

## 버어리종담배 산지의 Streptomycin 耐性 담배줄기속썩음병균 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*의 발생

강 여 규\*

한국인삼연초연구원 수원시험장  
(1996년 3월 15일 접수)

### Occurrence of Streptomycin-resistant Tobacco Hollow Stalk Disease Pathogen, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in Burley Tobacco Growing Area

Yue-Gyu Kang\*

Suwon Experiment Station, Korea Ginseng & Tobacco Research Institute  
(Receives March 15, 1996)

**Abstract** : *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc), a pathogen of tobacco hollow stalk disease, was isolated for testing susceptibility to streptomycin from diseased plants in burley tobacco growing area. Of 157 isolates tested, 17 isolates (10.8%) were resistant to the antibiotic at the level of 100 $\mu$ g /ml or higher. The detection frequency of pectolytic *Erwinia* resistant to the antibiotic from field soils, which streptomycin had been used continuously for three years for control of the disease was three times higher than those of non-used. There was no difference in virulence and generation times between streptomycin-sensitive and resistant strains.

**Key words** : Streptomycin-resistance, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, tobacco

---

\* 연락처자 : 440-600, 수원시 수원우체국 사서함 59호, 한국인삼연초연구원 수원시험장

\* Corresponding Author : Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Suwon Experiment Station, Suwon P.O.Box 59,  
Suwon Kyunggi-Do 440-600, Korea

담배줄기썩음병(空胴病) 방제를 위한 약제로서 streptomycin 처리는 일본에서 奥浦와 村野(1960)등에 의해서 1960년 처음으로 보고된 이후 神山(1962), 魚住 等(1965)에 의해서 실용화 된 바 있다. 우리나라에서는 金 等(1981)에 의하여 본 병에 감수성인 버어리종 담배의 적심부위에 streptomycin 용액을 처리하는 방법이 시험되어 담배산지에 보급된 후 일부 농가에서는 해마다 담배줄기썩음병 발생 최성기에 관습적으로 담배의 莖葉에 분무처리까지 하여 왔다. 그런데 최근 수년간 버어리종담배 재배지(전남, 전북 및 충남 일부 지역)의 발병실태 조사 결과는 streptomycin 처리 이전에 비해 크게 감소되지 않고 있는 것으로 나타났다(박 등, 1988; 손 등, 1989). 따라서 이러한 결과는 일반적으로 세균병에 대한 약제방제율이 낮은 데 원인이 있지만 한편으로는 streptomycin에 대한 耐性菌의 출현으로 약제처리 효과가 감소된 결과로 추정되었다.

그러므로 본 시험에서는 버어리종담배 재배지의 streptomycin내성균의 분포와 생태를 조사하였다.

## 재료 및 방법

**병원균의 수집** : 담배줄기썩음병 발생 최성기인 7월하순에 버어리종담배 재배지인 전남(영광, 무안, 영암), 전북(완주, 정읍, 고창, 부안, 임실, 순창) 및 충남(서산, 당진, 예산, 홍성, 서천) 지방에서 담배 이병주를 수집하고 *Erwinia carotovora*균 선별배지인 crystal violet pectate medium(CVP) 및 PT배지에 획선배양(劃線培養)하여 병원균을 분리하고(강, 1988) 이 균주들의 현탁액을 담배의 수조직(髓組織)에 접종하여 발병이 확인된 균주를 Bergey's manual(Lelliot, 1984)에 의해 동정하여 공시균주로 사용하였다.

**최소발육저지농도(minimum inhibitory concentration, MIC) 및 최소살균농도(minimum bactericidal concentration, MBC) 조사** : 액체배양에 의한 약제감수성 측정법(三橋, 1980), 즉 공시약제의

성분농도가 1.5 $\mu$ g, 3.1 $\mu$ g, 6.3 $\mu$ g, 12.5 $\mu$ g, 25 $\mu$ g, 50 $\mu$ g, 100 $\mu$ g, 200 $\mu$ g, 500 $\mu$ g, 1,000 $\mu$ g/ml로 각각 포함된 Penassay broth(Difco manual, 1984)가 3ml씩 들어 있는 시험관(1.5 x 15cm)에 Nutrient broth에서 24시간 배양된 공시균주 현탁액( $\times 10^6$  cells/ml)을 50 $\mu$ l씩 접종하고 28 $^{\circ}$ C에서 12시간 배양후 세균의 증식 여부를 탁도(濁度)로 판정하여 MIC를 측정하고 공시균이 증식되지 않은 농도의 시험관에서 배양액을 백금기로 취하여 Nutrient agar 평판배지에 접종하여 공시균주의 생존 여부를 확인하여 MBC를 측정하였다. 공시약제중 항생제는 시판되고 있는 의료용 주사제를 구입하여 사용하였으며 기타약제는 시약(Sigma사 제품)으로 구입하여 사용하였다.

## Streptomycin 처리된 담배포장의 토양중 내성균

**분포 조사** : 전북 완주군 이서면 소재 농가 담배포장중 계속 3년이상 streptomycin이 처리된 3개의 포장과 처리되지 않은 10개 포장에서 표토 2~15cm 깊이의 토양 시료를 채취하여 비닐주머니에 담아 실험실로 옮기고 하루 동안 음건시킨 후 2mm의 체를 통과시켰다. 이 토양 시료 1g을 Meneley와 Stanghellini(1976)의 농화배양법에 의하여 28 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양한 다음 micropipette로 0.1ml의 배양액을 CVP 평판배지에 도말접종하여 오목한 집락을 형성하는 세균을 분리하고 담배에 접종하여 공동병균과 같이 연부 증상을 일으키는 96개의 병원성 균주를 분리하고 액체배양에 의한 감수성 측정법(三橋, 1980)에 의해 streptomycin에 대한 MIC를 조사하였다.

## Streptomycin 내성균의 세대시간 및 병원성

Streptomycin 내성 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) 균 E-126R, E-258R, E-94R 및 감수성 균주 E-4, E-94 등 5개 균주를 Miller(1972)의 생장곡선 측정법에 의해 0.5%의 glucose가 첨가된 nutrient broth배지를 사용하여 28 $^{\circ}$ C에서 진탕배양하면서 공시균의 증식속도를 조사하고 세대시간을 산출하였다. 상기 5개의 공시균주를 nutrient agar

배지에서 28℃로 24시간 배양한 다음 균총을 멸균 증류수에 현탁시켜  $10^1 \sim 10^8$  cells/ml의 세균현탁액을 만들고 cork borer(직경 10mm)로 담배(Burley 21) 수조직(髓組織)을 절취하여 두께 5mm의 원판모양으로 잘라내고 각 공시균주 현탁액의 농도별로 담배수조직 조각 20개씩을 30초간 침지한 다음 꺼내어 증류수로 적신 두께 3cm 스폰지가 깔린 상자(52cmx35cmx8cm)에 치상하여 습도가 유지되도록 비닐을 덮고 28℃에서 12시간 둔 다음 연부된 개체수를 조사하여 median effective dose ( $ED_{50}$ )를 산출하였다.

**결과 및 고찰**

버어리종담배 산지에서 분리된 담배줄기속썩음병균의 streptomycin에 대한 감수성 : 1988년부터 1989년까지 버어리종담배 산지인 전남, 전북 및 충남 지방을 대상으로 담배줄기속썩음병 발병 최성기인 7월 중하순경에 이병주를 수집하여 분리한

157개의 병원균주들에 대하여 streptomycin에 대한 감수성을 조사한 결과, 조사균주의 10.8%가 streptomycin 농도  $100 \mu\text{g/ml}$  이상에서도 생존이 가능한 내성균으로 조사되었다. 또한 지역별로는 가장 많은 92개 균주를 조사한 전북 지역이 12%

Table 1. Frequency of streptomycin-resistant *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* strains isolated from diseased tobacco plants in burley tobacco growing areas

Location	No. of isolates*	Streptomycin resistant strains**	
		No.	%
Chungnam	36	5	3.2
Chonbuk	92	11	12.0
Chonnam	29	1	0.6

\* Isolated in 1988-1989

\*\* Resistant to  $100 \mu\text{g/ml}$  level of streptomycin

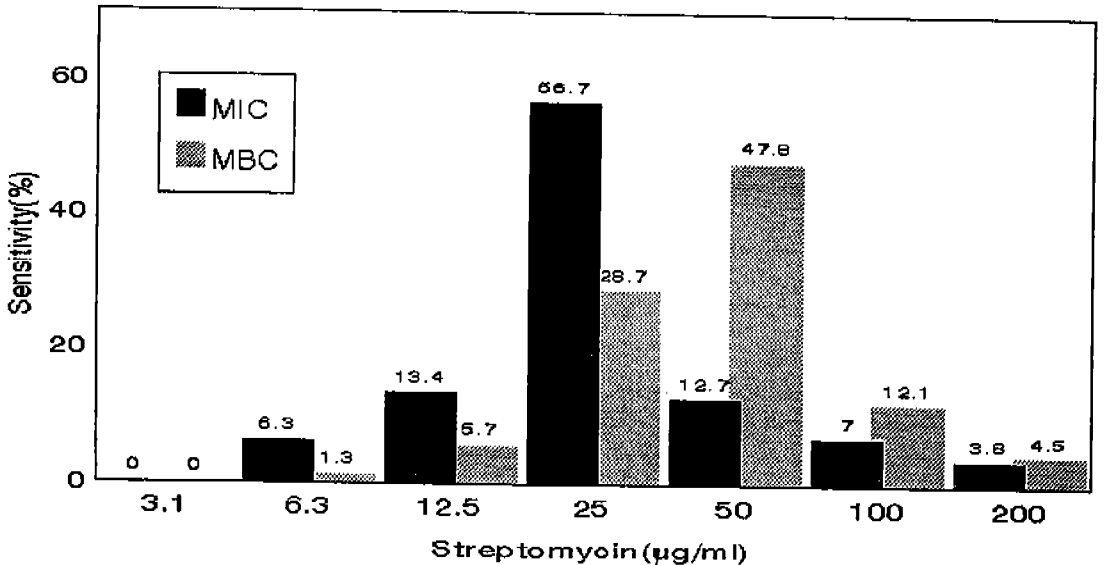


Fig. 1. Frequency distribution of streptomycin sensitivity in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* isolates collected from burley tobacco growing area, MIC :Minimum inhibitory Concentration, MBC: Minimum bactericidal concentration.

의 내성균 분포를 보였다( Table 1 ). 전체 157개 조사균주의 streptomycin에 대한 감수성 분포를 보면 그중 56.7%인 89개 균주의 최소발육저지농도는  $25\mu\text{g}/\text{ml}$ 였으며 최소살균농도는 공시균주의 47.8%가  $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 였다(Fig. 1).

Matsuzaki 등(1981)은 상처에서 분리된 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*(Ecc) 26개 균주들중 대부분이 최소발육저지농도가  $1\mu\text{g}/\text{ml}$  내외에 분포하였고 최소발육저지농도가  $50\sim 100\mu\text{g}/\text{ml}$ 인 균주는 7.7%였다고 하였다. 본 시험에서 감수성균주로 구분된 균주들도 대부분이  $12.5\sim 50\mu\text{g}/\text{ml}$ 범위에 분포하여 일반적으로 streptomycin에 대한 내성이 높게 나타났다. 한편 식물병원세균의 streptomycin 내성 발생기작은 염색체 변이 및 plasmid변이에 의한 것 등 두가지의 경우가 알려지고 있는데 (Chatterjee 와 Starr, 1972 ; Jones, 1982) 항생제에 대한 ribosomal protein의 결합능력에 손상을 주는 염색체의 변이는  $10^9\sim 10^8$ 의 비율로 자연 발생하며 streptomycin과 같은 aminoglycoside를 adenylation 또는 인산화하는 periplasmic enzyme에 의해 유도되는 plasmid에 의한 저항성은 접합에 의해 세균간에 저항성 유전자가 서로 이동되는 특성이 알려져 있다(Cho, 1977 ; Minsavage et al. 1990 ; Moller et al. 1981 ; Schroth et al. 1978).

**담배포장의 streptomycin 처리와 내성균 분포 :**

담배줄기썩음병 방제를 위해 계속해서 3년이상 streptomycin 처리를 해왔던 전북 완주군 이서면에 소재한 3개소의 농가포장과 streptomycin 처리가 없었던 10개 포장에서 담배수확이 끝난 8월 하순에 토양을 채취하여 pectolytic erwinia균 94개 균주를 분리하고 streptomycin에 대한 감수성을 조사한 결과, 최소발육저지농도가  $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상인 균주의 비율은 무처리포장의 6.5%에 비해 streptomycin을 3년 이상 처리했던 포장에서는 22.9%로 약 3배 이상의 높은 내성균 출현율을 보였다( Table 2 ).

담배줄기썩음병을 일으키는 Ecc균은 토양전염성 세균이므로 토양중에 존재하는 병원균이 다음

Table 2. Frequency of streptomycin-resistant *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* strains isolated from tobacco field soils

Fields sampled	No. of isolates	Streptomycin resistant strains	
		No.	%
Streptomycin treated field*	48	11	22.9
Non-treated field**	46	3	6.5

\* Soil samples were collected in three tobacco fields where streptomycin had been treated over three years.  
 \*\* Soil samples were collected from ten tobacco fields.

해에 중요한 1차 전염원이 될 수 있다. 특히 항생제 계통의 약제는 다른 유기살균제에 비하여 효과는 좋으나 약제에 대한 내성이 빨리 생기는 결점이 있으며 (Jones, 1982; Matsuzaki et al. 1981; Skylakakis, 1983) 토양중에 streptomycin내성균의 밀도가 높은 포장에서는 담배줄기썩음병 방제를 위한 streptomycin처리의 방제효과를 기대할 수 없다. 그러므로 이러한 문제점을 해결하기 위해서는 살균기작이 다양한 약제의 개발과 내성균 발생을 억제할 수 있는 약제처리방법이 개발, 보급되어야 할 것이다.

**Streptomycin 내성 및 감수성균의 세대시간 및 담배에 대한 병원력:** 담배줄기썩음병균의 streptomycin에 대한 내성 획득과 증식속도와의 관계를 파악하기 위하여 streptomycin 내성균 3개 균주와 감수성균 2개 균주에 대한 세대시간을 측정하고 streptomycin 감수성균주들이 내성균주들에 비해 세대시간이 다소 짧았으나 큰 차이는 없었다( Table 3).

또한 이 병원균의 streptomycin 내성 획득과 병원력과의 관계를 조사하기 위하여 streptomycin 내성균 및 감수성균의 담배(Burley 21) 수조직에

Table 3. Generation times of streptomycin susceptible and resistant *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* strains

Strains	Generation Time(Min.)
Streptomycin susceptible;	
E-4	25±3.6
E-94	26±8.2
Streptomycin resistant;	
E-126R	29±8.6
E-258R	29±8.2
E-94R*	26±7.9

\* Mutant was isolated from streptomycin sensitive strain E-94 by laboratory screening procedure.

Table 4. Virulence of streptomycin-susceptible and resistant *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* strains against tobacco pith tissue

Strains	ED <sub>50</sub> ( x10 <sup>3</sup> cfu/ml)*
Streptomycin susceptible;	
E-4	8.78
E-94	3.36
Streptomycin resistant;	
E-126R	0.21
E-258R	3.70
E-4R**	4.47
E-94R**	1.68

\* Effective dose for soft-rotting 50% of tobacco pith disks tested

\*\* Resistance derived by successive passing through streptomycin-contained media.

대한 ED<sub>50</sub>를 조사한 결과 streptomycin 내성 획득 여부와 관계 없이 병원력이 거의 유사하게 나타났다( Table 4 ). 이는 Schroth 등(1978)이 미국 태평양 연안지역의

배나무에 화상병(fire blight)을 일으키는 *Erwinia amylovora*의 streptomycin 내성균과 감수성균의 비교에서 세대시간, 병원력 및 다른 약제에 대한 반응에서 큰 차이가 없었다는 보고와 거의 유사한 결과였다.

식물병원세균중 특히 Ecc에 의한 담배줄기속썩음병은 장마철과 같이 고온다습한 환경이 계속될 때 발생되며 그 진전속도가 빠르기 때문에 방제가 매우 어려운 병해이다. 그러므로 병원균의 세대시간(doubling time)은 병해의 진전속도와 관련하여 발병 생태상 중요한 요소중의 하나이다. 따라서 이상의 결과로 보아 streptomycin 내성 획득이 야생형균주(wild type)에 비해 병원생태상 차이는 거의 없는 것으로 생각된다.

### 결 론

버어리종담배 산지의 담배줄기속썩음병 방제를 위한 streptomycin 처리로 발생하는 내성균의 실태를 파악하기 위하여 버어리종담배 산지에서 수집 분리된 157개의 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 균주중 10.8%가 streptomycin 농도 100µg/ml 이상에서도 생육이 가능한 내성균이었으며 3년 이상 계속 streptomycin을 처리해온 포장의 토양에서는 무처리 포장에 비해 3배 이상의 내성균이 검출되었다. 이러한 내성 획득은 병원균의 증식이나 병원력과 크게 관련이 없었다.

### 참 고 문 헌

1. Chatterjee, A. K. and M. P. Starr (1972) Transfer among *Erwinia* spp. and other Enterobacteria of antibiotic resistance carried on R factors. *J. Bacteriol.* 112:576-584.
2. Cho, J. J. (1977) Control of bacterial soft-rot of crisphead type lettuce in Hawaii. *Plant Dis. Reprtr.* 61: 783-787.
3. Difco Manual (1984) Dehydrated culture media and reagents for microbiology. Difco Lab. p.

- 78-86. Detroit Michigan, U.S.A.
4. Jones, A. L. (1982) Chemical of phytopathogenic prokaryotes. In: Phytopathogenic prokaryotes. Vol. 2. p. 399-417, M. S. Mount and G. H. Lacy eds. Academic Press, London, U.K.
  5. 神山功 (1962) タバ"コ空洞病に起因する吊り腐れの抗生物質による防除. 北日本病害蟲研究會報 13:155-156.
  6. 강여규 (1988) 담배줄기속썩음병의 발생 생태 및 방제에 관한 연구. 충남대학교 박사학위논문. pp. 81.
  7. 김정화, 이영근, 박은경 (1981) 적심부위 항생제 처리에 의한 담배 공동병 2차감염 억제효과. 한국연초학회지 3 :131-133.
  8. Lelliot, R. A. and R. S. Dickey (1984) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology vol. 1. p. 469-476. N. R. Krieg and J. G. Holt ed. Wilkins Co. Baltimore. U.S.A.
  9. Matsuzaki, M., K. Azegami and K. Ohata(1981) Acquisition of streptomycin resistance in pathogenic bacteria isolated from diseased lettuce. *Ann. Phytopath. Soc. Jpn.* 47:301-307.
  10. Matsuzaki, M., K. Azegami and K. Ohata (1981) Studies on streptomycin resistance in pathogenic bacteria isolated from diseased lettuce. *Ann. Phytopath. Soc. Jpn.* 47:297-300.
  11. Meneley, J. C. and M. E. Stanghellini (1976) Isolation of soft rot *Erwinia* spp. from agricultural soils using enrichment technique. *Phytopathology* 66:367-370.
  12. 三橋 進 (1980) 藥劑感受性 測定法. p. 68-136, 講談社, 東京.
  13. Miller, J. H. (1972) Experiments in molecular genetics. p. 466, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, USA.
  14. Minsavage, G. V., B. I. Canteros and R. E. Stall (1990) Plasmid-mediated resistance to streptomycin in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* 80: 719-723.
  15. Moller, W. J., M. N. Schroth and S. V. Thomson (1981) The scenario of fire blight and streptomycin resistance. *Plant Disease* 65:563-567.
  16. 奥浦正弘, 村野久富 (1960) ヒトマイシンによる巾腐病の防除. 葉たは"こ研究 23:84-86.
  17. 박은경, 김정화, 손준수, 이영근, 오명희, 강여규 (1988) 연초 병해충 발생기작 및 방제 연구. 1988년도 담배연구보고서(경작분야 육종 및 환경편), p.208-203, 한국인삼연초연구소.
  18. Schroth, M. N., S. V. Thomson, W. J. Moler and W. O. Reil (1978) Streptomycin resistance in *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 69: 565-568.
  19. Skylakakis, G. (1983) Theory and strategy of chemical control. *Ann. Rev. Phytopathol.* 21:117-135.
  20. 손준수, 김정화, 박은경, 이영근, 오명희, 강여규 (1989) 연초 병해충의 생리생태적 특성 구명 및 방제 연구. 1989년도 담배연구보고서(경작분야 육종 및 환경편) p.143-218, 한국인삼연초연구소.
  21. 魚住哲郎, 千葉信一, 佐藤彦 (1965) 空洞病菌によるきの下葉の腐れに對するストレプトマイシン劑本畑散布の效果. 葉たは"こ研究 39:84-87.