

## 대파 뿌리로부터 흑색썩음균핵병균에 길항하는 *Serratia plymuthica* AL-1의 분리 및 Chitinase의 생산

주길재\* · 이익희<sup>1</sup> · 김진호<sup>1</sup>  
경북대학교 농화학과, <sup>1</sup>상주대학교 식물자원학과

**Chitinase Production and Isolation of *Serratia plymuthica* AL-1 Antagonistic to White Rot Fungi from *Allium fistulosum* Roots. Joo, Gil Jae\*, Ig Hee Lee<sup>1</sup>, and Jin Ho Kim<sup>1</sup>.** Department of Agricultural Chemistry, Kyungpook Nat'l Univ., Taegu 702-701, Korea, <sup>1</sup>Department of Plant Resources, Sangju Nat'l Univ., Sangju 742-711, Korea - This study was carried out to isolate antagonistic bacterium against *Sclerotium cepivorum* causing *Allium fistulosum* white rot. Total of 146 strains were isolated from *A. fistulosum* roots. The isolates were screened for antagonism to *S. cepivorum* and the isolated strain No. AL-1 was selected among these bacteria. It was identified as *Serratia plymuthica* based on morphological and physiological characteristics according to the Bergey's manual of systematic bacteriology and 16S rDNA sequences methods. *Serratia plymuthica* AL-1 showed broad spectrum of antifungal activities against plant pathogenic fungi *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gleosporioides*, *Phoma* sp., *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Stemphylium solani*, *Fusarium oxysporium niveum* but not inhibited *Didymella bryoniae*. When *S. plymuthica* AL-1 cultivated in the TSB medium containing 1% colloidal chitin, the high molecular fraction (>10 kDa) have chitinase activity (3.2 units/ml) and the low molecular fraction (<10 kDa) have not chitinase activity. Oppositely, after heat treatment (80°C for 30 min) of the cultivation supernatant, the high molecular fractions have not antifungal activity but the low molecular fractions have antifungal activity.

**Key words:** *Allium fistulosum*, *Sclerotium cepivorum*, *Serratia plymuthica*, antagonistic bacterium, white rot

식물 뿌리는 타감물질(allelochemicals) 및 근권미생물의 먹이가 되는 여러 가지 유기물질들을 배출하며, 물질의 종류와 양은 식물의 종류, 연령, 온도, 광, 식물의 영양상태, 미생물 및 토양습도 등에 의해 크게 좌우되는 것으로 알려져 있다[3,19,25]. 이러한 물질들은 주로 뿌리의 선단부 근관에서 만드는 점액초(mucigel sheath)의 가용물과 근모에서 배출되는 액체방울, 그리고 세포 가용성 분비물, 세포벽의 노화로 인하여 생성되는 박리편, 미생물에 의해 피층 세포로부터 분리된 물질 등에 존재하는 것으로 알려져 있다[27].

파속(*Allium* sp.)의 식물들도 vanillic acid와 수용성 alkyl cysteine sulphoxides 등 타감물질이나 다양한 유기물질들을 분비하며, 특히 vanillic acid는 lignin 분해 중간대사산물로서 호밀, 귀리, 사탕수수, 옥수수, 담배, 고구마, 파인애플 및 바나나 재배 토양에서 타감작용을 유도하는 물질로서 많이 관찰되며, 연작한 국화의 생육을 억제시킨 것으로 확인되었다[31]. 파속식물의 수용성 alkyl cysteine sulphoxides는 흙 속에 확산되어 토양 미생물에 의해 휘발

성 alkyl sulphides로 변환되며, 이것이 파 흑색썩음균핵병균인 *Sclerotium cepivorum*의 균핵에 강한 발아유도 작용을 하므로써 파속식물의 근부 환경에 우점하게 되어 흑색썩음균핵병(white rot)을 유발시키는 것으로 보고되었다[28]. 따라서 파속 식물의 근권에는 이러한 vanillic acid와 수용성 alkyl cysteine sulphoxides 등에 저항성 있는 근권미생물만이 서식하고 있다.

식물 토양병해의 경종적 방제기술로는 파와 박을 혼식하므로써 병해를 방제하는 경우와 파·부추 혼식에 의한 토마토 시들음병을 방제하는 경우처럼 파·부추에 정착하는 근권 미생물은 토마토의 뿌리에는 정착하지 못하지만 파와 토마토 혼식에 의해 파의 뿌리에 존재하는 미생물을 토마토의 근권에 서식할 수 있도록 함으로써 병이 방제되는 경우가 있다[27]. 이처럼 대상식물 근권에 길항미생물을 정착시키려면 외래 유용미생물을 묘상이나 작물의 심는 부위에 집중적으로 투입하는 것도 중요하지만 투입되는 외래 유용미생물이 대상 작물이 생산하는 타감물질이나 유기물질에 의해 대부분 사멸되거나 생육에 어려움을 겪게되므로 올바른 미생물의 효과를 볼 수가 없는 것이 사실이다. 그러므로 대상작물의 근권에 도착화되어 있거나 우점화되어 서식하는 근권 길항미생물을 직접 분리하고 이들 근권미생물을 다시 재 투입하면 대상식물에 친화성을 가지고 있기 때문에

\*Corresponding author  
Tel. 82-53-950-6854, Fax. 82-53-950-6853  
E-mail: gjjoo@knu.ac.kr

미생물학적 병해방제 적용에 더욱 유리할 것이다.

따라서 본 연구는 파속 작물의 뿌리에서 주로 발생하는 흑색썩음균핵병을 미생물학적으로 방제하기 위한 실험의 일환으로 먼저 대파(*Allium fistulosum*)의 흑색썩음균핵병균 *S. cepivorum*에 길항하는 항진균성 길항미생물을 대파의 뿌리에서 분리하여 동정하고 chitinase 및 생리활성물질 생산능을 조사하였기에 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 병원성 곰팡이

본 실험에 사용한 대파의 흑색썩음균핵병균(*Sclerotium cepivorum*)은 농촌진흥청 식물병리과에서 분양 받았으며, 이 병원균은 5~20°C에서 생육이 가능한 저온 병원성 곰팡이로서 potato dextrose agar(PDA, Difco Co.)배지에 20°C 이하에서 배양하여 균핵을 형성시킨 후 이를 수집하여 4°C에 보관하며 실험에 사용하였다. 그 외 각종 병원성 진균으로 고추 검은무늬병균(*Alternaria altrata*), 고추 탄저병균(*Colletotrichum gleosporioides*), 도라지 줄기마름병균(*Phoma* sp.), 고추 갈록병균(*Rhizoctonia solani*), 고추 흰별무의병균(*Stemphlium solani*), 오이 균핵병균(*Sclerotinia sclerotiorum*), 수박 덩굴썩김병(*Fusarium oxysporium niveum*), 참외 만고병균(*Didymella bryoniae*) 등을 사용하였으며, 이들 병원성 곰팡이들은 농촌진흥청과 KCTC(유전자은행) 등에서 분양받아 PDA 배지에 28°C에서 배양하여 4°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

### 근권미생물의 분리

대파 뿌리에 서식하는 근권미생물을 분리하기 위해 대구 인근 칠곡, 영천, 고령, 성주 등지에서 대파 뿌리 시료를 채취하여 살균 증류수로 수회 세척하고 작게 조각낸 다음 살균된 0.85% NaCl 용액에 넣고 homogenizer로 2분간 마쇄하여 원심분리한 후 그 상등액을 균원시료로 사용하였다. 상기 균원시료 1 ml를 0.85% NaCl 용액으로 3단 희석한 뒤 세균은 nutrient agar(NA) 및 tryptic soy agar(TSA) 배지, 방선균은 yeast extract-malt extract agar(YMA)배지에 0.4% sodium propionate와 25 mg/l nalicidic acid를 첨가하여 사용하였고, 곰팡이는 PDA 배지를 사용하여 각각의 배지에 상기 균원시료 용액을 100 µl씩 도말하고 세균은 20°C에서 3일간, 방선균은 30°C에서 5일간, 곰팡이는 28°C에서 7일간 incubator에서 배양하여 각각의 colony 형태 및 색깔, 냄새 등으로 1차 분류하고 광학현미경으로 형태학적 세균, 방선균, 곰팡이로 2차 분리하여 실험에 사용하였다. Chitin 분해력을 가진 균주를 확인하기 위해 각각의 균들 선택 배지에 1%의 colloidal chitin을 첨가하고 배양한 후 chitin 분해능을 확인하였다.

### 길항력조사

저온 병원성 진균인 흑색썩음균핵병균 *S. cepivorum*에 길항하는 미생물의 선발은 분리균과 병원균을 대치배양(pairing plate culture)하여 생육억제환의 크기로 선발하였다. PDA 배지에서 키운 병원균체 덩어리를 1% colloidal chitin을 첨가한 PDA 배지 중앙에 올려놓고 가장자리 4곳에 순수분리한 미생물을 한 백금이씩 접종하여 15°C에서 7~10일간 배양한 후 병원균의 균사체의 생장억제 정도(inhibition zone)를 조사하여 생성된 clear zone의 길이로 길항력을 조사하였다. 그 외 각종 병원성 진균은 상기와 동일한 방법으로 접종하여 28°C에서 배양한 후 길항력을 조사하였다.

### 세균의 동정

길항미생물의 동정은 2가지 방법으로 행하였다. 먼저 The procaryotes[8] 및 Bergey's manual of systematic bacteriology의 방법[21]에 준하여 미생물의 형태학적, 배양학적, 생리·생화학적 특성을 조사하며, 두번째는 16S rDNA sequence 법[10]으로 동정하였다. 이때 PCR primer는 R14(5'-ACg ggC ggT gTg TAC-3')와 R15(5'-gCC AgC AgC CgC ggT A-3')를 이용하였고 sequencing data는 ribosomal database(<http://rdp.cme.msu.edu/html/analyses.html>)에서 상동성을 검색하여 동정하였다.

### Colloidal chitin의 조제 및 chitinase의 활성측정

Crude chitin(Sigma Co., C-7170) 100 g에 cold conc. HCl 2 l를 가하여 4°C에서 12시간 교반한 후, 95% cold ethanol 2 l를 가하여 생성된 colloidal chitin을 6,000 × g에서 10분간 원심분리(Beckman Co., L8-55M)하여 회수하고 증류수로 희석한 후 5 N NaOH로 pH를 중화시키고 증류수로 수회 세척하여 회수된 colloidal chitin을 건조하여 효소의 기질로 사용하였다. Chitinase 활성측정은 인산완충액(0.05 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer, pH 7.5)에 colloidal chitin을 0.5%로 현탁시킨 기질용액 0.5 ml에 인산완충액 1 ml을 넣은 후 효소액 0.2 ml를 첨가하여 45°C에서 1시간 30분 동안 반응시킨 후 DNS(dinitrosacylic acid)법[15]으로 환원당량을 측정하였다. 효소활성 1 unit는 시간당 colloidal chitin으로부터 1 µmol의 N-acethyl-glucosamine을 생성시키는 효소량으로 환산하였다.

### 길항균의 길항물질 조사

길항균의 길항 방제기작을 조사하기 위하여 먼저 1% colloidal chitin을 첨가하거나 또는 첨가하지 않은 TSB 배지에 종균을 접종하여 5, 10, 15, 20°C에서 온도별로 각각 배양하고 항균활성을 조사하거나 배양상등액을 YM10(Amicon Co.) membrane으로 분자량 10,000 dalton을 기준으로 여과한 후 각각의 분획의 항균활성을 조사하였으며,

또한 배양 상등액을 80°C에서 30분간 열처리하여 잔존 길항력을 조사하였다.

**결과 및 고찰**

**대파 뿌리에 서식하는 근권미생물의 분리**

대파의 근권미생물은 대파 뿌리를 균원시료로 하여 각각 선택배지 등에서 배양시킨 후 colony의 형태, 색깔, 냄새 등이 서로 다른 양상의 colony를 확보하여 광학현미경으로 관찰하여 분리한 결과, 세균 98종(AL로 표기), 방선균은 33종(GL로 표기), 곰팡이는 15종(DL로 표기)등 총 146종의 근권미생물을 분리하였다. 이들 146종의 분리 미생물을 1% colloidal chitin이 함유된 각각의 선택 고체배지에서 배양한 결과, 세균은 12종, 방선균은 2종이 chitin을 분해하였고 특히 분리주 No. AL-32, AL-1, GL-14 등이 clear zone을 나타내었다. 또한 분리주 AL-32과 AL-1은 4°C에서도 생육이 가능하였고 37°C에서는 자라지 않았다.

일반적으로 대파, 양파, 마늘 등 파속식물은 비교적 저온에서 생육하는 작물이므로 이들 작물에 병해의 미생물학적 방제를 위해서는 우선 저온에서 생육이 가능한 저온미생물이 유리할 것으로 판단하여 균 분리부터 20°C 이하 저온에서 배양하여 자라는 균을 선별하였다.

**대파 흑색썩음균핵병균에 길항하는 미생물의 선별**

대파 근권미생물 146종을 이용하여 대파 흑색썩음균핵병균인 *Sclerotium cepivorum*(Fig. 1A)에 길항하는 미생물을 선별한 결과, 길항미생물의 수가 지역별로 비슷한 양상을 나타내었으며, 세균은 총 51종이 길항력을 나타내었고 이들 중에서는 AL-1 균주가 15 mm(clear zone size, Fig. 1B)로 길항력이 가장 우수하였고, AL-8(13 mm), AL-32(12 mm), AL-48(10 mm) 순으로 길항성을 나타내었으며, 방선균은 총 9종이 길항력을 가지고 있었으며 이들중 GL-1균주가 초기 배양에서는 길항성을 나타내지 못하였으나 4일 배양후 10

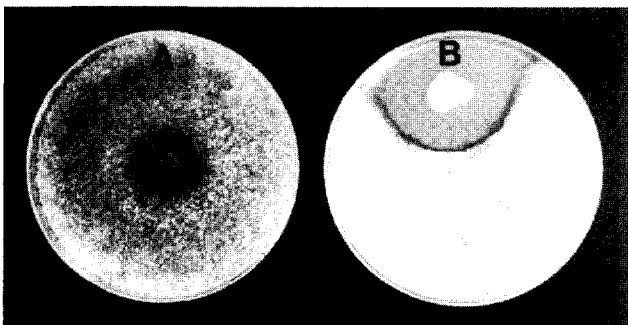


Fig. 1. Antagonistic effects of the isolated strain No. AL-1 on the growth of *Sclerotium cepivorum* as indicated by the inhibition zone formed around a colony. A, *S. cepivorum*; B, The isolated strain No. AL-1.

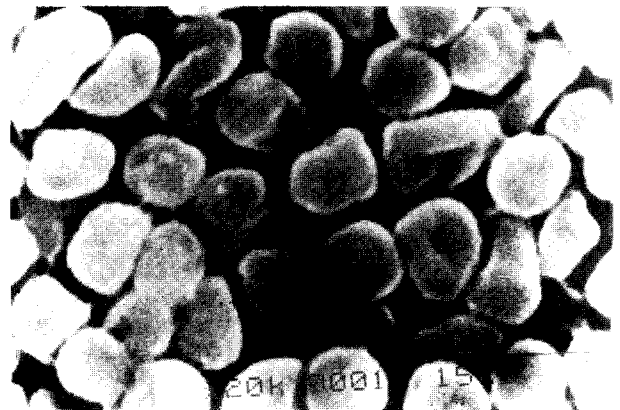


Fig. 2. Scanning electron microscopic photograph(x 15,000) of the isolated strain No. AL-1.

mm로 높은 길항성을 나타내었고, GL-7(8 mm), GL-8(7 mm) 등의 순으로 길항력을 나타내었다. 곰팡이는 5종에서 길항력을 나타내었으나 DL-4(3 mm)가 그들 중에서 비교적 약간의 길항력을 가지고 있으며, 그 외의 곰팡이는 아주 적은 길항성을 나타내었다. 따라서 대파에서 분리한 세균, 방선균, 곰팡이 등의 근권미생물 중에서 대파 흑색썩음균핵병균인 *S. cepivorum*에 가장 높은 길항력을 지닌 분리 세균 No. AL-1 균주(Fig. 2)를 공시균주로 사용하였다.

**길항균 No. AL-1의 동정 및 특성**

길항균 AL-1의 동정은 2가지 방법으로 행하였다. 먼저 The procaryotes[21]와 Bergey's manual of systematic bacteriology의 방법[8]에 준하여 미생물의 형태학적, 배양학적, 생리·생화학적 특성을 조사한 결과, Table 1에서와 같이 gram 음성 간구균으로 통성 혐기성조건에서 증식되며 주모성 편모를 가졌고 운동성이 있으며, indole 반응은 음성, V-P 반응은 양성, citrate 이용성은 양성, KCN 배지에서 발육은 부분적으로는 생육이 가능하였다. 또한 catalase test는 양성, gelatin을 액화하였고 DNase 활성을 가지고 있으며 Malonate에서는 생육이 되지 않았다. Lysine 탈탄산효소, arginine 가수분해 효소, ornithine 탈탄산효소 등은 생산하지 않았으며, glucose 배지에서 gas는 생성되지 않았고 색소도 생성되지 않았으며, haemolytic 활성은 4 mm 정도의 환을 생성시켰으며, 기타 10여종의 당 이용성 등을 조사하여 총 정리한 결과, 길항균 AL-1은 *Serratia* 속으로 판정되었다.

*Serratia* 속이나 그 유연군 중 *S. marcescens* 같은 세균은 nutrient 배지나 MacConkey 배지에서 붉은 색의 prodigiosin 색소를 생성하나 본 길항균 AL-1은 색소생성은 없었다. 특히 생화학적 조사(Table 1)에서 지금까지 알려진 *Serratia* 속 미생물 중에서 *S. plymuthica*와 가장 근접한 결과를 나타내었다.

두번째는 길항미생물 AL-1의 16S rDNA의 부분염기서열

**Table 1. Characteristics of the isolated strains No. AL-1 isolated as an antagonistic bacterium against *Sclerotium cepivorum*.**

Characteristics	AL-1	<i>S. marcescens</i>	<i>S. fonticola</i>	<i>S. plymuthica</i>
Morphological characterization				
Form	Rod	Rod	Rod	Rod
Gram stain	-	-	-	-
Motility	+	+	+	+
Physiological characterization				
Indole production	-	-	-	-
V-P reaction	+	+	+	+
Citrate	+	+	+	+
KCN growth	d	+	+	d
Gelatin liquefaction	+	+	+	d
DNase	+	+	+	+
Malonate	-	-	-	-
Lysine decarboxylase	-	+	-	-
Arginine dehydrogenase	-	-	-	-
Ornithine decarboxylase	-	+	-	-
Gas from glucose	+	+	-	d
Carbohydrate degradation				
Arabinose	+	-	+	+
Raffinose	+	-	+	+
Lactose	-	-	-	d
Rhamnose	-	-	+	-
Cellobiose	+	-	+	+
Erythritol	-	db	+	-
Ketoglutarate	-	d	db	-
Pigment production	-	d	-	-
Good growth at 4°C	+	-	+	+

Symbol : +, 90% or more positive; -, 10% or less positive; d, 11~89% positive; db, different reactions in different taxa.

5'CTGCATTAAACTGGCAAGNTAGATTNTGTAGAGGGGGGTANCA  
GGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATNTGNAGGAATACCGGTGGCGAAGG  
CGGCCCTTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAA  
ACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCTGTAACAGATGTCGATTTGGA  
GGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCG  
CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCC  
CGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCT  
TACCTACTTTGACATCCAGAGCTAGAGATAGCTTAGTGCCCTC  
GGGAACCTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGTGAA  
ATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATCCTTTGTTGCCAG  
CGAATTCGGTCGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAG  
GTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACG  
TGCTACAATGGCGTATACAAAGAGAAGCGAACTGGGAGAGCAAGCGGAC  
CTCATAAAGTACGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATG  
AAGTCGGAATCGCTAGTATCGTAGAATCAAAAATGNTACGGTGAGNACGT  
ACCANNACCGTNNGGTAGGNNNTNC 3'

**Fig. 3. 16S rDNA partial sequence (767 bp) of the isolated strain No. AL-1.** The PCR primer was R14 (5'-ACg ggC ggT gTg TAC-3') and R15 (5'-gCC AgC AgC CgC ggT A-3'). EcoR1 and Xho1 enzyme sites are shown in boxes.

을 결정한 결과, Fig. 3에서와 같이 767 bp의 염기서열이 결정되었고, Table 2에서와 같이 ribosomal database에서

상동성을 검색한 결과, *Serratia plymuthica*(유사도 93.2%)로 동정 되었다.

따라서 상기 2가지 방법에서의 결과를 종합하여 분리주 AL-1은 *Serratia plymuthica*이거나 그 유연균으로 동정되어 *Serratia plymuthica* AL-1으로 명명하였다.

*Serratia* 속은 *Serratia marcescens*, *S. liquefaciens*, *S. rubidaea*, *S. ficaria*, *S. adorifera*, *S. grimesii* 등이 있으나 이들은 폐렴, 폐회농증, 패혈증, 요로감염증, 수막염, 복막염, 창상 감염 등의 많은 감염증을 일으키는 것이 밝혀져 병원균으로 주목되고 있다. *S. plymuthica*는 밀, 귀리, 오이, 옥수수, 유지식물박, 토마토 등의 근권에서 분리되었으며[1,2,7], 지금까지 사람에게 심각한 병을 일으키는 병원성 미생물로는 인식되지 않으나 생선가공 공장[11]의 오염 미생물로 또는 콘택트 렌즈[14]를 오염시키는 미생물로 보고되었다. *S. plymuthica*는 농업에서 식물뿌리에 친화적인 미생물이므로 병원성 곰팡이의 생물학적 방제에 이용하려는 연구도 진행되고 있다[5,9,20]. 또한 *S. plymuthica*는 histamine [11]과 sucrose isomerase를 생성[24,25] 한다고 보고 되었다.

### *S. plymuthica* AL-1에 의한 병원성 곰팡이 대한 길항력 조사

길항미생물 *S. plymuthica* AL-1에 의한 대파 병원균에 대한 길항력을 온도별로 조사한 결과, 15°C에서 가장 높은 항진균 활성을 나타내었으며, 이때 Table 3과 같이 대파의 병원성 진균으로 흑색썩음균핵병균(*Sclerotium cepivorum*)에 대해서는 생육저지환의 크기가 15 mm로 나타났다. 그 외에도 고추 검은무늬병(*Alternaria altrata*)은 9 mm, 고추 탄저병균(*Colletotrichum gleosporioids*)은 13 mm, 도라지 줄기마름병균(*Phoma* sp.)은 10 mm, 고추 잘록병균(*Rhizoctonia solani*)은 8 mm, 고추 흰별무늬병균(*Stemphylium solani*)은 8 mm, 오이 균핵병균(*Sclerotinia sclerotiorum*)은 7 mm, 수박 덩굴썩김병(*Fusarium oxysporium niveum*)은 7 mm로 비교적 높은 길항력을 나타내었으나 참외 만고병균(*Didymella bryoniae*)에서는 길항력이 없었다. 상기 결과는 *S. plymuthica* AL-1을 15°C에서 배양하였을 경우에 나타나는 결과이나 배양온도를 20°C~30°C로 증가시키면 그 항진균활성은 더욱 감소하여 37°C 배양때에는 균의 성장도 중지되었으며, 항진균 활성도 거의 나타나지 않는 특징을 가지고 있었다.

지금까지 알려진 *S. plymuthica*의 길항력에 관한 연구로

**Table 3. Antagonistic effects of *S. plymuthica* AL-1 on the plant pathogens.**

Phytopathogenic fungi and bacterium	Inhibition zone (mm) <sup>a)</sup>
<i>Sclerotium cepivorum</i>	15
<i>Alternaria altrata</i>	9
<i>Colletotrichum gleosporioids</i>	13
<i>Phoma</i> sp.	10
<i>Rhizoctonia solani</i>	8
<i>Stemphylium solani</i>	7
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	7
<i>Didymella bryoniae</i>	0

<sup>a)</sup>Inhibition zone were obtained from clear zone in pairing plate culture with 3 replications. Each phytopathogenic fungi and *S. plymuthica* AL-1 were inoculated on PDA medium containing 1% colloidal chitin, the length between two strains were 5cm. Observations were made 7 days after inoculation on PDA at 28°C (*S. cepivorum* was incubated at 15°C).

**Table 4. Characteristics of the antifungal agent of *S. plymuthica* AL-1 for *S. cepivorum* growth inhibition.**

<i>S. plymuthica</i> AL-1	Inhibition by high MW(>10 kDa) fraction		Inhibition by low MW(<10 kDa) fraction	
	None	Heat treatment	None	Heat treatment
TSB	0.8 mm 0.1 unit	0.0 mm 0.0 unit	5.3 mm 0.0 unit	5.2 mm 0.0 unit
TSB containing 1% colloidal chitin	9.8 mm 3.2 unit	0.0 mm 0.1 unit	5.2 mm 0.0 unit	5.0 mm 0.0 unit

*S. plymuthica* AL-1 was cultivated in the TSB containing 1% colloidal chitin or not for 3 days at 15°C. After centrifugation at 10,000 × g for 30 min, the supernatant and heat treated supernatant (80 × 30 min) were used for antifungal activity (clear zone, mm) and chitinase activity (unit/ml).

Berg[2]는 토마토의 버티실리움 시들음병을 유발하는 *Verticillium dahliae*와 모잘록병균 *Rhizoctonia solani* 등의 곰팡이에 길항력이 높았다고 보고하였고, Kloepper 등[9]은 오이 탄저병균 *Colletotrichum orbiculare*, McCullagh 등[12]은 오이 피티움 뿌리썩음병균, Stanley 등[20]은 양배추 병원성 진균에 길항력을 가지고 있으며, Thaning 등[22]은 감자, 강낭콩, 담배, 메밀 등에서 균핵병을 유발하는 *Sclerotinia sclerotiorum*에 길항하는 물질이 존재함을 보고 하였다. 또한 McInroy 등[13]은 목화화 사탕옥수수의 내생 미생물(endophytes)로 존재함을 확인하였다. 그러나 대파 흑색썩음균핵병균 *S. cepivorum*, 고추 검은무늬병(*Alternaria altrata*), 도라지 줄기마름병균(*Phoma* sp.)에 대한 길항한다는 보고는 없는 상태이다.

### 길항균 *S. plymuthica* AL-1의 길항물질 생성능 조사

길항균의 길항 메카니즘에는 siderophores[17], β-1,3-glucanase[5,6], chitinase[16], antibiotic[18], cyanide[4] 등 다양하게 알려져 있다. 대파의 흑색썩음균핵병균에 대해 높은 길항력을 가진 길항균 *S. plymuthica* AL-1이 어떠한 길항물질에 의해 길항력을 가지는지를 조사하기 위해 1% colloidal chitin을 첨가하거나 첨가하지 않은 TSB 배지에서 배양한 배양 상등액을 YM10 membrane으로 분자량 10 kDa을 기준으로 나누어 각각의 항진균활성을 조사한 결과, Table 4와 같이 1% colloidal chitin을 첨가한 배양에서는 10 kDa 이상에서도 길항력이 나타났고 10 kDa 이하에서도 길항력을 나타내었다. 그러나 1% colloidal chitin 첨가하지 않은 배양에서는 10 kDa 이하에서만 활성을 나타내었고 10 kDa 이상에서는 거의 항진균 활성이 없었다. 또한 10 kDa 이하 물질들을 80°C에서 열처리한 후 길항력을 조사하여도 길항력을 나타내어 상기 메카니즘에서 chitinase 뿐만 아니라 분자량 10 kDa 이하의 다른 생리활성물질도 존재할 것으로 추정되며 colloidal chitin에 의해 chitinase가 유도생 산 됨을 확인하였다.

*Serratia* 속이 chitinase를 생산한다는 보고는 *Serratia marcescens*[16, 26]에서 많이 되어 있으며, 국내에서도 *S. proteamaculans*[29], *Serratia* sp. JM[30] 등에서 보고되었다.

## 요 약

대파 뿌리로부터 근권미생물 146종을 분리하여 대파 흑색썩음균핵병균인 *Sclerotium cepivorum*에 길항하는 AL-1 균주를 최종선별하였다. 분리주 AL-1은 the procaryotes와 Bergey's manual of systematic bacteriology의 방법과 16S rDNA의 부분염기서열을 결정하여 ribosomal database에서 상동성 검색 등의 방법으로 *Serratia plymuthica*로 동정되었다. *S. plymuthica* AL-1은 흑색썩음균핵병균(*Sclerotium cepivorum*)에 대해서는 생육저지환의 크기가 15 mm로 나타났으며, 고추 검은무늬병(*Alternaria altrata*)은 9 mm, 고추 탄저병균(*Colletotrichum gleosporioids*)은 13 mm, 도라지 줄기마름병균(*Phoma* sp.)은 10 mm, 고추 잘록병균(*Rhizoctonia solani*)은 8 mm, 고추 흰별무의병균(*Stemphylium solani*)은 8 mm, 오이 균핵병균(*Sclerotinia sclerotiorum*)은 7 mm, 수박 덩굴썩김병(*Fusarium oxysporium niveum*)은 7 mm로 길항력을 나타내었으나 참외 만고병균(*Didymella bryoniae*)에서는 길항력이 없었다. *S. plymuthica* AL-1은 1% colloidal chitin을 첨가한 TSB 배지에서 분자량 10 kDa 이상의 분획에서는 chitinase(3.2 units/ml)가 유도 생산되었고 80°C에서 30분간 열처리할 경우 chitinase의 활성은 없어 졌으나 길항력(6.4 mm)은 남아있었다. 또한 분자량 10 kDa 이하의 분획에서는 chitinase 활성은 없으나 길항력(5.2 mm)은 나타내었고, 80°C에서 열처리하여도 길항력(5.0 mm)이 남아있어 효소 이외 다른 생리활성물질이 존재함을 확인하였다.

## 감사의 말

본 연구는 2001년 제9차 산학연공동기술개발 지역컨소시엄 연구지원비에 의하여 수행된 연구결과의 일부이며, 이에 깊이 감사 드립니다.

## REFERENCES

- Alstrom, B. and B. Gerhardson. 1988. Differential reactions of wheat and pea genotypes to root inoculation with growth affecting rhizobacteria. *Plant and Soil* **109**: 263-269.
- Berg, G. 1996. Rhizobacteria of oilseed rape antagonistic to *Verticillium dahliae*. *J. of Plant Disease and Protection* **103**: 20-30.
- Einhellig, F. 1996. Interaction involving allelopathy in cropping systems. *Agronomy J.* **88**: 886-893.
- Flaishman, M. A., Z. Eyal, A. Zilberstein, C. Voisard, and D. Hass. 1996. Suppression of *Septoria tritici* blotch and leaf rust of wheat by recombinant cyanide-producing strains of *Pseudomonas putida*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**: 642-645.
- Frankowski, J., G. Berg, and H. Bahl. 1998. Mechanisms involved in the antifungal activity of the rhizobacterium *Serratia plymuthica*. In B. K. Duffy, U. Rosenberger and G. Defago (eds), *Molecular Approaches in Biological Control*, IOBC/wprs Bulletin **21**: 45-50.
- Fridlender, M., J. Inbar, and I. Chet. 1993. Biological control of soilborne plant pathogens by a  $\beta$ -1,3-glucanase-producing *Pseudomonas cepacia*. *Soil Biol. Biochem.* **25**: 1211-1221.
- Grimmont, P. A. D., F. Grimmont, H. L. C. Dulong De Ronay, and P. H. A. Sneath. 1977. Taxonomy of the genus *Serratia*. *J. Gen. Microbiol.* **98**: 39-66.
- Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley, and S. T. William. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology, 9th., Williams & Wilkins, U.S.A.
- Kloepper, J. W., G. Wic, and S. Tzun. 1992. Rhizosphere populations dynamics and internal colonization of cucumber by plant growth promoting rhizobacteria which induce systemic resistance to *Collectotrichum orbiculare*. pp. 185-192. In E. C. Tjamos, G. C. Papavizas and J. Cook (eds), *Biological Control of Plant Diseases Progress and Challenges for the Future Nato ASI Series a*, Vol. 230, New York, NY:Plenum Press.
- Loffler, F. E., Q. Sun, J. Li, and J. Tiedje. 2000. 16S rRNA gene-based detection of tetrachloroethene-dechlorinating desulfuromonase and dehalococoides species. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1369-1374.
- Lopez-Sabater, E. I., J. J. Rodriguez-Jerez, M. Hernandez-Herrero, and M. T. Moria-Ventura. 1996. Incidence of histamine-forming bacteria and histamine content in scombroid fish species from retail markets in the barcelona area. *Int. J. Food Microbiol.* **28**: 411-418.
- McCullagh, M., R. Utkehd, J. G. Menzies, Z. K. Punja, and T. C. Paulitz. 1996. Evaluation of plant growth-promoting rhizobacteria for biological control of Pythium root of cucumbers grown in rockwool and effects on yield. *Eur. J. Plant Pathol.* **102**: 747-755.
- McInroy, J. A. and J. W. Kloepper. 1995. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant and Soil* **173**: 337-342.
- Midelfart, J., A. Midelfart, and L. Bevanger. 1996. Microbial contamination of contact lens among medical students. *CLAO J.* **22**: 21-24.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
- Renwick, A., R. Campbell, and S. Coe. 1991. Assessment of in vivo screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. *Plant Pathol.* **40**: 524-532.
- Scher, F. M. and R. Baker. 1982. Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt pathogens. *Phytopathology* **72**: 1567-1573.
- Shanahan, P., D. J. O'Sullivan, P. Simpson, J. D. Glennon, and F. O'Gara. 1992. Isolation of 2,4-diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 353-358.

19. Springer, T. L. 1996. Allelopathic effects on germination and seedling growth of clovers by endophyte-free and infected tall fescue. *Crop Science* **36**: 1642–1649.
20. Stanley, R., M. Brown, N. Pool, D. Rodgeron, C. Sigeo, C. Knight, H. Ivin, A. S. Epton, and C. Leifert. 1994. Biocontrol of post-harvest fungal diseases on Dutch white cabbage by *Pseudomonas* and *Serratia* antagonists in storage trials. *Plant Pathology* **43**: 605–611.
21. Starr, M., H. Stolp, H. Truper, and H. G. Schlegel. 1981. The prokaryotes; A handbook and identification of bacteria, Spring-Verag, Berlin, Heidelberg, New York.
22. Thaning, C., C. J. Welch, J. J. Borowicz, R. Hedman, and B. Gerhardson. 2001. Suppression of *Sclerotinia sclerotiorum* apothecial formation by the soil bacterium *Serratia plymuthica*: identification of a chlorinated macrolide as one of the causal agents. *Soil Biol. & Biochem.* **33**: 1817–1826.
23. Veronese, T. and P. Perlot. 1998. Proposition for the biochemical mechanism occurring in the sucrose isomerase active site. *FEBS Letters* **441**: 348–352.
24. Veronese, T. and P. Perlot. 1999. Mechanism of sucrose conversion by the sucrose isomerase of *Serratia plymuthica* ATCC15928. *Enzyme Microb. Technol.* **24**: 263–269.
25. Weston L. A. 1996. Utilization of allelopathy for weed management in agroecosystems. *Agronomy J.* **88**: 860–866.
26. 김영일, 이영환, 김광식, 박화성, 전우복, 이재화, 김종현. 1991. 식물병원성 사상균에 길항력을 갖는 *Serratia marcescens* CK-3의 분리 및 효소적 성질. *한국농화학회지* **34**: 54–60.
27. 小林達治. 1994. 뿌리의 활력과 근권미생물. 한국원예기술정보센터.
28. 이두형, 백수봉. 1996. 식물병리학. 우성문화사.
29. 이은택, 김상달. 1999. Chitinase를 생산하는 길항미생물 *Serratia* sp. 3095의 선발과 *Fusarium* 속에 대한 항진균성. *한국농화학회지* **42**: 181–187.
30. 차지명, 진상기, 고한철, 이인화. 1996. Chitinase를 생성하는 *Serratia* sp. JM의 분리 및 특성. *한국생물공학회지* **11**: 92–99.
31. 최상태, 안형근, 강석우, 박인환, 정우윤, 장영득. 1999. 대파의 뿌리 분비물이 국화의 생육에 미치는 영향. *한국원예학회지* **40**: 371–375.

(Received Feb. 25, 2002/Accepted Apr. 12, 2002)