

Ⅵ 세균의 생화학적 특성 및 검정방법

농업과학기술원 작물보호부 병리과

최 용 철

1. 서 론

세균의 동정에 필요한 세균학적 성질은 시대의 변천과 함께 증가, 복잡하여졌다. 많은 성질검사가 필요할까 또는 좀더 간략하게 동정할 수 없을까 하는 의문이 생길 수 있다. 따라서 식물병원세균의 간이 동정법이 검토되고 있는 이유도 여기에 있으나 검사항목을 한정하면 할수록 하나의 잘못에 따라 큰 오류를 범할 위험성이 커지므로 그 적용에 한계가 있음을 염두에 둘 필요가 있다.

일반적으로 세균동정을 위한 성상은 완전 불변한 것은 없고, 세균학의 진보와 함께 항상 변화하고 보다 복잡하게 되었음을 이해할 필요가 있다. 세균동정을 위한 세균학적 성상의 검사는 복잡하고 시간을 요하는 작업이지만 기초적인 성질을 파악하지 않으면 이미 알려져 있는 기존 균주와의 비교검토가 불가능하므로 힘이 들더라도 검정방법을 확인 조사할 필요가 있다.

생화학적 특성조사는 세균이 자라면서 배출하는 성분과 시약에 의한 반응을 조사하는 것으로 하나 하나의 특성을 검정하기 위해서는 균을 배양하는 배양배지가 상이하며 배양후 반응을 검정하기 위한 시약을 동시에 만들어 둘 필요가 있으므로, 한 균주의 반응을 조사하기 위해서는 시간과 경제적 차질이 크므로 어느 시기를 택하여 동정하기 위한 균주를 모았다가 실시하는 것이 바람직할 것이다. 생리생화학적 성질을 조사하기 위해서는 1) 탄소화합물의 분해와 이용 2) 질소화합물의 분해와 이용 3) 고분자화합물의 분해, 이용 4) 이외의 다른 성상을 조사하게 된다.

이들 생화학적 특성에 대한 배양조건 및 반응을 조사하는 방법은 다음과 같다.

2. 탄소화합물의 분해와 이용

조사 내용	배지 및 시약	방법	관정
1) 당의 산화·발효시험 (OF시험)	<ul style="list-style-type: none"> • HUGH & LEIFSON의 OF배지: - Peptone 2 g NaCl 5 g K₂HPO₄ 0.3 g B.T.B 0.03 g Glucose 10 g Agar 3 g D.W 1,000ml pH 6.8 	<ul style="list-style-type: none"> • 배지는 고압살균후 급랭(고층배지) • 1군주에 2분씩 Stab culture - 한 test tube에 는 멸균한 액체 파라핀을 1cm 중층 • 28℃ 배양 	<ul style="list-style-type: none"> • 개방시험관에서만 세균의 생육과 배지의 황변이 보일 경우(산생산) : O형 • 개방, 폐쇄 양시험관에 생육이 황변시 : F형 • 산의 생성이 보이지 않던가 알카리를 떨 경우는 0/- 형으로 표시
2) 당의 분해	<ul style="list-style-type: none"> • AYERS, RUPP & JOHNSON 배지: - NH₄H₂PO₄ 1 g KCl 0.2g MgSO₄ · 7H₂O 0.2g B.T.B 0.03g Agar 15g, D.W 1,000ml, pH 6.8 ※ 單糖: xylose, arabinose rhamnose, glucose, fructose, galactose mannose 二糖 : saccharose, maltose, lactose 三糖 : raffinose, pentahydrate 多糖 : dextrin, starch, inulin, glycogen 多價alcohol: glycerin, adonitol, dulcitol, mannitol, sorbitol, inositol 	<ul style="list-style-type: none"> • 기본배지에 당을 0.5~1% 농도첨가 • 사면 또는 액체 배양 • 이식후 14일간 관찰 세균의 증식과 산의 생성 조사 (배지황변) * 기질을 첨가하지 않은 대조배지를 이용 생육과 색의 변화를 동시 비교 할 필요. 	<ul style="list-style-type: none"> • 황변 : + 배지에 균열이 생기면 gas 발생 • 배지가 백색으로 변해도 기록

조사 내용	배지 및 시약	방법	판정
3) Levan생산	Beaf extract 5g Peptone 10g Saccharose 50g Agar 15g D.W 1,000ml, pH 6.8	<ul style="list-style-type: none"> • Streak 혹은 Spot 배양 • 동시에 여러균주 가능 • 특히 <i>Pseudomonas</i> 속 세균분류시 유리 	<ul style="list-style-type: none"> • 매일조사 • 돔형상의 용기되는 대형의 점성 colony 형성시 : +
4) 3-ketolactose 생성	Yeast extract 1g lactose 10g Agar 20g D.W 1,000ml pH 6.8 * Benedict 시약 Sodium citrate dehydrous 17.3g Na ₂ CO ₃ 10g CuSO ₄ · 5H ₂ O 1.73g, D.W 100ml (Sodium c.d+Na ₂ CO ₃ 를 D.W 60ml 용해, 20ml D.W+CuSO ₄ 를 녹인후 합쳐 100ml 되게 mass up.	<ul style="list-style-type: none"> * <i>Agrobacterium</i> 속 세균 • Plating→세균을 직경 5mm 정도 streak • 한 plate에 여러 균주 배양가능 • 24시간 배양후 Benedict 시약 1~2방울을 표면에 떨어뜨리고 1~2 시간 방치 	<ul style="list-style-type: none"> • Colony 주위에 황색띠를 형성시 : +
5) Saccharose로부터의 환원물질의 생성	배지 : Levan배지와 동일 (- Agar, Saccharose 40g)	<ul style="list-style-type: none"> * <i>Erwinia</i>속 세균식별 • Test tube에 2ml 씩 분주→멸균→접종→2일간 배양후 Benedict시약을 가한후 10분간 끓이고 냉각 	<ul style="list-style-type: none"> • 황갈색 침전 생성시 : +
6) VP 반응 (VOGES-PROSKAUER) Acetoin시험	Peptone 5g K ₂ HPO ₄ 5g Glucose 5g D.W 1,000ml, pH 7.0 • 5ml씩 시험관 분주멸균 * α-naphtol시약 : α-naphtol 5g을 100ml ethanol용해 KOH용액 : KOH 40g을 D.W 100ml에 용해	<ul style="list-style-type: none"> • 5일간 배양후 배지 1ml를 다른 tube에 옮기고, 여기에 α-naphtol액 0.6ml와 KOH액 0.2ml를 가하고 shaking→경사지게 놓아둠. 	<ul style="list-style-type: none"> • 15~60분후에 배지가 농적색이 되면 : +

조사 내용	배지 및 시약	방법	판정
7) Methyl Red (MR) 시험	VP 배지와 동일 ※ Methyl Red 시약 : MR 0.01g을 30ml의 ethanol에 용해	• VP 시험에서 남았던 배양액에 5-6방울의 MR 시약을 떨어 트림.	• 배지가 적변 : + 황~등색 : -
8) Gluconate oxidation	HAYNES Gluconate 배지 Yeast extract 1g Peptone 1.5g K ₂ HPO ₄ 1g Potassium gluconate 40g, D,W 1,000ml pH 7.0	• 2일간 배양후 동량의 Benedict 시약 첨가 → 비등수에서 10분 가열후 급냉 ※ <i>Pseudomonas</i> 속 세균중 EMBDEA-MEYERHOP 경로 대신 ENTNER-DOUDOROFF 경로로서 포도당을 대사로 중간 대사산물인 Gluconate-6-phosphate 산을 생성시키는 것이 있다. 이들 세균은 Gluconate를 2-Ketogluconate로 대사하게 되는데 이 시험은 이 대사경로를 갖는지 여부를 조사키 위함.	• 황갈색의 침전이 생기면 : +
9) Sucrose reducing compounds	Peptone 10g Yeast extract 3g Esculin or albutin 1g Ironcitrate 0.5g D.W 1,000ml pH 7.0	• Tube에 5ml씩 분주 28°C 배양 (shaking)	• 배지가 흑갈색으로 변색 : + 갈변하여도 불투명하지 않을 경우 : - ※ esculin을 완전히 분해하면 UV 밑에서 형광을 잃음.

3. 질소화합물의 분해와 이용

조 사 내 용	배지 및 시약	방 법	관 정
1) 질소원 및 탄소원으로서의 Asparagine 이용	<ul style="list-style-type: none"> • Solution A : KH_2PO_4 1g KCl 0.2g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g D.W 500ml pH 7.0 → 멸균 • Solution B : L-Asparagine 5g, D.W 500ml → millipore 여과 • A+B 무균적으로 혼합 • Tube에 5ml씩 분주 	<ul style="list-style-type: none"> • 한균주당 4분의 tube에 접종 → 4일씩 4회 계대 배양 ※ 식물병원세균에서는 asparagine을 유일한 탄소원 및 질소원으로 이용하는 능력이 있다. 이의 여부조사 	<ul style="list-style-type: none"> • 4회 이식에서 균의 증식이 확인되면 : + 확실치 않을 경우에는 Bouillon에서 균의 생존 여부를 재확인
2) Nitrate reduction	<ul style="list-style-type: none"> KH_2PO_4 0.5g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g NaCl 5g Yeast extract 5g Sodium succinate 2g KNO_3 1g D.W 1,000ml pH 6.8 • tube에 5ml씩 붓, 멸균 ※ A액 : α-naphthyl amine 0.5g, 30% acetic acid 100ml B액 : sulfanilic acid 0.3g, 30% acetic acid 100ml ※※ KNO_3 첨가하지 않은 배지 별도조제 	<ul style="list-style-type: none"> • 2~5일간 배양후 A, B액을 각 1ml씩 가한후 30분간 둠 ※ KNO_3 무첨가 배지와 비교검토 • 초산초흡을 하는 세균은 N_2 gas를 발생한다. DURHAM tube사용 또는 배지(Agar) 균열, 기포발생 여부 표시 	<ul style="list-style-type: none"> • 배지가 적변시 : + ※ 적변되지 않았을 때는 초산이온이 환원되지 않았던가, 생성된 아초산이 암모니아에 환원되었던가에 원인
3) NO_3 respiration	<ul style="list-style-type: none"> • 배지 1 : Beef extract 5g Peptone 10g, D.W 1,000ml, pH 6.8 • 배지 2 : Beef extract 5g Peptone 10g KNO_3 1g, D.W 1,000ml, pH 6.8 	<ul style="list-style-type: none"> • 양배지에 각각 2분씩 이식하고, 이중 각 1분에 액체파라핀을 중층 • 7일간 배양 	<ul style="list-style-type: none"> • 액체파라핀한 배지 1에서만 생육불량, 다른 3분 tube에서 양호한 생육 : + • 개방시험관 1, 2에서 양호, 폐쇄시험관에서 불량 : -

조사 내용	배지 및 시약	방법	관정
4) Arginine dihydrolase	THORNLEY 배지 : Peptone 1g NaCl 5g K ₂ HPO ₄ 0.3g Phenolred 0.01g, L-Arginine · HCl 10g Agar 3g D.W 1,000ml pH 7.2 • 2ml씩 분주(고층)→ Stab culture	<ul style="list-style-type: none"> • Stab culture 후 액체 파라핀 첨가 → 7일간 배양 	<ul style="list-style-type: none"> • 배지가 홍적색 : + • 등황색 자체, 무변 : -
5) 단백질분해성	<ul style="list-style-type: none"> • Gelatin 액화 <ul style="list-style-type: none"> Beef extract 5g Peptone 10g Gelatin 120~200g D.W 1,000ml, pH 6.8 • tube에 5ml씩 멸균 • Casein hydrolysis <ul style="list-style-type: none"> 배지1 : Beef extract 1g Peptone 2g D.W 1,000ml, pH 6.8 배지 2 : Skim milk 10g D.W 1,000ml, pH 6.8 	<ul style="list-style-type: none"> • 20℃ 이하에서 균현 후 stab culture, 28℃, 6주간 culture ※ 조사시 저온처리후 (냉장고) • Streak, Spot culture 2주간 배양 	<ul style="list-style-type: none"> • 액화속도를 매일 관찰, 액화의 형태조사 • Colony 주변이 투명화된 것 : +
6) H ₂ S from cysteine	NH ₄ H ₂ PO ₄ 0.5g K ₂ HPO ₄ 0.5g MgSO ₄ · 7H ₂ O 0.2g NaCl 5g Yeast extract 5g Cysteine-HCl 0.5g D.W 1,000ml, pH 6.8 ※ 연당지 : 약 5×50mm로 자른 paper를 10% Lead acetate 수용액 (2N NaOH)에 적신후 멸균, 항온기에서 건조	<ul style="list-style-type: none"> • 세균을 이식시킨후 연당지를 면전의 사이에 끼운 후 2주간 관찰 (Shaking culture 하면 더욱 빠름) 	<ul style="list-style-type: none"> • 연당지가 흑변시 : +

조 사 내 용	배지 및 시약	방 법	관 정
7) 뇨소시험 (Urease)	CHRISTENSEN 배지 Peptone 1g NaCl 5g Glucose 1g KH ₂ PO ₄ 2g P.R 0.012g Agar 15g D.W 900ml, pH 6.8 → E. flask에 넣고 멸균 후, millipore filter로 여과한 20% urea용액 100ml 첨가 → Plating	• Urea를 첨가하지 않은 배지를 control 비교 - Streak 또는 Spot culture ※ Urease를 분비하는 세균은 뇨소를 분해하여 Ammonia와 CO ₂ 로, 이 Ammonia는 배지를 강 Alkali성으로 하기 때문에 pH 지시약으로 판정하는 시험	• 배지적변시 : +
8) Phenylalanine deaminase 시험	Ewing 배지 : Yeast extract 3g DL-Phenylalanine 2g (or L-phenylalanine) Na ₂ HPO ₄ 1g NaCl 5g Agar 12g, D.W 1,000ml, pH 7.3 • 멸균후 slant	• 24시간 배양 배양후 FeCl ₃ 10% 액 0.2ml를 떨어뜨림. ※세균을 배양하지 않은 배지를 대조	• 농녹색으로 변색시 : +
9) Indole 생성시험 (tryptophan 분해)	Polypeptone 10g, D.W 1,000ml, pH 6.8 ※ KOVACS시약 : P-(Dimethylamine) benzaldehyde 5g을 50°C 에 가온한 n-Amyl alcohol 75ml에 용해, 냉각시킨후 Conc-HCl 25ml를 첨가	• 2일간 배양후 KOVACS용액 0.5~1ml 첨가, Shaking후 정치	• 상부 시약액층이 적색시 : + 황 색 : -
10) Tyrosinase 활성시험	Saccharose 5g Peptone 10g K ₂ HPO ₄ 0.5g MgSO ₄ · 7H ₂ O 0.125g L-tyrosine 1g Agar 20g D.W 1,000ml, pH 7.2	• Plating, Streak 또는 Spot culture 4일간 관찰	• Colony 주위가 갈색으로 착색 : +

조사 내용	배지 및 시약	방법	관정
11) Ammonia 생성	Peptone 10g, D.W 1,000ml, pH 6.8 ※ Nessler's 용액 : KI 5g을 D.W 5ml에 용해 +HgCl ₂ 냉포화수용액 을 천천히 넣어 침전이 생길때까지 첨가, 여기 에 9N-NaOH 40ml를 가하고 → D.W로 100ml 되게 조제후 24 시간 두어둔후 사용	• 7일간 배양 세균을 이식하지 않은 배지를 대조 Nessler's 시약을 한방울 떨어뜨림.	• 갈색의 침전이 생기거 나 탁하게 생길시 : +

4. 고분자 화합물의 분해 · 이용

조사 내용	배지 및 시약	방법	관정
1) Starch hydrolysis	Beef extract 5g Peptone 10g NaCl 2.5g Soluble starch 2g Agar 15g D.W 1,000ml, pH 6.8 ※ 옥도 · 옥도가리액 : KI 3g을 D.W 300ml에 녹인후, I ₂ 1g을 가함. 용해후 갈색병에 보존	• Plate streak 또는 spot culture : 1주간 • 시약을 표면에 떨어 뜨림.	• Colony 주변에 투명대 형성시 : +
2) 지질의 분해 • 마가린 또는 면실유의 분해	Beef extract 5g Peptone 10g NaCl 2.5g Agar 15g D.W 1,000ml, pH 6.8 염색유지 10ml 추가첨가 ※ 염색유지 : 가열용해한 마가린 또는 면실유 10ml 와 Night blue의 ethanol 포화용액 1ml를 100ml 비커에 넣고 (주사기이용) 충분히 혼합 → 뜨거운 물 을 넣고 각반하면서 유리 색소를 피펫으로 제거 (조 작반복) → 적색으로 염색 된 유지를 멸균, 차광보존	• Plate streak 또는 spot culture : 1주간 (배지를 살균후 약 50℃로 냉각시키고 염색유지 10ml를 넣어 잘 혼합시킨후 샤레에 평판)	• Colony 주변에 청색 착색시 : +

조사 내용	배지 및 시약	방법	관정
<ul style="list-style-type: none"> • Tween 80 hydrolysis 	Peptone 10g NaCl 5g CaCl ₂ · 2H ₂ O 0.1g Agar 20g D.W 1,000ml, pH 7.0 배지멸균후 따로 멸균한 Tween 80의 10% 용액 100ml를 첨가후 평판	<ul style="list-style-type: none"> • Plate Streak 또는 Spot culture : 1주간 	<ul style="list-style-type: none"> • Colony 주변에 불투명한 백색대 : +
<ul style="list-style-type: none"> • Lecithinase 	Beef extract 5g Peptone 10g NaCl 2.5g Agar 15g D.W 1,000ml, pH 7.0 ※ 난황액 : 무균적으로 채취한 50ml에 멸균한 0.85% NaCl 50ml를 첨가, 혼합 배지살균후 (50℃ 냉각) + 난황액 100ml를 혼합	<ul style="list-style-type: none"> • Plate Streak 또는 Spot culture : 1주간 	<ul style="list-style-type: none"> • Colony 주변에 백탁 형성시 : +
<ul style="list-style-type: none"> • Pectin 분해 	HILDEBRAND배지 배지 A: CaCl · 2H ₂ O 0.6g Pectin 22g D.W 1,000ml 이 배지를 3등분 : 1N HCl 및 1N NaOH를 써서 pH를 5.0, 7.0, 8.5로 조정후 멸균 (알카리조정시 0.2~0.3정도 높게, pH 저하 염려) 배지 B: Agar 40g D.W 1,000ml - 배지 A, B를 멸균후 뜨거울 때 10:1 비율로 혼합 → 평판	<ul style="list-style-type: none"> • Plate Spot culture 	<ul style="list-style-type: none"> • Colony를 중심으로 평판에 함몰이 생길 때 : +

5. 이외의 다른 성장시험

조사 내용	배지 및 시약	방법	판정
1) 산소요구 조사	Beef extract 5g Peptone 10g NaCl 2.5g Agar 15g D.W 1,000ml, pH 6.8 tube에 분주 → 멸균 배지에 1% glucose를 첨가하여도 무방	• 배지를 가열 용해후 50℃에 냉각→세균 고농도 현탁액을 백 금이 한번를 가하여 혼합 →급냉→고층으로 균함.	• 배지의 상부 혹은 표면 만 생육 : 호기성 표면에서 하부까지 생육한 것 : 미호기성 관저미생물 : 편성혐기성 전체생육 : 통성혐기성
2) Catalase	Beef extract, Peptone, Agar 또는 Yeast extract peptone Agar 사면배지에 24시간 배양한 균	• 백금으로 slide glass 위에 도말→ 이 위에 3% H ₂ O ₂ 를 한방울 떨어트림.	• 다량의 기포가 발생시 : +
3) Oxidase	Catalase 배지와 동일 1% tetramethyl P-phenyl diamine 염산염 수용액 (시험전에 조제, 장기보존 안됨) ※ Cytochrome C의 유무 조사	• 1% 수용액에 적신 filter paper에 균을 묻힘. ※이 반응은 철로촉매 하므로 반드시 백금 의 백금이 사용	• 10초 이내에 균체 도말 부위에 농청자색 형성 시 : +
4) KCN시험	MOELLER의 KCN배지 Peptone 10g NaCl 5g KH ₂ PO ₄ 0.225g Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O 5.64g D.W 1,000ml, pH 7.0 고압살균후 → 냉각 0.5% KCN 용액 15ml를 첨가	• 1ml씩 screw tube에 무균적 분주, 균이식 밀전하여 1주간 배양	• 균 생육시 : +
5) NaCl 내성	Peptone 10g D.W 1,000ml, pH 6.8 이배지에 NaCl을 0~10% (1%간격 또는 0.5%간격) → 멸균	• 1주간 배양 (shaking)	• 세균의 생육확인, 최고 식염농도 기록

조사 내용	배지 및 시약	방법	판정
6) Milk test	<p>Litmus milk 배지 : Skim milk 100g D.W 1,000ml Litmus용액 40ml, pH 7.0 고압살균 5분, 간헐멸균 (Skim milk 대신 우유 원심분리 : 지방제거후 이용가능) ※ Litmus 용액 : 유본에 litmus 50g에 40% ethanol 150ml를 가하고 마쇄, 1분 간 데움, 상등을 취하고→ 침전물에 다시 150ml의 ethanol을 가하고, 데움. 이상등액에 전의 상등액을 첨가 → 하루밤 둔 후 → 여과하여 40% ethanol 을 첨가, 300ml 되게 함.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 균 접종후 계속관찰 • Milk의 pH 변화, casein 응고 및 소화 유무조사 	<ul style="list-style-type: none"> • 응고 : Litmus가 적변 하는 이외 응괴, 알카리 를 가하면 용해 소화 : 응고하지 않고 투명화 pH변화 : 색조변화조사 (산성화, 알카리화) Litmus색이 없어지고 백색이 될 경우 환원이 되었다고 기록
7) Phosphatase	<p>Beef extract 5g Peptone 10g NaCl 2.5g Agar 15g D.W 1,000ml, pH 7.2 배지가 50℃로 냉각시 millipore filter로 멸균된 1% phenolphthalein disodium salt 용액을 배지 100ml에 1ml 비율로 가하고→평판</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Streak 또는 spot culture 2~5일간 배양 배양한 petridish 뚜껑에 ammonia수 0.1ml를 떨어뜨리고 덮는다. 	<ul style="list-style-type: none"> • Colony가 홍색으로 변할시 : +
8) 색소생산	<ul style="list-style-type: none"> • King's A : Proteose peptone No.3 20g Glycerol 10ml MgCl₂ 1.4g Agar 15g D.W 1,000ml, pH 7.2 • King's B : Proteose peptone No.3 20g Glycerol 10ml K₂HPO₄ 1.5g Agar 15g D.W 1,000ml, pH 7.2 	<ul style="list-style-type: none"> • Slant → Streak 1주간 배양 <i>Pseudomonas</i> 속 세균 : 수용성 형광 색소 <i>Corynebacterium</i>, <i>Xanthomonas</i> 속 세균 : 비수용성 황색색소 	<ul style="list-style-type: none"> • King's A : <i>Pseudomonas</i> 속 세균 의 pyocyanin (청녹색) King's B : Fluorescin (황녹색형광성) YDC : <i>Erwinia</i>속 세균 의 색소(황, 적, 분홍색)

조사 내용	배지 및 시약	방 법	관 정
9) 항생물질 감수성	<ul style="list-style-type: none"> • YDC : <ul style="list-style-type: none"> Yeast extract 10g Glucose 5g Calcium carbonate 20g, Agar 15g D.W 1,000ml (50℃에 냉각시 잘 흔들어 calcium carbonate를 분산 시키도록 주의) Beef extract 5g Peptone 10g NaCl 2.5g Glucose 10g Agar 15g D.W 1,000ml pH 7.0 피검균+배지 → 평판	<ul style="list-style-type: none"> <i>Erwinia</i>속 세균 : 비수용성 황색, 청색, 홍색색소 • Paper disc method (erythromycin : 15μg 함유) 각종 항생물질 100 μg/ml 2배 희석 <ul style="list-style-type: none"> 100, 50, 25, 12, 5, 6, 25, 3, 13, 1, 56, 0.78, 0.39, 0.20, 0.10, 0.05, 0.025. 100μg/ml 이상 사용 : 200, 400, 800, 1,600μg/ml 2일간 배양 	<ul style="list-style-type: none"> ※ King's B → UV선 아래서 조사 • Paper disc 주위의 저지원이 생긴 것을 감수성 판정
10) 독소의 생성 • Phaserotoxin 과 tabtoxin	<ul style="list-style-type: none"> NH₄H₂PO₄ 1g KCl 0.2g MgSO₄ · 7H₂O 0.2g Glucose 2g Agar 15g D.W 1,000ml pH 7.0 ※ <i>E. coli</i> 의 slant로부터 균을 취하고 멸균수에 현탁 (10 ⁸ ~10 ⁹ cfu/ml)한 후 배지(50℃) 18ml에 균은 2ml 혼합 평판(4분획)한 것에 L-glutamine, L-Arginine 및 L-citrulline 수용액(2 mg/ml)과 증류수를 각각 5 μl paper disc로 각 분획에 놓고, 각 disc에서 1cm 이내의 곳에 피검균을 백금선으로 stab culture	<ul style="list-style-type: none"> • 1~2일간 배양 • 이식균에 의한 저지원 형성유무와 Amino acid에 의한 <i>E. coli</i> 생육의 회복을 관찰 <ul style="list-style-type: none"> - Arginine, citrulline 회복 : Phaserotoxin - 어떤것에 의해도 회복이 되지 않는 것 : 미지의 독소 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Ps. syringae</i> pv. <i>tabaci</i>나 <i>Ps. s. pv. caronafaciens</i>의 tabtoxin은 glutamine 합성을 저해 • <i>Ps. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>의 phaserotoxin은 Arginine 합성을 저해

조사 내용	배지 및 시약	방법	관정
<ul style="list-style-type: none"> • Syringomycin 및 syringotoxin 	PDA 배지 피검균을 평판배지에 spot → 2일간 배양 이 배양표면에 <i>Geotrichum candidum</i> 의 포자현탁액 spray후 1~2 일간 배양	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Ps. syringae</i> pv. <i>syringae</i>의 복숭아 계통은 syringomycin, 감귤계통은 syringotoxin을 생산 	<ul style="list-style-type: none"> • 피검균 colony 주위에 생육저지원 생김 : +
<ul style="list-style-type: none"> • Caronatine 	감자괴경의 부패시험에 준함. 접종후 1일째에 부패가 없으면 1주간 계속	<ul style="list-style-type: none"> • Caronatine : <i>Ps. s.</i> pv. <i>atropurpurea</i>가 만드는 독소 	<ul style="list-style-type: none"> • 세균 접종부위가 현저 히 비대육기한 것을 양성
11) DNA 분해 시험	<ul style="list-style-type: none"> • DNA배지 : Tryptose 20g DNA(연어정자) 2g NaCl 5g Agar 15g D.W 1,000ml, pH 7.3 • Difco DNase Test Agar Plating 	<ul style="list-style-type: none"> • Streak 혹은 Spot 배양 2~3일 • 1N HCl을 plate 배지에 떨어뜨림. DNA는 변성으로 백탁현상 발현 	<ul style="list-style-type: none"> • DNase 생산 세균 : Colony 주변에 투명대 형성

6. 참고문헌

1. 後藤正夫, 瀧川雄一. 1984. 植物病原細菌同定のための細菌學的性質の調べかた(3, 4). 植物防疫 38(9) : 432~484.
2. 駒形和男編. 1982. 微生物の化學分類實驗法. 學會出版セソタ. 東京.
3. Schaad, N. W. ED. 1980. Laboratory Guide for Identification of Plant pathogenic Bacteria. American Phytopathological Society. Minn.
4. Society of American Bacteriologists. 1957. Manual of Microbiological Methods. McGRAW-HILL Book CO. INC.