

채소연부병균 *Erwinia herbicola*의 생육억제균 분리 및 특성

김교창 · 도대홍* · 김도영**

충북대학교 식품공학과, *충청전문대학 식품공업과, **충청전문대학 식품영양과

Isolation and Characterization of Antagonistic Bacteria for Biocontrol of *Erwinia herbicola* Causing Vegetable Soft Rot

Kyo-Chang Kim, Dae-Hong Do*, Do-Young Kim**

Dept. of Food Sci. and Tech., Chungbuk National Univ., Cheongju 360-863, Korea

* Dept. of Food Sci. and Tech., Chungcheong College, Cheongweon 363-890, Korea

** Dept. of Food Nutrition, Chungcheong College, Cheongweon 363-890, Korea

Abstract

For the selection of powerful antagonistic bacterium for biological control of *Erwinia* sp. causing vegetable soft rot, two excellent strains(S4, S65) were selected from 1,196 strains of bacteria which were isolated from rhizosphere in vegetable root rot suppressive soil. Selected 2 strains were identified to be a species to *Pseudomonas fluorescens* S4(PS4) and *Pseudomonas fluorescens* S65 (PS65). The highest of inhibitory activity was produced in 523 synthetic broth medium at pH 7.0 and 25°C during 3 day culture. The isolate strains were resistant to the agricultural chemicals such as benomyl, proamocab hydrochloride and fosetyl-Al-folpet, and the antibiotics such as vancomycin, penicillin and lincomycin, only PS4 was resistant to erythromycin.

Key words : vegetable soft rot bacteria, inhibition, *Pseudomonas fluorescens*

서 론

우리나라는 재배기술과 유통수단의 발달로 채소 및 과일 생산량은 급격히 증가하였고, 생활수준의 향상으로 상품의 청정성과 투명성까지 요구하게 되었다. 그러나 대규모 시설을 갖춘 생산자외의 일반생산자들은 계절적 과잉생산에 따른 적절한 저장방법이 없어서 경제적 손실이 많다. 그래서 소규모 소자본의 일반생산농가는 경제적이면서 위생적이고 간편한 저장방법이 절실한 실정이다. 저장중 과채류의 부패는 흔히 시장병(연부병, 무름병)으로 인한 것이 대부분이며, *Erwinia*속, *Pseudomonas*속 등의 부패균에 기인한다^{1, 2, 3}). 이에 대한 화학적 방제법은 2차적인 위생문제를 야기하므로^{4, 5, 6}), 과채류는 CA(controlled atmosphere)저장, 필름저장, 피막제 처리, 방사선 조사 등으로 저장하게 되지만 기술적, 경제적 문제로 산지농가에서 손쉽게 이용할 수 없다. 그래서 계절적 홍수출하에 의한 가격하락과 저장시 부패로 인한 경제적 손실이 크다. 따라서 기술적으로

평이하고 저렴하며, 저장중 과채류 부패균의 번식을 억제하여 위생 및 환경적으로 문제가 없는 처리방법이 필요하다. 최근 미생물 상호간의 생물학적 억제방법으로 재배지의 병원균 방제 및 부패균의 생육억제를 유도하여 병해를 방지하고, 저장중 선도유지를 위한 방법 등이 연구되고 있으나 성과는 미미하다^{6, 7, 8, 9}).

본 연구는 생물학적 방제의 일환으로 경작지 채소와 과일은 물론 유통과정에서 시장병을 유발하여 큰 손실을 주는 *Erwinia herbicola* (EH)¹⁰의 생육을 억제하는 *Pseudomonas*속 길항균을 토양에서 분리하여, 미생물학적 특성과 발병억제 효과를 확인한 결과다.

재료 및 방법

1. 사용균주 및 배지

실험에 사용된 부패원인균 *Erwinia herbicola*(EH), *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *Erwinia rhapontici*는 농촌진흥청 농업기술연구소 식물병리과에서

분양받았다. 길항균은 경작지 토양에서 분리한 *Pseudomonas fluorescens* S4(PS4)와 *Pseudomonas fluorescens* S65(PS65)를 사용하였다. 부패균과 분리 길항균은 523 배지¹¹⁾(8g casein hydrolysate, 10g sucrose, 4g yeast extract, 2g K₂HPO₄, 0.3g MgSO₄ · 7H₂O, 15g agar per distilled water 1l, pH 7.0)를 사용하여 증식하였다. 길항균 분리에는 D4 선택배지¹¹⁾(10g glycerol, 5g NH₄Cl, 10g sucrose, 1g casein hydrolysate, 2.3g Na₂HPO₄, 0.6g SDS, 15g agar per distilled water 1l, pH 6.8)를 사용하였다.

2. 길항력 검증

분리균의 길항력은 paper disc법¹²⁾의 생육 억제환 크기로 측정하였고, 배양 및 배양액의 전처리하는 김 등의 방법⁸⁾에 따랐다.

3. 길항균 분리 및 선발

채소 경작지 표토로부터 5cm 이내의 토양에서 채집한 시료를 25℃에서 3일간 토양세균을 활성화시켜 김 등의 방법⁸⁾에 따라 분리한 후 API 20 NE 동정 kit¹³⁾을 이용하여 *Pseudomonas*속으로 확인하고, Bergey's manual¹⁴⁾를 참고하여 생화학적 성질을 조사하였다.

4. 생물학적 발병 억제

최종 선발된 분리길항균의 생물학적 발병억제효과는 10⁸cell/ml로 배양한 EH 연부병균 배양액과 분리길항균 배양액을 멸균 페트리 접시상에서 1:1의 비율로 혼합한 액에 약 15cm의 어린 배춧잎을 침지하여 25℃에서 48시간 동안 관찰하였다.

5. 배양조건에 따른 길항력 조사

분리길항균의 배양조건에 따른 EH 연부병균에 대한 길항력을 관찰하기 위하여 분리균을 25℃에서 16시간

전배양한 배양액 1ml를 30ml의 증식용 523배지에 이식하였다. 배양시간에 따른 EH 연부병균에 대한 생육억제력은 배양 시작 1일부터 5일 동안, pH에 대한 영향은 배양초기 pH를 2에서 12까지 조정하여 3일간, 배양온도는 15℃에서 40℃까지 5℃의 간격을 두고 3일간 배양하였다. 시료액은 길항력검정 시료액과 같은 방법으로 전처리한 배양상층액을 준비하여 paper disc법¹²⁾으로 생육억제환의 크기로 비교하였다.

6. 화학농약 및 항생물질 내성검사

화학농약과 항생물질이 분리길항균의 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 소정량의 화학농약과 항생물질을 8mm paper disc에 흡착시키고 분리길항균을 도말·진조한 523 한천배지에 부착시켜 25℃에서 3일간 배양하여 생육억제환의 생성 유무 및 크기를 측정하였다.

결과 및 고찰

1. 균주분리 및 선발

Kado 등¹¹⁾은 523배지에서 *Erwinia*속, *Pseudomonas*속, *Xanthomonas*속 및 *Agrobacterium*속 모두 잘 증식하지만 D4선택배지에서는 *Pseudomonas*속과 *Erwinia*속 일부만 생육하고 자외선 조사시 나타나는 형광성 집락은 *Pseudomonas*속으로, *Erwinia*속에 비하여 증식속도가 느리다고 하였다. 본 결과에서도 D4선택배지에서 형광성 집락을 분리하였다. *Erwinia herbicola*에 대하여 1차 생육억제력을 시험하여 생육억제환을 형성하는 15균주를 선발하였다. 이들중 생육억제력이 큰 7균주로 2차 선발하여 생육억제력이 가장 우수한 S4, S65 2균주를 최종 선발하고, 연부병균인 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *Erwinia rhapontici*와 함께 생육억제력을 비교해 본 결과 Table 1과 같이 분리길항균 모두 *Erwinia herbicola*에 대하여 억제력이 가장 우수하였다. 나머지

Table 1. Inhibition zones by antagonistic isolate strains [*Pseudomonas fluorescens* S4(PS4) and *Pseudomonas fluorescens* S65(PS65)] on 523 synthetic agar media^a against pathogenic bacteria causing soft rot of vegetable with the 8mm paper disc method

Soft rot bacteria	Diameters of Inhibition zone(mm)	
	S4 ^b	S65 ^c
<i>Erwinia herbicola</i>	24	32
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	23	19
<i>Erwinia rhapontici</i>	19	21

a : 523 synthetic agar media : 8g casein hydrolysate, 10g sucrose, 4g yeast extract, 2g K₂HPO₄, 0.3g MgSO₄ · 7H₂O, 15g agar per distilled water 1 liter, pH 7.0, b : S4, c S65 : Isolate strains [*Pseudomonas fluorescens* S4(PS4)] and *Pseudomonas fluorescens* S65(PS65)]

Table 2. Characteristics of antagonistic isolate strains (*Pseudomonas fluorescens* S4(PS4) and *Pseudomonas fluorescens* S65(PS65))

Characteristics	Isolate strains		Characteristics	Isolate strains	
	S4	S65		S4	S65
Number of flagella	1	1	Lactate	+	+
Fluorescent	+	+	Glycolate	-	+
Growth at 41°C	+	+	Glycelate	+	+
Starch hydrolysis	-	-	Sorbitol	+	-
Oxidase reaction	+	+	Malate	+	+
Gelatin hydrolysis	+	+	Citrate	+	+
Utilization of:			Acetate	+	+
Nicotinate	-	-	Succinate	+	+
Maltose	-	-	L-Glutamate	+	+
Glucose	+	+	Nitrate	+	+
D-Galactose	+	+	L-Serine	+	+
D-Fructose	+	+	L-Arginine	+	+
Cellobiose	-	-	L-Histidine	+	+
Lactose	-	-	L-Lysine	-	-
D-Mannose	+	+	L-Tryptophan	-	-
Manitol	+	+			

+ : Positive, - : Negative

Erwinia carotovora subsp. *carotovora*, *Erwinia rha-pontici*에 대해서도 생육억제력이 상당히 우수하였다. 실제 연부병 발생시 분리길항균의 발병 억제효과는 상당할 것으로 생각된다. API 20 NE 균동정 Kit로 *Pseudomonas*속을 확인하고 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology¹⁴⁾을 참고하여 이화학적 성질을 조사한 결과, Table 2와 같이 *Pseudomonas fluorescens*의 근연종으로 추정하여 *Pseudomonas fluorescens* S4(PS4)와 *Pseudomonas fluorescens* S65(PS65)로 동정하였다.

2. 분리길항균의 생물학적 억제

최종 선발한 PS4와 PS65 2균주를 실험 대상으로 약 15cm 크기의 어린 배춧잎을 이용하여 분리길항균과 EH 연부병균 배양액 (10⁸cell/ml)을 동량 혼합한 현탁액에 48시간 동안 침지하고 발병 억제효과를 관찰하였다. Fig. 1과 같이 EH 연부병균액에 침지한 경우는 배춧잎의 조직 연화가 심하고 엽록소가 변성되어 침지한 배춧잎이 탁한 황갈색으로 변색되었지만 분리길항균 배양액을 혼합한 시험구에서는 2균주 모두 국소적으로 약간의 발병 흔적만 확인될 뿐 엽록소 파괴와 조직연화로 인한 세포파괴가 거의 없었다. 따라서 분리한 2균주 모두 EH 연부병균의 생육을 억제하여 발병 억제에 상당한 효과가 있는 것으로 나타났다.

3. 배양시간과 pH에 따른 길항력 변화

523 배지를 이용하여 30°C에서 1~5일 동안 배양하면서 24시간마다 배양시간에 따른 길항력 변화를 본 결과 Fig. 2와 같이 2균주 모두 배양 시작 3일째 가장 높은 길항력을 나타내었다. 건조균체량은 배양액 100ml 당 PS4는 2.28mg, PS65는 1.87mg으로 PS4가 PS65에 비하여 증식속도가 높았다. 배양초기배지의 pH와 밀접한 관계가 있을 것으로 생각되어 배양초기 pH를 5에서 10까지 구분하여 3일간 배양하고 건조균체량을 측정 한 결과 Table 3과 같이 2균주 모두 pH 7.0에서 가장 증식이 활발하여 PS4균주는 2.38mg/100ml, S65균주는 1.88mg으로 균체량이 가장 많았다. 이때 2균주의 길항력도 Fig. 3과 같이 배양초기 pH 7.0에서 가장 높았다. 그러나 과채류의 부패균 생육억제를 위해 길항균으로 처리하면 과채류 표면의 pH 변화와 표면 색소 성분이 변색될 가능성도 있다¹⁵⁾. 채소의 저장·유통시의 연부병 발생억제를 위하여 본 실험균주로 표면처리하는 것은 표면 pH에 영향을 받고, 계절적으로 균의 분포양상이 다르므로¹⁶⁾ 좀더 면밀한 검토와 연구가 필요하다.

4. 배양온도에 따른 억제력 변화

배양온도에 따른 억제력은 2가지 길항균주 모두 일반 토양세균의 최적활성온도 범위인 25°C에서 높았다 (Fig. 4). 본 균주는 경작지 토양에서 토양온도가 비교적 높은 춘하절기에 높은 억제력을 나타낼 것으로 보이며 시설작물 재배지역의 토양에서는 연중 보온하면

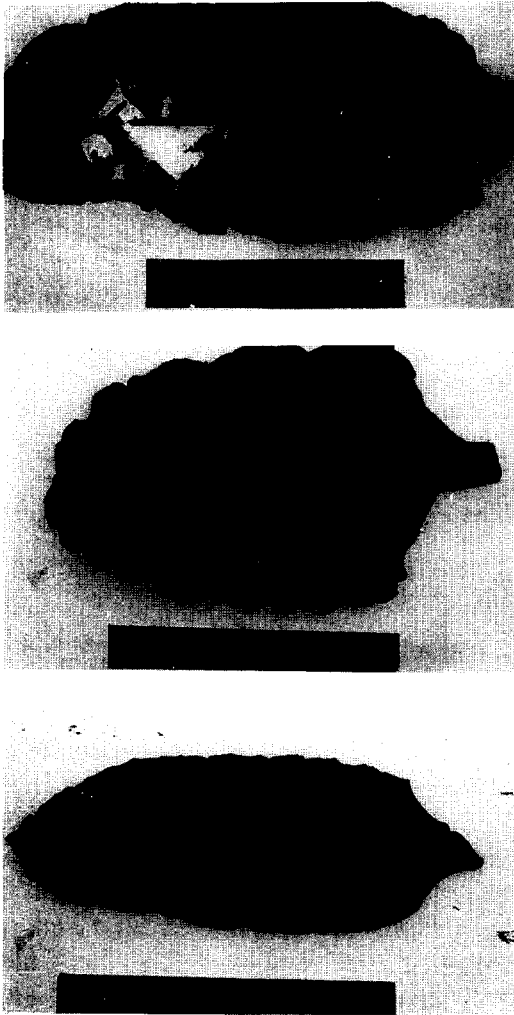


Fig. 1. Suppression of soft rot in leaf of chine cabbage by isolate strains *Pseudomonas fluorescens* S4(PS4) and *Pseudomonas fluorescens* S65(PS65) against *Erwinia herbicola* causing of soft rot vegetable in petri dish.

지속적인 효과를 기대할 수 있다. 시설원에 지역은 급속히 증가하고 있으나 관리미비로 인해 많은 병충해가 발생하고 있다. 이러한 원인은 고온다습한 재배조건, 병원균의 계절적, 자연적 조절 생육환의 파괴 등이다. 이에 따른 약제살포로 병원균에 대한 길항균이 감소되기 때문이다⁴⁾. 이러한 문제점은 농약살포를 본 균주를 보존 시설 재배지 토양에 적용하면 상당한 효과가 있을 것으로 기대된다.

5. 화학농약 및 항생물질 내성

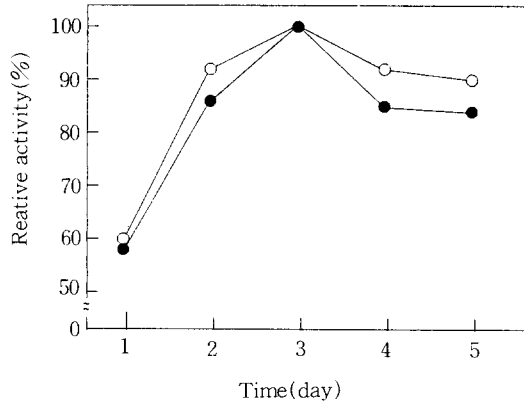


Fig. 2. Effect of culture days on the inhibitory activity to *Erwinia herbicola* by isolates *Pseudomonas fluorescens* S4(PS4) and *Pseudomonas fluorescens* S65(PS65). Relative activity(%) of culture synthetic broth(523 media) for 3 days was 100%, ○ : *Pseudomonas fluorescens* S4(PS4), ● : *Pseudomonas fluorescens* S65(PS65).

Table 3. Dry weight of antagonistic isolates *Pseudomonas fluorescens* S4(PS4) and *Pseudomonas fluorescens* S65(PS65) on the initial culture pH in synthetic broth(523 medium)^a

Initial culture pH	Dry weight ^b of the cell (mg /100ml)	
	PS4 ^c	PS65 ^d
5.0	1.76	1.71
6.0	1.86	1.79
7.0	2.38	1.88
8.0	2.18	1.72
9.0	2.11	1.67
10.0	1.68	1.48

a : 523 medium : 8g casein hydrolysate, 10g sucrose, 4g yeast extract, 2g K₂HPO₄, 0.3g MgSO₄ · 7H₂O, 15g agar per distilled water 1 liter, pH 7.0, b : Dry weight : The cell were determined after 3 days incubation at 25℃, c : S4 : *Pseudomonas fluorescens* S4, d : S65 : *Pseudomonas fluorescens* S65

각 분리길항균을 실제 경작지토양에 살포하여 병해 방제용 화학농약과 항생물질에 대한 영향을 관찰하였다. 그래서 일반적으로 사용되는 농도(Table 4)로 분리길항균을 미리 살포한 523한천배지에서 각 성분을 소정량씩 흡착시킨 paper disc를 부착시켜 30℃에서 3일간 배양하고 각 길항균의 내성을 확인하였다. Table 4과 같이 화학농약의 경우 benomyl, propamocab hydrochloride, fosethyl-Al-folpet, 항생물질인 vancomycin, penicillin 및 lincomycin에 대해서는 2균주

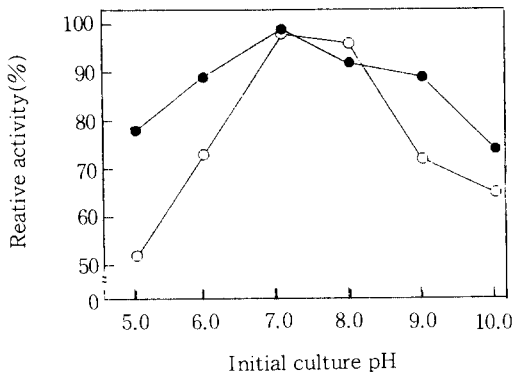


Fig. 3. Effect of initial culture pH on the inhibitory activity by isolates *Pseudomonas fluorescens* S4(PS4) and *Pseudomonas fluorescens* S65(PS65). Relative activity (%) of culture synthetic broth(523 media) in pH 7.0 was 100%, ○ : *Pseudomonas fluorescens* S4(PS4), ● : *Pseudomonas fluorescens* S65(PS65).

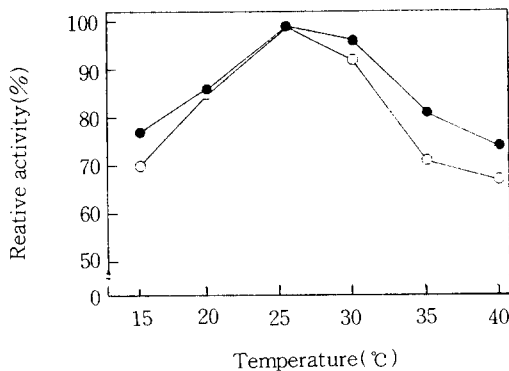


Fig. 4. Effect of temperature on the inhibitory activity to *Erwinia herbicola* by isolates *Pseudomonas fluorescens* S4(PS4) and *Pseudomonas fluorescens* S65(PS65). Relative activity (%) of culture synthetic broth(523 media) at 25°C was 100%, ○ : *Pseudomonas fluorescens* S4(PS4), ● : *Pseudomonas fluorescens* S65(PS65).

모두 내성을 나타냈다. PS4균주는 erythromycin에 대해서도 내성을 나타냈다.

요약

Erwinia herbicola(EH) 채소 연부병 방제를 위하여 충북 청원군, 진천군 및 충남 연기군 일원의 채소 경작지 토양으로부터 형광성을 나타내는 *Pseudomonas*속

Table 4. Resistance of the isolate antagonistic bacteria to the different agricultural chemicals and antibiotics with the 8mm paper disc method

Agricultural chemicals and antibiotics	Inhibition zones(mm)	
	PS4 ^a	PS65 ^b
Benomyl(65mg /100ml)	R	R
Propamocab hydrochloride (145μl /100ml)	R	R
Kasugamycin+copper oxychloride (100mg /100ml)	14	16
Fosethyl-Al-folpet (165mg /100ml)	R	R
Propineb(200mg /100ml)	13	12
Kanamycin(200μg /ml)	22	24
Erythromycin(200μg /ml)	R	18
Vancomycin(200μg /ml)	R	R
Streptomycin(200μg /ml)	24	25
Chloramphenicol(200μg /ml)	10	11
Penicillin(200μg /ml)	R	R
Lincomycin(200μg /ml)	R	R
Gentamycin(200μg /ml)	21	24

R : Resistance for antibiotics or agricultural chemicals, a : PS4 : *Pseudomonas fluorescens* S4, b : PS65 : *Pseudomonas fluorescens* S65

1,196균주를 선발하고, 연부병균 *Erwinia herbicola*에 대한 생육억제력과 생물학적 검정으로 발병억제력이 강한 2균주를 선발하여 *Pseudomonas fluorescens* S4 (PS4)와 *Pseudomonas fluorescens* S65 (PS65)로 동정하였다. 배춧잎을 이용하여 분리길항균의 연부병균에 대한 생물학적 억제력을 확인한 결과 상당한 발병억제력을 확인하였다. 이들 두 균주가 가장 높은 길항력을 나타내는 조건은 배양 초기배지의 pH를 7.0으로하여 25°C에서 3일간 배양했을 때였다. 화학농약 및 항생물질에 대해 2균주 모두 benomyl, propamocab hydrochloride, fosethyl-Al-folpet, vancomycin, penicillin 및 lincomycin에 내성을 나타냈고, PS4균주는 erythromycin에 대해서도 내성을 나타냈다.

참고문헌

1. Vantomme, R., Sarrzyn, R., Verdonck, L., Kerseters, K. and De Lay, J. : Bacterial rot of witloof chicory caused by strains of *Erwinia* and *Pseudomonas* ; Symptoms, Isolation and characterization. *J. Phytopathology*, 124, 337(1989).
2. Togachi, J. : Studies on phage-sensitivity of soft rot bacteria. *Ann. Phytopathology Soc.(Japan)*, 56, 309(1990).
3. Zink, R. T., Kemble, R. J. and Chatterjee, A. K. : Transposon Tn5 mutagenesis in *Erwinia carotovola*

- subsp. *carotovola* and *E. carotovola* subsp. *atroseptica*. *J. Bacteriology*, **157**, 809(1984).
4. 조종택 : 우리나라 시설원예의 병해현황과 그 방제대책 및 문제점. *한국식물보호학회지*, **15**, 213(1976).
 5. 최광태, 김상달, 양덕훈, 박상달 : 미생물농약 개발을 위한 기초연구. 유전공학연구보고서(인삼연구분야)(1986).
 6. 조성환, 서일원, 이근희 : 천연항균제처리에 의한 과채류의 선도유지 및 병해방지에 관한 연구(저장중 병리적 장애방지를 중심으로). *한국농화학회지*, **36**, 265(1993).
 7. 김교창, 김홍수, 도대홍, 조재민 : *Pseudomonas* sp.에 의한 채소병원균의 생물학적 억제. *한국산업미생물학회지*, **20**, 263(1992).
 8. 김교창, 육창수, 도대홍 : Bacteriocin 생산유전자의 cloning 및 식물병원균에 대한 생물학적 억제. *한국산업미생물학회지*, **18**, 98(1990).
 9. 김교창, 김도영, 도대홍 : 채소연부병균 *Erwinia rhapontici*에 대한 *Pseudomonas* sp.의 생물학적 억제. *한국영양식량학회지*, **23**, 104(1994).
 10. Luh, B. S. and Woodproof, J. G. : *Commercial vegetable processing*. AVI publishing, Connecticut, USA, p.34(1976).
 11. Kado, C. I. and Heskett, M. G. : Selection media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, **60**, 969(1970).
 12. Kavanagh, F. : Antibiotic assays, in *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York, Vol. **43**, p.53 (1975).
 13. BioMérieux Sa : Identification of non-enteric Gram-negative rods, in *API 20 NE identification table, analytical profile index*. Mercy L, Etoile, France (1994).
 14. Jhon, G. H., Noel, R. K., Peter, H. A. S., James, T. S. and Stanley, T. W. : *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 9th ed., Williams and Wilkins, Baltimore, p.153(1994).
 15. 최수규 : 식품화학, 효일문화사, 서울, p.348(1990).
 16. 장지현, 김찬조 : 신교 식품미생물학, 수학사, 서울, p.326 (1989).

(1996년 8월 28일 접수)