

## 고추역병균 *Phytophthora capsici*의 생육을 저해하는 *Chryseomonas luteola* 5042의 선발과 항진균성 길항작용

윤경현 · 이은탁 · 김상달\*

영남대학교 자연자원대학 응용미생물학과

Identification and Antifungal Antagonism of *Chryseomonas luteola* 5042 against *Phytophthora capsici*.

**Yun, Gyung-Hyun, Eun-Tag Lee, and Sang-Dal Kim\***. Department of Applied Microbiology, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea – A powerful antagonistic bacterium against *Phytophthora capsici* causing phytophthora blight of red pepper was isolated from the cultivated soil in Kyongju, Korea. The biological control mechanisms of the isolated strain were caused by strong antifungal antibiotic, siderophore and cellulase. The strain was identified as *Chryseomonas luteola* by the cultural, morphological and physiological characteristics. The optimal culture medium for the antibiotic production was determined as follows: 0.15% D(+)-cellobiose, 0.55% NH<sub>4</sub>Cl, 0.01% KCl, 0.7% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 0.05% sodium citrate at pH 7.0. The optimal incubation time was 84 hours at 30°C. In pot bioassay, the treatment of *C. luteola* 5042 protected red pepper plant against the blight of *Phytophthora capsici*.

**Key words:** Antifungal antibiotic, *Chryseomonas luteola* 5042, *Phytophthora capsici*, red pepper blight

식물병원성 진균에 대한 길항미생물을 이용한 생태학적 생물방제 방법에는 크게 3가지로 구분할 수 있다. 첫째, 길항미생물이 분비하는 외막기수분해효소인 chitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase에 의해 식물병원균의 세포벽을 분해시키는 용균작용과 둘째, 철이온(Fe<sup>3+</sup>) 성분 결합물질인 siderophore에 의해 식물병원균의 생육을 억제하는 경쟁적 길항작용과 셋째, 항진균성 항생물질에 의해 직접 식물병원균의 생육을 억제하는 항생작용이 있다. 이런 기작을 이용한 생물방제에 관한 연구가 활발히 진행되어져 오고 있다[1,3-4,6-17,19-24]. 진균성 식물병의 하나인 고추역병은 비교적 기온이 낮고 습한 하절기에 많이 발생하고 유묘기부터 전 생육기에 발생되며, 주로 뿌리와 땅 주변의 줄기부위에 발생되고 잎, 열매, 가지 등의 지상부에 발생되기도 한다. 병원균은 *Phytophthora capsici*로서 토양 중에서 난포자의 형태로 월동하고 적당한 습도와 온도를 만나면 유주자낭을 형성하고 여기서 생긴 유주자에 의하여 전염한다. 고추역병은 고추연작지에서 매년 피해를 주는 중요한 질병으로 고추에 발생하는 병 중 가장 피해가 큰 병으로서 전국적으로 발생되며 심하게 발생될 경우 수량 감소가 50~100%에 달하는데 토양전염을 하기 때문에 방제가 쉽지 않아 더욱 문제가 되고 있는 병해이다[2,8,27].

본 연구에서는 생물학적 방제기작의 하나인 항생물질을 생산하는 길항미생물을 이용하여 식물병원성 진균을 억제하여 농작물의 수확량 증가와 동시에 환경보호의 의미를 두고 경작지 토양으로부터 고추역병균인 *P. capsici*에 강력한 길항작용이 있는 균주를 선발, 동정하고 생물방제력과 항생물질 생산성을 확인한 후 항생물질 생산의 최적 배지 성분 조사와 동시에 풋트 실험을 통하여 실제 고추역병에 대한 길항력을 확인하였다.

### 재료 및 방법

#### 균주선발과 계대배양

본 연구에 사용된 균주는 경북 경주지역에서 환경농업으로 작물을 경작하고 있는 저병해 경작지역의 토양을 분리원으로 하여 멀균 생리식염수에 10<sup>-3</sup>까지 혼탁, 흐석하고 이를 Nutrient 한천배지에 0.1 ml씩 도말하여 30°C에서 1일간 배양하였다. 이로부터 고추역병균 *P. capsici*에 길항력을 갖는 길항균주를 분리하기 위하여 PDA (potato dextrose agar) 배지에 고추역병균 *P. capsici*를 6 mm 크기의 disc로 접종하여 30°C에서 2일간 배양한 후 우측 3 cm 떨어진 곳에 길항균을 확선 접종하여 4일간 배양한 후 *P. capsici*와 분리균과의 생육 억제거리를 측정하여 우수한 균주를 선발하였다. 분리된 균주의 계대배양을 위해서는 2% proteose peptone (No.3), 0.15% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.15% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1.5% glycerol, 1.5% 한천으로 조성된 King's B 배지를 pH 7.2로 조절한 배지에 접종하여 30°C에서 1일간 배양하였다.

\*Corresponding author  
Tel. 82-53-810-2395, Fax. 82-53-811-4319  
E-mail: sdkim@yu.ac.kr

### 항진균성 항생물질의 길항기작 확인

Chitinase 생산성 확인은 chitin-minimal 배지 즉, 0.7% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.05% sodium citrate, 0.01% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1% colloidal chitin, 1.5% 한천 (pH7.0)을 사용하여 길항균과 대조균을 접종하여 30°C에서 3일 배양 후 chitin 분해환의 유무를 확인하였다[20].

Cellulase 생산성 확인은 DCAB배지(detecting cellulolytic activity of bacteria) 즉, 0.1% NaNO<sub>3</sub>, 0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.05% KCl, 0.05% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.005% yeast extract, 0.5% CMC (carboxy methyl cellulose), 1.1% 한천으로 조성된 배지에 균을 접종하여 30°C에서 3일 배양 후 0.1% congo red를 배양 배지 위에 부어 30분 동안 처리한 후 버리고 다시 1.0 M NaCl을 배양배지 위에 부어 15분간 방치하면서 colony 주위에 변색 환(halo) 형성 유무를 확인하였다[18].

Siderophore 생산성 확인은 chrome azurol S(CAS) blue agar 평판배지[25]에 길항균을 대조균과 접종하여 30°C에서 3일 배양 후 철이 제거되면서 균주 위에 형성되는 오렌지색의 환(halo)을 확인하였다.

항생물질 생산성 확인은 길항균을 King's broth에서 3일간 진탕 배양한 후 10,000×g에서 15분간 원심분리 후 회수한 상등액을 Amicon Centriprep® 10 (MW 10,000)을 이용하여 고분자와 저분자로 분리하고 또한 많은 항생물질이 열에 안정함을 감안하여 80°C에서 30분간 열처리후 길항력을 측정하였다[20].

### 균주의 동정

선발된 균주의 분류학적 동정을 위해서는 Bergey's manual of systematic bacteriology[5]의 세균 분류·동정지침서의 시험항목을 기준으로 실험하였다. 또한, API® system의 20NE로도 동정하였으며 형태적 관찰을 위하여 투과전자현미경(TEM)에 의한 미세구조도 관찰하여 균의 크기 및 형태적 특징을 조사하여 확인하였다.

### *P. capsici*의 배양과 포자회수

고추역병균 *P. capsici*의 계대는 PDA를 사용하여 30°C에서 일주일간 배양한 후 실온 (24°C)에 보관하면서 실험에 사용하였다. 포자회수를 하기 위해 V8 배지 (20% V8 Juice, 80% 증류수, 0.4% CaCO<sub>3</sub>, 1.5% 한천)에 pH 5.0으로 맞춘 배지에 *P. capsici*를 6 mm 크기의 disc로 접종하여 30°C에서 plate의 가장자리까지 배양한 후 유리 도말봉으로 기증 균사를 제거하여 형광등과의 거리가 15 cm되는 곳에서 다시 2일간 배양하여 포자를 형성시켰다. 여기에 멀균증류수 5 ml를 넣어 멀균 그릇으로 훑어 포자를 회수하여 본 실험에 사용하였다.

### 균체량 측정법에 의한 억제력 확인

PDB (potato dextrose broth) 45 ml에 길항세균의 배양여액 5 ml와 *P. capsici* 포자 회수액 0.1 ml를 접종하여 30°C에서 170 rpm으로 72시간 배양한 후 Whatman No. 2 여과지를 이용하여 포자를 걸러 80°C에서 여과지의 수분을 제거하여 전조중량을 측정함으로써 길항균에 의한 억제력을 확인하였다. 길항세균의 배양여액의 준비는 30°C에서 170 rpm으로 길항세균을 진탕배양 후 10,000×g에서 15분간 원심분리하여 균체를 제거하고 이를 다시 Millipore 0.45 μm 세균여과필터로 잔존 세균을 완전히 제거하여 이용하였고 *P. capsici*는 위의 방법으로 포자를 회수하여 실험에 사용하였다.

### 항생물질 생산 최적배지 조성

길항균주의 항생물질 생산의 최적 배지조성을 알아보기 위하여 Davis 최소배지 즉, 0.7% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5% glucose, 0.1% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.05% sodium citrate, 0.01% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O를 기본배지로 하였으며 탄소원에 대해서는 기본배지의 glucose 이외에 12종의 탄소원을 0.5%씩 첨가하였으며 질소원의 경우 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 이외에 8종의 질소원을 0.5%씩 첨가하였고 무기염의 경우 7종의 무기염을 5 mM 농도로 첨가하여 각각에 대한 항진균성 항생물질 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 그리고 결정된 탄소원, 질소원에 대해서는 어느 농도에서 가장 강력한 항생물질을 분비하는지를 조사하기 위하여 0%에서 0.7%까지 0.05%씩 증가시킨 농도의 영향을 조사하였다. 이들의 조사방법은 밸육균체량 측정법으로 실험하였다.

### 항생물질 생산의 최적 배양시간

길항균주를 전배양하여 항생물질 생산의 최적배지에 1% 되게 접종한 후 12시간 간격으로 배양액 10 ml를 회수하여 600 nm에서 흡광도를 측정한 후 10,000×g에서 원심분리한 배양 상등액과 *P. capsici* 포자와의 억제력을 밸육균체량 측정법으로 5일간 측정하였다.

### 식물 pot실험을 통한 생물방제력 측정

선발된 길항균주의 항진균성 항생물질이 실제 토양에서 길항 능력이 발휘되어 *P. capsici*에 의한 역병이 억제되는지를 조사하였다. 기주식물로는 고추(*Capsicum annuum* L.)의 종자를 사용하여 5엽기까지 키운 어린 고추식물에 *P. capsici*의 포자 5 ml(200개/ml)를 관주 접종하고 여기에 항생물질 생산의 최적 조건 상태에서 진탕배양한 균주를 5 ml ( $3 \times 10^7$ 개/ml) 접종하여 하루 동안 습실 처리 후 28°C, 60% 항온·항습실에서 키우면서 주기적으로 방제력을 확인하였다.

## 결과 및 고찰

### 길항균주의 선발

경북 경주 지역의 저병해 경작지역의 토양으로부터 70여종의 세균을 분리하였으며 이들을 대상으로 고추역병균 *P. capsici*와의 대치배양과 발육균체량 측정법을 실시하여 가장 강력한 길항균주 PLP 5042를 최종 선발하였다 (Table 1, Fig. 1).

### 길항균주의 동정

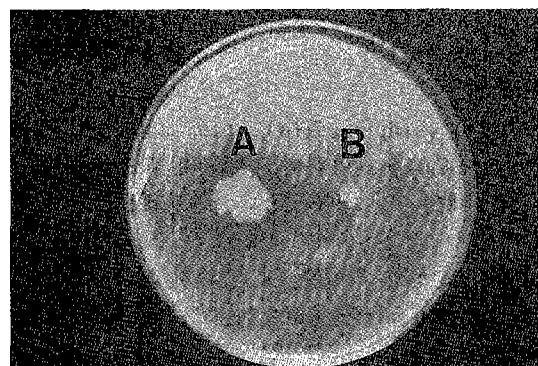
선발된 길항균주 PLP 5042는 Gram염색결과 Gram음성으로 판별되었으며, 전자현미경(TEM, transmittance electron microscope)으로 그 형태학적 특성을 관찰한 결과  $2.1 \times 0.9 \mu\text{m}$ 의 간균으로 확인되었다. 또한, 각종 동정에 필요한 배양학적, 형태학적, 그리고 생화학적 특성을 조사하여 Bergey's manual of systematic bacteriology의 분류동정표에 의해 고찰한 결과와 API<sup>®</sup>사의 20NE 동정 키트를 사용하여 검증한 결과(Table 2)에 따라 길항균주 PLP 5042는

**Table 1. Selection of indigenous antagonistic microorganisms against *Phytophthora capsici***

Strains	Inhibited distance (mm)*
BLP-3034	6.0
BLP-5057	7.0
BLP-8117	6.0
BLP-4045	5.2
PLP-6036	3.1
PLP-4059	5.3
PLP-2071	6.2
PLP-5046	1.8
PLP-5042	8.2

All strains were grown at 30°C for 72 hours on PDA agar plate.

\*Distance between each one of strain and *P. capsici*.



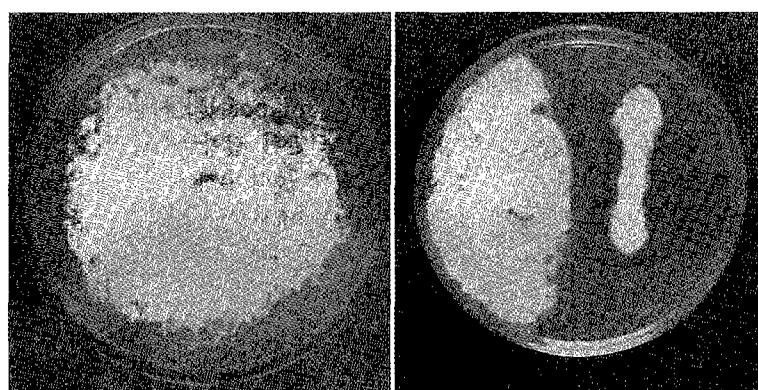
**Fig. 2. Clear zone formation of hydrolyzed chitin by the chitinase on chitin minimal agar plate.**

A, *Bacillus* sp. 7079 (chitinase producing strain); B, *Chryseomonas luteola* 5042.

*Chryseomonas luteola*로 최종 확인, 동정되었다.

### 선발된 길항균주의 항진균성 길항기작

현재까지 보고된 생물방제균이 생산하는 항진균성 물질에 관한 연구는 *Streptomyces*[1,7,23,26], *Pseudomonas*[9, 18,21], *Bacillus*[8,15,20], *Clostridium*[6], *Micromonospora* [27], *Aspergillus*[14] 등의 균주가 생산하는 concanamycin, bafilomycin, azolomycin, polyoxin, chloroflavonin, crisamicin 등의 항생물질이나 *Bacillus*[11], *Serratia*[20] 균주가 생산하는 chitinase가 있으며 또한 *Pseudomonas*[20,22] 균주가 생산하는 siderophore에 의한 항진균성 물질이 있다. 본 연구에서 분리된 균주의 방제기작이 길항미생물이 분비하는 chitinase와 같은 외막기수분해 효소들에 의해 식물병원균의 세포벽 성분을 분해시키는 용균 작용인지 혹은 철이온( $\text{Fe}^{3+}$ ) 결합물질인 siderophore에 의해 식물병원균의 생육을 억제하는 경쟁적 길항작용인지 또는 항진균성 항생물질에 의해 식물병원균의 생육을 억제하는 길항작용인지를 조사하였다.



**Fig. 1. Inhibition of the growth of *Phytophthora capsici* by *Chryseomonas luteola* 5042 by pairing culture on PDA at 30 for 96 hours.**

Left: Control of *P. capsici* only, Right: *P. capsici* inhibited by *C. luteola* 5042.

Table 2. Morphological, cultural, physiological characteristics of the strain PLP 5042

Test	PLP 5042	<i>Aeromonas sobria</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Chryseomonas luteola</i>
Gram strains	-	-	-	-
Cell shape*	rod	rod	rod	rod
Motility	+	+	+	+
Aerobic	+	-	+	+
Fluorescent pigment	-	-	+	-
Oxidase test	-	+	+	-
Catalase test	+	+	+	-
Indole test	-	+	-	+
Citrate test	+	-	-	-
Starch hydrolysis	-	-	d	-
Growth at 41°C	+	-	-	+
Growth at 4°C	-	-	+	-
0% NaCl, growth	+	+	-	-
Egg yolk reaction	+	-	+	-
MR test	-	-	-	-
VP test	-	d	-	-
<b>API® test</b>				
<b>PLP 5042</b>				
Potassium nitrate	-	-	+	-
Tryptophane	-	-	-	-
Glucose	-	-	+	-
Arginin	-	-	-	-
Urea	-	-	-	-
Esculin	-	-	+	-
Gelatin	-	-	-	-
p-nitro-phenyl-βD-galactopyranoside	-	-	+	-
Glucose	-	-	+	-
Mannitol	-	-	+	-
N-acetyl-glucosamine	-	-	+	-
Maltose	-	-	+	-
Gluconate	-	-	+	-
Caprate	-	-	-	-
Adipate	-	-	-	-
Malate	-	-	+	-
Citrate	-	-	+	-
Mannose	-	-	+	-

+: 90% or more positive -: 10% or less positive d: 11~89% positive

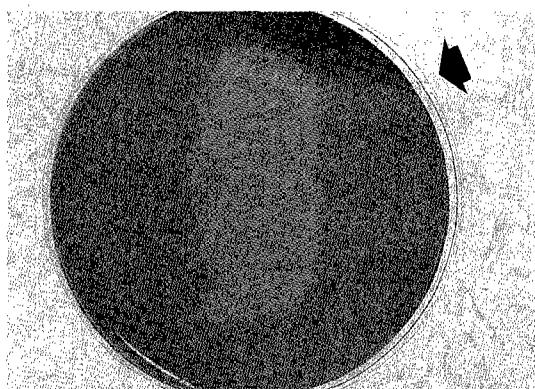
\*: Observation with transmittance electron microscopy (TEM,  $\times 20,000$ )

그 결과 chitinase생산성(Fig. 2)은 없으나 또 다른 외막 가수분해효소인 cellulase 생산성(Fig. 3)과 약한 siderophore 생산성(Fig. 4)이 확인되었고 또한 pairing culture test로 항생물질 생산성을 확인하였다(Fig. 1). 그리고 다양한 길항 능력 중 주 길항력을 확인하기 위하여 열처리한 배양상등 액에 대한 cell mass test를 시행한 결과 비열처리에 비해 약 80%의 길항력을 유지하는 것으로 보아 본 실험균주 *C. luteola* 5042의 주 길항기작은 항생물질임을 확인하였다 (Data not shown). 따라서 선발된 길항세균의 길항기작은 항생물질 생산이 주요기작으로 작용함과 동시에 cellulase

생산성과 siderophore 생산성을 나타내는 복수 길항기작임을 추정할 수 있었다.

#### 항생물질 생산의 최적 배지조성 결정

길항균주의 항진균성 항생물질 생산에 미치는 탄소원의 영향에 있어서는 Table 3에서 보는 바와 같이 길항균의 생육과 specific productivity의 경우는 CMC에서 가장 높았고 항진균 활성에 있어서는 N-acetyl-D-glucosamine과 D(+)-cellobiose가 각각 87.5%와 90.6%의 높은 양제율을 보였고 이 두 탄소원의 농도별 항진균 활성을 측정한 결과



**Fig. 3. Colony of *Chryseomonas luteola* 5042 and halo formation by the cellulase on the DCAB minimal agar plate (cellulase detecting agar).**

**Table 3. Effect of carbon sources for the production of antibiotic substance from *Chryseomonas luteola* 5042**

Carbon sources <sup>1</sup>	Cell growth (cell number/ ml)	Final pH	Inhibition rate(%) <sup>2</sup>	Specific activity <sup>3</sup>
Control <sup>4</sup>	-	7.0	0.0	-
None <sup>5</sup>	$1.35 \times 10^8$	6.7	18.7	100.0
N-acetyl-D-glucosamin	$3.88 \times 10^8$	6.9	87.5	162.8
Amylose	$1.54 \times 10^8$	6.7	69.7	326.8
D(+)-Arabinose	$4.12 \times 10^8$	6.5	65.6	114.9
CMC	$1.27 \times 10^8$	6.8	88.5	503.2
D(+)-Cellobiose	$4.25 \times 10^8$	6.5	90.6	153.9
Cellulose	$1.48 \times 10^8$	6.7	88.5	431.7
Dextrose	$3.61 \times 10^8$	6.6	70.8	141.6
Fructose	$3.89 \times 10^8$	6.6	75.0	139.2
Galactose	$3.87 \times 10^8$	6.6	28.1	52.4
Glycerol	$4.59 \times 10^8$	6.5	32.3	50.8
D(+)-Mannose	$4.01 \times 10^8$	6.5	43.7	78.7
D(+)-Melibiose	$3.94 \times 10^8$	6.5	46.8	85.8
Sucrose	$4.12 \times 10^8$	6.5	51.0	89.4

<sup>1</sup>Carbon sources (0.5%) were added to the basal medium [0.7% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.05% sodium citrate, 0.01% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, pH 7.0]. C. luteola 5042 was added to 1% volume and cultured for 72 hours at 30°C.

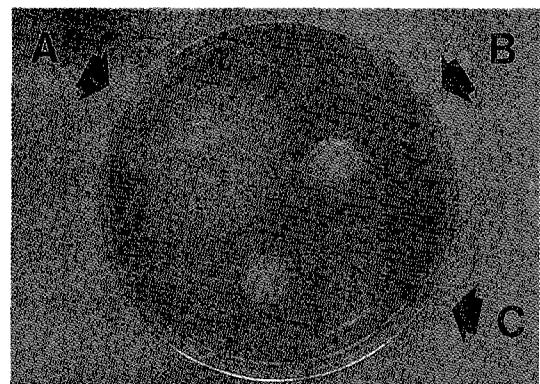
<sup>2</sup>Inhibition rate(%)=[(control-sample)/(control)] × 100

<sup>3</sup>Inhibition rate/cell growth. None settled on standard.

<sup>4</sup>Only spores of *Phytophthora capsici* were grown in PDB.

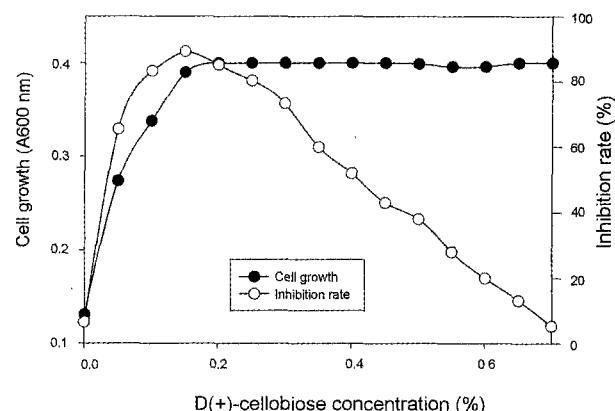
<sup>5</sup>None carbon source.

Fig. 5와 Fig. 6에서 보는 바와 같이 N-acetyl-D-glucosamin의 경우는 첨가하지 않았을 경우보다 농도가 0.45%일 때 81%의 억제율을 나타냈고 D(+)-cellobiose의 경우는 0.15%의 농도에서 89%의 *P. capsici* 포자의 성장억제율을 나타냈다. 따라서 최종 탄소원으로 D(+)-cellobiose를 선정

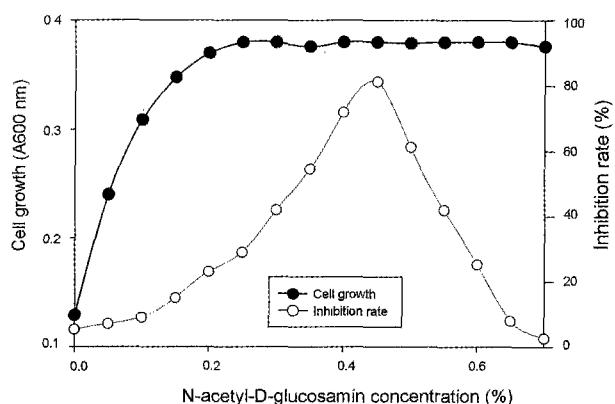


**Fig. 4. Orange halo formation by the siderophore on the CAS minimal agar plate.**

A, *Pseudomonas* sp. 2112 (siderophore producing strain); B, *Chryseomonas luteola* 5042; C, *Bacillus* sp. 7079 (non siderophore producing strain).



**Fig. 5. Effect of D(+)-cellobiose concentration for the production of antibiotic substance from *Chryseomonas luteola* 5042.**



**Fig. 6. Effect of N-acetyl-D-glucosamin concentration for the production of antibiotic substance from *Chryseomonas luteola* 5042.**

하였는데 본 길항균주가 cellulase를 생성한다는 길항기작과 연관성이 있음을 확인하였다. 그리고 초기의 배양 pH를 7.0

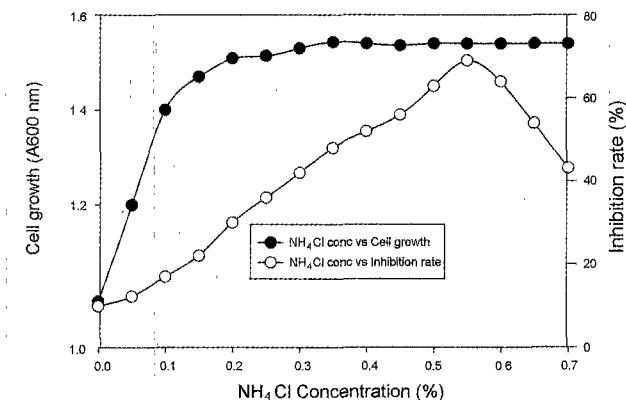


Fig. 7. Effect of NH<sub>4</sub>Cl concentration for the production of antibiotic substance from *Chryseomonas luteola* 5042.

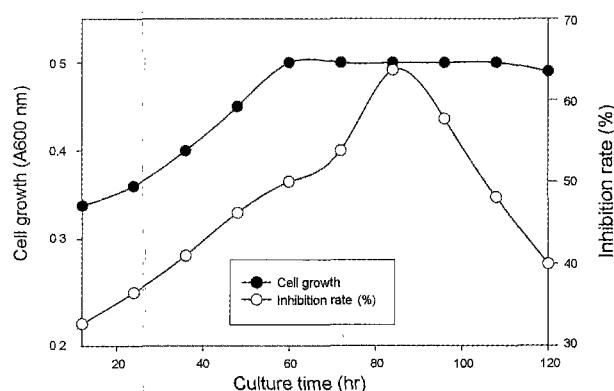


Fig. 8. Effect of culture time on the production of antifungal antibiotic under the optimum culture conditions.

으로 조절하였으나 배양후 최종 pH는 pH 7.0~6.5 범위의 약산성을 나타냈다. 질소원의 영향에 있어서는 Table 4에서 보는 바와 같이 본 길항균주는 casein과 urea의 이용능은 적으며 NH<sub>4</sub>Cl를 첨가했을 때 specific productivity와 균의 생육이 가장 좋았고 또한 항진균 활성에 있어서는 NH<sub>4</sub>Cl를 첨가했을 때 질소원을 첨가하지 않았을 때 보다 49%의 억제율을 보였고 0.55% NH<sub>4</sub>Cl의 농도에서 69%의 억제율을 나타냈다. 또한 최종 pH는 탄소원의 경우와는 상이하게 약염기성을 띠는 경우와 약산성을 띠는 경우 둘 다 확인이 되었다(Fig. 7). 무기염의 영향에 있어서는 KCl을 사용했을 때 63%의 억제율을 나타냈다(Table 5).

#### 항생물질 생산의 최적 배양시간 결정

길항균주를 전배양하여 앞서 결정된 항생물질 생산의 최적 배지 즉, 0.15% D(+)-cellobiose, 0.55% NH<sub>4</sub>Cl, 0.01% KCl, 0.7% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% sodium citrate에 접종한 후 12시간 간격으로 *P. capsici*의 포자억제력을 밸류균체량 측정법으로 확인한 결과 cell growth는 60시간 이후로 수치가 줄어들었으나 억제율은 접종 후 계속 증가

Table 4. Effect of nitrogen sources for the production of antibiotic substance from *Chryseomonas luteola* 5042

Nitrogen sources <sup>1</sup>	Cell growth (cell number/ml)	Final pH	Inhibition rate(%) <sup>2</sup>	Specific activity(%) <sup>3</sup>
Control <sup>4</sup>	-	7.0	0.0	-
None <sup>5</sup>	0.82 × 10 <sup>8</sup>	7.4	3.2	100.0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.38 × 10 <sup>8</sup>	6.7	29.6	550.0
NH <sub>4</sub> Cl	1.42 × 10 <sup>8</sup>	6.7	49.5	893.8
Beef extract	1.57 × 10 <sup>8</sup>	7.1	11.2	182.8
Casein	0.91 × 10 <sup>8</sup>	7.3	3.4	95.9
Casamino acid	1.87 × 10 <sup>8</sup>	7.3	23.8	326.4
Bacto pepton	1.81 × 10 <sup>8</sup>	7.2	2.9	41.0
Yeast extract	2.00 × 10 <sup>8</sup>	7.3	9.7	124.4
Urea	1.12 × 10 <sup>8</sup>	7.3	7.5	171.8
Tryptone	1.99 × 10 <sup>8</sup>	6.9	0.0	-

<sup>1</sup>Nitrogen sources (0.5%) were added to the basal medium [0.7% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% sodium citrate, 0.01% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O and 0.15% D(+)-cellobiose, pH 7.0]. *C. luteola* 5042 was added to 1% volume and cultured for 72 hours at 30°C.

<sup>2</sup>Inhibition rate(%)=[(control-sample)/(control)] × 100

<sup>3</sup>Inhibition rate/cell growth. None settled on standard.

<sup>4</sup>Only spores of *Phytophthora capsici* were grown in PDB.

<sup>5</sup>None nitrogen source.

Table 5. Effect of salts for the production of antibiotic substance from *Chryseomonas luteola* 5042

Salts <sup>1</sup>	Cell growth (cell number/ml)	Inhibition rate (%) <sup>2</sup>	Specific activity (%) <sup>3</sup>
Control <sup>4</sup>	-	0.0	-
None <sup>5</sup>	1.73 × 10 <sup>8</sup>	33.1	100.0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.73 × 10 <sup>8</sup>	50.5	152.6
LiCl	1.74 × 10 <sup>8</sup>	62.4	187.5
KCl	1.75 × 10 <sup>8</sup>	63.5	189.7
NaCl	1.71 × 10 <sup>8</sup>	50.5	154.4
CaCO <sub>3</sub>	1.91 × 10 <sup>8</sup>	37.3	102.1
CaCl <sub>2</sub>	1.88 × 10 <sup>8</sup>	37.3	103.7
ZnSO <sub>4</sub>	1.59 × 10 <sup>8</sup>	33.7	110.8

<sup>1</sup>Salts (5 mM) were added to the basal medium [0.7% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% sodium citrate, 0.01% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.15% D(+)-cellobiose and 0.55% NH<sub>4</sub>Cl, pH 7.0]. *C. luteola* 5042 was added to 1% volume and cultured for 72 hours at 30°C.

<sup>2</sup>Inhibition rate(%)=[(control-sample)/(control)] × 100

<sup>3</sup>Inhibition rate/cell growth. None settled on standard.

<sup>4</sup>Only spores of *Phytophthora capsici* were grown in PDB.

<sup>5</sup>No salt.

하다가 길항균주를 84시간 배양하였을 때 60%의 가장 높은 억제력을 보이다가 감소하였다(Fig. 8). 따라서 항진균성 항생물질 생산의 최적배양 시간으로는 84시간으로 결정하였다.

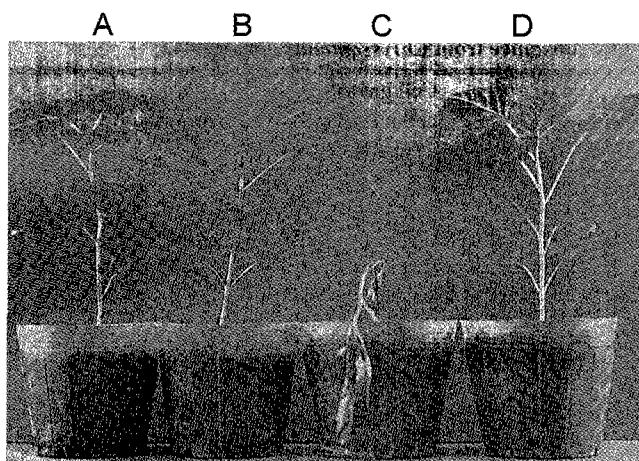


Fig. 9. *In vivo* antifungal activity of *Chryseomonas luteola* 5042 on the growth of red pepper infected by *Phytophthora capsici*. A, Control (non treated); B, *C. luteola* 5042 + *P. capsici*; C, *P. capsici* infected only; D, *C. luteola* 5042 alone.

#### 식물실험을 통한 생물방제력 측정

항진균성 항생물질 생산 길항미생물 *C. luteola* 5042가 *P. capsici*에 대해 토양내에서 실제로 그 생물방제력을 발휘하는지를 확인하기 위해 기주식물로는 고추를 대상으로 하여 *in vivo* test를 실시하였으며 고추의 종자를 5열기까지 키운 어린 고추식물에 *P. capsici*의 포자 5 ml (200개/ml)를 관주 접종하고 여기에 항생물질 생산의 최적 조건 상태에서 진탕배양한 본 균주를 5 ml ( $3 \times 10^7$ 개/ml)접종하여 하루동안 습실처리후 28°C, 60% 항온항습실에서 키우면서 발병 억제력 유무를 확인한 결과 *P. capsici*만 처리한 것은 고추역병에 의한 현상인 고추의 전반부가 고사되어 적갈색을 띠며 잎은 마르고 줄기부분은 말라 막딱해지는 고추역병 현상을 확인하였고 *P. capsici*와 길항균 *C. luteola* 5042를 함께 처리한 것은 역병 현상이 나타나지 않았고 또한 *C. luteola* 5042 만을 처리한 것에서는 무처리시와 같이 아무런 현상을 나타내지 않았다. 이것으로 보아 *C. luteola* 5042는 고추 식물의 성장 억제에는 영향을 미치지 않고 다만 *P. capsici*의 성장을 억제하여 *P. capsici*에 의한 고추역병의 발병을 억제한다는 사실을 확인할 수 있었다 (Fig. 9).

#### 요 약

경북 경주지역의 저병해 고추경작지역의 토양으로부터 생물학적 방제기작종의 하나인 항생물질을 생산하는 길항미생물을 분리하기 위하여 70여종의 세균을 분리하였으며 이들을 대상으로 고추역병균 *Phytophthora capsici*를 가장 강력하게 길항하는 균주를 최종 선발하였다. 선발균주는 *Chryseomonas luteola*로 동정되었고 방제 기작은 약한 siderophore 생산성과 cellulase 생산성도 기인되었으나 항생

물질 생산성이 주요 기작임을 확인하였다. 항진균성 항생물질의 대량생산의 기초자료로 활용하고자 항생물질 생산의 최적배지 조건 및 배양조건을 조사하였는데 길항균주의 항진균성 항생물질 생산에 미치는 탄소원의 영향은 0.45% N-acetyl-D-glucosamine과 0.15% D(+)-cellobiose에서 81%와 89%의 *P. capsici* 포자의 성장 억제율을 나타냈다. 질소원의 경우는 0.55% NH<sub>4</sub>Cl 첨가시 69%의 억제율을 나타냈다. 무기염의 영향에 있어서는 0.01% KCl을 사용했을 때 63%의 억제율을 나타냈다. 또한 배양 조건에 있어서는 pH 7.0, 30°C에서 84시간 배양시 가장 높은 항진균성 항생물질 생산성을 나타내었다. 토양내에서 실제로 생물방제력을 발휘하는지를 확인하기 위하여 고추를 이용한 *in vivo* pot test를 실시한 결과 *P. capsici*만 처리한 것은 고추역병 현상을 나타냈고 *P. capsici*와 길항균 *C. luteola* 5042를 함께 처리한 것은 역병 현상이 나타나지 않았다. 이것으로 길항균주 *C. luteola* 5042가 *P. capsici*의 성장을 저해하여 고추 역병의 발병을 억제한다는 사실을 확인할 수 있었다.

#### 감사의 말

본 연구는 영남대학교 교비연구비에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다. 또한 본 연구의 실험에 협조를 해준 김혜진 학우에게도 감사드립니다.

#### REFERENCES

- Bae, J. Y., H. J. Kwon, and J. W. Suh. 1999. Isolation and structural determination of antifungal antibiotic from *Streptomyces hygroscopicus* MJM1004. *J. Kor. Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **42**: 271-276.
- Chung, B. K. and M. J. Kang. 1990. Effect of temperature and nutrition affecting oospore formation of *Phytophthora capsici* causing red pepper fruit rot. *Kor. J. Mycol.* **18**: 203-208.
- Choi, J. K. 1996. Improvement in antagonistic effect of antagonistic bacterium *Bacillus* sp. SH14 by transfer of the urease gene. MS. Thesis. Yeungnam University.
- Cooksey, D. A. and L. W. Moore. 1982. High frequency spontaneous mutation to agrocin 84 resistance in *Agrobacterium tumefaciens* and *A. rhizogenes*. *Physiol. Plant Path.* **20**: 129-134.
- Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley, and S. T. Wiliiams. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th. Wiliiams Wilkins.
- Hong, S. H., M. J. Kim, Y. B. Park, J. K. Lee, and J. H. Ha. 1993. Identification of the antibiotic producing *Clostridium* sp. KH-431 and purification of the antibiotic. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 41-46.
- Kang, S. C., Y. G. Bark, D. G. Lee, and Y. H. Kim. 1996. Antifungal activities of *Metarrhizium anisopliae* against

- Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, and *Alternaria solani*. *Kor. J. Mycol.* **24**: 49–55.
8. Kim, C. J., I. K. Lee, B. S. Yun, and I. D. Yoo. 1993. Concanamycin B, active substance against *Phytophthora capsici* produced by *Streptomyces neyagawaensis* 38D10 Strain. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 322–328.
  9. Kim, H. R. 1994. Antifungal antibiotics of antagonistic bacterium *Bacillus* sp. YH-16 against *Fusarium solani* causing plant root rot. MS. Thesis. Yeungnam University.
  10. Kim, K. S., S. H. Hong, E. J. Lee, Y. B. Park, Y. T. Park, and J. H. Ha. 1995. Characterization and structural determination of an antifungal compound produced by *Pseudomonas aeruginosa* KGM-100. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bio-technol.* **23**: 98–103.
  11. Kim, K. Y. and S. D. Kim. 1997. Biological control of *Pyricularia oryzae* blast spot with the antibiotic substances produced by *Bacillus* sp. KL-3. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 396–402.
  12. Kim, S. D. 1998. Biological control of phytopathogenic fungi by the genetic breeding of indigenous antagonistic microorganisms. Ministry of Agriculture. 13–47.
  13. Kim, S. H., B. C. Han, J. W. Suh, C. O. Kim, C. S. Yon, D. K. Lee, K. P. Kim, J. K. Jung, Y. H. Lim, and C. H. Lee. 1993. Taxonomy, purification and physicochemical properties of novel antifungal antibiotics AF-011A. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 556–563.
  14. Kim, S. S., G. J. Joo, J. Y. Uhm, Y. J. Kim, and I. K. Rhee. 1997. Antifungal activity of *Bacillus* sp. SS279 and biocontrol of apple white rot fungus, *Botryosphaeria dothidea*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 527–536.
  15. Kim, S. U., S. Y. Lee, S. K. Kim, K. H. Son, Y. K. Kim, S. S. Moon, and S. H. Bok. Isolation and characterization of antifungal compound produced by *Aspergillus candidus* F1484. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 574–578.
  16. Kim, Y. S., H. S. Lim, and S. D. Kim. 1994. *Bacillus subtilis* YB-70 as a biocontrol agent of *Fusarium solani* causing plant root rot. *J. Microbiol. Biotech.* **4**: 68–74.
  17. Lee, D. K., Y. C. Su, S. S. Park, and T. J. Min. 1995. Study on the Screening and development of antibiotics in the Mushrooms. -the screening of fungal antibiotics in Basidomycetes (I) *Kor. J. Appl. Microbiol. Mycol.* **23**: 37–45.
  18. Lee, D. S., H. K. Kim, and M. Y. Park. 1984. Combination of colony formation and congo red reaction for detecting intra- and extra- cellular cellulolytic activities. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **12**: 305–309.
  19. Lee, E. J., K. S. Kim, S. H. Hong, and J. H. Ha. 1995. The mechanism of biological control of *Pseudomonas* spp. against *Fusarium solani* causing plant root-rot disease. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 91–97.
  20. Lee, E. T. 1999. Antifungal mechanisms and genetic development of antagonistic bacterium on the phytopathogenic fungi. Ph. D. Thesis. Yeungnam University.
  21. Lee, N. W., C. S. Kim, J. H. Do, I. C. Jung, H. W. Lee, and D. H. Lee. 1998. Isolation and identification of *Bacillus* sp. LAM 97-44 producing antifungal antibiotics. *J. Kor. Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **41**: 208–212.
  22. Lim, H. S. 1997. Genetic development of siderophore-producing *Pseudomonas fluorescens* GL20 as a biological control agent. Ph. D. Thesis. Yeungnam University.
  23. Lim, S. D., S. K. Yoon, M. S. Lee, W. H. Yoon, and C. H. Kim. 1996. Isolation and identification of *Streptoverticillium* sp. NA-4803 producing antifungal substance. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 664–670.
  24. Lee, I. K., C. J. Kim, S. D. Kim, and I. K. Yoo. 1990. Antifungal antibiotic against fruit rot disease of red pepper from *Streptomyces parvullus*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 142–147.
  25. Schwyn, B. and J. B. Neilands. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* **160**: 47–56.
  26. Suh, J. W., Y. H. Lim, S. H. Kim, B. C. Hyun, C. O. Kim, C. S. Yon, D. K. Lee, K. P. Kim, J. K. Jung, and C. H. Lee. 1993. Biological properties and structural analysis of novel antifungal antibiotics AF-011A. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 564–569.
  27. Yeo, W. H., B. S. Yun, K. S. Whang, C. O. Lee, and S. H. Yu. 1996. An isochromanquinone compound produced by *Micromonospora* sp. SA-264. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 321–326.
  28. Yun, B. S., C. J. Kim, I. K. Lee, H. Koshino, and I. D. Yoo. 1996. An antifungal compound against *Phytophthora capsici* produced by *Streptomyces* sp. 3D3. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 77–81.

(Received Feb. 22, 2001/Accepted Jun. 30, 2001)