(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0081910
(43) 공개일자 2024년06월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01N 63/28 (2020.01) *A01P 3/00* (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01) *C12R 1/465* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A01N 63/28 (2022.01)
A01P 3/00 (2021.08)
(21) 출원번호 10-2022-0165646
(22) 출원일자 2022년12월01일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
곽연식
경상남도 진주시 진주대로 1317(이현동, 이현하이클래스웰가아파트) 110-901
김다란
경상남도 통영시 무전2길 36(무전동, 주영에이스빌5차) 309호
(74) 대리인
특허법인 플러스

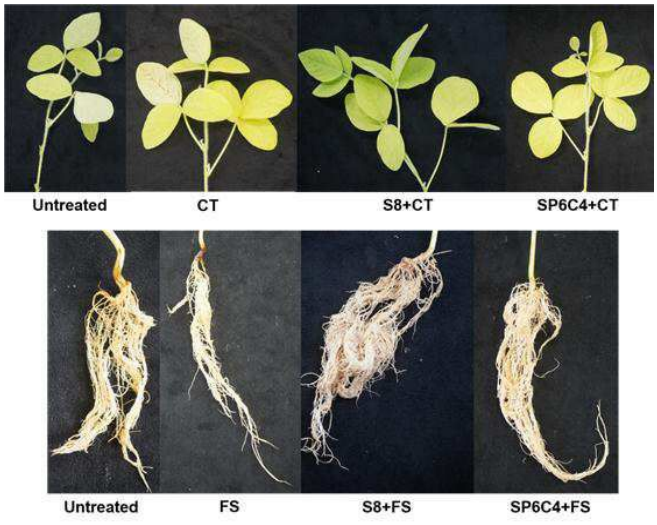
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **스트렙토마이세스 균주의 동시 배양방법 및 이를 이용한 식물병원균의 생물학적 방제방법**

(57) 요 약

본 발명은 스트렙토마이스 균주의 동시 배양방법 및 이를 이용한 식물병원균의 생물학적 방제방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는, 서로 다른 두 종류의 스트렙토마이세스 균주의 동시 배양을 위한 조건을 확립하고, 다양한 식물에 식물병을 유발하는 병원균에 대해 동시 배양을 통해 얻은 균주를 처리하여, 생물학적 방제 효과를 상승시키는 방제방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 스트렙토마이세스 균주의 동시 배양방법 및 이를 이용한 식물병원균의 생물학적 방제방법은 다른 균주 대비 배양이 용이하지 않은 스트렙토마이세스 균주를 하나 이상 공동 배양하여, 각 균주의 생균수를 유지하면서도, 식물병원균에 대한 항균 활성이 단일 배양 대비 향상되는 현저한 상승 효과를 얻었다.

대 표 도 - 도8



(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2021.05)
C12R 2001/465 (2021.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395071802
과제번호	PJ016437012022
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	바이오그린 연계 농생명혁신기술개발사업
연구과제명	딸기 병방제 위한 핵심미생물 발굴 및 생물학적 특성 평가기술 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	주식회사 솔붐(Solvum Co.,Ltd.)
연구기간	2021.06.11 ~ 2022.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S8 및 스트렙토마이세스 글로비스포러스(*Streptomyces globisporus*) SP6C4을 동시 배양한 배양액을 포함하는, 식물 탄저병 또는 뿌리썩음병 방제용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 식물은 콩, 오이, 고추, 가지, 감자, 무, 부추, 파, 파프리카, 참외, 메론, 포도, 딸기, 토마토, 벼, 밀, 보리, 호박, 잔디, 담배, 장미 및 인삼으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 식물 탄저병 또는 뿌리썩음병 방제용 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 탄저병은 콜렉토트리쿰 트룬카툼(*Collectotrichum truncatum*)에 의해 유발되는 것인, 식물 탄저병 또는 뿌리썩음병 방제용 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 뿌리썩음병은 푸사리움 속(*Fusarium* sp.) 균주, 파이티움 속(*Pythium* sp.) 균주 및 칼로네크트리아 일리시콜라(*Calonectria ilicicola*)로 이루어진 군에서 선택되는 병원균에 의해 유발되는 것인, 식물 탄저병 또는 뿌리썩음병 방제용 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 배양은 pH 7.0 내지 7.5의 액체 배지에서 수행되는 것인, 식물 탄저병 또는 뿌리썩음병 방제용 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 배양은 25 내지 30℃에서 100 내지 200 rpm으로 진탕배양하는 것인, 식물 탄저병 또는 뿌리썩음병 방제용 조성물.

청구항 7

제 5항에 있어서,

상기 배양은 pH 7.1 내지 7.3의 액체 배지에서 수행되는 것인, 식물 탄저병 또는 뿌리썩음병 방제용 조성물.

청구항 8

제 1항에 있어서,

상기 동시 배양은 하나 이상의 탄소원과 질소원을 포함하는 배지를 이용하여 수행되는 것인, 식물 탄저병 또는 뿌리썩음병 방제용 조성물.

청구항 9

제 8항에 있어서,

상기 배지는 R2A 배지 및 PDK배지로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 식물 탄저병 또는 뿌리썩음병 방제용 조성물.

청구항 10

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 제제화를 위한 계면활성제를 더 포함하는 것인, 식물 탄저병 또는 뿌리썩음병 방제용 조성물.

청구항 11

제 1항 내지 제 10항 중 어느 한 항의 조성물을 유효성분으로 함유하는 식물 탄저병 또는 뿌리썩음병 방제용 농약.

청구항 12

제 1항 내지 제 10항 중 어느 한 항의 조성물을 식물의 접촉 또는 살포하는 단계;를 포함하는 식물 탄저병 또는 뿌리썩음병의 방제방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 스트렙토마이스 균주의 동시 배양방법 및 이를 이용한 식물병원균의 생물학적 방제방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는, 서로 다른 두 종류의 스트렙토마이세스 균주의 동시 배양을 위한 조건을 확립하고, 다양한 식물에 식물병을 유발하는 병원균에 대해 동시 배양을 통해 얻은 균주를 처리하여, 생물학적 방제 효과를 상승시키는 방제방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 토양에 존재하는 주된 미생물 중 하나인 방선균은 균사 형태를 가지고 형태 분화를 하는 그람 양성(Gram-positive) 토양 미생물로, 복잡한 형태적 분화뿐만 아니라, 스트렙토마이신, 악티노마이신, 린코마이신 등의 항생제, 항암제 또는 면역억제제로 대표되는 다양한 종류의 2차 대사산물을 생산한다. 또한, 식물병원균으로부터 뿌리를 보호하고, 인돌 아세트산과 같은 다양한 종류의 식물 호르몬을 분비하여, 식물체의 발달에 영향을 주기도 한다.

[0003] 특히, 전체 토양 방선균의 약 50%를 차지하는 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.)은 상업적 또는 의약적으로 유용한 항생 물질의 75~80%를 생산한다고 보고된 바 있으며, 실제로 스트렙토마이세스 속의 균주가 생산하는 2차 대사산물인 스트렙토마이신을 에르위니아 아밀로보라 등의 식물병원균 방제를 위해 사용된 바 있다(Vanneste et al., 1992).

[0004] 방선균은 다른 미생물과 달리, 배양 및 생육 조건이 까다로운 면이 있어 주로 퇴비나 섞어띄움비 속에서 고체배양을 하거나, 이를 활용하여 액체 배양을 하는 방법이 있으며, 균주의 종류 별로도 배양 조건이 상이하기 때문에, 하나 이상의 스트렙토마이세스 속 균주를 함께 배양하거나 하는 경우, 균주별 세포 생장 및 생리활성 유지 여부를 확인하는 것이 중요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 제2017-0009708호(2017.01.25).

(특허문헌 0002) 대한민국 등록특허공보 제1695916호(2017.01.06).

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) Vanneste, J. L. et al. Journal of Bacteriology, 174(9), 2785-2796 (1992).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 상기와 같은 문제의 해결을 위해 본 발명은 스트렙토마이세스 속 균주 2종을 공동 배양하기 위한 배양 조건을 수립하고, 단일 배양시와 비교하여, 각 균주의 생균수가 및 식물병원균에 대한 방제 활성의 변화를 측정하여, 공동 배양에 따른 상승 효과를 확인하고자 하였다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명의 일 양태는 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S8 및 스트렙토마이세스 글로비스포러스(*Streptomyces globisporus*) SP6C4을 동시 배양한 배양액을 포함하는, 식물 탄저병 또는 뿌리썩음병 방제용 조성물을 제공한다.

[0009] 본 발명의 일 예에 있어서, 상기 식물은 콩, 오이, 고추, 가지, 감자, 무, 부추, 파, 파프리카, 참외, 메론, 포도, 딸기, 토마토, 벼, 밀, 보리, 호박, 잔디, 담배, 장미 및 인삼으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0010] 본 발명의 일 예에 있어서, 상기 탄저병은 콜렉토트리쿰 트룬카툼(*Collectotrichum truncatum*)에 의해 유발되는 것일 수 있다.

[0011] 본 발명의 일 예에 있어서, 상기 뿌리썩음병은 푸사리움 속(*Fusarium* sp.) 균주, 파이티움 속(*Pythium* sp.) 균주 및 칼로네크트리아 일리시콜라(*Calonectria ilicicola*)로 이루어진 군에서 선택되는 병원균에 의해 유발되는 것일 수 있다.

[0012] 본 발명의 일 예에 있어서, 상기 배양은 pH 7.0 내지 7.5의 액체 배지에서 수행되는 것일 수 있다.

[0013] 본 발명의 일 예에 있어서, 상기 배양은 25 내지 30℃에서 100 내지 200 rpm으로 진탕배양하는 것일 수 있다.

[0014] 본 발명의 일 예에 있어서, 상기 배양은 pH 7.1 내지 7.3의 액체 배지에서 수행되는 것일 수 있다.

[0015] 본 발명의 일 예에 있어서, 상기 동시 배양은 하나 이상의 탄소원과 질소원을 포함하는 배지를 이용하여 수행되는 것일 수 있다.

[0016] 본 발명의 일 예에 있어서, 상기 배지는 R2A 배지 및 PDK배지로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있다.

[0017] 본 발명의 일 예에 있어서, 상기 조성물은 제제화를 위한 계면활성제를 더 포함하는 것일 수 있다.

[0018] 본 발명의 다른 양태는 상기 조성물을 유효성분으로 함유하는 식물 탄저병 또는 뿌리썩음병 방제용 농약을 제공한다.

[0019] 본 발명의 다른 양태는 상기 조성물을 식물의 접촉 또는 살포하는 단계;를 포함하는 식물 탄저병 또는 뿌리썩음병의 방제방법을 제공한다.

발명의 효과

[0020] 본 발명에 따른 스트렙토마이세스 균주의 동시 배양방법 및 이를 이용한 식물병원균의 생물학적 방제방법은 다른 균주 대비 배양이 용이하지 않은 스트렙토마이세스 균주를 하나 이상 공동 배양하여, 각 균주의 생균수를 유지하면서도, 식물병원균에 대한 항균 활성이 단일 배양 대비 향상되는 현저한 상승 효과를 얻었다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S8 및 스트렙토마이세스 글로비스포러스(*Streptomyces globisporus*) SP6C4의 동시 배양 생균수 측정 결과에 관한 것이고,

좌상 및 좌하단: 고체 배지에서의 동시배양, 우상 및 우하단: 액체 배지에서의 동시배양

도 2는 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S8 및 스트렙토마이세스 글로비스포러스(*Streptomyces*

globisporus) SP6C4의 동시 배양 pH 조건에 관한 것이고,

A) 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S8, B) 스트렙토마이세스 글로비스포러스(*Streptomyces globisporus*) SP6C4

도 3은 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S8 및 스트렙토마이세스 글로비스포러스(*Streptomyces globisporus*) SP6C4의 동시 배양 시 생균수 측정 결과에 관한 것이고,

도 4는 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S8 및 스트렙토마이세스 글로비스포러스(*Streptomyces globisporus*) SP6C4의 동시 배양을 통한 항진균 활성 능력 평가 결과에 관한 것이고,

도 5는 동시배양으로 배양한 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S8 및 스트렙토마이세스 글로비스포러스(*Streptomyces globisporus*) SP6C4의 콩 병원균 대상 항진균 활성 평가 결과에 관한 것이고,

A) 콩 탄저 병원균과의 대치 배양, B) 콩 뿌리썩음 병원균과의 대치배양

도 6은 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S8 및 스트렙토마이세스 글로비스포러스(*Streptomyces globisporus*) SP6C4의 콩 작물을 이용한 정착력 검증 결과에 관한 것이고,

A) 콩 지하부 근권, B) 콩 지상부 잎

도 7은 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S8 및 스트렙토마이세스 글로비스포러스(*Streptomyces globisporus*) SP6C4의 콩 작물을 이용한 발병 억제 능력 검증 결과에 관한 것이고,

A) 콩 탄저병에 대한 발병 억제 능력, B) 콩 뿌리썩음병에 대한 발병 억제 능력

도 8은 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S8 및 스트렙토마이세스 글로비스포러스(*Streptomyces globisporus*) SP6C4의 콩 작물 생육 관찰을 통한 정착력 검증 결과에 관한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 이하 첨부한 표 또는 도면들을 참조하여 본 발명의 스트렙토마이스 균주의 동시 배양방법 및 이를 이용한 식물 병원균의 생물학적 방제방법에 대해 상세히 설명한다.

[0023] 도면이 기재되어 있을 경우, 이는 당업자에게 본 발명의 사상이 충분히 전달될 수 있도록 하기 위해 예로서 제공되는 것이다. 따라서 본 발명은 제시되는 도면들에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있으며, 상기 도면들은 본 발명의 사상을 명확히 하기 위해 과장되어 도시될 수 있다.

[0024] 이때, 사용되는 기술 용어 및 과학 용어에 있어서 다른 정의가 없다면, 이 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 통상적으로 이해하고 있는 의미를 가지며, 하기의 설명 및 첨부 도면에서 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 공지 기능 및 구성에 대한 설명은 생략한다.

[0025] 또한 본 발명의 명세서에서 사용되는 단수 형태는 문맥에서 특별한 지시가 없는 한 복수 형태도 포함하는 것으로 의도할 수 있다.

[0026] 또한 본 발명의 명세서에서 특별한 언급 없이 사용된 단위는 중량을 기준으로 하며, 일 예로 % 또는 비의 단위는 중량% 또는 중량비를 의미한다.

[0027] 또한 본 발명의 명세서에서, “포함한다”는 표현은 “구비한다”, “함유한다”, “가진다” 또는 “특징으로 한다” 등의 표현과 등가의 의미를 가지는 개방형 기재이며, 추가로 열거되어 있지 않은 요소, 재료 또는 공정을 배제하지 않는다. 또한 “실질적으로…로 구성된다”는 표현은 특정된 요소, 재료 또는 공정과 함께 열거되어 있지 않은 다른 요소, 재료 또는 공정이 발명의 적어도 하나의 기본적이고 신규한 기술적 사상에 허용할 수 없을 만큼의 현저한 영향을 미치지 않는 양으로 존재할 수 있는 것을 의미한다. 또한 “구성된다”는 표현은 기재된 요소, 재료 또는 공정만이 존재하는 것을 의미한다.

[0028] 본 발명에 있어 “샘플” 또는 “시료”는 분석을 위한 대상을 나타내는 것으로, 명세서에 걸쳐 동일한 의미로 사용되었다.

[0029] 이하 본 발명에 대해 상세히 설명한다.

[0030] 본 발명의 일 양태는 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S8 및 스트렙토마이세스 글로비스포러스(*Streptomyces globisporus*) SP6C4을 동시 배양한 배양액을 포함하는, 식물 탄저병 또는 뿌리썩음병 방제용 조

성물을 제공한다.

[0031] 상기 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S8 균주는 대한민국 공개특허공보 제2017-0009708호를 통해 기탁된 균주를 분양받아 사용하였고, 스트렙토마이세스 글로비스포러스(*Streptomyces globisporus*) SP6C4는 등록특허공보 제1695916호를 통해 기탁된 균주를 분양받아 사용하였은 이에 한정되는 것은 아니다.

[0032] 상기 식물은 특별히 제한되는 것은 아니나, 탄저병 또는 뿌리썩음병이 발병될 수 있는 기주 식물 또는 비기주 식물일 수 있으며, 일예로 콩, 오이, 고추, 가지, 감자, 무, 부추, 파, 파프리카, 참외, 메론, 포도, 딸기, 토마토, 벼, 밀, 보리, 호박, 잔디, 담배, 장미 및 인삼으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상, 보다 구체적인 일예로 본 발명의 일 실시예에 따른 콩(*Glycine max*) 등을 들 수 있다.

[0033] 탄저병은 특별히 제한되는 것은 아니나, 콜렉토트리쿰 트룬카툼(*Collectotrichum truncatum*) 등에 의해 유발되는 것일 수 있다.

[0034] 식물에 발생하는 탄저병(Anthracnose)은 잎, 줄기, 꼬투리, 종자 등에 발생하는 것으로 알려져 있으며, 잎에서는 처음에 갈색의 다각형 병반으로 나타나고, 병이 진전되면 갈색 내지 암갈색의 부정형 병반으로 확대된다. 오래된 병반의 내부는 회색 내지 담황색으로 변하고, 까만 점이 보이며, 잘 찢어진다. 줄기에서는 갈색의 타원형 내지 부정형 병반이 형성되는데, 후에 병반이 약간 움푹 들어가며 균열이 생기고, 오래된 병반에는 황색 내지 담홍색의 분생포자 덩어리가 형성된다. 심하게 병든 줄기는 검게 변색되고, 말라죽는다.

[0035] 탄저병 병원균은 균사의 형태로 종자 혹은 병든 부위에서 겨울을 보낸 후 분생포자를 형성하여 1차 전염원이 된다. 종자에 감염되어 있는 병원균은 초기에 묘를 침해하여 잘록 증상을 일으키거나, 병반형성 없이 감염된 상태로 있다가 작물이 성숙할 때 2차 전염원이 된다. 병 증상은 주로 식물체의 생육 중기 이후에 많이 진전되어 나타나는데, 병 발생은 여름철 장마기에 시작하여 가을 수확기까지 계속된다.

[0036] 본 발명의 일 예에 있어서, 상기 뿌리썩음병은 푸사리움 속(*Fusarium* sp.) 균주, 파이티움 속(*Pythium* sp.) 균주 및 칼로네크트리아 일리시콜라(*Calonectria ilicicola*) 등의 유해균에 의해 유발되는 것일 수 있다.

[0037] 식물에 발생하는 뿌리썩음병(Pythium root rot)은 주로 유묘기에 잘록 증상으로 나타나며, 종자가 발아하여 싹이 튼 직후부터 발생한다. 토양이 과습하고 배수가 불량하면 생육기에도 발생되는데 여러 갈래의 뿌리에 갈색 수침 병반이 불규칙하게 나타나고 썩는다. 지상부는 시들음 증상을 나타내며 생육이 위축된다. 효과적인 방제를 위해서는 건전토양에서 육묘하고, 토양이 장기간 과습하지 않도록 배수를 철저히 하여야 하며, 시설하우스 및 육묘상이 저온이나 고온이 되지 않도록 하고 밀식을 피해야 한다.

[0038] 뿌리썩음병 병원균은 토양에 존재하며, 토양전염성이나 관수에 의해 전염되기도 한다. 대부분의 파이토피움 속 균은 병든 식물체의 조직 속에서 난포자를 쉽게 형성하는데, 이들이 토양 속에서 겨울을 나고 다시 발아하여 1차 전염원이 된다. 토양 온도가 10도 이상이 되면 병원균은 활동을 시작하며, 이 때 충분한 토양 수분이 필요하다.

[0039] 상기 동시 배양은 특별히 제한되는 것은 아니나 일예로 pH 7.0 내지 7.5, 좋게는 pH 7.0 내지 7.4, 더욱 좋게는 pH 7.1 내지 7.3의 액체 배지에서 수행되는 것일 수 있으며, 상기 범위에서 두 종류의 스트렙토마이시스 균주가 모두 균일한 성장을 나타낼 수 있어 바람직하다.

[0040] 상기 동시 배양은 특별히 제한되는 것은 아니나 일예로 25 내지 30℃에서 100 내지 200 rpm, 좋게는 26 내지 30℃에서 110 내지 190 rpm, 더욱 좋게는 27 내지 29℃에서 130 내지 170 rpm으로 진탕배양하는 것일 수 있으며, 상기 범위에서 두 종류의 스트렙토마이시스 균주가 모두 균일한 성장을 나타낼 수 있어 바람직하다.

[0041] 상기 동시 배양은 특별히 제한되는 것은 아니나, 하나 이상의 탄소원과 질소원을 포함하는 배지를 이용하여 수행되는 것일 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에 따른 구체적인 예로 R2A 배지 또는 PDK배지 등을 이용할 수 있으며, 상기 배지를 이용하여 배양 시, 두 종류의 스트렙토마이시스 균주가 모두 균일한 성장을 나타낼 수 있어 바람직하다.

[0042] 상기 조성물은 특별히 제한되는 것은 아니나, 미생물 제제화를 위해 계면활성제 등을 더 포함할 수 있으며, 상기 계면활성제의 구체적인 일예로 폴리카르복실레이트, 리그노술폰산 나트륨, 칼슘 리그노설포네이트, 소듐 다이알킬설포석시네이트, 소듐 알킬 아릴 설포네이트, 폴리옥시에틸렌 알킬 페닐 에테르, 소듐 트리폴리포스페이트, 폴리옥시에틸렌 알킬 아릴 포스포릭 에스테르, 폴리옥시에틸렌 알킬 아릴 에테르, 폴리옥시에틸렌 알킬 아릴 폴리머, 폴리옥시알킬온 알킬 페닐 에테르, 폴리옥시에틸렌 노닐 페닐 에테르, 소듐 설포네이트 나프탈렌 포름알데히드, 트리톤 X-100, 트윈 20 및 트윈 80으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상을 들 수

있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 상기 계면활성제를 더 포함함으로써, 상기 식물 탄저병 또는 뿌리썩음병의 방제를 위한 조성물의 제형화가 보다 용이해질 수 있어 바람직하다.

[0043] 본 발명의 다른 양태는 상기 조성물을 유효성분으로 함유하는 식물 탄저병 또는 뿌리썩음병 방제용 농약을 제공한다.

[0044] 상기 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S8 및 스트렙토마이세스 글로비스포러스(*Streptomyces globisporus*) SP6C4을 동시 배양한 배양액을 유효성분으로 포함하는 농약은 종래의 화학비료와 유기합성농약을 주로 함유한 화학적 방제용 농약에 비해, 난분해성 잔류독성이 없고, 공기, 토양, 지하수 등을 오염시키는 환경 또는 생태계에 대한 문제점이 없을 뿐만 아니라, 병원균의 농약 저항성 획득에 의한 약효 감소 등의 부작용이 적고 방제 효과가 우수하여 상기 화학적 방제용 농약을 대체해 나갈 수 있을 뿐만 아니라, 상기 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S8 또는 스트렙토마이세스 글로비스포러스(*Streptomyces globisporus*) SP6C4을 각각 단일 배양한 배양액을 유효성분으로 포함하는 농약에 비해여, 방제 효과가 현저히 상승되는 효과를 나타내는 점에서 더욱 바람직하다.

[0045] 본 발명의 다른 양태는 상기 조성물을 식물의 접촉 또는 살포하는 단계;를 포함하는 식물 탄저병 또는 뿌리썩음병의 방제방법을 제공한다.

[0046] 상기 조성물을 식물에 접촉 또는 살포시 방법에 있어 특별히 제한되는 것은 아니나 식물의 종자, 줄기, 뿌리 등에 균일하게 도포하는 방식이나, 옆면에서 일정한 거리를 두어 살포하는 방식 등을 들 수 있으며, 이를 통해 식물에 존재하는 탄저병 원인균 또는 뿌리썩음병 원인균에 대한 철저한 방제를 수행할 수 있어 바람직하다.

[0048] 이하, 본 발명의 내용을 실시예를 통하여 보다 구체적으로 설명한다. 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 권리범위가 이들에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0050] **[재료, 원료, 시약 등]**

[0051] - 스트렙토마이세스 속 (*Streptomyces* sp.) S8 및 스트렙토마이세스 글로비스포러스(*Streptomyces globisporus*) SP6C4: 대한민국 공개특허공보 제2017-0009708호 및 대한민국 등록특허공보 제1695916호의 기탁균주를 사용하였다.

[0052] - 기타 균주는 KCTC, ATCC 등의 공인 기탁기관에서 분양받아 사용하였으며, 기타 구입처가 명시되지 않은 배지, 시약은 Gibco, Sigma-Aldrich 등의 판매처에서 구입하거나, 직접 제조하여 사용하였다.

실 시 예 1

[0054] **스트렙토마이세스 속 (*Streptomyces* sp.) S8 및 스트렙토마이세스 글로비스포러스(*Streptomyces globisporus*) SP6C4 의 동시 배양 조건 확립**

[0055] 본 발명자은 기 확보된 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S8과 스트렙토마이세스 글로비스포러스(*Streptomyces globisporus*) SP6C4 (대한민국 공개특허공보 제2017-0009708호 및 대한민국 등록특허공보 제1695916호 참조)의 고체 배지 또는 액체 배지를 이용한 동시 배양을 위해 이하 방법으로 조건을 확립하였다.

[0056] **1-1. 고체 배지 동시 배양**

[0057] 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S8과 스트렙토마이세스 글로비스포러스(*Streptomyces globisporus*) SP6C4의 고체 동시 배양을 위해, OD_{600} 0.6으로 제조된 포자 현탁액 10 μL을 MS(1L당 만니톨 20g, 콩(soya) 20g 및 한천 20g) 배지에 접종한 후, 멸균된 루프(loop)를 이용하여 교차로 도말한 후, 28℃ 배양기에서 5일간 배양하여, 포자 형성 여부를 확인하였다.

[0058] 그 결과를 도 1에 도시하였다.

[0059] 이로부터 고체 배지 상에서 두 균주를 동시 배양한 결과, 두 균주 모두 포자를 형성함으로써, 상호 간의 성장을 억제하지 않는 것을 확인하였다.

[0061] **1-2. 액체 배지 동시 배양 조건 확립**

[0062] 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S8과 스트렙토마이세스 글로비스포러스(*Streptomyces globisporus*) SP6C4의 액체 동시 배양을 위해, 응집된 두 방선균의 혼탁 배양이 가능한 R2A(1L당 프로테오스 펩톤 0.05g, 카사미노산 0.05g, 효모 추출물 0.05g, 덱스트로스 0.05g, 가용성 전분 0.05g, 인산이칼륨 0.03g, 황산마그네슘 0.005g, 피루브산나트륨 0.03g 및 한천 15g) 배지를 이용하여, 배양 조건을 확립하였다.

[0063] pH 조건 확립을 위해, 96 웰-플레이트에 각각 pH 2, 5, 7, 7.2 및 10 조건의 배양 배지를 첨가한 후, 두 균주의 혼합물을 접종하고 28℃에서 150 rpm으로 진탕배양하였다. 배양 후, 48시간 동안 600nm에서 흡광도를 측정하고, 이로부터 시간 당 성장 속도 측정을위해 기울기 값을 환산하여 사용하였다.

[0064] 그 결과를 도 2에 도시하였다.

[0065] 이로부터, 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S8 균주는 pH 10 조건에서 시간 당 성장 속도가 높은 것을 확인하였으나, 두 균주 모두의 생장률이 높은 조건을 선택하기 위해, 두 균주가 유사한 성장률을 나타낸 pH 7.2를 배양 조건으로 확립하였다.

[0066] 각 균주에 대해 하이그로마이신(hygromycin) 저항성 돌연변이체(플라스미드 pIJJ10257) 및 아프라마이신(apramycin) 저항성 돌연변이체(플라스미드 pSET152)를 각각 제작하여 사용하였다. 이후, 상기 확립된 배양 조건을 이용하여, OD_{600} 0.2로 제조된 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S8과 스트렙토마이세스 글로비스포러스(*Streptomyces globisporus*) SP6C4 각각 5 mL을 1L 플라스크에 접종하고 28℃에서 150 rpm으로 7일간 배양한 후, 배양액 1 mL 당 존재하는 생균수를 측정하였다.

[0067] 그 결과를 도 3에 도시하였다.

[0068] 이로부터, 스케일 업을 위해 1L 플라스크에서 배양한 결과, 각각 하이그로마이신(hygromycin) 및 아프라마이신(apramycin)에 저항성을 나타내는 두 돌연변이체는 생균수가 10^7 cfu/mL 이상을 나타내어, 동시 배양이 가능한 것을 확인하였다.

[0070] **1-3. 액체 배지에서 동시 배양된 혼합 스트렙토마이시스 배액의 항균 활성**

[0071] 액체 배지에서 동시 배양된 스트렙토마이세스(*Streptomyces*) 2 종의 항균 활성 측정을 위해, PDK (1L당 펩톤 10g, 포테이토 덱스트로스 10g, 한천 20g) 배지에서 대치 배양하였다.

[0072] 수득한 2 종의 스트렙토마이세스 혼합 배양액 10 μL을 8mm 필터 디스크에 접종한 후, 28℃에서 3일간 정치배양하였다. 이후, 탄저병원균 및 뿌리썩음 병원균을 각각 접종한 후 항균 활성 여부를 평가하였다.

[0073] 그 결과를 도 4에 도시하였다.

[0074] 이로부터, 동시 배양된 스트렙토마이세스 2 종은 항균 활성을 보존하고 있음을 확인하였다.

실 시 예 2

[0076] **스트렙토마이세스 속 (*Streptomyces* sp.) S8 및 스트렙토마이세스 글로비스포러스(*Streptomyces globisporus*) SP6C4의 콩 지상부 및 지하부 병원균에 대한 항진균 활성**

[0077] 본 발명자는 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S8 및 스트렙토마이세스 글로비스포러스(*Streptomyces globisporus*) SP6C4가 콩에서 발생하는 지상부 탄저병을 유발하는 병원균인 콜렉토트리쿰 트룬카툼(*Collectotrichum truncatum*)과 지하부 뿌리 썩음병을 유발하는 병원균인 푸사리움 속(*Fusarium* sp.)에 대해 항진균 활성을 나타내는지를 대치 배양을 통해 이하 방법으로 측정하였다.

[0078] 먼저, 두 스트렙토마이세스 균주의 단일 콜로니를 각각 MS(1L당 만니톨 20g, 콩(soya) 20g 및 한천 20g) 배지에 네 방향으로 스트리킹(streaking)한 후, 28℃에서 5일간 정치 배양하여 배지 전면에 균주를 배양하였다.

[0079] 이후, 1 mL의 별균수와 멸균솜(1cm x 1cm) 및 시린지(10 mL)를 이용하여, 포자현탁액을 제조하였다. PDK(1L당

펩톤 10g, 포테이토 덱스트로스 10g, 한천 20g) 배지에 제조된 포자현탁액 10 μL (OD_{600} 0.6)을 8㎜ 필터 디스크에 접종한 후, 3일 간 배양하여 대상 병원균을 치상하였다.

[0080] 항진균 활성은 배지 상에서 콩 병원균의 성장을 억제하는 정도를 수치로 환산하였다.

[0081] 그 결과를 도 5에 도시하였다.

[0082] 이로부터, 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) S8 및 스트렙토마이세스 글로비스포러스(*Streptomyces globisporus*) SP6C4 모두 콩 탄저병 유발 병원균인 콜렉토트리쿰 트룬카툼(*Collectotrichum truncatum*)과 콩 뿌리 썩음병을 유발하는 병원균인 푸사리움 속(*Fusarium* sp.)에 대해 항진균 활성을 나타냈으며, 탄저병 유발 원인균에 대해서는 두 균주 모두 통계적으로 유의적인 차이가 없는 60% 이상의 억제율을 나타내었고, 뿌리 썩음병 유발 원인균에 대해서는 각각 30% 및 38%의 항진균 활성을 나타내는 것을 확인하였다.

실 시 예 3

[0084] **스트렙토마이세스 속 (*Streptomyces* sp.) S8 및 스트렙토마이세스 글로비스포러스(*Streptomyces globisporus*) SP6C4의 작물에 대한 방제 효과**

[0085] 상기 실시예에서 대치 배양을 통해 확인한 항진균 활성에 대해, 콩을 생육하여 식물체 상에서도 동등한 효과가 나타나는지 확인하였다.

[0086] **3.1 방제용 미생물 제제의 제조 및 살포**

[0087] 상기 실시예의 배양 방법을 통해 배양한 스트렙토마이세스 속 (*Streptomyces* sp.) S8 및 스트렙토마이세스 글로비스포러스(*Streptomyces globisporus*) SP6C4에 대해 10^6 cfu/mL에 대해 0.1% (v/v)의 카르복시메틸 셀룰로오스를 혼합하여 방제용 제제를 제조한 후, 방제 효과 측정에 사용하였다.

[0088] 콩 지상부 탄저병 방제 효과 측정을 위해, 식물체 1 개체 당 5mL의 방제용 제제를 엽면 살포 방식으로 살포하였고, 콩 지하부 뿌리썩음병 방제 효과 측정을 위해, 식물체 1 개체 당 뿌리 주위에 10mL의 방제용 제제를 살포하였다.

[0089] **3.2 군집화 능력 검증**

[0090] 스트렙토마이세스 속 (*Streptomyces* sp.) S8 및 스트렙토마이세스 글로비스포러스(*Streptomyces globisporus*) SP6C4의 콩 잎과 뿌리 근권에서 군집화 능력을 검증하기 위해, 잎과 뿌리 시료 각 1 g을 멸균수 9mL에 넣고 30초간 볼텍싱(vortexing)한 다음 10^{-1} ~ 10^{-9}까지 희석 도말법으로 생균수를 검증하였다.

[0091] 이 때, 탄저병 발생도는 잎에 발생한 반점 및 괴사된 조직의 면적을 기준으로 하여, 하기표 1의 질병지수(Disease index, DI)를 평가 지표로 하여 측정하였고, 뿌리썩음병 발생도는 뿌리의 괴사 정도를 기준으로 질병지수(Disease index,DI)를 평가 지표로 하여, 발병도를 산출한 후 통계 처리하였다.

표 1

[0093] 발생도 평가 지표

질병 지수(DI, Disease Index)	탄저병 발생도 (%)	뿌리썩음병 발생도 (%)
0	증상 없음	증상 없음
1	~10	~20
2	10 초과~15	20 초과~50
3	15 초과~20	50 초과
4	20 초과	식물 죽음

[0094] 그 결과를 도 6 내지 도 8에 도시하였다.

[0095] 이로부터, 군집화 능력 검증 결과, 병원균의 유무와 관계없이 스트렙토마이세스 속 (*Streptomyces* sp.) S8 및

스트렙토마이세스 글로비스포러스(*Streptomyces globisporus*) SP6C4는 잎 또는 뿌리 근권에서 모두 10^7 cfu/g 이상의 생균수를 나타내는 것을 확인하였다(도 6 참조).

[0096] 또한, 콩 탄저병 방제능력 검증에서는 스트렙토마이세스 글로비스포러스(*Streptomyces globisporus*) SP6C4는 질병 지수 2.5를 나타내었고, 스트렙토마이세스 속 (*Streptomyces* sp.) S8은 질병 지수 1 미만으로, 발병 억제 능력이 현저히 높은 것을 확인하였다.

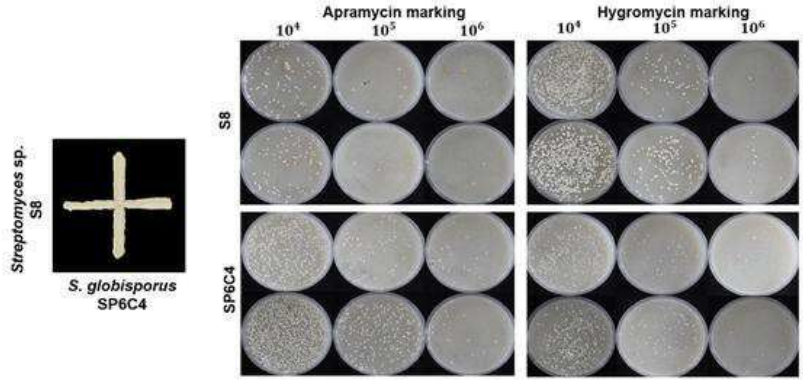
[0097] 콩 뿌리썩음병의 경우 스트렙토마이세스 속 S8은 질병 지수 2.5를 나타내었고, 스트렙토마이세스 글로비스포러스 SP6C4는 질병 지수 1로 발병 억제 능력이 현저히 높은 것을 확인하였다(도 7 참조).

[0098] 상기 결과로부터, 콩 지상부 탄저병에는 스트렙토마이세스 속 (*Streptomyces* sp.) S8 균주가, 콩 지하부 뿌리썩음병에는 스트렙토마이세스 글로비스포러스(*Streptomyces globisporus*) SP6C4가 각각 상대적으로 현저히 높은 발병 억제 능력을 나타내는 것을 확인하였으며, 비기주 식물인 콩에서도 병발생 억제가 가능한 것을 새롭게 확인하여 본 발명을 완성하였다(도 8 참조).

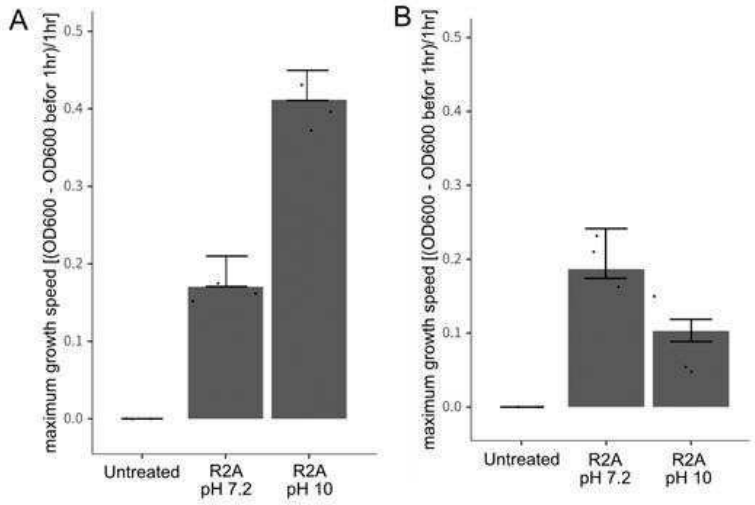
[0100] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

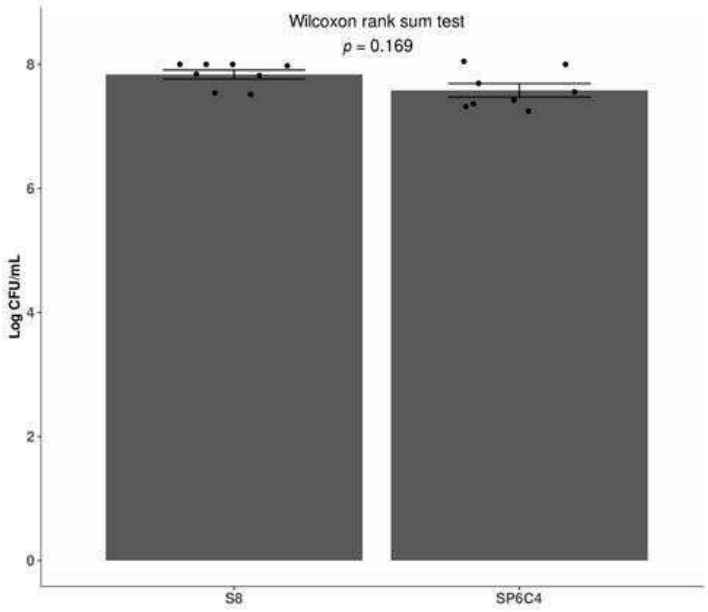
도면1



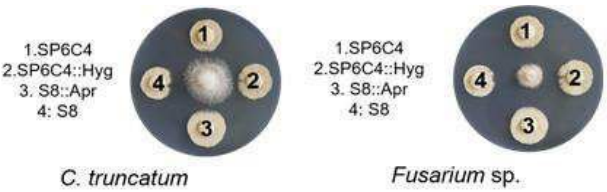
도면2


A
B
maximum growth speed [(OD600 - OD600 befor 1hr)/1hr]
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
Untreated
R2A pH 7.2
R2A pH 10

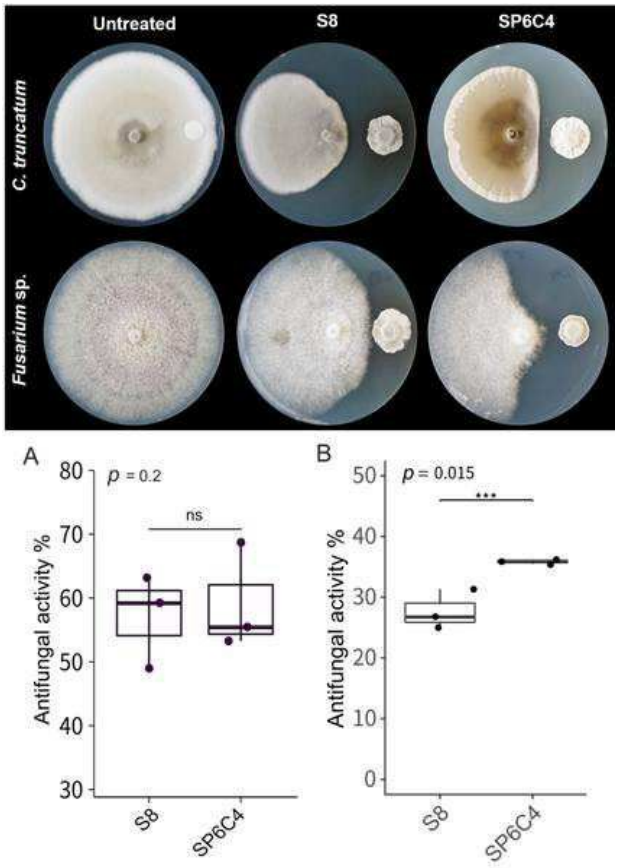
도면3


Wilcoxon rank sum test
p = 0.169
Log CFU/mL
0
2
4
6
8
S8
SP6C4

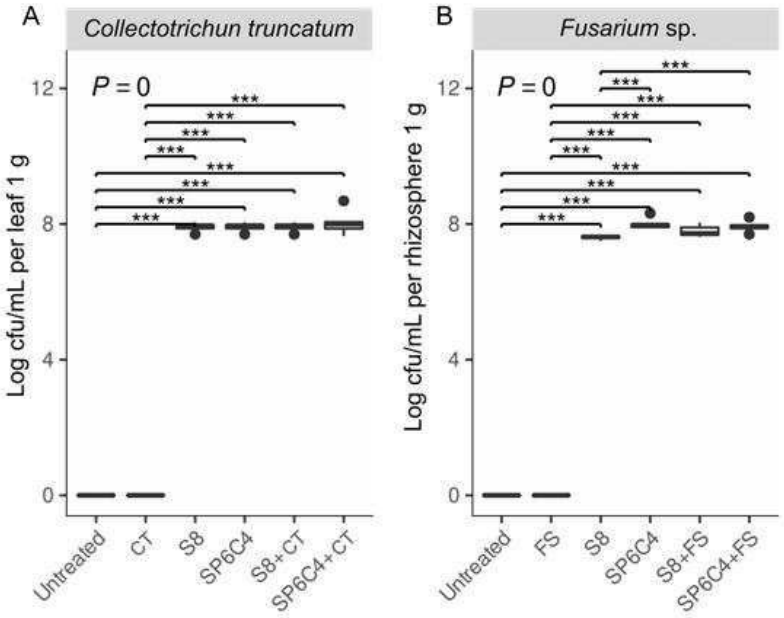
도면4


1.SP6C4
2.SP6C4::Hyg
3. S8::Apr
4: S8
C. truncatum
1.SP6C4
2.SP6C4::Hyg
3. S8::Apr
4: S8
Fusarium sp.

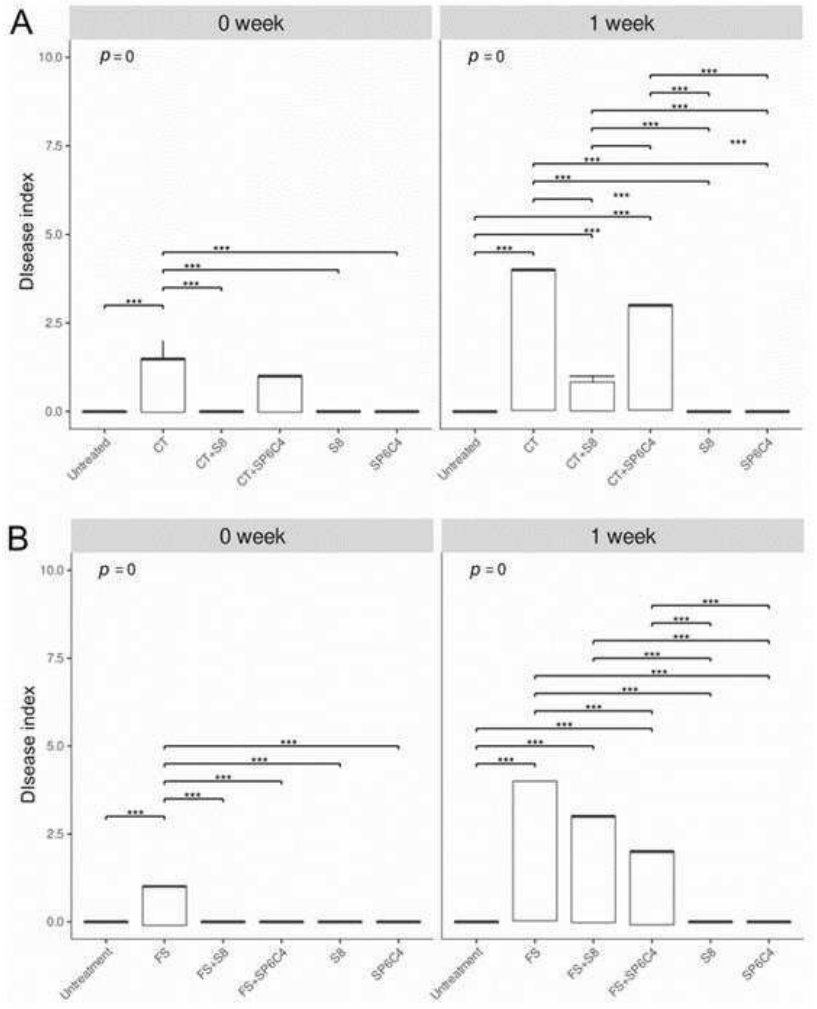
도면5


Untreated
S8
SP6C4
C. truncatum
Fusarium sp.
A
p = 0.2
ns
Antifungal activity %
S8
SP6C4
B
p = 0.015
***
Antifungal activity %
S8
SP6C4

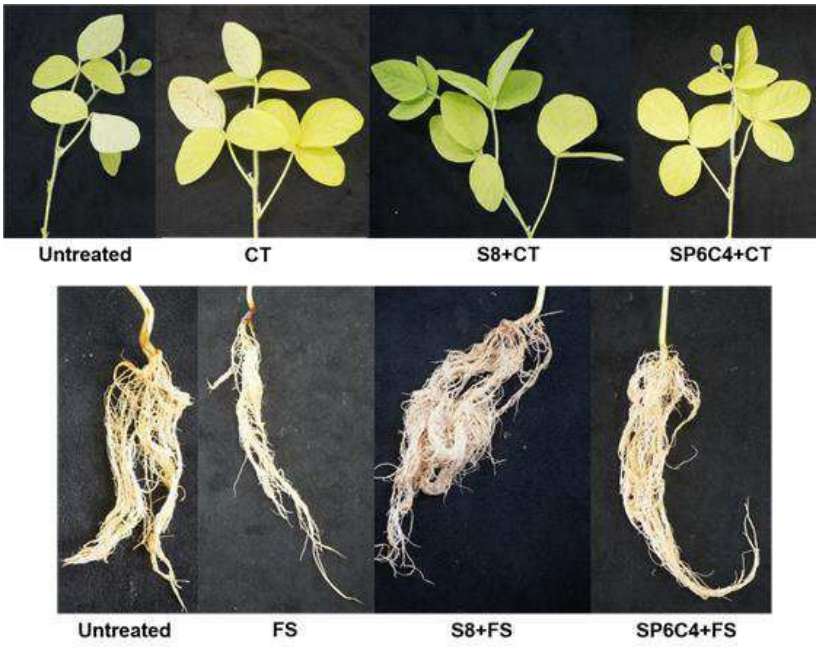
도면6


A
Collectotrichun truncatum
P = 0
Log cfu/mL per leaf 1 g
Untreated
CT
S8
SP6C4
S8+CT
SP6C4+CT
B
Fusarium sp.
P = 0
Log cfu/mL per rhizosphere 1 g
Untreated
FS
S8
SP6C4
S8+FS
SP6C4+FS

도면7


A
0 week
1 week
p = 0
p = 0
Disease index
10.0
7.5
5.0
2.5
0.0
***
Untreated
CT
CT+S8
CT+SP6C4
S8
SP6C4
B
0 week
1 week
p = 0
p = 0
Disease index
Untreatment
FS
FS+S8
FS+SP6C4
S8
SP6C4

도면8


Untreated
CT
S8+CT
SP6C4+CT
Untreated
FS
S8+FS
SP6C4+FS