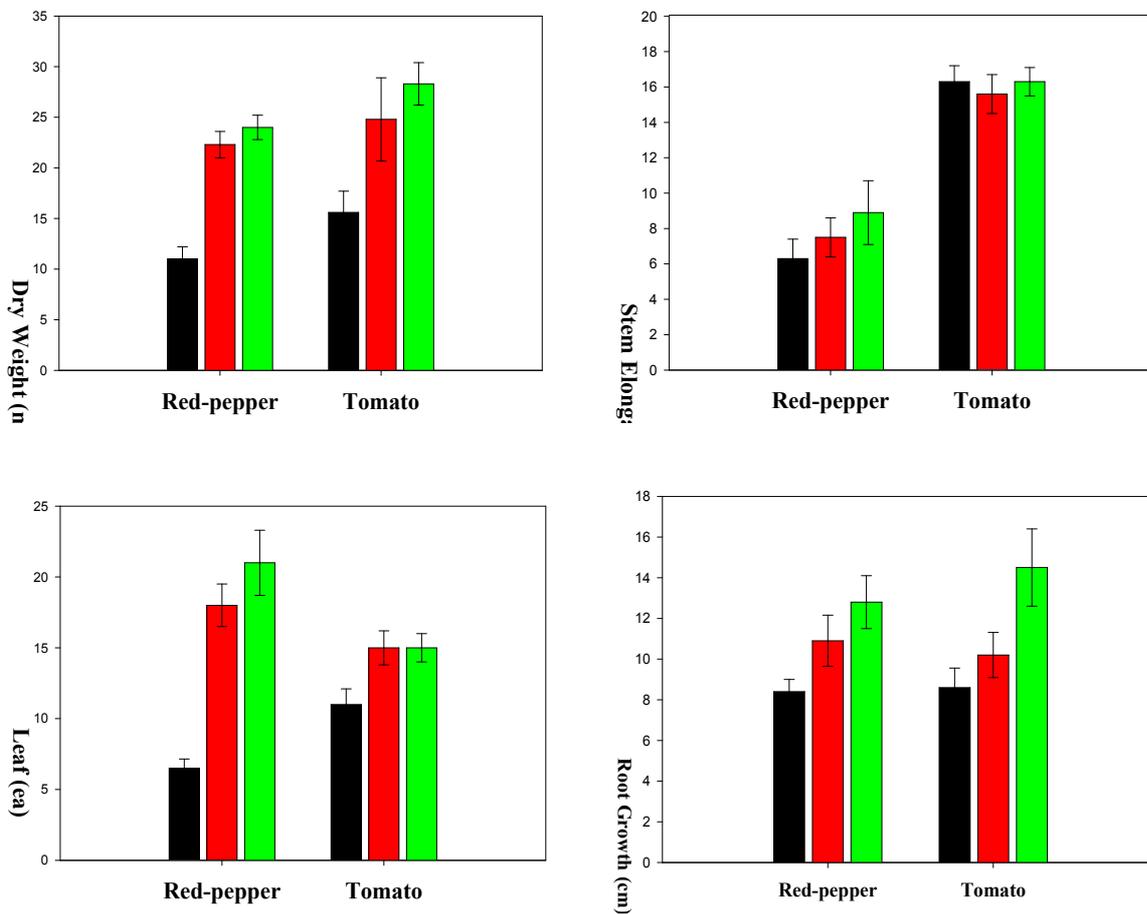


Fig. 3.15. Induction of salt stress resistance of red-pepper by the treatment of *B. licheniformis* K11.

■ : Salt\* , ■ : salt+ strain K11, ■ : Only water

The positive control was watered every 5 days with 50 ml of sterile water. Values are expressed as the means of three replicates, each containing 20 plants. Standard errors were determined at  $P \leq 0.05$ .

## 사. 고추의 건조 스트레스 저항능 단백질 및 전사 주순에서의 발현양상 조사

### (1) 건조 스트레스 저항능 단백질의 발현양상 조사

다기능 PGPR 균주들에 의하여 고추의 건조스트레스 저항성이 유도되는 것을 알 수 있었고, PGPR 균주 중 *B. licheniformis* K11의 건조스트레스 저항성 유도능이 가장 뛰어나다는 것을 알 수 있었다. 그리하여 30일간의 건조조건에서 *B. licheniformis* K11을 처리한 고추와 토마토의 뿌리에서 단백질 발현을 알아보았다. ACC deaminase 생산균주인 *B. licheniformis* K11을 처리한 고추와 토마토 뿌리에서는 물만 처리하거나, 아무것도 처리하지 않은 고추와 토마토 뿌리와 비교하였을 때 고추 뿌리에서는 222개의 단백질 spots이, 토마토 뿌리에서는 75개 단백질 spots이 현저한 발현의 차이를 보였다(Fig. 3.16, Table 3.2). 이렇게 선정된 222개의 spot 중 그 발현의 차이가 확연한 spot을 분리하여 단백질 동정을 실시하였다. 그 결과 동정된 spot 중 6종류, 8개의 단백질(Table 3.2.)은 식물의 스트레스 반응과 병원균의 침입을 받았을 때 발현되는 단백질로 확인되었다. 이들은 pathogenesis-related protein 10 (MW 12.94, 18.96 kDa), 식물생장촉진 호르몬인 cytokinin의 key enzyme인 adenosine kinase (MW 22.47, 42.99 kDa), 뿌리의 흡수기능과 물질수송 능력과 관련된 vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase, 건조 스트레스에 의해 발현되는 dehydrin-like protein, universal stress protein인 early nodulin ENOD18, ACC의 합성효소인 S-adenosylmethionine synthetase 등 이다[안, 2004; Bageshwar 등, 2005; 박 등, 2004; Borovskii 등, 2002; Barbara 등, 2000; Hohnjec 등, 2000; Glick 등, 1998]. 이러한 차이는 ACC deaminase와 auxin을 생산하는 다기능 PGPR 균주 *B. licheniformis* K11에 의한 고추와 토마토의 건조 스트레스 완화에 따른 단백질의 발현 차이라고 생각된다.

따라서 옥신 및 ACC deaminase를 생산하는 *B. licheniformis* K11은 식물이 생육 중에 일반적으로 겪을 수 있는 건조 스트레스나 화학농약 사용 등으로 인한 염축적지에서 겪을 수 있는 고염 스트레스를 충분히 완화시켜 줄 수 있을 뿐만 아니라 PGPR을 이용한 환경 스트레스 완화 연구에 큰 도움이 될 것이라 생각한다.



Table 3.2. Differentially expressed level of major proteins by the treatment of *B. licheniformis* K11 under drought condition.

Spot No.	pI	kDa	Homologus protein	Accession No.
12	4.20	12.94	<b>pathogenesis-related protein 10*</b>	<b>AJ879115.1</b>
406	4.32	42.99	<b>adenosine kinase isoform 1T*</b>	<b>AY695050.1</b>
508	4.25	46.63	<b>vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase A1 subunit* isoform</b>	<b>AY177247.1</b>
510	4.26	45.95	<b>dehydrin-like protein*</b>	<b>AY225438.1</b>
2604	4.67	54.76	Tubulin alpha-1 chain	P1460
3105	4.89	22.47	adenosine kinase isoform 1T*	AY695050.1
4101	5.06	18.96	<b>pathogenesis-related protein 10*</b>	<b>AJ879115.1</b>
4610	5.21	51.06	<b>S-adenosylmethionine synthetase*</b>	<b>P93254</b>
5106	5.42	21.64	vicilin-like storage protein	X63191.1
5112	5.40	17.12	alpha-tubulin	AJ279695.1
5203	5.29	32.99	Actin-51	Q96483
5410	5.49	42.34	perakine reductase	AY766462.1
5506	5.35	50.12	eukaryotic initiation factor 4A	D12627.1
6206	5.62	32.96	phosphomannomutase	DQ442995.1
6305	5.99	38.33	cyprosin	X81984.1
6407	5.88	40.02	Cysteine synthase	O81154
6611	6.12	55.80	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	Z18924.1
7011	7.01	9.38	putative prepo-beta-,3-glucanase precursor	AJ309385.1
7106	6.85	21.62	cobalamine-independent methionine synthase	Z49150.1
7108	7.07	23.00	Formate dehydrogenase (FDH)	Q07511
<b>7109</b>	<b>7.08</b>	<b>14.98</b>	<b>early nodulin ENOD18*</b>	<b>AJ271815.1</b>
7110	7.11	14.29	hypothetical protein	AM460452.2
7307	6.78	37.99	annexin	X93308.1
8202	7.21	37.72	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	AJ246011.1
5505	5.29	50.28	phosphoglycerate mutase	AF047842.1

(2) 건조 스트레스 저항능 유전자의 전사수준 발현 분석

건조 스트레스 저항성 유도 유전자들의 염기서열을 바탕으로 제작한 특이 primer 들을 사용하여 변형된 DD-PCR을 실시함으로써 물 처리구, 건조 처리구, PGPR 처리구에서 CaPR-10 (pathogenesis-related protein 10), ACCO (ACC oxidase), VA (vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase), Cadhn (Capsicum dehydrin-like protein ), ADK (adenosine kinase isoform 1T) 유전자들의 전사수준에서의 발현의 차이를 확인할 수 있었다(Fig. 3.17).

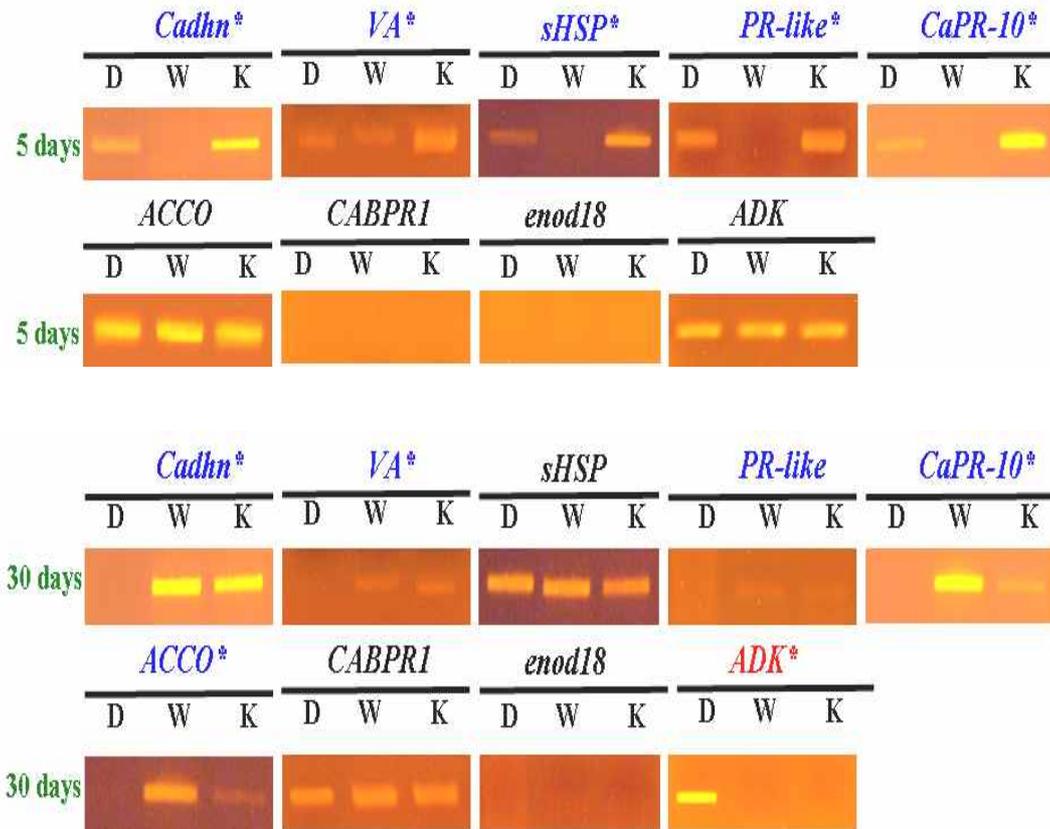


Fig. 3.17. Comparative analysis of amplified cDNA bands from red-pepper roots under the drought condition.

N, negative control (only drought condition, for 5 or 30 days); P, positive control (watering condition with watering); K, *B. licheniformis* K11 treated (drought condition + 108 cell/pot).

Dehydrin은 식물의 종자 건조과정에서 수반되는 건조 스트레스에 대한 내성을 부여하기 위하여 배 발생과정 후기에 발현되는 LEA (late embryogenesis abundant protein) 중 그룹 2 (D-11 family)에 속하는 단백질로, 종자 성숙과정의 수분결핍 상태뿐만 아니라 식물이 건조, 저온, ABA와 중금속 그리고 상처에 직면할 때 축적되는 수용성 단백질이다[안, 2004; 정 등, 2003; Borovskii 등, 2002]. Fig. 3.17에서 건조처리 후 5일에서 건조만 처리한 고추보다 PGPR 균주를 처리한 고추에서 Cadhn의 발현이 증가함을 알 수 있다. 이것은 PGPR 균주인 *B. licheniformis* K11에 의하여 Cadhn의 발현이 급속하게 증가하였고, 따라서, 고추가 건조 스트레스 내성을 가지게 됨을 보여준다. 또한, 물 처리구에서는 건조 스트레스에 발현되는 Cadhn의 발현은 관찰되지 않았다.

식물 원형질막 H<sup>+</sup>-ATPase는 electrochemical gradient를 형성하여 이차적인 이온 및 양분 흡수 기능을 조절하는 단백질로, 식물체 생장에 필수적인 뿌리의 흡수기능 및 물질수송 능력과 연관되어 있다[Bageshwar 등, 2005]. 식물이 저온, 고염, 산 등의 환경 스트레스조건에서는 세포내 원형질막의 H<sup>+</sup>-ATPase가 증가하게 되고, 증가한 H<sup>+</sup>-ATPase는 뿌리의 뿌리 강화와 생장 촉진 효과에 강하게 영향을 미쳐 환경스트레스에 대한 저항성을 나타내게 된다[Bageshwar 등, 2005]. 본 연구에서 실시한 고추 건조스트레스 실험에서 건조스트레스 5일 조건에서 PGPR 균주 *B. licheniformis* K11 처리구에서 H<sup>+</sup>-ATPase의 발현이 건조처리구 및 물처리구에 비하여 증가함을 볼 수가 있었고, 이것은 원형질막의 H<sup>+</sup>-ATPase의 기능과 연관지어 볼 때 PGPR 균주에 의한 H<sup>+</sup>-ATPase의 발현 증가가 고추의 건조 스트레스 저항능을 유도하였다고 생각할 수 있다. 30일 조건에서도 H<sup>+</sup>-ATPase가 물 처리구와 비슷하게 발현됨을 알 수 가있었고 건조만 처리한 고추의 경우에는 고사 직전에 직면하여 세포막의 붕괴가 일어났고, 따라서 H<sup>+</sup>-ATPase의 발현이 되지 않았을 것이라 생각한다.

열충격단백질(small heat shock protein)은 세포 내에서 발현되는 스트레스 단백질로 세포 내에서 새롭게 발현되는 단백질들이 정상적인 삼차구조를 가질 수 있도록 도와주고, 스트레스 하에서 변성된 단백질과 결합하여 응고를 막아주는 역할을 한다[Vos 등, 2009]. 따라서 식물이 고온, 건조 등의 스트레스 조건에서 발현되어 식물의 열 스트레스 저항성을 유도시킨다. Fig. 2.12에서 고추의 건조스트레스 5일 조건에서 물처리구를 제외하고 모두 발현되었으며, 특히 PGPR 균주 *B. licheniformis* K11의 처리에 의해서 건조 처리된 고추보다 더 많은 양이 발현되었음이 관찰되었다. 이것은 PGPR 균주가 열충격단백질의 발현을 더 많이 유도하여 건조 스트레스 조건의 고추에 건조 스트레스 내성을 유도하였다고 생각할 수 있다.

PR 단백질들은 일반적으로 병원균의 침입에 대한 방어기작으로 발현되는 단백질로 담배의 TMV 감염에서 첫 보고된 이후 여러 가지 식물들에서 동정되고 있고, 최근에는 병원균이 아닌 식물체 호르몬이나 삼투 스트레스, 염 스트레스에 의해서도 발현된다고 알려져 있다[박 등, 2004; 홍 등, 2005]. 이러한 PR 단백질들의 기능에 착안하여 PR-like protein과 고추의 PR-10 단백질의 primer들을 디자인하여 건조 스트레스 상태의 고추 뿌리에서 발현 여부를 조사하여 보았다. 그 결과 PR 단백질들은 건조 스트레스 상태에서는 PR-like와 CaPR-10 모두 발현됨을 알 수 있었고, 물처리의 비 건조 스트레스 상태에서는 발현되지 않음을 알 수 있었다. 또한, PGPR 균주 *B. licheniformis* K11을 처리하였을 때 건조 처리된 고추에 비하여 더 높은 발현양상을 보였고, 이것은 PGPR 균주의 처리에 의하여 PR 단백질들의 발현을 증가시켜 고추의 건조 스트레스 저항능이 유도되었다고 볼 수 있다.

식물 호르몬인 에틸렌의 합성효소 중 하나인 ACCO는 건조스트레스 5일에서는 모든 처리구

에서 비슷하게 발현되는 것을 알 수가 있었고, 30일째에서 건조 처리된 고추에서는 발현이 전혀 나타나지 않는 것에 비하여 PGPR 균주를 처리한 고추에서는 약하게나마 발현되는 것을 알 수 있었다. 또한, 30일째에는 물 처리구에만 높은 발현양상을 보여 물 처리구의 비 스트레스 조건에서는 적절한 농도의 에틸렌이 합성되어 고추의 생장에 긍정적인 영향을 주고 있다는 것을 보여준다. 하지만 PGPR균주 처리구에서도 식물의 성장촉진에 영향을 줄 만큼은 아니지만 약하게 발현되는 것은 건조 스트레스 상태인 것을 가만하면 어느 정도 성장 촉진에 긍정적으로 작용하고 있다는 것을 알 수 있다. 그러나 이 단백질이 건조스트레스에 직접적으로 관여하는지 여부에 연구는 앞으로 더 연구가 지속되어야 할 것이다.

식물에서 adenosine kinase는 식물호르몬인 cytokinin 생합성에 관여하는 key enzyme 효소로서 cytokinin에 의한 세포 신장이나 발아시 많이 발현된다[Barbara 등, 2000; Deikman, 1997]. 또 식물이 건조나 고온 등의 환경 스트레스를 받을 때 많이 분비되어 스트레스 저항성 유도에 관여하는 단백질이다[Barbara 등, 2000]. 본 연구에서 고추의 건조 스트레스 처리후 5일이 경과하였을 때 모든 처리구에서 비슷하게 발현됨을 알 수 있었고, 건조 스트레스 30일 후에는 건조 처리한 고추에서만 발현이 나타났다(Fig. 3.17). 건조 스트레스 고추에 PGPR 균주를 처리한 경우비 건조 처리구와 비슷하게 adenosine kinase의 발현이 나타나지 않았는데. 이는 PGPR 균주에 의해서 건조처리 고추의 스트레스 저항능이 유도되어 스트레스가 완화되었음을 간접적으로 나타내는 것이다.

이와같은 결과는 PGPR의 처리에 의하여 건조 스트레스 상태의 고추에 건조 스트레스 관련 유전자들의 발현이 더 많이 유도되거나(*Cadh*n, *VA*, *sHSP*, *PR-like*, *CaPR-10*, *ACCO*) 혹은 발현이 억제(*ADK*) 됨에 따라 건조 스트레스 저항성을 유도한다는 것을 나타낸다. 즉, ACC deaminase 생산성 PGPR인 *B. licheniformis* K11이 고추에 건조 스트레스 저항성 유전자들의 발현 양을 조절하여 건조 스트레스를 극복할 수 있음을 보여준다.

또, PCR의 산물을 Solgent Co.사에 의뢰하여 sequencing한 결과, Table 3.3에 보는 것처럼 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 검색에서 모두 99%이상 (VA의 경우 92%)의 높은 상동성을 나타내었다(Fig. 3.18-24).

Table 3.3. Differentially expressed level of RNA in red-pepper by the treatment of *B. licheniformis* K11.

	Differentially expressed Genes	Hormonology from Genbank (%)	Protein Name	Accession No.
Up Regulation	<i>Cadh</i> n	99	dehydrin-like protein	AY225438
	<i>VA</i>	92	vacuolar H <sup>+</sup> -ATPase	AY177247
	<i>sHSP</i>	99	small heat shock protein	AY284926
	<i>PR-like</i>	99	PR-protein-like gene	AF525142
	<i>CaPR-10</i>	99	pathogenesis-related protein 10	AF244121
	<i>ACCO</i>	100	ACC oxidase	AJ011109
Down Regulation	<i>ADK</i>	99	adenosine kinase isoform 1T	AY695050

1 AAACATTATGGGTGCTTATACCTTTACTGACAAGTCCACAGCCTCAGTTGCCCCATCAAG  
 61 GCTATTCAAAGCTTTGGTTATTGATTTTAAACAACCTTGTATCTAAATTGGCACCTGATGT  
 121 TAAGAGTATTGAGAATGTTGAAGGTGATGGTGGTGCTGGAACCATCAAGAAGATGACCTT  
 181 TGTCGAAGGTGGTCCAATAAAGTACATGAAGCACAAGATTCATGTGATTGACGAAAAGAA  
 241 TTTAGTAACAAAATATTTCACTTATCGAAAAGTGATGTTACTGAAAACAAAGCAGAATCAGT  
 301 TGATTATGATGGCAAATTTGAAGCTTCTGCAGATGGAGGAAGTGTTCACACCACAGTAAC  
 361 TGTGTACAACACAAAAGGTGATTATGTTGTTACTGAGGAAGAACACAATGTGCACAAAAGA  
 421 GAAAGCCAATGACCTTCTCAAGGCCATCGAAGCATACTCTCGCCAAT

Fig. 3.18. Nucleotide sequences of the pepper-CaPR-10 gene induced by *B. licheniformis* K11.

1 CTTGTACTIONTTCCGTTTGTGATCACCTCAATTTGGTCGCCAAGGTTGACCACAATGGAGTG  
 61 GCGCATAGGAGAACATCAATCCATTGGTCGTCTTTGAGGAGTTGAAGGCCACTCACTC  
 121 CTATGCGCCACTCCATTGTGGTCAACCTTGGCGACCAAATTGAGGTGATCACAAACGGA  
 181 AAGTACAAGAGTGTGATGCACAGAGTGATTG

Fig. 3.19. Nucleotide sequences of the pepper-ACCO gene induced by *B. licheniformis* K11.

1 ATCAAAACAATGGAGTACGATGGAATTTCTTTGGGCATGGGCAATCCATTACTCGATATC  
 61 TCAGCTGTTGTAGATCAAGATTTCTTGAACAAGTATGACATCAAGCCGAACAATGCAATT  
 121 CTTGCCGAGGAGAAGCACTTGCCTATGTATGACGAACTGGCATCCAAGAACATTGTTGAA  
 181 TACATTGCTGGAGGTGCTACGCAAAATTCAATAAGAGTGGCTCAGTGGATGCTACCATTT  
 241 CCAGGTGCAACAAGTTACATGGGCTCGATTGGAAAGGACAAGTTTGGAGAGAAAATGAAG  
 301 AAAAATGCAAAG

Fig. 3.20. Nucleotide sequences of the pepper-ADK gene induced by *B. licheniformis* K11.

1 GCTAACTTTGATGCTACAGGTCTAGGAGAACGTACAGGCCAAGTCTGAAGCATAGTCACT  
 61 TGCTTTTTGACTCCTTGAAACTCGAGCTCAAGAACAGTATCATTCAAAGAGTATTGACCA  
 121 GCTGGAGCAATGTAGGTGATCTTTCCCATGGCATCAGGAGGAAGAGCAACACGATGTTCC  
 181 ATCAAAGTGTTCAAAGACGGTAGCATAACAAGTCTCCACCTGTTAAGAGATCTCCCTCA  
 241 CCTATTTTCTTAGGCTGAAATTCCCATAGTATATCCTTGTCCAGGGCTGGAACAGACACA  
 361 CCACGAGGGATGTAGACATCACCAGACCTTTTGGCAATTGTCTTCAGAGGCCTCTGAATA  
 421 CCATCGAAGATGTTCCCCAAAATTCCAGGTCCAGCTCTACTGACAGGGGCTTGTGTGTA  
 481 GCTTTTTGACTCCTTGAAACTCGAGCTCAAGAACAGTATCATTCAAAGAGTATTGACCAG  
 541 CTGGAGCAATGTAGGTGATCTTTCCCATGGCATCAGGAGGAAGAGCAACACGATGTTCCA  
 601 TCAAAGTGTTCAAAGACGGTAGCATAACAAGTCTCCACCTGTTAAGAGATCTCCCTCAC  
 661 CTATTTTCTTAGGCTGAAATTCCCATAGTATATCCTTGTCCAGGGCTGGAACAGACACAC  
 721 CACGAGGGATGTAGACATCACCAGACCTTTTGGCAATTGTCTTCAGAGGCCTCTGAATAC  
 781 CATCGAA

Fig. 3.21. Nucleotide sequences of the pepper-VA gene induced by *B. licheniformis* K11.

1 TGTCCCTTAATCTTGTCTAGAAATCCCTTTTTCTCCTCAGTTTCCTCGTACTTCTCAACTG  
 61 GAACTGAAGTGTCTTCCGTTTTCTTGTCTTCTTCCTTGTGATCACCAGATATTTTGTCCCT  
 121 TCATCTTGTCCCTTCAATCCCTTCTTTTTCTTCTTCTTGGATTTTCTGTCCATCTTCTCCTA  
 181 CTACTTCTTCCCTCCTCATCACTTGAGCTACTAGAGCTGCTACTTGATCGATGAAGTTTCT  
 241 TCTCTTCTTTCTTTTTCTCCTCCTCCTTGTGTTCTTCTTCACCTACTTTAACTTTCTCAC  
 301 CAAACTCAGATGAAATTGCTTGTTCATGAGCATGAGTTGGTTTTTCCTCCTCCTTTT  
 361 TCCCTAGGAAATCAAACAATTGATTTCCCTAGGGAAAAAAGGAGGAGGAAAAACCAACTC  
 421 ATGCTCATGAAGAACAAGCAATTTTCATCTGAGTTTGGTGAGAAAGTTAAAGTAGGTGAA  
 481 GA

Fig. 3.22. Nucleotide sequences of the pepper-Cadhn gene induced by *B. licheniformis* K11.

1 GGGATGGGGGGGTGGGGAAGACTACACTTGCTAAAGATGCTTACAATGACGAGAAGGCA  
 61 AAAATCCATTTTAATTTGAAAGCTTGGTTTTGTGTGCTGAGCCATATAATGCTTTCAGA  
 121 ATAACAAAAGGGTACTTCAAGAAATTGGCTCATTTGACTTAAAGGATGACAATAATCTT  
 181 AATCGGTTACAAGTCAAATTAAGGAAAAAATAAATGGAAAAAAGGTTTCTCATTTGTTCT  
 241 AGATGATATGTGGAATGACAACACTACAAAGAGTGAGATGACTTGAGGAAGATTTTTGTFTA  
 301 AGGAGGTATTGGAAGTAAGATCATTGTGATGACACATGAAGAGGGTGTTCCTTGATGAT  
 361 GGGTAGCGGGGCAATCAACGTGGGGACTTTGTCTGATGAAGCCTCTTGGGCTTTATTCA

Fig. 3.23. Nucleotide sequences of the pepper-PR-like gene induced by *B. licheniformis* K11.

1 TGGCATCTCGAGCACAAAACATGCCAACTCAAGAACTGGTGATTGCAGCTTGATTCATT  
 61 CAGGTGCAGGGGAGAACCTTGCCAAGGGCGGTGGCGATTACACGGGGAGGCGTGCCGTGG  
 121 AGTTGTGGGTGTCTGAGAAGCCTAACTATAACCATGCTACCAACCAATGCGCTGGAGGCG  
 181 AGTGCAGACACTATACTCAAGTGGTCTGGCGCAACTCAGTTCGACTAGGTTGTGGTCCGG  
 241 CTCGTTGCAACAATGGGTGGTGGTTTCTTTGCAACTATGATCCTGTAGGCAA

Fig. 3.24. Nucleotide sequences of the pepper-sHSP gene induced by *B. licheniformis* K11.

#### 4. 고찰

대표적인 식물호르몬인 에틸렌은 매우 단순한 구조를 지니고 있고, 상온에서는 기체 상태로 존재하며 식물의 성장, 발달, 노화의 여러 면에 관여한다. 고등식물에서 에틸렌은 대부분의 경우 methionine → SAM → ACC → 에틸렌의 단계를 거쳐 생합성된다. SAM은 ACC synthase에 의해 ACC로 전환되는데, 이러한 전환은 식물내 생합성된 에틸렌의 양에 의해서 조절된다. 일반적으로 에틸렌은 0.5  $\mu\text{L/L}$  이하의 매우 낮은 농도로 존재할 때만 식물의 성장조절자로 작용한다. 하지만, 식물이 받을 수 있는 여러 가지 환경 스트레스 상태에서는 높은 농도(>0.5  $\mu\text{L/L}$ )의 “스트레스 에틸렌”이 식물체 내에서 합성되고, 이것은 식물의 여러 가지 스트레스 반응 징후들을 유도하게 된다. 따라서, 본 연구에서 사용한 다기능 PGPR균주들은 에틸렌의 전구체인 ACC를 분해하는 ACC deaminase를 생산함으로써 식물의 스트레스 에틸렌 합성을 억제하여 그 농도를 낮추고, 이에 따라 식물의 스트레스 반응 징후들을 완화 또는 경감시켜 줄 수 있을 것이라 생각한다. 또한, 식물의 여러 가지 환경 스트레스에 대한 반응은 “스트레스 에틸렌” 한 종류만이 관여하는 것이 아니라, ABA나 JA 등의 여러 가지 식물호르몬들의 매우 복잡한 상호작용 메카니즘에 의해서 이루지기 때문에, ACC deaminase에 의한 “스트레스 에틸렌”의 생산 억제에 의한 다른 식물호르몬들과의 상관관계에 대한 연구가 앞으로 이루어져야 할 것이다.

또한, ABA는 식물이 건조나 고염 등의 식물 스트레스에 반응하는 식물성장조절호르몬으로 식물체 잎의 기공 개폐를 조절하는 물질로 알려져 있으므로 ABA를 생산하는 *B. licheniformis* K11은 건조나 고염 등의 환경스트레스에 쉽게 노출되어있는 작물의 스트레스 반응을 조절할 수 있을 것이라 생각된다. Cytokinin은 휴면타파작용, 식물조직의 노화 억제, 잎과 결눈의 성장 촉진, 잎과 과일의 노화를 방지하고 조직이나 잎 등의 노화를 방지하는 식물호르몬으로 주요 cytokinin의 하나인 zeatin을 생산하는 PGPR인 *B. subtilis* AH18균주는 작물의 성장을 촉진하고 조직이나 잎 등의 노화를 방지할 수 있을 것이다. 한편, *B. subtilis* AH18균주는 JA를 생산하는 희귀한 세균이라는 점에서 의미가 있을 뿐만 아니라, 선발된 PGPR 균주인 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11의 토양내 적용시 다양하게 노출되어있는 식물의 환경적, 기계적, 병원균에 의한 스트레스에 내성을 갖는데 크게 기여할 것으로 보인다.

건조 스트레스 저항성 유도 유전자들의 전사수준의 발현을 확인한 결과 고추의 건조처리 5 일째부터 PGPR 처리구에서 *CaPR*-10 (pathogenesis-related protein 10), *ACCO* (ACC oxidase), *VA* (vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase), *Cadh*n (capsicum dehydrin-like protein), *sHSP* (small heat shock protein)의 발현 증가와 건조처리 30일째에서 *ADK* (adenosine kinase isoform 1T) 유전자의 발현 감소를 확인할 수 있었다. 하지만, 본 연구를 실시한 두 시점(5일과 30일)의 시간 간격이 길어 건조처리 일수에 따른 유전자의 발현의 차이도 심하게 나타났다. 또, 30일째 건조 스트레스를 포함한 식물의 스트레스 조건하에서 비건조 스트레스상태인 물 처리구에서 유전자들이 발현되는 것이 나타나, PGPR 균주에 의한 고추의 건조 스트레스 저항성 유도실험의 처리시간 설계의 필요성이 제기되었으며, 나아가 건조 처리구와 (건조+PGPR) 처리구 간의 각 유전자들의 발현 양상에 다소 오류가 있을 것으로 유추된다. 하지만, 물 처리한 비 스트레스 고추를 제외하고 건조 처리구와 (건조+PGPR) 처리구 간의 스트레스 내성 유전자 발현은

모두 *in vivo* pot 실험과 2-D PAGE 실험에서 모두 일치하였으므로, 본 연구에서 사용된 다기능 PGPR 균주 *B. licheniformis* K11은 매우 우수한 고추의 건조 스트레스 내성 유도능을 지니고 있음을 알 수 있다.

또한, 50 mM NaCl의 고염 스트레스 조건하에서도 PGPR인 *B. licheniformis* K11 처리구에서 비염생물인 고추의 고염 저항성을 유도함을 알 수 있었다. 고염 스트레스는 건조 스트레스와 마찬가지로 삼투 스트레스의 요인을 내포하고 있기 때문에 비슷한 양상을 나타낸다[Hopkins, 1999]. 보통 고염 스트레스 조건에서 고농도의 염은 토양의 다공성을 감소시킴에 따라 토양의 공기 유통과 수분 전도도에 부정적인 영향을 미치고, 생리적 가뭄의 한 형태인 낮은 토양 수분 포텐셜을 발생시켜 식물체가 물과 영양소를 점차적으로 얻기 어렵게 만든다[Hopkins, 1999]. Fig. 2.12에서 볼 수 있듯이 건조 스트레스 조건에서 PGPR에 의하여 고추의 수분 포텐셜에 관여하는 VA 유전자의 발현이 증가하고, 이에 따라 스트레스를 극복하기 위한 ATP 양이 증가하게 된다. 이것은 VA 유전자의 활성 증가가 건조 혹은 고염조건에서 증가된다는 보고와 일치하는 것이다[Bageshwar 등, 2005]. 또, PGPR 처리시 *sHSP*와 *Cadhn* 등 세포막 단백질의 응고와 구조의 변성을 막아주는 역할을 하는 유전자의 발현 증가도 수분 포텐셜의 항상성을 유지시키는데 도움이 된다고 생각한다. 즉, 본 연구에서 사용된 PGPR은 식물의 원형질체에 존재하는 VA 유전자의 활성을 증가시켜 식물의 고염 및 건조 스트레스에 대한 저항성을 유도시키 것으로 추측할 수 있다.

그리고, 본 연구에 사용된 PGPR은 auxin과 GA, cytokinin 등의 식물생장촉진 호르몬을 생산하여 고추와 토마토의 뿌리 성장촉진능을 발휘하였다. 이와같이 PGPR 처리에 의하여 식물생장촉진호르몬에 의한 뿌리의 생육촉진으로 식물의 뿌리기능과 발육이 증대되어 고추 식물체 전체의 생육에 긍정적인 영향을 나타냄으로써 건조 및 고염 스트레스에 저항성 유도능을 발휘할 수도 있다고 생각할 수 있다. 즉, 본 연구의 다기능 PGPR 균주는 식물체의 스트레스 저항성에 관여하는 단백질과 전사수준에서의 여러 가지 유전자 발현을 조절하여 식물스트레스 저항성을 유도할 뿐만 아니라, auxin을 비롯한 성장촉진호르몬의 작용으로 식물체 뿌리의 생육을 촉진하여 고추 식물에 전체의 건강성을 증대시킴으로써 결국 식물이 스트레스에 저항할 수 있는 원인을 제공한다고 생각된다.

## 제 4 절 고추역병 방제용 PGPR 컨소시엄의 *in situ* 현장 토양내 모니터링

### 1. 서론

최근들어 식물 보호를 위한 화학약품 사용량의 증가는 농업 생태계의 파괴, 화학농약에 대한 저항성 병해충의 출현, 화학농약의 잔류에 의한 인류의 건강 위협 등의 많은 피해를 주고 있다. 또한 신선하고 안전한 농산물에 대한 요구에 따라 농업 환경과 농산물의 안전성에 대한 국민들의 관심 증가는 정부의 농업 정책에 있어서 환경친화적인 작물재배라는 중요한 변화를 유도하고 있다. 따라서 화학농약의 사용량을 줄일 수 있는 친환경적 식물병 방제에 대한 요구가 증대하면서, 농산물의 안전성과 품질을 향상시킬 수 있는 방안으로 미생물제제의 이용, 우렁이 등을 이용한 친환경 농법, 병 저항성 유전자를 이용한 병 저항성 식물체의 개발 등의 방법들이 많이 시도되고 있다. 이 중에서 특히 미생물제제를 이용한 방법은 가장 많이 사용되는 친환경 농업 중 하나로 많은 농가에서 이미 널리 적용하고 있다. 하지만, 개발된 미생물제제의 효능 검증이나 토양내 잔존 여부 및 토양내 생태학적 특성의 추적 등에 대한 연구는 매우 미진한 상태이다[우 등, 2007]. 특히 토양내 생태학적 특성을 추적하는 연구는 미생물제제의 투입 시기와 효능 검증에 있어서 매우 중요한 요소[Cheun 등, 2003; Gera 등, 2003; Bourque 등, 1993]이기 때문에, 식물병 방제능 혹은 성장촉진능이 뛰어난 미생물제제의 개발에 못지않게 품질 관리와 토양생태 관리 차원에서 반드시 실시되어야 할 필요가 있다. 하지만, 토양미생물 특히 미생물제제의 토양내 유지 추적이나 밀도 변화 모니터링에 관한 연구는 거의 행해진 바 없으며, 미국, 일본 등의 선진국을 제외하고는 극히 제한적으로 적용되고 있는 실정이다[Hui 등, 2006; Silvar 등, 2005; Cheun 등, 2003; Gera 등, 2003; Kunst 등, 1997; Bourque 등, 1993]. 따라서 본 연구에서는 고추역병 방제를 위하여 개발한 다기능 PGPR 균주를 이용한 미생물제제를 실제 포장에 적용하고, 적용된 미생물제제의 토양 내 추적을 위해 multiplex PCR 및 real time PCR 방법 등 간편한 genetic monitoring 방법[우 등, 2007]들을 개발하여 실용화하고(Fig. 4.1), 이를 이용하여 다기능 PGPR 균주들의 토양내 우점능을 추적, 확인함으로써 미생물제제의 투입 시기 및 투입 횟수 등을 포함하는 미생물제제 실용화에 활용하고자 한다.

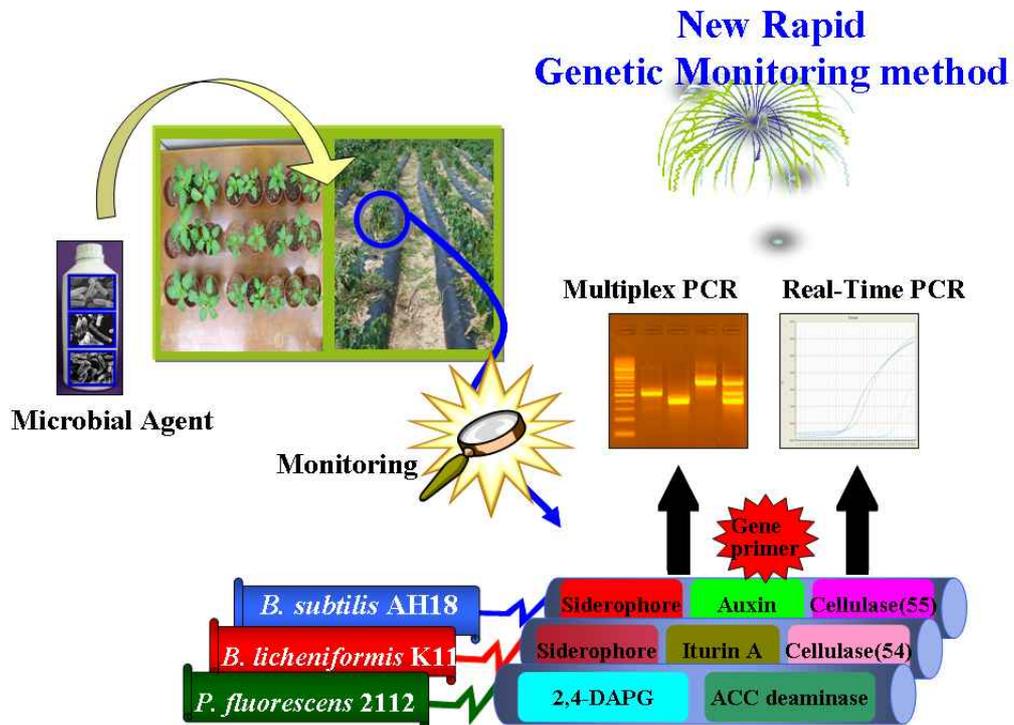


Fig. 4.1. New rapid genetic monitoring method of the multi-functional PGPR strains in field soil using multiplex PCR and real time PCR.

## 2. 연구개발수행 재료 및 방법

### 가. 토양내 컨소시엄 구성 길항미생물들의 모니터링 조건 확립

#### (1) Multiplex PCR을 이용한 모니터링

토양내에 존재하는 컨소시엄 길항미생물의 DNA 분리는 MOBIO사의 PowerSoil™ DNA kit 를 사용하였다. PCR 용 primer 들은 Table 4.1에 보여지는 것처럼 *B. subtilis* AH18에서는 auxin efflux carrier, siderophore 및  $\beta$ -glucanase의 3종 유전자의 특정서열을 primer로[우 등, 2007], *B. licheniformis* K11에서는  $\beta$ -glucanase[우 등, 2007], siderophore, iturin의 3종 유전자의 특정서열을 primer로 하였다(Table 4.1). 그러나, *B. licheniformis* K11의 경우 기존  $\beta$ -glucanase와 iturin의 primer가 특이성이 낮았기 때문에 감도가 높은 새로운 primer를 Table 4.1과 같이 다시 디자인하였다. Multiplex PCR에는 Taq DNA polymerase (Solgent Co., Ltd.) 를 사용하였으며, PCR은 template DNA 2  $\mu$ l에 reaction buffer 5  $\mu$ l, 각각의 primer 1  $\mu$ l, dNTP 1  $\mu$ l, Taq DNA polymerase 0.2  $\mu$ l와 3차 증류수를 가하여 총 50  $\mu$ l가 되도록하였으며, 반응은 pre-denaturation 94°C-5분 후, denaturation 94°C-1분, annealing 55°C-1분, polymerization 72°C-1분 30초의 증폭과정을 29 cycle 수행하였으며, 마지막으로 post-polymerization을 72°C-5분 행하였다. 모든 토양 DNA분리는 길항미생물 컨소시엄 투입 후 7일 후 수행하였다.

Table 4.1. Primer of sequences designed based on antagonistic genes of the *Bacillus* strains.

Strains	Antagonistic gene	Primers	Sequence	Reference
<i>B. subtilis</i> AH18	Auxin	<i>aec</i> 1	5'-TGT AAA GCT AAA GTA TAC GGA CAT AGG AT-3'	Woo et al., 2007
		<i>aec</i> 2	5'-GTC ACT GIT CAA ATT TCA AAC CTA AAG-3'	
	Siderophore	<i>sid</i> 1	5'-GAA TIG ATG ATA TGA ATG CAA AGG GTA TAG AGG GAA AAA-3'	Woo et al., 2007
		<i>sid</i> 2	5'-CAC GCC TAA GGT CCC CCC GC-3'	
	$\beta$ -glucannase	<i>cel</i> 1	5'-AGA AGT GTA GAG CCA AAA TGA TGC GAA GGA-3'	Woo et al., 2007
		<i>cel</i> 2	5'-CGG ACA TCG TTA CTG ATG TTC GCC-3'	
<i>B. licheniformis</i> K11	$\beta$ -glucannase	<i>celA</i> (+)	5'-AGG AGG AAA AGA TCA GAT ATG AAA CGG TCA ATC-3'	Woo et al., 2007
		<i>celA</i> (-)	5'-TTC AGT ATT TCA TCC ACA ACG CAA ACC TTC-3'	
	Siderophore	<i>sidK</i> (+)	5'-ATG CCC ATC CCT GAT TAA GCC TGT TCA GAT-3'	This study
		<i>sidK</i> (-)	5'-ATC GGA ATT CTA GAG TTA TCC AAC CTA TGA-3'	
	Iturin	<i>Itu1</i> (+)	5'-CAT GAC TCA CTC AAT ACG ATG ATT TAA TGC-3'	This study
		<i>Itu1</i> (-)	5'-TTC TGC ACC GIT CGC CAT CTC CTA GAT ATC-3'	

## (2) *In situ* 토양내 컨소시엄 길항미생물들의 경시적 추적 모니터링

컨소시엄으로 구성된 길항미생물 제제를 토양에 처리한 후 길항미생물의 토양내 변화를 추적하기 위해, *in vivo* pot 실험을 실시하고 1주 간격으로 5주간 경시적으로 pot 토양내 길항미생물 컨소시엄을 multiplex PCR로 확인해 보았다. Multiplex PCR 조건과 반응은 상기의 모니터링 실험과 동일하게 실시하였다.

## (3) Real time PCR을 통한 길항미생물 컨소시엄 균주들의 모니터링

Real time PCR을 통하여 토양 내 길항미생물 컨소시엄 구성 균주들의 잔존 복원량을 상대적으로 모니터링 하였다. Multiplex PCR에서 사용한 primer를 그대로 사용하여 SYBR Green based-real time PCR을 실시하였으며, 모든 반응 조건은 multiplex PCR과 동일하게 하였다.

## 나. *In situ* 경작지 현장 토양내 시용된 컨소시엄 구성 길항미생물 모니터링

고추역병방제용 길항미생물 컨소시엄으로 사용된 2개의 다기능 PGPR균주 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11을 경시적으로 추적, 모니터링한 상기의 pot 토양내 실험을 바탕으로, 실제 고추역병이 발병한 경작지 포장 토양에 길항미생물 컨소시엄을 투입 시용한 후 투입된 길항미생물 컨소시엄의 토양내 추적과, 경작지내 이미 이병되어 있는 고추역병균인 *P. capsici*의 밀도 감소를 multiplex PCR을 통하여 추적, 모니터링해 보고자 하였다. 또한, 고추역병 방제용 길항미생물로 추가하여 투입한 고추역병 방제용 다기능 PGPR 균주 *P. fluorescens* 2112의 토양내 유전학적 모니터링을 위해 이들의 특이 유전자에 대한 DNA primer를 제작하고 multiplex PCR을 동시에 실시하였다.

## (1) Multiplex PCR을 이용한 컨소시엄 길항미생물들의 경시적 모니터링

경시적으로 현장 포장내의 컨소시엄 길항미생물들의 모니터링을 위하여 현장내 컨소시엄 제제 투입일 기준으로 0일(zero time)부터 10일 간격으로 60일까지 토양내 DNA 샘플채취를 채취하였다. 현장 토양내 컨소시엄 길항미생물의 DNA 분리를 위한 토양 샘플은 ① 무처리구(물만 처리), ② *Bacillus* 처리구(*B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11 처리구), ③ *Pseudomonas* + *Bacillus* 처리구(*P. fluorescens* 2112, *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11 처리구) 및 ④ G사의 T제품 처리구(시판 미생물제제 처리구)에서 2개의 고추묘 근권토양을 대상으로 처리구당 4반복 실시하였다. 고추묘의 선발은 무작위적하였으며, 모든 처리구당 2개씩 뽑아 뿌리 주위에 붙은 흙을 조심스럽게 털어내어 잘 섞어주었다. 토양 내 DNA 추출은 각 처리구당 2개의 고추묘에서 회수한 흙을 하나로 혼합하여 MOBIO사의 PowerSoil™ DNA kit를 사용하여 추출하였다. 현장 토양내 모니터링을 위한 multiplex PCR 반응액은 template DNA 100 ng에 reaction buffer 5  $\mu$ l, 각각의 primer 1  $\mu$ l, dNTP 1  $\mu$ l, Taq DNA polymerase 0.2  $\mu$ l 와 3차 증류수를 가하여 총 50  $\mu$ l가 되도록 하였으며, 반응은 상기와 동일하게 실시되 annealing 58°C으로 행하였다.

(2) 현장 토양내 *P. fluorescens* 2112의 multiplex PCR 및 RFLP를 통한 추적 모니터링 조건 확립

*P. fluorescens* 2112의 multiplex PCR을 통한 토양내 유전학적 모니터링을 위하여 항생물질 2,4-DAPG gene과 환경스트레스 저항성 물질 ACC deaminase 합성 gene을 유전적 지표로 이용하고자 하였다. *P. fluorescens* 2112의 2,4-DAPG gene primer의 경우 *Pseudomonas* sp.들이 생산하는 2,4-DAPG gene의 *phd* gene primer를 이용하였지만(Table 4.2), 다른 *Pseudomonas* sp.들과의 차별성을 확보하기 위하여 제한효소 *Hae*III, *Msp*I, *Taq*I를 사용한 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)법을 실시하였다. 또, 나아가 토양내에 많이 존재하는 *Pseudomonas* sp.와의 특이성을 높이기 위하여, 환경 스트레스 저항성 물질인 ACC deaminase 유전자(*acdS*, Genbank Accession No. FJ465155)를 토대로 primer를 디자인하여 모니터링에 이용하였다(Table 4.2). PCR 조건은 template DNA 100 ng에 reaction buffer 5  $\mu$ l, 각각의 primer 1  $\mu$ l, dNTP 1  $\mu$ l, Taq DNA polymerase 0.2  $\mu$ l 와 3차 증류수를 가하여 총 50  $\mu$ l가 되도록 하였으며, 반응 조건은 상기와 동일하게 시행하였고, annealing temperature는 gradient PCR을 실시하여 최적화 시켰다.

Table 4.2. Primer sequences used for detecting of *P. fluorescens* 2112.

Strains	Antagonistic genes	Primers	Sequences
<i>P. fluorescens</i> 2112	2,4-DAPG	B2BF	5'-ACCCACCGCAGCATCGTTTATGAG-3'
		BPR4	5'-CCGCCGGTATGGAAAGATGAAAAAG-3'
	ACC deaminase	<i>acdS</i> (+)	5'-ACACGCAAGCTCGAATACCT-3'
		<i>acdS</i> (-)	5'-CHACATCTCGATGTTGCCTA-3'

(3) 경작지 현장 토양내 이병된 고추역병균 *P. capsici* 감소의 추적 확인

최종 컨소시엄으로 구성된 길항미생물 제제를 토양에 처리하였을 때 고추역병 방제효과를 고추역병균의 감소되는 동태를 추적해봄으로써 간접적으로 검증하기 위하여 고추역병균인 *P. capsici*의 모니터링을 실시하였다.

고추역병균인 *P. capsici*의 감소현상 모니터링을 위해 컨소시엄 길항미생물의 DNA 추출방법과 동일하게 MOBIO사의 PowerSoil™ DNA kit를 사용하여 토양 DNA를 추출하였다. 고추역병균인 *P. capsici*의 PCR을 위한 primer로는 *P. capsici*의 rDNA의 internal transcribed spacer regions (ITS)의 염기서열을 바탕으로 설계하여 사용하였다(Table 4.3). 모든 모니터링 실험은 컨소시엄 균주 모니터링과 동일하게 미생물제제 투입후 0일부터 10 일 간격으로 50일 까지 진행하였으며, PCR은 pre-denaturation 95°C-2분 후 denaturation 95°C-30초, annealing 55°C-30초, polymerization 72°C-1분의 증폭과정을 30cycle를 수행하였으며, 마지막으로 post-polymerization을 72°C-5분 하였다.

Table 4.3. Primer sequences base on *P. capsici* ITS for detection of pathogen in the field soil.

pathones	Specific genes	Primers	Sequences
<i>P. capsici</i>	Internal transcribed spacer regions (ITS) of rDNA	CAPFW	5'-TTTAGTTGGGGGTCTTGTACC-3'
		CAPRV1	5'-CCTCCACAACCAGCAACA-3'

#### 다. 미생물체제가 토양 미생물상에 미치는 영향

컨소시엄 길항미생물의 토양미생물 생태에 미치는 영향을 조사하기 위하여 전술한 방법으로 포트를 만든 다음 각 포트에 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11을 각각 5 ml 씩 접종하였다. 그리고 미생물을 처리하지 않은 무처리 대조구와 두 미생물을 2.5 ml 씩 혼용 처리한 혼용구 2개를 더하여 총 4 처리구를 4반복으로 실시하였다. 처리 7일 후에 토양을 모두 회수한 다음 2ml 채로 걸러서 -80℃에 보관하였다. 냉동 보관된 토양 시료를 이용하여 인지질 지방산을 추출한 후 토양미생물 군락의 구성을 분석하였는데, Peacock 등, 2001의 방법으로 추출하였다. 간단히 요약하면, 4 g의 토양 샘플에 chloroform : methanol : buffer solution (1 : 2 : 0.8 v/v/v) 혼합물을 넣고 지질을 추출한 후 silicic acid column으로 neutral, glyco and phospholipid로 분리한다. 이 중에서 인지질을 메틸화 하여 만들어지는 메틸화된 지방산에 fatty acid methyl ester 19:0을 내부 표준물질로 넣은 다음 MIDI Sherlock Microbial Identification System (MIDI Inc., Newark, DE)으로 지방산을 정성·정량하였다. 탄소 수가 10개에서 20개인 지방산이 동정되었는데, 각 PLFA 값은 각 샘플에서 총 PLFA의 퍼센트 비율로 표시하였다.

#### 라. 통계분석

모든 토양의 화학적 특성은 SAS version 9.13 (SAS Inst., Cary, NC, USA) 프로그램을 이용하여 analysis of variance (ANOVA)로 분석하였다. 전체 PLFA 41개 중에서 50% 이상의 시료에서 나타나는 지방산 30개만 통계 분석에 이용하였다. 전체 PLFA 데이터와 Biolog 데이터는 SAS version 9.13 (SAS Inst., Cary, NC, USA)을 이용하여 다변량 분석법의 하나인 주요 요인 분석을 통하여 분석하였다. 주요 요인 분석 결과의 그림에서 보여지는 시료 간의 거리는 시료간의 유사성 정도의 차이를 의미한다. 전체 PLFA 중에서 주요 지표 지방산은 토양 화학적 특성 변수와 같은 방법으로 분석하였으며, Li 등(2006)의 방법에 따른 지방산 분석 지표들을 이용하여 지방산을 분류하였다.

### 3. 연구개발수행 결과

#### 가. 토양내 컨소시엄 길항미생물들의 모니터링 조건 확립

##### (1) Multiplex PCR을 이용한 각 균주들의 모니터링

컨소시엄 NO. 11의 두 길항미생물 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11을 multiplex PCR을 통하여 토양으로부터 그 복원능을 추적, 모니터링하였다. 컨소시엄 No. 11을 구성하는 두 길항미생물들은 각각 *B. subtilis* AH18은 auxin, siderophore 및  $\beta$ -glucanase의 3종의 역병 길항유전자를 가지고 있으며, *B. licheniformis* K11은 iturin, siderophore 및  $\beta$ -glucanase의 3종의 특이 역병 길항유전자를 가진다. 이들 각각 컨소시엄 길항균주들을 접종한 후 토양으로부터 DNA를 회수하고 3종의 primer들을 동시에 사용하여 multiplex PCR을 수행하였다. 그 결과 3종의 특이유전자와 동일한 위치의 triplex band를 확인할 수 있었는데(Fig. 4.2, 4.3), 이는 토양내 접종된 길항미생물의 존재 여부 및 상태를 간편하게 확인하여 모니터링 할 수 있음을 보여주는 것이다. 특히, 길항미생물 1개 균주당 3개의 유전자를 동시에 증폭함으로써 투입된 길항미생물 이외의 미생물로부터 유래하는 비특이적 증폭을 최소화 또는 배제할 수 있는 확실한 모니터링 방법임을 보여준다.

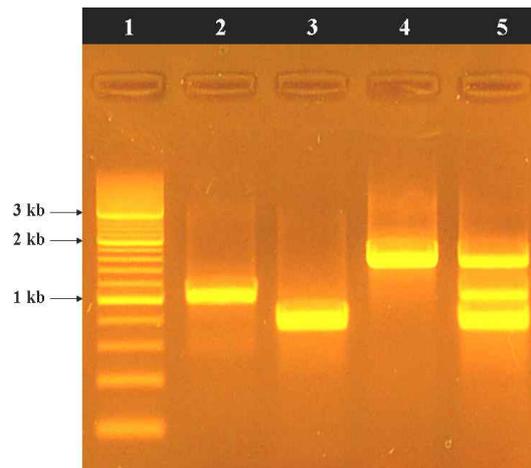


Fig. 4.2. Confirmation of *B. subtilis* AH18 using single and multiplex PCR in bed soil. 1, 200 bp DNA ladder; 2, auxin efflux carrier gene (1,062 bp); siderophore gene (794 bp); 3, cellulase gene (1,582 bp); 5, multiplex PCR of 3 genes.

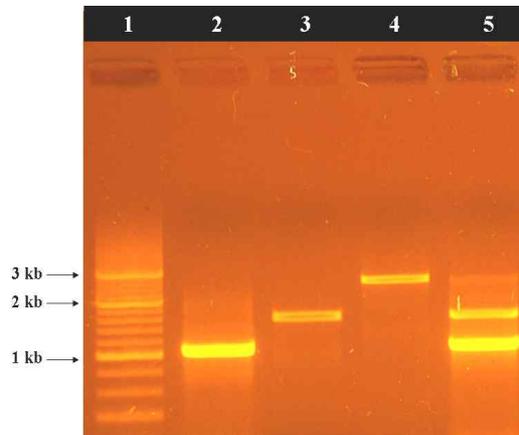


Fig. 4.3. Confirmation of *B. licheniformis* K11 using single and multiplex PCR in bed soil. 1, 200 bp DNA ladder; 2, siderophore gene (1,020 bp); 3, cellulase gene (1,682 bp); 4, iturin gene (2,480 bp); 5, multiplex PCR of 3 genes.

(2) 일반 경작지토양에서 컨소시엄 No.11 구성균주들의 모니터링

비살균 경작지토양에는 멸균 상토와 달리 수많은 종류의 미생물들이 생육하고 있기 때문에 여기에 투입된 컨소시엄 No. 11 구성 균주들의 증식 및 존재 여부를 확인하기 위하여 multiplex PCR을 수행하였다. 컨소시엄을 혼용 투입한 토양으로부터 Fig. 4.4와 같이 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11의 triple bands를 확인 할 수 있었다. 특히 *B. subtilis* AH18의 경우 3종의 특이유전자들이 모두 강하게 증폭되었지만, *B. licheniformis* K11의 경우 항진균성 항생물질인 iturin gene의 증폭이 다른 gene들에 비하여 약하게 나타나고, 나머지 2종의 특이 유전자들은 강하게 증폭되었다. 그러나, 두 길항미생물의 6종의 특이 유전자 primer 들을 전부 넣고 증폭시켰을 때에는 *B. subtilis* AH18의 auxin efflux carrier gene (1,062 bp),  $\beta$ -glucanase gene (1,582 bp)와 *B. licheniformis* K11의 siderophore gene (1,020 bp),  $\beta$ -glucanase gene (1,682 bp)의 증폭 산물들이 비슷한 크기를 지니고 있어서 전기영동 gel 상에서 겹쳐지기 때문에 정확히 구분할 수는 없었지만, iturin gene을 제외한 5종의 특이 유전자가 단일 밴드로 증폭되어 이들이 모두 토양내에서 모니터링할 수 있음을 증명할 수 있다. 이러한 결과로 볼 때 일반 경작지 토양에서도 실제 길항미생물 컨소시엄 No. 11이 투입되었을 때 이들의 존재 여부 및 상태를 multiplex PCR로 추적할 수 있는 모니터링 시스템이 확립된 것으로 사료된다. 하지만, 6종의 유전자들이 모두 증폭될 수 있는 PCR 조건을 완성할 필요성이 있으며, real time PCR 등의 다른 분자생물학적 기법을 활용하여 일반 토양 내에서 투입된 컨소시엄 균주만을 특이적으로 확인할 수 있는 방법 확립할 필요도 있다.

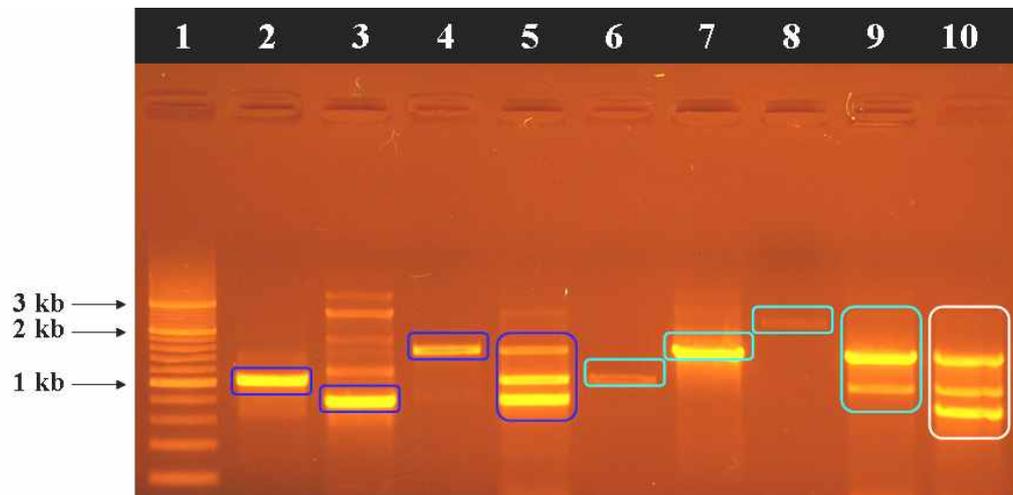


Fig. 4.4. PCR detection of *B. subtilis* AH18 and *B. licheniformis* K11 from DNA samples from field soil.

1, 200 bp DNA ladder; 2, auxin efflux carrier gene (1,062 bp); 3, siderophore gene (794 bp); 4, cellulase gene (1,582 bp); 5, multiplex PCR of strain AH18; 6, siderophore gene (1,020 bp); 7, cellulase gene (1,682 bp); 8, iturin gene (2,480 bp); 9, multiplex PCR of strain K11 ; 10, multiplex PCR of strain AH18 and K11.

### (3) 토양내 컨소시엄 길항미생물들의 경시적 추적

컨소시엄으로 토양내 투입, 접종된 두 길항미생물 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11의 경시적 추적을 위해 각각의 길항미생물을 토양에 처리하고 1주간격으로 5주까지 토양으로부터 DNA를 회수하여 multiplex PCR을 수행하였다. 그 결과 *B. subtilis* AH18의 경우 3개의 특이 band가 4주까지 확인되었고(Fig. 4.5), *B. licheniformis* K11의 경우 3개의 특이 band를 3주까지, 2개의 특이 band를 5주까지 확인할 수 있었다(Fig. 4.6). 다만 *B. licheniformis* K11에서 iturin 유전자의 증폭이 잘 되지 않았지만 3주까지는 희미하게 관찰할 수 있었고, siderophore와  $\beta$ -glucanase gene의 경우는 4주까지도 뚜렷하게 증폭되었다.

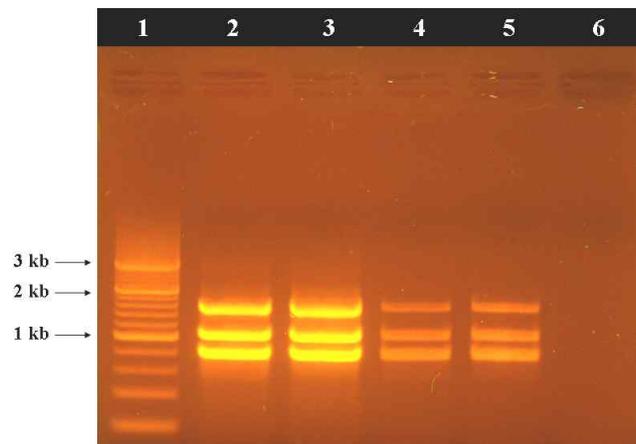


Fig. 4.5. Multiplex PCR monitoring of *B. subtilis* AH18 in the inoculated pot soil for 5 weeks.

1, 200 bp DNA ladder; 2, 1 week; 3, 2 weeks ; 4, 3 weeks; 5, 4 weeks; 6, 5 weeks.

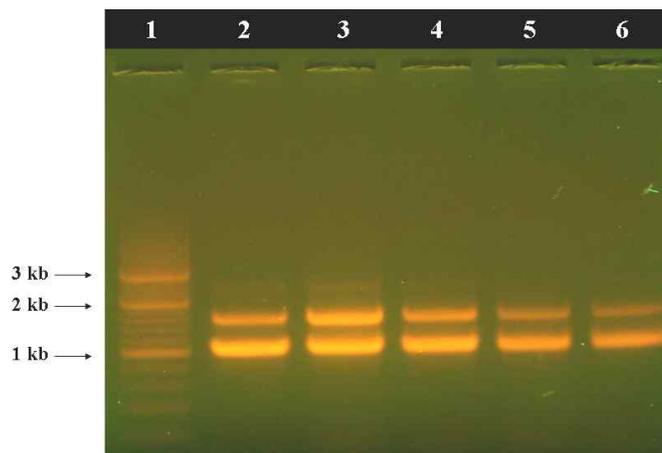


Fig. 4.6. Multiplex PCR monitoring of *B. licheniformis* K11 in the inoculated pot soil for 5 weeks.

1, 200 bp DNA ladder; 2, 1 week; 3, 2 weeks ; 4, 3 weeks; 5, 4 weeks; 6, 5 weeks.

(4) Real time PCR을 통한 길항미생물 컨소시엄의 모니터링

Real time PCR을 통하여 토양 내 길항미생물 컨소시엄 구성 균주의 밀도를 5주간 경시적으로 추적, 모니터링한 결과, 컨소시엄으로 투입된 두 길항미생물 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11 모두 4주까지 각 길항균주의 특이 유전자들의 증폭 사이클을 확인할 수 있었다(Fig. 4.7, 4.8). 특히 *B. licheniformis* K11은 5주까지 유전자 증폭을 확인할 수 있었다(Fig. 4.9). 이는 multiplex PCR에서 *B. subtilis* AH18이 4주까지, *B. licheniformis* K11이 5주까지 특이유전자를 증폭할 수 있었던 것과 동일한 결과다. 하지만, 비록 하나의 유전자지만 *B. subtilis* AH18의 siderophore 유전자가 5주까지 real time PCR에서 확인되는 것으로 보아, multiplex PCR과 real time PCR 모두 민감도에서 다소 차이가 있는 것으로 보인다. 물론 real time PCR의 cycle 수가 증가한다는 것이 토양내 균주의 밀도가 감소된다는 것을 직접 비례적으로 판단할 수는 없으며, 증폭 조건이나 기타 원인 등에 의해 간접적으로 영향을 받았다고 볼 수도 있으므로 좀더 연구해 볼 소지가 있다. 따라서, 두 종류의 PCR을 모두 활용하면 균주별로 발생할 수 있는 오차를 줄일 수 있을 것이며, real time PCR의 반복횟수를 늘이면서 정확한 모니터링 조건을 확립한다면 도움이 되리라 생각한다. 또, real time PCR 수행 시 컨소시엄 길항균주들이 가지고 있는 특이 유전자들의 증폭양상을 생균수와 비례하여 표준곡선을 만든다면 길항미생물을 정량할 수 있는 가장 좋은 모니터링 기술이 될 것이므로 이에 연구를 지속적으로 실시할 필요가 있다.

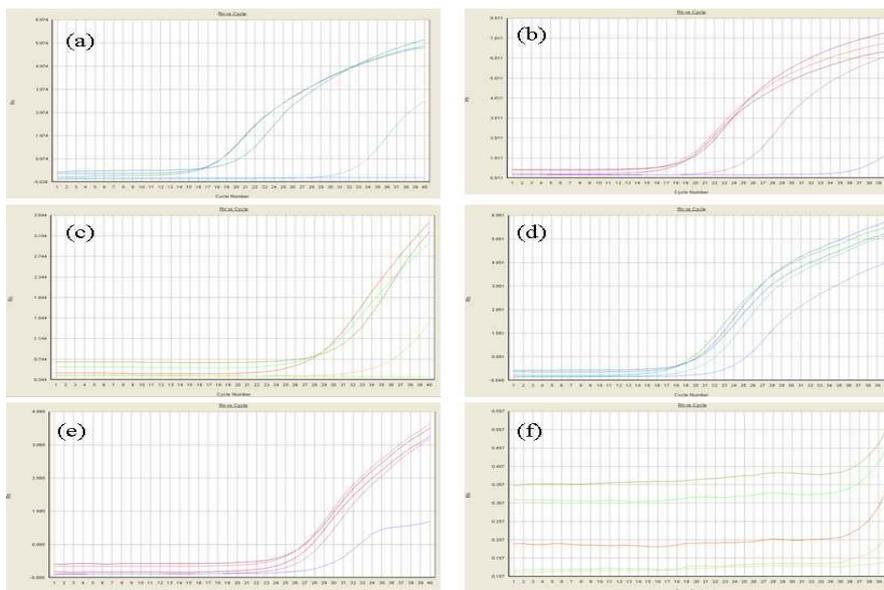


Fig. 4.7. Real time PCR-monitoring of 3 genes of *B. subtilis* AH18 and *B. licheniformis* K11 in the inoculated soil for 5 weeks.

(a), *aec* gene of *B. subtilis* AH18; (b), *sid* of *B. subtilis* AH18; (c), *cel* of *B. subtilis* AH18; (d), *spfE* of *B. licheniformis* K11; (e), *celA* of *B. licheniformis*; (f), *itu* of *B. licheniformis*.

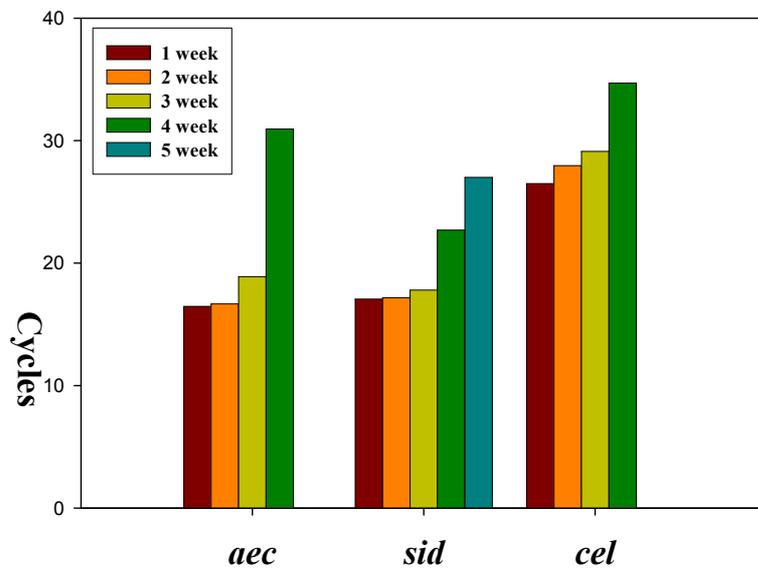


Fig. 4.8. Real time PCR-monitoring of 3 genes of *B. subtilis* AH18 in the inoculated soil for 5 weeks.

*aec*, auxin gene of *B. subtilis* AH18; *sid*, siderophore gene of *B. subtilis* AH18; *cel*, cellulase gene of *B. subtilis* AH18.

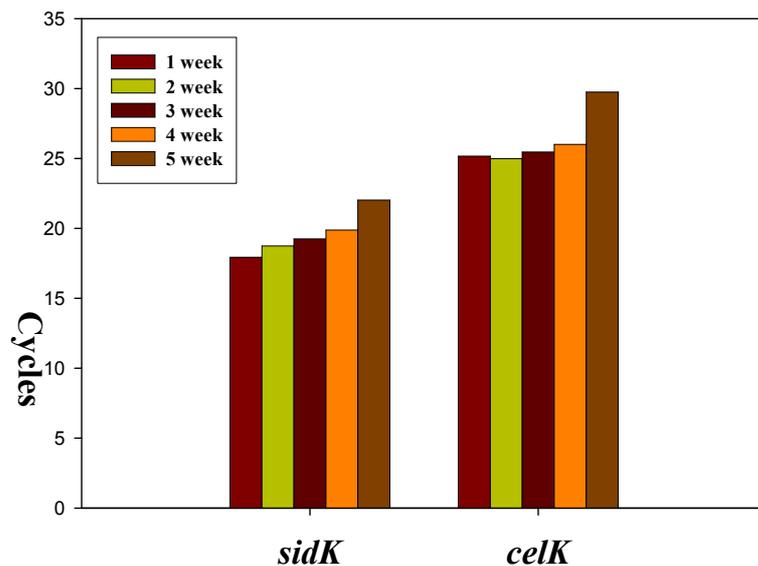


Fig. 4.9. Real time PCR-monitoring of 3 genes of *B. licheniformis* K11 in the inoculated soil for 5 weeks.

*spE*, siderophore gene of *B. licheniformis* K11; *celA* gene of *B. licheniformis*; *itu*, iturin gene of *B. licheniformis*.

나. *In situ* 현장 토양내 컨소시엄 구성 길항미생물들의 모니터링

(1) Multiplex PCR을 이용한 컨소시엄 길항미생물들의 토양내 경시적 모니터링

고추역병 방제용 친환경 미생물제제의 최적 컨소시엄으로 개발된 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11 조합의 컨소시엄 No. 11을 60일만에 걸쳐 고추 재배 현장 토양내에서 추적 모니터링하였다. 컨소시엄 No. 11의 경시적 모니터링을 위하여 고추재배 현장토양을 10일 간격으로 채취하여 추출한 DNA를 *B. subtilis* AH18및 *B. licheniformis* K11의 3중 고유 특이 유전자 primer를 이용하여 multiplex PCR을 실시하였다. 그 결과 Fig. 4.10, 4.11에서 볼 수 있듯이 다양하고 많은 미생물들이 공존하고 있는 노지의 현장 토양임에도 불구하고, 컨소시엄 No. 11을 투입한 처리구에서는 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11 모두 각각 3종의 특이 gene들이 증폭된 triplex band를 확인할 수 있었다. 또, 무처리구 지역과 상업용 미생물농약(G사, T제품) 처리구에서는 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11에서는 이들의 특이 유전자들의 증폭을 전혀 관찰 할 수 없었다. 이러한 결과는 길항미생물 모니터링 연구에서 확립한 multiplex PCR 조건과 컨소시엄 구성 길항미생물의 3중 특이 유전자 primer를 이용한 모니터링방법이 경작지 토양 현장에서도 적용이 가능한 확실한 신기술임을 보여주는 것이다.

한편, Fig. 4.10, 4.11에서 보이는 것처럼 컨소시엄 구성 길항미생물인 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11 모두 20일까지 triplex band를 확인할 수 있었다. 이것은 컨소시엄이 현장 토양내에 투입되었을 때 두 길항미생물 모두 20일까지는 multiplex PCR로 확인할 수 있는 정도의 고밀도로 존재하고 있는 것으로 생각된다.

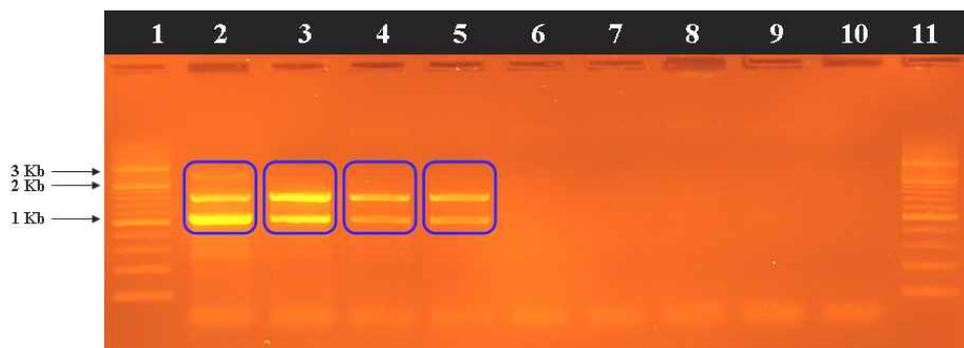


Fig. 4. 10. Individual monitoring of the triple genes of *B. licheniformis* K11 in the 3 strains co-inoculated field soil for 50 days.

lane 1, 200 bp DAN ladder; lane 2, 3 gene of *B. licheniformis* K11 genomic DNA; lane 3; 0 day; lane 4, 10 days; lane 5, 20 days; lane 6, 30 days; lane 7, 40 days; lane 8, 50 days; lane 9, *P. polymyxa* AC1 treated field soil (40 days); lane 10, water treatment field soil (40 days); lane 11, 200 bp DNA ladder.

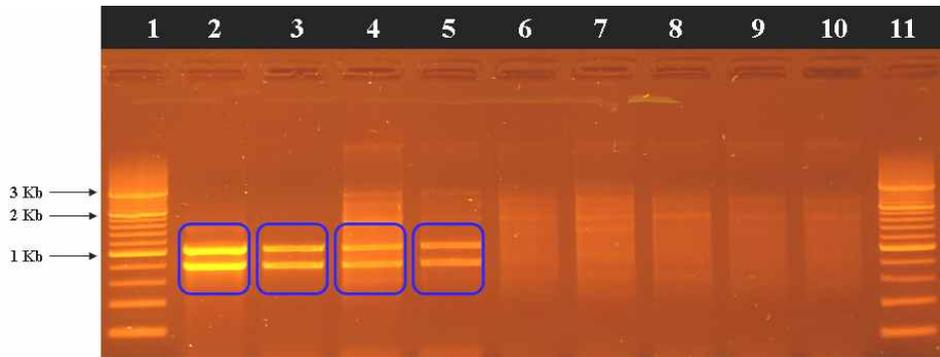


Fig. 4.11. Individual monitoring of the triple genes of *B. subtilis* AH18 in the 3 strains co-inoculated field soil for 50 days.

lane 1, 200 bp DNA ladder; lane 2, 3 gene of *B. subtilis* AH18 genomic DNA; lane 3; 0 day; lane 4, 10 days; lane 5, 20 days; lane 6, 30 days; lane 7, 40 days; lane 8, 50 days; lane 9; water treatment field soil (40 days); lane 10, water treatment field soil (40 days); lane 11, 200 bp DNA ladder.

(2) 경작지 토양내 투입된 *P. fluorescens* 2112의 multiplex PCR 및 RFLP를 통한 추적모니터링

*B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11로 조합된 컨소시엄 No.11이외에 더욱 효과적이고 높은 고추역병 방제능 향상과 길항미생물의 지속적인 근권우점능 유지를 위하여 고추역병 발생포장에 항진균성 항생물질 2,4-DAPG를 생산하는 *P. fluorescens* 2112균주를 투입하여 고추역병 방제능을 조사하고 토양내 우점능 추적의 모니터링을 실시하였다. 모니터링을 위하여 *P. fluorescens* 2112가 특이하게 생산하는 항생물질인 2,4-DAPG의 *phlD* gene primer와 환경스트레스 완화물질인 ACC deaminase gene의 *acdS* gene 고유유전자 확인법을 사용하였다. Multiplex PCR 조건은 두 유전자를 각각 gradient PCR을 통하여 최적 조건을 확인하였고, 그 결과 pre-denaturation 94°C 5분 후 denaturation 94°C-1분, annealing 58°C-1분, polymerization 72°C-1분 30초, 29cycle를 수행한 후 post-polymerization 72°C-5분으로 수행하는 것이 두 유전자를 동시에 증폭시킬 수 있는 조건이었다. *P. fluorescens* 2112의 *phlD* gene과 *acdS* gene의 최적 mutiplex PCR 조건을 바탕으로 고추역병 발생포장으로부터 회수한 토양의 DNA를 template로 하여 mutiplex PCR을 실시한 결과 2,4-DAPG의 *phlD* gene과 ACC deaminase gene의 *acdS* gene 모두 30일까지 증폭이 됨을 확인할 수 있었다(Fig. 4.12). 또, 무처리구 지역과 상업용 미생물농약 G사의 T제품 처리구에서는 *P. fluorescens* 2112의 2종의 특이 gene들의 증폭을 전혀 볼 수 없었다. *Bacillus*로 구성된 컨소시엄 No. 11이 모두 20일까지 증폭되는데 비하여 *P. fluorescens* 2112균주의 경우 30일까지 증폭이 되는 것으로 보아 *Bacillus*에 비하여 *Pseudomonas* 균주가 고추 근권에의 우점능이 뛰어나기 때문인 것으로 생각된다.

또, 많은 종류의 *Pseudomonas* sp.가 다양한 형태의 2,4-DAPG를 생산한다고 알려져 있고, 실제 토양 속에도 높은 우점능 때문에 수많은 *Pseudomonas* sp.가 존재한다. 따라서, 2,4-DAPG를 생산하는 고추역병 방제용 길항미생물인 *P. fluorescens* 2112의 정확한 모니터링

을 위하여 *P. fluorescens* 2112가 생산하는 2,4-DAPG의 *phlD* gene을 *Hae*III, *Msp*I, *Taq*I을 사용하여 RFLP 분석을 통해 토양속의 다른 *Pseudomonas* sp.가 생산하는 2,4-DAPG의 genotype과 비교해보았다. 노지포장의 토양으로부터 회수한 DNA (P)와 *in vitro* culture의 *P. fluorescens* 2112 genomic DNA (P2112)를 2,4-DAPG *phlD* gene primer로 PCR하였고, 여기에서 얻은 PCR product를 3종류의 제한효소 *Hae*III, *Msp*I, *Taq*I로 RFPL 분석하였다. 그 결과 노지포장의 토양으로부터 회수한 DNA (P)와 *in vitro* culture의 *P. fluorescens* 2112 genomic DNA (P2112)의 제한효소 fragment 양은 DAPG 생산균주 중 genotype C로 정확하게 일치하는 양상을 보였다(Fig. 4.13).

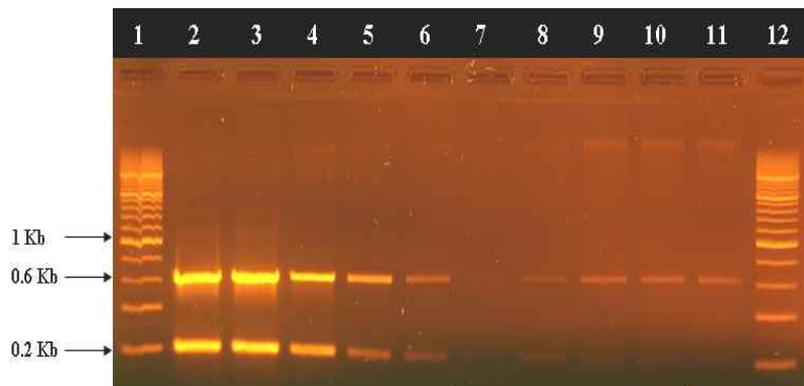


Fig. 4.12. Individual monitoring of the two genes of *P. fluorescens* 2112 in the 3 strains co-inoculated field soil for 50 days.

lane 1, 200 bp DNA ladder; lane 2, 2 gene of *P. fluorescens* 2112 genomic DNA; lane 3; 0 day; lane 4, 10 days; lane 5, 20 days; lane 6, 30 days; lane 7, 40 days; lane 8, 50 days; lane 9, consortium No.11 treated field soil; lane 10, *P. polymyxa* AC1 treated field soil (40 days); lane 11, water treated field soil (40 days); lane 12, 200 bp DNA ladder.

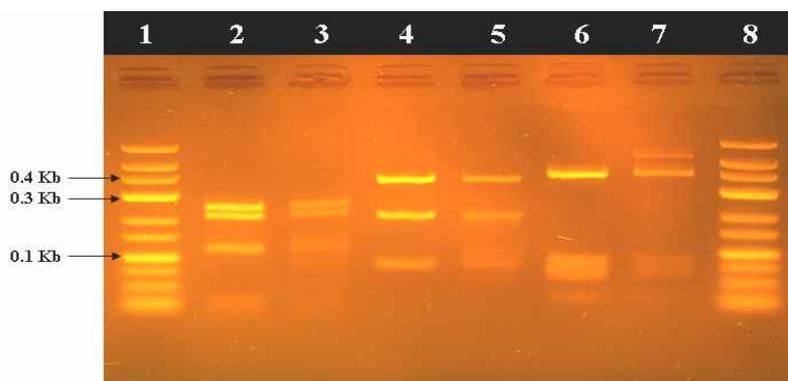


Fig. 4.13. RFLP confirmation of amplified 2,4-DAPG gene of *P. fluorescens* 2112 cell and its DNA in the inoculated soil.

Lane 1, Low range DNA ladder; Lane 2, P2112/*Hae*III; Lane 3, P/*Hae*III; Lane 4, P2112/*Msp*I; Lane 5, P/*Msp*I; Lane 6, P2112/*Taq*I; Lane 7, P/*Taq*I; Lane 8, Low range DNA ladder. P2112, 2,4-DAPG gene of *P. fluorescens* 2112; P, 2,4-DAPG gene of the consortium No.11 and *P. fluorescens* 2112 treated field soil.

### (3) 이병 경작지 현장토양내 고추역병균 *P. capsici*의 밀도 감소 모니터링

상기실험을 통하여 최적컨소시엄 No.11과 컨소시엄 No.11에 *P. fluorescens* 2112를 추가하여 최종컨소시엄으로 조성한 미생물제제에 의하여 실제 고추역병 발생포장으로부터 고추역병이 방제된다는 것을 확인하였다. 또, 고추역병 방제용 길항미생물 조합인 컨소시엄 No.11의 균주들과 *P. fluorescens* 2112를 현장내 토양으로부터 multiplex PCR을 사용하여 유전학적으로 그 우점정도를 추적 모니터링 할 수 있었다. 컨소시엄 길항미생물인 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11 균주는 20일까지, *P. fluorescens* 2112 균주는 30일까지 각 균주별 특이 유전자들이 증폭된다는 것은 이미 고추근권에 우점하고 있다는 것을 의미한다. 이것은 *B. subtilis* AH18, *B. licheniformis* K11과 *P. fluorescens* 2112의 고추근권 우점에 의하여 고추역병균인 *P. capsici*의 생육이 저해 또는 감소되었다고 예상할 수 있었다.

따라서 본 실험에서는 고추역병균인 *P. capsici*의 특이 고유유전자 primer를 이용하여 역병발생포장 토양으로부터 *P. capsici*를 모니터링 해보았다. 그 결과 Fig. 4.14에서 보는 것처럼 컨소시엄 No.11의 처리구에서는 미생물제제 투입 후 10일에 band를 보이지 않았고, 이후에는 0일 즉 미생물제제 투입 전보다는 확연하게 약한 band 양상을 50일까지 일정하게 보였다. 또, 컨소시엄 No.11에 *P. fluorescens* 2112균주를 추가한 처리구에서는 10일과 20일에서는 *P. capsici*의 특이 band가 나타나지 않았으며, 30일째 부터는 약하게 band가 나타났다(Fig. 4.15). 그리고, 상업용 미생물농약 처리구에서는 10일 이후부터 약해진 band를 50일까지 확인할 수 있었고(Fig. 4.16), 무처리구에서는 0일부터 일정하게 매우 강한 band 양상을 볼 수 있었다(Fig. 4.17). 이와 같은 결과는 고추역병 방제용 길항미생물 컨소시엄 No.11과 *P. fluorescens* 2112균주가 고추역병균인 *P. capsici*의 생육을 실제 경작지 토양내에서 저해 또는 감소시켰다는 것을 간접적으로 보여주는 것이다. 또한, *P. capsici*의 band 진하기와 양상을 볼 때 미생물제제인 G사의 T제품에 비하여 컨소시엄 No.11과 *P. fluorescens* 2112균주가 조금 더 고추역병 방제에 효과적일 것이라 추측된다.

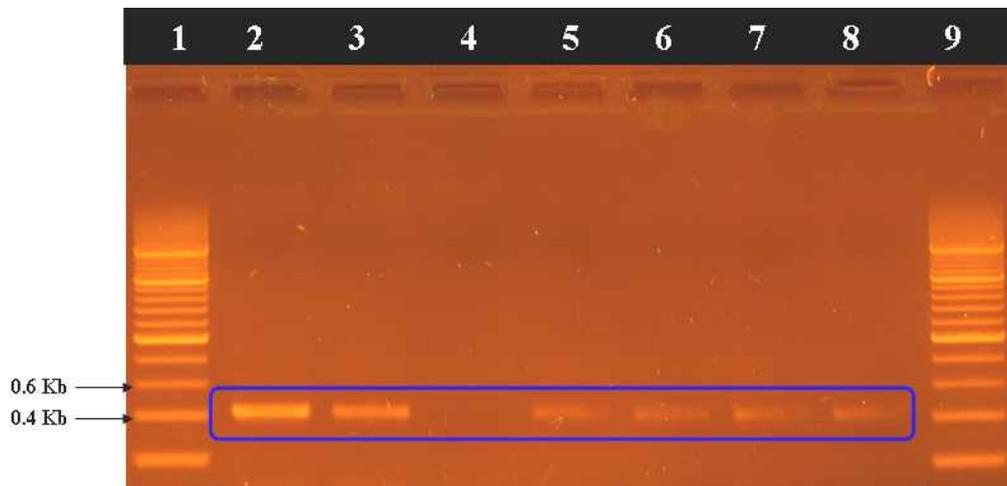


Fig. 4.14. Monitoring of pathogen *P. capsici* in two *Bacillus* sp.-inoculated field soil for 50 days.

Lane 1, 200 bp DNA ladder; Lane 2, gene of *P. capsici* genomic DNA; lane 3; 0 day; lane 4, 10 days; lane 5, 20 days; lane 6, 30 days; lane 7, 40 days; lane 8, 50 days; lane 9, 200 bp DNA ladder.

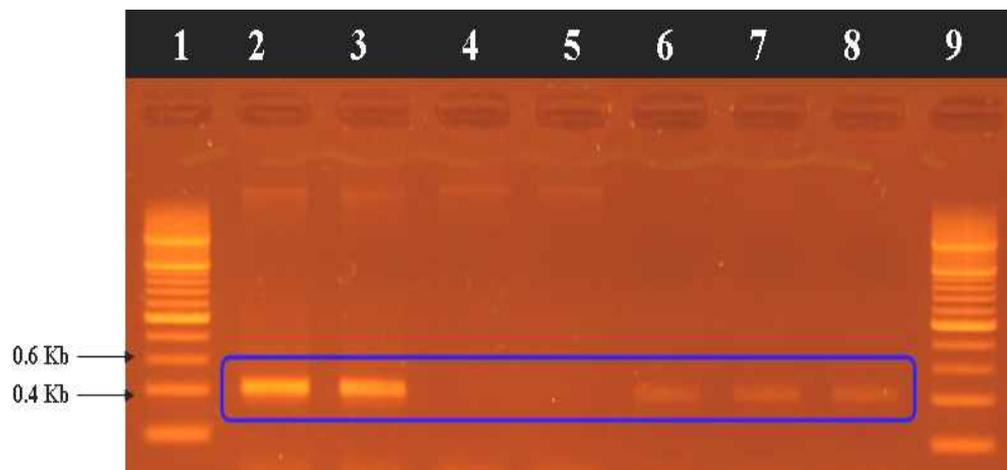


Fig. 4.15. Monitoring of pathogen *P. capsici* in two *Bacillus* sp. and a *Pseudomonas* sp.-inoculated field soil for 50 days.

Lane 1, 200 bp DNA ladder; Lane 2, gene of *P. capsici* genomic DNA; lane 3; 0 day; lane 4, 10 days; lane 5, 20 days; lane 6, 30 days; lane 7, 40 days; lane 8, 50 days; lane 9, 200 bp DNA ladder.

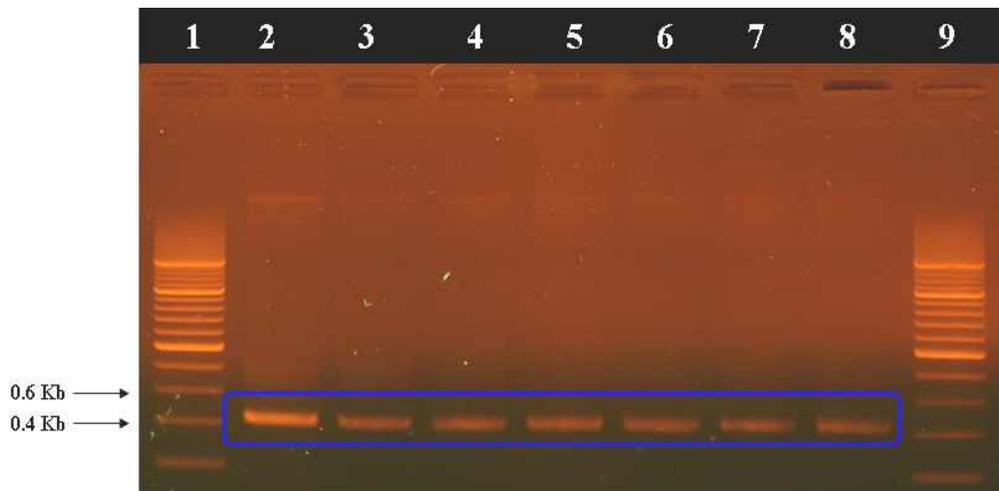


Fig. 4.16. Monitoring of pathogen *P. capsici* in the commercial biofungicide-untreated field soil for 50 days.

Lane 1, 200 bp DNA ladder; Lane 2, gene of *P. capsici* genomic DNA; lane 3; 0 day; lane 4, 10 days; lane 5, 20 days; lane 6, 30 days; lane 7, 40 days; lane 8, 50 days; lane 9, 200 bp DNA ladder.

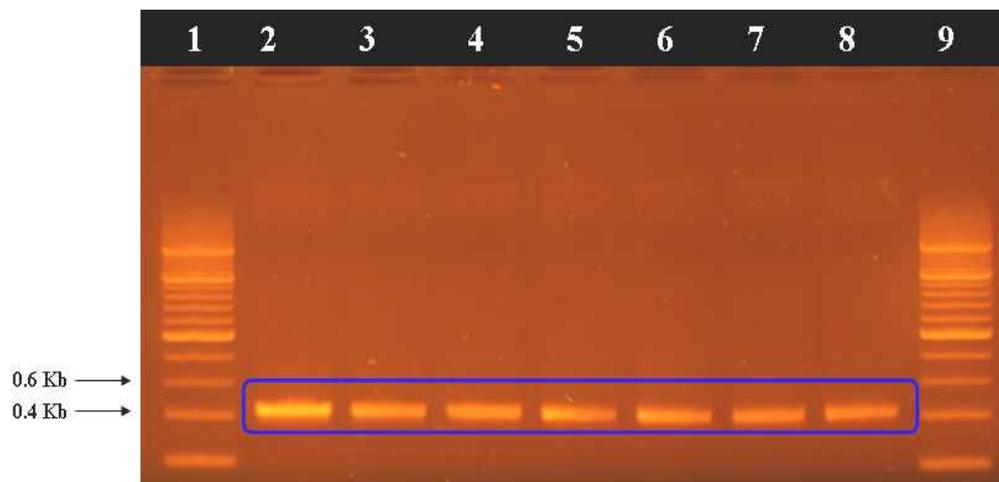


Fig. 4.17. Monitoring of pathogen *P. capsici* in the PGPR-untreated field soil for 50 days.

Lane 1, 200 bp DNA ladder; Lane 2, gene of *P. capsici* genomic DNA; lane 3; 0 day; lane 4, 10 days; lane 5, 20 days; lane 6, 30 days; lane 7, 40 days; lane 8, 50 days; lane 9, 200 bp DNA ladder.

다. 미생물체제가 토양미생물상에 미치는 영향

인지질 지방산을 이용한 토양 미생물 군락의 분석법은 전체 지방산의 수를 이용한 다양성 지수뿐만 아니라 주요 미생물 그룹의 존재 유무를 알려주기 때문에 미생물 군락의 구조를 연구하는데 매우 효과적인 방법으로 알려져 있다[Bossio 등, 1998]. 전체 미생물 군락의 차이를 조사하기 위하여 32개의 각 인지질 지방산을 다변량 분석법의 하나인 주요인 분석으로 분석한 결과 처리간 차이가 발견되었다(Fig. 4.18). 주요 요인 분석으로 얻어지는 그래프 상의 새로운 축인 PC1이 전체 변이의 46.7%를 설명하였고, PC2가 28.5%, PC3가 20.3%를 각각 설명하였다. 가장 큰 변이를 설명하는 PC1은 처리간 차이를 보이지 않았고, PC2와 PC3에 대하여 *B. subtilis* AH18 처리구가 무처리 대조구로부터 확연히 구분되었다.

따라서 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11의 전체 토양 미생물상에 미치는 영향은 *B. subtilis* AH18을 단용 처리 했을 때만 관찰되었고, *B. licheniformis* K11의 처리나 두 미생물 동시처리에서는 관찰되지 않았다.

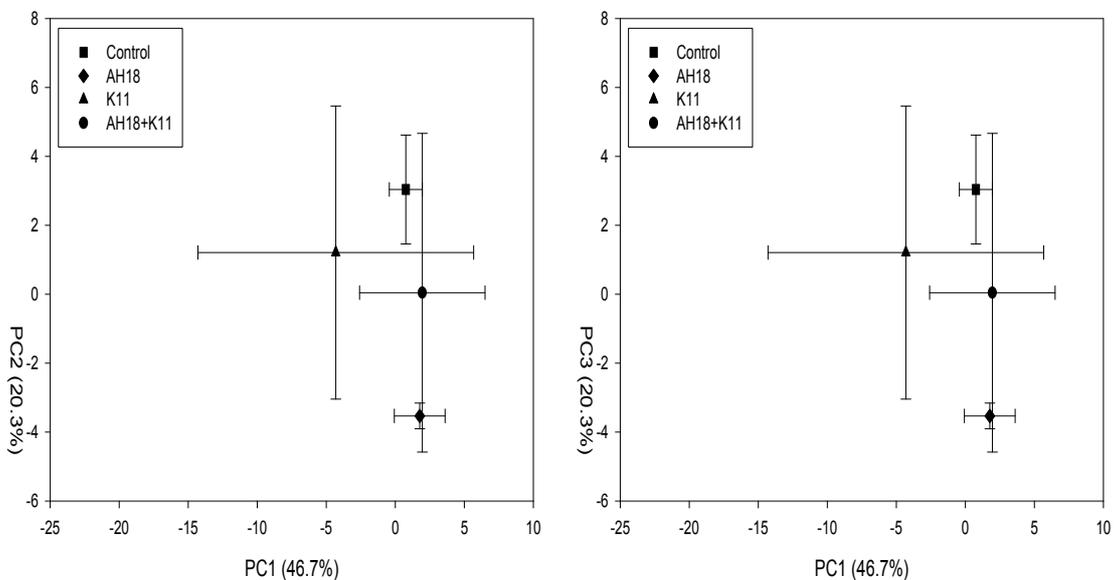


Fig. 4.18. Plots of sample scores extracted by the principal components on the PLFA. PC indicates a principle component.

생물적 지표인 지방산을 이용하여 미생물 군락을 세균, 곰팡이, 방선균, 근균으로 나누어 항생균의 처리에 따른 토양의 미생물상 차이를 분석하였다. 또한 곰팡이/세균 지방산, 그람음성세균/ 그람양성 세균 지방산, 혐기성균/호기성균 비율, cy19:0/18:1ω7c 지방산, 단불포화지방산/포화지방산, cyclopropyl fatty acids의 비율 등도 분석하여 토양미생물 군락의 상태를 조사하였다. 세균의 비율은 30.7%인 *B. subtilis* AH18 처리구에서 34.4%인 대조구와 36.1%인 *B. licheniformis* K11 처리구에서 보다 유의성 있게 적었고, 이들 컨소시엄 길항미생물 혼합 처리구와는 유의성있는 차이가 없었다. *B. licheniformis* K11 처리구와 혼합 처리구에서는 무처리

대조구와 차이가 없었다. 곰팡이 비율은 7.7 - 9.5%로서 처리간 유의성있는 차이가 없었지만 두 칸소시엄 길항미생물의 동시 처리구에서 가장 높았다. 방선균은 대조구에서 6.3%로서 7.1 - 7.5%인 다른 처리구 보다 유의성있게 적어서 이들 칸소시엄 길항미생물들이 토양의 방선균 밀도를 증가시켰다(Fig. 4.19). 균근을 내생균근과 외생균근으로 나누어 관찰한 결과 대조구에서 2.1%와 3.0%로서 가장 적었고, 두 미생물을 각각 나누어 처리한 경우에는 대조구 보다 약간 증가했지만 유의성있는 차이는 없었다. 그리고 두 미생물 동시 처리구에서는 가장 많은 4.9%와 4.6%이었지만 변이가 심해서 다른 처리구와 유의성있는 차이를 보여주지 못했다(Fig. 4.20).

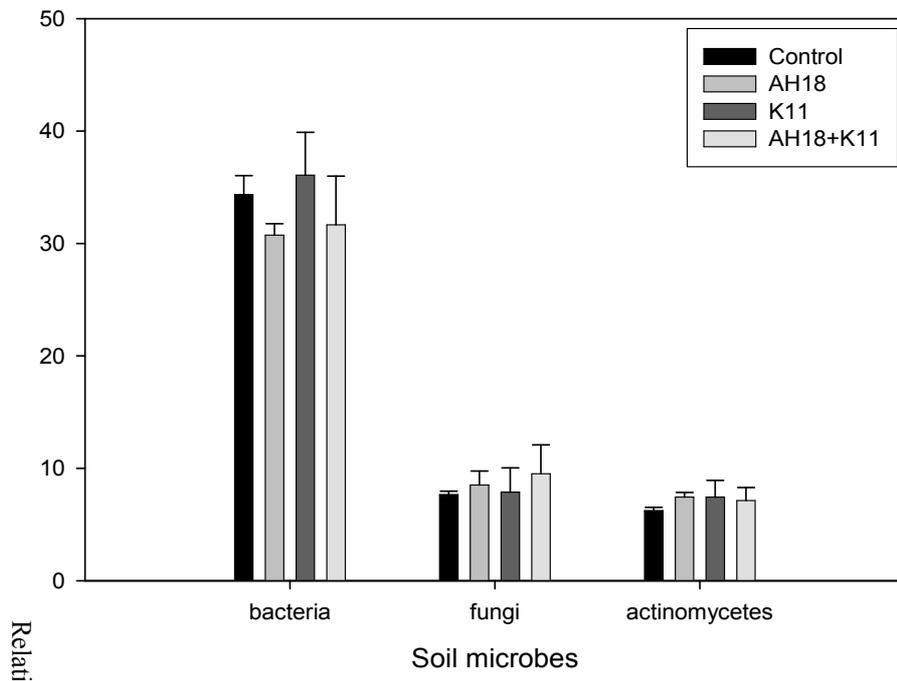


Fig. 4.19. Relative abundance of bacteria, fungi, and actinomycetes by the analysis of phospholipid fatty acids in the soils inoculated with antifungal bacteria *B. subtilis* AH18, *B. licheniformis* K11, and mixture of AH18 and K11.

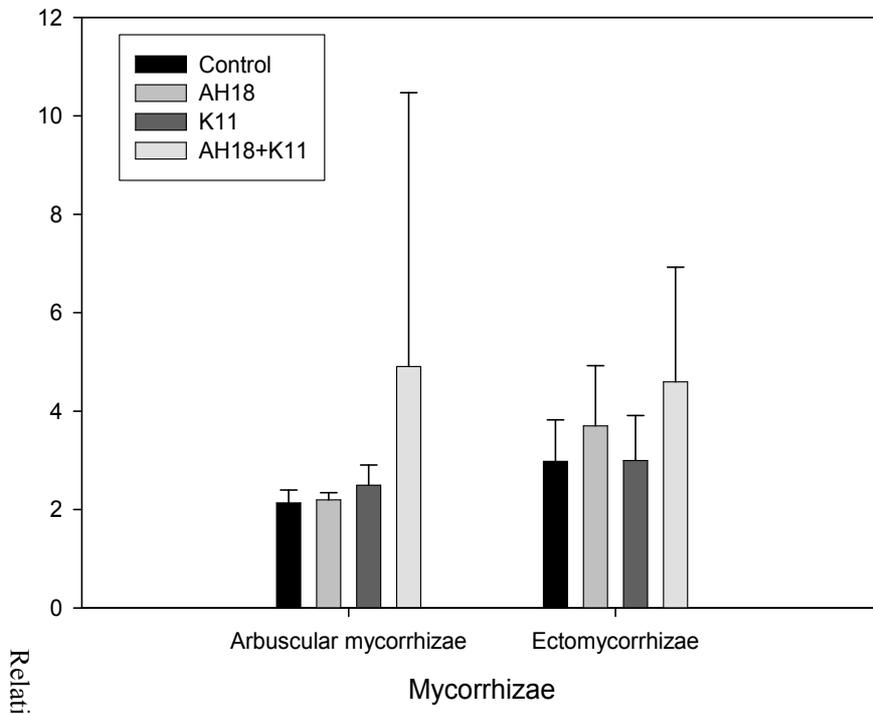


Fig. 4.20. Relative abundance of mycorrhizae by the analysis of phospholipid fatty acids in the soils inoculated with antifungal bacteria *B. subtilis* AH18, *B. licheniformis* K11, and mixture of AH18 and K11.

한편 주요 생물학 지표 중에서 토양 유기물 함량의 지표가 되는 곰팡이/세균의 비율은 (Bardgett 등, 1996; Frostegard and Baath, 1996) *B. subtilis* AH18 처리구에서 0.28로서 0.22인 대조구 보다 높았다. 탄소 영양원이 적은 조건에서 탄소 영양원이 풍부한 조건(Borga 등, 1994; Yao 등, 2000) 으로 이동의 지표가 될 수 있는 그람음성균/그람양성균 비율은 대조구에서 가장 높은 1.16이었고, *B. subtilis* AH18 처리구에서 0.73 유의성 있게 낮아서 이 균의 밀도 증가는 토양 탄소원 이용을 증가시킨 것으로 보였다. 혐기성균/호기성균의 비율은 *B. subtilis* AH18 처리구가 0.68로서 0.30인 대조구 대조구보다 유의성 있게 증가하였다. *B. subtilis* AH18 처리구에서 낮은 그람음성균/그람양성균 비율과 높은 혐기성균/호기성균 비율은 이 균의 처리가 토양 미생물 활성 증가에 효과적임을 보여주고 있다(Fig. 4.21). 또 다른 토양 미생물 지표로서 불량환경 적응성을 의미하는 cy19:0/18:1 $\omega$ 7c 지방산 비율과 단불포화지방산/포화지방산 비율도 0.38과 1.13인 대조구에 비하여 0.69와 1.90인 *B. subtilis* AH18 처리구가 유의성 있게 증가하였다(Fig. 4.22).

따라서 전체 토양 미생물상에 미치는 효과뿐 만 아니라 개별적인 미생물 구성에 있어서도 *B. subtilis* AH18의 단용 처리가 토양미생물상에 가장 큰 영향을 미쳤다.

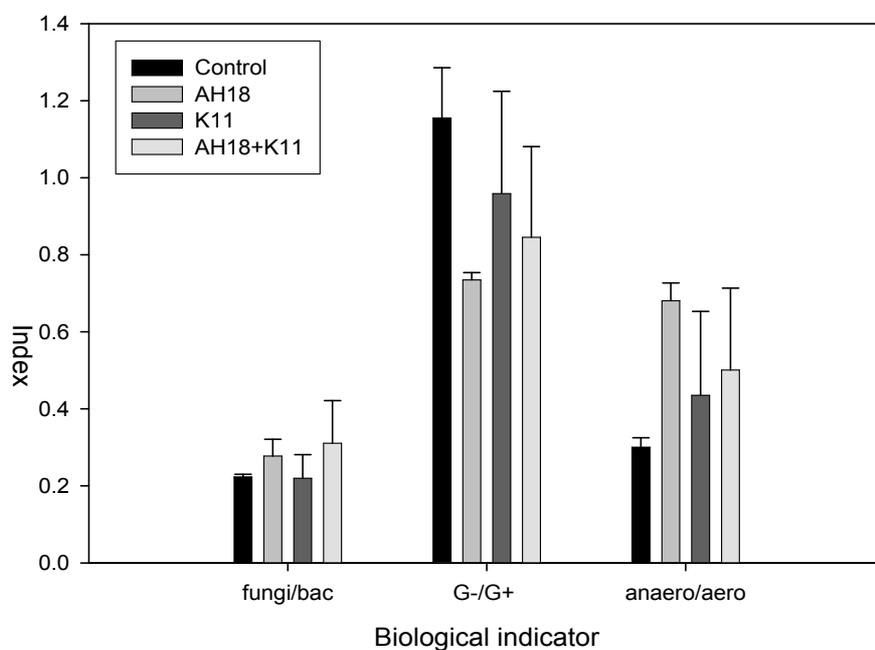


Fig. 4.21. Indices of biological indicators by the analysis of phospholipid fatty acids in the soils inoculated with antifungal bacteria *B. subtilis* AH18, *B. licheniformis* K11, and mixture of AH18 and K11.

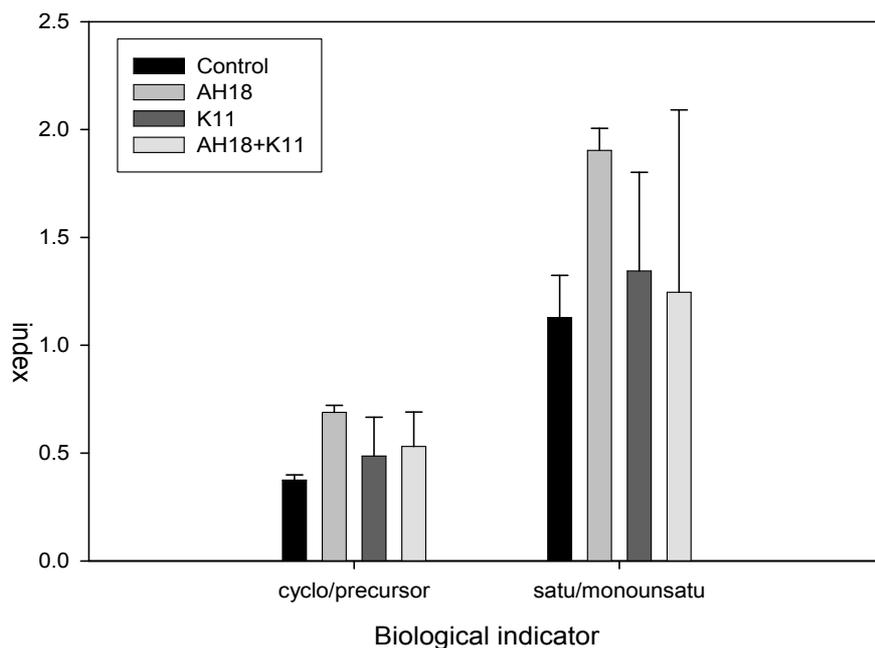


Fig. 4.22. Biological indicators by the analysis of phospholipid fatty acids in the soils inoculated with antifungal bacteria *B. subtilis* AH18, *B. licheniformis* K11, and mixture of AH18 and K11.

지방산 분석을 토양 미생물상 분석에서 *B. subtilis* AH18의 단일처리는 미생물을 처리하지 않은 대조구에 비하여 토양 미생물상을 뚜렷이 바꾸었지만, *B. subtilis* AH18이 *B. licheniformis* K11과 혼용되었을 때는 토양 미생물상 변화에 미치는 영향이 적었다. 따라서 이들 두 미생물의 복합처리가 단일 처리 보다 고추 역병 억제에 효과적인 연구 결과와 비교하면, 이들 미생물 조합은 토양 미생물상을 크게 변화시키지 않으면서 역병을 억제하는 즉, 토양 미생물 생태에 친화적인 생물학적 방제 방법이 될 수 있음을 보여주었다.

#### 4. 고찰

현재 생물농약으로 많이 사용 또는 유통되는 미생물제제는 그 특성상 살아있는 생물체형태인 미생물이다. 이러한 특성을 살펴볼 때 실제 농가에 미생물제제의 사용 후 이들 미생물들의 토양내 생태를 조사하는 것은 반드시 이루어야 할 항목이다. 하지만, 현재 미생물제제를 사용하는 농가가 포장내의 생태학적인 추적을 하는 경우는 연구단계에서 일부 이루어지는 것을 제외하고는 극히 제한적이다. 더구나 작물에 병을 일으키는 병원균에 대한 현장내 모니터링은 전무한 상태이어서, 시용된 미생물제제의 효과를 제대로 검증하는 것은 사실상 불가능한 상태이다. 따라서 본 연구에서는 고추역병 방제용 미생물제제로 개발된 다기능 PGPR균주를 multiplex PCR 모니터링법으로 pot 토양과 포장내 *in situ* 모니터링을 실시하여 경작지내 투입된 본 연구에서 개발된 미생물제제의 동태를 추적 모니터링 할 수 있었다. 그리하여 실제 노지 포장에서 길항미생물제제로 투입한 *P. fluorescens* 2112가 두 *Bacillus* sp.보다 경작지 토양내 장기간 존재함을 알 수 있었고, 이것은 *P. fluorescens* 2112가 생산하는 항생물질 2,4-DAPG의 *phlD* gene의 primer 제작하여 PCR과 RFPL 방법에 의하여 정확하게 증명하였다. 또한, *B. licheniformis* K11과 *B. subtilis* K11의 모니터링에서는 기존 우 등(2007)의 연구에서 일반 비멸균토양을 사용한 포트 토양내 모니터링이 3주까지 확립되었던 것을, 본 연구에서는 두 균주 모두 4주 이상 모니터링 할 수 있는 감도 높은 기술이 개발되었다.

또, 안동시 서후면 일대의 고추역병 발생포장에서 실시한 *In situ* 모니터링에서 두 *Bacillus* 균주는 20일까지, *P. fluorescens* 2112 균주의 경우 30일까지 모니터링 할 수 있었고, 이와 같은 결과는 실제 토양내에 처리된 PGPR 균주가 30일까지는 매우 우수하게 우점함을 보여주는 것이다. 한편, 투입 후 30일 이후부터는 PGPR 균주들의 우점능이 떨어질 수 있다는 것과 실제로는 PGPR균주들이 30일 이상 우점할 수 있지만, 모니터링에서 감지할 수 없는 낮은 농도로 존재할 수 있다는 것으로 예상할 수 있다.

고추역병균인 *P. capsici*의 *in situ* 모니터링에서는 PGPR균주 컨소시엄 미생물 방제제의 처리 후 완전하게 감소하는 양상을 나타내다가 20일 혹은 30일째에 다시 병원균이 증가하는 양상을 나타내었다. 따라서 다기능 PGPR 균주의 컨소시엄 미생물 방제제는 현장토양 내에서 투입 후 20일 이후에도 고추근권에 우점하고 있으나, 기술적으로 multiplex PCR 방법이 감도가 낮을 수 있다고 추측된다. 하지만, 컨소시엄 길항미생물들이 투입 후 20일까지는 매우 높은 농도로 고추 근권에 우점하고 있다는 것이므로 추후 컨소시엄 미생물방제제를 재투입하는 시기를 판단할 수 있는 지표로 사용할 수 있을 것이다. 통상적으로 고추재배 농가에서 노지 또는 시설에 고추묘를 이식한 후 한 달(30일) 간격으로 약 4회에 걸쳐 고추역병 방제를 위한 화학농약을 살포하는 것으로 볼 때 본 연구에서 개발된 고추역병 방제용 길항미생물 컨소시엄도 약 20-30일 사이에 추가 재투입하는 것이 컨소시엄 길항미생물의 고추근권 우점화와 고추역병 방제에 더 효과적일 수 있다고 생각한다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 목표달성도

#### 1. 1차년도 목표달성도

연구목표	연구개발 내용	달성도 (%)
기 확보된 10여종의 길항미생물중 주요 기작별 컨소시엄 구성	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 개별균주의 주요 기작별 상호보완형 컨소시엄 구성</li> <li>- 구성된 컨소시엄의 <i>in vivo</i> 역병 방제력 및 고추 성장 촉진능 측정.</li> <li>- 주요 기작별 다양한 컨소시엄 구성 : 후보군(11군)의 컨소시엄 조합과 최적 컨소시엄군 결정.</li> <li>- 구성된 후보 컨소시엄의 <i>in vivo</i> pot 실험을 통한 성장촉진능 및 역병방제능 조사.</li> <li>- 일반토양에서의 방제력 검증 : 최종 구성된 최적 컨소시엄의 실내 경작지토양실험을 통한 성장촉진능 및 역병방제능 검증.</li> </ul>	100
길항미생물의 상호 비경쟁적 상리공생 증식여부 조사	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 조합 및 배양방법에 따른 균체 증식여부 조사 : 단독 배양 및 혼합배양에 의한 상리공생여부 검증.</li> <li>- 역병 방제력 및 성장촉진능 검증 : 단독배양 후 혼용 및 동시배양을 통하여 <i>in vivo</i> pot 실험을 통한 검증.</li> </ul>	100
토양내 길항미생물의 모니터링 조건 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 최적컨소시엄으로 구성된 개별 길항미생물의 특이유전자를 multiplex PCR 및 Real Time PCR을 통해 추적, 모니터링 할 수 있는 조건 확립.</li> <li>- 개별 균주의 단일 PCR, multiplex PCR, Real Time PCR을 통한 컨소시엄 구성균주의 특이 유전자의 모니터링.</li> <li>- 컨소시엄 균주의 모니터링 및 경시변화 추적(5주).</li> </ul>	(차기년도 연구 조기착수)
공장형 대량배양 조건 확립 및 제제화 조건 조사	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 대량배양용 탄소원, 질소원의 종류 및 농도 결정.</li> <li>- 열스트레스 내생포자유도 최적 조건 및 제제화조건 확립.</li> <li>- 컨소시엄 구성된 개별균주별 상업용 대량 배양시 탄소원, 질소원의 종류와 농도 결정.</li> <li>- 대용량배양용 Fermentor 발효조건 확립.</li> </ul>	(최종년도 연구 조기착수)
확립미생물방제제의 토양내 효과 발현 증대방법 및 토양 미생물상에 미치는 영향 규명	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 미생물제제의 고추역병 억제효과 및 토양미생물상에 미치는 효과를 규명하기 위해서 온실내의 토양에서 효과 검증.</li> <li>- 컨소시엄 길항미생물을 경작지토양에 접종하여 활착하기를 기다린 다음 고추역병 포자를 접종하고 충분히 관수하면서 역병 발병 진전도를 관찰하였고, 토양 미생물상은 길항 미생물 접종 후 인지질 지방산을 분석하여 토양 미생물상을 관찰함.</li> </ul>	100

## 2. 2차년도 목표달성도

연구목표	연구개발 내용	달성도 (%)
<p>최적 컨소시엄균주의 포자유도 조건 및 제제화 방법</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 최적 컨소시엄균주들의 제제화를 위하여 무기담체사용 제제화법과 액상 제제화법 확립.</li> <li>- 무기담체 제제화 연구에서 무기담체의 종류 및 pH에 따른 60일간의 경시변화 추적.</li> <li>- 공장형 대량배양용 부재료의 종류에 따른 액상 제제의 경시변화추적을 통해 가열안정성시험(54℃)과 저온 안정성 시험(0℃)실시. 농진청 미생물농약 약효보증기간 3년 설정가능.</li> <li>- 최적 컨소시엄균주들의 온도, CaCl<sub>2</sub> 함량, dipicolonic acid 함량 조사를 통해 안정한 내생포자 유도 조건을 확립.</li> </ul>	100
<p>고추경작지 현장포장 토양내 길항미생물 컨소시엄의 모니터링</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Multiplex PCR을 사용하여 컨소시엄균주인 <i>B. subtilis</i> AH18과 <i>B. licheniformis</i> K11의 3중 특이 유전자를 이용하여 노지포장의 토양으로부터 20일까지 고추근권에 우점하고 있음을 확인.</li> <li>- 또다른 고추역병 방제용 길항미생물인 <i>P. fluorescens</i> 2112의 2중 특이 유전자를 이용하여 multiplex PCR법과 RFLP법을 통해 노지포장으로부터 30일까지 고추근권에 우점함을 확인.</li> <li>- 고추역병 발병포장에서 컨소시엄 길항미생물제제의 투입으로 인한 고추역병균인 <i>P. capsici</i>의 감소 및 억제양상을 특이 유전자를 이용하여 50일까지 모니터링 함. 컨소시엄균주들에 의한 고추역병균의 DNA 감소양상 확인.</li> </ul>	100
<p>노지포장에서 컨소시엄 길항미생물의 고추역병 방제능 검증</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 2종의 <i>B. subtilis</i> AH18과 <i>B. licheniformis</i> K11균주로 구성된 최적 컨소시엄과 2,4-DAPG 항생물질 생산성 <i>P. fluorescens</i> 2112균주를 포함하는 추가 컨소시엄을 고추역병 발병 노지포장에서 기존미생물제제 (<i>Paenibacillus poylyxa</i> AC1)와 고추역병 방제능 비교 및 검증 : 기존 미생물제제보다 더 우수한 고추역병 방제능을 보임.</li> </ul>	100
<p>노지포장에서 컨소시엄 길항미생물제제의 고추생장촉진효과 검증</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 노지 포장에서 고추역병의 비발생으로 노지 고추의 생장촉진효과를 화학농약, 기존 미생물제제, 컨소시엄 미생물제제와 비교분석하고 컨소시엄 미생물제제의 고추생장촉진효과를 검증 : 컨소시엄미생물제제의 과실 수량 증대효과 검증.</li> </ul>	100

### 3. 3차년도 목표달성도

연구목표	연구개발 내용	달성도 (%)
<p>친환경 고추재배 농가용 생물농약을 위한 최적 컨소시엄구성 및 농가포장 시험결과에 따른 조정</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 영양고추시험장의 시험포 2곳(역병 비저항성 품종)과 예천군농업기술센터의 고추농가 경작지 3곳(역병 다발생 연작지)에서 <i>B. subtilis</i> AH18, <i>B. licheniformis</i> K11, <i>P. fluorescens</i> 2112로 구성된 컨소시엄 미생물제제를 적용한 결과 고추생장촉진능이 무처리구에 비하여 20%이상, 농진청 개발 탐시드 제제에 비하여 10%이상, 타 친환경농법(아인산염)에 비하여 15%이상 우수함을 검증함.</li> <li>- 육묘상태의 고추묘에 컨소시엄 미생물제제 처리시 전 열가온 및 냉상 모두에서 엽색의 농도가 짙어지고, 잎의 수 증가, 주경장의 굵기 증가가 무처리 대조구, 기존 농약 및 기존 미생물제제에 비하여 10% 이상 우수함을 검증함.</li> </ul>	100
<p>농가포장실험에 의한 고추역병 억제용 미생물농약의 효과확립 및 대상 작물 확대 시험</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 시설고추, 토마토, 참외, 싹배추와 멜론을 대상으로 본 연구에서 개발된 컨소시엄 미생물제제를 처리하여 본 결과 생장촉진능에서 참여기업인 (주)대유에서 현재 시판되고 있는 B제품의 미생물제제와 동등하거나 좀 더 우수한 효과가 있음을 검증함.</li> <li>- 대상작물 모두에서 약해는 없는 것으로 판정됨.</li> </ul>	100
<p>맞춤형 컨소시엄 미생물제제의 상용화 방법확립</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>B. subtilis</i> AH18과 <i>B. licheniformis</i> K11 균주의 열 스트레스 내생포자를 이용한 상업용 액제 및 분제 개발방법 확립</li> <li>- <i>P. fluorescens</i> 2112의 경우 담체를 이용한 분말제제화 방법 개발 및 경시변화 시험</li> <li>- 3종의 다기능 PGPR균주 모두 농진청 생물농약 등록 기준 경시변화 시험에서 3년 이상의 약효보증 설정 가능(<math>10^8</math> CFU/ml 이상의 유효균수 보증)</li> <li>- 상업용 시제품제조 및 판매단가 설정</li> </ul>	100

## 제 2 절 관련분야에의 기여도

○ 현재 연구되거나 상품화 되고 있는 미생물제제(친환경 농자재 및 생물농약)는 하나 또는 두 개의 미생물 균주를 이용한 것이 대부분이고 소수의 3균주 이상 복합적인 미생물균주를 사용한 제제라 할지라도 이들 사용 미생물균주간의 공생, 경쟁 등의 상호관계에 대한 연구가 전무한 실정이어서 정확하고 지속적인 효능을 검증하는 것이 사실상 힘들었다. 이런 점들은 미생물제제가 광범위한 현장에의 적용 및 재현능을 방해하는 요소와 원인으로 지적될 수 있다.

본 연구에서 개발된 고추역병방제 및 생장촉진용 맞춤형 컨소시엄 미생물제제는 3종의 다기능 PGPR 균주로 구성되어 있으며, 각 균주들간의 상리공생관계 검증과 실제 농가포장에서의 재현성이 입증된 것이다. 또한, 개발된 분제 및 액제가 농진청 미생물농약 등록기준에 의거한 경시변화 시험을 통해  $10^8$  CFU/ml의 매우 높은 농도로 3년의 약효보존 설정이 가능하다. 따라서 본 연구의 맞춤형 컨소시엄 미생물제제는 실제 농가에서 병 방제를 포함하여 작물생육 촉진, 토양개량 등의 다양한 기능을 가지는 다기능 약제를 원하고 있는 현실과 현장 재현성의 애로점에 비추어 볼 때 가장 현실적이고 체계적인 고추의 무농약 재배를 위한 다기능의 친환경 농업용 맞춤형 컨소시엄 미생물제제의 개발인 것이다.

○ 따라서, 국내 채소 작물 중 재배 면적이 가장 넓고 우리나라 제2의 경제 작물인 고추 전용의 친환경 농자재(미생물농약)로서의 재현성 있는 맞춤형 친환경 길항미생물 컨소시엄의 개발로 농비절약, 고추 생산물의 부가가치 향상, 수입 농약의 대체 등을 통하여 농가와 관련 산업의 경제적 부가가치를 향상시키고, 화학농약 사용 경감으로 환경을 보전하며, 농산물의 품질 향상으로 한미 FTA 성사 후 우리나라 농업에 막대한 피해를 입힐 수 있는 외국 농산물에 대한 차별화를 위한 밑거름이 될 수 있다.

○ 또한 참외, 배추, 상추 등의 확대실험결과에서 볼 수 있듯이 고추 이외도 역병이나 탄저병이 주된 병으로 인한 피해가 큰 수박, 참외, 포도 등의 작물에서도 동일한 효과를 기대할 수 있고, 경북지역에 국한 된 것이 아니라 다른 지역의 고추 재배지에서도 상당한 효과를 거둘 수 있으리라 기대된다.

○ 마지막으로 현재 참여기업으로 있는 (주)대유에 기술이전을 통하여 상업화가 되면 고추 재배농가에서는 적은 비용으로 역병을 방제하여 품질 좋은 친환경농산물 고추를 소비자인 국민에게 공급할 수 있을 뿐만 아니라 (주)대유 등 친환경농자재 생산회사에서 우수한 미생물제제의 생물농약을 생산, 시판하여 기업이윤을 극대화함은 물론 기존 미생물제제나 화학농약을 대체하는 현장적용성 높은 친환경적 미생물 제제를 시장화 할 수 있는 기초가 될 것이다.

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용계획

### 1. 연구개발 성과

#### 가. 특허 (출원 1건, 등록 1건)

- (1) 고추역병 방제 및 고추생육촉진용 길항미생물 조합 조성물 (출원번호 10-2009-026109)
- (2) 제올라이트를 이용한 바실러스 포자의 열 안정성 향상 방법 (등록번호 10-0931948)  
(바이오그린21사업과 공동실적)

#### 나. 논문 (총 7건; SCI급 3건, 학술등재 2건, 투고준비 중 2건)

- (1) Biocontrol of phytophthora blight caused by *Pytophthora capsici* using *Bacillus subtilis* AH18 and *B. licheniformis* K11 formulations in red-pepper farming. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. (10월 게재).
- (2) Powder formulation using heat resistant endospores of two multi-functional PGPR *Bacillus* strains having phytophthora blight suppression and growth promoting functions. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. (8월 게재).
- (3) Jong-Hui Lim and Sang-Dal Kim (2009) Synergistic plant growth promotion by the indigenous auxins-producing PGPR *Bacillus subtilis* AH18 and *Bacillus licheniformis* K11. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 52(5), 531-538.
- (4) 박기춘, 임중희, 김상달, 이영근 (2009) 고추역병 길항미생물 *Bacillus subtilis* AH18과 *Bacillus licheniformis* K11의 토양미생물 생태에 미치는 영향. 한국응용생명화학회지 52(3), 121-125.
- (5) 임중희, 정희영, 김상달 (2009) 다기능 PGPR균주들의 기작별 상호보완형 컨소시엄 구성을 통한 고추역병 방제 및 고추생장촉진. 한국응용생명화학회지. 52(3), 116-120.
- (6) Genetic monitoring of multi-functional PGPRs and *Phytophthora capsici* in pepper farming field. J. Microbial. Biotechnol. (투고준비 중).
- (7) Drought stress resistance induction by multi-funtional PGPR *Bacillus licheniformis* K11. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. (투고준비 중).

#### 다. 국제학술대회 발표 (7건)

- (1) Jong-Hui Lim and Sang-Dal Kim (2007) Drought stress reduction by plant growth promoting rhizobacterium *Bacillus licheniformis* K11 producing auxin and ACC deaminase. 2007 International Symposium & Annual Meeting of the Korean Society for Microbiology and Biotechnology.
- (2) Sang-Min Woo and Sang-Dal Kim (2007) Genetic monitoring of antagonistic bacterium *Bacillus subtuilis* AH18 using multiplex PCR in field natural soil, and

purification of catechol-siderophore produced by the strain. 2007 International Symposium & Annual Meeting of the Korean Society for Microbiology and Biotechnology.

- (3) Jong-Hui Lim and Sang-Dal Kim (2007) Biological control and salt-stress by Multi-functional Plant Growth Promoting rhizobacteria(PGPR) *Bacillus subtilis* AH18 and *Bacillus licheniformis* K11. 2008 International Symposium and Annual Meeting of the KSABC.
- (4) Jong-Hui Lim and Sang-Dal Kim (2008) Genetic Monitoring of Multi-funtional PGPR *Bacillus subtilis* AH18 and *Bacillus licheniformis* K11 by Multiplex PCR and Real-time PCR in Field Soil. 2008 International Symposium & Annual Meeting of the Korean Society for Microbiology and Biotechnology.
- (5) Jong-Hui Lim and Sang-Dal Kim (2008) Plant Growth Promoting and Stress-Reduction by the Multi-Functional PGPR *Bacillus licheniformis* K11. Meeting of the International Union of Microbiological Societies 2008.
- (6) Jong-Hui Lim and Sang-Dal Kim (2008) Development of the Microbial Consortium for the Environmental Friendly Agriculture by the Antagonistic Rhizobacteria. 2008 International Symposium and Annual Meeting of the KSABC.
- (7) Jong-Hui Lim and Sang-Dal Kim (2009) Biological control of Phytophthora blight by multi-functional PGPR consortium and its genetic monitoring in field soil. 2008 International Symposium & Annual Meeting of the Korean Society for Microbiology and Biotechnology.

라. 국제세미나 발표 (1건, 8th International PGPR Workshop)

- (1) Drought stress resistance inducing and plant growth promotion by the multi-functional PGPR *Bacillus licheniformis* K11 in pepper plant

마. 교육 및 지도활용

- (1) 친환경농업과 미생물(교재명: 화훼산업의 경쟁력 제고로 돈이되는 화훼농업, 2009, 구미 화훼시험장)
- (2) 토착유용미생물 선발 및 대량배양 방법(교재명: 농촌발전연구소 연구과제 보고회 및 한우교육, 2009, 영천농업기술센터)
- (3) 예천군농업기술센터 (친환경바이오센터) : 길항미생물 배양방법 및 농가보급기술
- (4) 영천군농업기술센터 (환경농업과) : 길항미생물 선발 및 처리기술
- (5) 경북농업기술원 (원예연구과) : 길항미생물 배양 및 현장적용 기술

## 바. 수상실적

- (1) 제20회 과학기술우수논문상 (한국과학기술단체총연합회, 2010년 대한민국 과학기술연차대회)

## 2. 성과활용 계획

- (1) 다기능 PGPR균주들의 기작별 상호보완형컨소시엄 구성을 통한 고추역병 방제 및 고추 성장촉진용 맞춤형 컨소시엄 미생물제제

- 비경쟁의 상호 상리공생관계가 검증된 3종의 다기능 PGPR균주로 구성된 다기작의 기능상 시너지형 컨소시엄미생물제제의 개발로 현장토양에서 병해방제 뿐만 아니라 작물의 성장촉진, 건조/고염 스트레스 저항성 유도, 인산가용화 등의 다양한 효능을 재현성 있게 나타낼 수 있을 것이라 기대된다. 또한, 기존의 2종이상의 균주가 혼합된 복합미생물제제들은 각 균주들간의 상호관계에 대한 연구가 거의 전무한 상태에서 상품으로 출시되어 현장 재현성이 떨어지고 효과의 일관성이 부족한 경우가 대부분인 점을 고려할 때 본 연구개발과제의 맞춤형 컨소시엄 미생물제제는 농가포장과 영양고추시험장의 시험포에서 현장 재현성을 검증하였으므로 상업화 성공 가능성이 매우 클 것이라 생각됨.
- 참여기업 (주) 대유와 기술이전을 통하여 상업용화 할 계획이다.

- (2) 열스트레스 내생포자를 이용한 *Bacillus* 균주 및 zeolite를 이용한 *Pseudomonas* 균주의 안정한 제제화 기술

- *Bacillus* 균주의 내생포자를 이용한 제제화 방법과 *Pseudomonas*의 zeolite를 이용한 제제화 방법은 유효균수  $10^8$  CFU/ml 로 미생물농약등록기준에 의거 3년 약효보증 설정이 가능한 기술로 기존 미생물제제의 유효균수보다 최소 10배에서 최대 1,000 배이상의 고농도 제제화 방법으로 미생물제제의 상업화와 농가의 미생물제제 확대사용에 기대가 크다.
- 제제화 기술에 대한 특허를 출원할 계획이다.

- (3) Multiplex PCR 및 Real Time PCR을 이용한 생물농약용 미생물제제의 고추 재배 현장의 적응능 취약성 및 우점유지능 감소현상의 현장어로점 극복 및 재현성 향상 기술

- 각 균주별 3종 이상의 특이유전자를 이용하는 multiplex PCR 기반 미생물제제의 경작지 토양내 간편신속 모니터링 기술은 미생물제제의 현장사용 후 사후관리체계 구축과 품질관리 및 재현성 향상에 적극 활용할 수 있는 기술이다.
- 차후 농민이 간편용이하게 사용할 수 있는 키트 개발에 착수할 계획이다.

- (4) 미생물제제의 홍보방안

- 본 연구를 통해 개발된 컨소시엄미생물제제는 먼저 농촌진흥청에서 시행 중인 “친환경유기농자재목록공시” 제도를 통해 친환경유기농업에 사용 가능한 농자재로 등록을 추진하여 검증된 농자재라는 인식을 심어 (주)대유의 기존 영업망(시판, 농협)을 통해 홍보한다. 또한, 기존 (주)대유의 제품홍보책자에 본 연구개발 컨소시엄미생물제제의 별도 코너를 신설하여 관련특허 및 연구논문에 대한 간략한 소개와 해설로 농민들에게 단일미생물로

구성된 기존제품과의 차별성과 복합균주의 사용으로 단일미생물의 단점을 상호보완할 수 있는 효과의 우수성을 보다 쉽게 이해할 수 있도록 할 것이다. 그리고, 단독 팜플렛도 별도 제작하여 (주)대유에서 정기적으로 시행 중인 대농민 교육 자료로 이용하여 적극적으로 홍보하고자 한다. 특히, 전국 규모의 농업박람회에 참가하여 부스를 통한 홍보 및 농민신문 광고 게재를 통하여 기존 제품과의 차별성을 적극적으로 홍보하고자 한다.

(5) 현장중심의 적용사례 확대 방안

- 본 연구를 통해 개발된 컨소시엄미생물제제는 복합균주의 사용으로 다양한 작물과 식물병에 항균활성을 나타내고, 특히 고추의 성장촉진, 건조/고염 스트레스 저항성 유도, 인산가용화 등의 효과가 탁월하다. 따라서 고추를 포함한 여러가지 작물에 대한 포장시험을 병행하여 활용범위를 확대하고자 한다. 특히, 고추 역병의 경우 (주)대유의 영업망을 이용하여 지역 간 고추 품종을 달리한 포장시험을 통해 효과를 재입증하고자 한다. 현재 계획 중인 포장시험은 아래와 같다. 현장적용 시험자료는 추후 사례집으로 정리하여 홍보자료로 사용하고자 한다.

분 류	작 물	포장주소 및 면적	포장주
과수류	사과	경북 청도군 풍각면 덕양리 1374-4번지, 5000평	허규석
	배	경북 상주시 공성면 장동리 651번지, 2000평	손상보
과채류	고추	경남 밀양시 상동면 안인리 768번지, 1500평	구연진
	토마토	경북 경주시 내남면 덕천2리 801번지, 3000평	이순길
	오이	경북 군위군 군위읍 무성2리 966번지, 2000평	김화섭
	딸기	경남 김해시 삼량진읍 삼량진 825-2번지, 3000평	김판곤
	참외	경북 성주군 초전면 동포리 898-13번지, 6000평	김해규
엽채류	상추	경북 경산시 하양읍 남하리 285번지, 각 10000평	임영수
	적겨자		
	쌈배추		

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 미국의 바이오농약 시장의 주요 업체인 Certis-USA사, AgraQuest사의 경우 각각 특정 시장 공략용 품목, 기능성 특화제품들을 보유하여 글로벌 사업을 진행중이며, 최근 새로운 개념의 바이오작물보호제의 기전으로 이해되는 식물전신유도 저항성 유도에 대한 연구분야에서는 세균에 의한 ISR의 식물반응과 세균의 유도저항성 결정인자에 대한 연구에 주력하고 있으며 미국 Bayer사에서 개발한 미생물유래 제품인 Yield Shied 가 유일하게 출시되어 경쟁이 치열할 전망이다.
2. 유럽의 경우 독자적인 개발위주의 기업보다는 바이오농약을 유통 및 판매하는 기업들이 주류를 이루고 있다. 또한 유럽의 경우 전 세계 어느 지역보다 바이오농약 개발에 많은 시간과 비용이 소비되는 지역이다. 그리고 최근 독성에 대한 자료제출의 요구수준이 높아지고 있는 추세이다.
3. 일본의 경우 가켄사, 아그로 가네쇼사, SDS사가 주요 업체로서 가시적인 성과를 생산하고 있으며, 특히 가켄사의 경우 기존 항생제 생산 시스템에 대한 노하우로 성공적인 바이오농약 개발 모델을 만들고 있는 것으로 알려져 있다.
4. 중국의 경우 1990년 녹색식품개발계획 이후 녹색식품에 대한 사회적인 인식이 높아져가고 있으며 이로 인해 미생물제제의 사용이 증가하고 있는 추세이다. 그리고 2001년부터 시작된 국가발전개혁위원회의 생물기술 산업화프로젝트 가운데 생물농약개발이 포함되어 있어 그 중요성이 날로 대두되고 있다.

## 제 7 장 참고문헌

- Ahn YM. 2004. Expression of dehydrin-like proteins by dehydration or salt stress in maize seedlings. Graduate School, Korea National University of Education.
- Bae UK. 2008. Identification and expression profiling of abiotic stress-responsive genes from poplar (*Populus alba* × *P. glandulosa*). Graduate School, Kyungpook National University.
- Bageshwar UK, Taneja-Bageshwar S, Moharram HM, Binzel ML. 2005. Two isoforms of the A subunit of the vacuolar H(+)-ATPase in *Lycopersicon esculentum*: highly similar proteins but divergent patterns of tissue localization. *Planta*. 220,632-643.
- Backer CJ, Stavely JR, Thomas CA, Saser M, and MacFall JS. 1983. Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Uromyces phaseoli* and on development and on development of rust pustules on bean leaves. *Phytopathology* 73,1148-1152.
- Bakker PAHM, Glandorf DCM, Viebahn M, Ouwens TWM, Smit E, Leeflang P, Wernar K, Thomashow LS, Thomas-Oate JE, and van Loon LC. 2002. Effects of *Pseudomonas putida* modified to produce phenazine-1-carboxylic acid and 2,4-diacetylphloroglucinol on the microflora of field grown wheat. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81, 617-624.
- Barbara AM, Wang L, Allen MS, Stevens YY, Qin W4, Snider J, and Schwartzenberg K. 2000. Adenosine kinase of arabidopsis kinetic properties and gene expression. *Plant Physiol*. 124,1775-1785
- Bardgett, RD, Hobbs PJ, and Frostegard A. 1996. Changes in soil fungal:bacterial biomass ratios following reductions in the intensity of management of an upland grassland. *Biol Fert Soils* 22, 261-264.
- Belimov AA, Safronova VI, Sergeyeva TA, Egorova TN, Matveyeva VA, Tsyganov VE, et al. 2001. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Can J Microbiol*. 47,642-652.
- Boland GJ, Kuykendall LD. 1998. Plant - microbe interactions and biological control. Marcel Dekker, New York, U.S.A.

- Borga P, Nilsson M, and Tunlid A. 1994. Bacterial communities in peat in relation to botanical composition as revealed by phospholipid fatty-acid analysis. *Soil Biol Biochem* 26, 841-848.
- Borovskii GB, Stupnikova IV, Antipina AI, Vladimirova SV and Voinikov VK. 2002. Accumulation of dehydrin-like proteins in the mitochondria of cereals in response to cold, freezing, drought and ABA treatment. *BMC Plant Biol.* 2,1-7.
- Bossio DA, Scow KM, Gunapala N, and Graham KJ. 1998. Determinants of soil microbial communities: Effects of agricultural management, season, and soil type on phospholipid fatty acid profiles. *Microb Ecol* 36, 1-12.
- Bourque SN, Valero JR, Mercier J, Lavoie MC, and Levesque RC. 1993. Multiplex polymerase chain reaction for detection and differentiation of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microb.* 59,523-527.
- Burd GI, Dixon DG, Glick BR. 1998. A plant growth promoting bacterium that decreases nickel toxicity in plant seedlings. *Appl Environ Microbiol.* 64,3663-3668.
- Burd GI, Dixon DG, Glick BR. 2000. Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. *Can J Microbiol.* 46,237-245.
- Burges HD, Jones KA. 1998. Trends in formulation of microorganisms and future research requirements. In Burges HD (ed) Formulation of microbial biopesticides-beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments, pp. 311 -332, Kluwer, London, UK.
- Campbell BG and Thomson JA. 1996. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase genes from *Pseudomonas* strains. *FEMS Microbiol Lett.* 138,207-210.
- Cheun HI, Makino SI, Watarai M, Erdenebaatar J, Kawamoto K, and Uchida I. 2003. Rapid and effective detection of anthrax spores in soil by PCR. *J Appl Microbiol.* 95,728-733.
- Girlanda M, Perotto S, Mo'nnne-Loccoz Y, Bergero R, Lazzari A, De'fago G, Bonfante P, and Luppi AM. 2001. Impact of biocontrol *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and a genetically modified derivative on the diversity of culturable fungi in the cucumber rhizosphere. *Appl Environ Microbiol* 67, 1851-1864.
- Chet I and Inbar J. 1994. Biological control of fungal pathogens. *Appl Biochem Biotechnol* 48,37-43

- Chung E, Kim SY, Yi SY, Choi D. 2003. *Capsicum annuum* dehydrin, an osmotic-stress gene in hot pepper plants. *Mol Cells*. 15,327-332.
- Chun JO, Hwang YS, and Lee JC. 1995. Effect of cell wall hydrolase and Ca<sup>++</sup> hydrolysis of isolated apple cell wall. *J Kor Soc Hort Sci*. 13,206-207.
- Chung S and Kim SD. 2005. Biological control of phytopathogenic fungi by *Bacillus amyloliquefaciens* 7079; suppression rates are better than popular chemical fungicides. *J Microbiol Biotechnol* 15,1011 - 1021.
- Chung S, Kim HM, and Kim SD. 2007. Formulation of stable *Bacillus subtilis* AH18 against temperature fluctuation with highly heat-resistant endospores and micropore inorganic carriers. *Appl Microbiol Biotechnol*. 76,217-224.
- Costacurta A and Vanderleyden J. 1995. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Crit Rev Microbiol*. 21,1-18.
- Cunningham SD and Ow DW. 1996. Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiol*. 110,715-719.
- Cunningham SD, Berti WR, Huang JW. 1995. Phytoremediation of contaminated soils. *Trends Biotechnol*. 13,393-397.
- Deikman J. 1997. Molecular mechanisms of ethylene regulation of gene transcription. *Physiol Plant*. 100,561-566.
- Demoz, BT, and Korsten L. 2006. *Bacillus subtilis* attachment, colonization, and survival on avocado flowers and its mode of action on stem-end rot pathogens. *Biol Control*. 37, 68-74.
- Dobrev PI, Havlicek L, Vagner M, Malbeck J, and Kaminek M. 2005. Purification and determination of plant hormones auxin and abscisic acid using solid phase extraction and two-dimensional high performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 1075,159-166.
- Ekelund F and Olsson S, Johansen A. 2003. Changes in the succession and diversity of protozoan and microbial populations in soil spiked with a range of copper concentrations. *Soil Biol Biochem* 35, 1507-1516.

- Frostegard A, Tunlid A, and Baath E. 1993. Phospholipid fatty acid composition, biomass, and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals. *Appl Environ Microbiol* 59, 3605–3617.
- Frostegard A, and E Baath. 1996. The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. *Biol Fert Soils* 22, 59–65.
- García-Pineda E and Lozoya-Gloria E. 1999. Induced gene expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC oxidase) in pepper (*Capsicum annuum* L.) by arachidonic acid. *Plant science*. 145,11–21.
- Gaspar T, Kevers C, Penel C, Greppin H, Reid DM, and Thorpe TA. 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In vitro - Plant Cell Dev Biol* 32, 272–289.
- Georg SR and Joseph WK. 1998. Mixture of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. *Phytopathol* 88,1158–1164.
- Gera R, Pathak DV, and Sharma PK. 2003. Monitoring rhizosphere colonization by *Azospirillum* using constitutively expressed *gfp* gene. *Ind J Microbiol*. 43,219–222.
- Glick BR, Patten CL, Holguin G, Penrose DM. 1999. Biochemical and genetic mechanisms used by plant growthpromoting bacteria. London: Imperial College Press.
- Glick BR. 2003. Phytomediation: synergistic use of plants and bacteria to clean the environment. *Biotechnol Adv*. 21,383–393.
- Glick BR, Penrose DM, Li J. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth promoting bacteria. *J Theor Biol*. 190,63–68.
- Grichko VP, Glick BR. 2001. Amelioration of flooding stress by ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria. *Plant Physiol Biochem*. 39,11–7.
- Griffiths BS, Ritz K, Ebbelwhite N, and Dobson G. 1999. Soil microbial community structure: effects of substrate loading rates. *Soil Biol Biochem* 31, 145–153.
- Guinin G, Brummett DL, and Beier RC. 1986. Purification and measurement of abscisic acid and indoleacetic acid by high performance liquid chromatography. *Plant Physiol*. 81, 997–1002.

- Gutierrez-Mañero FJ, Ramos-Solano B, Probanza A, Mehouchi J, Tadeo FR, and Talon M. 2001. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiol Plant*. 111,206-211.
- Hall JA, Peirson D, Ghosh S, Glick BR. 1996. Root elongation in various agronomic crops by the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Isr J Plant Sci*. 44,37-42.
- Hohnjec N, Küster H, Albus U, Frosch SC, Becker JD, Pühler A, Perlick AM, Frühling M. 2000. The broad bean nodulin VfENOD18 is a member of a novel family of plant proteins with homologies to the bacterial MJ0577 superfamily. *Mol Gen Genet*. 264, 241-250.
- Hopkins WG. 1999. Introduction to Plant Physiology. Wiley Publishers, New York, NY. p.449-474.
- Hong JK, Lee SC, Hwang BK. 2005. Activation of pepper basic PR-1 gene promoter during defense signaling to pathogen, abiotic and environmental stresses. *Gene*. 15, 169-180.
- Honma M, Shimomura T. 1978. Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Agric Biol Chem*. 42,1825 - 1831.
- Hui CK, Bowden S, Bowden HY, Wong A, Lewin S, Rousseauv F, Mommeja-Marin H, Lee NP, Luk JM, and Locarnini S. 2006. Comparison of Real-time PCR assays for monitoring serum hepatitis B virus DNA levels during antiviral therapy. *J Clin Microbiol*. 44,2983-2987.
- Idris EE, Iglesias DJ, Talon M, and Borriss R. 2007. Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Mol Plant-Microbe Interact* 20,619-626.
- Jackson MA, Cliquet S, and Iten LB 2003. Media and fermentation processes for the rapid production of high concentrations of stable blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *Biocontrol Sci Technol* 13, 23 - 33.
- Jacobson CB, Pasternak JJ, and Glick BR. 1994. Partial purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Can J Microbiol*. 40,1019-1025.

- Jang JW and Kim SD. 1995. Seed coating for the application of biocontrol agent *Bacillus subtilis* YBL-7 against Phytopathogens. *Kor J Microbiol Biotechnol* 23,243-248.
- Johansen and Olsson. 2005. Using phospholipid fatty acid technique to study short-term effects of the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* DR54 on the microbial microbiota in barley rhizosphere. *Microb Ecol* 49, 271-281.
- Jung HK and Kim SD. 2003. Purification and characterization of an antifungal antibiotic from *Bacillus megaterium* KL39, a biocontrol agent of red-pepper phytophthora blight disease. *Kor J Microbiol Biotechnol* 31, 235-241.
- Jung HK, Kim JR, Kim BK, Yu TS, and Kim SD. 2003. Selection and antagonistic mechanism of *Bacillus thuringiensis* BK4 against fusarium wilt disease of tomato. *Kor J Microbiol Biotechnol* 33, 194-199.
- Jung, HK, Kim JR, Woo SM, and Kim SD. 2006A. An auxin producing plant growth promoting rhizobacterium *Bacillus subtilis* AH18 which has siderophore-producing biocontrol activity. *Kor J Microbiol Biotechnol* 34,94-100.
- Jung, HK, Kim JR, Woo SM, and Kim SD. 2006B. Selection of the auxin, siderophore, and cellulose-producing PGPR, *Bacillus licheniformis* K11 and its plant growth promoting mechanism. *J Kor Soc Appl Biol Chem* 50,23-28.
- Karadeniz A, Tocuoglu SF, and Inan S. 2006. Auxin, gibberellin, cytokinin and abscisic acid production in some bacteria. *World J Microbiol Biotechnol* 22,1061-1064.
- Katiyar, V. and G. Reeta. 2004. Improved plant growth from seed bacterization using siderophore overproducing cold resistant mutant of *Pseudomonas fluorescens*. *J Microbiol Biotechnol* 14,653-657.
- Kende H. 1989. Enzymes of ethylene biosynthesis. *Plant Physiol* 91,1-4.
- Kim DH, Jung HK, and Kim SD. 2004. Selection and identification of Auxin-producing plant growth promoting rhizobacteria having phytopathogen antagonistic activity. *J Kor Soc App. Biol Chem* 47,17-21.
- Kim SH and Kwon JS. 2001. Methods to improve soil microbial fertilizers. In *Soil microbial fertilizers*, pp 47 - 63, Korea Rural Development Administration, Republic of Korea.

- Kim JR. 2004. Isolation and characteristics research of an Auxin and hydrolytic enzyme by plant growth promotion rhizobacteria (PGPR). Graduate School, Yeungnam University.
- Kim WJ. 2006. Cold tolerance-related rice ADP-ribosylation factor (Arf) gene expression & functional analyses. Graduate School, Dankook University.
- Kloepper JW, Lifshitz R, Zablotowicz RM. 1989. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol* 7,39-43.
- Kloepper JW, Ryu CM, and Zhang S. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathol* 94,1259-1266.
- Kowalchuk GA, Souza FA, and Van Veen JA. 2002. Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Ammophila arenaria* in Dutch coastal sand dunes. *Mol Eco*. 11,571-581.
- Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, Albertini AM, Alloni G, Azevedo V, and Bertero MG. 1997. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*. 390,249-256.
- Kwon DH, Chio JH, Jung HK, Lim JH, Joo JJ, and Kim SD. 2004. Selection and Identification of Auxin-Producing Plant Growth Promoting Rhizobacteria having Phytopathogenantagonistic activity. *Journal of the Kor Agri Chem Soc*. 47,17-21.
- Lee ET and Kim SD. 1999. Isolation and antifungal activity of the chitinase producing bacterium *Serratia* sp. 3095 as antagonistic bacterium against fusarium sp. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 42, 181-187.
- Lee ET and Kim SD. 2000. Selection and antifungal activity of antagonistic bacterium *pseudomonas* sp. 2112 against red-pepper rotting *Phytophthora capsici*. *Kor. J Appl Microbiol Biotechn*. 28,334-340.
- Lee ET and Kim SD. 2001. An antifungal substance, 2,4-diacetylphloroglucinol, produced from antagonistic bacterium *Pseudomonas fluorescens* 2112 against *Phytophthora capsici*. *Kor J Microbiol Biotecjnl*. 29,137-142.
- Lee ET, Lim SK, Nam DH, Khang YH, and Kim SD. 2003. Pyoverdinin<sub>2112</sub> of *Pseudomonas fluorescens* 2112 inhibits *Phytophthora capsici*, a red-pepper blight-causing fungus. *J*

Microbiol Biotechnol. 13, 415-421.

Lee JH 2001. Present state of commercialization of soil microbial fertilizers in SouthKorea. In *Soil microbial fertilizers*, pp 31 - 45, Korea Rural Development Administration, Republic of Korea.

Lee JM, Lim HS, Chang JH, and Kim SD. 1999. Isolation of siderophore-producing *Pseudomonas fluorescens* GL7 and its biocontrol activity against root-rot disease. *Kor J Appl Microbiol Biotech.* 27,427-432.

Lee SJ, Lee SE, Seul KJ, Park SH, and Ghim SY. 2006. Plant growth-promoting capabilities of diazotrophs from wild Gramineous crops. *Kor J Microbiol Biotecjnl.* 34,78-82.

Li WH, Zhang CB, Jiang HB, Xin GR, and Yang ZY. 2006. Changes in soil microbial community associated with invasion of the exotic weed, *Mikania micrantha* HBK. *Plant Soil* 281, 309-324.

Lim JH and Kim SD. 2009a. Sysnergistic plant growth promotion by the indigenous auxin-producing PGPR *Bacillus subtilis* AH18 and *Bacillus licheniformis* K11. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 52, 231-538.

Lim JH, Jung HY, and Kim SD. 2009b. Development of the microbial consortium for the environmental friendly agriculture by the antagonistic rhizobacteria. *J appl Biol Chem* 52, 116-120.

Lim SU, Lee TG, and Sa DM. 1995. Isolation and physiological characteristics of auxin-producing soil bacteria. *Korean J Soil Sci Fert.* 28,75-82.

Lim TH, Kwon SY, and Kim JH. 2006. Effects of *Streptomyces griseofuscus* 200401 on growth of pepper plant sand phytophthora blight by *Phytpthora capsici*. *Res Plant Dis* 12, 46-50

Liu L, Kloepper JW, and Tuzun S. 1995. Induction of systemic resistance in cucumber by plant growth-promoting rhizobacteria: duration of protection and effect of host resistance on protection and root colonization. *Phytopathology.* 85,1064-1068.

Loper JE and Schroth MN. 1986. Influence of bacterial sources of indole-3-acetic acid

- biosynthetic on root elongation of sugar beet. *Phytopathology*. 76,386–389.
- Ma W, Sebestianova S, Sebestian J, Burd GI, Guinel F, and Glick BR. 2003. Prevalence of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase in *Rhizobia* spp. *Antonie van Leeuwenhoek*. 83,285–291.
- McSpadden-Gardener BB. 2004. The nature and application of biocontrol microbes, *Bacillus* sp. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural system. *Phytopathology* 94, 1252–1258.
- Minami R, Uchiyama K, Murakami T, Kawai J, Mikami K, and Yamada T. 1998. Properties, sequence, and synthesis in *Escherichia coli* of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from *Hansenula saturnus*. *J Biochem*. 123,1112–1118.
- Ministry for food, agriculture, forestry and fisheries. 2008. Food, agriculture, forestry and fisheries Statistical YearBook. p.82–89, 104–117.
- Morgan PW, Drew CD. 1997. Ethylene and plant responses to stress. *Physiol Plant*. 100,620–630.
- Muller A, Duchting P, and Weiler EW. 2002. A multiplex GC-MS/MS technique for the sensitive and quantitative single-run analysis of acidic phytohormones and related compounds, and its application to *Arabidopsis thaliana* *Planta*. 216,44–56.
- Nayani S, Mayak S, and Glick BR. 1998. The effect of plant growth promoting rhizobacteria on the senescence of flower petals. *Ind J Exp Biol*. 36:836–839.
- Park CJ, Kim KJ, Shin R, Park JM, Shin YC, Paek KH. 2004. Pathogenesis-related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway. *Plant J*. 37, 186–198.
- Park MS, Jung SR, Lee KH, Lee MS, Do JO, Kim SB, and Bae KS. 2006. *Chryseobacterium soldanellicola* sp. nov. and *Chryseobacterium taeanese* sp. nov., isolated from roots of sand-dune plants. *Int J Syst Evol Microbiol*. 56,433–438.
- Patten CL and Glick BR. 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can J Microbiol*. 42,207–220.

- Patten CL and Glick BR. 2002. The role of bacterial indoleacetic acid in the development of the host plant root system. *Appl Environ Microbiol.* 68,3795–3801.
- Peacock A D, Mullen MD, Ringelberg, DB, Tyler DD, Hedrick DB, Gale PM, and White DC (2001) Soil microbial community responses to dairy manure or ammonium nitrate applications *Soil Biol Biochem* 33, 1011–1019.
- Penrose DM and Glick BR. 2001. Levels of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) in exudates and extracts of canola seeds treated with plant growth-promoting bacteria. *Can J Microbiol.* 47,368–372.
- Penrose DM, Moffatt BA, Glick BR. 2001. Determination of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) to assess the effects of ACC deaminase-containing bacteria on roots of canola seedlings. *Can J Microbiol.* 47,77–80.
- Pusey PL. 1996. Micro-organisms as agents in plant disease control. In: Copping, LG (Ed.) *Crop Protection Agents from Nature: Natural Products and Analogues. Crit Rep Appl Chem* 35, 426–436.
- Silvar C, Duncan JM, Cooke DEL, Williams NA, Diaz J, and Merino F. 2005. Development of specific PCR primers for identification and detection of *Phytophthora capsici* Leon. *Euro J Plant Pathol.* 112,43–52.
- Shimon M, Tsipora T, and Glick BR. 2004. Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiol Bioch* 42,565–572.
- Shin YN. 2005. Cloning of cold stress responding fatty acid desaturase-2(fad-2) gene from cucurbitaceous vegetable, and their expression pattern during cold stress. Graduate school, Chunnam National University.
- Shin R, Lee GJ, Park CJ Kim TY, You JS, Nam YW, Paek KH. 2001. Isolation of pepper mRNAs differentially expressed during the hypersensitive response to tobacco mosaic virus and characterization of a proteinase inhibitor gene. *Plant sci.* 161,727–737.
- Shivanna MB, Meera MS, and Hyakumachi M. 1994. Sterile fungi from zoysia grass rhizosphere as plant growth promoters in spring wheat. *Can J Microbiol.* 40,637–644.
- Slininger PJ, Van Cauwenberge JE, Bothast RJ, Weller DM, Thomashow LS, and Cook RJ. 1996. Effect of growth culture physiological state, metabolites, and formulation on the

- viability, phytotoxicity, and efficacy of the take-all biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* 2-79 stored encapsulated on wheat seeds. *Appl Microbiol Biotechnol* 45, 391-398.
- Sturtevant DB and Taller BJ. 1989. Cytokinin production by *Rhizobium japonicum*. *Plant physiology*. 39,1247-1452.
- Thirup L, Johansen A, and Winding A. 2003. Microbial succession in the rhizosphere of live and decomposing barley roots as affected by the antagonistic strain *Pseudomonas fluorescens* DR54-BN14 or the fungicide imazalil. *FEMS Microb Ecol* 43, 383-392.
- Tunlid A, White DC. 1992. Biochemical analysis of biomass, community structure, nutritional status, and metabolic activity of microbial communities in soil. In: Stotzky, G, Bollag, JM (Eds.) *Soil Biochemistry* 7, 229-262.
- Van Veen JA, Van Overbeek LS, and Van Elsas JD. 1997. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiol Mol Rev* 61, 121 - 135.
- Vos MJ, Kanon B, Kampinga HH. 2009. HSPB7 is a SC35 speckle resident small heat shock protein. *Biochim Biophys Acta*. In press.
- Wang C, Knill E, Glick BR, De'fago G. 2000. Effect of transferring 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase genes into *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 and its gacA derivative CHA96 on their growth promoting and disease-suppressive capacities. *Can J Microbiol*. 46,898-907.
- Woo SM, Jung HK, and Kim SD. 2006. Cloning and characterization of a cellulase gene from a plant growth promoting rhizobacterium, *Bacillus subtilis* AH18 against Phytophthora blight disease in red-pepper. *Kor J Microbiol Biotechnol*. 34,311-317
- Woo SM. 2007. Genetic monitoring of plant growth promoting rhizobacterium (PGPR), *Bacillus subtilis* AH18 using multiplex PCR in field soil, and biological control of phytophthora blight disease in red-pepper by the strain. Graduate School, Yeungnam University.
- Woo SM and Kim SD. 2007a. Confirmation of non-siderophore antifungal substance and cellulase from *Bacillus licheniformis* K11 containing antagonistic ability and plant growth promoting activity. *J Life Sci*. 17,983-988

- Woo SM, Woo JW, and Kim SD. 2007b. Purification and characterization of the siderophore from *Bacillus licheniformis* K11, a multi-functional plant growth promoting rhizobacterium. *Kor J Microbiol Biotechnol* 35,128-134.
- Woo SM and Kim SD. 2008. Structural identification of siderophore (AH18) from *Bacillus subtilis* AH18, a biocontrol agent of Phytophthora blight disease in red-pepper. *Kor J Microbiol Biotechnol* 36,326-335
- Yao H, He Z, Wilson MJ, and Campbell CD. 2000. Microbial biomass and community structure in a sequence of soils with increasing fertility and changing land use. *Microb Ecol* 40, 223-237.