J. Fd Hyg. Safety 14(2), 167-171 (1999)

사과 푸른곰팡이병의 길항미생물의 분리 및 동정

이인선† · 조정일*

*계명대학교 식품가공학과, 조선이공대학 식품공업과**

Isolation and Identification of Antifungal Bacteria on Blue Mold in Apple

In-Seon Lee† and Jung-Il Cho*

Dept. of Food Science and Technology, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea

**Dept. of Food Technology, Chosun College of Science and Technology, Kwangju 501-759, Korea*

ABSTRACT – In order to screen the antagonistic bacteria which inhibit the growth of the apple pathogen, *Penicillum expansum*, we isolated an effective bacterial strain and investigated into the antifungal activity of the antagonist and it's identification. The eleven strains of bacteria which strongly inhibited *P. expansum* were isolated from the nature, and the best antagonistic bacterial strain designated as CH142, was selected. The antagonistic strain CH142 was identified to be the genus *Bacillus subtilis* based on morphological and biochemical characterization. The CH142 showed 55.9% of antifungal activity against the growth of *P. expansum*. By the treatment of the culture broth and the heat treated culture filtrate of it, the *B. subtilis* CH142 showed 90% and 15% of antifungal activity, respectively.

Key words □ Antagonistic bacteria, *Penicillum expansum*, *Bacillus subtilis* CH142

서 론

지금까지는 식물병 방제 중에서 생물학적 방제에 대한 연구는 주로 포장에서 발생하는 병에 대한 것이 주류를 이루어 왔다. 그에 비해 수확 후의 농작물에 발생하는 병에 대한 생물학적 방제는 상대적으로 연구가 미미한 실정이었고 이에 대해 관심을 갖게 된 것은 최근이다.[1] 그러나 경제적인 면에 있어서 수확된 농작물은 이미 비료나 농약 등의 처리로 인해 많은 투자가 이루어진 상태이므로 실제 그 피해는 포장에서의 발병에 의한 피해보다 손실이 크다고 하겠다.[2]

개발도상국에서의 농작물 수확 후의 손실은 5-50% 또는 그 이상으로 추정되며, 선진국에서조차 심각한 상황이다. 특히 저개발국에서는 저온 저장 시설의 부족이나 관리의 부실 등으로 인해 큰 손실을 나타내고 있다.[3]

최근에 이르러 농산물에서의 잔류 농약의 존재나 그 독성에 대한 위험이 일반인의 관심이 되고 있고,[4] 수출입시의 검역에서도 문제시되고 있어 보건 당국에서도 그에 대한 규제를 강화하고 있다. 특히 과실은 그것을 생식하기 때문에 더욱 문제가 되며, 농약을 사용하지 않거나 최소한으로 사용한 무공해 또는 저공해 과실에 대한 요구가 점차로 커지고 있다. 또한, 농약 사용 또한 약제 저항성 병원균의 발생으로 약효를 잃고 그 사용에 제한이 따르게 되었다. 그러므로 저장 병해에 대한 생물학적 방제가 관심을 끌게 되었다. 생물학적 방제의 성공 가능성이 Wilson 등[5] 에 의해 언급되어졌으며, 그 기술이 발달이나 최근의 연구 경향[6] 등이 종합 고찰되고 있다. 이러한 생물학적 방제에 대한 연구에서는 *Pseudomonas, Bacillus* 등의 세균[7] , *Trichoderma* 등의 곰팡이[8] 그리고 *Debaryomyces, Crytococcus, Candida* 등의 효모[9] 가 주로 이용되고, 이러한 생물학적 방제와 다른 방제법과의 혼용이 검토되고 있다[10].

본 연구에서는 사과등 과일류의 저장시 발생하는 푸른곰팡이병을 길항미생물을 이용한 생물학적으로 방제하기 위하여 길항균을 분리 · 동정하고자 하였다.

재료 및 방법

푸른곰팡이 병원균 분리 및 병원성 검정

사과 저장 중 푸른곰팡이병 증상을 나타내는 과실을 수

†Author to whom correspondence should be addressed.

집하여 병환부로부터 병원균 포자를 분리하여 공시하였다. 푸른곰팡이병 병반으로부터 푸른곰팡이를 분리하기 위하여 주요 사과재배단지를 현지 답사하면서 병징 및 표징별로 병반을 채집하여 병원균을 분리하였다[6]. 또한 농촌진흥청 농업과학기술원(NASTI; National Agricultural Science and Technology Institute) 및 원예연구소(HI; Horticultural Crop Institute of Research and Development)로 부터 사과병원균을 분양받아 본 실험실에서 분리한 병원균과 비교 및 검토하였다. 병원균을 분리하기 위하여 채집된 병반을 20℃, 상대습도 90% 이상의 항온항습실에서 3일간 습실처리후, 그리고 70% ethanol 및 5% sodium hypochlorite(NaOCl)로서 표면살균하고 병원균 선택용배지[potato dextrose agar (PDA) medium + streptomycine 200 μl/ml, pH 3.0]에 병반조직을 올려 놓고 25℃ 항온배양기에서 2~3일간 배양하여 균총(colony)을 형성시켜 병원균을 분리하였다.

자연계로부터 유효미생물분리

과실 표면으로부터 미생물을 분리하기 위하여, 사과 과실을 수집하고 그 표면을 살균수로 세척하여 그 세척한 액을 희석평판법에 의해 plate count agar(PCA)배지에 도말하고, 25℃에서 48시간 배양한 후 나타난 colony를 현미경하에서 검경하여 미생물를 분리한다. 또한, 토양으로부터 미생물 분리를 위해서 지표로부터 5~20 cm토양을 채취하고 희석평판법 및 토양평판법을 이용하여 단일 균주를 분리한다. 길항미생물 분리방법[5]은 채취한 시료를 tris-Cl buffer solution(pH 7.5) 100ml에 넣고 진탕배양을 10분 정도 실시한 후 배지내에 들어있는 미생물을 생리식염수(0.85%, NaCl)로 희석하여 영양한천배지[nutrient agar(NA) plate]에 희석하여 농도별로 도말하였다. NA plates는 30℃ 항온배양기(incubator SW-901)에서 24~36시간 정도 배양한 후 균주를 분리하여 사면배지에 보관하였다. 분리된 미생물은 영양한천배지에 접종하고 배양하여 단일 colony를 형성시켜 병원균과의 길항력 실험에 사용하였다.

길항미생물 선발 및 동정

길항력 실험은 병원성 사상균의 생육에 좋은 PDA 배지를 이용하였고, 배양기내의 배양온도 역시 25℃ 정도로 곰팡이의 생장에 양호한 온도로 배양하여 병원성 사상균의 생육에 적합한 환경조건에서 병원균에 대한 길항력이 우수한 세균성 균주를 분리하였다. 길항균 선발방법은 PDA 평판배지 중앙에 병원균을 접종하여 25℃ 내외에서 24시간 정도 배양한 후 그 주변에 분리한 균주를 양쪽에 접종하여 25℃ 내외의 온도에서 7일 정도 배양하면서 저지대(inhibition zone)를 형성하는 균주를 길항균으로 선발하였다. 생장저지율은 PDA 평판배지에서 병원균과 7일간 대치배양하면서 병원균 균총(colony)의 직경을 측정하여 무처리구와 비교하여 백분율로 나타내었다.

길항균 동정은 길항미생물의 동정은 사과병원균에 대해서 길항력이 우수한 균주를 동정하기 위하여, Bergey's mannual of systematic bacteriology,[7] Microbiological method,[8] the Procaryotes[9] 등의 방법에 의하여 미생물의 형태적 성질, 배양적 특성 및 생리 생화학적 성질 등을 검토하였다.

길항균 살포에 의한 푸른곰팡이의 억제효과

길항균을 살포하였을 때 푸른곰팡이에 대한 길항력을 검토하기 위하여, PDA배지에 *P. expansum*를 접종하여 24시간 배양한 후 완전영양배지(nutrient broth; NB)에서 24시간 배양한 길항균을 0.5 ml 살포하였다. 길항균이 살포된 *P. expansum*를 25℃ 배양기에서 7일간 배양하여 길항균을 무처리한 대조구와 비교하였다.

열처리한 길항균 배양액이 푸른곰팡이의 억제효과

열처리한 길항균 배양액이 푸른곰팡이에 대한 길항력이 있는지를 확인하기 위하여 길항균을 완전영양배지(nutrient broth; NB)에서 24시간 배양한 후 균체를 제거하고 원심분리(12,000 rpm, 10 min, 4℃)하여 상징액을 얻은 후 121℃ (1.3기압)에서 15분간 고압멸균 하였다. 푸른곰팡이는 PDA 배지에 24시간 배양한 후 배양된 *P. expansum*에 0.5 ml을 직접 살포 하여 25℃ 배양기에서 7일간 배양하여 길항균을 무처리한 대조구와의 억제 정도를 비교하였다.

결과 및 고찰

자연계로부터 미생물의 분리

유효 길항미생물을 자연계로부터 분리하기 위하여 전국 각지에서 수집된 시료를 실험방법에서와 같이 처리하여 단일균주를 3,000여종 분리하였다. 분리된 미생물은 영양한천배지에 접종하여 colony를 형성시킨 후 냉장 보관하면서 병원균과의 길항력 실험에 사용하였다.

푸른곰팡이 병원균 분리 및 수집

전남지방 주요 사과단지를 현지 답사하면서 병징 및 표징별로 병반을 채집하여 사과의 병해인 푸른곰팡이병원균인 *Penicillum expansum*을 분리하였다(Table 1). 또한 분리한 곰팡이 *P. expansum* CP201은 사과에서 푸른곰팡이의 전형적인 병증을 보여주어 본 실험의 공시균으로 하였다.

푸른곰팡이병균에 대한 길항미생물의 선발

Table 1. List and pathogenicity of *Penicillum expansum* isolated from diseased apple

Apple pathogenic fungi	Source	Pathogenicity(cm)**
Penicillum expansum CP201	This study	3.2
Penicillum expansum CP202	This study	3.1
Penicillum expansum CP203	This study	3.0
Penicillum expansum	NASTI*	3.3

*NASTI : National Agricultural Science and Technology Institute
**Pathogenicity(cm) : diameter of infection

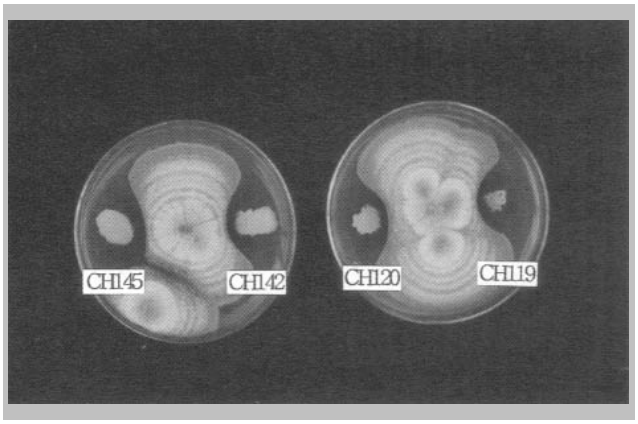

Fig. 1. Inhibition effects of antifungal bacteria CH142, 119, 145, 120 against apple pathogen, *Penicillum expansum* CP201(PE) on Potato Dextrose Agar(PDA) plate for 7 days at 28°C.

토양이나 잎에서 분리한 미생물 2,500여종 가운데 사과 푸른곰팡이 병원균에 대한 길항미생물을 선발한 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 그림에서 보는 바와 같이 길항균 CH142의 길항력이 가장 우수한 것으로 나타났으며 CH119, CH145, CH120 순서로 길항력을 보여주었다.

Table 2 에서 보는 바와 같이 CH142는 사과 푸른곰팡이병원균에 대한 저지율이 55.9%로 가장 우수한 미생물인 것으로 나타났으며, 그 다음으로 CH119(51.5%), CH145(50.0%), CH120(44.1%)순서로 길항력이 좋았다. 본 연구에서 분리한 길항미생물은 다른 곰팡이나 식물병원균에 대하여도 길항력이 있을 것으로 생각된다. 나아가서는 길항

Table 2. Zone of inhibition of the each antagonists against apple pathogen, *Penicillum expansum* on PDA media for 7 days at 28°C

Pathogen \ Isolated Microoganisms	CH142	CH119	CH145	CH120
Penicillum expansum CP201	55.9	51.5	50.0	44.1

$$\text{Zone of inhibition}^*(\%) = \frac{NT-T}{NT} \times 100$$

NT ; colony diameter of no treatment(mm)
T ; colony diameter of treatment(mm)

Table 3. Characteristics of antifungal bacteria CH142

Characteristics \ Strain	*Bacillus subtilis*	CH142
Cell diameter > 1.0 m	-	-
Spores round	-	-
Endospore	+	+
Gram stain	+	+
Form	rod	rod
Sporangium swollen	-	d(+/-)
Parasporal crystals	-	-
Catalase	+	+
Voges-Proskauer test	+	+
pH in V-P broth		
< 6	d(+/-)	d(+/-)
> 7	-	-
Acis from		
D-Glucose	+	+
L-Arabinose	+	+
D-Xylose	+	-
D-Mannitol	+	+
Gas from glucose	-	-
Hydrolysis of		
Casein	+	+
Gelatin	+	+
Starch	+	+
Utilization of		
Citrate	+	+
Propionate	-	-
Degradation of tyrosine	-	-
Deamination of phenylalanine	-	+
Egg-yolk lecithinase	-	d(+/-)
Formation of		
Indole	-	-
Dihydroxyacetone	ND	ND
NaCl and KCl required	-	-
Allantoin or urate required	-	-
Growth at pH		
6.8, nutrient broth	+	+
5.7	+	+
Growth in NaCl		
2%	+	+
5%	+	+
7%	+	
10%	ND	d(+/-)
Growth at		
5℃	-	-
10℃	d	d
30℃	+	+
40℃	+	+
50℃	d	d
55℃	-	-
65℃	-	-
Growth with lysozyme present	d	d

Symbols : -, 90% or more are negative ; +, 90% or more are positive
d, 11 ~ 89% are positive ; ND, no data available

균이 분비하는 길항물질을 분리 정제하여 길항물질 본체를 규명하는 연구를 하여할 것으로 생각된다.

길항균 동정

사과푸른곰팡이 병원균에 대해서 길항력이 우수한 균주인 CH142를 동정하기 위하여 미생물의 형태적 성질, 배양적 특성 및 생리화학적 성질 등을 검토한 결과 *Bacillus sp.*로 동정되었다(Table 3).

Bacillus sp. CH142는 약간의 운동성을 갖는 호기성 및 혐기성 단간균으로 4℃와 42℃에서 생육하지 않고 포자를 형성하는 Gram 양성균으로서 젤라틴 액화능과 starch 분해능은 있었고, catalase가 양성, citrate는 양성, nitrate reduction은 양성, indole 검사는 음성이었다. Methyl red 반응은 음성, VP반응은 약하게 나타났으며, H2S생성은 K/A이었고 당 분해능은 포도당, xylose, mannitol arabinose가 양성으로 나타났다. 본 연구에서 분리한 균주와 비교 균주인 *Bacillus subtilis*를 비교 검토한 결과 형태학적, 생리적 및 생화학적 특성이 거의 동일한 것으로 보였다.

이러한 결과를 토대로 Bergey's manual of systematic bacteriology, microbiological method 등에 기술된 분류 기준에 따라 CH142 균주는 Bacillus subtilis 또는 그 유연균으로 추정되었다. *B. subtilis* CH142로 명명하여 실험에 제공하였다.

길항균 살포에 의한 푸른곰팡이의 억제효과

길항균을 살포하였을 때 푸른곰팡이에 대한 길항력을 검토하기 위하여, PDA배지에 *P. expansum* CP201을 접종하여 24시간 배양한 후 완전영양배지(nutrient broth; NB)에서 24시간 배양한 길항균을 0.5m*l* 살포하였다. 길항균이 살포된 *P. expansum* CP201을 25℃ 배양기에서 7일간 배양하여 길항균을 무처리한 대조구와 비교하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 푸른곰팡이병원균에 길항균 *Bacillus subtilis* CH142 배양액을 살포하여 25℃에서 일주일간 배양하였을 때 푸른곰팡이병원균인 *P. expansum* CP201의 생육이 90%이상 억제되었다. 따라서 본 연구에서 분리한 길항균을 저장중인 사과에 살포하였을 때에 푸른곰팡이병을 방지 할 수 있을 것으로 기대된다.

열처리한 길항균 배양액이 푸른곰팡이의 억제효과

길항균의 길항물질이 내열성인지의 여부를 알아보기 위하여 길항균의 배양액을 열처리하여 길항력을 시험하였다. 먼저, 길항균 배양액의 열처리는 *Bacillus subtilis* CH142를 완전영양배지(nutrient broth; NB)에서 배양한 후 균체를 원심분리법으로 제거하고 상징액을 열처리하였다. 푸른곰팡이

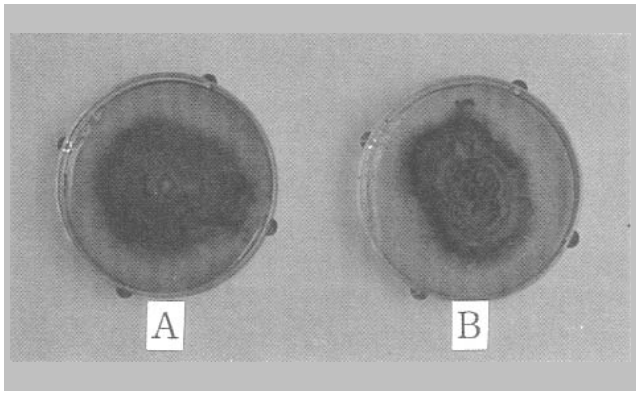

Fig. 2. Growth inhibition of *Penicillum expansum* by antagonistic bacteria.
P. expansum were grown on PDA at 24hrs and treated by antagonist, *Bacillus subtilis* CH142.
A: *P. expansum* CP201
B: *P. expansum* with *B. subtilis* CH142

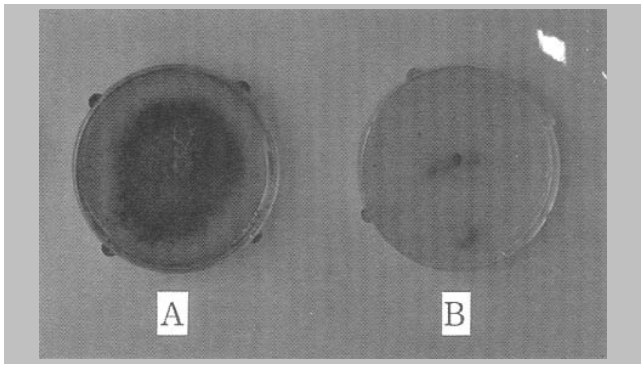

Fig. 3. Growth inhibition of *Penicillum expansum* by heat treat culture broth of antagonistic bacteria.
P. expansum were grown on PDA at 25℃ for 24hrs and treated by heat treat(121℃, 15min) culture broth of antagonist, *Bacillus subtilis* CH142.
A: *P. expansum* CP201
B: *P. expansum* with *B. subtilis* CH142

는 PDA배지에 접종하여 배양한 후 열처리한 길항균 배양액을 직접 살포하여 억제 정도를 살펴본 결과 약 15%정도의 길항력을 보여주어 길항균이 분비하는 길항물질이 어느 정도 열에 안정함을 보여주었다 (Fig.4). 따라서 본 연구의 결과를 토대로 하여 실제 사과과실에의 푸른곰팡이 병원균을 접종하고 실제로 방제효과를 검토하여 농약공해로부터 벗어나 안전식품생산에 큰 역할을 할 것으로 생각된다.

감사의 말

본 연구는 1998년도 계명대학교 비사연구기금으로 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

국 문 요 약

사과 저장중에 발생하는 푸른곰팡이병원균에 대한 길항미생물을 찾기 위하여 자연계로부터 유용미생물을 분리하여 *Penicillum expansum*에 대한 길항력 검정과 동정을 하였다. 자연계로부터 얻은 3,000여종의 미생물중에서 푸른곰팡이병원균에 대하여 길항력이 우수한 미생물을 1차적으로 11종 선발하였으며, 이중에서 가장 길항력이 뛰어난 미생물을 최종적으로 CH142를 선발하였다. 길항력이 우수한 CH142의 형태적 성질, 배양적 특성 및 생리 생화학적 성질 등을 조사하여 비교 검토한 결과 *Bacillus subtilis*와 유사한 균으로 동정되었다. 분리한 길항균 Bacillus subtilis CH142는 푸른곰팡이병에 대한 55.9%의 높은 생장억제력을 보였으며, 한천배지에서 *Penicillum expansum* 접종 후 길항균처리와 열처리한 길항균 배양액을 처리하였을때 각각 90%와 15%이상 길항력을 보여주었다.

참고문헌

1. Kelman, A.: The importance of reserch on the control of postharvest disease of perishable food crops. *Phytopathology*, **79**, 1374 (1989).
2. Wilson, C. L. and Pusey, P. L.: Potential for biological control of postharvest plant diseases. *Plant Dis.*, **69**, 375-378 (1985).
3. Eckert, J. W. and Ogawa, J. M.: Thechemical control of postharvest disease: Subtropical and tropical fruits. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **23**, 421-454 (1985).
4. Chalutz, E., Droby, S. and Wilson, C. L.: Biological control of postharvest disease. *Israel Agresearch*, **3**, 107-118 (1989).
5. Wilson, C. L. and Wisniewski, M, E.: Biological control of postharvest disease of fruits and vegetables: an emerging technology. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **27**, 425-441 (1989).
6. Wisniewski, M. E. and Wilson, C. L.: Biological control of postharvest disease of fruits and vegetables: Recent advances. *Hortscience*, **27**, 94-98 (1992).
7. Janisiewica, W. J. and Roitman, J.: Postharvest Mucor rot control on apples with *Pseudomonas cepacia*. *Phytopathology*, **77**, 1776 (1987).
8. Gullino, M. L.: Control of Botrytis rot of grapes and vegetables with Trichoderma spp. In Biological control of plant Diseases, Plenum press, NY. pp125-132 (1992).
9. Wilson, C. L. and Chalutz, E.: Postharvest biological control of Penicillium rots of citrus with antagonistic yeasts and bacteria. *Sci. Hort.* **40**, 105-112 (1989).
10. Pusey, P. L.: Enhancement of biocontrol agents for postharvest diseases and their integration with other control stategies. In Biological control of Postharvest diseases-therory and practice, CRC Press Inc. pp. 77-88 (1994).
11. Janisiewicz, W. J.: Enhancement of biocontrol of blue mold with the nutrient analog 2-deoxy-D-glucos on apples and pears. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 2671-2676 (1994).
12. Droby, S., Chaultz, E., Wilson, C. L. and Wisniewski, M.: Characterization of the biocontrol activity of Debaryomyces hansenii in the control of Penicillium digitatum on grapefruit. *Can. J. Microbiol.*, **35**, 794-800 (1989).