박테리옌을 분비하는 비병원성 돌연변이주에 의한 무름병 방제 효과

노은정 · 이승돈¹ · 허성기*농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부 유해생물과, ¹농촌진흥청 연구운영과Suppression Effect on Soft-rot by Bacteriocin-producing Avirulent *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc21-M15Eunjung Roh, Seungdon Lee¹ and Sunggi Heu*

Microbial Safety Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-707, Korea

¹Research Policy Bureau, RDA, Suwon 441-707, Korea

(Received on June 15, 2010; Accepted on July 1, 2010)

Pectobacterium carotovorum subsp. *carotovorum* causes soft rot disease in diverse plants. Carocin D is bacteriocin that is produced by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc21 strain. Nonpathogenic mutant *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc21-M15 strain was obtained by mutagenesis with Tn5 insertion and screened pathogenesis. *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc21-M15 and *E. coli* (pRG3431), carocin D gene-transformed *E. coli*, produce carocin D against *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc3. Pathogenic *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc3 and mixture with Pcc21-M15 or *E. coli* (pRG3431) were treated with lettuces. Pcc21-M15 and *E. coli* (pRG3431) effectively suppressed the development of soft-rot disease. While symptoms in 90% of Pcc3-treated lettuces were observed after 3 days, only 25% of Pcc3 and Pcc21-M15-treated lettuces were observed to be infected after 6 days. These results suggest that the nonpathogenic strain *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc21-M15 and *E. coli* (pRG3431) are effective to soft-rot disease suppression.

Keywords : Bacteriocin, Carocin D, Nonpathogenic mutant, *Pectobacterium*, Soft rot

세균성 무름병은 주요 채소작물에 병을 일으킨다. 다양하고 강력한 효소 기작으로 식물을 분해하여 병을 발생하며 생산, 이동 보관 시에 큰 손실을 야기한다(Whitehead 등, 2002). 배추를 포함하는 야채에 무름병을 발생시키는 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*은 생장 적온이 26-28°C이나, 다른 식물 병원 세균과는 달리 상온인 36°C 정도에서도 잘 자라, 여름철 배추 생산에 가장 큰 장애 요인이다. 무름병균은 배추를 비롯하여 거의 모든 식물에 침입하여 발병할 수 있는데, 한번 침입하면 주변의 다른 채소로 옮겨가 발병하며 계속 병을 전파한다. 또한 채소의 재배 시기뿐 아니라 이동 보관 시에도 신선 채소 등에 무름병이 발병한다. 이러한 채소무름병은 신선 채소 재배 및 유통에서 가장 피해가 큰 병원균으로 오랫동안

안 알려져 왔으나 병원균인 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*은 토양에서 비교적 오랫동안 생존이 가능하며, 농약에 의한 방제 효과도 일반적으로 낮아 새로운 방제법 개발이 요구되어져 왔다.

대부분 가공처리 없이 섭취하는 신선채소 특성상 친환경적이면서도 효과적인 방제기술 개발이 시급한데, 지금까지 각종 작물의 병 방제는 주로 저항성 품종의 개발과 농약 사용에 의한 화학적 약제에 의존하였지만 최근에는 생물학적 방제 기법이 대두되고 있다. 이러한 방제법은 병원균에 대해 길항 및 경쟁 미생물을 분리하여 배양한 후, 토양, 종자 또는 식물체에 직접 처리하여 그대로 병원균의 침입을 막거나 살균 물질을 분비하여 병원성 세균의 증식을 억제하는 방법이다.

박테리옌은 세균의 유전자로부터 직접 생합성되어 분비하는 단백질성 항균물질로서 동종이나 근연종의 세균에 대해 특이적인 생장억제 활성을 가지는 물질이다(Taggs 등, 1976). 식물 병원성 세균에 작용하는 박테리옌은 유

*Corresponding author

Phone) +82-31-290-0455, Fax) +82-31-290-0407

Email) heu@rda.go.kr

해 병균에만 특이적으로 살균 효과를 보이고, 유익한 역할을 하는 균들에게는 무해한 특성을 가지고 있어서 생물 농약으로 매우 유용하다(Riley 등 1998; Riley와 Gordon, 1999). 또한, 자체 독성이 없고, 장내세균이나 소화효소에 의해 분해되며, 생리적 pH에서는 불용성인 특징으로 인해 식품에 안전하게 사용할 수 있는 특징이 있다. 식물병원균 중에서는 *Corynebacteria*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* 등에서 박테리오킨의 생산이 보고되었다(Abreham와 Zamiri, 1985; Chuang 등, 2007; Heu 등, 2001; Lavermicocca 등, 2002). 또한 *Agrobacterium radiobacter* 84균주가 생산하는 Agrocin 84의 경우에는 효과적인 생물학적 제제로서 널리 이용되고 있다(Kerr와 Tate, 1984; McClure 등, 1998).

본 연구진은 이미 국내에서 분리한 여러 무름병균에 방제 효과가 있는 박테리오킨을 분비하는 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc21 균주를 선발하였으며(Roh 등, 2009), 특이적인 박테리오킨 유전자를 분리하였다(Roh 등, 2010). 본 연구는 박테리오킨을 생성하는 Pcc21 균주를 대상으로 비병원성 균주를 선발하였고, 그 균주를 이용하여 무름병 방제효과를 유도하고자 수행되었다.

재료 및 방법

무름병균의 분리와 동정. 강원도, 전라남도, 충청남도, 전라북도, 충청북도, 제주도의 배추, 감자, 무, 상추, 당근, 토마토의 재배지에서 토양과 병든 식물체를 수집하였다. 식물체는 병이 진행되고 있는 부분을 칼로 절단해 표면 살균한 뒤, 선택배지에서 분리하였으며, 분리된 균은 Biolog와 지방산 분석을 통하여 동정하였다.

1) Biolog를 이용한 분리균의 동정. 분리된 세균을 BACTOTRYPTIC Soy Agar(TSBA, BD211825) 배지에 접종하여 28°C에서 24-48시간 배양한 후, 신선한 균총을 면봉으로 채취하여 GN/GP-IF(0.40% sodium chloride, 0.03% pluronic F-68, 0.01% gallan gum) 용액에 5×10^8 cfu/ml 농도로 현탁시킨 후, 각각 GN2 microplate(BIOLOG, USA) 150 μ l씩 분주하여 배양하였다. 24-48시간 배양 후 Biolog 시스템을 이용하여 분석 및 동정하였는데, 그 결과 98%의 유사도로 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*으로 동정되었다.

2) 지방산 분석법을 이용한 분리균의 동정. 지방산 분석은 밀러(Miller, 1982)의 방법에 따라 수행하였다. 분리된 무름병균을 트립티카제 소이 아가(Trypticase Soy Agar, TSA) 배지에서 배양하고, 배양된 세균을 40 mg 정도 채취한 후, 지질의 비누화 반응을 위하여 시약(NaOH 45 g,

methanol 150 ml, 증류수 150 ml) 1 ml를 첨가하고 완전히 혼합하여 100°C에서 25분간 반응시켰다. 그 후, 찬물에 급랭시키고 시약 II(6 N HCl 325 ml, methanol 275 ml)를 2 ml씩 첨가하여 혼합하고 80°C에서 10분간 반응시켜 메틸화하였다. 그 후, 다시 찬물에 급랭시키고, 추출 용매(hexane:methyl-tertbutyether=1:1, v/v)를 1.25 ml 첨가하고 10분간 부드럽게 진탕하였다. 분리된 층에서 아래층 부분을 제거하고, 시약(NaOH 10.8 g, 3차 증류수 900 ml)를 3 ml씩 첨가하고, 5분 동안 부드럽게 섞어준 후 층이 완전히 분리될 때까지 방치하였다. 층이 완전히 분리되면 아래층 액이 섞이지 않도록 상층액을 GC 분석용 병으로 옮겼다. 지방산 분은 'MIDI Library version TABA 3.90'과 'Library Generation system software version 3.90'을 이용하여 분석하였다.

비병원성 돌연변이체 제조. 박테리오킨 검정을 통해 선발한 균주 Pcc21의 비병원성 돌연변이체를 선발하기 위하여 EZ-Tn5<R6K γ ori/KAN-2>Tnp Transposome kit(Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA)을 이용한 무작위 돌연변이법을 이용하였다. Transposome complex는 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc21 균주에 electroporation으로 형질 전환시킨 후 kanamycin과 rifampicin(각각 50 mg/l)이 첨가된 LB 배지에 도말하여 5,000여 개의 돌연변이 라이브러리 균주들을 확보하였다.

병원성 검정. 상기에서 분리한 비병원성 무름병균의 병원성을 검정하였다. 비병원성 돌연변이체의 현탁액을 시중에서 판매하고 있는 배추를 비롯한 각종 쌈야채에 주사기로 상처를 낸 후 50 μ l씩 접종하였으며, 대조구로 돌연변이체의 모균주인 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc21와 *E. coli*(pRG3431)을 동일한 방법으로 접종하였다.

박테리오킨 활성 검정. 지시균주(indicator strain)를 LB 액체배지(10 g of tryptone, 5 g of yeast extract, and 10 g of NaCl in 1 liter, pH 7.2) 5 ml에 접종하여 28°C에서 16-20시간 동안 200 rpm으로 진탕 배양 하였으며, 박테리오킨 활성을 측정하고자 하는 균주들(producer bacteria)은 최종 농도가 0.2 μ g/ml가 되게 마이토마이신 C(mitomycin C)를 첨가한 LB 고체배지에 지름 약 0.3 cm 정도로 점을 찍어 접종하여 28°C에서 16-20시간 동안 배양하였다. 클로로포름 500 μ l를 고체배지의 뚜껑에 떨어뜨리고 5분간 뚜껑을 닫아 세포를 용해시키고, 10분간 건조시켜 클로로포름을 완전히 건조하였다. Soft agar(LB, 0.7% agar, 50°C) 7 ml에 지시균주(O.D=0.1) 100 μ l을 혼합하여 10분간 건조시킨 뒤, 28°C에서 20시간 배양하여 투명한 생장 저지환의 여부(bacteriocin activity)를 관찰하였다(Morgan 등, 1995).

방제효과 검정. 분리한 비병원성 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc21-M15의 무름병 억제력을 검정하기 위해 온실에서 억제력 검정을 하였다. 5품종(‘뚝섬적측면’, ‘선풍포참’, ‘센세이션’, ‘청치마’, ‘삼선적측면’)의 상추를 이용하여 비병원성 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc21-M15 균주의 무름병 억제력을 검정하기 위한 접종 실험을 수행하였다. 5품종의 상추 종자를 파종하여 발아한 유묘를 2주간 온실에서 키운 후 미네랄오일 접종법으로 방제효과를 검정하였다. *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc21-M15(10^8 cells/ml, 10 mM $MgCl_2$) 현탁액을 5%의 미네랄 오일과 혼합하여 분무 접종하고, 마른 후 병원성 무름병균인 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc3(10^8 cells/ml, 10 mM $MgCl_2$) 현탁액을 5%의 미네랄 오일과 혼합하여 분무 접종하였다. 대조군으로는 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc21-M15와 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc3 각각의 (10^8 cells/ml, 10 mM $MgCl_2$) 현탁액을 5%의 미네랄 오일과 혼합하여 분무 접종하였다. 또한 박테리옌 유전자를 형질전환한 비병원성 *E. coli* BL21 균주 *E. coli*(pRG3431) (Roh 등, 2010, submitted)을 이용한 무름병 억제력을 검정하기 위해 5품종의 상추에 대하여 동일한 실험을 수행하였다. 대조군으로는 *E. coli* (pRG3431)과 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc3 각각의 (10^8 cells/ml, 10 mM $MgCl_2$) 현탁액을 5%의 미네랄 오일과 혼합하여 분무 접종하였다.

결과 및 고찰

비병원성 돌연변이주의 선발. 이전 연구에서 제주도를 포함한 전국에서 분리된 무름병균들 중에서 새로운 박테리옌인 carocin D를 생산하는 균주로 선발된 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc21를 대상으로 transposon 삽입 돌연변이 라이브러리를 제작하였다. Transposon과 transposase의 결합체인 transposome은 모균주인 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc21 내부에서 염색체내로 무작위적으로 삽입되어 삽입부위 유전자의 발현을 억제하기 때문에 염색체 내의 미지의 특정 유전자를 추적하는데 효과적인 방법이다. Tn5가 삽입된 5,000개의 돌연변이체는 각각 비병원성 돌연변이주를 선발하기 위해 모균주인 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc21를 대조군으로 하여 병원성 검정을 수행하였다. 최종적으로 선발된 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc21-M15 돌연변이체는 배추를 포함한 다양한 야채에 병을 일으키지 않았다. 또한 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc21로부터 분리한 박테리옌인 carocin D 유전자 형질전환 균주인 *E. coli*(pRG3431) 역

Fig. 1. Disease symptoms on Chinese cabbage by mechanical inoculation of *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc21-M15 and *E. coli* (pRG3431). *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc21 was inoculated as a positive control.

Fig. 2. Antibacterial activity of Tn5 insertion mutant Pcc21-M15 of *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc21 against the indicator strain Pcc3. Pcc21, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc21, Pcc21-M15 and *E. coli* (pRG3431). The photo was taken 24 h after the indicator strain had been overlaid.

시 비병원성인 것을 확인하였다(Fig. 1).

비병원성 돌연변이주의 박테리옌 활성 확인. 비병원성 돌연변이체인 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc21-M15가 모균주와 마찬가지로 carocin D를 생산하여 무름병균인 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc3을 지시균주하여 박테리옌 활성을 확인하였다(Fig. 2). 각각 모균주인 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc21와 *E. coli*(RG3431)을 대조군으로 하여 박테리옌 활성의 정도를 비교한 결과 돌연변이체인 Pcc21-M15는 박테리옌 활성에는 변화가 없다는 것을 확인하였다.

비병원성 돌연변이주의 무름병 방제효과. 비병원성과 carocin D 활성이 확인된 Pcc21-M15 돌연변이체와 carocin D 형질전환체인 *E. coli*(RG3431)의 무름병 방제효과를 확인하기 위하여 5품종의 상추를 대상으로 실험을 수행하였다. 무름병균인 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc3을 단독 접종한 상추에서는 5품종에서 모두 접종 2일 후에는 전체의 61%에서 무름병이 발생하였고, 3일 후에는 병 발생이 증가하여 90%의 상추에서 무름병이 발생하였다. 그러나 비병원성인 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc21-M15 균주와 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc3 균주를 혼합 접종한 경우 4일째까지 병이 전혀 발

Fig. 3. Control effect of Tn5 insertion mutant *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc21-M15 on soft-rot after 2 and 6 days of spray treatment.

Fig. 4. Control effect of *E. coli* (pRG3431) on soft-rot after 2 and 6 days of spray treatment.

생하지 않았으며, 6일 후에 25%의 상추에 병이 발생하였다(Fig. 3). 마찬가지로 *E. coli*(pRG3431) 균주와 *P.*

carotovorum subsp. *carotovorum* Pcc3 균주를 혼합접종 한 처리에서는 4일 후에는 병이 전혀 발생하지 않았으며 6일 후에 25%의 배추에 병이 발생하였다(Fig. 4). 상기의 결과들에 의하면 식물세포벽을 분해하는데 필수적인 여러 효소들의 발현 조절에 밀접한 관계가 있는 *expR* 유전자 내로 Tn5가 삽입된 돌연변이체 Pcc21-M15는 비병원성을 나타낸다. 또한 quorum sensing에 의한 발현조절을 받지 않는 carocin D는 Pcc21-M15 돌연변이 체에서도 모균주와 같이 발현되는 것을 확인하였다. 또한 Pcc21-M15는 선발을 위해 사용한 항생제인 kanamycin의 존재없이도 Pcc21 모균주의 염색체 내로 삽입된 Tn5는 transposase의 존재 없이는 안정적이므로 비병원성을 지속적으로 유지하게 된다. 따라서 무름병의 방제를 위한 돌연변이체 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc21-M15는 우수한 길항능력을 가진 미생물제제로 활용될 수 있다.

요 약

Pectobacterium carotovorum subsp. *carotovorum*은 채소 무름병의 원인균이다. 박테리오파지 carocin D는 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum* Pcc21 균주가 생산한다. Pcc21 균주의 비병원성인 돌연변이주를 선발하기 위해 Tn5를 이용하여 무작위적 삽입 돌연변이체들을 대상으로 병원성 검사를 하였다. 실험 결과 선발된 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc21-M15과 carocin D 유전자의 형질전환체인 *E. coli*(pRG3431)은 비병원성인 동시에 carocin D를 생산하여 무름병균인 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc3의 성장을 억제함을 확인하였다. Pcc21-M15와 *E. coli* (pRG3431)를 무름병균인 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc3과 함께 미네랄 오일법으로 상추에 처리한 결과 Pcc3 균주를 단독 처리했을 경우에는 3일 만에 90%가 무름병에 걸린 반면, Pcc21-M15와 *E. coli*(pRG3431)를 함께 처리한 경우는 6일 후에도 25%의 상추에서만 무름병 증상을 보였다.

감사의 말씀

본 연구는 농촌진흥청의 바이오그린 21(Code # 20070301034035) 연구비 지원에 의한 결과입니다.

참고문헌

Abreham, K. and Zamiri, I. 1985. Purification and characterization of a *Corynebacterium ulcerans* bacteriocin

- (ulceracin 378). *J. Gen. Microbiol.* 131: 707-713.
- Chuang, D. Y., Chien, Y. C. and Wu, H. P. 2007. Cloning and expression of the *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* gene encoding the low-molecular-weight bacteriocin carocin S1. *J. Bacteriol.* 189: 620-626.
- Heu, S., Oh, J., Kang, Y., Ryu, S., Cho, S. K., Cho, Y. and Cho, M. 2001. Gly gene cloning and expression and purification of glycinecin A, a bacteriocin produced by *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* 8ra. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4105-4110.
- Kerr, A. and Tate, M. E. 1984. Agrocins and the biological control of crown gall. *Microbiol. Sci.* 1: 1-4.
- Lavermicocca, P., Lonigro, S. L., Valerio, F., Evidente, A. and Visconti, A. 2002. Reduction of olive knot disease by a bacteriocin from *Pseudomonas syringae* pv. *ciccaronei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1403-1407.
- McClure, N. C., Ahmadi, A. R. and Clare, B. G. 1998. Construction of a range of derivatives of the biological control strain agrobacterium rhizogenes K84: a study of factors involved in biological control of crown gall disease. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3977-3982.
- Morgan, S., Ross, R. P. and Hill, C. 1995. Bacteriolytic activity caused by the presence of a novel lactococcal plasmid encoding lactococcins A, B, and M. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2995-3001.
- Riley, M. A. 1998. Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. *Annu. Rev. Genet.* 32: 255-278.
- Riley, M. A. and Gordon, D. M. 1999. The ecological role of bacteriocins in bacterial competition. *Trends Microbiol.* 7: 129-133.
- Roh, E., Lee, S., Lee, Y., Ra, D., Choi, J., Moon, E. and Heu, S. 2009. Diverse Antibacterial activity of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* isolated in Korea. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19: 42-50.
- Roh, E., Park, T., Lee, S., Ryu, S., Oh, C., Kim, D., Park, B. and Heu, S. 2010. Characterization of a new bacteriocin, carocin D, from *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc21. *Appl. Environ. Microbiol.* (submitted).
- Tagg, J. R., Dajani, A. S. and Wannamaker, L. W. 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* 40: 722-756.
- Whitehead, N. A., Byers, J. T., Commander, P., Corbett, M. J., Coulthurst, S. J., Everson, L., Harris, A. K., Pemberton, C. L., Simpson, N. J., Slater, H., Smith, D. S., Welch, M., Williamson, N. and Salmond, G. P. 2002. The regulation of virulence in phytopathogenic *Erwinia* species: quorum sensing, antibiotics and ecological considerations. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81: 223-231.