

백강균 (*Beauveria bassiana*) 을 이용한 식물병원성세균 생장억제효능 검증

이기만[#], 남성희^{#1}, 홍인표¹, 성규병¹, 배윤환², 강태진^{*}

삼육대학교 약학대학 및 만성병연구소, ¹농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부, ²대전대학교 자연과학대학 생명과학과

Effects of the growth inhibition against plant pathogenic bacteria using *Beauveria bassiana*

Ki Man Lee[#], Sung Hee Nam^{#1}, In Pyo Hong¹, Gyoo Byung Sung¹, Yoon Hwan Bae² and Tae Jin Kang^{*}

College of Pharmacy and Institute of Chronic Disease, Sahmyook University, Seoul 139-742, Korea

¹Department of Agricultural Biology, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-707, Korea

²Department of Life Science, College of Natural Science, Daejin University, Pocheon 487-711, Korea

(Received June 7, 2011, Revised June 12, 2011, Accepted June 14, 2011)

ABSTRACT: This study was performed to investigate the antibacterial activities and the minimal inhibitory concentration (MIC) of 6 strains of *Beauveria bassiana* against mulberry pathogenic bacteria. The antibacterial activities and the MIC were measured using paper disc method and broth dilution method, respectively. The antibacterial activities were found out just *B. bassiana* J200, and shown at 13 mm from *Erwinia rhapontici* KACC 10407 and at 17 mm from *Pseudomonas syringae* KACC 10390 and *Xanthomonas campestris* KACC 12134. The MIC were all observed at 4.0% from *E. rhapontici* KACC 10407, *P. syringae* KACC 10390 and *X. campestris* KACC 12134. The results suggest that *B. bassiana* could play a good role for biological control against mulberry pathogenic bacteria.

KEYWORDS : Antibacterial activities, *Beauveria bassiana*, Minimal inhibitory concentration (MIC), Mulberry pathogenic bacteria

동충하초(Cordyceps)로 잘 알려진 곤충병원성진균(Entomopathogenic fungi) 중 불완전균류인 백강균(*Beauveria bassiana*)은 기주의 범위가 넓고 비교적 환경의 변화에 강한 종으로 알려져 있다(Aslantas *et al.*, 2008). *B. bassiana*에 감염된 백강잠(Bombyx mori)은 예로부터 중풍, 두드러기 등의 치료에 한약 재료로 이용되어 이에 대한 연구가 이루어졌다(Jung *et al.*, 2000). 현재는 주로 *B. bassiana*가 다양한 종류의 해충을 치사시키는 특성이 있어 생물학적 방제 활용에 관한 지속적인 연구가 진행되고 있다(Ugine *et al.*, 2007; Aslantas *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008). 또한 *B. bassiana*에 관한 연구로 Lee *et al.*(2005)은 *B. bassiana*를 포함한 곤충병원성진균의 식중독균에 대한 항균활성을 보고하는 등 천연물질인 *B. bassiana*에 관한 관심이 증가하고 있다. 하지만 식물병원성세균에 관한 연구는 항생제에 대한 식물병원성세균의 감수성 조사(Seo *et al.*, 2005) 이 외에 보고가 거의 없는 실정이다. 특히 *B. bassiana*의 식물병원성세균에 대한 항균 효과에 대해서는 보고되지 않고 있다.

따라서 본 연구에서는 식물병원성세균 중 뽕나무의 줄기썩음병(胴腐病)을 발생시키는 *Erwinia rhapontici* (Yi *et*

al., 1977), 세균성오갈병(縮葉細菌病)의 *Pseudomonas syringae* (Choi *et al.*, 1988) 그리고 가지썩음병(黑腐病)의 원인균인 *Xanthomonas campestris* (Choi *et al.*, 1990)를 사용하여 뽕나무병원성세균에 대한 *B. bassiana*의 항균활성을 알아보고 적합한 균주를 선발하였다. 항균물질은 당 및 단백질과 결합할 수 있기 때문에 생물에 대한 방어 화합물로서 작용할 수 있다는 보고(Choi and Jung, 1997)에 따라 본 논문을 *B. bassiana*을 이용한 뽕나무병원성세균에 대한 생물학적 방제의 기초 자료로 활용하고자 하였다.

본 실험에 사용한 *B. bassiana* 균주는 농촌진흥청 잡사양봉소재과 보존주로 PDA (Potato Dextrose Agar) 배지에 접종되어 보존되었다. *B. bassiana* J33를 비롯하여 *B. bassiana* J34, *B. bassiana* J54, *B. bassiana* J57, *B. bassiana* J157, *B. bassiana* J200 등 총 6 균주를 실험에 사용하였다. 시험균주의 균사 선단 부분을 5 mm cork borer를 이용해 균총을 떼어내어 250ml 삼각플라스크에 100ml씩 분주된 PDB (Potato Dextrose Broth) 배지에 접종하고 14일간 진탕 배양(25℃, 150 rpm) 후 멸균된 여과지(Whatman No. 1)에 여과하였다. 여과된 배양액은 동결 건조 후 멸균수에 일정한 농도로 희석하여 13,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 상등액은 0.2µm syringe filter

* Corresponding author (kangtj@syu.ac.kr)

Table 1. List of species and cultural condition of mulberry pathogenic bacteria

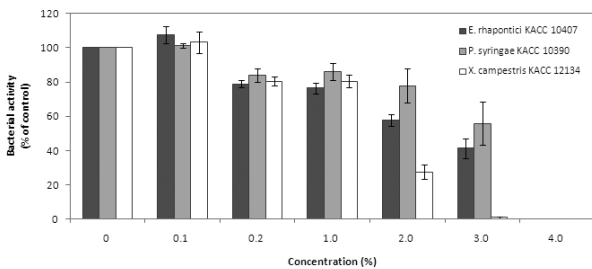
Species	Cultural condition
<i>Erwinia rhapontici</i> KACC 10407	Nutrient Agar ^a , 28°C, Aerobic
<i>Pseudomonas syringae</i> KACC 10390	Nutrient Agar, 28°C, Aerobic
<i>Xanthomonas campestris</i> KACC 12134	Glucose Yeast Agar ^b /NA, 26°C, Aerobic

^aNA : Nutrient broth 8 g; Agar 20 g; D.W 1,000 mL, ^bGYA : Glucose 20 g; Yeast extract 10 g; CaCO₃ 20 g; Agar 20 g; D.W 1,000mL.

Table 2. Antibacterial activities of *B. bassiana* extracts against mulberry pathogenic bacteria

Isolates	Inhibition zone ^a (mm)		
	<i>E. rhapontici</i> KACC 10407	<i>P. syringae</i> KACC 10390	<i>X. campestris</i> KACC 12134
<i>B. bassiana</i> J33	NI ^b	NI	NI
<i>B. bassiana</i> J34	NI	NI	NI
<i>B. bassiana</i> J54	NI	NI	NI
<i>B. bassiana</i> J57	NI	NI	NI
<i>B. bassiana</i> J157	NI	NI	NI
<i>B. bassiana</i> J200	13±1.0	17±0.5	17±0.5

^aDiameter : measured after 24 hours at incubator, ^bNo inhibition zone.

**Fig 1.** MIC of *B. bassiana* extracts against mulberry pathogenic bacteria.

(Sartorius)로 2차 여과하였고 4°C 항온기에 보관하며 실험에 사용하였다. 본 실험에 사용한 세균은 뽕나무에서 세균성 질환을 발생시키는 대표적인 균으로서 국립농업유전자원센터(Korean Agricultural Culture Collection, KACC)에서 *Erwinia rhapontici* KACC 10407, *Pseudomonas syringae* KACC 10390 그리고 *Xanthomonas campestris* KACC 12134를 분양받아 사용하였다. 배지 및 배양조건은 KACC의 product information sheet에 따라 Table 1에 나타냈다. 항균활성은 paper disc diffusion의 방법(Cappuccino and Sherman, 1983, Lee *et al.*, 2008)으로 측정하였다. 멸균된 petri dish (87×15mm, 녹십자)에 NA 또는 GYA 배지를 각각 20 mL 분주하였다. 배양된 세균은 600nm에서 흡광도(OD)를 측정(Amersham Biosciences, Ultrospec 6300 pro)하여 균수를 약 10⁶~10⁷ CFUs/mL 정도 되도록 조절한 후 각각의 배지에 100μL씩 spreader를 이용하여 균일하게 도말하였다. 지름이 8mm인 paper disc (Advantec)에 *B. bassiana* 희석액 50μL를 흡수시켜 실온에서 약 1시간 정도 확산시켰다. 확

산된 paper disc는 세균이 도말된 배지 표면상에 고정시킨 후 26~28°C의 조건에서 24시간 배양하여 paper disc 주위의 inhibition zone 크기로 항균활성을 확인하였다. 대조는 *B. bassiana* 추출액을 무첨가한 멸균수를 사용하였다. 최소 성장저해농도는 *B. bassiana* 6균주 중 *B. bassiana* J200을 사용하여 액체배지희석법(Piddock, 1990)으로 측정하였다. *B. bassiana* J200 추출물이 농도별(0%, 0.1%, 0.2%, 1.0%, 2.0%, 3.0% 및 4.0%)로 첨가된 NB 배지에 배양된 세균을 약 10⁶~10⁷ CFUs/mL이 되게 접종하였다. 이를 26~28°C의 조건에서 24시간 배양하여 600nm에서 OD를 측정하였다. 여기서 세균의 증식이 나타나지 않는 최소의 농도를 최소 성장저해농도 (MIC)로 하였다.

항균활성은 Table 2와 같이 *B. bassiana* 6균주 중 *B. bassiana* J200에서만 나타나 뽕나무병원성세균에 대한 가장 우수한 항균활성 균주로 밝혀졌다. *B. bassiana* J200은 *E. rhapontici* KACC 10407에서는 13mm의 적은 항균활성을 나타내었지만 *P. syringae* KACC 10390와 *X. campestris* KACC 12134에서는 각각 17mm의 항균활성을 나타내어 *E. rhapontici* KACC 10407 보다 비교적 우수하였다. 실험 결과 같은 종이라도 균주에 따라 항균활성의 차이성을 보였는데 이는 Lee *et al.*(2005)의 곤충병원성진균 항균활성 보고에서 사용한 동일 종내 균주별 항균활성에 차이를 보인 것과 유사하였다. 따라서 균주별 항균활성 차이가 발생지 감염 기주별 차이에 기인한 것인지 기타 요인이 작용한 것인지는 추후 추가 연구가 되어야 할 것이다. 특히 균주별 특성 연구 및 항균활성을 나타내는 물질 분리 연구가 필요할 것으로 사료된다. 액체배지희석법으로 실시한 MIC 측정 결과는 Fig. 1과 같이 나타났다. *E. rhapontici* KACC

10407, *P. syringae* KACC 10390 및 *X. campestris* KACC 12134 모두 0.2% 농도 이상에서 성장이 억제되었고 4.0% 농도에서 성장이 완전히 정지되었다. 특히 *X. campestris* KACC 12134는 1.0% 농도 이상부터 급속히 성장이 저해되어 3.0% 농도에서 세균이 거의 성장하지 못하였다. 따라서 상기 결과로 볼 때 *B. bassiana*의 최소성장저해농도는 4.0%로 확인되었다.

현재까지 식물에서 발생하는 병원균의 방제는 유기합성 살균제를 이용한 화학적인 방제가 보편화되어 있으나 식물체내 잔류 및 만성독성을 야기하며 내성균주 출현 가능성 등 사용에 많은 단점이 있다(An *et al.*, 2006). 따라서 본 실험은 곤충병원성진균 *B. bassiana*을 이용한 뽕나무병원성세균의 생물학적 방제 가능성을 확인하였으며 유기합성 살균제를 대체할 수 있을 것으로 판단된다. 앞으로 *B. bassiana*을 포함한 곤충병원성진균의 자원 확보와 더불어 다양한 식물 병원성세균에 대한 연구 및 현장 실험에서의 적용가능성에 대한 연구가 이루어져야 할 것이다.

적 요

뽕나무병원성세균에 대한 *Beauveria bassiana* 6균주의 항균활성을 paper disc법으로 조사하였고 최소성장저해농도(MIC)를 액체배지희석법으로 조사하였다. 항균활성은 *B. bassiana* J200에서만 나타났으며, *Erwinia rhapontici* KACC 10407에서는 13mm, *Pseudomonas syringae* KACC 10390와 *Xanthomonas campestris* KACC 12134에서는 각각 17 mm의 항균활성이 나타났다. MIC 측정 결과 *E. rhapontici* KACC 10407, *P. syringae* KACC 10390 및 *X. campestris* KACC 12134 모두 4.0%에서 MIC를 보였다. 이상의 결과로 *B. bassiana*의 뽕나무병원성세균에 대한 생물학적 방제제로서의 이용 가능성을 확인하였다.

참고문헌

An, X. H., An, W. H., Im, I. B., Lee, S. B. and Kang, J. G. 2006. Persistence of fungicide peniclyuron in soils. *Kor. J. Pesticide Sci.* 10 : 296-305.

Aslantas, R., Eken, C. and Hayat, R. 2008. *Beauveria bassiana* pathogenicity to the cherry slugworm, *Caliroa cerasi* (Hymenoptera: Tenthredinidae) larvae. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24 : 119-122.

Cappuccino, J. G. and Sherman, N. 1983. *Microbiology, a laboratory manual*, pp. 263-268. Addison-wesley

publishing company. Canada.

Choi, S. C. and Jung, J. S. 1997. Studies of antimicrobial from extracts of *Impatiens balsamina*(I). *J. Kor. Fiber Soc.* 34 : 393-399

Choi, S. H., Lee, K. G., Chio, Y. S., Kim, Y. T. and Lee, E. J. 1988. Pathogenicity and bacteriological characterization of *Xanthomonas campestris* from mulberry. *Kor. J. Plant Pathol.* 4 : 143-148.

Choi, S. H., Kim, Y. T., Lee, K. H. and Kim, C. U. 1990. The shoot and stem rot of mulberry caused by *Erwinia rhapontici*. *Kor. J. Plant Pathol.* 6 : 106-112.

Lee, K. M., Hong, I. P., Nam, S. H., Sung, G. B. and Bae, Y. H. 2008. The cultural characteristics and antibacterial activities of *Cordyceps militaris* and *Paecilomyces tenuipes*. *Kor. J. Appl. Entomol.* 47 : 479-486.

Lee, S. Y., Nakajima, I., Ihara, F., Kinoshita, H. and Nihira, T. 2005. Cultivation of entomopathogenic fungi for the search of antibacterial compounds. *Mycopathologia.* 160 : 321-325.

Liu, T., Wang, L., Duan, Y. X. and Wang, X. 2008. Nematicidal activity of culture filtrate of *Beauveria bassiana* against *Meloidogyne hapla*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24 : 113-118.

Jung, I. Y., Nam, S. H. and Cho, S. Y. 2000. Characteristics and pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* 101A on the silkworm (*Bombyx mori*). *Kor. J. Seric. Sci.* 42 : 99-103.

Piddock, L. J. V. 1990. Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 68 : 307-318

Seo, S. T., Lee, J. S., Park, J. H., Han, K. S. and Jang, H. I. 2005. Investigation of antibiotic susceptibility of some plant pathogenic bacteria. *Kor. J. Sci. Technol.* 23 : 495-498

Ugine, T. A., Wraight, S. P. and Sanderson, J. P. 2007. Effects of manipulating spray-application parameters on efficacy of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* against western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*, infesting greenhouse impatiens crops. *Biocontrol Sci. Technol.* 17 : 193-219.

Yi, Y. K., Kim, J. W. and Cho, Y. S. 1977. The study on rough colony type mutant of *Pseudomonas mori* (Boyer et Lambert) Stevens, caused mulberry bacterial blight : pathogenicity and general characteristics. *Kor. J. Pl. Prot.* 16 : 21-31.