

SCB저농도액비의 기능성향상을 위한 섬유소 분해 미생물균주탐색

임혜정* · 김영선 · 함선규
에이엠잔디연구소

Screening of Cellulose Decomposing Microorganisms for Functional Improvement for SCB (Slurry Composting and Biofiltering) Liquid Fertilizer

Hye-Jung Lim*, Young-Sun Kim, and Suon-Kyu Ham
Turfgrass Research Institute, AMENC Co. Ltd, Inchoen, Rep. of Korea

ABSTRACT. This study was performed to functional improvement by fermenting of SCB (Slurry Composting and Biofiltering) liquid fertilizer. After screening of cellulose decomposing test using microorganisms originated from composts produced with turf grass clipping, five kinds of Cellulose Decomposing Microorganisms (CDMs) were selected. The optimum medium for CDMs culture was Tryptic soy broth. The optimum fermenting time of CDMs in SCB liquid fertilizer was 36 hour. In addition, CDMs showed antimicrobial activity in vitro. *Sclerotinia homoeocarpa*, *Rhizoctonia solani* AG2-2(IV) and *Pythium* spp. were inhibited by CDMs, but *Rhizoctonia solani* AG2-2(IIIB) in vitro uneffected by CDMs we isolated.

Key words: Cellulose Decomposing microorganisms, SCB(Slurry Composting and Biofiltering), Antifungal activity

서 론

토양 유기물변화는 골프장 그린 및 티, 스포츠 잔디경기장과 같은 집약적으로 관리되는 모래기반 근권부의 통기성, 보수성, 투수성에 주요한 영향을 미치기 때문에 최근들어 골프장 잔디 관리자들은 토양 중 유기물함량에 대하여 관심을 가지고 있다(Qian and Follett, 2002). 유기물은 물리화학적성이 우수하여 골프코스의 토양물리성 개선에 효과적이거나(Joo, 1991; Joo, 1993) 여러 가지 토양개량제의 등장으로 퇴비용은 감소하였다. 특히, 골프코스에서 지나친 유기물의 축적은 thatch층을 형성하여 토양의 물리화학적성을 악화시키고, 발병의 원인이 된다(Park et al., 1998). 이러한 thatch의 주요 성분은 분해되기 어려운 세포벽 구성 성분인(carboxymethylcellulose, CMC) cellulose, hemicellulose와 lignin으로서 thatch건물량의 약 95%를 구성하고 있으며, 이중 cellulose는 20~40%가 함유(Yoon and Lee, 1990)되어 있어 분해가 지연되므로 thatch 건물량은 계속 증가하고 있다. 현재 대체방법으로 골프장에서는 유기물 관리를

배토(top-dressing), 코어링(coring), 수직깎기(vertical mowing), 그루밍(grooming) 등의 기계적인 방법들을 통하여 제거하고 있다(McCarty et al., 2005). 그러나 골프장 관리자들이 집약적으로 유기물 관리를 수행하고 있음에도 불구하고 여전히 위협적으로 증가하는 것을 효과적으로 조절하지 못하고 있는데(Huh and Ko, 2008), 그 이유는 토양 하부층의 유기물 집적이 원인이라고 예측된다(Huh et al., 2009). 기계적인 관리방법은 잔디표면을 단기적으로 손상시키는 결과를 가져오기 때문에 비파괴적이고 생물학적인 토양 유기물 제거를 위한 연구들이 수행되었지만(Ledeboer and Skogley, 1967; Murdoch and Barr, 1976) 뚜렷한 대체방법을 제시하지 못한 실정이다.

반면에 가축분뇨액비의 시비는 토양의 유기물의 분해를 촉진하여 토양 중 유기물 함량이 감소된다고 하였다(Lee et al., 2004). 따라서 가축분뇨액비는 골프코스에서 시용에 의해 골프코스의 대취층에 지나친 유기물의 축적을 방지할 수 있다고 판단된다(Ham et al., 2010). 가축분퇴비에서 분리된 일부 균들은 *Rhizoctonia solani*에서 항균력이 인정되었다(Seo et al., 1999).

따라서 본 연구는 가축분뇨액비를 퇴비단여과법(Slurry Composting and Biofiltering, SCB)을 통해 처리 후 생성된 SCB저농도액비의 기능성향상을 위해 유기물분해 균주인 섬유소분해 미생물을 탐색하여 선발하고자 한다.

*Corresponding author; Tel: +82-32-741-8516
E-mail : hih3843@naver.com
Received : May 17, 2011, Revised : May 30, 2011, Accepted : June 6, 2011

Table 1. The content of fertilizers used in this study.

(Unit : %)

Fertilizers	Type	Nutrient element (%)					
		N	P ₂ O ₅	K ₂ O	CaO	MgO	B ₂ O ₃
SCB	Liquid	0.138	-	0.38	0.03	0.02	-

재료 및 방법

섬유소분해 미생물 균주탐색

본 연구는 2010년 4월부터 2010년 11월까지 8개월 동안 (주)에이엠 이앤씨 부설 에이엠잔디연구소에서 수행하였고, 경기도 포천시 소재의 A골프클럽과 경기도 광주시 소재의 B 컨트리클럽에서 잔디 예초물 퇴비시료를 채취하였다. 잔디 예초물 퇴비시료를 5 g씩 정량하여 증류수 45 ml에 넣고 30분간 진탕한 후 적절히 희석하여 희석액 100 µl를 섬유소 분해배지(TSA + 1% CMC)에 도말한 후 25°C에서 7일간 배양하였다. 배양된 plate에 0.1%의 congo red solution로 10분간 염색시킨 후, 배지를 물로 세척하여 말린 다음 clear zone(cellulase 생산)의 생성여부를 확인하고 미생물을 분리하였다. 각 공시미생물의 섬유소분해 능력 정도를 확실히 검정하기 위하여 1차 기초조사, 2차 확인조사를 각각 실시하였다. 1차 조사에서 섬유소분해 능력이 있는 미생물을 선별하여 72시간동안 NB(Nutrient broth) 배지에 배양하여 20 µl씩 섬유소 분해배지(TSA + 1% CMC)에 도말하여 clear zone의 밝기여부로 2차 조사하였다.

섬유소분해 미생물균주의 생장 반응

잔디 예초물 퇴비시료에서 분리된 5종의 균주를 전배양부터 혼합 배양하여 사용하였다. TSB(Tryptic soy broth), NB배지에 24시간 동안 전배양한 섬유소분해 미생물균주를 25 ml의 TSB와 NB배지가 담긴 conical tube에 0.1%를 접종하고 진탕배양기(25°C, 180 rpm)에서 배양하였고, 분광광도계(UV-6800, Hitach, Japen)를 이용하여 접종 후 6시간 간격으로 멸균수와 1:1 희석하여 흡광도를 조사하였다.

SCB저농도액비에서 섬유소분해 미생물 균주의 생육평가

TSB(Tryptic soy broth)배지에 18시간 동안 전배양한 섬유소분해 미생물균주를 25 ml의 SCB가 담긴 conical tube에 0.1%를 접종하고 진탕배양기(25°C, 180 rpm)에서 배양하였다. 접종 후 6시간 간격으로 희석하여 TSA(Tryptic soy agar)배지에 100 ml 도말하여 colony수를 조사하였다.

섬유소분해 미생물균주가 첨가된 SCB저농도액비의 항균력 검정

섬유소분해 미생물균주를 SCB저농도액비에 처리하여

잔디병원균의 생육 억제여부를 검토하였다. 공시비료는 SCB저농도액비로 수행하였다. SCB저농도액비는 질소 0.138%와 칼리 0.3%이 주성분이고 인산과 칼슘, 마그네슘이 미량 포함되어 있었다(Table 1).

SCB저농도액비에 5종의 섬유소분해 미생물균주를 넣고 25°C에서 18시간 배양한 후 paper disc에 20 µl씩 점적한 후 PDA(Potato dextrose agar)배지 가장자리에 치상하였다. 잔디병원균을 5 mm Cork Borer를 이용하여 균일하게 자른 후, 중앙에 치상하였다. 25°C Incubator에서 5~7일 배양한 후 병원균의 균사생장억제율을 측정하였다. 항균력 시험을 위해 사용된 균주는 *Sclerotinia homoeocarpa*, *R. solani* AG2-2(IV), *R. solani* AG2-2(IIIB)와 *Pythium* spp.이었고 *S. homoeocarpa*, *Pythium* spp.은 2010년 sky72에서 분리하였고, NO.40132 *R. solani* AG2-2(IV), NO.40151 *R. solani* AG2-2(IIIB)는 KACC(Korean Agricultural Culture Collection)에서 분양받아 이용하였다.

균사 생장억제율(%) = ×100

결과 및 고찰

섬유소분해 미생물 균주탐색

예초물퇴비의 섬유소분해 미생물균주는 1차 실험결과 A골프클럽과 B컨트리클럽 퇴비에서 섬유소분해 미생물균주는 각각 12×10^5 cfu/ml와 3.3×10^5 cfu/ml로 조사되었으며(Table 2, Fig. 1), 배양 및 형태적 특성에 따라 5개의 균주를 선별하였다. Ham(2005)은 잔디 예초물 퇴비화 과정에서 CDMs이 퇴비 발효초기와 후숙과정에 관여한다고 보고하였다.

섬유소분해 미생물균주의 생장 반응

선발된 섬유소분해미생물균주의 배지에 따른 생장은 TSB

Table 2. The Cellulose Decomposing Microorganisms of Turf-grass clippings from Golf course.

Golf course ^z	Cellulose Decomposing Microorganisms
	colony (cfu×10 ⁵ cells/ml)
A	12
B	3.3

^zA : Pocheon, Gyeonggido, B : Gwangju, Gyeonggido

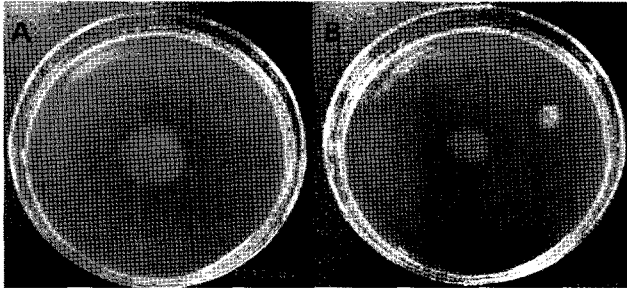


Fig. 1. Clear zone formation in cellulase medium (TSA+1% CMC) by CDMs. Cellulase medium was TSA contained 1% CMC (carboxymethylcellulose).

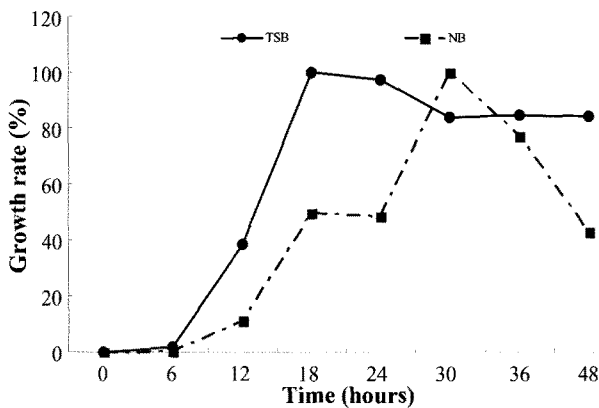


Fig. 2. Growth curve of CDMs on TSB and NB media.

와 NB배지에서 조사되었다. TSB배지에서는 접종 후 6시간까지 균생장이 거의 이루어지지 않다가 12시간이 지나면서 급격히 증가하여 18시간 후에 균생장이 최고조를 이룬 뒤 30시간 이후에는 사멸기가 시작되는 것으로 조사되었고, NB배지에서는 30시간 이후에 CDMs의 생장은 최고조를 이루었다. 배양된 섬유소분해미생물균주는 배지에 따라 성장시간이 달랐으며, 선발된 대취분해미생물균주의 배지에 따른 시간별 생장을 백분율로 환산한 결과, TSB와 NB배지에서 균생장이 최고를 이루는 시간이 각각 18와 30시간으로 나타났다(Fig. 2). NB배지에서 보다 TSB배지에서 CDMs의 성장속도가 빠른 것으로 조사되었다.

SCB저농도 액비에서 섬유소분해 미생물균주의 생육평가

선발된 섬유소분해 미생물균주를 TSB배지에서 18시간 전배양하여 SCB저농도액비에 접종한 결과, 접종 후 18시간에는 균생장이 거의 이루어지지 않다가 24시간이 지나면서 급격히 증가하여 36시간이 경과한 후에 균생장이 최고조를 이룬 뒤 48시간 이후에는 사멸기가 시작되는 것으로 확인되었다. SCB저농도액비만을 이용하여 배양한 결과는 30시간이후에 균생장이 최고조를 이루었다. SCB저농도액비에서 배양한 섬유소분해 미생물균주는 36시간에 196×10^5 cfu/ml으로 균생장이 가장 높았다(Table 3).

Table 3. Effect of culture time on cell growth of CDMs.

Time(hours)	Cell growth ² (cfu $\times 10^5$ cells/ml)		
	SCB ^y	SCB+CDMs	CDMs
6	66 b ^x	168 c	101 b
12	96 ab	185 bc	88 b
18	101 ab	177 c	76 b
24	96 ab	202 bc	106 b
30	127 a	237 b	109 b
36	117 ab	313 a	196 a
48	80 ab	216 bc	135 ab

²Growth was measured for viable cells by counting forming units(cfu) after dilution plating

^y(SCB+CDMs) - SCB = CDMs

^xDuncan's multiple range test 5% level

섬유소분해 미생물균주가 첨가된 SCB저농도액비의 항균력 검정

주요 잔디병원균에 대한 항균력을 검정한 결과 *S. homoeocarpa*, *R. solani* AG2-2(IV)와 *Pythium* spp.에서 SCB저농도액비는 9.8, 3.9, 28.0%로 균사생장억제 효과를 보였으며, CDMs이 첨가된 SCB저농도액비는 각각 14.1, 11.0, 26.8% 균사생장이 억제되었다(Fig. 3). *R. solani* AG2-2(IIIB)에 대해서는 균사생장억제효과가 나타나지 않았다(Table 4). 이 결과는 통계적 유의차는 없었으나 Yang et al. (2007)은 가축분뇨액비에서 길항성을 나타낸다고 보고하였고, Seo et al. (1999)은 퇴비에서 분리된 몇종의 미생물이 *R. solani*에서 항균력이 인정 되었으므로 잔디 퇴비에서 선발된 CDMs을 배양한 SCB저농도액비를 지속적으로 코스관리에 이용한다면 일부 잔디병원균에 효능이 있을 것으로 기대된다.

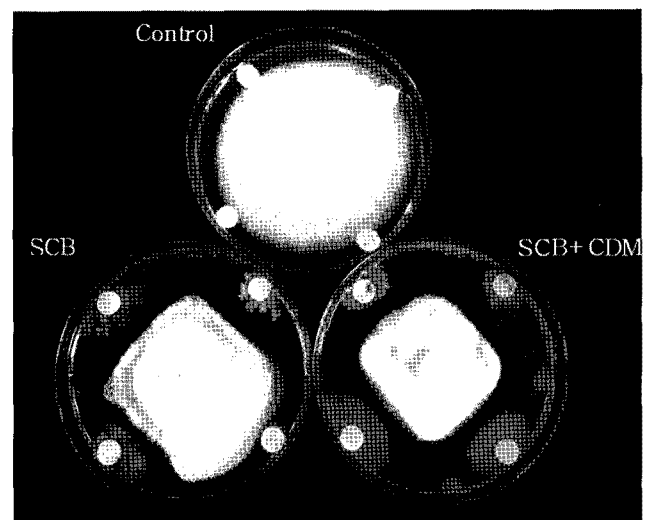


Fig. 3. Inhibition of *Pythium* spp. mycelial growth by SCB Liquid Fertilizer and CDMs at SCB Liquid Fertilizer on TSA.

Table 4. Inhibition rate of turfgrass pathogenic fungi mycelial growth by SCB and SCB added CDMs. (Unit : %)

Turfgrass pathogenic fungi	Treatment ^z	SCB	SCB+CDMs
<i>Sclerotinia homoeocarpa</i> (Dollar spot)		9.8 a ^y	14.1 a
<i>Rhizoctonia solani</i> AG2-2(IV) (Large patch)		3.9 a	11.0 a
<i>Rhizoctonia solani</i> AG2-2(IIIB) (Brown patch)		0.0 a	0.0 a
<i>Pythium</i> spp. (Pythium blight)		28.0 a	26.8 a

^zTreatments were SCB: Slurry Composting and biofiltration, SCB+ CDMs: Slurry Composting and biofiltration + five kind of Cellulose Decomposing Microorganisms

^yDuncan's multiple range test 5% level

요 약

본 연구는 SCB저농도액비의 기능성향상을 위한 섬유소 분해 미생물균주를 탐색하고 선발하기 위해 수행되었다. 예초물 퇴비에서 섬유소분해 미생물균주는 배양 및 형태적 특성에 따라 5개의 균주를 선발하였다. 선발된 섬유소 분해 미생물균주의 배지에 따른 균생장은 TSB배지에서 배양할 때 균의 성장속도가 가장 높게 나타났다. 섬유소분해 미생물균주를 SCB저농도액비에 접종한 결과, 접종 후 18 시간에는 균생장이 거의 이루어지지 않다가 24시간이 지나면서 급격히 증가하여 36시간후에 균생장이 최고조를 이룬 뒤 48시간 이후에는 사멸기가 시작되는 것으로 조사되었다. NB배지에서 보다 TSB배지에서 CDMs의 성장속도가 빠른 것으로 조사되었다. 주요 잔디병원균에 대한 항균력을 검정한 결과 *Sclerotinia homoeocarpa*, *Rhizoctonia solani* AG2-2(IV)와 *Pythium* spp.에서 CDMs을 첨가한 SCB저농도액비는 각각 14.1, 11.0, 26.8% 균사생장이 억제되었다. 통계적인 유의차는 없었으나, 잔디 퇴비에서 선발된 CDMs을 배양한 SCB저농도액비를 지속적으로 코스관리에 이용한다면 일부 잔디병원균에 효능이 있을 것으로 기대된다.

주요어: 섬유소분해 미생물, 퇴비단어과법(SCB), 항균력

감사의 글

이 논문은 농촌진흥청 어젠다 연구과제의 연구비지원에 의해 연구되었으며, 지원에 감사드립니다.

참고문헌

Ham, S.K. 2005. A study on the composting of turfgrass clippings

from golf courses. PhD Diss., Chungnam national Univ., Daejeon Korea.

- Ham, S.K., Y.S. Kim, and C.H. Park. 2010. The growth effects of creeping bentgrass by SCB(Slurry Composting and Biofiltration) liquid fertilizer application. *Kor. Turfgrass Sci.* 24(1):56-61.
- Huh, K.Y. and B.G. Ko. 2008. Organic Matter Dynamics on Golf Course Greens. *Journal of Korean Institute of Landscape Architecture.* 36(3) : 21-28.
- Huh, K.Y., I.H. Kim, and D. Markus. 2009. Assessment of microbial decomposition in soil organic matter accumulation with depth in golf greens. *Journal of Korean Institute of Landscape Architecture.* 37(4) : 64-71
- Joo, Y.K. 1991. Utilization of industrial waste to organic fertilizer for lawn. *Kor. Turfgrass Sci.* 5(2) : 81-86.
- Joo, Y.K. 1993. The measurement of soil conditioning effects of organic materials. *Kor. Turfgrass Sci.* 7(1) : 13-18.
- Ledeboer, F.B. and C.R. Skogley. 1967. Investigations into the nature of thatch and methods for its decomposition. *Agronomy Journal* 59 : 320-323.
- Lee, S.B., J.G. Kim, K.B. Lee, D.B. Lee and J.D. Kim. 2004. Decomposition of rice straw in paddy soil as affected by application of liquid pig manure. *Korean J. Soil Sci. Fert.* 37(2) : 104-108.
- McCarty, L.B., M.F. Gregg, J.J. Camberato and H.S. Hill. 2005. Minimizing thatch and mat development in a newly seeded creeping bentgrass golf green. *Crop Science* 45 : 1529-1535.
- Murdoch, C.L. and J.P. Barr. 1976. Ineffectiveness of commercial microorganism inoculum in breaking down thatch in common bermudagrass in Hawaii. *HortScience* 11 : 488-489.
- Park, J.H., S.Y. Kang, and H.K. Kim. 1998. Physiology of *Rhizoctonia solani* AG2-2(IV), *Trichoderma harzianum*, and *Chaetomium cochliodes*, and their utilization of thatch-related carbohydrate in *zoysia japonica*. *Kor. Turfgrass Sci.* 12(4) :
- Qian, Y. and R.F. Follett. 2002. Assessing soil carbon sequestration in turfgrass systems using long-term soil testing data. *Agronomy Journal* 94 : 930-935.
- Seo, M.C., K.H. So, and W.M. Park. 1999. Assays of maturity and antifungal activity against plant pathogen during the animal manure composting process. *Korean J. Soil Sci. Fert.* 32(3) : 285-294
- Yang, Y.K., J.I. Cho, H.K. Kang, M.N. Moon, and Y.B. Lee. 2007. Development of bio-formula complex for domestic animal feeding. *Korean Journal of Organic Agriculture.* 15(1) : 93-108
- Yoon, Y.B. and J.S. Lee. 1990. The differences of thatch accumulation by turfgrass species. *Kor. Turfgrass Sci.* 4(2) : 119-123.