

Bacillus spp. 및 Serratia marcescens에 의한 사과 푸른곰팡이병의 생물적 방제김용기* · 이승돈 · 류재기¹ · 류재당농업과학기술원 식물병리과, ¹농촌진흥청 연구관리국 연구운영과**Biological Control of Blue Mold of Apples by *Bacillus* spp. and *Serratia marcescens***Yong-Ki Kim*, Seong-Don Lee, Jae-Gee Ryu¹ and Jae-Dang Ryu

Plant Pathology Division, National Institute of Agricultural Science and Technology, Suwon 441-707, Korea

¹Research Coordination Division, Research Management Bureau, Suwon 441-707, Korea

(Received on November 3, 2003)

The 1080 epiphytic bacteria obtained from 370 samples of pome and stone fruits including apple, pear, peach, grape, apricot and Chinese quince were screened for antagonistic activity against postharvest pathogens, *Penicillium expansum*, *Alternaria alternata* and *Botrytis cinerea*. Among tested antagonistic bacteria, eight bacterial isolates inhibited mycelial growth of the postharvest pathogens and were identified as *Bacillus amyloliquefaciens* (three strains), *B. megaterium*, *B. subtilis* var. *gladioli*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* and *Serratia marcescens* based on biochemical characteristics and utility of carbon and nitrogen compounds (Biolog system). Eight carbohydrates were evaluated for their effect on mycelial growth and germination of the postharvest pathogen, *P. expansum* to select nutrients for enhancing bio-control efficacy. The growth of four selected antagonists, *B. amyloliquefaciens* P43-2, *B. amyloliquefaciens* A71-2, *B. licheniformis* P94-1, and *S. marcescens* P76-9 were also tested. As a result, 1% glucose (w/v) strongly stimulated growth of the antagonists, suppressed mycelial growth of the postharvest pathogen, and had a little comparatively stimulatory effect on germination of the the postharvest pathogen. It was confirmed that the addition of 1% glucose (w/v) greatly enhanced biocontrol effect of *B. amyloliquefaciens* P43-2, *B. licheniformis* P94-1, and *S. marcescens* P76-9. Application of *B. amyloliquefaciens* P43-2, *B. licheniformis* P94-1, and *S. marcescens* P76-9 with the addition of 1% glucose (w/v) increased the control efficacy up to 48%, 46%, 14% compared with those of the antagonists without glucose, respectively. When the antagonists were applied to control postharvest disease caused by *P. expansum* in apple wounds, the population of *B. amyloliquefaciens* P43-2 and *B. licheniformis* P94-1 increased until 4 days after inoculation (DAI) of the antagonists and then decreased from 10 DAI. Meanwhile the population of *S. marcescens* P76-9 decreased at early stage (4 DAI), but increased from 7 DAI, and finally maintained constantly until 10 DAI in apple wounds.

Keywords: Postharvest disease, Biological control, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Serratia marcescens*, *B. licheniformis*, *Penicillium expansum*, glucose

사과를 포함한 대부분의 과일은 2~3개월에 걸친 비교적 짧은 기간 동안에 수확을 하고 소비자의 요구는 연중 계속되므로 많은 양의 과일을 저장하게 되므로 저장 중 여러 가지 병에 의해 피해를 받게 된다(Tanaka, 1990). 생

육후기에 발생하는 겹무늬썩음병과 *Alternaria*병은 생육기는 물론 저장 중에도 피해를 주며, 푸른곰팡이병과 잿빛곰팡이병은 생육기간 중에는 피해를 거의 주지 않으나 저장 중 저장고 내에 관리를 소홀히 하여 병원균의 생장에 적당한 환경(온도와 습도)이 되면 발생이 심하다. 국내에서는 사과병해를 생육기에 국한하여 방제하고 있을 뿐 저장병해 방제용으로 등록된 약제는 전무한 실정이다. 그러나, 생육기간 중에 탄저병이나 겹무늬썩음병을 방제

*Corresponding author

Phone)+82-31-290-0439, Fax)+82-31-290-0453

E-mail)yongki@rda.go.kr

할 때 저장병에도 효과가 탁월한 약제를 선택적으로 살포하면 저장 중 부패를 줄일 수 있다(김 등, 1998). 사과 는 일단 수확한 후에는 농약을 전혀 사용할 수 없기 때문에 수확 후 과일부패를 억제할 수 있는 농약대체 방제 기술의 개발이 필요하다. 농약을 사용하지 않고 사과 저장 중 부패를 줄이기 위해서, 과일표피에 칼슘을 처리하기도 하고(Conway 등, 1992; Droby 등, 1997), Ethylene을 흡착시킬 수 있는 다공성 물질을 이용하기도 하며, 과일 내에 병 저항성을 증가시킬 목적으로 UV를 처리하거나(Frobes-Smith, 1999; Stevens 등, 1997), 키토산과 같은 저항성유도물질을 처리하기도 한다(El-Ghaouth 등, 2000a; El-Ghaouth 등, 2000b; Forbes-Smith, 1999). 최근 들어 미생물을 이용하여 저장병을 방제하기 위한 연구가 활발히 추진되고 있다. 과일의 저장조건은 엽권(phyllosphere)이나 근권(rhizosphere)과는 달리 비교적 환경조절이 용이하고, 미생물을 처리할 경우 환경에 의한 영향을 덜 받으므로 과일 저장병 방제를 위한 생물적 방제연구가 미국, 이스라엘, 스페인 등 선진국을 중심으로 활발히 추진되고 있다. 과일 저장병에 효과를 보이는 미생물로는 *Trichoderma* 속 진균(Hong 등, 1998), *Bacillus* 속 세균(Huang 등, 1992; Pusey 등, 1984; Sholberg 등, 1995), *Pseudomonas* 속 세균(Janisiewicz, 1988; 1994; Janisiewicz 등, 1992; 1995), *Pantoea* 속 세균(Nunes 등, 2001), *Candida* 속 효모(Guillino 등, 1992; Janisiewicz 등, 1994; Mclaughlin 등, 1990; Usall 등, 2000; 2001), *Aureobacidium Pullulans* (Leibinger 등, 1997) 등이 보고된 바 있으며, 그 중 *Pseudomonas syringae*를 이용하여 개발한 Bio-Save 100 과 Bio-Save 110, 그리고 *Candida oleophila*를 이용하여 개발한 Aspire가 미국과 이스라엘에서 특허 취득되었고 아울러 미생물농약으로 사용되고 있다(Lisansky, 1999). 그 밖에 스페인이 중심이 되어 유럽에서도 *Candida sake*를 이용한 실용화 연구가 집중적으로 추진되고 있다. 이 연구에서는 인과류(사과, 배, 모과) 및 핵과류(복숭아, 살구, 포도)의 과일표면으로부터 저장병균의 성장을 억제하는 미생물을 분리하여 사과저장병에 대한 방제가능성을 평가하기 위하여 수행하였다.

재료 및 방법

과일표피 서식 미생물 분리. 1995년부터 1998년까지 전국에 있는 사과, 배, 복숭아, 포도, 살구 및 모과과원으로부터 생육기 중에 건전한 과일을 채취하였다. 채취한 과일은 수돗물에 깨끗이 씻은 다음 살균증류수로 2차 세척하였다. 직경 1 mm인 corkborer로 과일표면을 포함하

여 2~3 mm 두께로 시료 당 3개씩 과일절편을 떼어내어 살균된 유발에 넣고 살균증류수를 10 ml씩 첨가한 다음 잘 마쇄하였다. 얻어진 마쇄액을 nutrient yeast dextrose agar(NYDA: nutrient broth, 8 g; yeast extract, 5 g; dextrose, 10 g; agar, 15 g; distilled water, 1 l)상에 샤레 당 0.1 ml씩 분주하고 삼각유리병으로 배지 표면에 골고루 도말한 다음 25°C 인큐베이터에서 24~48시간 동안 배양하였다. 각 샤레로부터 우점하는 세균균총을 외관상 차이를 기준으로 종류별로 떼어내어 NYDA 배지상에서 단일 균총 분리(single spore isolation)를 위하여 3회 재도말하였다.

미생물 배양 및 시험병원균. 효과가 우수한 길항균 선발을 위하여 NYDA배지에 길항균을 도말하여 25°C 인큐베이터에서 48시간 배양하였다. 시험에 사용한 병원균 *Penicillium expansum*, *Alternaria alternata* 및 *Botrytis cinerea*는 저온저장 중인 병든 사과로부터 분리하여 potato dextrose agar medium(PDA: potato, 300 g; dextrose, 20 g; agar, 15 g; distilled water 1 l)상에서 배양하였다.

길항균 선발. 저장병을 현저하게 억제하는 우수 길항균을 선발하기 위하여, 살균한 PDA배지를 50°C 정도로 식힌 다음 *P. expansum*, *A. alternata* 및 *B. cinerea*의 포자를 샤레 당 10^6 , 10^5 , 10^4 농도로 각각 혼합한 다음 샤레에 20 ml씩 분주하였다. 그 배지상에 과일표면으로부터 분리한 세균을 샤레 당 4균주씩 일정한 간격으로 치상한 다음 25°C 인큐베이터에서 5~7일간 배양하면서 배지상에 나타나는 균사생장 억제효과(저지원의 크기)를 조사하였다. 배지상에서 높은 균사생장 억제효과를 보인 세균에 대해서는 아래와 같이 사과 과일에 병원균과 함께 처리하여 병 진전 억제 효과를 조사하였다. 건전한 사과과일을 0.5% sodium hypochlorite로 소독한 다음 살균증류수로 깨끗이 씻어 말린 다음 과일표면에 끝을 뾰족하게 자른 이쑤시개를 사용하여 3 mm 깊이로 구멍을 4곳에 대각선으로 3개씩 뚫고 길항균 원액, 1/10 및 1/100로 희석한 현탁액 및 물을 각각 20 μ l씩 처리하였다. 처리한 길항균 현탁액이 과일 내로 흡수된 다음 *P. expansum*의 포자현탁액(1.0×10^5 /ml)을 20 μ l씩 접종하고 25°C 인큐베이터에 저장한 다음 병원균 접종 7일 후에 사과 과일상에 형성된 병반의 직경을 측정하였다.

선발 길항균의 동정. *P. expansum*의 균사생장 및 병진전을 억제하는 8 균주에 대해서는 균주동정을 실시하였다. 그람염색을 하여 그람양성 세균인 경우에는 Bartholomew Mitchell의 방법을 응용한 Walts의 방법(김용기, 1995)을 이용하여 내생포자 생성여부를 조사하였고, 공기 존재 하에서의 생육, catalase 및 oxidase 활성을 조

사하였다. 아울러 선발 균주의 간편한 동정을 위하여 아래과 같이 Biolog Microstation System(Biolog, Inc., Hayward, California, USA)을 이용하였다. 선발 균주를 BUGM 배지에 접종하여 배양한 다음 Biolog microplate에 접종하였다. 균주별 접종 농도는 비색계를 이용하여 Biolog 회사의 추천농도로 조절하였다. 균 현탁액은 그람염색의 결과에 따라 적절한 microplate(GN, 그람 음성; GP, 그람 양성)를 사용하였다. 접종한 microplate는 28°C에서 24시간 배양한 다음 Biolog reader를 사용하여 Biolog data base 종과의 유사도(similarity)를 측정하였다.

탄소원이 병원균의 성장과 길항균의 증식에 미치는 영향. 탄소원이 병원균의 성장과 길항균의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 기본배지(NH₄NO₃, 1.2 g; MgSO₄ · 7H₂O, 0.5 g; KH₂PO₄, 1.0 g; Fe, 0.2 mg; Zn, 0.2 mg; Mn, 0.1 mg; and distilled water, 1 l)에 탄소원으로 glucose, mannose, glycerin, dextrin, galactose를 1%씩 첨가하여 배지를 만들고 병원균과 병진진 억제효과가 우수한 4종의 길항균을 각각 접종하고 7일 후에 병원균의 성장과 길항균의 증식정도를 조사하였다.

Glucose 첨가가 길항균의 푸른곰팡이병 발생에 미치는 영향. 탄소원 중 길항균의 생육을 촉진하는 것으로 확인된 glucose를 첨가하여 푸른곰팡이병에 대한 길항균의 억제효과를 조사하였다. 길항균 처리와 병원균 접종은 위에서 묘사한 길항균 선발시험의 생물검정과 동일한 방법으로 수행하였다. Glucose 첨가가 길항균에 의한 병 발생억제효과에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 길항균 현탁액에 glucose를 1% 첨가한 다음 길항균을 살균증류수에 현탁한 처리를 대조로 하여 병 진진억제효과를 비교 조사하였다. 한편 선발된 glucose와 저장병에 억제효과가 있는 것으로 알려진 탄산수소나트륨 및 칼슘제제(4% calcium hypochlorite, RIFA Co.)를 처리하여 효과를 비교 검토하였다. 상처유무가 병원균의 발병과 길항균의 처리 효과에 미치는 영향을 알아보기 위하여 과일표면에 상처를 내고, 다른 하나는 상처를 내지 않고 병 발생을 비교 조사하였다.

처리부위에서의 길항균 밀도변동 조사. 유용미생물의 처리부위별 밀도 변동을 알아보기 위하여 사과표면에 직경 10 mm인 cork borer로 3 mm 깊이로 4개면에 3반복으로 상처를 낸 후 길항균별로 일정한 농도로 접종하고, 처리 후 2일, 4일, 7일 및 10일에 처리부위를 직경 20 mm인 cork borer로 도려내어 유발에 넣고 살균증류수를 1 ml 첨가한 다음 곱게 마쇄하여 NYDA배지에 100 µl씩 3반복으로 도말하였다. 도말한 배지는 25°C 인큐베이터에서 3-5일간 배양하였으며, 처리한 유용미생물의 밀도변동은 배지 상에 나타나는 균총을 계수하여 조사하였다. 아울러

상처가 나지 않은 사과표면에서의 길항균의 밀도변동을 상기한 것과 동일한 방법(상처를 내지 않은 것은 제외)을 이용하여 조사하였다.

결과 및 고찰

과일표피서식 미생물 분리 및 항균성 검정. 사과푸른곰팡이병균에 항균활성을 보이는 유용미생물을 분리하기 위하여 배, 사과, 복숭아, 포도, 살구 및 모과 등 과일시료 370점을 채취하여 과일표면으로부터 미생물 1080균주를 분리하였다(Table 1). 이들 과일표면 서식미생물을 공시하여 사과 저장 중 부패를 일으키는 푸른곰팡이병균(*P. expansum*), 검은썩음병균(*A. alternata*), 그리고 잿빛곰팡이병균(*B. cinerea*)과 대치배양하여 항균활성을 조사한 결과 P43-2, A46-6, P47-10 그리고 A71-2 균주는 3가지 병원균 모두에 항균활성을 보였고, P43-1, P76-9, P94-1 그

Table 1. Isolation of epiphytic microorganisms from the surface of healthy pome and stone fruits for the selection of effective antagonistic microorganisms to postharvest pathogens

Fruit	No. of samples	No. of isolates obtained
Pear	161	456
Apple	134	410
Peach	22	53
Grape	12	51
Apricot	39	113
Chinese quince	2	7
Total	370	1080

Table 2. Suppressive effect of eight antifungal bacteria isolated from surfaces of apples and pears on mycelial growth of apple postharvest pathogens

Isolate	Fruit originated	Suppression of mycelial growth (%) ^a		
		<i>Penicillium expansum</i>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
P 43-1	Pear	43.4	-	70.7
P 43-2	Pear	75.8	62.0	61.0
A 46-6	Apple	21.7	67.4	100.0
P 47-10	Pear	39.1	77.1	44.0
A 71-2	Apple	78.2	8.6	100.0
P 76-9	Pear	8.7	-	87.9
P 94-1	Pear	30.4	-	85.9
A 101-1	Apple	52.2	-	100.0

^a percent reduction = [(disease lesion diameter on non-treated apple - disease lesion diameter on apple treated with an antagonist) / (disease lesion diameter on apple treated with an antagonist)] x 100. Note: - means no reduction in disease development.

리고 A101-1 균주는 검은썩음병균을 제외한 푸른곰팡이 병균과 잿빛곰팡이병균에 항균활성을 보였다(Table 2). 특히, P43-2, A71-2 그리고 A101-1균주는 다른 균주에 비하여 푸른 곰팡이병균에 대한 항균활성이 높았다.

길항균 처리에 의한 사과저장 중 *Penicillium* 썩음병의 억제. *In vitro* 조건에서 저장병균에 대하여 높은 항균 활성을 보인 8종의 유용미생물을 처리하여 *in vivo* 조건에서 처리농도별로 병 진전억제 효과를 조사한 결과, P47-10 균주와 P76-9 균주를 제외한 유용미생물은 고농도로 처리하였을 때 높은 병 진전 억제효과를 보였다(Table 3). 이는 Leibinger 등(1997)이 포장조건에서 *B. cinerea*, *P. expansum* 및 *Pezicula malicortis*에 의한 병을 방제할 목적으로 *Aureobasidium pullulans*, *Rhodotorula glutinis* 및 *Bacillus subtilis*를 고농도 또는 저농도로 처리하였을 때 고농도에서 처리효과가 현저히 높았다는 결과와 일치하였다. 저장 중 부패를 줄이기 위하여 길항균을 처리할 때 길항균의 처리농도는 매우 중요하며, 병원균과의 상호작용에 있어서 우위를 점하기 위해서는 일정수준 이상의 길항균 농도가 필요한 것으로 알려져 있다(Hong 등, 1998; Huang 등, 1992; Janisiewicz, 1988; 1994; Janisiewicz 등, 1992; 1994; 1995; Leibinger 등, 1997; McLaughlin 등, 1990; Pusey 등, 1984; Usall 등, 2000a; 2000b). 또한 Nunes 등(2001)은 효과가 좋은 길항균이라 할지라도 병원균의 밀도가 높을 경우에는 그 효과가 저하되는 것으로 보고한 바 있다. 그러나, 본 시험에서 P47-10균주와 P76-9균주를 처리하였을 때 각각 1.8×10^6 과 8.2×10^7 의

Table 3. Lesion diameters (mm)^a on apples protected with different concentration of eight antifungal bacteria isolated from surface of apples and pears and wounds-inoculated with suspensions of *Penicillium expansum*

Antagonist ^b	Dilution rate (times) of antagonists			Untreated control
	Undiluted	10	100	
P 43-1	7.7	21.3	19.0	25.0
P 43-2	7.3	15.3	20.7	19.3
A 46-6	8.7	23.0	22.0	21.3
P 47-10	12.3	4.3	0	23.0
A 71-2	5.3	18.0	22.3	22.7
P 76-9	14.0	5.3	0	21.0
P 94-1	6.0	13.0	16.7	16.3
A 101-1	17.7	17.7	24.7	25.7

^aLesion diameters were investigated 7 days after inoculation of *P. expansum*.

^bOriginal concentration of eight antifungal bacteria used: P 43-1, 4.1×10^8 ; P 43-2, 9.8×10^8 ; A 46-6, 3.7×10^8 ; P 47-10, 1.8×10^8 ; A 71-2, 4.5×10^8 ; P 76-9, 8.2×10^9 ; P 94-1, 8.9×10^8 ; A 101-1, 4.0×10^7 .

고농도 보다 1.8×10^6 과 8.2×10^7 의 저농도에서 처리효과가 높은 것으로 나타났는데, 그 원인에 대해서는 추후 좀 더 검토가 필요하다고 생각된다.

길항균 동정. 선발한 사과푸른곰팡이병 억제길항균주를 그람염색한 결과 P76-9균주를 제외한 모든 균주는 그람 양성인 것으로 나타났으며, Bartholomew Mitchell의 방법을 응용한 Walts의 방법을 이용하여 포자염색을 한 결과 내생포자를 형성하는 것으로 나타났다. 이들 그람양성 세균은 공기 존재 하에서 생육하였으며, catalase 활성이 있었고, oxidase 활성은 없는 것으로 나타나 *Bacillus*속 세균으로 동정하였다. 그람염색 및 세균학적 시험으로 얻어진 결과에 따라 그람음성인 P76-9균주는 GN Biolog microplate를, 그 7균주는 GP Biolog microplate에 배양한 다음 Biolog reader를 사용하여 동정한 결과, P43-1, P43-2 및 A71-2는 *Bacillus amyloliquefaciens*로, A46-6는 *B. megaterium*으로, P47-10은 *B. subtilis*로, P94-1은 *B. licheniformis*로, A 101-1은 *B. pumilus*인 것으로 나타났으며, 그람음성인 P76-9는 *Serratia marcescens*로 동정되었다(Table 4). Sholberg 등(1995)은 Biolog System의 GP MicroPlate 를 이용하여 동정하는 것이 기존의 세균학적, 생화학적 동정결과와 정확하게 일치하지는 않으나 *Bacillus*속 세균에서 종 수준의 동정이 가능함을 보고한 바 있다. 본 시험에서 얻어진 동정결과에 대한 확인을 위해서는 추후 추가적인 세균학적, 생화학적 시험이 필요할 것으로 생각된다.

탄소원 첨가가 병원균의 생장 및 길항균의 증식에 미치는 영향. 기본배지에 탄소원을 1% 첨가하고 병원균의 균사생장 및 포자형성 정도를 조사한 결과 균사생장은 모든 탄소원 첨가배지에서 억제되는 것으로 나타났는데 특히 galactose를 첨가한 배지에서 가장 낮았고, 포자형성은 다른 탄소원에 비해 starch와 fructose를 첨가한 배지에서 낮은 경향이었다(Table 5). Glucose를 첨가한 배지

Table 4. Identification, similarity index and next closest species for eight antifungal bacteria isolated from apple and pear fruits according to the Biolog microstation for bacterial identification

Strain	Identification	Similarity	Closest species
P 43-1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0.848	<i>B. licheniformis</i>
P 43-2	<i>B. amyloliquefaciens</i>	0.622	"
A 46-6	<i>B. megaterium</i>	0.874	<i>B. azotoformans</i>
P 47-10	<i>B. subtilis</i> var. <i>glodioli</i>	0.685	<i>B. licheniformis</i>
A 71-2	<i>B. amyloliquefaciens</i>	0.798	<i>B. licheniformis</i>
P 76-9	<i>Serratia marcescens</i>	0.514	<i>Enterobacter tayloraie</i>
P 94-1	<i>B. licheniformis</i>	0.652	<i>B. megaterium</i>
A 101-1	<i>B. pumilus</i>	0.858	<i>B. amyloliquefaciens</i>

Table 5. Influence of carbon sources on the growth and sporulation of *Penicillium expansum* causing postharvest decay of apple fruit

Carbon compound	Radial growth ^x (mm)	Sporulation ^y
Starch	15.3 bc ^z	+
Mannose	16.3 b	++
Glucose	14.7 cd	++
Arabinose	15.0 c	+++
Galactose	6.0 e	++
Glycerin	16.3 b	++
Dextrin	18.0 a	+++
Fructose	13.7 d	+
Untreated check	18.0 a	-

^{x,y}Radial growth of mycelia and sporulation of *Penicillium expansum* were measured in minimal salts basal medium supplemented with 1% (w/v) of each carbon compound.

^zIn a column, means followed by the same letter are not significantly different at 5% level by Duncans multiple range test.

에서도 무처리에 비해 균사생장을 억제하는 것으로 나타났다. 한편, 배지에 탄소원을 첨가하지 않을 경우 포자가 전혀 형성되지 않는 것으로 나타나 푸른곰팡이병균이 포자를 형성하기 위해서는 탄소원이 필요한 것으로 판단되었다. 또한 기본배지에 여러 가지 탄소원을 첨가하고 사

과푸른곰팡이병의 생장을 억제하는 길항균의 증식정도를 조사한 결과 glucose, glycerin, mannose 순으로 길항균의 증식에 효과적인 것으로 나타났다(Table 6). Janiesiewicz 등(1994)은 사과와 배에 발생하는 푸른 곰팡이병을 방제 시 2-deoxy-D-glucose(2-DOG)를 처리할 경우 길항균 (*Pseudomonas syringae*)의 증식에는 영향을 주지 않고 *P. expansum*의 생장을 억제함으로 길항균의 처리효과를 증진시킨다 하였는데, 본 시험에서도 glucose를 처리할 경우 병원균의 증식을 억제하고, 게다가 선발한 길항균의 증식을 촉진하는 것으로 나타나 길항균 처리효과 높이기 위한 영양원(탄소원)으로 선발하였다.

Glucose 첨가에 의한 in vivo 조건에서의 길항균의 처리효과 향상. In vivo 조건에서 과일표면에 상처를 내고 *B. amyloliquefaciens* P43-2, *B. amyloliquefaciens* A71-2, *S. marcescens* P76-9 및 *B. licheniformis* P94-1를 처리하면서 glucose를 첨가하였을 때, 모든 처리에서 푸른곰팡이병에 대한 발병억제효과가 증가되는 것으로 나타났다 (Table 7). 특히 *S. marcescens* P76-9를 처리했을 때에는 가장 효과가 우수하였는데 현재 저장병 방제용 미생물농약으로 사용되고 있는 Aspire^R과 대등한 효과를 나타냈다. 그 밖에 *B. amyloliquefaciens* P43-2를 처리할 경우에도 무처리의 병반면적 7.4 mm에 비해 3.8 mm로 병 진전을

Table 6. Influence of carbon sources on the growth of four effective antagonists

Isolate	Growth ^y on minimal media amended with					
	Glucose	Mannose	Glycerin	Dextrin	Galactose	Control
<i>B. amyloliquefaciens</i> P 43-2	++++ ^z	+++	+++	++	+	-
<i>B. amyloliquefaciens</i> A 71-2	+++	+++	+++	++	+	-
<i>S. marcescens</i> P 76-9	++	++	++	++	++	-
<i>B. licheniformis</i> P 94-1	++	++	+++	++	+	-

^yMeasured in minimal salts basal medium supplemented with 1% each carbon compound.

^zNote : +, ++, +, - and means colony sizes of above 5 mm, 3.1~5 mm, 2.1~3 mm, less than 2.0 mm and no growth, respectively.

Table 7. Effect of glucose addition in the bacterial suspension on the suppression of the lesion development caused by *Penicillium expansum* on the apple fruit

Treatment	Lesion size (mm) on apple fruit			
	Wounded		Non-wounded	
	Glucose amended	Water	Glucose amended	Water
<i>B. amyloliquefaciens</i> P 43-2	3.8 ab ^x	7.4 ab ^y	0	0
<i>S. marcescens</i> P 76-9	1.6 b	3.1 b	0	0
<i>B. licheniformis</i> P 94-1	7.7 a	9.0 ab	0	0
Aspire ^R	1.4 b ^z	5.9 ab	0	0
Control	7.4 a	12.1 a	0	0

^{x,y}In a column, means followed by the same letter are not significantly different at 5% level by Duncans multiple range test.

^zAmended with NaHCO₃ instead of glucose.

Table 8. The effect of sodium carbonate, glucose and CaOCl (4%) pretreatment on postharvest decay of apple fruits caused by *Penicillium expansum*

Treatment	Lesion diameter (mm)		
	1 st trial	2 nd trial	Average
Sodium carbonate	0 c ^x	13.3 a ^y	6.7 b ^z
Glucose	7.4 ab	13.1 a	10.3 ab
CaOCl 4%	3.2 bc	15.4 a	9.3 b
Untreated check	12.1 a	17.2 a	14.5 a

^{x, y, z}In a column, means followed by the same letter are not significantly different at 5% level by Duncans multiple range test.

49% 억제하는 것으로 나타났다. 이상의 결과에서 glucose는 길항균의 처리효과를 증가시키는 영양원임이 확인되었다. 한편 Aspire^R 처리시에 사용되는 탄산수소나트륨은 멜론저장병을 일으키는 *Alternaria alternata*, *Fusarium spp.* 및 *Rhizopus stolonifer*와, 레몬 푸른곰팡이병(*Penicillium digitatum*) 등 여러 가지 저장병에 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Aharoni 등, 1997; El-Ghaouth 등, 2000). 본 시험에서도 2차에 걸쳐 병 진전효과를 검정한 결과 1차 시험에서는 전혀 병 발생이 없었고, 2차 시험에서는 병 진전을 23% 억제하는 것으로 나타나(Table 8), 탄산수소나트륨의 처리기술을 개발할 경우 좋은 농약대체제가 될 수 있을 것으로 사료된다. 과일표면에 상처를 내지 않았을 경우에는 무처리에서도 전혀 병이 발생되지 않았다.

사과표면 및 상처부위에서의 길항균의 밀도변동. 길항균의 밀도변동을 상처부위에서 조사한 결과, 3종의 *Bacillus* 속 세균 즉, *B. amyloliquefaciens* P43-2, *B. amyloliquefaciens* A71-2 및 *B. licheniformis* P94-1은 비슷한 양상을 보였는데 처리 후 7일까지는 밀도가 증가되다가 10일 후부터는

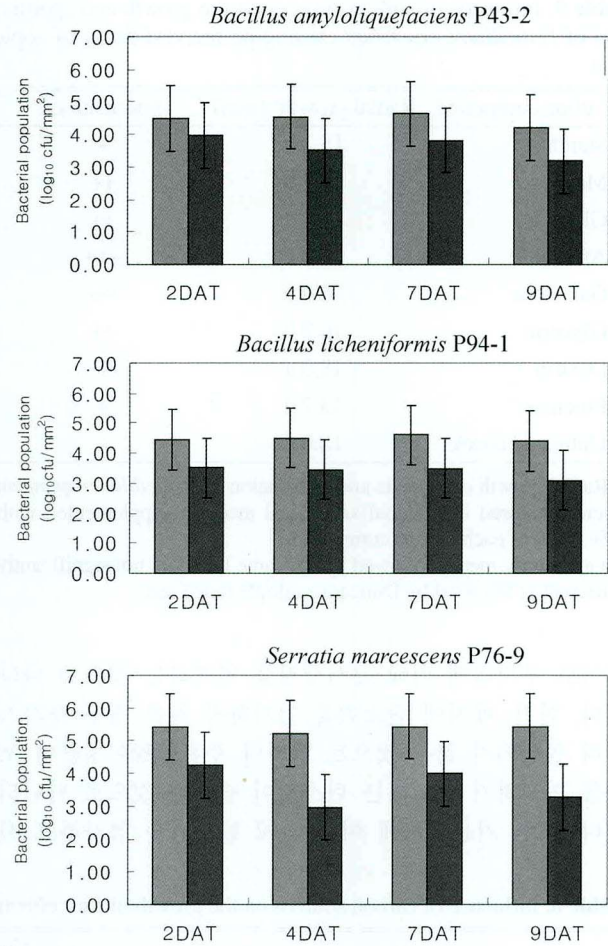


Fig. 2. Population dynamics of three antagonists on apple fruit wounds (■) and at the surface of healthy apple fruits (■).

감소되는 경향이었고, *Serratia marcescens* P76-9는 초기(처리 후 4일)에는 밀도가 감소되다가 처리 후 7일부터는

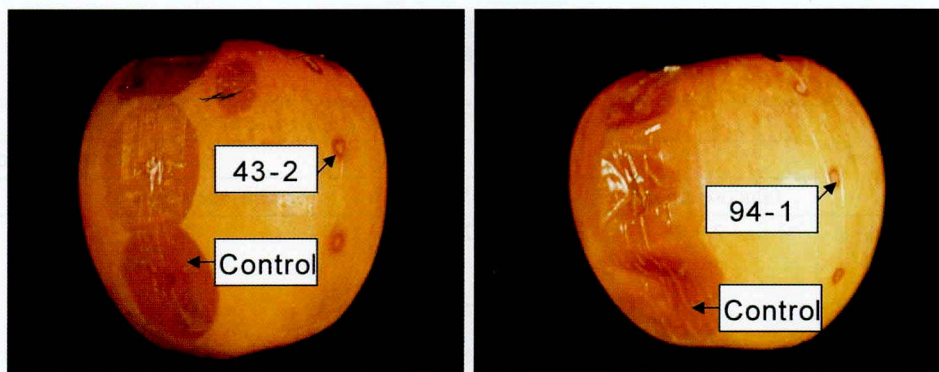


Fig. 1. Suppressive effect of two antagonistic bacteria, *Bacillus amyloliquefaciens* P43-2 and *Bacillus licheniformis* P94-1, on postharvest decay of apple fruits caused by *Penicillium expansum*. Areas of decay (right side) in fruits treated with two antagonists was significantly less than in nontreated fruit (left side).

증가되어 처리 후 10일까지도 일정한 수준으로 유지되는 것으로 나타났다(Fig. 2). 따라서 선발한 3종의 길항균 중 생물검정에서 가장 효과가 높았던 *S. marcescens* P76-9가 처리부위에서 가장 잘 정착하는 것으로 판단되었다.

요 약

사과 푸른곰팡이병을 방제하기 위하여 사과, 배, 복숭아 등 370점의 과일을 채취하여 과일표면으로부터 세균 1,080균주를 분리하였다. 분리한 1,080균주를 공시 하여 사과 저장병을 일으키는 *Penicillium expansum*, *Alternaria alternata* 그리고 *Botrytis cinerea*을 대상으로 항균활성 및 병 진전억제효과를 검정하여 8종의 길항세균을 선발하였다. 이 들 길항세균에 대한 세균학적 특성과 Biolog system에 의한 영양원 이용성을 조사한 결과 *Bacillus amyloliquefaciens*가 2균주, *B. megaterium*, *B. subtilis* var. *gladioli*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* 및 *Serratia marcescens*로 동정하였다. Glucose, mannose, starch 등 8종의 탄소원을 공시하여 병원균의 생장 및 길항균의 증식에 미치는 영향을 조사한 결과, 병원균의 증식을 억제하고 길항균의 증식을 촉진하는 영양원으로 glucose가 선발되었다. 길항균의 처리효과를 높이기 위하여 길항균 현탁액에 glucose를 1% 첨가하여 사과에 처리한 다음 푸른곰팡이병균을 10^5 포자/ml 농도로 처리하였을 때, 병 진전억제효과가 *S. marcescens* P76-9처리에서 48%, *B. amyloliquefaciens* P43-2 처리에서 46% 그리고 *B. licheniformis* P94-1 처리에서 14% 증가되었다. 사과표면의 상처부위에서 처리한 길항균의 밀도변동에 있어서는 *Bacillus* 속 세균인 *B. amyloliquefaciens* P43-2과 *B. licheniformis* P94-1는 처리 후 7일까지 밀도가 증가하다가 처리 후 10일부터는 감소되는 경향이었으며, *S. marcescens* P76-9는 초기(처리 후 4일)에는 밀도가 감소되다가 처리 후 7일부터 증가되어 처리 후 7일까지도 일정한 수준으로 밀도가 유지되었다.

참고문헌

Aharoni, Y., Fallik, E., Copel, A., Gil, M., Grinberg, S. and Klein, J. D. 1997. Sodium bicarbonate reduce postharvest decay development on melons. *Postharvest Biology and Technology* 10: 201-206.

Conway, W. S., Sams, C. E., McGuire, R. G. and Kelman, A. 1992. Calcium treatment of apples and potatoes to reduce postharvest decay. *Plant Dis.* 76: 329-334.

Droby, S., Wisniewski, M. E., Cohen, L., Weiss, B., Touitou, D., Eilam, Y. and Chalutz, E. 1997. Influence of $CaCl_2$ on

Penicillium digitatum, grapefruit peel tissue, and biocontrol activity of *Pichia guilliermondii*. *Phytopathology* 87: 310-315.

El-Ghaouth, A., Smilanick, J. L., Ippolito, A., Wisniewski, M. and Wilson, C. L. 2000a. Application of *Candida saitoana* and glycolchitosan for the control of postharvest diseases of apple and citrus fruit under semi-commercial conditions. *Plant Dis.* 84: 243-248.

El-Ghaouth, A., Smilanick, J. L. and Wilson, C. 2000b. Enhancement of the performance of *Candida saitoana* by the addition of glycolchitosan for the control of postharvest decay of apple and citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology* 19: 103-110.

Forbes-Smith, M. 1999. Induced resistance for the biological control of postharvest diseases of fruit and vegetables. *Food Australia* 51: 382-385.

Gullino, M. L., Benzi, D., Aloï, C., testoni, A. and Garibaldi, A. 1992. Biological control of *Botrytis* rot of apple. Proc. 10th Int. Botrytis Symposium: 197-200.

Hong, C. X., Michailides, T. J. and Holtz, B. A. 1998. Effects of wounding, inoculum density, and biological control agents on postharvest brown rot of stone fruits. *Plant Dis.* 82: 1210-1216.

Huang, Y., Wild, B. L. and Morris, S. C. 1992. Postharvest biological control of *Penicillium digitatum* decay on citrus fruit by *Bacillus pumilus*. *Ann. Appl. Biol.* 120: 367-372.

Janisiewicz, W. J. 1988. Biocontrol of postharvest diseases of apples with antagonist mixtures. *Phytopathology* 78: 194-198.

Janisiewicz, W. J. 1994. Enhancement of biocontrol of blue mold with the nutrient analog 2-deoxy-D-glucose on apples and pears. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 2671-2676.

Janisiewicz, W. J. and Bors, B. 1995. Development of a microbial community of bacterial and yeast antagonists to control wound-invading postharvest pathogens of fruits. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 3261-3267.

Janisiewicz, W. J., Peterson, D. L. and Rors, R. 1994. Control of storage decay of apples with *Sporobolomyces roseus*. *Plant Dis.* 78: 466-470.

Janisiewicz, W. J., Usall, J. and Bors, B. 1992. Nutritional enhancement of biocontrol of blue mold on apples. *Phytopathology* 82: 1364-1370.

Yong-Ki Kim, Ryung-Hee Kim, Jae-Dang Ryu, Sang-Yeob Lee and Yong-Chul Choi. 1998. Occurrence and control of postharvest diseases of apple. The Korean Journal of Pesticide Science 2(2): 83-89.

Yong-Ki Kim. 1995. Biological control of Phytophthora blight of red pepper by antagonistic *Bacillus polymyxa* AC-1. Ph. D. dissertation, Seoul National University, Suwon. 78pp.

Leibinger, W., Breuker, B., Hahn, M. and Mendgen, K. 1997. Control of postharvest pathogens and colonization of the apple surface by antagonistic microorganisms in the field. *Phytopathology* 87: 1103-1110.

- Lisansky, S. 1999. Biopesticide. 5th edition. Volume 2. CPL Scientific Publishing Service, Newbury, U. K. 482pp.
- McLaughlin, R. J., Wisniewski, M. E., Wilson, C. L. and Chalutz, E. 1990. Effect of inoculum concentration and salt solutions on biological control of postharvest diseases of apple with *Candida* sp. *Phytopathology* 80: 456-461.
- Nunes, C., Usall, J., Teixido, N. and Vinas, I. 2001. Biological control of postharvest pear diseases using a bacterium, *Pantoea agglomerans* CPA-2. *International Journal of Food Microbiology* 70: 53-56.
- Pusey, P. L. and Wilson, C. L. 1984. Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. *Plant Dis.* 68: 753-756.
- Sholberg, P. L., Marchi, A. and Bechard, J. 1995. Biocontrol of postharvest diseases of apple using *Bacillus* spp. isolated from stored apples. *Can. J. Microbiol.* 41: 247-252.
- Stevens, C., Khan, V. A., Lu, J. Y., Pusey, P. L., Igwegbe, K., Mafalo, Y., Chalutz, E. and Droby, S. 1997. Integration of ultraviolet(UV-C) light with yeast treatment for control of postharvest storage rots of fruits and vegetables. *Biological Control* 10: 98-103.
- Tanaka, 1990. Market disease guide book. Japan Plant Protection Association. 225pp.
- Usall, J., Teixido, N., Fons, E., Torres, R., de Eribe, X. O. and Vinas, I. 2001. Pilot tests of *Candida sake*(CPA-1) applications to control postharvest blue mold on apple fruit. *Postharvest Biology and Technology* 21: 147-156.
- Usall, J., Teixido, N., Fons, E. and Vinas, I. 2000. Biological control of blue mould on apple by a strain of *Candida sake* under several controlled atmosphere conditions. *International Journal of Food Microbiology* 58: 83-92.