

# Erwinia속 세균의 분류 및 동정

강원대학교 자원생물환경학부

임 춘 근

## 1. 서 론

*Erwinia*속 세균은 발병기작 및 생태적 특성에 준하여 2계통(계통 1, 2)으로 대별할 수 있다. "Erwinia-계통 1"의 경우 세균의 독(toxin)에 의하여 발병되며 주로 식물의 지상부에서 병이 관찰된다. 따라서 식물의 지상부에서 병징이 관찰되고 병징부위에서 악취가 나지 않으면 일단 "Erwinia-계통 1"에 해당하는 세균이 병원균일 가능성이 높다. 병징으로는 "마름병(blight)", "케양병(canker)" 및 시들음병(wilts)" 등이 있으며, *E. amylovora*, *E. mallotivora*, *E. salicis*, *E. tracheiphila*, *E. nigrifluens*, *E. rubrifaciens*, *E. quercina*, *E. herbicola* pv. *herbicola*, *E. herbicola* pv. *milletiae*, *E. anannas*, *E. uredovora* 및 *E. stewartii* 등의 세균이 "Erwinia-계통 1"에 속한다.

반면 "Erwinia-계통 2"의 경우 세균의 펙틴효소에 의하여 발병되며 주로 식물의 지하부, 때에 따라서는 식물의 지상부에서도 병징이 관찰된다. "Erwinia-계통 2"의 세균은 펙틴효소를 분비하여 식물 세포를 분해시키기에 병징부위에서 "무름증상과 함께 악취"가 발생한다. 따라서 식물의 지하부(간혹 지상부)에서 무름증상이 관찰되고 병징부위에서 악취가 나면 일단 "Erwinia-계통 2"에 해당하는 세균이 병원균일 가능성이 높다. 병징은 무름증상만을 기억하면 되며, *E. carotovora* subsp. *carotovora*, *E. carotovora* subsp. *atroseptica*, *E. carotovora* subsp. *betavascularum*, *E. chrysanthemi*, *E. cyripedii*, 및 *E. rhapontici* 등의 세균이 "Erwinia-계통 2"에 속한다.

## 2. Erwinia속 세균의 특징

*Erwinia*속 세균의 특징을 모두 암기하는 것은 쉬운 일이 아니다. 하지만 *Erwinia*속 세균의 특징 중 주요부분을 이해하는 것은 *Erwinia*속 세균의 동정 및 분류체계를 확립하는데 매우 중요하다. 따라서 *Erwinia*속 세균의 특징중 꼭 알아두어야 할 내용을 설명하면 다음과 같다. *Erwinia*세균은 "그람음성으로서 혐기적 성장"이 가능하다. 본 내용은 매우 중요한 것으로서 그람음성이면서 산소가 없이 성장할 수 있는 세균은 *Erwinia*와 몇 종의 *Pseudomonas*뿐이다. 따라서 "병원성을 확인한 후 혐기적 성장조사를 하였을 때 양성반응"을 나타내면 90%의 확률로 *Erwinia*속 세균이라고 예측해도 무방하다.

한편 *Erwinia*속 세균은 주생모(편모가 세균의 전체에 붙어있음)를 지닌 간균이다. 전자현미경 관찰이 가능할 경우, 간균모양의 세균으로서 주생모가 관찰된다면 99%의 확률로 *Erwinia*속 세균이다. 마지막으로 *Erwinia*속 세균은 매우 빠르게 증식하며 균총의 색깔이 주로 흰색 또는 크림색이다. 단 *E. herbicola*는 노란색, *E. rubrifaciens*는 핑크색의 균총을 형성한다. 결론적으로, 빠르게 증식하는 그람음성 세균중 흰색 또는 크림색의 균총(*E. herbicola*와 *E. rubrifaciens*는 예외)를 선별하여 병원성을 확인한 후, 혐기적 성장조사에서 양성을 나타내고 전자현미경사진을 통하여 주생모가 관찰된다면 99.9%의 확률로 *Erwinia*속 세균임을 예측할 수 있다.

### 3. *Erwinia*속 세균의 분리, 병원성 검정 및 동정

#### (1) “*Erwinia*-계통 1”세균의 분리, 병원성 검정 및 동정

서론부분에서 언급하였듯이 “*Erwinia*-계통 1”세균은 식물의 잎, 줄기 등, 식물의 지상부에 병을 야기시키며 분리는 비교적 쉬운 편이다. 즉, 이병조직을 절단하여 70% 알콜용액에 표면살균한 후 마쇄하여 평판희석법으로 MGY, 또는 YDC배지에 도말배양하여 28℃의 항온기에서 증식시킨다. 많은 논문의 경우, MS배지 또는 High sucrose(40%) 배지 등의 선택배지를 사용할 것을 중용하고 있으나, MGY, YDC등의 일반배지를 사용하여도 “*Erwinia*-계통 1”세균을 훌륭히 분리할 수 있다. 주의할 것은 *E. herbicola*(노란색), *E. rubrifaciens*(핑크색)를 제외한 “*Erwinia*-계통 1”세균들은 흰색 또는 크림색의 균총을 형성한다는 것이다. 특히, “*Erwinia*-계통 1”세균들은 EPS (extra-polysaccharides)라는 점액성(끈적끈적한) 물질을 분비하는데, 분비된 EPS가 식물에 독(toxin)으로 작용하여 병을 야기시키므로, “점액성”을 나타내는 흰색, 또는 회색의 균총을 순수분리하는 것을 원칙으로 한다. 순수분리가 완료되면, “혐기적 생장” 및 King’s B 배지에서의 “형광물질발현유무”조사를 실시하여, 혐기적 생장이 가능하며 형광물질을 발현하지 않는 세균들만을 순수분리한다. 이유는 많은 경우에 있어서, *Pseudomonas*세균들도 식물의 지상부에 병을 야기시키는데, 이들 세균들의 특성은 산소가 있어야만 생장을 하거나 형광물질을 발현하기 때문이다. 따라서 “산소 없이도 생장이 가능하며 형광물질을 발현하지 않는 세균”만을 선발하면 *Pseudomonas*세균들을 배제시킬 수 있기 때문이다. 혐기적 생장 조사법은 아래에 기술한 “*Erwinia*-계통 2”세균의 분리, 병원성검정 및 동정”중에서 “과정 2:조건적 혐기성(facultative anaerobe)이며 Gram stain에 음성인 세균분리”에 기술한 내용을 참고하기를 바란다.

병원성검정의 경우, 비교적 어려운 편이다. 즉, 순수분리한 세균을 식물에 직접 접종하여 병원성을 확인하여야하는데, “*Erwinia*-계통 1”세균은 주로 세포성분이 견고한 식물에 병을 야기시키므로 발병을 유도하는데 시간 및 세심한 관찰이 요구된다. 특히 수분 및 온도조절에 주의하여야 한다.

한편 세균동정법에는 Schaad지침서와 Bergey’s manual에 준한 재래적 동정방법과 Biolog program등을 이용한 조기동정법이 있다. 재래적 동정방법의 경우 약 18가지의 생화학적 특성을 조사하면 되며 시험수행도 비교적 수월한 편이다. 주의할 점은 지침서의 생화학적 특성조사 내용이 단순하여 결과해석에 오류가 있을 가능성이 있으므로, 기주범위 조사를 실시하는 것이 매우 중요하다. 최근에는 Biolog program등을 이용한 조기동정법에 지나치게 의존하는 경향이 있는데, Biolog program의 경우, 동정하고자하는 세균에 따라서 오류범위가 크다. 참고적으로 세균의 Biolog program분석결과, 유사도(similarity)가 70%이하일 경우, 유의성을 인정하기 어렵다는 것을 명심하여야 한다.

#### (2) “*Erwinia*-계통 2”세균의 분리, 병원성 검정 및 동정

“*Erwinia*-계통 2”는 주로 식물의 지하부에 무름증상을 일으키는 세균이다. 다시 말해 식물의 뿌리부분에 병을 야기시키는 토양성 병원세균이므로(간혹, 식물의 지상부에서도 무름증상에 관찰되는데, 이 경우, 곤충, 또는 빗방울 등이 토양성 병원세균을 식물의 지상부에 전반시켜서 병을 야기시킴), 무름증상을 나타내는 병환부에서 세균들을 분리하였을 경우, 대부분의 세균들이 토양에서 서식

하고 있는 부생세균(saprophytic bacteria)들이기에, "Erwinia-계통 2"세균을 분리하기가 어렵다. 물론 CVP(Crystal Violet-Pectate)배지와 같은 선택배지가 있으나, CVP배지는 만들기가 복잡하고, "Erwinia-계통 2"세균만을 선택적으로 분리하지도 못한다. 따라서 "Erwinia-계통 2"세균들은 감자에 강한 무름증상을 나타내고, 혐기상태에서도 성장할 수 있는 세균(facultative anaerobic bacteria)이고, Gram stain에 음성(negative)이며 주생모(peritrichous flagella)를 지닌다는 점을 유의하여 아래의 조기동정법을 이용하는데, 과정을 정리하면 다음과 같다.

※ 과정 1 : "Erwinia-계통 2" 세균의 enrichment(기간: 12시간)

무름병환부에서 "Erwinia-계통 2"세균의 밀도를 높이기 위하여 감자절편을 이용한다. 즉, 무름증상을 나타내는 병환부 조직을 마쇄한 후 마쇄조직을 감자절편에 접종하여 28°C의 항온기에서 배양한다. 배양 12시간 후 감자절편에서 강한 무름증상을 관찰할 수 있는데, 무름병환부에서 무름병원균을 직접 분리하는 것 보다 감자절편에서 무름병원균을 enrichment한 후에 순수분리를 시도하면 아주 높은 효율로 "Erwinia-계통 2"세균을 순수분리할 수 있다.

※ 과정 2 : 조건적 혐기성(facultative anaerobe)이며 Gram stain에 음성이 세균분리(기간: 3일)

과정 1, 즉 enrichment방법에 의하여 감자에서 무름증상을 나타내는 절편을 절단하여 70% 알콜 용액에 표면살균한 후 마쇄하여, 평판희석법으로 mannitol-glutamate yeast(MGY)배지에 도말배양(smear culture)하여 28°C의 항온기에서 증식시킨다. 배양 48시간 후 배지상에 나타난 단일 균총으로부터 세균을 순수분리한 후 조건적 혐기세균을 선발한다. 즉, Bromthymol blue(1% solution)을 peptone을 첨가한 test tube배지를 만든 후 분리세균을 접종한다. 접종 후 녹인 파라핀(melted paraffin)으로 test tube 입구를 봉(close)하여 혐기상태로 만든 다음 28°C에서 배양한다. 배양 20시간 후 test tube내의 배지색이 노란색으로 변하면, 분리세균이 혐기세균이다. 이후 5% KOH 용액을 떨어뜨린 slide glass에 분리세균을 접종하여 smear를 만든 다음, loop를 이용하여 점액도를 알아보았을 때 loop에서 점액성(sticky)이 관찰되면 그램음성 세균이다. 한편, 소수의 Pseudomonas속 세균들 역시 감자에 무름증상을 야기시킬 수 있는데, 조건적 혐기성이며 그램음성 세균중, King's B 배지에서 형광물질을 발현하지 않으면 99%의 확률로 "Erwinia-계통 2" 세균이다.

※ 과정 3 : "Erwinia-계통 2"세균의 병원성 검정(기간: 12시간)

과정 1, 2를 통하여 선발한 "facultative anaerobic and gram stain-negative" 세균들을 "과정 1"에서 이용한 방법과 유사한 방법으로 병원성을 검정한다. 즉, 세균을 loop를 이용하여 감자절편에 접종한 후, 28°C배양기에서 배양한다. 배양 12시간 후 무름증상을 나타내면 "Erwinia-계통 2" 세균으로 단정해도 무방하다.

※ 과정 4 : 전자현미경(Electron microscope)을 이용한 Erwinia species의 확인(기간: 6시간, optional)

전자현미경을 이용하였을 때 병원성 세균주변으로 주생모가 관찰되면 "Erwinia-계통 2" 세균임을 100% 확신할 수 있다. 그러나 본 방법은 전자현미경이라는 고가의 실험기계 및 사용상의 전문

성을 요구하기에 비전문가가 직접 실험을 수행하기에는 큰 어려움이 있다고 할 수 있다. 다만, 전자현미경의 경우 전문가에게 의뢰하여 병원세균의 편모를 확인함으로써 분리세균이 *Erwinia* 속 세균임을 “視覺的”으로 100% 확신할 수 있다는 강점이 있다.

※ 과정 5 : “*Erwinia*-계통 2”세균의 동정(3-5일)

일단 분리한 세균이 무름증상을 야기시키는 “*Erwinia*-계통 2”세균으로 확인된 후에는 정확한 종(species), 나아가서는 아종(subspecies)까지의 동정이 필요하다. 이를 위하여 사용하는 “재래식 동정법”은 “Bergey’s manual” 또는 “Schaad지침서”에 준한 생화학적 특성을 조사하는 것이다. 재래식 방법으로 동정을 할 경우, 대다수 “*Erwinia*-계통 2” 세균들이 “Bergey’s manual 및 Schaad 지침서”의 결과와 일치하는 경우가 드물다. 따라서 아종이하로 동정하는데는 많은 경험이 요구된다. 반면 Biolog program을 이용한 조기동정법의 경우, 2일 정도의 짧은 시간과 간단한 실험재료가 필요할 뿐만 아니라, 비전문가라 할지라도 간단한 교육과정을 통하여 쉽게 “*Erwinia*-계통 2”세균을 동정할 수 있다. 예로서, *E. carotovora* subsp. *carotovora*의 경우 보통 85%이상의 높은 유사도를 나타낸다. 그러나 *E. carotovora* subsp. *atroseptica* 등의 다른 세균들은 균주에 따라서 유사도가 매우 낮을 경우가 많다. 따라서 *E. carotovora* subsp. *carotovora* 이외의 “*Erwinia*-계통 2”세균을 동정할 경우 Biolog program을 과신하는 것은 위험하다.

## 4. *Erwinia*속 세균의 분류

### (1) “*Erwinia*-계통 1”세균의 분류

국내에서 분리한 “*Erwinia*-계통 1” 균주들(national strains)의 유연관계를 생화학적, 유전적, 혈청학적 및 형태적 측면에서 살펴본 결과, 비교적 균주간의 유연관계가 높았다(homogeneous group). 유전학적 측면에서의 유연관계를 살펴보기 위하여, RAPD를 수행하였는데, 비교적 단순한 band patterns을 보여주었다. 항체를 이용하였을 경우도, band patterns이 일정한 모양으로 나타났다. 따라서 국내 “*Erwinia*-계통 1”세균의 경우, 균주간의 변이가 심하지 않음을 알 수 있었다. 반면, 국내 균주와 국외균주간(international strains)의 유연관계를 보았을 때는, 비교적 균주간의 유연관계가 낮았는데(heterogeneous group), 이는 국가적 수준에서 지역적 분리(geographic isolation)가 존재함을 시사해준다. 따라서 검역차원에서 “*Erwinia*-계통 1”세균을 검출(detection)할 수 있는 probes를 선별하기 위해서는, 수출용인지 아니면 수입용인지에 따라 probe를 조심스럽게 개발해야한다.

### (2) “*Erwinia*-계통 2”세균의 분류

국내에서 분리한 “*Erwinia*-계통 2”균주의 경우, “*Erwinia*-계통1” 세균과는 반대로, 균주간의 유연관계가 낮은 편이다(heterogeneous group). 즉, 균주의 생화학적, 유전적 및 혈청학적 유연관계를 NTSYS를 이용하여 분석한 결과, 균주간의 유사도가 낮았으며, 다양한 group으로 나타났다. 또한 국내균주와 국외균주간의 분석에서도 유연관계가 낮은 것으로 나타났다. 따라서 검역차원에서 “*Erwinia*-계통 2”세균을 검출 할 수 있는 probes를 선별하기 위해서는, 수출용 및 수입용에 모두 사용할 수 있는 probe를 개발하는데 많은 시간, 인내 및 기술을 요구한다.