

버섯 세균성회색무늬병균 (*Pseudomonas agarici*) 에 대한 항균활성을 가지는 *Bacillus safensis* HC42

이찬중* · 이은지 · 박혜성 · 공원식

농촌진흥청 국립원예특작과학원 버섯과

Antagonistic Effect of *Bacillus safensis* HC42 on Brown Blotch Mushroom Disease Caused by *Pseudomonas agarici*

Chan-Jung Lee*, Eun-Ji Lee, Hae-Sung Park, and Won-Sik Kong

Mushroom Research Division, NIHHS, RDA, Eumseong 369-873, Korea

ABSTRACT: A gram-positive bacterium was isolated from the spent substrate of *Agaricus bisporus* that showed a marked antagonistic activity against *Pseudomonas agarici*. It was identified as *Bacillus safensis* HC42 based on its cultural, biochemical, and physiological characteristics, and 16S rRNA sequence. *B. safensis* HC42 was saprophytic, but not parasitic or pathogenic, in cultivated mushrooms and showed strong inhibition of *P. agarici* *in vitro*. Moreover, it showed a control efficacy of 66 % against browning disease caused by *P. agarici* in *Agaricus bisporus*. Therefore, *B. safensis* HC42 may be useful in the future for the development of a biocontrol system.

KEYWORDS: *Agaricus bisporus*, *Bacillus safensis*, Control efficacy, Mushrooms, *Pseudomonas agarici*

서 론

버섯에 병을 일으키는 *Pseudomonas* 속에는 *P. tolaasii*, *P. agarici*, *P. gingeri* 그리고 병원성 *P. reactans* 등이 보고되었다(Wells *et al.*, 1996; Wong *et al.*, 1982; Young, 1970). 이들 병원균들은 버섯의 수량감소 및 상품가치를 떨어뜨리는 하나의 원인이 되고 있다(Fermor, 1986; Gill, 1995). 이들 중 양송이버섯에 가장 큰 피해를 주는 병원균은 세균갈색무늬병을 일으키는 *P. tolaasii*이며, 세균갈색

무늬병은 1915년 Tolaas에 의하여 처음으로 보고되었으며(Tolaas, 1915), 1919년 Paine에 의하여 *P. tolaasii*로 명명되었다(Paine, 1919). *P. tolaasii*에 의한 갈색무늬 증상은 *P. gingeri*에 의해 발생하는 옅은 갈색(yellow-brown)의 반점병인 ginger blotch disease와 유사한 특성을 갖는다(Wong *et al.*, 1982; Cutri *et al.*, 1984). 양송이 재배에 있어 또 다른 2종류의 세균이 병을 일으키고 있으며 이들 중 *P. gingeri*는 giner blotch을 일으키고(Wong *et al.*, 1982), *P. agarici*는 양송이 갓의 표면에 갈색의 점무늬를 넓게 형성하여 상품성을 저하시키는 것으로 보고되어 있다(Geels *et al.*, 1994). 또한 *Pseudomonas agarici*는 느타리버섯에 yellow blotch을 일으키고(Bessette *et al.*, 1985), 양송이 갓과 대에 회색무늬병을 일으킨다. 이병은 병 발생의 예측이 매우 어렵고, 한번 발생하면 재배사 전체로 급격하게 전염되어 심한 경우에는 버섯을 전혀 수확하지 못하게 하는 특성이 있다(Lee and Cha, 1998).

최근에는 식물병 방제를 위해 화학농약의 대안으로 길항미생물을 이용한 생물학적 방제에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다(Scherwinski *et al.*, 2008). 오스트리아에서 Nair과 Fahy(1972)는 길항균을 이용한 갈색무늬병 방제에 대해 처음으로 연구하였고, Nutkins *et al.*(1991)

J. Mushrooms 2019 March, 17(1):19-23
<http://dx.doi.org/10.14480/JM.2019.17.1.19>
 Print ISSN 1738-0294, Online ISSN 2288-8853
 © The Korean Society of Mushroom Science

*Corresponding author
 E-mail : lchanj@korea.kr
 Tel : +82-43-871-5711

Received February 19, 2019
 Revised March 6, 2019
 Accepted March 20, 2019

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

은 *P. fluorescens*가 *P. tolaasii*에 대해 길항성을 가진다고 하였으나 병원균에 비해 80배의 많은 수가 있어야 효과가 있으므로 실용성이 떨어진다고 보고 하였다. 국내에서는 세균갈색무늬병이 분비하는 독소를 저해하는 독소저해균 및 길항미생물 선발하여 생물학적 방제를 위한 연구를 수행하고 있다(Lee *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2014b). 이와 같이 세균병 방제를 위하여 항생제를 이용한 화학적 방제와 길항미생물을 이용한 생물적 방제법이 계속하여 시도되고 있지만 아직 만족할 만한 효과를 거두지 못하고 있는 실정이다(Park *et al.*, 1992). 또한 버섯은 화학농약 처리에 의한 방제는 안전성문제로 사용이 어렵기 때문에 생물적 방제법에 의한 새로운 방법의 도입이 요구되고 있다.

따라서 본 연구에서는 양송이 세균성회색무늬병의 생물학적 방제를 위하여 길항미생물을 선발 및 동정하여 화학농약 대체를 위한 친환경 방제법을 개발할 목적으로 수행하였다.

재료 및 방법

미생물 분리

유용한 미생물을 분리하기 위해 재배중인 느타리버섯 수확후배지와 양송이 배지를 농가별 3점씩 채취하여 실험에 사용하였다. 미생물의 분리는 R2A배지에 단계별로 희석 배양하여 50~60개의 colony를 형성한 plate로부터 독립적으로 분리하였다. 순수 분리한 미생물은 약 3,500균 주였으며, 이들 분리 미생물은 R2A배지에서 2일 동안 배양한 후 균체를 모아서 20%(v/v) 글리세롤 용액에 넣어 -70°C에 보존하면서 검정용 시료로 사용하였다.

길항미생물 HC42의 선발

순수 분리한 미생물로부터 세균성회색무늬병균(*Pseudomonas agarici*)에 대한 길항 미생물을 선발하기 위하여 paper disk methods를 이용하였다. 병원균은 R2A배지(Kim and Whang, 2002)에 24시간 배양한 후 균체를 모아 100 µl 멸균수가 든 1.5 ml e-tube에 넣고 현탁(5×10^6 cfu/ml)하였고, 분리 미생물은 R2A배지에 48시간 동안 배양한 후 균체를 모아 50 µl 멸균수가 든 e-tube에 넣고 현탁(5×10^7 cfu/ml)하였다. 길항력 조사는 병원균 100 µl를 취하여 페트리디쉬에 도말한 후 8mm paper disk를 올려놓고 분리 미생물 70 µl를 취하여 paper disk에 접종하여 생육저지환의 정도에 따라 각 균주에 대한 길항능력을 평가하였다. 그 결과 길항력이 높은 미생물 HC42를 선발하였다. 그리고 이 미생물을 특허균주로 농업유전자원센터(KACC91773P)에 기탁하였다.

길항미생물 HC42의 DNA 분리 및 16S rRNA 유전자 염기서열의 결정

DNA는 Quiagen Genomic DNA Isolation Kit(Quiagen,

USA)을 사용하여 분리하였고, PCR 증폭은 Techne thermocycler(Techne LTD, Duxford, Cambridge, U.K.)로 수행하였다. PCR 반응혼합액은 1 x buffer (10 mM Tris-HCl pH 9.0, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 0.01% gelatin and 0.1% Triton X-100), 최종농도 200 µm의 deoxyribonucleotide triphosphates(dATP, dCTP, dTTP), 0.6 U Taq DNA polymerase(Molecular Biochemicals, Mt Wellington, Auckland, New Zealand), 최종농도 2 µm의 정, 역 방향의 primers [fD1(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 rP2(5'-ACGGCT ACCTTGTTACGACTT-3')] 그리고 10 ng template DNA로 이루어졌다. PCR은 94°C에서 1분, 56°C에서 1분 그리고 72°C에서 2분간 30cycles로 수행하였고, 반응 후 primer와 dNTP는 High Pure PCR Product Purification Kit(Bioneer Co., Chungbuk, Korea)을 사용하여 PCR 산물로부터 제거하였다. 정제된 PCR 산물은 pT7 blue Vector(Novagen Co., Madison, WI, USA)에 클로닝하여 Big Dye Terminator Kit와 ABI Prism 310 Genetic Analyzer(Perkin Elmer, New Jersey, USA)를 사용하여 염기서열을 결정하였다. 결정된 16S rRNA 유전자의 염기서열은 GenBank Database에 등록하였다. 종 유사성 결정을 위해 Clustral W 분석프로그램(Thompson *et al.*, 1994)을 사용하여 GenBank에 있는 다른 염기서열들과 비교하였다. Jukes와 Cantor(1969) 방법을 이용하여 evolutionary distance matrix를 작성하고, MEGA 4의 Neighbor-joining 방법을 이용하여 계통수를 작성하였으며, tree의 안정성은 1000 반복의 bootstrap 분석으로 조사하였다.

길항미생물 HC42의 생리·생화학적 특성

선발 유용미생물의 생화학적인 특성을 조사하기 위하여 기본배지(Stanier *et al.*, 1966)에 다양한 종류의 탄소원 fructose 등 18종, 질소원 6종 등을 0.1%(w/w)씩 첨가하여 생육정도를 조사하였으며, 부가적으로 API 20E, API 20NE, 50CH 키트 (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France)를 사용하였고, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Palleroni, 1984)에 준하여 실험을 하였다.

길항미생물 HC42의 방제효과 검정

세균성회색무늬병의 방제효과를 검정하기 위해 폿트(30×20 cm)에 재배된 양송이버섯을 실험에 사용하였다. 병원균은 R2A배지에 48시간 배양한 후 균체를 모아 250 ml 멸균수가 든 삼각플라스크에 넣고 현탁하여 최종 농도가 5×10^6 cfu/ml되도록 조제하였다. 길항미생물은 액체 배양에 따른 배지의 영향을 최소화 하기 위하여 R2A 배지에 48시간 배양한 후 균체를 직접 모아 250 ml 멸균수가 든 삼각플라스크에 넣고 현탁하여 최종 농도가 5×10^7 cfu/ml되도록 조제하였다. 길항미생물의 항균효과를 검정하기 위하여 준비된 폿트에 병원균 현탁액 100 ml

을 버섯 자실체에 먼저 분무처리한 후 30분 동안 과습한 발병환경을 조성한 후 길항미생물 100 ml을 분무살포(1일 간격, 3회처리)하여 온도 15°C, 습도 95%의 생육실에서 재배하면서 병 발생율을 조사하였다. 각 실험은 5반복으로 실시하였다.

발병율 및 방제가는 다음 식으로 계산하였다.

$$\text{발병율} = \text{발병조사개체수} / \text{조사개체수} \times 100$$

$$\text{방제가} = (\text{무처리발병율} - \text{처리발병율}) / \text{무처리발병율} \times 100$$

결과 및 고찰

길항미생물 HC42의 항균효과

순분 분리한 약 3,500균주의 미생물에 대해 길항력을 조사한 결과 대부분의 분리 미생물에서 길항력이 없거나 아주 약한 길항력을 보였으나, 미생물 HC42는 높은 길항력을 보였다(Fig. 1). 국내에서는 세균성회색무늬병에 대한 길항미생물로는 *Alcaligene*속이 보고되었고(Lee *et al.*, 2016), 세균갈색무늬병에 대해서는 *P. fluorescens*(Park *et al.*, 1992)와 *Pseudomonas azotoformans*(Lee *et al.*, 2014) 그리고 이 병원균이 분비하는 독소를 저해하는 *Pseudomonas* 속(Lee *et al.*, 2013) 등이 보고되었다. 길항미생물을 이용한 병 방제에 대한 연구는 많이 진행되고 있으나, 낮은 방제효과와 환경의 영향 때문에 처리 효과가 일정하지 않은 단점으로 생물농약으로의 실용화가 부진한 실정이다.

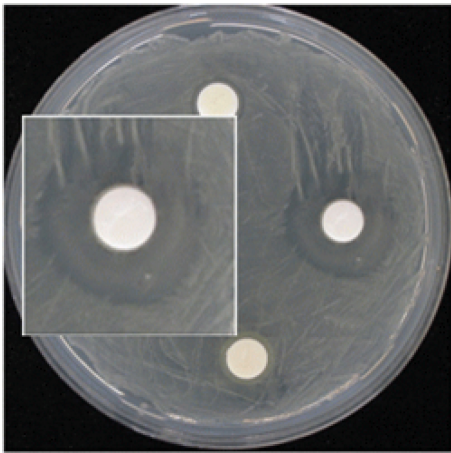


Fig. 1. Antimicrobial activity of *B. safensis* HC42 against *Pseudomonas agarici*.

길항미생물 HC42의 16S ribosomal DNA 분석

길항세균 HC42균주의 16S rDNA를 PCR 증폭에 의해 약 1.5 kb의 유전자를 확보하였으며, 염기서열을 결정하였다. 이 염기서열을 Ribosomal database project를 이용하여 상동성을 분석한 결과 *Bacillus safensis*와 높은 유사성을 보였다. 또한 Neighbor Joining방법(Saitou and Nei,

1987)을 이용한 유연관계를 분석한 결과 길항균 HC42는 *B. safensis*와 같은 그룹을 형성하였다(Fig. 2).

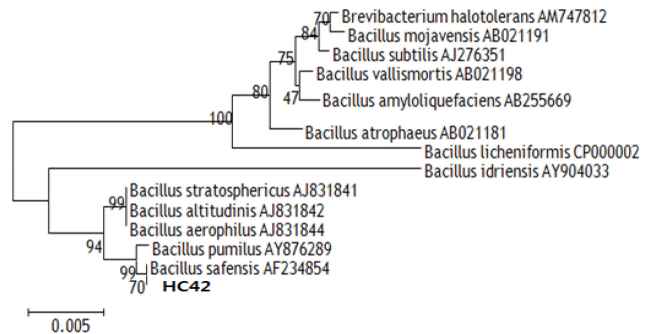


Fig. 2. Phylogenetic tree of HC42 based on 16S rRNA sequence similarity. Branching values determined using 1,000 bootstraps.

길항미생물 HC42의 생리·생화학적 특성

길항세균 HC42균주는 42°C에서 생육이 가능하며 아질산염의 환원시키지 못했지만 gelatin을 액화시켰다. 그리고 Raffinose, Inositol, Methyl a-D-glucopyranoside, Melibiose, D-turanose를 이용하였고, Maltose, Fructose를 이용하지 못하였다(Table 1).

Table 1. Biochemical characteristics of *B. safensis* HC42

Characters	HC42	Characters	HC42
growth at 42°C	+	Inositol	+
Nitrite reduction	-	Methyl a-D-glucopyranoside	+
gelatin liquefaction	+	Melibiose	+
Raffinose	+	D-turanose	+
Maltose	-	Fructose	-

길항미생물 HC42의 생물 검정 효과

양송이버섯에 세균성회색무늬병균을 접종한 후에 HC42를 처리한 결과 무처리구에서는 46.5%의 이병율을 보였지만 HC42처리에서는 15.7%의 이병율을 보여 66%의 방제효과가 있었다. 이와 같이 HC42균주는 세균성회색무늬병에 높은 항균효과를 보였고(Table 2, Fig. 3), 항균활성 관련 물질탐색 및 최적 생산조건 검토, 농가 편의성을 고려한 제형화 기술개발과 살포방법 등을 추가적으로 개발한다면 생물농약으로서의 충분히 가치가 있을 것으로 판단된다. Lee 등(2016)이 *Alcanigenes*속이 세균성회색무늬병에 대해 63%의 방제효과가 있었다는 보고보다는 방제효과가 우수하였다. 또한 Lee 등(2013;2014)은 세균갈색무늬병원균의 분비독소를 저해는 미생물인 *Pseudomonas* 속이 느타리, 팽이, 양송이 등에 55%~69%의 방제효과를 보였고, *Pseudomonas azotoformans*는 이들 버섯에 대해 69~71%의 높은 방제효과가 있었다고 보고하였다. 외국에

Table 2. Control efficacy of browning disease on *Agaricus bisporus* by HC42 strain

Treatment	Infection rate (%)	Control value (%)
Control	46.5 ± 4.5	
HC42	15.7 ± 3.2	66

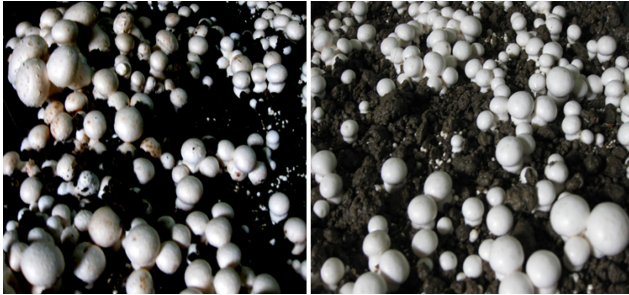


Fig. 3. Effect of spraying of HC42 suspension on browning disease development in *Agaricus bisporus*. Left, control treatment; Right, HC42 treatment.

서는 Nair와 Fahy(1972)는 병원균 *P. tolaasii*에 대해 *P. multivorans*, *P. fluorescens*, *Enterobacter aerogenes* 등이 길항효과가 있었다고 보고하였다. 현재까지 국내에서는 세균성회색무늬병에 대한 생물적 제제가 개발되어 상품화된 것은 없으므로 기 개발된 *Alcanigenes*속과 결합한다면 친환경 제제로서 충분한 가치가 있을 것으로 판단된다.

적 요

*Pseudomonas agarici*에 의해 발생하는 세균성회색무늬병은 양송이버섯 재배에서 문제가 되는 대표적인 병해이다. 본 연구에서는 세균성회색무늬병의 생물학적 방제법에 이용할 수 있는 길항미생물의 항균활성과 선발된 길항미생물에 대해 포트 수준의 생물검정 실험을 실시하였다. 재배중인 양송이버섯 배지에서 세균성회색무늬병 병원균을 강하게 억제하는 길항세균 HC42를 선발하였으며, 생리·생화학적 실험과 유전적 실험결과 HC42균주는 *B. safensis*로 동정되었다. *B. safensis* HC42를 양송이에 처리한 결과 66%의 방제효과를 보였다. 따라서 *B. safensis* HC42가 양송이버섯 세균성회색무늬병 방제를 위해 합성농약을 대체할 수 있는 친환경 방제제가 될 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

This study was supported by research grants (PJ012692032019) provided by the Rural Development administration (RDA) of Korea

References

Bessette AE, Kerrigan RW, Jordan DC. 1985. Yellow blotch of *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol* 50: 1535-1537.

Cutri SS, Macauley BJ, Roberts WP. 1984. Characteristics of pathogenic non-fluorescent (smooth) and non-pathogenic fluorescent (rough) forms of *Pseudomonas tolaasii* and *Pseudomonas 'gingeri'*. *J Appl Bacteriol* 57:291-298.

Fermor TR. 1986. Bacterial diseases of edible mushrooms and their control. In: Proceedings of International Symposium on Scientific and Technical Aspects of Cultivating Edible Fungi. Pennsylvania State University, University Park, PA, USA, 361-370.

Geels FP, Hesen LPW, Van Griensven LJLD. 1994. Brown discoloration of mushrooms caused by *Pseudomonas agarici*. *J Phytopathol* 140:249-59.

Gill WM. 1995. Bacterial disease of *Agaricus* mushrooms. Report. *Tottori Mycological Institute*. 33:34-35.

Jukes TH, Cantor CR. 1969. Evolution of protein molecules, pp.21-132. In: H. N. Munro(de.), Mammalian Protein Metabolism. Academic Press, N. Y.

Kim IG, Whang KS. 2002. The observation and a quantitative evaluation of viable but non-culturable bacteria in potable groundwater using epifluorescence microscopy. *The Kor J Microbiol* 38:180-185.

Lee HI, Cha JS. 1998. Cloning of a DNA Fragment Specific to *Pseudomonas tolaasii* Causing Bacterial Brown Blotch Disease of Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *Kor J Plant Pathol* 14:177-183.

Lee CJ, Moon JW, Cheong JC, Kong WS. 2016. Antagonistic effects of the bacterium *Alcaligenes* sp. HC12 on browning disease caused by *Pseudomonas agarici*. *Kor J Mycol* 44: 171-175.

Lee CJ, Yoo YM, Han JY, Jhune CS, Cheong JC, Moon JW, Suh JS, Han HS, Cha JS. 2013. Isolation of the bacterium *Pseudomonas* sp. HC1 effective in inactivation of tolaasin produced by *Pseudomonas tolaasii*. *Kor J Mycol* 41: 248-254.

Lee CJ, Yoo YM, Han JY, Jhune CS, Cheong JC, Moon JW, Suh JS, Han HS, Cha JS. 2014. Isolation of the bacterium *Pseudomonas azotoformans* HC5 effective in antagonistic of brown blotch disease caused by *Pseudomonas tolaasii*. *Kor J Mycol* 42:219-224.

Nair NG, Fahy PC. 1972. Bacteria antagonistic to *Pseudomonas tolaasii* and their control of brown blotch of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *J Appl Bacteriol* 35: 439-442.

Nutkins JC, Mortishire-Smith RJ, Packman LC, Brodey CL, Rainey PB, Johnstone K, Williams DH. 1991. Structure determination of tolaasin, an extracellular lipodepsipeptide produced by the mushroom pathogen *Pseudomonas tolaasii* Paine. *J Am Chem Soc* 113:2621-2627.

Palleroni NJ. Genus. *Pseudomonas*. 1984. In: Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. I, Ed. by N. R. Krieg and J. G. Hotr, P. 141-219. Williams and Wilkins, Baltimore.

- Park BS, Cho NC, Chun UH. 1992. Identification of *Pseudomonas fluorescens* antagonistic to *Pseudomonas tolaasii* and its cultivation. *Kor J Biotechnol Bioeng* 7: 296-301.
- Paine SG. 1919. Studies in bacteriosis II. A brown blotch disease of cultivated mushrooms. *Ann Appl Biol* 5:206-219.
- Scherwinski K, Grosch R, Berg G. 2008. Effect of bacterial antagonists on lettuce: active biocontrol of *Rhizoctonia solani* and *negligible*, short-term effects on nontarget microorganisms. *FEMS Microbiol Ecol* 64: 106-116.
- Stainer RY, Palleroni NJ, Doudoroff M. 1966. The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *J Gener Microbiol* 43:159-271.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biol Evol* 4:406-425.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighing position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 34-637.
- Tolaas AG. 1915. A Bacterial disease of cultivated mushrooms. *Phytopathology* 5:51-54
- Wells JM, Sapers GM, Fett WF, Butterfield JE, Jones JB, Bouzar H, Miller FC. 1996. Postharvest discolorization of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* caused by *Pseudomonas tolaasii*, *P. 'reactans'*, and *P. 'gingeri'*. *Phytopathology* 86:1098-1104.
- Wong WC, Fletche, JT, Unsworth BA, Preece TF. 1982. A note on ginger blotch, a new bacterial disease of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. *J Appl Bacteriol* 52:43-48.
- Young JM. 1970. Drippy gill: a bacterial disease of cultivated mushrooms caused by *Pseudomonas agarici* n. sp. *N Z J Agr Res* 13:977-990.