

## 길항미생물에 의한 *Rhizoctonia* spp.의 억제 및 길항미생물의 농약 혼용시 생존율

이상재 · 심경구 · 김영권\* · 허근영

성균관대학교 조경학과 · \*고려바이오 연구소

### Suppression of *Rhizoctonia* spp. by Antagonistic Microorganisms and Their Compatibility with Fungicides

Lee, Sang-Jae, Kyung-Ku Shim, Young-Kwon Kim\* and Keun-Young Huh

Dept. of Landscape Architecture, Sung Kyun Kwan Univ., \*Institute of Corea Biotech.

#### ABSTRACT

174 isolates of soil microorganisms were isolated from E-golf club from Apr. 1997 through Oct. 1997. And 27 strains of them were selected through the inhibition test of mycelial growth. In the same period, soil-borne disease pathogens, "*Rhizoctonia*", causing Large patch, Brown patch, Spring dead spot, and Yellow patch were isolated from the diseased areas in E-golf and S-golf club. The antagonistic activity of the strains against the pathogens was tested to select the excellent antagonists. In contact with the fungicides, the survivability of the antagonists was tested to assess the compatibility of the antagonists with the pesticides. The results were as follows :

##### 1. Suppression of *Rhizoctonia* by Antagonists.

Antagonistic activity of 27 strains against the pathogens was tested in vitro. In the result, 3 isolates(B-7, B-15, B-41) of bacteria and 2 isolates(F-5, F-47) of fungi were superior to the rest.

##### 2. Compatibility of the antagonists with the fungicides

With 13 kinds of pesticides widely using Golf Club, Compatibility of 5 antagonists were finally tested to select the strains that mostly survived in contact with pesticides. In the results, two of five strains were selected : one strain was bacteria B-15, the other strain was fungi F-47. 24h after the mixing with pesticides, these two strains were shown to survive at 90% level and these were identified as *Bacillus* and *Trichoderma*, respectively. And the most compatible pesticides with the antagonists were shown to Polytoxin-D thiram(survivability 99.4%) and Validamycin-A (survivability 98.6%).

**Key words:** Antagonist, Large Patch, *Trichoderma*, Compatibility, Fungicide.

## 서론

골프장에 발생하는 주요 병해의 원인균은 *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Sclerophthoa*, *Bipolaris* 등으로 알려져 있으며, 이 중 가장 문제가 되는 것은 *Rhizoctonia*에 의한 토양 전염성 병해이다(Baker et al., 1984). *Rhizoctonia*는 토양 내에서 균핵 또는 균사상태로 잠복하다가 적당한 환경이 되면 기주식물(잔디)의 지체부를 가해하여 식물 전체를 고사시킨다(Chet et al., 1981; Chet and Baker, 1981). 현재, *Rhizoctonia*를 방제하기 위하여 다양한 농약이 사용되고 있다. 그러나 *Rhizoctonia*와 같이 균핵을 형성하는 토양전염성 병원균은 완전방제가 불가능하다. 따라서 매년 *Rhizoctonia*의 발생시기만 되면 다량의 농약을 투입해야 하는 실정이다. 그러나, 농약에 내성을 가지는 병원균이 출현하여 방제가 더욱 더 어려워지고 있으며, 농약에 의한 환경오염문제가 사회적 물의를 빚고 있다(Elad et al., 1979). 따라서, 최근에는 길항미생물을 이용하여 *Rhizoctonia*를 방제하고자 하는 시도가 행해지고 있다. Elad 등(1981)은 생물학적 방제는 환경친화적이고 환경오염을 유발하지 않으며, 토양내 병원균의 밀도를 점진적으로 피해밀도 이하로 낮추도록 하며, 병저항성 토양구조를 갖게 하는 등의 장점이 있다고 언급하고 있다. 그러나 생물학적 방제는 매우 환경친화적인 방법이지만, 단기적인 방제효과가 미약하다(Elad et al., 1981). 따라서, 현실적으로 골프장 잔디의 병해관리를 전적으로 천적미생물에만 의존할 수 없는 것이 사실이다.

농약에 의한 화학적 방제와 길항미생물에 의한 생물학적 방제는 나름대로의 장단점을 가지고 있다. 즉, 농약은 독성분에 의하여 병원균을 신속하게 죽일 수 있는 특징을 가지며, 길항미생물은 항균물질 분비, 병원균 생장의 필수양분 고갈, 토양내 병원균 서식처에 우점, 병원균을 직접적으로 기생하여 사멸시키는 등의 특징을 가지고 있다(Liu and Baker, 1980; Moody and Gindrat, 1977; Ruppel et al., 1983; Tu, 1980). 따라서, 이 두 가지 방법을 접목시키는 지혜가 필요하다고 하겠다.

본 연구는 국내 골프장 토양에 서식하는 천연의 미생물 중에서 Large patch, Brown patch, Spring dead spot(춘고병), Yellow patch에 대한 길항능력이 뛰어난 미생물을 선발하고, 선발된 우수 길항미생물 중에서 농약 혼용시에도 생존율이 뛰어난 미생물을 최종선발하기 위한 목적으로 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 길항균 분리 및 선발

1997년 4월부터 1997년 10월까지 용인시에 위치한 E-골프장의 무병반 그린 토양 15점과 무병반 페어웨이 토양 8점으로부터 총 174종의 토양미생물(세균 102종, 곰팡이 72종)을 1차적으로 분리하였다. 즉, 멸균증류수에 토양시료 10 g을 넣고 20분간 진탕한 후, 10배 희석법(10-fold serial dilution)을 이용하여 TSA(tryptic soy agar)와 chlortetracycline이 1 g/ℓ 첨가된 PDA 배지 각각에 0.1 ml씩 도말하여 25℃에서 3~7일간 배양시킨 후, 형성된 균총을 분리하였다. 이러한 방법으로 TSA배지에서 세균 102종을, PDA 배지에서 곰팡이 72종을 분리하였다. 이들 1차 분리균 중, 균총 형태, 색깔 및 현미경 관찰을 통하여, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*, *Gliocladium* 속으로 추정되는 81종의 미생물을 2차 선발하였으며, 2차 선발 미생물 81종을

대상으로 하여 보유 증인 *Rhizoctonia solani*와 대치배양을 실시한 결과, *Rhizoctonia solani*에 대한 길항능력이 상대적으로 우수한 미생물을 27종을 재선발(3차 선발)하였다. 이 27종의 미생물을 대상으로 하여 항균력 검정, 농약과의 혼용성 검정 시험을 수행하였다.

## 2. 병원균 분리

1997년 4월부터 1997년 10월까지 용인시와 순천시에 위치한 E-골프장, H-골프장, S-골프장의 병반지(그린, 티, 페어웨이)로부터 Large patch, Brown patch, Spring dead spot(춘고병) 및 Yellow patch 병반지로부터 원인균을 분리하여 본 시험에 사용하였다. 시료는 각각의 병이 발생한 병반지에서 병징이 한창 진전되고 있는 가장자리 토양부위의 이병엽을 채취하여 다음과 같은 방법으로 병원균을 분리하였다.

이병엽의 병진전부위를 약 0.5 cm 크기로 잘라 멸균수로 5회 세척한 후, 다시 59% alcohol 용액에 30초씩 3회 세척한 이병엽을  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g / l,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g / l,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10 mg / l,  $\text{NaNO}_3$  0.2 g / l, chloramphenicol 50 mg / l, agar 15 g / l 로 조성된 *Rhizoctonia* Selective Medium(상기 배지를 멸균하여 50℃ 내외로 식었을 때, chlortetracycline, 슈도펜, tannic acid를 각각 10 mg / l, 10 mg / l, 400 mg / l 의 농도가 되도록 0.45  $\mu\text{m}$  filter 멸균하여 첨가한 배지)에 치상하여 20℃에서 15일간 배양하였다. Petri dish에 형성된 곰팡이 균총을 새로운 PDA배지에 이식하여 다시 15일간 배양하였다. 형성된 곰팡이 균총의 형태 및 색깔, 균핵형성 유무, 균사의 현미경적 특징 등을 조사하여 *Rhizoctonia*임을 확인하였다.

이러한 방법으로, 각각의 병을 유발하는 병원균 4종을 순수분리하였으며 PDA사면배지에 보관하면서 본 시험에 사용하였다.

## 3. 농약확보

길항미생물과 농약과의 관계를 조사하기 위하여 현재 잔디의 각종 patch성 병해 방제용으로 고시되어 널리 쓰이고 있는 농약 13종을 확보하여 각 농약별 추천 희석배수에 준하여 길항 미생물과의 compatibility를 조사하고자 하였다(Table 1).

Table 1. Fungicides tested in this experiment

Trade name	Common name	Dilution fold	Application dosage( $\ell / \text{m}^2$ )
Polyoxin-D thiram	Polyoxin-D + thiram	500	1
Thiophan	Thiophanate - methyl	1,500	flooding
Monceren	Pencycron	1,000	1
Rizorex	Tolclofos - methyl	500	3
Robdong	Oxin-copper + iprodione	500	1
Moncart	Flutolanil	1,000	0.15
Robral	Iprodione	1,000	1
Benrate	Benomyl		0.15
Priene	Propamocarb hydrochloride	500	1
Cystene	Myclobutanil	1,000	flooding
Nonsa	Mepronil	1,000	1
Valimun	Validamycin-A	1,000	1
Daconil	Chlorothalonil	500	flooding

#### 4. 길항미생물의 병원균 생육억제력 조사

4종의 병반지로부터 분리한 병원균에 대한 27종 길항미생물의 생육억제력을 조사하기 위하여 다음과 같은 방법으로 대치배양시험을 실시하였다.

- 1) PDA 배지의 한쪽 부분에 병원균(agar piece)을 치상하였다.
- 2) 인접 부위에 길항미생물을 접종(세균의 경우는 1 loop를, 곰팡이의 경우는 agar piece채로 접종)
- 3) 20℃에서 7~10일간 배양한 후, 병원균 생육억제력을 조사(길항세균의 경우, 세균에 의한 병원균 생육저지선을 대치배양 7일 후에 측정하였으며, 길항곰팡이의 경우는, 대치배양 10 일 후 병원균과 길항곰팡이 균사간 접촉선의 이동방향 및 이동폭을 측정함으로써 길항능력을 정량분석하였다).

#### 5. 길항미생물의 농약 혼용시 생존율 조사

길항미생물과 농약 혼용시 생존율을 조사하기 위하여 다음과 같은 방법으로 시험을 실시하였다.

- 1) 농약 13종 각각을 추천희석배수의 2배 농도액을 0.45 μm membrane filter로 멸균하여 50 ml씩 준비
- 2) 균(포자)밀도  $2 \times 10^6$  /ml의 길항미생물 희석액을 50 ml 준비
- 3) 농약희석액과 길항미생물 희석액을 혼합하여 20℃에서 24시간 방치 (농약 농도 - 추천희석배수 농도, 길항미생물 농도 -  $1 \times 10^6$  /ml)
- 4) 혼합액을 멸균증류수로 serial dilution한 후, 세균은 Tryphic Soy Agar 배지에 plating 하여 25℃에서 2일간, 곰팡이는 PDA 배지에 plating하여 25℃에서 4일간 배양하여 C.F.U.를 계산하여 생존율을 얻었다.

### 결과 및 고찰

#### 1. 길항미생물에 의한 병원균 생육억제력

본 시험에서 선발한 27종의 길항미생물의 *R. solani*, *R. cerealis*에 대한 군사생육 억제력을 조사한 결과, 길항미생물에 의한 생육저지선을 조사한 세균의 경우, 15종의 후보균 중 3종(B-7, B-15, B-41)은 4종 병원균 모두에 대해 강력한 길항균이 나타났다(Table 3). 이들 길항세균은 생육하면서 병원균 성장억제물질을 분비하는 것으로 판단되며, 이 분비물들은 대부분의 *Rhizoctonia*에 대해 유효한 기능을 발휘하는 것으로 사료된다(Table 2).

곰팡이의 경우, 대치접종한 병원균과 길항균이 배지 중앙부를 향해 자라면서 군사간 접촉이 이루어지게 되는데, 접촉 이후, 군사간 상호 물리화학적 경쟁관계에 따라 어느 한쪽 균이 다른 한쪽 균을 overgrowth하면서 잠식하게 된다. 본 시험에서는 군사접촉지점을 기준으로 overgrowth한 길이를 측정하여 길항균의 길항력을 평가하였으며, 이때 길항균이 병원균을 overgrowth하였을 경우에는 (+)로, 병원균이 길항균을 overgrowth하였을 경우에는 (-)로 표시하였다.

상기와 같은 방법으로 평가한 결과, 12종의 후보길항균 중 2종(F-5, F-47)이 4종 병원균 모두에 대하여 +300 mm 이상의 overgrowth 능력을 나타냈다. 즉, F-5 길항균의 경우, 배양시간이

**Table 2.** The activity of antagonistic bacteria against *Rhizoctonia*

Bacterial strains	Inhibition zone(mm)*			
	Large patch ( <i>R. solani</i> )	Brown patch ( <i>R. solani</i> )	Spring dead spot ( <i>R. cerealis</i> )	Yellow patch ( <i>R. cerealis</i> )
B-1	6	26	6	5
<b>B-7</b>	25	27	30	28
B-9	0	16	5	4
<b>B-15</b>	30	28	27	26
B-20	8	12	6	7
B-26	14	7	12	12
B-29	0	0	4	0
B-38	5	0	14	27
<b>B-41</b>	26	28	29	27
B-44	5	0	14	7
B-59	0	16	0	26
B-63	8	0	0	14
B-88	29	0	4	0
B-96	0	13	5	14
B-98	4	25	15	6

\* Distance from the edge of bacterial colony to the edge of *Rhizoctonia* colony.

경과함에 따라 병원균 성장부위를 점점 잠식해 들어갔으며, 배양 8일 후에는 배양접시의 약 80%를 점유하게 되었다. 이때, *Rhizoctonia*는 정상적인 균사색깔(진한 갈색)을 나타내고 있었다. 한편, 길항균 F-47의 경우, F-5와 유사한 양상을 나타내고 있으나, 특이할 점은, 배양접시 한 부분에 아직 남아있는 병원균 균사체가 하얗게 변해있는 것을 확인할 수 있었다. 이는 길항균에 의해 분비된 특정 수용성 항균물질이 병원균쪽으로 확산되어 병원균 균사를 고사시킨 것이 아닌

**Table 3.** The activity of antagonistic fungi against *Rhizoctonia*

Fungal strains	Antagonistic activity(mm)*			
	Large patch	Brown patch	Spring dead spot	Yellow patch
F-2	-4	+15	-7	-7
<b>F-5</b>	+31	+33	+35	+34
F-21	+14	-7	+4	+7
F-25	-5	+38	-7	+18
F-40	+12	-6	+8	-7
<b>F-47</b>	+35(white)**	+32(white)	+32(white)	+36(white)
F-48	+5	+16	-4	+6
F-51	+3	+3	+17	+2
F-54	+29	-4	-5	+3
F-56	+11	-5	+6	-8
F-58	-6	+15	+28	+16
F-61	+15	+2	+14	+6

\* Extent of the outgrowth over the other colony, based on the contact point.

\*\* Mycelial color change to white

가 추측된다(Liu and Baker, 1980).

이상의 결과, 27종의 후보길항균 중 5종(B-7, B-15, B-41, F-5, F-47)의 미생물이 매우 탁월한 길항효과를 발휘하는 것으로 나타났으며 이들 길항미생물은 잔디병반 분리균 4종 모두에 대하여 공히 우수한 생육억제효과를 나타냈다(Table 4).

## 2. 길항미생물의 농약 혼용시 생존율

탁월한 길항효과를 나타낸 5종의 미생물을 대상으로 하여, 농약 혼합에 따른 생존율을 조사한 결과, 세균 B-15와 곰팡이 F-47은 본 시험에 사용한 모든 농약에 대하여 90% 내외의 생존율을 나타냈으며, 농약의 영향을 거의 받지 않는 것으로 나타났다(Table 5). 따라서 이들은 농약과 혼용하여 토양에 투입되더라도 토양 내에서 생존하는데 문제가 없을 것이라고 판단된다. 또한, 길항 미생물과의 혼용성이 가장 높은 농약은 폴리옥신 디치람(99.4%)이며, 바리문(98.6%), 로브동(88.8%), 로브랄(87.6%), 리조텍스(83.8%) 등도 혼용성이 양호한 것으로 나타났다.

**Table 4.** The selected strains showing strong antagonistic activity against *Rhizoctonia*

Microbials	Isolate names	The results of identification
Bacteria	B- 7	<i>Bacillus</i> sp.
	B-15	<i>Bacillus</i> sp.
	B-41	<i>Pseudomonas</i> sp.
Fungi	F- 5	<i>Gliocladium</i> sp.
	F-47	<i>Trichoderma</i> sp.

**Table 5.** The survivability of antagonist in contact with the pesticides

Common name	The survivability of antagonist(%)					Average
	*B-7	B-15	B-41	F-5	F-47	
Polyoxin-D + thram	99	98	100	100	100	99.4
Thiophanate - methyl	49	89	92	62	92	76.8
Pencycron	39	92	86	58	96	74.2
Tolclofos - methyl	84	87	94	61	93	83.8
Oxin-copper + iprodione	77	96	98	73	100	88.8
Flutolani	39	87	88	42	93	69.8
Iprodione	75	96	99	68	100	87.6
Benomyl	49	94	88	41	90	72.4
Propamocarb hydrochloride	38	88	59	35	91	62.2
Myclobutanil	45	84	62	59	85	67.0
Mepronil	44	78	47	51	79	53.8
Validamycin-A	96	100	99	98	100	98.6
Chlorothalonil	27	74	46	52	66	52.4
Average	58.5	89.5	81.4	61.5	91.2	79.8

\* B-7 : *Bacillus* sp., B-15 : *Bacillus* sp., B-41 : *Pseudomonas* sp., F-5 : *Gliocladium* sp., F-47 : *Trichoderma* sp.

## 적 요

1997년 4월부터 10월까지 경기도 용인시에 위치한 E-골프장에서 총 174종의 토양미생물을 분리하였고, 선발시험을 통하여 27종의 길항미생물을 확보하였다. 동 기간에 Large patch, Brown patch, Spring dead spot(춘고병), Yellow patch를 야기시키는 잔디병원균 *Rhizoctonia*을 용인시와 순천시에 위치한 E-골프장과 S-골프장의 병반지로부터 분리하였다. 잔디병원균에 대한 미생물의 길항력을 분석하여 우수한 길항미생물을 선발하였다. 그리고 잔디용 살균제와 혼합하여, 우수 길항미생물의 생존율을 분석하여 농약 혼용성을 평가하였다. 본 시험을 실시한 결과는 다음과 같다.

### 1. 길항미생물에 의한 병원균 생육억제력

4종의 병원균에 대하여 27종의 길항미생물을 실험실 내에서 분석하였다. 길항력을 평가한 결과, 길항력이 우수한 3종의 세균(B-7, B-15, B-41)과 2종의 곰팡이(F-5, F-47)를 선발하였다. 이들 5종의 길항미생물은 대부분의 Patch성 병원균인 *Rhizoctonia*의 생육을 억제하는 효과가 탁월한 것으로 나타났다.

### 2. 길항미생물의 농약 혼용시 생존율

잔디병해 방제용으로 이용되는 13종의 농약으로, 5종의 우수 길항미생물을 대상으로 농약과 혼합시 생존율을 조사한 결과, 5종의 우수 길항미생물 중에서 2종(B-15, F-47)이 선발되었다. 농약과의 혼합 24시간 후에도 90% 내외의 생존율을 보였으며, 동정결과, 세균 B-15는 *Bacillus*, 곰팡이 F-47은 *Trichoderma*인 것으로 확인되었다. 그리고, 길항미생물과의 혼용성이 우수한 농약은 폴리옥신 디치람(99.4%)과 바리문(98.6%)으로 나타났다.

## 인용문헌

1. Baker, R., Y. Elad, and I. Chet. 1984. The controlled experiment in the scientific method with special emphasis on biological control. *Phytopathology*. 74: 1019-1021.
2. Chet, I., G. E. Harman, and R. Baker. 1981. *Trichoderma hamatum*: Its hyphal interaction with *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. *Microb. Ecol.* 7: 29-38.
3. Chet, I., and R. Baker. 1981. Isolation and biocontrol potential of *Trichoderma hamatum* from soil naturally suppressive to *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*. 71:286-290.
4. Elad, Y., I. Chet, and J. Katan. 1979. *Trichoderma harzianum* : a biocontrol agent of *Sclerotium rolfii* and *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*. 70: 119-121.
5. Elad, Y., I. Chet, and Y. Henis. 1981. A selective medium for isolation and counting of *Trichoderma* sp. from soil. *Phytoparasitica*. 9: 59-67.
6. Elad, Y., I. Chet, and Y. Henis. 1981. Biological control of *Rhizoctonia solani* in strawberry fields by *Trichoderma harzianum*. *Plant Soil*, 60: 245-254.
7. Liu, S., and R. Baker. 1980. Mechanism of biological control in soils suppressive to *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*. 70: 404-412.

8. Moody, A. R. and D. Gindrat. 1977. Biological control of cucumber black root rot by *Gliocladium roseum*. *Phytopathology*. 67: 1159-1162.
9. Ruppel, E. G., R. Baker, G. E. Harman, J. P. Hubbard, R. J. Hecker, and I. Chet. 1983. Field tests of *Trichoderma harzianum rifai* agar. as a biocontrol agent of seeding disease in several crops and *Rhizoctonia* root rot of sugar beet. *Crop Prot.* 2: 399-408.