

## 탄저병균에 길항력이 우수한 식물내생세균 *Burkholderia cepacia* EB215의 분리 및 특성 규명

박지현<sup>1,2</sup> · 최경자<sup>1</sup> · 이선우<sup>1</sup> · 장경수<sup>1</sup> · 임희경<sup>1</sup> · 정영훈<sup>2</sup> · 조광연<sup>1</sup> · 김진철<sup>1\*</sup>  
<sup>1</sup>한국화학연구원 생물기능연구팀, <sup>2</sup>경상대학교 응용생명과학부 기초과학연구소

**Isolation and Characterization of *Burkholderia cepacia* EB215, an Endophytic Bacterium Showing a Potent Antifungal Activity Against *Colletotrichum* Species.** Park, Ji Hyun<sup>1,2</sup>, Gyung Ja Choi<sup>1</sup>, Seon-Woo Lee<sup>1</sup>, Kyoung Soo Jang<sup>1</sup>, He Kyoung Lim<sup>1</sup>, Young Ryun Chung<sup>2</sup>, Kwang Yun Cho<sup>1</sup>, and Jin-Cheol Kim<sup>1\*</sup>. <sup>1</sup>Biological Function Research Team, Korea Research Institute of Chemical Technology, Taejon 305-606, Korea, <sup>2</sup>Division of Applied Life Sciences (BK21 program) and Research Institute of Natural Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea – In order to develop a new microbial fungicide using endophytic bacteria for the control of anthracnoses occurring on various crops, a total of 260 bacterial strains were isolated from fresh tissues of 5 plant species. After they were cultured in broth medium, their antifungal activities were tested for *in vivo* antifungal activity against cucumber anthracnose caused by *Colletotrichum orbiculare*. As the results, liquid cultures of 28 strains showed potent antifungal activities more than 90% against cucumber anthracnose. At 3-fold dilutions of liquid cultures, 18 strains inhibited the development of cucumber anthracnose of more than 70%. They were further tested for *in vivo* antifungal activity against red pepper anthracnose caused by *C. coccodes* and *in vitro* antifungal activity against *C. acutatum*, a fungal agent causing red pepper anthracnose. Among 18 strains, a bacterial strain EB215 isolated from cucumber roots displayed the most potent antifungal activity against *Colletotrichum* species. It was identified as *Burkholderia cepacia* based on its physiological and biochemical characteristics, Biolog test and 16S rDNA gene sequence. It also controlled effectively the development of rice blast (*Magnaporthe grisea*), rice sheath blight (*Corticium sasaki*), tomato gray mold (*Botrytis cinerea*), and tomato late blight (*Phytophthora infestans*). Studies on the characterization of antifungal substances produced by *B. cepacia* EB215 are in progress.

**Key words:** Anthracnose, antifungal activity, *Burkholderia cepacia*, *Colletotrichum* species, endophytic bacteria

*Colletotrichum* 속은 불완전균류에 속하는 식물 병원성 진균으로 오이, 수박, 고추, 딸기 등의 과채류와 같은 경제적으로 중요한 작물에 탄저병을 일으키는 대표적인 다병성 병원균으로 [1, 7], 그 중요성에도 불구하고 탄저병을 성공적으로 방제할 수 있는 연구는 많이 진행이 안 된 상태이다. 실제로 탄저병 방제를 위해 사용하는 화학살균제로 dithianon, carbendazium, chlorothalonil, azoxystrobin, mancozeb 등이 있지만, *Colletotrichum* 속들이 이들에 저항성을 가지게 되고, 또한 화학살균제들의 토양 내 잔류에 의한 환경오염과 인축 독성이라는 문제점들을 야기시키고 있다. 또한 최근에는 안전한 식품, 즉 유기농산물에 대한 수요가 증가하고 있다. 따라서 화학살균제들의 대안으로 생화학농약(biochemical pesticide)과 미생물농약(microbial pesticide)를 포함한 생물

농약(biopesticide)의 개발이 절실히 요구되고 있다.

식물내생세균은 식물체에는 실질적으로 해를 주지 않으면서 살아있는 식물체내에 거주하며 여러 가지 이점을 제공하는 세균을 말한다 [9, 15]. 식물내생세균은 연구 초기에는 병원성이 약한 식물병원균으로 생각되었지만 최근에 숙주 식물상에 식물병원균과 해충에 대한 저항성을 증가시킬 뿐만 아니라 감자, 토마토, 벼 등의 성장도 증진시키는 것으로 보고 되고 있다 [9]. 대표적인 식물내생세균들에는 *Pseudomonas* 속, *Bacillus* 속, *Eenterobacter* 속 및 *Agrobacterium* 속 등이 있다 [9].

*Burkholderia cepacia* (*Pseudomonas cepacia*)는 양파의 식물병원균으로 처음 보고된 이래 진균성 식물병원균에 길항작용을 나타내어 작물을 보호하는 생물제제로서 많이 연구되어왔다 [3, 13]. *B. cepacia*의 일부 균이 인체 병원균으로 알려져 있지만 다양한 범주의 식물 병원균에 대하여 항균활성이 있는 것으로 알려져 있으며 [4, 10, 17], 종자 처리제로서 개발되어 상품으로 출시되었다.

\*Corresponding author  
Tel: 82-42-860-7436, Fax: 82-42-861-4913  
E-mail: kjinc@kriict.re.kr

본 실험에서는 국내에서 재배중인 전천 채소 조직으로부터 분리한 식물내생세균을 이용하여 각종 채소에 발병하는 탄저병 방제용 미생물살균제 개발을 위해 오이 탄저병 (*Colletotrichum orbiculare*)에 대하여 높은 방제활성을 보일 뿐 아니라 고추 탄저병균(*Colletotrichum acutatum*)의 균사 생육과 고추 탄저병균(*Colletotrichum coccodes*)에 대해 *in vivo*에서 우수한 항균활성을 보이는 EB215균주를 선발하였다. 이 균주에 대한 분리 및 동정, 탄저병을 포함한 다양한 식물병원균에 대한 *in vivo* 항균활성에 대해 조사하여 이에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 식물내생세균의 분리

2002년 5월 괴산, 청주, 청원 등 충청도 8개 지역과 강원도 평창 1개 지역 등 총 9개 지역으로부터 고추, 오이, 토마토, 호박, 배추 등 5개의 채소작물을 채집하여 건전한 열매, 잎, 줄기, 뿌리 등 총 67개의 시료로부터 식물내생세균을 분리하였다.

잎의 경우, 잎 5g을 떼어 0.1% Tween 20이 첨가된 2% NaOCl에 10초간 담구어 표면 살균을 한 후, 멸균수 45 ml을 첨가하여 막자사발로 갈아 이중 1 ml을 취하여  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ 로 희석하였다. 이 희석액 각각을 40 mg/l cyclohexamide(Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)가 첨가된 tryptic soy agar medium[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 liter distilled water, Becton and Dickinson Co., Sparks, Maryland, USA]에 200  $\mu$ l씩 loading하여 도말하였다[18]. 줄기와 뿌리의 경우에는 각각의 조직 5g을 96% ethanol로 화염 살균한 후, 멸균수 15 ml을 첨가하여 막자사발로 간다. 이중 1 ml을 취하여  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ 으로 희석하여 이 희석액을 각각 40 mg/l cyclohexamide가 첨가된 TSA 배지에 200  $\mu$ l씩 loading한 후 도말하여 30°C 항온 조건 하에서 균 분리를 실시하였다[18]. 분리한 세균들은 다시 nutrient agar[NA; 3 g beef extract, 5 g peptone, 1.0 liter distilled water, Becton and Dickinson Co.] 배지에 3-4번씩 계대 배양하여 single colony로 분리하였으며, 분리한 260개 균주들은 NA배지에 배양하여 4°C에 보관하며 실험에 사용하였다.

### 오이 탄저병에 대한 *in vivo* 항균활성 검정

분리한 260개 균주들에 대한 항균활성 정도를 조사하기 위하여 액체 배양을 실시하였다. 멸균한 100 ml tryptic soy broth(TSB; Becton and Dickinson Co.)에 TSA 배지에서 자라고 있는 각각의 세균을 한 백금이 따서 접종한 다음 30°C, 150 rpm으로 3일간 진탕 배양하였다. 이 배양액 원액에 일반적으로 세균과 물질을 식물체에 발 흡착시키는 작용

을 하는 것으로 알려진 Xanthan gum을 100  $\mu$ g/ml 수준으로 첨가한 후 *in vivo* 항균활성을 조사하였다. 접종 1일 전 예방효과로 검정하였다. 즉 온실(25°C  $\pm$  5°C)에서 키운 2엽기 오이 유묘에 260개 식물내생세균의 배양액을 엽면 분무 살포한 후 상온에서 건조하였다. 24시간 후에 *C. orbiculare* 포자 현탁액( $1 \times 10^6$  포자/ml)을 분무하여 접종하였다. 2일간 습실상에서 발병시킨 후 3일간 25°C 항온·항습실에 두었다. 접종 5일 후에 병반면적율을 조사하여 방제 가(%)를 아래의 식에 의해 구하였다.

$$\text{방제가(\%)} = (\text{무처리구 병반면적율} - \text{처리구 병반면적율}) / (\text{무처리구 병반면적율}) \times 100$$

### 고추 탄저병에 대한 *in vivo* 및 *in vitro* 항균활성

오이 탄저병에 대하여 우수한 방제활성을 보이는 균주들에 대하여 현재 우리나라에서 가장 문제시 되고 있는 고추 탄저병균에 대하여 항균활성을 조사하였다. 고추 탄저병균의 병원균으로는 *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. dematium*, *C. coccodes* 및 *C. acutatum* 등이 알려져 있는데, 본 실험에서는 *in vitro*에서는 *C. acutatum*을 가지고 실험을 실시하였으며, *in vivo*에서는 *C. coccodes*을 가지고 실험을 실시하였다.

*In vivo* 검정의 경우 최아된 고추 종자를 지름 7.0 cm의 포트에 파종한 후 첫 번째 가지가 나오는 시점까지 온실에서 키운 후 약제를 엽면 살포하였다. 24시간 상온에서 건조한 후 고추 탄저병원균인 *C. coccodes*의 포자 현탁액( $1 \times 10^6$  포자/ml)을 분무 처리하였다. 습실상에서 2일간 발병시킨 후 25°C 항온·항습실에 2일간 두었다. 접종 4일 후에 병반면적율을 조사하였다.

*In vitro* 검정의 경우 배지로는 TSA배지와 PDA배지를 사용하였다. 두 배지의 한쪽에 PDA배지에서 왕성하게 자라고 있는 *C. acutatum* 균주의 균사 선단부를 cork borer( $\phi$  8 mm)로 떼어 접종한 후 약 4 cm정도 떨어진 곳에 세균을 접종하였다. 28°C에서 5일간 배양 후 생장 억제 거리를 측정하였다.

### EB215 균주의 동정

형태적, 생리·생화학적 특성 조사. 이상의 여러 가지 *in vivo* 및 *in vitro* 생물검정 결과 260개 균주 중 EB215균주가 가장 항균활성이 높은 것으로 나타났다. 따라서 이 균주의 동정을 위하여 Bergey's Manual of Systemic Bacteriology [11]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 EB215균주를 TSA배지에 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  $\mu$ l씩 분주하였다. 4시간, 24시간 그리고 48시간 배양하면서 탄소원 이용 여부를 reader로 측정하고, Microlog release 3.50 software에서 검색하여 균주를 분류하였다.

### 16S rDNA Sequencing

EB215균주의 정확한 동정을 위하여 16S rRNA gene을 kit(Product A1360; Promega Co., Medision, Wis., USA)를 이용하여 Polymerase Chain Reaction(PCR)으로 증폭시켰다. 이때 2개의 universal primer set 8F/1492r(5'-AGA-GTTTGATCCTGGCTCAG-3'/5'-GGTTACCTTGT-ACGACTT-3')와 Com1(forward)/Com2(reverse)(5'-CAGCAG-CCGCGTAATAC-3'/5'-CCGTCAATTCCTTGTAGTTT-3')를 이용하여 16S rDNA 유전자를 PCR로 증폭시켜 얻었다. Denaturation, annealing, extention을 각각 95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 2분간 반응시켰다. PCR product를 DNA purification kit(Product 28706; QIAGEN Inc., Valencia, Calif., USA)로 순수 분리한 후, automatic sequencer를 통해 염기서열을 결정하였고, database 검색은 NCBI network service의 BLAST program으로 수행하였다.

### EB215 균주의 7가지 식물병에 대한 *in vivo* 항균활성 검증

한편 선발한 EB215 균주의 다양한 항균활성 스펙트럼을 조사하고 또한 항균물질의 분리를 위한 기초실험을 하나로서 항균물질의 배지로의 배출여부를 조사하기 위하여 고추 탄저병, 벼 도열병, 벼 잎집무늬마름병, 토마토 역병, 토마토 잿빛곰팡이병, 밀 붉은녹병 및 보리 흰가루병 등 7가지 식물병에 대하여 *in vivo* 항균활성을 조사하였다. TSB 배지에서 3일간 배양하여 그 배양액을 9,000 rpm, 15분간 4°C에서 원심분리하여 균체와 상등액을 각각 따로 얻었다. 이렇게 얻은 균체는 증류수로 2번 정도 씻어내어 다시 원심 분리한 후 배양 했던 배지와 동량의 증류수를 넣어 현탁한 후 실험에 사용하였다. 배양액, 균체, 배양 상등액을 각각 원액과 1/3, 1/9로 희석한 후 Xanthan gum을 100  $\mu$ g/ml 수준으로 가한 다음 7가지 식물병에 대하여 *in vivo* 항균활성을 조사하였다. 고추 탄저병의 경우 상기의 방법과 동일하며 나머지 6가지 식물병에 대한 *in vivo* 항균활성 조사 방법은 전보[14, 15]에 묘사한 바와 같이 실시하였다.

## 결과 및 고찰

### 식물내생세균의 분리

충청도와 강원도 지역에서 채취한 5개 채소작물들의 총 67개의 건전한 식물체 조직으로부터 260개 식물내생세균을 분리하였다. 고추 시료 25개 시료로부터 104개 균주, 오이 12개 시료로부터 51개 균주, 토마토 15개 시료로부터 40개

균주, 호박 3개 시료로부터 10개 균주 그리고 배추 12개 시료로부터 65개 균주 등 총 260개 균주가 분리되었다(Table 1).

### 오이 탄저병에 대한 *in vivo* 항균활성 검증

분리한 260개 균주들의 배양액 원액을 처리하였을 때 28개의 균주가 90% 이상의 방제활성을 보여주었다(Table 2). 이들 28개 균주들에 대해서는 배양액을 3배로 희석하여 다시 오이 탄저병에 대한 방제활성을 조사한 결과, EB040, EB052, EB054, EB056, EB074, EB079, EB080, EB081, EB102, EB107, EB113, EB115, EB121, EB128, EB148, EB149, EB151 및 EB215 등 18개 균주가 70%이상의 높은 방제활성을 보였다.

### 고추 탄저병균에 대한 *in vivo* 및 *in vitro* 항균활성 조사

오이 탄저병에 대하여 높은 *in vivo* 항균활성을 보이는 18개 균주에 대하여 현재 우리나라에서 가장 문제시되고 있는 고추 탄저병에 대하여 *in vivo* 및 *in vitro*에서 항균활성을 조사하였다. *C. coccodes*에 대한 *in vivo* 항균활성을 조사한 결과 18개 균주 중 2개의 균주, 즉 EB151균주와 EB215균주의 배양액이 90%이상의 방제활성을 보였다(Table 3). 이들 두 균주의 배양액을 1/3과 1/9로 희석하여 고추 탄저병에 대한 활성을 조사한 결과, EB151의 균주의 경우 각각 24%와 0%의 방제활성을 보였다. 이에 비하여 EB215균주는 1/3희석액과 1/9희석액 각각 93%와 40%의 방제활성을 보여 실험한 18개 균주들 중에서 가장 방제활성이 높은 것으로

**Table 1. Isolation of endophytic bacteria from various plants in Korea.**

Source	Plant Part	No. of samples	No. of strains
Red pepper ( <i>Capsicum annuum</i> )	Fruits	1	10
	Leaves	8	19
	Stems	8	43
	Roots	8	32
Cucumber ( <i>Cucumis sativus</i> )	Leaves	4	15
	Stems	4	12
	Roots	4	24
Tomato ( <i>Lycopersicon esculentum</i> )	Leaves	5	18
	Stems	5	10
	Roots	5	12
Pumpkin ( <i>Curcubita moschata</i> )	Leaves	1	3
	Stems	1	2
	Roots	1	5
Chinese cabbage ( <i>Brassica campestris</i> subsp. <i>napus</i> var. <i>perkinensis</i> )	Leaves	4	22
	Stems	4	16
	Roots	4	17
Total		67	260

**Table 2. Liquid cultures of endophytic bacteria showing potent disease control activities against cucumber anthracnose<sup>a</sup>.**

Strain	Control value (%) <sup>b</sup>	
	1-fold dilution	3-fold dilution
EB040	95	74
EB042	90	7
EB043	97	46
EB052	99	79
EB054	94	87
EB056	96	87
EB072	93	25
EB074	90	86
EB075	92	36
EB079	92	89
EB080	90	79
EB081	94	78
EB086	96	11
EB102	92	95
EB107	92	89
EB109	90	39
EB112	94	11
EB113	99	82
EB114	94	29
EB115	94	75
EB121	99	79
EB128	95	76
EB148	94	89
EB149	95	81
EB151	94	79
EB152	90	62
EB153	92	61
EB215	93	86

<sup>a</sup>The cucumber seedlings were inoculated with spores of *Colletotrichum orbiculare* 1 day after 1-fold and 3-fold dilutions of liquid cultures of the bacterial strains were sprayed to run-off on the leaves.

<sup>b</sup>Control value (%) = 100 × (disease severity of untreated plants - disease severity of treated plants) ÷ disease severity of untreated plants.

나타났다. Fig. 1은 EB215균주의 배양액 1/3희석액을 처리하였을 때 고추 탄저병이 효과적으로 방제됨을 나타낸다. 오른쪽의 대조구에는 고추 잎이 고사될 정도로 탄저병이 심하게 발생한 반면에, 배양액 1/3희석액을 처리한 왼쪽의 두 식물체의 경우에는 약간의 병반만 보일뿐 비교적 건강하게 식물체가 생장을 계속하였다.

한편 선발한 18개 균주를 고추 탄저병균인 *C. acutatum*에 대하여 *in vitro* 항균활성을 조사한 결과, Table 4에서와 같이 18개 균주들 중에서 8개의 균주가 *in vitro*에서 항균활성을 보였다. 이들 중에서도 사용한 배지에 따라 항균활성에 차이가 보였지만 두 배지 모두에서 EB215균주가 가장 강한 항균활성을 보였다. Fig. 2는 EB215균주의 *C. acutatum* 균

**Table 3. *In vivo* antifungal activities against red pepper anthracnose caused by *Colletotrichum coccodes* of the liquid cultures which controlled effectively the development of cucumber anthracnose<sup>a</sup>.**

Strain	Control value (%) <sup>b</sup>
EB040	27
EB052	9
EB054	0
EB056	65
EB074	22
EB079	13
EB080	2
EB081	0
EB102	2
EB107	49
EB113	0
EB115	24
EB121	13
EB128	20
EB148	0
EB149	95
EB151	2
EB215	100

<sup>a</sup>The red pepper seedlings were inoculated with spores of *Colletotrichum coccodes* 1 day after the liquid cultures of the bacterial strains were sprayed to run-off on the leaves.

<sup>b</sup>Control value (%) = 100 × (disease severity of untreated plants - disease severity of treated plants) ÷ disease severity of untreated plants.



**Fig. 1. *In vivo* antifungal activity of a 3-fold dilution of liquid culture of EB215 against red pepper anthracnose caused by *Colletotrichum coccodes* (left two plants: treated with a 3-fold dilution of liquid culture of EB215, right one plant: treated with 100 µg/ml of Xanthan gum).**

주와 대치 배양시 나타나는 길항작용을 나타낸 것이다.

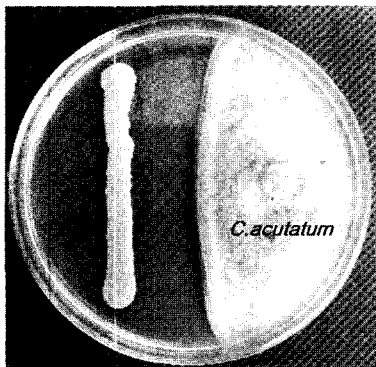
이상과 같이 각종 채소로부터 분리한 260개의 식물내생세균들을 *C. orbiculare*에 의한 오이 탄저병, 고추 탄저병균인 *C. acutatum*의 균사 생육 및 *C. coccodes*에 의한 고추 탄저병 등에 대하여 *in vivo* 및 *in vitro* 항균활성을 조사한 결과 EB215균주가 가장 항균활성이 높은 것으로 나타났다. 따라서 이 균주를 미생물살균제로 개발하고 또한 항균활성 기작을 규명하기 위하여 이 균주에 대하여 더 실험을 실시하였다.

**Table 4. Bacterial strains showing inhibitory activities against mycelial growth of *Colletotrichum acutatum*, a fungal agent causing red pepper anthracnose, on solid media.**

Strain	Inhibition zone (mm) <sup>a</sup>	
	Tryptic soy agar	Potato dextrose agar
EB054	3	11
EB081	2	10
EB102	+ <sup>b</sup>	4
EB103	+	4
EB115	2	6
EB121	2	9
EB151	2	12
EB215	26	17

<sup>a</sup> The growth inhibition was determined by the paired bioassay on tryptic soy agar and potato dextrose agar media after 5 days inoculation at 30°C.

<sup>b</sup> +: slight inhibition (<1 mm).



**Fig. 2. *In vitro* antifungal activity of EB215 against mycelial growth of *Colletotrichum acutatum*, a fungal causing agent of red pepper anthracnose.**

#### EB215균주의 동정

EB215균주는 그람 음성균이며 간상으로서 catalase와 oxidase 반응에서는 모두 양성이었다. 또한 starch는 분해하지 못했지만 casein, gelatin 및 lipid는 분해하였다(Table 5). Biolog실험을 수행한 결과 탄소원으로 tween 40, tween 80, N-acetyl-D-glucosamine, adinitol, D-fructose, D-galactose,  $\alpha$ -D-glucose, m-inositol, D-mannitol, D-mannose, D-sorbitol, sucrose, mono-methyl succinate, acetic acid, cis-aconitic acid, citric acid, formic acid,  $\beta$ -hydroxy butyric acid,  $\alpha$ -keto butyric acid,  $\alpha$ -keto valeric acid, D,L-lactic acid, malonic acid, quinic acid, D-saccharic acid, sebacic acid, bromo succinic acid, alaninamide, 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,  $\gamma$ -amino butyric acid, urocanic acid 및 glucose-6-phosphate 등은 이용하였다. 그러나  $\alpha$ -cyclodextrin, N-acetyl-D-galactosamine, L-arabinose, cellobiose, D-

**Table 5. Morphological and biochemical characteristics of EB215 strain.**

Characteristics	EB215
Gram stain	- <sup>a</sup>
KOH test	+
Cell shape	rod
Catalase	+
Oxidase	+
Spore forming	-
Starch hydrolysis	-
Casein hydrolysis	+
Gelatin hydrolysis	+
Lipid hydrolysis	+

<sup>a</sup>+: positive, -: negative.

melibiose, L-rhamnose, D-trehalose, turanose, xylitol, D-galactonic acid lactone, D-glucosamic acid,  $\gamma$ -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 EB215균주는 *B. cepacia*와 유사성이 높은 것으로 나타났다. 정확한 동정을 위하여 16S rDNA sequencing을 실시한 결과, EB215균주는 *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)[6]에 의하면 *Pseudomonas chloraphis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas syringe* 및 *B. cepacia* 등이 미생물살균제로서 상용화되어 판매되고 있다. *B. cepacia*의 경우에는 종자처리제로서 개발되어 시판되고 있다.

#### *B. cepacia* EB215 균주의 가지 식물병에 대한 *in vivo* 항균활성 검정

*B. cepacia* EB215 균주의 액체 배양액, 균체 및 배양 상등액으로 고추 탄저병과 벼 도열병, 벼 잎집무늬마름병, 토마토 잿빛곰팡이병, 토마토 역병, 밀 붉은녹병, 보리 흰가루병 등에 대한 *in vivo* 항균활성을 검정한 결과, EB215균주의 배양액은 고추 탄저병 외에 벼 도열병과 토마토 역병에 대해 원액에서 90% 이상의 높은 방제활성을 보였다. 그리고 벼 잎집무늬마름병과 토마토 잿빛곰팡이병에 대해서는 원액에서 60%이상의 비교적 높은 방제활성을 보였다. 이와 같이 *B. cepacia* 215균주가 생성하는 항균물질(들)은 고추 탄저병을 비롯하여 벼 도열병을 일으키는 *Magnaporthe grisea*, 토마토 역병을 일으키는 *Phytophthora infestans*, 벼 잎집무늬마름병을 일으키는 *Rhizoctonia sasaki* 및 토마토 잿빛곰팡이병을 일으키는 *Botrytis cinerea* 등에 대하여 항균활

성을 보임을 알 수 있었다.

한편 배양액을 상등액과 균체로 나누어 7가지 식물병에 대하여 처리한 결과 식물병에 따라 약간의 차이가 있지만 두 시료가 서로 비슷하게 *in vivo* 방제활성을 보였다. 이것은 *B. cepacia* EB215균주가 생성하는 항균물질(들)의 일부가 배출

되기도 하지만 상당량의 물질들이 아직도 균체에 남아 있을 을 나타낸다. 따라서 이 균주를 배양한 후 물질을 분리하기 위해서는 균체와 상등액 모두에서 항균물질을 추출해야 할 것으로 판단된다.

*B. cepacia*는 농업이나 의학적인 관점에서 매우 중요한 세

**Table 6. *In vivo* antifungal activities of *Burkholderia cepacia* EB215 against 7 plant pathogenic fungi<sup>a</sup>.**

Sample	Dilution	Control value (%) <sup>b</sup>						
		RAN <sup>c</sup>	RCB	RSB	TGM	TLB	WLR	BPM
Culture	1-fold	91	97	75	64	99	27	8
	3-fold	61	90	35	21	93	0	0
	9-fold	44	80	10	14	14	0	8
Supernatant	1-fold	47	97	10	21	91	0	8
	3-fold	17	67	0	14	21	0	0
	9-fold	19	17	0	7	7	0	0
Cells	1-fold	85	93	40	29	64	0	0
	3-fold	47	80	5	7	14	0	0
	9-fold	5	42	5	21	0	0	0

<sup>a</sup>The plant seedlings were inoculated with spores or mycelial suspensions of the test organisms 1 day after three dilutions of the liquid culture, cell suspension or culture supernatant of *Burkholderia cepacia* EB215 were sprayed to run-off on the leaves.

<sup>b</sup>Control value (%) = 100 × (disease severity of untreated plants - disease severity of treated plants) ÷ disease severity of untreated plants.

<sup>c</sup>RAN, red pepper anthracnose; RCB, rice blast; RSB, rice sheath blight; TGM, tomato gray mold; TLB, tomato late blight; WLR, wheat leaf rust; BPM, barley powdery mildew.

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGG  
 CAGCACGGGTGCTTGACCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACATGT  
 CCTGTAGTGGGGGATAGCCCGCGCAAAGCCGGATTAATACCGCATAACGATCTACGGATGAAA  
 GCGGGGGACCTTCGGGCCTCGCGCTATAGGGTTGGCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGG  
 GTAAAGGCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGA  
 CTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGGCGAAA  
 GCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTCCG  
 GAAAGAAATCCTTGGCTCTAATACAGTCGGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACCGGC  
 TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGC  
 GTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTGCTAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAC  
 TGCATTGGTGACTGGCAGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGTAGAATCCCACGTGTAGCAGT  
 GAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACTGAC  
 GCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAA  
 CGATGTCAACTAGTTGTTGGGGATTCAATTTCTTAGTAACGTAGCTAACCGGTGAAGTTGAC  
 CGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAATACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCG  
 GTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACCGCAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGGTCCG  
 AATCCTGCTGAGAGGCGGGAGTGTCTCGAAAGAGAACC GGCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTC  
 GTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGT  
 TGCTACGCAAGAGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACG  
 TCAAGTCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTCACACGT CATAAATGGTCGGAACAGAGGG  
 TTGCCAACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATTGCACTCTGC  
 AACTCGAGTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACG  
 TTCCCGGCTCTGTACACACCCCGTCAACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGGCTA  
 GTCTAACCGCAAGGAGGACGGTCAACACGGTAGGACTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAA  
 GGTAAC

**Fig. 3. The nucleotide sequence of 16S rDNA of EB215 strain.**

균이다. 농업에 있어서는 다양한 식물병원진균을 억제하는 길항균으로서 알려져 있으며[7], 의학적인 관점에서는 cystic fibrosis를 야기시키는 인체 병원균으로서 알려져 있다[5]. 이 세균은 하나의 complex로서 7개의 유전적 종(genomic species) 또는 genomovar들로 구성되어 있는 것으로 알려져 있다. 이들 7개의 genomovar들 중에서 특히 genomovar II와 III가 주요 인체 병원균으로 알려져 있다[12, 16]. 하지만 Fiore 등(2001)에 의하면 옥수수 근권에서 분리한 *B. cepacia*들 중에서 genomovar I, III 및 VI은 모든 포장에서 분리되었기 때문에 단순히 genomovar에 의해 인체 병원균인지 아닌지를 구별하는 것은 불가능하다고 하였다[8]. 또한 Balandreau 등(2001)은 genomovar III가 옥수수, 밀 및 루피너스 등의 근권이나 건전조직 내에서 흔히 발견되는 세균이라고 보고하였다[2].

이와 같이 *B. cepacia*의 일부 균들이 인체 병원균으로 알려져 있을지라도 인체에 병원성이 없다고 확인된 균의 경우에는 식물병원균을 방제하는 미생물 살균제로 개발되어 판매되고 있다. 미국에서는 현재 *B. cepacia* type Wisconsin strain M54와 *B. cepacia* type Wisconsin J82가 *Rhizoctonia*, *Pythium* 및 *Fusarium*속 균에 의한 모잘록병과 몇 가지 선충 방제용 미생물 살균제로서 개발되어 시판되고 있다. 이들 제품의 경우에는 직접 토양이나 식물체 뿌리 아니면 종자에 처리해야만 하며 옆면에 분무 처리해서는 안되는 것으로 규정되어 있다. 따라서 본 과제에서 발견한 미생물의 경우에도 먼저 genomovar를 확인하여 genomovar II와 III가 아닌 균인지 확인한 후 아닐 경우에 한하여 미생물살균제로서 개발 가능성을 타진하고자 한다. 본 균의 경우 고추 탄저병 외에 다양한 식물병에 대하여 우수한 방제활성을 보였으므로 모잘록병을 일으키는 *Rhizoctonia*나 *Fusarium*속 균에도 항균활성이 크리라 예상된다. 또한 길항작용을 규명하기 위하여 항균물질을 분리하고 구조를 동정하고자 한다.

## 요 약

식물내생미생물을 이용하여 다양한 작물에 발병하는 탄저병을 방제하기 위한 미생물 살균제를 개발하기 위하여 건전한 식물체 조직으로부터 총 260개 균주를 분리하였다. 이들은 액체배지에 배양한 후 오이 탄저병(*Colletotrichum orbiculare*)에 대하여 *in vivo* 항균활성을 조사한 결과 28개의 균주가 90% 이상의 높은 방제활성을 보였다. 이들 28개의 균주의 배양액을 1/3로 희석하여 처리하였을 경우에는 18개 균주가 70% 이상의 방제활성을 보였다. 이들 18개의 균주에 대하여 고추 탄저병균(*C. coccodes*)에 대한 *in vivo* 항균활성과 고추 탄저병균(*C. acutatum*)에 대한 *in vitro* 항균활성을 조사한 결과 EB215균주가 가장 우수한 활성을 보여주었다. 이 균은 생리·생화학적 특성과 Biolog실험 및 16S rDNA 유전자 서열에 의해 *Burkholderia cepacia*로 동정되

었다. *B. cepacia* EB215 균주의 배양액은 고추 탄저병 외에 벼 도열병(*Magnaporthe grisea*), 벼 잎집무늬마름병(*Corticium sasaki*), 토마토 잿빛곰팡이병(*Botrytis cinerea*) 및 토마토 역병(*Phytophthora infestans*) 등에 높은 항균활성을 보였다. 현재 이 균주로부터 항균물질의 분리 및 구조 동정에 대한 연구를 실시하고 있다.

## 감사의 글

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

## REFERENCES

- Bailey J. A., O'Connell, and C. Nash. 1992. Infection strategies of *Colletotrichum* species. pp. 88-120. In Bailey J. A and Jeger, M. J. (ed.), *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. CABI, Wallingford, UK.
- Balandreau, J., V. Viallard, B. Courmoyer, T. Coenye, S. Laevens, and P. Vandamme. 2001. *Burkholderia cepacia* genomovar III is a common plant-associated bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 982-985.
- Burkholder, W. 1950. A bacterial rot of onion bulbs. *Phytopathology* **40**: 115-118.
- Cartwright, D. K., W. S. Chilton, and D. M. Benson. 1995. Pyrrolnitrin and phenazine production by *Pseudomonas cepacia* strain 5.5B, a biocontrol agent of *Rhizoctonia solani*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**: 211-216.
- Coenye, T., L. Schouls, J. R. W. Govan, K. Kersters, and P. Vandamme. 1999. Identification of *Burkholderia* species and genomovars from cystic fibrosis patients by AFLP fingerprinting. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**: 1657-1666.
- Copping, L. G. 1998. The BioPesticide Manual, 1st ed. The British Crop Protection Council, Farnham, Surrey, UK. 333 pp.
- Elmer, W. H., H. A. Yang, and M. W. Sweetingham. 2001. Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from ornamental lupines in connecticut. *Plant Dis.* **85**: 216-219.
- Fiore, A., S. Laevens, A. Bevivino, C. Dalmastrri, S. Tabacchioni, P. Vandamme, and L. Chiarini. 2001. *Burkholderia cepacia* complex: distribution of genomovars among isolates from the maize rhizosphere in Italy. *Environ. Microbiol.* **3**: 137-143.
- Hallmann, J., A. Quadt-Hallmann, W. F. Mahaffee, and J. W. Kloepper. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.* **43**: 895-914.
- Janisiewicz, W. and J. Roitman. 1988. Biological control of blue mold and gray mold on apple and pear with *Pseudomonas cepacia*. *Annual Phytopathol.* **55**: 643-652.
- John, G. H., N. R. Krieg, and P. H. Sneath. 1994. *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology*. 9th ed., Williams and

- Wilkins, Baltimore, USA.
12. Keig, P. M., E. Inghant, P. A. R. Vandamme, and K. G. Kerr. 2002. Differential invasion of respiratory epithelial cells by members of the *Burkholderia cepacia* complex. *Clin. Microbiol. Infect.* **8**: 47-49.
  13. Kerr, A. 1980. Biological control of crown gall through production of agrocin 84. *Plant Dis.* **64**: 24-30.
  14. Kim, J.-C., G. J. Choi, J.-H. Park, H. T. Kim, and K. Y. Cho. 2001. Activity against plant pathogenic fungi of phomalactone isolated from *Nigrospora sphaerica*. *Pest Manag. Sci.* **57**: 554-559.
  15. Kim, J.-C., G. J. Choi, S.-W. Lee, J.-S. Kim, K. Y. Chung, and K. Y. Cho. 2004. Screening extracts of *Achyranthes japonica* and *Rumex crispus* for activity against various plant pathogenic fungi and control of powdery mildew. *Pest Manag. Sci.* **60**: 803-808.
  15. Kobayashi, D. Y. and J. D. Paulundo. 2000. Bacterial endophytes and their effect on plant uses in agriculture, pp. 199-233. In Bacon, C. W. and White, J. F. (ed.), *Microbial endophytes*. Marcel Dekker, Inc., New York, USA.
  16. Lipuma, J. J., B. J. Dulaney, J. D. McMenamin, P. W. Whitby, T. L. Stull, T. Coenye, and P. Vandamme. 1999. Development of rRNA-based PCR assay for identification of *Burkholderia cepacia* complex isolates recovered from cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 3167-3170.
  17. Meyer, J. M., D. Hohnadel, and F. Halle. 1989. Cepabactin from *Pseudomonas cepacia*, a new type of siderophore. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 1479-1487.
  18. Zinniel, D. K., P. Lambrecht, N. B. Harris, Z. Feng, D. Kuczarski, P. Higley, C. A. Ishimaru, A. Arunakumari, R. G. Barletta, and A. K. Vidaver. 2002. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 2198-2208.

(Received Sep. 6, 2004/Accepted Nov. 10, 2004)