

人蔘赤腐病原菌(*Erwinia carotovora*)의 營養生理學의 研究

劉 炳 瑞 · 李 敏 雄 · 李 址 烈* · 崔惠貞

(東國大學校 大學院 應用生物學科, 서울女子大學 教養學科*)

The Nutritional Physiology of Red Rotting of Ginseng caused by *Erwinia carotovora*

YU, Byeong Seo, Min Woong LEE, Ji Yul LEE* and Hae Jung CHOI

(Dept. of Applied Biology, Graduate School of Dongguk University,

*Dept. of General Education, Seoul Women's College, Seoul, Korea)

ABSTRACT

As a basic study to elucidate nutritional physiology and composition of synthetic medium of red rotting bacteria, *Erwinia carotovora*, of ginseng, the effects of hydrogen ion concentration, various kinds of carbon sources, nitrogen sources, micrometallic salts and its concentration on the growth of the bacteria were investigated and the results were as follows. Optimal pH in the basal medium for the growth of the bacteria was 6.5. After incubation the pH in culture media was neutralized. Among the various kinds of carbon sources, sucrose, glucose and fructose had the best effect on the growth and were followed by galactose, maltose and mannitol, but organic acids were not utilized effectively as nutrients. After incubation the pH turned acidic. Alanine as organic nitrogen sources and ammonium sulfate as inorganic nitrogen promoted the growth, but L-valine and sodium nitrite were the least effective. Ferric chloride 1.0mg/dl and ferrous sulfate 100mg/dl were the most effective as micrometallic sources. Control and boric acid were the least effective. New synthetic medium based on the above results was follows: Alanine 1.0g, KH_2PO_4 1.0g, sucrose 30.0g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.0mg, thiamine 200 μg , and distilled water 1000ml, pH6.5.

緒 論

人蔘은 五加科(Araliaceae), 人蔘屬(*Panax*)에 속하는 多年生 宿根性 植物로서, 우리나라 人蔘은 特히 高麗人蔘(*Panax ginseng* C.A. Meyer)의 명칭으로 全世界에 알려져 있으며 最近에는 長壽健康食品으로서 그 價値가 높히 評價되고 外貨획득에도 一翼을 차지하고 있다.

그러나 人蔘은 特殊한 條件 즉 항시 그늘지고

濕한 環境에서 4~6年間 栽培되고 있기 때문에 栽培期間동안 土壤微生物에 依한 病害를 입기 쉬우며 缺株率도 增加된다(李 1979, 朴 1979, 吳 1981).

이러한 條件下에서 一般的으로 發病하는 疾病의 하나가 *Erwinia carotovora*에 依한 赤腐病이라고 알려졌다.

Van Hook(1904)에 依하면 赤腐病에 걸린 美國人蔘(*Panax quinquefolia* L.)의 뿌리에는 細菌과 *Fusarium* sp.가 많았다고 하였으며 Whe-

tzel 等(1912)은 人蓼에 發病하는 軟腐의 病徵은 菜蔬類의 軟腐와 類似하고 特히 濕한 土壤에서 被害가 甚하다고 하였다.

鄭(1972)은 배추에서 分離된 배추 무름병균(*Erwinia carotovora*)의 人蓼뿌리에 對한 病原性을 확인하였으며, 李(1975)는 *Pseudomonas fluorescens*가 軟腐病原菌이라고 하였다. 鄭·李(1977, 1978)는 病徵과 病原菌을 再檢討한 結果 菜蔬의 軟腐病(*Erwinia carotovora*)과 같다고 하였으며, *Pseudomonas fluorescens*와 *Erwinia carotovora*에 依하여 人蓼뿌리를 썩히는 病名을 腐敗病으로 同定함이 타당하다고 하였고 李(1979)는 *Erwinia carotovora*가 赤腐病을 일으킨다고 報告한 바 있다.

病原菌의 寄生은 寄主에서 營養物質을 取하여 生活하므로 寄主의 營養物質自體가 寄生菌의 生長에 直接的인 影響을 준다.

그러므로 本 研究은 人蓼에 被害를 주는 本病原菌에 對한 가장 適合한 合成培地와 營養生理에 關한 基礎的인 問題들을 究明하기 위하여 1981年 3月부터 9月에 걸쳐 遂行되었다.

材料 및 方法

1. 實驗材料

(1) 供試菌: 東國大學校 微生物 研究室에서 純粹分離 培養하여 保管중인 李(1979)의 菌株(*Erwinia carotovora*)를 使用하였다.

(2) 基本培地: 金(1969)의 方法에 依하여 다음과 같이 調劑하였다.

Asparagin	1.0g
KH ₂ PO ₄	1.0g
Glucose	30.0g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5g
FeCl ₃ ·6H ₂ O	1.0mg
Thiamine	200.0mg
Distilled Water	1,000ml(pH6.5)

(3) 接種菌株: 純粹分離된 菌株을 28°C에서 nutrient agar medium에 3日 培養한 다음, 培地의 斜面에 滅菌蒸溜水를 加하여 얻은 細菌浮遊液을 4000rpm에서 30分間 遠心分離하여 3回 洗淨하였으며, 分光光度計(spectronic 20, spectrophotometer)의 波長 640nm에서 透過率

10%의 細菌 浮遊液을 만들어 使用하였다.

2. 實驗方法

(1) 接種 및 培養: 基本培地 5ml를 試驗管에 넣고 1ml pipette으로 接種菌株을 1滴씩 培地에 接種하였으며 28°C에서 靜置培養하였다. 培養開始後 7日에 混濁度를 分光光度計로 測定하였으며 水素 ion 濃度도 測定하였다. 또한 每 實驗마다 3回 反復하였으며 그 結果를 平均처리하였다.

(2) 生育과 水素ion濃度の 影響: 試驗管에 基本培地液 5ml씩 分注하고 間歇滅菌器에서 3日間 滅菌後 培養 開始의 水素 濃度를 0.1N HCl과 0.1N NaOH를 使用하여 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 가 되도록 glass electrode pH meter를 利用하여 조절하였으며, 菌接種後 7日間 培養하였고 培養後 다시 水素ion濃度도 測定하였다.

(3) 生育과 炭素源의 影響: 各 炭素源의 添加量은 基本培地의 glucose의 量과 等量이 되도록 하였다.

供試 炭素源으로는 單糖類로서 glucose, fructose, galactose, 二糖類로서 lactose, maltose, sucrose, 多糖類로서 soluble starch, inulin, 高級 alcohol類로서 mannitol, glycerine, 有機酸으로는 formic acid, acetic acid, succinic acid, oxalic acid, citric acid, lactic acid를 使用하였으며 培養後 水素ion濃度도 測定하였다.

(4) 生育과 窒素源의 影響: 各 窒素源의 添加量은 基本培地의 asparagin의 量과 等量이 되도록 添加하였다. 供試 窒素源으로는 有機窒素源으로 asparagin, DL-threonine, L-aspartic acid, alanine, lysine hydrochloride, L-phenylalanine, L-valine, L-methionine, arginine hydrochloride, L-histidine, L-isoleucine, L-cystine, L-glutamic acid를 使用하였고 無機窒素源으로는 KNO₃, NaNO₃, (NH₄)₂SO₄, NH₂NO₃, NaNO₂를 使用하였으며 培養後 水素ion濃度도 測定하였다.

(5) 生育과 微量金屬源의 影響: 微量金屬源으로는 FeSO₄, ZnSO₄, CaCl₂·6H₂O, CuSO₄·7H₂O, FeCl₃, MgCl₂, MnSO₄, NaMoO₄, H₃BO₃를 使用하였으며 基本培地液 100ml에 對하여 100mg, 10mg, 1.0mg, 0.1mg, 0.01mg의 各 濃度로 添加하여 實驗하였으며, 또한 微量金屬源이 本 菌

의生育에影響을 주는가를 알기 위하여 對照區로서 無添加區를 두었다. 또한 培養後의 水素ion濃度도 測定하였다.

(6) 基本培地와 合成培地上에서 生育의 差異: 菌生育에 많은 影響을 주는 營養源을 모아서 만든 合成培地로서 alanine 1.0g, KH_2PO_4 1.0g, sucrose 30.0g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.0mg, thiamine HCl 200 γ g, 蒸溜水 1,000ml (pH6.5)를 使用하여 基本培地보다 生育이 良好한가를 알기 위한 實驗을 하였다.

結果 및 考察

1) 生育과 水素ion濃度の 影響: 各 水素ion濃도가 本菌의 生育에 미치는 影響과 培養後 水素ion濃度の 變化에 對한 效果는 Fig.1.과 같다.

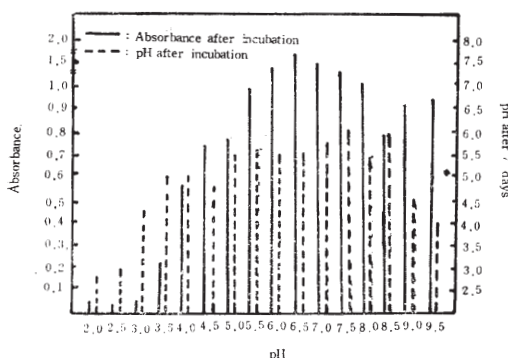


Fig. 1. The effect of various pH on growth of the bacteria

金等(1969)은 pH7.0~7.5인 中性 내지 약 알칼리에서 *Erwinia araliavora*의 生育이 좋다고 하였고 吳等(1979)은 軟腐를 일으키는 *Erwinia carotovora*는 alkali性 土壤에서 많이 發生한다고 하였다. 또 李(1975, 1979)는 *Pseudomonas* sp.와 赤腐病原菌의 最適 pH는 6.5~7.0이라 하였다. 本菌의 生育은 pH6.5에서 가장 良好하였으며 pH2.0~3.5에서 가장 不良하였다.

또 水素ion濃度の 變化는 一般의으로 酸性培地(pH5.5 이하)에서는 alkali化하였고 alkali性培地에서는 酸性化하는 傾向을 보였다. 이와같이 供試菌株은 一般 細菌의 生育關係와 一致한다고 생각된다.

2) 生育과 炭素源의 影響: 各種 炭素源이 本菌의 生育에 미치는 影響 및 培養後 水素ion濃度の 變化에 對한 效果는 Fig.2와 같다.

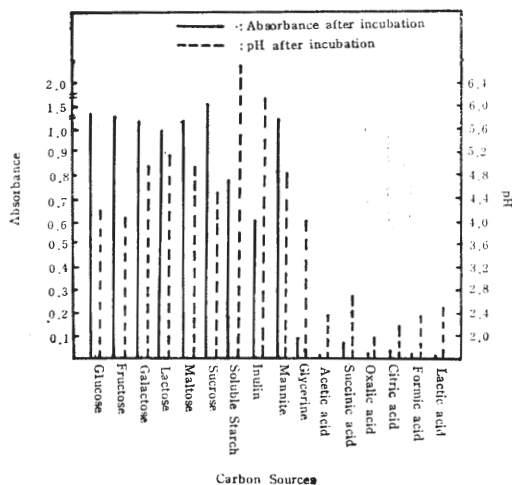


Fig. 2. The effect of various carbon sources on growth of the bacteria

Fig.2에 依하면 sucrose의 添加條件下에서 生育이 가장 良好하였으며, glucose, fructose, galactose의 順으로 生育이 促進되었고 가장 不良한 炭素源은 lactic acid와 acetic acid이었다. 單糖類에서는 glucose가 良好한 生育을 보였으며 二糖類에서는 sucrose가, 多糖類에서는 soluble starch, 高級 alcohol類에서는 mannitol가 良好하였고 有機酸類는 대부분 不良하였다.

水素ion濃度の 變化는 培養前보다 酸性化하는 傾向을 보였으나 多糖類의 soluble starch에서는 中性化하였다.

金(1969), 李(1975)는 人蔘赤腐病原菌과 根腐病原菌은 一般의으로 單糖類와 二糖類의 利用이 현저하다고 하였고, 또한 有機酸보다는 alcohol類가 生育을 促進한다고 하였다.

本 實驗에서도 一般 細菌과 같이 炭水化合物의 利用은 一致되는 結果를 얻었으나 有機酸類보다 alcohol類를 더 잘 利用하는 現象이 다른 菌들과는 다른 結果로 差異가 있는 것으로 보아서 alcohol類를 잘 利用하는 細菌이 있을수 있다고 생각된다.

3) 生育과 窒素源의 影響: 各種 窒素源이 本菌의 生育에 미치는 影響 및 培養後 水素ion濃度の 變化에 對한 效果는 Fig.3과 같다. 보통 모든 微生物에 利用되는 窒素源은 amino酸이며 S-

tarr(1946, 1950)는 vitamin 要求性이 강한細菌은 Amino酸에 對한 要求性이 強하다고 하였으며 植物 病原性 細菌에서도 같은 現象을 보인다고 하였다.

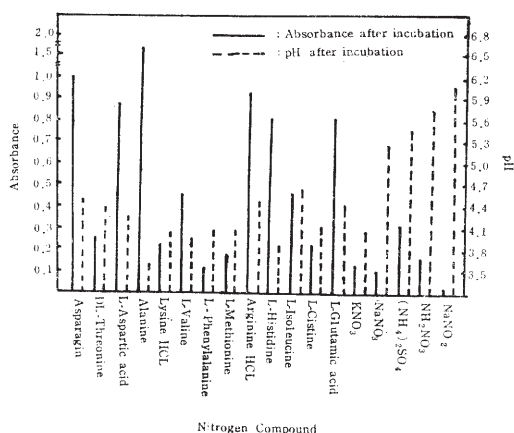


Fig. 3. The effect of various nitrogen sources on growth of the bacteria

Watanabe(1963)는 Ammonia能이 生育을 促

進하였으며 窒素能과 亞窒素能에서는 生育이 不良하다고 하였으며 金等(1969)을 窒素化合物中 amino酸 系統에서 alanine과 無機窒素源에서는 KNO₃의 利用이 顯著하다고 하였고 李(1975)도 *Pseudomonas fluorescens*에서 이와같은 報告를 하였다.

Fig.3에 依하면 窒素源으로는 alanine이 가장 良好한 生育을 하였고 다음으로는 asparagin이 있으며 가장 不良한 것은 NaNO₂이다. 有機窒素源中 alanine이 生育을 促進한 반면 L-valine이 不良하였고 無機窒素源中에서는 (NH₄)₂SO₄가 良好하였다.

一般的으로 水素ion濃度의 變化는 培養前보다 酸性化하는 傾向을 보였다. 本 實驗에서 無機窒素의 要求性이 相異한데 이와같은 現象은 그 要求性이 細菌에 따라서 다르기 때문이라고 생각된다.

4) 生育과 微量金屬源의 影響: 微量金屬鹽類가 本菌의 生育에 미치는 影響 및 水素ion濃度의 變化에 對한 効果는 Table 1과 같다.

Table 1. Effect of micrometallic salt on growth of the bacteria

Metall c Salts	Concentration. (mg/dl)	Average concentration of turbidity			pH after incubation for 7th day (Average)
		Incubation Time(days)			
		3	5	7	
FeSO ₄	100	##	###	###	3.5
	10	#	#	#	5.0
	1	+	#	#	5.0
	0.1	+	+	+	5.3
	0.01	+	+	+	5.3
ZnSO ₄	100	+	+	+	5.1
	10	+	+	+	5.1
	1	+	#	#	5.3
	0.1	+	+	+	5.2
	0.01	+	+	+	5.6
CaCl ₂	100	+	#	#	4.9
	10	+	+	#	5.3
	1	+	#	#	5.3
	0.1	+	+	+	5.6
	0.01	+	+	+	5.4
CuSO ₄	100	+	+	+	3.4
	10	#	##	##	5.1
	1	#	#	#	5.4
	0.1	+	+	+	5.4
	0.01	+	+	+	5.1
FeCl ₃	100	+	#	#	5.7
	10	#	#	#	4.9
	1	##	##	##	5.0
	0.1	#	#	#	4.7
	0.01	+	+	#	4.3
	100	+	+	+	4.1

MgCl ₂	10	+	+	+	4.3
	1	+	+	+	5.0
	0.1	+	+	+	5.1
	0.01	+	+	+	5.2
MnSO ₄	100	+	+	+	4.9
	10	+	+	+	5.0
	1	+	+	+	5.2
	0.1	+	+	+	5.4
	0.01	+	+	+	5.3
NaMoO ₄	100	+	+	+	5.4
	10	+	+	+	5.4
	1	+	+	+	5.6
	0.1	+	+	+	5.2
	0.01	+	+	+	5.4
H ₃ BO ₃	100	+	+	+	3.9
	10	+	+	+	4.2
	1	+	+	+	4.7
	0.1	+	+	+	5.3
	0.01	+	+	+	5.3
Control		+	+	+	5.2

Note : + : 0~0.29

+ : 0.60~0.89

+ : 0.30~0.59

+ : 0.90~2.0

微量元素들의 要求性은 細菌의 種類에 따라 다르다. table 1에 依하면 가장 生育을 促進한 것은 FeCl₃ 1.0mg/dl이었으며 다음으로 FeSO₄ 100mg/dl이었고 가장 不良한 것은 無添加區와 boric acid이었다. 金屬鹽類別로 보면 FeSO₄는 100mg/dl에서, ZnSO₄는 1.0mg/dl, CaCl₂는 1.0/dl, CuSO₄는 10.0mg/dl, FeCl₃는 1.0mg/dl, MgCl₂는 1.0mg/dl, MnSO₄는 10.0mg/dl에서 各各 生育이 促進되었으며 NaMoO₄와 H₃BO₃는 不良하였다.

金(1969)은 微量金屬鹽의 添加區가 無添加區보다는 生育이 促進되었다고 하였다. 本實驗에서도 添加區가 Control보다 生育이 促進되는 現象을 볼 수 있었으며 大部分의 金屬鹽類는 生理的 代謝과정에 關係하며 H₃BO₃는 control과 같이 生育이 不良한 것으로 보아서 生理的 代謝作用에 關係치 않는다고 생각된다.

5) 基本培地和 合成培地の 生育의 差異: 基本培地和 合成培地上 生育의 差異에 對한 結果는 Fig.4와 같다. 基本培地에서는 培養 1일부터 生

育이 점차 對數增加하여 5日째 生育이 停止期에 도달하였으나 合成培地上에서는 3日만에 本菌의 生育이 停止期에 도달하였다.

이러한 結果로 本 菌株는 合成培地에서 生育이 잘 되었음을 알 수 있었다.

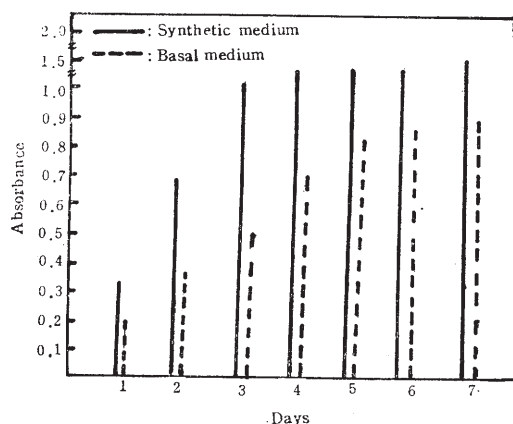


Fig. 4. Comparison of growth of the bacteria in basal medium and new synthetic medium

摘 要

人蔘赤腐病原菌의 生育과 水素ion濃度, 炭素源, 窒素源, 微量金屬源 및 濃度와의 關係를 實驗하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 本菌의 生育과 水素 ion濃度와의 關係는 pH6.5에서 가장 良好한 生育을 하였으며 培養後 培地液의 水素 ion濃度の 變化는 强酸性에서는 弱酸性化하였고 强알칼리性에서는 弱알칼리化되어 中性化하였다.

2. 本菌의 生育에 良好한 炭素源은 sucrose, glucose, fructose, 이었으며 galactose, maltose, mannitol도 良好하였다. 그러나 有機酸類는 비교적 利用되지 않았다. 培養後 水素ion濃度の 變化는 一般的으로 培養前보다 酸性化하는 傾向을 보였다.

3. 本菌의 生育에 良好한 窒素源은 alanine이었으며 L-valine이 가장 不良하였다. 無機窒素源은 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 가 良好하고 NaNO_2 가 不良하였으며 水素ion濃度の 變化는 一般的으로 酸性化하는 傾向을 보였다.

4. 本菌의 生育에 가장 良好한 微量金屬鹽類 및 濃度는 FeCl_3 1.0mg/dl, FeSO_4 100mg/dl이었으며 無添加區와 boric acid에서 가장 不良하였다. 水素ion濃度の 變化는 一般的으로 酸性化하는 傾向을 보였다.

5. 上記 結果를 綜合하여 良好한 生育條件을 基礎로 組成한 合成培地는 alanine 1.0g, KH_2PO_4 1.0g, sucrose 30.0g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.0mg, thiamine 200rg, 蒸溜水 1l(pH6.5)이었다.

引用文獻

1. Lee, M.W., 1975. Studies on the *Pseudomonas fluorescens* causing Root Rot of Ginseng, *Kor. Jour. Microbiol.* 13, 4 : 143~156.
2. Lee, M.W., 1979. Studies on the Etiology of Root Rot of Ginseng. *Kor. Jour. Microbiol.* 17, 4 : 179~186.
3. Pelczar, M.J. Jr., R.D. Ried, 1958. Microbiology, McGraw Hill Book Co., London.
4. Starr, M.P., 1946. The Nutrition of Phytopathogenic Bacteria. I. Minimal Nutrition requirements of the Genus *Xanthomonas*. *J. Bact.*, 51 : 131~143.
5. Starr, M.P., 1946. The Nutrition of Phytopathogenic Bacteria. II. Minimal Nutrition requirements of the Genus *Agrobacterium*. *J. Bact.* 52 : 187~193.
6. Starr, M.P. and M. Mandle., 1950. The Nutrition of phytopathogenic Bacteria. IV. Minimal nutrition requirements of the genus *Erwinia*. *J. Bact.* 60 : 669~672.
7. Von Hook, J.M., 1904. Disease of Ginseng. *Cornell Agr. Exp. Sta. Bull.*: 219.
8. Whetzel, H.H. and J. Rosenbaum, 1972. The Disease of Ginseng and Their control, *U.S. D. A. Bull.*: 250.
9. Watanabe, M., 1963. Studies on the nutrition physiology of *Xanthomonas oryzae* (Uyeda et ishiyama) Dowson. II. Effect of Carbon and Nitrogen Sources on multiplication of bacteria. *Ann. phytopathology* (Japan) 28 : 198~200.
10. 鄭厚燮, 1972. 人蔘의 病害, 韓國生藥學會 2 : 73~79.
11. 鄭厚燮, 李仁遠, 1977. 人蔘의 連作障害防止策, 人蔘赤腐病의 病原 및 防除對策에 關한 研究(I), 專賣廳用役報告書.
12. 鄭厚燮, 李仁遠, 1978. 人蔘의 連作障害防止策, 人蔘赤腐病의 病原 및 防除對策에 關한 研究(II), 專賣廳用役報告書.
13. 鄭厚燮, 1980. 人蔘病虫害研究, 韓國人蔘史(下), 한국인삼경작조합연합회 : 632~648.
14. 金倬熙, 李敏雄, 李榮俊, 1969. 人蔘赤腐病의 營養生理學的 研究, 東國大. 農林科學 論文集 3 : 143~155.
15. 明日山秀文, 向秀夫, 鈴木直治, 1962. 植物病理實驗法. 日本植物防疫協會, 日本 348~354.
16. 吳承煥, 1981. 人蔘의 환경 및 寄主條件과 發病과의 關係, 高麗人蔘學會誌, 5, No.1 : 7~384.
17. 李鍾華, 1979. 人蔘耕作研究의 現況과 展望, 人蔘研究 1, No.1 : 7~10.
18. 朴昌錫, 1979. 人蔘病害研究, 人蔘研究 1, No.1 : 25~27.