

탄닌산을 함유한 친환경농자재(공시번호 2-4-064)의 식물병원세균 기내 억제효과*

한규석** · 주호종*** · 홍진성**** · 정종상***** · 박덕환*****

In Vitro Screening of Tannic Acid-based Eco-friendly Farming Material (notice no. 2-4-064) against Plant Pathogenic Bacteria

Han, Kyu Suk · Ju, Ho-Jong · Hong, Jin Sung ·
Chung, Jong-Sang · Park, Duck Hwan

To date, chemical managements of plant bacterial diseases are complicated by limitations on use of antibiotics in agriculture, antibiotic resistance development, and limited efficacy of alternative control agents. In this study, thus, we performed screening of eco-friendly farming material (notice no. 2-4-064) containing tannic acid as new antibacterial-activity against 7 plant bacterial pathogens: *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc), *Ralstonia solanacearum* (Rs), *Acidovorax avenae* subsp. *citulli* (Aac), *Xanthomonas citri* pv. *citri* (Xcc), *Erwinia pyrifoliae* (Ep), *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm), and *Streptomyces scabies* (Sc). Initial screening of antibacterial effects of eco-friendly farming material was performed using the paper disk diffusion method and co-cultivation in broth culture. Tannic acid based eco-friendly farming material showed inhibitory effect against Pcc, Rs, Aac, Xcc, Cmm, and Ss, whereas it did not show inhibition zone against Ep. However, when it tested by co-cultivation in broth culture, it showed strong inhibition effect against all pathogens that declined growth curve compared to bacterial pathogen only. Interestingly, when we observed morphological changes

* 본 성과물은 농촌진흥청 연구사업(세부과제명 : 감자 연작지 더닝이병 발생현황 분석 및 친환경적 방제기술 개발, 세부과제번호 : PJ011190022016)의 지원에 의해 이루어진 것임.

** Co-first author, 강원대학교 응용생물학과

*** Co-first author, 전북대학교 농생물학과

**** 강원대학교 응용생물학과

***** (주)비아이지

***** Corresponding author, 강원대학교 응용생물학과(dhp@kangwon.ac.kr)

on those pathogens by SEM, cell morphologies of 7 pathogens were slightly changed that seem to be malfunction in their cell envelope.

Key words : *alternative control agents, antibacterial-activity, bacteria, plant pathogen, tannic acid*

I. 서 론

식물병원세균은 식물이 재배되고 있는 어떠한 환경조건에서도 발병하여 수확량 감소 및 상품성 저하의 원인이 되는 주요 식물병원체이다(Agrios, G. N., 1997). 특히 따뜻하고 습도가 높은 조건에서는 피해가 더 심각하여 그 위해성은 날로 증가하고 있다. 지구온난화의 영향으로 우리나라에서도 마찬가지로, 배추와 감자에서의 무름병, 수박과 멜론 등의 박과 작물에서의 과실썩음병, 가지과 작물에서의 풋마름병, 토마토, 키위 및 감귤 궤양병 그리고 감자 더덩이병 등 주요 작물에 심각한 피해를 주고 있는 식물세균병의 발생이 증가하고 있다. 일례로 과수 가지검은마름병의 경우 최초 발생한 1995년 이래 지속적인 모니터링 결과, 2016년 강원도 춘천, 홍천 및 횡성 그리고 경기도 포천 과수원에서 발생하여 발병주 제거 등으로 인한 경제적 피해를 주고 있는 실정이다(Han et al., 2016).

식물병원세균에 의한 식물세균병의 방제전략은 종자 또는 생식 생장체에서 병원세균이 오염되지 않은 무병종자와 조직배양 방법을 이용하는 배제(exclusion)의 개념이 있으며, 여기에는 국경 및 항만에서의 검역도 포함된다(Schumann and D'Arcy, 2010). 또한 윤작과 휴작에 의한 감염기주의 제거 및 감염이전 단계에서의 제거와 같은 박멸(eradication)의 개념이 있을 수 있다(Schumann and D'Arcy, 2010). 그러나 배제와 박멸의 개념을 포함하는 경종적 방제방법은 그 효율성이 낮고 오랜 기간 지속적인 관심과 유지가 관건이기에 현장에서의 인지도는 낮은 편이다. 이를 대체할 수 있는 가장 적절한 식물세균병의 방제전략은 항생제와 구리합성 화학물을 발병이전 또는 직후에 사용하는 화학적 방제방법이 가장 적극적이고 널리 사용되는 방법임을 알 수 있다. 그러나 사과와 배의 화상병원세균의 경우 지나치게 항생제 처리에 의한 방제방법에 의존한 결과, 이들 약제에 대한 저항성 병원세균의 출몰로 인해 방제효과의 감소, 약제처리 비용 증가 및 다른 병원세균 혹은 환경미생물내로의 저항성 유전자의 이동과 같은 문제점이 대두되어 사용이 점차 감소하고 급기야는 사용 금지된 사례가 있다(Tancos and Cox, 2016). 다른 일례로 감자더덩이병의 경우는 토양병해로 지하부에 존재하는 괴경에 발생하는 병징적 특성 때문에 화학농약의 사용이 매우 부정적인 입장이고, 이에 따라 길항미생물 등을 이용한 생물적 방제만이 강조되다보니 아직까지 큰 방제효과를 얻지 못하고 있는 실정이다(Meng et al., 2013).

탄닌산은 초본 및 목본 식물에서 공통적으로 존재하는 수용성 폴리페놀 물질로서, 많은

식물들은 그들을 공격하는 다양한 적들의 피해로부터 자신을 보호하기 위하여 가장 중요한 물질로 탄닌산을 이용하여 왔다(Scalbert, 1991). 이에 탄닌산의 항미생물 효과에 대한 연구가 다수 수행되어졌으며, 특히 인간에 질환을 유발하는 각종 장내세균에 대한 억제 및 기작에 대한 연구가 수행되었다(Chung et al., 1998; Akiyama et al., 2001; Hancock et al., 2010).

따라서 본 연구에서는 다양한 미생물에 대해 억제효과를 나타내는 탄닌산을 함유한 친환경농자재(공시번호 2-4-064)의 식물병원세균에 대한 억제효과를 기내실험을 통하여 판단하고, 향후 식물체 검정과 포장실험을 통하여 유기농산물 생산에서의 활용여부를 판단하기 위하여 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 대상 식물병원세균 선정

탄닌산 함유 친환경농자재의 식물병원세균에 대한 억제여부를 판단하기 위하여 최근 국내에서 문제시 되고 있는 식물세균병의 원인세균을 대상으로 하였다(Table 1). 즉 그람 음성 세균으로 무름병(soft rot), 감귤 궤양병(citrus canker), 풋마름병(bacterial wilt), 가지검은마름병(black shoot blight) 및 과실썩음병(bacterial fruit blotch) 그리고 그람 양성 세균으로는 토마토 궤양병(bacterial canker) 및 더덩이병(common scab)의 원인 병원세균에 대한 억제여부를 판단하였다.

Table 1. Plant pathogenic bacterial strains used in this study

Disease common name	Scientific name	Source or reference
Soft rot	Gram negative <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> (Pcc)	^a KACC 10057
Bacterial wilt	<i>Ralstonia solanacearum</i> (Rs)	KACC 10697
Bacterial fruit blotch	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> (Aac)	Prof. Oh, C.-S (Kyung Hee Univ.) courtesy provide
Citrus canker	<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i> (Xcc)	Prof. Jeon, Y. C (Jeju N. Univ.) courtesy provide
Black shoot blight	<i>Erwinia pyrifoliae</i> (Ep)	Ep1 (Han et al., 2016)

Disease common name	Scientific name	Source or reference
Bacterial canker	Gram positive <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (Cmm)	Prof. Oh, C.-S (Kyung Hee Univ.) courtesy provide
Common scab	<i>Streptomyces scabies</i> (Ss)	KACC 20101

^a Korean Agricultural Culture Collection.

2. 고체 및 액체배지 배양을 통한 억제효과 검정

탄닌산 함유 친환경농자재(유효성분 30.8%)의 식물병원세균에 대한 억제효과 검정은 먼저 고체배지에서의 확산법에 의해 수행되었다(Benkerroum and Sandine, 1988). MGY 고체배지(Mannitol Glutamate Yeast extract: D-mannitol 10 g, L-glutamic acid 2 g, KH₂PO₄ 0.5 g, NaCl 0.2 g, MgSO₄·7H₂O 0.2 g, Yeast extract 1 g, Agar 15 g/L, pH 7.0)에 24시간 배양한 식물병원세균 균총을 현탁하여 도말하여 3시간 동안 28°C에서 배양 후, 직경 0.5 cm paper disk를 치상하고 여기에 탄닌산 함유 친환경농자재 용액을 0, 10, 100, 500, 1,000, 5,000, 10,000 그리고 20,000 ppm 농도로 20 ul를 접종하였다. 그 후 28°C에서 1일간 배양하여 대상 식물병원세균 억제에 의해 나타나는 억제환(inhibition zone)의 형성여부에 따라 효과를 검정하였다. 이 때 positive control로 가스가마이신 입상수화제 및 코퍼하이드록사이드 입상수화제를 사용하였으며, 억제환 형성 농도를 최소억제농도(MIC, minimum inhibitory concentraion)로 나타내었다. 실험은 2반복 수행하였으며, 반복 간 동일한 결과를 나타내었다. 또한 액체배지 검정은 MGY 액체배지에 대상 식물병원세균을 흡광도(optical density) 0.01-0.02로 접종하여 고체배지 검정에서 최소억제농도 보다 높은 농도인 5,000 ppm으로 탄닌산 함유 친환경농자재를 첨가하여 1시간 단위 별 흡광도를 SPECTROstarNano (Ultra-fast Absorbance Spectrometer, BMG LABTECH Inc. Cary, NC, USA)로 측정하였다.

3. 주사전자현미경을 통한 억제효과 검정

탄닌산 함유 친환경농자재의 식물병원세균에 대한 작용현상을 이해하기 위해, 주사전자현미경(SEM: Scanning electron microscope)을 이용하여 처리 후 병원세균의 변화를 관찰하였다. 각 식물병원세균과 탄닌산 함유 친환경농자재를 5,000 ppm으로 혼합처리하여 30분간 반응 후, Ion sputter E1010 (Hitachi, Japan)을 이용하여 discharge current 15 mA에서 30초간 gold 코팅하였다. 이 후 한국기초과학지원연구원 춘천센터 소장 SUPRA55 VP-FESEM (Variable Pressure Field Emission Scanning Electron Microscope, Carl Zeiss, Germany)로 병원세균 표면의 변화를 관찰하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

탄닌산 함유 친환경농자재의 7종 식물병원세균에 대한 기내 억제효과는 4종의 그램 음성병원세균(무름병-Pcc, 풋마름병-Rs, 과실썩음병-Aac 및 감귤궤양병-Xcc)과 2종의 그램 양성병원세균(토마토궤양병-Cmm 및 더랭이병-Ss)에 대해 억제효과를 나타내었다(Fig. 1). 특히 무름병과 풋마름병의 2종의 그램 음성 병원세균에 대해서는 최소억제농도가 1,000 ppm으로 가장 효율적이었으며, 과실썩음병과 감귤궤양병 그리고 토마토 궤양병원세균에 대해서는 5,000 ppm, 더랭이병원세균에 대해서는 10,000 ppm으로 최소억제농도가 가장 높게 나타났다(Table 2). 반면 가지검은마름병원세균에 대해서는 억제효과가 나타나지 않았는데, 이는 가지검은마름병원세균의 균총 특성에 나타나듯이 과도한 다당류가 축전되어 매우

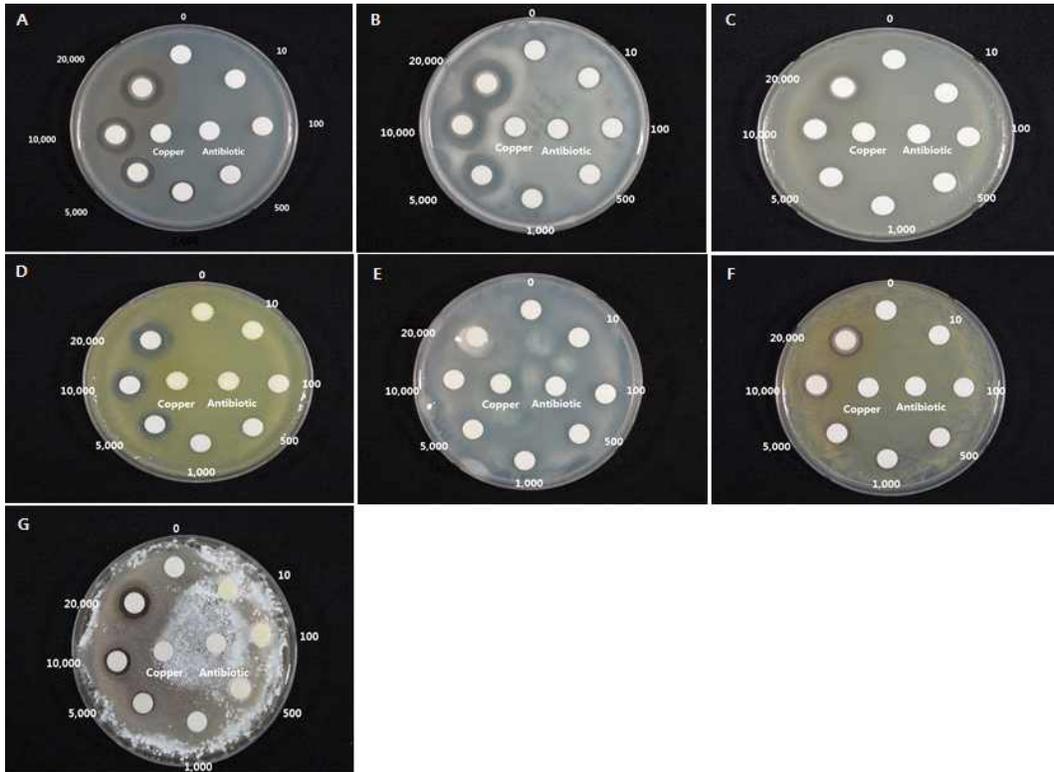


Fig. 1. Disk well diffusion method to observe antibacterial activity of the tannic acid based eco-friendly farming material (notice no. 2-4-064) against 7 plant pathogenic bacteria. A, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc); B, *Ralstonia solanacearum* (Rs); C, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac); D, *Xanthomonas citri* pv. *citri* (Xcc); E, *Erwinia pyrifoliae* (Ep); F, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm); G, *Streptomyces scabies* (Ss). The antibacterial activity was assessed by observing inhibitory zones in the background of the disks treated with eco-friendly farming material. The experiment was repeated two times with similar results.

Table 2. Anti-bacterial activity of tannic acid based eco-friendly material against seven different plant bacterial pathogens

Plant bacterial pathogens	Degree of anti-bacterial activity ^a					
	1,000 ppm	5,000 ppm	10,000 ppm	20,000 ppm	Copper	Antibiotic
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	+	++	++	+++	-	-
<i>R. solanacearum</i>	++	+++	+++	++++	-	-
<i>A. avenae</i> subsp. <i>citulli</i>	-	+	++	++	-	-
<i>X. citri</i> pv. <i>citri</i>	-	++	++	+++	-	-
<i>E. pyrifoliae</i>	-	-	-	-	-	-
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	-	+	+	+	-	-
<i>S. scabies</i>	-	+	++	++	-	-

^a Determined by measuring the average diameter of clear zone of infection, - = no inhibition; + = 0.1 to 1.5 cm; ++ = 1.1 to 1.5 cm; +++ = 1.51 to 2.0 cm; ++++ = > 2.0 cm

mucoid한 형태로 성장하기 때문에 탄닌산 함유 친환경농자재의 침투효과가 사라졌기 때문으로 사료된다. 또한 각각 항생제와 구리합성 화학물 계통 대조약제로 사용된 가스가마이신 입상수화제 및 코퍼하이드록사이드 입상수화제는 모두 고체배지 검정에서는 억제효과가 나타나지 않았다(Table 2).

한편 최소억제농도가 모두 1,000 ppm 이상의 농도에서 형성되어졌는데, 이는 고체배지에서의 탄닌산 함유 친환경농자재의 확산력에 따라 달라질 수 있다고 판단되며, 모든 병원세균에서 억제효과를 나타낼 수 있는 5,000 ppm 농도로 액체배지 억제검정을 실시하였다.

액체배지에서의 탄닌산 함유 친환경농자재의 억제효과는 처리농도 5,000 ppm에서 검정한 6종의 식물병원세균의 흡광도가 모두 배양 24시간까지 높아지지 않았다(Fig. 2). 배양 24시간 후는 탄닌산 함유 친환경농자재를 첨가하지 않은 6종의 대조구의 성장곡선에서 보여 주듯이 후기 안정기 또는 사멸기의 시점으로 검정에 필요한 충분한 성장시간으로, 이는 탄닌산 함유 친환경농자재의 효과에 의해 병원세균이 성장하지 못하는 것이 분명하다. 특히 고체배지 검정에서 저지환의 크기가 탄닌산 함유 친환경농자재의 확산력에 의해 달라질 수 있는 사실이, 직접 접촉에 의해 효과를 나타내는 액체배지 검정 결과 성장초기부터 말기까지 식물병원세균의 성장을 억제하는 것을 고려할 때, 최소억제농도는 고체배지에서 검정된 농도보다 매우 낮은 농도에서 억제할 수 있을 것으로 판단된다. 한편 더덩이병원세균(Ss)는 식물병원세균 중 유일한 실모양(filamentous) 형태로 성장하는 병원세균으로, 액체배지 검정에서는 흡광도를 측정하기가 적절하지 않아 액체배지 검정에서는 제외하였다.

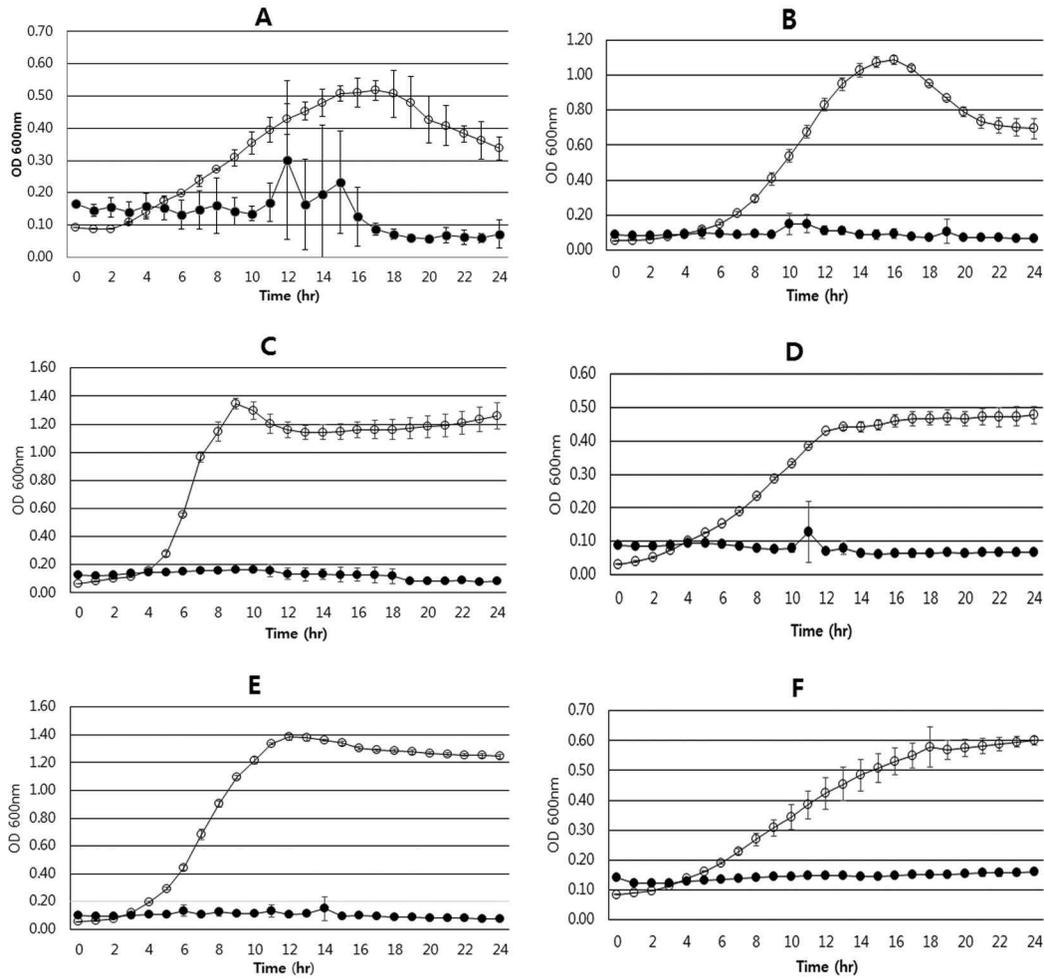
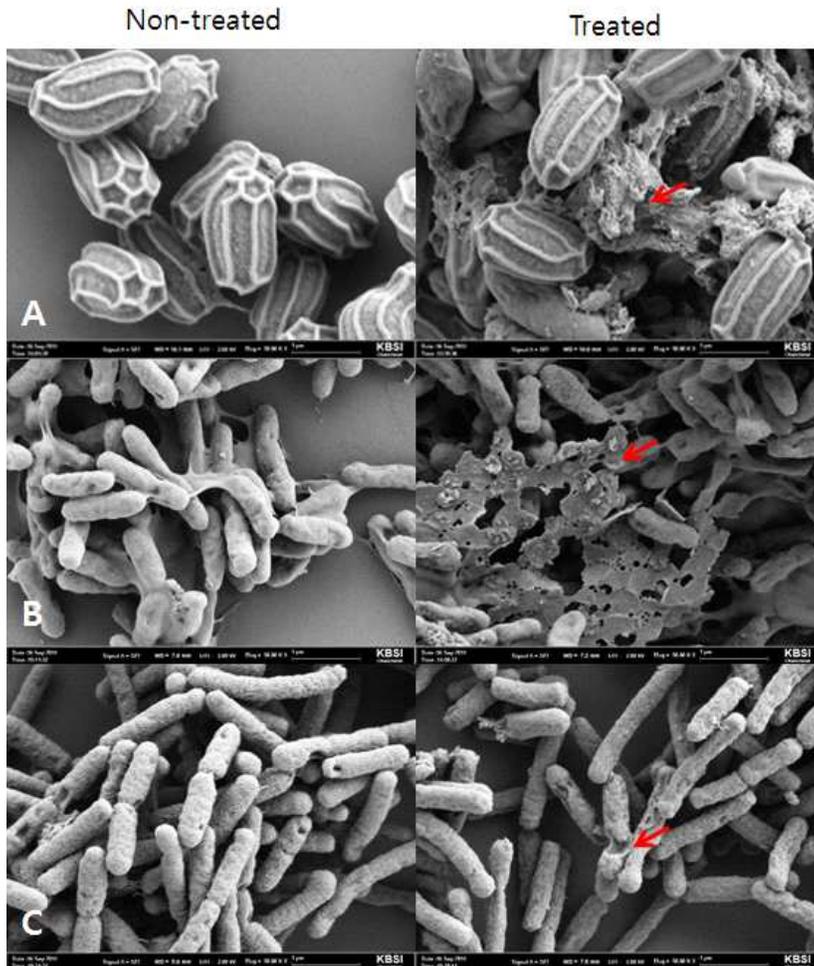


Fig. 2. Comparison in growth curve of non-treated (open circle) and tannic acid based eco-friendly farming material (notice no. 2-4-064) treated (closed circle) with 6 plant pathogenic bacteria. Error bars represent standard error with repeated experiments. A, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc); B, *Ralstonia solanacearum* (Rs); C, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac); D, *Xanthomonas citri* pv. *citri* (Xcc); E, *Erwinia pyrifoliae* (Ep); F, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm).

따라서 직접 접촉에 의해 억제효과가 나타나는 것으로 사료되어, 주사전자현미경을 이용하여 병원세균들의 표면에서의 변화를 관찰하였다(Fig. 3). 탄닌산 함유 친환경농자재는 식물병원세균의 정상적 세포모양을 크게 변화시켰다. 즉 모든 병원세균의 세포는 작은 구멍이 형성되면서 세포표면이 안으로 흡착되는 현상과 심할 경우에는 세포가 터지는 현상이 관찰되었다. 기존 탄닌산의 항미생물 효과와 관련되어 세포 표면변화 또는 터짐증상에 의한 세포사멸의 기작이 대부분 철을 흡착하여 세포막의 결속력을 와해시키기 때문이라는

연구결과에 따라 탄닌산 함유 친환경농자재의 억제효과도 유사한 기작을 나타낼 수 있다고 사료된다(Scalbert, 1991; Chung et al., 1998). 또는 식물병원세균의 세포벽인 펩티도글라이칸 층(peptidoglycan layer)을 와해시켜 삼투압 및 팽압을 유지할 수 없는 상태로 표면흡착과 터짐 증상의 외형변화가 나타날 수도 있는 것으로 사료된다. 특히 터짐증상으로 보아, 펩티도글라이칸 층의 acetylglucosamine과 acetylmuramic acid 간의 결합을 끊어주거나, 세포벽의 결속력을 강화하기 위해 존재하는 diaminopimelic acid와의 결합이 와해되기 때문이라고 추정하여 볼 수 있다. 한편, 토마토퀘양병원세균은 그람 양성 세균으로 탄닌산 함유 친환경농자재에 의한 표면변화가 가장 적게 나타났는데, 일반적으로 그람 음성 세균에 비해 세포벽이 두꺼운 양성 세균의 특성에 기인할 수도 있다고 판단된다. 그러나 같은 그람 양성세균인 더랭이병원세균은 세포터짐 현상이 관찰되어, 그람 양성 세균간에도 세포벽의 구조적 차이로 인해 탄닌산 함유 친환경농자재에 의한 억제효과가 다를 수 있다고 사료되어 이 부분에 대한 연구는 더 진행되어야 한다.



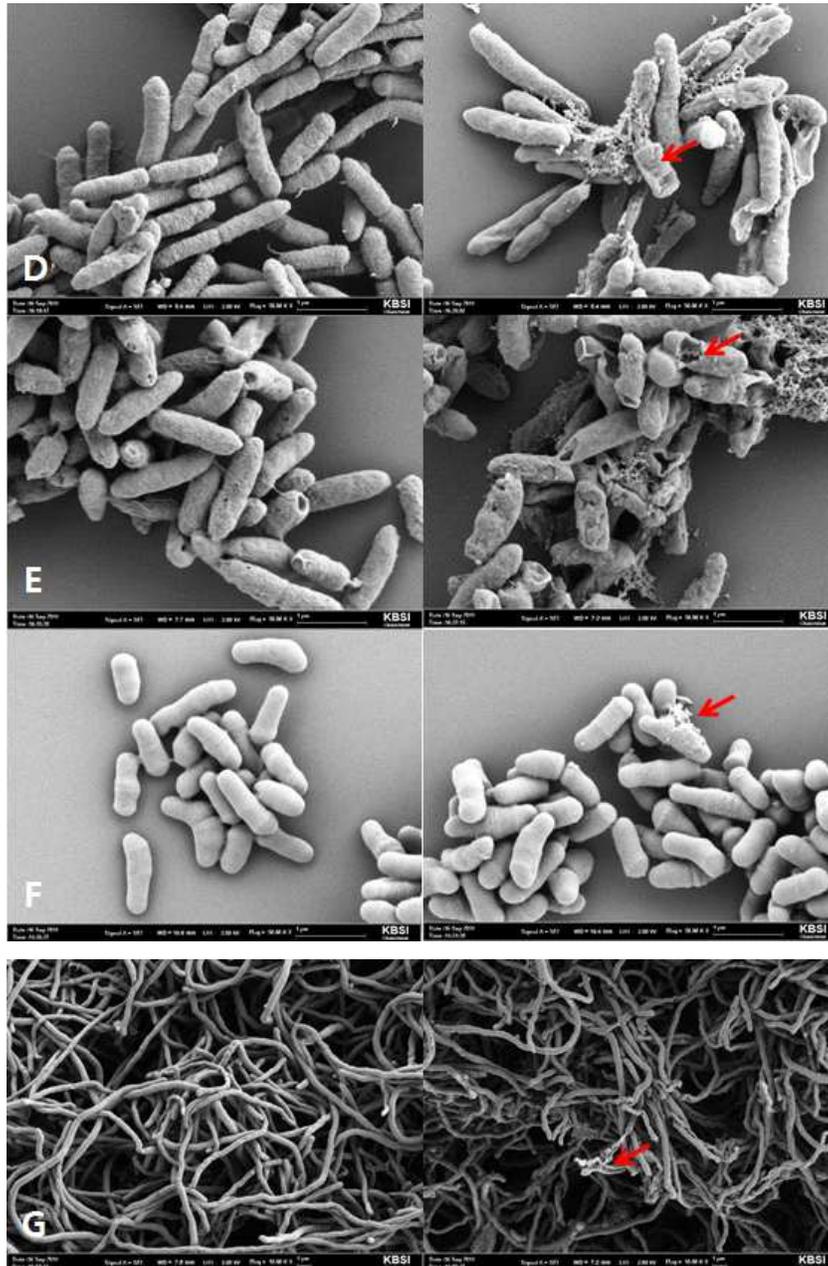


Fig. 3. Scanning electron microscopy of non-treated and tannic acid based eco-friendly farming material (notice no. 2-4-064) treated with 7 plant pathogenic bacteria. Red arrows indicate cell that bursted during co-cultivation with eco-friendly farming material. A, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc); B, *Ralstonia solanacearum* (Rs); C, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac); D, *Xanthomonas citri* pv. *citri* (Xcc); E, *Erwinia pyrifoliae* (Ep); F, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm); G, *Streptomyces scabies* (Ss).

IV. 적 요

지금까지 주요 식물병원세균에 대한 방제대책은 화학적 방제방법에 의존하여왔다. 그러나 항생제와 같은 화학적 방제방법은 저항성 균주의 출현으로 인해 효율성이 감소함에 따라 대체방법의 개발이 요구되어지고 있는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 주요 7종(그랩 음성 - 무름병, 감귤 궤양병, 풋마름병, 가지검은마름병 및 과실썩음병; 그랩 양성 - 토마토 궤양병 및 더덩이병)의 식물병원세균에 대한 탄닌산 함유 친환경농자재(공시번호 2-4-064)의 억제효과를 고체배지 확산법과 액체배지 배양법으로 검정하였다. 고체배지 확산법에서는 가지검은마름병원세균을 제외한 6종의 병원세균에 대한 억제효과를 나타내었으며, 액체배지 검정에서는 액체배지법으로 실험가능한 6종의 병원세균의 생장을 억제하였다. 전자현미경을 통한 표면변화를 관찰한 결과, 모든 병원세균의 표면구조의 변화를 발생하여 성장 저해 또는 세포사멸을 유도하는 현상이 관찰되었다.

[Submitted, November. 3, 2016 ; Revised, November. 14, 2016 ; Accepted, November. 16, 2016]

References

1. Agrios, G. N. 1997. Plant diseases caused by prokaryotes: Bacteria and Mollicutes. Pages 407-416 in: Plant Pathology. 4th ed. APS Press, St. Paul. MN.
2. Akiyama, H., K., Fujii, O., Yamasaki, T., Oono, and K. Iwatsuki. 2001. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. J. Antimicrobial Chemotherapy. 48: 487-491.
3. Benkerroum, N. and W. E. Sandine. 1988. Inhibitory action of nisin against *Listeria monocytogenes*. J. Dairy Science. 71: 3237-3245.
4. Chung, K. -T., Z., Lu, and M. W. Chou. 1998. Mechanism of inhibition of tannic acid and related compounds on the growth of intestinal bacteria. Food and Chemical Toxicol. 36: 1053-1060.
5. Han, K. S., J.-G., Yu, H.-B., Lee, C.-S., Oh, M. C. Yea, J.-H., Lee, and D. H. Park. 2016. Controlling by effective pruning of twigs showing black shoot blight disease symptoms in apple trees. Res. Plant Dis. *submitted*.
6. Hancock, V., M., Dahl, R. M., Vejborg, and P. Klemm. 2010. Dietary plant components ellagic acid and tannic acid inhibit *Escherichia coli* biofilm formation. DOI:10.1099/jmm.0.013680-0.

7. Meng, Q., L. E., Hanson, D., Douches, and J. J. Hao. 2013. Managing scab diseases of potato and radish caused by *Streptomyces* spp, using *Bacillus amyloliquefaciens* BAC03 and other biomaterials. *Biological Control*. 67: 373-379.
8. Scalbert, A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*. 30: 3875-3883.
9. Schumann, G. L. and C. J. D'Arcy. 2010. What are the causes of plant diseases? Bacteria. Pages 51-68 in: *Essential Plant Pathology*. 2nd ed. APS Press, St. Paul. MN.
10. Tancos, K. A. and K. D. Cox. 2016. Exploring diversity and origins of streptomycin-resistant *Erwinia amylovora* isolates in New York through CRISPR spacer arrays. *Plant Dis*. 100: 1307-1313.