

pH지시약을 이용한 느타리버섯 액체종균 오염 간이진단법 개발

장명준* · 이윤혜 · 주영철
경기도농업기술원 버섯연구소

Development of Simple Colorimetric Method for Detecting Contamination of Liquid Spawn of Oyster Mushroom by pH Indicator

Myoung-Jun Jang*, Yun-Hae Lee and Young-Cheol Ju

Mushroom Research Station, GARES, Gwang-ju 464-870, Korea

(Received April 2, 2008. Accepted May 22, 2008)

ABSTRACT: For the detection of contaminated liquid spawn, we selected suitable medium, indicator and developed method of diagnosis. The growth of pathogenic bacteria, *Pseudomonas* sp., and fungi, *Trichoderma* sp., in YPL media was better than in PDA and NA. In addition, the changes of color and absorbance of media were obviously showed when contaminated liquid spawn by pathogenic bacteria and fungi was incubated on YPL including phenol red for 48 hour at 25°C. The color of YPLP after incubating of infected liquid spawn by *Pseudomonas* sp. and *Trichoderma* sp. were changed from orange to red and to scarlet, respectively. Whereas, the color of YPLP after incubation of only *Pleurotus ostreatus* indicated yellow at liquid spawn. Therefore, it is possible to easily distinguish contaminated liquid spawn by color of change in YPLP.

KEYWORDS: Detection of contamination, Liquid spawn, Phenol red, *Pleurotus ostreatus*, *Pseudomonas* sp., *Trichoderma* sp., YPLP

버섯 종균은 버섯균을 곡립이나 톱밥배지 또는 액체배지에서 순수배양한 증식체로 작물에서의 종자와 같은 역할을 한다. 일반적으로 느타리버섯의 톱밥종균은 톱밥과 첨가제를 부피비로 8:2로 혼합하여 사용하고 있으며, 액체종균의 경우 대두박에 첨가제를 넣어 조제한 후 산소를 공급하여 종균을 배양한다.

우리나라에서 재배되는 식용버섯은 느타리버섯, 큰느타리버섯, 표고, 팽이, 양송이 등 5종이 주를 이루고 있다(농림부, 2006). 재배형태에 따라서는 균상재배, 봉지재배, 병재배로 나눌 수 있고, 최근에는 시설재배사와 자동화를 이용한 대규모의 병재배 농가가 늘어나고 있는 추세이며, 현재 병이나 봉지를 이용하여 재배하는 전업농가는 자체적으로 버섯종균을 배양하여 사용하고 있는 단계에 까지 이르렀다. 버섯재배의 성패는 배양 및 생육기의 환경관리가 큰 영향을 미치기 때문에 버섯재배전 종균의 오염여부를 확인 하는 것은 반드시 필요한 과정이다. 그러나 농가에서 세균이나 곰팡이의 혼입에 따른 종균의 오염을 육안 및 냄새로 판단하고 있으나 배양중기나 배양후기로 갈수록 구별하기 어려운 실정이며, 버섯재배 실패의 원인이 되기도 한다.

느타리버섯에 심각하게 문제를 일으키는 세균성갈반병과

푸른곰팡이병이 있다. 이 중 세균성갈반병은 *Pseudomonas tolaasii*와 *P. agarici*가 원인이며 보통 한천배지상에서 원형으로 구상(rasied)의 백색, 습광(glistening)을 띤 반투명(translucent)의 colony를 형성하며, dextrose, L-arabinose, levulose, D-xylose, D-mannose, galactose, D-trehalose, cellobiose, M-mannitol, glycerine, inositol, solbitol, L-rhamnose를 분해하여 산을 형성하는 균이며(Krieg and Holt, 1984), 이 등(1996)의 보고에 의하면 *P. tolaasii*와 *P. agarici*가 팽이버섯과 느타리버섯의 균사생장을 현저하게 억제한다고 하였다. 그리고 푸른곰팡이병은 양송이, 표고, 느타리버섯 등 인공재배 버섯의 모든 시기에 감염되어 초기에는 백색균사가 성장하고, 분생자경에 포자가 형성되면서 푸른색을 띠는 병원균들에 의해 발생하는 병원균으로 *Tricoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Gliocladium* 등이 있으며, 이들 중 가장 큰 피해를 주는 균은 *Tricoderma*이며, 발생초기에는 소식회나 벤레이트를 발병부위에 살포하는 방법으로 방제하나 병이 진전되면 방제효과를 보기 어렵다(전 등, 1990). 최 등(1998)에 의하면 푸른곰팡이병은 팽이버섯 재배시 종균배양단계에서는 오염원으로 작용하여 팽이균사의 생육을 억제시켜 활력을 약화시키는 원인이 되며, 불규칙한 발이를 유도하고, 톱밥배지와 자실체 경계부위에 수침상의 부패증상을 나타내어 저장 및 유통과정에 문제를 야기하고 있다고 보고하였다.

*Corresponding author <E-mail : plant119@hanmail.net>

배양기질이나 식품 등에서 신속정확하게 미생물의 오염을 검출하는 것은 순수배양 또는 식품의 안정성 확보 측면에서 매우 중요한 것으로 PCR, 효소반응 등을 이용한 방법 등이 보고되어 있다(Magae *et al.*, 2005; 이 등, 1998a; 정 등, 2003a). 그러나 이러한 방법으로는 버섯균의 오염여부를 농가현장에서 신속하게 진단하기에는 한계가 있다. 따라서 본 연구에서는 느타리버섯 액체종균의 오염여부를 간이진단 할 수 있는 기술을 개발하여 종균오염에 따른 피해를 예방함과 동시에 건전한 종균의 보급체계를 확립코자 본 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

진단배지선발

본 시험에 사용된 버섯균주는 경기도농업기술원 버섯연구소에서 보유하고 있는 느타리버섯균 중 춘추2호를 Potato Dextrose Agar(PDA, Difco Co.) 평판배지에 7일간 배양하여 시험용으로 사용하였다. 검정균으로 세균성갈반병균 *P. tolaasii*와 *P. agarici* 2종, 푸른곰팡이병균 *T. koningii*, *T. harzianum*, *T. atroviride* 그리고 *T. virens* 4종을 사용하였다. 진단용 배지를 선별하기 위하여 PDA배지에서 배양한 춘추2호와 푸른곰팡이, NA배지에서 배양한 세균을 각각 0.05 g씩 액체 및 고체진단배지에 접종하였다. 검정균을 단용으로 진단배지에 각각 접종하였으며, 혼용으로 접종할 경우 액체진단배지는 춘추2호를 먼저 접종하고 후에 검정균을 접종하였으며, 고체진단배지에서는 춘추2호와 검정균을 대치배양 하였다.

YPL(yeast extract, peptone, lactose), PDA, NA배지에 접종하여 25°C에서 7일간 배양한 후 기본배지를 선별하였다. 또한 기본배지로 선별된 진단배지에 pH지시약(bromocresol green, methyl red, bromocresol purple, bromothymol blue, phenol red)을 각각 10 ppm의 농도로 첨가하였으며, 발색반응이 뚜렷하게 관찰된 pH지시약 첨가배지를 진단배지로 선별하였다.

각각의 배지에 pH지시약을 첨가하여 춘추2호와 검정균을 배양한 후 고체진단배지의 균주별 발색반응은 육안으로 조사하였으며, 액체진단배지의 균주별 발색반응은 분광광도계(TECAN, GENios)로 BG첨가배지는 612 nm, MR첨가배지는 230 nm, BP첨가배지는 599 nm, BTB첨가배지는 610 nm, PR첨가배지는 560 nm에서 흡광도를 측정하여 반응전후의 값을 흡광도변화율[% ($\Delta O.D_{\text{반응후}} - \Delta O.D_{\text{반응전}} / \Delta O.D_{\text{반응전}} \times 100$)]로 나타내었다. 배지 pH의 변화는 pH meter(Radiometer, Co.)를 이용하여 측정하였다.

액체종균 오염진단

본 시험에 사용된 버섯균주는 춘추2호를 사용하였으며, 검정균으로 세균성갈반병균은 *P. tolaasii*와 *P. agarici* 2종을 NB배지(NB, Difco Co.)에 25°C로 6일간 배양하였

고, 푸른곰팡이병균은 *T. koningii*, *T. harzianum*, *T. atroviride* 3종을 PDA배지에 25°C로 6일간 배양하여 접종원으로 사용하였다.

액체종균은 대두박 3 g, 황설탕 30 g, KH_2PO_4 0.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, 식물성식용유 3 ml를 증류수 1 l에 혼합하여 사용하였으며, 삼각플라스크에 각각 200 ml를 분주하여 121°C에서 20분간 살균한 후 냉각하여 춘추2호는 평판배지(φ87 mm)에서 배양된 원균 1/2분량의 균사체를 접종하였고, 세균은 *P. tolaasii*와 *P. agarici* 모두 1.0×10^8 (cfu/ml) 밀도의 현탁액을 제조하여 각각 2 ml씩 춘추2호가 접종되어 있는 액체종균에 접종하였으며, 푸른곰팡이는 평판배지(φ87 mm)에 배양하여 평판배지 1/4분량의 균사체를 춘추2호가 접종되어 있는 액체종균에 접종하였다.

발색반응을 조사하기 위하여 검정균 접종 후 5일간 배양한 다음 진단배지에 접종하였으며, 진단배지의 배양온도는 25°C로 48시간 후에 발색반응을 조사하였다. 액체진단배지의 균주별 발색반응은 분광광도계(TECAN, GENios)로 560 nm에서 측정하여 반응전후의 흡광도변화율(%)을 진단배지 선발시 측정된 것에 준하여 조사하였다. 색상의 변화는 육안으로 조사하였으며, 색변화를 객관적으로 검정하기 위해 색차계(Minolta-720)를 이용하여 L(lightness, 명도), a값(redness, 적색도), b값(yellowness, 황색도)과 ΔE 값(color difference, 색차)을 측정하였다. 그리고 pH는 pH meter(Radiometer Co.)를 이용하여 측정하였다. 고체진단배지의 경우 육안으로 발색반응을 확인하였다.

결과 및 고찰

진단용 배지선발

YPL배지에 pH지시약 5종을 각각 첨가하여 버섯균 및 검정균을 배양하여 발색반응을 조사한 결과(Fig. 1), BP(bromocresol purple), BTB(bromothymol blue) 그리고 PR(phenol red)을 첨가한 배지에서 검정균 접종시 발색반응을 보였다.

검정균에 의한 발색반응을 좀더 정밀하게 확인하기 위하여 액체배지에 검정균을 접종하여 배양한 후 흡광도 변화를 측정된 결과(Fig. 2), BTB와 PR을 첨가한 배지가 그 외의 pH지시약 첨가배지에 비해 흡광도의 변화율이 컸으며, 검정균들의 경우 푸른곰팡이병균 보다는 세균에서 흡광도변화율이 큰 것으로 나타났다. 검정균들의 경우 주로 음(-)의 흡광도 변화율을 나타내는 것이 많았으며, 춘추2호의 경우 양(+)의 흡광도 변화율로 나타났다. 흡광도변화율의 경우 음(-)의 값이 높을수록 반응 후 액체진단배지 색깔의 진한정도가 강한 것을 나타내는 데 검정균 접종구가 춘추2호보다 진하게 변화하는 것을 알 수 있었다.

pH지시약을 첨가한 액체진단배지에 느타리버섯균과 검정균을 각각 접종하여 25°C에서 7일간 배양한 후의 pH변

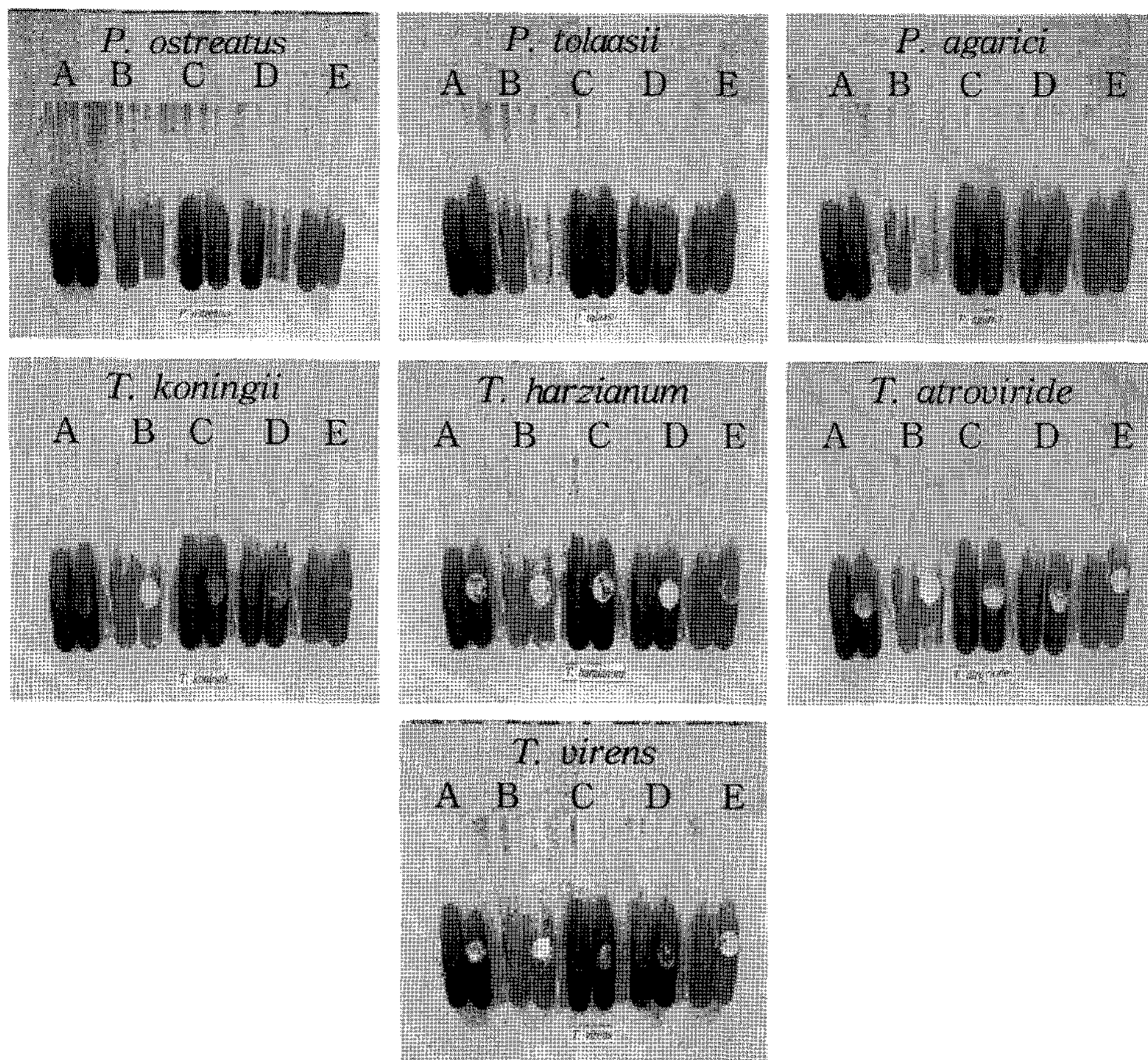


Fig. 1. Changes in color of YPL liquid media including the pH after growth of microorganisms. A: BG (bromocresol green), B: MR (methyl red), C: BP (bromocresol purple), D: BTB (bromothymol blue), E: PR (phenol red). Left and Right media are show to non-inoculated and microorganism inocuated media, respectively.

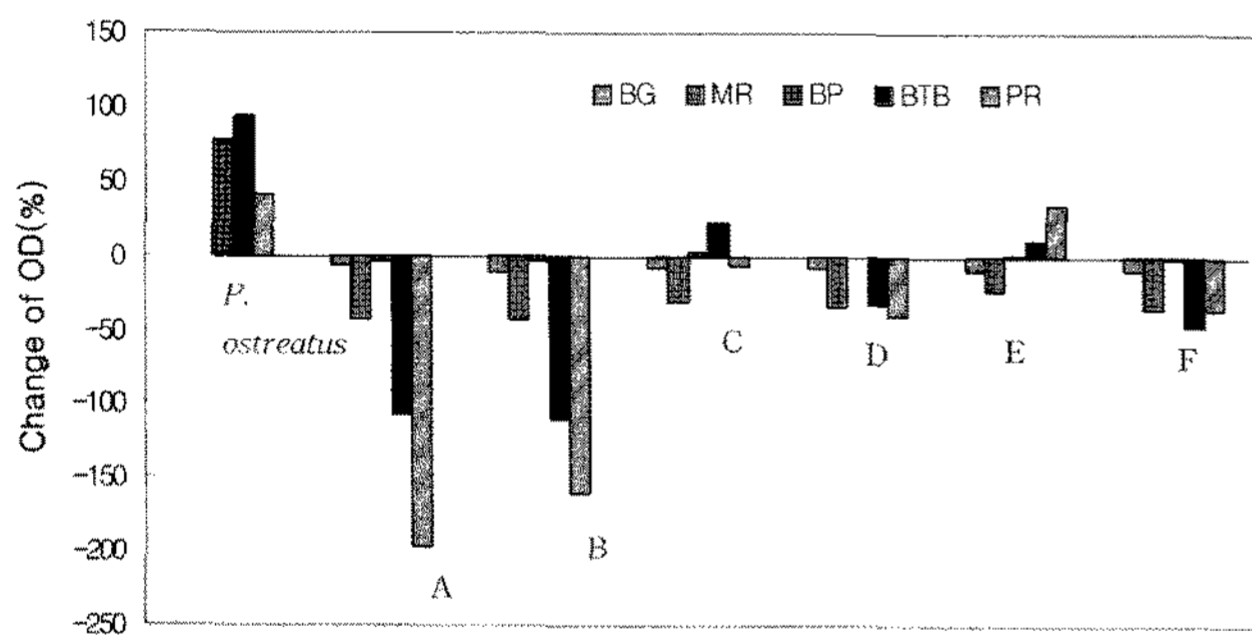


Fig. 2. Changes in optical density of YPL media including indicators after culturing microorganisms. A: *P. tolaasii*, B: *P. agarici*, C: *T. koningii*, D: *T. harzianum*, E: *T. atroviride*, F: *T. virens*.

Table 1. Changes in pH of media including indicators after growth of microorganisms cultured for 7 days at 25°C

Microorganism	Indicators ^a				
	BG	MR	BP	BTB	PR
<i>P. ostreatus</i>	6.7	6.7	6.6	6.7	6.6
<i>P. tolaasii</i>	7.8	8.1	8.0	8.1	7.9
<i>P. agarici</i>	7.5	7.4	7.3	7.5	7.2
<i>T. koningii</i>	7.3	6.9	6.9	7.1	7.1
<i>T. harzianum</i>	7.3	7.2	7.2	7.3	7.3
<i>T. atroviride</i>	6.9	6.8	6.8	6.9	6.7
<i>T. virens</i>	7.3	7.3	7.3	7.4	7.2

^aBG: Bromocresol green, MR: Methyl red, BP: Bromocresol purple, BTB: Bromothymol blue, PR: Phenol red. Initial pH of media was adjusted to 7.0.

화는 Table 1과 같다. BTB와 PR첨가배지에서 흡광도변화율(%)은 크게 나타났으나 pH의 변화는 5종의 지시약 모두 비슷한 경향이였다. 춘추2호를 배양한 배지의 pH는 6.6~6.7이었으며, 검정균을 배양한 배지의 pH는 춘추2호보다 최저 0.1에서 최대 1.4정도 높았다.

이와 같이 액체진단배지에서 발색반응은 pH 요인이기 보다는 버섯균의 세포외 분비효소 중 리그닌 분해효소 등

의 활력에 따라 색깔이 변화 된 것으로 판단된다. 古川久彦(1992)는 목재부후균의 대부분이 천연배양 기질에 함유되어 있는 리그닌을 분해하여 이용하고, 리그닌 또는 관련물질을 배지에 첨가한 결과 팽이버섯, 표고, 느타리 등의 목재부후균의 균사생장이 촉진되었다고 보고하였다. 따라서 BTB와 PR의 화학구조가 방향족탄화수소를 가지고 있고, 이것이 리그닌의 구조와 비슷한 구조이기 때문

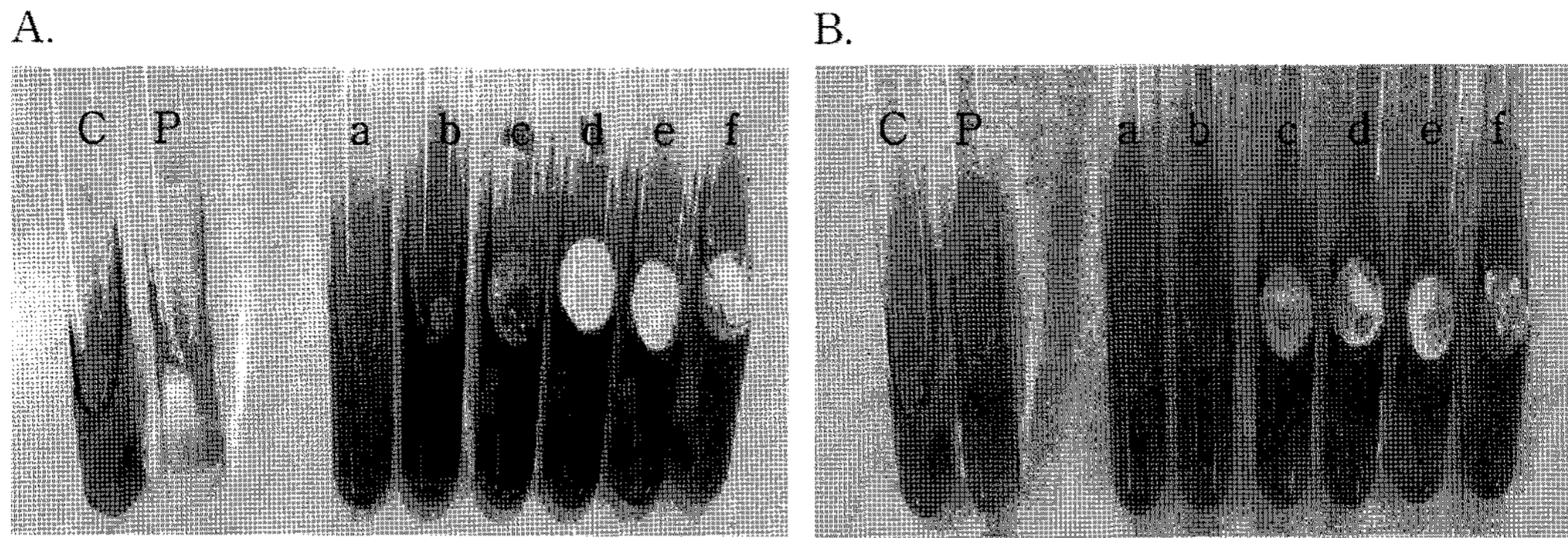


Fig. 3. Changes in color of YPL liquid media including BTB (A) and PR (B) when *P. ostreatus* and microorganism causing disease of mushroom were together cultured for 7 days at 25°C. C: non-inoculated media, P: *P. ostreatus*, a: *P. ostreatus* + *P. tolaasii*, b: *P. ostreatus* + *P. agarici*, c: *P. ostreatus* + *T. koningii*, d: *P. ostreatus* + *T. harzianum*, e: *P. ostreatus* + *T. atroviride*, f: *P. ostreatus* + *T. virens*.

에 각각의 검정균별로 분비하는 효소의 분해 정도에 따라 발색반응이 나타나는 것으로 판단되었다.

각각의 검정균별 고체진단배지에서의 변색반응 결과, BTB와 PR 첨가배지에서 춘추2호는 발색반응이 나타나지 않는 반면, 세균 및 푸른곰팡이병균에서 BTB 첨가배지는 녹색에서 청색으로, PR 첨가배지는 주황색에서 적색으로 변화하였다(성적미기재). 이상의 액체진단배지 및 고체진단배지 시험결과 오염진단배지는 YPL배지, 지시약은 BTB와 PR을 선발하였다.

선발한 YPL배지에 지시약 BTB와 PR을 첨가한 진단배지에서의 춘추2호와 검정균을 혼합접종하여 변색반응을 관찰한 결과(Fig. 3), BTB를 첨가한 액체진단배지에서 춘추2호는 녹색에서 황색으로 변화하였고, 춘추2호와 검정균의 혼합접종 처리구는 녹색에서 청록색으로 변화하였다. 또한 PR을 첨가한 액체진단배지에서 춘추2호는 주황색으로 색상의 변화가 없었고, 춘추2호와 검정균의 혼합접종은 주황색에서 적색으로 변화하여, 각각의 검정균 단용접종의

액체진단배지 변화와 유사한 경향으로 나타났다.

혼합접종시 액체진단배지에서의 흡광도변화율을 측정 한 결과(Fig. 4), BTB보다 PR을 첨가한 배지에서 흡광도가 크게 변화였다. 단용접종시와 유사한 경향을 나타내었으나 푸른곰팡이 중 *T. atroviride*는 양(+)의 흡광도 변화율로 나타났다.

한편, 혼합접종시 액체진단배지의 pH변화는(Table 2) BTB와 PR을 첨가한 액체진단배지 모두 비슷한 변화가 나타났다. 푸른곰팡이 중 *T. atroviride*를 제외한 모든 검정균 접종에서 춘추2호보다 다소 알칼리성으로 변화하는 것으로 나타났다.

이와 같이 혼합접종한 액체진단배지에서의 발색반응은 단용접종시와 유사하였으며, 세균 및 푸른곰팡이병균의 접종에 의해 pH변화 보다는 버섯균의 효소활력이 저하되어 지시약의 색깔이 변화 된 것으로 판단된다.

YPL배지에 BTB, PR을 각각 첨가하여 제조한 고체진단배지의 변색반응 결과(Fig. 5), BTB를 첨가한 배지에서 춘추2호는 녹색에서 연두색으로 변화하였고, 춘추2호와 검정균 혼합접종에서는 녹색에서 청록색으로 변화하였다. 그리고 PR을 첨가한 배지에서 춘추2호는 주황색으로 색상의 변화가 없었고, 춘추2호와 검정균 혼합접종에서는 주황색에서 적색으로 변화하였으며, 액체진단배지와 유사한

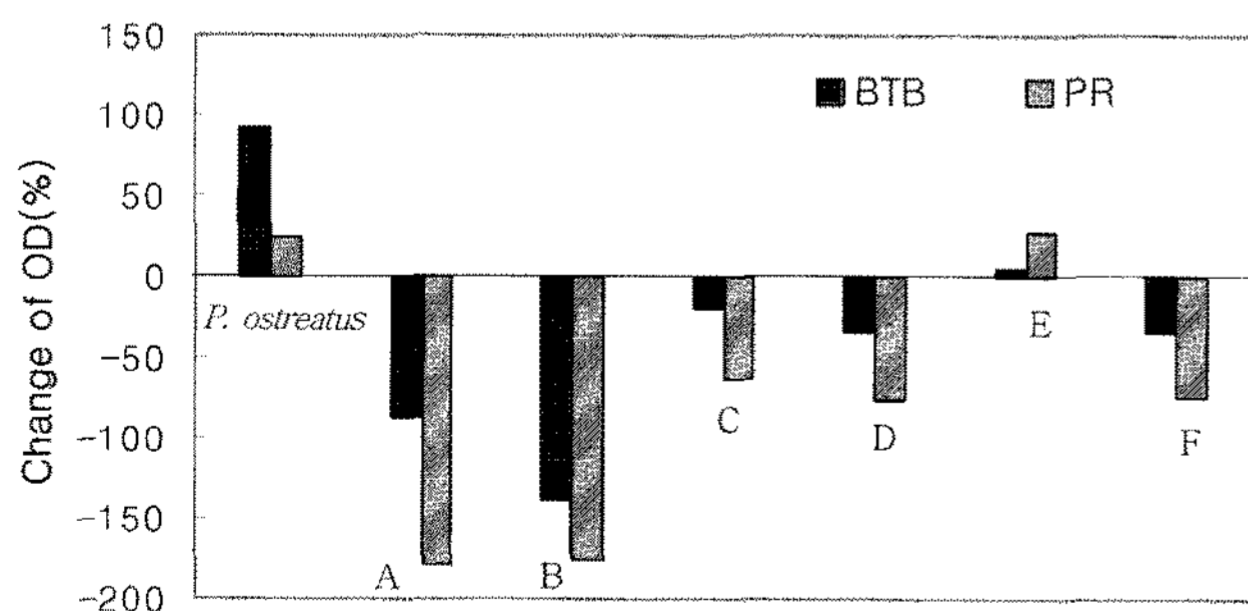


Fig. 4. Changes in optical density of media including BTB and PR when *P. ostreatus* and microorganism causing disease of mushroom were together cultured for 7 days at 25°C. A: *P. ostreatus* + *P. tolaasii*, B: *P. ostreatus* + *P. agarici*, C: *P. ostreatus* + *T. koningii*, D: *P. ostreatus* + *T. harzianum*, E: *P. ostreatus* + *T. atroviride*, F: *P. ostreatus* + *T. virens*.

Table 2. Changes in pH of media including BTB and PR when *P. ostreatus* and microorganism causing disease of mushroom were together cultured for 7 days at 25°C

Microorganism	BTB	PR
<i>P. ostreatus</i>	6.8	6.8
<i>P. ostreatus</i> + <i>P. tolaasii</i>	8.1	8.0
<i>P. ostreatus</i> + <i>P. agarici</i>	8.0	7.9
<i>P. ostreatus</i> + <i>T. koningii</i>	7.6	7.4
<i>P. ostreatus</i> + <i>T. harzianum</i>	7.6	7.5
<i>P. ostreatus</i> + <i>T. atroviride</i>	6.9	6.9
<i>P. ostreatus</i> + <i>T. virens</i>	7.4	7.5

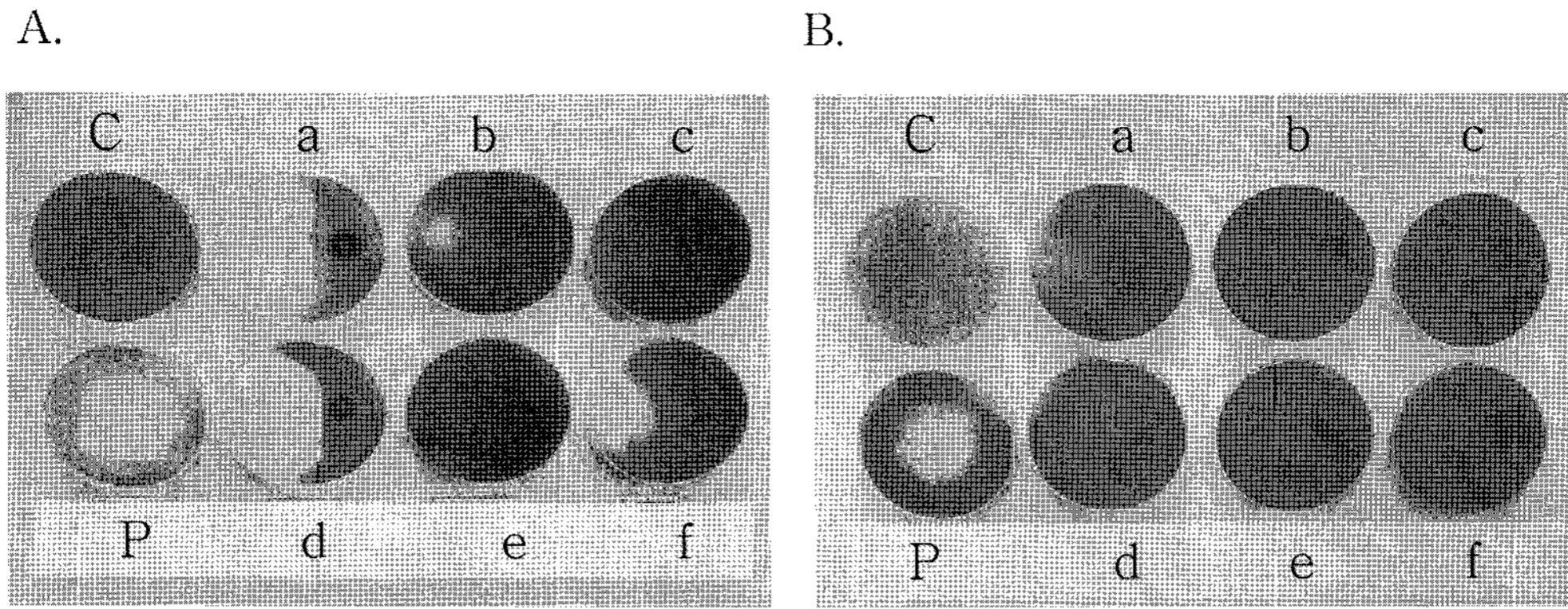


Fig. 5. Changes in color of solid media including BTB (A) and PR (B) when *P. ostreatus* and microorganism causing disease of mushroom were together cultured for 7 days at 25°C. C: non-inoculated media, P: *P. ostreatus*, a: *P. ostreatus* + *P. tolaasii*, b: *P. ostreatus* + *P. agarici*, c: *P. ostreatus* + *T. koningii*, d: *P. ostreatus* + *T. harzianum*, e: *P. ostreatus* + *T. atroviride*, f: *P. ostreatus* + *T. virens*.

결과를 나타냈다.

이상의 결과로 BTB와 PR첨가 배지 모두 색변화의 관찰이 용이하였으나 BTB보다 PR을 첨가한 액체진단배지에서 흡광도변화율이 크고, 고체진단배지에서는 춘추2호가 접종되어 있는 부분까지 색변화가 관찰되어 육안검정이 더 양호하였다. 따라서 YPL배지에 PR지시약을 첨가한 배지를 최종적으로 선발하였다.

액체종균 오염진단

톱밥종균의 종균퇴화 문제가 제기되면서 액체종균의 이용 가능성에 대한 연구가 시작되었고(정 등, 2003b; 홍 등, 2003), 최근에는 버섯재배의 자동화로 액체종균의 사용이 많이 증가하였다. 그러나 액체종균배양 탱크가 대부분 스테인레스로 되어 있어 배양상태를 육안으로 관찰하기 어려워 냄새 등에 의존하고 있는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 발색반응을 이용하여 액체종균의 오염여부를 확인하기 위하여 춘추2호 및 검정균 혼용접종구의 액체종균배

양을 실시하였다. 액체배양 5일째의 배양상태는 세균을 접종한 배지는 육안으로 구별하기 어려웠으나 푸른곰팡이를 접종한 배지는 다소 혼탁하였고 배양기간이 길면 플라스크벽에 푸른색의 포자가 형성되기도 하여 구별이 가능하였다(성적미기재).

일반적으로 세균의 경우 영양조건과 환경조건이 최적상태에서는 20~30분 만에 2배씩 증식하는데, *P. tolaasii*와 *P. agarici*은 그람음성세균으로서 *P. tolaasii*에서 tolaasin이라 불리는 독소물질을 분비하여 버섯균의 원형질막을 파괴한다고 보고하였으며(Fett *et al.*, 1995), 이 등(1998b)은 *P. agarici*가 배양배지내에서 팽이버섯균의 균사생장을 75%이상 억제한다고 보고하였다. 그리고 푸른곰팡이의 경우 *Trichoderma* sp.의 대부분은 chitinase, cellulase 등 다양한 종류의 효소와 trichodermin과 peptidase 항생물질을 생산하여 다른 균류의 생장을 억제하는 것으로 보고되었다(Dennis and Webster, 1971). 본 실험에서도 이와 같이 오염균들이 독소물질을 분비하여 춘추2호 균사를 가해함으로써 춘추2호의 균사생육은 약해지고, 검정균들의 생장이 증가하는 것으로 판단되었다.

YPLP액체진단배지에 접종구별로 접종하여 48시간 후의 색차(ΔE)를 나타낸 것은 Table 3과 같다. L값의 경우

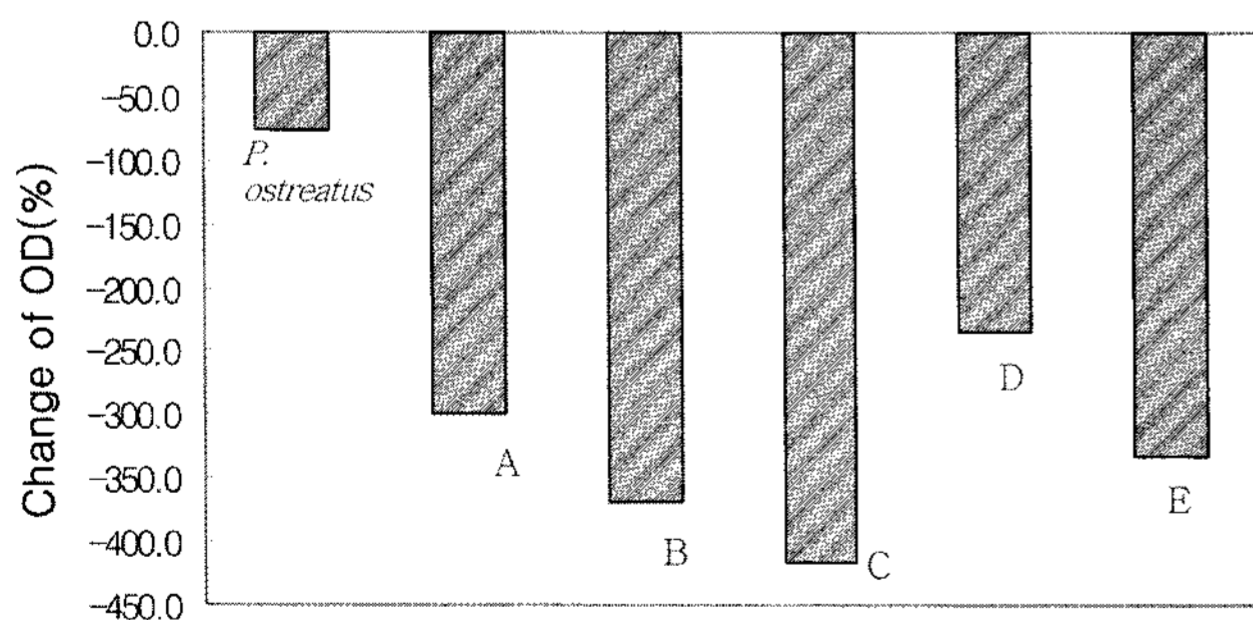


Fig. 6. Changes in optical density of YPLP liquid media including PR when *P. ostreatus* and microorganism causing disease of mushroom were together cultured for 2 days at 25°C. A: *P. ostreatus* + *P. tolaasii*, B: *P. ostreatus* + *P. agarici*, C: *P. ostreatus* + *T. koningii*, D: *P. ostreatus* + *T. harzianum*, E: *P. ostreatus* + *T. atroviride*.

Table 3. Color of YPLP liquid media when *P. ostreatus* and microorganism causing disease of mushroom were together cultured for 5 days at 25°C

Microorganism	L ^a	a ^b	b ^c	E ^d
Non-inoculated	60.13	3.23	15.81	0
<i>P. ostreatus</i>	63.6	-2.4	18.4	47.1
<i>P. ostreatus</i> + <i>P. tolaasii</i>	63.4	11.3	8.1	105.5
<i>P. ostreatus</i> + <i>P. agarici</i>	61.5	13.2	23.5	130.8
<i>P. ostreatus</i> + <i>T. koningii</i>	63.2	-3.3	13.4	55.0
<i>P. ostreatus</i> + <i>T. harzianum</i>	64.3	-2.5	17.6	51.8
<i>P. ostreatus</i> + <i>T. atroviride</i>	62.3	-1.6	12.7	32.9

^aLightness, ^bRedness, ^cYellowness, ^d $\Delta E = \sqrt{(L_{initial} - L_{measure})^2 + (a_{initial} - a_{measure})^2 + (b_{initial} - b_{measure})^2}$

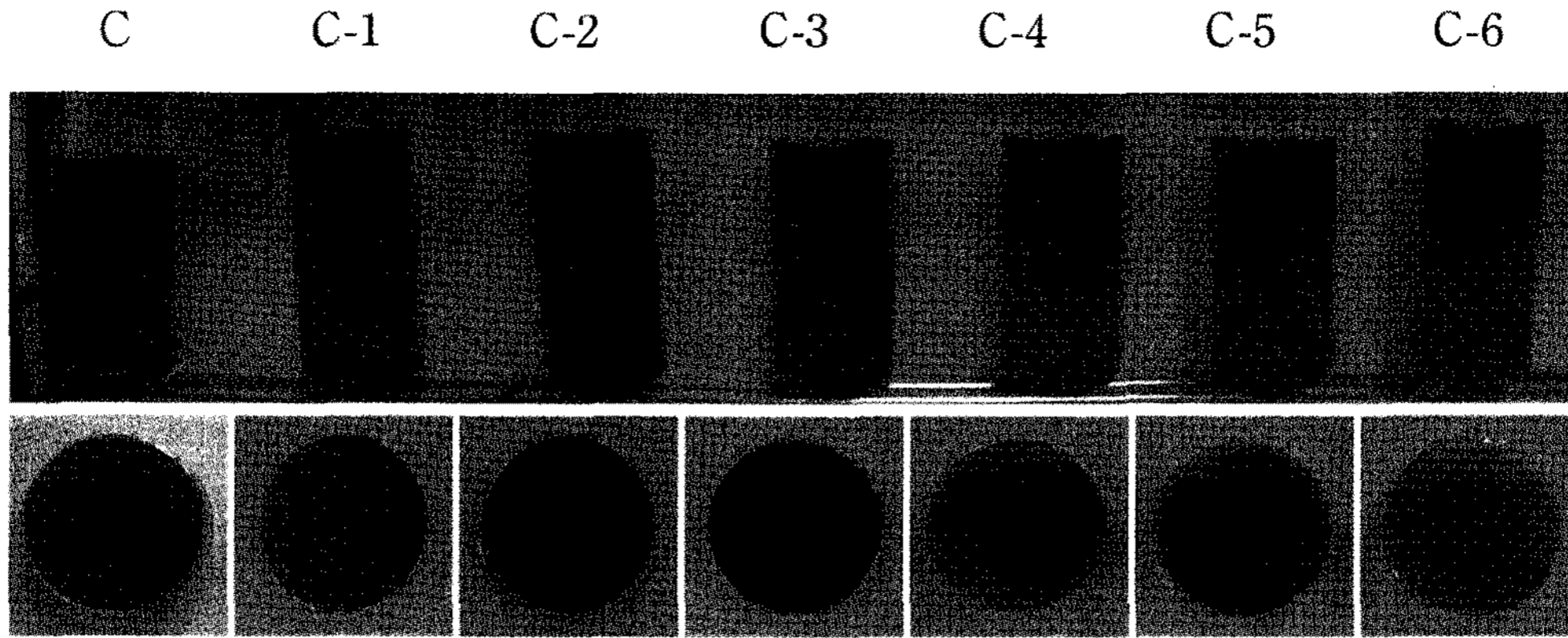


Fig. 7. Changes in color of YPLP media when *P. ostreatue* and microorganism causing disease of mushroom were together cultured for 2 days at 25°C. C: Non-inoculated, C-1: *P. ostreatus*, C-2: *P. ostreatus* + *P. tolaasii*, C-3: *P. ostreatus* + *P. agarici*, C-4: *P. ostreatus* + *T. koningii*, C-5: *P. ostreatus* + *T. harzianum*, C-6: *P. ostreatus* + *T. atroviride*. Upper and below photo is showed liquid and solid media, respectively.

처리구별 큰 차이는 없었으나 a값의 경우 춘추2호 및 푸른곰팡이는 -값, 세균은 +값으로 세균 접종구에서 적색도가 강한 것으로 나타났다. b값은 접종구별로 황색도가 모두 +값으로 나타났다.

오염된 액체종균의 흡광도변화율은 Fig. 6과 같다. 모든 처리구에서 낮은 흡광도의 값을 나타내었으며, 춘추2호 접종구에 비해 검정균 접종구의 흡광도 변화율이 크게 나타났다.

배양 5일 후 오염된 액체종균의 YPLP진단배지에서의 25°C, 48시간 후의 발색반응을 조사한 결과(Fig. 7), 액체 배지에서는 세균 오염은 적색으로 나타났으며, 푸른곰팡이 오염은 연두색으로 나타났다. 고체배지에서는 무접종 대비 춘추2호는 색변화가 없었고, 모든 검정균 접종구에서 적색 및 선홍색의 발색반응을 나타내었다.

이와 같은 결과로 액체종균 YPLP진단배지의 발색반응은 세균, 푸른곰팡이 모두 액체진단배지보다는 고체진단배지에서 색변화의 관찰이 용이하였으므로 YPLP고체진단배지가 적합한 것으로 판단되었다.

적 요

pH지시약을 YPL배지에 첨가하여 진단배지로 사용하였으며, 진단배지의 발색반응을 기준으로 오염균을 진단할 수 있는 기술을 개발코자 수행한 결과는 다음과 같다.

느타리버섯의 액체종균에 병원균 *P. tolaasii*, *P. agarici*, *T. koningii*, *T. harzianum*, *T. atroviride*, *T. virens*에 대한 오염진단을 위해 BG, MR, BP, BTB, PR 5종의 지시약이 각각 포함된 배지에서 발색반응 결과 BTB첨가배지는 녹색에서 청록색, PR첨가배지는 주황색에서 적색으로 변하여 오염균 진단배지로 선발하였다. 그리고 이후의 실험에서 BTB보다 PR첨가배지의 흡광도 변화율이 크게 나타나 YPL배지에 PR을 첨가한 액체 및 고체진단배지를 최종적

으로 선발하였다.

5일간 배양된 액체종균의 진단배지 발색반응으로 세균 (*Pseudomonas* sp.)접종구는 액체 및 고체진단배지 모두 적색의 발색반응이 나타났고, 푸른곰팡이(*Trichoderma* sp.)접종구는 액체진단배지에서 연두색으로 나타났으며, 고체진단배지의 경우 선홍색으로 나타났다. 따라서 액체종균 오염진단은 YPLP고체진단배지에서 가장 발색반응이 뚜렷하여 적합한 배지로 판명되었다.

참고문헌

- 농림부. 2006. 특용작물생산실적. pp. 44-81.
- 이항범, 전낙범, 손동화, 유승현. 1998a. 느타리버섯 세균성갈반 병원균 *Pseudomonas tolaasii*의 효소면역검출법. 한국산업미생물학회지 26:238-243.
- 이현욱, 이명환, 조동진, 신원교, 문병주. 1996. 버섯 세균성갈반 병원균 *Pseudomonas* spp.가 애느타리 및 팽이의 균사생장에 미치는 영향. 농업논문집 38:887-892.
- 이현욱, 문병주, 이흥수, 차홍오, 조동진, 신원교. 1998b. *Pseudomonas agarici*와 *P. tolaasii*의 접종시기 및 접종농도가 팽이버섯의 균사생장과 자실체형성에 미치는 영향. 한국균학회지 26:60-68.
- 전창성, 유창현, 차동열, 김광포. 1990. 느타리버섯 푸른곰팡이병에 대한 Thiabendazole의 방제효과. 한국균학회지 18:89-95.
- 정규식, 김우재, 장후봉, 차재순. 2003a. PCR을 이용한 느타리버섯 재배사 물로부터 세균성갈색무늬병 병원균 *Pseudomonas tolaasii* 검출. 한국버섯학회지 1:28-33.
- 정종천, 홍인표, 장갑열, 박정식. 2003b. 버들송이(*Agrocybe cylindracea*)의 액체종균 배양조건과 접종량. 한국균학회지 31:94-97.
- 최인영, 이왕휴, 최정식. 1998. *Trichoderma pseudokoningii*에 의한 팽이버섯 푸른곰팡이병. 한국균학회지 26:531-537.
- 홍성준, 이원호, 신범수, 성재모. 2003. 느타리·팽나무버섯 재배에서 액체종균 배양 및 접종시스템 적용방법의 구명. 한국균학회지 31:22-27.
- 古川久彦. 1992.きのこ學. 共立出版(株). pp. 85-86.
- Dennis, C. and Webster, J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. Production of non-volatile antibi-

- otics. *Transact. Brit. Mycol. Soc.* 57:25-39.
- Fett, W., Wells, J. M., Cescutti, P. and Wijey, C. 1995. Identification of exopolysaccharides produced by fluorescent pseudomonas associated with commercial mushroom (*Agaricus bisporus*) production. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:513-517.
- Krieg, N. R. and Holt, J. G. 1984. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams & Wilkins. Volume 1. Section 4. pp. 188-199.
- Magae, Y., Akahane, K., Nakamura, K. and Tsunoda, S. 2005. Simple colorimetric method for detecting degenerate strains of the cultivated Basidiomycete *Flammulina velutipes* (Enokitake). *Appl. Environ. Microbiol.* 71:6388-6389.