

## *Streptomyces* sp. AC-3을 이용한 배추 무사마귀병의 생물학적 방제

주길재 · 김영목 · 김정웅<sup>1</sup> · 김원찬<sup>1</sup> · 이인구<sup>1</sup> · 최용화<sup>2</sup> · 김진호<sup>2\*</sup>  
경북대 농업과학기술연구소, <sup>1</sup>경북대학교 농화학과, <sup>2</sup>상주대 식물자원학과

**Biocontrol of Cabbage Clubroot by the Organic Fertilizer Using *Streptomyces* sp. AC-3.** Joo, Gil-Jae, Young-Mok Kim, Joung-Woong Kim<sup>1</sup>, Won-Chan Kim<sup>1</sup>, In-Koo Rhee<sup>1</sup>, Yong-Hwa Choi<sup>2</sup>, and Jin-Ho Kim<sup>2\*</sup>. Institute of Agricultural Science & Technology, <sup>1</sup>Department of Agricultural Chemistry, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea; <sup>2</sup>Department of Plant Resource, Sangju National University, Sangju 742-711, Korea – This research is performed for a biological control of Chinese cabbage clubroot, we isolated an antagonistic bacterium AC-3 against *Plasmodiophora* sp., causal pathogens of cabbage clubroot. The isolated strain was identified as *Streptomyces* sp. by culture morphology, biochemical reactions, and homology research based on 16S rDNA sequences. *Streptomyces* sp. AC-3 produced chitinase (9.3 units/ml) in culture broth. So *Plasmodiophora* sp. mycelia changed abnormal swelling, curling and branching mycelia by *Streptomyces* sp. AC-3 culture. In a field infected by *Plasmodiophora* sp., the treatment of a organic fertilizer added 2% *Streptomyces* sp. AC-3 microbial inoculant, it resulted in about 50% reducing the severity of cabbage clubroot significantly on cabbage plants compared with treated organic fertilizer plants. Additional disease such as sclerotinia rot, fusarium wilt and pythium rot were also significantly reduced by the treatment of the organic fertilizer added *Streptomyces* sp. AC-3 microbial inoculant.

**Key words:** Biocontrol, cabbage clubroot, *Streptomyces* sp.

무사마귀병은 병원성 곰팡이 *Plasmodiophora brassicae* Woronin에 의해 발생하는데 유주자가 작물의 뿌리털로 침해하여 뿌리에 여러 개의 크고 작은 부정형의 혹을 형성시키고 뿌리혹의 부패와 함께 성숙하여 토양에 확산되어 월동한 후 다음 작기에 전염원이 되는 병이다[28]. 무사마귀병은 습도가 높은 산성토양에서 주로 발병하므로 석회 시용 등으로 토양의 pH를 7.0 이상으로 높여주면 병원균의 포자가 전혀 발아할 수 없거나 억제되어 방제할 수 있다[26]. 또한 오래 전부터 calcium cyanamide를 처리함으로써 무사마귀병이 현저히 감소된다는 것은 이미 잘 알려진 사실이다[24]. 최근에는 길항미생물을 이용한 생물학적 방제에 관한 연구가 여러 가지 식물병에서 많은 연구가 진행되어 방제 메커니즘이 밝혀지고 있다[22, 23].

일반적으로 농업적으로 많이 이용되고 있는 유용미생물은 질소고정 미생물, 불용양분 가용화 미생물, 작물 생육촉진 미생물, 유기물 분해촉진 미생물, 토양 환경 정화 미생물, 생물학적 방제 미생물 등이 있다[6]. 이러한 유용미생물을 농업적으로 이용하기 위해서는 유용미생물의 균체나 배양액을 직접 토양에 직접 처리하기도 하지만 기존 토착미생물과의 경쟁부족이나 재배환경에 대한 적응력이 감소되어 큰 효과

를 얻지 못하므로 대체적으로 유용미생물은 제형화하여 농업에 적용하고 있는 실정이다[16, 19]. 그러나 미생물제제도 필수요소인 흡착제와 부수적 요소인 유기물, 비료성분 등을 잘못 선택하거나 편향적으로 사용하거나 제형화 방법상의 문제 등으로 오히려 유용미생물의 생존력을 떨어지게 하여 토양 속에서 쉽게 유실되는 경향이 있다. 또한 토양의 온도 변화, pH의 변화, 수분의 변화 등 다양한 토양 환경조건에 대한 저항력이 부족하거나, 작물의 연작재배 및 염류집적 등의 토양 환경에서의 독립 증식력 부족, 각종 농약이나 환경 호르몬에 의한 현장 생존력 부족, 근권 정착능력 부족, 토착 미생물과의 경쟁 부족 등의 많은 문제점이 발생하고 있다 [15, 16, 19].

이러한 문제점을 해결하기 위해 미생물제제를 유기질비료에 적용하여 토양에 응용함으로써 기존 토착화되어 있는 미생물과의 경쟁에서도 이길 수 있고 또한 다양한 영양원을 지닌 유기질비료의 효과를 동시에 공급해 줌으로써 작물의 건강하게 되어 각종 식물병으로부터 저항성을 가질 수 있을 것으로 본다.

따라서 본 연구에서는 배추 무사마귀병균 (*Plasmodiophora* sp.)에 길항하는 미생물을 낙엽부식토양으로부터 분리·동정하고 제형화한 후 유기질비료에 혼합하여 전년도 무사마귀병이 만연했던 포장에 처리하여 배추 무사마귀병의 생물학적 방제 효과를 조사하였기에 보고하고자 한다.

\*Corresponding author

Tel: 82-54-530-5202, Fax: 82-54-530-5202

E-mail: kimjh@sangju.ac.kr

**재료 및 방법**

**토양미생물의 분리 및 보관**

균원시료는 경상도 일원에서 수집한 낙엽부식토양 및 퇴비 등을 이용하였고, 균원시료 1 g에 0.85% NaCl 멸균수 10 ml를 첨가하고 3단 희석한 후 세균은 Nutrient agar(NA) 배지, 방선균은 Yeast extract-malt extract agar(YMA) 배지, 곰팡이는 Potato dextrose agar(PDA) 배지 등에 100 µl씩 도말한 후, 28°C~37°C에서 3~7일간 배양하여 나타난 순수 독립 colony를 토양미생물로 이용하였다. 미생물의 보관을 위해 세균은 nutrient broth(NB) 배지, 방선균은 yeast extract-malt extract broth(YMB) 배지, 곰팡이는 potato dextrose broth(PDB) 배지 등에서 28~37°C에서 3~5일 동안 진탕 배양시킨 후, 4°C에 보관하거나 10% skim milk를 넣고 동결건조기로 건조하여 분말상태로 보관하였다.

**병원균의 배양 및 보관**

배추 병원균은 탄저병균 *Colletotrichum* sp., 시들음병균 *Fusarium oxysporium*, 역병균 *Phytophthora cryptogea*, 그루썩음병균 *Pythium ultium*, 밑둥썩음병균 *Rhizoctonia solani*, 균핵병균 *Sclerotium cepivorum* 등을 농촌진흥청 식물병리과, 한국과학기술원 유전자은행(KCTC), 경북대학교 농생물학과 등에서 분양 받거나 본 연구실에서 보관중인 균을 이용하였다. 배추 무사마귀병균 *Plasmodiophora* sp.는 본 연구팀에서 분리하여 보관 중인 균으로서 심하게 오염된 배추뿌리혹에서 분리하였다. 이들 병원성 곰팡이는 살균된 PDB 배지에 상정한 배추즙을 0.45 µm filter로 여과하여 5%(v/v) 되게 첨가하여 만든 PDCB(Potato dextrose cabbage-extract broth)에 병원균을 접종하여 28°C에서 7일간 배양한 다음 4°C 배양기에 넣고 보관하거나 또는 상기와 같이 배추즙을 첨가하여 만든 PDCA(PDCB에 agar 첨가) 배지에서 키운 균 사체를 가로×세로 1 cm 단편으로 절단하여 살균된 증류수에 넣고 4°C에서 보관하면서 사용하였다. 균핵병균 *Sclerotium cepivorum* 은 상기 동일한 배양조건이었으나 배양온도를 15°C에서 배양하여 이용하였다.

**배추 병원성 곰팡이에 대한 길항력 조사**

배추 병원균에 대한 길항력은 선발된 근권미생물들과 병원균을 대치배양(pairing plate culture)하여 생육억제환의 크기로 조사하였다. PDCA 배지에서 키운 병원균체 덩어리를 새로운 PDCA 배지 중앙에 올려놓고 가장자리 4곳에 순수분리한 미생물을 한 백금이씩 접종하여 28°C에서 7~10일간 배양하였다. 병원균의 균사체의 생장억제 정도(inhibition zone)를 조사하여 생성된 clear zone의 길이(mm)로 길항력을 나타내었다.

**미생물의 동정**

미생물의 동정은 방선균 동정법[9] 및 16S rDNA

sequence 법[12]에 따라 실시하였다. 16S rDNA sequence는 유용미생물의 염색체 DNA를 추출한 후 PCR primer로 R14(5'-ACg ggC ggT gTg TAC-3')와 R15(5'-gCC AgC AgC CgC ggT A-3')를 이용하여 PCR 산물을 얻었으며, sequencing data는 ribosomal database(<http://rdp.cme.msu.edu/html/analyses.html>)에서 상동성을 검색하여 동정하였다.

**Colloidal chitin의 조제 및 chitinase의 활성측정**

Crude chitin(Sigma Co., C-7170) 100 g에 cold conc. HCl 2 l를 가하여 4°C에서 12시간 교반한 후, 95% cold ethanol 2 l를 가하여 생성된 colloidal chitin을 6,000×g에서 10분간 원심분리(Model L8-55M, Beckman Co., CA, USA)하여 회수하고 증류수로 희석한 후 5N NaOH로 pH를 중화시키고 증류수로 수회 세척하여 회수된 colloidal chitin을 건조하여 효소의 기질로 사용하였다. Chitinase 활성측정은 인산완충액(0.05M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer, pH 7.0)에 colloidal chitin을 0.5%로 현탁시킨 기질용액 0.5 ml에 인산 완충액 1 ml을 넣은 후 효소액 0.2 ml를 첨가하여 45°C에서 1시간 30분 동안 반응시킨 후 DNS(dinitrosaclyic acid)법[13]으로 환원당량을 측정하였다. 효소활성 1 unit는 시간당 colloidal chitin으로부터 1 µM의 N-acetyl- glucosamine을 생성시키는 효소량으로 환산하였다.

**미생물의 제형화**

*Streptomyces* AC-3은 100 l 발효기에 1% glucose, 1.5% CSL, 5% molasses, 0.1% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, (pH 7.0) 배지에서 30°C로 45시간 배양한 배양액 50 l에 담체로는 흑운모와 왕겨를 각각 40 kg, 20 kg, 영양분으로는 당밀과 전분을 각각 5 kg, 미량요소로는 붕소, 철, 망간, 구리, 몰리브덴 등을 각각 0.05 kg을 첨가하고 잘 혼합하여 무균배양실에서 30°C 8일 이상 더 배양하고 건조기(40°C)에서 48시간 건조하여 수분의 함량이 10% 미만이면 고착제로 0.5% PVA(polyvinyl alcohol, 100,000)를 분무하면서 제형화하였다.

**유기질비료 제조**

유기질비료는 어박 10%, 골분 10%, 유박 10%, 대두박 22%와 축분 48%을 잘 혼합하고 용량이 6 m<sup>3</sup>(1.5 m×2 m×2 m)인 블록으로 제조한 간이 퇴비장에 2톤을 투입하였으며, 초기 퇴비화가 진행되는 동안에는 송풍형 고정더미 방식으로 강제송풍(air pump, 10 L/min)하며, 수분함량은 50~60%로 항상 조절하였고, 뒤집는 기계(turner)가 퇴비상을 천천히 주행하면서 퇴비더미를 뒤집어 가며 약 30일 동안 퇴비화를 실시하여 유기질비료(H-1)를 제조하였다. 또한 미생물제제 혼합 유기질비료(H-2)는 유기질비료(H-1)에 미생물제제 2%(w/w)를 잘 혼합하여 제조하였다.

### 토양 및 유기질비료 분석

토양의 화학성 및 유기질비료의 분석은 토양 및 식물체 분석법(농촌진흥청, 2000)에 준하여 실시하였다. 시료의 이화학적 성분분석을 위해 pH meter, EC meter, Salt meter는 1:10법, 총질소는 Kjeldahl법을 이용한 자동질소분석기(Tecator사, Kjeltac auto sampler system 1035 analyzer, 스웨덴), 총탄소는 회화법 및 Tyurin법, 총인은 HClO<sub>4</sub>로 분해한 후 원자흡광분광계로 분석하였고[17], 미량원소 및 중금속은 ICP(Inactivity Coupled Plasma emission spectro-meter, Thermo Jarrel Ash사, IRIS/AP, 미국)로 분석하였다.

### 배추의 재배

공시작물은 배추(*Brassica campestris* L., 노랑여름, 세미니스크리아사)를 사용하였고, 시험포장은 전년도 배추 무사마귀병에 의해 큰 피해를 입은 재배지(경북 군위군 효령면 장군리 소재) 0.1ha를 대상으로 하였다. 시험토양에서의 배추 재배기간은 2003년 5월 15일 파종하여 6월 10일까지 25일 육묘한 본엽이 5~6매된 모종을 멀칭 된 포장에 정식하고 7월 14일까지 전체 60일 재배하였다. 정식전 포장에 비료 사용량은 질소(N) - 인산(P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) - 칼리(K<sub>2</sub>O)를 100, 80, 90 kg/0.1ha 수준으로 시비하였다. H-1, H-2 유기질비료는 각각 1,000 kg/0.1ha 수준으로 처리하고 경운한 다음 20일 경과 후 비닐 멀칭하였다. 정식은 70 × 40 cm 재식거리로 하였으며, 시험구배치는 완전임의 3반복 배치로 하였고 기타 재배법은 농가의 관행재배법에 준하였다.

### 배추 병해의 발생 조사

배추 병해 발생조사는 배추를 파종에서 수확까지 60일간 재배하면서 각 시험구간의 배추를 뿌리째 뽑아 육안으로 병해 발생유무를 확인하거나 또는 육안으로 판정하기 어려울 경우에는 각각의 배추 시료를 채취하여 0.85% NaCl 멸균수를 첨가하고 3단 희석한 후 PDA 배지에 도말하여 28°C에서 7일 이상 배양하여 나타난 균사 또는 포자의 형태를 광학현미경으로 관찰하여 병원균을 확인하였다. 병발생율은 각 시험구당 1,200포기의 배추에서 각각의 병이 발생된 포기로 나누어 백분율로 환산하였다.

## 결과 및 고찰

### 무사마귀병균에 길항하는 미생물의 선발

토양미생물은 경상남도에서 37점, 경상북도에서 53점 등 총 90점의 낙엽 부식토양 및 퇴비를 균원시료로 하여 각종 미생물 분리 배지에서 약 350종의 토양미생물을 순수 분리하였다. 균원미생물은 배추 무사마귀병균(*Plasmodiophora* sp.)과 PDCA 배지 상에서 각각 서로 대치 배양하여 생육저지대 측정으로 길항력을 조사한 후 길항력이 우수한 세균 26종, 방선균 7종, 곰팡이 1종 등 35종을 선별하였다(Table 1). 이들

**Table 1. Isolation of antagonistic microorganisms against *Plasmodiophora* sp. causing clubroot.**

Sample	No. of isolates obtained	No. of antagonistic microorganisms <sup>a)</sup>
Kyungnam	37	129
Kyungbuk	53	223
Total	90	352

<sup>a)</sup>Strains forming inhibition zones on the PDCA medium after incubation for 10 days at 30°C were selected.

35종을 2차 길항력 조사를 실시하여 무사마귀병에 가장 활성이 우수한 방선균 AC-3 균주를 최종 선발하였다.

### 분리주 AC-3의 동정

선발균주 AC-3은 전형적인 방선균의 특징을 지닌 균주로서 oatmeal agar(The international of type project, ISP No. 3), yeast extract-malt extract agar(ISP No. 2), glycerol asparagine agar(ISP No. 5) 배지에 30°C 10일 배양한 후 colony의 형태, 기균사의 형태, 포자 및 포자사슬의 형태, 포자 표면 등을 관찰한 결과, colony의 형태는 powdery로 전형적인 방선균의 형태이었으며, 기균사의 형태는 spiral과 retinaculum-apertum의 복합형으로 나타났으며, 분지점을 형성하고 있었다. 포자는 10~20개로 구성되어 있었으며, 포자 형태는 계란형(oval)으로 크기는 0.8 × 0.6 μm이었고, 포자 표면은 전형적인 smooth type이었다. 또한 16S rDNA의 부분염기서열을 결정된 결과, Fig. 1에서와 같이 937 bp의 부분염기서열을 ribosomal database에서 상동성 검색한 결과, *Streptomyces carpinensis*(유사도 94.7%)로 동정되어 *Streptomyces* sp. AC-3으로 명명하였다.

### *Streptomyces* sp. AC-3의 길항력조사

배추에서 발생하는 각종 병원성 진균에 대한 *Streptomyces* sp. AC-3의 항진균성을 조사한 결과, Table 2와 같이 탄저병균(*Colletotrichum* sp.), 시들음병균(*Fusarium oxysporium*), 무사마귀병균(*Plasmodiophora* sp.), 밀둥썩음병균(*Rhizoctonia solani*) 등에서는 높은 길항 효과를 나타냈으며, 특히 무사마귀병균에 대한 생육억제환의 길이가 22.6 mm로 가장 높게 나타났다. 또한 역병균, 그루썩음병균, 균핵병균 등에서도 길항력을 나타내었다.

### *Streptomyces* sp. AC-3에 의한 무사마귀병균 균사의 변화

*Streptomyces* sp. AC-3 균주가 어떤 메카니즘으로 무사마귀병균 *Plasmodiophora* sp.의 생육을 억제하는지를 조사하기 위해 PDB 배지에 무사마귀병균을 접종하고 28°C에서 3일 동안 진탕 배양시킨 배양액에 *Streptomyces* sp. AC-3 균주를 한 colony 접종하고 30°C에서 2일간 배양하여 광학현미

```

1 GAACGATGAA GCCCTTCGGG GTGGATTAGT GGCGAACGGG TGAGTAACAC GTGGGCAATC
61 TGCCCTGCAC TCTGGGACAA GCCCTGGAAA CGGGGTCTAA TACCGGATAT GACCGTCTTG
121 GGCATCCTTG ACGGTGTAAG GCTCCGGCGG TGCAGGATGA GCCCGCGGCC TATCAGCTTG
181 TTGGTGAGGT AACGGCTCAC CAAGGCGACG ACGGGTAGCC GGCCTGAGAG GGCACCGCGC
241 CACACTGGGA CTGAGACACG GCCCAGACTC CTACGGGAGG CAGCAGTGGG GAATATTGCA
301 CAATGGGCGA AAGCCTGATG CAGCGACGCC GCGTGAGGGA TGACGGCCTT CGGGTGTGAA
361 ACCTCTTTCA GCAGGGAAGA AGCGAAAGTG ACGGTACCTG CAGAAGAAGC GCCGGCTAAC
422 TACGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGTAGG GCGCAAGCGT TGTCCGGAAT TATTGGGCGT
483 AAAGAGCTCG TAGGCGGCTT GTCACGTCGG TTGTGAAAAG CCGGGGCTTA ACCCCGGGTC
544 TGCAGTCGAT ACGGGCAGGC TAGAGTTCGG TAGGGGAGAT CGGAATCCTT GGTGTAGCGG
605 TGAATGCGC AGATATCAGG AGGAGTTGCC AGCAGGCCCT TGTGGTGCTG GGGACTCACG
666 GGAGNCCGCC GGGGTCAACT CGGAGGAAGG TGGGGTTCGA CGTCAAGTCA TCATGCCCTT
726 TATGTCTTGG GCTGCATCAC GTGCTACAAT GGCCGGTACA ATGAGCTGCG ATACCGTGAG
786 GTGGAGCGAA TCTCAAAAAG CCGGTCTCAG TTCGGATTGG GGTCTGCAAC TCGACCCCAT
846 GAAGTCGGAG TCGCTAGTAA TCGCAGATCA GCATTGCTGC GGTGAATACG TTCCCGGGCC
906 TTGTACACAC CGCCCGTCAC GTCACGAAAG TC
    
```

Fig. 1. 16S rDNA partial sequence of the isolated strain No. AC-3. The PCR was performed by two primers; R14 (5'-ACg ggC ggT gTg TAC-3') and R15 (5'-gCC AgC AgC CgC ggT A-3'). The sequencing data (937bp) was analyzed using ribosomal database (<http://rdp.cme.msu.edu/html/analyses.html>).

Table 2. Antagonistic effects of *Streptomyces* sp. AC-3 on the cabbage pathogens.

Phytopathogenic microorganism	mm, inhibition of mycelial growth <sup>a)</sup>
<i>Colletotrichum</i> sp. (Anthracnose)	20.3
<i>Fusarium oxysporium</i> (Fusarium wilt)	21.4
<i>Phytophthora</i> sp. (Phytophthora root rot)	15.8
<i>Plasmodiophora</i> sp. (Club root)	22.6
<i>Pythium ultimum</i> (Pythium rot)	12.6
<i>Rhizoctonia solani</i> (Bottom rot)	19.4
<i>Sclerotium cepivorum</i> (Sclerotinia rot)	10.7

<sup>a)</sup>Inhibition zone was obtained from clear zone in pairing plate culture with 3 replications. Each phytopathogenic microorganism and *Streptomyces* sp. AC-3 were inoculated on PDCA medium, the distance between two strains was 5 cm. Observations were made 7 days after inoculation on PDCA at 28°C But *Sclerotium cepivorum* (Sclerotinia rot) was cultured at 15°C.

경으로 관찰한 결과, Fig. 2와 같이 무사마귀병균의 균사체가 대부분 팽윤되었거나 변색되었으며, 세포막이 분해되는 현상을 관찰하였다. 특히 시간이 경과함에 따라 용균현상이 증가하여 4일 후에는 거의 액체상태로 전환되었다. 따라서 *Streptomyces* sp. AC-3 균주는 chitinase 같은 병원성 진균의 세포벽 용해 효소를 생산함으로써 무사마귀병균 *Plasmodiophora* sp.의 생육을 억제하는 것으로 판단하고 세포외 chitinase 활성을 조사한 결과, 배양액 ml 당 9.3 units

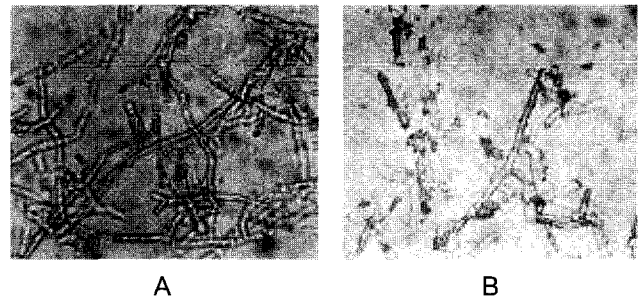


Fig. 2. Effect of crude fungicide from *Streptomyces* sp. AC-3 on morphology of *Plasmodiophora* sp. A, Normal mycelia of *Plasmodiophora* sp.; B, abnormal swelling, curling and branching of *Plasmodiophora* sp. mycelia grown with *Streptomyces* sp. AC-3.

의 효소활성을 가지고 있었다. 또한 *Streptomyces* sp. AC-3 균주 배양액을 100°C에서 5분간 고온 처리하여도 배양원액 (crude culture broth)의 길항력에 비해 약 50% 감소된 길항 효과를 가지고 있었다(테이타 미세시). 따라서 AC-3 균주는 chitinase 외에도 다른 항생물질을 생성할 것으로 추정된다.

일반적으로 병원성 진균에 대한 항진균성 역할은 먼저 포자의 발아를 억제하거나[27], 균사를 팽윤시키거나[1, 10], 균사 끝을 분해시키거나[6, 10, 14], 영양원에 대한 경쟁을 억제시키는 방법[27]들이 알려져 있다. Chitinase 활성만 가질 경우에는 균사 끝이 팽윤되는 현상이 주로 나타나며, lysozyme 활성이 나타날 경우에는 세포벽이 용균되어 세포속 내용물이 밖으로 나오는 현상을 볼 수 있다[6, 10].

*Streptomyces* sp. AC-3 chitinase에 의해서는 포자발아 억

제, 균사 팽윤, 균사 끝의 분해 등 chitinase 및 lysozyme의 기능을 다 가지며 항진균성 역할이 우수하게 나타났다. *Plasmodiophora* sp.에 작용하는 *Streptomyces* sp. AC-3 chitinase의 이러한 현상은 *Trichoderma harzianum* endochitinase [11]가 잣빛곰팡이병균 *Botrytis cinerea* 균사에 처리 될 경우와 동일하게 균사가 용균되거나 팽윤되었고, *Pseudomonas aeruginosa* K-187[25] 및 *Serratia plymuthica* [15]에 의해 생산된 chitinase와는 아주 비슷한 작용양상을 지니고 있었다.

**미생물제형화와 유기질비료의 제조 및 미생물 분석**

*Streptomyces* sp. AC-3을 이용하여 미생물제제를 제조한 결과, 미생물제제 g당 AC-3 균주의 포자 수는  $1.2 \times 10^9$  cfu/g로 존재하였다. 또한 유기질비료(H-1)를 제조한 후 미생물제제를 2%(w/w) 첨가하여 미생물제제 혼합 유기질비료

(H-2)를 제조하였다. 2종류의 유기질비료를 부산물비료 공정 규격의 적합성을 검토한 결과, Table 3에서와 같이 H-1과 H-2의 유기물 함량은 각각 30.48, 33.75%로 나타났고, 유기물함량/질소비는 29.88, 25.17로, 전질소함량은 1.65, 1.42%로 나타나 분석한 항목들이 부분적으로 동일하거나 거의 유사한 결과를 나타내어 H-1, H-2 모두 부산물비료 공정규격의 품질기준에 적합하게 나타났다. 유기질비료의 미생물의 수를 조사한 결과, H-1 비료는 세균이  $3.4 \times 10^8$  cfu/g, 방선균은  $2.1 \times 10^6$  spores/g이었으나 H-2 비료는 세균이  $3.2 \times 10^8$  cfu/g, 방선균은  $4.6 \times 10^6$  spores/g으로 나타났다. 따라서 미생물제제가 혼합된 유기질비료 H-2 비료는 H-1 비료에 비해 세균의 수는 거의 동일하게 나타났으나 방선균의 수가 2배 이상 증가되어 결국 *Streptomyces* sp. AC-3의 수는 대략 비료 g당  $2.5 \times 10^6$  cfu/g 정도 더 존재하는 것으로 추정되었다.

**Table 3. Qualities of organic fertilizer after composting for 30 days (dry basis).**

Items	H-1	H-2
O.M. (%)	30.48	33.75
C/N ratio	29.88	25.17
T-N (%)	1.65	1.42
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (%)	3.89	3.76
K <sub>2</sub> O (%)	1.27	1.82
Pb (mg/kg)	1.62	1.43
Cd (mg/kg)	0.13	0.17
Cu (mg/kg)	16.37	21.73
Cr (mg/kg)	3.33	2.86
As (mg/kg)	0.12	0.05
Hg (mg/kg)	trace	trace
Zn (mg/kg)	165.21	212.36
Ni (mg/kg)	2.20	5.82
W.C. (%)	42.90	40.67
S.C. (%)	0.13	0.17
pH	7.20	8.78
EC (mS/cm)	3.83	3.05

O.M., organic matter; C/N, carbon nitrogen ratio; T-N, total nitrogen; W.C., water content; S.C., salt content; H-1, organic fertilizer; H-2, organic fertilizer added 2% microbial inoculant.

**시험포장의 토양화학성 조사**

시험포장에 H-1 비료와 H-2 비료를 시비하고 20일 경과 후 배추를 정식하기 직전에 토양의 이화학적 성을 조사한 결과, Table 4와 같이 pH는 H-1 및 H-2 처리 토양에서 6.5와 6.6으로 중성으로 나타났다. 배추는 보통 pH가 5.5에서 6.8사이가 적정 pH로 알려져 있다. 두 처리구 모두에서 유기물의 함량, 인산(P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), 가리(K), 칼슘(Ca), 고토(Mg) 등 대부분의 성분들이 거의 동일하거나 비슷한 결과를 나타내었으나 CEC는 H-1은 16.5에 비해 H-2는 20.1로 증가되는 경향을 나타내었다. 이러한 결과는 H-1 비료 처리 토양보다 H-2 비료 처리 토양에서 2배 이상 많이 첨가된 방선균의 활동 결과로 추론된다.

**배추의 생육상황 및 병해발생 유무**

시험포장에서 배추의 생육상황을 조사 결과, Table 5에서와 같이 40일 재배후 H-1, H-2 비료 처리구 모두 초장과 생체중량이 거의 동일하게 나타났으나 60일 재배후에는 H-1 비료 처리구 보다 H-2 비료 처리구의 생육이 비교적 높게 나타났다. 이는 재배 시간이 경과될수록 H-1 비료 처리구에서는 병 발생이 증가되어 작물의 생육에 영향을 주기 때문으로 사료된다.

시험포장에서 배추의 병 발생율을 조사한 결과, Table 6에서와 같이 무사마귀병은 H-1 비료 처리구는 36.17%, H-

**Table 4. Some properties of soil and other materials used for experiment.**

Items	pH (1:5)	O.M (%)	N (%)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (ppm)	Ex. cations (cmol/kg)			C.E.C (cmol/kg)
					K	Ca	Mg	
H-1 treated soil	6.5	17.4	0.12	45.4	1.45	8.03	0.94	16.5
H-2 treated soil	6.6	17.5	0.10	46.7	1.38	7.95	1.42	20.1

O.M., organic matter; C.E.C., cation exchange capacity.

**Table 5. Height and fresh weight of cabbage 40 and 60 days after sowing.**

Items	Height(cm)		Fresh weight (g/plant)	
	40 days	60 days	40 days	60 days
H-1	18.4 ± 0.3	28.4 ± 2.3	357 ± 2.1	525 ± 12.5
H-2	18.5 ± 0.5	33.8 ± 0.4	358 ± 1.7	595 ± 1.3

**Table 6. Biocontrol of cabbage in the infected field with clubroot disease.**

Diseases	Percent of infected plants (%)	
	H-1 treatment	H-2 treatment
Clubroot	36.17	18.28
Sclerotinia rot	1.03	0.42
Fusarium wilt	0.25	0.00
Pythium rot	0.11	0.00

H-1, organic fertilizer; H-2, organic fertilizer added 2% microbial inoculant.

2 비료 처리구는 18.28% 발병되어 H-1 비료 처리구에 비해 H-2 비료 처리구는 50% 이상 무사마귀병의 방제 효과가 증가된 것을 확인하였다. 또한 균핵병(Sclerotinia rot)은 H-1 비료 처리구에 비해 H-2 비료 처리구에서는 50%이상 감염이 감소되었고, 또한 잎마름병(Fusarium wilt)이나 그루썩음병(Pythium rot)은 H-1 비료 처리구에서는 부분적으로 발병되었으나 H-2 비료 처리구 전혀 발병되지 않았다.

일반적으로 방선균은 이차대사산물, 항생물질, 세포벽분해효소 등을 생산하는 미생물로 잘 알려져 있다[7,18]. 이런 방선균은 생물학적 방제제로서도 많은 연구가 진행되고 있으며[2,3,4,5], *Alternaria*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Phomopsis*, *Pythium* *Phytophthora* 그리고 *Rhizoctonia* 등[20,21]의 병원성 곰팡이에 대한 우수한 생물학적 방제 효과가 이미 입증되고 있으나 *Plasmodiophora*에 관한 연구로 거의 없는 상태이다. 우리나라에서는 김 등[8]이 유용길항균을 이용한 무사마귀병의 생물학적 방제에 관한 연구를 진행하고 있으나 아직 많은 연구가 필요한 상태이다. 결론적으로 *Streptomyces* sp. AC-3 균주는 배추의 무사마귀병균인 *Plasmodiophora* sp. 및 각종 배추 병원성 진균에 대한 높은 길항력을 지닌 균주로서 생물학적방제가 가능한 균주로 확인하였다.

**요 약**

본 연구는 배추 무사마귀병의 생물학적 방제를 위해 수행되었다. 배추 무사마귀병균 *Plasmodiophora* sp.의 길항미생물은 낙엽부식토양에서 분리한 350여 종의 토양미생물 중에서 가장 길항력이 높은 방선균 AC-3균주를 이용하였고, AC-3 균주는 16S rDNA 염기서열분석방법으로 *Streptomyces* sp.로 동정되었다. *Streptomyces* sp. AC-3은 배양액 ml당

9.3 units의 chitinase를 생산하였다. 그 결과 배추 무사마귀병균 *Plasmodiophora* sp.의 배양액에 *Streptomyces* sp. AC-3을 접종하고 배양하면 *Plasmodiophora* sp.의 균체가 팽윤되거나 세포벽이 용해된 모습이 관찰되었다. *Streptomyces* sp. AC-3은 전년도 배추 무사마귀병이 만연했던 포장에서 재배 시험하기 위해 제형화시키고 유기질비료에 첨가하여 이용하였다. 미생물제제를 첨가하지 않고 제조한 유기질비료(H-1)(대조구)와 미생물제제 첨가하여 제조한 유기질비료(H-2)(처리구)에 의한 포장시험에서 배추의 생육은 재배 40일까지는 거의 차이를 나타내지 않았으나 재배 60일에는 다소 차이를 나타내었다. 배추의 병 발생율을 조사한 결과 무사마귀병은 H-1 비료 처리구에서는 36.17% 병이 발생되었으나 H-2 비료 처리구에서는 18.28% 발병되어 약 50%의 방제효과를 나타내었으며, 균핵병, 잎마름병, 그루썩음병 등에서도 길항효과를 나타내어 생물학적 방제가 가능한 균주로 확인되었다.

**감사의 글**

본 연구는 2003년 제11차 산학연공동기술개발 지역컨소시엄 연구지원비에 의하여 수행된 연구결과의 일부이며, 이에 깊이 감사 드립니다.

**REFERENCES**

1. Akihiro, O., A. Takashi, and S. Makoto. 1993. Production of the antifungal peptide antibiotic, iturin by *Bacillus subtilis* NB22 in solid state fermentation. *J. Ferm. Bioeng.* **75**: 23-27.
2. Broadbent, P., K. F. Barker, and Y. Waterworth. 1971. Bacteria and actinomycetes antagonistic to fungal root pathogens in Australian soils. *Aust. J. Biol. Sci.* **24**: 925-944.
3. Chamberlain, K. and D. L. Crawford. 1999. In vitro and in vivo antagonism of pathogenic turfgrass fungi by *Streptomyces hygrosopicus* strain YCED9 and WYE53. *J. Indust. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 641-646.
4. Crawford, R. L. and D. L. Crawford. 1984. Recent advances in studies of the mechanisms of microbial degradation of lignins. *Enzymol. Microb. Technol.* **6**: 434-442.
5. El-Abyad, M. S., M. A. El-Sayed, A.-R. El-Shanshoury, and N. H. El-Batanouny. 1993. Inhibitory effects of UV mutants of *Streptomyces corchorusii* and *Streptomyces spiroverticillium* on bean and banana wilt pathogens. *Can. J. Bot.* **71**: 1080-1086.
6. Elad, Y., I. Chet. and Y. Henis. 1982. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Can. J. Microbiol.* **28**: 719-725.
7. Goodfellow, M. and S. T. Williams. 1983. Ecology of actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* **37**: 187-216.
8. Kim, J. H., Y. R. Yeoung, B. S. Kim. and J. Y. Jeon. 2002. Control effect of chinese cabbage clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) disease by beneficial antagonist. Poster presenta-

- tion No. P-1-⑦. Korean Society for Horticultural Science.
9. Lechevalier, H. A., S. T. Williams, M. E. Sharpe, and J. G. Holt. 1989. The Actinomycetes: A Practical Guide to Genetic Identification of Actinomycetes, 2344-2347. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams & Wilkins, Sydney.
  10. Lim, S. H. K. S. Kim. and and S. D. Kim. 1991. *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 genetic transformation and antifungal mechanism against *Fusarium solani*, an agent to plant root rot. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 510-516.
  11. Lorito, M., A. Di Pietro, C. K. Hayes, S. L. Woo, and G. E. Harman. 1993. Antifungal synergistic interaction between chitinolytic enzymes from *Trichoderma harzianum* and *Enterobacter cloacae*. *Mol. Plant Pathol.* **83**: 721-728.
  12. Mehling, A., F. Wehmeir, and W. Piepersberg. 1995. Nucleotide sequences of streptomycete 16S ribosomal DNA: Towards a specific identification system for streptomycetes using PCR. *Microbiol.* **141**: 2139-2147.
  13. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
  14. Mitchell, R. and M. Alexander. 1965. Lysis of soil fungi by bacteria. *Can. J. Microbiol.* **9**: 169-177.
  15. Joo, G. J., I. H. Lee, and J. H. Kim. 2002. Chitinase production and isolation of *Serratia plymuthica* AL-1 antagonistic to white rot fungi from *Allium fistulosum* roots. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 135-141.
  16. Joo, G. J., J. H. Kim, and S. J. Kang. 2002. Isolation and antifungal activity of *Bacillus ehimensis* strain YJ-37 as antagonistic against vegetables damping-off fungi. *Kor. J. Life Sci.* **12**: 200-207.
  17. Sparks, D. L. 1996. Methods of soil analysis, part 3. Chemical methods, Agronomy, Book series number 5, Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin, USA.
  18. Srinivasan, M. C., R. S. Laxman, and M. V. Deshpande. 1991. Physiology and nutritional aspects of actinomycetes: An overview. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **7**: 171-184.
  19. Sturz, A. V., M. R. Carter, and H. W. Johnston. 1997. A review of plant disease, pathogen interactions and microbial antagonism under conservation tillage in temperate humid agriculture. *Soil & Tillage Research* **41**: 169-189.
  20. Tahvonen, R. and H. Avikainen. 1987. The biological control of seedborne *Alternaria brassicicola* of cruciferous plants with a powdery preparation of *Streptomyces* sp. *J. Agric. Sci. Finl.* **59**: 199-208.
  21. Tahvonen, R. and L. Lahdenpera. 1988. Biological control of *Botrytis cinerea* and *Rhizoctonia solani* in lettuce by *Streptomyces* sp. *An. Agric. Fenniae* **27**: 107-116.
  22. Thomashow, L. S. and D. M. Weller. 1995. Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: mechanisms and antifungal metabolites. pp. 187-235 In: G. Stacey and N. Keen, Editors, *Plant - Microbe interactions*, Chapman and Hall, New York.
  23. van Loon, L. C., P. A. H. M. Bakker, and C. M. J. Pieterse. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **36**: 453-483.
  24. Walker, J. C. 1935. Calcium cyanamide in relation to control of clubroot of cabbage. *J. Agric. Res.* **51**: 183-189.
  25. Wang, S. L. and W. T. Chang. 1997. Purification and characterization of two bifunctional chitinase/lysozyme extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a shrimp and crab shell powder medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 380-386.
  26. Webster, M. A. and G. R. Dixon. 1991. Boron, pH and inoculum concentration influencing colonization by *Plasmodiophora brassicae*. *Mycological Research* **95**: 74-79.
  27. Weston L. A. 1996. Utilization of allelopathy for weed management in agroecosystems. *Agronomy J.* **88**: 860-866.
  28. Young, C. C., K. T. Cheng, and G. R. Waller. 1991. Phenolic compounds in conducive and suppressive soils on clubroot disease of crucifers. *Soil Biol. and Biochem.* **23**: 1183-1189.

(Received Apr. 20, 2004/Accepted June 1, 2004)