

Colletotrichum orbiculare에 대한 길항세균 Pseudomonas aurantiaca YC4963의 분리 동정 및 항균물질 Phenazine-1-carboxylic acid의 생산

채희정 · 김루미 · 문석식¹ · 안종용² · 정영륜*

*경상대학교 응용생명과학부, 기초과학연구소, ¹공주대학교 화학과, ²한국해양대학교 해양과학부

경남 지역의 근권 토양 및 식물뿌리에서 다양한 길항세균을 분리하여 오이 탄저병원균 *Colletotrichum orbiculare*에 대한 길항효과를 조사하였다. 그 중 국화과에 속하는 털진득찰 (*Siegesbeckia pubescens* Makino) 뿌리에서 분리된 YC4963 균주가 병원균의 균사 생장에 대한 억제 능력이 가장 우수하였으며, 배양 상등액을 이용한 *in vitro* 실험에서도 *C. orbiculare*의 발아관 형성과 균사 생장을 억제하였다. 이 균은 Gram 음성과 양성세균에 대해서도 억제 능력이 있었으며, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* 등의 다양한 식물병원균에 대해서도 억제 능력이 좋았다. 이 균주의 형태, 생리·화학적 특성과 분자생물학적 특성을 조사한 결과 *Pseudomonas aurantiaca*로 동정되었다. 이 길항세균이 분비하는 항생물질의 구조결정을 위하여 대량 배양 후 물질 분리와 여러 종류의 크로마토그래피를 수행하였다. 분리 정제하여 얻은 순수 물질은 노란색 바늘 모양의 결정체이었고, 질량 분석, FT-IR spectrum 분석 및 NMR spectrum 분석을 바탕으로 구조를 추정한 결과 phenazine-1-carboxylic acid로 확인되었다. 이 항생물질의 활성을 조사하기 위하여 농도를 달리하여 *C. orbiculare*의 발아관 및 부착기 형성을 조사한 결과, 처리 18시간 후 발아관 생장은 103 μm 로 대조구의 798 μm 보다 8배 정도 억제되었으나 발아관과 부착기 형성비율은 큰 차이가 없었다. *P. aurantiaca*에 의한 phenazine-1-carboxylic acid의 생산과 이 항생물질에 의한 탄저균의 억제효과는 본 연구에서 처음 보고되는 것이다.

Key words □ anthracnose, *Colletotrichum orbiculare*, phenazine-1-carboxylic acid, *Pseudomonas aurantiaca*

식물의 탄저병원균인 *Colletotrichum* sp.는 불완전균에 속하는 중요한 식물병원진균으로 채소 및 과수 등 다양한 식물에 병을 일으켜 생산에 많은 피해를 일으킨다(1). 중요한 탄저병원균으로 *C. gloeosporioides*, *C. coccodes*, *C. acutatum*, *C. dematium*과 *C. orbiculare* 등이 있으며, 일부는 완전 세대가 *Glomerella* spp.로 밝혀진 바 있다(16).

이 중에서 *C. orbiculare*에 의한 오이, 참외 등 외과 작물의 탄저병은 세계적으로 가장 피해가 심한 병으로서 오이탄저병은 주로 잎, 줄기, 과일에 발생하는데, 6-9월 경 노지재배에서 발생이 많으며 과일의 경우 다 익어갈 때 가장 쉽게 발병된다. 이 병의 방제는 주로 합성 화학 살균제에 의존하고 있으나, 최근 생태계 파괴, 환경오염 및 인축 독성 문제와 약제 저항성 발생으로 방제 효과가 낮아지는 등 여러 문제점이 제기되고 있다(11, 19).

이러한 화학 살균제의 문제점을 해결할 수 있는 방법의 하나로 최근 길항 미생물을 이용한 생물학적 방제 연구가 여러 연구자에 의해 진행되고 있다. 이 중에서도 *Pseudomonas* spp.는 탄저병을 포함한 작물의 모잘록병이나 시들음병 등을 억제하는 길항세균으로 사상균에 높은 활성을 나타낸다고 알려져 있다(3, 5, 8, 13). 특히, *Pseudomonas* spp.가 생산하는 항생물질에 대해 많은 연구가 진행되어 왔는데, 현재 구조가 확인된 항생물질로는

2,4-diacetylphloroglucinol(14), phenazine(9, 12, 17, 18), pyoluteorin(19), rhamnolipids(10), pyrrolnitrin(3) 등이 있다. 이외에 siderophore를 생산함으로써 뿌리표면의 철분과 결합하여 유해세균의 생장을 억제하고 chitinase분비로 병원균 세포벽을 용해한다고 알려져 있다(19). 이러한 작용기작을 가진 *Pseudomonas* spp. 중 현재 다른 병원균의 생물학적 방제제로 개발되어 사용되고 있는 대표적인 균주로는 *P. cepacia* (*Burkholderia cepacia*), *P. putida*, *P. fluorescens* 등이 있다(19).

본 연구에서는 오이탄저병원균 *C. orbiculare*에 대하여 억제 능력이 있는 길항 세균을 다양한 식물 뿌리에서 분리하였고, 그 중에서 가장 활성이 우수한 균주를 선발, 동정하였다. 또한, 이 길항세균이 생산하는 항생물질의 오이탄저병원균에 대한 억제효과를 조사하였으며, 그 화학구조를 결정하였다.

재료 및 방법

병원균 및 길항세균의 분리

오이탄저병원균인 *C. orbiculare*는 고려대학교 생명환경과학대학 식물병리학연구실에서 분리하여 보관 중인 균주를 분양 받아 실험에 사용하였다. 이 균주의 병원성을 높게 유지하기 위하여 병균 접종 후 오이잎 병반으로부터 병원균을 재분리하여 감자포도 당찬천(PDA)배지에 배양하면서 사용하였다. 병균 분리를 위하여 멸균된 갈로 이병된 부위를 가로, 세로 5 mm 크기로 잘라 1%

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 055-751-5945, Fax: 055-759-0187
E-mail: yrchung@gnsu.ac.kr

NaOCl 용액에 1분간 침지한 후 ethanol에 살짝 담귀 표면 살균한 다음 살균 증류수에서 헹구어 filter paper에 올려 잠깐 말렸다. 이 조각을 ampicillin과 tetracycline을 각각 50 µg/ml 함유한 PDA 배지에 올려 28°C에서 7일간 배양하였다. 자라난 포자와 균사를 광학현미경 아래에서 관찰하고 전형적인 *C. orbiculare* (50610)의 형태임을 확인한 후 분리하여 사용하였다.

길항세균은 경상남도 진주 근교에서 채집한 다양한 식물의 뿌리에서 분리하였다. 채취된 식물 뿌리 5g을 수돗물로 깨끗이 세척하고 1% NaOCl로 1분간 표면 살균을 한 후, 멸균수 45 ml을 첨가하여 막자사발로 잘 마쇄한 뒤, 이 중 1 ml을 취하여 10⁵배까지 희석하였다. 희석액 0.1 ml를 0.1TSA(Tryptic soy agar, Difco) 배지 상에 도말한 후 30°C에서 3일간 둔 후 생겨난 균 집락을 분리하였다. 순수 분리된 세균의 길항력 조사는 PDA배지와 0.1TSA 배지에서 *C. orbiculare*와 각각 대칭 배양 방법에 의해 수행하였으며, 균사생장 억제력이 높은 균주를 선발하였다.

분리한 길항세균의 특성조사 및 동정

선발된 길항세균은 생리·생화학적 특성과 분자생물학적 특성(16S rDNA)을 조사하여 동정하였다. 형태학적, 생리·생화학적 실험은 'Manual of method for general bacteriology'(15)와 'Chemical methods in prokaryotic systematics'(7)의 방법을 이용하였다. 중요 생리·생화학적 특성을 조사하기 위해 API (Analytic Profile Index) ID 32E kit (bioMerieux, Marcy-l'Etoile, France)를 사용하였다.

16S rDNA 염기 서열 분석을 위해 2개의 oligonucleotide primers' 5'-TATGGATCCTTCTACGGAGAGTTTGATCC-3'와 5'-TATGGA TCCCACCTTCCGGTACGGCTACC-3'(밀줄 BamHI site)를 합성하여 확립된 방법을 이용하였다(4).

PCR 반응은 94°C, 56°C, 72°C로 각 1분씩 반응 시켰으며, 증폭된 PCR 산물은 BamHI으로 잘라 pBluescriptII SK(+) vector의 같은 자리에 연결하였고 삽입된 DNA를 exonucleaseIII 분해를 통하여 증폭된 subclone을 만들었다. 이들 clone을 염기서열 자동분석기(ABI)를 사용하여 염기서열을 결정 하였으며, GenBank AY839234로 제출되었다. 결정된 16S rDNA 염기서열간의 유사도는 NCBI의 GeneBank와 EMBL의 database의 16S rDNA 염기서열을 비교하여 결정하였다.

길항세균의 항균활성 범위 및 오이탄저병원균 생장억제 조사

길항세균 *Pseudomonas aurantiaca* YC4963의 항진균 및 세균 억제 범위를 알기 위하여 본 실험실에서 분리, 동정하여 소유하고 있는 주요 식물 병원균 7종류와 세균 4종류를 대상으로 억제 실험을 수행하였다. 사용 진균은 *R. solani* 50304, *B. cinerea* 50002, *C. orbiculare* 50610, *C. gloeosporioides* 50605, *C. coccodes* 50603, *F. oxysporum* 50456, *Pythium ultimum* 50651과 세균으로는 *Pseudomonas aeruginosa* KCTC 2004, *Enterobacter pyrinus* KCTC 2520, *Escherichia coli* KCTC 1923, *Bacillus subtilis* YC 5292 이었다. 병원 진균 억제 실험은 PDA 배지와 0.1TSA

배지의 가운데에 병원균의 균사 절편 (직경 5 mm)을 접종하고 이로부터 20 mm 떨어진 곳에 길항세균 현탁액 50 µl을 떨어뜨린 멸균된 paper disc (직경 8 mm)를 올려서 28°C에서 5일간 배양 후 억제 정도를 조사하였다. *B. cinerea*는 20°C에서 5일간 배양 후 그 억제 정도를 조사하였다. 세균 억제 실험은 대상 세균을 3 ml 0.5TSB (Tryptic soy broth, Difco)를 넣은 시험관에 접종하여 하룻밤 진탕 배양시킨 후 0.1TSA 배지에 10²~10³배로 희석하여 100 µl를 도말한 후 길항세균도 위와 같은 방법으로 동시 접종하고 28°C에서 2일간 배양 후 억제된 거리를 측정하였다.

오이탄저병원균의 균사 생장억제 조사를 위하여 PDA에 배양한 *C. orbiculare*의 포자 현탁액(10⁶포자/ml) 50 µl와 멸균된 증류수 및 길항세균 배양액 200 µl를 10 well-glass plate에 섞어 넣고 접종시간 (6, 12, 18시간) 별로 발아관형성, 흡착기형성 및 균사 생장억제 정도를 조사하였다.

항생물질의 추출 및 구조 결정

동정한 *P. aurantiaca* YC4963 균주의 항생물질 생성 배지는 M523 broth (sucrose 1.0 g, casamino acid 8.0 g, yeast extract 4.0 g, MgSO₄ 0.3 g/ 1 L D.W.)을 이용하였고, 2 L 삼각플라스크에 배지 500 ml를 넣고 살균 뒤 하룻밤 진탕배양한 세균 현탁액 10 ml를 접종하여 28°C, 160 rpm에서 48시간동안 진탕배양을 하였다. 배양액에 흡착수지(Amberlite XAD-7)를 처리하여 활성물질을 흡착시킨 후 원심분리(10,000rpm, 4°C, 10분)하여 균체와 흡착수지를 모은 다음 acetone으로 추출하여 감압 농축하였다. 이 농축물을 silica gel에 흡착시켜 ethyl acetate-CH₂Cl₂를 용매계로 하여 단계적으로 극성용매의 비율을 높이면서 (10:90→90:10) column chromatography (φ3×30 cm)를 행하여 활성분획물을 얻은 후 이것을 다시 methanol-H₂O (90:10)의 용매계를 이용한 RP-18 column chromatography (φ1.5×30 cm)를 통해 정제하여 노란색 분말형태의 활성물질을 얻었다. 이것을 CH₂Cl₂에 녹인 후 재결정화를 시도한 결과 활성물질은 최종적으로 침상의 결정으로 순수분리 되었다. 이 과정에서 각 분획물의 화합물조성과 정제도 및 활성물질의 존재여부는 UV detector 및 anisaldehyde 발색시약을 이용한 TLC (Merck, silica gel 60F₂₅₄)로 확인하였고, 활성유무는 *C. orbiculare* (10⁶ conidia/ml)를 PDA배지에 도말한 후 각 분획물을 paper disc에 50 µl씩 올려 2일 후 그 억제정도를 측정하여 판정하였다. 정제된 활성물질의 UV spectrum은 methanol을 용매로 하여 UV265 분광광도계(Shimadzu, Japan)로 측정하였고, IR spectrum의 측정은 FTIR spectrometer (Mattson, USA)로 하였다. Mass의 측정은 OPUS data system이 장착된 질량분석기(Micromass, England)로 하였으며, COSY, DEPT, HMBC 및 HMQC를 포함한 각종 NMR spectrum은 UNITY500 NMR spectrometer (Varian, USA)를 사용하였다. 이때 내부 표준물질로는 tetramethyl silane (TMS)을 사용하였고 측정용매는 CD₃OD 이었다.

결과 및 고찰

우수 길항세균의 분리 동정 및 미생물 억제 효과

Table 1. Inhibitory activity of antagonistic bacteria isolated from various rhizosphere soils against *Colletotrichum orbiculare*

Isolate	Location	Host plants	Inhibition zone (mm) ^a	
			0. ITSA	PDA
YC4622	Jinju	<i>Vigna vexillata</i> var. <i>tsusimensis</i> Matsumura	NI ^b	1-2
YC4631	"	"	NI	2
YC4639	"	<i>Erigeron annuus</i> L.	NI	1-3
YC4671	"	-	NI	2
YC4963	"	<i>Siegesbeckia pubescens</i> Makino	8-10	6-10
YC4943	"	<i>Setaria viridi</i> (L.)P. Beauv	2-3	NI
YC4947	"	"	NI	1-2
YC4935	"	<i>Commelina communis</i> L.	5-6	NI
YC4807	Hadong	<i>Acalypha australis</i> L.	1-4	NI
YC4955	Jinju	"	3-4	1-2
YC4904	"	<i>Artemisia princeps</i> var. <i>orientalis</i> (Pamp) Hara	2	NI
YC5025	"	"	5-14	3-7

a.The inhibition of mycelial growth was determined by the confrontation bioassay on 0. ITSA and PDA 1-3 days after inoculation at 28°C.

b.NI: no inhibition

0. ITSA와 PDA배지에서 *C. orbiculare*와 대치 배양시 6-10 mm의 가장 넓은 저지대를 보인 YC4963 균주를 털진딧물의 뿌리에서 최종 선발하였다(Table 1). YC4963 균주는 Gram negative, 간균 형태로 catalase, oxidase test에서 모두 양성반응을 보였으며, API kit를 이용하여 화학적 특성을 조사한 결과 *Pseudomonas aureofaciens*와 98%의 일치율을 보였다(Table 2). 그러나, 16S rDNA 염기서열 분석 결과 *P. aurantiaca*와 99.7%의 일치율을 보였으며, 그 다음으로는 *P. aureofaciens*로 유사도는 99% 이었다(Fig. 1). 따라서 본 YC4963 균주를 *P. aurantiaca*로 동정하였다. *P. aurantiaca*는 비교적 최근에 동정된 균주로 현재까지 식물과 관련된 연구는 거의 없는 종류이다(2).

이 길항세균의 오이탄저병균 *C. orbiculare*와 그 외 진균 및 세균생장 억제 조사 결과는 Table 3과 같았는데, 그람 양성세균인 *B. subtilis*와 그람 음성세균인 *P. aeruginosa*의 생장을 평균 20 mm 정도로 억제하였다. 진균의 경우 탄저병균 중에서도 *C.*

Table 2. Biochemical responses of *Pseudomonas aurantiaca* YC4963 in API identification kit

substrate	reaction ^a
L-ornithine	-
L-arginine	-
L-lysine	-
urea	+
L-arabitol	-
galacturonic acid	-
potassium 5-ketogluconate	+
5-bromo-3-indoxyl-nonanoate	-
5-bromo-4-chloro-3-indolyl-N-acetyl-β-Dglucosaminide	-
4-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside	-
4-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside	-
4-nitrophenyl-β-D-glucuronide	-
4-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside	-
4-nitrophenyl-α-D-galactopyranoside	-
4-nitrophenyl-β-D-maltopyranoside	-
sodium malonate	-
sodium pyruvate	-
D-maltose	-
D-mannitol	-
D-glucose	-
D-saccharose(sucrose)	-
L-arabinose	-
D-arabitol	-
adonitol	-
palatinose	-
D-trehalose	-
D-rhamnose	-
inositol	-
D-cellobiose	-
D-sorbitol	-
L-tryptophan	-
L-aspartic acid 4-nitroanilide	-

a.Determined 24 hours after inoculation at 37°C. Tests were carried out using API ID 32E identification system.

+: Positive response; -: Negative response.

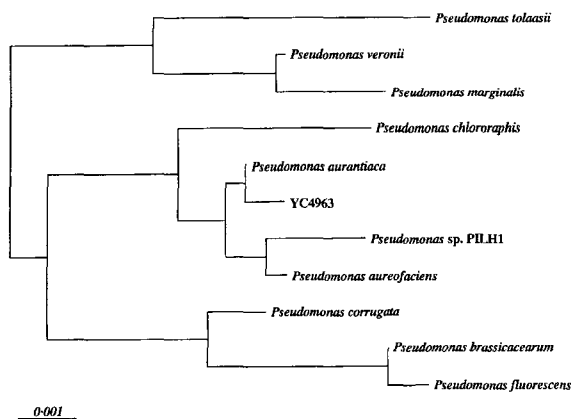


Fig. 1. Phylogenetic tree based on the 16S rRNA analysis of bacterial isolate YC4963 antagonistic to *Colletotrichum orbiculare*. The scale bar represents 0.001 nt substitutions per position.

Table 3. Antimicrobial spectrum of *Pseudomonas aurantiaca* YC4963

Microorganism	Inhibition zone (mm) ^a
Bacteria	
<i>Bacillus subtilis</i>	21-24
<i>Enterobacter pyrinus</i>	13-15
<i>Escherichia coli</i>	8-11
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23-25
Fungi	
<i>Colletotrichum orbiculare</i>	27-30
<i>Colletotrichum coccodes</i>	13-15
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	18-20
<i>Botrytis cinerea</i>	27-30
<i>Fusarium oxysporum</i>	25-27
<i>Pythium ultimum</i>	NI ^b
<i>Rhizoctonia solani</i>	13-15

a. The inhibition of mycelial growth was determined by the confrontation bioassay on PDA 1-3 days after inoculation at 28°C.

b. NI: no inhibition.

orbiculare, 잿빛곰팡이균 *B. cinerea*와 *F. oxysporum*는 평균 25 mm 이상의 생장 억제거리를 나타내었으나, *P. ultimum*은 억제되지 않았다.

현재까지 *Pseudomonas* spp. 중 탄저병균 *C. orbiculare*에 대하여 억제효과를 나타내는 종류는 *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *B. cepacia*가 알려져 있으나(11, 12), *P. aurantiaca*에 의한 억제효과는 본 연구결과가 처음이다.

***P. aurantiaca* YC4963에 의한 오이탄저병균의 억제**

YC4963 균주의 배양 상등액을 이용해 *C. orbiculare*의 분생포자 발아관 형성 억제를 실험하였다. 대조구인 살균수만 처리한 경우 18시간 후 발아관 길이가 798 µm 이었으나 YC4963의 상등액을 처리한 곳에서는 발아관이 거의 성장하지 않아 대조구보다 8배정도 작은 103 µm 정도로 대조구에 비해 1/8정도로 길이 생장이 억제되었다(Fig. 2). 부착기 형성은 처리 간에 비슷하였으나 상등액 처리구의 부착기 형태는 비정상적인 모습이었으며, 이는 탄저병균의 기주 침입시 영향을 줄 수 있을 것이다(6).

***P. aurantiaca* YC4963의 항생물질 추출 및 구조 결정**

YC4963 균주의 M523 배양액 (20L)에서 최종적으로 252 mg의 활성물질을 얻었다. 이 화합물의 구조결정을 위해 먼저 질량분석 실험을 통해 분자량이 224임을 알 수 있었고, UV spectrum 분석에서 λ_{max}가 212, 252, 366 nm임을 확인하였다. 또한 FT-IR spectrum을 통해 분자 내 -COOH (1740 cm⁻¹)를 가진 물질임을 알 수 있었고, ¹H-NMR spectrum의 분석결과 7개의 aromatic proton peak가 관찰되었다. ¹³C-NMR spectrum에서는 13개의 aromatic carbon peak가 검출되었고 DEPT 실험을 통해서 =CH 7개, 나머지 6개는 4급 탄소임을 알 수 있었다(자료 미제시). 이 자료를 바탕으로 구조를 유추한 결과 본 화합물은 phenazine-1-carboxylic acid로 확인되었으며(Fig. 3), *P. aurantiaca*에 의한

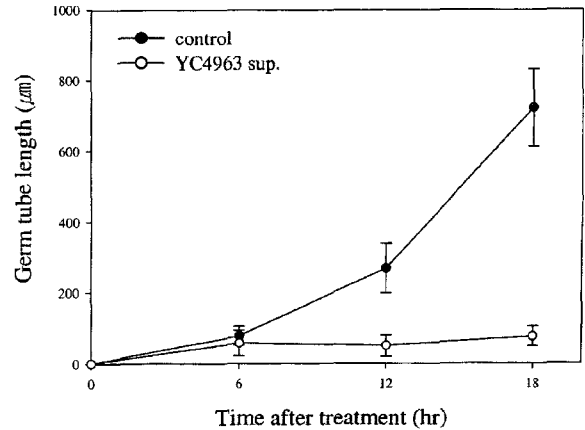


Fig. 2. Inhibition of the germ tube growth of *Colletotrichum orbiculare* by culture filtrate of bacterial isolate *Pseudomonas aurantiaca* YC4963 (sup.). Fifty microliter of conidial suspension of *C. orbiculare* (10⁶ conidia/ml) was inoculated on the culture filtrate and distilled water and the growth was measured after indicated time at 28°C.

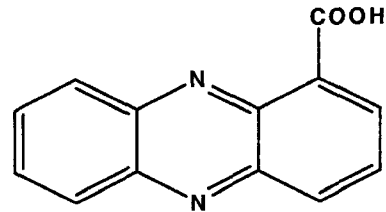


Fig. 3. The chemical structure of phenazine-1-carboxylic acid produced by *Pseudomonas aurantiaca* YC4963.

phenazine-1-carboxylic acid 생산 보고는 본 연구결과가 처음이다. 이 외에 지금까지 *P. aureofaciens*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* 등도 phenazine-1-carboxylic acid를 생산하는 것으로 확인되었으며, 이 항생물질은 밀 근권에서 *Gaeumannomyces graminis*를 억제한다는 사실도 밝혀졌다(12, 13, 17, 18). *Pseudomonas* spp.가 생산하는 phenazine 유도체로는 iodine (1,6-phenazinediol-5,10-dioxide), chlororaphines and pyocyanin (1-hydroxy-5-N-methyl-phenazine) 등도 보고 되어있다(9).

항생물질 phenazine-1-carboxylic acid의 항균력 조사

*P. aurantiaca*가 생산한 phenazine-1-carboxylic acid의 평균 억제 활성은 50 µg/ml에서는 발아와 부착기 형성에는 차이를 보이지 않았고, 100 µg/ml에서는 발아관의 길이가 대조구 800 µm에 비해 400 µm정도로 억제됨을 보였다(Fig. 4). Phenazine-1-carboxylic acid는 여러 논문에서 *Pythium ultimum*을 억제할 수 있는 항진균 물질로 알려져 있으나, 본 실험의 100 µg/ml에서는 균사 생장 억제 효과가 없었다. 이것은 아마도 *Pseudomonas* 생산 phenazine의 처리농도가 낮아 성장 속도가 상대적으로 빠른 *Pythium*의 생육에 별로 영향을 미치지 못한 것으로 보이며, 처리 농도가 증가 되면 억제효과가 있을 것으로 생각된다.

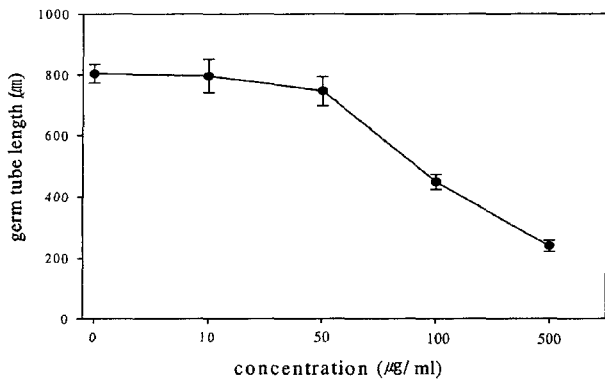


Fig. 4. Effect of phenazine-1-carboxylic acid on the germ tube growth of *C. orbiculare*. Fifty microliter of conidial suspension of *C. orbiculare* (10^6 conidia/ml) was inoculated in the culture filtrate and the growth was measured 18 hours after inoculation at 28°C.

감사의 글

이 논문은 2003년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음(KRF-2003-041-F00006).

참고문헌

- Agrios, G.N. 1988. Plant pathology, 3rd ed., p. 803. Academic press, San Diego, California.
- Anzai, Y., H. Kim, J.Y. Park, H. Wakabayashi, and H. Oyaizu. 2000. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 1563-1589.
- Burkhead, K.D., D.A. Schisler, and P.J. Slininger. 1994. Pyrrolnitrin production by biological control agent *Pseudomonas cepacia* B37W in culture and in colonized wounds of potatoes. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2031-2039.
- Chung, Y.R., C.H. Kim, I. Hwang, and J. Chun. 2000. *Paenibacillus koreansis*, sp. nov., a new species that produces an iturin-like antifungal compound. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 1495-1500.
- Deka Boruah, H.P. and B.S. Dileep Kumar. 2002. Biological activity of secondary metabolites produced by a strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Folia Microbiol.* 47, 359-363.
- Emment, R.W. and D.G. Parbery. 1975. Appressoria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 13, 147-167.
- Goodfellow, M. and A.G. O'Donnell. 1994. Chemical methods in prokaryotic systems. p. 575. John Wiley & Sons, New York, N.Y.
- Howell, C.R. and R.D. Stipanovic. 1980. Suppression of *Pythium ultimum* induced damping-off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, pyoluteorin. *Phytopathology* 70, 712-715.
- Ingram, J.M. and A.C. Blackwood. 1970. Microbial production of phenazines. *Adv. Appl. Microbiol.* 13, 267-282.
- Kim, B.S., J.Y. Lee, and B.K. Hwang. 2000. *In vivo* control and *in vitro* antifungal activity of rhamnolipid B, a glycolipid antibiotic, against *Phytophthora capsici* and *Colletotrichum orbiculare*. *Pest Manag. Sci.* 56, 1029-1035.
- Korsten, L. and P. Jeffries. 2000. Potential for biological control of diseases caused by *Colletotrichum*. p. 266-291. In D. Prusky, S. Freeman and M.B. Dickman (ed.), *Colletotrichum: Host specificity, pathology, and host-pathogen interaction*. American Phytopathological Society, St. Minnesota.
- Lee, J.Y., S.S. Moon, and B.K. Hwang. 2003. Isolation and *in vitro* and *in vivo* activity against *Phytophthora capsici* and *Colletotrichum orbiculare* of phenazine-1-carboxylic acid from *Pseudomonas aeruginosa* strain GC-B26. *Pest Manag. Sci.* 59, 872-882.
- Pierson III, L.S. and E.A. Pierson. 1996. Phenazine antibiotic production in *Pseudomonas aureofaciens*: role in rhizosphere ecology and pathogen suppression. *FEMS Microb. Letters* 136, 101-108.
- Shanahan, P., P. Simpson, J.D. Glennon, D.J. O'Sullivan, and F. O'Gara. 1992. Isolation of 2,4-diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. *Appl. Env. Microbiol.* 58, 353-358.
- Smibert, R.M. and N.R. Krieg. 1991. General characterization, p. 409-433. In Gerhardt, P. R., G.E. Murray, R.N. Costilow, E.W. Nester, W.A. Wood, N.R. Krieg, and G.B. Phillips (ed.), *Manual of methods for general bacteriology*, American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Sutton, B.C. 1992. The *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*, p. 1-26. In J.A. Bailey and M.J. Feger (ed.), *Colletotrichum; Biology. Pathology and Control*. CAB International, U.K.
- Thomashow, L.S. and D.M. Weller. 1988. Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *J. Bacteriol.* 170, 3499-3508.
- Thomashow, L.S., M.W. David., and F. Robert. 1990. Production of the antibiotic phenazine-1-carboxylic by fluorescent *Pseudomonas* species in the rhizosphere of wheat. *Appl. Env. Microbiol.* 56, 908-912.
- Weller, D.M. 1988. Biological control of soilborn plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.* 26, 379-407.

(Received May 13, 2004/Accepted November 22, 2004)

ABSTRACT : Identification of Antagonistic Bacteria, *Pseudomonas aurantiaca* YC4963 to *Colletotrichum orbiculare* Causing Anthracnose of Cucumber and Production of the Antibiotic Phenazine-1-carboxylic acid

Hee-Jung Chae, Rumi Kim, Surk-Sik Moon¹, Jong-Woong Ahn², and Young-Ryun Chung* (Division of Applied Life Sciences (BK21 program), Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea. ¹Department of Chemistry, Kongju National University, Kongju 314-701, Korea. ²Division of Ocean Science, Korea Maritime University, Busan 606-791, Korea)

A bacterial strain YC4963 with antifungal activity against *Colletotrichum orbiculare*, a causal organism of cucumber anthracnose was isolated from the rhizosphere soil of *Siegesbeckia pubescens* Makino in Korea. Based on physiological and biochemical characteristics and 16S ribosomal DNA sequence analysis, the bacterial strain was identified as *Pseudomonas aurantiaca*. The bacteria also inhibited mycelial growth of several plant fungal pathogens such as *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani* on PDA and 0.1 TSA media. The antifungal activity was found from the culture filtrate of this isolate and the active compound was quantitatively bound to XAD adsorption resin. The antibiotic compound was purified and identified as phenazine-1-carboxylic acid on the basis of combined spectral and chemical analyses data. This is the first report on the production of phenazine-1-carboxylic acid by *Pseudomonas aurantiaca*.