

인삼 뿌리썩음병을 유발하는 곰팡이에 대한 미생물농약 개발

김경석 · 홍수형 · 이은주 · 하지홍
(경북대학교 자연과학대학 유전공학과)

Studies on The Bio-Fungicide Against Pathogenic Fungi Causing Ginseng Root-Rot Disease

Kim, Kyung-seok · Hong, Su-hyung · Lee, Eun-ju, Ha, Ji-hong

Dept. of Genetic Engineering, Coll. of Natural Science, Kyungpook National University
Taegu 702-701, Korea.

Abstract

We selected KGM-100, a powerful antagonizing bacterium against soilborne *Fusarium solani* causing root rot of many important crops, among 500 strains of bacteria isolated from rhizosphere in ginseng root rot-suppressive soil. KGM-100 was presumed to be *Pseudomonas aeruginosa* or its near species. Antagonistic substances produced by KGM-100 against *Fusarium solani* were identified as heat-stable, low-molecular weight antibiotics. The antagonist KGM-100 produced siderophore, an iron chelating agent, that is assumed to be pseudobactin, but the siderophore did not inhibit *Fusarium solani* in vitro. Morphological changes of *Fusarium solani* inhibited by the antibiotics showed an abnormal branch stimulation and a hyphal disintegration. Pot test showed approximately 30%-50% biological control effects when KGM-100 was treated with *Fusarium solani*-infected soil.

I. 서론

유기합성농약의 과량사용은 농작물의 증산을 가져왔으나, 잔류독성과 심각한 환경오염 문제를 야기하여 그 사용에 대한 규제가 강화되고 있는 추세이다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 길항미생물이나 이들이 분비하는 길항물질을 탐색하여 유기합성농약을 대체하고자하는 연구가 활발히 진행되어오고 있다. 현재까지, 유용 길항미생물에 관한 연구에서 *Streptomyces*(1), *Pseudomonas*(2,3), *Bacillus*(4,5), *Trichoderma*(6)등이 보고되고 있으며, 이들의 식물병원성 곰팡이에 대한 억제 기작은 항생물질의 작용에 의한 antibiosis기작(7,8,9), siderophore등의 작용에 의한 competition기작(10,11,12),

chitinase등 외막 가수분해효소의 작용에 의한 exploitation기작(2,13,14)의 세가지 방제기작이 있는것으로 보고되고있다. 이 중에서 항진균성 항생물질에 의한 방제기작은 매우 중요하게 인식되고 있는데, 유기합성농약의 안정성이 문제가 되고있는 현실에 비추어볼 때 미생물에 의해 생성되는 저독성 천연물인 항생물질농약에 대한 관심이 고조되고 있기 때문이다.

본 연구에서는 저병해 인삼경작지로부터 인삼근부병균인 *Fusarium solani*를 비롯한 여러 식물 병원성진균에 강한 길항작용을 가지는 미생물의 분리과 선별 및 동정 그리고 선별균의 항진균 기작을 조사하였으며, pot test를 통해 분리길항균의 이용가능성을 검토하였다.

II. 재료 및 방법

1. 길항균주 분리 및 선별

시료는 영풍균의 저병해 인삼경작지 및 기타 토양에서 채취하였으며, 균을 분리하기 위하여 토양 약 1g을 PBS buffer에 10배 희석한 후 nutrient agar(NA)에 도말하여 육안으로 보아 뚜렷이 구별되는 약 500여주를 분리하였다. 이들로 부터 항진균 활성을 통해 각종 식물병해를 유발하는 곰팡이에 대해 강한 활성을 보이는 균주를 선별하였다. 각종 곰팡이의 배양배지로는 potato dextrose agar(PDA)배지를 사용하였다.

2. 선별균주의 생리, 생화학적 특성 및 동정

선별된 균주의 동정은 Manual of Methods for General Bacteriology (15), Bergy's Manual of Systematic Bacteriology의 방법에 따라 조사하였으며, 균주의 형태 및 운동성은 transmission electron microscope(TEM)으로 관찰하였다.

3. 항진균 활성조사

가. Disk diffusion method

시험균의 fresh culture broth를 O.D₆₀₀=0.15 정도로 희석한 후 Kirby-Bauer법(16)으로 agar배지에 도말하여 사용하였다. 분리된 균배양액을 직경 6mm (Whatman 3 MM)의 filter paper에 묻혀 시험균을 도말한 plate상에 둔 후 저지환을 조사하였다.

나. Agar plug method

Disk diffusion method에서 활성을 보이는 균을 분리하여 petri dish의 가장자리에서 1 cm떨어진 한쪽 끝의 위치에 점적하여 agar배지에 스며들게한 후 곰팡이의 5 mm plug을 plate중심부에 두고 4~5일간 배양하였다. 길항균의 가장자리와 곰팡이 균사 사이의 거리를 측정하여 inhibition여부를 결정하였다. 또한 길항균의 항진균기작을 조사하기 위해 선별균의 배양액을 원심분리하여 상등액을 membrane filter(0.45μm pore size)를 통해 filtration한 후 얻은 상등액을 agar medium과 섞고 균화되, 중심부에 곰팡이의 PDA agar plug을 놓고 배양하여 곰팡이 균사의 직경을 조사하였다. 이때 저지율은 상등액을 포함하지않은 control과 비교하여 계산하

였다.

4. 선별균주의 생물적 방제 기작조사

가. 외막 가수분해 효소의 생성가능성

Chitinase등과 같은 외막 가수분해 효소는 대부분 분자량이 30,000이상이며, 열에 불안정한 것으로 밝혀져있다. 따라서, 10,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상등액을 filtration하여 상등액을 cellulose dialysis sack(MW 12,000)으로 투석한 후 항진균 활성을 조사하였다. 또한 상등액을 80℃에서 1시간동안 가열한 후 항진균 활성을 조사하였다.

나. Siderophore assay (2)

Siderophore의 생성은 low iron synthetic배지(SM배지, Sucrose 2%, L-asparagine 0.2%, K₂HPO₄ 0.1%, MgSO₄ 0.05%, pH 7.2)에서 길항균을 배양한 뒤 결정하였다. 길항균을 50ml SM배지에 접종하고 28℃에서 24시간동안 배양한 후 12,000rpm에서 20분간 원심분리하여 얻은 culture filtrate를 pH 5.5로 적정하고 spectrophotometer tube에 3ml씩 넣은 후, 10⁻²M FeCl₃을 15μl 가한다. 이때 iron을 가하지않은 tube를 blank로 사용하여 350nm~500nm의 파장에서 흡광도를 조사하였다. 한편, King's medium B agar배지(KMB배지, Proteose peptone 2%, Glycerol 1%, KH₂PO₄ 0.15%, MgSO₄·7H₂O 0.15%, Agar 1.5%, pH 7.2)에 미생물을 배양했을 때 형광성 색소를 분비한다면 siderophore의 생성을 의미하므로(17), 길항균을 KMB agar배지상에 배양하여 형광성 색소의 유무를 UV-365nm하에서 관찰하였다.

다. Antibiosis test

선별균에 의한 병원성 진균의 생육 억제가 siderophore이외의 항생물질에 의한것인지를 조사하기 위하여 이 실험을 행한다. siderophore는 수용성임을 감안하여 길항균으로부터의 항생물질 분리는 Buthanol, Ethyl acetate, Benzen, n-Hexane 등으로 추출하여 항진균 활성을 조사하였다.

5. Siderophore의 정제 및 특성

Siderophore의 분리는 Misagi(18)의 방법에 따라 행하였다. 시험균을 50ml SM 배지에 접종하고 24~26℃에서 38시간동안 정치배양 후 12,000rpm에서 20분간 원심분리한 상등액에 두배의 acetone을 가하고 다시 원심분리하였다. 그후 다시

두배의 acetone을 가하고 원심분리하여 얻은 침전물을 reagent-grade acetone으로 세번 washing한 후 0.03M acetone buffer(pH 5.2) 4ml에다 녹이고, 이중 2.4ml의 용액을 sephadex G-25 column(1.5x25cm)에 넣고 fraction collector를 사용하여 24~25℃에서 분당 1.0ml씩 증류수로 용출했다. 그후 fraction당 2ml씩 모아 403nm에서 흡광도를 조사하고 각 peak를 이루는 분획을 모아 10^{-4} M FeCl₃를 100 μ l 가한 뒤 iron chelating능력을 시험하여 siderophore의 peak를 결정하고 기존의 siderophore와 비교하였다(17). 길항균이 분비하는 siderophore가 항진균 활성을 가지는지의 여부를 결정하기 위해 먼저 선별균의 형광성 색소에 대하여 iron과 iron chelator가 미치는 영향에 대해 조사하였다. Iron에 대한 영향은 FeCl₃를 1 μ g/ml, 3 μ g/ml, 10 μ g/ml씩 KMB배지에 첨가하면서 iron chelator로는 EDTA를 2mg/ml씩 동일배지에 가하고 형광성 색소의 유무를 관찰한 뒤 siderophore가 활성에 미치는 영향을 조사하였다.

6. 항생물질의 생산과 정제

항생물질의 생산은 LB배지를 사용하였으며 항생물질의 최적생산온도와 pH, 최적배양시간을 조사한 후 전 배양된 seed 1%를 600ml배지가 든 1L 삼각 flask에 접종하고 37℃, 200rpm 조건하에서 15 liter를 3일간 배양하였다. 배양액을 10,000rpm에서 10분간 원심분리한 후 Diaion HP-20 column에 통과시켜 50% Acetone으로 활성물질을 용출시키고 이를 농축한 후 ethyl acetate로 추출하였다. 그후 농축된 sample을 silica gel (Merck, 70~230 mesh, 230~400mesh) column chromatography(19)와 재결정 실험(20) 및 Preparative TLC (Merck, silicagel plate 60 F₂₅₄)를 반복하면서 정제하였다. 정제과정중 항생물질의 이동은 bioassay, 화학적 정량 및 bioautography법(21)을 병행하여 추적하였다.

7. Pot test

길항 미생물이 in vivo상태에서 *Fusarium solani*의 생육 및 발병을 억제하는지를 조사하기 위하여 Pot test를 행하였다. 길항균을 LB 배지에 배양한 후 원심분리하여 pellet을 0.1M MgSO₄(22)에 현탁시키고, *Fusarium solani*는 PDA에 10일간 solid culture하여 멸균 증류수로 현탁하여 길항균과 *Fusarium solani*를 각각 $1\sim 2 \times 10^9$ CFU/g, 5×10^4 CFU/g의 양으로 멸균 vermiculite에 충분히 섞어 시료로 사용하였다. 그후 so-

dium hypochlorite용액으로 10분간 표면 살균 처리한 후 발아시킨 red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.)을 pot당 2개씩 심고 25℃ growth chamber에서 매일 한차례 관수하며 약 20일간 키운 후 뿌리썩음병이 발병여부를 조사하였다. 발병여부는 root와 hypocotyl부분이 썩은 것을 control plant와 비교하여 결정하였으며, 이를 확인하기위해 각 부분을 잘라 표면 살균처리 후 gentamycin(30 μ g/ml)을 함유한 halfstrength PDA에 배양하여 *Fusarium solani*의 생육여부를 조사하였다. Control은 미생물을 처리하지않은 Pot와 *Fusarium solani*만을 처리한 Pot로 비교하였다. Pot test는 각 실험당 60개의 bean을 사용하여 4회 반복하였으며 그 결과는 Chi-square검정과 Duncan's Multiple Range Test로 통계처리 하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 균주 분리 및 선별

저병해 인삼경작지 및 기타 토양에서 약 500여 균주를 순수 분리하였다. 이들로부터 항진균 활성을 가진 여러 균주를 선별하였으며 이들의 항진균 활성을 Table 1에 나타내었다. 이 중에서 다양한 경제작물의 근부 병균인 *Fusarium solani* 및 기타 식물 병원성 곰팡이에 대해 재현성있게 강한 억제활성을 보이는 균주를 최종 선별하였으며 이를 KGM-100이라 명명하였다.

2. 선별균주의 동정

KGM-100의 형태학적 생리학적 특성을 조사한 결과를 Table 2, Table 3에 나타내었으며, 전자 현미경사진을 Fig. 1에 나타내었다. 길항균은 rod형이였으며 운동성이 있는 것으로 확인되었다. Oxidase 및 arginine dihydrolase생산능과 pyocyanin pigment, pyoverdine pigment의 생성 그리고 41℃에서의 생육등은 전형적인 *Pseudomonas aeruginosa*의 특징을 보이고 있다. 따라서, 길항균은 *Pseudomonas aeruginosa* 또는 그의 근연균으로 동정되었다.

3. 선별균주 KGM-100의 항진균기작

가. 외막 가수분해효소 생성

KGM-100을 LB배지에서 2일간 진탕배양한 후 12,000rpm

에서 20분간 원심분리하여 얻은 상등액을 membrane filter(0.45 μ m pore size)로 filtration한 것을 시료로 사용하여 48시간 투석 한 후와 80 $^{\circ}$ C에서 1시간 가열한 후 disk diffusion method로 항진균 활성을 조사하였다. 그 결과를 Table 4.에 나타내었으며 KGM-100은 외막 가수분해 효소를 생성하지

않는 것으로 확인되었다. 한편 KGM-100 배양액을 동일 volume의 유기용매로 추출한 후 농축하여 활성조사한결과 강한 억제환을 보였으므로 지용성의 항생물질이 존재함을 확인하였다.

Table 1. Antifungal spectrum of isolated microorganisms

\	Test Fungi					
	<i>Maduralla grisea</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium solani</i>	<i>Pyricularia oryzae</i>	<i>Pythium ultimum</i>	<i>Valsa ceratosperma</i>
15	B*			B		C
46			D			
75	B	B	C	B		C
100	A	B	B	A	B	A
152	C	C	C	B	C	B
223	C			C		
261			C			
369	B			C		
464	C			C		

* Agar plug test (Inhibition zone: A \geq 15, 15 > B \geq 10, 10 > C \geq 5, 5 > D)

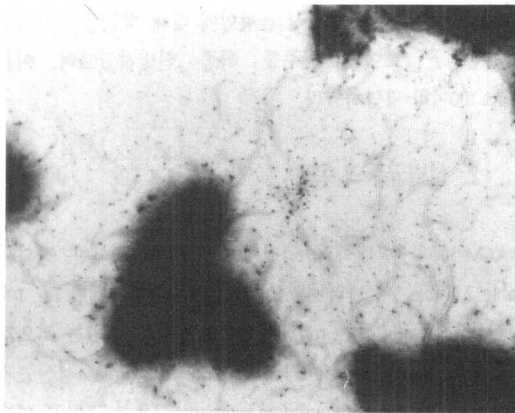


Fig. 1. Micrograph of KGM-100 (by TEM, \times 12,000).

Table 2. Morphological characteristics of KGM-100 and *P. aeruginosa*

Characteristics	KGM-100	<i>P. aeruginosa</i>
Cell form	rod	rod
Motility	+	+
Flagellar number	1	1
Flagellar arrangement	polar	polar
Cell size, μ m	1.2 - 2.2	1.5 - 3.0
Cell diameter, μ m	0.7 - 0.8	0.5 - 0.7

Table 3. Physiological and biochemical characteristics of KGM-100 and *P. aeruginosa*

Characteristics	KGM-100	<i>P. aeruginosa</i>
Gram stain	—	—
Gelatin liquefaction	+	+
Starch hydrolysis	—	—
Denitrification	+	+
Catalase production	+	+
Citrate utilization	+	+
Arginine dihydrolase	+	+
Oxidase	+	+
H ₂ S formation	+	—
Esculin Hydrolysis	+	+
Growth at 4°C	—	—
Growth at 41°C	+	+
Fluorescent pigment	+	+
Pyocyanin	+	d
Lecithinase	—	—
Lipase(Tween 80)	+	+
Utilization of carbon sources*		
(Ribose, Glucose, Arginine, Succinate, Glutamate, Mannitol Gluconic acid, n-Propanol, Ethanol, Citrate, Tyrosine, Fructose, Glycerol)	+	+
Xylose, Arabinose, Mannose Galactose, Sucrose, Sorbitol, myo-Inositol, Maltose, iso-Propanol, Phenol	—	—

+ : positive or good — : negative or not utilized d : doubtful

* Each carbon sources were added with concentrations of 0.5% to The minimal medium of Palleroni and Doudoroff, and growth was checked after 10 days cultivation at 30°C.

Table 4. Assay results on extracellular enzyme production of KGM-100

	Antifungal activity		
	Disk diffusion method	Agar plug method	
	Inhibition zone(mm)	Colony size(mm)	Relative activity(%) ⁵
Culture filtrate ¹	20	24	100
Dialyzed sol. ²	0	40	6
Heat-treated sol. ³	20	26	90
Ethyl acetate ext. ⁴	18	n.e*	n.e

¹ Culture filtrate was concentrated to one tenth by volume.

² Dialyzed culture filtrate, against water at 4°C for 48hrs through cellulose dialysis sack(MW 12,000).

³ Heat-treated culture filtrate at 80°C for 1hr.

⁴ Concentrated soln. after equal volume extraction by 5ml ethyl acetate.

⁵ Relative inhibition of culture filtrate against a control without incorporated culture filtrate.

n.e* : not examined

나. Siderophore 생성

Low iron medium에서 KGM-100에 의해 생성되는 siderophore는 yellow green pigment와 fluorescence에 의해 확인되었으며, culture filtrate에 FeCl₃를 가한 후 350nm~500nm에서 측정된 흡광도를 Fig. 2에 나타내었다. 이 결과로 볼 때 low iron medium에서 배양한 filtrate에 철을 가했을 경우 405nm에서 peak absorbance가 나타났으나 iron-added medium에서 배양한 filtrate에 철을 가했을 경우에는 peak absorbance가 나타나지 않았다. 따라서, KGM-100은 Fe가 부족한 환경에서 철을 효과적으로 이용하기위해 siderophore를 분비함을 알 수 있었다. 405nm에서 KGM-100의 absorption peak는 Teintze *et al.*에 의해 보고된 mixed siderophore인 pseudobactin의 흡수파장인 400nm peak와 유사하다. 따라서 KGM-100에 의해 생성되는 siderophore는 pseudobactin인 것으로 추정되었다.

4. Siderophore의 분리 및 정제

가. Siderophore의 분리 및 정제

Fraction collector에서 얻은 각 fraction을 403nm의 흡수파장에서 조사한 결과를 Fig. 3에 나타내었으며, 여러 peak가 존재하였으나 iron chelating능력을 조사한 결과 fraction number(9, 10, 11, 12)에서 나타나는 peak가 siderophore인 것으로 확인되었다. Siderophore peak를 이루는 fraction을 모아 다시 scanning UV spectrometer로 이들의 흡수파장을

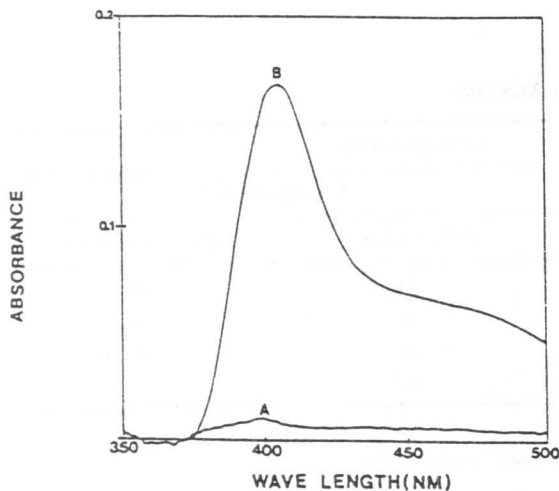


Fig. 2. Absorption spectra of the culture filtrates of KGM-100.

- Iron added(0.1g FeCl₃/L) : Curve A
- Iron not added : Curve B

수파장을 조사하였으며 이 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 여기서 403nm의 peak를 확인할 수 있었으며 이는 pseudobactin의 흡광도와 유사하였다.

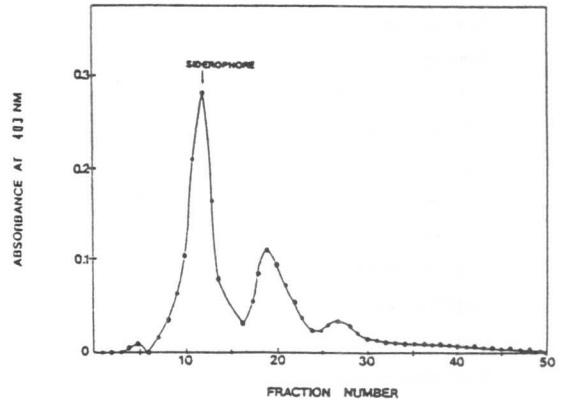


Fig. 3. Gel filtration chromatography of siderophore using a column of Sephdex G-25. Sephdex G-25 column(1.5 x 25cm) was equilibrated and eluted with deionized water. Fractions of 2ml were collected at a flow rate 1ml/min.

나. Siderophore의 생물학적 특성

In vitro에서 iron과 iron chelator가 KGM-100의 형광성 색소 생성 및 활성에 미치는 영향을 Table 5에 나타내었다. 10μg/ml 농도의 iron을 KMB medium에 가했을 경우 형광성 색소를 분비하지 않았으며, *Fusarium solani*에 대한 KGM-100의 억제활성은 가해진 iron의 양에 관계없이 거의 일정하였다. 또한 EDTA을 넣었을 경우에도 siderophore의 생성이 없었으며 iron및 EDTA를 가해주지 않은 KMB medium에서 KGM-100이 보이는 항균활성에 비해 활성이 줄지않았다. 따라서, KGM-100이 분비한 siderophore는 in vitro에서 항균 활성에 관여하지 않는 것으로 보이며 이는 정제 과정에 의해 얻어진 siderophore의 활성조사의 경우와도 동일한 결과로 나타남을 알 수 있었다. 그러나 정제과정 중의 impurity나 처리농도에 있어서 차이가 있을 수 있으므로 이에 대한 후속연구가 필요하리라 본다.

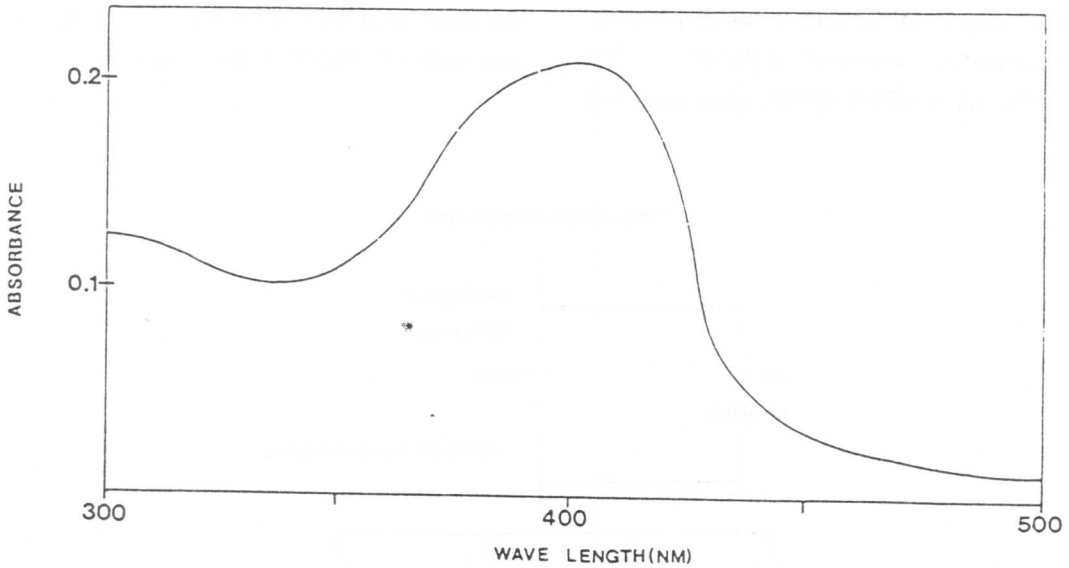


Fig. 4. UV absorption spectra of siderophore

Table 5. Effect of iron and iron chelator on the production of fluorescence and antifungal activity of KGM-100 in vitro

		Chelator added			
		None		EDTA ³	
		fluorescence observed	colony ⁴ size(mm)	fluorescence observed	colony size(mm)
Iron ² added	None Iron	+	30	+	25
	1µg/ml	+	30	.	.
	3µg/ml	+	28	.	.
	10µg/ml	-	29	-	24

¹(+) signifies presence of fluorescence.

²Iron as FeCl₃ was added to the treatments.

³EDTA was added to the KMB medium at 2mg/ml.

⁴Colony size of control(without KGM-100) was 62mm.

5. 항생물질의 생산과 정제

배양시간에 따른 균의 생육, 항균 활성 및 pH의 변화를 Fig. 5에 나타내었다. 균의 생육은 배양 6시간 만에 이미 exponential phase에 들어갔으며 36시간에 stationary phase에 접어들었다. 항균활성은 균의 생육과 동시에 증가하는 양상을 보였으며 48이후 최고에 달하였다. 배지의 pH는 배양 기간동안 거의 일정하게 증가하는 양상을 보였다. 최적조건을 고려하여 15ℓ의 배양액을 Fig. 6과 같은 정제과정을 거쳐 최종적으로 서로 다른 polarity를 가진 두 물질을 순수분

리하였으며, 여기서 methanol로 재결정 실험을 하여 정제한 것을 KGM-100A, prep TLC에 의해 정제한 것을 KGM-100B라 명명하였다. KGM-100A는 노란색의 분말 결정이었으며 이를 현미경으로 확대한 사진을 Fig. 7에 나타내었다. Prep TLC에 의해 정제한 KGM-100B는 dark brown gel이었으며 TLC 상에서 다양한 solvent system으로 전개시킨 결과 단일 spot을 보였다. 선별균이 분비한 항생물질에 의해 영향을 받은 *Fusarium solani*의 사진을 Fig. 8에 나타내었다. 선별균에 의해 영향을 받은 *Fusarium solani*는 control에 비해 abnormal branch와 hyphal disintegration 현상을 보였다. 이러한 mor-

phological change로 보아 cell wall이나 membrane에 영향을 미치는 polyoxin이나, polyene계통의 항생물질은 아닌 것으로 사료된다. 또한 RNA합성을 방해하는 griseofulvin의 전형

적인 hyphal curling현상도 일어나지 않았다. 그러므로 다른 target site를 가질 가능성이 큰 것으로 사료된다.

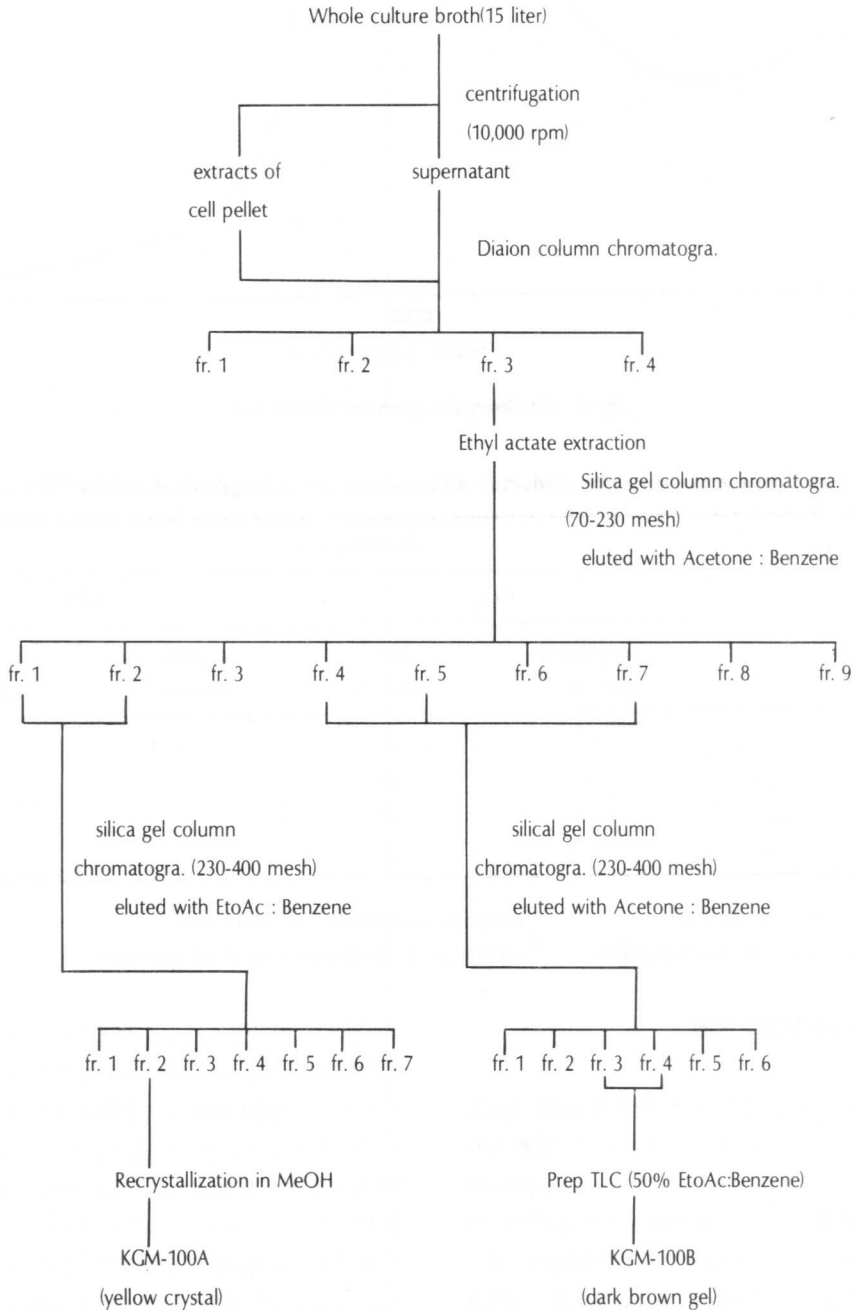


Fig. 5. Purification procedures of the antibiotics KGM-100A and KGM-100B.



Fig. 6. Micrograph of KGM-100A ($\times 400$).

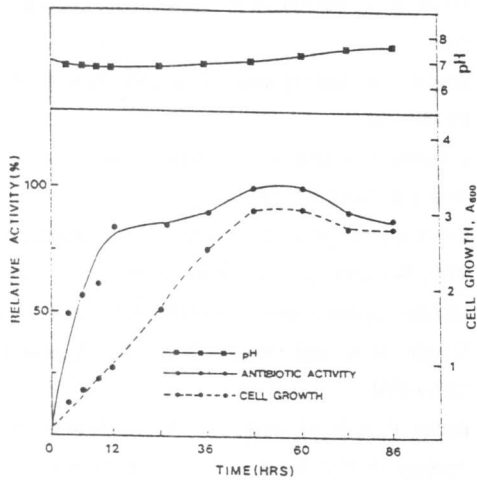


Fig. 7. Growth profile and time course of antibiotic production

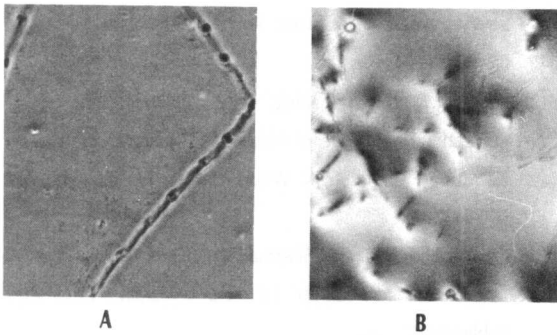


Fig. 8. Morphological changes of *F. solani* inhibited by KGM-100

A : *F. solani* on slide glass ($\times 200$)

B : *F. solani* inhibited by KGM-100 on slide glass ($\times 200$)

7. Pot test

Pot test의 결과를 Fig. 9에 나타내었다. 동일한 실험을 4

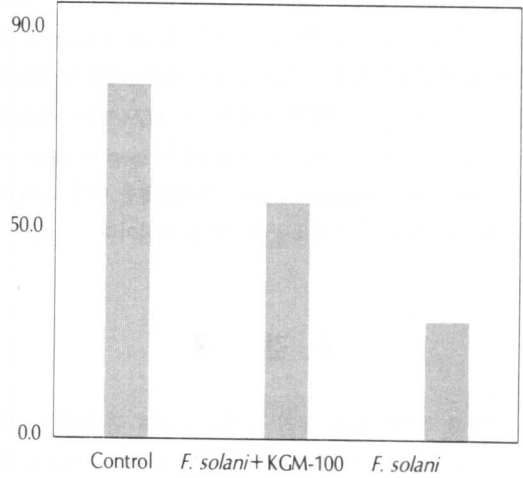


Fig. 9. Mean survival rate of red kidney beans when KGM-100 and *F. solani* were added to pots.

Each column is the means of four replicates.

Survival rate : Control(not-treated) : 84.3%

F. solani + KGM-100 : 64.6%

F. solani : 28.6%

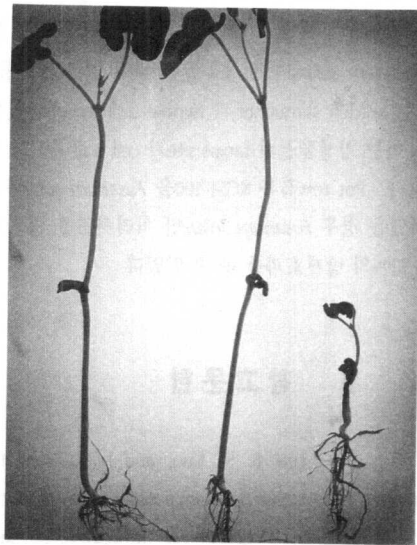


Fig. 10. The photograph of red kidney bean plants after 10 days.

A ; Control (Not-treated)

B ; KGM-100 ($1\sim 2 \times 10^9$) + *F. solani* (5×10^4)

C ; *F. solani* (5×10^4)

회 반복하여 얻은 data를 Chi-square검정과 Duncan's Multiple Range Test로 통계 처리한 결과이며 control, *Fusarium solani* + KGM-100, 그리고 *Fusarium solani*를 처리하였을 경우 각각 84.3%, 64.6%, 28.6%의 생존율을 보였다. 이 결과로 볼 때 *Fusarium solani*만 처리하였을 경우보다 KGM-100과 함께 처리하였을 경우 약 30~50%의 방제효과를 보였음을 알 수 있으며, 이는 생물학적 방제로서 KGM-100이 사용될 수 있음을 나타낸다. Fig. 10은 control과 *Fusarium solani* + KGM-100, 그리고 *Fusarium solani*만 처리하였을 때의 red kidney bean의 10일 후의 생육을 보여주는 사진이다.

IV. 결 론

저병해 인삼경작지로부터 근채류 식물의 근부원인이 되는 *Fusarium solani* 및 기타 식물 병원성 곰팡이의 생육을 강력히 억제하는 세균 KGM-100을 분리, 선별하였으며 *Pseudomonas aeruginosa*이거나 그 근연종으로 동정되었다. 선별된 KGM-100에 의해 생산된 근부균 생육억제 물질은 열에 안정한 저분자의 항생물질인 것으로 확인되었다. 또한 KGM-100은 iron chelating agent인 siderophore를 생산하였고 이는 pseudobactin인 것으로 추정되나 in vitro에서 활성을 보이지 않았다. 항생물질의 분리, 정제결과 두가지 순수물질을 분리하였다. *Fusarium solani*가 항생물질에 의해 영향을 받을 때 비정상적인 branch stimulaton과 hyphal disintegration현상을 보였으며, 이는 항생물질의 target site가 cell wall내부인 것으로 추정된다. Pot test결과 KGM-100을 *Fusarium solani*와 함께 처리하였을 경우 *Fusarium solani*만 처리하였을 경우보다 약 30%~50%의 방제효과를 볼 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Kim, C. J., I. K., Lee, B. S., Yun, and I. D., Yoo. 1993. Concanamycin B, Active Substance Against *Phytophthora capsici* Produced by *Streptomyces neyagawaensis* 38D10 Strain. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. **21**:322~328.
2. Scher, F. M., and Baker, R. 1982. Effect of *Pseudomonas putida* and a Synthetic Iron Chelator on Induction of Soil Suppressiveness to Fusarium Wilt Pathogens. Phytopathology **72**:1567~1573.

3. Weller, D. M., and Cook, R. J. 1983. Suppression of take-all of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonads. Phytopathology **73**:463~469.
4. Pusey, P. L., 1989. Use of *Bacillus subtilis* and Related Organisms as Biofungicides. Pestic. Sci. **27**:133~140.
5. Baker, C. J., Stavely, J. R., Thomas, M. S., and Macfall, J. S. 1983. Inhibitory effect of Bacilis on *Uromyces Phaseoli* and development of rust pustules on bean leaves. Phytopathology **73**:1148~1152.
6. Kim, C. H., 1989. Biological Control of Phytophthora Blight of Red-peper in Korea. Korean J. Plant Pathol. **5**:100~105.
7. Colyer, P. D., and Mount, M. S. 1984. Plant Dis. **68**:703~706.
8. Howell, C. R., and Stipanovic, R. D. 1979. Phytopathology **69**:480~482.
9. Gutterson, N. I., Layton, T. J., Ziegler, J. S., and Warren, G. J. 1986. J. Bacteriol. **165**:696~703.
10. Kloepper, J. W., Leong, j. I., Teintze, M., and Schroth, M. N. 1980. Pseudomonas siderophores: a Mechanism Explaining Disease-suppressive Soils. Current Microbiology **4**:317-320.
11. Schroth, M. N., and Hancock, J. G. 1982. Science **216** : 1376~1381.
12. Bakker, P. A. H. M., Bakker, A. W., Weisbeek, P. J., and Schippers, B. 1987. Soil Biol. Biochem. **29**:443~449.
13. Michell, R. 1963. Phytopathology **53**:1068~1071.
14. Lim, H. S. and S. D., Kim. 1990. Antifungal Mechanism of *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 for Biocontrol of *Fusarium solani* causing Plant Root Rot. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech. **18**:81~88.
15. Smibert, R. M. and Krieg, N. R. 1981. General characterization. In Manual of Methods for General Bactriology (G. Murray, C. Nester, K. Wood nad M. Phillips, eds.), pp. 409-443. ASM.
16. Cappuccino, J. G. and Sherman, N. 1987. Microbiology, A Lab Manual, 2nd ed., pp. 248. The Benjamin / Cummings Publishing Co, Inc.
17. Teinze, M., Hossain, M. B., Baines, C. L., Leong, J., and van der Helm, D. 1981. Struture of ferric pseudobactin, a siderophore from a plant growth promoting Pseudomonas. Biochemistry **20**:6446~6457.
18. Misaghi, I. J., Stowell, L. J. Grogan, R. C., and Spearman, L.

- C. 1982. Fungistatic Activity of Water-Soluble Fluorescent Pigments of Fluorescent Pseudomonads. *Phytopathology* **72**:33~36.
19. Bobbitt, J. M., Swarting, A. e., and Gritter, R. J. 1986. Column chromatography. In *Introduction to Chromatography*, pp. 84~105. D.Van. Nostrand Co.
20. Roberts, R. M., Gilbert, J. C., Rodewald, L. B. and Wingrove, A. S. 1985. Recrystallization and melting points. In *Modern Experimental Organic Chemistry*, pp. 65~91.
21. Issaq, H. J., Barr, E. W., and Aszalos, A. 1977. Thin layer chromatographic classification of antibiotics exhibiting antitumor properties. *J. Chromatogr.* **133**:291~301.
22. Suslow, T, V., and Schroth, M. N. 1981. Rhizobacteria of Sugar Beets: Effects of Seed Application and Root Colonization on Yield. *Phytopathology* **72**:199~206.