

토끼풀(*Trifolium repens* L.) 방제용 생물제제 *Penicillium oxalicum* (PENOX)의 발아, 성장, 포자생성 및 탄소원이용에 미치는 수분활성 및 온도의 영향

이향범 · 김창진*

생명공학연구소 첨단생물소재연구센터

요약 : *Penicillium oxalicum*(PENOX)은 잔디밭 토끼풀(*Trifolium repens* L.)의 방제를 위한 생물제제(biocontrol agent, BCA)로서의 잠재성을 보여왔다. 미생물제초균류에 의한 제초활성은 다양한 환경조건하에서 이들의 발아율, 성장력 및 기질이용성 등에 크게 영향을 받는다. 따라서 본 연구는 PENOX의 다양한 수분활성(0.94~0.995 a_w) 및 온도조건(18~30°C)하에서의 균사생장, 포자발아율 및 포자생성량을 glycerol로 조정된 MEA(malt extract agar) 배지를 사용하여 *in vitro*상에서 조사하였다. PENOX의 균사생장은 높은 수분활성조건(0.995 a_w)에서 가장 좋았으며 30°C에서 가장 양호하였다. 또한 0.995 a_w 에서는 저온(20°C)에서도 균사생장이 대체로 양호하여 수분활성이 약간 낮은 조건(0.97 a_w)에서의 최대 균사생장율과 비슷한 균사생장율을 나타냈다. 0.97 a_w 에서의 균사생장율은 25°C와 30°C조건간에 대체로 비슷한 결과를 나타냈으며 저온(20°C)에서는 매우 감소하였다. PENOX의 포자발아율도 0.995 a_w /30°C에서 가장 높았으며 수분활성이 감소할수록 낮아지는 경향을 나타냈다. 저온(18°C)에서의 발아전 지체시간(lag phase time)은 전 a_w 조건하에서 6시간 이상, 그리고 낮은 수분활성조건(0.94 a_w)하에서는 18과 25°C에서 각 18, 12시간 이상으로 나타났다. 그러나 포자생성은 0.995 a_w 의 높은 수분조건에 비해 약간 낮은 0.97 a_w 조건에서, 그리고 고온(30°C)에 비해 저온조건(20°C)하에서 훨씬 양호하였다. 한편, GN MicroPlate를 이용해 PENOX의 기질로서의 95개 탄소원에 대한 이용성을 조사한 결과 0.995 a_w /25°C에서의 생태적 생식역값(niche size)은 86으로 가장 높았으며 수분스트레스조건(0.955 a_w)에서는 그 이용성이 낮아져 그 값은 65를 나타냈다. 그리고 고온(30°C)에서는 0.995 a_w 및 0.955 a_w 에서는 각각 84와 50을 나타내 0.995 a_w 에서 보다 0.955 a_w 조건에서 탄소원 이용시 온도스트레스에 더 민감하게 반응하는 것으로 나타났다. 이러한 균류생태생리학적 정보는 효과적인 BCA의 개발을 위한 기초자료로서 유용하게 활용될 수 있을 것이다. (2000년 7월 14일 접수, 2000년 9월 15일 수리)

Key words : Biocontrol agent(BCA), clover, *Penicillium oxalicum*(PENOX), temperature, water activity.

서 론

잡초방제를 위해 사용되는 유기합성농약의 남용으로 이들의 토양내 잔류, 새로운 우량잡초의 출현, 기존농업생태계의 파괴 등과 같은 다양한 문제가 야기됨으로써 최근에는 자연생태계를 고려한 생물제제(biocontrol agent, BCA)를 이용한 생물학적 방제(biological control) 또는 환경보존형 방제로 전환해야 한다는 인식이 커지고 있다. 전통적인 방법에 의한 우점잡초 종의 방제는 한계에 와 있으며 경종적 방법과 병행하여 생물학적 방제법을 사용해야 한다는 필요성이 대두되면서 생물제제의 사용은 선택적 잡초관리 및 방제는 물론 지구생물다양성 보존차원에서 매우 적절한 방제법으로 받아들여지고 있다. 따라서 최근에는 미생물제초제를 포함하는 생물농약의 사용은 환경친화형 농업을 운용하려는 많은 선진국가에서 점차 늘어나고 있는 실정이며, 유럽연합의 경우 최근까지 COST-816 프로그램을

통해 유럽의 대표적인 문제잡초 종들에 대한 생물학적 방제를 위한 공동연구를 진행해왔다 (Müller-Scharer 등, 2000).

지난 30여년간 잡초방제를 위한 미생물제초제 개발에 관한 많은 연구가 이루어져 100여개 이상의 미생물(대부분 곰팡이)이 잡초방제와 관련이 있는 것으로 탐색되어왔다 (Jackson 등, 1998). 이러한 실적에도 불구하고 지금까지의 미생물제초제는 제초효과면에서 기존의 화학제초제에 비해 매우 낮고, 제제 개발에서부터 사용때 까지 생물학적이고 환경기술적인 면에서 많은 어려움이 있어왔다.

한편, BCA의 산업적인 생산과 최적화를 위해서는 이들의 생물제제로서의 적합성이 우선적으로 평가되어야 하는데 즉, 대상잡초에 대한 제초활성이 높을 뿐만 아니라 포장에서 안정적으로 제초활성이 발휘·유지되고 환경(또는 기주체)에 잘 적응할 수 있는 균주인지가 평가되어야 한다. BCA가 기주식물체에 정착·침입하여 제초활성을 발휘할 수 있는 능력은 주로 수분활성 및 온도 등의 환경요인에 의해 크게 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 최근에 김 등

*연락처

(1996, 1997)은 PENOX가 토끼풀을 비롯한 까마중, 도꼬마리 등 몇몇 잡초에 높은 제초활성을 보여 포자를 직접 이용하는 미생물제초제의 개발을 위해 현재 포자를 직접 잡초에 처리하는 연구를 진행하고 있으며 이를 위해 기본배지에 다양한 용질을 첨가하여 PENOX균류에 의한 포자 대량생산을 유도하기 위한 환경조건에 대한 연구가 진행되고 있다. 우수한 BCA의 탐색 및 제제화를 위해서는 다양한 환경조건하에서의 이들의 균류생태생리학(fungal ecophysiology)적인 특성에 관한 연구가 매우 중요하다고 볼 수 있다.

따라서 본 연구는 토끼풀(*Trifolium repens* L.)에 선택적인 제초활성을 보이는 *Penicillium oxalicum*(PENOX)의 수분활성(수분이용성) 및 온도와 같은 환경스트레스에 대한 BCA로서의 적응력 및 저항성 수준 등을 알아보려 다양한 수분활성(0.94~0.995 a_w) 및 온도(18~30°C)조건하에서 (1) 분생포자발아, 발아관 신장(germ tube elongation) 및 균사생장정도를 조사하며, (2) 포자생성능을 조사하고, (3) 기질로서의 탄소원 이용성을 조사하여 생태적 생식역(生態域) 수준을 알아봄으로써 효과적인 생물제제 개발을 위한 기초자료로 활용하고자 본 연구를 실시하였다.

재료 및 방법

균 주

본 연구에 사용된 토끼풀에 제초활성을 나타내는 균주의 탐색은 대전 및 충북 청원군 일원의 잔디밭이나 초지에 자생하는 토끼풀 이병병반으로부터 직접 분리하였다. 분리방법은 일반적인 진균분리방법으로 분리하였으며 제초활성을 보인 균주는 *Penicillium oxalicum*(이하 PENOX)으로 동정되었다. 균 동정은 Czapek's agar 및 pdtato dextrose agar(PDA) 배지에 접종하여 균주의 형태적 특징을 광학현미경 및 전자현미경(SEM)하에서 관찰하였으며 Samson과 Pitt 등(1990)의 방법에 따라 실시하였다. 분리된 균은 실험 기간중 4°C에 냉장보관하면서 본 실험에 사용하였다.

배지

균배양을 위한 기본배지는 2% MEA(malt extract agar, pH 5.5)를 사용하였다. 기본배지의 수분활성도(water activity, a_w)는 0.995였으며 여기에 용질인 glycerol을 첨가하여 0.94, 0.97 a_w 배지를 조제하였다. 조제된 배지의 a_w 는 Novasina IC II(Novasina AG, Zurich, Switzerland)로 측정하여 확인하였다.

균사생장 조사

PENOX를 미리 PDA배지에서 배양한 후 분생포자를 모아 각 a_w 로 조절된 살균된 용액에 현탁시켜 분생포자현탁액(1×10^7 ml^{-1})을 만들어 이를 접종원으로 사용하였다. 균생장을 조사하기 위하여는 공시균들의 포자현탁액을 a_w 가 0.94, 0.97, 0.995로 조절된 MEA배지의 중앙에 원형 백금

니를 이용하여 한방울씩 접종하였다. 접종 후에는 동일한 a_w 의 처리구별로 polyethylene bag으로 밀봉하여 20, 25, 30°C에서 배양하면서 2일간격으로 균사의 생장직경을 조사하였다. 균사의 생장 직경은 균총의 반경을 4 방향에서 측정하여 얻었다. 이로부터 회귀직선을 통해 균사생장율($mm\ day^{-1}$)을 구하였으며 모든 실험은 3반복으로 실시하였다.

포자발아율, 발아관 신장 및 포자생성량 조사

포자발아율 및 발아관 신장조사는 PDA배지에서 배양한 후 얻은 포자를 각 0.94, 0.97, 0.995 a_w 로 조절된 용액에 균포자를 현탁시켜 분생포자현탁액(1×10^5 ml^{-1})을 만들어 동일 a_w 로 조절된 MEA배지에 도말하여 18, 25 30°C에서 온도별로 배양한 후 배양 시간대별로 배양기에서 꺼내어 광학현미경하에서 측정하였다. 발아는 발아관의 길이가 포자의 직경과 같거나 그 이상의 것으로 간주하였으며 발아율은 발아된 포자수/측정된 총 포자수 $\times 100$ (%)의 식으로 구하였다.

이와 동시에 발아전 지체시간(lag phase time)은 발아율이 대략 5%되는 수준을 기준으로 하였으며 2시간 간격으로 측정하였다. 한편, 다양한 수분활성 및 온도조건하에서의 포자생성능을 조사하기 위하여는 상기 방법과 동일하게 처리하였으며 MEA배지에 2~8주 까지 배양기에 배양한 후 각 plate로부터 agar plug를 취하여 이를 살균수(0.1% Tween)가 들어있는 소형시험관에 넣고 흔들어 포자현탁액을 만든 후 이를 광학현미경하에서 haemocytometer를 사용하여 포자수(CFU, colony forming unit)를 측정하였다.

탄소원이용성 조사

본 실험은 BIOLOG plates(GN MicroPlates, BIOLOG, Inc. CA)를 이용하여 PENOX의 기질이용성을 알아보기 위하여 Lee와 Magan(1999)의 방법에 따라 다양한 수분활성 및 온도 조건하에서 PENOX가 이용할 수 있는 탄소원을 조사하여 탄소원 이용성(여기서는 생태적 생식역 수준으로 정의)을 구하였다. 즉 생태적 수준은 PENOX가 95개 탄소원중 각 조건에 따라 이용가능한 탄소원수에 의해 결정하였다.

각 BIOLOG plate상에는 탄수화물, 카르복시산, 아미노산, 아민, 아미이드, 기타 탄소화합물을 비롯한 95개의 탄소원(기질)이 함유되어있다. PDA배지에서 배양하여 얻은 PENOX의 분생포자를 살균수에 현탁하여 원심분리하는 과정을 3번 반복한 후 MES완충액(Sigma Chemical Co.)으로 씻고 다시 원심분리하였다. MES용액에 NaCl의 양을 달리하여 0.90, 0.955 및 0.995 a_w 용액을 만든 후 이 용액으로 포자현탁액(포자농도 1×10^7 ml^{-1})을 만들어 각 well에 100 μl 씩 떨어 뜨렸다. 처리된 Biolog Plate는 18, 25, 30°C에서 15일 이상 배양한 후 탄소원의 이용유무를 육안 및 광학입체현미경하에서 조사하여 각 조건에서의 생식역의 크기를 구하였다.

결 과

PENOX의 균사생장에 대한 수분활성 및 온도의 효과

균사 생장에 미치는 a_w 와 온도의 영향은 그림 1에서와 같다. PENOX의 균사 생장은 a_w 와 온도에 따라 차이가 있었다.

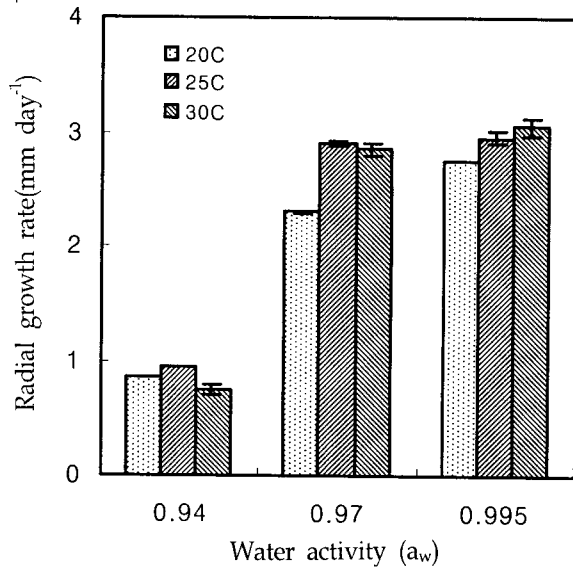


Fig. 1. Effect of water activity and temperature on mycelial growth of PENOX on 2% malt extract agar medium. Vertical bars represent standard errors.

대체적으로 수분활성이 낮거나 저온조건하에서는 균사생장이 감소하였다. 균사생장은 수분활성이 높은 0.995 a_w 에서 가장 좋았으며 특히 30°C에서 가장 양호하였다. 또한 수분활성이 높을 경우 저온(20°C)에서도 균사생장이 양호하여 0.97 a_w 에서의 최대 균사생장과 대체로 비슷한 결과를 나타냈는데 일반적인 곰팡이의 균사 생장적온이 24-28°C인 것에 비하면 온도스트레스에 대한 저항성이 높은 것으로 나타났다. 수분활성이 약간 낮은 0.97 a_w 조건에서는 25°C와 30°C 조건간의 균사생장율이 거의 비슷하였으나 20°C의 낮은 온도 조건에서는 매우 감소였다. 한편, 0.94 a_w 의 낮은 수분조건하에서는 모든 온도조건에서 균사생장율이 0.995 a_w 조건에 비해 대략 3배 이상 낮지만 일반 포장균류 (field fungi)의 생장이 거의 이루어지지 않는 것과는 달리 대체로 균사생장이 이루어진다는 것을 의미한다. 지금까지의 결과는 삼투수분압 (osmotic water potential)의 조절을 위해 glycerol을 용질로 사용하였을 경우이며 균사생장의 차이는 매트릭 수분압 (matric water potential)의 조건, 첨가된 기질의 종류 등에 따라 차이를 나타낼 것으로 생각된다.

PENOX의 분생포자 발아, 발아관 신장 및 포자생성에 대한 수분활성 및 온도의 효과

분생포자 발아에 대한 수분활성도 및 온도의 영향은 그

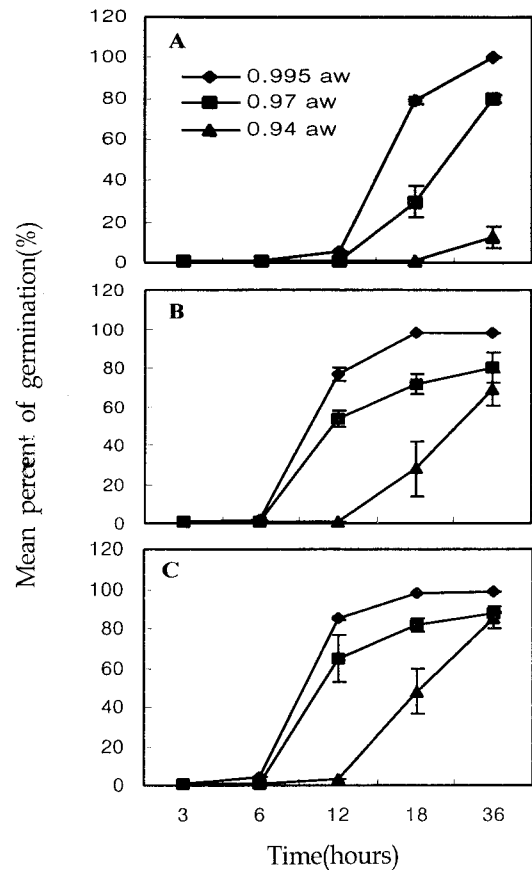


Fig. 2. Effect of water activity and temperature on the germination of PENOX on 2% malt extract agar medium. A: 18, B: 25 and C: 30°C. Vertical bars represent standard errors.

림 2에서와 같다. PENOX의 분생포자 발아율은 균사생육 조건에서와 마찬가지로 a_w 및 배양온도에 따라 많은 차이가 있었다. PENOX의 배양 36시간 이내에서의 분생포자 발아는 최적 균사생장조건에서와 같이 30°C에서 가장 좋았으며 수분활성 조건에서는 0.995 a_w 에서 제일 좋았으며 12시간 후에 약 90%의 발아율을 나타냈으나, 0.97 a_w 에서는 대략 70%로 다소 떨어지는 경향을 나타냈다(그림 2). 그러나 이러한 낮은 수분활성조건에서의 발아율은 발아조건이 대략 >0.99 a_w 의 높은 수분활성이 요구되는 일반 포장균류에 비해서는 매우 높은 것이며 발아전 지체시간도 a_w 및 온도에 따라 차이가 있기는 하지만 발아시 높은 수분활성을 요구하는 *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Verticillium* 등과 같은 일반 포장균류에 비해 대체로 짧은 것으로 나타났다(그림 3). 저온(18°C)에서의 발아전 지체시간은 모든 a_w 조건에서 6시간이상, 그리고 0.94 a_w 에서는 18과 25°C에서 각각 >18 시간 및 >12 시간으로 나타났다. 이러한 결과는 수분활성이 약간 낮은 0.97 a_w 에서 포자생성이 훨씬 양호한 결과와 대조된다(그림 5). 0.97 a_w 의 조건에서는 18°C에서 18시간 후에 약 29.8%, 36시간 후에 83%의 발아율을 나타

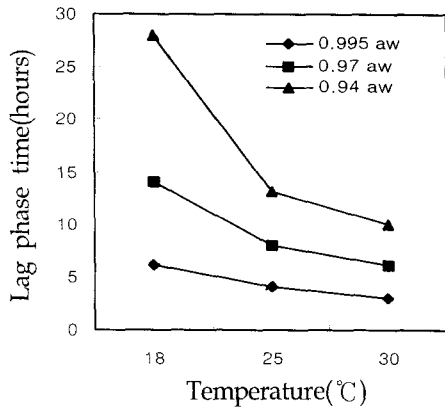


Fig. 3. Lag phase times(hrs) prior germination of spores of PENOX required for germination under different water activity and temperature conditions.

났으며 25 및 30°C에서 12시간 후에 각각 49.3 및 64.7%의 발아율을 나타냈으나 0.94 aw의 낮은 수분활성조건에서는 36시간 후에 18, 25 및 30°C에서 각각 12, 72, 79%의

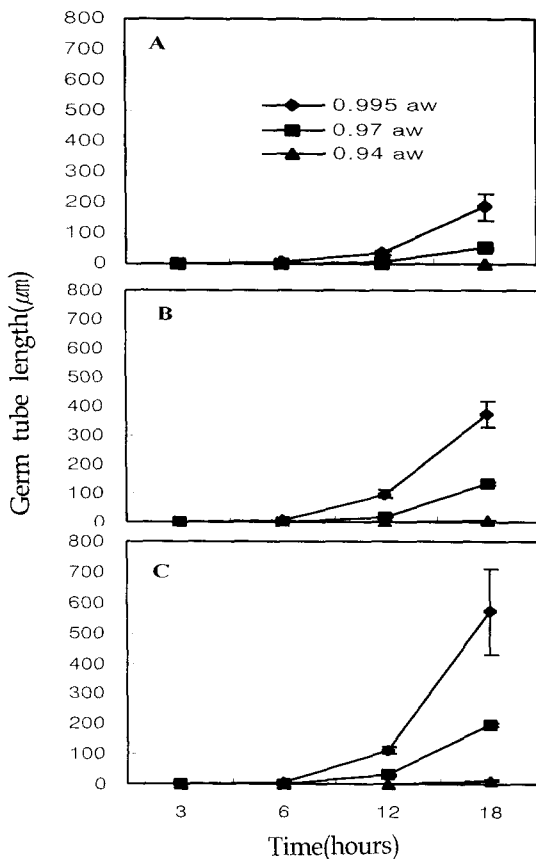


Fig. 4. Effect of water activity and temperature on germ tube extension of PENOX on 2% malt extract agar medium. A: 18, B: 25 and C: 30°C. Vertical bars represent standard errors.

발아율을 나타내 온도가 낮아질수록 그 지체시간도 길어지지만 대체로 발아율은 시간이 지나면서 높은 경향을 보였다.

한편, PENOX의 18시간 이내의 발아관의 길이는 처리조건별 발아율의 차이가 크지 않더라도 aw의 변화에 따라 커다란 차이를 보였다(그림 4). 0.995 aw에서 18시간 후 발아

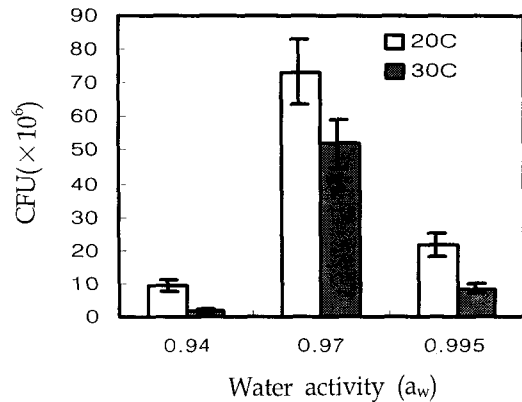


Fig. 5. Sporulation(CFU) of PENOX on 2% malt extract agar medium after 8 weeks' culture under different water activity and temperature conditions. Vertical bars represent standard errors.

관의 길이는 18 및 30°C에서 각각 185 및 571 µm로 약 3배의 차이를 보였다. 0.97 aw의 대체로 낮은 수분활성조건에서는 낮은 온도조건(18°C)에서 12시간 이후에 발아가 시작되며 25 및 30°C에서도 12시간 후의 발아관의 길이가 각각 17 및 31 µm를 나타냈다.

한편, PENOX의 포자생성정도를 조사한 결과는 그림 5에서와 같이 균사생장이 제일 양호한 0.995 aw에서 보다 수분활성이 조금 낮은 0.97 aw조건에서, 또한 고온(30°C)에서 보다는 저온조건(20°C)에서 더 높았다. 그러나 매우 낮은 수분활성조건(0.94 aw)에서도 포자생성이 급격히 떨어지긴 하지만 어느 정도 생성이 잘 이루어지는 것으로 나타났다. 지금까지의 결과는 용질로서 glycerol을 사용하였을 경우이며 다른 용질을 사용할 경우 포자 생성경향은 이와 다를 수 있을 것으로 생각된다.

탄소원이용성 조사

A_w와 온도를 달리하여 탄소원 이용능력(생태적 생식역 수준)을 조사한 결과 aw 및 온도에 따라 큰 차이를 나타냈다(그림 6). 수분활성이 낮은 0.95 aw나 0.90 aw에서 보다는 수분활성이 높은 0.995 aw/25°C조건에서 생식역값이 86으로 탄소원 이용성이 가장 높았으며, 특히 0.995 aw에서는 25°C와 30°C에서의 생식역값이 비슷하였으며 20°C에서 상당히 낮아지는 경향을 나타냈다. 0.95 aw의 수분활성조건에서는 생태적 생식역값이 25°C에서 65로 제일 컸으며 30°C에서는 낮아져 생식역값이 가장 큰 0.995 aw/25°C조건에

비해 약 41% 덜 이용하는 것으로 나타나 탄소원 이용시 온도변화에 더 민감한 것으로 나타났다. 그리고 고온(30°C)에서는 0.995 a_w 및 0.955 a_w 에서 각각 84와 50을 나타내 0.995 a_w 에서 보다 0.955 a_w 조건에서 탄소원 이용시 온도 스트레스에 더 민감하게 반응하는 것으로 나타났다. 0.90 a_w 의 낮은 수분활성 조건에서는 모든 온도 조건하에서도 어떤 탄소원도 이용하지 못하였다.

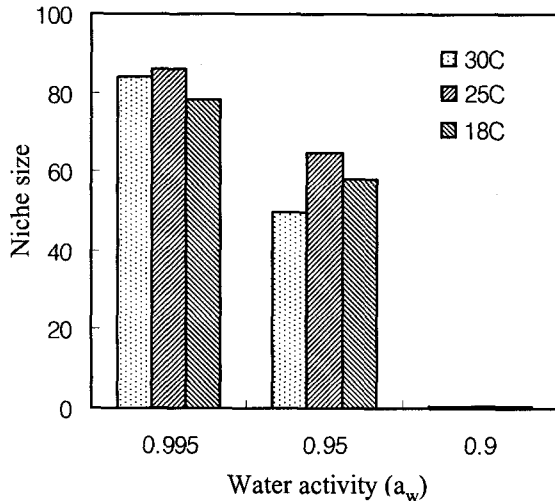


Fig. 6. Niche size representing the ability of PENOX to utilize carbon sources on GN Biolog MicroPlate under different water activity and temperature conditions.

고찰

Penicillium oxalicum 균주가 토끼풀 등의 잡초에 제초활성이 있다는 보고는 Kim 등(1996, 1997)에 의해 확인된 바 있으며 BCA제로서의 개발을 위한 잠재성을 인정받아왔다. 또한 이 균은 최근에 *Fusarium* 식물병의 생물학적 방제제로서 주목받게 되면서 생물제제로서의 개발과 관련한 대량 포자생성 등에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다 (Pascual 등, 1997). 지금까지 *Penicillium*속 균은 다병성 식물병원균으로서 많은 식물에 직접 병을 일으키는 것으로 보고되어 왔지만 대체로 병원성이 약하거나 부생균으로서 또는 다른 균과 상호적으로 병을 일으키는 것으로 알려져 왔다. 일반적으로 호건성(xerophilic) 또는 내건성(xerotolerant)의 특징을 갖는 *Penicillium*속 균은 지금까지 다양한 식물병원균으로서 뿐만 아니라 저장식품의 부패와 관련이 있는 저장균류로 주로 알려져 왔으며 대부분의 포장균류에 비해 특히 낮은 수분 조건하에서도 잘 자랄 수 있는 특징을 갖고 있다는 생물제제로로서 큰 의의를 지니고 있으며 이러한 PENOX가 미생물제제로서 개발될 경우 특히 건조한 포장조건하에서도 잘 적응하고 저장시에도 생존력이 높을 수 있다는 점에서 많은 장점을 지니고 있다고 생각된다. 한편, 본 연구진에 의해 확인된 결과에 의하면, PENOX는 급성독성시험결과 전혀 독성을 나타내지 않았으며, 주요 작물에 대한 약해가 거의 없고, 잡초방제시

Fusarium 식물병의 방제효과도 얻을 수 있다는 점 때문에 BCA로서 더 높은 평가를 받고있다. 특히, PENOX는 균사생장에 있어서 0.95 a_w 에서 최대생육을 보이는 *Aspergillus*속 균과 같은 전형적인 xerophilic한 균류에 비해서는 최대생육을 위한 a_w 조건이 약간 더 높은 a_w 를 나타내지만 다른 일반 포장균류의 성장을 위한 최적 a_w (대략 >0.99 a_w)에 비해서는 더 낮은 a_w 를 가지며 수분 및 온도스트레스에 대한 저항성이 커 생물제제로서의 많은 잇점을 가지고 있다고 볼 수 있다.

다양한 종류의 균류는 균사생장, 포자형성, 포자발아는 물론 기질(영양원)을 이용(또는 점유)하는데도 최적 수분함량 및 한계점이 있다. 모든 균류가 항상 최대수분활성조건에서 생장이 최대가 되는 것은 아니다. Xerophilic한 균류에 속하는 *Eurotium repens*, *E. amstelodami*, *Aspergillus niger* 및 *A. vesicolor* 등의 균사생장은 최적온도조건의 0.90~0.95 a_w 에서 최대치를 나타낸다. Hocking과 Pitt(1979)는 한 *Penicillium*속 균의 생장은 포화습도의 수준인 1.00 a_w 에서 보다 약간 낮은 수분조건(0.98 a_w)에서 최대치를 나타낸다고 하였다. Hill과 Lacey(1983)는 *in vitro*에서 *Penicillium* spp. 및 *Eurotium* spp.의 생장이 각각 25°C/1.00 a_w 및 30°C/0.90 a_w 에서 각각 최대치를 나타내며 또한 *Penicillium aurantiogriseum* 과 *P. viridicatum* 및 *Eurotium*속 균은 0°C/1.00 a_w 및 30°C/0.70 a_w 에서 각각 최대로 분포하는 것으로 나타나 저장곡립상에서의 결과와는 항상 일치하지 않는다고 하였다. 본 연구는 MEA 고체배지상에서의 결과이며 다른 용질이나 기질을 사용할 경우 수분활성에 대한 민감도 또는 환경요인에 대한 저항성패턴은 변할 수도 있으며 이에 대한 연구는 더 필요한 것으로 생각된다. 일반적으로 BCA의 집중원으로서의 균사체보다는 포자가 더 용이하며 BCA개발시 이의 효능을 높이려는 다양한 연구가 이루어지고 있다. 균에 따라 다르겠지만 포자형성은 성장을 위한 최소 a_w 또는 약간 높은 a_w 에서 발생하며 최소 a_w 는 온도에 따라 변하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 PENOX의 균사생장은 수분활성이 높은 조건인 0.995 a_w 에서는 고온(30°C)에서 가장 좋았으나 포자생성은 수분활성이 약간 낮은 0.97 a_w 조건하에서 가장 양호하였으며 수분활성이 매우 낮은 0.94 a_w 에서도 대체로 포자형성이 잘 이루어졌다. 일반적으로 포자연령 및 영양상태에 따라 발아전 지체시간이 영향을 받는다고 한다. 우수한 BCA는 건조하거나 수분포텐셜이 낮은 불리한 환경조건에도 잘 적응할 수 있어야 하며 이를 위해 처음부터 환경스트레스에 대한 적응력이 높은 균주를 선발함과 동시에 선발된 균주로 하여금 환경변화에 잘 적응하도록 세포내 저항성 관련 축적물의 생성을 유도할 수도 있으며, 또한 발아전 지체시간을 줄이려는 연구도 이루어지고 있다. 이러한 미생물의 생장, 발아 및 포자생성 등과 관련된 수분 및 온도스트레스에 대한 적응력과 저항성 등에 관한 정보는 우수한 BCA의 탐색 뿐만 아니라 산업적인 제제화 개발시 요구되는 대량포자생산 기술 등에도 유용하게 활용될 수 있

을 것이다.

감사의 글

본 연구는 농림부 농림기술개발연구사업에 의한 연구비 지원으로 수행된 연구결과의 일부이며 지원에 감사드립니다.

인용문헌

- Baker, R. and F. M. Scher. (1987) Enhancing the activity of biological control agents. *In* Innovative Approaches to Plant Disease Control(ed. I. Chet), pp. 1~18. John Wiley & Sons: Chichester, U.K.
- Beuchat, L. R. (1981) Microbial stability as affected by water activity. *Cereal Foods World* 26(7): 345~349.
- Brown, A. D. (1978) Compatible solutes and extreme water stress in Eucaryotic microorganisms. *Adv. Microbiol. Physiol.* 17: 181~242.
- Dallyn, H. and A. Fox. (1980) Spoilage of material of reduced water activity by xerophilic fungi. *Society of Applied Bacteriology Technical Series no. 15*(ed. G. H. Gould & J. E. L. Corry), pp. 129~139. London: Academic Press.
- Hocking, A. D. and J. I. Pitt. (1979) Water relations of some *Penicillium* spp. at 25°C. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 73: 141~145.
- Hill, R. A. and J. Lancy (1983) Factors determining the microflora of stored barley grain. *Ann. Appl. Biol.* 102:467~483.
- Jackson, M. K., D. A. Schisler, C. D. Boyette, W. J. Connick, W. J. and N. K. Zidack. Improving mycoherbicide fitness using nutrition management during production and formulation. pp.37, *In* THE FUTURE OF FUNGI IN THE CONTROL OF PESTS, WEEDS AND DISEASES. British Mycological Society International Symposium.
- Kim, P.-K., D. J. Park, J. -S. Choi, I. T. Hwang, K. S. Hong, and C. -J. Kim. (1997) Biological control of clover by *Penicillium* sp. *Agric. Chem. and Biotech.* 40(1): 65~70.
- Kim, P. -K., D. J. Park, S. -Y. Choi, and C. -J. Kim. (1996) Screening of *Penicillium* sp. showing herbicidal activity on *Trifolium repens* L. *Agric. Chem. and Biotech.* 39(6): 455~459.
- Lee, H. B. and N. Magan. (1999) Environmental factors and nutritional utilization patterns affect niche overlap indices between *Aspergillus ochraceus* and other spoilage fungi. *Lett. in Appl. Microbiol.* 28(4): 301~304.
- Luard, E. J. (1985) Respiration of *Penicillium chrysogenum* in relation to the osmotic potential of the growth medium. *Exper. Mycol.* 9: 99~107.
- Müller-Scharer H., P. C. Scheepens and M. P. Greaves. 2000. Biological control of weeds in European crops: recent achievements and future work. *Weed Res.* 40: 83~98.
- Magan, N. (1997) Fungi in extreme environments. *In* Mycota Vol. IV, Environmental and Microbial Relationships (ed. D. Wicklow & B. Soderstrom), pp. 99~113. Springer Verlag.
- Pascual, S., A. D. Cal, N. Magan and P. Melgarejo. (1997) Induction of submerged conidiation of the biocontrol agent *Penicillium oxalicum*. *Appl. Microbiol. and Biotech.* 48: 389~392.
- Pascual, S. P., Melgarejo and N. Magan (2000) Accumulation of compatible solutes in *Penicillium frequentans* grown at reduced water activity and biocontrol of *Moniliana laxa*. *Biocon. Sci. and Tech.* 10:71~80.
- Righelato, R. C., A. P. J. Trinci, S. J. Pitt and A. Peat. (1968) The influence of maintenance energy and growth rate on the metabolic activity, morphology and conidiation of *Penicillium chrysogenum*. *J. Gen. Microbiol.* 50: 399~412.
- Samson, R. A. and J. I. Pitt. (1990) Modern concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Plenum Press.
- TeBeest, D. O. (1991) *Microbial Control of Weeds.* Chapman and Hal.

Effect of Water Activity and Temperature on Growth, Germination, Sporulation, and Utilization of Carbon Source of *Penicillium oxalicum*(PENOX) as a Biocontrol Agent(BCA) for control of Clover(*Trifolium repens* L.)

Hyang Burm Lee and Chang-Jin Kim^{*}(*Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, P.O Box, 115, Yusong, Taejon, Korea*)

Abstract : *Penicillium oxalicum*(PENOX) has shown the potential as a biocontrol agent(BCA) for control of a weed, clover(*Trifolium repens* L.) in grass plots. The bioherbicidal activity may be due to germinative and growth capacities and substrate availability of the agent over a range of environmental factors. The influences of different water activities(0.94~0.995 a_w) and temperatures(18~30°C) on mycelial growth, conidial germination, sporulation on 2% MEA(malt extract agar) adjusted to different water activities with glycerol, and carbon source utilization using BIOLOG GN MicroPlate were determined *in vitro*. Decreases in a_w on MEA caused a reduction in mycelial growth and conidial germination depending on temperature. The mycelial growth of PENOX was greatest at 30°C/0.995 a_w . At some lowered water activity(0.97 a_w), the growth was similar between 25 and 30°C, and considerably decreased at lowered temperature(20°C). The germination rate was also greatest at 30°C/0.995 a_w . Lag phase times for PENOX at 18°C on MEA were >6hrs at the whole a_w level tested, and at 18 and 25°C they were >18hrs and >12hrs at 0.94 a_w , respectively. However, its sporulation was some better at 0.97 a_w than 0.995 a_w or 0.94 a_w , and better at 20°C than 30°C. In contrast, the number of carbon sources(niche size) utilized by PENOX varied with a_w and temperature. Under some water stress condition(0.95 a_w), the agent utilized smaller number of carbon sources than 0.995 a_w depending on temperature. The niche size at 0.995 and 0.95 a_w were highest at 25°C, and showed 86 and 65, respectively. At 30°C, the niche size at 0.995 and 0.95 a_w showed 84 and 50, respectively. There was no carbon source utilized by PENOX at 0.90 a_w regardless of temperature. These information of the fungal ecophysiology will be useful for the effective development of BCA.

*Corresponding author (Fax: +82-42-860-4595, E-mail: changjin@mail.kribb.re.kr)