

콩나물 부패균의 검정을 위한 선택배지 개발

김형무* · 송원엽** · 김수현*** · 강미형*** · 박종철***

(*전북대학교 생물자원과학부 교수 · **전북대학교 생물자원과학부 post-doc ·

***전북대학교 생물자원과학부 대학원생)

A Selective Medium for Detecting *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in Soybean Seed

Hyung-Moo Kim* · Wan-Yeab Song** ·

Su-Hyun Kim*** · Mi-Hyung Kang*** · Jong-Cheol Park***

Faculty of Biological Resources Science, Coll. of Agri.,
Chonbuk Nat. Univ., Chonju 561-756, Korea

적 요

나물콩 종자에서 콩나물 무름병균인 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*의 검정을 위한 선택배지 (SSEC)를 개발하였다. 배지는 mannitol 10.0g, nicotinic acid 0.5g, L-asparagine 3.0g, K_2HPO_4 2.0g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g, 억제물질로는 0.1% bacitracin 1ml, 0.1% nitrofurantoin 1ml, 0.1% phenethicillin 1ml, tyrothricin 1ml, 염색물질로는 0.1% acridine orange 1ml, 0.1% methylene blue 1ml, 0.1% methyl violet 1ml 등으로 조성되었다. 선택배지에서 *E. carotovora* subsp. *carotovora*의 특징은 지름이 3-4mm의 원형으로 처음에는 집락이 오렌지색으로 변하였다가 나중에는 진한 청색으로 변하였다. 집락의 중앙에 분화구 같은 모양이며 동심운운을 형성하는 것이 다른 부생세균과 쉽게 구별되는 특성이 있었다. 선택배지에서 *E. carotovora* subsp. *carotovora*의 회수율은 KB배지와 비교하여 75%에서 94% (평균 84.1%)로 높았다. 또 선택배지에서 종자와 혼합시킨 *E. carotovora* subsp. *carotovora*의 회수율은 77.7%에서 86.6% (평균 81.9%)였다.

1. 서론

콩나물은 고려시대 이전부터 우리나라 전통식품으로 다른 식품에 비하여 특정 비타민의 함유량이 많은 식품으로 평가되어 왔으며, 최근 그 소비가 증가하는 추세를 보이고 있다. 소비의 급증으로 인하여 최근에는 콩나물의 재배가 기업화하는 경향을 보이고 있으며, 양질 다수성 나물콩의 품종 육성에 관한

연구가 주로 이루어지고 있다. 그러나 이와같은 추세와 함께 콩나물 재배시 부패병의 발생도 심각한 문제로 대두되고 있다.

콩나물 부패병은 대부분 콩종자에 존재하는 종자 전염성 병원균에 의해서 발병되는 종자전염성 병해이다. 종자에 의해서 발병되는 본 병해는 종자의 발아, 생장과 함께 병원체도 발아 번식하여 종자를 부패시키거나, 콩나물에 부패병을 일으켜 피해를 주고, 다음해 포장에서 1차 전염원으로 역할을 하며, 종자

의 원거리 운반과 함께 병원체도 이동하기 때문에 식물병리학적인 면에서 매우 중요시되고 있다.

일반적으로 세균은 곰팡이와 달리 종피내부에 침입하여 있는 경우가 많기 때문에 일반적인 농약처리나 간단한 열처리 방법으로 건전한 종자를 얻기 어려운 특징이 있다. 그러므로 종자가 세균에 감염되었을 경우, 종자로 사용되기 전에 선택배지를 이용한 종자검정 방법을 이용하여 종자의 박테리아 감염유무를 확인하여 건전한 종자만 사용하는 것이 병해의 피해를 감소시킬 수 있는 최선의 방법이다.

우리나라에서 콩나물에 부패증상이나 무름증상을 보이는 병해로는 *E. carotovora* subsp. *carotovora*에 의한 콩나물 무름병¹⁶⁾, *Pseudomonas* spp.에 의한 부패병^{14,15,16)}과 *Fusarium* spp.에 의한 부패병¹⁵⁾ 등이 보고되었으며, 외국에는 *Bacillus subtilis*와 기타 병원균에 의한 병해가 보고되어 있다^{5,20)}. 콩나물 부패병의 방제에 대한 연구는 주로 생물학적 방제와 환경조절에 의한 방제법이 보고되었다^{4,17,18,19)}. 콩종자에서 병원미생물의 검정방법으로는 Alvarez¹⁾와 Fett⁷⁾에 의하여 *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*의 검정방법이 보고되었을 뿐 콩나물 부패균의 검정방법에 대한 연구가 없다.

본 연구는 나물콩 종자와 콩나물에 무름병의 원인으로 보고된 *E. carotovora* subsp. *carotovora*를 검정할 수 있는 선택배지의 개발을 위하여 실시하였다. 본 연구를 통하여 개발된 선택배지를 이용하여 나물콩 종자에서 무름병균이 검출될 경우 콩나물재배에 사용하지 않으므로써 근본적으로 콩나물 무름병의 발생을 감소시킬 수 있을 것이다. 또 식물검역의 수단으로 국제간 무역에 의해서 수입되는 종자의 철저한 검사로 오염된 나물콩의 수입을 막음으로써 우리나라 콩 재배농가의 피해를 줄일 수 있을 것이다.

II. 재료 및 방법

1. 나물콩 품종

실험에 사용된 콩 [*Glycine max* (L.) Merr]은 국내에서 육성되어 콩나물 재배에 많이 이용되고 있는 대립종인 남해콩, 푸른콩, 명주나물콩 및 부광콩과 소립

종인 은하콩, 익산나물콩, 한국콩, 광안콩, 소백나물콩 및 한남콩 등 총 10개의 나물콩 품종을 사용하였다.

2. 공시균주

본 실험에 사용한 균주는 무름병증상을 보이는 콩나물에서 분리한 *E. carotovora* subsp. *carotovora*의 9개 균주 (A2, A3, A4, A6, A9, A12, A13, A15, A16)를 사용하였고, 공시세균은 King's medium B (KB)에 보관 및 배양하면서 실험에 사용하였다.

3. 선택배지 개발

공시한 9개의 균주를 대상으로 KB에 배양하면서 콩나물 무름병균의 검정을 위한 선택배지를 개발하였다. 선택배지는 콩나물 무름병균인 *E. carotovora* subsp. *carotovora*가 부생균과 비교하여 보다 쉽게 구별되고 특이성있는 특징을 나타내는 기본배지와 항생물질 및 염색물질 등을 선별한 후 상호조합하여 개발하였다.

기본배지 선별:

기본배지의 선별은 MS(13), (manitol, 10.0g; nicotinic acid, 0.5g; L-asparagine, 3.0g; K₂HPO₄, 2.0g; MgSO₄ · 7H₂O, 0.2g; sodium taurocholate, 2.5g; sodium heptadecyl sulfate, 0.1ml; nitrilotriacetic acid, 10ml; 0.2% bromothymol blue, 9ml; 0.5% neutral red, 2.5ml; agar, 20.0g; cyclohexamide, 50mg; 1.0% thallium nitrate, 1.75ml), CPG(8), (glucose, 10g; Bacto-peptone, 10g; Bacto-casamino acids, 1g; Bacto-agar, 18g), CVP(6), (1N NaOH, 9ml; 10% CaCl₂ · H₂O 6ml; 1.5% bromothymol blue, 1ml; Bacto-agar 30g; sodium polypectate, 30g. 0.075%; crystal violet, 2ml), MPM(6), (1N NaOH, 9ml; 10% CaCl₂ · H₂O 6ml; Bacto-agar 30g; Bacto-yeast extract, 0.1g; sodium polypectate, 30g; NaNO₃, 2g), PM(2), (1N NaOH, 9ml; 10% CaCl₂ · H₂O 6ml; 1.5% bromothymol blue, 1ml; Bacto-agar 30g; Bacto-yeast extract, 10g; sodium polypectate, 30g) 및 PT(3) (polygalacturonic

acid, 5.0g; NaNO₃, 1.0g; K₂HPO₄, 4.0g; MgSO₄ · 6H₂O, 0.2g; Ion agar, 9.0g; sodium heptadecyl sulfate, 0.1ml; 1N NaOH, 17ml) 배지 등 대상으로 항생물질과 염색물질을 제외한 각 배지에서 *E. carotovora* subsp. *carotovora*의 생장이 다른 배지보다 양호한 기본배지를 선발하였다. 실험에 사용한 콩나물 무름병균의 농도는 스펙트로포토미터 vis. 600nm에서 0.1로 수치로 조절한 후, 0.85% 생리식염수에 10⁶로 희석하여 1개의 페트리디쉬에 50-100개의 집락으로 조절된 접종원을 실험에 사용하였다.

항생물질 선발:

나물콩에 기생하는 부생세균들의 성장에는 억제력이 강하나, *E. carotovora* subsp. *carotovora*의 성장에는 억제력이 약한 항생물질을 선발하기 위하여 ampicillin, bacitracin, carbenicillin disodium salt, cephalixin, chloramphenicol, dithioerythritol, erythromycin, 5-fluorouracil, 5-fluoro-1-(tetrahydro-2-furyl)uracil, gentamycin, kanamycin, kasugamycin, neomycin sulfate, nitrofurantoin, novobiocin, novomycin, nystatin, penicillin G, phenethicillin, polymyxin B sulfate, rifampicin, sodium selenite, streptomycin, tetracyclin, tobramycin, trimethoprim, 2, 3, 5-triphenyl tetrazoliumchloride, tyrothricin, vancomycin 등의 항생물질을 대상으로 선발하였다.

나물콩 종자에 기생하는 세균 세포의 추출을 위하여 콩종자 120g (약 1,000립중)을 추출완충액 (PBS : Na₂HPO₄, 1.15g; K₂HPO₄, 0.5g; NaCl, 8.0g, pH 6.0)에 넣고 4°C에서 24시간 교반추출하여 얻은 나물콩 종자에 부생하는 세균을 수집하여 실험에 사용하였다.

항생물질은 콩나물 무름병원균과 부생세균을 KB에 분무접종 후 30분이 지난 다음 항생물질을 흡수시킨 여지원판을 배지에 올려 놓고 25°C에서 3일간 배양하여 미생물의 성장저지대를 조사하는 여지원판법 (Bacto concentration disk 1/4")으로 선발하였다. 항생물질의 농도는 각각 0.1 %로 조절하였다.

염색물질 선발:

선택배지에서 콩나물 무름병균과 부생세균의 집락

에 대한 특이성이 있고, 항생물질과 같이 생장에 영향을 주는 염색물질을 acridine orange, aniline blue, brilliant yellow, brilliant blue R, brilliant crecyl blue, bromocresol purple, bromphenol blue, bromthylmol blue, congo red, crystal violet, gentian violet B, malachite red, methylene blue, methyl green, methyl violet, neutral red, phenol red, phenol safranin, rose bengal, safranin O 및 trypan blue 등을 대상으로 선발하였다.

이상과 같은 과정을 통하여 최적 기본배지를 선정하고 항생물질과 염색물질을 조합하여 부생균으로부터 콩나물 무름병균의 구별이 쉬운 특이성이 있는 선택배지의 조성을 선발하였다.

4. 나물콩 종자에서 콩나물 무름병균의 회수

나물콩 종자는 남해콩의 9개의 품종을 각각 다른 장소에서 구별하여 수거하였으며, 나물콩 종자 120g을 수돗물에 수세하여 종자에 혼합된 이물질을 제거한 후 실험재료로 사용하였다. 종자에서 콩나물 무름병균의 회수는 일정농도로 조절된 *E. carotovora* subsp. *carotovora*를 120g의 나물콩 종자와 혼합후 0.1 M 인산완충액 800ml에 접종하여 4°C에서 24시간 침지후 KB와 선택배지에 도말 접종하여 9cm 피트리디쉬에 나타난 세균 집락의 수를 비교하여 회수율을 조사하였다.

III. 결과 및 고찰

선택배지 개발:

콩나물 무름병균인 *E. carotovora* subsp. *carotovora*의 배지상에서 집락의 특성, 부생 세균의 억제력과 나물콩 종자에서 본 병원균의 회수율을 KB배지와 비교하면서 선택배지를 개발하였다. 이결과 선발된 콩나물 무름병의 선택배지 SSEC는 mannitol 10.0g, nicotinic acid 0.5g, L-asparagine 3.0g, K₂HPO₄ 2.0g, MgSO₄ · 7H₂O 0.2g, 0.1% bacitracin 1ml, 0.1% nitrofurantoin 1ml, 0.1% phenethicillin 1ml, tyrothricin 1ml, 0.1% acridine orange 1ml, 0.1% methylene blue 1ml, 0.1% methyl violet 1ml 등으로 조성되었다.

본 실험 결과 개발된 SSEC 배지는 콩나물 무름병균인 *E. carotovora* subsp. *carotovora*의 성장에는 억제 효과가 약하나 부생하는 미생물에 대하여는 억제력이 강한 선택배지로 특이성 있는 우수한 배지였다. SSEC 배지에서 콩나물 무름병균인 *E. carotovora* subsp. *carotovora*의 집락은 다른 부생세균과 구별되는 특이적인 코로니 형태와 색을 나타냈다. SSEC 선택배지

에서 *E. carotovora* subsp. *carotovora* 집락의 특징은 처음에는 집락 근처의 배지가 오렌지색으로 변하였다가 나중에는 진한 청색으로 변하였다. 집락의 중앙에 분화구같이 움푹 들어가며 동심윤문을 형성하는 것이 다른 부생세균과 쉽게 구별되는 본 선택배지에서의 특성이었다(Fig. 1). 특히 선택배지 SSEC에서 본 병원균 집락과 부생박테리아는 서로 다른 형태,

Table 1. Source and recovery percentage of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* on the SSEC selective medium compared to KB

Isolate	Source	Mean recovery(%)
A2	soybean seed, Korea	75
A3	//	91
A4	//	81
A6	//	87
A9	//	85
A12	//	78
A13	//	76
A15	//	84
A16	//	94
Mean		84.1

Mean recovery = (the number of colonies recovered on SSEC selective medium / the number of colonies on KB medium) × 100.

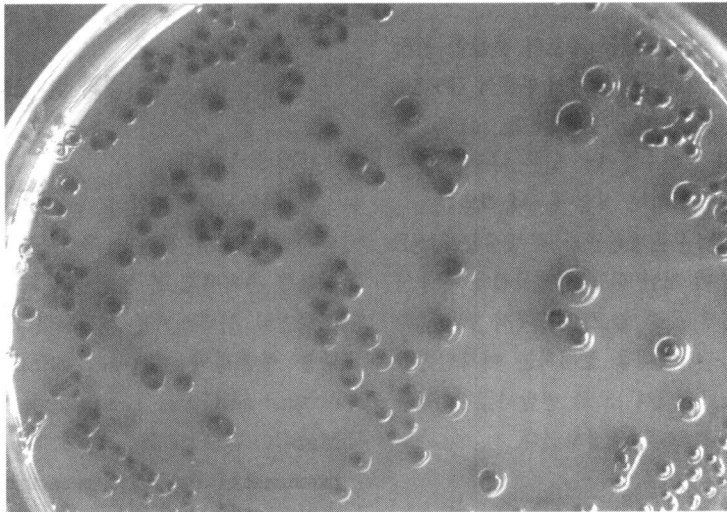


Fig. 1. Colonies of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* on the SSEC selective medium.

모양, 색 등에서 차이를 보여 이런 특징들이 뚜렷이 구별되므로 선택배지로서 우수하다고 생각된다.

본 실험에서 새로 개발된 SSEC 선택배지는 *E. carotovora* subsp. *carotovora* 균주의 성장에는 영향을 적게 주면서 나물콩 종자에 기생하는 부생세균의 생

장에는 억제력이 강하였다. *E. carotovora* subsp. *carotovora*의 선택배지에서 회수율은 84.1%로 비교적 높았다(Table 1). 벼종자에서 *Pseudomonas glumae*의 검정을 위한 선택배지에서도 회수율은 본 실험과 같은 경향을 나타낸 바 있다⁹⁾. 이와같은 결과는 본실험

Table 2. Suppression size of antibiotics against *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and saprophytic bacteria on KB

Antibiotics	<i>Erwinia carotovora</i> (mm)	Saprophytic bacteria (mm)
ampicillin	1.6	2
bacitracin	-	1
carbenicillin disodium salt	-	0.5
cephalexin	1.3	1.6
chloramphenicol	-	2
dithioerythritol	-	-
erythromycin	-	-
5-Fluorouracil	-	0.5
5-Fluro-1-(tetrahydro-2-furyl) urail	1.2	-
gentamycin	0.7	1.8
kanamycin	0.9	-
kasugamycin	1.1	0.8
neomycin sulfate	0.6	1.5
nitrofurantoin	-	0.5
novobiocin	0.3	0.6
novomycin	0.3	0.6
nystatin	0.05	-
penicillin G	0.5	0.6
phenithicillin	-	0.7
polymyxin B sulfate	0.25	1.5
rifampicin	0.7	1.6
sodium selenite	0.6	-
streptomycin	0.95	0.8
tetracyclin	1.7	1.2
tobramycin	0.6	1.2
trimethoprim	1.7	1.2
2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride	0.1	-
tyrothricin	-	0.5
vancomycin	0.1	-

에서 개발된 SSEC 선택배지는 *E. carotovora* subsp. *carotovora*군에 대하여 생장에 영향을 주지 않는 것으로 생각된다.

기본배지 선발:

CPG, CVP, PM, MPM, MS 및 PT 배지에서 *E. carotovora* subsp. *carotovora*의 생장을 조사하여 기본배지를 선발하였다. *E. carotovora* subsp. *carotovora*의 생장에 가장 양호한 배지는 MS 배지였다. MS배지는 다른 배지보다 *E. carotovora* subsp. *carotovora*의 세균 집락이 특이성이 있었고 생장도 양호하였다. 그러나 다른 배지에서는 *E. carotovora* subsp. *carotovora*의 생장이 낮고 세균의 집락도 특이적인 모양을 갖지 않아 선택배지로서 적합치 않았다. PT배지에서 *E.*

carotovora subsp. *carotovora*의 생장이 억제되었는데 이런 결과는 일부 토양이나 근권세균에 독성이 있다는 보고와 일치한다³⁾.

항생물질 선발:

여지원판법에 의해 29개의 항생물질을 대상으로 선발하였으며 항생물질의 선발은 *E. carotovora* subsp. *carotovora*의 생장에는 크게 영향을 주지않으면서 부생세균의 생장에는 억제력이 강한 항생물질을 선발하였다(Table 2). 항생물질의 생장 저지대를 조사하여 부생 세균에 대하여 0.5mm이상 생장에 저지력이 있는 항생물질중 *E. carotovora* subsp. *carotovora*의 생장에는 영향을 적게 주는 항생물질을 선발하였다. 선발된 항생물질로는 bacitracin, carbenicillin, nitro-

Table 3. Suppression size of dyes against *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and saprophytic bacteria on KB

Dye	<i>E. carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> (mm)	Saprophytic bacteria (mm)
acridine orange	-	0.5
aniline blue	-	-
brilliant yellow	-	-
brilliant blue R	0.1	-
brilliant crecyl blue	0.3	0.8
bromocresol purple	0.1	-
bromphenol blue	0.1	-
bromothymol blue	0.1	-
congo red	-	-
crystal violet	0.1	-
gentian violet B	-	-
malachite red	0.1	0.2
methylene blue	-	0.1
methyl green	-	-
methyl violet	-	0.1
neutral red	-	-
phenol red	0.1	-
phenol safranin	0.05	-
rose bengal	0.1	-
safranin O	0.1	-
trypan blue	0.05	-

furantoin, phenethicillin, tyrothricin가 *E. carotovora* subsp. *carotovora*의 성장에는 영향을 주지 않으면서 부생세균의 성장에는 억제력이 강한 항생물질로 선발되었다.

염색물질 선발:

E. carotovora subsp. *carotovora*에 대하여 특이성이 있으면서 성장에는 크게 영향을 주지 않으나 부생세균의 성장에는 억제력이 강한 염색물질을 선발하였다(Table 3). 공시된 염색액중 Acridine orange, methylene blue, methyl violet에 의해 균이 점차 옅어짐으로 되었다가 약 4일후에 다시 청색으로 돌아오는 현상을 보여 다른 부생균과 쉽게 구별할 수 있었다. Acridine orange, methylene blue, methyl violet이 첨가된 SSEC 배지는 *E. carotovora* subsp. *carotovora*의 성장에는 영향을 크게 주지 않았다.

4. 나물콩 종자에서 콩나물 무름병균의 회수

나물콩 종자에 인위적으로 일정농도로 현탁된 *E. carotovora* subsp. *carotovora*를 혼합시킨 후 선택배지에서의 회수율은 KB배지에 비교하여 77.7%에서 86.6% (평균 81.9%)로 높았다(Table 4). 이와같은 회수율을 타선택배지와 비교하면 같은 경향으로 나타났다^{9,10,11,12}.

참고문헌

1. Alvarez. E., E. J. Braun and D. C. McGee, 1995, New assays for detection of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* in soybean seed, Plant Disease 79, pp.12-15.
2. Beraha. L, 1968, A rapid method for the

Table 4. Reduction in the number of saprophytic bacteria isolated from different lots of soybean on selective media, SSEC, relative to KB

Cultivar	Mean CFU number of saprophytic bacteria	
	KB ^a	SSEC ^b
Ik san	112	25(77.7) ^z
Nam hae	160	29(82.0)
Fu reun	130	24(81.5)
Eun ha	150	30(80.0)
Han guk	120	18(85.0)
Bu kwang	105	21(80.0)
Han nam	112	15(86.6)
Kwang an	135	26(80.7)
So baek	114	22(80.7)
Myung ju	122	19(84.5)
Mean	126.1	22.9(81.9)

^aKing's medium B.

^bNewly developed selective medium for *E. carotovora* subsp. *carotovora*.

^zFigures in parentheses are reduction percent determined as follows:

$$100 - \frac{\text{No. of saprophytic bacteria colonies on selective media}}{\text{No. of saprophytic bacteria colonies on KB}} \times 100.$$

- preparation of semi-solid agar medium for detection of pectolytic enzyme activity in *Erwinia carotovora*, Plant Dis. Rep. 52, p.167.
3. Burr. T. J. and M. N. Schroth, 1977, Occurrence of soft-rot *Erwinia* spp. in soil and plant material, Phytopathology 67, pp.1382-1387.
 4. 최연식, 1995, 콩나물 부패경감을 위한 소주방법 개성과 식품첨가제이용, 영남대학교대학원 석사학위 논문.
 5. Chincclair. J. B. and P. A. Backman, 1989, Compendium of soybean diseases, APS.
 6. Cuppels. D. and A. Kelman, 1974, Evaluation of selective media for isolation of soft-rot bacteria from soil and plant tissue, Phytopathology 64, pp.468-475.
 7. Fett. W. F., 1979, Survival of *Pseudomonas glycinea* and *Xanthomonas phaseoli* var. *sojensis* in leaf debris and soybean seed in Brazil, Plant Dis. Rep. 63, pp.79-83.
 8. Kelman, A., 1954, The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium, Phytopathology 44, pp.693-695.
 9. 김형무, 송완엽, N. W. Schaad, 1993, 벼 종자에서 *Pseudomonas glumae*의 분리를 위한 선택배지, 한국식물병리학회지 9(4), pp.248-251.
 10. 김형무, 이광식, 1993, 수박 종자에서 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli*의 분리를 위한 선택배지, 전북대학교 농대논문집 36, pp.65-70.
 11. 김형무, 송완엽, 소인영, 이두구, 1994, 벼 종자에서 *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*의 분리를 위한 선택배지, 한국식물병리학회지 10, pp.13-17.
 12. Kim Hyung Moo, and N. W. Schaad, 1989, Modified tween medium for detecting *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in tomato seeds, Phytopathology 79, p.1140.
 13. Miller. T. D. and M. N. Schroth, 1973, Monitoring the epiphytic population of *Erwinia amylovora* on pear with a selective medium, Phytopathology 62, pp.1175-1182.
 14. 명인식, 1987, 콩나물부패의 원인과 방제, 고려대학교 대학원석사 학위논문.
 15. 오병준, 1989, 철분 및 염분이 콩나물 생육과 부패에 미치는 영향 및 콩나물 부패병균, 고려대학교 대학원 석사학위논문.
 16. 박종철, 송완엽, 김형무, 1997, *Erwinia carotovora*에 의한 콩나물 부패병, 한국식물병리학회지 13, pp.50-55.
 17. 박의호, 최연식, 1995, 콩나물 부패경감에 유용한 약제 선발, 한국작물학회지 40, pp.487-493.
 18. 박원목, 1990, 콩나물 부패의 원인과 대책, 두채 1(7), pp.4-9.
 19. 박원목, 명인식, 이용세, 1986, 콩나물 부패병의 생물학적 방제, 한국콩연구회지 3(2), pp.4-9.
 20. Tenne. F. D., Foor. S. R., and Sinclair. J. B., 1977, Association of *Bacillus subtilis* with soybean seeds, Seed Sci. Technol. 5, pp.763-769.