

버섯 폐배지로부터 분리한 방선균 균주 CA-23과 AA-65균주의 키틴 분해능력과 항균력 검정

심창기 · 김민정* · 김용기 · 지형진 · 홍성준 · 박종호 · 한은정 · 김석철

국립농업과학원 유기농업과

Estimation of the Chitinolytic and Antifungal Activity of *Streptomyces* sp. CA-23 and AA-65 isolates Isolated from Waste Mushroom Media

Chang-Ki Shim, Min-Jeong Kim*, Yong-Ki Kim, Hyeong-Jin Jee, Jong-Ho Park, Sung-Jun Hong,
Eun-Jung Han and Seuk-Chul Kim

Organic Agriculture Division, National Institute of Agricultural Science, RDA, Wanju-gun 55365, Korea

(Received on October 28, 2015. Revised on November 10, 2015. Accepted on November 14, 2015)

Abstract The purpose of this study was to estimate the chitinolytic and antifungal activity of *Actinomycetes* sp. isolated from waste mushroom media. In five kinds of waste mushroom media, Sinyeong mushroom and Yangsongi were the order of the population density of actinomycetes. Totally 91 chitinolytic isolates of *Actinomycetes* sp. were obtained from waste mushroom media. The isolates were categorized into 3 groups based on chitinolytic activity and antagonisms against *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Collectotrichum gloeosporioides*, and *Cladosporium cucumerinum* in vitro. CA-23 was selected as a representative isolate of a group showing strong chitinolytic and antagonistic activities to all of the plant pathogens, while AA-65 was selected as a representative isolate showing no chitinolytic activities but strong antagonistic activities to the pathogens. CA-23 and AA-65 were highly effective on control of *Phytophthora* blight of hot-pepper, powdery mildew and scab of cucumber in a greenhouse tests. Among the isolates tested, CA-23 showed highest control efficacy, while AA-65 not only effectively controlled the diseases but also consistently increased plant growth and yield. Although the isolates are similarly affected on suppression of plant pathogens, the isolates could be differ from each other in modes of action. Further studies on mechanisms and practical applications are being progressed.

Key words Biological control, chitinolytic actinomycetes, plant diseases, plant growth promotion

서 론

최근 버섯폐배지를 재활용하기 위한 여러 가지 연구들이 진행되고 있다. 버섯폐배지는 배지원료, 배합비, 재배한 버섯의 종류, 재배방식에 따라 미분해 양분을 다량함유하고 있으며, 그 성장 및 기능에 차이가 많다(Kim et al., 2007). 버섯폐배지의 농업적 활용을 살펴보면 원예용 상토(Kim et al., 2014; Oh et al., 2013), 유기물 퇴비(Ehaliotis et al.,

2005), 지렁이 생산용 배지(Edwards et al., 1985), 토양개량제(Semple and Fermor, 1995; Staments, 2001), 가축사료(Adamovie et al., 1998) 등으로 활용연구가 진행되고 있다.

유기농업의 급속한 확산과 더불어 토양 건전성을 증진시키기 위한 여러 가지 방법들에 대해 연구되고 있으나 유기농업에서 활용할 수 있는 고품질의 유기물재료가 매우 적은 편이다. 식물의 근권(rhizosphere) 주변의 토양에는 유기물이 풍부한 환경이 형성되어 있어 다양한 유용 미생물들이 존재하고 있는 것으로 보고되었다(Yeo et al., 2009). 특히 방선균은 항생물질, 비타민, 효소와 같은 다양한 2차 대사산물로 10,000여종 이상을 생성하기 때문에 산업적으로 매우

*Corresponding author
E-mail: kjs0308@korea.kr

중요한 미생물이며(Miyadoh, 1993; Tanaka and Omura, 1990), 토양 비옥화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Vasconcello and Cardoso, 2009). 양질의 활성화된 토양이나 유기질을 많이 넣은 토양은 방선균의 밀도가 높은 특징이 있다.

토양방선균 중에서 *Streptomyces*속이 69.4%로 가장 많이 존재하며, 그 다음으로 *Micromonospora*, *Nocardia*, *Streptosporangium*속이 차지하고 있다(Lechevalier, 1989; Kim, 1997). 이들 중에서 *Streptomyces*속 방선균이 생성하는 식물생육 조절인자는 indole-acetic acid (IAA) (Aldesuqy et al., 1998), siderophore (Tokala 등, 2012), polyamine류(Nassar et al., 2003) 등이 농업적으로 이용가치가 높은 것으로 알려져 있다. 또한 임상적으로 사용되는 항생제의 약 2/3가 방선균으로부터 유래한 것으로 보고되고 있다(Labeda et al., 1997; Bakkiyaraj and Pandian, 2010).

화학농약의 무분별한 사용으로 인한 부작용으로 약제저항성 균의 출현 뿐만 아니라 생태계교란 등 다양한 악영향을 최소화하기 위한 대안으로 토양내의 방선균에 의한 식물병원균의 발생을 억제하기 위한 생물학적 방제방법이 활발히 연구되고 있다(Cho et al., 2007; Kim et al., 2014; Lim et al., 2006; Tanaka and Omura, 1990). 방선균 추출물에 의해 *Xanthomonas oryzae*의 바이오 필름 형성을 억제하는 효과가 있는 것으로 보고하여 새로운 흰잎마름병 방제의 미생물 제제로써 사용할 수 있을 것으로 보고하였다(Kim, 2013). 또한 6개 고추 재배토양의 근권과 해안가 토양으로부터 고추 역병균(*P. capsici*)와 벼 도열병(*Magnaporthe grisea*)에 대해 길항효과가 있는 32개의 방선균을 분리하여 14종의 식물 병원성 곰팡이 대해 길항력을 검증하였더니 비교적 넓은 항진균성 스펙트럼을 가졌으나, 11종의 식물병원성 세균에 대해서는 *Pseudomonas solanacearum*을 제외하고는 항균작용이 거의 없는 것으로 보고하였다(Ahn et al., 1992).

본 연구는 버섯폐배지로부터 키틴분해 능력이 뛰어난 방선균을 선발하고 분리한 방선균 중 키틴분해능력과 항균능력이 우수한 CA-23과 AA-65균주의 식물병 방제효과를 검증하여 유기농 병해 관리용 자재로써 농가에서 쉽게 활용할 수 있도록 활용방법을 정립하고자 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

버섯폐배지

경기도 인근의 버섯재배 농가로부터 5종류의 버섯(팽이버섯, 잎새버섯, 느타리버섯, 신령버섯, 양송이버섯)재배한 후 1차 발효과정을 거친 버섯폐배지를 1 kg씩 수거하여 바람이 잘 통하는 음지에서 4일간 말렸다. 잘 건조된 시료를 식물분쇄기로 1차 파쇄하여 가는 채(10 mm)로 한번 걸러 실험에 사용하였다.

식물병원균

실험에 사용된 식물병원균은 오이역병균(*Phytophthora capsici*, KACC 40181), 고추탄저병균(*Colletotrichum gloeosporioides*, KACC 40690), 오이잘록병(*Rhizoctonia solani* AG-1B, KACC 40111), 마늘흑색썩음균핵병(*Sclerotium cepivorum*, KACC 40582), 오이흑성병(*Cladosporium cucumerinum*) 등 5종으로 국립농업미생물자원센터(KACC)로부터 분양 받아 사용하였다. 5종의 식물병원균은 PDA (20 g Potato, 18 g dextrose, 18 g Agar, 1000 ml 멸균수) 배지에서 배양하였고 배양조건은 병원균의 최적생육조건을 고려하여 20~25°C에서 7일간 배양하여 사용하였다.

방선균의 분리

키틴 분해 능력이 뛰어난 방선균을 분리하고자 Lee et al. (1998)과 Kim et al. (2007)이 보고한 방선균 분리 방법을 병행하여 사용하였다. 우선 수집한 버섯폐배지를 48시간 동안 풍건한 후, 10 g씩 개량하여 90 ml의 멸균증류수가 들어 있는 삼각플라스크에 넣고 65°C 항온수조에서 120 rpm 속도로 2시간 동안 교반하였다. 위 버섯폐배지 시료 상등액 50 ml를 3% colloidal chitin이 들어 있는 450 ml의 Chin배지(2.64 g (NH₄)₂SO₄, 2.38 g KH₂PO₄, 5.65 g K₂HPO₄, 1.5 g MgSO₄·7H₂O, 6.4 mg CuSO₄·5H₂O, 2.5 mg FeSO₄·7H₂O, 2.5 mg MnCl₂·H₂O, 2.5 g ZnSO₄·7H₂O, Agar 20 g, 증류수 1000 ml, pH 8.0)가 들어 있는 삼각플라스크에 넣은 후 거품이 발생하지 않도록 조심해서 교반 후 일정한 양을 페트리디쉬에 분주한 후 실온에서 식힌 후 37°C 항온인큐베이터에서 7일간 배양 후, 배지에 Clean zone을 형성하여 키틴 분해능력을 보이는 균주를 멸균된 needle로 수집하여 3% colloidal chitin이 들어 있는 Chin배지에 삼분 도말하여 키틴분해 능력을 재 검증하여 키틴분해 균주를 2차적으로 선발하였다.

항균력 검증

본 실험에서 2차적으로 키틴분해 능력이 있는 것으로 확인된 방선균 균주의 주요 식물병원균에 대한 항균력을 검증하고자, 7일간 배양한 방선균 균주별로 멸균된 미생물 접종 루프(loop)에 묻혀 PDA 배지 중앙에 선을 그어 접종하였다. 방선균이 접종된 PDA배지의 중앙에서 2 cm 간격으로 5일간 배양한 각 식물병원균의 균사 disc를 화염 소독한 직경 8 mm corker borer로 균일하게 절단 후 올려놓고 28°C에서 6일간 대치 배양한 후 균사생육 저해 정도를 측정하여 항균력을 조사하였다(Hwang 등, 2006).

식물재배

실험에 사용한 오이는 싱싱백다다기(*Cucumis sativus*) 품종으로 종자를 시중에서 구입하여 사용하였으며, 24시간 동

안 멸균증류수에서 불린 후, 바로커상토가 들어 있는 72공 육묘상자에 파종하여 48시간 동안 포화습도 상태에서 발아를 유도하였고 제2분엽이 전개될 때까지 육묘상자에서 키웠다. 파종 후 45일이 지난 오이 식물체를 바로커상토가 들어 있는 직경 7 cm² 비닐포트에 정식 후, 낮 온도 25 ± 5°C, 밤 온도 15 ± 5°C로 재배조건을 유지하면서 온실에서 오이 식물체를 재배하였다.

오이 흰가루병, 검은별무늬병 방제시험

오이 성체에 흰가루병균을 자연 발생시키고자 오이 유묘를 7 cm² 비닐포트에 심어서 이병 식물체 주변에 배치하여 오이 흰가루병균을 지속적으로 발생하도록 유도하였으며, 오이 잎에 흰가루병 병반 면적율이 30% 정도 발병했을 때 오이흰가루병 방제 시험을 수행하였다.

오이 흑성병(*C. cucumerinum*)의 균사조각을 PDA배지에 치상하여 20°C, 암상태의 항온기에서 5일 동안 배양하여 포자형성을 유도하였다. 포자형성을 광학현미경으로 확인한 후 멸균증류수에 포자를 현탁하여 최종 농도가 1 × 10⁶ conidia/ml이 되도록 농도를 조절한 후 4엽기의 오이 유묘에 분무 접종하였다(Kwon et al., 1999).

방선균 CA-23과 AA-65 균주를 PDB배지에서 10일간 배양한 배양액을 믹서기로 3분간 마쇄한 후, 키타올(유한킴벌리, 한국)을 사용하여 1차적으로 걸러서 방제실험에 사용하였다. 방선균 배양액은 고압분무기를 사용하여 오이 잎의 앞면과 뒷면에 흠뻑 적시게 살포하였다. 시험구는 구당 10 주씩 4반복으로 처리하였다. 또한 방선균 배양액 살포 후 3일 간격으로 15일간 병 방제효과를 조사하였다.

고추 역병 방제시험

고추 역병균(*P. capsici*)의 균사조각을 V8쥬스배지(50 ml V8 쥬스, 3 g CaCO₃, 18 g Agar, 1000 ml 증류수)에 올려놓고 25°C, 암상태의 항온기에서 1주일 동안 배양한 후에 균 총 표면의 공중균사를 제거하고 1일 동안 형광등 아래에 두면 유주자낭이 형성된다. 유주자낭을 배지로부터 수확하고 4°C에서 2시간 정도 두면 유주자가 유출되면 고추 1주당 50 ml 분주하여 접종한다.

방선균 CA-23과 AA-65 균주를 PDB배지에서 10일간 배양한 배양액을 믹서기로 3분간 마쇄한 후, 방선균 배양액 50 ml씩을 고추근권 주위에 고루 처리하였다. 시험구는 구당 10주씩 4반복으로 처리하였다. 또한 방선균 배양액 분주 후 3일 간격으로 15일간 병 방제효과를 조사하였다.

ITS 염기서열 분석

버섯폐배지로부터 분리한 키틴분해 방선균인 CA-23과 AA-65균주의 동정을 위해 16S rDNA 유전자 염기서열 분석을 위해 Chen and Goodfellow (1995)이 사용한 2개의

프라이머 ITS 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')과 ITS 1492R (5'-ACGGCTACCTTGTACGACTT-3')를 사용하여 PCR로 증폭하였다. PCR 조건은 최종농도 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 nM dNTPs, 10 pmol의 ITS 8F와 ITS 1492R 프라이머, 0.1 unit의 rTaq DNA polymerase (Takara, Japan)를 사용하였으며, 50 µl로 반응용량을 맞추었다. PCR 반응조건은 pre-denaturation (95°C, 5분), denaturation (95°C, 30초), annealing (50°C, 30초), extension (72°C, 30초), total cycle (35 cycles), final extension (72도, 10분) 수행하였으며, 증폭된 PCR 산물은 1.2% agarose gel에서 전기영동 후, ethidium bromide로 염색하여 UV-transilluminator에서 밴드를 확인하였다. 확인된 밴드는 QIAquick PCR purification kit (Qiagen)를 사용하여 분리 정제하였고 pGEM-T easy 벡터(Promega)에 클로닝한 후 M13F와 M13R 프라이머를 이용하여 염기서열을 분석하였다. 염기서열은 ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (PE Biosystems, Foster, CA, USA)를 이용하여 결정하였다.

통계분석

시험별 통계분석은 SAS (ver. 8.0)을 이용하여 처리한 두 종류의 방선균의 고추 역병, 오이 흰가루병, 오이 흑성병 방제효과 및 고추 생육촉진효과에 대하여 5% 수준에서 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

키틴 분해 방선균의 분리

경기도 지역에서 수집한 5종류의 버섯(팽이버섯, 잎새버섯, 느타리버섯, 신령버섯, 양송이버섯) 폐배지로부터 키틴(chitin) 첨가 배지를 이용하여 키틴분해 능력이 있는 것으로 보이는 방선균을 1차 선별하였다. 분리한 방선균의 숫자는 신령버섯(167.8 cfu/g) > 양송이버섯(23.0~26.6 cfu/g) 순으로 높게 나타났으며, 팽이버섯, 잎새버섯, 느타리버섯 폐배지에서는 전혀 방선균이 분리되지 않았다(Fig. 1).

본 실험에서 팽이버섯, 잎새버섯, 느타리버섯 폐배지에서 방선균이 전혀 분리되지 않은 것은 신령버섯이나 양송이버섯을 재배에 사용되는 배지는 벗짚과 사탕수수, 계분 등을 혼합하여 퇴비화하여 주로 균상재배를 이용하며 80~90°C의 고온에서 살균한 후 밧을 재배하기 때문에 고온에서 살아남은 방선균의 밀도가 상대적으로 높았던 것으로 사료된다(Kim et al., 2002). Lee et al. (2014)은 양송이 재배농가의 복토재료 살균온도에 따른 미생물 변화를 조사하였더니 중온성 방선균의 경우 복토 15일에 급격히 증가하여 복토 22일에 가장 높은 밀도를 보인 것으로 보고하였다. 또한 Song et al. (2001)에 의하면 버섯폐배지로부터 41개의 방선균 균

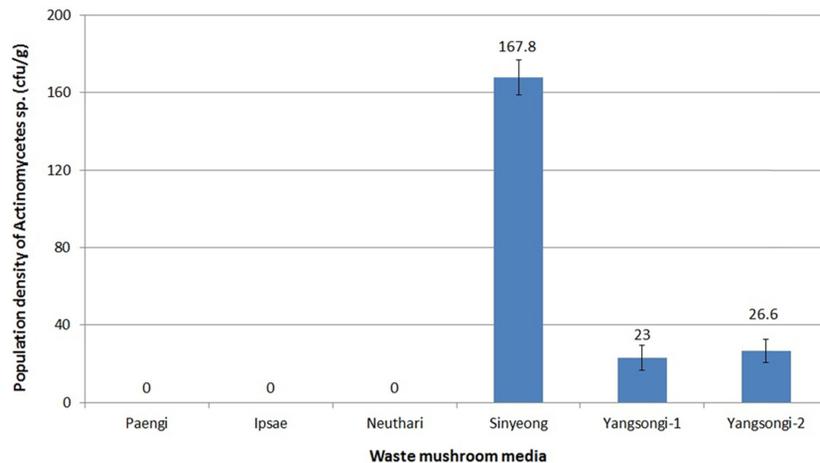


Fig. 1. Isolation of chitinolytic isolates of *Actinomycetes* spp. from five kinds of waste mushroom media.

주를 분리하였는데 16S rRNA 분석결과 *Streptomyces* 속과 *Thermoactinomyces* 속에 속하는 것으로 보고한 바 있다.

일반적으로 방선균을 분리하는데는 주로 토양을 시료로 하고 토양에 존재하는 방선균의 수와 형태는 지리적 위치, 토양온도, 토양형태, 토양pH, 유기물질 성분 등에 의해 큰 영향을 받는 것으로 알려져 있다(Goodfellow and Williams, 1983).

본 실험에서는 섬유소가 가장 많이 존재할 것으로 생각되어 버섯폐배지를 대상으로 방선균을 분리하였더니 폐배지에 사용된 재료의 종류에 따라 다양한 방선균 분리 양상을 보이는 것으로 사료된다.

대부분의 버섯은 발효된 유기물이 퇴적된 곳에서 양분을 흡수 이용하여 성장하는 습성이 있어 인공재배에 있어서 특수하게 제조된 배지에서 필요한 양분을 공급받아야 한다. 느타리버섯은 볏짚배지, 폐면배지를 이용한 균상재배와 톱밥배지(미송톱밥: 미강=80:20(w/w), 미송톱밥: 비트펄프: 면실박=50:30:20), 면실박, 비트펄프 등을 혼합하여 이용하는 병재배, 봉지재배, 상자재배 등 다양한 방법으로 재배되고 있다(Ju et al., 2007). 양송이, 신령버섯의 경우 우리나라와 일본, 중국에서는 볏짚과 사탕수수, 계분 등을 혼합하여 퇴비화하여 주로 균상재배를 하는 것으로 보고되었다(Kim et al., 2002). 팽이버섯의 경우 초기에는 미송톱밥, 미강 위주의 배지재료에서 콘코브, 면실박, 면실피, 비트펄프 등 다양한 수입재료들을 혼합하여 병재배를 하는 것으로 보고되었다(Cheong et al., 2010).

따라서, 본 실험에서도 5종류의 버섯 폐배지마다 방선균의 분리밀도의 차이를 보이는 것은 버섯을 재배하기 위하여 사용되는 배지원의 종류가 다르기 때문이라 사료된다.

키틴 분해 방선균의 항균력 검정

5종의 버섯 폐배지로부터 분리한 방선균 균주 91개의 항균력과 2차적으로 키틴분해 능력을 조사하였더니 대부분의

분리 균주들은 키틴분해 능력을 나타내었으나, 7개의 균주(AC001, AC015, AC025, AC037, AC040, AC065, AC067)는 전혀 키틴분해 능력을 보이지 않았다(Fig. 2). 91개의 분리균주 중 AC005, AC007, AC008, AC012, AC029, AC032, 5개의 균주는 키틴분해 능력과 4개의 식물병원균에 대한 항균력이 매우 뛰어난 것으로 나타났다 (Fig. 2).

Fig. 2와 같이 버섯폐배지로부터 분리한 91개의 방선균 균주에 대해 키틴 분해능력과 4종의 식물병원균에 대한 항균력을 기준으로 3개의 그룹으로 분류하였더니, 키틴분해 능력과 항균력이 뛰어난 그룹(CA; chitinolytic antifungal actinomycetes)으로 CA-23, CA-24, CA-39이 분류되었고 키틴분해 능력은 없으나 항균력이 뛰어난 그룹(AA; Antifungal actinomycetes)으로 AA-15, AA-65, AA-67이 분류되었으며, 키틴분해 능력이 뛰어나고 항균력이 있는 그룹(Ca; chitinolytic actinomycetes)으로 Ca-07, Ca-12, Ca-05가 분류되었다 (Table 1).

방선균은 토양, 바다, 유기물질 등 다양한 서식처에 존재할 수 있는 환경적으로 매우 넓게 분포되어 있는 미생물이다(McNeil and Brown, 1994; Park et al., 2012). 퇴비 발효 시 내부 온도가 70~80°C 일 때 퇴비 내 우점 미생물은 고온성 세균과 고온성 방선균이며, 퇴비를 많이 넣은 토양은 병해 억제 능력이 바로 방선균에 의하여 생성된 다량의 항생물질 때문인 것으로 알려져 있다. 특히, Michael et al. (1992)은 바다모래로부터 분리한 키틴 분해능력이 있는 방선균 116개 균주 중에서 85개의 균주가 항균력을 가지는 것으로 보고하였다.

본 실험결과에서도 키틴분해 능력이 뛰어난 방선균 균주일수록 4종류의 식물병원균에 대한 균사생육억제능력이 뛰어난 것으로 조사되었다. 키틴은 방선균의 중요한 영양원이 되며 키틴을 이용하는 대부분의 방선균들은 복잡한 외부비체계를 가지고 있기 때문에 식물병원성 곰팡이에 대한 길항능력이 높게 나타나는 것으로 사료된다.

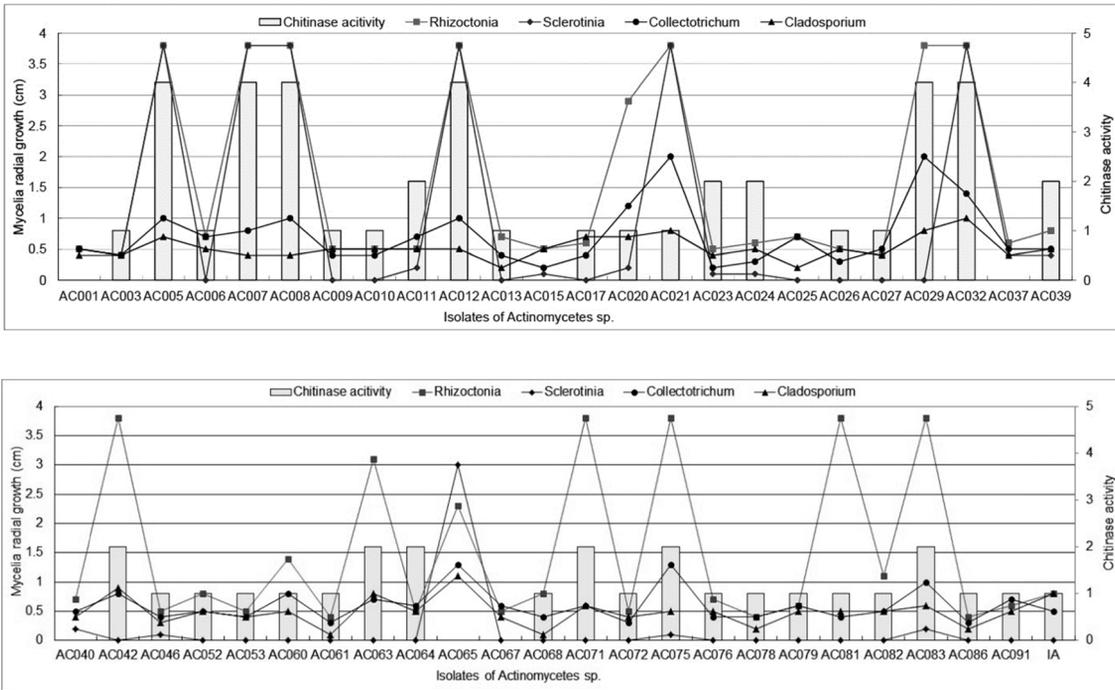


Fig. 2. Estimation of chitinolytic and antifungal activity of 91 isolates of *Actinomycetes* spp. isolated from a waste mushroom media.

Table 1. Grouping of nine isolates of actinomycetes isolated from mushroom media waste by chitinolytic and antifungal activity

Group	Isolates	Activity	
		Chitinolytic	Antifungal
CA (Chitinolytic Antifungal Actinomycetes)	CA-23		
	CA-24	++	+++
	CA-39		
AA (Antifungal Actinomycetes)	AA-15		
	AA-65	-	+++
	AA-67		
	Ca-07		
Ca (Chitinolytic Actinomycetes)	Ca-12	+++	++
	Ca-05		

방선균 CA-23과 AA-65균주의 고추 역병 방제효과

키틴분해 능력과 항균력이 뛰어난 그룹(CA)에서 선발한 CA-23 균주와 키틴분해 능력은 없으나 항균력이 뛰어난 그룹(AA)에서 선발한 AA-65 균주를 고추 유묘에 처리한 후 역병균에 대한 방제효과를 조사하였더니 무처리의 경우 역병균 유주자를 접종 후 4일째부터 시들음 증상을 보이더니 7일 후부터는 지제부에 수침상의 병징이 나타나기 시작하였고 15일 후에는 지제부에 괴사 증상을 보였다. 반면에 두 종류의 방선균 배양액을 처리한 고추는 전혀 역병이 발생하지 않았으며 15일 후 역병 방제가를 조사하였더니 AA-65균주는 89.6%이었고 CA-23균주는 100%로 나타났다(Table 2).

Ahn and Hwang (1992)은 고추재배지의 근권으로부터 *P. capsici*와 *Magnaporthe grisea*에 길항효과가 있는 방선균 중 고추 역병균의 균사생장을 5 mm 이상 저지원을 형성하는 32개의 균주를 고추 역병에 대한 길항력을 검정하였더니

Table 2. Effect of antifungal *Actinomycetes* spp., CA-23 and AA-65 against *Phytophthora* blight of hot-pepper caused by *Phytophthora capsici* at 15 days after treatment in the greenhouse

Treatment	Phytophthora blight of hot-pepper	
	Disease incidence (%)	Control efficacy (%)
CA-23	0.0 c ^z	100.0 a
AA-65	7.1 b	89.6 b
Control	66.7 a	-

^z In a column, means followed by the same letter are not significantly different 5% level by Duncan's multiple range test.

균주마다 다양한 길항효과를 보이는 것으로 보고하였다. 특히, 길항 방선균 배양액의 Butanol 추출액이 *P. capsici*와 *M. grisea*의 균사생육을 억제하는 것으로 보아 항균물질이 강하게 생성되는 것으로 보고하였다.

본 실험에서는 키틴분해 능력이 뛰어난 CA-23과 키틴분

해 능력은 낮으나 항균력이 뛰어난 AA-65균주 모두 고추 역병균에 대하여 뛰어난 방제효과를 나타내었는데 방선균이 식물병원성 곰팡이 대한 항균능력을 가지는 것은 대부분 항생물질의 생성과 관련되어 있는 것으로 보고되어 있다, 특히 Chitinase와 같은 외분비 가수분해효소의 영향이 큰 것으로 알려져 있으므로 추후 정밀한 실험이 진행되어야 하겠지만 CA-23은 Chitinase를 분비하고 키틴분해 능력이 없는 AA-65균주는 다른 항생물질을 가지고 있는 것으로 사료된다.

방선균 CA-23과 AA-65균주의 오이 흰가루병, 검은별무늬병 방제효과

오이 흰가루병을 방제하고자 키틴분해 능력과 항균력이 뛰어난 CA-23 균주와 항균력이 뛰어난 AA-65 균주 배양액을 흰가루병이 발생한 오이 엽면에 처리하였더니, 무처리 대비 AA-65균주의 방제가는 79.4%이었고 CA-23균주는 87.3%로 1회 처리 후 2주까지 효과가 지속되는 것을 확인하였다(Table 3).

고추 역병과 오이 흰가루병에 뛰어나 방제효과를 보인 방선균 CA-23 균주와 AA-65 균주 배양액을 오이 검은별무늬병을 접종한 오이 엽면에 처리하였더니, 무처리대비 AA-65 균주의 단독 또는 안정제인 0.3% 난황유를 혼합하여 처리하였더니, 방선균 배양액 단독처리는 CA-23균주는 44.2%, AA-65균주는 41.0%로 낮은 방제가를 보였으나 안정제로 0.3% 난황유를 혼합하여 처리하였을 때는 CA-23균주는 98.8%, AA-65균주는 98.0%로 매우 높은 방제효과를 보였다(Table 4).

Cho (2005)는 *streptomyces* SH-09가 오이흰가루병(*Sphaeri-*

theca fusca)에 대해 길항력이 강하고 실제 균배양액을 이용한 실험에서도 흰가루병 방제효과가 높고 다른 식물병원균에 대해서도 강한 활성을 보여 미생물 농약으로의 개발이 가능할 것으로 보고하였다. Chi et al. (2012)은 식물근권으로부터 분리한 *Streptomyces padanus* IA70-5 균주가 *in vitro*에서 *Colletotrichum acutaum*의 균사생장, 포자발아, 그리고 부착기 형성을 효과적으로 억제하였으며, 고추 과실에 대하여 고추 탄저병원균 접종 전 IA70-5 배양액 처리 시 약 90%의 탄저병 억제효과를 나타내는 것으로 보고하였다.

본 실험에서는 방선균 CA-23과 AA-65균주 모두 오이에 발생한 흰가루병은 효과적으로 방제하였으나 CA-23과 AA-65균주 단독처리로는 오이 검은별무늬병에 대한 방제효과가 낮은 것으로 나타났다. 이러한 단점을 보완하고자 농가에서 친환경자재로 널리 알려져 있는 0.3% 난황유와 혼합하여 처리하였더니 검은별무늬병에 대한 방제효과가 높게 나타났는데 이러한 결과는 난황유의 포자발아 억제능력과 방선균의 항균력이 더해져 상승효과를 낸 것으로 판단된다. 이러한 혼합제의 처리는 향후 농가현장에서 길항미생물을 적용할 때 보다 안정적으로 식물체에 정착시킬 수 있는 좋은 방법이 될 수 있을 것으로 사료된다.

방선균 CA-23과 AA-65균주의 고추 생육촉진 효과

키틴분해 능력과 항균력이 뛰어난 CA-23 균주와 항균력이 뛰어난 AA-65 균주는 고추 역병균에 대해 항균력이 뛰어난 뿐만 아니라, 고추의 생체중이 무처리 대비 CA-23균주는 64.7% 증가하였으며 AA-65균주는 2배이상 증가하였으며 고추의 과중은 CA-23균주는 17.6% 증가하였으며 AA-65균주는 32.4% 증가 하였다(Table 5).

Han et al. (2012)은 비농경지의 식물 근권토양에서 분리한 4개의 방선균 균주인 MSS181, MSS269, MSS275, MSS276가 식물체의 초기생육촉진 효과가 있으며 MSS275 균주는 *P. capsici*, *F. oxysporum*, *R. solani*, *S. sclerotiorum*에 강한 항균활성을 보이는 것으로 보고하였다. Yandigeri et al. (2015)은 인도의 Chilika 호수에서 분리한 *S. vinaceusdrappus* S5MW2는 실내실험에서 *R. solani*에 대하여 균사생육 억제 능력이 뛰어났고 키틴 분해능력이 뛰어난 방선균으로 토마토에 *R. solani*균을 접종하고 방선균 S5MW2

Table 3. Effect of antifungal *Actinomycetes* spp., CA-23 and AA-65 against cucumber powdery mildew caused by *Sphaeroseca fusca* at 15 days after treatment in the greenhouse

Treatment	Powdery mildew of cucumber	
	Disease incidence (%)	Control efficacy (%)
CA-23	0.8 c ^z	87.3 a
AA-65	1.3 b	79.4 b
Control	6.3 a	-

^z In a column, means followed by the same letter are not significantly different 5% level by Duncan's multiple range test.

Table 4. Effect of antifungal *Actinomycetes* spp., CA-23 and AA-65 against cucumber scab caused by *Cladosporium cucumerinum* in the greenhouse

Treatment	Single		Combined with COY ^z	
	Disease incidence (%)	Control efficacy (%)	Disease incidence (%)	Control efficacy (%)
CA-23	25.33 b ^y	44.2 b	0.33 c	98.8 a
AA-65	26.80 b	41.0 b	0.53 c	98.0 a
Control	45.43 a	-	25.53 a	-

^z COY: It was used as stabilizer and made with 0.3% cooking oil and egg yolk mixture

^y In a column, means followed by the same letter are not significantly different 5% level by Duncan's multiple range test.

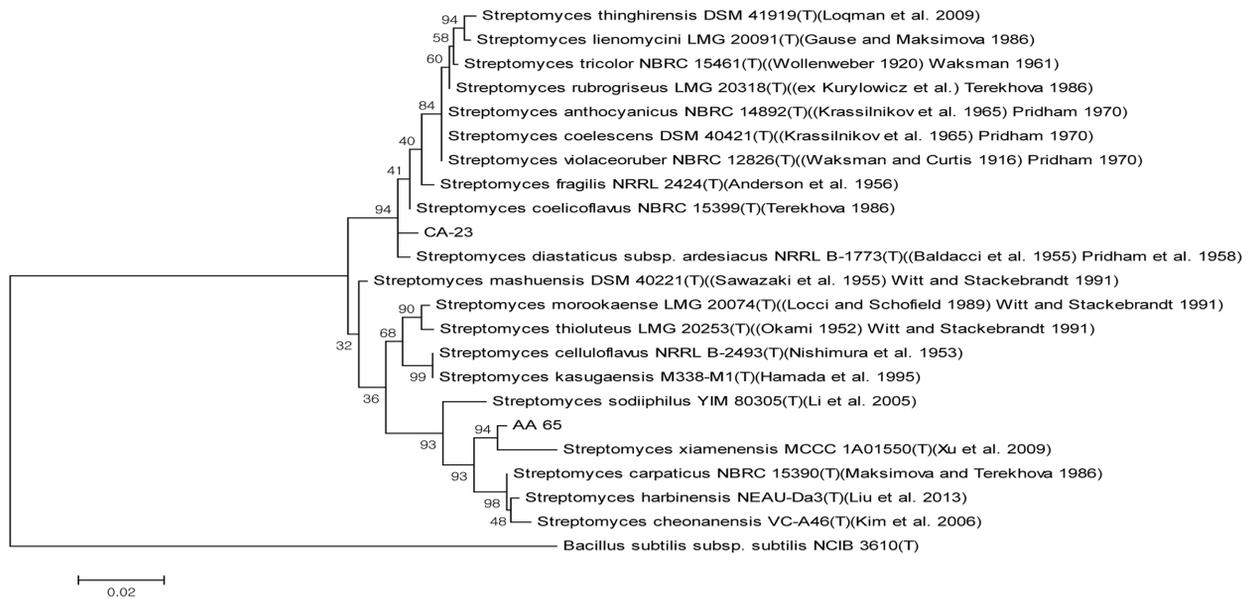


Fig. 3. Phylogenetic analysis of 16S rRNA sequence of *Streptomyces* sp. AA-65 and CA-23 isolated from the waste mushroom media. Bootstrep percentage (from 1000 replications) > 50% are shown at branch points analyzed by with MEGA 6 program ().

Table 5. Effect of *Actinomycetes* spp., CA-23 and AA-65 on the growth promotion of hot-pepper plant in greenhouse

Treatment	Fresh weight of hot-pepper (g)	
	Plant	Fruit
CA-23	137.5 b ^z	120 b
AA-65	169.5 a	135 a
Control	83.5 c	102 d

^z In a column, means followed by the same letter are not significantly different 5% level by Duncan's multiple range test.

을 처리하였을 때 토마토 시들음병 방제뿐만 아니라 토마토의 생육을 촉진하는 것으로 보고하였다. 본 연구결과에서도 길항능력이 우수한 CA-23과 AA-65 균주 모두 토마토와 같은 가지과 작물인 고추의 생육을 촉진시켰으며 고추역병에 대한 방제효과도 우수한 것으로 나타났다.

최근 친환경 유기농산물 중 저농약인증제도가 폐지됨으로써 유기농산물의 안정적인 생산기반을 조성하기 위해서는 병해충을 친환경적으로 방제할 수 있는 유기농자재의 개발이 절실히 필요하다(Lee, 2012; Thomashow and Weller, 1996). 식물병 방제를 위하여 키틴분해 능력을 지닌 생물적 방제인자를 적용하는 기술은 매우 중요한 것으로 보고되어 있다(Cho et al., 2007; Han et al., 2012; Kim et al., 2007; Kishore et al., 2005; Michael et al., 1992; Pati et al., 2011; Yandiferi et al., 2015).

ITS 염기서열 분석에 의한 동정

버섯 폐배지로부터 분리한 병원균의 분자생물학적인 동정을 위해 병원균의 rDNA의 ITS부분을 PCR로 증폭하여,

ITS rDNA 영역의 염기서열(1,200 bp)을 BLASTN 프로그램을 이용하여 분석하였더니, 키틴분해 항균성(Chitinolytic Antifungal Actinomycetes) 방선균인 CA-23과 항균성(Antifungal Actinomycetes) 방선균인 AA-65은 *Streptomyces diastaticus* subsp. *ardesiacus* NRRL B-1773 (GenBank: DQ026631)과 *Streptomyces xiamenensis* MCCC 1A01550 (T) (GenBank: EF012099.1)에 대하여 각각 100%의 상동성을 나타내었다. 키틴분해 방선균인 CA-23과 AA-65에 관련된 분류 군들과의 유전적 상관관계를 알아보기 위하여 MEGA 6.0 프로그램을 이용하여 neighbor-joining 방법으로 유연관계를 분석한 결과, *Streptomyces* sp.을 다시 확인하였다.

따라서, 본 연구에서는 방선균의 좋은 먹이가 되는 섬유질이 풍부한 버섯폐배지로부터 분리한 키틴분해 방선균 *Streptomyces* sp. CA-23과 AA-65균주는 오이 흰가루병, 검은별무늬병, 고추 역병에 대한 방제효과와 작물의 생육촉진 효과가 뛰어난 것으로 그 효과가 인정되었다. 이러한 기초 연구를 토대로 농가현장에서 활용할 수 있도록 적용기술과 방선균 CA23과 AA-65균주가 분비하는 항균성 물질에 대한 후속연구가 뒷받침된다면, *Streptomyces* sp. CA23과 AA-65균주는 유기농 병해관리를 위한 유기농자재로 개발될 수 있을 것으로 기대된다.

Acknowledgment

This study was carried out with the support of "Research Program for Agricultural Science & Technology Development (PJ00999702), National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Republic of Korea in 2015.

Literature Cited

- Adamovic, M., G. Grubi, L. Milenkovic, R. Jovanoi, R. Proti, L. Sretenovi and L. Stoievi (1998) The biodegradation of wheat straw by *Pleurotus ostreatus* mushroom and its use in cattle feeding. *Ani. Feed Sci. Tech.* 71:357-362.
- Ahn, S. J. and B. K. Hwang (1992) Isolation of antibiotic-producing Actinomycetes antagonistic to *Phytophthora capsici* from pepper-growing soils. *Korean Mycol.* 20:259-268.
- Aldesuquy, H. S., F. S. Mansour and S. A. Abo-Hamed (1998) Effect of the culture filtrates of Streptomyces on growth and productivity of wheat plants. *Folia Microbiologica.* 43:465-470.
- Bakkiyaraj, D. and Pandian, S. K. (2010) In vitro and in vivo antibiofilm activity of a coral associated actinomycetes against drug resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *Biofiling* 26:711-717.
- Cheong, J. C., C. S. Jhume, C. J. Lee and J. A. Oh (2010) physicochemical characteristics and utilization of raw materials for mushroom substrates. *Korean J. of Mycology* 38:136-141.
- Chi, T. T. P., O. H. Choi, Y. S. Kwak, D. Y. Son, J. J. Lee and J. W. Park (2012) Evaluation of *Streptomyces padanus* IA70-5 strain to control hot pepper anthracnose (*Colletotrichum acutatum*). *J. Agriculture & Life Science* 46:37-45.
- Cho, J. I., J. Y. Cho, Y. S. Park, D. M. Son, B. G. Heo and C. S. Kim (2007) Screening and isolation of antagonistic Actinomycetes #120 against the Kiwi Fruit Rot for the Environment-Friendly Culture of Kiwifruits. *J. Bio-Environment Control.* 16:252-257.
- Cho, M. K. (2005) Biocontrol of powdery mildew using Actinomycetes of Streptomyces SH-09 and identification of antifungal substances from the isolate. The thesis of Master degree of Chungnam National University, Daejeon, Korea.
- Chun, J. and M. Goodfellow (1995) A phylogenetic analysis of the genus *Norcardia* with 16s rDNA gene sequence. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45:240-245.
- Edwards, C. A., I. Burrows, K. E. Fletcher, B. A. Jones (1985) The use of earthworms for composting farm wastes. In: *Composting of agricultural and other wastes.* Gasser J. K. R. Eds; Elsevier Applied Science Publishers, London, pp. 229-242.
- Ethaliotis, C., I. Z. Georgios and P. Karavitis (2005) Residues and by-products of olive-oil mills for root-zone heating and plant nutrition in organic vegetable production. *Scientia Horticulturae* 106:293-308.
- Goodfellow, M. and E. Williams (1983) Ecology of actinomycetes. *Ann. Review of Microbiology* 37:189-216.
- Hwang, J. Y., C. K. Shim, K. Y. Ryu, S. H. Choi and H. J. Jee (2006) Selection of *Brevibacillus brevis* B23 and *Bacillus stearothersophilus* B42 as biological control agents against sclerotinia rot of Lettuce. *Res. Plant Dis.* 12:254-259.
- Ju, Y. C., S. M. Yoon and H. W. Kang (2007) Effects of different substrate on the growth and microstructure of fruit body in the Basidiomycetes, *Pleurotus ostreatus*. *J. Life Science* 17:1271-1277.
- Kim, J. N., C. S. Suh and D. C. Park (2002) Studies on the comparative analysis of immunofunction of *Agricus blazei* Murill cultivated with fermented media containing *Pueraria thunbergiana*. *Korean J. Food Preservation* 9:114-119.
- Kim, T. J. (2013) Screening inhibitory compounds for the biofilm formation of *Xanthomonas oryzae* from Streptomycetes. The thesis of Master degree of Kookmin University, Seoul, Korea.
- Kim, Y. I., S. H. Jung, J. S. Seok, S. Y. Yang, J. W. Huh and W. S. Kwak (2007) Isolation and identification of high cellulolytic bacteria from spent mushroom substrate and determination of optimal medium conditions for the growth. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 35: 255-260.
- Kim, Y. I., J. S. Bae, S. H. Jung, M. H. Ahn and W. S. Kwak (2014) Yield and physicochemical characteristics of spent mushroom (*Pleurotus ryngii*, *Pleurotus osteratus* and *Ammulina velutipes*) substrates according to mushroom species and cultivation types. *J. Anim. Sci. & Technol.* 49:79-88.
- Kishore, G. K., S. Pande and A. R. Podile (2005) Chitin-supplemented foliar application of *Serratia marcescens* GPS 5 improves control of late leaf spot disease of groundnut by activating defense-related enzymes. *J. Phytopathol.* 153: 169-173.
- Kwon, J. H., J. R. Hong, B. H. Cho, U. K. Ki and K. C. Kim (1999) A scab disease caused by *Cladosporium cucumerinum* on water melon seedlings. *Plant Pathol. J.* 15:72-75.
- Lebeda, D. P., M. P. Lechevalier and R. T. Testa (1997) *Streptomyces stramineus* sp. nov., a new species of verticillate streptomycetes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47:747-753.
- Lechevalier, M. P. and H. Lechevalier (1970) Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic Actinomycetes. *J. Syst. Bacteriol.* 20:435-443.
- Lee, C. J., Y. M. Yoo, C. S. Jhume, J. C. Cheong, J. W. Moon, W. S. Kong, J. S. Suh, Y. G. Kim, B. E. Lee and M. H. Yoon (2014) Effects of microorganism density and mushroom yields according to the sterilization of casing soils at the cultivation of button mushrooms. *J. Mushrooms* 12:220-225.
- Lee, E. J., K. D. Kang, K. Y. Hwang, D. H. Kim, S. G. Kim and S. I. Seong (1998) Isolation and identification of Actinomycetes for the control of agricultural pests and fungal pathogen. *Korean J. Seric. Sci.* 40:63-69.
- Lee, H. R. (2012) Screening and characterization of microbial resources for the development of environmental friendly organic agricultural materials. The thesis of Master degree in Mokwon University, Daejeon, Korea.
- Lim, T. H., S. Y. Kwon and J. H. Kim (2006) Effects of *Streptomyces griseofuscus* on growth of pepper plants and Phytophthora blight by *Phytophthora capsici*. *Res. Plant*

- Dis. 12:46-50.
- McNeil, N. M. and Brown J. M. 1994. The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. Clin. Microbiol. Rev. 7:357-417.
- Michael, A. P., J. S. Michael and T. Loretta (1992) Bioactivity of chitinolytic actinomycetes of marine origin. Applied Microbiology and Biotechnology 36:553-555.
- Nassar, A. H., K. A. El-Tarabily and K. Sivasithamparam (2003) Growth promotion of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by a polyamine-producing isolate of *Streptomyces griseoluteus*. Plant Growth Regulation. 40:97-106.
- Oh, T. S., C. H. Kim, D. G. Shim, Y. K. Cho and Y. W. Kim (2013) Study on usefulness of used *Flammulina velutipes*-media for horticultural crops. Korean J. Int. Agric. 25:448-453.
- Park, S. W., T. O. Bae and S. B. Kim (2012) Isolation and characterization of *Streptomyces* spp. from soil showing broad spectrum antibiotic activity. Korean J. Microbiology 48:270-274.
- Semple, K. T. and T. R. Fermor (1995) Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. Environmental Pollution 112:269-283.
- Song, J. K., H. Y. Weon, S. H. Yoon, D. S. Park, S. J. Go, and J. W. Suh (2014) Phylogenetic diversity of the thermophilic actinomycetes and *Thermoactinomycetes* spp. isolated from mushroom composts in Korea based on 16S rRNA gene sequence analysis. FEMS Microbiology Letters 202: 97-102.
- Staments, P. (2001) Mycova: Helping the ecosystem through mushroom cultivation. <http://www.fungi.com/bioremediation/index.html>.
- Tanaka, Y. and Omura, S. (1990) Metabolism and products of Actinomycetes-an introduction. Actinomycetol. 4:13-14.
- Thomashow, L. S. and D. M. Weller (1996) Current concepts in the use of introduced bacteria for biological control: mechanisms and antifungal metabolites. Chapman and Hall, New York.
- Tokala, R. K., J. L. Strap, M. J. Carina, D. L. Crawford, M. H. Salove, L. A. Deobald, J. F. Bailey and M. J. Morra (2002) Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and Pea Plant (*Pisum sativum*). Applied and Environmental Microbiology. 68:2161-2171.
- Vasconcellos, R. L. F. and E. J. B. N. Cardoso (2009) Rhizospheric Strptomycetes as potential biocontrol agents of *Fusarium* and *Armillaria* pine rot and as PGPR for *Pinus taeda*. Biocontrol. 54:807-816.
- Yandigeri, M. S., N. Malviya, M. K. Solanki, P. Shrivastava and G. Sivakumar (2015) Chitinolytic *Streptomyces vinaceus-drappus* S5MW2 isolated from Chilika Lake, India enhance plant growth and biocontrol efficacy through chitin supplementation against *Rhizoctonia solani*. World J. Microbiology and Biotechnology 31:1217-1225.
- Yeo, S. H., Y. M. Yook and H. S. Kim (2009) Isolation and characterization of plant growth promoting rhizobacterium *Bacillus subtilis* YK-5 from soil. KSBB J. 24:334-340.

버섯 폐배지로부터 분리한 방선균 균주 CA-23과 AA-65균주의 키틴 분해능력과 항균력 검정

심창기 · 김민정* · 김용기 · 지형진 · 홍성준 · 박종호 · 한은정 · 김석철

농촌진흥청 유기농업과

요약 본 연구의 목적은 버섯폐배지로부터 분리한 방선균의 키틴 분해 능력과 항균활성능력을 검정하고 선발하기 위함이다. 5종류의 버섯폐배지(팽이버섯, 잎새버섯, 느타리버섯, 신령버섯, 양송이버섯) 중 신령버섯 > 양송이버섯 순으로 방선균이 분리되었다. 버섯 폐배지로부터 전체 91개의 키틴분해 방선균을 분리하였다. 분리한 91개의 균주는 키틴분해 능력과 *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Collectotrichum gloeosporioides*, *Cladosporium cucumerinum*에 대한 항균력에 따라 크게 3개의 그룹으로 분류하였다. CA-23균주는 강한 키틴 분해 능력과 모든 식물병원균에 대해 항균력을 보이는 대표적인 균주로 선발하였고 반면에 AA-65 균주는 키틴 분해능력은 없지만 모든 식물 병원균에 대한 강한 항균력을 보이는 대표적인 균주로 선발하였다. 실내시험에서 CA-23 균주와 AA-65 균주는 오이 역병, 흰가루병, 검은별무늬병을 효과적으로 방제하였다. CA-23 균주는 높은 방제가를 보인 반면 AA-65 균주는 병 방제효과뿐만 아니라 식물생육과 수량을 지속적으로 증가시켰다. 비록 두 균주의 식물병 방제효과 유사하지만 두 균주 사이의 작용기작은 서로 다를 것으로 사료된다. 향후 작용기작과 적용방법에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

색인어 생물적방제, 키틴분해 방선균, 식물병, 식물생육촉진