J. Fd Hyg. Safety 16(3), 232–240 (2001)

느타리버섯에서의 *Pseudomonas tolaasii* 오염 연구

이혜영 · 장금일 · 김광엽†
충북대학교 식품공학과

Study on the Contamination of *Pseudomonas tolaasii* in Oyster Mushroom

Hye-Young Lee, Keum-Il Jang and Kwang-Yup Kim†
Dept. of Food Science & Technology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

ABSTRACT – One hundred twenty five bacterial isolates were obtained from the brown blotch-diseased oyster mushrooms collected from markets. Among them, 45 were determined as pathogenic bacteria and white line forming organisms(WLFO) were 6 strains and white line reaction organisms (WLRO) were 6 strains. All of the white line forming isolates were identified as *Pseudomonas tolaasii* which is a known pathogen of brown blotch disease of oyster mushroom by GC-MIS(Gas chromatography-microbial identification system). Six of the white line reacting organisms were identified as *P. chlororaphis*, *P. fluorescens* biotype A and type C. The rest of them were *P. gingeri*, *P. agarici*, *P. fluorescens* biotype B, *P. chlororaphis*, non-pathogenic *P. tolaasii*, *P. putida* biotype A and B etc. For spectrum of activity of tolaasin, culture filtrates from pathogenic isolates were examined by browning of mushroom tissue and pitting of mushroom caps. The weak pathogenic bacteria didn't induce browning or pitting of mushroom tissue. On the other hand, strong pathogenic isolates showed browning and pitting reaction on mushroom. An extracellular toxin produced by *P. tolaasii*, was investigated. The hemolysis activity test of 6 strains identified as *P. tolaasii* were 0.8~0.9 at 600 nm and 3 strains of WLRO were 0.9~1.0 and *Pseudomonas* spp. were 1.0~1.2. Observation of fresh mushroom tissue using confocal laser scanning microscopy was carried out for images of optical sectioning and vertical sectioning. Also images of brown blotch diseased oyster mushroom tissue after contamination *P. tolaasii* was obtained by CLSM.

Key words □ oyster mushroom, brown blotch disease, *Pseudomonas tolaasii*, confocal microscopy, membrane fatty acid analysis

느타리버섯에서 발생하는 세균병은 갈변병(褐變炳) 내지 갈반병(褐斑病)으로 불리고 있는데 주요 병원균으로 *Pseudomonas tolaasii*이 보고되고 있으며1~4) 이 균에 의한 질병이 가장 치명적인 병해로[5] 알려져 있다. 그 외에도 *P. agarici*, *P. gingeri*, *P. cepacia*, 기타의 미정립된 *Pseudomonas* spp., *Athrobacter* spp., *Erwingella americana* 등에 의한 버섯에서의 다양한 세균병이 있는 것으로 알려져 있다[6~9].

*P. tolaasii*은 세포외독소인 tolaasin을 생성 · 분비하는데[10] 이 독소는 molecular weight 1,985 Da.의 저분자량 물질이며 N-terminus에 β-octanoic acid group의 8개의 아미노산 잔기로 구성된 lipodepsipeptide이며[11~14] 곰팡이나 버섯의 균류, 세균, 동 · 식물의 원형질막(plasma membrane)을 파괴하며 적혈구를 용혈하는 특성을 가졌다[13,15,16]. Tolaasin은 단독으로 질병의 병징을 나타내는 병원성 인자로서[8,11] 느타리 자실체 내의 세포 간극에 독소가 분비되어 생체막을 관통하는 구멍(pore)을 형성하여 planar lipid bilayer에 막 내외의 이온을 통과시키는 이온통로(ion channel)를 만든다[8,17,18]. 이온통로는 채널을 개폐하는 게이트와 통과하는 이온을 선택하는 필터 그리고 이온이 통과하는 통공의 역할을 한다. 생체막에는 이온 능동수송을 담당하는 펌프로써의 단백질이 있어 그 작용으로 세포 내외에 각종 이온의 농도차, 즉 전기화학적인 전위차가 형성이 되고 이 농도차에 의해 이온은 이온통로를 통해 수동적으로 이동이 되는데 이 이온통로는 선택적으로 양이온(Fe^{2+})만을 통과시키므로[17] 콜로이드 삼투압의 용해(colloid osmotic lysis)가 일어나 세포막의 붕괴와 세포내의 구조를 파괴한다[8,17]. 또한 대기중의 산소와 tyrosinase가 활성화되어 버섯 세포의 액포내에 방출된 phenols물질과 반응하여 갈변을 일으키며[19~22] 버섯의 안쪽보다 바깥 표면에서 산소와 더 잘 반응하므로 tyrosinase의 활

†Author to whom correspondence should be addressed.

성이 3배 이상 높아 버섯 표면에서 갈변이 더 심하게 나타난다[7,22]. Tolaasin은 생물학적 계면활성(biosurfactant)의 특성이 있어 버섯 표면에서의 수분의 표면장력을 감소시킨다[8,23]. 따라서 *P. tolaasii*가 상대습도가 80%이상의 포화수분환경을 통해 자실체로 함께 이동을 하면 증식을 하여 tolaasin을 분비하고 biosurfactant에 의해서 수분의 표면장력을 낮춰 버섯 자실체의 전체로 균이 확산되어 변패를 일으킨다[8].

현재 느타리버섯 세균성 갈변병의 연구로 비병원성 *Pseudomonas* spp.인 WLRO와 P. tolaasii의 특이상호반응에 의한 white line 형성[8,15,24], 양송이 또는 느타리버섯에서의 browning-pitting 반응[24-26] 및 항혈청과의 반응[11,13,15] 등을 이용한 신속하고 간편한 *P. tolaasii* 신속 검색 및 동정이 확립되어 있다. 또한 PCR에 의한 신속 검출[15,27,28]과 항PT-항혈청을 이용한 효소면역측정법(ELISA)[1]등이 개발되고 있다. 갈변병 방제에 관한 연구로 갈반병의 방제효과가 높은 tetracycline, kanamycin 및 kasugamycin 등의 항생제, 식초, 목초액, $CaCl_2$, NaOCl, 오존과 같은 환경오염이 크게 문제되지 않는 무공해 소독제 등도 연구 개발 중에 있다[6].

본 연구에서는 시장에서 유통중인 느타리버섯의 갈변병을 일으키는 병원성 *Pseudomonas* spp.를 조사하고 각 세균의 세포 지방산 조성에는 차이가 있다는 사실에 근거하여 미생물 신속 동정기를 이용함으로 그 지방산을 분석하고 동정하였으며 느타리 갈변병의 치명적인 병징을 나타내는 *P. tolaasii*의 오염을 조사하였다. 또한 공초점 레이저 현미경(Confocal Laser Scanning Microscopye; CLSM)[29,30]을 이용하여 신선한 버섯의 조직 관찰[31,32]과 자연 갈변되었을 때의 조직 관찰 그리고 *P. tolaasii*에 의해 오염되는 갈변병 버섯의 조직을 시간 경과에 따라 비교 관찰하였다.

재료 및 방법

변패버섯에서의 원인세균의 분리

12~2월, 3~5월, 6~9월로 기간을 나누어 각기 다른 농산물 시장에서 변패된 느타리버섯을 수집하여 갈변병의 원인 균주의 1차 분리에 사용하였다. 수집된 갈변병의 느타리버섯에서 변패된 부위를 잘라내어 멸균 pak에 0.85% 생리식염수와 함께 넣고 실온에서 30분동안 stomacher(Stomacher 400, Seward, England)로 마쇄한 후 단계별 희석하여 King's mediun B(KB, BBL, Cockeysville, Maryland, USA) 평판배지에 도말하였으며, 25°C에서 24~48시간 배양하여 오염균주를 분리하였다. 순수 분리된 세균은 nutrient broth(NB, BBL, Cockeysville, Maryland, USA)와 20% glycerol(Shinyo pure chemical Co., Osaka, Japan)를 첨가한 배지에 접종하여 -80°C에 보관하였다.

병원성 검정

병원성 검정을 위한 방법으로 browning-pitting test[24-26]를 실시하였으며 양송이 버섯 자실체를 이용하였다. Petri dish 안에 멸균수로 적신 여과지를 넣어 습실 상태의 조건을 만들어 준 후 양송이 버섯의 갓조직을 여과지 위에 넣고 배양한 분리 세균의 현탁액(6×10^7~10^9 CFU/ml) 20 μl를 버섯 갓의 표면에 접종하여 25°C 배양기에 두면서 24시간 간격으로 갈변과 버섯조직의 함몰 여부를 조사하였다.

White Line Test

본 연구에서는 *Pseudomonas tolaasii* ATCC 51309, WLRO 16-1C, WLRO 502-3(G-23)를 충북대학교 농생물학과에서 분양받아 실험에 사용하였다. White line test(8,15,24)는 분리된 균주와 분양받은 WLRO (WLRO 16-1C, WLRO 502-3(G-23))를 Pseudomonas Agar F 평판배지 위에서 1~2 cm 간격을 두고 streak 한 후 25°C에서 24시간 정도 배양했을 때 분리균주와 WLRO사이에 흰색침강선(white line)이 형성하였는지를 조사하였으며, 그 결과 WLRO를 선발하였다. 변패된 느타리버섯에서의 분리균주에서의 WLRO는 분양받은 *P. tolaasii*와 white line test를 같은 방법으로 실시하여 white line 형성여부를 조사하였다.

미생물동정 전처리과정

미생물의 동정을 위한 전처리는 KB에서 순수 배양된 각각의 선발균을 trypticase soy broth agar(TSBA, Difco, Maryland, USA) 평판배지에 streak하여 28°C에서 24시간 동안 배양하고 harvest, saponification, methylation, extraction, base wash의 5단계 과정을 실시하였다. Saponification은 reagent 1(NaOH 45 g/methanol 150 ml/D.W 150 ml)을 넣고 거칠게 흔든 후 100°C 25분 중탕하여 세포막 또는 세포벽의 지질로부터 지방산을 분리였다. Methylation은 reagent 2 (methanol 275 ml/6N-HCl 325 ml)를 넣고 80°C에서 10분 정도 중탕하여 지방산에 methyl ester를 형성하여 지방산의 기화를 촉진한 후 급냉하였다. Reagent 3(hexane 200 ml/methyl-tert butyl ether 200 ml)을 시료가 든 tube에 넣고 10분 동안 orbital rotator로 부드럽게 섞어준 후 지방산을 수용층에서 유기층으로 전이하고 유기층만을 분리하는 extraction단계를 거친 후, 마지막 단계인 base wash는 GC 분석에 사용할 정제된 지방산을 얻기 위해 reagent 4(NaOH 10.8 g/D.W 900 ml)를 넣고 5분 정도 교반한 후 유기층만을 재분리하였다.

GC-MIS 의한 선발균 동정

각 시료는 gas chromatography를 이용하여 지방산에 대한

각 peak의 정성·정량 데이터를 얻고 microbial identification system(MIDI; Microbial ID, Inc., Newark, Delaware U.S.A)의 sherlock software내의 있는 표준미생물의 library의 fatty acid profiles과 비교하여 자동적으로 data화함으로써 미생물을 동정하였다. GC는 hewlett-packard 6890 series로 capillary column (ultra2, nonpolar fused silica, 23m-diameter × 0.25mm-ID × 0.33-film thickness)을 사용하였다. Injector는 split injection port를, detector는 flame ionization detector를 사용하였고, N_2, H_2, air의 순도는 99.9999%로 사용하였으며 각각의 유속은 30, 30, 400 ml/min 이었다. GC분석상 조건으로 injection temperature는 250°C, detector temperature는 300°C, oven temperature는 170~300°C이었으며, 시료 분석 시간은 20.6분이었다.

선발균의 toxin 생성능 실험

독소 생성을 검정하고자 하는 균의 세포 배양 여과액을 신선한 버섯에 접종하여 조사하였다[8]. 우선 세포 배양 여과액은 선발된 균을 KB에 접종하여 48시간동안 진탕배양 (25°C, 200 rpm)한 후 25°C에서 9000 rpm으로 30분 동안 원심분리(micro high speed centrifuge, VS-15000CFN, Vision Scientific Co.)를 실시하고 그 후 세균세포를 제거하고 상층액 만을 분리, 막여과(0.45 μm)를 통하여 여과하여 조제하였다. 다음 세포 배양 여과액을 버섯의 자실체 표면에 0.5 ml 정도 접종하여 조직의 갈변과 함몰 여부를 조사하였다.

적혈구 용혈 활성 실험

25 mM $CaCl_2$를 함유한 Hepes buffered saline(150 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM Hepes, 1 mM $MgSO_4$ per liter, pH 7.4) 4 ml와 defibrinated sheep blood(Korea Media) 0.5 ml, 세포 배양 여과액 0.5 ml를 첨가하여 멸균된 test에 넣고 항온수조에서 1~2시간 방치한 후 상층액을 취하여 spectrophotometer(DU-650, Beckman, U.S.A)로 600 nm에서 흡광도를 측정하여 용혈활성을 조사하였다.

CLSM에 의한 느타리버섯 조직 관찰

신선한 버섯 조직과 노쇠한 버섯을 멸균된 칼로 1 × 1 cm^2씩 잘라내어 각각 멸균된 에핀돌프 튜브에서 0.1% acridine orange (AO, sigma)를 이용하여 30초간 염색한 후 2~3회 수세하고 풍건하여 조직내 수분을 완전히 제거하였다. 수분이 제거된 버섯 조직 단편을 슬라이드 글라스 위에 놓고 버섯 조직 주위를 단편의 두께만큼 두꺼운 종이로 간격을 준 후 커버 글라스를 덮고 테이프로 고정하였다. 그리고 공초점 레이저 현미경 (CLSM, MRC-1024, BioRad Inc., Hemel hempstead, England)을 이용하여 100 × 10 배율, 512 × 512 픽셀 상태로 488 nm(522DF32 filter)에서 광학적 절편화(optical sectioning)와 수직적 절편화(vertical sectioning)하여 버섯의 조직을 비교 관찰하였다.

느타리 버섯의 *P. tolaasii*의 오염 관찰

*P. tolaasii*는 PAF(Difco, Maryland, USA)에서 48시간 동안 진탕배양(25°C, 200 rpm)하였다. 그리고 신선한 버섯의 자실체를 0.1% AO로 염색한 후 3~4회 수세하고 풍건한 다음 배양된 *P. tolaasii*를 2시간동안 접종하였다. *P. tolaasii*가 접종된 후 0, 3, 10, 20시간마다 버섯자실체를 멸균된 칼로 1 × 1 cm^2로 잘라내어 조직을 슬라이드 글라스 위에 올려두고 커버 글라스로 덮은 후 테이프로 고정시켰다. 공초점 레이저 현미경(CLSM)의 RGB방법으로 100 × 10배율, 512 × 512 픽셀에서 버섯 조직은 488 nm(522DF32 filter)에서 녹색 형광의 영상을 광학적 절편화(optical sectioning)하여 관찰하였다.

결과 및 고찰

변패버섯에서의 원인균주 분리

재래시장에서 유통되는 느타리 버섯중 변패된 것을 수집하여 버섯의 오염균주를 125 strains 분리하였고 Table 1에 나타내었다. 재배사의 경우 버섯에서의 갈변병의 피해는 주로 겨울철에 발병율이 높고 피해도가 큰 것으로 조사된 바 있다[6,33]. 병 발생은 상대습도가 80%이상 일 때 버섯 갓 표면의 수막현상이 가속화되고 다공의 포화수분환경은 세균의 이동에 이상적인 상태를 제공해준다[8,34]. *P. tolaasii*는 20°C 이상의 온도에서 버섯에서의 높은 감염율을 나타내는데 유통중의 변패 버섯을 수집한 결과를 보면 기온이 온난 다습한 6~8월에 시료중 50 % 이상의 변패버섯을 획득하였으며 병원성 *Pseudomonas* spp., 특히 *P. tolaasii* 분리가 많았다.

병원성 검정

분리된 125 strains를 병원성 검정하기 위해 Fig. 1에서와

Table 1. Bacterial isolates derived from brown blotch diseased-oyster mushroom collected from markets.

Month	Isolated strains	Pathogenicity by b-p[a] test		
		WLFO[b]	WLRO[c]	Others.
12~2월	27	1	1	7
3~5월	31	1	2	14
6~8월	67	4	3	17

a: browning pitting test.
b: white line formimg organisms.
c : white line reacting organisms.

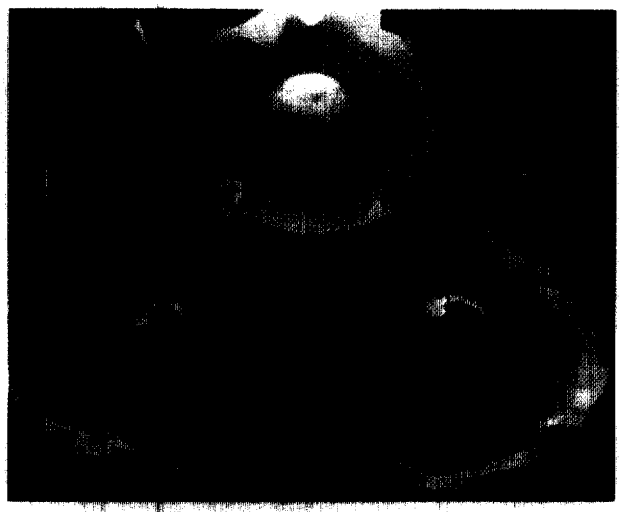

Fig. 1. Browning pitting reaction of *Mushroom tissue*.

같이 browning pitting test를 실시하였고 그 결과 48 strains가 병원성이 있는 것으로 나타났다. 하지만 계대하는 중에 3 strains는 병원성을 잃었고 최종적으로 병원성 있는 균주는 45 strains 이었으며 이들 중 27 strains는 KB평판 배지에서 fluorescent pigment를 형성하는 Pseudomonas spp. 이었고, WLRO균 중 비병원성 3 strain도 fluorescent pigment를 형성하였으며 다음 Table 2에 나타내었다. 발병 초기인 연한 갈변의 병징이 있던 버섯에서는 병원성 균주가 많았던 반면 조직 함몰과 변패취가 강했던 발병 후기의 버섯에서는 부생균과 비병원성 균주의 분리가 많았다. 분리된 병원성 45 strains를 버섯에 접종한 후 20분 이내에 browning, pitting 현상이 강하게 나타난 균주가 6 strains로 나타났으며 10시간 정도 경과하여 7 strains 이 두 가지 현상이 모두 나타났고 그 외의 25 strains는 연한 갈변~암갈색 병징을 나타냈다.

White Line Test

분리된 균주에 대해 white line test를 실시한 결과는 Table 2와 같이 12 strains 만이 white line을 형성하였고 Fig. 2에 나타내었다. 그 중 WLFO(white line forming organisms)는 6 strains였고 WLRO도 6 strains 였다. WLFO는 WLRO의 WLIP와 반응을 하여 white line을 형성함으로써 tolaasin을 분비한다고 추정되는 미동정된 균주를 지칭하며 WLRO는 WLIP를 분비하는 비병원성 *Pseudomonas* spp. 이다. 하지만 분리된 WLRO균 중에는 3균주가 병원성을 나타내어 비병원성으로 알려져 있던 WLRO가 갈변병의 원인균으로 작용할 수 있다는 최근의 wells[9]의 연구 보고를 뒷받침한다.

Table 2. Characterisitics of WLFO & WLRO isolates from brown blotch-diseased Oyster mushroom

Strains isolated	Fluorescence pigment on KB	Pathogenicity		White line test
		browning	pitting	
White Line Forming Organisms (WLFO)				
Pt 6681[a]	F[e]	+	+	+
206	F	+	+	+
531	F	+	+	+
603	F	+	+	+
606	F	+	+	+
85	F	+	+	+
911	F	+	+	+
White Line Reacting Organisms (WLRO)				
6061[b]	F	-	-	+
6147[c]	F	+	-	+
511	F	-	-	+
535	F	+	-	+
608-3	F	+	-	+
702	F	+/-	-	+
910-1	F	-	-	+
1525	F	-	-	+

a: *Pseudomonas tolaasii* ATCC 51309.
b: WLRO 16-1c.
c: WLRO 502-3(G23).
d: bacterium which dosen't have hemolitic activity.
e: fluorescent pigment.
+: positive reaction.

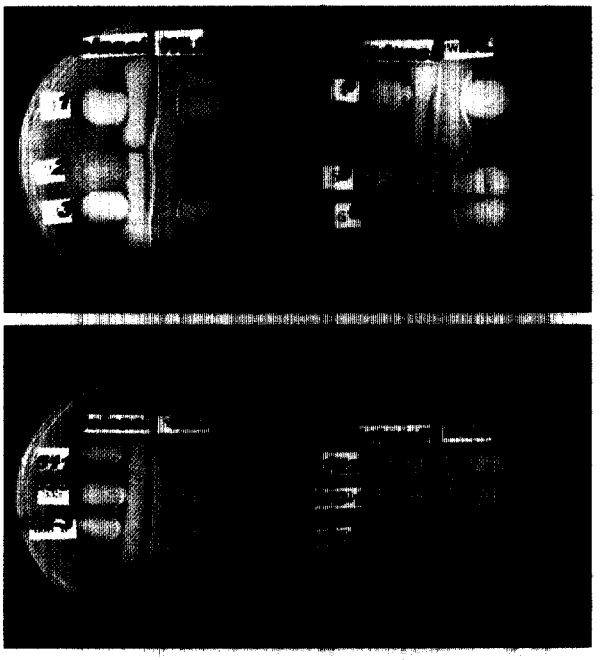

Fig. 2. Screening of WLFO(top) & WLRO(bottom) isolates using the white line test afterincubation for 24h at 25°C.

선발균의 동정

선발된 병원성 균주중 WLFO 및 WLRO의 동정 결과를 Table 3에 나타내었다. WLFO는 모두 *P. tolaasii*로 동정이 되었다. WLRO는 *P. chlororaphis*, *P. flurescens* biotype A와 *P. fluorescens* biotype C로 동정이 되었다. WLRO의 동정 결과에서 분리 균주 535와 910-1은 *P. fluorescens* biotype A이지만 각각 병원성과 비병원성을 나타내었다. Table 5에서의 동정 결과를 보면 white line을 형성하지 않았는데 *P. tolaasii*로 동정된 7 strains이 조사되었다. 그 중 2 strains는 암갈색 병반만을 나타내고 조직함몰은 없었으며 3 strains는 아주 경시의 증상을 나타냈으며 2 strains는 병원성을 전혀 나타내지 않았다. 7 strains의 *P. tolaasii*가 white line을 형성하지 못하고 병원성 역시 미약하거나 나타나지 않았다는 것은 tolaasin이 white line을 형성하는 요인이며 병원성 인자임을 뒷받침한다.

선발균의 toxin 생성과 용혈 활성

선발된 균주의 toxin의 분비와 적혈구에 대한 용혈 활성의 실험 결과는 Table 4과 같다. *P. tolaasii*로 동정된 WLFO는 세포 배양 여과액을 신선한 버섯에 접종한 후 20 분내에 갈변 내지 흑변과 조직의 괴저를 나타내었다. 용혈 활성 실험에서도 대조구와의 흡광도 1.23를 비교했을 때 현저하게 낮은 수치인 0.8~0.9로 나타나 tolaasin의 적혈구 용혈 특성을 확인할 수 있었다. 하지만 WLRO의 경우 병원성을 나타내었던 3 strains 중 하나는 세포 배양 여과액의 접종시 48시간이 지나도 아무런 증상이 나타나지 않았고 2 strains은 갈변의 병징을 나타내었다. WLRO의 용혈활성은 600nm에서 흡광도를 측정해본 결과 WLRO의 비병원성인 3 strains는 1.00 정도였으며 병원성이었던 3 strains는 0.9~1.0 사이의 수치를 나타내었다. WLRO가 분비하는 WLIP는 적혈구에 대한 colloid osmotic lysis와 biosurfactant의 특성을 가지고 있지만 버섯 조직내에는 아무런 병징을 나타내지 않는다는 연구보고[8]에서 볼 때 WLRO가 비병원성 임에도 대조구와의 흡광도의 차이는 WLIP에서 기인된다고 볼 수 있겠다. WLRO균이 분비하는 물질에 버섯에서의 갈변 병징을 나타내는 toxin이 존재함을 알 수 있었고 비병원성보다 병원성 WLRO에서 용혈활성이 더 낮은 결과가 나타났기 때문에 병원성 WLRO의 toxin에도 적혈구 용혈 특성이 있다고 추정이 된다. 하지만 병원성의 WLRO에 대한 toxin의 존재나 특성, 생물학적인 역할이 아직 연구되지 않고 있다.

Table 3. Identification of WLFO & WLRO isolates from brown blotch diseased- oyster mushroom by MIDI

Strains isolated	Identification	Similarity	Strains isolated	Identification	Similarity
206	*Pseudomonas tolaasii*	0.885	511	*P. fluorescens biotype C*	0.911
603	*P. tolaasii*	0.870	535	*P. fluorescens biotype A*	0.920
606	*P. tolaasii*	0.907	608-3	*P. chlororaphis*	0.882
531	*P. tolaasii*	0.890	702	*P. chlororaphis*	0.870
85	*P. tolaasii*	0.832	910-1	*P. fluorescens biotype A*	0.774
911	*P. tolaasii*	0.931	1525	*P. chlororaphis*	0.907

Table 4. The activity of the culture filtrates obtained from WLFO or WLRO

WLFO	Toxin production (b.p teste)	Hemolysis test (OD_{600})	WLRO	Toxin production (b.p test)	Hemolysis test (OD_{600})
Pt6681[a]	+	0.83	6061b	-	1.02
206	+	0.79	6147c	+	0.92
531	+	0.84	511	-	1.02
603	+	0.85	535	+	0.91
606	+	0.80	608-3	+	0.97
85	+	0.83	702	-	1.01
911	+	0.86	910-1	-	1.08
Control[d]	·	1.23	1525	-	1.06

a: *Pseudomonas tolaasii* ATCC 51309.
b: WLRO 16-1c.
c: WLRO 502-3(G23).
d: bacterium which dosen't have hemolytic activity.
e: either browning-pitting or browning reaction.
+: no reaction.

기타 병원성 *Pseudomonas* spp.의 toxin 생성과 용혈 활성

병원성 *Pseudomonas* spp.는 느타리버섯을 오염시키는 주된 원인균이므로 분리된 병원성 균주에서 선발하여 그 toxin의 생성과 tolaasin의 용혈 특성과의 비교 실험을 실시하였다. 병원성 28 strains를 처리하여 조제한 세포 배양 여과액을 신선한 버섯 자실체에 접종한 결과 16 strains만이 병징을 나타내었다. 나머지 12 strains에는 부생균으로 동정된 strains가 많았고 같은 균으로 동정이 된 strains 임에도 불구하고 병원성과 비병원성의 형태가 모두 있는 strains가 존재하였다. 이는 환경의 영향에 따라 병원성이 비병원성으로 전환되었다고 볼 수 있다. 형광성의 *Pseudomonas* spp.은 자발적으로 병원균이 되기도 하는데 이런 비병원성의 균주들은 버섯 유인성분에 대해 강한 주화성을 나타내고 병원성균보다 3배 정도 빠르게 균사에 도달한다[8]. 유인성분은 14개의 아미노산 혼합물로 구성되어진 분자량이 2000이하의 매우 작으며 열에 안정된 화합물이다. 하지만 유인성분의 다른 화합물과 그 특징은 아직 연구 중에 있다. 또한 결과를 살펴보면 *P. tolaasii*는 병원성을 나타냈지만 white line을 형성하지 못한 83, 1521-2의 2 strains와 약한 병징을 나타냈지만 세포 배양 여과액을 접종하였을 때 병징이 나타나지 않은 141, 409, 604의 3 strains 그리고 병원성 균주의 선발에서도 병원성을 나타내지 않았던 602, 81의 2 strains가 나타나 있는데 이때의 tolaasin은 균의 밀도와 pH 변화, 온도, toxin의 세포막 용해를 저해하는 Zn^{+2} 등의 2가 양이온 등에 의해 그 활성이 변화[8,17,20]하므로 저해되거나 상실된 것으로 추정이 된다.

또한 *P. tolaasii*의 non-pathogenic form은 pathogenic form보다 nutrient-poor environment나 sudden nutrient shock에서 생존력이 강하고 내성이 강하며 빠른 호흡을 하기 때문에[8] 환경에 의해 병원성이 비병원성으로 이행되었다고 볼 수 있다.

느타리버섯 조직의 CLSM 관찰

신선한 버섯 조직과 노쇠한 버섯의 조직을 비교 관찰한 영상을 Fig. 3에 나타내었다. 신선한 버섯의 실모양으로 길게 이어진 개개의 균사(hypha)가 모여서 느슨한 다발모양으로 배열된 균사체(mycelium)의 섬유균사조직(prosenchyma)이 선명하게 나타났으며, 또한 균사가 접합된 모습과 굵은 균사가 가는 균사에 엉켜있는 모습이 나타나있었다. 노쇠한 버섯의 조직은 Geels[20]가 SEM으로 관찰한 결과와 같이 균사가 건조한 상태가 되고 균사의 부피가 많이 감소한 경향이 관찰되었다. CLSM을 이용한 관찰에서 버섯 조직의 높이 변화를 optical sectioning을 통하여 입체적인 영상을 획득했으며, 수직단면영상(Fig. 4)도 함께 얻을 수 있었다.

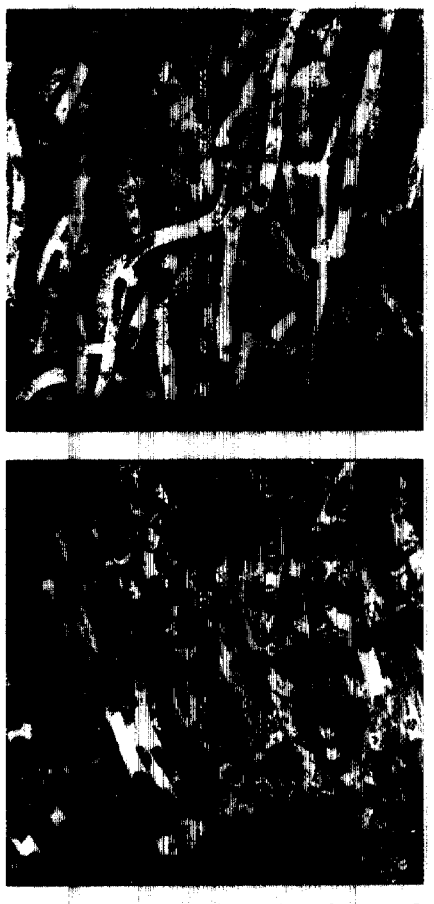

Fig. 3. CLSM images of heathy(top) and natural senescent (bottom) oyster mushroom (magnification 100×10, scale bar = 50 μm).

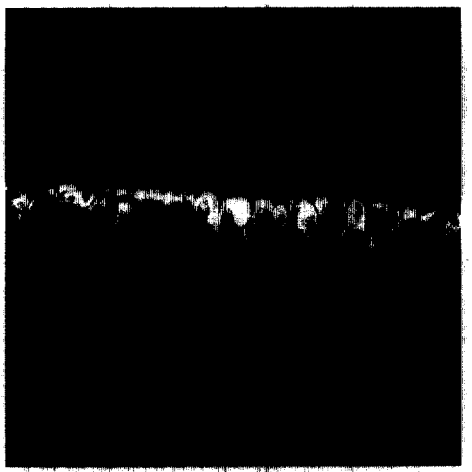

Fig. 4. Vertical sectioning images of healthy oyster mushroom (magnification 100×10, scale bar = 50 μm).

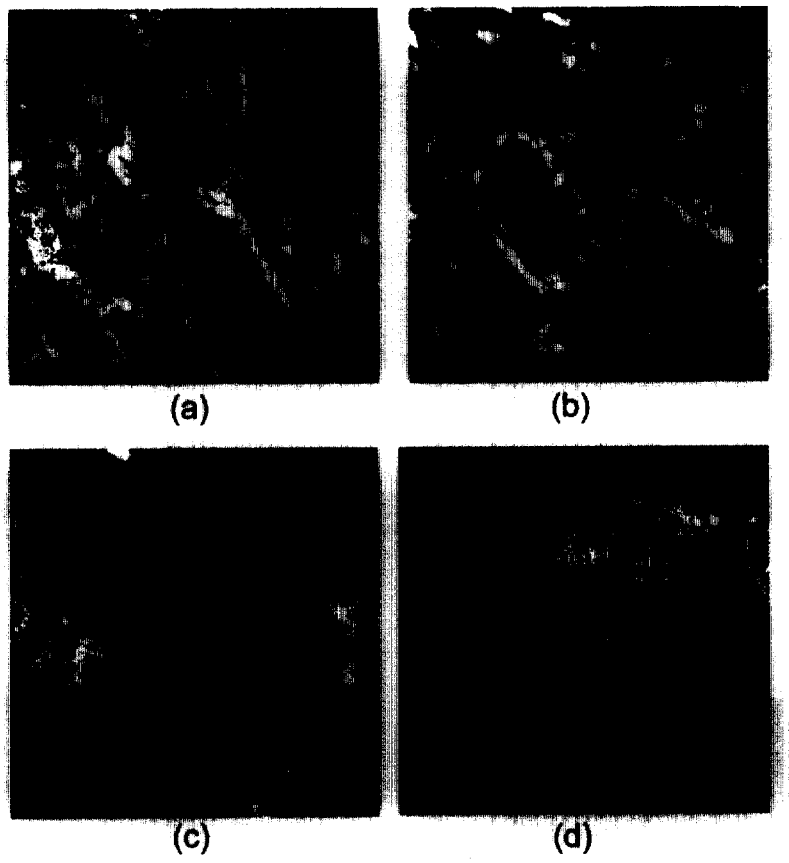

Fig. 5. CLSM images of the morphological changes of oyster mushroom tissue after inoculating *P. tolaasii* (a, b, c : magnification 100 × 10, d : magnification 63 × 10, scale bar = 50 μm).
(a) : 0 hr, (b) : 3 hr, (c) : 10 hr, (d) : 20 hr after inoculation.

느타리버섯에서의 *P. tolaasii* 오염관찰

느타리버섯에 *P. tolaasii* $10^7 \times 10^8$ CFU/ml를 인위적으로 2시간 동안 접종하여 부착을 시킨 후 시간 경과에 따른 변패 모습을 CLSM으로 관찰하였고 Fig. 5과 같다. 또한 대조구로서 염색을 하지 않은 느타리의 자실체에 같은 조작으로 *P. tolaasii*를 접종하여 육안으로 보이는 버섯조직과 CLSM을 통한 조직의 변화를 함께 관찰하였다. 균을 접종하고 3시간이 지나 대조구에서 연한 갈변의 증상을 나타났을 때 같은 시간의 처리구의 버섯 조직 관찰에서는 조직 변화에서는 신선한 버섯의 조직이나 2시간 동안 균 부착했을 때의 관찰된 사진과 큰 차이가 보이지 않았다. 하지만 10시간이 지나서 대조구의 버섯은 암갈색의 색택과 조직이 허물어지는 증상이 나타났고 CLSM에서의 관찰에서는 균사체의 엉겨있는 모습과 균사의 형태 모두가 희미해지고 균사의 그 부피가 신선한 상태에 비해 많이 감소하는 경향이 있었다. 그리고 접종한 균은 조직내로 침투가 되어 관찰이 어려웠다. 20시간이 지나서는 대조구의 버섯은 점액을 분비하고 아주 심한 악취와 비린내를 내고 암갈색으로 색이 변화하였고 조직이 와해되었다. 이에 따른 처리구의 현미경 관찰에서는 균사의 형태는 전혀 남아있지 않았고 균사간의 네트워크식의 연결 모습도 없어져 섬유 조직을 전혀 관찰할 수 없었다.

국문요약

시장에서 수집한 갈변병에 감염된 느타리버섯으로부터 125 균주를 분리하였고 그 중 45 균주는 병원성 균주로 조사되었다. WLFO 6 strains, WLRO 6 strains으로 나타났고, WLRO의 몇 균주는 병원성 검정 실험에서 약한 병원성을 나타내기도 했다. WLFO 6균주는 모두 느타리버섯의 갈변병 주원인균으로 알려진 *P. tolaasii*로 미생물 신속 동

정기(MIDI, gas chromatograph-microbial identification system)에 의해 동정되었고 WLRO는 *P. gingeri, P. fluorescens* biotype A and type C. 로 동정되었다. 그 외의 선발된 *Pseudomonas* spp.는 *P. gingeri, P. agarici, P. fluorescens* biotype B, *P. chlororaphis*, non-pathogenic *P. tolaasii, P. putida* biotype A, B 등으로 동정이 되었다. 분리된 병원성 세균의 세포배양 여과액으로 버섯에서의 갈변과 조직 함몰을 실험하였다. 병원성 검정에서 약한 병원성을 보인 분리균들은 갈변 또는 조직함몰이 나타나지 않았으나 강한 병원성을 나타냈던 균들은 두 현상이 모두 나타났다. *P. tolaasii*에 의해서 생성되는 세포외독소인 tolaasin의 활성을 조사하기 위하여 600 nm에서 용혈 활성을 측정하였다. *P. tolaasii*로 동정된 6 균주는 0.8~0.9, 약한 병원성의 WLROs는 0.9~1.0 그리고 *Pseudomonas* spp.는 10~1.2로 나타났다. 공초점 현미경 기술을 이용하여 신선한 버섯에서의 조직을 optical sectioning image와 vertical sectioning image로 관찰하였고 또한 *P. tolaasii*에 의하여 오염된 조직부위의 영상을 획득하였다.

참고문헌

1. 이향범, 전낙범, 손동화, 유승헌 : 느타리버섯 세균성 갈반병균 *Pseudomonas tolaasii*의 효소 면역 검출법, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **26**, 238-243 (1998).
2. 김종완, 김근희, 강희진 : 인공 재배버섯에 질병을 일으키는 *Pseudomonas*속 병원세균에 관한 연구- (1) 인공 재배버섯의 부패 변성 원인세균에 대하여, 한국식물병리학회지, **10**, 197-210 (1994).
3. 김종완, 김근희, 강희진 : 인공 재배버섯에 질병을 일으키는 *Pseudomonas*속 병원세균에 관한 연구- (2) 버섯 세균성 갈색무늬병의 병원세균 *Pseudomonas tolaasii*와 White Line 형성균의 세균학적 특성, 한국식물병리학회지, **11**, 353-360 (1995).
4. 권선우, 고승주, 강희완, 전명숙, 류진창 : 버섯에서 분리한 형광성 *Pseudomonas* spp.의 ITS I 영역분석에 의한 계통분류, 한국식물병리학회지, **14**, 350-357, (1998).
5. 박용환 : 최신 버섯학, 한국버섯원규영농조합, 15-150 (1997).
6. 유승헌 : 느타리버섯 세균성갈반병의 종합방제법 개발에 관한 연구, 연차보고서 현장애로기술개발사업(1996), 농림부농림수산기술관리센터, **58** (1997).
7. 이두원 : 느타리버섯 재배농가 경영분석, 농업기술 (1997)
8. Rainey, P. B., Brodey, C. L., and Jonstone, K. : Biology of *Pseudomonas tolaasii* cause of brown blotch disease of the cultuvated mushroom, *Advences in plant pathology*, **8**, 95-117 (1992).
9. Wells, J. M., Sapers, G. M., Butterfield, J. E., Jones, J. B., Bouzar, H. B. and Miller, F. C. Postharvest discoloration of the cultivated mushroom agaricus bisporus caused by *Pseudomonas tolaasii, P. reactans*, and *P. gingeri*, *Phytipathology*, **86**, 1098-1104 (1996).
10. Fett, W. F., Wells, J. M., Paola, C. and Chandi, W. : Identification of expolysacchaides produced by fluorescent *Pseudomonas* associated with commsecial mushroom (*Agaricus bisporus*) production, *Applied and Environmential Microbiology*, **61**, 513-517 (1995).
11. 박경순, 정은이, 심재섭, 김영기: '95 농업환경 심포지움, 환경개선을 위한 농화학적 접근, 한국농화학회, 한국환경농학회, **169** (1995).
12. Han Sy um, B. and Johnstone, K. : Molaeculas anlalysis of tolaasin and pyovsrdin biosynthesis by the mushroom pathogen *Pseudomonas tolaasii*, University of Cambridge.
13. Rainey, P. B. P., Brodey, C. L. and Johnstone K. : Biological properties and spectrum of activity of tolaasin, a lipodepsipeptide toxin produced by the mushroom pathogen *Pseudomonas tolaasii*, *Pysiological and Molecular Plant Pathology*, **39**, 57-70 (1991).
14. Nutkins, J. C., Mortishire-Smith, R. J., Packmann, L. C., Brodey, C. L., Rainey, P. B., Johnstone K. and Williiams D. H. : Structure determination of tolaasin, an extracellular lipodepeptide produced by the mushroom pathgen *Pseudomonas tolaasii* paine, *American Chemical Society*, **113**, 2621-2627 (1991).
15. 이혁인 : 느타리 세균성갈색무늬병균 *Pseudomonas* spp.의 검출 및 동정을 위한 PCR 방법 개발, 충북대학교, 식물병리학 전공 석사논문 (1999).
16. 이혁인, 이승돈, 박경선, 김영기, 차재순: 충청북도에서 분리한 느타리버섯 갈변병 병원세균의 병원성, *Jour. Agr. Chungbuk Nat'l Univ.*, **14**, 121-132 (1997).
17. Brodey, C. L., Rainey, P. B. P., and Johnstone K. : Bacterial blotch disease of cultivated mushroom is caused by an ion channel forming lipodepsipeptide toxin, molecular plant-microbe interactions, **4**, 407-411 (1991).
18. 이현욱, 문병주, 이홍수, 차홍오, 조동진, 신원교: *Pseudomonas agarici*와 *Pseudomonas tolaasii* 접종시기 및 접종농도가 팽이버섯의 균사생장과 자실체형성에 미치는 영향, The Korean Journal of Mycology, **26**, 60-68 (1998).
19. Jin, N. H., Ryu, S. Y., Choi, E. J., Kang, S. H. and Chang, I, M. : Oxyresveratrol as the potent inhibitor on dopa oxidase activity of mushroom tyrosinase, *Biochemical and Biophysical reaserch Communication*, **243**, 801-803 (1998).
20. Geels, F. P., Hesen, L. P. W. and VanGriensvan, L. J. L. D. : Brown discolouration of mushroom caused by *Pseudomonas agarici*, *J. Phytopathology*, **140**, 249-259 (1994).
21. Wichers, H. and Rivas, C. R. : Molecular aspects of bacterial

blatch disease of *Agaricus bisporus*

22. Rivas, R. C., Arpin, N., Oliver, J. M., and Wichers, H. J. : The effect of tolaasin, the toxin produced by *Pseudomonas tolaasii* on tyrosinase activity and the induction of browning in *Agaricus bisporus* fruiting bodies, *Phytipathological and Molecular Plant Pathology*, **55**, 21-28 (1999).
23. Suk, W. S., Son, H. J., Lee, G. and Lee, S. J. : Purification and characterization of biosurfactants produced by *Pseudomonas* sp. SW1, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **9**, 56-61 (1999).
24. Wong, W. C. and Preecr, T. F. : Identification of *Pseudo-monas tolaasii*; the white line in agar and mushroom tissue block rapid pitting test, *Journal of Applied Bacteriology*, **47**, 401-407 (1979).
25. Bessette, A. E.: Use of the mushroom tissue block rapid pitting test to detect brown blotch pathogens, *Applied and Environment Microbiology*, **49**, 999-1000 (1985).
26. Moquet, F., Mamounm, M. and Oliver, J. M. : *Pseudomonas tolaasii* and tolaasin: comparision of symptom induction on a wide range of *Agaricus bisporus* strains, *FEMS Microbiology Letter*, **142**, 99-103 (1996).
27. 이혁인, 차재순 : 느타리 버섯 세균성 갈색무늬병 병원균 *Pseudomonas tolaasii*의 특이적 DNA 클로닝, 한국식물병리학회지, **14**, 177-183 (1998).
28. 손서규, 이윤혜, 조성산, 진경식 : 버섯 병해충 방제에 관한 연구, 농업과학기술원 (1995)
29. 이장헌 : Confocal Fluorescent Microscope를 위한 시료제작의 원리, 서울대학교 농업생명과학대학부속 농업과학기센터 주최, 제1회 NICEM Workshop Confocal Laser Scanning Microscopy 원리와 응용, 23-24 (1998).
30. 정구보 : Confocal Microscopy의 최신 경향 충북대학교 공동실습관 주최, 제2차 Confocal Microscopy Workshop, 1-10 (1998)
31. Moller, S., Anne, R. P., Poulsen, L. K., Arvin, E. and Molin, S. : Activity and three-dimmentinal distribution of toluene-degarding *Pseudomonas putida* in multispecies biofilm assessed by quantitative in situ hybridization and scanning confocal laser microscopy, *Applied and Environmental Microbiology*, **62**, 4632-4640 (1996).
32. Shiv, I., Grewal, S., Han, B. and Johnstone, K. : Identification and characterization of a locus which regulates multiple function in *Pseudomonas tolaasii* the cause of brown blotch disease of *Agaricus bisporus*, *Journal of Bacteriology*, **177**, 4658-4668 (1995).
33. 이용환, 고숙주, 최충식, 이숙재, 박인진 : 버섯병해충 방제에 관한 연구: 전남지방 세균성 갈변병 피해조사와 병원균의 분리동정, 전라남도 농촌진흥원 시험연구보고서, 706-709 (1997).
34. 전창성 : 느타리버섯 병충해 방제, 농업과학기술원.