

Pseudomonas sp.에 의한 채소병원균의 생물학적 억제

김교창* · 김홍수 · 도대홍¹ · 조제민²

충북대학교 식품공학과, ¹충청전문대학 식품가공과, ²충주공업전문대학 식품공업과

Biological Control of Plant Pathogen by *Pseudomonas* sp.

Kim, Kyo-Chang*, Heung-Su Kim, Dae-Hong Do¹ and Chae-Min Cho²

Department of Food Science and Technology, Chung-Buk National University, Cheongju 360-763, Korea

¹Department of Food Science and Technology, Chung-Cheong College, Cheongweon 363-890, Korea

²Department of Food Technology, Chung-Ju National Technical Junior College, Chungju 383-870, Korea

Abstract — For the selection of powerful antagonistic bacterium for biological control of soil borne *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* causing rot of vegetable, excellent strains (S4, S14, S65) were selected from 1,196 strains of bacteria which were isolated from rhizosphere in vegetable root rot-suppressive soil. Strains were identified to be *Pseudomonas* species with Api 20NE kit. Antagonistic substance was produced in 523 synthetic broth medium at pH 7~8 and 30°C during 3 days culture. The substance was stable in the pH range of 6 to 9. When the basal medium was supplemented with mannitol and sorbitol as carbon source and calcium chloride as metal salt, the production of the inhibitory substance was increased. The inhibitory activity was increased by the addition of fertilizer in soil. The isolated strains were resistant to the agricultural chemical such as benomyl and fosethyl-Al-folpet, and the antibiotics such as penicillin and lincomycin. We had found that *Pseudomonas* sp. S14 strain had a single plasmid. After treated with acridin orange for curing, we confirmed the existence of antagonistic gene in the chromosomal DNA.

채소 등의 식물병원균에 대한 생물학적 방제는 세균이 생산하는 살균성단백질(bacteriocin)과 미생물의 항생물질로 대별할 수 있다. 일반적으로 식물병원균을 방제하기 위하여 사용하는 화학농약이나 항생제 계통은 그 사용범위가 넓은 반면 인체에 유해하고 병원균의 약제 저항성을 증가시킨다. 최근에는 사용속주 범위는 좁지만 이러한 결점을 보완할 수 있는 생물학적 방제에 관한 관심이 고조되고 있다(1-3). 이러한 유용 길항미생물에 관한 연구로는 *Agrobacterium radiobacter*(4), *Erwinia carotovora*(5), *Erwinia herbicola*(6), *Pseudomonas phaeolicola*(7), *Pseudomonas syringae*(8) 등이 보고되어 있으며, 최근에는 억제물질 생성 유전자의 성질조사 및 cloning(3, 9, 10) 등의 다양한 연구가 진행되고 있다. 식물병원균에 대한 생육억제능력이 우수한 길항균을 분리하였더라도 토

양의 여러가지 자연적, 인공적 환경조건에 따라서 억제력의 변화가 예상된다. 본 실험에서는 채소 등의 부패균인 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*의 생육을 억제하는 형광성 *Pseudomonas* sp.를 토양으로부터 분리하고 분리균의 미생물학적 특성과 억제물질 생성 유전자의 소재를 확인하고 분리길항균의 이용 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양

실험에 사용된 식물병원균은 채소 등의 부패균인 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*를 농촌진흥청 농업기술연구소 식물병리과에서 분양받아 사용하였고, 길항균으로 *Pseudomonas* sp. S4, S14, S65을 토양으로부터 분리하여 사용하였다. 식물병원균과 길항세균의 증식에는 523 배지(11)(8g casein hydrolysate, 10g sucrose, 4g yeast extract, 2g K₂HPO₄, 0.3g

Key words: Plant pathogen, antagonistic *Pseudomonas* sp., biological control

*Corresponding author

MgSO₄·7H₂O, 15g agar per distilled water 1 liter, pH 7.0)를 사용하였고, *Pseudomonas* sp. 길항세균의 분리용 배지는 D4 선택배지(11)(10g glycerol, 5g NH₄Cl, 10g sucrose, 1g casein hydrolysate, 2.3g Na₂HPO₄, 0.6g SDS, 15g agar per distilled water 1 liter, pH 6.8)를 사용하였다.

길항력검정

길항세균의 분리는 paper disc법(12)으로 생육저지환의 크기를 측정하여 분리하였고, 시료액은 배양액을 12,000 rpm으로 원심분리하여 균체 등을 제거한 상층액에 chloroform을 사용하여 살균하고 검정용 시료액으로 사용하였다. *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 병원균에 대한 생물학적 방제는 배양액을 petri dish에 도말건조한 후 시료액 0.65 ml씩 흡착시킨 직경 8 mm의 paper disc를 부착시켜 30°C에서 3일간 배양하고 생성되는 생육저지환의 직경을 측정하여 길항력을 검정하였다.

길항세균 분리 및 선발

길항세균 분리는 채소 경작지 표토층 5 cm 이내의 토양을 채집하고 토양시료 1g을 생리식염수로 희석하여 D4 선택배지에 도말하고 배양한 후 Kado(11) 등의 방법에 따라 자외선조사시 형광성을 나타내는 균집락을 *Pseudomonas* sp.로 분리하였다. 분리균은 523 증식용 고체배지에 이식하여 4°C에 보관하면서 길항력검정에 사용하였다. 분리균들의 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 병원균에 대한 길항력검정은 병원균액을 도말건조한 증식용 배지로 Gratia(4) 등의 agar spot test를 실시하여 길항력이 있는 균주를 1차 선발하였다. 1차 선발균들중 길항력이 우수한 균주를 paper disc법으로 최종선발하고 Api 20NE kit(13)를 사용하여 *Pseudomonas* sp.임을 재확인하고 시험균주로 사용하였다.

생물학적 방제

최종선발된 길항세균의 생물학적 방제는 균수가 10⁸ cell/ml인 길항세균과 병원균 현탁액을 멸균 petri dish에 1:1의 액량으로 혼합하고 15 cm로 절단한 어린배추잎을 침지시켜 30°C에서 48시간 방치한 후 방제효과를 관찰하였다. 발병 대조구는 길항세균을 혼합하지 않은 식물병원균액을 같은 조건으로 처리하여 비교하였다.

배양조건에 따른 길항력 조사

분리길항세균의 배양조건에 따른 식물병원균에 대한 생육억제력을 관찰하기 위하여 분리길항균을 30°C에서 16시간 전배양한 배양액을 1 ml씩 30 ml의 증식용 배지에 이식하여 3일간 배양하고 길항력 검정시료액과 같은 방법으로 배양상층액을 준비하여 paper disc법으로 생육억제력 정도를 관찰하였다. 증식용 배지에서 분리길항균의 배양조건은 다음과 같다. 배양시간에 따른 식물병원균에 대한 억제력변화는 배양시작 1일부터 5일까지 관찰하였고, pH에 대한 영향은 배양초기 pH를 2에서 12까지 조정하여 3일간 배양하여 관찰하였다. 배양온도는 5°C에서 40°C까지 5°C 간격을 두고 3일간 배양하면서 실시하였다.

배지성분조성에 따른 길항력 조사

523 증식용 배지를 기초배지로하여 탄소원(1%), 질소원(0.8%) 및 무기염류(0.2%)를 첨가하고 30°C에서 3일간 배양한 후 길항력검정용 시료액과 동일한 배양상층액을 처리하고 paper disc법으로 배지성분 조성에 따른 길항력변화를 관찰하였다.

토양정착 및 시비효과 조사

토양으로부터 분리한 길항세균을 살균토양과 소정량의 화학비료를 첨가한 토양에 재흡착시켜 길항세균의 토양내 활성변화를 관찰하였다. 살균토양과 화학비료 첨가토양을 test tube에 각각 40g씩 분주하고 수분함량을 40%로 조절한 후 전배양한 배양액(10⁸ cell/ml) 1 ml씩 이식하고 30°C에서 15일간 배양한 후 살균증류수로 10배 희석한 상층액으로 paper disc법에 따라 생육억제력을 비교하였다. 화학비료첨가는 황산암모늄 1.0%, 중과인산석회 0.4%, 염화칼리 0.4%씩 첨가하였다.

화학농약 및 항생물질 내성검사

화학농약 및 항생물질의 토양살포시 길항세균의 생육에 미치는 영향을 조사하기 위하여 benomyl(65 mg/100 ml), propamocarb hydrochloride(145 µg/100 ml), kasugamycin + copper oxychloride(100 mg/100 ml), fosethyl-Al-folpet(165 mg/100 ml), propineb(200 mg/100 ml)계 화학농약과 항생물질(200 µg/ml)을 흡착시킨 paper disc를 길항세균이 도말된 증식용 한천배지에 부착시키고 30°C에서 3일간 배양하고 생육저지환의 생성유무 및 크기를 측정하였다.

분리 길항세균의 억제물질 생성유전자의 확인

길항세균을 LB 배지를 사용하여 30°C에서 24시간 배양하여 Maniatis(14) 등의 방법에 따라 plasmid를 분리하였다. 억제물질생성 유전자확인을 위한 plasmid 소거는 acridin orange를 50, 75, 100, 125 µg씩 첨가한 5 ml의 LB 배지에 접종하고 30°C에서 1~3일간 처리한 후 LB 고체배지에 희석도말하고 3일간 배양한 후 형성되는 단일집락을 선택하여 plasmid를 분리하여 plasmid 소거유무를 관찰하였다. 이들 변이주의 길항력검정을 실시하고 plasmid 분포양상과 비교하여 길항관련 유전자의 소재를 확인하였다.

결과 및 고찰

길항세균의 분리 및 선발

증식용 배지로 사용한 523 액체배지는 Kado(11) 등에 의하면 *Erwinia* sp., *Pseudomonas* sp., *Xanthomonas* sp. 및 *Agrobacterium* sp.가 모두 잘 자라지만 D4 선택배지에서는 *Pseudomonas* sp.와 일부 *Erwinia* sp.만이 생육하고 *Pseudomonas* sp.는 *Erwinia* sp.에 비하여 증식속도가 빠르며 형광성 colony을 형성한다고 하였다. 본 실험에서도 Kado(11) 등이 사용한 바 있는 D4 배지를 이용하여 비교적 생육이 왕성하고 자외선조사시 형광성을 나타내는 1,196균주의 균집락을

을 선택하여 *Pseudomonas* sp.로 분리하였다. 분리용 선택배지에서 분리된 *Pseudomonas* sp. 집락의 분리율은 논토양에서 10.8%였고 밭토양에서는 9.9%였다. 실험에 사용된 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 식물병원균에 대하여 생육저지환을 형성하는 13균주를 1차 선발하고, 지름이 15 mm 이상의 생육저지환을 형성하는 S4, S14, S65를 2차 선발균주로 선발하였다. 이들의 생육저지환의 크기는 각각 16, 23, 19 mm로 우수한 생육억제력을 보였다. 이들 3균주를 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 병원균에 대한 길항세균으로 선택하고, Api 20NE kit를 사용하여 동정하고 *Pseudomonas* sp. S4, S14 및 S65로 명명하였다.

길항세균의 발병 억제효과

분리선발한 *Pseudomonas* sp.(S4, S14, S65) 길항세균들의 병원균에 대한 발병억제효과를 알아보기 위하여 약 15 cm 길이의 어린 배추잎을 식물병원균과 길항세균수가 10⁸ cell/ml로 각각 조정된 배양액을 1:1의 액량으로 혼합한 액에 침지하여 발병상태를 관찰한 결과 Fig. 1에서와 같이 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 병원균액에 침지한 경우는 배추잎맥을 제외한 부분이 발병에 의하여 조직이 완전히 파괴된 반면 분리길항균액이 혼합된 혼합액에 침지한 경우에는 발병흔적만 약간 보일 뿐 거의 원형이 유지됨을

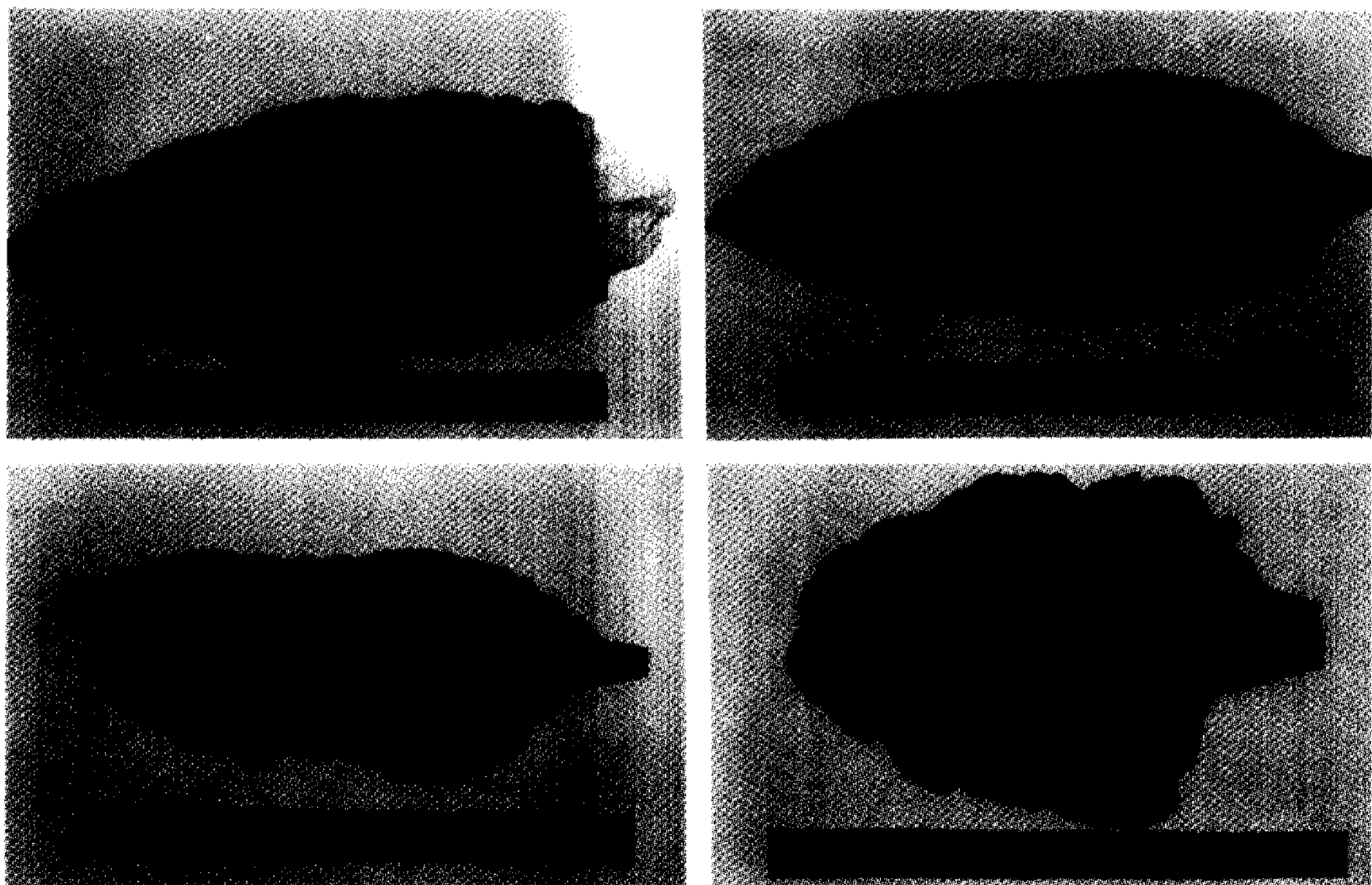


Fig. 1. Biological control of *Pseudomonas* sp. isolates against *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*.

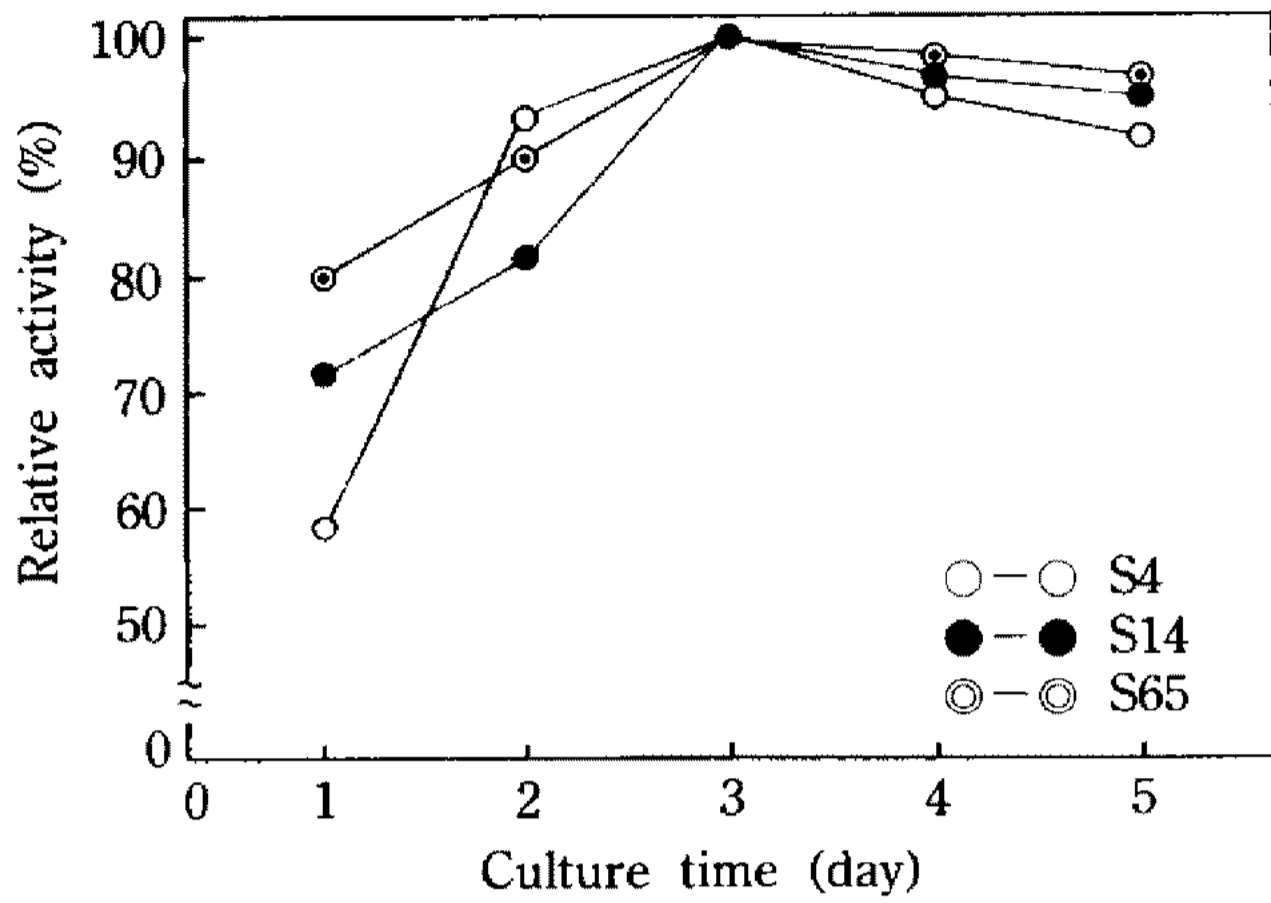


Fig. 2. Effect of culture time on the antagonistic activity of isolated strains against *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*.

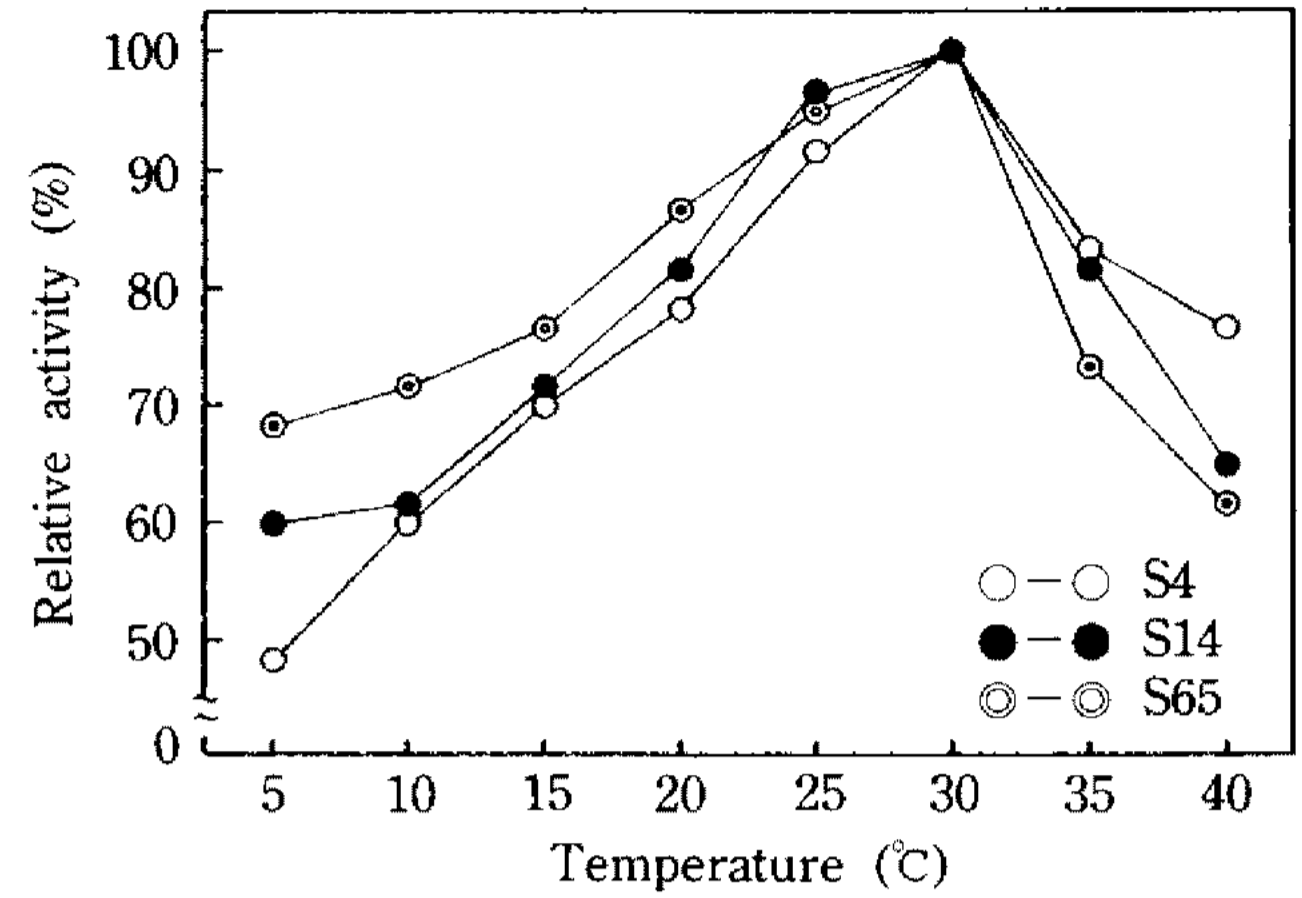


Fig. 4. Effect of temperature on the antagonistic activity of isolated strains against *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*.

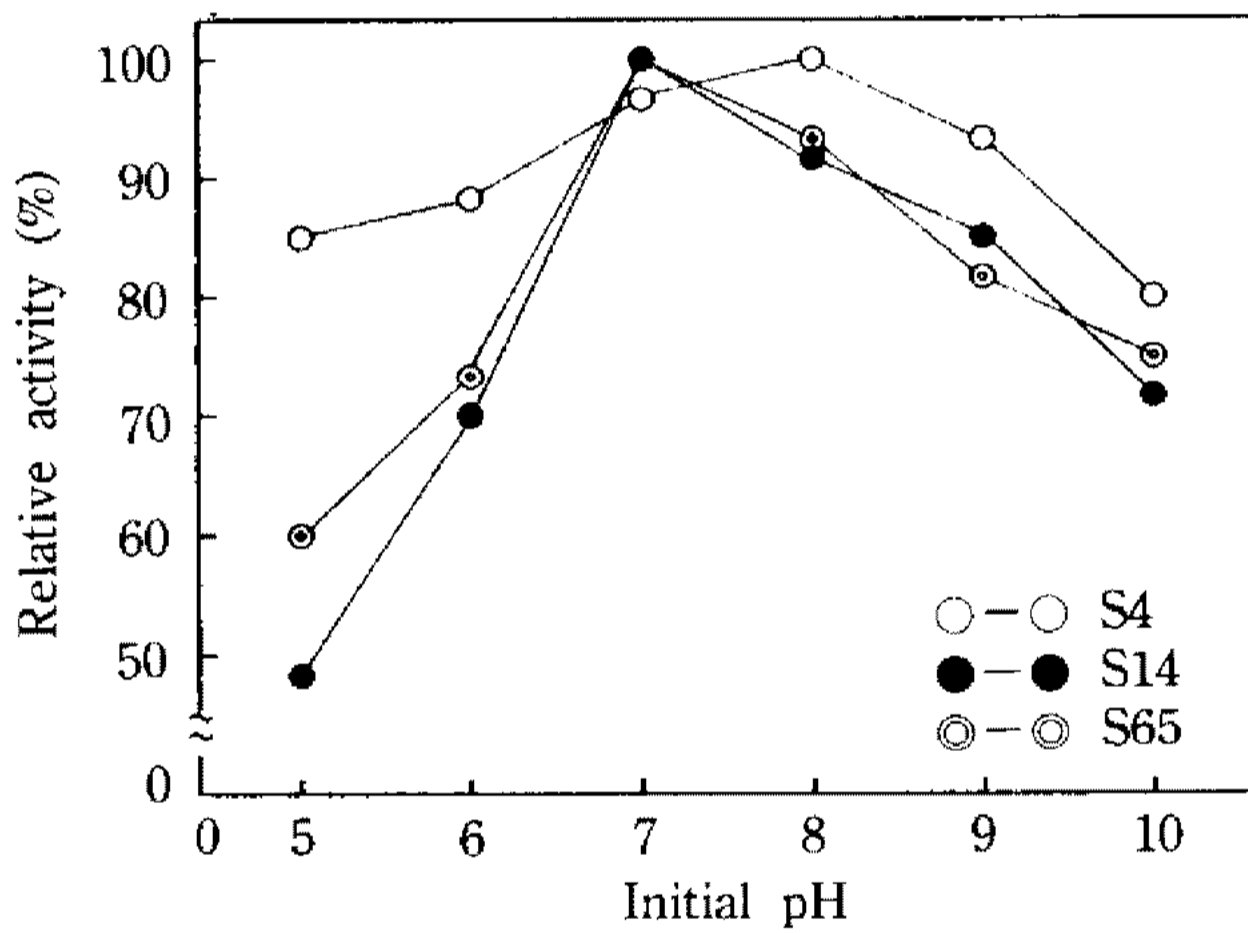


Fig. 3. Effect of initial pH on the antagonistic activity of isolated strains against *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*.

볼 수 있다. 따라서 길항균들의 발병억제력은 실험실적 조건이지만 상당한 억제력을 확인할 수 있다.

길항세균의 생육조건에 따른 길항력 변화

최적 배양조건 : 분리 길항세균의 배양시간에 따른 식물병원균에 대한 생육억제정도를 조사하기 위하여 증식용 배지를 이용하여 30°C에서 배양하면서 배양상층액으로 생육저지환의 크기를 측정된 결과 Fig. 2와 같이 배양시작 3일까지는 3균주 모두 급격한 억제력상승을 나타내었으나 배양시작 3일 이상의 배양시는 억제력이 감소하였다. S65 균주의 경우 배양시작 1일에서도 배양시작 3일의 약 80% 정도의 억제력을 보였다. 증식용 배지에서 배양초기 pH의 억제력영향은 Fig. 3과 같이 pH 7에서 S14와 S65 균주의 경우 가장 높은 억제력을 나타내었고, pH 5~6에서는 억제

력이 급격히 감소하였다. S4 균주는 pH 8에서 가장 높은 억제력을 나타내었고 pH 5~6에서도 pH 8에 비해 약 80% 이상의 억제력을 나타내어 산성조건에서도 상당한 억제력을 나타내었다. 전국 밭토양의 대부분은 pH 5.1~6.0으로 산성화되어 있고 많은 식물병원균은 산성토양에서 오히려 발병이 잘 된다는 보고(15) 등으로 보아 토양의 산도 개선은 여러가지 측면에서 유익한 이점이 있을 것이다. 본 실험균주의 식물병원균에 대한 생육억제력을 높이고 병원균의 생육을 억제할 수 있는 토양내 정착은 산도조절 등의 토양조건 개선방안이 모색되어야 할 것이다. 이러한 측면에서 보면 S14와 S65 균주에 비하여 넓은 범위의 pH에서 억제력을 나타내는 S4 균주가 실제 토양에서 활성이 높을 것으로 생각되어 주목된다.

배양온도에 따른 억제력변화는 3일 동안 배양하면서 조사한 결과 30°C에서 3균주 모두 가장 높은 억제력을 나타냈으나 15°C 이하에서는 억제력이 급격히 감소하였고 30°C 이상에서도 30°C에 비해 30%의 억제력감소를 보였다. 이같이 온도에 대한 활성변화는 병원미생물과 같이 토양세균의 일반적 특성으로 계절적 자연감소를 의미한다. 그러나 시설원예의 관리 불충분으로 연중 고온다습한 조건이 지속되고 병원균의 계절적 자연감소와 증식환이 파괴되고 있어(17) 화학농약의 연중 대량살포가 필요하고 이로 인한 여러가지 문제점이 발생되고 있다. 따라서 미생물농약의 개발이 절실히 필요한 실정이다. 본 실험균주의 시설원예지 토양의 정착에는 몇가지 정착조건이 개선된다면 상당한 효과가 있을 것으로 생각된다.

최적 배지성분 : 523 증식용 배지를 기본배지로 사

Table 1. Effect of carbon source on the antagonistic activity of S4, S14 and S65 against *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*

C-source ¹	Relative activity (%)			C-source	Relative activity (%)		
	S4	S14	S65		S4	S14	S65
None ²	100	100	100	Mannitol	120	185	137
Cellulose	107	85	98	Sorbitol	117	177	134
Glucose	111	89	121	Starch	108	115	98
Lactose	102	108	97	Sucrose	128	130	124
Maltose	111	92	101	Xylene	105	119	104
Mannose	97	89	101				

Basal medium: casein hydrolysate 0.8%, sucrose 1% yeast extract 0.4%, K₂HPO₄ 0.2%, MgSO₄ 0.03%

C-source¹: each carbon source was added to the basal medium and autoclaved after setting pH to 7.0.

None²: no carbon source was added.

Table 2. Effect of nitrogen source on the antagonistic activity of S4, S14 and S65 against *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*

N-source ¹	Relative activity (%)			N-source	Relative activity (%)		
	S4	S14	S65		S4	S14	S65
None ²	100	100	100	(NH ₄) ₂ SO ₄	102	114	150
Casein hydrolysate	128	128	154	NH ₄ H ₂ PO ₄	100	114	130
Malt extract	111	114	138	NH ₄ Cl	96	114	123
Peptone	109	100	131	NH ₄ NO ₃	101	108	110
Urea	100	121	138	NaNO ₃	103	111	131
Yeast extract	113	118	115	KNO ₃	118	118	123

Basal medium: casein hydrolysate 0.8%, sucrose 1%, yeast extract 0.5%, K₂HPO₄ 0.2%, MgSO₄ 0.03%

N-source¹: each nitrogen source was added to the basal medium and autoclaved after setting pH to 7.0.

None²: no nitrogen source was added.

용하여 탄소원 1%, 질소원 0.8%, 무기염 0.2%씩 첨가하여 30°C에서 3일간 배양하고 배양상층액으로 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*의 생육억제력 변화를 조사하였다. 탄소원은 Table 1과 같이 3균주 모두 mannitol을 첨가하여 배양했을 때 relative activity가 기본배지를 사용한 경우에 비하여 S4 균주는 20%, S14 균주는 85%, S65 균주는 37%씩 증가하여 가장 효과적인 탄소원이었으며 sorbitol과 sucrose를 탄소원으로 사용한 경우에도 3균주 모두 억제력 상승효과가 상당히 높았다. 질소원의 경우 Table 3과

Table 3. Effect of salts on the antagonistic activity of S4, S14 and S65 against *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*

Salt ¹	Relative activity (%)			Salt	Relative activity (%)		
	S4	S14	S65		S4	S14	S65
None ²	100	100	100	NaH ₂ PO ₄	116	108	122
CaCl ₂	127	133	130	Na ₂ HPO ₄	118	108	111
MgCl	103	100	127	Na ₂ CO ₃	109	108	144
MgSO ₄	103	100	100	ZnSO ₄	100	133	94
K ₂ HPO ₄	104	108	105	CuSO ₄	114	125	100
KH ₂ PO ₄	108	108	111	FeSO ₄	106	133	105
NaCl	123	105	101				

Basal medium: casein hydrolysate 0.8%, sucrose 1%, yeast extract 0.4%, K₂HPO₄ 0.2%, MgSO₄ 0.03%

Salt¹: each salt was added to the basal medium after setting pH to 7.0.

None²: no salt source was added.

Table 4. Culture of antagonistic bacteria in fertilizer additive soil

Strain	Relative activity (%)	
	Additive fertilizer ¹	No additive fertilizer ²
S4	145	100
S14	123	100
S65	126	100

Additive fertilizer¹: (NH₄)₂SO₄ 1%, KH₂PO₄ 0.4%, CaCl₂ 0.4%

No additive fertilizer²: relative activity is 100%.

같이 무기태질소에 비해 유기태질소를 사용했을 때 억제력이 다소 높았으며 특히 S65 균주의 경우 모든 실험대상 질소원에 대하여 높은 억제력을 나타내었다. 무기염류중 CaCl₂, ZnSO₄ 및 FeSO₄를 첨가하여 배양한 경우 가장 효과적인 생육억제력 상승을 보였다. 일반적으로 *Pseudomonas* sp.는 약제내성 plasmid DNA에 기인하는 Cu, Ag, Hg, Sb에 대한 내성이 알려져 있다(15). 이같은 중금속이온에 대한 *Erwinia* sp. 병원균과 분리길항균과의 상관관계를 검토할 필요가 있다.

토양정착 및 시비효과

분리 길항균이 토양에 살포시 생육활성과 화학비료의 시비에 대한 영향을 조사하기 위하여 살균토양에 황산암모늄 1%, 중과인산석회 0.4%, 염화칼륨 0.4%씩

Table 5. Resistance of the isolated antagonistic bacteria to the different agricultural chemical and antibiotics

Compound	Inhibition zone (mm)		
	S4	S14	S65
Benomyl	R*	R	R
Propamocab hydrochloride	10	R	R
Kasugamycin + copper oxychloride	14	18	26
Fosethyl-Al-folpet	R	R	R
Propineb	13	14	18
Kanamycin	22	22	24
Erythromycin	R	14	20
Vancomycin	30	R	R
Streptomycin	24	24	25
Chloramphenicol	10	R	R
Penicillin	R	R	R
Lincomycin	R	R	R
Gentamycin	21	18	24

R*: resistance

첨가한 후 분리길항균을 접종하고 15일간 30°C에서 배양한 후 살균증류수 추출액으로 억제력을 측정한 결과 Table 4와 같이 3균주 모두 비료를 첨가하지 않은 살균토양에 비하여 억제력이 약 23~45% 증가한 결과를 얻었다. 이는 분리길항균의 토양정착 가능성을 확인할 수 있으며, 실험에 사용된 질소, 인산, 칼리 비료는 토양정착에 도움이 되는 것으로 생각된다. Bakker(18)는 토심이 깊어짐에 따라 정착능력이 감소한다고 보고하였고, James(19) 등은 토층간의 전하의 성질에 좌우된다고 하였다. 따라서 분리길항균의 토양정착조건을 파악하기 위하여서는 보다 다양한 토양조건이 검토되어야 하겠다.

화학농약 및 항생물질 내성

경작지 토양에 살포되는 화학농약 및 항생물질이 분리길항균의 토양내 생육활성을 관찰하기 위하여 일반적으로 사용되는 농약의 살포농도로하여 실험에 사용하고 paper disc에 흡착시켜 분리균을 도말한 petri dish 위에 부착하여 배양하고 내성을 확인한 결과, Table 5와 같이 화학농약의 경우 S4 균주는 benomyl, fosethyl-Al-folpet에 대하여 내성이 있었고, S14와 S65 균주는 benomyl, propamocarb hydrochloride, fosethyl-Al-folpet에 대하여 내성이 있었으나 3균주 모두 kasugamycin + copper oxychloride, propineb에 대해서는 감수성이 있었다. 항생물질에 있어서 3균주 모두 penicillin, lincomycin에 대하여 내성을 나타냈으며,

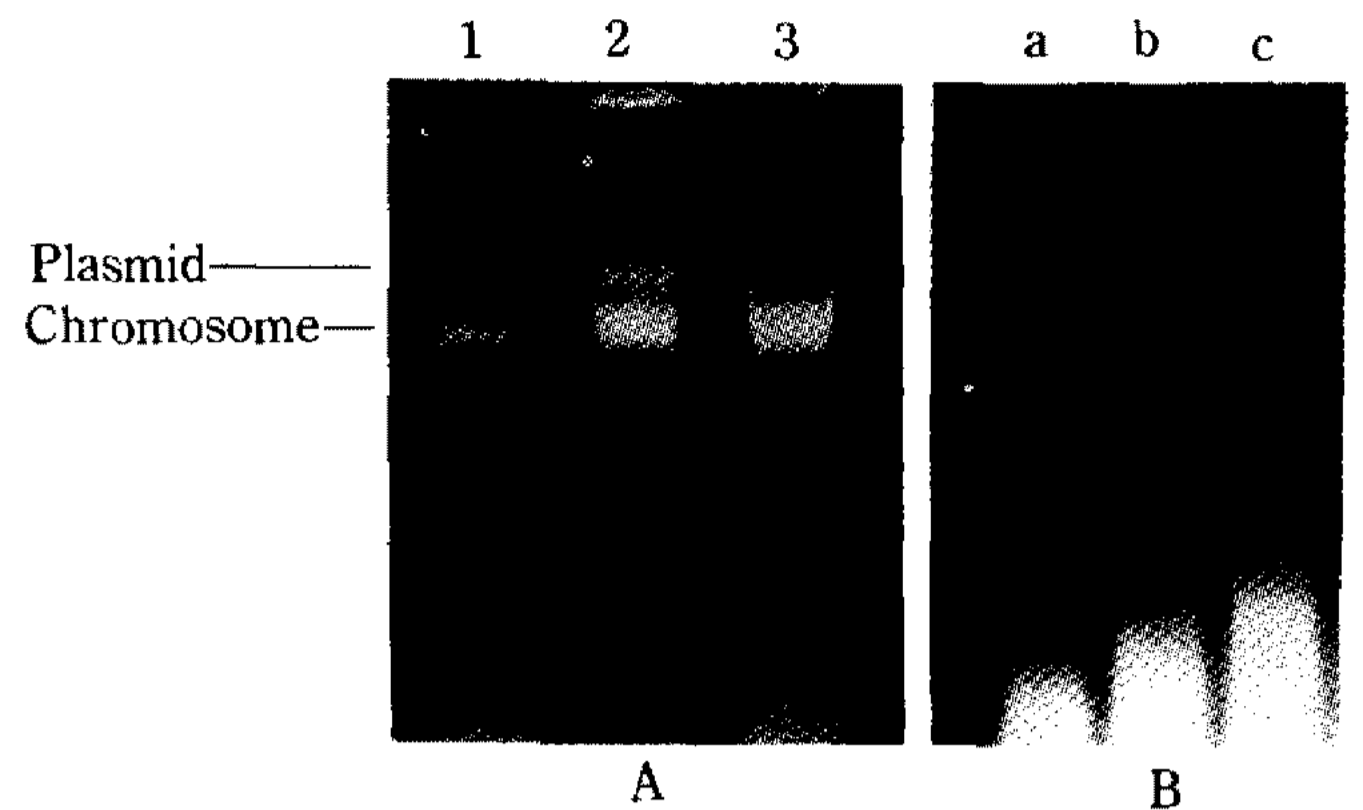


Fig. 5. Plasmid patterns of antagonistic bacteria against plant pathogenic *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (A) and mutants treated with plasmid curing agent (B). (A) lane 1: S4, lane 2: S14, lane 3: S65 (B) lane a: A-5, lane b: A-2, lane c: A-3

S4 균주의 경우는 erythromycin에 대하여, S14와 S65 균주의 경우는 vancomycin에 대하여서도 내성이 있었다. 전반적으로 분리길항균의 약제내성이 강하다고 할 수 있다. 이러한 내성은 이들 분리길항균이 갖고 있는 내성 관련 유전자의 내성획득기구를 통한 변이일 가능성이 높다.

분리길항균의 plasmid 분포양상 및 길항관련 유전자 확인

Plasmid DNA의 일반적인 특성은 chromosomal DNA에 비하여 genome의 크기가 적기 때문에 손상이 없는 DNA를 분리, 정제하여 이용할 수 있을 뿐만 아니라 유전자를 조작하기에 간편한 이점이 있다. 따라서 분리길항균의 plasmid DNA의 존재유무와 억제물질 생성관련 유전자의 소재를 확인하기 위하여 plasmid를 분리한 결과 Fig. 5의 A 그림과 같이 분리길항균중 S14 균주만이 chromosomal DNA보다 크기가 큰 단일 plasmid를 확인할 수 있었고 S14와 S65 균주는 plasmid를 확인할 수 없었다. 분리균들중 단일 plasmid를 갖고 있는 S14 균주를 선정하고 길항관련 유전자의 소재를 확인하기 위하여 plasmid의 복제를 저해하는 acridine orange를 처리하고(20) LB 배지에 희석도말하여 배양한 후 형성된 단일집락을 임의로 선택하여 plasmid를 분리한 결과, plasmid가 부분소거된 A-2, A-3, A-5의 집락을 Fig. 5의 B와 같이 얻었다. 이들 변이주의 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*에 대한 생육억제력을 조사한 결과, 모두 억제력이 있었다. Fig. 5의 B에서 보면 A-2와 A-3의 2균주는 chromosomal DNA만 확인할 수 있으나

A-5 균주는 plasmid DNA와 chromosomal DNA를 동시에 확인할 수 있다. 이는 S14 균주의 chromosomal DNA와 plasmid DNA 중 식물병원균의 생육을 억제하는 길항관련 유전자가 plasmid상에 있지 않고 chromosomal DNA상에 존재함을 간접적으로 증명하는 것으로서 최(21) 등의 인삼근부병균 길항세균의 길항관련 유전자와 이(22) 등의 고추역병균 길항세균인 *Pseudomonas* B-14 균주의 길항유전자가 chromosomal DNA상에 있음을 보고한 바 있다. 이상의 결과로 보아 본 실험에 사용된 *Pseudomonas*속의 S14 균주의 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 병원균에 대한 생육을 저해하는 길항관련 유전자는 chromosomal DNA상에 있음을 알 수 있다. 앞으로 길항관련 유전자를 보다 면밀하게 탐색하고 유전자 재조합 등으로 고효성 길항세균의 개발과 억제물질의 이용성을 높일 수 있는 방법의 개발에 더욱 많은 노력이 필요하다.

요 약

채소 등 작물의 부패균인 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*의 생육을 억제하는 길항세균을 경작지 표토층으로부터 분리하고 배양조건에 따른 억제력변화를 조사하고, 길항관련 유전자의 소재를 확인하였다. 분리균들중 가장 우수한 억제력을 갖는 S4, S14, S65 균주를 최종 선발하고 *Pseudomonas* 근연종으로 동정하였다. 523 배지를 사용하여 배양조건에 따른 억제력변화를 조사한 결과 배지초기 pH를 7~8로 조정하여 30°C에서 3일간 배양하였을 때 가장 높은 억제력을 보였고, 배지성분중 탄소원으로 mannitol과 sorbitol, 무기염으로 CaCl₂를 첨가 배양했을 때 효과적이었으나 질소원에 대한 감수성은 낮았다. 분리균들의 토양정착시 시비에 의한 효과가 있었으며, benomyl, fosetyl-Al-folpet, penicillin, lincomycin 등의 화학농약 및 항생물질에 대한 내성이 있었다. 이들의 DNA 분포양상은 S14 균주만 plasmid DNA를 확인할 수 있었고 길항관련 유전자는 chromosomal DNA에 있음을 확인하였다.

감사의 글

이 논문은 1991년도 문교부 지원 학술연구진흥재단의 지방대 육성 학술연구보조비에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Bernard, K., H. Schrempf and W. Goebel. 1978. Bacteriocin and antibiotic resistance plasmid in *Bacillus creus* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **133**: 897-903.
- Bredley, D.E. 1967. Ultrastructure of bacteriophage and bacteriocins. *Bacteriol. Rev.* **31**: 230-314.
- 김교창, 육창수, 도대홍. 1990. Bacteriocin 생산유전자의 cloning 및 식물병원균에 대한 생물학적 억제. *산업미생물학회지* **18**: 98-102.
- Gratia, A. 1946. Techniques selectives pour la recherche systematique des germes antibiotiques. *C.R. Sciences Soc. Biol. Paris*, **140**: 1053-1055.
- Zink, R.T., R.J. Kemble and A.K. Chatterjee. 1984. Transposon Tn5 mutagenesis in *Erwinia* subsp. *carotovora* and *E. carotovora* subsp. *atroseptica*. *J. Bacteriol.* **157**: 809-814.
- Gantotti, B.V., K.L. Kindle and S.V. Beer. 1981. Transfer of the drug-resistance transposon Tn5 to *Erwinia herbicola* and the induction of insertion mutations. *Curr. Microbiol.* **6**: 377-381.
- Peet, R.C. P.B. Lindgren, D.K. Willis and N.J. Panopoulos. 1986. Identification and cloning of genes involved in phaseolotoxin production by *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *J. Bacteriol.* **166**: 1095-1105.
- Anderson, D.M. and D. Mills. 1985. The use of transposon mutagenesis in isolation of nutritional and virulence mutants in two pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Phytopathol.* **75**: 104-108.
- Peilin, X., L. Sally and S. Luis. 1988. Molecular cloning of genes that specify virulence in *Pseudomonas solanaccarum*. *J. Bacteriol.* **170**: 617-622.
- Tamaki, S.J., S. Gold, M. Robeson, S. Manulis and N.T. Keen. 1988. Structure and organization of the *pel* genes from *Erwinia chrysanthemi* EC16. *J. Bacteriol.* **170**: 3468-3478.
- Kado, C.I. and M.G. Heskett. 1970. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathol.* **60**: 969-976.
- Kavanagh, F. 1975. Antibiotic assays, Pp. 53-76. *In Methods in Enzymology*, Vol. 43, Academic Press, New York.
- Api 20NE Kit Manual. 1991.
- Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook. 1989. *Molecular Cloning*, Vol. 1, Pp. 1.25-1.28, 2nd ed., Cold Spring Harbor, New York.
- 이은호, 노영팔, 정연태. 1985. 고추연작지대 연작피해 경감에 관한 연구. *영시 시험연보*: 510-516.
- Haefeli, C., C. Franklin and K. Hardy. 1984. Pla-

- smid determined silver resistance in *Pseudomonas stutzeri* isolated from silver mine. *J. Bacteriol.* **158**: 389-392.
17. 조종택. 1976. 우리나라 시설원예의 병해현황과 그 방제대책 및 문제점. *한국식물보호학회지* **15**: 213-219.
 18. Barkker, K.F. 1987. Evolving concepts of biological control of plant pathogens. *Ann. Res. Phytopathol.* **25**: 67-85.
 19. James, D.W., D. Suslow and K.E. Steinbck. 1985. Relationship between rapid, "form adhesion" and long term colonization of roots by bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**: 392-397.
 20. Trevors, J.T. 1986. Plasmid curing in bacteria. *FEMS. Microbiol. Rev.* **32**: 149-157.
 21. 최광태, 김상달, 양덕춘, 박상달. 1986. 미생물농약 개발을 위한 기초연구. 유전공학연구보고서(인삼연초분야).
 22. 이재달, 구분성, 윤상홍, 김용환, 정태영, 유진경. 1988. 토양 병해 길항세균의 Plasmid 특성. 농시논문집(생물공학편), **30**: 34-43.

(Received March 27, 1992)