

느타리버섯 갈반병에 대한 길항균의 선발 및 특성조사

이 은 관 · 유 승 호 · 조 제 선 · †전 익 한
경희대학교 생명자원과학부 식품가공학과
(접수 : 1998. 9. 14., 게재승인 : 1999. 3. 20.)

Screening and Characterization of Antagonistic Strains Against Brown Blotch Causing Bacteria on *Pleurotus ostreatus*

Eun-Kwan Lee, Seung-Ho You, Jai-Sun Jo, and Uck-Han Chun†
Department of Food Technology and Science, Institute of Life and Resource Science, Kyung Hee University,
Suwon 440-701, Korea
(Received : 1998. 9. 14., Accepted : 1999. 3. 20.)

Screening experiments were carried out in order to select bacteria causing brown blotch disease on the mushroom, *Pleurotus ostreatus*. Four bacteria causing brown blotch disease were isolated from *Pleurotus ostreatus* and soils around the mushroom farm. Three strains showing antagonism against brown blotch causing bacteria, A-11, A-20 and A-29 were also isolated through methods pitting test, cross checking and biochemical test, and identified as *Pseudomonas fluorescense* for A-11 and A-20, and *Pseudomonas sp.* for A-29, respectively. Colonial morphology test also showed that A-11 and A-29 were appeared as transparent gel with green color, whereas the colony of A-20 showed opaque gel with light green color.

Key Words : brown blotch disease, *Pseudomonas tolaasii*, *Pseudomonas fluorescense*, *Pleurotus ostreatus*

서 론

느타리버섯은 우리 나라에서 인공 재배되는 전체 버섯 생산량의 45%를 차지하는 재배버섯의 주 품목이며, 농가 소득의 주요한 작목이다. Roland 등(1)에 의하여 담자 균류의 항암 성분에 관한 연구가 시작되어, Gregory 등(2)에 의해 보다 광범위하게 연구가 진행되었으며, Yoshioka(3)는 항암 효과 등, 약리 활성이 있다고 보고하였다. Kim(4)은 느타리버섯 자실체 추출물이 sarcoma 180에 대해 강한 종양 억제 작용이 있으며, 이 성분들은 다당류와 단백질로 구성되어 있다고 보고하였다. 그리고 Chang(5)은 고혈압과 당뇨병 등에도 효과가 있다고 보고함으로써 건강 식품으로 각광을 받게 되어, 그 수요가 점차 증가 추세를 보이게 되었고, 이로 인하여 대량 생산의 필요성이 요구되었다. 재배법도 다양하게 발전되어 우리 나라에서는 Kim 등(6)에 의해 개발된 볏짚을 이용한 느타리버섯 재배와 유 등(7)이 개발한 폐면을 이용한 느타리버섯 재배가 주류를 이루고 있으며, 톱밥 병 재배도 점차 확산되어 가고 있어 버섯 수요를 충족시키고 있다.

1994년에는 7,906 농가가 1,635,987평에서 57,868톤을 생산하

여 호당 평균 23,937,000 원의 수익을 올렸으며, 이는 5년 전에 비해 97%나 증가하였다. 이렇게 농가 소득의 주요한 느타리버섯 재배에 있어서 가장 심각한 문제점은 갈반병에 의해 버섯의 조직이 갈변되어 고사하거나, 상품성이 없어 수확을 포기하는 등 막대한 피해를 주고 있는 것이다. 단위 면적당 생산량이 해마다 줄어 1990년도의 평당 평균 생산량이 약 40 kg인데 반하여 1994년도에는 평당 평균 생산량이 약 35 kg밖에 되지 않으며, 이런 작황의 차이는 주로 버섯의 병해로부터 기인되는데 그 중에서도 가장 피해가 큰 세균성 갈반병에 의해 일어난다고 보고되었고(8), 갈반병은 느타리버섯, 양송이 버섯에만 있는 것이 아니라 팽이버섯 등에도 나타난다(9). 이러한 갈반병 세균은 혼합 퇴비, 버섯 농장 주변의 토양 중에 많이 존재하고 있으며(10), 우리나라에서의 느타리버섯 배지 원료로 이용하는 볏짚, 톱밥, 폐면 등에도 많이 존재하는 것으로 알려지고 있다. 또한 Nutkins 등(11)은 세균성 갈반병의 원인균인 *Pseudomonas tolaasii*가 직접 버섯에 작용하여 버섯을 병들게 하는 것이 아니고 *P. tolaasii*가 분비하는 tolaasin 이라고 하는 toxin에 의한 것이며, 이는 白(9)도 같은 결과를 얻었으나 아직까지 이를 효과적으로 방제할 수 있는 방법이 제시되고 있지 않다.

Nair 등(12)은 *Pseudomonas fluorescens*가 *P. tolaasii*에 대해 길항성을 가진다고 하였으나 병원균에 비해 80배의 많은 수가 있어야 효과가 있으므로 실용성이 떨어진다고 보고하였다. 또한 Wong 등(13)에 의하면 sodium hypochlorite가 갈반병 세균에 효과가 있다고 보고하였으나 완벽하지 않으며, 버섯에 생리적 부작용을 일으켜 상품성이 떨어지는 문제가 있다.

† Corresponding Author : Department of Food Technology and Science, Institute of Life and Resource Science, Kyung Hee University, Suwon 440-701, Korea
Tel · 82-331-201-2626, Fax : 82-331-204-8116
e-mail · uhchun@nms.kyunghee.ac.kr

따라서 본 연구는 갈반병 세균에 대한 길항균주를 직접 버섯 농장으로부터 선발하여 이들 길항 세균을 조사하였다.

다. 갈반병 유발세균과 길항세균은 각각 P-1, P-2와 A-1, A-2 등으로 표기하였다.

재료 및 방법

균주 선발

갈반병 유발세균의 선발은 경기도 용인군 기흥읍 신갈리의 느타리버섯 재배 농가로부터 구입한 신선한 느타리버섯의 갓(cap) 피막을 벗기고 가로, 세로, 두께를 10 mm×10 mm×1 mm로 만들어 무균 plate에 놓은 후, 갈반병이 걸린 버섯에서 분리한 39가지의 세균을 각각 20 μL씩 취하여 접종하였다. 24±1℃에서 24시간 배양 후 버섯 조직의 갈반병 발생 유무를 조사하여 갈반병 유발세균을 선발하였다

길항세균의 선발은 경기도 광주군에 소재한 버섯재배장 주변 토양에서 분리한 18가지의 균주와 이미 선발한 39개의 균주들 중에서 길항성을 갖는 세균을 선발하기 위하여 갈반병 유발세균과의 cross test를 실시하여 길항성이 우수한 균주를 선발하였

사용균주 및 배지

분리한 갈반병 유발균주는 PAF(*Pseudomonas Agar F*)배지를 사용하여 23-25℃에서 배양하였으며 PAF 고체 배지는 agar 20.0 g/L을 가하여 제조하였다. 또한 길항세균의 배양도 갈반병 원인균주와 같은 배지와 조건으로 배양하였다. 본 실험에서 사용한 배지는 6가지이며 각각의 배지 조성과 농도는 Table 1과 같다. 길항세균의 stock culture를 위해서 starch 배지를 사용하였다 또한 느타리버섯 균은 PDA (Potato Dextrose Agar) 배지에 배양하였다. 생화학적 test를 위해서 KB 배지와 PAF 배지를 사용하였으며, 특히 fluorescence test를 위해서는 KA 배지와 KB 배지를 이용하였다.

생화학적 test

Temperature sensitivity는 nutrient agar media에서 0-4℃와

Table 1. Composition of various type of media.

Type of media	Components	Quantity (g/L)
PAF (<i>Pseudomonas Agar F</i>)	Bacto- trypton	10.0
	Bacto- proteose peptone No.3	10.0
	dipotassium phosphate	15
	magnesium sulfate	1.5
	Bacto- agar	20.0
	Bacto- glycerol	10.0
PDA (Potato Dextrose Agar)	potato	200.0
	glucose	20.0
	agar	20.0
Thorneley ' s medium	peptone	1.0
	NaCl	5.0
	KH ₂ PO ₄	0.3
	agar	3.0
	phenol red	0.01
starch	yeast extract	3.0
	peptone	5.0
	agar	15.0
	potato starch	8.0
KB	proteos peptone	20.0
	Bacto-agar	15.0
	glycerol	10.0
	KH ₂ PO ₄	1.5
	MgSO ₄	1.5
KA	Bacto-peptone	20.0
	Bacto-agar	15.0
	glycerol	10.0
	K ₂ SO ₄	10.0
	MgCl	1.4

40°C에서 colony 생성도에 의해 조사하였으며, pigment 생성 조사는 멸균한 KB와 PAF 배지(Table 1)에 각각 균주를 접종한 후 25±1°C에서 배양하여 24-48시간 후에 색소 생성 여부를 관찰하였다.

Fluorescence test는 KA agar 배지와 KB agar 배지(Table 1)에서 25-30°C의 조건으로 3-6일간 colony의 색을 관찰하였다. Colony morphology는 PAF 배지에서 균주를 3일간 배양한 후 colony의 color와, 배지에 생성된 pigment, morphology 등을 관찰하였다.

Pitting test

Gandy(14)가 사용한 방법대로 버섯 cap의 tissue block을 사용하였다 분리한 갈반병 원인균주를 PAF 배지에서 25±1°C로 배양한 후 멸균수에 세포수가 약 10^8 cells/mL이상 되도록 현탁시킨 후 버섯 cap의 표피를 벗긴 시방 10 mm 정도의 tissue block에 1 loop정도의 현탁액을 접종시킨 후, 물에 적신 종이가 들어 있는 petri dish에서 25±1°C로 배양한 후 조직의 변화를 검사하였다. 또한 갈반병 원인균주인 P-24, P-27, P-28, P-33과 길항균주인 A-11, A-20, A-29를 각각 10^6 cells/mL로 배양하고, 이를 PDA배지에서 갈반병 원인균주를 먼저 도포하고 이어서 각각의 길항균주를 갈반병 원인균주에 대해 2배 및 3배로 희석한 것을 각각 1:1로 재도포하고 *P. ostreatus*(품종: 농기원형 1호) 균사 절편(10 mm×10 mm×1 mm)을 접종하여 23±1°C로 7일간 배양하여 균사 성장을 관찰하였다.

임상 실험

경기도 광주군 소재의 대한버섯연구소의 버섯 재배 농장에서

실시하였으며, 균사 활착이 완료된 후 균 굵기를 하고, 곧바로 갈반병 원인균주를 spray 접종하여 갈반병 유도하고, 길항균주를 1:1로 spray하여 1차 접종하였으며, 버섯의 pin이 발생된 후 2차 접종하여 선발된 길항균의 갈반병 예방 효과를 관찰하였다. 이때 재배사내 온도는 18°C, 습도는 90% (RH)를 유지하였다.

결과 및 고찰

갈반병 원인균주 및 길항균주 선발

갈반병 원인균주 선발을 위하여 무균 plate에 멸균한 버섯 절편을 놓고 39개의 균주를 각각 20 µL를 접종한 후 24±1°C에서 24시간 배양하였다 5회 반복하여 갈반병이 유발된 버섯으로부터 갈반병 유발세균을 분리하였다. Table 2에 갈반병 유발세균에 대하여 정리하였듯이 P-24, P-27, P-28, P-33 세균이 가장 두드러지게 갈반병을 유발시켰다 P-1, P-7, P-17, P-26, P-42 세균도 갈반병을 유발시켰으나 길항세균 분리를 위한 실험에서 제외시키고 가장 갈반병을 강하게 유발시키는 4가지의 균주를 선택하였다 4개의 갈반병 유발 세균에 대하여 cross test를 각각 실시하여 길항균에 대한 activity 조사를 실시한 결과를 Table 3에 정리하였다 A-1을 비롯하여 14 종류의 균주가 갈반병 유발세균에 대한 길항성을 보였으며 그 중에도 A-11, A-20, A-29, A-46, A-51이 우수한 길항성을 보였다. 이들 중 A-46, A-51은 길항성은 좋으나 Table 2에서 보듯 갈반병을 유발하는 관계로 길항성이 우수한 균주로 A-11, A-20, A-29를 최종 선발하였다. 세가지 균주에 대한 길항성 조사를 위하여 갈

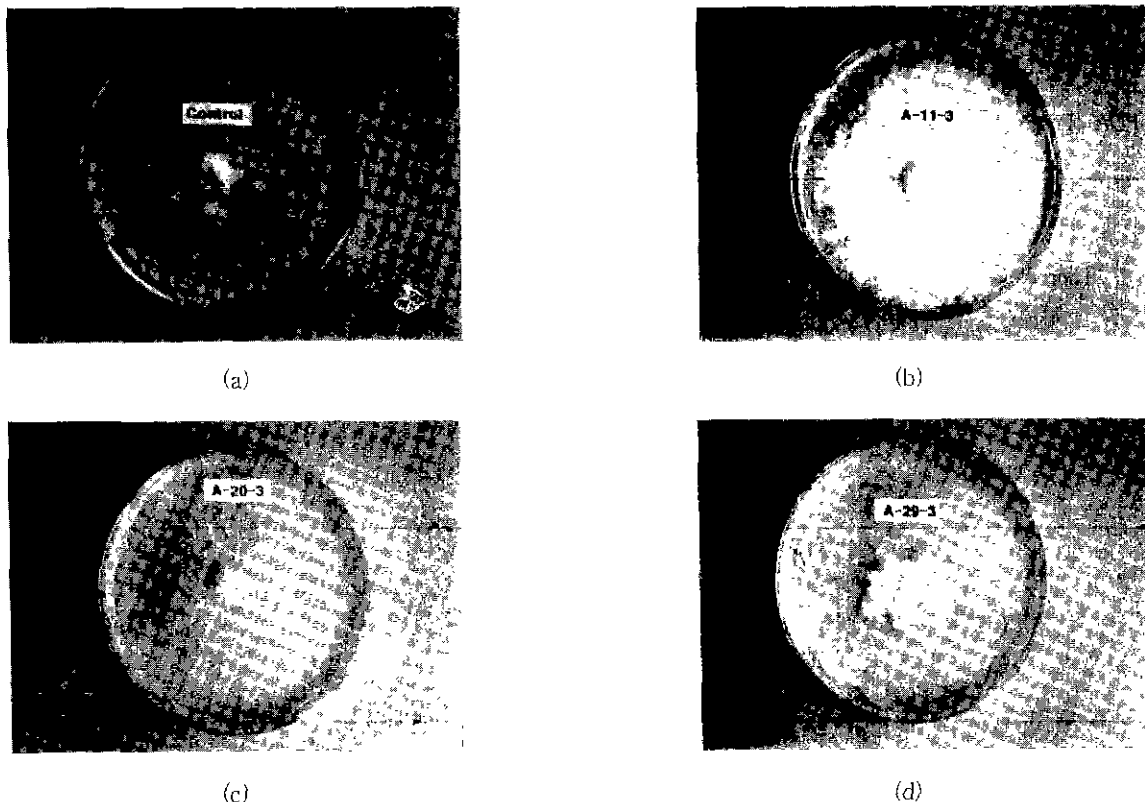


Figure 1. Growth of *Pleurotus ostreatus* mycelium on PDA media controlled by antagonistic bacteria after the bacteria causing brown blotch disease were inoculated. Control represents mycelium growth on the media infected with brown blotch causing bacteria.

Table 2. Bacterial strains isolated from cultivated *Pleurotus ostreatus* showing brown blotch symptoms.

P-	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
	++	-	-	+	-	+	++	-	+	-	-	+	-	-	-	+	++	+	-
P-	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38
	-	+	-	+	+++	++	++	+++	+++	-	-	+	-	+++	-	-	-	+	-
P-	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57
	+	+	+	++	+	+	+	++	+	+	+	++	+	+	+	+	++	+	+

- : negative

+ : positive

Table 3. Selection of antagonistic bacteria against brown blotch causing bacteria.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
P-24	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
P-27	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
P-28	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
P-33	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38
P-24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P-27	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-
P-28	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
P-33	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-
	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53				
P-24	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-				
P-27	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-				
P-28	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-				
P-33	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-				

+ : positive antagonism

- : negative antagonism

반병 유발세균만을 접종한 PDA배지에 느타리버섯 균사를 접종시키고, 또한 갈반병 유발세균을 접종한 PDA배지에 길항세균을 1, 1/2, 1/3로 접종시킨 후, 느타리버섯 균사 생장을 비교한 결과 Figure 1에서 보듯 a)는 갈반병균에 의하여 균사 생장이 저해된 반면 Figure 1의 b), c), d)에서 보듯이 A-11, A-20, A-29의 길항세균을 3배로 희석하여 접종한 배지 임에도 균사가 생장되었으며, 특히 A-11 길항세균을 접종한 PDA배지에서는 균사 생장이 원활하였다. 이는 길항세균이 갈반병 유발세균의 activity를 저하시킨 때문으로 사료된다.

선발세균의 특성

갈반병 유발세균 중 P-27과 길항세균 중 A-11에 대한 특성을 조사하였다. Table 4에 정리하였듯이 pigment는 두 균주 모두 생산하였으나 온도에 대해서는 상이성을 보였다. 즉 40℃에서는 두 균주 모두 생육하지 못하였지만 1-4℃에서는 갈반병 유발세균은 생육하였고 길항세균은 생육하지 못하였다. 또한 갈반병 유발세균은 KA, KB 배지에서 모두 fluorescence를 생성하였으나 길항세균은 생성하지 않았으며 갈반병균의 경우 KB 배지에서 fluorescence를 특히 많이 생성하였다.

염분에 대한 내성 조사 결과 길항세균이 비교적 높은 내성을 보였으며 7% 농도에서는 생육이 저해되었다.

갈반병균과 길항세균의 colony morphology, pigment 생성 및 색깔을 조사하였다. P-24, P-27, P-28은 colony 형태가 opaque gel 형태로서 pigment의 색상은 옅은 green색을 띠었으며 P-33은 sandy gel 형태를 보였다. 그리고 길항세균 A-11과 A-29가 fluorescence white인 반면 A-20은 white 색을 나타내었다(Table 5).

생화학적 검사

갈반병 유발세균과 길항세균에 대한 생화학적 검사를 API 20E kit(BioMericux)를 사용하여 실시하였으며 그 결과를 Table 6에 정리하였다. Gas, H₂S, indol, V-P test는 모든 균주에서 음성인 반면 citrate test는 모두 양성이었으며, Gram staining은 모든 균주가 음성이었다. 또한 gelatin liquefaction은 P-24, P-27, P-28 세균은 음성을 보인 반면 P-33, A-11, A-20은 양성을 보였다. Manitol, rhamnose, sorbitol은 모든 균주가 이용하였다. 생화학적 검사 결과 갈반병 유발세균인 P-24, P-27, P-28, P-33 중에서 P-24, P-28은 *Pseudomonas putida*

Table 4. Characteristics of brown blotch disease bacteria and antagonistic bacteria.

Characteristics	Brown blotch strain (P-27)	Antagonistic bacteria strains (A-11)
Pigment production	+	+
Temperature sensitivity		
40°C	-	-
1-4°C	+	-
Rapid pitting test	-	+
Fluorescence on KA medium	+	-
Fluorescence on KB medium	+++	-
Salt tolerance (Nutrient broth + NaCl)		
3%	++	+++
4%	+	++
5%	-	+
6%	-	+
7%	-	-

Table 5. Colonial morphology and appearance on PAF medium.

Strains	Colonial morphology	Pigmentation on medium	Colony color	
<i>Brown blotch causing bacteria</i>	P-24	opaque gel	light-green	white
	P-27	opaque gel	light-green	white
	P-28	opaque gel	light-green	white
	P-33	sandy gel	light-green	white
<i>Antagonistic bacteria</i>	A-11	transparent gel	green	fluorescens white
	A-20	opaque gel	light-green	white
	A-29	transparent gel	green	fluorescens white

Table 6. Biochemical tests by API 20E kit.

Test	Strains	Brown blotch causing bacteria				Antagonistic bacteria		
		P-24	P-27	P-28	P-33	A-11	A-20	A-29
KIA		k/k	k/k	k/k	k/k	k/k	k/k	k/k
Gas		-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S		-	-	-	-	-	-	-
Indol		-	-	-	-	-	-	-
V-P		-	-	-	-	-	-	-
Citrate		+	+	+	+	+	+	-
Urease		-	-	-	-	-	-	-
Glucose/Gas		-	-	-	-	+	+	-
Gelatin liquefaction		-	-	-	-	+	+	-
D-Mannitol		-	-	-	-	-	-	-
D-Sorbitol		-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose		-	-	-	-	+	+	-
L-Rhamnose		-	-	-	-	-	-	-
Oxidase test		-	+	+	+	+	+	+
Gram staining		-	-	-	-	-	-	-

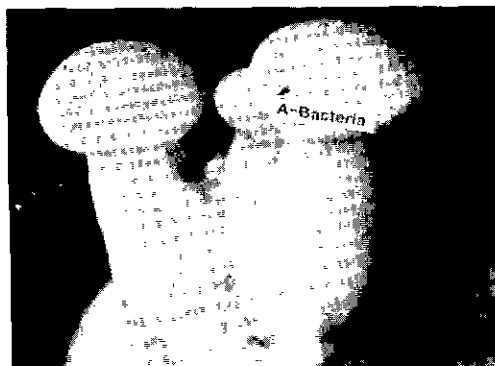
로 동정되었으며 P-28, P-33은 *Pseudomonas tolaasii*로 동정되었다. 길항균주인 A-11, A-20, A-29 중에서 A-11, A-20은 *Pseudomonas fluorescence*로 A-29는 *Pseudomonas sp* 계통의 균주로 동정되었다.

임상 실험

선발된 길항세균의 실제 버섯 재배시 길항성을 조사하였다. Figure 2에서 보듯이 갈반병 유발세균만을 접종한 배지에서는 갈반병이 유발되어 버섯의 정상적인 생육이 저하되고 또한 생육한 버섯도 cap이나 stem이 갈변 현상이 일어났으나(a), 버섯의 pin이 발생 직전에 길항세균을 처리한 결과 갈반병 유발이 현저히 저해되었다(b). (b)의 그림은 가장 길항성이 좋은 경우로써 길항세균의 농도를 갈반병균과 동일하게 했을 때이며 길항세균의 농도가 갈반병균 보다 적을 때는 갈반병은 100% 억제하지 못하였다.



(a) Brown blotch occurrence on *Pleurotus ostreatus*



(b) Healthy *Pleurotus ostreatus* by antagonistic bacteria treatment

Figure 2. Brown blotch of *Pleurotus ostreatus* and brown blotch of *Pleurotus ostreatus* controlled by antagonistic bacteria.

요 약

갈반병이 유발된 느타리버섯과 버섯 재배장 주변 토양에서 채집한 균주로부터 갈반병 원인균주 4개와 길항균주 3개를 선발하였다. 선발된 균주를 API 20E kit에 의해 동정한 결과 갈반병 원인 균주 P-24, P-28은 *Pseudomonas putida*로 P-27, P-33

은 *P. tolaasii*로 동정되었으며, 길항균주 중 A-11, A-20은 *Pseudomonas fluorescence*로 A-29는 *Pseudomonas sp*로 동정되었으며, 그 중 A-11 균주가 버섯 균사 및 자실체에 해를 주지 않으면서 길항성이 우수한 균주로 선발되었다. 길항성은 갈반병 원인균 대 길항균의 농도비를 1:1로 처리하였을 때 길항성이 양호하였다.

감사의 글

본 연구는 '97 농림수산 특정 과제에 의하여 연구되었으며 이에 감사 드립니다.

참 고 문 헌

1. Roland, J. F., Z. F. Chmiolowicz, B.A. Weiner and A. M. Gross (1960), Calvacin: a new antitumor agent. *Science* 132: 1897.
2. Gregory, F. J., E. M. Healy, H. P. K. Agerborg, Jr. and G. H. Warren (1966), Studies on antitumor substances produced by Basidiomycetes. *Mycologia* 58: 80.
3. Yoshioka, Y., R. Tabeta, H. Saito, N. Uehara and F. Fukuoka (1985), Antitumor polysaccharides from *P. Ostr-estus*(Fr.) Quel.: Isolation and structure of α -glucan, *Carbohydrate Research* 140: 93-100.
4. Kim, B. K., K. S. Chung and M. S. Yang (1980), Studies on the antinoplastic components of Korean basidiomycetes. *Kor. J. Mycor* 8: 107.
5. Chang, S.T. and P.G. Miles (1989), *Mushroom Science in "Edible mushrooms and their cultivation"* CRC Press, Inc., 3-25
6. 金東秀. (1975). 버섯을 이용한 느타리버섯 재배에 관한 연구. 第1報, 培地 材料에 관한 試驗. 農 試研報 第17輯: 103-107.
8. Healey K. W. and J. M. Harvey (1989). A biological control agent for the mushroom industry *Proceedings Eighth Aust. Biotechnol. Conference*. pp. 322-324.
9. 白田 昭. (1995). 느타리버섯 病原 細菌 毒素의 分離 同定과 特性. 特産情報 第17卷 第2號 通卷 第 194號: 39-41.
10. Wong, W. C and T. F. Preece (1980), *Pseudomonas tolaasii* in mushroom crops: A note on primary and secondary sources of the bacterium on a commercial farm in England. *J Appl. Bacteriol.* 49: 305-304.
11. Nutkins. C. Jennifer. Mortishire-Smith, J. Russell, Packman. C. Leonard, Brodey, L. Catherine, Raney, B. Paul, Johnstone, Keith., Williams. H. Dudley (1991), Structure Determination of Tolaasin, an Extracellular Lipodepsipeptide Produced by the Mushroom Pathogen *Pseudomonas tolaasii* Paine : *J. Am. Chem. Soc.* 113, 2621-2627.
12. Nair, N. G., and D. C. Fahy (1972), Bacteria antagonistic to *Pseudomonas tolaasii* and their control of brown blotch of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*.

- J. Appl. Bact.* 35:439-442.
13. Wong, W. C. and T. F. Preece (1985), *Pseudomonas tolaasii* in mushroom (*Agaricus bisporus*) crops: activity of formulations of 2-bromo-2-nitropane-1,3-diol (bronopol) against the bacterium and the use of this compound to control blotch disease. *J. Appl. Bacteriol.* 58:275-281.
 14. Gandy, D. G. (1968), A technique for screening bacteria causing brown blotch of cultivated mushrooms, Annual Report of the Glasshouse Crops Research Institute for 1967, 150-154.