

과제 구분	지역농업 기술개발	Code: LS0604	수행시기	전반기	연구기간	'00 ~ '02(3년차완결 )
연구과제명	토양미생물대사산물을 이용한 미세종자작물 생력재 배기술 개발				연구책임자	사 종 구
세부과제명	발아촉진세균 및 곰팡이 분리·동정					
연구원별임무						
구 분	소 속		성 명		담 당 임 무	
세부과제책임자	환경농업연구과		사 종 구		연구계획, 수행, 총괄	
공동연구자	"		김 성 일		연구대행 및 조사	
	"		정 태 성		"	
색인 용어	미세종자, 종자발아, 종자가공, 유용균주					

## ABSTRACT

To isolate seed germination rate improving microorganism from rhizosphere, We collected plant roots and investigated the microflora. The number of fungi and bacteria on rhizoplane was greater than that of rhizosphere. The culture area plenty with organic matter distributed high population density of microorganism. *Azospirillum* spp. less colonized on the rhizosphere of *Allium*. than rhizosphere of *Isoetes japonica*., *Codonopsis lancedlata*, Seame, and grass(*Zoysia japonica*). The seeds harvested domestically had low germination rate, percentage of seed rot development was high so precision needed at seed harvest time and post-harvest storage period. the seed germination rate increased by sorting, testa scarification, washing with cleaning material and drying. As a seed germination rate increasing microorganism *Bacillus* sp.2019, *B. mycooides* 10412, 0023, 0124, *B. pumilus* 0125, 3013, *B. megatherium* 0072, *B. subtilis* 0129, *Pseudomonas putida* 0314, *Fusarium* sp., *Rhizopus* sp., *Trichoderma harzianum* were collected from rhizosphere and rhizoplane of Galic(*Allium sativum*), Leek(*A. thunberg*), Wild-Rocamboles(*A. monathum*) and *Isoetes japonica*., *Codonopsis lancedlata*, and Seame. The microaerobic diazotrophic bacteria, *Azospirillum lipoferum* and *A. brasilens* were isolated from grass. The seeds coated with fungal conidia and bacterial cell, harvested from each fungi and bacteria isolate culture, had high germination rate compared with untreated seeds.

### 1. 연구배경

토양에는 세균, 방선균, 효모, 곰팡이와 같은 다양한 미생물군이 분포하고, 이들은 토양에 유입된 유기물을 분해하여 광물화하는 물질순환의 최종분해자 역할을 한다(Koike 등, 1997). 즉 토양에 유입된 농산부산물이나 퇴비등은 미생물에 의한 광물화작용과정을 거침으로써 최종분해

되어 식물체가 이용가능한 영양원으로 되고, 식물이 그 영양원을 흡수함으로써 자연계의 물질순환 한 주기가 이루어진다. 따라서 토양미생물 생태계가 잘 보존된 토양에서는 식물이 건강하게 자랄수 있다(Lie 등, 1995). 이러한 자연상태에서 식물생장촉진이나 수량증수는 토양에 분포하고 있는 미생물 중 농업에 유익한 영향을 주는 미생물종들의 역할에 의한 것으로 이들은 유용미생물로 구분하여 분리, 보존되어 연구 및 상품생산(Browers, 1982)의 재료로 활용되고 있다(Mccabe 등, 1986; Papavizas 등, 1984; Somasegaran, 1985; Mihuta-Grimm 등, 1986).

유용미생물의 이용은 새로운 농업개발에 광범위하게 이용되고 있는데 그 이유는 이들이 유기물분해와 같은 대사과정에서 분비하는 2차대사산물에 농업에 유리한 물질을 다양하고 포함하고 있기 때문이다(Kloepper, 1983). 유용미생물들이 토양내에서 식물에 유리한 조건을 제공하는 기작으로 철, 마그네슘과 같은 무기이온들과 친화력이 높은 킬레이트화합물을 생산하여 미생물 무기영양원 결핍증을 유발하여병발생을 억제하거나(Kloepper 등, 1980; Neilands 등, 1986), 무기영양원의 식물체흡수를 촉진시켜 수량을 증대시키고, 토양에 있는 곰팡이병원균들의 생육을억제하거나죽이는 항균물질생산하여 병발생을 억제하고(Chet 등, 1988), 식물생장조절제를 생산하여 종자 출현율증대 및 생장을 촉진하고(Harman 등, 1988), 토양내 불용성 인산을 용해하여 가용성인산으로 용해하여 식물흡수를 촉진(Beniens 등, 1976)시켜 식물생장촉진은 물론 염류집적에 의한 작물생육억제 저하효과를 유도하며, 토양병해충에 기생하여 병해충 피해를 방지하고, 공중질소 고정에 의한 질소공급으로 화학비료 절감효과유도(Drevon, 1983)등이 알려져 있다.

본 연구목표는 토양내 유용미생물들이 생산하는 2차대사산물 중 식물생장촉진물질을 분리·수확하여 종자가공처리 재료로 이용하는 것이다. 종자회사에서 직파작물 종자의 품질향상을 위해 종자선별기술과 코팅처리 등 종자가공기술개발에 대한 연구가 활발히 진행되어 농가에서 다루기 쉽고, 파종시 발아율과 출현율을 높여 단위면적당 수량 및 상품을 향상에 기여하고 있다. 이러한 종자발아력향상을 위한 종자가공기술개발에 미생물 이용효과에 대한 연구가 보고되어 있는데, 현재종자가공에 이용되는 미생물들은 주로 토양병생물적방제를 위해 주로 길항미생물 이용기술 개발이 주 목적이었으나, 최근 식물생장호르몬에 대한 분리·정제기술이 발달과 함께 기존 길항미생물들이 항균물질 이외에 식물생장호르몬 생산가능도 가지고 있다는 연구보고가 증가하고, 이들이 생산하는 식물생장조절재의 식물에 대한 영향이 밝혀짐에 따라 식물생장촉진근권세균(Plant Growth Promoting Rhizobacteria:PGPR)로 구분하여 종자발아율 향상을 위한 생물체재로 활용하는 연구가 진행되고 있다. 종자에 처리한 미생물들은 종자발아 시 분비되는 물질과 뿌리 성장과정에서 근권에 분비되는 물질을 이용하여 종자표면이나 근권에 서식하고, 식물에 유리한 물질을 대사산물로 제공함으로써 병방제나 식물생육촉진의 효과를 유발한다. 종자발아촉진을 위한 휴면타파처리물질로 다양하게 이용되고 있는 Gibberellic acid를 생산할수 있는 균들로 곰팡이류(*Alternaria* 속, *Aspergillus* 속, *Fusarium* 속, *Penicillium* 속, *Rhizopus* 속, *Rhizopogon* 속, *Sphaceloma* 속, *Suillus* 속), 방선균류(*Actinomyces* sp., *A. violaceus*, *Nocardia* sp., *Streptomyces* sp.), 세균류(*Arthrobacter* spp., *Azospirillum brasilense*, *A. lipoferum*, *Azotobacter beijerinckii*, *A. chroococcum*, *A. paspali*, *A. vinelandii*, *Bacillus brevis*, *B. megatherium*, *Brevibacterium* sp., *Flavobacterium* sp., *Pseudomonas fluorescens*, *P. fragi*, *Rhizobium phaseoli*) 등이 보고되어있고, 위에 나열한 미생물 중 일부는 종자표면에 접종처리한

후 파종하면 발아율증대는 물론 수량증대 효과도 유도에 이용하고있다. 이러한 균들을 종자가공에 이용하기 위해서는 대상작물에 따라 발아촉진효과를 보이는 균주를 선발하고, 대상 식물의 종자표면과 근권에서 분비한 물질들을 영양원으로하여 용이하게 정착할 수 있는 균을 찾는 것이 중요하다(Roberts 등, 1997). 즉 종자와 근권에서 분비하는 물질은 주로 분해된 탄소화합물로 당류, 아미노산, 친수성 또는 소수성의 유기산 등이 있는데(Curl 등, 1986) 식물에 따라 분비물의 양과 종류가 다르고 균종에 따라 생장에 요구되는 영양원이 다르기 때문이다. 국내외적으로 환경에 대한 관심이 높아지고, 안전한 농업생산물에 대한 요구가 증가됨에 따라 미생물을 이용한 새로운 농법개발에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이러한 미생물이용 농법개발은 식물생장촉진균주를 이용한 토양처리제, 길항균을 이용한 식물병방제 그리고 *Bacillus thuringiensis* 같은 해충방제제등이 주를 이루고 있다. 최근 종자파종기술개발을 위한 종자가공기술에 미생물이 이용되기 시작하였다. 이용목적은 종자파종시 발아촉진에 의한 입모율향상, 농약대체 토양병생물적방제기술개발, 수량증대 등으로 이를 위하여 유용한 미생물을 종자에 효과적으로 처리하는 기술개발이 활발히연구되어지고 있다(Kloepper 등 1988). 종자에 처리된 미생물은 종자발아시 외부토양으로 분비되는 물질을 영양원으로하여 증식하고, 식물의 성장에 따라 뿌리표면에 정착하여 식물에 유익한 기작을 발휘한다(Katzelson, 1965; Rovira, 1965). 그 기작으로 두과식물에 공생하여 뿌리혹을 형성하는 *Rhizobium*(Phillips 등, 1970; Puppo 등, 1978)과 식물뿌리와 관계없이 토양에서 자유서식하는 *Azotobacter*(Apte 등, 1981)에 의한 질소공급(Suba rao, 1984; Hussain 등, 1973, 1983), 토양 내 유기인산이나 불용성 무기인산을 용해하여 식물체 흡수를 도와주는 *Bacillus megatherium var. phosphoticum*(Cooper, 1959; Menkina, 1956), 토양 내 Fe<sup>+++</sup>과 친화력이 높은 Siderophore를 생산하는 유용균들은 병원균이 성장하는데 필요한 철이온 이용제한에 의한 병방제 유도(Swinburne, 1986)등이 실험적증거와 일부 상품화로 알려져있다. 과거 토양미생물학자들은 식물생장촉진을 위해 인산용해세균이나 *Azotobacter*와 같은 질소고정세균 이용에 대한 연구를 활발히 진행하였으며(Cooper 등 1959, Brown 1974)이 균들은 Peat moss같은 재료에 섞어 증량한 다음 경작지에 뿌려 증수효과를 유도하였고, Schmidt(1979)는 질소고정세균과 인산용해세균을 이용하여 수량을 25%이상 증가시키기도 하였다.

대부분의 길항미생물은 식물생장호르몬을 생산하는 기능도 겸비하여 종자가공처리시 이용되는 살충제, 살균제와 같은 농약이나 비료질성분과 함께 생물적재료라는 이름으로 종자가공처리에 이용되고 있다. 무균처리한 종자표면에 균체를 수확하여 처리하면 출현율을 증대시켜주는 세균을 EPR(Emergence promoting rhizobacteria)이라고 명칭하였다. EPR이 생산하는 식물생장에 관여하는 물질은 식물체내에서 생성되는 Phytohormone과 구분하여 식물생장조절물질(Plant Growth Regulator: PGR)로 구분한다(Brown, 1972; Kampert, 1975a; Rovira, 1965). 미생물 중 PGR생산균주의 식물생장에 대한 연구로 Kloepper등(1978)은 무(*Raphanus sativus*)뿌리에서 분리한 세균을 무 종자에 처리하여 파종한 결과 유리온실에서는 21%, 야외에서는 17%의 수량증수가 있었으며 이러한 결과는 사탕무와 감자에서도 비슷하게 관찰되었다(Suslow 등, 1978). 이러한 식물생장촉진세균(PGPR : Plant Growth-Promoting Rhizobacteria)들은 특히 뿌리를 수확 대상으로하는 감자, 무, 사탕무등과 같은 작물의 수량을 30%정도 증가시킨다고 하였다(Suslow, 1982). PGPR 연구자들은 식물생장을 촉진하는 기작에 대한 관심도 증가하고 있다. 즉 이 균의

킬레이트 화합물인 siderophore나 항균물질생산 기작에 대한 연구는 물론 종자발아력 향상에 대한 연구도 진척되고 있는데 종자발아력향상에 관여하는 PGPR균 즉 EPR(Emergence-Promoting Rhizobacteria)들의 기작은 근권내에서 확인하는데 어려움이 많다고하였다(Kloepper, 1988.). 특히 PGPR균들을 이용한 종자가공기술 개발에 대한 연구 보고로, Raha등(1992)은 *Pseudomonas fluorescens*와 *Streptomyces*를 사탕무 종자에 펠릿처리하면 출현율이 13%증가한다고 하였다. 식물의 성장과 발생에 대한 성장물질의 역할이 밝혀지고, 미생물에 의한 PGR물질생산 예가 여러연구자들에 의해 확인됨에 따라 PGPR균들이 생산하는 물질들이 식물에 흡수되어 가시적인 효과를 보인다고 하였다(Brown, 1972). 이에 대한 연구로 Libbert(1969, 1966)는 뿌리표면에 착생하여 서식하고 있는 세균들은 뿌리의 IAA함량을 증가시켜주는 역할을 하고, 식물이 IAA를 흡수하는 것을 실험적으로 증명하였다. PGR에 의한 식물발생촉진은 생육촉진효과 이외에도 종자가 발아하여야 묘로 성장하는 기간을 단축시킴으로써 토양병원균에 의한 피해를 줄이는 부수적효과를 보이는 실험으로 Chikuo(1993)은 *Pseudomonas* spp. 균들을 사탕무 종자에 펠릿처리하여 모잘록병 방제효과를 조사하였으며, Homma등(1979)은 사탕무 종자에 *Stentrophomas* 균을 펠릿처리하여 모잘록병방제효과가 있음을 확인하였다. 이들은 펠릿처리과정에서 처리한 균주수가 감소하는 것을 문제점으로 지적하였다.

본 연구는 토양과 식물근권에서 미생물을 분리하여 참깨, 도라지, 더덕 종자에 처리하여 발아율을 향상시키고 출현율을 증대시켜주는 균주를 선발하고, 이들이 생산하는 PGR물질을 수확하여 종자가공기술개발의 재료로 사용하고자 하였다.

## 2.. 재료 및 방법

### 가. 근권미생물 분리

#### 1) 식물 뿌리채취

근권미생물 분리 대상식물은 알리움속식물 마늘(*Allium sativum* L.), 부추(*Allium thunbergii* G.), 산부추(*Isoetes japonica* A.), 달래(*Allium monathum* Mo.)과 참깨(*Sesamum*), 도라지(*Platycodon grandiflous*), 더덕(*Codonopsis lanceolata*, 잔디(*Zoysia japonica*)을 굴취하여 실험실에 옮긴 후 밀폐한 비닐봉지에 넣고 4℃ 저온저장고에 보관하면서 분리작업을 하였다.

#### 2) 미생물분리

##### ◦ 일반세균 및 열저항세균

뿌리표면과 뿌리에 인접한 토양에 서식하는 근권미생물분리를 위해, 굴취한 뿌리의 표면에 있는 토양을 털어내어 5g을 취하여 생리식염수(0.85% NaCl) 45ml에 넣고 진탕하고(140rpm, 28℃, 30min), 뿌리표면에 서식하는 근면세균은 흙을 털어낸 뿌리를 생리식염수에 넣고 진탕하였다. 열저항성 미생물분리는 토양현탁액을 일정한 온도 유지가 가능한 증기

멸균기에 넣고 열처리(90℃, 1hr)하였다. 희석한 토양 및 근면 현탁액은 생리식염수에 연속 희석한 후 각 선택배지에 0.1ml씩 Nutrient 평판배지에 접종한 후 4mm 유리구슬로 배지 전면에 도말접종하고, 28℃ 항온배양기에 배양하여 형성된 집락으로부터 순수분리 과정을 거쳐 사면배지에 접종·보관(4℃, 냉장고)하였다.

◦*Pseudomonas* 속

토양 및 뿌리희석액을 King's medium B에 접종배양한 후 집락이 형성되면 암실에서 UV light를 조사하여 집락과 집락주변에 형광물질을 생산하는 집락을 선발하였다.

◦*Azospirillum* 속

NFb배지(표 1) 7ml를 시험관에 분주하고, 흙을 털어낸 후 잘게 자른 뿌리조각이나 토양 희석액( $\times 10^{-5}$ )을 접종하여 35℃에 배양하였다. 배지표면에 세균막이 형성되면서 배지에 첨가된 지시약 Bromthymol blue의 변색으로 Acetylene reduction반응이 확인된 시험관의 세균을 채취하여 새로운 NFb배지에 옮겨 배양하고, 순수분리를 위해 세균막 형성초기에 균을 채취하여 NFB + 20mg yeast extract 배지에 도말접종하여 형성된 작은집락을 다시 질소원 결핍배지에 옮겨배양하여 생육이 왕성한 집락을 선택한다. 선택된 집락은 Potato agar(DL-Malic acid-2.5g, Sucrose-2.5g, 감자 200g 추출액-1ℓ)에 미량원소( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ -0.4g,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0.12g,  $\text{H}_2\text{BO}_3$ -1.4g,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -1.0g,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -1.g, DW-1ℓ) 2ml와 Biotin용액 1ml를 첨가한 평판배지에 배양하여 보관하였다. 균주보관시에는 배지표면에 mineral oil 1ml를 넣어 공기접촉에 의한 균주 손상을 최소화하였다.

◦곰팡이류

곰팡이류는 토양현탁액을 DPY agar에 접종하여 배양한 후 형성된 집락으로부터 균을 채취하여 PDA사면배지에 보관하고, 집락의 색깔, 공중균사 발달여부, X100~X400배 광학 현미경하에서 균사격막유무, 포자배열형태 등을 관찰하여 분리하였다. *Fusarium*속은 DPY배지와 PP agar 두배지에서 선발하였다.

토양미생물의 분리를 위한 배지조성은 표 1과 같다.

## 나. 공시작물

발아촉진 미생물선발 조사에 작물은 참깨, 도라지, 더덕이었으며, 참깨는 강원도원종장에서 분양 받은 서둔참깨(발아율-98.5%)이었으며, 도라지와 더덕은 종묘상을 통해 구입한 농가 채취종자로 발아율은 각각 56.3%, 42.7%이었다. 발아율을 높이고 부패율을 낮추기 위해 더덕은 종자에 있는 날개를 제거하고, 날개를 제거한 더덕과 도라지는 농가에서 구입하기 쉬운 세제로 세척하여 그 효과를 조사하였다.

표 1. 토양미생물 분리배지

분리대상균	배 지 명	배지조성( /ℓ)
일반세균	Nutrient agar(NA)	Beef extract 3g, Peptone 5g, glucose 2.5g, agar 15g
<i>Pseudomonas</i> spp.	King's B medium(KB)	Proteose peptone 20g, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 2.5g MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 6g, Agar 15g, Glycerol 15ml
<i>Azospirillum</i> spp.	Semi-solid NFb medium (NFb)	DL-Malic acid 5g, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.5g, MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.25g, NaCl 0.1g, CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O 0.02g, Bromthymol blue sol.;0.5% in 0.2N KOH 2ml, Minor element soln. <sup>a</sup> 2 ml, Fe-EDTA(1.64%) 4ml, pH with KOH 6.8, Vitamin soln. <sup>b</sup> 1ml, Agar 1.75g  Minor element soln. : CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O-0.4g, ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O-0.12g, H <sub>2</sub> BO <sub>3</sub> -1.4g, Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O-1.0g, MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O-1.g, DW-1ℓ Vitamin soln. : Biotin - 10 mg, Pyridoxol-HCl - 20mg, D.W. 100ml
진균류	DPY agar	Dextrose 5g, Peptone 1g, Yeast extract 2g, Sodium propionate 1g, Oxgall 5g, NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 5g, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1g, MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.5g, FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O trace, Agar 20g, D.W. 1ℓ. Autoclave and cool to 45 to 50°C. Add 30mg each of aureomycin and streptomycin
<i>Fusarium</i> spp.	PP agar	Agar 20g, Peptone 15g, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1g, MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.5g, PCNB 0.75g, Streptomycin sulfate 1g, Neomycin sulfate 0.12g

#### 다. 발아촉진균주 선발

근권토양 및 근권에서 분리하여 보관중인 균주들 중 세균류 중 일반세균, 열저항세균, 형광성 *Pseudomonas*는 Nutrient broth 20ml(100ml 삼각플라스크)에 접종하여 24시간 배양한 후 10ml를 취하여 새로운 Nutrient broth 200ml(1000ml 삼각플라스크)에 접종하여 배양(30°C, 120rpm, 12hr)하고, 얼음을 채운 물에 담귀 식힌 후 원심분리하여(6,000rpm, 10 ~ 20min, 4°C) 균체를 수확한 다음 0.1M Phosphate buffer(pH 6.8)로 3회세척하였다. 세척한 균체는 멸균수에 현탁하여 흡광도측정기로 세균 농도가 10<sup>8</sup>cfu/ml가 되도록 세균현탁액을 준비하였다. 곰팡이류는 PDA배지에 배양하여 conidia형성시 까지 배양한 후 멸균수를 부어 접종바늘로 긁어 포자를 현탁시킨 후 4겹의 가아제에 통과시켜 균사를 최대한 제거하고 멸균수로 3회 원심분리세척(4,000rpm, 5min, 4°C)한 후 멸균수에 10<sup>5</sup>cells/ml 농도로 조정하였다. 준비된 세균 및 곰팡이 현탁액은 5% Sodium carboxy-methylcellulose 용액과 1:1(v/v)섞은 후 종자에 소량씩첨가하여 저으면서 Talc를 뿌려 건조하게 한 후 다시 용액을 첨가하는 과정을 반복하여 종자표면에 균체가 충분히 묻도록하였다. 종자표면은 멸균수로 5회 세척하였으며 NaOCl과 같은 표면살균처리는 하지 않았다. 준비된 종자는 건조시키지 않고 최대한 빠른 시간내에 파종하여 발아율을 조사하였다.

## 라. 균주 동정

무처리구에 비해 발아율을 향상시키는 균주 중 세균은 Grma 염색, 전자현미경을 통해 형태와 편모를 확인하고, 생화학적 분해능과 필수영양소 그리고 항생제저항성등을 조사하여 Bergey의 분류체계에 준하여 동정하고, 곰팡이류는 포자형태, 균사격막, Phialide, 분지양상, 집락형태고 탄소영양원 공급에 의한 생육상황 등을 조사하여 동정하였다.

*Bacillus*속은 Gram stain, Endospore, Catalase, V-P reaction, Growth in aerobic agar, Growth at 50°C and 65°C, Growth in 7% NaCl, Acid and gas in glucose, NO<sub>3</sub> reduced to NO<sub>2</sub>, Starch hydrolysis, Rods 1.0µm wide or wider, pH in V-P medium<6.0, Hydrolysis of casein, Parasporal bodies등을 조사하였으며, 동정은 Norris 등(1981)(표 2)에 준하였다

K.B배지에서 분리한 형광성 *Pseudomonas*세균들은 Poly-β-hydroxybutyrate (PHB), Arginine dehydrolase, oxydase test와 각종 영양원분해 등을 다음과 같이 조사하였다.

### 1) 그람반응

3% KOH의 한방울을 슬라이드글라스위에 놓고 이것에 beef extract:peptone agar 또는 yeast extract:peptone agar에서 24시간 배양한 균체를 백금으로 취해서 혼합한다. 그람음성균에서는 균체가 응집해 점질을 띠고 백금으로 혼합액을 들어올리면 실처럼 따라올라오지만 그람양성균에서는 균체가 균일하게 분산하고 상태대로 변하지 않는다.

### 2) 운동성

세균은 편모의 추진력으로서 운동한다. 이 운동성은 좁은 범위에서 진동하는 브라운 운동과는 확실히 구별된다. 운동성은 위상차현미경을 이용하면 간단히 확인할 수 있다. 보통 현미경에서 운동성을 관찰하는 경우는 세균현탁액 또는 액체배양액을 백금으로 취해서 커버글라스의 중앙에 놓는다. 이것을 거꾸로 흘 슬라이드글라스의 구멍의 중앙에 물방울이 오도록 커버글라스를 덮는다. 양자사이에 소량의 물을 스며들게 커버글라스를 고정하고 검경한다.

### 3) 탄소화합물의 분해와 이용

#### ① 당의 산화·발효시험(OF 시험)

화학합성종속영양세균의 식물병원세균은 당을 대사하고 에너지원으로 한다. 이 대사에는 혐기적 조건하에 일어나는 발효적 대사와 산소 존재하에 일어나는 산화적 대사로 구별된다. 세균은 그 종류에 따라서 어느것이나 한쪽 경로에 따라서 당을 대사하는 것과 양쪽의 경로를 이용해서 대사하는 것이 있다. 본 시험은 발효적 대사경로를 갖는 세균과 산화적 대사 경로를 가지는 세균, 산생성을 지표로해서 조사하는 것으로서 세균의 동정상 중요한 식별요소의 하나이다. 기질로서는 보통 glucose를 이용한다.

㉠ 방법 : Hugh and Leifson의 OF 배지를 이용한다.

㉡ 배지 : peptone 2g, NaCl 5g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.3g, BTB 0.03g, Glucose 10g, Agar 3g, 증류수 1,000ml, pH 6.8

배지는 고압살균후 급냉해 용존하는 공기를 빼낸다. 1균주에 2개의 시험관으로 고층배지에 침적중하고 그중 한 시험관에는 멸균유동파라핀을 약 1cm의 두께로 덮는다. 28°C에서 배양한다.

㉔판정 : 유동파라핀을 중층으로 하지 않은 개방시험관만이 세균의 생육과 배지의 황변(산의 생성)이 보여지는 경우는 산화형(O형)이고 또 개방, 폐쇄 양시험관에 생육과 황변이 보여지는 경우는 발효형(또는 산화·발효형; F형)으로 판정.

세균의 종류에 따라서 가스를 발생해 배지에 균열이나 기포가 생기는 경우가 있다. 개방 폐쇄의 어느쪽의 시험관에도 생육이 보여지지 않는 경우는 배지의 영양조건이 만족되지 않을 가능성이 있다. 이 경우는 glucose를 다른 당으로 대신하고 yeast extract를 소량(0.1% 이하)가해서 조사한다. 생육은 인정되지만 산의 생성이 인정되지 않는다면 알칼리를 나타내는 경우는 O/-형으로 표시하고 구별한다.

표 2. 내생포자형성 세균동정표(Norris등,1981)

---

1. Catalase: positive.....2	
Negative.....17	
2. Voges-Proskauer: positive.....3	
negative.....10	
3. Growth in aerobic agar: positive.....4	
negative.....9	
4. Growth at 50°C: positive.....5	
negative.....6	
5. Growth in 7% NaCl: positive.....	<i>B. licheniformis</i>
negative.....	<i>B. coagulans</i>
6. Acid and gas from glucose(inorganic N): positive.....	<i>B. polymyxa</i>
negative.....7	
7. Reduction of NO <sub>3</sub> to NO <sub>2</sub> : positive.....8	
negative.....	<i>B. alvei</i>
8. Parasporal body in sporangium: positive.....	<i>B. thuringiensis</i>
negative.....	<i>B. cereus</i>
9. Hydrolysis of starch: positive.....	<i>B. subtilis</i>
negative.....	<i>B. pumilus</i>
10. Growth at 65°C: positive.....	<i>B. Stearothermophilus</i>
negative.....11	
11. Hydrolysis of starch: positive.....12	
negative.....15	
12. Acid and gas from glucose(inorganic N): positive.....	<i>B. macerans</i>
negative.....13	
13. Width of rod 1.0μm or greater: positive.....	<i>B. megatherium</i>
negative.....14	
14. pH in V-P broth<6.0: positive.....	<i>B. circulans</i>
negative.....	<i>B. firmus</i>
15. Growth in anaerobic agar: positive.....	<i>B. laterosporus</i>
negative.....16	
16. Acid from glucose(inorganic N): positive.....	<i>B. brevis</i>
negative.....	<i>B. sphaericus</i>
17. Growth at 65°C: positive.....	<i>B. atearothermophilus</i>
negative.....18	
18. Decomposition of casein: positive.....	<i>B. larvae</i>
negative.....19	
19. Parasporal body in sporangium: positive.....	<i>B. popilliae</i>
negative.....	<i>B. lentimorbus</i>

---



## ② 당의 분해

세균이 유일한 탄소원으로 분해·이용하는 당의 종류를 조사하는 시험이다. 배지에 1종류의 당을 첨가해서 배양하고 산의 생성과 증식의 유무로서 분해성을 판정한다. alcohol, 다가 alcohol 및 배당체의 분해성도 같은 방법으로 조사한다.

㉠방법 : 다음의 배지 가운데 하나를 기본배지로 해서 기질을 0.5~1% 농도로 첨가하고 사면배양한다.

- ㉡배지 : <Ayer's, Rupp and Johnson의 배지>  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  1g, KCl 0.2g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2g, BTB 0.03g, Agar 15g, 증류수 1,000ml, pH 6.8  
<Stanier, Palleroni and Doudoroff의 배지> 1M Phosphate buffer(pH 6.8) 40ml, Hutner's vitamin free 염류용액 20ml,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1g, BTB 0.03g, Agar 15g, 증류수 1,000ml  
Hutner's vitamin free 염류용액의 조성 : 니트리로트리초산(용해후 KOH에서 중화),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  14.45g,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  3.33g,  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  9.25mg,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  99mg, Metals 44 50ml, 증류수 950ml  
Metals 44의 조성 : EDTA 250mg,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,095mg,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  500mg,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  154mg,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  39.2mg,  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  24.8mg,  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  17.7mg,  $6\text{NH}_2\text{SO}_4$  수방울, 증류수 100ml  
<Dye의 C 배지>  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  0.5g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2g, NaCl 0.5g, Yeast extract 1g, Agar 15g, 브롬크레졸황(1.5% ethanol에 용해) 0.7ml, 증류수 1,000ml, pH 6.8  
<peptone 수> Peptone 10g, 브롬크레졸황(1.5% ethanol에 용해) 0.7ml, 증류수 1,000ml, pH 6.8

대부분의 식물병원세균은 Ayers 등의 배지에서 생육하지만 일부세균은 두드러지게 생육 불량이든가 전혀 생육하지 않는다. 이러한 경우는 Stanier 등의 배지에서도 생육하지 않는 세균은 생장소를 요구한다고 생각해도 좋다. 생장소 요구성을 갖는 식물병원세균은 많은 경우 니코틴산 또는 니코틴산아미드의 첨가(1~50mg/l)에 의해서 생장할 수 있게 된다. 이렇게 해도 생장이 보여지지 않는 경우는 영양요구성이 매우 복잡하다고 생각되어지고 yeast extract 또는 peptone을 0.05~0.1% 첨가한다. yeast extract나 peptone은 분해해서 알칼리를 생성하기 때문에 산의 생성이 약한 경우는 중화되어서 검출불능으로 될 가능성이 있다. 첨가량을 낮게 억제하는 것에 주의한다.

어느 기본배지를 사용하는 경우도 기질을 첨가하지 않는 대조를 반드시 준비해서 생육과 색조의 변화를 비교할 필요가 있다.

㉢판정 : 이식후 14일간 수시로 관찰하고 세균의 증식과 산의 생성(배지의 황변)이 보여지는 것을 양성으로 한다. 배지에 균열이 생기는 경우는 가스의 발생을 나타낸다. pH 지시약이 환원되어서 배지가 백색으로 되는 경우는 그것도 기록한다.

세균의 증식과 산의 생성은 반드시 일치하지는 않는다. 일부의 세균에서는 특정의 당류를

첨가한 합성배지에서 생육이 거의 보이지 않는데도 불구하고 배지가 급속도로 황변하는 경우가 있다. 이것은 당이 탄소원으로는 이용되지 않고 직접산화를 받아서 산성물질로 변화하는 것을 나타낸다. 당류의 분해성을 조사하는 경우에 가장 주의해야만 하는 점중의 하나이다.

### ③ 유기산의 분해

유기산도 당류와 마찬가지로 탄소원으로서의 이용성을 조사한다. 단지 반응은 유기산이 이용된 결과 방출되는 알칼리 이온에 의한 배지의 청변으로 판정한다.

㉠ 방법 : 기본배지는 당분해성 배지에서 이용한 것과 동일하다. 그외에 Dye의 OY 배지를 이용할 수도 있다. OY 배지 :  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  0.5g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2g, NaCl 5g, Yeast extract 0.8g, BTB 0.016g, 유기산 2g, Agar 15g, 증류수 1,000ml, pH 6.8 유기산은 나트륨염을 이용한다. 유리산의 경우는 용해후 NaOH로서 중화한다.

㉡ 판정 : 당류의 분해시험에 준해서 관찰하고 배지가 비식균대조에 비해서 분명히 청변한 것을 양성으로 한다.

### ④ Saccharose로 부터의 환원물질의 생성

Saccharose를 분해해서 환원물질을 생성하는 물질을 조사하는 시험

㉠ 방법, 배지 : Beef extract 5g, Peptone 10g, Saccharose 40g, 증류수 1,000ml, pH 6.8 시험관에 2ml씩 분주해서 멸균하고 세균을 이식해서 2일간 배양한다. 이것에 동량의 베네딕트액을 첨가해서 끓는 물에 10분간 넣은 후 급냉한다. <베네딕트액> 구연산나트륨 17.3g,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ (무수) 10g,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  1.73g, 증류수 100ml 구연산나트륨과 탄산나트륨을 60ml의 증류수에 용해시키고 이것을 각반하면서 별도로 20ml의 증류수에 용해한 유산동을 혼합하고 증류수를 첨가해 100ml로 만든다.

㉡ 판정 : 황갈색 침전이 생기는 것을 양성으로 한다.

### ⑤ 아세트산 시험

포도당을 분해해서 아세트산을 생성하느니 여부를 조사하는 시험으로서 장내세균군의 감별성상으로서 중요하다. 이 반응은 제안자의 이름을 따서 Voges-Proskauer(VP) 반응이라고도 불린다.

㉠ 방법, 배지 : Peptone 5g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  5g, Glucose 5g, 증류수 1,000ml, pH 7.0 5ml씩 시험관에 분주후 멸균한다. α-나프톨 시약 : α-나프톨 5g을 에탄올 100ml에 용해 KOH 액 : KOH 40g을 증류수 100ml에 용해 상기배지에 5일간 배양한 후 배지 1ml를 별도의 시험관에 넣고 이것에 α-나프톨액 0.6ml와 KOH액 0.2ml를 첨가한후 잘 진탕한 뒤 사면으로 놓은후 정취한다.

㉡ 판정 : 15~60분 후에 배지가 짙은 빨강색으로 된 경우를 양성으로 판정.

### ⑥ 메틸레드 시험

아세트산 시험과 같은 조성의 배지를 이용하고 포도당의 분해산물에 의해서 강산성(pH

4.2)이 되는지 어떤지를 조사하는 시험이다.

㉠ 방법, 배지 : Peptone 5g,  $K_2HPO_4$  5g, Glucose 5g, 증류수 1,000ml, pH 7.0 <메틸레드시약> 메틸레드 0.01g을 30ml의 95% 에탄올에 용해 → 아세트인 시험이 끝난후 남은 배지에 5~6 방울의 메틸레드시약을 첨가한다.

㉡ 판정 : 배지가 적변하는 것을 양성, 황~등색의 것을 음성으로 판정한다.

#### 4) 질소화합물의 분해와 이용

##### ① 질소원 및 탄소원으로서의 아스파라긴의 이용

식물병원세균에서는 아스파라긴을 유일한 탄소원 및 질소원으로서 이용하는 능력이 감별성상의 하나로 되어있다.

##### ㉠ 방법, 배지

<용액 A>  $KH_2PO_4$  1g, KCl 0.2g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2g, 증류수 500ml, pH 7.0  
고압살균한다.

<용액 B> L-아스파라긴 5g, 증류수 500ml → 밀리포어 필터에서 여과한다.

A, B 양액을 무균적으로 혼합하고 시험관에 5ml씩 분주한다. 1균주당 4개의 시험관을 준비하고 4일 마다 4회 계대배양을 행한다.

㉡ 판정 : 생육의 유무로서 판정한다. 4회의 이식에서 전부 증식이 인정된다면 양성으로 한다. 확실하지 않는 경우는 최후에 부이온에 이식해서 생균의 존재를 확인한다.

##### ② 초산염의 환원성

세균이 초산염을 환원해서 아초산 또는 암모니아를 생성하는지 여부를 조사하는 시험으로서 세균의 중요한 감별성상의 하나이다.

㉠ 방법, 배지 : Beef extract 5g, Peptone 10g,  $KNO_3$  1g, 증류수 1,000ml, pH 6.8  
시험관에 5ml씩 분주하고 고압살균한다.

<시액 A>  $\alpha$ -나프틸아민 0.5g, 30% 초산 100ml

<시액 B> 설파닐산 0.3g, 30% 초산 100ml

배지에 균을 이식하고 2~5일 배양한 후 이것에 시액 A 및 B를 각각 1ml씩 첨가하고 30분간 정치시킨다. 반드시  $KNO_3$ 를 첨가하지 않은 배지를 대조로서 이용한다.

㉡ 판정 : 배지가 붉게 변하는 것을 양성으로 한다. 적변하지 않은 경우는 초산이온이 환원되지 않았던가 생성된 아초산이 암모니아로 환원되었던가의 중의 하나이다. 이것을 조사하기 위해 시액 A, B를 첨가한 상기배지에 아연분말을 첨가하고 1~2시간 정치한다. 초산염이 환원되지 않고 남아있다면 적변한다.

##### ③ 아르기닌 가수분해

*Pseudomonas*속 세균의 일부는 혐기적 조건하에서 아르기닌을 가수분해하고 시트룰린, 오르니틴, 카루베미롤린산을 거쳐서 최종적으로 ATP,  $NH_3$  및  $CO_2$ 를 생성하는 대사경로를 갖고 있다. 본 시험은 이 대사에 관여하는 Arginine dehydrolase의 존재를 조사하는 시험으로서 특히 *Pseudomonas*속 세균의 중요한 식별성상의 하나이다.

㉠ 방법, Thornley의 배지 : Peptone 1g, NaCl 5g,  $K_2HPO_4$  0.3g, Phenol red 0.01g,

L-arginine-HCl 10g, Agar 3g, 증류수 1,000ml, pH 7.2

이 배지를 시험관에 2ml씩 분주하고 고압살균한다. 고충배지로서 침적종한 뒤 유동파라핀을 중층으로 덮고 1주일간 배양한다.

㉠ 판정 : 배지가 적홍색으로 변하는 것을 양성으로 판정하고 등황색 그대로 변하지 않는 것을 음성으로 한다.

#### ④ 단백질 분해성

일반적으로 pronase 또는 protease라고 총칭되는 단백질 분해효소의 활성유무를 조사하는 시험으로서 기질로는 젤라틴, 카제인, 혈청, 계란 등이 사용된다.

(1) 젤라틴 액화시험 : 고분자인 젤라틴의 분해를 점성의 저하로서 조사한다.

㉡ 방법, 배지 : Beef extract 5g, Peptone 10g, 젤라틴 120~200g, 증류수 1,000ml, pH 6.8 시험관에 5ml씩 분주하고 고압살균한다. 이 배지를 20℃이하의 고체상태에서 침적종하고 20℃ 6주간 배양 관찰한다.

㉢ 판정 : 세균의 증식과 함께 젤라틴층의 액화가 일어나는 것을 양성으로 한다. 액화의 속도를 매일 기록한다. 액화속도가 늦는 것에서는 액화의 형태도 참고가 된다. 이외 28℃에서 배양(젤라틴은 이온도에서 액상)하고 검사시 냉장고에서 냉각하고 응고의 유무를 조사하는 방법도 있다.

#### (2) 카제인의 소화시험

비수용성인 카제인을 분해해서 수용성으로 변화시키는 성질을 조사한다.

#### ㉣ 방법, 배지

<배지 1> Beef extract 1g, Peptone 2g, 증류수 100ml, pH 6.8

<배지 2> Skim milk 10g, 증류수 100ml, pH 6.8

사용에 있어서 배지 1과 2를 동량 혼합하고 평판한다. 이것에 화선 또는 점배양하고 2주간 관찰한다. 평판 하나에서 여러균주를 조사할 수 있다.

㉤ 판정 : 집락의 주변이 투명한 것을 양성으로 한다.

#### ⑤ 황화수소의 생산

세균은 그 종류에 따라서 초산염, 치오유산염, 시스틴 및 시스테인을 분해해서 황화수소를 생산하는 것이 있다. 본 시험은 생성된 황화수소를 금속염과 반응시켜서 황화물로 되고 이것을 정색반응에 따라 검출하는 것이다.

#### ㉥ 방법, 배지

<배지 1> Beef extract 5g, Peptone 10g, 증류수 1,000ml, pH 6.8

시험관에 5ml씩 분주하고 고압살균한다.

<배지 2> NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2g, NaCl 5g, Yeast extract 5g, Cystene-HCl 또는 황산나트륨 0.5g, 증류수 1,000ml, pH 6.8

연당지 : 약 5×50mm로 절단한 거름종이를 10% 초산염수용액(2N NaOH에서 중화)에 침지하고 고압살균한 뒤 정온기내에서 건조시킨다.

상기배지에 세균을 이식하고 연당지를 시험관 마개와 같이 끼워 넣은 다음 종이 종이를 향하게 한후 2주간 관찰한다. 진탕배양하면 반응이 빠르다.

㉔ 판정 : 연당지가 흑변하는 것을 양성으로 판정한다. 흑변은 연당지의 하단부위에 약간 약하게 나타나는 경우도 있기 때문에 주의한다.

⑥ Phenylalanine-deaminase 시험

Phenylalanine을 Phenylalanine-deaminase의 작용에 의해서 산화적으로 탈 아미노화하고 phenylpyruvic acid(PPA)와 암모니아를 생성하는 세균이 있다. 이 효소작용의 유무를 조사하는 것이 본시험이고 반응생성물의 이름을 따서 PPA시험이라고도 한다.

㉕ 방법, Ewing의 Phenylalanine 한천배지 : Yeast extract 3g, DL- phenylalanine 2g(또는 L-phenylalanine 1g),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1g, NaCl 5g, Agar 12g, 증류수 1,000ml, pH 7.3 이 배지를 사면으로 하고 대량의 균체를 도말해서 24시간 배양한다.

판정 : 24시간후 염화제이철( $\text{FeCl}_3$ )의 10% 수용액을 0.2ml 떨어뜨리고 사면부분이 농록색으로 변색된 것을 양성으로 한다. 이 농록색의 변화는 시간이 경과함에 따라 희미해지고 염화철용액을 지나치게 넣으면 판정할 수 없게되는 점에 주의한다. 세균을 배양하지 않은 배지를 대조로해서 정색을 비교할 필요가 있다.

⑦ Indole의 생성

본시험은 세균이 트립토판을 분해하고 유리의 인돌을 생성하는지 여부를 조사하는 시험으로서 장내세균균의 식별성상으로서 옛날부터 이용되고 있다. 이 외의 세균에서도 반드시 조사할 성질중의 하나이다.

㉖ 방법, 배지 : Peptone 10g, 증류수 1,000ml, pH 6.8

<Kovacs 시액> 파라-디메칠아미노벤즈알데히드 5g을 50℃로 가온한 n-아밀알콜 75ml에 용해하고 냉각후 질은 염산 25ml를 가한다.

㉗ 판정 : 상기 펩톤수에 2일간 배양한 뒤 Kovacs 시액을 0.5~1ml 가하고 잘 흔든 뒤 정치한다. 상부의 시액층이 적색으로 되는 것을 양성, 황색에 이르는 것을 음성으로 판정한다. Peptone은 트립토판 함량이 높은 폴리펩톤, 트립톤, 트립티카제 등이 적당하다.

5) 고분자화합물의 분해·이용

① 전분의 가수분해

전분을 가수분해하는 효소는 amylase로 총칭되고 아밀로스 및 아밀로 펙틴의 절단양식에 따라서 여러종의 효소로 구분되지만 식물병원세균의 아밀라제는 그 종류가 충분히 밝혀져 있지않다. 전분분해능은 세균의 중요한 감별성상의 하나이다.

㉘ 방법, 배지 : Beef extract 5g, Peptone 10g, NaCl 2.5g, 가용성 전분, 2g, Agar 15g, 증류수 1,000ml, pH 6.8

<요오드·요오드화칼륨액> 요오드화칼륨 3g을 증류수 300ml에 용해한 뒤 요오드 1g을 첨가해서 용해한다. 갈색병에 넣어 보존한다. 상기배지를 평판하고 이것에 세균을 화선 또는 점배양으로 1주간 배양한다.

㉙ 판정 : 요오드·요오드화칼륨액을 평판배양의 표면에 흐르게해 집락주변에 투명띠를 갖는 것을 양성으로 한다. 투명띠의 대소에 따라서 반응의 강약을 알 수 있다.

② Tween 80의 분해

㉚ 방법, Siella의 배지 : Peptone 10g, NaCl 5g,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.1g, Agar 20g, 증류수 1,000ml,

pH 7.0 고압살균 후 별도로 멸균한 Tween 80의 10% 수용액 100ml를 첨가해서 페트리 접시에 흐르게 하면서 평판한다. 이것에 화선배양 또는 점배양으로 7일간 배양한다.

㉞ 판정 : 집락주위에 불투명한 백색띠를 생성하는 것을 양성으로 한다. 이것은 Tween 80이 분해되어서 생성되는 올레인산과 배지에 첨가했던 Ca 이온이 반응해서 물에 불용의 침전을 만들고 이것이 배지중에 미세한 결정으로서 석출되기 때문이다.

### ③ 레시티나제

인지질인 레시틴(포스파티딜 콜린)을 분해하는 효소는 레시티나제 또는 포스포리파제로 불리고 가수분해에 의해 지방산을 생산한다. 레시티나제의 검출은 난황에 함유된 지질단백질인 레시토비테린을 기질로 이용하고 난황반응 또는 레시토비테린반응(LV 반응)이라고 불린다. 레시티나제에도 여러 종류가 있고 레시토비테린을 분해하지 않는 것도 있지만 통상은 난황반응의 결과를 갖고 판정한다.

㉟ 방법, 배지 : Beef extract 5g, Peptone 10g, NaCl 2.5g, Agar 15g, 증류수 1,000ml, pH 7.0 <난황액> 무균적으로 취한 난황 50ml에 멸균한 0.85% NaCl 수용액 50ml를 첨가하고 잘 섞는다. 고압살균한 뒤 50℃까지 냉각하고 난황액 100ml를 가해서 잘 혼합한 뒤 평판하고 세균을 화선 또는 점배양으로 1주간 배양한다.

㊱ 판정 : 생육한 집락의 주변에 백탁을 생성하는 것을 양성으로 한다. 이것은 난황을 분해해서 물에 불용의 유리지방을 생성하기 때문이다. 또한 리파제활성을 갖는 세균의 일부에는 레시티나제를 생산하지 않고서도 양성반응이 나올 때가 있다. 그러나 그 혼탁정도는 미미하다.

## 6) 기타

### ① Catalase

세포가 산소원자와 접촉해서 산화환원반응을 일으킬 때 특히 플라보단백질 등을 갖는 계에서는 필연적으로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 발생하지만 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 독성을 갖고 있어서 직접적으로 이것을 분해할 필요가 있다. Catalase는 이러한 작용을 갖는 효소의 일종으로서 직접 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 산소와 물로 분해한다. 이 효소의 유무는 세균의 기초적인 감별성상의 하나로 되어있다.

㉠ 방법 : Beef extract-Peptone Agar 또는 Yeast extract-Peptone Agar 사면배지에 24시간 배양한 세균을 백금이로 슬라이드글라스 위에 조금 찍어 놓는다. 이 위에 3% 과산화수소수를 1방울 떨어뜨린다. 소시험관에 0.5ml의 과산화수소수를 넣은 뒤 1백금이의 균체를 투입해도 좋다.

㉡ 판정 : 다량의 기포가 연속적으로 발생하는 것을 양성으로 한다.

### ② Oxydase

전자전달계를 구성하는 시토크롬은 몇 종류로 나누어지지만 그중의 하나인 시토크롬 C는 세균의 종류에 따라 이것을 갖지 않는 종이 있고 이것의 유무는 세균의 분류상 중요한 의의를 갖고 있다. 본 시험은 시토크롬 C의 유무를, 이것과 공존하는 시토크롬 옥시다제의 유무에 의해 검정하는 것이다.

#### ㉢ 방법

<Kovacs의 Oxydase Test> Beef extract-Peptone Agar 또는 Yeast extract-Peptone Agar

사면배지에 24시간 배양한 균체를 백금으로 취해서 1% 테트라메틸 파라페닐렌디아민염 산염(디메틸체에서도 좋다) 수용액을 스며들게 한 여과지에 놓는다.

㉞ 판정 : 10초 이내에 균체가 짙은 청자색(디메틸체를 이용한 경우는 짙은 적자색)으로 착색하는 것을 양성으로 판정한다. 이 반응은 철에서 촉매되는 것으로서 반드시 백금제의 백금을 이용한다. 또 시액은 보존이 되지않기 때문에 알맞게 조제한다.

### ③ 생장요구성 시험

생명활동에 직접 관여하는 물질내에서 세균이 스스로 합성할 수 없는 물질은 이것을 영양으로 해서 보충해주지 않으면 안된다. 탄소원, 질소원, 무기염류 이외의 이러한 물질을 생장소라고 총칭하고 이 요구성은 세균의 감별성상의 하나가 된다. 생장소는 단백질 구성성분으로서의 아미노산, 핵산의 구성성분으로서의 퓨린 및 피리미딘, 효소 및 조효소의 구성성분이 되는 비타민류 및 기타(니코틴아미도아데닌디뉴클레오티드나 헤민 등)로 대별된다.

㉟ 방법, 배지 :  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  0.5g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.4g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05g, NaCl 0.1g,  $\text{FeCl}_3$  0.01g, Glucose 1g, 증류수 1,000ml 이 배지를 둘로 나누어 한쪽에는 yeast extract를 0.3%의 농도로 첨가하고 2주간 배양한다.

㊱ 판정 : 어느 배지에서도 생육이 인정되어지는 것을 생장소비요구성, yeast extract를 첨가한 배지에서만 생육하는 것을 생장소요구성으로 판정한다.

### ④ Phosphatase

Phosphatase는 여러 종류의 유기인산화합물을 가수분해하고 인산을 제거하는 효소로서 세포막투과성을 높이는 역할이 있다고 한다. 이것은 acid phosphatase와 알칼리 phosphatase로 나누어지지만 본 시험에서는 그 어느쪽도 검출할 수 있다.

㉡ 방법, 배지 : Beef extract 5g, Peptone 10g, NaCl 2.5g, Agar 15g, 증류수 1,000ml, pH 7.2 고압살균한다. 이배지를 가열용해후 50°C로 냉각하고 별도로 여과멸균한 1% 페놀프탈레인·2인산나트륨 수용액을 배지 100ml에 1ml의 비율로 첨가하고 페트리접시에 흐르게 평판한 뒤 세균을 점 또는 화선배양한다. 2~5일간 배양.

㊲ 판정 : 뒤집어서 페트리접시의 뚜껑에 암모니아수를 0.1ml 떨어뜨리고 그위에 배양한 것을 덮는다. 집락이 홍색으로 염색되는 것을 양성으로 판정한다. 이것은 phosphatase에 의해 배지중의 페놀프탈레인·2인산이 가수분해되어 유리한 페놀프탈레인의 정색반응에 의한 것이다.

### ⑤ 항생물질 감수성

의학영역에서는 치료 등의 응용면으로부터 세균의 약제내성은 중요한 성질의 하나이고 이것을 분류·동정의 감별성상으로서 이용하는 일이 많다. 식물병원세균에서도 에리스로마이신 등의 항생물질 감수성이 조사되어지는 일이 있다.

㉢ 방법, 배지 : Beef extract 5g, Peptone 10g, NaCl 2.5g, Glucose 10g, Agar 15g, pH 7.0 페트리 접시에 피검균의 농후현탁액을 수방울 취해 용해후 50°C로 냉각한 상기배지 10ml를 흐르게 해서 잘 섞은 다음 정치해서 굳힌다. 이위에 시판 에리스로마이신 종이디스크(에스스로마이신 15 $\mu$ g 함유)를 놓고서 2일간 배양한다.

㊳ 판정 : 디스크의 주위에 생육저지원이 생기는 것을 감수성이라고 판정한다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 근권미생물분리

식물근권 미생물을 분리하기 위해 알리움속식물을 채취한 충북 단양마늘시험장의 토양은 석회암지대로 토양 pH 7이었다. 근권 미생물분포를 조사한 결과 세균류는 근권토양에서 보다 뿌리에 근접한 근면의 밀도가 높은 반면 곰팡이는 근면에서 밀도가 현저히 낮았다(표 3).

표 3. 알리움속 식물근권미생물 분리 (log cfu/mg.soil)

식물명	세균류						곰팡이	
	전세균		<i>Pseudomonas</i> 속		내열세균		근권토양	근면
	근권토양	근면	근권토양	근면	근권토양	근면		
재래부추	4.6	5.9	2.4	2.7	1.1	1.2	1.2	1.6
달래	4.4	4.3	2.1	3.3	1.2	2.4	1.1	1.4
산부추	4.6	3.8	2.3	2.8	1.3	1.6	1.3	1.8
마늘	4.4	4.3	2.7	2.2	1.8	2.2	2.1	1.8

도라지, 더덕의 근권미생물상을 조사한 결과, 야생식물의 근권에는 재배지 식물의 근권보다 미생물분포수가 낮았다. 곰팡이의 경우 알리움속식물 근권에서와 반대로 도라지와 더덕의 근면에서 분포수가 높았다(표 4).

표 4. 도라지, 더덕, 참깨 식물근권미생물분리 (log cfu/mg.soil)

식물명	채집장소	세균류						곰팡이	
		전세균		<i>Pseudomonas</i> 속		내열세균		근권	근면
		근권	근면	근권	근면	근권	근면		
도라지	야생(강릉)	3.2	4.5	2.2	2.5	1.8	2.2	1.2	1.7
	경작(양구)	4.3	4.8	2.3	3.2	2.6	2.5	1.4	1.6
더덕	야생(춘천)	3.8	3.2	1.4	2.3	1.4	1.6	1.1	1.4
	경작(평창)	3.2	4.7	2.7	3.2	2.3	2.1	1.5	1.8
참깨	경작(춘천)	4.4	4.8	2.6	3.4	2.3	2.8	1.2	1.8

*Azospirillum* 선택배지(NFB)를 이용하여 채집한 토양을 6등분하여 각각 Acetylene reduction 반응이 있는 토양샘플을 *Azospirillum* 서식토양으로 판정하여 분포여부를 조사한 결과 알리움속 근권에서의 서식빈도는 낮고, 잔디 근면에서 서식빈도가 높았으며 이러한 경향은으며 퇴비나 비료사용이 빈번한 골프장에서도 비슷한 서식빈도를 나타내었다(표 5). 도라지의 경우 경작지에서 서식빈도가 야생에 비해 낮았으나 더덕은 야생과 재배지 근권에서 서식빈도가 높은 것으로 확인되었다.



표 5. *Azospirillum* 선택배지를 이용한 균분리

식물명	채집장소	<i>Azospirillum</i> 분리					
		1	2	3	4	5	6
재래부추	충북단양(경작)	○	×	×	×	○	×
달 래	충북단양(경작)	×	×	×	×	×	×
	춘천(야생)	○	×	×	×	×	×
산 부 추	충북단양(경작)	×	×	×	×	×	×
마 늘	충북단양(경작)	×	×	×	×	×	×
잔 디	춘천(농로)	○	○	○	○	○	○
	평창(골프장)	○	○	○	○	○	○
도 라 지	야생(강릉)	○	○	○	○	○	○
	경작(양구)	○	×	×	○	○	○
더 덕	야생(춘천)	×	○	○	○	○	○
	경작(평창)	○	○	○	○	○	○
참 개	경작(춘천)	×	○	○	×	○	○

나. 공시작물

미세종자작물로 본시험에 공시한 작물은 참깨, 도라지, 더덕이었는데(표 6), 참깨는 강원도 원종장에서 수확하여 종자품질검사를 거친 종자로 발아율은 파종 5일 후(19℃)에 98.5%이었으며, 도라지는 춘천시 재배농가에서 1년생 모주에서 채종한 종자로 발아율은 파종 7일 후(19℃) 56.3% 이었다. 더덕은 춘천(4년근)과 횡성(2년근)에서 채종한 종자로 4년근에서 채종한 종자의 발아율은 파종 7일후(19℃) 42.7%이었다. 농가에서 채종한 도라지 더덕종자는 채종기까지 관리체계가 확립되지 않았고, 수확후에도 종자를 창고에 방치하여 부패율이 도라지 22.3, 더덕 32.5%로 조사되었다. 농가에서 구입한 더덕종자를 갈대로 만든 키에 비벼 날개를 제거한 후 1,000배 세재(파워트리오)에 넣고 24시간 고점도용 혼합기로 저어주면서 세척한 후 수돗물을 100℃로 20분 간 끓인후 식혀 준비한 물로 5회이상 세척한 후 건조하여 발아율을 조사한 결과 발아율 86.2%, 부패율 7.5%로 처리효과가 큰 것으로 확인되었다(표. 7, 8).

표 6. 농가 채집종자 발아율 조사

작 물	발아율(%)	부패율(%)
참 개	98.5	2.3
도 라 지	56.3	22.3
더 덕	42.7	32.5

표 7. 더덕 종자세척 및 종피제거 효과

처 리 구	농가채종종자		전처리종자	
	발아율(%)	부패율(%)	발아율(%)	부패율(%)
습실처리	41.5	28.7	86.2	7.5
멸균토양	46.2	32.3	78.7	12.3
발 토 양	34.6	23.7	60.2	5.8

표 8. 도라지종자 세척효과

처 리 구	농가채종종자		전처리종자	
	발아율(%)	부패율(%)	발아율(%)	부패율(%)
습실처리	56.3	18.3	86.7	11.2
멸균토양	62.3	22.8	75.6	9.4
발 토 양	56.4	16.7	58.3	8.3

농가에서 채취한 도라지와 더덕종자에 분리한 세균 균체를 처리한 후 발아율을 조사한 결과(그림 1), 도라지에 발아촉진 효과를 보이는 균주 GSP42는 Nutrient agar 평판배지에서 5일 이상 배양시 황색집락을 형성하는 특성이 있으며, 집락에서 균체를 채취하여 멸균수에 현탁하여 400배로 관찰하면 출아법에 의한 증식을 확인할 수 있었다. GSP42와 AZP42 2균주는 더덕에도 발아촉진효과가 높았다(표 9).



그림 1. 미생물균체 처리 발아율 조사(좌-무처리, 우-균체처리)

100℃로 고온처리하였을 때 열저항성을 가지는 세균 중 도라지 발아율을 향상시키는 균주는 BHB002등 6균주, 형광성세균은 PSE004 등 4균주가 분리되었다. 이균주들의 발아율 향상효과는 균주에 따라 작물들에 대한 발아촉진효과가 다르게 나타났다. 도라지의 경우 PSE087과 BHB017에 의해 발아율이 13%, 12%각각 증가하였으며, 만삼의 경우 PSE004에

의해 발아율이 18% 크게 증가하였다. 더덕은 형광성세균들에 의해 발아율이 증가하였으나 열저항성세균들 중에는 발아를 저해하는 균주들이 있었다. 대체로 BHB017과 형광성세균인 PSE087 처리구에서 도라지, 만삼, 더덕의 발아율은 크게 증가하였다(표 10).

표 9. Nutrient agar 및 NFB agar 배지에서 분리한 세균들의 발아촉진효과

분리균주	발아율(%)	
	도라지	더덕
GSP3	55b	51b
GSP7	56b	59a
GSP42	66a	64a
GSP58	58b	59a
GSP74	56b	46b
AZP5	56b	61a
AZP42	59ab	65a
AZP63	54b	64a
무처리	51b	49b

※ 발아율조사 : 온도 28℃, 배양일수(도라지 7일, 더덕 10일)

표 10. 열저항성세균 및 KB agar 배지에서 분리한 세균들의 발아촉진효과

분리균주	발아율(%)		
	도라지	만삼	더덕
BHB002	62ab	71ab	51bc
BHB017	66b	73ab	60abc
BHB019	57ab	69ab	49bc
BHB083	58ab	60b	48c
BHB092	61ab	61b	61ab
BHB118	62ab	72ab	68a
PSE004	66b	78a	70a
PSE006	62ab	73ab	54abc
PSE024	63ab	72ab	64a
PSE087	67b	73ab	68a
무처리	54a	60b	52bc

※ 발아촉진균주 (DMRT 0.05) 발아율조사 : 배양일수(도라지 7일, 만삼 11일, 더덕 10일)

종자채종 및 선종과정 관리와 살균처리로 발아율을 크게 향상시킨 도라지, 더덕종자에 처리한 알리움속근권 서식균주를 종자표면에 처리한 후 발아율을 조사하면 시험기내에서는 90%이상 발토양에서 65%이상의 발아하였다(표 11).

표 11. 종자 세균 균체처리에 의한 발아촉진효과

분리균주	처 리	발아율(%)		
		도라지	더 덕	참 깨
BGAR 2019	습실처리	93.4	91.2	92.3
	멸균토양	85.7	84.2	85.7
	발 토 양	72.1	69.2	85.7
BGAR 0412	습실처리	91.6	89.7	87.7
	멸균토양	86.2	80.1	90.4
	발 토 양	74.4	70.6	82.3
BGAR 0023	습실처리	93.1	93.1	96.3
	멸균토양	83.7	84.3	87.6
	발 토 양	69.2	65.7	85.7
BGAR 0124	습실처리	89.8	91.4	94.2
	멸균토양	79.4	85.7	92.3
	발 토 양	70.3	72.4	84.3
BLEEK 3013	습실처리	99.6	97.2	99.7
	멸균토양	87.2	79.4	87.8
	발 토 양	64.7	72.3	79.2
BLEEK 0125	습실처리	96.1	93.0	87.9
	멸균토양	86.0	78.7	85.9
	발 토 양	72.4	70.5	86.7

토양과 뿌리표면에서 분리한 열에 강한 세균들은 Nutrient agar평판배지에서 다양한 집락 형태를 보이며 대부분 집락크기가 크고 중앙은 매끄럽거나 약간 융기하는 모습을 보였다(그림 2). 이 균들은 세균내부에 포자를 형성하고, 현미경관찰시 운동성이 있는 균주가 대부분이었으나 운동성이 없는 균주도 관찰되었다. 전자현미경관찰시 이균주 들은 세포주위에 얇은 막을 형성하고있으며, 운동성이 있는 균주들은 주모성으로 세포표면에 편모가 잘려나간 흔적들이 관찰되었다.

종자발아율을 향상시키는 열저항성세균들은 그람음성의 주모성세균들로 세포내부에 내생 포자를 형성하는 특성을 가지고 있으며 이들은 모두 *Bacillus*속하는 균들로 종동정이 어려운 BGAR2019를 제외한 균들은 *B. mycoides*, *B. pumilus*, *B. megatherium*, *B. subtilis*, *B. polymixa*로 동정되었다(표 12). 형태적,생화학적 분해 특성에 근거한 동정(표 13)과 함께 균주별 세포벽 각 지방산조성 비율에 근거하여 MIDI Microbial identification system(Microbial ID, Inc.) 검색결과 *B. mycoides*, *B. pumilus*, *B. subtilis*(그림 3~6)임이 확인되었다.



그림 2. 열저항세균 집락형태

표 12. 열저항성 세균 특성조사

주요특성	<i>B. megatherium</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. pumilus</i>	<i>B. polymixa</i>	<i>B. mycooides</i>
	BWRO0072 BHB017	BWRO0129 BHB019 BHB118	BGAR3013 BGAR0125	BHB002	BGAR0412 BGAR0412 BGAR0412
Endospore	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+
V-P	-	+	+	+	+
Growth in anaerobic agar	-	-	-	+	+
Growth at 50°C	-	+	+	-	-
Growth in 7% NaCl	+	+	+	-	+
Acid gas in glucose	-	-	-	+	-
NO <sub>3</sub> reduced to NO <sub>2</sub>	V	+	-	+	+
Starch hydrolysis	+	+	-	+	+
Growth at 65°C	-	-	-	-	-
Rods 1.0μm wide or wider	+	-	-	-	+
pH in V-P medium < 6.0	V	V	+	V	+
Acid from glucose	+	+	+	+	+
Hydrolysis of casein	+	+	+	+	+
Parasporal bodies	-	-	-	-	V

표 13. 형광성 *Pseudomonas* 세균 형태적·생화학적 특성

조사 내용	분리균주명			
	PSE004	PSE006	PSE024	PSE087
편모수	1>	1>	1>	1>
형광색소	+	+	+	+
Growth at 41°C	-	-	-	-
Levan formation from sucrose	d	d	d	d
Arginine dihydrolase	+	+	+	+
Oxidase reaction	+	+	+	+
Denitrification	d	d	d	d
Starch hydrolysis	-	-	-	-
Gelatin hydrolysis	+	+	+	+
Utilization of				
Glucose	+	+	+	+
Trehalose	-	-	-	-
meso-Inositol	+	+	+	+
DL-Arginine	+	+	+	+

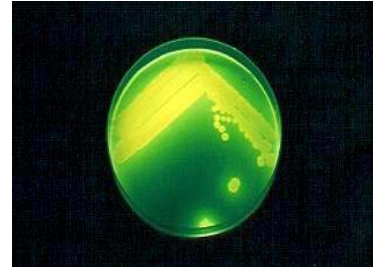


그림 6. 형광성세균

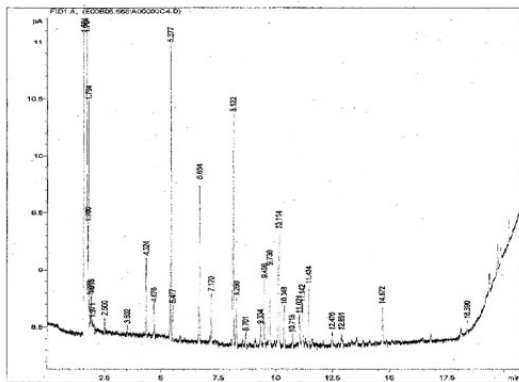


그림 3. *Bacillus mycoides* 세포벽 지방산 분석

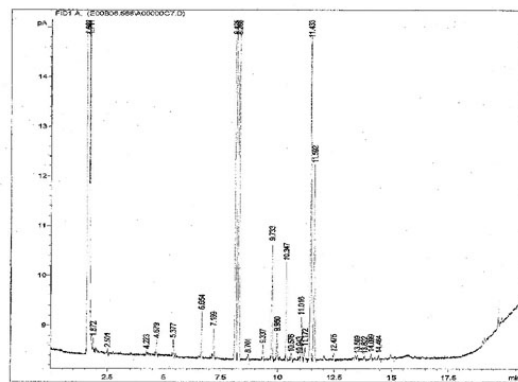


그림 4. *B. pumilus* 세포벽 지방산분석

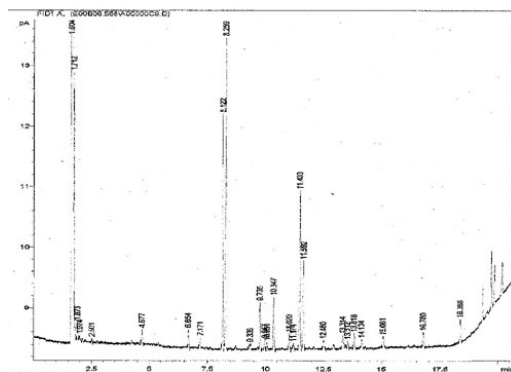


그림 5. *B. subtilis* 세포벽 지방산분석

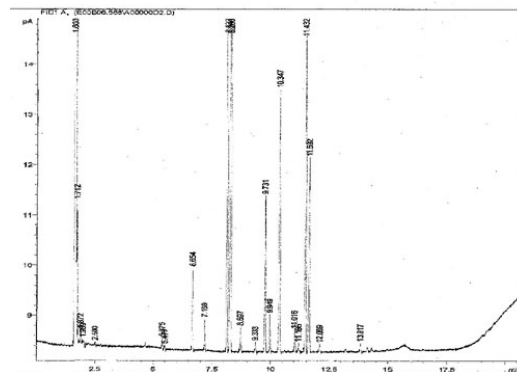


그림 6. *Bacillus* sp. 세포벽 지방산분석

표 14. 형광성 *Pseudomonas* 세균동정

조 사 내 용	분리균주명			
	PSE004	PSE006	PSE024	PSE087
편모수	1>	1>	1>	1>
Pyoverdin production	+	+	d	d
Yellow-orange cellular pigments	-	-	-	-
Levan formation from sucrose	d	-	-	-
Lechinase(egg yolk)	+	-	-	-
Lipase(Tween 80 hydrolysis)	d	d	d	d
Extracellular PHB hydrolysis	-	-	-	-
Growth at 4°C	+	d	d	+
Catecol, ortho cleavage	+	+	+	+
Utilization of				
L-Rhamnose	-	-	-	-
D-Fructose	+	+	+	+
Glycerate	+	d	d	+
2-Ketogluconate	+	d	d	+
Glycine	-	d	d	+
L-Lycine	+	+	+	d
Histamine	d	d	+	+
Nicotinate	-	d	+	+
	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. putida</i>

King's B배지에서 분리한 세균들은 세포내부에 PHB를 저장하지 않는 group에 속하는 균들로(표 14), 이들의 탄수화물 이용특성에 따라 PSE004는 *P. fluorescens*, PSE024와 PSE087은 *P. putida*에 가까운 특성을 보였다.

표 15. NFb 배지에서 분리한 세균균주의 형태 및 생화학적 특성

특성조사내용	<i>A. brasilense</i>	<i>A. lipoferm</i>	
	AZP63	AZP5	AZP42
Cell width( $\mu\text{m}$ )	1.0>	1.0>	1.0>
Pleomorphic cells	+	-	-
Biotin requirements	-	+	+
Dissimilation of			
$\text{NO}_3^-$ to $\text{NO}_2^-$	+	+	+
$\text{NO}_2^-$ to $\text{NO}_2$	+	+	+
$\text{NO}_3^-$ -dependent anaerobic growth	+	+	+
Use of glucose	-	+	+
Use of sucrose, maltose	-	-	-
Optimal pH range	6.8 ~ 8.0	5.5 ~ 6.5	5.5 ~ 6.5

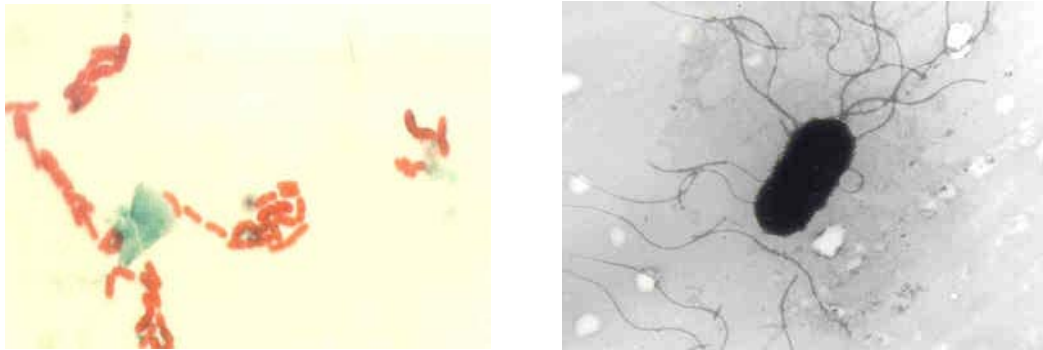


그림 7. *Azospirillum* spp.(좌-그램염색, 우-전자현미경 편모관찰)

Azp63은 슬라이드그라스에 증류수를 소량 떨어뜨린 다음 NFb배지에서 자란 균체를 옮겨 관찰하면 운동성이 활발하나 AZP5와 AZP42는 세포형태가 균일하지 않고 세포가 서로 연결되어져 있다. 이 균주는 PDA배지에 배양하면 초기에는 작고 매끄러운 흰색의 집락을 형성하고, 배양기간이 길어질수록 분홍빛으로 변한 다음 건조되어 주름을 띤다. Malic acid 대신 fructose를 첨가하면 끈적한 집락을 형성하여 배양접시를 뒤집어 놓으면 중앙부위의 집락이 흘러내린다. 그러나 AZP63은 fructose첨가시 이러한 집락의 변화가 관찰되지 않고 액체배양균체는 Gram음성을 나타내나(그림 7) 평판배지에서 자란 균체는 Gram음성과 양성세균세포가 혼재하고 있다. AZP5는 *Azospirillum lipofeuurm*, AZP42, 63은 *A. brasilense*로 확인되었다(표 15).

시험조건하에서 발아촉진효과를 보인 균주들은 종자처리 후 노지에 파종하여도 그와 비슷한 발아촉진효과를 보였다. 이러한 발아촉진균주들을 자생종 종자표면에 처리한 후 포장에 파종하면 출현율이 무처리구에 비해 현저히 증가하였다(표 16).

표 16. 근권에서 분리한 세균류 처리에 의한 발아촉진효과

분리균주	출현율(%)		
	도라지	더덕	참깨
<i>Bacillus</i> sp.2019	72.1	69.2	85.7
<i>B. mycooides</i> 0412	74.4	70.6	82.3
<i>B. mycooides</i> 0023	69.2	65.7	85.7
<i>B. mycooides</i> 0124	70.3	72.4	84.3
<i>B. pumilus</i> 3013	64.7	72.3	79.2
<i>B. pumilus</i> 0125	72.4	70.5	86.7
<i>B. megaterium</i> 0072	80.5	65.7	82.4
<i>B. subtilis</i> 0129	68.2	80.7	88.6
<i>Pseudomonas putida</i> 0314	73.4	67.4	85.7
무 처리	58.3	60.2	84.3



곰팡이의 경우 배양기 내에서 발아율을 조사하면 대부분 처리한 균주의 균사생장이 왕성하고 부패율이 크게 증가되나 표 17, 18의 균주들은 무처리구에 비해 대상식물들의 발아율이 대체적으로 향상되어 유용미생물로 분리하였다.

표 17. 종자 곰팡이 포자처리에 의한 발아촉진효과

분리균주	처리토양	발아율(%)		
		도라지	더덕	참깨
TRICHO 16	습실처리	90.4	96.3	94.7
	멸균토양	82.7	82.3	84.5
	밭 토 양	68.7	75.2	86.4
UKFUN 9	습실처리	92.3	94.8	96.7
	멸균토양	80.4	85.7	87.8
	밭 토 양	72.3	82.3	87.9

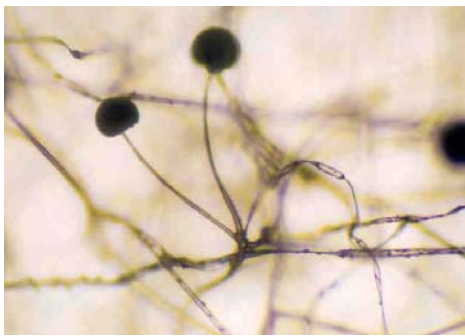


그림 8. *Rhizopus* sp.



그림 9. 포자 및 분생자경(*Fusarium*)



그림 10. 균사 내 후막포자 (*Fusarium moniliforme* 근연 종)

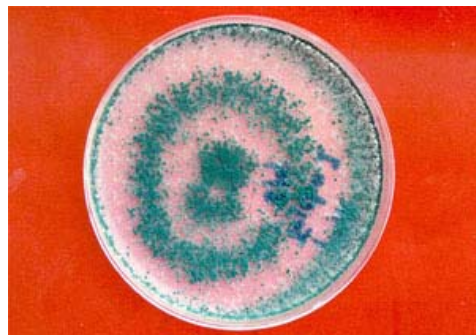


그림 11. *Trichoderma harzianum*

표 18. 근권에서 분리한 곰팡이 처리에 의한 발아촉진효과

분리균주명	출현율(%)		
	도라지	만삼	더덕
<i>Aspergillus niger</i> .012	68a	71a	59abc
<i>Aspergillus niger</i> .017	73a	70a	58abc
<i>Aspergillus niger</i> .043	56bc	78a	57abc
<i>Fusarium moniliform</i> .002	48c	66a	64ab
<i>Fusarium oxysporum</i> .024	54bc	74a	68a
<i>Fusarium sp.</i> 053	64ab	67a	56abc
<i>Rhizopus stolonifer</i> .042	54bc	70a	56abc
<i>Rhizopus stolonifer</i> .043	53bc	69a	68a
무 처리	46c	67a	48c

Rhizopus042(그림 8)는 conidiophore 분지 부위에 가근형성이 관찰되고 균총이 밀식상태로 자라는 성장특성을 가진 *Rhizopus stolonifer*로 확인되고, *Fusarium* 024, 053은 분생자경 윗부분에 microconidia가 밀생하며(그림 9), 균사 기저부분에 chlamydospore가(그림 10) 형성되는 *Fusarium moniliform* 근연 종이였다. TRICHO 16균주는 영양이 풍부한 PDA배지 상에서 공중균사 및 Phialide가 무성하게 발달하여 conidiophore와 균사분지형태를 관찰하기 어려우나 한천배지에 배양하여 조사하면 이러한 부속기의 관찰이 용이하였으며 형태적인 특성으로 보아 *Trichoderma harzianum*(그림 11)으로 확인되었다.

#### 4. 적 요

식물근권에서 발아촉진에 관여하는 미생물을 분리하기 위해 채집한 식물의 근권미생물상을 조사한 결과 근권토양에 비해 근면에 세균 및 곰팡이의 서식밀도가 높았으며, 유기물이 풍부한 경작지토양의 미생물밀도가 높았다. *Azospirillum*속 세균들은 알리움속식물의 근권에서 서식밀도가 낮았고 잔디, 도라지, 더덕, 참깨 근권에서 서식밀도가 높은 것으로 조사되었다. 도라지와 더덕은 자가채종으로 종자공급이 이루어지고 있으나 유통되는 종자들은 발아율이 낮고 부패율이 높아 채종단계와 수확 후 종자관리에 주의가 필요하였다. 이 종자들은 종피제거와 종자선별작업 그리고 세제를 이용한 세척 및 건조과정 만으로도 발아율을 현저히 증가 시킬수 있었다. 분리한 근권미생물 중 36균주가 종자처리시 발아촉진효과 보였으며 이들은 작물의 종류에 따라 발아촉진효과에 차이를 보였다. 공시한 3작목에 두루 발아촉진효과를 보이는 균주로 세균류는 *Bacillus* sp.2019, *B. mycooides*0412, *B. mycooides*0023, *B. mycooides*0124, *B. pumilus*3013, *B. pumilus*0125, *B. megaterium*0072, *B. subtilis*0129, *Pseudomonas putida*0314로, 곰팡이는 *Trichoderma harzianum*으로 동정되었다.

## 5. 인용문헌

- Bowers, R.C.(1982)** Commercialization of microbial biological control agents. In Biological control of weeds with Plant pathogens, R.Charudattan and H.L. Walker,(eds.) John Wiley & Sons, New York, pp.157-173.
- Brown M.E.(1974)** Seed and bacterization. Annu Rev. Phytopathol. 12:181-197.
- Chet, I., and Sivas(1988)** Antifungal copositions containing *Trichoderma* active against *Fusarium*. US patent 4,748,021.
- Chikuo Y.(1993)** Incorporation of antagonistic *Pseudomonas* spp. to pelleted seed to control sugar beet damping-off. Plant protection. 47.130-133.
- Cooper R.(1959)** Bacterial fertilizers in the soviet union. Soils fertilizers, 22:327-333.
- Curl, E.A. and Truelove B.(1986)** The rhizosphere. Springer-Verg. New York.
- Harmon, G.E., and Taylor, A.C.(1988)**. Improving seedling performance by integration of biological agents at favorable pH levels with solid matrix priming. Phytopathology 78:520-525.
- Homa Y., K. Katoh, H. Uchino and K. Kanezawa(1997)** Suppression of sugar beet damping-off by seed bacterization with *Stentrophomas* sp. SB-K88 in a paper-pot system. In the 4th PGPR Int. Workshop organizing committe. 205-208.
- Kloepper J. W. and M.N. Schroth(1978)** Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. Proc. 4th Int. Cont. Plant Path. Bact. Agens. 879-882.
- Kloepper J.W., J. Leong, M. Teintze, and M.N. Schroth(1980)** Enhanced plant growth by siderophores produced by plant groth-promoting rhizobacteria. Nature[London]286:885-886.
- Kloepper J.W., Scher F.M., and Laliberite M.(1986)** Tipping B. Emergence-promoting rhizobacteria: Description and implications for agriculture. In; Swinburne T.R., ed. Iron siderophores and plant diseases. New York; Plenum. 155-164.
- Kloepper J.W., Lifshitz R., and Schroth M.N.(1988)** *Pseudomonas* inoculants to benifit plant protection. ISI atlas of science 0894-3761. 60-64.
- Kloepper J.W.(1993)** Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents in soil microbial ecology-Applications in agricultural and environmental management(ed.0 by F.B. Metting. Jr. 255-305.
- Koike, N., K. Kageyama, M. Hyakumachi, S. Tsuyumu, H.-J. Park and N. Doke(1997)** Lignification and superoxide generation elicited in plant tissues by culture filtrates of plant growth promoting fungi(PGPF) associated with induced systemic resistance. The 4th PGPR international workshop organizing committee. 269-272.
- Liu, L., J.W. Kloepper, and S. Tuzun(1995)** Induction of systemic resistance in cuccumber against *Fusarium* wilt by plant growth promoting rhizobacteria. Phytopathology 85:695-698
- McCabe, D.E., A.S. Paau, B.J. Martinell, and L.L Graham-Weiss(1986)** Production of microbial

field crop inoculants, European patent Application 86309438.9.

- Mihuta-Grimm L. and R.C. Row(1986)** *Trichoderma* sp. as biocontrol agents of *Rhizoctonia* damping-off of radish in organic soil and comparison of four delivery systems. *Phytopathology* 76:306–312.
- Neilands J.B. and S.A. Leong(1986)** Siderophores in relation to plant growth and disease. *Annu Rev Plant Physiol.* 37:187–208.
- Papavizas, G.C., M.T. Dun, J.A. Lewis, and J. Beagle-Ristaino(1984)** Liquid fermentation technology for experimental production of biocontrol fungi. *Phytopathology* 74:1171–1175.
- Rath M. and Wolf G.(1992)** Biological control of seed rot and damping-off of sugar beet with microbial antagonists. *Bulletin OILB/SROP.* 15. 113–114.
- Roberts D.P., P.D. Dery, I. Yucel, J. Buyer, M.A. Holtman and D.Y. Kobayashi(1997)** Genetic analysis of the seed colonization mutant *Enterobacter cloacae* A-11. In the 4th PGPR Int. Workshop organizing committee. 330–332.
- Schmidt E.L.(1979)** Initiation of plant root microbe interactions. *Annu Rev. Microbiol* 33:355–79.
- Somasegaran P.(1985)** Inoculant production with diluted liquid cultures of *Rhizobium* sp. and autoclaved peat: Evaluation of diluents, *Rhizobium* sp. Peats, Sterility requirements, storage and plant effectiveness. *Appl. Environ. Microbiol.* 398–405.
- Schroth M.N. and Hancock J.G.(1982)** Disease suppressive soil and root-colonizing bacteria. *Science.* 216:1376–1381.
- Suslow T.V., Burr T.J., and Schroth M.N. (1978)** Increased yields of sugar beet and potatoes by treating seed with specific rhizobacteria. Abstracts IVth international Conf. Plant Pathogenic bacteria.
- Suslow T.V.(1982)** Role of root-colonizing bacteria in plant growth. in: Mount MS, Lacy GS, eds. *Phytopathogenic prokaryotes*, Vol 1. New York, Academic press. 187–223.
- Swinburne T.R.(1986)** Iron, Siderophores, and Plant disease. NAT ASI series. Series A: Life sciences vol.117. Plenum press. New York and London.