(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0120748
(43) 공개일자 2011년11월04일

(51) Int. Cl.
C12N 1/20 (2006.01) *A01N 63/02* (2006.01)
C12R 1/07 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0040303
(22) 출원일자 2010년04월29일
심사청구일자 2010년04월29일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전 유성구 궁동 220 충남대학교
(72) 발명자
김홍기
충청남도 공주시 교동 대우아파트 104동 502호
이동국
대전광역시 유성구 궁동 충남대학교 농대 1호관 1419호
남명현
충청남도 논산시 부적면 마구평리 충남농업기술원 논산딸기시험장
(74) 대리인
김지형

전체 청구항 수 : 총 7 항

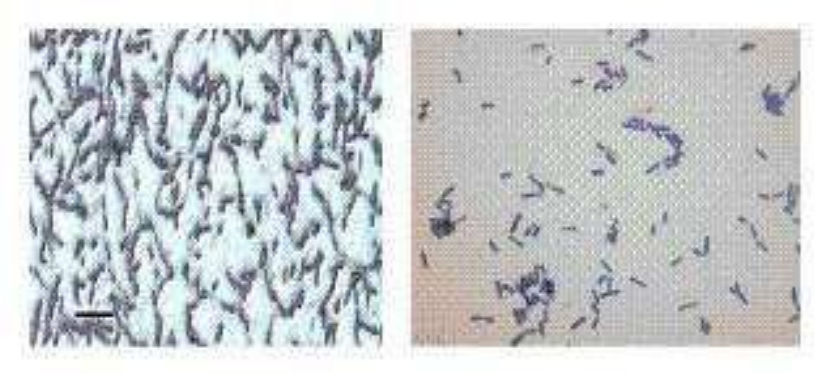
(54) 신규한 미생물 바실러스 아밀로리큐파션스 씨피 1 및 이를 이용한 딸기 탄저병균의 방제방법

(57) 요 약

본 발명은 딸기 탄저병균에 대한 항진균 활성 효과를 갖는 바실러스 아밀로리큐파션스 씨피1(*Bacillus amyloliquefaciens* CP1, 수탁번호: KCTC 11676BP)에 관한 것이다. 본 발명은 딸기의 탄저병에 항진균성을 가지며 병원성이 없는 바실러스 아밀로리큐파션스 씨피1(*Bacillus amyloliquefaciens* CP1)를 건강한 딸기 식물체로부터 분리 동정하여 고정하고 바실러스 아밀로리큐파션스 씨피1 균주를 배양하여 생물학적 방제제로서의 활용된다.

특히 바실러스 아밀로리큐파션스 씨피1 균주의 신규한 대사산물 이투린 에이2(iturin A2)는 항진균성 활성물질로 딸기의 탄저병 등 병원균 균사생장을 억제함으로써 딸기의 탄저병에 탁월한 효과가 있다.

대 표 도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

딸기 탄저병균에 대한 항진균 활성 효과를 갖는 바실러스 아밀로리큐파션스 씨피1(*Bacillus amyloliquefaciens* CP1)(수탁번호: KCTC 11676BP)

청구항 2

제1항에 있어서,

딸기 탄저병균은 코레토트리쿰(Colletotrichum gloeosporioides) 병균인 것을 특징으로 하는 바실러스 아밀로리큐파션스 씨피1(*Bacillus amyloliquefaciens* CP1)

청구항 3

제1항 또는 제2항의 바실러스 아밀로리큐파션스 씨피(Bacillus amyloliquefaciens CP1) 배양물을 이용하여 딸기의 탄저병균을 방제하는 방법.

청구항 4

제1항 또는 제2항의 바실러스 아밀로리큐파션스 씨피(Bacillus amyloliquefaciens CP1) 배양물을 이용하여 딸기의 흰가루병을 방제하는 방법.

청구항 5

제3항에 있어서 바실러스 아밀로리큐파션스 씨피(Bacillus amyloliquefaciens CP1) 배양물은 10~50℃의 온도에서 대량배양하여 딸기의 탄저병균을 방제하는 방법.

청구항 6

제3항에 있어서 바실러스 아밀로리큐파션스 씨피(Bacillus amyloliquefaciens CP1) 배양물은 pH 5~8의 범위에서 대량배양하여 딸기의 탄저병균을 방제하는 방법.

청구항 7

제1항 또는 제2항의 바실러스 아밀로리큐파션스 씨피(Bacillus amyloliquefaciens CP1) 배양액을 1/10 내지 1/2000의 비율로 희석하여 딸기에 처리하는 것을 특징으로 하는 딸기의 생장활성을 촉진하는 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 딸기(Strawberry)는 장미과의 영년생 작물로서 다양한 토양과 환경에서 잘 자라 아프리카, 아시아 및 유럽 뿐만 아니라 북아메리카, 오세아니아 등지에 널리 분포되어 있다. 요즘 많이 재배되는 딸기 품종으로는 설향, 매향, 장희, 육보 등이 있으며, 국내 전체 채소생산액의 9%를 차지하는 중요한 작물이다. 딸기 재배는 생산성과 상품성이 높은 시설재배 위주로 이루어지며 고소득 농작물로써 인기가 높다. 하지만 이러한 시설재배로 인하여 연작

에 따른 작물 생육 환경이 열악한 경우가 많으며 병원균의 밀도가 높아져 병 발생도 많은 편이다.

[0002] 현재 국내에 보고되어 있는 딸기 병해는 약 30여 종이 알려져 있으며 주요 병증으로는 흰가루병, 시들음병, 탄저병, 잿빛곰팡이병 등이 있고 이들 병 중 토양전염 또는 수매전반하는 탄저병의 피해가 심각하다.

배 경 기 술

[0003] 딸기 탄저병은 주로 장마기에 수매전반에 의해 전염하고 경엽이 젖어 있는 시간이 길수록 용이하게 침입하며 토양수분이 높을수록 심하게 발병한다. 자낭각이 토양에 존재하고 연작 재배시 많이 발생하여 방제가 매우 힘들다. 또한 병든 식물의 잔재는 탄저병의 중요한 제 1차 전염원이 되어 과실보다는 포복지나 관부 등 식물체 유묘기에 모주와 자묘에 시들음과 고사를 일으키고 이미 감염된 식물은 정식 후에도 고사가 진행되어 결주가 되기 때문에 탄저병으로 인한 딸기의 피해가 심각한 편이다.

[0004] 국내에서의 딸기 탄저병의 일반적 방제법은 하우스 내 육묘나 고설재배 등의 재배적 방제와 화학적 방제를 많이 사용하는 실정이다. 그러나 토양전염 또는 수매전반하는 탄저병균의 특성상 효과적인 방제는 매우 어려운 실정이다. 화학적 방제는 치료보다 예방적으로 처리하였을 때 효과가 더 우수하며 국내에 고시된 약제는 dithianon, carbendazim, chlorothalonil, azoxystrobin, mancozeb 등이 있다. 하지만 탄저병과 같은 토양병해는 방제가 매우 까다로우며 이들 화학농약은 생태계의 파괴 및 환경오염, 농약의 잔류독성 등의 큰 문제점으로 인해 농민과 소비자로 하여금 안전한 방제수단을 필요로 하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 상기와 같은 종래기술의 문제점을 해결하고자 본 발명은 딸기 탄저병을 발병시키는 병원균인 코레토트리쿰에 주목하고, 이 병원균의 균사생장 및 포자발아 억제 활성을 가지는 대사산물을 생산할 수 있는 바실러스 아밀로리큐파션스 씨피1 (*Bacillus amyloliuefaciens* CP1)균주를 선발하고 이를 이용한 딸기 탄저병의 방제방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0006] 본 발명은 다른 목적은 바실러스 아밀로리큐파션스 CP1 균주를 친환경 농자재로 사용하여 딸기에 발병하는 탄저병을 감소시키는 동시에 현재 사용되고 있는 유기합성 농약의 폐해성을 감소시키고 종국적으로는 딸기의 상품성 및 생산성을 증대시키기 위함이다.

과제의 해결 수단

[0007] 화학농약의 대체 수단으로 미생물 자체 또는 미생물이 생산하는 2차 대사산물을 이용하려는 생물농약의 개발 연구는 1980년대 이후 그 중요성이 인식되기 시작되어 오늘날에 이르기까지 많은 관심이 집중되었고 그 결과 효과적인 방제 가능성이 밝혀져 이후 우수한 많은 업적이 이루어져있다. 그 예로 *Pseudomonas* sp., *Streptomyces* sp., *Gliocladium virens*, *Trichoderma* spp. 등이 있다. 따라서 효과적인 길항균을 분리하여 환경오염이 적고 지속적인 살균효과를 유지할 수 있는 무공해 길항미생물 선발과 개량을 통한 제품화는 매우 시급한 문제라 할 수 있다.

[0008] 이러한 *Bacillus*속의 세균이 생산하는 항진균성 항생물질은 mycosubtilin, eumycin, bacillomycin, surfactin 및 iturin류의 cyclic polypeptide, zwittermicin 같은 aminopolyol 물질, lipoprotein 등 10여 종류가 알려져 있으며, *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. polymixa*, *B. amyloliquefaciens*, *B. thuringiensis* 등이 대표적으로 이용되는 균주이다.

[0009] 따라서 본 발명에서는 길항균으로써 이제까지 작물병의 생물학적 방제에 널리 사용되어 온 세균 중 가장 안정성이 높은 *Bacillus amyloliquefaciens*를 건전한 딸기 식물체 내에서 분리하였으며, 딸기의 주요 병원균 *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora cactorum*에 대한 길항작용을 확인하여 높은 내생균을 선발하였다. 이를 이용해서 식물생장 촉진효과와 함께 최근 딸기 육묘시 가장 큰 피해를 주는 탄저병을 대상으로 병 방제효과를 입증함으로써 농민들에게 실질적으로 도움을 줄 수 있는 환경

친화적인 생물학적 방제방법을 개발하고자 하였다.

발명의 효과

[0010] 본 발명은 생물학적 방제에 이용되고 있는 세균 중 *Bacillus*속으로 대표되는 식물 내생세균은 식물의 종자와 배주, 과실, 줄기, 뿌리 및 괴경을 포함하는 식물의 조직 속 즉, 도관조직과 피층조직에 집락화되어 있으나 병을 일으키지 않으며 식물의 병저항성을 증대시키고 생장촉진 효과가 있어 생물학적 방제에 많이 이용되고 있다.

[0011] 생물학적 방제제용 미생물로 각광받고 있는 *Bacillus* 속에 대해서는 1940년대부터 효소생산을 위한 연구가 많이 진행되어 왔으나 최근에는 식물병 방제 및 식물생장 촉진 관련 연구가 많이 진행되고 있다. 항균성 물질이나 독성물질을 세포 밖으로 분비하여 병원성 진균에 대해 길항작용을 나타내는 것으로 보고되어 있다. 또한 열, 건조, pH, 햇빛 등의 자극에 견디는 능력이 탁월하여 작물 재배포장 및 자연계에서 쉽게 사멸되지 않으며 또한 내생포자를 형성하여 오랫동안 살아남을 수 있어서 균 자체를 이용한 분제, 수화제, 유제 등의 제제화에도 유리하다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 바실러스 아밀로리큐파션스 씨피1 균주(CP1)를 그람염색한 후의 광학현미경 사진

도 2는 바실러스 아밀로리큐파션스 씨피1 균주(CP1)의 주사전자현미경 사진

도 3은 바실러스 아밀로리큐파션스 씨피1 균주(CP1)의 항균기작을 보여주는 사진

도 4는 바실러스 아밀로리큐파션스 씨피1 균주(CP1)의 대사산물에 의해 균사생장 및 포자발아가 억제된 효과를 나타내는 사진

도 5는 딸기를 포트에 재배한 후 바실러스 아밀로리큐파션스 씨피1 균주(CP1)의 균 현탁액과 배양여액을 각각 희석하여 처리했을 때 Control구의 발병률 사진

도 6은 노지포장에서 바실러스 아밀로리큐파션스 씨피1 균주(CP1)의 배양여액으로 딸기의 탄저병 방제 실험을 수행한 사진

도 7은 바실러스 아밀로리큐파션스 씨피1 균주(CP1)를 이용하여 딸기의 생장 촉진 효과를 보여주는 사진

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 본 발명은 딸기 탄저병에 대하여 항진균 활성을 가지는 신규한 미생물 바실러스 아밀로리큐파션스 CP1(수탁번호: KCTC 11676BP) 및 이를 이용한 딸기 탄저병균의 방제방법에 관한 것이다. 이하 실험예 및 도면을 인용하여 발명을 실시하기 위한 구체적인 기술구성에 대하여 설명하기로 한다.

[0014] 딸기의 주요 병해인 탄저병 방제용 유용 미생물을 선발하기 위해 재배중인 건전한 딸기 식물체를 구해 잎, 줄기, 뿌리 세 부위로 나누어 표면소독을 실시하였다.

[0015] 표면소독한 부위를 Nutrient agar (NA, Difco), DRBC agar (DRBC, Difco), Kings'B agar, V-8 juice agar, Potato Dextrose agar 배지에 각각 3개씩 절편을 올렸으며 30 항온기에서 24~48시간 배양한 후 분리되는 순서대로 배지의 알파벳 첫 자와 식물체의 3가지 부위를 표시하기 위해 잎(L), 줄기(S), 뿌리(R)를 붙이고 나오는 순서대로 번호를 부여하였다.

[0016] 배지에서 나온 세균의 단일 콜로니를 다시 Nutrient agar에 계대한 후 잿빛곰팡이병원균과 탄저병균에 대치배양을 실시하고 길항작용에 의한 저지원을 형성하는 세균을 재분리하였다. 재분리한 세균은 20% glycerol용액에 현탁하여 deep-freezer(-70℃)에 보관하였다.

[0017] 건전한 딸기 식물체를 뿌리, 줄기, 잎으로 나누어 내생세균을 분리한 결과 뿌리로부터 66균주, 줄기에서 35균주, 잎에서 17균주의 내생세균을 확보하였다. 이들 내생세균의 동정을 위해 콜로니의 색깔, 투명정도,

높이, 형태, 운동성, 그람염색 및 크기 등의 특징을 관찰하여 Bergey′ s Manual(1984)에 의거하여 *Bacillus* 그룹에 속하는 균주를 잠정 추정하였다.

[0018] 분리된 118개의 내생세균의 길항력을 검정하기 위하여 딸기 잿빛곰팡이병원균 및 탄저병균과 대치배양하고 7~10일 후 저지원의 크기가 20mm 이상인 것을 선발하였다. 그 결과 뿌리에서 분리된 세 균주(NR32, NR81, NR83), 줄기에서 선발된 균주는 한 균주(VS25), 잎에서 분리된 한 균주(KL78) 이들을 모두 형태적 특성에 의해 *Bacillus* 그룹으로 잠정 확인된 균주들이다.

[0019] 이들 5개의 균주 중 KL 78균주는 최대 2개월까지 저지원을 유지할 정도로 강한 항균활성을 유지하였고 병원균의 항균물질에 대한 저항성을 유도하지 않았음으로 이 균주를 최종적으로 선발하였다(표 1). 그리고 이 균주를 CP1이라 명명하였다.

표 1

[0020]

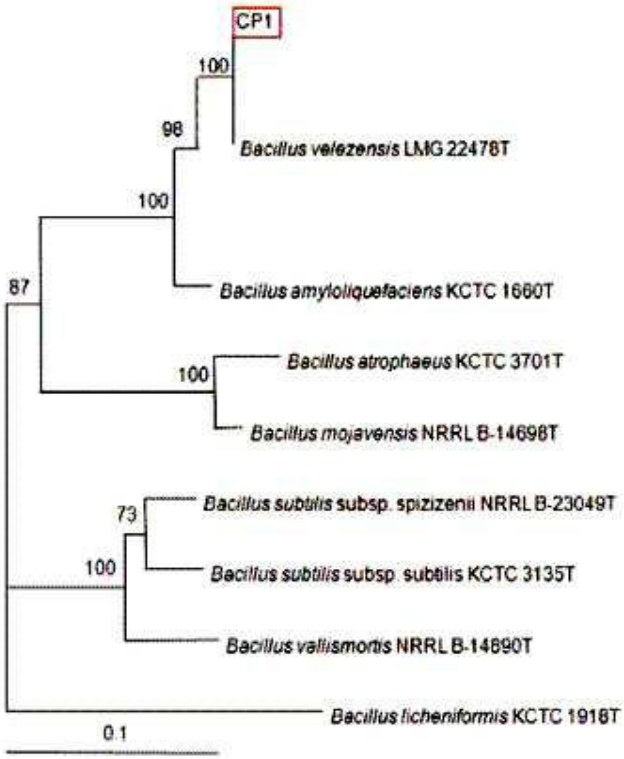
Isolate	Isolated point	Genus	Pathogens			
			B. cinerea		*C. gloeosporioides*	
			inhibition zone (mm)	Antifungal activity*	inhibition zone (mm)	Antifungal activity
NR32	Root	*Bacillus*	20.9	+++	20.1	+++
NR81			20.1	+++	22.1	+++
NR83			21.6	+++	21.3	+++
VS25	Stem		21.4	+++	20.4	+++
KL78	Leaf		20.5	+++	22.8	+++

[0021] CP1 균주의 16S rDNA를 분석한 결과 *Bacillus velezensis*와 99%의 유사도를 보였다(표 2).

[0022] Gyrase A 유전자의 염기서열을 바탕으로 한 Neighbour - joining tree에서 CP1 균주는 *B. velezensis* 와 100% 유사도를 보이며 한 그룹에 속하였다(표 3). 따라서 최근 연구동향에서 *B. velezensis*는 *B. amyloliquefaciens* 와 동종으로 보고된 바 있으므로 CP1를 최종적으로 *B. velezensis* 또는 *B. amyloliquefaciens* 로 동정하였다.

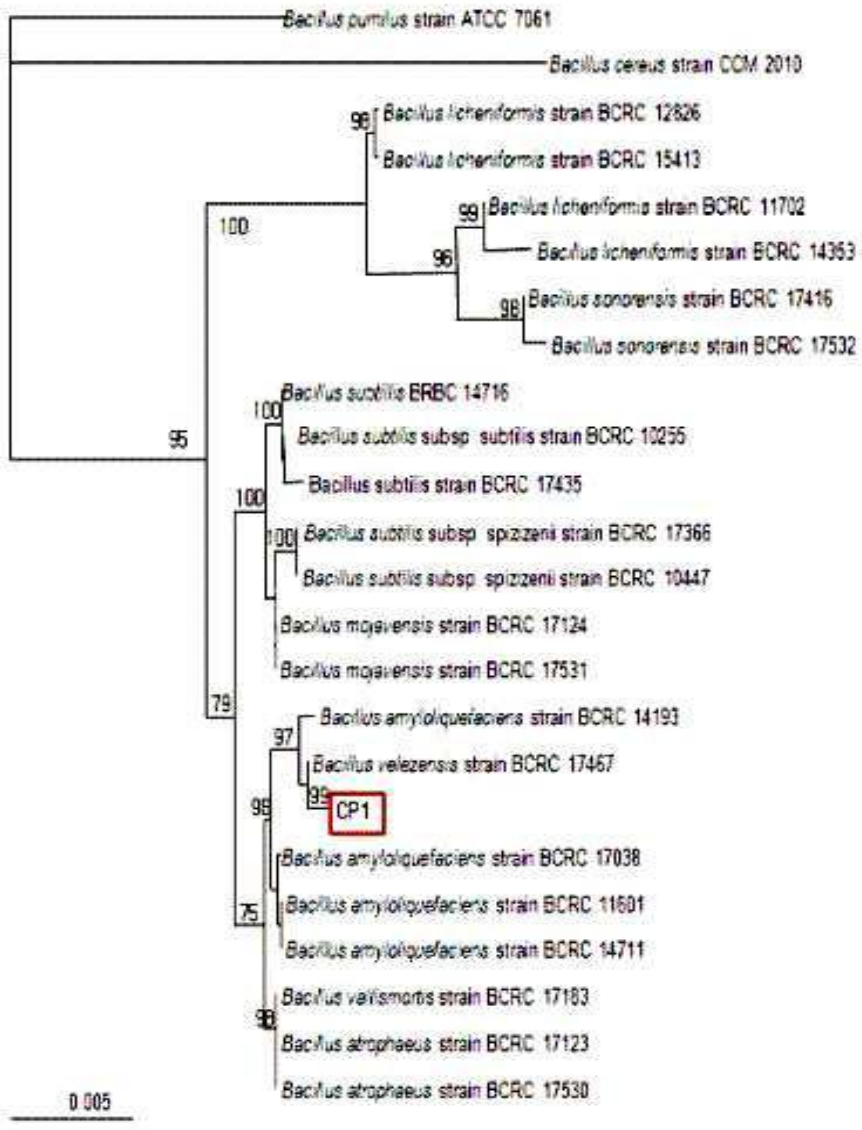
[0023] CP1 균주의 형태적 특성, API kit을 이용한 당 이용 패턴 및 16S rDNA 와 *gyr* Agene sequencing 등의 분석을 통해 최종적으로 *B. amyloliquefaciens* 으로 동정하였다.

표 2


CP1
100
98
Bacillus velezensis LMG 22478T
100
87
Bacillus amyloliquefaciens KCTC 1660T
100
Bacillus atrophaeus KCTC 3701T
Bacillus mojavensis NRRL B-14698T
73
Bacillus subtilis subsp. spizizenii NRRL B-23049T
100
Bacillus subtilis subsp. subtilis KCTC 3135T
Bacillus vallismortis NRRL B-14890T
Bacillus licheniformis KCTC 1918T
0.1

[0024]

표 3



[0025]

[0026] 동정결과 바실러스 아밀로리퀴파션스 씨피1(*Bacillus amyloliquefaciens* CP1)(수탁번호: KCTC 11676BP)의 형태적 특징 및 배양적 특성은 아래 표 4 및 표 5와 같은 특징을 나타냈다.

표 4

[0027]

형태적 특징	
형태	간상형
세포크기	0.5~1.0㎛
운동성	+
그람염색	+
포자형성	타원형
포자위치	중앙

표 5

[0028]

배양적 특성	
콜로니 형태	원형
콜로니 표면	매끄러움
콜로니 모서리	파상
콜로니 에리베이션	돌출
콜로니 흐림도	불투명면
콜로니 색깔	크림색
콜로니 광택성	빛나지 않음

[0029] 선발된 내생세균의 DNA를 추출하기 위해 바실러스 아밀로리큐파션스 씨피1(*Bacillus amyloliquefaciens* CP1) 균주를 LB 배지에 접종하여 배양균체를 Effendorf tube에 1㎖ 넣고 13,000rpm으로 원심분리하여 순수한 균체를 획득한 후 DNeasy Blood & Tissue Kit(QIAGEN. Cat. No. 69504)를 이용하여 DNA를 얻은 다음 이를 -20℃에서 보관하면서 사용하였다. 16S rDNA의 클로닝을 위해, Primer 5´-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3´ (Forward) 와 5´-ACGGGCGGGTGTGTRC-3´(Reverse)를 이용하여 PCR 증폭을 시행하였다.

[0030] PCR 증폭은 100ng의 template DNA, 0.5㎛의 primer, 0.2mM dNTPs, 10X Taq buffer(20mM magnesium이 포함된 10X Ex Taq buffer, Takara Co. Japan) 10㎕, Taq polymerase는 0.025U/㎕을 사용하여 95℃에서 30초, 55℃에서 30초의 annealing, 72℃에서 1분 30초의 신장으로 35cycle 반응하여 Biometra thermocycler(Tampa, Florida, USA)로 증폭시켰다. PCR 산물을 1% agarose gel 전기영동을 하여 확인하였다. 확인된 PCR 산물을 PCR Purification kit(Bioneer, Korea)를 이용하여 정제한 후, 정제된 PCR 산물을 T4 ligase를 이용하여 pGEM T-easy vector(Promega, Madison, WI, USA)에 ligation 하였으며 16s rDNA sequencing 통해 OK1-4와 OK1-6의 full sequence의 자료를 얻었다.

[0031] *gyr* A primer는 10pmol의 p-gyrA-f 와 p-gyrA-r primer, 10XTaq buffer, 10mM dNTP-Mix, 50Unit Taq 및 50ng의 template DNA를 첨가하여 최종 volume을 50㎛로 조정하였다. DNA 증폭은 initial denaturation을 94℃에서 5분간 실시하고 denaturation 40초(94℃), annealing 40초(55℃), extention 1분(72℃)으로 30 cycle을 실시한 뒤 final extension 72℃에서 15분간 실시하였다.

[0032] 균 동정 결과 바실러스 아밀로리큐파션스 씨피1(*Bacillus amyloliquefaciens* CP1)균과 계통수에서 유연관계에 있는 균주들의 딸기 주요 병원균인 *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora cactorum*에 대한 길항력을 비교하기 위해 KACC에서 *Bacillus amyloliquefaciens* ATCC 23843, *Bacillus velezensis* CCUG 50740균주를 분양받아 동일 조건에서 배양 후 항균활성을 비교 검토하였다.

[0033] 오이(Bacdadagi), 고추(Red Pepper) 및 딸기(Red fur)의 공시작물을 이용하여 CP1 균주의 길항력을 검정하였다.

[0034] 이때 PDA 평판배지를 멸균하여 식히고(50℃), 여기에 배양여액을 각각의 희석배수별로(10, 20, 40, 60, 80, 100, 1,000, 2,000배) 첨가하여 약제평판배지를 만들었다. 약제평판배지의 중앙에 7일 동안 배양한 4가지의 병원균의 균사 선단부로부터 떼어낸 직경 8mm의 균사조각을 올려놓고 25℃에서 배양한 후 균총의 직경을 조사하였다. 균사생장 억제율은 다음의 식으로 계산하였다.

$$\text{억제율}(\%) = \frac{\text{무처리구 균총직경(mm)} - \text{처리구의 총직경(mm)}}{\text{무처리구의 균총직경(mm)} - 8} \times 100$$

[0035]

[0036] 딸기의 탄저병균 포자를 멸균수에 현탁하여 최종 포자농도가 $1x10^6$/㎖이 되도록 조제하였다. 1.5㎖ tube에 PDB에 배양여액을 희석배수별로 넣었고, 포자현탁액을 100㎕씩 첨가한 후 28℃ 항온기에 배양하면서 3, 8, 12시간별로 시료를 채취한 후 광학현미경(×400)으로 포자발아 억제율 및 발아관의 길이를 조사하였다.

[0037] 배양액, 배양여액, 균체를 희석배수별로 분무 처리한 뒤 24시간 후에 탄저병균의 포자농도를 $1x10^6$spore/㎖ 분무 처리하여 이병과율로 방제가를 산출하였다. 노지재배 딸기에 배양여액과 대조약제인 Difenoconazole을 1주일 간격으로 3회 처리한 후 28일째 되는 날 이병주율로 방제값을 산출하였다.

[0038] 딸기 탄저병 방제 조사 실험에서 *Bacillus amyloliuefaciens* CP1 균주의 농도를 10^7 spore/㎖ 처리한 결과 딸기의 생장이 촉진됨을 관찰하여 주 1회씩 분무 살포한 후 4주차 때 잎의 면적, 줄기의 길이 등을 측정하여 조사하였다.

[0039] 분리한 내생균 *Bacillus amyloliuefaciens* CP1 균주의 배양액을 분무살포 한 후 식물체 안에 *Bacillus*속이 존재하는지 재검출하기 위해 잎, 줄기, 뿌리의 세부분을 표면소독 한 다음 Homogenizer(IKA, 25㎛)를 이용해 곱게 마쇄하고 입자가 균일한 채를 이용해 불순물을 걸러냈다. 이 후 *Bacillus* 선택배지(M.Y.P Agar base, OXOID)를 사용하여 희석배수별로(10^{-1} ~ 10^{-7}) 3반복 도말한 후 30℃ 배양기에서 1~2일 관찰하여 single spore colony를 세었다.

[0040] *Bacillus amyloliuefaciens* CP1균이 생산하는 항균물질은 주로 배양여액 중에 존재하며 유기용매에 따른 분획결정을 실시한 결과 부탄올층에서 강한 항균활성을 나타내었다. 항균활성 물질의 각 단계의 활성분획은 탄저병에 대한 항균활성으로 확인하였다. 먼저 항균물질의 생산을 위하여 *Bacillus amyloliuefaciens* CP1균을 Molasses broth에 접종하고 30℃에서 4일간 진탕배양한 후 배양액 4L를 1,000rpm으로 40분간 원심 분리하여 배양여액과 균체를 얻었다. 배양여액은 100% Acetone과 1:3 비율로 혼합하여 24시간 방치한 후 Rotary Evaporator를 이용하여 농축하였다. 4가지의 용매 분획에 의해 추출된 물질은 탄저병에 대한 항균활성을 통해 관찰하였다.

[0041] 배양여액은 pH 조절 없이 Diaion HP-20 resin에 통과시킨 후 50% 함수 메탄올로 세척하여 30% 함수 메탄올로 용출하였다. 활성을 보인 30% 함수 메탄올 분획을 감압농축 한 다음 동결 건조하여 연한 갈색의 분말을 획득하였다.

[0042] C18 Reverse column을 이용하여 항균물질을 분획에 따라 분리하였을 때 탄저병에 대해 항균활성을 보이는 분획을 확인하고 그 물질을 MALDI-TOF mass spectrum을 이용하여 분자량을 측정해 규명하였다.

[0043] 본 발명의 신규한 미생물 바실러스 아밀로리큐파션스 씨피1(*Bacillus amyloliquefaciens* CP1) (수탁번호: KCTC 11676BP) 균주의 대사산물인 항진균성 물질을 이투린 에이2(iturin A2)라 한다.

[0044] 바실러스 아밀로리큐파션스 씨피1 균주의 대사산물인 iturin A2를 공시작물(오이, 고추, 딸기)에 접종하여 생육억제, 이상생육 등을 나타나는지 관찰한 결과 무처리구와 동일한 양상을 보였다.

[0045] 따라서 본발명의 바실러스 아밀로리큐파션스 씨피1은 공시작물에 병해를 주지 않으면서 주요 병원균의 균사생장을 억제함으로써 생물학적 방제제로서 활용될 수 있음을 알게되었다.

[0046] 즉, Molasses 배지에서 *B. amyloliquefaciens* CP1을 배양하여 그 배양여액을 PDA 배지 상에 농도별로 혼합한 후 딸기의 4가지 주요병원균을 배양하여 균사생장 억제율을 조사한 결과 배양여액은 *B. cinerea, C. gloeosporioides*에 강한 균사생장 억제율을 보였다.

[0047] 또한 본발명의 바실러스 아밀로리큐파션스 씨피1 배양여액이 1/10 포함된 배지에서는 *B. cinerea, C. gloeosporioides* 대해 90% 이상의 균사생장 억제율을 보였고, 1/2000까지 희석되었을 때에도 그 효과는 현저히 줄어들지는 않았다.

[0048] 특히 탄저병균에 대해서는 1/2000 희석된 경우에도 72% 억제율을 보여 바실러스 아밀로리큐파션스 씨피1(Bacillus amyloliquefaciens CP1)이 딸기 탄저병균의 방제효과가 높았다. 또한 바실러스 아밀로리큐파션스 씨피1 배양액을 1/10 내지 1/2000의 비율로 희석하여 딸기에 처리하는 경우 딸기의 생육이 건강하고 생장에 활성을 보였다.

[0049] 균사생장 억제 효과조사 실험에서 바실러스 아밀로리큐파션스 씨피1 배양여액이 딸기의 4가지의 주요병원균 중 *B, cinerea, C. gloeosporioides*를 가장 크게 억제하였으며, *C. gloeosporioides*의 포자발아 억제율은 Control에 비해 발아관 길이와 포자발아율이 매우 낮았다. 10와 20배 희석 시에는 3, 8, 12시간 관찰한 결과 3시간째는 포자의 형태를 유지하며 탄저병의 모양을 그대로 유지한 상태였으며, 이 후 12시간부터는 포자가 거의 관찰되지

않았다. 이는 포자가 배양여액의 항균력에 용해되었기 때문이다.

[0050] 본 발명의 바실러스 아밀로리큐파션스 씨피1 균주는 딸기의 병 발생을 현저하게 감소시켜 주었으며, 딸기의 묘를 건강하게 자랄 수 있도록 식물 생장의 촉진효과가 있었다.

[0051] 딸기를 포트에 재배한 후 바실러스 아밀로리큐파션스 씨피1 균주의 균 현탁액과 배양여액을 각각 희석하여 처리했을 때 Control구의 발병률은 75%로 병 방제 효과가 있었다. *Bacillus amyloliuefaciens* CP1 균주의 배양여액을 10배, 20배 처리한 경우 70%이상의 높은 방제가를 보였으며 100배에서는 50%이하의 방제가를 보였다. 이는 균현탁액의 처리로 인해 균에 의해 점진적이지만 지속적으로 항균물질이 분비되기 때문이다.

[0052] 또한 *Bacillus amyloliquefaciens* CP1 균주의 식물생장 촉진효과도 있었다. 즉, 도 5에서와 같이 균 현탁액의 처리에 의해 잎의 면적과 줄기의 길이가 월등히 좋았다.

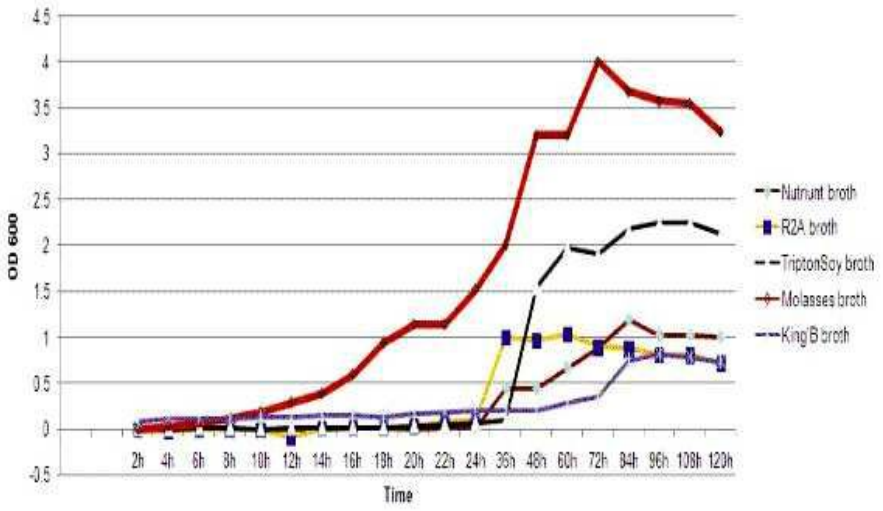
[0053] 노지포장에서 *Bacillus amyloliquefaciens* CP1 균주의 배양여액으로 딸기의 탄저병 방제 실험을 수행한 결과 92%의 높은 방제효과가 있었다. 따라서 CP1 균주의 2차 대사산물(iturin A2)은 화학농약을 대체할 수 있는 미생물농약으로 활용될 수 있을 것이다.

[0054] 또 상기 itruin A2는 탄저병 외에도 흰가루병이 뚜렷히 억제되었음을 알 수 있었다.

[0055] <실험예1> 배지의 배양조건에 따른 *Bacillus amyloliquefaciens* CP1 균주의 생장실험

[0056] CP1 균주의 대량배양을 위해 Nutient broth를 포함하여 주로 세균배양에 많이 쓰이고 있는 5가지 종류의 배지에서 *Bacillus amyloliquefaciens* CP1 균주를 동일한 조건으로 배양한 후, 시간대별로 흡광도(OD. 600nm)를 측정, 균체수를 확인하였다.

표 6



[0057]

[0058]

[0059] *Bacillus amyloliquefaciens* CP1 균주는 Molasses broth에서 배양하였을 때 가장 높은 항균활성을 보였으며, 상기 표6에서 보는바와 같이 *Bacillus amyloliquefaciens* CP1 균주는 Molasses broth 배지에서 증식이 가장 활발하여 *Bacillus amyloliquefaciens* CP1 균주의 대량배양에 적당한 배지이다.

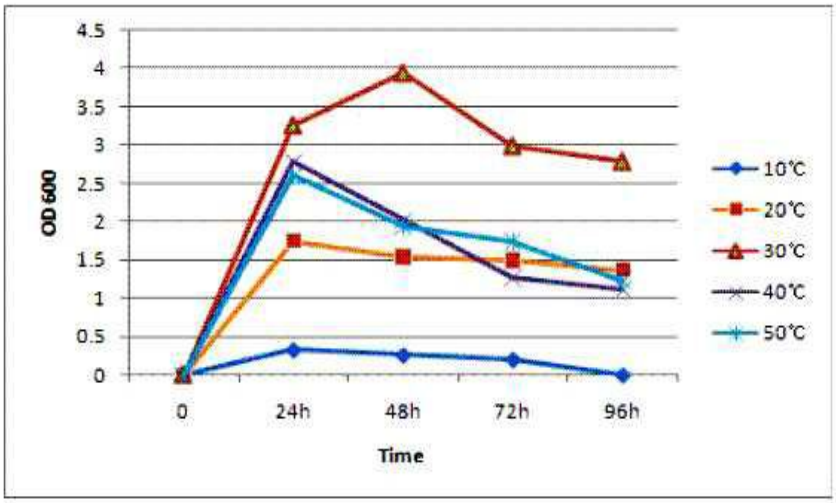
[0060] *Bacillus amyloliquefaciens* CP1균주는 배양 후 72시간이 지났을 때 최고 균체수를 보인 반면, *B. atrophaeus*는 24시간 때, *B. amyloliquefaciens*, *Burkholderia pyrrocinia*는 30시간 때 각각 최고밀도임이 측정되었다. 이렇게 다른 최고밀도의 균체수를 나타내는 것은 균주의 생리적인 특성뿐 아니라, 균체수를 측정하는 Spectrophotometer와 배양하는 배지의 종류, 접종원의 농도 및 용량 등이 다르기 때문이라 판단된다.

[0061] <실험예2> 배양온도에 따른 *Bacillus amyloliquefaciens* CP1 균주의 생장실험

[0062] 생육 적온의 조건 탐색은 500㎖ 삼각플라스크에 *Bacillus amyloliquefaciens* CP1 균주를 Molasses broth 배지에 접종하고 온도를 10℃씩 차이를 둔 Shacking incubator를 이용해 배양하였다. 배양을 실시하는 동안 흡광도(OD. 600nm)를 사용하여 균체수를 측정하였을 때 30℃에서 생육이 월등히 좋았다(표 7). 하지만 50℃에서는 30℃에서 배양하였을 때 보다 내생포자의 비율이 높았다. 이 점은 내생포자의 생성을 유도하여 생물학적 방제제로써의 이용가능성이 높다고 판단된다.

[0063] 일반적으로 *Bacillus*속 균주들이 포자 생성 시 Dipicolinic acid를 생성한다. 내생포자는 생물학적 방제제로 만들기에 매우 유용하지만 지금까지 알려진 *Bacillus*속 균주의 포자생성율을 증강시킬 수 있는 배지는 주로 crytstal toxin protein의 생성력 증가나 항생물질의 생산 증가 등 2차 대사산물의 생산증가를 위한 포자형성율을 높이기 위한 배지가 대부분이고 건조 포자체를 만들기 위한 배지는 전무한 상태이다.

표 7

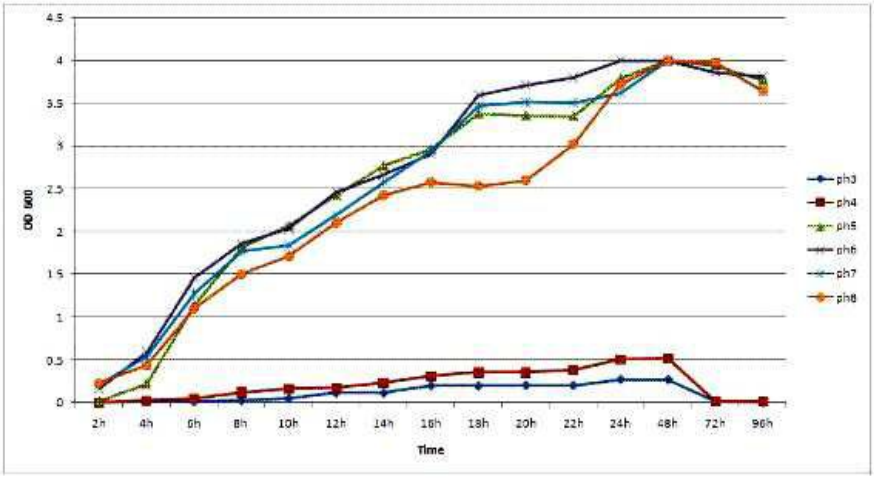


[0064]

[0065] <실험예3> pH에 따른 *Bacillus amyloliquefaciens* CP1 균주의 생장실험

[0066] 최적 배지 Molasses broth에 초기 pH를 달리하여 *Bacillus amyloliquefaciens* CP1 균주의 생장을 측정하였을 때 pH 5 ~ pH 8 까지 고루 잘 자랐으며(표 8) 특히 pH 6에서 가장 잘 자랐으며 또한 Generation Time이 가장 짧아 최적의 조건으로 선발하였다.

표 8



[0067]

[0068] <실험예4> 대량배양에 따른 *Bacillus amyloliquefaciens* CP1 균주의 생장실험

[0069] 대량배양은 최적화한 대량생산 통해 얻어진 길항미생물 배양액을 제형화할 때 생물학적 방제제로써 제조공정이 간단해지고 사용하기 쉬우며, 경제적인 제품을 생산할 수 있는 장점이 있어 위 실험에서 *Bacillus amyloliquefaciens* CP1 균주의 배양 최적 조건 배지: Molasses broth, 온도: 30℃, pH: 6 의 조건으로 Jar-fermenter(BIOTRON, LiFlis GX, 5L vessel)를 사용하여 4ℓ 대량배양을 실시한 결과 최종 균체의 농도가 3일째 되던 날 실 균체수가 최고 밀도가 되었으며 그 이후로 점점 사멸기에 이르렀다. 또한 항균활성은 4일째 되던 날 가장 강했다(표 9).

[0070] 주기적으로 오염여부를 판단하기 위해 그람염색을 실시하여 현미경으로 관찰하였으며 그람 양성에 간상형이 관찰되었으며 3일째 되던 날부터 곤봉형의 내생포자를 생성하기 시작하였다.

[0071] 한편, Jar-fermenter를 이용하여 *Bacillus*속, *Pseudomonas*속 균주 등 유용미생물을 대량배양 실시하는 데 있어 배지의 구성성분인 생장소, 무기염류, 질소원, 탄소원 등의 최적조건을 선발하고 실 균체수의 최고 밀도 및 항균활성 물질이 중요한 요소로 판단된다.

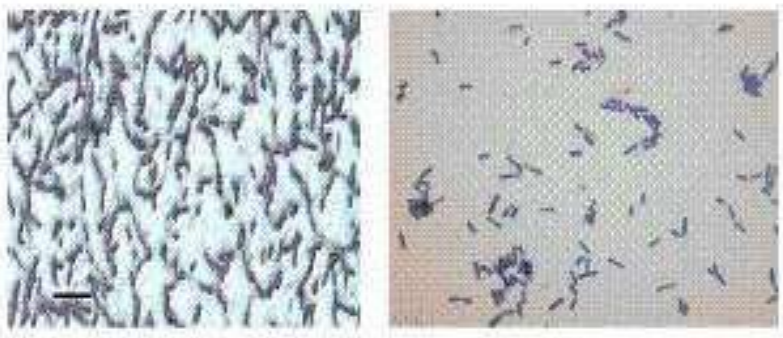
표 9

Culture time	OD600	pH	Vegetative cell	Antifungal activity (mm)				Gram-reation	현미경형태
				BC[a]	PC[b]	CG[c]	FO[d]		
0h	0	6.7	0	0	0	0	0		
24h	3.204	6.2	1.3×10^{7}	3.6	10	8.6	3	+	rod
48h	3.962	5.8	3.7×10^{8}	5.3	11	11.3	4.6	+	rod
72h	4.02	5.7	5.7×10^{10}	7.6	11.3	11	6	+	rod, clavate
96h	3.804	5.14	1.4×10^{9}	12	14.3	13	7.3	+	rod, clavate
120h	3.8	5.14	5.7×10^{8}	11.3	11.3	12	6	+	rod, clavate

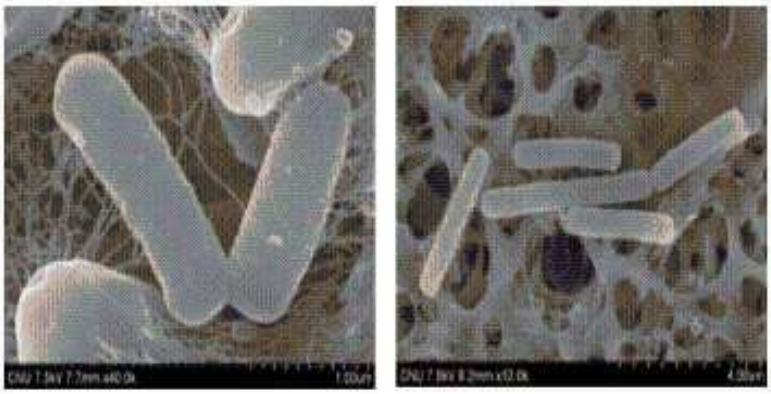
[0072]

도면

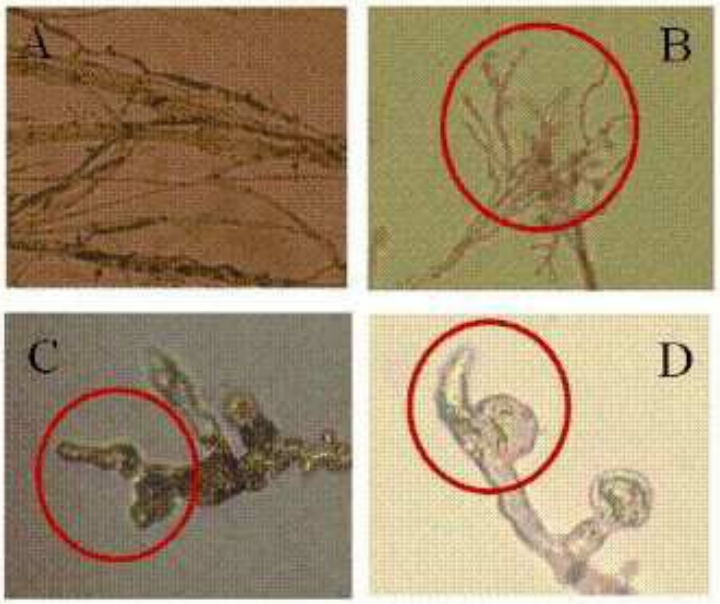
도면1



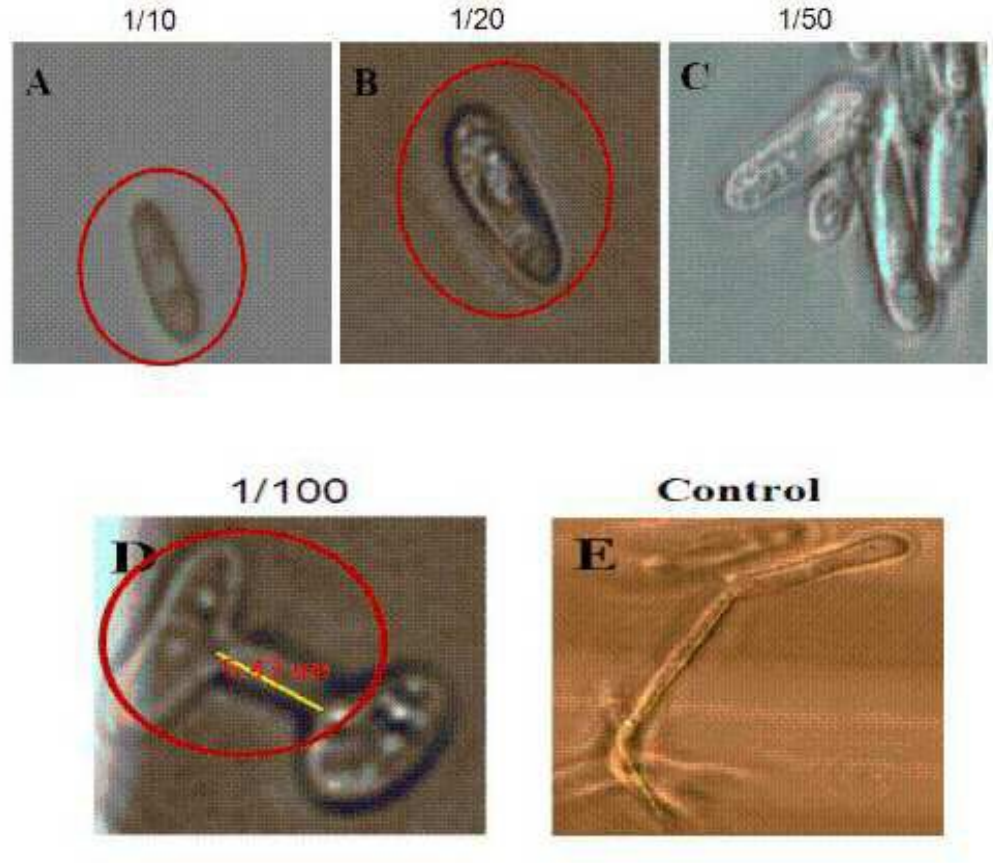
도면2



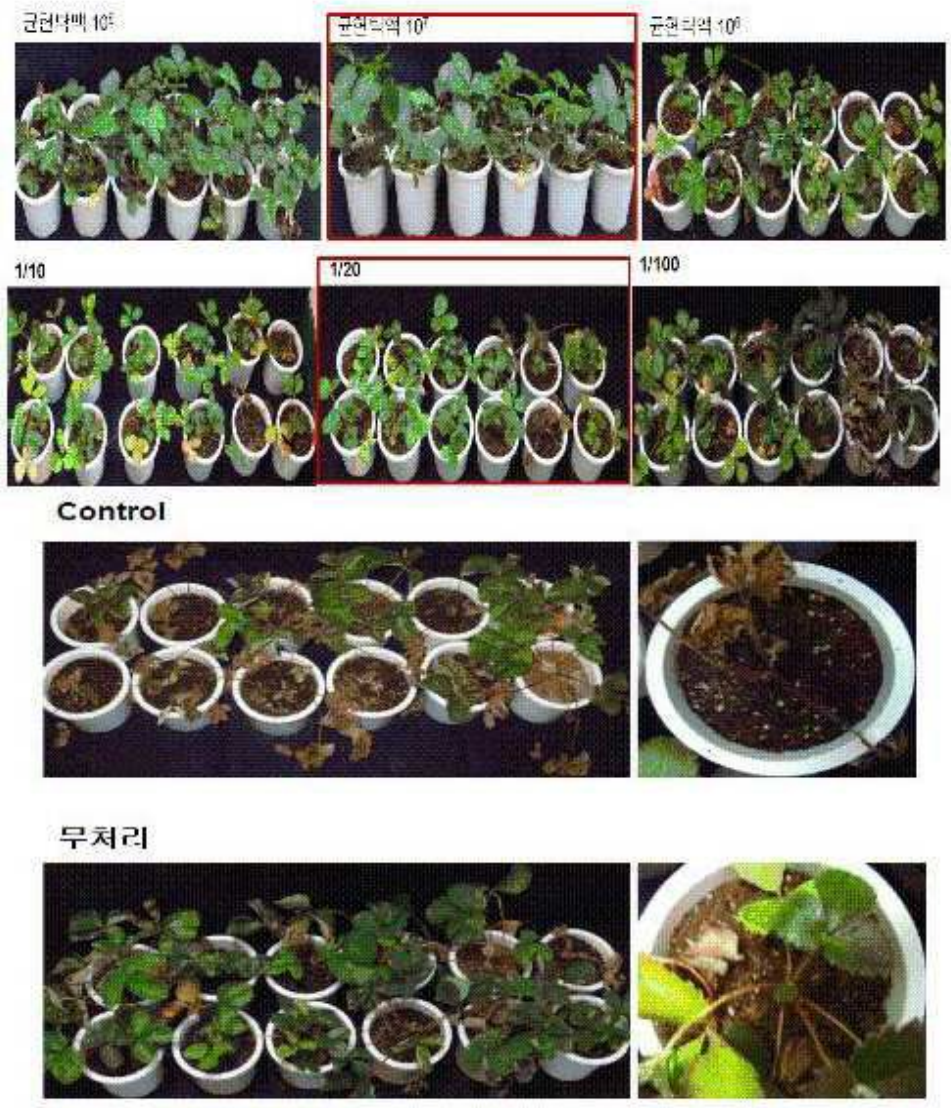
도면3



도면4



도면5



도면6



도면7

