

## 잔디 갈색퍼짐병 (Large patch)의 생물학적 방제를 위한 길항 미생물의 선발과 효력 검증

정우철 · 신태수 · 김봉수 · 임재성 · 이재호 · 김진원<sup>1\*</sup>  
(주)그린바이오텍 부설 생명공학연구소, <sup>1</sup>서울시립대학교 환경원예학과

### Efficacy of Antagonistic Bacteria for Biological Control of Rhizoctonia Blight (Large patch) on Zoysiagrass

Woo Chul Jung, Taek Su Shin, Bong-Su Kim, Jae-Seong Im, Jae-Ho Lee and Jin-Won Kim<sup>1\*</sup>  
Green Biotech Co., Ltd., Sanggisug-ri, Gyoha-eup, Paju-city, Gyeonggi-do 737-28, Korea  
<sup>1</sup>Department of Environmental Horticulture, University of Seoul, Seoul 130-743, Korea  
(Received on March 10, 2008)

**Rhizoctonia blight (large patch) caused by *Rhizoctonia solani* AG2-2 is one of the major diseases on zoysiagrass in golf courses. In this study, antagonistic bacteria to *R. solani* AG2-2 were selected *in vitro* tests using confrontation bioassay and triple layer agar diffusion method. The most active bacteria, *Bacillus subtilis* CJ-9 were tested for controlling large patch in pots. Relative Performance Index (RPI) was used as a criterion for the selection of potential biocontrol agent. *B. subtilis* CJ-9 showed resistance to major synthetic agrochemicals used in golf course. In field tests at golf course, *B. subtilis* CJ-9 was more effective in suppression of large patch severity and population development of *R. solani* AG2-2 in soil than chemical fungicides. *B. subtilis* CJ-9 could be an alternative to chemical fungicides for eco-friendly management of large patch on zoysiagrass.**

**Keywords :** Biological control, *Bacillus subtilis* CJ-9, Rhizoctonia blight (Large patch), *Rhizoctonia solani* AG2-2, Zoysiagrass

잔디는 원래 야생성이 강하여 병에 잘 걸리지 않으나, 골프장 등과 같은 지역에 식재되어 상업적으로 이용되고 있는 잔디류는 사용목적상 시비, 잔디깎기(예초) 등 집약 관리가 이루어지고 있으며, 잔디로 조성된 지역은 경운작업이 거의 불가능하므로 오랜 기간 동안 예지물의 축적에 의한 발병환경이 조성되고, 기계작업이나 플레이어 등의 답압에 의한 스트레스로 인해 다양한 병이 발생되고 있다. 우리나라 골프장에 식재되어 있는 잔디류에 발생하는 병은 약 10여종이 알려져 있으나(한국식물병리학회, 2004), 잔디품종, 토양, 기후 환경 등에 따라 년 중 발병 시기에 차이가 있다. 한지형 잔디의 경우 동전마름병(dollar spot), 피시움마름병(pythium blight), 갈색마름병(brown patch), 탄저병(anthracnose), 누른잎마름병(yellow patch) 등이 주요 병해이고, 난지형 잔디인 한국잔디류(zoysiagrass)

로 식재된 지역은 주로 갈색퍼짐병(large patch)이 문제가 되고 있다.

우리나라 골프장은 퍼팅그린과 페어웨이 모두를 한지형 잔디로 식재하여 골프코스를 조성한 제주 지역 등 일부지역을 제외하고는 대부분의 경우 퍼팅그린은 한지형 잔디인 bentgrass류로 식재되어 있고, 골프코스의 대부분을 차지하는 페어웨이의 경우는 난지형 잔디인 한국잔디류로 식재되어 있다. 특히, 한국잔디로 식재된 페어웨이에서 가장 문제가 되고 있는 잔디병은 *Rhizoctonia solani* AG2-2에 의한 갈색퍼짐병이다.

잔디 갈색퍼짐병은 우리나라의 경우 병원균 생육에 적합한 시기인 늦봄과 가을 년 중 2회 발생하며, 특히 가을 발병시 그 피해가 심하다. 병반의 크기가 직경 30~50 cm의 소형 병반부터 보통 1~3 m의 병반을 형성하며, 크게는 10 m의 대형 병반을 형성하기도 한다. 배수불량지에서 발병이 조장되기 쉬우며, 강우에 따라서 병의 진전과 확산이 급속히 이루어진다(심 등, 1994). 이 병은 다른 병에 비해 병반 및 발생 규모가 크며 피해 장소가 골프코

\*Corresponding author  
Phone) +82-2-2210-2664, Fax) +82-2-2210-2838  
E-mail) jwkim@uos.ac.kr

스 면적의 대부분을 차지하는 페어웨이, 러프, 티그라운드에서 걸쳐 발생되기 때문에 방제를 위한 약량, 노동력 등 경제적인 부담이 매우 크다. 또한, 병원균이 토양 태취층에 서식하기 때문에 약제의 처리가 어렵고, 강우량의 증가, 배수 불량과 같은 발병 호조건 상황에서는 병의 진전이 매우 급속히 이루어지기 때문에 방제에 많은 어려움이 따른다.

그 동안 골프 코스 관리자들은 본 잔디병의 방제하기 위해 유기 합성 살균제를 이용한 화학적 방제를 하고 있으나 토양전염성병인 관계로 방제가 쉽지 않다. 일반적으로 잔디 병의 방제를 위해서는 합성농약을 이용한 화학적 방제법과 경종적 방제법을 주로 이용해 왔다(Shurtleff 등, 1987). 그러나 집중적인 화학적 방제는 병원균의 저항성 발현과 주변 환경의 오염, 인축 독성 등 많은 부작용을 초래한다(Nelson, 1997; Uddin와 Viji, 2002). 적절한 경종적 방제는 골프장 관리에 있어서 필수 요소이지만, 골프장 운영의 특성상 플레이어들의 경기 시간과 코스 관리자들의 작업 시간이 상충되고, 장마와 같은 기후적인 영향으로 충분히 이루어질 수 없는 경우가 많으므로 이를 보완할 수 있는 새로운 관리가 필요하다. 또한, 최근에는 골프장에서 농약사용에 의한 환경문제가 대두되면서 우리나라에서도 농약사용 저감을 위한 환경친화적 병해관리가 요구되고 있다.

잔디병 방제를 위한 환경친화적 방제법의 일환으로 천연물제제와 길항미생물을 이용한 생물적 방제, 저항성 품종의 개발 등 많은 부분에서 이루어지고 있다. Hodges 등(1993)은 *Streptomyces* 균주를 이용하여 동전마름병의 병원균인 *Sclerotinia homeocarpa*에 대한 항균활성을 보고하였고, 국내에서도 황 등(1996)이 인삼의 뿌리썩음병 방제 미생물제제로 개발된 6가지 균주를 이용하여 잔디 피시움마름병에 대한 높은 방제 효과를 보고하였다.

본 연구에서는 국내에서 한국잔디류에 대표적인 난방제성 잔디병으로 알려져 있는 갈색퍼짐병의 생물학적 방제를 위해 길항 미생물의 선발, 길항 미생물의 최적 배양 조건, IPM 소재로의 사용 여부, 방제 효과의 검정을 수행하였다.

## 재료 및 방법

**길항 미생물 선발.** 국내 골프장 페어웨이에 식재되어 있는 한국잔디에 문제가 되고 있는 잔디 갈색퍼짐병원균인 *R. solani* AG2-2에 대해 항균 활성을 갖는 미생물을 선발하기 위해서 경기 9개 지역, 충북 2개 지역, 충남 1개 지역의 골프장 토양과 밭 토양, 산림 토양을 채취하

여, 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 조정된 다음 한천(agar) 15 g을 첨가하고 30 ml용 시험관에 10 ml씩 분주한 다음, 통상의 방법으로 가압 멸균하여 50°C의 항온수조에 보관하였다. 이어서 채취한 토양시료 1 g을 멸균한 생리식염수 100 ml에 현탁한 다음, 현탁액 2~3방울을 상기 시험관에 넣고 잘 혼합하여 배양기를 제조하였다. 제조한 배양기 위에 1.5% 물한천배지 용액 5 ml를 넣어 균한 후, 마지막으로 감자한천배지(PDA)에서 25°C 항온 조건으로 7일간 배양한 *R. solani* AG2-2를 코르크보아를 이용하여 약 3 g 채취하여 20 ml의 멸균 증류수를 넣고 homogenizer를 이용하여 분쇄하여 50°C 항온기에 준비된 PDA 배지 10 ml에 2~3방울 첨가하고 잘 혼합한 후에 상기의 배양기에 다시 분주하여 삼중층 평판배지를 제조하였다. 제조된 평판배지를 30°C 항온기에서 3~7일간 배양하고, 잔디 갈색퍼짐병원균인 *R. solani* AG2-2에 대해 생육 저지환의 유무로 길항성 미생물을 선발하여 tryptic soy broth(TSB) 배지를 이용하여 배양한 다음 대칭배양법과 생육 저지환(clear zone) 측정법을 이용하여 우수한 길항력이 있는 미생물을 선발하였다. 대칭배양법의 경우 다음의 식에 의해 생육 저해율을 계산하였고, 생육 저지환 측정법은 투명환의 직경으로서 길항력을 평가하였다.

생장억제정도(%) =

$$\frac{(\text{공시 균주에 대한 병원균의 생육 억제 반경})}{(\text{대조구 상에서의 병원균의 생육 반경})} \times 100$$

**길항 미생물의 잔디 갈색퍼짐병 억제 효과 검증(pot 실험).** 실험에 사용할 한국잔디(zoysiagrass)는 한국잔디 포장에서 채취하여 30×45 cm 사각 pot로 옮긴 후에 20~30°C의 온실에서 30일 이상 활착시킨 것과 종자를 파종 후 60일 이상 재배한 것을 사용하였다. 병원균 접종원은 1일 간격으로 2회 연속 살균한 sand-oatmeal 배지(1,000 ml 삼각플라스크에 모래 380 g, oatmeal 20 g을 넣어 혼합하고, 증류수 76 ml를 첨가)에 감자한천배지(PDA)에서 5일간 배양한 *R. solani* AG2-2의 균총을 코르크보아로 채취한 것을 5개씩 이식하여 25°C 항온기에서 20일간 배양하여 준비하였다. 준비된 병원균의 접종은 길항미생물 처리 전에 지름이 1 cm인 실린더를 이용하여 깊이 5~10 cm로 구멍을 뚫고, pot 당 접종원을 20 g 수준으로 처리하였으며, 길항미생물 처리는 대상 길항미생물이 충분히 자랄 수 있도록 potato dextrose broth(PDB)나 TSB에서 150 rpm으로

30°C에서 48 hr 동안 배양 후 배양액을 100배 희석하여 pot당 200 ml씩 처리하였다. 대조구는 펜시쿠론 수화제를 1,000배 희석액을 살포하였다. 약제 처리 후에 습실상(온도 25°C, 상대습도 100%)에 두고 발병을 유도하였다. 처리 10일 후에 발병 면적율을 조사하고, 무처리 대비 방제가(%)를 구하여 높은 항균활성을 나타내는 미생물을 선발하였다.

**상대적 길항효과 지수(Relative Performance Indices, RPI)를 이용한 길항미생물 선정.** 최종 길항 미생물의 선정은 병원균에 대한 길항력과 성장 속도를 복합적으로 고려할 수 있도록 세균의 성장 속도와 세포 분열 속도를 기본 값으로 하여 종합적인 세균의 배양 속도를 측정하는 RPI 기법(Slininger 등, 2003)을 본 실험에 적합하게 변형하여 이용하였다. RPI를 구하는 방법은 다음과 같으며, 효과는 잔디 갈색퍼짐병 억제 효과 검증 실험에서의 방제가를 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 OD<sub>600</sub>을 X값으로 이용하였다.

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

i) 병원균에 대한 길항력에 관한 RPI<sub>Efficacy</sub>

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

ii) 후보균의 성장속도에 대한 RPI<sub>Kinetics</sub>

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

X: single observation value(꽃트 시험을 통한 해당 균주의 갈색퍼짐병 방제가)

$\bar{X}$ : the average of all observations(꽃트 시험이 진행된 모든 균주의 평균 갈색퍼짐병 방제가)

$\sigma$ : the standard deviation of observations(실험 균주의 갈색퍼짐병 방제가의 표준편차)

**길항 미생물의 동정.** RPI를 이용한 균주 선발 과정을 통해 잔디 갈색퍼짐병균에 높은 항균활성을 나타내는 길항미생물의 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 동

정하였다.

**길항미생물의 합성농약에 대한 안정성 검증.** 최종 선발된 길항미생물 *Bacillus subtilis* CJ-9에 대하여 골프장에서 통상적으로 사용하고 있는 살균제, 살충제, 제초제 78개에 대하여 혼용성 여부를 조사하였다. *B. subtilis* CJ-9를 LB배지(yeast extract 0.5%, tryptone 1.0%, NaCl 0.5%)에서 30°C에 12시간 동안 진탕 배양하고,  $1 \times 10^7$  cell(spore)/ml 수준으로 조정하여 현탁액을 제조하였다. 이 현탁액을 0.85% topping용 soft agar 5 ml에 100  $\mu$ l을 첨가하고 잘 혼합한 후, LB agar plate에 부어 풍건하여 합성농약 혼용성 평가용 배지를 제조하였다. 살균수 처리를 대조구로 하고, 78개 검증 대상 농약의 권장희석배수의 1/10배, 1배, 2배 희석액을 제조하여 0.8 mm thick paper disc에 100  $\mu$ l씩 처리하여서 미리 제작한 농약 혼용성 평가용 배지위에 치상한 다음 30°C에서 배양하여 생육 저지원의 유무로 농약 혼용성을 평가하였다. 혼용성 여부는 전 농도에 걸쳐서 생육 저지원이 생기지 않는 것을 기준으로 하였다.

**야외 포장에서의 약효 검증.** 최종 선발된 길항 미생물의 포장에서의 약효 실험은 2007년 5월 중순부터 11월 초순 동안 강원도 홍천군 소재 비발디파크 Par 3 골프코스 내 한국잔디(*Zoysia japonica*)로 식재된 페어웨이에서 수행하였다. 해당 골프장의 전체 페어웨이 중 16번과 8번 홀 사이에 1000 m<sup>2</sup>의 면적으로 길항 미생물을 처리한 실험구(처리구)를 조성하였고, 실험구 아래의 5번과 3번 홀 주변을 합성농약 처리구인 관행구(대조구)로 정하였다. 두 지역에서 실험에 영향을 줄만한 환경의 차이는 없었다. 실험 기간 동안 길항 미생물을 7회(5/30, 7/10, 8/23, 9/3, 9/19, 10/1, 10/19) 처리하였고, 합성농약은 발병과 기상조건을 고려하여 7회(7/27, 8/10, 8/24, 8/27, 9/5, 9/16, 11/2) 처리하였다. 관행구에 처리된 합성농약으로는 터부코나졸 유제(상표명, 호리쿠어)를 1,000배 희석하여 1 l/m<sup>2</sup>로 처리하였다. 길항 미생물은 앞에서의 균주 선발 실험과 본 연구에 기재하지 않은 수차례의 외부 포장 실험을 통해 효력이 입증된 길항미생물(*B. subtilis* CJ-9)을 액상수화제로 제형화한 길항 미생물제제[CJ-9, (주)그린바이오택]을 사용하였다. 길항미생물의 처리는 골프장의 지하수를 이용하여 200배로 희석액을 제조하고, 희석액을 처리할 대상 페어웨이에 1 l/m<sup>2</sup>로 관주처리 하되, 희석액은 살포 직전에 제조하여 사용하였다. 실험 대상지역에서의 시비, 통기, 예초 등의 관리는 비발디파크 Par 3 골프코스의 관행 관리에 따라 진행하였다. 병 발생여부는 해당 실험 기간인 5월부터 11월까지 주기적으로 방문하여 조사하였다.

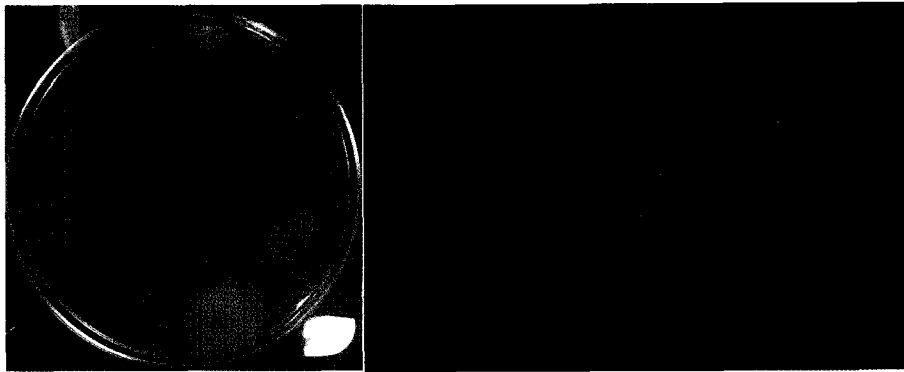


Fig. 1. Microflora of *Rhizoctonia solani* (left, arrow) and typical microphotograph of *Rhizoctonia solani* (right) on selective medium.

길항 미생물 처리에 따른 토양 중 *R. solani*의 밀도 변화. 야외 포장 약효 실험지역을 대상으로 길항 미생물제제(*Bacillus subtilis* CJ-9; 제품명 CJ-9)를 1차 처리 시점 직후부터 3차례(6월 16일, 7월 13일, 8월 3일)에 걸쳐 길항미생물 처리지역(처리구)과 무처리지역(대조구)의 토양을 채취하여 잔디 갈색괴짐병원균인 *R. solani* AG2-2의 토양 내 밀도를 조사하였다. 각 시기별로 처리구와 대조구를 대상으로 3곳을 무작위로 선택하여 표면으로부터 15 cm 내외의 깊이로 토양을 채취하여 음지에서 24시간 이상 풍건한 후 실험에 사용하였다. 채취한 토양 5 g을 50 ml 물한천배지(water agar, WA; agar 함량 0.03%)에 넣고 잘 교반하여 희석한 후, micro-pipet으로 1 ml 취하여 Ko와 Hora(1971)가 제시한 *R. solani* 선택배지를 변형한 배지(멸균 증류수 1,000 ml에  $K_2HPO_4$  1.0 g,  $MgSO_4 \cdot H_2O$  0.5 g, KCl 0.5 g,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  10.0 mg,  $NaNO_2$  0.2 g, gallic acid 0.4 g, dexton 70% WP 90.0 mg, fosetyl-Al 0.25 g, chloramphenicol 50.0 mg, streptomycin 50.0 mg, agar 20.0 g)에 약 250회(페트리디쉬 당 약 30회 정도가 적당) 점적하였다. 72시간 경과 후, 선택배지 위에 점적한 토양 함유 물한천배지에서 형성된 *R. solani* 균을 현미경하에서 동정하고(Fig. 1), 배지에 형성된 균총의 수를 계수하였다. 특히, 2007년 10월에 야외 포장 실험이 수행된 지역 외에서 잔디 갈색괴짐병이 새로 발생한 지역을 대상으로 길항 미생물 처리지역[처리구, 18 m<sup>2</sup>(6 m<sup>2</sup>×3반복)]과 처리하지 않은 지역[무처리구, 18 m<sup>2</sup>(6 m<sup>2</sup>×3반복)]으로 구분하여 추가적인 실험을 수행하였다.

## 결과 및 고찰

길항 미생물의 활성 검증. 각 지역의 토양에서 삼중층 평판배지를 이용하여 길항성이 있는 것으로 보이는 미생물의 균총(colony)을 분리하였다. 이때, 토양 현탁액에 존

Table 1. Antifungal activity and inhibition of mycelial growth against *Rhizoctonia solani* AG2-2 by antagonistic microorganisms isolated from soils

Antagonistic microorganism	Radius of clear zone <sup>a</sup> (mm)	Inhibition of mycelial growth (%) <sup>b</sup>
Inha#1	10	33
Inha#2	11	47
Inha#4	12	10
Inha#7	15	18
Inha#16	13	65
Inha#18	13	0
Inha#19	13	15
Inha#20	11	12
Inha#31	12	20
Inha#43	10	20
CJ-1	9	33
CJ-2	10	21
CJ-3	10	40
CJ-4	17	65
CJ-5	10	60
CJ-8	12	55
CJ-9	20	72
CJ-10	10	40
CJ-12	10	40
CJ-15	10	30
G-47	18	65
G-50	19	70
C52	14	40
C75	12	32
C82	11	0
D48	10	10
F63	11	0
F83	13	10

<sup>a</sup>Antifungal activity by measuring radius of clear zone.

<sup>b</sup>Inhibition rate of mycelial growth by dual culture method.

재하는 사상형 미생물(filamentous soil microorganism)의 경우 물한천 층까지 성장하여 병원균 접종 시 오염원으로 작용할 수 있으므로 토양 현탁액이 희석된 층이 일체의 외부 오염 없이 완전히 건조된 후, 물한천을 붓도록 함으로써 사상형 미생물의 간섭을 방지하였다(이 등, 1997). 투명환의 크기가 10 mm 이상인 것을 기준으로 순수 분리된 균총을 TSB에 배양하여 균총의 형태 및 현미경 관찰을 통해 본 결과, actinomycetes, bacteria, fungi 등 총 28종의 미생물이 조사되었다(Table 1). 각각의 순수 분리된 미생물은 지역과 분리 순서에 따라 일련의 명칭을 부여하였고, *in vitro* 상에서 *R. solani* AG2-2에 대한 활성 저지원 실험 결과 직경이 17 mm 이상인 것과 균사억제율이 65% 이상인 균주(CJ-9, CJ-4, G-47, G-50)를 대상으로 잔디 갈색피집병 억제력을 측정할 포트 수준의 생물검정 실험에 사용하였다.

**길항 미생물의 잔디 갈색피집병 억제 효과 검증(pot 실험).** 실내실험을 통해 *R. solani* AG2-2에 대해 길항 능력이 뛰어난 것으로 조사된 4개 균주에 대해 포트를 이용한 생물검정 실험을 실시한 결과(Table 2), CJ-9과 CJ-4가 무처리 대조구 대비 방제가(%)에서 비교적 높은 병 발생 억제력을 나타냈으며, 두 균주는 통계적으로 화학농약 처리와 동일한 수준의 우수한 방제력을 나타냈다. 포트에서의 실험은 비교적 빠른 시간 안에 여러 후보 균주에 대해 *in vivo* 상에서의 잔디 갈색피집병의 방제가를 검정할 수 있다는 장점이 있다. 항균활성과 균사 성장 억제력이 높은 균주일지라도 토양 내에 존재하는 수많은 다른 미생물과의 경쟁이나 자외선, 온습도의 변화 등 외부 환경에 취약하여 실제로는 현장에서 방제 효과가 전혀 없는 경우가 많다. 이런 *in vitro* 상에서의 균주 선발 실험의 한계점을 극복하기 위해서는 여러 단계의 생물검정 실험을 거치는 것이 필수적이라 할 수 있다. 토양 전염성 병원균의 방제를 목적으로 하는 미생물 제제로 이용되기

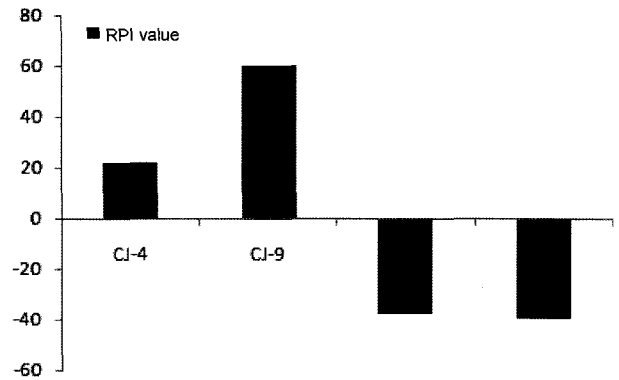
**Table 2.** Suppression of Large patch by antagonistic microorganisms isolated from various soil in pot test

Treatment	Disease incidence (%)			Average <sup>a</sup>	Control value (%) <sup>b</sup>
	No. 1	No. 2	No. 3		
CJ-4	30	40	40	36.7 c	49.0
CJ-9	50	50	43	47.7 bc	33.8
G-47	60	60	60	60.0 ab	16.7
G-50	45	50	30	41.7 c	42.1
Pencycuron (WP)	40	35	30	35.0 c	51.4
Control	60	78	78	72.0 a	-

<sup>a</sup>Duncan's multiple range test, 95%.

<sup>b</sup>Calculated from the equation  $(1 - D. I_{treat} / D. I_{cont}) \times 100$ .

**RPI value**



**Fig. 2.** Use of RPI to achieve a 2-dimensional assessment of antagonistic organism based on growth and control effect against *Rizoctonia solani* AG2-2 of liquid-grown cells.

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 상대적 길항효과 지수(RPI) 개념을 도입하여 위 능력에 대해 검증한 결과(Fig. 2), RPI 값을 기준으로 보았을 때, CJ-9이 약 60으로 가장 높은 RPI 값을 가진 것으로 나타나 잔디 갈색피집병에 대한 미생물 제제의 후보 균주로 최종 선정 되었다.

**최종 선발 길항 미생물 CJ-9의 동정.** 선행 연구를 통해 잔디 갈색피집병의 방제를 위한 미생물제제로 이용되기 가장 적합한 균주로 선정된 길항미생물인 CJ-9의 생리·형태학적 특성을 조사하고, 염기서열의 분석을 실시한 결과, GenBank의 *Bacillus subtilis*와 16s rRNA 서열의 동일성이 98% 이상 나타나 최종적으로 *B. subtilis*로 동정하였다(Table 3). 동정 자료를 토대로 일반적인 *Bacillus* spp.의 배양 조건을 참고하여 실제 생물적 방제법에 사용될 수준의 길항 미생물제제 시제품을 생산하여 외부 포장 실험에 사용하였다. 길항 미생물제제는 외부의 오염으로부터 보호하고자 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 이용하여 pH를 4.2 정도로 낮추고, 멸균 증류수를 이용하여 미생물의 밀도를 1.0 × 10<sup>8</sup> 수준으로 조제하였다.

**길항미생물(*B. subtilis* CJ-9)의 합성농약에 대한 안정성 검증.** 길항 미생물이 병원균에 대해 방제 효과를 나타내기 위해서는 해당 지역의 토양 생태계에 잘 정착하여 일정 수준 이상의 밀도를 유지하고, 항생물질 혹은 병원균에 대한 중복감염 등을 통해 병원균의 밀도를 발병 수준 이하로 억제할 수 있어야 한다(Baker, 1968). 골프장의 경우 병의 방제 외에도 해충의 방제, 잡초의 제거 등을 위해 화학 농약을 사용하고 있다. 이의 사용은 토양 내 서식하고 있는 병원균을 포함한 모든 미생물에 영향을 끼

**Table 3.** Morphological and physiological characteristics of *Bacillus subtilis* CJ-9

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 mannitol	+
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%

친다. 또한, 친환경적인 방제를 위해 화학 농약의 사용을 전면적으로 중지하더라도 기존의 화학 농약이 토양 내에서 완전히 소멸되기에는 많은 시간이 필요하기 때문에 화학 농약에 대한 영향을 검증하는 것이 필요하였다. 골프장에서 널리 사용되고 있는 화학 농약 제품 중 살균제 43종, 살충제 11종, 제초제 22종, 생장조절제 1종에 대하여 *B. subtilis* CJ-9에 미치는 영향에 대해 조사한 결과(Table

4) 살균제의 경우, 카바메이트계, 피리미딘계, 이족사눌계, 카르복시아나리이드계, 아실아라닌계, 요소계 등 22종, 살충제는 유기인계, 카바메이트계, 합성 피레스로이드계 등 6종이 혼용 가능하였고, 제초제에 있어서는 디니트로아니린계, 설폰닐우레아계, 카바메이트계 등 4종이 가능하였다. 이와 같은 결과를 토대로 골프장에서의 포장실험에서는 방제 계획 중 길항 미생물에 영향을 미칠 수 있는 농약의 사용 여부를 미리 점검하여 방제 계획에 반영하였다.

**야외 포장에서의 약효 검증.** 야외 포장 실험이 이루어진 비발디파크 Par 3 골프장의 경우 잔디 갈색퍼짐병에 의한 피해가 매년 발생하는 곳으로 실험이 이루어진 당해(2007년)의 강수량과 강수 빈도와 같은 조건하에서는 발병이 충분히 예상될 수 있는 곳이었다. 잔디 갈색퍼짐병의 방제를 위한 길항 미생물과 살균제의 처리는 발병 전부터 이루어졌으며, 본 병의 방제 적기는 발병 직전으로 병의 발생 후에는 방제가 쉽지 않기 때문에 전년 코스 관리 일지를 참고하여 미리 약제 처리 일정을 계획하였다. 또한, 길항 미생물의 경우는 토양 병원균의 서식처인 탱크층에 정착하여 항균 물질 혹은 먹이 경쟁을 통해 병원균의 밀도를 낮추는 방법으로 병을 방제하기 때문에 병 발생 전 예방 시약이 살균제에 비해 더욱 중요하다. 잔디 갈색퍼짐병의 방제를 위해 선발된 길항미생물 *B. subtilis* CJ-9를 액상수화제로 제형화한 것을 처리한 지역(처리구)과 살균제를 이용한 관행 관리 지역(관행구)에서의 갈색퍼짐병의 발병 현황을 조사한 결과(Fig. 3), 관행구에서는 7월 중순과 10월 중순에 갈색퍼짐병이 발생하였지만, 처리구에서는 조사기간 동안 갈색퍼짐병이 발생하지 않았다. 이와 같은 결과를 통해 *B. subtilis* CJ-9이 갈색퍼짐병 방제를 위한 대안으로 사용될 수 있는 가능성을 확인할 수 있었다.

**길항 미생물 처리에 따른 토양 중 *R. solani*의 밀도 변화.** *B. subtilis* CJ-9처리에 따른 토양 중 *R. solani*의 밀도를 조사하기 위하여 선택배지 상에서 균총을 계수하였다. 본 연구에서는 *R. solani* AG2-2의 밀도를 따로 조사하지 않고, *R. solani*의 밀도 변화와 거의 일치할 것으로 예상하고 조사를 수행하였다. *B. subtilis* CJ-9을 5월 30일에 최초 처리한 후, 6월 16일 토양을 채취하여 무처리구

**Table 4.** Agrochemicals available to applicate together with *Bacillus subtilis* CJ-9

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

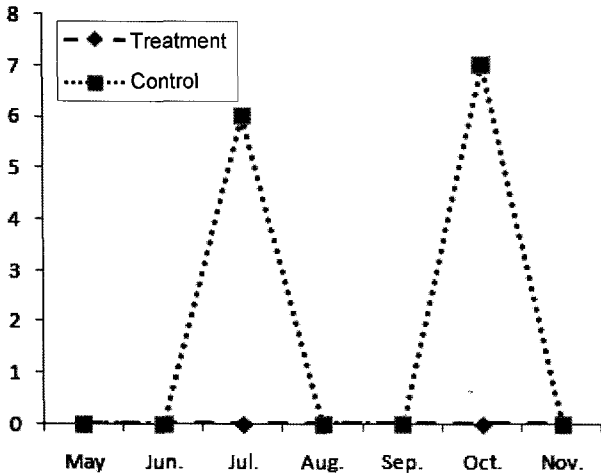


Fig. 3. Seasonal occurrence of Large patch in golf course which experiment was conducted in 2007.

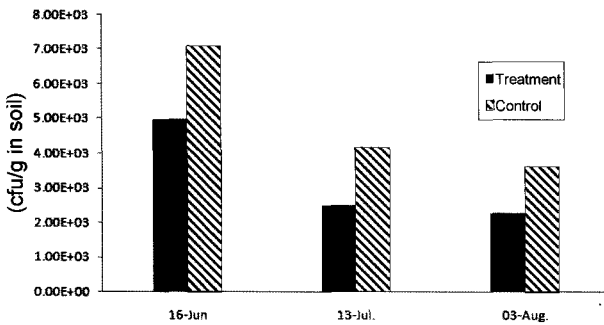


Fig. 4. Effect of the *Bacillus subtilis* CJ-9 on the population dynamics of *Rhizoctonia solani* in the soil.

와 비교한 결과 실험구의 토양 g 당 *R. solani*의 검출빈도는 평균  $4.97 \times 10^3$  CFU으로 무처리구의 검출빈도  $7.10 \times 10^3$  CFU에 비해 현저하게 낮았다. 7월 10일 2차 처리 후 7월 13일 토양을 채취하여 무처리구와 비교한 결과 토양 g 당 *R. solani*의 검출빈도는 평균  $2.50 \times 10^3$  CFU으로 무처리구의 검출빈도  $4.20 \times 10^3$  CFU에 비해 낮았고, 8월 3일 토양을 채취하여 무처리구와 비교한 결과 토양 g 당 *R. solani*의 검출빈도는 평균  $2.27 \times 10^3$  CFU으로 무처리구의 검출빈도  $3.63 \times 10^3$  CFU에 비해 낮았다(Fig. 4). 상대적으로 7월 13일과 8월 3일의 검출빈도가 6월 16일에 비해 낮은 것은 *R. solani*가 여름과 같은 고온보다는 봄, 가을 같은 서늘한 기온에서 토양 내 밀도가 높아지며 발병률이 높아지는 생리적 특성에 기인한 것으로 판단된다. 10월 중순에 야외 포장 실험이 수행된 지역 외에서 새로 발생한 갈색퍼짐병 발생지역을 대상으로 추가적인 실험결과(Fig. 5) *B. subtilis* CJ-9을 처리하기 전(10/12)에 토양을 채취하여 토양 g 당 *R. solani*의 검출빈도를 조사한 결과, 길항 미생물 처리 전에는 평균  $1.97 \times 10^3$  CFU

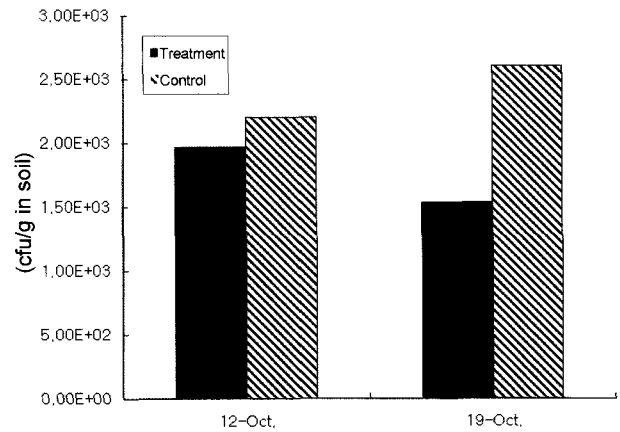


Fig. 5. Effect of the *Bacillus subtilis* CJ-9 on the population dynamics of *Rhizoctonia solani* in the soil of Large patch area.

로 무처리구의  $2.20 \times 10^3$  CFU와 비슷하였으나, *B. subtilis* CJ-9을 처리한 7일 후(10/19)에는 무처리구와 비교한 결과, 토양 g 당 *R. solani*의 검출빈도가 평균  $1.53 \times 10^3$  CFU으로 다소 감소하는 경향을 나타냈지만, 무처리구에서는  $2.60 \times 10^3$  CFU으로 증가하였다. 이는 *B. subtilis* CJ-9처리에 따라 토양내 병원균의 밀도가 줄어든 것으로 판단된다. 따라서 본 길항 미생물을 실제 골프장에 적용하여 잔디 갈색퍼짐병 방제에 사용할 경우 병발생을 줄여 잔디 갈색퍼짐병에 사용되는 합성농약 사용량을 효과적으로 줄일 수 있을 것으로 판단된다.

## 요 약

*Rhizoctonia solani* AG2-2에 의해 발생하는 잔디 갈색퍼짐병(large patch)은 한국잔디로 식재된 골프장 페어웨이에서 문제가 되는 대표적 병해이다. 본 연구에서는 잔디 갈색퍼짐병의 생물학적 방제법에 이용할 수 있는 길항 미생물을 *R. solani* AG2-2에 대한 항균활성과 균사생장 억제율 등을 기준으로 1차 선발하였고, 선발된 길항미생물에 대해 포트 수준의 생물검정실험을 실시하였다. 두 실험을 통해 선발된 길항미생물 중에서 상대적 길항효과 지수(RPI) 값을 기준으로 잔디 갈색퍼짐병에 대해 가장 우수한 것으로 최종 선발된 길항미생물 CJ-9는 동정한 결과 *Bacillus subtilis*로 밝혀져, *B. subtilis* CJ-9이라 명명하였다. *B. subtilis* CJ-9는 합성농약에 대한 내성 실험을 통해 현장에 적용시 화학 농약과의 혼용이 가능함을 밝혔다. 골프장에서 야외 포장시험을 실시한 결과, 실험 기간 동안 합성농약에 의한 관행처리구에서 잔디 갈색퍼짐병이 2차례 발병된 것과 비교하여 *B. subtilis* CJ-9를 처리한 시험구에서는 전혀 발생하지 않아 방제 효과가 인정

되었다. 선택배지를 이용한 병원균 밀도 조사를 통하여 *B. subtilis* CJ-9 처리가 잔디 갈색퍼짐병을 일으키는 병원균의 밀도를 감소시키는 것을 확인하였다. 따라서 *B. subtilis* CJ-9이 잔디 갈색퍼짐병 방제를 위해 합성농약을 대체할 수 있는 친환경적인 방제방법이 될 수 있음을 입증하였다.

## 감사의 글

본 연구는 2007년도 한국환경기술진흥원 차세대 핵심 환경기술개발사업의 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. 412 p. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht, Netherlands.
- 황연성, 최준수. 1999. 유용미생물의 사용이 잔디의 질과 이용성에 미치는 영향. *한국잔디학회지* 13: 202-212.
- 황연성, 최준수, 김영호. 1996. Creeping Bentgrass에서 미생물제에 의한 Pythium Blight, Brown Patch 및 Dollar spot 방제 효과. *한국식물병리학회지* 12: 237-244.
- 한국식물병리학회. 2004. 한국식물병목록. 제 4판. 한국식물병리학회 779 pp.
- Harmon, G. E. and Hardar, Y. 1983. Biological control of *Pythium* species. *Seed Sci. Technology* 11: 893-906.
- Ko, W. and Hora, F. K. 1971. A selective medium for the quantitative determination of *Rhizoctonia solani* in soil. *Phytopathology* 61: 707-710.
- 이용세, 전하준, 이창호, 송치현. 1997. 잔디 토양전염성병원진균에 대한 길항미생물의 분리 및 길항효과. *Kor. J. Org. Agric.* 6: 133-149.
- Nelson, E. B. 1997. Biological control of turfgrass disease. *Golf Course Management July* 60-69.
- 심규열, 김진원, 김희규. 1994. 국내골프장 한국잔디의 라이족토니아 마름병 발생. *한국식물병리학회지* 10: 54-60.
- 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.
- Slininger, P. J., Behle, R. W., Jackson, M. A. and Schisler, D. A. 2003. Discovery and development of biological agents to control crop pests. *Neotropical Entomology* 32: 183-195.
- Uddin, W. and Viji, G. 2002. Biological control of turfgrass disease. pp. 313-314. In: Biological control of crop disease. Marcel Dekker, Inc. Barseel, New York.