

식물역병균 *Phytophthora* spp.에 특이 길항균인 YNB54 균주의 분류

김삼선 · 권순우 · 이선영 · 김수진 · 구본성 · 원항연¹ · 김병용 · 여윤수 · 임용호² · 윤상홍*
농업생명공학원 미생물유전과, ¹농업과학기술원 응용미생물과, ²건국대학교 응용생물화학과

Taxonomy of a Soil Bacteria YNB54 Strain Which Shows Specific Antagonistic Activities against Plant Pathogenic *Phytophthora* spp. Kim, Sam-Sun, Soon-Wo Kwon, Seon-Young Lee, Soo-Jin Kim, Bon-Sung Koo, Hang-Yeon Weon¹, Byung-Yong Kim, Yun-Soo Yeo, Yoong-Ho Lim², and Sang-Hong Yoon*.
Microbial Genetics Division, National Institute of Agricultural Biotechnology, Suwon 441-707, Korea, ¹Applied Microbiology Division, National Institute of Agricultural Sciences, Suwon441-707, Korea, ²Department of Applied Biology Chemistry, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea – YNB54 strain which shows inhibitory activities specific to the plant pathogenic *Phytophthora* sp. on potato dextrose agar medium was screened among lots of strains isolated from Korean soils. To identify taxonomy of the *Phytophthora* specific antagonistic bacteria YNB54, 16S rDNA sequence, MIDI fatty acid composition, DNA-DNA hybridization, GC content, and commercial multitest systems such as API 20E and Biolog GN were performed. Results of commercial kits including lots of biochemical and physiological reactions showed that this strain was closely related to taxa including *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter cancerogenus* species than other genera (*Citrobacter*, *Klebsiella*, *Leclercia*). Also, analysis of its MIDI, G+C contents, and DNA-DNA hybridization suggests that this strain was more similar to the Genus *Enterobacter* than other genera (*Citrobacter*, *Klebsiella*, *Leclercia*). This strain was potentially identified as *Enterobacter* sp. by these results. But our 16S ribosomal DNA sequences (rDNA) analysis confirmed that it was more closely related to the cluster of *Citrobacter freundii* ATCC 29935 than any other *Enterobacter* species. In the absence of defined phylogenetic criteria for delineating genera, the results observed with *Citrobacter* and *Enterobacter* species suggest that further studies are needed to clarify their relationships. This investigation demonstrates that YNB54 strain is genetically diverse and potentially more taxonomically complex than hitherto realized. Further study is necessary to confirm their taxonomic positions.

Key words: *Enterobacteriaceae*, Anti-*Phytophthora* activity, 16S rDNA, MIDI, API, Biolog, Tn5 *lac* mutagenesis

Oomycetes는 몇몇 동물과 인간의 질병 뿐만 아니라 많은 식물에 심각한 질병을 일으키는 분류학상 갈색 조류(brown algae)에 속한다. Oomycetes는 chlorophyll a와 c를 가진 heterokont algae와 관련이 있다는 보고와 heterokont flagellated stages와 유사한 kinetics를 기준으로 볼 때 *Chrysophytes*(golden-brown algae) 혹은 그 근연종이라는 보고도 있다. Oomycetes는 tubular mitochondrial cristae와 cellulose cell walls를 가지고, diaminopimelic acid pathway에 의한 lysine을 생합성 한다는 점에서 true fungi와는 다르다[21]. 현재 이들에 대한 생물학적 지식도 제한되어 있지만 특히 그것의 생리학은 일반 곰팡이와는 확연히 구분된다. 따라서 개발된 다수의 fungicide가 Oomycetes에서는 비효과적이다. 특히 식물에 질병을 일으키는 대표적

Oomycetes는 *Phytophthora*와 *Pythium*속이며 세계적으로 매년 이들에 의한 직접적 피해가 수 십억 달러에 달하는 것으로 알려져 있다. 현재까지 약 95종의 *Phytophthora*와 100종의 *Pythium*이 보고되어져 있다[10]. 이들 중 감자역병을 일으키는 *Phytophthora infestans*, 900여 종 이상의 식물에 뿌리썩음병을 일으키는 *Phytophthora cinnamomi*는 특히 유명하다. 국내에서도 *Phytophthora capsici*에 의한 고추 및 참깨의 역병 발발에 의한 피해가 심각한 실정이나 기존 대부분의 유기합성 농약이 이 균에 효과가 미약하거나 내성균의 출현으로 방제에 문제가 있으며 환경이나 보전에 위해적 측면을 가지므로, 자연적 분해가 용이한 Oomycetes 특이적 항진균제의 개발이 요구되고 있다. 따라서 세계적으로 이 분야의 연구가 진행되었으나 아직은 미진한 실정이다. 그러나 *Serratia marcescens*로부터 강력한 항Oomycetes활성을 가지는 Coccidian, *Cladosporium cladosporioides*으로부터 β 1,3-glucan 생합성 저해제인 Cladosporol, 그리고 *E. cloacae*가 *Pythium ultimum*의 생육을 억제하며 길항균으로 이용되

*Corresponding author
Tel: 82-31-299-1751, FAX: 031-299-1752
E-mail: shyo556@rda.go.kr

었다는 보고가 있으며[8], 국내에서는 *Pseudomonas fluorescens* MM-B16이 항역병 항진균제인 acrogrin을 생산한다는 보고가 있다[13]. 그밖에 Ethaboxam, Metalaxyl 과 같은 유기합성 물질의 항역병 특이적 효과가 보고된 바 있다[11].

따라서 우리는 Oomycetes에 특이적인 길항균을 한국도양으로부터 선별을 시도해 온 결과, 유전자 기능분석을 용이하게 해주는 transposon 돌연변이가 가능한 YNB54를 최종 선별하였으며 이 균주에 대한 분류를 위해 16S rDNA 분석, DNA-DNA hybridization, 지방산 조성 분석, G+C 함량조사 및 Biolog, API 20E, API ID32GN, API 50CH, API ZYM 등 시판되고 있는 biochemical kit를 통한 생리생화학적 특성을 조사하여 이 균의 분류적 위치에 대한 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

균주 및 균 배양

생리 생화학적 실험을 위한 공시 균주, *Enterobacter cancerogenus* ATCC 35317, *Citrobacter freundii* ATCC 29935, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Leclercia adecarboxylata* LBV449, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13884는 American Type Culture Collection(Manassas, VA)로부터 분양 받았다. 분리균 YNB54 균과 위 공시 균들은 각각 Tryptic soy broth (Biolife, Italy)에 1.5% agar를 첨가한 TSA배지, 28°C에서 배양하였고, Tn5 돌연변이 균주들(M54-47, M54-113, M54-329)은 kanamycine(50 µg/mL)이 함유된 TSA에서 배양하였다. *Phytophthora capsici* KACC40157, 40475, 40476, 40483, *P. cinnamomi* KACC40183, *P. melonis* KACC40193, KACC40166, *P. drechsler* KACC40190, *P. sojae* KACC40468, *P. palmivora* KACC40409, *P. infestans* KACC40718, *Collectotrichium*, *Aspergillus* A151-50, *Rhizopus oryzae*, *Phythium* KACC 41052, *Phythium* KACC 41062, *Phythium* KACC 41063 등의 식물 병원성 곰팡이는 한국농업 미생물 자원센터 KACC(Korea Agricultural Culture Collection)에서 분양받았다. 감자 한천 배지(potato dextrose agar, PDA: Difco Laboratories, Detroit, U.S.A.)에서 5일간 배양된 이들 곰팡이의 선단 부위를 떼어내 새로운 PDA에 각각 계대 배양하였고, 균주의 보관은 PDA사면 배지에 배양하여 실온에서 보관하였으며 2개월에 한번씩 계대 배양 하였다. 분리 길항 균의 활성은 PDA에서 자란 *P. capsici*의 선단 부위에 길항 균을 접종함으로써 검정하였다.

항 진균 활성 조사

PDA상에서 3일 정도 배양한 식물 병원성 곰팡이의 선단 부위에 일정간격(10 mm)을 두고 YNB54와 기존 논문[23]에 발표된 P1:: Tn5 *lac* 돌연변이주의 단일 콜로니를 멸균

된 이쑤시게로 접종하였다. 그것을 25°C에서 24시간 동안 배양한 후, 콜로니 주위에 형성되는 저지환의 직경으로 상대적 항진균 활성을 조사하였다.

생리 생화학적 특성

분리균 YNB54의 생리 생화학적 특성을 조사하기위해 API 및 Biolog kit를 이용하였다. API20E는 *Enterobacteriaceae* 속 nonfastidious gram negative rod를 동정하기위해 고안된 kit이다. TSA배지에서, 28°C, 24시간 배양된 균의 단 콜로니를 40 mL 0.85% NaCl에 현탁하여 API20E test를 수행하였다. Biolog GN은 TSA배지에서, 28°C, 24시간 배양된 균을 이용해 Biolog GN test를 수행하였다. 37°C에서 6시간 및 24시간 배양된 Microplate를 Biolog Microlog3 4.01C program으로 기질 이용성을 검정하였다. 32종의 탄소원이 포함된 ID32 GN과 50종의 탄소원이 포함된 API 50CH는 각각 표준 방법에 의거하여 반응하였다. 20종의 효소 반응을 측정할 수 있는 기질이 포함된 API ZYM은 API suspension medium에 균체를 현탁하여 37°C, 4시간 반응시킨 후 결과를 측정하였다.

MIDI를 이용한 지방산 분석 및 HPLC를 통한 G+C 함량조사

공시균, 분리균 및 Tn 돌연변이주들을 TSBA에 접종한 후 28°C에서 24시간 동안 배양한 후, 균체 60 mg를 screw cap tube(13 × 100 mm)에 넣어, 표준 조건(Microbial ID, U.S.A.)에 따라 지방산을 추출하였다. 균체를 100°C에서 1 mL methanolic NaOH[15%(w/v) NaOH in 50%(v/v) methanol]로 saponification시키고, 46% (v/v) methyl-tert-butyl ether-hexane에 3.25 N HCl이 들어있는 용액을 2 mL 넣어 80°C에서 지방산을 esterification 시킨 후 1.25 mL hexane/methyl tert-butyl ether(1:1; v/v)로 추출하였다. 이 추출액을 3 mL 1.2%(w/v) NaOH 용액으로 organic extract를 세척한 후, 표준 방법에 따라 Hewlett-Packard 6890A gas chromatography를 이용해 지방산을 분석하였다.

HPLC를 통한 G+C 함량조사는 DNA를 0.5 µg/µl로 조제하여 5분간 boiling후 얼음에 식힌 다음, 20 µl DNA solution을 첨가하고, 20 µl nuclease P1 solution(40 units/ml, CH₃COONa⁺ 12 mM ZnSO₄, pH 5.3)용액을 넣고 50°C에서 overnight 시켰다. 여기에 20 µl alkaline phosphatase solution(2.4 units/in 0.1 M Tris-HCl, pH8.1)을 넣고 37°C에서 3시간 반응 후, C¹⁸ reverse phase column(250 × 4.6 mm)에 1 mL/min 유속으로 elution buffer(0.01 M NH₄H₂PO₄: acetonitril=20:1)를 흘려 보내주며, 시료 10 µl 를 주입시켜 260 nm의 흡광도로 peak를 분석하였다.

16S rDNA에 의한 계통 분류 분석

16S rDNA 증폭을 위한 forward primer로 fD1(5'-AGA-

GTTTGATCCTGGCTCAG)을 사용하였고, reverse primer로 rP2(5'-ACGGCTACCTTGTACGACTT)를 사용하였다. 16S rDNA 염기서열 분석용 DNA는 YNB54로부터 Ausubel방법 [2]을 변형하여 분리하였다.

PCR 반응액을 94°C 5분간 반응한 다음, 94°C denaturation 1분, 58°C annealing 1분, 72°C extension 2분을 35회 반복하고, 72°C에서 10분간 final extension을 실시하여 16S rRNA를 코딩하는 DNA 단편을 증폭하였다. 증폭된 16S rRNA 유전자 단편을 전기영동하여 추출한 후 증폭시 사용한 oligonucleotides를 primer로 사용하여, ABI Prism 3100 automated DNA sequencer로써 16S rDNA를 sequencing 하였다. 16S rDNA 염기서열의 homology는 DDBJ/NCBI/Gen Bank database로부터 BLAST algorithm을 이용하여 비교하였다. 각 염기서열의 alignment는 DAN Plus version 3.0 sequence alignment program(Scientific and Educational Software)을 이용하여 병렬로 정렬하였고, MEGA version 3.0, 근린 결합법에 의거하여 길항균 YNB54의 계통분류학적 위치를 결정하였다.

DNA-DNA hybridization

DNA 분리는 Bioneer사의 AccuPrep genomic DNA Extraction Kit를 이용하였고, 표준 방법에 따라 실시하였다. 100 µg/100 µl로 맞춘 DAN에 100 µl TE buffer를 넣고, 4 µl 10 M NaOH, 35 µl 20 × SSC를 첨가 한 후, 80에서 10분간 반응시키고 얼음에서 5분간 식혀주었다. 이 반응용액에 40 µl 1 M Tris-Cl(pH7.5)를 첨가하여 final volume이 289 µl 되게 한 후, 위 반응액 200 µl와 40 µl을 각 well에 loading하여 vacuum을 걸어 빼주고, 각 well을 3 × SSC 용액으로 씻어준 다음, 이 membrane을 UV illuminator에서 1분간 crosslink 해 주었다. prewarm시킨 20 mL hybridization buffer를 hybridization bag에 넣은 후 DIG high prime DNA labeling과 AlkPhos direct labeling reagents kit를 이

용하여 labeling된 probe DNA(100 ng)을 plastic bag에 넣어 65°C 항온조에서 하룻밤 반응시켰다. prewarm 된 primary washing buffer로 65°C, 10분간 2회 씻어주고, 상온에서 secondary washing buffer로 5분간 2회 씻어준다. Membrane에 detection reagent(30-40 µl/cm², DIG luminescent detection kit for nucleic acids)을 떨어뜨려 상온에서 5분간 방치한 후 X-ray film에 10분간 노출시킨다. 현상된 film을 Image Analyzer(Total Lab version 2.01)을 이용하여 probe와 각 DNA의 hybridization 정도를 비교하였다.

결과 및 고찰

YNB54의 역병 특이적 길항력 검증

Phytophthora 속은 세포막내 sterol의 결핍 또는 낮은 sterol 함량과, membrane fluidity를 증가시키는 요인이 되는 phospholipid fatty acid의 불포화도가 다른 곰팡이 속과 다른 점이며, 특정 항생물질(antifungal fatty acids)에 더욱 민감한 strain이 되게 하는 요인이 된다는 보고가 있다[20]. 또한 cis-unsaturated fatty acid는 이웃하는 acyl chains을 교란시켜 결국 membrane fluidity 증가로 인해 곰팡이의 생육이 억제된다는 보고가 있다[17]. 길항검정의 지시 식물 병원성 곰팡이들 중에 oomycete에 속하는 *Phytophthora* sp.들의 생육이 길항균 YNB54에 의해 가장 심하게 억제되었고, *Pythium ultimum*은 초기에만 생육이 약간 억제될 뿐 시간이 경과함에 따라 정상적으로 균사가 성장하였다. 그러나 true fungi에 속하는 *Rhizoctonia solani*, *Penicillium citrinum*, *Aspergillus A151-50*, *Rhizopus oryzae* 등에서는 *in vitro*검정에서 전혀 생육억제 현상을 보이지 않았다(Table 1). 또한 이 균은 대부분의 세균들에서 항균능력이 없음을 알 수 있었다. 또한 YNB54의 16S rDNA 염기서열분석에 의한 분류도에서 유사한 cluster로 구분되는 다른 속에 속하는 각 type strain의 길항검정도 동시 병행했으나 이들 중 어떤 균도

Table 1. Anti-fungal spectra of antagonist YNB54 strain against plant pathogenic fungi.

Plant phytopathogenic fungi	(KACC no.*)	Antifungal activities
<i>Phytophthora capsici</i>	(KACC40157, 40475, 40476, 40483)	+++
<i>Phytophthora infestans</i>	(KACC40718)	+++
<i>Phytophthora cinnamomi</i>	(KACC40183)	++++
<i>Phytophthora melonis</i>	(KACC40193)	+
<i>Phytophthora palmivora</i>	(KACC40409)	++
<i>Phytophthora drechsleri</i>	(KACC40190)	+++
<i>Phytophthora sojae</i>	(KACC40468)	++
<i>Pythium ultimum</i>	(KACC 41052, KACC 41062)	+
<i>Rhizoctonia solani</i>		-
<i>Rhizopus oryzae</i>		-
<i>Fusarium oxysporum</i>		-
<i>Aspergillus oryzae</i>		-
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>		-
<i>Penicillium citrinum</i>		-

Phytophthora spp.들의 성장을 저해하는 균은 없었고, YNB54는 Oomycetes의 *Phytophthora*속만을 특이적으로 저해하는 특별한 성질을 가진 길항균임을 알 수 있었다(Fig. 1). Yoon은 *Tn5 lac* 돌연변이를 통해 길항력이 증강된 M54-47, 완전상실된 M54-113과 M54-329를 이미 얻어 보고한 바 있다[23]. 분리균 YNB54와 Tn mutants(M54-47, M54-113, M54-329) 그리고 20kb anti-*Phytophthora* gene(EnAP20)이 포함된 *E.coli* T414를 길항 검증한 결과, *Phytophthora capsici*의 생육을 억제함을 알 수 있었다. *E.coli* T414와 대치된 *Phytophthora capsici*의 균사 선단 부위를 전자현미경(SEM)으로 본 결과 정상 균사에 비해, 균사의 심한 branching 현상을 관찰할 수 있었다(미공개 자료). 식물병원균에 대한 *Enterobacter*속의 길항효과는 일부 보고가 있

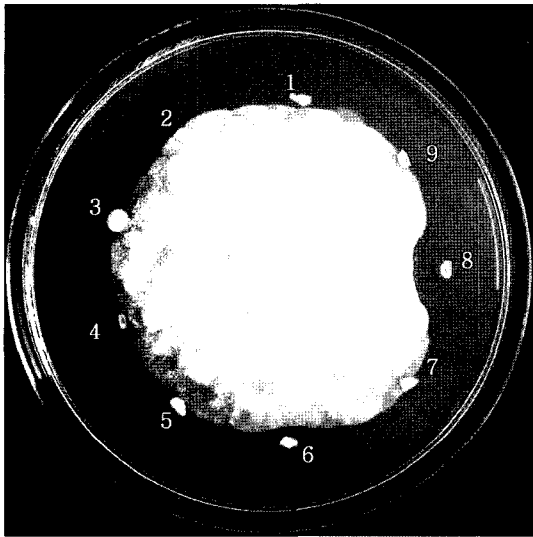


Fig. 1. Antagonistic test of YNB 54, type strains and Tn mutants. A: 1: YNB54 (Antagonistic bacterium to *P. capsici*), 2: *E. cancerogenus*, ATCC35317, 3: *C. freundii* ATCC29935, 4: *E. cloacae*, ATCC13047, 5: *K. pneumoniae*, ATCC13884, 6: *L. adencarboxylate*, LBV449, 7. M54-329, 9. M54-113 : Tn5 *lac* mutants with loss of antifungal activities. 8. M54-47: Tn5 *lac* mutant with more strengthened antifungal activities than wild type YNB54. These bacteria were cocultured with *Phytophthora capsici* on the PDA for 48 hrs.

지만 이와 같이 *Phytophthora* 속에만 제한된 길항효과에 대한 보고는 현재까지 거의 알려져 있지 않다. 따라서 이 균주에 대한 분류 및 동정은 후속연구를 위해 매우 중요하다.

생화학적, 기질이용성 상업적 kit에 의한 동정 분석

YNB54의 동정을 위해 우선 API 20N, Biolog GN, API 20NE, API ZYM, API ID32GN, API 50CH kit를 이용해서 여러 가지 생리 생화학적 특성을 조사하였다 그 결과 YNB 54는 α-galactosidase, β-galactosidase, arginine dihydrolase, α-glucosidase, β-glucosidase, esculin hydrolysis, catalase, oxidase, N-acetyl β-glucosaminidase의 효소 반응에서 양성반응을 보였으며, lysine decarboxylase, ornithine decarboxylase, tryptophane deaminase, urease, gelatinase, lipase, trypsin, glucuronidase 등의 효소반응에서는 음성을 나타내었다. citrate, glucose, mannitol, rhamnose, sucrose, melibiose, amygdalin, arabinose 등을 탄소원으로 이용하며, NO₂, acetone 생성 반응, VP반응에서 양성 반응을 보였으나 H₂S, indol, N₂ 생성 반응에서는 음성을 나타내었다. *Enterobacter* 속의 특이인 β-galactosidase, arginine dihydrolase, VP반응 등에서 양성을 나타내는 YNB54균은 API code book(API 20E)과 API사의 data base search 결과 *E. sakazakii*와 76%, *E. cloacae*와 68%의 homology를 나타내었다(Table 2). 또한 API ZYM, API ID32GN, API 50CH를 이용해서 본 YNB54의 탄소원 이용성은 Table 3에서 보이는 바와 같았다. *Enterobacteriaceae*는 주로 생리 생화학적 특성 및 병 발생 기주 및 혈청학적 방법에 의거해 분류되어 왔다. Biolog kit는 호흡 중 발생하는 전자들의 교환에 근거한 세균 동정 시스템이다. 이 시스템은 95종의 다른 탄소원을 산화시키는 능력을 테스트한다. J. M. Miller등에 의하면 352균주 중 266주의 동정이 정확했으며(75.6%) 속 수준에서는 87.3%, 종 수준에서는 75.6%의 정확성을 검증하였다[15]. 이 시스템은 많은 속에서 정확했으나 *Klebsiella*, *Enterobacter*, 및 *Serratia*의 일부 종은 대부분 탄소원 활용이 활발하기 때문에 너무 많은 양성반응이 일어나고 그것으로 인해 동정의 신뢰도가 낮은 문제점이 있다. 그러나 6~8시간 배양 시 분

Table 2. Biochemical test of YNB54 strain by API 20E kits.

ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO
+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-
SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	NO ₂	N ₂	MOB	McC	OFO	OFF	
-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	

+, positive reaction, -, negative reaction.

ONPG: β-galactosidase, ADH: arginine dihydrolase, LDC –lysine decarboxylase, ODC: ornithine decarboxylase, CIT: citrate utilization, H₂S: H₂S production, URE: urease, TDA: tryptophane deaminase, IND: indol production, VP: acetoneproduction, GEL: gelatinase, GLU: glucose, fermentation/oxidation, MAN: mannitol fermentation/oxi. INO: inositol, SOR: sorbitol, RHA: rhamnose, SAC: sucrose, MEL: melibiose, AMY: amygdalin, arabinose, OX: cytochrome oxidase, NO₂: NO₂ production, N₂: reduction to N₂, MOB: motility, McC: growth on MacConkey medium, OFO: glucose fermentation under mineral oil, OFF: glucose oxidation (exposed to the air).

석과 최근 database의 지속적 갱신으로 이것에 의한 *Enterobacteriaceae*의 동정이 보다 정확해 지고 있다. Klinger 등에 의하면 일부 *Klebsiella*, *Enterobacter*, 그리고 *Kluyvera*의 종 동정은 4시간과 24시간 내 사이에 변화하는 경향이 있다고 하였다[12]. 일부 장내세균의 종, 예를 들어 *Enterobacter cloacae*나 *E. agglomerans*는 제작사에서 추천하는 4시간 반응보다 6-8시간대에서 일관성 있고 정확한 종 동정이 가능하다고 하였다. BioLog시스템은 비 장내미생물에서 만족할 만한 정확도가 있지만 배양시간에 따른 변화에 의한 부정확성은 특히 장내세균의 경우 종 동정에 많은 어려움이 있다. 이러한 점은 oxidase, catalase, indole 및 motility 시험에 의해 어느 정도 개선이 가능하다. 상기 사항을 고려한 Biolog system의 database분석 결과에서 YNB54는 *E. cloacae*와 가장 높은 homology(43%)를 나타내었다. Izard, D.에 의하면 567종 *Enterobacteriaceae* 분리주들 중 558주가(98.4%) 기존 방법의 결과와 속과 종 수준에서 일치하며 약 3주의 동정 오류는 혈청학적 방법으로 확인하였다[9]. 항진균 활성이 강화된 M54-47의 당 이용성을 비교해 본 결과, D-mannose, D-mannitol, D-saccharose, D-trehalose, gentiobiose, L-arabinose, D-galactose, D-glucose, D-fructose, N-acetylglucosamine 등의 당으로부터 산 생성 반응이 음성으로 나타난 점이 YNB54와 다른 점이였다.

MIDI시스템에 의한 균 동정

YNB54와 type strain들의 세포벽 지방산 조성 분석 결과, 모두 major fatty acid는 C_{16:0}이고 2nd major fatty acid는 사용된 균 마다 차이가 났다. YNB54의 지방산 조성은 C_{16:0} (28.4 mol%), cycloC_{17:0}(18.1 mol%), C_{18:1w7c}(13.5 mol%), ISO2O C_{16:1w7c}(11.5 mol%) 이었으며, Midi data bank를 이용하여 근연 관계를 조사해 본 결과 YNB54는 *Pantoea agglomerans*-GC subgroup B(*Enterobacter*)와 SI value 0.52를 나타내었다(Table 4). 일반적으로 similarity index(SI)가 >0.5 이상일 때 MIDI 동정의 유의성이 인정된다는 보고가 있다[16]. Tn 돌연변이주 M54-47의 C_{18:1w5C} 함량이 10.25% 증가되었는데 이것이 길항력 증가와 관여되는 요인 인지는 앞으로 연구되어야 할 것이다.

분자생물학적 동정

YNB54와 사용된 여러 속의 type strains들의 16S rDNA 염기서열 분석 결과 *Citrobacter freundii*와 99.4%, *E. cloacae*와 98.8%, *E. cancerogenus*, *Leclercia adecarboxylate*, *Klebsiella pneumoniae* 등과도 98% 이상의 상동성을 나타냈다. 16S rDNA 염기 서열을 이용한 계통 분류도에 의하면 YNB54는 *Citrobacter freundii* 와 가장 유연관계가 밀접한 하나의 소그룹을 형성하였고, *Enterobacter cancerogenus*, *Leclercia adecarboxylata*.와도 유사한 것으로 나타났다. 하

Table 3. Investigation of major carbon source utilization of YNB54 by API kits (API32GN, API50CH).

Carbon source	YNB54	Carbon source	YNB54	Carbon source	YNB54
N-Acetylglucosamine	+	Gentiobiose	+	L-rhamnose	+
Amygdalin	-	D- glucose	+	D-rhifinose	+
D-arabinose	-	Glycogen	-	D-ribose	+
L-arabinose	+	Inositol	-	D-Saccharose	-
Dulcitol	-	Inulin	-	D- sorbitol	-
D- fructose	+	D-maltose	+	Starch	+
D-fucose	-	D-mannitol	+	D-trehalose	+
L-fucose	-	D-mannose	+	D-xylose	-
D-galactose	+	Melibiose	+	L-xylose	

Table 4. Cellular fatty acid composition of YNB54, M54-47, and ATCC type strains by MIDI analysis.

Fatty acid	Strain		<i>E. cancerogenus</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>L. adecarboxylata</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>C. freundii</i>
	YNB54	M54-47	ATCC35317	ATCC13047	LBV449	ATCC13884	ATCC29935
18:1w7c	13.45	0.09	10.66	17.12	17.85	9.8	14.07
18:1w5c	0	10.25	0	0	0	0	0
17:0 cyclo	18.14	21.72	21.61	13.43	12.55	15.61	4.36
17:0	3.46	3.98	2.75	3.29	2.26	2.67	0.77
16:1w7c	11.48	8.28	6.56	12.6	15.05	17.38	26.18
16:1 ISO	7.69	7.45	8.06	6.99	8	8.66	8.95
16:0	28.39	29.71	32.93	31.02	29.09	30.09	31.18
14:0	6.94	7.05	6.62	8.14	6.1	10.91	7.75
12:0	3.92	7.05	0.05	1.13	4.07	0.44	4

Numbers refer to percentage of total fatty acids. The bacterial strains were incubated on TSA (Tryptic soy agar) at 28°C for 24hours.

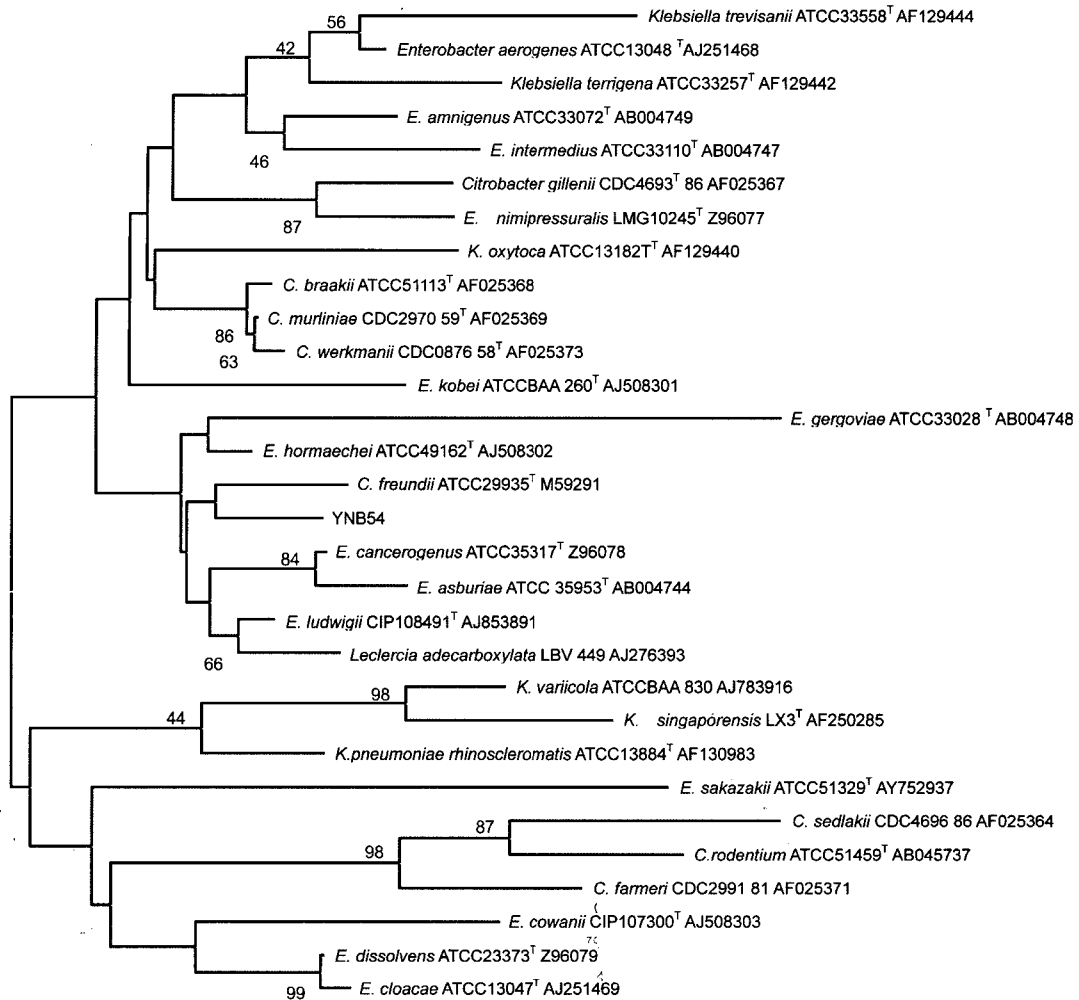


Fig. 2. Neighbour-joining analysis of DNA sequences from several *Enterobacter* spp. Phylogenetic analysis was based on full 16S rRNA gene sequences, and the scale reflects relative phylogenetic distance. The isolates, whose names with ATCC numbers, were retrieved from GenBank.

지만 전체 5종의 type strains(*Citrobacter*, *Enterobacter*, *Leclercia*, *Klebsiella*, *Leclercia*)를 넣어 계통 분류도를 그렸을 때 boot strap value가 낮아 신뢰도가 떨어짐을 알 수 있었다(Fig. 2). 여러 속에 속하는 type strain들과의 높은 16S rDNA 상동성과 분류도내 cluster의 불일치는 Forsythe, S. 등의 보고에서도 잘 나타내주고 있는데, *E. sakazakii* type strain이 또 다른 *Enterobacter*종, *E. cloacae*와 유사하지만, 16S rDNA 염기분석 결과, *E. cloacae*(97.0%)보다 *Citrobacter koseri*(97.8%)에 더 가깝고 *gyrB* 염기서열분석에서도 이와 유사한 polyphyletic 특성을 보인다고 하였다[5]. 분류학적으로 rDNA sequence homology가 97% 이상인 경우 DNA-DNA hybridization 실험을 통해서 종의 동정을 수행하는 것이 일반적인데, 70% 이상의 DNA 유사성을 보이는 경우 하나의 종으로 정의하고 있다[18]. DNA-DNA hybridization 결과에서 YNB54는 *E. cloacae*(100%), *Klebsiella pneumoniae*와 97.5% 상동성을 나타내었고, *Leclercia adecarboxylate*, *Citrobacter freundii*와도 각각 92%와 88%의 상동성을 나

타내었다. Bergey's manual에 의거한 *Enterobacter* 속의 G+C 함량은 52-60%, *Citrobacter*, 50-52%, *E. coli*: 48-52%, *Klebsiella*, 56-58%로 명시 되어 있는데, 본 실험군 YNB54의 G+C함량은 59.36%을 나타내었다.

일반 분류학상으로 97%이상의 16S rDNA 염기서열 상동성과 70% 이상의 DNA 유사성을 나타내는 균주들의 경우 하나의 종으로 정의할 수 있다. 본 연구에서 사용된 균주 YNB54는 공시된 5개 속의 5가지 표준종(type species)과 모두 97% 이상의 16S rDNA 염기서열 상동성과 70% 이상의 DNA 유사성을 나타내는 것으로 미루어, 5가지 속의 표준 종들은 하나의 종으로 정의할 수 있었다. 이러한 경우 YNB54 균주는 분자생물학적 data를 근거로 가장 먼저 명명된 *Klebsiella* 속으로 동정되는 것이 바람직하다고 여겨졌다. 하지만 현재 *Enterobacter* 속의 분류는 생리 생화학적, 병원성, 및 혈청학적 방법을 기준으로 분류되고 있다. 분리된 YNB54 균주는 토양에서 분리된 균주였기 때문에 병원성 test가 불가능하였고 생리 생화학적 특성의 비교에 근거하는 경

우 *Enterobacter*속의 표준종인 *Enterobacter cloacae*와 가장 유사한 특성을 갖는 것으로 보아 잠정적으로 *Enterobacter*속으로 명명하였다.

현재까지 기존 다른 속으로 구분된 이들 균주가 유전적으로 서로 매우 유사하다는 것은 상기의 16S rDNA 염기서열 상동성 결과에서도 보여주었다. 따라서 본 실험 결과는 *Enterobacter* family에 대한 재분류의 필요성을 부각시키는 의미 있는 참고 자료가 될 것으로 사료된다.

요 약

Phytophthora sp.의 균사성장을 특이적으로 저해하는 토양 미생물인 YNB54 균주의 정확한 분류적 위치를 밝히기 위해 Biolog GN2, API 20E와 같은 상업적 생화학 kit, 16S rDNA, DAN-DNA hybridization, GC함량, MIDI 등의 분석을 수행하였다. 다양한 생화학적 kit를 사용한 동정 결과는 이 균주가 다른 어떤 종보다 *Enterobacter cloacae*와 *E. cancerogenus*에 보다 더 가까움을 보여주었다. 또한 DAN-DNA hybridization, GC함량, MIDI 분석의 결과들 역시 다른 속(*Citrobacter*, *Klebsiella*, *Leclercia*)보다 *Enterobacter* 속에 더 유사함을 암시해 주었다. 그러나 16S rDNA 분석에서 이 균주는 *Citrobacter freundii*(99.4%)와 동일 그룹으로 구분되었지만 *Enterobacter*, *Leclercia*, *Klebsiella* 속 등과도 98%이상의 상동성을 보여주는 polyphyletic 특성을 보였다. 결론적으로 YNB54의 분류 동정을 위한 우리의 조사들은 이 균주가 유전적으로 다양하고 지금까지 아는 것보다 분류학적으로 더 복잡함을 암시해줌에도 불구하고 *Enterobacter*속임이 가장 유력하다는 것을 보여주었다.

감사의 글

본 연구는 농림 특정기술 개발사업의 지원을 받아 수행되었으며, 이에 감사 드립니다.

REFERENCES

- Andersen, B. M. 1995. Biochemical profiles and serotypes of nosocomial *Enterobacter cloacae* strains in Northern Norway: biochemical identification problems with commercial test systems. *Infection* **23**: 339-343.
- Ausubel, F. M. 1995. Short protocols in molecular biology. New York(State): John Wiley & Sons, Inc.
- Benyagoub, M. C. Willemot, and R.R. Be' langer. 1996. Influence of a subinhibitory dose of antifungal fatty acids from *Sporothrix flocculosa* on cellular lipid composition in fungi. *Lipids* **31**: 1077-1082.
- Bloch, K. 1983. Sterol structure and membrane function. *Crit. Rev. Biochem.* **14**:47-92.
- Carol, I., Iversen, C., M. Waddington, L.W.O. Stephen, and S. Forsythe. 2004. Identification and phylogeny of *Enterobacter skazakii* relative to *Enterobacter* and *Citrobacter* species. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 5368-5370.
- Fravel, D. R. 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant disease. *Ann. Rev. Phytophthol.* **26**: 75-91.
- Harmsen, D., and H. Karch. 2004. 16S rDNA for diagnosing pathogens: a living tree. *ASM News* **70**: 19-24.
- Howell, C. R., R. C. Beier, and R. D. Stipanovic. 1988. Production of ammonia by *Enterobacter cloacae* and its possible role in the biological control of *Pythium* pre-emergence damping-off by the bacterium. *Ecol. Epidemiol.* **78**:1075-1078.
- Izard, D., M. O. Husson, P. Vincent, H. Leclerc, D. Monget, and J. M. Boeufgras. 1984. Evaluation of the four-hour rapid 20E system for identification of members of the family *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol.* **20**: 51-54.
- Kamoun, S., E. Huitema, and V. G. A. A. Vleeshouwers. 1999. Resistance to oomycetes: a general role for the hypersensitive response? *Trends Plant Sci.* **4**:1360-1385.
- Kim, D.-S., S. J. Chun, J. J. Jeon, S.-W. Lee, and G.-H. Joe. 2004. Synthesis and fungicidal activity of ethaboxam against Oomycetes. *Pest Manag. Sci.* **60**: 1007-1012.
- Klingler, J. M., R. P. Stowe, D. C. Obenhuber, T. O. Groves, S. K. Mishra, and D. L. Pierson. 1992. Evaluation of the biolog automated microbial identification system. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2089-2092.
- Lee, J. Y., S.S. Moon, and B. K. Hwang. 2003. Isolation and antifungal and antioomycete activities of aerugine produced by *Pseudomonas fluorescens* strain MM-B16. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 2023-2031.
- Loper, J. E. 1988. Role of fluorescent siderophore production in biological control of *Pythium ultimum* by a *pseudomonas fluorescens* strain. *Phytopathology* **78**:166-172.
- Miller, J. M. and D. L. Rhoden. 1991. Preliminary evaluation of Biolog, a carbon source utilization method for bacterial identification. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 1143-1147.
- Osterhout, G. J., V. H. Shull, and J. D. Dick. 1991. Identification of clinical isolates of gram-negative nonfermentative bacteria by an automated cellular fatty acid identification system. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 1822-1830.
- Rustenbeck, I., and S. Lenzen. 1989. Regulation of transmembrane ion transport by reaction products of phospholipase A₂ II. Effects of arachidonic acid and other fatty acids on mitochondrial Ca²⁺ transport. *Biochim. Biophys. Acta* **982**: 147-155.
- Stackebrandt, E. and B. M. Goebel. 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**: 846-849.
- Tang, Y., N. M. Ellis, M. K. Hopkins, D. H. Smith, D. E. Dodge, and D. H. Persing. 1998. Comparison of phenotypic and genotypic techniques for identification of unusual aerobic pathogenic gram-negative *Bacilli*. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 3674-3679.
- Tyler, J. A. and R. B. Richard. 2001. Specificity and mode of

- action of the antifungal fatty acid *cis*-9-heptadecenoic acid produced by *Pseudozyma flocculosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 956-960.
21. Vogel, H. J., 1965. in *Evolving Genes and Proteins*, eds. Bryson, V. & Vogel, H.J. (Academic, New York), pp.25-40.
22. Winstanley, T. G., D. I. Limb, P. F. Wheat, and C. D. Nicol. 1993. Multipoint identification of Enterobacteriaceae: report of the British Society for Microbial technology collaborative study. *J. Clin. Pathol.* **46**: 637-641.
23. Yoon, Sang-Hong. 1999. Molecular cloning and expression of genes related to antifungal activities from *Enterobacter* sp. B54 antagonistic to *Phytophthora capsici*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **3**: 352-357.

(Received Mar. 2, 2006/Accepted Mar. 25, 2006)