

Paenibacillus sp. IUB225-08의 *Colletotrichum gloeosporioides*에 대한 항균활성

김혜영¹ · 이태수^{2*}

¹신성대학교 임상병리과, ²인천대학교 생명과학부

Antifungal Activity of *Paenibacillus* sp. IUB225-08 Against *Colletotrichum gloeosporioides*

Hye Young Kim¹ and Tea Soo Lee^{2*}

¹Department of Clinical Laboratory Science, Shinsung University, Danggin 343-861, Korea

²Division of Life Sciences, University of Incheon, Incheon 406-772, Korea

(Received 3, October 2012., Revised 27, November 2012., Accepted 10, December 2012)

ABSTRACT : Bacterial strains isolated from diseased red pepper fruits showed inhibitory effect on mycelial growth and spore germination of *Colletotrichum gloeosporioides*. The bacterium was identified as *Paenibacillus* sp. based on its physiological, biochemical characteristics and MicroLog analysis and named *Paenibacillus* sp. IUB225-08. The bacterium showed the highest level of antifungal activity *C. gloeosporioides* when cultured at 25°C for 60 hrs in LB broth with initial pH of 7.0. The butanol fraction from culture extract of *Paenibacillus* sp. IUB225-08 effectively inhibited the mycelial growth and spore germination of *C. gloeosporioides* than any other agricultural chemicals tested. Pepper fruits and seeds treated with spores of *C. gloeosporioides* showed symptoms, while those treated with the culture extract and *C. gloeosporioides* together did not show any symptoms. Therefore, the culture extract of *Paenibacillus* sp. IUB225-08 have a potential for biocontrol agent of red pepper anthracnose.

KEYWORDS : Antifungal substances, Biocontrol agent, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Paenibacillus* sp., Plant pathogenic fungi

서 론

식물병원균에 의해서 발생하는 작물의 병을 방제하기 위해 사용하고 있는 화학적 방제법은 예방 및 치료효과가 높고, 짧은 시간에 넓은 면적을 방제할 수 있을 뿐 아니라 적용대상 병원균의 범위가 넓어서 많은 작물의 병을 방제하는 수단으로 널리 이용되고 있다. 하지만 사람·가축을 비롯한 생물체에 대한 광범위한 독성과 난분해성 성분의 잔류와 잔류성분에 포함된 중금속에 의한 토양오염, 환경 오염 등 생태계의 파괴 원인이 되고 있다(Burpee and Goult, 1984). 이에 이런 문제들을 해결하기 위하여 식물이나 미생물로부터 유래된 저 독성 천연물질이나 유용한 길항미생물제제들을 이용하는 생물학적 방제법의 연구와 개발이 요구되고 있다(Lee and Kim, 2001). 고추(*Capsicum annuum*)는 우리나라에 들어온 지 300여 년이 지나는 동안 한국인의 식생활에 뿌리깊이 토착화되어 전통적 식생활에 빼놓을 수 없는 중요한 열매채소이며, 농가의 고소득 작물로서 세계적으로 약 1,149,000 ha에서 재배되며, 국내 채소 재배 면적의 22.5%를 차지하고 있다. 그러나 고추역병과 고추탄저병으로 인해 생산량이 감소하

고 있어서 2006년 116,914 ton이었으나, 2011년 77,110 ton으로 보고되었다(Statistics, 2011). 특히 고추탄저병은 고추의 열매에 발병하여 생산량의 감소와 품질저하를 초래하는 탄저병의 원인 균주로 *Colletotrichum acutatum*, *Glomerella cingulata*, *C. coccodes*, *C. capsici*, *C. dematium* 과 *C. gloeosporioides* 등이 보고되어 있다. 이들 중 *C. gloeosporioides*는 병원성이 강하며, 재배포장에서도 많이 발견되는 종으로 보고되고 있다(Hadden and Black, 198). 고추 외에 사과(Bernstein *et al.*, 1995), 딸기(Smith and Black, 1990) 및 다른 많은 작물에 병을 발생시키는 중요한 식물병원균으로 보고되어 있다. 이에 *C. gloeosporioides*를 방제하기 위해 최근까지 살균제 사용이 보편화되어 있지만, 약제에 대한 내성균이 점점 증가하게 되고, 약제에 저항성을 나타내는 균을 사멸시키기 위하여 살균제의 사용량도 더 늘어나게 되면서 토양이나 기주에 더 많은 양의 살균제 잔류로 인한 환경문제가 발생되고 있다. 최근 우리나라에서도 농산물에 대한 잔류독성과 지속적인 농업 생산의 안전성을 추구하기 위해 미생물의 길항관계를 이용한 친환경적인 식물병의 생물적 방제법이 모색되고 있다(Kim *et al.*, 2008; Li and Choi, 2009). 길항미생물을 이용해 식물병을 방제하기 위한 방법은 *Trichoderma* spp., *Gliocladium virens* 등의 진균과 *Pseudomonas* spp.,

*Corresponding author <E-mail : tslee@incheon.ac.kr>

Bacillus spp. 등의 세균과 *Streptomyces* spp. 등의 방선균이 연구되고 있다(Hardar *et al.*, 1979; Yoshie *et al.*, 1993). 특히 *Trichoderma harzianum*을 토양에 처리한 포장에서 이 균은 *Sclerotium* spp.에 의하여 발생하는 식물병을 효과적으로 방제하였으며, *Bacillus subtilis* CMB32가 생산한 lipopeptides Iturin A, fengycin and surfactin A 등의 항생물질이 *Colletotrichum gloeosporioides*에 대해 높은 방제효과를 보였다는 보고도 있다(Mumpuni *et al.*, 1998); Kim *et al.*, 2010). 실제로 *B. subtilis*를 이용해 식물병을 방제하기 위해 개발한 미생물 제제로는 Kodiak(Gustafson), Botkiller 등이 상품명으로 등록되어 있으며, 주로 종자처리제나 수확 후 채소의 부패방지용 처리제로 사용되고 있다(Fravel *et al.*, 1998; Brannen and Kenney, 1997).

따라서 본 연구는 우리나라의 기후풍토와 토양환경에 잘 적응하여 살균력과 생존성이 뛰어난 세균을 선발하고자 우리나라 고추재배지역에서 탄저병이 발생한 고추로부터 항진균 물질을 생산하는 세균을 분리하고, 그 효과를 규명하여, 이를 고추 탄저병의 생물적 방제제로 이용하기 위한 기초적인 실험을 수행한 결과이다.

재료 및 방법

시료의 채집

항진균 활성이 있는 세균을 분리하기 위하여 전국 60개 지역의 고추재배지에서 탄저병균에 감염된 고추열매를 채집하여 실험실로 옮겨 4°C에 보관하면서 균을 분리하였다.

배지 및 배양조건

항진균 물질을 생산하는 균주의 분리배지로는 NA(Nutrient agar; beef extract 0.3%(w/v), peptone 0.5%(w/v), agar 1.5%(w/v), Difco, USA)를 사용하여 25°C에서 배양하였다. 항진균 물질을 생산하기 위한 배지로는 LB(Luria-Bertani; tryptone 1%(w/v), yeast extract 0.5%(w/v), NaCl 0.5%(w/v), Difco, USA)를 이용하여 25°C에서 180 rpm, 48시간 진탕배양 하였으며, 항진균력을 검정하기 위한 배지로는 항생제가 포함되지 않은 PDA(potato dextrose agar, potatoes infusion 20%(w/v), Bacto dextrose 2%(w/v), Bacto agar 1.5%(w/v), Difco, USA)를 사용하였다.

항균물질 생산균주의 분리

채집한 고추 중 고추탄저병 병반의 확산이 멈춘 주변부위를 1 g 정도 잘라 5 mL의 멸균증류수와 함께 막자사발에서 넣어 마쇄한 후 10 mL의 멸균 증류수가 들어있는 시험관에 넣고 잘 흔든 다음 80°C의 water bath에서 10분간 열처리 후, 시료액 1 mL를 NA배지가 들어있는 petri-dish에 분주하고 유리봉으로 고르게 편 후 25°C에서 48시간 배양하여 형성된 균총을 2~3회 추가로 희석 접종하여

균을 순수 분리하였다.

고추탄저병균의 선발

순수 분리된 균주들이 생산한 물질의 항균성을 탐색하기 위해 고추에 탄저병을 일으키는 *Colletotrichum gloeosporioides* 균주를 서울대학교 식물병원성 곰팡이유전자은행으로부터 분양받아 실험에 사용하였다.

고추탄저병균의 군사생장 억제균의 선발

고추에서 분리한 세균들이 *C. gloeosporioides* 군사의 생장을 억제하는지 조사하기 위해 PDA 배지에서 7일 배양한 고추탄저병균의 군사체를 직경 5 mm의 cork borer로 절단한 뒤 PDA 배지 중앙에 희석 접종된 분리균주에 20 mm의 간격으로 놓고, 25°C에서 5일간 대치배양한 후 생긴 생장저지대(Inhibition zone)를 단위로 측정하여 항균 효과가 높은 세균을 선발하였다(Schiewe and Mendgen, 1992; Victor and Editor, 1991).

고추탄저병균의 포자발아 억제균 선발

분리한 길항세균 중 고추탄저병균의 포자발아에 억제력이 높은 균을 선발하기 위해 고추탄저병균의 군사생장에 억제력을 나타낸 각각의 균주들을 LB배지에 접종하여 25°C에서 180 rpm으로 2일 동안 진탕배양한 후 얻어진 배양액을 10,000 rpm으로 30분간 원심분리(VS23STM, Vision Co., Korea)한 후 상등액 50 µL를 paper disc(Avantec, 8 mm, Toyo Roshi Kaisha, Ltd. Japan)에 적셔, 탄저병균의 포자 현탁액($1 \sim 5 \times 10^6$ conidia/mL)이 1 mL접종된 PDA 배지의 중앙에 올려놓고 25°C에서 3일 간 배양한 뒤 생장저지대(inhibition zone)의 직경을 단위로 측정하여 포자의 발아를 억제하는 세균을 선발하였다.

항균물질을 생산하는 균의 동정

선발된 항균물질 생산 세균을 동정하기 위해 Bergey's Manual에 따라 그람염색, 내생포자염색, 형태, 운동성, 당분해능 등의 생리·생화학적 특성을 분석하였으며(Holt *et al.*, 1994), 이와는 별도로 Biolog(Biolog, Inc. USA)사의 Biolog MicroLog 3, 4.01 version을 이용하여 선발된 세균을 최종적으로 동정하였다.

배양액에서 부탄올 분획을 이용한 항균물질 추출

항균물질의 생산을 위해 선발한 균을 LB배지에 접종하고 25°C에서 180 rpm으로 72시간 동안 진탕 배양한 후 배양액을 10,000 rpm으로 30분간 원심분리(VS23STM, Vision Co., Korea)한 후 butanol과 물(1:1)로 3회 반복 분획 후 부탄올 층만을 회수하여 농축기(N-1, Tokyo Rikakikai Co., Japan)로 감압 농축한 후 동결건조(Operon Co., Korea)하여 고추탄저병균에 항균 활성을 나타내는 물질을 추출하였다(Fig. 1).

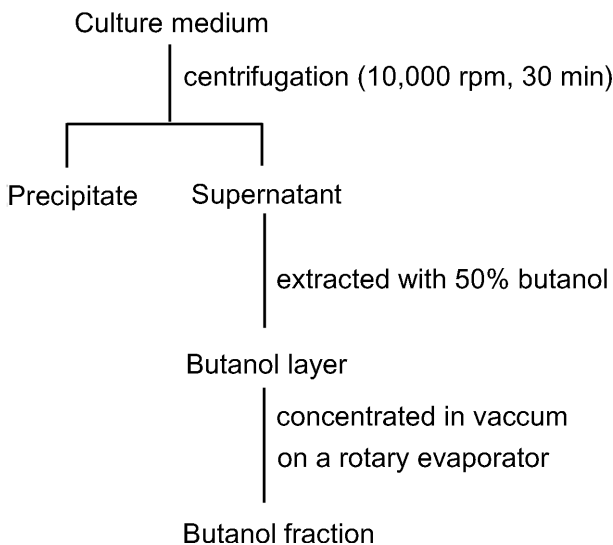


Fig. 1. Extraction procedure of butanol fraction from culture medium of *Paenibacillus* sp. IUB225-08.

항균물질 생산 최적의 pH

배지의 초기 pH가 *Paenibacillus* sp. IUB225-08의 항균물질 생산에 미치는 효과를 알아보기 위해 LB배지 100 mL에 1N HCl과 1N NaOH을 이용하여 pH를 4.0~10.0으로 조정 후 균을 접종하고 25에서 180 rpm으로 72시간 진탕 배양한 후 배양액은 회수하여 10,000 rpm으로 30분간 원심분리(VS23STM, Vision Co., Korea)한 후 부탄올로 분획하고 동결건조한 후 농도를 희석하여 pH의 차이에 따른 균의 성장과 항균 활성을 조사하였다.

항균물질 생산 최적의 배양온도 및 시간

항균물질 생산을 위한 *Paenibacillus* sp. IUB225-08 균주의 최적 배양온도와 배양시간을 알아보기 위해 LB 배지 100 mL가 들어있는 삼각플라스크에 균을 접종하고 배양 온도를 각각 20°C, 25°C, 30°C, 40°C로 맞춘 뒤 180 rpm에서 72시간 동안 진탕 배양하였다. 균의 성장정도는 분광광도계(Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech, England)를 사용하여 660 nm에서 측정하였다. 배양이 끝난 배양액은 회수하여 10,000 rpm으로 30분간 원심분리(VS23STM, Vision Co., Korea)하여 상등액을 회수한 다음 부탄올로 분획한 후 이를 이용하여 고추탄저병균의 균사 생장억제와 포자의 발아억제 효과의 실험에 사용하였다.

배양액의 부탄올 추출물과 농약의 항균효과

*C. gloeosporioides*의 균사생장 억제

배양액을 부탄올로 분획하여 얻어진 물질과 시판되는 농약의 항균력을 비교하기 위해 carbendazim, benomyl, folpet, iprodione, polyoxin D zinc salt, polyoxin B, trifloxystrobin 등 7종의 농약과 항균물질을 생산하는 균주의 배양액을 부탄올로 분획하여 얻어진 물질을 건조한

후 각각 10 µg/mL, 100 µg/mL의 농도로 조정하고 멸균한 PDA 배지의 온도가 50°C일 때 넣고 잘 섞은 후 petri dish에 부어 굳혔다. 그리고 PDA에서 25°C, 5일 간 배양한 *C. gloeosporioides* 균사체를 멸균한 직경 5 mm의 cork borer로 절단한 후 각각의 농약과 부탄올 추출물이 함유되어있는 배지의 중앙에 접종하고 25°C에서 5일간 배양하여 각각의 공시된 항균물질의 균사생장 억제 효과를 mm 단위로 측정하였다.

*C. gloeosporioides*의 포자발아 억제

Paenibacillus sp. IUB225-08 균주가 액체배지에서 생산한 항균물질과 시판 농약의 고추탄저병균 포자발아에 미치는 효과를 조사하기 위해 *C. gloeosporioides*의 포자 현탁액을 $1\sim5 \times 10^6$ conidia/mL가 되도록 준비하여 PDA 배지에 1 mL씩 고르게 분주하여 접종하였다. 시판되고 있는 cabendazim, iprodione, benomyl, folpet, polyoxin D zinc salt, polyoxin B, trifloxystrobin 등 7종의 농약과 배양액을 부탄올로 분획하여 얻어진 물질을 100 µg/mL의 농도로 50 µL씩 paper disc에 적신 후, 고추탄저병균의 포자가 접종된 PDA배지의 중앙에 접종하고 25°C에서 3일 동안 배양하여 생장저지대(inhibition zone)의 직경을 측정하였다.

탄저병균을 접종한 고추종자에 대한 항균효과

고추종자를 0.5%의 차아염소산나트륨으로 30분간 소독하고 멸균수로 2회 수세한 뒤 6시간 동안 멸균수에 침지 후, *C. gloeosporioides*의 포자 현탁액 1×10^6 conidia/mL의 농도에서 1시간 침지한 다음 상온에서 건조시켰다. 그리고 이 종자를 부탄올 분획물에 6시간 침지한 후 petri-dish 내에 멸균수로 적신 여과지 위에 올려놓고 습도 70%, 온도 25°C의 암 상태에서 14일간 관찰하여 종자의 발아 상태를 조사하였다.

탄저병균을 접종한 고추에 대한 항균효과

푸른색의 미성숙한 고추와 붉은색의 성숙한 고추를 70% ethanol로 표면소독한 후 핀으로 상처를 내고 *C. gloeosporioides*의 포자 현탁액 1×10^6 conidia/mL를 30 µL 접종하여 건조시킨 후 상처에 *Paenibacillus* sp. IUB225-08가 생산한 물질의 부탄올 분획물을 100 µg/mL의 농도로 30 µL 처리한 후 70%의 상대습도가 유지되는 습실에 넣고 25°C에서 10일 동안 배양하여 고추에 발생한 탄저병의 발병정도를 조사하였다(Manandhar *et al.*, 1995).

결과 및 고찰

항균물질 생산균주의 선발

고추에 병원성을 나타내는 *C. gloeosporioides*의 균사생

장과 포자의 발아를 억제하는 균주들을 선발하여 그 중 가장 우수한 효과를 나타내는 *Paenibacillus* sp. IUB225-08을 최종 선발하였다.

항진균물질 생산 균주의 동정

고추탄저병균에 항진균성을 나타낸 세균을 선발한 후 이를 동정하기 위해 Bergey's Manual에 따라 조사한 형태적, 생리·화학적 특성은 Table 1과 같다. 이 균주는 Gram 양성 간균으로 조건부호기성이며, 내생포자 형성, 운동성이 있으며, catalase 양성, D-glucose, D-xylose, D-mannose 발효능을 보였지만, D-arabinose는 발효하지 않았다. 또한 casein, gelatin 가수분해효소를 생산하며, NaCl 2~7%와 생장온도 20~45°C에서 생장을 보였다. 그리고 Biolog kit를 이용하여 동정한 결과 고추탄저병균에

Table 1. Physiological and biochemical characteristics of the isolated *Paenibacillus* sp. IUB225-08

Characteristics	Bacterial Isolates	
	IUB225-08	
Morphology	rod	
Motility	+	
Catalase	+	
Anaerobic growth	+	
MR test	-	
VP test	+	
Acid from	D-glucose	+
	D-arabinose	-
	D-xylose	+
	D-mannose	+
Gas from glucose	-	
Hydrolysis of	casein	+
	gelatin	+
	starch	-
Utilization of citrate	-	
Deamination of phenylalanine	-	
Nitrate reduced to nitrite	-	
Formation of indole	-	
Growth in	NaCl 2%	+
	NaCl 5%	+
	NaCl 7%	+
	NaCl 10%	-
Growth at	20°C	+
	35°C	+
	45°C	+
	50°C	-
	55°C	-
	60°C	-

+, 90% or more of strains are positive.
-, 90% or more of strains are negative.

항균성을 나타내는 세균은 *Paenibacillus* sp.로 확인 되어 *Paenibacillus* sp. IUB225-08로 명명하였다. *Paenibacillus* 속은 Bacillaceae과의 *Bacillus* 속에 속해있었으나, 1993년 이후 16S rRNA 유전자 염기서열의 상동성 근거로 Bacillaceae 속으로부터 분리되었으며(Ash *et al.*, 1993), *Paenibacillus* 속에는 *P. polymyxa*(Nielson and Sorensen, 1997, Zengguo *et al.*, 2007.), *P. elgii*(Wu *et al.*, 2010.), *P. validus*(Heyndrickx *et al.*, 1995.), *P. chibensis*, *P. peoriae*(Von der Weid *et al.*, 2003), *P. koreensis*(Chung *et al.*, 2000), *P. ehimensis*(Lee *et al.*, 2004.), *P. amylolyticus*, *P. illinoisensis* 및 *P. chibensis*(Shida *et al.*, 1997) *P. alginolyticus*(Lee, 1995), *P. kobensis*(Martin *et al.*, 2003) 등의 종이 보고 되었다. 또한 *Paenibacillus* 속 세균들은 다양한 항진균물질과 항생물질을 생산한다고 알려져 있다(Nielson and Sorensen, 1997; Slepecky and Hemphil, 1991; Budi *et al.*, 2000). *Paenibacillus polymyxa*이 생산하는 fusaricidin type의 항진균물질은 유채작물에 피해를 주는 *Leptosphaeria maculans*에 항균력을 나타내며(Beatty and Jensen, 2002), *Paenibacillus macerans* PM-1가 생산한 물질은 벼에 도열병을 일으키는 *Pyricularia oryzae*에 생물적 방제효과가 있으며(Bae *et al.*, 2000.), 항균물질인 mattacin이 *P. koreensis* M에 의해 생산되는 것이 보고된 바 있다(Chung *et al.*, 2000).

항진균물질 생산을 위한 최적 pH, 배양온도 및 시간

배지의 초기 pH 및 배양 온도가 항진균물질의 생산에 매우 큰 영향을 준다는 보고에 따라(Gong *et al.*, 2003) pH가 항진균물질의 생산에 미치는 효과를 조사한 결과 균의 생장은 pH 8.0 에서 가장 높게 나타났으며, 항진균 물질의 생산은 pH 7.0에서 가장 우수하였다(Fig. 2). 또한 이 균주는 최적 배양온도는 25°C인 것으로 나타났다. 따라서 항진균물질의 생산을 위한 최적의 배양 조건은 pH 7.0 과 25°C에서 60시간 배양하는 것으로 나타났다(Fig. 3).

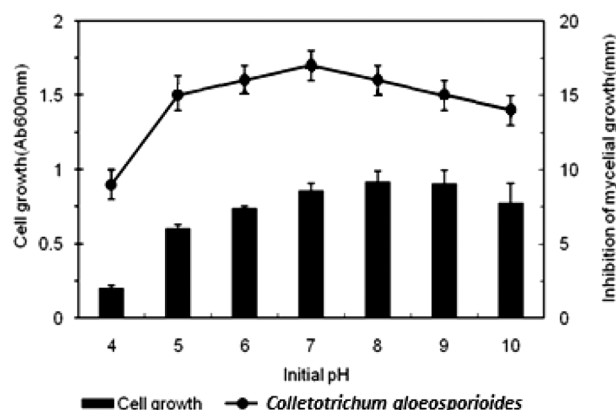


Fig. 2. Effect of initial pH on the cell growth of *Paenibacillus* sp. IUB225-08 and inhibition of mycelial growth on *Colletotrichum gloeosporioides*.

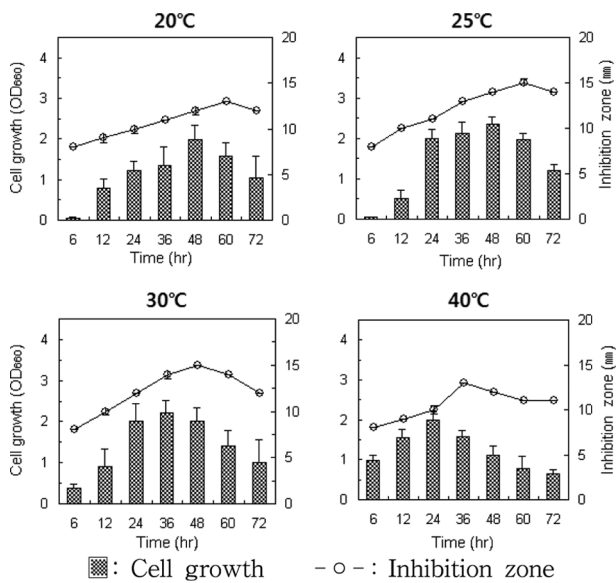


Fig. 3. Effect of incubation temperature and period on cell growth of *Paenibacillus* sp. IUB225-08 and inhibition of mycelial growth on *Colletotrichum gloeosporioides* cultured in LB medium. : Cell growth -- : Inhibition zone

조배양액과 부탄올 분획물의 포자발아 억제

Paenibacillus sp. IUB225-08의 배양액과 배양액을 부탄올로 분획한 물질의 *C. gloeosporioides* 포자에 대한 발아억제력을 분석한 결과 부탄올로 분획한 물질의 포자 발아 억제력이 배양액에 비해 2배 이상 높게 나타났다. 따라서 *Paenibacillus* sp. IUB225-08의 배양액을 부탄올로 분획해서 분리한 물질에는 항진균 효과를 나타내는 유효

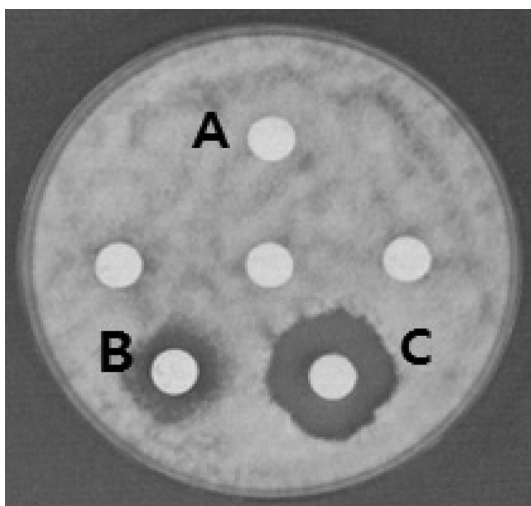


Fig. 4. Inhibition zone of spore germination of *C. gloeosporioides* by culture medium of *Paenibacillus* sp. IUB225-08. A; Control, B; Crude culture extract of *Paenibacillus* sp. IUB225-08 cultured in LB medium, C; Butanol fraction extracted from crude culture medium of *Paenibacillus* sp. IUB225-08.

Table 2. Inhibition of mycelial growth and spore germination of *C. gloeosporioides* by agricultural chemicals and butanol fraction from the culture medium of *Paenibacillus* sp. IUB225-08

Treatment	mycelial growth ^a		spore germination ^b
	Diameter (mm)		Inhibition zone diameter (mm)
	10 μ L	100 μ L	
Control	40 $\pm$ 0.4	40 $\pm$ 0.4	0
Butanol fraction	25$\pm$0.5	15$\pm$0.4	23$\pm$0.7
Carbendazim	28 $\pm$ 1.0	25 $\pm$ 1.4	15 $\pm$ 0.5
Benomyl	26 $\pm$ 0.7	19 $\pm$ 0.5	12 $\pm$ 0.7
Folpet	40 $\pm$ 0.5	40 $\pm$ 0.3	0
Iprodione	25 $\pm$ 0.7	18 $\pm$ 0.7	10 $\pm$ 0.4
Polyoxin D zinc salt	38 $\pm$ 1.0	36 $\pm$ 0.7	0
Polyoxin B	39 $\pm$ 0.8	36 $\pm$ 1.0	0
Trifloxystrobin	26 $\pm$ 0.7	19 $\pm$ 0.4	13 $\pm$ 0.5

^aMycelial growth was measured 5 days after incubation at 25°C.

^bSpore germination was measured 3 days after incubation 25°C.

성분이 배양액에 비해 많이 함유되어 있다는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

시판 농약과 부탄올 분획물의 항진균 활성

*C. gloeosporioides*의 균사생장 억제

Paenibacillus sp. IUB225-08 균주가 배지에서 생산한 물질이 *C. gloeosporioides*의 균사 생장에 대한 억제효과를 조사하기 위해 작물의 진균병 방제에 널리 사용되고 있는 7종의 농약과 부탄올 분획물의 효과를 비교하였다. 그 결과 Table 2와 같이 각각의 농약을 100 μ g/mL 농도로 처리한 배지에서 *C. gloeosporioides*의 균사체를 배양했을 때 대조군에 비해 carbendazim은 37.5%, iprodione는 55%, benomyl과 trifloxystrobin 등은 각각 52.5%의 균사생장이 억제되었으며, polyoxin D zinc salt와 polyoxin B는 균사생장이 각각 10% 억제되었고, folpet을 처리한 배지에서는 균사생장이 전혀 억제되지 않았다. 이에 비해 *Paenibacillus* sp. IUB225-08 배양액을 부탄올로 분획한 물질을 처리한 군에서의 균사생장은 62.5%가 억제되어 시판농약에 비해 항균효과가 높게 나타났다(Table 2, Fig. 5).

*C. gloeosporioides*의 포자발아 억제

Paenibacillus sp. IUB225-08 균주가 생산하는 물질이 *C. gloeosporioides*의 포자발아에 미치는 효과를 규명하기 위해 7종의 농약과 부탄올로 분획한 물질을 이용해 고추탄저병균의 포자 발아억제 실험을 수행한 결과, iprodione, folpet, polyoxin D zinc salt, polyoxin B 등 4종의 농약은 고추탄저병균의 포자 발아를 전혀 억제하지 못하는 것으로 나타나 실험에 사용한 고추탄저병 균주는 이들 농약에 대해 100% 저항성을 나타내고 있었으며, carbendazim,

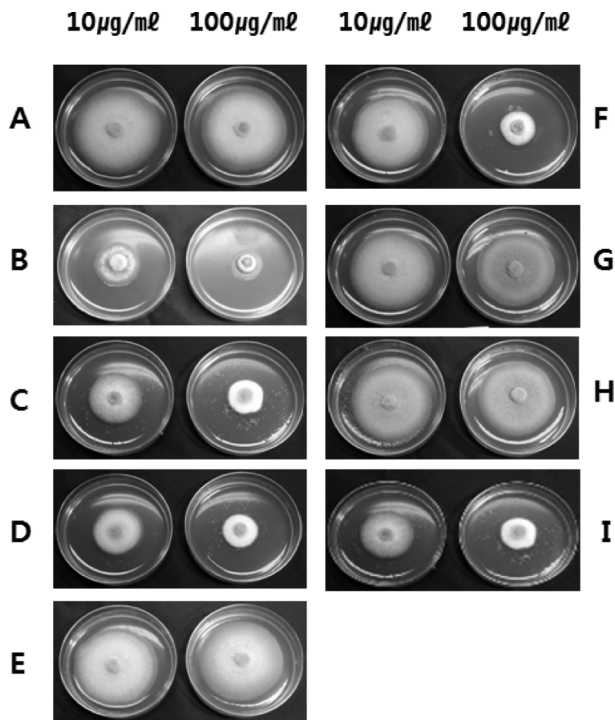


Fig. 5. Mycelial growth of *C. gloeosporioides* on PDA medium treated with butanol fraction extracted from culture medium of *Paenibacillus* sp. IUB225-08 and agricultural chemicals. Mycelial growth inhibition of the butanol fraction and agricultural chemicals (10 µg/mL and 100 µg/mL) were measured after incubation for 5 days at 25°C. A; Control, B; Butanol fraction, C; Carbendazim, D; Benomyl, E; Folpet, F; Iprodione, G; Polyoxin D zinc salt, H; Polyoxin B, I; Trifloxystrobin.

benomyl, trifloxystrobin 등 3종의 농약을 처리한 배지에 서의 포자발아 억제환의 길이가 각각 15 mm, 12 mm, 10 mm로 나타나 포자의 발아가 농약에 의해 억제되는 것으로 나타났다. *Paenibacillus* sp. IUB225-08 균주의 배양액을 부탄올로 분획한 물질의 포자 발아의 억제환 길이는 23 mm로 나타나 포자 발아억제 효과가 실험에 사용한 모든 농약에 비해 높게 나타났다(Table 2).

고추종자에 대한 항진균물질의 활성

고추탄저병균의 포자를 접종한 고추종자에 대해 *Paenibacillus* sp. IUB225-08이 생산하는 물질의 항진균 효과를 조사하였다. 고추탄저병균의 포자를 접종하지 않은 대조군은 발아와 동시에 근모가 활발하게 형성되면서 정상적으로 성장하였으나, *C. gloeosporioides*를 접종한 종자에서는 종자가 부패하면서 배축에서 모마름병 증상이 발생한 것을 확인 할 수 있었다. 본 실험 결과는 Lee (1995)가 고추종자의 종피, 배유 및 자엽에서 *G. cingulata*, *C. gloeosporioides*와 *C. dematium*를 분리하여, 이들 균이 고추종자의 모잘록병 및 모마름병을 일으킨다고 보고한 것과 매우 유사한 것으로 사료되었다. 부탄올 분획 물질

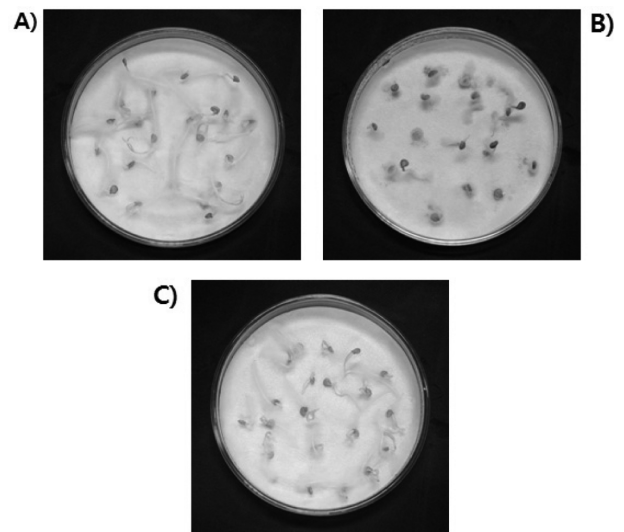


Fig. 6. Seed germination and seedling rot of pepper plants inoculated with the butanol fraction of the crude extract of *Paenibacillus* sp. IUB225-08. A; Control, B; *C. gloeosporioides* (1×10^6 conidia/mL), C; Butanol fraction of the crude extract of *Paenibacillus* sp. IUB225-08 (100 µg/mL).

을 처리한 군은 대조군에 비해 종자의 발아는 느리게 진행되었지만 종자가 발아하여 근모를 형성하고 병이 발생하지 않는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 6). Park *et al.* (2000)에 의하면 길항미생물을 식물체 근원에 선택적으로 적용하여 병을 효율적으로 방제하는 가장 이상적인 방법이 종자처리라는 보고와 전 세계적으로 상업화된 미생물 살균제 중 6종이 종자처리용 미생물 제제로 알려져 있다 (Fravel *et al.*, 1998). 앞으로 본 실험을 통해 항진균물질을 생산하는 것이 밝혀진 *Paenibacillus* sp. IUB225-08 균주를 이용해 유묘의 병의 억제하기 위한 종자처리제나 종자 코팅제로의 사용에 대해서도 고려가 필요하다고 사료된다.

고추에 대한 항진균 효과

푸른 고추와 붉은 고추를 70%의 에탄올로 표면을 소독한 후 핀으로 상처를 내고, *C. gloeosporioides*의 포자 현탁액 1×10^6 conidia/mL를 30 µL 접종한 후 상온에서 건조시켰다. 대조군의 고추는 탄저병균만을 접종하였고, 처리군은 대조군과 같이 상처를 낸 고추에 고추탄저병균을 접종한 후 100 µg/mL 농도의 부탄올 분획물을 30 µL를 접종하였다. 접종처리가 끝난 대조군과 처리군의 고추는 25°C가 유지되는 70%의 습실에서 10일 간 배양한 후 탄저병의 발생 여부를 조사하였다. 배양 10일 후 *C. gloeosporioides*의 포자만을 접종한 대조군에서는 고추탄저병이 발생하였으나 부탄올 분획물을 처리한 실험군은 고추탄저병이 발생하지 않아 *Paenibacillus* sp. IUB225-08 균주가 배지에 분비한 물질에는 고추탄저병균의 균사체나 포자의 생장을 억제할 수 있는 함유되어 있다는 것

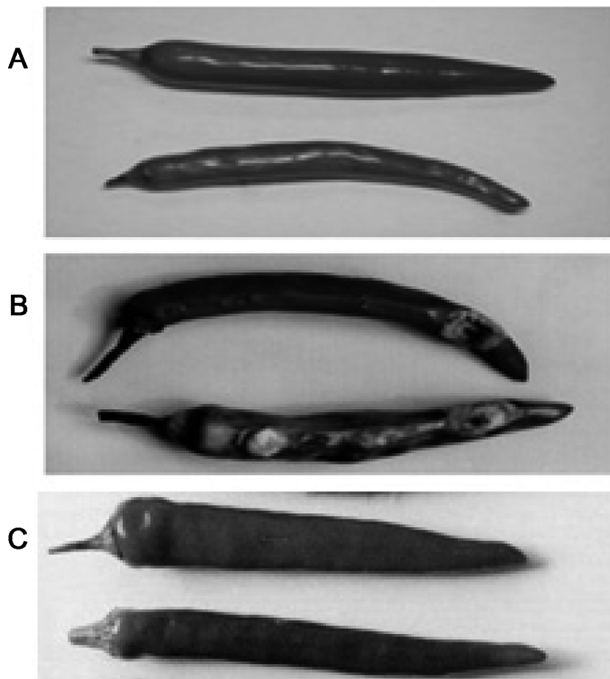


Fig. 7. Effect of antifungal activity against *C. gloeosporioides* treated with butanol fraction of the crude extract of *Paenibacillus* sp. IUB225-08. A; Control, B; *C. gloeosporioides* (1×10^6 conidia/mL), C; *C. gloeosporioides* (1×10^6 conidia/mL) + butanol fraction of the crude culture extract from *Paenibacillus* sp. IUB225-08(100 μ g/mL).

이 밝혀져, 실용화를 위해서는 앞으로 포장 실험을 통한 항균효과 입증 실험이 필요한 것으로 사료되었다(Fig. 7).

적 요

국내 고추 재배지에서 고추탄저병균인 *C. gloeosporioides*에 대해 균사생장이나 포자발아 억제력이 우수한 균주를 선발하였다. 선발된 균주의 생리·생화학적특성과 MicroLog 방법을 이용하여 동정한 균주는 *Paenibacillus* sp. IUB225-08로 명명되었다. 항진균물질의 최적 생산을 위한 배양 조건은 pH 7.0, 25°C에서 60시간인 것으로 나타났다. *Paenibacillus* sp. IUB225-08를 배양한 액체배지에 부탄올을 첨가하여 분획한 물질과 시판 농약의 *C. gloeosporioides*에 대한 균사생장과 포자 발아억제 효과를 조사한 결과 부탄올 분획물이 시판 농약에 비해 고추탄저병균의 균사생장과 포자발아를 크게 억제하는 것으로 나타났다. 또한 고추열매와 고추종자에 *C. gloeosporioides* 포자와 부탄올로 분획한 물질을 동시에 접종한 결과 부탄올 분획물이 고추와 고추종자의 병 발생을 억제하는 것으로 나타났다. 따라서 본 연구를 통해 *Paenibacillus* sp. IUB225-08가 생산하는 항진균 물질은 고추탄저병의 생물적 방제제로 사용될 수 있는 잠재력이 있다고 판단되었다.

참고문헌

- Ash, C., Priest, F. G. and Collins, M. D. 1993. Molecular identification of rRNA group 3 *Bacilli* using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 64:253-260.
- Bae, D. W., Kawk, Y. S., Lee, J. T., Son, D. Y. and Chun, S. S., 2000. Purification and characterization of a novel antifungal protein from *Paenibacillus macerans* PM1 antagonistic to rice blast fungus, *Pyricularia oryzae*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 10:805-810.
- Bernstein, B., Zehr, E. I., Dean, R. A. and Shafi, E. 1995. Characteristics of *Colletotrichum* from peach, apple, pecan and other hosts. *Plant Dis.* 79:478-482.
- Beatty, P. H. and Jensen, S. E. 2002. *Paenibacillus polymyxa* produces fusaricidin-type antifungal antibiotics active against *Lepidosphaeria maculans*, the causative agent of blackleg disease of canola. SourceDepartment of Biological Sciences, University of Alberta, Edmonton, Canada. *Can. J. Microbiol.* 48:159-69.
- Brannen, P. M. and Kenney D. S. 1997. Kodiak-a successful biological-control product for suppression of soil-borne plant pathogens of cotton. *J. Indust. Microbiol. Biotechnol.* 19:169-171.
- Budi, S. W., van Tuinen, D., Arnould, C., Dums-Gaudot, E., Gianinazzi-Pearson, V. and Gianinazzi, S. 2000. Hydrolytic enzyme activity of *Paenibacillus* sp. strain B2 and effects of the antagonistic bacterium on cell. *Appl. Soil Ecol.* 15: 191-199.
- Burpee, L. L. and Goult, L. G. 1984. Evaluations of fungicides for control of pink and gray snow mold on creeping bentgrass. pp.6-7, In; Turfgrass Research Annual Report, R. W. Sheard (ed). Univ. of Guelph, Ontario. 38.
- Chung, Y. R., Kim, C. H., Hwang, I. and Chun, J. 2000. *Paenibacillus koreensis* sp. nov., a new species that produces an iturin-like antifungal compound. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50:1495-1500.
- Fravel, D. R., Connick, W. J. and Lewis, J. A. 1998. Formulation of microorganisms to control plant diseases. pp. 187-202. In H. D. Burges(eds). Formulation of microbial biopesticides, beneficial microorganisms and nematodes and seed treatments. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, London.
- Gong, X. Y., Luan, Z. K., Pei, Y. S., and Wang, S. G. 2003. Culture conditions for flocculant production by *Paenibacillus polymyxa* BY-28. *J. Environ. Sci. Health. A* 38:657-669.
- Hadden, J. F. and Black, L. L. 1987. Comparison of virulence of tomato and pepper isolates of *Colletotrichum* spp.(Abstr.) *J. Phytopathol.* 77:641.
- Harder, Y., Chet, I. and Henis, Y. 1979. Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with bran culture of *Trichoderma harzianum*. *J. Phytopathol.* 69:64-68.
- Heyndrickx, M., Vandemeulebroecke, K., Scheldeman, P., Hoste, B., Kersters, K., De Vos, P., Logan, N. A., Aziz, A. M., Ali, N., and Berkeley R. C. 1995. *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *gordonae* (Pichinoty et al. 1986) Ash et al. 1994 is a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *validus* (Nakamura 1984) Ash et al. 1994: emended description of *P. validus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45:661-9.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., P. H., Sneath, A., Staley, J. T. and Williams, S. T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th, Williams Wilkins, U. S. A.
- Kim, G. H., Lim, M. T., Hur, J. S., Yum, K. K. and Koh, Y. J. 2008. Control of gray blight of tea plants using a biofungicide. *Res. Plant Dis.* 14(1):37-42.

- Kim, P. I., Ryu, J., Kim, Y. H., Chi and Y. T. 2010. Production of biosurfactant lipopeptides Iturin A, fengycin and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20:138-45.
- Lee, D. H. 1995. Seed-borne infection of anthracnose fungi isolated from diseased red pepper. *Kor. J. Mycol.* 23:114-120.
- Lee, E. T. and Kim, S. D. 2001. An antifungal substance, 2,4-diacetylphloroglucinol, produced from antagonistic bacterium *Pseudomonas fluorescens* 2112 against *Phytophthora capsici*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 29:37-42.
- Lee, J. S., Pyun, Y. R. and Bae, K. S. 2004. Transfer of *Bacillus ehimensis* and *Bacillus chitinolyticus* to the genus *Paenibacillus* with emended descriptions of *Paenibacillus ehimensis* comb. nov. and *Paenibacillus chitinolyticus* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:929-33.
- Li, X. G. and Choi, J. E. 2009. Development of a system for controlling ginseng *Alternaria* leaf blight (*Alternaria panax*) to reduce fungicide application and use. *Res. Plant Dis.* 15(1): 17-22
- Manandhar, J. B., Hartman, G. L. and Wang, T. C. 1995. Anthracnose development on pepper fruits inoculated with *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant. Dis.* 79:380-383.
- Martin, N. I., Hu, H. Mokae, M., Churey, J. J., Whittal, R. and Worobo, R. W. 2003. Isolation, structural characterization, and properties of mattacin (polymyxin M), a cyclic peptide antibiotic produced by *Paenibacillus kobensis* M. *J. Biol. Chem.* 278:13124-13132.
- Mumpuni, A., Sharma, H. S. S. and Brown, A. E. 1998. Effect of metabolites produced by *Trichoderma harzianum* biotypes and *Agaricus bisporus* on their respective growth radii in culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:5053-5056.
- Nielson, P. and Sorensen, J. 1997. Multi-target and mediumindependent fungal antagonism by hydrolytic enzymes in *Paenibacillus polymyxa* and *Bacillus pumilus* strains from barley rhizosphere. *FEMS Microb. Ecol.* 22:183-192.
- Park, C. S., Kim, J. W. and Choi, O. H. 2000. Attributes of some root colonizing bacterial strains associated with biological control of soil borne disease. Biological control for crop protection international symposium. pp.67-84.
- Schiewe, A. and Mendgen, K. 1992. Identification of antagonists for biological control of the post harvest pathogens *Pezizula malicorticis* and *Nectria galligena* on apple. *J. Phytopathol.* 134:229-237.
- Shida, O., Takagi, H., Kadowaki, K., Nakamura, L. K. and Komagata, K. 1997. Emended description of *Paenibacillus amylolyticus* and description of *Paenibacillus illinoisensis* sp. nov. and *Paenibacillus chibensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47:299-306.
- Slepecky, R. A. and Hemphill, H. E. 1991. The genus *Bacillus*-nonmedical. In *The Prokaryotes*, pp. 1663-1696. Edited by A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder & K. H. Schleifer. New York: Springer.
- Smith, B. J. and Black, L. L. 1990. Morphological, cultural and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. *Plant Dis.* 74:69-76.
- Victor L. M. and Editor, D. 1991. Antibiotics in laboratory medicine (2nd). Williams & Wilkins. 17-52.
- Von der Weid, I., Alviano, D. S., Santos, A. L. S., Soares, R. M. A., Alviano, C. S. and Seldin, L. 2003. Antimicrobial activity of *Paenibacillus peoriae* strain NRRLBD-62 against a broad spectrum of phytopathogenic bacteria and fungi. *J. Applied Microbiol.* 95:1143-1151.
- Wu, X. C., Shen, X. B. and Ding, R. 2010. Isolation and partial characterization of antibiotics produced by *Paenibacillus elgii* B69. *FEMS Microbiol. Lett.* 310:32-38.
- Yoshie, Y., Katsushige, I., Yoshihisa, U., Atsuko, O., Kazutoh, T., Ikunoshin, K. and Hiroshin, N. 1993. Isolation, structures, and antifungal activities of new Aureobasidins. *J. Antibiotics.* 46:1347-1354.
- Zengguo, H., Duygu K., Liwen Z., Chunhua Y., Kari B. G. C., and Ahmed, E. Y. 2007. Isolation and identification of a *Paenibacillus polymyxa* strain that coproduces a novel lantibiotic and polymyxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:168-178.