

생물방제균 *Pseudomonas fluorescens* 2112의 선발과 고추역병균에 대한 항진균성 길항작용

이은탁 · 김상달*

영남대학교 자연자원대학 응용미생물학과

Selection and Antifungal Activity of Antagonistic Bacterium *Pseudomonas* sp. 2112 against Red-Pepper Rotting *Phytophthora capsici*. Lee, Eun-Tag and Sang-Dal Kim*. Department of Applied Microbiology Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea - In order to select multifunctional powerful antagonistic biocontrol agent against red-pepper rotting fungi *Phytophthora capsici*, we isolated an indigenous antagonistic bacterium which produces antifungal substances and siderophores from a local soil of Kyongju, Korea. The isolated strain was identified as *Pseudomonas fluorescens* biotype F. The antibiotic produced from *P. fluorescens* 2112 inhibited hyphae growth and the zoospore germination of *Phytophthora capsici*. The favorable carbon, nitrogen source and salts for the production of antibiotic from *P. fluorescens* 2112 were glycerol, beef extract and LiCl at 1.0%, 0.5% and 5 mM, respectively. And antagonistic activity of *P. fluorescens* 2112 was confirmed against *P. capsici* *in vivo*.

Key words: Antagonistic bacterium, *Pseudomonas fluorescens* 2112, antifungal, siderophore, biocontrol

급격히 증가한 세계인구와 이의 식량 수요를 해결하는데는 화학비료와 함께 1920년 이후 사용되어온 합성화학농약이 핵심적인 역할을 하여 왔다. 식량 생산량을 안정적이고 지속적으로 증가시키기 위해 가장 현실적이고 경제적인 방안으로 인식되고 있는 방안의 하나가 작물의 병충해 방제용 화학농약이라고 생각되었다. 세계 농약시장의 82%를 차지하고 있는 10대 회사들은 매출액의 10% 정도를 연구 개발에 투자하면서 10%내외의 순이익을 내고 있다. 국내 농약시장은 1996년 기준 6,160억으로 세계 10위의 규모이나, 대부분의 원재료는 수입에 의존하고 있으며, 사업의 영세성으로 국내 농약회사들의 매출규모는 아직도 미미한 실정이며 세전 이익률이 5% 내외로 연구개발과 신물질 농약 개발은 엄두도 못 내고 있는 실정이다. 현재 세계적으로 생물공학 기법을 이용한 생물농약개발 연구는 지속적으로 이루어져 2005년에는 세계농약 시장의 10%를 차지할 것으로 기대되고 있다.

최근 전세계적으로 연구가 활발히 이루어지고 있는 생물농약은 미생물을 이용한 것이 그 축을 이루면서 매년 크게 발전을 거듭하고 있다. 그러나 미생물농약은 현지의 기후 풍토나 토양환경 조건에 지배를 받을 수밖에 없는 생물체로 생태계 환경에 크게 영향을 받는 것으로 해당 지역 환경에 따른 활성의 차이가 크다고 할 수 있다. 따라서 우리나라 기후나 토양환경에 맞는 생물농약 개발의 필요성이 자

연스럽게 대두되고 있으며, 특히 최근 외국기술의 지적소유권 논란에 적극 대응하기 위해서도 필수적이라 할 수 있다.

식물근부병균 등 여러 가지 식물병원성 진균에 대한 길항균주를 이용한 생태학적 생물방제방법에는 크게 3가지 형태로 구분될 수 있다. 첫째는 진균 외막가수분해효소인 chitinase[9,10], β -1,3-glucanase 와 최근에 보고된 식물성 chitinase[13]에 의해 식물병원균의 세포벽을 분해시키는 용균작용, 둘째로는 *Streptomyces griseus*[5], *Streptomyces blastomyces*[15], *Penicillium nigricans*[3], *Bacillus subtilis* [7,11], *Pseudomonas* sp.[1] 등이 생산하는 항진균성 항생물질에 의해 직접 식물병원균의 생육을 저해시키는 항생작용(antibiosis), 셋째는 plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) 즉, 대부분 근권 *Pseudomonas* sp.가 분비하는 철(Fe^{3+}) 성분 특이 결합물질인 siderophore에 의해 식물병원균의 생육을 저해하는 경쟁적 길항작용(competitive antagonism)을 이용한 방제방법이다[12]. 이러한 경쟁적 길항작용은 토양전염병을 감소시키며, 기주식물의 근권 정착능력을 촉진함으로써 작물의 성장을 양호하게 하여 수확량을 증대할 수 있는 아주 효과적인 생물학적 방제방법이라 할 수 있다.

이에 본 연구에서는 우리 지역 토양환경에 오랜 세월 토착해 살고 있는 토착길항균주를 분리·선발·육종하고 다시 지역으로 돌아가서도 토착·우점화를 통해 적응력이 있고 두 가지이상의 길항기작을 가지는 길항균주를 선발하고자 하였다. 그 일환으로 경북 경주지역에서 토착길항미생물을 이용하여 자연농법을 수행하고 있는 저병해 경작지나 토착미생물 채취법으로 증균시킨 시료 토양[8]으로부터 고추역병

*Corresponding author

Tel. 82-53-810-2395, Fax. 82-53-811-4319

E-mail: sdkim@yu.ac.kr

균 *Phytophthora capsici*에 강한 길항력을 보이는 균주중 항진균성 항생물질과 siderophore를 동시에 생성하는 강력한 복합기능의 길항균주를 최종 선발하여 그 길항력을 검토하였다.

재료 및 방법

토착길항균주의 분리 및 선발

지역토양내 우점능, 토착능, 복귀능이 강한 길항균주를 선발하기 위해 경주지역의 자연농법 저병해 경작지 토양을 분리원으로 하여 멸균 생리식염수에 현탁, 희석하고, 이를 LB 한천배지에 접종하여, 30°C에서 1일간 배양시켜 분리하였다.

또한 항생물질을 생산하는 *Pseudomonas* 속의 균주를 분리, 배양하기 위하여 *Pseudomonas* isolation agar(PIA)를 거쳐 King's B agar를 사용하여 분리할 수 있었으며, 이들을 대상으로 하여 고추역병균 *Phytophthora capsici*를 방제할 수 있는 길항균주의 분리선발을 위하여 Potato dextrose agar(PDA)에서 대치배양(paring culture)을 실시하여 큰 억제거리를 형성하는 균주들을 분리하였다.

또한 다기능 방제력을 가진 균주를 선발하기 위해 이들을 대상으로 또 다른 방제기작인 siderophore 생산성을 검증하였으며, 이를 위해 대부분의 siderophore 생산 균주가 *fluorescens*를 생성하는 점을 착안하여 sucrose minimal agar (SMA)에서 항생물질을 생산하는 균주를 대상으로 *fluorescens*를 생성하는 균주를 선발하였으며, 또다시 이들을 대상으로 CAS(chrome azurol S) blue agar 평판배지에[14] 크고 분명한 오렌지색 환을 형성하는 균주를 분리, 선발하였다.

고추역병균 *Phytophthora capsici*의 포자 수확

*Phytophthora capsici*의 유주자(zoospore)를 회수하기 위하여서는 V8 주스와 증류수를 2:8의 조성으로 혼합한 후 CaCO₃ 0.4%와 agar 2%를 첨가한 V8 주스 한천배지에 *P. capsici*를 6 mm 크기의 disc로 접종하여 28°C에서 5일간 배양하여 plate의 가장자리까지 균사를 성장시킨 후에 도말 붓으로 기균사를 밀어주고 형광등에서 15 cm 떨어진 곳에서 빛을 쬐어주며 24시간 동안 추가 배양시켜 포자를 생성시켰으며, 여기에 멸균 생리식염수를 5 ml를 넣은 후에 멸균 붓으로 유주자를 회수하였다.

발육저지대 측정법을 통한 방제력 검증

PDA에서 식물병원균과 선발균주와 발육저지 거리를 측정하기 위하여 고추역병균 *P. capsici*를 6 mm 크기의 disc로 접종을 실시하여 28°C에서 24시간 배양한 후 3 cm 떨어진 곳에 분리된 길항세균을 백금으로 획선하여 28°C에서 계속 배양하면서 병원성 진균 *P. capsici*의 성장이 억제되는 것을 확인하였다.

균체량 측정법을 통한 방제력 검증

선발균주에 의해 발육 억제된 균체량 측정을 하기 위하여 45 ml의 PDB에 병원성 진균 *P. capsici*의 포자를 접종하였으며, 여기에 길항세균을 King's B broth에서 28°C, 48시간 미리 배양하여 10,000 × g에서 15분간 원심분리하여 균체를 제거한 후 Millipore 0.45 μm 세균여과필터로 잔존 세균을 제거한 배양여액 5 ml 첨가하여 28°C에서 72시간 진탕 배양하였으며, 이를 미리 건조시켜 중량을 측정한 Whatman No 2 여과지에 배양된 병원성 진균을 여과하여 95°C에서 항량이 될 때까지 건조시켜 증가된 중량을 측정하여 억제력을 검증하였다.

항생물질 생산성 길항균주의 선발

항생물질 생산성 길항균주의 선발을 하기 위해 항생물질 생산성 토착균주로 분리된 세균들을 대상으로 해서 그들의 배양원천액을 Amicon Centriprep 10[®] (MW 10,000)에 의해 수집한 저분자물질의 길항력을 고추역병균 *P. capsici*를 이용해 paring culture test, cell mass test 등으로 조사하여 선발하였다. 또한 항생물질중 많은 것이 내열성이므로 분리된 길항세균의 배양상징액을 80°C에서 30분간 열처리한 후의 길항력도 cell mass test로 조사하였으며, 아울러 대부분의 항생물질이 butanol 등 비극성 용매에 용출되는 지용성임을 감안하여 butanol로 추출한 후, 그 길항력을 cell mass test로 조사하였다.

Siderophore 생산성 길항균주의 선발

항생물질생산성 길항균주 중 siderophore 생산성 토착길항균주의 선발을 위하여 SM배지와 CAS배지를 이용하여 분리하였고 이들 균주를 대상으로 다시 CAS liquid assay [14]에 의해 siderophore 활성에 따른 CAS의 탈색율과 Arnow phenolic assay[2]와 Csaky hydroxamate assay[4]에 의한 siderophore 활성도 측정법을 이용하여 siderophore 생산능이 가장 우수한 균주를 최종 선발하였다.

토착길항균주의 동정

토착길항균주의 분류학적 동정을 위해 API[®] test (bio Merieux)와 Biolog사의 동정시스템(MicroLog[™] 3), 지방산 분석 그리고 각종 생화학적 성상검사를 하였고, 투시형 전자현미경(transmission electron microscope, TEM)으로 그 형태를 관찰하였다. 이를 바탕으로 Bergey's manual of determinative bacteriology[6]색인을 이용하여 최종 동정하였다.

항균활성물질의 생산 및 활성조사

길항세균 *Pseudomonas* sp. 2112 로 부터 항진균성 항균활성물질을 얻기 위하여 King's B broth에 균을 접종한 뒤 28°C에서 3일간 180 rpm에서 진탕배양 하였다. 이를

8,000 × g에서 20분간 원심분리하여 원침상등액을 회수하였으며, 이 원침상등액을 항진균 활성검사에 사용하였다.

길항물질의 항균활성은 여지 disc 방법으로 조사하였다. 즉, PDA 배지에 *P. capsici*의 포자를 도달한 후, 직경 6 mm disc에 100°C 에서 10분간 살균한 항균활성분획을 침적시켜 28°C에서 2~4일간 배양하면서 *P. capsici*의 균사생장을 억제하는 disc 주위의 항진균성 억제환의 유무로 조사하였다.

항진균성 항생물질 생산에 미치는 탄소원의 영향

K₂HPO₄ 0.7%, KH₂PO₄ 0.2%, Glucose 0.5%, (NH₄)₂SO₄ 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.01% 의 조성으로 이루어진 최소영양배지에 glucose를 제외시키고 10종의 탄소원을 1.0%씩 첨가하여 30°C에서 3일간 균을 배양한 후, 그 원침배양상등액을 이용하여 균체량 측정법에 따라 항진균 활성도를 조사하였다.

항진균성 항생물질 생산에 미치는 질소원의 영향

상기 최소영양배지에 ammonium sulfate를 제외시키고 앞의 결과에서 선택된 탄소원을 최적 농도로 넣어준 후 13종의 무기 및 유기 질소원을 0.5%씩 첨가하여 탄소원의 경우와 동일한 방법으로 항생물질 생산에 대한 영향을 조사하였다.

항진균성 항생물질 생산에 미치는 무기염의 영향

무기염을 제외한 상기 최소영양배지에 앞서 결정된 탄소원과 질소원을 최적의 농도로 첨가한 후 12종의 무기염(salt)을 5 mM 농도로 넣어주어 항진균성 항생물질 생산에 미치는 영향을 조사하였다.

길항균주의 in vivo 방제력 검증

선발된 길항세균이 실제 토양에서 식물병원균에 방제력을 발휘하는지 여부를 검증하기 위하여 고추(*Capsicum annuum*)를 대상 기주식물로 하여 그 방제력 검증을 실시하였으며, 상토로 발효·퇴비·모래를 2:1:1로 섞은 것을 사용하였다. 28°C, 70% 습도를 유지한 항온항습실에서 3엽기의 고추묘를 직경 15 cm pot에 이식하여 3일간 정착시킨 후, 미리 V8 주스 한천배지에서 배양·형성시킨 *Phytophthora capsici*의 유주자를 회수하여 350개/ml의 유주자를 5 ml 관주 접종한 후, 1일간 습실처리(28°C, 습도70%)하고 여기에 선발된 방제균을 6.0 × 10⁸/ml의 균수로 5 ml 처리하여 하루동안 더 습실배양하였다. 이를 28°C, 70% 항온항습실에서 키우면서 주기적으로 발병을 확인하였으며, 이때 대조구로 방제균 무처리구와 비교하여 고추역병의 발병억제력을 확인하였다.

결과 및 고찰

균주선발 및 배양

경주지역의 자연농업 수행 저병해 경작지 토양에서 분리된 토착세균을 대상으로 *Pseudomonas*속 분리 배지인 *Pseudomonas* isolation agar(PIA)배지를 이용하여 *Pseudomonas* 속을 120여종 분리할 수 있었고, 이들을 대상으로 고추역병균 *Phytophthora capsici*와 대치배양과 발육균체량 측정법을 실시하여 고추역병균에 길항하는 생물방제균주를 분리하였다. 이중 고추역병균 *P. capsici*에 대해 강력한 발육저지대를 형성하는 10주의 생물방제세균들을 분리할 수 있었으며, 또한 이들 중 많은 균류가 sucrose minimal agar (SMA)배지에서 fluorescence의 생성력을 확인 할 수가 있었다. 이들을 대상으로 siderophore 검출용 CAS배지에서 siderophore를 강력히 생성하는 균주를 최종 분리하였는데 그 중 큰 오렌지색의 변색환을 생성하고 고추역병균 *Phytophthora capsici*에 가장 큰 길항력을 가지는 토착길항균주 *Pseudomonas* sp. 2112를 최종 선발할 수 있었다. (Fig. 1, 2, Table 1).

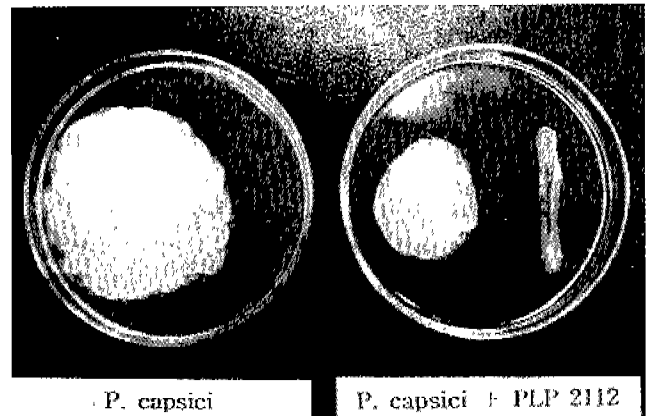


Fig. 1. Inhibition of the growth of *Phytophthora capsici* by *Pseudomonas* sp. 2112 by pairing culture on PDA.

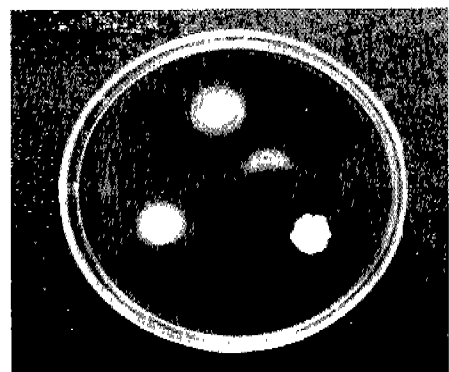


Fig. 2. Orange halo formation by the siderophore of *Pseudomonas* sp. 2112 in CAS medium. S: *Pseudomonas* sp. 2112, two bottoms: control (left: positive, right: negative).

Table 1. Selection of indigenous antagonistic microorganism against *Phytophthora capsici*

Strain	Pairing distance(mm)	Siderophore production(mm)*	Cell mass inhibition (%)**
BLP-3034	6	0	72.7
BLP-5057	7	0	84.2
BLP-8117	6	0	87.5
BLP-4045	5	0	64.8
PLP-5042	8	5	56.5
PLP-6036	3	13	85.4
PLP-4059	5	9	75.4
PLP-2071	6	11	85.4
PLP-5046	1	7	68.1
PLP-2112	9	10	89.8

*Diameter of formed halo zone by extracellular siderophore on CAS agar plate.

**5 ml of each bacteria culture fluid was added to a PDB 45 ml inoculated with *P. capsici* zoospore. Inhibition rate was determined by dry weight of fungal cell after 72 hours incubation at 28°C.

항진균성 항생물질 생산 길항균주의 동정

항생물질 생산성 길항균주로 분리, 선발된 길항균주 *Pseudomonas* sp. 2112의 동정을 위해 그람염색을 실시하여 그 형태를 관찰한 결과 그람음성의 간균으로 판별되었으며, 그 미세형태를 확인하기 위해 전자현미경으로 관찰한 결과 2-3개의 편모를 가지는 간균으로 판명되었다. 또한 각종 생화학적 성장시험과 API® test(Table 2), 지방산 분석 등의 각종 *Pseudomonas* 동정에 필요한 분석 방법을 통해 비교, 동정해 본 결과 *Pseudomonas fluorescens* biotype F에 58.3%의 근연성을 보였으며, 이를 Biolog사의 동정시스템을 이용하여 확인 동정하여 본 결과 *P. fluorescens* biotype F에 74.5%의 근연성을 보임으로 최종적으로 *P. fluorescens* biotype F 내지는 그 근연종으로 동정하였다.

P. fluorescens 2112가 생산하는 항생물질의 항진균성 고추역병균 *P. capsici*에 대해 *P. fluorescens* 2112가 생산하는 항진균성 항생물질이 포자발아를 억제하는지 아니

Table 2. Identification of the *Pseudomonas* sp. 2112 isolated as an antagonistic bacterium against *Phytophthora capsici*

Test	PLP 2112		<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	24h	48h	
Potassium nitrat	+	+	±
Typtophan	+	+	-
Glucose	-	-	-
Arginin	-	-	+
Urea	-	-	-
Esculin	+	+	+
Gelatin	+	+	±
p-nitro-phenyl-βD-galactopyranoside	-	-	-
Glucose	+	+	+
Arabinose	+	+	+
Mannose	+	+	+
Manitol	+	+	+
N-acetylglucosamine	+	+	±
Maltose	-	-	-
Gluconate	+	+	+
Caprate	+	+	+
Adipate	-	-	-
Malate	+	+	+
Citrate	+	+	+
Phenyl-acetate	-	-	-
Tetramethyl-p-phenylenediamine	+	+	+
Cell form*	Rod		Rod
Gram strain	-		-
Flagella number*	1<(polar)		1<(polar)
Endospore production	-		-
Fluorescens pigment	+		+
Identification	<i>Pseudomonas fluorescens</i>		

±: 30~60% reaction.

*Observation with transmittance electron microscopy. (TEM, 15,000 ×)

면 균사체 성장을 억제하는 현상인지 그 길항작용의 양상을 알아보기 위하여 고추역병균 *P. capsici*의 유주자(zoo-spore) 현탁액을 PDA 배지에 도달한 후 조정제된 항생물질을 침적한 disc paper를 놓았을 때에 *P. capsici*의 유주자 발아의 저지로 disc paper 주위로 생육저해환이 나타났으며 (Fig. 3), 균사체 성장억제를 확인하기 위하여 V8 주스배지를 조정제된 항생물질과 혼합 분주하여 제작한 V8 주스배지에 *P. capsici*를 6 mm 크기의 disc로 배지 중앙에 접종하여 균사의 성장도를 확인하였고(Fig. 4), 또한 PDB에 PDA 배지에서 키운 *P. capsici*를 6 mm 크기의 disc로 접종하고 여기에 조정제된 항생물질을 첨가하여 30°C에서 배양했을 때에도 disc로 접종한 disc의 균사체 성장을 볼 수가 없었다. 따라서 *P. fluorescens* 2112가 생산하는 항진균성 항생물질은 *P. capsici*의 유주자 생육과 발아과정 그리고 균사생장을 모두 저해하는 항진균성 항생물질로 확인할 수 있었다.

항진균성 항생물질 생산에 미치는 탄소원의 영향

최소영양배지에 탄소원인 glucose를 제외시키고 10종의



Fig. 3. Inhibition zone of *Phytophthora capsici* zoospore by *P. fluorescens* 2112 culture broth on PDA.

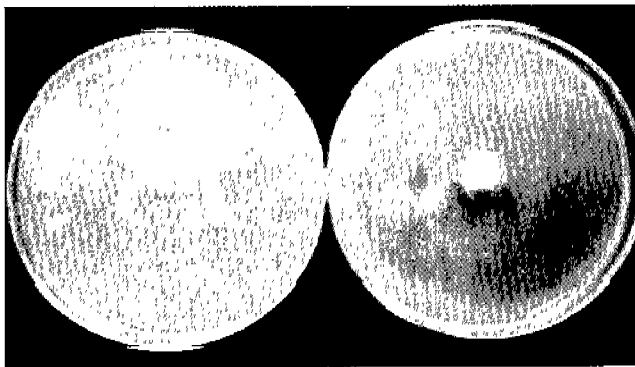


Fig. 4. Antifungal activity of the antibiotic PLP 2112 produced by *P. fluorescens* 2112 against the growth of *Phytophthora capsici* hyphae. Left dish: *P. capsici* plug on the V8 medium without antibiotic, Right dish: *P. capsici* plug on the V8 medium with antibiotic.

탄소원을 1.0%씩 첨가하여 30°C에서 3일간 *P. fluorescens* 2112를 배양한 후 그 원침상등액을 이용하여 발육균체량 측정법에 따라 항진균 활성을 조사하여 본 결과 Table 3에서 볼 수 있는바와 같이 항진균 활성과 길항세균의 성장 모두 glycerol이 가장 좋은 효과를 보였다. 이는 *Pseudomonas* 속의 최적배지인 King's B배지의 성분과 동일한 것으로 glycerol이 *Pseudomonas* 속의 성장과 항생물질 생산에 필요한 탄소원으로 필수적인 탄소성분임을 추정할 수 있었다.

항진균성 항생물질 생산에 미치는 질소원의 영향

최소영양배지에 질소원인 ammonium sulfate를 제외시키

Table 3. Effect of carbon sources for the production of antibiotic substance from *Pseudomonas fluorescens* 2112

Carbon source*	Cell growth (Cell/ml)	Inhibition rate(%)
Sodium citrate	5.10×10^7	100.0
Arabinose	6.59×10^8	77.5
Saccharose	7.64×10^8	281.8
Glycerol	8.18×10^8	516.7
Glucose	6.39×10^8	155.0
Ramirarin	6.32×10^7	193.8
Galactose	6.63×10^8	67.4
Xylose	7.65×10^8	238.5
Lactose	6.09×10^7	124.0
Maltose	6.27×10^7	155.0
Fructose	6.91×10^8	182.4

*Carbon sources(1.0%) were added to the basal medium [K_2HPO_4 0.7%, KH_2PO_4 0.2%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01% and sodium citrate 0.05% pH7.0] and then *P. fluorescens* 2112 was cultivated for 3 days at 30°C.

Table 4. Effect of nitrogen sources condition for the production of antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* 2112

Nitrogen source*	Cell growth (Cell/ml)	Inhibition rate(%)
$(NH_4)_2SO_4$	3.37×10^8	100.0
Urea	2.55×10^8	72.0
Bacto peptone	5.39×10^8	54.5
$NH_4H_2PO_4$	3.42×10^8	69.2
Malt extract	2.52×10^8	94.7
KNO_3	3.03×10^8	78.3
Beef extract	4.69×10^8	180.0
$NaNO_3$	2.97×10^7	150.0
Yeast extract	9.27×10^8	180.0
$(NH_4)_2S_2O_8$	7.67×10^6	43.9
Tryptone	7.85×10^8	257.1
Proteose peptone NO.3	8.18×10^8	62.1
$(NH_4)_2HPO_4$	2.78×10^8	58.1

*Nitrogen source(0.1%) were added to the medium [K_2HPO_4 0.7%, KH_2PO_4 0.2%, sodium citrate 0.05%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01% and glycerol 1.0%, pH7.0] and then *P. fluorescens* 2112 was cultivated for 3 days at 30°C.

Table 5. Effect of salts on the production of antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* 2112

Mineral salts*	Cell growth (Cell/ml)	Inhibition rate(%)
None	3.46×10^8	100
FeCl ₂	7.41×10^8	242.9
BaCl ₂	2.34×10^8	130.8
RbCl	7.34×10^8	89.5
Na ₂ HPO ₄	5.29×10^8	154.5
CaCO ₃	6.35×10^8	51.5
ZnSO ₄	2.01×10^8	56.7
MgCl ₂	9.38×10^8	283.3
KCl	3.38×10^8	141.7
LiCl	3.65×10^8	340.0
K ₂ HPO ₄	5.73×10^8	130.8
NaCl	9.97×10^8	94.4
CaCl ₂	2.61×10^8	42.5

*Mineral salts(5 mM) were added to the medium [Yeast extract 0.5%, sodium citrate 0.05% and glycerol 1.0%, pH7.0] and then *P. fluorescens* 2112 was cultivated for 3 days at 30°C.

고 탄소원으로 glycerol을 넣어준 후 13종의 무기 및 유기 질소원을 0.5%씩 첨가하여 탄소원의 경우와 동일한 방법으로 항생물질 생산에 대한 영향을 조사하였다. 그 결과 Table 4에서 볼 수 있는 것과 같이 beef extract, NaNO₃, yeast extract, tryptone, proteose peptone 등에서 ammonium sulfate 경우 보다 1.5배 이상의 항진균 활성을 나타내었으며, *Pseudomonas* 속의 최적배지인 King's B배지의 성분인 proteose peptone에서 높은 항진균 활성과 균체 성장률을 나타내었으나 tryptone에 의해서는 항진균성 항생물질 생성이 약 3배 더 좋은 효과를 보이는 점은 주목 할만 하다.

항진균성 항생물질 생산에 미치는 무기염의 영향

무기염을 제외한 최소영양배지에 앞서 결정된 탄소원과 질소원을 각각 첨가한 후 12종의 무기염을 5.0 mM 농도로 넣어주어 항진균성 항생물질 생산에 미치는 영향을 조사하여 본 결과 Table 5에서 볼 수 있는바와 같이 항진균 활성과 길항세균의 성장에 있어 FeCl₂, LiCl 그리고 MgCl₂가 가장 좋은 효과를 보였다. 특히 LiCl는 다른 무기염에 비해 길항세균의 성장률은 절반정도이지만 탁월한 길항력을 보임으로써 LiCl가 생산 유도에 촉진적인 작용을 하는 것으로 추정한다.

***In vivo* pot test를 통한 길항작용 검증**

항진균성 항생물질 생산성 길항균주 *P. fluorescens* 2112가 실제 토양에서 식물병원균에 방제력을 발휘하는지 여부를 검증하기 위하여 고추를 대상 기주식물로 *in vivo* test를 실시하였으며, 28°C, 70% 습도를 유지한 항온항습실에서 기주식물 고추가 이식되어 있는 pot에, 미리 V8 주스배지에서 배양하여 수집한 *P. capsici*의 유주자를 회수하여 판

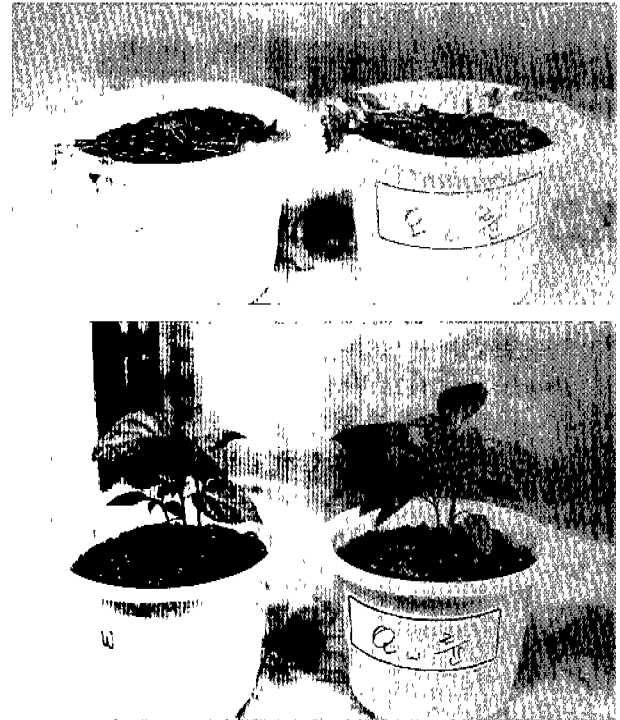


Fig. 5. *In vivo* antifungal activity of *P. fluorescens* 2112 on the growth of red pepper(*Capsicum annum* L.). Upper: Only *Phytophthora capsici* infected, Lower: *Phytophthora capsici* + *P. fluorescens* 2112.

주 접종한 후, 1일간 습실처리(28°C, 습도70%)하고 여기에 선발된 방제균 *P. fluorescens* 2112를 처리하여 하루동안 더 습실배양하였다. 이를 28°C, 70% 항온항습실에서 키우면서 주기적으로 발병을 확인한 결과 Fig. 5에서 볼 수 있는 바와 같이 고추역병균 *P. capsici*에 탁월한 방제력을 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

요 약

우리 지역 토양환경에 장기간 적응하며 살고 있는 토착 길항균주를 분리·선발·육종하고 다시 지역토양으로 돌려줄 때 그 우점 능력이 크고 길항력이 큰 생물방제균을 선발하고자 경북 경주지역에서 토착길항균주를 이용하여 자연능법을 수행하고 있는 저병해 경작지로부터 토착길항균주를 분리하고, 이들 중에서 대상으로 고추역병균 *Phytophthora capsici*와 *in vitro* test를 실시하여 고추역병균의 생육을 강력히 억제하는 길항세균을 분리하였다. 또한 이들을 대상으로 siderophore를 동시에 생산할 수 있는 복수 길항기작의 토착길항세균 PLP 2112를 최종 선발할 수 있었다.

선발된 길항균주 PLP 2112의 분류학적으로 동정을 위해 각종 생화학적 성장시험과 API® test, 지방산 분석 등의 각종 동정에 필요한 분석 방법을 통해 동정해 본 결과 *Pseudo-*

monas fluorescens biotype F에 58.3%의 근연성을 보였으며, 이를 Biolog사의 동정시스템을 이용하여 확인 동정하여 본 결과 *P. fluorescens* biotype F에 74.5%의 근연성을 보임으로 최종적으로 *P. fluorescens* biotype F 내지는 그 근연종으로 동정하였다.

P. fluorescens 2112가 생산하는 항진균성 항생물질과 siderophore의 *P. capsici*의 포자생육과 발아과정 그리고 균사생장에 대한 억제력을 검토한 결과, 두 기능 모두를 저해하는 근본적이고 본질적인 방제능력을 발휘하는 항진균성 항생기작으로 추정할 수 있었다.

P. fluorescens 2112로부터 항진균성 항생물질의 최적생산 조건조사를 조사하여 본 결과 탄소원으로 glyceroli, 질소원은 균의 성장률에 따른 항진균 활성을 볼 때 beef extract가 가장 좋은 효과를 보였으며, 무기염의 경우 LiCl, MgCl₂ 그리고 siderophore와 관련이 있는 FeCl₂ 에서 높은 활성을 보였는데 특히 LiCl은 다른 무기염에 비해 절반의 길항세균의 성장이지만 탁월한 길항력을 보임으로써 LiCl가 항진균 물질의 생산 유도에 촉진적인 작용을 하는 것으로 보인다.

또한 고추를 이용한 *in vivo* pot test를 통해 *P. fluorescens* 2112가 실제 토양에서 고추역병균 *P. capsici*에 대한 탁월한 방제력을 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

감사의 글

본 논문은 1995년도 농림부 농림특정연구과제의 연구비 지원에 의하여 수행된 결과의 일부이며, 연구비 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Arima, K., H. Imanaka, M. Kousaka, A. Fukuta, and G. Tamura. 1964. Pyrrolnitrin, a new antibiotic substance, produced by *Pseudomonas*. *Agric. Biol. Chem.* **28**: 575-576.
2. Arnow, L. E. 1937. Colorimetric determination of the components of 3,4-dihydroxyphenylalanine-tyrosine mixtures. *J. Biol. Chem.* **118**: 531-537.
3. Brian, P. W., J. M. Wright, J. Stubbs, and A. M. Way. 1951. Uptake of antibiotic metabolites of soil microorganisms by plant. *Nature.* **167**: 347-349.
4. Csaky, T. 1948. On the estimation of bound hydroxylamine. *Acta Chem. Scand.* **2**: 450-454.
5. Gregory, K. F., O. N. Allen, A. J. Riker, and W. H. Peterson. 1952. Antibiotics as agents for the control of certain damping-off fungi. *Am. J. Botany.* **9**: 405-415.
6. Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley, S. T. Williams. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th., Williams Wilkins, U.S.A.
7. Kim, Y. S., and S. D. Kim. 1994. Antifungal mechanism and properties of antibiotic substances produced by *Bacillus subtilis* YB-70 as a biocontrol agent. *J. Microbiol. Biotech.* **4**: 296-304.
8. Lee, E. T. and S. D. Kim. 1998. Biological control of phytopathogenic fungi by the genetic breeding of indigenous antagonistic microorganisms. *The report of reserch for the development of agricultural technology*, The Ministry of Agriculture and Forestry, Korea.
9. Lee E. T. and S. D. Kim. 1999. Urification and characterization of antifungal chitinas from indigenous antagonistic Microorganism *Serratia* sp. 3095. *Agri. Chem. Biotechnol.* **42**: 7-11.
10. Lee E. T. and S. D. Kim. 1999. Isolation and antifungal activity of the chitinase producing bacterium *Serratia* sp. 3095 as Antagonistic Bacterium against *Fusarium* sp. *Agri. Chem. Biotechnol.* **42**: 181-187.
11. Leoffler, W., J.S.M. Tschén, N. Vanittanakom, M. Kugler, E. Knorpp, T.F. Hsieh, and T.G. Wu. 1986. Antifungal effects of bacilysin and fengymycin from *Bacillus subtilis* F-29-3: a comparison with activities of other *Bacillus* antibiotics. *J. Phytopathol.* **115**: 204-213.
12. Paulitz, T. C., and J. E. Loper. 1991. Lack of a role for fluorescent siderophore production in the biological control of *Phythium* damping-off of cucumber by a strain of *Pseudomonas putida*. *Phytopathol.* **81**: 930-935.
13. Schlumbaum, A., F. Mauch, U. Vogeli and T. Boker. 1986. Plant chitinase are potent inhibitors of fungal growth. *Nature.* **324**: 367-367.
14. Schwyn, B., and J. B. Neilands. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* **160**: 47-56.
15. Takeuchi, S., K. Hirayama, K. Ueda, H. Sasaki, and H. Yonehara. 1958. Blastidicin S, a new antibiotic. *J. Antibiot.* **11**: 1-5.

(Received November 3, 2000)