

## 은 나노 용액의 식물병원성 세균에 대한 살균활성

김상우 · 민지선 · 이윤수\*

강원대학교 농업생명과학대학 생물자원공학부

## Bactericidal Effects of Nano-silver Liquid Against Various Plant Pathogenic Bacteria

Sang Woo Kim, Ji Seon Min and Youn Su Lee\*

Division of Bio-Resources Technology, College of Agriculture and Life Sciences,  
Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

(Received on July 8, 2009)

We have conducted *in vitro* experiments with nano-silver liquid for their effect against various plant pathogenic bacteria. Different types of nano-silver liquid WA-CV-WA13B, WA-AT-WB13R and WA-PR-WB13R were used. These are classified based on different manufacturing processes. The tested bacteria were provided by KACC. We experimented ten bacterial isolates in *Clavibacter*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, and *Xanthomonas* genera. In order to determine the level of concentrations of control effects, different concentrations (10, 25, 50, and 100 ppm) of each different nano-silver liquid were added in the culture media. As a result, WA-CV-WA13B showed high inhibition effect against C-1 at 10 ppm, and showed minor inhibition effects against P-6, X-1, and X-2. WA-AT-WB13R showed bactericidal effect against P-6 at 10 ppm. At 10 ppm, WA-AT-WB13R showed relatively high inhibition effects against C-1, X-1, and X-2. WA-PR-WB13R showed bactericidal effects against P-5, P-6 and X-2 at 10 ppm or higher concentrations. All the tested three nano-silver liquid showed bactericidal effects against all the tested plant pathogenic bacteria at concentrations of 25 ppm or higher. These results indicated the possible use of nano-silver liquid for the control of plant pathogenic bacteria.

**Keywords :** Bactericidal, Nano-silver, Plant pathogenic bacteria

최근 작물의 시설재배 면적이 급증하고 있으며, 시설재배 하는 작물도 다양화 되고 있는 상황에서 병해에 의한 피해 수준도 급증하고 있어 효과적으로 병해를 방제 할 수 있는 대책이 요구되고 있다. 인구증가 및 생활수준의 향상으로 인한 농산물 수요 증가로 인해 각종 화학비료 및 농약의 사용량이 급증함에 따라 지력 저하, 농약 오염, 환경오염 등 많은 문제점이 발생하고 있다. 따라서 일반 대중들도 점차 친환경적인 농법에 대한 관심이 높아지고 있으며 실제 농가에서도 천연농법이나 유기농법을 적용하여 고소득을 추구하며, 환경보호에도 일조하는 농가들이 증가하는 추세이고, 다양한 친환경 농자재의 개발이 필요한 상황이다.

최근 들어 은 이온( $Ag^+$ )은 현재까지 화농성 질환, 황색 포도상구균, 요소부패균, 대장균, 녹농균, 폐렴균, 레지오넬라균, O-157균 등 각종 내성균에 대한 단세포 병원균을 살균하는 것으로 알려져 있다(Elchiguerra 등, 2005; Morones 등, 2005; Samuel과 Guggenbichler, 2004). 은과 접촉하여 6분 이상 살 수 있는 세균은 없으며(Storz와 Imlay, 1999), 이러한 은( $Ag^+$ )은 병원균의 신진대사를 막아 살균하는 것으로 알려져 있으며, 금속의 은이 방출한 음이온의 전기적 부하가 병원미생물의 생식기능을 제어함으로써 광범위한 항균 및 살균 기능이 있는 것으로 알려져 있다(Bragg와 Rannie, 1974; Feng 등, 2000). 보통 은( $Ag^+$ )은 인체에 해가 없으며, 독성이 없고, 미생물 체내에 전달되어 원활한 신진대사 기능을 억제하는 650여 가지의 유해성 미생물을 살균하는 것으로 알려져 있다(Morones 등, 2005). 따라서, 본 연구에서는 제조 방법이 다른 3가지 nano-

\*Corresponding author

Phone) +82-33-250-6417, Fax) +82-33-244-6410

E-mail) younslee@kangwon.ac.kr

silver 용액을 사용하여 식물병원성 세균에 대하여 생장억제 효과 및 살균효과를 검정하여 식물병원성 세균에 의한 병해의 방제 활용 가능성을 조사하였다.

**공시 nano-silver 용액.** 본 실험에 사용한 nano-silver 용액은 제조 방법이 다른 WA-CV-WA13B(CV), WA-AT-WB13R(AT), WA-PR-WB13R(PR) 3가지 용액을 사용하였으며, 포항공대의 바이오 플러스(주)에서 1,000 ppm 농도로 제공 받아 각 처리에 맞는 농도로 증류수를 이용하여 희석하여 사용하였으며, 저장은 4°C 냉장 보관하여 필요할 때 마다 꺼내어 사용하였다(Table 1).

**공시 대상 균주 및 배양배지.** 기내실험에 사용한 균주는 각종 과채류 작물에 병을 야기 시키는 세균 10개의 균주를 사용하였다. 균주는 농촌진흥청 농용미생물 보존센터(Korean Agricultural Culture Collection, KACC)로 부터 분양 받은 균주를 실험에 사용하였으며, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*를 포함하여 10개 세균 균주는 Table 2와 같다. 세균 배양에 사용한 배지로는 YPG(Yeast Peptone Glucose), YGC(Yeast Extract Glucose Carbonate), NA(Nutrient Agar), MNA(Nutrient OXOID CM3 with Phosphate)를 사용하였다.

**항균 활성 검정 in vitro 실험.** 항균 활성 검정을 위하여 선발된 10종의 세균 균주를 각각의 한천배지에 제조

방법이 다른 3가지 nano-silver용액을 사용하였다. 분양받은 세균을 각 액체배지에 접종 후 진탕배양기(30°C, 170 rpm)에서 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세균의 농도는  $1.0 \times 10^5$  CFU/ml으로 제조하여 사용하였다. 각각 고체 배지에 nano-silver 용액을 10 ppm, 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm의 농도로 첨가하여 배지를 조제하였다. 희석된 세균을 10 µl씩 각각의 고체배지에 접종하여 도말하였다. 접종한 후 30°C에서 배양하고, 도말하여 72시간 후 세균의 colony 수를 계수하여 기록하였다.

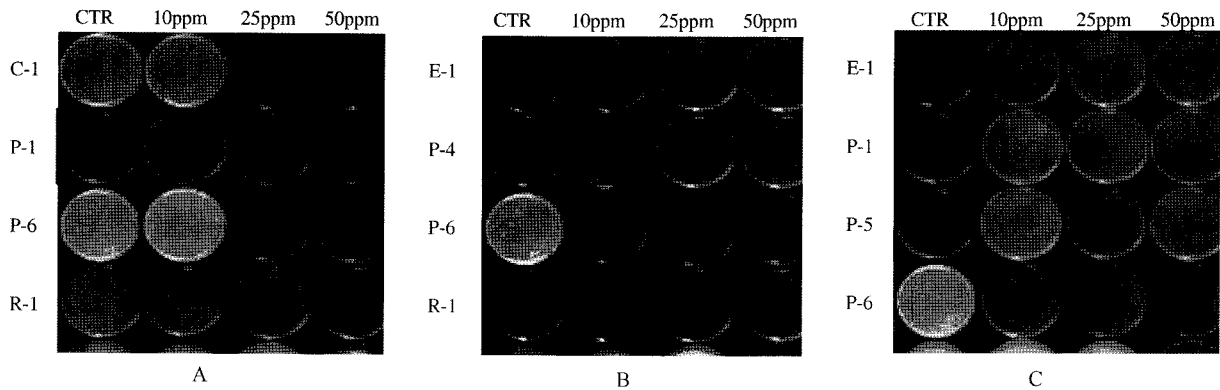
**Nano-silver 용액의 식물병원성 세균의 생장억제 효과 검정.** WA-CV-WA13B 용액을 첨가한 각각 YPG, YGC, NA, MNA액체배지에 10개의 균주를 접종하여 24 h 진탕 배양(30°C, 170 rpm) 후  $1.0 \times 10^5$  CFU/ml 농도로 희석하여 10 ppm, 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm 은 나노 용액이 첨가된 각 고체배지에 도말하여 접종하고 72시간 후, colony counting을 하여 생육 억제 능력을 확인한 결과, 25 ppm 이상에서 살균효과를 나타냈다. WA-CV-WA13B 용액의 경우 C-1에 대하여 10 ppm에서도 높은 생장 억제 효과를 나타냈고, P-6, X-1, 그리고 X-2에 대해서도 생장억제 효과를 나타냈다. 다른 세균에서는 25 ppm 이상에서 살균 효과를 나타냈다. WA-CV-WA13B용액의 경우 10 ppm의 농도에서는 Control에 비해 C-1을 제외하고는 낮은 생장

**Table 1.** Three different types of Nano-silver used for the experiments

Type	Physical form	Average particle size (nm)	Silver contents (µg/ml)	Solvent
WA-CV-WA13B	Dark brown Colloid	7~25	40,000~50,000	Pure water
WA-AT-WB13R	Colorless Colloid	7~25	5,000~15,000	Pure water
WA-PR-WB13R	Colorless Colloid	7~25	5,000~15,000	Pure water

**Table 2.** Plant pathogenic bacteria tested in this experiment

Plant Pathogenic Bacteria	Code	KACC accession No.	Host plants
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	C-1	20122	Pepper
<i>Erwinia tracheiphila</i>	E-2	10084	Cucumber
<i>Pseudomonas cichorii</i>	P-1	10137	Cabbage, Garlic, Banana, Foxglove
<i>Pseudomonas corrugata</i>	P-2	10141	Tomato
<i>Pseudomonas marginalis</i>	P-4	10466	Onion, Tomato, Pepper, Lettuce, Cucumber, Ginger, Cabbage, Garlic, Carrot, Kale
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	P-5	10387	Eggplant, Pepper, Carrot, Cabbage, Lettuce, Tomato
<i>Pseudomonas syringae</i>	P-6	10396	Eggplant, Pumpkin
<i>Ralstonia solanacearum</i>	R-1	10220	Eggplant, Potato, Pepper, Tomato, Ginger, Perilla
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	X-1	10377	Cabbage, Kale, Radish
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	X-2	10563	Pepper



**Fig. 1.** *In vitro* inhibitory effects of nano-silver liquid (A: WA-CV-WA13B, B: WA-AT-WB13R, C: WA-PR-WB13R) against various plant pathogenic bacteria (C-1: *Clavibacter michiganensis*, P-1: *Pseudomonas cichorii*, P-6: *Pseudomonas syringae*, R-1: *Ralstonia solanacearum*, and X-1: *Xanthomonas campestris*) on NA media.

**Table 3.** *In vitro* inhibitory effects of three different nano-silver liquid against various plant pathogenic bacteria

Plant Pathogenic Bacteria	Colony number/plate at $1.0 \times 10^5$ CFU/ml <sup>a</sup>												
	Control	WA-CV-WA13B				WA-AT-WB13R				WA-PR-WB13R			
		10 ppm	25 ppm	50 ppm	100 ppm	10 ppm	25 ppm	50 ppm	100 ppm	10 ppm	25 ppm	50 ppm	100 ppm
C-1	51.0	9.0	0.0	0.0	0.0	47.3	0.0	0.0	0.0	44.3	0.0	0.0	0.0
E-1	1,354.6	1,149.3	0.0	0.0	0.0	962.6	0.0	0.0	0.0	1,008.0	0.0	0.0	0.0
P-1	1,416.0	1,054.3	0.0	0.0	0.0	1,153.0	0.0	0.0	0.0	1,088.0	0.0	0.0	0.0
P-2	246.3	397.3	0.0	0.0	0.0	203.3	0.0	0.0	0.0	192.0	0.0	0.0	0.0
P-4	1,472.0	1,313.3	0.0	0.0	0.0	1,067.0	0.0	0.0	0.0	973.3	0.0	0.0	0.0
P-5	864.0	909.3	0.0	0.0	0.0	899.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
P-6	104.0	69.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
R-1	517.3	362.6	0.0	0.0	0.0	408.0	0.0	0.0	0.0	304.0	0.0	0.0	0.0
X-1	42.0	37.6	0.0	0.0	0.0	16.3	0.0	0.0	0.0	39.0	0.0	0.0	0.0
X-2	75.0	61.6	0.0	0.0	0.0	64.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

<sup>a</sup>The number of colonies are the average number of colonies counted on YPG, YGC, NA and MNA media. The experiments were performed twice.

도에서는 전혀 효과가 나타나지 않았고, 오히려 colony 수가 증가한 것은 nano-silver 용액이 전혀 생장억제 효과를 나타내지 않은 것으로 판단된다(Fig. 1, Table 3). WA-AT-WB13R 용액이 농도별로 첨가된 각 고체배지에서 72 시간 배양 후 세균의 colony를 계수한 결과, 10 ppm의 농도에서 P-6에 대하여 살균효과가 나타났다. 10 ppm의 농도에서는 C-1, X-1, 그리고 X-2에 대해서 약간의 생장억제 효과가 관찰되었다. WA-CV-WA13B 용액에서와 마찬가지로 WA-AT-WB13R 용액의 경우도 25 ppm 혹은 그 이상의 농도에서 모든 실험대상 식물병원세균의 생장을 완전히 억제시킨 것이 관찰되었다(Fig. 2, Table 3). WA-PR-WB13R 용액이 각 농도별로 첨가된 각 고체배지에서 72시간 배양 후, 세균의 colony를 계수한 결과(Fig. 2, Table 3). WA-PR-WB13R 용액 10 ppm 혹은 그 이상의 농도는 P-5, P-6, 그리고 X-2에 대하여 살균효과를 나타내었다.

P-6 균주가 WA-CV-WA13B 용액에서 30% 정도 생장이 감소하였고, WA-AT-WB13R 용액 10 ppm에서 살균된 것으로 보아 P-6 균주가 nano-silver 용액에 대하여 감수성이 것으로 판단된다. 실험대상 식물병원성 세균의 경우 다른 nano-silver 용액에서와 마찬가지로 WA-PR-WB13R 용액의 경우도 25 ppm 이상의 농도에서는 모두 자라지 않았다. 이러한 nano-silver 용액의 식물병원성 세균에 대한 살균 효과기작은 추가적인 연구가 필요하며, 살균기작에 대한 예비 연구를 위한 TEM 관찰 결과, 세균의 세포벽 주변에 nano-silver 입자가 밀집하는 것을 관찰할 수 있었으며(미발표자료, Thurman 등, 1989), 이들 세포벽에 밀집된 nano-silver 입자가 미생물의 세포막을 크게 손상시키는 것으로 추정되며, 이와 관련해 nano-silver 입자가 미생물의 세포막을 크게 손상시킨다는 연구 결과도 발표되었으며(Nel 등, 2003; Yeo 등, 2003), nano-silver 입자

가 세포막을 손상시켜 미생물을 불활성화 시킨다는 주장도 발표된 바 있다(Hwang 등, 2008). 본 연구를 통해, 인체에 무해하고 안정성이 뛰어난 nano-silver 용액을 이용하여, 농산물의 생산을 늘리고, 환경오염의 피해를 줄일 수 있으며, 나노 입자를 사용함으로써 농약의 남용을 줄이고, 환경도 개선할 수 있을 것으로 기대된다. 저농도로 효과를 증대하여 농가에 농업경영에 비용을 줄임으로써, 경제적이고, 친환경 농업에 사용됨에 따라 농산물 경쟁력 강화될 것으로 기대된다.

## 요 약

Nano-silver 용액의 식물병원성 세균에 대한 항균 활성 검정을 하기 위해 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*를 포함한 10가지 균주를 대상으로 실험을 수행 하였다. Nano-silver 용액은 바이오 (주)플러스에서 제공된 WA-CV-WA13B, WA-AT-WB13R과 WA-PR-WB13R 용액을 사용하였으며, 10 ppm, 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm 농도로 nano-silver 용액을 배지에 첨가하여 nano-silver 배지를 제조한 후 실험대상 세균 균주를 72 h 배양 후 생장억제 정도를 관찰하기 위하여 세균의 colony 수를 세었다. 실험 결과, WA-CV-WA13B 용액의 경우 C-1에 대하여 10 ppm에서도 높은 생장 억제 효과를 나타냈고, P-6, X-1, 그리고 X-2에 대해서도 생장억제 효과를 나타냈고, WA-AT-WB13R 용액의 경우 10 ppm의 농도에서 P-6에 대하여 살균효과가 나타났다. 10 ppm의 농도에서는 C-1, X-1, 그리고 X-2에 대해서 약간의 생장억제 효과가 관찰 되었다. WA-PR-WB13R 용액의 경우 10 ppm 혹은 그이상의 농도가 P-5, P-6, 그리고 X-2 균주에 대하여 살균효과를 나타내었다. 실험에 사용된 3가지 nano-silver 용액 모두 25 ppm 이상에서 모든 실험대상 식물병원성 세균에 대하여 살균효과를 나타내었으며, 이러한 결과는 nano-silver 용액을 식물병원성 세균의 방제제로 활용할 수 있는 가능성을 보여주는 결과라고 판단다.

## 감사의 글

본 연구에 사용된 nano-silver 용액은 (주)바이오플러스

에 의하여 제공되었으며, 실험에 사용된 균주는 KACC에 의하여 제공되었음. 본 연구는 농림수산식품부에서 지원한 농림기술개발사업(과제번호: 307005-3)의 지원에 의하여 수행된 결과의 일부임.

## 참고문헌

- Bragg, P. D. and Rannie, D. J. 1974. The effect of silver ions on the respiratory chain of *Escherichiacoli*. *Can. J. Microbiol.* 20: 883-889.
- Elchiguerra, J. L., Burt, J. L., Morones, J. R., Camacho-Bragado, A., Gao, X., Lara, H. H. and Yacaman, M. J. 2005. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *J. Nanobiotechnol.* 3: 6.
- Feng, Q. L., Wu, J., Chen, G. O., 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.
- Hwang, E. T., Lee, J. H., Chae, Y. J., Kim, Y. S., Kim, B. C., Sang, B. I. and Gu, M. B. 2008. Analysis of the toxic mode of action of silver nanoparticles using stress-specific bioluminescent bacteria. *Small* 4: 746-750.
- Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramirez, J. T. and Yacaman, M. J. 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanobiotechnol.* 16: 2346-2353.
- Nel, A. T., Xia, L. M. and Li, N. 2003. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311: 622-627.
- Samuel, U. and Guggenbichler, J. P. 2004. Prevention of catheter-related infections: the potential of a new nano-silver impregnated catheter. *International J. of Antimicrobial Agents* 23S1: S75-S78.
- Storz, G. and Imlay, J. A. 1999. Oxidative stress. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 188-194.
- Thurman, K. G. and Gerba, C. H. P. 1989. The molecular mechanisms of copper and silver ion disinfection of bacteria and viruses. *Crit. Rev. Environ. Control* 18: 295-315.
- Yeo, S. Y., Lee, H. J. and Jeong, S. H. 2003. Preparation of nanocomposite fibers for permanent antibacterial effect. *J. Mater. Sci.* 38: 2143-2147.