

## 식물병원성 곰팡이에 대한 곤충장내세균의 항균활성

오산나 · 서미자 · 윤영남 · 유용만\*

충남대학교 농업생명과학대학 응용생물학과

## Antifungal Activity Against Plant Pathogenic Fungi on Insect Enterobacteriaceae

San Na Oh, Mi Ja Seo, Young Nam Youn and Yong Man Yu\*

Department of Applied Biology, College of Agriculture and Life Sciences,  
Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

(Received on February 9, 2015. Revised on February 25, 2015. Accepted on March 13, 2015)

**Abstract** In order to investigating the effects of antifungal activity of intestinal bacteria obtained from insect, it was identified these bacteria isolated from the gut. In this result, total 49 isolates of intestinal bacteria were identified from 10 kinds of insect species. It was that 4 isolates including *Cedecea* sp. from *Nesidiocoris tenuis*, 3 isolates including *Enterobacter* sp. from *Odontotaenius disjunctus*, 4 isolates including *Acinetobacter* sp. from *Reticulitermes speratus*, 4 isolates including *Clavibacter* sp. from *Riptortus clavatus*, 11 isolates including *Bacillus* sp. from *Lema decempunctata*, 3 isolates including *Enterococcus* sp. from *Henosepilachna vigintioctopunctata* 2 isolates including *Staphylococcus* sp. from *Harmonia axyridis*, 5 isolates including *Enterobacter asburiae* from *Popillia mutans*, 7 isolates including *Aeromonas* sp. from *Hydrophilus acuminatus*, and 7 isolates including *Brucella* sp. from *Anomala octiescostata*. In order to investigating antifungal activity against plant-pathogenic fungi, *Altanaria solani*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia sclerotiorum* were dual cultured with each 49 gut enterobacteriaceae. As these results showed that many isolates have the antifungal activities including 26 isolates against *A. solani*, 6 isolates against *B. cinerea*, 13 isolates against *C. gloeosporioides*, 11 isolates against *F. oxysporum*, 17 isolates *P. capsici*, 2 isolates against *R. solani* and 2 isolates against *S. sclerotiorum*. *Pseudomonas aeruginosa* was showed strong antifungal activity against all of tested plant pathogens. It might be taken a potential for application against plant-pathogenic fungi with useful control agent.

**Key words** enterobacteriaceae, plant-pathogenic fungi, *Pseudomonas aeruginosa*, antifungal activity

## 서 론

자연 생태계에서 존재하는 수많은 미생물들은 동물과 식물 등 다른 생물들과의 공생과 기생관계가 광범위하고 복잡하게 얽혀있다(Margulis 등, 1991; Ruby 등, 2004). 이러한 공생과 기생관계는 기주가 되는 생물에 이로운 역할도 하지만 치명적인 병원균이나 해로운 역할에 관여 한다(Buchner, 1965; Moran, 2006). 이들 공생을 하는 균들 중에서 기주의

몸속에 살아가면서 기주와 밀접한 관계를 유지하는 균을 내부공생자라고 하며, 외부에 영향을 미치는 균을 외부공생자라고 한다(Kikuchi, 2009).

곤충의 유연한 먹이섭취에는 내부기생자가 필수적으로 관여하게 된다. 실제 내부공생자들은 곤충의 소화기관 근처에서 흔히 발견되고, 널리 알려진 일반적인 내부공생자들은 기주가 되는 곤충의 소화와 영양에 있어 중요한 역할을 한다(Genta 등, 2006). 그러나 최근에는, 공생자들이 기주의 영양에만 영향을 미치는 것이 아니라는 것이 밝혀지고 있다(Bourtzis & Miller, 2003; 2006; Buchner, 1965). 많은 곤충 내생공생자들, 특히 세포 내부공생자들은 DNA를 포함한 유전적 요소에까지 영향을 주는 것이 밝혀지고 있다(Ishikawa,

\*Corresponding author

Tel: +82-42-821-5763, Fax: +82-42-823-8679

E-mail: ymyu@cnu.ac.kr

1989). 이렇게 곤충과 장내에서나 표면에서 서식하는 많은 다른 미생물들은 다양한 방법으로 서로 공존하고 있다 (Steinhaus, 1960; Buchner, 1965; Walker 등, 1999).

곤충은 절대적이거나 선택적 공생자를 갖는데, 진딧물 (Buchner, 1965; Baumann 등, 1995), 흰개미 (Breznak, 1984), 바퀴벌레 (Bracke 등, 1979) 등의 곤충에서 장내 공생세균에 대한 연구가 되어있다. 대표적인 예로 진딧물과 그 공생균주인 *Buchnera* 균은 필수 아미노산을 제공하며 기주의 성장과 생식에 관여하는 상리공생관계로 경관전염을 통해서 후대로 전염되는 절대기생균이다 (Douglas, 1998; Munson 등, 1991; Miura 등, 2003). *Wolbachia* 균은 곤충의 생식에 관여하는 대표적인 공생미생물로 기주의 생식을 저해하거나 성비를 조절하여 해로운 영향을 끼치기도 한다 (Bourtzis & Miller 2003). 나비목 곤충의 장내 공생세균이 소화효소를 분비하여 기주의 영양과 소화에 일부분을 차지한다는 것이 연구되어 밝혀졌다 (Appel 1994; Bignell & Eggleton 1995). 대표적으로 누에나방의 장에서는 셀룰로오스와 자일렌, 펙틴과 녹말을 분해하여 그들의 소화에 영향을 주는 공생세균이 보고되었다 (Dillon & Dillon 2004; Anand 등, 2010, Feng 등, 2011).

곤충병원성 선충인 *Steinernema* 종과 *Heterorhabditis* 종의 경우, 몸속에 *Xenorhabdus* 종 세균과 함께 공생한다 (Akhurst, 1982). 이러한 *Xenorhabdus* 종 세균은 생물적 방제인자로도 쓰이는데, *Xenorhabdus nematophilus*는 직접적인 독소를 분비할 뿐 아니라 대사산물로 항생물질을 분비함으로써 식물병원균에 탁월한 효과가 있고, 항중양물질을 분비하기도 한다 (Ji 등, 2004).

본 연구에서는 곤충의 장내세균으로 식물에 병을 일으키는 곰팡이에 대한 항균활성에 대해 조사하였다. 곤충의 장내에서 분리한 장내세균 중 항균성을 갖는 균주를 선발하여 식물 병에 대한 방제활성을 측정하여 미생물제제로서의 개발 가능성을 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 시험곤충

시험곤충으로 사용한 10종은 가운데 담배장님노린재 (*Nesidiocoris tenuis*)는 (주)동부 팜 세레스로부터 구입하여 온도  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , 광조건 16L:8D, 상대습도 50~60%의 조건에서 보관하면서 성충을 사용하였다. 사슴벌레붙이 (*Odontotaenius disjunctus*)는 경기도 포천 일대에서 성충을 채집하여 사용하였다. 흰개미 (*Reticulitermes speratus*)는 2011년 6월에 계룡산 일대에서 채집하여 사육하던 국립문화재 연구소 보존과학연구실에서 분양받아 온도  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , 광조건 16L:8D, 상대습도 50~60%의 조건에서 썩은 나무에서 사육하며 사용하였다. 툭다리개미허리노린재 (*Riptortus clavatus*)는 대전 유성 일대에서 성충을 채집하여 사용하였다. 열점

박이잎벌레 (*Lema decempunctata* Gebler)는 충남 청양 구기자 밭에서 성충을 채집하여 온도  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , 광조건 16L:8D, 상대습도 50~60%에서 밭에서 딴 구기자 잎을 먹이며 사육하여 사용하였다. 무당벌레 (*Harmonia axyridis*)는 대전 유성에서 성충을 채집하여 사용하였다. 이십팔점박이무당벌레 (*Henosepilachna vigintioctopunctata*)는 충남 청양 구기자 밭에서 채집하여 구기자잎과 토마토 잎을 먹이며 사육하여 사용하였다. 콩풍뎅이 (*Popillia mutans*)는 충남 청양에서, 물땡땡이 (*Hydrophilus acuminatus*)와 팔맥풍뎅이 (*Anomala octiescostata*)는 충남 공주에서 성충을 채집하여 사용하였다.

### 소화기관 분리

담배장님노린재와 흰개미는 크기가 너무 작아 장을 분리할 수 없기 때문에  $-20^\circ\text{C}$ 에 10분간 넣어 기절시킨 후, 멸균된 해부가위로 부속지를 땨 충체를 표면소독 하였다. 표면소독은 1%  $\text{NaClO}_3$ 에 1분간 침지한 후 70%(w/w) 에탄올에 1분 침지한 후에 충체에 남아있는 에탄올을 제거하기 위하여 멸균된 saline solution (9.32 g NaCl, 0.77 g KCL, 0.5 g  $\text{CaCl}_2$ , 0.18 g  $\text{NaHCO}_3$ , 0.01 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  / l pH7.4)으로 세척한 후 멸균수 200  $\mu\text{l}$ 가 채워진 1.5 ml eppendorf tube (Axyzen, Central Avenue Union City, USA)에 한 마리씩 넣어서 곤충마쇄봉으로 마쇄하였다.

또한, 사슴벌레붙이, 툭다리개미허리노린재, 열점박이잎벌레, 무당벌레, 이십팔점박이 무당벌레, 콩풍뎅이, 물땡땡이와 팔맥풍뎅이는 기절시킨 후 같은 방법으로 표면소독한 후 멸균된 미세가위로 복부를 절개한 후 소화기관을 분리하였다. 분리된 소화기관은 멸균수 100  $\mu\text{l}$ 가 채워진 1.5 ml eppendorf tube에 한 마리의 소화기관을 넣어 곤충마쇄봉으로 마쇄하였다.

### 장내세균의 분리 및 동정

각 시험곤충들의 개체별로 분리된 소화기관과 충체를 eppendorf에 멸균수와 함께 넣고 마쇄봉으로 마쇄한 후, 적정량을 희석하여 NA배지 (Difco™ Nutrient Agar), PDA (Difco™ Potato Dextrose Broth, Bacto™ Agar), TSA (Bacto™ Tryptic Soy Broth, Bacto™ Agar)배지에 각각 배양하여 서로 다른 콜로니를 육안으로 식별하여 순수 분리하였다. 순수 분리한 단일 콜로니들을 (주)MACROGEN에 의뢰하여 16sRNA를 PCR 증폭 하였다. PCR 증폭에 사용된 primer는 518F (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3') primer와 800R (5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3') primer를 사용하였다. 518 Forward primer, 1  $\mu\text{l}$ ; 800 Reverse primer, 1  $\mu\text{l}$ ; Taq polymerase (Solgent, Korea), 0.1U; dNTP, 1  $\mu\text{l}$ ; 10 × buffer, 3  $\mu\text{l}$ ; DW, 22.9를 0.2 ml PCR tube에 넣고 잘 혼합한 후  $95^\circ\text{C}$ 에서 5분간 반응한 다음  $94^\circ\text{C}$ 에서 denaturation 45초,  $55^\circ\text{C}$ 에서 annealing 1분,  $72^\circ\text{C}$ 에서 extension 1분을 35회 반

복하고, 72°C에서 10분간 final extension의 조건으로 PCR (DNA Engine Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler (BIO-RAD)) 반응을 실시하였다. 정제된 16s RNA를 주형으로 BigDye(R) Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems)를 사용하여 염기서열을 결정하였다. Sequencing PCR은 BioDye 1.3 µl, T7 primer 1 µl, 16s RNA sample 1 µl (100 ng), 2Xbuffer 3.4 µl에 멸균수 13.3 µl를 잘 혼합한 후 cycle sequencing을 실시하였다. PCR 산물은 100% ethanol 50 µl와 3M sodium acetate (pH 5.2) 2 µl를 첨가한 후 22,040G에서 25분간 침전시키고, 250 µl의 70% ethanol로 세척하여 건조시킨 후 HiDi 후 Formamide 20 µl를 첨가하여 95°C에서 2분 동안 denaturation 후 얼음 위에서 냉각시키고 ABI PRISM 3730XL Analyzer (96 capillary type)를 사용하여 16S rDNA (500~580 bp) 염기서열을 결정하였다. 염기서열은 SeqMan program을 이용하여 Alignment하여 정리하였다. 정리된 16s RNA 염기서열의 similarity는 NCBI/GeneBank database의 BLAST program을 이용하여 비교하였다.

### 식물병원성 곰팡이

농작물에 피해를 주는 주요 식물병원균은 7종으로 토마토 겹등근무늬병균(*Alternaria solani* CNU 003591), 고추 탄저병균(*Colletotrichum gloeosporioides* CNU 134099)은 충남대학교 식물병리I실험실에서 분양받아 사용하였으며, 잭빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*), 시들음병균(*Fusarium oxysporum*), 고추역병균(*Phytophthora capsici*), 벼문고병균(*Rhizoctonia solani*), 상추균핵병균(*Sclerotinia sclerotiorum*)은 충남대학교 식물병리II 실험실에서 분양받아 사용하였다.

### 항균활성 측정

식물병원성 곰팡이 7균주의 선단부를 7 mm cork borer로 떼어낸 후 NA배지에서 배양된 장내세균과 2.5 cm 간격으로 PDA (Potato Dextrose Agar)배지에 접종하여 대치배양하였다. 병원균의 성장속도에 따라 5~15일간 25°C에서 배양한 뒤 장내세균에 의한 병원균의 inhibition zone의 길이를 측정하여 다능과 같은 식으로 활성을 검정하였다.

$$\text{항균활성도는 control value (\%)} = \frac{R_1 - R_2}{R_1} \times 100$$

$R_1$  = 병원성 곰팡이의 대조구의 직경,

$R_2$  = 항균활성을 갖는 장내세균에 의해 저해되는 곰팡이의 직경

을 이용하여 구하였다.

### 길항 세균 선발

곤충으로부터 분리한 장내세균과 7종의 식물병원성 곰팡이 모두가 잘 자라는 PDA배지에서 대치배양을 하였을 때,

비교적 높은 방제가를 가지며, 7종 모두의 식물병원성 곰팡이에 항균활성을 갖는 *Pseudomonas aeruginosa*를 선발하였으며 이는 시슴벌레붙이와 콩풍뎅이에서 동시에 분리되었다.

### in vivo 분무실험

곤충의 장내세균 중 식물병원성 곰팡이에 높은 항균활성을 갖는 *P. aeruginosa*를 선발하여 고추에 직접 분무 처리한 다음, 고추 탄저병균 분무 후의 방제효과를 실험하였다. 먼저 병이 들지 않은 건강한 고추를 물로 세척한 후 1% 락스에 3분간 담갔다가 70% 에탄올로 표면을 소독하여 한 처리구당 고추 5개씩 준비한다. 무처리구 고추로는 아무것도 처리하지 않은 고추와 표면에 멸균수를 5 ml 스프레이로 뿌려 충분히 적신 고추를 말한다. 세균 처리구는 액체배지인 LB (Difco™ Luria Bertani medium broth) 배지에 *P. aeruginosa* 균을 배양한 배양액  $1 \times 10^6$  cfu/ml를 고추 표면에 분무하여 충분히 뿌린 후 자연건조 하였다. 그리고 모든 처리구에 *C. gloeosporioides*의 포자현탁액  $1 \times 10^5$  spores/ml을 5 ml씩 충분히 적도록 분무한 후 자연건조 하였다. 플라스틱 용기에 (30 × 20 × 8 cm) 담고 바닥에는 멸균된 티슈를 깔고 그 위에 멸균수를 30 ml뿌려 습도를 유지하였고 25°C에서 10 일 동안 저장 한 후 발병도를 관찰하였다(Lee 등, 2003). 모든 처리구는 3반복씩 실험하였다.

### in vivo 접종실험

곤충의 장내세균 중 식물병원성 곰팡이에 높은 항균활성을 갖는 균으로 선발한 *P. aeruginosa*를 고추에 처리한 후 고추 탄저병균을 직접 접종하여 방제효과를 실험하였다. 건강한 고추를 물로 세척한 후 1% 락스에 3분간 담갔다가 70% 에탄올로 표면을 소독하여 한 처리구당 고추 5개씩 준비한다. 아무것도 처리하지 않은 무처리구와 아무것도 배양하지 않은 액체배지인 LB배지, 시중에서 판매되고 있는 고추 탄저병 농약(정보화학-해비치 입상수화제)과 선발된 *P. aeruginosa* 배양액을  $1 \times 10^5$  cfu/ml,  $1 \times 10^6$  cfu/ml 그리고  $1 \times 10^7$  cfu/ml 모두 5 ml씩 spray한다. 모든 처리구들을 자연건조 시킨 후, 멸균한 핀으로 고추의 위, 중간, 아래 세 구역에 핀으로 2번 찌른 후, *C. gloeosporioides*의 포자현탁액  $1 \times 10^5$  spores/ml을 20 µl씩 직접 접종한다. 그리고 위에서의 실험과 같이 습도를 유지하고 25°C에서 15일 동안 저장한 후 발병도를 관찰하였다(Paul, 2012). 모든 실험은 3반복씩 실험하였다.

## 결과 및 고찰

### 곤충의 장내세균의 분리 및 동정

곤충과 미생물과의 관계에 대한 연구는 기주와 공생자로서의 관계뿐만 아니라 곤충장내미생물이 병원성을 일으키거

**Table 1.** Intestinal microorganisms obtained from adult of 10 insects

Strain	Blast search	Similarity (%)
<i>Nesidiocoris tenuis</i>	<i>Cedecea neteri</i>	99
	<i>Enterobacter asburiae</i>	98
	<i>Serratia marcescens subsp. marcescens</i>	99
	<i>Serratia marcescens subsp. sakuensis</i>	99
<i>Odontotaenius disjunctus</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	99
	<i>Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum</i>	97
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99
<i>Reticulitermes speratus</i>	<i>Acinetobacter oleivorans</i>	97
	<i>Bacillus anthracis</i>	99
	<i>Bacillus cereus</i>	99
<i>Riptortus clavatus</i>	<i>Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis</i>	95
	<i>Micrococcus luteus</i>	99
	<i>Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum</i>	98
	<i>Pseudomonas putida</i>	99
<i>Lema decempunctata</i>	<i>Bacillus cereus</i>	99
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	98
	<i>Enterobacter cloacae subsp. cloacae</i>	98
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	99
	<i>Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae</i>	92
	<i>Lactococcus garvieae</i>	99
	<i>Micrococcus luteus</i>	99
	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	99
	<i>Salmonella enterica subsp. Enterica</i>	98
	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	98
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99	
<i>Henosepilachna vigintioctopunctata</i>	<i>Enterococcus sp.</i>	97
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	99
	<i>Klebsiella variicola</i>	99
<i>Harmonia axyridis</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	99
	<i>Staphylococcus sciuri</i>	99
<i>Popillia mutans</i>	<i>Enterobacter asburiae</i>	98
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99
	<i>Raoultella ornithionolytica</i>	99
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99
	<i>Weeksella virosa</i>	92
<i>Hydrophilus acuminatus</i>	<i>Aeromonas hydrophila subsp. hydrophila</i>	99
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	95
	<i>Enterobacter sp.</i>	99
	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	99
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	99
	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	99
	<i>Pectobacterium sp.</i>	98
<i>Anomala octiescostata</i>	<i>Brucella pinnipedialis</i>	98
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	99
	<i>Enterobacter sp.</i>	99
	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	99
	<i>Mycobacterium gilvum</i>	98
	<i>Pectobacterium sp.</i>	98
<i>Weeksella virosa</i>	92	

나 장내미생물 자체의 역할에 대한 연구가 증가하고 있다. 최근에는 특히 곤충병원성에 한정되는 것이 아니라 곤충과 미생물을 동시에 다방면으로 연구하는 경향을 보이고 있다 (Werren, 1997; Douglas, 1998). 따라서 본 연구에서는 곤충 중장내 미생물에 의한 식물병원성균을 억제하는 균주를 탐색하여 미생물살균제를 개발하기 위하여 포식성이자 식식성 곤충인 담배장님노린재를 포함한 10가지 곤충의 중장내에서 분리한 장내세균이 식물병원균에 대한 항균활성을 연구하였다. 실험에 사용한 10종의 곤충은 상품화되어있는 곤충을 구입하거나 또는 야외에서 채집하여 중장을 분리하여 마쇄한 후 NA배지에 배양하였고 육안으로 식별하여 형태적으로 차이를 보이는 콜로니들을 분리하여 동정하였다. 분리한 장내세균의 16S rRNA 염기서열을 분석하여 BLAST search를 통해 동정되었다(Table 1). 그 결과 담배장님노린재에서 *Cedecea*속을 포함한 4균주가, 사슴벌레붙이에서 *Enterobacter*

속을 포함한 3균주, 흰개미에서는 *Acinetobacter*속을 포함한 3균주, 툭다리개미허리노린재에서 *Clavibacter* 속을 포함한 4균주가 분리되었고, 열점박이잎벌레에서는 *Bacillus*속을 포함한 11균주, 이십팔점박이무당벌레에서는 *Enterococcus*속을 포함한 3균주, 무당벌레에서는 *Staphylococcus*속 균주 2가지가, 콩풍뎅이에서는 *Enterobacter asburiae* 균을 포함한 5균주, 물땡땡이에서는 *Aeromonas*속 균을 포함한 7균주, 팔맥풍뎅이에서는 *Brucella*속 균을 포함한 7균주가 분리되어 10종의 곤충으로부터 총 49균주를 분리하는데 성공하였다. 이러한 균주는 농작물과 밀접한 관계를 갖고 있는 곤충으로부터 분리하였기 때문에 식물병원성 병원균과의 길항작용의 관계를 시도하였다.

**항균활성 측정**

항균활성은 세균과 곰팡이 모두가 잘 자라는 PDA배지에

**Table 2.** Antifungal activity of intestinal microorganisms against plant-pathogenic fungi on the PDA

Bacteria	Plant-pathogenic fungi						
	<i>A.s</i>	<i>B.c</i>	<i>C.g</i>	<i>F.o</i>	<i>P.c</i>	<i>R.s</i>	<i>S.s</i>
<i>Serratia marcescens subsp. marcescens</i>	+	-	+	+	+	-	-
<i>Serratia marcescens subsp. sakuensis</i>	+	-	+	+	+	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus anthracis str. Sterne chromosome</i>	+	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas putida</i>	+	-	-	-	+	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	++	-	+	+	+	-	-
<i>Enterobacter cloacae subsp. cloacae</i>	+	-	-	-	+	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	+	+	-	+	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae</i>	+	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus garvieae</i>	+	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella enterica subsp. Enterica</i>	+	-	-	-	+	-	-
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	+	-	++	++	-	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	-	-	-	+	-	-
<i>Klebsiella variicola</i>	+	-	-	-	+	-	-
<i>Staphylococcus sciuri</i>	+	-	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter asburiae</i>	+++	+	+	+	++	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+++	++	+++	+++	+++	++	+
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	+	-	+	+	+	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+	-	-	-	+	-	-
<i>Enterobacter sp.</i>	+	+	+	+	+	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	+	+	+	++	-	-
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	+	-	+	+	-	-	-
<i>Brucella pinnipedialis</i>	+	-	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+	-	+	+	-	-	-
<i>Enterobacter sp.</i>	+	-	+	+	+	-	-
<i>Pectobacterium sp.</i>	+	-	-	-	-	-	-

(*A.s*: *Alternaria solani*; *B.c*: *Botrytis cinerea*; *C.g*: *Colletotrichum gloeosporioides*; *F.o*: *Fusarium oxysporum*; *P.c*: *Phytophthora capsici*; *R.s*: *Rhizoctonia solani*; *S.s*: *Sclerotinia sclerotiorum*)

Inhibition zone diameter: -: 0 mm; +: ≤ 5 mm; ++: ≤ 10 mm; +++: ≤ 20 mm).

서 7종의 식물병원성 곰팡이와 곤충의 장내세균 49균주를 각각 대치배양 하였을 때 항균효과에 의해 곰팡이가 저해되는 정도를 관찰하여 측정하였다. 그 결과 Table 2에서 볼 수 있는 것 같이 49균주에서 26균주는 활성을 나타냈으나 나머지 23균주는 어느 곳에서도 효과를 보이지 않았다. 따라서 항균활성을 나타내는 균주들을 살펴보면 *A. solani*에 항균 활성을 갖는 26균주, *B. cinerea*에 항균활성을 갖는 5균주, *C. gloeosporioides*에 항균활성을 갖는 13균주, *F. oxysporum*에 항균활성을 갖는 11균주, *P. capsici*에 항균활성을 갖는 16균주, *R. solani*에 항균활성을 갖는 1균주와 *S. sclerotiorum*에 대하여 항균활성을 갖는 1균주로 나타났다. 식물병원성 7종 모든 균주에 활성을 나타내는 것은 *Pseudomonas aeruginosa* 1종이었다.

#### 길항세균 선발

시험곤충으로 사용한 10종의 곤충으로부터 49종의 장내 세균을 분리하였고 그중에서 26종의 생물효과를 나타내는 균주에서 생물효과가 우수하고 살균활성범위가 넓은 *Pseudomonas aeruginosa* 균주를 선발하였다. 그리고 대표적인 식물병원성 곰팡이 7종을 PDA배지에서 재시험하여 대치배양한 결과, *Alternaria solani*에 대하여 83.8%, *Botrytis cinerea*에 71.4%, *Colletotrichum gloeosporioides*에 63.3%, *Fusarium oxysporum*에 65.0% 그리고 *Phytophthora capsici* 병원균에 대하여 75.8%의 억제효과를 나타냈다(Fig. 1). 따라서 7종의 곰팡이 모두에게 항균활성을 갖는 *Pseudomonas aeruginosa* 균주를 생물활성을 하기 위하여 선발하였다.

#### in vivo 분무시험

항균활성이 뛰어난 *Pseudomonas aeruginosa* 균주의 배양액으로 고추탄저병에 대한 방제효과를 검토하였다(Fig. 2). 빨간 고추를 준비하여 무처리구는 증류수만 처리한 것(Fig. 2, A)과 아무것도 처리하지 않은 것(Fig. 2, B)에 그리고 생

물효과를 검토 위하여 *P. aeruginosa* 배양액을  $1 \times 10^6$  cfu/ml가 되도록 건전한 고추에 살포한 것(Fig. 2, C)에 음건 후 고추탄저병균(*C. gloeosporioides*)이 감염되도록 배양액이  $1 \times 10^5$  spores/ml로 하여 처리하였다. 처리한 후 습도를 유지시켜주며 25°C에서 10일간 배양하였다. 그 결과 무처리구와 증류수 처리한 것에서는 눈에 띄게 탄저병을 발생한 것을 관찰 할 수 있었으며 *P. aeruginosa* 배양액을 살포한 고추에서는 비교적 매우 적게 발생한 것을 관찰 할 수 있었다.

#### in vivo 접종시험

곤충의 장내세균 중 7종의 식물병원성 곰팡이에 대하여 높은 항균활성을 갖는 *P. aeruginosa* 균주를 선발하여 생물효과 시험을 행하였다. 먼저 각각의 시험재료를 고추에 분무 처리하고 나서 음건 후에 고추 탄저병균(*C. gloeosporioides*)을 고추에 직접 접종하여 방제효과를 실험하였다. Fig. 3에서 볼 수 있는 것 같이 아무것도 처리하지 않은 고추를 무처리구(A)와 순수 액체배지인 LB배양액(B) 그리고 고추탄저병 농약(성보화학-해비치 입상수화제)(C)을 처리하였다. 또한 시험균주인 *P. aeruginosa* 배양액을 각각 농도별로  $1 \times 10^5$  cfu/ml(d),  $1 \times 10^6$  cfu/ml(e) 그리고  $1 \times 10^7$  cfu/ml(f)가 되도록 조제하여 살포하였다. 건조된 6개의 처리구의 고추에 멸균한 핀으로 일정하게 찢러 상처를 낸 후, *C. gloeosporioides* 균주의 각각 포자현탁액을 조제하여 20  $\mu$ l씩 직접 접종 처리하였다. 습도를 유지시켜주며 25°C에서 15일을 배양하였다. 그 결과, Fig. 3의 A의 무처리구에서는 고추탄저병의 증상이 눈에 띄는 병징을 관찰 할 수 있었으며, 영양분이 풍부한 LB배지 처리구에서는 고추탄저병의 병징 뿐 아니라 무처리구에서 발생한 병징보다 더 무름 현상을 관찰할 수 있었다. 고추탄저병에 등록된 해비치 농약을 처리한 구와 각각의 농도로 살포된 *P. aeruginosa* 배양액 처리구에서는 비교적 고추 탄저병의 병징이 덜 한 것을 관찰할 수 있었다. 특히 농약처리구와 *P. aeruginosa* 배양액 처리구는 육안으

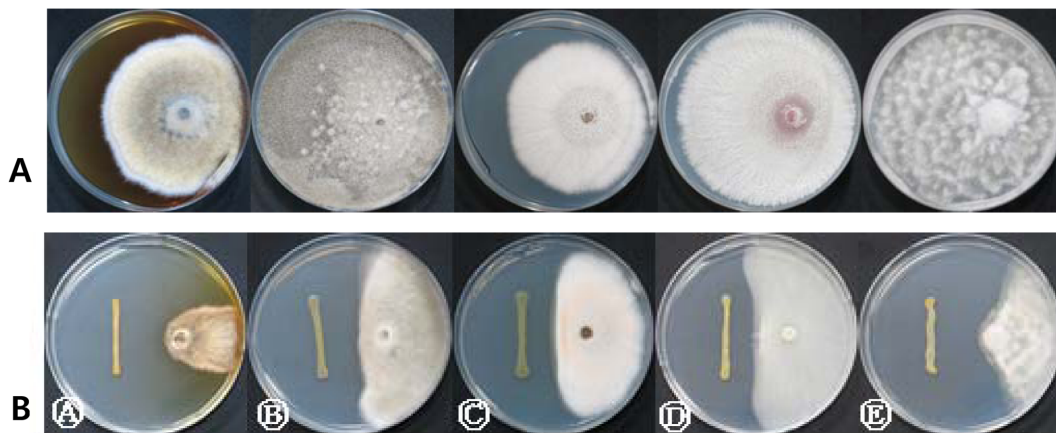
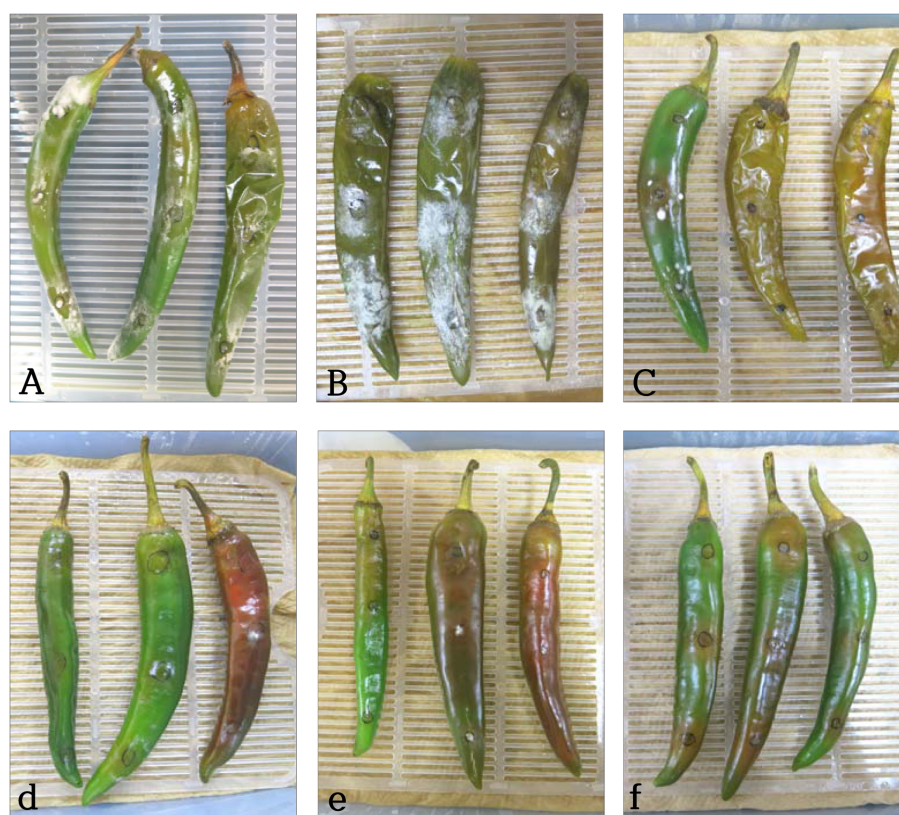


Fig. 1. Antifungal activity of *Pseudomonas aeruginosa* against (A) *A. solani*, (B) *B. cinerea*, (C) *C. gloeosporioides*, (D) *F. oxysporum* and (E) *P. capsici* on PDA (A: only fungi; B: *Ps. aeruginosa* and fungi dual culture)



**Fig. 2.** Control effect of *Pseudomonas aeruginosa* against *Colletotrichum gloeosporioides* on chilli at 25°C, 10 days after spray experiments. (A: treat DW, *C. gloeosporioides* spray, B: only *C. gloeosporioides* spray, C: treat *Ps. aeruginosa* suspension  $1 \times 10^6$  cfu/ml)



**Fig. 3.** Control effect of *Pseudomonas aeruginosa* against *Colletotrichum gloeosporioides* on chilli at 25°C, 15 days after spray and spot experiments. (A: only *C. gloeosporioides* spot; B: treat LB media, *C. gloeosporioides* spot; C: treat fungicide(Haibichi), *C. gloeosporioides* spot; d: treat *Ps. aeruginosa* suspension  $1 \times 10^5$  cfu/ml, *C. gloeosporioides* spot; e: treat *Ps. aeruginosa* suspension  $1 \times 10^6$  cfu/ml, *C. gloeosporioides* spot; f: treat *Ps. aeruginosa* suspension  $1 \times 10^7$  cfu/ml, *C. gloeosporioides* spot).

로 보았을 때 병 발생의 저해가 비슷하게 관찰되었으나 시간이 지남에 따라 농약처리구의 고추가 더 빨리 시드는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 *P. aeruginosa* 균주는 그람음성의 녹농균으로서 미생물살균제로서의 사용은 더 많은 분류 과학적 연구수행을 필요로 한다.

### 감사의 글

본 연구는 2014년도 충남대학교 학술연구비에 의하여 수행되었으며 이에 감사를 드립니다.

## Literature Cited

- Akhurst, R. J. (1982) Antibiotic Activity of *Xenorhabdus* spp., Bacteria Symbiotically Associated with Insect Pathogenic Nematodes of the Families Heterorhabditidae and Steinernematidae. *J. Gen. Microbiol.* 128:3061-3065.
- Anand, A. A. P., S. J. Vennison, S. G. Sankar, D. I. G. Prabhu, P. T. Vasan, T. Raghuraman, C. J. Geoffrey and S. E. Vendan (2010) Isolation and characterization of bacteria from the gut of *Bombyx mori* that degrade cellulose, xylan, pectin and starch and their impact on digestion. *J. Insect Sci.* 10:107.
- Appel, H. M. (1994) The chewing herbivore gut lumen: physicochemical conditions and their impact on plant nutrients, allelochemicals and insect pathogens. *Insect-Plant Interactions.* 5:209-221.
- Baumann, P., L. Baumann, C. Y. Lai, D. Rouhakhsh, N. A. Moran and M. A. Clark (1995) Genetics, physiology, and evolutionary relationships of the genus *Buchnera*: intracellular symbionts of aphids. *Ann. Rev. Microbiol.* 49:55-94.
- Bignell, D. E. and P. Eggleton (1995) On the elevated intestinal pH of higher termites (Isoptera, Termitidae). *Insect Soc.* 42: 57-69.
- Bourtzis, K. and T. A. Miller (2003) *Insect symbiosis*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Bourtzis, K. and T. A. Miller (2006) *Insect symbiosis II*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Bracke, J. W., D. L. Cruden and A. J. Markovetz (1979) Intestinal microbial flora of the American *cockroach* *Periplaneta americana* L. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 945-955.
- Breznek, J. A. (1984) Biochemical aspects of symbiosis between termites and their intestinal microbiota. In *Invertebrate- Microbial Interaction* (J. M. Anderson, A. D. M. Rayer, and D. W. H. Walton, Eds.). Cambridge University Press, Cambridge, U. K. pp. 173-204.
- Buchner, P. (1965) Endosymbiosis of animals with plant microorganisms. In *terscience*, Troy, NY.
- Dillon, R. J. and V. M. Dillon (2004) The gut bacteria of insects: Nonpathogenic Interactions. *Annu. Rev. Entomol.* 49:71-92.
- Douglas, A. E. (1998) Mycetocyte symbiosis in insect. *Biol. Rev.* 64:409-434.
- Douglas, A. E. (1998) Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. *Annu. Rev. Entomol.* 43:17-37.
- Feng, W., X. Q. Wang, W. Z. Zhou, G. Y. Liu and T. J. Wan (2011) Isolation and characterization of lipase-producing bacteria in the intestine of the silkworm, *Bombyx mori*, reared on different forage. *J. Insect Sci.* 11:135.
- Genta, F. A., R. J. Dillon, W. R. Terra and C. Ferreira (2006) Potential role for gut microbiota in cell wall digestion and glucoside detoxification in *Tenebrio molitor* larvae. *J. Insect Physiol.* 52:593-601.
- Ishikawa, H. (1989) Biochemical and molecular aspects of endosymbiosis in insect. *Int. Rev. Cytol.* 116:1-45.
- Ji, D. J., Y. K. Yi, G. H. Kang, Y. H. Choi, P. K. Kim, N. I. Baek and Y. G. Kim (2004) Identification of an antibacterial compound, benzylideneacetone, from *Xenorhabdus nematophila* against major plant-pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 239:241-248.
- Kikuchi, Y. (2009) Endosymbiotic bacteria in insects: their diversity and culturability. *Microbes Environ.* 24:195-204.
- Lee, J. Y., S. S. Moon and B. K. Hwang (2003) Isolation and in vitro and in vivo activity against *Phytophthora capsici* and *Colletotrichum orbiculare* of phenazine-1-carboxylic acid from *Pseudomonas aeruginosa* strain GC-B26. *Pest Manag Sci.* 59:872-882.
- Margulis, L. and R. Fester (1991) *Symbiosis as a source of evolutionary innovation*. MIT Press, Cambridge, MA.
- Miura, T., C. Braendle, A. shingleton, G. Sisk, S. Kambhampati and D. L. Stern (2003) A comparison of parthenogenetic and sexual embryogenesis of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera:Aphidoidea). *J. Exp. Zool. B* 295: 59-21.
- Moran, N. A. (2006) *Symbiosis*. *Curr. Biol.* 16:R886-R871.
- Munson, M. A., P. Baumann and M. G. Kinsey (1991) *Buchnera* gen. nov. and *Buchnera aphidicola* sp. nov., a taxon Consisting of the mycetocyte-associated, primary endosymbionts of aphids. *Int. J. Syst. Bacterol.* 41:566-568.
- Paul, N. C. (2012) Diversity and Biological Control Activity of Endophytes from Chili Pepper (*Capsicum annuum* L.) in Korea. PH. Thesis. Chungnam National University, Daejeon, Korea.
- Ruby, E., B. Henderson and M. McFall-Ngai (2004) We get by with a little help from our (little) friends. *Science* 303:1305-1307.
- Steinhaus, E. A. (1960) The important of environment factor in the insect microbe ecosystem. *Bacteriol. Rev.* 24:365- 373.
- Walker, A. J., D. M. Glen and P. R. Shewry (1999) Bacteria associate with the digestive system of the slug *Deroceras reticulatum* are not required for protein digestion. *Soil Biol. Biochem.* 31:1387-1394.
- Werren, J. H. (1997) Biology of *Wolbachia*. *Ann. Rev. Entomol.* 42:587-609.



## 식물병원성 곰팡이에 대한 곤충장내세균의 항균활성

오산나 · 서미자 · 윤영남 · 유용만\*

충남대학교 농업생명과학대학 응용생물학과

**요 약** 국내에서 서식하는 10종의 곤충에서 분리한 49균주의 장내세균으로 7종의 주요한 식물병원성 곰팡이에 대하여 항균활성을 검토하였다. 49개의 균주들은 담배장님노린재(*Nesidiocoris tenuis*)에서 *Cedecea* sp. 포함 4균주, 사슴벌레붙이(*Odontotaenius disjunctus*)에서 *Enterobacter* sp. 포함 3균주, 흰개미(*Reticulitermes speratus*)에서 *Acinetobacter* sp. 포함 4균주, 톱다리개미허리노린재(*Riptortus clavatus*)에서 *Clavibacter* sp. 포함 4균주, 열점박이잎벌레(*Lema decempunctata*)에서 *Bacillus* sp. 포함 11균주, 이십팔점박이무당벌레(*Henosepilachna vigintioctopunctata*)에서 *Enterococcus* sp. 포함 3균주, 무당벌레(*Harmonia axyridis*)에서 *Staphylococcus* sp. 포함 2균주, 콩풍뎅이(*Popillia mutans*)에서 *Enterobacter asburiae* 균을 포함한 5균주, 물땡땡이(*Hydrophilus acuminatus*)에서는 *Aeromonas* sp. 포함 7균주가 팔색풍뎅이(*Anomala octiescostata*)에서는 *Brucella* sp. 를 포함한 7균주 등이 분리, 동정되었다. 이 49균주를 항균활성을 측정하기 위해 7종의 식물병원성 곰팡이인 토마토겍겍균무늬병(*A. solani*), 고추탄저병(*C. gloeosporioides*), 잿빛곰팡이병(*B. cinerea*), 시들음병(*F. oxysporum*), 고추역병(*P. capsici*), 버문고병(*R. solani*), 상추균핵병(*S. sclerotiorum*)과 함께 PDA배지에서 대치 배양한 결과, *A. solani*에 대하여 항균활성을 갖는 26균주, *B. cinerea*에 항균활성을 갖는 6균주, *C. gloeosporioides*에 항균활성을 갖는 13균주, *F. oxysporum*에 항균활성을 갖는 11균주, *P. capsici*에 항균활성을 갖는 17균주, *R. solani*에 항균활성을 갖는 2균주와 *S. sclerotiorum*에 대하여 항균활성을 갖는 2균주로 나타났다. 항균활성의 결과 7종의 모든 식물병원성 곰팡이에 항균활성을 갖는 *Pseudomonas aeruginosa*를 선발하였다. 생물활성은 고추에 직접 분무 및 접종 처리하였을 때 고추 탄저병균(*C. gloeosporioides*)에 대하여 항균 효과가 뚜렷하게 나타나는 것으로 확인되었다.

**색인어** 장내세균, 식물병원성 곰팡이, *Pseudomonas aeruginosa*, 항균활성, 고추 탄저병균