

식물 근권에서 분리한 미생물의 식물병원성 진균에 대한 길항효과 검정

김윤석¹ · 김상우² · 거비르 람살² · 이윤수^{2*}

¹농림수산식품기술기획평가원, ²강원대학교 식물자원응용공학과

Evaluation of Rhizobacterial Isolates for Their Antagonistic Effects against Various Phytopathogenic Fungi

Yun Seok Kim¹, Sang woo Kim², Kabir Lamsal² and Youn Su Lee^{2*}

¹Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Anyang 14055, Korea

²Division of Biological Resources Sciences, Department of Applied Plant Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea

ABSTRACT : This study was conducted to evaluate five different strains of rhizobacterial isolates viz. PA1, PA2, PA4, PA5 and PA12 for biological control against *Colletotrichum acutatum*, *C. coccodes*, *C. gloeosporioides*, *C. dematium*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia minor* and *Fusarium* sp. *In vitro* inhibition assay was performed on three different growth mediums, potato dextrose agar (PDA), tryptic soy agar (TSA), and PDA-TSA (1:1 v/v) for the selection of potential antagonistic isolates. According to the result, isolate PA2 showed the highest inhibitory effect with 65.5% against *C. coccodes* on PDA and with 96.5% against *S. minor* on TSA. However, the same isolate showed the highest inhibition with 58.5% against *C. acutatum* on PDA-TSA. In addition, an *in vivo* experiment was performed to evaluate these bacterial isolates for biological control against fungal pathogens. Plants treated with bacteria were analyzed with phytopathogens and plants inoculated with phytopathogens were treated with isolates to determine the biological control effect against fungi. According to the result, all five isolates tested showed inhibitory effects against phytopathogens at various levels. Mode of action of these rhizobacterial isolates was evaluated with siderophore production, protease assay, chitinase assay and phosphate solubilizing assay. Bacterial isolates were identified by 16S rDNA sequencing, which showed that isolates PA1 and PA2 belong to *Bacillus subtilis*, whereas, PA4, PA5, and PA12 were identified as *Bacillus altitudinis*, *Paenibacillus polymyxa* and *Bacillus amyloliquefaciens*, respectively. Results of the current study suggest that rhizobacterial isolates can be used for the plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) effect as well as for biological control of various phytopathogens.

KEYWORDS : Antagonistic effect, *Bacillus* sp., Effective microorganism, Enzymatic assay, Phytopathogenic

서론

현대농업에서 화학농자재의 개발 및 사용은 농업생산량 증대에 필수적 요소 중 하나이다. 그러나 수십 년 동안 계속된 화학농자재 사용으로 토양의 물리성 및 화학성이 파괴되었으며, 특히 경종부분에서 환경파괴와 유해 화학물질의 농산물 축적 등 환경문제와 함께 사회적 문제로 인식되고 있다. 이런 상황에서 유기농업은 현대 화학농업의 문제점을 보완하고, 지속 가능한 농업의 대안으로 여겨지고 있다. 유기농업이란 화학비료, 유기합성농약(농약, 생장조절제, 제초제) 등 일체의 합성 화학물질을 사용하지 않고 유기물과 자연광석, 미생물, 천적 등 친환경적 자재를 사용하

Kor. J. Mycol. 2016 March, 44(1): 36-47
<http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2016.44.1.36>
 pISSN 0253-651X • eISSN 2383-5249
 © The Korean Society of Mycology

***Corresponding author**

E-mail: younslee@kangwon.ac.kr

Received November 20, 2015

Revised December 3, 2015

Accepted March 18, 2016

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

는 농법으로 자연과 생태적 공생관계를 유지하는 농업을 말한다. 유기농업은 자연생태계와 환경의 회생이라는 관점에서 그 중요성을 더하고 있다. 미생물을 이용한 유기농업 분야는 미생물 비료, 미생물 농약 등으로 구분할 수 있는데, 이는 토양 내 미생물이 성장하면서 분비하는 호르몬, 항생물질 등 2차 대사산물을 이용한 것이다. 그 중 미생물을 식물에 접종하거나 식물 근권에 처리하였을 때 병 발생을 억제하거나 병 발생과 진전 속도를 감소시키는 것을 길항작용(antagonism)이라 한다. 이는 어떤 상반되는 2가지 요인이 동시에 작용하여 서로 그 효과를 상쇄시키는 작용을 말하며, 병원균과 비병원성 균의 경쟁 및 타감작용의 결과로 생각된다. 그 밖에도 미생물이 성장 중 분비하는 hydrogen cyanide (HCN), antibiotics 등의 물질과 chitinase, protease 등과 같은 다양한 효소의 작용으로 길항작용이 나타난다고 알려져 있다. 어떤 미생물은 진균의 세포벽 주요 구성물질인 chitin을 분해하는 chitinase를 분비하여 진균의 균사를 파괴하거나, 성장을 억제함으로써 병원성 진균에 의한 식물병해를 억제한다는 연구가 보고되어 있다 [1]. 또한 미생물의 성장 중 분비하는 volatile compounds의 영향으로 식물병원성 진균의 생장이 억제된다는 연구도 보고되어 있다 [2]. 이러한 식물병 발생 억제 기작은 유용미생물이 진균 및 세균 병을 억제시키는 동시에 식물체의 defence pathway를 활성화시켜 pathogen related gene을 발현 시킴으로써 병에 대한 저항성을 획득하는 것으로 연구되어 있다 [3]. 이러한 식물체의 병원성 미생물에 대한 방어기작을 전신획득저항성(induced systemic resistance, ISR)이라 하는데 최근 연구에 따르면 비병원성 식물생장 촉진 미생물인 *Bacillus cereus*를 식물체에 접종했을 때 salicylate dependent signaling pathway와 jasmonate/ethylene dependent signaling이 동시에 활성화되어 강력한 저항성이 유도된다고 보고되어 있다. 또한 비병원성 미생물을 접종했을 때 priming이라는 단계를 거치면서 병원성 미생물이 식물에 침투했을 때 좀더 빠르고 강하게 저항성을 유도한다는 연구가 보고된 바 있다[4].

본 연구는 다양한 기주에 탄저병 및 모잘록병 등 식물병을 유발하는 *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum coccodes*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum dematium*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia minor*, *Fusarium sp.*에 대해 식물 근권에서 분리한 미생물이 가지는 식물병 억제 능력을 평가하고, 식물병 억제 원인

물질을 구명하여 유기농업을 위한 천연 미생물제제로 실용화하는데 그 목적이 있다.

재료 및 방법

미생물의 선발 및 동정

본 연구에서 사용한 균주는 인천시 강화군, 소백산, 오감산의 식물 근권에서 토양을 수집하여 희석평판법으로 분리하여 실험에 사용하였다. 토양시료를 10⁶까지 희석하고 tryptic soy agar (TSA) 배지에 20 μL 분주, 도말하여 28°C에서 3일간 배양하였다. 배양 후 각각의 토양에서 colony의 모양, 색, 중심부의 형태, 주변부의 형태 등 형태학적으로 다른 특성을 가진 균주를 순수 분리하여 실험에 사용하였다.

식물병원성 진균 생장억제 능력 검정

최종 선발된 균주의 식물병원성 진균에 대한 생장억제 능력을 평가하고자 식물병원성 진균과 대치배양을 실시하였다. TSA, potato dextrose agar (PDA) 그리고 TSA, PDA를 각각 1:1로 혼합한 배지를 사용하였으며, 식물병원성 진균은 농업유전자원센터(Korean Agricultural Culture Collection, KACC)에서 분양받은 *Colletotrichum acutatum*, *C. coccodes*, *C. gloeosporioides*, *C. dematium*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia minor*, *Fusarium sp.*를 사용하였다(Table 1). 식물병원성 진균을 직경 3 mm의 agar plug 형태로, 유용미생물은 paper disk법으로 접종하였다. 그 후 28°C에서 진균만 접종한 무처리 대조구가 직경 90 mm 되도록 배양한 후 식물병원성 진균과 유용 미생물 간의 거리를 측정하여 억제율(inhibition rate)로 환산하였다. 각각의 실험은 10 plate씩 3반복으로 수행하였다.

$$\text{Inhibition rate (\%)} = \frac{(R-r)}{R} \times 100$$

Where, R is the maximum radius of the fungal colony away from the bacterial colony; r is the radius of the fungal colony opposite the bacterial colony.

Chitinase 생성 조사

분리균들이 2차 대사산물로 chitinase의 분비 여부를 확인하기 위한 실험을 실시하였다. 사용된 colloidal chitin의

Table 1. Identification of bacterial isolates to species level by means of 16S rDNA sequences

Bacterial isolates	GenBank accession No.	Closest Gen Bank library strain	Similarity (%)	Isolate location
PA1	HQ851067.1	<i>Bacillus subtilis</i>	99.0	Sobaeksan
PA2	CP002468.1	<i>Bacillus subtilis</i>	99.0	Ogabsan
PA4	HM582688.1	<i>Bacillus altitudinis</i>	99.0	Kangwhado
PA5	AM062684.1	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	99.0	Kangwhado
PA12	GU191913.1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99.0	Ogabsan

제조는 crab-shell chitin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 20 g을 HCl 350 mL에 녹이고 4°C의 냉장고에서 24 시간 동안 정치 후 거즈로 filtering 하여 2 L의 차가운 ethanol (20°C)에 빠르게 혼합하였다. 얻어진 chitin 현탁액을 10,000 rpm으로 20분간 원심분리하였다. 상청액은 버리고 pellet은 pH 7.0이 될 때까지 멸균수로 세척하였다. 그 후 pellet을 동결 건조하여 colloidal chitin을 제조하였다. 제조한 colloidal chitin은 20°C에서 보관하면서 사용하였다. Chitinase의 분비를 확인하기 위해 TSA 배지에 colloidal chitin 2% (w/v)를 첨가하여 배지확산법을 이용, clear zone을 측정하여 chitinase의 분비 여부를 확인하였다[5].

Protease 생성 조사

분리균의 2차 대사산물로 protease의 분비를 확인하기 위한 실험을 실시하였다. 2% skim milk agar 배지 중앙에 지름 8 mm의 well을 만들어 액체 배양한 균주를 접종 후 30°C에서 4일간 배양하였다. Protease의 분비는 미생물을 접종한 well 주변부의 clear zone 생성 여부로 확인하였다.

인산가용화(phosphate solubilizing) 조사

인산가용화 가능 여부는 Pikovskaya (PVK) agar [6] 배지를 이용하여 실험하였다. PVK 배지(yeast extract 0.5 g, dextrose 10 g, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g, KCl 0.2 g, MgSO_4 0.1 g, MnSO_4 0.0001 g, FeSO_4 0.0001 g, agar 15 g, distilled water 1 L)에 토양에서 분리한 균주를 희석 접종하였다. 접종 후 28°C에서 10일 동안 배양하였다. 미생물의 난용성 인산 가용화 여부는 halo zone의 여부로 확인하였다.

Siderophore 생성 조사

Siderophore의 생성 여부는 chrome azurole S (CAS) 배지를 이용하여 실험하였다 [7]. CAS 배지에 분리균을 접종한 후 28°C에서 7~10일간 배양하였다. siderophore의 생성 여부는 halo zone의 여부로 확인하였다.

Hydrogen Cyanide (HCN) 생성 조사

HCN의 생성 여부는 토양에서 분리한 미생물 균주를 glycine (4.4 g/L)이 첨가된 TSA 평판배지에 접종한 후 0.5% (w/v) picric acid와 1% Na_2CO_3 를 혼합한 solution에 멸균한 100 mm filter paper를 침지시킨 후, petridish의 뚜껑에 부착시켜 sealing 하였다. 그 다음 28°C에서 7일간 배양하여 뚜껑에 부착된 filter paper의 색이 yellow에서 red-brown으로 변화하는 것으로 HCN의 생성 여부를 확인하였다.

Scanning Electron Microscope Assay

토양에서 분리된 미생물이 진균의 균사 형태에 미치는 영향을 알아보기 위해 주사전자현미경 촬영을 하였다. 선

발 세균 PA2와 식물병원성 진균 *Colletotrichum acutatum*을 대치배양 하였다. 배양 후 형성된 생육저지선을 중심으로 균사가 자란 agar plug를 잘라 시료 부피 10배의 glutaraldehyde solution (25% glutaraldehyde, 0.1 M sodium phosphate buffer (SPB), tween 80)을 넣어 고정시켰다. 그 후 SPB에 20분간 침지하여 2번 세척하였다. 세척 후 30% / 50% / 70% / 95% ethanol로 각각 1회씩, 100% ethanol로 2회 탈수시켰다. 탈수 시킨 후 시료의 변형을 줄이기 위해 임계점 건조법(critical point drying method; CPD)으로 건조시킨 후 주사전자현미경으로 균사의 형태를 관찰하였다.

식물병 억제효과 생물검정

토양분리 미생물들이 식물병원성 진균의 생장억제 효과를 확인하기 위하여 pot 상에서 식물병원성 진균의 생장 억제 실험을 실시하였다. 식물병원성 진균은 다양한 기주에 균핵병을 일으키는 *Sclerotinia minor*와 모잘록병, 뿌리썩음병, 줄기썩음병을 일으키는 *Rhizoctonia solani*를 대상으로 실험하였다. 처리구는 미생물을 먼저 처리한 후 식물병원성 진균을 처리하는 것과 식물병원성 진균을 먼저 처리한 후 미생물을 처리하는 두 가지 처리구와 수분만 공급하는 대조구로 구분하였다. 각각의 식물병원성 진균은 2×10^4 spores/mL의 포자현탁액을 만들어 접종하였으며, 길항세균은 2×10^7 spores/mL의 농도로 식물체에 관주 처리하였다.

결 과

미생물의 선발 및 동정

유용미생물을 선발하기 위하여 소백산, 강화, 오감산에서 수집한 토양으로부터 미생물을 순수 분리하여 colony 형태학적으로 서로 다른 특징을 갖는 41균주를 선발하였다 (Table 2). 1차 분리 균주를 대상으로 식물생장촉진 능력을 갖는 미생물을 선발하고자 식물체에 처리한 결과 시금치 등 9 작물의 생장촉진효과가 우수한 5균주의 세균을 최종 선발하였으며, 각각 PA1, PA2, PA4, PA5, PA12로 명명하였다. 이 5균주를 16S rDNA로 염기서열을 분석한 결과 *Bacillus subtilis*, *Bacillus altitudinis*, *Paenibacillus polymyxa*, *Bacillus amyloliquefaciens*임을 확인하였다(Table 1).

미생물의 식물병원성 진균 생장억제 능력 검정

토양에서 분리한 5균주가 가지는 식물병원성 진균의 생장 억제 효과를 확인하기 위하여 각 균주를 *Colletotrichum acutatum*, *C. gloeosporioides*, *C. coccodes*, *C. dematium*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia minor*, *Fusarium* sp.와 PDA, TSA, PDA와 TSA 혼합배지(v/v, 1:1)에서 대치배양하여 길항성을 확인하였다. 그 결과 PDA 배지에서는 5 균주 모두 탄저병 균의 균사생장을 높은 수준에서 억제하는 것을 확인하였다(Fig. 1). 그 중 특히 PA1은 *C. coccodes*의 균사생장을 58% 억제하여 높은 억제율을 보였

Table 2. Bacterial isolates from plant rhizosphere and their plant growth promotion effect

Isolates bacteria	PGPR effect	Isolate location	Isolates bacteria	PGPR effect	Isolate location
MK I-A	+	Kangwha-do	TS II-D	+++	Sobaeksan
MK I-B	++	Kangwha-do	TY-A	+++	Ogabsan
MK I-C	++	Kangwha-do	TY-B	+	Ogabsan
MK I-D	+	Kangwha-do	TY-C	++	Ogabsan
MS I-A	+++++	Sobaeksan	TY-E	++	Ogabsan
MS I-B	+	Sobaeksan	TY-F	+++	Ogabsan
MS II-A	+	Sobaeksan	TY-G	+++	Ogabsan
MS II-B	-	Sobaeksan	TK I-A	+	Kangwha-do
MY-A	+	Ogabsan	TK I-B	+	Kangwha-do
MY-B	+++	Ogabsan	TK I-C	+	Kangwha-do
TS I-A	+++	Sobaeksan	TK I-D	+	Kangwha-do
TS I-B	++	Sobaeksan	TK I-E	+	Kangwha-do
TS I-C	+++	Sobaeksan	TK I-F	+++++	Kangwha-do
TS I-D	+++	Sobaeksan	TK I-G	+	Kangwha-do
TS I-E	+	Sobaeksan	TK I-H	+++++	Kangwha-do
TS I-F	+	Sobaeksan	TK I-I	+	Kangwha-do
TS I-G	+++	Sobaeksan	TK II-B	+++	Kangwha-do
TS I-H	++++	Sobaeksan	TK II-C	+++++	Kangwha-do
TS II-A	+	Sobaeksan	TK II-D	+	Kangwha-do
TS II-B	++	Sobaeksan	TK II-E	+	Kangwha-do
TS II-C	++	Sobaeksan	Control	-	

PGPR Index: +, 5~20%; ++, 20~35%; +++, 35~50%; +++++, 50~65%; ++++++, ≥ 65%. PGPR, plant growth promoting rhizobacteria.

Table 3. Plant pathogens used in this study and their host plants

Pathogen	Host plants	Symptoms	KACC accession No.
<i>Colletotrichum acutatum</i>	Strawberry, Pepper	Anthracnose	KACC 40042
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Pepper	Anthracnose	KACC 40003
<i>Colletotrichum coccodes</i>	Tomato, Potato, Pepper	Anthracnose, Black-dot	KACC 40802
<i>Colletotrichum dematium</i>	Pepper, Boxthorn	Anthracnose	KACC 40013
<i>Botrytis cinerea</i>	Tomato, Pepper	Gray mold	KACC 40574
<i>Rhizoctonia solani</i>	Chinese cabbage, Radish	Damping off	KACC 40111
<i>Sclerotinia minor</i>	Chinese cabbage, Radish	Sclerotinia rot	KACC 41066
<i>Fusarium</i> sp.	Potato, Pepper, Tomato	Fusarium wilt	KACC 40050

고, PA2는 *C. dematium*에 60%, PA4 역시 *C. coccodes*의 균사생장을 48.5% 억제하는 것을 확인하였다. 또한 PA5는 *B. cinerea*와 *Fusarium* sp.의 균사생장을 48% 억제하였고, PA12는 *C. coccodes*의 균사생장을 64% 억제하는 것을 확인하였다(Fig. 1). 또한 유용미생물 5균주는 각각 *R. solani*, *B. cinerea*, *S. minor*, *Fusarium* sp.의 균사생장을 억제하는 것을 확인하였다(Fig. 1). TSA 배지에서는 PDA 보다 균사생장 억제 효과가 좋았으며, 다양한 식물병원성 진균에서 좀 더 높은 균사생장 억제를 보였다(Fig. 2). PA1, PA2, PA4, PA5 그리고 PA12는 식물에 균핵병을 일으키는 *S. minor*에

각각 94.5%, 96.5%, 95%, 67.5%, 91.5%로 높은 균사생장 억제율을 보였다(Fig. 2). 그 밖에도 토양에서 선발한 유용 미생물 5균주는 각각 *R. solani*, *B. cinerea*, *S. minor*, *Fusarium* sp.의 균사생장 억제 능력은 PDA 배지에서 대체배양 결과보다 TSA 배지에서 대체배양 했을 때 더 높은 억제율을 보이는 것을 확인할 수 있었다. PDA와 TSA 배지를 1:1로 혼합한 배지에서는 PA1은 *C. acutatum*에 대하여 52%의 균사생장 억제율을 보였으며, PA2 역시 같은 식물병원성 진균에 58.5%의 균사생장 억제율을 보였다. PA4는 *B. cinerea*의 균사생장을 43% 억제하였고, PA5는 *C. acutatum*을

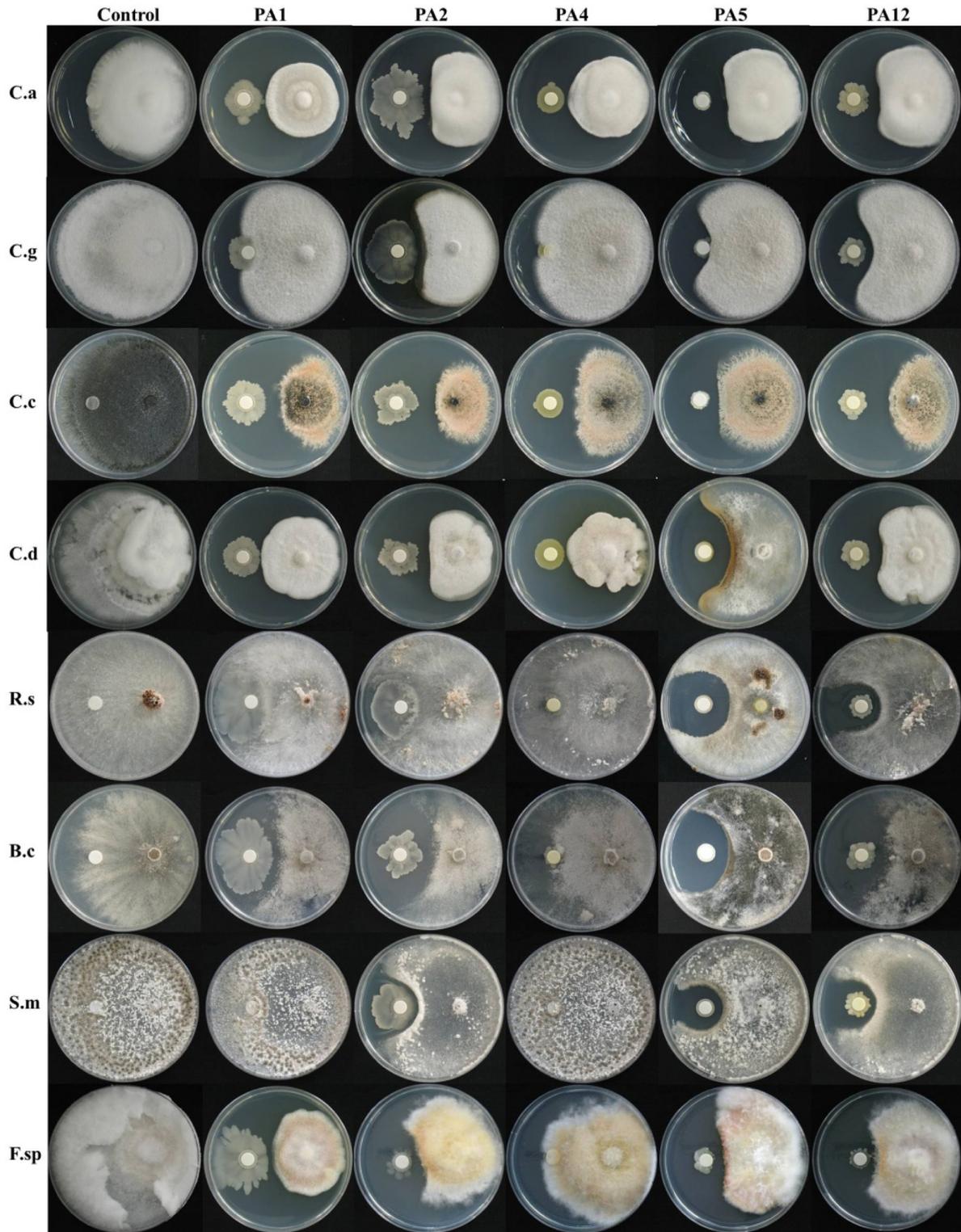


Fig. 1. Dual culture assay on potato dextrose agar medium for *in vitro* inhibition of mycelial growth of various plant fungal pathogens by selected bacterial isolates. C.a, *Colletotrichum acutatum*; C.g, *C. gloeosporioides*; C.c, *C. coccodes*; C.d, *C. dematium*; R.s, *Rhizoctonia solani*; B.c, *Botrytis cinerea*; S.m, *Sclerotinia minor*; F.sp, *Fusarium* sp.

53%, PA12는 *C. coccodes*를 58% 억제하였다(Fig. 3).

Chitinase 생성 활성

진균의 세포벽 주성분인 chitin을 분해하는 chitinase의

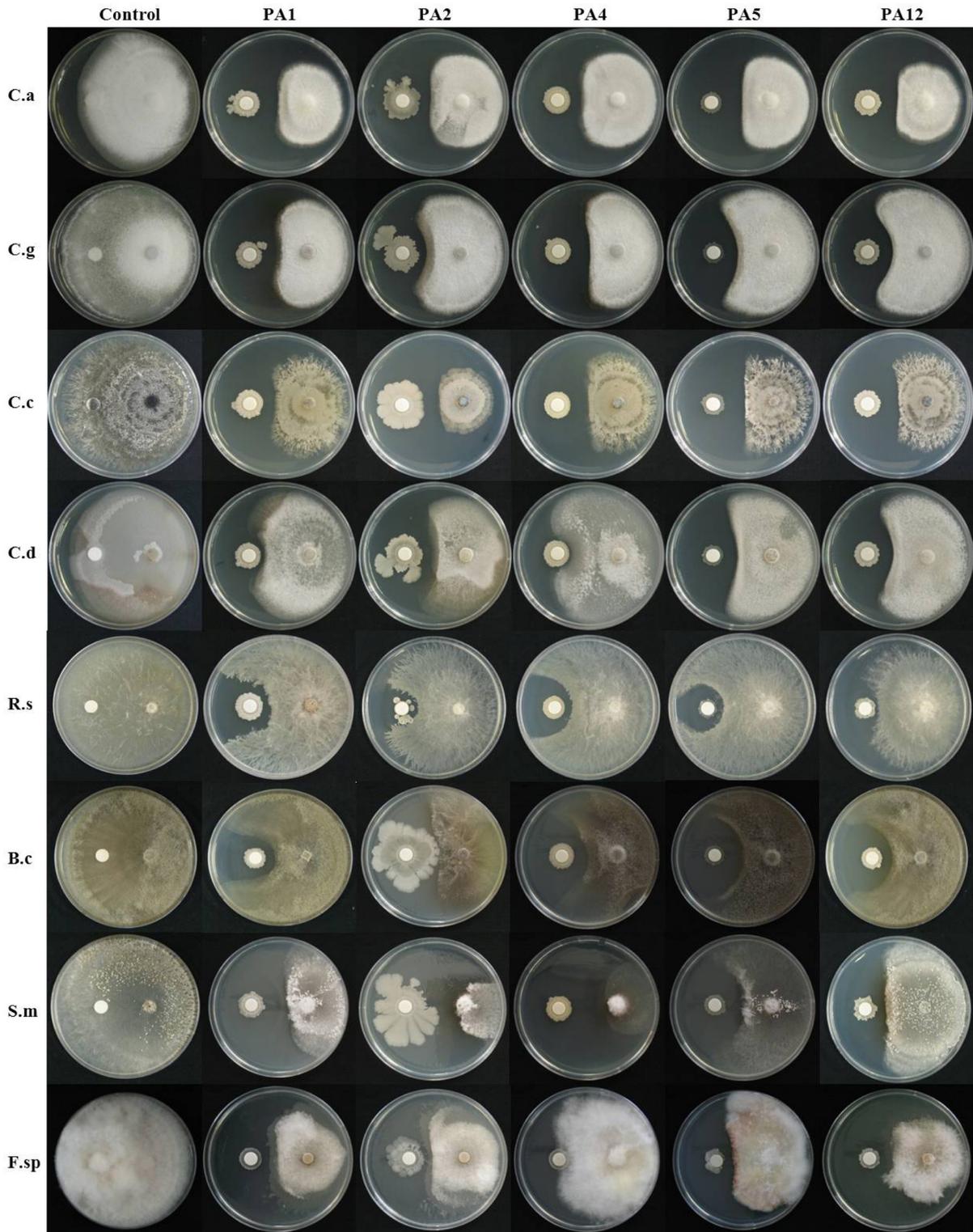


Fig. 2. Dual culture assay in tryptic soy agar medium for *in vitro* inhibition of mycelial growth of various plant fungal pathogens by selected bacterial isolates. C.a, *Colletotrichum acutatum*; C.g, *C. gloeosporioides*; C.c, *C. coccodes*; C.d, *C. dematium*; R.s, *Rhizoctonia solani*; B.c, *Botrytis cinerea*; S.m, *Sclerotinia minor*; F.sp, *Fusarium* sp.

분비를 확인하기 위하여 colloidal chitin medium을 만들어 실험하였지만 본 실험에서 사용된 유용미생물 5균주는 모

두 chitinase를 분비하지 않는 것을 확인하였다.

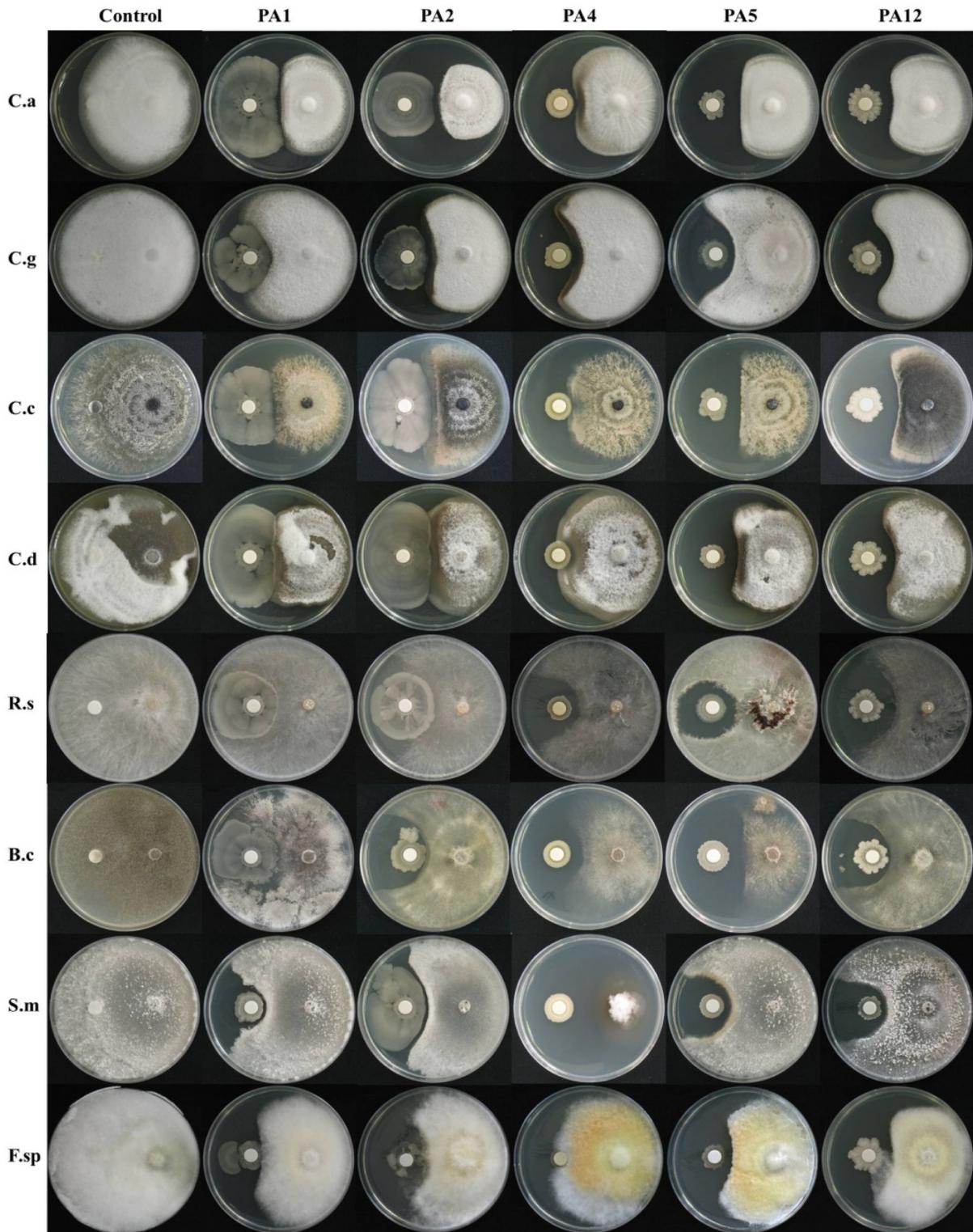


Fig. 3. Dual culture assay in potato dextrose agar and tryptic soy agar combination medium for *in vitro* inhibition of mycelial growth of various plant fungal pathogens by selected bacterial isolates. C.a, *Colletotrichum acutatum*; C.g, *C. gloeosporioides*; C.c, *C. coccodes*; C.d, *C. dematium*; R.s, *Rhizoctonia solani*; B.c, *Botrytis cinerea*; S.m, *Sclerotinia minor*; F.sp, *Fusarium* sp.

Protease 생성 활성

토양에서 분리한 5균주가 단백질 분해효소를 분비하는지

확인하기 위하여 2% skim milk agar 배지에 접종하여 halo zone의 여부를 실험한 결과 5균주 모두 protease를 분비하

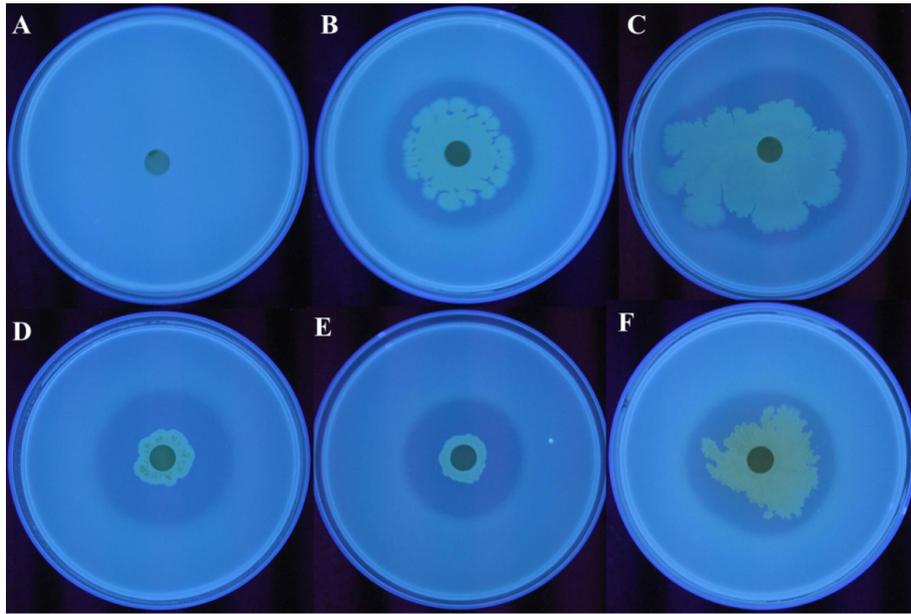


Fig. 4. Proteinase activity by the bacterial isolates on tryptic soy agar and 5% of skim milk agar. A, Control; B, PA1; C, PA2; D, PA4; E, PA5; F, PA12.

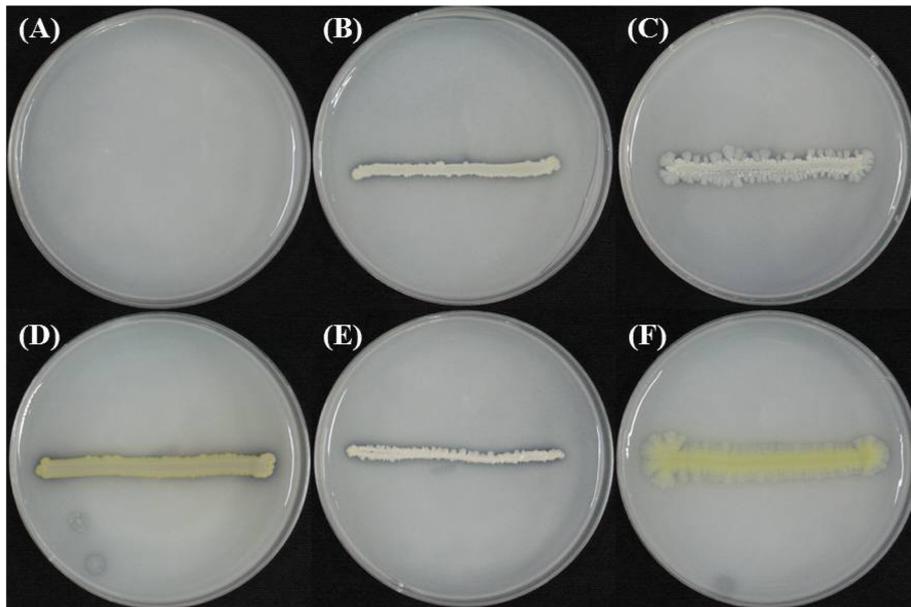


Fig. 5. Phosphate solubilizing activity by the bacterial isolates on Pikovskaya (PVK) agar medium. The bacterial isolates were cultured on PVK medium at 28, for 7 days. A, Control; B, PA1; C, PA2; D, PA4; E, PA5; F, PA12.

는 것을 확인하였다(Fig. 4).

인산가용화(phosphate solubilizing) 활성

토양에서 분리한 5균주의 세균이 난용성 인산을 가용화할 수 있는지 확인하기 위하여 PVK agar 배지에서 인산가용화 실험을 실시하였다. 인산가용화 실험을 실시한 결과

5균주 모두 colony 주변에 halo zone이 관찰되어 난용성 인산을 가용화시킬 수 있는 것으로 판단하였다(Fig. 5).

Siderophore 생성

토양에서 분리한 세균의 Siderophore 생성 여부를 확인한 결과 5 균주 중 PA1, PA2, PA4, PA12가 siderophore를

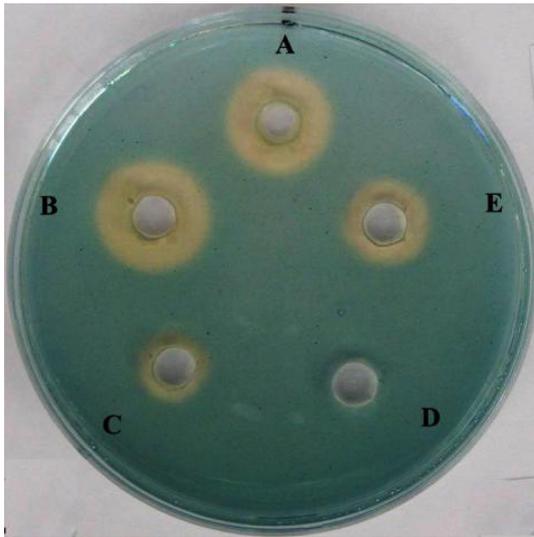


Fig. 6. Siderophore production by bacteria isolates on chrome azurol S agar plates. A, PA1; B, PA2; C, PA4; D, PA5; E, PA12.

생성하였고, 그 중 PA2가 가장 많은 siderophore를 생성하는 것을 확인하였다(Fig. 6).

Hydrogen cyanide (HCN) 생성

토양에서 분리한 5균주가 hydrogen cyanide를 생성하는지 확인하기 위해 실험을 실시하였다. HCN 생성 여부를 확인한 결과 0.5% picric acid와 1% NaCl solution에 침지시킨 filter paper의 색이 brown-red color로 변한 것으로

보아 PA1, PA2, PA12가 HCN을 생성하는 것으로 확인하였다(Fig. 7).

길항균 처리에 따른 탄저병균의 형태적 변화

토양에서 분리한 유용미생물 PA2와 탄저병균 *Colletotrichum acutatum*을 대치배양하였을 때 형성되는 저지선 부분의 균사 형태를 scanning electron microscope (SEM)로 관찰하였다. 그 결과 무처리균의 균사와 PA2와 대치 배양하여 형성된 저지선 부분의 균사를 비교했을 때 처리균의 균사가 무처리균과는 다르게 균사가 정상적인 균사와는 다른 형태인 것을 확인하였다(Fig. 8).

길항균의 식물병 억제 효과

토양에서 분리한 유용미생물과 식물병원성 진균과 대치 배양을 통해 확인된 길항성을 식물체에서 검증하기 위해 pot에서 생물검정을 실시하였다. 대상 병원균은 십자화과 식물에 모잘록병과 균핵병을 유발하는 *R. solani*와 *S. minor*와 그에 강한 길항성을 나타내는 PA4, PA5 균주를 대상으로 실시하였다. 처리는 병원균 접종 후 길항균을 접종하는 방법과 길항균을 접종 후 병원균을 접종하는 2가지 방법으로 실시하였다. 그 결과 무에서는 모잘록병이 발병하여 유용미생물의 효과를 확인할 수 있었다. *R. solani*를 접종한 대조구에서는 66.5% 발병한 반면, 무처리 대조구에서는 모잘록병이 발병되지 않았다. 그러므로 *R. solani*가 효과적으로 접종되었다고 판단되었다. 유용미생물 PA4, PA5를 처리한 것 모두 *R. solani* 접종 대조구보다 낮은 발병율을 보였으며, 모잘록병 방제효과는 PA5가 더 좋은 것을 확인

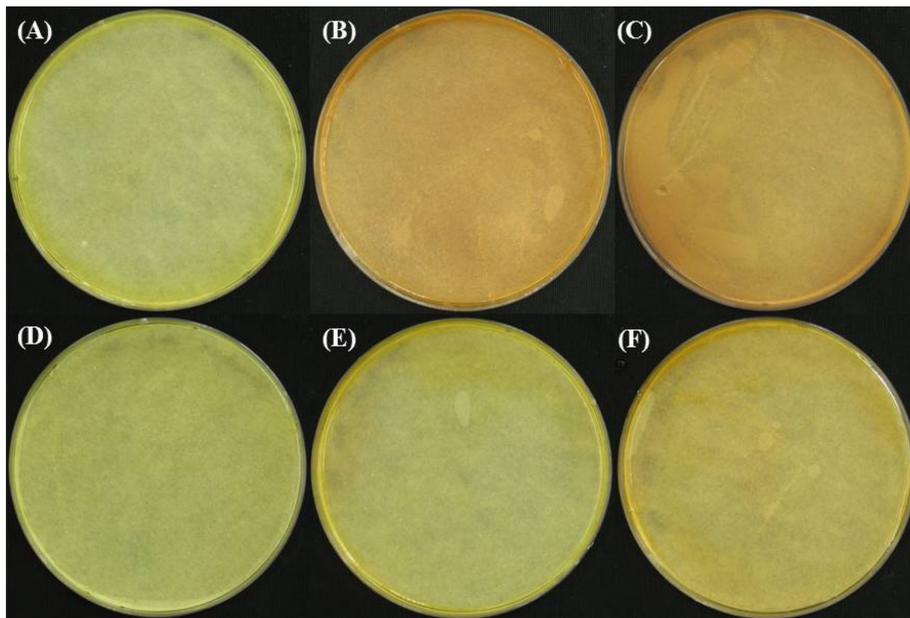


Fig. 7. Production of hydrogen cyanide (HCN) by bacterial isolates in filter paper with 0.5% picric acid and 1% NaCl solution. A, Control; B, PA1; C, PA2; D, PA4; E, PA5; F, PA12.

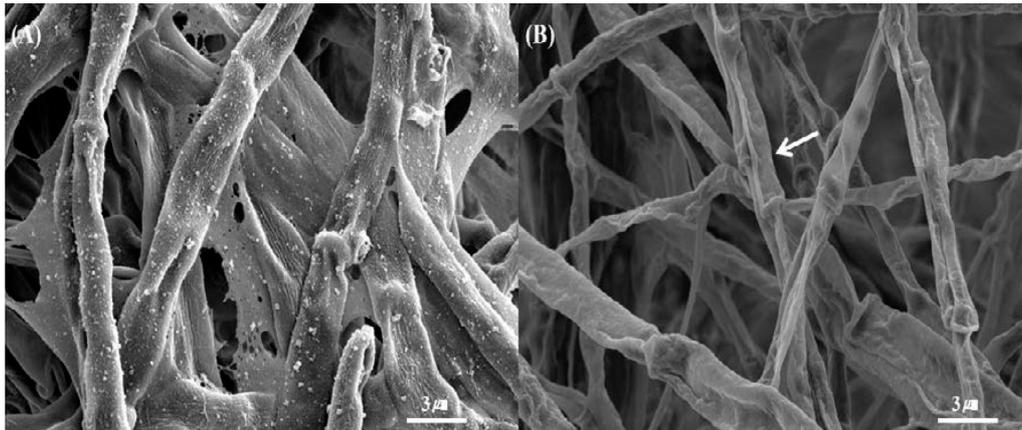


Fig. 8. Scanning electron micrographs of mycelia of *Colletotrichum acutatum* in dual culture plate. A, Control with no treatment; B, Mycelia with PA2 treatment.

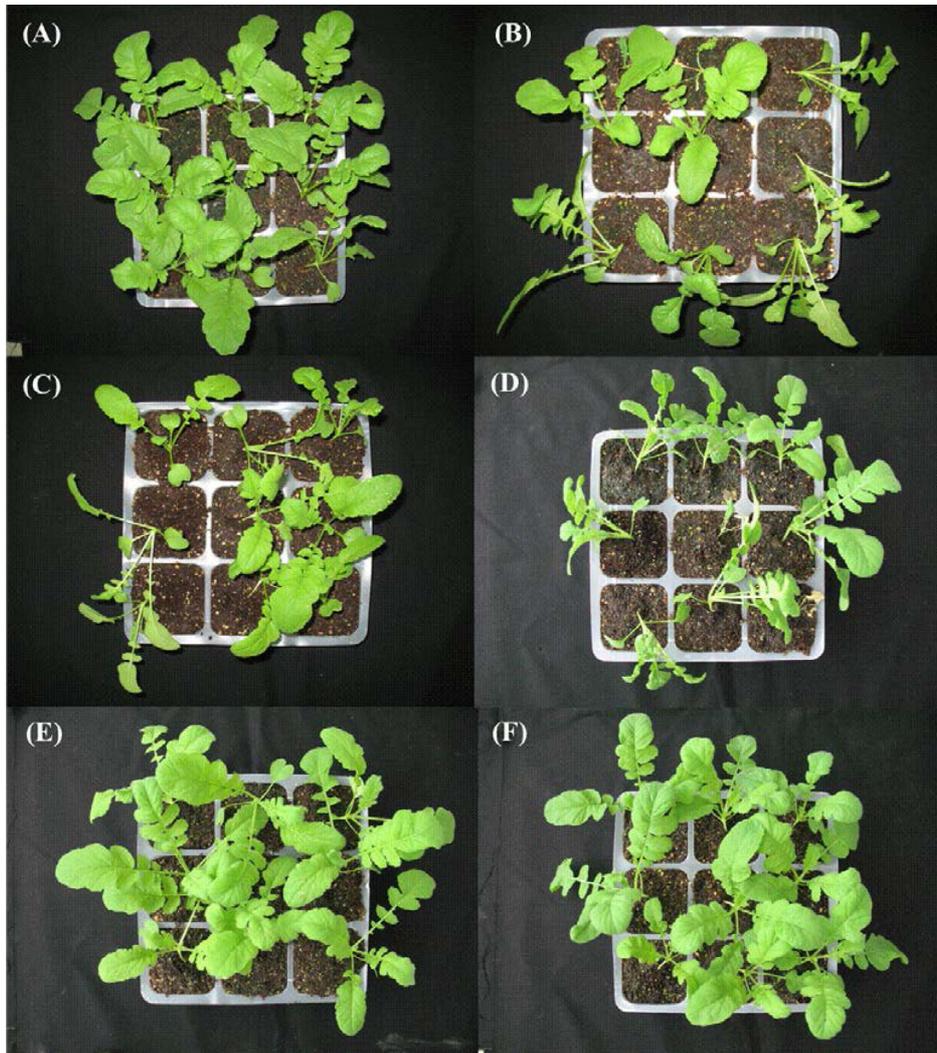


Fig. 9. Inhibitory effect of bacterial isolates PA4 and PA5 on radish against damping off disease caused by *Rhizoctonia solani*. A, water treated only; B, *R. solani* inoculated only; C, treated with PA4 and then inoculated *R. solani*; D, inoculated *R. solani* and then treated with PA4; E, treated with PA5 and then inoculated *R. solani*; F, inoculated *R. solani* and then treated with PA5.

하였다. 또한 병원균 접종 후 길항균을 처리한 것과 먼저 길항균을 처리 후 병을 처리하는 것에 따른 효과는 길항균 처리 후 병원균을 처리한 것이 모잘록병 방제에 더 효과적이었다(Fig. 9).

고찰

본 연구에서 사용된 유용 미생물 중 PA5와 PA12가 식물 병원성 진균의 생장억제 효과가 가장 높은 것을 확인하였다. 선발 미생물의 식물병원성 진균의 생장을 억제하는 2차 대사산물의 영향으로, 그 중 특히 진균의 세포벽 구성물질인 chitin을 분해하는 chitinase, 다양한 세균 및 곰팡이의 생장을 억제하는 antibiotics 그리고 다양한 효소와 volatile compounds 등 2차 대사산물이 식물병원성 진균의 생장을 억제하는 기작으로 작용하는 것으로 보여진다 [2, 5]. 본 연구에서 사용된 선발 세균의 식물병원성 진균의 작용 메커니즘을 밝히기 위해 volatile compounds의 진균 생장 억제 능력 여부를 실험하였지만 본 실험에서 사용된 균주의 volatile compounds에 의한 진균 생장 억제 효과는 확인하지 못하였다. 또한 이전 연구에 따르면 *Bacillus* spp가 분비하는 chitinase의 영향으로 고추의 뿌리썩음병을 일으키는 *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani*를 억제한다는 연구가 보고된 바 있지만 [8] 선발 균주에서는 chitinase를 분비하지 않는 것을 확인하였다. 하지만 토양 내 다양한 유기물을 분해할 수 있는 효소 활성을 실험한 결과 5균주 모두 다양한 종류의 효소를 분비하는 것을 확인할 수 있었다. 미생물의 생장 중 다양한 효소의 분비는 토양 내 유기물을 분해하는데 중요한 역할을 하며 유기물 분해는 식물 생장 중 이용할 수 없는 고분자의 물질을 이용 가능한 저분자의 물질로 변화시킨다는데 중요한 의의가 있다. 또한 인산은 토양에서 식물이 이용할 수 없는 난용성 인산으로 쉽게 변화하는데, 선발된 균주 모두에서 난용성 인산을 가용화 시키는 능력이 있음을 확인하였다. 이는 토양에서 인산의 구조를 변화시킴으로 식물의 인산 흡수율을 증가시켜 식물의 생육을 건전하게 할 수 있을 것으로 생각된다 [9]. 그리고 PA1, PA2, PA4, PA12 균주는 siderophore를 생성하므로 인해 난용성인 $Fe(OH)_3$ 의 구조를 Fe^{3+} 의 이온 형태로 변화시켜 식물이 재흡수할 수 있도록 하며, 근권 주위의 Fe^{3+} 의 이온을 식물 및 유용미생물이 흡수함으로써 식물병원성 미생물이 생육하는 것을 억제할 수 있을 것으로 추측된다 [10]. 미생물의 hydrogen cyanide (HCN) 분비는 식물 근권의 병원성 미생물의 생장을 억제할 수 있다고 보고되었다 [11, 12]. 본 연구에서 사용된 유용미생물 PA1, PA2, PA12 균주도 이 같은 효과가 있을 것으로 추측된다.

다음 연구에서는 유용미생물들이 2차 대사산물의 정량적 분석과 그것들을 분비하는 유전자에 대한 연구가 이루어져야 할 것이다. 또한 유용미생물이 식물의 병 저항성 관련 유전자의 발현에 미치는 영향과 미생물제제의 제형 연구를

통해 미생물제제의 보존기간을 늘리고 그 효과를 장기간 유지시킬 수 있는 연구가 수행되어야 할 것이다.

적요

본 연구는 식물 근권에서 분리한 유용미생물 PA1, PA2, PA4, PA5, PA12의 식물 생장 촉진능력과 식물 병원성 진균인 *Colletotrichum acutatum*, *C. coccodes*, *C. gloeosporioides*, *C. dematium*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia minor* 그리고 *Fusarium* sp.에 대한 생장억제능력을 평가하는데 그 목적이 있다. *In vitro* 실험에서 유용미생물의 식물 병원성 진균의 생장억제 능력을 확인하기 위해 세균배지인 TSA 배지와 곰팡이 배지인 PDA배지, 그리고 TSA와 PDA배지를 각각 50%씩 혼합한 배지(v/v, 1:1)에서 대치배양을 실시하였다. 그 결과 PDA배지에서는 PA2가 *C. coccodes*에 대해 65.5%로 가장 높은 억제능력을 보였으며, TSA배지에서는 PA2가 *S. minor*에 대해 96.5%로 가장 높은 억제력을 보였다. 또한 PDA와 TSA를 혼합한 배지에서는 PA2가 *C. acutatum*에 대해 58.5%로 가장 높은 억제능력을 보였다. 분리한 5균주 모두에서 식물병원성 진균에 대하여 생물적 방제 효과가 있음을 확인하였다. 또한 식물 생장 촉진능력을 유발하는 원인물질을 탐색하기 위해 siderophore, protease, chitinase, hydrogen cyanide (HCN) 생성 유무를 확인하였고, phosphate solubilizing 실험을 실시하였다. 본 연구에서 사용된 유용미생물 5균주를 16s rDNA sequencing 결과 PA1, PA2는 *Bacillus subtilis*, PA4, PA5, PA12 각각 *Bacillus altitudinis*, *Paenibacillus polymyxa*, *Bacillus amyloliquefaciens*로 동정되었다.

Acknowledgements

This research was supported by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (Project No. 111155-3). We would like to appreciate to the financial support.

REFERENCES

- Liu M, Cai QX, Liu HZ, Zhang BH, Yan JP, Yuan ZM. Chitinolytic activities in *Bacillus thuringiensis* and their synergistic effects on larvicidal activity. *J Appl Microbiol* 2002;93:374-9.
- Kai M, Effmert U, Berg G, Piechulla B. Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. *Arch Microbiol* 2007;187:351-60.
- Verhagen BW, Trotel-Aziz P, Couderchet M, Höfte M, Aziz A. *Pseudomonas* spp.-induced systemic resistance to *Botrytis cinerea* is associated with induction and priming of defense responses in grapevine. *J Exp Bot* 2010;61:249-60.
- Niu DD, Liu HX, Jiang CH, Wang YP, Wang QY, Jin HL, Guo JH. The plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus cereus* AR156 induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*

- by simultaneously activating salicylate- and jasmonate/ethylene-dependent signaling pathways. *Mol Plant Microbe Interact* 2011;24:533-42.
5. Roberts WK, Selitrennikoff CP. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. *J Gen Microbiol* 1988;134:169-76.
 6. Pikovskaya RI. Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya* 1948;17:362-70.
 7. Schwyn B, Neilands JB. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem* 1987; 160:47-56.
 8. Ahmed AS, Ezziyani M, Pérez Sánchez C, Candela ME. Effect of chitin on biological control activity of *Bacillus* spp. and *Trichoderma harzianum* against root rot disease in pepper (*Capsicum annuum*) plants. *Eur J Plant Pathol* 2003;109:633-7.
 9. Rodríguez H, Fraga R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol Adv* 1999; 17:319-39.
 10. Mori K, Lee HT, Rapoport D, Drexler IR, Foster K, Yang J, Schmidt-Ott KM, Chen X, Li JY, Weiss S, et al. Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest* 2005;115: 610-21.
 11. Devi KK, Seth N, Kothamasi S, Kothamasi D. Hydrogen cyanide-producing rhizobacteria kill subterranean termite *Odontotermes obesus* (Rambur) by cyanide poisoning under *in vitro* conditions. *Curr Microbiol* 2007;54:74-8.
 12. Kremer RJ, Souissi T. Cyanide production by rhizobacteria and potential for suppression of weed seedling growth. *Curr Microbiol* 2001;43:182-6.