



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0009708
(43) 공개일자 2017년01월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) A01N 63/00 (2017.01)
C12R 1/47 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2013.01)
A01N 63/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0047962
(22) 출원일자 2016년04월20일
심사청구일자 2016년04월20일
(30) 우선권주장
1020150100818 2015년07월16일 대한민국(KR)

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
곽연식
경상남도 진주시 진주대로 1317, 110동 901호 (이현동, 이현하이클래스웰가아파트)
전창욱
경상남도 밀양시 삼문중앙로2길 24, A동 702호 (삼문동, 성원플러스6차)
이정환
경기도 성남시 분당구 서현로429번길 16-4, 202호 (분당동)
(74) 대리인
최규환

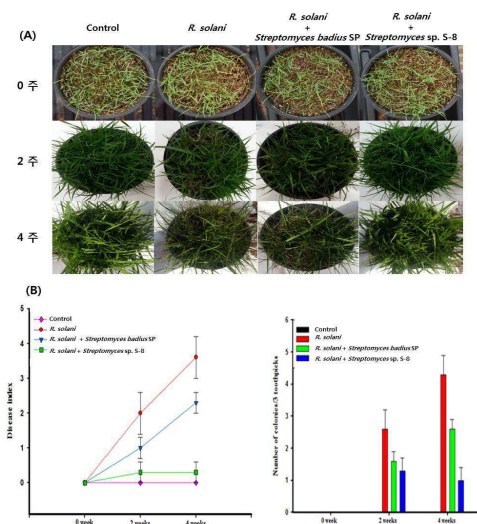
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 잔디 뿌리의 근권토양으로부터 분리한 잔디병원균에 대해 항균 활성을 가지는 스트렙토마이세스 속 S-8 균주 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명에서는 잔디 뿌리의 근권토양으로부터 분리한 스트렙토마이세스 속 S-8 균주가 근권 정착력(root colonization ability)이 우수하며, 리족토니아 솔라니(*Rhizoctonia solani*), 피시움 그라미니콜라(*Pythium graminicola*) 또는 스클레로티니아 호모에오크arpa(*Sclerotinia homoeocarpa*)의 생장을 억제시켜 갈색퍼짐병 및 동전마름병의 발생을 감소시키는 것을 확인하였다. 본 발명의 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주는 농약의 부작용으로 발생하는 환경 오염 및 잔류 농약으로 인한 인체 독성의 위험성이 없는 친환경적인 생물 농약으로 사용될 수 있으며, 잔디병에 대한 방제 효과가 있으므로, 산업적으로 매우 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류
C12R 1/47 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

근권 정착력(root colonization ability)이 우수하고, 잔디병원균에 대해 항균 활성을 가지는 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주(KCCM11704P).

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 잔디병원균은 갈색퍼짐병(large patch) 원인균 또는 동전마름병(dollar spot) 원인균인 것을 특징으로 하는 균주.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 갈색퍼짐병 원인균은 리족토니아 솔라니(*Rhizoctonia solani*) 또는 피시움 그라미니콜라(*Pythium graminicola*)이고, 동전마름병 원인균은 스클레로티니아 호모에오크아르파(*Sclerotinia homoeocarpa*)인 것을 특징으로 하는 균주.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 잔디병 방제용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 잔디병은 갈색퍼짐병(large patch) 또는 동전마름병(dollar spot)인 것을 특징으로 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 갈색퍼짐병 원인균은 리족토니아 솔라니(*Rhizoctonia solani*) 또는 피시움 그라미니콜라(*Pythium graminicola*)이고, 동전마름병 원인균은 스클레로티니아 호모에오크아르파(*Sclerotinia homoeocarpa*)인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주를 배양하는 단계를 포함하는 잔디병 방제용 조성물의 제조 방법.

청구항 8

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주 또는 이의 배양액의 유효량을 식물 또는 토양에 처리하는 단계를 포함하는 잔디병을 방제하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 잔디 뿌리의 근권토양으로부터 분리한 잔디병원균에 대해 항균 활성을 가지는 스트렙토마이세스 속 S-8 균주 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 경제성장에 따른 문화생활의 향상과 더불어 골프장이나 각종 경기장, 공원, 조경지 등이 늘어남에 따라 잔디의 식재면적이 넓어지고 있다. 이 같은 잔디 식재면적의 확대는 잔디의 활용이 단순히 관상적인 측면에 그치는 것이 아니라, 기능적인 측면 및 경기적인 측면 등으로 잔디 역할의 폭이 한층 더 증대되고 있다. 그러나 잔디의

식재면적의 확대와 더불어 잔디에 치명적인 피해를 주는 토양전염병인 갈색퍼짐병(large patch), 동전마름병(dollar spot) 등이 발생되고 있다.

[0003] 갈색퍼짐병(Large patch)은 잔디가 휴면에 들어가는 늦은 가을과 휴면에서 깨어나는 이른 봄에 발생하는 것이 가장 일반적이다. 그러나 한여름에도 장마기, 습한 지역, 음지 등에서 가끔 발생되기도 한다. 병징의 크기는 직경 약 60cm에서 부터 6m에 이르기까지 매우 다양하게 나타나며 잔디밭에 발생하는 패치병 중에서 가장 크게 형성된다. 감염된 잔디의 줄기는 쉽게 뽑히고 엽신(lamina)의 지제부(soil surface)가 하얗게 쭈그러져 고사하며 줄기의 표면에 갈색의 균사매트가 형성된다. 균사 생육 최적 온도는 25~30℃, 발병온도는 15~30℃, 발병 최적 온도는 23℃ 전후이다. 지온이 10~15℃가 되면 급속히 균체 밀도가 높아지고 잔디를 침해하기 시작한다. 갈색퍼짐병 원인균(*Rhizoctonia solani* AG2-2)은 병든 잔디의 잔사물, 대취, 살아있는 포복경 등에서 균사나 혹은 균핵으로 월동한다. 이 균핵이는 포자를 형성하지 않으며 균사의 형태로 증식 및 전염된다. 분포밀도는 대취층(thatch layer)에서 가장 높으며, 감염부위도 대취층에 묻혀있는 지제부 줄기이다. 5월 초부터 발병이 시작되어 강우의 빈도가 증가함에 따라 점차 증가하여 6월 말부터 7월 중순의 장마기에 대발생하고, 7월 하순에서 8월 중순의 30℃ 이상의 고온기에는 병원균의 활력이 떨어져서 발생이 일시적으로 정지되었다가 8월 중순 이후 강우와 함께 다시 대발생하게 된다. 현재 갈색퍼짐병의 방제는 품종의 선택과 경종적인 방법을 일부 사용하는 가운데 주로 농약사용에 의존하고 있는 실정이나, 생물학적 방제에 관한 연구에 관심이 높아지고 있으며, 최근에는 제형화된 미생물 제제가 골프장의 잔디에 사용되고, 미생물 제제의 사용이 점점 증가되는 경향을 보이고 있다. 또한, 잔류 독성과 환경오염의 문제가 없는 생화학 농약과 미생물 농약을 포함한 생물 농약 개발에 관심이 집중되고 있다.

[0004] 동전마름병(dollar spot)은 봄 또는 가을 동안 스크레로티니아 호모에오크아르파(*Sclerotinia homoeocarpa*)에 의해 발생하는 전 세계적으로 가장 흔한 잔디 진균 병해이다. 골프장 등 잔디밭에서 병반의 크기는 직경 2.5~5cm 이하이지만 병이 진전되면서 불규칙하게 큰 병반을 형성하기도 한다. 이 병은 일반적으로 적절한 경종적 방법과 살균제를 이용하여 예방 및 방제되고 있다. 특히, 스크레로티니아 호모에오크아르파(*S. homoeocarpa*) 균주의 특성상 약제 저항성 발현이 빈번하기 때문에 살균제의 이용보다 친환경적인 방법의 도입이 필요한 실정이다.

[0005] 한편, 한국등록특허 제0397796호에는 항균성 미생물제제와 그의 용도에 대해 개시되어 있고, 한국등록특허 제1336609호에는 잔디의 주요 병해에 길항반응을 갖는 신규한 균주인 바실러스 발리스모르티스 GG290, 상기 균주의 배양방법 및 이 균주를 포함하는 방제용 미생물제제 및 그 제조방법에 대해 개시되어 있으나, 본 발명의 잔디 뿌리의 근권토양으로부터 분리한 잔디병원균에 대해 항균 활성을 가지는 스트렙토마이세스 속 S-8 균주 및 그의 용도에 대해서는 개시된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명의 잔디 뿌리의 근권토양으로부터 분리한 스트렙토마이세스 속 S-8 균주는 근권 정착력(root colonization ability)이 우수하며, 리족토니아 솔라니(*Rhizoctonia solani*), 피시움 그라미니콜라(*Pythium graminicola*) 또는 스크레로티니아 호모에오크아르파(*Sclerotinia homoeocarpa*)의 생장을 억제시켜 갈색퍼짐병 및 동전마름병의 발생을 감소시키는 효과를 보였다. 이를 통해, 스트렙토마이세스 속 S-8 균주의 잔디병에 대한 방제 효과를 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 근권 정착력(root colonization ability)이 우수하고, 잔디병원균에 대해 항균 활성을 가지는 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주를 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주 또는 그의 배양액을 유효성분으로 포함하는 잔디병 방제용 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주를 배양하는 단계를 포함하는 잔디병 방제용 조성물의 제조 방법을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주 또는 그의 배양액의 유효량을 식물 또는 토양에 처리하는 단계를 포함하는 잔디병을 방제하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명에서는 잔디 뿌리의 근권토양으로부터 분리한 스트렙토마이세스 속 S-8 균주가 근권 정착력(root colonization ability)이 우수하며, 리족토니아 솔라니(*Rhizoctonia solani*), 피시움 그라미니콜라(*Pythium graminicola*) 또는 스크레로티니아 호모에오크아르파(*Sclerotinia homoeocarpa*)의 생장을 억제시켜 갈색퍼짐병 및 동전마름병의 발생을 감소시키는 것을 확인하였다. 본 발명의 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주는 농약의 부작용으로 발생하는 환경 오염 및 잔류 농약으로 인한 인체 독성의 위험성이 없는 친환경적인 생물 농약으로 사용될 수 있으며, 잔디병에 대한 방제 효과가 있으므로, 산업적으로 매우 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 잔디 뿌리의 근권토양으로부터 분리한 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주의 16S rRNA 염기서열을 나타낸 것이다.

도 2는 잔디 뿌리의 근권토양으로부터 분리한 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주의 잔디병원균에 대한 항균 활성을 나타낸 것이다. (A)는 동전마름병 원인균(*S. homoeocarpa* SDS), (B), (C) 및 (D)는 갈색퍼짐병 원인균(*R. solani* 40151, *R. solani* 40132 및 *P. graminicola*)에 대한 항균활성을 나타낸 플레이트(plate) 사진이다.

도 3은 잔디 뿌리의 근권토양으로부터 분리한 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주 처리에 따른 갈색퍼짐병에 대한 방제 효과를 나타낸 포트 사진이다. Control은 무처리 대조군이며, *R. solani*은 갈색퍼짐병 원인균이다.

도 4는 실내실험을 통해 잔디 뿌리의 근권토양으로부터 분리한 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주를 처리하였을 때, 갈색퍼짐병에 대한 발병도(A) 및 근권 정착력(B)을 나타낸 그래프이다. Control은 무처리 대조군이다.

도 5는 잔디 뿌리의 근권토양으로부터 분리한 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주 처리에 따른 동전마름병에 대한 방제 효과를 나타낸 포트 사진이다. Control은 무처리 대조군이며, *S. homoeocarpa*은 동전마름병 원인균이다.

도 6은 잔디 뿌리의 근권토양으로부터 분리한 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주 처리에 따른 동전마름병에 대한 발병도(A) 및 근권 정착력(B)을 나타낸 그래프이다. Control은 무처리 대조군이다.

도 7은 본 발명의 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주 및 대조군으로 이와 동속인 스트렙토마이세스 바디우스 SP(*Streptomyces badius* SP) 균주 처리에 따른 갈색퍼짐병에 대한 방제 효과를 비교하여 나타낸 포트 사진(A) 및 발병도 그래프(B)이다. Control은 무처리 대조군이다.

도 8은 본 발명의 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주 및 대조군으로 이와 동속인 스트렙토마이세스 바디우스 SP(*Streptomyces badius* SP) 균주의 근권 정착력을 비교하여 나타낸 그래프이다. Control은 무처리 대조군이다.

도 9는 야외실험을 통해 잔디 뿌리의 근권토양으로부터 분리한 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주를 처리하였을 때, 갈색퍼짐병 원인균의 밀도변화를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 본 발명을 달성하기 위하여, 본 발명은 근권 정착력(root colonization ability)이 우수하고, 잔디병원균에 대해 항균 활성을 가지는 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주를 제공한다.

[0014] 상기 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주는 잔디 뿌리의 근권토양으로부터 분리하였으며, 근권 정착력이 우수하고, 잔디병원균인 갈색퍼짐병 원인균(*Rhizoctonia solani* 또는 *Pythium graminicola*)과 동전마름병 원인균(*Sclerotinia homoeocarpa*)에 대해 항균활성이 뛰어난 균주로 선발되었다. 상기 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주를 한국미생물보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms, KCCM)에 2015년 06월 03일자로 기탁하였다(기탁번호: KCCM11704P).

[0015] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 잔디병원균은 갈색퍼짐병 원인균 또는 동전마름병 원인균일 수 있

으며, 바람직하게는 리족토니아 솔라니(*Rhizoctonia solani*), 피시움 그라미니콜라(*Pythium graminicola*) 또는 스클레로티니아 호모에오크아르파(*Sclerotinia homoeocarpa*)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0016] 또한, 본 발명은 상기 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 잔디병 방제용 조성물을 제공한다. 상기 잔디병 방제용 조성물은 미생물 농약의 의미로 사용될 수 있다.
- [0017] 본 발명에 따른 잔디병 방제용 조성물은 예를 들어, 직접 분사가 가능한 용액, 분말 및 현탁액의 형태 또는 고농축 수성, 유성 또는 다른 현탁액, 분산액, 에멀전, 유성 분산액, 페이스트, 분진, 흠뿌림 물질 또는 과립제로 제조할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0018] 본 발명의 잔디병 방제용 조성물은 다양한 형태로 제제화할 수 있다. 상기 제제는 예를 들어 용매 및/또는 담체를 첨가함으로써 제조될 수 있다. 종종, 비활성 첨가제 및 표면-활성 물질, 예를 들어 유화제 또는 분산제를 제제에 혼합한다. 적합한 표면-활성 물질은 방향족 술폰산(예를 들어 리그노술폰산, 페놀-술폰산, 나프탈렌- 및 디부틸나프탈렌술폰산), 지방산, 알킬- 및 알킬아릴술포네이트, 알킬 라우릴 에테르, 지방 알코올 술페이트의 알칼리 금속, 알카라인 토금속, 암모늄염, 술페이트화 헥사-, 헵타- 및 옥타데칸올, 지방 알코올 글리콜 에테르의 염, 술포네이트 나프탈렌 및 이의 유도체, 포름알데히드의 축합물, 나프탈렌 또는 나프탈렌술폰산, 페놀 및 포름알데히드의 축합물, 폴리옥시에틸렌옥틸 페놀 에테르, 에톡실화 이소옥틸-, 옥틸- 또는 노닐페놀, 알킬페닐 또는 트리부틸페닐 폴리글리콜 에테르, 알킬아릴폴리에테르 알코올, 이소트리테실 알코올, 지방 알코올/에틸렌 옥사이드 축합물, 에톡실화 피마자유, 폴리옥시에틸렌 알킬에테르 또는 폴리옥시프로필렌, 라우릴 알코올 폴리글리콜 에테르 아세테이트, 소르비톨 에스테르, 리그닌-술포이트 페액 또는 메틸셀룰로오스일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0019] 적합한 고형 담체 물질은 원칙적으로, 모두 다공성이고, 농업적으로 허용가능한 담체, 예를 들어 광물토류(예컨대 실리카, 실리카 겔, 실리케이트, 활석, 고령토, 석회암, 석회, 초크, 보울, 황토, 점토류, 백운석, 규조 토류, 황산칼슘, 황산 마그네슘, 산화마그네슘, 분쇄 합성물질), 비료(예컨대 황산암모늄, 인산암모늄, 질산암모늄, 우레아), 식물성 제품(예컨대 곡물 가루, 나무 껍질 가루, 목분(wood meal) 및 견과 껍질 가루) 또는 셀룰로오스 분말일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한, 상기 고형 담체는 1종류 또는 2종류 이상을 혼합하여 사용할 수도 있다.
- [0020] 본 발명의 잔디병 방제용 조성물은 유효성분으로서 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주를 단독으로, 또는 2종 이상의 다른 항진균, 항균 또는 항바이러스성 물질 등과 혼합하여 사용할 수 있다.
- [0021] 본 발명의 잔디병 방제용 조성물은 잔디 식물체 흡수 및 효과를 증진시키기 위하여 확산제 및 침투제, 또는 계면활성제와도 혼용이 가능하다.
- [0022] 또한, 본 발명은 상기 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주를 배양하는 단계를 포함하는 잔디병 방제용 조성물의 제조 방법을 제공한다.
- [0023] 상기 균주의 배양 방법은 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용할 수 있으며, 특정 방법에 특별히 제한되는 것은 아니다.
- [0024] 또한, 본 발명은 상기 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주 또는 이의 배양액의 유효량을 잔디식물 또는 토양에 처리하는 단계를 포함하는 잔디병을 방제하는 방법을 제공한다.
- [0025] 상기 잔디병을 방제하는 방법으로는 상기 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주 및 이의 배양액의 유효량을 이용한 방제용 조성물을 잔디식물이나 토양에 분무 또는 살포하여 수행할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0026] 본 발명의 '유효량'은 유익한 또는 원하는 결과를 일으키기에 충분한 양으로, 잔디병을 방제하기 위해 방제용 조성물을 물로 균일하게 희석한 후 동력살포기와 같은 적절한 살포장치를 이용하여 식물체 및 경작지에 살포할 수 있다. 본 발명의 수화제 또는 액상 수화제를 물에 희석하는 경우 수화제 또는 액상 수화제의 농도는 유효성분이 생물학적으로 유효한 범위가 될 수 있도록 10^5 내지 10^{10} cfu/ml으로, 바람직하게는 10^8 cfu/ml 내외로, 더욱 바람직하게는 10^6 cfu/ml으로 조절할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0027] 이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상

의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.

실시예 1. 잔디 재배지로부터의 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주의 분리

잔디에 발생하는 갈색피집병 원인균 및 동전마름병 원인균에 대해 항균 활성을 지닌 균주를 찾기 위하여, 장성의 잔디 재배지로부터 토양(이하 '시료'라 함)을 확보하였다. 시료 회석을 위하여 채집한 잔디근권 부위의 토양 1g을 멸균수 9ml에 첨가하여 1/10배씩 7번 반복하여 $10^1 \sim 10^8$ 까지 희석한 후, 각각의 희석된 시료(10^4 부터 10^8) 100 μ l를 스트렙토마이세스 선택배지에 희석도말법을 이용하여 미생물을 분리하였다.

실시예 2. 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주의 동정

분리된 미생물의 분자생물학적 동정을 위하여 게놈 DNA를 분리하여 16S rRNA 염기서열(서열번호 1)을 분석하였다. 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주의 게놈 DNA를 CTAB(Cetyl trimethyl ammonium bromide) 기법을 이용하여 추출하였다. 시퀀싱 분석에는 16S rRNA의 V1 내지 V3 영역을 타겟으로 하는 하기 표 1의 프라이머를 사용하였다. 그 결과, 도 1에 개시된 바와 같이 16S rRNA 염기서열은 NCBI의 BLAST 검색을 통하여 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.)으로 동정되었으며, 상기 균주를 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주로 명명하였다.

표 1

본 발명에 사용된 프라이머

프라이머 이름	서열번호	정방향(5'-3') 프라이머 염기서열	프라이머 이름	서열번호	역방향(5'-3') 프라이머 염기서열
27F	2	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	1492R	3	GGYTACCTTGTACGACTT

실시예 3. 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주의 잔디병원균에 대한 길항력 확인

분리된 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주의 항균 활성을 확인하기 위하여, 갈색피집병 원인균인 리족토니아 솔라니(*Rhizoctonia solani*) 40151(KACC), 리족토니아 솔라니(*Rhizoctonia solani*) 40132(KACC) 및 피시움 그라미니콜라(*Pythium graminicola*)와 동전알마름병 원인균인 스크레로티니아 호모에오크파(*Sclerotinia homoeocarpa*)를 이용하였다. 항균활성을 검증하기 위하여 PDA(감자 텍스트로스 10g, 펙톤 10g, 아가 20g/ℓ) 평판 배지에 본 발명의 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주와 상기 잔디병원균들을 각각 대치배양하였다. 이때, 각종 병원균의 생육 온도인 28℃로 배양한 후, 저지대(Inhibition zone)를 관찰하였다. 그 결과, 도 2에 개시된 바와 같이 본 발명의 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주는 상기 잔디병원균들에 대하여 강력한 항균 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

실시예 4. 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주의 배양

본 발명의 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주의 배양은 PDA(감자 텍스트로스 10g, 펙톤 10g, 아가 20g/ℓ), IPS2(효모 추출물 4g, 맥아 추출물 10g, 글루코스 4g 및 아가 20g/ℓ, pH 7.3) 및 TSA(Tryptic soy agar) 평판배지에서 실시하였다. 상기 평판배지에서 배양된 단일 콜로니를 살균된 루프를 이용하여, 액체배지(5mL)에 접종하여 28℃에서 150 rpm으로 3일간 진탕배양한 후, 1ℓ의 액체배지에 배양된 5mL의 접종원을 접종하여 10일간 동일 조건에서 배양하였다.

실시예 5. 실내실험을 통해 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주의 잔디병에 대한 생물적 방제효과 및 근권 정착력 확인

본 발명의 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주의 잔디병에 대한 방제 효과 및 근권 정착력을 검증하기 위하여, 먼저 실내에서 생물적 방제 실험을 실시하였다. 실험에 앞서, 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주에 하이그로마이신(hygromycin)에 내성을 가지는 벡터를 삽입한 후, 그 균을 10^6 (CFU/ml)으로 일

주일간 3회 분주하고 매주 CFU를 측정하였다.

[0039] (1) 갈색퍼짐병에 대한 방제효과 및 근권 정착력 확인

[0040] 무처리구(0.1% methyl cellulose), 갈색퍼짐병 원인균(*Rhizoctonia solani*) 처리구 및 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주와 상기 갈색퍼짐병 원인균 혼합 처리구인 총 3단계의 처리구에서 1주부터 5주까지 발병도(Disease index) 및 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주의 근권 정착력을 측정하였다. 그 결과, 도 3 및 4(A)에 개시된 바와 같이, 갈색퍼짐병 원인균인 리족토니아 솔라니(*Rhizoctonia solani*)을 처리하였을 경우, 접종 1주일부터는 발병도 수치가 급증한 반면, 본 발명의 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주와 갈색퍼짐병 원인균인 리족토니아 솔라니(*Rhizoctonia solani*)를 혼합처리하였을 때, 발병도 수치가 현저히 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

[0041] 또한, 본 발명의 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주의 근권 정착력을 확인한 결과, 도 4(B)에 개시된 바와 같이 1주부터 5주까지 무처리구(control) 및 갈색퍼짐병 원인균(*Rhizoctonia solani*) 처리구에서는 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주가 존재하지 않는 반면, 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주와 갈색퍼짐병 원인균(*Rhizoctonia solani*) 혼합 처리구에서는 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주의 존재를 확인함으로써, 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주가 근권 정착력이 우수하다는 것을 확인할 수 있었다.

[0043] (2) 동전마름병에 대한 방제효과 및 근권 정착력 확인

[0044] 무처리구(0.1% methyl cellulose), 동전마름병 원인균(*Sclerotinia homoeocarpa*) 처리구 및 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주와 상기 동전마름병 원인균 혼합처리구인 총 3단계의 처리구에서 1주부터 5주까지 발병도(Disease index) 및 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주의 근권 정착력을 측정하였다. 그 결과, 도 5 및 6(A)에 개시된 바와 같이, 동전마름병 원인균인 스크레로티니아 호모에오크라파(*Sclerotinia homoeocarpa*)을 처리하였을 경우, 접종 1주일부터는 발병도 수치가 급증한 반면, 본 발명의 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주와 동전마름병 원인균인 스크레로티니아 호모에오크라파(*Sclerotinia homoeocarpa*)을 혼합처리하였을 때, 발병도 수치가 현저히 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 본 발명의 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주의 근권 정착력을 확인한 결과, 도 6(B)에 개시된 바와 같이 1주부터 5주까지 무처리구(control) 및 동전마름병 원인균(*Sclerotinia homoeocarpa*) 처리구에서는 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주가 존재하지 않는 반면, 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주와 동전마름병 원인균(*Sclerotinia homoeocarpa*) 혼합 처리구에서는 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주의 존재를 확인함으로써, 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주가 근권 정착력이 우수하다는 것을 확인할 수 있었다.

[0045] (3) 본 발명의 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주 및 대조구로 이와 동속인 스트렙토마이세스 바디우스 SP(*Streptomyces badius* SP) 균주의 갈색퍼짐병에 대한 방제효과 비교분석

[0046] 본 발명의 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주의 갈색퍼짐병에 대한 방제효과를 확인하기 위해, 대조구로 이와 동속인 스트렙토마이세스 바디우스 SP(*Streptomyces badius* SP) 균주와 비교분석하였다. 스트렙토마이세스 속 S-8 균주, 스트렙토마이세스 바디우스 SP 균주 및 상기 갈색퍼짐병 원인균을 처리한 후 7일부터 2주일 간격으로 발병도 수치를 측정하였다. 그 결과, 도 7에 개시된 바와 같이 갈색퍼짐병 원인균인 리족토니아 솔라니를 처리한 후 14일부터는 발병도 수치가 급증하였고, 반면에 갈색퍼짐병 원인균 및 스트렙토마이세스 속 S-8 균주를 함께 처리하였을 경우 발병도 수치가 현저히 감소하는 것을 확인하였으며, 갈색퍼짐병 원인균 및 스트렙토마이세스 바디우스 SP 균주를 함께 처리하였을 때에는 발병도 수치가 본 발명의 스트렙토마이세스 속 S-8 균주를 처리하였을 때보다 더 높은 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 통해, 본 발명의 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주의 갈색퍼짐병에 대한 방제효과가 이와 동속인 스트렙토마이세스 바디우스 SP(*Streptomyces badius* SP) 균주의 것보다 현저함을 확인할 수 있었다.

[0047] (4) 본 발명의 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주 및 대조구로 이와 동속인 스트렙토마이세스 바

디우스 SP(*Streptomyces badius* SP) 균주의 근권 정착력 비교분석

[0048] 무처리구(0.1% methyl cellulose), 갈색퍼짐병 원인균(*Rhizoctonia solani*) 처리구, 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주와 상기 갈색퍼짐병 원인균 혼합처리구 및 스트렙토마이세스 바디우스 SP(*Streptomyces badius* SP) 균주와 상기 갈색퍼짐병 원인균 혼합처리구인 총 4개의 처리구에서 0주 및 4주까지 본 발명의 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주 및 대조구로 이와 동속인 스트렙토마이세스 바디우스 SP(*Streptomyces badius* SP) 균주의 근권 정착력을 비교분석하였다. 그 결과, 도 8에 개시된 바와 같이 0주부터 4주까지 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주와 갈색퍼짐병 원인균(*Rhizoctonia solani*) 혼합처리구 및 스트렙토마이세스 바디우스 SP(*Streptomyces badius* SP) 균주와 갈색퍼짐병 원인균(*Rhizoctonia solani*) 혼합처리구에서는 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주와 대조구로 이와 동속인 스트렙토마이세스 바디우스 SP(*Streptomyces badius* SP) 균주의 존재를 확인하였으며, 특히 본 발명의 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주가 이와 동속인 스트렙토마이세스 바디우스 SP(*Streptomyces badius* SP) 균주보다 근권 정착력이 더 우수하다는 것을 확인할 수 있었다.

[0049] 실시예 6. 실외실험을 통해 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주의 갈색퍼짐병에 대한 생물적 방제 효과 확인

[0050] 본 발명의 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S-8 균주의 갈색퍼짐병에 대한 방제 효과를 검증하기 위해, 실외에서 생물적 방제 실험을 실시하였다. 구체적으로, 스트렙토마이세스 S-8 균주를 PDK배지(pepton 10g, PDA10g/L)에서 28℃의 조건으로 대량배양하였으며 배양된 균주(3×10^9 cfu/m²)를 처리하였다. 처리횟수는 3회로 4월, 5월 및 7월 초에 각각 처리하였으며, 갈색퍼짐병 원인균인 리족토니아 솔라니(*Rhizoctonia solani*)의 밀도(number of colonies/toothpicks) 측정 날짜는 4월 14일, 5월 12일, 6월 3일, 8월 3일, 8월 27일, 9월 14일 및 10월 13일로 7회로 측정하였다. 그 결과, 도 9에 개시된 바와 같이 스트렙토마이세스 속 S-8 균주 처리전인 04월 14일에는 갈색퍼짐병 원인균을 처리한 대조군에서 갈색퍼짐병 원인균의 밀도가 1.3(cfu/ml)으로 측정되었고, 본 발명의 스트렙토마이세스 속 S-8 균주를 처리한 경우, 갈색퍼짐병 원인균의 밀도가 2.0(cfu/ml)으로 측정되었다. 5월 12일 갈색퍼짐병 원인균을 처리한 대조군 측정에서 갈색퍼짐병 원인균의 밀도가 2.8로, 스트렙토마이세스 속 S-8 균주를 처리하였을 때 갈색퍼짐병 원인균의 밀도 0.7로 최초 측정결과와 반대되는 결과를 나타내었다. 6월 3일, 8월 3일 및 8월 27일 갈색퍼짐병 원인균을 처리한 대조군 측정에서 갈색퍼짐병 원인균의 밀도가 1.3, 3.5 및 4.0으로 점차적으로 증가하였고, 본 발명의 스트렙토마이세스 속 S-8 균주를 처리한 구 역시 0.4, 0.8 및 1.4로 밀도가 증가하였으나 대조군에 비해 현저히 낮게 측정되었다. 9월 14일 및 10월 13일 갈색퍼짐병 원인균을 처리한 대조군 측정에서 3.2에서 2.5로 갈색퍼짐병 원인균의 밀도가 감소하였으며, 스트렙토마이세스 속 S-8 균주를 처리한 구 역시 1.3에서 0.5로 갈색퍼짐병 원인균의 밀도가 감소하였다. 실험기간 동안 갈색퍼짐병 원인균을 처리한 대조군의 경우 갈색퍼짐병 원인균의 평균 밀도가 약 2.7이었으며, 스트렙토마이세스 속 S-8 균주 처리구의 경우 약 1.0으로 측정되었다. 이러한 결과를 통해, 본 발명의 스트렙토마이세스 속 S-8 균주를 처리하였을 때, 갈색퍼짐병 원인균의 밀도가 효과적으로 감소한다는 것을 확인할 수 있었다.

수탁번호

[0051]

기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM11704P

수탁일자 : 20150603

도면

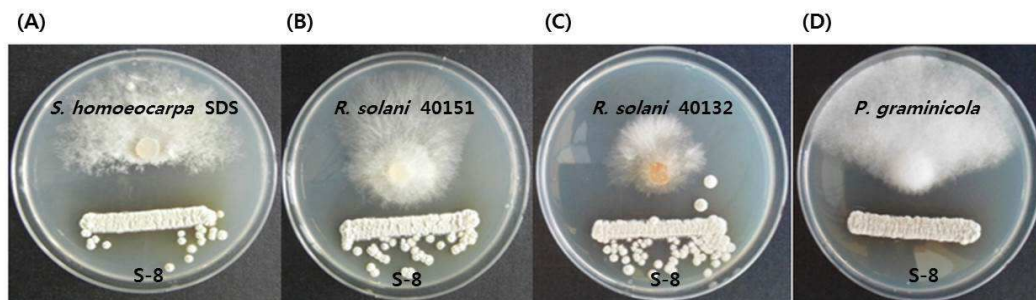
도면1

```

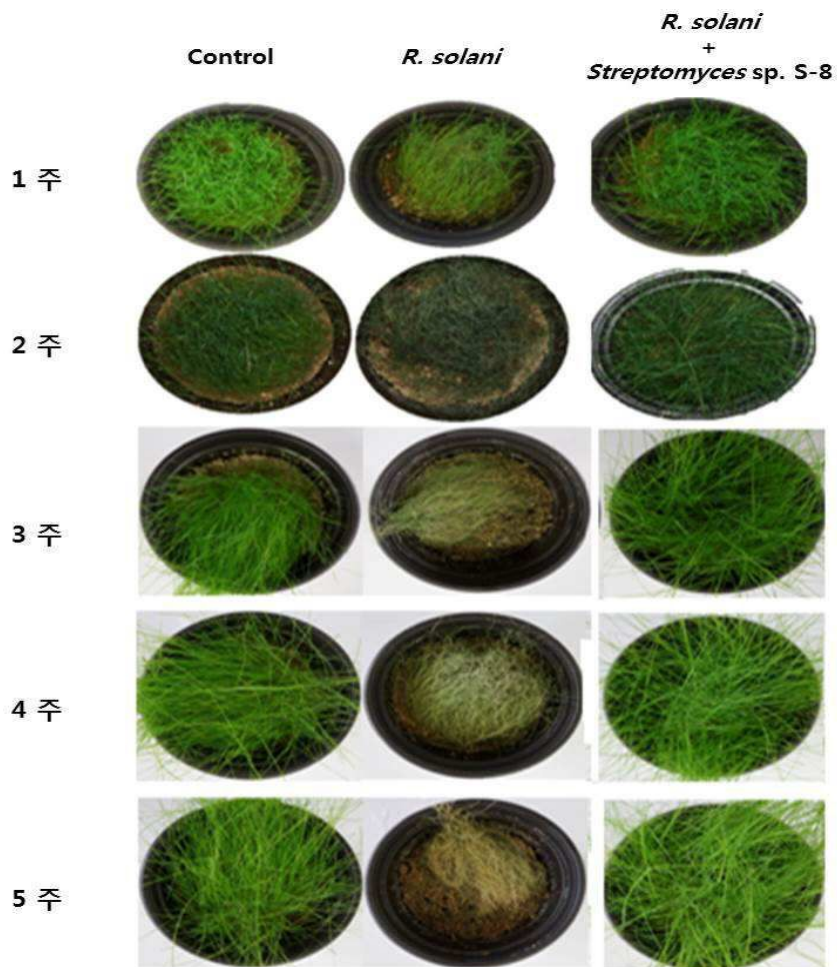
GNCAIACTACCATGCAGTCGAACGATGAAGCCCATTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGT
GAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATA
CCGGATAATACTTCTGCCTGCATGGGTGGGGGTTGAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCC
GCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTG
AGAGGGCGACCGGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCCACTCTACGGGAGGCAGCAGT
GGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCCGGTGAGGGATGACGGCC
TTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAG
CGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATT
ATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACGTGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACC
CCGGGTCTGCATTGATACGGGCTAGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGT
AGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCAT
TACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
GCCGTAAACGTTGGGAACTAGGTGTTGGCGACATTCCACGTGTCGGTGCCGCACTAACGC
ATTAAGTTCCTCCGCTGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGG
CCCGCACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGC
TTGACATATACCGGAAAGCATCAGAGATGGTGCCCCCTTGTGGTCGGTATACAGGTGGTGC
ATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGTCGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTT
GTTCTGTGTTGCCAGCATGCCTTTCGGGGGTGATGGGGANTCACAGGAGACTGCCGGGGTTC
AACTT

```

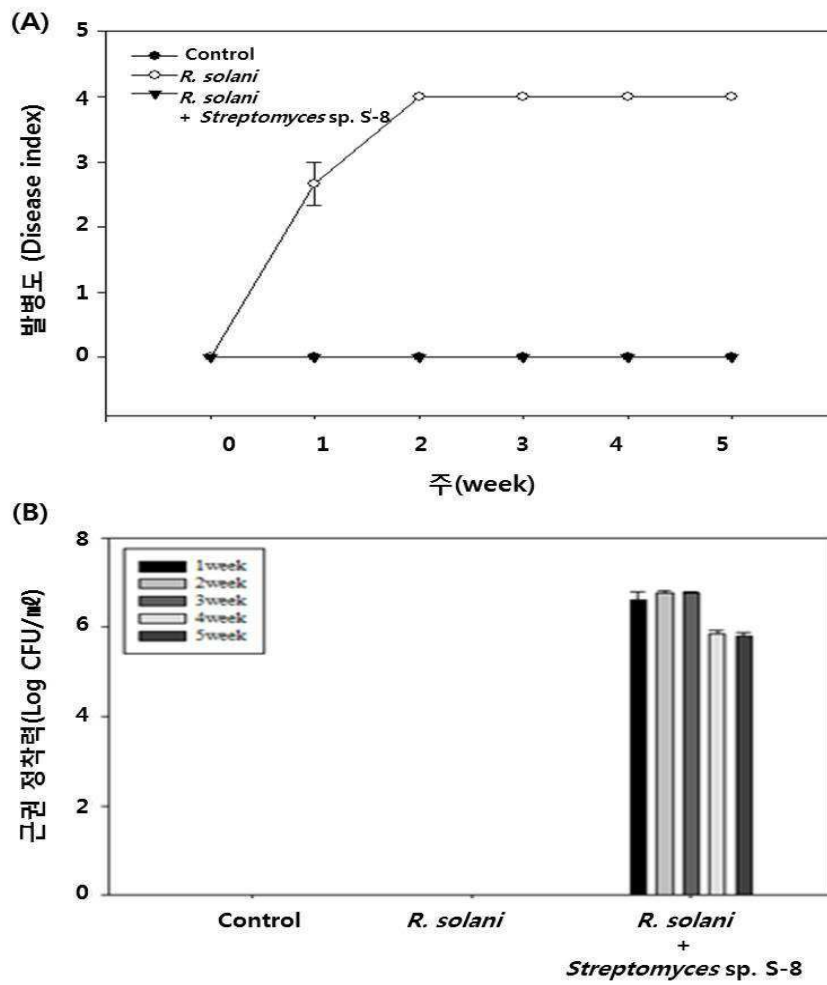
도면2



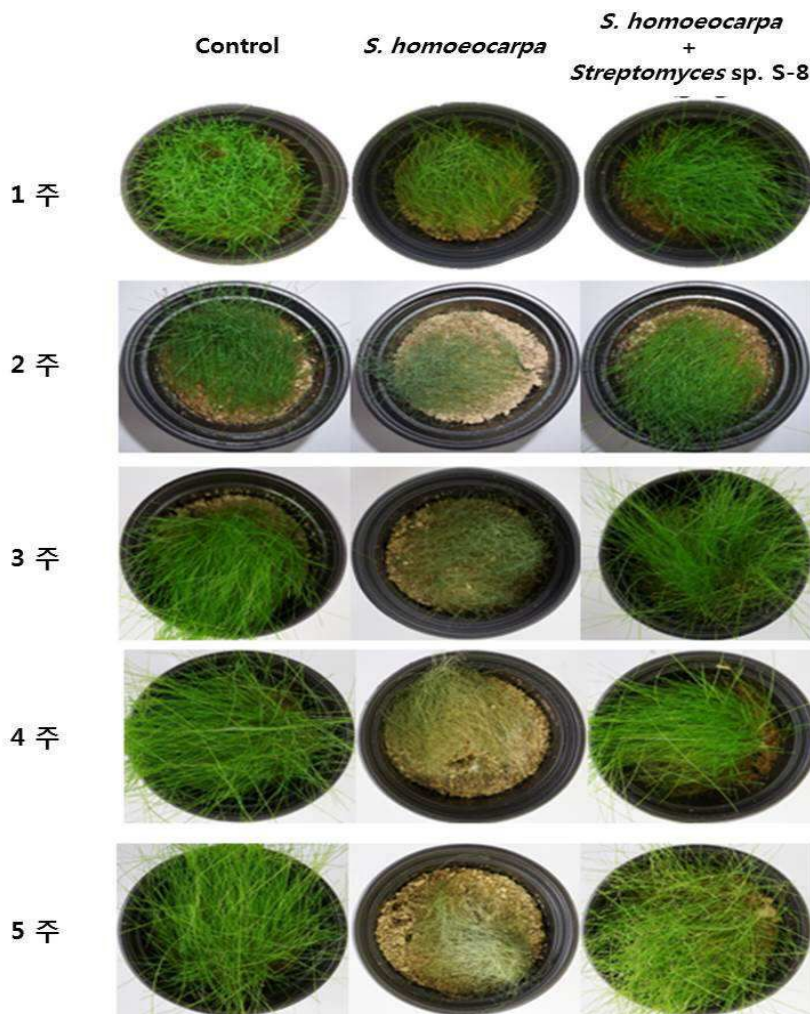
도면3



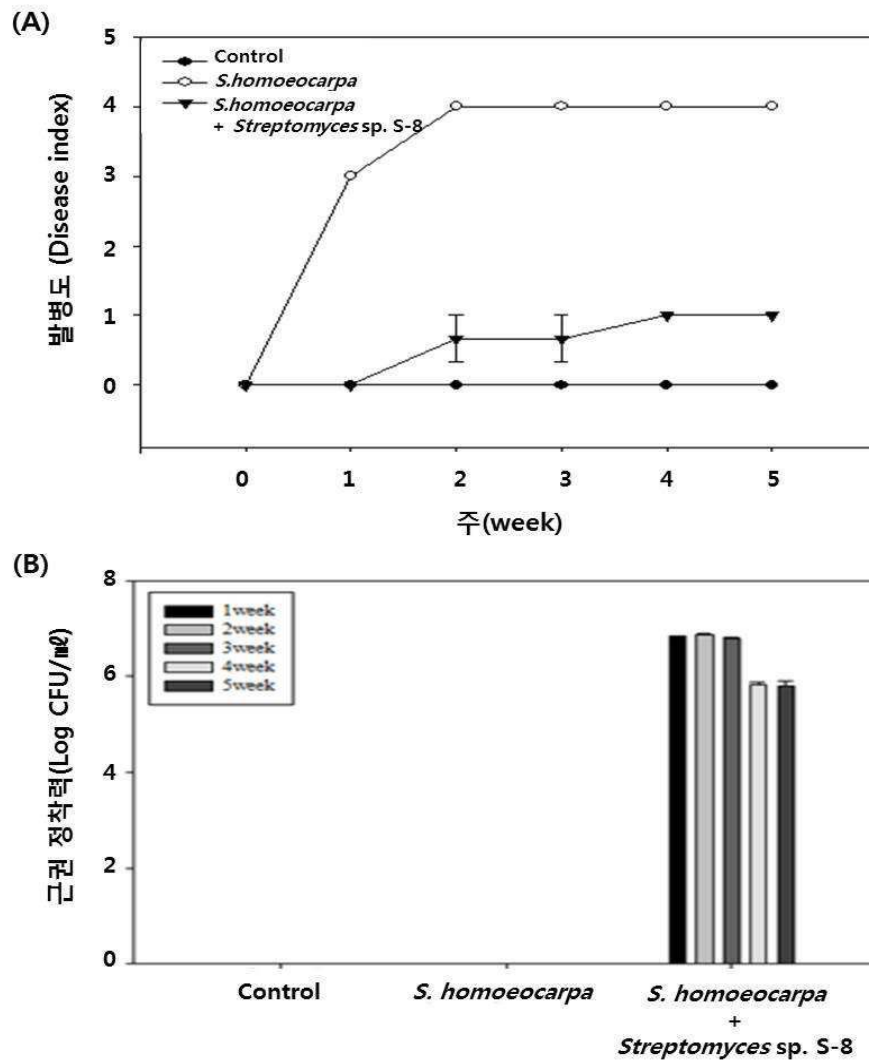
도면4



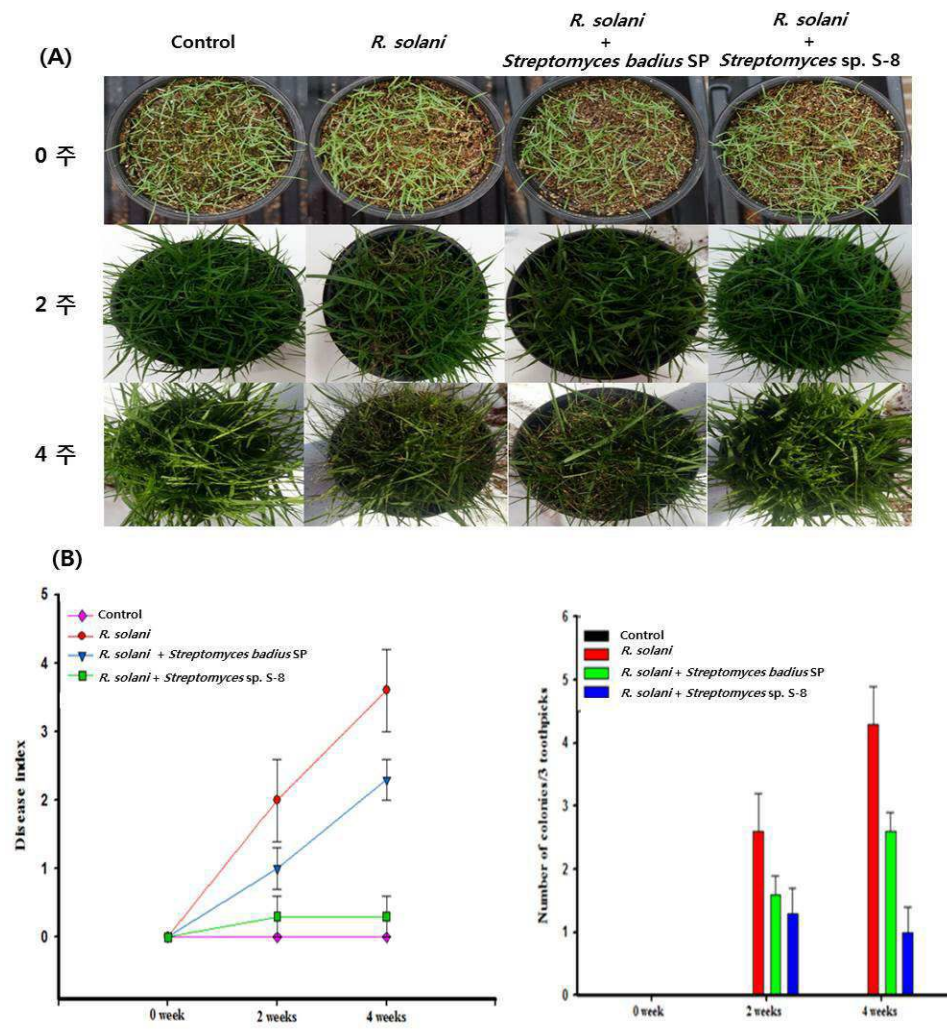
도면5



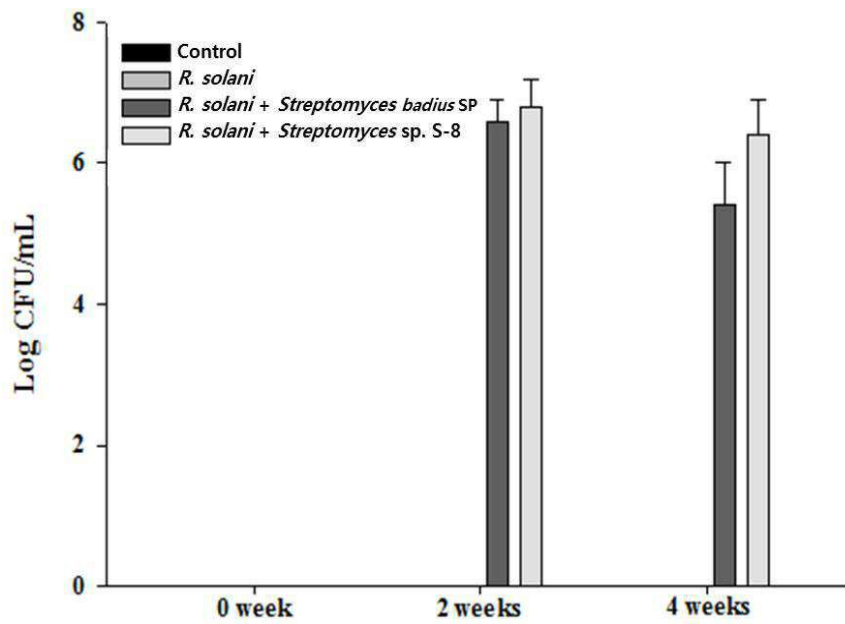
도면6



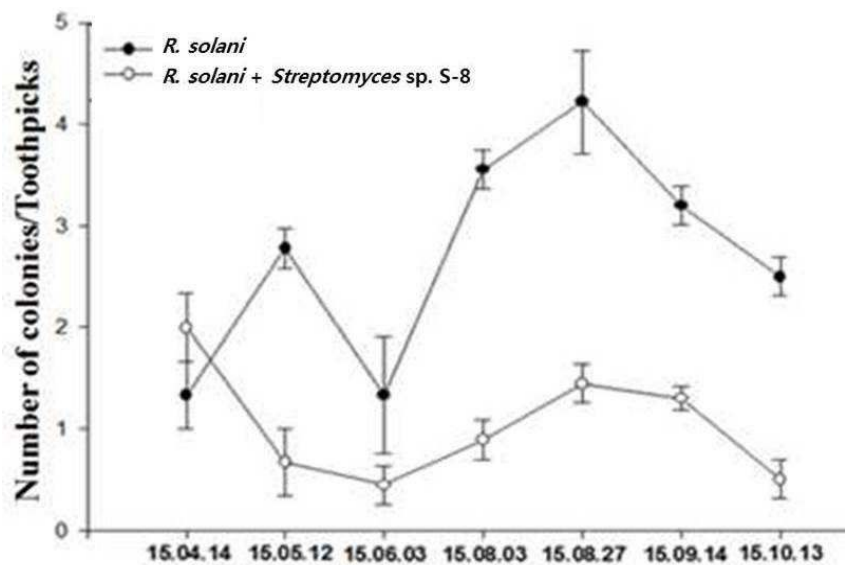
도면7



도면8



도면9



서열 목록

- <110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
- <120> Streptomyces sp. S-8 strain having antimicrobial activity against turfgrass pathogen isolated from rhizosphere soil of turfgrass root and uses thereof
- <130> PN16102
- <160> 3
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1

<211> 1112

<212> DNA

<213> Streptomyces sp.

<400> 1

gncanactac catgcagtcg aacgatgaag cccattcggg gtggattagt ggcgaacggg 60

tgagtaacac gtgggcaatc tgcccttcac tctgggacaa gccctggaaa cgggggtctaa 120

taccggataa tacttctgcc tgcatgggtg ggggttgaaa gctccggcgg tgaaggatga 180

gcccgcggcc tatcagcttg ttggtggggt aatggcctac caaggcgacg acgggtagcc 240

ggcctgagag ggcgaccggc cacactggga ctgagacacg gccagactc ctacgggagg 300

cagcagtggg gaatattgca caatgggcga aagcctgatg cagcgacgcc gcgtgaggga 360

tgacggcctt cgggttgtaa acctctttca gcagggaaga agcgcaagtg acggtacctg 420

cagaagaagc gccggctaac tacgtgccag cagcccggtt aatacgtagg gcgcaagcgt 480

tgtccggaat tattgggcgt aaagagctcg taggcggctt gtcacgtcgg atgtgaaagc 540

ccggggctta acccgggtc tgcatcgtat acgggctagc tagagtgtgg taggggagat 600

cggaattcct ggtgtagcgg tgaaatgcgc agatatacagg aggaacaccg gtggcgaagg 660

cggatctctg ggccattact gacgtgagg agcgaaagcg tggggagcga acaggattag 720

ataccctggt agtcacgcc gtaaacgttg ggaactaggt gttggcgaca ttccacgtcg 780

tcggtgccgc agctaacgca ttaagttccc cgcttgggga gtacggccgc aaggctaaaa 840

ctcaaaggaa ttgacggggg ccgcacaaag cagcggagca tgtggcttaa ttcgacgcaa 900

cgcaagaac cttaccaagg cttgacatat accggaaagc atcagagatg gtgccccctt 960

tgtggtcggg atacaggtgg tgcatggctg tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt 1020

aagtcgccga acgagcgcaa cccttgttct gtgttgccag catgcctttc gggggtgatg 1080

gggantcaca ggagactgcc ggggttcaac tt 1112

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

agagtttgat cmtggctcag 20

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

ggytaccttg ttacgactt

19