

잔디 피시움마름병 (*Pythium* blight)의 생물학적 방제를 위한 길항 미생물의 선발과 효력 검정

정우철* · 신태수 · 도기석 · 김원극 · 이재호 · 최기현

(주)그린바이오텍 부설 생명공학연구소

Development of Antagonistic Microorganism for Biological Control of *Pythium* Blight of Turfgrass

Woo Chul Jung*, Taek Su Shin, Ki Suk Do, Won Kuk Kim, Jae Ho Lee and Ki Hyun Choi

Green Biotech Co., Ltd., Sanggisug-ri, Gyoha-eup, Paju-city, Gyeonggi-do 737-28, Korea

(Received on November 10, 2006)

Pythium blight caused by *Pythium* spp. is one of major diseases in putting green of golf course. In this study, microorganisms which are antagonistic to *Pythium aphanidermatum*, a pathogen of pythium blight, were selected primary through *in vitro* tests, dual culture method and triple layer agar diffusion method. *In vivo* test against pythium blight were conducted to select the best candidate biocontrol microorganism by pot experiment in a plastic house. *Bacillus subtilis* GB-0365 was finally selected as a biocontrol agent against pythium blight. Relative Performance Index(RPI) was used as a criterion of selecting potential biocontrol agent. *B. subtilis* GB-0365 showed resistance to major synthetic agrochemicals used in golf course. Alternative application of synthetic agrochemicals and *B. subtilis* GB-0365 was most effective to successfully control pythium blight. *B. subtilis* GB-0365 suppressed the development of pythium blight of bentgrass by 56.4% as compared to non-treated control and its disease control efficacy was 60.9% of a synthetic fungicide Oxapro(WP) efficacy. *B. subtilis* GB-0365 has a potential to be a biocontrol agent for control of pythium blight.

Keywords : Biological control, *Bacillus subtilis* GB-0365, *Pythium* blight, *Pythium aphanidermatum*, Resistant to agrochemicals

Pythium spp.에 의해 화분과 작물인 잔디류에 발생하는 병에는 종자의 발아 전·후에 발생하는 모잘록병과 잎마름병, 관부·뿌리 썩음병 등이 있다. 또, 뿌리에 특별한 갈변이나 썩음 증상을 나타내지는 않지만 장애를 일으켜서 생육을 저해하는 경우도 보고되어 있다(Harmon와 Hardar, 1983). 이러한 병중에서 가장 널리 문제가 것으로 *Pythium* spp.에 의해 발생하는 잎마름병의 일종인 피시움마름병 (*Pythium* blight)이 있는데, 이와 관련된 *Pythium* spp.에는 주로 *P. aphanidermatum*, *P. graminicola*, *P. ultimum*과 *P. venterpoolii*가 일반적으로 알려져 있으나, 이 외에도 수종의 *Pythium* spp. 균들이 병해를 발생시킨다고 한다.

피시움마름병이 가장 문제가 되는 곳 중에는 골프장의

퍼팅 그린에 있다. 퍼팅 그린의 경우 한지형 잔디가 주로 식재되어 있는데, 이는 *Pythium* spp.에 감수성으로 병이 발생하기 쉽고, 토양 전염 병원균인 *Pythium* spp.의 병의 전파가 수매성으로 이루어지기 때문에 방제가 쉽지 않다. 또한, 퍼팅 그린에서 발생한 피시움마름병은 방제가 된 후에도 계절적·환경적으로 병원균 생육에 적합한 시기가 오면 주기적으로 재 발생되는 경우가 많으므로 방제에 많은 어려움이 따른다(안, 1992). 하지만, 퍼팅 그린의 경우 골프 코스의 심장과도 같은 역할을 하는 부분으로 항상 최상의 상태를 유지해야 하므로 코스 관리자 또는 관계자들은 상대적으로 더욱 많은 노력과 비용을 들여 병을 방제하기 위해 노력하고 있다.

현재 골프장에서 피시움마름병의 방제는 유기 합성 살균제를 이용한 화학적 방제법과 경종적 방제법이 주를 이루고 있다(Shurtleff 등, 1987). 하지만 기존의 화학적 방

*Corresponding author

Phone) +82-31-946-5614, Fax) +82-31-946-5615

E-mail) wcjung22@greenbiotech.com

제법의 경우 처리 장소인 그린은 대부분 사질성 토양으로 조성되어 있어 처리 약제가 쉽게 유실되고, 살균제의 남용과 오랜 사용은 환경오염, 인축 독성, 저항성 병원균의 발생 등 여러 부분에 문제점을 발생시킬 수 있다는 단점이 있다(Nelson, 1997; Uddin와 Viji, 2002).

지금까지 유기 합성 살균제의 문제점을 극복하고, 난방제성인 피시움마름병의 방제를 하기 위한 연구가 많이 진행되었다. 일반적으로 유기 합성 살균제의 대체방법으로는 천연물을 이용한 제제와 미생물을 이용한 생물적 방제가 주를 이루는데, 생물적 방제법으로 황(1996) 등은 인삼의 뿌리썩음병 방제 미생물제제로 개발된 6가지 균주를 이용하여 피시움마름병에 대한 높은 방제 효과를 보았고, 염(1999)은 *Trichoderma*를 이용하여 피시움마름병에 대한 방제 효과를 연구하였다.

본 연구에서는 수년간 여러 지역에서 채취한 토양 내 미생물에 대해 피시움마름병을 일으키는 *Pythium* spp.의 길항균을 *in vitro*에서 활성 검증하여 선발하였고, 풋트와 간이 묘포장 수준에서 생물 검정 시험을 통해 피시움마름병 방제제로 사용할 수 있는 미생물 제제를 개발코자 하였다.

재료 및 방법

길항 미생물 선발. 퍼팅 그린에서 문제가 되고 있는 토양 전염성 병원균에 대해 항균 활성을 갖는 미생물을 선발하기 위해서 경기 9개 지역, 충북 2개 지역, 충남 1개 지역의 골프장 토양과 밭 토양, 산림 토양을 채취하였고, 삼중층 평판배지를 이용하여 길항균을 분리하였다. 삼중층 평판배지를 만들기 위한 과정은 다음과 같이 진행하였다. 양질의 토양 250 g에 2배량의 증류수를 넣고 가압 멸균한 다음 거즈를 이용하여 여과하였다. 여액을 증류수를 사용하여 1 l로 조정하고 다음 agar 15 g을 첨가하고 30 ml/용 시험관에 10 ml/씩 분주한 다음, 통상의 방법으로 가압 멸균하여 50°C의 항온수조에 보관하였다. 이어서 채취한 토양시료 1 g을 멸균한 생리식염수 100 ml에 잘 현탁한 다음, 현탁액 2~3 방울을 상기 시험관에 넣고 잘 혼합하여 plate를 제조하였다. 지금까지 제조한 plate 위에 water agar 용액 5 ml/를 넣어 균한 후 마지막으로 계대배양중인 사면배지로부터 잔디병원성 미생물의 포자현탁액(1×10^5 cfu/ml)을 만든 것을 50°C 항온기에 준비된 PDA 배지 10 ml에 2~3방울 첨가하고 잘 혼합한 후에 상기의 plate에 다시 분주하여 삼중층평판배지를 제조하였다. 제조된 평판배지를 30°C 항온기에서 3~7일간 배양하고, 피시움마름병 병원균인 *Pythium aphanidermatum*에 대

해 길항성을 조사하여 길항성이 있는 것으로 보이는 미생물은 순수 분리한 후, Tryptic Soy Broth(TSB) 배지를 이용하여 배양한 다음 대칭배양법과 생육 저지환 측정법을 이용하여 우수한 길항력이 있는 미생물을 선별하였다. 대칭배양법의 경우 다음의 식에 의해 생육 저해율을 계산하였고, 생육 저지환 측정법은 투명환의 직경으로서 길항력을 평가하였다.

생장억제율(%) =

$$\frac{(\text{공시 균주에 대한 병원균류의 생육 억제 변경})}{(\text{대조구 상에서의 병원성 균류의 생육 변경})} \times 100$$

길항 미생물의 잔디병 억제 효과 검증(풋트 실험)

실험 작물. 실험 작물은 골프장 그린의 주초종인 크리핑 벤투그라스(품종: 펜크로스)로 잔디 포지에서 채취하여 30×45 cm 사각 풋트로 옮긴 후에 20~30°C의 온실에서 30일 이상 활착을 시킨 것이나 파종 후 60일 이상 재배한 것을 사용하였다.

병원균 접종원. 병원균의 접종원은 1일 간격으로 2회 연속 살균한 sand-oatmeal 배양기(1,000 ml 삼각플라스틱에 모래 380 g, oatmeal 20 g을 넣어 혼합하고, 증류수 76 ml를 첨가)에 감자한천배지(PDA)에서 5일간 배양한 피시움마름병의 병원균 *P. aphanidermatum*의 균총을 코르크보아로 잘라 5개씩 이식하여 30°C 항온기에서 20일간 배양하여 준비하였다.

풋트 수준의 약효 검증 실험. 병원균 접종은 길항미생물 처리 전에 풋트당 접종체 20 g 수준으로 처리하였으며, 길항미생물 처리는 대상 길항미생물이 충분히 자랄 수 있도록 적절한 배지(PDB 또는 TSB)에서 충분히 배양한 다음 배양액을 100배 희석하여 풋트당 200 ml/씩 처리하였다. 대조 화학 농약으로는 옥사프로 수화제 500배 희석액을 살포하였다. 약제 처리 후에 습실상(온도 28°C, 상대습도 100%) 안에서 발병을 유도하였다. 처리 10일 후에 발병 면적율을 조사하고, 무처리 대비 방제율(%)을 구하여 높은 항균활성을 나타내는 미생물을 선발하였다.

Relative Performance Indies(RPI). 최종 길항 미생물의 선정은 병원균에 대한 길항력과 생장 속도를 복합적으로 고려할 수 있도록 RPI 기법을 이용하였다. RPI를 구하는 방법은 다음과 같으며, Efficacy는 앞서의 생물 검정 시험(풋트 시험)에서의 방제율을 X 값으로 계산하였고, Kinetics는 후보 균들을 5 ml/ LBS 배지(soluble starch, 10 g/l; Tryptone, 10 g/l; Yeast extract, 5 g/l; NaCl, 5 g/l)에서 1차 사면배양(30°C, 16시간)한 후, 10 ml/ LBS 배지에서 2차 사면배양(30°C, 12시간)을 진행한 후보 균들의 최종

OD₆₀₀을 X 값으로 이용하였다.

$$RPI = RPI_{\text{Efficacy}} + RPI_{\text{Kinetics}}$$

i) 병원균에 대한 길항력에 관한 RPI_{Efficacy}

$$RPI_{\text{Efficacy}} = [\{ (X - \bar{X}) / \sigma \} - 2] \times 25$$

ii) 후보균의 성장속도에 대한 RPI_{Kinetics}

$$RPI_{\text{Kinetics}} = [\{ (X - \bar{X}) / \sigma \} + 2] \times 25$$

X: single observation value

\bar{X} : the average of all observations

σ : the standard deviation of observations

길항 미생물의 동정. 균주 선발 과정을 통해 잔디 피시움마름병에 높은 항균활성을 나타내는 미생물을 최종 선발하였고, 이 균주의 동정을 위해 형태적 특성 및 생리적 특성을 조사하였다. 균주의 동정에 있어 1차적으로 Bergey's manual of determinative bacteriology, Microbiological methods, Manual of methods for general bacteriology, Bergey's manual of systemic bacteriology 등을 참고하였고, BIOLOG system, Fatty acid methyl ester(FAME) 분석과 16s RNA 유전자 염기서열 분석을 통하여 최종적으로 동정하였다.

IPM(Intergrated Pest Management) 소재 여부 검정 실험. 골프장에서 사용하고 있는 화학 농약과의 혼용성 여부를 검정함으로써 IPM 소재로서의 여부를 검증해 보았다. 최종 선발 미생물을 LB 배지(yeast extract 0.5%, tryptone 1.0%, NaCl 0.5%)에서 30°C에 12시간 동안 진탕 배양하고, 1×10^7 cell(spore)/ml 수준으로 조정하여 현탁액을 제조하였다. 이 현탁액을 0.85% topping용 soft agar 5 ml에 100 μ l을 첨가하고 잘 혼합한 후, LB agar plate에 부어 풍건하여 농약 혼용성 평가용 plate를 제조하였다. 물 처리를 대조구로 하고, 검정 대상 농약의 권장희석배수 1/10배, 1배, 2배 희석액을 제조하여 0.8 mm thick paper disc에 100 μ l씩 처리하여서 미리 제작한 농약 혼용성 평가용 plate 위에 치상한 다음 30°C에서 배양하여 생육 저지원의 유무로 농약 혼용성을 평가하였다. 혼용성 여부는 전 농도에 걸쳐서 생육 저지원이 생기지 않는 것을 기준으로 하였다. 농약은 시중에서 판매되고 있는 제품을 사용하였다.

미생물 제제와 유기 합성 살균제의 혼용에 따른 효력 검정 실험. 미생물 제제의 단독 처리와 혼용 처리의 효력 차이를 검정하기 위해 온실 내에서 포트 수준의 생물 검정 실험을 실시하였다. 병원균의 준비와 접종법은 위에서 설명한 포트 수준의 생물 검정 실험과 같고, 미생물 제제의 경우 최종 선발된 길항 미생물을 사용하였으며,

혼용 또는 단독 처리한 화학 농약으로 metalaxyl을 사용하였다. 실험구의 약제 처리는 다음과 같이 분류하여 실시하였다. 미생물 제제의 단독 처리 효과를 알아보기 위해 최종 선발 길항 미생물을 100배 희석하여 처리구당 1 l/m² 처리하였고, 미생물 제제와 화학 농약의 혼합 처리 효과를 알아보기 위해 metalaxyl 2000배 희석액을 사용하여 최종 선발 길항 미생물을 100배 희석하여 처리구당 1 l/m² 처리하였다. 미생물 제제와 화학 농약의 교호 사용에 따른 효과를 알아보기 위해서 metalaxyl을 2000배 희석 처리하고, 3일 후에 최종 선발 길항 미생물 제제를 100배 희석하여 처리구당 1 l/m² 처리하였다. 대조구로는 무처리구와 유기 합성 살균제 단독 처리구를 두었고, 무처리구 대비 방제가로 효력을 검증하였다.

간이 묘포장 수준의 약효·약해 검증 실험. 최종 선발된 길항 미생물의 약효 실험은 경기도 모 골프장의 간이 묘포장에서 난괴법 3반복으로 실험구(1 실험구당 4 m²)를 배치하여 진행하였다. 대상 작물은 약효 검증 실험의 경우 한지형 잔디인 크리핑 벤프그라스(Creeping bentgrass), 약해 실험은 크리핑 벤프그라스와 난지형 잔디인 한국 잔디(*Zoysia japonica*)를 사용하였다. 실험은 피시움마름병 자연 발생지에서 진행하였으며, 길항 미생물의 처리는 본 연구기관인 그린바이오텍에서 개발한 최적 생산 배지와 최적 배양 공정을 통해 만들어진 시제품을 100배 희석하여 발병 직후부터 7일 간격으로 실험구 당 1 l/m²씩 4주간 처리하였다. 대조 화학 농약은 옥사프로 수화제를 사용하였으며, 500배 희석액을 역시 1주 간격으로 4회 경엽 살포하였다. 최종 처리 7일 후에는 발병 면적을 조사하였고, 무처리 대비 방제(%)와 화학 농약 대비 방제 효과(%)를 구하였다. 약해 검증 실험의 경우 약효 검증 실험 기준량과 그 배량으로 실험을 실시하였고, 1 실험구(1 m²) 당 약효 검증 실험량과 같은 1 l/m²로 처리하였다.

결과 및 고찰

길항 미생물의 활성 검정. 각 지역의 토양에서 삼중층 평판배지를 이용하여 길항성이 있는 것으로 보이는 미생물의 colony를 분리하였다. 이 때, 토양 현탁액에 존재하는 filamentous soil microorganism의 경우 water agar층까지 성장하여 병원균 접종 시 오염원으로 작용할 수 있으므로 토양 현탁액이 희석된 층이 일체의 외부 오염없이 완전히 건조된 후, water agar를 붓도록 함으로써 filamentous soil microorganism의 간섭을 방지하였다(이 등, 1997). 투명한 크기를 기준으로 순수 분리된 colony를 TSB에 배

양하여 colony의 형태 및 현미경 관찰을 통해 본 결과, actinomycetes, bacteria, fungi 등 총 28종의 미생물이 조사되었다. 각각의 순수 분리된 미생물은 지역과 분리 순서에 따라 일련의 명칭을 부여하였고, 대칭 배양법과 활성 저지원법을 이용하여 *P. aphanidermatum*에 대한 길항성을 조사하였다. 활성저지원 실험 결과 직경이 27 mm 이상인 것을 기준으로 활성이 존재한다고 보았으며, 본 연구와 동시 실시한 다른 실험 결과에서 우수한 길항력을 보인 미생물을 포함하여 13종에 대하여 대칭 배양법을 실시하였다. 조사 결과는 Table 1과 같다.

Table 1의 결과를 보면 *in vitro* 상에서 GB-0365와 GB-017, EW-15, F63 등이 *P. aphanidermatum*에 대해 높은 길

Table 1. Antifungal activity and inhibition of mycelial growth against *Pythium aphanidermatum* by antagonistic microorganisms isolated from soils

Antagonistic microorganism	Radius of clear zone ^a (mm)	Inhibition of mycelial growth (%) ^b
GBA-0927	27	40
GB-14	16	-
GB-14-1	24	-
GB-14-2	25	-
GB-15	17	-
GB-017	38	65
GB-18-1	22	-
GB-18-5	18	-
GB-19	25	-
GB-20(1)	28	50
GB-21	29	45
GB-21-1	15	-
GB-22	18	-
GB-24	14	-
GB-25	18	-
GB-25-1	17	-
GB-27	22	-
GB-28	17	-
GB-29	20	-
GB-30	30	45
GB-0365	35	69
EW 15	15	53
EW 42-1	24	30
EW 52	19	30
Pse D	18	45
OOOK	30	43
D48	31	50
F63	32	55

^aAntifungal activity by measuring radius of clear zone.
^bInhibition rate of mycelial growth by dual culture method.

항력을 가진 것으로 볼 수 있었다. 위의 *in vitro*의 결과를 토대로 풋트 수준의 생물 검정 실험을 통해 피시움마름병의 병 억제력을 측정할 후보 균주를 선발하였다.

생물 검정 실험(풋트 실험). 생물학적방제법에 이용할 미생물을 선발하기 위해서 신중히 고려해야 할 점 중 하나는 *in vitro* 상에서 대상 병원균에 대해 항균활성을 나타낸다고 해서 길항 미생물이 실제로 병 발생 억제력을 반드시 갖는다고는 말할 수 없다는 것이다(이 등, 1997). 이는 길항 미생물이 plate가 아닌 실제 현상이나 외부 토양에선 다른 미생물에 의한 간섭과 환경 요인에 의해 처리 지역에 정착할 수 없어서 병원균에 대해 억제력을 보이지 못할 수 있기 때문이다. 그리하여, 본 연구에서는 *in vitro* 상에서 길항 작용을 보인 균주에 대해 생물 검정 실험을 실시하였다. 앞서 *P. aphanidermatum*에 대해 길항 능력이 뛰어난 총 13개의 후보 균주에 대해 먼저 생물 검정 실험을 실시하였고, 이 중 병 발생 억제력 면에서 가장 높은 효과가 보이는 4개 균주에 대해 풋트를 이용한 2차 생물 검정 실험을 실시하여 Table 2에 결과를 나타내었다.

이중 F63과 GB-0365가 무처리 대조구 대비 방제가(%)에서 비교적 높은 병 발생 억제력을 갖는 것을 볼 수 있었으며, 두 균주는 통계적으로 화학 농약 처리와 동일한 수준의 우수한 방제력을 갖는 것을 알 수 있었다.

Relative Performance Indies(RPI). 토양 전염성 병원균의 방제를 목적으로 하는 미생물 제제로 이용되기 위하여 길항 미생물은 병원균에 대한 길항력 외에도 토양 내에서 밀도를 유지하고 병원균에 대한 지속적인 억제력을 갖기 위하여 병원균 대비 높은 성장 속도를 가지고 있어야 한다. 이에 본 연구에서는 RPI 개념을 도입하여 위 능력에 대해 검증하였다(Fig. 1). 결과적으로 RPI 값을 기준으로 보았을 때, GB-0365가 약 80으로 가장 높은 RPI 값을 가진 것으로 나타나 피시움마름병에 대한 미생물 제

Table 2. Suppression of *Pythium* blight by antagonistic microorganisms isolated from various soil in pot test

Treatment	Disease incidence (%)			Average ^a	Control value (%) ^b
	No. 1	No. 2	No. 3		
D48	33	35	33	33.7 b	29.8
F63	10	25	23	19.3 cd	59.8
GB-017	20	25	30	25.0 bc	47.9
GB-0365	25	25	20	23.3 bcd	51.5
Oxapro(WP)	10	10	20	13.3 d	72.3
Control	40	50	54	48.0 a	-

^aDuncan's multiple range test, 95%.
^bCalculated from the equation $(1 - D. I_{\text{treat}} / D. I_{\text{cont}}) \times 100$.

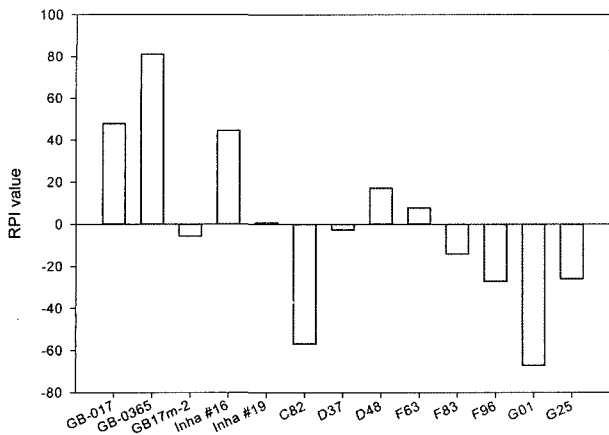


Fig. 1. Use of RPI to achieve a 2-dimensional assessment of antagonistic organism based on growth and control effect against *Pythium* blight of liquid-grown cells.

Table 3. Morphological and physiological characteristics of *B. subtilis* GB-0365

Factor	Characteristic
Shape	Rod
Gram stain	Positive
Spore strain	Endospore
Mobility	Mobile
Temperature range for growth	5.0~45.0°C
Optimum temperature range for growth	25.0~35.0°C
pH range for growth	5.0~7.0
Oxidase	+
Catalase	+
Voges-Proskauer reaction	-
Hydrolysis of starch	+
Hydrolysis of casein	+
Gelatin liquefaction	+
Indole production	-
NaCl tolerance for growth	2.0~10.0
Acid form from glucose	+
from arabinose	+
from xylose	-
from manitol	+
Analysis of cellular fattyacid composition	
C 14 : 0 Iso	2.1%
C 15 : 0 Iso	25.0%
C 15 : 0 anteiso	43.3%
C 15 : 0	1.0%
C 16 : 0 iso	4.4%
C 16 : 1 W 11C	1.7%
C 16 : 0	4.3%
Iso 17 : 1 W 10C	1.7%
C 17 : 0 Iso	7.2%
C 17 : 0 Anteiso	8.5%

제의 후보 균주로 최종 선정되었다.

최종 선발 미생물의 동정. 이전까지의 연구를 통해 피시움마름병의 방제를 위한 미생물 제제로 이용되기에 가장 적합한 균주로 GB-0365가 선정되었다. 이에 최종 선발 길항 미생물의 생리·형태학적 특성을 조사하고, 염기서열의 분석을 실시한 결과, GenBank의 *Bacillus subtilis* 와 16s rRNA 서열의 동일성이 98% 이상 나타나 최종적으로 *Bacillus subtilis*로 동정하였고, 동정 결과를 Table 3에 나타내었다. 동정 자료를 토대로 일반적인 *Bacillus* spp.의 배양 조건을 참고하여 실제 생물적 방제법에 사용될 수준의 배양 조건을 연구하였고, 본 연구의 간이 묘포장 실험에 사용한 시제품 생산에 적용하였다.

농약 혼용성 여부 검정. 골프 코스의 잔디 관리에 있어서 미생물 제제의 단독 처리만으로 발생하는 모든 병을 막는 것은 불가능하다. 본 연구에서 개발한 *B. GB-0365*의 경우 피시움마름병에는 효과가 있지만, 그밖에 발생하는 잔디동전 마름병(dollar spot), 녹병(rust), 갈색마름병(brown patch), 탄저병(anthracnose)과 페어웨이에서 주로 발생하는 황색 마름병(yellow patch) 등 다른 많은 병에도 효과가 있으리라 기대하기 어렵다. 그러므로 골프 코스의 관리를 위해서 생물적 방제에 이용할 길항 미생물이 살균제와 혼용 가능한지의 여부는 매우 중요하다.

본 연구를 통해 골프장에서 널리 사용되고 있는 화학 농약 제품 중 살균제 43종, 살충제 11종, 제초제 22종, 생장조절제 1종에 대하여 *B. subtilis* GB-0365의 농약 혼용 가능 여부를 조사하였다. Table 4에 나와 있는 결과에는 살균제의 경우, 카바메이트계, 피리미딘계, 이족사놀계, 카르복시아니라이드계, 아실아라닌계, 요소계 등 22종, 살충제는 유기인계, 카바메이트계, 합성 피레스로이드계 등 6종이 혼용 가능하였고, 제초제에 있어서는 디니트로아니린계, 설펜포우레아계, 카바메이트계 등 4종이 가능하였다.

미생물 제제와 유기 합성 살균제의 혼용에 따른 효력 검정 실험. 미생물 제제의 단독 처리로만 골프장 그린에서의 병해를 방제한다는 것은 현실적으로 어려운 일이다. 미생물 제제의 경우 일반적으로 화학 농약에 비해서 약효가 떨어지고, 사용 시 화학 농약에 비해 고려해야 할 점이 많은 단점을 가지고 있다. 하지만, 오랜 기간 동안 과도한 화학 농약의 사용이 계속될 경우 토양 내 병원균 뿐만 아니라 chitin의 분해 또는 식물 섬유소의 분해를 하는 유용미생물 역시 함께 영향을 받는다. 이는 텃취가 집적되어 생육환경이 악화되고, 각종 병해충의 발생을 높이는 결과를 가져온다(황과 최, 1999). 그러므로, 미생물 농약의 사용을 통해 당장의 비용 절감보다는 화학 농약의 사용량을 줄여 건강한 토양 상태를 유지하는 것이 골프

Table 4. Agrochemicals available to applicate together with *Bacillus subtilis* GB-0365

Products	
Fungicides	carbendazim, kasugamycin, nuarimol, hymexazol, metalaxyl, myclobutanil, mepronil, validamycin-A, bitertanol, etridiazole, iprodione, thiophanate-methyl, tebuconazole, tolclofos-methyl, triadimefon, propamocarb hydrochloride, pencycuron, hexaconazole, fenarimol
Insecticides	carbaryl, phosalone, deltamethrin, fenitrothion, etofenprox, ethoprophos, tralomethrin
Herbicides	triclopyr, pendimethalin, pyrazosulfuron-ethyl, pyributicarb

Table 5. Disease control efficacy of *B. subtilis* GB-0365 and metalaxyl against pythium blight of bentgrass

Treatment	Disease incidence (D. I.) (%) ^a	Control value (%) ^b
<i>B. subtilis</i> GB-0365 treatment	6.0	67.9
<i>B. subtilis</i> GB-0365 + Metalaxyl mixed application	3.8	79.6
<i>B. subtilis</i> GB-0365 + Metalaxyl combined application ^c	1.7	90.9
Metalaxyl treatment	5.0	73.2
Non-treated control	18.7	-

^aNumbers are average of 3 replications.
^bCalculated from the equation $(1 - D. I_{\text{treat}} / D. I_{\text{cont}}) \times 100$.
^cTreated *B. subtilis* GB-0365 at 3-days after treated metalaxyl.

장의 미래를 보았을 때 더욱 값어치 있는 일이다.

이런 관점에서 실시한 미생물 제제와 유기 합성 살균제의 혼용에 따른 실험 결과를 Table 5에 나타내었다. 최종 선발된 피시움마름병 병원균 *P. aphanidermatum*의 길항 미생물 *B. subtilis* GB-0365가 피시움마름병 용 화학 살균제인 metalaxyl 수화제와 거의 대등한 방제 효과를 보였으며, metalaxyl 수화제를 먼저 살포하고 3~4일 후에 *B. subtilis* GB-0365를 처리한 경우에 가장 강한 방제 효과를 보였다. 이를 보았을 때, *B. subtilis* GB-0365 역시 미생물 농약과 화학 농약의 혼용을 통해 효과를 증진시킬 수 있으며, 앞으로 미생물과 화학 농약의 혼용 처리에 따른 효력 상승효과 및 토양 미생물상의 변화에 대한 실험을 통해 골프장 관리에 실제 적용될 수 있는 모델의 개발이 필요할 것이다.

간이 묘포장에서의 생물 검정 시험. 최종 선발된 미생물인 *B. subtilis* GB-0365의 피시움마름병에 대한 효력 검정을 위하여 간이 묘포장에서 생물 검정 시험을 실시하였다. 이 실험은 기존의 생물 검정 실험과 다르게 병원균 접종을 하지 않고, 피시움마름병의 자연 발생지에서 실험을 실시하였다. 온실이나 실험실 내부에서의 생물 검정 실험에만 그칠 경우 실제 병 발생 현장에 바로 적용하는 것은 어렵다. 실제 골프장 환경은 기상 상태, 잔디의 생

Table 6. Effect of treatment of Creeping bentgrass with *B. subtilis* GB-0365 on control of pythium blight in nursery

Treatment	Disease incidence (%) ^a				Control value (%)
	1	2	3	Ave.	
<i>B. subtilis</i> GB-0365	30.7	10.4	19.0	20.0	56.4
Oxapro(WP) ^b	5.7	4.5	0	3.7	92.6
Non-treated control	63.0	27.7	47.0	45.9	-

^amonitored at 7-days after final treatment.
^btreated with sprayer.

육 정도, 토양의 이화학적, 시비량, 토양 병원균의 병원성 등 많은 차이가 있으며, 이로 인해 병의 발생 정도가 다르고 생물적 방제에 의한 결과도 달라질 수 있다(Harmon 과 Hardar, 1983). 이번 실험은 경기도 모 골프장의 실제 골프 코스와 대등한 관리 아래 있다 가정할 수 있는 간이 묘포장에서 실시하였다. 실험 기간 동안 실험 결과에 영향을 줄만한 기후적, 물리적 영향은 없었고, 발병률은 대조구에서 27% 이상으로 실험을 진행하기에 충분한 정도였다. 실험 결과는 Table 6과 같다. *P. aphanidermatum*만 처리한 대조구의 경우 전체적으로 높은 수준의 발병 면적율을 보이며 잔디가 고사했고, *B. subtilis* GB-0365를 처리한 경우 만족할 수준은 아니지만 무처리 대비 방제가는 56.4%, 화학 농약 대비 방제 효과는 60.9%로 비교적 우수한 방제 효과를 나타내었다. 약해는 기준 처리량 배량의 약제 처리에서도 크리핑 벤틀그라스와 한국 잔디 두 종에서 모두 발견되지 않았다.

실제 골프장에 미생물 농약을 이용한 생물적 방제를 적용하기 위해서는 크게 두 가지 조건을 갖추고 있어야 한다. 첫째로, 미생물 농약의 품질을 유지하는 것이다. 미생물의 경우 배양 조건 및 보존 상태에 따라 대상 병원균의 길항 활성에 큰 차이가 난다. 미생물이 대상 병원균에 활성을 나타내는 기작에는 중복 감염(hyperparasitism), 영양과 서식처에 대한 경쟁(competition) 및 항생물질에 의한 항생작용(antibiosis) 등으로 나눌 수 있는데(Baker, 1968), 미생물 농약이 효과를 나타내기 위해서는 이들 특성에 맞는 배양 조건, 균 밀도 유지, 항균 물질의 가수 분해 방

지 등의 개발 및 연구가 필요하다. 둘째로, 골프장 현장에 적합한 제형의 연구가 필요하다. 이런 관점에서 염(1999)의 경우, *Trichoderma harzianum* 균을 이용한 골프그린에 발생하는 피시움마름병 방제 실험에서 토양 내 미생물 제제의 처리 시 제형과 처리 방법이 효력에 얼마나 영향을 미치는 지 검증하여 Topdressing Aeration Core (TAC) 처리 시 관주 처리에 비하여 더 좋은 효과를 나타내었다. 미생물은 외부 환경에 노출되는 경우 급속한 밀도 저하를 일으키거나 대상 병원균에 대한 활성을 잃을 수 있다(Burges, 1998). 이를 방지하고 더 좋은 방제 결과를 얻기 위해 제형의 연구가 함께 뒤따라야 할 것이다.

요 약

Pythium spp. 균에 의해 발생하는 피시움마름병(Pythium blight)은 골프장 퍼팅 그린에서 문제가 되는 대표적 병해이다. 본 연구에서는 *Pythium aphanidermatum*를 피시움마름병 병원균으로 하여 생물학적 방제법에 이용할 수 있는 길항 미생물을 1차 선발하였고, 선발된 길항 미생물에 대해 포트 수준의 생물 검정 실험을 실시하였다. 두 실험을 통해 선발된 미생물 중에서 Relative Performance Indies 값을 기준으로 가장 우수한 것을 선별하여 피시움마름병에 대한 길항 미생물로 최종 선발하였고, 동정한 결과 *Bacillus subtilis*로 밝혀졌다. 최종 선발된 미생물은 *B. subtilis* GB-0365라 명명하였고, 화학 농약에 대한 내성 실험과 혼용 처리에 따른 효과를 검증하여 화학 농약과 시간의 차이를 두고 교호 살포할 경우 방제효과가 보다 높게 나타났다. 골프장의 간이 묘포장에서 자연 발생된 피시움마름병에 대한 *B. subtilis* GB-0365의 방제효과를 검증한 결과, 무처리 대비 방제가는 56.4%, 화학 농약 대비 방제가는 60.9%로 우수한 방제 효과를 가진 것으로 판명되었다.

감사의 글

본 연구는 한국환경기술진흥원 차세대 핵심환경기술개발사업의 지원에 의하여 수행되었으며, 지원에 감사드립니다.

참고문헌

- Baker, R. 1968. Mechanism of biological control of soil-borne pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 6: 263-294.
- Burges, H. D. 1998. Formulation of Microbial Biopesticides. 412p. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht, Netherlands.
- Nelson, E. B. 1997. Biological control of turfgrass disease. *Golf Course Management* 60-69.
- Harmon, G. E. and Hardar, Y. 1983. Biological control of *Pythium* species. *Seed Sci. Technology* 11: 893-906.
- Shurtleff, M. C., Fermanian, T. W. and Randell, R. 1987. Controlling turfgrass pests. 449 p. In: A reston book. Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, New Jersey.
- Uddin, W. and Viji, G. 2002. Biological control of turfgrass disease. pp. 313-314. In: Biological control of crop disease. Marcel Dekker, Inc. Barsel, New York.
- 이용세, 전하준, 이창호, 송치현. 1997. 잔디 토양전염성병원진균에 대한 길항미생물의 분리 및 길항효과, *Kor. J. Org. Agric.* 6: 133-149.
- 안용태. 1992. Golf장 관리의 기본과 실제, 한국잔디연구소. 유천문화사.
- 염주립. 1999. *Trichoderma harzianum* ABGC-95를 이용한 골프그린에 발생하는 *Pythium* 마름병의 생물적 방제. *한국잔디학회지* 13: 223-234.
- 황연성, 최준수, 김영호. 1996. Creeping Bentgrass에서 미생물제에 의한 *Pythium* Blight, Brown Patch 및 Dollar spot 방제 효과. *한국식물병리학회지.* 12: 237-244.
- 황연성, 최준수. 1999. 유용미생물의 사용이 잔디의 질과 이용성에 미치는 영향. *한국잔디학회지.* 13: 202-212.