

버섯 세균성회색무늬병균(*Pseudomonas agarici*)에 대한 *Alcaligenes* sp. HC12의 항균활성

이찬중* · 문지원 · 정종천 · 공원식

농촌진흥청 국립원예특작과학원 버섯과

Antagonistic Effects of the Bacterium *Alcaligenes* sp. HC12 on Browning Disease Caused by *Pseudomonas agarici*

Chan-Jung Lee*, Ji-Won Moon, Jong-Chun Cheong and Won-Sik Kong

Mushroom Research Division, National Institute of Horticultural and Herbal Science, RDA, Eumseong 27709, Korea

ABSTRACTS : A gram-negative bacterium was isolated from spent substrates of *Agaricus bisporus* and showed significant antagonistic activity against *Pseudomonas agarici*. The bacterium was identified as *Alcaligenes* sp. based on cultural, biochemical, physiological characteristics and a 16S rRNA sequence analysis. The isolate is saprophytic, but not parasitic or pathogenic on cultivated mushroom, whereas it showed strong inhibitory effects against *P. agarici* cells *in vitro*. The control efficacy of *Alcaligenes* sp. HC12 against brown blotch of *P. agarici* was up to 63% on *Agaricus bisporus*. The suppressive bacterium may be useful for the development of biocontrol systems.

KEYWORDS : *Agaricus bisporus*, *Alcaligenes* sp., Control efficacy, Mushrooms, *Pseudomonas agarici*

서 론

형광성 *Pseudomonas*속을 포함하는 여러 세균이 다양한 버섯에 병을 일으켜 수량성을 저하시킨다[1, 2]. 이들 중 가장 큰 피해를 주는 병원균은 세균갈색무늬병을 일으키는 *Pseudomonas tolaasii*이며, 세균갈색무늬병은 1915년 Tolaas에 의하여 처음으로 보고되었으며[3], 1919년 Paine에 의하여 *P. tolaasii*로 명명되었다[4]. *P. tolaasii*는 느타리, 양송이, 표고 등에 갈색무늬병을 일으키며[5-7], 분류학적으로 버섯에서 분리되는 여러 종의 형광성 *Pseudomonas*종과 매우 유사

하여, 생리적인 특성 및 영양요구성에 의한 방법으로는 동정하기가 쉽지 않다[8, 9]. 그리고 병징에 있어서는 *P. tolaasii*에 의한 갈색무늬 증상은 *P. gingeri*에 의해 발생하는 옅은 갈색(yellow-brown)의 반점병인 ginger blotch disease와 유사한 특성을 갖는다[10, 11]. 양송이 재배에 있어 또 다른 2종류의 세균이 병을 일으키고 있으며 이들 중 *P. gingeri*는 ginger blotch을 일으키고[10], *P. agarici*는 양송이 갓의 표면에 갈색의 점무늬를 넓게 형성하여 상품성을 저하시키는 것으로 보고되어 있다[12]. 또한 *P. agarici*는 느타리에 yellow blotch을 일으키고[13], 양송이 갓과 대에 회색무늬병을 일으킨다. 이 병은 병 발생의 예측이 매우 어렵고, 병 발생 후에는 방제가 거의 불가능하며, 한번 발생하면 재배사 전체로 급격하게 전염되어 심한 경우에는 버섯을 전혀 수확하지 못하게 하는 특성이 있다[14].

최근에는 친환경농업에 대한 관심이 증가되면서 화학농약의 대안으로 식물병원균에 대한 길항미생물의 생물학적 방제에 의한 연구가 활발하게 진행되고 있다[15]. 길항균을 이용한 갈색무늬병의 방제를 오스트리아에서 Nair과 Fahy[16]가 처음으로 연구하였고, 프랑스[17]와 타이완[18]에서 시행한 연구를 이용해 한때 상업적으로 생물학적 제제로 이용하였다. *P. fluorescens*가 *P. tolaasii*에 대해 길항성을 가진다고 하였으나 병원균에 비해 80배의 많은 수가 있어야

Kor. J. Mycol. 2016 September, 44(3): 171-175
http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2016.44.3.171
pISSN 0253-651X • eISSN 2383-5249
© The Korean Society of Mycology

*Corresponding author
E-mail: lchanj@korea.kr

Received August 2, 2016
Revised September 8, 2016
Accepted September 22, 2016

©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.

효과가 있으므로 실용성이 떨어진다고 보고하였다[19]. 또한 국내에서는 세균갈색무늬병이 분비하는 독소를 저해하는 독소저해균 및 길항미생물을 선발하여 생물학적 방제를 위한 연구를 수행하고 있다[20, 21]. 이와 같이 세균병 방제를 위하여 항생제를 이용한 화학적 방제와 길항미생물을 이용한 생물적 방제법이 계속하여 시도되고 있지만 아직 만족할 만한 효과를 거두지 못하고 있는 실정이다[22]. 또한 버섯은 화학 처리에 의한 방제는 안전성 문제로 사용이 어렵기 때문에 생물적 방제법에 의한 새로운 방법의 도입이 요구되고 있다.

따라서 본 연구에서는 양송이 세균성화색무늬병의 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 수확 후 배지와 양송이 배지를 농가별 3점씩 채취하여 실험에 사용하였다. 미생물의 분리는 R2A 배지에 단계별로 희석 배양하여 50~60개의 colony를 형성한 plate로부터 독립적으로 분리하였다. 순수 분리한 미생물은 R2A 배지에서 2일 동안 배양한 후 균체를 모아서 20% (v/v) 글리세롤 용액에 넣어 -70°C에 보존하면서 검정용 시료로 사용하였다.

길항미생물의 선발

순수 분리한 미생물로부터 세균성화색무늬병균(*P. agarici*)에 대한 길항균을 선발하기 위하여 paper disk methods를 이용하여 실험하였다. 병원균을 R2A 배지[23]에 24시간 배양한 후 균체를 모아 100 µL 멸균수가 든 1.5 mL e-tube에 넣고 현탁(5×10^6)하여 100 µL를 취하여 페트리디쉬에 도말하였다. 길항미생물 선발은 순수 분리한 미생물을 R2A 배지[23]에 48시간 배양한 후 균체를 모아 50 µL 멸균수가 든 e-tube에 넣고 현탁(5×10^7)하여 70 µL를 취하여 8 mm paper disk에 접종하여 생육저지환의 정도에 따라 각 균주에 대한 길항능력을 평가하였다.

DNA 분리 및 16S rRNA 유전자 염기서열의 결정

DNA는 Qiagen Genomic DNA Isolation Kit (Qiagen, Germantown, MD, USA)을 사용하여 분리하였고, polymerase chain reaction (PCR) 증폭은 Techne thermocycler (Bibby Scientific Limited, Stone, UK)로 수행하였다. PCR 반응혼합액은 1× 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 (Sigma-

Aldrich, St. Louis, MO, USA), 최종농도 2 µM의 정, 역방향의 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 30 cycles로 수행하였고, 반응 후 primer와 dNTP는 high pure PCR Product Purification Kit (Bioneer, Daejeon, Korea)을 사용하여 PCR 산물로부터 제거하였다. 정제된 PCR 산물은 pT7 blue Vector (Merck Millipore, Billerica, MA, USA)에 클로닝하여 Big Dye Terminator Kit와 ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 염기서열을 결정하였다. 결정한 16S rRNA 유전자의 염기서열은 GenBank Database에 등록하였다. 종 유사성 결정을 위해 Clustal W 분석프로그램[24]을 사용하여 GenBank에 있는 다른 염기서열들과 비교하였다. Jukes와 Cantor[25] 방법을 이용하여 evolutionary distance matrix를 작성하고, MEGA 4의 neighbor-joining 방법을 이용하여 계통수를 작성하였으며, tree의 안정성은 1,000 반복의 bootstrap 분석으로 조사하였다.

선발균의 생리·생화학적 특성

선발 유용미생물의 생화학적인 특성을 조사하기 위하여 기본배지[26]에 다양한 종류의 탄소원과 질소원, 유기산 등을 0.1% (w/w)씩 첨가하여 생육정도를 조사하였으며, 부가적으로 API 20E, API 20NE, 50CH 키트(bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France)를 사용하였고, Bergey's manual of systematic bacteriology [27]에 준하여 실험을 하였다.

길항균의 세균성화색무늬병 방제효과 검정

세균성화색무늬병의 방제효과를 검정하기 위해 포트(30 × 20 cm)에 재배된 양송이버섯을 실험에 사용하였다. 병원균은 R2A 배지[23]에 48시간 배양한 후 균체를 모아 250 mL 멸균수가 든 삼각플라스크에 넣고 현탁하여 최종 농도가 5×10^6 되도록 조제하였다. 길항미생물은 액체 배양에 따른 배지의 영향을 최소화하기 위하여 R2A 배지[23]에 48시간 배양한 후 균체를 직접 모아 250 mL 멸균수가 든 삼각플라스크에 넣고 현탁하여 최종 농도가 5×10^7 되도록 조제하였다. 길항미생물의 항균효과를 검정하기 위하여 준비된 포트에 병원균 현탁액 100 mL을 버섯 자실체에 먼저 분무처리한 후 30분 동안 과습한 발병환경을 조성한 후 길항미생물 100 mL을 분무살포하여 온도 15°C, 습도 95%의 생육실에서 재배하면서 병 발생율을 조사하였다. 각 실험은 5반복으로 실시하였다.

발병율 및 방제가는 다음 식으로 계산하였다.

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

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

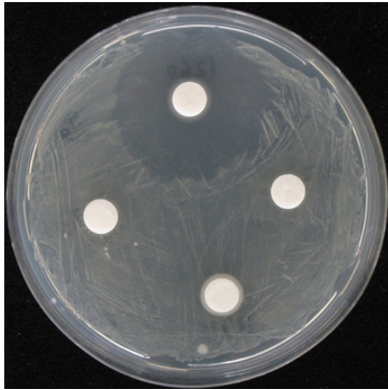


Fig. 1. Antimicrobial activity of *Alcaligenes* sp. HC12 against *Pseudomonas agarici*.

결과 및 고찰

길항미생물 HC12의 선발

세균성회색무늬병을 일으키는 *P. agarici*에 대해 길항성을 나타내는 미생물을 선발하기 위하여 버섯 배지로부터 약 3,500균주의 미생물을 분리하여 길항력을 조사하였다. 그 결과 미생물 HC12가 가장 높은 길항력을 보였지만 대부분의 분리 미생물은 길항력이 없었거나 아주 약한 길항력을 보였다(Fig. 1). 국내에서는 세균갈색무늬병에 대한 길항미생물로 *P. fluorescens* [28], *P. azotoformans* [21] 그리고 이 병원균이 분비하는 독소를 저해하는 *Pseudomonas*속[20]이 보고되어 있지만, 세균성회색무늬병 방제를 위한 생물학적 방제에 대한 연구는 없는 것으로 알고 있다. 실제적으로 길항미생물을 이용한 방제는 신속하고 정확한 방제 효과를 기대하기 어렵고, 병 발생 후의 치료 효과가 매우 낮으며 환경의 영향을 많이 받기 때문에 처리 효과가 일정하게 나

타나지 않는 등의 단점으로 생물농약으로 실용화되지는 못하고 있는 실정이다.

길항미생물 HC12의 16S ribosomal DNA 분석

길항세균 HC12균주의 16S rDNA를 PCR 증폭에 의해 약 1.5 kb의 유전자를 확보하였으며, 염기서열을 결정하였다. 이 염기서열을 Ribosomal Database Project를 이용하여 상동성을 분석한 결과 *Alcaligenes* sp.와 높은 유사성을 보였다. 또한 neighbor-joining 방법을 이용한 유연관계를 분석한 결과 길항균 HC12는 *Alcaligenes*속과 같은 그룹을 형성하였다(Fig. 2).

생리·생화학적인 특성

본 연구의 길항세균 HC12균주는 42°C에서 생육이 가능하며 아질산염의 환원과 gelatin의 액화를 시키지 못하였다. 그리고 L-histidine, L-tryptophan, L-ornithine, L-serine, malonate, valerate, propionate, N-acetyl glucosamin 등과 같은 산과 당을 이용하였고, urease, proline, potassium gluconate 등은 이용하지 못하였다(Table 1).

생물 검정 효과

양송이버섯에 세균성회색무늬병균을 접종한 후에 HC12를 처리한 결과 무처리구에서는 68.5%의 이병율을 보였지만 HC12처리에서는 25.3%의 이병율을 보여 63%의 방제효과가 있었다. 이상의 결과로 HC12균주는 세균성회색무늬병을 일으키는 양송이에 높은 항균효과가 있는 것으로 판단된다(Table 2, Fig. 3). Lee 등[20, 21]은 세균갈색무늬병 원균의 분비독소를 저해하는 미생물인 *Pseudomonas* 속이 느타리, 팽이, 양송이 등에 55~69%의 방제효과를 보였고, *P. azotoformans*는 이들 버섯에 대해 71~69%의 높은 방제효과가 있었다고 보고하였다. 외국에서는 Nair와 Fahy[16]

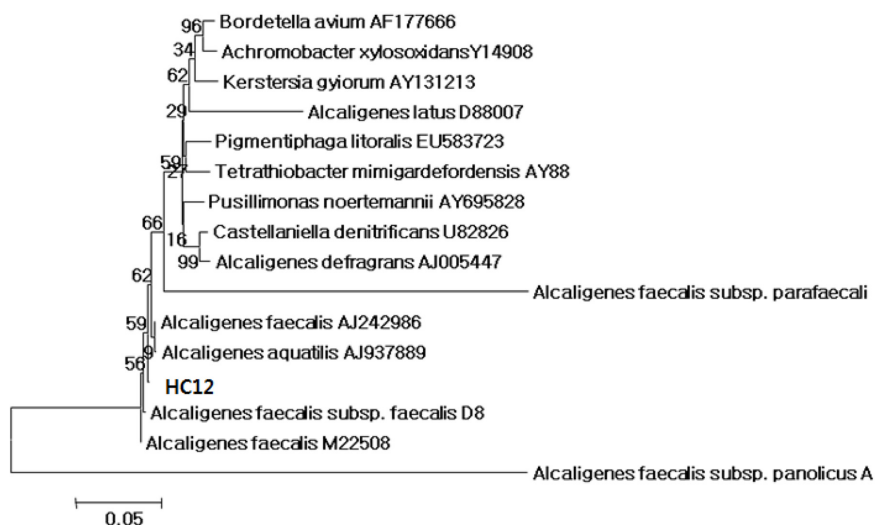


Fig. 2. Phylogenetic tree of HC12 based on 16S rRNA sequence similarity. Branching values determined using 1,000 bootstraps.

Table 1. Biochemical characteristics of *Alcaligenes* sp. HC12

Characters	HC12	Characters	HC12
growth at 42°C	+	L-serine	+
Nitrit reduction	-	Malonate	+
Gelatin liquefaction	-	Valerate	+
Urease	-	Propionate	+
L-histidine	+	Proline	-
L-tryptophan	+	N-acetyl glucosamin	+
L-ornithine	+	Potasslum gluconate	-

Table 2. Control efficacy of browning disease on *Agaricus bisporus* by HC12 strain

Treatment	Infection rate (%)	Control value (%)
Control	68.5 ± 3.9	
HC12	25.3 ± 4.3	63

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 없다. 따라서 길항세균 HC12 균주의 항균활성관계 물질탐색 및 최적 생산조건 검토, 농가 편의성을 고려한 제형화 기술개발과 살포방법 등을 추가적으로 개발한다면 산업적으로 충분히 가치가 있을 것으로 판단된다.

적 요

*Pseudomonas agarici*에 의해 발생하는 세균성회색무늬병은 양송이 재배에서 문제가 되는 대표적인 병해이다. 본 연구에서는 세균성회색무늬병의 생물학적 방제법에 이용할 수 있는 길항미생물의 항균활성과 선발된 길항미생물에 대해

포트 수준의 생물검정 실험을 실시하였다. 재배중인 양송이 배지에서 세균성회색무늬병 병원균을 강하게 억제하는 길항세균 HC12를 선발하였으며, 생리·생화학적 실험과 유전적 실험결과 HC12균주는 *Alcaligenes* sp.로 동정되었다. *Alcaligenes* sp. HC12를 양송이에 처리한 결과 63%의 방제 효과를 보였다. 따라서 *Alcaligenes* sp. HC12가 양송이버섯 세균성회색무늬병 방제를 위해 합성농약을 대체할 수 있는 친환경 방제제가 될 수 있을 것으로 생각된다.

Acknowledgements

This study was supported by research grants (PJ011125) provided by the Rural Development Administration (RDA) of Korea.

REFERENCES

1. Fermor TR. Bacterial diseases of edible mushrooms and their control. In: Wuest PJ, Royse DJ, Beelman RB, editors. Cultivating edible fungi. Amsterdam: Elsevier; 1986. p. 361-70.
2. Gill WM. Bacterial disease of *Agaricus* mushrooms. Rep Tottori Mycol Inst 1995;33:34-55.
3. Tolaas AG. A bacterial disease of cultivated mushrooms. Phytopathology 1915;5:51-4.
4. Paine SG. Studies in bacteriosis II: a brown blotch disease of cultivated mushrooms. Ann Appl Biol 1919;5:206-19.
5. Tsuneda A, Suyama K, Muradami S, Ohira I. Occurrence of *Pseudomonas tolaasii* on fruiting bodies of *Lentinula edodes* formed on *Quercus* logs. Mycoscience 1995;36:283-8.
6. Kim JW, Kim KH, Kang HJ. Studies on the pathogenic *Pseudomonas* causing bacterial disease of cultivated mushroom in Korea: 1. on the causal organisms of the rots of *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinus edodes*. Korean J Plant Pathol 1994;10:197-210.
7. Rainey PB, Brodey CL, Johnstone K. Biology of *Pseudomonas*

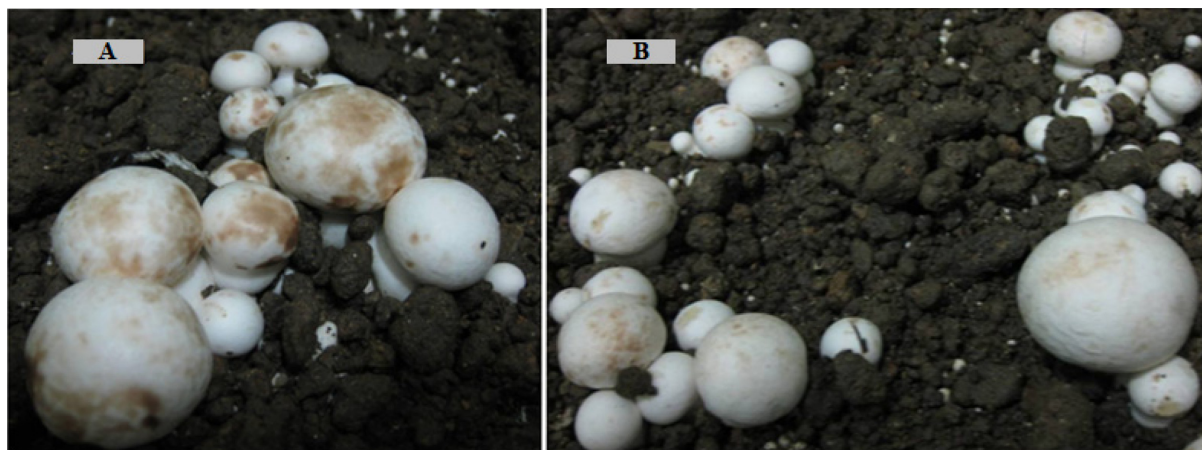


Fig. 3. Effect of spraying of HC12 suspension on browning disease development in *Agaricus bisporus*. A, control treatment; B, HC12 treatment.

- tolaasii*, cause of brown blotch disease of cultivated mushroom. In: Andrews JH, Tommerup I, editors. Advances in plant pathology. Vol. 8. New York: Academic Press. 1992. p. 95-117.
8. Wells JM, Sapers GM, Fett WF, Butterfield JE, Jones JB, Bouzar H, Miller FC. Postharvest discoloration of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* caused by *Pseudomonas tolaasii*, *P. 'reactans'*, and *P. 'gingeri'*. Phytopathology 1996;86:1098-104.
9. Goor M, Vantomme R, Swings J, Gillis M, Kersters K, de Ley J. Phenotypic and genotypic diversity of *Pseudomonas tolaasii* and white line reacting organisms isolated from cultivated mushrooms. J Gen Microbiol 1986;132:2249-64.
10. Wong WC, Fletcher JT, Unsworth BA, Preece TF. A note on ginger blotch, a new bacterial disease of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. J Appl Bacteriol 1982;52:43-8.
11. Cutri SS, Macauley BJ, Roberts WP. Characteristics of pathogenic non-fluorescent (smooth) and non-pathogenic fluorescent (rough) forms of *Pseudomonas tolaasii* and *Pseudomonas 'gingeri'*. J Appl Bacteriol 1984;57:291-8.
12. Geels FP, Heslen LP, Van Griensven LJ. Brown discoloration of mushrooms caused by *Pseudomonas agarici*. J Phytopathol 1994;140:249-59.
13. Bessette AE, Kerrigan RW, Jordan DC. Yellow blotch of *Pleurotus ostreatus*. Appl Environ Microbiol 1985;50:1535-7.
14. Lee HI, Cha JS. Cloning of a DNA fragment specific to *Pseudomonas tolaasii* causing bacterial brown blotch disease of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). Korean J Plant Pathol 1998;14:177-83.
15. Scherwinski K, Grosch R, Berg G. Effect of bacterial antagonists on lettuce: active biocontrol of *Rhizoctonia solani* and *negligible*, short-term effects on nontarget microorganisms. FEMS Microbiol Ecol 2008;64:106-16.
16. Nair NG, Fahy PC. Bacteria antagonistic to *Pseudomonas tolaasii* and their control of brown blotch of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. J Appl Bacteriol 1972;35:439-42.
17. Olivier JM, Guillaumes J, Martin D. Study of a bacterial disease of mushroom caps. In: Proceedings of 4th International Conference Plant Pathogenic Bacteria; 1978 Aug 27-Sep 2; Angers, France. Paris: INRA; 1978. p. 903-16.
18. Liao YM, Tu CC, Jeng JJ. Control of bacterial blotch of mushroom. Taiwan Mushrooms 1980;4:34-41.
19. Nutkins JC, Mortishire-Smith RJ, Packman LC, Brodey CL, Rainey PB, Johnstone K, Williams DH. Structure determination of tolaasin, an extracellular lipodepsipeptide produced by the mushroom pathogen *Pseudomonas tolaasii* Paine. J Am Chem Soc 1991;113:2621-7.
20. Lee CJ, Yoo YM, Han JY, Jhune CS, Cheong JC, Moon JW, Suh JS, Han HS, Cha JS. Isolation of the bacterium *Pseudomonas* sp. HC1 effective in inactivation of tolaasin produced by *Pseudomonas tolaasii*. Kor J Mycol 2013;41:248-54.
21. Lee CJ, Yoo YM, Han JY, Jhune CS, Cheong JC, Moon JW, Suh JS, Han HS, Cha JS. Isolation of the bacterium *Pseudomonas azotoformans* HC5 effective in antagonistic of brown blotch disease caused by *Pseudomonas tolaasii*. Kor J Mycol 2014;42: 219-24.
22. Park BS, Cho NC, Chun UH. Identification of *Pseudomonas fluorescens* antagonistic to *Pseudomonas tolaasii* and its cultivation. Korean J Biotechnol Bioeng 1992;7:296-301.
23. Kim IG, Someya T, Whang KS. The observation and a quantitative evaluation of viable but non-culturable bacteria in potable groundwater using epifluorescence microscopy. Korean J Microbiol 2002;38:180-5.
24. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighing position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res 1994;22:4673-80.
25. Jukes TH, Cantor CR. Evolution of protein molecules. In: Munro HN, editor. Mammalian Protein Metabolism. Vol. III. New York: Academic Press; 1969. p. 21-132.
26. Stainer RY, Palleroni NJ, Doudoroff M. The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. J Gen Microbiol 1966;43:159-271.
27. Palleroni NJ. Genus I: *Pseudomonas* *migula* 1894. In: Krieg NR, Holt JG, editors. Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. I. Baltimore: Williams and Wilkins; 1984. p. 141-99.
28. Kim MH, Park SW, Kim YK. Bacteriophages of *Pseudomonas tolaasii* for the biological control of brown blotch disease. J Korean Soc Appl Biol Chem 2011;54:99-104.