

Siderophore 생산성 생물방제균 *Pseudomonas fluorescens* GL7의 선발 및 식물근부병의 방제

이정목 · 임호성 · 장태현¹ · 김상달*
영남대학교 응용미생물학과, 대유식물영양연구소¹

Isolation of Siderophore-producing *Pseudomonas fluorescens* GL7 and Its Biocontrol Activity against Root-rot Disease. Lee, Jung-Mok, Ho-Seong Lim, Tae Hyun Chang, and Sang-Dal Kim*. Department of Applied Microbiology, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea, ¹Research Institute of Plant Nutrient, Dae Yu Co., Inc, Kyongsan 712-820, Korea – For the development of a multifunctional biocontrol agent, the siderophore-producing strain GL7 was isolated from a rhizosphere on chrome azurol S agar. The GL7 was identified as a strain of *Pseudomonas fluorescens* on the basis of their reactions to standard physicochemical tests from Bergey's manual, API[®] diagnostic test, and fatty acid analysis. *P. fluorescens* GL7 produced a large amount of yellow-green fluorescent siderophore in iron-deficient media. *P. fluorescens* GL7 considerably inhibited spore germination and hyphal growth of phytopathogenic fungus *Fusarium solani* in a dual culture. In pot trials of bean with *P. fluorescens* GL7, the disease incidence was significantly reduced down to 5% from 70% of incidence in the untreated control. *P. fluorescens* GL7 also enhanced plant growth to nearly 1.5 times than that of the untreated control, promoting elongation and development of the roots. These results suggest that the plant growth-promoting *P. fluorescens* GL7 can play an important role in the biological control of soil-borne plant disease in a rhizosphere.

Key words : siderophore, biological control, *Pseudomonas fluorescens*, *Fusarium solani*

미생물이 생육에 필요로 하는 철(Fe)의 양은 Gram 양성균과 곰팡이의 경우 0.4~4.0 μM 정도, Gram 음성균의 경우 0.3~1.8 μM 정도이다[14]. 이러한 대부분의 철은 호기적인 환경하에서 중성이나 알칼리 pH에서 용해상수가 $10^{-38.7}$ 정도로[2] 불용성의 ferric-oxyhydroxide polymer[Fe(OH)₃]로 존재하며[8], 그 free-ferric iron(Fe³⁺) 농도는 일반적으로 pH 7에서 용해상수 10^{-18} 정도로 매우 낮다고 볼 수 있다[12].

비록 토양에서 철 성분이 전체 무기이온의 1~6%로 풍부하다 할지라도 미생물들이 필요로 하는 철이온(Fe³⁺)의 양은 자신의 생육유지에 충분하지 않으며, 모든 토양미생물들 간의 경쟁적 요인이 될 수밖에 없다. 따라서 이러한 철이 부족된 환경(low-iron stress)을 극복하기 위해 호기성 및 통성혐기성 미생물들은 생육에 필요한 충분한 양의 철을 효과적으로 얻기 위해 진화된 고친화성 철수송계(high-affinity iron-transport system)를 가지고 있어, 철이온(Fe³⁺)과 친화성이 높고 형광색을 나타내는 저분자량(주로 400~2,000 daltons)의 가용성인 siderophore를 분비하여 철이온(Fe³⁺)

과 복합체를 형성한 다음, 에너지 의존성 과정에 의해 세포 내로 받아들여지게 된다[9]. 길항미생물을 이용하여 식물질병을 방제하는 생물방제 기작중에 철이온(Fe³⁺) 특이 결합물질(iron-chelating compound)인 siderophore에 의한 길항기작의 중요성이 각광을 받고 있으며, 최근 이 기능을 주로 발휘하는 plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR)를 활용하는 생물학적 방제법이 활발히 연구되고 있다.

근권(rhizosphere)에서의 PGPR은 식물뿌리 표면에 군집을 이루어 살며, 철이온(Fe³⁺) 흡수의 경쟁에서 우위를 선점함으로써 식물병원균의 생육을 억제시키는데, 이는 대부분 fluorescent pseudomonads가 분비하는 siderophore에 의해 식물병원성 진균의 포자 발아(spore germination)와 발아관 신장(germ tube elongation)에 필요한 철 성분을 탈취하여 그 생육을 억제하는 것으로서[10], 이러한 경쟁적 길항작용은 토양 전염병을 감소시키면서 그 방제력을 발휘한다.

따라서 본 연구에서는 siderophore를 생산하는 강력한 생물방제균을 선발하기 위하여 전국 각 지역의 저병해 경작지 토양으로부터 가장 길항력이 우수한 siderophore 생산성 길항균주를 분리하여 동정하였다. 또한 선발된 생물방제균으로부터 생산된 siderophore에 의한 식물병원균의 생육억제기작을 *Fusarium solani*를 대상으로 규명하였고, 콩과식

*Corresponding author
Tel. 82-53-810-2395, Fax. 82-53-811-4319
E-mail: sdkim@yeungnam.ac.kr

물의 뿌리썩음병의 방제력을 검증하여 향후 다기능 생물방제균 개발의 숙주 균주로서 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

Siderophore 생산균주의 선발

토양으로부터 siderophore 생산성 생물방제균을 선발하기 위해 전국 각 지역의 근권(rhizosphere) 토양의 현탁액을 siderophore 생산균주의 분리배지인 CAS(chrome azurol S) blue agar 평판배지[11]에 접종하여 28°C에서 배양시키면서 orange halo zone의 생성에 의한 siderophore 생산균을 일차적으로 분리하였다. 또한 CAS liquid assay[11]에 의해 siderophore 활성에 따른 CAS의 탈색율과 Arnw phenolic assay[1] 및 Csaky hydroxamate assay[3]에 의한 siderophore 활성도 측정법을 이용하여 siderophore 생산능이 우수한 균주를 최종 선발하였다.

Siderophore 생산균주에 의한 식물병원균의 생육 억제능 조사

Siderophore 생산균주에 의한 식물병원균의 생육 억제능은 뿌리썩음병을 유발시키는 식물 근부병원균인 *Fusarium solani*를 대상으로 8-hydroxyquinoline으로 탈철화[13]시킨 siderophore 생산용 배지인 King'B[6] 액체배지(KB)와 100 μ M FeCl₃가 첨가된 KB 배지를 사용하였다. 이 배지에 길항균을 접종하여 28°C에서 24시간 배양한 다음, *F. solani*의 포자체를 첨가하여 다시 4일간 배양시킨 후, Toyo filter paper No. 2로 여과, 95°C에서 건조하여 그 균체 중량을 측정, 비교하였다.

Siderophore 생산성 길항균주의 동정

Siderophore 생산성 길항균주의 분류학적 동정을 위해서는 Bergy's manual of systematic bacteriology[7]와 Manual of methods for general bacteriology[5] 등의 세균 분류 동정 지침서의 시험항목을 기준으로 해서 각종 분류 동정 시험방법에 따라 배양학적, 형태학적 특성 및 생리학적 특성을 조사하였고, 지방산 분석(fatty acid analysis)과 API[®] 20NE diagnostic strips(Analytical products, France)로도 확인, 동정하였다. 또한 투사 전자현미경(TEM, transmittance electron microscope)에 의한 미세구조도 관찰하여 선발된 siderophore 생산성 길항균주의 크기, 편모 등의 특징도 조사하여 위의 동정결과를 확인하였다.

Siderophore 생산성 길항균주의 식물병원균 생육에 대한 억제기작 조사

Siderophore 생산성 길항균주에 의한 식물 근부병원균 *F. solani*의 포자 발아 억제현상을 조사하기 위해 우선 potato dextrose agar(PDA) 배지를 이용하여 *F. solani*를 28°C에

서 7일간 배양시키고, 그 평판배지에 5 ml의 멸균수를 부은 후, 멸균된 붓을 이용해 포자를 모아 원심분리시켰다. 그 원심침전물을 멸균수로 3회 씻어낸 후, 10점의 멸균된 guaze로 여과하여 균사체로부터 포자를 회수하였다[4]. 선발된 siderophore 생산성 길항균주를 KB 액체배지에 접종하여 28°C에서 24시간 배양한 다음, *F. solani*의 포자 현탁액을 첨가하여 5일간 배양시킨 후, Toyo filter paper No. 2로 여과하고 95°C에서 건조하여 그 균체 중량을 측정 후 비교하였다. 또한 회수된 *F. solani*의 포자 현탁액 50 μ l를 산으로 세척한 depression slide 위에서 길항균주의 배양액 50 μ l와 함께 처리한 후, 시간별로 포자 발아율과 발아관의 길이를 위상차 현미경(phase-contrast microscope)으로 관찰하였다.

식물 근부병원균의 균사 생장(mycelial growth)의 억제현상을 조사하기 위해서는 KB 액체배지에 *F. solani*의 포자를 첨가하여 3일간 배양한 다음, 선발된 siderophore 생산성 길항균주를 접종하여 28°C에서 4일간 배양시킨 후, Toyo filter paper No. 2로 여과하고 95°C에서 건조하여 그 균체 중량을 측정 후 비교하였다.

식물체를 이용한 생물방제력 시험

Siderophore 생산성 길항균주들을 대상으로 토양 내에서 실제로 식물근부의 방제력이 있는가를 조사하기 위해 발병 기주식물로는 생육도가 빠른 강낭콩 종자(*Phaseolus vulgaris* L.)를 사용하여 28°C 항온실에서 발아시켰고, 그 크기가 비슷한 종묘를 골라 멸균된 bermiculite와 경작지 토양의 혼합 토양이 들어 있는 pot에 심었다. 식물근부 병원균 *F. solani*의 포자(6×10^8 cfu/g 토양)와 길항균(5×10^8 cfu/g 토양)을 각 pot의 혼합 토양에 함께 접종하여 22~25°C에서 성장시키면서 식물생장 기간별로 식물의 생육도 및 뿌리의 발육, 부패상태 등 근부병 발생정도를 14일간 단계별로 관찰, 조사하였다.

결과 및 고찰

Siderophore 생산균주의 선발

식물의 생육을 촉진하고 식물병원균의 발병을 감소시키는 데는 근권(rhizosphere)미생물인 plant growth-promoting rhizobacteria(PGPR)의 역할이 크며, 그 원인으로 철이온(Fe³⁺) 특이 결합물질인 siderophore의 생산에 기인된다는 것은 이미 널리 알려진 사실이다[10]. 본 연구에서는 실제 경작지 토양에서 환경보전형 생물학적 방제에 활용할 생물방제균을 육종하기 위해 식물 근부병원균 *F. solani*의 생육을 강력히 억제하는 siderophore 생산성 길항균주들을 전국 각 지역의 저병해 경작지 토양 중에서 특히 근권의 토양세균을 대상으로 분리하였다.

이를 위해 근권토양의 현탁액을 siderophore 생산균주의

Table 1. Characterization of siderophore-producing strains in iron-deficient medium

Strain	CAS liquid assay ^a	Catechol assay ^b	Hydroxamate assay ^c
GL7	0.092	0	26.49
GL11	0.113	10.27	4.52
SH14	0.100	26.22	0
GL17	0.093	0	22.75
GL19	0.098	0	13.88
LS3	0.152	0	11.24
LS6	0.196	0	10.41
LS12	0.134	0	12.52
LS16	0.214	15.26	0
Referencce	1.000	0	0

All strains were grown at 28°C for 40 h in iron-deficient KB medium. The cell-free culture supernatant fluids were assayed for siderophore production. All values are means of three replicates.

^aSiderophore production was determined by measuring the decrease in absorbance at 630 nm by the method of Schwyn and Neilands.

^bThe presence of catechol-phenolic type siderophores was detected at 510 nm by the method of Arnow. The values are 2,3-dihydroxybenzoic acid equivalents per ml.

^cThe presence of hydroxamate type siderophores was detected at 543 nm by the method of Csaky. The values are hydroxylamine HCl equivalents per ml.

분리배지인 CAS(chrome azurol S) blue agar 평판배지에서 orange halo zone이 1 cm 이상인 9개 균주를 일차적으로 우선 분리하였다(Table 1). 그리고 siderophore 활성에 따른 CAS liquid assay에 의해 90% 이상의 탈색을 나타내며, Csaky hydroxamate assay와 Arnow phenolic assay에서 siderophore 생산능이 아주 우수한 4개 균주 GL7, SH14, GL17, GL19를 2차로 선발하였으며, 그 중 가장 활성이 높은 GL7 균주를 최종 선발하였다(Table 1).

Siderophore 생산균주에 의한 식물병원균의 생육 억제능 조사

선발된 siderophore 생산성 길항균주에 의한 토양 전염성 식물병원균의 생육 억제능을 조사하기 위해 인삼 등 주요 경제식물의 뿌리썩음병을 유발시키는 식물 근부병원 *F. solani*를 대상으로 8-hydroxyquinolinc으로 탈철화시킨 KB 액체배지와 100 μM FeCl₃가 첨가된 KB 배지를 이용하여 그 억제능을 조사하였다.

그 결과 철이온이 제거된 KB 액체배지에서 성장한 siderophore 생산성 길항균주들은 철이온이 첨가된 배지에서 보다 *F. solani*에 대한 높은 생육 억제능을 나타내었으며, 그 중 GL7 균주의 경우 타 균주보다 *F. solani*의 생육을 95% 정도로 강하게 억제하였다(Fig. 1). 이상의 결과로 미루어 보아 선발된 siderophore 생산균주들은 철이온

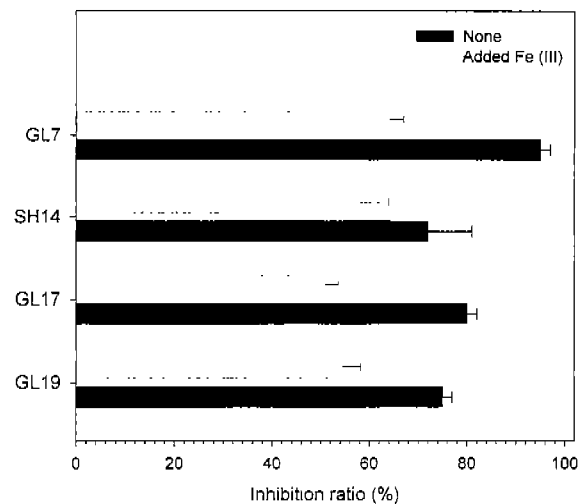


Fig. 1. Inhibitory effects of siderophore-producing strains against *F. solani* in iron-deficient cultures.

Bacterial strains were grown at 28°C for 40 hr in an iron-deficient KB broth and in a KB broth supplemented with 100 μM FeCl₃, respectively. The bacterial cultures were inoculated with a suspension (10⁸ cfu/ml) of *F. solani* and dry weights of the cultures were determined after 4 days of incubation at 28°C. Each data point represents the mean of three replications; vertical bars represent standard deviations.

(Fe³⁺) 이 결핍된 환경에서 분비하는 철이온(Fe³⁺) 특이 결합물질인 siderophore에 의해 식물 근부병원 *F. solani*의 생육을 강하게 억제하였다.

Siderophore 생산성 길항균주의 동정

환경보전형 생물학적 방제균으로 siderophore 생산능과 근부병에 대한 길항능력이 가장 강한 것으로 나타난 길항균주 GL7 균주를 최종 선택하여 여러 가지 방법을 이용하여 분류학적으로 동정하였다.

그 결과 API[®] 20NE diagnostic strips (Analytical products, France)로 분석한 결과 *Pseudomonas fluorescens*와 99.5%의 유사성을 나타내었으며, 균체 지방산을 분석한 결과 *Pseudomonas fluorescens* biotype A에 90.6%의 유사성을 나타내었다. 또한 투사 전자현미경으로 그 형태학적 특성을 관찰한 결과 1개 이상의 극성 편모를 가진 간균으로 확인되었다. 이상의 결과를 토대로 각종 동정에 필요한 배양학적, 형태학적 그리고 생화학적 특성을 비교하여 조사한 결과(Table 2)와 Bergey's manual of systematic bacteriology의 분류동정표에 의해 고찰한 결과로 선발된 siderophore 생산성 길항세균 GL7은 *Pseudomonas fluorescens*의 한 균주로 동정되었다.

Siderophore 생산성 길항균주의 식물병원균에 대한 억제기작 조사

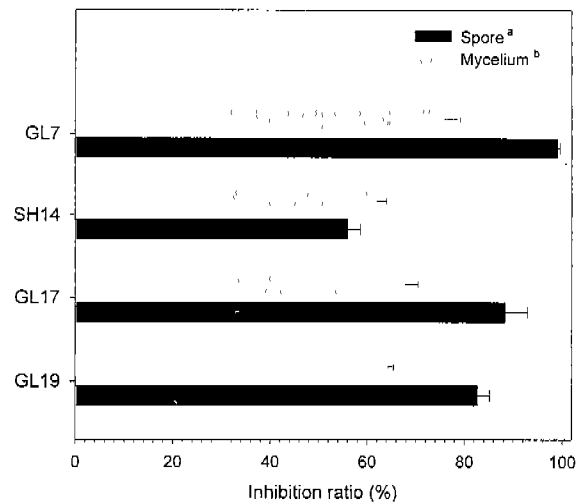
Table 2. Morphological, cultural, and physiological characteristics of isolate GL7

Characteristic	Isolate GL7	<i>P. fluorescens</i>
Gram staining	Gram(-), rod	Gram(-), rod
Cell diameter, μm	0.7~0.8	0.7~0.8
Cell length, μm	2.0~2.8	2.0~3.0
Flagella number	>1	>1
Flagella arrangement	polar	polar
Aerobic	+	+
Growth at 4°C	+	+
Growth at 41°C	-	-
Growth at pH 3.6	-	-
Need at least 12~15% NaCl for growth	-	-
Requirement for growth factors	-	-
Water-soluble fluorescent pigment formed	+	D
Oxidase reaction	+	D
Catalase reaction	+	+
Pyocyanin production	-	-
Pseudobactin production	+	D
Phenazine monocarboxylate production	-	-
Starch hydrolysis	-	-
Gelatin hydrolysis	+	+
Lipase (Tween 80 hydrolysis)	+	D
Arginine dihydrolase	+	+
Utilization of sorbitol	-	D
Utilization of xylose	+	D
(Antibiotic sensitivity)		
kanamycin, streptomycin, neomycin, tetracyclin:		sensitive
ampicillin, nalidixic acid:		resistant

+, positive; -, negative; D, doubtful

선발된 siderophore 생산성 길항균주들이 어떠한 기작으로 식물 근부병균 *F. solani*의 생육을 억제하는지, 그 억제 기작을 규명하기 위해 *F. solani*의 포자 발아 및 균사 생장에 미치는 영향을 조사하였다.

그 결과 선발된 길항균주 모두 *F. solani*의 포자 발아를 상당히 억제하였으며, 균사 성장 억제율도 60% 이상으로 높게 나타났다(Fig. 2). 그 중 최종 선발된 *P. fluorescens* GL7 균주의 경우 포자 발아 억제율이 97% 정도, 균사 성장 억제율이 75% 정도로 타 균주의 경우보다 가장 강한 억제능을 나타내었다(Fig. 2). 또한 위상차 현미경을 이용하여 *F. solani*의 포자 현탁액 50 μl 와 *P. fluorescens* GL7

**Fig. 2. Inhibitory activities of siderophore-producing strains on the growth of *F. solani* in dual culture.**

^a Bacterial cells were grown in iron-deficient KB broth with a spore suspension (2×10^8 cfu/ml) of *F. solani*. Dry weights of the cultures were determined after 5 days of incubation at 28°C. Inhibition ratio(%) was expressed relative to a control with water.

^b Bacterial cells were added to iron-deficient KB cultures grown for 3 days with *F. solani*. Dry weights of the cultures were determined after 4 days of incubation. Each horizontal bar represents the mean of three replications and error bar represents standard deviation.

의 배양액 50 μl 를 depression slide 위에 함께 처리한 후, 시간별로 포자 발아율 및 발아관 길이를 관찰한 결과 *F. solani*의 포자는 거의 발아되지 않았으며, 발아관 신장 또한 관찰되지 않았다. 이상의 결과로 미루어 보아 선발된 siderophore 생산균주 *P. fluorescens* GL7은 *F. solani*의 포자 발아 및 균사 생장을 동시에 억제할 수 있었다. 이는 그 억제기작이 선발된 균주가 분비한 siderophore에 의해 식물 근부병균인 *F. solani*의 포자 발아와 발아관 신장에 필수적 요인이 되는 철 성분의 결핍으로 그 생육이 저해되는 경쟁적 길항작용(competition)에 의한 것을 알 수 있었다.

Siderophore 생산성 길항균주의 식물체를 이용한 생물 방제력 검증

선발된 siderophore 생산성 길항균주가 토양 내에서 실제로 근부방제력이 있는가를 조사하기 위해 발병 기주식물로는 강낭콩 종자(*Phaseolus vulgaris* L.)를 사용하여 식물 근부병균 *F. solani*의 포자(6×10^8 cfu/g 토양)와 길항균 (5×10^8 cfu/g 토양)을 멸균된 bermuculite와 경작지 토양의 혼합 토양에 함께 접종한 후, 식물생장 기간별로 식물의 생육도 및 뿌리의 발육, 부패상태 등 근부병 발생정도를 조사하였다.

그 결과 최종 선발된 *P. fluorescens* GL7의 경우 타 균

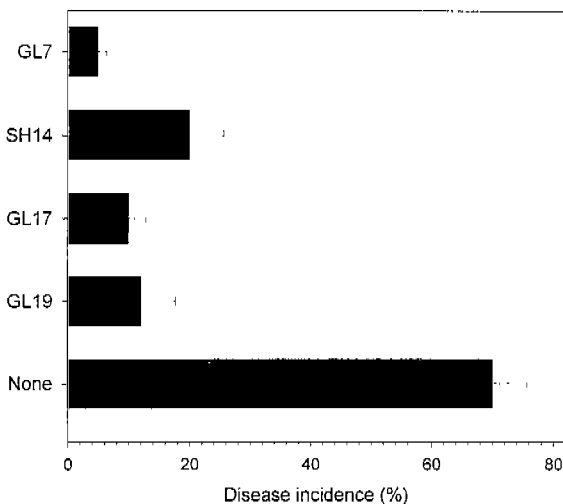


Fig. 3. Suppression of *F. solani*-induced root-rot disease by *P. fluorescens* GL7.

Plastic pots were filled up to two-third with a vermiculite soil, and a 3 day-old seedling of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) was transplanted in each pot. A seed cover layer (one-third of the pot's depth) was infested with a preparation (6×10^8 cfu per gram of dry soil) of *F. solani* and mixed with 5 ml of bacterial suspension (approximately 1×10^8 cfu per ml). Each horizontal bar represents the mean of three replications of 50 seedlings each and error bar represents standard deviation.

Table 3. Growth promotion of bean by *P. fluorescens* GL7

Treatment	Average weight per plant (g)	Increase compared to control (%)
Control	6.3	100
GL7	9.3 *	147
SH14	7.0	111
GL17	8.5 *	135
GL19	7.2	114

All seedlings of bean were infested with a preparation (6×10^9 cfu per gram of dry soil) of *F. solani* and mixed with 5 ml of the bacterial suspension (approximately 1×10^8 cfu per ml) except for the untreated control. The plants were harvested 14 days after transplanting, and the weights of the whole plant were recorded. Each value is the average of three replications of 50 seedlings.

* indicates significant increase compared to control ($P = 0.05$).

주에 비해 *F. solani*에 의한 발병율이 가장 낮았으며, 방제 효과도 크게 나타났다. 즉, *F. solani*만 처리한 경우는 30%의 식물 성장율을, *P. fluorescens* GL7 균주와 *F. solani*를 함께 처리한 경우는 95% 정도의 식물 성장율을 보여 65% 정도의 발병율을 줄일 수 있었다 (Fig. 3). 그리고 *F. solani*와 *P. fluorescens* GL7을 처리하지 않은 무처리구에 비해 식물 무게가 147% 정도 증가하여 식물의 생육도와 뿌리의 발육상태가 양호하였으며, 근부병 발생도 거의 볼 수 없었다 (Table 3, Fig. 4). 따라서 선발된 *P. fluorescens* GL7은 *F. solani*에 의한 근부병을 보다 더 효과적으로 방제할 수 있었으며, 또한 *P. fluorescens* GL7이



Fig. 4. *In vivo* suppressive effect of *P. fluorescens* GL7 against root-rot of bean caused by *F. solani*.

The plants were harvested 14 days after transplanting; left, *F. solani*; center, *F. solani* and *P. fluorescens* GL7; right, None

생산하는 siderophore에 의해 철이온을 식물에 공급함으로써 식물의 성장을 촉진시킬 수 있는 PGPR로서의 역할이 아주 우수하였다.

요 약

농산물의 증산을 위한 과도한 농약 사용으로 인한 토양 생태계의 파괴를 줄이기 위하여 맹독성 농약을 대신할 수 있는 생물학적 방제제 개발의 일환으로 식물병원성 진균의 생육을 억제하는 siderophore를 생산하는 생물학적 방제균을 선발하여, 이를 동정하고 근부병억제기작을 연구하여 향후 다기능 생물학적 방제제 개발의 기초자료로 활용하고자 하였다. 이를 위해 저병해 경작지 토양에 장기간 우점화 되어 있는 siderophore 생산 가능성이 높은 토착 길항미생물을 전국 각지의 저병해 경작지에서 분리하였고, 이들 중 siderophore 생산능이 높은 길항미생물 4종의 균주를 chrome azurol S(CAS) agar를 이용하여 선발하였다. 그 중 최고의 길항성을 나타내는 GL7 균주를 최종 선발하였고, API[®] diagnostic test와 지방산 분석, 그리고 각종 생리학적 특성 및 형태학적 특성을 통해 동정한 결과 *Pseudomonas fluorescens*의 한 균주임을 확인하였다. 최종 선발된 siderophore 생산균주 *P. fluorescens* GL7의 길항기작을 병원성 진균인 *Fusarium solani*를 대상으로 균사 생장과 포자 발아 등의 억제율을 조사한 결과 균사 생장 억제율은 75% 이상이며, 포자 발아억제율은 97% 이상으로 우수한 방제능을 확인할 수 있었다. 선발된 siderophore 생산능이 높은 길항균주 *P. fluorescens* GL7을 대상으로 토양 내에서 실제로 근부병에 방제력이 있는가를 조사하기 위해 강낭콩 종자(*Phaseolus vulgaris* L.)를 발병 기주식물로 사용하여 방제시험을 한 결과 *F. solani*만 처리한 경우는 30%의 성장율을, *P. fluorescens* GL7 균주와 *F. solani*

와 함께 처리한 경우는 95% 정도의 성장율을 나타내어 약 65% 정도의 발병율을 줄일 수 있었다. 또한 *F. solani*와 *P. fluorescens* GL7을 처리하지 않은 무처리구에 비해 식물 무게가 147% 정도로 증가하여 식물의 생육도와 뿌리의 발육상태가 양호하였고, 근부병 발생도 거의 볼 수 없었으므로 아주 우수한 siderophore 생산성 생물학적 방제균을 선 발할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 농림부에서 지원하는 농림특정연구사업 및 영남대학교 교비 연구비 지원으로 수행된 연구결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Amow, L. E. 1937. Colorimetric determination of the components of 3,4-dihydroxyphenylalanine-tyrosine mixtures. *J. Biol. Chem.* **118**: 531-537.
2. Biedermann, G. and P. Schindler. 1957. On the solubility of precipitated iron (III) hydroxide. *Acta Chem. Scand.* **11**: 731-740.
3. Csaky, T. 1948. On the estimation of bound hydroxylamine. *Acta Chem. Scand.* **2**: 450-454.
4. Elad, Y. and R. Baker. 1985. Influence of trace amounts of cations and siderophore-producing pseudomonads on chlamydo-spore germination of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathol.* **75**: 1047-1052.
5. Gerhardt, P. G. R. G. E. Murray, R. N. Costilow, E. W. Nester, W. A. Wood, N. R. Krieg, and G. B. Phillips. 1981. *Manual of Methods for General Bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington.
6. King, J. V., J. J. R. Campbell, and B. A. Eagles. 1948. Mineral requirements for fluorescein production by *Pseudomonas*. *Can. J. Research* **26C**: 514-519.
7. Krieg, N. R. and J. G. Holt. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 9th ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
8. Lindsay, W. L. 1979. *Chemical Equilibria in Soils*. John Wiley, New York.
9. Neilands, J. B. 1982. Microbial envelope proteins related to iron. *Ann. Rev. Microbiol.* **36**: 285-309.
10. Scher, F. M. and R. Baker. 1982. Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt pathogens. *Phytopathol.* **72**: 1567-1573.
11. Schwyn, B. and J. B. Neilands. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* **160**: 47-56.
12. Spiro, T. G. 1977. Chemistry and biochemistry of iron, pp. 23-32. In E. B. Brown, P. Aisen, J. Fielding, and R. R. Crichton (eds.), *Proteins of Iron Metabolism*. Grune and Stratton, New York.
13. Waring, W. S. and C. H. Werkman. 1942. Growth of bacteria in an iron-free medium. *Arch. Biochem.* **1**: 303-310.
14. Weinberg, E. D. 1974. Iron and susceptibility to infectious disease. *Science* **184**: 952-956.

(Received October 28, 1999)