최 종
연구보고서

고품질 농작물 생산체제에서 식물병방제를 위한 환경친화형 미생물 농약 개발

Development of Ecologically compatible Biopesticide for Controlling Plant Disease under high Quality Crop Production System

세부과제명 :

1. **종자처리용 미생물 농약 개발**
2. **토양처리용 미생물 농약 개발**
3. **원예작물 저장병 방제 미생물 농약 개발**
4. **미생물 유래 천연 살균제 개발**

주관연구기관

경상대학교 농과대학

농 림 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 고품질 농작물생산체제에서 식물병 방제를 위한 환경친화형 미생물 농약 개발에 관한 연구의 최종보고서로 제출합니다.

1998 . 12 . .

주관 연구 기관 : 경 상 대 학 교
총괄연구책임자 : 박 창 석
세부연구책임자 : 정 영 륜
세부연구책임자 : 김 희 규

협동연구기관명 : 고 려 대 학 교

협동연구책임자 : 황 병 국

요 약 문

Ⅰ. 제 목

고품질 농작물 생산체제에서의 식물병 방제를 위한 환경친화형 미생물농약개발

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 중요성

제 1 절 연구개발의 목적

1. 환경에 안전된 종자처리용 미생물 제제의 개발
2. 종자처리에 의한 작물생장촉진과 식물병의 생물적 방제
3. 토양병을 효과적으로 억제하는 길항미생물의 개발
4. 식물표면 정착 미생물을 활용한 원예작물의 저장성병 방제
5. 우수한 항지균성 물질 생산균주 선발 및 물질분리 탐색
6. 항균성 물질을 활용한 식물병 방제용 천연 살균제 개발

제 2 절 연구개발의 중요성

1. 고품질 농업생산에서 병해충의 방제는 가장 중요한 기술이며 안전한 무공해 농산물을 생산하기 위해서 미생물 농약의 활용이 반드시 고려되

어야 한다. 미생물 농약의 시장 점유물은 점차 확대되고 있으며 앞으로 우수한 미생물을 사용함에 있어서 막대한 기술료를 지불해야 할 전망이다.

2. 종자에 미생물을 처리하여 작물의 생장을 촉진시키고 식물병을 방제하는 기술은 매우 간편하면서도 활용도가 높은 기술로서 선진국에서는 앞다투어 이 분야의 기술을 확보하였고 치열하게 경쟁하고 있다.

3. 토양병을 현재 개발된 농약으로 방제효과가 매우 낮으며 처리 방법에도 많은 문제점이 있기 때문에 토양에 처리하는 미생물 제제의 개발은 새로운 재배법 도입과 함께 반드시 개발되어야 한다.

4. 원예작물뿐만 아니라 수확 후 저장성병에 대해서는 농약 사용이 극히 제한되어 있으므로 표면 정착 미생물을 활용한 저장병의 방제는 생물적 방제의 새로운 영역으로 새로운 미생물 자원 개발과 함께 수확 후 병 방제가 절실히 필요하다.

5. 항균성 물질을 생산하는 우수한 균주의 개발은 모든 나라에서 경쟁적으로 시도하고 있으며 천연 살균제의 개발은 엄청난 부가가치를 창출하는 연구이다.

6. 생물적 방제를 포함하는 병해충의 종합 방제 기술은 농업의 선진성을 과시하는 선도적 농업기술으로써 우리 농산물의 우수성을 인식시켜 농작물 수출에 기여할 수 있다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

제 1 장 종자처리용 미생물농약의 개발

1. 우수한 종자처리 미생물의 선발.

가. 종자와 식물의 근권에 정착 능력이 우수한 미생물.

나. 길항력이 우수하여 토양전염병을 억제할 수 있는 미생물.

다. 식물의 생장을 촉진시키는 능력이 우수한 미생물.

2. 미생물의 근권 정착과 병 발생 억제 기작 규명.

가. 선발한 미생물의 종자에서부터 뿌리로 이동하고 확산하면서 증식하는 과정을 추적.

나. 근권정착과 관련된 기작 규명.

다. 토양병원균에 대한 억제 기작 규명.

3. 미생물의 종자처리 기술 개발.

가. 근권정착능력을 향상시키는 종자처리 기술 개발.

나. 종자처리된 미생물의 생존력을 향상시키는 기술 개발.

4. 실용화를 위한 병 발생억제 및 식물 생장촉진 효과검정.

가. 대상 식물 : 벼, 보리, 밀, 참깨, 오이, 고추.

나. 실내 및 온실 실험: 실내의 폿트 실험과 온실에서의 소규모 토양 실험과 온실을 통하여 방제 및 생장촉진 효과를 검정.

다. 경상대학교 부속농장 및 농가포장을 활용한 생장촉진 및 병 방제

효과 검정.

라. 각 대상 작물별 3개 이상의 포장에서 선발한 균주에 대한 효과검정.

제 2 장 토양처리용 미생물 농약 개발

1. 병원균 세포벽 분해 길항미생물의 분리.

가. 세포벽의 주요 성분인 chitin을 영양원으로 하는 미생물을 국내 토양으로부터 분리.

나. chitin 분해 미생물중 병원균 균사 생장 억제효과 검정 및 길항균의 분리.

2. 길항미생물의 발병억제 효과 조사.

가. 길항균 현탁액 또는 임시 제제화 하여 직접 토양에서 억제효과 조사.

3. 토양처리용 제제방법 개발.

가. 미생물 보존과 선택적 증식을 위한 부재료 선발.

나. 선발된 부재료를 이용하여 미생물의 제제화.

4. 길항미생물 대량 증식용 재료 선발 및 조건 확립.

가. 미생물 대량 증식을 위한 경제적 배지 조성 개발.

5. 제제 종류별, 보관 기간별 효과조사.

가. 제제 종류별로 발병억제 효과 조사.

나. 냉장고, 실온에 보관 기간을 달리한 시료의 억제효과 조사.

6. **길항미생물의 밀도변화 조사.**

가. 길항미생물의 환경내 동태 관찰을 위해 항생제 내성균을 선발

나. 이 미생물을 이용하여 제제화 한 후 시간별로 밀도변화 조사.

7. **실용화를 위한 제제의 온실 및 포장실험.**

가. 실제 농가포장 또는 온실에서 미생물제제를 처리하여 병억제 효과 조사.

제 3 장 원예작물 저장병 방제 미생물 농약 개발

1. **생육기 발생 병원균과 표면 미생물 집단의 생태.**

가. 저장중의 병원 미생물 발생 생태 조사.

나. 병원균 분리 동정.

다. 길항 미생물 선발.

2. **표면정착 우점 미생물의 특성 검정과 저장병의 생물적 방제활용 기능성 탐색.**

가. 문제점 파악을 위한 접근 방법의 타당성.

나. 생태계 적응형 미생물 개발.

1) 분리된 길항균의 길항능력 검정.

2) 저장성 병원균의 특성 연구.

3) 선발된 길항균의 포장 적응.

4) 포장 시험에서 길항균의 밀도변화 조사.

다. 방제효과 검정.

1) 수확 후 길항균의 효과 검정.

라. 효과적인 병조사를 위한 INDEX 개발.

3. 생물적 방제활용 가능성 탐색 및 저장성병 억제 미생물의 특성 검정.

가. 채소 정착 우수 미생물의 특성 검정.

나. 저장병원균의 전염원과 유용 길항균의 경합 연구.

다. 선발 미생물의 항균활성 유지기술의 실용화 연구.

제 4 장 미생물 유래 천연살균제 개발

1. 길항 미생물의 밀도 조사

가. 갯벌지역과 동굴지역같이 일반 육지토양과는 방선균의 생육환경이 달라 여러 속의 희귀 방선균이 서식할 가능성이 높은 것으로 알려져 있는 다양한 서식지에서의 길항 미생물의 밀도 조사.

2. 길항 미생물의 선발 및 동정

가. 식물병원 진균에 대한 항균효과가 뚜렷한 길항 미생물을 선발·동정.

3. 항균물질 분리

가. 선발된 길항 방선균으로부터 항진균 활성물질을 순수분리·정제.

4. 구조식 추적

가. 밝혀진 항진균 활성물질의 분자량의 화학구조를 밝힘.

5. 병방제효과 실험

가. 순수분리한 항균성 항생물질의 식물병 방제용 농용항생제로서의 사용 가능성을 식물병 방제 효과

나. 실험을 통해 확인하여 새로운 미생물 유래 천연살균제를 개발.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

제 1 장 종자처리용 미생물농약의 개발

제 1 절 연구개발 결과

1.유용미생물 선발 및 동정

본 연구에서 선발하고자 하는 길항 미생물은 단순히 종자에만 처리하여도 발아하는 종자의 유근을 따라 작물 근권전체에 잘 정착하는 유용 미생물을 선발하려는 것이다. 근권에 잘 정착하는 미생물을 종자에 처리한다는 것은 미생물을 토양이나 다른 식물체에 처리하는 것에 비하여 훨씬 적은 량만 가지고도 작물 전체 근권에 고르게 미생물을 공급할 수 있는 유리한 점이 있다.

가. 균주 채집 및 유용미생물 선발

1) 경상남도와 전라남도를 대상으로하여 남부 지방 66개 지역에서 1996년부터 1997년 까지 밀, 보리 뿌리를 채집하여 80도 이상의 온도에서도 살아남은 근권 미생물을 총 3197균주를 얻었다.
이들 미생물들은 대부분 저온에서 잘 자랐으며, 생장속도가 매우 빠르고 1/10 TSA배지에서 잘 자랐다.

나. 분리한 미생물의 병원균에 대한 길항 능력 검정

1) 선발된 균주들은 우선 주요한 토양병균에 대한 길항능력을 실내에서 평가하였다. 토양 병원균들 중에서 어디든지 많이 분포하면서 여러가지 작물에 큰 피해를 주는 *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia*

solani, *Fusarium oxysporium* 등에 대하여 평가하였다.

2) 선발된 3211균주 중 *P. ultimum*에 대해서는 31균주, *R. solani*에 대해서는 365균주, *F. oxysporium*에 대해서는 101균주가 병원균에 대하여 균사 생장을 억제하였고, 이 중 16균주는 3가지 병원균 대하여 모두 균사 생장 억제 능력을 가지고 있었다.

다. 분리한 미생물의 근권정착 능력 검정

1) 연구진이 개발한 이중 여과지법(Double Layered Filterpaper)으로 선발한 모든 균주에 대하여 근권정착 능력을 검정하였다. 예상하였던 것처럼 내생포자를 형성하는 세균들은 근권에 정착하는 비율이 매우 낮았으며 전체적으로 근권정착력이 왕성한 균주는 3197균주 중에서 49균주에 불과하였다.

라. 미생물의 작물 생장 촉진효과 검정

1) 선발된 3197균주 중에서 무처리에 비하여 오이생장을 촉진시킨다고 인정되는 균주를 34개 선발하였고 기존에 작물생장 촉진능력을 갖고 있다고 인정되는 M45 보다도 더 효과가 큰 16균주를 추가로 선발하였다.

마. 선발된 미생물의 동정

1) 지질의 특성에 따라 분류하는 MIDI system에 의해서 일차적인 동정 작업을 하였다. 특히 선발과정에서 내열성을 갖는 포자형성균들만 선발하였으므로 비슷한 세균군인 *Bacillus*속과 *Paenibacillus*속에 해당되는 균주들을 대상으로 하였다. 이와 함께 생장촉진 효과와 근권정착 능력이 우수하다고 인정되었던 *Pseudomonas*속 균주 44개에 대해서도 MIDI system과 영양원의 이용 능력에

따라 분류하는 Biolog system을 이용하여 동정하였다.

2) 각종 실내 실험과 온실실험, 그리고 소규모 포장실험을 통하여 주요 토양병원균에 대한 길항능력이 인정되고 오이 뿐만아니라 참깨, 당근, 고추, 벼, 시금치 등 다른 작물의 근권에서 정착능력도 우수하며, 이들의 유묘 생장을 촉진시킨다고 인정된 우수한 균주로서 E-606, E-681, G-157, H210 등의 내생포자 형성 세균과 B16, MC07, M45 등의 *Pseudomonas*속 세균을 선발하였다. 이들 중 *Paenibacillus polymyxa* E681과 *Pseudomonas fluorescens* B16은 종자처리에 의한 병 방제와 작물생장 촉진 세균으로 균주특허를 출원하였다.

2. 미생물의 종자처리와 근권정착

가. 종자처리 기술 개발

1) L22와 E681을 종자처리한 후 종자에서 미생물의 생존력을 조사하였을때, E681은 내생포자를 형성하여 종자 처리한 후 200일 이상 종자에서 일정한 밀도로 유지하였지만, L22는 종자처리 후 종자에서의 밀도가 급격히 감소하여 7일 이후로는 재분리할 수 없었다.

2) 분말형 첨가제 중 perlite와 talc는 종자에서 L22의 생존력을 균현탁액에 침종한 처리보다 23일, bentonite는 53일 더 향상시킬 수 있었다. 접착제인 xanthan gum 처리시 L22의 생존력을 23일, 고추에서는 17일, 볍씨에서는 20일 더 향상시킬 수 있었다.

3) 미생물들을 분말형 종자 첨가제와 혼합 처리하였을 때 근권에서 L22와 E681의 정착밀도는 균현탁액에 침종한 처리보다 더 낮았다. 이러한 결과는 오이외에 고추, 볍씨에서도 동일한 결과를 얻었다.

4) 종자 처리 직후 L22와 E681은 종자 내부에 이미 정착하고 있었고, 완전한 종자와 종피가 제거된 종자 모두 뿌리에서 10^5이상의 밀도를 유지하고 있었다. 처리된 미생물은 종자표면 뿐만 아니라 종자내부에서도 빠른 증식을 하였고 종자내부에 정착한 균만으로도 충분한 근권정착밀도를 유지할 수 있었다. 이 실험의 결과로 침종과정중 미생물은 종자 내부에 정착하고 증식하여 유근에서의 미생물의 정착밀도에 직접적으로 영향을 끼친다는 것을 알수 있었다.

5) 종자를 L22와 E681의 균현탁액에 침종시킨 후 XG로 처리하였을 때 뿌리 전반적으로 세균의 정착밀도가 높았고, 특히 뿌리의 근단에서 그 정착밀도가 다른 종자처리에 비해 가장 높았다.

나. 근권정착 기작 규명

1) *Lux* gene이 도입된 *P. fluorescens* L22를 오이와 보리에 종자처리하였을 때, 뿌리의 주근과 측근 전반적으로 정착하였으며 증식한 균을 효과적으로 확인할 수 있었다. *P. fluorescens* L22는 모균주인 *P. fluorescens* B16에 비해 근권정착밀도가 다소 떨어졌지만 오이에 종자처리하였을 때 지상부 생체 중은 *P. fluorescens* B16보다 오히려 더 증가되었다.

다. 균의 존재양상 관찰

1) 주사전자현미경으로 종자처리 후 미생물의 존재양상을 알아보았을 때, *Ps. fluorescens* L22와 *P. polymyxa* E681은 종자 처리 직후 종자표면 뿐만 아니라 종자내부에 무작위적으로 부착하였고, 시간의 지남에 따라 종자내부에 정착한 균은 상당히 빠른 증식을 하여 높은 밀도를 유지하였다. 내부에서 증식한 균은 유근의 결을 따라

정착하여 증식하고 있음을 확인하였다. 이렇게 정착한 균들은 지속적으로 증식하면서 뿌리 전반적으로 확산되는 것으로 보여진다. SEM의 관찰을 통해 침종과정에 종자내부로 들어간 균들은 유근이 출현하기 전에 높은 밀도로 증식하고, 증식한 균들은 유근으로 직접적으로 이동한다는 것을 확인할 수 있었다.

2) E681을 종자처리한 후 오이뿌리에 존재하고 있는 양상을 Immunofluorescence microscopy, confocal laser scanning microscopy(CLSM)를 이용하여 관찰하였을 때, 뿌리표면에 많은 균들이 뿌리의 결을 따라 정착을 하고 있었다. 주근에 정착하였던 *P. polymyxa* E681이 측근이 나옴에 따라서 그 지점의 밀도가 높아지고 측근이 생장함에 따라 측근쪽으로 이동하는 것을 관찰하였다. 또한 뿌리조직 내부의 세포간극 사이에도 균이 존재하고 있는 것이 관찰되었다.

다. 미생물에 의한 지상부병 저항성 유도 균주 선발

1) PGPR효과가 인정되는 최종 8개 균주를 대상으로 오이 탄저병에 대한 유도저항성을 검정하였다. 종자처리에 의한 탄저병 유도저항성 균주로 94X01, CHa94, M45등이 가능성 있는 것으로 나타났다.

3. 미생물의 종자처리에 의한 작물의 생장촉진 및 병방제

가. 보리, 밀의 생장촉진 및 병 방제

1) 본 연구를 통하여 선발된 *Paenibacillus polymyxa* E681과 G157, 그리고 *Pseudomonas fluorescens* L22을 보리종자에 처리하여 경상남도 진흥원 포장에 파종하여 파종 15일 후 입모율을 조사한 결과 무처리에 비해 유묘의 생장이 현저하게 증가되었으며 단위 면적당

더 많은 수의 입모를 보였다.

2) 1997년의 결과는 예년에 비해 기온이 다소 높아서 무처리에 비해 큰 차이를 볼수 없었지만 현재 진행중인 1998년의 결과는 1996년에 실험하였던 것과 비슷한 결과를 보이고 있다.

3) 월동 전후의 유묘무게와 지상부의 길이를 조사한 결과 월동전, 월동후, 분얼시기, 모두 무처리에 비해 현저한 차이를 보였다. 분얼경수는 월동후인 3월 10일 경부터 큰 차이를 보였다.

4) 미생물 처리구는 출수일에서도 무처리구에 비해 평균 7일 이상 앞당겼고, 직접적으로 수량에 영향을 미치는 것으로 알려진 유효분얼경수 조사에서도 E681은 무처리에 비해 25%로 높게 나타났다.

5) E681은 파종 150일까지 근권에서 104 cfu/g root 정도의 밀도를 유지하였지만 *Pseudomonas* 종인 B16은 파종 한달 후 그 밀도가 급격히 감소하여 그 이후 근권에서 분리할 수 없었다. E681 처리에 의한 보리 생산량에 있어서 가장 많은 차이를 보인 것은 평균수량이 무처리가 361.12kg/10a인데 비해 50 3.8kg/10a로 39.5%의 증수율을 보였다.

6) 1997년 11월부터 1998년 5월까지 같은 실험을 반복한 결과 미생물 처리구는 출수일에서 무처리구에 비해 평균 1-3일 정도 앞당겼다. 보리와 밀의 평균수량에 있어서 무처리구에 비해 보리에서 E681과 L22은 각각 5, 6%의 증수효과를 보였으며 밀의 경우 각각 28, 14%의 증수효과를 보여 주었다. 이는 1997년도 겨울의 평균온도가 높았으며 출수기후 잦은 강우로 정상적인 결실을 맺지 못했기 때 문인 것으로 추정된다.

나. 고추의 생장촉진과 병방제

1) 선발된 미생물 종자처리 방법으로 고추에 도입하여 상업적으로 운영되고 있는 플러그육묘장에서 재배하면서 초기생장을 조사하였다. 50일된 유묘에서 L22의 경우 무처리에 비해 지상부와 지하부의 생체중과 건물중에서 15 51%, E681의 경우 25 73%의 생장촉진 효과를 보였고, 초장은 2 3㎝가 길었고, 엽수는 1 2장이 많았다.

2) 수량과 직접적인 연관이 있는 꽃망울 수에서는 무처리와 비교해 L22는 2개, E681은 2.5개 정도 많았다.

3) 1996년도에 6회에 걸친 풋고추의 누적생산 수량을 조사한 결과 L22는 무처리와 비교해 30 40%, E681은 170%의 수량증대를 보였고, 1997년 8회에 걸친 풋고추의 누적생산 수량은 L22와 E681 모두 무처리와 비교해 40 50%의 수량증대를 보였다.

4) 파종에서부터 정식직전의 50일 된 유묘의 근권에서 E681은 104 cfu/root의 밀도를 일정하게 유지하였고, L22는 10일된 유묘의 근권에서는 103cfu/root로 밀도가 떨어졌지만 그후 밀도를 회복하기 시작하여 50일된 유묘에서는 104cfu/root의 밀도를 유지하였다.
정식에서부터 수확말기까지 고추의 근권에서 처리한 미생물 L22와 E681은 104 5cfu/root의 밀도를 유지하였다.

5) 생장촉진과 근권정착 능력에 대한 효과를 보여주었던 E681 균주와 L22 균주 를 고추역병균(*Phytophthora capsici*)에 대한 억제능력을 실험한 결과, 배지상에서 E681 균주는 강한 억제력을 보인 반면, L22 균주는 역병균에 대한 억제효과가 없었다. 그러나 고추역병이 자주 발생한 포장에 E681과 L22 균주를 고추종자에 처리하여 정식 45일 후 병발생을 관찰한 결과 L22 처리구는 E681 처리구와

무처리구에 비해 실제 농가 실증실험에서 80% 이상의 역병 억제 효과를 보였다.

다. 참깨의 생장촉진 효과

1) 과립재료 Clay와 Vermiculite가 발아율과 미생물의 종자표면에서의 생존을, 그리고 뿌리에서의 근권정착 밀도에서 다른 처리에 비해 우수하였다. 점착제로는 1 % PVA를 선발하였고 선발된 조합과 M45과 E681을 참깨종자에 과립처리하여 연작지 토양을 사용한 미생물 처리구는 Pot시험과 포장실험에서 발아율이 무처리에 비하여 40-60% 높았다.

2) 전체적으로 관행에 비하여 경장과 착삭부위장이 10㎝이상 길어져 지상부 생육이 양호한 것으로 나타났다. 미생물간에는 M45가 E681에 비해 지상부 생육이 좋고 포장의 병해 발생은 미생물 접종처리가 엽고병의 병반과 역병의 발생정도가 적었다.

3) 파종 78일 후 M45 , E681 각각 76%, 92%정도로 무처리 45%에 비해 건전주의 수가 월등히 많았다. 최종적으로 평균 수량에 있어서 무처리에 비해 E681과 M45의 경우 각각 74.4kg/10a, 79.5kg/10a이며 무처리가 66.8kg/10a로 11.3, 19%의 증수율을 보였다.

4) 1998년 5월부터 9월까지 전국 각 지역으로 포장실험을 실시하였는데 조사한 포장 거의 모두에서 E681의 처리구는 무처리에 비해 간장과 이삭길이가 길고, 꼬투리수가 많았다. 수확량에도 그 효과가 이어질 것으로 믿어졌는데 수확기를 전후로 하여 전국에 걸친 기후 이상으로 그 수량을 정확히 측정하지 못하였다.

라. 벼의 생장촉진효과

1) 보리와 고추에 생장촉진 효과가 인정된 E681, G157, H210균주중 1차 선발에서 벼의 생장촉진효과가 있는 H210을 선발하여 공시하고, 일품벼 종자를 사용하였다. 근권정착 능력이 우수한 L22와 벼의 뿌리에서 분리한 F29(미동정)를 공시 균주로 이용하였다.

2) H210, L22, F29를 이용하여 벼의 초기 발아촉진 실험한 결과, 36시간을 전후하여 미생물 처리구에서는 무처리에 비해 각각 22, 14, 11%의 발아촉진 효과가 있었다. 이는 벼 직파재배에 있어서 볍씨가 발아하는 불리한 환경에서 신속하게 뿌리를 내릴 수 있는 여건을 만들어 주는 것으로 실제 포장에서의 활용 가능성이 높다고 생각되어진다.

3) 미생물의 벼 종자처리 후 여과지가 깔린 plate에 놓고, 10일후 벼 종자에 내재되어 있던 종자 전염성 곰팡이에 대한 억제력을 조사한 결과, 미생물 처리구가 benomyl 처리구와 비슷한 수준으로 종자전염성 곰팡이에 대한 억제력을 보였다.

4) H210, L22 그리고 F29를 벼종자에 처리한 후 간척지 토양 중에서 매년 입모가 불량한 지역의 토양을 채취하여 Pot에 담아서 세 균주를 처리하고, 파종 21일째 입모율을 조사하였다. 간척지에서 채집한 토양으로 pot실험을 한 결과, H210과 L22의 처리구는 무처리와 metalaxyl 처리에 비해 입모율을 향상시켰고 특히, H210와 L22는 벼 종자의 초기 발아율 향상에도 효과가 있었다.

5) 1998년 경상대학교 농과대학 부속농장 벼재배 포장에 실험을 실시하였다. H210, B16, L22, F29를 각각 볍씨에 종자처리하여 모판에서 유모기까지 기른후 기계이양법으로 이양하였다. H210과 B6은 무처리에 비해 각각 42.7, 35.6%의 증수 효과를 보여 주었다.

제 2 절 활용에 대한 건의

1. 농림부 : 본 연구에서 보리 밀의 종자처리는 출수단축과 수량 증가가 포장 실험으로 입증 되었고 참깨 종자처리에서도 입모율 확보와 생장 촉진 효과가 인정도었으므로 지방적응 실험을 거쳐 전국에 확대 보급할 것을 건의함
2. 산업체 : 고추의 종자처리 실험은 한미프러그(주)와 진주육묘장(주)을 통하여 미생물을 처리한 프러그묘을 농가에 보급하고 있으며 그 결과를 monitoring하여 본격적인 산업화를 추진하고 있으며 보리 종자처리는 맥주보리 생산을 위하여두산농산(주)과 협의하여 경남과 전남 2개 지역의 육종포장에 시험중.
3. 농업인 : 경상대학교 농업 최고경영자 과정 재학생 및 수료생을 대상으로 미생물 종자 처리제를 농가에 보급학고 있슴.
4. 학계 논문 발표: 한국식물병리학회 1996년부터 1998년 까지 22편의 논문을 구두발표 이중 2개의 논문을 투고 중

   특허출원: 국내 균주특허 2건 출원 (1997. 5, 1998. 12.)

   인력양성: 석사 2명 졸업(류충민, 이상희), 재학 2명(최옥희, 김진우)

제 2 장 토양처리용 미생물 농약 개발

제 1 절 연구개발 결과

1. Chitin 분해력이 우수한 40개 균주 중 병원균 *Rhizoctonia solani* 와 F*usarium oxysporum*에 대한 억제력이 뛰어난 6균주를 선발하였다.

2. 위 6균주를 이용한 미생물 제제는 상토 처리시 무 모잘록병의 방제효과가 높았다. 또 이들 균주의 복합적 증식을 위하여 새우껍질과 왕겨를 혼합하여 퇴비화 하였을 때 퇴비의 발병억제 효과가 높았다.
3. 6균주중 chitin 분해력이 특히 우수한 #300, #385 두 균주를 선발하여 오이 덩굴쪼김병원균 *F. oxysporum*, 무 모잘록병균 *R. solani*에 대한 억제효과를 조사한 결과 병균생장을 현저하게 억제하였다.
4. 두 균주는 세포벽분해 효소인 chitinase와 β-1,3-glucanase를 생산하였으며, 조효소 액에서 병원균 균사분해가 일어났다.
5. 2균주를 배양 후 균체를 동일한 양으로 섞고, 대량 배양용 기질, peat 또는 clay 등으로 제제화 하여 덩굴쪼김병 발병억제 효과를 조사한 결과 평균 80%의 방제가를 나타내었다. 처리양을 달리하여 실험한 결과 6-8g/kg 토양에서도 높은 발병억제 효과를 보였다.
6. 여러 종의 배양기질을 이용하여 소량의 콩가루, 수용성 전분 및 무기염류를 이용할 경우 경제적으로 대량증식이 가능한 배양조건을 확립하였다.
7. 확립된 대량 증식방법을 이용하여 포장실험에 필요한 200리터의 미생물 배양을 하고 균체를 수확하여 제제화 하였다.
8. 제제의 길항미생물 밀도 및 보관성을 검토한 결과 실온에서 6개월간 보관 하여도 미생물 밀도 및 발병억제 활성이 거의 유지되었다.
9. 포장실험에서는 제주도 감자 싹 썩음병 및 양파 모잘록병 방제효과, 딸기 흰가루병 방제효과와 멜론 재배실험에 사용하였다. 길항미생물 제제 현탁액에 씨감자를 침지하고 파종 후 감자 싹썩음병의 발생을조사한 결과 미생물제제 처리에 의해 평균 70%의 발병억제 효과가 있었다. 양파 모잘록병의 경우 종자침지에 의해 80% 방제효과가 있었다(양파시험장과 공동실험). 딸기의 경우 토양에 미생물제제를 처리 후 지상부

열매의 흰가루병 발병율을 조사하였는데 대조구에 비해 평균 32.4%의 병억제 효과가 있었다(충남 농촌진흥원 딸기시험장과 공동 실험). 멜론 재배시 유묘의 경우 초장 및 엽폭이 대조구에 비해 각각 17%, 27% 정도 더 컸으며, 열매를 수확했을 때 개당 중량도 약 10.7% 무거웠다.

10. 이 실험에 사용된 #300 균주는 다른 연구과제 수행 결과 우리나라에만 있는 신규 미생물로 확인되어 그 이름을 *Paenibacillus hallasanae*로 명명하였다.

제 2 절 활용에 대한 건의

1. 농림부 : 본 연구 결과로 만들어진 미생물 제제는 포장 실험에서 발병억제 효과가 아주 높았고, 그 효과의 재현성이 확실하므로 산업화 할 계획임. 따라서 추가로 포장실험, 독성실험, 등록실험 등을 위한 추가 연구비 지원이 필요함.
2. 산업체 : 본 연구 결과의 산업화를 추진 중인 Fine International (주)에 전용 실시권을 계약하였슴.
3. 농업인 : 이 미생물 제제는 환경친화형 토양병 방제 약제이므로 농업생산에 적극 활용될 수 있을 것임.
4. 학계 논문 발표: 미국식물병리학회지 Phytopathology 89:92-99 (1999)와 한국식물병리학회의 '식물병과 농업' 4권 1호(1998)에 발표.
   특허출원: 국내 발명특허 2건 출원 (1997. 6. 20, 1998. 8. 6)
   인력양성: 석사 4명, 박사후 과정 1명 양성

제 3 장 원예작물 저장성 병방제 미생물 농약개발

제 1 절 연구개발 결과

양파, 마늘의 저장 중 발생하는 부패병을 방제하기 위하여 먼저 문헌을 조사한 결과 무름병(*Erwinia carotovora*)에 대한 보고가 대다수를 차지하였다. 하지만 이번 연구수행중 저장, 판매되고 있는 양파, 마늘의 부패병 조사한 결과 양파, 마늘 모두 뿌리를 통하여 감염하여 저장 중에 발병하는 *Fusarium oxysporum*의 피해가 더 많음을 알 수 있었다(Table 1-1). 먼저 길항균 선발을 위하여 기주 식물인 양파, 마늘의 생육중 표면 미생물의 분포를 조사하고, 이들 표면 미생물을 분리, 동정하였다(Table 1-5). 그리고 이들 표면 미생물과 기존에 실험실에서 사용하던 길항 미생물을 이용하여, 부패 병원균에 대해 길항력이 있는 *Bacillus amyloliquefaciens* BL3, *Pseudomonas putida* Cha94, *Trichoderma harzianum* TM, *Phaenibacillus polymyxa* BL4등을 길항력이 우수한 균으로 선발하였다(Table 1-6). 저장병원균들의 감염경로를 조사하여, 감염경로를 차단하므로 부패율을 줄이기를 시도하였다. 가장 많은 발병률을 보인 *Fusarium oxysporum*을 감염을 줄이기 위하여 마늘의 종구와 양파의 뿌리를 이식기에 길항균에 침지하여 심었다. 그리고 재배중 처리한 길항균의 밀도를 조사한 결과 BL3, TM, Cha94는 10^4-5의 밀도를 지속적으로 유지하였고, 수확후 농가와 같은 간이 저장을 거쳐 저온고에 저장한 결과 BL3, Cha94, TM의 처리구의 양파, 마늘이 병발생율이 낮았다(Fig.2-5, Fig.2-6). 또 다른 감염경로로 양파의 절단된 줄기를 통해서 감염되는 *Botrytis allii*, *Aspergillus* sp.에 대해서는 TM, BL3의 방제 효과를 보였다(Fig.2-7, Fig.2-8). 마늘에서도 마찬가지로 길항균 처리 후 재배한 결과 저장중 발병이 심한 *Fusarium oxysporium*의 발병이

TM, Cha94에 의해 현저히 억제됨을 알 수 있었다.(Fig.2-9, Fig.2-10). 이들 길항 미생물의 농약 개발 첫과정으로 먼저 선발 미생물의 항균활성 유지 기술개발을 위하여 여러 가지 첨가제, Carboxyl methyl cellulose, Gum xanthan, 톱밥, 미강, Talc, Bentonite, Vermiculater와 혼합한 후 진공, 비진공 상태로 보관하면서 생존밀도를 일정한 간격으로 조사한 결과 BL3, Cha94는 보관상태, 혼합 첨가제에 상관없이 10^{5-6}의 밀도를 지속적으로 유지하였고, TM은 톱밥:미강(8:2)로 보관한 것이 가장 안정한 밀도를 유지할 수 있었다(Fig.3-3 9). 앞의 제형화된 길항 미생물의 포장적용 실험을 위하여 먼저 양파의 종자에 처리하여 실내 발아실험을 실시한 결과 종자의 발아에는 아무런 문제가 없음을 확인한 후 직접 양파의 종자, 마늘의 종구에 처리하여 포장에서 재배 중에 있다(Fig.3-10).

제 2 절 활용에 대한 건의

저장병 방제를 위한 미생물 농약개발을 위해서는 먼저 감염경로 차단을 위하여 선발된 길항 미생물의 적절한 시기 및 감염부위에 처리하여 길항 미생물과 병원균과의 경쟁을 통한 부패병 감소를 이루어 냄으로서 저장병 방제 미생물농약 개발의 가능성을 보여주고 있으며, 이들 길항 미생물을 농산물 수확 후 저장과 유통중에 발생하는 병 방제에 활용함으로 수확물의 신선도를 유지할 수 있을 것이라고 본다. 2년간의 포장실험 수행후 농산물 저장 유통 연구회에 보고하고 실용화를 시도할 것이다.

제 4 장 미생물 유래 천연 살균제 개발

제 1 절 연구개발 결과

식물병원 진균에 대해 항균효과를 지닌 길항 방선균을 선발하기 위하여, 국내 여러지역에서 채집한 동굴토양 및 갯벌토양 시료로부터 다양한 종류의 방선균주를 분리하였다. 주요 식물병원진균에 대한 항균효과를 검정하여 길항 방선균의 속(Genus)별, 서식지별 밀도를 조사하였다. 여러종류의 길항 방선균주 가운데 길항 방선균 Da2균주를 선발하여 여러가지 분류학적 실험을 통해 *Actinomadura roseola*로 동정하였다. 길항 방선균 Da2균주가 생성하는 항균활성 물질의 대량생산 조건, 최적 배지등을 확인하여 다량의 배양액을 생산하였다. 여러 가지 Chromatography법을 사용하여 길항 방선균의 배양액으로부터 항균성물질을 분리,정제하였다. 순화된 항생 물질의 분자량, 화학구조, 특성등을 유기분광학적 방법을 이용하여 분석한 결과, Daunomycin 구조의 항생물질로 규명되었다. Daunomycin은 항암효과를 지닌 항생물질로 알려져 있는데, 본 연구를 통해 여러 식물병원진균에 대해 항균활성을 보이며, 특히 고추역병균에 대해 뛰어난 항균력을 갖고 있음을 구명하였다. 길항 방선균 *Actinomadura roseola*균주 Da2로부터 분리한 항균성 항생물질 Daunomycin은 *in vitro*상에서의 항균활성 뿐 아니라, 온실조건하에서 고추역병에 대해 뚜렷한 방제효과가 나타내어, 새로운 농용항생제로서의 사용가능성을 보여 주었다.

제 2 절 활용에 대한 건의

본 연구를 통해 여러 종류의 서식지로부터 식물병원진균에 항균효과가 있

는 다양한 길항 방선균을 분리함으로서 생리활성 물질탐색 지역을 다양화 할 수 있는 가능성을 밝혔고, 이들 길항 방선균의 배양여액에서 식물병원진균에 대하여 활성을 보이는 항생물질을 효율적으로 분리, 정제하는 기술을 확립함으로서 생리활성 검정을 위한 시료를 대량 확보할 수 있는 기술을 마련하였다. 길항 방선균 *Actinomadura roseola*균주 Da2로부터 분리한 항생물질 Daunomycin은 식물병 방제를 위해 직접 사용가능한 수준의 효과가 있음을 기존의 살균제인 Metalaxyl과 비교평가한 결과를 통해 확인할 수 있었다. 농용살균제로서의 직접 실용화 할수 있을뿐만 아니라, 이 항생물질을 선도물질(lead compound)로 이용하여 항균효과를 증대 시키기 위한 유기합성법에 대한 계속적인 연구를 통해 경쟁력 있는 신규 농용항생제의 개발에 토대가 될 것이다.

인력양성: 석사 1 명, 현재 박사과정 2 명, 현재석사과정 2 명

SUMMARY

Development of Ecologically compatible Biopesticide for Controlling Plant Disease under high Quality Crop Production System

Chapter 1. Development of microbial agents for seed treatment

Section 1. Collection and isolation of useful microbial agents and their identification

We attempted to isolate and develop the biocontrol agent that readily colonized all over the the rhizosphere of various crops from the seed to emerging root after the microorganins inoculate to seed. The seed treatment of root colonizing biocontrol agents enable to deliver to beneficial microorganisms to whole root system very conveniently and much reduced amount of inoculum then soil treatment or foliar application.

1. Collection and isolates of beneficial microorganisms

The barley and wheat roots were collected from 66 different locations mainly from Kyeungsang-namdo and Chollanamdo. Total 3197 bacterial isolates were selected from the roots of barley and wheat on the basis of heat stable, low temperature growth and rapid growth in 1/10 TSA.

2. *In vitro* test for antifungal activity to some soil borne pathogens.

In vitro assay for antifungal activity of collected isolates to major soil born pathogens such as *Pythium, ultimum, Rhizoctonia* and *Fusarium oxysporum* were made in 1/2 PDA plates. Among the 3197 isolates, 31 isolates were showed antinfungal activity against Pythium, 365 isolates for Rhizoctonia and 407 isolates against Fusarium. Among them 16 isolates inhibite all of three fungal pathogens.

3. Assay for root colonizing ability of collected isolates

Primary screening for the root colonizing ability of collected isolates was conducted through Double Layered Filterpaper(DLF) method which developed in our laobratory. The collected isolates were mostly endospore forming bacteria and only a small portion of them were rhizosphere competent. Among the 3197 isolates, only 49 isolates were actively colonized on the cucumber root.

4. Assay for plant growth promoting ability of collected isolates

The plant growth promotion ability of the collected isolates were tested in pot experiments using cucumber seedling. We selected 34 isolates having plant growth promoting ability. Among them, 16 isolates showed superior to Pseudomonas fluorescens M45 which was selected as good plant growth promoting ability.

5. Identification of selected isolates

a. Through the procedure of preliminary screening, we selected 52 endospore forming bacterial isolates. For the mass and rapid identification of bacteria, we employed MIDI system which classify and identifiy the bacterial on the basis of membrane bounded lipid component with computor aid data base. We clasified the endospore forming bacterial into 11 different species of Bacillu and 1 of Peanibacillus. Besides, we identified 44 Pseudomonas isolates by Biolog system which classify the bacteria on the basis of nutrient untilization.

b. Through laboratory and green house assayes and screening tests, we selected endospore forming biocontrol agents E606. E681, G1157, and H210 and Pseudomonas sp. B16, M45, and MC07. These isolates are readily colonied on the root system of cucumber, sesame, pepper, and rice by seed treatment, enhanced the growth of these plants, and suppressed the soil born fungal disease. We applied *Paenibacillus polymyxa* E681 and *Pseudomonas fluorescens* B16 for the patent

Section 2. Seed treatment of microbial agents and root colonization

1. Development of techiques for seed treatment

a. *P. fluorescens* L22 can not survive more than 7 days on cucumber seed when the bacteria were inoculated on the seed by soaking method. In contrary, *P. polymyxa* E681, a endospore forming bacterium, has a long shelf life as over 120 days.

b. Powder formulation materials for delivering high population of rhizobacteria on seeds were adaptable to commercial planting procedures. Especially, bentonite and xathan gum enhanced survivability of L22 to 60, 30 days, respectively. Generally, powder formulation materials enhanced attachment of L22 and E681 on surface of cucumber seed compared to the treatment of soaking the seeds in bacterial suspension.

c. The powder formulation seed treatment showed critical defect reducing root colonizing population density significantly compare to seed soaking treatment. The population densities of L22 and E681 in transferred to root from the treatment just seed soaking on root was much higher than that of these treatment.

d. It was confirmed that the bacteria invaded and colonized inside of seed coat while the seeds were soaked in bacterial suspension, through the series experiments : seed surface sterilization and/or coat excised seed. Almost same number of bacteria that

on seed surface already invaded to inside of seed coat right after seed soaking. Invaded bacteria into seed coat colonized at inner plane of seed and proliferated until seed germination. The population densities of L22 and E681 increased greatly inside of seed as well as surface of seed before emerging the radicle and the bacteria attached on emerging radicle affected directly on the initial population of newly emerging root.

e. The coating with xanthan gum after soaking in bacterial suspension revealed the most effect on the survivability of L22 on the seeds and its root colonization efficiency. The optimum concentration of xathan gum was 0.6% in total bacterial suspension for extension of survivability and root colonizing ability.

2. Searching of mechanism of root colonization

a. The lux gene introduced bacteria, *Pseudomonas fluorescens* L22, readily colonized on the main and lateral roots of cucumber and the fibrous root of barley and were easily detected the location of root colonizing bacteria. The population density of L22 on the root was little less than wild type but it enhanced the seedling growth of cucumber better than parental strain.

b. The cells of L22 and E681 inside of seed as well as on surface of seed scattered randomly at the first. At 6, 10hrs after seed treatment, cells of bacteria that were moved from endothelium

of seed to emerging radicle and increased abundantly on emerging radicle. The cells were arranged linearly toward elongation root axis. Through the observation of SEM, we had confidence that colonized cells of bacteria inside of seed moved directly to emerging root.

c. The cells of E681 were found preferentially at the junction of epidermal cell, a microhabitat with enhanced exudation, humidity and mucigel. In addition to colonizing the root surface, strain E681 was also found inside the roots, where cells colonized the intercellular space between certain epidermal and cortical cell. Also some of cells were located at vicinity of emerged lateral root.

d. The 8 isolates that finally selected as good plant growth promoting rhizobacteria were tested for the inhibitory effect on the anthracnose disease of cucumber. The isolate 94X01, Cha94 and M45 showed the possibility to inhibit the formation of anthracnose symptom on the cucumber leaf.

Section 3. Plant growth promotion and disease suppression by seed treatment of selected biocontrol agent.

1. Wheat and Barley

a. The selected isolates *Paenibacillus polymyxa* E681, G157, and

Pseudomonas fluorescens L22 enhanced the seedling growth of wheat and barley significantly and the more seeds were germinated than that of untreated control.

b. In year 1997, the enhancement of barley and wheat seedling growth was not significant because the temperatures during the winter time was so mild. However, we got the same results as 1996's experiment in this year, the much enhanced seedling growth and the more seedling stands were observed in treated plots than control.

c. The fresh weight and plant height of barley seedlings that observed before and after overwintering showed significant increase compare to control. The number of tillers also showed much higher than control March 10, afterward.

d. The seed treatment of beneficial bacteria brought the earlier heading and maturing of barley. The average heading date of test varieties was shorten by 7 days and the number of effective tillers was increased 25% more in comparison with control.

e. Endospore forming bacteria E681 sustained bacterial population by 104 cfu/root up to 150 days after seeding but *Pseudomonas* B16 was not detectable after one month. The highest yield differences between E681 seed treatment and untreated control were observed. The yield was 361.2 Kg/10a in control and 503.8 Kg/10a in treatment.

f. The same experiment conducted from November 1997 to May 1998, the heading date was reduced 1-3 days the yield increase was

only 5-6% more than control. This results may be attributed to mild winter and to many rainfalls during the heading and maturing season.

2. Hot pepper

a. The selected bacterial isolates were treated to pepper seeds and planted in the plug nursery trays that running under the large commercial scale. The fresh weight of 50 days old pepper seedling that treated with L22 revealed 15-51% increasement in fresh and dry weight. The same seedlings treated with E681 showed 25-75% increasement in fresh and dry weight 2-3 cm higher in plant hight and 1-2 more in number of leaves.

b. Number of flowers which direct related to fruit bearing was 2 more in L22 treated plots and 2.5 more in E681 treated plots.

c. Accumulated yield of green pepper fruits harvested in the experimental field in 1996, the seed treatment of L22 resulted 30-40% yield increase and E681 treated plots showed up to 170% yield increase. Another experiment conducted in 1997, the yield increase of E681 and L22 treated plots were 40-50%.

d. The population densities of L22 and E681 on the root of pepper plants cultivated in field sustained 10^4-5 cfu/root up to harvesting time. The seed inoculation of L22 and E681 was sufficient to deliver the bacteria to whole root system and the population density reached 10^4 cfu/root by the time the seedlings are ready to transplant 50 days after seeling.

e. E681 showed strong inhibition activity to *Phytophthora capsici* in vitro, however, L22 did not showed any activity. The two bacterial isolates were inoculated to pepper seeds and planted to farmer's field where the pepper had been cultivated previous years and the pathogens had accumulated. The both bacterial seed treatment successfully inhibited the Phytophthora blight the control effect was as high as up to 80%

3. Sesame

a. The clay and vermiculite were good material for granular forming of sesame seed. They allowed the higher population density on the seed surface, root colonization and survivability of inoculated bacteria. The granule formation seeds with bacteria inoculation showed 40-60% increased germination rate in the pot and field experiments. The experimental field soil was heavily accumulated with soil borne pathogens by continuous cultivation of sesame.

b. The plant height and length of pod attached region of bacteria treated sesame were 10cm longer than that of untreated control. The bacteria seed treated plots revealed much less occurrence of leaf spot disease and phytophthora root rot.

c. After 78 days from seeding, the rate of healthy stands of control was 45% while M45 treated plot was 76% and E681 treated plots was 92%. The average yield of control was 66.8Kg/10a, M45 was 74.4Kg/10a and E681 was 79.5Kg/10a.

d. In 1998, the granule formation seeds with bacteria inoculation were planted in farmer's fields, 18 different locations nation side. The most of the bacteria treated plots showed higher plant height, the more pod number and length of head. But only 5 locations showed yield increase because the yield of farmer's field were not accessible and heavy rain fall during the harvest season.

4. Rice

a. The isolate E681, G157, and H210 were selected to control the rice seedling disease and plant growth promotion. And L22 and F29 which showed good colonization on the rice root system were also used.

b. The seed treatment of H210, L22, and F29 enhanced the germination rate of rice 22%, 14% and 11% respectively. The enhancement of rice germination by seed bacterization can be applied to direct sowing system where the rice seed are stressed by deleterious microorganisms and harmful environments.

c. The bacteria treated seeds were placed on the moistened filter paper in petri plates and examined the inhibition of fungal pathogens which infected seeds inside previously. The bacteria H210, L22, and F29 showed the fungal inhibition almost like benomyl, the commercial fungicide.

d. The bacteria treated seeds were planted in the soil collected from reclaimed sea land where the seedling stands was not

adequate every year, and the rate of seedling stand was observed. The seeds treated with H210 and L22 enhanced the seedling stands more than control even metalaxyl treated plot, and those treatments accelerated the early germination.

e. In 1998, the seeds treated with H210, B16, L22, and F29 were seeded and transplanted in Gyeongnam RDA experimental farm. The final yield of H210 and B16 treated plots showed 42.7% and 35.6% increasement of average grain yield compare to untreated control.

Chapter 2. Development of microbial fungicide for controlling soil-borne plant disease

1. Results and their application

a. Six bacterial isolates with strong chitinolytic activity antagonistic to *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* were obtained from soils.

b. Several formulations with six isolates provided good protection against Rhizoctonia damping-off of radish and composts prepared with shrimp shell wastes and rice husk had also high suppressive effects against the disease.

c. Two isolates, #300 and #385 with high chitinase activity were shown to inhibit mycelial growth of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* strongly.

d. Chitinase and β-1,3-glucanase were produced by these two isolates and the mycelia of the pathogenic fungi were lysed during incubation in crude enzyme solution.

e. A mixture of two strains in a ratio of 1:1 or 4:1 gave significantly better control of disease than each of the strains used individually. Several formulations were tested, and a zeolite-based chitosan-amended formulation provided the best protection against disease. Dose-response studies indicated that the threshold dose of 6g of formulations/ kg of potting medium was requied for significant suppression of disease.

f. For the mass culturing of the bacteria, a small amount of soybean meal, soluble starch and several inorganic nutrients were used for culture media.

g. The formulation maintained the high population of the antagonists enough for the effective control of disease when stored for six months at room temperature or 4C.

h. In several field tests, the formulation also provided a good control of sprout rot of potato by dipping of seed pieces, Rhizoctonia damping-off of onion by seed treatment or mixture of covering soil, powdery mildew of strawberry by soil treatment and an increase of seedling growth of melon.

i. The isolate #300 was found to be indigenous to Korea and tentatively identified as a new species of *Paenibacillus* sp

Chapter 4. Development of microbial agents for post harvest diseases of horticultural crops

Section 1. Isolation of pathogens associated wtih postharvest decay and Monitoring of epiphytic microorganisms on nion and garlic

1. Fungal pathogens from onion bulb rot were identified as *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus* sp. *Botrytis allii*, and those from garlic clove decay were *Fusarium oxysporum*, *Penicillium echinulatum*, *Stemphylium botryosum*, *Embellisia allii*. Among the pathogen, the most frequent and damaging was *Fusarium oxysporum* interestingly enough, no symptom by this pathogen appeared onion and garlic plant during the growing season in the field plot suggesting characteristic quiescent infection until harvesting.

2. The influence of physical conditions on the growth of both isolates of *Fusarium oxysporum* were investigated for 9 days on PDA at different pH and temperature. Optimum range was at pH 6-7 and 20-25℃, but slow to steady growth was still observed at low temperature of 10-15℃, under the experimental condition.

3. Epiphytic microorganisms of onion and garlic plants were identified as *Bacillus*, *Sphingobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Morganella*, *Xanthomonas* by MIDI system. As onion and garlic epiphytes, *Bacillus* sp.(BW, BWW), *Micrococcus* sp.(BY), were predominant throughout the cultivation period, while the other strains were fluctuating aparently.

4. Based on the ability of predominant colonization on surface of onion and garlic plants and also on the antagonism against these pathogenic fungi, we have selected *Bacillus amyloliquefaciens* BL3 and *Paenibacillus polymyxa* BL4, also included *Pseudomonas putida* Cha94 which has selected in our laboratory for biocontrol experiment previously, and antagonistic fungal isolate *Trichoderma harzianum* TM.

Section 2. Feasibility of antagonistic micro-organis for the biocontrol potentials.

1. Three strains, BL3, BL4, Cha94 were screened for suppressive effects on conidial germination of *Fusarium oxysporum* from infected onion and garlic bulbs. Germination of conidia of both isolated was limited only to below 15% to 10%, compared to 95% to 100% under antagonist free condition at 28℃ for 11 hrs respectively.
2. After antagonistic bacteria and fungus were treated, the onion

and garlic roots were sampled monthly for monitoring the quantitative survival of population density. Among these antagonists, population density of BL3, Cha94, TM is contsistantly higher enough to maintain significant population at concentration of 104-105 cfu/g on onion roots from planting to harvesting, but BL4 survived only for two months. Cha94 and TM were able to survive remarkably well on garlic roots at concentration of 104-105 cfu/g until harvesting in the field plot.

3. *Trichoderma harzianum* TM was the most effective biocontrol agent against *Fusarium oxysporum*, basal rot pathogen. Number of bulbs rotted were only less than 2 out of 50 bulbs per subsample as compared to 8 for untreated samples. Dry rot of clove garlic was prevented significantly at control value of 50% by biocontrol agents applied, by but slightly less effective as compared to the contorl of value of 75% of onion bulb rot. *Trichoderma harzianum* TM was the best antagonist but its efficacy was not significantly different from other strains applied.

Section 3. Characters and biocontrol efficacies of antagonists selected.

1. From October, 1997 to June, 1998, the repeated field experiment was conducted for assessing biocontrol efficacies and the quantitative survival of introduced microbes. Among used

antagonists, population density of Cha94, TM was continually maintained with 105-6 for cultivating periods, but population density of BL3, BL4 started to decline 10 days after planting. Similar results, with a few exceptions, were obtained with garlic experiment..

2. After garlic clove was woundinoculated with pathogens, *F.oxysporum* (dry rot), *S. botryosum*(purple spot), and followed by coating with three antagonists, Sprouting rate of garlic cloves in field plot was higher for plots treated with antagonists then for untreated plots and higher for intact acaly cloves then for descaled cloves.

3. Antagonists were formulated to dust by mixing them with stickers (Methyl Cellulose and Xanthan gum) and carrier materials(Vermiculite, Bentonite, Talc). Those dusts were either ampouled with vacuum or bottled with air, witch were stored at ambient temperature for 120-140 days. Populattion density for TM was consistently survived in sawdust-rice polish(8:2) fromulation and that for Cha94 was in methyl cellulose-talc formulation at the conentraion of 104-105 cfu/0.3g. BL3 was able to survive and maintain population density of 106 cfu/0.3g for all formulations. ie. least influenced by every combination of sticker and carrier materials. Storage under vaccum condition was not significantly different form that under aerobic condition in terms of survival of propaguales.

4. Seed germination in vitro was slightly lower for onion seeds treated with formulation dusts than for untreated onion seeds. However, in field trials, higher germination rate was obtained with BL3 and Cha94 formulated in CMC and Talc. The highest was TM formulated in sawdust and ricepolish than any other antagonist formulations in vitro as well as in field trials.

Chapter 4. Development of natural fungicides originated from micororganims

Section 1. Isolation of antagonistic actinomycetes

1. To isolate actinomycetes antagonistic to plant pathogenic fungi, soil samples were collected from caves and sea-shores in Korea. The 481 actinomycetes were isolated from the soil samples pre-treated by dry-heating.

2. *Streptomyces* isolates were rich in all the soil samples examined, representing more than 50% of total counts. Nocardioform actinomycetes were isolated at high rates of 6-18.8%. They were relatively rich in both cave and sea-mud soils rather than other rare actinomycete genera.

3. *Saccharomonospora* could be isolated only in 3 cave soil samples from Cheondong, Kosoo, and Nodong, but was not present in all the sea-mud soils examined. *Dactylosporangium*, *Saccharomonospora*, and *Streptosporangium* were very rare in both cave and sea-mud soils.

4. The 311 of 481 actinomycete isolates inhibited the mycelial growth of at least one of the tested fungi. The isolation rates of actinomycete antagonists from cave soils ranged from 45.7% to 78%, and those of sea-mud soils were from 59.1% to 66.0%. The 96 of 136 *Streptomyces* isolates from cave soils, and 93 of 133 isolates from sea-mud soils showed antifungal activity.

5. The proportion of antagonistic isolates of Nocardioform actinomycetes (13.6%) was lower than that of other genera. Among the actinomycetes from sea-mud soils, *Dactylosporangium* and *Streptosporangium* had highest proportions of actinomycete antagonists of 85.7% and 80%, respectively. The isolation rate of Nocardioform antagonist from sea-mud soils were 11.1% similar in the cave soils. *Streptomyces* strains showed higher antifungal activities against plant pathogenic fungi than did other rare actinomycete antagonists.

section 2. Development of microbial fungicide from actimomytes

1. Among the antagonistic actinomycetes, the strain DA2 that produced antifungal metabolites active against some plant pathogenic fungi was identified as *Actinomadura roseola*, based on the analyses of morphological and physiological characteristics.

2. The antifungal activity of Da2 grown in 4 different kinds of media were examined by paper disk method. YMB ans SSB were determined most proper medium for production of antifungal susbstance. The antifungal activity grown in YMB or SSB became increased after 7 days of incubation and reached highest peak at 13 days of incubation.

3. Application of antifungal active susbstance produced by Da2 to Phytophthora blight of pepper resulted successful disease control. 1000 ug/ml of the substance showed 82.6% of disease control efficiency and 500 ug/ml reached almost 40% of control efficiency.

4. The antibiotic Da2B that showed a strong antifungal activity was isolated from the culture broth and mycelial mats of *A. roseola* strain DA2 using various chromatographic procedures. The high resolution FAB mass and UV spectral data revealed that the antibiotic was an anthracycline having the formula C27H29NO10 (M+H, m/z 527.1782).

5. On the basis of 1H NMR, 13C NMR and 2-D NMR correlation data, the antibiotic Da2B was confirmed to have the structure of an anthracycline antibiotic, daunomycin.

6. *In vitro* antimicrobial spectrum tests showed that the antibiotic Da2B had substantial inhibitory activity (10 g mL-1 of MICs) against mycelial growth of *Phytophthora capsici* and *Rhizoctonia solani*. The antibiotic also showed antiyeast activity against *Saccharomyces cerevisiae* but the growth of *Candida albicans* was not affected.

7. Antibacterial activity was found only against Gram-positive bacteria. In the further evaluation of *in vivo* efficacy, application of the antibiotic Da2B effectively inhibited the development of Phytophthora blight in pepper plants. However, the control efficacy of the antibiotic against Phytophthora infection was somewhat less than that of metalaxyl. The antibiotic Da2B did not show any phytotoxicity on pepper plants even at 500 g mL-1.

CONTENTS

목 차

제 1 장 서 론

우리 농업이 당면한 과제는 수량의 증대보다는 안전한 농산물 생산과 함께 생태계를 보존하고 가꾸어야 할 임무가 중요하게 대두되고 있다. 더욱이 WTO체제에서는 모든 농산물이 국제 수준에 해당하는 품질을 갖추어야 할 뿐만 아니라 안전한 무공해 농산물의 생산이 절실히 요구되고 있다. 안정적으로 고품질 농산물을 생산하기 위해서는 작물 병의 효과적인 방제가 반드시 따라야 하며 환경 친화적인 생물농약의 사용이 무엇보다 우선적으로 고려되어야 한다.

제 1 절 종자처리용 미생물 농약 개발

미생물을 종자에 처리하여 식물병을 막는 생물학적 방제는 생태계 파괴 및 오염 등의 부작용이 없으며 간단하게 종자에만 처리함으로 쉽게 보급할 수 있고 활용 범위도 종자에 국한함으로 독성이나 기타 부작용이 매우 낮아 무공해 농산물 생산에 적합하다. 또한 종자생산과 처리기술은 모든 국가에서 경쟁적으로

확보하려는 주요 기술로서 농산물의 국제 경쟁력을 가질 수 있는 고품질, 고부가가치의 안전한 농산물 생산에 대한 요구에 아주 필수적인 기술이라 하겠다. 본 연구에서 개발하고자 하는 미생물 종자처리 기술은 종자에 처리된 미생물이 스스로 발아하는 뿌리로 이동하고 계속해서 뿌리 전면에 골고루 정착하고 증식하면서 식물의 뿌리를 병원균으로부터 보호하고 기주 식물과의 상호작용에 의해 생장촉진 효과와 병 방제 효과를 가져오게 하는 것이다.

식물 병의 생물적 방제를 위하여 지금까지 시도되었던 연구들은 대부

분 많은 량의 유기물과 함께 길항미생물을 토양에 투입하고 있다. 그러나 이러한 미생물들은 대부분 짧은 기간밖에 생존하지 못하여 토양 전면에 미생물을 골고루 처리하기 위하여 엄청난 량의 미생물을 투입하고도 식물 병을 방제하는 효과는 일시적이다. 그리하여 한 작기에 여러 번 미생물을 투입하는데 이 경우 인위적으로 투입한 많은 미생물로 인하여 토양 생태계는 균형이 파괴되고 또 다른 부작용을 낳을 수 있다.

본 연구에서는 근권정착형 미생물을 개발하여 최소의 식물형태인 종자에 적은 량의 미생물을 처리하여 그들이 발아하는 유근을 따라 근권 전면에 정착하게 하므로 어느 부위에 침입하는 병원균에 대해서도 길항력을 나타나게 하려는 것이다 이 미생물은 뿌리가 공급하는 영양분으로 증식하다가 식물이 죽으면 집단이 사라지게 되므로 토양 생태계에 미치는 영향은 거의 없다고 말 할 수 있다.

제 2 절 토양처리용 미생물 농약 개발

식물병원진균에 의한 작물의 병은 해충, 잡초와 더불어 작물의 안정적 생산에 크나큰 제한요인이 되고있다. 식물병원진균 중에서도 특히 토양전염 병원균은 대부분 침입부위가 눈에 잘 보이지 않는 땅 속의 뿌리, 괴경 또는 땅가 부분의 줄기 등으로 여러 종류의 작물에 광범위하게 병을 일으켜 많은 피해를 가져온다. 대표적인 토양전염 병원진균으로는 *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium* spp. *Phytophthora* spp. *Sclerotinia* spp., *Verticillium* sp. 등이 있으며 이들은 곡류, 채소, 화훼류 등 많은 작물을 침입하는 다범성 병원균이다. 이 병원균들의 방제를 위해 현재 여러 종류의 살균제가 사용되고 있는데 우리 나라에서는 *R. solani*의 경우 벼잎집무늬 마름병 방제용으로는 validamycin,

flutolanil, pencycuron 등이 있고 그 외 모잘록병이나 잔디병의 방제를 위해서는 효과적인 살균제가 없는 실정이다. *Fusarium oxysporum*, *Pythium* spp. *Phytophthora* spp. 역시 피해가 워낙 심하기 때문에 토양훈증제 또는 metalaxyl 등 살균제가 사용되고는 있으나 토양의 재오염, 약제저항성 발생으로 별로 좋은 방제효과를 얻지 못하고 있다. 더구나 여러 가지 살균제의 오용과 남용으로 환경오염 및 인축독성 문제가 사회문제로 대두되고 있고 약제저항성 발생에 의한 방제효과 감소로 이러한 문제가 없고 안전하고 효과적인 방제방법의 개발이 절실히 요구되고 있다.

환경적으로 안전하고 효과적인 방제 방법으로는 식물병원 진균의 생태를 이용한 미생물농약에 의한 방제가 있는데, 외국과 국내에서 1970년대 초반 이후로 이에 관한 연구가 여러 연구자에 의해 많이 수행되고있다. 최근 몇 종류 미생물농약의 상품화와 1992년 리우 유엔환경개발회의의 '환경적으로 건전하고 지속 가능한 개발(ESSD)'을 목표로 하는 지구환경선언 이후 국내외적으로 미생물농약 개발에 대한 관심이 급증하고 있다. 현재 외국에서 개발되어 식물병원 진균 방제용으로 상품화된 미생물농약은 길항진균 *Trichoderma harzianum*과 *T. polysporum*으로 만들어진 BINAB T(1988, E.R. Butts International, 목재부후균을 억제), *Gliocladium virens*를 이용한 GlioGard(1990, W. R. Grace Co., 온실화훼작물유모에 병 억제), *T. harzianum*을 이용한 F-stop(1991, Kodak)과 길항세균 *Bacillus subtilis*를 이용한 KODIAK(1990, Gustafson, 종자처리제), *Pseudomonas fluorescens*를 이용한 DAGGER(1990, Ecogen Inc., 목화의 *Rhizoctonia*, *Pythium* 모잘록병 방제), *P. cepacia*를 이용한 BLUE CIRCLE(1990, Stine Microbial Products, 여러 작물의 종자처리제), 그리고 길항방선균 *Streptomyces griseoviridis*를 이용한 MYCOSTOP(1985, Kemira Oy Biocontrol of Finland, *Fusarium* 시들음병, 모잘록병 방제) 등이 있다.

국내에서는 1970년대 초반부터 인삼뿌리썩음병의 생물학적 방제연구를 시작으로 고추역병, 오이 딸기 시들음병, 참깨 모잘록병과 잿빛곰팡이병의 생물학적 방제에 관한 연구가 한국인삼연초연구원, 농업과학기술원, 생명공학연구소 및 여러 대학교에서 계속적으로 수행되어 왔으나 아직 공식적으로 상품화 된 것은 없다. 위 연구로 얻어진 결과의 대부분이 실내 온실실험 이었으며, 포장실험도 있었으나 미생물농약으로 개발되기에는 효과의 불안정성, 제제화 미흡, 비경제성 등 여러 가지 개선되어야 할 점이 많은 것으로 보고되었다.

제 3 절 원예작물 저장성병 방제 미생물 농약 개발

우리 나라의 생물적 방제는 지금까지는 상당한 지식과 기술이 축적되었으나 연구와 실험 단계에 머물렀고 실제 작물 재배 환경에 적응 할 수 있는 미생물의 선발과 도입 방법 제형 개발등 핵심적인 기술이 개발되지 않아 이에 대한 연구가 필요하다. 특히 저장성병은 농약으로 방제하기가 어려우므로 환경과 친화형인 안전성을 나타내며 경제적으로도 활용 가능한 생물 농약 개발이 필요하다. 또한 우리 나라에서 사용되는 농약은 많은 양이 외국에서 수입되고 있으며 특히 1987년 물질 특허 제도가 도입됨에 따라 신물질에 대해서 막대한 기술료를 지불해야만 사용할 수 있는 실정에서 선진국에 의한 기술적 종속을 피하기 위하여 신물질 창출에 대한 연구 개발이 절실하게 필요한 실정이다. 경제적으로도 기술개발에 필요한 소요 연구비 측면에서도 기존의 합성 살균제 개발에 비해 비생물 농약 개발은 개발비가 훨씬 적게 드는 것으로 판단되고 있다. 사회적 측면에서도 생물적 방제의 이론과 실기를 개발하여 선진 기술 농업 국가임을 과시하여 국내외적으로 우리 농산물의 우수성을 인식시켜 농산물 수출에 기여할 수 있을 것이다. 이러한 생물적 방제의 필요성을 한 층 더 느끼게 하는 것은 양파와 마늘이

다. 국내에서 생산되는 양파와 마늘은 약 60, 50만톤(농업통계연보, 1996)이고, 연중 고른 소비 성향을 나타내는 양파(*Allium cepa* L.)와 마늘(*Allium sativum* L.)은 저장이 불가피 하다. 하지만 저장 중 부패병의 발생으로 인한 많은 경제적 손실로, 본 실험실에서는 저장병 발생을 줄이기 위하여 길항 미생물을 이용한 생물적 방제를 실시하였다. 본 연구에서는 1) 양파, 마늘의 저장 중 발생하는 병원균을 분리, 동정하고, 생육 중 표면 미생물 상을 밝히며, 2) 미생물 농약개발을 위해 분리된 표면 미생물 중 저장병원균들에 대한 길항 미생물을 선발하고, 3) 선발된 길항 미생물을 양파, 마늘의 뿌리에 처리하여 포장 실험을 실시하여, 4) 재배 중 길항 미생물의 생존 밀도를 조사하고, 양파, 마늘의 수확하여 각 처리별 부패율을 조사하고, 5)선발된 길항 미생물의 항균활성 유지 기술의 실용화를 위하여, 또는 최적의 첨가제 선발을 위하여 제형화 후 생존밀도를 조사하고, 6) 제형화된 길항 미생물을 종자에 처리하여 육묘 후 저장결과를 조사하므로 저장병 방제를 위한 미생물 농약 개발에 목적을 두고 있다.

제 4 절 미생물 유래 천연 살균제 개발

UR타결로 농산물시장이 개방됨에 따라 고품질, 무공해 농작물 생산에 대한 필요성이 증가되고 있다. 이를 위해서는 식물병 해충으로부터 농작물을 효율적으로 보호하기 위한 노력이 필수적이다. 식량증산을 위해 종래에 대량으로 사용되어 왔던 유기합성농약은 농업생태계의 파괴, 약제저항성 병원균의 유발 및 인축, 식품에 대한 잔류독성등 많은 환경문제를 발생시키고 있다. 최근에 와서 이러한 농약사용의 부작용에 대한 사회의 관심이 고조됨에 따라 분해성, 선택독성, 안전성의 면에서 유리한 무공해 농약개발이 절실하게 요청되고 있다.

미생물의 이차 대사물로부터 얻어진 많은 생리활성 천연물은 바로

살균제로 이용되거나 농약개발을 위한 선도물질(lead compound)로 이용되고 있다. 미생물로부터 개발된 항진균 물질은 생분해성이 강하여 토양에 오래 축적되지 않아 생태계의 파괴 및 오염 등의 부작용이 적으며, 인축에 대한 독성이 적어 무공해 식물 생산에 사용하기 적합하다. 그 동안 이루어져 왔던 미생물 대사산물에서 유용 살균제 및 생리활성 물질의 탐색은 주로 일반 육지 토양에 서식하는 미생물군을 대상으로 연구되어 왔기 때문에, 신규 생리활성물질을 생산할 가능성이 있는 다양하고 희귀한 미생물 균주의 선발이 어려웠다. 특히 다양한 이차 대사산물을 생산하는 것으로 알려져있는 방선균을 선발하는 경우에는 방선균의 생육조건이 까다롭고 또한 다양하기 때문에, 미생물의 탐색지역을 다양화 할 필요가 있다.

제 2 장 종자처리용 미생물 농약의 개발

제 1 절 우수한 종자처리 미생물 선발

1. 서 설

본 연구에서 선발하고자 하는 길항 미생물은 단순히 종자에만 처리하여도 발아하는 종자의 유근을 따라 작물 근권 전체에 잘 정착하는 유용 미생물을 선발하려는 것이다. 근권에 잘 정착하는 미생물을 종자에 처리한다는 것은 미생물을 토양이나 다른 식물체에 처리하는 것에 비하여 훨씬 적은 량만 가지고도 작물 전체 근권에 고르게 미생물을 공급할 수 있는 유리한 점이 있다. 근권에 정착한 길항미생물은 작물이 생육하는 동안에 뿌리를 가해하는 병원균의 침입을 막고 뿌리의 활력을 증진시켜 작물의 생장을 촉진시키는 효과를 얻고자 하는 것이다. 생물적 방제에 있어서 주체가 되는 길항 미생물의 선발은 주어진 조건에서 병 방제를 성공 여부를 가늠하는 가장 중요한 관건이 된다. 최근 들어 국내외를 막론하고 근권에 잘 정착하면서 작물의 생장을 촉진시키거나 토양 병을 억제하는 **작물생장촉진근권세균**(Plant Growth Promoting Rhizobacteria)대한 연구가 활발하게 진행되고 있으며 이와 관련된 우수한 균주가 많이 선발되었다. 그러나 우수성이 인정된 세균들이 대부분 *Pseudomonas* 속에 해당하는 것으로서 건조와 자외선 등 불리한 환경에 노출되면 쉽게 사멸되는 문제점을 나타내고 있다. 따라서 본 연구에서는 이러한 결정을 보완하여 불리한 환경에서도 오랫동안 살아 남을 수 있으면서 작물의 근권에 잘 정착하여 종자 처리 미생물로 실용가치가 높은 우수한 미생물을 선발하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 균주 채집 및 유용미생물 선발

종자 처리에 유용한 미생물을 선발하기 위하여 95년 12월부터 96년 12월까지 우리 나라 남부 지방 중에서 보리나 밀이 많이 재배되고 있는 지역을 선정하고 각 지역 별로 3개 이상의 포장을 선정하였다. 각 포장에서 주위 보다 생장이 우수하다고 인정되는 포기를 택하여 2-3 주 씩 채집하였다.

본 연구에서는 내생포자를 형성하는 세균 중에서 근권정착 능력을 가지는 균주를 목적으로 하였기 때문에 처음부터 내열성을 가진 Bacillus 속 세균만을 분리하였다. 따라서 채집한 보리나 밀의 뿌리만 택하여 흙을 털어 낸 다음 막자 사발에 갈아서 완전히 마쇄한 다음 시험관에 넣고 Water Bath에서 80℃로 열처리하여 얻은 시료로부터 미생물을 분리하였다. 본 실험에서 가장 많이 사용한 배양기는 1/10 TSA이고 미생물의 분리과정은 그림 1과 같다.

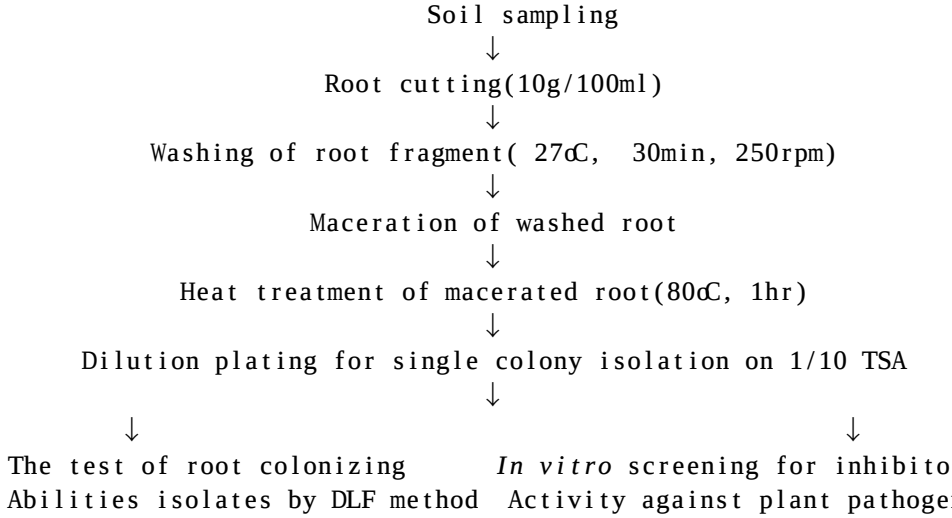


Fig 1. Procedure for isolation of endospore forming bacterial from wheat and barley root

나. 미생물의 병원균에 대한 길항력 검정

많은 균주를 효과적으로 검정하기 위하여 1개의 Petri접시에 채집한 세균을 6개를 동일한 간격으로 주변에 접종하고 중심에 PDA에서 3일 간 배양한 *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici*의 직경 1㎝되는 균사절편을 접종하여 균사가 다 자란 다음 선발한 세균과 병원균 균사 사이에 형성되는 저지대(沮止帶)를 측정하여 각 균주에 대한 길항능력을 평가하였다.

다. 미생물의 근권정착 능력 검정

분리한 3,000 이상의 균주에 대하여 근권정착 능력을 검정하기 위하여 본 실험실에서 개발한 이중여과지법(DLF)을 이용하였다. 각 균주당 5개의 오이종자(신풍 흥농종묘)에 세균을 접종하여 이중 여과지가 깔린 Petri 접시에 치상하여 4일 후 오이뿌리 끝에 정착한 세균의 밀도를 조사하였다. 일차 선발에 의해서 근권 정착능력이 인정된 균주에 대해서는 개량된 Ahmad & Baker (토양내 검정)법으로 근권정착 능력을 검정하였다.

라. 미생물의 식물생장 촉진 능력 검정

10차례 이상 남부 지방의 밀·보리 뿌리로부터 분리한 미생물 전체에 대해서 단순히 종자에만 접종하여 작물의 생장을 촉진시키는지 여부를 조사하였다. 발아와 유묘의 생장이 빠른 오이를 이용하여 선발 모든 균주에 대하여 일차적인 생장촉진 효과를 검정하였다. 16X10X6 ㎝ 되는 사각 포트에 미생물을 종자에 처리한 오이 균주 당 5개 씩 심고 식물생장상에서 충분히 발아시킨 다음 비닐하우스에서 2주일간 재배하면서 무처리에 비하여 10% 이상 생장이 촉진되었다고 인정되는 균주를 선발하였다. 일차실험에서 효과가 인정된 균주에 대해서는 같은 포트 실험을 반복하였으며 30일간 재

배 후 유묘의 생장을 비교하였다.

마. 미생물의 동정

선발한 모든 균주을 동정하지 않고 실내 실험과 온실실험을 통하여 선발된 내생포자 형성세균 52개와 생장촉진 효과와 병방제 효과가 인정된 44개의 Pseudomonas 균주에 대하여 동정을 실시하였다. Bacillus 속 세균에 대해서는 세균의 세포막에 포함된 지질의 Gas-Chromatography 분석 결과를 computor에 수록된 Data Base와 유연성을 비교하여 동정하는 MIDI System을 이용하였고, Pseudomonas에 대해서는 몇 가지 생리실험과 영양소 이용능력에 따라 분류하는 Biolog System을 이용하였다

3. 결과 및 고찰

가. 유용 미생물의 선발 및 동정

1) 균주 채집 및 유용 미생물 선발

주로 경상남도와 전라남도를 대상으로 하여 남부 지방에서 66개 지역으로부터 밀·보리 뿌리를 채집하여 80도 이상의 온도에서도 살아남은 근권 미생물을 총 3197개의 균주를 얻었다. 이들 미생물들은 저온에서 잘 자랐으며 내생포자를 형성하였고 여러 가지 인공 배양기에서 생장 속도가 매우 빨랐으며 1/10 TSA배지에서도 잘 자랐다. 채집 장소와 채집 균주는 Table 1.과 같다.

Table 1. List of locations where the sample collected and corresponding numbers of endospore forming bacterial isolates

지역	채집장소	채집균주수	선발균주수	지역	채집장소	채집균주수	선발균주수
경남 하동군	곤명면	31	-	경남 거제군	사등면	60	-
	횡천면	16	-		일운면	34	-
	양양면	8	-		남부면	50	1
	북천면	330	30		동부면	15	-
	양보면	19	1		거제면	50	6
	하동읍	4	-		연초면	26	-
경남 사천군	사천읍	45	-		하청면	40	-
	삼천포항	18	-		장목면	82	2
경남 고성군	하일면	27	2		둔덕면	691	47
	삼산면	18	-	전남 구례군	구례읍	15	-
	상리면	9	2	전남 고흥군	남양면	60	-
	정동면	54	-		도덕면	13	-
경남 진주시	가좌동	63	-		과역면	51	1
	초전동	18	-		대서면	12	-
	진성면	21	4	전남 보성군	조성면	56	1
	일반성면	35	1		회천면	49	3
	이반성면	14	1	전남 장흥군	안량면	34	2
경남 마산시	진전면	49	8		용산면	8	-
	진동면	21	-		관산읍	28	-
	구산면	21	1		대덕읍	42	1
경남 남해군	설천면	36	2	전남 강진군	도암면	65	1
	창선면	103	9		마량면	16	1
경남 통영시	산양읍	27	-		칠량면	35	1
경남 산청군	차황읍	167	11		강진읍	10	-
	산청읍	37	1		신전면	3	-
	금서면	58	4	전남 진도군	의신면	61	1
경남 함양군	수동면	10	2		고군면	21	-
경남 함양군	휴천면	20	1	전남 해남군	황산면	5	-
	병곡면	8	-		화산면	10	-
	백전면	10	3		현산면	8	-
	서하면	61	5		북평면	21	-
경남 거창군	남하면	30	-	전남 완도군	완도읍	92	1
	신원면	20	1				
	북상면	26	-				
합 계						3197	158

2) 분리한 미생물의 병원균에 대한 길항 능력 검정

선발된 균주들은 우선 주요한 토양병균에 대한 길항능력을 실내에서 평가하였다. 토양병원균들 중에서 어디든지 많이 분포하면서 여러 가지 작물에 큰 피해를 주는 *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporium* 등에 대하여 평가하였다. 선발된 3211균주 중 *P. ultimum*에 대해서는 31균주, *R. solani*에 대해서는 365균주, *F. oxysporium*에 대해서는 101균주가 병원균에 대하여 균사 생장을 억제하였고, 이 중 16균주는 3가지 병원균 대하여 모두 균사 생장 억제 능력을 가지고 있었다(Table 2). 근권에서 선발된 미생물은 대부분 Pseudomonas가 많은 것으로 보고되어 있지만 본 연구에서는 Bacillus 속에 세균을 집중적으로 선발하고자 하였으므로 일단 선발된 미생물들 중에는 길항력을 나타내는 것들이 많았다.

3) 분리한 미생물의 근권정착 능력 검정

본 연구에서 선발하려는 미생물은 종자처리만으로 근권 전체에 미생물을 골고루 공급하려는 것이므로 채집한 미생물은 무엇보다도 근권에 정착하는 능력을 갖추고 있어야 한다. 본 연구진이 개발한 이중여과지 법(Double Layered Filterpaper)으로 선발한 모든 균주에 대하여 근권정착능력을 검정하였다. 예상하였던 것처럼 내생포자를 형성하는 세균들은 근권에 정착하는 비율이 매우 낮았으며 전체적으로 근권 정착력이 왕성한 균주는 3197 개중에서 49 개 균주에 불과하였다(Table 3).

4) 미생물의 작물 생장 촉진효과 검정

선발된 3197균주중에서 무처리에 비하여 오이 생장을 촉진 시켰다고 인정되는 균주를 34개 선발하였고 기존에 작물생장 촉진 능력을 갖고 있다고 인정되는 M45 보다도 더 효과가 큰 16균주를 추가로 선발하였다(Table

4). 이와는 별도로 이미 본 연구진이 94년부터 채집하여 선발하였던 균주 중에서 근권정착능력이 우수하다고 인정되어진 Pseudomonas 속 499균주를 동시에 검정한 결과 그 중 28개의 균주가 이병토양에서 오이의 생장을 촉진시켰다(Table 5).

Table 2. Screening of collected bacterial isolates for the inhibitory effects on the some fungal pathogens

Test No.	No. of isolates	Antifungal active isolates to			Representative isolates
		Pythium	*Rhizoctonia*	*Fusarium*	
1 series	79	0	6	9	-
2 series	189	0	11	14	-
3 series	161	1	26	34	C-224
4 series	198	0	16	44	-
5 series	733	9	69	-	E-225, E-257, E-606, E-681
6 series	29	0	14	-	-
7 series	555	10	194	-	G-149, G-157, G-316, G-453
8 series	457	1	7	-	H-309
9 series	520	8	16	-	I-293, I-297, I-338, I-470
10series	290	2	6	-	J-197, J-279
Total	3211	31	365	101	16

* The series means a batch of experimant

Table 3. Screening of collected bacterial isolates for root colonizing ability by seed treatment

Test No.	No. of Isolates	No. selected isolates *		Representative isolates
		Primary	2nd screen	
1 series	79	1	0	-
2 series	189	5	3	B-24
3 series	161	15	4	C-11, C64
4 series	198	14	7	D-107
5 series	733	13	6	E-606, E-681
6 series	29	0	0	-
7 series	555	11	9	G-157, G-177
8 series	457	28	7	H-24, H-210
9 series	520	45	11	I-270, J-244, I-242
10series	290	28	2	J-272, J-254, I-276
Total	3211	160	49	15

Table 4. Screening of collected endospore forming bacterial isolates for the plant growth promotion effects on cucumber

Test No.	No. of Isolates	No. selected isolates *		Representative isolates
		A group	B Group	
1 series	79	0	0	-
2 series	189	0	0	-
3 series	161	3	0	-
4 series	198	1	1	D-107
5 series	733	3	2	E-606, E-681
6 series	29	0	0	
7 series	555	4	2	G-157, G-177d
8 series	457	4	2	H-24, H-210
9 series	520	12	5	I-270, J-244, I-242,I-229
10series	290	7	4	J-272, J-254, I-276
합계	3211	34	16	15

* A Group : Enhanced the seedling growth of cucumber 10% more than control
B Group : Enhanced the seedling growth of cucumber 10% more than MC07 which was proved promising PGPR isolates

Table 5. Screening of some *Pseudomonas* isolate for the plant growth promotion.

Test No.	No. test Isolates	Selected Isolates		Representative Isolates	Test No.	No. of tested Isolates	Selected Isolates		Representative Isolates
		A	B				A	B	
1 series	20	10	-	-	14series	22	8	-	-
2 series	24	6	1	94B16	15series	6	4	1	94P01
3 series	22		-	-	16series	23	10	-	-
4 series	22	10	3	94D01	17series	18	6	-	-
5 series	22	2	-	-	18series	23	10	3	94S06,94S18
6 series	22	3	-	-	19series	22	8	1	94T03
7 series	22	10	5	94G03, 94G17	20series	11	8	-	-
8 series	22	9	3	94H18	21series	23	4	2	94V13
9 series	22	15	2	94I18	22series	16	8	-	-
10series	22	16	-	-	23series	22	5	-	-
11series	21	8	2	94L03, 94L04	24series	6	3	-	-
12series	22	3	-	-					
13series	19	9	2	94N04, 94N18	24series	25	3	3	CY06,Cha94, SH60
					합 계	499	178	28	

* A group : Enhanced the seedling growth of cucumber 10% more than control
B group : Enhanced the seedling growth of cucumber 10% more than MC07 which was proved promising PGPR isolates

5) 선발된 미생물의 동정

분리한 미생물을 실내 실험과 온실을 실험을 통하여 주요 병원균에 대한 길항력이 인정되고 종자처리만으로 오이 근권에 정착할 수 있는 능력이 있고 오이 유묘의 생장을 촉진시킨 96균주를 일차적으로 선발하였다. 이들은 세균의 세포막에 포함되어 있는 지질의 특성에 따라 분류하는 MIDI system에 의해서 일차적은 동정 작업을 하였다. 특히 선발과정에서 내열성을 갖는 포자형성균들만 선발하였으므로 비슷한 세균군인 Bacillus속과 Paenibacillus속에 해당되는 균주들을 대상으로 하였다. 이와 함께 생장촉

진 효과와 근권정착 능력이 우수하다고 인정되었던 Pseudomonas 균주 44개에 대해서도 MIDI system과 영양원의 이용능력에 따라 분류하는 Biolog system을 이용하여 동정하였다.(Table 6, 7).

Table 6. Identification of endospore forming bacterial isolates collected from barley field by MIDI system.

Identified Name	No. of Isolates	Representative Isolates
B. subtilis	12	I-123, I-244, I-422, I-496
B. amuloliquefaciens	6	C-11, C-64, E-232
B. cereus	3	E-606, J-254, J-276
B. pumilus	5	D-107, J-240, J-246, J-270
B. maceans	5	I-166
B. brevis	1	I-229
B. megaterium	3	J-249, J-169, J-234
B. atrohaeus	2	I-495,
B. pulvifaciens	1	H-227
B. laterosporus	1	I-120
B. pantothenticus	2	C-165, D-126
Peanibacillus. polymyxa	11	E-681, I-458, G-157,
	52	20

Table 7. Identification of Pseudomonads isolates collected from barley field using Biolog System and MIDI System.

Identified Name	No. of Isolates	Representative Isolates
P. fluorescens	34	MC07, 94B16, 94X01, 94M16, M45
P. putida	10	CY06, Pf3, Cha94, SH60, PI
Unidentified	1	94V13
	44	11

각종 실내 실험과 온실실험 그리고 소규모 포장을 실험을 통하여 주요 토양병원균에 대한 길항능력이 인정되고 오이 뿐만 아니라 참깨, 고추, 벼, 등 다른 작물의 근권에서 정착능력도 우수하며 이들의 유묘 생장을 촉진시킨다고 인정된 우수한 균주로서 E-606, E-681, G-157, H210 등의 내생포자 형성 세균과 B16, MC07, M45 등의 Pseudomonas 세균을 선발하였다. 이들 중 Paenibacillus polymyxa E681과 Pseudomonas fluorescens B16은 종자처리에 의한 병 방제와 작물생장 촉진 세균으로 균주특허를 출원하였다.

제 2절 미생물의 종자처리와 근권정착

1. 서 설

미생물의 종자처리는 미생물을 종자에 접종하여 발아하는 유근을 따라 확산하여 전체 근권에서 생장하도록 하는 것으로 미생물은 뿌리에서 분비되는 근 분비물을 영양원으로 이용하여 증식함으로서 병원균으로부터 근권을 보호하며 작물의 생장을 촉진시키는 역할을 하고 있다. 종자는 휴면상태이기 때문에 적은 량의 미생물 투입이 가능하고 다루기가 쉽고 저장과 수송이 용이하기 때문에 실용화 가능성이 높다. 또한 투입된 미생물은 작물과 함께 소멸되므로 생태계에 극히 적은 영향밖에는 주지 않는다. 따라서 종자처리용 미생물 제제의 개발은 생물적 방제를 실용화하고 보급하는데 가장 간편하고 효율적인 방법이므로 이 분야의 연구가 필수적이라 할 수 있다.

미생물의 근권정착능력은 미생물을 도입하여 식물의 생장촉진과 생물적 방제를 수행하는데 있어서 가장 중요한 요인이라고 할 수 있다. 기주식물의 근권에 정착하여 지속적인 증식을 하지 못하는 미생물은 그 처리가

일시적인 효과만을 기대할 수밖에 없다. 앞선 몇 차례의 연구를 통해 종자에 정착한 후 유근에서의 밀도변화와 존재양상에 대해 보고한 바 있었다. 그러나 근권정착 미생물의 작물 근권에 정착하기 위한 과정 중 미생물이 종자에 처리된 직후 과연 종자의 어느 부위에서 정착하고 증식하며 발아시 유근에 효율적으로 정착시키기 위한 방법에 대한 연구는 미미했다고 여겨진다. 따라서 본 실험은 미생물의 종자처리 초기 단계에서 *lux* gene을 도입하는 방법과 주사전자현미경(scanning electron microscopy)과 면역항체법을 활용한 confocal laser scanning microscopy를 이용하여 미생물의 존재양상을 알아보고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 종자처리 기술 개발

이미 보리와 고추에서 근권정착능력과 식물생장촉진효과가 인정된 균주인 *Pseudomonas fluorescens* L22와 *Paenibacillus polymyxa* E681 균주를 공시균주로 사용하였고, 종자는 오이종자(신흑진주, 흥농종묘)를 사용하였다.

종자처리 첨가제는 분말형태의 perlite, bentonite, talc를 사용하였고, 접착제로 methyl cellulose(MC), carboxy methyl cellulose(CMC), xanthan gum(XG)을 사용하였다. 균 현탁액과 20% xanthan gum를 혼합시키고 그 혼합물과 분말형 첨가제를 각각 섞은 뒤 건조시켰다. 건조 후 분쇄하여 입자형태 만들어 0.1% poly vinyl alcohol와 함께 분사하면서 오이종자에 처리하였다. 액체 형태의 접착제 처리는 0.1M $MgSO_4$ 용액에 1%의 농도로 MC, CMC, XG를 녹인 후 살균하였다. 살균된 접착제에 5×10^8/㎖의 농도로 현탁시킨 후 오이 종자를 1시간 침종시켰다. 이렇게 처리된 종자를 상온에 보관하면서 시간별로 종자에서의 생존력을 조사하고, 그에 따른 근

권정착밀도를 조사하였다.

나. 근권정착 기작 규명

1) *lux* 유전자를 이용한 유근에서의 균의 존재 양상 관찰

식물체의 근권에 정착한 생물적 방제 미생물을 효과적으로 추적하기 위하여 *Vibrio fisheri*에서 도입한 발광 단백질인 luciferase와 kanamycin 저항성 유전자가 구축되어 있는 Transposon Tn4431를 사용하여 표시 균주를 얻었다. Tn4431이 구축된 pUCD623벡터를 가진 *E. coli* HB101과 rifampicin에 저항성을 가진 *Pseudomonas fluorescens* B16을 혼합하여 mating하였다. Kanamycin과 rifampicin에 모두 저항성을 가지고 어두운 장소에서 발광이 확인되는 colony를 분리하여 22개의 균주를 얻었다. 선발된 22개의 균주 중에서 발광이 좋고, 근권정착능력과 식물생장촉진효과가 모균주와 비슷한 균주를 찾고자 Ahmad & Baker 방법으로 근권정착능력을 조사하였다.

2) Immunofluorescence microscopy, Confocal Laser Microscopy(CLSM)을 통한 뿌리에서 균의 존재양상 관찰

Immunofluorescence stain을 위해서 *P. polymyxa* E681, *P. fluorescens* L22를 0.85% 생리식염수로 3회 세척한 후 생리식염수에 McFARLAND scale 2 (6× 108/ml농도로 부유하여 면역원으로 사용하였다. 면역은 목적한 농도로 조정된 각 공시균을 등부 피하로 0.5ml을 Freund's complete adjuvant와 혼합하여 주사하고, 3주 후 Freund's incomplete adjuvant와 혼합하여 피하 주사하였다. 3주 후 3일 간격으로 균체(6× 108/ml농도)를 5차례 귀 정맥 주사하였다. 13일 경과한 후 전량 채혈하여 항혈청만을 분리하였다. 이 때 혈청내의 항체가를 Immuno-diffusion test를 한 결과, *B. polymyxa* E681, *P. fluorescens* L22로 면역한 토끼혈청

모두 210의 항체가를 나타내었다. E681을 오이 종자에 처리한 후 발아한 유근의 단면에 1차 항체(1/1000 희석)를 2시간동안 처리한 후, 0.05M PBS-T(PBS Twin-20을 0.05% 첨가)로 5분 간격으로 3회 세척하였다. 2차항체(Goat anti-rabbit IGg-FITC Conjugates, 1/1000 희석)를 1시간 동안 처리하고, 0.05M PBS-T로 5분간, 3회 세척하였다. Immuno- fluorescence microscopy, confocal laser scanning microscopy(CLSM)을 사용하여 유근의 표면과 조직세포 내부의 미생물의 존재 양상을 관찰하였다.

다. 미생물에 의한 지상부병 저항성 유도 균주 선발

3차 선발 실험을 통하여 PGPR효과가 인정되는 최종 8개 균주를 대상으로 오이 탄저병에 대한 유도저항성을 검정하였다. 2가지 품종(신흑진주, 신풍)의 오이 종자를 5×108 cfu/㎖ 농도의 균 현탁액에 15분간 침종시킨 후 상토에 파종하여 growth chamber에서 제 3본엽기까지 키웠다. 제 1본엽과 제 2본엽을 채취하여 1% water agar에 올린 다음, *Colletotrichum lagenarium*을 5×106농도로 20㎕ 10방울 접종하였다. 접종 5일 후 병반의 수를 조사하였다.

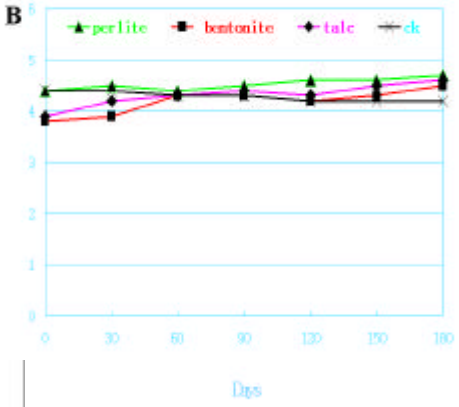
3. 결과 및 고찰

가. 종자처리 기술 개발

이미 보리와 고추에서 근권정착능력과 식물생장촉진효과가 인정된 균주인 *Pseudomonas fluorescens* L22, *Paenibacillus polymyxa* E681균주를 공시균주로 사용하였다.

L22와 E681을 종자 처리한 후 종자에서 미생물의 생존력을 조사하였을 때, E681은 내생포자를 형성하여 종자 처리한 후 200일 이상 종자에서 3×104의 밀도로 유지하였지만 L22는 종자처리 후 종자에서의 밀도가

급격히 감소하여 7일 이후로는 재분리할 수 없었다(Fig.1). 그래서 종자에 처리된 미생물의 생존력을 보다 향상시키고 종자처리 초기 단계에서 미생물의 정착력과 근권에서의 밀도를 높이고자 여러 가지 점토광물과 접착제를 이용한 실험을 수행하였다.



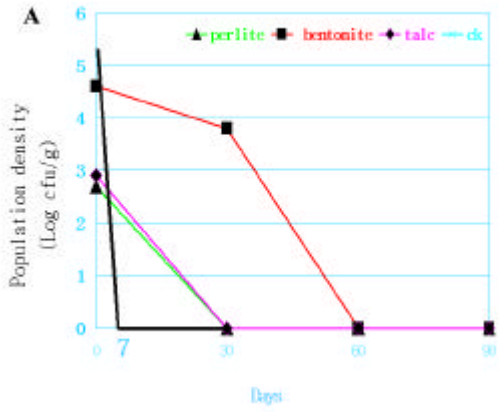


Fig.1. Survivability of *P. fluorescens* L22(A) and *P. polymyxa* E681(B) on seed of cucumber with or without pelleting materials.

분말형 첨가제로 talc, bentonite, perlite를 사용하였고, 접착제로는 methyl cellulose(MC), carboxy methyl cellulose(CMC), xanthan gum(XG)를 사용하였다. 분말형 첨가제를 L22균과 혼합하여 종자에 처리할 경우, perlite와 talc는 종자에서 L22의 생존력을 단순히 균 현탁액에 침종한 처리보다 23일 더 향상시킬 수 있었고, bentonite는 53일 더 향상시킬 수 있었다. 비록 분말형 첨가제를 혼합 처리한 경우에 비하여 효과는 낮았지만 접착제와 혼합 처리한 경우에도 미생물의 종자에서의 생존력을 향상시킬 수 있었다(Fig.2). 특히, XG의 처리 시 균의 생존력을 오이에서는 23일, 고추에서는 17일, 볍씨에서는 20일 더 향상시킬 수 있었다.

그러나 미생물들을 분말형 종자첨가제와 혼합하여 처리한 후 상토에 파종하였을 때 근권에서 L22, E681의 정착밀도는 균현탁액에 침종한 처리보다 오히려 낮은 결과를 얻었다(Fig.3). 이러한 결과는 오이 외에 고추, 볍씨에서도 동일한 결과를 얻었다.

비록 종자표면에 많은 세균을 부착시키더라도 근권정착밀도가 낮은 것을 볼 때 미생물의 종자처리방법에서 침종에 의한 방법이 근권정착밀도를 높이는데 더 효과적이라는 것을 알게 되었다. 이 결과는 종자를 세균 부유액에 침지하는 동안 종피내부로 침입한 세균이 뿌리로 이동하는데 관여하고 있다는 것을 말해 주고 있다.

종자표면과 내부에 존재하는 세균이 각각 근권에 정착하는 기여도를 알아보기 위하여 세균 부유액에 다양한 종자를 침지시키고 건조시킨 뒤 종자표면을 살균한 것 과 살균하지 않은 종자에서의 E681의 근권정착밀도를 조사하였다. 내부에 정착

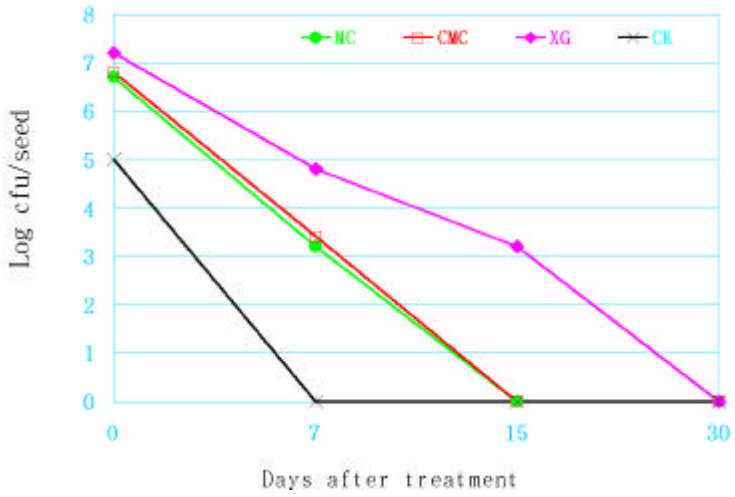


Fig. 2. Survivability of L22 on cucumber seed treated with various stickers.

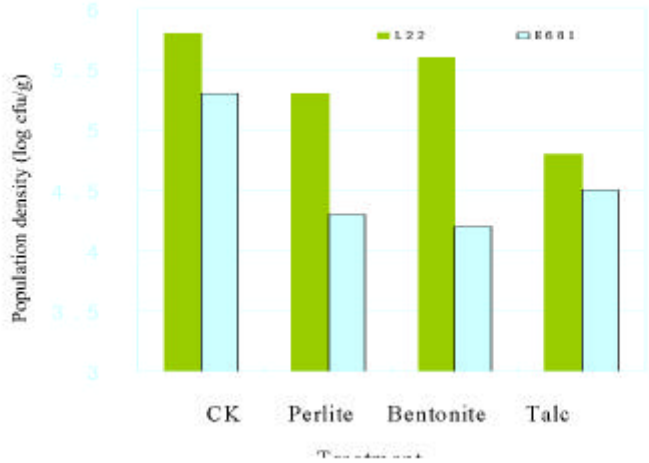


Fig. 3. Root colonization of E681 on cucumber by seed coated with various pelleting materials

하는 미생물의 밀도를 알아보고자 미생물을 종자에 처리한 후 종피를 제거시킨 종자와 완전한 종자로 나누어 종자표면과 근권에서의 L22, E681의 정착밀도를 조사하였다. 표면 살균된 오이, 고추, 볍씨, 참깨로부터 출현한 뿌리에 정착한 E681의 밀도는 표면 살균하지 않은 것과 같거나 오히려 높았다(Table 1). 종자 처리 직후 종자 내부에 이미 L22는 10^5cfu/seed, E681은 10^4cfu/seed로 정착하고 있었고 완전한 종자, 종피가 제거된 종자 모두 뿌리에서 10^5이상의 밀도를 유지하는 것을 관찰하였다(Table 2). 종자처리 후 유근이 발아하기까지 연속적으로 미생물의 밀도변화를 알아보았을 때 종자표면 뿐만 아니라 종자내부에서도 빠른 증식을 하였고 종자내부에 정착한 균만으로도 충분한 근권정착밀도를 유지 할 수 있다는 것을 알 수 있었다(Fig. 4). 이 실험의 결과로 침종 과정 중 미생물은 종자 내부에 정착한 뒤 증식하여 유근에서 미생물의 정착밀도에 직접적으로 영향을 끼친다는 것을 알게 되었다.

따라서 근권에서의 정착밀도는 침종 중 종자 내로 들어가는 균의 밀도에 직접적인 영향을 받기 때문에 근권에서의 정착밀도를 높이기 위해서는 종자 내로 들어가는 균의 밀도를 높일 수 있는 방법들이 보다 중요하다.

Table 1. Root colonizing population of *P. polymyxa* E681 from surface sterilized and nonsterilized seeds after the bacteria inoculated onto cucumber seed.

Crops	Seed surface sterilization	Population density on (×10⁴cfu/root tip)	
		Seed surface	Root
Cucumber	none	3.3	28
	sterile	-	240
Hot pepper	none	0.76	100
	sterile	-	370
Rice	none	5.0	5.4
	sterile	-	2.2
Sesame	none	0.33	17
	sterile	-	52

Table 2. Attached population densities on seed coat and their colonized population of *P. fluorescens* L22 and *P. polymyxa* E681 on the cucumber seed

Treatment	Population densities			
	Seed(×105 cfu/seed)		Root(×105 cfu/root)	
	L22	E681	L22	E681
Intact	42.01	0.33	15.21	2.82
Removed seedcoat	2.74	0.35	10.03	3.04

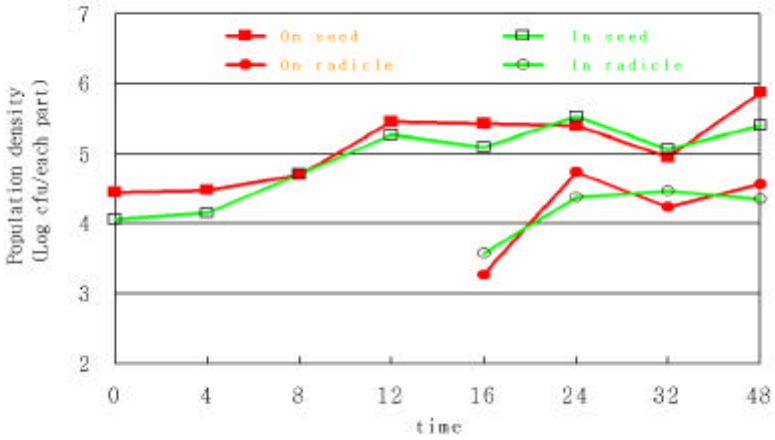


Fig. 4. Population change of *Paenibacillus polymyxa* E681 on/in emerging root of cucumber.

근권정착밀도를 향상시키고 균의 생존력을 향상시킬 수 있는 종자처리방법으로 침종처리와 XG처리의 혼합처리가 선택되었다. 2가지의 처리를 여러 가지 조합으로 종자에 처리한 후 Ahmad & Baker방법으로 근권정착밀도를 조사하였을 때 L22와 E681 모두 균현탁액에 침종시킨 후 XG로 처리하였을 때 뿌리 전반적으로 정착밀도가 높았고, 특히 뿌리의 근단에서 그 정착밀도가 다른 처리에 비해 가장 높았다(Table 3, 4).

미생물 처리 방법에서 볼 때 미생물의 분제처리보다는 미생물 현탁액에 침종하는 방법이 근권정착을 향상시키는데 더 효율적인 방법이라고 생각된다. 구체적으로 본 실험실 균주의 종자처리방법을 알아보면 E681균주는 종자를 균현탁액에 침종시키는 처리만으로도 효과적이었고, L22를 종자 처리할 경우에는 침종처리 후 Xathan Gum으로 피막 처리하는 것이 효과적인 처리법이라는 것을 알게 되었다.

Table 3. Population densities of *P. fluorescens* L22 detected from different part of cucumber root when the bacteria inoculated onto seed

root part	Treatment(×10²cfu/1-cm)			
	A	B	C	D
Top	100 b	1980 a	515 b	832 b
Middle	0.11 a	0.11 a	0 b	1.11 a
Tip	0.11 c	0.15 a	0 d	0.13 b

A: soaking itself, B: coating with XG after soaking, C: bacteria coated with XG, D: bacteria coated with XG after soaking

Table 4. Population densities of *P. polymyxa* E681 detected from different part of cucumber root when the bacteria inoculated onto seed

Root part	Treatment(×10²cfu/1-cm)			
	A*	B	C	D
Top	658 a	629 a	451 b	389 b
Middle	3.4 a	0.73 b	1.4 b	0.46 b
Tip	0.07 c	1.52 b	0.26 c	2.19 a

A: soaking itself, B: coating with XG after soaking, C: bacteria coated with XG, D: bacteria coated with XG after soaking

나. 근권정착 기작 규명

1) *lux* 유전자를 이용한 유근에서의 균의 존재 양상 관찰

선발된 22개의 균주 중에서 발광이 좋고, 근권정착능력과 식물생장 촉진효과가 모균주와 비슷한 균주를 찾고자 Ahmad & Baker 방법으로 근권정착능력을 조사하였다. *P. fluorescens* L22는 모균주인 *P. fluorescens* B16에 비해 뿌리의 중간과 끝부분의 정착밀도가 다소 떨어졌지만(Table 5), 오이에 종자 처리하였을 때 지상부 생체 중은 *P. fluorescens* B16보다 오히려 더 증가되었다(Fig.5). 처리된 균이 뿌리에 어떤 형태로 정착하고 있는지를 알아보기 위하여 *P. fluorescens* L22 균을 오이와 보리 종자에 처리하여 식물을 기르고 뿌리를 분리한 다음 1/2 LB agar 배지에 밀착시키고 상온에서 16시간 정도 균을 증식시킨 후 암실에서 ASA100 칼라 필름을 30분 노출하여 사진을 찍었다. 식물체 뿌리의 주근과 측근에서 정착하여 증식한 균을 효과적으로 확인할 수 있었다(Fig. 8).

Table 5. Spatial differences of population densities of *Pseudomonas fluorescens* B16 and bioluminescens mutant (L22) on the cucumber roots analyzed with Ahmad & Baker method

Isolate	Population density on root (×104 cfu/㎝)		
	First 1 cm	4-5 cm (middle part)	Last 1 cm
B16	79.7	5.47*	0.81*
L22	81.3*	0.40	0.18

* Significantly different(P=0.05)in each column.

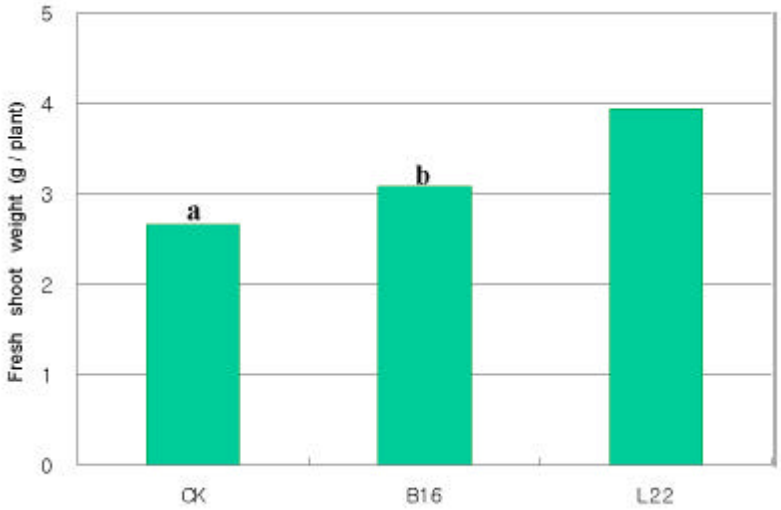


Fig. 5. Fresh shoot weight of cucumber at 15 days after seeding when the seeds were treated with *P. fluorescens* B16 (wild type) and L22 (bioluminescent mutant) in the pot soil. Values followed by the same letter do not differ significantly (P=0.05).

2) SEM을 이용한 종자와 유근에서의 균의 존재 양상 관찰

종자처리 후 미생물의 생존력, 종자에서의 정착 위치, 밀도 변화에 대한 결과를 바탕으로 하여 종자 발아 초기 단계에서의 미생물의 정착과 증식을 주사전자현미경(SEM-Scanning Electronic Microscopy, JSM-6400, JEOL Co. Japan)으로 관찰하였다. *P. fluorescens* L22는 미생물의 처리 직후 종자표면 뿐만 아니라 종자내부에 이미 정착하고 있는 것을 관찰하였다. *P. fluorescens* L22에 비해 그 정착밀도가 낮지만 *P. polymyxa* E681도 마찬가지로 종자표면, 종자내부에 정착하고 있었다. 시간의 경과에 따라

종자의 종피를 제거시킨 후 유근이 출현하는 부위를 관찰한 결과, 미생물 처리 직후 정착한 밀도에 비해 상당히 빠른 증식을 하여 높은 밀도로 유근에 정착하고 있는 것을 관찰할 수 있었다. 유근에 높은 밀도로 정착한 균들은 유근의 결을 따라 정착하고 있었다. 이렇게 정착한 균들은 지속적으로 증식하면서 뿌리 전반적으로 확산되는 것으로 보여진다. SEM의 관찰을 통해 침종과정에 종자내부로 들어간 균들은 유근이 출현하기 전에 높은 밀도로 증식을 하고, 종자의 내막에서 증식한 균들은 유근으로 직접적으로 이동한다는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6, 7).

3) Immunofluorescence microscopy, Confocal Laser Microscopy(CLSM)을 통한 뿌리에서 균의 존재양상 관찰

E681을 종자 처리한 후 오이 뿌리에 존재하고 있는 양상을 Immunofluorescence microscopy, Confocal Laser Microscopy(CLSM)를 이용하여 관찰하였다. *B. polymyxa* E681을 항원으로 하는 항체는 이 균에 대해서만 특이적으로 반응하였고, 2차 항체를 처리하였을 때 균의 표면에 염색이 되는 것을 확인하였다. 뿌리표면에 많은 균들이 뿌리의 결을 따라 정착을 하고 있었고, 주근 뿐만 아니라 측근에서도 많은 균들이 정착하고 있었다. 뿌리의 측근이 나오는 시기, 주근에 정착하였던 *B. polymyxa* E681이 측근이 나옴에 따라서 그 지점의 밀도가 높아지고 측근이 생장함에 따라 측근쪽으로 이동하는 것을 관찰하였다. 또한 뿌리조직 내부의 세포간극 사이에도 균이 존재하고 있는 것이 관찰되었다. 유근의 단면에서 유근의 안쪽보다는 바깥쪽에서의 정착 밀도가 높음을 알 수 있었다(Fig.9)

다. 미생물에 의한 지상부병 저항성 유도 균주 선발

3차 선발 실험을 통하여 PGPR효과가 인정되는 최종 8개 균주를 대상

으로 오이 탄저병에 대한 유도저항성을 검정하였다. 종자처리에 의한 탄저병 유도 저항성 균주로 94X01, CHa94, M45등이 가능성 있는 것으로 나타났다(Table 6).

Table 6. Induced systemic resistance mediated by eight rhizobacteria strains against *Colletotrichum lagenarium* in two cucumber cultivars

strains	Mean total lesion number			
	Shinhugchinju		Shinpung	
	leaf 1	leaf 2	leaf 1	leaf 2
94B16	3.00	4.33	5.33	5.00
Cha 94	-	4.00	4.50	4.53
CY6	2.60	4.33	9.00	5.60
MC07	2.40	7.33	8.97	5.62
M45	1.00b	5.33	6.00	4.00
SH60	2.30	2.33	8.67	1.44
94X01	1.33b	4.00	8.00	1.38
94V13	2.27	-	-	-
CK	3.57	5.00	9.00	4.38

* Significantly different(P=0.05)in each column.

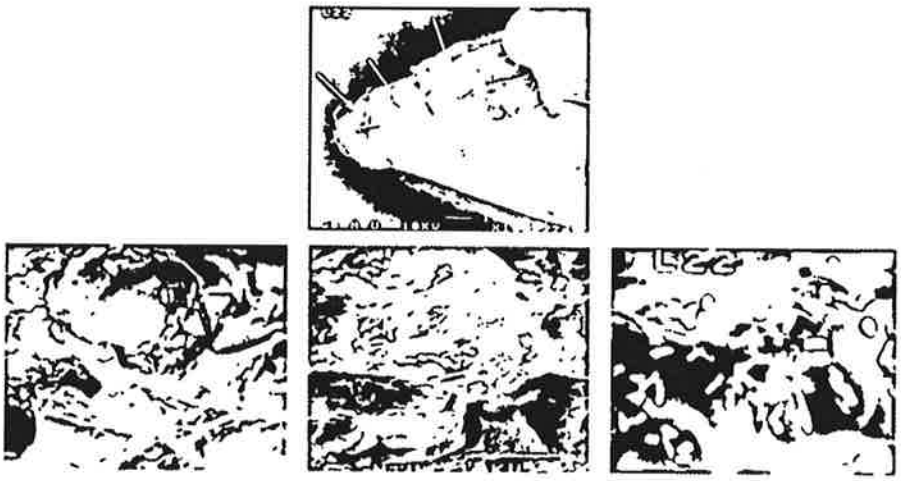


Fig.6. Scanning electron microscopic observation of L22 on cucumber seed 6hrs after seed inoculation. A,C: Cells of L22 on a endothelium of seed, B: Cells of L22 on a radicle

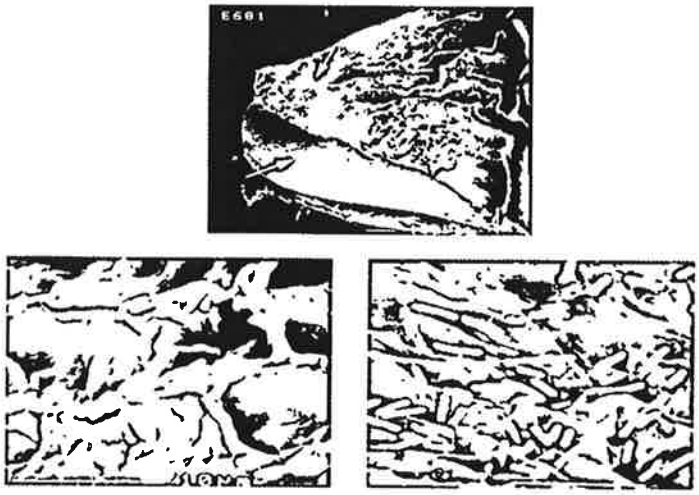


Fig. 7. Scanning electron microscopic observation of E681 on cucumber seed 6hrs after seed inoculation. A: Cells of E681 on a radicle, B: Cells of E681 on a endothelium of seed.

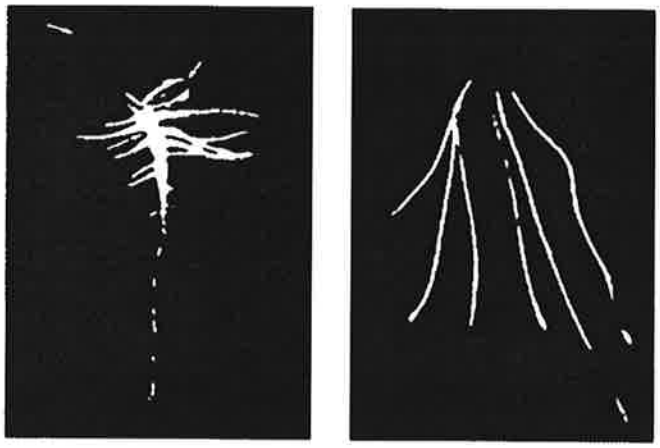


Fig. 8. In situ observation of lux gene introduced P. fluorescens L22 on the young cucumber root when bacteria were introduced through seeds. The plants were inoculated and incubated in the filter paper. The photographs were taken under dark condition ASA100 film with 30 min exposure. Left : cucumber root, right : barley root.

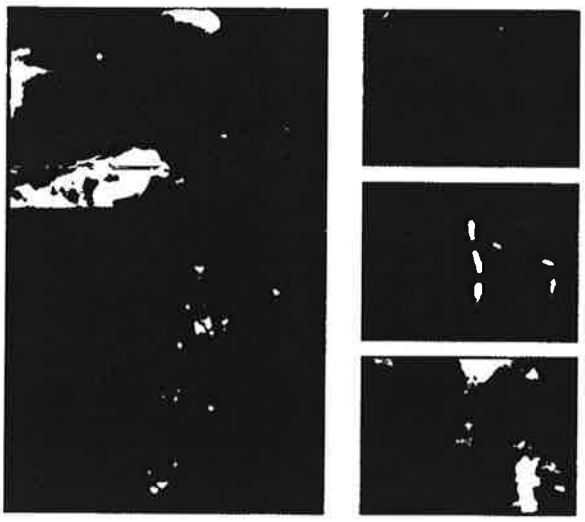


Fig. 9. Cells of *P. polymyxa* E681 on the surface and inside of root and lateral root that observe through immunofluorescence microscopy. I : overall view of lateral root emerging. II : Enlarge of each square field. A: cells of E681 locate around emergent site of lateral root. B,C: Cells of E681 on the surface of lateral root.

제 3 절 미생물의 종자처리에 의한 작물의 생장 촉진효과

1. 서 설

주요한 토양 병에 대한 억제력과 근권정착능력을 가진 선발균주를 대상으로 보리, 밀, 고추, 참깨, 벼의 종자에 처리하여 식물생장촉진능력을 포장에서 알아보고자 하였다. 본 연구는 토양과 근권에서 분리한 미생물을 보리, 밀, 고추, 참깨, 벼 종자에 처리하여 근권에 정착시키고 그 결과로 토양병을 방제하고 작물의 생장을 촉진시키는 현상을 구명하고자하였다

2. 재료 및 방법

가. 미생물의 종자처리에 의한 보리, 밀의 생장촉진 효과

실내실험에서 생장촉진 효과가 인정된 균주 *P. polymyxa* E681, G157와 앞서 연구에서 근권정착능력이 우수한 *Ps. fluorescens* B16등을 보리, 밀 종자에 직접 처리한 후 월동전후의 보리의 생장과 분얼경수, 출수일, 유효분얼경수, 처리균의 근권정착밀도 및 최종 평균수량을 조사하였다.

나. 선발된 균주들의 종자처리에 의한 고추의 생장촉진효과

E681와 L22균주를 상토처리나 관주처리에 비해 생장촉진효과가 인정된 종자처리 방법을 이용하여 고추종자(녹광, 흥농종묘)에 처리한 후 plug 육묘상에서 생장촉진 효과와 근권정착능력을 조사하였다. 고추묘의 지상부와 지하부의 무게, 엽수, 엽면적, 꽃망울수, 풋고추의 누적수량을 측정하고 근권 정착밀도 변화를 조사하였다. plug 육묘상에서 50일된 고추묘를

직접 농가에 보급하여 농가실험을 수행하였고 고추수량 및 자연 발생한 고추역병에 대한 균주의 병억제력도 조사하였다.

다. 미생물의 종자처리에 의한 참깨의 생장촉진효과

1)실내에서의 발아실험

실내 발아시험 중 pot 시험은 참깨 연작재배지 사질 양토를 pot에 넣고 관수한 후 실내에 12시간 놓아둔 다음 과립 또는 미생물처리 종자를 파종한 다음 5㎖ 씩 물을 넣고 23℃의 항온기에 두었다. plate 발아시험은 3, 6일째, 토양발아시험은 3, 6, 9, 12, 15, 30일째 발아율을 조사하였다.

2) 포장시험에서 미생물의 종자처리 방법

참깨의 연작재배로 인해 토양병의 발생이 빈번한 지역에 근권정착능력과 토양병에 대한 생물적 방제 능력이 인정된 *P. polymyxa* E681과 *Ps. fluorescens* M45균주를 참깨종자에 직접 처리하거나, 0.1% PVA와 균주를 각각 혼합 후 5가지 과립조합 (talc, clay+talc, clay+vermiculite, clay+peatmoss, clay+vermiculite)을 제조하여 100㎖씩 분무하여 접종 과립된 종자를 병발생율이 높았던 지역에 파종하였다. 1998년 포장시험에는 전국 18개 농가에 미생물을 처리한 종자를 보내서 농민이 직접 파종케 하여 시험하였고 전국을 순회하면서 간장, 꼬투리수를 조사하였고 수확 후 수확량을 조사하였다.

라. 미생물의 종자처리에 의한 벼의 생장촉진효과

보리와 고추에 생장촉진효과가 인정된 E681, G157, H210, B16, L22 균주 중에서 1차 pot 시험으로 선발한 벼의 생장촉진효과가 있는 H210을 선발하여 공시하였고 벼의 근권에서 분리한 F29 (미동정)를 공시균주로 사용

하였다.

1)실내시험 종자 발아시험

공시한 미생물을 0.1M MgSO4 세균부유액에 침종하여 상온에서 건조한 후 수분을 공급한 filter paper를 깐 petri plate에 벼종자를 50립씩 치상하여 12, 24, 36,48시간을 주기로 미생물처리에 의한 발아촉진효과를 조사하였고 종자전염성 곰팡이에 의한 발아감소와 미생물처리에 의한 발아율 향상을 조사하였다.

2)간척지 토양에서 발아시험

미생물의 벼 (일품) 종자에 직접 처리하여 매년 입모가 불량한 간척지 논토양을 채집하여 pot (15×20×10 ㎝)에 채우고 미생물을 처리한 종자 100립씩 파종하여28℃ 식물배양상에 놓고 파종 21일 후 입모율을 조사하였다.

3)포장시혐

1997년 5월, 경상대학교 농과대학 부속농장 벼직파재배 포장에 실험을 실시하였다. 공시 품종으로 농안벼, 대산벼, 동진벼, 삼남밭벼, 신선찰벼, 진부찰벼, 화성찰벼등 7품종의 볍씨를 사용하였다. 볍씨에 L22를 25℃에서 24시간 침종한 후 매일 한번씩 물로 씻어주면서 5일간 물에 침종하여 백아(white tip)를 틔운 뒤 꺼내 물을 빼서 24시간 최아를 시키고 포장에 직파하여 파종 21일째 입모율을 조사하였다. 1998년 4월 에 H210, L22와 서산농장에서 볍씨를 소독할 때 사용하는 metalaxyl 살균제를 처리하여 24시간 동안 볍씨(일품)를 침종하여 서산농장에 직파하여 포장실험을 실시하여 파종 30일째 0.25 ㎡ 당 입모수를 조사하였다. 당해 경상남도 농촌진흥

원 포장에서 공시한 H210, B16, L22, F29를 볍씨(대산벼)에 처리하여 상자 육묘에서 키운 후 포장에 기계 이양을 하여 초장, 이삭수, 이삭길이, 낟알수, 천립중, 수확량은 수량구성요소에 해당하는 조사항목으로 조사하였으며, 동일 포장에서 자연 발생한 잎집무늬마름병의 병반과 미생물에 의한 병억제력을 조사하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 보리, 밀의 생장촉진 및 병 방제

1) 보리, 밀의 입모율

1996년 선발된 *Paenibacillus polymyxa* E681과 G157 그리고 *Pseudomonas fluorescens* B16을 보리종자에 처리하여 경상남도 진흥원 포장에 파종하여 파종 15일 후 입모율을 조사한 결과 무처리에 비해 더 높은 입모율을 보였고, 단위 면적당 더 많은 수의 입모를 보였다. 1997년의 결과에 의하면 예년에 비해 기온이 다소 높아서 무처리에 비해 큰 차이를 볼 수 없었지만 1998년의 결과는 1996년에 실험하였던 것과 비슷한 현상을 보여 각각의 미생물처리구가 무처리에 비해 높은 입모율과 단위면적당의 많은 입모수를 보였다 (Fig. 1, Fig. 2). E681, G157, B16의 종자처리에 의한 초기 입모율 향상은 보리, 밀 종자의 발아생리에 영향을 끼쳐 초기 발아를 촉진시킨데 기인된 것으로 분석된다.

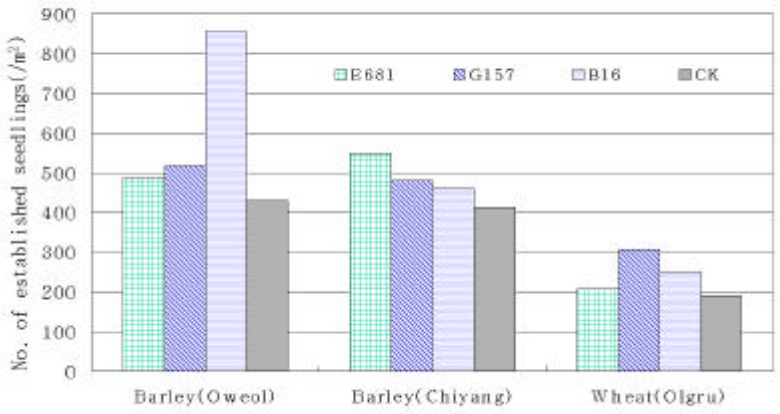


Fig. 1. Number of established seedlings of barley and wheat treated with *Ps. fluorescens* B16, *P. polymyxa* E681, and G157 in Gyeongnam RDA experimental field.

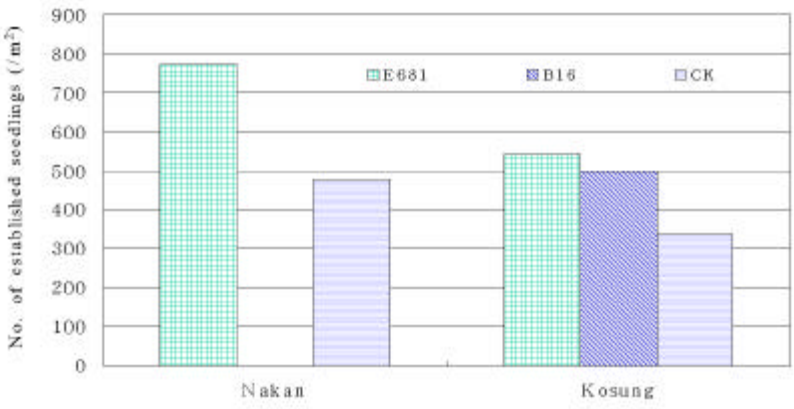


Fig. 2. Number of established seedlings of barley treated with *Ps. fluorescens* B16 and *P. polymyxa* E681 in Nakan and Kosung experimental fields.

2) 보리, 밀의 월동 전후 유묘기 생육 조사

1996년과 1998년의 결과에 의하면 입모 후 보리, 밀의 유묘생장에 있어서 월동 전후의 전체무게와 지상부의 길이를 조사한 결과 조기 생육시기인 월동전과 월동 후 미생물처리 모두 무처리에 비해 현저한 차이를 보였다. 1997년의 실험 결과의 경우는 파종기인 10월 하순과 11월이 예년에 비해 상당히 높은 기온의 영향으로 유묘 생장에는 큰 차이를 보이지 않았고 월동 후에도 생장의 차이를 볼 수 없었다. 월동작물인 보리와 밀의 유묘생장은 겨울을 나서 이듬해 봄에 생장을 하기 위한 힘을 보유하는 시기로 월동전 유묘가 왕성하고 튼튼할수록 전체적인 작물의 생육에 큰 영향을 미칠 수 있다.

3) 분얼수 및 출수율 조사

1996년의 결과에 있어서 월동전에는 큰 차이를 보이지 않았지만 월동 후인 3월 10일 경부터 미생물 처리구는 무처리에 비해 더 빨리 분얼을 시작하여 많은 수로 분얼경수를 유지하였고 직접적으로 수량에 영향을 미치는 것으로 알려진 유효 분얼경수 조사에서도 E681은 무처리에 비해 25%로 높게 나타났다 (Fig. 3). 1997년의 조사결과는 50%이상의 증가를 보였고, 지금 진행중인 1998년의 실험조사 결과도 이와 비슷한 수준으로 유지될 것을 기대한다.

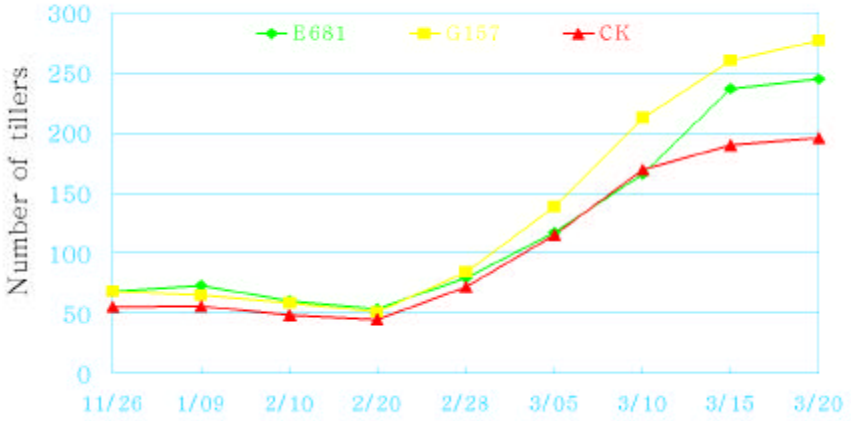


Fig. 3. The number of tiller of barley treated with *P. polymyxa* E681 and G157 for 4 months in Gyeongnam RDA experimental field (1997).

1996년 실험의 경우 미생물처리구는 출수 및 생육기가 무처리구에 비해 최고 13일 까지 단축하였으며 평균 7일 이상 앞당겼다. 월동기간 중 기온이 비교적 온화하였던 1997년에는 무처리에 비해 1-2일 정도만 단축하였는데 1997년에 남부지역에서는 전체적으로 보리의 출수일이 평균 7일에서 10일 단축되었다. 이러한 결과는 보리에 처리한 미생물이 저온기의 작물생장을 촉진하는 특성을 가짐으로 전체적으로 온도가 높을 때는 별로 효과가 없는 것으로 여겨진다 (Fig. 4, 5).

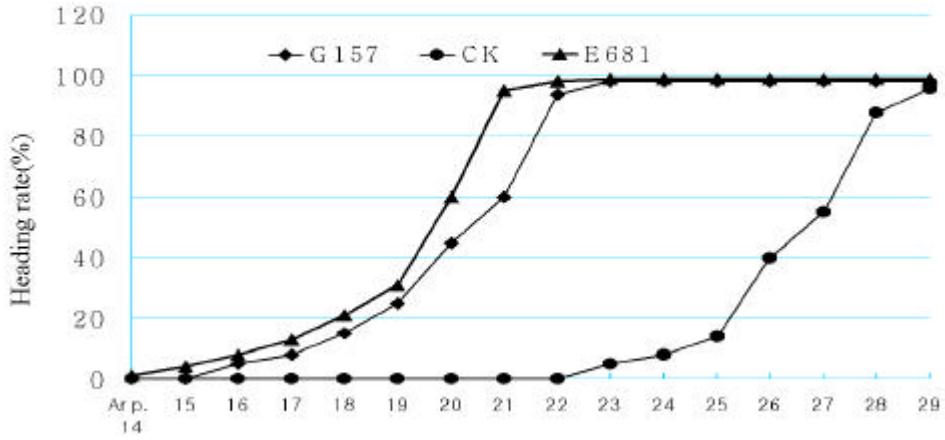


Fig. 4. Heading rate of barley treated with *P. polymyxa* E681 and G157 in Gyeongnam RDA experimental field (1997).

4) 보리, 밀의 근권에서의 정착밀도 조사

파종 후 30일 간격으로 처리 미생물의 보리, 밀 뿌리 1g 에서 정착밀도를 도말평판법으로 조사하였다. E681은 2.0×104 cfu/root, G157은 5.0×10[illegible] 1.0×104 cfu/root정도로 정착하였고 L22의 경우는 보다 많은 수로 정착하였는데 1.0×10[illegible] 1.0×106 cfu/root의 정착밀도를 보였다 (Fig. 6). 처리미생물은 보리와 밀이 생장을 계속할 때는 식물체 뿌리에 정착하여 함께 생존하였고 이에 따라 미생물의 지속적인 효과를 기대할 수 있었던 것으로 분석된다.

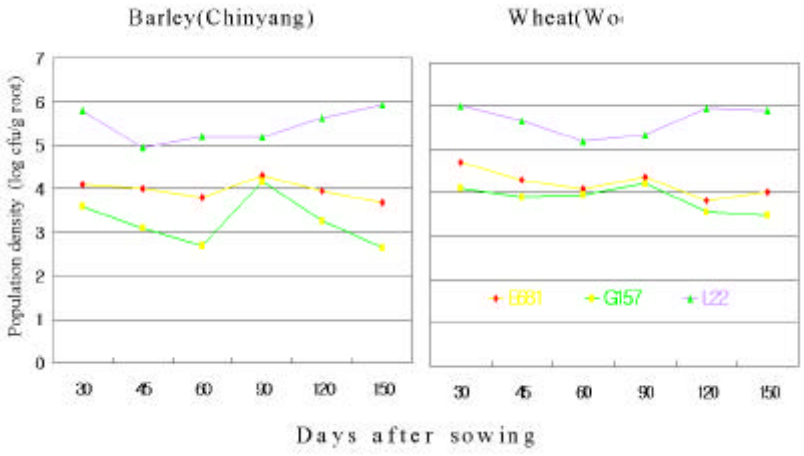


Fig. 6. Population densities of *Ps. fluorescens* L22, *P. polymyxa* E681, and G157 colonized on barley and wheat root in Gyeongnam RDA experimental field.

5) 보리, 밀 수확 후 수량 조사

1996년 파종 이듬해인 1997년의 최종적으로 평균 수량에 있어서 무처리에 비해 E681의 경우 503.79 kg/10a로 39.5%의 증수효과를 보였고 (Table 1), 파종 이듬해 1998년의 수확량은 품종에 따라 다소 차이를 보였지만 무처리에 비해 보리에서 E681과 L22는 각각 5, 6%의 증수효과를 보였으며 밀의 경우 각각 28, 14%의 증수효과를 보여 주었다 (Fig. 7). 1997년 수확량에 큰 차이가 없었던 것은 이상기온으로 예년에 비해 날씨가 따뜻하여 전체적인 보리생육에 큰 차이가 없었으며 수확기에 많은 비로 인해 전국적으로 피해를 입혔던 맥류 붉은곰팡이병의 피해로 정확한 포장실험 결과를 얻을 수 없었던데 기인된 것으로 본다.

Table 1. Effect of *P. polymyxa* E681 seed treatment on the yield production of winter barley (1997)

Treatment	Grain yield (Kg/10a)			Average
	I	II	III	
E681	554.88	452.75	503.75	503.79*
CK	382.25	386.06	315.13	361.15

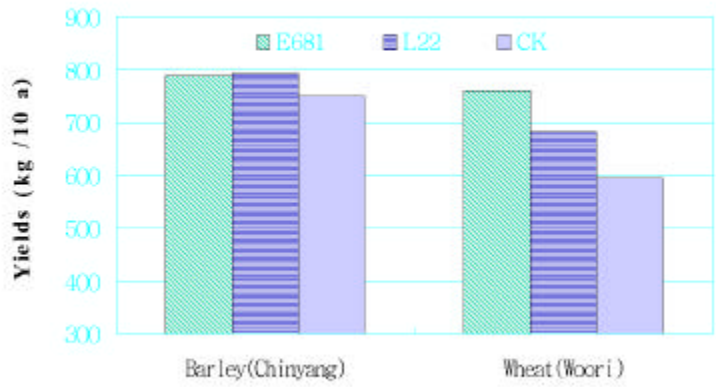


Fig. 7. Yield of barley and wheat treated with *Ps. fluorescens* L22 and *P. polymyxa* E681 in the field condition (1998).

나. 미생물의 종자처리에 의한 고추의 생장촉진 및 병 방제

1) 고추 유묘의 생장

P. polymyxa E681과 *Ps. fluorescens* L22를 고추종자에 처리하여 플러그육묘장에서 실시되고 있는 기계파종기로 파종하여 고추유묘기의 생장을 조사하였다. 파종에서부터 정식직전인 50일 까지 10일 간격으로 초기생장을 조사한 결과, 20일된 유묘에서는 처리구와 무처리구 사이에서 생장의 차이가 없었으나 시간이 지날수록 생장에 차이가 나기 시작하여 50일된 유묘에서 L22의 경우 무처리에 비해 지상부와 지하부의 생체중과 건물 중에서 15-51%, E681의 경우 25-73%의 생장 촉진 효과를 보였고, 초장은 2-3 cm가 길었고, 엽수는 1-2장이 많았다 (Fig. 8, 9, 10, Table 2, 3). 수량과 직접적인 연관이 있는 꽃망울 수에서는 무처리와 비교해 L22는 2개, E681은 2.5개 정도 많았고, 엽면적에서도 주당 L22는 27 cm^2, E681은 36 cm^2가 넓었다 (Fig. 11)

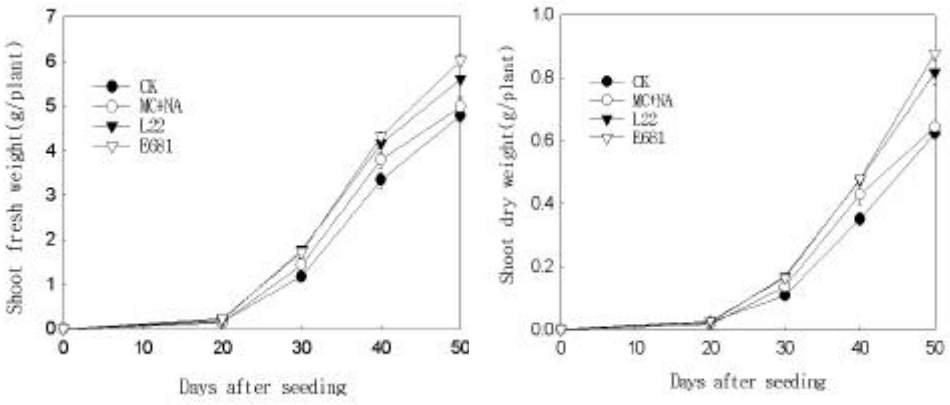


Fig 8. Enhancement of shoot weight of hot pepper by seed treatment of *Ps. fluorescens* L22 and *P. polymyxa* E681 in plug nursery. CK : not treated. MC + NA : Seeds were treated with 1.0 μg/ℓ nicotinic acid in 1% methylcellulose solution. A : Fresh weight, B : Dry weight.

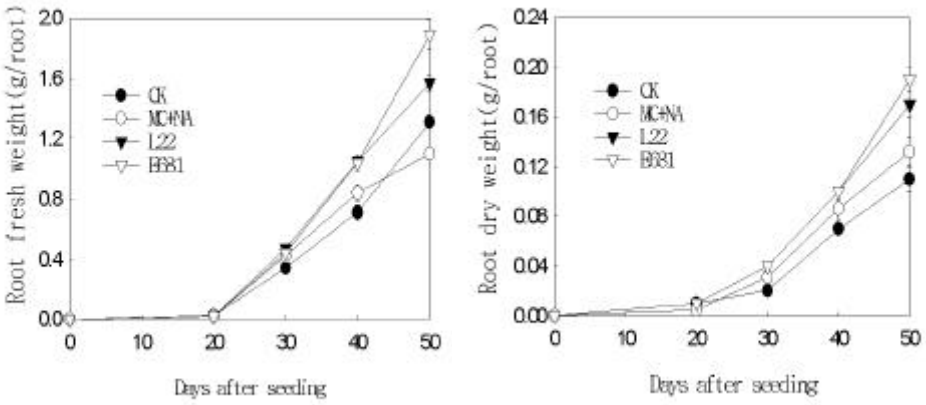


Fig 9. Enhancement of root weight of hot pepper by seed treatment of *Ps. fluorescens* L22 and *P. polymyxa* E681 in plug nursery. CK : not treated. MC + NA : Seeds were treated with 1.0 μg/ℓ nicotinic acid in 1% methylcellulose solution. A : Fresh weight, B : Dry weight.

Table 3. Enhancement of number of leaf of hot pepper by seed treatment of *P. fluorescens* L22 and *B. polymyxa* E681 in plug nursery

Treatment	Number of leaf at days after seeding			
	20	30	40	50
L22	4.3±0.07	8.8±0.12	13.3±0.13	18.8±0.70
E681	4.8±0.06	8.5±0.29	13.5±0.29	18.3±0.48
MC + NA	4.1±0.13	8.2±0.23	12.3±0.07	16.5±0.13
Control	4.3±0.24	7.8±0.12	12.1±0.13	16.1±0.53

aMC + NA : Seeds were treated with 1.0 μg/ℓ nicotinic acid in 1% methylcellulose solution.

bcontrol : not treated.

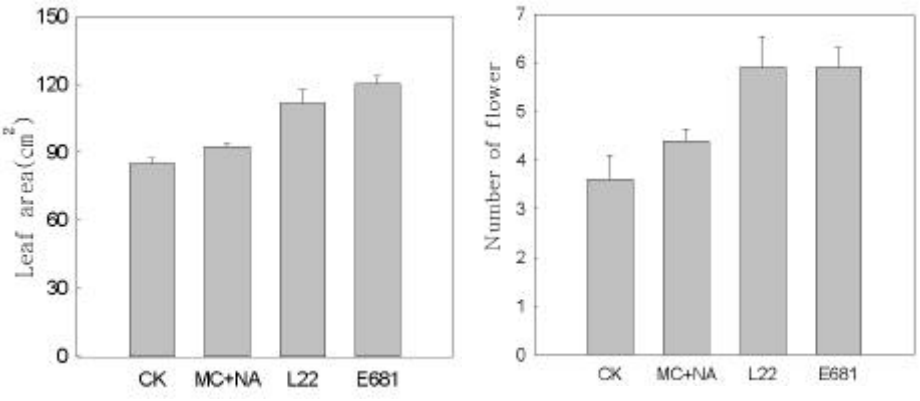


Fig 11. The increment of leaf area(A) and flower number(B) of hot pepper by seed treatment of *P. fluorescens* L22 and *B. polymyxa* E681 at 50 days old seedling. CK : not treated. MC + NA : Seeds were treated with 1.0 μg/ℓ nicotinic acid in 1% methylcellulose solution.

2) 고추 근권에서의 정착밀도 조사

파종에서부터 정식직전의 50일 된 유묘의 근권에서 E681은 104 cfu/root의 밀도를 일정하게 유지하였고, L22는 10일 된 유묘의 근권에서는 103 cfu/root로 밀도가 떨어졌지만 20일 된 유묘에서는 밀도를 회복하기 시작하여 50일 된 유묘에서는 104 cfu/root의 밀도를 유지하였다. 정식에서부터 수확말기까지 고추의 근권에서 처리한 미생물 L22와 E681은 10⁴ 5 cfu/root의 밀도를 유지하였다 (Fig. 12).

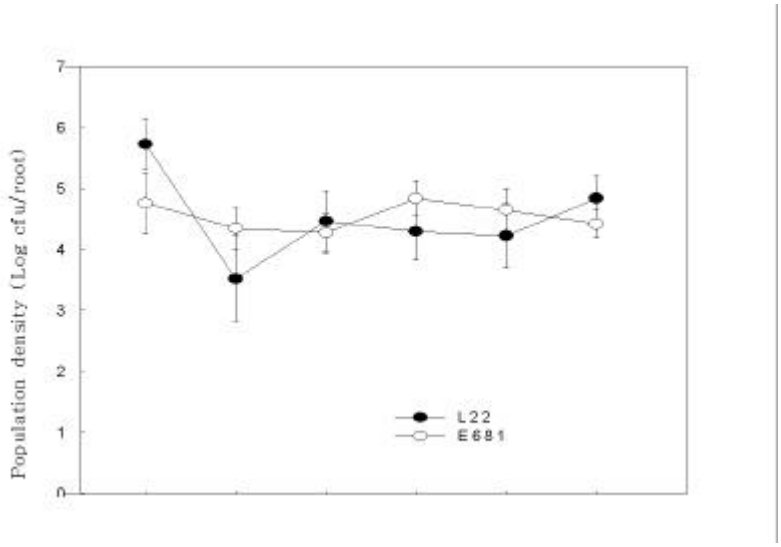


Fig. 12. Population density of *Ps. fluorescens* L22 and *P. polymyxa* E681 on root of hot pepper in plug nursery.

3) 고추 수확 후 수량 조사

1996년도에 6회에 걸친 풋고추의 누적수량의 결과 L22는 무처리와 비교해 30 40%, E681은 170%의 증수효과를 보였고, 1997년 8회에 걸친 풋고추의 누적수량의 결과 L22와 E681 모두 무처리와 비교해 40 50%의 수량증대를 보였다 (Fig.13, Fig. 14). 고추의 수량증대는 몇 차례 반복실험에서 게속 확인된 것으로 특히 시비량이 많지 않고 토양 병원균의 밀도가 높은 토양에서는 이러한 효과가 어 크게 나타났다. 뿌리생장 또한 무처리에 비해 미생물처리구는 굵고 왕성하게 나타났다.

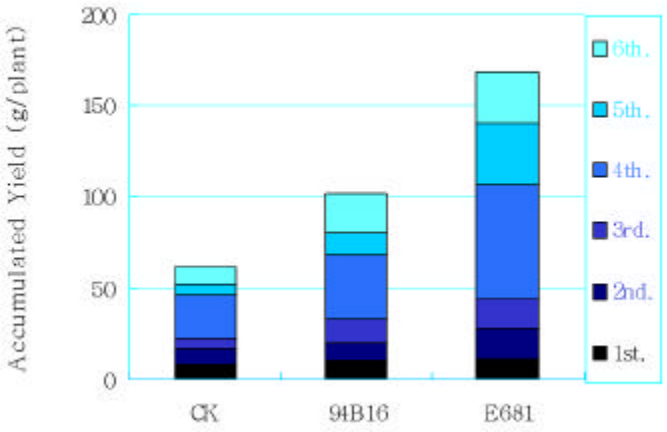


Fig. 13. Accumulated weight of green pepper fruits harvested the plants that the seeds were treated with *Ps. fluorescens* L22 and *P. polymyxa* E681, and untreated (1996).

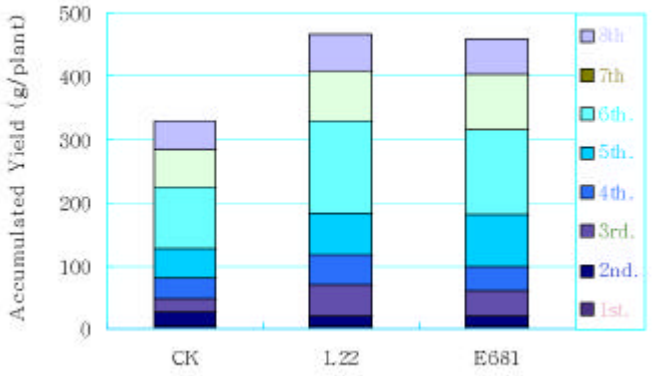


Fig. 14. Accumulated weight of green pepper fruits harvested the plants that the seeds were treated with *Ps. fluorescens* L22 and *P. polymyxa* E681, and untreated (1997).

4) 고추역병에 대한 발병 억제력 검정

생장촉진과 근권정착능력에 대한 효과를 보여주었던 E681 균주와 L22 균주를 고추역병균(*Phytophthora capsici*)에 대한 억제능력을 실험한 결과, 배지 상에서 E681 균주는 강한 억제력을 보인 반면, L22 균주는 역병균에 대한 억제효과가 없었다. 그러나 고추역병이 자주 발생한 포장에 E681과 L22 균주를 고추종자에 처리하여 정식 45일 후 병발생을 관찰한 결과 L22 처리구에서는 1주, E681 처리구는 7주, 무처리구는 28주가 감염되었다. L22와 E681 처리구는 무처리구에 비해 실제 농가 실증실험에서 역병의 억제효과를 보였다 (Fig. 15). 배양기에서 병원균과의 억제력에는 효과가 없는 L22가 실제 포장에서 역병에 의한 병역제효과를 보이는 것은 배양기 조건에서는 항균물질을 분비하지 않고 영양분이 다소 부족한 근권환경에서만 분비되어 병이 억제되었거나 Joshep Hendelsman 박사의 연구 결과와 같이 L22의 처리에 의해 고추 뿌리에서의 미생물사의 변화로 인해 역병균의 병발생이 억제된 것으로 생각되어지며 또 한가지는 L22가 고추에 저항성 유전자발현에 관련된 물질을 생산하여 유도저항성 기작을 보인 것으로 이중 한가지에 의해 병억제력을 해석할 수 있으리라본다.

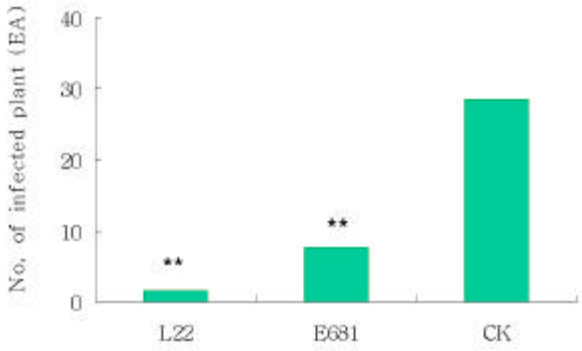


Fig. 15. Effect of suppression against phytophthora blight by *Ps. fluorescens* L22 and *P. polymyxa* E681 in farmer's vinyl-house.

다. 참깨의 생장촉진 및 병 방제

1) 미생물의 종자처리 후 참깨종자의 입모율 조사

안정적인 과립재료를 선발하는 실험에서 Clay와 Vermiculate가 발아율과 종자표면에서의 생존율, 그리고 뿌리에서의 근권정착밀도에서 다른 처리에 비해 우수하였다. 점착제로는 1 % PVA를 선발하였고 선발된 조합과 *Ps. fluorescens* M45와 E681을 참깨종자에 과립 처리하여 Petri plate에서는 무처리와 모든 처리구에서 입모율에 차이가 없었지만, 연작지 토양을 사용한 결과 연작지 토양에서 실시한 Pot실험에서는 그 차이가 뚜렷하여 M45의 경우 78%, E681의 경우 73%, 무처리는 10.3%이었으며, 포장실험에서는 그 발아율이 무처리에 비하여 40-60% 높았다 (Table 4).

Table 4. Germination rate of sesame seeds coated with *Ps. fluorescens* M45 and *P. polymyxa* E681(1997)

Treatment	Petri plate(%)	Pot trial(%)	Field test(%)
M45	92.7	78	99
E681	94.0	73	98
CK	98.3	10.3	56.5

2) 종자처리에 의한 유묘 생장 촉진 효과

1997년의 결과에 의하면 전체적으로 관행에 비하여 경장과 착삭부위장이 10㎝이상 길어져 지상부 생육이 양호한 것으로 나타났다. 미생물간에는 M45가 E681에 비해 지상부 생육이 좋고 포장의 병충해 발생은 관행에 비하여는 미생물접종처리가 엽고병의 병반과 역병의 발생정도가 적었다.

파종 78일 후 M45 , E681 각각 76%, 92%정도로 무처리에 비해 건전주의 수가 월등히 많았다 (Table 5). 1998년 8월에 전국 각 지역으로 대단위 포장실험을 실시하였다. 미생물 처리 종자를 재배한 농가는 전국에 18농가 이었으나 그중15개 포장에서 조사가 가능하였다. 조사한 15개 포장 중 12개 포장에서 간장이 10% 이상 길었으며 15개 모든 포장에서 이삭의 길이가 길었다. (Fig. 16, Table 6).

3) 시들음병의 억제력 조사

생장촉진과 근권정착능력에 대한 효과를 보여주었던 E681 균주와 M45 균주를 참깨의 damping-off에 대한 억제능력을 실험한 결과 건전주율에 있어서 M45처리구에서는 79%, E681 처리구는 92%, 무처리구는 22%로 미생물 처리구에서 보다 높은 건전주율을 보였다 (Fig. 17).

Table 5. Healthy stand of sesame by palletizing and seed treatment with *Ps. fluorescens* M45 and *P. polymyxa* E681 (1997)

Treatment	Untreated-CK	Pelleted-CK	M45	E681
Healthy stand(%)	24.7	40	76	92

Table 6. Enhancement of stem length, pod number, and yield of sesame with seed treatment of *P. polymyxa* E681 (1998)

Location of Farmer's Fields		Stem length (cm)		Pod number (per plant)		Yeild (kg/10a)	
		CK	E681	CK	E681	CK	E681
Kyeongki	Younchun	144	185	75	94	78	78
	Hwasung	111	123	63	75	-	-
	Ansung	130	128	62	66	60	65
	Pochun	148	145	70	74	65	67
Kangwon	Youngwol	105	121	52	66	-	-
Chungbuk	Umsung	115	125	78	91	-	-
Cyeungbuk	Kumi	124	138	61	79	-	-
	Kumi	124	140	93	96	38	43
Choungbuk	Gongju	149	175	60	87	86	94
Junnam	Goksung	145	150	61	72	56	59
	Goksng	128	134	54	57	-	-
Cyeungnam	Hadong	105	103	57	75	-	-
	Chinju	102	116	70	79	50	48
	Chinju	93	112	50	64	-	-
	Changwon	163	160	64	72	68	74

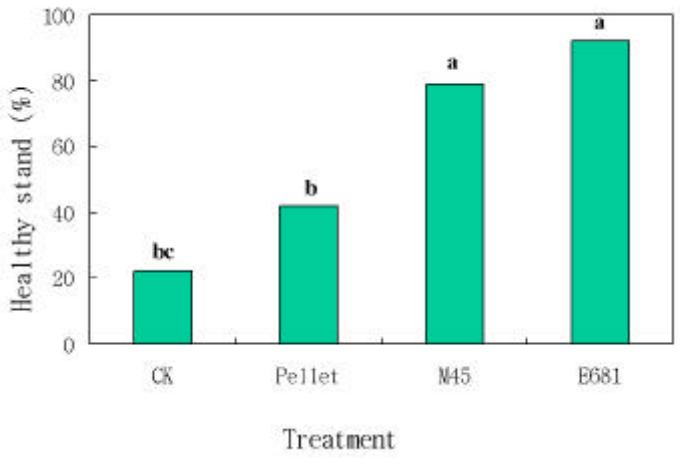


Fig. 17. Heslthy stand of sesame that the seeds were pelletized and treated with by pelletizing and seed treatment with *Ps. fluorescens* M45 and *P. polymyxa* E681 2 months after seeding. Columns with the same letter are not significantly different at p=0.05 protected LSD.

4) 참깨 수확 후 수량조사

1997년의 포장실험에서 얻은 수량조사에서 최종적으로 평균 수량이 무처리에 비해 E681과 M45의 경우 평균수량이 각각 74.4kg/10a, 79.5kg/10a이며 무처리가 66.8 kg/10a로 11.3, 19%의 증수율을 보였다 (Table 7). 1998년에 얻은 결과에 의하면 E681의 처리구는 무처리에 비해 간장과 꼬투리수가 길거나 많이 달려서 수확량까지 그 효과가 이어질 것으로 믿어졌는데 전체적으로 8개 포장에서만 최종 수량을 알려 왔는데 그중 5개 포장에서 현저한 수량 증가를 보였다. 수확기를 전후로 하여 전국에 걸친 기후 이상으로 그 수량을 정확히 측정하지 못하여 아쉬움이 있다 (Table 6).

라. 종자처리에 의한 벼의 생장촉진 및 병 방제

보리와 고추에 생장촉진 효과가 인정된 E681, G157, H210균주 중에서 1차 선발에서 벼의 생장촉진효과가 있는 H210을 선발하여 공시하고, 일품벼 종자를 사용하였다. 근권정착 능력이 우수한 L22와 벼의 뿌리에서 분리한 F29 (미동정)를 공시 균주로 이용하였다

Table 7. Yield increasing of sesame by pelletizing and seed treatment with *Pseudomonas fluorescens* M45 and *Bacillus polymyxa* E681 in field, GSNU research farm, Daegok, Chinju (1997).

Treatment	No. of capsules/plant	wt / L(g)	Grain yield(Kg/10a)
CK	48	591.4	60.4
Pelletizing-CK	67	606.2	66.8
M45	57	635.0 *	79.5 *
E681	58	634.3 *	74.4 *
LSD(.05	18.9	15.2	12.2

* indicates significant difference from the control (P=0.05)

1) 미생물의 종자처리 후 실내에서의 벼 발아율 조사

H210, L22, F29를 이용하여 벼의 초기 발아촉진 실험한 결과, 36시간을 전후하여 미생물 처리구에서는 무처리에 비해 각각 22, 14, 11%의 발아촉진 효과가 있었다 (Fig. 18). 이는 벼직파재배에 있어서 볍씨가 발아하는 불리한 환경에서 신속하게 뿌리를 내릴 수 있는 여건을 만들어줄 수 있다고 여겨진다. 이는 실제 포장에서의 활용 가능성이 높아질 수 있는 결과라고 생각되어진다.

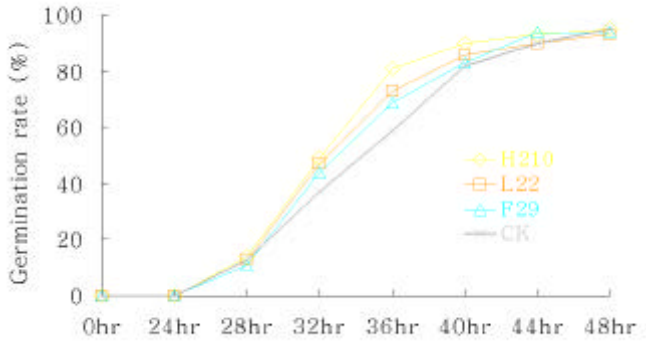


Fig. 18. Enhancement of early germination by the seed treatment with *Ps. fluorescens* L22, *P. polymyxa* H210, and F29 in Petri plate at 28℃.

2) 벼 종자전염성 곰팡이 억제력 검정

미생물의 벼 종자처리 후 plate에 놓고 10일 후 벼 종자에 내재되어 있던 종자 전염성 곰팡이에 대한 억제력을 조사한 결과, 미생물 처리구가 무처리구에 비하여 종자전염성 곰팡이에 대한 억제 효과가 인정되었고 benomyl 처리구와 비슷한 수준으로 종자전염성 곰팡이에 대한 억제력을 보였다 (Fig. 19). 이와 같은 종자전염성병원균에 대한 억제력은 종자에 미

생물을 처리한 후 외부로부터의 병원균의 침입에 대한 작물의 보호뿐만 아니라 종자내부 혹은 표면에 붙어있는 유해한 미생물도 억제할 수 있는 것으로 나타났다.

3) 벼의 입모율 조사

H210, L22 그리고 F29를 벼종자에 처리한 후 서산 간척지 토양 중에서 매년 입모가 불량한 지역의 토양을 채취하여 Pot (15×20×10 ㎝)에 담아서 세 균주를 처리하고 볍씨를 3반복하여 각각 100립씩 파종 후 파종 21일째 입모율을 조사하였다. 간척지와 같이 불리한 환경에서 직파재배로 인하여 발생하는 문제점은 지금까지 알려진 방법으로는 거의 효과가 없었다. 직파재배에서 요구되는 초기 입묘율 확보와 균일한 발아를 위해서는 종자처리 미생물의 개발이 반드시 필요하다. 서산 간척지에서 채집한 토양으로 pot실험을 한 결과 H210과 L22의 처리구는 무처리와 metalaxyl 처리에 비해 입모율을 향상시켰고 특히, H210과 L22는 벼 종자의 초기 발아율 향상에도 효과가 있었다 (Fig. 20, 21).

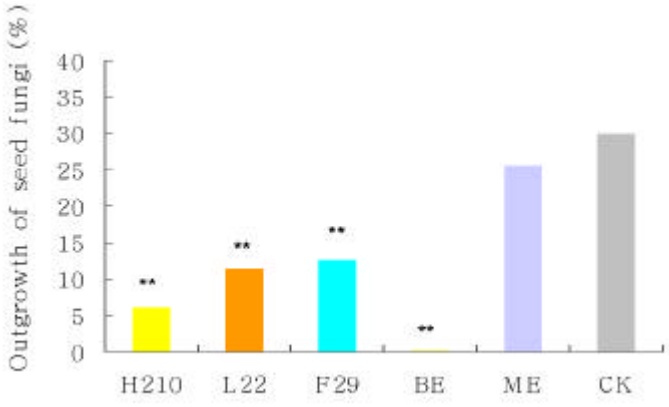


Fig. 19. Effect of bacterial seed treatment with *Ps. fluorescens* L22, *P. polymyxa* H210, and F29 on fungal outgrowth from rice seeds.

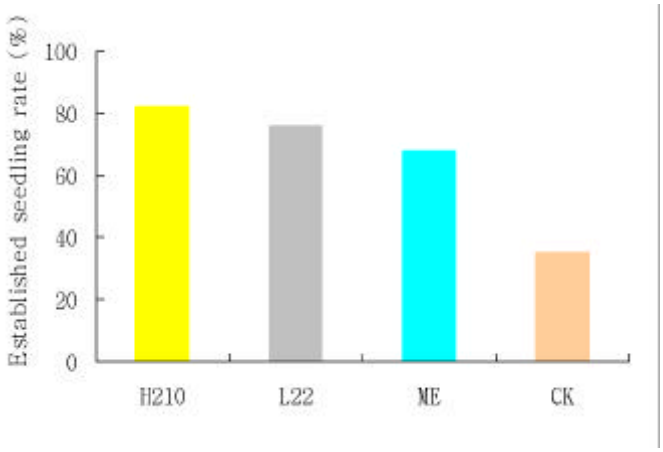


Fig. 20. Enhancement of established seedling rate by the seed treatment with *Ps. fluorescens* L22, *P. polymyxa* H210, metalaxyl in Seosan paddy soil.

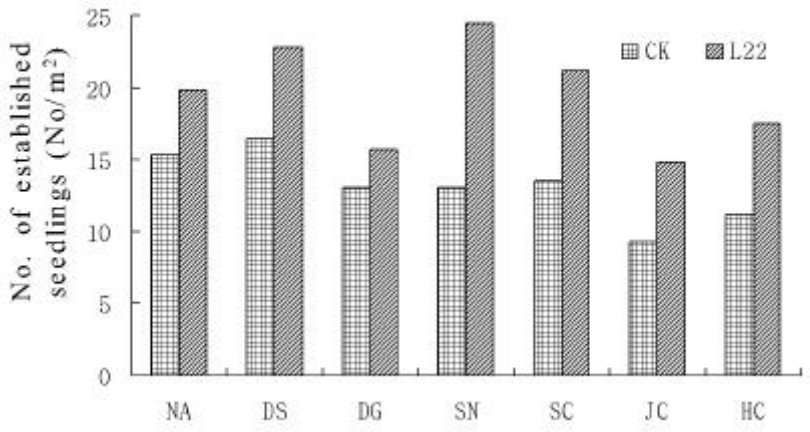


Fig. 22. Enhancement of established seedlings with variation of rice varieties by the seed treatment with *Ps. fluorescens* L22 in GSNU experimental paddy field. NA: Nong-an, DS: Dae-san, DG: Dong-gin, SN: Sam-nam, SC: Sinsunchal, JC: Jinbuchal, HC: Hwasuncha

1997년 5월, 경상대학교 농과대학 부속농장 벼직파재배 포장에 실험을 실시하였다. 공시품종으로 농안벼, 대산벼, 동진벼, 삼남밭벼, 신선찰벼, 진부찰벼, 화성찰벼 등 7종의 볍씨를 사용하였다. 볍씨에 L22를 25℃에서 24시간 침종한 후 매일 한번씩 씻어주면서 5일간 물에 침종하여 백아를 틔운 뒤 꺼내어 물을 빼서 24시간 최아를 시키고 포장에 직파하여 파종 21일째 입모율을 조사하였다. 1998년 4월 30일에 H210, L22와 서산농장에서 볍씨를 침종할 때 사용하는 metalaxyl 처리는 24시간동안 볍씨(일품)를 침종하여 서산농장에 직파하여 포장실험을 실시하였다. 파종30일째 0.25 m2 당 입모수를 조사하였다. 1경상대학교 부속농장에 파종한 직파 재배 포장 실험에서 L22는 무처리에 비해 초기 입모율 확보에 효과(Fig. 22)가 인정되었으며 1998년 4월에 실시한 서산농장 포장실험에서도 H210과 L22는 무처리와 metalaxyl 살균제 처리구 보다 높은 입모수를 나타내었다(Fig. 23). 이 결과 는 1년차 결과이기는 하지만 비교적 처리가 균일한 포장시험이므로 금년도 같은 처리에 의한 2차 시설결과가 나오면 살균제를 대신할 수 있는 미생물 농약 개발이 기대된다.

4)병억제력

경상대학교 농장에서 자연 발생한 잎집무늬마름병을 조사한 결과 L22는 35.52주 /m2 와 무처리에서는 83.47주/m2로 나타나 잎집무늬마름병을 억제하는데도 효과가 인정되었다 (Fig. 24)

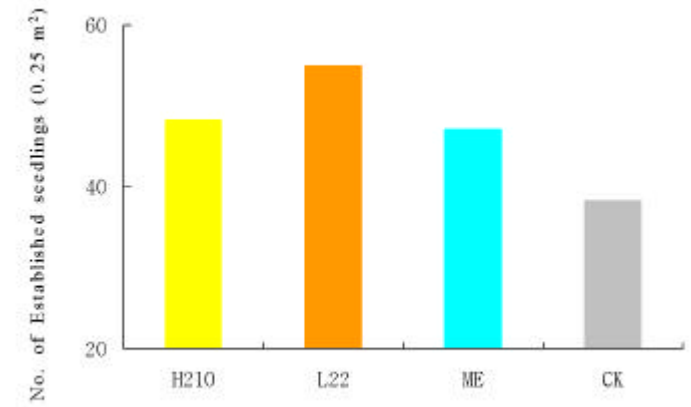


Fig. 23. Enhancement of established seedlings by seed treatment of *Ps. fluorescens* L22 and P. polymyxa H210 in Seosan reclaimed paddy field.

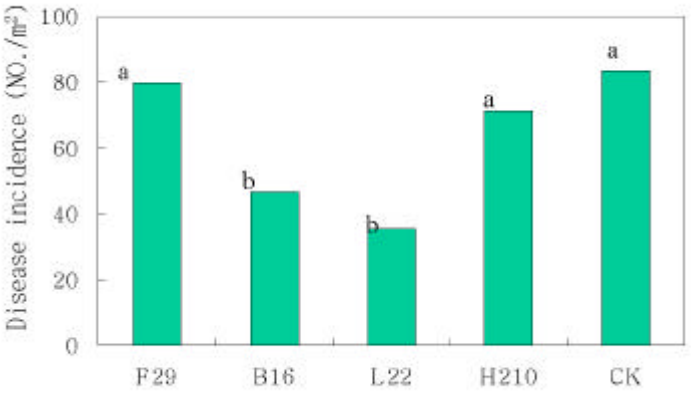


Fig. 24. Suppression of sheath blight of rice by seed treatment of *Ps. fluorescens* B16, L22, *P. polymyxa* H210, and F29 in GSNU experimental field.

5) 벼 수확 후 수량 조사

1998년 5월, 경상대학교 농과대학 부속농장 벼재배 포장에 실험을 실시하였다. H210, B16, L22, F29를 각각 볍씨에 종자처리하여 모판에서 유모기까지 기른 후 기계이양법으로 이양하였다. H210과 B16은 무처리에 비해 각각 42.7, 35.6%의 증수 효과를 보여 주었다 (Table 8).

Table 8. Yields and yield components of rice by seed treatment of *Ps. fluorescens* B16, L22, *P. polymyxa* H210, and F29 in GSNU experimental field

Isolate	Panicle length (cm)	No. of panicle (m²)	No. of grain (/panicle)	No. of grain (1,000/m²)	Ripened grain (%)	Grain weight (g/1000)	Yield (kg/10a)
H210	21.10	334*	90	30.0**	93.26	24.57	668.7**
B16	19.96	342*	82	28.0**	92.07	24.61	635.4**
L22	20.26	295	84	24.8	93.46	24.91	576.9*
F29	20.20	290	86	24.9	93.70	24.42	570.6*
Control	20.10	240	86	20.6	92.92	24.43	468.5

*,** ; Significant at 0.05 and 0.01 levels, respectively.

Fig. 5. Growth of barley treated with *Ps. fluorescens* B16, *P. polymyxa* E681, and G157 in Gyeongnam RDA expeimental field (1997).

Fig. 10. Enhancement of early growth fo hot pepper by seed treatment *Ps. fluorescens* L22 and *P. polymyxa* E681 in plug nersery.

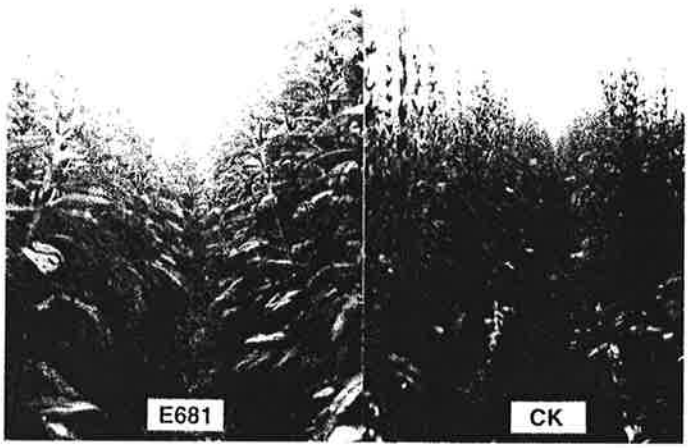


Fig. 16. Enhancement of sesame growth by seed treatment of *P. polymyxa* E681 in farmer's field (1997).

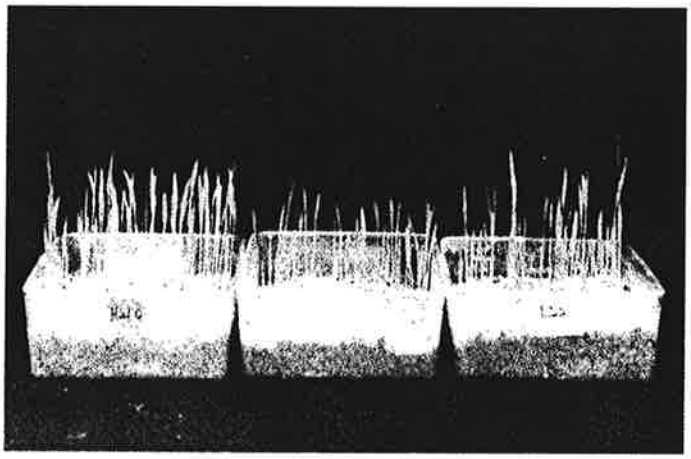


Fig. 21. Enhancement of established seedling rate by seed treatment of *Ps. fluorescens* L22 and *P. polymyxa* E681 in Seosan reclaimed paddy soil.

제 4 절 참고문헌

1. Abmus, B., Schloter, M., Kirchhof, G., Hutzler, P. and Hartmann, A. 1997. Improved In situ tracking of rhizosphere bacteria using dual staining with fluorescence-labelled antibodies and rRNA-trageted oligonucleotides. Microb Ecol. 33:32-40
2. Bae, Y. S., Kim, H, K., Park, C. S. 1990. An improved methods for rapid screening and analysis of root colonizing biocontrol agents. *Korea J. Plant Pathology*. 6:325-332
3. Brown, M. E. (1974). Seed and root bacterization. *Annu. Rev. Phytopathol*. 12:181-197
4. Chao, W. L., Nelson, E. B., Harman, G. E. and Hoch, H. C. 1986. Colonization of rhizosphere by biological control agents applied to seeds. *Phytopathology* 76:60-65.
5. Chin-A-Woeng T. F. C., Bloemberg G. V., Van der Bij A. J., Van der Drift K. M. G., Schripsema J., Kroon B., Scheffer K. R., Keel C., Bakker P. A. H. M., Tichy H-V., De Bruijn F. J., Thomas-Oates J. E., and Lugtenberg B. J. J. 1998. Biocontrol by phenazine-1-carboxamide-producing *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 of tomato root rot caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. radicis-lycopersici. Molecular Plant-Mirobe Interaction 11: 1069-1077.
6. Dakkers. L. C. 1997. Isolation and characterization of novel rhizosphere colonization mutants of *Pseudomonas fluorescens* WCS365. Ph. D. Thesis. Leiden Uni. The Netherlands.

7. Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W. F. and Kloepper, J. W. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.* 43:895-914

8. Hurek, B. R., and Hurek, T. 1998. Life in grasses: diazotrophic endophytes. Trends in Microbiology. 6:139-144

9. Kang, J. H. and Park, C. S. 1997. Colonization pattern of fluorescent pseudomonads on the cucumber seed and rhizoplane. *Korean J. Plant Pathol.* 13: 160-166

10. Kim, J. W., Choi, C. H., Kang, J. H., Ryu, C. M., Jeong, M. J., Kim, J. W. and Park, C. S. 1998. Tracing of some root colonizing *Pseudomonas* in the rhizosphere using *lux* gene intronduction bacteia. *Korean J. Plant Pathol.* 14: 13-18

11. Kloepper, J. W. and Beauhamp, C. J. 1992. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. *Can. J. Microbiol.* 38:1219-1932

12. Kloepper, J. W. and Schroth, M. N. 1981. Development of a powder fornulation of rhizobacteria for inoculation of potato seed pieces. *Phytopathology* 71:590-593

13. Mahaffee, W. F., Bauske, E. M., van Vuurde, J. W. L., van der Wolf, J. M., van den Brink, M., and Kloepper, J. W. 1997. Comparitive analysis of antibiotic resistance, immunofluorescent colony staining and a transgenic marker(bioluminescence) for monitoring the enviornmental fate of a rhizobacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 63:1617-1622

14. Maria-isabel ramos- gonzalez, Francise ruiz-cabello, Ingrid brettar, Federico garrido, and Juanl ramos. 1992. Tracking genetically engineered bacteria: Monoclonal antibodies against surface determinants of the soil. *Journal of bacteriology*. 174:2978-2985

15. Park, C. S. and Kang, J. H.(1996). Colonizing pattern of seed-treated fluorescent Pseudomonads on the cucumber rhizoplane at the early growth stage. Pro. Int. Workshop on Biocontrol of Plant Pathogens held in Beijing China. 288-294

16. Quadt-Hallmann, A. Q., Hallmann, J. and Kloepper, J. W. 1997. Bacterial endophytes in cotton: location and interaction with other plant-associated bacteria. *Can. J. Microbiol*. 43:254-259

17. Quadt-Hallmann, A., Benhamou, N. and Kloepper, J. W. 1997. Bacterial endophytes in cotton: mechanisms of entering the plant. *Can. J. Microbiol*. 43:577-582

18. Raupach G. S. and Kloepper J. W., 1998. Mixtures of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Enhance Biological Control of Multiple Cucumber Pathogens. *Phytopathol*. 88:1158-1164

19. Ryu, C. M 1998. Nature of root colonizing *Eacillus polymyxa* E681 and its effects on the growth of barley and sesame. Ms. D. Thesis. Gyeongsang National Uni. Korea

20. Schloter, M., Abmus, B. and Hartmann, A. 1995. The use of immunological methods to detect and identify bacteria in the environment. *Biotech. Adv*. 13:75-90

21. Schloter, M., Borlinghaus, R., Bode, W. and Hartmann, A. 1993. Direct identification and localization of *Azospirillium* in the rhizosphere of wheat using fluorescence-labelled monoclonal antibodies and confocal scanning laser microscopy. *The Royal Microscopical Society*. 171:173-177

22. Suslow, T.V. and Schroth, M. N. 1982. Rhizbacteria of sugar beets: effects of seed application and root colonization of yield. *Phytopathology* 72:199-206

23. Taylor, A. G. and Harman, G. E. 1990. Concepts and technologies of selected seed treatments. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28:321-339

24. Troxler, J., Berling, C. H., Moenne-loccoz, Y., Keel, C. and Defago, G. 1997. Interactions between the biocontrol agent *Fseudomonas fluorescens* CHA0 and *Thielaviopsis basicola* in tobacco roots observed by immunofluorescence microscopy. *Plant Pathology*. 46:62-71

제 3 장 토양 처리용 미생물농약 개발

제 1 절 서 설

식물병원진균에 의한 작물의 병은 해충, 잡초와 더불어 작물의 안정적 생산에 크나큰 제한요인이 되고있다. 식물병원진균 중에서도 특히 토양전염 병원균은 대부분 침입부위가 눈에 잘 보이지 않는 땅 속의 뿌리, 괴경 또는 땅가 부분의 줄기 등으로 여러 종류의 작물에 광범위하게 병을 일으켜 많은 피해를 가져온다. 대표적인 토양전염 병원진균으로는 *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium* spp. *Phytophthora* spp. *Sclerotinia* spp., *Verticillium* sp. 등이 있으며 이들은 곡류, 채소, 화훼류 등 많은 작물을 침입하는 다범성 병원균이다. 이 병원균들의 방제를 위해 현재 여러 종류의 살균제가 사용되고 있는데 우리나라에서는 *R. solani*의 경우 벼잎집무늬 마름병 방제용으로는 validamycin, flutolanil, pencycuron 등이 있고 그 외 모잘록병이나 잔디병의 방제를 위해서는 효과적인 살균제가 없는 실정이다. *Fusarium oxysporum*, *Pythium* spp. *Phytophthora* spp. 역시 피해가 워낙 심하기 때문에 토양훈증제 또는 metalaxyl 등 살균제가 사용되고는 있으나 토양의 재오염, 약제저항성 발생으로 별로 좋은 방제효과를 얻지 못하고 있다. 더구나 여러가지 살균제의 오용과 남용으로 환경오염 및 인축독성 문제가 사회문제로 대두되고 있고 약제저항성 발생에 의한 방제효과 감소로 이러한 문제가 없고 안전하고 효과적인 방제방법의 개발이 절실히 요구되고 있다.

환경적으로 안전하고 효과적인 방제 방법으로는 식물병원 진균의 생태를 이용한 미생물농약에 의한 방제가 있는데, 외국과 국내에서 1970년대 초반 이후로 이에 관한 연구가 여러 연구자에 의해 많이 수행되고있다. 최

근 몇 종류 미생물농약의 상품화와 1992년 리우 유엔환경개발회의의 '환경적으로 건전하고 지속가능한 개발(ESSD)'을 목표로 하는 지구환경선언 이후 국내외적으로 미생물농약 개발에 대한 관심이 급증하고 있다. 현재 외국에서 개발되어 식물병원 진균 방제용으로 상품화된 미생물농약은 길항진균 *Trichoderma harzianum*과 *T. polysporum*으로 만들어진 BINAB T(1988, E.R. Butts International, 목재부후균을 억제), *Gliocladium virens*를 이용한 GlioGard(1990, W. R. Grace Co., 온실화훼작물유모에 병억제), *T. harzianum*을 이용한 F-stop(1991, Kodak)과 길항세균 *Bacillus subtilis*를 이용한 KODIAK(1990, Gustafson, 종자처리제), *Pseudomonas fluorescens*를 이용한 DAGGER(1990, Ecogen Inc., 목화의 *Rhizoctonia*, *Pythium* 모잘록병 방제), *P. cepacia*를 이용한 BLUE CIRCLE(1990, Stine Microbial Products, 여러작물의 종자처리제), 그리고 길항방선균 *Streptomyces griseoviridis*를 이용한 MYCOSTOP(1985, Kemira Oy Biocontrol of Finland, *Fusarium* 시들음병, 모잘록병 방제) 등이 있다. 국내에서는 1970년대 초반부터 인삼뿌리썩음병의 생물학적 방제연구를 시작으로 고추역병, 오이 딸기 시들음병, 참깨 모잘록병과 잿빛곰팡이병의 생물학적 방제에 관한 연구가 한국인삼연초연구원, 농업과학기술원, 생명공학연구소 및 여러 대학교에서 계속적으로 수행되어 왔으나 아직 공식적으로 상품화 된 것은 없다. 위 연구로 얻어진 결과의 대부분이 실내 온실실험 이었으며, 포장실험도 있었으나 미생물농약으로 개발되기에는 효과의 불안정성, 제제화 미흡, 비경제성 등 여러가지 개선되어야 할 점이 많은 것으로 보고되었다.

국내외를 막론하고 미생물농약을 개발하고자 하는 대상병은 일반적으로 현재 유기합성 살균제로 방제가 전혀 안되거나 부분적으로만 방제가 되는 진균병이 대부분이다. 그 중에서도 벼잎집무늬 마름병, 채소작물의 모잘록병과 잔디의 갈색, 황색마름병 등 여러가지의 병을 일으키는 *Rhizoctonia*

*solani*와 채소, 화훼작물의 시들음병을 일으키는 *Fusarium oxysporum*에 대한 미생물농약 개발연구는 다른 어느 병원진균보다 많이 수행되어져 왔다. *R. solani* 의 방제를 위한 길항균으로 가장 많이 연구된 것은 *Tricoderma spp*. 인데, 그 중 *T. harzianum*은 *R. solani*의 균사와 접촉하여 구멍을 내어 병원균을 죽인다. 이때 분비되는 효소로는 chitinase, β-1,3-glucanase가 있고 순수분리된 효소가 *R. solani*와 *F. oxysporum*을 비롯한 여러종류의 식물병원 진균에 대한 억제효과가 있음이 밝혀졌다. 최근에는 *T. harzianum*을 *R. solani* 세포벽을 유일한 탄소원으로 배양하였을때 serine protease가 특이적으로 생성됨이 밝혀졌는데 mycoparasitism에서 중요한 역할을 할 것으로 추정되었고, 분해효소 몇가지 외에도 병원진균 억제물질을 생성하여 효소와 상승적으로 작용하여 기주인 병원진균을 죽이는 것으로 알려졌다.

세균을 이용한 *R. solani*의 방제연구는 주로 *Bacillus subtilis*, *P. fluorescens*와 *P. cepacia*를 이용한 것으로 대부분이 실내 폿트실험 결과이며 벼 잎집무늬마름병균의 경우 거의 모두가 동남아시아 국가에서 이루어진 연구 결과였다. 논토양 또는 벼 근권에서 여러 세균들을 분리하고 배양기에서 길항력을 검정한 후 폿트실험으로 효과를 검정하는 정도로 실용화를 위한 미생물농약 연구 수준에는 미치지 못하였다. 시들음병균 *F. oxysporum*도 기주 다범성과 많은 피해 때문에 여러곳에서 오래전부터 발병기작 및 미생물농약 개발에 관한 연구가 수행되어 왔으며, 그 중에서 포장실험을 거쳐 실용성이 있는 것으로 판단된 것은 비병원성 *Fusarium* sp.를 이용한 미생물농약으로 현재 개발이 진행 중이다.

위에서 언급한 바와 같이 *R. solani*와 *F. oxysporum*의 계속적인 미생물농약 개발 연구에도 불구하고 실험실이나 온실실험을 벗어나 지금까지 뚜렷하게 실용화되지 못하고 있는데, 그 이유로는 다음과 같은 2가지 주

요인을 들 수 있다. 첫째, 길항미생물을 이용한 생물농약이 유기합성농약에 비해 사용장소, 시기에 따라 상대적으로 방제효과가 낮다는 것과 둘째, 합성농약에 비해 사용자가 경제적인 잇점이 없다는 것이다. 포장에서 방제효과의 불안정성은 미생물농약을 적절한 시기에 반복적으로 처리하여 처리하고자 하는 환경내에서 일정기간 미생물이 살 수 있도록 함으로써 극복될 수 있고, 또한 균주를 유전적으로 변화시켜서 환경에서의 적응력을 높일 수도 있다. 그리고 사용하는 균주도 1종류만을 쓸것이 아니라 여러가지를 복합적으로 사용하므로써 다양한 환경에서 효과를 증진시킬 수 있다. 길항미생물의 환경내 잔효력을 높이기 위해서는 길항미생물들만 독특하게 이용할 수있는 기질을 선택하여 제제화 하거나 또는 기질자체를 길항미생물이 충분히 차지하여 다른 미생물이나 대상병원진균이 이를 이용할 수 없도록 사전에 처리해야만 한다. 경제적인 문제에 있어서는 미생물농약의 경우 적절한 제제가 필요한데 사용된 부제의 용량이 유기합성농약에 비해 엄청나게 많아질 수 있기 때문에 부제 재료의 선택에 있어서 충분히 값싼 유기성 부산물(또는 폐기물)을 재활용하는 방법이 좋다.

미생물농약 개발에 있어서 현재 어려움이 있는 것은 사실이지만 최근 급격히 강화되고 있는 환경, 독성위해 물질에 관한 규제와 지속가능한 발전이라는 사회적 인식의 변화로 미생물농약 개발에 대한 연구가 활성화 될 것이며 장애가 해결될 수 있을것으로 생각된다. 특히, 미국환경청에서는 생물농약인 경우 기존의 유기합성농약이 거쳐야 하는 여러가지 검증과정을 대폭 단순화 할 계획으로 있기 때문에 개발비용 측면에서도 훨씬 경제적으로 될 수 있다. 국내 연구에서도 식물병원 진균 방제용으로는 생물농약이 아직 개발되어 실용화 된 것이 없지만 부분적으로 좋은 효과를 가지고 있는 결과가 있어서 앞으로의 진행이 기대되고 있다.

본 보고서에서는 지난 3년간 길항세균을 이용하여 토양전염 병원진균인

*R. solani*와 *F. oxysporum*을 효과적으로 방제할 수 있는 새로운 형태의 환경조화형 미생물농약을 개발하여 그 결과를 보고한다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 길항미생물의 분리, 동정 및 병원균 조제

가. 길항미생물의 분리 및 동정

Chitin 분해 활성 및 *R. solani*와 *F. oxysporum*에 대하여 길항력을 지닌 미생물을 분리하기 위하여 경남 진주시, 진양군, 경기도 안산시, 수원시, 충청남도 그리고 울릉도 등 전국의 토양 및 퇴비 시료를 채취하였다. 채취한 토양 5 g을 멸균증류수 45 ㎖와 혼합하여 28℃에서 20분간 진탕한 뒤 적절하게 희석하고 토양희석 한천평판법에 의하여 희석액 0.1㎖를 0.1% (w/v) colloidal chitin이 첨가된 최소 영양배지 전면에 고루 편다음 28℃ 항온기에서 4 6일 동안 배양하였다. Colloidal chitin 배지에서 배양 후 자라나온 세균의 단일집락을 재차 순수분리한 후 0.1 TSA 사면배지 및 10% glycerol 용액에 현탁하여 사면배지는 4℃ 냉장보관하고, 10% glycerol 용액에 현탁한 균주는 -70℃에 냉동 보관하여 사용하였다. 분리된 길항균의 동정은 Hewlette Packard 사의 지방산 조성 분석에 따른 미생물 동정 기기 (Microorganisms Identification System)를 사용하였다.

나. 길항미생물의 길항력 조사

분리한 세균의 길항력 조사는 Potato dextrose agar (PDA), M523, TSA 고체배지상에서 병원균과의 대치배양법에 의하여 수행하였다. 길항균의 항 진균범위 조사는 본 연구실에서 분리 또는 확보하여 보관중인

Pythium ultimum, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, *Rhizoctonia solani* AG4를 이용하였다. PDA 배지 중앙에 직경 5 ㎜ 정도의 각 진균 균사 disc를 올려 놓고 disc를 중심으로 일정한 거리를 유지하여 배지 가장자리에 백금이를 사용하여 세균을 길게 접종하였다. 접종 후 28℃ 항온기에서 2 7일 간 배양하면서 길항균에 의해 형성된 각 진균의 균사생장 억제 거리를 측정하였다.

다. 병원균 조제

병원균인 *R. solani* AG4는 모잘록병이 발병된 무의 이병 조직에서 순수분리하여 사용하였고, 병균 접종원은 유기물이 풍부한 밭토양을 직경 2 ㎜ 눈금 크기의 체로 친다음, 이 토양 500 g과 잘게 썬 감자조각 50 g, 그리고 증류수 50 ㎖를 함께 섞어 2 ℓ 삼각 플라스크에 담고 3일 연속으로 3번 고압 살균하였다. 이렇게 제조한 토양 배양기에 PDA 고체 배지 상에서 활발하게 자란 *R. solani*의 균사를 직경 5 ㎜의 cork borer를 사용하여 떼어낸 후 떼어 낸 균사 disc 10개를 무균적으로 접종하고 간혹 뒤섞어 주면서 28℃ 항온기에서 2주간 배양하였다. 배양이 끝난후 배양물을 그늘에서 말리고 막자 사발을 사용하여 약하게 덩어리를 부순다음, 체로 치고 직경 1 2 ㎜의 동일한 크기의 입자를 접종원으로 사용하였다. 시들음 병원균인 *F. oxysporum*은 이병된 오이에서 순수분리하여 위와 동일한 방법으로 접종원을 제조하여 사용하였다.

2. 발병도 조사

가. 모잘록병

발병조사는 위와 같이 제조한 병원균 접종원을 식물 육묘용 peat moss (Bio-mix potting substratum, Seoul Agricultural material Co

Ltd.) 1ℓ에 1 g (w/v)을 접종하고 polyvinyl bag내에서 격렬하게 섞은후에 72 φ x 75 ㎜, 180 ㎖ 용량의 polystyrene 수지

pot에 적당량 나누어 담았다. 그런뒤 무 종자 (중앙종묘, 춘추 알타리무, 발아율 95% 이상) 24개 씩을 각 pot에 골고루 뿌리고 pot에 담고 남은 상토로 살짝 덮은후 약 25 30℃ 온도 범위의 상온에서 7일간 식물체를 생육시켰으며, 식물체의 발병 상태에 따라 0= 건전 식물체, 1= 0 25% 발병, 2= 26 50% 발병, 3= 51 75% 발병, 4= 76 100% 또는 pre-emergence damping-off의 5등급으로 발병 등급을 정하였다. 발병도(%)는 (1 x N1 + 2 x N2 + 3x N3 + 4 x N4)/ 4 x 식물체 조사주 수 x 100 의 식에 따라 구하였다.

나. 시들음병

시들음병 발병시험은 판매되고 있는 상토(원예용 부농 상토) 1 kg에 접종원 3 g (w/v)을 잘 섞어 직경 10 cm의 폿트에 분배 후 오이 종자 (서울종묘, F1 summer long) 5개를 파종하여 28℃ 식물생육상에서 30일간 재배하면서 시들음병의 전형적 병징을 나타내는 오이의 숫자를 세었다. 발병도(%)는 (이병주 수/총 조사 수) x 100의 식에 따라 구하였으며, 통계 처리는 1-5 %에서의 최소유의차(LSD)를 검정하였다.

3. 길항미생물의 병원균 세포벽 분해 활성 조사

길항균의 병원균 세포벽 분해 활성은 병원균인 *R. solani*, *F. oxysporum*의 균사 세포벽을 유일한 탄소원으로 첨가한 액체배지에서 길항균을 배양한 후 생성된 β-1,3-glucanase와 chitinase의 활성을 조사하였다. 균사 세포벽은 Perez-Leblic등의 방법에 따라 제조된 병원균의 cell wall을 1 ㎖ 당 1 ㎎ 첨가하였다. 세포벽이 첨가된 50 ㎖의 최소영양 액체

배지에 TSA 고체배지 상에서 활성화시킨 각 길항균을 1 백금이 씩 무균적으로 접종하고 28℃, 170 rpm에서 9일간 진탕 배양하면서 일정 시간 간격으로 배양액을 3 ㎖씩 무균적으로 채취하였다. 그 후 채취한 시료를 즉시 사용하였으며, 그렇지 못한 경우에는 -20℃에 냉동 보관하여 사용하였고, 보관 기간은 2일을 경과하지 않았다.

가. β-1,3-glucanase 활성 측정

β-1,3-glucanase 활성 측정은 Tweddell 등과 DNS법을 조합·응용하여 실시하였다. 채취한 시료 1.5 ㎖을 12,000 rpm에서 10분간 초원심분리한 다음 상등액 1 ㎖를 기질용액 (laminarin, 20 ㎎/㎖) 100 ㎕와 40℃에서 1시간 반응시켰다. 반응후 반응액 300 ㎕와 DNS 용액 1 ㎖를 혼합하고 끓는물에서 5분간 중탕한 다음 상온에서 식혔다. 그후 550 ㎚에서 흡광도를 측정하여 생성된 환원당양을 측정하였다. 효소액에 포함된 환원당에 의한 흡광도값을 제거하기 위하여 반응시키지 않은 반응혼합액을 대조구로 시험하여 순수 반응 생성물에 의한 환원당량을 측정하였으며 표준곡선은 glucose를 사용하여 작성하였고, 1 unit는 위에 주어진 조건에서 시간당 1 ㎛ole의 glucose를 생성시키는 효소의 양으로 정의하였다.

나. Chitinase 활성 측정

Chitinase의 측정은 본 실험실에서 계속 사용하고 있는 방법에 따라 행하였으며 기질로는 10 mM sodium phosphate 완충용액(pH 5.8)에 현탁된 swollen chitin (25 ㎎/㎖)을 사용하였다. 기질용액 1 ㎖와 12,000rpm에서 10분간 원심분리한 조효소액 1 ㎖를 혼합하여 50℃에서 1시간 반응시켰다. 반응액을 끓는물에서 15분간 중탕하여 반응을 중지시킨 후 수돗물로 식혔다. 그런뒤 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 남아있는 기질을 제거하고

반응상등액 0.5 ㎖와 potassium borate (pH 9.1) 완충용액 0.1 ㎖를 혼합하였다. 그런 다음 혼합액을 끓는 물에서 정확하게 3분간 중탕하였으며, 수돗물을 이용하여 즉시 식혔다. 이어서 3 ㎖의 DMAB (*p*-dimethylaminobenzaldehyde)용액을 혼합하고 37℃ 항온수조에서 정확하게 20분간 발색시켰다. 발색후 수돗물로 식혔으며 585 ㎚에서 흡광도를 측정하여 생성된 N-acetylglucosamine (NAGA)을 측정하였다. 효소액에 포함된 NAGA에 의한 흡광도값을 제거하기 위하여 반응시키지 않은 반응 혼합액을 대조구로 사용하여 순수 반응생성물에 의한 NAGA양을 측정하였으며, 표준곡선은 N-acetylglucosamine을 사용하여 작성하였고, 1 unit는 주어진 조건에서 시간당 1 ㎛ole의 N-acetylglucosamine을 생성시키는 효소의 양으로 정의하였다.

4. 길항미생물 제제의 발병 억제 효과

가. 길항미생물 제제 방법

분리된 미생물 중 chitin 분해활성이 좋고 동시에 생장과 병원균에 대한 길항작용이 뛰어난 6균주(#300, #383, #386, #387, #601, #630) 또는 2균주(#300, #385)를 선발하여 제제화에 사용하였다 (Table. 1). 0.5 TSA 고체 배지상에서 활성화 시킨 각 길항균을 5 ㎖의 0.5TSB 액체배지에 1백금이 씩 접종하여 28℃, 170 rpm에서 12시간 종균 배양하였다. 그리고, 이 배양액을 500 ㎖의 0.5 TSB 액체배지에 접종하여 동일 조건에서 3일간 본배양하였다. 배양후 배양액을 6,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 균체를 수확하고 멸균된 증류수로 2 3회 세척하여 제제화에 사용하였다. 길항미생물의 제제는 제제 기제로써 peat moss, zeolite 또는 vermiculite를 사용하여고, 제제방법은 본 실험실에서 개발된 방법을 이용하였다. 제제의 조제후 aluminium foil을 사용하여 완전히 밀봉되지 않게 한후 4℃에 냉장

보관 하면서 생물체 검정에 사용하였다.

나. 접종원 농도별 발병 억제

50%의 발병도를 나타내는 ED_{50} 값을 결정하기 위하여 위의 방법에 따라 제조한 병균 접종원의 접종량 별로 발병정도를 조사하였다. 모잘록병은 peat 식물 생육상토 또는 왕겨+새우껍질 퇴비(RHC)를 1:3 비율 (v/v)로 섞은 상토 1ℓ당 접종원을 0, 1, 2, 4, 8 g 씩 각각 접종한 후 발병 정도를 조사하였다. 시들음병은 접종원 량을 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 g/kg상토로 조절하였으며, 모든 실험은 3반복으로 실시하였다.

다. 길항미생물의 pot내 동태 조사

선발된 6 길항균 중 4 균주 (#300, #383, #386, #601)를 선택하여 항생제 내성균주를 만들어 처리기간 경과에 따른 생존 밀도를 조사하였다. 먼저 각 균주를 멸균수로 적절하게 희석한뒤 TSA 배지상에 도말하고 clean bench의 short wave length의 UV를 돌연변이원으로 사용하여 약 30 ㎝의 거리에서 1분 가량 비추어 주었다. 그 후 28℃ 항온기에서 배양하여 자라난 각 길항균 집락을 최초 50 ppm의 rifampicin, oxytetracycline, nalidixic acid, streptomycin, kanamycin, ampicillin이 첨가된 TSA 배지에 이쑤시개를 사용하여 계대배양하고, 여기서 다시 각 항생제에 대하여 내성이 있는 내성균주들을 100 ppm의 항생제가 첨가된 배지에서 다시 선발하였다. 그런뒤, 각각 100 ppm의 항생제 첨가 배지에서 수차례 계대배양하여 내성을 확인하였으며, 최종적으로 획득한 내성균주들을 PDA 배지상에서 병원균과 대치배양하여 억제활성이 모균주와 차이가 나지않는 균주를 사용하여 제제화 하였다. 이 제제들을 식물 생육 상토에 처리한뒤 경과 일수에 따라 배양토를 채취, 적절하게 희석하고 각 항생제를 함유한 TSA 선택배지

에서 자라난 길항균의 집락수를 계수하였다.

라. 미생물제제의 종류 별, 보관기간 별 발병억제 효과

제제의 실용화 후 유통시 안정성을 보기 위하여 길항미생물을 제제화한 후 일정기간 별, 보관온도별로 발병억제 효과를 조사하였다.

마. 미생물제제화를 위한 대량생산 배지 선정

미생물제제를 대량으로 값싸게 배양하기 위한 최적 배양배지를 선발하고자 잘 알려진 여러 가지 값싼 유무기물을 선발하여 길항균의 생장이 가장 양호한 배합을 찾아내고자 하였다. 이때 사용된 배지로는 TSB, soybean flour, soluble starch, corn steep liquor, yeast extract, sucrose, NaCl, K_2HPO_4, beef extract 등이며, 이들을 적정 양별로 섞어 배지를 만든 후 시간 별로 길항미생물의 농도변화를 조사하였다.

5. 퇴비화 원료 및 퇴비화 방법

병원진균의 세포벽 구성분인 chitin을 분해할 수 있는 다양한 길항미생물들의 복합체를 대량적으로 배양하기 위하여 농수산 폐기물인 새우 또는 게껍질과 왕겨를 이용하여 퇴비화하였다. 퇴비화하기 위하여 진주시 인근에 위치한 삼천포의 수산물 가공회사에서 다량의 새우껍질과 게껍질을 도정공장에서 구입한 왕겨와 1 : 1 (v/v)로 혼합 (RHC) 하였다. 또한 진주시 인근의 돈사에서 생돈분을, 그리고 진주시내 상평동에 위치한 제재소에서 육송 톱밥을 구입하여 왕겨와 돈분 (RHM), 톱밥과 새우껍질 (SDC), 톱밥과 돈분 (SDM)등의 재료별로 소형 굴삭기를 사용하여 혼합하였다. 각각의 재료를 혼합하면서 각 퇴비구의 수분함량이 약 50% 가량되게 조정해주

었으며 혼합후 지름 3 m, 높이 2 m 정도의 정체식 야적 퇴비 더미를 제조하였다. 더미 제조후 90일이 경과하는 동안 퇴비화 하면서 최초 7일째와 14일째에 한번씩, 그 후에는 2주 간격으로 각각 1번씩 2번을 뒤집기하였다. 퇴비화가 진행되는 동안 필요에 따라서 수분조정을 해주었으며, 일정 시간 간격으로 퇴비 표면으로부터 약 15 ㎝ 내부의 시료를, 각 퇴비구당 4곳에서 채취하여 퇴비내의 이화학적, 생물학적인 변화들을 조사하였다.

6. 퇴비화 과정 또는 미생물제제 중의 Chitin 분해성 세균의 밀도 변화 측정

퇴비화 과정 또는 미생물제제 중의 Chitin 분해성 세균의 밀도는 퇴비 또는 제제 시료를 토양 한천희석 평판법으로 0.1TSA에 colloidal chitin을 첨가한 배지를 이용하여 측정하였다. 배지위에 도말 후 chitin을 분해하여 세균 집락주위에 분해환(clear zone)을 형성하는 총 균 숫자를 측정하였다.

7. *Rhizoctonia solani*에 대한 길항미생물의 밀도 변화

*R. solani*에 대한 퇴비내의 길항미생물의 밀도 변화를 조사하기 위하여 2층 한천 평판배양법을 이용하였다. 즉, 배양기에 멸균한 M523 고체배지 (sucrose 10.0 g, casamino acid 8.0 g, yeast extract 4.0 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3 g, agar 18 g / litre) 10 ㎖를 분주하여 굳히고 적절하게 희석한 퇴비-멸균수 현탁액을 0.1 ㎖를 도말하여 28℃에서 overnight 배양하였다. 배양후 약 50℃ 정도 식은 PDA 배지를 배양접시위에 중층하였다. 중층된 PDA 배지가 완전히 굳은 뒤 PDB 액체배지에서 7일 동안 키운 *R. solani*

의 균사체를 멸균된 가아제에서 거르고 멸균수에 재 현탁한 후 waring blendor (model 31BL91)를 이용하여 균질화 시켰으며, 이 균질액 0.1 ㎖를 중층 배지위에 도말하고 다시 항온기 내에서 3일간 배양하여 *R. solani*의 균사 성장을 억제하는 세균의 집락수를 조사하였다.

8. 부숙 퇴비의 발병 억제 효과

가. 식물체 배양상토 조제

식물체 생육을 위한 배양상토는 시중에서 판매되는 peat moss (Bio-mix potting substratum, Seoul Agricultural material Co Ltd.)를 사용하였으며 필요에따라 퇴비를 첨가하여 사용하였고, 첨가한 퇴비의 양은 별도의 언급이 없는한, 25% (v/v) 였다.

나. 퇴비 첨가량에 따른 발병 억제 효과

최종 90일 부숙퇴비 (RHC, RHM, SDC, SDM)의 첨가 비율에 따른 무의 모잘록병 억제 효과를 조사하기 위하여 상업용 상토 (부농 원예용 상토)에 각 퇴비를 0, 25, 50, 75% (v/v)의 비율별로 첨가하고 0% 첨가구를 대조구로 삼았으며 아울러 peat를 또 다른 대조구로 하여 퇴비와 동일한 첨가 비율에 따른 발병정도를 조사하였다.

다. 길항미생물 제제와 퇴비의 첨가에 의한 억제 효과 비교

미생물제제와 RHC 퇴비, 그리고 미생물제제와 RHC 퇴비의 병용 처리에 의한 모잘록병의 억제효과를 조사하였다. 길항미생물 제제를 조제한 후 peat 상토, peat와 RHC 퇴비 첨가상토 1ℓ에 대하여 2 g의 제제를 첨가하고 위의 방법에 따라 potting 하였으며, 대조구로는 병균 접종원만 첨가한 처리구, 그리고 RHC 퇴비만 첨가한 처리구를 사용하여 억제효과를 비교,

조사하였다.

9. 미생물제제의 포장실험 효과

가. 감자 토양병의 억제효과

감자포장은 제주도 지역의 봄, 가을 감자 재배지를 선정하였으며, 토양병의 억제효과를 보기 위하여 씨감자 식부시 미생물제제 현탁액(100배액)에 10분간 담근 후 씨감자를 파종하였다. 파종 후 발아율 및 싹 썩음병, 흑지병 등의 토양병 이병율을 조사하였고 수확량도 비교하였다. 시험기간 (1997. 7. 14 - 9. 5, 1998. 7. 30 - 8. 27) 중 감자재배 및 지상부 약제 살포는 관행법으로 농민에 의해 수행되었으며, 본 시험은 제주대학교 아열대 원예산업 연구센터의 도움으로 진행되었다.

나. 양파 모잘록병 방제효과

양파 모잘록병의 주요 병원균은 *R. solani*, *Fusarium* spp.로 알려져 있어, 이 병에 대한 미생물제제의 방제효과를 1998년 9월 4일 - 9월 27일에 경남농촌진흥원 창녕 양파시험장의 협조로 이곳의 온실에서 실시하였다. 매년 모잘록병이 심하게 발생된 곳에 미생물제제로 분의 처리한 양파 종자를 파종하여 관행방법으로 재배하였다. 또 다른 처리로 복토용 톱밥과 모래에 미생물제제 8g/ kg복토를 이용하여 덮어 주고 발아 후 기간별로 모잘록병의 발병정도를 조사하였다.

다. 토양처리에 따른 딸기의 흰가루병 방제효과

미생물제제의 딸기시들음병 방제효과를 보기 위하여 충남농촌진흥원 논산딸기시험장 협조로 온실실험을 실시하였다. 딸기묘 식부를 위한 묘상토에 미생물제제 10g/kg토양을 미리 잘 섞어 골고루 편 뒤에 딸기묘를 식부하고 시들음병 발병과 지상부 흰가루병의 발병정도를 기간별로 조사하였

다. 딸기재배는 관행법으로 수행하였다.

라. 멜론병 방제효과 실험

미생물제제의 멜론 토양병 방제효과를 알기 위하여 남해군 설천면 고사리에 1997년도에 검은점 뿌리썩음병이 심하게 발생된 온실 200평에 미생물제제를 처리한 상토에서 재배된 멜론 유묘를 옮겨 심어 발병 억제효과를 조사하였다. 멜론재배는 농민의 관행재배법으로 수행하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 병원균 *R. solani* 억제 길항균의 분리 및 동정

총 330개의 순수분리 세균 중 chitin 분해능력이 좋은 40개 균주를 선발하여 배양기 상에서 병원균 억제를 조사하였다. chitin 분해능력이 있는 여러 균주들은 Table 1에서와 같이 chitin 최소배지와 TSA상에서 생장이 양호하였으며, 특히 #300, #383, #386, #387, #601, #630 균주는 chitinase 외에도 진균세포벽 분해효소인 β-1,3-glucanase (laminarinase) 활성도 좋았다(Table 2). 이 균주들 중 PDA, M523 등 여러 종류의 배양기에서 공통적으로 균사생장을 억제하는 #300 균주외 5개의 우수 균주를 선발하였고 이 균주들은 중요한 토양병원균인 *R. solani*, *F. oxysporum*과 *Pythium ultimum*의 균사생장을 억제하였다(Table 3, 4). 이들 균주를 지방산종류 별 분석 동정기계로 동정한 결과 4 균주는 *Bacillus thuringiensis*, *B. macerans*, *B. cereus*, *B. amyloliquefaciens* 으로 확인되었으나 2 균주는 동정되지 않았다(Table 2).

Table 1. Chitinolytic bacteria isolated from various soils and composts

Isolate	Locality	Chitinolvtic Activitya	Growth Rateb	
			MCM	TSA
300	Chinju	++	++	++
301	〃	++	+	+
304	〃	++	+	+
310	〃	+	+	+
311	〃	++	+	++
312	〃	+	++	++
313	〃	+	+	++
321	〃	+	+	+
335	〃	+	+	+
336	〃	++	++	++
337	〃	+	+	++
340	〃	++	+	++
343	〃	++	+	++
348	〃	++	+	++
350	〃	+	+	+
352	〃	+	+	+
353	〃	++	+	+
355	Ahnsan	++	+	+
356	〃	+	++	++
357	〃	++	+	+
360	〃	+	++	++
361	〃	+	+	+
364	〃	+	+	+
370	Suwon	++	+	++
371	〃	+	+	++
374	〃	++	++	++
378	〃	+	+	++
379	〃	+	+	++
380	Chinyang	+	++	++
381	〃	++	+	+
382	〃	+	+	+
383	〃	+	++	++
384	〃	+	++	++
385	〃	++	+	+
386	〃	+	++	++
387	Chinju	++	++	+
514	Ahnsan	+	++	++
515	〃	+	+	+
516	〃	+	+	+
601	Soonchun	+++	++	++
618	Ulleungdo	+	+	++
630	〃	++	+	++

a. +; mild, ++; medium, +++; strong.

b. +; slow, ++; medium, +++; fast growth at 28℃. MCM; minimal chitin media, composed of swollen chitin 0.05% (w/v), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g, K_2HPO_4 0.7g, KH_2PO_4 0.3g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01g, $ZnSO_4$ 0.001g, $MnCl_2$ 0.001g, pH 6.8, Agar 15g,D.W 1L: TSA; tryptic soy agar.

Table 2. Lytic activities of antagonistic bacteria to *Rhizoctonia solani* inliquidculture media

Isolate	Identificationb	Lytic Activitya (U/mℓ)		Chitosanolytic Activityc
		Laminarinase	Chitinase	
300	unidentified	0.09	0.08	+++
383	*Bacillus thuringiensis*	0.03	0.07	-
386	*B. macerans*	0.10	0.12	-
387	*B. cereus*	0.12	0.06	-
601	unidentified	0.05	0.03	-
630	*B. amyloliquefaciens*	0.07	0.04	++

a. Lytic activity was determined in liquid culture media contain-ing Rhizoctonia cellwall as a sole carbon source. Enzyme unit defined: laminarinase (β-1,3- glucanase); μmole glucose/hr, chitinase; μmole N-acetyl-D-glucosamine/hr.

b. Antagonistic bacteria were identified with the method of fatty acid analysis using Hewlett Packard Microorganisms Identification Device (MID).

c. Chitosanolytic activity was determined on 0.1 TSA media containing chitosan(0.25%, w/v): -; negative, +; mild, ++; medium, +++; strong.

Table 3. Mycelial growth inhibition of *Rhizoctonia solani* by antagonistic bacteriaon various agar media

Isolate	Inhibition Zone (mm)a				
	0.1TSA	0.5TSA	PDA	M523	MCM
300	7	5	4	9	4.5
336	3	0	0	4	1
374	0	0	0	0	3
383	6	2	5	N.D	2
384	0	0	5	2	1
385	4	4	5	6	6
386	3	4	5	3	2
387	N.D	N.D	N.D	5	2
601	9	7	9	9	7
618	1	3	6	3	1
630	1.5	0	5	6	2

a. The mycelial growth inhibition was determined by the paired bioassay on variousagar media 2 5 days after inoculation at 28℃. TSA; Tryptic Soy Agar,

PDA; Potato Dextrose Agar, MCM; Minimal Chitin Media. N.D; not determined.

Table 4. Mycelial growth inhibition of soilborne plant pathogenic fungi by antagonistic bacteria

Isolate	Inhibition Zone (mm)a					
	M523			PDA		
	R. sol.b	P. ult.	F. oxy.	R. sol.	P. ult.	F. oxy.
300	9	5	14	4	4	19
383	-	-	5	5	0	6
386	3	1	2	5	0	4
387	5	-	3	-	0	8
601	9	0	-	9	0	0
630	6	5	-	5	2	4

a. Growth inhibition was determined 3 days after simultaneous inoculation of fungi and antagonistic bacteria: -; not determined.

b. R. sol.; *Rhizoctonia solani*, P. ult.; *Pythium ultimum*, F. oxy.;

Fusarium oxysporum f. sp. *cucumerinum*.

2. 시들음병균 *F. oxysporum* 억제 길항균의 선발 및 균사생장 억제효과

무모잘록병균 *R. solani*에 대하여 억제 효과가 있는 1차년도 분리 40 균주와 2차년도에 추가로 분리된 10 균주 중에서 시들음병균에 대한 억제 효과가 뛰어난 길항미생물 2 균주(#300, #385)를 선발하였다. 두 균주는 사용된 배양기 PDA와 0.1TSA 배지 상에서 10 ㎜ 이상의 억제 효과를 나타내었으며, 오이, 멜론, 토마토 덩굴쪼김 병원균 모두에 대하여 약간의 차이는 있으나 억제 효과가 높았다 (Table 5, 6). 이 두 균주들은 병원균 세포벽분해 효소인 chitinase, chitosanase와 β-1,3-glucanase의 활성이 다른 균주에 비해 월등히 높았다(Table 7). 또 이 균주들은 세포벽 분해효소 외에 여러종류의 배양기에서 항생물질을 분비하였으며 특히 M523 배지에서 생성된 배양여액의 병균억제 활성이 높았다 (Table 8).

Table 5. Inhibition of mycelial growth of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* by different antagonistic bacteria

Isolate	Inhibition zone (㎜)	
	PDA	0.1TSA
75	3.0	2.0
300	6.0	10.5
383	7.0	8.0
385	13.0	12.0
386	2.0	0.0
387	5.0	0.0
631	6.0	0.0
636	7.5	7.0
637	3.0	3.0
638	3.0	3.0
639	4.0	7.0
640	3.0	8.0

* The mycelial growth inhibition was determined by paired bioassay

test on PDA and 0.1TSA at 25 C.

Table 6. Inhibition of mycelial growth of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum*, *F. o.* f.sp. *melonis* and *F.o.* f.sp. *lycopersici* by antagonistic bacteria

Isolate	Inhibition zone (㎜)					
	F. o. c.		F. o. m.		F. o. l.	
	PDA	0.1TSA	PDA	0.1TSA	PDA	0.1TSA
300	7.5	12.0	13.0	8.0	11.0	7.0
383	6.0	7.0	6.0	7.0	3.0	4.0
385	9.5	13.5	8.0	4.0	5.0	0.0
601	0.0	0.0	4.0	1.0	0.0	0.0
635	8.0	7.0	1.0	5.0	0.0	3.0
636	9.5	9.0	12.0	5.0	5.0	3.0
639	6.5	7.5	7.0	4.0	4.0	4.0

Table 7. Enzyme activities in culture supernatants of some antagonistic isolates

Isolate	Total protein (㎎)	Chitinase		Chitosanase		β-1,3-glucanase	
		Tot. Act. (U)	Sp. Act. (U/㎎)	Tot. Act. (U)	Sp. Act. (U/㎎)	Tot. Act. (U)	Sp. Act. (U/㎎)
300	3.35	15.4	4.6	7.9	2.4	14.7	4.4
383	2.47	0.0	0.0	0.5	0.2	0.0	0.0
385	4.05	14.1	3.5	3.5	2.6	1.2	0.3
601	0.56	0.0	0.0	0.0	0.1	4.1	0.7
635	2.67	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
636	2.80	1.4	0.5	0.5	0.5	1.9	0.7
639	2.77	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Table 8. Antifungal activity of culture filtrates of antagonistic bacteria #300 and #385 in various media

Media	Inhibition zone (mm)	
	#300	#385
PDNB	3.0	2.0
PPGS	3.0	4.5
SF	0.0	2.0
0.1TSB	0.0	4.0
TSB	3.0	2.0
KB	2.0	3.0
M523	4.0	6.0

3. 길항미생물의 발병억제효과 검정

가. 무 모잘록병 방제효과

분리된 길항세균 6균주를 이용한 제제는 왕겨와 새우껍질을 섞어 만든 퇴비(RHC)를 첨가하지 않았을 때 *R. solani* AG4에 의한 무모잘록병 발병억제 효과가 대조구에 비해 약 47% 더 좋았으며, 퇴비 첨가시에는 효과가 약간 낮았다. 제제에 chitosan, TSB(tryptic soy broth)를 적정량 첨가하였을 때에는 퇴비 첨가시 억제효과가 가장 높았다. 그러나 길항균 단독처리와 통계적인 유의성은 없었다(Table 9). 미생물제제 기제로 peat와 vermeculite를 사용하였는데, 전자의 경우 발병이 80% 이상 억제되었으나 후자의 경우 전혀 억제효과가 없었다(Table 10). 아마도 이것은 peat의 경우 유기물의 변형체로 세균이 생장 가능하지만 vermiculite의 경우는 무기물로 세균생장에는 부적합한 이유 때문으로 생각된다.

Table 9. Efficacy of bacterial formulation treatment in the suppression of Rhizoctonia damping-off of radish

Treatmentb	Disease Severity (%)a	
	- RHC	+ RHC
Ant. Bact.	24.7	24.5
Ant. Bact. + Chitosan	-	-
Ant. Bact. + TSB	-	-
Ant. Bact. + Chitosan + TSB	27.6	19.1
Chitosan	39.4	27.3
Control	45.1	35.9
LSD(.05	16.3	

a. Disease severity was determined 7 days after simultaneous treatment of 1 g soil inoculum and antagonistic formulation. The severity was rated as follows; 0= healthy, 1= 0 25% diseased, 2= 26 50% diseased, 3= 51 75% diseased and 4= 76 completely girdled or pre-emergence damped-off.

b. Ant. Bact.; antagonistic bacterial suspension, TSB; Tryptic Soy Broth.

Table 10. Effect of bacterial formulation treatment against Rhizoctonia damping-off of radish

Treatmenta	Disease severity (%)b		
	I	II	Mean
PF	25.3	11.8	13.2
VF	34.4	48.6	41.5
RHC + PF	13.2	6.6	9.9
RHC + VF	36.8	62.5	49.7
RHC	28.1	20.8	24.5
Control	57.3	62.9	60.1
LSD(.05			13.0

a. PF; antagonistic bacteria formulated in peat, VF; antagonistic bacteria formulated in vermiculite, RHC; rice husk compost.

b. The disease severity (%) was determined 7 days after co-application of PF (2g/ℓ) and soil inoculum (1g/ℓ) and rated as follows: 0= healthy, 1= 0 25% diseased, 2= 26 50% diseased, 3= 51 75% diseased, 4= 76%

completely girdled or pre-emergence dampped-off.

나. 오이 시들음병 방제효과

오이 시들음병 방제를 위해서 병원균 *F. oxysporum* 억제효과가 좋은 #300, #385 두균주를 이용하여 억제효과를 조사하였는데, 1균주씩 따로 접종한 것 보다는 #300이 약간 많게 제제화 한 것이 훨씬 발병억제 효과가 좋았다(Fig. 1). 아마도 2 균주사이의 협력작용에 의한 상승효과로 생각된다. 제제 종류별로 시들음병 방제효과를 보면 제제에 따라 발병 효과 차이가 있었다(Fig. 2). Peat+antagonists (PA), zeolite+antagonists (ZA), peat+antagonists+chitosan (PAC), zeolite+antagonists+chitosan (ZAC) 중 PAC와 ZAC가 발병율 20% 정도로 대조구의 70%에 비하여 훨씬 발병이 낮았으며, 처리량에 따른 발병억제율은 6g/kg상토 이상에서는 발병율이 20% 이하로 더 줄어들지는 않았다.

제제화 된 ZAC과 그렇지 않은 길항균 현탁액(A) 만을 처리한 경우 전자의 경우 처리후 15일이 지난 후 오이를 파종하여도 발병억제 효과가 있는 반면에 후자의 경우에는 처리 9일 이후에는 효과가 급격히 감소하였다(Fig 3). 이것으로 볼 때 미생물의 제제화는 세균의 안정성을 높혀주는 것으로 판단된다.

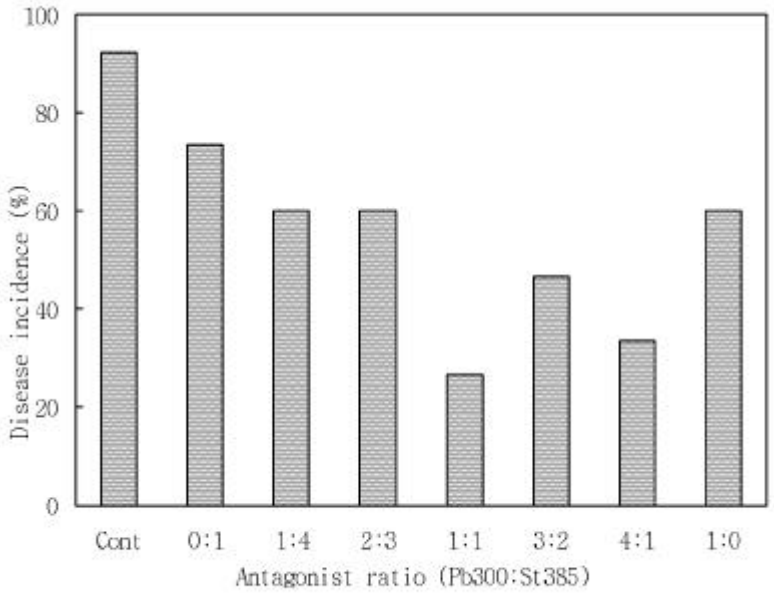


Fig. 1. Effect of mixing *Paenibacillus* sp. 300 (Pb300) and *Streptomyces* sp. 385 (St385) in different ratios on suppression of Fusarium wilt of cucumber. Bacteria were grown separately in tryptic soy broth on a rotary shaker for 96 h at 30C, mixed to give the appropriate ratio of each strain and fifteen ml of a suspension was added to 1 kg of potting medium infested with *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. Cucumber plants were grown for 30 days and the incidence of disease was calculated by counting the number of plants showing typical disease symptoms. Potting medium alone served as control (Cont). Bars with a different letter differ according to a least significant difference test ($P < 0.05$).

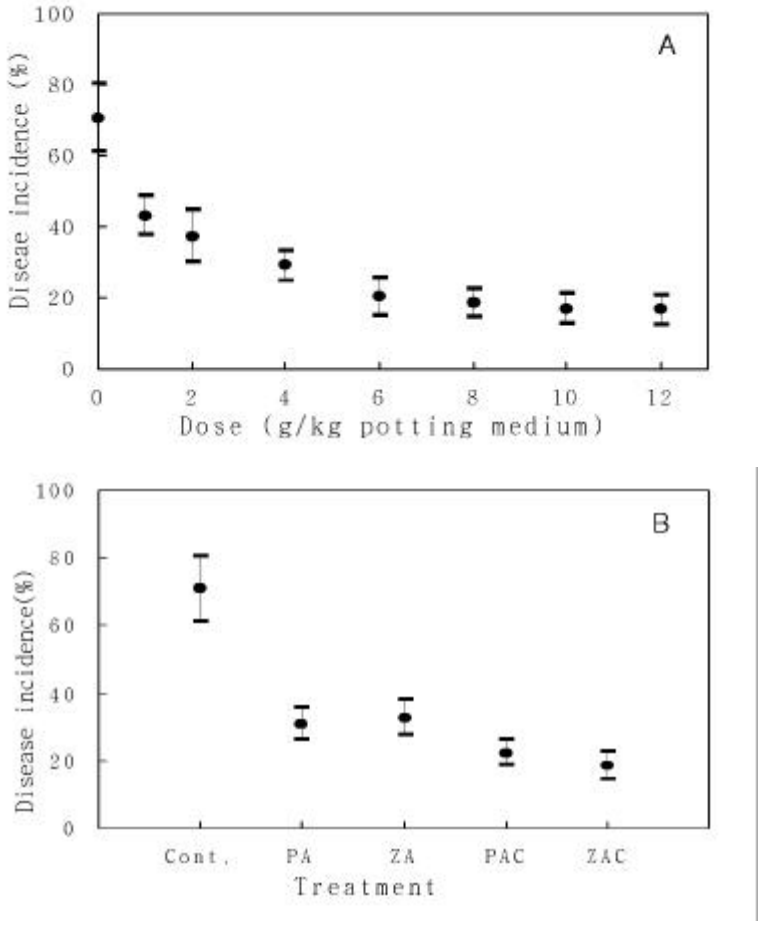


Fig. 2. Effects of peat- and zeolite-based formulations of *Paenibacillus* sp. 300 and *Streptomyces* sp. 385 incorporated into pathogen infested potting medium on suppression of Fusarium wilt of cucumber. A, Levels of mean wilt incidence in response to different dosages of antagonist formulations. B, Mean wilt incidence in response to different antagonist formulations. Formulations were prepared by mixing 4 g Canadian peat moss or zeolite with 10 ml of a mixed cell suspension (1:1) of two antagonists, with or without chitosan. PA, peat plus antagonists; PAC, peat plus antagonists plus chitosan; ZA, zeolite plus antagonists; ZAC, zeolite plus antagonists plus chitosan. Bars indicate 95% confidence limits.

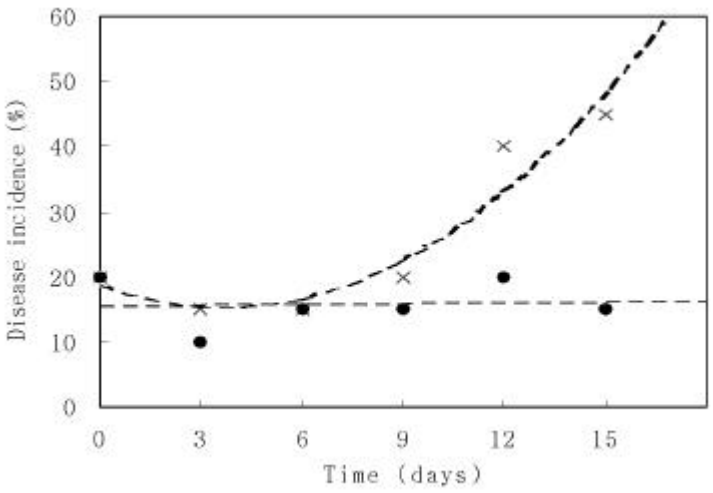


Fig. 3. Effect of time of planting in pathogen-infested potting medium amended with cell suspension A and formulation ZAC on the suppression of Fusarium wilt of cucumber. Cucumber seeds were planted 0 to 15 days after addition of the antagonists in to the potting medium and the disease incidence was calculated by counting the number of plants showing typical disease symptoms. A = mixed cell suspension (1:1, v/v) of *Paenibacillus* sp. 300 and *Streptomyces* sp. 385, ZAC = zeolite-based antagonist formulation prepared by mixing zeolite (4 g) with 10 ml of mixed cell suspension of the two antagonists amended with 0.25% (w/v) chitosan. Data are from a single representative test and are the mean of five replicates per treatment.

4. 제제 보관기간 별 억제효과 조사

가. 무 모잘록병 방제효과

길항세균 6균주를 제제화 하여 4℃의 냉장고에서 보관기간 별로 억제효과를 조사한 결과 62일 까지도 발병정도가 18%로 대조구 62%에 비해 80% 이상 발병억제 효과가 유지되었다(Fig. 4).

나. 오이 시들음병 방제효과

길항세균 #300과 #385를 ZA, ZAC로 제제화 하여 각각 냉장고와 실온에서 45일, 90일, 180일 보관한 후 발병억제 효과를 조사하였다. 그 결과 두 제제 모두 6개월 간 보관후에도 여전히 발병억제 효과가 높았으며 특히 ZAC 제제를 냉장고에 보관한 것이 발병억제 효과가 가장 높았다(Fig. 5).

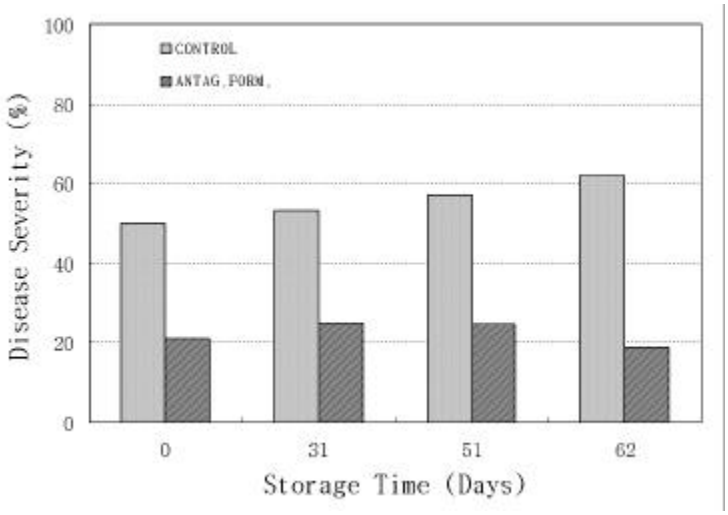


Fig. 4. Effect of antagonists formulations of 6 isolates stored at 4C on the suppression of Rhizoctonia damping-off of radish.

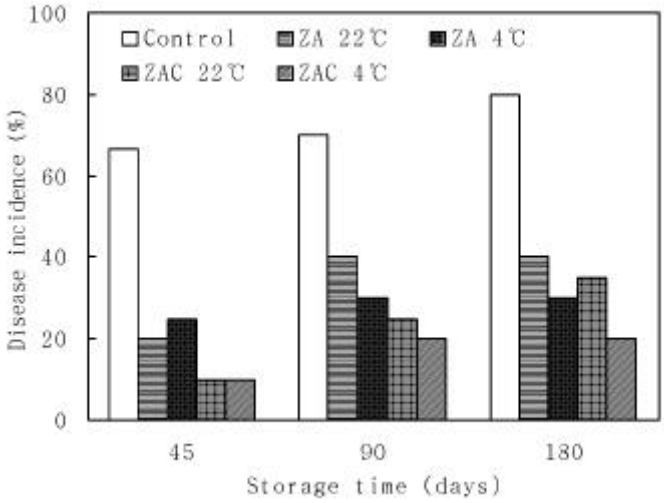


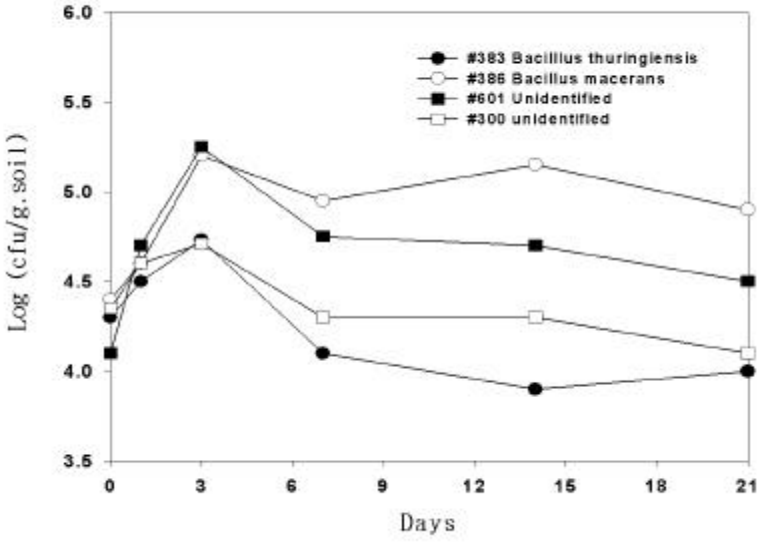
Fig. 5. Effect of ZA (zeolite plus antagonists) and ZAC (zeolite plus antagonists plus chitosan) formulations of *Paenibacillus* sp. 300 and *Streptomyces* sp. 385 stored at 4C and room temperature (22C) on the suppression of Fusarium wilt of cucumber. Bars with a different letter differ according to a least significant difference test ($P < 0.001$) at indicated times. Data are from a single representative test and are the mean of five replicates per treatment.

5. 길항미생물의 제제 중 밀도변화

가. 무 모잘록병 억제 길항세균의 변화

각기 다른 항생물질에 대하여 내성이 유발된 4 종류 길항세균을 이용하여 제제화 한 후 밀도변화를 조사하였다. Peat 상토에 처리된 길항 세균의 밀도 변화는 처리시에 상토 1g 당 104 cfu 정도에서 3일 후에 10배 가량 증가하였다가 감소하기 시작하여 처음 1주일 정도는 10^5/ g soil 로 유

지되었다. 그 이후 서서히 감소하여 3 주 후에는



#386과 #601 균주는 처리시보다 약간 높은 밀도를 유지하였고 #300, #383 균주는 처음 농도와 같은 밀도를 유지하였다(Fig. 6). 3일 후 밀도가 증가된 것은 종자 발아시 영양분에 의한 증가로 보여지며 그 이후의 감소는 이들 길항균 외에도 여러 가지 미생물들의 증가에 의한 영양부족 때문인 것으로 생각된다.

Fig. 6. Changes in population densities of antagonistic bacteria in the rhizosphere of radish at different intervals after introduction bacterial formulations in to potting medium infested with *Rhizoctonia solani*. Radish seeds were planted simultaneously with antagonists treatment. Two g of bacterial formulation was added to 1 liter of soil (w/v).

나. 오이 시들음병 억제 길항세균의 변화

상토에 길항균을 처리하고 4일 후 오이 종자를 파종하였기 때문에 오이 종자가 발아하기 전 첫 8일간은 길항균의 밀도가 제제에 관계없이 감소하였다. 그러나, 8일 이후로는 점차 밀도가 증가하기 시작하였는데, 기질 chitosan을 첨가하지 않은 ZA제제는 ZAC에 비해 밀도가 낮게 유지되었으며 두 제제 모두 무처리에 비해서 그 밀도가 현저하게 높았다(Fig. 7).

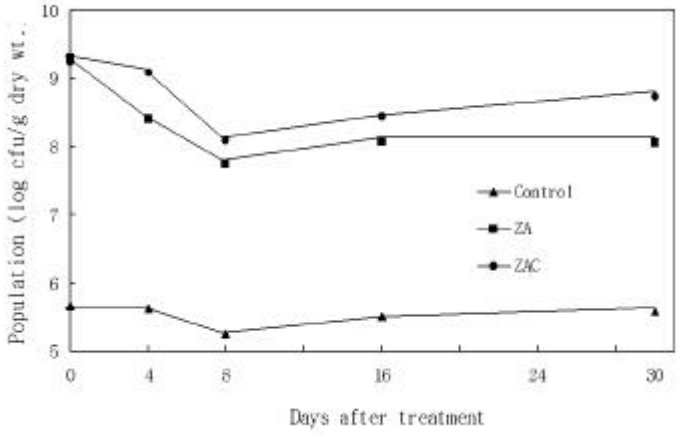


Fig. 7. Changes in population densities of chitinolytic bacteria in the rhizosphere of cucumber at different intervals after introduction of ZA (zeolite plus antagonists) and ZAC (zeolite plus antagonists plus chitosan) formulations in to potting medium infested with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. Potting mix alone served as control. Cucumber seeds were planted 4 days after antagonists treatment. A different letter represent significant differences in the population size among treatment means at a sample time according to a least significant difference test ($P < 0.001$). Data are from a single representative test and are the mean of three replicates per treatment.

6. Chitin 분해미생물 복합체의 대량증식을 위한 농수산 폐기물의 퇴비화

Chitin을 분해 할 수 있는 세균의 선택적 증식을 위해 새우, 게 껍질을 수산물 가공공장에서 수거하여 왕겨, 톱밥 등과 섞어 자연상태에서 퇴비화 하면서 퇴비화 과정 중 발생되는 chitin 분해미생물의 밀도 변화를 조사하였다(Fig. 8). 4가지 퇴비 중 새우껍질을 이용하여 만든 퇴비에서 chitin 분해 미생물의 밀도가 다른 종류 퇴비에 비해 훨씬 높았다. 특히 3개월이 경과한 뒤의 밀도는 108 cfu/g soil에 달하였다.

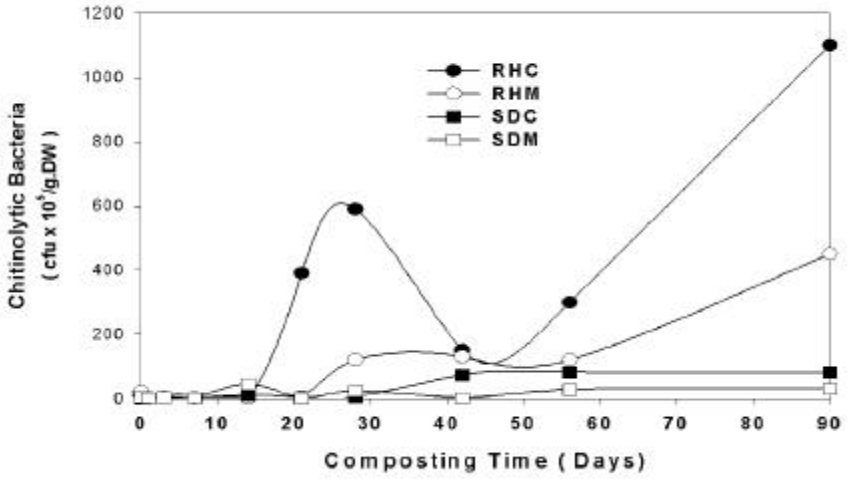


Fig. 8. Population changes of chitinolytic bacteria in composts during composting of various agricultural wastes. RHC; rice husk and shrimp shell wastes, RHM; rice husk and pig manure, SDC; sawdust and shrimp shell wastes, SDM; sawdust and pig manure.

7. 퇴비 및 길항미생물 제제 첨가 퇴비의 발병억제효과 조사

새우껍질과 왕겨로 제조한 퇴비 RHC가 약 50-60% 정도로 억제효과가 가장 높았다(Table 9, 10). 이 결과는 6회 이상의 실험에서 모두 동일한 경향을 나타내었으며, 길항미생물 제제를 첨가 할 경우 발병억제 효과가 25% 정도 더 증가되었다.

8. 길항미생물의 억제작용

길항세균 #300, #385 균주의 병원균 억제 작용을 알기 위하여 두 균이 생산하는 chitinase, β-1,3-glucanase 를 배양여액으로부터 농축하고 phenyl column을 통한 부분적 분리분획을 이용하여 세포벽 분해실험을 실시하였다. 그 결과 #300 균주는 두 세포벽 효소 모두를 같은 분획에 포함하고 있었으며 #385는 서로 다른 분획에서 활성을 나타내었다(Fig. 9). 이 균주의 효소분획에 병원균의 균사체를 넣어 분해되는 정도를 관찰 한 결과 #300 균주 분획의 분해효율이 chitinase만을 포함한 #385 균주분획 보다 높게 나왔다(Fig. 9). 이것은 균사분해에 있어서 두가지 효소의 작용이 상승적임을 증명하는 것으로 생각된다.

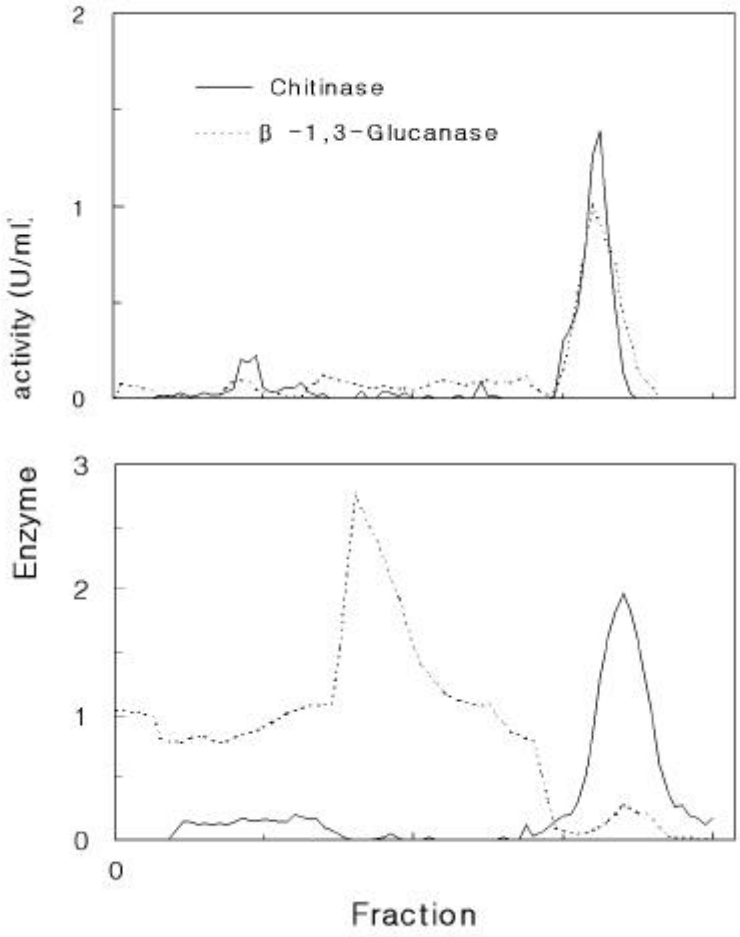


Fig. 8. Fractionation of the chitinases ( ) and -1,3-glucanases (----) on a phenyl -Toyopearl column. A, *Paenibacillus* sp. 300, and B, *Streptomyces* sp. 385. Enzyme activity in all figures is in U/ml. One unit of chitinase activity was defined as the amount of enzyme that liberated 1 M N-acetyl-D-glucosamine per hour at the defined conditions. One unit of -1,3-glucanase activity was defined as the amount of enzyme that liberated 1 M of glucose per hour at the defined conditions.

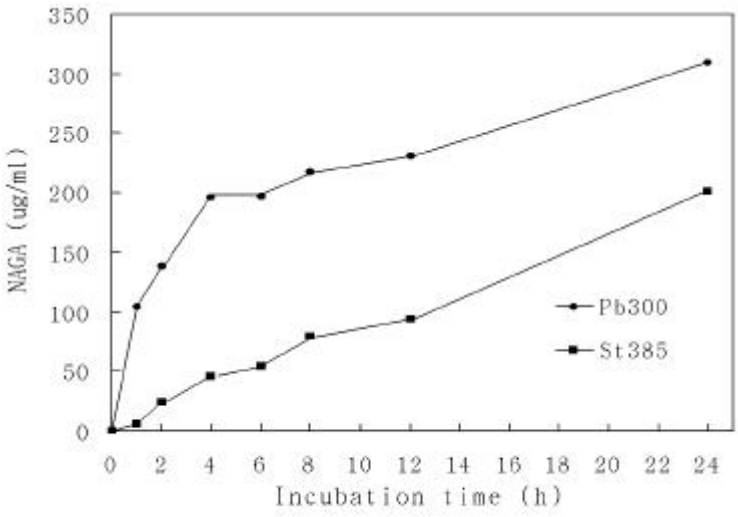


Fig. 9. Release of N-acetyl-D-glucosamine(NAGA) from a living cell wall preparation of *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* by partially purified enzyme fractions of *Paenibacillus* sp. 300 (fractions 64-67) (Pb300), and *Streptomyces* sp. 385 (fractions 68-71) (St385) showing high chitinase activity. Ten ml of a mycelial suspension was mixed with an equal volume of partially purified enzyme solution by phenyl-Toyopearl column chromatography and incubated at 37C.

9. 미생물제제의 포장 실증시험

1, 2차년도에 개발된 미생물제제의 방제효과를 포장상태에서 검증하기 위하여 3차년도에는 전년도 토양병 발병이 심하였던 감자, 양파, 멜론, 딸기(온실재배) 포장에서 실험을 수행하였다.

가. 제주도 가을 감자의 토양병 억제효과

제주지역의 가을 감자 재배 중 최근 3-4년간 엄청난 피해를 가져온 싹 썩음병 발병 억제를 위하여 씨감자 식부시 미생물제제를 침지하여 파종하였다. 그 결과 1997년도, 1998년도 2년 여름동안 시험한 결과 2시험 포장 모두 무처리에 비하여 싹썩음병 발병이 현저히 낮았으며 방제가도 1997년과 1998년에 각각 70%와 66.5% 이었다(Table 11). 본 시험 결과의 실용화를 위해서는 실험을 확대 수행해야 할 필요가 있다.

Table 11. Efficacy of the microbial product treatment in controlling Fusarium sprout rot of potato in Cheju fields

Year	Treatment	Disease Incidence (%)	Control Value (%)
1997a	Seed dipping	9.3	69.8
	Soil incorporation	8.8	71.4
	Control	30.8	-
1998b	Seed dipping	15.0	66.5
	Control	44.8	

a 1997. planting: 7. 14, disease survey: 9. 5.

b 1998. planting: 7. 30, disease survey: 8. 27.

나. 양파 모잘록병 방제효과

미생물제제의 양파 모잘록병(병원균: *Rhizoctonia solani*) 방제효과를 알기 위하여 전년도 모잘록병이 심하게 발생된 온실 토양에 양파종자를 파종하고 복토용 톱밥과 모래에 미생물제제를 8g/ kg으로 섞은 후 관행법으로 종자를 덮어준 후 발병정도를 조사하였다. 이 경우 68.8%의 방제가를 보였으나, 종자를 미생물제제 50배 희석액에 침지 후 파종한 경우는 79.9%의 높은 방제효과를 보였다(Table 12).

다. 미생물제제의 토양처리에 따른 딸기 흰가루병 방제효과

딸기시들음병 방제효과를 조사하기 위하여 충남농촌진흥원 논산딸기시험장과 공동으로 온실실험을 실시하였으나 심하게 이병된 토양을 구하기 어려워 미생물제제 처리에 의한 지상부의 흰가루병 방제 효과를 조사하였다. 미생물제제 처리는 10g/kg토양의 비율로 미리 섞어 준뒤에 딸기묘를 식부하여 기간별로 발병조사를 하였다. Table 13과 같이 미생물제제 처리에 의해 흰가루병이 약간 감소되는 경향을 보였다.

Table 12. Efficacy of the microbial product treatment in controlling Rhizoctonia damping-off of onion seedlings in nursery bed soils

Year	Treatment	Disease Incidence (%)	Control Value (%)
1998	Seed coating	5.8	79.9
	Covering soil mixture	9.0	68.8
	Control	28.8	-

* Test: 1998. 9. 4 - 9. 27, Chang-young Onion Experimental Station

Table 13. Efficacy of soil incorporation of the microbial product in inducing disease resistance to powdery mildew of strawberry under greenhouse condition (1998)

Treatment	Infected Fruits (%)					Mean	Control Value (%)
	2/28	3/9	3/13	3/18	3/25		
Soil incorporation	0.0	36.5	24.8	27.4	55.1	28.8	32.4
Control	0.0	54.4	51.9	44.5	62.3	42.6	-

라. 멜론병 방제효과 및 생육에 미치는 영향

미생물제제의 멜론 토양병 방제효과를 알기 위하여 전년도 검은점뿌리썩음병이 심하게 발생된 온실 약 200평에 미생물을 상토에 처리한 후 육묘한 묘를 옮겨 심었으나 올해에는 발병이 되지 않아 발병억제효과를 볼 수 없었다. 그러나, 미생물처리한 유묘의 초기생장이 무처리구에 비하여 월등히 좋았으며 개당 중량과 당도도 약간 높은 경향을 보였다 (Table 14).

Table 14. Effect of micrbial product treatment on the growth of musk melon seedlings

Treatment	Growth (cm)		(kg/ea)	Sugar index
	Height	Leaf width		
Soil mixture	14.2	7.9	1.86	18.0
Control	12.1	6.2	1.68	17.7

* Treatment rate: 6g product/ kg soilless potting medium (Ball co.).
* Growth was measured one month after mixing.

10. 미생물의 대량 제제화를 위한 배지 종류 조사

미생물을 값싸게 대량으로 배양하기 위하여 몇가지 배지성분을 조합 변형하여 길항미생물을 배양하면서 시간별로 밀도변화를 조사하였다. 사용된 배지종류는 Table 15와 같이 5가지 였다. 5가지 배지를 이용하여 길항미생물을 배양한 결과 Fig. 10 과 같이 TSB, SMF1, SMF2 배지에서의 생장이 가장 좋았으며 24시간 뒤에 이미 정지기에 들어갔고 균밀도는 108 cfu/ml 이었다. 이 결과에 따라서 배지가격을 고려하여 SMF2를 대량배양용

배지로 선정하였다.

Table 15. Ingredients of culture media for mass culture of antagonists

Media	TSB		SMF1		SMF2		SMF3		SMF4	
Ingredient (g/L)	Dextrose	2.5	Dextrose	5	Crd. sucrose	3	Corn steep liq.	3	Corn steep liq.	1.5
	Soytone	3.0	Yeast ext.	4	Yeast ext.	1.5	Yeast ext.	1.5	Crd. sucrose	1.5
	Tryptone	17.0	Beef ext.	1	Sol. starch	3	Sol. starch	3	Yeast ext.	1.5
	NaCl	5.0	Sol. starch	20	SMF	3	SMF	7	Sol. starch	3
	K_2HPO_4	2.5	SMF	25	K_2HPO_4	0.1	K_2HPO_4	0.1	SMF	7
			K_2HPO_4	0.1	NaCl	2	NaCl	2	K_2HPO_4	0.1
			NaCl	2					NaCl	2

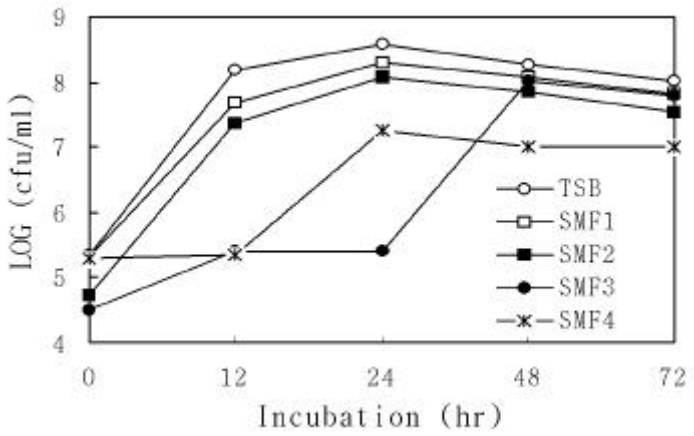


Fig. 10. Comparison of population changes of antagonistic bacteria in various growth culture media.

제 4 절 참고문헌

1. Agrios, G. N. 1988. *Plant Pathology*. pp. 803 Academic press, Inc., New York.
2. Sneh, B., Burpee, L., and Ogoshi, A. 1991. *Identification of Rhizoctonia Species*. American Phytopathological Society, St. Paul, Mn. 67 pp.
3. Korean Society of Plant Pathology. 1994. Proceedings of International Symposium on Biological Control of Plant Diseases. 102 pp.
4. 한국신약개발연구조합. 1992. 신의약/신농약 제품기술 개발사업연구 기획 최종보고서 별책 III, 무공해 생물농약.
5. Campbell, R. 1989. *Biological control of microbial plant pathogens*. pp.218. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
6. 정영륜. 1993. 시설 원예작물의 잿빛곰팡이병 방제용 미생물 농약개발. 경상남도 농촌 진흥원 연구 보고서.
7. Cook, R. J. and Baker, K. F. 1983. *The Nature and practice of biocontrol of plant pathogens*. pp. 539. Am. Phytopathol. Soc., St. Paul, Minn.
8. Baker, K. F. 1970. Types of Rhizoctonia diseases and their occurrence. pp.125 - 133 in: *Rhizoctonia solani, Biology and Pathology*. J. R. Parmeter, Jr., ed. University of California press, Berkeley. 255pp.
9. Elad, Y., Chet, I., Boyle, P., and Henis, Y. 1983. Parasitism of *Trichoderma* spp. *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*-

scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. *phytopathol*. 73: 85 - 88.

10. Benhamou, N., and Chet, I. 1993. Hyphal interactions between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: Ultrastructure and cytochemistry of the mycoparasitic process. *phytopathol*. 83: 1062 - 1071.
11. Diane Valois., Karine Fayad., Tharcisse Barasubite., Marie Garon., Claude Dery., Ryszard Brzezinski., and Carole Beaulieu. May. 1996. Glucanolytic actinomycetes antagonistic to *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, the causal agent of Raspberry root rot. *Appl. Env. Microbiol*. p. 1630 - 1635.
12. Anna P. Vionis., Frank Niemeyer., Amalia D. Karagouni., and Hildgund Schrempf. May. 1996. Production and processing of a 59-Kilodalton exochitinase during growth of *Streptomyces lividans* carrying pCHIO12 in soil microcosms amended with crab or fungal chitin. *Appl. Env. Microbiol*. p. 1774 - 1780.
13. Lorito, M., Di Pietro, A., Hayes, C. K., Woo, S. L., and Harman, G. E. 1993. Antifungal, synergistic interaction between chitinolytic enzymes from *Trichoderma harzianum* and *Enterobacter cloacae*. *Phytopathol*. 83: 721 - 728.
14. Russell J. Tweddell, Suha H. Jabaji-Hare, and Pierre M. Charest. Feb. 1994. Production of chitinase and β-1,3-glucanase by *Stachybotrys elegans*, a mycoparasite of *Rhizoctonia solani*. *Appl. Env. Microbiol*. p. 489 - 495.
15. Leonid Chernin, Zafar Ismailov, Shoshan Haran, and Ilan Chet.

May. 1995. Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* antagonistic to fungal plant pathogens. *Appl. Env. Microbiol.* p. 1720 - 1726.

16. Larkin, R. P., Hopkins, D. L., and Martin, F. N. 1996. Suppression of Fusarium wilt of watermelon by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and other microorganisms recovered from a disease-suppressive soil. *Phytopathol.* 86: 812 - 819.
17. Paulitz, T. C., and Baker, R. 1984. Biological control of Fusarium wilt of cucumber with nonpathogenic isolates of *Fusarium oxysporum* and strains of *Pseudomonas putida*.(Abst.)
18. Sutton, J. C., and Peng, G. 1993. Manipulation and vectoring of biocontrol organisms to manage foliage and fruit diseases in cropping systems. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31: 473 - 493.
19. Deborah, R. Fravel. 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26: 75 - 91.
20. David, M. Weller. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26: 379 - 407.
21. Papavizas, G. C., and Lumsden, R. D. 1980. Biological control of soilborne fungal propagules. *Annu. Rev. Phytopathol.* 18:389 - 413.
22. Leong, J. 1986. Siderophores: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 24: 187 - 209.
23. Howell, C. R., and R. D. Stipanovic. 1979. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas*

fluorescens and with an antibiotic produced by the bacterium. *Phytopathol*. 69: 480 - 482.

24. Kraus, J., and Lopper, J. E. 1992. Lack of evidence for a role of antifungal metabolite production by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 in biological control of Pythium damping-off of cucumber. *Phytopathol*. 82: 264 - 271.

25. Lewis, J. A., and Papavizas, G. C. 1987. Permeability changes in hyphae of *Rhizoctonia solani* induced by germling preparations of *Trichoderma* and *Gliocladium*. *Phytopathol*. 77: 699 - 703.

26. Silo-Suh, L. A., Lethbridge, B. J., Raffel, S. J., He, H., Clardy, J., and Handelsman, J. June. 1994. Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. *Appl. Env. Microbiol*. p. 2023 - 2030.

27. Sneh, B., and Henis, Y. 1972. Production of antifungal substances active against *Rhizoctonia solani* in chitin-amended soil. *Phytopathol*. 62: 595 - 600.

28. Schirmbock, M., Lorito, M., Wang, Y. L., Hayes, C. K., Arisan-Atac, I., Scala, F., Harman, G. E., and Kubicek, C. P. Dec. 1994. Parallel formation and synergism of hydrolytic antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Appl. Env. Microbiol*. p. 4364 - 4370.

제 4 장 원예작물 저장병 방제 미생물 농약 개발

본 연구에서는 1) 양파, 마늘의 저장 중 발생하는 병원균을 분리, 동정하고, 생육 중 표면 미생물 상을 밝히며, 2) 미생물 농약개발을 위해 분리된 표면 미생물 중 저장병원균들에 대한 길항 미생물을 선발하고, 3) 선발된 길항 미생물을 양파, 마늘의 뿌리에 처리하여 포장 실험을 실시하여, 4) 재배 중 길항 미생물의 생존 밀도를 조사하고, 양파, 마늘을 수확하여 각 처리별 부패율을 조사하고, 5) 선발된 길항 미생물의 항균활성 유지 기술의 실용화를 위하여, 또는 최적의 첨가제 선발을 위하여 제형화 후 생존밀도를 조사하고, 6) 제형화된 길항 미생물을 종자에 처리하여 육묘 후 저장결과를 조사하므로 저장병 방제를 위한 미생물 농약 개발에 목적을 두고 있다.

제 1 절 저장 중 부패 병원균과 생육기 중 표면 미생물 집단조사.

1. 서 설

저장 중 발생하는 부패 병원균을 조사하기 위하여 1995년 8월부터 1996년 2월까지 양파 주산단지를 순회하였고, 이렇게 분리된 부패 병원균의 특성을 검정하였다. 또 이러한 부패 병원균에 대한 길항 미생물을 찾기 위해 생육기중의 양파 포장에서 표면 미생물 집단을 조사하여 표면 미생물로부터 길항능력이 있는 미생물을 선택하여 실험에 이용하기 위하여 연구

를 수행하였다.

2. 재료 및 방법

가. 저장중 부패 병원균 분리 동정.

1995년 8월부터 1996년 2월까지 양파 주산단지인 경남 창녕, 함양, 의령 그리고 마늘 집산지인 남해를 순회하면서 저장중 부패한 양파와 마늘을 채취하여 표면을 1% NaOCl 용액에 1분동안 소독한 후 살균수에 헹구어 water agar배지에 옮겨 28℃에서 배양시킨다. 또한 감염된 부위를 습실처리하여 얻은 병원균의 포자를 water agar배지에 옮겨 분리하는 방법이다. 이렇게 분리된 병원균은 potato-dextrose agar(PDA, Difco)에 배양시킨다.

나. 저장 병원균의 특성 검정.

저장병원균으로 양파 *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus* sp.와 마늘 *Penicillium* sp.적정온도, pH를 알아보기 위하여 PDA를 pH 4 8, 온도 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35℃로 하여 균사 생장을 조사하였다.

다. 표면 미생물 분리 및 동정

1996년 2월부터 5월 수확 전까지 7-10일 간격으로 경남 창녕, 함양, 의령 그리고 마늘 집산지인 남해 지방을 순회하면서 재배중인 양파, 마늘을 채취하여 표면 미생물상을 조사하였다. 채취한 시료를 9㎖ 0.1M MgSO4 용액에 넣어 30분 동안 rotary shaker(200 rpm, KMC)에서 shaking 하여 NA, PDA상에서 희석 도말하여 28℃에서 이틀 배양하여 균총의 형태적 특징에따라 미생물집단의 분포를 주기적으로 조사하였다.표면 미생물 조사 기간 중 우점 미생물을 선발하여 MIDI system(Microbial Id. Inc,U.S.A)에 의해서 하였다. 이 system은 세포벽의 지방산을 분석하여 동정하는 방법으로, 다섯 단계로 나뉜다. 분리된 세균을 TSBA (Pancreatic digest of

casein, 17g;Pancreatic digestof soybean meal, 3g; Sodium chloride, 5g; Dipotassium Phosphate, 2.5g; dextrose, 2.5g;Agar, 20g; per 1 liter distilled water)에 접종하여 28℃에서 24시간 배양 시킨다.

step 1. 24시간배양, loop이용하여 세균을 3㎜×100㎜의 tube에 옮김.

step 2. reagent#1(sodium hydroxide, 45g; methanol,150㎖; deionized distilled water, 150㎖)을 1.0±0.1㎖넣고 5-10초 vortex시킨 후100±2℃ water bath에서 10분 끓임.

step 3. 각 tube에 2.0±0.1㎖의 reagent#2(6.0N hydrochloric acid, 325 ㎖; methanol, 275㎖)을 넣어 5-10초 vortex시킨 후 80±1℃ water bath에서 10분간 끓인후 빨리 식힘.

step 4. tube에 reagent#3(hexan, 200㎖; methyl-tert butyl ether, 200㎖)을 1.25±0.1㎖넣어 10분간 잘 혼합- 아랫층을 제거.
이 단계가 지방산 물질을 추출하는 과정.

step 5. reagent#4(sodium hydroxide, 10.8g; deionized water, 900㎖)을 3.0±0.1㎖을 넣어 5분동안 흔든 다음, 윗층 용액을 앰플에 담음.

라. 길항미생물의 선발.

약 100여종의 표면미생물을 1/2PDA에 다섯종을 살균된 이쑤시개로 등거리에 접종하여 28℃에서 하루정도 배양시킨다. 그 후 9㎜ diameter의 분리된 병원균을 표면미생물이 접종되어있는 중앙에 옮겨 일주일 배양시켜서 clean zone이 형성된 미생물을 길항미생물로 선발하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 생육기 중 양파, 마늘포장 순회조사결과 및 부패균 분리 동정

1996년 포장 순회시 생육중 심각한 병의 피해가 없이 작황이 양호하

였다. 그러나 시중 유통되고 있는 양파, 마늘을 구입하여 부패의 원인을 조사한 결과, 출하시 상품일수록 부패병원균의 감염이 높음을 알 수 있었다. 또한 Table 1.에 나타낸 바와 같이 토양병원균으로서 양파 또는 마늘 종구의 뿌리를 통하여 감염하는 병원균*(Fusarium oxysporum)*에 의한 부패율이 가장 높았다. 본 병원균은 생육기 중에 감염되었으나, 재배 중 시들어 고사하는 오이 등 다른 원예작물과는 달리 생육기간 중에 발견될 정도의 증상발현이 없었던 점이 특이 할 만하다. 그 외 양파에는 상단부위를 침입하는 2종의 병원균이 발견되어 양파의 부패는 주로 하단부, 상단부를 침입하는 병원균에 의한 것임을 확인하였다.

마늘종구의 뿌리를 침입하는 토양병원균*(Fusarium oxysporum)*의 피해가 가장심하였고, 정확한 감염경로가 밝혀지지 않은 3종(*Penicillium* sp. *Stemphylium* sp. *Embellisia* sp.)의 균을 분리 동정하였다.

Table 1. Degree of each pathogens attributed to rotting of onion blub and garlic clove

Pathogens	onion bulb	garlic clove
Fusarium oxysporum	++++	++++
Aspergillus niger	++	-
Botrytis allii	++	-
Penicillium hirstum	-	++
Stemphylium botryosum	-	++
Embellisia allii	-	+

나. 저장 병원균의 특성검정

*Fusarium oxysporum*은 pH 6-7,온도 25℃에서 가장 빠른 생장을 보였고, *Penicillium*은 15, 20℃에서 균사 생장이 좋았으며, *Aspergillus*는 pH에 상관없이 30, 35℃에서 균사 생장이 좋았다(Table 2., Table 3. Table 4)

Table 2. Mycelial growth of *F.oxysporum* on potato dextrose agar in 9-days incubation at different pH and Temperature

pH	Temperature(℃)					
	10	15	20	25	30	35
4	-	19*	39	55.6	65	78
5	-	17	46	61.5	67.5	84
6	-	18.5	49	65.5	81.5	84
7	-	17.5	48.5	52	84	84
8	-	13	38.5	76	76	84

* diameter(㎜)

Table 3. Mycelial growth of *Penicillium* spp. on potato dextrose agar in 6-days incubation at different pH and Temperature

pH	Temperature(Pen/Penᵃ)					
	4	10	15	20	25	30
4	37/35*	53.5/51	74.5/66.5	72/61	37/37.5	12/17.5
5	37/36	50/47	74/64.5	75.5/73	39.5/38	11.5/18
6	37/32.5	52/45	73/69	78/84	40.5/38.5	13.5/23
7	35/32	50/47	72.5/70	78/75	41/45	15/22.5
8	37/31	54/48	65/77.5	78.5/77.5	40.5/48	17.5/24

* diameter(㎜) a : *Penicillium* sp.1,2

Table 4. Mycelial growth of *Aspergillus* sp. on potato dextrose agar in 6-days incubation at different pH and Temperature

day	Onion/Garlic									
	pH					Temperature(℃)				
	4	5	6	7	8	10	15	20	25	30
3	21ㅋ/29	22/30	29/30	32/33	31/22	9/9	10/9	22/24	31/32	34/31
6	39/54	49/53	59/53	62/67	62/44	10/10	23/21	38/55	66/56	52/57
9	57/76	74/71	81/79	76/82	79/60	20/19	32/44	72/79	90/79	79/77

* diameter(mm)

다. 표면미생물조사

양파에는 *Bacillus* spp.가 주로 우점 하였으며(BM), *Micrococcus* sp., *Rathayibacter* sp.도 많은 밀도를 나타내었고, *Sphingobacterium*은 재배 후기에 들어 밀도가 줄어드는 경향을 보였다. 진균인 *Penicillium* spp.의 밀도도 상당수준으로 증가되었다가 다소 감소하는 경향을 나타내었다. 마늘에서도 역시 *Bacillus* spp.(BW, BWW),*Micrococcus* sp. *Rathayibacter* sp.가 우점하였고, *Sphingobacterium* sp.는 꾸준히 차위 우점종으로 조사된 점이 양파와는 다른 점이다(Table 5).

Table 5. List of isolated epiphytic microbes from onion and garlic plant

Colony Morphology	Scientific name
BDY	*Sphingobacterium multivorum*
BW	① *B. thuringiensis* ② *B. macerans* ③ *B. amyloliquefaciens*
BY	① *Micrococcus leteus* ② *Rathayibacter tritici*
BWW	*B. pumilus*
PS	① *Pseudomonas marginalis* ② *P. chlorophilus*
BS	*Morganella morgnis*
FB	*Aureobacterium multivorum*
FWG	*Penicillium* spp.
BB	*Bacillus subtilis*
BAC	*Xanthomonas maltophilia*

라. 표면정착 우점 미생물의 선발 및 동정

본 연구과정에서 분리한 표면 우점미생물 중 Bacillus 종으로 *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. macerans*, 및 *B. pumilus*와 토양에서 분리된 것으로서 *B. polymyxa*와 *Trichoderma* spp.등이 유망시 되는 종으로 앞의 미생물은 미생물농약으로서 많은 보고가 있고, 일부 국가에서는 지금 등록, 사용되고 있다. 이들 다수의 분리된 미생물은 저장병에 관련된 병원균의 포자발아 억제력을 검정하여, 길항력이 뛰어난 몇종의 길항미생물을 선발하였다. 선발된 미생물의 동정은 본 대학에 미생물 분류, 동정장치(MIDI)를 이용하여 동정하였다(Table 6).

Table 6. *In vitro* antagonism of selected microorganisms against pathogen of onion and garlic in storage

antagonists		*Aspergillus* sp.(onion)	*Eotrytis* sp.(onion)	*Fusarium* sp.(onion)	*Stemphylium* sp.(garlic)	*Penicillium* sp.(garlic)	*Fusarium* sp.(garlic)
Bacillus amyloliquefaciens	AB-3	+++	++++	++	+++	+++	++
B. amyloliquefaciens	AB-5	+++	++++	+++	+++	+++	++
B. amyloliquefaciens	AB-6	++	+++	+++	+++	++	++
B. amyloliquefaciens	D-122	++++	++++	++	++++	+++	+
B. amyloliquefaciens	I-294	+++	++++	++++	++++	++++	++++
B. amyloliquefaciens	J-279	-	++++	++++	++++	++++	++++
B. amyloliquefaciens	G-451	+++	+++	+++	++	++	++
B. circulans	J-80	++	+++	++	+++	++	+
B. macerans	D-89	+++	++++	+++	+++	+++	+
B. macerans	AB-2	++	++++	++	++	++	++
B. polymyxa	G-453	++	++++	++++	+++	++++	++++
B. polymyxa	E-225	++	++++	++++	++++	++++	++++
B. polymyxa	I- 450	++	++++	++++	++++	++++	++++
B. polymyxa	I-433	+	++++	++++	++++	++++	++++
B. pantothenticus	D-126	-	-	+++	+++	+++	+
B. pumilus	AB-7	+	++	+++	+++	++	++
B. pulvifaciens	H-227	-	+	-	-	-	-
B. subtilus	C-21	++	++++	+++	+++	++	+
Pseudomonas putida	Cha94	-	+	-	+	+	-
Trichoderma spp.	1	+++	++++	++++	++++	+++	++++
Trichoderma spp.	2	++	++++	+++	++++	++++	++++
Trichoderma spp.	3	+++	++++	++++	++++	+++++	++++

마. 길항력 검정

본 연구과제 관련 길항 미생물 선발과정으로 양파,마늘의 표면 미생물에서 분리한 모든 미생물을 공시하여 양파 및 마늘 저장 중 부패관련 병

원균에 대한 길항력을 검정한 결과를 Table 1-6.에 나타내었다. 많은 미생물이 길항력이 뛰어났고, 정확한 길항미생물 선발을 위하여 반복실험을 수행하였다. 특기할 만한 것은 *Pseudomonas putida* Cha94는 오이류의 덩굴쪼김병균(*Fusarium oxysporum*)에 대하여 효과적인 길항균으로서 본 연구진이 지금까지 사용하여 온 것이지만, 양파 마늘종구에 감염하는 *F. oxysporum*에 대하여는 길항력이 다른 분리된 길항미생물보다 길항력이 조금 떨어 짐을 알 수 있었다.

제 2 절 표면 정착 우점 미생물의 특성검정과 저장병의 생물적 방제 활용 가능성 탐색

1. 서 설

부패병원균에 대하여 길항력이 뛰어난 미생물로 선발된 표면 미생물 중 배지상의 길항력과 포자 발아억제력이 뛰어난 세균 3종; *Pseudomonas putida* Cha 94, *Bacillus amyloliquefaciens* BL-3, *B. polymyxa* BL-4, 영양 경쟁력이 뛰어난 진균인 *Trichoderma harzianum* TM을 선발하여 양파 집산지인 경남 함양의 양파 포장과 경남 진주 대곡 소재(경상대학교 농장) 마늘 포장실험에 사용하여 재배중 길항균의 밀도를 조사하고, 수확 후 부패병 발생율을 조사하므로 길항균의 효과를 검정하였다.

2. 재료 및 방법

가. 길항미생물의 포자발아억제효과

분리된 길항미생물(*Pseudomonas putida* Cha94, *Bacillius*

amyloliquefaciens BL-3, *B.polymyxa* BL-4)을 PDB 3㎖에 28℃에서 24, 48시간 배양하여, 5×10⁵/㎖의 *Fusarium oxysporum* 분생포자와 함께 hole slid glass에 넣어서 28℃에서 배양하면서 30분마다 분생포자의 발아를 관찰하였다.

나. 재배기간중 길항균의 밀도조사

선발된 4종의 길항 미생물을 포장실험에 적용한 후 한달 간격으로 수확기(97년 6월)까지 조사하였다. 한달 간격으로 처리구별 양파, 마늘의 구근을 채취하여 항생제 선택배지(Rifampicin.50ppm)를 이용하여 뿌리 1g당 길항 미생물의 밀도를 조사하였다.

다. 선발된 길항균을 이용한 포장 실험

포장실험은 경남 함양(양파), 진주 대곡(마늘)에서 실시하였다. 양파 품종은 '창녕 대고', 마늘품종은 '남해', '남도'를 사용하였고, 길항미생물로는 위에서 선발된 BL3, BL4, Cha94, TM을 사용하였다. 선발된 길항미생물(BL3, BL4, Cha94)은 PDB에 접종하여 28℃에서 이틀간 배양한 후 원심분리(8000rpm)하여 그 pellet을 0.1M $MgSO_4$에 희석하고, TM은 PDA에 접종한 후 28℃에서 일주일 배양하여 포자를 살균수에 현탁하여 준비하였다. 선발된 길항균의 농도는 10^{7}-^{8}으로하여 양파와 마늘의 뿌리 및 종구에 1시간 침지하여 말린 후 양파(96. 11. 4), 마늘(96. 10. 10)을 이식하였다.

라. 수확후 길항미생물의 효과검정

수확 후 양파, 마늘을 농가와 같은 간이 저장방법으로 97. 8. 23까지 일반온도에서 저장 하고, 97. 8.23부터 4℃ 저온 저장고에 저장 하면서

한달간격으로 양파 병징별; *Fusarium oxysporum*(basal rot), *Botrytis allii*(nect rot), *Aspergillus* sp.(nect rot), 마늘 병징별; *Stemphylium botryosum* (purple spot)로 조사 하였다.

마. INDEX를 이용한 부패율의 효율적조사

길항미생물의 효율적인 검정을 위하여 먼저 양파, 마늘의 병징별로 나누어 발병 정도에 따라 각각의 INDEX값을 정하여 효율적 병조사를 시도하였다.이때 사용한 양파는 시험포장외의 양파를 구입하여 길항균의 효과를 검정하였다. 절단된 목부위를 통해서 감염되는 *Botrytis allii*, *Aspergillus niger*의 피해를 조사하기 위한 방법으로 감염부위에 길항 미생물(1×10⁷-⁸)을 처리한 후 28℃에서 한달 간 저장한 다음 양파를 절단하여 부패율을 INDEX에 준하여 조사하였다. INDEX값은 0-4까지이며 0. No neck rot, 1. Slight internal infection of neck rot, 2. Mild internal infection of neck rot, 3. Moderately advanced infecion and decay of bulb, 4. Severely advanced neck rotting and decay of bulb.이다.

3. 결과 및 고찰

가. 길항미생물 처리를 통한 포자 발아 억제력 조사

3종의 길항미생물(Cha94, BL3, BL4)이 가장 포자 발아억제력이 뛰어났는데, 이는 무처리가 11시간 뒤 모두 발아하는 반면 길항균을 처리한 처리구에서 10%이하의 발아율을 보였다. 특히 BL3와 BL4의 포자발아억제 능력이 좋았다.(Fig.1, 2)

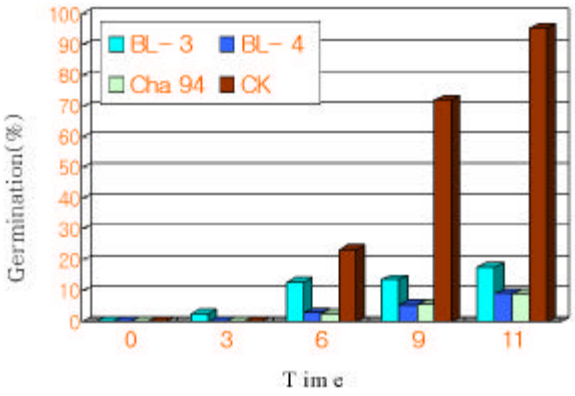


Fig.1. Effect of antagonistic bacteria, *Bacillus amyloliquefaciens* BL-3, *B. polymyxa* BL- 4, *Pseudomonas putida* Cha 94, on suppression of conidial germination of *F. oxysporum* , basal rot pathogen of onionbulbs infected

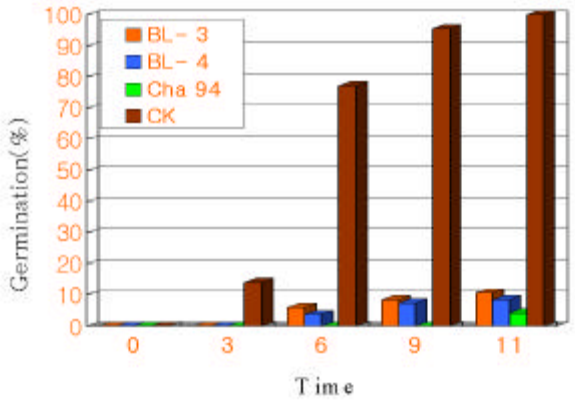


Fig. 2. Effect of antagonistic bacteria, *Bacillus amyloliquefaciens* BL-3, *B. polymyxa* BL- 4,*Pseudomonas putida* Cha 94, on suppression of conidial germination of *F. oxysporum*, dry rot pathogen of garlic cloves infected

나. 길항균의 밀도 조사 결과

107 cfu/g으로 처리한 길항균의 밀도가 BL4는 처리 후 한달만에 급격히 감소하는 것을 관찰 할 수 있었고 Cha94, BL3, TM등은 10^{4-5}정도의 밀도를 지속적으로 유지하였다(Fig.3).

마늘에서도 양파와 마찬가지로 BL4를 제외한 나머지 길항균의 밀도가 10^{4-5}로 유지되었다. 하지만 길항미생물 BL3는 월동중 밀도가 급격히 감소하였으나 월동 후 다시 밀도가 증가하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

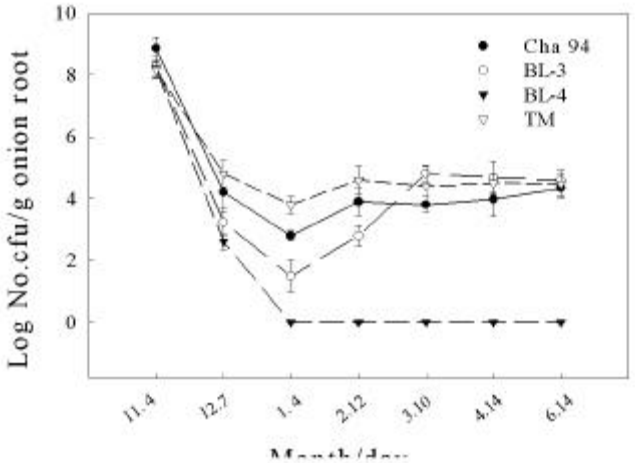


Fig. 3. The population density of treated antagonists from onion root during cultivating period. Cha 94, *P. putida;* BL-3, *B. amyloliquefaciens;* BL-4,*B.polymyxa;* TM, *Trichoderma harzianum*

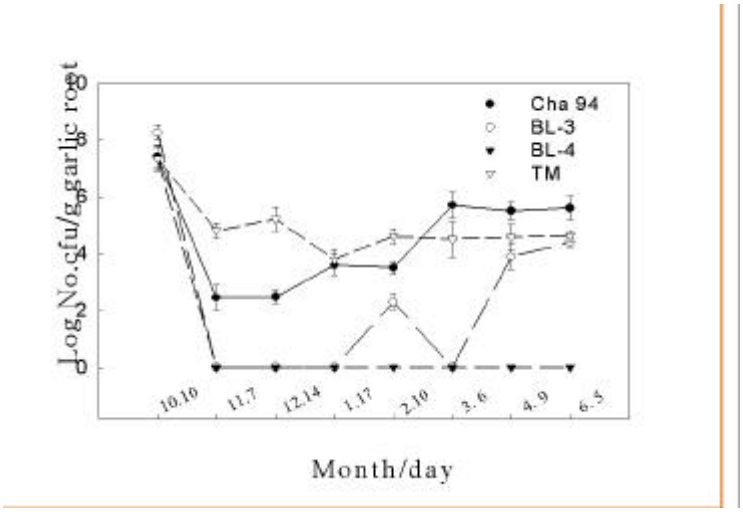


Fig. 4.The population density of treated antagonists from garlic root during cultivating period. Cha 94, *P. putida;* BL-3, *B.amyloliquefaciens;* BL-4, *B.polymyxa;* TM, *Trichoderma harzianum*

다. 선발된 길항균을 이용한 포장 실험결과

시험포장인 함양 양파, 대곡 마늘 포장에서 재배중 처리한 길항 미생물에 의한 병의 발생이나, 생육촉진 등의 현상은 나타나지 않았다. 수확량 조사는 97, 98년 양파와 마늘을 수확하여 각 50개씩 구근의 무게를 조사하였다. 97년과 마찬가지로 98년에도 수확량의 특이할 만한 증가 현상은 보이지 않았다. 아래 도표는 98년 6월 10일에 수확한 양파와 마늘의 수확량을 조사한 것이다.(Fig. 5, 6)

라. 저장 중 길항미생물의 효과 검정

저장 중인 양파, 마늘에서 병징별로 병발생을 조사한 결과 가장 심한 피해를 주는 *F. oxysporum*에 의한 병징은 길항 미생물 처리구에서는 무처리 구에 비해 병 발생이 현저히 감소하였고, 수확기 양파의 절단된 목부위

를 통하여 감염되는 Neck rot은 TM, BL3의 처리구에서 뛰어난 병발생 억제력을 보였다. 그리고 마늘의 점무늬병징 조사결과 TM의 처리구가 가장 적은 발병을 보였고, 다른 처리구에서는 무처리에 비해 조금의 병 억제

력을 보였다. 마늘의 *F. oxysporum*에 의한 병발생은 양파와 마찬가지로 TM, BL3의 처리구에서 높은 병 억제력을 보였다.(Fig.7, 8, 9, 10).

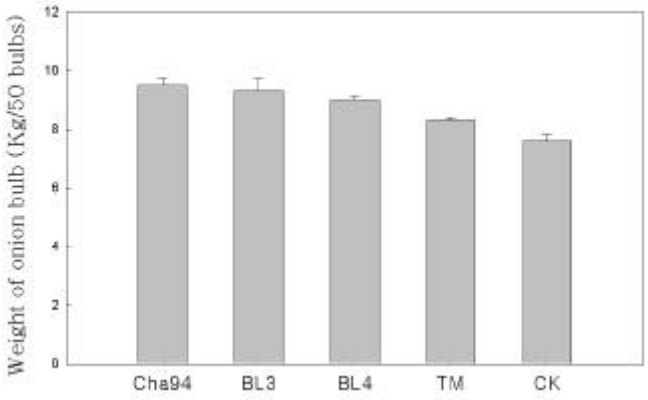


Fig. 5. Effect of onion yield by treating antagonists and planting in field trial

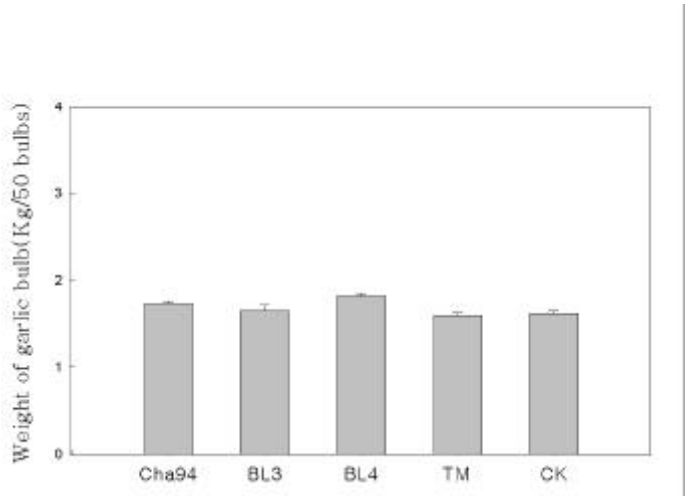


Fig. 6. Effect of garlic yield by treating antagonists and planting in field trial

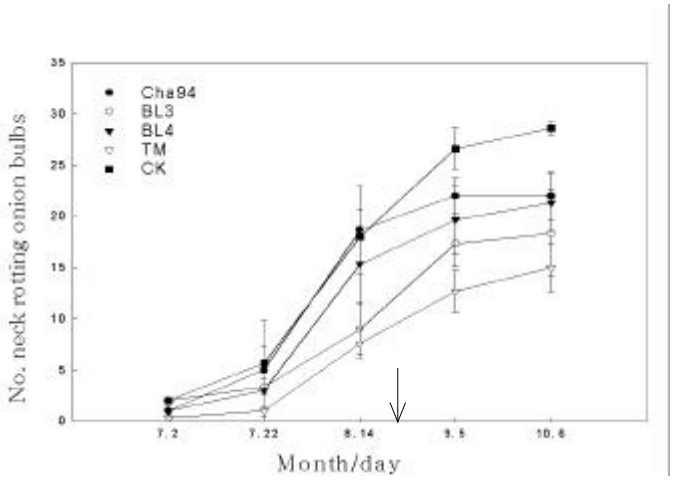


Fig. 7. Accumulated number of neck rotted onion bulbs throughout storage period; indicates the date(Aug.23) when onion package stored under ambient temperature were moved to cold storage at 4℃

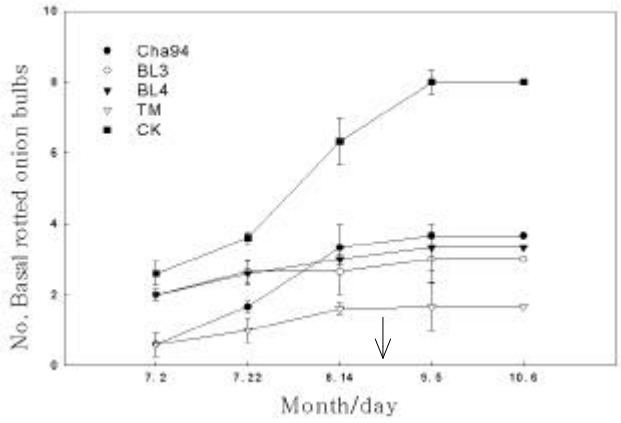


Fig. 8. Accumulated number of basal rotted onion bulbs throughout storage period; ⟶, indicates the date(Aug. 23) when onion package stored under ambient temperature were moved to cold storage at 4℃

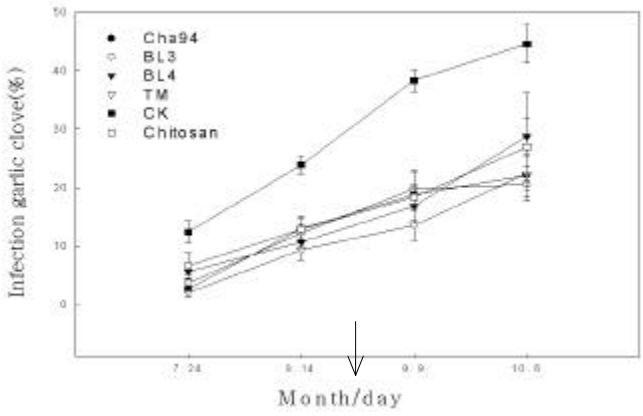


Fig. 9. Accumulated percent of dry rotted garlic cloves infected with *F.oxysporum*; ⟶, indicates the date(Aug.23) when garlic package stored under ambient temperature were moved to cold storage at 4℃

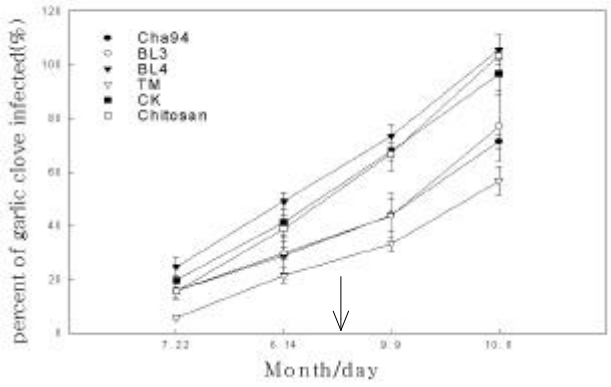


Fig . 10. Accumulated percent of garlic cloves infected by *Penicillium echinulatum, Stemphylium botryosum, Embellisia lliii;* ⟶, indicates the date(Aug. 23) when garlic package stored under ambient temperature were moved to cold storage at 4℃

마. INEDX를 이용한 길항미생물의 효율적 능력 조사

그 결과 길항균 처리구에서 1.5이하의 Index값을 나타내어 *Botrytis* sp., *Aspergillus* sp.의 병발생 억제 효과가 뛰어남을 알 수 있었다(Fig. 11).

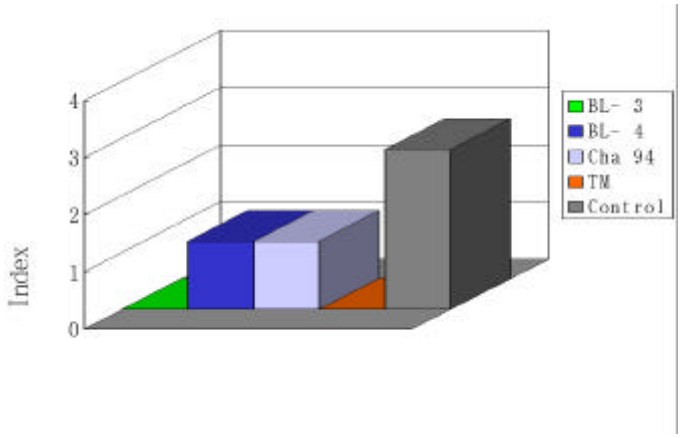


Fig. 11. Effect of microorganisms on protection of post-harvest onion bulbs from neck rotting when the microbial suspension were sprayed upon harvesting

제 3 절 생물적 방제 활용 가능성 탐색 및 저장성병 억제 미생물의 특성 검정

1. 서 설

생물적 방제의 활용 가능성을 탐색하기 위하여 양파, 마늘 반복 표장 실험을 실시하였으며, 저장중 발생병이 생육기에 어떻게 작용하며 길항 미생물을 같이 처리하였을 때 길항미생물의 능력을 검정하였다. 마지막으로 이들 길항 미생

물의 항균 활성유지 기술을 위하여 제형화를 실시하였으며, 제형화된 미생물을 종자에 pelling하여 발아율도 조사하였다.

2. 재료 및 방법

가. 양파 마늘 반복 포장 실험

길항미생물의 포장반복 실험으로 전년도에 사용한 균주, *P.putida*(Cha94), *B. amyloliquefacience* (BL3), *B. polymyxa*(BL4)를 PD broth, *Trichoderma harzianum*(TM)은 PDA에 각각 3, 5일간 배양하여 0.1M $MgSO_4$와 살균수에 현탁 시켜 양파(품종: 함양대고), 마늘(품종: 남도)을 현탁액에 1시간 침종 시킨후 경상대학교 농장에 재식하였다(97.11.10, 97.10.11). 처리당 3반복 난괴법으로 실시 하였으며, 15 실험 처리구 이외에도 이병종구 및 병원균을 배양하여 상처접종을 실시한 후 길항미생물을 처리하여 포장 실험을 실시 하였다. 재배기간 동안 한 달 간격으로 뿌리에서 길항 미생물의 밀도를 조사

나. 저장병원균과 길항미생물의 경합

마늘의 마름병(*Fusarium oxysporum*), purple spot(*stemphylum botryosum*)의 병징을 가진 이병 종구와 건전한 마늘 종구(인편의 유무)에 병원균인 *Penicillum* sp.을 접종 2시간 후 길항 미생물(전자의 경우는 TM, Cha94 및 BL3, 후자의 경우는 TM, BL3)을 처리한 후 파종하여, 발아율을 조사하였다.

다. 길항 미생물의 항균활성 유지 기술의 실용화 방법

TM(*Trichoderma harzianum*)은 미강, 톱밥:미강(8:2) 에서 한달간 배양하여 암 조건에서 3일 건조시켜서 분쇄하고, 또 다른 방법으로 10^4conidia/㎖의 TM을 10㎖ 접종시킨후 1주일 배양시켜 원심분리를 시켜 그 pellet을 PEG와 섞어 60% 암조건에서 하루 건조시킨 후 동결건조하여 분쇄한다.TM(*Trichoderma harzianum)*의 보관 방법으로 미강, 톱밥:미강(8:2),배양 후 PEG와 혼합하여 동결건조 하는 3가지를 사용하였고, BL3(*Bacillus amyloliquefacience*), Cha94(*Pseudomonas putida*)는 500㎖ PDB에 이틀간 배양하여 원심분리(8000rpm)시킨 후 pellet을 20% CMC(Carboxy Methyl Cellulose), MC(Methyl Cellulose), XG(Gum Xanthan)와 1:1 비율로 섞은 뒤 그 섞은 양의 4배의 Talc, Bentonite(Ben), Vermiculater(Ver)와 섞어 마쇄한 후 2 3일 동안 음지에서 건조하여 사용하였다.

제형화한 길항 미생물을 두가지 조건에서 보관하였는데, 상온에서 비진공 상태에서 보관하고, 다른 한편으로 직경1㎝, 길이 8㎝되는 Ampoule에 넣어 진공상태로 상온에 보관하였다. 한 달 간격으로 길항미생물을 Cha94, BL3는 0.3g, TM은 0.1g을 살균수에 희석시켜 PDA,KB,TSM(Trichoderma selective medium)에 도말하여 생존밀도를 조사하였다.

라. 제형화된 길항미생물을 양파종자에 처리

제형화한 길항미생물을 양파종자에 coating하여 발아율을 실내, 외에서 조사하였다. coating방법은 양파종자를 물에 2시간 침종시킨 후 길항균의 접착력을 강화하기 위하여 0.1 0.2%의 PVA(Poly vinyl alchol)에 양파종자를 담근 후 건져서 BL3, Cha94는 생존밀도가 높았던 Talc가 포함된 제형, 즉 BL3-CMC-Talc, BL3-MC-Talc, BL3-XG-Talc, Cha94-CMC-Talc,

Cha94-MC-Talc, Cha94-XG-Talc, TM은 톱밥:미강=8:2인 제형을 pelleting 하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 양파,마늘 반복 포장 실험(97.10 - 98. 6)

Cha94와 TM은 10⁴ ⁵의 밀도를 지속적으로 유지한 반면 BL3와 BL4는처리후 한달만에 밀도가 급격히 떨어졌다(Fig.1, 2).

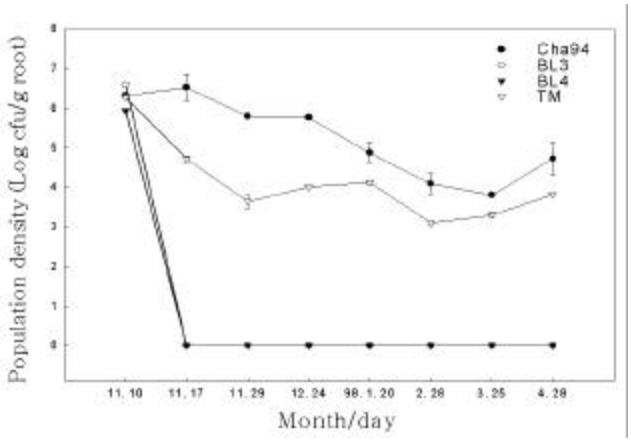


Fig. 1. The population density of treated antagonists from onion root during cultivating period

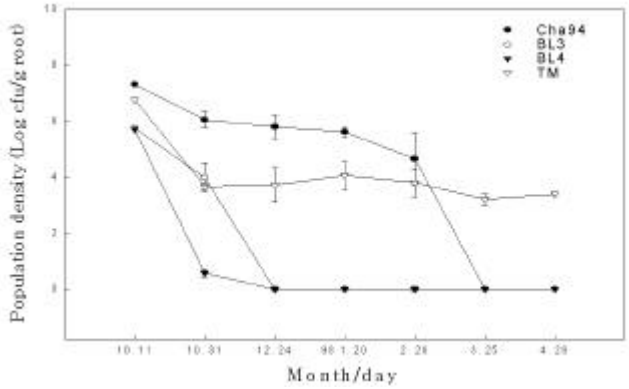


Fig. 2. The population density of treated antagonists from garlic root during cultivating period

나. 저장 병원균의 전염원과 유용 길항미생물의 경합(Table 1, 2).

마늘에서 병원균을 접종한 후 길항 미생물을 처리하여 발아율을 관찰하였는데, Dry rot에는 TM, purple spot에는 Cha94를 처리했을 때 발아율이 좋았다. Penicillium을 접종한 후 길항 미생물을 처리하여 발아력을 관찰한 결과 인편을 벗겼을 때는 TM, 벗기지 않았을 때 BL3가 발아력이 높았다.

Table 1. Sprouting rate of garlic cloves with either dry rot or purple spot after spraying antagonist in field trial.

Treatment	Sprouting percentage(%)	
	Dry rot	purple spot
TM	92.5	58.3
Cha94	NTa	71.7
BL3	83.3	NT
CK	75.0	60.8

a; Not tested

Table 2. Effect of antagonist in the sprouting of garlic clove after inoculating *Penicillum* sp. in field trial.

Treatment	Sprouting percentage(%)	
	scaly clove*	scaled clove**
TM	71.7	63.3
BL3	63.3	65.0
CK	63.3	63.3

* garlic cloves with intact scale

** garlic cloves that scale was removed

다. 선발 미생물의 항균활성 유지 기술의 실용화 연구

포장실험 결과 병발생 억제력이 뛰어난 길항 미생물들의 항균활성 유지와 간편한 사용을 위하여 효과가 우수했던 TM, BL3, Cha94에 대해서 제형화 방법 개발을 실시 하였다.

제형화한 길항 미생물을 생존밀도를 일정한 간격(30일)으로 조사한 결과 진공상태와 비진공상태에서의 생존 밀도는 큰 차이를 보이지 않았다 (Fig.3 9). BL3는 첨가제의 종류에 상관없이 $1\times10^{5-7}$의 밀도를 지속적으로 유지하였고, Cha94는 MC-Talc의 보관 방법에서 가장 안정된 밀도를 유지하였다. TM은 톱밥:미강(8:2)의 조건에서 높은 생존 $1\times10^{4-5}$밀도를 나타내고 비진공 상태보다는 진공상태에서 높은 밀도가 유지 됨을 알 수 있었다. 이와 같은 결과로서 미생물 농약의 개발의 가능성을 시사하고 있다.

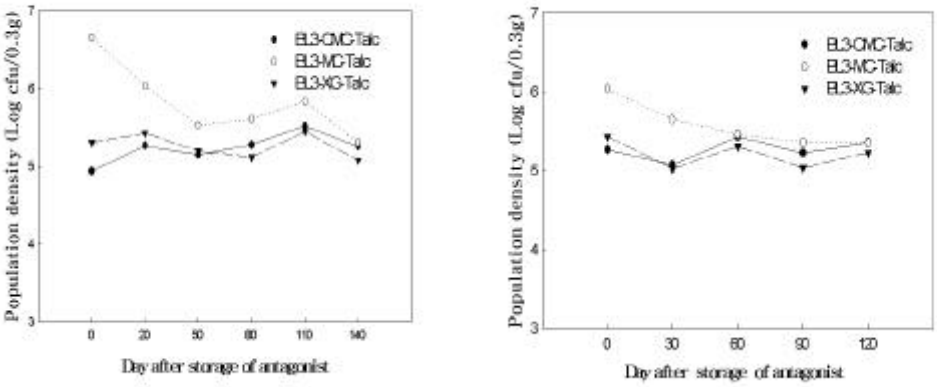


Fig. 3. The population density of BL3-Talc during storage period (Left : aerobic condition , right : anaerobic condition)

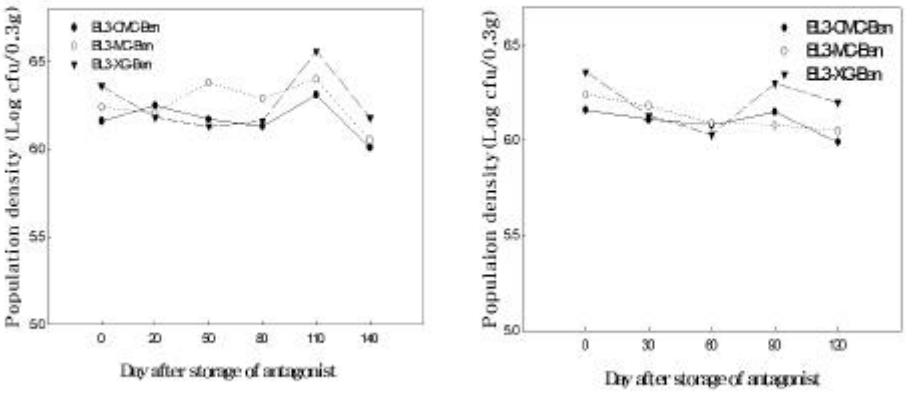


Fig. 4. The population density of BL3-Ben during storage period (Left : aerobic condition , right : anaerobic condition)

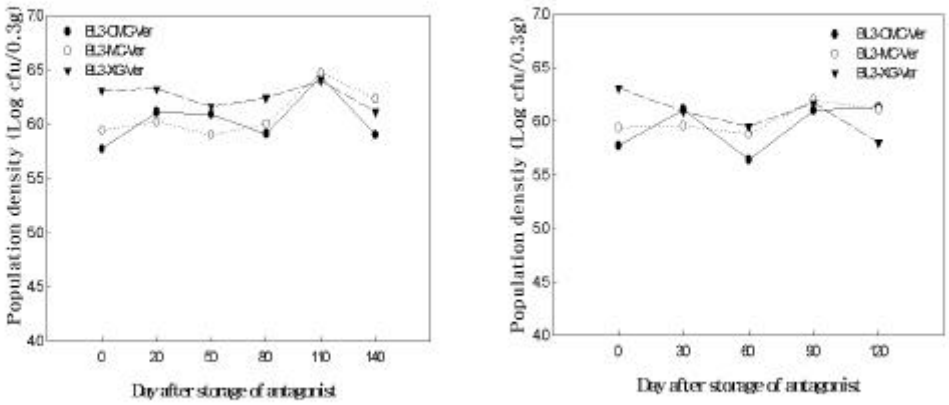


Fig. 5. The population densityof BL3-Ver during storage period (Left : aerobic condition , right : anaerobic condition)

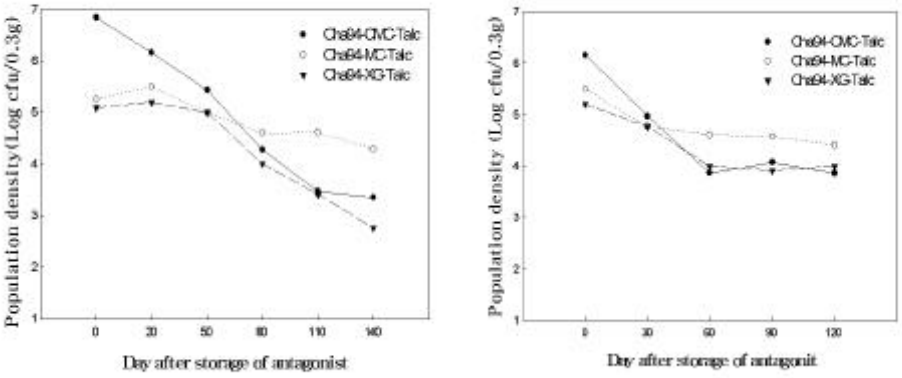


Fig. 6. The population density of Cha94-Talc during storage period (Left : aerobic condition , right : anaerobic condition)

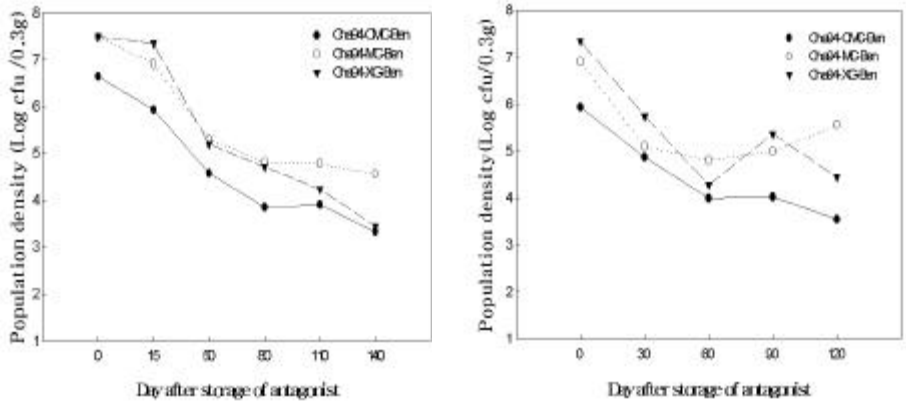


Fig. 7. The population density of Cha94-Ben during storage period (Left : aerobic condition , right : anaerobic condition)

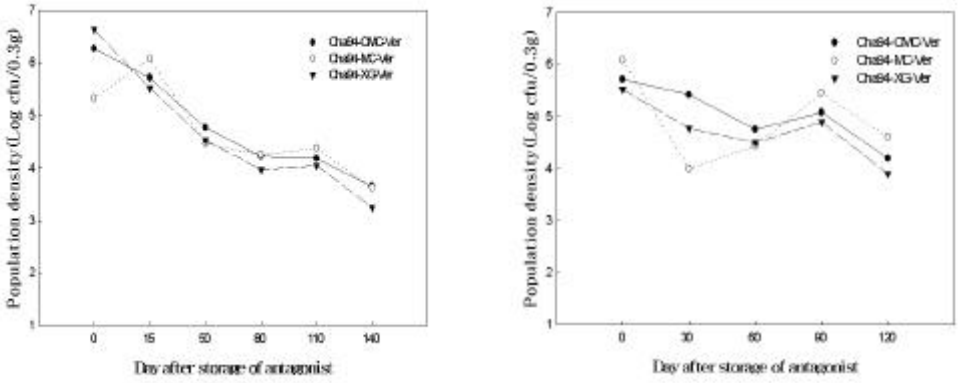


Fig. 8. The population density of Cha94-Ver during storage period (Left : aerobic condition , right : anaerobic condition)

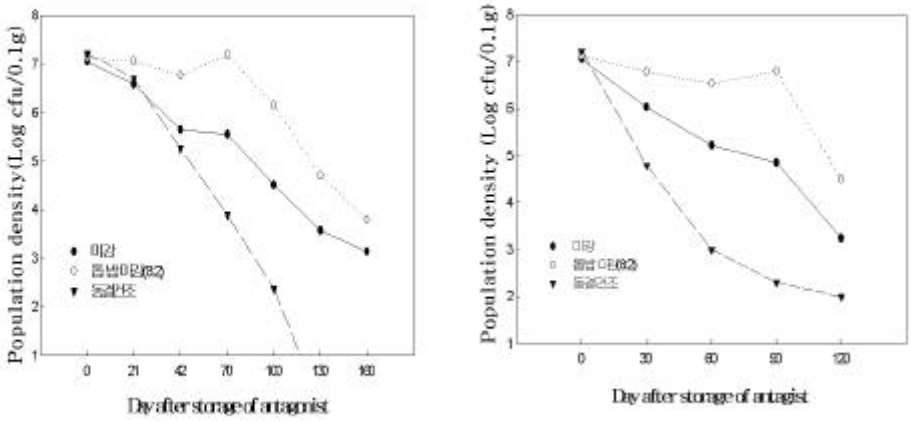


Fig. 9. The population density of *Trichoderma harzianum* during storage period(Left : aerobic condition, right:anaerobic condition)

라. 제형화한 길항균을 양파종자에 처리하여 발아율조사

발아율 조사 결과 실내에서는 CK에 비해서 다른 처리의 발아율이 낮았지만 TM(톱밥 : 미강)의 처리는 CK의 수준에 가깝게 나타났다. 또 다른 처리를 하지 않고 균에 침종만 하여 처리한 것의 발아율이 높음을 알 수 있었다. 반대로 실외에서는 CK에 비해 다른 처리의 발아율이 높음을 알 수 있는데 이것은 포장 조건에 따라 다른 것으로 사료된다. 실외에서는 BL3, Cha94 모두 CMC처리에서 효과가 좋았으며, TM은 실내에서와 마찬가지로 여전히 효과가 좋았다. 이렇게 육묘한 양파를 본포장에 그대로 이식하여 실험 중이다(Fig. 10).

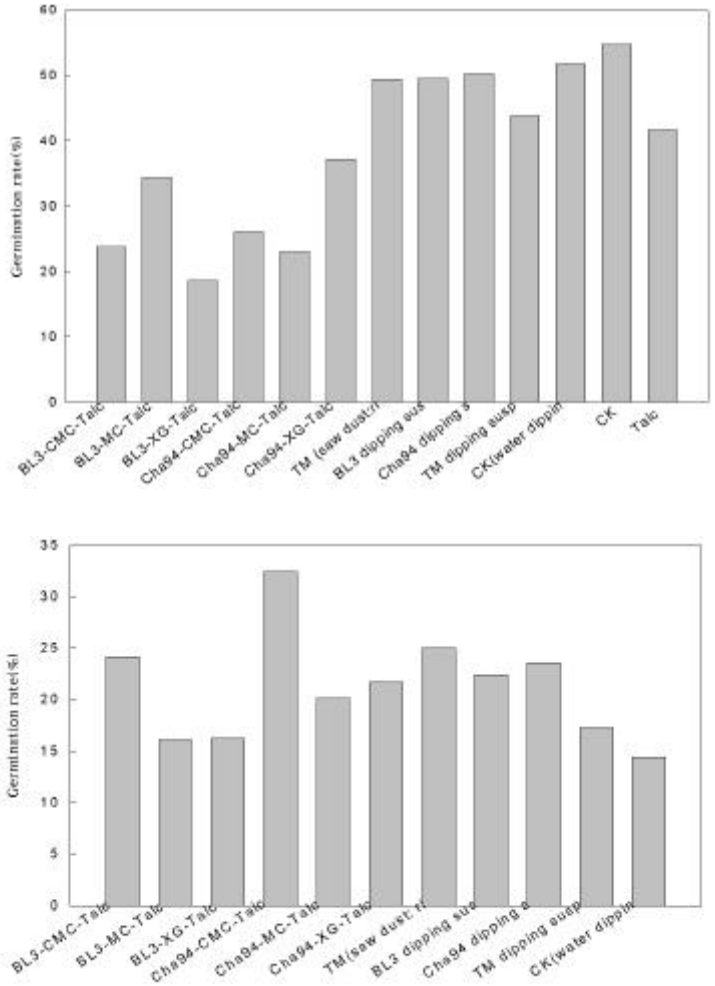


Fig.10. Germination experiment of onion seed pelleted with appropriate material mixed with antagonists.

(up : in laboratory , down : in field trial)

제 4 절 참고문헌

1. Abawi. G. S., & J. W. Lorbeer. 1971. Population of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* in Crganic Soil in New York. Phytopathology 61:1042-1048
2. Abawi. G. S., & J. W. Lorbeer. 1971. Pathological Histology of Four Onion Cultivars Infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*. Phytopathology 61:1164-1169
3. Amies, A. 1915. The Temperature Relations of some Fungi causing Storage Rots. Phytopathology 5:11-19
4. Bertolini, P., & S. P. Tian. 1996. Low-temperature biology and pathogenicity of *Penicillium hirstum* on garlic in storage. Postharvest Biology Technology 7: 83-89
5. Cho, W. D., W. G. Kim., & H. M. Kim. 1995. Fungi Associated with Storage Diseases of Garlic. RDA. J. Sgri. Sci. 37(2):325-329
6. Chung. H. D. 1982. Control of Onion Bulb Rot During Low Temperature Storage by Post-Harvest Fundicide Treatment. J. of the Korean Society for Horticultural Science(CAB Abstracts) 23(2):109-121
7. Kim, H. K., & Hyeong J. J. 1988. Influence of Rhizosphere Antagnists on Supression of Cucumber Wilt, Incressed Cucumber Growth and Density Fluctuation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerium* Cwen. Korean J. Plant Pathol. 4(1):10-18
8. Kloepper, J. W. . & M. N. Schroth. 1981. Development of a Powder Formulation of Rhizobacteria for Inoculation of Potato Seed Pieces. Phytopathology 64:590-592

10. Knudsen, G. R., D. J. Eschen., L. M. Candurand., & Z. G. Wang. 1991. Method To Enhace Growth and Sporulation of Pelletized Biocontrol Fungi. Appl. Envi. Microbiol. Cct.:2864-2867

11. Madue, R. B., & A. H. Presly. 1977. Infection of Cnions by *Botrytis allii*. Annals of Applied Biology(CAB Abstracts) 85(1):165

12. Presly. A. H., 1985. Studies on *Botrytis* spp. Cccurring on Cnions(*Allium cepa*) and Leeks(*Allium porrum*). Plant Pathology

13. Pusey, P. L., & C. L. Wilson. 1984. Postharvest Biological Control of Storn Fruit Brown Rot by *Bacillus subtilis*. Plant Disease 68:753-756

14. Schwartz, H. F., & S. K. Mohan. 1995. Compendium of Onion and Garlic Diseases. APS Pres pp.54

15. Shah-Smith, D. A., & R. G. Burns. 1996. Biological control of damping-off of sugar beet by *Pseudomonas putida* applied to seed pellets. Plant Pathology 45:572-582

16. Smalley E. B., & H. N. Hansen. 1962. *Penicillium* Decay of Garlic. Pathopathology 52:666-678

17. Summer, D. R., R. D. Gitaitis., J. D. Gay., D. A. Smittle., B. W. Maw., E. W. Tollner., & Y. C. Hung 1997. Control of Soilborne Pathogenic Fungi in Fields of Sweet Cnion. Plant Disease 81:885-891

18. Vidhyasekaran, P., K. Sethuraman, K. Rajappan., & K. Vasumathi. 1997. Powder Formulation of *Pseudomonas fluorescens* to Control Pigeonpea Wilt. Biological control 8:166-171

19. Vidhyasekaran, P., & Muthamilan, M. 1995. Development of formulations of *Pseudomonas fluorescens* for control of chikpea wilt. Plant Dis. 79:782-786

제 5 장 미생물유래 천연살균제 개발

제 1 절 길항미생물의 서식지에서 분리, 밀도 조사

1. 서 론

방선균은 다양한 종류의 이차대사산물, 특히 항생물질의 생산자로 잘 알려져있다. 현재까지 개발된 유용한 항생물질의 3분의 2가 방선균에서 발견되었다. 토양방선균은 aminoglycosides, anthracyclines, glycopeptides, β-lactams, macrolides, nucleocides, peptides, polyenes, polyethers, tetracyclines 등의 다양한 종류의 화학구조를 갖는 항균활성 물질을 생성하는 것으로 알려져 있다 (Goodfellow et al., 1988; Suzuki et al. 1994).

최근에 와서 새로운 항균활성물질을 분리하기 위한 미생물학적인 측면에서의 연구의 일환으로 다양한 환경조건에서 서식하는 미생물자원에 대한 연구와 함께 미생물균주의 선발방법에 대한 연구가 이루어지고 있다 (Okami and Hotta 1988; Bushell, 1983; Cheetam, 1987). 갯벌토양, 심해퇴적물, 동굴토양, 호수퇴적물등의 토양시료에서 분리한 미생물군의 밀도조사와 항균활성물질을 생성하는 미생물 균주만을 선택적으로 선발할 수 있는 배지를 고안하기 위한 연구가 수행되었다 (Huck et al., 1991; Jensen and Fenical, 1994; Jiang and Xu, 1996; Suzuki et al., 1994; Xu et al. 1996). Hayakawa 등(1988)은 토양시료의 전처리와 선발배지의 영양원을 조절함으로써, 빠른 생장율로 인해 일반적으로 가장 많이 분리되는 *Streptomyces*속의 생장을 억제시켜, 다양한 종류의 토양방선균을 분리하였다. 이들 균주로부터 새로운 종류의 항균활성물질이 다수 분리되었다 (Hayakawa and Nonomura 1987). *Micromonospora*나 *Rhodococcus*속의 희

귀방선균들은 일반 육지토양 이외의 서식지, 예를 들면 열대우림토양, 호수퇴적물, 강흙, 바다흙, 등에서 높은 선발율을 보였다 (Rowbotham and Cross, 1977).

토양시료에는 많은 종류의 희귀 방선균이 서식하고 있지만, 방선균의 선발에 이용되는 배지에서 분리할 수 있는 균주는 제한되어 있다. 토양과 수중환경에는 많은 수의 진정세균류와 생장속도가 빠른 *Streptomyces*가 존재하고 있어서 생장속도가 상대적으로 느린 희귀 방선균들이 선발배지상에서 균총을 형성하는 것을 방해한다. 그러므로, 미생물의 분리과정에 토양시료를 항생제나 유기용매, 염기성 혹은 산성물질, 또는 고온으로 처리하여 원하지 않는 미생물군의 감소를 유도함으로써, 유용한 방선균의 선발율을 높이기 위한 노력이 시도되고 있다 (Huck et al., 1991; Nolan and Cross, 1988). 토양시료의 건열처리나 phenol에 의한 전처리는 진정세균류나 *Streptomyces*속 균주의 생장을 억제하는 것으로 알려져 있다. 최근에는 토양시료의 고온의 열을 사용한 전처리가 *Micromonospora*, *Microbispora*, *Streptosporangium*, *Dactylosporagium*과 *Actinomadura*속 균주의 선발율을 높이기 위해 사용되었다 (Hayakawa et al., 1991a; Hayakawa et al., 1991b; Hayakawa and Nonomura, 1987; Hayakawa et al., 1995). 지금까지는 식물병 방제용 항균물질의 탐색을 위해서 생성미생물의 선발은 주로 작물이 재배되고 있는 토양에서 이루어져 왔다 (Ahn and Hwang, 1992; Crawford et al., 1993; Filnow and Lockwood, 1985). 그러나 보다 다양한 미생물군의 확보를 위해서는 다양한 서식지에서의 길항미생물의 밀도조사와 선발에 관한 노력이 필요하다 (Suzuki et al., 1994; Huck et al., 1991).

본 연구에서는 동굴토양과 갯벌토양을 분리원으로 사용하여 토양시료의 건열처리를 통해 선발된 내열성 길항방선균의 여러식물병원 진균에 대한 항균활성을 검정하였다. 이들 길항방선균 중 뛰어난 항균력을 보인 균

주를 선발하여 동정실험과 항균활성물질의 분리와 구조결정실험에 사용하였다.

2. 재료 및 방법

가. 토양형 및 토양 pH조사

우리나라의 서해안 갯벌지역 5개소(경기도 강화군 석모도, 작약도, 덕적도, 충남 무창포, 전남 가좌도)와 여러 동굴(경북 성류굴, 충북 천동굴, 충북 노동굴, 충북 고수굴, 제주 쌍용굴)에서 토양시료를 채집한 후, 토양형을 확인하고 토양 pH를 측정하였다.

나. 시료의 전처리 및 방선균 분리

희귀 방선균(rare actinomycetes)의 분리를 위해 Hayakawa등 (1991)이 사용한 전처리 방법을 이용하여 방선균을 분리하였다. 토양시료는 7일간 air-dry한 후 마쇄하여 110℃에서 dry heating시켰다. 토양시료를 살균수에 희석한 후 0.01%의 benzethonium chloride를 혼합하여, 이 희석액을 nalidixic acid와 leucomycin이 포함된 humic acid vitamine agar에 도말한 후, 30℃에서 4주간 배양했다. 형성된 방선균의 균총 가운데 서로 상이한 균총만을 선발하여 Bennett`s agar에 옮겨 보존하였다.

다. 길항방선균의 분류 및 동정

분리된 방선균 가운데 희귀방선균을 알아내기 위하여, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 4 (Williams et al., 1989) 에 따라 Bennett 배지에서 포자를 형성시킨 후 균총의 모양 및 색깔, 기중균사모양과 포자의 형태, 생리적 특성 등 을 관찰하여 각 방선균의 속(genera)을 확인하였다 (Schaal, 1985; Shirling and Gottlieb, 1966).

라. 길항방선균의 항진균효과 검정

분리된 모든 방선균을 식물병원진균(*Alternaria mali*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, *Magnaporthe grisea*, *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani*)에 대치배양하여 각 방선균의 식물병원진균에 대한 항균 효과를 검정하였다. 대치배양 결과, 분리한 길항방선균 가운데 균사생장 억제효과가 뚜렷한 균주를 선발하여, 유용 항균성 물질의 생성여부를 확인하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 길항 방선균의 분리

식물병원 진균에 대해 길항력을 지닌 방선균의 분리를 위해 5개 동굴지역 토양과 5개 갯벌지역에서 채집한 토양시료를 분리원으로 사용하였다(Fig. 1). 갯벌토양은 우리나라 서해안의 5개 지역에서 채집하였다. 이들 토양은 회색의 진흙으로 토양산도는 7.3에서 8.3까지 다양하게 나타났다. 동굴토양은 갯벌시료보다 토양형이 다양했으며, 토양산도도 pH 6.6에서 8.3 사이의 pH분포를 보였다(Table 1). 그 중 노동동굴 시료의 산도가 가장 낮았다. 채집한 모든 시료는 풍건하여 건조한 상태에서 건열처리한 후, 살균수로 희석하여 humic acid-vitamine (HV) 배지에서 분리하였다. 토양시료의 건열처리는 세균류와 열에 약한 *Streptomyces*속의 균주의 분리율을 감소 시켜서, 희귀방선균의 선발율을 높일 수 있었다. 방선균의 균총은 nalidixic acid가 첨가된 HV 배지에서 배양후 7일부터 형성되기 시작하여, 이후 28일간 선발배지상에 형성되는 모든 균총을 선발하였다.

유용한 이차대사산물을 생성하는 희귀방선균의 효율적인 분리를 위해서는 분리원의 다양화, 시료의 전처리, 분리배지의 개발, 등과 같은 여러 가지 요소를 고려한 다양한 연구가 수행되어야 한다 (Huck et al., 1991;

Shomura, 1993; Suzuki et al., 1994; Wakisaka et al., 1982). 본 연구에서는 분리원으로 갯벌토양과 동굴토양을 사용하였다. 갯벌토양은 염분이 있는 수생환경으로*Streptomyces, Nocaria*와 *Micromonospora*와 같은 희귀방선균의 서식지로 알려져있고 (Cross, 1981), 동굴토양은 기온 변화의 폭이 적고 유기물질의 함유정도가 낮아서 유용한 이차대사산물을 생성하는 희귀방선균의 밀도가 높은 것으로 알져져 있다 (Kim et al., 1996; Steele and Stowers, 1991).

나. 선발된 방선균의 속(Genus)별 분포

모든 토양시료에서 *Streptomyces*속의 방선균 가장 많이 분리되었고,

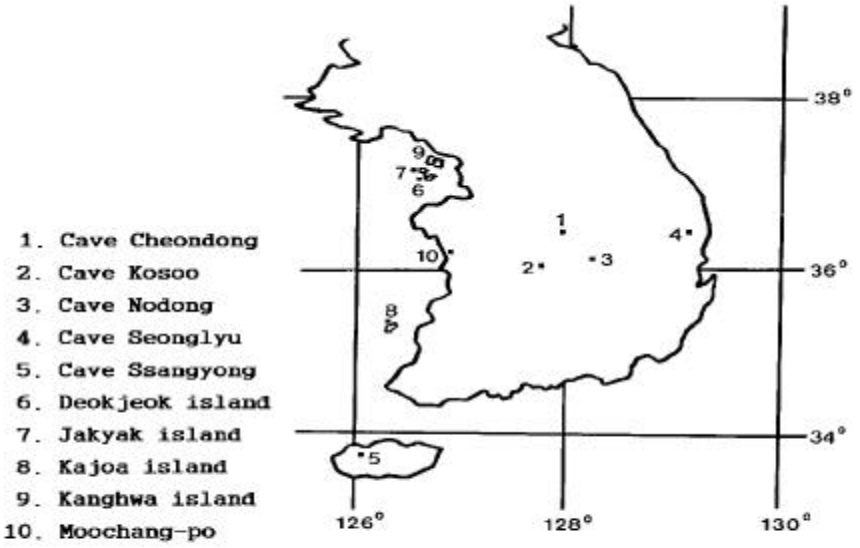


Fig. 1. Sampling areas for isolating actinomycetes antagonistic to plant pathogenic fungi in Korea.

*Micromonospora*와 *Rodococcus, Streptosporangium*속의 방선균도 채집한 대부분의 토양시료에서 발견할 수 있었다 (Table 2). 동굴토양에서의

Table 1. Characteristics of soil samples collected from 10 sampling locations for the isolation of actinomycetes in Korea

	Sampling sites	Soil pH	Soil type
Cave soil	Cheondong	7.4 - 7.7	Red-yellow clay, brown soil
	Kosoo	7.1 - 7.3	Yellow-brown soil
	Nodong	6.6 - 6.9	Red-brown clay soil
	Seonglyu	8.1 - 8.3	Dark brown soil
	Ssangyong	7.0 - 7.2	Light-brown sandy soil
Sea-mud soil	Deokjeok	7.8 - 8.1	Light gray clay
	Jakyak	7.7 - 8.1	Light gray clay
	Kajoa	7.5 - 8.0	Light gray clay
	Kanghwa	7.3 - 7.6	Light gray clay
	Moochang-po	7.6 - 8.3	Light gray clay

*Streptomyces*속 균주의 분리율은 48%에서 62%로 갯벌토양에서의 분리율인 50-59% 보다 변이의 폭이 컸다. 이러한 차이는 동굴시료의 토양형이나 토양산도의 변이가 갯벌보다 크게 나타난 것에서 기인하는 것으로 판단된다. Nocardioform 방선균은 6-18.8%로 모든 토양시료에서 높게 나타났다. 토양시료 중에 가좌도와 무창포의 갯벌토양시료에서 많은 수의 Nocardioform 방선균이 분리되었다. *Saccharomonospora*는 천동, 고수, 성류굴에서 채집한 토양시료에서만 발견할 수 있었다. *Dactylosporagium*, *Saccharomonospora*와 *Streptosporangium*은 동굴토양과 갯벌토양에서 적은 수의 균주가 분리되었다.

희귀방선균의 선발율을 높이기 위해 채집한 토양시료를 건열처리를 하였음에도, *Streptomyces*의 분리율은 60%였다. 그러나 이러한 분리율은 일반 작물재배 토양에서 전처리 없이 방선균을 선발한 경우 나타나는 80-90% 이상의 분리율에 비해 상당히 낮은 것으로 나타났다 (Suzuki et al., 1994; Xu et al., 1996). *Micromonoapora*속의 균주는 호수의 퇴적물에서 많이 발견되며, 해안가 모래토양에서는 Nocardioform균주가 서식하는 것으로 알려져있다 (Jiang and Xu, 1996; Suzuki et al., 1994). 김, 등

(1996)은 다른 종류의 희귀방선균에 비해 Nocardioform과 *Micromonospora* 속 방선균이 동굴토양에 다수 존재하는 것으로 보고하였다. 본 연구에서 Nocardioform 방선균이 동굴토양 뿐 아니라 갯벌토양시료에서도

Table 2. Generic diversity of actinomycetes isolated from caves and sea-mud soils in Korea

Sampling sites	Number of isolates							Total no. of isolates
	Sm[a]	*Mc*	*No*	*Dc*	*Sa*	*Sp*	*Ot*	
Cave soil								
Cheondong	26	4	5	1	2	1	7	46
Kosoo	31	1	1	2	3	4	8	50
Nodong	24	2	3	3	0	3	15	50
Seonglyu	29	2	8	0	2	1	6	48
Ssangyong	26	3	5	3	0	4	8	49
Total	136	12	22	9	7	13	44	
Sea-mud soil								
Deokjeok	26	4	4	0	0	2	8	44
Jakyak	28	4	2	2	0	2	11	49
Kajoa	27	2	9	1	0	0	9	48
Kanghwa	27	5	3	1	0	3	8	47
Moochang-po	25	0	9	3	0	3	10	50
Total	133	15	27	7	0	10	46	

[a] Abbreviations represent actinomycete genera as follows: Sm, *Streptomyces*; Mc, *Micromonospora*; No, Nocardioform actinomycetes; Dc, *Dactylosporangium*; Sa, *Saccharomonospora*; Sp, *Streptosporangium*; Ot, Others.

*Streptomyces*에 이어 가장 많이 분리되었다.

다. 길항 방선균의 분리지역별, 속(Genus)별 분포

분리된 방선균의 항균효과를 6개의 식물병원진균에 대한 대치배양을 통해 검정하였다. 항균활성을 보인 방선균중에 5 ㎜ 이상의 저지원을 형성한 균주만을 길항방선균으로 선발하였다 (Table 3). 481개의 균주 가운데 311균주가 최소한 한 개 이상의 식물병원진균에 대해 항균효과 나타냈다. 고수, 노동, 성류 동굴에서의 길항방선균의 분리율은 각각 78%, 74%, 77.1%로서, 59.1%에서 66.0%의 길항방선균의 선발율을 보인 갯벌토양에서 보다 높았다. 이러한 높은 비율의 길항방선균 선발율은 Huck 등(1991)의 결과와 비교해 볼 때 높은 것으로 나타났다. 동굴 토양과 갯벌토양에서 *A. mali*, *M. grisea*, *P. capsici*에 대해 길항효과를 보인 방선균은 전체 균주 중 각각 61.6%, 51.5%, 57.5%를 차지한 반면, *Colletotrichum gloeosporioides*와 *Rhizoctonia solani*에 대해 항균효과를 보이는 균주는 21.2%와 13.2%로, 적게 분리되었다.

분리된 방선균 속별로 항진균효과를 보이는 균주의 분포를 알아본 결과 (Table 4), 모든 토양에서 다수의 항진균효과를 갖는 *Streptomyces* 속 균주들이 분리되었다. 동굴시료에서 분리한 136개 균주 중 83개 균주와 갯벌시료에서 분리한 133개 균주중에 92개 균주가 한 개 이상의 식물병원진균에 대해 항균효과를 나타내었다. 동굴시료에서 분리한 *Saccharomonospora* 균주는 85.7%가 항균력을 보인 반면, Nocardioform 균주의 길항균비율은 13.6%로 *Micromonospora* (75%), *Dactylosporangium* (66.7%), *Streptosporangium* (61.5%) 속에 비해 길항균의 선발율이 낮은것으로 나타났다. 갯벌시료에서 분리한 방선균주 가운데 *Dactylosporangium* 과 *Streptosporangium*속의 길항균 선발율은 각각 85.7%와 80%로 다른속에 비해 항진균효과를 보이는 균주의 분리율이 높았다. 갯벌시료에서의 Nocardioform속 길항균의 비율은 11.1%로 동굴에서의 비율과 비슷하게 나타났다. 또한 6가지 속으로 분류되지 않은 균주 가운데에서도 식물병원균에 대해 항균효과를 보이는 균주가 많이 분리되었다.

Huck 등 (1991)은 포장토양 시료에서 M3배지를 이용한 경우에 항균물질을 생성하는 방선균의 분리율은 약 10%내외였고, 선발배지인 M3배지에 proline, humic acid, asparagine과 vitamins을 첨가한 경우의 길항방선균의 선발율을 40% 내외로 증진시킬 수 있었다고 보고하였다. 본 연구에서는 분리한 485개 방선균주 가운데 311개 균주가 한 개 이상의 식물병원진균에 대해 균사생장억제 효과를 나타내어, 동굴토양과 갯벌토양에서의 길항방선균의 분리율은 각각 66.4%와 60.9% 였다 (Table 3). 이들 시료에서의 건열처리 및 HV배지를 이용한 길항방선균의 선발율은 Huck 등(1991)에 의해 보고된 길항방선균의 분리율 보다 높은 것으로 나타났다.

HV배지는 Hayakawa 등 (1987)에 의해 *Actinomadura*, *Dactylosporangium*, *Micromonospora*, *Microbispora*, *Streptosporangium*같은 희귀방선균의 분리를 위해 사용되었다. 본 연구에서 분리배지로 사용된 HV배지는 특히 생장속도가 느린 방선균의 분리에 적합하였으며, 분리배지에서 형성된 모든 방선균 균총의 생장이 양호했으며, 포자형성율도 높았다.

길항방선균의 서식지로서 갯벌토양과 동굴토양은 낮은 유기물질 함유율과 비교적 온도변화의 폭이 적은 환경으로서, 미생물간의 경쟁을 유발하여 다양한 생물화학적인 기능을 하는 이차대사산물을 형성하도록 유도할 가능성이 있다 (Steele and Stowers, 1991). 갯벌토양과 동굴토양에서의 항진균물질을 생성하는 방선균의 분리율은 일반 육지토양에서의 분리율에 비해 높게 나타나 다양한 종류의 길항방선균이 존재함을 확인 하였다. 또한 토양시료의 건열처리는 생장속도가 빠른 진정세균류의 생장을 억제시켜서 분리배지로 부터의 분리기간을 늘려주므로 생장속도가 상대적으로 느린 희귀방선균의 분리율을 증진시킬수 있었다.

라. 길항방선균의 항균 spectrum

Table 4. Proportions of antifungal isolates in each actinomycete genus from cave and sea-mud soils

Actinomycete genus	No. antifungal isolates/ no. total isolates						Percent of antagonistic isolates[b]
	Am[a]	*Cg*	*Fo*	*Mg*	*Pc*	*Rs*	
Cave soil							
Streptomyces	83/136	22/136	58/136	77/136	96/136	19/136	70.6
Micromonspora	4/12	0/12	5/12	9/12	7/12	1/12	75.0
Nocardioform	1/22	1/22	2/22	3/22	1/22	0/22	13.6
Dactylosporangium	4/9	0/9	6/9	6/9	4/9	0/9	66.7
Saccharomonospora	1/7	0/7	1/7	6/7	3/7	0/7	85.7
Streptosporangium	5/13	1/13	3/13	6/13	8/13	0/13	61.5
Others	20/44	8/44	11/44	36/44	9/44	7/44	81.8
Sea-mud soil							
Streptomyces	92/133	11/133	71/133	93/133	93/133	16/133	69.9
Micromonspora	8/15	2/15	6/15	8/15	8/15	0/15	53.3
Nocardioform	3/27	1/27	3/27	1/27	0/27	0/27	11.1
Dactylosporangium	5/7	0/7	3/7	4/7	6/7	0/7	85.7
Saccharomonospora	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0.0
Streptosporangium	5/10	1/10	4/10	8/10	5/10	0/10	80.0
Others	24/46	15/46	24/46	29/46	27/46	10/46	63.0

[a] Plant pathogenic fungi : Am, *Alternaria mali;* Cg, *Colletotrichum gloeosporioides;* Fo, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici;* Mg, *Magnaporthe grisea;* Pc, *Phytophthora capsici;* Rs, *Rhizoctonia solani.*

[b] Percents of actinomycete isolates which shows antifungal activity against at least one of plant pathogenic fungi were calculated from total isolates of each actinomycete genus.

항균spectrum을 Table 5에 제시하였다. 길항방선균 311개 균주 가운데 36개 균주가 최소한 1개이상의 식물병원진균에 대해 10 ㎜이상의 저지원을 형성하였다. 36개 균주 가운데 29개의 균주가 *Streptomyces*속으로 동정되

었다. *Micromonospora* 균주KG13, *Streptosporangium* KH19,

Table 5. Antifungal spectra against six plant pathogenic fungi of the representative actinomycete antagonists from cave and sea-mud soils

	Inhibition zone length (mm) of mycelial growth					
	Am[a]	*Cg*	*Fo*	*Mg*	*Pc*	*Rs*
Streptomyces						
SL 3-1	12	4	5	11	6	0
SL 4-2	0	0	16	0	18	0
SL 11	12	7	0	10	0	0
SL 12	10	0	11	4	10	0
CD 4-1	4	8	5	4	10	10
CD 5-1	10	0	7	10	0	0
CD 6	10	0	6	12	12	0
CD 12	14	0	0	10	14	0
CD 22	0	0	11	4	10	0
ND 25	13	0	9	17	7	5
ND 36-1	15	0	0	15	12	12
ND 211	12	0	0	12	12	0
KS 610	19	0	0	22	5	5
KS 1-2	17	0	7	20	12	13
KS 478	9	0	0	14	8	0
KD 463	14	0	0	12	0	0
SY 5	9	12	8	7	8	2
SY 12	12	0	14	3	0	0
SY 17	0	10	15	0	0	0
SY 26	10	0	8	9	19	0
SY 32	0	15	12	16	8	15
KH 8-1	0	0	20	7	10	0
JY 23	13	0	0	11	0	11
JY 28	14	0	0	10	12	0
JY 29	14	0	0	0	12	10
DJ 10	4	0	0	12	11	0
DJ 31	15	4	4	8	4	0
MC 27	10	0	4	4	12	0
KG 1	10	0	0	12	12	0
Micromonspora						
KG 13	0	0	0	20	0	0
Streptosporangium						
KH 19	12	0	11	11	8	0
Dactylosporangium						
KH 26	10	0	7	10	14	0
JY 22	12	0	0	10	4	0
Others						
Da 2	12	15	12	16	22	12
KG 8	14	0	12	4	14	0
KG 39	11	7	8	12	12	0

[a] Plant pathogenic fungi used in this test: Am, *Alternaria mali*; Cg, *Colletotrichum gloeosporioides*; Fo, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*; Mg, *Magnaporthe grisea*; Pc, *Phytophthora capsici*; Rs, *Rhizoctonia solani*.

Dactilosporangium KH26, JY22와 미동정균주 Da2, SL32, KG8, KG39도 높은 수준의 항균활성을 보였다. 이들 길항방선균중 항균효과가 우수한 균주를 선발하여 식물병원진균에 대해 항균활성을 가진 항생물질의 순화와 구조결정 및 생성균주의 동정에 관한 실험에 사용하였다.

4. 참고 문헌

1. Ahn, S.J. and B.K. Hwang. 1992. Isolation of antibiotic-producing actinomycetes antagonistic to *Phytophthora capsici* from pepper-growing soils. *Korean J. Mycol.* 20, 259-268.
2. Bushell, M.E. 1983. Search and discovery of novel microbial metabolites, pp.1-6. *In* M. E. Bushell (ed.), Progress in industrial microbiology, vol. 17. Elservier, Amsterdam.
3. Bheetam, P.S.J. 1987. Screening for novel biocatalysts. *Enzyme Microb. Technol.* 9, 194-213.
4. Crawford, D.L., J.M. Lynch, J.M. Whipps, and M.A. Ousley. 1993. Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(11), 3899-3905.
5. Cross, T. 1981. Aquatic actinomycetes: A critical survey of the occurence, growth and role of actinomycetes in aquatic habitats. *J. Appl. Bacteriol.* 50, 397-423.
6. Filnow, A.B., and J.L. Lockwood. 1985. Evaluation of several actinomycetes and the fungus *Hypochytrium catenoides* as biocontrol agents of *Phytophthora* root rot of soybean. *Plant Dis.* 69, 1033-1036.
7. Goodfellow, M., Williams, S. T., and Mordarski, M. 1988. Actinomycetes in biotechnology. Academic Press, London, 501 pp.
8. Hayakawa, M., K. Ishizawa, and H. Nonomura. 1988. Distribution

of rare actinomycetes in Japanese soils. *J. Ferment. Technol.* 66(4), 367-373.

9. Hayakawa, M., T. Kajiura, and H. Nonomura. 1991a. New methods for the highly selective isolation of *Streptosporangium* and *Dactylosporangium* from soil. *J. Ferment. Bioengin.* 72(5), 327-333.
10. Hayakawa, M., T. Sadakata, T. Kajiura, and H. Nonomura. 1991b. New methods for the highly selective isolation of *Micromonospora* and *Microbispora* from soil. *J. Ferment. Bioengin.* 72(5), 320-326.
11. Hayakawa, M., Y. Momose, T. Kajiura, T. Yamajaki, T. Tamura, K. Hatano, and H. Nonomura. 1995. A selective isolation method for *Actinomadura viridis* in soil. *J. Ferment. Bioengin.* 79(3), 287-289.
12. Hayakawa, M., and H. Nonomura. 1987. Efficacy of artificial humic acid as a selective nutrient in HV agar used for the isolation of soil actinomycetes. *J. Ferment. Technol.* 65(6), 609-616.
13. Huck, T.A., N. Poster, and M.E. Bushell. 1991. Positive selection of antibiotic-producing soil isolates. *J. Gen. Microbiol.* 37, 2321-2329.
14. Jensen, P. R., and W. Fenical. 1994. Strategies for the discovery of secondary metabolites from marine bacteria : Ecological perspectives. *Annu. Rev. Microbiol.* 62(1):249-253.
15. Jiang, C.L., and L.H. Xu. 1996. Diversity of aquatic actinomycetes in lakes of the middle plateau, Yunnan, China. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(1), 249-253.
16. Kim, C.Y, O.S. Kwon, P.K. Kim, D.J. Park, D.H. Lee, and C.J. Kim. 1996. Distribution pattern of soil actinomycetes at natural caves. *Kor. J. Appl. Microboil. Biotechnol.* 24(5), 534-539
17. Nolan, R.D., and T. Cross. 1988. Isolation and screening of actinomycetes, p.1-32. *In* Goodfellow, M., Williams, S.T., and

Mordarski, M. (ed.), Actinomycetes in Biotechnology. Academic Press, London.

18. Okami, Y. and K. Hotta. 1988. Search and discovery of new antibiotics. *In* Goodfellow, M., Williams, S.T., and Mordarski, M. (eds.), *Actinomycetes in Biotechnology*, pp.33-67. Academic Press, London.
19. Rowbotham, T.J., and T. Cross. 1977. Ecology of *Rhodococcus corprophilus* and associated actinomycetes in freshwater and agricultural habitats. *J. Gen. Microbiol.* 100, 231-240
20. Schaal, K.P. 1985. Identification of clinically significant actinomycetes and related bacteria using chemical techniques, p. 359-381. *In* M. Goodfellow and D. E. Minnikin (ed.), Chemical methods in bacterial systematics. Academic Press, London.
21. Shirling, E.B. and D. Gottlieb. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 16, 313-340.
22. Shomura, T. 1993. Screening for new products of new species of *Dactylosporangium* and other actinomycetes. *Actinomycetol.* 7(2), 88-98.
23. Steele, D.B. and Stowers M.D. 1991. Techniques for selection of industrially important microorganisms. *Ann. Rev. Microbiol.* 45, 89-106.
24. Suzuki, K., K. Nagai, Y. Shimizu, and Y. Suzuki, Y. 1994. Search for actinomycetes in screening for new bioactive compounds. *Actinomycetol.* 8(2), 122-127.
25. Wakisaka, Y., Y. Kawamura, Y. Yasuda, K. Koizumi, and Y. Nishimoto. 1982. A selective isolation procedure for *Micromonospora*. *J. Antibiot.* 35(7), 822-836.
26. Williams, S.T., M.E. Sharpe, J.G. Holt, R.G.E. Murray, D.J. Brener, N.R. Krieg, J.W. Mouldar, N. Pfennig, P.H.A. Sneath, and J.T. Staley. 1989. Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 4. William & Willkins, Baltimore.

27. Xu, L. H., Q. R. Li, and C. L. Jiang. 1996. Diversity of soil actinomycetes in Yunnan, China. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(1), 244-248.

제 2 절 길항미생물 유래 천연 살균제 개발

1. 서 론

식물병방제를 위한 살균제로서 유용한 특성을 가지고 있는 미생물유래 이차대사산물은 농용살균제 개발에 있어서 중요한 역할을 차지하고 있다. 미생물유래 항생물질은 자연환경에서 빠르게 분해됨으로 잔류독성에 의한 피해가 적고, 화학구조와 생물학적 기능이 매우 다양하여 유기합성농약에 의해 유발된 약제저항성 병원균주의 출현과 토양 및 인축에 대한 피해와 같은 부작용을 감소시킬 수 있을것으로 기대된다.

농용항생제로서 처음으로 개발된 물질은 blasticidin S로 *Magnaporthe grisea*에 의한 벼도열병에 대해 뛰어난 방제효과를 나타내었다 (Takeuchi et al., 1957). Blasticidin S의 성공 이후에 농용항생제로서의 미생물대사산물에 대한 탐색이 집중적으로 이루어져, kasugamycin, validamycin A, polyoxins와 mildiomycin 등이 개발되었고 여러 종류의 식물병방제에 사용되고 있다(Godfrey, 1994; Knight et al., 1997). 미생물유래 항균물질은 또한 보다 강력하고 안전한 새로운 살균제의 개발을 위한 선구물질로 사용되고 있다. 예를 들면 β-methoxyacrylates azoxystrobin과 kresoxim-methyl은 항생물질인 strobilurin으로부터 개발되었고 (Anke et al., 1977; Godfrey, 1994), feniclonil과 fludioxonil (Nyfeler and Ackermann, 1992)은 pyrrolnitrin으로부터 개발된 농용 살균제이다. 최근에 와서는 미생물유래 이차대사물질 중에 기존에 확인되지 않았던 여러 가

지 식물병원균에 대한 농용살균제로서의 활성이 재발견되기도 하였다. Gopalamycin (Nair et al., 1994), tubercidin (Hwang et al., 1994; Hwang and Kim, 1995), manumycin-type 항생제 (Hwang et al., 1996)등이 여러 식물병의 방제에 효과가 있음이 확인되었다.

방선균은 aminoglycosides, anthracyclines, glycopeptides, β-lactams, macrolides, nucleocides, peptides, polyenes, polyethers, tetracyclines 등의 다양한 종류의 화학구조를 가진 항생물질을 생성하는 것으로 잘 알려져있다 (Goodfellow et al., 1988; Suzuki et al. 1994). 최근에 와서 새로운 항균활성물질을 분리하기 위한 미생물학적인 측면에서의 연구의 일환으로 다양한 환경에 서식하는 미생물로부터 분리한 이차대사산물에 대한 연구가 다양하게 이루어지고 있다 (Okami and Hotta 1988; Bushell, 1983; Cheetam, 1987).

희귀 방선균의 하나인 *Actinomadura*속의 방선균은 토양시료로 부터의 분리가 어려워서 항생물질의 첨가를 통해 생장속도가 빠른 *Streptomyces*를 억제한 상태에서 주로 분리되었다 (Lavroba et al., 1972; Preobrazhenskaya et al., 1975; Athalye et al., 1981). 대부분의 *Actinomadura*속 방선균은 일반 육지토양에서 주로 분리되었지만 강흙이나 바다와 같은 환경에서도 분리되는 것으로 알려져 있다 (Cross, 1981; Lawson and Davey, 1972). 현재까지 *Actinomadura*속에서 발견된 항생물질로서 maduramicin (Tsou et al., 1984), esperacins (Konishi and Okai, 1991), pradimicins (Fukagawa et al., 1993; Saito et al., 1993)이 알려져 있다.

본 연구에서는 갯벌토양으로부터 분리한 길항방선균주 가운데, 뛰어난 길항효과를 보였던 Da2균주를 선발하여 동정하였고, 그 배양액으로부터 항균활성을 가진 물질을 순화하여 화학구조를 밝혔고, 여러 식물병원 진균에 대한 *in vitro* 상에서의 항균효과와 고추역병에 대한 방제효과를 온실

조건하에서 생물검정하였다.

2. 재료 및 방법

가. 항균물질 생성 길항방선균의 동정

우리나라 서해안 갯벌 지역 및 동굴지역에서 분리한 길항 방선균 가운데 식물병원 진균에 대해 뛰어난 항균력을 보인 길항방선균 Da2균주를 선발, 동정실험을 수행하였다.

길항방선균 Da2균주의 배양학적 특성을 알아보기위하여 6가지 ISP배지를 이용하였다. 사용된 배지는 tryptone-yeast extract agar (TYEA, ISP1), yeast malt extract agar (YMA, ISP2), oatmeal agar (OA, ISP3), inorganic salts starch agar (ISSA, ISP4), glycerol asparagine agar (GAA, ISP5), peptone-yeast extract agar (PYEA, ISP6)이다. Da2 균주를 각 배지에 접종하여 30℃에서 14일간 배양한후 생장정도와 기중균사의 형성 여부, 균사색상, 기질균사의 색상과 배지상에서의 색소 형성여부를 관찰하였다. 길항방선균 Da2균주의 포자 크기및 형태와 배열상태등을 알아보기 위하여 주사전자현미경을 통해 관찰하였다.

방선균주의 세포벽 구성물질의 하나인 diaminopimelic acid (DAP)의 성분분석을 위하여 ISSA배지에서 14일간 배양한 Da2균주의 균체를 가수분해 하였다. 가수분해한 추출액을 Da2균주의 DAP 이성질체 분석을 위하여 thin layer chrimatogaphy (TLC)를 통해 분석하였다. 방선균 Da2균주의 세포벽에 있는 당성분의 분석을 위하여, 동결건조된 균체를 가수분해하고 순화하여 cellulose로 coating된 TLC plate에서 분석하였다. plate는 aniline-phtalate reagent로 발색반응을 시킨후 확인하였다. Da2 균주의 menaquinone 분석을 위해서 C18 reverse phase column(SymetriPrep C18 column, 7μm, 7.8x300, Waters)이 장착된 HPLC system을 사용하여 분석하

였다. 그 밖의 탄소원 이용실험 및 생화학적 실험은 Bergey's mannual (Williams et al., 1989)과 Schaal (1985), Shrling과 Gottlieb(1966)의 방법에 따라 수행하였다.

나. 길항방선균 Da2 균주가 생성하는 항균성물질의 대량생산조건 및 대량 배양

길항방선균 Da2균주가 생성하는 항균성 물질의 최적생산 조건을 알아보기위하여 4가지 배지를 사용하여 배양시간대별 항균력을 paper disk 방법을 통해 알아보았다. 사용한 배지는 yeast malt extract broth (YMB, maltose 10.0g, yeast extract 4.0g, glucose 4.0g in 1 liter of distilled water, pH 7.3), oatmeal broth (OB, oatmeal 20.0g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.1g, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g in 1 liter of distilled water), glycerol asparagine broth (GAB, glycerol 10.0g, L-asparagine 1.0g, K_2HPO_4 1.0g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g in 1 liter of distilled water), soluble starch broth (SSB, soluble starch 20g, $CaCO_3$ 2.0g, $(NH_4)_2SO_4$ 2.0g, K_2HPO_4 1.0g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.0g, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.1g, in 1 liter of distilled water, pH 7.2) 이다. 접종후 4일부터 3일간격으로 각 배지에서 XAD-16 resin과 균사체를 회수하여 methanol로 추출한후 역병균에 대한 항균력을 검정하였다.

다. 길항방선균 Da2균주가 생성하는 항균성물질의 고추역병방제 효과

길항방선균 Da2가 생성하는 항균활성물질의 고추식물에서의 역병방제 효과를 알아보기 위하여, 대량배양을 통해 얻은 XAD-16 resin과 균사체를 methanol과 acetone으로 각각추출하여 감압조건하에서 evaporator로 농축한후 동결건조된 항균물질을 실험에 사용하였다.

추출한 항균활성물질을 0, 10, 100, 1000㎍/ml의 농도별로 희석하고

0.05%농도로 Tween20을 첨가하여, 1분지기의 고추식물에 처리하였다. 약제처리 24시간후, 역병균 (*Phytophthora capsici*)의 유주자현탁액을 105 zoospores/ml의 농도로 만들어 줄기접종하였다. 역병접종후 24시간 간격으로 병피해도(disease severity)를 평가하였다. 병피해도는 0에서 5까지의 scale로 평가하였다(1-고추식물의 잎이 시들기 시작하고 줄기에 갈변한 병반이 형성되기시작, 2-고추식물의 30-50%에 병이 진전, 3-고추식물의 50-70%에 병이 진전, 4-고추식물의 70-90%에 병이 진전, 5-고추식물의 완전고사).

라. 길항방선균 Da2균주가 생성하는 항균성물질의 순화

대량배양을 통해 회수된 XAD-16 resin은 10 liter의 methanol로 추출하고 균사체는 4 liter의 actone으로 추출한 후, Fig. 1에 나타낸 과정을 통해 순화작업을 수행하였다. XAD-16추출액과 균사추출액은 농축하여 C18 resin으로 flash chromatography을 행하였다. C18 resin에 시료를 loading한 후 100% H_2O에서부터 100% MeOH까지 step gradient로 column을 elution 하였다. 각 fraction은 감압상태에서 농축한후 항균활성을 검정하였다. 항균력 검정결과 항균활성을 보인 fraction을 모아서, ethyl acetate와 MeOH의 step gradient로 silica gel flash chromatography를 수행한 후 항균활성을 나타낸 fraction을 모아서 Sephadex LH-20 column chromatography(2.6 x 95 cm)를 통해 순화하였다. Sephadex LH-20을 사용한 gel filtration은 100%의 methanol을 eluent로 하여 분당 0.15 ml의 속도로 수행하였다. 항균활성을 보인 fraction들을 모아서 Shodex gel filtration column (KW-8025)을 사용한 HPLC과정을 통해 순화하였다. gel filtration HPLC를 통해 부분순화된 항균성 물질은 C18 column(7.8 x 300 mm, symmetry C18, Waters)을 이용한 reverse phase HPLC를 통해 완전순화하였다. Elution용매로 actonitrile:water (10:90, v/v)부터

acetonitrile:water (60:40, v/v)까지 30분간의 linear gradient system을 사용하였고 UV detector를 사용하여 232nm의 파장에서 검출하였다.

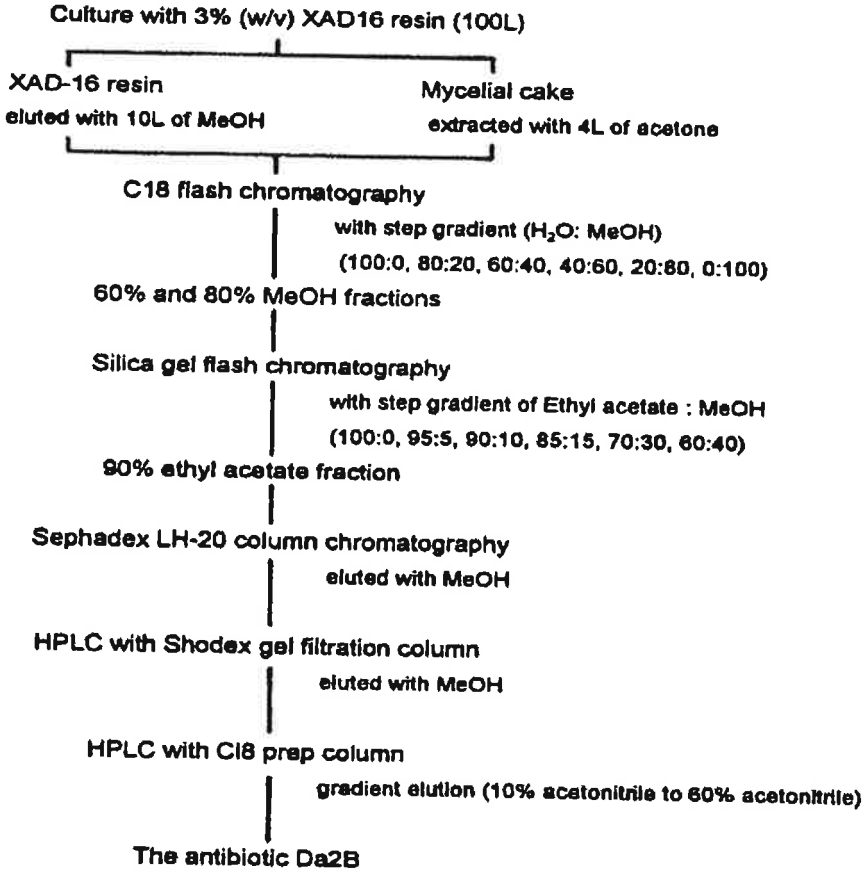


Fig. 1. Purification procedures of antibiotic substances Da2B from culture extracts of antagonistic actinomycete strain Da2.

마. 항균물질 Da2B의 화학구조 결정

Beckmann DU650 spectrophotometer을 사용하여 methanol상에서의 순화된 항균물질 Da2B의 UV spectrum patern을 조사하였다.

순수분리된 항균활성물질 Da2B의 화학구조분석을 위하여 Bruker AMX 500 NMR spectrometer를 이용하여 핵자기공명 스펙트럼을 조사하였다. 항균활성물질 Da2B를 CD_3OD에 녹여 1H NMR, C13 NMR 스펙트럼을 조사하였다. 또한 탄소의 결합상태를 알아보기위한 DEPT spectroscopy실험과 수소원자간, 수소와 탄소원자간의 상관관계를 알아보기위한 2 dimensional NMR spectra를 수행하였다. CD_3OD상에서의 DEPT spectroscopy와 1H-1H, 1H-13C COSY spectroscopy, ROESY spectroscopy를 수행한 후, 항균활성물질 Da2B의 분자량과 탄소, 질소, 산소원자의 구성비율을 알아보기위하여 high resolution mass spectroscopy를 수행하였다. JEOL HX 100A-HX100A Tandem mass spectrometer(Kontron instrument)을 이용하여 fast atom bambarment방법으로 mass spectrum을 확인하였다. 이상의 유기분광학적 방법을 사용하여 얻은 spectrum을 분석하여, 항균활성물질Da2B의 화학구조를 규명하였다.

바. 길항방선균 *A. roseola* strain Da2가 생성하는 항균활성물질 Da2B의 생물검정

항균활성물질 Da2B의 여러 가지 식물병원진균 및 효모와 세균에 대한 항균활성을 검정하기위하여 24-well microtiter dish (Greiner)에서 serial dilution assay방법을 사용하였다. 각 well에 PDB와 항균활성물질 Da2B를 0, 0.1, 0.5, 1, 10, 50μg/ml의 농도로 각 well에 넣고 식물병원진균(106 cfu/ml), 세균 및 효모를(104 cells/ml) 접종하였다. 접종된 plate는 28。C의 shaking incubator에서 3-4일간 배양한 후, 각 well에서의 미생물의 생장여부를 조사하여 최소억제농도(MIC)를 평가하였다.

항균활성물질 Da2B의 고추식물에서의 역병방제효과를 알아보기 위하여 고추역병방제용 살균제인 metalaxyl과 비교하여 생육실 조건하에서 생물검정하였다. 항균물질Da2B와 metalaxyl은 각각 10, 50, 100, 500μg/ml

의 농도가 되도록 희석하여 각각의 고추식물 표면에 살포하였다. 약제살포 1일후 고추식물의 줄기에 고추역병균(*P. capsici*)의 유주자 현탁액(105 유주자/ml)으로 줄기 접종 하였다. 병원균 접종후 병피해도(disease severity)를 조사하였다

3. 결과 및 고찰

가. 길항방선균의 동정

길항방선균 Da2균주의 배양학적 특성을 6가지 ISP배지를 이용하여 알아보았다(Table 1). 길항방선균 Da2 균주는 YMA, OA, PYEA, Bennett배지에서 잘 자랐으며 모든 배지상에서 기질균사의 색이 보라빛의 붉은색을 보였다. 배양후 10일이 지나면서 붉은색이 진해지면서 OA배지에서 약간의 연한 보라색 색소를 분비하였다. OA배지를 제외한 사용한 모든 배지에서 기중균

Table 1. Cultural characteristics of antagonistic actinomycete strain Da2 obtained from sea-mud soil

Medium	Growth	Aerial mycelium	Reverse color	Diffusible pigment
Tryptone-yeast extract agar (ISP 1)	Moderate	Poor White to pale pink	Pale violet	none
Yeast malt extract agar (ISP 2)	Good	Poor White to pale pink	dark violet	none
Oatmeal agar (ISP 3)	Good	Moderate White to pink	pale pink to red violet	pale violet
Inorganic salts starch agar (ISP 4)	Poor	Poor White	white to pale pink	none
Glycerol asparagine agar (ISP 5)	Poor	None	brownish red	none
Peptone-yeast extract iron agar (ISP 6)	Good	None	brownish red to violet	none
Bennett's medium	Good	None	pink	none
Nutrient agar	Moderate	None	pale pink	none

Fig. 2. Scanning electron microscopy of spore chains of the actinomycete strain Da2 cultured on oatmeal agar for 14 days. Bar represents 1 μm.

사가 형성되지 않거나 현미경상으로만 관찰이 가능할 정도로 형성되었다. 이러한 사실로 보아 Da2균주는 일반적으로 잘알려진 *Streptomyces*속과는 상이한 배양학적 특성을 보이는 것으로 관찰되었다. Da2균주의 포자모양을 주사전자현미경을 통해 확인하였다 (Fig. 2). Da2균주의 포자는 0.7에서 0.9 ㎛의 구형으로 포자의 배열은 straight 또는 slightly bented type으로 8-10개의 포자가 달려 있었다. 방선균의 세포벽구성 성분의 하나인 DAP 이성질체의 확인을 위해, Da2균주의 세포벽 구성성분을 분석한 결과, meso-form의 DAP를 가지고 있는 것으로 확인되었다. Da2 균주의 균체 추출물에서 aniline-phtalate reagent로 발색반응을 시켰을때 arabinose와 xylose의 spot사이의 위치에서 갈색의 spot으로 나타나는 madurose가 검출되었다. Menaquinone분석결과, Da2균주의 균체에서 major menaquinone으로 MK-9(H4, H6, H8)이 검출되었고, MK-9(H2)와 MK8-(H8), MK10-(H4)등도 확인되었다. 길항방선균 Da2는 *Actinoamdura* 속의 방선균과 형태적 생화학적

특성이 일치하여 *Nocardiopsis*, *Saccharothrix*, *Streptomyces*, *Nocardia*, *Microtetraspora*와 같은 다른 유사속과 구분되었다. *Actinomadura*속으로 확인된 Da2균주의 종수준의 동정을 위하여 질산환원력과 여러 가지 가수분해력에 대한 실험을 수행하였다 (Table 2). 실험 결과, nitrate reduction test는 positive로 나타났고, esculin, gelatin, hypoxanthine, starch, tyrosine과 testosterone에 대해서는 분해능력이 있었으나, casein과 xathine에 대해서는 가수분해력을 보이지 않았다. 이상의 결과와 전자현미경하에서의 형태적인 특성, 및 배양학적 특성을 종합하여, 길항방선균 Da2 균주를 *Actinomadura. roseola* strain Da2로 동정하였다.

Table 2. Morphological and biochemical characteristics of the actinomycete strain Da2

Characteristic		Strain Da2	*Actinomadura roseola*[a]
Morphological character			
Fragmentation of substrate mycelium		–[b]	–
Spore chain		straight or slightly bent	Straight
Spores per chain		8-10 spores	short or long spore chain
Inter spore pad		–	–
Spore morphology		elliptical, warty	elliptical, folded
Cultural character			
ISP2	AM[c]	pink	Pink
	SM	brown-red	brown-red
	SP	–	–
ISP3	AM	pink-violet	pink-violet
	SM	red-brown	red-brown
	SP	–	–
ISP4	AM	–	–
	SM	red, scare	–
	SP	–	–
Physiological character			
Diagnostic amino acid		meso-DAP	meso-DAP
Characteristic sugar		madurose	madurose
Mycolic acids		ND	–
Predominat menaquinone		MK–9[d](H_4,H_6,H_8)	MK–9(H_4,H_6,H_8)
Reduction of nitrate		+	+
Hydrolysis of			
Casein		–	–
DNA		ND	–
Esculin		+	+
Gelatin		+	+
Hypoxanthine		+	+
Starch		+	–
Testosterone		+	+
Tyrosine		+	+
Xanthine		–	–

[a] Data were obtained from Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Williams et al., 1989).
[b] Symbols: +, present; -, absent; ND, not determined.
[c] Abbreviations are AM: aerial mycelium, SM: substrate mycelium, and SP: soluble pigment.
[d] MK-9(H_4) means menaquinones having four of the nine isoprene units hydrogenated.

나. 항균물질 대량생산 조건 및 대량배양

길항방선균 Da2가 분비하는 항균성 물질의 최적생산 조건을 알아보기 위하여, glycerol asparagine broth(GAB), yeast-malt extract broth(YMB), soluble starch broth(SSB), oatmeal broth(OB)의 4가지 배지를 사용하여 배양시간대별 항균력을 paper disk 방법을 통해 알아본 결과, 각 배지에서 배양후 시간이 지날수록 역병에대한 항균력이 크게 나타났는데, 특히 YMB와 SSB에서 7일째부터 높은 항균력을 나타내었다 (Fig. 4). YMB와 SSB에서 13일간 배양한 경우 가장 높은 항균력을 나타내는 것으로 보아 두 배지에서 가장 많은 항균성 물질이 생성되고 있음을 알 수 있었다. 모든 배지상에서 pH는 배양기간중에 계속 증가하는 것으로 나타났는데 항균성물질의 분비와 pH의 변화가 상관관계가 있는 것으로 보인다. 이상의 결과를 통해 길항방선균 Da2균주의 대량배양조건으로, SSB배지에서 13일간 배양하는 것으로 하여 100 liter를 배양하였다. 13일간의 배양후 XAD-16 resin과 균사체를 회수하여 methanol과 acetone으로 각각 추출하여 16.7g의 항균물질을 얻을수 있었다.

다. 길항방선균 Da2균주가 생성하는 항균성물질의 고추역병방제 효과

대량배양을 통해 얻은 항균활성물질을 사용하여 길항방선균 Da2가 생성하는 항균활성물질의 고추식물에서의 역병방제효과를 온실조건하에서 알아보았다 (Fig. 5). 항균활성물질을 처리하지 않은 고추식물은 접종후 6일이 지나면서 완전히 고사한 반면, 1000μg/ml의 농도로 처리된 고추식물의 disease severity는 평균 0.7로, 역병에 대해 방제효과를 나타냈다. 10μg/ml의 약제로 처리된 고추식물에서의 disease severity는 무처리구와 비교해서 차이를 나타내지 않았으나, 100μg/ml로 처리된 고추식물에서는 역병의 발생이 억제되었다. 1000μg/ml 농도의 항균물질을 처리한 경우에 고추식물에서의 역병에 대한 방제가는 82.6%였고, 100μg/ml의 처리시에도

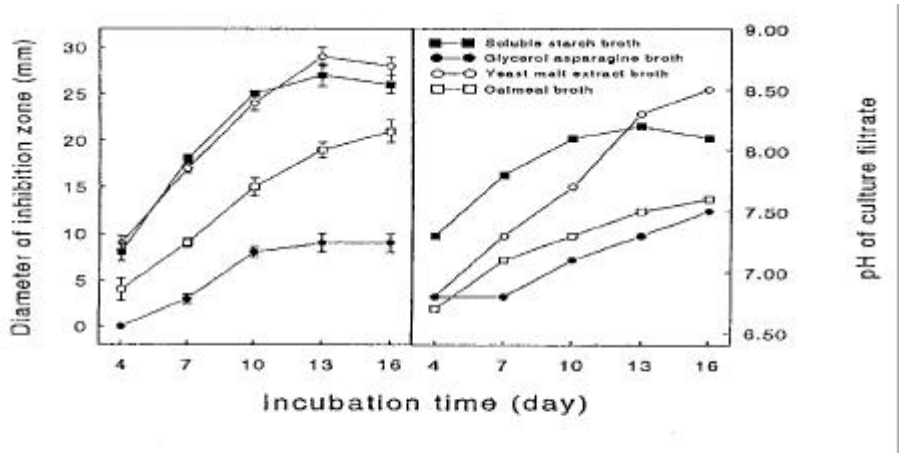


Fig. 4. Antifungal activity against *Phytophthora capsici* of one ml-culture filtrates of antagonistic actinomycete strain Da2 produced in different culture media. Vertical bars represent standard deviations.

40%에 가까운 방제가를 나타냈다. 길항방선균 Da2가 생성하는 항균활성 물질 조추출물은 *in vitro*항균활성뿐 아니라 고추식물에서의 역병발생을 효과적으로 억제하였다. 살균제 개발을 위한 screening 과정에서 선발된 항균물질 가운데는, *in vitro*상에서 높은 항균활성을 나타냈던 물질이 *in vivo*상에서는 병방제 효과를 보이지 못하는 경우가 많다. 이런 이유로 기주식물에서의 병방제효과에 대한 생물검정이 살균제 screening의 초기단계에서부터 요구된다 (Fawcett and Spencer, 1970).

라. 항균물질의 부분순화

대량배양을 통해 회수된 XAD-16 resin은 10 liter의 methanol로 추출하고 균사체는 4 liter의 acetone으로 추출한 후, Fig. 1에 나타낸 과정으로 순화작업을 수행하였다. XAD-16추출액과 균사추출액은 농축하여 C18 resin으로 flash chromatography을 행하였다. 각 fraction 중, MeOH 60%와 80%의 fraction에서 항균활성을 보였다. 항균활성이 확인된 fraction을 모아서 silica gel flash chromatography를 수행한 결과, 90% ethyl acetate fraction에서 항균력을 나타내었다. 90% ethyl acetate fraction

은 Sephadex LH-20 column (100% methanol)을 통해 부분순화하였다 (Fig. 6). 200개의 fraction중에 67번 fraction부터 85번 까지의 fraction에서 역병균에 대한 균사생장 억제효과를 나타냈다. 항균활성을 보인 fraction을 모아서 Shodex gel filtration column (KW-8025)을 사용한 HPLC과정을 수행하였다. Eluent로 100% methanol을 사용하여 분당 2 ml의 유속으로 분취한 결과, 12.7분대에서 elution된 peak에서 항균활성이 확인되었다(data

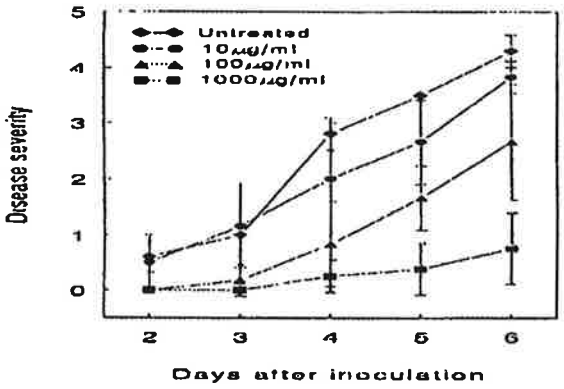


Fig. 5 Effect of XAD-16 eluates of culture extracts of antagonistic actinomycete strain Da2 at different concentrations on the disease development in pepper plants inoculated with *Phytophthora capsici*. Vertical bars represent standard deviations

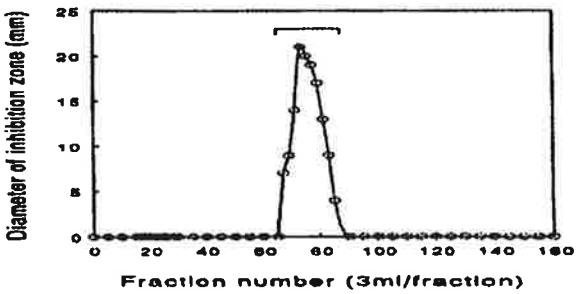


Fig. 6. Sephadex LH-20 column chromatography of the active fractions obtained from silica gel flash chromatography. The active fractions were concentrated *in vacuo* and chromatographed on Sephadex LH20 column (26 x 950 mm) with methanol at a flow rate of 0.15 mL min^{-1}. All fractions were bioassayed for the antifungal activity against *Phytophthora capsici*. Bar represents the pooled active fractions

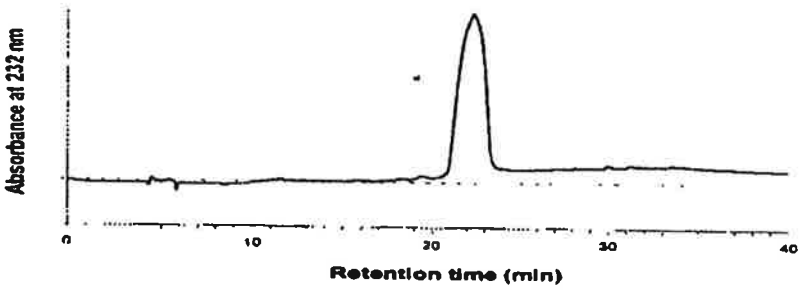


Fig. 7. High performance liquid chromatogram of the antibiotic Da2B purified from preparative HPLC procedures. The chromatogram was conducted with a Gilson HPLC system (SymetryPrep C18 column, 7 μm, 7.8x300, Waters) using a solvent system (linear gradient of 10% acetonitrile to 80% acetonitrile). Elutions were monitored at 232 nm.

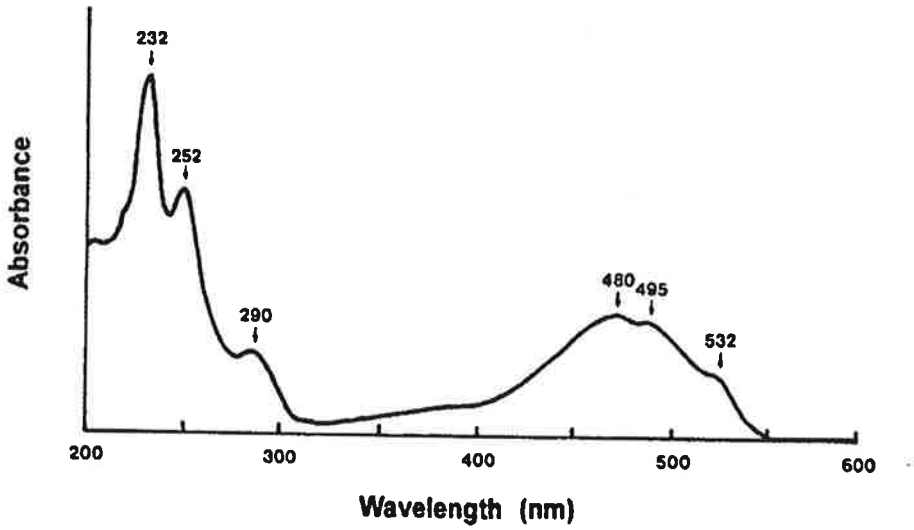


Fig. 8. UV absorption spectrum of the antibiotic substance Da2B.

미 제시). Gelfiltration HPLC를 통해 부분순화된 항균성 물질은 C18 column을 이용한 reverse phase HPLC를 통해 완전순화하였다. 10% acetonitrilel부터 60% acetonitrile까지의 linear gradient system에서 분취된 peak 가운데 22.1분대의 peak와 24.9분대의 peak가 역병균 (*Phytophthora capsici*)에 대해 균사생장 억제 효과를 나타내어, 각각을 Da2B와 Da2A로 명명하였다. 그 중 항균물질 Da2B가 완전순화되어, HPLC상에서 단일peak로 나타났다 (Fig. 7). 분취용 HPLC system을 이용하여 분리한 항균활성 peak를 모아서 농축한 후 8.7 mg의 붉은색의 항균활성물질 Da2B를 얻었다. 순수분리한 항균활성물질 Da2B의 UV spectrum pattern을 methanol상에서 알아본 결과, 232nm의 파장에서 최대흡광도를 나타내었으며, 252nm와 290근처에서 두 번의 shoulder peak를 나타냈다 (Fig. 8).

마. 항균성물질 Da2B의 화학구조 결정

항균성물질 Da2B을 고해상도 FAB mass sppectroscopy로 알아본 결과, $C_{27}H_{29}NO_{10}$ (분자량 527.1782)의 분자식을 갖고 있는 것으로 확인되었다. 항균성물질 Da2B의 ^{1}H (Fig. 9), ^{13}C (Fig. 10)와 DEPT NMR spectra를 분석하여 23개의 수소와 27개의 탄소를 확인하였다 [carbons: 2 개의 CH3, 3개의

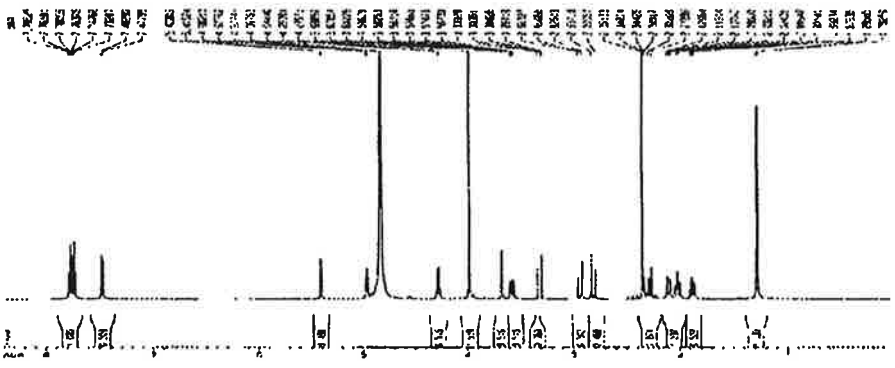


Fig. 9. The ^{1}H NMR spectrum of the antibiotic Da2B in CD_3OD.

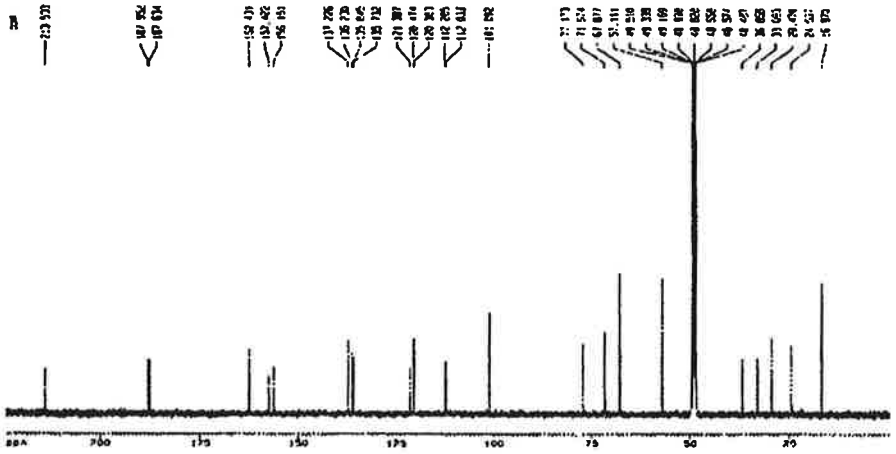


Fig. 10. The ^{13}C NMR spectrum of the antibiotic Da2B in CD_3OD.

CH2, 9개의 CH, 13 의 C (3개의 C=O)] (Table 3). Carbon NMR spectrum에서 67.9 ppm에 위치한 peak는 2개의 탄소peak가 겹쳐있음을 DEPT experiment결과를 통해 확인하였다. H,H-COSY NMR experiment와 HMQC, HMBC, ROESY spectral data를 종합하여 볼 때 항생물질 Da2B는 한 개의 daunosamine부분과 한 개의 trisubstituted benzenoid부분, CH_2-C-CH_2-CH unit, 한 개의 methoxy와 acetyl group을 갖고 있었다 (Fig. 11). 한 개의 acetyl group 과 두 개의 quinoid carbonyl 탄소의 존재는 213.6, 187.6, 188.0 ppm에서의 3개의 carbonyl carbon signals를 통해 확인하였다. 187.6 ppm위치의 quinoid carbonyl 탄소는 7.80 ppm의 trisubstituted bezenoid 수소와 연관되어 있음이 HMBC 결과를 통하여 확인되었다 (Fig. 11). Methoxy group은 162.4 ppm의 trisubstituted benzenoid 탄소와 연결되어있고, CH_2-C-CH_2-CH unit의 밀단수소는 135.7과 135.9 ppm의 aromatic 4차 탄소와 HMBC상에서 연결되어 있었다. Daunosamine부분의 α

-configuration은 ROESY data를 통해 확인하였다 (H-1의 coupling constant는 br d, J = 3.3 Hz). 또한 ROESY결과를 분석한 결과, daunosamine 부분이 aglycone과 연결되어있음을 알 수 있었다 (Fig. 11). Aglycone의 7번 수소는 5.42 ppm의 anomeric proton (H-1')과 연결되어있다. 다양한 2-D NMR correlation 실험결과를 통해 항균활성물질 Da2B는 anthracycline계 항생물질인 daunomycin과 동일한 구조를 갖고 있음을 확

Table 3. NMR spectral data of the antibiotic Da2B (^{1}H at 500 MHz and ^{13}C at 125 MHz in CD_3OD)

Carbon no.	^{13}C,δ	^{1}H,δ (m[a],J inHz)	HMBC[b]
1	120.5[c]	7.80(d, 8.0)	3, 4a, 12
2	137.2	7.75(t, 8.0)	4, 12a
3	120.3[e]	7.49(d, 7.6)	4a
4	162.4	-	OCH_3,
4-OCH3	57.1	3 99(s)	4
4a	121.4	-	1
5	188.0[d]	-	-
5a	112.3[e]	-	-
6	156.2[f]	-	-
6a	135.9[g]	-	7, 8
7	71.7	4.99(dd, 2.3, 4.9)	-
8	36.9	2.29(br d, 14.6), 2.12(dd, 5.2, 14.6)	6a, 10
9	77.2	-	10
10	33.1	2.84(d,18.4), 2.95(dd, 1.4, 17.2)	8, 9, 10a
10a	135.7[g]	-	10
11	157.4[f]	-	-
11a	112.0[e]	-	-
12	187.6[d]	-	1
12a	136.2	-	2
13	213.6	-	14
14	24.5	2.36(s)	-
1'	101.4	5.42(br d, 3.3)	
2'	29.5	1.89(dd, 4.7, 12.8), 2.03(td, 3.9, 12.9)	4'
3'	48.6	3.583(ddd, 2.9, 4.7,12.8)	1', 4'
4'	67.9	3.88(br s)	5'
5'	67.9	4.29(m)	CH_3, 1'
5'-CH3	17.0	1.29(t, 6.5)	5'

[a] Abbreviations of signal multiplicity are s:singlet, d:doublet, dd: doublet of doublet ddd: doublet of doublets of doublets, brd: broad doublet, q: quartet.

[b] Correlation to proton no.

[c,d,e,f,g] Interchangeble.

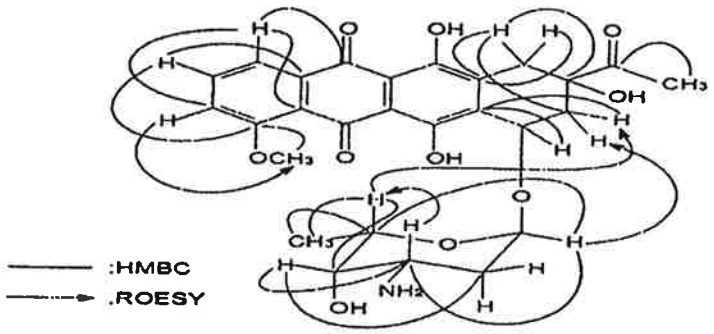


Fig. 11. HMBC and ROESY correlations of the antibiotic Da2B.

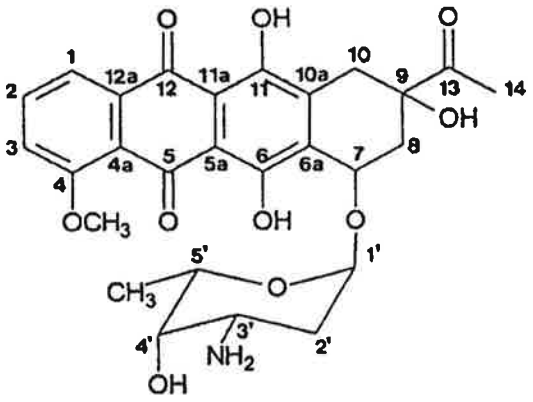


Fig. 12. Structure of the antibiotic Da2B isolated from *Actinomadura roseola* strain Da2.

인하였다 (Fig. 12). 항생물질 daunomycin은 DiMarco, 등 (1964)와 D'bost, 등 (1963)에 의해 *Streptomyces*에서 처음 발견되었는데 특이적인 항암효과로 인해 의학용으로 많은 관심을 받았으나, 항진균활성에 대해서는 알려지지 않았다 (Arcamone, 1984). 항생물질 daunomycin의 생성은 *Streptomyces* 속의 방선균주에서만 보고되어 있는데, daunomycin이 *Actinomadura*속의 방선균에서 분리된 것은 Da2균주가 처음이다.

Table 4. Minimum inhibitory concentrations (MICs) against various microorganisms of the antibiotic Da2B from *Actinomadura roseola* strain Da2.

Microorganism	Minimum inhibitory concentration (μg mL^{-1})[a]
Alternaria mali	>50[b]
Botrytis cinerea	30
Cladosporium cucumerinum	30
Colletotrichum gloeosporioides	>50
Cylindrocarpon destructans	30
Didymella bryoniae	30
Fusarium oxysporum f.sp. *cucumerinum*	50
Magnaporthe grisea	50
Phytophthora capsici	10
Rhizoctonia solani	10
Candida albicans	>50
Saccharomyces cerevisiae	7.5
Bacillus subtilis	10
Erwinia carotovora pv. *carotovora*	>50
Pseudomonas solanacearum	>50
Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria*	>50

[a] The lowest concentration that completely inhibits the growth of test microorganism was determined after incubation for 3-5 days.

[b] >50 represents that the growth of test microorganism was not inhibited at the concentrations above 50 μg mL^{-1}.

바. 항균성물질 Da2B의 항진균활성 및 고추역병방제 효과

항균활성물질 Da2B의 여러 가지 식물병원진균 및 효모와 세균에 대한

항균활성을 검정하기 위하여 24-well microtiter dish (Greiner)에서 serial dilution assay방법을 사용하여 *in vitro*상에서의 항균활성을 알아보았다 (Table 4). 항균활성물질 Da2B는 *Botrytis cinerea*, *Cladosporium cucumerinum*, *Cylindrocarpon destructans*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, *Magnaporthe grisea*에 대한 최소억제농도(MIC)는 각각 30, 30, 30, 50, 50 μg/ml였으며, *Phytophthora capsici*와 *Rhizoctonia solani*에 대해서는 10 μg/ml의 MIC값을 나타내어, 이들 식물병원 진균에 대해 높은 항균력을 갖고 있음을 알 수 있었다. 또한 Da2B는 효모인 *Saccharomyces cerevisiae*와 세균인 *Bacillus subtillis*에 대해서도 각각 7.5와 10 μg/ml의 농도에서 항균활성을 보였다. 그러나 나머지 그람 음성 세균과 *Candida albicans*에 대해서는 50 μg/ml의 농도에서도 항균활성을 나타내지 않았다. 항균활성물질 Da2B의 고추식물에서의 역병방제효과를 알아보기 위하여 고추역병방제용 살균제인 metalaxyl과 비교하여 생육실 조건하에서 생물검정하였다 (Fig. 13).

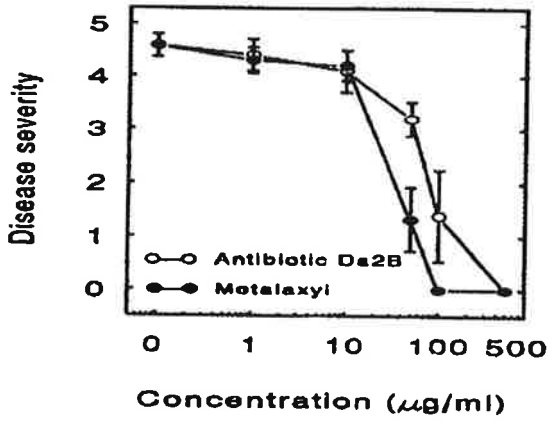


Fig.13. Effects of the antibiotic substance Da2B and metalaxyl at different concentrations on the disease development in pepper plants at the first branch stage inoculated with *Phytophthora capsici*. Disease severity is based on a 0-5 scale, where 0 = no visible symptom and 5 = plant dead. Vertical bars represent standard deviations.

접종 후 3일째부터 약제를 처리하지 않은 고추식물의 줄기에서 갈색병반이 나타나기 시작한 반면, metalaxyl과 Da2B를 처리한 고추식물에서는 병징이 관찰되지 않았다. 접종후 5일이 되면서 Da2B 10㎍/ml와 50㎍/ml의 약제처리구의 고추식물에서도 병반이 관찰되기 시작하였다. Metalaxyl

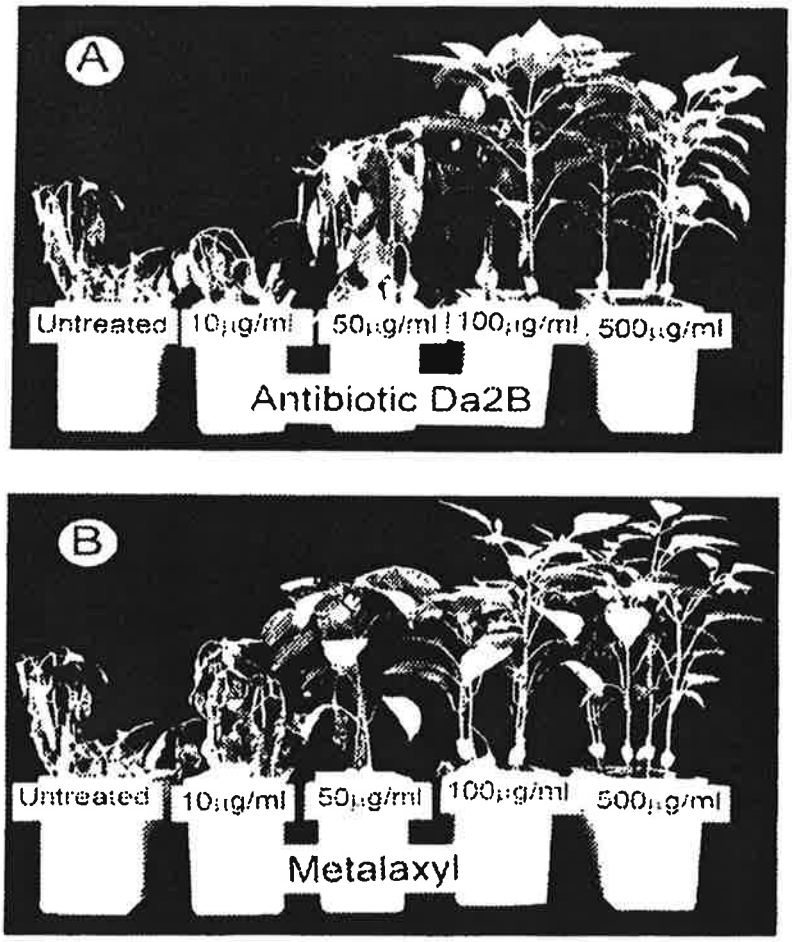


Fig. 14. Phytophthora development in pepper plants treated with different concentrations of the antibiotic substance Da2B (A) and metalaxyl (B)

10㎍/ml을 처리한 고추식물에서도 약간의 시들음 증상이 관찰되었다. 약제를 처리하지않은 고추식물은 접종후 7일이 되면서 완전고사하였으나, 항생물질 Da2B 500㎍/ml 이 처리된 고추식물에서는 역병이 발생하지 않았고, 100㎍/ml농도의 약제 처리구에서는 약간의 병피해가 관찰되었다. Metalaxyl 처리구에서도 100㎍/ml이상의 처리시에 역병이 발생하지 않아서, 항진균물질 Da2B가 고추역병 방제효과면에서 기존약제인 metalaxyl과 비슷한 수준의 병방제 효과를 갖고 있는것으로 나타났다 (Fig. 14).

이상의 결과를 통해 길항방선균 *Actinomadura roseola* strain Da2로부터 분리한 항균성 물질 Da2B가 daunomycin의 화학구조를 갖고 있음을 밝혔으며, 이물질이 식물병원 진균에 대해 높은 항균활성을 보이며, 고추역병에 대한 방제효과가 있음을 확인하였다. 본 연구에서 확인된 항균성 물질 Da2B의 역병 방제효과를 토대로, Da2B 유도체들의 여러 식물병원 진균에 대한 항균활성 검정과 시용조건 및 제재에 대한 연구 등 포장에서의 방제효과에 대한 다양한 연구가 계속되야 할 것이다.

4. 참고 문헌

1. Anke, T., Oberwinkler, F., Steglich, W., and Schramm, G. 1977, The strobilurins-new antifungal antibiotics from the Basidiomycete *Strobilurus tenacellus*. J. Antibiot. 30:806-810.
2. Arcamone, F. 1984. Antitumor anthracyclines: recent developments. Med. Res. Rev. 4:153-188.
3. Athalye, M., Lacey, J., and Goodfellow, M. 1981. Selective isolation and enumeration of actinomycetes using rifampicin. J. Appl. Bacteriol. 51:289-297.

4. Bushell, M.E. 1983. Search and discovery of novel microbial metabolites, pp.1-6. *In* M. E. Bushell (ed.), Progress in industrial microbiology, vol. 17. Elservier, Amsterdam.

5. Cheetam, P.S.J. 1987. Screening for novel biocatalysts. *Enzyme Microb. Technol.* 9, 194-213.

6. Cross, T. 1981. Aquatic actinomycetes: A critical survey of the occurrence, growth and role of actinomycetes in aquatic habitats. J. Appl. Bacteriol. 50:397-423.

7. Dbost, M., Ganter, P., Maral, R., Ninet, L., Pinnert, S., Prudhomme, J., and Werner, G. H. 1963. Un novel antibiotique a properties cytostatique: la rubidomycine. C. R. Acad. Sci. 257:1813-1815.

8. DiMarco, A. Gaetani, M., Orezzi, P., Scarpinato, B. M., Silverstrini, R., Soldati, M., Dasdia, T., Valentini, L. 1964. Daunomycin, a new antibiotic of the rhodomycin group. Nature 201:706-707.

9. Fawcett, C. H. and Spencer, D. M. 1970. Plant chemotherapy with natural products. Annu. Rev. Phytopathol. 8:403-418.

10. Fukagawa, Y., Ueki, T., Numata, K., and Oki, T. 1993. Pradimicins and benanomicins, sugar-recognizing antibiotics: their novel mode of antifungal action and conceptual significance. Actinomyccetol. 7:1-22.

11. Godfrey C. R. A. 1994. Fungicides and bactericides. pp.311-340. *In* C. R. A. Godfrey. (ed.), *Agrochemicals from natural products*, Marcel Dekker Inc., New York.

12. Goodfellow, M., Williams, S. T., and Mordarski, M. 1988.

Actinomycetes in biotechnology. Academic Press, London, 501 pp.

13. Hwang, B. K., Ahn, S. J., and Moon, S. S. 1994. Production, purification, and antifungal activity of the antibiotic nucleoside, tubercidin, produced by *Streptomyces violaceoniger*. Can. J. Bot. 72:480-485.
14. Hwang, B. K., Lee, J. Y., Kim, B. S., and Moon, S. S. 1996. Isolation, structure elucidation, and antifungal activity of a manumycin-type antibiotic from *Streptomyces flaveus*. J. Agric. Food Chem. 44:3653-3657.
15. Hwang, B. K., and Kim, B. S. 1995. *In vivo* efficacy and *in vitro* activity of tubercidin, an antibiotic nucleoside, for control of *Phytophthora capsici* blight in *Capsicum annuum*. Pestic. Sci. 44:255-260.
16. Knight, S. C., Anthony, V. M., Brady, A. M., Greenland, A. J., Heaney, S. P., Murray, D. C., Powell, K. A., Schulz, M. A., Sinks, C. A., Worthington, P.A., and Youle, D. 1997. Rationale and perspectives on the development of fungicides. Annu. Rev. Phytopathol. 35:349-372.
17. Konishi, M and Oki, T. 1991. A novel class of antitumor antibiotics containing a cyclodiynene skeleton: activity and mechanism of action. Actinomycetol. 5:1-9.
18. Lavrova, N. V., Preobrazhenskaya, T. P., and Sveshnikova, M. A. 1972. Isolation of soil actinomycetes on selective media with rubomycin. Antibiotiki. 11:965-970.
19. Lawson, E. N., and Davey, L. M. 1972. A water-borne actinomycete resembling strains causing mycetoma. J. Appl. Bacteriol.

35:389-394.

20. Nair, M. G., Chandra, A., and Thorogood, D. L. 1994. Gopalamicin, an antifungal macrodiolide produced by soil actinomycetes. J. Agric. Food Chem. 42:2308-2310.

21. Nyfeler, R., and Ackermann, P. 1992. Phenylpyrroles, a new class of agricultural fungicides related to the natural antibiotic pyrrolnitrin. *In* Baker, D. R., Fenyes, J. G., and Steffens, J. J. (eds.), *Synthesis and Chemistry of Agrochemicals III*, ACS symposium Series 504.

22. Okami, Y. and K. Hotta. 1988. Search and discovery of new antibiotics. *In* Goodfellow, M., Williams, S.T., and Mordarski, M. (eds.), *Actinomycetes in Biotechnology*, pp.33-67. Academic Press, London.

23. Preobrazhenskaya, T. P., Lavrova, N. V., Ukholina, R. S., and Nechaeva, N. P. 1975. Isolation of new species of *Actinomadura* on selective media with streptomycin and bruneomycin. Antibiotiki. 20:404-409.

24. Saito, N., Kitame, F., Kikuchi, M., and Ishida, N. 1974. Studies of new antiviral antibiotic, 9-methylstreptimidone. I. Physicochemical and biological properties. J. Antibiot. 27:206-214.

25. Schaal, K. P. 1985. Identification of clinically significant actinomycetes and related bacteria using chemical techniques. *In* M. Goodfellow and D. E. Minnikin (eds.), *Chemical methods in bacterial systematics*. pp. 173-199. Academic Press. London.

26. Shirling, E. B. and Gottlieb, D. 1966. Methods for

characterization of *Streptomyces* species. Int. J. Syst. Bacteriol. 16:313-340

27. Suzuki, K., K. Nagai, Y. Shimizu, and Y. Suzuki, Y. 1994. Search for actinomycetes in screening for new bioactive compounds. *Actinomycetol.* 8(2), 122-127.

28. Takeuchi, S., Hirayama, K., Ueda, K., Sakai, H., and Yonehara, H. 1957. Blasticidin S, a new antibiotic. J. Antibiot. 11:1-5.

29. Tsou, H. R., Rajan, S., Fiala, R., Mowery, P. C., Bullock, M. W., Borders, D. B., James, J. C., Martin, J. H., and Morton, G. O. 1984. Biosynthesis of the antibiotic maduramicin. Origin of the carbon and oxygen atoms as well as the carbon-13 NMR assignments. J. Antibiot. 37:1651-1653.

30. Williams, S. T., Sharpe, M. E., Holt, J. G., Murray, R. G. E., Brener, D. J., Krieg, N. R., Mouldar, J. W., Pfennig, N., Sneath, P. H. A. and Staley, J. T. 1989. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 4.* William & Willkins, Baltimore.