

최 종
연구보고서

고품질 과채류의 수경재배를 위한 근부강화 기능성
균주 탐색, 양액 조성 및 실용화 기술 개발

Identification of effective microorganisms to
improve the root activity for high quality
fruit-vegetable, and development of the proper
substrates and techniques for commercialization

2004. 8.

연구 기관
진 남 대 학 교

농림부 도서실



0001413

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “고품질 과채류의 수경재배를 위한 근부 강화 기능성 균주 탐색, 양액 조성 및 실용화 기술 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004 년 8 월 19 일

주관연구기관명 : 전남대학교

총괄연구책임자 : 배 동 규

세부연구책임자 : 정 순 주

세부연구책임자 : 지 연 태

세부연구책임자 : 배 동 규

연 구 원 : 이 범 선

연 구 원 : 허 선 미

연 구 원 : 조 경 철

연 구 원 : 박 상 화

요 약 문

I. 제 목

고품질 과채류의 수경재배를 위한 근부 강화 기능성 균주 탐색, 양액 조성 및 실용화 기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

현재 농가에서는 대다수의 과채류를 병해와 환경스트레스로부터 보호하기 위하여 양액 또는 토양 관비재배 방법으로 시설재배를 하고 있다. 양액재배의 문제점들이 발생하는 원인으로 근권의 온도변화 (고온 또는 저온)에 의한 뿌리의 활력 저하, 근의 노화와 착과절위이하 하부엽들의 노화, 과실 비대기의 강한 sink load로 인한 새로운 엽 전개에 어려움, 그리고 전개된 잎의 크기가 확대되지 않아 충분한 광합성을 할 수 없다는 점 등을 들 수 있다. 일반적으로 작물들은 물질들의 sink/source 관계를 조직적으로 유지함으로써 영양생장과 생식생장과의 균형을 이루고 원활한 생장과 과실 생산을 하게된다. 반면에 영양생장과 생식생장의 균형이 깨질 경우 근사(root death), 또는 부진과 (fruit abortion)가 유발되어 수량과 품질에 치명적인 영향을 끼치게 된다. 오이 등의 호온성 작물의 경우 영양생장과 생식생장의 밸런스가 잘 이루어지지 않아 잎 조직의 생장 제한, 뿌리기능의 약화, 지하부와 지상부 또는 과실간에 동화물질들에 대한 경합이 발생하여 생리장해와 병해가 일어나며 이 현상은 열악한 과실 품질, 저위수량과 직접적으로 관련되어 있다.

이러한 문제를 개선하기 위하여 가장 중요한 것은 뿌리의 기능을 강화시키는 것이다. 겨울철에 시설재배하는 농가에서는 호온성 작물들의 뿌리기능을 강화시키기 위하여 유사작물의 뿌리를 대목으로 사용하고 있으나, 접목에 요구되는 경비 부담과 재배 제한성과 같은 문제점이 수반되고 있다. 그 외에 뿌리기능을 향상시키기 위하여 이온이나 영양물질 흡수기능과 관련된 유전자들을 이용한 형질전환 식물체 개발을 고려할 수 있으나 아직 실용할 수 있는 단계는 아니다.

외국에서는 미생물을 이용한 작물재배 기술이 발달되어 실용화가 이루어진 반면에

우리나라에서는 관비재배나 양액재배에 미생물을 이용한 사례가 거의 없어 재배기술 체계의 개발과 실용화를 위한 기술보급이 시급한 실정이다. 우리나라의 지형과 기후에 맞는 토착미생물을 개발하여 산업적으로 이용하려는 시도가 일부 진행되고 있으나, 작물의 생육촉진을 효과적으로 유도하는 유용미생물의 분리, 분리한 유효미생물의 기능성 탐색 및 이들의 재배환경에 따른 생리, 생태적 반응에 대한 연구는 아직까지 기본 체계도 확립되어 있지 않다.

지금까지 거의 연구되어 있지 않은 유효토착 미생물을 이용한 양액재배 및 토양 관비재배에 적용할 수 있는 기술개발은 동계 호온성 과채류의 시설재배시 부적절한 환경, 품종선택, 재배기술 등 현재 우리나라의 시설재배가 안고 있는 많은 문제점들을 보완하게 될 것이다. 따라서 미생물 전용 양액재배 기술을 농가에 보급함으로써 양액재배의 과학영농기술 체계를 확립할 수 있을 것이다.

따라서 본 연구는 식물의 생장을 촉진하는 유용미생물 혼합체에서 뿌리강화 미생물을 순수분리하여 동정하고, 유용미생물의 배양적 최적조건을 조사하여 균주의 대량 생산체계를 확립하고, 이들과 수경재배 작물과의 상호연관성을 고찰하고자 하였다. 또한 식물생장촉진 단일 근권미생물을 수경재배 과채류의 근권에 효율적으로 입식하고자 housing system을 모색하고, 이들을 유묘단계에서 뿐만 아니라 재배전반에 걸쳐 적용하여 생육의 촉진과 과실의 품질 및 수량의 증가를 도모하여 장래에 유용한 미생물을 과채류 양액재배에 실용화할 수 있는 기술을 개발하고자 하였다. 본 연구를 통하여 얻은 결과를 요약하면 아래와 같다.

1. 미생물 혼합체(MS101)를 0.5~1% 농도로 오이, 멜론과 고추의 양액 재배에 사용, 대조군에 비하여 20%이상의 생육촉진 효과를 얻었다.
2. 1차로 선별된 미생물을 16s r-DNA sequence와 BIOLOG SYSTEM을 이용하여 동정한 결과 *Pseudomonas*속과 *Bacillus*속 등 여러 가지 종류로 나타났으며, CPS는 *pseudomonas*속 D2는 *Saccharomyces* 속으로 규명 되었다.
3. 선별된 기능성 미생물(CPS, D2)는 근부강화를 통하여 작물의 생육을 증진시킨다.
4. 미생물혼합체(MS101)로부터 분리된 균주나 균주들의 조합으로 양액재배에 처리할 경우 CPS와 D2균들이 오이나 고추에 대하여 최대 생육 촉진 효과를 보였으며, 이 결과는 두 미생물을 양액 재배 시 사용가능함을 시사한다.
5. 토양 및 양액 재배시 CPS와 D2 균주의 농도 유지를 위하여 alginate bead를 이용한 housing system을 개발하였다.

6. 알긴산 비드화 근권미생물의 시설 환경내 수경재배 조건을 확립
7. 알긴산 비드화 근권미생물을 화란PBG 양액과 mixlite 배지와 혼용하여 최대 생육 촉진효과를 얻을 수 있었다.
8. 근권미생물을 이용한 수경재배 배지에서 미생물에 의하여 폐놀 성분의 감소로 연작장애가 경감됨을 확인하였다.
9. 수경재배 오이의 생육과 과실 품질 및 수확량에 D2가 최대효과를 나타냄을 확인하여 근권미생물을 다수확 및 품질향상을 위하여 이용할 수 있음을 확인하였다.
10. CPS와 D2의 근부 강화를 통한 작물 생육 증진의 주된 이유로 균주들이 식물과의 상호작용을 통해 분비한 IAA임을 확인하였다.
11. CPS나 D2 균주들에 대한 housing system을 구축하여 작물 생육 촉진 미생물의 상품을 제작하였다.
12. 기능성 균주들은 원형질막 H⁺-ATPase 활성도를 증가시켜 뿌리 기능을 강화함을 증명하였다.
13. 뿌리 기능 강화 균주에 의한 H⁺-ATPase 활성도 증가 원인은 유전자 발현의 증가로 인한 막 내의 H⁺-ATPase 단백질의 양적 증가임을 밝혔다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 기능성 미생물을 이용한 수경재배 조건확립 및 과채류 전용양액개발 및 재배 기술 체계 확립을 위해
 - 가. 미생물 혼합체(MS101)를 이용한 과채류의 수경재배시 작형 및 생육단계별 생육촉진 분석
 - 나. 성장촉진에 효율적인 뿌리강화 미생물 선발을 위한 최적 농도 설정
 - 다. 선발된 뿌리강화 미생물의 수경재배 근권내 증식 환경조건 확립
 - 라. 뿌리강화 미생물의 지속적인 번식을 위한 housing 시스템에 적합한 전용배지 및 양액 선발

마. 오이의 저온 내성에 대한 미생물 영향

바. 생리 활성 물질 규명

4. 농가에서 Housing system(bead)으로 재배한 작물의 생리활성 기능 분석

5. 기능성 균주 등록, 상품화를 위한 시제품 개발하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구 개발 결과

오이와 멜론의 양액재배에 미생물 혼합체를 0.5~1% 농도로 사용하여 엽 면적과 뿌리의 생육이 촉진되는 것을 확인하였다. 따라서 미생물 혼합체를 작물의 양액재배에 사용할 수 있음을 확인하였다.

작물생육을 증진시키는 미생물 혼합체로부터 더욱 효율적인 작물 생육 증진을 위하여 미생물들을 분리하고 경정배양(closed system)을 통하여 생육 촉진 기능성 균주들을 선별하였다. 선별한 각 균주들에 대하여 작물별, 생육 단계별, 재배방식별로 생육촉진 기능을 조사하였다. 특히 *Pseudomonas* 속의 CPS와 *Sacharomyces* 속의 D2 균주는 오이, 멜론과 고추의 지상부와 뿌리, 과실의 생육 촉진에 효과적임을 확인하였다. 또한 이들 균주들은 토양재배와 수경재배에도 활용이 가능함을 확인하였다.

토양 내 관주를 통한 시비 방법에서 효과적으로 미생물을 공급하기 위하여 housing 기법을 이용한 미생물 담체를 개발하였다. 유묘의 초기에 조속한 생육 촉진을 위해서는 CPS 균주가, 과실 수확기까지 지속적인 생육 촉진을 위해서는 D2 균주가 효과적임을 확인하였다.

알긴산 비드화 근권미생물을 이용한 과채류의 수경재배시 지상부 및 지하부의 생장 촉진 효과를 확인할 수 있었으며, 오이는 *S. sp.* D2 배양액의 관주처리시 생장에 가장 양호한 결과를 나타낸 반면, 고추의 생장은 *P. sp.* CPS가 가장 좋은 결과를 보였다.

선발된 *P. sp.* CPS와 *S. sp.* D2의 알긴산 비드화 적정량이 결정됨에 따라 수경재배시 기본적으로 수행되어야 할 배지와 양액의 종류 및 양액농도에 관한 실험을 수행한 결과, 배지는 유·무기배지가 혼합된 mixlite가 수경재배 오이의 생장에 가장 좋았으며, 양액의 종류와 농도는 화란 PBG양액의 표준액인 1X (EC 2.0dS/m, pH 5.8-6.2)에서 가장 좋은 결과를 보였다.

오이와 토마토의 수경재배시 allelopathy물질인 phenolic compound를 분석한 결과 시간이 경과함에 따라 페놀의 함량이 증가하였다. 오이 및 토마토를 연속 재배한 배지를 재사용하였을 때 발생하는 phenolic compound를 경감시키기 위한 미생물 *P. sp.* 'CPS'와 *S. sp.* D2의 효과를 알아보려고 실시한 결과 CPS와 D2 처리구 모두 재사용배지 처리구에 비해 페놀의 함량이 감소하는 것으로 나타났다.

다양한 재배조건하에서 선발된 *P. sp.* CPS와 *S. sp.* D2의 알긴산 비드화 제제의 실용화를 위해 수경재배 오이의 현장적용실험 통하여 이들 미생물의 다수확 및 품질향상에 미치는 영향을 구명하고자 실시한 결과, 수경재배 오이의 생육과 과실품질 및 수확량에 D2가 가장 유리한 것으로 나타났고, CPS의 경우 대조구와 큰 차이를 보이지 않았으나, 과실 수확량면에서 D2 다음으로 좋은 결과를 보였다. 또한 하루 동안의 광합성량을 측정한 결과, 광합성의 패턴은 D2 비드 처리구에서 가장 효율적으로 유지되었으며, CPS 비드 처리구가 그 다음이었다.

단일 및 조합으로 처리된 미생물중 CPS와 D2는 다른 처리군에 비해 식물생육을 효율적으로 촉진하였다. 이들의 root activity와 ion-conductivity 효과를 조사한 결과 근부의 강화기능을 토대로 작물의 생육이 증진되는 것으로 사료된다. CPS와 D2의 작물 생육 촉진이 근부 강화로부터 시작된다면 어떻게 근부 강화를 수행하는지 조사하였다. 일반적으로 PGP(plant-growth-promoting) 기능은 여러 가지 요인에 의해 나타나는 것으로 알려져 있으나 CPS와 D2의 경우 미생물들이 식물과 상호작용하여 phytohormone IAA를 생산함으로써 작물의 생육을 증진시키는 것으로 사료된다. 실험 결과 IAA의 전구체인 Tryptophan을 외부에서 공급 해주었을 때 CPS와 D2는 상당히 많은 양의 IAA를 방출하였으며, 미생물이 스트레스 상태에서 IAA를 생산하였다. 이를 토대로 설계된 실험들을 통하여 CPS와 D2는 토양 내에서 root에 colony체를 형성 하여 식물체 뿌리로부터 Trp 이나 그 밖의 유기산들을 공급받아 에너지를

획득하고 식물에게 bacterial IAA를 공급하여 근부의 생육과 흡수기능을 증가시키는 상리공생관계의 미생물들이다. Housing system을 이용하여 토양이나 양액재배 시 배지 내에서 미생물들의 안정도를 높힘으로써 식물의 생육을 증진시킬 수 있다. 이 미생물들의 담체 매개체인 bead를 동결 건조함으로써 6개월에서 1년 6개월 까지 보전이 가능하다.

오이와 같은 호온성 작물은 지온의 온도가 일정한 수준이하로 떨어지거나 영양공급이 순조롭지 못하면 뿌리 기능의 저하로 생장을 멈추고 또한 병해 피해도 커진다. 뿌리의 이온이나 영양물질 흡수 기능과 관련된 것으로 H^+ -ATPase, K^+ , Ca^{+2} ion channel 들이 보고되고 있으며 특히 H^+ -ATPase의 활성화는 뿌리의 흡수 기능과 매우 깊은 관련을 맺고 있다. 본 연구과제는 기능성균주가 작물의 생장과 발육에 미치는 생리 기능과 생리활성 기작을 H^+ -ATPase를 중심으로 분석하였고 그 균주들이 분비하는 IAA가 생리활성 물질로 작용함을 규명하였다. 또한 저온 내성 유도와의 상관성을 분석하였다. D2와 CPS는 뿌리의 흡수 기능과 관련있는 원형질막 H^+ -ATPase 활성도를 증가시킴으로써 뿌리와 작물의 생육을 촉진시키는 것으로 확인하였다. H^+ -ATPase의 활성화 증가 기작으로 미생물들이 분비한 auxin(IAA)이 식물뿌리에서 유전자 발현을 조절하여 막에 분포한 효소양을 증가시킴을 밝혔다. 즉, 두 균주 모두 H^+ -ATPase 유전자 발현을 촉진시켜 세포내 전사체(transcripts)양과 막에 분포한 단백질양이 증가 되었다. 위 결과를 통해 기능성 균주 D2와 CPS에 의한 뿌리기능 강화 요인은 유전자 발현 증가로 인한 H^+ -ATPase 단백질의 양적인 증가인 것으로 판단된다. 오이 뿌리의 기능을 강화 시키는 생리활성 물질이 auxin임을 증명하기 위하여 오옥신 수송 억제제 TIBA(2,3,4-Triiobenzoic acid)를 처리한 결과 D2와 CPS에 의한 성장 촉진이 중단됨을 확인하였다.

2. 활용에 대한 건의

가. 미생물을 이용한 생물제제의 연구 및 개발품에 대한 등록허가 및 활용을 위한 법적, 제도적 장치 마련

우리나라는 현재 미생물농약에 대한 등록기준이 별도로 없어 화학농약의 등록기준에 준하여 등록하여야 하기 때문에 등록이 매우 어려운 실정이다. 따라서 보

다 안전한 미생물농약의 이용을 촉진하기 위해서 우리의 실정에 맞고 국제적으로도 조화를 이룰 수 있도록 미생물을 이용한 생물제제의 연구 및 개발품에 대한 등록허가 및 활용을 위한 법적, 제도적 장치의 마련이 요구된다.

나. 연구 및 특허출원 지원강화

우리나라는 대학과 연구소를 중심으로 핵심기술 부문의 혁신적인 연구개발이 기대되고 있으나, 아직까지도 지적재산권에 대한 중요성이 대체로 낮고 이와 관련된 활동도 활발하다고 할 수 없는 실정이라고 한다. 한편, 출원된 특허의 유지비용이 많이 소요가 되기 때문에, 이를 쉽게 포기하는 경향도 나타나고 있다. 미국이나 유럽 등 선진국은 '1건의 특허는 10편의 논문에 상당한다'는 식으로 특허를 높이 평가하는 대학 분위기가 조성되고 있다. 이에 따라 우리나라도 논문뿐만 아니라 지적재산권 취득 역시 연구 활동의 중요한 성과물로서 평가하는 진전된 환경조성이 요구된다. 따라서, 현재 선발된 미생물이나 개발된 미생물제제의 연구 및 특허출원에 대한 지원 및 유지를 위한 제도의 강화가 요구된다.

다. 미생물 활용을 위한 연구의 간접 지원(분석, 동정 등) 확대

본 연구에서 선발한 *Pseudomonas* sp. CPS와 *Saccharomyces* sp. D2는 오옥신류인 IAA를 생산할 수 있는 능력이 발견되었다. 이 물질은 식물의 성장촉진에 직접 관여하는 성장조절물질로써 미생물에 의해 생산된 천연호르몬이라는 점에서 주목할만 하다. 또한 이러한 효과로 보이는 미생물에 의한 작물 생육촉진, 수량증대 및 품질향상에 기여할 수 있는 액상 미생물 제품을 개발하였으며, 현재는 이보다 더 효과적으로 밝혀진 알긴산 비드화 미생물 제품을 개발 중에 있다. 따라서, 이들 미생물 활용을 위한 분석 및 동정 등 연구의 간접 지원의 확대가 필요하다

SUMMARY

Most farmers have adapted an agricultural system using a hydroponical of ferti-irrigation method in vinyl house to protect the most fruit-vegetables from disease and environmental stresses. Troubles in hydroponical cultivation cause a decrease in root activity due to change root zonal temperature, senescence of roots and leaves under a fruiting-forming point, rare new leaf formation due to sink load during fruit-growing period, and insufficient photosynthesis. Plants generally sustain sink/source relationship for the metabolites, and keep the balance between vegetative growth and reproductive growth. Therefore plants can produce fruits in harmony with the growth. On the other hands, the unbalanced vegetative-reproductive growth in plants causes root death, fruit abortion, and finally affect quality and quantity of the fruits. In case of sub-tropical plants like a cucumber, balance between vegetative and reproductive growth is not kept well during a culture period, and this unbalance caused the limited leaf growth, decrease of the root activity, and competition for the metabolites between fruits and other tissues. These unfavorable phenomena are known to be directly related with coarse and less amount of fruits. In order to improve the cultivate techniques for a sub-tropical vegetables, most important thing will be the reinforcement of the roots' physiological activities.

Plant cultivation techniques utilizing the microorganisms are well developed and industrialized in foreign countries, but the hydroponical culture or ferti-irrigation techniques utilizing microorganisms have been rarely developed in Korea. Therefore, it is necessary to identify the native functional and suitable microorganisms in environmental conditions of Korea, to investigate their functions in promoting plant growth and development, and finally to industrialize these microorganisms for farmers.

The objectives of this research are to identify the growth promoting

microorganisms for the cucumber and musk-melon cultivation from the microorganisms mixture (MS101), and to investigate their physiological functions in root development. The final goals of this research is the establishment of a hydroponic culture system for a sub-tropical plants like a cucumber and musk-melon utilizing the plant growth promoting microorganisms to improve.

1. Effects of MS101 which is the mixture of indigenous microorganisms on the growth promotion of hydroponically grown fruit vegetables.

1) Effect of MS101 on the growth of cucumber seedlings

This study was conducted to know the effect of MS101 on the growth of cucumber seedlings. Cucumber seedlings were dipped in the 0.5% MS101 solution. At 48 hours after treating, growth characteristics such as leaf area, shoot and root fresh weight were better in the plot of 0.5% MS101 than those of control. Judging from promoting root growth, it was considered that MS101 mixture of microorganisms could strengthen the root growth of cucumber and melon plants. Effects of concentrations(0, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 3, 6 and 9%) of MS101 solution supplemented into nutrient solution in deep flow technique(DFT) were investigated. Optimum concentration of MS101 solution supplemented into nutrient solution for the growth promotion was determined as 0.5%. Concentrations over 1% MS101 solution resulted in harmful effects. Both shoot and root growth were markedly stimulated by the treatment of MS101 solution.

2) Effect of MS101 on the growth and fruit quality of muskmelon plants grown in rockwool

This study was aimed to investigate the effect of MS101 on the feasibility of

utilization to muskmelon grown in rockwool. A solution of 0.5% MS101 was supplemented into nutrient solution and applied for 21 days after pollination using drip irrigation system. Growth characteristics in terms of plant height, leaf area and fresh weight of each organ were best on the plots of MS101 treatment. Leaf area at 20 days after pollination was 1.82 m² per plant in the plot of MS101 treatment and 1.40 m² per plant in the control plot. Leaf weight was 1,008g per plant in the plot of MS101 treatment but 716g per plant in control plots. Fruit weight did not differ significantly between MS101 treated and control plots, Soluble solid content was slightly higher in the treated plots of MS101 compared to the control plots. Also physiological root death was not occurred in MS101 treatment. These results demonstrated that MS101 treatment into nutrient solution contributed to increment of root mass of muskmelon grown in rockwool. Consequently, possibility of high yield and better fruit quality were shown due to the balancing between vigorous shoot and root growth.

2. Determining optimal concentration of effective microorganisms promoting plant growth

This study was conducted to select effective microorganisms promoting plant growth, especially root growth from MS101 and to investigate the optimal concentration of microorganisms used on the plant growth.

1) Selection of *Pseudomonas sp.* CPS

To select effective microorganisms promoting plant growth, especially root growth, ten *pseudomonas sp.* were isolated from MS101. Each microorganism cultured in LB broth was diluted with 0, 1.0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 % and drenched to pot filled with perlite and cocopeat after transplanting, respectively.

Generally, the growth of cucumber plants was better in the plot of cocopeat than that of perlite regardless of the kinds of selected microorganism. Growth characteristics in terms of plant height and leaf area was best in the plot of 0.5% N₂ (CPS). In the plots of lower or higher concentration compared to 0.5%, the

effectiveness of growth promotion was reduced. Root activity using by TTC method was good in the range from 0.5 to 1.0% of each microorganism. It also was highest in the plot of CPS. Therefore, CPS was determined as the best microorganism of 10 *pseudomonas sp.*

2) Selection of *Sacharromyces sp.* D2

To select another effective microorganism from MS101, *bacillus sp.* CMB and *saccharomyces sp.* D2 were compared on the growth of cucumber seedlings. At 7 days after transplanting (DAT), promoting effect of CMB and D2 on the growth was not appeared, but at 14 DAT, they showed differences from control. In the plot of D2, early growth until 14 days was reduced, but at 21 days, it showed higher growth promotion than that of control. Leaf area was similar tendency with previous result. In the treated plot of CMB, at 14 DAT, shoot growth was better than that of D2, but at 21 DAT, it was less than that of control. In the results of root growth as affected by D2 and CMB, D2 was similar tendency with shoot growth at the same time. CMB showed better root growth than shoot growth. In the case of root activity, it was similar tendency with previous results.

3. Optimization of environmental condition for maintaining selected microorganisms in hydroponic system

1) Development of housing system for concentrating selected microorganisms into rhizosphere of hydroponic system

This study was conducted to development of housing system for concentrating selected microorganisms, CPS and D2 into the rhizosphere of hydroponic system. To do this, alginate which have a high molecule possessing the structure of polyuronide and extracted from seaweed was used for bead

making as housing system. Cucumber cv. Chunchunggang was transplanted to pot filled with mixlite (perlite:cocopeat, 3:7, v/v). Growth characteristics in terms of plant height, leaf area, shoot and root fresh and dry weight were better in all plots of CPS and D2 than those of control. Especially, in the plot of D2 bead treated, it showed more over 130% growth promotion than that of control. In comparison of the growth between liquid and bead type of CPS and D2, both CPS and D2 bead showed more growth enhancement than that of liquid. Single alginate bead was more favorable in the growth of root length than that of control. It's effectiveness was considered due to well aeration, water and nutrients uptake by the treatment of alginate bead.

- 2) The effect of the amount of selected microorganisms on the growth of hydroponically grown cucumber plants.

Alginate bead treatment with selected microorganism CPS and D2 has appeared to be more effective growth promotion than that of liquid treatment. Hence, this study was carried out to determine the optimal concentration of alginate bead treatment with CPS and D2. CPS bead was treated with 0.5, 1.0, 3.0 and 10.0g / plant and D2 bead treated with 0.25, 0.5, 1.0 and 5.0g / plant to contact directly with roots in substrate. In all plots except 10.0g CPS, the growth was better than that of control. The optimal concentration for the growth promotion of cucumber plants was found in the range from 0.5 to 1.0g and 0.25 to 0.5g on CPS and D2 bead, respectively. The highest plant height was 195cm and 192.5cm in 1.0g CPS bead and 0.25 D2. leaf growth and shoot fresh weight was best in the plot of 0.25g D2. Therefore, the optimal concentrations were determined as 0.5g CPS and 0.25g D2 for improving the growth of cucumber plant. In the plots of lower or higher concentration compared to 1.0g CPS and 0.5g D2, it would be considered as economical concentrations which are the most suitable growth of plants.

4. Selection of optimum substrate and nutrient solution for maintaining

microorganisms

- 1) Effects of alginate bead buried with microorganisms promoting root growth and kinds of substrates on the growth of hydroponically grown cucumber plants.

This study was conducted to select the most suitable substrate for alginate bead treatment of microorganism CPS and D2. CPS and D2 bead were treated with 0.5 and 0.25g / plant, respectively, to contact directly with roots into substrate. The kinds of substrates were perlite, cocopeat and perlite plus cocopeat (hereinafter mixlite, 3:7, v/v), respectively. Generally, almost all growth characteristics were better in mixlite than those of perlite or cocopeat. Also, in all kinds of substrates, D2 bead increased the growth characteristics in terms of plant, the number of leaves, leaf area, shoot fresh and dry weight and root fresh and dry weight. In cocopeat substrate, regardless of treating microorganisms, early growth was lower than that of the other treatment due to holding high salt content of cocopeat. However, regrowth occurred in the plot of cocopeat treated with CPS and D2 bead compared to control with time, therefore, CPS and D2 were considered that they could reduce salt damage.

- 2) Effects of alginate bead buried with microorganisms promoting root growth and kinds of nutrient solutions on the growth of hydroponically grown cucumber plants.

This study was conducted to select the optimal nutrient solution formula for alginate bead treatment of microorganism CPS and D2. CPS and D2 bead were treated with 0.5 and 0.25g / plant, respectively, to contact directly with roots into substrate. The kinds of nutrient solution were PBG solution recommended by Research Station for Floriculture & Vegetables in Holland, JBS solution recommended by Japanese Horticultural Experiment Station and EVRDC solution

recommended by Europe Vegetables Research & Development Center in Belgium, respectively. Substrate used was mixlite. The growth of cucumber plants were good in control with JBS solution and in the plots of CPS and D2 with PBG solution, respectively. In control, however, root growth was better in PBG solution than that of JBS solution. In the plots of CPS and D2, root growth showed best result in PBG solution.

3) Effects of alginate bead buried with microorganisms promoting root growth and the concentration of nutrient solution on the growth of hydroponically grown cucumber plants.

This study was conducted to select the optimal concentration of PBG solution for alginate bead treatment of microorganism CPS and D2. CPS and D2 bead were treated with 0.5 and 0.25g / plant, respectively, to contact directly with roots into substrate. The strengths of PBG solution were $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, 1(2.0dS/m, pH 5.8–6.2) and 2 ionic strength. The optimal concentration of PBG solution for growth characteristics in terms of plant height, leaf area and shoot growth appeared to be standard solution, 1 time. In the plots of $\frac{1}{4}$ and 2 times, early growth was inhibited markedly. Especially, in the plot of $\frac{1}{4}$ times, chlorophyll content was lower than those of the other treatment, However, as increasing the concentration or treating CPS and D2 bead with $\frac{1}{4}$ times, it occurred to be greener gradually. In case of D2 bead, the plot of $\frac{1}{2}$ times showed the growth promotion equivalent to that of 1 times, it was considered that D2 increased nutrient and water uptake of cucumber plants.

5. Improvement of physical property of substrate used and development for reduction of continuous cropping injuries using by plant growth promoting microorganisms.

1) Analysis of root exudates during growing period and it's reusing effects on

the growth of hydroponically grown cucumber and tomato plants.

Phenolic compounds in the nutrient solution sampled from cucumber and tomato growing bed were analyzed in the course of growth period. The longer the growing period and times of reusing nutrient solution, the higher the content of phenolic compounds in the nutrient solution. Phenol compounds in nutrient solution affected severely in shoot and root growth reduction. Linear reduction was observed according to the amount of phenolic compounds secreted from roots. Same results were obtained in both cucumber and tomato plants. One of the main factors of autotoxicity of root zone in solution culture was demonstrated as phenolic compounds.

2) Effect of microorganisms promoting root growth on reduction of root exudates during continuous cropping of hydroponically grown cucumber and tomato plants

Addition of effective microorganisms seems to be an alternative counter-measure in hydroponics of cucumber and tomato plants. The modes of action of plant growth promoting rhizobacteria and microbial inoculants divide into three parts but detailed mechanisms are not yet well known, but suggest the following factors; ① enhanced mineral and water uptake (growth promotion), ② antibiotic activity through production of antibiotic compounds, production of siderophores and competition in the rhizosphere, ③ production of growth regulators. Especially in hydroponics, reduction in phenolic compounds (root exudates) in nutrient solution, increase in nutrient availability, pH and EC stability, increase in root activity under low temperature in root zone, were associated with effective microorganisms used in our experiments. With further research of beneficial microorganisms to horticultural plants, biological control with reduce the agro-chemicals application in hydroponics would be feasible.

6. Improvement of fruit quality and yield of hydroponically grown cucumber plants

using alginate bead incorporated with microorganisms promoting root growth

- 1) Effects of alginate bead incorporated with microorganisms promoting root growth on the growth and fruit quality of hydroponically grown cucumber plants.

This study was conducted to investigate the effect of alginate bead incorporated of CPS and D2 selected under various environmental condition on the growth and fruit quality of hydroponically grown cucumber plants through field application. Cucumber cv. Chungnakhap was transplanted to styrofoam bed filled with mixlite at 30 days after sowing. Planting density was 30cm between plants and PBG solution (EC 2.0dS/m, pH 5.8–6.2) was fed. CPS and D2 bead were treated with 0.5 and 0.25g / plant, respectively, to contact directly with roots into substrate. To maintain microbial density, 0.5% CPS and D2 liquid were drenched into rhizosphere at 45 and 60 DAT, respectively.

In the treated plot of D2 bead, plant height was 279.7cm and more over 30cm than those of CPS bead and control, and stem diameter was thicker too. The number of leaves was much more over 2 leaves than that of control. Also, leaf area was much larger in proportion to the number of leaves. In the plot of D2 bead treatment showing the growth promotion, fruit quality in terms of fruit length, sugar degree, average fruit number and fruit weight were higher than those of control and CPS bead. In the treated plot of CPS bead, sugar degree and average fruit number were higher than those of control, but fruit length and average fruit weight were slightly lower than that of control. Total fruit number and weight were not showed among treatments in early harvesting stage, after that, the treated plot of D2 bead had more yield than those of CPS bead and control. In the treated plot of CPS bead, growth rate was similar with control, but total fruit number and weight were much more than that of control due to producing more fruit number per plant. Photosynthetic rate of 15th full opened leaf was higher in the treated plot of D2 bead than those of CPS bead and control at 30 DAT. These results were considered increasing fruit yield and

quality.

- 2) Effects of alginate bead incorporated with microorganisms promoting root growth on the growth and fruit quality of hydroponically grown pepper plants .

This study was conducted to investigate the effect of alginate bead incorporated with CPS and D2 selected under various environmental condition on the growth and fruit quality of hydroponically grown pepper plants through field application. Cucumber cv. Nokkwang was transplanted to styrofoam bed filled with mixlite at 60 days after sowing. Planting density was 30cm between plants and PBG solution (EC 2.0dS/m, pH 5.8–6.2) was fed. CPS and D2 bead were treated with 0.5 and 0.25g / plant, respectively, to contact directly with roots into substrate. To maintain microbial density, 0.5% CPS and D2 liquid were drenched into rhizosphere at 45 and 60 DAT, respectively.

Growth characteristics in terms of plant height, main stem length, stem diameter and the number of side shoots were higher in the treated plot of CPS bead than those of D2 bead and control. Judging from cucumber's results, the responses of microorganisms were considered to be occurred differently according to kinds of crop plants. In the treated plot of CPS bead treatment showing the growth promotion, fruit number and weight were higher than those of D2 bead and control.

7. Analysis of the microorganisms' physiological functions in cucumber.

- 1) Effects of the microorganisms on the reinforcement of cucumber root activities

CPS(*pseudomonas*, sp) and D₂(*saccharomyces*, sp) were selected as an effective microorganisms for promoting plant growth from mixture of the native

microorganism(MS101). The selected CPS or D₂ was treated individually or in combined form to the pots for a cucumber, musk-melon, and pepper culture. The microorganism treated plants showed 3-times higher root activity and 25% improvement in ion-conductivity than non treated control plants. These microorganisms seemed to promote plant growth through reinforcing the plant root physiological functions.

- 2) Effects of the microorganisms on the H⁺-ATPase activity of root plasma membrane(PM).

The sub-tropical plants like a cucumber cease the growth due to a decline of root activities under the circumstance of low soil temperature and defective transport of nutrients. H⁺-ATPase of root plasma membrane is well known to be related to the absorptive function of the ions and nutrients. We investigated the changes of H⁺-ATPase activities with the microorganism treatments as the criteria of root growth and development. The enzyme activity of CPS treated roots showed the highest activity after 2-3weeks and D₂ treated roots after 4-5weeks, and around 30% increment of the enzyme activities compared to the control roots.

- 3) Studies on the mechanism for the increasement of H⁺-ATPase activity with the microorganism treatment.

Several microorganisms are known to secrete the hormones like auxin and cytokinin. We investigated how CPS and D₂ induced the PM H⁺-ATPase activity of the cucumber roots. Cellular transcripts amount in the D₂ and CPS treated roots were higher than the controls at 4-5 and 2-3 weeks respectively in RNA blot analysis. Protein amount in PM were also higher in the treated roots than

those of control in Western blot analysis using the anti-H⁺-ATPase antibodies. Cellular transcripts and protein amounts increased at the same time as the enzyme activities increased. Trypsin treatment for the PM proteins increased the enzyme activities by same ratio (~25%) in both the treated and non treated control roots. From these results, we confirm that the microorganism induce the H⁺-ATPase gene expressions, and increase the enzyme activities in the treated roots.

8. Identification of the physiologically effective metabolites secreted by the microorganisms.

It has been well known that several microorganisms are secret the phytohormones under the stress conditions, and these hormone affect the plant growth and development. We identified that CPS and D₂ secreted IAA by the exogenous tryptophan supply and also by the interaction with the plant roots. CPS and D₂ were multiplied and formed colony around the plant roots through the interactions with roots. Microorganism treated root exudates were analysed by salkowski's reagent and HPLC, and IAA amount in the exudates of CPS or D₂ treated roots increased are culture time extended until 120hrs, but D₂ secreted 7 times higher amount of IAA than a CPS at 120hrs culture time. IAA or microorganism treated cucumbers showed higher growth rate than the controls, and also showed higher H⁺-ATPase activities. All of the IAA, CPS or D₂ treated plants showed same patterns of growth promotion, enzyme activity increasement, and induction of H⁺-ATPase gene expression. To prove that the growth promoting and increase of the root H⁺-ATPase activity were resulted from the bacterial auxin. Inhibitor of auxin transportation, TIBA, was treated to the roots of IAA, CPS, or D₂ treated plants and control plants. Plant growth promotion by the microorganisms and IAA was retarded in all of the TIBA treated plants, but

not in control plants.

9. Application of the CPS and D₂ microorganism for the cultivation of cucumbers in a farmer's vinyl house during fall to spring season.

To verify of the CPS and D₂ microorganisms are effective growth in the farms, we cultivate the cucumbers and peppers in the vinyl house. The microorganism were housed in alginated bead and mixed with field soil, and cucumber seedlings were planted for their roots to contact with the microorganisms. These microorganisms were effective in growth promotion of both the cucumber and pepper, but more effective to the pepper. However, rate of growth promotion by the microorganism was less in the field than in the pot filled with mixlite. This implies that soils of the farmer's field contain a population of many different effective and deleterious microorganisms, and CPS and D₂ do not perform their functions fully and/or do not overcome the effect of the deleterious microorganisms.

We finally registered a CPS and D₂ to KCTC(Korean Collection for Type Cultures) as the plant growth promoting microorganisms. Also we developed techniques to industrialize these microorganisms as a plant growth promoting substance in a solid and liquid form.

CONTENTS

CHAPTER 1. Introduction -----	31
Part 1. Needs of study -----	31
Part 2. Objectives and contents of study -----	38
CHAPTER 2. Trends of technical development in the related scientific area -----	42
Part 1. Technical development and troubles in the related scientific area -----	42
Part 2. Changes in the related scientific area -----	46
Part 3. Prospects in the related scientific area -----	47
Part 4. Validity of importing foreign techniques -----	48
CHAPTER 3. Research methods, results and discussion -----	50
Part 1 Effects of MS101 which is the mixture of indigenous microorganisms on the growth promotion of hydroponically grown sub-tropical plants -----	50
1. Effect of MS101 on the growth of cucumber seedlings-----	50
2. Effect of MS101 on the growth and fruit quality of muskmelon plants grown in rockwool -----	59
Part 2. Separation and identification of growth promoting microorganisms from MS 101 mixture -----	69
1. Morphological analysis of the root and leaf development by the selected microorganisms -----	69
2. Determining optimal concentration of effective microorganisms promoting plant growth -----	78
3. Selection of effective microorganisms for hydrophonic culture system -----	83
4. Identification of the selected microorganisms -----	91

Part 3. Optimization of environmental condition for maintaining selected microorganisms in hydroponic system -----	94
1. Development of housing system for concentrating selected microorganisms into rhizosphere of hydroponic system -----	94
Part 4. Improvement of fruit quality and yield in hydroponically grown cucumber plants as affected by alginate bead treatment with microorganisms promoting root growth -----	103
Part 5. Selection of optimum substrate and nutrient solution for maintaining microorganisms -----	111
1. Effects of alginate bead buried with microorganisms promoting root growth and kinds of substrates on the growth of hydroponically grown cucumber plants. -----	111
2. Effects of alginate bead buried with microorganisms promoting root growth and kinds of nutrient solutions on the growth of hydroponically grown cucumber plants. -----	118
3. Effects of alginate bead buried with microorganisms promoting root growth and the concentration of nutrient solution on the growth of hydroponically grown cucumber plants. -----	125
Part 6. Improvement of physical property of substrate used and development for reduction of continuous cropping injuries using by plant growth promoting microorganisms. -----	133
1. Analysis of root exudates during growing period and it's reusing effects on the growth of hydroponically grown cucumber and tomato plants. -----	133
2. Effect of microorganisms promoting root growth on reduction of root exudates during continuous cropping of hydroponically grown cucumber and tomato plants -----	142
Part 7. Effects of the selected microorganisms in alginate beads on fruit quality and yields -----	150
1. Effects on the cucumbers developments and fruit quality in hydrophonic system -----	150
2. Effects on the pepper developments and fruit quality in hydrophonic system -----	160
Part 8. Analysis of the microorganisms physiological functions in cucumbers -----	163

1. Effects of the CPS or D2 on the reinforcement of cucumber root activities -----	166
2. Effects of the microorganisms on the H ⁺ -ATPase activity of root plasma membrane(PM) -----	167
Part 9. Effects of the microorganisms on the cold resistance of cucumber -----	178
1. Developmental change of the cucumber with cold treatments -----	178
2. Studies on the acquired cold resistance by the microorganisms in cucumber -----	179
Part 10. Elucidation of the physiologically active substances for plant growth promotion -----	182
1. Identification of the physiologically active substances for the hydroponic system -----	183
2. IAA detection -----	185
3. Root colonization -----	188
4. Verification of the physiologically active substrate through HPLC analysis -----	189
5. Effect of IAA on the root physiological functions -----	192
Part 11. Application of the microorganisms with housing system to farmer's field -----	199
1. Test of the beaded microorganisms in farmer's field -----	199
Part 12. Registration of microorganisms and development of the starting goods for commercialization. -----	206
1. Registration of the microorganism -----	206
2. Studies to develop the starting goods using microorganisms -----	206
Part 13. Conclusion -----	210
CHAPTER 4. Achievement Evaluation -----	212
Part 1. Degree of achievement on research plan -----	212
Part 2. Contributions to the related scientific area -----	213

CHAPTER 5. Practical application of the results -----	216
CHAPTER 6. Scientific information collected through the project --	219
CHAPTER 7. References -----	220

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요-----	31
제 1 절 연구개발의 필요성-----	31
1. 기술적 측면-----	33
2. 경제·산업적 측면-----	36
3. 사회·문화적 측면-----	36
제2절 연구 개발의 목표와 내용, 범위-----	38
제 2 장 국내외 기술개발 현황-----	42
제 1절 국내외 관련 기술의 현황과 문제점-----	42
제2절 국내외 관련분야의 환경변화-----	46
제3절 앞으로 전망-----	47
제 4절 기술도입의 타당성-----	48
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과-----	50
제 1 절 미생물 혼합체(MS101)를 이용한 과채류의 수경재배시 작형 및 생육단계별 생육촉진 분석-----	50
1. 미생물 혼합체가 오이 유묘의 생육에 미치는 영향-----	50
2. 미생물 혼합체가 암면재배 머스크멜론의 생육단계별 생육에 미치는 영향-----	59
제 2절 식물 생육증진 미생물 혼합체로부터 기능성 미생물 분리,선별 및 동정-----	69
1. 미생물 혼합체 내 균주별 또는 균주 조합이 호온성 작물의 뿌리와 엽 생장촉진에 대한 형태학적 분석-----	69
2. 미생물혼합체로부터 분리한 미생물의 최적농도 설정 및 근부강화 미생물의 선발-----	78
3. 수경 재배에 적합한 기능성 균주선별 -----	83
4. 기능성 균주의 동정-----	91

제 3절 미생물의 효과적인 작물 생육 촉진을 위한 Housing system의 확립-----	94
1. 선발된 미생물의 수경재배 근권내 집적화 유도를 위한 housing system 모색-----	94
제 4 절 알긴산 비드화 미생물의시비 및 관비방법의 계량화-----	103
제 5 절 미생물의 지속적인 번식을 위한 housing 시스템에 적합한 전용배지 및 양액의 선발-----	111
1. 균주별 알긴산 비드화 적용 및 배지의 종류가 수경재배 오이의 생육에 미치는 영향-----	111
2. 균주별 알긴산 비드화 -----	119
3. 균주별 알긴산 비드화 적용 및 양액의 농도가 수경재배 오이의 생육에 미치는 영향-----	125
제 6 절 미생물을 이용한 배지의 물리성 개선 및 연작장해 경감기술 개발 -----	133
1. 오이와 토마토의 재배기간에 따른 root exudate 분석 및 재이용 과정에서 토마토 및 오이의 생육에 미치는 영향-----	133
2. 오이와 토마토 연작재배가 배지내 미생물, 균 및 root exudate의 함량에 미치는 영향-----	142
제 7 절 미생물의 알긴산 비드화 및 선발양액의 은실 적용을 통한 다수 및 품질향상-----	150
1. 미생물의 알긴산 비드화 처리가 수경재배 오이의 생장과 과실품질에 미치는 영향-----	150
2. 미생물의 알긴산 비드화 처리가 수경재배 고추의 생장과 과실품질에 미치는 영향-----	160
제 8 절 균주들의 작물에 대한 생리 활성 기능 분석-----	163
1. 실험 목적-----	163
가. 기능성 균주 처리에 따른 오이 뿌리의 양수분 및 이온 흡수율 비교-----	166

나. 작물 뿌리의 생리 활성 기능에 대한 기능성 균주들의 영향-----	167
제 9 절 오이의 저온 내성에 대한 미생물 영향-----	178
1. 실험 목적-----	178
가. 저온 처리에 의한 오이 생육 변화-----	178
나. 균주들에 의한 환경 스트레스(저온을 중심으로) 내성 강화 기능 분석-----	179
제 10 절 생리활성 물질 규명-----	182
1. 실험 목적-----	182
가. 수경재배에서의 생리활성물질 탐색: 유용 미생물을 이용한 수경재배-----	183
나. IAA detection-----	185
다. Root colonization-----	188
라. HPLC를 통한 생리활성 물질 규명-----	189
마. 작물 뿌리의 생리 활성 기능에 대한 생리활성물질의 영향-----	192
제 11 절 농가에서 Housing system(bead)으로 재배한 작물의 생리활성 기능 분석-----	199
1. 농가에서의 Housing system(bead) 적용 실험-----	199
1) 농가에서 재배한 작물의 생육 비교-----	199
2) H ⁺ -ATPase 활성도를 중심으로 한 오이와 고추 뿌리의 기능 분석-----	202
3) 뿌리 기능 향상 원인 분석 : H ⁺ -ATPase 유전자 발현 분석, 전사 및 번역수준에서의 조절 분석-----	202
제 12 절 기능성 균주 등록, 상품화를 위한 시제품 개발-----	206
1. 균주 등록-----	206
2. 시제품을 위한 기초 조사-----	206

제 13절 종합 결론-----	210
제 4 장 목표달성도 및 관련 분야에의 기여도-----	212
제 1절 목표 달성도-----	212
제 2절 관련분야 기여도-----	213
제 5 장 연구 개발결과의 활용계획-----	216
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보-----	219
제 7 장 참고 문헌-----	220

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발 필요성

수경재배는 연작장해를 회피할 수 있고, 양수분의 효율적인 이용으로 청정채소류의 생산이 가능하며, 단위면적당 수확량을 증대시킬 수 있는 장점이 있으며, 토양재배시 토양의 염류장해와 토양전염성 병원미생물의 만연으로 지속적 생산이 불가능해지면 서 수경재배로 대체하려는 농가가 크게 증가되고 있다. 특히, 수경재배는 관수, 시비 작업의 자동화, 표준화가 가능하여 영농규모의 확대가 가능하고, 경운, 퇴비, 제초, 방제작업 등이 생략되면서 부녀자의 참여가 용이한 장점이 있으며, 근권환경을 인위적으로 조절함으로써 작물의 생육과 품질이 조절 가능한 미래지향적 영농기법으로 인식되고 있다.

그러나 수경재배는 초기 시설투자비용이 높고, 계절변화에 따른 재배환경 차이 및 작물의 생육단계에 따른 배양액관리가 어려울 뿐만 아니라 그에 따른 뿌리전염성 병해 및 작물의 조기 노화발생으로 인한 생산이 불안정해질 가능성이 있다. 또한 소비적인 측면에서 일반 토양재배 생산품에 대한 수경재배 생산품의 차별화와 판매전략이 잘 이루어지지 않고 있다. 현재, 수경재배는 생산시설의 시스템화 및 첨단화를 통한 대규모적인 생산방식으로 발전되고 있으며, 환경부하가 적은 생산방식으로 개발이 이루어지고 있다. 특히, 노동력 절감과 작업환경 개선의 수단으로서 많이 이용되고 있는 우리나라의 수경재배는 생산의 자동화 및 시스템화가 더욱더 필요한 실정이다. 환경부하가 적은 수경재배로의 발전이라는 측면에서는 저농약을 통한 고품질 원예산물의 생산, 폐쇄순환식 수경재배를 이용한 배양액의 환경오염 방지, 락울에 대한 대체배지로서 각종 유기물질 농업부산물의 이용, 길항성 유용미생물과 천적을 이용한 생물학적 방제 및 식물생장촉진 근권미생물을 통한 양분이용의 효율화 등에 관한

새로운 기술개발이 진행되고 있다.

이러한 측면에서 유용미생물의 원예분야로의 도입이 절실히 요구되고 있다(김, 1992; 이, 1995; 최, 1995; Lazarovits와 Nowak, 1997; Aguilar와 Barea, 1997). 근권 미생물과 관련하여 Schroth과 Hancock(1982)는 토양미생물 524균주 중에서 병원균에 길항력이 우수하고 식물생장에 유리하게 작용한 균주는 2%정도에 불과하다고 하였으며, Schippers와 Baker(1987)는 식물의 근권에 군집하여 유해미생물이 증식하는 것을 억제하고, 식물의 근권부를 보호하고, 대사작용을 원활하게 해줌으로서 양수분의 흡수를 도와주는 식물생장 촉진 미생물 (Plant growth promoting rhizobacteria; PGPR)이 존재하는 반면에, 뿌리에 기생하여 병해를 유발시키거나 대사산물이 뿌리의 활동을 억제하는 식물에 유해한 미생물 (Deleterious rhizosphere microorganisms ; DRMO)도 동시에 존재한다고도 보고하였다.

식물생장 및 억제작용을 나타내는 근권미생물 중에서 경합력이 우수한 미생물은 다음과 같은 특성을 보유하고 있다. 종자에 입식할 수 있어야 하고, 운동성 (mobility), 뿌리 침출물에 대한 주화성(Chemotaxis to root exudates)등을 갖고 있어야 한다(Seymour and Doetsch, 1973). 뿌리에 대한 입식능력은 기주식물과의 상호작용 및 다른 근권 미생물들과의 경합작용에서 필수적인 요인이며, 식물뿌리에 입식하는 미생물들은 전구물질(Precursors)을 첨가유무와 관계없이 auxins, gibberellins 및 cytokinines등의 호르몬을 생산하고, 근권미생물 처리에 의해서 유기되는 식물생장 촉진 효과 중에서 그 일부는 IAA 또는 gibberellin류의 호르몬 활성화에 의한 것으로 보고되고 있다(Brown, 1974).

근권미생물을 접종하여 양수분 흡수를 촉진시키려는 연구는 양수분이용성의 향상과 촉진이라는 측면에서 주로 이루어지고 있으며(Willy 등, 1983; Lifshitz 등, 1987; Sarig 등, 1988; Dashti 등, 1997; Aguilar와 Barea, 1997), 특히 용인균을 이용한 토양내 불용성 인의 분해 및 흡수 등에 좋은 연구결과(Gerretsen, 1984; Glick 등, 1997)를 보이고 있다.

그러나, 유용미생물을 수경재배 근권에서 이용하는 것에는 많은 문제가 남아 있다.

수경재배는 토양을 대체하여 무기성 고품 및 비고형배지에서 무기양분을 영양원으로 공급하여 작물을 생산하는 방식이기 때문에 주로 유기물을 영양원으로 살아가는 근권미생물에게는 생육에 매우 불리한 환경이다(Barber와 Lynch, 1977; Krieg와 Hort; 1984). 수경재배 근권에 있는 유용미생물 및 병원성 미생물은 이러한 무기성 근권환경에서 무기물뿐만 아니라 뿌리 분비물이나 과편, 뿌리조직 등의 유기물을 영양원으로 이용하여 생육하고 있다(Lynch, 1982; 小林, 1992). 수경재배에서 유용미생물의 이용은 균주라는 단일요인 뿐만 아니라, 근권미생물 및 영양원이라는 복합적인 관련성 속에서 연구하고 개발해야 할 필요성이 있다.

따라서 본 연구는 식물의 생장을 촉진하는 유용미생물 혼합체에서 뿌리강화 미생물을 순수분리하여 동정하고, 유용미생물의 배양적 최적조건을 조사하여 균주의 대량생산체계를 확립하고, 이들과 수경재배 작물과의 상호연관성을 고찰하고자 하였다. 또한 식물생장촉진 단일 근권미생물을 수경재배 과채류의 근권에 효율적으로 입식하고자 housing system을 모색하고, 이들을 유묘단계에서 뿐만 아니라 재배전반에 걸쳐 적용하여 생육의 촉진과 과실의 품질 및 수량의 증가를 도모하여 장래에 유용한 미생물을 과채류 수경재배에 실용화할 수 있는 기술을 개발하고자 하였다.

1. 기술적 측면

가. 오이, 멜론과 방울토마토 등과 같은 시설재배 과채류들을 각종 환경 스트레스와 병해로부터 보호하여 작물의 수량과 품질을 향상시키는 기술 개발은 재배 기술적인 면 외에 경제적으로도 매우 중요하다.

나. 현재 농가에서는 대다수의 과채류를 병해와 환경스트레스로부터 보호하기 위하여 양액 또는 토양 관비재배 방법으로 시설재배를 하고 있다. 양액재배의 문제점들이 발생하는 원인으로 1)근권의 온도변화 (고온 또는 저온)에 의한 뿌리의 활력 저하, 2)근의 노화와 착과절위이하 하부엽들의 노화, 3)과실 비대기의 강한 sink

load로 인한 새로운 엽 전개에 어려움, 4)전개된 엽의 크기가 확대되지 않아 충분한 광합성을 할 수 없다는 점등을 들 수 있다.

다. 일반적으로 작물들은 물질들의 sink/source 관계를 조직적으로 유지함으로써 영양생장과 생식생장과의 균형을 이루고 원활한 생장과 과실 생산을 하게 된다. 반면에 영양생장과 생식생장의 균형이 깨질 경우 근사(root death), 또는 부전과 (fruit abortion)가 유발되어 수량과 품질에 치명적인 영향을 끼치게 된다.

라. 오이 등의 호온성 작물의 경우 영양생장과 생식생장의 밸런스가 잘 이루어지지 않아 잎조직의 생장 제한, 뿌리기능의 약화, 지하부와 지상부 또는 과실간에 동화물질들에 대한 경합이 발생하여 생리장애와 병해가 일어나며 이 현상은 열악한 과실 품질, 저위수량과 직접적으로 관련되어 있다.

마. 이러한 문제를 개선하기 위하여 가장 중요한 것은 뿌리의 기능을 강화시키는 것이다. 겨울철에 시설재배하는 농가에서는 호온성 작물들의 뿌리기능을 강화시키기 위하여 유사작물의 뿌리를 대목으로 사용하고 있으나, 접목에 요구되는 경비 부담과 재배 제한성과 같은 문제점이 수반되고 있다. 그 외에 뿌리기능을 향상시키기 위하여 이온이나 영양물질 흡수기능과 관련된 유전자들을 이용한 형질전환 식물체 개발을 고려할 수 있으나 아직 실용할 수 있는 단계는 아니다.

바. 외국에서는 미생물을 이용한 작물재배 기술이 발달되어 실용화가 이루어진 반면에 우리나라에서는 관비재배나 양액재배에 미생물을 이용한 사례가 거의 없어 재배기술체계의 개발과 실용화를 위한 기술보급이 시급한 실정이다. 우리나라의 지형과 기후에 맞는 토착미생물을 개발하여 산업적으로 이용하려는 시도가 일부 진행되고 있으나, 작물의 생육촉진을 효과적으로 유도하는 유용미생물의 분리, 분리한 유효미생물의 기능성 탐색 및 이들의 재배환경에 따른 생리, 생태적 반응에

대한 연구는 아직까지 기본 체계도 확립되어 있지 않다.

사. 근부 강화 기능성 미생물을 이용하여 오이의 뿌리기능 향상과 생육 촉진을 유도하기 위해서는 유효미생물 혼합체로부터 기능성 균들을 분리, 동정하였으며 이들의 작물 생육에 대한 효능을 조사하여 할 필요가 있다. 토착 미생물 혼합체에서 오이 뿌리의 생리기능 향상과 관련된 균주, 엽 성장 촉진과 관련된 균주들을 분리했으며, 호온성 작물 재배에 이용할수 있도록 재배 체제를 확립 하여야 할 것이다.

아. 지금까지 거의 연구되어 있지 않은 유효토착 미생물을 이용한 양액재배 및 토양 관비재배에 적용할 수 있는 기술개발은 동계 호온성 과채류의 시설재배시 부적절한 환경, 품종선택, 재배기술 등 현재 우리나라의 시설재배가 안고 있는 많은 문제점들을 보완하게 될 것이다. 따라서 미생물 전용 양액재배 기술을 농가에 보급함으로써 양액재배의 과학영농기술 체계를 확립할 수 있을 것이다.

자. 유용미생물을 이용한 양액재배 기술은 식물, 근권 미생물 및 영양원이 라는 복합적인 관련성 속에서 연구하고 개발해야 할 필요성이 있다. 양액재배 근권에 있는 유용미생물 및 병원성 미생물은 무기성 근권환경에서 뿌리 분비물이나 뿌리조직 등의 유기물을 이용하여 번식하여야 한다. 따라서 불리한 환경에서 살아가는 미생물을 양액재배에 이용하기 위해서는 유효 근권미생물의 분리, 동정 및 대량생산, 양분이용성 증대 및 양액재배 작물과 관련된 전용 양액처방 기술등이 개발되어야 실용화가 이루어 질 수 있을 것이다.

차. 본 연구는 시설재배 과채류 작물의 양액재배와 토양 관비재배에서 뿌리 전염성 병해와 작물 생육 촉진과 관련된 유용미생물들을 실용화하기 위한 기술 개발을 목표로 한다. 이를 위하여 1) 양액재배에 있어서 작물별 유용미생물의 생장

과 발육에 미치는 환경 특성을 구명하며, 2) 균주의 대량생산체계를 확립하고, 3) 양액재배 작물과 연관시켜 유용미생물이 포함된 전용양액처방을 개발하여 과채류 양액재배에 실용화할 수 있는 기술을 개발코자한다.

2. 경제·산업적 측면

가. 우리 나라의 지형과 기후에 적합한 유효토착 미생물을 이용한 양액재배 및 토양 관비재배 기술의 확립은 다음과 같은 장점을 지니고 있어서 과채류의 가격 및 품질 경쟁력을 높이고 농가소득 증대에 이바지할 것이다.

- 1) 유효토착 미생물을 이용한 양액재배 기술은 양수분을 효율적으로 이용하므로써 양액 비료 사용량을 절감하는 경제적인 효과를 기대할 수 있다.
- 2) 미생물을 이용한 양액재배 기술로 병해 방제, 관리 등 생산비를 절감시킬 수 있다.
- 3) 근권환경의 안정화 범위가 확대를 되어 성장제한을 완화, 조기수확이 가능하며, 따라서 고품질의 상품을 다수확 할 수 있을 것으로 기대된다.
- 4) 미생물 양액 재배기술을 저온이나 병해로부터 내성을 유도하는 재배법으로 발전시켜 동계에 과채류의 시설재배시 에너지 절감과 생산량의 증가 효과를 기대할 수 있다.

나. 미생물을 이용한 양액재배 및 토양 관비재배 기술은 채소나 화훼 등 다양한 원예작물의 시설재배로의 기술 도입이 확장될 수 있으며, 또한 관리의 시스템화 및 자동화에 따른 경영규모의 확대가 가능하여 생물산업의 발전에도 크게 기여할 것이다.

3. 사회·문화적 측면

가. 미생물을 이용한 재배기술 개발은 원예작물의 가격 및 품질 경쟁력을 높임으로써 현재 우리 나라가 겪는 농산물 교역 불균형을 극복하고 우리 농업의 국제경쟁력을 크게 강화시킬 것이다. 우리나라 농산물 교역은 수출보다는 저가 농산물 위주의 수입이 주를 이루고 있는 상황에서 현재 수출을 주도하고 있는 원예작물에 대하여 저비용, 고품질과 다수확을 위한 실용화 기술개발은 시대적으로 중요한 의미를 지닌다.

나. 미생물을 이용한 재배기술은 토양뿐만 아니라 주변 환경을 보호하는 환경친화형 농업기술이다.

다. 미생물을 이용한 식물 성장촉진 기술의 개발은 유전공학 기술이 안고 있는 공해문제의 위험성이 적다. 유전자 도입에 의한 형질전환 작물들은 인체에 많은 부작용을 가져올 수 있으며 생태계 파괴라는 위험성을 지니고 있으나 미생물을 이용한 기술은 생물체간의 상호작용을 이용함으로써 생태계의 유기적 관계를 더욱 활성화시키는 자연적인 농업기술이다.

제 2 절 연구개발 목적과 범위

1. 연구 개발 목적

기능성 미생물을 이용하여 오이, 멜론과 망울 토마토 등 호온성 과채류의 뿌리 기능 강화 및 생육 촉진을 유도하는 양액재배 및 토양 관비 기술을 개발하고 농가에 서 실용화 할 수 있는 미생물 이용 양액재배 기술 시스템의 확립을 목표로 한다.

2. 세부 연구 내용과 연구 범위

가. 미생물 혼합체(MS101)를 이용한 과채류의 수경재배시 작형 및 생육단계별 생육촉진 분석

- 1) 미생물 혼합체가 오이 유묘의 생육에 미치는 영향
- 2) 미생물 혼합체가 암면재배 머스크멜론의 생육단계별 생육에 미치는 영향

나. 식물 생육증진 미생물 혼합체로부터 기능성 미생물 분리, 선별 및 동정

- 1) 미생물 혼합체 내 균주별 또는 균주 조합이 호온성 작물의 뿌리와 엽 생장 촉진에 대한 형태학적 분석
- 2) 미생물혼합체로부터 분리한 미생물의 최적농도 설정 및 근부강화 미생물의 선별
- 3) 수경 재배에 적합한 기능성 균주선별
- 4) 기능성 균주의 동정

다. 생물의 효과적인 작물 생육 촉진을 위한 Housing system의 확립

- 1) 미생물의 수경재배 근권내 집적화 유도를 위한 housing system 모색

라. 알긴산 비드화 미생물의 시비 및 관비방법의 계량화

마. 미생물의 지속적인 번식을 위한 housing 시스템에 적합한 전용배지 및 양액의 선발

- 1) 균주별 알긴산 비드화 적용 및 배지의 종류가 수경재배 오이의 생육에 미치는 영향
- 2) 균주별 알긴산 비드화 적용 및 양액의 종류가 수경재배 오이의 생육에 미치는 영향
- 3) 균주별 알긴산 비드화 적용 및 양액의 농도가 수경재배 오이의 생육에 미치는 영향

바. 미생물을 이용한 배지의 물리성 개선 및 연작장애 경감기술 개발

- 1) 오이와 토마토의 재배기간에 따른 root exudate 분석 및 재이용 과정에서 토마토 및 오이의 생육에 미치는 영향
- 2) 오이와 토마토 연작재배가 배지내 미생물, 균 및 root exudate의 함량에 미치는 영향

사. 미생물의 알긴산 비드화 및 선발양액의 온실 적용을 통한 다수 및 품질향상

- 1) 미생물의 알긴산 비드화 처리가 수경재배 오이의 성장과 과실품질에 미치는 영향
- 2) 미생물의 알긴산 비드화 처리가 수경재배 고추의 성장과 과실품질에 미치는 영향

아. 균주들의 작물에 대한 생리 활성 기능 분석

- 1) 기능성 균주 처리에 따른 오이 뿌리의 양수분 및 이온 흡수율 비교
- 2) 작물 뿌리의 생리 활성 기능에 대한 기능성 균주들의 영향
(가) 미생물 처리에 따른 H^+ -ATPase 활성도 변화 분석

- (나) Housing system에 의한 미생물이 뿌리 원형질막 H⁺-ATPase 활성도에 미치는 영향
- (다) 미생물에 의한 H⁺-ATPase 활성도 증가 원인 분석
- (라) 막 단백질의 trypsin 처리에 따른 H⁺-ATPase 활성도 변화 양상 분석
- 3) H⁺-ATPase 유전자 발현 양상과 조절 유전자 14-3-3 유전자의 발현분석
- 4) H⁺-ATPase 유전자 발현 분석-전사수준에서의 조절 분석
- 5) H⁺-ATPase 유전자 발현 분석-번역수준에서의 조절 분석

차. 오이의 저온 내성에 대한 미생물 영향

- 1) 저온 처리에 의한 오이 생육 변화
- 2) 균주들에 의한 환경 스트레스(저온을 중심으로) 내성 강화 기능 분석

차. 생리활성 물질 규명

- 1) 수경재배에서의 생리활성물질 탐색: 유용 미생물을 이용한 수경재배
- 2) IAA detection
 - 가) salkowski's reagent 반응 결과
 - 나) CPS, D2 균주의 시간대별, Tryptophan 농도별 IAA 생성량
- 3) Root colonization
- 4) HPLC를 통한 생리활성 물질 규명
- 5) 작물 뿌리의 생리 활성 기능에 대한 생리활성물질의 영향
 - 가) IAA 처리에 따른 생장 변화와 H⁺-ATPase 활성도 변화 분석
 - 나) IAA처리와 균처리에 의한 H⁺-ATPase 유전자 발현 비교-번역수준에서의 조절 비교
- 6) 오이 뿌리 기능 강화 원인으로 미생물이 분비한 오옥신 기능 재확인
 - 가) 오이 지상부 성장에 대한 TIBA(2,3,4-Triobenzoic acid)처리 효과
 - 나) 저온 및 TIBA 처리 시 뿌리의 H⁺-ATPase 활성도 변화

카. 농가에서 Housing system(bead)으로 재배한 작물의 생리활성 기능 분석

1) 농가에서의 Housing system(bead) 적용 실험

가) 농가에서 재배한 작물의 생육 비교

나) H^+ -ATPase 활성도를 중심으로 한 오이와 고추 뿌리의 기능 분석

다) 뿌리 기능 향상 원인 분석 : H^+ -ATPase 유전자 발현 분석-전사 및 번역수준에 서의 조절 분석

타. 기능성 균주 등록, 상품화를 위한 시제품 개발

1) 균주 등록

2) 시제품을 위한 기초 조사

가) 미생물의 실용화를 위한 균주들의 대량생산 체제 확립

나) 동결 건조된 bead의 안정도

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내·외 관련기술의 현황과 문제점

근권(rhizosphere)이라는 용어는 Hiltner(1904)에 의해 처음으로 정의되었으며, 식물의 뿌리에서 분비되는 탄소원과 질소원(carbon and nitrogen sources) 및 에너지원으로 모든 근권미생물의 생장이 이루어지는 지역을 포함하고 있다. 일반적으로 수경재배를 하고 있는 근권에는 미생물이 거의 없다고 생각하고 있으나 실제로는 토양에 비해서 적은 양이지만 다수의 세균 및 진균류들이 고형배지, 배양액, 수경재배 시스템 및 뿌리 등에 존재하고 있는 것으로 보고되고 있다(山崎, 1991).

근권미생물을 접종하여 식물의 양수분 이용성을 향상시키려는 연구는 식물의 양수분 흡수 촉진의 측면에서 주로 진행되어 왔다 (Duff 등, 1963; Kapulnik 등, 1983). *Bacillus megaterium*과 *Pseudomonas fluorescens* 등을 식물체의 뿌리나 배지에 접종했을 경우 나타나는 식물생장촉진 효과는 재배환경의 조건에 따라 다양하게 나타나는 것으로 보고되었다(Gerresten, 1948; Duff 등, 1963; Martin, 1973). Sarig 등(1988)은 포장실험시 식물생장촉진 근권미생물을 처리하여 식물체의 수분 이용성을 향상시켰다는 보고를 하였는데, *Azospirillum brasilense*를 접종하면 사탕수수의 수분 이용성이 향상되어 잎의 수분포텐셜이 높아지고, 수관(canopy) 온도가 낮아지며, stomatal conductivity와 증산율이 증가되었는데, 이 경우 미생물을 접종한 토양내 총 수분함량은 미생물을 접종하지 않은 대조구의 토양수분함량에 비해 약 15% 정도 많았던 것으로 보고하였다.

일부 근권미생물들은 식물의 지상부와 뿌리 발달을 저해하는 미생물에 대하여 항생작용을 갖는다 (Brown, 1974; Kloepper 등, 1980). 이러한 길항성 근권미생물은 뿌리전염성 병원균의 생육을 억제함으로써 식물의 생장을 촉진시킨다(Lesinger와

Margraff, 1979). 병원성 미생물의 성장을 억제하는 메카니즘에는 항생물질 (Howell 과 Stipanovic, 1979; Baker와 Scher, 1986)과 철 킬레이트 화합물의 생산 (Nielands, 1981a; Nielands와 Leong, 1986), 양분을 이용하기에 좋은 위치 확보(Lynch, 1982; Schroth와 Hancock, 1982) 등이 보고되고 있다.

식물뿌리에 입식하는 많은 미생물들은 전구물질(precursors)을 첨가하거나 첨가하지 않은 배지에서 auxins, gibberellins 및 cytokinins 등의 호르몬을 생산하는 것으로 알려져 있다(Brown, 1974). 근권미생물 처리에 의해서 유기되는 식물생장촉진 효과 중에서 그 일부는 IAA 또는 gibberellin류의 호르몬 활성화에 의한 것으로 보고되고 있다(Brown, 1974). 그러나 현실적으로 이러한 가설들은 일반적으로 인정되지 않고 있는 실정이다. 멸균한 토양을 이용하여 실시한 실험에 의하면 식물생장촉진 근권미생물의 직접적인 작용에는 호르몬류의 물질이 포함되어 있지 않은 것으로 보고되어 있다(Suslow, 1982; Klopper 등, 1988).

현재 외국에서 수행되고 있는 수경재배에서 식물생장촉진 근권미생물의 이용에 관한 연구를 보면 주로 *P. sp.*와 *A. sp.*를 처리하여 양수분의 효율적인 이용 (Sarig 등, 1998)과 생물학적 방제를 실시 (Van Peer 등, 1988)하는 측면에서 주로 실시하고 있다. 수경재배에 적합한 식물생장촉진 근권미생물(PGPR)이 구비해야 할 가장 중요한 요건은 근권에 처리한 후 장기간 지속적으로 생존하며, 뿌리에 생리활성적으로 유용한 효과를 보여야 한다는 것이다(Brown, 1974; Klopper 등, 1988). 근권에 미생물을 처리 후 생장이 저하되는 균주는 뿌리 주위에 있는 토착미생물에 비해 경쟁력이 낮기 때문이다(Klopper 등, 1988). 그 다음으로 중요한 점은 효율적으로 뿌리 표면(epidermal cell)에 입식할 수 있는 능력을 소유하여 식물생장에 직·간접적으로 유용한 생리적 작용을 할 수 있어야 한다는 점이다(Suslow, 1982; Suslow와 Schroth, 1982).

수경재배 작물의 성장과 근권미생물의 관계를 보면 Van peer와 Schipper(1988)는 수경재배 작물의 근권 배양액에 미생물 배양액을 처리했을 경우 세균의 수, 특히 뿌리 내생근균인 *pseudomonas*의 수와 작물의 생장은 부의 상관관계(negative

correlation)가 있다고 하였다. 그러나 PGPR인 *P. sp.* WCS417의 처리는 *pseudomonas*에 의한 식물의 성장저하를 방제한다. 이러한 식물의 성장촉진은 *P. sp.* WCS417이 뿌리 내생미생물로서 적은 밀도로 서식함으로써 미생물 처리 전에 뿌리 내부에 서식하고 있는 *pseudomonas*와의 치환(displacement)작용에 의한 것으로 보고되고 있다. 이러한 결과로 미루어 보아 식물의 성장을 억제하는 유해 *pseudomonas* 등이 수경재배시스템, 특히 뿌리 내부의 근권 미생물로서 쉽게 발생할 수 있다는 것을 보여주고 있다.

Van Peer와 Schippers 등(1988)에 의하면 토마토, 오이, 상추 및 감자 등의 수경재배시 식물성장촉진 근권미생물인 *pseudomonas* 균주들의 처리시 지상부 및 지하부의 생체중을 증가시켰다고 하였다. 식물의 성장촉진은 근권의 유해미생물, 특히 유해한 부리 내생미생물의 억제에 따른 성장촉진 결과이다. NFT와 암면경 등 인공배지 내의 미생물 군락의 조성은 토양재배에 비하여 비교적 덜 복잡한 것으로 생각된다. 그러므로 식물의 생장에 유해한 근권미생물의 발생 및 전염이 더욱 더 급속하게 발생할 위험성이 있다. 수경재배시 근권의 길항성 미생물의 처리는 이러한 유해미생물의 발생을 억제한다.

식물의 성장을 촉진하는 근권미생물에 관한 연구가 토양재배를 중심으로 일부 소개되고 있다. Lifshitz 등 (1987)은 식물성장촉진 근권미생물 균주인 *P. putida*를 canola유묘에 처리하여 인 (32-P-labelled phosphate)흡수를 촉진시켰으며, Sarig 등 (1988)은 토양 포장실험에서 *Azospirillum brasilense*를 접종하면 사탕수수의 수분 이용력이 향상되어 엽의 수분포텐셜이 높아지고 수관(canopy) 온도가 낮아지며, stomatal conductivity와 증산율이 높아졌다고 보고하였다.

네덜란드나 일본 등 선진농업국의 주요 연구개발 방향이 미생물을 이용한 토양재배기술에 치중되어 있기 때문에 상대적으로 토양미생물을 이용한 관비재배나 수경재배 기술에 대한 연구개발의 폭은 매우 넓으며 경쟁력도 지닐 수 있다. 최근에 시설재배를 통한 과채류 재배에서도 환경친화적 농법으로의 전환이 크게 요구되고 있어 유용미생물의 원예적 이용이 시도되고 있다. 유용미생물의 이용은 주로 식물의 성장

을 촉진시키고 뿌리 전염성 병해에 대한 생물학적 방제력을 높이는 데 사용되고 있다.

예로 본 연구팀은 멜론 수경재배에 근권 미생물을 사용한 효과를 조사한 결과 다양한 면에서 효능을 나타냈으며, 주된 기능으로 작물의 생육촉진과 뿌리의 양수분 흡수 기능을 강화시켰다 (Jang, 1999). 따라서 유용미생물을 다양한 작물의 수경재배에 이용하여 작물의 생장을 촉진시키는 재배기술의 개발이 필요하다. 본 연구에서 사용한 미생물은 오이, 토마토, 고추 등에서 엽면적 증대, 광합성증대, 뿌리생장촉진 등 생육촉진 효과가 있는 것으로 보고되었다 (Jang, 1999). 야산과 들판에서 서식하며 토양에 적응하고 있는 토착미생물인 고초균, 곰팡이류, 유산균, 광합성세균, 효모균, 방선균을 분리하여 특수공법 (특허 제 115425, 제 0202285, 제 0207061호)으로 배양시킨 미생물들의 혼합체들로부터 뿌리와 엽 생장을 촉진시키는 다양한 균주들을 탐색하여 관비 및 양액 재배에 이용하고자 한다.

또한 과채류 시설 재배에서 가장 문제가 되고 있는 환경내성, 특히 저온이나 병충해 내성 증가 기능을 갖는 균주들을 분리, 동정하여 관비 또는 수경재배에 응용하여야 할 것이다. 본 연구팀은 저온 민감성인 오이를 조직배양 할 경우 미생물 첨가균이 대조균에 비하여 저온 내성을 지니고 있음을 확인하였다.

작물의 생육을 촉진시키는 토착 미생물을 수경재배 및 토양 관비재배 기술에 실용화하기 위해서는 토양이나 양액내 일정량 이상의 균을 유지시키는 기술이 개발되어야 할 것이다. 본 연구팀이 분리한 균주들을 토양과 양액에서 작물 재배시 기능을 조사한 결과 일정시기마다 균주들을 재 투입하여야 작물에 대한 생육촉진 기능이 유지되었으며, 과도한 양의 균은 오히려 역효과가 발생하였다. 또한 토양에 처리할 경우 토양 토착 미생물들에 의하여 균 농도가 희석되어 기능이 다소 떨어짐을 확인하였다. 따라서 미생물을 이용한 재배 기술을 실용화하기 위해서는 균들이 계속 번식할 수 있는 system, 즉 housing 역할을 하는 system을 개발하여야 할 것이다.

제 2 절 국내외 관련분야의 환경변화

지나친 화학비료와 농약 사용은 토양의 산성화가 증가 되었으며, 또한 생태계 파괴 및 작물의 다양성 감소등의 환경문제를 일으켰다. 이러한 문제의 해결로써 환경친화적 작물재배가 대두되고 있다. 천적을 이용하거나, 화학비료나 농약을 유기물비료, 미생물비료로 대체하고 있는 추세이다. 이들 중 미생물비료는 상당한 장점과 설득력을 가지고 있다. 현재 유전자 조작 작물 개발하여 이를 극복하고자 하였으나, 여러 가지 문제들이 발생되고 있으나 미생물 비료는 이러한 문제들을 상당부분 해결해주며 작물의 생육증진에 효과를 보여주고 있다. 기존의 연구들에 의하면 상당수의 토양미생물들은 작물생육에 지대한 영향을 미치며 작물에 따른 미생물의 기능 차이도 보고 되었다. 이러한 미생물에 의한 작물 생육 촉진 기작은 현재 연구가 진행되고 있으며 대표적으로 *Pseudomonas* sp.은 비교적 잘 알려져 있다. *Pseudomonas* 속은 ISR(Induced systemic Resistance)을 통하여 병충해 저항성에 관련된 식물 유전자를 turn on 시킴으로서 병충해에 보다 강한 내성을 가지는 것으로 보고 되었으며 또한 고온 저온 한발 중금속과 같은 다양한 환경 Stress하에서 성장촉진기능이 보고 되어있다. 그러나 이러한 미생물들을 이용하여 수경재배에 이용하는 연구는 아직까지 연구된바가 없다. 수경재배에서 가장 문제가 되는 것은 뿌리 노화(Senesis)이다. 따라서 수경 재배 시 뿌리노화를 억제하는 방안으로 뿌리기능을 향상시키는 미생물과 뿌리와의 상호 작용을 분석하고 이러한 상호 작용에 의해 생성되는 생리활성물질에 대한 연구가 수행되어야 할 것이다.

제 3 절 앞으로 전망

1. 경쟁력있는 원예산업을 육성하기 위한 당면과제는 기존 품목들의 생산량을 증가시키고 아울러 새로운 수출품목을 적극 개발해나가는 것이다.

2. 원예작물을 이용한 3차 산업, 즉, 건강보조 식품 및 미용 분야로의 확장으로 원예산물의 국내 수요가 증가할 것이며, 환경친화적 생산기술 개발로 건강에 유효하고 안전하며 품질이 우수한 작물의 대량생산 체제가 확립되면 수출을 통하여 해외 수요 또한 확장될 것이다.

3. 미생물 양액재배 기술은 주요 과채류의 수출농업 육성을 제한하는 문제점과 환경문제를 동시에 해결할 수 있기 때문에 이 기술의 개발은 매우 시의 적절하다고 하겠다.

4. 유전공학적으로 형질전환된 동·식물체들은 자연생태계의 파괴, 인간 대사작용에 미치는 영향 등으로 유전공학 기술에 의한 형질전환체 사용은 전세계적으로 규제되고 있는 실정이다.

제 4 절 기술도입의 타당성

1. 농업선진국으로부터 근권 미생물(PGPR)을 이용한 학술적인 재배 기술의 도입은 가능하다. 외국의 경우 식물 성장촉진 근권 미생물(PGPR)에 대한 연구가 비교적 활발히 진행되어 왔다. 양액 재배시 근권 미생물들에 의한 효과는 배지 조성, 첨가하는 금속 이온, 미생물 농도에 따라 뿌리로부터의 이온 흡수, 지상 및 지하부의 성장촉진의 효과가 다르며 또한 근권 기원 진염병에 대한 저항성 등의 효과도 유도된다고 보고되었다.

2. 그러나 근권 미생물을 양액 재배를 위한 상품으로 개발한 사례는 흔치 않다. 양액 재배 활성제로 상품화 된 것으로는 미국의 MIRACLE GROW, 국내의 AM 등과 그 외에 일본과 유럽에서 개발된 상품들이 있다. 그러나 이러한 제품들의 조성은 노하우로 처리하여 어떤 미생물을 어느 농도로 첨가했는지 확인 할 수 없다.

3. 국내의 여러 연구기관에서 기능성 미생물을 분리하여 미생물 제재로 사용하고 있지만 성공 사례는 극히 드물다. 그 이유로 실험실 조건하에서 미생물의 생육 조건이 적절하기 때문에 미생물이 일정 농도로 유지되고 그에따라 성장촉진 효과가 있는 것으로 해석하였다. 그러나 이러한 균주들은 포장에서 실험하게 되면 거의 실패하는데 이는 단지 미생물을 토양에 뿌려주는 것으로 끝나기 때문이다. 토양중에는 수많은 미생물이 존재하여 특정 유효한 미생물의 수는 상대적으로 극히 적으며, 또한 토양 자체에는 영양분이 결핍되어 기능성 미생물이 생존하기에는 열악한 조건으로 대부분의 경우 미생물은 30일 이내에 거의 소멸된다. 이러한 원인을 제거하기 위하여 본 연구팀은 Housing 개념을 도입하고자 한다. 즉, 미생물을 bead화하여 균주 밀도를 높여주며 또한 bead를 먹이로 이용하게 하므로써 토양속에서 오랜기간 생존시키고자 한다.

4. 또한 외국에서 개발된 미생물 소재 생장촉진제를 도입하기 위해서는 국내 환경에서의 적응력이 검토되어야 한다. 환경적응성이 매우 예민한 오이나 멜론 같은 작물에 대하여 국내 환경에의 적응 능력이 충분히 검증되지 않은 상태에서 외국의 재배기술을 그대로 이식시키는 것은 매우 위험한 발상으로 실패할 확율이 매우 높다.

5. 따라서, 우리 나라 환경에 적합한 재배 기술의 도입은 현실적으로 어렵다. 작물의 특성, 재배자의 특정 작물에 대한 재배기술 수준 등을 고려하여 우리 나라의 기후와 토질 여건에 적합한 실용적이며 합리적인 농업기술의 개발이 보다 효과적일 것이다.

6. 이미 본 연구팀은 사전 실험을 통하여 우리나라 조건에 적합한 MS균의 오이에 대한 생장촉진 기능을 확인한 상태이다. 로열티를 지불하고 외국 기술을 도입하는 것보다 이미 본 연구팀이 분리, 동정한 균들을 이용한 재배기술의 개발이 장기적으로 보다 효과적인 것으로 판단된다.

제 3 장 연구 개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 미생물 혼합체(MS101)를 이용한 과채류의 수경 재배시 작형 및 생육단계별 생육촉진 분석

1. 미생물 혼합체가 오이 유묘의 생육에 미치는 영향

가. 실험목적

현재 농가에서는 과채류의 시설재배시 병해와 각종 환경스트레스로부터 보호하기 위하여 양액 또는 토양 관비재배 방법으로 전환하고 있다. 그러나 양액재배의 경우 초기수량은 높으나 시간이 지남에 따라 엽면적 및 근생장 감소 결과로 과실과 각 기관으로의 동화산물의 배분이 저하되어 재배작물의 수량과 품질의 저하 등과 같은 문제점에 직면하게 된다. 양액재배시 이러한 문제점들이 발생하는 원인으로 근권의 온도변화(고온 또는 저온)에 의한 뿌리의 활력 저하, 근의 노화와 착과절위이하 하부엽들의 노화, 과실비대기의 강한 과실부담으로 인한 새로운 엽 전개에 어려움, 전개된 엽 크기가 확대되지 않아 충분한 광합성을 할 수 없음 등을 들 수 있다.

일반적으로 작물은 영양생장과 생식생장과의 균형을 이룸으로써 원활한 생장과 과실 생산을 하게 된다. 이는 작물체내에 sink/source 관계가 조직적으로 유지됨으로써 가능한 것이다. 뿌리에서 흡수한 이온들과 영양물질의 지상부로의 이동과, 잎조직에서 동화한 탄수화물과 호르몬을 포함한 성장조절 물질들의 뿌리로의 전달이 조화를 이루어 각 조직은 기능을 유지할 수 있다. 반면에 영양생장과 생식생장의 균형이 깨질 경우 근사(root death), 또는 부전과(fruit abortion)가 유발되어 수량과 품

질에 치명적인 영향을 끼치게 된다.

오이 및 멜론 등은 호온성 작물로서 경우 영양생장과 생식생장의 균형이 잘 이루어지지 않으면 재배에 많은 어려움을 겪는다. 따라서 잎조직의 생장 제한, 뿌리 기능의 약화, 지하부와 지상부 또는 과실간에 동화물질에 대한 배분 경합 등 복합요인의 부조화에 따른 결과는 열악한 과실 품질, 저수량과 직접적으로 관련되어 있다.

이러한 문제를 개선하기 위하여 가장 중요한 것은 뿌리의 기능을 강화시키는 것이다. 겨울철에 시설 재배하는 농가에서는 호온성 작물들의 뿌리기능을 강화시키기 위하여 유사작물의 뿌리를 대목으로 사용하고 있으나, 접목에 요구되는 경비 부담과 재배 제한성과 같은 문제점이 수반되고 있다. 그 외에 뿌리기능을 향상시키기 위하여 이온이나 영양물질 흡수기능과 관련된 유전자들을 이용한 형질전환 식물체 개발을 고려할 수 있으나 아직 실용할 수 있는 단계는 아니다.

전염성 병해에 대하여 항생작용을 갖는 길항미생물과 식물의 생장을 촉진시키는 유용미생물을 이용하는 기술은 최근에 들어 새로운 환경친화적 농업 기술로 받아들여지고 있다. 외국에서는 미생물을 이용한 작물재배 기술이 발달되어 실용화가 이루어진 반면에 우리나라에서는 관비재배나 양액재배에 미생물을 이용한 사례가 거의 없어 재배기술체계의 개발과 실용화를 위한 기술보급이 시급한 실정이다. 또한 우리나라의 지형과 기후에 맞는 토착미생물을 개발하여 산업적으로 이용하려는 시도가 일부 진행되고 있으나, 작물의 생육촉진을 효과적으로 유도하는 유용미생물의 분리, 분리한 유효미생물의 기능성 탐색 및 이들의 재배환경에 따른 생리, 생태적 반응에 대한 연구는 아직까지 기본 체계가 확립되어 있지 않다.

지금까지 거의 연구되어 있지 않은 유효토착 미생물을 이용한 양액재배 및 토양 관비재배에 적용할 수 있는 기술개발은 동계 호온성 과채류의 시설재배시 부적절한 환경, 품종선택, 재배기술 등 현재 우리나라의 시설재배가 안고 있는 많은 문제점들을 보완하게 될 것이다. 또한 환경 부하가 적은 미생물 전용 양액재배 기술은 저농약 재배를 통한 고품질 원예 산물의 생산, 순환식 양액재배시 미생물의 항균성을 이용한 배양액의 오염방지, 각종 유기성 농업부산물을 이용한 대체배지의 개발

및 이용, 길항성 유용미생물과 천적을 이용한 생물학적 방제 및 근권 미생물을 이용한 양분의 이용성을 증대시킬 수 있는 기술개발이 시급하다.

나. 재료 및 방법

본 실험은 겨울살이청장오이를 공시품종으로하여 1999년 3월 5일 인큐베이터(30℃)에 최아한 후 익일 파종하였다. 파종 후 본엽 1~2매 정도 전개한 10일째 일본원시균형액(JBS, 표 1-1) 1/2배액+MS101 0.5%를 저면으로 관수하여 48시간 후 초장, 경경, 엽병, 엽면적 등 각 기관별 생육을 조사하였으며, 파종 후 30일째 3.5ℓ의 용기에 Coir dust 배지를 사용하여 정식하였다. 급액은 타이머에 의한 방식으로 점적 관수(Netafim社, 이스라엘)를 사용하여 비순환식으로 온실 내에서 재배하였다. 온도는 야간 최저온도를 18℃로 관리하였으며 이후 4주간의 성장반응을 조사하였다.

미생물혼합체인 MS101의 적정농도를 알아보기 위해 일본원시표준액(JBS) 표준농도의 1/2배액으로 30일간 육묘한 유묘의 뿌리를 수세한 후 Wagner pot(3.5ℓ) 용기에 DFT 방식으로 각 5반복으로 재배하였으며, 근권의 산소공급을 위하여 air pump를 설치하였다. MS101 처리는 정식 후 3일째 처리하였으며 농도는 무처리구, 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1%, 3%, 6% 및 9%로 하였다. 이후 3일 간격으로 양액(MS101 각처리농도+JBS 1배액)을 교환하여 3주간의 생육을 관찰하여 각 기관별 생육을 조사하였다.

Table 1-1. Composition of the balanced nutrient solution recommended for cucumber by Japanese Horticultural Experiment Station.

Ingredient	Chemical fomula	Concentration(mg·L ⁻¹)
Macronutrient	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	944
	KNO ₃	768
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	492
	NH ₄ H ₂ PO ₄	114
Micronutrient	Fe-EDTA(12.5%)	16
	H ₃ BO ₃	1.200
	MnSO ₄ ·H ₂ O	0.625
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.090
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.040
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.125

다. 결과 및 고찰

MS101은 야산과 들판에 서식하고 있는 토착미생물인 고초균 곰팡이류, 유산균, 광합성세균, 효모균, 방선균 등을 수집하여 특수한 공법으로(미공개) 한국의 토양에 맞는 환경친화적 미생물 발효로 제조, 원예 분야에 적용가능성을 검토한 결과 오이, 토마토, 고추 등에서 생육 촉진효과를 볼 수 있었다.

Table 1-2. Composition of the macroelement and microelement in MS101.

MS101	Macroelement(%)						Microelement(ppm)				
	T-N	P ₂ O ₅	K ₂ O	CaO	MgO	B ₂ O ₃	Fe ²⁺	Zn ²⁺	Mo ²⁺	Cu ²⁺	Mn ²⁺
	0.31	0.45	0.55	0.20	0.33	0.017	855.5	21.7	-	-	-

1) MS101의 성분 분석

MS101의 성분분석을 표 1-2에 나타내었다. 비료성분인 T-N (0.31%), P₂O₅ (0.45%), K₂O (0.55%), MgO (0.33%), B₂O₃ (0.017%)로 모두 1%이하의 함량이 검출되었으며, 미량요소의 경우에는 Fe²⁺가 855.5ppm, Zn²⁺이 21.7ppm 검출되었으나 Mo²⁺, Cu²⁺, Mn²⁺는 검출되지 않았다. 미생물이 생산하는 하나의 저분자량 물질인 siderophores는 철에 대하여 친화력이 강한 성질을 갖고 있는 iron chelator (철 결합 유도물질)이다. 이물질은 대부분의 호기성미생물에서 생산되는 것으로 알려져 있으며, MS101에서도 발효과정 중에 생산 될 것으로 추정된다. 유용미생물들은 siderophores를 생산하여 철에 대한 친화력이 비교적 낮은 식물 병원균의 성장을 억제시킨다. 근권 환경에서 유용미생물은 병원균과 철에 대한 경쟁적인 기작을 통해 병원균의 성장을 억제하고 식물 성장촉진과 근 활성화 및 수량증대를 유도한다는 보고와 일치하는 결과를 MS101에서도 얻을 수 있다. 이는 미생물의 길항작용에 의하여 유기된 식물성장촉진은 수용성 철을 근권에 첨가시 유용미생물의 생장에 필요한 철의 공급을 적당히 함으로써 병원균의 생장억제효과가 있고, siderophores를 생산하는 유용미생물은 식물생장을 촉진하는 것으로 보고되고 있었다.

2) MS101 혼합물의 성장 촉진 효과

가) 오이 육묘에 대한 성장 촉진 효과

오이육묘에 JBS 1/2배액+MS101 0.5%로 오전, 오후 각 1회씩 저면관수하여 48시간이 경과한 결과 대조구보다 처리구에서 엽면적, 생체중 및 뿌리 등 각기 관별 생육이 월등한 결과를 나타내었으며(그림 1-1), 지상부와 지하부가 함께 생장이 촉진되는 결과를 보여주었다. 따라서 이러한 성장촉진효과에 대한 직간접효과를 보다 상세히 검토할 필요가 있으며 특히 뿌리발달이 현저하게 촉진되는 것으로 미루어 오이 및 멜론재배에 문제가 되는 근생장을 강화시킬 수 있을 가능성이 보였다. 한편 배지경을 전제로한 시험으로 3.5ℓ 용기에 Coir dust 배지를 충전하여 MS101를 처리

한 결과에서도 지상부 및 지하부에서 생육이 월등하였다. 그림 1-2에서 보는 바와 같이 배지내 근권의 분포가 대조구에 비하여 월등하였다.

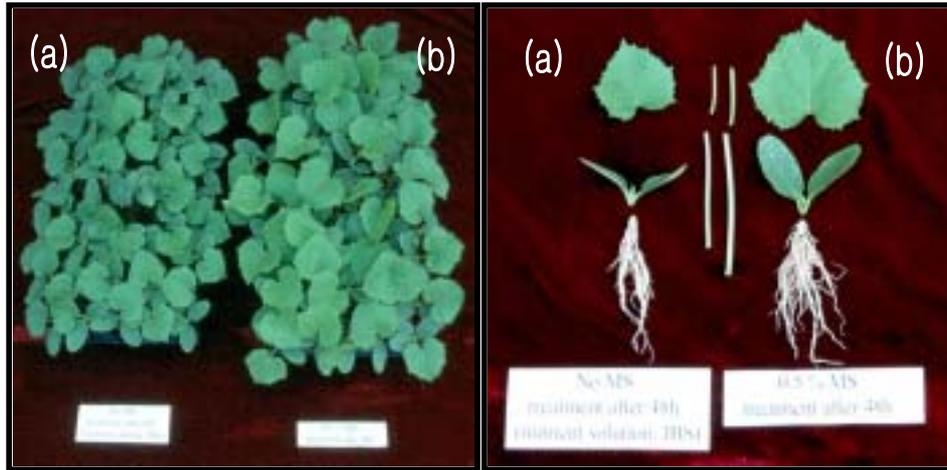


Fig. 1-1. Effect of MS101 on the growth of cucumber seedlings grown in plug tray. [Only 1/2 JBS treatment(a), 1/2 JBS + 0.5% MS101 treatment (b)]

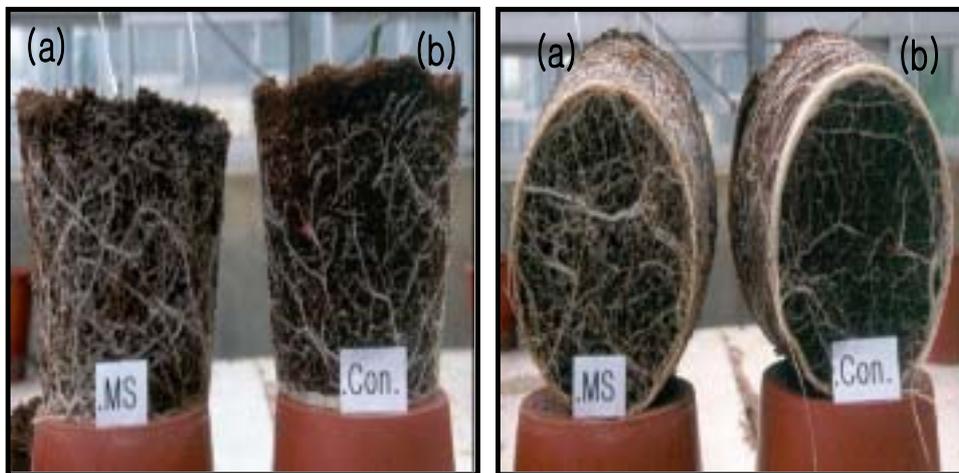


Fig. 1-2. Effect of MS101 on the growth of cucumber roots grown in coir-dust. (Only 1/2 JBS treatment(a), 1/2 JBS + 0.5% MS101 treatment (b))

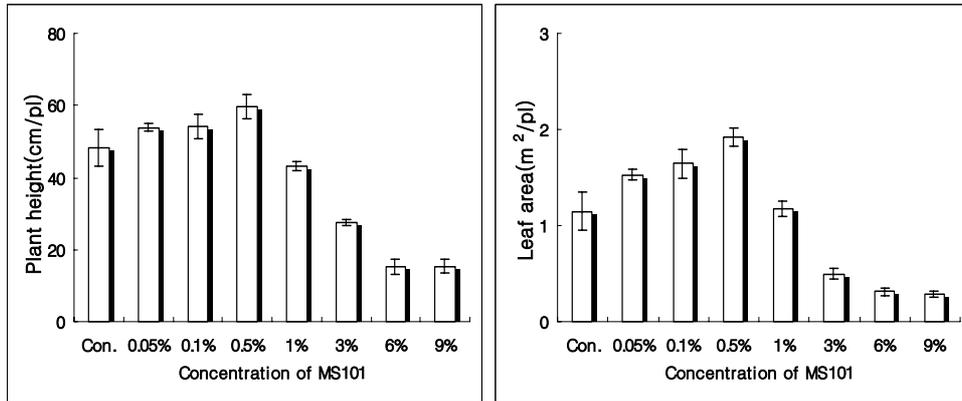


Fig. 1-3. Effects of different concentrations of MS101 supplemented to nutrient solution on the plant height and leaf area of cucumber at 21 days after transplanting.

나) MS101의 생장 촉진 최적 농도 분석

그림 1-3은 MS101의 적정농도를 구명하기 위하여 0.05, 0.1, 0.5, 1, 3, 6 및 9%의 농도로 처리하여 정식 후 21일째의 초장과 엽면적의 성장반응을 나타낸 것이다. MS101 농도별 처리시 오이의 초장은 0.5%까지 농도가 높을수록 증가하였으나 1%이상의 농도에서는 오히려 대조구보다 감소하는 경향을 나타내었으며, 엽면적에 있어서도 이와 유사한 경향으로 MS101 0.5% 처리구에서 가장 높은 것으로 나타났다. 따라서 MS101를 양액내 첨가시 1% 수준을 넘으면 오히려 생장이 저해되는 것을 볼 수 있었다.

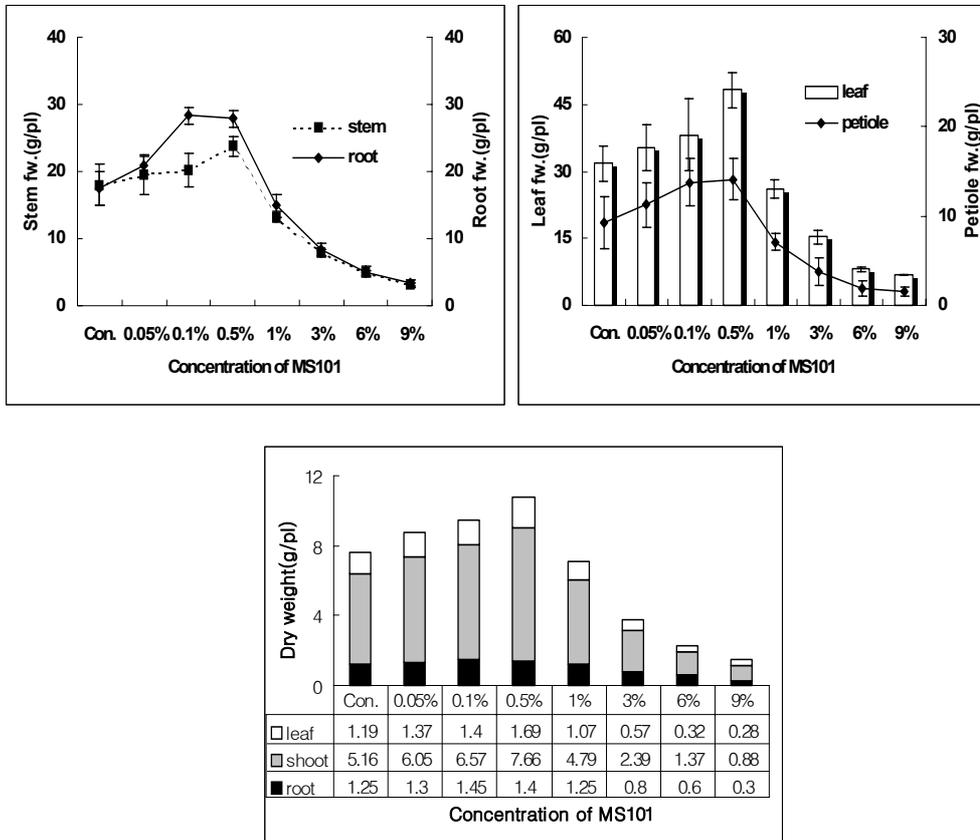


Fig. 1-4. Effect of different concentration MS101 supplemented to nutrient solution on growth of cucumber plant.

다) MS101의 기관별 성장 촉진효과 분석

그림 1-4는 MS101 농도별 처리시 정식후 21일째 대조구와 처리구의 근, 경, 엽병, 엽 등 각 기관별 생체중 및 건물중을 나타낸 것이다. 초장이나 엽면적 성장에서 나타난 결과와 유사하게 미생물의 효과가 나타나고 있으며 줄기, 뿌리, 엽, 엽병 등 기관에 관계없이 균일하게 효과가 나타나 근권에 MS101 용액을 적정농도 투입하고 이들의 성장촉진 효과 원인에 대하여도 상세한 검토가 요청되었다.

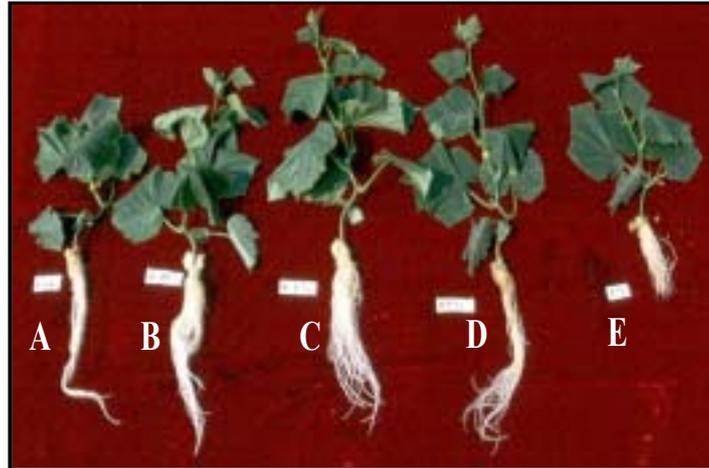


Fig. 1-5. Effect of MS101 supplemented to nutrient solution on the growth and development of cucumber plant. (A : Con. B : 0.05%, C : 0.1%, D : 0.5%, E : 1% MS101)

MS101균의 적절한 농도를 구명하기 위하여 DFT방식으로 JBS 양액내에 MS101을 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1%, 3%, 6% 및 9%의 농도별로 처리하여 성장반응을 조사한 결과 0.5%농도로 처리한 경우 초장, 엽면적 및 각 기관별 생육의 증가가 확연히 나타났으며 1% 이상의 농도에서는 모든 부분에 있어서 생육이 저해되었다. 이는 1%이상의 농도처리에서부터는 MS101이 뿌리에 흡착되어 점성을 띄게되었으며 이에 따라 뿌리의 갈변을 초래함과 동시에 양수분의 흡수를 저해하면서 전반적인 생육의 억제를 가져온 것으로 생각되었다.

2. 미생물 혼합체가 암면재배 머스크멜론의 생육단계별 생육에 미치는 영향

가. 실험목적

본 연구는 암면재배 머스크멜론 재배시 MS101제재를 처리하여 근권의 생육 촉진을 도모하고 보다 많은 엽면적을 확보하여 동화산물의 뿌리로의 재분배가 이루어짐에 따라 근권으로부터 장기적인 양수분흡수를 이루어 고품질 과실생산하기 위해 수행하였다.

나. 재료 및 방법

공시품종은 일본 시즈오카 Earls Favorite 준계 F₁로써 암면큐브에 과중하여 1999년 4월 2일 본엽 3~4매된 묘를 암면배지(100×15×7.5cm, Grodan社)에 3주씩 정식하였다. 처리는 대조구인 일본 원예시험장 표준액(JBS)과 예비실험결과 생장이 월등하였던 0.5% MS101을 조합시킨 처방에 따라 2처리로 구분하여 처리구당 5베드, 총 15주를 공시하였다. MS101 처리는 수분을 시작한 1999년 4월 27일부터 5월 18까지 21일간 처리하였다. 배양액 급액은 점적관수(Netafim社, 이스라엘)를 사용하여 정식 후 6일째인 4월 8일부터 시작하여 비순환식으로 온실 내에서 재배하였다.

온도관리는 재배기간 동안 야간 최저온도를 18℃이상으로 하고 수분 후부터 30일간(4월 27~5월 17일)은 과실비대기에 열과를 방지하기 위한 하나의 방법으로서 과실의 육질을 연하게 하기 위하여 23~25℃로 관리하였다. 수분은 4월 27일부터 5월 2일까지 6일간에 걸쳐 제13~15절위에 실시하였으며, 과실의 수확은 수분 후 55일째인 6월 25일부터 실시하였다. 매일 급액종료후 주당 급액량과 배액량을 측정하여 배액률(10~20%) 및 주당 흡수량을 산출하였고 이것을 이용하여 급액량을 조절하였다. 또한 배액의 EC 및 pH도 매일 측정하였다. EC는 전기전도계(Horiba B-173, 일본)로, pH는 pH미터(Horiba B-212, 일본)로 측정하였다. 당도측정은 굴절당도계를 사용하였으며, 당분석은 HPLC로 sucrose, glucose, sorbital, fructose, maltose의 함량을 측정하였다.

다. 결과 및 고찰

1) MS101의 생육 촉진 효과 분석

육묘시 MS101를 처리하여 생육촉진효과와 근생장을 그림 1-6에 나타내었다. 미생물에 의한 식물생장촉진은 뿌리에 있어서 미생물의 aggressive colonization으로 인한 근권 유해미생물의 경합 및 치환작용 등으로 추측된다. 본 실험에서도 근권에 처리된 유용 미생물 MS101은 식물과 미생물간에 생물학적인 복합상호작용을 갖는 것으로 예측된다. 이는 근권에 처리된 MS101은 영양흡수를 증진시키고 생리활성에 영향을 미치므로써 근권세균으로서 보고된 균주는 *Pseudomonas sp.*, *Basillus sp.*, *Azospirillum sp.*, 광합성세균(*Rhodopseudomonas sp.*) 등이 사용되고 있다. 이러한 근권세균이 식물의 생장을 촉진시키는 기작을 보면 토양과 뿌리전염성 병해에 대한 생물학적 방제효과, 미생물이 분비하는 생장촉진 호르몬류를 포함한 각종영양물질과 생리활성물질, 양·수분흡수촉진 등으로 식물생장이 촉진되는 것으로 보고되고 있다.



Fig. 1-6. Effect of MS101 0.5% supplemented into nutrient solution on the growth of shoot and roots.

2) 재배기간중 MS101처리에 의한 배액의 변화

재배기간 중에 암면슬라브로부터의 배액 EC의 경시적 변화를 그림 1-7에 나타내었다. 정식 후 25일까지는 두 처리구간의 차이는 나타나지 않았으나 수분과 적심 후(4월 27일)에 점차 상승하면서 수확기에는 급격한 증감의 변화를 나타내었다. 대조구의 경우에는 그 차이가 크게 나타났다. 또한 0.5% MS101 처리후 MS101처리구에서 대조구보다 배액의 EC가 낮은 경향이었는데 이는 MS101구에서 보다 많은 양분의 흡수가 이루어진 것으로 추측된다.

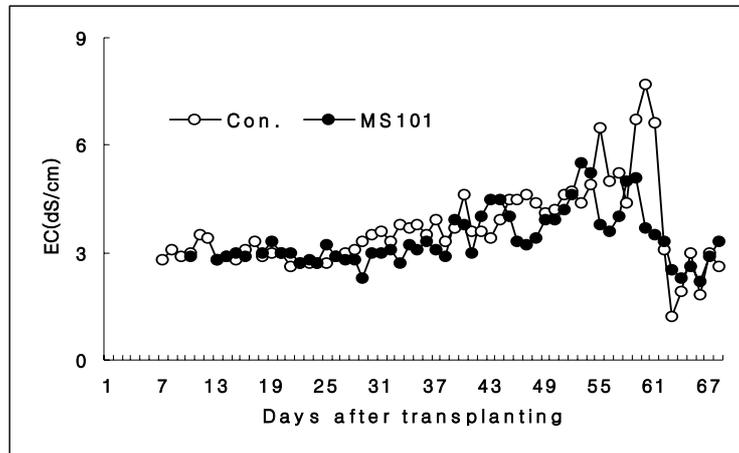


Fig. 1-7. Changes in EC(mS/cm) of drained solution as affected by supplementing MS101 to the nutrient solution during experimental period.

재배기간 중에 암면슬라브로부터의 배액 pH 경시적 변화를 그림 1-8에 나타내었다. MS101 처리구에서는 수분 후 29일간 MS101처리와 동시에 pH 6~6.5까지 상승 후 수확기까지 서서히 하락하는 경향을 보였으나, MS101처리가 끝난 후에는 전반적으로 안정된 상태를 수확기까지 유지하는 추세를 보였다. 대조구에서는 적심과 수분 후 pH 3~4정도 급격히 떨어진 후 수확기까지 서서히 증가하는 경향을 보였다.

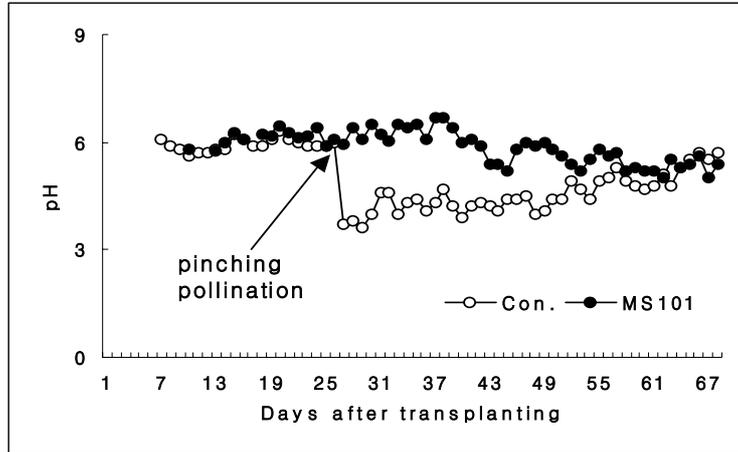


Fig. 1-8. Changes in pH of drained solution as affected by supplementing MS101 to the nutrient solution during experimental period.

3) 암면재배조건에서 MS 101의 생장 촉진 효과

가) 암면재배시 기관별 생장 촉진 효과

MS101를 배양액내 첨가시 토양이 없는 배양액내의 조건에서 증식을 하면서 식물의 생장을 직접적으로 촉진시키는 것을 알 수 있었다. MS101의 처리구에서 대조구보다 엽면적, 지상부 생체중과 건물중이 증가하는 경향을 보였다(표 1-3).

Table 1-3. Effect of 0.5% MS101 supplemented into nutrient solution on fresh weight and dry weight of muskmelon plants grown in rockwool [Pinching after 20days (9. June)].

Characters	Plant height (cm)	Stem diameter (mm)	No. of leaves (ea)	Leaf area (cm ²)	Fresh weight (g · plant ⁻¹)			Dry weight (g · plant ⁻¹)		
					Leaf	Petiole	Stem	Leaf	Petiole	Stem
Con.	117.5a ²⁾	17.3a	23	14,091.2b	715.6b	244.7a	213.7a	77.8b	18.1a	21.9a
0.5% MS101	120.1a	17.8a	23	18,152.3a	1,007.6a	265.7a	230.2a	106.1a	20.4a	24.2a

²⁾Mean separation within each by Duncan's multiple range test at 5%.

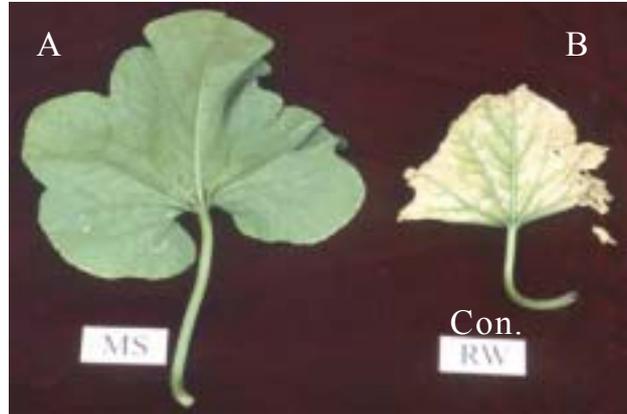


Fig. 1-9. Effect of MS101 supplemented into nutrient solution on leaf growth of muskmelon plants grown in rockwool. [0.5% MS101(A), Con.(B)]

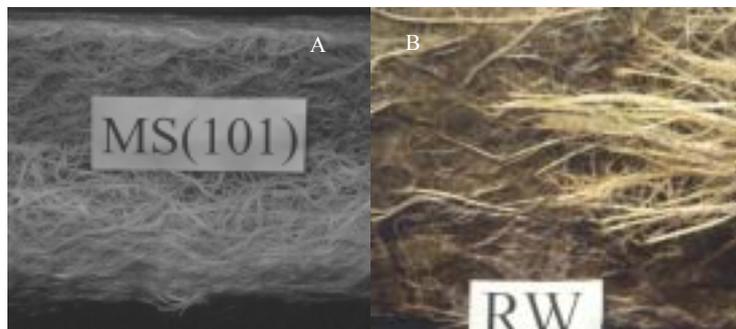


Fig. 1-10. Patterns of root growth between MS101 treated (A) and non-treated (B) of muskmelon grown in rockwool.

나) 과실 비대기 미생물처리효과

일반적인 멜론재배에서는 이시기가 과실비대기로 양분요구량이 많아지므로 과실 주위의 엽은 과실에 급격한 양분공급으로 인하여 엽은 황화현상 및 엽소현상(그림 1-9B)을 볼 수 있지만, MS101 처리구에서는 이와 같은 현상은 나타나지

않았다(그림 1-9A). 황화현상 및 엽소현상의 원인은 양액재배 멜론의 경우 착과 후 3 내지 4주 정도가 되면 과실부근의 엽이 황화되어 엽면적이 작아지는 현상이 관찰되는데 이는 양수분과 동화산물이 강하게 sink로 분배되어 이때 root mass가 발달하지 못함으로써 근사(root death)가 일어난 것으로 추측된다. 과실 비대의 시작과 동시에 근의 생장은 감소하며 경우에 따라서는 정지되기도 하는데 특히 과실의 크기가 최대로 될 때 root mass의 크기는 최소로 된다. 따라서 근사는 아마도 작물이 엽면적이 작고 빈약한 광조건하에서 성장한 경우에 발생한 것으로 보고되고 있다. 암면재배시 MS101을 21일간 처리하였을 때 암면 슬라브내의 근 형성을 그림 1-10(A)에 나타내었으며 대조구의 근사 상태를 그림 1-10(B)에 나타내었다. MS101처리구에서는 대조구에 비교해서 근사는 나타나지 않았고 오히려 매우 강한 root mass를 형성하는 것으로 나타났다. 일반적으로 멜론재배시 근사가 진행되면 뿌리는 갈색을 띠며 이후 표층이 부패하여 점액성 액체를 분비한다. 과실비대가 끝나면 뿌리의 생장이 다시 시작되는 경우도 있지만, 새로운 뿌리는 근사로부터 측근을 형성하기까지는 다소 시간이 요구되며 근사와 새로운 뿌리 형성시 그 시기가 다른데 이는 근사의 특성으로 생각된다. 그러나 멜론 암면재배시 MS101은 일반적으로 멜론 과실비대기에 일어나는 근사가 일어나지 않고 근 형성과 과실엽 생육촉진에 효과가 있다는 것을 알 수 있다.

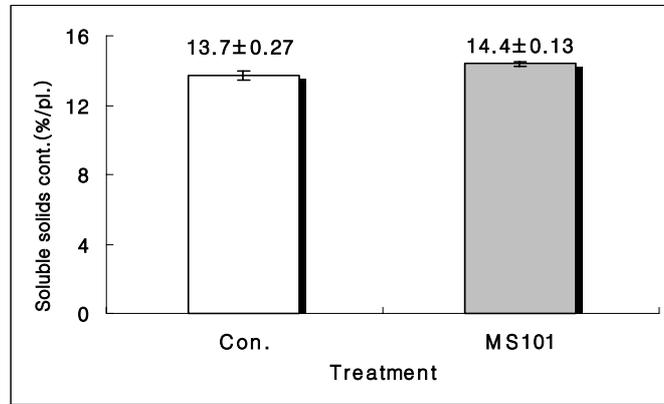


Fig. 1-11. Effect MS101 supplemented into nutrient solution on soluble solids content(%) of muskmelon fruit grown in rockwool.

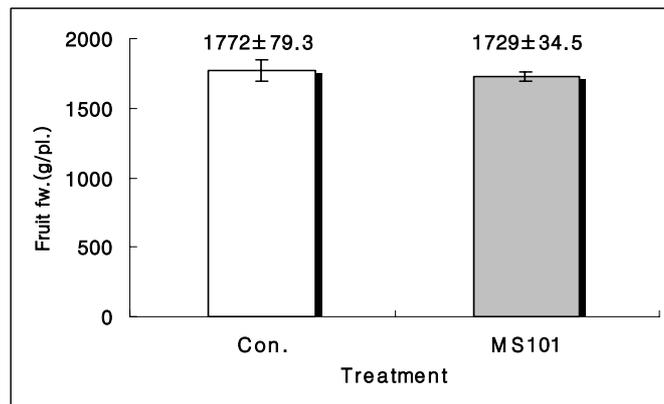


Fig. 1-12. Effect MS101 supplemented into nutrient solution on fruit fresh weight of muskmelon fruit grown rockwool.

다) 미생물 처리의 과실 당도 변화에 대한 영향

과실의 당도는 대조구에서 13.4±0.27인 반면에 MS101처리구에서는 14.4±0.13%로 약 0.7% 정도 다소 높은 경향이 나타났다(Fig. 1-11). 과실중은 대조구

에서 1,772g이었고, MS101처리구에서는 1,729g로 유의차는 나타나지 않았다(Fig. 1-12). 이것은 현재 고품질로 인정하고 있는 멜론 과실중이 1,500~1,800g을 감안한다면 양처리구간의 과실중은 양호하다고 볼 수 있다.

그림 1-13은 머스크멜론의 당함량을 HPLC기기로 sucrose, glucose, fructose, maltose 및 sorbitol의 함량을 분석하였다. 대조구에서는 sucrose의 함량이 높은 반면 MS101구에서는 glucose의 함량이 높았으며 전체적인 당함량으로는 MS101처리구에서 다소 높은 경향을 나타내었다. 과실의 네트발현과 과실 외관을 그림 1-14에 나타내었다. MS101 처리구에서는 대조구보다 과실의 네트 발현도가 균일하고 약간 원형의 과실이 많았다. 고급멜론은 네트발생 정도에 따라 시장가격이 크게 달라지고 있어서 네트발현 정도를 균일하게 재배하는 기술은 멜론재배에 있어서 매우 중요한 재배기술중의 하나이다. 앞으로 보다 체계적인 연구가 필요하지만 MS101은 네트발현을 위한 재배기술을 보완 할 수 있을 것으로 본다. 본 실험에 있어서도 양액에서 호기성 미생물과 혐기성 미생물이 공생하여 각기 동화작용 및 이화작용의 촉진을 통해 생육촉진과 근 성장활성, 잎의 노화방지 등에 효과를 나타낸 것으로 생각되었다.

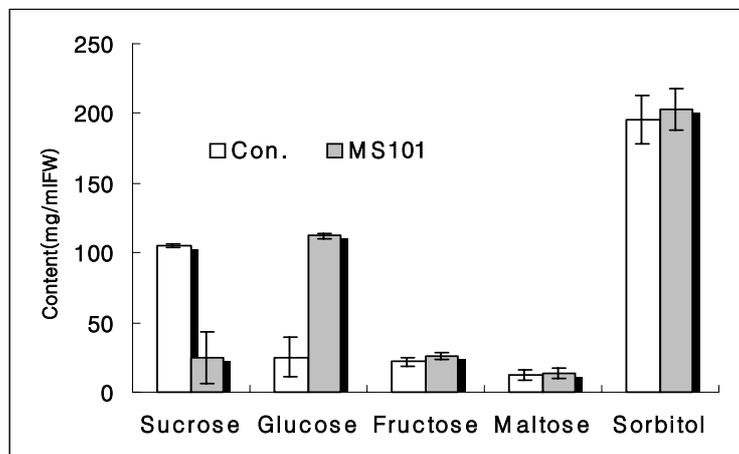


Fig. 1-13. Patterns of soluble solid content of muskmelon grown in rockwool.

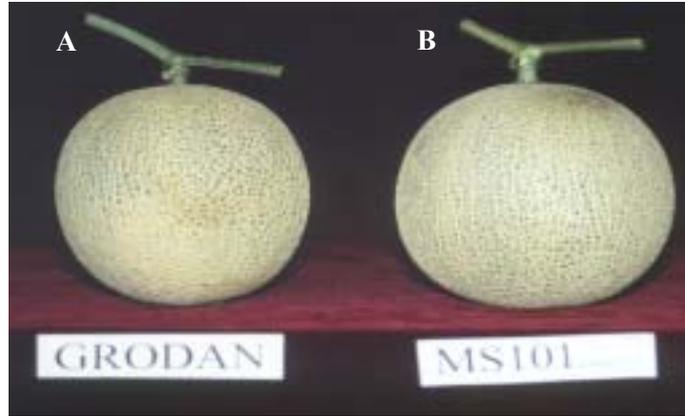


Fig. 1-14. Effect of MS101 supplemented into nutrient solution on external appearance of muskmelon grown in rockwool. (A : Con. B : MS101 0.5%)

특히, 뿌리의 활력을 촉진하고, 또한 충분한 엽면적 확보를 통한 순광합성율을 증대시켜 과실의 크기에는 영향이 없었지만 과실의 품질향상에 크게 영향을 주는 경향이 있다고 보며 환경친화적 농업과 고수량 및 고품질을 기대하는 원예적 이용에 크게 기대된다. 특히 본 연구에서 MS101은 멜론재배의 수량증대를 위한 새로운 멜론재배의 가능성과 현재까지 정확한 해명이 되어 있지 않는 근사(root death)에 관한 연구로의 새로운 연구 영역의 확대가 요청되어 앞으로 보다 상세한 균의 분리 동정 및 작물 재배에 이용 가능성 등에 관한 체계적인 연구도 요청되고 있다.

제 2 절 식물 생육증진 미생물 혼합체로부터 기능성 미생물 분리, 선별 및 동정

1. 미생물 혼합체 내 균주별 또는 균주 조합이 호온성 작물의 뿌리와 엽 생장 촉진에 대한 형태학적 분석

가. 실험목적

산업혁명 이후 인구는 폭발적으로 증가하였고 그에 따른 식량의 문제가 대두 되었으며, 이러한 식량문제의 해결은 농업혁명으로 이어졌다. 화학비료와 농약 등의 이용은 일시적으로 식량문제를 상당히 완화시켰으나 또 다른 문제를 야기하였다. 지나친 화학비료를 사용으로 토양의 산성화가 증가되었으며, 지나친 농약을 사용함으로써 생태계 파괴 및 작물의 다양성 감소 등의 환경문제를 일으켰다. 이러한 문제의 해결로써 환경친화적 작물재배가 대두되고 있다. 천적을 이용하거나, 화학비료나 농약을 유기물비료, 미생물비료로 대체하고 있는 추세이다. 이들 중 미생물비료는 상당한 장점과 설득력을 가지고 있다. 현재 유전자 조작 작물로 각종 병해충 및 환경에 저항성을 나타내는 작물을 개발하여 이를 극복하고 있으나, 여러 가지 문제들이 발생되고 있다. 그러나 미생물 비료는 이러한 부분들을 상당부분 해결해주며 작물의 생육증진에 효과를 보여주고 있다. 우리는 장성균 토양으로 채취한 미생물군 (MS101)으로부터 근부강화를 통한 생육 증진효과를 보이는 미생물을 선별 분리 동정하였다.

나. 재료 및 방법

1) 균주 및 작물 배양 배지

전라남도의 야산 및 바닷가 일대의 토양을 채취하여 이 토양으로부터 약 400여종의 단일 균주를 분리하였으며 이들 균주 중 식물에 기능성을 발휘한다고 판단되는 20여종을 1차 선별하여 기능 분석 실험에 사용하였다. 균주의 배양은 LB broth를 이용하였으며 각 균주별로 최적 생육 온도를 확인하고 B는 30℃, 나머지 균주는 37℃에서 shaking Incubator로 12시간 배양하였다. 최종적 약 10여종의 균주를 선별, 동정하여 실험에 사용하였다. 작물의 경정배양에 사용한 배지는 일반적으로 사용하는 MS 배지를 사용하였다. 미생물 혼합체는 일정 농도의 균주 배양액을 일본 원시 표준액(JBS)에 첨가하였으며, 선별한 균주는 동일한 방법으로 화란 PTG 양액에 첨가하여 처리하였다.

2) 실험대상 작물

홍농종묘사의 은성 백다다기와 겨울살이 청장오이

3) 미생물 혼합체의 단시간 침지 및 양액내 농도별 첨가에 따른 오이유묘의 성장반응 조사

겨울살이 청장오이를 과종 후 본엽 1~2매 정도 전개한 10일째에 0.5% 미생물 혼합체를 1/2배액의 JBS와 혼합하여 저면 관수하고 48시간 후 기관별로 생육정도를 조사하였다. 과종 후 30일이 경과시에는 3.5ℓ의 용기에 Coir-dust 배지를 사용하여 정식하고 타이머를 이용한 점적관수(Netafim社, 이스라엘)를 사용하여 급액하였으며, 온실에서 재배하였다. 온도는 야간 최저온도를 18℃로 관리하였다.

4) 경정배양

일차적으로 선별한 균주를 양액재배에 사용한 결과 식물체간의 차이가 미생물의 효과 차이보다 크게 나타나서 경정배양을 사용하여 균주의 효과를 분석하였다. 오이종자를 먼저 70% ethanol로 살균한 후 식물배지 MS agar plate에 심었다. 약 일주일 후 생장이 비슷한 개체들의 성장점 주위를 각각의 균 또는 균 조합이 첨

가(0.5% v/v)된 MS배지에 옮겨 조직 배양실에서(28℃)에서 배양(광-18시간, 암-6시간)하면서 근활력과 이온 유출정도를 측정하였다. Pot 재배나 경정배양을 한 오이에 대하여 시기별로 각 기관별 파괴조사 및 TTC법으로 근활력을 측정하고 뿌리의 생육과 이온 흡수율 비교, 측정하였다.

5) 수경재배 및 노지재배

미생물농도와 식물배지에 의한 효과 검정을 위해 1차 선발과 경정배양 결과, 효과를 보이는 균주를 선발하여 양액재배에 사용하였다. 배지별 균주들의 효과를 비교하기 위하여 코코비트와 펄라이트 단일 배지를 사용하였다. 식물생장에 미치는 균주들의 효과를 검증하기 위해 노지재배에서 사용하는 양액에 균주를 혼합하여 관주방식으로 처리하였다. 각 균주 또는 균주 조합을 사용할 때에 균주 농도는 균주 농도 설정에서 사용한 방법과 동일하다.

6) 식물 근부 기능성 분석

가) Root activity

근활력 측정은 1mm 이하의 뿌리를 0.5cm 간격으로 자른 일정량(1g)의 뿌리를 triphenyltetrazolium chloride(TTC) 0.1% 용액(1% TTC + 0.4M disodium succinate hexahydrate + 0.1M 인산염 완충액) 30mL를 넣은 배양병에 담아 1시간 동안 37℃ 항온기에서 보관한 후 시료를 거르고 formazan이 형성된 여액에서 3mL 취하여 UV/VIS spectrophotometer를 이용 475nm에서의 O.D(optical density)값을 측정함으로써 formazan형성을 확인하였다

나) Ion-conductivity

경정배양된 식물의 뿌리를 ddH₂O로 배지를 완전히 세척한 다음 각 실험구의 뿌리 1g을 잘라서 tube에 10mL 의 ddH₂O와 함께 넣고, 실온에서 80rpm에

서 1시간동안 흔들어서 ion conductivity meter(TOA EC meter CM-14p, T,O,A Electronics Ltd)로 ion conductivity를 측정하였다. 측정된 처리구들을 liquid nitrogen에 냉동시키고(10분) 실온에서 녹이는(30분) 과정을 2회 수행 후 80rpm에서 1시간동안 (80rpm) 흔들어서 100% ion conductivity 값을 측정하여 상대적인 값을 비교하였다.

다. 결과 및 고찰

전남지역의 토양에 서식하는 미생물 혼합체는 오이와 머스크 멜론 양액 재배시 작물의 생육을 증진시킨다. 그러나 미생물 혼합체는 수천종미생물의 혼합체로 예상되었다. 따라서 그중 어떠한 미생물의 효과인지, 효과를 보이는 최소 미생물의 조합을 통하여 불필요한 미생물들을 배제함으로써 효율적인 미생물, 미생물군을 조사하였다.

미생물 혼합체로부터 식물생장을 촉진하는 PGPR (Plant-Growth Promoting Regulating) microorganism을 일차선발하기 위하여 각 균주를 작물에 처리하여 선별할 경우 많은 노동과 시간, 경비가 소요된다. 따라서 짧은 시간에 효과적으로 선별하기 위해서 백다다기 오이 종자를 분리한 각 균주의 0.5% 배양액에 백다다기 오이 종자를 침지하고 3,4일후 발아도니 종자의 뿌리, 줄기 생체중을 단순 비교하여 촉진 기능성 균주로 예상되는 균주를 1차 선별하였다. 일차적으로 선별한 기능성 균주들의 효과 및 조합된 균주들의 효과를 일반적 수경재배를 통한 실험으로 분석할 경우 오랜 시간이 필요하며 또한 결과도 환경 적인 요인으로 불확실할 수도 있다. 본 연구팀은 보다 짧은 기간에 보다 균일화된 환경을 보장해주는 Closed System 의 경정배양방법을 통하여 균주의 기능을 조사하였다.

1) 경정배양단계에서의 단일 미생물의 효과

처리균은 1차 선별결과 효율적인 기능성 균주로 판단되는 미생물을 분리 선별하여 경정 배양 배지(MS medium)에 첨가한 후 오이를 3주간 배양하여 생체중

과 뿌리의 무게를 측정하였다(Fig 2-1). 실험 결과는 3반복의 평균값으로 B 균주에서 최고의 식물 생육 증진 효과를 나타내었으며, D를 제외한 모든 균주에서 대조군보다 우월한 효과를 보였다. 미생물 B를 처리한 경정배양결과 줄기나 잎의 생육증진은 비교적 작게 나타났으나 뿌리부분의 생육증진은 크게 나타났다.

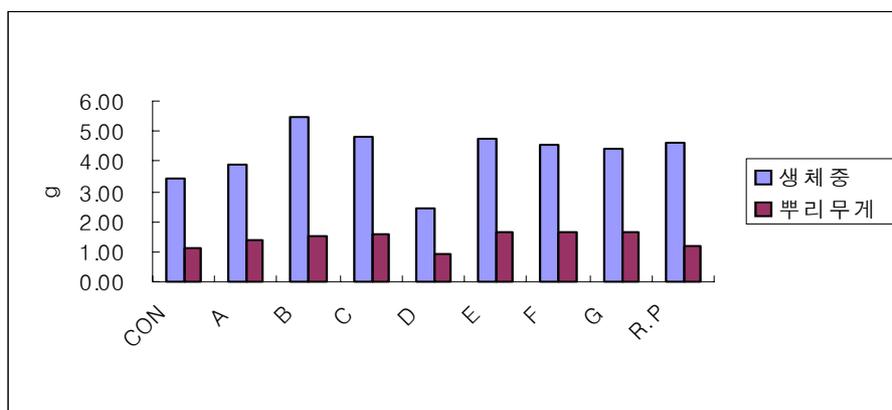


Fig. 2-1. Effect of Plant fresh & root Weight of preliminary Screened microorganisms on the shoot tip cultures in the MS medium

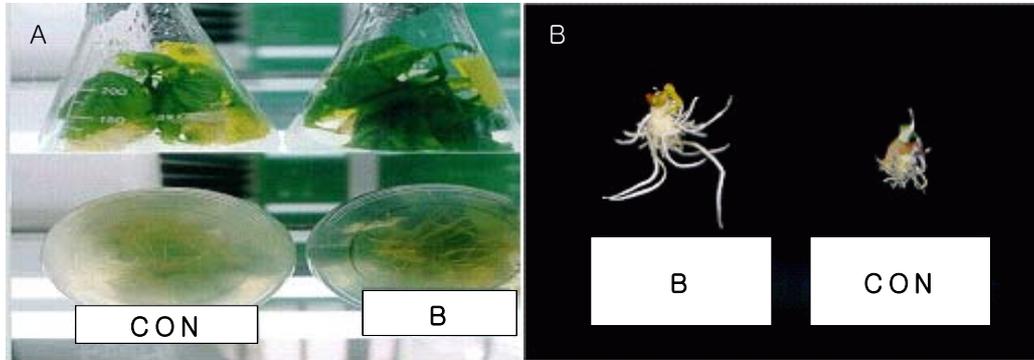


Fig 2-2. A: comparison of developments of shoot tip cultured in cucumber in tissue culture room after 30 days (28℃) B: shoot tip cultured Root

뿌리, 잎, 줄기 모두에서 미생물 처리군의 생장촉진 효과를 보였으므로 조직별 체중 비율을 분석하기 위하여 경정 배양한 오이의 조직별 체중을 조사하였다. (Fig2-4) B군주를 첨가하여 배양한 오이의 경우 뿌리 체중의 비율이 상당히 높음을 발견하였고 생체중에서도 대조군에 비하여 우월함을 보여 주었다. Stem이나 Leaf에서는 대조군과 비슷한 결과를 보여주고 있다. 뿌리 생체중 비율이 높아 졌다는 것은 근부강화가 강화되었다고 예측되며 이를 토대로 식물 전체의 생육증진이 되었을 것으로 예상된다. 본 실험은 closed system에서 수행되어 미생물의 효과를 검증할 수 있으나 양분의 제한성 등의 이유로 장기간의 식물체 배양이 불가능하였다. 또한 근부 강화를 통한 생육 증진이라면 뿌리에 기원을 두는 환경 스트레스에 대해서도 대조군에 비해 내성을 지닐 것으로 예상된다. 결과적으로 B군주가 근권을 강화하여 생육 증진을 할 것으로 예상되었다.

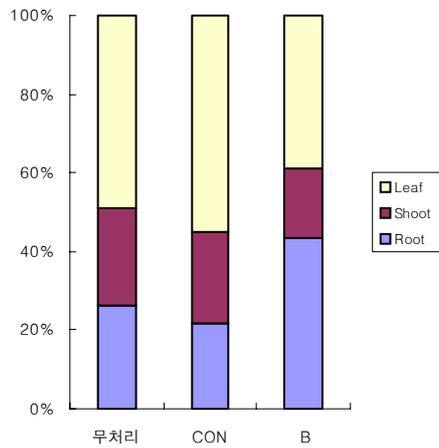


Fig. 2-3. Composition Rate

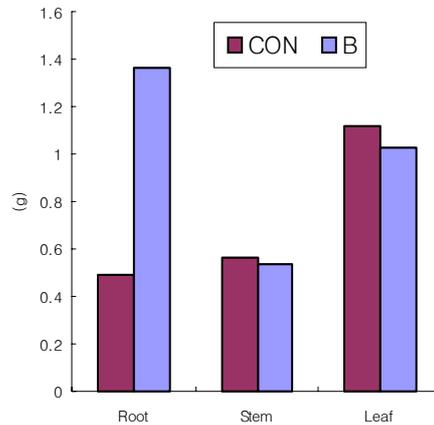


Fig. 2-4. Weights of Cucumber roots and rest part

2) 최적 단일 미생물의 의한 작물뿌리기능 향상 여부 분석

생체중 중심의 비교나 비율을 조사한 결과 근부의 질량이나 비율이 늘어남을 확인하였다. 특히 근부 생체중 증가가 단순한 부피의 증가인지 또는 기능 향상을 수반하는 것인지 증명할 필요가 있다. 여부의 증명이 요구되었다. 이를 위해 선별된 균주를 토대로 경정배양을 통하여 재현성을 조사하였으며, 근부 강화를 토대로 생육을 증진시키는 것으로 판단되는 미생물 처리에 따른 뿌리에서 질량과 Root activity, Ion-conductivity를 조사하였다.

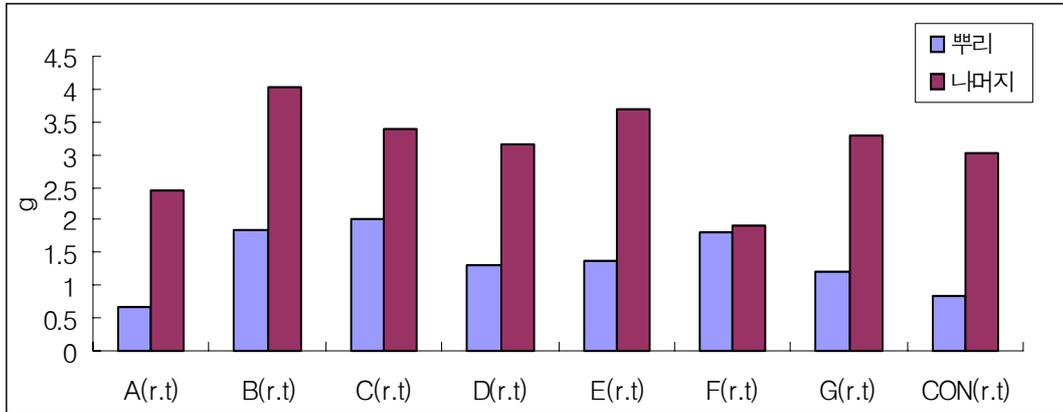


Fig.2-5. Shoot tip cultivated cucumber fresh weight

A-G refer to the different microorganisms. r(root), t(the rest of parts of plant)

생체중은 A 처리군을 제외한 모든 군에서 대조군보다 우월한 생체중을 보였으며 뿌리 체중값 또한 B, C, E 대조군들이 대조군에 비해 많은 체중값을 보였다. 선별된 기능성 미생물은 근부강화를 토대로 식물 생육 증진에 영향을 미치는 것으로 판단된다. 그러나 단순한 무게의 비교만으로 근부의 기능 강화 여부를 언급하기에 부족하므로 근활력과 Ion-conductivity를 측정하였다.

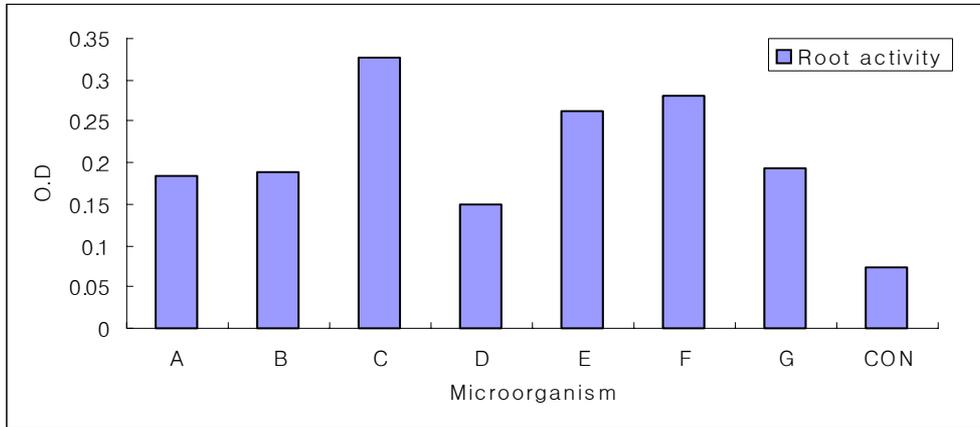


Fig. 2-6. Root activity

TTC를 이용하여 Root activity를 측정한 결과이다. 모든 미생물 처리군의 뿌리 activity가 대조군에 비해 상당히 높음을 확인할 수 있었다. 처리구 A의 경우에 체중

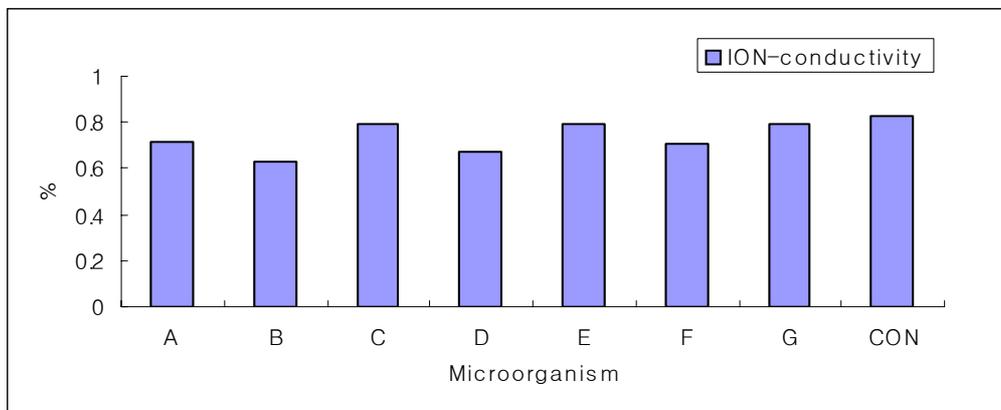


Fig. 2-7. Ion conductivity was measured after freezing the root tissues, and ion conductivity of frozen tissue was elevated by comparing to unfrozen control root tissues. Lower ion leakage means the more stable root tissue.

은 대조군에 비해 적지만 activity는 상대적으로 더 높게 나타났으며 이는 뿌리부분의 기능이 정상적으로 수행함을 보여준다. 또한 root activity가 C,E,F,G순서로 활발함을 보여주는데 이는 뿌리 체중의 절대값의 크기순서와는 다른 것으로 나타났다.

뿌리를 급속 냉동한 후 뿌리 조직의 Ion-conductivity를 측정하였다. 급속 냉동으로 뿌리조직의 파괴 정도를 이온 유출량으로 측정함으로써 뿌리 조직의 건강함을 추측할 수 있었다. 거의 모든 처리군에서 대조군보다 낮은 값을 보여주고 있으며 B군주의 경우에는 대조군과 상당한 차이를 보여 주고 있다. 이 현상은 뿌리의 활력 비교와 일치하는 결과를 보여주고 있다. Root activity와 Ion-conductivity를 조사한 결과 미생물이 뿌리의 체중을 높이는 역할뿐만 아니라 뿌리의 구조와 기능에도 영향을 주었음을 확인할 수 있었다. 결과적으로 유용성 미생물들은 근부의 기능강화를 토대로 식물의 생육을 증진 시킨다.

2. 미생물혼합체로부터 분리한 미생물의 최적농도 설정 및 근부강화 미생물의 선발

가. 실험목적

미생물 혼합체로부터 작물의 생육을 특히 뿌리의 성장과 기능 향상에 효율적인 미생물들을 선발하기 위해 각 미생물들에 대하여 성장촉진을 위한 최적 농도를 조사하고자 실시하였다.

나. 재료 및 방법

본 실험은 은성백다다기 오이를 공시품종으로하여 2001년 4월 5일 인큐베이터(30℃)에 최아한 후 익일 파종하였다. 파종 후 본엽 1~2매 정도 전개한 10일째 PBG 1/2배액을 저면으로 관수하여 육묘하였다. 배지는 perlite와 cocopeat를 각각 단독으로 사용하였으며, 파종 후 30일째 3.5ℓ의 용기에 정식하였다. 급액은 타이머에 의한 방식으로 점적관수(Netafim社, 이스라엘)를 사용하여 비순환식으로 온실내에서

재배하였다. 선발된 미생물은 총 10종으로 *Pseudomonas* 속 *bacillus* sp 등 이었으며, 이들의 처리농도는 각각 0, 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 및 2.0%로 조정하여 포트에 100ml씩 정식후에 관주하였다. 이들 중 특히 효과가 증명된 N2는(B) 균주의 이들 미생물 실험처리후 30일째에 초장, 엽면적, 지상부와 지하부 생체중 및 근활력을 조사하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 기능성 미생물의 농도나 양액재배 배지의에 따른 식물 생육 분석

미생물 혼합체로부터 작물의 생육을 특히 뿌리의 성장과 기능 향상에 효율적인 균주들을 선별하고 선별한 각 균주들에 대하여 재배방식별로 성장 촉진의 최적 농도를 조사하였다. Fig 2-8은 정식후 30일째 각 균주를 재배 방식별, 농도별로 처리한 후 초장신장의 효과를 나타낸 표이다. 미생물 처리균이나 무처리균이나 전반적으로 펠라이트 단일배지에서 보다는 코코피트배지에서 보다 나은 초장신장을 보인 것으로 보아 균주 종류와 농도에 관계없이 펠라이트 단일배지보다는 코코피트배지가 보다 나은 생육을 조장하는 것으로 판단되었다. 각 10가지의 균주를 0.1~2.0%까지 처리한 결과 대부분의 균주에서 초장신장이 대조군보다 나은 생육을 보였으나 처리군에서 농도의 차이는 관찰되지 않기 때문에 농도가 다소 높다하더라도 이에 대한 안정성이 높다고 할 수 있다. 균주별, 농도별로 재배방식에 따른 지상부의 생육의 촉진 효과는 균주 0.5% 농도와 그 이상의 농도에서 비슷하였지만 0.1% 처리구에서는 0.5%처리보다 그 효과가 다소 떨어지는 것을 알 수 있었다(Fig 2-8~2-13). 엽면적의 생육을 조사한 결과 초장신장의 경우와는 달리 농도가 1.0% 이상이 되면 각각 균주에 따라 0.5% 농도보다 엽면적 수치가 높게 나타는 것도 있지만 대부분의 균주에서 0.5% 농도처리보다 그 생육이 떨어지거나 비슷한 수준으로 나타났다 (Fig 2-9).

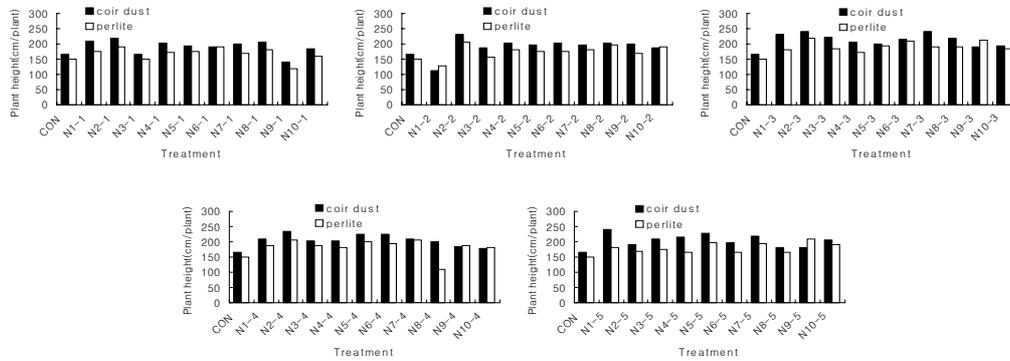


Fig. 2-8. Effects of isolated microorganisms on the plant height of cucumber grown in perlite and coir dust at 30 days after transplanting. N 1~N10: selected 10 different microorganism species, -1:0.1, -2:0.5, -3:1.0 -4:1.5 and -5:2.0% of microorganism added for each species. Notation for concentration is same for all 14-2~14-6 figures.

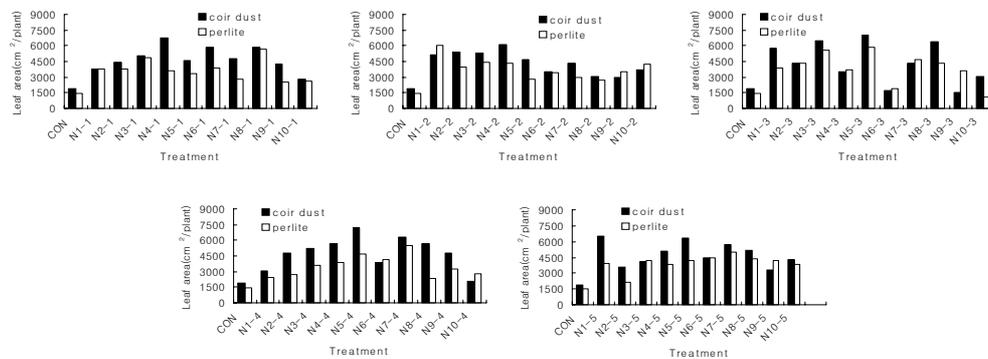


Fig. 2-9. Effects of isolated microorganisms on the leaf area of cucumber grown in perlite and coir dust at 30 days after transplanting.

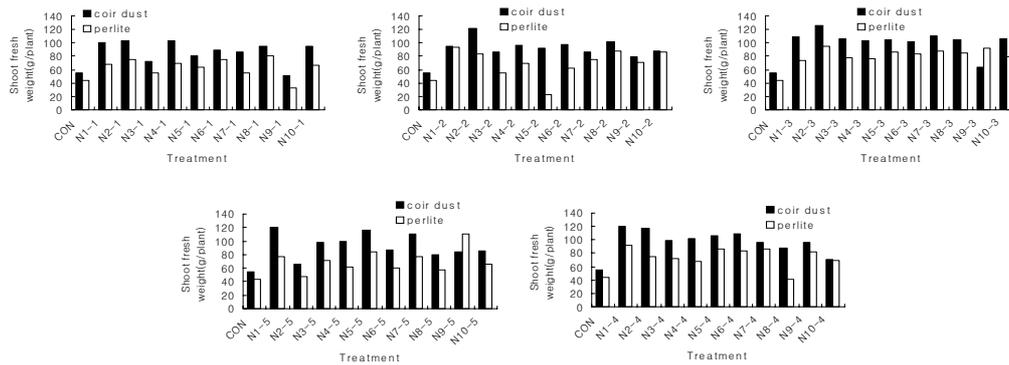


Fig. 2-10. Effects of isolated microorganisms on the shoot fresh weight.

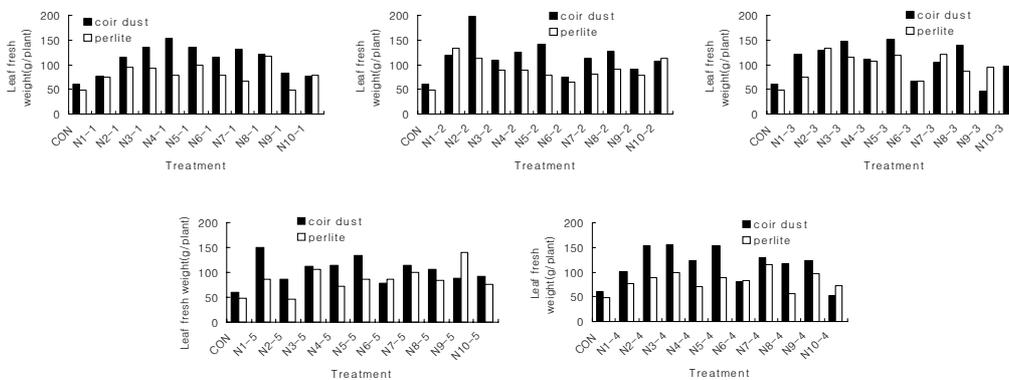


Fig. 2-11. Effects of isolated microorganisms on the leaf fresh weight of cucumber grown in perlite and coir dust at 30 days after transplanting.

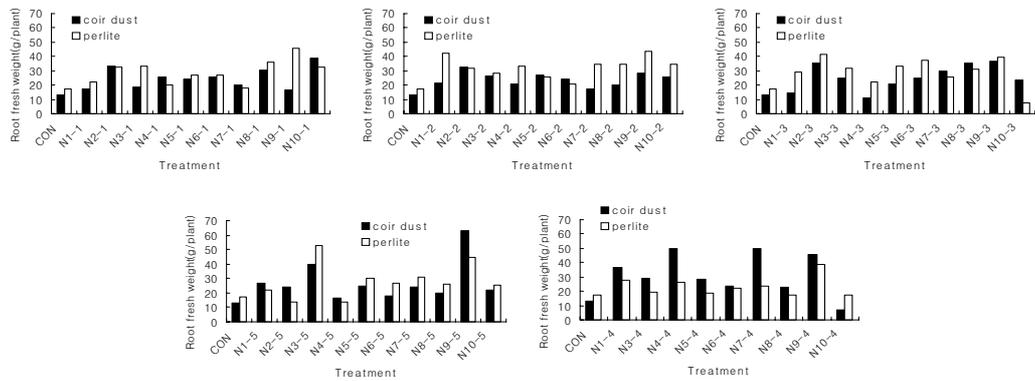


Fig. 2-12. Effects of isolated microorganisms on the root fresh weight of cucumber grown in perlite and coir dust at 30 days after transplanting.

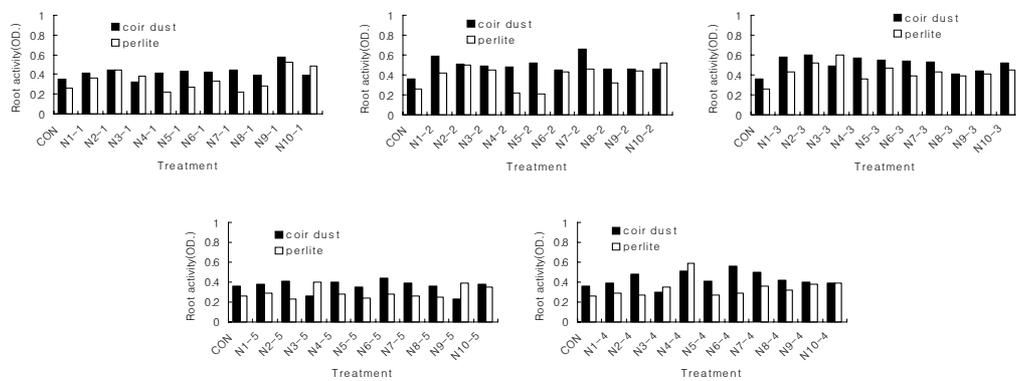


Fig. 2-13. Effects of isolated microorganisms on the root activity of cucumber grown in perlite and coir dust at 30 days after transplanting.

TTC법에 의해서 측정한 근의 활력을 그림 2-13에 나타내었다. 균주에 따라 지하부의 생육이 다양하게 나타난 반면 근의 활력에 있어서는 0.5~1.0%에서 다소 높은 경향을 나타냈다. 이상의 자료로 볼 때 본 실험재료로 쓰인 대부분의 균주가 생육을 촉진시킨다고 판단되며, 0.5% 농도에서도 충분히 1.0% 농도와 비슷한 생육을 유도할 수 있는 것으로 보아 경제적인 측면으로도 0.5% 농도가 그 적정농도라 할 수 있다.

3. 수경 재배에 적합한 기능성 균주선별

가. 실험 목적

일차적으로 germination 과정과 seedling 성장과정에 생육 촉진효과가 탁월한 균주를 선별하여 경정배양에서 생육 촉진을 검증하였다. 또한 이차적으로 선별한 균주(양액재배)에 대하여 재현성과 식물체의 생육 촉진을 과정을 조사하고 선별된 균주를 고정하였다.

나. 재료 및 방법

1) 균주 및 작물 배양 배지

전라남도의 야산 및 바닷가 일대의 토양을 채취하여 이 토양으로부터 약 400여종의 단일 균주를 분리하였으며 이들 균주 중 식물에 기능성을 발휘한다고 판단되는 20여종을 1차 선별하여 기능 분석 실험에 사용하였다. 균주의 배양은 LB broth를 이용하였으며 각 균주별로 최적 생육 온도를 확인하고 CPS는 30℃, 나머지 균주는 37℃에서 shaking Incubator로 12시간 배양하였다. 최종적 약 10여종의 균주를 선별, 동정하여 실험에 사용하였다. 작물의 경정배양에 사용한 배지는 일반적으로 사용하는 MS 배지를 사용하였다. 미생물 혼합체는 일정 농도의 균주 배양액을 일본 원시 표준액(JBS)에 첨가하였으며, 선별한 균주는 동일한 방법으로 화란 PTG 양액

에 첨가하여 처리하였다.

2) 수경재배에 적합한 기능성 균주 선별

경정배양과 Pot 관비재배를 통하여 일차적으로 선발된 기능성 균주를 수경재배에 이용할 수 있는지 알아보기 위하여 다음과 같은 실험을 실행하였다. 은성 백다다기 오이를 양액재배 시스템으로 재배하였다. 코코비트 배지를 사용하여 균주의 효과를 성장단계별로 조사하였다. 또한 경정배양에서의 B 균주 양액 재배실험에서 N2는 CPS로 명명하였다.

3) 작물의 뿌리와 엽 성장 촉진에 대한 형태학적 분석

경정배양, pot 관비재배 및 양액재배를 통하여 일정기간 재배한 작물의 전체와 조직별 즉, 뿌리, 엽면적, 줄기의 길이, 무게, 와 세 뿌리 수 등을 비교하였다.

다. 실험 결과 및 고찰

지금까지 선별된 미생물을 통한 양액재배에서 식물체를 기간별로 조사하여 균주의 효과를 증명하였다.

1) 수경재배에서의 CPS 균주의 효과

Closed system을 통한 식물 생육증진 미생물을 수경재배에서 효과를 검증하기 위하여 수경재배 실험을 실시하였다. 식물은 오이(은성 백다다기)를 사용하였으며 배지 코코비트와 펄라이트(7/3비율)를 혼합하여 사용하였고 양액(1/2PTG)은 drop 방식으로 공급되었으며 균주는 직접 관주형식으로 5일에 한번씩 4회 관주하였다. 1회 관주시에 물 200ml에 0.5% 균주배양액을 희석하여 관주하였다. 대조구는 처리구와 동일한양의 LB(미생물배지)를 처리하였다. 처음 관주(D 일) 후 28일 동안 재배하면서 주 간격으로 height, leaf area, diameter, leaf DW(dry weight), shoot DW, root DW 등을 3회 조사하여 평균값을 그림 2-14에서 2-19로 제시하였다. 작물의

height에 대한 효과는 CPS균주가 가장 큰 것으로 나타났으며 특히 D+21일부터 급속도한 성장을 보여주고 있다(그림 2-14). leaf area의 경우에도 height와 거의 같은 양상을 보여주고 있다(그림 2-15). 또한 leaf dry weight도 동일한 양상으로 진행되고 있으나 D+28일에서 급속히 성장하였고(그림 2-16), diameter의 경우에도 동일한 결과를 얻었다(그림2-17). Root dry weight(DW)는 미생물 처리군과 무처리군에서 D+21일 이후에 큰 차이를 보여주었으며 특히 CPS가 가장 큰 효과를 나타내었다(그림 2-19). 반면에 shoot Dw에서는 두 군간의 차이를 발견할 수 없었다(그림 2-18). 결과적으로 미생물을 처리한 수경재배를 통하여 미생물 미치는 효과를 시기별로 파악 할 수 있었는데 대부분의 경우 처리 3주 후부터 효과가 나타나기 시작하였으며, D+28일에 가장 큰 효과를 보였다. 특히 미생물 처리는 shoot보다 root 성장 촉진에 더욱 효과적이었으며 미생물중에서도 CPS 균주의 효과가 가장 큰 것으로 나타났다. 따라서 CPS균주를 직접 관주방식으로 수경재배에 사용한다면 작물의 생육을 촉진시킬 수 있을 것으로 결론지었다.

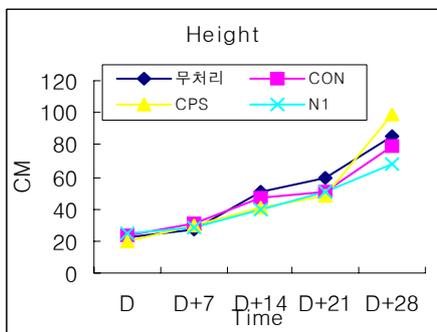


Fig. 2-14

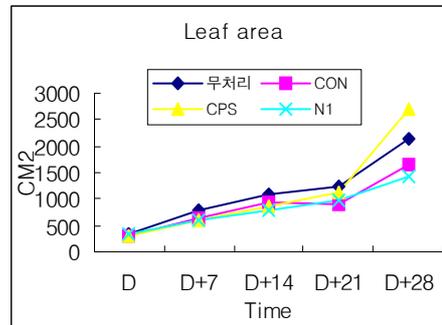


Fig. 2-15

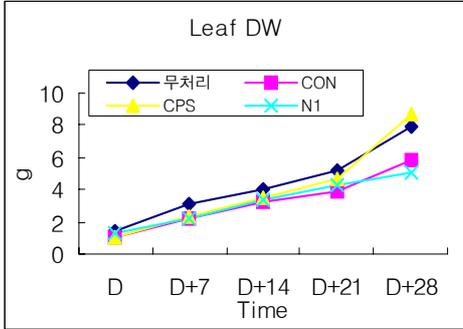


Fig. 2-16

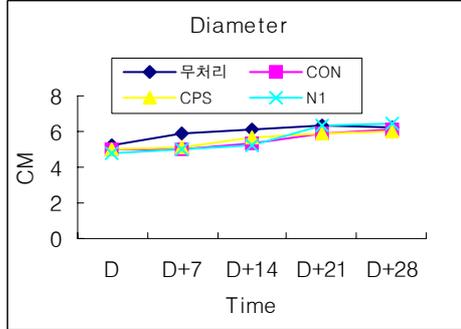


Fig. 2-17

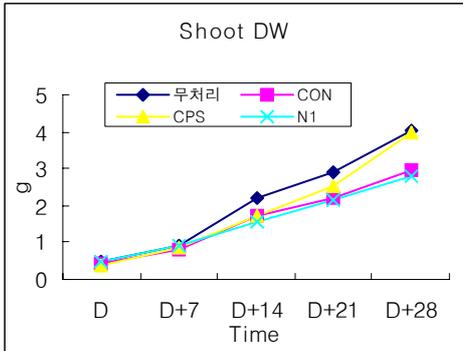


Fig. 2-18

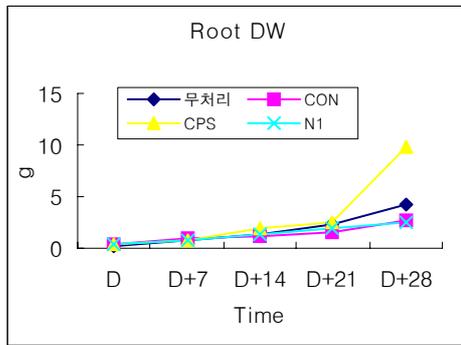


Fig. 2-19

2) 수경재배에서 D2 균주의 효과

선별한 균주 중 CMB와 D2균을 양액에 첨가하여 초장과 엽면적의 생육 촉진 효과를 조사한 결과이다. 정식 후 7일째에서는 균에 대한 효과가 나타나지 않았지만 정식 후 14일에서 이들에 대한 효과가 나타났다. D2균은 오히려 대조군보다 초장면에서 저하되었지만 21일에는 급속도로 신장을 보여 대조군보다 나은 생육을 보였으며 엽면적에서도 유사한 경향을 나타내었다. 지상부 생육에 있어서 CMB 균은 정식 후 14일째에는 D2 보다 나은 생육을 보였지만 21일째 조사한 결과를 보면 오히려 대조군 보다 생육을 억제시키는 경향을 나타내었다(그림 2-20).

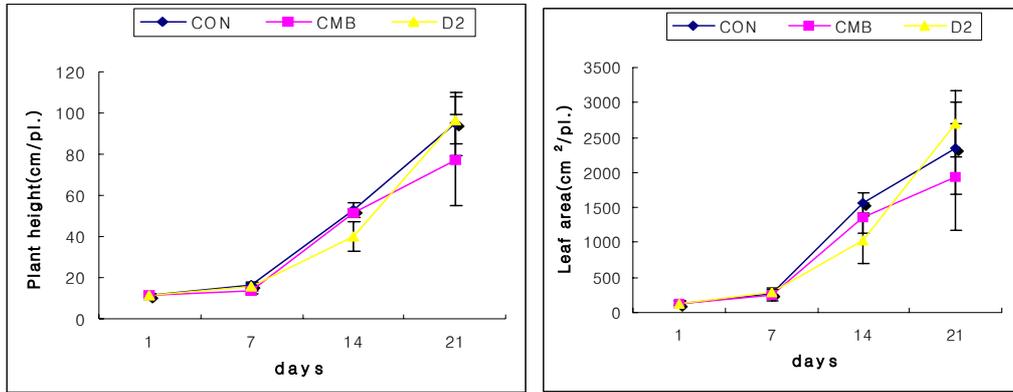


Fig. 2-20. Effects of CMB and D2 supplemented as mixlite into JBS on the plant height and leaf area of cucumber grown during 3 weeks after transplanting.

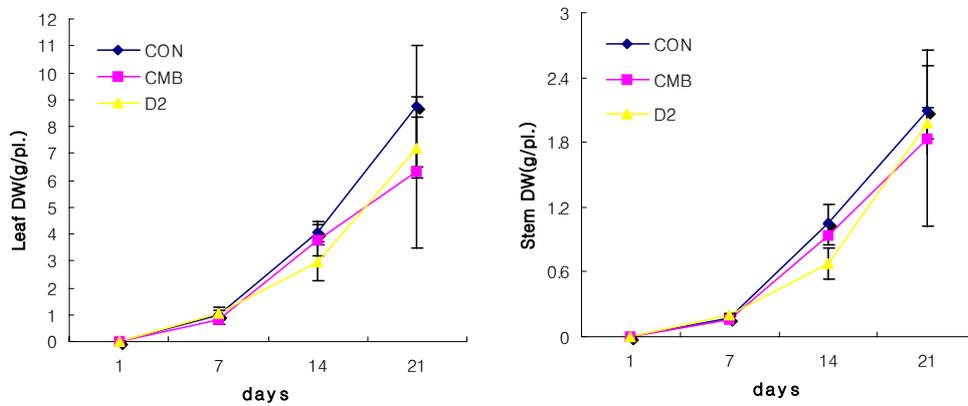


Fig. 2-21. Effects of CMB and D2 supplemented as mixlite into JBS on the leaf and stem dry weight of cucumber plants grown in mixlite during 3 weeks after transplanting.

그림 2-22는 D2와 CMB 균주에 대한 지하부 생육반응을 조사한 것이다. 균주 D2의 경우 지상부 생육과 마찬가지로 정식 후 14일째 보다는 21일째 대조군보다 나은 생육을 보였다. CMB 균주는 지상부 생육이 저하된 것과는 반대로 오히려 생육이 더 나은 결과를 나타냈다. 이에 대한 근의 활력에 있어서도 유사한 경향이였다.

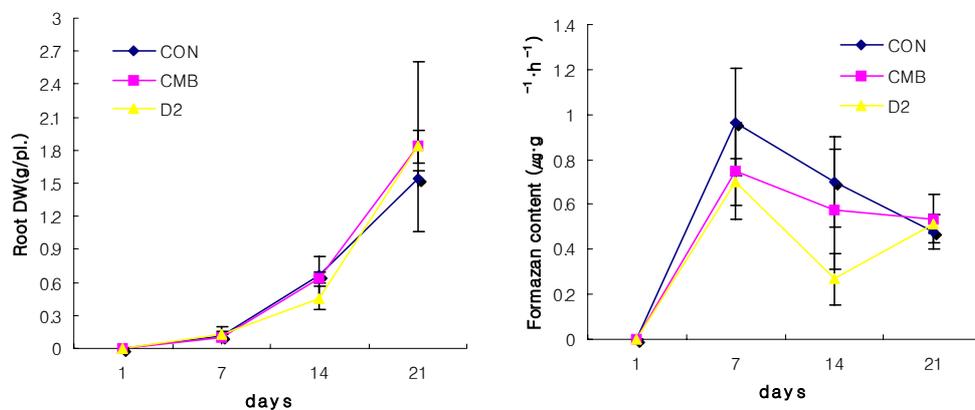


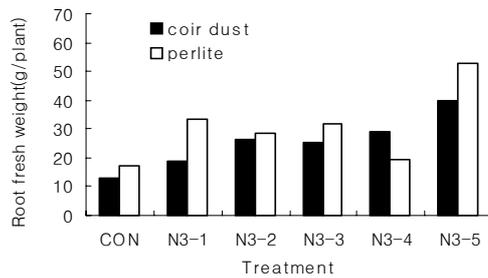
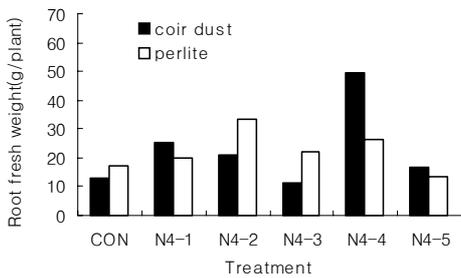
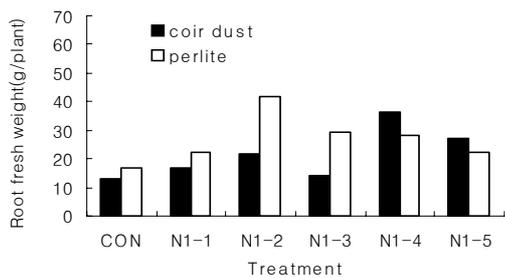
Fig. 2-22. Effects of CMB and D2 supplemented in mixlite into substrates on the root dry weight and activity of cucumber during 3 weeks after transplanting.

그림 2-20,21은 CMB와 D2 균주처리에 따른 정식 후 21일째 오이의 생육 반응을 나타낸 것으로 전반적으로 두 균주 모두 생육 촉진효과를 얻을 수 있었다. 또한 CMB와 D2 균주간의 우월성에 있어서는 D2 균주 처리가 다소 높은 촉진 효과를 얻을 수 있었으나 유의차는 인정되지 않았다.

3) 수경재배에서 CPS1, D2외의 균들 효과

수경재배과정에서 재배 배지별로 선별한 미생물들의 생육 촉진효과를 본 과제에서 조사하였다. 처리방법은 1 세부과제와 동일하며 미생물(N1, N3, N4, N5,

N6, N7, N8, N9 등 10종)의 농도는 -1; 0.1%, -2; 0.5%, -3; 1.0%, -4; 1.5%, -5; 2%로 표기하였다. 수정재배 배지에 미생물을 처리한 결과 균주별로, 배지별로 생육 촉진 효과면에서 균주별 특징을 비교할 수 있으며 배지별 차이를 확인하였다. 일반적으로 적은 농도나 높은 농도보다는 중간정도의 농도(0.5%)에서 작물의 생육이 촉진되었으며, 뿌리 생체중의 촉진 효과는 N9 종이 상당히 뛰어남을 볼 수 있고 그 외 균주들도 대조군과 비교하여 우월함을 보여주었다(그림 2-23). 코코비트와 펄라이트 배지에서 뿌리무게에 대하여 동일한 효과를 나타내는 균주는 2개 균주에 불과하였으며, 대부분의 경우 코코비트 배지를 사용하였을 때 뿌리 무게가 높게 나타났다. 즉, 미생물 처리 농도가 0.1%-2% 이므로 미생물의 과잉 공급으로 인한 효과보다는 배지에 따라 균주의 효과가 다른 것으로 판단되었다.



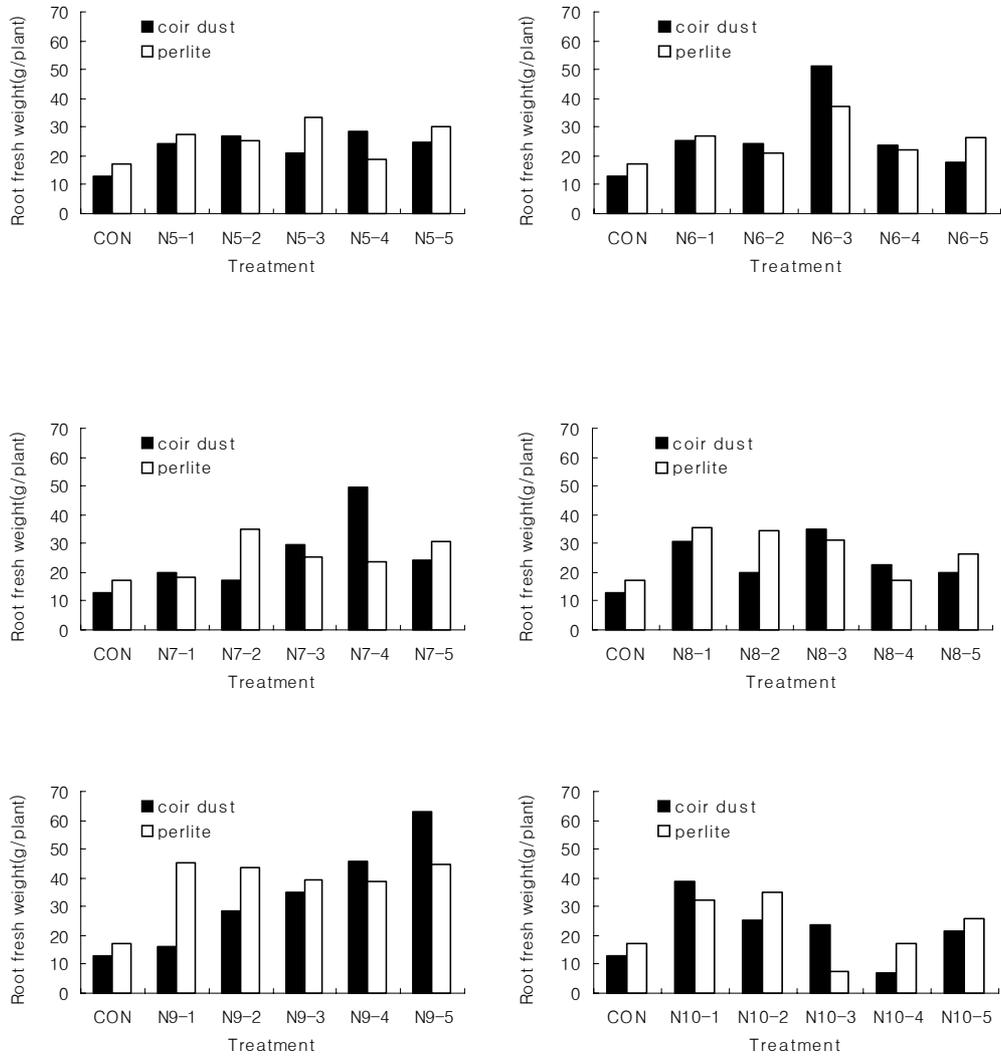


Fig. 2-23. 미생물별, 재배배지별 수경재배에서 오이 조직의 생육 촉진 효과 비교

특히 N-9의 경우에 아주 낮은 농도에서 펠라이트배지를 사용하였을 때 근 부분의 무게가 코코비트배지를 사용하였을 때 보다 훨씬 높게 나타났다. Root activity(1절)의 경우에도 2, 3번 처리군(0.5, 1% 농도)의 경우에는 대조군보다 훨씬 우월함을 보여주고 있으며 1, 4번(0.1, 1.5% 농도)은 대조군과 거의 비슷한 수준을 보이고 5번 처리구(2.0% 농도)의 경우는 N4, N7, N8군을 제외하고는 거의 비슷하다. N4, N7, N8, 군들이 2.0%농도로 처리하는 경우 root activity에서 최대 효과를 나타내지 못한 것으로 미루어 2.0%농도가 최적의 균처리 농도가 아님을 알수 있다. 대부분의 실험 균주들은 0.5%-1% 농도로 처리한 군에서 최대값을 보였다. **결론으로 양액재배 방식에 적절한 농도(0.5%-1%)의 미생물 균주를 사용하여 뿌리는 물론 작물의 생육에 영향을 미친다는 결론을 얻었다.**

4. 기능성 균주의 동정

가. 실험 목적

식물의 생육을 증진하는 미생물 혼합체로부터 단일 미생물로 분리하여 여러 번의 선별 과정을 통하여 획득한 미생물들이 식물에 미치는 영향을 조사하였다. 그리고 선별된 기능성 미생물들의 효과적인 활용과 상품개발을 위하여 균주의 동정이 수행되었다.

나 재료 및 방법

1) 분리된 유용미생물의 동정

선별된 미생물의 균주 동정은 BIO LOG SYSTEM과 16S rRNA, 18S rRNA Sequence로 동정하였다. 각 미생물들을 LB broth(Trptone, NaCl, yeast extrct)에서 culture한 후 각각 2ml을 취하여 모았다. 이를 genomic DNA isolation kit(QIAGEN Co. Germany)를 이용하여 total DNA를 분리한 후 16S rRNA gene

primer(5'-TGG CTC AGA ACG AAC GCT GGC GGC, Reverse 5'-CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT bionics co.kr)와 18S rRNA gene Primer(5'-TAA GGG TTC GAT TCC GGA G,Reverse 5'-TTC GAG CAA TAC GCC TGC bionics co.kr) 를 사용하여 분리한 DNA를 template로 PCR하였고, sequencing을 통하여 염기서열을 확인하여 균주를 동정하였다.

다. 결과 및 고찰

1) 동정 결과

오이와 멜론을 대상으로 지금까지 수행한 결과를 토대로 생육촉진 기능성 균주들에 대하여 BIO LOG SYSTEM과 16S rRNA Sequence를 통하여 조사한 결과

A	<i>Pseudomonas.sp</i>	M2	<i>Rhodococcus sp</i>
CPS	<i>Pseudomonas. sp</i>	M10	<i>Brevibacterium sp</i>
C	<i>Pseudomonas.sp</i>	M11	<i>Pseudomonas.sp</i>
D	<i>Pseudomonas.sp</i>	CMB100	<i>Paenibacillus sp</i>
E	<i>Pseudomonas.sp</i>	M3	<i>Bacillus.sp</i>
F	<i>Pseudomonas.sp</i>	M1	<i>Bacillus.sp</i>
G	<i>Pseudomonas.sp</i>	M6	<i>Bacillus.sp</i>
D2	<i>Saccharomyces sp</i>	HWPD5	<i>Rhodococcus sp.</i>
RP	<i>Methylobacterium sp</i>	CMB88	<i>Bacillus.sp</i>

Table 2-1. 동정 결과

Table 1에 제시한 바와 같이 각 균주들이 동정되었다. BIO-LOG사의 동정결과 N1과 N3-N10까지의 균주는 *Pseudomonas* 종이었는데 이들 중 특히 효과가 증명된 CPS(B)균주의 16S-rDNA를 분석한 결과 *Pseudomonas pavonacei*와 99%이상의 유사성을 가졌으며, 본 연구팀에서는 *Pseudomonas sp* CPS라 명명하였다. 이는 일반적으로 PGPR로 알려진 균주 중의 대표적인 것으로 이미 보고된 바가 있다. 또한 *Bacillus* 속의 종들(CMB)는 일정농도에서 억제 현상이 일어났으며 D2에 비해 효과가 낮아 조사를 중지 하였다. D2는 18S rRNA 분석 결과 *Saccharomyces cariocanus*

와 94%의 유사도를 보였으며 *Saccharomyces* sp D2로 명명 사용하였다. 동정된 미생물 중 *pseudomonas* sp와 *bacillus* sp가 주 균주로 선별되었다. 그러나 근체중 ,root activity Ion-conductivity등 근부의 기능 촉진 측면에서 최적의 효과를 보인 CPS와 D2를 선별 중점적으로 수경재배 이용 여부와 housing system 구축하였다.

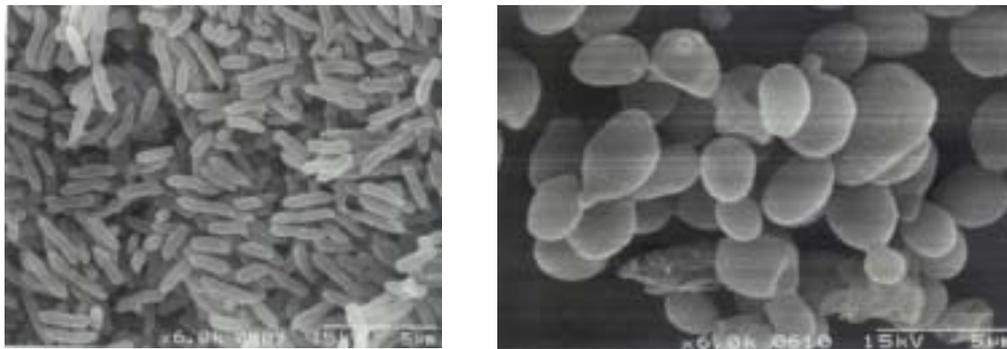


Fig.2-24. CPS and D2

제 3 절 미생물의 효과적인 작물 생육 촉진을 위한 Housing system의 확립

1. 선발된 미생물의 수경재배 근권내 집적화 유도를 위한 housing system 모색

가. 실험목적

본 실험은 오이 수경재배시 선발된 미생물들의 근권내 집적화를 유도하기 위한 housing system을 모색하고자 실시하였다. 일반적으로 실험실에서 활성이 인정되는 균주도, 직접 토양중에 투입하면 대부분의 경우에 효과가 발현되지 않거나 초기의 약간의 효과만을 보이는 것은 투입된 미생물의 서식장소와 먹이가 없기 때문이다. 그러므로 이미 그 토양에서 살고 있는 토양미생물과의 경쟁에서 지기 때문이다. 수경재배에서의 가능성을 토대로 궁극적으로 토양에서 사용을 위하여 housing system을 위해 해조류 중 갈조류의 폴리우로나이드(polyuronide)구조를 갖고 있는 고분자물질을 보유하고 있는 알긴산을 이용하였다. 이들 알긴산은 만뉴론산(mannuronic acid)과 글루론산(guluronic acid)의 조합으로 이루어져 있다고 밝혀져 있으며(이 등, 1968), 또한 알긴산은 인간에게서 무독성인 소재이므로 무한정 섭취하여도 좋은 것으로 인정되었다(IAEA, 1978; ICRP, 1978).

나. 재료 및 방법

1) 미생물에 담체(housing)system을 제공하기 위한 bead 제조

LB broth에서 overnight culture(28°C)한 유용 미생물 배양액에 2%(g/v) Sodium alginate를 녹인다. Alginate가 배양액에 충분히 녹으면 1차 멸균수에 10%

(g/v) CaCl₂ 수용액을 dropping 하면 chelation이 일어나 고형화를 이룬다. LB 1L는 40g의 bead를 생산한다.

2) 작물재배 시 미생물 처리 방법

미생물을 관주 처리할 경우 약 1mL의 미생물이 포함된 배양액을 물 200mL(v/v)에 희석하여 배지를 충분히 적실 정도로 처리하였다. 육묘를 정식한 후 격일 간격으로 3회 처리하였다. 미생물을 bead화하여 처리할 경우에는 1차년도 결과로 가장 효과가 좋은 미생물의 농도로 판정한 0.5%가 되도록 배양액 17.5mL기준으로 약5g의 bead를 생산하는 기준으로 미생물을 처리하였다.

3) 작물재배에 미생물을 포함한 bead 처리 방법

Mix 방식 ; 작물 배지 제조에 사용하는 건조된 코코피트, 펄라이트와 bead를 함께 물을 넣어서 미생물의 농도가 0.5 %되도록 섞어 pot에 담는다. 뿌리 접촉부분의 직접 처리; bead를 제외하고 작물배지를 동일한 방법으로 제작한 후 육묘를 이식할 때 배지내의 육묘 뿌리가 접촉하는 부분에 bead를 직접 처리하였다.

4) 오이재배 양액 및 관주

본 실험은 춘추청장 오이를 공시품종으로하여 2003년 3월 22일 인큐베이터 (30℃)에 최아한 후 익일 파종하였다. 파종 후 분엽 1~2매 정도 전개한 10일째 PBG 1/2배액을 저면으로 관수하여 육묘하였다. 배지는 perlite와 cocopeat를 7:3(v/v)으로 혼합(mixlite)하여 사용하였으며, 파종 후 30일째 3.5ℓ의 용기에 정식하였다. 급액은 타이머에 의한 방식으로 점적관수(Netafim社, 이스라엘)를 사용하여 비순환식으로 온실내에서 재배하였다. 이들 미생물 실험처리후 45일째에 초장, 엽면적, 지상부와 지하부 생체중 및 엽록소 함량을 조사하였다.

다. 결과 및 고찰

1) 작물재배 기간 양액 및 토양 내 일정 농도의 균주를 유지하여 미생물 기능을 강화시키기 위한 housing system 구축

선별한 균주들의 담채(housing system)을 구축하기 위하여 식물의 생육을 촉진시키는 것으로 보고 된 alginate를 이용하여 양액재배에 사용하여 식물 생육 증진 여부를 조사하였다. 또한 미생물에 의한 생육증진의 효과 기간을 최초 미생물 처리 후 3-4주간으로 예상하고 작물생육을 더욱 증진시키기 위하여 housing system인 bead를 처리 3주 후에 재처리하였다. 작물 재배 배지 내 처리 미생물의 안정성과 전체 미생물의 변동을 확인하였다. 오이를 6주간 재배하면서 3주 후에 미생물을 재처리하였다. 미생물을 재처리할 때에는 처음과 같이 작물배지(코코비트+펄라이트)에 고형화 된 미생물을 혼합할 수 없었으므로 작물배지 위에 올리는 방법으로 수행하였다.

가) 오이 재배를 통한 housing system의 기능 확인

(1) housing system을 이용한 오이의 생육 조사

수경재배 오이의 성장 촉진을 위한 근권 미생물 CPS와 D2를 alginate를 이용한 bead 형태로 배지와 혼합 처리한 것과 이들의 배양액을 배지내 관주한 것을 비교 실험한 결과는 표 3-1과 같다. 초장, 엽면적, 지상부와 지하부 생체중 및 건물중 모두 대조구에 비해 처리구에서 좋았으며, 특히 D2 비드 처리구에서 대조구에 비해 130%이상 생장이 증가한 것으로 나타났다.

Table 3-1. Growth characteristics of hydroponically grown cucumber as affected by liquid and alginate bead treatments with functional microorganisms strengthening root growth in 6 weeks after transplanting.

	Plant height (cm)	Leaf area (cm ²)	Stem diameter (mm)	Internode length	Root length	Fresh weight (g)		Dry weight (g)	
						Shoot	Root	Shoot	Root
Con.	145.3 b ^z	1707.1 b	7.3	8.5 ab	28.3 b	159.0 b	27.6 b	16.9 d	2.9 b
Alginate	165.0 b	1885.8 b	6.9	8.8 ab	37.3 a	179.6 b	35.0 ab	20.5 cd	3.9 b
CPS liquid	171.0 ab	1824.1 b	7.1	8.2 b	38.3 a	167.0 b	33.8 ab	19.6 cd	3.7 b
CPS bead	176.7 ab	1966.2 ab	7.2	9.3 ab	33.7 ab	196.4 b	35.3 ab	23.7 bc	4.2 ab
D2 liquid	167.3 ab	2032.9 ab	7.8	8.5 ab	28.3 b	243.0 a	32.0 b	29.2 ab	3.6 b
D2 bead	198.0 a	2288.1 a	7.9	9.5 a	33.0 ab	260.5 a	42.9 a	33.0 a	5.4 a

^zMean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

미생물의 액상과 비드화의 오이 생육 비교시, CPS와 D2 모두 비드화 처리가 더 좋은 성장을 보였다. 알긴산 단독처리도 또한 대조구보다 생장면에서 더 유리하였으며, 특히 뿌리길이 신장에서 37.3cm로 대조구보다 약 9cm가 더 길게 나타났다.

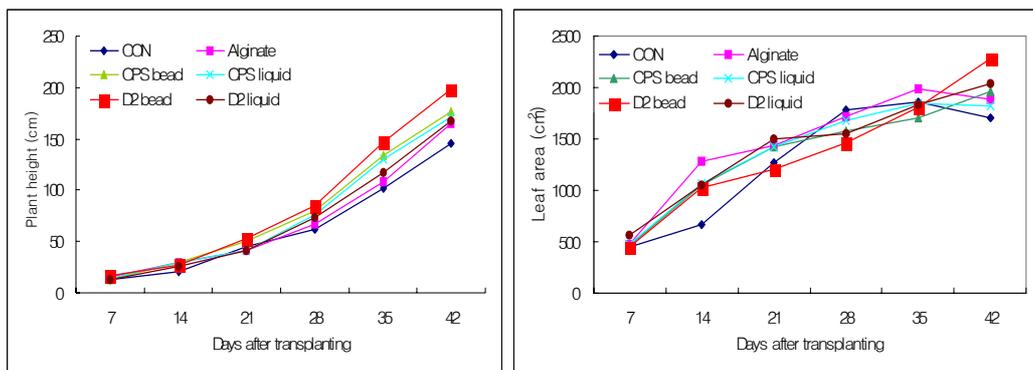


Fig. 3-1. Changes in plant height and leaf area of hydroponically grown cucumber as affected by treating liquid type and bead type of microorganisms 'CPS' and 'D2' by using alginate.

그림 3-1은 초장과 엽면적의 경시적 변화를 비교한 것이다. 초장은 대조구에 비해 모든 처리구에서 시간이 경과할수록 높게 나타났다. 특히 CPS와 D2 모두 비드 처리구가 관주처리구보다 다소 양호한 결과를 보였다. 엽면적은 초장과 마찬가지로 대조구에 비해 미생물 처리구에서 넓은 경향이였다. 또한 bead화 재료인 alginate를 단독으로 처리한 경우에도 대조구보다 초장이나 엽면적이 다소 좋게 나타났다. 이는 기존의 보고된 alginate가 식물 생육 증진 효과를 보인다는 내용과 일치 하였다.

그림 3-2는 미생물의 종류와 처리방법에 따른 오이의 지상부와 지하부의 생체중 변화를 나타낸 것이다. 지상부와 지하부의 생체중 모두 CPS 처리구보다 D2 처리구에서 더 양호한 결과를 나타냈다. 또한 초기 생장은 관주처리에서 좋았으나, 정식 40일 정도를 기점으로 bead 처리에서 점점 더 좋은 효과를 보여, D2 bead 처리구에서 지상부와 지하부의 생체중이 각각 220g과 43g으로 대조구의 160g과 27g에 비해 1.4배와 1.6배 더 높았다.

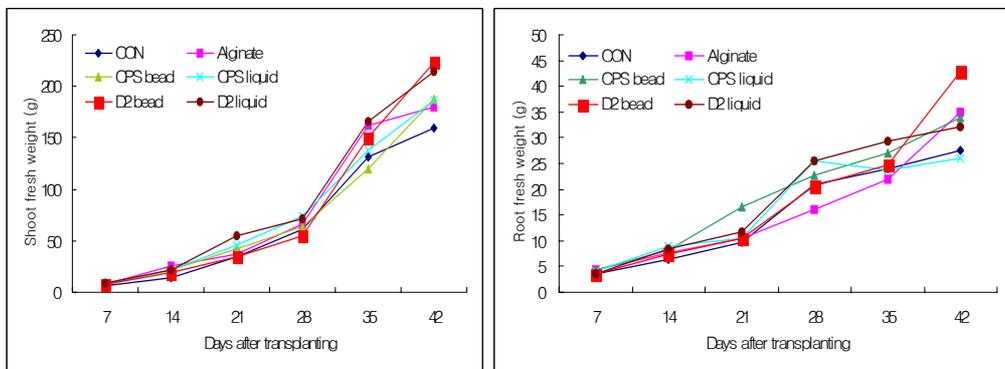


Fig. 3-2. Changes in shoot and root fresh weight of hydroponically grown cucumber as affected by treating liquid type and bead type of microorganisms 'CPS' and 'D2' by using alginate.

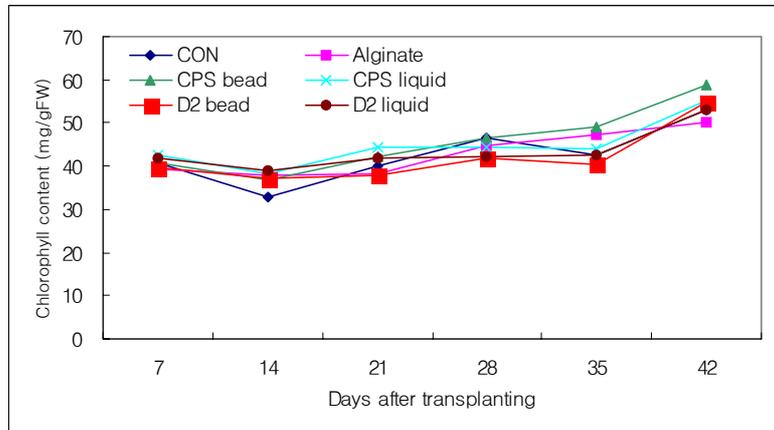


Fig. 3-3. Changes in chlorophyll content of hydroponically grown cucumber as affected by treating liquid type and bead type of microorganisms CPS and D2 by using alginate.

엽록소 함량은 모든 처리구에서 정식 후 시간이 경과할수록 높아지는 경향이었으며, 특히 CPS bead 처리구에서 정식 1개월 이후부터 점점 높아지기 시작하였다. 결과적으로 CPS, D2의 미생물을 관주 형식 보다는 housing system을 채용하여 처리한 경우가 작물 생육 증진효과를 나타내었다. 이는 Alginate만을 처리한 처리구 보다 더욱 작물의 생육을 증진 하였으므로 균주의 효과로 판단되며 양액재배 방식에 더욱 적합한 형태로 사료된다.

(2) 미생물 안정성 조사

미생물 안정도 조사는 위 조사와 같은 처리구에서 작물의 뿌리 주위 배지를 1g 채취 후 평판 측정법을 통하여 작물배지내의 전체 미생물 수와 항생제 (ampicillin) 반응과 morphology를 관찰하여 처리한 미생물의 안정도를 조사하였다. LB(AP) 상에서 균주의 생육을 조사한 결과 3주 후 80%, 6주 후 50% 이상이 최초 처리 균주와 동일함을 확인하였다(그림3-5). 미생물을 재처리한 후 1주(전체 재배 4주)

후에 미생물 재처리 효과를 조사한 결과 작물의 생육에 미치는 영향은 그다지 크지 않았지만 작물 배지 내에 유용미생물의 숫자가 증가함을 볼 수 있었다. 또한 양액재 배 배지내에서 기능성 미생물의 지속적 유지가 가능한 것으로 예상된다. 결과적으로 housing system을 통하여 유용 미생물의 안정도가 높아짐을 확인하였다.

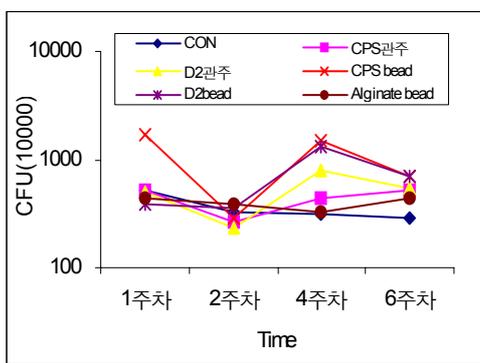


Fig. 3-4. 오이 재배시의 미생물

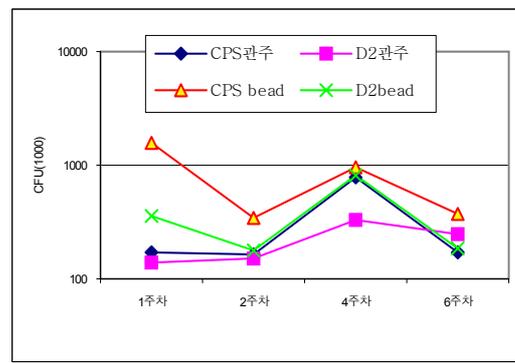


Fig. 3-5. 오이 재배시의 CPS1, D2 안정도

미생물 재처리 방법을 초기와 달리하여 효과를 조사하였다. 즉, 작물이 어느 정도 성장 한 후에는 뿌리부분에 bead를 직접 접촉하게 할 수 없었기 때문에 배지 위에 뿌려 주는 방식으로 처리 하였는데 균체 수의 증가는 이루어 졌지만 초기에 비해 근부 생체중 변화의 효과는 크지 못하였다. D2 bead 처리군은 재처리 2주후인 5주 후에 생육증가를 보였다. 이는 미생물의 안정도를 기준으로 비교한 결과 처리 미생물의 작물배지내의 숫자는 오히려 다소 감소한 것으로 미루어 D2 균주의 반응이 다소 늦은 것으로 예상되며 pot 위에 올려주는 bead 재처리 방식은 비효율적으로 사료된다. 따라서 재처리 방식은 균주를 관주하는 형태가 더욱 유력해 보인다. 이는 근부에 직접적으로 고정화도니 bead 처리가 불가하기 때문이다.



Fig. 3-6. Housing system 재처리 Fig. 3-7. housing system 재처리

나) 선발된 미생물의 오이 수경재배 근권 내 집적화 유도를 위한 housing system 모색

Housing system을 이용한 미생물이 다른 작물에도 효과가 있는지 조사하기 위하여 동일한 방법을 고추에 적용하였다. 그림 3-8과 그림 3-9은 처음 housing system을 처리한 후 6주간 재배하여 뿌리의 발달을 조사한 결과이다. 고추의 경우 CPS 균주를 bead로 처리한 경우에 3-5주차에서 월등한 근장과 근부의 생체 중을 보여주었다. D2 균주 또한 대조군에 비해 높은 값을 보여주었으나 오이에서 보다 높은 생육 촉진 효과를 나타내었다. 따라서 오이보다 오히려 고추 작물에 CPS와 D2 근부강화 미생물을 이용하는 것이 효과가 큰 것으로 나타났다. 고추 root activity의 경우에서도 CPS 균주는 대조군에 비해 월등한 Activity를 보였다(그림 3-10). 작물 배지내의 전체 미생물 양은(그림3-11) 크게 변동사항이 없었다. 다만 배지내에서 총 균주 수는 거의 비슷한 수준으로 유지되지만 처리한 균주의 비율은 6주 후 상당히 많은 수가 감소하였고, 오염 등으로 인한 다른 균주 수가 증가 하였다. 전체 균수의 8/10(1주차)에서 5/10(6주차)정도의 비율로 처리 미생물이 존재 하였다.

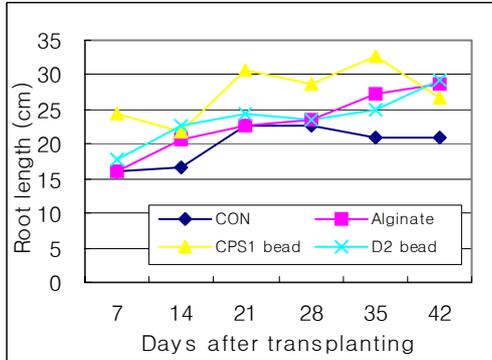


Fig. 3-8. Housing system이용한 고추 근장

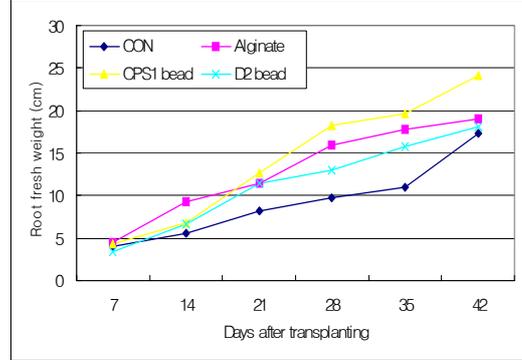


Fig. 3-9. housing system이용한 고추 근부 생체중

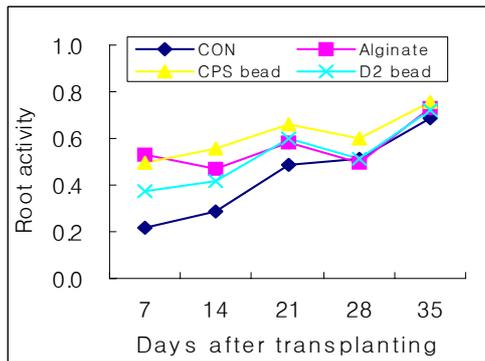


Fig. 3-10. housing system 이용한 고추 root activity

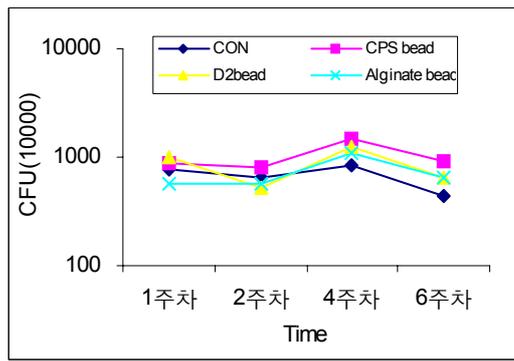


Fig. 3-11. Housing system이용 작물 배지 내 미생물

결론적으로 오이와 고추의 실험을 통하여 양액 재배 시 housing system은 관주형태의 처리방법 보다 더 작물재배에 효율적이며, 미생물의 안정성을 높여준 것으로 판단되었다. 또한 고추와 오이에 동일한 균주, CPS과 D2를 사용할 수 있음을 확인하였다.

제 4 절 알긴산 비드화 미생물의 시비 및 관비방법의 계량화

1. 균주별 알긴산 비드화의 농도가 수경재배 오이의 생장에 미치는 영향

가. 실험목적

Housing system을 통한 수경재배 오이의 근권내 미생물 집적화를 유도하기 위한 CPS와 D2의 알긴산 비드화가 액상처리보다 생육에 더 효과적인 것으로 밝혀졌다. 따라서, 본 실험은 이들 미생물의 알긴산 비드화의 최적 농도 재선정하고자 실시하였다.

나. 재료 및 방법

1) 양액 재배

본 실험은 춘추청장 오이를 공시품종으로 하여 2003년 3월 22일 인큐베이터(30℃)에 최아한 후 익일 파종하였다. 파종 후 본엽 1~2매 정도 전개한 10일째 PBG 1/2배액을 저면으로 관수하여 육묘하였다. 배지는 perlite와 cocopeat를 7:3(v/v)으로 혼합(mixlite)하여 사용하였으며, 파종 후 30일째 3.5ℓ의 용기에 정식하였다. 급액은 타이머에 의한 방식으로 점적관수(Netafim社, 이스라엘)를 사용하여 비순환식으로 온실내에서 재배하였다.

2) 미생물 처리

미생물에 담체(housing)system을 제공하기 위한 bead 제조는 제3절에서와 같으며, 농도는 CPS의 경우, 0.5, 1.0, 3.0 및 10.0g/pot, D2는 0.25, 0.5, 1.5 및

5.0g/pot로 하여 배지 내 뿌리와 직접 접촉하도록 처리하였다. 실험처리후 45일째에 초장, 엽면적, 지상부와 지하부 생체중 및 근활력을 조사하였다.

다. 결과 및 고찰

Housing system을 통한 수경재배 오이의 근권내 미생물 집적화를 유도하기 위한 *Pseudomonas* sp. 'CPS'와 'D2'의 알긴산 비드화의 농도의 영향을 알아보기 위하여 실시한 결과는 표 4-1에서 보는 바와 같다. CPS 10.0g 처리구를 제외한 모든 처리구에서 대조구보다 생장이 우수하였으며, CPS는 0.5-1.0g에서, D2는 0.25-0.5g 사이의 처리구에서 가장 좋은 결과를 보였다. 초장은 CPS는 1.0g에서 195cm로, D2는 0.25g에서 192.5cm로 가장 컸으며, 엽생장과 지상부 생체중은 D2 0.25g에서 가장 좋았다. 따라서 성장촉진을 위한 적동 농도는 CPS는 0.5g, D2는 0.25g으로 판단되었으며, 그 이상의 농도에서도 비교적 높은 성장특성을 나타냈으나 경제적인 효과도 고려하여야 할 것으로 판단되었다. 또한 CPS 3.0g 과 D2 0.5g보다 농도가 높아질수록 생장이 점차 감소하는 경향이었으며, 이는 미생물에 의한 대사산물의 생성이 과도하게 이루어진 것으로 생각되었다.

Table 4-1. Growth characteristics of hydroponically grown cucumber plants as affected by different kind and amount of alginate bead treated with functional microorganisms in 45 days after transplanting.

Treatment	Plant height (cm)	Leaf length (cm)	Leaf width (cm)	Stem diameter (mm)	Internode length (cm)	Fresh weight (g)	
						Shoot	Root
Con	141.5 d ^z	20.5abc	20.5 ab	7.2	8.0 b	130.0	17.1 bc
CPS	0.5g	192.5 b	19.5 bc	19.3abc	7.9	8.8 ab	154.0
	1.0g	195.0 a	19.5 bc	20.0abc	7.2	9.5 a	153.0
	3.0g	180.0ab	21.0 ab	20.0abc	8.3	7.8 b	162.0
	10.0g	134.0 d	17.3 c	16.5 c	7.5	8.5 ab	143.0
D2	0.25g	192.5ab	23.5 a	21.8 a	7.3	9.5 a	175.0
	0.5g	174.0abc	19.3 bc	19.8abc	7.5	8.0 b	172.0
	1.5g	160.0bcd	17.0 c	18.0 bc	7.8	8.5 ab	149.0
	3.0g	146.0 cd	19.5 bc	19.5abc	8.3	8.8 ab	136.0

^zMean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

그림 4-1은 CPS bead의 적정량을 구명하기 위하여 포트당 0.5g, 1.0g, 3.0g 및 10.0g의 농도별 처리와 D2 bead를 포트당 0.25g, 0.5g, 1.5g 및 5.0g의 농도별 처리하여 정식 후 초장의 성장반응을 나타낸 것으로서 CPS1 bead의 경우에는 28일까지는 배지내 혼합(mix) 처리가 다소 높았던 반면, 42일까지는 3.0g의 처리가 꾸준히 향상되었음을 알 수 있었다. 이와 유사한 경향으로 D2 bead의 배지 내 혼합(mix) 처리구에서 28일까지 급격히 증가되었지만 그 이후에는 큰 차이는 나타나지 않고 오히려 대조구의 생장이 높아지는 경향을 볼 수 있었다.

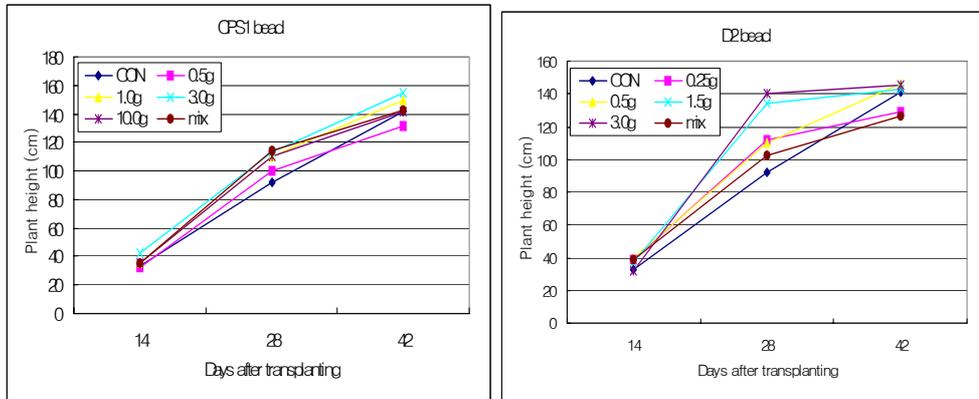


Fig. 4-1. 근권미생물의 종류와 농도 처리에 따른 오이 초장의 변화

그림 4-2는 CPS 농도별 처리시 정식 후 28일째에는 3.0g에서 다소 높아졌다가 그 이후에는 큰 차이가 나타나지 않았고 10.0g의 농도에서는 42일째 경계의 변화가 가장 큰 것으로 나타났으며 다른 농도에서는 대조구와 큰 차이를 보이진 않았다. D2 bead의 5.0g의 농도에서는 28일까지 큰 성장을 보이다가 추후에는 별다른 변화가 없었고 0.25g에서는 28일까지 줄곧 성장하다가 42일째에는 다른 처리와 비교해 오히려 감소하는 경향까지 나타냈다. 배지 내 CPS bead의 농도별 처리에 따른 근장의 변화를 나타낸 것으로써 정식 후 28일까지는 10.0g의 농도에서 가장 급격한 차이를 나타낸 반면 그 이후에는 서서히 감소되는 추세를 나타냈고 다른 농도는 대조구와 비교해 양호한 성장을 보였다(그림 4-3). 이와 유사한 경향으로 D2 bead의 경우 5.0g에서 대조구와 비교해 28일까지는 큰 변화를 나타냈지만 차차 별 다른 성장을 나타내

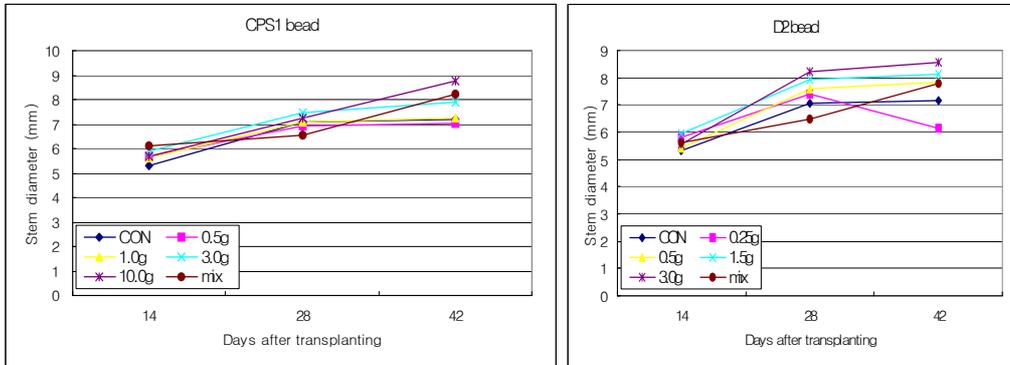


Fig. 4-2. 근권미생물의 종류와 농도 처리에 따른 오이 경경의 변화

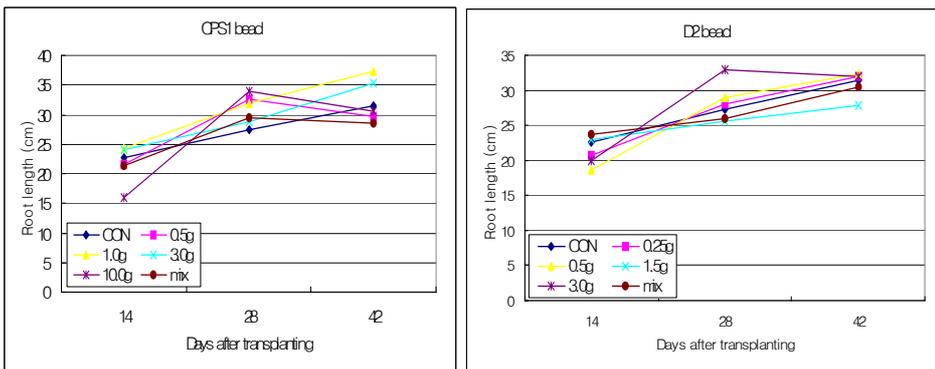


Fig. 4-3. 근권미생물의 종류와 농도 처리에 따른 오이 근장의 변화

지 못했으며 다른 농도는 대조구와 비슷한 경향을 나타냈다. 그림 4-4는 CPS bead의 처리에서는 지상부 생체중의 변화가 대조구와 비교해 거의 유사한 형태로 나타났지만 0.5g의 농도에서 다소 높았다. D2 bead를 1.5g와 5.0g 첨가한 처리구에서 지상부 생체중이 급격한 변화를 보였지만 42일 후에는 거의 변화가 나타나지 않았으며 0.25g의 농도에서는 대조구와 비교해 양호한 증가를 보였다. 이는 일정 농도에서는 대조구보다 높은 증가속도를 보였지만 일정시기가 경과하면서 근권미생물이 지상부의 생체중에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다.

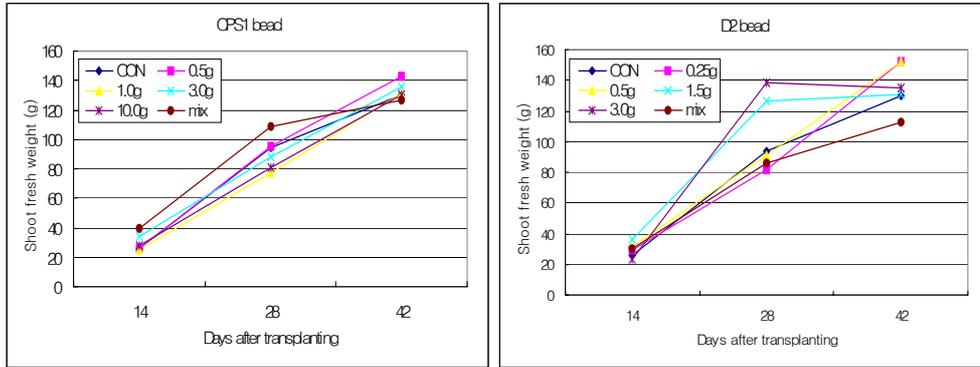


Fig. 4-4. 근권미생물의 종류와 농도 처리에 따른 오이 지상부 생체중의 변화

그림 4-5는 근권미생물 첨가량에 따른 지하부 생체중의 증가속도를 경시적으로 나타낸 결과로써 CPS bead의 경우 0.5g의 농도가 대조구에 비해 모든 첨가구에서 높은 경향을 보였으며, 10.0g의 고농도에서는 초기에는 큰 영향을 끼쳤지만 결과적으로 가장 저조한 경향을 나타냈다. D2 bead의 경우에는 CPS bead와 유사한 경향을 나타냈지만 대조구와 비교해 각 처리구간 차이는 그리 크지 않았다.

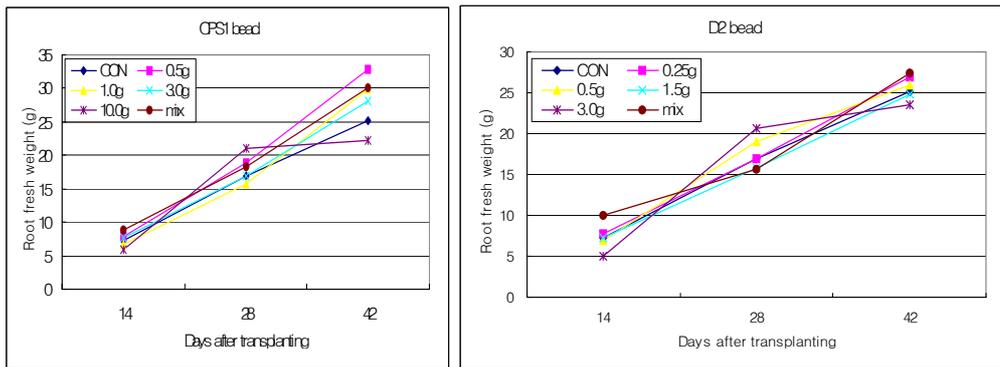


Fig. 4-5. 근권미생물의 종류와 농도 처리에 따른 오이 지하부 생체중의 변화

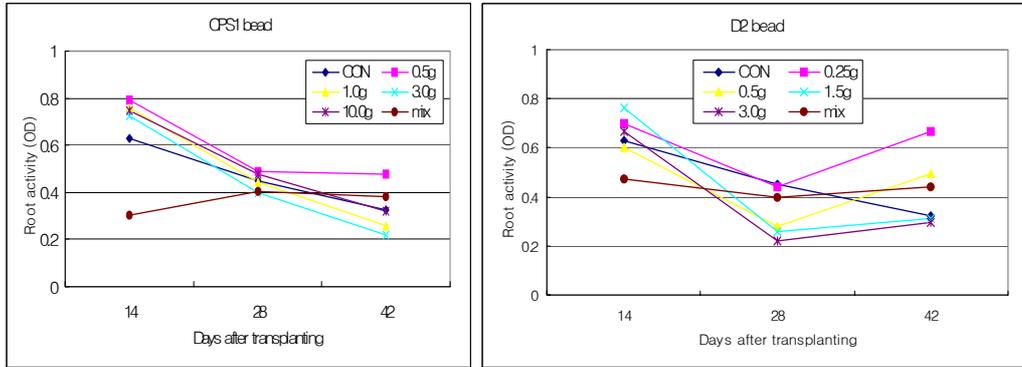


Fig. 4-6. 근권미생물의 종류와 농도 처리에 따른 오이 근활력의 변화

그림 4-6은 배지 내 근권미생물의 첨가량에 따른 뿌리의 활성을 나타낸 것으로써 CPS bead의 경우 단위면적당 첨가된 미생물의 양이 많을수록 근활력의 감소속도가 다소 높았지만 10.0g의 고농도의 처리에서는 약간 증가하는 경향을 볼 수 있었다. 이와는 다르게 D2 bead에서는 미생물의 농도가 높아짐에 따라 28일까지는 현저히 감소하였으며 그 이후에는 비슷한 증가속도를 가지고 근활력이 높아지는 현상을 알 수 있었다. 이는 미생물이 근권에 미치는 효과에 대해서도 추후 상세한 검토가 요청되었다.

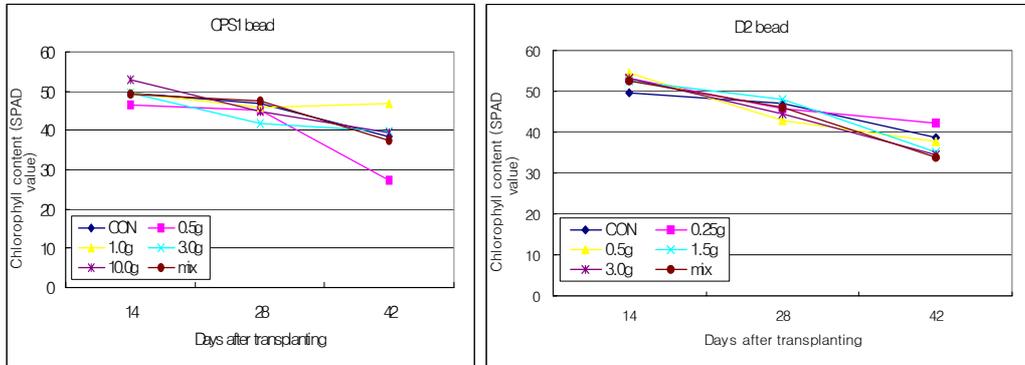


Fig. 4-7. 근권미생물의 종류와 농도 처리에 따른 오이 엽록소함량의 변화

CPS bead의 경우에 정식 후 28일까지는 각 처리구 간의 차이는 크지 않았지만 시간이 경과하면서 1.0g의 농도에서는 거의 감소추세가 나타나질 않았던 반면 0.5g의 농도가 현저히 감소되었음을 알 수 있었다. D2 bead는 CPS bead 처리와 비슷한 감소 경향을 보였으나 가장 저 농도인 0.25g에서 가장 협소한 감소를 나타냈다. 따라서 근권미생물이 갖는 직접적인 영향이 엽록소함량에 대하여 약간의 경감효과를 나타낸다고 판단할 수 있었다.

제 5 절 미생물의 지속적인 번식을 위한 housing 시스템에 적합한 전용배지 및 양액의 선발

1. 균주별 알긴산 비드화 적용 및 배지의 종류가 수경재배 오이의 생육에 미치는 영향

가. 실험목적

Housing system을 통한 수경재배 오이의 근권내 미생물 집적화를 유도하기 위한 *Pseudomonas* sp. 'CPS'와 'D2'의 알긴산 비드화의 처리시 적정농도가 CPS는 0.5g, D2는 0.25g으로 밝혀졌다. 따라서 본 실험은 이들 미생물의 알긴산 비드화 적용을 위한 최적 배지를 선발하고자 실시하였다.

나. 재료 및 방법

본 실험은 겨울나기청장 오이를 공시품종으로 하여 2004년 1월 7일 인큐베이터(30℃)에 최야한 후 익일 파종하였다. 파종 후 분엽 1~2매 정도 전개한 10일째 PBG 1/2배액을 저면으로 관수하여 육묘하였다. 배지의 종류는 perlite와 cocopeat 단용 및 perlite와 cocopeat를 7:3(v/v)으로 혼합한 mixlite를 각각 사용하였으며, 파종 후 30일째 3.5ℓ의 용기에 정식하였다. 양액은 화란 PBG 1배액(EC 1.5-1.6dS/m, pH 5.8-6.2)를 공급하였으며, 급액은 타이머에 의한 방식으로 점적관수(Netafim社, 이스라엘)를 사용하여 비순환식으로 온실내에서 재배하였다. 미생물에 담체(housing)system을 제공하기 위한 bead 제조는 제3절에서와 같으며, 농도는 CPS는 0.5g/pot, D2는 0.25g/pot로 각각 조정하여 배지내 뿌리와 직접 접촉하도록 처리하였다. 실험처리후 35일째에 초장, 엽면적, 지상부와 지하부 생체중 및 근활력을 조사하였다.

다. 결과 및 고찰

Housing system을 통한 수경재배 오이의 근권내 미생물 집적화를 유도하기 위한 *Pseudomonas* sp. 'CPS'와 'D2'의 알긴산 비드화의 적용과 이의 효과를 극대화하기 위한 최적 배지를 선정하고자 실시한 결과는 표5-1에서 보는 바와 같다. 배지별 생장은 perlite나 cocopeat 단용보다는 이들을 혼합한 mixlite에서 가장 좋은 결과를 보였으며, 비드화 미생물의 입식효과는 모든 배지 공히 D2에서 초장, 엽수, 엽면적 및 지상부와 지하부의 생체중 및 건물중에서 가장 좋은 결과를 보였다. cocopeat 단용배지에서 가장 저조한 생장을 보였는데, 이는 cocopeat내에 함유된 염(salt)의 농도가 높았기 때문에 발생한 것으로 생각되며, 이 배지에서 CPS와 D2 비드가 처리된 실험구에서 대조구보다 생장이 더 유리한 것으로 보아 이들 미생물이 염에 의한 피해를 어느 정도 감쇠하였다고 판단되었다. 그림 5-1과 5-2는 *Pseudomonas* sp. 'CPS'와 'D2'의 알긴산 비드화의 적용과 수경재배배지의 종류에 따른 오이의 초장과 엽면적의 경시적 변화를 나타낸 것이다. 정식 후 14일까지는 모든 처리구에서 초장과 엽면적이 별 차이를 보이지 않았으나, 초장의 경우 mixlite에서 14일 이후, 엽면적은 28일 이후에 급격한 변화를 보였으며, 특히 D2비드 처리구에서 가장 큰 차이를 보였다. Cocopeat 배지에서 자란 오이는 perlite나 mixlite 배지에서보다 생육초기부터 저조한 생장을 보였으나 28일 이후 CPS와 D2비드 처리구에서 점차 회복되는 것으로 나타났다.

Table 5-1. Growth characteristics of hydroponically grown cucumber plant as affected by different substrates with treating microorganisms CPS and D2 integrated to alginate bead at 35 days after transplanting.

Treatment		Plant height(cm)	No. of leaves(ea)	Leaf area(cm ²)	Stem diameter(cm)	Chlorophyll content
Perlite	CON	97.7	14.5	1411.5	5.82	44.9
	CPS	103.5	15.0	1401.9	5.80	45.4
	D2	108.0	14.5	1535.2	5.88	46.2
Cocopeat	CON	75.5	12.0	900.8	5.25	42.3
	CPS	84.5	13.0	1120.0	5.40	43.6
	D2	92.5	13.0	1204.9	5.73	43.8
Mixlite	CON	101.0	14.5	1486.0	5.87	45.1
	CPS	112.0	14.0	1539.6	5.85	46.3
	D2	119.2	15.5	1630.3	6.13	48.3
Treatment	Fresh weight(g)		Dry weight(g)			
	Shoot	Root	Shoot	Root		
Perlite	CON	82.0	17.6	7.66		
	CPS	80.5	17.4	7.61		
	D2	85.0	18.1	7.91		
Cocopeat	CON	62.6	14.2	4.56		
	CPS	76.0	17.6	6.06		
	D2	79.4	17.9	6.13		
Mixlite	CON	91.3	20.8	9.02		
	CPS	94.6	22.6	9.61		
	D2	100.9	24.9	9.77		

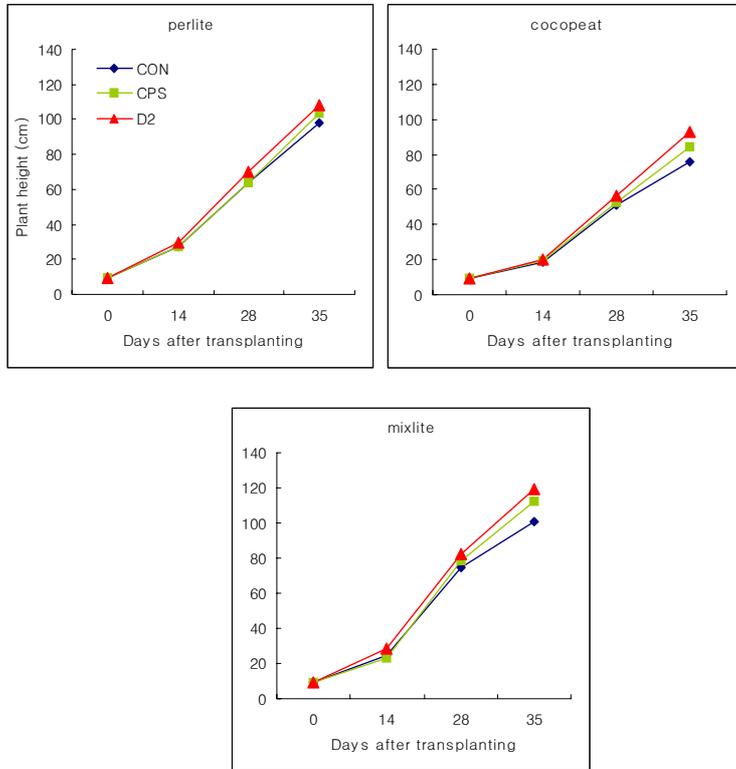


Fig. 5-1. Changes in plant height of hydroponically grown cucumber plant as affected by different substrates with treating microorganisms 'CPS' and 'D2' integrated to alginate bead.

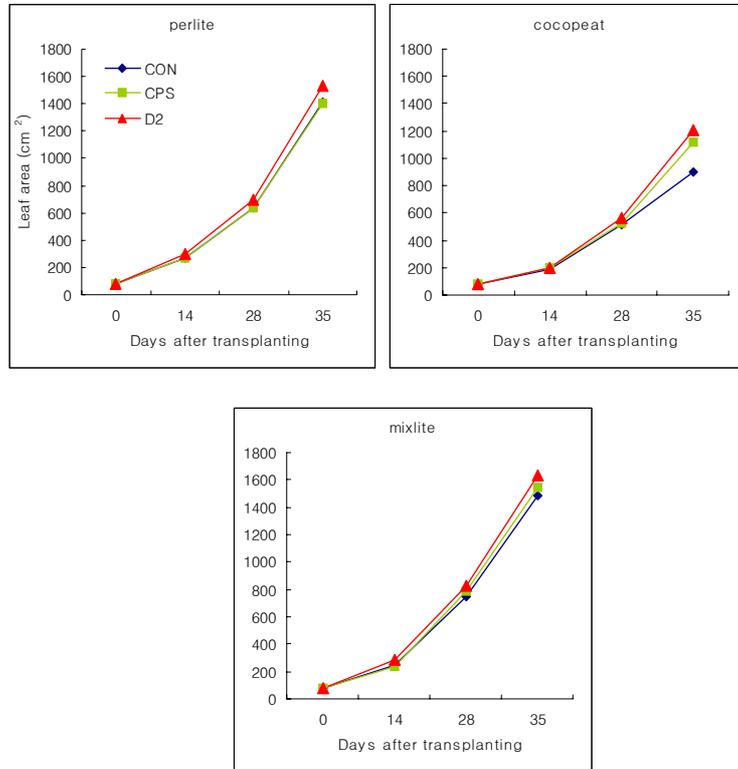


Fig. 5-2. Changes in leaf area of hydroponically grown cucumber plant as affected by different substrates with treating microorganisms 'CPS' and 'D2' integrated to alginate bead.

그림 5-3과 5-4는 *Pseudomonas* sp. 'CPS'와 'D2'의 알긴산 비드화의 적용과 수경재배배지의 종류에 따른 오이의 지상부와 지하부 생체중의 경시적 변화를 나타낸 것이다. 지상부 생체중의 경우, 초장과 엽면적의 결과와 비슷한 경향을 보였다. 지하부의 생체중은 perlite나 cocopeat 단용배지보다 mixlite 배지에서 더 좋았으며, 특히 mixlite에서는 대조구와 CPS 및 D2비드 처리간에 큰 격차를 보이는 것으로 나타났다.

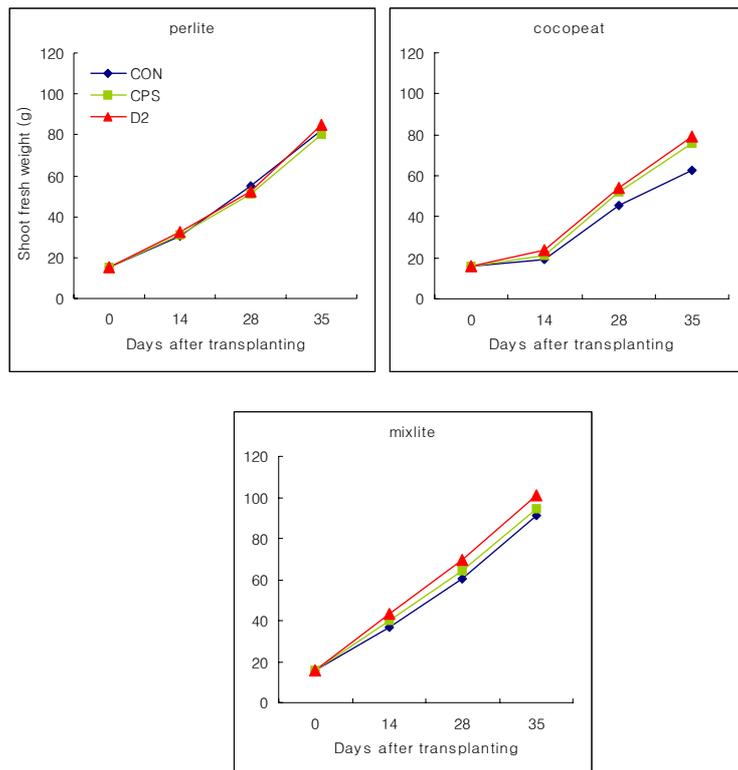


Fig. 5-3. Changes in shoot fresh weight of hydroponically grown cucumber plant as affected by different substrates with treating microorganisms 'CPS' and 'D2' integrated to alginate bead.

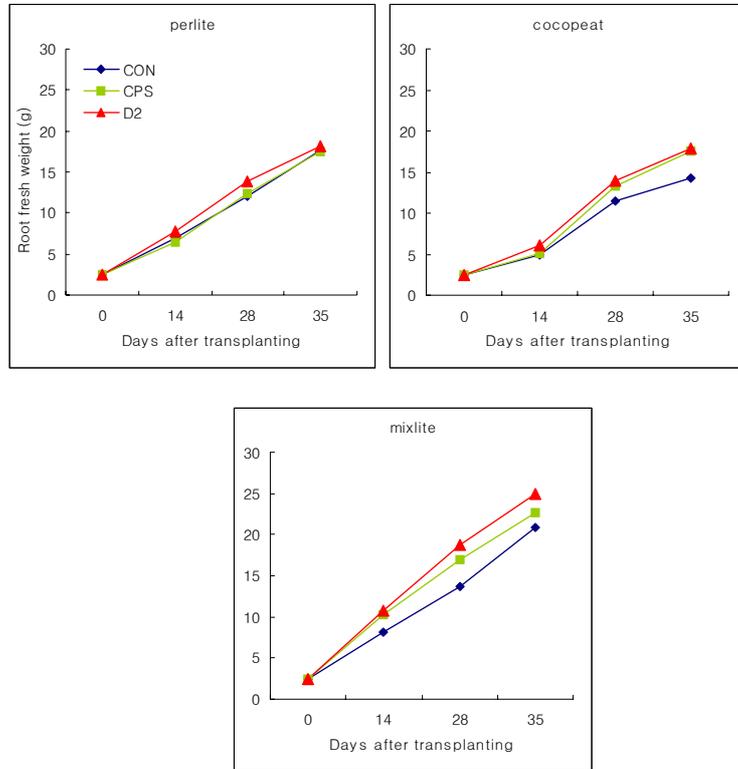


Fig. 5-4. Changes in root fresh weight of hydroponically grown cucumber plant as affected by different substrates with treating microorganisms 'CPS' and 'D2' integrated to alginate bead.

그림 5-5는 *Pseudomonas* sp. 'CPS'와 'D2'의 알긴산 비드화의 적용과 수경재 배배지의 종류에 따른 오이의 근활력의 경시적 변화를 나타낸 것이다. 모든 배지종류에서 정식 후 28일 째에 근활력이 최대를 이루었으며, 그 이후는 점차 감소하는 경향이였다. 이러한 감소경향은 과실의 비대 영향인 것으로 생각되며, 이때 과실과 뿌리의 동화산물 경합이 일어나 뿌리가 약화되었기 때문인 것으로 생각되었다. 그럼에도 불구하고 mixlite에서 D2비드 처리구에서는 정식 35일 째 근활력이 다소 높게

나타났으며, 이는 D2가 지상부 생체중에 유리하게 작용하는 등 뿌리생장에 좋은 영향을 줄 수 있는 것으로 판단되었다.

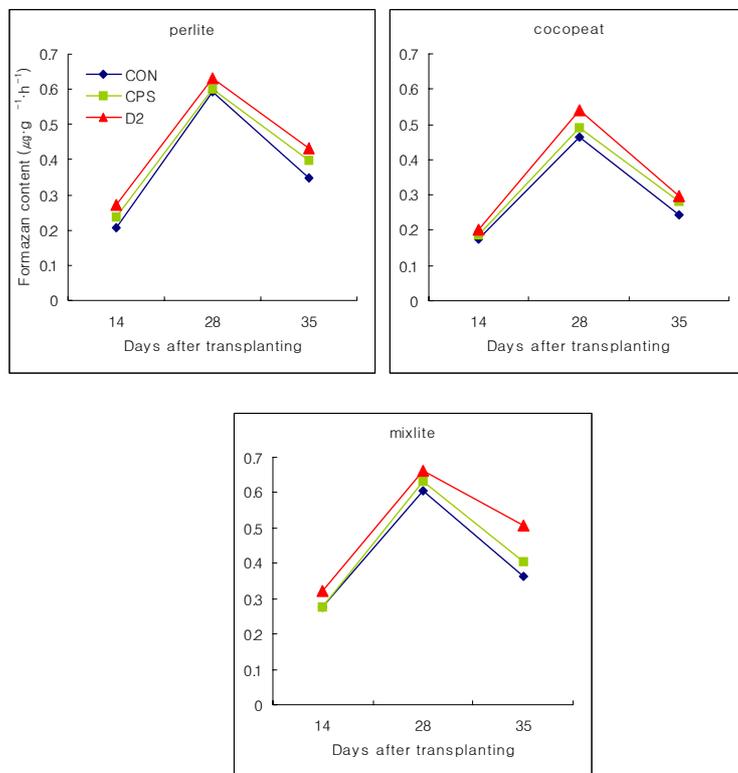


Fig. 5-5. Changes in root activity of hydroponically grown cucumber plant as affected by different substrates with treating microorganisms 'CPS' and 'D2' integrated to alginate bead.

2. 균주별 알긴산 비드화 적용 및 양액의 종류가 수경재배 오이의 생육에 미치는 영향

가. 실험목적

Housing system을 통한 수경재배 오이의 근권내 미생물 집적화를 유도하기 위한 *Pseudomonas* sp. 'CPS'와 'D2'의 알긴산 비드화의 처리시 적정농도가 CPS는 0.5g, D2는 0.25g으로 밝혀졌다. 따라서 본 실험은 이들 미생물의 알긴산 비드화 적용을 위한 최적 양액조성을 선발하고자 실시하였다.

나. 재료 및 방법

본 실험은 겨울나기청장 오이를 공시품종으로 하여 2004년 1월 7일 인큐베이터(30℃)에 최아한 후 익일 파종하였다. 파종 후 분엽 1~2매 정도 전개한 10일째 PBG 1/2배액을 저면으로 관수하여 육묘하였다. 배지는 perlite와 cocopeat를 7:3(v/v)으로 혼합한 mixlite를 사용하였으며, 파종 후 30일째 3.5ℓ의 용기에 정식하였다. 양액의 종류는 표에 나타난 바와 같이 화란 PBG, 일본 JBS 및 벨기에 EVRDC를 표준농도로 하여 공급하였다. 급액은 타이머에 의한 방식으로 점적관수(Netafim社, 이스라엘)를 사용하여 비순환식으로 온실내에서 재배하였다.

미생물에 담체(housing)system을 제공하기 위한 bead 제조는 제3절에서와 같으며, 농도는 CPS는 0.5g/pot, D2는 0.25g/pot로 각각 조정하여 배지내 뿌리와 직접 접촉하도록 처리하였다. 실험처리 후 35일째에 초장, 엽면적, 지상부와 지하부 생체중 및 근활력을 조사하였다.

다. 결과 및 고찰

Housing system을 통한 수경재배 오이의 근권 내 미생물 집적화를 유도하기 위한 *Pseudomonas* sp. 'CPS'와 'D2'의 알긴산 비드화의 적용과 이의 효과를 극대화하기 위한 최적 배양액조성을 선정하고자 실시한 결과는 표 5-2에서 보는 바와

같다. 대조구는 JBS에서, CPS와 D2비드 처리구는 PBG에서 각각 모든 성장특성이 좋았다. 또한 대조구에서는 뿌리의 생장이 지상부의 성장에서 유리한 JBS처리구보다 PBG 처리구에서 30%이상 증가되었으며, 이는 CPS와 D2처리구에서도 동일한 결과로 나타났다.

Table 5-2. Growth characteristics of hydroponically grown cucumber plant as affected by the kinds of nutrient solution with treating microorganisms 'CPS' and 'D2' integrated to alginate bead at 42 days after transplanting.

Treatment		Plant height (cm)	Leaf length	Leaf width	Stem diameter	Internode length ^e	Fresh weight	
							Shoot	Root
Con	PBG	151.5abc ^z	18.5b	19.5ab	8.1abc	9.0bc	134.0cd	17.9ab
	JBS	154.5abc	21.0a	20.5a	7.9bc	9.3bc	156.0bc	13.7cd
	EVRDC	145.0bc	16.0c	16.5cd	8.2ab	9.0bc	108.0c	14.5bc
CPS	PBG	170.0a	19.3ab	19.0ab	7.5bc	9.5abc	177.0ab	16.8abc
	JBS	148.5bc	16.5c	16.0d	8.2ab	8.8c	116.0c	14.3c
	EVRDC	161.5abc	19.0ab	18.8ab	8.2ab	9.5abc	158.0bc	16.7abc
D2	PBG	169.0a	20.3ab	19.8ab	7.9bc	10.0ab	202.0a	18.7a
	JBS	142.5c	19.0ab	18.3bc	7.3c	8.5c	119.0c	10.9d
	EVRDC	163.0ab	20.0ab	19.3ab	8.7a	10.5a	177.0ab	19.7a

상기한 배양 조성액을 이용한 오이의 수경재배시 CPS와 D2의 알긴산 비드화의 적용에 따른 배지내 미생물상 변화를 조사하였으나 양액에 따른 균체의 변화는 보이지 않았다. 그림 5-6는 양액의 종류에 따른 미생물 CPS와 D2비드처리가 오이초장의 경시적 변화에 미치는 영향을 나타낸 것으로서, 각각 미생물에 대한 전반적인 초장의 변화는 PBG양액에서 효과적으로 나타났으며, CPS비드 처리구는 생육초기에서 중기까지, D2비드 처리구는 4주이후에 점차 초장의 변화가 크게 나타난 것으로 조사되었다. 그림 5-7,8은 양액의 종류에 따른 미생물 CPS와 D2비드처리가 오이의 지상부와 지하부의 생체중 변화에 미치는 영향을 나타낸 것으로서, 각각 미생물에

대한 전반적인 생체중의 변화는 초장의 결과와 비슷하게 PBG양액에서 효과적으로 나타났으며, CPS비드 처리구는 생육초기에서 중기까지, D2비드 처리구는 4주이후에 점차 초장의 변화가 크게 나타난 것으로 조사되었다. 특히, 지하부의 생체중은 PBG양액에 D2비드를 처리한 실험구에서 6주째에 크게 증가하였다.

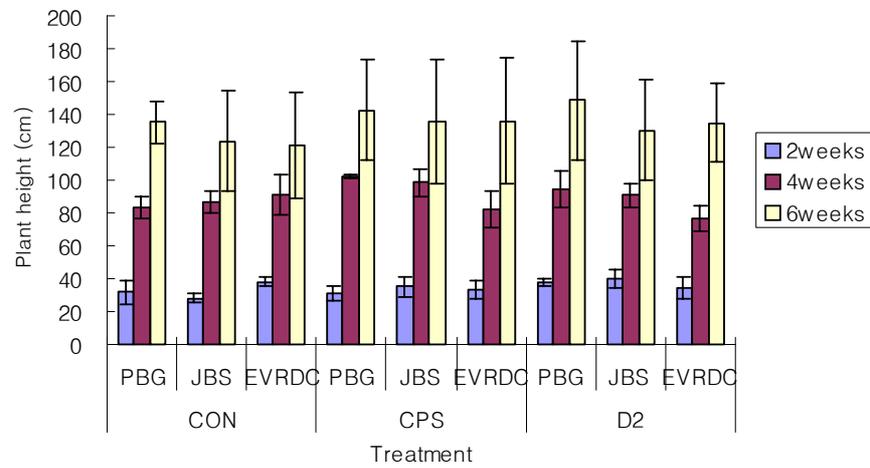


Fig. 5-6. Changes in plant height of hydroponically grown cucumber plant as affected by the kinds of nutrient solution with treating microorganisms 'CPS' and 'D2' integrated to alginate bead.

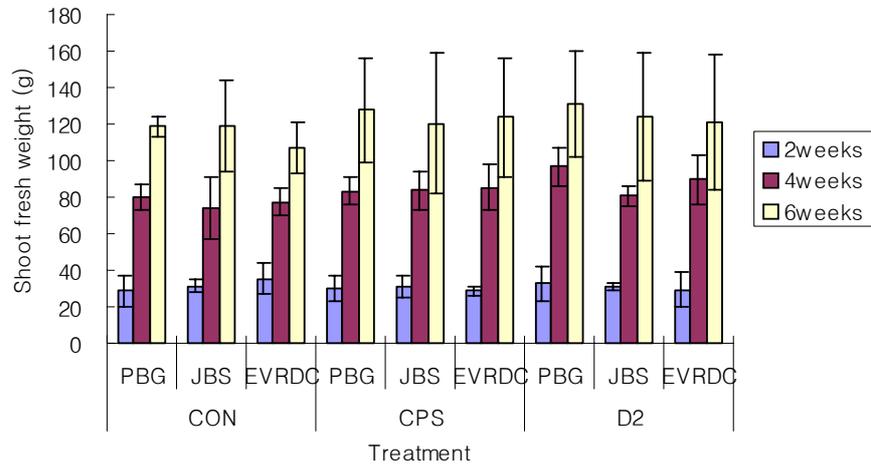


Fig. 5-7. Changes in shoot fresh weight of hydroponically grown cucumber plant as affected by the kinds of nutrient solution with treating microorganisms 'CPS' and 'D2' integrated to alginate bead.

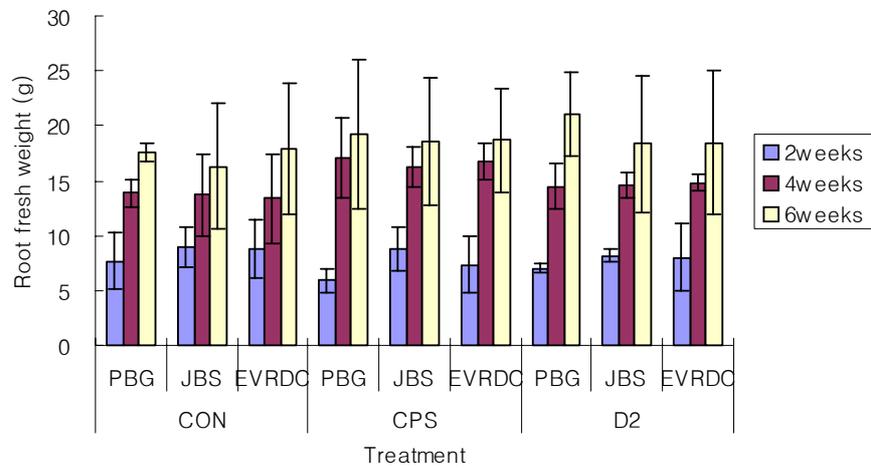


Fig. 5-8. Changes in root fresh weight of hydroponically grown cucumber plant as affected by the kinds of nutrient solution with treating microorganisms 'CPS' and 'D2' integrated to alginate bead.

그림 5-9는 양액의 종류에 따른 미생물 CPS와 D2비드처리가 오이 근활력의 경시적 변화에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 대조구의 경우, 일본 JBS양액보다는 화란PBG와 벨기에 EVRDC배양액에서 근활력이 더 좋은 것으로 나타났으나, CPS비드 처리구에서는 대조구의 이러한 경향을 바꾸어 주어, 일본 JBS양액처리구의 근활력이 다소 높게 나타났다. D2비드 처리구의 경우는 2주째에 일본 JBS에서 근활력이 다소 높았으나 시간이 갈수록 점차 감소하는 경향이었으며, 화란 PBG와 벨기에 EVRDC배양액에서는 꾸준히 증가하는 것으로 나타났다. 따라서 미생물의 안정도와 오이의 지상부와 지하부의 생육반응을 토대로 할 경우 화란 **PBG양액**이 오이의 생장에 가장 적합한 것으로 나타났다.

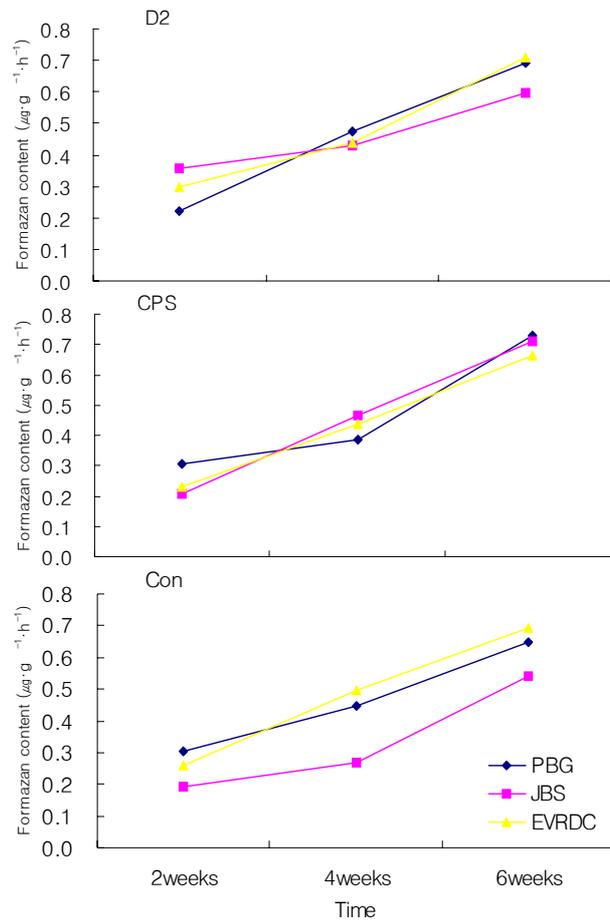


Fig. 5-9. Changes in root activity of hydroponically grown cucumber plant as affected by the kinds of nutrient solution with treating microorganisms 'CPS' and 'D2' integrated to alginate bead.

3. 균주별 알긴산 비드화 적용 및 양액의 농도가 수경재배 오이의 생육에 미치는 영향

가. 실험목적

Housing system을 통한 수경재배 오이의 근권내 미생물 집적화를 유도하기 위한 *Pseudomonas* sp. 'CPS'와 'D2'의 알긴산 비드화의 처리시 적정농도가 CPS는 0.5g, D2는 0.25g으로 밝혀졌다. 또한 양액조성은 화란 PBG가 가장 좋은 것으로 나타났다. 따라서 본 실험은 이들 미생물의 알긴산 비드화 적용을 위한 PBG양액의 농도를 선정하고자 실시하였다.

나. 재료 및 방법

1) 양액재배

본 실험은 겨울나기청장 오이를 공시품종으로 하여 2004년 1월 7일 incubator(30°C)에 최아한 후 익일 파종하였다. 파종 후 본엽 1~2매 정도 전개한 10일째 PBG 1/2배액을 저면으로 관수하여 육묘하였다. 배지의 종류는 perlite와 cocopeat 단용 및 perlite와 cocopeat를 7:3(v/v)으로 혼합한 mixlite를 각각 사용하였으며, 파종 후 30일째 3.5ℓ의 용기에 정식하였다. 양액의 농도는 화란 PBG를 ¼, ½, 1(1.5-1.6dS/m, pH 5.8-6.2) 및 2배액으로 조정하여 공급하였으며, 급액은 타이머에 의한 방식으로 점적관수(Netafim社, 이스라엘)를 사용하여 비순환식으로 온실내에서 재배하였다. 미생물에 담체(housing)system을 제공하기 위한 bead 제조는 제3절에서와 같으며, 농도는 CPS는 0.5g/pot, D2는 0.25g/pot로 각각 조정하여 배지내 뿌리와 직접 접촉하도록 처리하였다. 실험처리 후 35일째에 초장, 엽면적, 지상부와 지하부 생체중 및 근활력을 조사하였다.

2) Root activity

근활력 측정은 1mm 이하의 뿌리를 0.5cm 간격으로 자른 일정량(1g)의 뿌리를 triphenyltetrazolium chloride(TTC) 0.1% 용액(1% TTC + 0.4M disodium succinate hexahydrate + 0.1M 인산염 완충액) 30mL를 넣은 배양병에 담아 1시간 동안 37°C 항온기에서 보관한 후 시료를 거르고 formazan이 형성된 여액에서 3mL 취하여 UV/VIS spectrophotometer를 이용 475nm에서의 O.D(optical density)값을 측정함으로써 formazan형성을 확인하였다

다. 결과 및 고찰

Housing system을 통한 수경재배 오이의 근권내 미생물 집적화를 유도하기 위한 CPS와 D2의 알긴산 비드화의 적용과 이의 효과를 극대화하기 위한 화란 PBG 양액의 농도를 선정하기 위해 실시한 결과는 표 5-3에서 보는 바와 같다. 초장, 엽수, 엽면적 및 신초 생체중 등 지상부 생육에 가장 적합한 농도는 1X로 나타났으며, 1/4X와 2X의 농도 처리구에서는 생육이 상당히 부진하였다. 특히 엽록소 함량은 1/4X 농도에서 미생물 처리와 상관없이 낮게 나타났으며, 농도가 높아질수록 점점 회복되는 경향을 보였다. D2비드 처리의 경우, 1/2X농도에서도 1X의 농도에 상당하는 성장효과를 나타내었으며, 이는 미생물 D2가 양분의 흡수촉진에 영향을 끼친 것으로 생각되었다. 그림 5-10은 PBG 양액농도와 CPS와 D2의 알긴산 비드화 처리에 따른 오이 생장의 경시적 변화를 나타낸 것이다. 모든 농도에서 정식 후 14일까지는 초장변화가 큰 차이를 보이지 않았으나 정식 후 28일째에 큰 증가의 변화를 보여, D2비드의 경우 1X의 농도에서 가장 크게 나타났다. 또한 1/4X나 2X의 농도 처리구에서도 D2비드 처리에 의해 성장후기로 갈수록 초장이 커지는 경향으로 나타났다. 엽면적의 경우, 초장의 변화와는 다르게 정식 후 28일째까지 큰 변화를 보이지 않았으나, 그 이후 1/2X와 1X의 농도에서 D2비드처리에 의해 엽면적이 크게 증가하는 경향이었다(그림 5-11). 하지만 이보다 낮거나 높은 농도에서는 그 이후에도 크게 증가하지는 않았다. CPS비드는 2X의 농도 처리구를 제외하고는 엽면적의 변화가 대

조구와 거의 일치하는 것으로 나타났다.

Table 5-3. Growth characteristics of hydroponically grown cucumber plant as affected by the concentration of PBG nutrient solution with treating microorganisms 'CPS' and 'D2' integrated to alginate bead at 35 days after transplanting.

Treatment		Plant height (cm)	No. of leaves(ea)	Leaf area(cm ²)	Stem diameter(cm)	Chlorophyll content
¼X	CON	93.5	14.5	827.4	5.88	24.3
	CPS	102.5	15.5	803.7	6.38	24.8
	D2	124.0	15.0	1010.4	7.00	25.1
⅓X	CON	103.0	15.0	1029.1	6.80	35.5
	CPS	112.5	16.0	1073.2	7.13	37.3
	D2	129.0	16.5	1525.8	7.98	39.2
1X	CON	107.0	14.0	1283.8	7.05	46.3
	CPS	112.0	14.5	1211.0	7.90	46.7
	D2	141.0	17.5	1649.4	7.65	49.6
2X	CON	98.0	14.5	835.3	6.30	40.1
	CPS	108.0	16.0	1033.6	6.70	42.6
	D2	116.5	16.0	1116.4	7.25	43.8
Treatment	Fresh weight (g)		Dry weight (g)			
	Shoot	Root	Shoot	Root		
¼X	CON	91.4	16.4	9.83		
	CPS	91.1	15.5	9.77		
	D2	101.2	16.9	11.48		
⅓X	CON	97.1	17.0	10.33		
	CPS	107.9	16.7	10.73		
	D2	121.4	23.7	12.81		
1X	CON	106.5	19.8	11.32		
	CPS	107.8	18.9	10.51		
	D2	124.7	26.8	14.01		
2X	CON	90.5	14.9	9.67		
	CPS	96.8	15.3	10.67		
	D2	103.8	17.8	10.78		

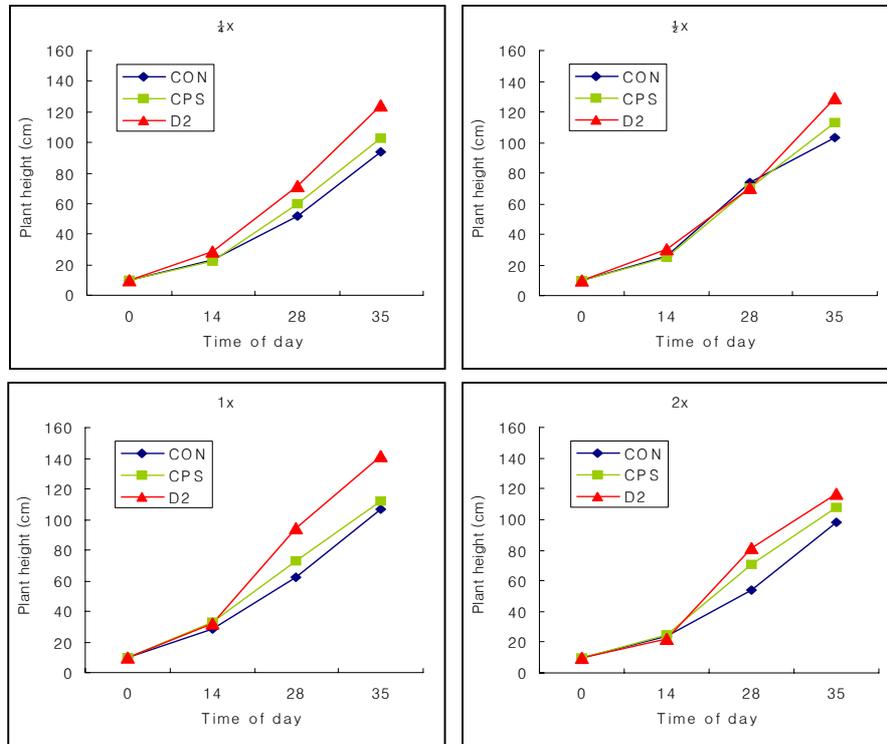


Fig. 5-10. Changes in plant height of hydroponically grown cucumber plant as affected by the concentration of PBG nutrient solution with treating microorganisms CPS and D2 integrated to alginate bead at 35 days after transplanting.

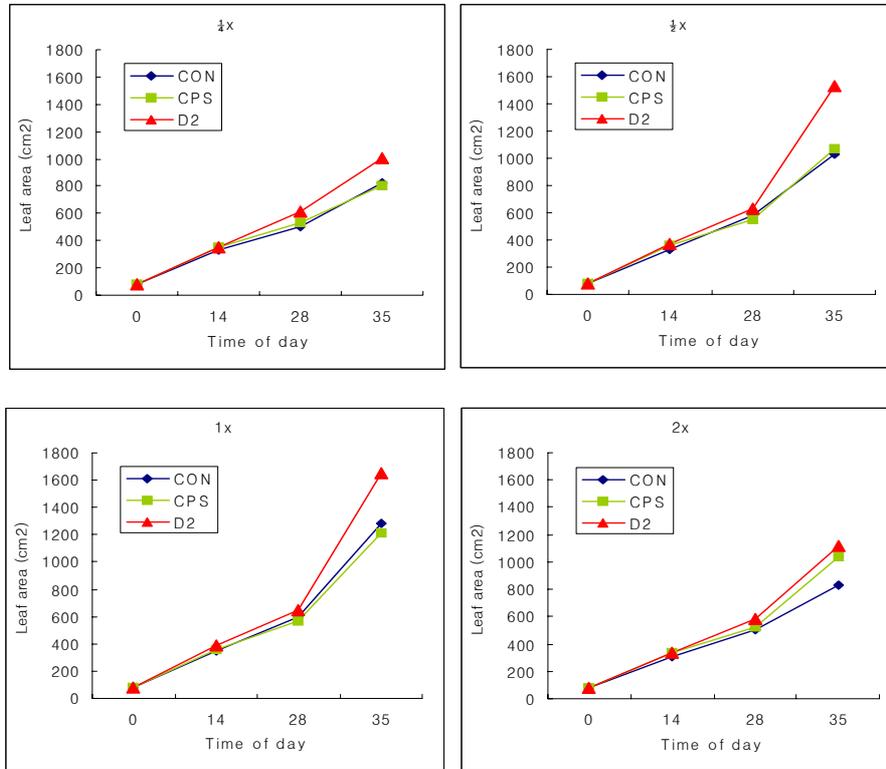


Fig. 5-11. Changes in leaf area of hydroponically grown cucumber plant as affected by the concentration of PBG nutrient solution with treating microorganisms 'CPS' and 'D2' integrated to alginate bead at 35 days after transplanting.

지상부 생체중은 14일째부터 소폭 증가하였으며, 모든 배양액 농도 공히 D2비드 처리구에서 다소 높은 경향이다(그림 5-12). 지하부 생체중의 경우, 1/4X에서는 미생물비드의 처리와 상관없이 거의 일정한 증가경향을 보였으나, 1/2X와 1X의 농도에서 D2비드처리구가 정식후 28일을 기점으로 큰 증가를 보였다(그림 5-13).

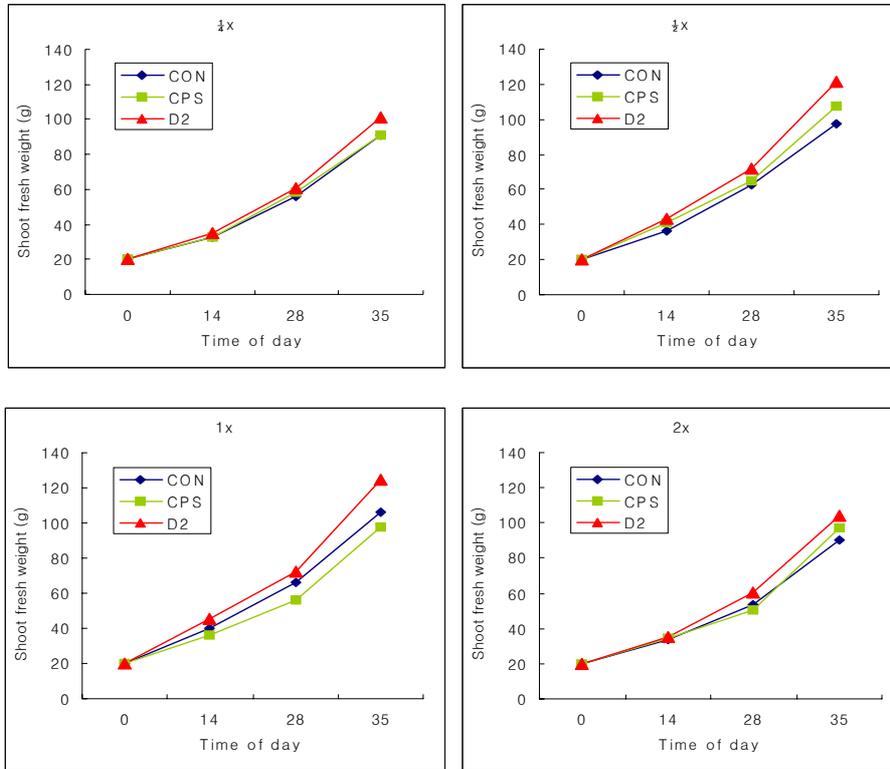


Fig. 5-12. Changes in shoot fresh weight of hydroponically grown cucumber plant as affected by the concentration of PBG nutrient solution with treating microorganisms 'CPS' and 'D2' integrated to alginate bead at 35 days after transplanting.

그림 5-13는 PBG양액 농도와 비드처리에 따른 근활력의 변화를 나타낸 것이다. 모든 농도 처리구에서 미생물처리와 상관없이 정식 후 28일까지 증가하다가 35 일째에 일제히 감소하는 경향을 보였는데, 이는 과실의 비대와 연관이 있을 것으로 생각되었다. 1/4X와 2X의 농도에서 전반적으로 뿌리의 활력이 낮은 경향이였으며, 1/2X의 농도에서는 CPS와 D2가 거의 동일하게, 1X의 농도에서는 D2비드처리구에서 높게 유지되는 경향이였다.

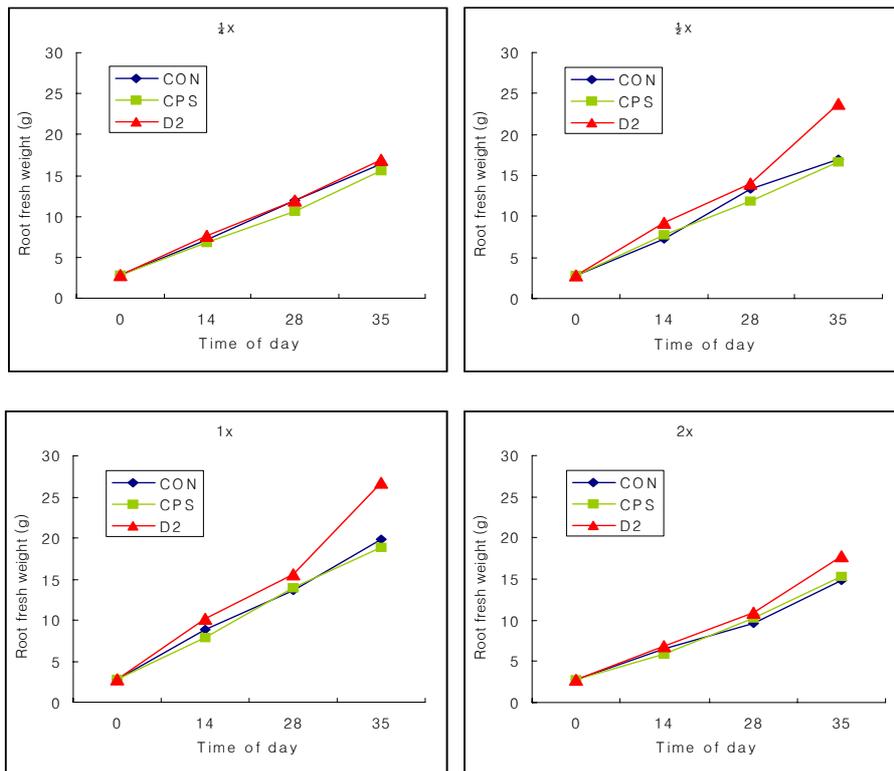


Fig. 5-13. Changes in root fresh weight of hydroponically grown cucumber plant as affected by the concentration of PBG nutrient solution with treating microorganisms 'CPS' and 'D2' integrated to alginate bead at 35 days after transplanting.

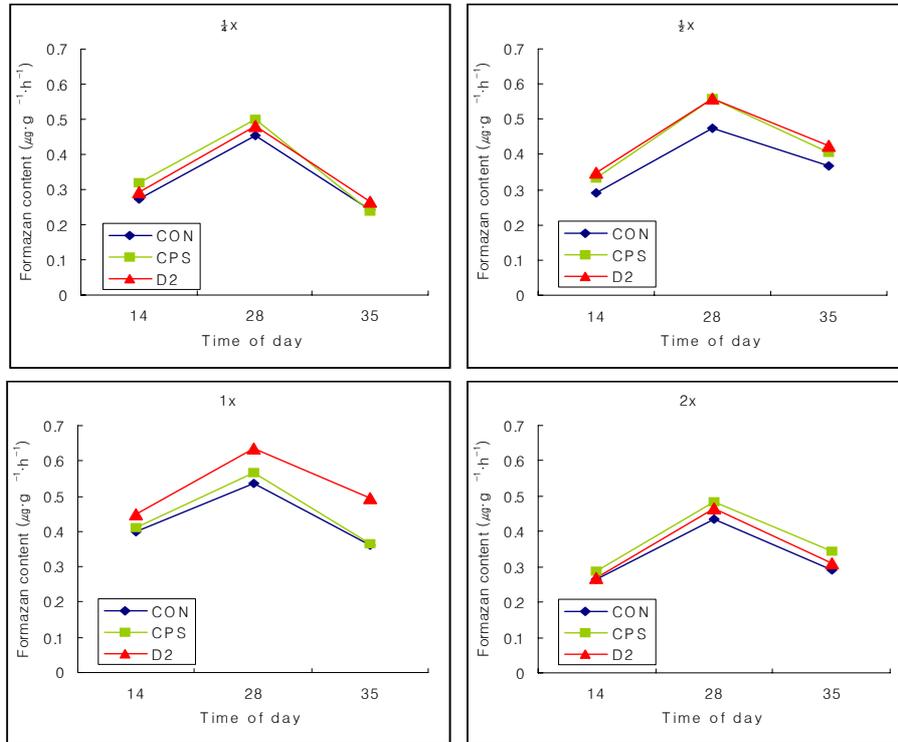


Fig. 5-14. Changes in root activity of hydroponically grown cucumber plant as affected by the concentration of PBG nutrient solution with treating microorganisms 'CPS' and 'D2' integrated to alginate bead at 35 days after transplanting.

제 6 절 미생물을 이용한 배지의 물리성 개선 및 연작장해 경감기술 개발

1. 오이와 토마토의 재배기간에 따른 root exudate 분석 및 재이용 과정에서 토마토 및 오이의 생육에 미치는 영향

가. 실험목적

근권(rhizosphere)이라는 용어는 Hiltner(1904)가 처음으로 사용하였는데, 처음에는 뿌리혹(nodules)이 분비하는 질소화합물로 인해 콩과식물(legumes)주변에서 세균의 생장이 촉진되는 지역을 의미하였다. 그러나, 현재는 식물의 뿌리에서 분비되는 탄소원과 질소원(carbon and nitrogen sources) 및 에너지원 등으로 모든 근권 미생물의 생장이 이루어지는 지역을 포함하고 있다. 병원균과 비병원성 미생물(Darbyshire와 Greaves, 1973; Old와 Nicholson, 1978)이 입식하고 있는 뿌리 표피와 피층 사이의 지역을 Balandreau와 Knowles는 뿌리내생 근권이라고 칭하였다.

토양재배에서 근권 미생물상에 관한 연구를 보면 Broadbent 등(1971)은 토양 미생물로는 *Pseudomonas* 속, *Bacillus* 속, *Streptomyces* 속 등 3,500개의 균주 중에서 기내실험의 경우 뿌리전염성 병원균에 대한 길항성 균주는 40% 정도이고, 포장실험에서 병원균을 억제시킨 균주는 겨우 4%에 불과하다고 하였다. Suslow와 Schroth(1982)는 토양미생물 524 균주 중에서 불과하다고 하였다. 이처럼 토양미생물 중에는 식물 근권에 미생물이 군집하여 유해미생물이 증식하는 것을 방지하여 식물의 근부를 보호하고 대사작용을 원활하게 해 줌으로써 식물의 양수분 흡수를 도와주는 식물생장촉진 근권 미생물(plant growth promoting rhizobacteria ; PGPR)이 있는 반면, 뿌리에 기생하여 병해를 유발시키거나 대사산물이 뿌리의 활동을 억제하는 식물에 유해한 미생물(deleterious rhizosphere microorganisms ; DRMO)도 존재한다고 보고하였다(Baker와 Scher, 1986). 이러한 토양 근권 미생물상의 변화는 재배환경, 토양성질 및 토양 내의 유해미생물의 밀도와 구성비율에 따라 다르며, 식물생장

축진 근권 미생물의 작용 역시 이러한 환경요인에 따라서 활성이 다르게 나타난다 (공, 1996; Zhang 등, 1997; Lazarovits와 Nowak, 1997). 일반적으로 양액재배를 하고 있는 근권에는 미생물이 거의 없다고 생각하고 있으나 실제로는 토양에 비해서 적은 양이지만 다수의 세균 및 진균류들이 고행배지, 배양액, 양액재배시스템 및 뿌리 등에 존재하고 있는 것으로 보고되고 있다(山崎, 1991). 이러한 근권 미생물들은 육묘자재, 공기 및 재배시스템 등으로 유입되어 유기물 배지, 뿌리 파편과 분비물 등을 영양원으로 살아간다(Barber와 Martin, 1976; Sauerbeck과 John, 1977). 앞에서 합성되는 전체 광합성산물 중 약 20% 정도가 뿌리에서 유기물 상태로 분비된다 (Baber와 Lynch, 1977). 이 중에는 탄수화물이 주를 이루고 있는데 아미노산을 기초로 하여 뿌리 분비물 중 탄소/질소의 비율(carbon/nitrogen ratio)을 계산한 경우 약 30/1 정도에 해당한다고 Barber와 Gunn(1974)은 보고하였다. 근권 미생물이 뿌리에서 식하는 밀도는 오래된 뿌리일수록 높는데, 이것은 뿌리의 분비물질이 많은 결과로 생각된다(Barber와 Gunn, 1974). 토양재배나 고행배지경의 경우 정식 후 새로운 뿌리가 배지 내에 성장함에 따라 각 배지에 위치별로 새로운 근권 미생물층이 형성된다. 그러나, 일종의 세균류, 특히 *Pseudomonas* 등은 토양 및 고행배지에서 우점 세균류로 남아 있다(Rouatt와 Katznelson, 1961). Newman 등(1981)의 보고에 의하면 영국의 40개 지역에서 채취한 *Plantago lanceolata*의 뿌리 표면에 있는 세균류에 대한 진균류의 비율(the fungal to bacterial ratios)은 약 0.28~14.0 정도였다고 보고하였다. 양액재배에서 근권 미생물의 조성은 토양재배에 비하여 미생물의 종류와 농도가 상대적으로 낮은 밀도로 조성되어 있는 것으로 알려져 있다(Prices, 1976; Lynch, 1982; 공, 1996). 근권의 미생물이 뿌리와 공생하고 작물의 양수분 흡수를 촉진하며, 뿌리전염성 병원균의 생육을 억제하는 미생물상으로 조성되어 있으면 작물의 생육을 촉진하고 뿌리전염성 병원균의 발생을 줄일 수 있다는 장점이 있다(Van Peer와 Schippers, 1989; 山崎, 1991; 高野, 1992; 이, 1995; 최, 1995; Vogt와 Buchenaver, 1997). 그러나 토양에 비하여 미생물의 조성이 단순하고 근권 완충력이 낮은 양액재배에 유해미생물이 유입되면 뿌리전염성 병원균이 급속히 확산하여 다른 식물에 감

염 및 전염될 수 있는 위험성이 항상 내재되어 있는 특정도 있다)Schroth와 Hancock, 1982; 池田, 1988). 따라서, 본 실험은 오이 및 토마토를 연속재배를 하였을 때 이들 식물체에서 발생하는 물질들이 allelopathy물질과 유사한지 구명하고 이들 Allelopathy물질이 오이, 토마토의 초기생육에 어떠한 영향을 미치는가에 대한 특성을 조사하고자 실시하였다.

나. 재료 및 방법

본 실험은 2002년 8월부터 전남대학교 시설원예실험실의 유리온실에서 행해졌으며, 실험에 사용한 공시작물로는 오이(품종 : 겨울나기 청장, 흥농종묘)와 토마토(품종 : 수퍼도태랑, 흥농)를 8월 20일에 침종하여 21일에 50공 트레이에 과종(coir dust : perlite = 1 : 1)한 후 9월 5일에 이식하였고, 9월 10일에 본엽이 3~4매 전개된 묘를 정식하였다. 재배시스템은 DFT(deep flow technique, 강제통기식)을 이용하여 작물을 재배하였고, 처리구당 5반복씩 처리하여 air-stone을 이용하여 배양액 내 산소를 공급하였다. 배양액은 네덜란드 PBG 배양액을 이용하였고 배양액의 pH와 EC는 pH는 5.8~6.2, EC는 1.8dS/m²로 보정해준 후 3~4일 간격으로 조사하였다. 실험은 정식후 5주 생육을 기준으로 하여 매주 양액재배 베드에서 양액을 채취하여 재배기간에 따른 root exudate를 분석하였다. 또한 재배 후 이들의 양액에 무기원소를 재충진하여 동일 작목을 연속으로 재배하였을 경우 오이와 토마토의 생육에 나타나는 영향을 조사하였다. 조사항목으로는 양액재배 베드 내에 존재하는 root exudate, 양액의 pH, EC를 측정하여 재배기간에 따른 오이 및 토마토의 생육상태를 비교하고 생육기간에 따른 root exudate의 함량과 종류를 분석하였다.



Fig. 6-1. 실험 전경

다. 결과 및 고찰

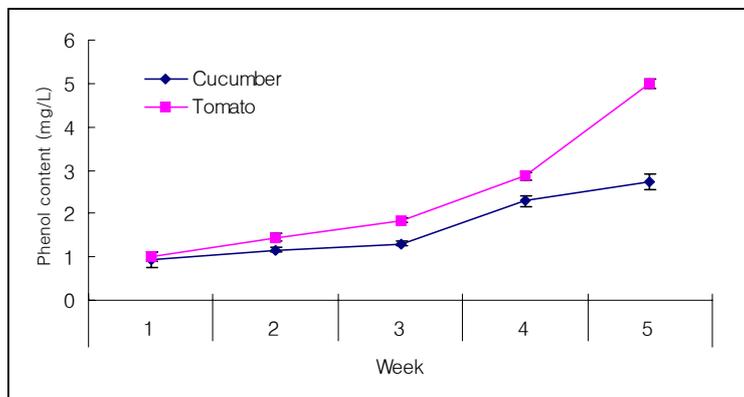


Fig. 6-2. Changes in phenol content of nutrient solution with cultivating cucumber and tomato plants

그림 6-2은 오이와 토마토의 생육기간에 따른 배양액내 페놀함량을 분석한 그래프이다. 생육기간에 따라 양액재배 베드 내에서 양액을 채취하여 페놀의 함량을 분석한 결과를 보면 생육기간이 경과함에 따라 페놀의 함량이 증가하였다. 정식 1주 후의 양액에서 분석되어진 페놀의 함량은 오이와 토마토 각각 0.947ppm과 1.006ppm을 나타내었으나 정식 후 5주후의 페놀의 함량은 오이 2.73ppm, 토마토 4.99ppm으로 증가하는 경향을 나타내었다. 생육기간이 길어질수록 오이와 토마토의 지하부에서 배출되어지는 phenolic compound가 높아지는 것으로 사료되어진다. 표 6-1과 2는 오이와 토마토의 재배시 생육기간에 각각의 시기별로 생육을 시킨 후 이들의 배양액을 재이용하여 동일 작목을 재배하였을 때 나타나는 성장특성을 나타낸 것이다. 생육기간별 배양액의 재이용시 생육 1주후의 배양액에서 재정식을 하였을 경우 4주 이상의 생육기간을 거친 처리구의 생육보다 양호한 것을 나타내었다. 생육기간이 길어지는 처리구일수록 차후 재배에서 생육이 저조한 경향을 나타내는 것으로 보아 나타내었다. 이러한 결과로 보아 생육기간이 길어질수록 지하부에서 생성되어지는 root exudate가 차기 재배 시 동일 작목의 생육에 큰 영향을 나타낼 것으로 판단되었다.

Table 6-1. Growth characteristics of hydroponically grown cucumber plants transplanted to reused nutrient solution.

week	Plant height(cm)	No. of leaves (ea)	Stem diameter (mm)	Leaf length (cm)	Leaf width (cm)	Chlorophyll (mg/gFW)
1	113.75	14.0	12.94	27.55	25.87	43.52
2	103.30	14.0	12.13	27.35	26.55	52.00
3	95.25	12.7	11.70	25.07	23.05	51.15
4	91.25	12.7	10.86	23.65	23.17	52.37
5	79.75	11.7	8.72	19.88	15.63	49.97

Table 6-2. Growth characteristics of hydroponically grown tomato plants transplanted to reused nutrient solution.

week	Plant height (cm)	No. of leaves (ea)	Stem diameter (mm)	Leaf length (cm)	Leaf width (cm)	Chlorophyll (mg/gFW)
1	83.75	15.3	7.82	39.5	37.00	50.97
2	66.50	13.5	7.80	33.5	23.25	47.80
3	65.25	12.5	6.92	29.5	19.75	46.25
4	64.75	13.7	6.70	26.5	18.75	46.12
5	63.50	11.7	6.07	26.0	16.50	42.82

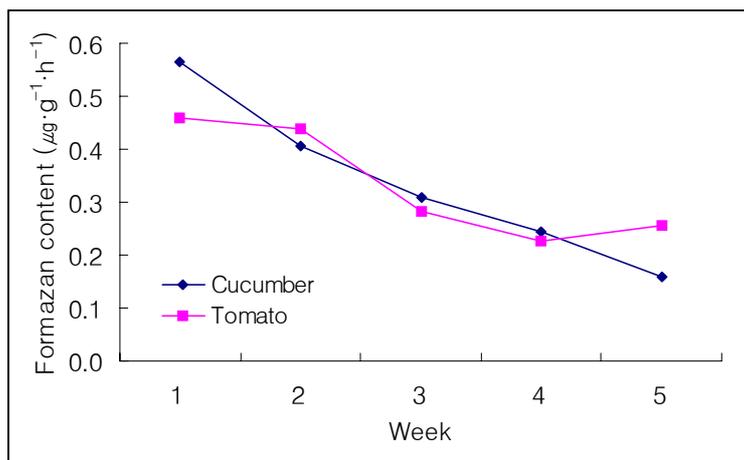


Fig. 6-3. Root activity of hydroponically grown cucumber and tomato plants transplanted to reused nutrient solution.

Fig 6-3는 생육기간에 따른 배양액의 재이용시 나타나는 오이 및 토마토의 근 활력에 있어서는 생장이 좋았던 1주 처리구에서 근활력이 높게 나타났으며 생육기간 이 길어질수록 근활력도 낮아지는 경향을 나타내었으며 토마토의 생육기간에 따른

근활력에서도 오이와 같이 유사한 경향을 나타내었다. 오이의 경우 생육기간이 길어 질수록 근활력이 떨어지는 것을 확인할 수 있었으나 토마토의 경우에는 3주 생육기간 이후의 근활력은 큰 유의차를 나타내지 않는 경향을 보였다. 그림 6-4~8은 배양액의 재 이용시 나타나는 오이 및 토마토의 식물체내 다량원소를 분석한 그래프이다. 생육기간별 폐양액을 이용하여 동일 작물을 재배한 결과 식물체내 다량원소의 함량은 처리구간 유의차를 나타내지 않았으나 오이의 경우 대체적으로 5주차 배지에서 재 증식을 하여 재배를 한 경우 다량원소의 함량이 전체적으로 높게 나타나는 경향을 보였다. 1주차의 배지에서는 전체생육에 필요한 무기영양분들이 고르게 흡수되어 식물생육에 적합하게 이용된 것으로 판단되었으나 3주차 이상의 폐양액을 재이용한 경우 3주차는 Mg^{2+} 의 함량이 가장 낮은 것으로 나타났으며, 4주차는 질소의 함량이 가장 낮은 경향을 나타내었다. 토마토의 경우에서도 오이와 같이 1주차의 폐양액을 재이용한 결과 식물체내에서 무기영양분이 고르게 분석되어지는 것을 알 수 있었으나 2주차에서 질소의 함량이 가장 낮은 경향을 나타내었으며, Mg^{2+} 의 함량은 오이에 비하여 전체적으로 낮게 나타나는 것을 알 수 있었다.

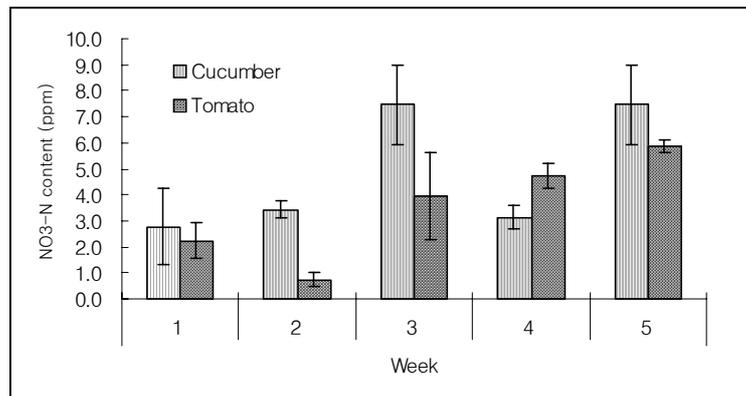


Fig. 6-4. Nitrogen content of cucumber and tomato plants transplanted to reused nutrient solution.

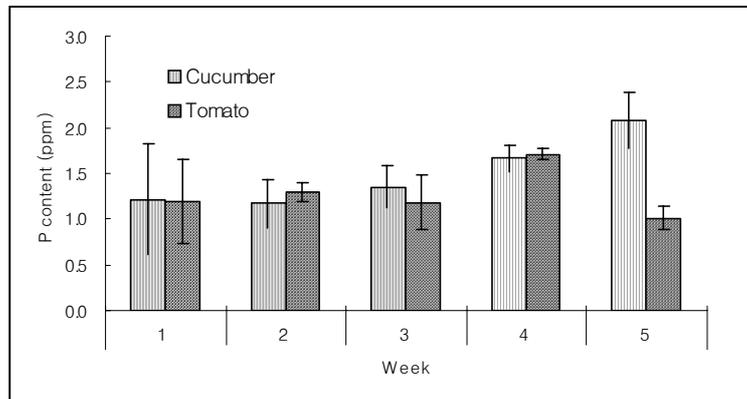


Fig 6-5. Phosphorous content of cucumber and tomato plants transplanted to reused nutrient solution.

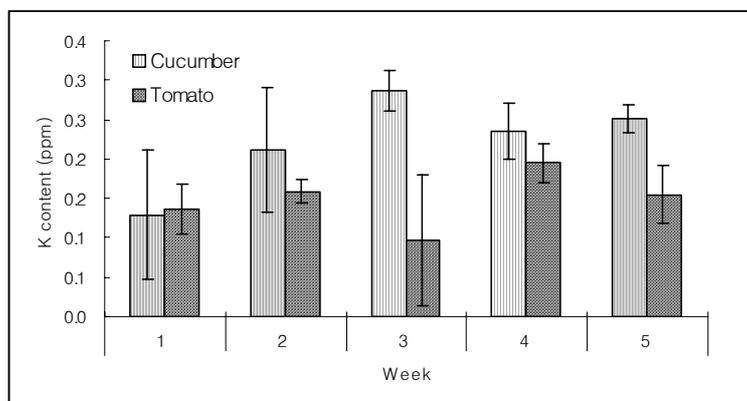


Fig. 6-6. Potassium content of cucumber and tomato plants transplanted to reused nutrient solution.

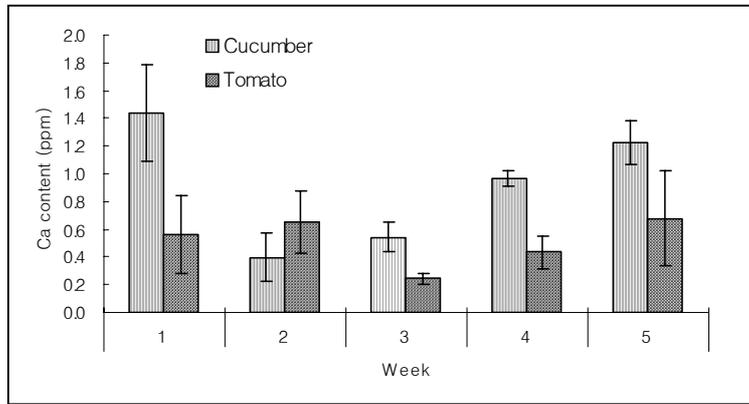


Fig. 6-7. Calcium content of cucumber and tomato plants transplanted to reused nutrient solution.

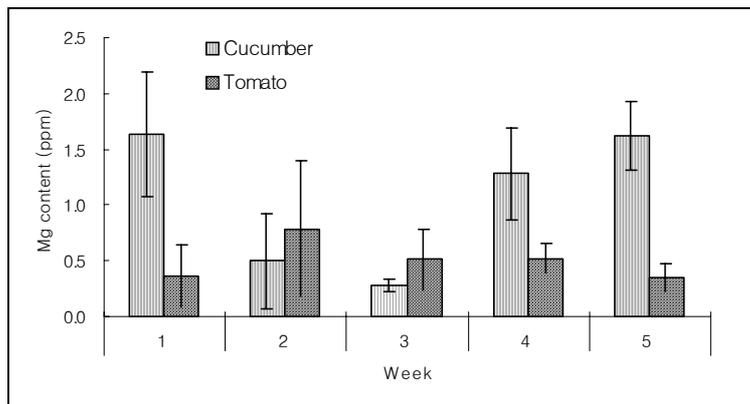


Fig. 6-8. Magnesium content of cucumber and tomato plants transplanted to reused nutrient solution.

2. 오이와 토마토 연속재배가 배지내 미생물, 균 및 root exudate의 함량에 미치는 영향

가. 실험목적

식물체내에서 분비 또는 잔여물에서 용출되는 화학물질이 다른 식물에 직접 또는 간접적으로 억제작용을 미치는 식물간의 상호작용을 allelopathy라 하는데 작물의 연속장해, 토양 내 유해물질적, 초지생태계의 천이 등이 작물의 생육 및 수량에 영향을 미친다. Allelopathy는 상호억제작용을 나타내는 것으로 종간에 있는 것이 대부분이나 autotoxicity라 하여 종내에 존재하는 것도 있다. Allelopathy를 일으키는 물질은 주로 phenol compounds로 알려져 있고, 그 외 tannin, alkaloid compounds로 allelopathy작용을 하는 것으로 보고되고 있다. Phenolic compounds는 치환될 수 있는 수산기를 가진 방향족고리구조를 가지고 있는 이차대사산물의 총칭으로 화학적으로 이질적인 것이 많이 있는데, 지용성, 수용성, 중합체 등 여러 가지 형태로 나타난다. 페놀화합물은 대부분 shikimic acid pathway에 의해서 합성된 방향족물질, 일부는 malonic acid pathway에 의해서 합성되어지며 페놀화합물의 합성에서 중요한 조절부위는 PAL(Phenylalanine ammonia-lyase)에 의해 촉매되는 반응(phenylalanine→(PAL)→trans-cinnamic acid→phenolics)이며 PAL은 여러 가지 생물적 비생물적 또한 내적 외적 요인에 의해서 조절된다. 자연계에는 수많은 식물들이 이러한 물질을 함유하고 있으며 특히 맥류인 호밀, 보리, 밀, 수수 및 알팔파에 이러한 allelopathy물질이 함유되어 있다고 알려지고 있다. 알팔파 재배지에서의 연속장해는 토양 이화학적 특성의 약화와 토양 미생물상의 변화 등으로 밝혀지고 있으며 토양의 이화학적 원인으로는 동일작물의 연속재배시 특정성분을 계속하여 다량 흡수 이용하기 때문에 뿌리로부터 분비되는 유해물이나 作物遺體에서 나온 유독물질이 연속에 의해 토양내에 축적되면 동일종이나 근연종 작물생육에 지장을 초래하는 원인이 발생한다는 것이다. 따라서 본 실험은 오이 및 토마토를 연속재배를 하였을 때 식물체에서 발생하는 물질들이 allelopathy물질인지 구명하고 이 물질이 초기생육에 어떠한 영향을 미

치는지 조사하고 표준물질과 분석실험으로 활성물질의 유무를 밝히고자 실시하였다.

Table 6-3. 페놀화합물의 종류

		functional group
simple phenolic	phenylpropanols	초식성 곤충과 균류의 공격에 대한 방어작용, 타감작용(allelopathy)
	coumarins	푸노쿠마린은 광독성이 있어서 DNA 전사회복을 방해하여 세포를 죽게함
	benzoic acid derivatives	두통치료제 아스피린은 살리실산의 초산에스테르인데 살리실산은 신호전달에서 매우 중요한 기능을 수행함. 카페인산, 페룰산은 인접식물의 발아와 성장을 억제
lignin		phenylpropane alcohol로 구성된 분지가 많은 중합체 기본구성물질은 coniferyl alcohol etc. cinamic acid 유도체가 peroxidase 에 의해 중합됨 셀룰로즈 다음으로 풍부한 유기화합물 세포벽의 주요성분 지지기능과 물관부의 장력에 대한 저항성 유지
flavonoids	anthocyanin	3번 탄소에 당이 결합한 배당체. 이 당의 종류에 따라서 색이 다양하게 나타남. 꽃과 과일의 색(적,분홍,자주,청)을 나타내는 색소→ attractant
	flavone	꽃에 들어있는 것으로 안토시아닌 보다 짧은 파장을 흡수. 이 색소는 곤충의 눈에는 보임→attractant로서 작용
	flavonol	잎에서는 자외선으로부터 식물 보호 기능
	iso-flavone	B고리의 위치가 이동된 플라보노이드 에스트로젠과 비슷한 이소플라보노이드는 가축에게 불임을 유도함 rotenoid→issecticidal function phytoalexin→bacteria, fungi에 대한 방어기능. elicitor가 phytoalexin의 합성을 촉진함. 이것은 phytoalexin의 합성에 관여하는 유전자의 전사를 촉진하기 때문→phytoalexin은 거의 모든 스트레스에 대한 방어물질로 작용
tannins	flavonoids를 단량체로 하는 페놀물질	박테리아,곰팡이에 대한 저항성,초식동물에 대한 독성(생존력 감소) gallic acid와 결합한 형태인 gallotannin은 타감작용을 나타냄.

나. 재료 및 방법

본 실험은 오이 및 토마토의 연속재배시 배지내에 미생물과 토양균근의 밀도 및 지하부로부터 배출되어지는 root exudate를 조사하고 배지의 재이용시 오이와 토마토의 성장 특성에 대해 알아보려고 수행하였다.

실험은 2003년 1월부터 전남대학교 시설원예실험실의 유리온실에서 행해졌으며, 실험에 사용한 공시작물로는 오이(품종 : 겨울나기 청장, 흥농종묘)와 토마토(품종 : 수퍼도태랑, 흥농)를 1월 6일에 침종하여 8일에 50공 트레이에 과종(coir dust : perlite = 1 : 1)한후 1월 28일에 이식하였고, 2월 14일에 본엽이 3~4매 전개된 묘를 정식하였다. 재배시스템은 DFT(deep flow technique)을 이용하여 작물을 재배하였고, 처리구당 5반복씩 처리하여 air-stone을 이용하여 배양액 내 산소를 공급하였다. 배양액은 네덜란드 PBG 배양액을 이용하였고 배양액의 pH와 EC는 pH는 5.8~6.2, EC는 1.8dS/m²로 보정해준 후 3~4일 간격으로 조사하였다. 실험은 정식 후 5주 생육을 기준으로 하여 매주 양액재배 베드에서 양액을 채취하여 재배기간에 따른 root exudate를 분석하였다. 또한 재배 후 이들의 양액에 무기원소를 재충진하여 동일작물을 연속으로 재배하였을 경우 오이와 토마토의 생육에 나타나는 영향을 조사하였다. 조사항목으로는 양액재배 베드내에 존재하는 root exudate, 양액의 pH, EC를 측정하여 재배기간에 따른 오이 및 토마토의 생육상태를 비교하고 생육기간에 따른 root exudate의 함량과 종류를 분석하였다.



Fig. 6-9. 미생물 처리에 의한 생육실험 전경

다. 결과 및 고찰

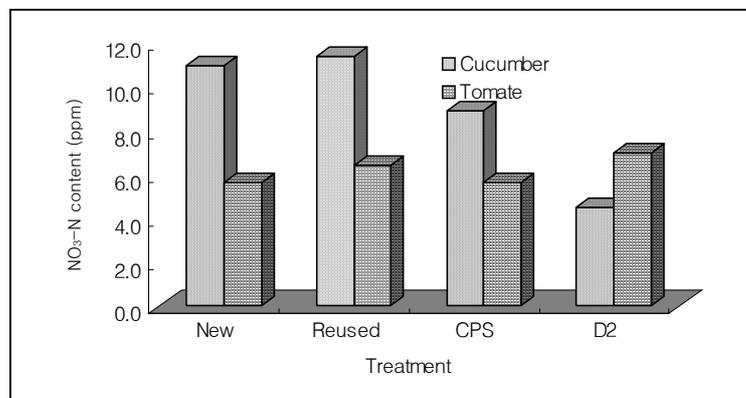


Fig. 6-10. Nitrogen content of cucumber and tomato plant hydroponically grown in new and reused nutrient solution as affected by microorganism CPS and D2.

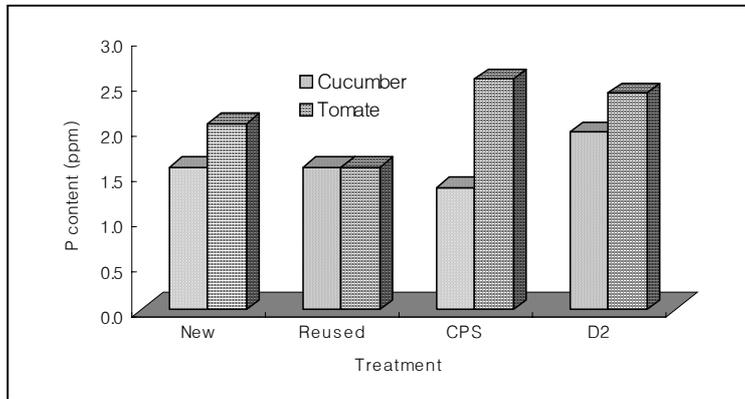


Fig. 6-11. Phosphorous content of cucumber and tomato plant hydroponically grown in new and reused nutrient solution as affected by microorganism CPS and D2.

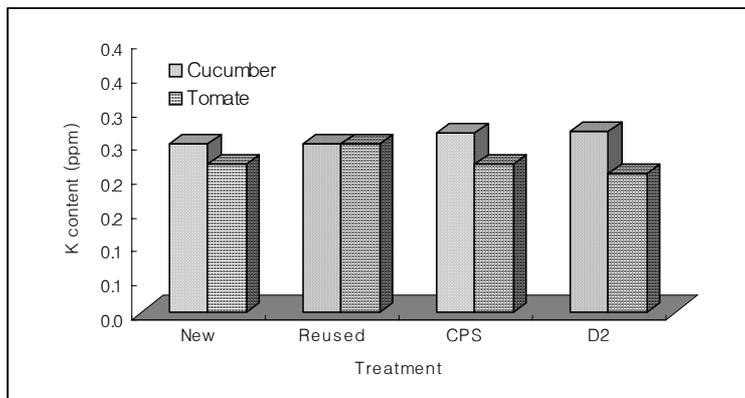


Fig. 6-12. Potassium content of cucumber and tomato plant hydroponically grown in new and reused nutrient solution as affected by microorganism CPS and D2.

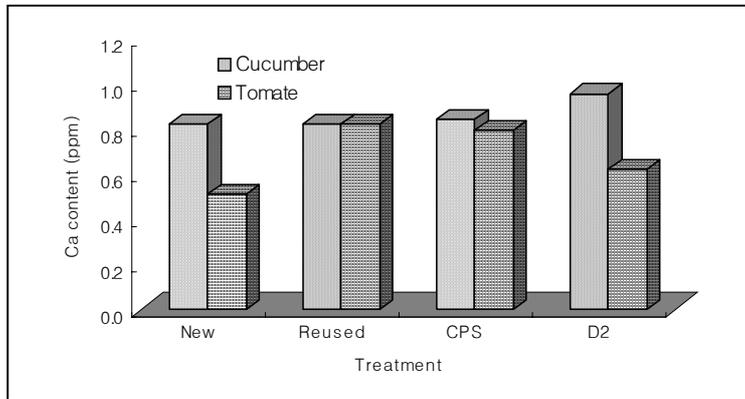


Fig. 6-13. Calcium content of cucumber and tomato plant hydroponically grown in new and reused nutrient solution as affected by microorganism CPS and D2.

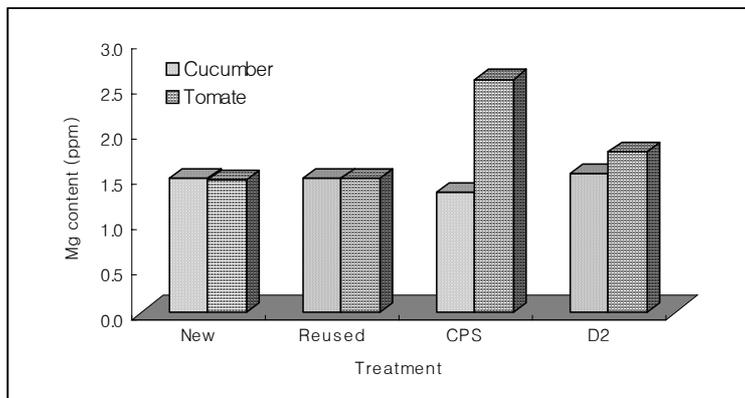


Fig. 6-14. Magnesium content of cucumber and tomato plant hydroponically grown in new and reused nutrient solution as affected by microorganism CPS and D2.

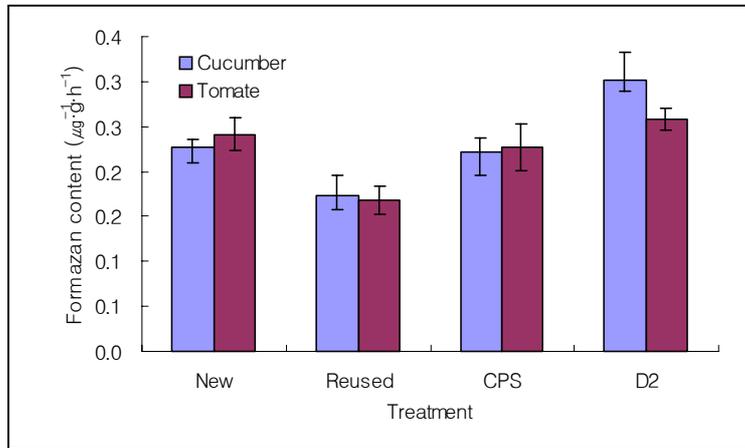


Fig. 6-15. Root activity of cucumber and tomato plant hydroponically grown in new and reused nutrient solution as affected by microorganism CPS and D2.

그림 6-10~15은 새로운 배지 및 재사용 배지에 미생물 첨가에 의한 작물의 생장 특성을 나타낸 그래프이다. 전체적인 생육은 일반 대조구보다 미생물이 투입된 배지에서 생장촉진효과를 나타내었으나 식물체에 함유된 N, P, K, Ca, Mg의 함량에 있어서는 큰 유의차를 나타내지 않는 것으로 보아 투입된 미생물이 생장촉진형 미생물이라고 판단되어졌다. 이러한 내용은 근활력의 그래프에서 나타난 데이터와 같이 미생물이 투입된 처리구에서 근활력이 높게 나타나는 것으로 보아 미생물은 생장촉진에 관여하는 미생물로 판단되어졌다.

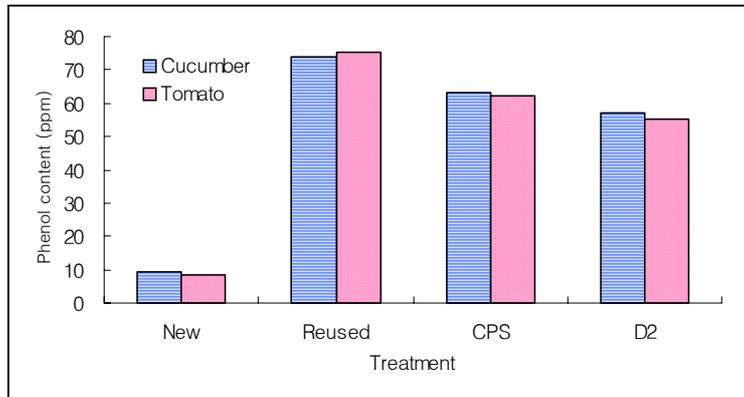


Fig. 6-16. Phenolic compound content of cucumber and tomato plant hydroponically grown in new and reused nutrient solution as affected by microorganism CPS and D2.

미생물의 처리에 의한 배지내 phenolic compound의 함량은 처음 작물을 재배하는 배지에서 약 10ppm을 나타내었고, 재사용한 배지에서는 대조구에 비하여 7배 이상의 phenolic compound 함량을 나타내었다. 2년차 실험에서 분리 동정되어진 D2, CPS의 미생물은 작물의 생장에 영향을 미치는 것으로 보아 작물생장촉진형 미생물인 것으로 판단되었으며, phenolic compound의 함량을 억제하는 부분에는 다소 억제하였으나 큰 효과를 나타내지는 않았다. 전체 phenolic compound의 함량은 오이와 토마토에서 CPS보다는 D2가 phenolic compound의 생성을 억제하는 것으로 판단되었다. phenolic compound 함량의 억제를 위한 미생물의 제독 연구는 차후에 더 심도 깊게 연구해야 할 것으로 사료되어진다.

제 7 절 미생물의 알긴산 비드화 및 선발양액의 온실 적용을 통한 다수 및 품질향상

1. 미생물의 알긴산 비드화 처리가 수경재배 오이의 성장과 과실품질에 미치는 영향

가. 실험 목적

담체를 통한 수경재배 오이의 근권내 미생물 집적화를 유도하기 위한 CPS와 D2의 알긴산 비드화의 처리시 적정농도가 CPS는 0.5g, D2는 0.25g으로 밝혀졌다. 또한 양액조성은 화란 PBG가 가장 좋은 것으로 나타났다. 따라서 본 실험은 이들 미생물의 알긴산 비드화의 현장적용을 통한 다수 및 품질향상을 위해 실시하였다.

나. 재료 및 방법

본 실험은 청낙함 오이를 공시품종으로하여 2003년 11월 7일 인큐베이터(30℃)에 최아한 후 익일 파종하였다. 파종 후 본엽 1~2매 정도 전개한 10일째 PBG 1/2배액을 저면으로 관수하여 육묘하였다. 배지의 종류는 각각 사용하였으며, 파종 후 30일째 산소베드(그림7-1)에 perlite와 cocopeat를 7:3(v/v)으로 혼합한 mixlite를 충전하고 재식밀도 30cm로 하여 정식하였다. 양액은 화란 PBG 1배액(EC 1.5-1.6dS/m, pH 5.8-6.2)를 공급하였으며, 급액은 타이머에 의한 방식으로 점적관수(Netafim社, 이스라엘)를 사용하여 비순환식으로 온실내에서 재배하였다. 미생물에 담체(housing)system을 제공하기 위한 bead 제조는 제3절에서와 같으며, 농도는 CPS는 0.5g/pot, D2는 0.25g/pot로 각각 조정하여 배지내 뿌리와 직접 접촉하도록 처리하였다. 미생물의 밀도를 유지하기 위해 처리 45일과 60일 후 액상의 CPS와 D2를 각각 0.5%를 근권에 관주하였다. 실험처리 후 60일째에 초장, 경경, 절간장, 엽면

적, 각 기관별 생체중 및 건물중을 조사하였으며, 과장, 과중, 과실당도, 평균과실수 및 무게, 누적과실수 및 과중 등 과실품질을 시기별로 조사하였다. 하루 중 광합성량은 LI-6400 휴대용 광합성장치를 이용하여 아침 8시부터 저녁 6시까지 측정하였다.

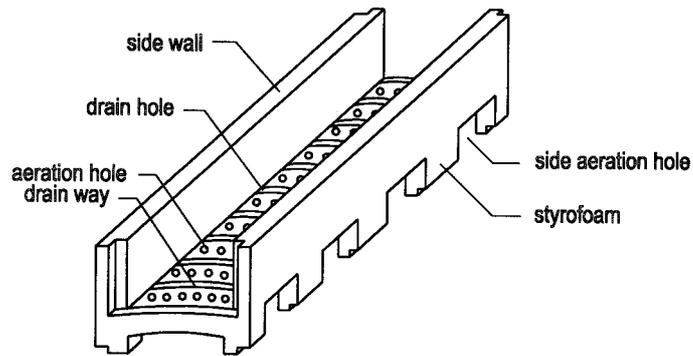


Fig. 7-1. Diagram of the 'Oxybed' structure developed

다. 결과 및 고찰

Table 7-1. Growth characteristics of hydroponically grown cucumber plant as affected by treating microorganisms CPS and D2 integrated to alginate bead at 60 days after transplanting.

Treatment	Plant height (cm)	Stem diameter (mm)	No. of leaves (ea)	Internode length (cm)	Leaf area (cm ²)
CON	245.3 ab ^z	3.8	25.7 b	9.8 b	5764.3 b
CPS	234.3 ab	3.8	26.0 ab	9.4 b	5211.2 ab
D2	279.7 a	4.7	27.7 a	11.2 a	6526.0 a

Treatment	Fresh weight(g)				Dry weight (g)			
	Leaf	Fetiole	Stem	Root	Leaf	Fetiole	Stem	Root
CON	188.3 b ^z	65.5 b	97.2 bc	48.0 ab	23.1 bc	3.8 ab	9.4 bc	4.9 b
CPS	171.7 ab	56.1 ab	92.7 c	46.0 b	21.7 c	3.4 b	8.8 c	4.9 b
D2	210.3 a	69.8 a	113.4 a	63.0 a	27.1 ab	4.2 a	11.0 a	6.7 a

^zMean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

CPS와 D2가 오이의 영양생장에 각각 초기와 중기 및 후기에 생장을 촉진한다는 앞의 결과를 토대로 이들이 수경재배 오이의 장기재배시, 생육과 과실품질에 미치는 영향을 알아보려고 하였다. 표 1은 정식 및 처리 60일 후 각각 미생물에 대한 지상부 생육반응을 나타낸 것이다. 초장은 D2비드 처리구에서 279.7로 CPS비드 처리구와 대조구에 비해 30cm이상 크게 나타났으며, 경경 또한 굵게 나타났다. 엽수도 D2비드처리구에서 대조구보다 2배 이상 많았으며, 이는 엽면적의 확보에도 큰 영향을 끼쳤다. 절간장의 신장 또한 D2비드 처리구에서 가장 크게 나타났다. 각 기관별 생체중 및 건물중의 경우에도 D2비드 처리구에서 높았다.

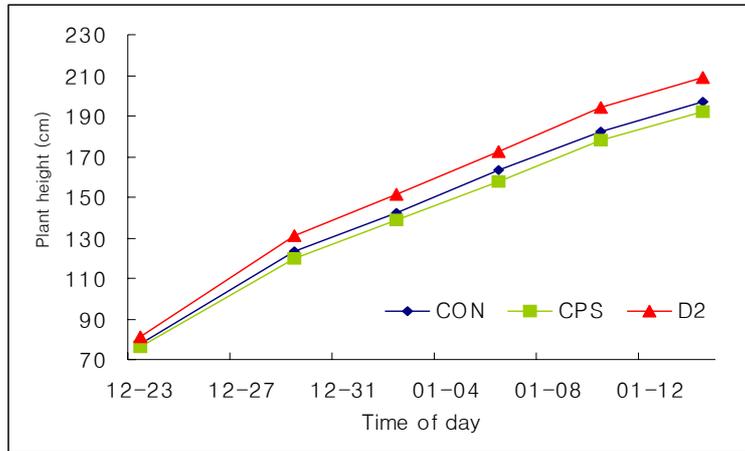


Fig. 7-2. Changes in plant height of hydroponically grown cucumber plant as affected by treating microorganisms CPS and D2 integrated to alginate bead.

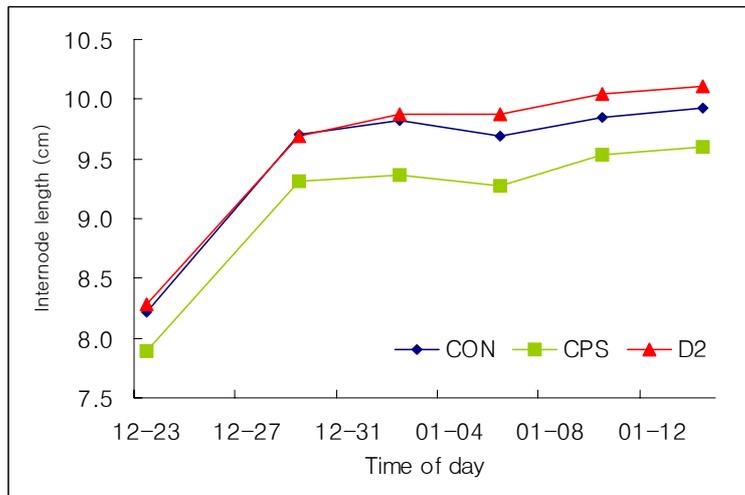


Fig. 7-3. Changes in internode length of hydroponically grown cucumber plant as affected by treating microorganisms 'CPS' and 'D2' integrated to alginate bead.

그림 7-2와 7-3은 초장과 절간장의 변화를 경시적으로 관찰한 결과이다. 초장은 D2비드 처리구에서 꾸준히 증가하여 가장 크게 나타났다. 절간장은 CPS비드 처리구에서 짧게 유지되는 경향이었으며, 대조구와 D2비드 처리구의 경우, 일정기간 비슷하게 유지하다가 D2 비드처리구가 약간 길게 유지되는 경향이였다. 그림 7-4는 엽면적의 변화를 나타낸 것으로서 10엽에서는 초기에 D2비드 처리구는 높게 유지되다가 점차 증가폭이 감소한 반면, CPS비드 처리구는 꾸준히 유지하여 시간이 갈수록 D2비드처리구와 같은 면적을 유지하였다. 하지만 15엽의 경우, D2비드처리구가 초기부터 크게 유지하기 시작하여 생육후기까지 높게 유지되는 경향이였다. CPS와 D2가 수경재배 오이의 과실생장에 미치는 영향을 관찰하였다. 생장에 효과적인 D2 비드처리구에서 과장, 당도, 평균 착과수 및 평균 과중이 대조구나 CPS비드 처리구보다 더 높게 나타났다. CPS는 대조구보다 당도와 평균과수는 높게 나타났지만, 과장과 평균과중이 약간 낮은 것으로 조사되었다(표7-2). 그림 4는 총과수와 총 과중을 조사한 것으로 초기 과수 수확시에는 모든 처리구에서 큰 차이를 보이지 않았으나,

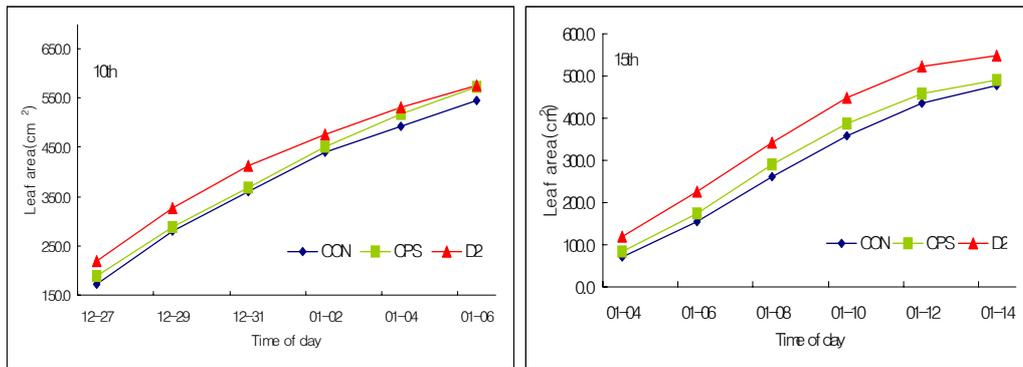


Fig. 7-4. Changes in 10th and 15th leaf area of hydroponically grown cucumber plant as affected by treating microorganisms CPS and D2 integrated to alginate bead.

Table 7-2. Effect of microorganisms CPS and D2 integrated to alginate bead on the fruit growth of hydroponically grown cucumber plants.

Treatment	Fruit length (cm)	Fruit diameter (mm)	Sugar content (° Bx)	Avg. fruit number (ea/plant)	Avg. fruit weight (g/fruit)
CON	24.5	3.7	3.8	5.6	202.4
CPS	24.1	3.7	3.9	6.2	198.0
D2	25.1	3.7	4.2	7.3	205.6

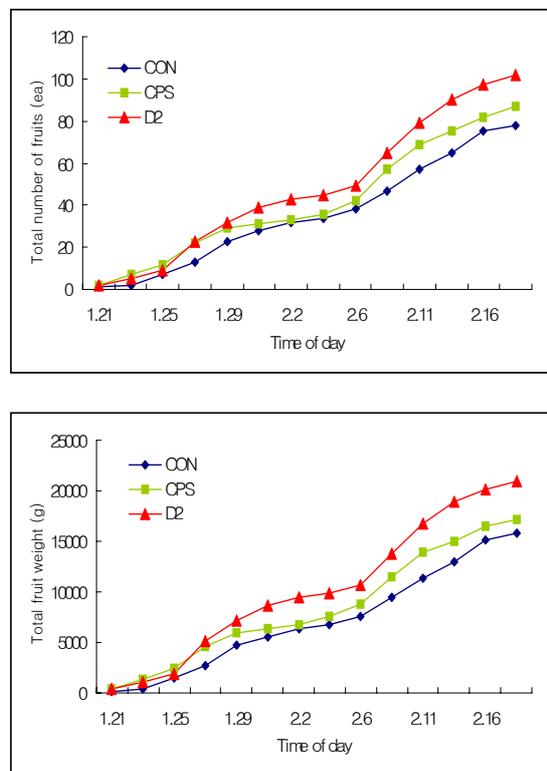


Fig. 7-5. Cumulative fruit number and weight of hydroponically grown cucumber plant as affected by treating microorganisms 'CPS' and 'D2' integrated to alginate bead.

그 이후 D2비드 처리구에서 CPS비드처리구나 대조구보다 더 많은 수확량을 확보하였다(그림 7-6). 또한 생장면에서 대조구와 CPS비드처리구는 비슷한 결과를 보였지만 주당 과실수량을 많이 확보할 수 있었기 때문에, 총과수와 과중이 대조구보다 CPS비드 처리구에서 더 많은 것으로 조사되었다.

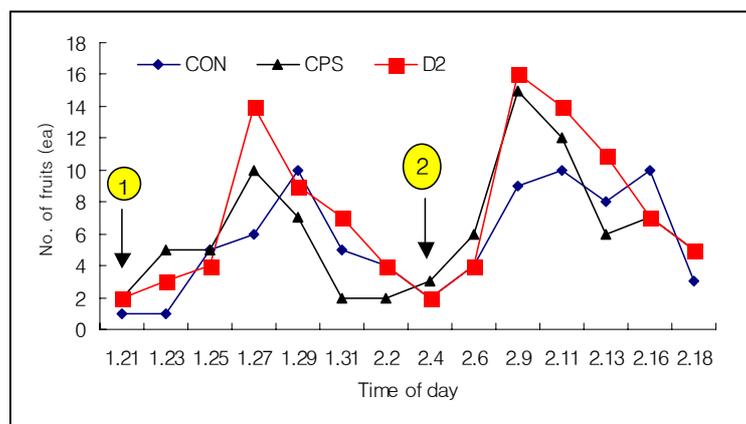


Fig. 7-6. Changes in fruit fresh number of hydroponically grown cucumber plant as affected by treating microorganisms CPS and D2 integrated to alginate bead.

그림 7-6는 생육시기별 과실수량을 경시적으로 관찰한 결과이다. 그림에 표시한 ①과 ②는 액상 미생물 CPS와 D2를 각각 1차와 2차 재처리한 것을 나타내며, 1차 처리이후 약 1주일 후에 D2비드 처리구에서 많은 수량을 확보할 수 있었으며, 2차 처리 후에도 이와 같은 경향으로, CPS와 D2비드 처리구 모두 대조구에 비해서 이 시기 이후, D2과실수량이 약 1.6배 증가하는 것으로 나타났다. 이는 그림 7-7에 나타난 과실중량의 변화와도 유사하는 경향이였다. 식물은 뿌리에서 흡수하는 유기물, 무기물과 광합성에 의해 생성하는 물질들을 이용하여 생명을 유지하고 있다. 식물에서 일어나는 일련의 대사 과정 중에서 가장 중요한 부분은 필요한 구성 성분을

흡수하고 재이용하는 과정으로서 식물체가 종자에서 발아하면서 시작되는 생장의 양적, 질적 변화에는 지속적인 영양분의 공급이 있어야만 한다. 그러므로 생육초기의 영양 관리는 향후 그 식물체의 생장에 지속적인 영향을 미치므로 이 시기의 과학적인 시비관리는 대단히 중요하다. 그림 7-8은 *Pseudomonas* sp. 'CPS'와 'D2' 비드를 수경재배 오이에 적용 후 30일째에 완전히 전개된 15엽을 대상으로 아침 8시부터 밤 6시까지 하루 동안의 광합성량을 측정된 결과이다. 이때 CO₂의 농도는 약 400ppm으로 일정하였고, 광도는 12시까지 증가하다가 점차 감소하였다.

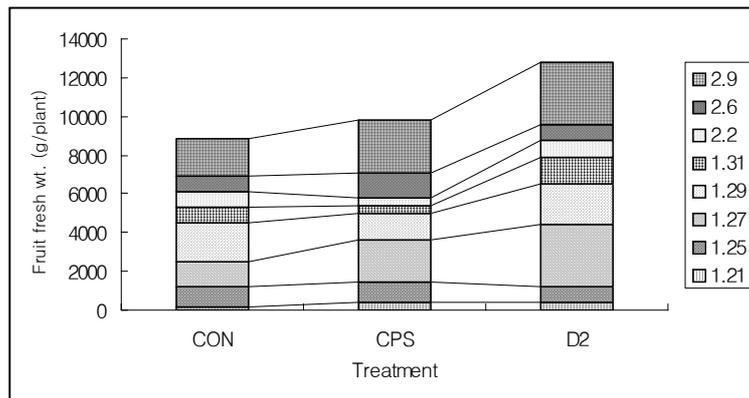


Fig 7-7. Changes in fruit fresh weight of hydroponically grown cucumber plant as affected by treating microorganisms CPS and D2 integrated to alginate bead.

하루 중 기온은 2시에 가장 높았고, 엽온은 12시를 기준으로 전후 약간 감소하였다. 광합성의 패턴은 모든 처리구에서 12시에 가장 높았으며, 그 이후에는 점차 감소하는 경향이였다. 이러한 패턴은 D2비드 처리구에서 가장 효율적으로 유지되었으며, CPS비드 처리구가 그 다음이었다. 이는 D2 처리구에서 15엽의 엽면적(그림7-4)이 가장 넓게 유지되었기 때문인 것으로 생각되었으며, 이러한 높은 광합성 효율이 과실의 생산량과 품질에 좋은 영향을 끼친 것으로 판단되었다. 미생물 혼합체에서 분리한 근부강화 미생물인 *Pseudomonas* sp. 'CPS'와 'D2'는 모두 오이의 영양생장과 생식생장의 전환기까지 초장, 엽면적 및 신초의 생체중 등 지상부의 생장과 지하부의 생체중, 근활력 등 지하부의 생장에 효과적인 것으로 나타났다. CPS비드처리구는 생장초기에, D2비드는 생장 후기에 각각 그 효과가 발현되었지만, 결과적으로 이러한 효과는 과실의 수확량과 과실품질에 영향을 주었다.

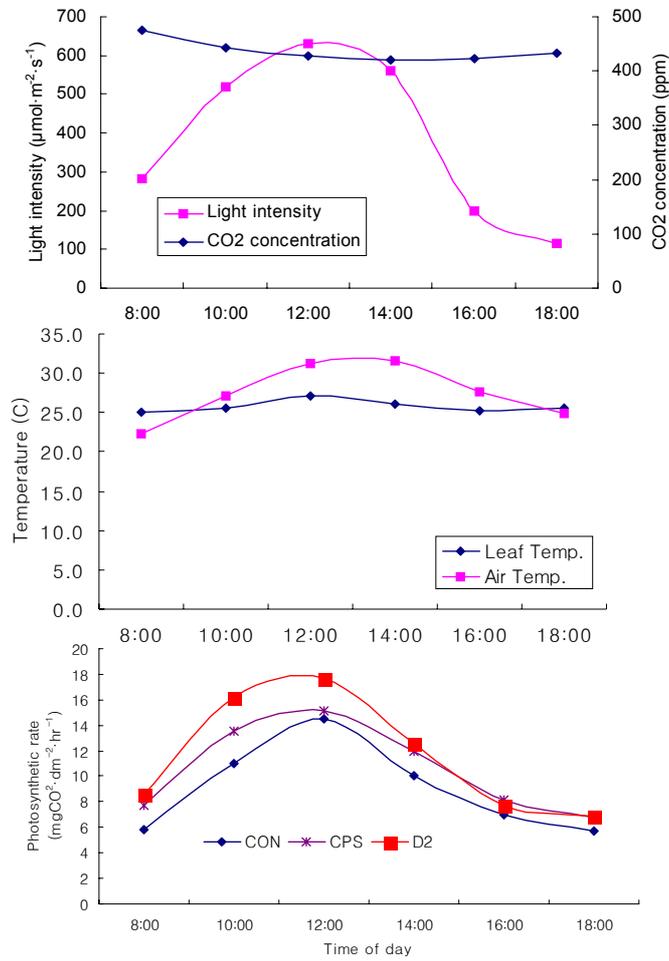


Fig. 7-8. Diurnal changes of photosynthetic rate of 15th leaf as affected by alginate bead treatment with functional microorganism strengthening plant root in 30 days after transplanting.

2. 미생물의 알긴산 비드화 처리가 수경재배 고추의 성장과 과실품질에 미치는 영향

가. 실험목적

Housing system을 통한 수경재배 고추에 대해 *Pseudomonas* sp. 'CPS'와 'D2'의 알긴산 비드화의 현장적용을 통한 다수 및 품질향상을 위해 실시하였다.

나. 재료 및 방법

본 실험은 녹광 오이를 공시품종으로하여 2003년 10월 10일 인큐베이터(30°C)에 최아한 후 익일 파종하였다. 파종 후 본엽 1~2매 정도 전개한 10일째 PBG 1/2배액을 저면으로 관수하여 육묘하였다. 배지의 종류는 각각 사용하였으며, 파종 후 60일째 산소베드에 perlite와 cocopeat를 7:3(v/v)으로 혼합한 mixlite를 충전하고 재식밀도 30cm로 하여 정식하였다. 양액은 화란 PBG 1배액(EC 1.5-1.6dS/m, pH 5.8-6.2)를 공급하였으며, 급액은 타이머에 의한 방식으로 점적관수(Netafim社, 이스라엘)를 사용하여 비순환식으로 온실내에서 재배하였다. 미생물에 담체 system을 제공하기 위한 bead 제조는 제3절에서와 같으며, 농도는 CPS는 0.5g/plant, D2는 0.25g/plant로 각각 조정하여 배지내 뿌리와 직접 접촉하도록 처리하였다. 미생물의 밀도를 유지하기 위해 처리 45일과 60일 후 액상의 CPS와 D2를 각각 0.5%를 근권에 관주하였다. 실험처리 후 60일째에 초장, 경경, 절간장, 엽면적, 각 기관별 생체중 및 건물중을 조사하였으며, 과장, 과중, 과실당도, 평균과실수 및 무게, 누적과실수 및 과중 등 과실품질을 시기별로 조사하였다. 하루 중 광합성량은 LI-6400 휴대용 광합성장치를 이용하여 아침 8시부터 저녁 6시까지 측정하였다.

다. 결과 및 고찰

그림 7-9는 CPS와 D2비드화 처리가 고추의 정식 및 처리 75일 후 각각 미생물에 대한 지상부 생육을 나타낸 것이다. 초장, 주경장, 경경 및 측지수 모두 CPS

비드 처리가 D2나 대조구보다 높게 나타났다. 앞의 오이에서의 결과와 다르게 나타난 걸로 보아 미생물이 식물의 종류에 다르게 반응하는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 엽면적과 뿌리의 생체중과도 유사한 경향이였다(그림 7-10). 또한 지상부 및 지하부의 성장을 촉진시킨 CPS비드처리구는 과실수량 및 중량에도 같은 결과를 유도하였다(그림 7-11).

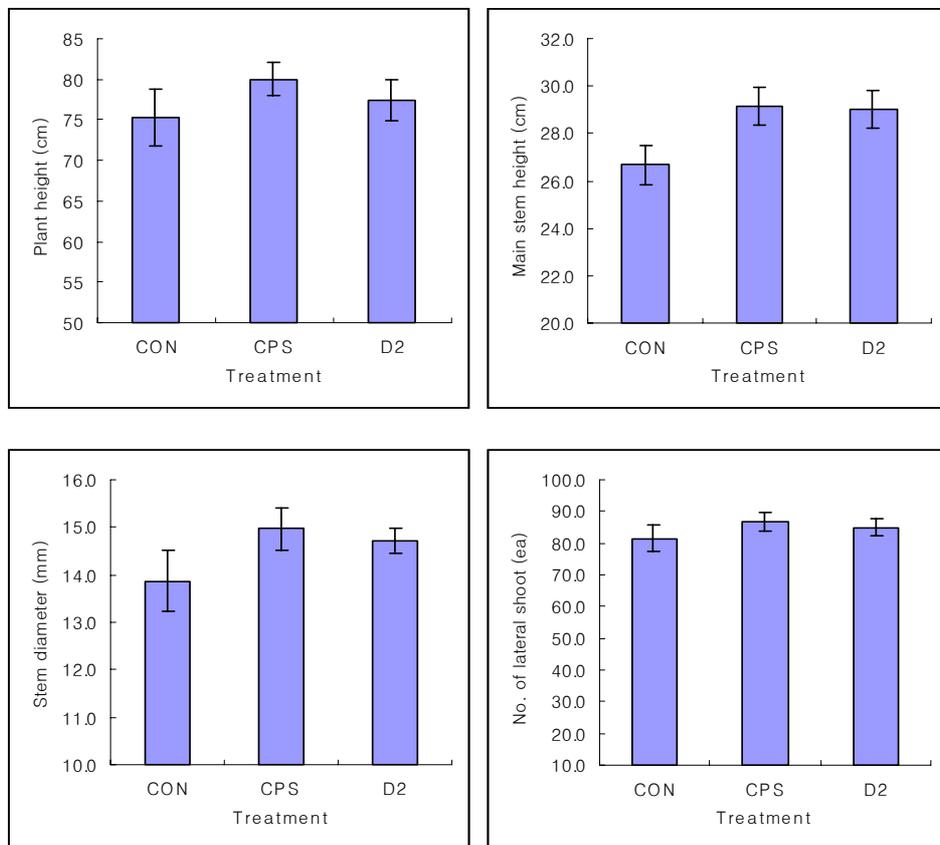


Fig. 7-9. Growth characteristics of hydroponically grown pepper plant as affected by treating microorganisms CPS and D2 integrated to alginate bead at 60 days after transplanting.

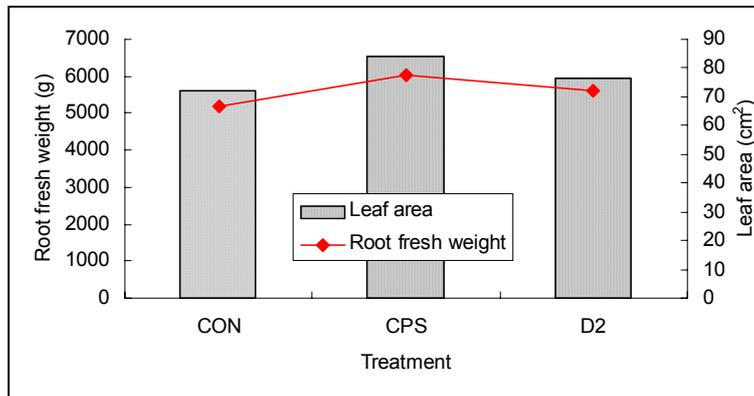


Fig. 7-10. Root fresh weight and leaf area of hydroponically grown pepper plant as affected by treating microorganisms CPS and D2 integrated to alginate bead.

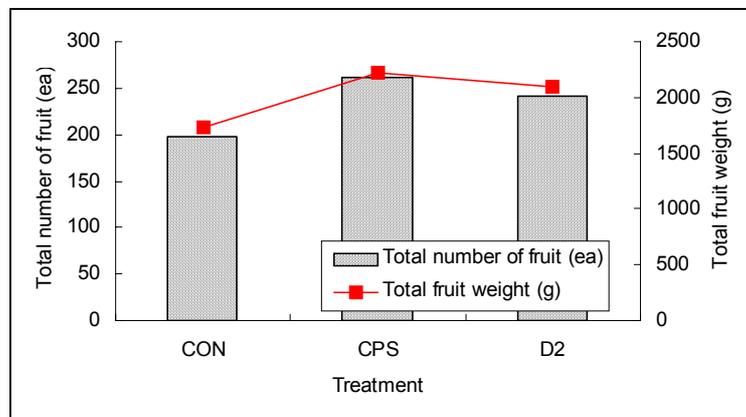


Fig. 7-11. Total number of fruit and fruit weight of hydroponically grown pepper plant as affected by treating microorganisms CPS and D2 integrated to alginate bead.

제 8 절 균주들의 작물에 대한 생리 활성 기능 분석

1. 실험 목적

식물들은 영양생장과 생식생장과의 밸런스를 이룸으로써 원활한 생장을 이루며 또한 풍요로운 과실 생산을 이룬다. 이는 물질들의 sink/source 관계가 조직적으로 유지됨으로써 가능한 것이다. 즉 뿌리에서 흡수한 각 종 이온들이나 영양물질들의 지상부로의 이동과, 잎조직에서 동화한 탄수화물과 호르몬을 포함한 성장조절 또는 신호전달 물질들의 뿌리로의 전달이 조화를 이루어 식물의 각 조직은 기능을 유지할 수 있다.

반면에 오이와 같은 호온성 작물들의 경우 영양생장과 생식생장의 밸런스가 잘 이루어지지 않아 재배에 많은 어려움을 겪는다. 즉, 잎조직의 생장 제한, 뿌리 기능의 약화, 지하부와 지상부 또는 과실간에 동화물질들에 대한 경합 등과 같은 생리장애에 따라 생장저해, 환경 스트레스에 대한 민감성, 병해에 취약성, 열악한 과실 품질, 저위수량과 같은 피해를 받는다.

이러한 취약점을 개선하기 위하여 무엇보다도 뿌리의 기능이 강화되어야 할 것이다. 특히 오이의 경우, 뿌리의 이온이나 영양물질들의 흡수 및 지상부로의 전류 기능이 저하되어 재배에 어려움을 겪는다. 온도나 습도와 같은 환경조건이 적합하며 영양공급이 순조로운 상황에서 오이의 성장은 매우 활발하지만 뿌리의 온도가 일정한 수준이하로 떨어지거나 영양공급이 순조롭지 못하면 매우 민감하게 생장을 멈추고 또한 병 피해도 커진다.

뿌리의 이온이나 영양물질 흡수 기능과 관련된 유전자로 H^+ -ATPase, K^+ , Ca^{+2} ion channel 등이 보고 되었으나, 이 유전자들을 도입시켜 뿌리 기능이 향상된 형질 전환 식물체는 아직 개발되지 않았다. 이 중에서도 특히 원형질막의 H^+ -ATPase의 활성은 뿌리의 흡수 기능과 매우 깊은 관련을 맺고 있으며, 저온에서 뿌리기능의 유지와도 연관되어 있다. H^+ -ATPase 활성도 조절에 관한 연구가 활발히 진행되고 있

지만, H⁺-ATPase 활성과 저온 내성과의 관계, 14-3-3 단백질에 의한 효소 활성도 조절, expansin에 의한 primary root 성장과 효소 활성도 변화, 그리고 뿌리 기능이 다른 식물들과 효소 활성도와의 상관성 등에 대하여 더 많은 연구가 필요하다.

최근 들어 박테리아에 의한 식물 성장 촉진 효과가 이미 널리 알려지고 있다. *Rhizobacteria* 계통의 좋은 공기로 운반될 수 있는 화학물질을 분비하는데 이 물질은 *Arabidopsis thaliana*에 작용하여 성장을 촉진 시키며 또 다른 좋은 EPS(exopolysaccharide) 종류의 물질을 분비하여 효과적인 토양 응집체 생성을 가능하게 해주어서 주변 식물의 성장에 영향을 미치기도 한다. 콩과 식물의 질소고정 bacteria로 잘 알려진 *Rhizobiaceae*의 경우는 콩과 식물에 질소고정 뿌리혹 생성을 유도하여 질소 고정 역할을 담당하지만 비 콩과식물의 뿌리에 colony를 형성하여 비 콩과식물의 성장촉진효과를 나타내기도 한다.

박테리아 식물성장 촉진 효과의 몇 가지 작용기작으로는 박테리아 자체에서 생성하는 식물호르몬에 의한 촉진효과와 부족한 물과 영양분의 공급, 질소고정과 질소 환원 효소 활성도의 증가 등이 있다. 따라서 오이 뿌리의 성장과 재생을 촉진시키는 미생물부터 작물의 성장과 발육에 미치는 생리 기능 규명과 생리활성 기작을 분석하고 단리 미생물 또는 생리활성 물질에 의한 병해 및 저온 내성 유도와의 상관성을 분석하고자한다.

2. 실험 재료 및 실험 방법

가. 실험대상 작물

- 1) 겨울살이 청장오이(cv. Chunchuchungjang)와 고추(cv. Johyang)를 대상으로 미생물의 생육촉진 효과를 조사하였다.
- 2) 오이와 고추의 유묘는 함평천지 플러그 육묘장에서 파종한 후 전남대학교 유리온실에 정식하여 일정기간 재배하였다. 온도는 야간 최저온도를 18℃로 관리하였다

나. 실험 방법

1) 작물 뿌리의 순수한 원형질막 분리와 원형질막의 H^+ -ATPase 활성도 측정

가) 본엽이 2매 인 유묘를 정식한 후 균주를 1회 처리하고 3주 동안 재배하면서 주 간격으로 뿌리 조직을 취하였다.

나) 미생물 처리군과 무처리군의 오이 뿌리 50-60g을 사용하여 6.2% PEG/6.2% Dextran two phase partitioning 방법으로 순수한 원형질막을 분리 하였다. Bradford 정량법으로 막 단백질을 정량한 후 분주하여 액체질소에 보관하였다.

다) 뿌리 원형질막의 H^+ -ATPase 활성도를 측정하기 위하여 20 μ g 단백질에 해당하는 원형질막 시료를 사용하고 ATP를 기질로 삼았다. 반응 혼합체를 30 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시킨 후, 10mM $CuSO_4$ 가 섞인 1% ascorbic acid 로 30 $^{\circ}$ C에서 30분간 발색시켰다. Mg^{+2} 의존성이고 K^+ 에 활성화되는 H^+ -ATPase 활성도를 720nm에서의 흡광도로 측정하였다.

2) H^+ -ATPase에 대한 SDS-PAGE와 Western blotting

가) 생물의 뿌리 강화 mechanism을 분석하기 위하여 미생물이 어떤 방법으로 뿌리 흡수 기능과 관련한 H^+ -ATPase 활성도를 증가시키는지 조사하였다.

나) 일차적으로 효소 활성도 변화가 원형질 막의 H^+ -ATPase 단백질양의 변화 에 기인하는지를 판단하기 위해서 SDS-PAGE로 단백질 pattern 을 조사하고 아울러 H^+ -ATPase 단백질의 항체를 이용한 Western blot 을 실시하였다. 일정량의 원형질막 시료(30 μ g 단백질에 해당)를 SDS-PAGE방법으로 10% polyacrylamide gel에서 단백질을 분리하고 coomassie 염색시켰다. 또한 SDS-PAGE로 분리한 막단백질을 Electro transfer(Bio-RAD) kit을 사용하여 nitrocellulose membrane으로 transfer한 후 제조한 anti- H^+ -ATPase 항체로 Western blot을 실시하였다. Alkaline phosphatase와 NBT와 BCIP 용액으로 발색시켜

H^+ -ATPase 효소 단백질의 양을 확인하였다.

3) H^+ -ATPase에 대한 trypsin 처리 : 효소 활성도의 변화가 효소 단백질의 구조 변화 즉, autoinhibitory domain의 변화나 단백질 인산화등에 의해 변화되는지를 조사하기 위해서 막 단백질을 최종농도가 $1\mu\text{g}/10\mu\text{l}$ 되도록 trypsin으로 처리하여 효소의 autoinhibitory 부분을 제거한 후 효소 활성도 증가 폭을 미생물별로 처리군과 무처리군을 비교하였다.

4) 오이 뿌리 조직으로부터 Total RNA 추출과 Northern hybridization

가) 미생물이 전사수준에서 식물유전자의 발현에 영향을 주었는지 조사하기 위하여 H^+ -ATPase와 H^+ -ATPase 활성과 관련된 *fad2*와 *fad3* 및 14-3-3 유전자의 세포내 전사체양을 Northern blot로 조사하였다.

나) Trizol Reagent (Gibco-BRL) 용액으로 오이 뿌리조직으로부터 total RNA를 추출하였다.

다) 균주 처리군과 무처리군으로부터 추출한 total RNA $40\mu\text{g}$ 을 1% formaldehyde agarose 변성 gel에 분리한 후 Zeta-probe membrane(Bio-rad)에 capillary blotting시켰다. 7% SDS hybridization buffer상에서 42°C 에서 hybridization하였다. Northern blot에 사용한 probe는 오이로부터 클론한 H^+ -ATPase의 cDNA를 사용하였으며 14-3-3의 경우는 옥수수로부터 클론한 cDNA, *fad2*와 *fad3*의 경우는 오이로부터 클론한 cDNA를 probe로 사용하였다.

3. 실험 결과 및 고찰

가. 기능성 균주 처리에 따른 오이 뿌리의 양수분 및 이온 흡수율 비교

MS101 혼합체로부터 선별한 균주(CPS, D2)들의 뿌리 기능 활성 여부를 조사하기 위하여 뿌리 무게(표8-1)와 이온 흡수율을 조사한 결과, 미생물 처리 후 3주

생육 기간 동안 뿌리의 절대 무게 값은 실험군간에 비하여 뚜렷한 차이를 보이지 않았다. 표8-1은 각 처리군의 1주째 뿌리 무게를 기준으로 하여 2주, 3주째 뿌리 무게를 상대적인 값으로 비교한 결과 미생물 처리 군에서 2주에 무처리군에 비하여 다소 증가폭이 큰 것으로 나타났으나 3주에는 오히려 증가폭이 감소하였다. 이온 흡수율을 조사한 결과 D2 처리군에서 Ca^{+} , K^{+} 과 N^{+} 의 농도는 감소하는 경향을 보였다. 반면에 Mg^{2+} 의 농도는 대조군에 비해 일시적으로 증가한 후 감소하였다. 그러나 오이 뿌리 기능과 밀접하게 관련된 P의 농도는 3주에서 대조군보다 높게 나타났다. 이러한 실험 결과만으로 미생물 처리군과 대조군의 뿌리 흡수 기능을 비교하여 결론을 내리기에는 다소 무리가 있다. 다만 처리군에서 인의 농도가 높아진 것이 오이의 생육과 상관이 있을 것으로 잠정적인 결론을 얻었다.

Table 8-1. Relative changes in the fresh weight of cucumber roots cultured for 3 weeks in pots

	Control	CPS	D2
1주	100 (%)	100(%)	100(%)
2주	190	214	223
3주	894	811	764

나. 작물 뿌리의 생리 활성 기능에 대한 기능성 균주들의 영향

1) 미생물 처리에 따른 H^{+} -ATPase 활성도 변화 분석

식물의 원형질막 H^{+} -ATPase는 electro-chemical gradient를 형성하여 이차적인 이온 및 양분 흡수 기능을 조절하는 주요한 역할을 담당하고 있다. 따라서 이 효소의 활성도는 물질수송과 식물체 성장에 필수적이며 뿌리의 흡수 기능과 매우 밀접하게 연관되어 있다. 선별한 기능성 균주들을 근권에 처리한 후 뿌리의 원형질

막 H^+ -ATPase 활성도변화를 비교하여 뿌리의 흡수 기능여부를 판단하였다(그림 8-1). 그림 1은 처리 후 1주일 대조군의 효소 활성도를 기준으로 각 실험군의 상대적인 활성도를 도식화하였다. D2 처리군은 처리 1주에서 대조군과 CPS1 처리군에 비하여 약 20%정도 높은 효소 활성도를 보였으며, 1주에 대조군 보다 15% 증가한 후 2주, 3주에 점차적으로 감소하는 현상을 보였으나 조사 기간동안대조군보다는 높은 수준을 유지하였다. D2와는 다르게 CPS 처리군의 효소 활성도는 2주와 3주에서 일정한 폭으로 지속적으로 증가하였다. 미생물 처리로 뿌리 원형질막의 H^+ -ATPase 활성도가 증가함을 확인하였다. 미생물 처리 후 효소 활성 변화의 시간적 차이로 미루어 두 미생물의 효소 활성 촉진 기작이 다른 것으로 예측된다. 즉, 오이 뿌리의 H^+ -ATPase 활성 조절이 유전자 발현 조절, 또는 효소의 인산화, 막구성 성분의 변화에 따른 효소 활성의 변화 등 두 미생물의 활성 기작이 다른 것으로 추측된다. 따라서 이를 미생물에 의한 효소 활성도 증가 원인을 조사하였다.

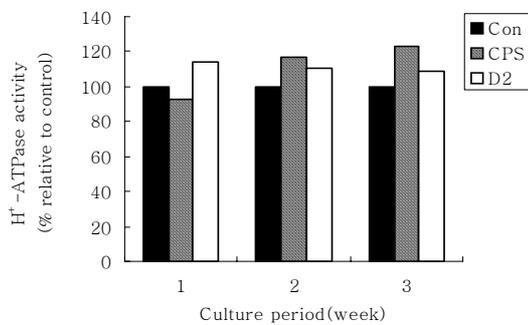


Fig. 8-1. Effect of microorganism on relative activity of plasma membrane H^+ -ATPase.

2) Housing system에 의한 미생물이 뿌리 원형질막 H⁺-ATPase 활성도에 미치는 영향

미생물 배양액을 관주로 처리한 앞의 실험과는 달리 미생물을 Alginate를 이용한 housing system으로 처리하여 뿌리 기능 강화 효과를 조사하였다. 미생물의 성장촉진 유효기간 측정과 미생물 재처리 기간 선정을 위하여 미생물의 뿌리 기능 강화 효과를 6주까지 조사하였다(그림8-2). 관주 방식으로 미생물을 처리한 결과와는 달리 CPS 처리 경우 처리 후 3주에 모든 개체에서 가장 높은 활성도를 보였으나 그 이후 감소하여 6주에서는 대조군과 유사한 효소 활성도를 보였다. D2의 경우는 CPS와는 달리 3주 후에도 지속적으로 증가하여 4주에 가장 높은 효소 활성도를 나타냈으나 CPS와 동일하게 이후 감소 현상을 보였다. 4주에서 보여진 D2의 활성도 증가는 그 변화 양상이 대조군과 유사하여 활성도가 가장 높게 나타나긴 하였으나 식물체의 성장에 따른 증가 가능성 또한 배제할 수 없다. Alginate만을 처리한 경우 3개 실험군과는 다른 양상을 보였다. 4주 이후의 처리군들의 전반적인 활성도 감소 현상으로 미루어 미생물들의 뿌리강화 기능 효과기간이 3-4주임을 예측할 수 있으며 그 이후에는 미생물을 재처리하여 기능을 유지시켜야 할 것으로 예측된다. 그림 8-2는 대조군 1주의 효소 활성도를 기준으로 각 처리군의 효소 활성도를 상대적으로 나타내었다. 미생물 처리 초기(1, 2주)에서의 활성도는 거의 비슷한 수준이나 3주에서

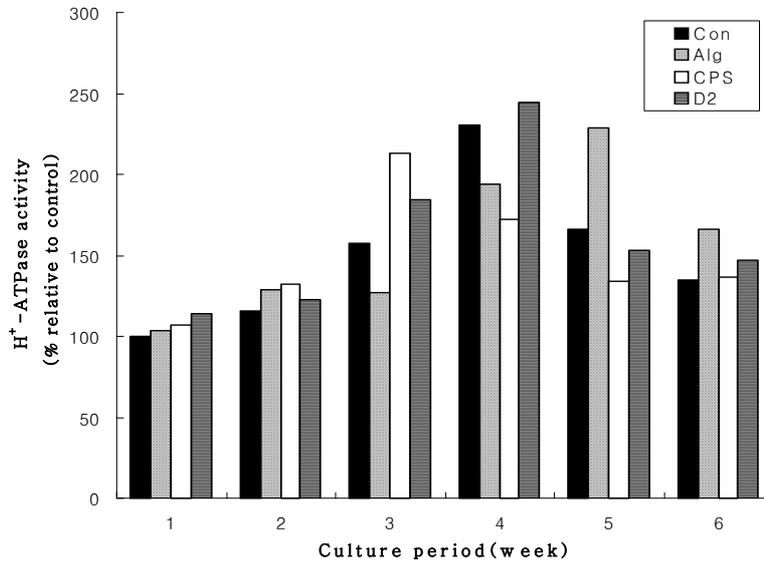


Fig. 8-2 . Effect of microorganism on relative activity of plasma membrane H^+ -ATPase

CPS 처리군의 경우 급격한 활성도 증가를 보여 실험군 중 가장 높은 활성도를 보였다. 반면에 4주에서 D2 처리군의 활성도가 가장 높았다. 결론적으로 실온에서 미생물 처리로 오이 뿌리의 원형질막 H^+ -ATPase 활성도가 증가되며 미생물에 의한 효과는 3-4주 유지되어 4주 후 기능성 균주의 재처리가 필요함을 확인하였다(그림 8-3). 오이 이외의 타작물에 대한 기능성균주의 효과를 조사하기 위해 고추를 대상으로 동일한 실험을 수행하였다. 고추 뿌리에서 원형질막을 추출하여 H^+ -ATPase 활성도를 조사하여 오이의 결과와 비교하였다(그림8-4). 미생물에 의한 오이 원형질막의 H^+ -ATPase 활성도 증가보다 고추 원형질막 효소 활성도는 매우 큰 폭으로 증가되었다.

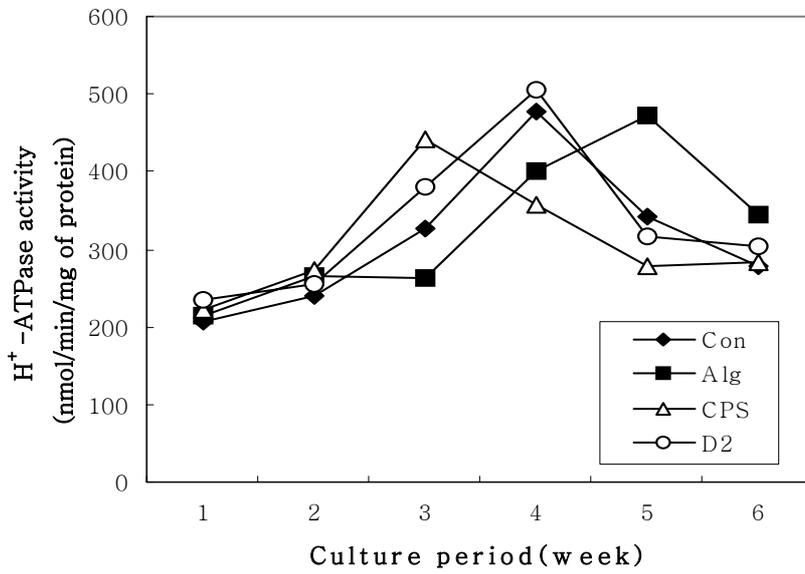


Fig. 8-3. Effect of microorganism on activity of plasma membrane H⁺-ATPase.

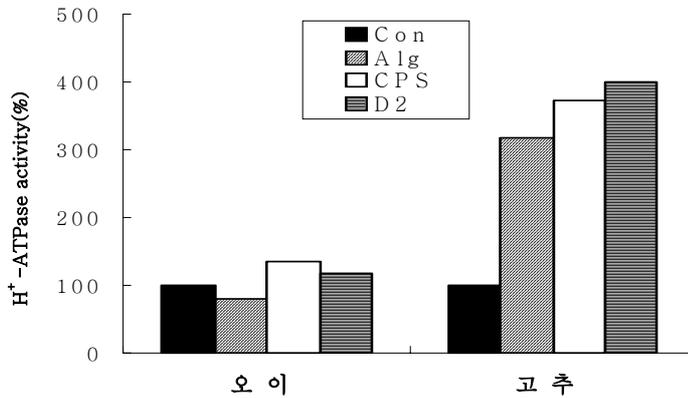


Fig. 8-4. Comparison of microorganism on relative activity of plasma membrane H⁺-ATPase in the cucumber and pepper roots.

3) 미생물에 의한 H⁺-ATPase 활성화도 증가 원인 분석

원형질막 H⁺-ATPase 활성화도의 조절은 다양하게 이루어지고 있다. 원형질막 H⁺-ATPase C-terminal domain에 존재하는 auto-inhibitory domain의 modification에 의한 조절과 유전자 발현의 증가에 따른 효소 활성화도 증가, 또한 효소가 존재하는 막 환경의 변화 즉 막 구성 지질의 불포화로 인한 효소 활성화도 조절 등이 있다. 효소 단백질 구조의 변화로 auto-inhibitory domain의 인산화/탈인산화에 의한 또는 trypsin에 의한 auto-inhibitory domain의 절단, 그리고 14-3-3 조절 단백질에 의한 효소 활성화도 증가 등이 알려져 있다.

가) 막 단백질의 trypsin 처리에 따른 H⁺-ATPase 활성화도 변화 양상 분석

효소 활성화도 증가 원인을 규명하기 위한 시도로 원형질 막 단백질을 trypsin으로 처리한 후 효소 활성화도 증가 정도를 비교함으로써 auto-inhibitory domain의 억제에 의한 효소활성도 증가 여부를 조사하여 그 결과를 Table 8-1에 제시하였다. 각 실험군에서 detergent(Brij 58)만을 처리하였을 때의 효소의 활성을 기준으로 trypsin 처리시 증가값을 상대적으로 표시하였다. 대조군의 경우 trypsin 처리에 의한 H⁺-ATPase 활성화도 증가가 거의 없었으나 2주와 3주에서 일정하게 증가하였다. 또한 D2의 경우도 대조군과 동일한 양상의 증가현상을 보인 반면에 CPS의 경우 처리 1주일 후에 크게 증가한 후 2주와 3주에서 증가폭이 감소하였다. 이러한 결과로 미생물간에 H⁺-ATPase 활성화도 조절 기작이 다른 것을 확인할 수 있었다. 일반적으로 autoinhibitory domain을 trypsin으로 제거할 경우 170% 이상으로 효소 활성화도가 증가된다. CPS과 D2, alginate처리군은 처리 초기(1-2주)에는 trypsin 처리에 의한 막의 활성화도가 대조군보다 큰 200%이상으로 증가하였다. 특히 CPS 처리의 경우 효소 활성화도가 제일 높은 3주 이후에는 trypsin 처리로 인한 효소활성도 증가폭이 140% 수준미만으로 유지 되었다. 이러한 현상은 D2 처리군에서도 동일하게 나타났다. 즉, 효소 활성이 가장 높은 4주 이후로 trypsin에 의한 증가폭은 현저히 저

하됨을 알 수 있었다. Trypsin 처리 초기에 막 활성화도 증가폭이 매우 큰 현상은 원형질막 단위 면적당 효소단백질양의 증가로 설명할 수 있을 것이다.

Table 8-1. Effect of trypsin treatment on the H⁺-ATPase activity of cucumber root plasma membrane.

		Control	Alginate	CPS	D2
1주	+Brij58	100%	100%	100%	100%
	+Trypsin	181.9	237.8	302.9	229.8
2주	+Brij58	100	100	100	100
	+Trypsin	198.5	206.2	210.4	202.8
3주	+Brij58	100	100	100	100
	+Trypsin	157.2	196.3	144.7	184.1
4주	+Brij58	100	100	100	100
	+Trypsin	115.3	131.9	133.8	119.9
5주	+Brij58	100	100	100	100
	+Trypsin	133.9	122.3	140.8	133.1
6주	+Brij58	100	100	100	100
	+Trypsin	139.4	126.2	126	129.1

또는 효소활성도가 높은 시기이후로 증가폭이 적다는 것은 막상 단백질의 구조 변화 (인산화 또는 막지질의 변화 등)로 인한 효소활성도의 증가 가능성도 배제 할 수 없다. Fusiccocin과 오옥신 등이 효소 단백질과 결합하여 효소 활성도를 증가시킨다고 알려져 있는데 본 실험에서 사용한 미생물 또한 유사한 기작으로 효소활성도를 증가 시켜 오이 뿌리의 흡수 기능이 향상될 수도 있을 것이다.

고추에서의 미생물의 생장촉진 효과가 오이에 비하여 큰 원인이 미생물이 막단백질의 구조변화를 유도하였는지를 조사하기 위하여 trypsin 처리에 의한 효소 활성화도 증가 양상을 조사하였다. 오이 경우와는 다르게 trypsin 처리에 의한 활

성도 증가 폭이 거의 미미한 수준이었다(표 8-3). 미생물에 의하여 효소 단백질이 활성화 형태로 이미 변하여 trypsin을 처리하여도 효소의 활성도가 더 이상 증가되지 않은 것으로 판단되며, 이 결과는 오이보다 고추에서 미생물의 효과가 뚜렷함을 확인 할 수 있었다.

Table 8-3. 오이와 고추의 원형질막 H⁺-ATPase 활성도에 대한 Trypsin 효과

	오 이				고 추			
	Control	Alginate	CPS	D2	Control	Alginate	CPS	D2
+Brij58	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
+Trypsin	157.2	196.3	144.7	184.1	133.8	116.4	103.1	103.4

나) H⁺-ATPase 유전자 발현 양상과 조절 유전자 14-3-3 유전자의 발현 분석

위 실험의 결과로 CPS와 D2에 의한 H⁺-ATPase 효소 활성도 조절이 다른 것을 확인하였다. 그에 따라 CPS와 D2가 H⁺-ATPase 유전자 발현에 영향을 주어 막에 배치된 효소양을 변화시켰을 가능성을 조사하기 위하여 RNA blot analysis와 Western blot analysis를 실시하였다. 오이에서 클론한 H⁺-ATPase cDNA의 일부분(1.4kbp)을 probe로 사용하여 처리군과 무처리군의 뿌리조직내 H⁺-ATPase 세포내 전사체양을 처리 기간 별로 조사하였다. 재배 기간에 따라 H⁺-ATPase 전사체의 양은 증가하였으나 처리군과 무처리군간의 차이는 확인하지 못하였다(그림8-5). 따라서 미생물 처리군에서 대조군에 비해 효소 활성도가 높은 원인이 미생물에 의한 유전자 발현이 증가하여 효소양이 증가한 것은 아님을 시사한다. 그러나 짧은 처리 시기에 대한 조사 결과로 단정짓기는 힘들며 보다 지속적인

조사가 필요하다. 14-3-3 단백질은 yeast, 식물, 동물 등에서 매우 구조가 잘 보존된 단백질로 원형질막과 세포질, 핵, 엽록체 등 다양한 부위에 존재하여 전사 조절자로 작용하고 특히 H^+ -ATPase 활성도를 조절한다고 알려져 있다. 14-3-3 단백질은 효소의 C-terminal regulatory domain과 결합하여 inhibition 작용을 억제함으로써 H^+ -ATPase 활성도를 증가시킨다고 알려져 있다. 따라서 조절 단백질 14-3-3에 의한 효소 활성도 증가 가능성을 조사하였다. 미생물 처리에 의한 14-3-3 유전자 발현 조절을 조사하기 위하여 RNA blot analysis를 실시하였다. 옥수수에서 클론한 1.2 kb 크기의 14-3-3 cDNA를 probe으로 사용하였다. 미생물 처리군이나 무처리군 모두에서 14-3-3 전사체 양이 매우 적었으나 2주에 미미한 증가 양상을 나타냈으나 처리군이나 대조군간에 큰 차이를 보이지 않았다. 결론적으로 CPS과 D2에 의한 H^+ -ATPase 효소 활성도 조절은 H^+ -ATPase 유전자나 조절 단백질인 14-3-3 유전자의 발현을 전사 수준에서 조절하는 것은 아닌 것으로 판단된다.

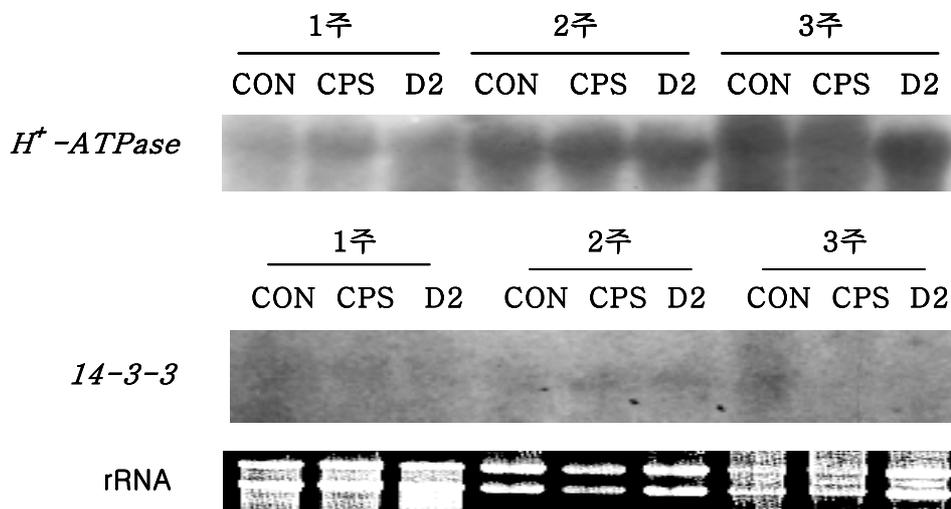


Fig. 8-5. RNA gel blot analysis of H^+ -ATPase and 14-3-3 mRNA of control and microorganism treated cucumber roots.

다) H⁺-ATPase 유전자 발현 분석-전사수준에서의 조절 분석

Alginate, CPS나 D2 처리로 H⁺-ATPase 유전자 발현이 증가하여 막의 효소 양이 변화되었을 가능성을 RNA blot analysis와 항체를 이용한 western blot analysis로 조사하였다. 처리군과 대조군의 조직내 H⁺-ATPase 전사체를 처리기간 별로 조사하였다. 재배기간 동안에 처리군과 대조군간에 H⁺-ATPase 전사체양의 큰 차이는 확인하지 못하였다(그림 8-6).

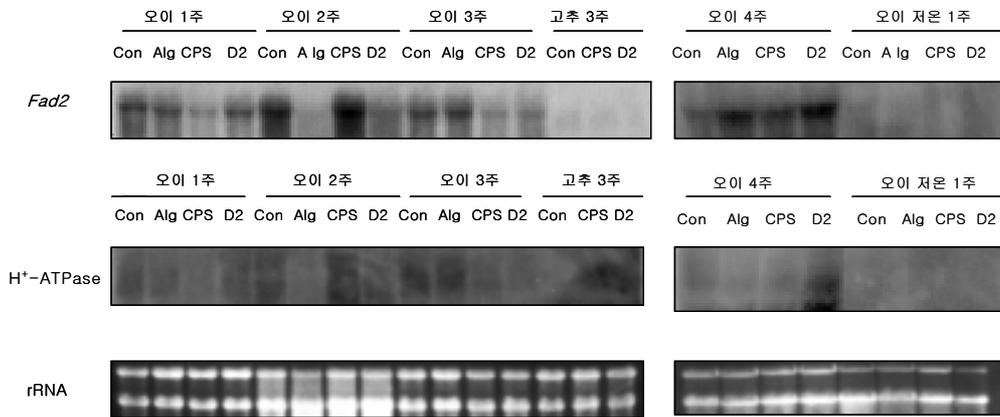


Fig. 8-6. RNA gel blot analysis of *fad2* mRNA and H⁺-ATPase mRNA (1,2,3,4 : cultured period(week) C : Control, A : Alginate,).

라) H⁺-ATPase 유전자 발현 분석-번역수준에서의 조절 분석

미생물이나 alginate 처리가 단백질 합성단계를 조절하여 H⁺-ATPase 효소 활성도가 증가되었을 가능성을 조사하기 위하여 H⁺-ATPase 항체를 이용하여 오이와 고추 뿌리 조직의 원형질막에 존재하는 효소 단백질 양을 분석하였다. 정식 재배 후 주 간격으로 오이 뿌리로부터 원형질막을 순수 분리하여 SDS-PAGE로 분리하고 H⁺-ATPase 항체를 이용하여 분석한 결과 1-3주된 막단백질과 H⁺-ATPase 항체와의 반응은 대조군보다 처리군에서 높게 나타났으며, 특히 CPS와 D2 처리군이

강한 반응을 보였다(그림8-7). 다른 호온성 작물인 고추에 대하여 미생물 처리에 따른 H^+ -ATPase 효소활성 변화의 원인을 동일한 방법으로 조사하였다. 고추에서도 H^+ -ATPase 활성도가 대조군 보다는 Alginate와 미생물 처리군에서 높은 것을 확인하고 그 원인 분석을 western blot과 northern blot으로 조사하였다. H^+ -ATPase 항체와 반응도 대조군에 비해 처리군에서 강하게 나타났다 (그림 8-8).

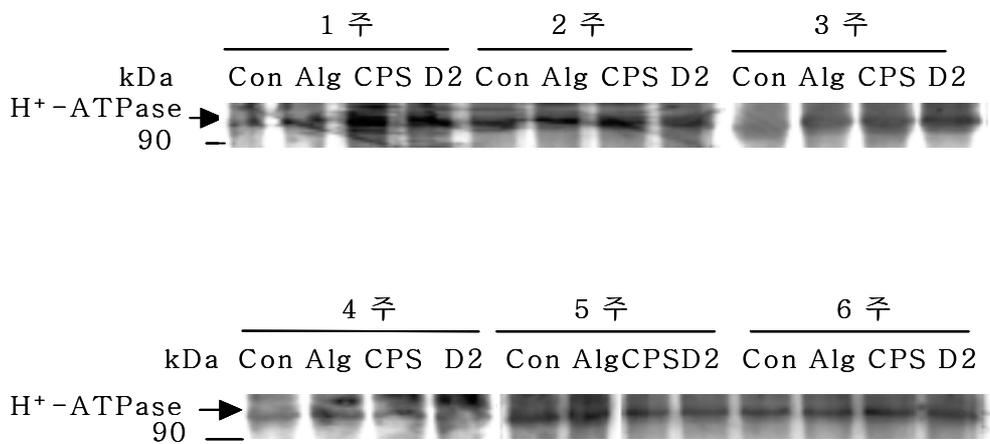


Fig.8-7. Western blot analysis of plasma membrane H^+ -ATPase cucumber roots.

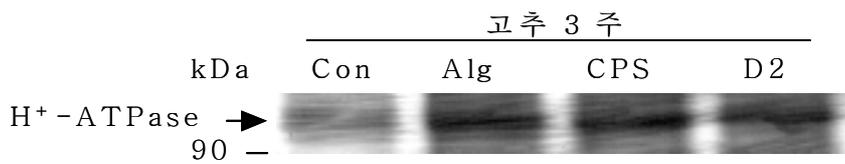


Fig.8-8. Western blot analysis of plasma membrane H^+ -ATPase pepper roots.

제 9 절 오이의 저온 내성에 대한 미생물 영향

1. 실험 목적

오이 유묘를 정식 한 후 3주간 재배하고 4주가 되기 전에 미생물을 처리한 후 일부는 저온실(10℃)로 옮겨 3주간 더 재배하면서 미생물에 의해 오이 뿌리가 저온 내성을 갖는지 조사하였다.

2. 실험 방법

가. 실험 작물 : 겨울살이 청장오이(cv. Chunchuchungjang)와 고추(cv. Johyang)를 대상으로 미생물의 생육촉진 효과를 조사하였다.

나. 저온처리 : 정식 후 4주 재배한 오이와 고추 pot 전체를 growth chamber 옮긴 후 1일간 순화 시켰다. 순화 후 시간당 1℃저하되어 최종 10℃가 조절하였다. 3주간 저온 처리하면서 주 간격으로 생육정도와 저온 내성을 조사 하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 저온 처리에 의한 오이 생육 변화

저온 재배된 오이의 근부 생체중과 작물 배지내의 미생물 수를 조사한 결과를 그림 9-1에 제시하였다. 저온 재배한 오이의 근부 생체중을 조사한 결과 모든 미생물 처리군들이 대조군에 비하여 높은 생체중 값을 보였다(그림 9-1A). 또한 재배 5주(저온 처리 2주)가 되었을 때 대조군의 오이들은 거의 죽었으나 미생물을 housing system으로 처리한 오이는 상당한 내성을 보여주어 모두 생존하였다. 그러나 6주(저온 3주)가 되자 미생물처리군 또한 생장을 멈추고 시들기 시작하였다. 저온

작물 배지 내에서의 미생물도 감소하였다(그림 9-1B). 저온에서도 미생물 안정도는 크게 변화하지 않았으나 시기가 경과함에 따라 일반적으로 전체적으로 감소하는 경향을 나타냈다. CON은 무처리군이다 결론적으로 근부에 존재하는 미생물의 숫자 보다 어떠한 미생물이 존재하느냐에 따라 housing system을 통한 근부 강화 결과오 이가 저온에 내성을 다소 지니게 되었음을 시사한다.

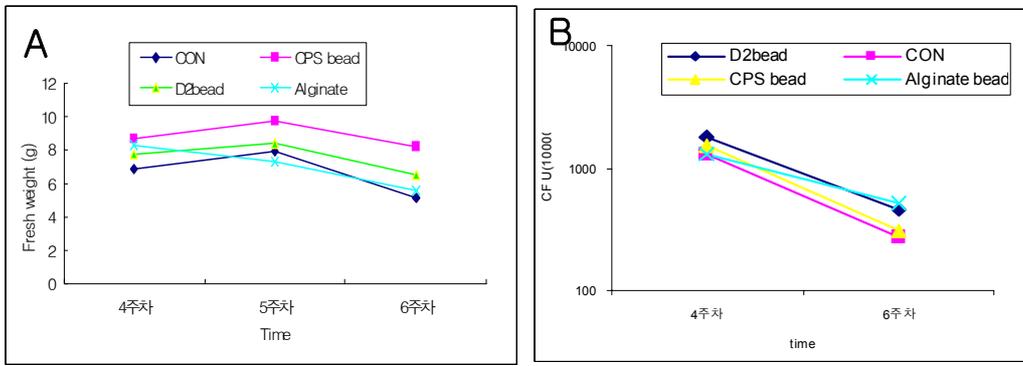


Fig. 9-1. 저온 재배된 오이의 근부 생체중 및 저온 재배 오이 배지내의 미생물

나. 균주들에 의한 환경 스트레스(저온을 중심으로) 내성 강화 기능 분석

저온민감성인 오이에 대한 저온 스트레스 상에서의 균주 효과를 조사하기 위해 상온에서 3주 재배한 오이를 growth chamber로 옮긴 후 서서히 온도를 낮춰 순화 기간을 가진 후 3주간 재배하면서 주별로 H^+ -ATPase 활성도변화를 조사하였다. 그림 7는 상온에서 오이를 3주간 재배한 후 저온처리 기간별 뿌리의 효소 활성도 변화를 나타낸 것이다. 저온처리 결과, 상온에서 재배할 때에 비해 모든 실험군에서 효소활성도가 감소하였으나 저온 처리 후 2주 쯤부터 모든 처리군이 대조군보다 높은 활성도를 유지하였다. 이 중 D2가 대조군이나 다른 처리군에 비하여 가장 높은 활성도를 나타냈으며(그림 9-2), 저온 처리 1주 (재배 4주)에서 가장 높은 효소 활성도를 보이고 있다. 이 결과는 저온처리로 효소 활성도가 상당한 수준 감소하였어도

여전히 높은 절대값을 지니고 있음을 알 수 있었다. 결과적으로 CPS와 D2의 처리로 오이 뿌리가 저온에 내성을 갖게 되었음을 확인하였다.

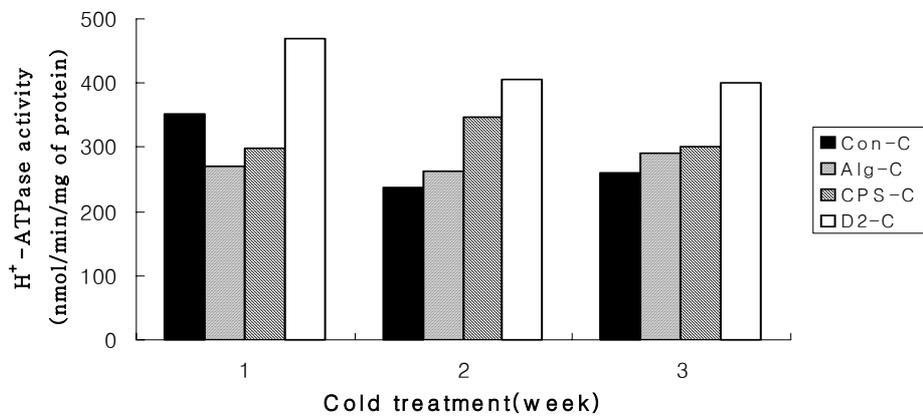


Fig. 9-2. 저온 처리군 오이의 원형질막 H⁺-ATPase 활성화도 비교 (C: cold treatment).

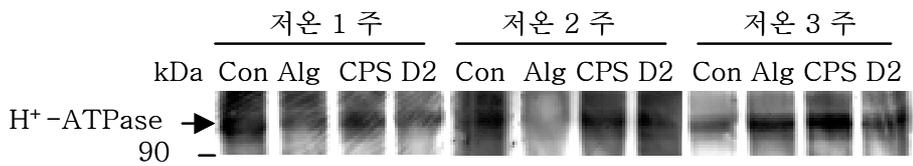


Fig. 9-3. Western blot analysis of plasma membrane H⁺-ATPase cold treated cucumber roots

저온에서의 단백질 양의 조사 결과(그림 9-3)는 저온처리 1주에서 대조군과 비교해 볼 때 미생물 처리군의 단백질양의 증가가 나타나지 않았고 저온처리 2주에서는 미생물처리에 의존 단백질양의 증가를 볼 수 있다. 이러한 단백질양의 증가는 저온처리 3주에서도 볼 수 있다. 특히, D2보다는 CPS에서 단백질양이 더욱 증가한 것을 볼 수 있었다. 이 결과로 미루어 미생물 처리에 의한 H^+ -ATPase 효소 활성도의 증가는 transcriptional level이 아닌 post transcriptional level 에서 조절된다고 판단된다.

제 10 절 생리활성 물질 규명

1. 실험 목적

미생물 이용은 현재 PGPR(Plant Growth Promoting Rhizobacteria)이라고 알려진 토양미생물을 이용하는 것이다. 기존의 연구들에 의하면 상당수의 토양미생물들은 여러 가지 메커니즘으로 작물생육에 지대한 영향을 미치며 작물에 따른 미생물의 기능의 차이도 보고되었다. 일반적인 PGPR의 mechanism 은 **plants hormone**(IAA, Ethylene)의 유도나 생성을 통하여 식물생육의 증진하는 *Pseudomonas* sp,와 *Bacillus megaterium* 등의 세균, *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp, 경우처럼 **phosphate**이온 **흡수의 증가**를 통한 경우, **Antibiotic material**의 합성, *Azotobacter*, *Azospirillum* sp의 경우 작물로부터 탄수화물을 공급받아 공기 중의 질소를 고정하여 작물에 공급한다. 또한 **siderphore** 생성 또는 ISR(Induced Systemic Resistance)을 통하여 이루어지며 한 가지 또는 이상의 특징을 가지고 종합적인 생육촉진의 특성을 나타낸다. 각종 환경 stress로부터 작물을 보호해주며 이는 생산량 증가로 이어진다. 선별 동정된 **CPS, D2 균주**는 식물 생육 증진효과를 나타낸다. 어떠한 기능을 통하여 생육 증진 효과를 나타내는지 정확한 기작의 연구가 필요하다. 이를 위해 수경재배를 실시하였으며, phytohormone IAA 생산능을 조사하였다.

2. 재료 및 방법

가. salkowski's 반응

M9 배지에 탄소원으로(glucose, glucose+Trp, Trp)선택적으로 공급하여 28℃에서 48시간 배양하여 600nM에서 cell값을 측정하였다. 또한 mambrane

filtration(0.45ul)을 통하여 균체를 제거한 배양액 1ml 과 salkowski's reagent 4mL 을 첨가 후 상온에서 20분간 반응시켰다. UV spectrophotometer를 이용하여 535nm 에서 OD 값을 측정 후 standard curve와 비교하였다.

나. HPLC

Shimadzu HPLC system LC8A delivery pump와 SPD-10A spectrophotometric detector로 구성된 Shimadzu HPLC system을 이용하여 bacterial IAA를 isocratic 방식으로 분석하였다. Column은 WATERS Symmetry C18, 유동상은 Acetonitrile 50mM:KH₂PO₄(30:70) 0.1% TFA를 이용하고 유속은 1mL/30min 이며 220nm에서 detection 하여 분석하였다.

다. 수경재배

수경재배가 가능한 Water bath를 이용하여 1주일된 육묘를 1/1비율로 화란양액과 물을 섞은 배양액 15L에 2일 순화 시킨 후 재배하였다. 미생물 처리는 Housing system을 이용하지 않고 균 배양액 자체를 처리한 균과 균만을 분리하여 배지에 투여한 방법으로 구분하였다. 대조군으로 배지만을 처리한 균과 배지에 LB 배양액을 혼합한 균을 비교하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 수경재배에서의 생리활성물질 탐색: 유용 미생물을 이용한 수경재배

실험은 생리활성물질의 규명과 활성물질의 수경재배 이용 가능성을 증명하기 위하여 수행되었다. LB broth를 이용하여 유용미생물을 배양하여 균과 배양액으로 구분하고 작물 수경 MS 배지 배양액에 균을 혼합한 상태로 공급하였을 때 최대의 생육 촉진 효과가 나타났으며, 균만 또는 배양액만을 처리 시에는 효과가 나타나지 않았다. MS 배양액은 agar를 첨가하므로 배지가 고형화되어 재배양액인 균의 이동성이 없을 것으로 예상된다. 기존의 Plant Growth Promoting rhizobium 들 중의 일부는 stationary phase에서 박테리아가 IAA를 생산한다는 보고를 참조로 수경재

배시 오염의 근원이 될 수 있는 Carbon Source를 첨가하지 않고 순수한 양액에 균만을, 또는 균 배양액(LB)을 균주의 농도가 0.5%(v/v) 되도록 혼합하여 15L bath에서 10일간 배양하고 뿌리의 발달을 관찰하였다(그림 10-1).



Fig. 10-1. CPS1 균주를 이용 수경재배(10일경과) 근부 사진

새로 생성된 뿌리는 기존의 뿌리에 비해 흰색을 띄었다. 대조군은 새 뿌리의 생성율이 매우 낮았으나, 균+배양액 또는 균만 처리한 경우 새로운 뿌리가 생성하는 것으로 관찰되었다. 반면에 균을 배양한 후 균을 걸러내고 배양액만을 처리한 경우에는 뿌리 성장에 전혀 효과가 없었다. 이로부터 미생물 단독배양에서 작물 생육에 영향을 주는 생리활성 물질이 미생물로부터 분비되지 않고 식물과의 상호작용으로 생리활성물질이 분비됨을 확인하였다.

나. IAA detection

1) salkowski's reagent 반응 결과

수경재배 결과 균, 균+배양액 처리군이 새 뿌리 생성에 최대의 효과를 보였다. 이는 결과적으로 균이 투여되어야 최고의 효율을 보이는 것으로 판단되며, 미생물의 개체수를 확장하기 위한 미생물 배지에서 미생물만을 배양할 경우 배양에선 생리활성 물질이 분비되지 않는 것을 확인하였다. 따라서 최소배지(M9)에 IAA 전구체인 트립토판을 첨가하여 배양하였다.

Table10-1. 40시간 배양 후 salkowski's reaction

Strains&standard	Carbon source	OD(600nm)	OD(535nm)	OD 1 기준
E.coli XL 1-blue	Glucose(2mg/ml)	1.4698	0.021	0.014288
	Glucose(2mg/ml) tryptophan(200ug/ml)	1.2284	0.078	0.068497
	Tryptophan(200ug/ml)	0.1676	0.0501	0.179594
<i>pseudomonas. sp</i> CPS	Glucose(2mg/ml)	1.5082	0.0062	0.004111
	Glucose(2mg/ml) tryptophan(200ug/ml)	1.2129	0.5185	0.427488
	Tryptophan(200ug/ml)	0.1219	0.1844	1.512715
indole-3-acetic acid(IAA)	5ug		0.087	
	10ug		0.2015	
	25ug		0.8908	
	50ug		0.7966	

기존의 보고 된 바에 의하면 박테리아는 생육곡선의 stationary phase에서 IAA를 생성하는 것으로 알려졌다. 따라서 배양 40시간후 박테리아가 생성한 IAA양을 조사 하였다. CPS균주는 최소배지에서 탄소원으로 glucose와 IAA 전구체인 트립토판을 첨가하여 배양했을 때 IAA를 많이 합성하였으며, 트립토판을 첨가하지 않은

경우엔 IAA 생합성이 일어나지 않았다. 이 결과로 박테리아는 자체 내의 트립토판을 이용하여 IAA 합성이 일어나지는 않는 것으로 판단되었다. 탄소원으로 glucose를 넣어주지 않고 트립토판만을 첨가하여 배양할 경우 cell의 생육이 일어나지 않았으나 O.D(600nm)에서의 cell density를 기준으로 환산할 때 IAA 생합성의 효율이 최대치를 나타내었다. 이는 탄소원이 없으므로 cell density가 증가하지 않고 박테리아가 스트레스를 받아 다량의 IAA를 합성하는 것으로 해석된다. 결과적으로 배양액 ml당 CPS 균주는 약 20ug의 박테리아 IAA를 생성한다. 이는 CPS 균주를 대량으로 처리하였을 때 생육저해를 일으킨다는 과거의 보고와 일치하며 적정량을 처리시 근부 강화를 유도하여 식물의 생육을 증진하는 것으로 판단된다.

2) CPS, D2 균주의 시간대별, 트립토판 농도별 IAA 생성량

그림 10-2는 40시간 배양후 salkowski's reagent 반응으로 IAA 합성량을 조사한 결과이다.

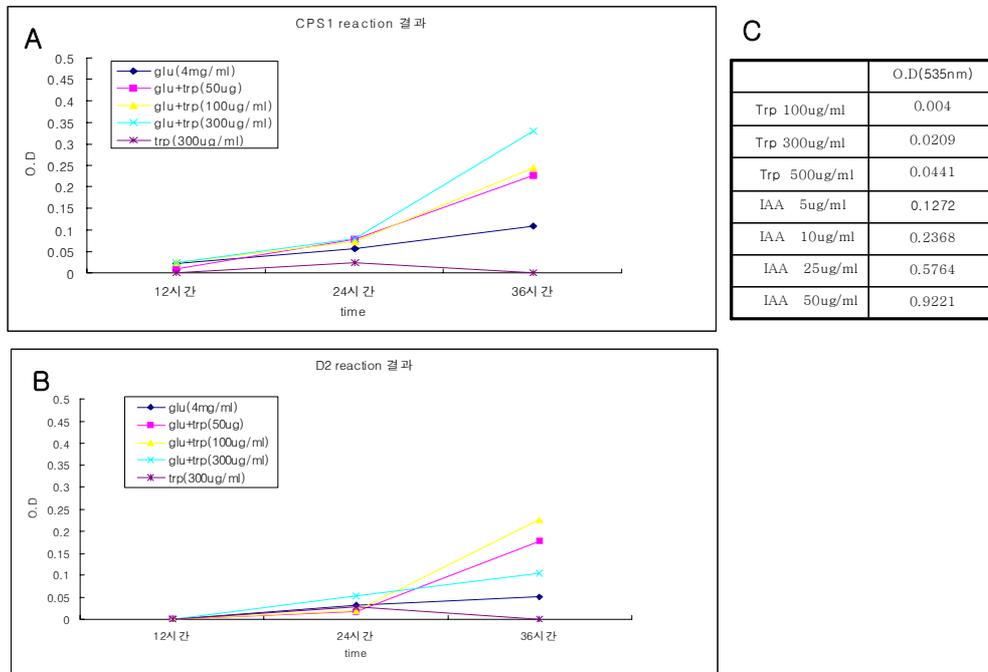


Fig. 10-2. Cultivation(IAA 합성량을 조사) A: CPS, B: D2, C: Standard.

CPS와 D2 두 균주는 36시간에서 최고의 IAA 생성율을 보였다. 이 시기는 일반적인 미생물의 생육곡선을 고려한다면 stationary phase의 끝부분으로 예상되며, 미생물 배지 내에 영양분의 고갈에 인한 스트레스 상황인 것으로 예상된다. 반면에 12시간에서 24시간까지의 증가율은 매우 저조하였다. 이는 기존에 언급된 stationary phase에서 stress 상황을 직면하여 박테리아가 IAA를 생성한다는 보고와 일치한다. Carbon source인 glucose를 넣어주지 않고 트립토판만을 첨가한 경우에는 carbon source 부족으로 세포증식이 이루어지지 않아 IAA 생산량이 현저히 적은 수치를 보였으나 glucose만 첨가한 경우 IAA의 생산기능이 약간 있는 것으로 나타났다. 즉, 박테리아가 endogenous 트립토판을 사용하여 IAA를 미량이나마 생산하는 것을 예

상되며 exogenous 트립토판을 첨가하였을때 IAA생산기능이 급격하게 높아진 것으로 사려된다. 이는 CPS, D2 균주가 식물 생육 증진을 위한 충분한 양의 IAA를 생산하기 위해서는 트립토판의 공급이 필수적인 것으로 예상되며 트립토판 공급원은 식물 뿌리인 것이 확실시된다. CPS glucose+트립토판(300ug/ml)배양액에서 약 10ug/ml 이상, D2는 glucose+트립토판(100ug/ml)에서 약 5ug/ml의 IAA를 합성하며 이 양은 각 균주가 합성하는 최대치에 해당된다. 이 정도 수치의 IAA는 오이 식물 뿌리 생장을 저해하는 수준의 높은 농도임이 많은 연구에서 밝혀졌다. 따라서 호르몬의 특성상 높은 농도는 식물생육을 저해 하므로 생육을 증진할 정도의 양을 공급해 주는 것이 중요하다. 그 방안으로 Housing system을 이용하면 식물체의 근부에 적당량의 IAA를 공급하기에 적절하다.

다. Root colonization

본 과제를 수행하면서 생육 촉진을 유도하는 생리 활성 물질의 분리에 많은 어려움을 겪었다. 박테리아가 미생물 배지내에서 생리 활성 물질을 분비하지 않기 때문이었다. 생리 활성물질 규명을 위하여 실시한 salkowski's reagent 반응 결과 IAA생성을 위해서여분의 트립토판을 외부로부터 첨가하여야 됨을 확인하였다. 즉, CPS와 D2균주가 IAA를 생성하여 근부강화를 토대로 식물의 생육을 증진한다면 트립토판의 source를 밝혀야 할 것이다. 이를 위해서 경정배양시 뿌리 표면 부위와 배양 병 부위에서 배지를 채취하여 평판계수 희석법을 통하여 균체수를 조사 하였다 (표 10-2).

Table10-2. Microorganism population of root surface and others

	ROOT(10^3 cfu/ml)	Rest(10^3 cfu/ml))
CPS	100 ±16.26	20 ±2.82
D2	122 ±23.64	48 ±7.96

두 균주 모두 root surface에 존재하는 균체수가 그 외 지역에 존재하는 수보다 4배 이상 많다. 이는 박테리아가 식물체로부터 증식에 필요한 물질을 공급받아 균체수가 증가되어 root 표면에 colony를 형성하고 있다는 증거이다. 이에 대한 근거로 여러 연구에서 상리 공생관계의 유지가 발표되었다.

라. HPLC를 통한 생리활성 물질 규명

Salkowski's 반응은 indolic compound 와 반응하여 O.D값 측정하여 분석하므로 더욱 정확한 분석방법이 필요하여 HPLC로 분석하였다. HPLC 측정시 IAA internal standard를 결정하고 각 균주(A:M1 B: D2 C:CPS)로부터 분리되는 물질을 분석한 결과, 4분 20초대에 동일한 peak가 형성되었다. 이는 트립토판을 첨가하여 5일간 배양 후 배지 내용물을 HPLC로 분석하였다. 배양시간이 증가함에 따라 IAA peak 또한 5일까지 증가함을 보였다. CPS과 M1은 D2에 비하여 IAA peak 가 낮았으며 peak 수도 적었다(그림 10-3).

표 10-4는 IAA 농도별 HPLC 분석결과 나타난 peak로 균주 분비물의 분석에서 IAA 물질과 농도 확인을 위하여 기준으로 삼았다. CPS, M1, D2 배양액에서의 IAA standard와 동일한 시간에 peak를 확인하고 IAA를 분리하였으며 정량분석을 통하여 각 배양액에서 시간대별 IAA량을 Area 단위로 분석하였다(표 10-4). salkowski's 반응을 통한 결과는 indolic compound의 양을 알 수 있으나 정확한 IAA 분석이 필요하여 HPLC를 통하여 배양시간별로 IAA 생성량을 비교하였다. CPS는 10ug/ml 정도의 IAA를 합성하였으며, 그 결과는 salkowski's 반응결과와 유사한 것으로 나타났다. CPS mutant인 M1의 경우 50% IAA 합성량이 증가함을 보였다. D2 균주의 경우, salkowski's 반응값과 HPLC 결과에는 많은 차이가 있었다. 특히 120시간 배양시에 salkowski's 결과보다 많은 72ug/ml IAA 생성능을 보였으며, HPLC peak 형태도 CPS, M1균주의 결과와 다른 패턴으로 나타났으나 IAA retention time에는 변동이 없었다. 이는 비드화 시킨 미생물의 적정 농도 조사결과와 같은 의미로 보여진다.

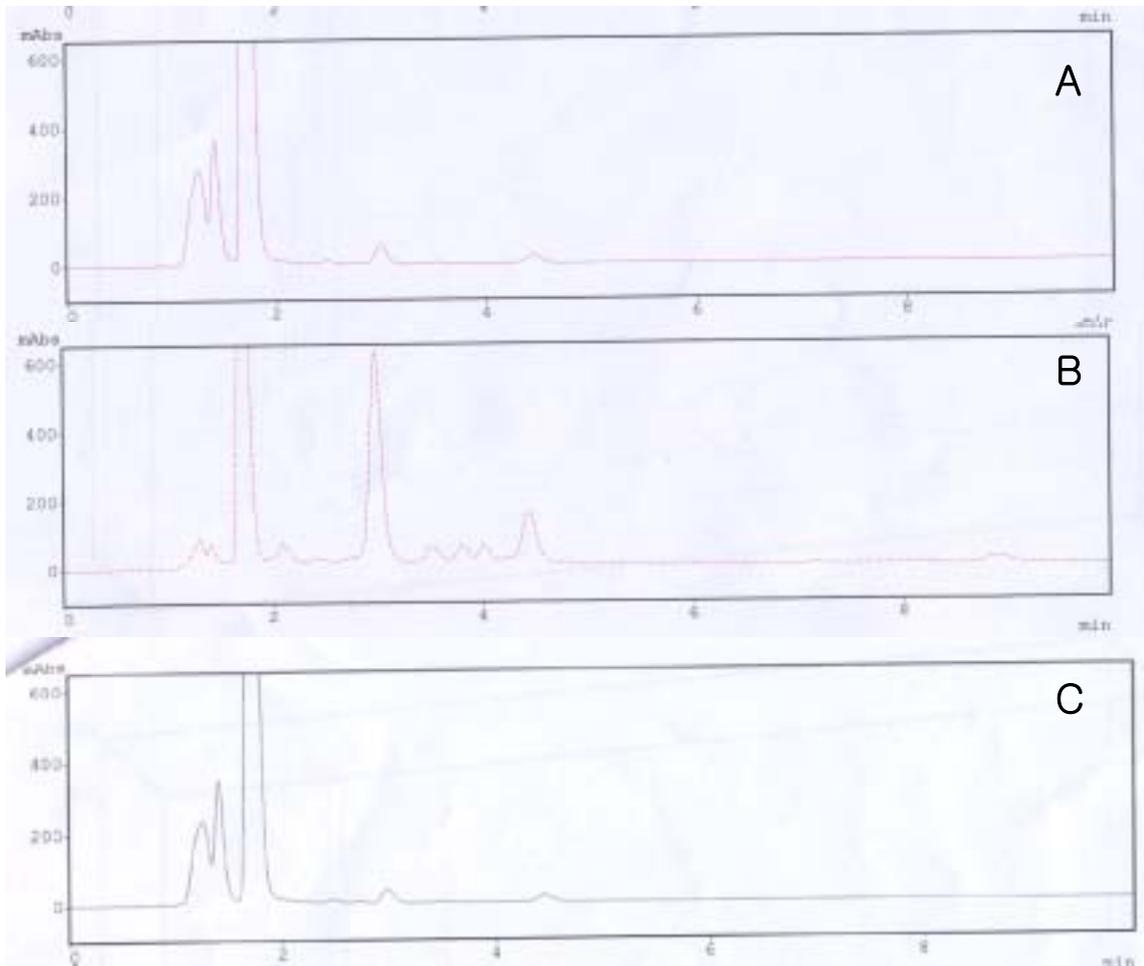


Fig. 10-3. 미생물에서 분리한 물질에 대해 HPLC 결과

Table 10-3. HPLC에 사용된 external standard

IAA Conc(ug/mL)	RT(retention time)	Peak(AREA)	Peak(HEIGHT)
1	4.399	17488	2442
4	4.38	73652	9865
8	4.376	154228	20103
20	4.374	406783	51599
60	4.389	1186709	153766
100	4.391	2009746	256947

Table 10-4. HPLC result 분석

CPS	AREA		ug/ml
24hr	111147	17488	6.355615279
60hr	148304	17488	8.480329369
120hr	179701	17488	10.27567475
M1			
24hr	164383	17488	9.399759835
60hr	197051	17488	11.26778362
120hr	253739	17488	14.50932068
D2			
24hr	511674	17488	29.25857731
60hr	985445	17488	56.34978271
120hr	1261352	17488	72.12671546

다. 작물 뿌리의 생리 활성 기능에 대한 생리활성물질의 영향

1) IAA 처리에 따른 생장 변화와 H⁺-ATPase 활성도 변화 분석

CPS, D2 와 M1으로부터 분비되는 생리활성물질로 IAA가 유력한 것으로 판명됨에 따라 오이에 IAA를 처리하여 생장 변화와 뿌리 원형질막의 H⁺-ATPase 활성도 변화에 미치는 효과를 조사하였다. IAA를 0.1mg/L의 농도로 뿌리부분에 처리하여 positive control로 삼고, 균주 처리군과 대조군의 오이 뿌리의 생체중 변화를 측정하였다. 그 결과 3주째에는 M1 처리군의 뿌리 생체중이 가장 높았으며, 4주째에는 D2, M1, CPS과 IAA처리군 모두가 대조군의 뿌리 생체중 보다 높았다. D2의 경우는 대조군에 비해 49%, IAA 처리군은 78%의 생체중 증가를 보였다(표10-5). 효소 활성도 측정 결과, CPS 처리군은 정식 후 2주째 H⁺-ATPase 활성도가 가장 높았으며, D2 처리군은 미생물을 처리하지 않은 대조군보다도 낮은 현상을 보였다. IAA처리군은 3주째 가장 높은 H⁺-ATPase 활성도를 보였으며 그 이후 활성도가 감소하였다. 반면 2주째 가장 높은 활성을 보인 CPS처리군은 3주째부터는 H⁺-ATPase 활성도가 떨어지며 4주째 미생물을 처리하지 않은 대조군과 유사한 정도의 활성도를 유지하였다. D2 처리군은 2주와 3주째는 대조군보다 낮은 H⁺-ATPase 활성도를 보였으나, 4주째에는 다른 처리군들의 활성도가 모두 감소한 반면 D2 처리군에서 가장 높은 H⁺-ATPase 활성도를 보였다(그림 10-4). 결론적으로 CPS, D2 와 M1 균주 등이 IAA 처리군과 동일하게 뿌리 생체중과 뿌리 원형질막의 H⁺-ATPase 활성도를 증가시키는 효과를 보였다. 이 결과는 균주들이 작물과 상호작용으로 IAA를 분비하여 작물 뿌리의 생육과 흡수 기능을 촉진하고 결과적으로 작물의 생육을 촉진시키는 것으로 추측된다.

Table 10-5. 오이 뿌리의 생체중 변화 (% relative to control)

	CON	D2	M1	CPS	IAA
2주	100	83	75	76	89
3주	100	100	135	85	116
4주	100	149	136	118	178

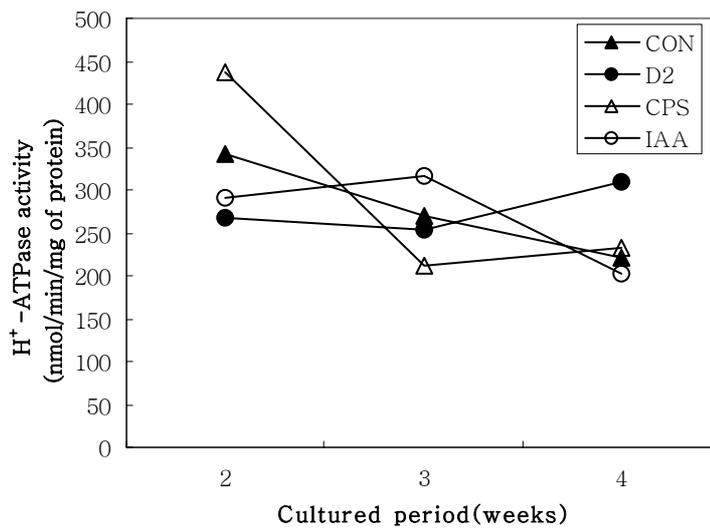


Fig. 10-4. Activity of plasma membrane H⁺-ATPase in roots of cucumber grown in the pot

2) IAA처리와 균처리에 의한 H⁺-ATPase 유전자 발현 비교-번역수준에서의 조절 비교

식물 호르몬 Auxin은 원형질막의 H⁺-ATPase 기능을 활성화하여 H⁺을 분비, 세포의 성장을 촉진시킨다고 알려져 있다(Acid-growth theory). 또한 옥옥신은 H⁺-ATPase를 포함한 여러 유전자 등의 발현을 촉진시켜 세포 성장 및 대사 작용을 촉진시키는 것으로 보고되었다. 기능성 균주에 의한 생육 촉진 효과가 IAA에 의한 효과와 동일한 것으로 판명됨에 따라 균주 등이 IAA와 동일한 기작으로 뿌리의 기능 및 생육을 촉진 시키는지를 규명하기위하여 유전자 발현 수준을 조사하였다. 오이 뿌리로부터 원형질막을 순수 분리하여 SDS-PAGE로 분리하고 H⁺-ATPase 항체를 이용하여 막 내 효소 단백질량을 비교, 분석하였다(그림 10-5). 균이나 IAA 처리 2주 후에는 CPS 처리군에서 효소 단백질량이 가장 많은 증가하였고, 3주에서는 IAA 처리군, 4주에서는 D2 처리군에서 단백질양이 가장 많은 것으로 나타났다. 그 결과 효소 활성도 결과(그림10-4)와 동일하게 나타났다. 이 결과는 균이나 IAA 처리에 따른 H⁺-ATPase 효소 활성도 증가는 막내 단백질량의 증가 결과임을 증명한다. 이러한 결과는 균이 IAA를 분비하여 오이 뿌리 조직에서 H⁺-ATPase 유전자 발현을 조절, 뿌리 조직의 생육 및 기능 촉진시키는 것으로 유추된다. 이 결과로 미루어 미생물 처리에 의한 H⁺-ATPase 효소 활성도의 증가는 transcriptional level이 아닌 post transcriptional level 에서 조절된다고 판단되며 오이와 고추의 뿌리 기능강화와 H⁺-ATPase 활성도가 밀접하게 상관관계를 맺고 있음을 확인 할 수 있었다.



Fig. 10-5. Western blot analysis of plasma membrane H⁺-ATPase cucumber roots

3) 오이 뿌리 기능 강화 원인으로 미생물이 분비한 옥신 기능 재확인

가) 오이 지상부 성장에 대한 TIBA(2,3,4-Triobenzoic acid)처리 효과

미생물에서 분비된 생리활성물질이 IAA임을 확인하기 위한 실험으로 auxin transport inhibitor인 TIBA를 미생물과 함께 오이 뿌리에 처리하였다. TIBA를 1mg/L의 농도로 미생물 처리 18일 후에 뿌리에 처리하였다. 대조군의 TIBA에 의한 성장 저해가 나타나지 않았다. 따라서 TIBA 처리에 의한 성장저해 효과는 TIBA 자체에 의한 직접적인 효과가 아니라 TIBA에 의한 옥신 기능 저하 효과에 의한 것으로 판단할 수 있을 것이다. 즉, 1mg/L 농도의 TIBA는 식물 자체 내의 옥신 작용에 영향을 주지 않고 외부에서 가해진 IAA의 수송을 저해함을 알 수 있었다. 식물체에 직접 IAA를 처리하여 이를 positive control로 보고 미생물 처리군과 그 양상을 비교하였다. IAA 처리 후 24일 재배한 오이의 경우에 무처리군인 대조군보다 지상부 성장율이 48% 증가하였으며 TIBA를 처리한 경우에는 대조군과 유사한 성장율을 나타내었다. IAA 처리후 나타난 48%의 성장 증가율은 IAA에 의한 직접적인 효과로 판단된다. CPS의 경우에도 대조군보다 19%정도 높은 성장율을 보였고 TIBA를 처리한 경우는 IAA 처리군과 동일하게 대조군과 비슷한 성장율을 나타내었고 CPS에 의한 성장율 증가가 TIBA에 의해 저해되었음을 의미한다 (그림 10-6, 7). 그림 10-6의 결과는 TIBA 처리 1주일 후의 지상부 길이 변화 결과이며 그림 10-7은 재배 기간동안의 지속적인 지상부 길이의 변화를 나타내었다. 이 결과에 의해 CPS에 의해 분비된 생리활성물질이 IAA임을 재확인하였다. 그림 10-6과 10-7에서 D2 처리군은 미생물처리군과 TIBA 처리군에서 모두 대조군보다 낮은 성장을 보였다. 이는 D2 균주에 의해 분비된 다량의 IAA에 의해 생장이 저해된 것으로 판단되었다. 이 결과를 토대로 D2 처리군에 대해서 TIBA 농도를 5mg/L로 처리하여 재 실험을 실시하였다(그림 10-8). CPS와 마찬가지로 D2 또한 TIBA에 의해 생장이 D2 균주만 처리한 군보다 40%정도 저해되었다. 따라서 D2에 의해 분비된 생리활성물질이 IAA임을 확인하였다.

나) 저온 및 TIBA(2,3,4-Triobenzoic acid) 처리 시 뿌리의 H⁺-ATPase
활성도 변화

25℃에서 자란 오이의 경우 효소 활성도가 대조군보다 D2, CPS, IAA 처리군이 20%-40%정도 증가하였다. TIBA 처리군의 경우는 D2, CPS 처리군과 대조군의 효소 활성도가 유사하게 나타났으나 IAA 처리군은 대조군보다 20% 감소한 값을 보였다. 10℃로 일주일 동안 처리한 오이에서는 대조군 보다는 높은 활성도를 보이거나 25℃에서 나타낸 효소 활성도 보다 전반적으로 감소하였다(그림 10-9). 저온 처리를 한 경우 효소 활성도는 D2에서 가장 높게 나타났다.

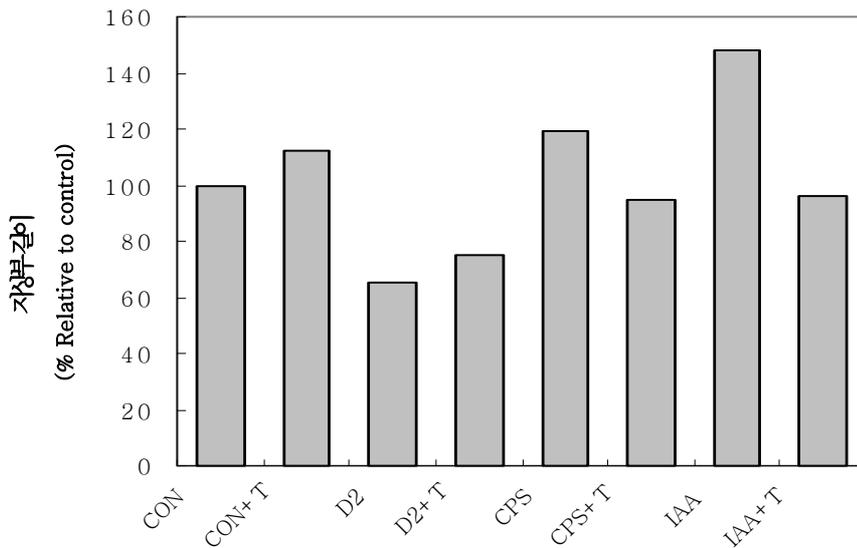


Fig. 10-6. Comparison of relative changes in the length of cucumber shoots grown in pots(T: TIBA treatment).

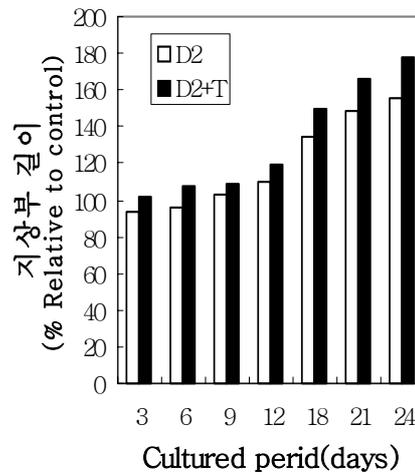
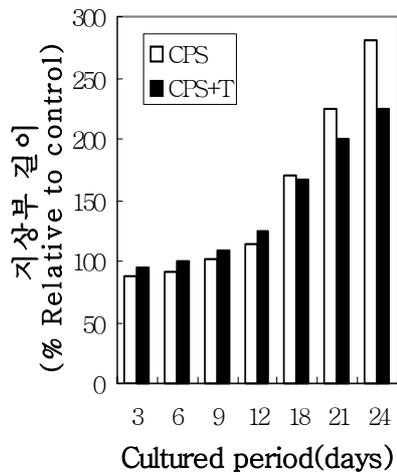
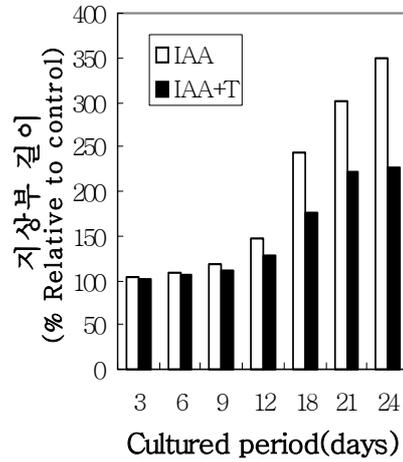
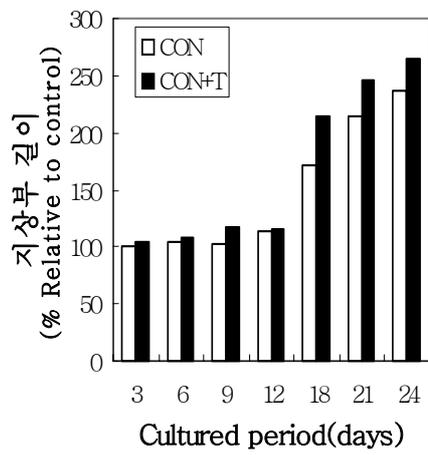


Fig. 10-7. Relative changes in the length of cucumber shoots grown in pots(T : TIBA treatment).

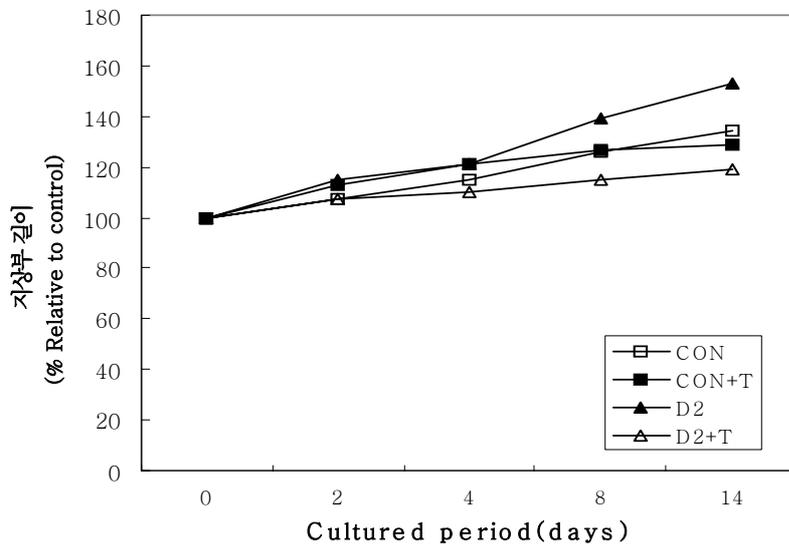


Fig. 10-8. Comparison of relative changes in the length of untreated and D2 treated cucumber shoots grown in pots(T: TIBA treatment).

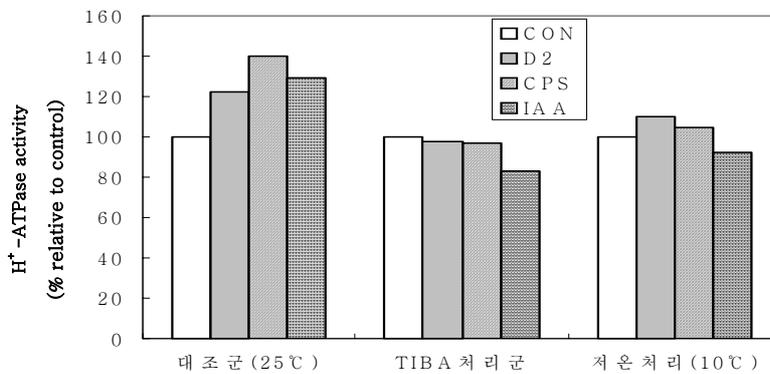


Fig. 10-9. Relative activity of plasma membrane H⁺-ATPase in the root of TIBA-treated and Cold-treated cucumber. (TIBA treatment for 7 days, Cold treatment for 7 days)

제 11 절 농가에서 Housing system(bead)으로 재배한 작물의 생리활성 기능 분석

1. 농가에서의 housing system(bead) 적용 실험

가. 실험 목적

실험실의 pot 실험과 온실 실험에 의해 MS101 혼합체로부터 선별한 CPS와 D2에 대한 housing system(bead)을 확립하였다. 확립된 housing system(bead)에 대한 농가에서의 실효성과 효용성을 조사하기 위해 농가 온실에서의 적용실험을 실시하였다.

나. 재료 및 방법

광주광역시 광산구 임곡동에 위치한 농가에서 온실을 대여하여 housing system(bead)화된 D2, CPS, M1를 field에 직접 처리하여 오이와 고추를 재배하였다. 이를 재료로 각 처리군의 생육 상태와 생리 활성 기능을 조사하였다.

다. 결과 및 고찰

1) 농가에서 재배한 작물의 생육 비교

그림 11-1은 임곡 온실에서 실험을 수행한 사진이다. 농가 적용 실험에서는 오이와 고추를 대상으로 실험하였고 각각의 지상부 길이와 뿌리의 생체중을 측정하여 생장 차이를 비교하였다(표 11-1, 2). 지상부 길이에 있어서 오이의 경우 미생물 처리 후 5주째에 D2와 M1는 대조군에 비해 19%, CPS는 12% 증가한 성장을 보였으나 고추의 경우는 대조군과 유사한 성장을 보였다. 뿌리의 생체중에 대해서 오이의 경우는 D2 처리군이 대조군에 비해 20%이상의 증가하였으며 미생물 처리군

중 가장 좋은 효과를 나타냈다. 고추의 경우는 미생물처리 4주 후에 모든 미생물 처리군에서 10%이상 증가를 나타냈다. 실험실에서의 단기간 재배와 달리 보다 장기간 재배함으로써 과실을 수확하여 과실의 상태를 파악하였다. 수확된 과실의 경우에는 오이, 고추 모두 대조군과 비슷한 수준의 수량과 과실 상태를 보였다(그림 11-2).



Fig. 11-1 . 광주광역시 광산구 임곡동 온실 실험

Table 11-1. 농가에서 재배한 오이와 고추의 지상부 길이 변화

오이 field sample 지상부 길이 (% relative to control)					고추 field sample 지상부 길이 (% relative to control)				
	CON	D2	M1	CPS		CON	D2	M1	CPS
5주	100	119	119	112	4주	100	105	100	101
7주	100	106	108	87	6주	100	111	103	104
9주	100	112	111	108	8주	100	102	95	96

Table 11-2. 농가에서 재배한 오이 와 고추의 뿌리 생체중 변화

오이 field sample fresh weight (% relative to control)					고추 field sample fresh weight (% relative to control)				
	CON	D2	M1	CPS		CON	D2	M1	CPS
5주	100	122	105	103	4주	100	111	113	110
7주	100	121	101	84	6주	100	113	109	113
9주	100	123	113	119	8주	100	102	94	101

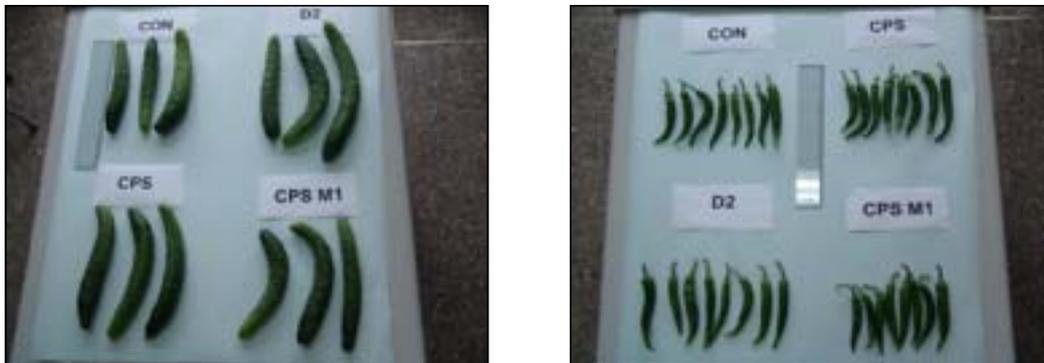


Fig. 11-2. 농가 재배에서 수확한 오이와 고추

2) H^+ -ATPase 활성도를 중심으로 한 오이와 고추 뿌리의 기능 분석

미생물의 housing system을 시범농가에 실제 적용하기 위하여, 오이와 고추를 임곡의 온실에서 재배시켜 보았다. 농가의 field실험은 실험실에서의 pot실험과 상당히 다른 양상을 보였다. 오이와 고추 모두 정식 후 진딧물과 병원균에 의해 노출되어 초기 성장이 더디었다. 그래서 진딧물과 병원균을 제거한 후 4주째부터 2주마다 한번씩 식물체로부터 뿌리를 채취하였다. 고추의 경우 2년차 실험결과에서는 오이보다도 H^+ -ATPase 활성이 더 높게 나타났으며 생육 또한 미생물 처리군이 더 좋게 나타났다. 그러나 농가의 field에 적용시켜본 결과 오이와 고추 모두 생육 면에서는 미생물 처리군이 미생물을 처리하지 않은 대조군에 비해 10-20%정도 높게 나타났으나, H^+ -ATPase 활성에 있어서는 pot에서 재배한 경우와는 상당히 다른 양상을 보였다. 오이의 경우 5주째는 모든 처리군간의 H^+ -ATPase 활성에 거의 차이가 없었으며, 7주째 D2와 CPS가 좋았으며 9주째에는 거의 차이가 나타나지 않아 보인다. 고추의 경우 마찬가지로 4주에는 대조군이 미생물 처리군보다 H^+ -ATPase 활성이 더 좋았으며, 6주째는 미생물 처리군들의 H^+ -ATPase 활성이 약간 더 높게 나타나다 8주째는 모든 처리군들의 활성이 비슷해진다. H^+ -ATPase의 활성이 떨어지는 오이의 9주와 고추의 8주 기간은 각 식물체에서 과실이 맺기 시작하는 시기와 일치한다(그림 11-3, 4).

3) 뿌리 기능 향상 원인 분석 : H^+ -ATPase 유전자 발현 분석-전사 및 번역수준에서의 조절 분석

실험실 pot 실험과 마찬가지로 미생물 처리가 H^+ -ATPase 유전자 발현에 영향을 주어 막의 효소 양 또한 변화되었는지를 RNA blot analysis와 항체를 이용한 western blot analysis로 조사하였다(그림 11-5, 6). RNA blot analysis의 결과 H^+ -ATPase 전사체량이 D2 처리 후 7주 오이 뿌리에서 증가되었고 9주 처리한 뿌리에서도 증가된 양상을 보였다 CPS의 경우는 미생물 처리 후 7주 에 그 전사량이 증가하였다. 효소 활성도의 경우에서도 CPS와 D2가 7주에서 높은 양상을 나타내었

다. *fad2* 전사량의 경우 D2처리군은 5주,7주에 전사체량이 증가했음을 확인하였다.

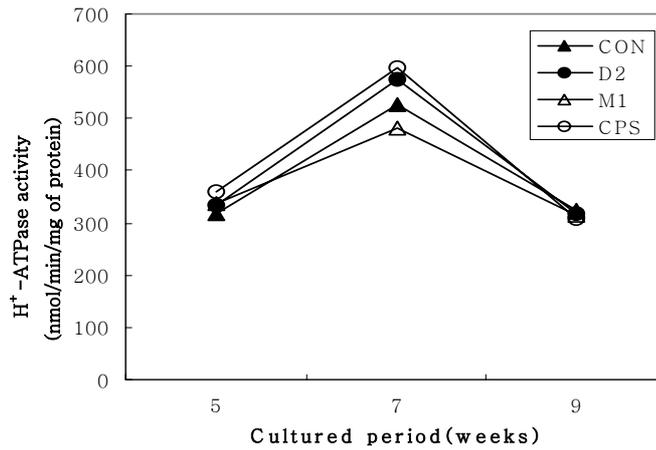


Fig. 11-3. Activity of plasma membrane H⁺-ATPase in roots of cucumber grown in the field.

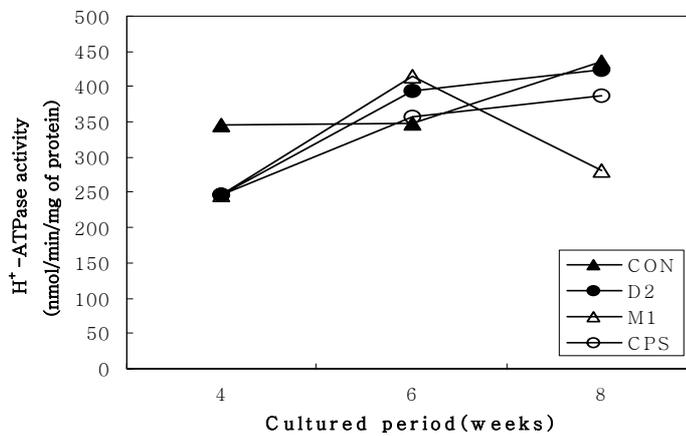


Fig. 11-4. Activity of plasma membrane H⁺-ATPase in roots of pepper grown in the field.

그 증가 양상이 H^+ -ATPase 전사체량 변화양상과 유사하다. Western blot analysis의 결과 오이는 재배 기간에 의한 단백질량 증가 양상을 보였고 CPS는 7주째 단백질량이 다른 비교군들에 비해 증가하였다. 고추의 경우는 D2처리군은 4주,6주에 증가하였고 CPS는 4주,6주,9주 모두에서 가장 많은 단백질량을 확인할 수 있었다.

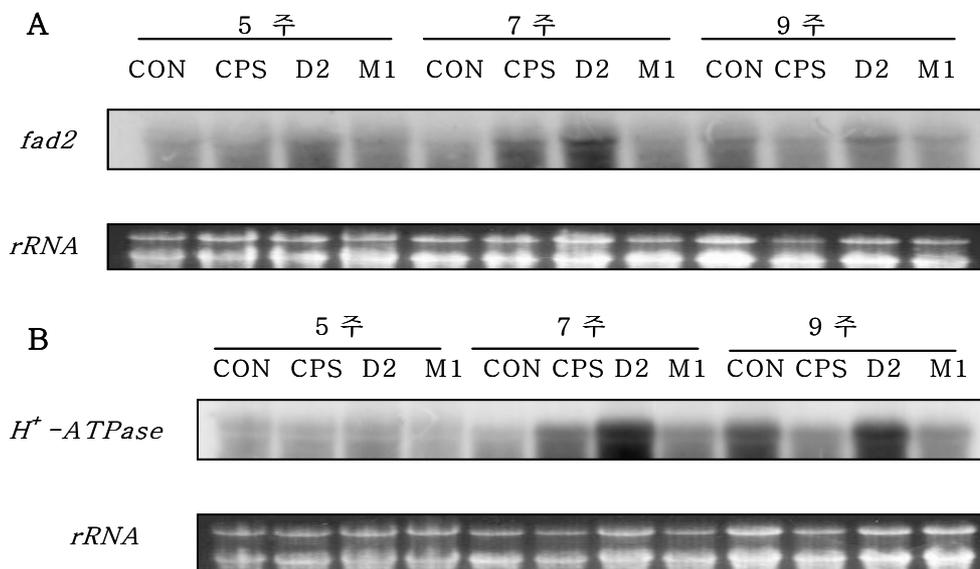


Fig. 11-5. RNA gel blot analysis *fad2* mRNA and H^+ -ATPase mRNA of cucumber roots grown in the field.

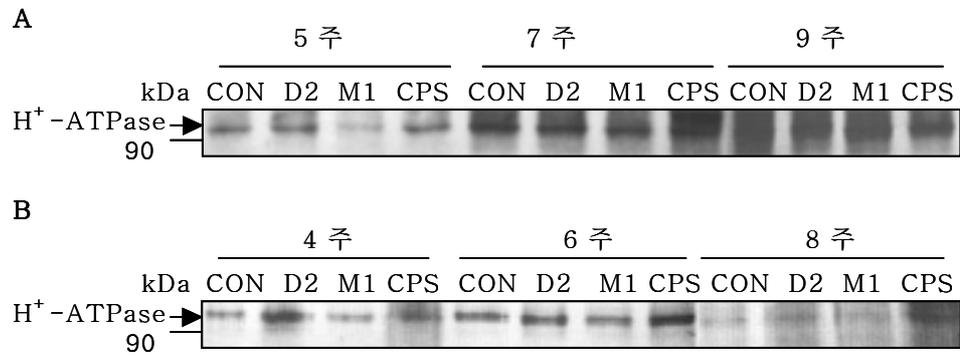


Fig.11-6. Western blot analysis of H⁺-ATPase of control and microorganism treated cucumber roots(A) and pepper roots(B) grown in the Field.

제 12 절 기능성 균주 등록, 상품화를 위한 시제품 개발

1. 균주 등록

CPS 와 D2를 대전에 위치한 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC : Korean Collection for Type Cultures) 에 안전기탁(기탁자: 지연태)하였다.

2. 시제품을 위한 기초 조사

1) 미생물의 실용화를 위한 균주들의 대량생산 체제 확립

기능성 균주들에 대한 생리 기능을 확인한 후 상품화 또는 농가에 보급하기 위해서는 대량 생산 체제를 확립하여야 한다. 따라서 대상 작물에 대하여 생육촉진이 뛰어난 CPS균주의 대량생산을 시도하였다. 7L 용량의 발효조를 사용하여 종균을 1% 접종하고 30℃에서 150RPM으로 20시간 배양하였다. 매 시간마다 sampling 을 하여 O.D(600nm)값을 측정하여 생장곡선을 얻었다. CPS균주는 12시간 배양 후 최고 O.D값이 3.2정도 되었고 그 후 감소하는 것으로 미루어 일반적인 *Pseudomonas* 속과 같은 생육 상태 보여 대량배양에는 큰 문제가 없는 것으로 판단하였다(그림 12-1).

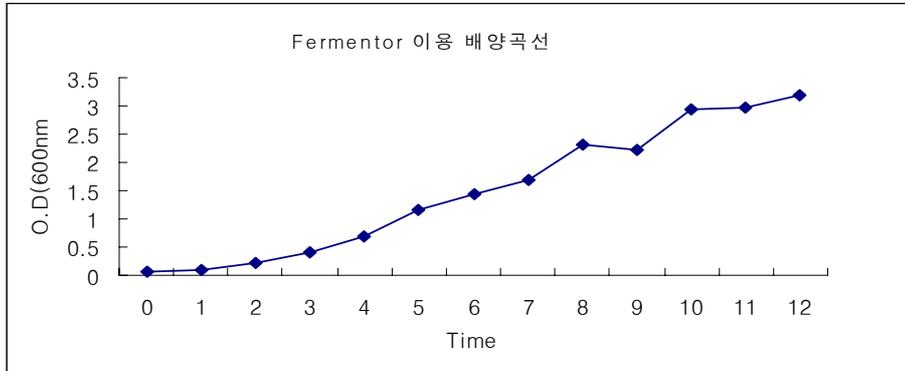


Fig. 12-1. CPS 배양 곡선

2) 동결 건조된 bead의 안정도

현재 실험에서 housing system의 bead는 제조 후 냉장 보관하며 1주일 안에 사용하였다. bead의 상업성을 위하여 유통기간의 증가가 필요하였으며, 동결건조는 일반적으로 균주를 장기간 보존하는데 효과적인 방법으로 알려져 있다. 이를 토대로 100ml의 미생물 배양액으로 40g의 bead를 생산할 수 있으며, 이 bead를 동결 건조하여 4g의 건조 bead를 생산할 수 있다. 동결 건조된 bead는 물에 24시간 이상 침지후 식물 재배에 사용이 가능하며, 동결 건조된 bead는 장기간 사용 가능함을 확인하였다. 그림 12-2은 제조 직후의 bead와 동결 건조된 bead를 나타낸 그림이다.



Fig. 12-2. Bead and freeze-dried bead

동결 건조된 bead의 사용 기간을 조사하기 위하여 bead를 먼저 급속 냉동 후 건조하여 5개월, 18개월 후에 잔여 미생물수를 측정하였다. 또한 bead를 냉장보관(4℃) 1개월 후에 동결건조 미생물수와 비교하였다(표 12-1).

Table 12-1. Freeze-dried bead stability test

	LB(/1g)	LBAP(/1g)
CPS(f/d)	3019*10 ⁴	1831.5*10 ⁴
CPS(5개월)(f/d)	1999*10 ⁴	1220.5*10 ⁴
CPS(18개월)(f/d)	391.5*10 ⁴	345*10 ⁴
CPS 1개월 (bead)	1217*10 ⁴	782.5*10 ⁴
CPS (bead)	2858.5*10 ⁴	784*10 ⁴

동결건조 5개월, 18개월 후 bead내에 존재하는 미생물수는 감소함을 보여준다. 그러나 AP(LB ampicillin)과 형태학적인 조사 결과 CPS균주의 감소는 적다. 보관기간에 큰 차이를 보이지 않았으며 bead의 60%정도가 CPS 균주로 판단된다. 동결 건조된 CPS(5,18개월)은 bead 상태에서 냉장 보관한 후 조사한 처리구와 커다란 차이를 보이지 않았다. 이는 동결건조를 통하여 최대 1년6개월 정도의 효과기간을 예상할 수 있다.

제 13 절 종합 결론

토착 유효 미생물 혼합체로부터 오이와 멜론등 호온성 과채류의 뿌리 기능을 강화하고 생육을 촉진시키는 *pseudomonas* 속의 CPS와 *Saccharomyces* 속의 D2 를 분리, 동정하였다. CPS와 D2는 오이와 고추뿌리의 이온과 영양흡수 기능을 강화시키는 것을 확인하였다. 즉 Root activity와 H^+ -ATPase 기능을 향상시켜 결과적으로 작물의 생육을 촉진시키는 것으로 판단된다. CPS와 D2에 의한 근권 강화와 생육 촉진 기작으로 이 균들이 작물 뿌리와 상호작용을 통하여 auxin을 분비하며, bacterial auxin이 뿌리의 H^+ -ATPase 유전자 발현을 조절하여 뿌리의 흡수기능을 향상시키고 결과적으로 작물의 생육이 촉진됨을 확인하였다. 이 사실은 auxin 수송 억제제인 TIBA를 처리할 경우 미생물에 의한 생육촉진이 중단되는 결과로 재확인할 수 있었다. 또한 미생물들이 작물 수경재배시 양액내에 축적되는 phenolic compound 들의 Toxic효과를 완화시킴으로써 뿌리 기능을 향상시킨다는 것도 확인하였다.

이 균주들을 양액재배에 활용하기 위한 배지로는 Mixlite (coir-dust:perlite70/30), 양액으로는 PBG가 적합하였다. 균주는 0.5%-1%농도로 배지에 혼합하였을때 최대의 촉진 효과가 나타났다. 작물의 재배기간동안 균주들의 농도 유지와 작물 뿌리와의 접촉을 유지하기 위하여 alginate로 bead화함으로써 미생물의 생육 촉진 효과를 높일 수 있었다. 오이나 고추의 생육 촉진 효과가 CPS는 처리 후 2-3주에서 D2는 4-5주에서 최대치를 보였는데 이결과로 4-5주 간격으로 미생물을 재처리하는 것이 효과적임을 밝혔다. CPS나 D2균을 생장 촉진제로 농가에서 사용할 수 있는지를 판단하기 위하여 현지 농가에서 오이와 고추 재배에 적용하였다. CPS나 D2균을 Mixlite (coir-dust:perlite70/30)배지에 혼합하여 pot에 처리할 경우 대조군보다 월등한(30%이상) 생육촉진 효과를 보이며 저온에서도 작물의 생장이 유지됨을 확인하였으나, 현지 농가 적용실험에서는 생육 촉진 효과를 보이기는 하였으나 효과정도가 현저히 저하되었다. 이는 일반 농가에서 각종 배지나 미생물들을

처리하여 토양에는 다양한 유효 미생물은 물론 해로운 미생물들이 혼합되어 있다.

따라서 CPS와 D2가 유효한 미생물이라 할지라도 이들이 토양내에서 일정농도 이상 유지되어 우점종으로 기능을 발휘하는데 어려움이 있을 것으로 사료된다.

이러한 사실은 1-2개의 유효 미생물을 이용하여 상품화 하여도 현지 농가에서 효과적으로 작물의 생육을 촉진시킬 지는 의문시 된다. 즉 현재 토양을 개량하여 유해성 미생물들을 최소화 하는 것이 우선되어야 미생물 성장촉진제 개발이 순조로울 것으로 사료된다.

CPS와 D2균주를 한국생명공학연구원, 생물 자원센터(KCTC)에 등록하였으며 성장 촉진제로 상품화할 수 있는 시제품을 개발하였다.

4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 목표 달성도

세부과제 및 주요내용	연 도	계 획 추진실적		
		2001 (차년도)	2002 (2차년도)	2003 (3차년도)
<ul style="list-style-type: none"> ○ 유효미생물을 이용한 전용양액 개발 및 재배기술의 실용화 체계 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 균주 및 생리활성 물질을 이용한 과채류 전용양액 개발 및 적정 생육환경 구축 - 균주 증식 시스템과 부합하는 과채류 전용양액 개발과 적정 근권환경 설정 - 미생물 전용 양액재배의 현장 적용 실험 - 양액 및 토양내 균주들의 증식 환경 조건 설정 및 적정양액 재배시스템 개발 - 미생물 적용 농도 및 관비 방법 계량화 - 연작장해 경감을 위한 토양 개선기술개발 - 미생물 전용양액 재배시 지상부 생육환경 적정화와 다수확 및 품질향상 기술 개발 - 농가현장 실증재배(오이, 고추) 및 상품개발 ○ 미생물에 의한 생육촉진 재배조건 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 양액 및 수경재배 적용 가능 균주선별 - 균주별, 양액별 생육 촉진 효과 분석 - 균주 배양조건 및 대량생산체계 확립 - 균주 증식을 위한 housing 시스템 개발 ○ 작물생육에 미치는 미생물의 생리기능 분석 및 저온, 병해 내성 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 유효미생물 또는 생리활성 물질에 의한 작물의 저온과 병해 내성 강화기능 분석 - 농가 현장에서 미생물 전용양액으로 재배 중인 작물에 대한 생리활성 분석 		←→		
		←→		
		←→	←→	
		←→	←→	←→
		←→		←→
		←→	←→	
		←→	←→	←→
		←→		←→
		←→	←→	
		←→	←→	←→
		←→		←→
		←→	←→	

제 2 절 관련 분야 기여도

1. 미생물 혼합체의 수경재배에 이용 가능성 확인

오이와 멜론의 양액재배에 미생물 혼합체를 0.5~1% 농도로 사용하여 엽 면적과 뿌리의 생육이 촉진되는 것을 확인하였다. 따라서 미생물 혼합체를 작물의 양액재배에 사용할 수 있음을 확인하였다.

2. 분리된 단일 미생물의 생육촉진 효과 분석

두 번의 선별 과정을 통하여 선별한 각 균주들에 대하여 작물별, 생육 단계별, 재배방식별로 생육촉진 기능을 조사하였다. 특히 *Pseudomonas* 속의 CPS와 *Sacharomyces* 속의 D2 균주는 오이, 멜론과 고추의 지상부와 뿌리, 과실의 생육 촉진에 효과적임을 확인하였다. 또한 이들 균주들은 토양재배와 수경재배에도 활용이 가능함을 확인하였다.

3. 양액내 균주들의 housing 시스템 개발

현재 시판되고 있는 대부분의 미생물 제제는 미생물 배양액을 이용한 토양내 관주를 통한 시비가 주를 이루고 있다. 본 연구에서는 이보다 더 효과적인 미생물의 공급을 위하여 housing 기법을 이용한 미생물 담체를 개발하였으며, 유묘의 초기에 조속한 생육 촉진을 위해서는 CPS 균주가, 과실 수확기까지 지속적인 생육 촉진을 위해서는 D2 균주가 효과적임을 확인하였다. 따라서 작물별, 재배 목적에 따라 CPS와 D2 균주를 달리 사용함으로써 효과를 극대화 할 수 있을 것이다.

4. 알긴산 비드화 근권미생물의 시설환경내 수경재배 조건확립

알긴산 비드화 근권미생물을 이용한 과채류의 수경재배시 지상부 및 지하부의 생장 촉진 효과를 확인할 수 있었으며, 오이는 *S. sp.* D2 배양액의 관주처리시 생장

에 가장 양호한 결과를 나타낸 반면, 고추의 생장은 *P. sp.* CPS가 가장 좋은 결과를 보였다. 토양재배에 이용할 경우, 유묘를 정식하기 전에 토양 내 유묘 뿌리가 위치할 부위에 alginated bead 형태의 미생물을 투여하고, 정식 후 4주 간격으로 액체 상태의 미생물을 양액과 함께 투여함으로 생육촉진을 유지 할 수 있다.

5. 알긴산 비드화 근권미생물을 이용한 재배기술 실용화체계 확립

선발된 *P. sp.* CPS와 *S. sp.* D2의 알긴산 비드화 적정량이 결정됨에 따라 수경재배시 기본적으로 수행되어야 할 배지와 양액의 종류 및 양액농도에 관한 실험을 수행한 결과, 배지는 유·무기배지가 혼합된 mixlite가 수경재배 오이의 생장에 가장 좋았으며, 양액의 종류와 농도는 화란 PBG양액의 표준액인 1X (EC 2.0dS/m, pH 5.8-6.2)에서 가장 좋은 결과를 보였다. 이러한 결과들을 토대로 오이의 수경재배에 미생물 배양액을 이용함으로써 실용화 시킬 수 있을 것이다.

6. 근권미생물을 이용한 수경재배 배지의 물리성 개선 및 연작장해 경감

식물체내에서 분비 또는 잔여물에서 용출되는 화학물질이 다른 식물에 직접 또는 간접적으로 억제작용을 미치는 식물간의 상호작용을 allelopathy라 하는데 작물의 연작장해, 토양 내 유해물질적, 초지생태계의 천이 등이 작물의 생육 및 수량에 영향을 미친다. 실제로, 오이와 토마토의 수경재배시 allelopathy물질인 phenolic compound를 분석한 결과 시간이 경과함에 따라 페놀의 함량이 증가하였다. 생육기간이 길어질수록 오이와 토마토의 지하부에서 배출되어지는 phenolic compound가 높아지는 것으로 생각되었으며, 이를 재이용하였을 경우, 오이와 토마토의 생육이 새로운 배지나 배양액에서 자란 것보다 저조함을 보였다.

따라서 본 연구에서는 오이 및 토마토를 연속재배한 배지를 재사용하였을 때 발생하는 phenolic compound를 경감시키기 위한 미생물 *P. sp.* 'CPS'와 *S. sp.* D2의 효과를 알아보고자 실시한 결과 CPS와 D2처리구 모두 재사용배지 처리구에 비해 페놀의 함량이 감소하는 것으로 나타났다. 결과적으로 이러한 효과가 작물의 생

장과 발육에 유리하게 작용할 수 있을 것으로 기대되었다.

7. 근권미생물의 현장재배 적용을 다수확 및 품질향상

다양한 재배조건하에서 선발된 *P. sp.* CPS와 *S. sp.* D2의 알긴산 비드화 제제의 실용화를 위해 수경재배 오이의 현장적용실험 통하여 이들 미생물의 다수확 및 품질향상에 미치는 영향을 구명하고자 실시한 결과, 수경재배 오이의 생육과 과실품질 및 수확량에 D2가 가장 유리한 것으로 나타났고, CPS의 경우 대조구와 큰 차이를 보이지 않았으나, 과실수확량면에서 D2 다음으로 좋은 결과를 보였다. *P. sp.* CPS와 *S. sp.* D2 비드를 수경재배 오이에 적용 후 30일째에 완전히 전개된 15엽을 대상으로 아침 8시부터 밤 6시까지 하루동안의 광합성량을 측정된 결과, 광합성의 패턴은 모든 처리구에서 12시에 가장 높았으며, 그 이후에는 점차 감소하는 경향이 있었다. 이러한 패턴은 D2비드 처리구에서 가장 효율적으로 유지되었으며, CPS비드 처리구가 그 다음이었다. 이는 D2 처리구에서 많은 엽면적의 확보, 근권내 폐놀함량의 감소와 함께 높은 광합성 효율이 과실의 생산량과 품질에 좋은 영향을 끼친 것으로 판단되었다. 이러한 결과는 수경재배 과채류 재배농가의 소득증가에 기여할 것으로 생각되었다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 토착 유효미생물의 분리, 동정 및 특성검정을 통한 실용화 방안에 대한 지속적인 탐구로 기능성 균주들의 혼합체 형태인 생장 촉진제 개발.

미생물들은 지구상에 나타난 최초의 생물로써 오랜 역사를 가지며 다양하게 분화하여 오늘날 지구상의 거의 모든 생물권에 분포하면서 다양한 기능을 수행하고 있다. 지구상에 존재하는 미생물의 종류는 5만여종에 달한다고 한다. 이 중에서 분류하여 밝혀 놓은 것은 2만 5천 종류 정도에 불과하다고 한다. 본 연구에서도 100여 가지의 미생물을 분리, 동정하여 특성을 검정한 결과, 식물의 생장에 관련한 미생물은 불과 수 가지에 불과하였다. 따라서, 분리된 단일미생물의 특성을 보다 구체적으로 파악하고 실제 현장에 효과적으로 적용할 수 있는 방법을 지속적인 탐구한다면 다양한 미생물 생장 촉진제가 개발될 수 있을 것이다. 특히 1-2개 균주에 의한 생육촉진제보다 각기 조금씩 효능이 다른 미생물들의 혼합체를 개발하면, 현재 미진한 미생물제제 개발 산업의 발전을 도모할 수 있을 것이다.

2. 생장촉진 근권미생물 및 항균, 항충 특이 균주의 개발 및 타 작물에의 적용 범위 확대

일부 근권미생물들은 식물의 지상부와 뿌리 발달을 저해하는 미생물에 대하여 항생작용을 갖는다. 이러한 길항성 근권미생물은 뿌리전염성 병원균의 생육을 억제함으로써 식물의 생장을 촉진시킨다. 근권에서 항생물질의 생산은 식물생장촉진 근권미생물에 의한 병원균의 생물학적 방제의 메카니즘 중의 한 방편으로 생각되고 있다. 그러나, 이 물질은 근권에서 확산되기 쉽고, 토양에서 지속성이 없으며, 배지입자와 흡착하여 불활성화 되는 것으로 밝혀졌다. 항생물질을 생산하는 길항성 근권세균의 식물생장촉진 효과는 항생물질 생산에 의한 근권 토착미생물의 상장억제 작용과 그에 따른 작물의 생장촉진효과로 나타나는 것으로 보인다. 따라서, 근권에서 길항물

질 생산에 의한 병해방제효과는 아직도 많은 연구가 필요하며, 특히 병충에 약한 작물의 적용범위를 확대할 필요가 있다.

3. 토양 및 양액내의 미생물의 효과지속을 위한 housing system 의 적정 근권 환경요인의 구명 및 상호작용효과 검증을 통한 실용화

현재 시판되고 있는 대부분의 미생물 제제는 미생물 배양액을 이용한 토양 내 관주를 통한 시비가 주를 이루고 있다. 본 연구에서는 이보다 더 효과적인 미생물의 공급을 위하여 housing 기법을 이용한 미생물 담체를 개발하여 그 효과를 입증하였다. 이에 따라 토양 및 수경재배시 미생물의 효과지속을 위한 housing system 확립에 대하여 적정 근권 환경요인의 구명 및 상호작용효과 검증을 수행함으로써 다양한 미생물제제의 개발이 이루어질 수 있을 것이다.

4. 알긴산 비드의 효과 증대를 위한 영양요인의 탐색 및 현장 적용성 확대

미생물의 비드화에 이용된 알긴산은 식물종자의 발아율 증대를 위한 알긴산을 적용 및 알긴산의 중금속 흡착능력이 있는데, 식물체의 생장에 필요한 필수 미네랄의 흡착과 작물의 흡수 및 생리대사에 보다 더 효과적일 것으로 예상할 수 있다. 이에 따라 알긴산 비드화 미생물의 효과증대와 지속을 위한 균주의 단독 및 타 균주와의 혼합 및 영양요인의 탐색을 통한 비드화 방법을 개선한다면 현장적용성을 더욱 확대할 수 있을 것이다.

5. 유효 토착미생물의 균자체 및 균의 대사산물의 이용효과 분석

본 연구에서 선발한 *Pseudomonas* sp. CPS와 *Saccharomyces* sp. D2는 호르몬 오옥신 IAA를 분비하는 것으로 밝혀졌다. 이 물질은 식물의 생장촉진에 직접 관여하는 생장조절물질로써 미생물에 의해 생산된 천연호르몬이라는 점에서 주목할 만하다. 따라서 이러한 호르몬 분비작용을 이용한다면 식물 조직배양 등에 널리 활용

될 수 있을 것이다.

6. 작물 생육촉진 수량증대 및 품질향상에 기여할 수 있는 미생물 제품 개발

본 연구에서는 작물 생육촉진, 수량증대 및 품질향상에 기여할 수 있는 액상 미생물 제품을 개발하였으며, 현재는 이보다 더 효과적으로 밝혀진 알긴산 비드화 미생물 제품을 개발 중에 있다.

개발된 시제품은 다음과 같다.

1. CPS 와 D2 균주를 포함한 Bead의 동결건조 및 분말화 시제품
2. 액체상의 CPS 와 D2 배양액

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술
정보

없 음

제 7 장 참고문헌

1. Hager A. Role of the plasma membrane H^+ -ATPase in auxin-induced elongation growth: historical and new aspects. *J Plant Res.* 2003 Dec;116(6):483-505. Epub 2003 Aug 20.
2. Rober-Kleber N, Albrechtova JT, Fleig S, Huck N, Michalke W, Wagner E, Speth V, Neuhaus G, Fischer-Iglesias C. Plasma membrane H^+ -ATPase is involved in auxin-mediated cell elongation during wheat embryo development. *Plant Physiol.* 2003 Mar;131(3):1302-12.
3. Peltier JB, Rossignol M. Auxin-induced differential sensitivity of the H^+ -ATPase in plasma membrane subfractions from tobacco cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996 Feb 15;219(2):492-6.
4. Grebe M. Ups and downs of tissue and planar polarity in plants. *Bioessays.* 2004 Jul;26(7):719-29.
5. Lopez Nicolas JI, Acosta M, Sanchez-Bravo J. Role of basipetal auxin transport and lateral auxin movement in rooting and growth of etiolated lupin hypocotyls. *Physiol Plant.* 2004 Jun;121(2):294-304.
6. Rahman A, Amakawa T, Goto N, Tsurumi S. Auxin is a positive regulator for ethylene-mediated response in the growth of Arabidopsis roots. *Plant Cell Physiol.* 2001 Mar;42(3):301-7.
7. Friml J, Palme K. Polar auxin transport-old questions and new concepts? *Plant Mol Biol.* 2002 Jun-Jul;49(3-4):273-84.
8. Cona A, Cenci F, Cervelli M, Federico R, Mariottini P, Moreno S, Angelini R. Polyamine oxidase, a hydrogen peroxide-producing enzyme, is up-regulated by light and down-regulated by auxin in the outer tissues of the maize

- mesocotyl. *Plant Physiol.* 2003 Feb;131(2):803-13.
9. Baluska F, Samaj J, Menzel D. Polar transport of auxin: carrier-mediated flux across the plasma membrane or neurotransmitter-like secretion? *Trends Cell Biol.* 2003 Jun;13(6):282-5.
 10. Friml J, Vieten A, Sauer M, Weijers D, Schwarz H, Hamann T, Offringa R, Jurgens G. Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature.* 2003 Nov 13;426(6963):147-53.
 11. Muday GK, DeLong A. Polar auxin transport: controlling where and how much. *Trends Plant Sci.* 2001 Nov;6(11):535-42.
 12. Fischer-Iglesias C, Sundberg B, Neuhaus G, Jones AM. Auxin distribution and transport during embryonic pattern formation in wheat. *Plant J.* 2001 Apr;26(2):115-29.
 13. Kerk NM, Jiang K, Feldman LJ. Auxin metabolism in the root apical meristem. *Plant Physiol.* 2000 Mar;122(3):925-32.
 14. Reed RC, Brady SR, Muday GK. Inhibition of auxin movement from the shoot into the root inhibits lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 1998 Dec;118(4):1369-78.
 15. Peltier JB, Rossignol M. Auxin-induced differential sensitivity of the H⁺-ATPase in plasma membrane subfractions from tobacco cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996 Feb 15;219(2):492-6.
 16. Baunsgaard L., Fuglsang A.T., Jahn T., Korthout H.A.A.J., de Boer A.H., Palmgren, M.G. 1998. The 14-3-3 protein associate with the plant plasma membrane H⁺-ATPase to generate a fusicoccin binding complex and a fusicoccin responsive system. *The Plant Journal* 13(5): 661-671
 17. Brown, M.E. 1972. Plant growth substances produced by microorganisms of soil and rhizosphere. *J. Appl. Bacteriol.* 35:443-451.

18. Brown, M.E. 1974. Seed and root bacterization. *Annu. Rev. Phytopathol.* 12:181-197.
19. Usgrove D.J. 1997. Creeping walls, softening fruit, and penetration pollen tubes: The growing roles of expansins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 5504-5505
20. Cosgrove D.J. 1997. Relaxation in a High-Stress Environment: The Molecular Bases of Extensible Cell Walls and Cell Enlargement. *The Plant Cell* 9: 1031-1041
21. Duff, R.B., D.M. Webley and R.O. Scott. 1963. Solubilization of minerals and related materials by 2-ketogluconic acid-producing bacteria. *Soil Sci.* 95:105-114.
22. Jahn, T., Fuglsang, A.T., Olsson, A., Collinge, D.B., Volkmann, D., Sommarin, M., Palmgren, M.G. and C. Larsson. 1997. The 14-3-3 protein interacts directly with the C-terminal region of the plant plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Cell* 9:1805-1814
23. Jang, H.G., J.Y. Lee., B.S. Lee., Y.T. Chi and S.J. Chung. 1999. Effect of MS101 Supplemented in the Media on the Seedlings Growth of Cucumber Plants. *K.J.Horticultural Sci. & Tec.* pp 611.
24. Kapulnik, Y., R. Gafny and Y. Okon. 1983. Effect of *Azospirillum* spp. Inoculation on root development and NO₃⁻ uptake wheat in hydroponic system. *Can. J. Bot.* 63:627-631.
25. Kloepper, J.W., J. Leong., M. Teintze and M.N. Schroth. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature.* 286(28):885-886.
26. Kloepper, J.W., R. Lifshitz and M.N. Schroth. 1988. Pseudomonas inoculants to benefit plant production. *Anim. Plant Sci.* 60-64.

27. Kodama H., Hamada T., Horiguchi G., Nishimura M. and Iba K. 1994. Genetic enhancement of Cold Tolerance by Expression of a Gene for Chloroplast ω -3 fatty Acid Desaturase in Transgenic Tobacco. *Plant Physiol.* 105:601-605.
28. Miquel M., James D., Dooner h., Browse J. 1993. Arabidopsis requires polyunsaturated lipids for low-temperature survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 6208-6212.
29. Morgenstern, E. and Y. Okon. 1987. Promotion of plant growth and NO_3^- and Rb^+ uptake in *Sorghum bicolor* \times *Sorghum sudanense* inoculated with *Azospirillum brasilense* Cd. *Arid Soil Res. Rehabil.* 1:211-217.
30. Nielands, J.B. and S.A. Leong. 1986. Siderophores in relation to plant growth and disease. *Annu. Rev. Plant physiol.* 37:187-208.
31. Schaller A., Oecking C. 1999. Modulation of Plasma Membrane H^+ -ATPase Activity Differentially Activates Wound and Pathogen Defense Responses in Tomato Plants. *The Plant Cell* 11: 263-272
32. Van peer, R. and B. Schipper. 1988. Bacteria in hydroponic system: Effects on growth. *ISOSC Proc.* pp.375-384.
33. Van peer, R. and B. Schipper. 1989. Plant growth responses to bacterization with selected *Pseudomonas* spp. strains and rhizosphere microbial development in hydroponic cultures. *Can. J. Microbiol.* 35:456-463.
34. Vlugt, J.L.F. and Van der. 1989. A literature review concerning root death in cucumber and other crops. *Norwegian Journal of Agricultural Science* 3:265-274.
35. Willy, L., Y. Okon and R.W.F. Hardy. 1983. Enhanced mineral uptake by *Zea mays* and *Sorghum bicolor* roots inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45(6):1775-1779.
36. Choong-Min Ryu and Mohamed A. Farag (2003) Bacterial volatiles promote

- growth in *Arabidopsis*. PNAS 100. 4927-4936
37. Agustin Hernandez and David T. cooke (2002) *In vivo* activation of plasma membrane H⁺-ATPase hydrolytic activity by complex lipid-bound unsaturated fatty acids in *Ustilago maydis*. Eur. J. Biochem 269. 1006-1011
 38. Michael G. P, Per, A., Karin, F. and Christer L. (1990) Sealed inside-out and Right-side-out plasma membrane vesicles. Plant Physiol 92. 871-880
 39. Michael G. P. and Mariane S. (1991) Identification of an Autoinhibitory domain in the C-terminal region of the plant plasma membrane H⁺-ATPase. The Journal of Chemistry 266. No 30. 20470-20475
 40. Walker. (1996) Western blot. The protein protocol. Humana press. 313-317
 41. Sambrook, Fritsch, Maniat (1989) Molecular cloning. 7.42-7.57
 42. Michael, R. S. and Jeffrey, F. H. (1989) Molecular biology of the plasma membrane of higher plants. The Plant Cell 1. 953-960
 43. Ferdrik Johansson and Marianne Sommarin (1993) Fusicocin avtinates the plasma membrane H⁺-ATPase by a mechanism involving the C-terminal inhibitory domain. The Plant Cell 5. 321-327
 44. Olivier Maudoux and Henri Batoko (2000) A plant plasma membrane H⁺-ATPase expressed in yeast is activated by phosphorylation at its penultimate residue and binding of 14-3-3 regulatory proteins in the absence of fusicocin. The Journal of Biological Chemistry 275. No 23. 17762-17770
 45. Hong Luo and Pierre Morsomme (1999) The two major types of plasma membrane H⁺-ATPase show different enzymatic properties and confer differential pH sensitivity of yeast growth. Plant Physiology 119. 627-634
 46. E.Boopathi, Sankara Rao (1999) A siderophore from *Pseudomonas putida* type A1:structure and biological characterization. BBA 1435:30-40
 47. Y.Bashan, L.E.Gonzalez(1998) Long term survival of the

- plant-growth-promoting bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* in dry alginate inoculant. *AMB* 51:262-265
48. G.A.Amer,R.S.utkhede(2000) Development of formulations of biological agents for management of root rot of lettuce and cucumber. *CJM* 46:809-816
 49. anishi Mishira, Reeta Goel(1999) development of a resistant mutant of plant growth promoting *Pseudomonas fluorescens* and its functional characterization. *JB* (75)71-75
 50. GENRICH I. BURD,D. GEORGE DIXON, BERNARD R.GLICK (1998) A plant Growth-promoting Bacterium that Decreases Nickel Toxicity in seedling. *AEM*10:3663-3668
 51. E.Boopathi, Sankara Rao (1999) A siderophore from *Pseudomonas putida* type A1:structure and biological characterization.*BBA*1435:30-40
 52. Y.Bashan, L.E.Gonzalez(1998) Long term survival of the plant-growth-promoting bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* in dry alginate inoculant. *AMB* 51:262-265
 53. GENRICH I. BURD,D. GEORGE DIXON, BERNARD R.GLICK (1998) A plant Growth-promoting Bacterium that Decreases Nickel Toxicity in seedling. *AEM*10:3663-3668
 54. CHUNQUAN, RICHARD R BELANGER, NICOLE BENHAMOU and TIMOTHY PAULITZ(2000) Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth promoting rhizobacteria(PGPR) and *Pythium aphanidermatum* *Physiological and Molecular Plant Pathology* 56, 13-23
 55. John S. Tiedeman, Robert E. Moore, Caroline C. Philpott Siderophore-Iron Uptake in *Saccharomyces cerevisiae* *The JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*(2000) Vol 275 No 21 Issue of MAY 26 (16354-16359)
 56. LE LUO GUSN, KANEO KANO, AND KEI KAMINO Effect of Exogenous

- Siderophores on Iron Uptake Activity of Marine Bacteria under Iron-Limited Conditions AEM(2001), p. 1710-1717
57. P.DE BELLIS and G.L ERCOLLANI Growth Interactions during Bacterial Colonization of seeding Rootlets AEM. (2001), p. 1945-1948
 58. M.SCHLOTTER W.WIEHE B.ASSMUS Root colonization of Different Plants by Plant-Growth Promoting Rhizobacteria leguminosarum bv .trifolii R39 Studied with Monospecific Polyclonal Antisera AEM. (1997), p.2038-2046
 59. Penrose DM, Glick BR. Related Articles, Links Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiol Plant.* (2003)118(1):10-15.
 60. Kravchenko LV, Makarova NM, Azarova TS, Provorov NA, Tikhonovich IA. Isolation and phenotypic characteristics of growth-stimulating rhizobacteria (PGPR), with high root-colonizing and phytopathogenic fungi inhibiting abilities *Mikrobiologiya.* (2002) Jul-Aug;71(4):521-5. Russian.
 61. Probanza A, Mateos JL, Lucas Garcia JA, Ramos B, De Felipe MR, Gutierrez Manero FJ. Effects of Inoculation with PGPR *Bacillus* and *Pisolithus tinctorius* on *Pinus pinea* L. Growth, Bacterial rhizosphere Colonization, and Mycorrhizal Infection. *Microb Ecol.* (2001) 41(2) 140-148.
 62. Mehnaz S, Mirza MS, Haurat J, Bally R, Normand P, Bano A, Malik KA. Isolation and 16S rRNA sequence analysis of the beneficial bacteria from the rhizosphere of rice. *Can J Microbiol.* (2001) 47(2):110-7.
 63. Burdman S, Okon Y, Jurkevitch E. Surface characteristics of *Azospirillum brasilense* in relation to cell aggregation and attachment to plant roots. *Crit Rev Microbiol.* (2000) 26(2):91-110. Review.
 64. Timmusk S, Wagner EG. The plant-growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene

- expression: a possible connection between biotic and abiotic stress responses. *Mol Plant Microbe Interact.* (1999) 12(11):951-9.
65. Shah S, Li J, Moffatt BA, Glick BR. Isolation and characterization of ACC deaminase genes from two different plant growth-promoting rhizobacteria. *Can J Microbiol.* (1998) 44(9):833-43.
66. Chabot R, Antoun H, Kloepper JW, Beauchamp CJ. Root colonization of maize and lettuce by bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. *Appl Environ Microbiol.* (1996) 62(8):2767-72.
67. Noel TC, Sheng C, Yost CK, Pharis RP, Hynes MF. *Rhizobium leguminosarum* as a plant growth-promoting rhizobacterium: direct growth promotion of canola and lettuce. *Can J Microbiol.* (1996) 42(3):279-83.
68. Bano N, Musarrat J. R Characterization of a new *Pseudomonas aeruginosa* strain NJ-15 as a potential biocontrol agent. *Curr Microbiol.* (2003) 46(5):324-8.
69. Patten CL, Glick BR. Regulation of indoleacetic acid production in *Pseudomonas putida* GR12-2 by tryptophan and the stationary-phase sigma factor RpoS. *Can J Microbiol.* (2002) 48(7):635-42.
70. Patten CL, Glick BR. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl Environ Microbiol.* (2002) 68(8):3795-801.
71. Tam YY, Normanly J. Overexpression of a bacterial indole-3-acetyl-L-aspartic acid hydrolase in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant.* (2002) 115(4):513-522.
72. Sergeeva E, Liaimer A, Bergman B. Evidence for production of the phytohormone indole-3-acetic acid by cyanobacteria. *Planta.* (2002) 215(2):229-38.

73. Pal KK, Tilak KV, Saxena AK, Dey R, Singh CS. R. Suppression of maize root diseases caused by *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium moniliforme* and *Fusarium graminearum* by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiol Res.* (2001) 156(3):209-23.
74. Ansari MM, Sridhar R. Related Articles, Links. Some tryptophan pathways in the phytopathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Folia Microbiol (Praha)*. (2000)45(6):531-7.
75. Mayak S, Tirosh T, Glick BR. Effect of Wild-Type and Mutant Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on the Rooting of Mung Bean Cuttings. *J Plant Growth Regul.* (1999) 18(2):49-53.
76. Zakharova EA, Shcherbakov AA, Brudnik VV, Skripko NG, Bulkhin NSh, Ignatov VV. Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*. Insights from quantum chemistry. *Eur J Biochem.* (1999) 259(3):572-6.
77. Chou JC, Mulbry WW, Cohen JD. The gene for indole-3-acetyl-L-aspartic acid hydrolase from *Enterobacter agglomerans*: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet.* (1998) 259(2):172-8.
78. Manulis S, Haviv-Chesner A, Brandl MT, Lindow SE, Barash I. Differential involvement of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in pathogenicity and epiphytic fitness of *Erwinia herbicola* pv. *gypsophila*. *Mol Plant Microbe Interact.* (1998) 11(7):634-42.
79. Zimmer W, Wesche M, Timmermans L. Identification and isolation of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene from *Azospirillum brasilense* Sp7: sequencing and functional analysis of the gene locus. *Curr Microbiol.* (1998) 36(6):327-31.
80. Brandl MT, Lindow SE. Cloning and characterization of a locus encoding an

- indolepyruvate decarboxylase involved in indole-3-acetic acid synthesis in *Erwinia herbicola*. *Appl Environ Microbiol.* 1996 Nov;62(11):4121-8.
81. Patten CL, Glick BR. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can J Microbiol.* 1996 Mar;42(3):207-20. Review.
82. Oberhansli T, Dfago G, Haas D. Indole-3-acetic acid (IAA) synthesis in the biocontrol strain CHA0 of *Pseudomonas fluorescens*: role of tryptophan side chain oxidase. *J Gen Microbiol.* (1991) 137 (Pt 10) 2273-9.
83. YOUNES ALAMI and Wafa ACHOUAK (2000) Rhizosphere Soil Aggregation and Plant Growth Promotion of Sunflower by Exopolysaccharide-Producing *Rhizobium* sp. Strain Isolated from Sunflower Roots. *Applied and Environmental Microbiology* 66. 3393-3398
84. Michael G palmgren (2000) Plant Plasma Membrane H⁺-ATPase:Powerhouses for Nutrient Uptake. *Annu. Rev. Plant Mol. Biol* 52. 817-845
85. Seerrano, R. (1989) Structure and Function of Plasma Membrane ATPase. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40. 61-94
86. Vera V. Chelysheva and Irina N. Smolenskaya (1999) Role of the 14-3-3 proteins in the regulation of H⁺-ATPase activity in the plasma membrane of suspension-cultured sugar beet cells under cold stress. *FEBS Letters.* 456. 22-26
87. Martine Miquel and Douglas James (1993) *Arabidopsis* requires polyunsaturated lipids for low temperature survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90. 6208-6212
88. Wada H and Murata N (1998) Membrane lipids in cyanobacteria. In *lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics.* Kluwer Academic Publishers.65-81
89. Nishida I and Murata N (1996) Chilling sensitivity in plants and

- cyanobacteria: the crucial contribution of membrane lipids. *Ann Rev Plant Physiology Plant Mol Biology* 47. 541-568
90. M. Schloter and W. Wiehe (1997) Root colonization of different plants by plant-growth-promoting *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii R39 studied with monospecific polyclonal antisera. *Applied and Environmental Microbiology*. 2038-2046
 91. Hartmann A. and M. Fernandes (1983) Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indole acetic acid. *Can. J. Microbiol* 29. 916-923
 92. Häflich G. and H. H. Glante (1992) phytoeffective combination effects of symbiotic and associative microorganisms on leguminous plants. *Symbiosis* 14. 427-438
 93. Tien T. and M. Gaskins (1979) Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet. *Appl. Environ. Microbiol* 37. 1016-1024
 94. Okon Y. (1987) Microbial inoculants as crop-yield enhancers. *Crit. Rev. Biotechnol* 6. 388-401
 95. Ferreira M. and M. Fernandes (1987) Role of *Azospirillum brasilense* nitrate reductase in nitrate assimilation by wheat plants. *Biol. Fertil. Soils* 4. 47-53
 96. Andreas Schaller and Claudia Oecking (1999) Modulation of plasma membrane H⁺-ATPase activity differentially activates wound and pathogen defense response in tomato plants. *The Plant Cell* 11. 263-272
 97. Jeff C. young and Natalie D. DeWitt (1998) A transgene encoding a plasma membrane H⁺-ATPase that confers acid resistance in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Genetics* 149. 501-507
 98. Zimmer W, Aparicio C, Elmerich C. Relationship between tryptophan

- biosynthesis and indole-3-acetic acid production in *Azospirillum*: identification and sequencing of a *trpGDC* cluster. *Mol Gen Genet.* (1991) 229(1):41-51.
99. Prinsen E, Chauvaux N, Schmidt J, John M, Wieneke U, De Greef J, Schell J, Van Onckelen H. Stimulation of indole-3-acetic acid production in *Rhizobium* by flavonoids. *FEBS Lett.* (1991) 22:282(1):53-5.
100. Koga J, Adachi T, Hidaka H. Molecular cloning of the gene for indolepyruvate decarboxylase from *Enterobacter cloacae*. *Mol Gen Genet.* (1991) 226(1-2):10-6.
101. Sharma A, Johri BN. Growth promoting influence of siderophore-producing *Pseudomonas* strains GRP3A and PRS9 in maize (*Zea mays* L.) under iron limiting conditions. *Microbiol Res.* (2003) 158(3):243-8.
102. Weinberg ED. Iron chelation in chemotherapy. *Adv Appl Microbiol.* (2003) 52:187-208. Review.
103. Aguilar, C.A. and J.M. Barea. 1997. Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: significance and potentials. 1997. *Scientia Horticulture* 68:1-24.
104. Saring, S., Y. Kapulnik. and Y. Okon. 1988. Improvement of the water status and yield of field-grown grain sorghum (*Sorghum bicolor*) by inoculation with 139. *Azospirillum brasilense*. *J. Agric . Sci. (Cantab.)* 110:271-177.
105. Baker, R. and F.M. Scher. 1986. Enhancing the activity of biological control agents. In *Innovative Approaches to Plant Disease Control*(I. Chet, Ed.). Wiley, Nw york, pp. 1-18.
106. Barber, D.A. and J.M. Lynch. 1977. Microbial growth in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* 9:305-308.
107. Brown, M.E. 1974. Seed and root bacterization. *Annu. Rev. Phytopathol.* 12:181-197.
108. Schroth, M.N. and J.G. Hancock. 1982. Disease-suppressive soil and

- root-colonizing bacteria. *Science* 216(25):1376-1381.
109. Suslow, T.V. 1982. Role of root-colonizing bacteria in plant growth. In *Phytopathogenic Prokaryotes Vol. 1*, Academic Press, New York, pp. 187-223.
110. Willy, L., Y. Okon. and R.W.F. Hardy. 1983. Enhanced mineral uptake by *Zea mays* and *Sorghum bicolor* roots inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45(6): 1775-1779.
111. 조자용. 1998. 식물생장 촉진 근권 미생물의 검색, 분리 및 근권처리가 수경재배 오이와 토마토의 생장과 발육에 미치는 영향. 전남대학교 박사학위논문. pp. 108-113.
112. 최영수. 1995. 길항미생물제제의 처리가 작물의 생육과 수량에 미치는 영향. 전남대학교 농화학과 석사학위논문.
113. Dashti, N., F. Zhang., R. Hynes and D.L. Smith. 1997. Application of plant growth-promoting rhizobacteria to soybean (*Glycine max* (L) Merr.) increases protein and dry matter yield under short-season conditions. *Plant and Soil* 188(1):33-41.
114. Duff, R.B., D.M. Webley and R.O Scott. 1963. Solubilization of minerals and related materials by 2-ketogluconic acid-producing bacteria. *Soil Sci.* 95:105-114.
115. 小林達治. 1992. 有機營養栽培論. *ハイドロポニックス* 6(1) :40-45.
116. Gerretsen, F.C. 1948. The influence of microorganisms on the phosphate intake by the plant, *Plant and Soil* 1(1): 51-81.
117. 山崎肯哉. 1991. 根圏生態からみた養液栽培(1). *ハイドロポニックス* 4(2):103-104.
118. Glick, B.R., C.P. Liv., S. Ghosh and E.B. Dumbroff. 1997. Early development of canola seedling in the presence of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* Gliz-z. *Soil Biology and Biochemistry*

- 29(8):1233-1239.
119. Howell, C. R. and R. D. Stipanovic. 1979. Control of *Rhizoctonia solani* in cotton seedling with *Pseudomonas fluorescens* and with antibiotic produced by the bacterium. *Phytopathology* 69:480-482.
 120. Kapulnik, Y., R. Gafny. and Y. Okon. 1983. Effect of *Azospirillum* spp. inoculation on root development and NO₃ - uptake in wheat (*Triticum aestivum* cv. Miriam) in hydroponic system. *Can. J. Bot.* 63:627-631.
 121. 김태우. 1992. 혐기성 광합성 세균의 bio fertilizer로서의 이용. 경북대학교 농화학 과 석사학위논문.
 122. Kloepper, J.W. and M.N. Schroth. and T.D. Miller. 1980. Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathology* 70:1078-1082.
 123. Kloepper, J.W., R.Lifshitz. and M.N. Schroth. 1988. *Pseudomonas* inoculants to benefit plant production. *Anim. Plant Sci.* 60-64.
 124. Suslow, T.V. and M.N. Schroth. 1982. Rhizobacteria of sugarbeets; effects of seed application and root colonization on yield. *Phytopathology* 72:199-206.
 125. Krieg, N.R and J.G. Holt. 1984. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Williams and Wilkins, baltmor. pp. 215-232.
 126. Lazarovits, G. and J. Nowak. 1997. Rhizobacteria for improvement of plant growth and establishment. *HortScience* 32(2): 188-192.
 127. 이창호. 1995. 토양전염성 식물 병원균에 대한 길항 미생물의 분리 및 길항 미생물로부터 생산되는 항균물질의 분리. 대구대학교 농화학 과 석사학위논문.
 128. 이창훈. 1995. 토양미생물에서 생리활성 성분의 분리 및 구조 연구. 서울대학교 약학과 박사학위논문.
 129. Lesinger, T. and R. Margraff. 1979. Secondary metabolites of the fluorescent pseudomonads. *Microbiol. Rev.* 43:422-442.

130. Lifshitz, R., J.W. Kloepper., M. Kozlowski., C. Simonson., J. Carlson., E.M. Tipping. and I. Zaleska. 1987. Growth promotion of canola(rapeseed) seedling by a strain of *Pseudomonas putida* under gnotobiotic conditions. Can.J. Microbiol. 33:390-395.
131. Lynch, J.M. 1982. Interaction between bacteria and plants in the root environment. Soil. Appl. Bacteriol. Symp. Ser. 10:1-23.
132. van peer, R. and B. Schipper. 1988. Bacteria in hydroponic system: Effects on plant growth. ISOSC Proc. pp. 375-384.
133. Marcelis, L.F.M. 1994. Effects of fruit growth, temperature and irradiance on biomass allocation to the vegetative parts of cucumber. Neth. J. Agri. Sci. 42:115-123.
134. Martin, J.K. 1973. The influence of rhizosphere microflora on the availability of ^{32}p -myoinositol hexophosphate phosphorus to wheat. Soil Biol. Biochem. 5:473-483.
135. Nielands, J.B. 1981a. Iron absorption and transport in microorganisms. Annu. Rev. Nutr. 1:27-46.
136. Nielands, J.B. and S.A. Leong. 1986. Siderophores in relation to plant growth and disease. Annu. rev. Plant physiol. 37:187-208.