



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0127670
(43) 공개일자 2014년11월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) A01N 63/02 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0046313
(22) 출원일자 2013년04월25일
심사청구일자 2013년04월25일

(71) 출원인
(주) 제일그린산업
경상남도 창원군 창녕읍 창녕공단길 30
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
정영륜
경남 진주시 진주대로815번길 11, 102동 502호 (주약동, 주약현대아파트)
모하마드토파잘호세인
방글라데시 하싸자리 비에이알1 사이언티픽 오피서
레저날 어그리컬츄럴 리서치 스테이션
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이숙열

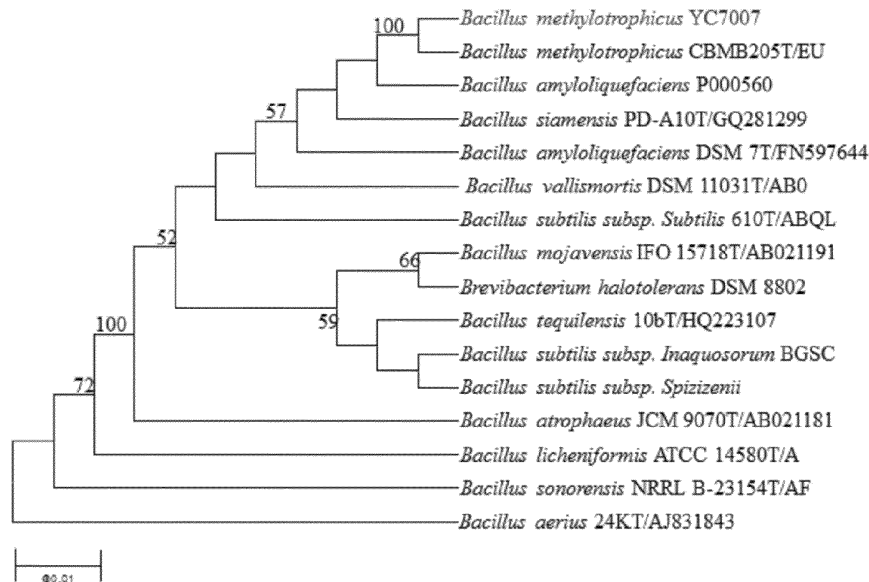
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 식물 내생세균 바실러스 메칠로트로피쿠스 YC7007 균주 및 이를 이용한 다기능 생물농약 및 미생물비료 개발

(57) 요약

식물 병원 진균 및 세균의 생육을 광범위하게 억제할 수 있고 동시에 기주 식물인 벼에 특이적으로 작용하여 병저항성 유도 및 식물생육 촉진 효과를 모두 갖는 다기능 식물 내생세균을 분리, 대량 배양하여 제제화 함으로써 미생물 비료 효율도 가진 새로운 형태의 생물 농약으로 이용될 수 있는 신균주가 개시된다. 본 발명은 식물 병원 진균 및 세균의 생육 억제, 식물 생육 촉진 및 기주의 식물병 저항성 유도 효과 모두를 갖는 바실러스 메칠로트로피쿠스(*Bacillus methylotrophicus*) YC7007 (수탁번호: KCCM11275P) 균주를 제공한다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

정유진

경남 진주시 술밭로 75, (상평동)

김근곤

경상남도 창원시 의창구 평산로 215번길 4-1

이정은

경남 진주시 초장로14번길 27, 104동 803호 (초전동, 초전1차푸르지오아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 808015-3-2

부처명 농림수산식품부

연구관리전문기관 그린바이오연구조합

연구사업명 차세대생물농약개발사업

연구과제명 길항 미생물을 이용한 식물병 방제용 차세대 미생물소재 개발

기 여 율 1/1

주관기관 (주)제일그린산업

연구기간 2010.06.01 ~ 2013.05.31

특허청구의 범위

청구항 1

식물병 저항성 유도 효능을 갖는 바실러스 메칠로트로피쿠스(*Bacillus methylotrophicus*) YC7007 (수탁번호: KCCM11275P) 균주.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 식물병은 벼 알마름병, 벼 흰잎마름병 및 벼 키다리병으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는 바실러스 메칠로트로피쿠스(*Bacillus methylotrophicus*) YC7007 (수탁번호: KCCM11275P) 균주.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 균주는 식물병원균 억제 효능 및 식물생육 촉진 효능을 더 갖는 것을 특징으로 하는 바실러스 메칠로트로피쿠스(*Bacillus methylotrophicus*) YC7007 (수탁번호: KCCM11275P) 균주.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 식물생육 촉진 효능은 벼에 대한 식물생육 촉진 효능인 것을 특징으로 하는 바실러스 메칠로트로피쿠스(*Bacillus methylotrophicus*) YC7007 (수탁번호: KCCM11275P) 균주.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 함유하는 비료용 및 생물농약용 미생물 제제.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 균주 또는 이의 배양액 중 상기 효능을 나타내는 생리활성 물질을 유효성분으로 함유하는 비료용 및 생물농약용 미생물 제제.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 식물 내생 미생물 균주 및 이를 함유한 미생물 제제에 관한 것으로, 보다 상세하게는 바실러스 메칠로트로피쿠스(*Bacillus methylotrophicus*) 신균주 및 이를 함유한 미생물 제제에 관한 것이다.

[0002] 본 발명은 2010년 농림수산식품부에서 지원하는 '차세대생물농약개발사업'의 일환으로 수행된 연구로부터 도출된 것이다.

[0003] [과제고유번호: 808015-3-2, 과제명: 길항 미생물을 이용한 식물병 방제용 차세대 미생물소재 개발(2010-2013)]

배경기술

[0004] 세계적으로 지난 수십여 년간 곡류, 채소, 과수 등 농작물의 수량을 증가시키기 위하여 해마다 많은 양의 화학비료와 병, 해충 및 잡초 방제를 위한 화학농약을 사용해 왔다. 이와 같은 지속적인 화학비료 및 농약 사용에 의하여 토양 산성화, 지력 손실, 환경오염과 생태계 파괴, 인축독성, 병해충 및 잡초의 농약에 대한 저항성 유발 등의 문제가 지속적으로 제기되고 있다.

[0005] 국내외에서는 이러한 문제들을 해결하기 위하여 화학 비료 및 농약의 사용량을 감축하고자 노력하고 있으며, 특히 우리나라에서는 1999년 최초로 친환경농업 육성법을 제정한 이후 현재까지 제3차 친환경농업 육성 정책을 추

진해오고 있다. 이 계획의 목표는 2015년까지 2011년 대비 약 15% 정도의 화학비료 및 농약 사용량을 감축하는 것이다. 이와 동시에 사회적으로는 생활수준 향상으로 인한 안전 식품에 대한 국민의 요구가 증가되고 있고, 농업 생산 환경 및 자연 생태계의 보존을 지향하는 유기농업이나 자연농법 등의 친환경농업이 급속히 확대되고 있어, 화학비료 및 농약을 대체할 수 있는 미생물을 이용한 비료 및 생물농약 개발에 대한 연구가 급격히 증가되고 있다. 이렇게 개발된 미생물 제품들은 특정 기능이 있는 미생물을 환경에서 선발하여 대량 배양 후 제제화하여 엽면 살포 또는 입체로 토양 처리함으로써 병해충을 방제하거나 미생물 비료로 이용되기도 한다(비특허문헌 1 참조).

[0006] 여기에 사용되는 미생물들은 토양, 식물근권, 해양 등 자연환경에 널리 분포되어 있으면서 그 종류가 다양하고 여러 종의 대사산물을 분비하기 때문에 친환경농업에 효과적으로 이용되고 있다. 미생물의 이용 방법으로는 크게 3가지로 나눌 수 있는데, 미생물 자체를 이용하는 방법, 미생물 발효에 의해 생산되는 대사 물질을 이용하는 방법, 새로운 농약 합성을 위한 선도 화합물로 미생물 대사 물질을 이용하는 방법 등이다. 이 중에서도 식물 병원균을 억제할 수 있는 길항 미생물, 식물 생육을 촉진시키는 식물생육 촉진 근권세균(PGPR) 및 식물 내생(endophytic) 미생물의 직접 사용에 의한 경우가 대부분이며, 특히 이들 미생물에 의한 식물병 저항성 연구가 많이 진행되고 있다.

[0007] 최근 10여년 간 여러 미생물 중에서도 식물 내생세균에 대한 연구가 국내외적으로 활발하게 이루어지고 있는데, 내생세균은 살아 있는 건강한 식물 조직 내에 살면서 식물에는 실질적인 해를 주지 않고 여러 가지 이점을 주는 세균으로 정의되고 있다. 일반적으로 식물 내생세균은 식물세포 사이의 공간이나 세포 내에 존재하기도 하며 직접·간접적으로 식물의 병해충, 스트레스에 대한 저항성을 유도하기도 하고 식물 성장에도 큰 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 보다 구체적으로는 내생세균은 질소 고정, 인산의 가용화, 철분 착화합 물질(siderophore) 생산, 활성 호르몬의 생성, 항균물질 생산 또는 식물의 병 저항성을 유도하여 병 감염을 방지하고 식물생장을 촉진하는 것으로 여겨진다(비특허문헌 1 내지 4 참조). 이러한 내생세균은 기주 식물과 친화적이며 병원균으로 인식되지 않고 기주 식물의 조직에 공생할 수 있다(비특허문헌 5 참조). 어떤 특정 내생세균은 하나 또는 그 이상의 기작을 동시에 이용하여 식물생장 촉진과 병 방제 효과를 낼 수 있고, 식물의 일생 동안 각 다른 시기에 다른 기작이 적용될 수도 있다. 식물 유전자는 세균이 존재함으로써 바뀔 수도 있으며, 이렇게 변화된 유전자가 식물에서의 내생세균의 효과에 대한 실마리를 제공하기도 한다(비특허문헌 6 참조). 식물 내생세균은 세포 내에서 증식하는데, 보통 뿌리와 줄기 시작 부분에서 전체 밀도가 높고, 줄기, 잎 등의 식물체 외부분으로 갈수록 점점 줄어들며, 옥수수 잎의 경우에는 그 밀도가 $\log 10^3 \sim \log 10^7$ cfu/g 정도로 밝혀졌다. 현재까지 분리된 내생세균은 바실러스(*Bacillus*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 엔테로박터(*Enterobacter*), 아그로박테리움(*Agrobacterium*) 등 50여개 속에서 130여 종이 알려져 있으며, 이들은 토마토, 감자, 옥수수 및 벼와 같은 경제적으로 중요한 작물의 생장 및 병 발생을 억제하여 작물의 생산을 증진시킨다.

[0008] 벼는 세계 5대 작물 중의 하나로 여러 가지 병에 의하여 많은 생산 손실이 일어나고 있다. 그 중에서도 도열병, 잎집무늬마름병 등 병원 진균에 의한 피해는 작물 생산에 치명적인 손실을 일으키는 것으로 현재까지 저항성 품종 육종, 화학 살균제 개발 등을 통하여 효과적으로 방제되고 있다. 그러나, 이 외에 주로 종자전염에 의해 발병되는 키다리병이나 세균병인 알마름병 및 흰잎마름병 등도 지역에 따라 많이 발생하여 큰 피해를 주는데 최근 들어 방제에 많은 어려움을 겪고 있다. 이들 병원균은 논토양이나 주위 잡초 조직에서 월동하며 특히 따뜻하고 습한 조건에서는 벼가 병균에 취약하므로 일단 한번 발병이 시작되면 방제하기가 어렵다. 이러한 병원균의 방제는 주로 화학 살균제에 의존해 왔으나 대부분의 살균제 사용은 환경오염이나 인축독성 위험 문제가 있어 이를 대체할 수 있는 친환경적인 생물 농약에 대한 관심이 커지고 있다.

[0009] 현재까지 개발되어 판매되고 있는 식물병 방제용 생물농약은 국내외적으로 수십 여 종에 이르고 있는데, 이들 중 효과가 있다고 인정된 것은 주로 세균 바실러스(*Bacillus*)와 곰팡이인 트리코데르마(*Trichoderma*)를 이용하여 만든 제품이다(비특허문헌 7 내지 10 참조). 바실러스(*Bacillus*) 제품에 사용된 종류는 바실러스 서브틸리스(*B. subtilis*), 바실러스 푸밀러스(*B. pumilus*) 및 바실러스 아밀로리퀘페이스스(*B. amyloliquefaciens*)가 있으며, 이 균주들은 거의 대부분이 항균물질인 이투린(iturin), 서팩틴(surfactin) 등의 고리형 펩티드(cyclic peptide)를 분비하여 병원균을 직접 억제하는 기작을 갖고 있거나 기주의 병 저항성을 유도하는 것으로 알려져 있다. 바실러스(*Bacillus* sp.)는 내생포자(endospore)를 형성하여 좋지 않은 자연 환경에서도 오랜 기간 생존할 수 있고, 항균 능력이 좋은 이유로 많은 연구자들이 식물병의 생물학적 방제를 위하여 연구 결과를 발표하고 있다(비특허문헌 10 참조). 앞서 언급한 종류 외에 최근 새로운 내생 세균 바실러스 메틸로트로피쿠스(*Bacillus methylotrophicus*)에 대한 몇 건의 연구 결과가 보고되었다. 이 균주는 2010년 우리나라에서 처음으로 분리 명명되어 식물생장 촉진 능력이 있는 것으로 확인 되었고(비특허문헌 1 참조), 이어서 중국에서 인삼, 토마토, 감

자 근권에서 분리되어 병원균 억제능력과 식물생육 촉진 효과가 있다고 보고되었다(비특허문헌 11 내지 13 참조). 그러나 이들 연구에서는 이 균주가 식물병원균에 대한 항균력 외에 기주 식물의 병 저항성 유도 또는 벼 세균 병 억제에 대한 결과는 없다. 바실러스(*Bacillus* sp.) 종류에 대하여 세계적으로 수 많은 연구가 진행되었음에도 불구하고 실제로 상품화되어 식물병 방제에 효과적으로 사용되는 것은 몇 종에 불과하다. 이것은 길항 세균을 분리할 때 단순히 병원균을 억제하는 기작만을 기준으로 삼았기 때문에 상대적으로 방제 효과가 낮은 것이 한 원인 일 것으로 생각된다. 따라서, 이 균주의 특성을 살리면서 보다 효과적인 방제를 위하여 항균 활성, 기주 식물의 병 저항성 유도 능력 및 생육 촉진 효과를 동시에 갖는 새로운 다기능 미생물의 탐색과 개발이 필요하다.

- [0010] [비특허문헌]
- [0011] 비특허문헌 1: Madhaiyan, M., Poongguzhali, S., Kwon, S. W., and Sa, T. M. (2010). *Bacillus methylotrophicus* sp. nov., a methanol-utilizing, plant-growth-promoting bacterium isolated from rice rhizosphere soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:2490-2495.
- [0012] 비특허문헌 2: Chert, C., Bauske, E. M., Musson, G., Rodriguez-Kabana, R., and Kloepper, J. W. (1995). Biological control of *Fusarium* wilt of cotton by use of endophytic bacteria. *Biol Cont* 5:10-16.
- [0013] 비특허문헌 3: Costa, J. M., & Loper, J. E. (1994). Characterization of siderophore production by the biological control agent *Enterobacter cloacae*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*7: 440-448.
- [0014] 비특허문헌 4: Wakelin, S. A., Warren, R. A., Harvey, P. R., Ryder, M. H. (2004). Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. closely associated with wheat roots. *Biology and Fertility of Soils* 40: 36-43.
- [0015] 비특허문헌 5: Rosenblueth, M., & Martinez-Romero, E. (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19: 827-837.
- [0016] 비특허문헌 6: de Matos Nogueira, E., Vinagre, F., Masuda, H. P., Vargas, C., de P, V. L. M., da Silva, F. R., dos Santos, R. V., Baldani, J. I., Gomes Ferreira, P. C., and Hemerley. (2001). Expression of sugarcane genes induced by inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. *Genet. Mol. Biol.* 24: 199-206.
- [0017] 비특허문헌 7: Bibi, F., Yasir, M., Song, G. C., Lee, S. Y., and Chung, Y. R. (2012). Diversity and characterization of endophytic bacteria associated with tidal flat plants and their antagonistic effects on oomycetous plant pathogens. *Plant Pathol J* 28:20-31.
- [0018] 비특허문헌 8: Cao, C., Park, S., and McSpadden, G. (2010). Biopesticide controls of plant diseases: resources and products for organic farmenrs in Ohio. Fact Sheet, Agricultural and Natural Resources. SAG-18-10 The Ohio State Univeristy.
- [0019] 비특허문헌 9: Lee, S. K., Sohn, H. B., Kim, G. G., and Chung, Y. R. (2006). Enhancement of biological control of *Botrytis cinerea* on cucumber by foliar sprays and bedpotting mixes of *Trichoderma harzianum* YC459 and its application on tomat in the greenhouse. *Plant Pathol J* 22:283-288.
- [0020] 비특허문헌 10: 박경석. (2011). 미생물농약의 개발 현황과 바실러스 미생물의 중요성. *공업화학 전망*14(4):1-11.
- [0021] 비특허문헌 11: Kim, B. K., Chung, J. H., Kim, S. Y., Jeong, H., Kang, S. G., Kwon, S. K., Lee, C. H., Song, J. Y., Yu, D. S., Ryu, C. M., and Kim, J. F. (2012). Genome sequence of the leaf-colonizing bacterium *Bacillus* sp strain 5B6, isolated from a cherry tree. *J Bacteriol* 194:3758-3759.
- [0022] 비특허문헌 12: Ma, L., Cao, Y. H., Cheng, M. H., Huang, Y., Mo, M. H., Wang, Y., Yang, J. Z., and Yang, F. X. (2013). Phylogenetic diversity of bacterial endophytes of *Panax notoginseng* with antagonistic characteristics towards pathogens of root-rot disease complex. *Ant van Leeuwen* 103:299-312.
- [0023] 비특허문헌 13: Yan, X., He, L., Song, G., and Wang, R. (2011). Antagonistic bioactivity of endophytic strains isolated from *Salvia mitiorrhiza*. *Afr J Biotech* 10:15117-15122.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0024] 이에 본 발명은 상기의 단점을 보완할 수 있는 한 방법으로 식물 병원 진균 및 세균의 생육을 광범위하게 억제할 수 있고 동시에 기주 식물인 벼에 특이적으로작용하여 병 저항성 유도 및 식물생육 촉진 효과를 모두 갖는 다기능 식물 내생세균을 분리, 대량 배양하여 제제화 함으로써 미생물 비료 효능도 가진 새로운 형태의 생물 농약을 개발하여 제공하는 것을 그 목적으로 하고 있다.

과제의 해결 수단

- [0025] 상기 과제를 해결하기 위하여 본 발명은, 식물병 저항성 유도 효능을 갖는 바실러스 메칠로트로피쿠스(*Bacillus methylotrophicus*) YC7007 (수탁번호: KCCM11275P) 균주를 제공한다.
- [0026] 또한, 상기 식물병은 벼 알마름병, 벼 흰잎마름병 및 벼 키다리병으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는 바실러스 메칠로트로피쿠스(*Bacillus methylotrophicus*) YC7007 (수탁번호: KCCM11275P) 균주를 제공한다.
- [0027] 또한, 상기 균주는 식물병원균 억제 효능 및 식물생육 촉진 효능을 더 갖는 것을 특징으로 하는 바실러스 메칠로트로피쿠스(*Bacillus methylotrophicus*) YC7007 (수탁번호: KCCM11275P) 균주를 제공한다.
- [0028] 또한, 상기 식물생육 촉진 효능은 벼에 대한 식물생육 촉진 효능인 것을 특징으로 하는 바실러스 메칠로트로피쿠스(*Bacillus methylotrophicus*) YC7007 (수탁번호: KCCM11275P) 균주를 제공한다.
- [0029] 상기 또 다른 과제 해결을 위하여 본 발명은, 상기 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 함유하는 비료용 및 생물농약용 미생물 제제를 제공한다.
- [0030] 또한, 상기 균주 또는 이의 배양액 중 상기 효능을 나타내는 생리활성 물질을 유효성분으로 함유하는 비료용 및 생물농약용 미생물 제제를 제공한다.

발명의 효과

- [0031] 이러한 본 발명에 따르면, 작물의 중요한 식물병원 진균 및 세균의 생장을 동시에 억제할 수 있고, 기주 식물의 병 저항성 유도 및 생육촉진 효과를 모두 갖는 다기능 세균 바실러스 메칠로트로피쿠스(*Bacillus methylotrophicus*) YC7007 균주를 이용, 항생물질을 분비하여 식물병원균을 직접 억제할 뿐만 아니라 벼에 특이적으로 작용하여 생육 촉진, 전신성 병 저항성 유도 능력을 동시에 모두 지닌 다기능 세균을 함유한 제제로서, 지금까지 보고된 어느 세균보다도 생물농약과 미생물비료로서의 역할을 동시에 수행할 수 있는 우수한 미생물 제제를 제공할 수 있게 된다.

도면의 간단한 설명

- [0032] 도 1은 YC7007 균주의 16S rRNA 유전자의 염기서열,
 도 2는 YC7007 균주의 16S rRNA 유전자 서열 분석으로 만든 계통수,
 도 3은 YC7007 균주의 유전자 분석(BOX-PCR)을 이용한 표준 균주 대비 유전자 비교 분석 결과를 나타낸 사진,
 도 4는 벼 알마름병 방제효과를 설명하는 처리구별 비교 사진,
 도 5는 벼 흰잎마름병 방제효과를 설명하는 처리구별 비교 사진,
 도 6은 YC7007 균주 배양여액의 배양기간별 항균 효과를 나타낸 그래프(a) 및 사진(b),
 도 7은 YC7007 균주 배양여액의 온도 처리별 항균 효과를 나타낸 그래프.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0033] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 이에 앞서, 본 명세서 및 청구범위에 사용된 용어나 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 한정해서 해석되어서는 아니 되며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여, 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다. 따라서, 본 명세서에 기재된 실시예의 구성은 본 발명의 가장

바람직한 일실시예에 불과할 뿐이고 본 발명의 기술적 사상을 모두 대변하는 것은 아니므로, 본 출원 시점에 있어서 이들을 대체할 수 있는 다양한 균등물과 변형예들이 있을 수 있음을 이해하여야 한다.

[0034] 실시예 1: YC7007 균주의 분리 및 동정

[0035] (1) YC7007 균주의 분리

[0036] YC7007 균주는 진주시 경상대학교 시험포장의 논토양에서 자라는 논잡초 방동사니(*Cyperus* sp.)의 뿌리 내부조직에서 분리되었다.

[0037] 먼저, 식물 내생세균을 분리하기 위하여 뿌리 절단 조각의 표면을 1% 차아염소산나트륨(NaOCl) 용액에 10분간 담구어 표면을 살균하였다. 이 조각들을 1/10TSA 배지(Tryptic Soy Broth 3g, 한천 16g / 증류수 1ℓ)에 올려 놓고, 2~3일 정도 배양하면서 표면에서 세균 성장 여부를 관찰하면서 표면 살균 여부를 확인하였다. 조각의 표면 살균이 확인된 뿌리 조각 1.0g을 취하여 고압멸균기에서 살균된 증류수 9.0ml를 넣어 살균된 주발과 절구로 마쇄하였다. 이 마쇄된 액 0.1ml를 취하여 살균된 증류수 0.9ml에 넣어 10배씩 희석(10^{-3})하고 순차적으로 10배씩 추가 희석(10^{-4} 및 10^{-5})하였고, 희석액을 1/10TSA 배지에 3등분하여 분주한 후 고르게 도말하였다. 이 배양기를 28℃에서 2~3주 동안 배양하고 생육된 단일 집락을 순수하게 분리하였고, 이를 YC7007 균주로 명명하였다.

[0038] (2) YC7007 균주의 동정

[0039] 상기 분리된 YC7007 균주의 동정을 위하여, 하기와 같이 형태학적 특성, 생리·생화학적 특성에 관한 조사를 수행하였다. 상기 분리된 YC7007 균주와 유사한 표준균주(type species)를 대상으로, 형태학적 특성은 주사전자현미경으로 조사하였고, 생리·생화학적 특성은 본 발명자가 개발한 분석 방법과 일반적인 분석법을 사용하여 조사하였다(비특허문헌 7 참조).

[0040] 분리된 YC7007 균주는 그람(Gram) 양성으로 운동성이 없고, 세포는 막대형(폭 0.6μm, 길이 1.8~2.6μm)이고, 내생포자를 형성하였으며, 혐기성 조건에서는 생장이 불가능하였다. 이 균주와 유사한 종과의 생리·생화학적 특성을 조사한 결과를 하기 표 1에 나타내었으며, 이 균주는 바실러스 메칠로트로피쿠스(*Bacillus methylotrophicus*)로 확인되었다. 표 1에서 1, 2번 균주는 상기 분석 방법에 따른 조사 결과이고, 3, 4번 균주는 각각 비특허문헌 13(Gatson, J. W., Benz, B. F., Chandrasekaran, C., Satomi, M., Venkateswaran, K., and Hart, M. E. (2006). *Bacillus tequilensis* sp. nov., isolated from a 2000-year-old Mexican shaft-tomb, is closely related to *Bacillus subtilis*. Int J Syst Evol Microbiol 56:1475-1484), 비특허문헌 14(Sumpavapol, P., Tongyonk, L., Tanasupawat, S., Chokesajjawatee, N., Luxanani, P., and Visessanguan, W. (2011). *Bacillus siamensis* sp. nov., isolated from salted crab (*poo-khem*) in Thailand. Int J Syst Evol Microbiol 60:2364-2370)에서 인용하였다.

표 1

Characteristic	1	2	3	4
Pigmentation	Creamy white	Creamy white	Yellow	Creamy white
Anaerobic growth	-	-	-	+
Oxidase	+	+	+	-
Growth in 10% NaCl	+	-	ND	+
Growth at 50℃	+	-	+	+
Growth at 10℃	+	-	-	+
Utilization of				
Ethanol	+	+	ND	ND
Methanol	+	+	ND	ND
<u>API 20E & 20NE</u>				
Nitrate reduction to nitrite	+	+	-	
Ortho-nitro-phenyl-β-D-galactopyranoside	-	+	ND	ND
Arginine	-	+	+	ND
Sodium citrate	-	+	ND	ND
Sodium pyruvate	-	+	ND	ND
<u>API zym</u>				
Esterase lipase (C8)	+	-	ND	+
α-Glucosidase	+	-	ND	-
β-Glucosidase	+	-	ND	-
<u>API 50CH</u>				
D-Xylose	-	+	+	+
D-Glucose	+	+	+	+
D-Mannose	+	+	+	-

[0041]

[0042] * 주

[0043] - 1: YC7007

[0044] - 2: *B. methylotrophicus* KACC13105^T

[0045] - 3: *B. tequilensis* 10b^T

[0046] - 4: *B. siamensis* PD-A10^T

[0047] - +: 양성, -: 음성, ND: 조사안됨

[0048] 표 1을 참조하면, YC7007 균주의 생리·생화학적 특성을 유사한 다른 바실러스(*Bacillus*) 종들과 비교한 결과, 10% 소금 용액에서 성장, 10℃ 및 50℃에서 성장, 오르토-니트로-페닐-β-D-갈락토피라노사이드(ortho-nitro-

phenyl-β-D-galactopyranoside), 시트르산나트륨(sodium citrate), 피루브산나트륨(sodium pyruvate)으로부터 산 생성, API zym kit 시험의 에스테라제 리파제(esterase lipase (C8)), α-글루코시다제(α-glucosidase), β-글루코시다제(β-glucosidase) 반응 및 API 50CH kit 시험의 D-자일로스(D-xylose) 이용 여부 등의 중요한 표현형적 특성에서 YC7007 균주가 근연종들과 다른 점을 확인할 수 있다.

[0049] 한편, YC7007 균주의 16S rRNA 유전자의 염기서열(1513bp, 도 1 참조)을 결정하고, GenBank/EMBL/DDBJ의 데이터베이스와 상동성 검색을 수행하여 계통학적 위치를 검토하였다. 도 2에서는 YC7007 균주의 16S rRNA 유전자 서열 분석으로 만든 계통수를 나타내고 있다. 도 2에서 교점 숫자는 1000 반복에서 나온 부트스트랩 값(bootstrap value)을 나타낸다.

[0050] 도 3에서는 YC7007 균주의 유전자 분석(Box-PCR)을 이용한 표준균주 대비 유전자 비교 분석 결과를 나타내고 있다. 유전자 분석(Box-PCR)을 위한 폴리머라제(polymerase)는 Platinum Taq DNA polymerase High Fidelity(Invitrogen), 프라이머(primer)는 BOXAR1(5'-CATCGGCAAGGCGACGCTGACG-3')을 사용하였다. PCR 조건은 초기 변성(initial denaturation)은 95℃에서 7분, 35회 반복되는 과정인 변성(denaturation), 어닐링(annealing), 연장(extension)은 각각 90℃에서 30초, 40℃에서 1분, 72℃에서 3분, 마지막으로 final extension은 72℃에서 10분간 반응시켜 증폭시켰다. 이러한 과정을 거쳐 얻은 PCR 산물에 대해 1% LE agarose gel(Seakem)을 이용하여 증폭유무를 확인하였다. 도 3에서 M은 1kb 마커(marker), 1은 YC7007 균주, 2는 YC7010 균주, 3은 바실러스 메칠로트로피쿠스(*Bacillus methylotrophicus*) KACC13105 표준균주를 나타낸다.

[0051] 도 3에 나타난 바와 같이, YC7007 균주와 학명이 같은 표준균주와 보다 세부적인 비교를 위해 유전자 분석(Box-PCR)을 수행한 결과, YC7007 균주는 표준균주들과는 다른 것으로 판명되었다.

[0052] 따라서, 본 발명의 미생물은 바실러스 메칠로트로피쿠스(*Bacillus methylotrophicus*) YC7007 균주로 명명하고 2012년 04월 18일자로 한국미생물보존센터(KCCM: Korean Culture Center of Microorganisms)로부터 수탁번호 KCCM11275P를 부여받았다.

[0053] 실시예 2: YC7007 균주의 병원 진균 및 세균에 대한 배양기내 억제효능 검정

[0054] YC7007 균주의 병원 진균 및 세균에 대한 억제효능을 검정하기 위하여, 하기와 같이 항균활성을 조사하였다.

[0055] 내생 세균 YC7007의 항균 활성은 중요한 식물병원 진균 10종(*Gibberella fujikuroi*(벼키다리병), *Colletotrichum acutatum*(탄저병), *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum*(오이시들음병), *Sclerotinia sclerotiorum*(균핵병), *Pythium ultimum*(모잘록병), *Bipolaris oryzae*(벼깨씨무늬병), *Magnaporthe grisea*(벼도열병), *Botrytis cinerea*(갯빛곰팡이병), *Botryosphaeria dothidea*(겉무늬썩음병), *Rhizoctonia solani*(벼잎집무늬마름병)) 및 병원 세균 4종(*Burkholderia glumae*(벼알마름병), *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*(벼흰잎마름병), *Pectobacterium carotovorum*(세균성 무름병), *Pseudomonas syringae*(꽃썩음병))에 대한 대면 생물검정(confrontation bioassay) 방법으로 생장의 억제 조사로 확인하였다.

[0056] 상기 병원 진균과 YC7007 균주는 감자한천설탕배지(PDB, Difco) 5g을 포함한 생육배지(16g 한천 / 증류수 1ℓ) 1/5PDA와 1/10TSA에서 평판디스크 측정법(paper disc method)을 이용하여 생장 억제효과를 조사하였다. 종이 디스크(직경 5mm)를 배양기 가장자리로부터 1cm 똑같은 거리에 놓았고, 균주 배양액 100μℓ를 종이 디스크에 충분히 스며들게 한 후 가운데에 PDA 배지에서 4일 동안 자란 병원 진균 균사 디스크(6mm)를 놓고 병균에 따라 24~28℃에서 4~6일간 배양하였다.

[0057] 병원 세균 억제 조사는 28℃에서 하룻밤 동안 배양한 병원 세균을 살균 증류수에 현탁하여(0.D₆₀₀=0.1) 현탁액 0.1mℓ를 배지에 도말 한 후 YC7007 균주의 병균 생장 억제 정도를 측정하였다. YC7007 균주가 생산하는 배양여액의 병균 억제효과는 균주를 한천을 제외한 위 배양 액체 배지에서 28℃, 72시간까지 진탕배양(120rpm)하고, 배양액을 원심분리 후 밀리포어 필터(millipore filter)로 걸러낸 여액을 이용하였다. 배양여액의 온도에 대한 반응을 보기 위하여 각 처리 온도로 유지된 온수에 10분간 처리 후 억제효과를 조사하였다.

[0058] 하기 표 2 및 표 3에 YC7007 균주의 주요 식물병원 진균 및 주요 식물병원 세균에 대한 항균활성 조사 결과를 나타내었다.

표 2

배 양 기	억제 정도*									
	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Colletotrichum acutatum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Gibberella fujikuroi</i>	<i>Magnaporthe grisea</i>	<i>Pythium ultimum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
1/10TSA	++	++	++	+++	++++	++++	+++	+++	+++	+++
1/5PDA	+++	+	+	++	+++	+++	++	++	++	+++

* 억제정도: +, <3 mm; ++, 4-5 mm; +++, 6-8 mm; +++, 8-10 mm

[0059]

표 3

배 양	억제 정도*			
	<i>Burkholderia glumae</i>	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>
배양액	++++	++++	+++	++
배양여액	+++	+++	++	+

* 억제정도: +, <3 mm; ++, 4-5 mm; +++, 6-8 mm; +++, 8-10 mm

[0060]

[0061] 표 2를 참조하면, 내생세균 YC7007 균주의 식물병원 진균에 대한 항균활성은 배지에 따라 약간 다르지만 3~10mm 균사 생장 억제효과를 나타낸 것을 확인할 수 있다.

[0062] 또한, 표 3을 참조하면, 내생세균 YC7007 균주의 식물병원 세균에 대한 항균활성도 1/10TSA에서 배양액은 6~10 mm, 배양여액은 3~8mm 생장 억제효과를 나타낸 것을 확인할 수 있다.

[0063] 이러한 결과로부터 현재까지 알려진 다른 어느 길항 세균보다 더 광범위한 병원균 억제효과가 있는 것으로 파악할 수 있다.

[0064] 실시예 3: YC7007 균주의 병원 진균에 대한 포트 실험 방제효능 검증

[0065] 상기 실시예 2에 따른 실험실 배양기내 시험의 억제 효과를 바탕으로 YC7007 균주의 7종의 주요 식물병에 대하여 하기와 같이 방제효과를 조사하였다. 방제효능 검증은 한국화학회연구원에 의뢰하여 시행하였으며, 대상 식물병은 벼 도열병, 벼 잎집무늬마름병, 토마토 잿빛곰팡이병, 토마토 역병(병원균: *Phytophthora infestans*), 밀 붉은녹병(병원균: *Puccinia recondita*), 보리 흰가루병(병원균: *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) 및 고추 탄저병(병원균: *Colletotrichum coccodes*)이었다.

[0066] 약제 처리는 YC7007 균주 현탁액을 접종 1일 전에 식물병 당 식물 2포트씩을 회전원판 위에 놓고 회전시키면서 분무충(1kg/cm²)으로 식물체 전체에 골고루 충분히 부착되도록 살포하여 수행되었다. YC7007 균주 현탁액의 관주 처리에 의한 병 저항성 유도 효과 조사는 균주를 병원균 접종 7일 전에 각 기주 식물 3포트 당 5ml씩 관주하고 온실에서 1주일 간 재배 후 병 발생 정도를 조사하여 수행되었다. 균주 현탁액 준비는 1/10TSB 배지에서 28℃로 하루 밤 동안 진탕배양 후 원심분리하여 세균 세포를 10mM MgSO₄ 용액에 현탁시켜 2x10⁶ cfu/ml 농도로 조절하여 사용하였다. 병원균 접종 및 발병 조사는 균주를 처리한 식물에 7종 병원균의 포자 및 균체를 각 기주 식물에 접종하여 수행하였다. 각 식물병에 대한 구체적인 실험방법은 다음과 같다.

[0067] 벼 도열병(RCB)은 병원균인 마그나포스 그리시아(*M. grisea*) KJ201 균주를 싼겨 한천배지에 접종하여 25℃ 배양기에서 2주간 배양하여 형성된 포자를 살균 증류수로 수확하여 일정 농도의 포자현탁액(3x10⁵ spores/ml)을 준비하였다. 이를 약제 처리된 낙동 벼(본엽 3~4엽기)에 흘려내릴 정도로 충분히 분무하였다. 접종된 벼는 습실상에서 암상태로 24시간 배양한 뒤에 상대습도 80% 이상이며 온도가 26℃인 항온항습실에서 4일간 발병시킨 후 병반면적율을 조사하였다.

[0068] 벼 잎집무늬마름병(RSB)은 적당한 양의 밀기울을 1ℓ 배양병에 넣고 멸균한 후 병원균인 리족토니아 솔라니(*R.*

solani)AG1 균주를 접종한 후 25℃ 배양기에서 7일간 배양하였다. 병 접종은 배양된 균사덩어리를 적당하게 잘게 마쇄하여 약제 처리된 4~5엽기의 낙동 벼가 자란 포트에 고르게 접종하여 습실상(25℃)에서 7일간 배양하여 발병을 시킨 후 병 조사는 잎집(sheath)에 형성된 병반면적율을 조사하였다.

[0069] 토마토 잿빛곰팡이병(TGM)은 병원균인 보트리티스 시네레아(*B. cinerea*)를 감자한천배지에 접종하여 25℃ 항온기에서 배양하여 형성된 포자를 접종원으로 사용하였다. 병 접종은 포자를 수확하여 혈구계를 사용하여 포자농도를 3×10^5 포자/㎖로 만든 후 약제가 처리된 토마토 유묘(2~3엽기)에 분무접종 하였다. 접종된 토마토 유묘는 20℃ 습실상(상대습도 95% 이상)에 넣어 3일간 발병을 유도시킨 후 병반면적율을 조사하였다.

[0070] 토마토 역병(TLB)은 병원균인 파이트오프쏘라 인페스탄스(*P. infestans*) 균주를オート밀 배지에 접종하여 20℃ 배양기에서 배양하여 유주자낭을 형성시켰다. 병원균 접종은 형성된 유주자낭을 살균 증류수를 첨가하여 수확하고 포자농도가 3×10^4 포자낭/㎖인 포자현탁액을 만들었다. 이들을 냉장고에 넣어 저온 처리하여 유주자를 유출시켜 유주자 현탁액을 준비하였다. 이를 약제 처리된 토마토 유묘(2~3엽기)에 분무접종 하였다. 병원균을 접종한 토마토 유묘는 20℃ 습실상에서 2일간 습실처리하고 항온습실실에서 발병시켜 접종 3일 후에 잎에 발생한 병반면적율을 조사하였다.

[0071] 밀 붉은녹병(WLR)은 병원균인 푸치니아 레콘디타(*P. recondita*)는 활물기생균이므로, 실험실에서 식물체에 직접 계대배양하면서 밀 유묘에 형성된 하포자를 접종원으로 사용하였다. 균주의 약효조사를 위하여 일회용 포트(직경: 4.5cm)에 5립씩 밀 종자(품종: 은파)를 파종하여 온실에서 8일간 재배한 1엽기 유묘에 약제를 처리하고 1일 후에 접종원(포자 0.11g/ℓ)을 분무접종하였다. 접종된 밀 유묘는 20℃의 습실상에서 1일간 습실처리한 후에 상대습도가 70%인 20℃의 항온습실로 옮겨서 발병을 유도하고 접종 7일 후에 병반면적율을 조사하였다.

[0072] 보리 흰가루병(BPM)은 병원균인 블루메리아 그라미니스(*B. graminis* f. sp. *hordei*)는 활물기생균이므로 실험실에서 보리 유묘로 계대배양하면서 보리에 형성된 포자를 접종원으로 사용하였다. 약효조사는 일회용 포트(직경: 4.5cm)에 5립씩의 보리 종자(품종: 동보리)를 파종하여 온실에서 8일간 재배한 1엽기 유묘에 약제를 살포하고 온실에서 풍건시킨 후 약제 처리된 보리에 흰가루병 포자를 털어 접종하였다. 접종된 보리 유묘는 20~23℃, 상대습도 60% 정도의 항온습실에 두어 7일간 발병시킨 후 병반면적율을 조사하였다.

[0073] 고추 탄저병(RPA)은 병원균인 콜레토트리쿰 코코데스(*C. coccodes*)를オート밀 배지에 접종하고 25℃에서 10일 동안 배양하여 형성된 포자를 수확하고, 포자 농도를 ㎖당 2×10^5 spores가 되도록 조정하여 포자현탁액을 준비하였다. 약제를 처리한 고추 유묘(3~4엽기)에 준비한 포자현탁액을 분무접종하고 이를 습실상(25℃)에 넣고 2일 동안 습실처리한 후에 항온습실(25℃, 75% RH)에서 발병시켰다. 접종 3일 후에 고추 잎에 형성된 병반면적율을 조사하였다.

[0074] 방제가는 병 조사로부터 얻은 병반면적율로부터 하기 수식식 1에 따라 계산하여 산출하였다.

수식식 1

[0075] 방제가 (%) = (1 - 처리구의 병반면적율/무처리구의 병반면적율) × 100

[0076] 하기 표 4에 YC7007 균주의 주요 식물병에 대한 방제효과 조사 결과를 나타내었다.

표 4

처리방법	방 제 가 (%)						
	벼도열병	벼잎집무늬마름병	토마토 잿빛곰팡이병	토마토 역병	밀 붉은녹병	보리 흰가루병	고추 탄저병
엽면살포	70	6	36	31	83	72	71
토양관주	35	0	0	0	0	0	0

[0077]

[0078] 표 4를 참조하면, 7종의 주요 식물병에 대한 방제효과는 벼 도열병, 밀 붉은녹병, 보리 흰가루병 및 고추 탄저병의 경우 70~83% 정도의 방제가를 보였으나, 벼 잎집무늬마름병, 토마토 잿빛곰팡이병 및 토마토 역병의 경우에는 36% 이하의 낮은 방제가를 나타낸 것을 알 수 있다. 특히, 토양에 관주 후 병 저항성 유도에 의한 방제효과는 벼의 경우에만 35%로 나타나 YC7007 균주가 벼에 대한 기주 특이성이 있음을 확인할 수 있다.

[0079] 실시예 4: YC7007 균주의 병 저항성 유도에 의한 벼 알마름병 방제효능 검정

[0080] YC7007 균주의 병 저항성 유도에 의한 벼 알마름병 방제효능을 검정하기 위하여, 하기와 같이 방제효과를 조사하였다.

[0081] 식물 생육상(28~30℃, 상대습도 80% 이상)에서 5주 동안 재배한 벼(동진1) 유묘를 멸균 또는 비멸균 벼 재배용 상토에 옮겨 심은 뒤 바로 균주 현탁액(2×10^7 cfu/ml) 10ml를 상토(120g)에 분주 처리하였다. YC7007 균주 현탁액 준비는 1/10TSB 배지에서 28℃로 하루 밤 동안 진탕배양 후 원심분리하여 세균 세포를 10mM MgSO₄ 용액에 현탁시키고 농도를 적절하게 조절하여 수행하였다. 처리 5일 후에 벼 알마름병균(*B. glumae*) 현탁액(5×10^7 cfu/ml, OD₆₀₀=0.1)을 접종 침에 묻혀 각 잎에 3반복으로 20개 잎에 접종하였다. 병원균 현탁액은 R2A 배지에서 24시간 배양 후 원심분리하여 세균 세포를 10mM MgSO₄ 용액에 현탁시키고 농도를 적절하게 조절하여 사용하였다. 병원균 접종 후 5일 동안 생육상에 둔 후에 병반 괴사 정도를 조사하였다. 발병도는 0~3(0: 병징 없음, 1: 소형 괴사반점, 2: 몇 개 괴사반점이 합쳐져 대형 갈반, 3: 전체 괴사)으로 구분하였고, 방제가는 대조구에 대한 병 억제 정도를 계산하여 산출하였다. 벼의 병 저항성 유도 대조약제로는 벤조티아디아졸(benzothiadiazole(BTH), 1mM 용액)을 사용하였다.

[0082] 하기 표 5에 YC7007 균주의 토양처리에 의한 벼 알마름병 방제효과 조사 결과를 나타내었으며, 도 4에서 벼 알마름병 방제효과를 설명하는 처리구별 비교 사진을 나타내었다.

표 5

처리	발병 정도*		방제가 (%)
	잎병반 길이 (mm)	발병도	
무처리	0±0c	0±0c	-
<i>B. glume</i>	17.4±1.0a	2.4±0.06a	-
YC7007+B. <i>glume</i>	2.0±0.2b	1.10±0.06b	54
BTH	1.5±0.2bc	1.03±0.09b	57

[0084] 표 5 및 도 4를 참조하면, YC7007 균주 현탁액을 토양에 처리한 5일 후에 병균을 접종하여 방제 효과를 조사한 결과, 균주 처리구는 잎병반길이 2.0mm, 발병도 1.1로 병원균 처리한 대조구의 잎병반길이 17.4mm, 발병도 2.4에 비하여 훨씬 적게 나타났으며, 방제가는 54%로 대조약제인 BTH의 57%와 동일한 정도의 기주 병 저항성 유도 효과가 확인되었다.

[0085] 실시예 5: YC7007 균주의 병 저항성 유도에 의한 벼 흰잎마름병 방제효능 검정

[0086] YC7007 균주의 병 저항성 유도에 의한 벼 흰잎마름병 방제효능을 검정하기 위하여, 하기와 같이 방제효과를 조사하였다.

[0087] 식물 생육상(28~30℃, 상대습도 80% 이상)에서 5주 동안 재배한 벼(동진1) 유묘를 멸균 또는 비멸균 벼 재배용 상토에 옮겨 심은 뒤 바로 균주 현탁액(2×10^7 cfu/ml) 10ml를 상토(120g)에 분주 처리하였다. 처리 5일 후에 벼 흰잎마름병균(*X. oryzae* pv. *oryzae*) 현탁액(1×10^7 cfu/ml, OD₆₀₀=0.1)을 접종 침에 묻혀 각 잎에 3반복으로 20개 잎에 접종하였다. 벼 흰잎마름병균 현탁액은 상기 벼 알마름병균과 같은 방법으로 준비하였다. 병원균 접종 후 5일간 생육상에 둔 후에 병반 괴사 정도를 조사하였다. 발병도는 0~9(0: 병징 없음, 1: 소형 괴사반점, 2~4: 몇

개 괴사반점이 합쳐져 중형 갈반, 5~8: 몇 개 괴사반점이 합쳐져 대형 갈반, 9: 전체 괴사)으로 구분하였고, 방제가는 대조구에 대한 병 억제 정도를 계산하여 산출하였다.

[0088] 하기 표 6에 YC7007 균주의 토양처리에 의한 벼 흰잎마름병 방제효과 조사 결과를 나타내었으며, 도 5에서 벼 흰잎마름병 방제효과를 설명하는 처리구별 비교 사진을 나타내었다.

표 6

처 리	발병도*		방제가 (%)
	pin prick	clipping	
병균접종법			
무처리	1.0±0c	1.0±0c	-
<i>X. oryzae</i>	7.4±0.4a	2.4±0.06a	-
YC7007+ <i>X. oryzae</i>	2.3±0.67b	2.2±0.23b	65

* 발병도는 0-9; 다른 영문 철자는 던컨 다중검증에 의하여 유의적 차이가 난다는 것을 의미함 (p=0.05)

[0089]

[0090] 표 6 및 도 5를 참조하면, YC7007 균주 현탁액을 토양에 처리한 5일 후에 병균을 접종하여 방제 효과를 조사한 결과, 병원균의 바늘 접종(pin prick)과 크리핑(clipping) 접종 방법에 따라 약간 차이가 있으나, 병원균만 처리한 잎의 발병도가 각각 7.4 및 5.67인 것에 반해, YC7007 균주 처리구는 2.3 및 2.2로 각각 69% 및 61%(평균 65%)의 방제가를 나타내어, 우수한 기주 병 저항성 유도 효과가 확인되었다.

[0091] 실시예 6: YC7007 균주의 병 저항성 유도에 의한 벼 키다리병 방제효능 검정

[0092] YC7007 균주의 병 저항성 유도에 의한 벼 키다리병 방제효능을 검정하기 위하여, 하기와 같이 방제효과를 조사 하였다.

[0093] 식물 생육상(28~30℃, 상대습도 80% 이상)에서 2주 동안 재배한 벼(동진1) 유묘를 멸균 또는 비멸균 벼 재배용 상토에 옮겨 심은 뒤 바로 균주 현탁액($10^5 \sim 10^7$ cfu/ml) 15ml를 상토(150g)에 분주 처리하였다. 처리 3일 후에 벼 키다리병균(*G. fujikuroi*)(5×10^5 cfu/g)을 3반복으로 반복 당 10개씩의 유묘에 1.5g/pot 씩 접종하였다. 접종 후 10~30일 동안 생육상에 둔 후에 병 발생 정도를 조사하였다. 발병도는 0~5 (0: 병징 없음, 1: 잎 약간 황화 및 줄기 왜화, 2~3: 잎 황화 및 줄기 키 커짐, 5: 전체 괴사)으로 구분하였고, 방제가는 대조구에 대한 병 억제 정도를 계산하여 산출하였다.

[0094] 하기 표 7에 YC7007 균주의 토양처리에 의한 벼 키다리병 방제효과 조사 결과를 나타내었다.

표 7

처 리	발병도*	방제가 (%)
무처리	0±0c	-
<i>G. fujikuroi</i>	3.40±0.31a	-
YC7007+ <i>G. fujikuroi</i>	1.40±0.12b	58.8

* 발병도는 0-5; 다른 영문 철자는 던컨 다중검증에 의하여 유의적 차이가 난다는 것을 의미함 (p=0.05)

[0095]

[0096] 표 7을 참조하면, YC7007 균주 현탁액을 토양에 처리한 3일 후에 병균을 접종하여 방제 효과를 조사한 결과, 병원균만 처리한 곳에서는 발병도가 3.4이었으나 균주 처리구는 1.4로 58.8%의 방제가를 나타내어, 우수한 기주 병 저항성 유도 효과가 확인되었다.

[0097] 실시예 7: YC7007 균주 처리에 의한 벼의 생육 촉진 효능 검증

[0098] YC7007 균주 처리에 의한 벼의 생육 촉진 효능을 검증하기 위하여, 하기와 같이 식물생육 촉진 효능을 조사하였다.

[0099] 벼 재배용 상토 1kg을 균주 현탁액(2×10^7 cfu/ml) 200ml와 골고루 혼합 후에 발아된 벼 종자를 파종하였다. 파종 후 식물 생육상(28~30℃, 상대습도 80% 이상)에서 재배하면서 10일(유묘기), 30일(분얼기), 75일(출수기) 후에 각각 줄기와 뿌리 생장 정도를 조사하였다. 대조구는 같은 양의 10mM MgSO₄ 완충 용액만으로 혼합한 토양을 사용하였다. 접종 30일 후 분얼기에 세균 밀도의 유지를 위하여 YC7007 균주 현탁액 5ml를 벼 뿌리 부분 토양에 다시 관주 처리하였다. 각 처리는 3반복으로 반복 당 10주의 식물을 사용하였다.

[0100] 하기 표 8에 YC7007 균주의 벼 생육 촉진 효능 조사 결과를 나타내었다.

표 8

처 리	생육 상태					
	유묘기		분얼기		출수기	
	줄기(cm)	뿌리(cm)	줄기(cm)	분얼 수	줄기(cm)	분얼 수
무처리	11.7±0.3b	2.7±0.3b	36.5±1.2b	1.9±0.2b	55.3±0.3b	5.3±0.7b
YC7007	19.3±0.3a	7.7±0.3a	46.3±2.0a	2.9±0.1a	61.0±2.0a	7.0±0.6a

* 다른 영문 철자는 던컨 다중검증에 의하여 유의적 차이가 난다는 것을 의미함 (p=0.05)

[0101]

[0102] 표 8을 참조하면, YC7007 균주를 벼 재배용 상토에 처리하여 포트에 재배하면서 생육기 별로 생장 촉진 효과를 조사한 결과, YC7007 균주 처리구는 유묘기에서 줄기와 뿌리의 길이가 모두 무처리구의 11.7cm 및 2.7cm에 비하여 19.3cm 및 7.7cm로 훨씬 길었고, 분얼기에서도 줄기 길이가 27.4% 더 증가되었고 분얼된 숫자도 52% 정도 더 많았다. 출수기에서도 YC7007 균주 처리구는 줄기 길이가 10.8% 더 증가되었고 분얼된 숫자도 32% 정도 더 많은 것으로 나타나, YC7007 균주 처리에 의한 벼의 생육 촉진 효능이 확인되었다.

[0103] 실시예 8: 병원균 억제 항균물질의 생산 및 효과 조사

[0104] YC7007 균주에 의한 병원균의 억제가 항균물질 생산에 의한 것인지를 확인하기 위하여 1/10TSB 액체배지에서 항균물질 생산 여부를 조사하였다. 항균물질의 억제 효과 정도는 전술한 디스크 확산법(disc diffusion method)으로 실시하여 종이 디스크 주위에 형성된 곰팡이 군사 또는 세균 세포 생장 억제 거리를 측정하여 확인하였다. YC7007 균주를 액체배지에서 28℃로 72시간 동안 진탕(180rpm) 배양하여 9000g으로 10분간 원심분리 후 배양액을 밀리포어 필터(millipore filter, 0.2μm)로 여과 후에 배양 시간별로 항균활성을 측정하였다.

[0105] 도 6은 YC7007 균주 배양액의 배양기간별 항균 효과를 나타낸 그래프(a) 및 사진(b)이고, 도 7은 YC7007 균주 배양액의 온도 처리별 항균 효과를 나타낸 그래프이다.

[0106] 먼저, 도 6을 참조하면, YC7007 균주 배양액의 배양기간별 항균 효과는 벼 병원세균(*B. glume*, *X. oryzae*) 및 키다리병균(*G. fujikuroi*)은 균주 배양시간이 증가할수록 억제 효과가 높아지다가 60시간 배양액에서 억제 효과가 가장 좋았으며, 72시간 배양액은 효과가 급속히 감소하는 것으로 나타났다.

[0107] 또한, 도 7을 참조하면, 배양액의 열에 대한 안정성을 조사한 결과 90℃ 처리 시까지는 항균활성이 유지되었으나 100℃를 넘어서면 억제효과가 다소 감소하는 것으로 나타났다. 이 결과로 보아 YC7007 균주에 의하여 생산되는 항균물질은 상대적으로 열에는 안정한 물질인 것으로 볼 수 있다.

[0108] 실시예 9: YC7007 균주의 제제화

- [0109] YC7007 균주의 활성과 보관 중 밀도 유지를 위하여, 하기와 같이 분말과 액제 형태로 제제화하였다.
- [0110] 균주를 대형 발효기(1톤 이상)에서 배양하여 얻은 세균 배양액 또는 원심분리 후 얻은 균체를 카올린(kaolin), 벤토나이트(bentonite), 이탄(peat) 등의 점토 광물과 1:100으로 혼합하여 저온에서 말린 후 균일하게 분쇄하여 분말 형태의 고상제로 제조하였다. 동시에 균 배양체를 상기 점토 광물과 1:100으로 혼합하여 액제 현탁액 형태로도 제조하였다.
- [0111] 상기와 같이 제제화한 시료의 밀도를 조사한 한 결과 대부분의 제제에서 10^8 cfu/g 이상을 포함하고 있었으며, 점토 광물과 혼합하여 제제한 액제 현탁액도 10^8 cfu/ml 이상의 밀도를 함유한 것으로 확인되었다.
- [0112] 이상에서 설명한 본 발명의 바람직한 실시예들은 기술적 과제를 해결하기 위해 개시된 것으로, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 본 발명의 사상 및 범위 안에서 다양한 수정, 변경, 부가 등이 가능할 것이며, 이러한 수정 변경 등은 이하의 특허청구범위에 속하는 것으로 보아야 할 것이다.

수탁번호

- [0113] 기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)
수탁번호 : KCCM11275P
수탁일자 : 20120418

도면

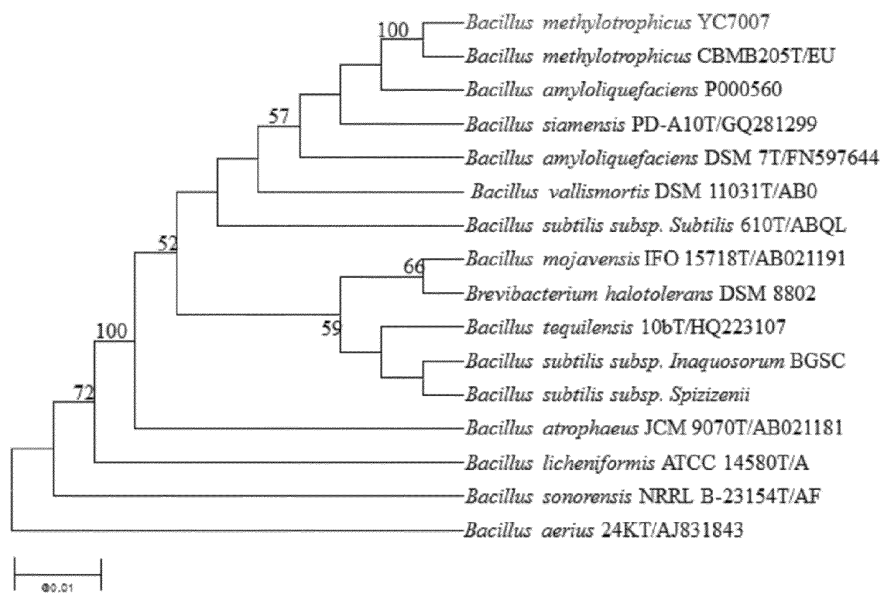
도면1

```

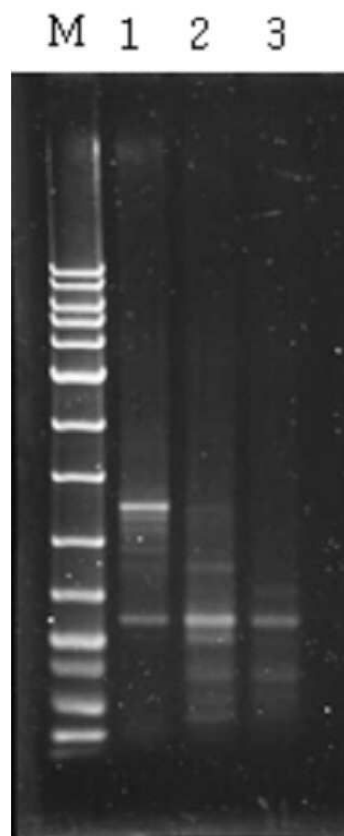
TGAGTTTGATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTG
CTCCCTGATGTTAGCGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACC
GGGCTAATACTGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGA
CCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCG
GCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTC
TGACGGAGCAACGCGCGGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTT
CAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACGAGAAAGCCAGGCTAACTACGTGOCAGCAGCGCGGTAATACGTA
GGTGGCAAGCGTTGTCCGAATTATTGGCGGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCG
GCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTG
AAATCGGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGCGGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTGCAGCTGAGGAGCGAAAGC
GTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACCGGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTCGGC
CCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGA
CGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCTTTGACATCCT
CTGACAAATCCTAGAGATAGGAGCTCCCCCTTCGGGGGCGAGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTGTCAGCTCGTGTG
TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAAGGT
GACTGCCGTTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCCTGGGTACACAGT
GCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCG
CAGTCTGCAACTGACTGCGTGGAAGCTGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGG
GCCTTGTACACACGCGCGGTCACACCAGGAGGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTAGGAGCCAGC
CGCGGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACACGTAAACGTA

```

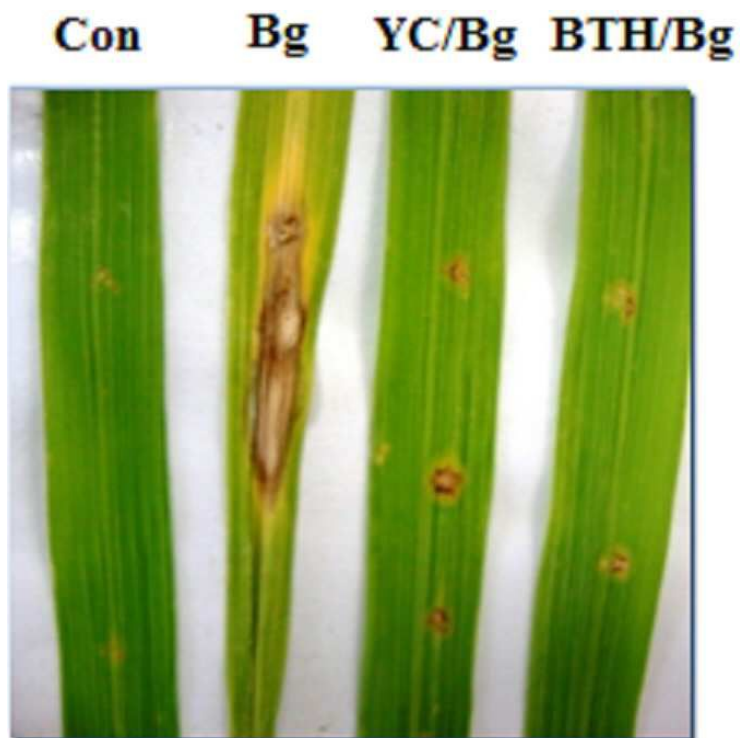
도면2



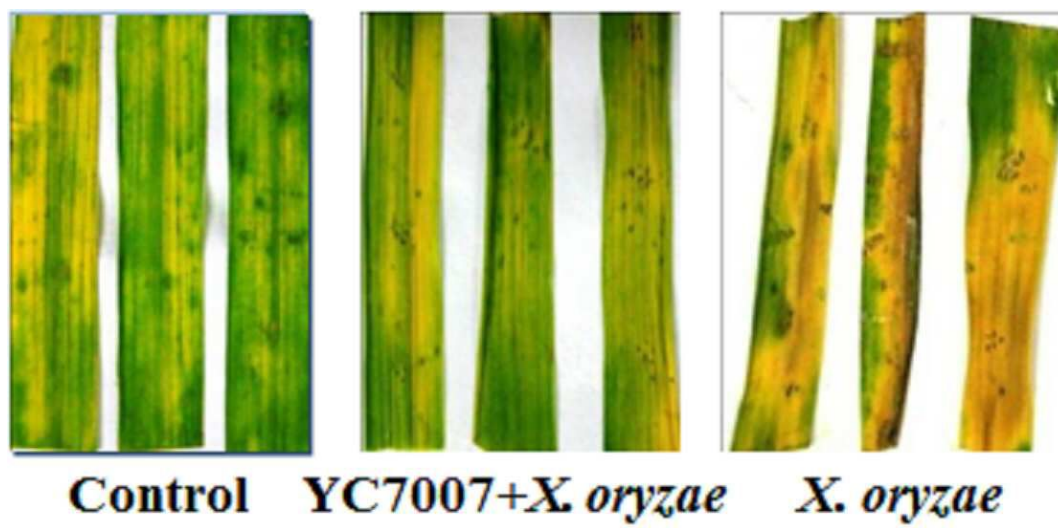
도면3



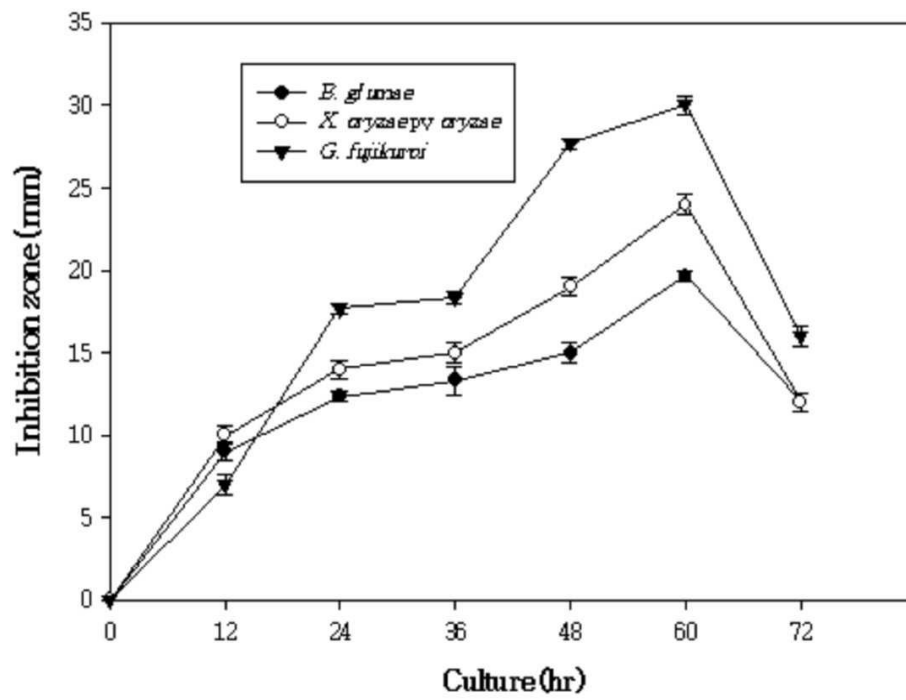
도면4



도면5



도면6

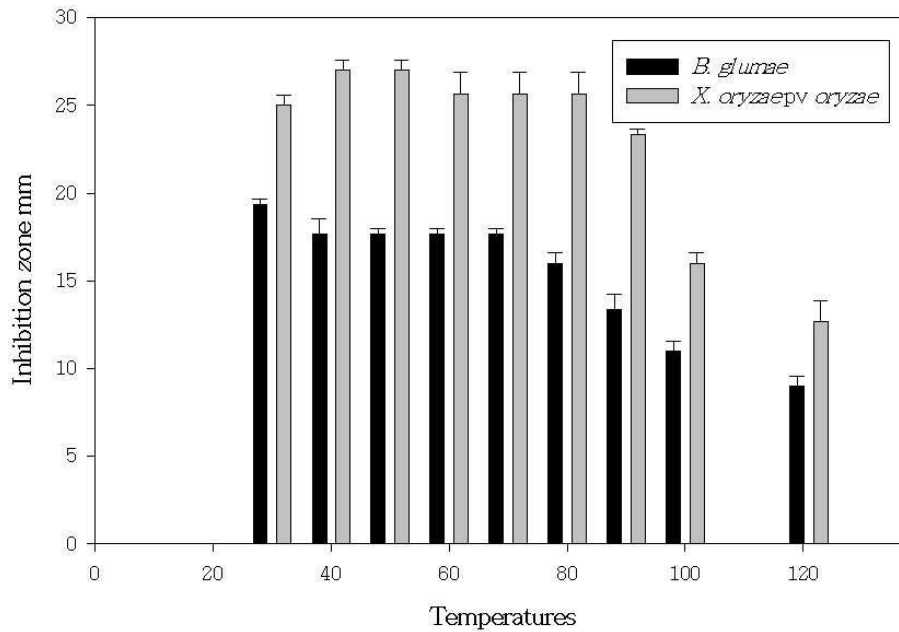


(a)



(b)

도면7



서열 목록

<110> Jgreen Inc.

INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> Endophytic bacteria Bacillus Methylophilus YC7007 and
development of a multifunctional biopesticide and microbial
fertilizer using same

<130> NP13-04055

<160> 1

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 1381

<212> RNA

<213> Bacillus methylophilus

<400> 1

acagatggga gcttgctccc tgatgttagc ggccggacggg tgagtaaacac gtgggtaacc 60

tgccctgtaag actgggataa ctccgggaaa ccggggcctaa taccgatgg ttgtttgaac 120

cgcatgggtc agacataaaa ggtggcttcg gctaccactt acagatggac ccgcggcgca 180

ttagctagtt ggtgaggtaa cggctcacca aggcgacgat gcgtagccga cctgagaggg 240

tgatcgcca cactgggact gagacacggc ccagactcct acgggaggca gcagtaggga 300

atcttcgca atggacgaaa gtctgacgga gcaacgccgc gtgagtgatg aaggttttcg 360

gatcgtaaag ctctgttgtt agggagaagaac aagtgccgtt caaatagggc ggcaccttga 420

cggtacctaa ccagaaagcc acggctaact acgtgccagc agccgcggta atacgtaggt	480
ggcaagcggt gtccggaatt attgggcgta aagggtctgc aggcggtttc ttaagtctga	540
tgtgaaagcc cccggctcaa ccggggaggg tcattggaaa ctggggaact tgagtgcaga	600
agaggagagt ggaattccac gtgtagcggg gaaatgcgta gagatgtgga ggaacaccag	660
tggcgaaggc gactctctgg tctgtaactg acgtgagga gcgaaagcgt ggggagcgaa	720
caggattaga taccctggta gtccacgccg taaacgatga gtgctaagtg ttagggggtt	780
tccgccccctt agtctctcag ctaacgcatt aagcactccg cctggggagt acggtcgcaa	840
gactgaaact caaaggaatt gacgggggcc cgcacaagcg gtggagcatg tggtttaatt	900
cgaagcaacg cgaagaacct taccaggtct tgacatcctc tgacaatcct agagatagga	960
cgcccccttc gggggcagag tgacaggtgg tgcattggtg tcgtcagctc gtgtcgtgag	1020
atgttgggtt aagtcccgca acgagcgcaa cctttgatct tagttgccag cattcagttg	1080
ggcactctaa ggtgactgcc ggtgacaaac cggaggaagg tgggatgac gtcaaatcat	1140
catgccccctt atgacctggg ctacacacgt gctacaatgg acagaacaaa gggcagcgaa	1200
accgcgaggt taagccaatc ccacaaatct gttctcagtt cggtatcgag tctgcaactc	1260
gactgcgtga agctggaatc gctagtaatc gcggatcagc atgccgcggt gaatacgttc	1320
ccgggccttg tacacaccgc ccgtcacacc acgagagttt gtaacaccgc aagtcggtga	1380
g	1381