

표고수확후배지 퇴비 물 추출물에서 *Bacillus subtilis* BSM320의 고밀도 배양 및 표고 푸른곰팡이병의 생물학적 방제

김자윤¹ · 박세현¹ · 박성준¹ · 황보주형¹ · 강희완^{1,2*}

¹한경국립대학교 생명공학부

²한경국립대학교 유전공학연구소

High density culture of *Bacillus subtilis* BSM320 in aqueous extract of composted spent mushroom substrate of *Lentinula edodes* and biological control of green mold disease

Ja-Yoon Kim¹, Se-Hyun Park¹, Seong-Joon Park¹, Ju-Hyeong Hwang Bo¹, and Hee-Wan Kang^{1,2*}

¹School of Biotechnology, Division of Horticultural Biotechnology, Hankyong National University, Anseong 17579, Korea.

²Institute of Genetic Engineering, Hankyong National University, Anseong 17579, Korea

ABSTRACT: The objective of this study was to achieve biological control of green mold disease in Pyogo mushrooms using antagonistic microorganisms. *Bacillus subtilis* BSM320 cells inhibited mycelial growth by 48–60% against three *Trichoderma* isolates including *T. hazianum* isolated from the substrates of *Lentinula edodes*, showing their antifungal activity. The bacteria were cultured to a high density of $4.2 \times 10^9 \pm 113.7$ cfu/ml in aqueous extract of composted spent mushroom substrates of *L. edodes* containing 1% glucose and showed a higher growth rate than that observed when using the commercial medium, Luria-Bertani broth. The bacterial culture showed a 75% protective effect without damaging the mushroom fruiting bodies. These results suggest that *B. subtilis* BSM320 culture is suitable for biological control of green mold disease during mushroom cultivation.

KEYWORDS: *Bacillus subtilis* BSM320, Biological control, Green mold

서론

표고(*L. edodes*)의 생산 방식이 원목 재배에서 톱밥 재

배로 급격히 전환되고 있으며 중국으로부터 균사체 배양이 완료된 저렴한 톱밥 배지가 대량 수입되어 농가에서 사용됨에 따라 표고 수확 후 배지(spent mushroom substrate, SMS)가 대량 방출되어 SMS 처리 문제에 직면하고 있다. 표고 톱밥 배지는 균사체 배양, 갈변 및 2-3주 기 버섯 수확 과정을 거치면서 oxalic acid 등 유기산 집적으로 인해 pH 4 이하로 산성화되고 염류농도가 높아져 SMS를 퇴비로 직접 사용 시 작물에 생리장해와 환경오염 및 생태계 교란 등을 유발할 수 있다 (Song *et al.*, 2020). 표고 SMS의 물 추출물을 이용하여 토마토 풋마름병과 고추역병 방제에 적용 한 바 있으며 병 저항성 유전자 (*CABPR1*, *CaBGLU*, *CaPR-4*) 발현유도 및 식물 성장 등에 유효한 효과가 있는 것으로 보고되었다 (Kang *et al.* 2017).

시중에 판매되고 있는 유기질 퇴비는 기준치 이상의 높은 영양 성분이 검출되고 있으며 계분 등 축산분뇨를 사용하고 있어 악취의 원인이 되어 친환경 작물 재배에 문제점이 되고 있다(Kang, 2019; Song *et al.*, 2020). 반면

J. Mushrooms 2023 September, 21(3):140-144
<http://dx.doi.org/10.14480/JM.2023.21.3.140>
 Print ISSN 1738-0294, Online ISSN 2288-8853
 © The Korean Society of Mushroom Science

Ja-Yoon Kim (Graduate student, PhD course), Se-Hyun Park (Graduate student, Master course), Seong-Joon Park(Undergraduate student), Ju-Hyeong Hwang Bo(Undergraduate student), Hee-Wan Kang (Professor)
 *Corresponding author

E-mail : kanghw2@hknu.ac.kr

Tel : +82-31-670-5420, Fax : +82-31-676-2602

Received August 3, 2023

Revised August 18, 2023

Accepted September 14, 2023

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.

에 표고 SMS를 부숙 화하여 생산된 퇴비(composted SMS of *L. edodes*, LeCSMS)는 pH 6.9로 NPK성분과 미네랄 성분이 풍부하고 중금속과 농약 성분이 없으며 악취가 없어 친환경 유기농 작물 재배에 유용하게 사용할 수 있다 (Song *et al.*, 2020).

Trichoderma 종은 버섯에서 가장 문제가 되는 푸른곰팡이 병균으로 알려져 있다(Nagy *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2016). 푸른곰팡이 병균은 균사 성장 후 불완전 세대의 포자가 형성되면 급속도로 전파되어 표고의 수확량 및 품질 저하의 원인이 된다(Nagy *et al.*, 2012). 푸른곰팡이병의 화학적 방제는 버섯 자실체 형성에 장애 요인이 되고 약해와 잔류농약 축적으로 친환경 재배의 장애 요인이 된다. 따라서 *Bacillus spp.*를 이용하여 버섯에 발생하는 푸른곰팡이병에 대한 생물학적 방법이 적용된 바 있다(Altaf *et al.*, 2022; Aydođdu *et al.*, 2021; Stanojevic *et al.*, 2019). 최근, 길항성 미생물인 *B. velezensis* HKB-1를 LeCSMS 물 추출물에 배양하여 고추역병 방제에 활용되었다(Kim *et al.*, 2021). LeCSMS 추출물 활용은 고가의 상용화된 미생물 배지를 대체할 수 있을 뿐만 아니라 식물체 성장 촉진을 위한 유기질 비료의 성능을 동시에 보유함으로써 친환경적 생물학적 방제에 유용하다. LeCSMS 추출물은 표고 배지 유래로 다양한 영양성분을 포함하고 있어 푸른곰팡이에 항균 활성을 보유한 *Bacillus* 종을 직접 배양하여 버섯 푸른곰팡이병 방제에 활용할 수 있다.

본 연구는 표고 푸른곰팡이 병균에 항균 활성을 나타내는 *B. subtilis* BSM320 균주를 선발하였으며 1% glucose를 포함하는 LeCSMS 물 추출물에 배양하였으며 표고 푸른곰팡이병의 생물학적 방제에 목적을 두고 수행하였다.

재료 및 방법

표고수확후배지 퇴비 추출 배지 제조 및 *B. subtilis* BSM320 배양

B. subtilis BSM320는 전북대학교로부터 분양받아 사용하였다. LeCSMS건조물 50g에 물 1L를 첨가하여 실온에서 80 rpm으로 4시간 추출하였다. LeCSMS 잔여물을 미라크로스(22-25 µm, Calbiochem)로 거르고 원심분리(6,000 rpm)하여 제거 후 상등액을 LeCSMS의 water extract(WE)로 하였다. LeCSMS WE에 glucose 함량이 1%로 되게 첨가하여 15기압 121°C 조건에서 15분간 고압 멸균하고 *B. subtilis* BSM320 (1×10^7 /mL) 500 µl를 접종한 후 28°C 2일간 100rpm에서 진탕배양 하였다. 희석배양법으로 Tryptic soy agar(TSA) 배지에 도말하여 배지에 형성된 세균 colony 수를 colony forming unit (cfu) / mL로 하여 세균 밀도를 조사하였다.

항균활성검정

Potato dextrose agar (PDA)에 배지 중앙에 표고버섯에

서 분리한 푸른곰팡이병균 *T. harzianum* LeT-3의 균사절편(직경 5 mm)을 접종하고 접종부위로부터 2.5 cm 떨어진 지점에 1×10^6 의 *B. subtilis* BSM320 5 µl를 paper 절편(직경 5 mm)에 접종하여 7일 후 균사체 성장 억제율을 조사하였다.

표고 푸른곰팡이병 발병도

LeCSMS WE + 1% glucose에 배양한 BSM320를 1/10로 희석하여 표고 봉형 배지에 3일 간격으로 20 ml × 3회 분무 살포하였다. 방제 효과는 최종 처리 후 3일 후에 조사하였다. 발병지수는 봉형 배지에 형성된 푸른곰팡이 발병지수는 0: 병징없음, 1: 10~20%, 2: 30~40%, 3: 41~60%, 5: 71~100%로 하였다. Kang *et al.* (2017)의 방법을 변형하여 다음 식에 의해 발병도(Disease severity)를 구하였다. a는 표고 배지에서 푸른곰팡이 발병지수, b는 감염된 표고 배지수, N은 조사된 전체표고 배지수를 나타낸다.

$$\text{Disease severity (\%)} = \frac{\sum(a \times b)}{4N} \times 100$$

통계처리

3회 반복 실험을 통하여 얻어낸 각각의 모든 값은 평균치±표준편차로 표시하였고, 집단 간 평균의 차이는 SAS 9.4 (statistical analysis system; SAS Institute, USA)를 이용하여 two-tailed unpaired Student's t-test 및 one-way analysis of variance (ANOVA) test를 이용하였다. 각 실험의 평균차에 대한 통계적 유의성 검증은 Duncan의 다중 검증법(DMRT: Duncan's multiple range test)으로 하여, p<0.05 및 p<0.01수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

B. subtilis BSM320의 푸른곰팡이균 *Trichoderma spp.*에 대한 항균 활성

B. subtilis BSM320의 표고 푸른곰팡이균 *Trichoderma spp.*에 대한 항균 활성 효과를 조사하였다. Table 1은 표고에서 분리한 푸른곰팡이 병균 *Trichoderma spp.* 3균주에 대한 BSM320의 균사체 억제 효과를 보여주고 있다. BSM320를 접종하지 않은 대조구의 균사체 성장이 8.5 cm에 비하여 *T. harzianum* LeT-3, *Trichoderma sp.* KACC42249, *T. harzianum* KME은 BSM320의 접종 지점으로부터 각각 4.5cm, 4.3cm, 3.4cm의 균사체 성장억제가 관찰되었다. Fig. 1은 *T. harzianum* LeT-3에 대한 BSM320의 균사체 성장억제를 보여 주고 있다. 전 보고에서 느타리 푸른곰팡이병균 *T. pleurotum*에대한 길항성 미생물 *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*균주가 분리 동정 되었으며(Nagy *et al.*, 2012,) 양송이 푸른곰팡이병균 *T. aggressivum* f. *europaeum* T77, *T. harzianum*에 대한 *B. amyloliquefaciens* B-241와 *B. subtilis*-38의

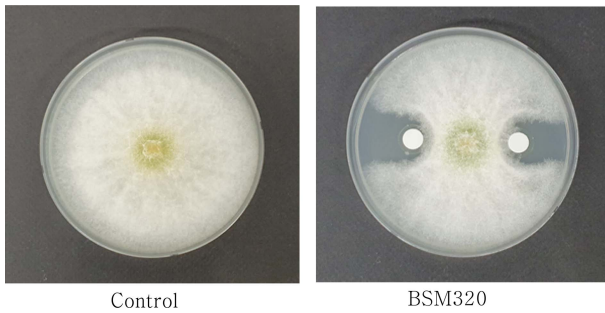


Fig. 1. Antifungal activity of *Bacillus subtilis* BSM 320 against *Trichoderma hazianum* LeT-3. The control represents no inoculation with BSM320.

Table 1. Mycelial growth inhibition of *Trichoderma* spp. by *Bacillus subtilis* BSM320

Isolates	Mycelial growth inhibition (cm)
<i>Trichoderma hazianum</i> LeT-3	4.5±0.3
<i>Trichoderma</i> sp. KACC42249	4.3±0.2
<i>Trichoderma hazianum</i> KME	3.4±0.2
Control	8.5±0.3

The control represents no inoculation with BSM320.

생물학적 방제를 수행한바 있다(Altaf *et al.*, 2022; Stanojevic *et al.*, 2019). 따라서 *B. subtilis* BSM320는 기 보고의 *Bacillus* spp.의 푸른곰팡이 병균(*Trichoderma* spp.)의 항균 활성과 유사한 특성을 보여 생물학적 방제에 잠재적 가능성을 제시하고 있다.

LeCSMS 물 추출물을 이용한 *B. subtilis* BSM320의 고농도 배양

그람양성균으로 분류되는 *Bacillus* 속의 포자는 고온에서도 견딜 수 있어 살아있는 미생물의 가공성이 우수하여 식물병방제의 생물학적 방제의 친환경 소재로 널리 사용되고 있으나(Cawoy, 2011) 대량생산을 위한 고 농도배양을 위한 경제적 배지개발이 필요하다. 본 연구는 *B. subtilis* BSM320를 배양하기 위하여 LeCSMS WE를 이용하였다. 1% 당밀과 glucose를 포함하는 LeCSMS WE에 *B. subtilis* BSM320를 접종하고 2일 후에 세균 세포수를 조사하였다. LeCSMS WE + 당밀 1%와 포도당 1%에 배양한 BSM320는 $4\sim 5 \times 10^9$ (cfu/mL)의 세균수가 검출되었다. 반면에 상용배지 LB broth에서 배양한 BSM320는 1.2×10^9 로 위의 LeCSMS WE배지 보다 다소 낮은 농도의 세균수가 검출되었다. 이 결과는 LeCSMS WE 배지에서 세균의 고 농도배양이 가능하다는 것을 시사한다.

생물학적 방제에 이용하는 길항세균은 상용화를 위하여 10^9 (cfu/mL)이상의 고농도 배양이 필수적이다. 일반적으로 *Bacillus* 종의 배양 배지로 LB, TSB 등 상용화 배지가 사용되고 있으나 고가로 대량생산을 위하여 경제적 부담

Table 2. Bacterial density of *Bacillus subtilis* BSM320 cultured in different media

Culture Media	Bacterial colony (CFU/mL)
LeCSMS WE + molasses 1%	$3.0 \times 10^9 \pm 51.0$
LeCSMS WE + Glucose 1%	$4.2 \times 10^9 \pm 113.7$
Lurina-Bertani broth	$1.2 \times 10^9 \pm 67.0$

이 되고 있다. 반면에 LeCSMS WE는 저 비용 고효율로 *B. subtilis* BSM320의 고농도 배양이 가능하여 상용화 배지를 대체할 수 있을 것으로 사료 된다. 기보고에서 *B. subtilis*의 고농도 배양조건으로 pH 6~7이며 sucrose 등의 다당류보다 glucose와 같은 단당류가 적합하다고 하였으며 (Cho and Park, 1997), Kim *et al.* (2012) 은 K_2HPO_4 0.1~1 g/L, $MgCl_2$ 0.01~0.1 g/L, $CaCl_2$ 0.01~0.1 g/L 및 NaCl 0.1~1 g/L이 유효하다고 하였으며 옥수수 분말, 대두 분말, 효모추출물을 사용하여 1.2×10^9 (cfu/mL)의 고농도 배양법을 개발하였다. LeCSMS는 pH 6.5이며 N (1.2%), P (2.3%), K (0.77%)와 Ca (2.11%), Mg (0.46%)로 세균성장에 필요한 영양원을 포함하고 있으며 크롬, 납, 수은 등 중금속 유해 성분과 농약 성분이 검출되지 않아(Song *et al.*, 2020) *Bacillus* 종의 고 농도배양에 유효한 성분을 충족하는 것으로 나타났다.

***B. subtilis* BSM 320 배양액을 이용한 표고 푸른곰팡이 병의 생물학적 방제**

상기 LeCSMS 추출물 + 1% glucose에 배양한 *B. subtilis* BSM320 배양액을 봉형 배지에 3일 간격으로 3회 분무처리 후 푸른곰팡이병의 방제효과를 조사 하였다. *B. subtilis* BSM320 배양액 처리 구는 푸른곰팡이 발병도가 19%였으나 대조구는 75%로 나타났다 (Fig. 3). *B. subtilis* BSM320 처리 후 표고 톱밥 배지에서 표고 자실체 성장 저해 없이 푸른곰팡이 균이 제거된 것을 관찰할 수 있었으나 물 처리구에서는 푸른곰팡이 균이 잔존하고 자실체 형성이 억제된 것을 확인할 수 있었다 (Fig 4). 전 보고에서 다양한 식물 병원성 곰팡이에 항균 활성이 있는 *B. velezensis* HKB-1가 WE LeCSMS 배양하여 고추역병 방제에 적용된 바 있다(Kim *et al.*, 2022). 본 연구에서는 *B. subtilis* BSM320를 WE LeCSMS에 배양하여 표고 푸른곰팡이 방제에 적용하였는데 이는 다양한 *Bacillus* 종의 WE LeCSMS 배양 가능성을 반영하는 결과이다.

표고 푸른곰팡이병을 발생시키는 *Trichoderma* 속으로는 *T. harzianum*, *T. atroviride*, *T. viride*, *T. pleuroticola*, *T. longibrachiatum*, and *T. oblongisporum*, *T. harzianum*, *T. virens*, *T. viride*, *T. konigii* 등이 알려져 있다(Wang *et al.*, 2016). 따라서 *B. subtilis* BSM320의 푸른곰팡이 균의 항균 활성 스펙트럼을 확대하여 조사할 필요가 있다. 푸른곰팡이병 방제를 위하여 살균제 사용은 표고 약해에

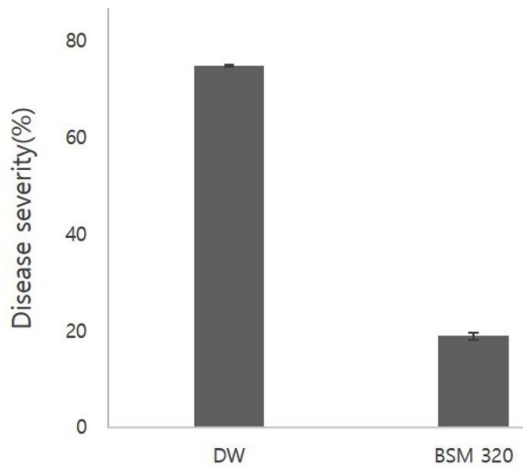


Fig. 3. Disease severity of green mold on substrate of *Lentinula edodes* treated with *Bacillus subtilis* BSM320 cultured in WE LeCSMS.

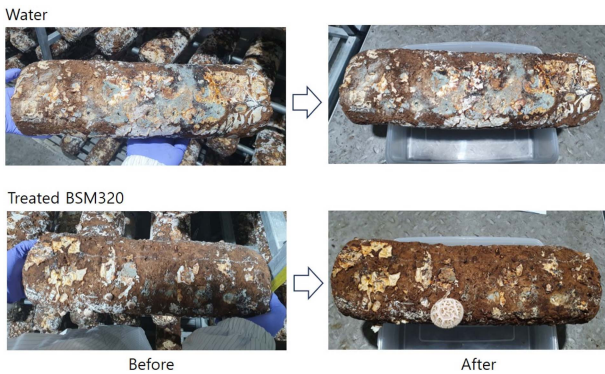


Fig. 4. Protective effect on green mold disease of *Lentinula edodes* after treatment of *Bacillus subtilis* BSM320 cultured in WE LeCSMS.

따른 표고 생산을 감소와 잔류농약으로 인한 부작용을 동반하여 친환경 버섯 생산의 제한 요인이 된다. 그러나 식물 병원성 곰팡이에 대한 길항성 미생물로서 *Bacillus* 종이 널리 적용되고 있으며 미생물농약으로 상용화되고 있다 (Cawoy, 2011). *Bacillus* 종을 이용한 느타리, 양송이 푸른곰팡이병의 생물학적 방제를 보고한 바 있으며 (Aydoğdu *et al.*, 2021; Milijasevic-Marcic *et al.*, 2017; Nagy *et al.*, 2012; Pandin *et al.*, 2018; Stanojevic *et al.*, 2019) 길항성 미생물의 버섯성장을 저해하는 문제점에 관하여 보완 연구가 필요하다고 하였다. 본 연구의 *B. subtilis* BSM320의 WE LeCSMS 배양액은 표고에 약해 없이 푸른곰팡이병의 친환경 방제에 유용하게 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

적 요

본 연구는 길항성 미생물, *Bacillus subtilis* BSM320을

이용한 표고 푸른곰팡이병의 생물학적 방제를 목적으로 하였다. *B. subtilis* BSM320은 표고 톱밥배지에서 분리된 *T. hanzanum*을 포함한 3 *Trichoderma* 분리균주 대해 균사 생장을 억제하는 항균 활성을 나타냈다. *B. subtilis* BSM320은 1% glucose를 포함하는 LeCSMS물 추출물 (LeCSMS WE)에서 $4.2 \times 10^9 \pm 113.7$ cfu/mL 세균수로 고밀도 배양 되었으며 상용배지 *Lurina-Bertani* broth 배지보다 높은 세균 밀도를 보였다. *B. subtilis* BSM320의 LeCSMS WE 배양액은 표고 자실체에 약해 없이 표고 톱밥 배지에 발생하는 푸른곰팡이병에 대하여 75%의 방제 효과를 보였다. 그 결과는 LeCSMS 물 추출물 배양 *B. subtilis* BSM320은 표고 푸른곰팡이병의 생물학적 방제에 활용할 수 있는 것을 시사한다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품기술기획평가원(IPET)의 유용농생명 자원산업화 기술개발 사업(과제번호:321103-3)와 중소기업벤처부(과제번호:S3067029)의 연구지원에 의해 수행된 결과입니다.

REFERENCES

- Altaf S, Jan KS, Basu U, Ahanger SA, Dave A, Kakraliya SS, Baazeem A, Mishra AK, Kumar A, Shah IA. 2022. Sustainable management of green mold disease of white button mushroom using botanicals and biocontrol agents under temperate conditions. *Horticulture* 8: 768-772.
- Aydoğdu M, SülüSM, Kurbetli I, SülüIn G. 2021. *In vitro* and *in vivo* biological control of the green mold using different bacteria in button mushroom cultivation. *Egyptian J Biol Pest Cont* 31: 70-81.
- Cawoy H, Bettiol W, Fickers P, Ongena M. 2011. *Bacillus*-based biological control of plant diseases. In: *Pesticides in the Modern World-Pesticides Use and Management*.
- Cho JI, Park HS, 1997. Cultural condition for mass production of *Bacillus subtilis* CAP141. *Kor J Org Agri* 6: 85-98.
- Kang DS, Min KJ, Kwak AM, Lee SY, Kang HW. 2017. Defense response and suppression of *Phytophthora* blight disease of pepper by water extract from spent mushroom substrate of *Lentinula edodes*. *Plant Pathol J* 33: 264-275.
- Kang HW. 2019. Industrial utilization of spent mushroom substrate. *J Mushrooms* 17: 85-92.
- Kim JY, Seo HJ, Kang DS, Kang HW. 2021. Cultural characteristics of *Bacillus velezensis* HKB-1 in the water extract of the composted spent mushroom substrate of *Lentinula edodes* and biological control of *Phytophthora* blight disease of pepper. *J Mushroom* 19: 272-278.
- Kim DY, Kim YH, Cho SB, Jeong HJ, Lee SD, Kim SH, Cho GH, Hwang OH, Kim IC, Kim SG. 2012. Medium composition for high concentration culture of *Bacillus* and uses thereof. Patent KR-10-2010-0138621.

- Kwak AM, Lee IK, Lee SY, Yun BS, Kang HW. 2016. Oxalic acid from *Lentinula edodes*. Antimicrobial activity on phytopathogenic bacteria and qualitative and quantitative analyses. *Mycobiology* 44: 338-342.
- Milijasevic-Marcic S., Stepanovic M, Todorovic B, Duduk B., Stepanovic J, Rekanovic E, Potocnik I. 2017. Biological control of green mould on *Agaricus bisporus* by a native *Bacillus subtilis* strain from mushroom compost. *Eur J Plant Pathol* 148, 509-519.
- Nagy A, Manczinger L, Tombácz D, Hatvani L, Gyrfi J, Antal Z, Sajben E, Vágvölgyi C, Kredics L. 2012. Biological control of oyster mushroom green mould disease by antagonistic *Bacillus* species. *IOBC-WPRS Bulletin*. 78: 289-293.
- Pandin C, Védie R, Rousseau T, Le Coq D, Aymerich S, Briandeta R. 2018. Dynamics of compost microbiota during the cultivation of *Agaricus bisporus* in the presence of *Bacillus velezensis* QST713 as biocontrol agent against *Trichoderma aggressivum*. *Biol Control* 127: 39-54.
- Song JM, Phong NH, Kim JY, Kang DS, Yu JY, Kang HW. 2020. Physicochemical changes and plant growth effect on composting of spent mushroom substrates. *J Mushrooms* 18: 268-273.
- Stanojevic O, Beric T, Potocnik I, Rekanovic E, Stankovic S, Milijasevic-Marcic S. 2019. Biological control of green mould and dry bubble diseases of cultivated mushroom (*Agaricus bisporus* L.) by *Bacillus* spp. *Crop Protec* 126: 104944.
- Wang G, Cao X, Mal X, Guo M, Liu C, Yan L, Bian Y. 2016. Diversity and effect of *Trichoderma* spp. associated with green mold disease on *Lentinula edodes* in China. *Microbiology* 5: 709-718.