THE KOREAN JOURNAL OF MYCOLOGY
Vo. 32, No 1, p31-38 June 2004
Copyright © 2004 by The Korean Society of Mycology
Printed in S. KOREA

탄저병균에 대하여 길항작용을 보이는 *Burkholderia cepacia* EB215로부터 분리한 Pyrrolnitrin의 항균활성

박지현[1,2] · 최경자[1] · 이선우[1] · 장경수[1] · 최용호[1] · 정영륜[2] · 조광연[1] · 김진철[1]*

[1]*한국화학연구원 생물기능연구팀,* [2]*경상대학교 응용생명과학부, 기초과학연구소*

In vivo Antifungal Activity of Pyrrolnitrin Isolated from *Burkholderia capacia* EB215 with Antagonistic Activity Towards *Colletotrichum* Species

Ji Hyun Park[1,2], Gyung Ja Choi[1], Seon-Woo Lee[1], Kyoung Soo Jang[1], Yong Ho Choi[1], Young Ryun Chung[2], Kwang Yun Cho[1] and Jin-Cheol Kim[1]*

[1]*Biological Function Research Team, Korea Research Institute of Chemical Technology, Taejon 305-606, Korea*
[2]*Division of Applied Life Sciences (BK21 program) and Research Institute of Natural Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea*

(Received March 29, 2004)

ABSTRACT: **An endophytic bacterial strain EB215 that was isolated from cucumber (*Cucumis sativus*) roots displayed a potent *in vivo* antifungal activity against *Colletotrichum* species. The strain was identified as *Burkholderia cepacia* based on its physiological and biochemical characteristics, and 16S rDNA gene sequence. Optimal medium and incubation period for the production of antifungal substances by *B. cepacia* EB215 were nutrient broth (NB) and 3 days, respectively. An antifungal substance was isolated from the NB cultures of *B. cepacia* EB215 strain by centrifugation, *n*-hexane partitioning, silica gel column chromatography, preparative TLC, and *in vitro* bioassay. Its chemical structure was determined to be pyrrolnitrin by mass and NMR spectral analyses. Pyrrolnitrin showed potent disease control efficacy of more than 90% against pepper anthracnose (*Colletotrichum coccodes*), cucumber anthracnose (*Colletotrichum orbiculare*), rice blast (*Magnaporthe grisea*) and rice sheath blight (*Corticium sasaki*) even at a low concentration of 11.1 μg/ml. In addition, it effectively controlled the development of tomato gray mold (*Botrytis cinerea*) and wheat leaf rust (*Puccinia recondita*) at concentrations over 33.3 μg/ml. However, it had no antifungal activity against *Phytophthora infestans* on tomato plants. Further studies on the development of microbial fungicide using *B. cepacia* EB215 are in progress.**

KEYWORDS: **Anthracnose, *Burkholderia cepacia*, *Colletotrichum* species, Endophytic bacterium, Pyrrolnitrin**

*Colletotricum*속 균은 오이, 수박, 고추, 딸기 등의 과채류와 같은 경제적으로 중요한 작물에 탄저병을 일으키는 대표적인 다범성 병원균으로(Bailey *et al.*, 1992; Elmer *et al.*, 2001), 약 200억 정도의 국내 채소병 시장을 차지하고 있을 정도로 큰 문제가 되고 있는 병이다. 현재 탄저병의 효율적인 방제 방법은 화학 살균제 살포에 의한 방법으로 이 방법은 화학농약 잔류에 의한 자연 생태계의 오염과 인축 독성 등의 커다란 문제점을 안고 있다. 이러한 문제점을 해결하고 환경과 조화를 이루는 방제 수단으로 저항성 품종, 경종적 방제, 생물학적 방제 및 천연물 농약 등이 있다. 특히 천연물 농약은 그 활성 성분 자체뿐 아니라 그 골격을 이용하여 새로운 합성 농약을 만들 수 있기 때문에 이 분야의 연구는 널리 수행되고 있다(Baker *et al.*, 1983; Katz and Demain, 1977; Kim *et al.*, 2004; Lange *et al.*, 1993; Porter and Fox, 1993; Powel and Jutsum, 1993).

식물내생세균은 살아있는 식물 조직 내에 살면서 식물에는 실질적인 해를 주지 않고, 식물 조직 내에서 식물에게 여러 가지 이점을 주는 세균으로 정의 된다(Hallmann *et al.*, 1997; Kobayashi and Palunbo, 2000). 식물내생세균의 식물 조직 내에 집적하는 현상은 매우 광범위한 자연 현상으로 보이며, 이러한 식물내생세균은 경제적으로 중요한 작물의 성장을 증진시킬 뿐만 아니라 모잘록병 등에 대한 강한 항균활성이 있다고 보고 되었다(Bashan *et al.*, 1989; Nowak, 1995; Gardner, 1982). 이러한 식물내생세균으로는 *Peudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter* 그리고 *Agrobacterium* 등 54개 이상의 속의 129개 이상의 종이 알려져 있으며(Gardner, 1982; McInroy *et al.*, 1995; Mundt and Hinkle, 1972; Sturz, 1995), 다른 미생물에서는 발견되지 않는 독특한 구조의 물질을 분비하는 것으로

*Corresponding author <E-mail: kjinc@krict.re.kr>

알려져 있다.

*Burkholderia cepacia*는 예전에는 *Pseudomonas cepacia*로 명명되었던 균으로 *Burkhoderia*속과 *Pseudomonas*속은 다양한 이차 대사산물의 보고로서 알려져 있다. 이들이 생산하는 주요 이차 대사산물로는 2,4-diacetylphloroglucinol, phenazine-1-carboxylic acid, pyrrolnitrin 등이 있으며, 이러한 물질들은 실제로 생물학적 방제활성이 있다고 보고되어 있다. *B. cepacia*는 진균성 식물병에 대한 생물학적 방제(Janisiewicz and Roitman, 1988)로서의 높은 가능성이 있다고 보고 되고 있으며, 종자 처리제로서 개발되어 상품으로 출시되었다. *B. cepacia*의 주요 길항작용 중의 하나로 항진균물질의 생산이 알려져 있는데, 이에는 cepaciamide A(Jiao, 1996), cepacidine A(Lee *et al.*, 1994), xylocandin complex(Meyers *et al.*, 1987), pyrrolnitrin(Homma and Suzui, 1989) 등이 있으며, 이들은 대부분 항진균활성을 가지고 있다. *B. cepacia*에 의해 생산되는 cepacin A 와 cepacin B(Parker *et al.*, 1984)와 같은 물질들은 오직 항세균활성만을 가지는 것에 반하여 pyrrolnitrin은 곰팡이와 효모, 그람 양성 세균에 대해 모두 활성이 있는 것으로 알려져 있다(Arima *et al.*, 1964; El-Banna *et al.*, 1998).

본 연구팀에서는 국내에서 재배중인 건전한 채소 조직으로부터 분리한 식물내생세균을 이용하여 각종 채소에 발병하는 탄저병 방제용 미생물살균제 개발에 대한 연구를 진행하던 중에 오이 탄저병(*Colletotrichum orbiculare*)에 대하여 높은 방제활성을 보일 뿐만 아니라 고추 탄저병균(*Colletotrichum acutatum*)의 균사 생육에 대해서도 높은 항균활성을 보이는 EB215 균주를 선발하였다(박, 2004). 이 세균을 이용한 미생물 살균제 개발에 대한 연구의 하나로서 균주의 동정, 항균물질의 분리 및 구조 결정, 그리고 탄저병을 포함한 다양한 식물병원균에 대한 *in vivo* 항균활성에 대하여 조사하여 본 논문에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

균주의 보관 및 배양

오이 뿌리로부터 분리한 EB215 균주는 Tryptic soy agar(TSA; 17.0 g casein, 3 g soybean meal, 2.5 g dextrose, 5 g NaCl, 2.5 g dipotassium phosphate, 15 g agar, 1.0 *l* 증류수; Becton and Dickinson Co., Sparks, Maryland, USA)에서 단일 콜로니로 분리한 후 다시 nutrient agar(NA; 3 g beef extract, 5 g peptone, 1.0 *l* 증류수; Becton and Dickinson Co.) 배지에 3~4회 계대배양하여 단일콜로니로 분리하였다. 분리한 균주는 멸균한 40% glycerol에 현탁하여 −80°C에서 장기 보관하였고, 또한 NA 배지에 배양하여 4°C에 보관하며 실험에 사용하였다.

생리생화학적 특성

EB215균의 동정을 위하여 Bergey's Manual of Systemic Bacteriology(John *et al.*, 1994)의 표준 방법에 따라 몇 가지 생리·생화학적 특성을 조사하였다. 또한, Micro Station System(Biolog, Inc., Hayward, Calif., USA)을 이용하여 95가지 탄소원의 이용에 대한 특성을 조사하였다. Biolog 실험을 위해 EB215 균주를 TSA 배지에 하루 동안 배양한 다음 미리 멸균된 saline 용액에 현탁하여 균의 밀도를 조정한 후, 탄소원이 들어 있는 Biolog GN Microplate에 준비된 현탁액을 각 well 당 150 μl씩 분주하였다. 4시간, 24시간 그리고 48시간 배양하면서 탄소원 이용 여부를 reader로 측정하고, Micrologrelease 3.50 software에서 검색하여 균주를 분류하였다.

16S rDNA의 Sequencing

EB215 균주의 정확한 동정을 위하여 16S rRNA gene을 kit(Product A1360; Promega Co., Madison, W.I., USA)를 이용하여 Polymerase Chain Reaction(PCR)으로 증폭시켰다. 이때 2개의 universal primer set 8F/1492r(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'/5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')와 Com1(forward)/Com2(reverse) (5'-CAGCAGCCGCGGTAATAC-3'/5'-CCG TCAATTCCTTTGAGTTT-3')를 이용하여 16S rDNA 유전자를 PCR로 증폭시켜 얻었다. Denaturation, annealing, extension을 각각 95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 2분간 반응시켰다. PCR product를 DNA purification kit(Product 28706; QIAGEN Inc., Valencia, C.A., USA)로 순수 분리한 후, automatic sequencer를 통해 sequencing하였고, database 검색은 NCBI network service의 BLAST program으로 수행하였다.

항균물질 생성을 위한 최적 배지 선발

EB215 균주로부터 항균물질을 분리, 동정하기 위하여 최적배지 선발을 실시하였다. Table 1에서와 같이 Nutrient broth 배지(NB; 3.0 g beef extract, 5.0 g peptone, 1 *l* 증류수), Tryptic soy broth 배지(30 g tryptic soy broth, 1 *l* 증류수), Potato dextrose broth 배지(24 g potato dextrose broth, 1 *l* 증류수), Proteose peptone glucose sucrose broth 배지(5.0 g proteose peptone, 3.0 g glucose, 2.0 g sucrose, 3.0 g NaCl, 0.5 g Na_2HPO_4, 3.0 g $CaCO_3$, 1 *l* 증류수), Glucose starch broth 배지(5.0 g soluble starch, 5.0 g glucose, 0.5 g aspartic acid, 0.5 g K_2HPO_4, 0.5 g $MgSO_4$, 0.01 g $FeSO_4$, 1 *l* 증류수), Glucose peptone broth 배지(20.0 g glucose, 10.0 g peptone, 1.0 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5 g KH_2PO_4, 3.0 g $CaCO_3$, 1 *l* 증류수), M523 broth 배지(1.0 g sucrose, 8.0 g casamino acid, 4.0 g yeast extract, 0.3 g $MgSO_4$, 1 *l* 증류수), Yeast extract polypeptone glucose broth 배지(20.0 g glucose, 5.0 g yeast extract,

Table 1. Inhibition of mycelial growth of *Colletotrichum acutatum* by culture filtrates of *Burkholderia cepacia* EB215 incubated in various broth media

Media	Culture period (hrs)				
	24	48	72	96	120
NB[a]	24[b]	29	31	30	29
TSB	12	17	19	19	17
PDB	NI[c]	10	13	9	NI
PPGSB	17	26	30	29	24
GSB	11	16	20	18	13
GPB	12	18	23	21	15
M523B	NI	12	15	9	NI
YPGB	NI	NI	NI	NI	NI

[a]NB, nutrient broth; TSB, tryptic soy broth; PDB, potato dextrose broth; PPGSB, proteose peptone glucose starch broth; GSB, glucose starch broth; GPB, glucose peptone broth; M523, M523 broth; YPGB, yeast extract polypeptone glucose broth.
[b]Inhibition zone (mm).
[c]No inhibition.

5.0 g polypeptone, 0.5 g $MgSO_4$, 1.0 g KH_2PO_4, 1 *l* 증류수) 등 8가지 배지를 이용하여 배양 시간별로 고추 탄저병균(*C. acutatum*)에 대해 항균활성 조사를 하였다. 멸균한 후 각각의 배지 100 *ml*에 EB215 균주를 접종하고, 30°C, 150 rpm에서 진탕배양하였다. 배양액을 시간별로 수확하여 여과한 후 멸균된 paper disk(1.5×8.0 mm; Advantec, Toyo Roshi Kaicha, Ltd., Tokyo, Japan)에 50 *μl*씩 분주하여 건조한 다음 pour-plating 방법으로 접종된 고추 탄저병균인 *C. acutatum*의 균사 생육에 대한 항균활성을 조사하였다.

항균물질의 분리

EB215 균주의 대량 배양을 위하여 항생물질 생산을 위한 최적 배지로 선발된 NB 배지(Becton and Dickinson Co.) 12 *l*에 균주를 접종한 다음, 30°C에서 150 rpm으로 3일간 진탕 배양하였다. 배양액을 9,000 rpm에서 12분간 원심 분리한 후 상등액만을 취하여 동량의 *n*-hexane으로 2회 추출한 다음 30°C에서 rotary vacuum evaporator로 감압, 농축하였다. *n*-hexane 추출물(0.18 g)로부터 활성물질을 분리하기 위하여 Kiesel gel 60(230~400 mesh, 50 g; E. Merck. Darmstadt, Germany)이 충진된 컬럼(2.4×45 cm)에 가한 후 100% methylene chloride로 용출하였다. Fraction collector를 이용하여 10 *ml*씩 취하여 TLC 분석을 한 다음 *C. acutatum*에 대하여 항균력을 조사하여 활성이 있는 분획들을 모았다(F1). F1(70 mg) 분획을 preparative TLC plate(20×20 cm, thickness 0.5 mm, Kiesel gel 60 F254, precoated, E. Merck)에 가한 다음 *n*-hexane : acetone(2 : 1, v:v) 용매조건하에서 전개한 후 EB215 compound라 명명한 항균활성 물질(26.8 mg)을 순수하게 분리하였다. Fig. 1은 *B. cepacia* 배양액으로부터 항균물질인 EB215 compound의 분리 및 정제 과정을 정리한 것이다.

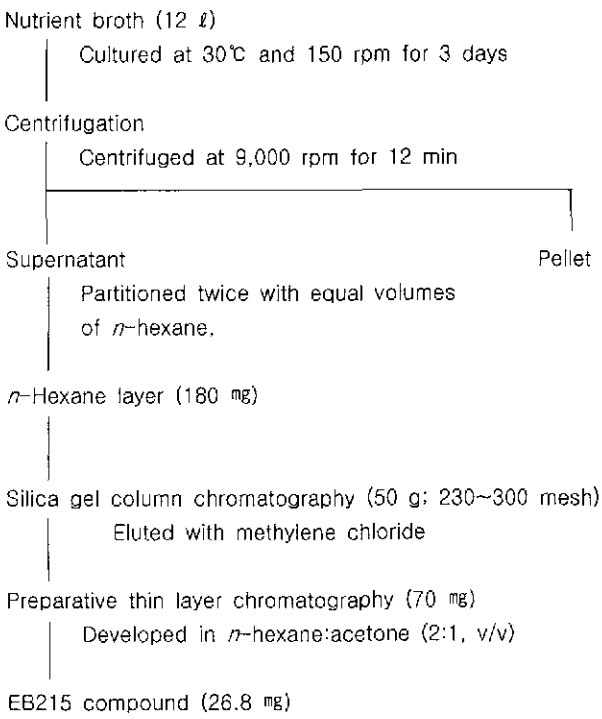

Fig. 1. Extraction and purification procedure of an antifungal substance from nutrient broth cultures of EB215.

항균물질의 구조 분석

분리한 EB215 compound의 UV spectrum은 methanol (MeOH)에 용해한 후 Shimadzu UV-2401PC spectrophotometer(Shimadzu Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다. 질량분석은 double-focusing high resolution(HR) mass spectrometer (JEOL JMS-DX303; JEOL Ltd., Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다. NMR spectrum은 Bruker-AMX 500(500 MHz) NMR spectrometer(Bruker Analytische Messtechnik GmbH, Rheinstetten, Germany)로 측정하였고, tetramethylsilane(TMS)를 internal standard로 이용하였다.

Pyrrolnitrin의 식물병원진균에 대한 *In vivo* 항균활성 검정

EB215 균주로부터 분리한 항균물질인 pyrrolnitrin에 대하여 고추 탄저병, 오이 탄저병, 벼 도열병, 벼 잎집무늬마름병, 토마토 잿빛곰팡이병, 토마토 역병, 밀 붉은녹병 및 보리 휘가루병 등의 8가지 식물병에 대하여 *in vivo* 항균활성을 조사하였다. 접종 1일 전 예방효과로 검정하였고, 각각의 실험에 사용되는 식물들은 온실(25±5°C)에서 키웠다.

오이 탄저병은 2엽기 유묘에 *C. orbiculare* 포자 현탁액

(1×10^6 포자/*ml*)을 분무하여 접종한 후, 2일간 습실상에서 발병시킨 후 3일간 25°C 항온·항습실에 두었다. 고추 탄저병의 경우 최아된 고추 종자를 지름 7.0 cm의 포트에 파종한 후 첫번째 가지가 나오는 시점까지 온실에서 키운 후 약제를 엽면 살포하였다. 24시간 상온에서 건조한 후 고추 탄저병원균인 *C. coccodes*의 포자 현탁액(1×10^6 포자/*ml*)을 분무 처리하였다. 습실상에서 2일간 발병시킨 후 25°C 항온·항습실에 2일간 두었다. 고추 탄저병과 오이 탄저병은 각각 접종 4일과 5일 후에 병반면적율을 조사하였다. 다른 6가지 식물병, 즉 벼 도열병, 벼 잎집무늬마름병, 토마토 잿빛곰팡이병, 토마토 역병, 밀 붉은녹병 및 보리 흰가루병 등에 대한 *in vivo* 항균활성 조사 방법은 전보(Kim *et al.*, 2001)에 잘 묘사되어 있다.

각 병원균들에 대해 잘 알려져 있는 화학약제들을 대조약제로 사용하여 pyrrolnitrin과의 비교 실험을 실시하였는데, 각각의 대조약제로는 탄저병은 dithianon, 벼 도열병(*Magnaporthe grisea*)에는 blasticidin-S, 벼 잎집무늬마름병(*Corticium sasaki*)에는 validamycin, 토마토 잿빛곰팡이병(*Botrytis cinerea*)에는 fludioxonil, 토마토 역병(*Phytophthora infestans*)에는 metalaxyl, 밀 붉은녹병(*Puccinia recondita*)에는 mancozeb, 보리 흰가루병(*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*)에는 benomyl을 사용하였다. Pyrrolnitrin과 대조약제들은 100, 33.3, 11.1, 3.70, 1.23, 0.41 μg/*ml* 등 6가지 농도로 처리하였고, 무처리구로는 5% MeOH이 첨가된 250 μg/*ml*의 Tween 20 용액을 사용하였다. 이들은 모두 병원균 접종 1일 전에 유묘에 처리하였다.

결과 및 고찰

EB215 균주의 동정

EB215 균주는 그람 음성균이며 모양은 rod형이었고, catalase와 oxidase 반응은 모두 양성이었다. 전분은 분해하지 못했으나 casein, gelatin 및 lipid는 분해하였다. Biolog실험을 수행한 결과 탄소원으로 tween 40, tween 80, N-acetyl-D-glucosamine, adinitol, D-fructose, D-galactose, α-D-glucose, m-inositol, D-mannitol, D-mannose, D-sorbitol, sucrose, mono-methyl succinate, acetic acid, cis-aconitic acid, citric acid, formic acid, β-hydroxy butyric acid, α-keto butyric acid, α-keto valeric acid, D,L-lactic acid, malonic acid, quinic acid, D-saccaric acid, sebacic acid, bromo succinic acid, alanin-amide, D-alanine, L-alanine, L-asparagine, L-glutamic acid, L-histidine, hydroxy-L-proline, L-phenylalanine, L-proline, L-pyroglutamic acid, D-serine, L-serine, γ-amino butyric acid, urocanic acid 및 glucose-6-phosphate 등은 이용하였다. 그러나 α-cyclodextrin, N-acetyl-D-galactosamine, L-arabinose, cellobiose, D-melibiose, L-rhamnose, D-trehalose, turanose, xylitol, D-galactonic acid lactone, D-glucosamic acid, γ-hydroxy butyric acid, p-hydroxy phenylacetic acid, itaconic acid, glucuron amide, glycyl-L-aspartic acid, glycyl-L-glutamic acid, L-leucine, L-ornithine, L-threonine, inosine, uridine 및 putrescine 등은 이용하지 못하였다. Biolog 실험 결과 EB215 균주는 *B. cepacia*와 유사성이 높은 것으로 나타났다. 정확한 동정을 위하여 16S rDNA sequencing을 실시한 결과, EB215 균주는 *B. cepacia*로 동정되었다.

*B. cepacia*는 예전에는 *Pseudomonas cepacia*로 분류된 세균으로서 *Pseudomonas*속과 *Burkholderia*속에 속하는 여러 세균들이 생물농약으로서 이용되고 있다. The BioPesticide Manual(1st edition)(Copping, 1998)에 의하면 *Psudomonas chloraphis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas syringe* 및 *B. cepacia* 등이 미생물살균제로서 상용화되어 판매되고 있다. 이 두 가지 속에 속하는 세균은 다양한 항균물질을 생성하는 것으로 알려져 있으며(Leisinger and Margraff, 1979), 많은 경우에 항균물질이 생물농약으로서의 활성과 직접적으로 관련되어 있는 것으로 알려져 있다(Dowling and O'Gara, 1994).

최적 배지 선발

항균물질 생산을 위한 최적 배지 선정을 위하여 NB 배지를 비롯한 8가지 배지에 배양한 후 탄저병균인 *C. acutatum*에 대하여 항균활성을 조사한 결과 Table 1에서와 같이 나타났다. 배양 기간이 72시간일 때 가장 항균활성이 높게 나타났으며, 또한 NB 배지에 배양할 때 가장 항균활성을 높은 것으로 나타났다. 따라서 이후 항균물질의 분리 및 정제를 위해서 NB 배지에 접종하여 3일간 진탕배양하였다.

Burkholderia cepacia EB215로부터 항균물질의 분리 및 구조 동정

B. cepacia EB215 균주의 배양 상등액으로부터 원심분리, *n*-hexane 분획, silica gel column chromatography 및 preparative TLC 등을 통하여 26.8 mg의 EB215 compound를 순수 분리하였다. 이 물질의 순도를 알아보기 위하여 HPLC 분석을 실시한 결과 순수한 것으로 나타났다. EB215 물질의 UV maxima는 214 nm와 252 nm였다. 이 물질의 구조 결정을 위하여 질량분석 및 핵자기공명분석을 실시하였다. EB215 compound를 electron impact(EI) mode로 질량분석을 실시한 결과 Fig. 2에서와 같이 분자이온(M^+)이 *m/z* 256에서 나타났고, $[M+2]^+$ ion이 *m/z* 258에서, $[M+4]^+$ ion이 *m/z* 260에서 나타나 분자 구조 내에 chloride 원소가 2개 존재함을 알 수 있었다. EI-mass spectrum을 가지고 library search를 실시한 결과 EB215 compound는 pyrrolnitrin, 즉 3-chloro-4-(2'-nitro-3-chlorophenyl)-pyrrole(Fig. 3)로 나타났다. 이 물질의 정확한 구

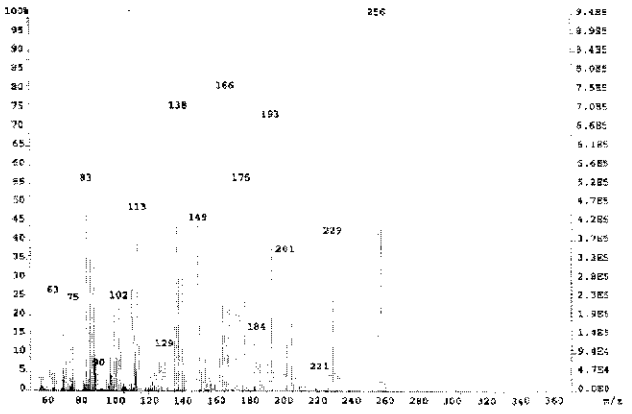

Fig. 2. Low-resolution mass spectrum of EB215 compound obtained by positive ion EI mode at 70 eV. The molecular ion is *m/z* 256.

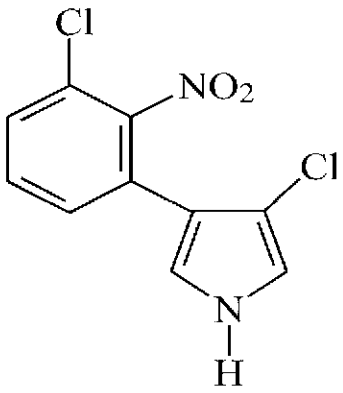

Fig. 3. Chemical structure of pyrrolnitrin.

조 동정을 위하여 ^{1}H-NMR 스펙트럼을 얻었는데 pyrronitrin과 일치하는 것으로 나타나, EB215 compound는 pyrrolnitrin으로 동정되었다.

Pyrrolnitrin은 *B. capacia*에서 생산되는 주요 이차 대사산물 중의 하나이다. Pyrrolnitrin은 많은 종류의 *Pseudomonas*속 균들(Arima *et al.*, 1964; Hamill *et al.*, 1967) 뿐만 아니라 *Myxococcus*속(Gerth *et al.*, 1982) 및 *Enterobacter agglomerans*(Chernin *et al.*, 1996)에 의해서도 생산된다. *B. cepacia*은 pyrrolnitrin 외에도 cepaciamide A(Jiao *et al.*, 1996), cepacidine A(Lee *et al.*, 1994) 및 xylocandin complex(Meyers *et al.*, 1987) 등을 생산하는 것으로 알려져 있다. 이들 항균물질들은 식물병원균에 대한 길항작용과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 *B. cepacia* EB215 균주의 탄저병에 대한 길항작용도 주로 pyrrolnitrin에 의해 발현되는 것으로 추정된다.

Pyrrolnitrin의 *In vivo* 항균활성

B. cepacia EB215균으로부터 분리한 pyrrolnitrin의 여러 가지 식물병원균에 대한 *in vivo* 항진균활성을 조사하기 위하여 고추 탄저병, 오이 탄저병, 벼 도열병, 벼 잎집무늬마름병, 토마토 잿빛곰팡이병, 토마토 역병, 밀 붉은녹병 및 보리 흰가루병 등 8가지 식물병에 대하여 대조약제와 비교하여 실험을 실시하였다. 그 결과 pyrrolnitrin은 고추 탄저병에 대하여 11.1 $\mu g/ml$ 이상의 농도에서 90% 이상의 방제효과를 나타내었으며, 저농도인 1.23 $\mu g/ml$ 이하의 농도에서는 거의 활성이 없었다(Fig. 4A). 오이 탄저병에 대한 항균활성에서는 고추 탄저병에 대한 효과와 거의 비슷하게 나타났으며, 11.1 $\mu g/ml$ 이상의 농도에서 90% 이상의 방제활성을 보였고 1.23 $\mu g/ml$ 이하의 농도에서는 고추 탄저병에 비해 좀 더 나은 활성을 보였다(Fig. 4B). 고추 탄저병과 오이 탄저병의 대조 약제인 benomyl과 비교하였을 때 높은 농도에서는 비슷한 효과를, 낮은 농도에서는 더 우수한 효과를 보여 주었다.

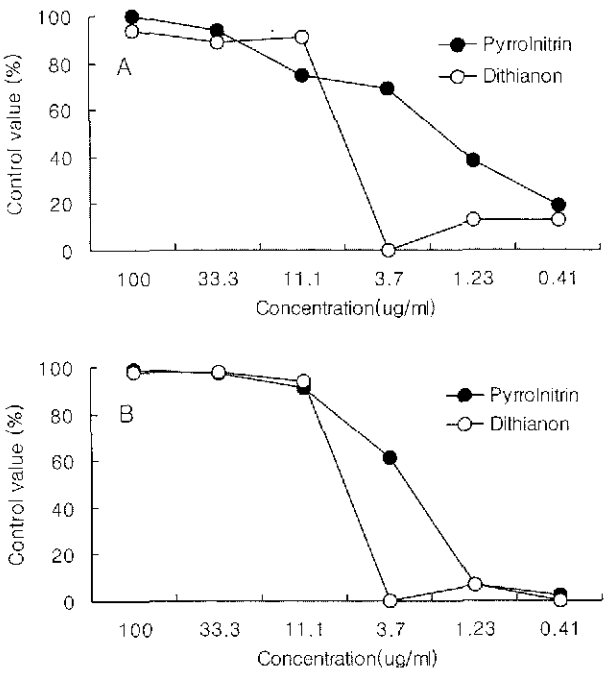

Fig. 4. *In vivo* antifungal activity of pyrrolnitrin against pepper anthracnose (A) and cucumber anthracnose (B).

한편, 벼 도열병(Fig. 5A)과 벼 잎집무늬마름병(Fig. 5B)에 대해서는 3.7 $\mu g/ml$ 이상의 농도에서 90% 이상의 방제활성을 보였다. 각각의 대조 약제들과 비교할 경우 벼 도열병에서는 blasticidin-S보다 더 나은 방제활성을, 벼 잎집무늬마름병에서는 validamycin과 비슷한 방제활성을 보여주었다. 토마토 잿빛곰팡이병(Fig. 6A)과 밀 붉은녹병(Fig. 6B)에 대해서는 33.3 $\mu g/ml$의 농도 이상에서는 90% 이상의 방제활성을 보여 주었다. 토마토 잿빛곰팡이병의 대조약제인 fludioxonil과 밀 붉은녹병의 대조약제인 mancozeb과 비교하였을 때는 33 $\mu g/ml$의 고농도에서는 비슷한 효과를 보였지만 낮은 농도에서는 대조 약제보다 더 낮은 방제활성을 나타냈었다. 보리 흰가루병에 대해서는 100 $\mu g/ml$에서 50%, 33.3 $\mu g/ml$에서 42%의 방제 효

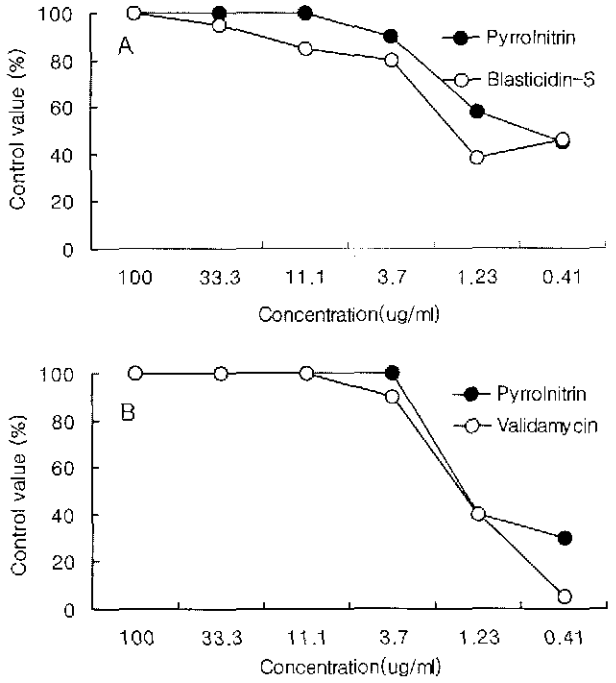

Fig. 5. *In vivo* antifungal activity of pyrrolnitrin against rice blast (A) and rice sheath blight (B).

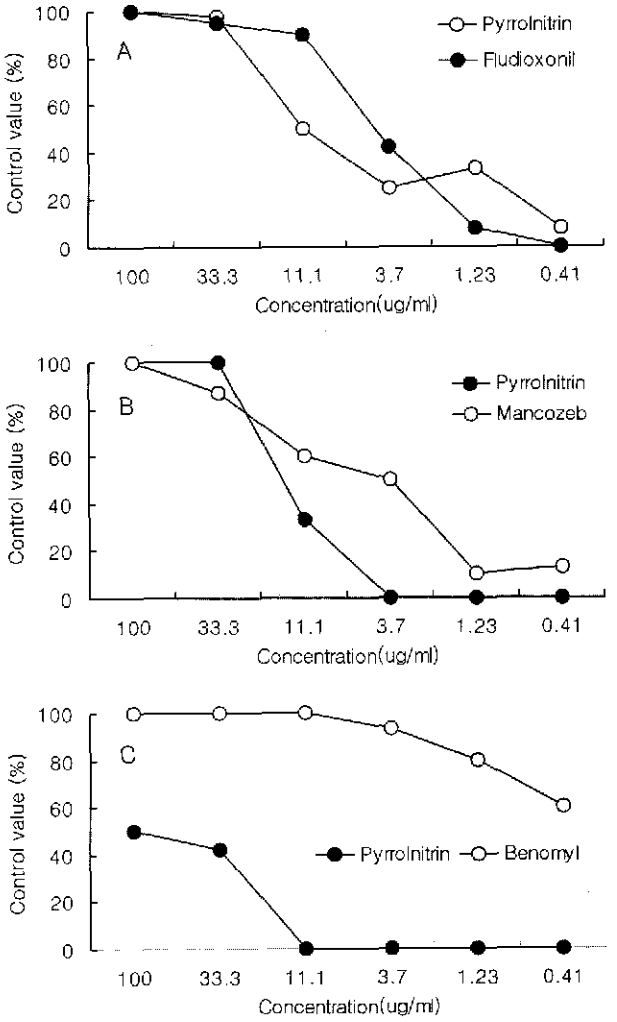

Fig. 6. *In vivo* antifungal activity of pyrrolnitrin against tomato gray mold (A), wheat leaf rust (B) and barley powdery mildew (C).

과를 보여 다른 병들에 비해 *in vivo* 항균활성이 낮았으며, 이는 대조 약제인 benomyl의 효과에 훨씬 미치지 못하였다(Fig. 6C). 토마토 역병에 대해서는 100 $\mu g/ml$ 이상의 높은 농도에서도 항균활성이 거의 없었다(데이타 제시 않음.).

이상의 실험 결과 pyrrolnitrin은 고추 탄저병, 오이 탄저병, 벼 도열병 및 벼 잎집무늬마름병에 대해서는 대조 약제와 유사하거나 더 나은 항균활성을 보였고, 토마토 잿빛곰팡이병과 밀 붉은녹병에는 대조 약제보다 약했지만 비교적 높은 항균활성을 보였다. *B. graminis* f. sp. *hordei*에 의한 보리 흰가루병에 대해서는 약한 항균활성을 보였다. 그러나 Oomycetes에 속하는 *P. infestans*에 의한 토마토 역병에 대해서는 전혀 항균활성이 없는 것으로 나타났다. Oomycetes에 속하는 균들은 이른 바 higher fungi라고 일컬어지는 불완전균류, 자낭균류 및 담자균류들과는 진화 과정이 달라 일반적으로 higher fungi에 약효가 있는 약제들은 Oomycetes균들에는 약효가 없는 것으로 알려져 있다. Pyrrolnitrin도 이와 마찬가지로 higher fungi에 속하는 다양한 식물병원균들에 대해서는 높은 활성을 보였지만, *P. infestans*와 같은 Oomycetes에는 활성이 적은 것으로 나타났다.

Pyrrolnitrin은 *Rhizoctonia*속이나 *Fusarium*속에 의한 모잘록병 뿐만 아니라(Homma and Suzui, 1989) 푸른곰팡이병과 *Botrytis*속에 의한 잿빛곰팡이병에 대해서도 높은 활성을 지니고 있는 것으로 알려져 있다(Janisiewicz and Roitman, 1988). 또한 pyrrolnitrin은 *in vitro*에서 *Paecilomyces variotii*와 *Penicillum*속 등의 곰팡이와 *Bacillus*속과 *Streptomyces*속 등 그람양성세균에 대해서도 항균활성이 있는 것으로 보고 되었다(El-Banna and Winkelmann, 1998). 그러나 저자들이 아는 한 오이와 고추 탄저병, 벼 도열병, 벼 잎집무늬마름병 및 밀 붉은녹병 등에 대하여 *in vivo*에서 높은 활성을 보인다는 것은 본 논문에서 처음으로 보고하는 것이다. 이와 같이 pyrrolnitrin은 *in vitro*에서 뿐만 아니라 *in vivo*에서도 고추와 오이 탄저병을 비롯한 여러 가지 식물병에 대하여 높은 항균활성을 보이므로 pyrrolnitrin을 생산하는 *B. cepacia* EB215의 미생물 살균제로서의 이용가능성에 대하여 지속적으로 연구를 진행할 예정이다. *B. cepacia* EB215균은 특히 식물내생세균으로서 식물체내에서 잘 생육하는지에 대하여 추가적인 연구가 진행되어야 하겠지만 식물체내에 안정적으로 정착할 경우에는 지속적으로 pyrrolnitrin을 생성할 것으로 기대되어 식물생육 전 단계에 걸쳐 식물

병원균의 침입을 효과적으로 억제할 수 있을 것으로 추정된다.

적 요

오이 뿌리조직으로부터 분리한 식물내생세균 EB215균은 탄저병균인 *Colletotrichum* species에 대하여 강한 항균활성을 보였다. 이 균은 생리 생화학적 특성과 Biolog 실험 및 16S rDNA 유전자 서열에 의해 *Burkholderia cepacia*로 동정되었다. 이 균의 항균물질 생산을 위한 최적배지는 nutrient 액체(NB) 배지로 그리고 배양기간은 3일로 결정되었다. *B. cepacia* EB215 균주의 NB 배양체로부터 원심분리, *n*-hexane 분획, silica gel 컬럼, preparative TLC 및 *in vitro* 생물검정 등을 통하여 한개의 항균물질을 분리하였다. 이 물질은 질량분석과 핵자기공명분석을 통하여 pyrrolnitrin으로 동정되었다. Pyrrolnitrin은 고추 탄저병(*Colletotrichum coccodes*), 오이 탄저병(*Colletotrichum orbiculare*), 벼 도열병(*Magnaporthe grisea*), 벼 잎집무늬마름병(*Corticium sasaki*) 등의 4가지 식물병에는 11.1 $\mu g/ml$ 낮은 농도에서도 90% 이상의 높은 방제활성을 보였다. 그리고 또한 토마토 잿빛곰팡이병(*Botrytis cinerea*)과 밀 붉은녹병(*Puccinia recondita*)에 대해서는 33.3 $\mu g/ml$ 이상의 농도에서 90% 이상의 방제활성 보였다. 하지만 *Phytophthora infestans*에 의한 토마토 역병에 대해서는 전혀 항균활성이 없었다. 앞으로 *B. cepacia* EB215균을 이용한 미생물살균제 개발에 대한 연구를 진행할 예정이다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업의 지원에 의해 이루어진 것이기에 이에 감사를 드립니다.

참고문헌

박지현. 2004. 식물내생세균 *Burkholderia cepacia* EB215로부터 분리한 항균물질의 특성 규명. 경상대학교 석사학위 논문. 진주시.

Arima, K., Imanaka, H., Kousaka, M., Fukuta, A. and Tamura, G. 1964. Pyrrolnitrin, a new antibiotic substance, produced by *Pseudomonas*. *Agr. Biol. Chem.* **28**: 575-576.

Bailey, J. A., O'Connell, R. J., Pring, R. J. and Nash, C. 1992. Infection strategies of *Colletotricum* species. Pp 88-120. *In* : Bailey, J. A. and Jeger, M. J. Eds. *Colletotricum*: Biology, Pathology and Control. CABI, Wallingford, UK.

Baker, C. J., Stavely, J. R., Thomas, C. A., Sasser, M. and MacFall, J. S. 1983. Inhibition effect of *Bacillus subtilis* on *Uromyces phaseoli* and on development of rust pustules on bean leaves. *Phytopathology* **73**: 1148-1152.

Bashan, Y., Ream, Y., Levanony, H. and Sade, A. 1989. Nonspecific response in plant growth, yield, and root colonization of noncereal crop plants to inoculation with *Azospirillum brasilense* Cd. *Can. J. Bot.* **67**: 1317-1324.

Chernin, L., Brandis, A., Ismailov, Z. and Chet, I. 1996. Pyrrolnitrin production by an *Enterobacter agglomerans* strain with a broad spectrum of antagonistic activity towards fungal and bacterial phytopathogens. *Curr. Microbiol.* **32**: 205-212.

Copping, L. G. 1998. The BioPesticide Manual, 1st Edition. The British Crop Protection Council, Farnham, Surrey, UK. 333 pp.

Dowling, D. N. and O'Gara, F. 1994. Metabolites of pseudomonads involved in the biocontrol of plant disease. *Trends Biotechnol.* **12**: 133-140.

El-Banna, N. and Winkelmann, G. 1998. Pyrrolnitrin from *Burkholderia cepacia*: antibiotic activity against fungal and novel activities against streptomycetes. *J. Appl. Microbiol.* **85**: 69-78.

Elmer, W. H., Yang, H. A. and Sweetingham, M. W. 2001. Characterization of *Colletotricum gloeosporioides* isolates from ornamental lupines in *Connecticut*. *Plant Dis.* **85**: 216-219.

Gardner, J. M., Feldman, A. F. and Zablotowicz, R. M. 1982. Identity and behavior of xylem-residing bacteria in rough lemon roots of Florida citrus trees. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**: 1335-1342.

Gerth, K., Trowitzsch, W., Wray, V., Höfle, G., Irschik, H. and Reichenbach, H. 1982. Pyrrolnitrin from *Myxococcus fulvus* (Myxobacterales). *J. Antibiotics* **35**: 1101-1103.

Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W. F. and Kloepper, J. W. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.* **43**: 895-914.

Hamill, R., Elander, R., Mabe, J. and Gorman, M. 1967. Metabolism of tryptophan by *Pseudomonas aureofaciens*. V. Conversion of trytophan to pyrrolnitrin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1967**: 388-396.

Homma, Y. and Suzui, T. 1989. Role of antibiotic production in suppression of radish damping-off by seed bacterization with *Pseudomonas cepacia*. *Annals Phytopathol. Soc. Japan* **55**: 643-652.

Janisiewicz, W. and Roitman, J. 1988. Biological control of blue mold and gray mold on apple and pear with *Pseudomonas cepacia*. *Phytopathology* **78**: 1697-1700.

Jiao, Y., Yoshihara, T., Ishikuri, S., Uchino, H. and Ichihara, A. 1996. Structural identification of cepaciamide A, a novel fungitoxic compound from *Pseudomonas cepacia* D-202. *Tetrahedron Lett.* **37**: 1039-1042.

John, G. H., Krieg, N. R. and Sneath, P. H. A. 1994. Bergey's Menual of Determinative Bacteriology, 9th ed., Williams and Wilkins, Baltimore, USA.

Katz, E. and Demain, A. 1977. The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis and possible functions. *Bacteriol. Rev.* **41**: 449-475.

Kim, J.-C., Choi, G. J., Lee, S.-W., Kim, J.-S., Chung, K. S. and Cho, K. Y. 2004. Screening extracts of *Achyranthes japonica* and *Rumex crispus* for activity against various plant pathogenic fungi and control of powdery mildew. *Pest Manag. Sci.* (In press).

_____, _____, Park, J.-H., Kim, H. T. and Cho, K. Y. 2001. Activity against plant pathogenic fungi of phomalactone isolated from *Nigrospora sphaerica*. *Pest Manag. Sci.* **57**: 554-559.

Kobayashi, D. Y. and Palumbo, J. D. 2000. Bacterial endophytes and their effect on plants and uses in agriculture. Pp 199-233. *In*: Bacon, C. W. and White, J. F. Eds. Microbial endophytes

Marcel Dekker, Inc., New York, USA.

Lange, L., Breinholt, J., Rasmussen, F. W. and Nielsen, R. I. 1993. Microbial fungicides-the natural choice. *Pestic. Sci.* **39**: 155-160.

Lee, G. H., Kim, S., Hyun, B. and Suh, J.-W. 1994. Cepacidine A, a novel antifungal antibiotic produced by *Pseudomonas cepacia*. I. Taxonomy, production, isolation, and biological activity. *J. Antibiotics* **47**: 1402-1405.

Leisinger, T. and Margaff, R. 1979. Secondary metabolites of the fluorescent pseudomonads. *Microbiol. Rev.* **43**: 422-442.

McInroy, J. A. and Kloepper, J. W. 1995. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotten and sweet corn. *Plant Soil* **173**: 337-342.

Meyers, E., Bisacchi, G. S. and Dean, L. 1987. Xylocandin: a new complex of antifungal peptide. I. Taxanomy, isolation and biological activity. *J. Antibiotics* **21**: 1515-1519.

Mundt, J. O. and Hinkle, N. F. 1976. Bacteria within ovules and seeds. *Appl. Eniron. Microbiol.* **32**: 694-698.

Nowak, J., Asiedu, S. K., Lazarovits, G., Pillay, V., Stewart, A., Smith, C. and Liu, Z. 1995. Enhancement of *in vitro* growth and transplant stress tolerance of potato and vegetable plantlets co-cultured with a plant growth promoting pseudomonad bacterium. Pp 173-179. *In*: Carre, F. and Changvardieff, P. Eds. Ecophysiology and photosynthetic *in vitro* cultures. Commissariat a l'energie atomique. France.

Parker, W. L., Rathnum, M. L., Seiner, V., Trejo, W. H., Principe, P. A. and Sykes, R. B. 1984. Cepacin A and cepacin B, two antibiotics produced by *Pseudomonas cepacia*. *J. Antibiotics* **37**: 431-440.

Porter, N. and Fox, F. M. 1993. Diversity of microbial products-discovery and application. *Pestic. Sci.* **39**: 161-168.

Powel, K. A. and Jutsum, A. R. 1993. Technical and commercial aspects of biocontrol products. *Pestic. Sci.* **37**: 315-321.

Sturz, A. V. 1995. The role of endophytic bacteria during seed piece decay and potato tuberization. *Plant Soil* **175**: 257-263.