

## *Pantoea agglomerans* S59-4를 이용한 마늘 푸른곰팡이병의 생물학적 방제

김용기\* · 홍성준 · 지형진 · 박종호 · 한은정 · 박경석<sup>1</sup> · 이상엽<sup>1</sup> · 이승돈<sup>2</sup>

국립농업과학원 농산물안전성부 유기농업과, <sup>1</sup>농업생물부 농업미생물과, <sup>2</sup>농촌진흥청 연구정책국 연구조정과

(2010년 4월 23일 접수, 2010년 5월 13일 수리)

### Biological Control of Garlic Blue Mold using *Pantoea agglomerans* S59-4

Yong-Ki Kim\*, Sung-Jun Hong, Hyung Jin Jee, Jong-Ho Park, Eun-Jung Han, Kyung-Seok Park<sup>1</sup>,  
Sang-Yeob Lee<sup>1</sup> and Seong-Don Lee<sup>2</sup>

Organic Agriculture Div., Department of Agro-Food Safety, NAAS, RDA, Suwon 441-707, Korea, <sup>1</sup>Agricultural Microbiology Div., Department of Agricultural Biology, NAAS, RDA, Suwon 441-707, Korea, <sup>2</sup>Research Coordination Division, Research Policy Bureau, RDA, Suwon 441-707, Korea

#### Abstract

S59-4 isolate was evaluated as a potential biocontrol agent using *in vivo* wounded garlic bulb assay. When the spore suspension ( $10^5$  spores/ml) of *Penicillium hirsutum* was co-inoculated with cell suspension of S59-4 isolate on wounded garlics, the isolate showed high suppressive effect to disease development. The isolate was identified as *Pantoea agglomerans* S59-4(Pa59-4) through Biolog system. Furthermore, soaking garlic bulbs in the suspension of Pa59-4 significantly reduced garlic decay caused by *P. hirsutum*. The optimal concentration of Pa59-4 for controlling garlic blue mold was  $10^7 \sim 10^8$  cfu/ml. And suppressive effect of Pa59-4 on garlic storage decay reduced as inoculation concentration of *Penicillium hirsutum* increased. In addition in order to investigate population dynamics of Pa59-4 on application site of garlic cloves, two antibiotic markers, pimarcin and vancomycin were selected. Bacterial density of Pa59-4 on the wounded garlic cloves increased continuously both under room temperature condition and low temperature condition until 30days after application of Pa59-4, meanwhile that of Pa59-4 on intact garlic cloves increased until 15days after application of Pa59-4 and thereafter decreased continuously. Two culture media for mass-production of Pa59-4, LB medium and TSB medium, were selected. By-product of bio-fungicide formulated by mixing white carbon and bacterial suspension of Pa59-4 suppressed by 40 to 50% garlic blue mold. Above results suggest that Pa59-4 be a promising control agent against garlic blue mold.

**Key words** *Pantoea agglomerans* S59-4, garlic blue mold, Biological control, mass production

#### 서 론

마늘은 1~2개월의 짧은 기간에 걸쳐 수확되고 종구로 사용될 마늘은 5~6개월간 저장을 하게 된다. 씨 마늘은 고온다

습한 여름을 거치면서 부패균인 푸른곰팡이를 비롯한 부패균에 의하여 피해를 받게 되어 심할 경우 씨 마늘이 50%이상 썩기도 한다. 씨 마늘의 부패는 이듬 해 마늘 생산량에 결정적인 영향을 주므로 저장 중 부패를 막을 수 있는 방제법의 개발이 절실한 실정이다. 씨 마늘 이외에 소비자에게 판매를 목적으로 저장고에 저장 중인 마늘도 저장고 내가 다습하고

\*연락처 : Tel. +82-31-290-0554, Fax. +82-31-290-0507  
E-mail: yongki@rda.go.kr

저장기간이 긴 경우 다습한 조건에서 많이 발생하는 푸른곰팡이병에 의한 피해가 매우 크다. 마늘에 발생하여 큰 피해를 주는 병원균으로는 푸른곰팡이병균(*Penicillium hirsutum*), 마른썩음병균(*Fusarium oxysporum*), 잎마름병균(*Stemphylium botryosum*), 비단병균(*Sclerotium rolfsii*)등이 있는데(田中, 1990; 김 등, 2000), 이 중 가장 큰 피해를 주는 병원균은 푸른곰팡이병균이다. 우리나라의 경우 수확 후 농산물에 대해서는 농약을 전혀 사용할 수 없으므로 저장 중 농산물의 부패를 억제하기 위한 방법으로는 수확시기 조절 및 담전윤환과 같은 경종적 방법, 저장온도를 조절하거나, 비가림 시설을 하거나 저장고내의 환기를 조절함으로써 저장 중 병 발생을 억제하는 방법, 그리고 생육기 중 농약을 선택적으로 사용함으로써 수확 후 부패를 줄일 수 있는 화학적 방제 등이 일부 농산물을 대상으로 실시되고 있다(김 등, 1999; 김 등, 2003; Wilson 등 1994). 최근 들어 이러한 저장 중 부패를 줄이기 위한 방법 이외에 길항균이나 영양원 결합균 처리에 의한 저장병의 생물학적 방제연구가 활발히 추진되고 있다(Janisiewicz 등, 2000; Poppe 등, 2003). 저장 조건은 엽권(phyllosphere)이나 근권(rhizosphere)에 비하여 환경조절이 비교적 쉽고, 미생물을 처리할 경우 환경에 의한 영향을 덜 받고, 처리하고자 하는 부위에 길항균의 투여가 용이하다는 장점이 있어 미국, 캐나다, 스페인, 이스라엘, 호주 등의 선진국을 중심으로 실용화 연구가 활발히 추진되고 있다(Costa 등, 2001, 2002a; Nunes 등, 2002). 저장병 방제용으로 활용되는 주요 미생물은 사과 및 배 저장병 방제용 *Candida sake* (Abadias 등, 2001), *Rhodotorula glutinis*(Calvente 등, 1999), *Aureobasidium pullulans*(Castoria 등, 2001; Janisiewicz 등, 2000), *Cryptococcus* spp. (Chand-Goyal, 등, 1997), *Pantoea agglomerans*(Costa 등, 2001; Poppe 등, 2003; Stockwell 등, 2002; Wright 등, 2001)가 있다. *Pseudomonas syringae*에 의해 발생하는 보리 basal kernel blight 방제용 *Pantoea agglomerans*(Andrea 등, 2000), 배 화상병 방제용 *Erwinia herbicola*(Kearns 등, 1996), 오렌지 녹색곰팡이 및 푸른곰팡이병 방제용 *Serratia*(Meziane 등, 2005) 등이 알려져 있다. 이들의 병 발생 억제작용은 대부분 항생물질 생산(Stockwell 등, 2002; Wright 등, 2001; Pusey 등, 2008), siderophore 생산(Calvente 등, 1999) 등에 기인하는 것으로 알려져 있고, 최근 들어 영양원 결합이 우수한 미생물을 이용한 방제 성공 사례(Janisiewicz 등, 2000; Poppe 등, 2003; Castoria 등, 2001), 병 저항성 유도에 의한 사례(Han 등, 2000)가 속속 보고되고 있다. Janisiewicz 등(1997)은 *Pseudomonas syringae*를 활용하여 만든 과일저장병 방제용 제제

(ESC-10, ESC-11)를 처리하였을 때 사과 잿빛곰팡이병과 푸른곰팡이에 의한 부패를 현저히 억제함을 보고하였다.

그러나 국내에서의 생물적 방제연구는 토양 및 엽권에 생육기에 발생하는 병해만을 대상으로 수행되어 왔을 뿐 저장 중에 발생하는 병해를 대상으로 한 연구는 매우 적은 실정이다. 본 연구에서는 마늘이나 양파 등의 *Allium*속 채소류의 근권으로부터 미생물을 분리하여 마늘푸른곰팡이병균에 대한 처리농도별 효과를 구명하였으며, 길항균을 마늘 종구 처리한 후 마늘 저장 중 부패 억제효과와 생육 초기 출현율에 미치는 영향을 조사하였다. 또한 항생제 마커를 선발하여 마늘 처리부위에서의 길항균의 밀도변동을 조사하였고, 실용화 가능성을 검토하기 위하여 시제품을 조제하여 마늘 저장 중 부패억제효과를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 시험 병원균

저장중인 마늘에 푸른색 곰팡이 포자가 형성된 부패 마늘을 골라 포자를 루프에 묻힌 후 potato dextrose agar(PDA) 배지에 접종하고 20°C 항온기에서 5일간 배양하였다. 배지에 생긴 곰팡이 균총을 새로운 PDA 배지에 이식하여 이를 시험균주로 이용하였다. 접종원은 병원균을 PDA 배지상에 14일간 배양한 후 배지에 20 ml의 멸균수를 첨가하고 부드러운 고무브러시로 문질러서 병원균 포자를 회수하고 hemacytometer로 계수하여 제조하였다.

### 마늘과 양파의 근권, 근면 및 표피서식 미생물 분리

마늘 푸른곰팡이병균에 대한 길항균을 선발하기 위하여 마늘 재배지의 토양, 마늘과 양파의 근권, 저장 중인 마늘과 양파의 표면으로부터 세균을 분리하였다. 토양 시료는 토양 20 g에 물 200 ml을 첨가하여 상온에서 150 rpm으로 진탕한 후 이를 희석하였다. 마늘과 양파 뿌리시료는 흐르는 물에 한번 수세한 후 가위로 잘게 절제하여 20 ml의 멸균수를 첨가하여 마쇄하고 이를 거즈에 걸러 얻어진 여과액을 희석하였다. 저장 중인 마늘과 양파시료는 표피를 잘 벗겨 가위로 적당한 크기로 자른 다음 2 ml의 멸균수를 첨가하여 마쇄하고 이를 거즈에 걸러 얻어진 여과액을 희석하였다. 회수한 각각의 희석액에 대해서는 tryptic soy agar 배지(TSA) (Difco Laboratories, Detroit)에 각각 도말하여 단 콜로니를 분리하였다.

### 길항균 선발

먹이경합 우수하거나 유도저항성을 일으키는 미생물을 선발하기 위하여 마늘인편상에서 아래와 같은 방법으로 생물검정을 수행하여 병 진전을 억제하는 미생물을 선발하였다. 마늘은 껍질을 벗긴 후 1% 차아염소산나트륨에 1시간동안 표면을 살균하고 멸균수로 3번 씻어내고 건조시켰다. 마늘에 직경 2 mm, 깊이 1 mm의 구멍을 2개 내고 흘러넘치지 않을 정도로 길항균 현탁액을 구멍에 접종하였다. 약 30분정도 건조 후 구멍에 *Penicillium hirsutum* 현탁액이 넘치지 않을 정도로 접종하여 습실 상자에 넣어 20°C 항온기에 7일간 배양하고 형성된 병반 직경을 측정하여 억제효과가 우수한 균주를 선발하였다.

### 길항균 동정

마늘인편상에서 푸른곰팡이병에 대하여 높은 억제효과를 보인 S59-4균주에 대해서는 그람염색을 하여 음성과 양성으로 구분한 후 Biolog GN plate에 접종하여 영양원(탄소원, 질소원)의 이용성을 조사하여 동정하였다.

### 길항균 처리농도에 따른 부패억제효과

마늘 푸른곰팡이병균에 대한 길항균 Pa59-4의 적정 처리농도를 알아보기 위하여 길항균을 선발할 때 사용한 방법과 동일하게 마늘인편을 차아염소산을 이용하여 표면 살균하여 건조한 후 이쑤시개 5개를 하나로 묶어 마늘 인편에 상처를 내었다. 그 상처 낸 마늘을 길항균 Pa59-4 현탁액( $10^7 \sim 10^{10}$  cfu/ml)에 침지한 후 건져서 건조한 다음 상처 주위에 *Penicillium hirsutum* 포자현탁액( $10^3$  포자/ml)을 분무 접종하였다. 발병을 조장하기 위하여 밀폐통 바닥에 물에 적신 키친타올을 깔아 습실을 만들고 접종된 마늘을 넣은 다음 20°C 배양기에서 14일간 배양한 후 마늘인편상에 형성된 병반직경을 측정하였다.

### 푸른곰팡이병균 처리농도에 따른 부패억제효과

길항균 처리농도별 푸른곰팡이병 억제효과 검정방법과 동일하게 마늘인편에 상처를 낸 다음, 상처 낸 마늘인편을 길항균 Pa59-4 현탁액( $10^8$  cfu/ml)에 침지한 후 건져서 건조하였다. 길항균을 처리한 마늘인편의 다음 상처부위에 *Penicillium hirsutum* 현탁액을 농도별로  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  포자/ml씩 접종하였다. 발병을 조장하기 위하여 밀폐통 바닥에 물에 적신 키친타올을 깔아 습실을 만들고 접종된 마늘을 넣은 다음 20°C 인큐베이터에서 10일간 인큐베이션하면서

마늘인편상에 형성된 병반직경을 측정하였다.

### 길항균 처리에 의한 마늘저장 중 부패억제효과 조사

저장중인 마늘의 껍질을 벗긴 후 표면 소독하여 건조한 다음 이쑤시개 5개로 침 상처를 주고 그 마늘을 Pa 59-4 현탁액( $10^8$  cfu/ml)에 침지한 후 건조하였다. 상처 주위에 *Penicillium hirsutum* 현탁액( $10^3$  conidia/ml)을 충분히 분무 접종하였다. 접종된 마늘인편은 발병이 잘되도록 상기한 방법으로 습실을 만들고 20°C에서 27일간 배양한 다음 병반직경과 발병률을 조사하여 병 억제 효과를 구하였다. 처리는 구당 30개의 마늘인편을 공시하였으며 2회 반복하여 시험을 수행하였다.

### 길항균 처리에 의한 포장에서의 생육초기 부패억제효과 조사

포장조건에서 길항균처리가 생육초기에 푸른곰팡이병균에 의한 부패억제에 미치는 영향을 검토하기 위하여 마늘 중구를 길항균 Pa59-4 현탁액 ( $5 \times 10^7$  cfu/ml)에 1시간 동안 침지하여 포트(직경 13 cm×높이 10 cm)에 파종하였다. 마늘중구가 파종된 포트 상에 병원성이 확인된 푸른곰팡이병균 포자현탁액( $10^5$  포자/ml)을 포트 당 20 ml씩 관주 접종한 다음 병원균 접종 40일 후에 지상부 및 지하부에 나타난 발병률을 조사하였다.

### 길항균 Pa59-4에 대한 항생제 마커 선발

처리부위에서의 길항균 Pa59-4의 밀도변동 조사용 marker를 선발하기 위하여 tryptic soy agar 배지(TSA)에 피마리신, 반코마이신, 리팜피신, 스펙티노마이신, 가나마이신, 페니실린, 테트라사이클린, 스트렙토마이신, 클로람페니콜, 암피실린을 각각 25, 50, 100 µg/ml 농도로 첨가하고 길항균을 배양하여 길항균 Pa59-4의 성장정도를 조사하였다.

### 마늘처리부위에서의 길항균 Pa59-4의 밀도변동 조사

마늘에서 Pa59-4의 정착력을 보기위하여 밀도 변화를 조사하였다. 표면 소독한 마늘인편에 이쑤시개 5개로 상처를 준 처리와 상처를 주지 않은 처리로 구분하여 각각의 마늘을 Pa59-4 현탁액( $10^8$  cfu/ml)에 1시간동안 침지한 후 각각 상온(23°C)과 저온(4°C)에 저장하면서 60일 동안 조사하였다. 시기별로 3개의 인편을 꺼내어 상처 처리구는 상처주위를, 무상처는 인편의 임의의 부위를 직경 8 mm 되는 크기로 절단한 후 유발에 넣고 살균수 20 µl를 첨가한 다음 잘 마쇄하

고 희석하여 TSA 배지상에 도말하였다. 도말한 배지는 25°C에서 2일간 배양한 후 배지상에 형성된 균총수를 조사하였다.

### 길항균 시제품의 처리효과 조사

Pa59-4의 방제 실용화 가능성을 검토하기 위하여 농약을 제조할 때 증량제로 많이 사용되고 있는 white carbon, pyrophillite, talc를 첨가하여 시제품을 조제하였다. 시제품은 TSA에서 고체 배양하여 얻은 Pa59-4 현탁액 (10<sup>12</sup> cfu/ml) 200 ml에 각 증량제 400 ml를 잘 섞고 음건한 후, 블렌더를 이용하여 골고루 마쇄하여 고운 분말가루로 조제하였다. 조제한 길항균 시제품의 효과를 확인하기 위하여 마늘 인편에 시제품을 골고루 잘 문게 섞어준 후 망사자루에 넣어 바람이 잘 통하는 곳에 매달아 놓고 5개월간 4회에 걸쳐 시제품별 부패율을 조사하였다. 처리구당 시험 마늘 인편은 155개를 공시하였다.

### 결과 및 고찰

#### 파속 채소 근권 및 근면서식 미생물의 분리

마늘 푸른곰팡이병을 생물적으로 방제하기 위하여 2001년부터 2002년까지 2년에 걸쳐 파속채소의 근권 및 근면으로부터 표면서식미생물 1,292종을 분리하였다.

#### 길항균 동정

파속채소 근권 및 근면에서 분리한 미생물을 공시하여 마늘인편검정법을 이용하여 3차에 걸쳐 마늘 푸른곰팡이병 발생 억제효과가 우수한 S59-4균주를 선발하였다. 선발된 S59-4균주를 그람 염색한 결과 음성으로 판명되었으며, Biolog GN plate를 사용하여 동정한 결과 *Pantoea agglomerans* S59-4(Pa59-4)로 최종 동정되었다.

#### 길항균 처리농도에 따른 부패억제효과

마늘푸른곰팡이병균에 대한 길항균 Pa59-4의 적정처리농도를 구명하기 위하여 푸른곰팡이병균을 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup> 포자/ml 농도로 접종한 다음 길항균 Pa59-4를 10<sup>7</sup>, 10<sup>8</sup>, 10<sup>9</sup>, 10<sup>10</sup> cfu/ml 농도로 접종하였을 때 모든 처리에서 푸른곰팡이병균에 의한 부패가 현저히 억제되었다(Fig. 1과 Fig. 2).

마늘푸른곰팡이병균을 10<sup>3</sup>~10<sup>4</sup>포자/ml 농도로 접종하였을 때 길항균 Pa59-4의 처리농도가 10<sup>7</sup> cfu/ml 이상만 되면 병원균 접종농도에 상관없이 높은 발병억제효과를 보였다. 따라서 마늘수확 후 푸른곰팡이병 방제를 위한 길항균 Pa59-4

의 적정처리농도를 10<sup>7</sup>~10<sup>8</sup> cfu/ml로 결정하였다. 푸른곰팡이병이 발병되기 전에는 마늘 표면에서의 푸른곰팡이병균 밀도가 10<sup>3</sup>포자/ml이하일 것으로 추정되므로 마늘 수확 후 길항균 Pa59-4를 처리할 경우 저장 중 부패를 효과적으로 줄일 수 있을 것으로 사료된다. Nunes 등(2001, 2002)에 따르면 사과와 배 저장병 방제시 길항균 *Pantoea agglomerans*를 처리했을 때 병 억제 효과는 길항균의 처리농도가 매우 중요한 것으로 보고하였다. 그는 *Penicillium expansum*을 1×10<sup>3</sup> 포자/ml 농도로 처리하고 길항균을 2×10<sup>7</sup> cfu/ml농도로 처리할 경우 33%가 발병된데 비해 길항균을 1×10<sup>8</sup> cfu/ml으로 접종할 경우 단지 6%만이 발병되는 것으로 보고하였다. 그러나 본 시험에서는 길항균 처리농도가 1×10<sup>7</sup> cfu/ml 이상일 경우 처리간 차이를 보이지 않아 Nunes 등이 보고한 결과와는 상이한 경향을 보였다. Schisler 등(1997)도 *Pantoea agglomerans*를 포함한 길항균을 혼합처리하면서 길항균의 처리농도가 *Gibberella pulicaris*에 의한 감자 마른썩음병 발생에 영향을 주는 것으로 보고하였다.

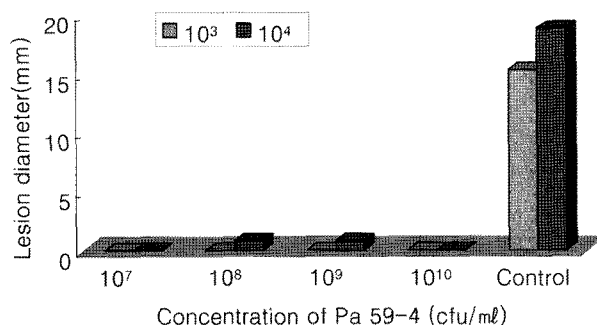


Fig. 1. Suppressive effect of cell concentration of *Pantoea agglomerans* 59-4 on postharvest decay of garlic cloves.

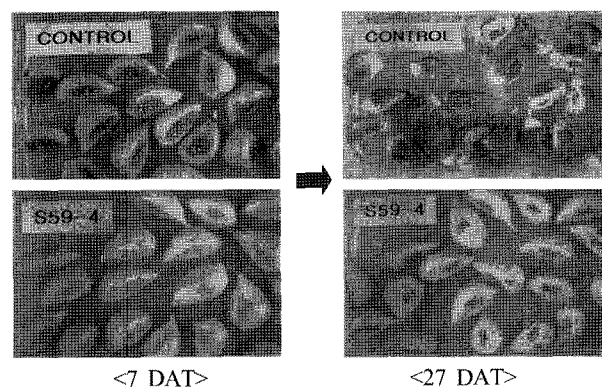
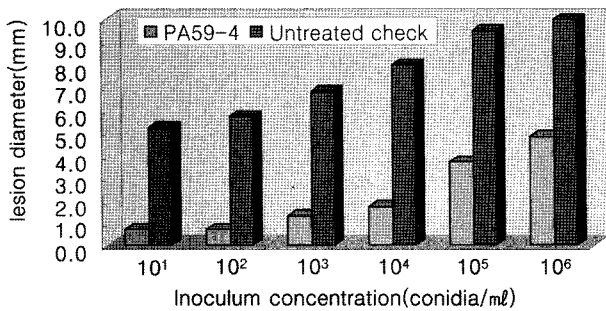


Fig. 2. Suppressive effect of *Pantoea agglomerans* S59-4 on postharvest decay of garlic. Cell concentration of Pa59-4 was 10<sup>8</sup> cfu/ml and spore concentration of *Penicillium hirsutum* was 10<sup>3</sup> spores/ml. Disease severity was investigated two times, 7 days and 27 days weeks after inoculation of *Penicillium hirsutum*.

**푸른곰팡이병균 처리농도별 길항균 Pa59-4의 마늘부패억제**

푸른곰팡이병균의 접종농도별 길항균 Pa59-4 처리효과를 마늘인편을 이용하여 조사한 결과, 푸른곰팡이병균의 포자접종농도가 10<sup>4</sup> 포자/ml이하일 때에는 높은 발병억제 효과를 보였으며 병원균의 접종농도를 증가시킴에 따라 길항균의 처리효과는 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 3).

일반적으로 마늘표면에서의 병원균 밀도는 푸른곰팡이병에 감염된 마늘을 제외하고는 10<sup>4</sup> 포자/ml이하일 것으로 판단되므로 마늘을 수확한 후 길항균 현탁액에 침지처리하거나 길항균제제로 종구분의처리하면 소기의 성과를 거둘 수 있을 것으로 사료된다. Nunes 등(2002)도 사과 저장병을 생물적으로 방제하기 위하여 *Pantoea agglomerans*를 처리하면서 길항균의 처리효과는 병원균의 접종농도와 밀접한 관계가 있음을 보고한 바 있다. 그에 따르면 길항균 처리농도가 1×10<sup>8</sup> cfu/ml일 때 푸른곰팡이병균을 1×10<sup>3</sup> 포자/ml 농도로 접종하면 단지 6%만이 발병되는데 반하여 푸른곰팡이병균을 1×10<sup>5</sup> 포자/ml 농도로 접종하면 44%가 발병되는 결과를 나타냈다. Schisler 등(1997)도 감자 마른썩음병 방제하면서 *Enterobacter cloacae*, *Pantoea agglomerans* 등 길항균의 농도가 매우 중요한 요인인 것으로 보고하였다. 본 시험의 결과도 Nunes의 시험결과와 유사한 경향이였다.



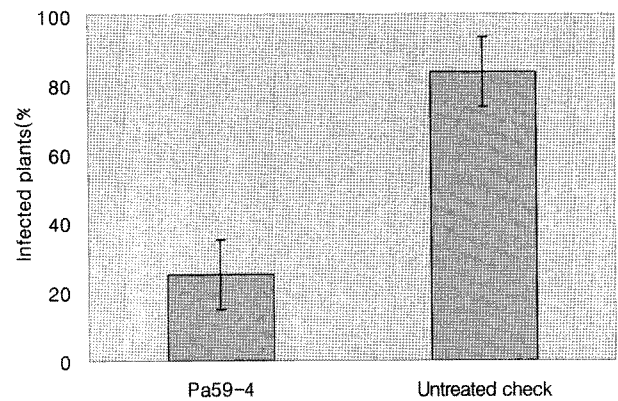
**Fig. 3.** Suppressive effect of *Pantoea agglomerans* 59-4 on postharvest decay of garlics which were inoculated with different conidial concentration of *Penicillium hirsutum*. Disease severity was investigated 10 days after inoculation of *P. hirsutum* on garlic cloves.

**길항균 처리에 의한 마늘저장 중 부패억제**

마늘표면에 길항균 Pa59-4를 처리한 다음 푸른곰팡이병균을 접종하고 마늘을 저장하면서 길항균 Pa59-4의 발병억제효과를 60일 동안 2회에 걸쳐 조사한 결과, 발병율과 병진전을 현저히 억제하는 것으로 나타났다(Table 1).

**길항균 Pa59-4처리가 포장에서의 생육초기 부패억제에 미치는 영향**

마늘 종구를 길항균 Pa59-4의 현탁액으로 분의 처리하여 파종한 다음 마늘의 출현률을 조사한 결과, 길항균 현탁액을 처리한 시험구에서는 86.7%의 마늘이 출현한 반면 무처리구에서는 단지 23.1%만이 건전하게 생육되는 것으로 나타났다(Fig. 4). 마늘푸른곰팡이병균은 저장 중 부패를 일으키고, 파종된 이병 마늘종구는 토양 속에서 대부분 부패되므로 마늘수량감소에 주 원인이 되고 있다. 길항균 Pa59-4는 수확 후 마늘표면에 처리하였을 때 저장 중 마늘부패를 현저히 억제함은 물론 파종 후 토양 속에서 발생하는 푸른곰팡이병균에 의한 부패억제 효과도 우수한 것으로 판명되었다.



**Fig. 4.** Suppressive effect of Pa 59-4 on disease development of garlic seedlings when garlic cloves was soaked into bacterial suspension(5×10<sup>7</sup>cfu/ml) of Pa59-4 and 20 ml of conidial suspension of *Penicillium hirsutum* was drenching-inoculated on potted soil(diameter×height, 13 cm × 10 cm). Disease incidence was investigated 40days after inoculating *Penicillium hirsutum*.

**Table 1.** Suppressive effect of Pa59-4 on storage decay of garlic cloves caused by *Penicillium hirsutum*

Treatment	Disease incidence (%) <sup>a)</sup>			Lesion diameter (mm) <sup>b)</sup>		
	1st trial	2nd trial	Average	1st trial	2nd trial	Average
Pa59-4	37.2	16.7	27.0	1.8	0.7	1.3
Control	97.7	100	99.0	13.9	18.8	16.4

<sup>a),b)</sup> investigated 60 days after inoculation of *Penicillium hirsutum*.

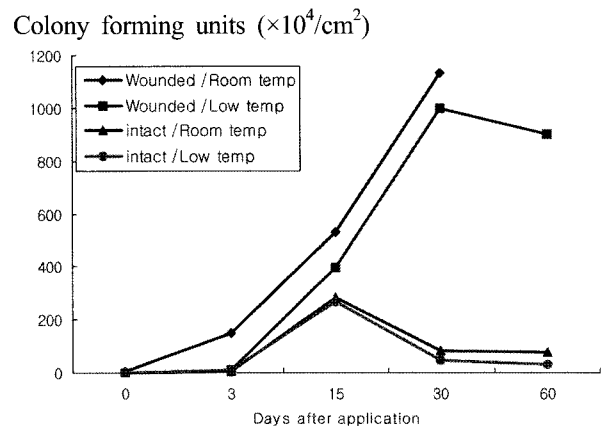
**마늘 처리부위에서의 길항균 Pa59-4의 밀도변동 조사**

길항균 Pa59-4 처리하였을 때 처리 부위에서의 동태해석을 위한 항생제 marker를 얻기 위하여 pimaricin외 11종의 항생제를 25-100  $\mu\text{g/ml}$  농도로 처리한 배지상에서 길항균 Pa59-4의 생장을 조사하였다. 항생제 pimaricin과 vancomycin을 25~100  $\mu\text{g/ml}$  첨가한 배지상에서는 길항균 Pa59-4의 생장이 양호하였으나, 그 밖의 항생제를 첨가한 배지상에서는 길항균 Pa59-4의 생장이 현저히 억제되었다. 따라서 pimaricin과 vancomycin을 길항균 Pa59-4의 동태를 추적하기 위한 항생제 마커로 선발하였다. 이들 항생제 마커는 길항균 Pa59-4가 특정부위에 다른 균들과 섞여 있을 경우에도 Pa59-4만을 효율적으로 선발할 수 있는 지표가 될 수 있을 것으로 판단되었다. Johnson 등(2000)은 사과와 배 화상병에 방제효과가 우수한 길항균 *Pantoea agglomerans*를 처리한 후 꽃에서의 밀도변동을 조사하면서 streptomycin에 저항성인 strain을 이용한 바 있으나 본 시험에 공시한 길항균 Pa59-4균주는 Johnson등이 사용한 균주와 동일한 종이라 할지라도 streptomycin에 대해서는 저항성을 보이지 않았다. 한편 처리한 부위에서의 길항균의 밀도변동을 정확히 추적하기 위하여 PCR기법을 이용하여 16S 또는 16S-23S rRNA의 상동성 분석을 행하기도 한다. 그러나 PCR기법을 이용할 경우 균 검출을 위한 특이 primer 선발이 필요하고 핵산을 증폭하기 위한 기기가 필요한데 반해 본시험에서 선발한 길항균 Pa59-4균주는 pimaricin이나 vancomycin에 대하여 뚜렷한 저항성을 보이므로 PCR기법을 이용하지 않더라도 항생제 저항성을 이용하여 처리한 부위에서의 밀도변동을 쉽게 확인할 수 있을 것으로 판단되었다. 마늘처리부위에서의 길항균 Pa59-4의 정착능력을 알아보기 위하여 상처를 낸 마늘과 상처를 내지 않은 마늘 상에 길항균 Pa59-4를 처리하고, 저장온도는 상온(23°C)과 저온(4°C)으로 2수준으로 하여 경과일수별로 60일까지 밀도변화를 조사하였다. 상처를 준 마늘에서는 상온과 저온 모두에서 30일까지 꾸준히 길항균 밀도가 증가하였고, 저장온도간에도 큰 차이를 보이지 않아 처리한 길항균

Pa59-4는 상처부위에서 잘 정착된다는 것을 확인하였다. 반면에 무상처 처리구에서는 처리 후부터 15일까지는 길항균 Pa59-4의 밀도가 증가되다가 그 이후에는 상온 및 저온처리 모두 밀도가 감소하였다(Fig. 5).

마늘에 상처를 내고 길항균 Pa59-4를 접종한 다음 저온에 저장의 경우 30일 이후부터는 밀도가 더 증가하지 않았으며 상온에 저장할 경우에는 30일 이후 고온성 병원균인 *Aspergillus niger*가 발생하여 마늘을 급격히 부패시켜 지속적인 밀도조사를 할 수 없었다. Kim 등(2000)에 따르면 푸른곰팡이병원균은 토양 중에 편재하는 병원력이 약한 곰팡이로 수확 후 저장하는 과정에서 마늘의 활력이 떨어지고 상처가 생겼을 때 마늘에 큰 피해를 주는데, 길항균 Pa59-4는 상처 난 마늘에서 잘 정착하고 증식하기 때문에 수확 한 마늘에 길항균 Pa59-4를 처리할 경우 푸른곰팡이병 발생을 현저히 억제할 수 있을 것으로 생각된다.

길항균 Pa59-4 시제품 처리효과. Pa59-4의 방제 실용화를 위하여 TSA 배지상에서 대량으로 배양하여 얻은 Pa59-4 현탁액에 증량제로 white carbon, pyrophillite, talc를 첨가하여 미생물농약 시제품을 만들어 마늘종구에 분의 처리한 후 5개월 동안 저장하면서 부패율을 조사하였다. Pa59-4의 미생



**Fig. 5.** Population dynamics of Pa59-4 on the application site after Pa59-4 was applied on wounded and intact garlic cloves.

**Table 2.** Suppressive effect of by-products of bio-fungicides formulated with *Pantoea agglomerans* 59-4 and three bulking agents on storage decay of garlic according to different duration of garlic storing period

Bulking agent	No of cloves used	Decay (%) at different garlic storing period			
		Two month	3 months	4 months	5 months
White carbon	155	5.2	8.4	20.0	27.1
Pyrophillite	155	11.0	12.3	23.9	29.7
Talc	155	11.6	13.6	26.5	38.1
Untreated check	155	12.3	16.8	30.3	45.8

물농약 시제품의 처리효과에 있어서는 pyrophyllite나 talc를 첨가하여 만든 시제품에 비하여 white carbon을 첨가하여 조제한 시제품을 처리하였을 때 발병억제 효과가 가장 높았다 (Table 2).

시제품 처리 3개월 후에 조사하였을 때 white carbon 시제품 처리구에서의 마늘 부패율은 8.4%인데 비해 무처리구의 부패율은 16.8%로 50%의 병 발생억제 효과를 보였고, 5개월 후에는 white carbon 시제품처리구에서의 마늘 부패율이 27.1%인데 반해 무처리구에서는 45.8%로 40.8%의 발병억제 효과를 나타냈다. 이상의 결과로 볼 때 길항균 Pa59-4를 잘 제제화하여 수확한 마늘에 처리할 경우 저장 마늘의 푸른 곰팡이병을 효과적으로 억제할 수 있을 것으로 보여지며, 길항균 Pa59-4의 제제화를 위한 증량제로는 white carbon이 적당한 것으로 사료된다. 미생물 농약은 살아있는 미생물에 의해 효과가 발현되는 것이므로 제제화후 제품 중에 미생물 생존여부가 매우 중요하다. Abadias 등(2001)은 제품의 안정적 보존을 위하여 동결건조하거나 skim milk, galactose, raffinose, sodium glutamate 등을 첨가하여 제품중의 생존력을 증진시킬 수 있음을 보고하였다. 본 연구에서 선발된 길항균 Pa59-4의 실용화를 위해서는 그람 음성균은 내성포자를 형성하지 않으므로 제제화하게 되면 저장 중 활력이 저하될 수 있으므로 Abdias 등이 한 것처럼 제품 중 균 생존력을 향상시킬 수 있는 안정제에 대한 검토도 필요할 것으로 사료된다. Costa 등(2000)은 *Pantoea agglomerans* strain CPA-2를 가지고 제제화를 위한 동결건조를 하면서 길항균 밀도, 보호제 및 배지 등의 효과를 검토하면서 초기밀도를 높게( $10^{10}$  cfu/ml)하고 보호제로 설탕을, 건조배지로 무지방 skim milk를 사용하였을 때 동결과정에서 미생물의 활성을 유지할 수 있음을 보고하였는데, Pa59-4 균주도 긴 기간 활성을 유지하기 위해서는 보호제 및 배지에 대한 검토도 필요할 것으로 사료된다. Costa 등(2002b)은 미생물 보존을 위해 분무건조(spray drying)할 때 건조배지로 무지방 skim milk를 사용하면 미생물 생존을 높일 수 있음을 보고하였다. Costa 등(2002c)은 *Pantoea agglomerans* strain CPA-2의 대량배양을 위하여 Fructose, sucrose 등 탄소원과 더불어 yeast extract를 사용할 경우 배양밀도를 현저히 증가시킬 수 있어 대량 배양을 위한 질소원으로 선발 보고하였고, Teixido 등(2001)은 *Pantoea agglomerans* strain CPA-2의 처리효과가 중탄산소다(sodium bicarbonate)를 첨가할 경우 향상된다고 보고하였는데, Pa59-4도 향후 실용화를 위한 대량배양을 위해서는 이들 탄소원과 질소원을 영양원로서 함께 고려할 필요가 있다고 본다.

## >> 인 / 용 / 문 / 헌

- Abadias, M., A. Benabarre, N. Teixido, J. Usall, and I. Vinas (2001) Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. *International Journal of Food Microbiology* 65:173~182.
- Andrea, B. K., B. J. Jacobsen and D. C. Sands (2000) Biological control of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, the causal agent of basal kernel blight, by antagonistic *Pantoea agglomerans*. *Phytopathology* 90:368~375.
- Calvente, V., D. Benuzzi and M. I. S. de Tosetti (1999) Antagonistic action of siderophore from *Rhodotorula glutinis* upon the postharvest pathogen *Penicillium expansum*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 43:167~172.
- Castoria, R., F. De Curtis, G. Lima, L. Caputo, S. Pacifico and V. De Cicco (2001) *Aureobasidium pullulans*(LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its modes of action. *Postharvest Biology and technology* 22: 7~17.
- Chand-Goyal, T. and R. S. Spotts (1997) Biological control of postharvest diseases of apple and pear under semi-commercial and commercial condition using three saprophytic yeasts. *Biological Control* 10:199~206.
- Costa, E., J. Usall, N. Teixido, R. Torres and I. Vinas (2002a) Effect of package and storage conditions on viability and efficacy of the freeze-dried biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2. *Journal of Applied Microbiology* 92: 873~878.
- Costa, E., J. Usall, N. Teixido, N. Garcia and I. Vinas (2000) Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze-drying. *Journal of Applied Microbiology* 89:793~800.
- Costa, E., N. Teixido, J. Usall, E. Amares and I. Vinas (2001) Production of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 using commercial products and by-products. *Applied Microbiological Biotechnology* 56:367~371.
- Costa, E., N. Teixido, N. Usall, J. Fons, E., V. Gimeno, J. Delgado and I. Vinas (2002b.) Survival of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 in a spray-drying process. *J. Food Protection* 65(1):185~191(Abstract).
- Costa, E., N. Teixido, J. Usall, E. Amares and I. Vinas (2002c) The effect of nitrogen and carbon sources on growth of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2. *Letters in Applied Microbiology* 35:117~120.
- Han, D. Y., D. L. Coplin, W. D. Bauer and H. A. J. Hoitink (2000) A rapid bioassay for screening rhizosphere microorganisms their ability to induce systemic resistance. *Phytopathology* 90:327~332.
- Janiesiwicz, W. J. and S. N. Feffers (1997) Efficacy of commercial formulation of two biofungicides for control of blue

- mold and gray mold of apples in cold storage. *Crop Protection* 16(7):629~633.
- Janisiewicz, W. J., T. J. Tworkoski and C. Sharer (2000) Characterizing the mechanism of biological control of postharvest diseases on fruits with a simple method to study competition for nutrients. *Phytopathology* 90:1196~1200.
- Jeng, R. S., A. M. Svircey, A. L. Myers, L. Beliaeva, D. M. Hunter and M. Hubbes (2001) The use of 16S and 16S-23S rDNA to easily detect and differentiate common gram-negative orchard epiphytes. *Journal of Microbiological methods* 44:69~77.
- Johnson, K. B., V. O. Stockwell, T. L. Sawyer and D. Sugar (2000) Assessment of environmental factors influencing growth and spread of *Pantoea agglomerans* on and among blossoms of pear and apple. *Phytopathology* 90:1285~1294.
- Kearns, L. P. and C. N. Hale (1996) Partial characterization of inhibitory strain of *Erwinia hervicola* with potential as a biocontrol agent for *Erwinia amylovora*, the fire blight pathogen. *J. Appl. Bacteriol.* 81:369~374.
- Meziane, H., S. Gavriel, Z. Ismailov, I. Chet, L. Chernin and M. HÖfte (2006) Control of green and blue mold on orange fruit by *Serratia pymuthica* strains IC14 and IC1270 and putative modes of action. *Postharvest Biol. Biochem.* 39:125~133.
- Nunes, C., J. Usall, N. Teixido and I. Vinas (2001) Biological control of postharvest pear diseases using a bacterium, *Pantoea agglomerans* CPA-2. *International Journal of Food Microbiology* 70:53~64.
- Nunes, C., J. Usall, N. Teixido, E. Fons and I. Vinas (2002) Postharvest biological control by *Pantoea agglomerans* (CPA-2) on golden delicious apples. *Journal of Applied Microbiology* 92:247~255.
- Poppe, L., S. Vanhoutte and M. Hofte (2003) Modes of action of *Pantoea agglomerans* CPA-2, an antagonist of postharvest pathogens on fruits. *European Journal of Plant Pathology* 109:963~973.
- Pusey, P. L., V. O. Stockwell and D. P. Rudell (2009) Antibiosis and acidification by *Pantoea agglomerans* strain E325 may contribute to suppression of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 98:1136~1143.
- Schisler, D. A., P. J. Slininger and R. J. Bothast (1997) Effects of antagonist cell concentration and two-strain mixtures on biological control of fusarium dry rot of potatoes. *Phytopathology* 87:177~183.
- Stockwell, V. O., K. B. Johnson, D. Sugar and J. E. Loper (2002) Antibiosis contributes to biological control of fire blight by *Pantoea agglomerans* strain Eh252 in orchards. *Phytopathology* 92:1202~1209.
- Wilson, C. L., A. E. Ghaouth, E. Chalutz, S. Droby, C. Stevens, Y. Lu and J. Arul (1994) Potential of induced resistance to control postharvest diseases of fruits. *Plant disease* 78(9): 837~844.
- Wright, S. A. I., C. H. Zumoff, L. Schneider and S. V. Beer (2001) *Pantoea agglomerans* strain EH318 produces two antibiotics that inhibit *Erwinia amylovora* in vitro. *Applied and Environmental Microbiology* 67:284~292.
- 김용기. 1999. 양파 저장병의 발생 실태 및 방제. 원예저장유통연구회지 8(3):21~27.
- 김용기, 이상범, 이상엽, 이용환, 김희대, 윤태, 박세원. 2000. 마늘, 양파 저장병 발생생태 및 피해경감연구. 작물보호연구 56~89.
- 김용기, 이상범, 이상엽, 심홍식, 최인후. 2003. 마늘 저장병 방제를 위한 경종적, 화학적 접근. 한국농약과학회지 7(2):139~148.
- 田中寛康. 1990. 市場病害ガイドブック. 日本植物防疫協會. p. 225.
- 조원대, 김완규, 김한명. 1995. 마늘저장병해에 관여하는 진균. 농시 논문집 37(2):325~329.



## ***Pantoea agglomerans* S59-4를 이용한 마늘 푸른곰팡이병의 생물학적 방제**

김용기\* · 홍성준 · 지형진 · 박종호 · 한은정 · 박경석<sup>1</sup> · 이상엽<sup>1</sup> · 이승돈<sup>2</sup>

국립농업과학원 농산물안전성부 유기농업과, <sup>1</sup>농업생물부 농업미생물과, <sup>2</sup>농촌진흥청 연구정책국 연구조정과

**요 약** 마늘 저장병을 일으키는 푸른곰팡이병의 생물적 방제를 위하여 마늘 근면으로부터 부패억제효과가 우수한 *Pantoea agglomerans* S59-4(Pa59-4)를 선발하였다. 길항균 Pa59-4의 푸른곰팡이병에 대한 적정처리농도는  $10^7 \sim 10^8$  cfu/ml이었으며, Pa59-4의 처리효과는 병원균의 접종농도가 증가됨에 따라 감소되었다. 길항균 Pa59-4의 현탁액에 마늘을 침지 처리할 경우 저장 중 부패를 90%억제하였으며, 종구 분의 처리하여 파종하였을 때에도 무처리구 부패율이 86.7%인데 비해 Pa59-4 처리시 부패율이 23.1%로 부패를 현저히 감소시켰다. 마늘처리부위에서의 길항균의 밀도변동을 알아보기 위하여 항생제 마커로서 pimaricin과 vancomycin을 선발하였고 이들 항생제가 포함된 배지상에서 길항균 Pa59-4의 밀도변동을 저온조건과 상온조건으로 나누어 조사하였을 때 상처를 낸 마늘표면에서는 처리 후 30일까지도 밀도가 계속하여 증가하였으며, 저온조건하에서는 처리 후 15일까지 증가하다가 그 이후에는 감소되는 것으로 나타났다. 길항균 Pa59-4의 산업화를 위하여 증량제로 white carbon을 첨가하여 만든 미생물제제를 처리할 경우 저장 중 마늘부패를 40~50% 줄일 수 있었다. 이상의 결과로써 길항균 Pa59-4는 마늘저장 중 부패를 줄일 수 있는 유망한 길항균으로 판단되었다.

**색인어** *Pantoea agglomerans* S59-4, 마늘 푸른곰팡이병, 생물학적 방제, 대량배양