

GOVP1199801720

632.9
L293 L
V. 2

최 종
연구보고서

느타리버섯 세균성 갈반병의 종합방제법
개발에 관한 연구

Integrated Control of Bacterial Brown Blotch
of Oyster Mushroom

연구 기관

충남대학교 농과대학

농 립 부

제 출 문

농림부장관 귀하

본 보고서를 “느타리버섯 세균성 갈반병의 종합방제법 개발에 관한 연구
과제의 최종보고서로 제출합니다.

1997 . 11 . .

주관연구기관명 : 충남대학교

총괄연구책임자 : 유 승 헌

연 구 원 : 최 재 을

연 구 원 : 장 후 봉

연 구 원 : 백 근 배

연 구 원 : 전 낙 범

연 구 원 : 김 병 련

연 구 원 : 이 욱 경

연 구 원 : 박 명 수

연 구 원 : 여 운 형

연 구 원 : 서 건 식

요 약 문

I. 제목

느타리버섯 세균성 갈반병의 종합방제법 개발에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

느타리버섯의 인공재배는 포플러 등을 이용한 원목재배법으로부터 벗짚 및 폐습을 이용한 균상재배법으로 발전하면서 주년재배 및 대량생산이 가능하게 되어 재배면적이 확대되고 생산량도 크게 증가하여 왔다. 그러나 최근 세균성 갈반병(갈변병)을 비롯한 각종 병해가 우리 나라 전역에 걸쳐 발생하고 있으며 그 피해가 아주 심각한 실정이다. 특히 세균성 갈반병은 수분의 과부족으로 인한 피해증상과 유사하여 잘못 진단되는 경우가 있으며 아직 병원균의 전염경로 및 효과적인 방제법이 확립되어 있지 않아 매년 재배에 실패하는 농가가 많고 이로 인한 농민의 경제적 피해가 매우 크다. 따라서 느타리버섯의 생산성 향상 및 고품질의 버섯 생산을 위하여는 세균성 갈반병의 정확한 진단과 방제체계의 확립이 시급한 과제이다. 특히 최근 환경문제에 대한 관심과 저농약 안전식품의 중요성이 강조되고 있으므로 버섯병의 방제는 농약의 잔류, 식품의 안전성 및 환경오염문제를 야기시키지 않는 안전한 저농약방제법의 개발이 필요하다.

본 연구는 느타리버섯 세균성 갈반병의 저농약 종합 방제법을 개발하여 버섯의 생산성을 향상시키고 상품가치가 높은 우량버섯을 생산하므로써 농가소득증대에 기여하기 위하여 실시하였으며 구체적인 연구목표는 다음과 같다.

1. 느타리버섯 세균성 갈반병균의 정확하고 신속한 동정법과 진단법을 개발하고 전염경로를 밝힌다.
2. 무분별한 항생제 사용을 막기 위하여 효과적인 항생제 농약을 선별하고 적정 사용농도를 구명하므로써 항생제 사용을 최소화하면서 방제효과를 올릴 수 있는 방법을 개발한다.
3. 안정성 및 환경오염이 크게 문제되지 않는 식초, 목초, 클로르칼크, 오존수 및 NaOCl 등과 같은 소독제를 이용한 병해 방제법을 개발한다.
4. 길항세균 및 비병원성세균을 이용한 생물학적 방제법을 개발한다.
5. 느타리품종의 세균성 갈반병 저항성 정도를 검정한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 느타리버섯 세균성 갈반병의 신속하고 정확한 진단법 및 저농약 종합방제법을 개발하기 위하여 수행하였으며 구체적인 연구 개발내용 및 범위는 다음과 같다.

1. 병원세균의 동정 및 간편한 진단법 개발
 - 전국각지에서 채집한 이병자실체 및 균상배지인 벚짚, 폐습에서 분리한 세균의 세균학적 성질 및 병원성을 조사하여 병원세균을 동정한다.
 - 병원세균의 간편하고 신속한 동정을 위하여 병원세균의 특이 항혈청을 이용한 효소면역측정법(ELISA)을 개발한다.
2. 병원세균의 전염원 및 전염경로 구명
 - 병원세균의 전염원 및 전염경로를 구명하기 위하여 시판되는 느타리버섯 종균, 균상배지(벚짚 및 폐습), 관수용 물 및 재배사 내의 버섯파

리를 각 지역에서 수집하여 병원세균의 검출유무를 white line test, ELISA법 등으로 조사한다.

3. 항생제 농약을 이용한 세균성 갈반병의 방제법 개발

- 시판되는 항생제 33종류를 공시하여 병원세균에 대한 항균활성을 조사한다.
- 항균활성이 우수한 유용항생제를 선발하여 농도별로 세균성 갈반병 방제효과와 약해 유무를 조사한다.
- 유용 항생제의 세균성 갈반병 방제효과를 재배사 실증 실험으로 실시한다.

4. 저독성 소독제의 세균성 갈반병의 방제효과

- 식초, 목초액, 클로르칼크, CaCl_2 , NaOCl , 오존수와 같은 소독제의 병원세균에 대한 항균활성과 느타리버섯의 균사생장에 미치는 영향을 조사한다.
- 식초, 목초액, CaCl_2 , NaOCl , 오존수의 세균성 갈반병 방제효과를 재배사 실증실험으로 실시한다.

5. 미생물을 이용한 세균성 갈반병의 생물학적 방제법 개발

- 느타리버섯 및 균상배지(벼짚, 폐습)에서 분리한 세균중에서 병원세균에 항균활성이 있는 균주와 느타리버섯에 비병원성인 균주를 선발한다.
- 분리한 길항세균 및 비병원성 세균의 세균성 갈반병 방제효과를 실내실험과 재배사(병재배) 실험으로 실시한다.

6. 느타리 품종의 세균성 갈반병 저항성 검정

- 원형느타리, 원형느타리 2호, 여름느타리, 사철느타리1호, 사철2호, 애느타리, 농기2-1호, 농기201호, 농기202호 및 흑평(중국품종)등 국내외 품종의 병저항성 정도를 실내실험과 재배사 실험으로 조사한다.

IV. 연구결과 및 활용에 대한 건의

(I). 연구결과

1. 병원세균의 분리, 동정

느타리버섯의 병든 자실체에서 분리한 35개의 세균균주중에서 P-1을 비롯한 24개 균주는 느타리, 양송이, 팽이버섯에 병원성이 있었으며 WLRO(white line reacting organism)균주와 대치배양할 때 균주사이에 white line을 형성하였다. 이 병원세균 균주들의 세균학적 성질을 조사한 결과 이들은 *Pseudomonas tolaasii*로 동정되었다. 한편 P-2를 비롯한 6개 균주는 *P. tolaasii*와 대치 배양할 때 white line을 유도하는 WLRO(*P. reactans*)균이며, 이중 3균주는 느타리조직에 아주 약한 병원성이 있었다. 나머지 5개균주는 부생성 *Pseudomonas*였다.

2. 병원세균(*P. tolaasii*)의 신속한 검출과 동정을 위한 효소면역측정법 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)의 개발

병원세균인 *P. tolaasii*(PT)의 신속한 검출 및 정확한 동정을 위하여 효소면역측정법(ELISA)을 개발하였다. 이를 위하여 PT를 면역원으로 하여 Freund's adjuvant와 함께 토끼에 10^8 cfu/ml의 농도로 면역하고 PT에 특이적인 항 PT IgG 항혈청을 생산하였다. 항 PT항혈청을 비경합적 간접 ELISA로 분석한 결과 4차 면역한 토끼에서 가장 높은 항체역가를 나타냈으며 이

항체를 이용하여 비경합 간접 ELISA 및 경합 간접 ELISA법을 각각 확립하였다. PT항체의 *P. agarici*, *P. reactans*, *P. solanacearum*, 기타 비병원성 *Pseudomonas* 속균, *Erwinia chrysanthemi*, *Streptococcus mutans* 및 *Xanthomonas citri* 등 유사균과의 교차반응을 비경합 간접 ELISA 및 경합 간접 ELISA로 조사하였던 바 이 세균들에 대해서는 교차반응을 나타내지 않아 매우 특이성이 높은 항 PT항체로 생각되었다. 또한 항 PT항체를 이용하여 *P. tolaasii*와 다른 세균을 혼합하거나 다른 세균만을 coating 한 후 ELISA를 실시할 경우 *P. tolaasii*가 포함된 처리구에서만 강한 양성 반응을 나타내었다. 완충액조건에서 구한 표준곡선에서 PT의 검출한계는 10^2 cfu/ml이었으며 버섯추출물로 비경합 간접 ELISA를 실시한 후 얻은 표준곡선의 경우 대략 10^3 cfu/ml를 나타냈다. 실제 버섯시료의 분석에 ELISA 활용가능성을 조사하기 위하여 인위적으로 PT를 오염시킨 버섯시료로부터 재차 PT를 추출하고 희석하여 assay한 결과 그 회수율이 매우 안정된 값을 나타내었다. 이상의 결과, 본 ELISA법을 이용할 경우 많은 버섯시료 및 균상배지 등으로부터 *P. tolaasii*의 오염 및 감염여부를 신속하게 진단함으로써 세균성 갈반병의 예방 및 방제에 효과적으로 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

3. 병원세균의 전염원 및 전염경로 구명

병원세균(*P. tolaasii*)의 전염원 및 전염경로를 구명하기 위하여 시판종균, 재배사 관수용 물, 균상배지(벗짚, 폐습) 및 버섯파리로부터 병원세균의 검출유무를 white line test 및 ELISA법으로 조사한 결과는 다음과 같다.

가. 시판종균 검정

전국의 버섯종균회사 8개소로부터 구입한 느타리버섯 종균 160병을 공

시하여 종균내의 병원세균 검출유무를 조사하였던 바 공시한 종균병에서는 병원세균이 검출되지 않았다.

나. 균상배지 (벗짚, 폐습) 검정

충남 및 대전의 10개 지역 느타리 재배사에서 균상배지(벗짚, 폐습)를 채취하여 병원세균의 검출여부를 조사하였던 바 6개 재배사의 배지(벗짚, 폐습)에서 병원세균이 검출되었다. 특히 2곳의 재배사에서는 종균접종 직전의 발효가 끝난 배지에서 *P. tolaasii*와 *P. reactans*가 검출되었는데 이는 균상배지가 병원세균의 전염원이 될 수 있음을 나타내는 것이다.

다. 관수용 물의 검정

충남 및 대전의 10개 지역 느타리 재배사에서 관수용으로 사용하는 지하수와 저장 수조의 물을 채취하여 병원세균의 검출여부를 조사하였던 바 지하수에서는 병원세균이 검출되지 않았으나 저장 수조를 이용하는 2곳에서 병원세균이 검출되었고 일반세균의 밀도도 높게 나타났다. 이는 저장수조를 이용할 경우 병원세균이 관수용 물을 통하여 전염될 수 있음을 나타내는 것이다.

라. 버섯 파리의 검정

느타리버섯 재배사 9곳에서 각각 10마리씩의 버섯파리를 채집하여 병원세균의 검출여부를 조사하였던 바 5개 재배사에서 채집한 버섯파리에서 병원세균이 검출되었다. 이는 버섯파리가 병원세균을 전염시키는 중요한 매개체로 작용하고 있음을 나타내는 것이다.

4. 항생제 농약을 이용한 세균성 갈반병의 방제법 개발

가. 유용항생제 선발

시판되는 항생제 33개를 공시하여 세균성 갈반병균에 대한 항균활성을 paper disk법으로 조사하였던 바 tetracycline을 비롯한 19개 항생제가 항

균활성을 나타내었다. 항균활성을 나타내는 19개 항생제들의 농도별 항균활성을 조사하였던 바 tetracycline은 10ppm의 낮은 농도에서 kanamycin은 100ppm이상에서, kasugamycin은 150ppm이상에서, 대조약제인 streptomycin(농용신 수화제)은 200ppm이상에서 병원세균의 성장을 완전히 억제하였다. 기타 항생제들은 500ppm~ 1,000ppm 이상에서 억제효과가 있었다.

나. 항생제를 이용한 세균성 갈반병 방제효과

병원세균에 항균활성이 높은 tetracycline, kanamycin, kasugamycin 및 streptomycin을 공시하여 재배사에서 세균성 갈반병 방제효과를 조사하였다. 버섯재배는 원형느타리버섯을 폐쇄상자재배로 하였으며 병을 유도하기 위하여 병원세균 현탁액을 버섯 발이 전에 2회 분무 접종하였다. 항생제 처리는 병원세균 2차접종 1일 전에 1회, 접종 후에 2일 간격으로 2회 살포하였다. 실험은 2차례 실시하였으며 1차 실험에서는 kanamycin(100ppm)과 tetracycline(100ppm)의 처리효과를 조사하였던 바 방제가가 각각 76%, 79%였고 버섯에 약해도 없었다. 2차 실험에서는 kanamycin(100ppm), tetracycline(100ppm), kasugamycin(150ppm) 및 대조약제인 streptomycin(150ppm)의 효과를 조사하였는데 방제가가 각각, 72%, 71%, 65% 및 60%였고 버섯에 약해도 없었다.

5. 저독성 소독제의 항균활성 및 세균성 갈반병 방제효과

세균성 갈반병 방제효과가 있는 소독제를 선별하기 위하여 클로르칼크, 식초, 목초액, NaOCl, CaCl₂ 및 오존수를 공시하여 이들이 병원세균 및 느타리버섯 성장에 미치는 영향과 병방제 효과를 조사하였다.

가. 항균활성 조사

① 클로르칼크의 항균활성

클로르칼크 처리가 병원세균의 성장과 느타리버섯의 성장에 미치는 영

향을 조사하였던 바 0.5%이상 농도에서 세균의 생장이 완전히 억제되었다. 그러나 클로르칼크는 느타리균 성장에도 강한 저해작용이 있어 0.25% 농도에서는 느타리버섯의 균사생장이 40%억제되었고 0.5%이상 농도에서는 균사생장이 완전히 억제되었다. 즉 클로르칼크는 세균성 갈반병 방제에 효과적이지 못하였다.

② 식초의 항균활성

식초처리가 병원세균의 성장에 미치는 영향을 조사하였던 바 공시한 식초(초산농도 6.5~7%인 현미식초)의 0.5%이상 희석농도에서 세균생장이 완전히 억제되었다. 한편 식초가 느타리버섯 균사생장에 미치는 영향을 조사하였던 바 공시한 식초의 0.25%, 0.5%, 1% 희석농도에서 균사생장이 각각 5~10, 17~20, 35~40% 억제되었다. 그러나 식초 희석액이 버섯 자실체 형성에 미치는 영향을 조사하였던 바 0.25~2% 희석농도에서는 약해가 없었으며 5%처리구에서 약해가 나타났다.

③ 목초액의 항균 활성

목초액 처리가 병원세균의 성장에 미치는 영향을 조사하였던 바 시판 목초액(Actus, 슈퍼아스톱)의 1%이상 희석농도에서 세균생장이 완전히 억제되었다. 한편 느타리버섯 성장에 미치는 목초액의 영향을 조사하였던 바 목초액 0.1%처리구에서는 28~30%의 균사생장 촉진효과가 있었고 1%처리구에서는 5~10%의 균사 생장 촉진 효과가 있었으며 0.1~2%의 전처리구에서 자실체 형성도 양호하였다.

④ 차아염소산나트륨(NaOCl), 오존수, CaCl_2 의 항균활성

병원세균에 대한 차아염소산 나트륨의 항균활성을 조사하였던 바 100ppm에서는 생장억제효과가 미약하였으나 400ppm이상에서는 강한 억제효과를 나타내었다. 오존수가 병원세균의 생육에 미치는 영향을 조사하였던 바 오존농도 0.1, 0.2ppm의 오존수에서는 처리 후 5~20분까지는 세균밀도

가 저하하였으나 20분후 부터는 세균 밀도가 다시 급격히 증가하였다. 한편 CaCl_2 는 0.5% 이상농도에서 병원세균의 성장만을 억제하였고 비병원성 세균의 성장억제효과는 없었다.

나. 소독제의 세균성 갈반병 방제효과

식초, 목초액, 차아염소산나트륨, 오존수 등의 병방제효과를 조사하기 위하여 원형느타리 버섯을 폐쇄 상자재배 하였으며 발병유도를 위하여 병원 세균 현탁액을 2회 분무 접종하였고 약제처리는 병원세균 2차접종 1일 전에 1회, 접종 후에 2일 간격으로 3회 살포하였다.

먼저 식초, 목초액의 병방제 효과를 2차례 걸쳐 조사하였다. 1차 실험에서는 목초액(0.5, 1, 2%) 처리구에서 65~71%의 방제가를, 식초(0.5, 1%)처리구에서 64~66%의 방제가를 나타내었다. 그러나 2차 실험에서는 목초액 처리구의 방제가가 33~37%, 식초처리구의 방제가가 35~39%로서 방제효과가 매우 낮았다. 2차 실험에서는 무처리(대조구)의 이병율이 83%로서 1차 실험 때의 24%에 비하여 높았는데 이 결과로 보아 발병이 심한 경우에는 식초, 목초액 처리로는 병 방제효과를 기대할 수 없을 것으로 생각된다.

차아염소산 나트륨 및 오존수의 병 방제효과를 조사하였던 바 차아염소산나트륨(0.1%)처리구와 오존수(0.2ppm)처리구의 방제가가 각각 46%, 14%였다.

6. 항생제 농약, 식초, 목초액의 세균성 갈반병 방제효과 농가실험

항생제 농약과 식초, 목초액의 병방제 효과를 97년 2월 ~5월과 10~11월에 2차례 실시하였던 바 항생제인 tetracycline (100ppm), kanamycin(100ppm) 및 kasugamycin(150ppm)처리구의 방제가는 각각 73~75%, 71% 및 68~75%로서 대조약제인 streptomycin(농용신 수화제, 150ppm)의 63~68%보다 높았다 그러나 목초액(1%)과 식초(1%)처리구의 방제가는 각

각 23~39%와 31.9%로서 매우 낮았다.

7. 미생물을 이용한 생물학적 방제

가. 유용균주 선발

균상배지(벗짚, 폐습) 및 느타리버섯 자실체에서 분리한 340개 세균 균주중에서 병원세균에 길항작용이 있는 *Pseudomonas* 12개 균주를 선발하였고 또한 병원세균에 길항작용은 없지만 느타리버섯의 군사생장 및 자실체 형성을 억제하지 않는 비병원성 *Pseudomonas* 15개 균주를 선발하였다.

길항균으로 선발된 12개 균주들의 느타리생장에 미치는 영향을 조사하였던 바 T-11과 Ao-15 등 2개 균주를 제외한 10개 균주는 느타리버섯 군사생장 또는 자실체 형성을 억제하였다. 또한 비병원성 *Pseudomonas* 15개 균주중에서 Ao-7은 느타리군사생장의 촉진효과가 있었다.

이상의 결과로 길항세균인 T-11균주, Ao-15균주, 비병원성 세균인 Ao-7균주, P-50균주 등 4균주를 생물학적 방제의 후보균주로 선발하였다.

나. 선발된 균주의 병방제 효과

위에서 선발된 4균주들을 가지고 병원세균에 대한 방제효과를 병재배의 느타리버섯과 팽이버섯 자실체를 이용한 접종실험으로 실시하였던 바 길항세균인 T-11 균주를 병원세균과 10:1(v/v)비율로 처리하였을 때 87.5%의 가장 높은 방제가를 나타내었다.

8. 느타리 품종의 병 저항성 검정

가. 군사생장 억제비교

원형느타리를 비롯한 10개 품종의 느타리 군사를 병원세균과 대치 배양하여 군사생육 억제정도를 비교하였던 바 품종간 차이 없이 모두 군사생육이 강하게 억제되었다.

나. 자실체의 병저항성 검정

공시한 10개 품종을 폐습상자배지에서 배양한 후 병원세균을 접종하여 품종간 저항성 정도를 조사하였던 바 원형느타리, 애느타리, 농기2-1호, 농기201호 흑명 등 저온성, 중온성 품종들은 평균 이병율이 15.5~20.6%였으나 사철느타리1호, 사철느타리2호, 여름느타리, 농기202호 등 중고온성 품종들은 평균 이병율이 5.6~7.4%였다.

(II) 활용에 대한 건의

1. 느타리버섯 세균성 갈반병(갈변병)은 주로 *Pseudomonas tolaasii*에 의해 발생하는 병으로서 병징이 건조에 의한 갈변 및 관수과다시 발생하는 갈변, 부패증상과 유사하여 잘못 진단되는 경우가 있다. 버섯병의 효과적인 방제를 위하여는 병원균의 정확한 동정과 진단이 필수적인 작업인 바 기존의 방법(세균학적 성질 조사, 병원성 조사등)으로는 많은 노력과 시간(최소 3~5일)이 소요된다. 특히 검정 시료가 많은 경우에는 더욱 불편하며 정확도도 떨어진다. 그러나 본 연구에서 개발한 효소면역측정법(ELISA)은 신속하고 정확하게 병원세균(*P. tolaasii*)을 동정할 수 있는 간편한 방법으로서 특히 수백점의 많은 버섯 시료와 균상배지 시료도 3시간 이내에 정확하게 동정, 진단할 수 있는 아주 실용적이고 획기적인 방법이다. 따라서 이 ELISA법을 농가의 느타리버섯 세균성 갈반병의 진단과 예찰에 활용할 수 있기를 건의한다. 또한 이 방법은 느타리버섯 뿐아니라 양송이, 팽이버섯의 세균성 갈반병 진단에도 활용될 수 있을 것이다. (ELISA법 개발과 이용에 관한 특허 출원예정임)

2. 세균성 갈반병균의 전염원으로서 균상배지(벗짚과 폐습)와 저장수조의 물 및 버섯파리가 중요한 역할을 함을 확인하였으므로 병의 예방을 위하여

는 ELISA법 및 white line test법을 이용한 배지와 저장수조의 병원세균 오염여부에 관한 사전 진단과 배지의 철저한 발효살균, 저장수조의 소독 및 버섯파리구제가 필요함을 지도하여야 할 것이다.

3. 세균성 갈반병 방제약제로 현재 사용 가능한 것은 농용 항생제인 농용신(streptomycin)수화제이며 균상에 버섯이 없을 때 관수대신 살포한다. 본 연구에서는 농용항생제인 kasugamycin과 기타항생제인 kanamycin 및 tetracyclin의 약효가 농용신(streptomycin) 보다 우수한 것을 확인하였으며 이들 약제를 농용신과 교호살포할 경우 방제효과를 높일 수 있을 것으로 생각되므로 이 약제들을 방제약제로 활용할 수 있기를 건의한다.

식초, 목초액과 같은 소독제는 실내실험에서는 병 방제효과가 인정되었으나 재배사 실험에서는 방제가 떨어지므로 병의 예방제로는 활용가능성이 있으나 발병이 심한 경우 방제약제로는 실용성이 없었다.

4. 생물학적 방제제의 우수균주로 선발한 길항세균 *Pseudomonas* sp. T-11 균주는 병원세균(*P. tolaasii*)에 강한 길항작용이 있으며 느타리버섯 생육에는 전혀 해가 없는 균으로서 앞으로 이 균주가 생산하는 항세균성 항생물질의 개발에 활용할 계획이며 농가에서 병방제제로 활용하기 위하여는 재배사내 균상에서의 정착력, 세포독성(cytotoxicity)구명 등 추가연구가 필요하다.

Summary

Bacterial brown blotch of oyster mushroom is one of the most severe and epidemic diseases in oyster mushroom cultivation in Korea. In spite of its severe damage, etiology, inoculum source and integrated control measures of the disease have been studied with rare. In this study, pathogens of the disease were isolated from cultivated oyster mushroom and were investigated their bacteriological characteristics and pathogenicity. Also, several control methods including bactericide treatment and biological control were explored to develop the effective control methods of the disease.

The results obtained are summarized as follows

1. Pathogenic bacteria causing brown blotch of oyster mushroom were identified as *Pseudomonas tolaasii* based on the white line test, bacteriological characteristics and pathogenicity. For rapid and effective detection of *P. tolaasii*, enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) system was developed. The ELISA system could be a convenient tool to detect and identify the pathogen on oyster mushrooms and further to diagnose the bacterial brown blotch from various mushroom culture site.

In addition to *P. tolaasii*, *P. reactans* was also isolated from symptoms of the brown blotch disease and the pathogenicity test showed that some isolates of the bacterium have weak pathogenicity against oyster mushroom.

2. Studies on inoculum sources of the disease and dissemination of the pathogen revealed that the pathogenic bacteria may disseminated by substrates such as rice straw and waste cotton, irrigation water stored in tanks, and mushroom flies.

3. Among 33 antibiotics tested, tetracycline(100ppm), kanamycin(100ppm), and kasugamycin(150ppm) were selected as effective bacteriocides for controlling the bacterial brown blotch of oyster mushroom. Control effect of them was superior than that of streptomycin.

4. In the five low-toxic disinfectants tested, vinegar(1%), wood vinegar(1%) and sodium hypochlorite(100ppm) entirely inhibited *in vitro* growth of the pathogenic *Pseudomonas*, but their control effect on the brown blotch in the mushroom house was not very effective.

5. The effectiveness of biological control of *P. tolaasii* with a bio-control agent *Pseudomonas* sp. T-11 was investigated in *in vitro* test and in the spawn bottle experiment of oyster mushroom. The control value was as high as 87.5% when the mixture of control agent(T-11) and pathogen was 10:1(v/v).

6. The relative resistance of 10 cultivars of oyster mushroom to bacterial brown blotch was investigated by artificial inoculation of

P. tolaasii. Cultivars of low and medium temperatures including Wonhyong, Nonggi #2-1, #201 and Heukpyong(Chinese cv.) were susceptible.

Contents

Chapter 1. General introduction	21
Chapter 2. Identification, characterization and pathogenicity of bacteria causing brown blotch of oyster mushroom	23
1. Introduction	23
2. Materials and methods	24
3. Results and discussion	25
4. Abstract	31
Chapter 3. Development of ELISA system for detection and identification of <i>Pseudomonas tolaasii</i>	36
1. Introduction	36
2. Materials and methods	37
3. Results and discussion	41
4. Abstract	50
Chapter 4. Investigation of inoculum sources of the disease and dissemination of the pathogen	52
1. Introduction	52
2. Materials and methods	52
3. Results and discussion	54
4. Abstract	60
Chapter 5. Control of bacterial brown blotch of oyster mushroom by antibiotics	61
1. Introduction	61
2. Materials and methods	62
3. Results and discussion	64
4. Abstract	71

Chapter 6. Control of bacterial brown blotch of oyster mushroom by disinfectants	72
1. Introduction	72
2. Materials and methods	72
3. Results and discussion	74
4. Abstract	86
Chapter 7. Biological control of bacterial brown blotch oyster mushroom by antagonistic bacteria	89
1. Introduction	89
2. Materials and methods	89
3. Results and discussion	90
4. Abstract	95
Chapter 8. Resistance of oyster mushroom cultivars to bacterial brown blotch disease	96
1. Introduction	96
2. Materials and methods	96
3. Results and discussion	97
4. Abstract	99
Chapter 9. Conclusion	100
Chapter 10. References	102

목 차

제 1장 서 론	21
제 2장 느타리버섯 세균성갈반병균의 동정, 세균학적 특성 및 병원성	23
제 1절 서언	23
제 2절 재료 및 방법	24
제 3절 결과 및 고찰	25
제 4절 적요	31
제 3장 느타리버섯 세균성갈반병균(<i>Pseudomonas tolaasii</i>)의 신속한 검출과 동정을 위한 효소면역측정법(ELISA)의 개발	36
제 1절 서언	36
제 2절 재료 및 방법	37
제 3절 결과 및 고찰	41
제 4절 적요	50
제 4장 느타리버섯 세균성갈반병균의 전염원 및 전염경로 구명	52
제 1절 서언	52
제 2절 재료 및 방법	52
제 3절 결과 및 고찰	54
제 4절 적요	60
제 5장 항생제농약을 이용한 세균성갈반병의 방제법개발	61
제 1절 서언	61
제 2절 재료 및 방법	62
제 3절 결과 및 고찰	64
제 4절 적요	71

제 6장 저독성소독제를 이용한 세균성갈반병의 방제	72
제 1절 서언	72
제 2절 재료 및 방법	72
제 3절 결과 및 고찰	74
제 4절 적요	86
제 7장 미생물을 이용한 세균성갈반병의 생물학적방제	89
제 1절 서언	89
제 2절 재료 및 방법	89
제 3절 결과 및 고찰	90
제 4절 적요	95
제 8장 느타리버섯 품종의 세균성갈반병 저항성 검정	96
제 1절 서언	96
제 2절 재료 및 방법	96
제 3절 결과 및 고찰	97
제 4절 적요	99
제 9장 결론	100
제 10장 인용문헌	102

제 1장 서 론

느타리버섯(*Pleurotus* spp.)은 각종 활엽수의 고사목 및 살아있는 나무에 총생 또는 균생으로 발생하는 목재부후균으로 우리나라를 비롯하여 세계 각지에 분포한다. 느타리버섯은 향과 맛이 좋아 오래전부터 한국, 일본에서 식용되어 왔으며 최근 미국, 중국, 인도, 유럽각지에서 생산량이 증가하고 있다. 옛날부터 미류나무 버섯, 버드나무버섯등으로 불려졌으며 구미에서는 맛과 모양이 굴과 같다하여 굴버섯(oyter mushroom)으로 부르고 있다. 느타리버섯의 국내 생산량은 1990년 87,038kg이던 것이 1992년에는 220,427kg으로 생산량이 급증하였으며(산림청1993), 세계적으로도 1987년에는 16,900만톤이었던 것이 1990년대에는 90,900만톤으로 생산량이 급증하고 있다(chang 등 1993). 느타리버섯의 인공재배는 포플라등 활엽수의 원목을 이용한 원목재배법을 이용하여 왔으나, 원목의 수급이 어려워짐에 따라 볏짚, 폐습과 같은 농업부산물을 이용한 균상재배법이 개발되어(Bano와 Strivastava 1962, Cho 등 1981, 박 등 1975, 정 1983, 차 등 1997) 보급되면서 재배 면적의 확대와 생산량의 증가를 갖어 왔다. 그러나 생산량의 증가추세에 부합하는 재배기술의 축적, 재배사 관리의 모델화가 미흡하기 때문에 그 생산량은 국민적인 소비욕구를 만족시키지 못하는 실정이다. 느타리버섯의 재배사는 양송이나 병재배등의 영구재배사와 달리 간이 재배사가 대부분이기 때문에 버섯재배에 요구되는 환경조건이 재배사 외부의 환경조건에 크게 지배를 받는다. 이러한 재배사 환경은 외부의 온도변화에 민감하게 반응하기 때문에 버섯재배에 부적당한 환경에서 버섯재배를 하기도 한다. 특히 낙후된 시설의 재배사에서는 그 정도가 심하며 따라서 각종 병의 발생이 심하다. 최근 병원세균에 의한 세균성 갈반병이 우리나라 전역에 걸쳐 발생하고 있으며 그 피해가 아주 심각하다(신 과 전 1991, 전 과 차

1988, 차 등 1997). 이 병은 *Pseudomonas*속 세균에 의하여 발생하는데 아직 병원균의 전염경로 및 효과적인 방제법이 확립되어 있지 않아 매년 재배에 실패하는 농가가 있으며 농민의 경제적 피해가 매우 크다. 따라서 느타리버섯의 생산성 향상과 고품질의 버섯 생산을 위하여는 세균성 갈반병의 방제 체계 확립이 시급한 과제이다. 특히 최근 환경문제에 대한 관심과 무공해 안전식품의 중요성이 강조되고 있으므로 버섯병의 방제는 농약잔류, 식품의 안전성, 환경오염등의 문제를 야기시키지 않는 항생제 농약의 선발, 저독성 소독제의 선발, 생물학적 방제법의 개발등 무공해, 저농약 방제법의 개발이 필요하다.

본 연구는 느타리버섯 세균성 갈반병의 저농약 종합 방제법을 개발하여 버섯의 생산성을 향상시키고 상품가치가 높은 우량버섯을 생산함으로써 농가 소득증대에 기여하기 위하여 실시하였으며 구체적인 연구개발의 목표와 범위는 다음과 같다.

1. 느타리버섯 세균성 갈반병균의 정확하고 신속한 동정법과 진단법을 개발하고 전염원과 전염경로를 밝힌다.
2. 무분별한 항생제 사용을 막기 위하여 효과적인 항생제 농약을 선발하고 적정 사용농도를 구명함으로써 항생제 사용을 최소화하면서 병 방제효과를 올릴 수 있는 방법을 개발한다.
3. 식품의 안전성 및 환경오염이 크게 문제되지 않는 식초, 목초액, 클로르 칼크, 오존수, 차아염소산나트륨과 같은 소독제를 이용한 병해 방제효과를 조사한다.
4. 길항세균 및 비병원세균을 이용한 생물학적 방제법을 개발한다.
5. 느타리버섯 품종의 세균성 갈반병 저항성 정도를 검정한다.

제 2장 느타리버섯 세균성 갈반병균의 동정, 세균학적 특징 및 병원성

제 1절 서 언

느타리버섯 (*Pleurotus* spp.)은 향과 맛이 뛰어나며 영양이 풍부한 건강식 기호식품으로 세계적으로 소비가 증가하고 있는 버섯이다. 국내에서는 최근에 벗짚 및 폐습을 이용한 균상재배법이 개발(박 등 1975, 정 1983, 차 등 1997), 보급되면서 대량생산이 가능하게 되어 재배면적이 확대되고 생산량도 증가하였다. 그러나 일부 농가는 낙후된 시설과 밀폐된 환경에서 재배하기 때문에 각종 병의 발생이 심하고 이런 병해로 인하여 버섯재배를 포기하는 농가도 많은 실정이다. 이들 피해포장은 유해 균류에(신 1987) 의한 피해도 크지만 최근 몇년간 세균성 갈반병이 발생하면서 특히 큰 피해를 주어 세균성 갈반병으로 인한 경제적 손실이 막심하다(전 과 차 1988, 차 등 1997). 세균성 갈반병의 병징은 초기에는 버섯 갓의 표면에 황갈색의 점무늬가 생기고 점차 진한 갈색의 불규칙한 큰 병반으로 확대된다. 발병이 심하면 버섯 표면은 점액성을 띄고 부패한다. 어린 버섯에 감염되면 뚜렷한 갈색 점무늬가 생기고 더 어린 자실체는 전체가 갈변 부패한다. 느타리버섯 세균성 갈반병균은 *Pseudomonas tolaasii*로 알려져 있으며(Shirata 등 1995, Suyama 와 Fuji 1993, 陶山 등 1987, 김 등 1994) 이외에 *P. agarici*에 의한 yellow blotch도 각종 식용버섯에서 보고되어 있다(Bessette 등 1985, Suyama 와 Fuji 1993, Zarkower 등 1984). 최근 김등(1994)은 국내 재배버섯의 부패, 변성의 원인을 구명하기 위하여 이병버섯(양송이, 느타리버섯, 표고버섯)을 수집하여 세균을 분리, 동정한 결과 *P. tolaasii*가 부패, 변성의 주 원인이며 *P. agarici*는 그다지 문제가 되지 않는다고 하였

다. *P. tolaasii*는 버섯에서 분리된 비병원성 *Pseudomonas*속의 특정균주와 *Pseudomonas* agar F(PAF)배지에서 대치배양하면 그 중앙부에 백색의 침강선 (white line)이 형성된다. 이러한 현상은 Wong과 Preece(1979)에 의하여 처음으로 보고된 것으로서 white line 반응이 선명하고 짧은 시간내에 형성되며 특이성이 높기 때문에 *P. tolaasii*의 동정에 널리 이용되고 있다(Goor 등 1986, 陶山 등 1987, 김 등 1995). 그러나 병원성 *P. tolaasii*중에는 white line반응이 나타나지 않는 균주도 있음으로(김 등 1995) 이 반응의 특이성이 문제가 제기되기도 한다. *P. tolaasii*와 white line을 형성하는 비병원성 *Pseudomonas*는 white line reacting organisms(WLRO)(Wong 과 Preece 1979) 또는 *P. reactans*(Preece 등 1982, 공식적인 종으로 인정되지 않음)로 명명되고 있으며 이들의 세균학적 성질은 매우 유사한 것으로 알려져 있다. 본 연구는 느타리버섯 재배사의 이병버섯에서 분리한 세균의 세균학적 특성과 병원성을 조사하여 이들을 동정하므로서 세균성 갈반병의 병원을 구명하고 이 병의 방제법 확립에 기초자료를 제공하고자 한다.

제 2절 재료 및 방법

1. 세균의 분리.

대전, 충남·북 지역의 느타리버섯 재배포장에서 이병자실체를 채취하여 이병부위를 절단한 다음 2% 차아염소산나트륨 용액과 70% 에탄올로 1~2분간 침지하여 표면소독한 다음 살균수로 씻었다. 이 시료들을 상법에 따라 마쇄한 후 King's B배지에 도말 또는 희석하여 25℃ 항온기에서 1~2일간 배양후 형광성을 띄는 colony를 분리 하였다.

2. White line 검정.

Wong 과 Preece(1979)의 방법에 따라 이병자실체로부터 분리한 *Pseudomonas*균주를 *Pseudomonas* agar F(PAF)배지에 일직선으로 획선배양하고 이에 직각으로 일본 東京農業大學에서 분양받은 white line형성 균주(*P. reactans*)를 접종하여 25℃ 항온기에서 24시간 배양한 후 백색침강선의 형성유무를 조사하였다.

3. 세균학적 특성 조사.

Lelliot 등(1966), Wong 과 Preece(1979), Hildebrand 등(1988)의 방법에 따라 배양적, 형태적, 생리적특성을 조사하였다.

4. 병원성 검정.

실내검정은 밀폐용기 (28×22×9cm)내의 여지에 멸균수를 가하고 느타리버섯, 표고버섯, 만가닥버섯, 팽이버섯의 자실체를 올려놓은 다음, PAF배지에서 배양된 세균을 도포접종하여 15℃ 항온기에서 24-48시간 배양하면서 접종부위의 갈변 및 부패유무로 병원성을 확인하였다. 재배사 검정은 느타리버섯(원형느타리) 종균을 폐쇄상자배지에 접종하여 25-27℃에서 30일간 배양한 후 자실체 발이를 유도하면서 분리된 병원세균을 2일 간격으로 3회 분무접종하고 핀 형성시부터 병 발생을 조사하였다. 이때 접종원은 병원세균을 nutrient broth(Difco)에서 24시간 배양 후 원심하여 세균현탁액을 약 10^{10} cfu/ml농도로 조절한 것을 이용하였다.

제 3절 결과 및 고찰

1. 세균학적 특성.

느타리버섯에서 분리한 세균 35개 균주를 PAF배지에서 *P. reactans*(WLRO) 균주와 대치배양할 경우 white line(백색 침강선)을 형성하는 균주는 P-1을 비롯한 24개 균주였고 11개 균주는 white line을 형성하지 못하였다(Fig. 1). P-1을 비롯한 24개 균주의 세균학적 특성을 조사한 결과는 Table 1과 같다. 이 균주들은 감자 절편에 접종할 경우 감자를 부패시키지는 않았으나 접종부위를 흑변시키는 현상을 나타내었다. 이런 현상은 Suyama 와 Fuji(1993)가 보고한 *P. tolaasii*의 특성과 일치하였다. 또한 King's B배지에서 배양하면 blue 형광성을 나타내었고 OF test, catalase, oxidase, arginine dehydrolase, gelatin 액화능은 양성 반응을 보인 반면, V-P test, indol, levan 생성, 질산염 환원은 음성 반응을 나타내었다. Glucose, glycerin, lactose, sucrose로부터 gas생성, lactose, sucrose로부터 산생성은 음성반응을 보였고, glucose로부터 산생성은 양성이었다. 공시균은 6℃, 30℃에서 배양할 경우에도 성장하였는데 이 특성은 Paine(1919)이 보고한 *P. tolaasii* 성장 온도 범위와 유사하였다. 탄수화물 중 mannose, galactose, glucose는 이용하였으나 trehalose, xylose, cellobiose, ribose, sucrose, lactose는 이용하지 못하였다. 한편 *P. reactans*균주와 대치배양시 white line 형성능이 없는 11개 균주를 *P. tolaasii*로 동정된 P-1균주와 대치배양하였던 바 P-2를 비롯한 6개 균주가 *P. tolaasii*와의 사이에 white line을 유도하는 *P. reactans*균주였다. 이들 *P. reactans*균주와 *P. tolaasii*(P-1)에 대하여 분류학적으로 중요한 10가지 성질을 조사한 결과는 Table 2와 같다. *P. tolaasii*인 P-1균주는 erythritol의 5종의 물질을 이용하여 성장하는 반면 L-arabinose를 포함한 4종의 물질은 이용하지 못하였다. 이러한 특성은 Goor 등(1986)이 보고한 *P. tolaasii*의 성질과 일치하는 것이었다. 반면 white line을 유도하는

P-2, P-184균주 등은 histamine, D-tartrate를 제외한 8종의 물질을 이용하여 성장하였는데 이 특성은 Goor등이 보고한 WLRO의 특징과 동일하였다. 이상 분리균주들의 세균학적 특성을 종합하여 분석한 결과 공시균주중 P-1, P-4, P-105를 포함한 24개 균주는 Tolaas(1915), Paine(1919), Suyama(1993) 등이 보고한 *P. tolaasii*의 특징과 유사하므로 *P. tolaasii*로 동정하였고 P-2, P-3, P-184를 비롯한 6개 균주는 *P. reactans*(WLRO)로 동정하였다. *P. reactans*균주중 P-2, P-3은 저온(6℃)에서 *P. tolaasii*와 대치배양할 경우에도 white line을 유도하였으나 P-184균주는 6℃에서 white line을 유도하지 못하였다. 김 등(1994)은 *P. tolaasii*와 *P. reactans* 대치 배양은 22℃에서 가장 좋아서 대치거리 4mm정도에서 36시간에 확실한 반응을 얻을 수 있었고 25℃에서는 72시간 후에도 white line의 형성이 없었다고 보고하였으나, 본 연구에서는 일부 균주에서 25℃뿐 아니라 30℃에서도 white line의 반응을 얻을 수 있었다.

2. 병원성 검정.

*P. tolaasii*로 동정된 P-1균주등은 느타리버섯을 비롯한 표고버섯, 팽이버섯, 만가닥버섯에 도포접종한 결과 접종부위가 움푹패이며 황변~갈변시키는 강한 병원성을 나타내었고(Fig. 2), 양송이에 대한 병원성 검정에서도 16시간만에 조직이 갈변, 부패하는 특징을 나타내었다(Fig. 3). 한편 *P. reactans* 6개 균주중에서 P-2를 비롯한 3개 균주는 느타리버섯에 약한 병원성을 나타내어 접종부위가 갈색으로 변색되었다(Fig. 2). Wong 과 Preece(1979), Goor 등(1986)에 의하면 WLRO는 부생성인 것으로 알려졌으나 최근 Wells 등(1996)은 양송이 수확 후 저장중 발생하는 갈변현상이 *P. tolaasii*뿐 아니라 *P. reactans*(WLRO)에 의해서도 발생한다고 보고하였는데 이러한 보고와 본 연구 결과를 비교해볼 때 *P. reactans*균주중에는 병원성

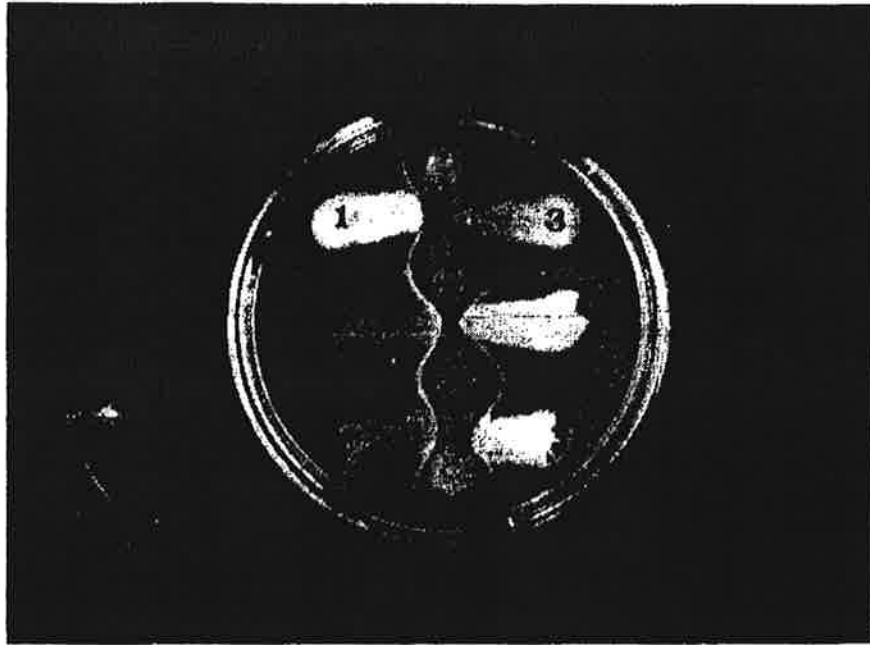


Fig. 1. White line test of *Pseudomonas tolaasii* with *Pseudomonas reactans*(WLRO)

1: *P. tolaasii*, 2: *P. reactans*, 3: *P. reactans*

Table 1. Characteristics of *Pseudomonas* isolates derived from disease oyster mushroom.

Characters	Present isolates ^a			<i>P. tolaasii</i> previously reported by		
	P-1	P-4	P-105	Paine	Young	Suyama
Fluorescent pigment	+	+	+	+	+	+
OF test	+	+	+			+
Catalase	+	+	+		+	+
Oxidase	+	+	+		+	+
Nitrate reduction	-	-	-	-(+)	-	-
Indol production	-	-	-	-(±)	-	-
Levan production	-	-	-		-	-
Arginine dehydrolase	+	+	+	+	+	+
Gelatin liquefaction	+	+	+	+(+)	+	+
V-P test	-	-	-			-
Gas production						
Glucose	-	-	-	-(-)		
Glycerine	-	-	-	(-)		
Nitrate				(-)		
Lactose	-	-	-	-(-)		
Sucrose	-	-	-	-(-)		
Acid production						
Glucose	+	+	+	+(+)	+	+
Lactose	-	-	-	-(-)	-	-
Sucrose	-	-	-	-(-)	-	-
Growth at						
6°C	+	+	+	+		
30°C	+	+	+	+		
Potato tuber slice	+	+	+			+
White line test	+	+	+			+
Rapid pitting test (browning test)	+	+	+			+
Tobacco hypersensitivity	-	-	-			-

+ : Positive reaction, - : Negative reaction, ± : Weak

Table 2. Phenotypic features useful for the differentiation of the *Pseudomonas* isolates.

Feature	<i>P. tolaasii</i> reported by Goor et al	<i>P. reactans</i> reported by Goor et al	Present isolates			
			<i>P.</i> <i>tolaasii</i> P-1	<i>P. reactans</i>		
				P-2	P-3	P-184
Growth on						
Erythritol	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+	+
L-Arabinose	-	+	-	+	+	+
L-Rhamnose	-	+	-	+	+	+
L-Arabitol	+	+	+	+	+	+
2-Ketogluconate	+	+	+	+	+	+
n-Valerate	+	+	+	+	+	+
n-Caproate	+	+	+	+	+	+
D-Tartrate	-	-	-	-	-	-
Histamine	-	-	-	-	+	-
White line test at 6°C				+	+	-
White line test at 30°C				+	+	+
Colony type				Flat	Convex	Flat
Pathogenicity				±	v	-

+: Positive -: Negative ±: Weak V: Variable

이 있는 균주가 분포하고 있음을 알 수 있다. 재배사에서 느타리버섯 폐쇄상자배지에 *P. tolaasii*(P-1)를 인공접종한 처리구에서도 농가의 포장에서 나타나는 병징과 동일한 갈변증상이 핀헤드(약 2mm)형성시 확인되었으며, 자실체의 갓은 윤기가 나뉘어 미끈거리고, 병반주변은 황변~갈변하며 부패증상을 보였다(Fig 4A, 4B). 이병자실체가 성숙할 경우 대와 갓은 전체적으로 연약하고, 초코렛색이나 갈색으로 변색되며, 만지면 심한 비린냄새가 나는 물기가 배어나오는 특징이 있었다. 이상의 느타리버섯 이병자실체에서 분리한 세균의 세균학적 성질과 병원성검정에 관한 실험으로 세균성 갈반병은 기존의 보고(Suyama 와 Fuji 1993, 김 등 1994)에서와 같이 *P. tolaasii*에 의해 발생하는 병임을 확인하였으며 그외에 white line을 유도하는 *P. reactans* 균주중에서 병원성이 있는 균주들도 발병에 관여하고 있음을 알 수 있었다.

제 4절 적 요

대전, 충남북 지역에서 많이 재배되고 있는 느타리버섯에 세균성 갈반병이 발생하여 큰 피해를 주고 있으며, 이들 피해포장의 이병자실체와 균상으로부터 분리한 세균 35개 균주의 세균학적 성질과 병원성을 조사하여, 동정한 결과는 다음과 같다.

1. 공시 세균중 P-1, P-4, P-105를 비롯한 24개 균주는 *P. reactans*(WLRO) 균주와 대치배양할 때 균주사이에 white line을 형성하였으며 그들의 세균학적 특성을 조사한 결과 *Pseudomonas tolaasii* Paine로 동정되었다. *P. tolaasii*는 느타리버섯외에 양송이, 팽이버섯에도 강한 병원성을 나타내었다.
2. 공시 세균중 P-2, P-3, P-184를 비롯한 6개 균주는 *P. tolaasii*와 대치

배양할 때 white line을 유도하는 *P. reactans*균으로 분류되었으며, 이중 P-2를 비롯한 3균주는 느타리버섯 조직에 갈변을 일으키는 약한 병원성을 나타내었다. 한편 P-3, P-184는 병원성이 없는 부생성균 이었다.



Fig. 2. Pathogenicity test of *Pseudomonas tolaasii* (P-1 isolate) and *P. reactans* (P-2 isolate) on sporocarps of *Pleurotus ostreatus* (48h after inoculation)

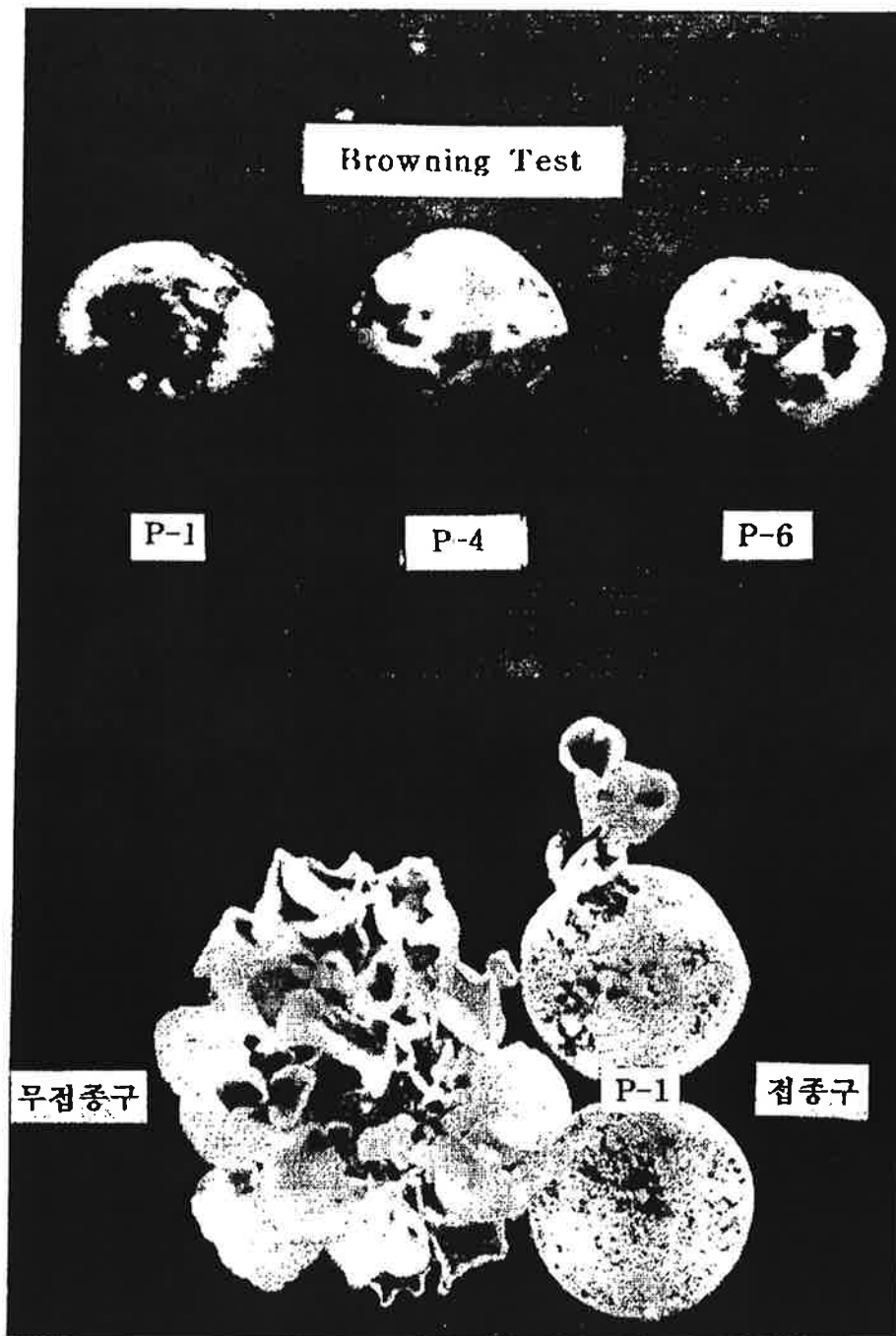


Fig. 3. Pathogenicity of *P. tolaasii* on the surface of common mushroom sporocarps(upper) and spawn bottles of oyster mushroom(lower).

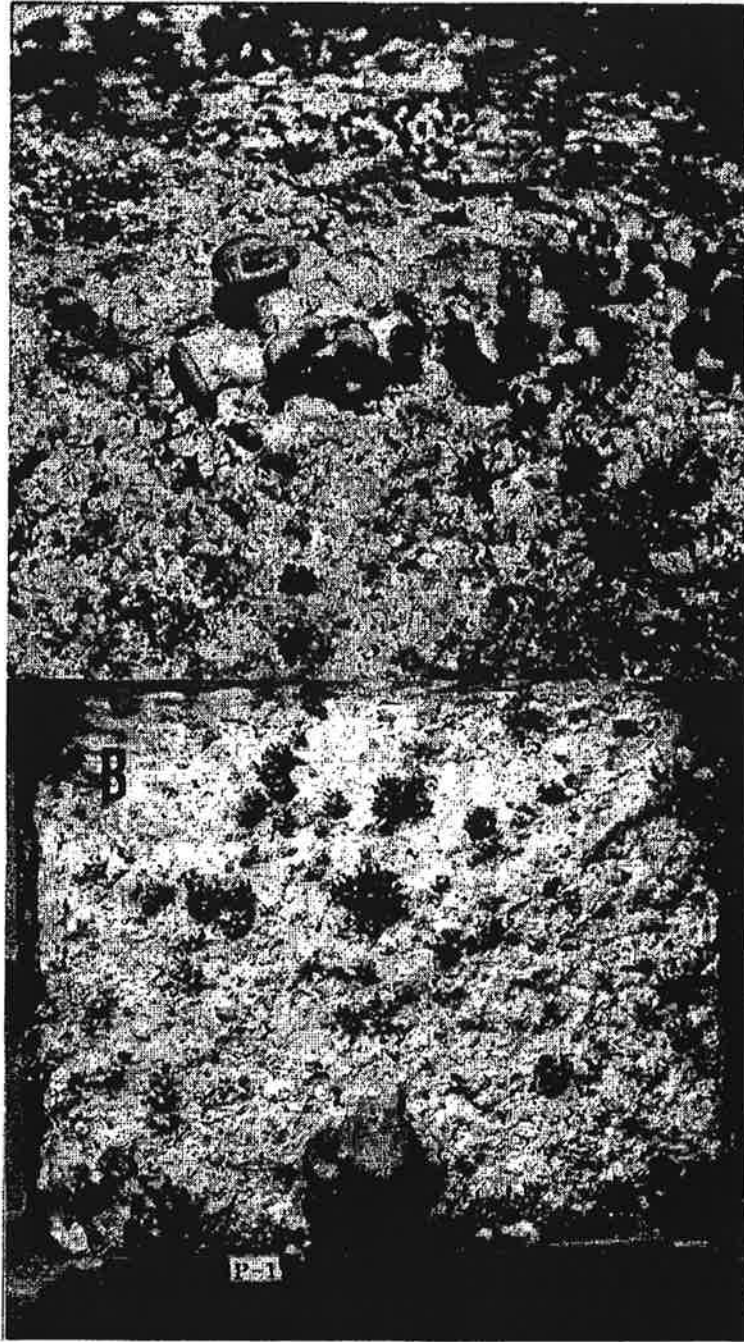


Fig. 4. Symptoms of bacterial brown blotch of oyster mushroom
A: Natural symptoms in a commercial farm, B: Symptoms by artificial
inoculation of *Pseudomonas tolaasii*

제 3장 느타리버섯 세균성갈반병균 *Pseudomonas tolaasii*의 신속한 검출과 동정을 위한 효소면역 측정법(ELISA)의 개발

제 1절 서 언

느타리버섯의 세균성 갈반병(bacterial brown blotch)은 형광 *Pseudomonas*의 일종인 *Pseudomonas tolaasii* Paine에 의해 주로 발생하는 것으로 알려져 있다. 이 병원균은 1915년 Tolaas에 의해 처음 양송이에서 보고되었고 1919년 Paine에 의해 정식으로 명명되었다(Paine 1919, Tolaas 1915). *P. tolaasii* (PT)는 양송이 뿐아니라 느타리버섯, 팽이버섯에도 발생하여 피해를 주며 생육중인 버섯뿐 아니라 저장중인 버섯에도 썩음병을 일으켜 큰 피해를 준다(김 등 1994, 김 등 1995, Wells 등 1996). 국내에서는 특히 느타리버섯에서 피해가 크며 이 균에 의한 세균성 갈반병의 병징은 건조에 의한 갈변, 관수과다에 의한 갈변 및 부패증상과 유사한 경우가 많아 세심한 관찰을 하지 않으면 잘못 진단할 수가 있다. *P. tolaasii*는 *Pseudomonas*속 세균중에서 WLRO(white line reacting organism)균주와 한천 배지상에 대치배양할 경우 그 중앙부위에 백색 침강선(precipitate of white line)을 형성하는 특징이 있는데(Wong 과 Preece 1979), 이 침강반응은 특이성이 높아 rapid pitting test(Wong 과 Preece 1979)와 함께 *P. tolaasii*의 동정이나 검출에 자주 이용되어 왔다. 그러나 이 방법도 때로는 특이성에서 문제가 제기되고 있어 병원세균의 정확한 동정을 위하여는 균의 세균학적 성질 및 병원성 조사와 같은 많은 노력과 시간이 소요되는 작업이 요구된다. 따라서 병원세균을 신속하고 정확하게 동정할 수 있는 간편한 진단법이 개발된다면 이 병의 예방 및 방제에 효과적으로 활용될 수 있을 것

이다. 식물병원균의 검출 및 동정을 위한 방법중에서 면역화학적 방법의 이용은 지금까지 몇몇 세균에 한정되어 이루어져 왔으나(Alvarez와 Lou 1982, Comstock와 Irey 1992, Domen과 Alvarez 1978, Deveiller와 Bragard 1992, Norman과 Alvarez 1994) 점차 다양한 미생물들의 동정을 위한 신속하고 간편한 assay방법으로서 주목받고 있다(Alvarez등 1985, De Boer 1987, Dewey 1988, Kitagawa등 1989, Lyons와 Taylor 1990, Van Vurdee 1987). 본 연구는 *P. tolaasii*의 신속하고 정확한 동정을 위하여 항 PT 항혈청을 이용한 효소면역측정법(ELISA)을 개발하고자 실시하였다. 이를 위하여 *P. tolaasii* 특이항체의 생산, 다른세균과의 교차반응시험 및 효소면역측정법의 조건확립, 그리고 표준 PT의 완충용액 및 추출물상의 표준곡선을 통한 실제 오염 시료의 정량분석등에 관한 실험을 실시하였다.

제 2절 재료 및 방법

1. 재료

본 연구에 사용한 Bovine serum albumin(BSA), goat anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase conjugate, Freund's complete adjuvant(FCA) 와 Freund's incomplete adjuvant (FIA), 5'-tetramethyl benzidine dihydrochloride(TMB), tris (hydroxymethyl) amino methane(TRIZMA, BASE), phosphate-buffered saline(PBS), sodium azide(NaN_3), Tween 20은 Sigma사의 제품을 사용하였다. 면역용 실험동물은 체중 2.5 Kg가량의 웅성 New Zealand white rabbit를 한국실험동물연구소(경기도 수원)에서 구입하였다. 흡광도 측정을 위한 Spectrophotometer는 Colorimeter(Jenway, PC02)이었으며, microtiter plate는 Nunc사의 MaxiSorp™(#446612)를,

microplate reader는 Molecular Devices사의 THERMOmax™를 사용하였다.

2. 항혈청의 생산

*P. tolaasii*에 대한 특이항체 생산을 위한 면역원은 nutrient액체배지에서 24시간 배양한 *P. tolaasii* 배양액을 원심분리한 후 10^8 cfu/ml의 농도로 조정하여 동결건조시킨 것을 냉동보관하면서 사용하였다. 즉, 균체를 phosphate buffered saline(PBS: 1.9mM Na₂HPO₄, 154 mM NaCl, pH 7.4) 1ml에 용해시켜 Freund's complete adjuvant와 함께 동량비(1:1, v/v)로 유탁액을 만들어 토끼 뒷발바닥에 피하주사(S.C)로 1차 면역하였고 2차 면역부터는 등뒤에 피하주사하였다. 그후 2주일 간격으로 Freund's incomplete adjuvant와 함께 피하주사로 4회 추가 면역하였고 각각의 면역 1주일 후에 귀의 정맥으로부터 채혈하였다. 채혈후 3시간 가량 실온에 방치하여 혈액이 응고된 다음 원심분리(3,000rpm, 10분)하여 항혈청을 분리하고 0.02% NaN₃를 첨가하여 실험전까지 냉동보관하면서 일부를 실험에 사용하였다.

3. 특이항체의 항체역가 검정

ELISA를 행하기 위한 기본조건을 검토하기 위하여 microplate에 coating시키는 항원농도 및 항 PT항체와 2차항체-효소접합체의 반응시 역가가 높은 희석배율을 비경합 간접 ELISA로 조사하여 titration하였다. *P. tolaasii*의 적정농도를 10^7 cfu/ml($A_{600nm}=0.1$)되게 조정하여 well에 coating한후 1시간 방치하고 washing buffer(PBS buffer+0.05% Tween 20)로 세척하였다. 다음 4차면역에서 얻은 항 PT 항혈청을 희석하여(1/2,000, 1/4,000, 1/8,000, 1/10,000, 1/20,000, 1/30,000, 1/40,000) coating하였고 위와 같은 방법으로 반응·세척한후, 2차항체-효소접합체를 같은 농도로 처리하여 발색시킨 다음 항 PT 항체와 2차항체-효소접합체의 반응에서 흡광도의 변화율이 높은

(항체역가가 안정한) 희석배율을 구하였다.

4. 비경합 간접 ELISA (noncompetitive indirect ELISA)

항체역가의 측정 및 항 PT항혈청의 ELISA조건을 확립하기 위하여 다음과 같이 비경합 간접 ELISA를 실시하였다. 즉 항원인 *P. tolaasii*균을 약 10^7 cfu/ml농도가 되도록 coating buffer(0.02M Tris, 0.15M NaCl, pH 9.0)에 용해시켜 well당 100 μ l씩 coating한 후 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 방치하고 washing buffer(0.02M Tris, 0.15M NaCl, 0.05 % Tween20, pH 7.4) 150 μ l로 3회 세척한 후 항 PT항혈청 (α -PT)을 1/1,000-1/100,000배 희석하여 100 μ l 넣고 상온에서 항원·항체반응시켰다. 그후 다시 washing buffer로 3회 세척하고 항 PT 특이항체에 결합하는 2차 항체인 anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase conjugate를 washing buffer로 희석하여 1/1,000-1/200,000까지 희석한후 well당 100 μ l 넣고 상온에 한시간 방치한 다음 washing buffer로 3회 세척하였다. 다음 기질용액(0.01% TMB, 0.05% phosphate citrate buffer, pH 5.0, 사용전 H₂O₂를 최종농도 0.02%가 되도록 첨가)을 well당 100 μ l를 넣고 30분간 방치하여 발색시킨다음 반응정지액(2M H₂SO₄) 50 μ l를 첨가하고 microplate reader로 파장 450nm에서 각 well의 흡광도를 측정하였다. 이로부터 1차 항체 및 2차 항체의 적정 농도를 정해 다음 실험에 적용하였다. 이 비경합 간접 ELISA는 검정하고자 하는 세균균주 및 세균성 갈반병에 오염된 버섯시료추출물을 plate에 coating한 다음 위와 동일한 방법으로 assay하여 *P. tolaasii*의 동정 및 진단에 사용하였다.

5. 경합 간접 ELISA (competitive indirect ELISA)

경합 간접 ELISA법은 비경합 ELISA법과 유사하지만, 항원(*P. tolaasii*)을 coating한후 항혈청과 시료의 혼합액을 각 well에 처리하여 항원-항체반

응시 항체가 well표면에 coating된 항원과 시료용액중의 항원간에 경합한다는 점이 다르다. 즉, 항혈청과 시료용액의 1:1 혼합액을 well에 100 μ l씩 넣고 상온에서 한시간 처리한후 2차 항체등을 위와 같은 방법으로 처리하였다.

6. PT정량을 위한 항 PT항체의 표준곡선

항체역가가 높은 4차 항혈청의 항 PT IgG항체의 표준곡선상에서의 검출 감도를 비경합과 경합 간접 ELISA법으로 조사하였다. 먼저, buffer상태에서 표준 PT항원의 농도를 10⁷cfu/ml에서 출발하여 1/10, 1/100, 1/1,000, 1/10,000, 1/100,000까지 희석하여 coating한후 항 PT항체 및 2차항체-효소 접합체를 반응시켜 비경합 간접ELISA법으로 표준곡선을 구하였다. 경합 간접ELISA는 buffer상태에서 PT를 적정농도(10⁷cfu/ml)로 희석하여 coating한 후 washing buffer를 이용하여 위와 같이 단계별로 희석된 표준PT와 항 PT항체를 1:1(v/v)혼합하여 경합시키는 방법과 buffer대신에 버섯시료에서의 정량분석을 위하여 버섯추출물(mushroom surface washing extract)로 PT의 농도를 위와 같이하여 경합시키는 방법을 사용하여 추출물에서의 표준곡선을 구하였다.

7. 항 PT항혈청의 교차반응

*Pseudomonas*속 균과 다른 종의 균에 대한 항 PT 항혈청의 교차반응 (cross reactivity)을 경합 간접 ELISA 및 비경합 간접 ELISA로 조사하였다. 공시균으로 *P. tolaasii*균을 비롯하여 *P. agarici*, *P. reactans*, *P. solanacearum* 그리고 비병원성인 형광 *Pseudomonas*속균, *Erwinia chrysanthemi*, *Streptococcus mutans*, *Xanthomonas citri*등을 사용하였다. 비경합 간접 ELISA는 공시균을 적정농도(10⁷cfu/ml)로 희석하여 plate에

coating한 후 항 PT항체를 처리하였고, 경합 간접 ELISA는 *P. tolaasii*를 10^7 cfu/ml으로 조정하여 coating한 후 다른 종의 공시세균을 washing buffer에 희석하여(10^7 cfu/ml) 항 PT항체(1/10,000)와 1:1(v/v)혼합하여 경합시켰다. 또한 항 PT항체의 특이성 조사를 위하여 *P. tolaasii*와 다른 종의 세균을 혼합하여 coating하거나 다른 종의 세균만을 coating한후 ELISA를 실시하였다.

8. ELISA에 의한 *P. tolaasii*의 검출 및 회수율 분석

버섯조직으로부터 *P. tolaasii*(PT)를 검출할 때 분석의 신뢰성을 검증하기 위하여 60℃에서 30분간 열처리된 PT를 다섯단계의 농도(10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2)로 조정하여 NaOCl로 표면소독한 버섯조직에 인위적으로 오염시킨후 다시 coating 및 washing buffer로 PT를 회수하였으며 경합 및 비경합 간접 ELISA에 의한 표준곡선에 대조하여 회수율을 구하였다.

제 3절 결과 및 고찰

1. 특이항체의 항체역가

PT를 4차례 면역하고 각 1주일 후에 얻은 항혈청으로 비경합 간접 ELISA를 실시한 결과 2마리 토끼에서 PT에 대해 특이적으로 결합하는 항 PT IgG 항체가 생성되었으며 대체로 4차 면역 후 가장높은 항체역가를 나타냈다 (Fig. 5). 또한 항 PT 항체는 1/10,000배액, 2차항체-효소접합체는 1/15,000희석구에서 흡광도의 변화율이 높은 안정적인 반응을 나타내었다.

2. 항 PT항체의 표준곡선상에서의 검출감도

항체역가가 높은 항 PT IgG의 항혈청을 사용하여 PT의 정량을 위한 비

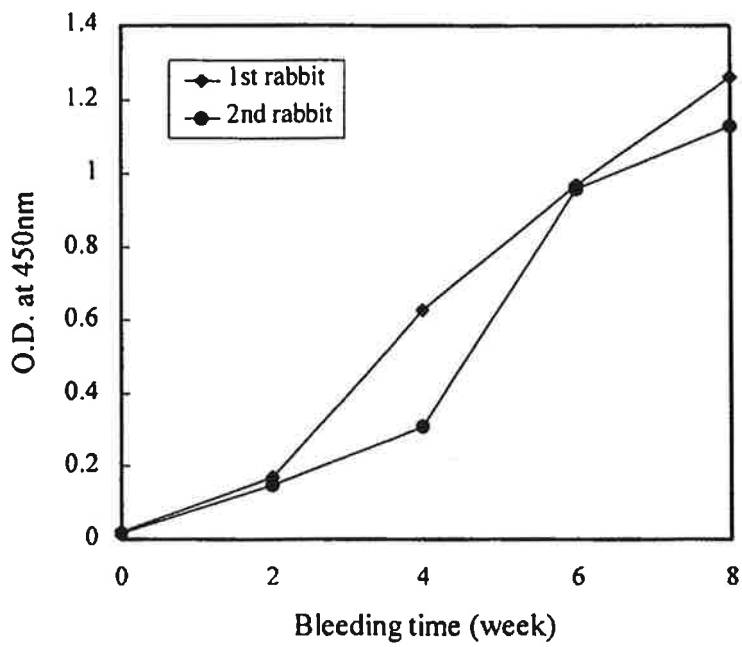


Fig. 5. Production of anti *P. tolaasii*(PT) antiserum by two rabbits which were immunized with PT and Freund's adjuvant on weeks 0, 3, 5, and 7. Rabbits were bled 1 week after each immunization.

경합 및 경합 간접 ELISA를 실시한 결과 안정된 표준곡선을 나타냈다(Fig. 6). 먼저 비경합 간접 ELISA의 경우 *P. tolaasii*를 농도별로 coating시킨후 buffer상태에서 ELISA를 실시하였으며 이로부터 구한 *P. tolaasii*의 검출한계는 약 10^2 cfu/ml였다. 경합 간접 ELISA에서 PT의 농도가 높을수록 항 PT 항체는 coating된 PT항원과 결합하는 기회를 잃게 됨으로써 기질반응시 낮은 발색치를 나타내게 된다. 다음으로 표준 *P. tolaasii*를 적정농도 (10^7 cfu/ml)로 coating한 후 살균수 및 buffer로 추출한 버섯 추출물 (mushroom surface washing)에 표준 *P. tolaasii*를 여러 농도로 희석하여 항 PT항체와 경합시키는 경합 간접 ELISA를 실시하였던 바 검출한계는 약간 떨어져 약 10^3 cfu/ml로 나타났다(Fig. 7). 버섯 추출물을 사용하는 경우 전체적으로 O.D값이 떨어지는 경향을 보였는데 이는 coating 또는 경합시 추출물에 의한 간섭 때문인 것으로 생각되었다.

3. 항PT항체와의 교차반응

항PT항체의 특이성을 조사하기 위하여 *P. tolaasii*를 비롯하여 다른 종의 세균에 대한 교차반응을 비경합 간접 ELISA로 알아본 결과 Fig. 8에 나타난 바와 같이 항 PT항체는 *P. tolaasii*와만 특이적으로 잘 결합하였으나 그 이외의 균에 대하여는 거의 교차반응을 나타내지 않았다. 한편 *P. tolaasii*와 다른세균을 혼합하거나 다른세균만을 coating buffer로 coating하고 ELISA를 실시한 경우 *P. tolaasii*가 혼합된 구에서만 양성반응을 나타내었다. 특히, 세균을 직접 coating하는 비경합 간접 ELISA에서 *Pseudomonas reactans*는 약간의 교차반응을 나타냈으나 *P. tolaasii*를 직접 coating하고 항체와 경합시키는 경합 간접 ELISA에서는 거의 교차반응을 나타내지 않았다. 또한 병원성을 잃은 *P. tolaasii* 변이균주의 경우 비경합 간접 ELISA에서 PT항체와 약한 binding을 보였으나 경합 반응에서는 표준 *P.*

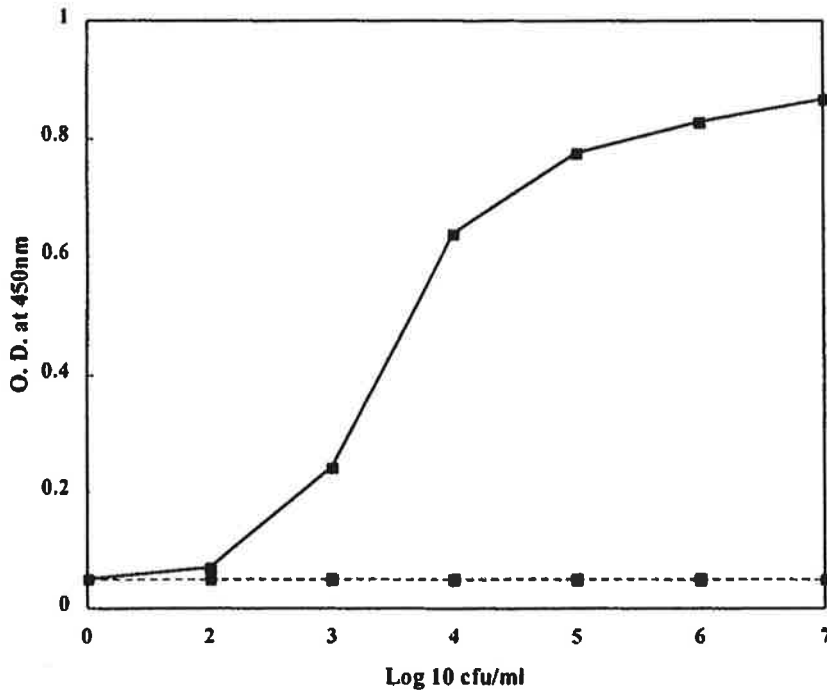


Fig. 6. Standard curve by noncompetitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay for *P. tolaasii* in buffer solution. Dashed lines indicates negative control (O. D.=0.05).

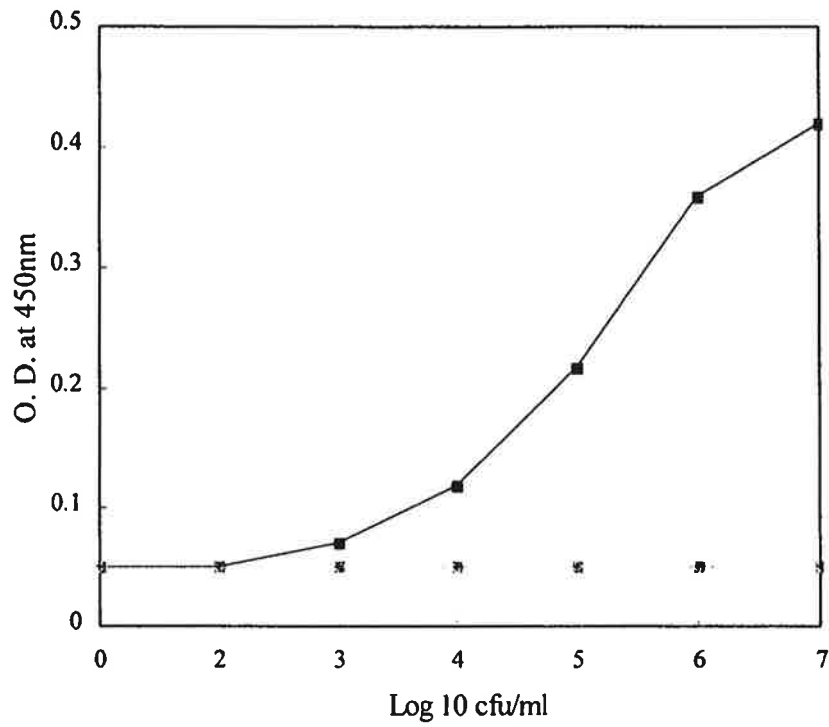


Fig. 7. Standard curve by noncompetitive indirect ELISA for *P. tolaasii* in mushroom extracts. Dashed lines indicates negative control (O. D. = 0.05).

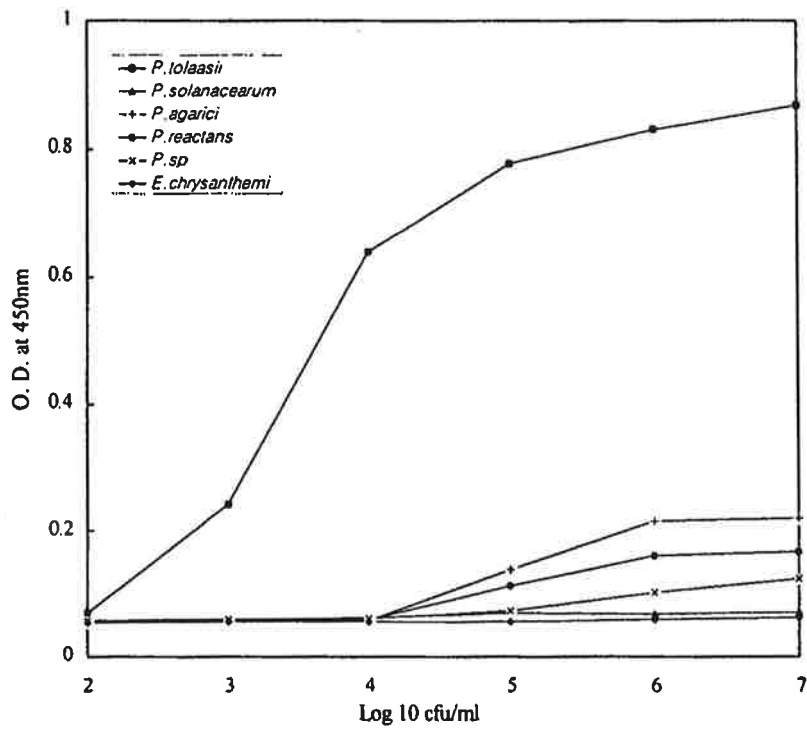


Fig. 8. Effect of different species of *Pseudomonas* and *Erwinia chrysanthemi* on the binding of anti-PT polyclonal antibody as determined by noncompetitive indirect ELISA.

*tolaasii*와 같이 높은 반응성을 보였다(Fig. 9). 이처럼 비경합 ELISA는 감도면에서는 경합 ELISA보다 높지만 특이성은 약간 낮아지는 경향을 보였다. 그러나 많은 시료의 정량분석에는 감도가 뛰어나야 하므로 비경합 ELISA를 적극 활용할 수 있을 것이다. 그러나 실제시료를 coating하는 경우 false positive의 반응이 나올수도 있으므로 이에 대한 주의만 한다면 많은 시료 추출물을 희석하지 않고 assay할 수 있는 잇점이 있다. 따라서 정확한 균의 동정을 위해서는 경합 간접 ELISA로 확인하는 것이 바람직할 것으로 생각되었다.

4. PT동정 및 오염도 조사

본 연구에서 개발한 ELISA법을 사용하여 느타리버섯 시료의 *P. tolaasii* 감염여부를 조사하였다(Table 3). 세균성 갈반병을 나타내는 병든버섯 30개와 건전한 버섯 10개를 공시하여 조사하였던 바 병든버섯은 29개에서 양성 반응을 나타내었고 병든버섯 1개와 건전버섯 10개에서 음성반응을 나타내었다. 공시한 버섯시료에서 세균을 분리하여 세균학적 성질 및 병원성을 조사하였던 바 ELISA양성반응을 나타낸 29개 버섯에서 분리한 세균균주들은 *P. tolaasii*로 동정되었고 기타 버섯에서는 *P. tolaasii*가 검출되지 않았다.

한편, 건전 느타리버섯 조직에 PT를 인공처리한 후 표면세척한 것을 ELISA를 통해 회수율을 구한 결과는 Table 1과 같다. 즉, 처리농도가 높은 10^5 cfu/ml이상의 처리구에서는 대체로 80%이상의 높은 회수율을 나타냈으나 처리농도가 10^4 cfu/ml이하의 경우에는 회수율이 불안정한 경향을 보였다. 한편 버섯유래 방해물질의 간섭을 배제시키기 위해 washing buffer에 표준PT를 첨가하여 작성한 표준곡선을 기준으로 회수율을 구한 결과 회수율은 처리구의 균농도가 낮아질수록 낮아지는 경향을 보였다. 따라서 본 ELISA법을 이용하여 *P. tolaasii*를 비롯한 유사균 및 기타세균에 동시 감염

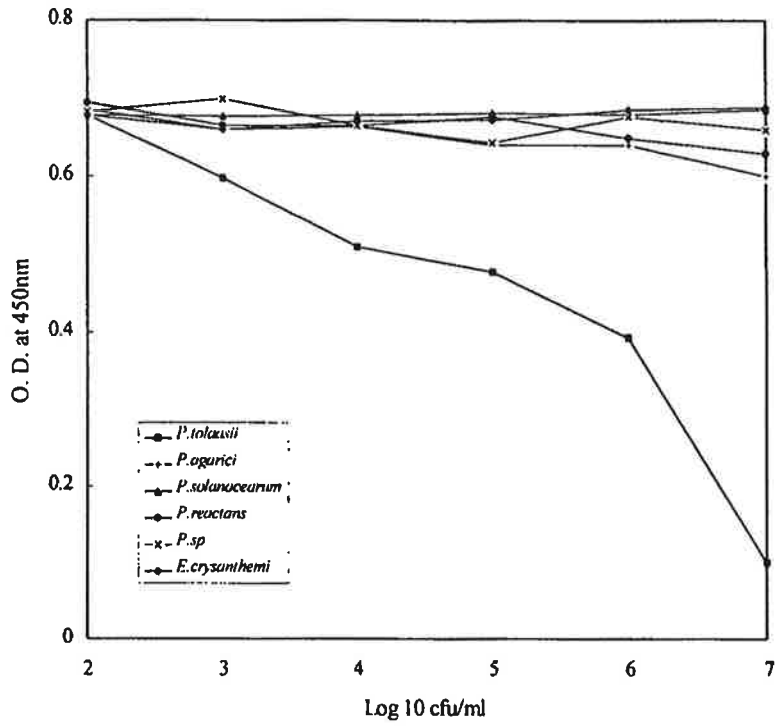


Fig. 9. Effect of different species of *Pseudomonas* and *Erwinia chrysanthemi* on the binding of anti-PT polyclonal antibody as determined by competitive indirect ELISA. Microtiter plate wells were coated with standard PT as a solid antigen.

Table 3. Pathogenicity, white line and ELISA tests of different species of *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Streptococcus* and *Erwinia*.

Isolate	Source	Pathogenicity test	White line test	ELISA test
<i>P. tolaasii</i>				
P-1	<i>Pleurotus ostreatus</i>	+ ^a	+	+
P-4	"	+	+	+
P-6	<i>Flammulina velutipes</i>	+	+	+
P-105	<i>P. ostreatus</i>	+	+	+
P-170	"	+	+	+
P-205	"	+	+	+
P-218	"	+	+	+
P-237	"	+	+	+
A-54	"	+	+	+
P-252	<i>F. velutipes</i>	+	+	+
P-221	<i>Agaricus bisporus</i>	+	+	+
Nonpathogenic <i>Pseudomonas</i>				
P-2	<i>P. ostreatus</i>	±	-	-
P-27	"	-	-	-
P-41	"	-	-	-
P-47	"	-	-	-
P-50	"	-	-	-
P-155	"	-	-	-
P-227	<i>A. bisporus</i>	-	-	-
<i>P. agarici</i>	ATCC ^b	+	-	-
<i>P. solanacearum</i>	KCTC ^c	-	-	-
<i>X. citri</i>	"	-	-	-
<i>S. mutans</i>	"	-	-	-
<i>E. chrysanthemi</i>	"	-	-	-

^a+ : Positive - : Negative ± : Weak, ^bATCC : American Type Culture Collections,

^cKCTC : Korean Collection for Type Cultures.

되었을 경우도 병원균 PT만을 특이적으로 검출해냄으로써 버섯 세균성 갈반병의 효과적인 진단에 적극적으로 활용할 수 있을 것으로 생각된다. 이상의 결과를 볼 때 비경합간접 ELISA로 버섯에 오염된 PT의 오염도를 측정할 경우 10^2 cfu/ml 이상의 PT에 오염된 다양한 버섯시료의 정량분석에 이용될 수 있을 것이다.

제 4절 요약

P. tolaasii(PT)의 신속한 검출 및 정확한 동정을 위하여 효소면역측정법(ELISA)을 개발하였다. 이를 위하여 PT를 면역원으로 하여 Freund's adjuvant 유탁액(1:1, v/v)을 조제하여 New Zealand White 토끼에 10^8 cfu/ml의 농도로 면역하였고 PT에 특이적인 항 PT IgG 항혈청을 생산하였다. 항 PT항혈청을 비경합 간접 ELISA로 분석한 결과 4차면역에서 높은 항체역가를 나타냈으며 이 항체를 이용하여 비경합 간접 ELISA 및 경합 간접 ELISA법을 각각 확립하였다. *P. agarici*, *P. reactans*, *P. solanacearum*, 다른 *Pseudomonas*속균, *Erwinia chrysanthemi*, *Streptococcus mutans* 및 *Xanthomonas citri* 등 다른 세균과의 교차반응을 비경합 간접 ELISA 및 경합 간접 ELISA로 조사하였을 때, 항 PT 항체는 다른세균들에 대해서 거의 교차반응을 나타내지 않아 매우 특이성이 높은 항 PT항혈청으로 생각되었다. 또한 항 PT항혈청을 이용하여 *P. tolaasii*와 다른세균을 혼합하거나 다른세균들만을 coating한후 ELISA를 실시한 경우 *P. tolaasii*가 포함된 처리구에서만 강한 양성반응을 나타내었다. 완충액조건에서 구한 표준곡선에서 PT의 검출한계는 10^2 cfu/ml이었으나 버섯추출물로 경합 간접 ELISA를 실시하여 얻은 표준곡선의 경우 대략 10^3 cfu/ml를 나타냈다. 실제 버섯시료의

분석에 ELISA 활용가능성을 조사하기 위하여 인위적으로 PT를 오염시킨 버섯시료로부터 다시 PT를 추출하여 assay한 결과 PT처리 농도가 10^4 cfu/ml이하의 처리구에서는 그 회수율이 불안정하였으나 그보다 높은 10^5 cfu/ml이상의 농도에서는 그 회수율이 80-105%로 매우 안정된 값을 나타내었다. 이상의 결과, 본 ELISA법을 이용할 경우 많은 버섯시료 및 균상배지등으로부터 *P. tolaasii*의 오염 및 감염여부를 신속하게 진단하므로서 세균성갈반병의 예방 및 방제에 효과적으로 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

제 4장 느타리버섯 세균성 갈반병균의 전염원 및 전염경로 구명

제 1절 서 언

느타리버섯에 발생하는 세균병의 병원세균으로는 *Pseudomonas tolaasii* 와 *P. agarici*가 보고되어 있는데 그 중에서 세균성갈반병균인 *P. tolaasii* 의 피해가 특히 심하다. 이 균은 느타리버섯뿐 아니라 양송이, 표고버섯, 팽이버섯에도 세균성 갈반병을 일으키는 중요 병으로 알려져 있다.

이 병은 다습한 재배사에서 발생이 심하며 특히 버섯 자실체 표면에 수분이 존재할 경우 발생이 많다. 이 병은 시설이 낙후되어 보온력이 없는 재배사에서 많이 발생하며, 특히 재배사내의 온도가 내려가는 저녁에 벽면, 균상, 버섯 등에 결로현상이 생기면 많이 발생한다. 느타리버섯은 수분의 과부족으로 인한 피해증상이 세균성 갈반병의 병징과 유사한 경우가 있어 (차 등 1997) 잘못 진단되는 경우가 있으며 아직 전염원의 소재나 전염경로가 확실히 밝혀져 있지 않아 방제에 어려움이 많다.

본 연구는 느타리버섯 세균성 갈반병의 전염원 소재 및 전염경로를 구명하기 위하여 종균배양소에서 수집한 느타리버섯 종균, 농가재배사의 균상배지(벗짚 및 폐솥), 관수용 물 및 재배사내의 버섯파리를 채집하여 병원세균의 검출여부를 조사하였다.

제2절 재료 및 방법

1. 시료수집 및 세균분리

가. 종균. 전국의 버섯 종균배양소 8개소에서 구입한 종균 160병(각 배양소에서 20병씩)을 공시하였다. 종균병에서 종균을 무균적으로 꺼내어 20g씩 정량 하여 삼각 후라스크에 넣고 살균수 100cc를 부어 잘 교반한 후 상등액을 NB 및 King's B배지에서 평판 배양하여 형광성 *Pseudomonas*의 colony를 모두 분리하였다.

나. 균상배지. 충남 및 대전지역의 10개 느타리재배사에서 균상배지(벗짚배지 4개소, 폐송배지 6개소)시료를 채취하였다. 배지시료는 각 재배사에서 균상의 위치를 달리하여 5곳에서 채취 하였다. 이 배지시료를 20g씩 삼각후라스크에 넣고 살균수 100cc를 부어 잘 교반한 후 상등액을 NB 및 King'B배지에 평판배양하여 형광성 *Pseudomonas* colony를 분리 하였다.

다. 관수용 물. 충남 및 대전지역 10개 느타리재배사에서 관수용으로 사용하는 지하수와 저장 수조의 물을 살균한 시료병에 200cc씩 채취하였다. 채취한 관수용 물을 NB 및 King's B 배지에서 평판 배양하여 형광성 *Pseudomonas*를 분리하였다.

라. 버섯파리. 느타리재배사 9곳에서 각각 10마리씩의 버섯파리를 채집하였다. 채집한 버섯파리를 10cc의 살균수를 넣고 잘 교반한 후 상등액을 NB 및 King's B 배지에서 평판 배양하여 형광성 *Pseudomonas*를 분리하였다.

2. 세균동정

분리한 세균 균주를 white line 검정법(2장 참조)과 ELISA법(3장 참조)으로 *Pseudomonas tolaasii*를 동정하였다.

제 3절 결과 및 고찰

1. 종균검정

버섯 종균회사에서 구입한 느타리버섯 종균 160병을 공시하여 종균내의 병원세균(*P. tolaasii*) 검출유무를 조사한 결과는 Table 4에서 보는바와 같이 공시한 8개 종균회사의 종균병에서는 병원세균이 검출되지 않았다.

Table 4. Detection of *Pseudomonas tolaasii* from commercial spawns of oyster mushroom by white line test and ELISA

Spawn production company	No of spawn bottles tested	Detection of <i>P. tolaasii</i> by	
		White line test	ELISA
A	20	- ^a	-
B	20	-	-
C	20	-	-
D	20	-	-
E	20	-	-
F	20	-	-
G	20	-	-
H	20	-	-

^a- : not detected, + : detected.

2. 균상배지 검정

느타리버섯 재배사 10개소에서 균상배지를 채취하여 병원세균의 검출유무를 조사한 결과는 Table 5와 같다. 재배사의 균상배지의 종류는 4곳이 벚짚 배지였고 6곳이 폐솜배지였는데 그 중에서 벚짚재배사 2곳과 폐솜재배사 4곳에서 병원세균이 검출되었다. 특히 2곳의 재배사(재배사 5번, 6번)는 종균 접종 직전의 발효가 끝난 배지를 채취하여 검사하였는데 여기에서도 병원세균(*P. tolaasii*)이 검출되었다(Fig. 10A). *P. tolaasii*는 퇴비와 같은 각종 유기부산물에 존재하고 있음이 알려져 있으며(Wong 과 Preece 1980) 본 연구의 결과도 벚짚이나 폐솜과 같은 균상배지가 전염원의 소재가 되고 있음을 나타내었고, 또한 통상적인 배지의 발효를 통하여도 병원세균이 생존할 수 있음을 알 수 있다.

Table 5. Detection of *Pseudomonas tolaasii* from substrates(culture media) of oyster mushroom by white line test and ELISA

Oyster mushroom farms	Kinds of culture medium	Detection of <i>P. tolaasii</i> by	
		White line test	ELISA
1	Rice straw	-	-
2	Rice straw	+	+
3	Waste Cotton	-	-
4	Waste Cotton	-	-
5	Waste Cotton	+	+
6	Waste Cotton	+	+
7	Rice straw	-	-
8	Rice straw	+	+
9	Waste Cotton	+	+
10	Waste Cotton	+	+

^a-: not detected, +: detected.

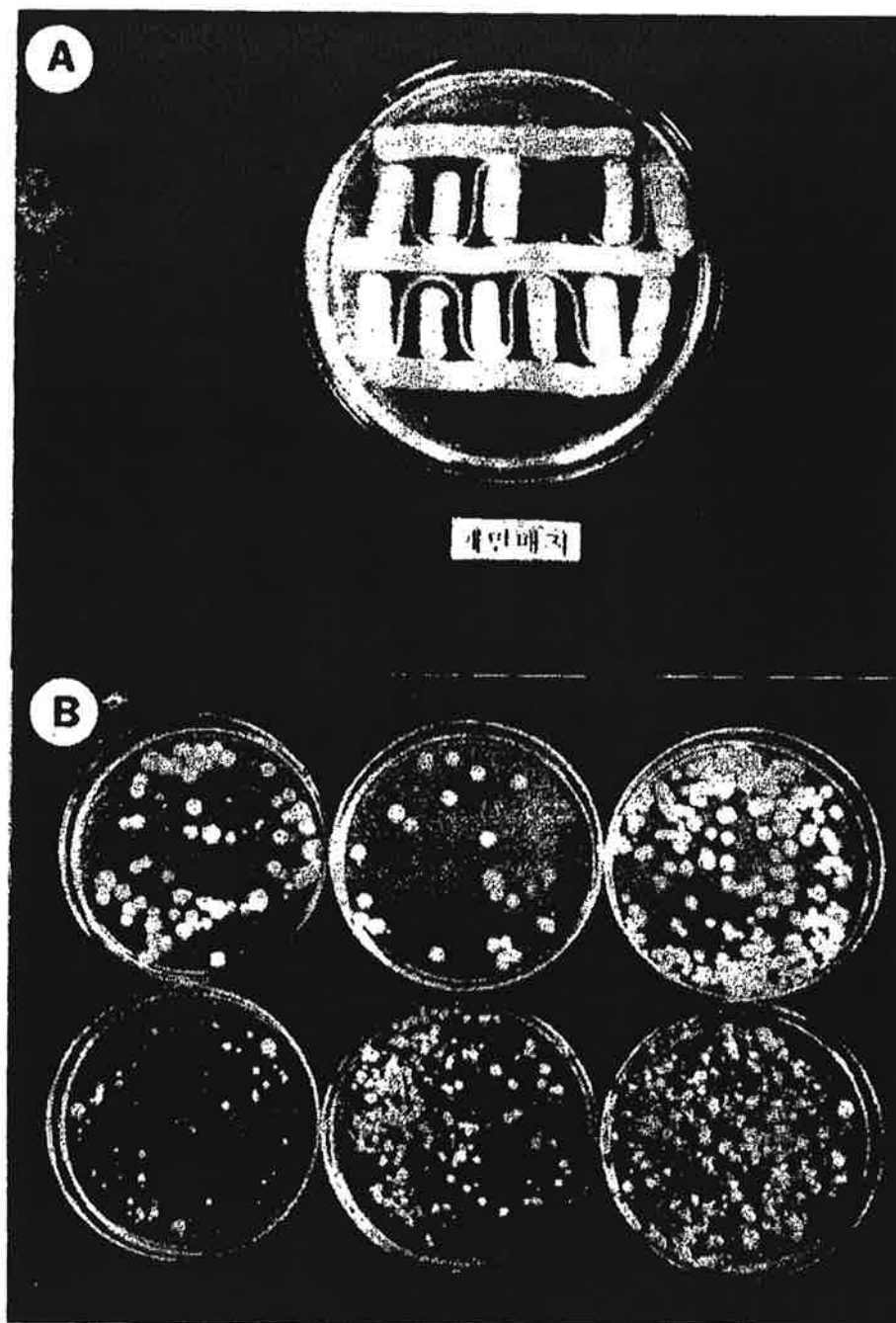


Fig. 10. (A) 폐습배지에서 분리된 *P. tolaasii*와 *P. reactans*의 white line 반응
 (B) 저장수조의 물에서 분리된 다양한 세균의 colony

3. 관수용 물의 검정

충남 및 대전의 10개 느타리버섯 재배사에서 관수용물로 사용하는 지하수와 저장수조의 물을 채취하여 병원세균의 검출여부를 조사한 결과는 Table 6과 같다. 공시한 10곳의 관수용 물 중에서 8곳의 지하수에서는 병원세균이 검출되지 않았는데 저장수조에 물을 담아 두었다가 사용하는 2곳에서는 병원세균이 검출되었다(Fig. 10B). 이는 저장수조를 이용할 경우 세균의 오염 가능성이 있으며 저장수조의 물을 통하여 병원세균이 전염될 수 있음을 나타내는 것이다.

Table 6. Detection of *Pseudomonas tolaasii* from irrigation water of oyster mushroom farms by white test and ELISA

Oyster mushroom farms	Water source	Detection of <i>P. tolaasii</i> by	
		White line test	ELISA
1	Underground water	- ^a	-
2	Underground water	-	-
3	Underground water	-	-
4	Underground water	-	-
5	Underground water	-	-
6	Underground water	-	-
7	Underground water	-	-
8	Water in tanks	+	+
9	water in tanks	+	+
10	Underground water	-	-

^a-; not detected, +; detected

4. 버섯파리검정

느타리버섯 재배사에서 채집한 버섯파리에서 병원세균이 검출되는지를 조사한 결과는 Fig. 11, Table 7과 같다. 공시한 9개 재배사중에서 5개 재배사에서 채집한 버섯파리에서 병원세균이 검출되었다. 3개 재배사에서는 공시한 10마리에서 모두 검출되었으며 2곳 재배사에서는 각각 7, 9마리에서 병원세균이 검출되었다. 이는 버섯 파리가 병원세균을 전염시키는 중요한 매개자로 작용하고 있음을 나타내는 것이다.

Table 7. Detection of *Pseudomonas tolaasii* from mushroom flies collected from oyster mushroom houses by white line test

Oyster mushroom farms	No. of flies	
	collected	contaminated with <i>P. tolaasii</i>
1	10	0
2	10	10
3	10	0
4	10	0
5	10	7
6	10	9
7	10	0
8	10	10
9	10	10

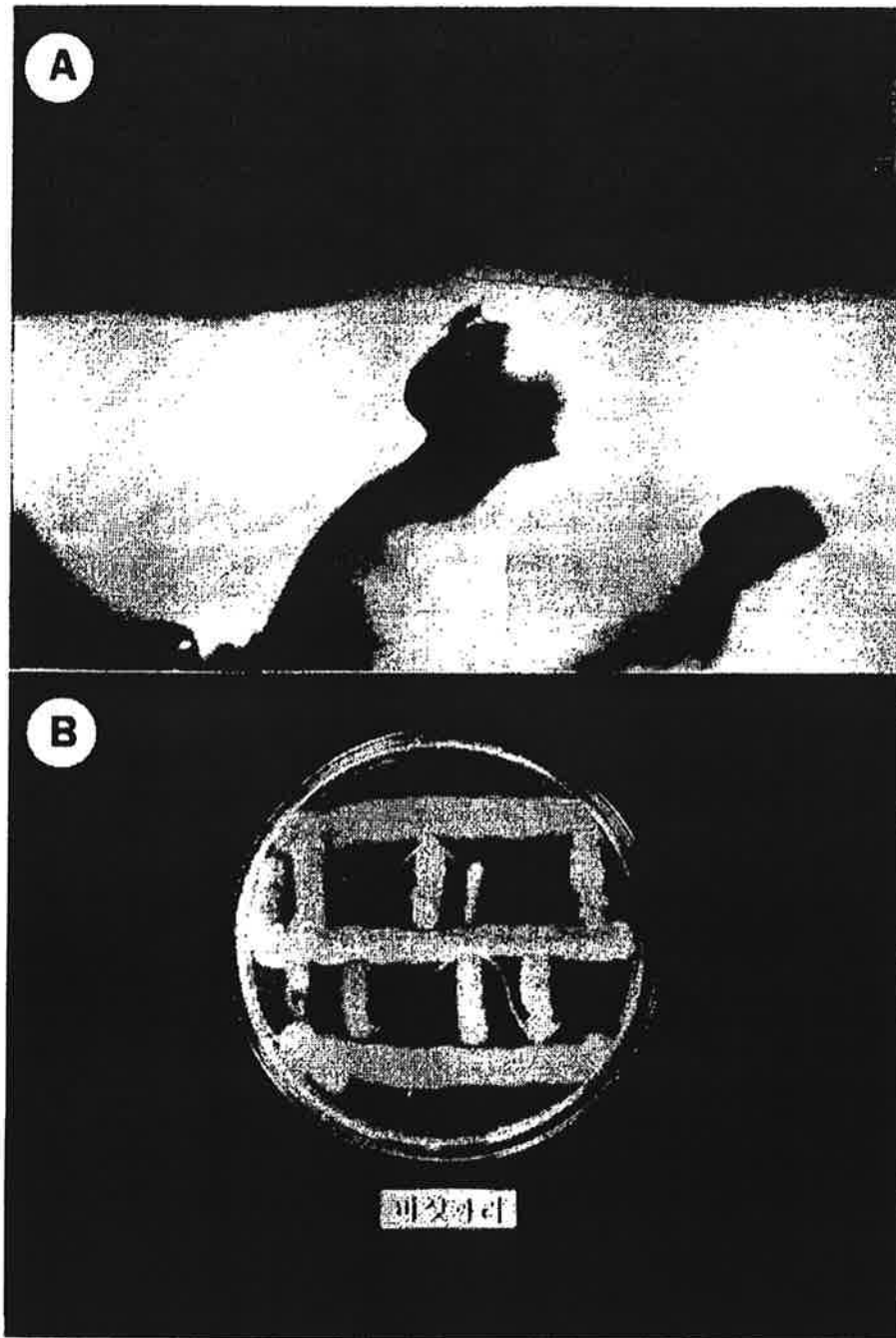


Fig. 11. (A) 느타리버섯 위에 있는 벼섯파리
 (B) 벼섯파리에서 분리된 *P. tolaasii*와 *P. reactans*의
 white line 반응

제 4절 요약

병원세균(*P. tolaasii*)의 전염원 및 전염경로를 구명하기 위하여 시판종균, 재배사의 관수용 물, 균상배지(벼짚, 폐습) 및 버섯파리로부터 병원세균의 검출유무를 white line test 및 ELISA법으로 조사한 결과는 다음과 같다.

1. 전국의 버섯 종균회사 8개소로부터 구입한 느타리버섯 종균 160병을 공시하여 종균내의 병원세균 검출유무를 조사하였던 바 공시한 종균병에서는 병원세균이 검출되지 않았다.
2. 충남 및 대전의 10개 지역 느타리 재배사에서 균상배지(벼짚, 폐습)를 채취하여 병원세균의 검출여부를 조사하였던 바 6개 재배사의 배지(벼짚, 폐습)에서 병원세균이 검출되었다. 특히 2곳의 재배사에서는 종균접종 직전의 발효가 끝난 배지에서 *P. tolaasii*와 *P. reactans*가 검출되었다.
3. 충남 및 대전의 10개 지역 느타리 재배사에서 관수용으로 사용하는 지하수와 저장 수조의 물을 채취하여 병원세균의 검출여부를 조사하였던 바 지하수에서는 병원세균이 검출되지 않았으나 저장 수조를 이용하는 2곳에서 병원세균이 검출되었다.
4. 느타리버섯 재배사 9곳에서 각각 10마리씩의 버섯파리를 채집하여 병원세균의 검출여부를 조사하였던 바 5개 재배사에서 채집한 버섯파리에서 병원세균이 검출되었다.

제 5장 항생제 농약을 이용한 느타리버섯 세균성 갈반병의 방제법 개발

제 1절 서 언

세균성 갈반병은 *Pseudomonas tolaasii*에 의해 발생하며 느타리버섯 뿐아
니라 양송이에서도 중요한 병으로서 피해가 크다. 이 병은 다습한 환경조건
에서 많이 발생하므로 재배사의 환경조절이 병발생과 밀접한 관련이 있다.
느타리버섯 재배사중에서 시설이 낙후된 재배사는 재배사내의 온, 습도 변화
가 외부환경의 영향을 받아, 주야 온도격차가 심할 경우 결로현상이 일어나
기 쉬우며 이때에 이 병의 발생이 많다. 재배사의 환경조절이 병발생을 줄
이는데 효과적이긴 하지만 대부분의 경우 충분치 못하며 별도의 방제방법을
강구하여야 한다. 양송이의 세균성 갈반병 예방과 방제에 관한 많은 연구가
수행되었으며 특히 차아염소산나트륨, chlorine dioxide(ClO_2)와 같은 염소
수를 이용한 방제가 많이 이용되지만(Oliver 등 1978, Basahan과 Okon
1981, Wong과 Preece 1985, Geels 등 1991), 방제효과가 미흡할 때가 많
다. 또한 항세균제 처리(Tu와 Liao, 1981, Geels 1995) 및 길항세균을 이용
한 생물학적 방제(Nair와 Fahy 1972, Oliver 등 1978, Liao등 1980)가 시도
되고 있지만 방제효과가 크지 않다.

양송이 세균성갈반병 방제에 대만에서는 streptomycin과 oxytetracycline
이 사용되고 있으며(Tu와 Liao 1981), 최근에는 kasugamycin의 방제효과가
보고되었으나(Geels 1995) 느타리버섯에서의 방제효과는 보고된 바 없다.
본 연구는 효과적인 항생제를 선발하고 적정 사용농도를 구명하므로서 느타
리버섯 재배 농가에서의 무분별한 항생제 사용을 막고 항생제 사용을 최소
화하면서 방제효과를 얻기 위하여 실시하였다.

제 2절 재료 및 방법

1. 공시균주 및 버섯

느타리버섯 재배포장에서 채집한 이병자실체로부터 분리한 병원세균으로 *P. tolaasii*(P-1)와 white line생성 반응균인 *P. reactans*(P-2)를 공시하였으며, 느타리품종은 원형느타리(*Pleurotus ostreatus*)를 실험에 사용하였다.

2. 공시항생제

본실험에 공시한 항생제는 ampicillin, amikacin, aztreonam, bacitracin, bramycin, carbenicillin, cefamandole, cefazolin, cefoperazone, cefotaxime, cefoxitin, ceftrixone, cephalothin, chloramphenicol, colistin, erythromycin, gentamycin, imipenem, kanamycin, lincomycin, methicillin, maxalactam, nalidixic acid, neomycin, netilmycin, novobiocin, oxacillin, penicillin, piperacillin, tetracycline, vancomycin, streptomycin 및 kasugamycin 등 33종이다.

3. 항균활성검정

공시한 항생제 중에서 세균성 갈반병균에 대한 항균활성이 높은 유용항생제를 1차 선별하기 위하여 공시균주를 NB배지에 접종하고 paper disk법으로 inhibition zone을 조사하였다. 1차 screening을 통하여 선별된 항생제의 항균활성은 다음과 같은 방법으로 조사하였다. 즉 멸균된 PYP배지(PD broth 24g, Yeast extract 5g, Peptone 5g, Agar 15g, D.W 100ml)를 50-60℃ 정도로 식힌 후 공시 항생제의 최종농도가 10, 50, 100, 500ppm이 되도록 항생제를 첨가하여 혼합하였고 이를 샐레(90mm)에 분주하였다. 각각의 항생제

가 첨가된 배지에 PAF 사면배지에서 24시간 배양된 병원세균을 streak접종 하여 실온(28℃)에서 10일간 배양한 후 세균의 성장여부를 조사하였다. 한편 항생제가 느타리 균사의 성장에 미치는 영향을 조사하기 위하여 PDA배지에서 배양된 직경 5mm의 느타리 균총을 항생제가 첨가된 PYP배지에 접종하여 28℃에서 7일간 배양한 후 균총의 직경을 측정하여 균사 성장율을 조사하였다.

$$\text{균사성장율(\%)} = \frac{\text{약제처리구 균총 직경}}{\text{약제 무처리구 균총 직경}} \times 100$$

4. 병방제효과 검정

가. 상자재배검정. 충남대학교 농과대학의 버섯재배사에서 실시하였고, 버섯재배는 원형느타리버섯을 폐쇄상자 배지(50×40×10 cm)에서 재배하였으며 병을 유도하기 위하여 버섯 발이 전인 30일 배양된 상자배지에 병원세균 현탁액을 2일 간격으로 2회 분무접종 하였다. 항생제 처리는 2차 병원세균 접종 2일 후에 2일 간격으로 2회, 1주기 수확 후에 1회 살포하였다. 공시항생제 및 처리농도는 kanamycin 100ppm, tetracycline 100ppm, kasugamycin 150ppm, streptomycin 150ppm 이었다. 실험은 각 처리당 5반복(1상자1반복)으로 하였으며 1차(세균 접종농도 10^{10} cells/ml)와 2차(접종농도 10^{10} cells/ml)에 걸쳐 실시하였다. 처리후 1~2주기의 버섯을 수확하여 이병율과 약해 유무를 조사하였고 다음과 같은 방법으로 방제가를 환산하였다.

$$\text{방제가(\%)} = \left(1 - \frac{\text{약제처리구 발병율}}{\text{무처리구 발병율}} \right) \times 100$$

나. 농가재배사 실험. 농가재배사를 대상으로 하는 항생제 농약의 병방제 효과는 2차례 실시하였다. 1차 실험은 97년 2~5월 사이에 태안군 근흥면

안기리의 농가 재배사에서 실시하였다. 시험재배사는 폐쇄배지에서 원형 느타리를 재배하고 있었으며 1주기 수확이 끝난 직후의 상태에서 실험을 시작하였다. 공시약제는 tetracycline, kanamycin, kasugamycin 및 streptomycin(농용신 수화제)을 사용하였으며 1주기 수확이 끝난 후 2일 간격으로 2회, 2주기 수확이 끝난 후 1회 살포하였다.

2차 실험은 97년 10~11월 사이에 옥천군 안내면 서대리의 농가 재배사에서 실시하였다. 시험재배사는 태안군의 농가와 마찬가지로 폐쇄배지에서 원형느타리를 재배하고 있었다. 공시약제 및 살포방법은 앞의 방법과 동일하게 하였고 3반복으로 실시하였다.

약효조사는 2~3주기의 버섯을 수확하여 이병율과 방제가를 조사하였다.

제 3절 결과 및 고찰

1. 유용항생제 선별

공시한 33종의 항생제의 병원세균에 대한 항균활성을 paper disk법으로 조사한 결과는 Table 8과 같다. 즉 33종의 항생제 중에서 19종의 항생제가 항세균활성을 나타내었으며 그 중에서 특히 kanamycin, tetracycline, streptomycin, kasugamycin 4종의 항생제가 강한 항균활성을 나타내었다.

이들 4종의 항생제들의 농도별 항균활성을 조사한 결과는 Table 9와 같다. 즉 tetracycline의 항균활성이 가장 강하여 10ppm의 낮은 농도에서도 세균생장을 완전히 억제시켰으며(Fig. 12) kanamycin은 100ppm이상의 농도에서, kasugamycin은 150ppm이상에서 그리고 streptomycin은 200ppm 이상에서 병원세균의 생장을 완전히 억제하였다.

Table 8. Screening of antibacterial activity of 33 antibiotics against *Pseudomonas tolaasii* and *P. reactans*

Antibiotics	Inhibition zone		Antibiotics	Inhibition zone	
	<i>P. tolaasii</i> (P-1)	<i>P. reactans</i> (P-2)		<i>P. tolaasii</i> (P-1)	<i>P. reactans</i> (P-2)
Ampicillin 10mcg	-	-	Gentamycin 30	++	++
Amikacin 30	++	++	Imipenem 10	++	++
Aztreonam 30	+	++	Kanamycin 30	+++	+++
Bacitracin 10units	-	-	Lincomycin 2	-	-
Bramycin 10	++	++	Methicillin 5	-	-
Carbenicillin100mcg	+	+	Maxalactam 30	+	+
Cefamandole 30	-	-	Nalidixic acid 30	+	+
Cefazolin 30	-	-	Neomycin 30	++	++
Cefoperazone 75	+	++	Netilmycin 30	++	++
Cefotaxime 30	+	+	Novobiocin 30	-	-
Cefoxitin 30	-	-	Oxacillin 1	-	-
Ceftrixone 30	+	+	Penicillin 10units	-	-
Cephalothin 30	-	-	Piperacillin 100	++	++
Chloramphenicol30	-	-	Tetracycline 30	+++	+++
Colistin 10	-	-	Vancomycin 30	-	-
Erythromycin 15	++	+	Streptomycin500ppm	+++	+++
			Kasugamycin500ppm	+++	+++

* Inhibition zone, +++=>2.4cm, ++=1.5~2.4cm, +=<1.5cm, -=<0.4cm

Table 9. Antibacterial activity of 4 antibiotics against *Pseudomonas* spp.

<i>Pseudomonas</i> isolates	Concentration of antibiotics (ppm)														Control	
	Kanamycine					Tetracycline					Kasugamycine					
	10	50	100	500	1000	10	50	100	500	1000	10	50	100	500		1000
<i>P. tolaasii</i>																
P - 1	+ ^a	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+
P - 4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+
P - 6	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+
<i>P. reactans</i>																
P - 2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+
P - 3	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

^a +: growth of bacteria, -: non-growth of bacteria

2. 항생제의 세균성 갈반병 방제효과

병원세균에 항균활성이 높은 kanamycin, tetracycline, kasugamycin 및 streptomycin을 공시하여 느타리버섯 세균성 갈반병 방제효과를 폐습상자재 배 실험과 농가재배사 실험으로 실시하였다.

가. 폐습상자재 배 실험

항생제의 병방제효과를 1차실험(병원균 접종농도 10^{10} cells/ml)과 2차실험(균 접종농도 10^{10} cells/ml)으로 실시한 결과는 Table 10, 11과 같다. 1차 실험의 결과는 Table 10에서 보는 바와 같이 kanamycin, teracycline 처리구에서 각각 76%, 79%의 방제가 나타내었으며 버섯에 약해도 없었다.

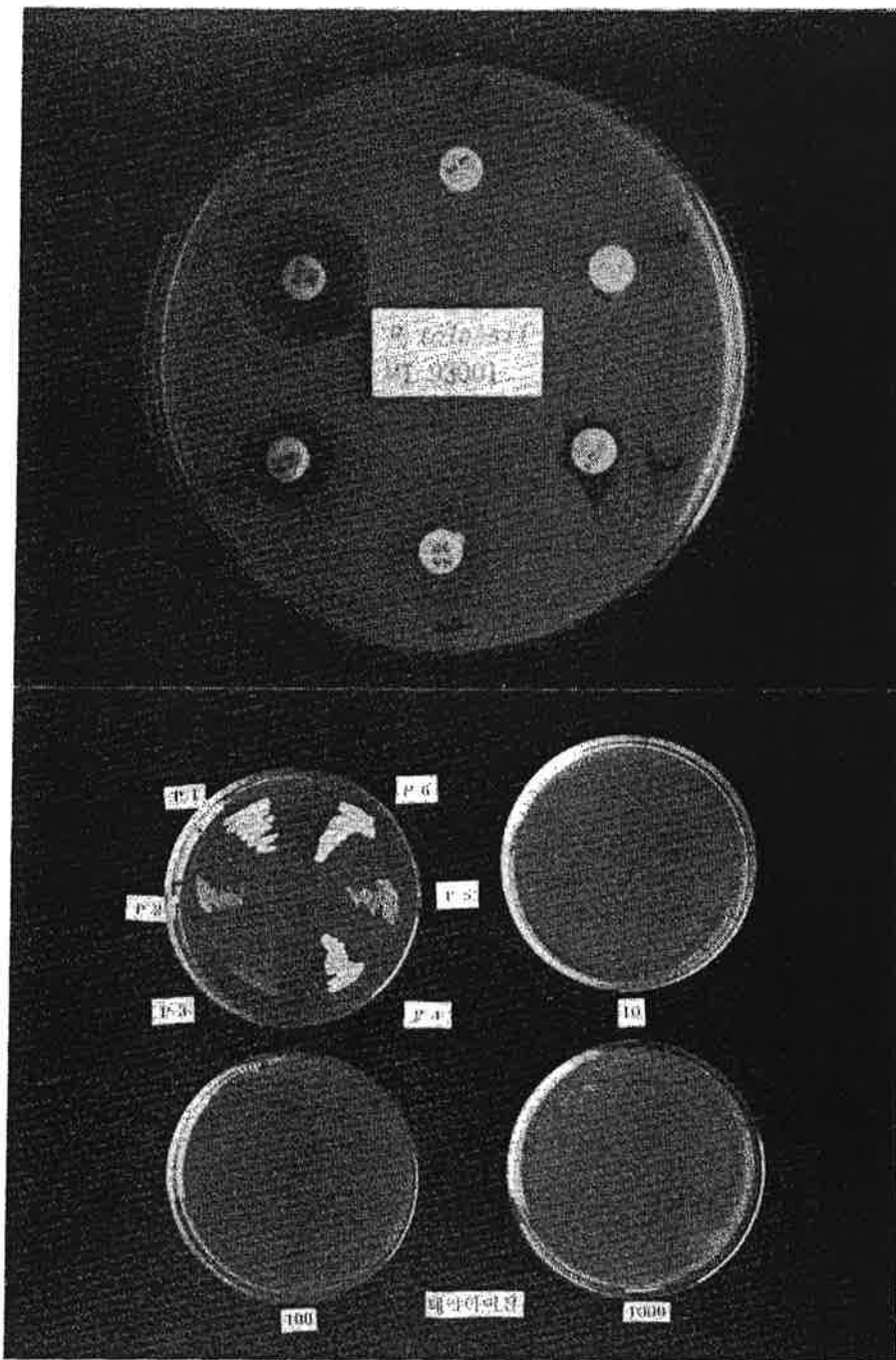


Fig. 12. 느타리버섯 세균성 갈반병균에 대한 항생제의 항균활성
 검정시험
 A= Paper disk 검정에 의한 공시 항생제의 항균활성
 B= Tetracycline을 농도별(무처리, 10, 100, 1000ppm)
 로 처리한 PYP배지에서 병원세균의 억제

Table 10. Effect of kanamycin and tetracycline on control of bacterial brown blotch of oyster mushroom(1st experiment)

Treatment	Disease incidence(%)			Control value(%)	Chemical damage
	1st flush	2nd flush	Ave		
Kanamycin 100ppm	4.9	3.5	4.2	75.9	No
Tetracycline 100ppm	4.0	3.4	3.7	78.7	No
Control	19.1	15.6	17.4		

2차 실험에서는 kasugamycin 및 streptomycin의 병 방제효과를 kanamycin 과 tetracycline 의 효과와 비교하였던 바 Table 11에서 보는 바와 같이 kanamycin(72% 방제가), tetracycline(71%)에 비하여 약간 낮기는 하나 60% 이상의 방제가를 나타내었고 버섯에 약해도 없었다.

Table 11. Effect antibiotics on control of bacterial brown blotch of oyster mushroom(2nd experiment)

Treatment	Disease incidence(%)	Control value(%)	Chemical damage
Kanamycin 100ppm	23.0	72.3	NO
Tetracycline 100ppm	24.5	70.5	NO
Kasugamycin 150ppm	29.0	65.1	NO
Streptomycin 150ppm	33.1	60.1	NO
Control	83.0		1

나. 농가 재배사 실험

항생제의 세균성 갈반병 방제효과 농가재배사 실험을 2차례 실시한 결과는 Table 12, 13과 같다. 태안군의 농가에서 실시한 1차 실험의 결과(Table 12) tetracycline(100ppm), kanamycin(100ppm), kasugamycin (150ppm) 처리구의 방제가는 각각 72.9%, 71.2%, 68.1%로서 대조약제인 streptomycin(농용신 150ppm)의 62.7% 보다 높았다.

옥천군에서 실시한 2차 실험의 결과는 Table 13에서 보는바와 같이 tetracycline (100pp), kanamycin(100ppm), kasugamycin(150ppm)처리구의 방제가는 각각 75%, 71%, 75% 로서 streptomycin (150ppm)의 68%와 비슷하거나 높았다.

느타리버섯 세균성 갈반병 방제용 항생제 약제로 국내에서는 streptomycin(농용신 수화제)만이 알려져 있으나 본 연구의 결과 농업용 항생제인 kasugamycin과 인체용 항생제인 tetracyclin 및 kanamycin의 병방제 효과가 우수한 것으로 나타났다. 그 중에서 특히 kasugamycin은 포유류 독성 및 어독성이 매우 낮으며 쉽게 생분해되는 항생제로서 인체의 건강에 장애가 되지 않기 때문에 인공재배용 버섯의 농약으로 실용화가 가능하다고 생각된다.

농작물에서 항생제의 사용이 권장되고 있지는 않지만 kasugamycin은 위에서 설명한 바와 같이 다른 항생제와는 달리 비교적 안전한 항생제이기 때문에 예외에 속한다고 볼 수 있다. 이웃 일본에서 kasugamycin은 녹차(잎), 토마토, 오이, 벼, 멜론 과 같은 식품 작물에 사용되고 있으며 이들 작물에서의 잔류는 모두 검출한계 이하인 것으로 알려져 있다. 따라서 kasugamycin은 식용버섯 세균성 갈반병 방제 약제로 실용화의 가능성이 높은 것으로 생각된다.

Table 12. Effect of antibiotics, wood vinegar and vinegar on control of bacterial brown blotch of oyster mushroom(1st experiment in farm mushroom house)

Chemicals	Concentration	No. of treated	Disease occurrence(%)	Control value(%)
Tetracycline	100ppm	3	8.0	72.9
Kanamycin	100ppm	3	8.5	71.2
Kasugamycin	150ppm	3	9.4	68.1
Streptomycin	150ppm	3	11.0	62.7
Wood vinegar	1%	4	22.7	23.2
Vinegar	1%	4	20.1	31.9
Control	-	-	29.5	-

Table 13. Effect of antibiotics, wood vinegar on control of bacterial brown blotch of oyster mushroom(2nd experiment in farm mushroom house)

Chemicals	Concentration	No. of treated	Disease occurrence(%)	Control value(%)
Tetracycline	100ppm	3	3.4	75.0
Kanamycin	100ppm	3	4.0	71.4
Kasugamycin	150ppm	3	3.5	75.0
Streptomycin	150ppm	3	4.5	67.9
Wood vinegar	1%	4	8.5	39.0
Control	-	-	14.0	-

제 4절 요약

1. 시판되는 항생제 33개를 공시하여 세균성 갈반병균에 대한 항균활성을 paper disk법으로 조사하였던 바, tetracycline을 비롯한 19개 항생제가 항균활성을 나타내었다. 항균활성을 나타내는 19개 항생제들의 농도별 항균활성을 조사하였던 바 tetracycline은 10ppm의 낮은 농도에서, kanamycin은 100ppm이상에서, kasugamycin은 150ppm이상에서, 대조약제인 streptomycin(농용신수화제)은 200ppm이상에서 병원세균의 성장을 완전히 억제하였다.

2. 병원세균에 항균활성이 높은 tetracycline, kanamycin, kasugamycin 및 streptomycin을 공시하여 재배사(폐송상자재배)에서 세균성 갈반병 방제효과를 조사하였다. 실험은 2차례 실시하였으며 1차 실험에서는 kanamycin(100ppm)과 tetracycline(100ppm)의 처리효과를 조사하였던 바 방제가가 각각 76%, 79%였고 버섯에 약해도 없었다. 2차 실험에서는 kanamycin(100ppm), tetracycline(100ppm), kasugamycin(150ppm) 및 대조약제인 streptomycin(100ppm)의 효과를 조사하였는데 방제가가 각각 72%, 71%, 65% 및 60%였고 버섯에 약해도 없었다.

3. 항생제 농약의 병 방제효과를 농가 재배사 실험으로 실시하였던 바 1차 실험(태안군, 근흥면, 안기리)에서는 tetracycline, kanamycin, kasugamycin의 방제가가 각각 72.9%, 71.2%, 68.1%로서 대조약제인 streptomycin(농용신수화제)의 62.7%보다 높았다. 2차 실험(옥천군)에서는 tetracycline, kanamycin, kasugamycin의 방제가가 각각 75%, 71%, 75%로서 streptomycin처리구의 68%보다 높았다.

제 6장 저독성 소독제를 이용한 세균성 갈반병의 방제

제 1절 서 언

*Pseudomonas tolaasii*에 의해 발생하는 느타리버섯 세균성 갈반병은 느타리버섯 재배의 큰 감수요인이 되고 있으며 그 피해가 매우 크다. 따라서 느타리버섯의 생산성 향상 및 고품질의 버섯 생산을 위하여는 세균성갈반병의 방제체계 확립이 시급한 과제이다. 버섯은 수확후 바로 식품으로 이용하기 때문에 버섯병의 방제는 농약잔류, 식품의 안정성 및 환경오염 등의 문제를 야기시키지 않는 무공해 또는 저독성 소독제를 이용한 방제법의 개발이 필요하다.

*P. tolaasii*에 의한 양송이 세균성 갈반병 방제에 차아염소산나트륨(Wong 과 Preece 1985), chlorine(Royse 와 Wuest 1982, Geels 등 1991), chlorine dioxide(Geels 등 1991) 등과 같은 염소수계통의 소독제가 이용되고 있으며 이들의 처리가 발병을 현저히 줄이기는 하지만 충분한 방제효과를 올리지 못하는 경우가 많다.

본 연구는 식품 및 식수오염 등이 크게 문제되지 않는 클로르칼크, 식초, 목초액, 차아염소산나트륨 등과 같은 저독성 소독제의 느타리버섯 세균성 갈반병 방제효과를 조사하기 위하여 실시하였다.

제 2절 재료 및 방법

1. 공시균주. 느타리버섯 세균성갈반병균 *P. tolaasii*(P-1)와 white line 유도균인 *P. reactans*(p-2)를 공시하였으며, 느타리버섯 품종은 원형느타

리를 사용하였다.

2. 공시소독제. 본 연구에 공시한 소독제는 클로르칼크[Ca(OCl)₂], 식초(초산농도 6.5~7%인 양조식초), 목초액(유기농업협회에서 구입), 차아염소산나트륨(NaOCl), 오존수(O₃) 및 CaCl₂ 등이다.

3. 항균활성 검정. 클로르칼크, 식초, 목초액 및 CaCl₂처리가 병원세균의 생장에 미치는 영향을 조사하기 위하여 PDA배지에 최종농도가 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 %가 되게 각 소독제를 첨가하고 균한 후 병원세균을 streak접종하여 25℃에서 5일간 배양한 후 세균의 성장여부를 조사하였다. 한편 이들 소독제가 느타리버섯 균사생장에 미치는 영향을 조사하기 위하여는 위와 같이 소독제가 농도별로 조정된 PDA배지에 느타리 균총을 접종하여 28℃에서 7일간 배양한 후 균사생장 억제 여부를 조사하였다.

차아염소산나트륨의 항균활성을 검정하기 위하여는 농도별(50~1,000ppm)로 희석한 액에 paper disc(Ø8mm)를 흡습시키고 병원세균이 희석 평판된 YPDA 배지 위에 올려놓은 다음 28℃에서 48시간 배양한 후 저지정도를 조사하였다.

오존수(O₃)의 항균활성을 조사하기 위하여 오존수 제조기(신성엔지니어링 제조)를 이용하여 생산한 오존수(0.1, 0.2 ppm)에 병원세균을 현탁하고 5, 10, 15, 20, 25분 후에 일정량을 취하여 NA배지에 도발하고 28℃로 배양하여 세균의 생존여부와 밀도를 조사하였다.

4. 병방제효과 검정

가. 상자재배 검정. 목초액, 식초, 차아염소산나트륨, 오존수의 느타리버섯 세균성 갈반병 방제효과를 폐쇄 상자재배로 조사하였다. 버섯 재배 방법 및 병원세균 접종 방법은 앞에서 설명한 항생제의 병 방제효과 실험과 동일하였다. 목초액의 처리농도는 0.5, 1, 2%, 식초는 0.5, 1%로 희석하여 병원세균 2차 접종 전에 1회, 접종 후에 2일 간격으로 3회 살포하였다. 실험은

처리당 5반복(상자 1반복)으로 하였으며 1차(세균접종농도 10^{10} cells/ml)와 2차(접종농도 10^{10} cells/ml)에 걸쳐 실시하였다. 차이염소산 나트륨은 1% 희석액을, 오존수는 0.2ppm 용액을 살포하였다. 이병을과 병 방제가는 처리 후 1~2 주기의 버섯을 수확하여 조사하였다.

나. 농가재배사 실험. 목초액과 식초의 병 방제효과를 농가재배사 실험으로 조사하였다. 실험에 공시한 재배사는 앞에서 설명한 항생제의 병방제 실험에 사용한 재배사를 이용하였으며 약제 처리방법도 앞의 항생제 처리와 동일한 방법으로 실시하였다. 목초액과 식초의 처리농도는 모두 1% 희석액을 사용하였다.

제 3절 결과 및 고찰

1. 소독제의 항균활성

가. 클로르칼크의 항균활성

클로르칼크 처리가 느타리버섯 세균성갈반병균의 생장에 미치는 영향을 조사하기 위하여 PDA배지에 클로르칼크를 농도별로 첨가하고 세균성갈반병균의 생장 여부를 조사하였던 바(Table 14) 0.25% 농도까지는 갈반병균이 생장하였고 0.5% 이상에서는 생장이 완전히 억제되었다. 한편 클로르칼크가 느타리 균사생장에 미치는 영향을 조사하였던 바 0.1, 0.25% 처리구에서는 무처리구에 비하여 균사생장이 28, 40% 억제되었고 0.5% 이상 처리구에서는 균사생장이 완전히 억제되었다. 따라서 병원세균의 억제농도인 0.5%의 클로르칼크 처리는 느타리균의 생장에도 강한 저해작용이 있었으므로 클로르칼크는 느타리 갈반병 방제에 효과적으로 사용할 수 없음을 나타내었다.

나. 식초의 항균활성

식초처리가 세균성갈반병균의 생장에 미치는 영향을 조사하기 위하여 PDA

배지에 식초를 농도별로 희석하여 첨가하고 갈반병균의 성장 여부를 조사하였던 바(Table 15) 시판 식초액(초산농도 6.5~7%인 양조식초)의 0.25% 희석농도까지는 공시세균 모두 성장하였고 0.5% 이상에서는 생장이 완전히 억제되었다. 식초가 느타리 균사생장에 미치는 영향을 조사하였던 바 0.1% 희석구에서는 무처리구와 차이가 없었으나 0.25%, 0.5% 1% 처리구에서는 균사생장이 각각 5~10, 17~20, 35~40% 억제되었다(Fig. 13).

한편 식초가 느타리버섯의 자실체 형성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 병재배의 느타리를 대상으로 원기 형성부터 자실체 성숙기까지 식초를 농도별로 분무살포 하였던 바 0.5~2%까지는 대조구인 수돗물과 증류수 처리구와 차이가 없이 버섯 발생이 양호하였고 5% 처리구에서는 약간의 약해가 나타났다(Fig. 15).

이상의 결과 갈반병균의 성장을 억제하는 식초 농도인 0.5~1% 희석구에서 비록 느타리 균사생장이 약간 억제되기는 하였지만 자실체 형성에는 전혀 약해를 나타내지 않았다.

다. 목초액의 항균활성

목초액 처리가 갈반병균 성장과 느타리 균사생장에 미치는 영향을 앞에서와 같은 방법으로 조사할 결과는 Table 16과 같다. 시판 목초액의 0.1%~0.5 희석농도에서는 공시세균의 성장억제효과가 없었고 1% 처리구에서 세균생장이 완전히 억제되었다(Fig. 14). 반면에 목초액 처리가 느타리 균사생장에 미치는 영향을 조사하였던 바 목초액 0.1% 처리구에서도 5~10%의 균사 성장촉진효과가 있었다. 한편 목초액 처리가 느타리버섯 자실체 형성에 미치는 영향을 조사하였던 바 그림 15에서 보는 바와 같이 목초액 0.5~2% 처리구는 대조구와 차이가 없이 버섯 발생이 양호하였다.

Table 14. Effect of Ca(OCl)₂ on growth of *Pseudomonas tolaasii*, *P. reactans* and mycelial growth of *Pleurotus* on PDA media

<i>Pseudomonas</i> isolate	Conc. of Ca(OCl) ₂ (%)				Control
	0.1	0.25	0.5	1.0	
<i>P. tolaasii</i>					
P-1	+ ^{a)}	+	-	-	+
P-4	+	+	-	-	+
P-6	+	+	-	-	+
<i>P. reactans</i>					
P-2	+	+	-	-	+
Mycelial growth index of <i>Pleurotus</i> ^{b)}	72	60	0	0	100

^{a)} +: growth of bacteria, -: non-growth of bacteria

^{b)} Index= colony diameter in Ca(OCl)₂ treatment/colony diameter in non-treatment × 100

Table 15. Effect of vinegar on growth of *Pseudomonas tolaasii*, *P. reactans* and mycelial growth of *Pleurotus* on PDA media

<i>Pseudomonas</i> isolate	Conc. of vinegar(%)				Control
	0.1	0.25	0.5	1.0	
<i>P. tolaasii</i>					
P-1	+ ^{a)}	+	-	-	+
P-4	+	+	-	-	+
P-6	+	+	-	-	+
<i>P. reactans</i>					
P-2	+	+	-	-	+
Mycelial growth index of <i>Pleurotus</i> ^{b)}	100	90	80	60	100

^{a)} +: growth of bacteria, -: non-growth of bacteria

^{b)} Index= colony diameter in vinegar treatment/colony diameter in non-treatment × 100

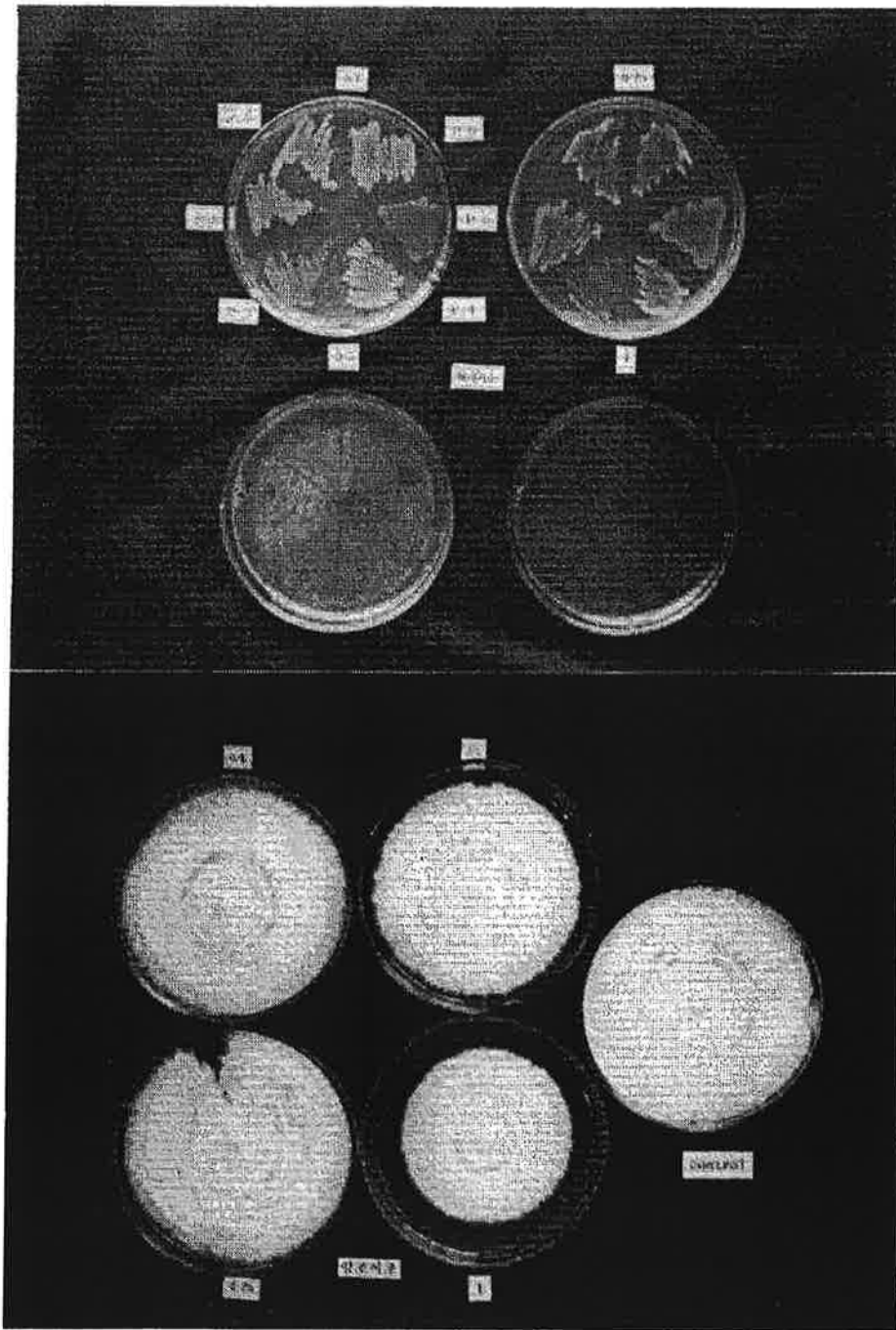


Fig. 13. 식초가 느타리버섯 세균성 갈반병균(위) 및 느타리버섯 균사(아래)의 생장에 미치는 영향

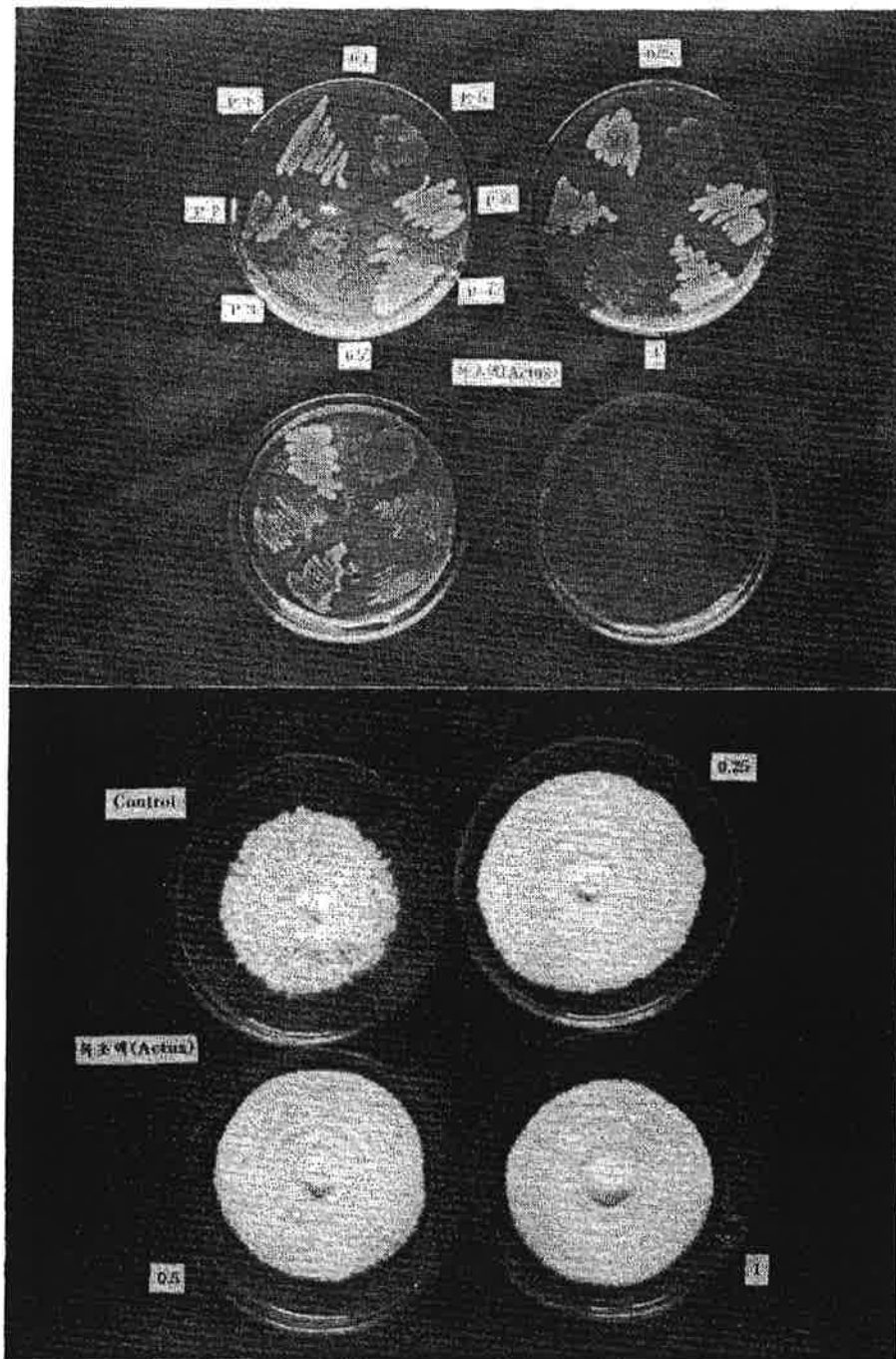


Fig. 14. 목초액이 느타리버섯 세균성 갈반병균(위) 및 느타리버섯 균사(아래)의 생장에 미치는 영향

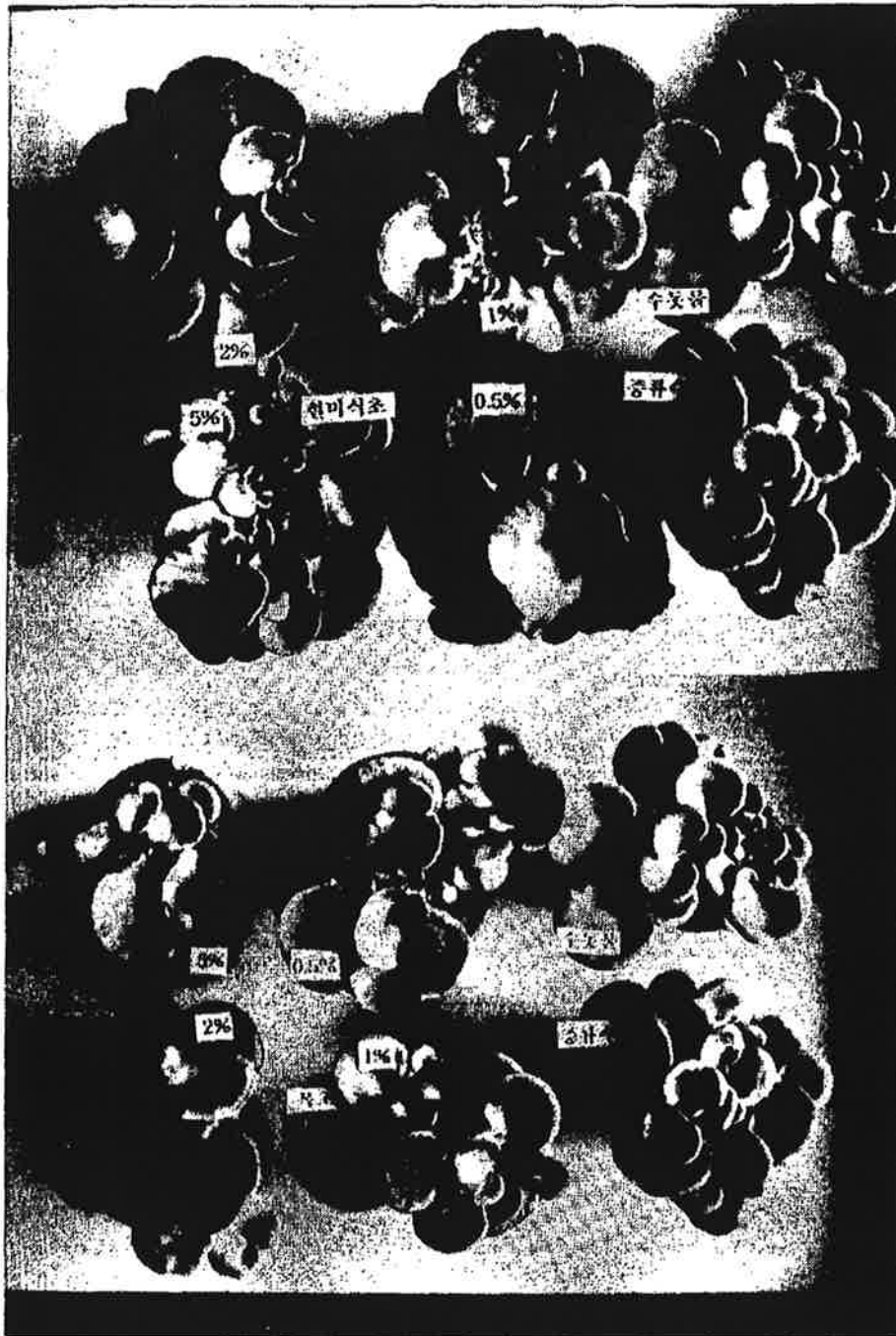


Fig. 15. 식초(위) 및 목초액(아래)이 느타리버섯 자실체 형성에 미치는 영향(위:식초처리, 아래:목초액처리)

Table 16. Effect of wood vinegar on growth of *Pseudomonas tolaasii*, *P. reactans* and mycelial growth of *Pleurotus* on PDA medium

<i>Pseudomonas</i> isolate	Conc. of wood vinegar				Control
	01.	0.25	0.5	1.0	
<i>P. tolaasii</i>					
P-1	+ ^{a)}	+	+	-	+
P-4	+	+	+	-	+
P-6	+	+	+	-	+
<i>P. reactans</i>					
P-2	+	+	+	-	+
Mycelial growth index of <i>Pleurotus</i>	130	120	116	110	100

^{a)} +: growth of bacteria, -: non-growth of bacteria

^{b)} Index= colony diameter in wood vinegar treatment/colony diameter in non-treatment × 100

Table 17. Effect of sodium hypochlorite on growth of *Pseudomonas tolaasii* and *P. reactans*.

<i>Pseudomonas</i> isolate	Conc. of NaOCl (ppm)					
	50	100	200	400	800	1000
<i>P. tolaasii</i>						
P-1	- ^{a)}	±	±	+	+	+
P-4	-	±	±	+	+	+
P-9	-	±	±	+	+	+
<i>P. reactans</i>						
P-2	-	±	±	+	+	+

^{a)} Degree of bacterial growth inhibition, -:no inhibition. ±: slightly inhibited +:strongly inhibited

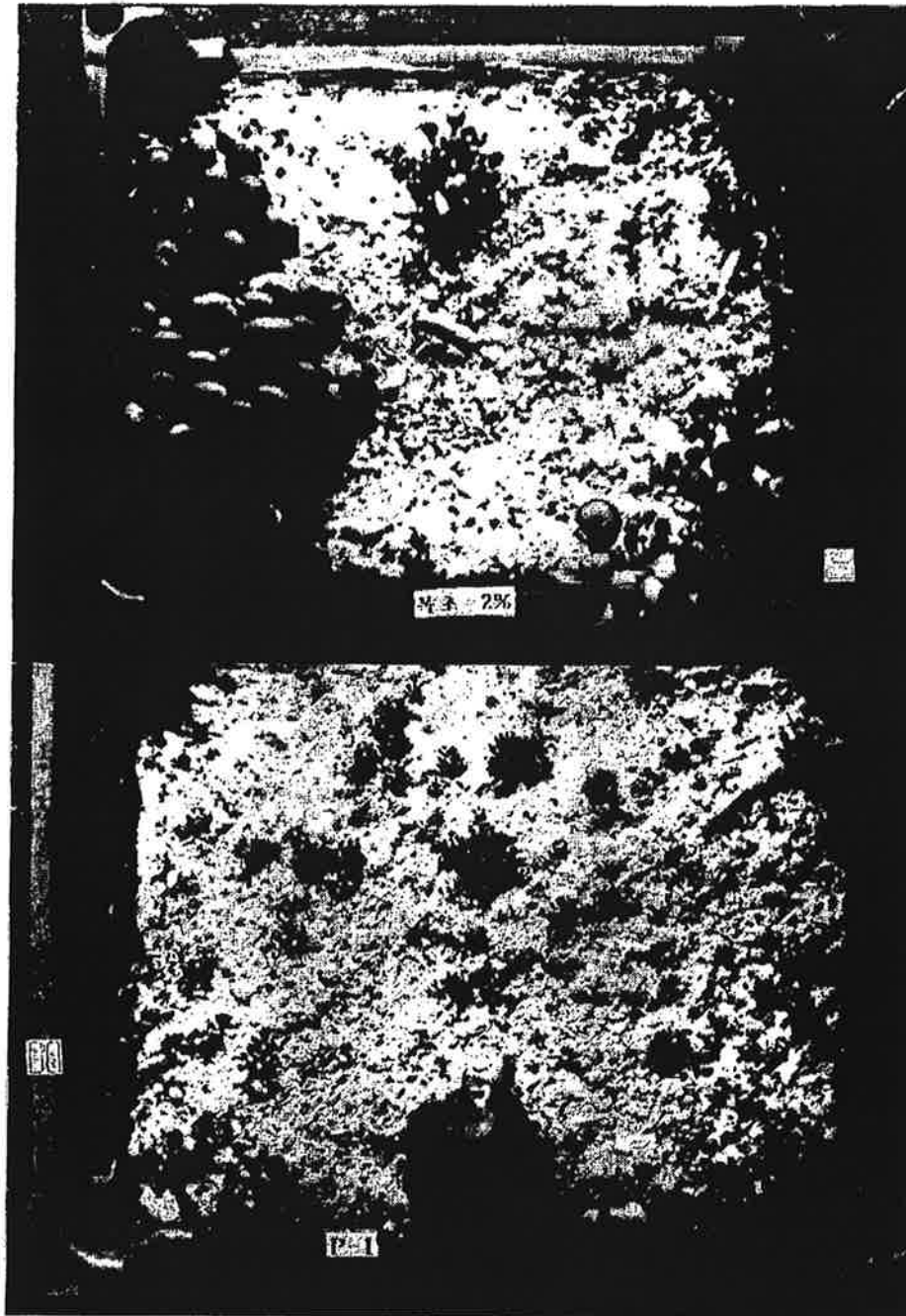


Fig. 16. 목초액의 느타리버섯 세균성갈반병 방제효과(상자재배)
(위: 목초액2% 처리구, 아래: 대조구)

라. 차아염소산나트륨, 오존수(O₃), CaCl₂의 항균활성

병원세균에 대한 차아염소산나트륨의 항균활성을 YPDA 배지에서 조사한 결과는 Table 17에서 보는 바와 같이 400ppm 이상의 농도에서 강한 억제효과를 나타내었다.

오존수가 병원세균의 생육에 미치는 영향을 조사하였던 바 Fig. 17에서 보는 바와 같이 0.1, 0.2ppm의 오존수에서 3.7×10^6 cells/ml의 세균이 처리 5분 후에는 3×10^4 cells/ml으로 밀도가 저하하였으나 시간이 경과함에 따라 밀도가 서서히 증가하였고 처리 20분 후에는 급격히 증가하였다.

CaCl₂가 *P. tolaasii* 및 느타리균사 생장에 미치는 영향을 조사하였던 바 Table 18에서와 같은 결과를 얻었다. 즉 CaCl₂가 0.5% 이상 첨가된 배지에서 병원세균인 *P. tolaasii*의 생장이 억제되었으나 비병원세균의 성장 억제 효과는 없었다.

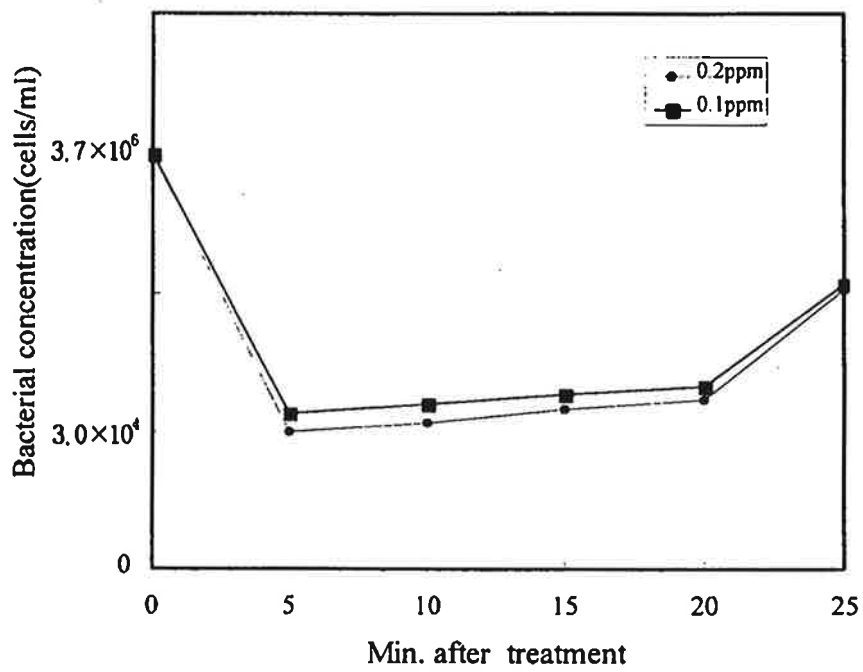


Fig 17. 오존수 처리가 *P. tolaasii* 생장에 미치는 영향

Table 18. Effect of CaCl₂ on growth of *P. tolaasii* and *P. reactans*

Pseudomonas <i>isolate</i>	Conc. of CaCl ₂ (%)			
	0.1	0.2	0.5	1
<i>P. tolaasii</i>				
P-1	+ ^{a)}	+	±	±
P-4	+	+	±	±
P-9	+	+	±	±
<i>P. reactans</i>				
P-3	+	+	+	+

^{a)}+: growth of bacteria, -: non-growth of bacteria

^{b)}Index= colony diameter in CaCl₂ treatment/colony diameter in non-treatment × 100

2. 소독제의 세균성 갈반병 방제효과

목초액과 식초의 병방제효과는 폐습상자 재배와 농가재배사 실험으로 조사하였고 차아염소산 나트륨과 오존수의 병방제효과는 폐습상자 재배로 조사하였다.

가. 폐습상자 재배 실험

목초액과 식초의 병 방제효과를 2차례 걸쳐 실시한 결과는 Table 19, 20과 같다.

제1차 실험(균 접종농도 10⁸cells/ml)의 결과는 Table 19에서 보는 바와 같이 목초액 처리구에서 65~71%의 방제가를(Fig. 16), 식초 처리구에서 64~66%의 방제가를 나타내었으며 버섯에 약해는 없었다.

그러나 2차 실험(균 접종농도 10¹⁰cells/ml)의 결과는 Table 20에서 보는 바와 같이 목초액 처리구의 방제가가 33~37% 였고, 식초처리구는 35~39%로

서 1차 실험에 반하여 방제효과가 매우 낮았다. 2차 실험에서는 무처리
 이병율이 83%로 1차 실험 때의 24%에 비하여 높았는데 이 결과로 보아 목
 초, 식초는 병 발생초기에 처리하여야 병 방제효과가 있으며 발병이 심하거
 나 병이 많이 진전된 후에는 방제효과가 없을 것으로 생각된다.

Table 19. Effect of wood vinegar and vinegar on control of bacterial
 brown blotch of oyster mushroom(1st experiment)

Treatment	Disease incidence(%)			Control value(%)	Chemical damage
	1st flush	2nd flush	Ave.		
Wood vinegar 0.5%	9.6	7.1	8.4	64.8	No
1	8.1	5.7	6.9	71.1	No
2	7.6	7.1	7.4	69.1	No
Vinegar 0.5	7.7	8.5	8.1	66.1	No
1	9.3	7.6	8.5	64.4	No
Control	28.3	19.6	23.9		

Table 20. Effect of wood vinegar and vinegar on control of bacterial
 brown blotch of oyster mushroom(2nd experiment)

Treatment	Disease incidence (%)	Control value(%)
Wood vinegar 1%	55.8	32.8
2%	52.5	36.7
Vinegar 0.5%	54.2	34.7
1%	50.5	39.2
Control	83.0	

차아염소산나트륨(1%)과 오존수(0.2ppm)의 병방제 효과는 Table 21에서 보는 바와 같이 방제가가 각각 46%, 14%로서 매우 낮았다.

Table 21. Effect of NaOCl and ozone on control of bacterial brown blotch of oyster mushroom

Treatment	Disease incidence(%)	Control value(%)	Chemical damage
NaOCl 1%	15.3	46.3	No
O ₃ 0.2ppm	24.5	14.0	No
Control	28.5		

나. 농가재배사 실험

목초액과 식초의 병 방제효과 농가재배사 실험을 2차례 실시하였다. 태안군의 농가재배사에서 실시한 1차 실험의 결과(Table 12), 목초액(1%), 식초(1%) 처리구의 병 방제가는 각각 23.2%, 31.9%로 매우 낮았다. 옥천군의 재배사에서 실시한 2차 실험의 결과(Table 13)도 목초액(1%) 처리구의 병 방제가가 39%로 낮았다.

제 4절 요약

세균성 갈반병 방제효과가 있는 소독제를 선별하기 위하여 클로르칼크, 식초, 목초액, NaOCl, CaCl₂ 및 오존수를 공시하여 이들이 병원세균 및 느타리버섯 생장에 미치는 영향과 병방제 효과를 조사한 결과는 다음과 같다

1. 클로르칼크 처리가 병원세균의 생장과 느타리버섯의 생장에 미치는 영향을 조사하였던 바 0.5%이상 농도에서 세균의 생장이 완전히 억제되었다. 그러나 클로르칼크는 느타리 균생장에도 강한 저해작용이 있어 0.25% 농도에서는 느타리버섯의 균사생장이 40%억제되었고 0.5%이상 농도에서는 균사생장이 완전히 억제되었다. 즉 클로르칼크는 세균성 갈반병 방제에 효과적이지 못하였다.

2. 식초처리가 병원세균의 생장에 미치는 영향을 조사하였던 바 공시한 식초(초산농도 6.5~7%인 현미식초)의 0.5%이상 희석농도에서 세균생장이 완전히 억제되었다. 한편 식초가 느타리버섯 균사생장에 미치는 영향을 조사하였던 바 공시한 식초의 0.25%, 0.5%, 1% 희석농도에서 균사생장이 각각 5~10, 17~20, 35~400% 억제되었다. 그러나 식초 희석액이 버섯 자실체 형성에 미치는 영향을 조사하였던 바 0.25~2% 희석농도에서는 영향이 없었으며 5%처리구에서 약해가 나타났다. 이상의 결과 식초는 0.5~1% 희석농도에서 비록 느타리 균사 생장이 약간 억제되기는 하였지만 자실체 형성에는 전혀 약해가 없었다.

3. 목초액 처리가 병원세균의 생장에 미치는 영향을 조사하였던 바 시판 목초액 1%이상 희석농도에서 세균생장이 완전히 억제되었다. 한편 느타리버섯 생장에 미치는 목초액의 영향을 조사하였던 바 목초액 0.1% 처리구에서는 28~30%의 균사생장촉진효과가 있었고 1%처리구에서는 5~10%의 균사생장촉진효과가 있었으며 0.1~2%의 전처리구에서 자실체 형성도 양호하였다.

4. 병원세균에 대한 차아염소산나트륨의 항균활성을 조사하였던 바

400ppm 이상에서는 강한 억제효과를 나타내었다. 오존수가 병원세균의 생육에 미치는 영향을 조사하였던 바 오존농도 0.1, 0.2ppm의 오존수에서는 처리 후 5~20분까지는 세균밀도가 저하하였으나 20분 후부터는 세균 밀도가 다시 급격히 증가하였다. 한편 CaCl₂는 0.5% 이상 농도에서 병원세균의 생장만을 억제하였고 비병원성 세균의 생장억제효과는 없었다.

5. 원형느타리 버섯을 폐쇄 상자 재배하면서 식초, 목초액, 차아염소산나트륨, 오존수 등의 병방제효과를 조사하였다. 먼저 식초, 목초액의 병방제효과를 2차례 걸쳐 조사하였던 바 1차 실험에서는 목초액(0.5, 1, 2%) 처리구에서 65~71%의 방제가를, 식초(0.5, 1%) 처리구에서 64~66%의 방제가를 나타내었다. 그러나 2차 실험에서는 목초액 처리구의 방제가가 33~37%로서 방제효과가 매우 낮았다. 차아염소산 나트륨 및 오존수의 병 방제효과를 조사하였던 바 차아염소산나트륨(0.1%) 처리구와 오존수(0.2ppm) 처리구의 방제가가 각각 46%, 14%였다.

6. 식초, 목초액의 병방제 효과를 농가재배사 실험으로 2차례 실시하였던 바 목초액(1%)과 식초(1%) 처리구의 방제가는 각각 23.2~39%와 31.9%로서 매우 낮았다.

제 7장 미생물을 이용한 세균성 갈반병의 생물학적 방제

제 1절 서 언

인공재배 버섯에 발생하는 세균성 갈반병을 방제하기 위하여 클로르칼크나 차아염소산나트륨과 같은 염소수 계통의 소독제가 사용되고 있으며(Wong 과 Preece 1985, Olive 등 1978) 양송이에서는 테라마이신의 방제효과도 보고되어 있다(Tu 와 Liao 1981).

최근 *P. tolaasii*에 길항작용이 있는 길항세균과 bacteriophage를 이용한 생물학적 방제에 관한 연구가 세계 여러 나라에서 진행되고 있다. Fermor 등(1991), Nair 와 Fahy(1972)는 길항세균의 병방제 효과는 세균간의 양분 경쟁에 기인하는 것이라 하였고, Olivier 등(1978, 1981)은 길항균으로 *P. fluorescens*를 사용하여 이병율을 40~60% 감소시켰다고 하였다. Guilanumes 등(1888)은 길항세균과 bacteriophage를 동시에 이용할 경우 상승효과가 있어 80%의 방제효과가 있었다고 하였다. 호주에서 생물학적 방제제 "Conquer"가 상품화되어 있으나 길항균에 관한 정보는 발표되어 있지 않다(Fermor 등 1991).

본 연구는 국내의 느타리버섯 및 재배사에서 *P. tolaasii*에 대한 길항균을 선발하고 이 균을 이용한 병방제효과를 조사하였다.

제 2절 재료 및 방법

1. 길항균 및 비병원성균의 분리

느타리버섯 재배용 균상배지(벗짚, 폐습) 및 느타리버섯 자실체에서 분리

한 340개 세균 균주를 공시하여 *P. tolaasii*에 대한 길항작용을 다음과 같은 방법으로 조사하였다. 즉, PAF배지 중앙부위에 공시세균을 접종하여 28°C에서 4일간 배양하였고, Chloroform으로 혼중 사멸시킨 후 병원세균을 증충하여 1~2일 배양하고 저지원 크기로 길항균을 선발하였다.

또한 느타리버섯에 비병원성인 균주를 선발하기 위하여 공시균주들이 느타리버섯 균시생장에 미치는 영향과 느타리버섯에 대한 병원성을 조사하였다.

2. 길항균의 병방제 효과

Nutrient broth에서 24시간 배양한 병원세균 및 길항세균을 각각 원심하여 균체를 10 cfu/ml의 농도로 조절한 후 병원세균과 길항세균을 5, 1:10의 비율로 희석하여 팽이버섯자실체와 병재배의 느타리버섯에 분무 접종하였다.

팽이버섯은 시중에서 건전한 자실체를 구입하여 세균현탁액을 살포한 후 15°C의 항온기에서 72시간 까지 두면서 병발생정도를 조사하였다. 느타리버섯은 플라스틱 종균병에서 균생장이 완료된 것을 대상으로 종균병의 윗부분을 잘라 낸 후 세균현탁액을 살포하고 배양실에 둔 후 pin head로부터 버섯이 성숙할 때까지 매일 버섯을 관찰하여 아병율을 조사하였다. 처리당 5병씩 5반복으로 실시하였다.

제 3절 결과 및 고찰

1. 유용균주 선발

공시균주 340개 중에서 *Pseudomonas* 12개 균주가 *P. tolaasii*에 길항작용이 있었다(Table 22). 길항세균 중에서 inhibition-zone이 40mm이상인 것이 2균주, 20~40mm인 것이 4균주, 20mm 이하인 것이 2균주였다. 길항 세균을

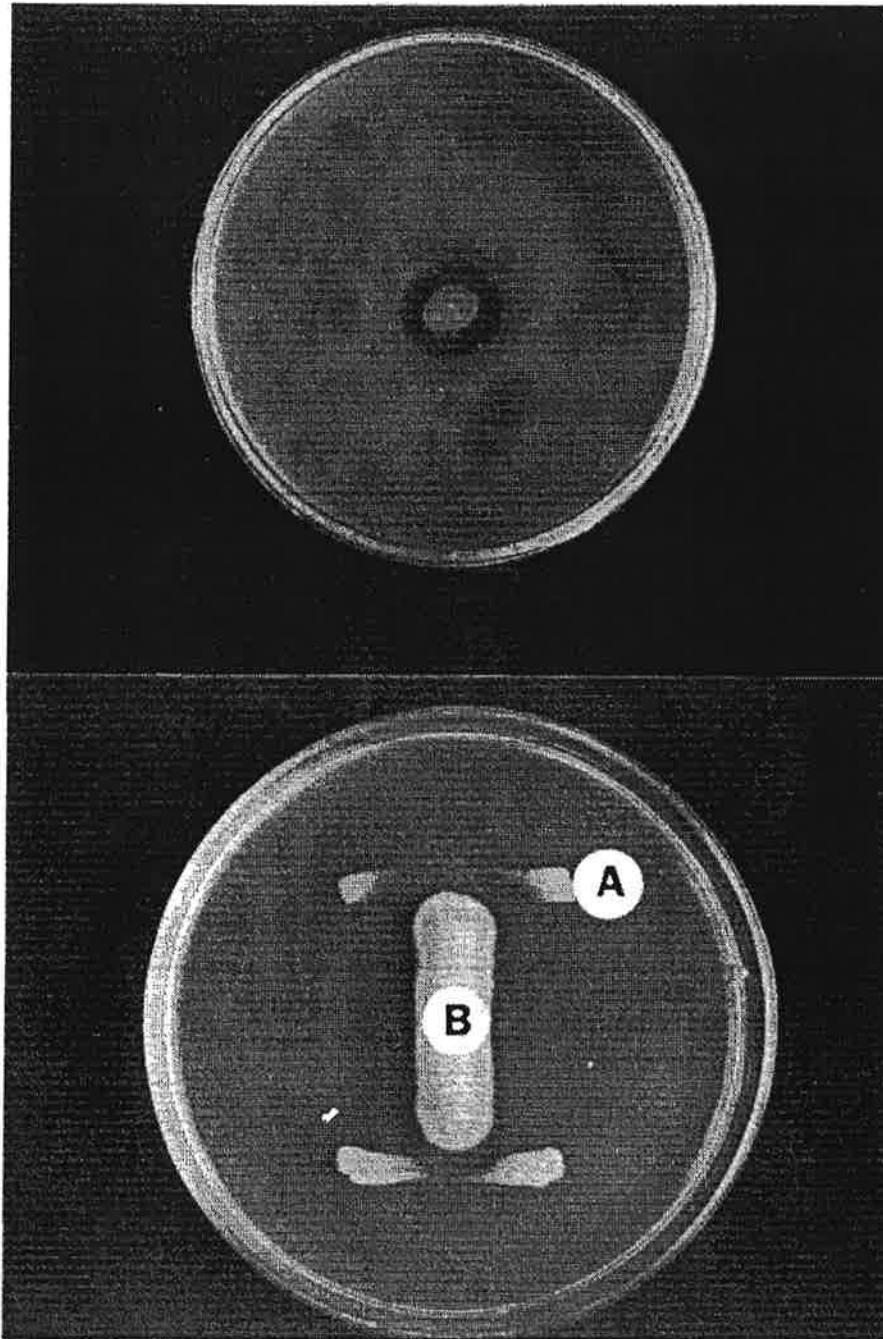


Fig. 18. 길항세균(T-11)의 *P. tolaasii*에 대한 항균력 검정
 (위:저지원 검정, 아래:대치배양검정)
 A=병원세균 *P. tolaasii*, B=길항세균 T-11 균주

비롯한 공시세균들의 느타리버섯에 대한 병원성을 조사하였던 바 길항세균 중에서 T-11, Ao-15 등 2개 균주가 느타리버섯의 군사생장 및 자실체 형성에 피해를 주지 않았다(Fig. 18). 한편 Ao-7을 비롯한 15개 균주는 병원세균에 길항작용은 없었지만 느타리버섯에 비병원성을 나타내었다(Table 23). BT-1균주는 *P. tolaasii*에는 강한 길항작용을 나타내었으나 느타리 군사생장을 저해하였다.

Table 22. Screening of antagonistic bacteria against *P. tolaasii*

Bacteria	No. of isolates tested	No. of antagonistic isolates			Total
		Inhibition zone			
		> 40mm	20~40mm	< 20mm	
<i>Pseudomonas</i>	250	2	4	6	12
<i>Bacillus</i>	90	2	0	1	3

Table 23. Effect of some selected *Pseudomonas* isolates on antagonistic activity against *P. tolaasii* and growth of oyster mushroom

Bacterial isolate	Antagonistic activity against <i>P. tolaasii</i> ^{a)}	Inhibition of mycelial growth of oyster mushroom ^{b)}	Pathogenicity to oyster mushroom
Ao-7	-	-	-
Ao-15	+	-	-
BT-1	+	+	-
P-50	-	-	-
T-4	-	+	-
T-11	+	-	-

a)-; no antagonistic activity, +; antagonistic activity

b)-; mycelial growth nit inhibited, +; mycelial growth inhibited

c)-; non pathogenic, +; pathogenic

2. 길항세균 T-11의 병방제효과

유용균주로 선발된 T-11, Ao-15, Ao-7, P-50균주를 공시하여 병원세균과 10:1로 혼합한 후 팡이버섯자실체에 분무 접종한 후 발병억제 효과를 조사하여 T-11균주를 병방제효과가 좋은 균주로 최종 선발하였다(Fig. 19).

길항세균 T-11과 Ao-15를 병원세균과 혼합하여 병재배의 느타리버섯에 접종한 후 병방제효과를 조사한 결과는 Table 24와 같다. Ao-15균주에 비하여 T-11균주의 병방제효과가 높았으며 T-11:병원세균을 10:1(v/v) 비율로 섞어 처리하였을 때 87.5%의 방제가를 나타내었다(Fig. 20).

Table 24. Effect of biological control on the brown blotch of oyster mushroom in spawn bottle

Antagonistic isolate	Mixture ratio A : P ^{a)}	Infection rate(%)	Control value(%)
T-11	0:1	67.4	0
	5:1	27.0	59.9
	10:1	8.4	87.5
A-15	0:1	67.4	0
	5:1	41.5	38.4
	10:1	29.5	56.3

A: Antagonistic isolate, P: Pathogen *P. tolaasii*(P-1)

길항세균 T-11균주는 *P. tolaasii*에 대한 길항작용은 비교적 강한 반면에 비병원성 *Pseudomonas*에 대한 길항작용은 약하며 또한 느타리버섯에는 피해를 주지 않는 특징이 있으므로 이 균주는 세균성갈반병의 생물학적방제제로 이용 가능성이 있다고 생각하며 포장적용시험 및 발병억제기작에 관한 지속적인 연구가 필요하다고 생각한다.

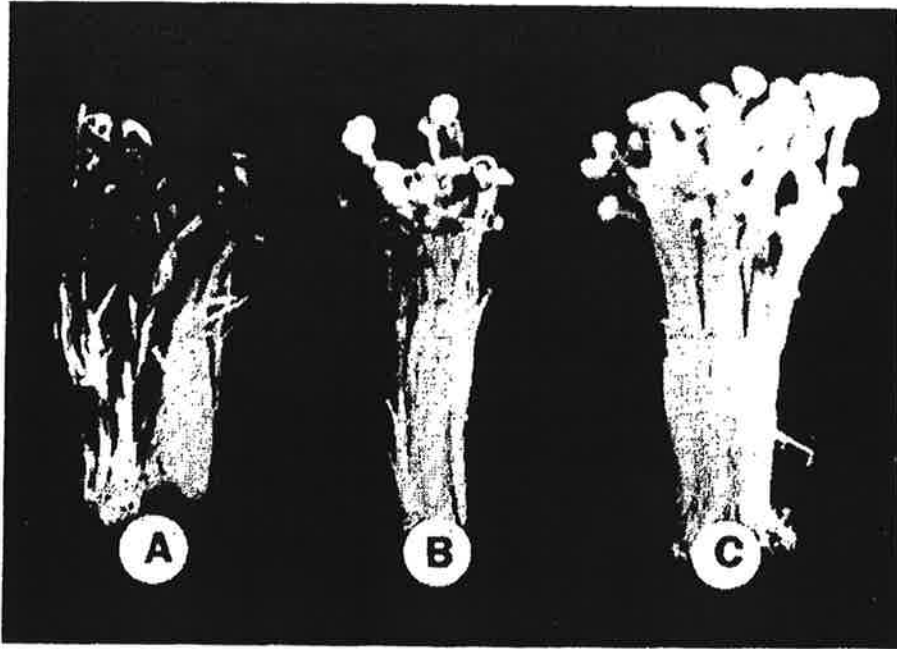


Fig. 19. 길항세균 (T-11균주)의 팽이버섯 병방제효과
 A=병원균, B=길항세균 : 병원균(5:1), C=길항세균 : 병원균(10:1)

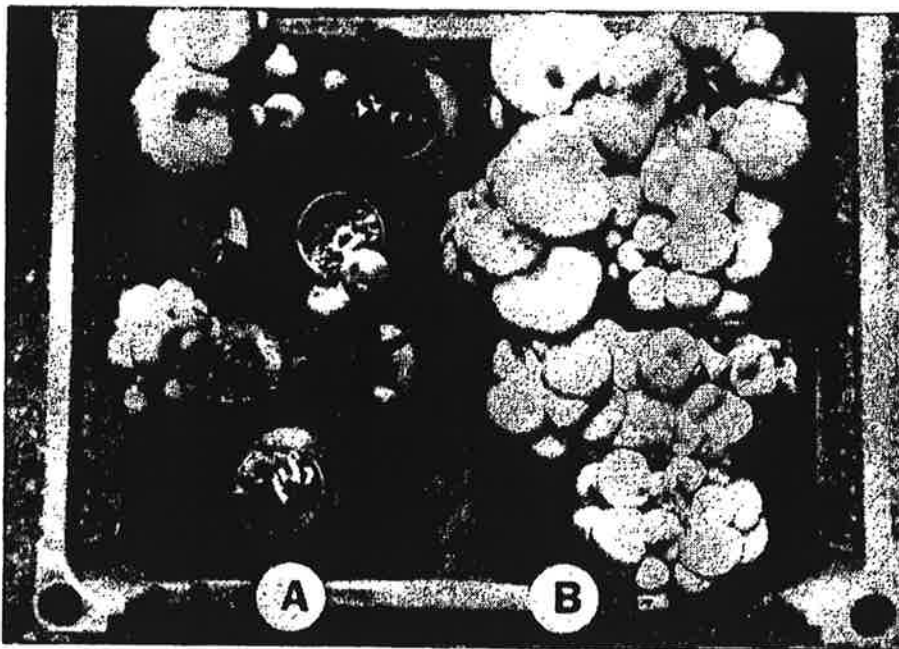


Fig. 20. 길항세균의 느타리버섯 세균성 갈반병 방제효과(병재배)
 (A=병원세균 처리, B=길항세균 : 병원세균(10:1) 혼합처리)

제 4절 요약

1. 균상배지(벗짚, 폐송) 및 느타리버섯 자실체에서 분리한 340개 세균 균주중에서 병원세균에 길항작용이 있는 *Pseudomonas* 12개 균주를 선발하였고 또한 병원세균에 길항작용은 없지만 느타리버섯의 군사생장 및 자실체 형성을 억제하지 않는 비병원성 *Pseudomonas* 15개 균주를 선발하였다. 길항균으로 선발된 12개 균주들의 느타리 생장에 미치는 영향을 조사하였던 바 T-11과 Ao-15 등 2개 균주를 제외한 10개 균주는 느타리버섯 군사 생장 또는 자실체 형성을 억제하였다.

2. 선발된 4균주의 병원세균에 대한 방제효과를 병재배의 느타리버섯과 팽이버섯 자실체를 이용한 접종실험으로 실시하였던 바 길항세균인 T-11균주를 병원세균과 10:1(v/v)비율로 처리하였을 때 87.5%의 높은 방제가를 나타내었다.

제 8장 느타리버섯 품종의 세균성 갈반병 저항성 검정

제 1절 서 언

느타리버섯은 버섯 발생온도를 기준으로 저온성, 중온성, 중고온성 및 고온성품종으로 구분한다. 저온성 품종은 버섯 발생에 적당한 온도가 10~16℃이며, 중온성 품종은 10~20℃, 중고온성 품종은 10~24℃, 고온성품종은 18~24℃이다(차 등 1997). 현재 국내에는 10여종의 느타리 품종이 보급되어 있으나 이 품종들의 세균성 갈반병에 대한 저항성 정도는 보고된 바 없다. 특히 최근 흑평을 비롯한 중국산 품종들이 비공식적으로 도입되어 재배가 확대되고 있으므로 이들 품종들의 병 저항성 정도를 검정할 필요가 있다.

본 연구는 국내에 보급되어 있는 주요 품종을 공시하여 병원세균을 인공 접종한 후 버섯의 발병정도를 조사하여 병 저항성 정도를 검정하였다.

제 2절 재료 및 방법

1. 공시품종

저온성 품종으로 원형느타리버섯, 원형느타리2호, 농기2-1호를, 중온성품종으로 농기 201호를, 중고온성품종으로 농기202호와 사철느타리 1호를, 고온성 품종으로 사철느타리 2호와 여름느타리를, 중국산 품종으로 흑평을, 그리고 톱밥재배용인 애느타리를 공시하였다.

2. 공시균주

균사생장억제율 검정 및 병원성 검정에 병원세균 *P. tolaasii*(P-1)를 공

시하였으며 군사생장억제를 검정에는 *P. reactans*(P-2)도 공시하였다.

3. 군사생장억제를 검정

원형느타리버섯을 비롯한 10개 품종의 느타리 군사를 YPDA배지 중앙에 각각 접종하고 일정한 간격을 두어(3.5cm) *P. tolaasii*와 *P. reactans*를 대치 배양한 후 27℃에서 배양하고 군사생장억제를 조사하였다.

$$\text{군사생장 억제율(\%)} = \frac{(\text{무처리의 군사생장정도} - \text{세균처리의 군사생장정도})}{\text{무처리의 군사생장정도}} \times 100$$

4. 자실체 검정

원형느타리버섯을 비롯한 10개 품종의 느타리버섯을 폐쇄상자배지(50×40×10cm) 재배하였다. 종균을 접종한 후 30일 배양된 균상에 10¹⁰cfu/ml 농도로 조절한 병원세균(*P. tolaasii*) 현탁액을 2일 간격으로 4회 분무접종하였고 버섯 발생후에 병 발생율을 조사하였다. 실험기간 중의 재배사내의 온도는 16~20℃였다.

제 3절 결과 및 고찰

1. 군사생장 억제율 검정

느타리버섯 10개 품종과 *P. tolaasii*를 대치배양할 경우 병원세균에 의한 군사생장 억제율을 조사한 결과는 Table 25와 같다. 공시한 10개 품종에서 품종간 차이 없이 *P. tolaasii*에 의하여 군사생육이 강하게 억제되었다. 한편 *P. reactans*도 느타리군사 성장을 억제하였다.

2. 자실체의 병저항성 검정

공시한 10개 품종을 폐쇄상자배지에서 배양한 후 병원세균을 접종하여 품종간 병저항성 정도를 조사한 결과는 Table 26과 같다. 원형느타리버섯, 농

기 2-1호, 농기 201호등 저온성, 중온성 품종들은 평균 이병율이 15.5~20.6%였으나 사철느타리, 여름느타리, 농기202호 등 중고온성, 고온성품종들은 평균 이병율이 5.6~7.4%로 비교적 낮은 이병율을 나타내었다. 중국산 품종인 흑평도 이병율이 15.0%로 국내의 저온성, 중온성품종과 비슷한 이병율을 나타내었다.

Table 25. Effect of *Pseudomonas tolaasii* and *P. reactans* on mycelial growth of different cultivars of oyster mushroom

<i>Pseudomonas</i> isolate	Inhibition ratio of mycelial growth(%)									
	원형느타리	원형느타리 2호	농기 2-1호	농기 201호	농기 202호	사철느타리 1호	사철느타리 2호	여름느타리	애느타리	흑평
<i>P. tolaasii</i> (P-1)	41.4	48.2	45.4	39.9	42.0	43.2	44.4	49.4	40.8	43.5
<i>P. reactans</i> (P-2)	29.3	23.3	28.1	26.1	26.5	31.4	23.1	27.5	22.1	25.5

본 저항성 검정은 재배사 온도가 16~20℃에서 수행된 결과이며 각 품종의 버섯발생온도에 적합한 환경(온도, 습도)에서 수행할 경우 이병율이 달라질 수도 있을 것이다.

Table 26. Reaction of oyster mushroom cultivars to *P. tolaasii*

Cultivar	Disease incidence(%)
원형느타리 버섯	17.0
원형느타리 2호	15.5
농기 2-1호	19.4
농기 201호	20.6
농기 202호	7.4
사철느타리 1호	6.2
사철느타리 2호	6.5
여름느타리	5.6
애느타리	13.7
흑 평	15.0

제 4절 요약

1. 원형느타리를 비롯한 10개 품종의 느타리 균사를 병원세균과 대치배양하여 군사생육 억제정도를 비교하였던 바 품종간 차이 없이 모두 군사생육이 강하게 억제되었다.
2. 공시한 10개 품종을 폐쇄상자배지에서 배양한 후 병원세균을 접종하여 품종간 저항성 정도를 조사하였던 바 원형느타리, 애느타리, 농기2-1호, 농기201호, 흑명 등 저온성, 중온성품종들은 평균 이병율이 15.5~20.6%였으나 사철느타리1호, 사철느타리2호 여름느타리, 농기202호 등 중고온성 품종들은 평균 이병율이 5.6~7.4%이었다.

제 9장 결 론

1. 느타리버섯 세균성갈반병에 관여하는 병원세균이 *Pseudomonas tolaasii*임을 세균학적 성질, 병원성 등을 조사하여 동정하였고, 이 병원세균의 신속하고 정확한 동정법, 진단법을 확립하기 위하여 효소면역측정법(ELISA)을 개발하였다. 이 ELISA법은 신속하고 정확하게 병원세균(*P. tolaasii*)을 동정할 수 있는 실용적인 방법으로 버섯재배 농가의 병 진단에 간편하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다. 병원세균 중에서 *P. tolaasii* 외에 *P. reactans*가 분리되었는데 이들의 병원성은 *P. tolaasii*보다 낮았다.
2. 병원세균의 전염원 및 전염경로 구명에 관한 연구에서 병원세균이 균상 배지(벼짚, 폐습), 저장수조의 물 및 버섯파리를 통하여 전염되고 있음을 구명하였다. 병의 예방을 위하여는 균상 배지 및 저장수조의 병원세균 오염여부에 관한 사전 진단과 철저한 배지살균 및 발효, 저장수조의 소독, 버섯파리구제가 필요함을 확인하였다.
3. 시판되는 항생제 33종 중에서 세균성갈반병 방제효과가 높은 것으로 tetracycline, kanamycin 및 kasugamycin을 선발하였으며 이들의 약효가 대조약제인 streptomycin(농용신수화제)보다 우수한 것을 확인하였다. 이들의 적정 사용 농도와 병 방제 효과를 구명하므로써 무분별한 항생제 남용을 막고 항생제 사용을 최소화하면서 병방제효과를 올릴 수 있을 것으로 기대된다. 특히 kasugamycin은 어독성이 매우 낮으며 쉽게 생분해되는 항생제로서 식용버섯의 농약으로서 실용화가 가능하다고 생각된다.

4. 식초, 목초액, 클로르칼크, 차아염소산나트륨, 오존과 같은 환경오염이 크게 문제되지 않는 저독성 소독제의 세균성 갈반병 방제 효과를 조사하여 이들 중 식초, 목초액 및 차아염소산나트륨에서 발병 초기의 병 방제 효과가 인정되었으나 재배사 실증실험에서는 방제가가 낮았다. 따라서 이들 소독제들은 병의 예방제로는 활용가능성이 있으나 방제약제로는 실용성이 없음을 제시하였다.
5. *P. tolaasii*에 길항작용이 있는 길항세균과 느타리버섯에 병원성이 없는 비병원성 세균균주들을 선발하고 이들의 세균성갈반병 방제효과를 실내 실험 및 병재배 실험으로 실시하여 T-11균주를 우수균주로 선발하였다. 농가의 활용가능성에 대하여는 병방제기작의 구명 등의 추가연구가 필요하다.
6. 느타리품종의 병 저항성 검정을 통하여 저온성, 중온성 품종들은 모두 세균성 갈반병에 감수성임을 밝혔고 병저항성 품종이라는 소문과 함께 시중에 유통되고 있는 흑평(중국품종)도 저항성 품종이 아님을 확인하였다.

제 10장 인용문헌

Alvarez A. M. and Lou, K. 1982. Rapid field identification of a bacterial pathogen by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). (Abstr.), *Phytopathology* 72(7):947.

Alvarez, A. M., Benedict A. A., and Mizumoto, C. Y. 1985. Identification of *Xanthomonads* and growing of strains of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* with monoclonal antibodies. *Phytopathology* 75(6):722-728.

Ayers, T. T and Lambert, E. B. 1995. Controlling Mushroom disease with chlorinated water. *Plant Disease Reporter* 39(11):829-836.

Bano, Z. and Strivastava, H. C. 1962. Studies on the cultivation of *Pleurotus* spp. on paddy-straw. *Food Science* 12:363-365.

Bashan, Y. and Okon, Y. 1981. Integrated control of bacterial blotch in Israel. *The Mushroom Journal* 97:29-33.

Bessette, A. E., Kerrigan, R. W. and Jordan, D. C. 1985. Yellow blotch of *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiology* 50:1535-1537.

차동열, 박정식, 유창현, 김광포, 전창성, 이두원. 1997. 느타리버섯 재배 기술과 경영. 농민신문사.

Chang, S. T., Buswel, J. A. and Chiu, S. W. 1993. Mushroom biology and mushroom products. The Chinese University Press.

Comstock, J. C. and Irey, M. S. 1992. Detection of the sugarcane leaf scald pathogen, *Xanthomonas albilineans*, using tissue blot immunoassay, ELISA, and isolation techniques. Plant Disease 76(10):1033-1035.

De Boer, S. H. 1987. Use of monoclonal antibodies to identify plant pathogenic bacteria. Can. J. Plant Pathol. 9:182-187.

Deveiller, E. and Bragard, C. 1992. Comparison of immunofluorescence and two assays for detection of *Xanthomonas campestris* pv. *undulosa* in seeds of small grains. Plant Disease 76(10):999-1003.

Dewey, F. M. 1988. Development of immunodiagnostic assays for fungal plant pathogens. Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference Council, Thornton Heath. pp.777-786.

Domen, H. Y. and Alvarez, A. M. 1978. Detection of *Xanthomonas campestris* in soil using a direct immunofluorescent technique. Proc. 4th Int. Conf. Plant Pathogenic Bacteria (Angers, Frana) 1: 301-305.

Fermor, T. R. and Lynch, J. M. 1988. Bacterial disease of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* : screening, isolation and characterization of bacteria antagonistic to the pathogen (*Pseudomonas tolaasii*). J. of Appl. Bacteriol. 65:179-187.

Fermor, T. R., Henry, M. B., Fenlon, J. S., Glenister, M. J., Lincoln, S. P. and Lynch, J. M. 1991. Development and application of biocontrol system for bacterial blotch of the cultivated mushroom. Crop Protection 10(4):271-278.

Geels, F. P. 1995. *Pseudomonas tolaasii* control by kasugamycin in cultivated mushroom(*Agaricus bisporus*). Journal of Applied Bacteriology 79:38-42.

Geels, F. P., Van Griensven, L. J. L. D. and Rutjens, A. J. 1991. Chlorine dioxide and the control of bacterial blotch on mushroom, caused by *Pseudomonas tolaasii*. Mushroom. Science XIII:437-442.

Goor, M., Vantomme, R., Swings, J., Gillis, M., Kersters, K. and De ley, J. 1986. Phenotypic and genotypic diversity of *Pseudomonas tolaasii* and white line reacting organisms isolated from cultivated mushrooms. J. Gen. Microbiol. 132:2249-2264.

Guillaumes, J., Houdeau, G., Germain, R., Oliver, J. M. 1988.

Amelioration de la lutte biologique contre *P. tolaasii* par utilisation de bacteriophages. Bulletin OEPP/EPP0. 18:77-82.

Healey, K. W. and Harvey, J. M. 1989. Control of *Pseudomonas tolaasii* by *Pseudomonas fluorescens*. Aust. J. of Biotechnol. 3:250-251.

Hildebrand, D. C., Schroth, M. W. and Sands, D. C. 1988. *Pseudomonas*: pp. 60-80 In: *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. 2nd ed. by N. W. Schaad. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota.

전창선, 차동열. 1988. 느타리버섯 병해발생조사. 농업기술연구소 시험연구 보고서 생물부편 794-800.

정환재. 1983. 느타리버섯의 벚짚배지 발효방법에 관한 연구. 한국균학회지 11:177-181.

김종완, 권순익, 강희진. 1995. 인공 재배버섯에 병을 일으키는 *Pseudomonas* 속 병원 세균에 관한 연구-2. 세균성 갈색점무늬병의 병원세균 *Pseudomonas tolaasii* 와 white line 형성균의 세균학적 성질. 한국식물 병리학회지 11(4):353-360.

김종완, 김근희, 강희진. 1994. 인공 재배버섯에 질병을 일으키는 *Pseudomonas*속 병원 세균에 관한 연구-1. 인공재배버섯의 부패 변성 원인 세균에 대하여. 한국 식물 병리 학회지 10(3):197-210.

Kitagawa, T., Hu, J. G., Ishida, Y., Kuhara, S., Koizumi M. and Matsumoto, R. 1992. A new immunoassay for *Xanthomonas campestris* pv. *citri* and its application for evaluation of resistance in citrus plants. *Plant Disease* 76(7):708-712.

Kitagawa, T., Sakamoto, Y., Furumi, K and Ogara, H. 1989. Novel enzyme immunoassays for specific detection of various *Fusarium* species. *Phytopathology* 5:551-556.

Lelliott, R. A., Billing, E. and Hayward, A. C. 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic Pseudomonads. *J. of Bacteriology* 29:479-489.

Liao, Y. M., Tu, C. C. and Jeng, J. J. 1980. Control of bacterial blotch of mushroom. *Taiwan Mushroom* 4:34-41.

Lyons, N. F. and Taylor, J. D. 1990. Serological detection and identification of bacteria of plants by conjugated *Staphylococcus aureus* slide agglutination test. *Plant Pathology* 39:584-590.

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

Nair, N. G. and Fahy, P. C. 1976. Commercial application of biological

- control of mushroom bacterial blotch. Aust. J. Agric. 27:415-422.
- Nair, N. G., and Fahy, P. C. 1973. Toxin production by *Pseudomonas tolaasii* Paine. Aust. J. biol. Sci. 26:509-512.
- Norman, D. J. and Alvarez, A. M. 1994. Rapid detection of *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae* in Anthurium plants with a miniplate enrichment/ELISA system. Plant Disease 78(10):954-958.
- Olivier, J. M., Guillaumes, J. 1981. Essais de lutte biologique contre la tache bacterienne. Mush. Sc. XI:353-367.
- Olivier, J. M., Guillaumes, J. and Martin, G 1978. Study of a bacterial disease of mushroom caps. In : Proc. 4th Int. Cont. Plant Pathogenic Bacteria, Angers, Frans, 1978, Part 2, pp. 903-916, Institut National de la Recherche Agronomoque, Angers.
- Paine, S. G. 1919. Studies in bacteriosis II. A brown blotch disease of cultivated mushrooms. Ann. Appl. Biol. 5:206-219.
- 박용환, 고승주, 김동수. 1975. 벚짚을 이용한 느타리버섯 재배에 관한 연구. 제1보. 재배재료에 관한 시험. 농사시험연구보고 19:93-97.
- Preece, T. F. and Wong, W. C. (1982). Quantitative and scanning electron microscope observation on the attachment of *Pseudomonas*

tolaasii and other bacteria to the surface of *Agaricus bisporus*.
Physiol. Plant Pathol. 21:251-157.

Royse, D. J., and P. J. Wuest. 1980. Mushroombrown blotch : effects of chlorinated water on disease intensity and bacterial populations in casing soil and on pilei. Phytopathology 70: 902-905.

신관철, 전낙범. 1991. 느타리버섯 세균성 갈반병의 병원균 분류 동정 및 생물학적 방제. 농사 논문집 34:1-10.

신관철. 1987. 느타리버섯 벗짚배지에 발생하는 유해균류. 학국균학회지 15:92-98.

Shirata, A., Sugaya, K., Takasugi, M and Monde, K. 1995. Isolation and biological activity of toxins produced by a Japanese strain of *Pseudomonas tolaasii*, the pathogen of bacterial rot of cultivated oyster mushroom. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 61: 493-502.

Suyama, K and Fuji, H. 1993. Bacterial disease occurred on cultivated mushroom in Japan. J. Agri. Sci. Tokyo Nogyo Daigaku 38:35-50.

陶山一雄, 河原林上一, 根岸寛光, 藤井 薄. 1987. White line 形成法による各種キノコからの *Pseudomonas tolaasii*의 検出. 日本植物病理學會報 53:71.

- Tolaas, A. G. 1915. A bacterial disease of cultivated mushrooms. *Phytopathology* 5:51-54.
- Tu, C. C., Liao, Y. M. 1981. Control of bacterial blotch of mushroom with bactericides. *Mush. Sc.* XI:313-323.
- Tucker, C. M. and Routin, J. B. 1942. The mummy disease of the cultivated mushroom. *Univ. Missouri Agr. Exp. Sta. Res. Bull.* 358: 27p.
- Van Vurdee, J. W. L. 1987. New approach in detecting phytopathogenic bacteria by combined immunoisolation and immunoidentification assays. *Bulletin OEPP/EPPPO Bulletin* 17:139-148.
- Wells, J. M., Sapers, G. M., Felt, W. F., Butterfield, J. E., Jones, J. B., Bouzar, H and Miller, F. C. 1996. Postharvest discoloration of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* caused by *Pseudomonas tolaasii*, *P. reactans* and *P. gingeri*. *Phytopathology* 86: 1098-1104.
- Wong, W. C and Preece, T. F. 1979. Identification of *Pseudomonas tolaasii*: the white line in agar and mushroom tissue block rapid pitting tests. *J. Appl. Bacteriol.* 47:401-407.
- Wong, W. C. and Preece, T. F. 1985. *Pseudomonas tolaasii* in cultivated mushroom(*Agaricus bisporus*)crop : effects of sodium hypochlorite on

the bacterium and on blotch disease severity. J. Appl. Bacteriol. 58:259-267.

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. 49:305-314.

Young, J. M. 1970. Drippy gill-a bacterial disease of cultivated mushrooms caused by *Pseudomonas agarici*, n. sp. N.Z.J. Agric. Res. 13:977-990.

Zarkower, P. A., Wuest, P. J., Royse, D. J and Myers, B. 1984. Phenotype traits of fluorescent *Pseudomonas* causing bacterial blotch of *Agaricus bisporus* mushroom and mushroom-derived fluorescent *Pseudomonas*. Can. J. Microbiol. 30:360-367.

산림청. 1993(제 23호). 임업통계연보, IV. 임업생산 및 공급, 1. 임산물 생산량, 버섯.