

Research Report

가축분뇨액비의 길항미생물에 의한 토양전염성 병원균의 생육억제 효과

류주현¹, 심규열², 김기선^{1,3*}¹서울대학교 농업생명과학대학 식물생산과학부²한국잔디연구소³서울대학교 농업생명과학연구원

Inhibition of in Vitro Growth of Three Soil-borne Turfgrass Diseases by Antagonistic Bacteria from Composted Liquid Manure

Ju Hyun Ryu¹, Gyu Yul Shim², and Ki Sun Kim^{1,3*}¹Department of Horticultural Science & Biotechnology, Seoul National University, Seoul 151-921, Korea²Korea Turfgrass Research Institute, Seongnam 463-840, Korea³Research Institute of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Seoul 151-921, Korea

Abstract: This study was conducted to test in vitro the antagonistic effect of composted liquid manure (CLM) against soil-borne turfgrass pathogenic fungi, *Rhizoctonia solani* AG-2-2 (IIIB) (brown patch), *R. solani* AG-2-2 (IV) (large patch), and *Sclerotinia homoeocarpa* (dollar spot) for environmentally friendly turfgrass management. CLMs were collected from 9 livestock excretion treatment facilities around the country including Gunwi (GW), Hapcheon (HC), Hoengseong (HS), Icheon (IC), Iksan (IS), Muan (MA), Nonsan (NS), and Yeosu (YJ). CLMs of IC, GW, and IS showed significant ($p < 0.05$) mycelium growth inhibition that was 17.8%, 20.4%, and 48.0% against *R. solani* AG-2-2 (IIIB), *R. solani* AG-2-2 (IV), and *S. homoeocarpa*, respectively. A total of 110 bacterial isolates were obtained from the CLMs that showed antagonistic effects. Among them, 5, 4, and 10 microbe isolates showed promising antifungal activity against mycelium growth of *R. solani* AG-2-2 (IIIB), *R. solani* AG-2-2 (IV), and *S. homoeocarpa*, respectively. The bacterial isolates ICIIB60, GWIV70, and ISSH20 effectively inhibited the mycelial growth of three soil-borne turfgrass pathogens. Selected bacterial isolates were identified as *Alcaligenes* sp., *Bacillus licheniformis* Ab2, and *B. subtilis* C7-3 through 16s rDNA gene sequence analysis. Among 5 fungicides, the most compatible fungicide with ICIIB60, GWIV70, and ISSH20 was tebuconazol, toclofos-methyl and toclofos-methyl, respectively. These findings suggested that CLMs could be effectively used not only as organic liquid fertilizer sources but also as biological control agents for soil-borne turfgrass diseases such as brown patch, large patch, and dollar spot.

Additional key words: *Alcaligenes*, *Bacillus*, brown patch, dollar spot, integrated pest management (IPM), large patch

서 언

국내 골프장에 주로 발생하는 잔디병의 병원균들은 *Rhizoctonia*와 *Pythium*, *Fusarium*, *Sclerotinia* 등으로 알려져 있다. *Rhizoctonia*속 병원균에는 한국잔디에 large patch를 일으키는 *R. solani* AG2-2(IV)균과 한지형잔디에 brown

patch를 일으키는 *R. solani* AG2-2(III-B)균이 동정되어 보고되었다. *Sclerotinia*속은 dollar spot을 일으키는 *S. homoeocarpa*가 알려져 있으며, 페어웨이는 물론 티, 그린 등에도 많은 피해를 일으키고 있다(Shim and Kim, 2000). 이 균들은 토양 내에서 균핵 또는 균사의 형태로 존재하다가 발병조건이 갖추어지면 잔디의 지체부를 가해하여 식물체 전체를 고사

*Corresponding author: kisun@snu.ac.kr

※ Received 9 May 2014; Revised 23 July 2014; Accepted 2 August 2014. 본 연구는 2013년도 농촌진흥청 아젠다사업(No: PJ008456032013)의 지원에 의하여 수행되었음.

© 2014 Korean Society for Horticultural Science

시키며, 태치층 아래에 서식하기 때문에 무기 및 유기합성 농약을 이용한 방제가 어렵고, 한 번 발병한 부위에서 재발하는 경우가 많아 코스관리에 많은 문제를 안고 있다(Lee et al., 1998). 또한 잔디병해를 관리하기 위한 유기 및 무기합성 농약의 사용은 토양 및 수질오염이나 토양생태계 교란과 같은 환경문제를 일으켜 사용에 제한을 받고 있다. 따라서 길항미생물을 이용한 생물학적 방제와 같은 복합처리방안이 주목을 받고 있지만, 단기적인 방제효과와 구입비용 등의 문제로 실제 잔디관리 현장에서는 많이 사용되지 못하고 있다(Shim and Kim, 2000).

축산농가의 전업화, 기업화, 밀집화 사육에 의해서 발생된 다량의 가축분뇨 처리를 위해 고품분은 퇴비화시켜 일반 경종농가에 보급하고, 액상은 악취가 나지 않는 저농도액비로 만들어 수도작물이나 일반작물, 산림작물 등에 적용하고자 많은 노력을 기울이고 있다. 특히, 골프장과 잔디생산지는 넓은 면적에 연중 다량의 액비를 사용할 수 있다는 장점으로 인하여 잔디재배 및 관리에 가축분뇨액비 적용방안 마련을 위한 연구가 요구되고 있다.

잔디관리에 있어서 유기질비료는 완효성비료로서 질소성분을 지속적으로 천천히 용출시켜 양분용탈에 따른 환경오염을 줄이며, 잔디의 색과 생육을 증가시키거나(Garling and Boehm, 2001), 화학비료와 혼합하여 사용하였을 때 페스큐류나 잔디땃장생선에 필요한 화학비료의 사용량을 20-30% 정도 절감하는 효과를 얻었을 뿐만 아니라(Cheng et al., 2008), 가축분뇨 부숙퇴비나 옥수수가루와 모래의 혼합토에 길항미생물(*Enterobacter cloacea*)을 혼합하여 배토하였을 때 dollar spot이 감소하는 등 잔디병의 발생을 감소시켰다는 연구결과들이 보고되었다(Boulter et al., 2002; Nelson and Craft, 1991). Brown patch는 하수슬러지와 식물폐기물을 이용하여 배토하였을 때 각각 42%와 39%씩 병발생이 줄었고(Nelson and Boehm, 2002), large patch는 예지물을 이용한 부숙퇴비를 배토하였을 때 47% 정도 발병이 줄었다(Nakasaka et al., 1998). 이러한 연구결과들은 모두 고품 부숙퇴비를 배토하였을 때 나타난 결과로 가축분뇨의 유기질 액상비료에 대한 연구는 부족한 실정이다. 유기질 액상비료를 활용한 연구로는 가축분뇨액비의 일종인 SCB 액비를 고추나 토마토, 오이, 튜립나무의 재배에 적용한 연구(Kim et al., 2011; Lim et al., 2008; Park et al., 2011; Seo et al., 2010), 한국잔디와 한지형잔디의 잔디품질 변화 및 관리방안에 대한 연구(Ham et al., 2009, 2010; Kang et al., 2010; Park et al., 2012), SCB 액비 살포에 따른 골프장의 토양화

학적과 연못수질의 변화에 대한 모니터링(Kim et al., 2012) 및 SCB 액비 내에 있는 대취분해 미생물에 대한 연구(Lim et al., 2011) 등 일반 작물이나 잔디의 생육에 대한 연구가 일부 이루어지고 있으나, 가축분뇨 액비를 이용한 병발생 억제에 대한 연구는 수행되지 않고 있다.

잔디의 병발생을 억제하는 요인은 미생물활성의 변화나 미생물 군상의 변화, 토양 내 양분변화 등 여러 가지로 접근할 수 있다(Boulter et al., 2002). 특히 길항미생물은 항균물질의 분비나 양분경합, 서식처 우점, 병원균에 직접 기생 등의 특징을 나타냄으로써 병원균의 활력이나 군상의 변화를 가져와 병해를 줄이는 것으로 알려져 있다(Liu and Baker, 1980; Moody and Gindrat, 1977; Ruppel et al., 1983; Tu, 1980).

따라서 국내 각지의 공동자원화시설에서 생산되는 가축분뇨액비의 잔디병해 억제력을 알아보고, 액비 내 존재하는 미생물 중에서 brown patch와 large patch, dollar spot에 대한 길항력이 있는 미생물을 선발한 후, 선발된 길항미생물과 잔디관리에 많이 사용되는 농약과의 혼용성을 조사하여 종합적 방제(integrated pest management, IPM) 소재로서의 활용방안을 제시하고자 이번 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

가축분뇨액비 채취 및 길항력검정

2012년 9월에 전국의 광역단위별로 선정한 각 공동자원

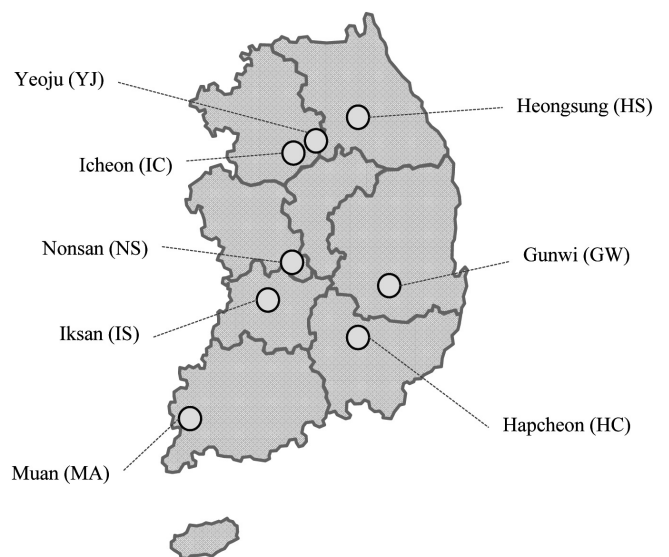


Fig. 1. Location of public livestock excretions treatment facilities for this study.

화센터에서 최종 저장조에 있는 가축분뇨액비를 1L씩 채취하였다(Fig. 1). 가축분뇨의 잔디병원균에 대한 항균효과 검정과 가축분뇨의 항균효과가 원액에 포함된 미생물에 의한 것인지를 확인하기 위하여 원액과 고압멸균처리한 가축분뇨를 각각 0.1mL씩 채취하여 6mm의 paper disk에 흡수시켜 감자한천배지(PDA)의 가장자리에 3개씩 치상하고 중앙에 공시균주를 이식하여 25°C 항온기에 5일간 배양한 후 균사의 성장길이를 무처리구와 비교하여 길항력을 검정하였다. 실험균주인 *Rhizoctonia solani* AG2-2(IIIB)와 *R. solani* AG2-2(IV)는 수원에 소재한 한국농업미생물자원센터로부터 분양받았으며(KACC No. 40132, No. 40151), *Sclerotinia homoeocarpa*는 대정잔디연구소(인천, 한국)로부터 분양받아 사용하였다.

길항미생물 분리 및 동정

길항력 검정결과 균사생장억제력을 보인 paper disk 근처의 균총을 긁어내어 생리식염수 1mL에 희석한 후 0.1mL씩 채취하여 NA(nutrient agar)배지에 도말한 후 25°C에서 3-7일간 배양시켰다. 이후 형성된 균총을 분리하여 총 273종을 분리하였다. 이들을 대상으로 보유중인 병원균주들과 대치배양을 실시한 결과 *R. solani* AG2-2(IIIB)에 길항능력이 있는 미생물 23종과 *R. solani* AG2-2(IV)에 길항능력이 있는 23종, *S. homoeocarpa*에 길항능력이 있는 54종 등 총 110종을 1차 선별하였다. 선별된 균주는 16s rRNA 유전자 염기서열 분석을 통하여 선별종의 동정 및 유사한 종의 분류를 실시하였고, 병원균주별로 상대적 길항력이 가장 우수한 한 종씩을 최종 선별하였다.

길항미생물 최적 생육조건 규명

선별된 길항미생물의 안정적 생산을 위한 최적배지를 선별하기 위하여 LBB(Luria bertani broth, Difco, USA), NB(Nutrient broth, Difco, USA), PDB(Potato dextrose broth, Difco, USA), TSB(Tryptic soy broth, Difco, USA)를 사용하였다. NA 배지에 24시간 배양한 균주들을 1loop(1μL, SPL, Korea)씩 NB broth 50mL에 이식하여 30°C, 180rpm으로 12시간 배양하여 접종원을 조제하였다. 삼각플라스크(250mL)에 상기의 4종 배양액을 100mL씩 분주하여 고압멸균한 후 준비된 접종원을 1mL씩 접종하고 30°C, 150rpm에서 72시간 동안 진탕배양하였다. 배양 중 24시간마다 배양액을 100μL씩 취하여 10⁻¹-10⁻⁵까지 희석한 후, 이를 NA 배지에 100μL씩 도말하여 균총의 수를 조사하여 배양균주의 증식 밀도를

측정하였다.

각 균주들의 생육 최적온도와 pH를 조사하기 위하여 각 생육 최적배지로 밝혀진 NB와 TSB 25mL에 각 균주들을 250μL씩 이식한 다음, 온도는 15-50°C까지 5°C 단위로, pH는 3-10까지 1단위로 구분하여 180rpm으로 24시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 spectrophotometer(Spectronic 21D, Milton Roy Co., Rochester, NY, USA)를 이용하여 600nm(*Bacillus sp.*)와 660nm(*Alcaligenes sp.*)의 파장으로 optical density(OD)값을 조사하여 균의 생육 정도를 판단하고 온도와 pH에 따른 회귀방정식을 구하여 최적생육온도를 판단하였다.

IPM 소재 여부 검정 실험

최종 선별 미생물의 large patch, brown patch 및 dollar spot용 농약으로 품목 등록된 톨클로포스메틸 수화제(리조렉스, toclofos-methyl 50%), 메프로닐 수화제(논사, mepronil 75%), 이프로디온 수화제(로브랄, iprodione 50%), 테부코나졸 유제(호리쿠어, tebuconazole 25%) 및 헥사코나졸 액상수화제(한빛, hexaconazole 5%)에 대한 약제내성을 검정하였다. 각각의 약제는 추천 농도의 2배로 희석한 후 0.45μm membrane filter로 멸균하였고, 길항미생물은 균밀도 2 × 10⁶/mL로 희석하여 약제와 길항미생물 희석액을 각각 5mL씩 혼합하여 20°C에서 24시간 동안 방치하였다. 이후 NA 배지에 도말하여 25°C에서 48시간 배양하였고, 형성된 균총수를 측정하여 생존율을 조사하였다.

통계처리

모든 실험은 3반복으로 수행하였으며, SAS 프로그램(Statistical analysis system, Ver 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)을 이용하여 분석하였고 처리구간 평균비교는 5% 수준의 Duncan의 다중검정법(Duncan's multiple range test)을 이용하였다.

결과 및 고찰

가축분뇨액비 길항력 검정

병원균주의 균사생장억제효과를 통한 8개 지역 가축분뇨액비의 길항력 검정 결과 생산지 별로 많은 차이가 나타났고, 각 병원균주에 대한 균사생장 억제효과도 다양하게 나타나는 것을 확인할 수 있었다(Table 1). 하지만 각 지역의 모든 액비를 멸균처리하였을 경우에는 균사생장 억제효과가 나타

나지 않아 가축분뇨액비의 길항력은 액비 내 길항미생물에 의한 효과인 것으로 판단되었다. 세 가지 공시 병원균주에 대한 평균적인 균사생장억제효과는 익산지역의 액비에서 가장 높게 나타났다. 이에 비해 합천지역의 액비는 평균값이 가장 낮았으나 dollar spot의 병원균주인 *S. homoeocarpa*에 대한 균사생장억제효과는 약 19% 정도 있는 것으로 나타났다. 이처럼 각 지역 가축분뇨액비의 길항력은 공시액비의 종류 및 병원균주에 따라 길항효과가 다르게 나타났다.

각 병원균주별로 보면 brown patch에 대한 길항력은 익산 지역의 액비에서 17.8%로 가장 높게 나타났고, large patch는 군위지역의 액비에서 20.4%, dollar spot은 논산지역의 액비에서 48.0%의 균사생장억제효과를 나타냈다. 하지만 멸균처리한 모든 액비에서는 균사생장억제효과가 나타나지 않아 가축분뇨액비의 길항력은 미생물에 의한 것임을 확인할 수 있었다. 액상인 여러 종류의 퇴비침출액(compost water extract)을 5%에서 15%까지 희석하여 배양기내에서 병원균주에 처리하였을 경우에도 토양전염성 병원균인 *P. debaryanum*과 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *S. bataticola*의 균사생장을 각각 62.2%, 94.4%, 94.4%씩 억제하였다는 보고도 있으며(EI-Masry et al., 2002), 'Flora Mas'라는 퇴비를 이용한 퇴비차(compost tea)를 멜론의 흰가루병의 병원균인 *G. cichoracearum* DC에 배양기 내 처리하였을 경우에도 병원균의 포자발아를 51% 정도 억제하였다는 보고도 있다(Naidu et al., 2012). 또한 같은 보고서에서 이 퇴비차에 미생물생육에 필요한 영양분과 공기를 주입하여 미생물의 양을 증가시

킨 후 동일한 처리를 하였을 때 병원균의 포자발아 억제효과가 85%까지 증가한다고 보고하였다. 이상의 결과를 통해 본 연구에 공시된 가축분뇨액비의 잔디병 방제에 적용 가능성을 확인하였고, 가축분뇨액비로부터 길항력이 우수한 미생물을 분리, 증식하여 길항효과 제고를 위한 연구의 필요성을 확인할 수 있었다.

하지만 이러한 가축분뇨액비의 길항효과에 대한 결과는 본문에는 제시하지 않았지만 합천지역 액비의 경우 large patch에 대한 길항효과가 6월에 채취한 시료 23.5%, 9월 시료 0%로 액비의 채취 시기에 따라 차이가 많이 나타나고 있는데, 이는 공동자원화시설에 유입되는 원분뇨의 차이와 시설운영 실태에 따라 달라지는 것으로 보이며, 따라서 향후 일정한 품질을 유지하기 위한 정책마련 및 연구가 필요한 실정이다(Jeon et al., 2012).

길항미생물 분리 및 동정

각 병원균주에 대해 길항력을 나타낸 가축분뇨액비의 균총에서 분리된 273종을 각 병원균주들과 대치배양을 실시하여 길항력이 있는 110종을 1차 선별을 하였고, 이들을 16s rRNA 유전자 염기서열 분석을 통하여 동정을 하였고, 유사한 종들간에 *R. solani* AG2-2(IIIB)에 길항능력이 높게 나타난 미생물 4종과 *R. solani* AG2-2(IV)에 길항능력이 있는 5종, *S. homoeocarpa*에 길항능력이 있는 10종 등 19종의 길항미생물을 2차 선별하였다. 선별된 미생물들을 대상으로 병원균주들과 반복적인 대치배양을 통해 각각 brown patch

Table 1. Inhibition of mycelial growth against three soil-borne turfgrass pathogenic fungi by composted liquid manure (CLM) from livestock excretions treatment facilities.

Source of CLM	Inhibition rate (%) of mycelial growth			Mean
	<i>Rhizoctonia solani</i> AG-2-2(IIIB)	<i>Rhizoctonia solani</i> AG-2-2 (IV)	<i>Sclerotinia homoeocarpa</i>	
Gunwi	7.6 bc ^z	20.4 a	40.4 a	22.8 a
Hapcheon	0.9 d	0.0 c	18.7 c	6.5 a
Hoengsung	8.9 bc	13.8 ab	0.0 d	7.6 a
Icheon	12.4 ab	4.0 bc	42.2 a	19.6 a
Iksan	17.8 a	19.1 a	29.3 b	22.1 a
Nonsan	9.8 bc	4.4 bc	12.0 c	8.7 a
Muan	5.3 cd	1.8 c	48.0 a	18.4 a
Yeoju	12.9 ab	17.3 a	0.0 d	10.1 a
ST-CLM ^y	0	0	0	0

^zMean separation within columns by Duncan's multiple range test, 5% level.

^ySterilized CLM of 8 CLM samples.

에 가장 억제력이 높게 나타난 ICIIIB60과 large patch에 길항력이 있는 GWIV70, dollar spot에 길항력이 있는 ISSH20 등 3종의 균주를 최종 선발하였다(Table 2). 이들 균주들의 16s rRNA 서열의 동정결과 brown patch에 길항력을 보인 ICIIIB60은 *Alcaligenes*속의 균으로 동정되었고, large patch에 길항력을 나타낸 GWIV70은 *Bacillus licheniformis* Ab2, dollar spot에 길항력을 보인 ISSH20은 *Bacillus subtilis* C7-3으로 동정되었다(Table 3). *Bacillus*속의 미생물들은 다른 잔디병해의 생물학적 관리를 위한 연구에서도 많이 선발되어 효과가 보고되고 있으며(Jung et al., 2006; Lee et al., 1998), 이 외에도 *Trichoderma*계열의 균들이나(Shim and Kim, 2000), *Streptomyces arenae*와 같은 균들도 선발되어 길항효과가 보고되었다.

길항미생물 최적 생육조건 규명

선발된 길항미생물의 안정적 생산을 위한 최적배지를 선발하기 위하여 LB, NB, PDB, TSB 배지에서 ICIIIB60과

GWIV70, ISSH20 균주의 생육정도를 비교한 결과, ICIIIB60 균주는 NB 배지에서, GWIV70과 ISSH20 균주는 TSB 배지에서 생육이 가장 왕성했다. 또 생균수는 모든 배지에서 24시간 배양 시 가장 많았고 이후에는 서서히 감소했다(Table 4). 생균수의 변화를 보면 GWIV70과 ISSH20 균주는 24시간부터 72시간까지 약간 감소한 후 큰 감소를 보이지 않다가 96시간 이후에 급격히 감소한 점으로 보아 24시간부터 72시간까지가 정지기일 것으로 추정되었고, ICIIIB30 균주는 72시간부터 감소하는 경향을 나타내어 위의 두 균주보다는 생육의 정지기가 약간 짧을 것으로 추정되었다.

선발미생물들의 생육적온을 조사하기 위해 15°C-50°C의 범위에서 진탕배양한 후 균주의 생육을 OD값으로 조사하여 회귀방정식을 이용하여 분석한 결과, 각 균주의 적정생육온도는 ICIIIB60은 30.9°C, GWIV70은 29.5°C, ISSH20은 31.4°C로 모두 30°C 정도에서 가장 왕성한 생육반응을 보였다. 하지만, ICIIIB60 균주는 GWIV70이나 ISSH20 균주에 비해 상대적 저온인 15°C에서도 생육이 증가하였고, 35°C

Table 2. Antagonistic effect of various microorganisms on mycelial growth of three soil-borne turfgrass pathogenic fungi.

Isolate	<i>Rhizoctonia solani</i> AG-2-2 (IIIB)	Isolate	<i>Rhizoctonia solani</i> AG-2-2 (IV)	Isolate	<i>Sclerotinia homoeocarpa</i>
	IR ^z (%)		IR (%)		IR (%)
ICIIIB60	50.0 a ^y	GWIV30	46.2 ab	GWSH20	42.3 a
NSIIIB50	44.2 ab	GWIV70	53.8 a	GWSH30	28.8 b
YJIIIB21	34.6 b	ISIV10	46.2 ab	GWSH70	34.6 ab
YJIIIB22	46.2 ab	ISIV30	50.0 ab	GWSH80	38.5 ab
		ISIV50	32.7 b	ISSH20	46.2 a
				ISSH32	36.5 ab
				ISSH51	34.6 ab
				ISSH70	36.5 ab
				MASH10	32.7 ab
				MASH70	32.7 ab

^zPercent inhibition rate of mycelial growth.

^yMean separation within columns by Duncan's multiple range test, 5% level.

Table 3. Identification of isolates from composted liquid manure.

Isolate	Nearest relative ^z	Accession no. of nearest relatives	Similarity (%)
ICIIIB60	Uncultured <i>Alcaligenes</i> sp. BJS72-013	AB238978	100.0
GWIV70	<i>Bacillus licheniformis</i> Ab2	JN969601	99.2
ISSH20	<i>Bacillus subtilis</i> C7-3	EU257445	99.2

^zBased upon a Blast search of the NCBI database.

Table 4. Effect of culture media and incubation period on the growth of selected antagonists.

Media	ICIIIB20 ^z				GWIV70				ISSH20			
	24 h	48 h	72 h	96 h	24 h	48 h	72 h	96 h	24 h	48 h	72 h	96 h
	No. of cells (cfu/mL)				No. of cells (cfu/mL)				No. of cells (cfu/mL)			
LB ^y	2.52×10^7	0.48×10^6	7.62×24^6	3.69×10^5	7.87×10^6	4.63×10^6	4.65×10^6	7.13×10^5	5.78×10^7	6.89×10^6	1.86×10^6	0.68×10^5
NB	1.92×10^8	9.24×10^7	5.05×10^6	9.14×10^6	0.08×10^7	6.67×10^6	6.84×10^6	2.35×10^5	4.46×10^7	6.17×10^6	7.87×10^6	4.62×10^5
PDB	3.40×10^6	2.54×10^6	4.25×10^5	0.84×10^4	0.71×10^6	7.00×10^5	7.68×10^4	6.54×10^4	1.25×10^6	7.27×10^6	3.26×10^5	8.53×10^4
TSB	3.44×10^7	8.83×10^6	8.60×10^5	6.47×10^5	9.17×10^7	4.77×10^6	4.52×10^6	7.11×10^5	9.67×10^7	4.77×10^6	2.34×10^6	9.55×10^5

^zICIIIB60, *Alcaligenes* sp.; GWIV70, *Bacillus licheniformis* Ab2; ISSH20, *Bacillus subtilis* C7-3.

^yLB, Luria bertani broth; NB, Nutrient broth; PDB, Potato dextrose broth; and TSB, Tryptic soy broth.

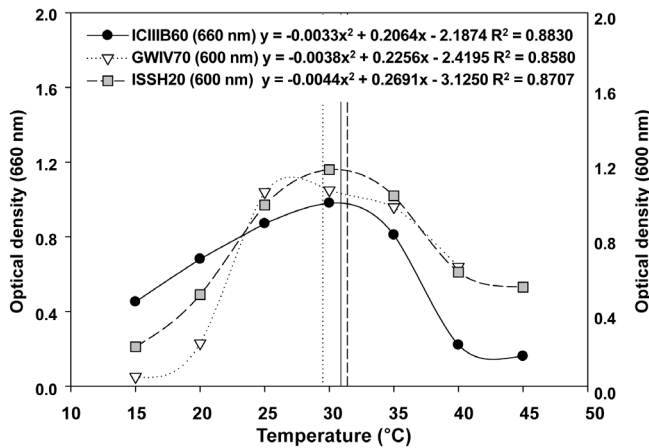


Fig. 2. Effect of temperature on the growth of antagonistic bacterial isolates from composted liquid manure against three soil-borne turfgrass pathogenic fungi.

이상의 온도에서 급격한 생육의 저하가 관찰되었으며, 40°C 이상에서는 거의 생육이 이루어지지 않았다(Fig. 2). 이는 *A. sp.* A111는 30°C에서 생육이 가장 좋았고, 37°C 이상에서 생육이 거의 이루어지지 않았으며(Oh et al., 1994), *A. sp.* ECU0401의 경우에는 30°C에서 대사활동이 가장 높았고, 40°C 이상에서 현격히 줄어드는 것(He et al., 2010)과 비교하였을 때, *Alcaligenes*속의 특징으로 판단되었다.

각 길항미생물의 적합배지로 확인된 NB 배지와 TSB 배지를 pH 4-10까지 조정하고 길항미생물을 접종한 후 30°C에서 24시간 동안 균들의 생장을 조사한 결과, ICIIIB60 균주는 실험한 모든 범위의 산도에서 다른 균주에 비해 많은 성장량을 보여 산도변화에 다소 강한 것으로 보인다. Large patch에 길항력을 보이는 GWIV70 균주의 적정 생육 pH는 7.35로 중성이지만 다른 균주에 비하여 약간 높은 산도에서도 잘 자라는 것으로 조사되었다. ISSH20 균주는 ICIIIB60와 거의 비슷한 생육양상을 보였으나 산도가 증가할수록 생

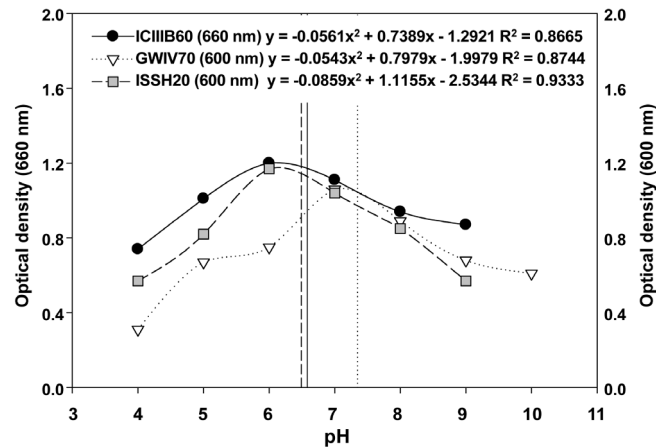


Fig. 3. Effect of initial pH on the growth of antagonistic bacterial isolates from composted liquid manure against three soil-borne turfgrass pathogenic fungi.

육의 감소가 확연하게 나타났다(Fig. 3). Kim et al.(2012)이 2012년도에 실시한 결과에 의하면 골프장 토양의 pH는 평균적으로 pH 7.07로 나타나 선발미생물들의 생육범위에 있어서 골프장 토양 내에서의 생육에는 큰 문제가 없을 것으로 판단되었다.

IPM 소재 여부 검정 실험

선발된 길항미생물 3종을 대상으로 하여, 농약혼합에 따른 생존율을 조사한 결과, *B. licheniformis*(GWIV70)는 공식 살균제에 따라 차이는 있지만 평균 90.9% 정도의 생존율을 나타냈으며, *B. subtilis*(ISSH20)는 평균 59.7%의 생존율을 나타내었다(Table 5). Lee et al.(1998)이 보고한 자료에서도 다른 2종의 *Bacillus*계열의 길항미생물을 13종의 농약과 혼용처리 시의 생존율이 각각 58.5%와 89.5%로 비슷하게 나타났다. 본 실험의 결과로 볼 때 brown patch에 대한 길항성 균주인 ICIIIB60은 현장에 적용할 경우에 이프로디온 수화

Table 5. Survival rate of selected antagonists as affected by several fungicides.

Common name	ICIIB60 ^z	GWIV70	ISSH20	Mean
Survival rate (%)				
Toclofos-methyl	49.7 c ^y	98.1 a	73.5 a	73.8 a
Mepronil	39.3 d	89.1 ab	68.0 ab	65.5 a
Iprodione	84.7 b	92.8 a	35.6 c	71.0 a
Tebuconazole	96.1 a	96.2 a	59.2 b	83.8 a
Hexaconazole	27.4 e	78.1 b	62.3 ab	55.9 a
Mean	59.4	90.9	59.7	70.0

^zICIIB60, *Alcaligenes* sp.; GWIV70, *Bacillus licheniformis* Ab2; ISSH20, *Bacillus subtilis* C7-3.

^yMean separation within columns by Duncan's multiple range test, 5% level.

제나 테부코나졸 유제의 혼합처리가 가능할 것으로 판단되며, dollar spot에 대한 길항성 균주인 ISSH20은 테부코나졸 유제와 헥사코나졸 액상수화제와의 혼합처리가 가능할 것으로 판단되었다. 하지만 헥사코나졸 액상수화제는 ICIIB60 균주의 생육을 강하게 억제하는 것으로 나타났고, ISSH20 균주는 이프로디온 수화제에 의하여 강하게 생육을 억제 받는 것으로 나타나 선발된 길항미생물을 현장에 적용할 경우 주의해야 할 것으로 판단되었다.

결론적으로 가축분뇨액비는 생산되는 시설과 시기에 따라 brown patch나 large patch, dollar spot 등과 같은 잔디병해에 대한 길항능력이 크게 달라지며, 액비 내 존재하는 길항미생물들에 의해 길항능력이 있는 것으로 밝혀졌다. 이들 액비에 있는 미생물들 중에서 단계적인 병원균주들과의 대치배양을 통해 각 병원균주별로 길항능력이 우수한 한 종씩을 선발하여, 이들을 대상으로 5종의 합성농약과의 혼용 시 생존율을 본 결과 large patch에 길항성을 지닌 GWIV70 균주는 모든 혼용처리구에서 70% 이상의 높은 생존율을 보여 현장적용에 용이할 것으로 판단되었고, brown patch에 길항성을 나타낸 ICIIB60 균주는 헥사코나졸 액상수화제에, dollar spot에 길항성을 보인 ISSH20 균주는 이프로디온 수화제와의 혼용처리 시 주의해야 하는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과들은 가축분뇨액비와 화학농약의 혼용처리가 가능함으로 IPM 개념의 잔디병 방제효과 제고에 활용할 수 있을 것으로 생각한다.

초 록

가축분뇨액비의 토양전염성 잔디병해들의 억제능력을

알아보고자 군위, 논산, 무안, 여주, 이천, 익산, 합천, 횡성 등 8개 지역의 가축분뇨액비생산시설에서 생산된 액비를 이용하여 기내에서 수행하였다. 가축분뇨액비와 병원균주들과의 대치배양을 통해 총 110종의 길항미생물을 선발하였으며, 각 병원균주별로 길항능력이 우수한 한 종씩을 선발하였다. 선발된 각각의 미생물은 16s rRNA 서열분석을 통해 brown patch에 길항력을 보인 ICIIB60은 *Alcaligenes* sp., large patch에 길항력을 나타낸 GWIV70은 *Bacillus licheniformis* Ab2, dollar spot에 길항력을 보인 ISSH20은 *B. subtilis* C7-3으로 동정되었다. 이들의 최적배양조건은 NB 배지(ICIIB60)와 TSB 배지(GWIV70, ISSH20)에서 온도는 29.5°C-31.4°C의 범위에서, pH는 6.5-7.3의 범위에서 잘 자라는 것으로 확인되었다. 또한 각 균주를 5종의 살균제와 혼용한 결과, ICIIB60 균주는 테부코나졸 제제, GWIV70과 ISSH20 균주는 토클로포스메틸 제제에서 생존율이 높아 혼용처리가 가능할 것으로 판단되었다. 이러한 결과를 통해 가축분뇨액비는 비료로서의 역할뿐만 아니라 잔디병해를 줄일 수 있는 친환경적인 소재로 이용이 가능함을 확인하였다.

추가 주요어 : *Alcaligenes*, *Bacillus*, 갈색잎마름병, 동전마름병, 종합적 방제, 라이족토니아 마름병

인용문헌

Boulter, J.I., G.J. Boland, and J.T. Trevors. 2002. Evaluation of composts for suppression of dollar spot (*Sclerotinia homoeocarpa*) of turfgrass. *Plant Dis.* 86:405-410.

Cheng, Z., P.S. Grewal, B.R. Stinner, K.A. Hurto, and H.B. Hamza. 2008 Effects of long-term turfgrass management practices on soil nematode community and nutrient pools. *Appl. Soil Ecol.* 38:174-184.

El-Masry, M., A. Khalil, M. Hassouna, and H. Ibrahim. 2002. In situ and in vitro suppressive effect of agricultural composts and their water extracts on some phytopathogenic fungi. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18:551-558.

Garling D.C. and M.J. Boehm. 2001. Temporal effects of compost and fertilizer applications on nitrogen fertility of golf course turfgrass. *Agron. J.* 93:548-555.

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.* 24:56-61.

Ham, S.K., Y.S. Kim, T.S. Kim, K.S. Kim, and C.H. Park. 2009.

- The effect of SCB (slurry composting and biofiltration) liquid fertilizer on growth of creeping bentgrass. *Kor. Turfgrass Sci.* 23:91-100.
- He, Y.C., J.H. Xu, J.H. Su, and L. Zhou. 2010. Bioproduction of glycolic acid from glycolonitrile with a new bacterial isolate of *Alcaligenes* sp. ECU0401. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160:1428-1440.
- Jeon, S.J., S.R. Kim, K.S. Rho, D.Y. Choi, D.K. Kim, and M.G. Lee. 2012. Physicochemical characteristics of liquid fertilizer made from pig manure in Korea. *J. Livestock Housing Environ.* 18:221-228.
- Jung, W.C., T.S. Shin, K.S. Do, W.K. Kim, J.H. Lee, and K.H. Choi. 2006. Development of antagonistic microorganism for biological control of blight of turfgrass. *Res. Plant Dis.* 12:260-266.
- Kang, B.K., H.H. Jung, and K.S. Kim. 2010. Effect of slurry composted and biofiltered solution and an organic fertilizer on the growth of zoysiagrass. *Hort. Environ. Biotechnol.* 51:507-512.
- Kim, H.Y., K.S. Gwak, H.Y. Kim, K.O. Ryu, P.G. Kim, D.H. Cho, J.Y. Choi, and I.G. Choi. 2011. Effect of treatment amounts of slurry composting and biofiltration liquid fertilizer on growth characteristics and bioethanol production of yellow poplar. *Kor. Soc. Wood Sci. Tech.* 39:459-468.
- Kim, Y.S., S.K. Ham, and H.J. Lim. 2012. Monitoring of soil chemical properties and pond water quality in golf courses after application of SCB liquid fertilizer. *Asian J. Turfgrass Sci.* 26:44-53.
- Lee, S.J., K.K. Shim, Y.K. Kim, and K.Y. Hue. 1998. Suppression of *Rhizoctonia* spp. by antagonistic microorganisms and their compatibility with fungicides. *Kor. Turfgrass Sci.* 12:23-30.
- Lim, H.J., Y.S. Kim, and S.K. Ham. 2011. Screening of cellulose decomposing microorganisms for functional improvement for SCB (slurry composting and biofiltering) liquid fertilizer. *Asian J. Turfgrass Sci.* 25:48-51.
- Lim, T.J., S.D. Hong, S.H. Kim, and J.M. Park. 2008. Evaluation of yield and quality from red pepper for application rates of pig slurry composting biofiltration. *Kor. J. Environ. Agr.* 27:171-177.
- Liu, S. and R. Baker. 1980. Mechanism of biological control in soils suppressive to *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 70:404-412.
- Moody, A.R. and D. Gindrat. 1977. Biological control of cucumber black root rot by *Gliocladium roseum*. *Phytopathology* 67: 1159-1162.
- Naidu, Y., S. Meon, and Y. Siddiqui. 2012. In vitro and in vivo evaluation of microbial-enriched compost tea on the development of powdery mildew on melon. *BioControl* 57:827-836.
- Nakasaki, K., S. Hiraoka, and H. Nagata. 1998. A new operation for producing disease-suppressive compost from grass clippings. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4015-4020.
- Nelson, E.B. and C. Craft. 1991. Introduction and establishment of strains of *Enterobacter cloacae* in golf course turf for the biological control of dollar spot. *Plant Dis.* 75:510-514.
- Nelson, E.B. and M.J. Boehm. 2002. Compost-induced suppression of turf grass diseases. *BioCycle* 43:51-51.
- Oh, H.M., J.H. Kang, C.H. Lee, C.S. Park, S.K. Ahn, B.D. Yoon, and Y.H. Kho. 1994. Isolation and characterization of a naphthalene-degrading strain, *Alcaligenes* sp. A111. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22:423-429.
- Park, J.M., T.J. Lim, S.E. Lee, and I.B. Lee. 2011. Effect of pig slurry fertigation on soil chemical properties and growth and development of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Kor. J. Soil Sci. Fert.* 44:194-199.
- Park, S.J., S.Y. Lee, J.H. Ryu, H.H. Jung and K.S. Kim. 2012. Optimum application amount, timing, and frequency of slurry composted and biofiltered liquid fertilizer for *Zoysia japonica* 'Millock'. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 30:635-641.
- Ruppel, E.G., R. Baker, G.E. Harman, J.P. Hubbard, R.J. Hecker, and I. Chet. 1983. Field tests of *Trichoderma harzianum* Rifai aggr. as a biocontrol agent of seedling disease in several crops and *Rhizoctonia* root rot of sugar beet. *Crop Prot.* 2:399-408.
- Seo, Y.H., B.O. Cho, H.K. Choi, A.S. Kang, B.C. Jeong, and Y.S. Jung. 2010. Impact of continuous application of swine slurry on changes in soil properties and yields of tomatoes and cucumbers in a greenhouse. *Kor. J. Soil Sci. Fert.* 43: 446-452.
- Shim, G.Y. and H.K. Kim. 2000. Control of large patch caused by *Rhizoctonia solani* AG2-2 by combined application of antagonists and chemicals in golf courses. *Kor. Turfgrass Sci.* 13:131-138.
- Tu, C.M. 1980. Influence of five pyrethroid insecticides on microbial populations and activities in soil. *Microb. Ecol.* 5:321-327.