

ORIGINAL ARTICLE

*Pseudomonas koreensis*에 의한 잡초제어활성물질인 HCN 생성과 이 균주의 식물성장 촉진 및 흰개미 살충 활성

유지연 · 장은진 · 박수연 · 손흥주*

부산대학교 생명환경화학학과 및 생명산업융합연구원

Production of HCN, Weed Control Substance, by *Pseudomonas koreensis* and its Plant Growth-Promoting and Termiticidal Activities

Ji-Yeon Yoo, Eun-Jin Jang, Soo-Yeun Park, Hong-Joo Son*

Department of Life Science & Environmental Biochemistry/Life and Industry Convergence Institute, Pusan National University, Miryang 50463, Korea

Abstract

To develop a microbial weed control agent, HCN-producing bacteria were isolated, and their characteristics were investigated. A selected strain of WA15 was identified as *Pseudomonas koreensis* by morphological, cultural, biochemical and 16S rRNA gene analyses. The conditions for HCN production was investigated by a One-Variable-at-a-Time (OVT) method. The optimal HCN production conditions were tryptone 1%, glycine 0.06%, NaCl 1%, and an initial pH and temperature of 5.0 and 30°C, respectively. The major component for HCN production was glycine. Under optimal conditions, HCN production was about 3 times higher than that of the basal medium. The WA15 strain had physiological activities, such as indoleacetic acid that was associated with the elongation of plant roots and siderophore and ammonification inhibiting fungal growth, and produced hydrolytic enzymes, such as cellulase, pectinase and lipase. The strain was able to inhibit the growth of phytopathogenic fungi, such as *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea* and *Fusarium oxysporum*, by the synergistic action of volatile HCN and diffusible antimicrobial compounds. A microscopic observation of *R. solani* that was treated with the WA15 strain showed morphological abnormalities of fungal mycelia, which could explain the role of the antimicrobial metabolites that were produced by the WA15 strain. The volatile HCN produced by the WA15 strain was also found to have insecticidal activity against termites. Our results indicate that *Pseudomonas koreensis* WA15 can be applied as a microbial agent for weed control and also as a termite repellent. Furthermore, it could be applied as a microbial termiticidal agent to replace synthetic insecticides.

Key words : Antifungal activity, HCN, *Pseudomonas koreensis*, Termite, Weed control

1. 서론

잡초는 수분, 영양분, 빛에 대해 농작물과 경쟁하고,

농작물이 서식할 수 있는 공간을 침범할 뿐만 아니라 해충이나 식물 병원균을 보호하는 역할을 하므로 농산물의 품질 저하와 생산량을 감소시킨다(Kremer and Souissi,

Received 4 May, 2018; Revised 15 May, 2018;

Accepted 16 June, 2018

*Corresponding author: Hong-Joo Son, Department of Life Science & Environmental Biochemistry, Pusan National University, Miryang 50463, Korea

Phone: +82-55-350-5544

E-mail: shjoo@pusan.ac.kr

The Korean Environmental Sciences Society. All rights reserved.
© 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.

2001). 해충이나 병원균에 의한 농작물 질병의 발생은 산발적인 반면, 잡초는 일정하게 존재하므로 농작물 생산에 문제가 되는 다른 원인과는 차이가 있다(Kamei et al., 2014). 해충 및 병원균은 각각 작물 수확량의 30% 및 20%를 감소시키는데 반해 잡초는 수확량의 45%를 감소시킴으로써 심각한 경제적 손실을 초래한다. 잡초는 1,800여 종에 달하는 것으로 알려져 있으며, 이중 약 300 종은 전 세계에 걸쳐 재배 작물에 전염병을 유발한다 (Ware and Whitacre, 2004).

과거에는 잡초를 제어하기 위하여 경종적 방법이나 사람과 기계를 이용하여 제초작업을 하였는데, 이 방법들은 효율성이 떨어지거나 비경제적이며, 인력을 구하기 어려운 단점이 있었다(Mishra et al., 2013). 현재, 잡초를 관리하는 가장 효과적인 방법은 합성제초제를 사용하는 것이다. 합성제초제를 사용함으로써 노동시간이 대폭 감소되었을 뿐만 아니라 작물의 생산성도 크게 증대되었다. 그러나 합성제초제는 소비자에 의해 부정적으로 인식되고 있으며, 토양과 지하수와 같은 환경을 오염시키는 등 그 안전성은 항상 논쟁의 여지가 있다. 나아가 합성제초제 사용에 따른 제초제 내성 잡초의 발생과 같은 새로운 문제점도 지적되고 있다(Lee et al., 2016). 따라서 이러한 문제점을 해결하기 위한 방안으로 생분해성, 선택적 및 환경친화적 제초제에 대한 관심이 증폭되고 있으며, 그 중 미생물을 이용한 잡초 방제법에 대한 연구가 많이 시도되고 있다(Lakshmi et al., 2015; Choi et al., 2017).

잡초에 대한 미생물학적 방제제로 연구되고 있는 대표적인 그룹은 식물뿌리에 집락화할 수 있는 Deleterious Rhizobacteria (DRB)이다(Lakshmi et al., 2015). 부생적 비기생성 식물병원균으로 정의되는 DRB는 시안 화합물, siderophore, phytotoxin 등을 분비함으로써 잡초의 대사과정을 저해한다(Grossman and Kwiatkowski, 1995). DRB는 강한 숙주 특이성을 나타내며, 단일 식물 종에만 집락화하는 특성을 가지고 있을 뿐만 아니라 이들이 생산하는 2차 대사산물은 식물표면처럼 타겟이 되는 장소에만 국부적으로 작용한다. 예를 들면, 어저귀 (*Abutilon theophrasti* Medik)로부터 분리된 DRB는 잡초의 뿌리에만 선택적으로 집락화하기 때문에 다른 농작물의 성장에 유해한 영향을 미치지 않으며(Owen and Zdor, 2001), DRB의 특성을 나타내는 *Pseudomonas*

spp.는 완두(*Pisum sativum*)의 성장을 크게 감소시키지만 밀의 성장에는 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 보고되었다(Astrom and Gerhardson, 1988). 따라서 DRB의 숙주 특이성을 잘 이용하여 잡초 근권에 이들을 성공적으로 정착시킬 수 있다면 유용 작물의 성장에 악 영향을 미치지 않으면서 잡초를 효율적으로 제어할 수 있을 것으로 기대된다.

DRB에 의해 생성되는 대표적인 2차 대사산물로서 Hydrogen Cyanide(HCN)를 들 수 있다. HCN은 각종 효소의 작용기와 착물을 형성할 수 있는 휘발성 물질로서, CO₂와 질산염동화 억제, 호흡에서의 산소환원과 광합성에서의 전자전달을 저해함으로써 식물뿌리의 성장을 억제한다고 알려져 있다(Schippers et al., 1990). 이러한 작용으로 인하여 잡초의 일종인 돌피(*Echinochloa crus-galli*)의 현저한 성장 감소가 보고되었다(Kremer and Kennedy, 1996). 한편, 식물성장 촉진활성을 가진 HCN 생성 DRB는 식물 성장을 향상시킬 수 있다고도 보고되어 있다. 즉 *Mesorhizobium loti* MP6는 정상적인 환경에서 HCN을 생성하고, 겨자의 성장을 향상시켰다고 보고되었다(Chandra et al., 2007). 또한 HCN을 생성할 수 있는 *Pseudomonas fragi* CS11RH18984는 밀 종자의 발아율을 증가시키고, 밀의 영양원 흡수와 성장을 크게 증가시킨다는 것이 밝혀졌다(Selvakumar et al., 2009). 따라서 이러한 특성을 가진 DRB는 잡초의 생물학적 방제를 위한 잠재적이고, 환경친화적인 수단이 될 수 있다고 제안되었다(Randviir and Banks, 2015).

상기와 같이 잡초제어 및 몇몇 식물성장 촉진활성을 가진 DRB에 대한 연구는 다수 보고되었으나 이들의 병원성 곰팡이에 대한 길항능에 대한 연구는 그렇게 많지 않다. 따라서 이들 활성을 모두 공유하는 DRB의 분리와 특성 연구는 농업생물공학적인 관점에서 응용 가능성이 크다고 판단된다. 본 연구는 다양한 생리활성을 가진 미생물학적 잡초 방제제 개발을 최종목표로 설정되었으며, 이에 따라 먼저 잡초제어물질인 HCN을 생성할 수 있는 세균을 분리 및 동정하고, 선정된 실험군주에 의한 HCN 생성조건을 최적화한 후, 이들의 항진균 활성을 포함한 각종 식물성장 촉진활성을 조사하였다. 아울러 응용분야 확대를 위하여 실험군주에 의한 흰개미 살충효과도 확인하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 균주 분리 및 동정

본 실험에 사용된 균주는 사과 과수원에서 자라고 있는 쑥(*Artemisia princeps* Pampanini)의 근권 토양에서 분리되어 저자의 연구실에서 보존중인 WA15 균주였으며, 이 균주는 HCN 생성능이 있는 것으로 확인되었다. 잡초의 뿌리에서 분리된 DRB는 잡초에만 선택적으로 작용하는 경향이 강하다는 보고(Owen and Zdor, 2001)에 의거하여 잡초인 쑥의 근권으로부터 HCN 생성능이 있는 균주 분리를 시도하였으며, 결과적으로 이에 부합하는 WA15 균주가 분리되었다. 실험균주를 동정하기 위하여 세포나 집락의 형태 등 표현형적 특성을 Manual for the identification of medical bacteria(Barrow and Feltham, 1993)에 의하여 조사하였으며, Bergey's manual of determinative bacteriology(Holt et al., 1993)를 참조하여 동정하였다. 또한 실험균주의 16S rRNA 유전자의 염기서열을 분석함으로써 분자생물학적 동정도 수행하였다. 16S rRNA 유전자를 증폭하는데 사용된 primer는 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG)와 1492R (TACGGYTACCTTGTTAC GACTT)이었다. 분석된 16S rRNA 유전자의 염기서열은 GenBank DB를 이용하여 유사균주들과 상동성을 비교하였다. 또한 이들의 염기서열을 Clustal X (version 1.81)를 이용하여 정렬한 후, MEGA 소프트웨어를 이용하여 계통학적 위치를 조사하였다.

2.2. HCN 생성조건 조사

HCN 생성을 위한 기본배지는 LB broth (tryptone 1%, yeast extract 0.5%, NaCl 2%, pH 7)를 사용하였다. HCN 생성에 영향을 미치는 요인을 조사하기 위하여 One-Variable-at-a-Time (OVT) 방법에 의하여 탄소원(glucose, fructose, sucrose, maltoes, lactose, glycerol, sorbitol, mannitol), 질소원(bactopeptone, beef extract, casamino acid, casein, gelatin, malt extract, polypeptone, proteose peptone NO.3, skim milk, soytone, tryptone, yeast extract), NaCl, glycine, 배양온도(25-35 °C) 및 초기 pH(3.0-10.0)에 따른 HCN 생성량을 측정하였다. 실험균주를 육즙배지에 접종하여 30 °C, 200 rpm에서 24 시간동안 배양하여 전배양액으로 사용하였다. 본배양 배지에 전배양액을 2%(v/v) 접종하여 30 °C, 200 rpm에서 일정시간 배양하였다. 본배양에 사용된 배양용기는

biometric flask였으며, arm 부분에 1M NaOH 1.5 ml을 첨가하여 배양액으로부터 휘발되는 HCN을 포집하였다. HCN의 농도는 Bakker and Schippers(1987)을 이용하여 다음과 같이 측정하였다. Biometric flask의 arm으로부터 회수한 1 M NaOH에 1% alkaline picric acid를 첨가하여 37 °C에서 15분 동안 반응시킨 후, 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. KCN 표준용액을 사용하여 동일한 방법으로 처리하여 작성한 표준곡선으로부터 HCN 농도를 계산하였다.

2.3. 식물성장 촉진활성 조사

실험균주의 indoleacetic acid, siderophore, ammonia, cellulose, lipase, pectinase의 생성능 및 불용성인산 가수분해를 표준방법에 의하여 정성적으로 확인하였다(Gerhardt et al., 1981; Dye et al., 2004). 또한 다양한 농작물에 질병을 유발하는 식물병원성 곰팡이(젓빛곰팡이병원균인 *Botrytis cinerea*, 시들음병 및 뿌리썩음병원균인 *Fusarium oxysporum*, 모잘록병원균인 *Rhizoctonia solani*)에 대한 확산성 항균물질의 길항능을 대치배양에 의하여 조사한 후, 균사의 형태를 실제현미경으로 관찰하였다. 아울러 실험균주가 생성한 휘발성 HCN에 의한 길항능도 밀봉된 2-section-compartment petri dish를 이용하여 관찰하였다. 이들 식물병원성 곰팡이의 배양에는 potato dextrose agar 배지를 이용하였으며, 30 °C에서 4일동안 배양하였다.

2.4. 흰개미 살충능 조사

2-section-compartment petri dish를 이용하여 최적 배지를 조제하였다. Petri dish의 한쪽에는 실험균주를 접종하고, 다른 한쪽에는 흰개미 20마리와 이들의 먹이로 멸균된 증류수에 적신 여과지를 두었다. 실온에서 24 시간동안 방치하면서 경시적으로 흰개미의 활동과 사멸 유무를 관찰하였다.

2.5. 데이터 분석

별도로 언급하지 않은 한, 모든 정량실험은 세 번 반복하였으며, 결과는 평균값으로 나타내었다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 실험균주 동정

WA15 균주의 표현형적 특성을 조사한 결과, 본 균주는 막대형(1.2-2 μ m)의 그람음성세균으로, 운동성이

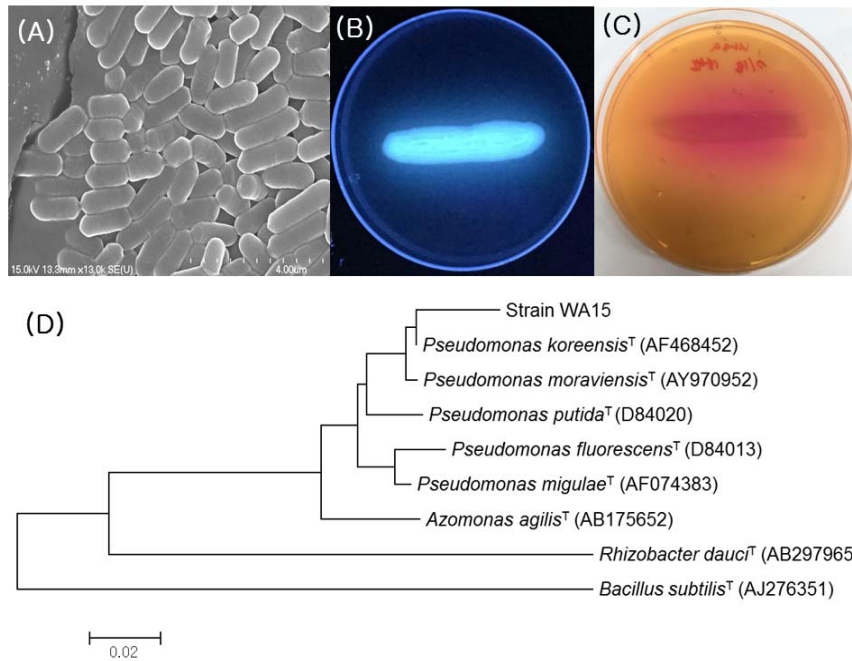


Fig. 1. Phenotypic property and phylogenetic tree of strain WA15. (A) cell shape, (B) fluorescence under UV light (C) urease production, (D) dendrogram based on 16S rRNA gene sequences showing the position of strain WA15.

있었고, 내생포자를 형성하지 않았다(Fig. 1A). 실험균주는 catalase, oxidase 및 urease를 생산하였으며, Nutrient agar 평판배지에서 동그랗고(round), 연한 노란색의 집락을 형성하였고, 자외선 하에서 형광을 발하였다(Fig. 1B와 C). Bergey's manual of determinative bacteriology를 참조하여 일차 동정한 결과, 실험균주는 *Pseudomonas* 속에 포함됨을 알 수 있었다. 이후, 실험균주의 16S rRNA 유전자의 염기서열을 분석하여 GenBank DB에 등록된 유사균주와 비교한 결과, *Pseudomonas koreensis*와 99%의 상동성을 가지고 있었다. 기존의 *Pseudomonas* 속 균주와의 계통학적 관련성을 조사하기 위하여 계통수를 작성한 결과, 실험균주는 *P. koreensis*와 동일한 계통학적 그룹에 포함됨을 알 수 있었다(Fig. 1D). 따라서 이들 결과에 근거하여 실험균주를 *Pseudomonas koreensis* WA15로 명명하였다.

3.2. HCN 생산 최적화

미생물에 의한 대사산물의 생산은 탄소원 등 배지성분과 배지의 pH 등 배양조건에 영향을 받는다(Vyas et

al., 2014). 따라서 HCN 생성에 관여하는 배양변수를 조사하는 것은 매우 중요하지만 아미노산(Castric, 1983)과 철(Michelsen and Stougaard, 2012)의 영향에 대한 연구만 단편적으로 보고되었을 뿐 HCN 생성을 위한 배지성분 최적화에 대한 구체적인 연구는 거의 보고된 바 없다.

먼저 HCN 생성을 위한 기본배지를 선정하기 위하여 King's B 배지, LB 배지, 육즙배지, Trypticase soy 배지를 사용하여 배양한 결과, LB broth에서 HCN 생성량이 가장 많음을 확인하였다(미제시). 따라서 LB 배지를 기본배지로 하여 다음의 최적화 실험을 수행하였다.

각종 탄소원을 0.5%씩 첨가하여 실험균주에 의한 HCN 생성량을 측정한 결과는 Fig. 2에서 보는 바와 같다. 탄소원을 첨가하지 않은 대조구에서 HCN 생성량이 가장 높았으며, 탄소원의 첨가는 오히려 HCN의 생성을 저해하였다.

각종 질소원을 1.5% 첨가하여 실험균주에 의한 HCN 생성량을 측정한 결과, HCN 생성에 질소원의 첨가는 필수적인 것으로 나타났으며, 기본배지의 질소 성분이

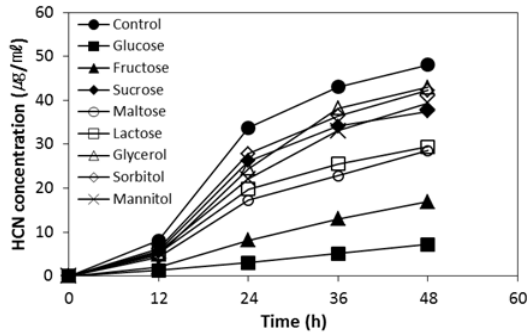


Fig. 2. Effect of carbon source on HCN production by *Pseudomonas koreensis* WA15.

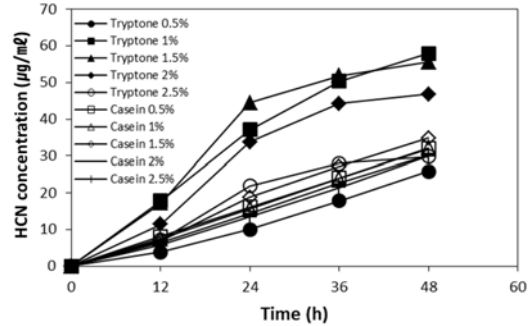


Fig. 3. Effect of nitrogen source concentration on HCN production by *Pseudomonas koreensis* WA15.

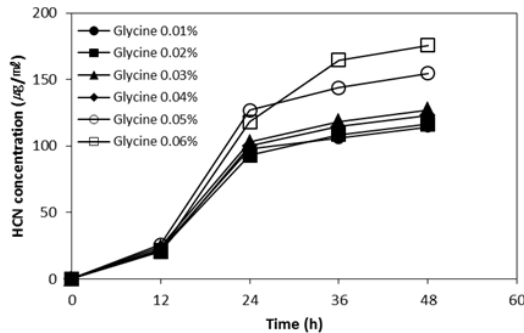


Fig. 4. Effect of glycine concentration on HCN production by *Pseudomonas koreensis* WA15.

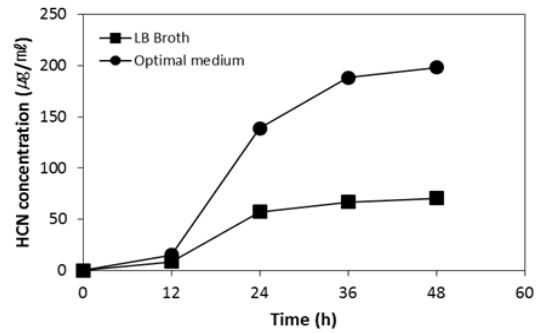


Fig. 5. Time curve of HCN production by *Pseudomonas koreensis* WA15 in basal (LB broth) and optimal media.

함유된 대조구(tryptone 1% + yeast extract 0.5%)보다 높은 생성량을 나타낸 것은 tryptone 및 casein이었다(미제시). 따라서 tryptone과 casein의 농도를 각각 달리하여 실험을 진행하였으며, 그 결과는 Fig. 3에서 보는 바와 같이 HCN 생성량은 tryptone 1%를 첨가했을 때 가장 높았고, 1.5% 이상의 농도에서는 생성량이 감소하였다. 기본배지인 LB 배지에는 tryptone과 yeast extract가 함유되어 있고, 이들은 질소원으로서의 역할뿐만 아니라 탄소원의 역할도 하므로 본 실험에서 추가적으로 공급된 탄소원들은 catabolite repression에 의하여 HCN 생성을 억제하는 것으로 판단되었다.

기본배지 성분인 NaCl을 농도별로 첨가하여 실험균주의 HCN 생성량을 측정한 결과, 1%까지 농도 증가에 비례하여 생성량이 증가하다가 그 이상의 농도에서는 감소하였다. 기본배지에 함유되지 않은 인산염(NaH_2PO_4 ,

K_2HPO_4)과 철염(FeCl_3)의 추가 공급은 HCN 생성에 아무런 영향을 미치지 않았다(미제시).

Glycine은 HCN의 전구물질로 알려져 있다 (Michaels et al., 1965). 앞서 최적화된 질소원 성분인 tryptone은 tryptophan의 함량은 높으나 다른 아미노산의 함량은 매우 낮다고 알려져 있다(Zimbro et al., 2009). 따라서 glycine 농도에 따른 HCN 생성량을 조사하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 HCN 생성량은 glycine의 농도 증가에 비례하여 증가하여 0.06% 첨가시 가장 높은 생성량을 나타내었으며, 앞서 최적화된 어떤 배지성분보다 더 큰 영향을 미쳤다. Owen and Zdor(2001)에 의하면 HCN은 glycine의 amino-methyl group으로부터 유래하며, 잡초의 뿌리 삼출물에 함유된 glycine에 의하여 생성량이 증가함으로써 잡초 제어에 효과적이라고 하였다.

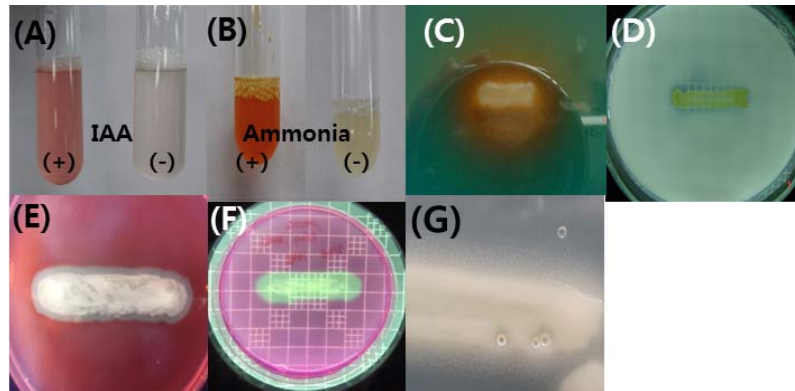


Fig. 6. Photographs showing physiological activities of *Pseudomonas koreensis* WA15. (A) indoleacetic acid(IAA), (B) ammonia, (C) siderophore, (D) insoluble phosphate solubilization, (E) cellulase, (F) pectinase, (G) lipase.

한편, 배양온도(25-35℃) 및 초기 pH(3.0-10.0)가 HCN 생성량에 미치는 영향을 조사한 결과, 30℃ 및 pH 5.0가 최적 배양조건으로 선정되었다(미제시).

상기에서 확립된 최적배지(tryptone 1%, NaCl 1%, glycine 0.06%, pH 5 및 30℃)와 기본배지에 실험균주를 접종하여 배양한 후, 생성된 HCN 농도를 비교한 결과, 배양 48시간만에 각각 198.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 및 70.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 HCN이 생성됨을 알 수 있었다(Fig. 5). 즉 배지 및 배양조건을 최적화시킴으로써 기본배지 대비 약 3배 정도 높은 HCN 생성이 이루어졌음을 확인할 수 있었다.

3.3. 식물성장 촉진활성

실험균주가 보유하고 있는 생리활성을 보다 자세하게 조사하기 위하여 식물성장 촉진활성과 식물병원성 곰팡이에 대한 길항능을 조사하였다. 먼저 식물성장 촉진활성을 조사한 결과는 Fig. 6에서 보는 바와 같다. 실험균주의 배양액은 식물성장호르몬인 indoleacetic acid 및 항진균 물질인 ammonia를 검출할 수 있는 시약인 Nessler(Dye et al., 2004) 및 Salkowsky(Mayer, 1958) 시약에 의하여 각각 연분홍색과 적색으로 변함으로써 이들 대사산물을 생성할 수 있음을 확인하였다(Fig. 6A와 B). 많은 세균은 ammonia 생성을 통하여 식물병원성 곰팡이의 생육을 억제한다고 보고되었다(Dye et al., 2004). 본 균주는 siderophore 검출배지인 Chrome azurol S 및 불용성 인산 가용성 확인배지인 NBRIP 평판배지에서 각각 옐로우색 환과 투명환을 집락 주변에 형성하였기에 이들 생리활성을 가지고 있음을 알 수 있었다(Fig. 6C와 D).

또한 본 균주는 식물병원성 곰팡이의 세포성분을 분해할 수 있는 cellulase, pectinase 및 lipase를 생성할 수 있었다(Fig. 6E와 F). 인산은 농작물이 흡수할 수 없는 불용성 상태로 토양에 대량 존재하고 있다. 따라서 불용성인 산을 식물이 흡수가능한 가용성 상태로 전환시킬 수 있는 미생물은 합성비료의 사용을 최소화하면서, 토질의 큰 변화없이 농작물의 성장을 증가시키는 것으로 알려져 있다(Vassilev and Vassileva, 2003). Siderophore는 철이온과 선택적으로 결합할 수 있는 물질로서, 이를 생산하는 미생물은 식물병원성 곰팡이와의 철이온 흡수에 대한 경쟁에서 우위를 점할 수 있기 때문에 방제력을 발휘할 수 있다(Sulochana et al., 2014).

3.4. HCN과 확산성 항균물질에 의한 식물병원성 곰팡이 길항능

휘발성 HCN에 의한 식물병원성 곰팡이에 대한 길항능을 밀봉된 2-section-compartment petri dish를 이용하여 조사한 결과, *R. solani*, *B. cinerea*, *F. oxysporum*의 생육을 억제할 수 있음을 확인하였다. 이중 HCN에 의한 길항능이 가장 높았던 *R. solani*의 생육저해 현상을 Fig. 7에 나타내었다. 실험 균주가 접종된 실험구에서 HCN 검출시약인 alkaline picric acid를 적신 여과지가 적색으로 변하였고, 이에 따라 곰팡이의 생육이 억제된다는 것을 관찰할 수 있었으나 WA15 균주를 접종하지 않은 실험구에서는 곰팡이의 생육이 크게 억제되지 않았다.

한편, 실험균주가 생성한 확산성 항균물질에 의한

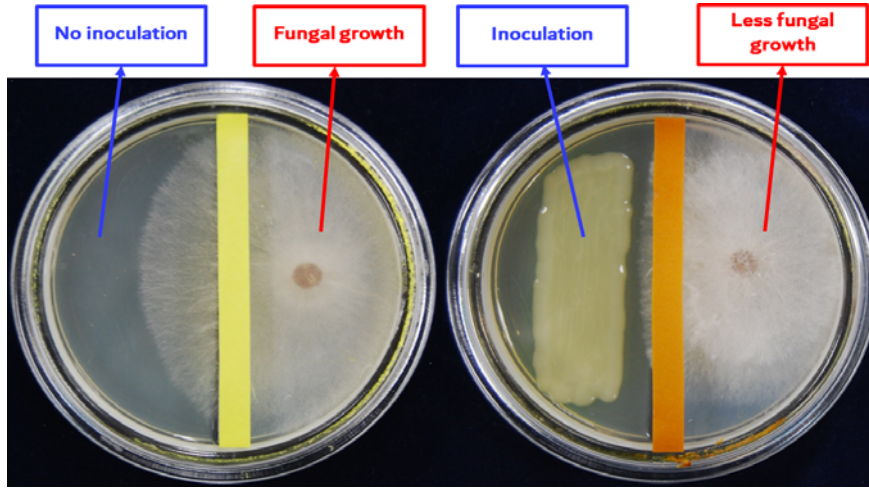


Fig. 7. Antifungal activity of *Pseudomonas koreensis* WA15-derived volatile HCN against *Rhizoctonia solani*.

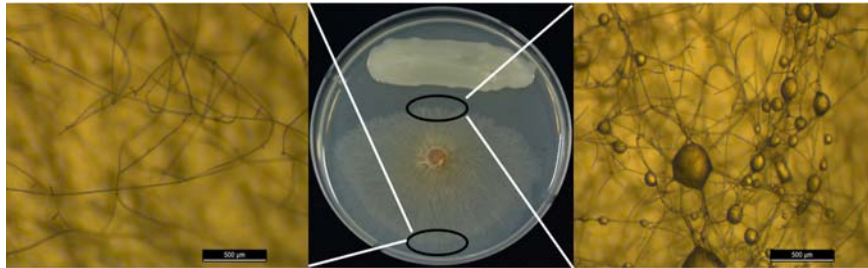


Fig. 8. Antifungal activity of *Pseudomonas koreensis* WA15-derived diffusible compounds against *Rhizoctonia solani*. Left and right micrographs show deformation of *R. solani* hyphae by diffusible compounds (left, normal hyphae; right, deformed hyphae).

곰팡이 길항능을 조사하기 위하여 대치배양을 실시한 결과, 상기 식물병원성 곰팡이들의 생육이 모두 억제됨을 확인하였다. 따라서 본 실험균주에 의한 식물병원성 곰팡이에 대한 길항능은 휘발성 HCN과 확산성 항균물질의 복합작용에 의한 것으로 판단되었다. 본 균주가 *R. solani*의 균사 형태에 미치는 영향을 관찰한 결과는 Fig. 8에서 보는 바와 같다. 실험균주에 의하여 영향을 받지 않은 영역에서 생육한 *R. solani*의 균사는 정상적인 형태를 나타낸 반면, 실험균주와 함께 대치배양된 곰팡이는 균사의 thickening과 함께 균사 중간중간 부위에 다양한 크기의 액포가 형성되는 등 기형적 형태가 관찰되었다. 이러한 변화는 연이어 세포 용해를 가져오고, 결과적으로 균사 생육이 억제되는 것으로 보고되었다(Getha and Vikineswary, 2002). *B. cinerea*, *F. oxysporum*의 균사

형태 역시 *R. solani*와 마찬가지로 동일한 기형을 보여주었다.

3.5. 흰개미 살충능

흰개미는 자연계에서 물질순환에 큰 역할을 수행하는 등 그 생태학적 가치가 높음에도 불구하고 가옥의 목재, 전신주, 목조 다리, 철도 침목 등의 목조 구조물 및 심지어 농작물에도 피해를 주고 있기 때문에 대표적인 목재 해충으로 간주되고 있는데, 국외에서 보고된 흰개미에 의한 피해는 실로 막대하다(Matsuura, 2005). 따라서 본 실험균주의 응용분야 확대 가능성을 알아보기 위하여 HCN에 의한 흰개미 살충효과를 조사하였다. 2-section-compartment petri dish를 이용하여 실험균주에 의한 흰개미 살충능을 조사한 결과, 실험균주를 접종하지

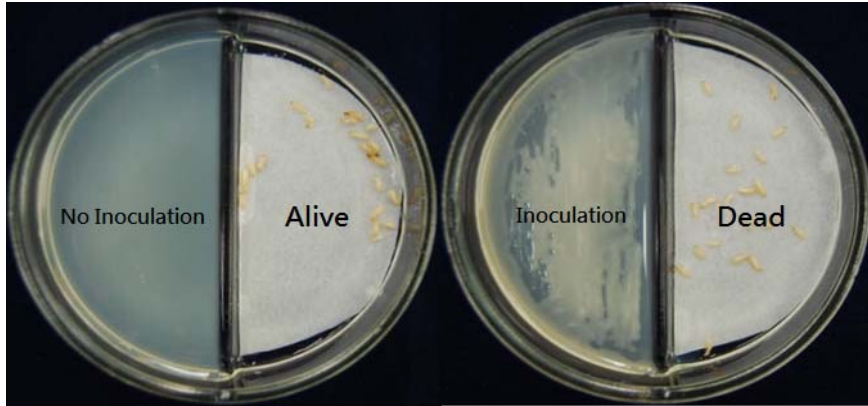


Fig. 9. Termiticidal activity of volatile HCN produced by *Pseudomonas koreensis* WA15.

않은 대조구에서는 사육한 대부분의 흰개미(19마리)가 생존한 반면, 균주를 접종한 실험구에서는 한 마리만 생존하였다(Fig. 9). 서론에서 언급했듯이 HCN은 흰개미 호흡대사경로상의 전자전달체를 불활성화시키고, 결과적으로 산소환원이 차단(Schippers et al., 1990)됨으로써 살충효과를 발휘하는 것으로 추정되었다. 현재 목재 보존제로 사용되고 있는 약제는 chromic anhydride, dimethyl benzyl (C_{12} - C_{14})-alkyl ammonium chlorides 등을 들 수 있는데, 이들은 대부분 생체 및 환경에 대한 유해성이 입증된 물질들이다. 본 실험균주가 생성한 휘발성 HCN은 흰개미에 대한 살충능이 있음이 확인되었으므로 향후 환경친화적 흰개미 기피제, 나아가 합성살충제를 대신할 미생물 살충제로서 응용 가능성이 있을 것으로 판단된다.

4. 결론

미생물을 이용한 잡초 방제제를 개발하기 위하여 HCN을 생성할 수 있는 세균을 분리한 후, 특성을 조사하였다. 실험균주의 형태학적, 배양적, 생화학적 특성 및 16S rRNA 유전자의 염기서열을 분석한 결과, 본 균주는 *Pseudomonas koreensis*로 동정되었다. 실험균주에 의한 HCN 생성조건을 OVT 방법을 통하여 조사하였다. 확립된 HCN 생성 최적조건은 tryptone 1%, glycine 0.06%, NaCl 1%, 초기 pH 5.0 및 30°C이었다. HCN 생성에 가장 큰 영향을 미친 성분은 glycine이었다. 최적 조건에서 HCN 생성량은 기본배지보다 약 3배 정도 높

았다. 실험균주는 식물성장 호르몬인 indoleacetic acid, 식물병원성 곰팡이의 생육을 저해하는 siderophore, ammonia 등의 생리활성물질을 생산하였으며, cellulase, pectinase, lipase와 같은 식물병원성 곰팡이의 세포성분 분해효소도 생산하였다. 본 균주는 휘발성 HCN과 확산성 항균물질의 상승작용에 의하여 *R. solani*, *B. cinerea*, *F. oxysporum*과 같은 식물병원성 곰팡이의 생육을 저해할 수 있었다. 실험균주를 처리한 *R. solani*의 현미경 사진은 곰팡이 균사체의 형태학적 기형을 보여주었고, 이것으로 실험균주가 생성한 상기의 항균 대사산물의 역할을 설명할 수 있었다. 실험균주가 생성한 휘발성 HCN은 흰개미에 대한 살충능이 있음이 확인되었다. 결론적으로 실험균주는 향후 잡초 방제를 위한 미생물 제제뿐만 아니라 환경친화적 흰개미 기피제로서 응용가능성이 높은 것으로 판단되며, 나아가 합성살충제를 대신할 미생물 살충제로서의 잠재성을 가지고 있는 것으로 판단된다.

REFERENCES

- Astrom, B., Gerhardson, B., 1988, Differential reactions of wheat and pea genotypes to root inoculation with growth-affecting rhizosphere bacteria, *Plant Soil*, 109, 263-269.
- Bakker, A. W., Schippers, B., 1987, Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp-mediated plant growth-stimulation, *Soil Biol. Biochem.* 19, 451-457.
- Barrow, G. I., Feltham, R. K. A., 1993, *Cowan and Steel's*

- manual for the identification of medical bacteria, Cambridge University Press, New York, 94-116.
- Castric, P. A., 1983, Hydrogen cyanide production by *Pseudomonas aeruginosa* at reduced oxygen levels, *Can. J. Microbiol.*, 29, 1344-1349.
- Chandra, S., Choure, K., Dubey, R. C., Maheshwari, D. K., 2007, Rhizosphere competent *Mesorhizobium loti* MP6 induces root hair curling, inhibits *Sclerotinia sclerotiorum* and enhances growth of Indian mustard (*Brassica campestris*), *Braz. J. Microbiol.*, 38(1), 124-130.
- Choi, J. S., Kim, Y. S., Kim, J. D., Kim, H. J., Ko, Y. K., Park, K. W., Moon, S. S., 2017, Herbicidal characteristics of soil bacteria Actinomycetes G-0299 to southern crabgrass, *Weed Turf. Sci.*, 6, 212-221.
- Dye, R., Pal, K. K., Bhatt, D. M., Chauhan, S. M., 2004, Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria, *Microbiol. Res.*, 159, 371-394.
- Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Costilow, R. N., Nester, E. W., Wood, W. A., Krieg, N. R., Phillips, G. B., 1981, Manual of methods for general bacteriology, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 285-392.
- Getha, K., Vikineswary, S., 2002, Antagonistic effects of *Streptomyces violaceusniger* strain G10 on *Fusarium oxysporum* f.sp. *ubense* race 4: Indirect evidence for the role of antibiosis in the antagonistic process, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 28, 303-310.
- Grossman, K., Kwiatkowski, J., 1995, Evidence for a causative role of cyanide, derived from ethylene biosynthesis, in the herbicidal mode of action of quinclorac in barnyard grass, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 51, 150-160.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., Williams, S. T., 1994, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed., The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- Kamei, A., Dolai, A. K., Kamei, A., 2014, Role of hydrogen cyanide secondary metabolite of plant growth promoting rhizobacteria as biopesticides of weeds, *Global J. Sci. Front. Res.*, 14, 108-112.
- Kremer, R. J., Kennedy, A. C., 1996, Rhizobacteria as biocontrol agents of weeds, *Weed Technol.*, 10, 601-609.
- Kremer, R. J., Souissi, T., 2001, Cyanide production by rhizobacteria and potential for suppression of weed seedling growth, *Curr. Microbiol.*, 43, 182-186.
- Lakshmi, V., Kumari, S., Singh, A., Prabha, C., 2015, Isolation and characterization of deleterious *Pseudomonas aeruginosa* KC1 from rhizospheric soils and its interaction with weed seedlings, *J. King Saud Univ. Sci.*, 27, 113-119.
- Lee, I. Y., Park, T. S., Choi, J. S., Ko, Y. K., Park, K. W., Seo, H. A., 2016, Current status and perspectives of weed science in the world, *Weed Turf. Sci.*, 5, 105-110.
- Matsura, K., 2005, Distribution of termite egg-mimicking fungi ("termite balls") in *Reticulitermes* spp. (Isoptera: Rhinotermitidae) nests in Japan and the United States, *Appl. Entomol. Zool.*, 40, 53-61.
- Mayer, A. M., 1958, Determination of indole acetic acid by the Salkowsky Reaction, *Nature*, 182, 1670-1671.
- Michaels, R., Hankes, L. V., Corpe, W.A., 1965, Cyanide formation from glycine by nonproliferating cells of *Chromobacterium violaceum*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 111, 121-125.
- Michelsen, C. F., Stougaard, P., 2012, Hydrogen cyanide synthesis and antifungal activity of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* In5 from Greenland is highly dependent on growth medium, *Can. J. Microbiol.*, 58, 381-390.
- Mishra, S., Upadhyay, R. M., Nautiyal, C. H., 2013, Unravelling the beneficial role of microbial contributors in reducing the allelopathic effects of weeds, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97, 5659-5668.
- Owen, A., Zdor, R., 2001, Effect of cyanogenic rhizobacteria on the growth of velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) and corn (*Zea mays*) in autoclaved soil and the influence of supplemental glycine, *Soil Biol. Biochem.*, 33, 801-809.
- Randviir, E. P., Banks, C. E., 2015, The latest developments in quantifying cyanide and hydrogen cyanide, *Trends Analyt. Chem.*, 64, 75-85.
- Schippers, B., Bakker, A. W., Bakker, P. A. H. M., Van Peer, R., 1990, Beneficial and deleterious effects of HCN-producing pseudomonads on rhizosphere interactions, *Plant Soil*, 129, 75-83.
- Selvakumar, G., Joshi, P., Nazim, S., Mishra, P. K., Bisht,

- J. K., Gupta, H. S., 2009, Phosphate solubilization and growth promotion by *Pseudomonas fragi* CS11RH1 (MTCC 8984), a psychrotolerant bacterium isolated from a high altitude Himalayan rhizosphere, *Biologia*, 64, 2, 239-245.
- Sulochana, M. B., Jayachandra, S. Y., Kumar, S. A., Parameshwar, A. B., Reddy, K. M., Dayanand, A., 2014, Siderophore as a potential plant growth-promoting agent produced by *Pseudomonas aeruginosa* JAS-25, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 174, 297-308.
- Vassilev, N., Vassileva, M., 2003, Biotechnological solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 61, 435-440.
- Vyas, P., Rahi, P., Chadh, B. S., Gulati, A., 2014, Statistical optimization of medium components for mass production of plant growth-promoting microbial inoculant *Pseudomonas trivialis* BIHB 745 (MTCC5336), *Ind. J. Microbiol.*, 54, 239-241.
- Ware, G. W., Whitacre, D. M., 2004, *An Introduction to Herbicides*, 2nd ed., A division of Meister Media Worldwide, Ohio.
- Zimbro, M. J., Power, D. A., Wilson, G. E., Johnson, J. A., 2009, *Difco & BBL manual - Manual of microbiological culture media*, Becton, Dickinson and Company, Maryland.