

나노 금속복합체의 박과 작물 종자 분리균에 대한 항균효과

Antimicrobial Activities of Nano Metal Hybrid Materials against the Microorganisms Isolated from Cucurbit Seeds

***Corresponding author**

Tel: +82-33-250-6417

Fax: +82-33-243-3314

E-mail: younslee@kangwon.ac.kr

김상우¹ · 권병헌¹ · 주한준¹ · 마헤시 아드히카리¹ · 박미리² · 송석균² · 이윤수^{1*}¹강원대학교 식물자원응용공학과²(재)철원플라즈마산업기술연구원**Sang Woo Kim¹, Byeong Heon Gwon¹, Han Jun Ju¹, Mahesh Adhikari¹, Mi-ri Park², Seok-Kyun Song², and Youn Su Lee^{1*}**¹Department of Applied Plant Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea²Cheorwon Plasma Research Institute, Cheorwon 24047, Korea

This study was carried out to test the antimicrobial activities of nano metal hybrid materials produced by plasma technologies (radio frequency–thermal plasma system and direct current sputtering system) against microbes isolated from cucurbit (watermelon, pumpkin, and gourd) seeds. Eight different nano metal hybrid materials and four carriers were tested against five different fungal and ten different bacterial isolates *in vitro*. Among the tested nano metal hybrid material, Brass/CaCO₃ (1,000 ppm) exhibited 100% antimicrobial effect against all the five tested fungi. However, nano metal hybrid material Brass/CaCO₃ (1,000 ppm) inhibited only four bacterial isolates, *Weissella* sp., *Rhodotorula mucilaginosa*, *Burkholderia* sp., and *Enterococcus* sp. at 100% level, and did not inhibited other six bacterial isolates. Nano metal hybrid material graphite-nickel (G-Ni) showed 100% inhibition rate against *Rhizopus stolonifer* and 52.94–71.76% inhibition rate against four different fungal isolates. Nano metal hybrid material G-Ni did not show any inhibition effects against tested ten bacterial isolates. In summary, among the tested eight different nano metal hybrid materials and four carriers, Brass/CaCO₃ showed inhibition effects against five fungal isolates and four bacterial isolates, and G-Ni showed variable inhibition effects (52.94–100%) against five fungal isolates and did not show any inhibition effects against all the bacterial isolates.

Keywords: Antimicrobial, Brass/CaCO₃, Cucurbit seed, Graphite-Nickel (G-Ni), Nano metal hybrid materials

Received November 25, 2019

Revised December 6, 2019

Accepted December 6, 2019

서론

수박은 세계적으로 90여 개국에서 생산되는 중요 과채 작물로 농산물 유통공사의 자료에 따르면 우리나라의 수박재배 현

황은 2018년 기준 재배면적은 11,814ha이고 생산량은 476,634톤에 달하는 중요 과채류 중 하나이다. 수박재배 시 가장 문제가 되는 병해는 *Acidovorax avenae*에 의해 발생하는 과실썩음병 (bacterial fruit blotch, BFB)으로 종자전염이 1차 전염의 주요 원인으로 알려져 있으며(Latin과 Hopkins, 1995; Rane과 Latin, 1992), 이병 잔해물이나 접목에 의한 피해가 확산되는 대표적인 병으로 세계적으로 피해가 급증하고 있다(Assis 등, 1999; Burdman 등, 2005; Hopkins 등, 2003; Martin과 Horlock, 2002).

Research in Plant Disease

pISSN 1598-2262, eISSN 2233-9191

www.online-rpd.org

© The Korean Society of Plant Pathology

© This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

국내에서는 1991년 전북 고창에서 처음 발견되었으며, 2006년에는 나주 멜론 재배지에서 보고되었으며(Seo 등, 2006), 이후에도 전국에서 피해 보고가 발생하는 실정이다. 최근 수박 종자에서 유래하는 BFB균 살균에 대한 연구가 진행되었으며(Kim 등, 2015a), Kim 등(2015b) 및 Park 등(2015)은 각종 나노 금속복합체가 수박 종자에서 분리한 BFB균을 포함한 각종 미생물에 대하여 항균 활성이 있는지 연구한 결과를 발표한 바 있다. 따라서 수박 종자 및 수박의 대목으로 이용되는 호박과 박의 종자에 감염되어 병해를 유발하는 BFB균을 포함한 각종 미생물의 살균을 통해 무병 종자 및 건전 묘를 생산할 가능성을 추가로 연구할 필요성이 있다.

최근 농업의 국내외적으로 친환경 농업에 대한 관심이 높아지고 기존 관행 농업에서 벗어나 화학 농약 및 비료를 대체할 소재 개발에 대한 필요성이 대두되고 있다(Kim 등, 2015a), 현재 친환경 농자재가 많이 개발되어 있지만 생물 농약의 경우 유통 및 보관상의 문제점을 가지고 있다(Fravel 등, 1985; Kim 등, 2011). 따라서 이러한 필요성과 문제점을 해결하기 위한 일환으로 항균력을 지니고 안정적이면서 적은 양으로 최대의 효과를 볼 수 있는 금속 나노 소재에 관심을 가지게 되었다. 나노에 대한 개념은 1959년 Richard Feynman에 의하여 제기되었으며, IBM의 주사터널현미경(scanning tunneling microscope)이 개발되고 원자 구조에 대한 구조적인 관찰이 가능하게 되면서 구현되기 시작하였다. 나노 입자는 덩어리 상태보다 단위 부피당 표면의 원자의 개수가 상당히 많으며, 물질은 쪼개면 쪼갠수록 급격하게 증가하게 되며, 나노미터 수준의 입자는 어떤 물질의 크기가 cm 수준에서 나노미터 크기로 작아지면 표면적은 약 10^8 배 정도로 커진다고 보고되었다(Adamson과 Gast, 1997). 나노 기술은 원자 분자 크기 수준으로 나노 소재를 이용하면 표면적이 넓어지며 강한 촉매 작용과 반응성을 보여주며(Haruta, 1997), 넓은 표면적을 이용하여 흡착 및 유용물질을 전달하는 데 유용하게 사용할 수 있다(Brannon-Peppas와 Blanchette, 2004). 또한, 나노 기술을 생명공학 분야에 적용하게 된 시기는 1990년이며, 당시의 기술한계를 극복하고자 나노 기술을 연구 개발하고자 많은 투자가 진행되고 있다. 나노 입자는 약 100 nm 이하의 크기를 말하며 덩어리 또는 마이크로 이상의 큰 입자와는 다른 전자적, 화학적, 자기적인 특이성을 가진다고 보고되었다(Sharma 등, 2009).

나노 기술을 활용한 소재는 의학 및 화장품 원료로 많이 이용하고 있다. 이러한 나노 기술을 활용하여 금(Au), 은(Ag), 철(Fe) 등을 나노 입자로 만들어 오염물 제거와 반도체 산업에의 활용 등 다양한 목적으로 사용되고 있다. 은의 경우 가

장 많이 알려진 나노 소재로 살균 및 소독의 목적으로 응용되고 있다. 은 나노의 경우 인체에는 무해하지만 미생물과 접촉하면 불활성화 및 활성산소(reactive oxygen species, ROS) 생성을 유도한다는 보고가 있다(Feng 등, 2000; Holt와 Bard, 2005; Hwang 등, 2011; Min, 2008; Park 등, 2009; Roh 등, 2009). 하지만 은 또는 금 소재의 경우 고가의 금속으로 다양한 분야에서 활용하기에 부적합하여 살균 효과가 있는 것으로 알려졌고 은 소재에 비하여 상대적으로 가격이 저렴한 구리(Cu), 니켈(Ni), 이산화티타늄(TiO_2) 등이 은, 금 소재 대체제로 많이 활용되고 있다(Chang 등, 2006; Dastjerdi와 Montazer, 2010; Karimi 등, 2014).

기존 나노 입자의 합성 방법은 크게 두 가지 방법으로 나눌 수 있으며, 화학적 합성 방법은 화학반응을 이용하여 용액 내에 결정핵을 생성시키고 원하는 크기까지 성장시켜 나노 분말을 제조하는 방법(Brinker와 Scherer, 1990)이며, 생물학적 제조방법은 식물 및 미생물을 이용한 방법으로 나노 입자 생성의 정확한 메커니즘은 밝혀지지 않았지만, 곰팡이의 한 종류인 *Fusarium oxysporum*의 경우 NADPH dependent reductase가 체외로 분비되면서 환원 반응에 의하여 나노 입자를 합성한다고 보고되어있다(Hsieh 등, 2012; Song 등, 2008). 하지만 위의 방법들은 입경 분포 및 형태, 결정성 등의 입자가 고르지 못하거나 응집되는 현상이 발생하여 정밀한 제어가 필요한 기술이다(Park, 2002). 하지만 최근 플라즈마 기술을 이용하면 입경 분포 및 형태 그리고 응집 현상 없이 안정된 나노 입자를 제작할 수 있으며, 다양한 담체에 코팅하여 나노 복합체를 제조할 수 있는 방법이 보고된 바 있다(Burda 등, 2005). 또한, 제조 공정이 환경친화적이고 안정적이며 단순한 공정을 통하여 외부환경으로부터 오염 없이 고순도의 나노 물질을 대량 생산할 수 있으며, 비용 절감의 효과를 볼 수 있는 기술로 현재 여러 분야에서 활발하게 이용하고 있다(Kim 등, 2015b).

본 연구는 radio frequency [RF]-thermal plasma system (RF-thermal plasma system) (Park 등, 2015) 및 direct current (DC) sputtering 기술(Kim 등, 2015b)을 활용하여 물리적인 방법으로 다양한 금속 나노 입자를 각종 담체(Graphite, Fe^0 , Activated Carbon [2040Aw], $CaCO_3$)에 코팅하여 제작한 나노 금속복합체를 활용해 건전 종자 생산을 위한 종자소독 방법의 하나로 박과 작물(수박, 호박, 박)의 종자에서 분리한 세균 및 곰팡이를 효과적으로 억제할 수 있는 나노 금속복합체를 탐색하기 위하여 수행되었다.

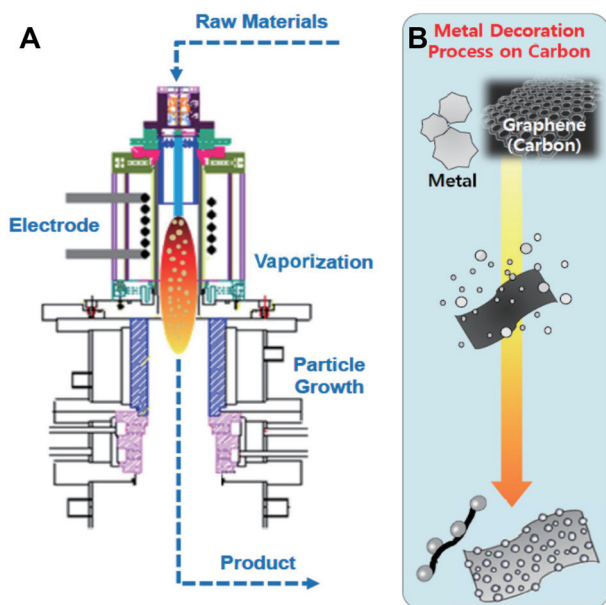


Fig. 1. Radio frequency (RF) thermal plasma system. (A) RF-thermal plasma system. (B) Various carrier such as graphite, activated carbon (2040Aw) or Fe⁰ were mixed with various metal particles and carrier gas were injected onto feeder of RF-thermal plasma system. Various metal particles except graphite, activated carbon and Fe⁰ which are carbon-based materials were vaporized by high temperature (10,000°C) of RF-plasma and were integrated on carrier surface of chemical bond.

재료 및 방법

RF-thermal plasma system을 이용한 나노 금속복합체 제조. 여러 가지 금속 나노 금속복합체를 제작하기 위하여

RF-thermal plasma 기법을 사용하였다(Fig. 1). 담체는 activated carbon (2040Aw), graphite, Fe⁰ 사용하였으며, 담체에 증착시킬 금속 입자는 micro 사이즈의 Ni, MgO, Mn, Fe, Mn+Ag 혼합물, Mn+Cu+Ag 혼합물을 사용하였다. 금속 입자를 담체에 증착하기 위하여 각각의 담체와 micro 사이즈의 금속 입자를 혼합하여 carrier gas와 함께 RF-thermal plasma system의 10,000°C 초고온 플라즈마 영역에 주입하였다. 담체를 제외한 금속 입자들이 초고온에 의하여 기화되면 RF-thermal plasma system 내부에 quenching gas (argon gas)를 주입하여 냉각시킨다. 기화된 금속 입자들은 argon gas에 의하여 냉각되면서 금속 나노 입자로 결정화되도록 한 후 각각의 담체 표면과 화학결합되면서 증착되도록 하였다. RF-thermal plasma system을 이용해 제작된 나노 금속복합체는 Table 1과 같다(Park 등, 2015).

DC sputtering system을 이용한 Brass/CaCO₃ 나노 금속복합체 제조. Brass/CaCO₃ 나노 금속복합체를 제작하기 위하여 DC sputtering system을 사용하였다(Fig. 2). 담체는 CaCO₃를 사용하였으며, 입자의 크기는 50–100 μm이다. Brass 나노 입자를 담체에 증착시키기 위하여 Brass metal target (직경, 10 inch; 두께, 10 mm)을 제작하였다. 나노 금속복합체 제작을 위하여 담체를 진공조(vacuum chamber)의 교반통(darrel)에 장입하여 교반과 동시에 제작된 Brass target으로부터 이온화된 나노 입자를 담체 표면에 증착시켰다. DC sputtering 공정 단계의 진공조의 기본진공도(base pressure)는 5×10⁻⁵ Torr이었으며, working pressure는 9×10⁻³–9×10⁻⁴ Torr로 조정하여 실시

Table 1. List of nano materials used in this study

Method used ^a	Carrier	Nano metal hybrid materials used	Abbreviations
A	Graphite	Graphite coated Ni	G-Ni
-		-	Graphite
A	Micro-sized Fe ⁰ (>100 μm)	MgO-coated micro Fe ⁰	MgO/Fe-A
-		-	mFe ⁰
-	No carrier	Nano-sized Fe (<100 μm)	nFe
-	Activated carbon (2040Aw)	-	2040Aw
A		Activated carbon-coated Fe 10%	2040Aw/Fe (10%)
A		Activated carbon-coated Mn 5%	2040Aw/Mn (5%)
A		Activated carbon-coated Mn/Ag 3%	2040Aw/Mn/Ag (3%)
A		Activated carbon-coated Mn/Cu/Ag 10%	2040Aw/Mn/Cu/Ag (10%)
B	CaCO ₃	CaCO ₃ -coated Brass 1,000 ppm	Brass/CaCO ₃

^aMethod used to produce nano metal hybrid materials: A, radio frequency–thermal plasma system; B, direct current sputtering system.

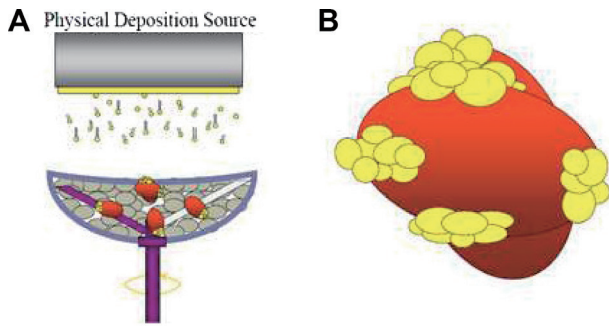


Fig. 2. Direct current (DC) sputtering system for the production of Brass/CaCO₃. (A) DC sputtering system. The carrier CaCO₃ is inserted into the Darrel in a vacuum chamber where the brass metal target is sputtered through DC to become nano particles and be deposited on the carrier CaCO₃. (B) Final Brass/CaCO₃ nano metal hybrid material. Red particle is a carrier (CaCO₃) and yellow particle is nano-size brass deposited on the carrier particle.

하였다. 또한, Brass target을 이온화하기 위한 입력 전압은 DC 300–500 W 조건으로 실시하였다. 나노 입자의 농도는 input power, sputtering rate, sputtering efficiency 등의 조건을 반영하여 증착 시간을 조정하였으며, 최종 1,000 ppm 농도의 Brass/CaCO₃ 나노 금속복합체를 제작하였다(Kim 등, 2015b).

박과 작물 종자에서 미생물 분리 및 동정. 실험에 사용한 세균 및 곰팡이 균주는 박과에 속하는 수박, 호박, 박 종자로

부터 분리하였다. 미생물을 분리하기 위하여 종자를 표면살균 후 막자사발을 이용하여 마쇄하여 1 g의 시료를 9 ml 멸균수에 넣어 serial dilution법을 이용하여 10⁻² 및 10⁻⁴ 농도로 희석하여 곰팡이는 potato dextrose agar (PDA) 배지(MBCCell, Seoul, Korea)에 도말 접종하여 25°C에서 7일 동안 배양하면서 형태적 특성에 따라 순수분리 배양하였으며, 세균의 경우 tryptic soy agar (TSA; MBCCell) 배지에 30 µl 도말 접종하여 28°C에서 3–5 일 동안 배양하면서 형태적으로 다른 균을 순수분리 배양하였다. 분리된 균주들은 20% glycerol stock으로 제작하여 -80°C에 보관하여 실험에 사용하였다. 순수 분리된 각각의 균주는 internal transcribed spacer region, 16S rRNA로 염기서열을 분석하고 분석된 결과를 NCBI GenBank의 BLAST 프로그램을 이용하여 동정하였다(Table 2).

박과 작물 종자에서 분리한 곰팡이에 대한 나노 금속복합체의 항균실험. 플라즈마 기술을 활용하여 제작된 나노 금속복합체 8개와 담체 4개의 항균효과 실험을 위하여 박과 작물(수박, 호박, 박)의 종자에서 분리한 곰팡이 5종을 대상으로 항균 활성 검정을 실시하였다. 나노 금속복합체 8개와 담체 4개를 PDA 배지에 1% (250 ml) 농도로 배지 온도가 50°C 이하로 떨어졌을 때 첨가하였다. 박과 작물(수박, 호박, 박) 종자에서 분리한 곰팡이는 PDA 배지에 배양하였으며, cork borer(φ, 3 mm)를 이용하여 agar plug를 만들고 각각의 나노 금속복합체가 첨가된

Table 2. List of fungi and bacteria isolated from cucurbit seeds

	Host	Source	Species	GenBank accession No.	Similarity (%)
Fungi	Watermelon	Seed coat	<i>Penicillium pinophilum</i>	CP017345.1	99
	Pumpkin	Seed endosperm	<i>Talaromyces purpleogenus</i>	KJ572249.1	99
	Gourd	Seed coat	<i>Aspergillus tubingensis</i>	KY864240.1	99
			<i>Aspergillus fumigatus</i>	KM268635.1	99
<i>Rhizopus stolonifer</i>			MF461025.1	99	
Bacteria	Watermelon	Seed coat	<i>Prorocentrum micans</i>	AY822609.1	98
			<i>Weissella</i> sp.	LC096236.1	99
			<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	DQ832198.1	99
		Seed endosperm	<i>Burkholderia</i> sp.	KT159931.1	100
			<i>Enterococcus</i> sp.	KC699067.1	99
			<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	NG_042640.1	99
	Pumpkin	Seed coat	<i>Enterobacter</i> sp.	CP017184.1	99
		Seed endosperm	<i>Bacillus cereus</i>	CP021061.1	99
			<i>Bacillus</i> sp.	JX680098.1	99
	Gourd	Seed coat	<i>Burkholderia</i> sp.	KT159931.1	99
Seed endosperm		<i>Burkholderia</i> sp.	KT159931.1	99	

Table 3. Antimicrobial activities of various nano materials against different fungal isolates from cucurbit seeds

Nano materials and carries	Inhibition rate (%)				
	<i>Penicillium pinophilum</i>	<i>Talaromyces purpureogenus</i>	<i>Aspergillus tubingensis</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>
G-Ni	71.76 d ^a	52.94 d	62.71 d	57.29 e	100 e
Graphite	0 a	0 a	0 a	0 a	7.06 b
MgO-Fe-A	27.05 b	27.41 c	29.41 b	23.88 bcd	33.76 c
mFe ⁰	54.12 c	26.71 bc	27.41 b	28.24 d	66.71 d
nFe	20.82 b	22.35 bc	40.06 c	17.65 a-d	3.88 a
2040Aw ^b	2.0 a	0 a	0 a	5.53 ab	25.53 bc
2040Aw-Fe (10%)	18.47 b	11.41 ab	0 a	22.71 bcd	8.59 ab
2040Aw-Mn (5%)	15.65 b	29.06 c	0 a	8.59 abc	14.12 abc
2040Aw-Mn-Ag (3%)	21.53 b	22.71 bc	3.88 a	24.70 cd	30.59 a
2040Aw-Mn-Cu-Ag (10%)	0 a	0 a	9.76 a	0 a	18.82 abc
Brass/CaCO ₃ (1,000 ppm)	100 e	100 e	100 e	100 f	100 e
Control	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a

^aAverage value of three repetitions. Means followed by the same letter(s) in each column are not significantly different based on Duncan multiple range test ($P \leq 0.05$).

^b2040Aw: activated carbon.

배지 중앙에 접종하여 25°C에서 7일간 배양하였다. 무처리 배지의 균사 생장 선단의 길이와 처리구의 생장 선단의 길이를 측정하여 비교하였으며, 3반복 실험하여 평균값을 조사하였다.

박과 작물 종자에서 분리한 세균에 대한 나노 금속복합체의 항균실험. 플라즈마 기술을 활용하여 제작된 나노 금속복합체 8개와 담체 4개에 대한 항균효과 실험을 위하여 박과 작물(수박, 호박, 박)에서 분리한 10종을 대상으로 항균 활성을 실험하였다. 각각의 나노 금속복합체 8개와 담체 4개를 TSA 배지에 1% (250 ml) 농도로 배지 온도가 50°C 이하로 떨어졌을 때 첨가하였다. 세균은 TSA 배지에 28°C/150 rpm/48 hr 배양하여 1×10^7 cells/ml 농도로 희석하여 사용하였다. 항균성 검정은 나노 금속복합체가 첨가된 TSA 배지에 30 μ l씩 도말 접종하여 28°C에서 48시간 동안 배양한 후 colony를 카운팅하였다. 실험은 3반복 실험하여 평균값을 조사하였다.

결 과

나노 금속복합체의 곰팡이에 대한 항균활성 검정. 박과 작물 종자(수박, 호박, 박)에서 분리한 곰팡이 5종을 대상으로 플라즈마 기술을 이용해 제작된 나노 금속복합체 8개와 담체 4개에 대한 항균효과를 확인하였으며, 각각의 나노 금속복합체와

담체를 첨가하여 제조한 배지에서 실험한 결과, 대조구와 비교하면 Brass/CaCO₃ 1,000 ppm 농도의 나노 금속복합체가 곰팡이 5종 모두에 대해서 100%의 억제율을 보이며 가장 높은 항균효과를 보였다. G-Ni은 *Rhizopus stolonifer*에 대하여 100% 균사 생장 억제율을 보였으며, 다른 4가지 곰팡이에 대해서 52.94–71.76%의 억제율을 보였다(Table 3). mFe⁰는 *Penicillium pinophilum*, *R. stolonifer* 곰팡이의 균사 생장을 각각 54.12%, 66.71% 억제하였으며, nFe의 경우 *Aspergillus tubingensis*에 대하여 40.06% 균사 생장을 억제하는 것으로 확인되었으며, 나머지 나노 금속복합체 및 담체의 항균효과는 경미한 것으로 확인되었다. 또한, 나노 금속복합체 첨가 배지 제조 시 나노 금속복합체가 고르게 분포되지 않은 배지의 경우 나노 금속복합체가 묻쳐있는 곳에서는 균사가 자라지 못하는 것을 확인하였으며, 나노 금속복합체의 경우 직접적으로 접촉한 경우에 확인한 항균효과가 나타나는 것으로 판단된다(Fig. 3).

나노 금속복합체의 세균에 대한 항균 활성 검정. 박과 작물 종자에서 분리한 10종의 세균에 대하여 항균효과를 확인한 결과, Brass/CaCO₃ (1,000 ppm) 첨가 배지에서 *Weissella* sp., *Rhodotorula mucilaginosa*, *Burkholderia* sp., *Enterococcus* sp.의 생장이 100% 억제되는 것을 확인하였다(Table 4). Brass/CaCO₃ (1,000 ppm) 이외의 다른 나노 금속복합체와 담체들은 실험한

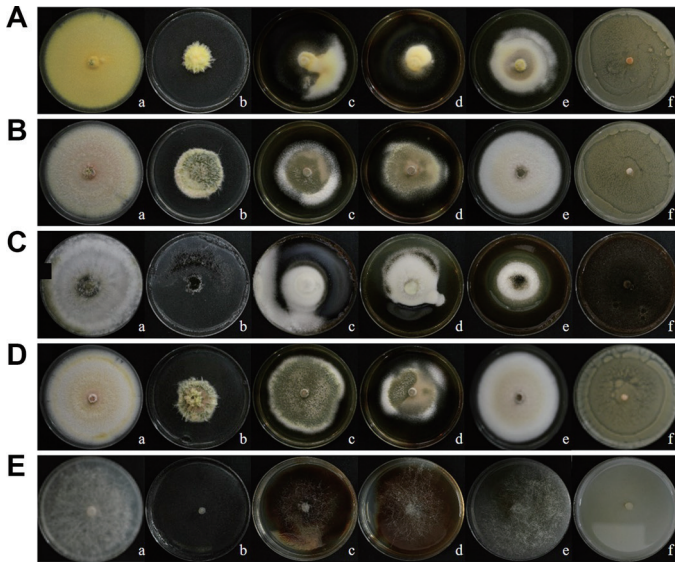


Fig. 3. Inhibition effects of various nano metal hybrid material against different fungal isolates on potato dextrose agar medium. Brass/CaCO₃ (1,000 ppm) exhibited 100% antimicrobial effect against all the five tested fungi. Nano metal hybrid material Graphite-Nickel (G-Ni) showed 100% inhibition rate against *Rhizopus stolonifer* and showed 52.94–71.76% inhibition rates against other four fungal isolates. mFe⁰ showed inhibition rate of 54.12% and 66.71% against *Penicillium pinophilum* and *R. stolonifer*, respectively. nFe showed 40.06% inhibition rate against *Aspergillus tubingensis*. Other nano materials and carriers showed minimal inhibition effects against the tested fungal isolates. (A) *P. pinophilum*. (B) *Talaromyces purpureogenus*. (C) *A. tubingensis*. (D) *Aspergillus fumigatus*. (E) *R. stolonifer*. a, control; b, G-Ni; c, MgO-Fe-A; d, mFe⁰; e, nFe; f, Brass/CaCO₃ (1,000 ppm).

세균들에 대하여 항균성을 전혀 보이지 않았다(Fig. 4). 세균의 경우에서도 나노 금속복합체 첨가 배지 제조 시 나노 금속복합체가 고르게 분포되지 않은 배지의 경우 나노 금속복합체가 묻혀있는 곳에서는 세균이 성장하지 못하는 것을 확인하였으며, 일부 나노 금속복합체의 경우 직접 접촉했을 경우 효과가 나타나는 것으로 확인되었다(Table 4). 선행연구에서 Ni가 효과가 있었던 것과 유사하게(Kim 등, 2015b) G-Ni 나노 금속복합체가 높은 항균효과를 보였다(Fig. 4).

고 찰

현재 농업의 가장 큰 과제는 기후 변화, 환경오염 등 많은 문제점을 가지고 있으며 지속적인 화학농약 및 비료의 사용에 따라서 토양 및 수질 오염 등에 많이 노출되어 있다(Ditta, 2012; Kim 등, 2015a). 따라서 새로운 기술을 이용하여 환경오염도 줄이면서 화학제품들의 사용을 자제하는 농업이 발전되고 있다.

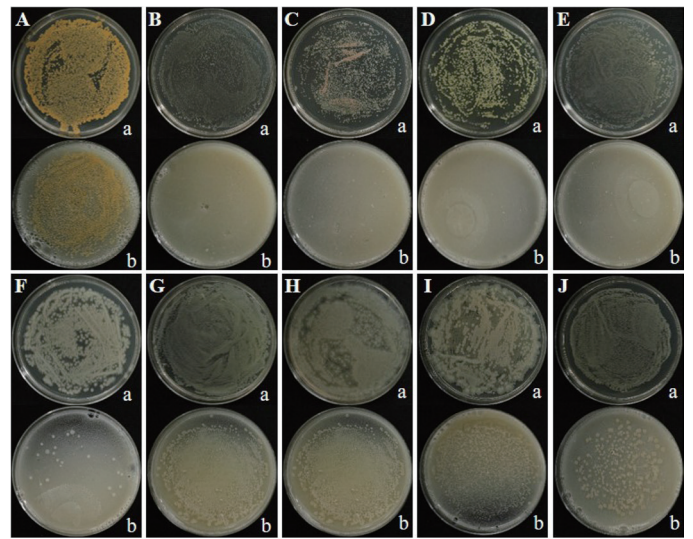


Fig. 4. Inhibition effects of nano metal hybrid material Brass/CaCO₃ (1,000 ppm) against different bacterial isolates on tryptic soy agar medium. Nano metal hybrid material Brass/CaCO₃ (1,000 ppm) inhibited only four bacterial isolates, *Weissella* sp., *Rhodotorula mucilaginosa*, *Burkholderia* sp., and *Enterococcus* sp. at 100% level. Other nano metal hybrid materials and carriers did not show any inhibition effects against all the tested bacterial isolates. (A) *Prorocentrum micans*. (B) *Weissella* sp. (C) *Rhodotorula mucilaginosa*. (D) *Burkholderia* sp. (E) *Enterococcus* sp. (F) *Meyerozyma guilliermondii*. (G) *Enterobacter* sp. (H) *Bacillus cereus*. (I) *Bacillus* sp. (J) *Burkholderia* sp. a, control; b, treated.

그 중에서 나노 기술을 활용하여 항균력을 지닌 금속성 재료들을 나노 크기로 제작하여 물리적, 화학적, 생물학적 특성을 가지는 소재로 유용하게 이용하는 연구가 진행되고 있다(Kim 등, 2015a; Park 등, 2015). 또한, 금속 나노 소재의 경우 이온보다 독성이 낮으며 아주 소량으로 효과가 나타나는 것으로 알려져 있다(Mamonova, 2013). 이는 금속 덩어리나 마이크로 크기보다 적은 크기로 표면적이 넓어 나노 입자들이 세균의 세포막에 붙어 금속 이온에 의하여 세포막에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Morones 등, 2005). 그리고 나노 입자의 항균성은 입자들이 세포막에 접촉하여 물리적인 반응으로 인하여 ROS 및 세포막의 붕괴에 의한 항균성을 가진다고 보고 되었다(Pal 등, 2007). 황동에 포함되어있는 구리(Cu)는 인체에는 무해하고 항균력을 가지고 있으며, 공기 중의 유해성분을 제거한다고 보고 되었다(Oya 등, 1993; Park 등, 2003).

본 연구에서 몇몇 나노 금속복합체의 항균력을 확인하였으며, Brass/CaCO₃ 및 G-Ni 나노 금속복합체의 경우 박과 작물(수박, 호박, 박) 종자로부터 분리한 곰팡이에 대하여 100%의 매우 강한 항균력을 보였다(Table 3, Fig. 3). G-Ni 나노 금속복합체의 경우 세균에 대하여 높은 항균효과를 보였다(Table 4, Fig. 4). Park 등

Table 4. Antimicrobial activities of various nano materials against different bacterial isolates from cucurbit seeds

Nano materials and carriers	Inhibition rate (%)									
	Watermelon				Pumpkin			Gourd		
	<i>Prorocentrum micans</i>	<i>Weissella</i> sp.	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Burkholderia</i> sp.	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	<i>Enterobacter</i> sp.	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Burkholderia</i> sp.
G-Ni	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Graphite	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MgO-Fe-A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
mFe ⁰	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
nFe	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2040Aw ^a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2040Aw-Fe (10%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2040Aw-Mn (5%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2040Aw-Mn-Ag (3%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2040Aw-Mn-Cu-Ag (10%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Brass/CaCO ₃ (1,000 ppm)	0	100	100	100	100	0	0	0	0	0
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

^a2040Aw: activated carbon

(2015)은 Ni, G-Ni을 이용하여 수박과 실썩음병의 원인균인 BFB군 15개 strain을 대상으로 항균 활성을 검정한 결과, G-Ni를 처리 시 무처리구에 비하여 세균 생장을 억제한다고 보고한 바 있다. 다른 연구에서 Ni 나노 입자가 항생제보다 높은 항균효과를 가진다고 보고되기도 하였다(Kumar 등, 2012). 또한, 황동에 포함된 구리는 세포내 ROS를 증가시켜 세포를 사멸시킨다고 보고되었다(Harrison 등, 2009). 본 연구에서는 RF-thermal plasma system 및 DC sputtering system을 활용하여 여러 가지 금속 나노 입자를 담체(graphite, Fe⁰, activated carbon [2040Aw], CaCO₃)에 코팅하여 나노 금속복합체(nano metal hybrid materials)를 제작할 경우 항균력을 유지하는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 농업 및 환경 분야의 넓은 범위에서 미생물을 제어하는 소재로 이용할 수 있는 충분한 잠재력이 있을 것으로 판단된다.

요 약

이 연구는 플라즈마 기술 (radio frequency-thermal plasma

system과 direct current sputtering system)을 이용하여 제작된 나노 금속복합체를 이용하여 박과 작물(수박, 호박, 박)의 종자에서 분리한 미생물의 항균 활성 효과를 검정하기 위하여 실험을 진행하였다. 8종의 나노 금속복합체와 4가지의 담체를 이용하여 5종의 곰팡이와 10종의 세균을 대상으로 기내 실험을 수행하였다. 그 결과, 곰팡이를 대상으로 한 항균실험에서 나노 금속복합체 Brass/CaCO₃의 경우 1,000 ppm 농도에서 5종의 곰팡이에 대하여 100%의 항균효과를 나타내었다. 세균을 대상으로 한 항균실험의 경우 나노 금속복합체 Brass/CaCO₃ (1,000 ppm)은 *Weissella* sp., *Rhodotorula mucilaginosa*, *Burkholderia* sp. 그리고 *Enterococcus* sp. 4가지 세균을 100% 억제하는 것으로 확인되었다. 나노 금속복합체 G-Ni은 *Rhizopus stolonifer*에 대하여 100% 항균효과를 나타냈으며, 4가지 곰팡이에 대해서는 52.94–71.76% 정도의 항균효과를 나타내었다. 하지만 나노 금속복합체 G-Ni은 10종의 세균에 대해서는 효과가 없는 것으로 나타났다. 요약하면, 8가지 나노 금속복합체와 4가지 담체 중에서 Brass/CaCO₃가 5종의 곰팡이와 4종의 세균

에 대하여 항균효과가 있었으며, G-Ni는 5종의 곰팡이에 대해서 52.94–100% 효과를 보였으나 세균에 대해서는 항균효과가 없는 것으로 확인되었다.

Conflicts of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

Acknowledgments

This work was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, and Forestry (IPET) through Golden Seed Project (213006-05-3-SBS30), funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA), Ministry of Oceans and Fisheries (MOF), Rural Development Administration (RDA) and Korea Forest Services (KFS). This research was also partially supported by the University Industry Cooperation Foundation of Kangwon National University.

References

- Adamson, A. W. and Gast, A. P. 1997. Physical Chemistry of Surfaces. 6th ed. John Wiley & Sons, New York, NY, USA. 808 pp.
- Assis, S. M. P., Mariano, R. L. R., Silva-Hanlin, D. M. W. and Duarte, V. 1999. Bacterial fruit blotch caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citruilli* in melon in the state of Rio Grande do Norte, Brazil *Fitopatol. Bras.* 24: 191. (In Portuguese)
- Brannon-Peppas, L. and Blanchette, J. O. 2004. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56: 1649-1659.
- Brinker, C. J. and Scherer, G. W. 1990. Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing. Academic Press, Boston, MA, USA. 908 pp.
- Burda, C., Chen, X., Narayanan, R. and El-Sayed, M. A. 2005. Chemistry and properties of nanocrystals of different shapes. *Chem. Rev.* 105: 1025-1102.
- Burdman, S., Kots, N., Kritzman, G. and Kopelowitz, J. 2005. Molecular, physiological, and host-range characterization of *Acidovorax avenae* subsp. *citruilli* isolates from watermelon and melon in Israel. *Plant Dis.* 89: 1339-1347.
- Chang, H.-S., Kim, J.-E., Chung, D.-J., Lee, J.-S., Choi, C.-B. and Kim, H.-Y. 2006. The antibacterial effect of photo-catalytic titanium dioxide on canine skin. *Korean J. Vet. Res.* 46: 279-284. (In Korean)
- Dastjerdi, R. and Montazer, M. 2010. A review on the application of inorganic nano-structured materials in the modification of textiles: focus on anti-microbial properties. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 79: 5-18.
- Ditta, A. 2012. How helpful is nanotechnology in agriculture? *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.* 3: 033002.
- Feng, Q. L., Wu, J., Chen, G. Q., Cui, F. Z., Kim, T. N. and Kim, J. O. 2000. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J. Biomed. Mater. Res.* 52: 662-668.
- Fravel, D. R., Marois, J. J., Lumsden, R. D. and Connick, W. J. Jr. 1985. Encapsulation of potential biocontrol agents in an alginate-clay matrix. *Phytopathology* 75: 774-777.
- Harrison, J. J., Tremaroli, V., Stan, M. A., Chan, C. S., Vacchi-Suzzi, C., Heyne, B. J. et al. 2009. Chromosomal antioxidant genes have metal ion-specific roles as determinants of bacterial metal tolerance. *Environ. Microbiol.* 11: 2491-2509.
- Haruta, M. 1997. Size-and support-dependency in the catalysis of gold. *Catal. Today* 36: 153-166.
- Holt, K. B. and Bard, A. J. 2005. Interaction of silver(I) ions with the respiratory chain of *Escherichia coli*: an electrochemical and scanning electrochemical microscopy study of the antimicrobial mechanism of micromolar Ag⁺. *Biochemistry* 44: 13214-13223.
- Hopkins, D. L., Thompson, C. M., Hilgren, J. and Lovic, B. 2003. Wet seed treatment with peroxyacetic acid for the control of bacterial fruit blotch and other seedborne disease of watermelon. *Plant Dis.* 87: 1495-1499.
- Hsieh, C.-T., Tzou, D.-Y., Pan, C. and Chen, W.-Y. 2012. Microwave-assisted deposition, scalable coating, and wetting behavior of silver nanowire layers. *Surf. Coat. Technol.* 207: 11-18.
- Hwang, I.-S., Cho, J., Hwang, J. H., Hwang, B., Choi, H., Lee, J. et al. 2011. Antimicrobial effects and mechanism(s) of silver nanoparticle. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* 39: 1-8. (In Korean)
- Karimi, L., Zohoori, S. and Amini, A. 2014. Multi-wall carbon nanotubes and nano titanium dioxide coated on cotton fabric for superior self-cleaning and UV blocking. *New Carbon Mater.* 29: 380-385.
- Kim, H. S., Um, Y. H., Kim, S. W., Yadav, D. R., Adhikari, M., Lee, S. C. et al. 2015a. Antimicrobial activity of chemical fungicides against *Acidovorax citruilli* and *Acidovorax valerianellae*, pathogens of bacterial fruit blotch (BFB). *J. Agric. Life Environ. Sci.* 27: 56-60. (In Korean)
- Kim, S. W., Adhikari, M., Yadav, D. R., Lee, H. G., Um, Y. H., Kim, H. S. et al. 2015b. Antimicrobial activity of nano materials against *Acidovorax citruilli* and other plant pathogens. *Res. Plant Dis.* 21: 12-19. (In Korean)
- Kim, Y.-K., Hong, S.-J., Jee, H.-J., Shim, C.-K., Park, J.-H., Han, E.-J. et al. 2011. Population dynamics of effective microorganisms in microbial pesticides and environmental-friendly organic materials according to storing period and temperature. *Korean J. Pestic. Sci.* 15: 55-60. (In Korean)
- Kumar, A., Verma, U. and Chauhan, S. 2012. Antimicrobial activity of nickel II coordinated compounds. *G. J. B. B.* 1: 310-313.

- Latin, R. X. and Hopkins, D. L. 1995. Bacterial fruit blotch of watermelon. The hypothetical exam question becomes reality. *Plant Dis.* 79: 761-765.
- Mamonova, I. A. 2013. Study of the antibacterial action of metal nanoparticles on clinical strains of gram-negative bacteria. *World J. Med. Sci.* 8: 314-317.
- Martin, H. L. and Horlock, C. M. 2002. First report of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* as a pathogen of Gramma in Australia. *Plant Dis.* 86: 1406.
- Min, J. S. 2008. Effects of nano-silver liquid against various plant pathogenic microorganisms. M.S. thesis. Kangwon National University, Chuncheon, Korea. 92 pp. (In Korean)
- Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramírez, J. T. et al. 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 16: 2346-2353.
- Oya, A., Wakahara, T. and Yoshida, S. 1993. Preparation of pitch-based antibacterial activated carbon fiber. *Carbon* 31: 1243-1247.
- Pal, S., Tak, Y. K. and Song, J. M. 2007. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 1712-1720.
- Park, H.-J., Kim, J. Y., Kim, J., Lee, J.-H., Hahn, J.-S., Gu, M. B. et al. 2009. Silver-ion-mediated reactive oxygen species generation affecting bactericidal activity. *Water Res.* 43: 1027-1032.
- Park, K. Y. 2002. Status and problems of synthesis of nanoparticles by vapor phase method. *Theories Appl. Chem. Eng.* 8: 1. (In Korean)
- Park, M. R., Choi, W. S., Yadav, D. R., Kim, S. W., Kim, J. I. and Lee, Y. S. 2015. Antibacterial effect of nickel nanoparticles on *Acidovorax citrulli*, the causal agent of bacterial fruit blotch of cucurbits. *J. Agric. Life Environ. Sci.* 27: 43-50.
- Park, S.-J., Kim, B.-J. and Rhee, J. M. 2003. Antibacterial activity of activated carbon fibers containing copper meta. *Polymer (Korea)* 27: 235-241. (In Korean)
- Rane, K. K. and Latin, R. X. 1992. Bacterial fruit blotch of watermelon: association of the pathogen with seed. *Plant Dis.* 76: 509-512.
- Roh, J.-Y., Sim, S. J., Yi, J., Park, K., Chung, K. H., Ryu, D.-Y. et al. 2009. Ecotoxicity of silver nanoparticles on the soil nematode *Caenorhabditis elegans* using functional ecotoxicogenomics. *Environ. Sci. Technol.* 43: 3933-3940.
- Seo, S.-T., Park, J.-H., Lee, J.-S., Han, K.-S. and Cheong, S.-R. 2006. Bacterial fruit blotch of melon caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Res. Plant Dis.* 12: 185-188. (In Korean)
- Sharma, V. K., Yngard, R. A. and Lin, Y. 2009. Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. *Adv. Colloid Interface Sci.* 145: 83-96.
- Song, J., Chu, Y., Liu, Y., Li, L. and Sun, W. 2008. Room-temperature controllable fabrication of silver nanoplates reduced by aniline. *Chem. Commun. (Camb)* 10: 1223-1225.