

고추역병과 시들음병을 방제하는 토착길항세균 *Pseudomonas fluorescens* 4059의 선발과 길항기작

정희경 · 김상달*

영남대학교 자연자원대학 응용미생물학과

Selection and Antagonistic Mechanism of *Pseudomonas fluorescens* 4059 Against Phytophthora Blight Disease. Jung, Hee-Kyoung and Sang-Dal Kim*. Department of Applied Microbiology, College of Natural resources Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea – In order to select the powerful rhizosphere-dorminatable biocontrol agent, we had isolated an indigenous antagonistic bacterium which produced antibiotic and siderophore from a disease suppressive local field soil of Gyungusan, Korea. And we could select the *Pseudomonas* sp. 4059 which can strongly antagonize against *Fusarium oxysporum* and *Phytophthora capsici* by two kinds of antifungal mechanism that can be caused by the antibiotic of Phenazin, a siderophore and a auxin like substance. The selected strain was identified as *Pseudomonas fluorescens* (biotype A) 4059 by biochemical tests, API® test, MicroLog TM system and 16S rDNA analysis. The selected antagonistic microorganism, *Pseudomonas* sp. 4059 had an antifungal mechanism of antifungal antibiotic and siderophore. And we were confirmed the antagonistic activity of *P. fluorescens* 4059 with *in vitro* antifungal test against *Phytophthora capsici* and *in vivo* by red-pepper.

Key words: Biocontrol, antifungal antibiotic, *Phytophthora capsici*, *Pseudomonas fluorescens*

식물병해충에 의한 작물 생산의 손실은 전체 생산량의 12%에 달하며 그 중에서 20%정도만이 토양선충과 세균에 의한 손상이고 나머지 대부분은 식물병원성 진균에 의해 발생된다[7-9]. 따라서 세균성 식물병해의 방제 필요성 보다는 진균성 식물병원균의 방제 필요성이 훨씬 시급하다고 할 수 있다. 지금까지는 진균방제용 유기화학농약이 주로 사용되어 왔으나 여러 가지 폐해로 계속적 사용은 한계점에 왔다. 이러한 시점에서 식물진균병 방제에 대한 환경친화적인 생물학적 방제법의 개발이 필연적으로 요구되고 있으므로 그동안 지역내 질병발생이 적은 저병해 경작지에 우점화 되어 있는 토착미생물 중에서 근부병균, 역병균 등 대표적인 식물병원균을 대상으로 하여 방제력이 뛰어난 길항미생물을 분리, 선발하고 선발된 길항미생물의 생물방제기작을 규명하며, 식물실험을 통한 방제력 검증을 실시하고, 자연 환경에서 그 능력을 확대 유지할 수 있도록 길항미생물의 유전 공학적 육종을 실시함으로써 우리나라 고유의 생물방제력이 있는 미생물 농약을 개발하고자 하였다[7, 8, 11].

길항미생물을 이용하는 생물학적 방제법은 생태계 내에서 서로 다른 두 종류의 미생물간에 일어나는 경쟁현상 (competition), 기생 또는 포식관계 (parasitism, predation)나 항생작용 (antagonism) 등의 상호작용을 인위적으로 조절, 활용함으로

써 가능하게 된다[7-9, 11-13, 18]. 이를 길항기작별로 보면 크게 3가지 형태로 구분될 수 있다. 첫째는 식물병원균의 세포벽을 분해시키는 용균작용 (degradative parasitism), 둘째로는 *Streptomyces griseus*[5], *Streptomyces blastomyces*[17], *Penicillium nigricans*[3], *Bacillus subtilis*[10], *Pseudomonas* sp.[1] 등이 생산하는 항진균성 항생물질에 의해 직접 식물병원균의 생육을 저해시키는 항생작용 (antibiotic), 셋째는 plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR)인 근권 *Pseudomonas* sp.가 분비하는 철(Fe³⁺)성분 특이 결합물질인 siderophore에 의해 식물병원균의 생육을 저해하는 경쟁적 길항작용 (competitive antagonism)을 이용한 방제방법이다[15].

따라서 본 연구에서는 근부병균 *Fusarium solani*, 시들음병균 *Fusarium oxysporum*과 고추역병균인 *Phytophthora capsici*의 생육을 강력히 억제하는 길항균주를 경북지역의 저병해 경작지 토양으로부터 분리, 선발, 동정하고, 이 길항균주가 생성하는 항진균성 길항물질과 병원균에 대한 방제기작을 조사하여 지역토양에 우점복원능이 우수한 생물방제균으로 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

토착길항미생물의 분리 및 선발

지역경작지 토양내 우점, 복귀능이 강한 토착길항미생물을 선발하기 위해 경북경주 지역에서 토착길항미생물 이용 자연농업을 시행하는 저병해 경작지 토양을 분리원으로 하

*Corresponding author
Tel: 82-53-810-2395, Fax: 82-53-810-4663
E-mail: sdkim@yumail.ac.kr

여 생리식염수에 현탁, 희석하고 이를 nutrient agar배지에 접종하여 30°C에서 1일간 배양시킨 후 생성된 토양세균을 분리했다.

분리된 각종 토착토양세균중에서 *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici* 억제능을 보이는 길항균주 선발을 위해 *F. oxysporum*, *P. capsici*를 시험균주로 하여 발육저지대 측정법(pairing plate culture)으로 길항미생물의 방제력을 검증하였다. Potato dextrose broth(PDA)에서 식물병원균과 선발균과의 발육저지거리를 측정하기 위하여 식물병원성 진균을 6 mm 크기의 disc로 접종을 실시하여 28°C에서 24시간 배양한 후 3 cm 떨어진 곳에 길항세균을 백금으로 희석하여 28°C에서 계속 배양하여 병원성진균의 성장이 억제되는 거리를 확인하였다.

식물병원성 진균의 포자 수확

*F. oxysporum*의 포자를 회수하기 위하여 PDA 평판배지에 미리 배양된 *F. oxysporum*의 균사체를 6 mm 정도의 disc로 50 ml PDB(potato dextrose broth)에 접종하여 28°C에서 48 시간 진탕배양을 한 후에 여섯겹의 멸균가아재로 여과하면서 기균사를 제외한 포자를 획득할 수 있었으며, 이를 3,000×g에서 10분간 원심분리하여 포자를 회수하고 멸균생리식염수로 1회 세척한 후 10 ml의 생리식염수에 현탁시켜 사용하였다.

*P. capsici*의 유주자(zospore)를 회수하기 위하여서는 V8 주스와 증류수를 2 : 8의 조성으로 혼합 후 CaCO₃ 0.4%와 agar 2%를 첨가하여 제조한 V8 주스 한천배지에 *P. capsici*를 6 mm 크기의 disc로 접종하고 28°C에서 5일간 배양하여 plate의 가장자리까지 균사를 성장시킨 후에 도말봉으로 기균사를 밀어주고 형광등에서 15 cm 떨어진 곳에서 빛을 쬐어주며 24시간 동안 추가 배양시켜 포자를 생성시켰으며 여기에 멸균생리식염수를 5 ml 넣은 후에 멸균 붓으로 유주자를 회수하였다.

항생물질 생산성과 siderophore 생산성 조사

항생물질과 같은 저분자 길항물질 생산하는 토착길항균주의 선발을 위해 토착길항세균으로 분리된 토양세균을 대상으로 배양 원침상등액을 Amicon® Centriprep(MW 10,000)에 의해 수집한 후 저분자물질의 길항력을 *P. capsici*, *F. oxysporum* 식물병원성균주를 대상으로 균체량 측정법(cell mass test)[9]를 통해 조사하여 선발하였다. 또한 항생물질 중 많은 것이 내열성이며 항생물질이 butanol 등 비극성 용매에 용출되는 지용성임을 감안하여 선발된 길항세균의 배양상등액을 80°C에서 30분간 열처리하거나 butanol로 추출한 후 잔존활성을 cell mass test로 조사하였다.

항생물질 생산성 길항미생물 중 siderophore 생산성 토착길항균주의 선발은 Chromo azurol S(CAS)배지를 이용하여 검증하였고, 이들 균주를 대상으로 다시 CAS liquid[16]에

의해 siderophore 활성에 따른 CAS의 탈색율을 조사하는 sideophore 활성도 측정법을 이용하여 sideophore 생산능이 가장 우수한 균주를 최종 선발하였다.

토착길항세균의 계대배양

본 실험에 사용된 균주의 계대는 King's B 한천배지(Proteose peptone No3 2%, K₂HPO₄ 0.15%, MgSO₄·7H₂O 0.15%, Glycerol 1.5%, agar 1.5%)를 사용하여 30°C에서 2일간 배양한 후 4°C에서 보관하였고, 장기보관을 위해 King's B broth에 1일간 키운 후 15%가 되도록 멸균한 glycerol을 첨가하여 -70°C에서 동결 보관하였다.

토착길항미생물의 동정

토착길항미생물의 분류학적 동정을 위해 primer 8F(5'AGT TGA TCC CTC AG) 1492R(5'ACC TTG TTA CGA CTT)을 이용하여 PCR 증폭 후 16S rDNA를 analysis하고, API® test (bioMérieux), Biolog사의 동정시스템(MicroLog™3), 그리고 각종 생화학적 성장검사와 함께 투시형 전자현미경(transmission electron microscope, TEM)으로 그 형태를 관찰하였다. 이를 바탕으로 Bergey's Manual of systematic Bacteriology[6]색인을 이용하여 최종 동정하였다.

길항미생물의 in vivo 방제력 검증

선발된 토착길항미생물을 대상으로 in vivo 검증을 실시하기 위하여 고추식물(*Capsicum annum*)를 기주식물로 하여 선발된 길항균주의 각종 식물병원균에 대한 길항력을 검증하였으며, 이들 기주식물을 발효 : 모래 : 퇴비를 2 : 1 : 1로 섞은 실험토양을 121°C, 20분간 멸균시켜 이를 상토로 사용하여 28°C, 70% 습도를 유지한 항온항습실에서 12시간 주기로 광을 조사하여 24구 pot에서 시험식물인 고추를 발아, 성장을 시켰다. 방제력을 검증하기 위하여 28°C, 70% 습도를 유지한 항온 항습실에서 3엽기까지 성장시킨 기주식물을 직경 15×20 cm 크기의 단일 pot에 이식하고 이를 3일간 정착시킨 후 미리 V8 주스 한천배지에서 배양, 형성시킨 *Phytophthora capsici*의 유주자를 회수하여 350개/ml의 유주자를 5 ml 관주 접종한 후 1일간 습실(28°C, 습도 70%)처리하고 여기에 선발된 방제균을 6.0×10⁸CFU/ml의 균수로 5 ml 처리하여 하루 동안 더 습실배양하였다. 이를 28°C, 70% 항온항습실에서 키우면서 주기적으로 발병을 확인하였으며, 이때 대조구로 방제균만을 처리하거나 무처리한 pot와 비교하여 고추역병의 발병억제력을 확인하였다.

결과 및 고찰

토착길항미생물의 분리 및 선발

경북 경주지역의 자연농업 수행 저병해 고추 경작지 토양으로부터 토착길항세균을 120여종 분리할 수 있었고, 이들을

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

Strain	Siderophore production (mm)*	Cell mass inhibition(%)		Low molecular substrate inhibition rate(%)	
		<i>P. capsici</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>P. capsici</i>	<i>F. oxysporum</i>
BLP3034	0	72	0	19	0
BLP5057	0	74	0	43	0
BLP8117	0	67	4	28	5
BLP4045	0	64	0	20	0
PLP5042	5	56	15	27	21
PLP6036	13	65	5	57	11
PLP4059	9	75	25	67	9
PLP2071	11	70	31	54	15
PLP5046	7	68	33	41	18

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

대상으로 시들음병균 *F. oxysporum*과 고추역병균 *Phytophthora capsici*와 대치배양을 실시하여 시들음병균과 고추역병균에 길항하는 길항토양세균을 6종을 분리하였다. 이들은 모두 저분자성 길항물질을 생산하여 시들음병균 *F. oxysporum*과 고추 역병균 *P. capsici*의 생육을 억제하였다. 이들을 대상으로 다시 siderophore 검출용 CAS배지에서 siderophore를 강력히 생성하는 균주를 분리 하였다(Table 1). 분리선발된 길항미생물 중 *P. capsici*, *F. oxysporum*에 대한 길항기작은 지용성 이고 내열성인 저분자 항생물질과 철이온 특이적 결합물질인 siderophore을 생산하는 다중 길항기작의 식물성장촉진 기능에 의한 것임을 확인 할 수 있었으며, 이들 중 고추역병균 *P. capsici*에 가장 큰 길항력을 가지는 토착길항미생물 PLP 4059를 최종 선발할 수 있었다(Table 2, Fig. 1, 2).

다기능적 길항미생물 PLP 4059의 형태 및 동정

항생물질 및 siderophore 복수 길항물질생산성 길항균주로 분리, 선발된 토착 길항균주 PLP 4059의 동정을 위해 몇 가지 동정방법을 수행하였다. 그 형태를 관찰한 결과 그람 음성의 간균으로 판별되었으며, 그 미세형태를 확인하기 위해 전자현미경으로 관찰한 결과 1개의 편모를 가지는 간균으로 판명되었다. 또한 각종 생화학적 정상시험과 API® test(Table 3) 등의 각종 *Pseudomonas* 동정에 필요한 분석방법을 통해 비교, 동정해 본 결과 *Pseudomonas fluorescens* biotype A에 근연성을 보였으며, 이를 Biolog사의 동정시스

Table 2. Production of the antifungal antibiotic of *Pseudomonas fluorescens* 4059 against *Phytophthora capsici*.

Substance	Inhibition rate(%)
culture broth	78
Heat treated	42
N-butanol ext. sol	44

*Heat was treated for 20 min at 80°C.

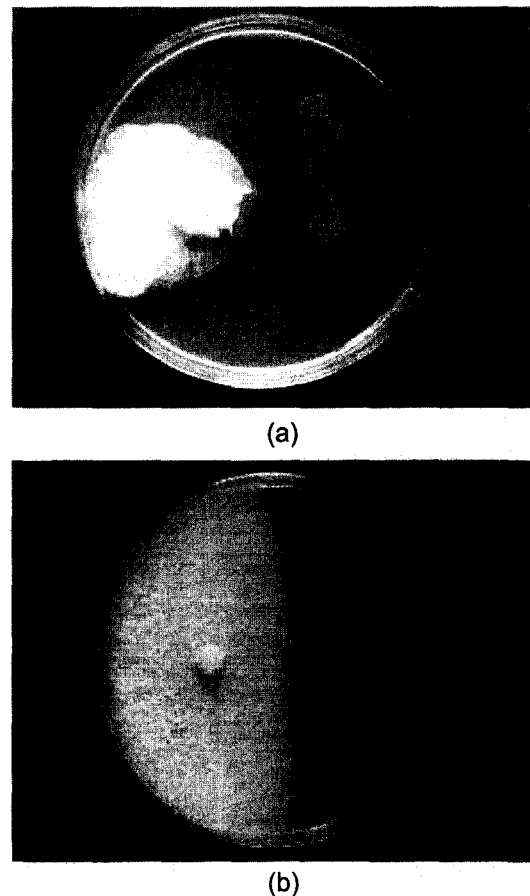


Fig. 1. Mycelial growth inhibition of *Phytophthora capsici* (A) and *Fusarium oxysporum* (B) by antagonistic microorganism *Pseudomonase fluorescens* 4059 on PDA by pairing culture test. A: *Phytophthora capsici* (left), *Pseudomonase fluorescens* 4059 (right), B: *Fusarium oxysporum* (left), *Pseudomonase fluorescens* 4059 (right).

템과 16S rDNA sequencing을 이용하여 확인 동정하여 본 결과 *P. fluorescens* biotype A에 98%의 근연성을 보임으로

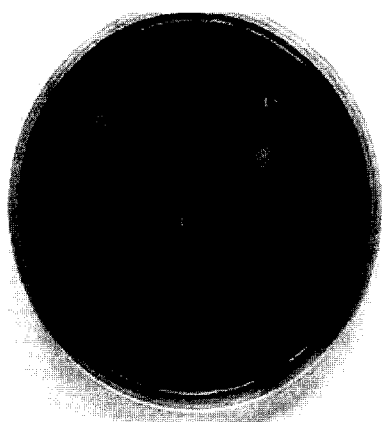


Fig. 2. Orange halo formation of the siderophore produced by *Pseudomonas fluorescens* 4059 in CAS medium. A: *Bacillus* sp. 7079 (No production of siderophore), negative control, B: *Pseudomonas* sp. 5042 (Weak production of siderophore), C: *Pseudomonas* sp. 4059.

최종적으로 *P. fluorescens* biotype A 내지는 그 근연종으로 동정 하였다(Table 3).

In vivo test를 통한 *P. fluorescens* 4059의 길항작용 검증

항진균성 항생물질 및 siderophore 생산성 길항미생물 *P. fluorescens* 4059가 실제 토양에서 고추역병균에 방제력을 발휘하는지 여부를 검증하기 위하여 고추를 대상 기주식물로 식물방제실험을 실시하였으며 28°C, 70% 습도를 유지한 항온항습실에서 기주식물 고추가 이식되어 있는 pot에 미리 V8 주스배지에서 배양하여 수집한 *P. capsici*의 유주자를 관주 접종한 후, 1일간 습실(28°C, 70% 습도)처리하고 여기에 선발된 방제균을 처리하여 28°C, 70% 항온항습실에서 키우면서 주기적으로 발병을 확인한 결과 고추역병균 *P. capsici*에 의한 고추역병에 대한 90%이상의 방제력을 가지고 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

Table 3. Identification of the *Pseudomonas* sp. 4059 isolated as an antagonistic bacterium against *Phytophthora capsici* and *Fusarium oxysporum*.

Test	PLP 4059	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Potassium nitrat	+	
Typtophan	-	-
Glucose	+	-
Arginin	+	+
Urea	-	-
Esculin	+	+
Gelatin	+	
p-nitro-phenyl-β D-galactopyranoside	-	-
Glucose	+	+
A Arabinose	+	+
P Mannose	+	+
I Manitol	+	+
N-acetylglucosamine	+	
Maltose	-	-
Gluconate	+	+
Caprate	+	+
Adipate	-	-
Malate	+	+
Citrate	+	+
Phenyl-acetate	-	-
Tetramethyl-p-phenylenediamine	+	+
Cell form	Rod	Rod
Gram strain	-	-
Flagella number	1	1
Endospore production	-	-
Fluorescens pigment	+	+
16SrDNA sequence	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	
Biolog system™ 4.0	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	

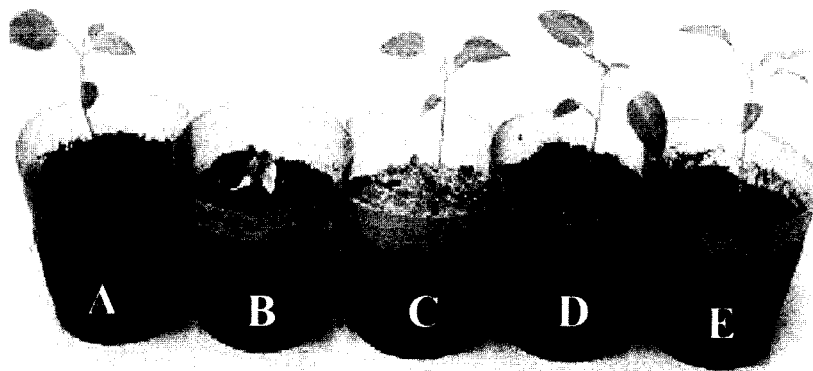


Fig. 3. In vivo antifungal activity of *P. fluorescens* 4059 on the growth of red pepper (*Capsicum annum* L.) phytophthora blight disease. A: Control, B: Only *Phytophthora capsici* infected, C, E: *Phytophthora capsici* vs *P. fluorescens* 4059(cell), D: *Phytophthora capsici* vs *P. fluorescens* 4059 (culture broth).

요 약

토양 우점능이 강한 생물학적 방제제 제조를 위해 경북지역 토양에서 길항균주를 분리하고 이들 중 *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici*에 강력한 길항능을 보이는 *Pseudomonas* sp. 4059를 선발, 동정하였다. *Pseudomonas* sp. 4059의 시들음 병원균 *Fusarium oxysporum*, 고추 역병원균 *Phytophthora capsici*에 대한 길항기작은 내열성 저분자의 항생물질과 철이온을 특이적으로 흡착하는 siderophore의 생산에 의한 것이었다. *Pseudomonas* sp. 4059는 항진균성 항생물질 Phenazine 생산 유전자를 소유하며 Salkowski test에 양성인 옥신류 생산도 한다는 것을 확인하였다. *Pseudomonas* sp. 4059는 biochemical tests, API test, MicroLogTM system을 통해 *Pseudomonas fluorescens* (biotype A)으로 98% 상동성을 보였으므로 이를 *Pseudomonas fluorescens* (biotype A) 4059로 명명하였다. 선발된 길항균 *Pseudomonas fluorescens* (biotype A) 4059는 고추를 기주식물로 하였을때 고추역병원균인 *Phytophthora capsici*가 원인이 되는 고추역병을 *in vivo*상에서도 충분히 억제할 수 있는 생물방제능을 나타내었다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 Biogreen 21 사업(과제번호: 105649) 지원에 의하여 이루어졌으며 이에 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 and S. T. Williams. 1994. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 9th, Williams & Wilkins, U.S.A.
7. Kim, S. D. and H. S. Lim, 1990. Antifungal mechanism of *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 for biocontrol of *Fusarium solani* causing plant root rot. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 81-88.
8. Kim, S. D. and H. S. Lim, 1990. The role of chitinase of *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 in biocontrol of *Fusarium solani*. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 188-194.
9. 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. Biotechnol.* **4**: 296-304.
10. 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 fengycin from *Bacillus subtilis* F-29-3: a comparison with activities of other *Bacillus* antibiotics. *J. Phytopathol.* **115**: 204-213.
11. Lim, H. S. and S. D. Kim. 1994. The production and enzymatic properties of extracellular chitinase from *Pseudomonas stutzeri* YPL-1, as a biocontrol agent. *J. Microbiol. Biotechnol.* **4**: 134-140.
12. Lim, H. S. and S. D. Kim. 1995. The Role and Characterization of β -1,3-Glucanase in Biocontrol of *Fusarium solani* by *Pseudomonas stutzeri* YPL-1. *Kor. J. Microbiol.* **33**: 295-301.
13. Lim, H. S., Y. S. Kim, and S. D. Kim. 1991. *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 genetic transformation and antifungal mechanism against *Fusarium solani*, an agent of plant root rot. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 510-516.
14. Lim, H. S. and S. D. Kim. 1994. The Production and Enzymatic Properties of Extracellular Chitinases from *Pseudomonas stutzeri* YPL-1, as a Biocontrol Agent. *J. Microbiol. Biotechnol.* **4**: 134-140.
15. Paulitz, T. C., and J. E. Loper. 1991. Lack of a role for fluorescent siderophore production in the biological control of *Phytophthora damping-off* of cucumber by a strain of *Pseudomonas putida*. *Phytopathol.* **81**: 930-935.
16. Schwyn, B., and J. B. Neilands. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* **160**: 47-56.
17. Takeuchi, S., K. Hirayama, K. Ueda, H. Sasaki, and H. Yonehara. 1958. Blasticidin S, a new antibiotic. *J. Antibiot.* **11**: 1-5.
18. You, J. H., B. H. Song, J. G. Kim, M. H. Lee, and S. D. Kim. 1995. Genetic organization and nucleotide sequencing of the urea gene cluster in *Bacillus pasteurii*. *Mol. cell.* **5**: 359-369.

(Received Nov. 18, 2004/Accepted Dec. 3, 2004)