(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl. [7]
C12N 1/20

(11) 공개번호 특2002-0090249
(43) 공개일자 2002년12월02일

(21) 출원번호 10-2001-0029200
(22) 출원일자 2001년05월26일

(71) 출원인 이기성
대전광역시 서구 갈마동 산 35-41 영풍빌라 마동 103호

(72) 발명자 이기성
대전광역시 서구 갈마동 산 35-41 영풍빌라 마동 103호
박영식
대전광역시서구월평동전원아파트103-705
고동규
대전광역시중구태평동253-1유등마을아파트108-501
현기돈
대전광역시서구갈마동366-10
조주환
대전광역시중구문화동1-46상아아파트5-401

(74) 대리인 김형준

심사청구 : 있음

(54) 항진균 활성을 가지는 신규의 미생물 바실러스 섭틸리스이비엠 3과 이를 함유하는 미생물농약

요약

본 발명은 광범위한 항진균 활성을 가지는 신규의 미생물 바실러스 섭틸리스(Bacillus subtilis) EBM 3과 이를 함유하는 미생물 농약에 관한 것이다.

바실러스 섭틸리스 EBM 3은, 식물 병원성 진균인 벼도열병(Pyricularia oryzae), 입고병(Pythium ultimum), 벼문고병(Rhizoctonia solani), 사과부패병(Botryoshaeria dothidea), 깨씨무늬병(Bipolaris sorokniana), 잿빛곰팡이병(Botrytis cinerea), 고추탄저병(Colletotrichum gloeosporioides), 벼도열병(Pyricularia grisea), 수박덩굴마름병(Mycosphaerella melonis), 고추역병(Phytophthora capsici), 토마토겹둥근무늬병(Alternaria solani), 근부병(Fusarium oxysporum), 균핵병(Sclerotinia sclerotiorum), 버섯곰팡이병(Neurospora sp.), 그리고 특이적으로 동물 병원성 진균인 칸디다증(Candida albicans)에 항진균 활성 스펙트럼을 가지는 미생물이며, 이를 함유하는 병원성 진균 방제용 미생물농약(biopesticide)이 제공된다.

본 발명의 바실러스 섭틸리스 EBM 3은 항진균 활성에 더하여 유기물 분해능, 농약내성 및 농약분해능을 지니고 있어 환경보전 및 정화작용이 있는 다기능적 농약제로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도

도 1

색인어

바실러스 섭틸리스, 진균, 바이오 매트릭스, 미생물농약

명세서

도면의 간단한 설명

도1은 EBM 각 균주 유전자의 RAPD에 의한 유연관계 비교 사진

도2는 본 발명의 바실러스 섭틸리스 EBM 3 균주의 항진균 활성 비교 사진

도3은 바실러스 섭틸리스 EBM 3 균주와 트리코더마 균주의 항진균 활성 스펙트럼 비교표

도4는 바실러스 섭틸리스 EBM 3 균주와 바이오 매트릭스를 이용한 미생물농약 제조도

도5는 본 발명의 미생물농약의 버섯 곰팡이병(Neurospora sp.)에 대한 방제효과 비교사진

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 식물 및 동물 병원성 진균에 대해 광범위한 항진균 활성 스펙트럼을 가지는 신규의 세균 바실러스 섭틸리스(Bacillus subtilis) EBM 3과 이를 함유하는 식물 병원성 진균 방제용 미생물농약(biopesticide)에 관한 것이다.

미생물농약은 농작물의 해충, 잡초, 병원 미생물 등을 방제하기 위하여, 자연에서 분리 선발하거나 용도에 맞게 변형시킨 미생물, 또는 미생물이 분비하는 화합물 등을 제품화 한 것이다.

미생물농약의 개발에 있어 필수적인 요소는, 길항성이 뛰어난 유용 미생물을 선발하거나 변형하여 만들어 내고, 선발된 미생물 또는 미생물이 분비하는 약제를 대량 생산하여 이 들을 농작물에 효율적으로 전달하여 사용하는데 있다.

최근 미생물을 이용한 미생물농약의 연구개발이 활발히 이루어지고 있다.

한국 특허출원 1990-0017551(신규의 바실러스 서브틸리스 아종 및 이로부터 생산되는 항진균 물질 KRF-001 복합체의 용도)에는, 항진균 올리고 펩티드계 물질을 생산하는 바실러스 서브틸리스 아종 크릭티엔시스(Bacilus subtilis subsp. Krictiensis)에 관한 것이 있으나, 항진균 활성 스펙트럼이 좁은 문제점이 있었다.

한국 특허출원 1993-0022037(바이오캡슐화를 이용한 미생물 살충제의 제조방법)에는, 콩류의 천연 고분자를 물과 혼합하여 단백질이 풍부한 천연겔 매트릭스를 제조하고, 가압멸균 후, 바실러스 터링지엔시스 포자 등을 혼합 후, 건조시켜 바이오캡슐화된 미생물 살충제를 제조하는 방법에 관한 것이 있으나, 항진균 활성 스펙트럼이 좁고, 바이오 매트릭스의 구성 성분과 조성이 복잡한 점이 있었다.

한국 특허출원 1998-027468(개선된 코팅 농약성 매트릭스, 이의 제조방법 및 이를 함유한 조성물)에는 농약제, 중합체, 가소제, 자외선 보호제, 활성 증진제,활탁제를 포함하는 코팅된 농약성 매트릭스에 관한 것이 공지되어 있으나, 항진균 활성 스펙트럼이 좁고, 효과도 한계를 갖고 있었다.

또한, 본 출원인이 선출원한 한국 특허출원 10-1998-0062437(병원성 진균에 대한 항진균 활성을 가지는 미생물, 이를 함유하는 항진균성 미생물 농약제 및 그의 제조방법)에는, 바실러스 섭틸리스 변종 아밀로리쿠파시엔스(Bacilius subtilis var. amyloliquefaciens), 슈도모나스 아에루기노사(Pseudomonas aeruginosa) 등 항진균 활성을 나타내는 미생물과 이를 이용한 바이오 매트릭스 에 관한 것이 나와 있으나, 바이오 매트릭스의 구성이 복잡하고, 항진균 활성 스펙트럼이 좁은 점이 있었다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은 식물 병원성 진균에 대해 광범위한 항진균 활성 스펙트럼을 가지며 항진균 활성이 우수한 신규의 미생물과 이를 함유하는 환경친화적인 진균 방제용 미생물농약을 제공하는데 그 목적이 있다.

발명의 구성 및 작용

본 발명은 식물 병원성 진균에 대해 광범위한 항진균 활성 스펙트럼을 가지며 항진균 활성이 우수한 신규의 미생물 바실러스 섭틸리스(Bacillus subtilis) EBM 3(수탁번호 :KCTC 0983BP)을 제공한다.

또한, 본 발명의 바실러스 섭틸리스 EBM 3을 함유하는 환경친화적인 미생물농약이 제공된다.

본 발명의 바실러스 섭틸리스 EBM 3은, 식물 병원성 진균인 벼도열병(Pyricularia oryzae), 입고병(Pythium ultimum), 벼문고병(Rhizoctonia solani), 사과부패병(Botryoshaeria dothidea), 깨씨무늬병(Bipolaris sorokniana), 잿빛곰팡이병(Botrytis cinerea), 고추탄저병(Colletotrichum gloeosporioides), 벼도열병(Pyricularia grisea), 수박덩굴마름병(Mycosphaerella melonis), 고추역병(Phytophthora capsici), 토마토 겹둥근무늬병(Alternaria solani), 근부병(Fusarium oxysporum), 균핵병(Sclerotinia sclerotiorum), 버섯곰팡이병(Neurospora sp.) 등 과 동물 병원성 진균인 칸디다증(Candida albicans) 등에 항진균 활성을 나타낸다.

또한, 본 발명의 바실러스 섭틸리스 EBM 3은, 글루칸, 전분, 단백질, 셀룰로오즈, 리그닌 등의 유기물 분해 능력이 높으며, 제초제, 살균제 및 살충제를 포함한 20여종의 농약에 대하여 내성이 있고, 농약을 분해하므로 여러 종류의 농약에 대하여 저항성을 나타낸다.

따라서 본 발명의 항진균 활성 미생물은 환경 보전 및 정화에 유용한 환경친화적인 다기능적 항진균제로 이용될 수 있다.

즉 본 발명의 미생물은 항진균 활성에 더하여 유기물 분해능, 농약 내성 및 농약 분해능 등을 가짐으로 토양개량제, 퇴비부숙제, 엽면살포제 또는 관주살포제 등의 유효성분으로 이용될 수 있다.

특히, 느타리버섯 배양시 문제가 되는 뉴로스포라(Neurospora sp.)의 성장억제에 탁월한 효과가 있어, 버섯의 곰팡이병 방제용 미생물농약, 버섯재배용 무살균 배지제조를 위한 첨가제, 바이오 상토의 제조에도 활용될 수 있다.

또한, 본 발명의 바실러스 섭틸리스 EBM 3은 식물종자 발아율을 전혀 저해하지 않는 것으로 나타나 미생물 농약제로 뿐만 아니라 종자 피막화로 저장 및 보존에도 유용하다.

또한, 본 발명은 본 발명의 바실러스 섭틸리스 EBM 3과 미생물 담체인 바이오 매트릭스를 혼합하여 만든 미생물 농약을 제공한다.

바이오 매트릭스는 본 출원인이 선출원한 한국특허출원 10-1998-0062437 에 의하여 만든 것을 사용할 수 도 있지만, 선출원의 바이오 매트릭스 구성 성분이 복잡하므로 다음과 같이 구성을 단순화 하여 만든 것을 사용한다.

바이오 매트릭스는 식물자원 고분자 재료, 미생물 기원 생체 고분자 재료, 영양제, 보조 재료 및 첨가제로 구성된다.

식물자원 고분자 재료는 감자가루, 콩가루, 전분가루 등을 사용한다.

미생물기원 생체 고분자는 뮤코폴리사카라이드, 폴리-베타하이드록시-알카노에이트, 응집제로 구성된다.

영양제로는 포도당, 펩톤, 무기염류를 사용한다.

보조 재료로 질석, 왕겨 태운가루 등을 사용한다.

첨가제로 증량제, UV 차단제, 계면활성제를 사용한다.

이와 같은 재료를 혼합하여 만들어진 바이오 매트릭스에 본 발명의 바실러스 섭틸리스 EBM 3을 다음과 같이 혼합하여 미생물 농약을 만든다.

본 발명의 바실러스 섭틸리스를 배양하여 농축한 다음, 뮤코폴리사카라이드로 피막화 한다.

상기 바이오 매트릭스 성분을 혼합하여 만든 바이오 매트릭스를 멸균한 다음, 50 ℃ 정도로 냉각한다.

피막화된 바실러스 섭틸리스 EBM 3을 바이오 매트릭스와 혼합하되 바이오 매트릭스 그람 당 균체 수가 10^8 - 10^9 정도 되게 한 다음 호모지나이저(Homogenizer) 속에서 균일하게 혼합시킨다.

이렇게 하여 만들어진 미생물과 바이오 매트릭스 복합체를 건조하여 적당한 크기의 분말형태인 미생물농약을 만든다.

본 발명의 바실러스 섭틸리스 EBM 3을 피막화한 다음 바이오 매트릭스와 혼합하여 만든 미생물농약은 활성 세균의 생존 유지기간, 생존 발아율, 항진균 활성 유지, 항진균 물질 생성능력이 우수하다.

이 미생물농약은 항진균 미생물농약, 종자 코팅제, 미생물영양제, 토양개량제, 퇴비부숙제, 엽면살포제 또는 관주살포제 등에 사용될 수 있다.

이하 실시예에 의하여 본 발명을 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예들은 본 발명을 예시하는 것으로, 본 발명의 내용이 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

< 실시예 1 > 신규 균주 바실러스 섭틸리스 EBM 3의 선발

식물 병원성 진균에 대해 광범위한 활성 스펙트럼을 가지며, 활성 효과가 우수한 미생물을 선발하기 위해 수차례의 선발과 확인 실험을 하였다.

충청지역 일대의 토양, 옥비, 퇴비 등으로부터, 식물 병원성 진균에 강한 항진균 활성을 나타내는 균주 109 개 균주를 분리하고, 이중 45 개 균주를 1 차 선발하였다.

다시 항진균 효과, 균주의 활성 등을 기준하여 2차로 EBM 1, 2, 3, 13, 31, 43, 67, 99 등 12 균주를 선발하였다.

이들을 다시 항진균 효과 시험 등을 하여 우수한 항진균 활성세균 EBM 3, EBM 13, EBM 31, EBM 99 를 선발하였다.

선발된 이들 균주를 API 키트 및 추가적으로 80 가지 이상의 실험을 수행하여 이들의 생리화학적 특성을 알아내고 동정하였다(표1 참조).

동정한 결과, EBM 3, EBM 13, EBM 31 균주는 바실러스 섭틸리스(Bacillus subtilis)로 확인되었고, EBM 99는 바실러스 폴리믹사(Bacillus polymyxa)로 확인되었다.

표1. EBM 균주의 생리화학적 특성

[표 1]

Test	substrate	reaction/enzymes	EBM13	EBM3	EBM31	EBM99
Gram	Gram staining	+/−	+	+	+	+
Cell form		rod/coccus	rod	rod	rod	rod
Catalase	hydrogen peroxide	catalase	+	+	+	−
OX	tetramethyl - p - phenylene diamine	cytocrome oxidase	−	−	−	−
ONPGPNPG	ortho - nitrophenyl - galactoside/p - nitro	beta - galactosidase	−	−	−	+
ADH	arginine	arginine dihydrolase	+	+	+	−
CIT	sodium citrate	assimilation	+	+	+	−
URE	urea	urease	+	+	+	−
INDTRP	tryptophane	indol production	−	−	−	−
GEL	gelatine	gelatinase(protease)	+	+	+	−
ARA	arabinose	assimilation	+	+	+	+
NO_3	potassium nitrate	reduction of nitrates to nitrites	+	+	+	+
		reduction of nitrates to nitrogen	−	−	−	−
ESC	esculin	beta - glucosidase	+	+	+	+
MNE	mannose	assimilation	+	+	+	±
NAG	N - acetyl - glucosamine	assimilation	+	+	+	−
MAL	maltose	assimilation	+	+	+	±
GNT	gluconate	assimilation	+	+	+	+
CAP	caprate	assimilation	−	−	−	−
ADI	adipate	assimilation	+	+	−	−
MLT	malate	assimilation	+	+	+	−
PAC	phenylacetate	assimilation	−	±	−	−
PA	proteolytic agar(gelatine)	1% tannic acid	+	+	+	+
LA	lipolytic agar(tween 80)	opaque zone	−	−	−	+
SA	amylolytic agar(starch)	Gram iodine	+	+	+	+
CA	cellulolytic agar(CMC)	0.5% congo red	+	+	+	+
SPF	spore staining	spore formation	+	+	+	+
	Glucose	acidification	+	+	+	+
		carbon dioxide(gas)	−	−	−	+
	Fructose	acidification	+	+	+	+
		carbon dioxide(gas)	−	−	−	+
	Lactose	acidification	−	−	−	+
		carbon dioxide(gas)	−	−	−	+
	Sucrose	acidification	+	+	+	+
		carbon dioxide(gas)	−	−	−	+
	Mannitol	acidification	+	+	+	+
		carbon dioxide(gas)	−	−	−	+
VP	Voges - Proskauer test		+	−	+	+
MR - VP	Methyl Red test		−	−	−	+

< 실시예 2 > EBM 균주의 상호 유연관계 비교

실시예 1에서 선발한 EBM 균주의 상호 유연관계를 비교 확인하였다.

동일한 종속명(Bacillus subtilis)을 가지는 EBM 균주 EBM 13, EBM 3, EBM 31, EBM 43과 특허출원을 미생물 국제기탁기관인 한국생명공학연구원 유전자은행의 공시균주인 KCTC 1660 및 본 출원인이 선출원한 한국특허출원 1998-0062437의 KCTC 8913P 균주를 대상으로 하여, 랜덤 프라이머(random primer)를 이용하여, 유전자의 RAPD(random amplified polymorphic DNA) 분석을 통하여 상호 유연관계를 비교하였다(표2, 도1 참조).

그 결과 각각의 균주 마다 독특한 DNA 밴드를 나타냈으며, 각 균주마다 유연관계가 서로 다른 것으로 나타났다.

표2. EBM 균주의 상호 유연관계 비교

[표 2]

균주	EBM 13	EBM 3	EBM 31	EBM 43	KCTC8913P	KCTC1660
EBM 13	100	87.36	58.87	59.79	80.325	18.065
EBM 3	87.36	100	56.265	55.36	75.005	17.81
EBM 31	58.87	56.265	100	48.08	57.405	16.55
EBM 43	59.79	55.36	48.08	100	62.955	15.875
KCTC8913P	80.325	75.005	57.405	62.955	100	19.605
KCTC 1660	18.065	17.81	16.55	15.875	19.605	100

< 실시예 3 > EBM 균주의 항진균 활성 스펙트럼 비교

식물 병원성 진균류 14종 벼도열병(Pyricularia oryzae), 입고병(Pythium ultimum), 벼문고병(Rhizoctonia solani), 사과부패병(Botryoshaeria dothidea), 깨씨무늬병(Bipolaris sorokniana), 잿빛곰팡이병(Botrytis cinerea), 고추탄저병(Colletotrichum gloeosporioides), 벼도열병(Pyricularia grisea), 수박 덩굴마름병(Mycosphaerella melonis), 고추역병(Phytophthora capsici), 토마토 겹둥근무늬병(Alternaria solani), 입고병, 근부병(Fusarium oxysporum) 또는 균핵병(Sclerotinia sclerotiorum), 버섯곰팡이병(Neurospora sp.) 그리고 동물 병원성 진균인 칸디다증(Candida albicans)에 대한 항진균 활성 실험을 하였다.

병원성 진균류가 도말된 PDA (Difco Co.) 배지에 종이 디스크 (직경 6mm)를 이용하여 영양 배지에서 전 배양된 세포 배양액을 접종하고 30℃에서 2 3일간 배양하여 조사했다.

상기 병원성 진균을 대상으로 한 항진균 활성 조사결과는 표3과 같다.

표3. EBM 균주의 항진균 활성 스펙트럼

[표 3]

항진균 활성세균	항진균 활성														
	C. A	P. O	P. U	R. S	B. D	B. S	B. C	C. G	P. G	M. M	P. C	A. S	F. O	S. S	N.s
EBM 13	◎	●	◎	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
EBM 3	●	●	○	●	●	●	●	●	●	○	●	●	●	●	●
EBM 31	●	●	●	●	●	◎	●	●	●	●	●	◎	●	●	●
EBM 99		●	●	●	◎	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

● : 매우 우수 ; ◎ : 우수 ; ○ : 약간 C. A : Candida albicans. P. O : Pyricularia oryzae (벼도열병). P. U : Pythium ultimum (입고병). R. S : Rhizoctonia solani (벼문고병). B. D : Botryoshaeria dothidea (사과부패병). B. S : Bipolaris sorokniana (깨씨무늬병). B. C : Botrytis cinerea (잿빛곰팡이병). C. G : Colletotrichum gloeosporioides (고추탄저병). P. G : Pyricularia grisea (벼도열병). M. M : Mycosphaerella melonis (수박덩굴마름병). P. C : Phytophthora capsici (고추역병). A. S : Alternaria solani (토마토 겹둥근무늬병). F. O : Fusarium oxysporum (입고병, 근부병). S. S : Sclerotinia sclerotiorum (균핵병). N. s : Neurospora sp. (버섯곰팡이병균)

본 발명의 바실러스 섭틸리스 EBM 3은 벼도열병 등 13개의 식물 병원성 진균과 캔디다 알비칸스 동물 병원성 진균에 매우 우수 하였으며, 입고병 진균과 수박덩굴마름병에는 약한 활성을 나타냈다.

본 발명의 우수한 항진균성 균주 바실러스 섭틸리스(Bacillus subtilis) EBM 3을, 특허출원을 위한 국제미생물기탁기관인 한국생명공학연구원 유전자은행에 수탁번호 KCTC 0983BP 로 2001년 4월 13일 기탁하였다.

< 실시예 4 > 바실러스 섭틸리스 EBM 3의 최적 배양 조건

상기 실시예 1에서 선발한 본원발명의 바실러스 섭틸리스 EBM 3 균주를 대상으로 항진균 활성물질이 생성되는 최적 조건을 조사하였다.

실험에 사용한 배지 조성 중 탄소원, 질소원 및 인산원에 대한 것은 표2에 나타낸 바와 같고 이러한 조성을 이용한 성장 효과는 미생물의 성장곡선을 48시간 동안 620 또는 630㎚ 에서의 흡광도로 측정하여 확인하였다.

표4. 미생물 배지 조성

[표 4]

배 지	종류
Glu-MOPS 배지의 인산 농도(mM)	0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0
질소원	비프 추출물, 카사미노산, 말트 추출물, 펩톤, 트립톤, 우레아, 이스트 추출물
탄소원	과당, 갈락토스, 글리세롤, 락토스, 말토스, 만니톨, 슈크로스

(1) 탄소원 종류에 따른 성장량

GM63 배지에 질소원으로 펩톤 (0.5%)을 고정양으로 넣어주고 각각의 탄소원을 0.5%씩 첨가하여 조사하였다. 포도당을 제외한 7가지 탄소원 중 락토스와 만니톨이 탄소원으로 효과적이었다.

(2) 질소원 종류에 따른 성장량

GM63 배지에 각각의 질소원을 0.5%로 첨가한 것을 이용하여 측정하였다. 항진균 활성 균주의 성장을 위한 질소원으로 펩톤과 이스트 추출물이 가장 좋았고, 우레아를 사용한 경우 성장률이 가장 낮았다.

(3) 인산원 농도에 따른 성장량

인산원은 Glu-MOPS 배지의 인산 농도를 달리하여 항진균 활성 균주의 성장 정도를 측정하였다. 인산 농도에 따라 성장률은 정확히 비례하였고, 0.5mM 이상의 농도에서는 성장량에 차이가 없었다.

(4) 탄소원, 질소원 종류 및 인산원 농도에 따른 항진균 활성 조사

항진균 활성 균주로부터 배양시간 (6, 12, 24시간)에 따라 배양액을 취하고 이를 원심분리하여 미생물을 제거한 다음 상등액에 동량의 부탄올을 사용하여 항진균 활성물질을 추출하였다.

이 중 1㎖ 만을 농축하여 항진균 활성도를 측정하였다. 활성도는 캔디다(C. albicans) 또는 푸사리움(Fusarium) 이 성장하지 못하는 억제환의 직경 (cm 단위)으로 측정하였다. 그 결과 EBM 3 균주는 배지 조성에 영향을 받지 않고 높은 활성도를 보였다.

(5) 아미노산, 비타민 첨가 및 pH 변화에 따른 항진균 활성 조사

EBM 3 균주를 대상으로 환경요인에 따른 항진균 활성물질의 생성능을 비교하기 위하여, 온도, pH, 비타민 (B1, B2, B12) 및 첨가 아미노산 등을 달리하면서 배양하였다.

각 구간에서 배양된 배양액의 상등액을 동량의 부탄올로 추출하여 감압 농축하고, 농축액으로부터 항진균 활성물질을 측정한 결과, 비타민 B1이 첨가될 때 항진균 활성물질을 최대로 생산하였다.

아미노산은 아르기닌, 라이신을 처리한 경우 항진균 활성물질의 생성능이 높았다.

(6) 온도에 따른 항진균 활성물질 생성능

배양 온도를 15, 25, 30, 37℃ 구간에서 3일간 배양하여 항진균 활성도를 측정한 결과, 30 37℃ 온도 구간에서 항진균물질 생성능이 우수하였다.

< 실시예 5> 바실러스 섭틸리스 EBM 3 균주의 항진균 활성도 비교

본 발명의 바실러스 섭틸리스 EBM 3 균주를 실시예 1에서 수집한 EBM 1과 EBM 2 를 대상으로 칸디다증균, 오이시드름병균, 사과겹무늬썩음병균, 벼잎집무늬마름병균에 대하여 항진균 활성도를 비교 시험하였다.

시험결과는 표5 및 도2에 나타냈다.

시험결과 본 발명의 바실러스 섭틸리스 EBM 3이 우수한 항진균 활성을 나타냈다.

표5. EBM 3 균주의 항진균 활성도 비교

[표 5]

균주	항진균 활성도(억제환, mm)			
	칸디다증균	오이시드름병균	사과겹무늬썩음병균	벼잎집무늬마름병균
EBM1	3.8	4.0	3.0	6.2
EBM2	9.0	9.0	7.0	8.8
EBM3	8.0	9.0	8.0	10.0

< 실시예 6> EBM 3 균주와 트리코더마(Trichoderma sp.) 균주의 항진균 스펙트럼 비교

본 발명의 바실러스 섭틸리스 EBM 3 균주를 현재 국제적인 종자회사로 알려진 인코텍(INCOTEC)사의 종자 처리제로 사용되고 있는 트리코더마(Trichoderma sp.) 균주와 항진균 스펙트럼을 조사 비교하였다.

그 결과, 트리코더마 균주는 식물 병원성 진균 4종에 대하여 활성을 나타내는 데 비해,본 발명의 바실러스 섭틸리스 EBM 3 균주는 조사한 11종 모두의 식물병원성 진균에 항진균 스펙트럼을 가지는 것으로 나타났다(도3 참조).

< 실시예 7> 바실러스 섭틸리스 EBM 3이 식물 종자 발아율에 미치는 영향조사

본 발명의 바실러스 섭틸리스 EBM 3을 사용하여 발아율을 조사한 결과, 불암조생 풋호박 종자의 발아율은 100%의 발아율을 나타내고, 오리엔탈 피망글로리의 경우, 기준균과 유사한 발아율을 보였다.

이와 같이 본 발명의 바실러스 섭틸리스 EBM 3은 식물종자 발아율을 저해시키지 않으므로 포장에서 쓰이는 미생물농약으로 뿐만 아니라, 종자 수준에서 피막화시킬 경우 종자 저장 및 보존에도 대단히 유용하다.

< 실시예 8 > 미생물농약 제조용 바이오 매트릭스 제조

항진균 활성 세균이 자연 환경생태계 또는 식물체에서 생존을 유지하면서, 항진균 생리활성물질을 생산하기 위해서는 영양분 공급 (단기적, 중장기간 이용가능한 영양분), 항진균 세균의 보호, 발아율 증진, 장단기적 생장 등을 유지하는 것이 필요하다.

이와 같은 작용을 가지는 바이오 매트릭스(bio-matrix)를 제조하였다.

바이오 매트릭스는 식물자원 고분자 재료(biogel)에, 미생물기원 생체고분자(microgel), 영양제, 보조재료, 그리고 첨가제를 혼합하여 만들었다.

식물자원 고분자 재료로는 감자가루, 콩가루 등을 사용했다.

미생물 기원 생체고분자로는 뮤코폴리사카라이드 (MPS), 폴리-베타-하이드록시알카노에이트, 응집제를 사용하였다.

영양제로는 포도당, 펩톤과 무기염류를 사용했다.

보조 재료로는 질석, 왕겨 태운가루를 사용했다.

첨가제로는 증량제, UV 차단제, 계면활성제를 사용했다.

바이오 매트릭스 제조용 조성 성분과 성분량을 표6에 나타냈다

표6. 바이오 매트릭스 조성 성분량

[표 6]

성 분		성분량
식물자원 고분자 재료(감자가루, 콩가루)		400g
미생물기원 생체고분자 재료(뮤코폴리사카라이드, 폴리-베타-하이드록시알카노에이트, 응집제)		5 10g
영양제	포도당	2g
	펩톤	2g
	$MgCl_2$	0.04g
	$CaCO_3$	2g
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	120mg
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	20mg
	KH_2PO_4	0.1g
보조 재료(질석, 왕겨태운가루)		5 10g
첨가제(증량제, UV 차단제, 계면활성제)		미량
H_2O		1ℓ

< 실시예 9> 바실러스 섭틸리스 EBM 3을 함유하는 미생물농약의 제조

본 발명의 바실러스 섭틸리스 EBM 3을 배양하여 농축하였다.

농축된 바실러스 섭틸리스 EBM 3을 뮤코폴리사카라이드(MPS : mucopolysaccharide)로 피막화하였다.

실시예 8에서 만든 바이오 매트릭스를 멸균한 후 50 ℃ 정도에서 냉각시켰다.

피막화된 바실러스 섭틸리스 EBM 3 균체 수가 바이오 매트릭스 그람 당 10^8 - 10^9 개 정도 되게 혼합한 다음 호모지나이저(homogenizer)속에서 균일하게 섞었다.

이렇게 만들어진 바실러스 섭틸리스 EBM 3과 바이오 매트릭스 복합체를 건조하여 적당한 크기의 분말로 제조하여 미생물농약을 만들었다.

본 발명의 미생물농약을 이용하여 수화제, 입제, 코팅입제 등 도 만들 수 있다.

< 실시예 10> 미생물 농약을 이용한 코팅종자의 제조

본 발명의 미생물 농약을 이용하여 코팅종자를 제조하였다.

실시예 9에서 만든 미생물농약에, 전착제(sticker), 증량제(filler) 등을 혼합하여 슬러리를 제조하였다.

종자코팅기계(seed processing machine)를 이용하여 종자를 슬러리로 펠렛코팅(pelletizing)하거나, 필름코팅(film coating)하였다.

또는 펠렛코팅과 필름코팅 두 가지 기법을 동시에 적용한 다양한 형태의 생물농약 코팅종자를 만들었다.

생물농약 코팅종자의 경우, 파종하면 미생물이 식물체의 뿌리와 함께 생장하여 작물의 근권에 자연스럽게 정착. 병원균의 침입부위를 유용 미생물이 미리 선점, 효율적으로 토양 병원균의 침입을 막아 식물을 보호, 뿌리에 유용물질을 분비하여 작물의 생육 촉진효과를 나타낸다.

< 실시예 11> 미생물농약을 이용한 미생물 영양제의 제조

상기 실시예 9에서 제조된 본 발명의 미생물농약을 이용하여 미생물 영양제를 제조하였다.

본 발명의 미생물농약과, 생체고분자 물질(microgel), 식물영양원(질소, 인산, 칼륨, 아미노산, 기타 무기물 등), 전착제(sticker), 증량제(filler), UV 차단제 등을 혼합하여 분말 및 액상 형태의 미생물 영양제를 만들었다.

미생물 영양제의 경우, 식물체에 살포하였을 때 작물의 생육증진효과 뿐만 아니라 본 발명의 바실러스 섭틸리스 EBM 3이 함유되어 있기 때문에 식물병 방제효과도 뛰어났다.

< 실험예 1> 본발명의 바실러스 섭틸리스 EBM 3 균주의 유기물 분해능 및 농약 내성 조사

(1) 바실러스 섭틸리스 EBM 3의 환경 보전 및 정화 능력

항진균 활성 세균이 생물 폐자원을 이용하여 고부가가치의 미생물 농약 제제 및 항진균제 생산은 물론이고, 환경정화능력이 있는지 여부를 가리기 위해 세포외효소의 활성을 액체 상태와 고체배지 상태로 나누어 조사하였다.

본 발명의 바실러스 섭틸리스 EBM 3은 글루칸, 전분, 단백질, 셀룰로오즈, 리그닌 등 유기물 분해능력이 뛰어났다.

(2) 바실러스 섭틸리스 EBM 3의 농약 내성 및 분해능

본 발명의 바실러스 섭틸리스 EBM 3의 농약에 대한 저항성을 분석하기 위하여 NA 배지에 23종의 농약, 살균제로는 베노밀(Benomyl), 플루실라졸 (Flusilazole), 테부코나졸(Tebuconazole), 옥사디실(Oxadixyl), 에디펜포스 (Edifenphos), 트리사이클라졸(Tricyclazole), 만코젭(Mancozeb), 클로로타로닐 (Chlorothalonil), 디클로프루아니드(Dichlofluanide), 펜사이쿠론(Pencycuron), 아족시스트로빈(Azoxystrobin), 수산화구리(Copper hydroxide), 이소프로티오란 (Isoprothiorane), 이프로벤포스(Iprobenphos), 살충제로는 클로르페나피르 (Chlorfenapyr), 이미다클로프리드(Imidacloprid), 카보퓨란(Carbofuran), 펜파이옥시메이트(Fenpyroximate), 클로르피리포스(Chlorpyrifos), BPMC, 디아지논 (Diazinon), 제초제로는 부타클로르(Butachlor), 글리포세이트(Glyphosate)를 각각 첨가하여 30℃에서 2일간 배양하여 성장 여부를 관찰하였다.

농약 분해능의 분석을 위해서는 탄소원으로 포도당 대신에 농약를 첨가한 GM63 액체 배지와, 유일한 인(P)원으로 농약을 첨가한 Glu-MOPS 액체 배지에 균주를 30℃에서 3일간 배양하여 성장 여부 및 분해능을 UV 스펙트럼과 TLC 방법 등으로 조사하였다.

대조군 (control)으로는 탄소원으로 포도당이 첨가된 GM63 액체 배지와 역시 원래의 인원인 인산을 첨가한 Glu-MOPS 0.1mM Pi 액체 배지에 균주를 배양하여 동일한 방법으로 조사하였다.

그 결과, 본 발명의 바실러스 섭틸리스 EBM 3은 여러 종류의 농약에 대하여 저항성을 갖고 분해능은 농약별로 차이를 나타내었다.

독성이 강하고 환경오염물질로 작용하는 대부분의 유기화학농약에 대하여 본 발명의 바실러스 섭틸리스 EBM 3이 저항성과 분해능을 가지고 있기 때문에 환경 보전 및 정화에 매우 유용한 환경 친화적인 다기능적 미생물농약으로 이용될 수 있다.

< 실험예 2> 본 발명의 미생물 농약의 안정성 및 성능 조사

(1) 미생물 농약의 안정성

미생물 농약은 약효 수명이 최소한 1 2년 정도 유지되는 것이 중요하다.

실시예 9에서 제조한 본 발명의 미생물 농약을 0 개월, 3 개월, 6 개월, 9 개월, 12 개월을 방치한 다음 회생되는 살아있는 미생물 수를 조사하였다.

농축된 바실러스 섭틸리스 EBM 3을 실험 구간을 설정하여 각각의 시료를 NA 평판배지 상에 도말한 다음 30℃에서 24시간 배양하고, 처음에 넣어준 미생물 수와 회생된 미생물 수를 비교하여 안정성을 측정하였다.

그 결과, 대조군에 비하여 피막화되어 건조된 본 발명의 미생물 농약은 다소 차이는 있지만 12개월 저장기간 동안 아무런 변화 없이 안정하였다.

회생된 바실러스 섭틸리스 EBM 3의 항진균 활성을 분석하기 위하여, 회생된 세균을 임의로 50개씩 선별하여 항진균활성(AF) 실험을 수행하였다.

그 결과, 모두 AF^+ 길항성을 보유하고 있어 회생된 균주들은 모두 생물학적인 항진균 활성을 그대로 유지함을 확인하였다.

(2) 미생물농약 내에서 바실러스 EBM 3 균주의 엽면, 토양생존률 조사

미생물농약 내의 바실러스 섭틸리스 EBM 3 균주에 대하여 배추엽면, 배추근권토양, 일반토양에서 1주후, 2주후의 생존률을 조사한 결과, 초기의 생존률에 비하여 오히려 2 20배까지 증가하였다.

(3) 미생물 농약의 살포 활성 조사

본 발명의 바실러스 섭틸리스 EBM 3 균주를 피막화시켜 제조한 미생물농약 시제품(5,000ppm, 10^7 cfu/㎖)은 대조약제 플루아지아남(Fluazianam, 200ppm)에 비하여 오이잿빛곰팡이에 대한 방제 효과가 오히려 높았으며(시제품: 85%, Fluazianam: 74%), 오이흰가루병에 대한 방제효과도 매우 우수하였다(시제품: 92%, Hexaconazole: 87%).

(4) 미생물농약을 이용한 코팅종자의 발아율 조사

본 발명의 미생물농약을 이용하여 실시예 10에서 코팅한 오이, 토마토, 고추의 종자들 100개씩을 대상으로 발아율을 조사하였다.

그 결과, 코팅 종자의 발아율 및 발아세가 코팅하지 않은 일반종자와 차이가 없거나 오히려 증가하는 효과가 나타났다.

(5) 미생물 농약의 UV 저항성 조사

실시예 9에서 제조한 미생물 농약의 UV 저항성을 조사하였다.

햇볕에 5시간 노출시킨 미생물농약 내에 함유되어 있는 바실러스 섭틸리스 EBM 3의 생존률은 감소되지 않았다.

< 실험예 3> 본 발명의 미생물농약과 항진균제의 독성 조사

본 발명의 바실러스 섭틸리스 EBM 3을 함유한 미생물농약과 시제품화한 다른 미생물농약을 대상으로 세포독성실험, 피부자극실험 및 급성독성실험을 수행하였다.

본 발명의 미생물농약과 다른 미생물 농약 시제품을 이용하여 모두 마우스를 대상으로 경구 투입에 의한 급성독성실험을 수행하였다.

그 결과, 본 발명의 미생물농약은 일반 농약투입 기준보다 높은 2,000mg/kg 을 투여하여도 전혀 독성을 나타내지 않을 뿐만 아니라 오히려 대조구에 비하여 체중이 증가하는 효과도 나타냈다.

발명의 효과

본 발명의 바실러스 섭틸리스 EBM 3은 식물 병원성 진균에 대하여 광범위한 항진균 활성 스펙트럼을 나타내며, 유기물 분해능, 농약내성 및 농약 분해능을 지니고 있어 환경 보전 및 정화 작용이 있는 다기능적 농약제로서 환경친화형 토양개량제, 퇴비부숙제, 환경정화제 등에도 이용될 수 있다.

또한, 본 발명의 바실러스 섭틸리스 EBM 3을 피막한 다음 바이오 매트릭스와 복합시켜 만든 진균 방제용 미생물농약은 우리나라에서 자생하는 미생물을 이용하여 경제적인 대체 효과가 크고 고성능을 가지므로 농업 인력도 획기적으로 줄일 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

병원성 진균에 대해 항진균 활성을 가지는 미생물 바실러스 섭틸리스(Bacillus subtilis) EBM 3(수탁번호 : KCTC 0983BP)

청구항 2.

제 1항에 있어서, 병원성 진균은 벼도열병(Pyricularia oryzae), 입고병(Pythium ultimum), 벼문고병(Rhizoctonia solani), 사과부패병(Botryoshaeria dothidea), 깨씨무늬병(Bipolaris sorokniana), 잿빛곰팡이병(Botrytis cinerea), 고추탄저병(Colletotrichum gloeosporioides), 벼도열병(Pyricularia grisea), 수박덩굴마름병(Mycosphaerella melonis), 고추역병(Phytophthora capsici), 토마토 겹둥근무늬병(Alternaria solani), 근부병(Fusarium oxysporum), 균핵병(Sclerotinia sclerotiorum), 버섯곰팡이병(Neurospora sp) 및 칸디다증Candida albicans) 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 바실러스 섭틸리스 EBM 3.

청구항 3.

제 1항에 있어서, 바실러스 섭틸리스 EBM 3은 미생물농약, 종자코팅제, 버섯의 곰팡이병 방제용 미생물농약, 버섯재배용 무살균 배지제조를 위한 첨가제, 바이오상토, 미생물영양제, 토양개량제, 퇴비부숙제, 엽면살포제 또는 관주살포제의 유효성분으로 이용되는 것을 특징으로 하는 바실러스 섭틸리스 EBM 3.

청구항 4.

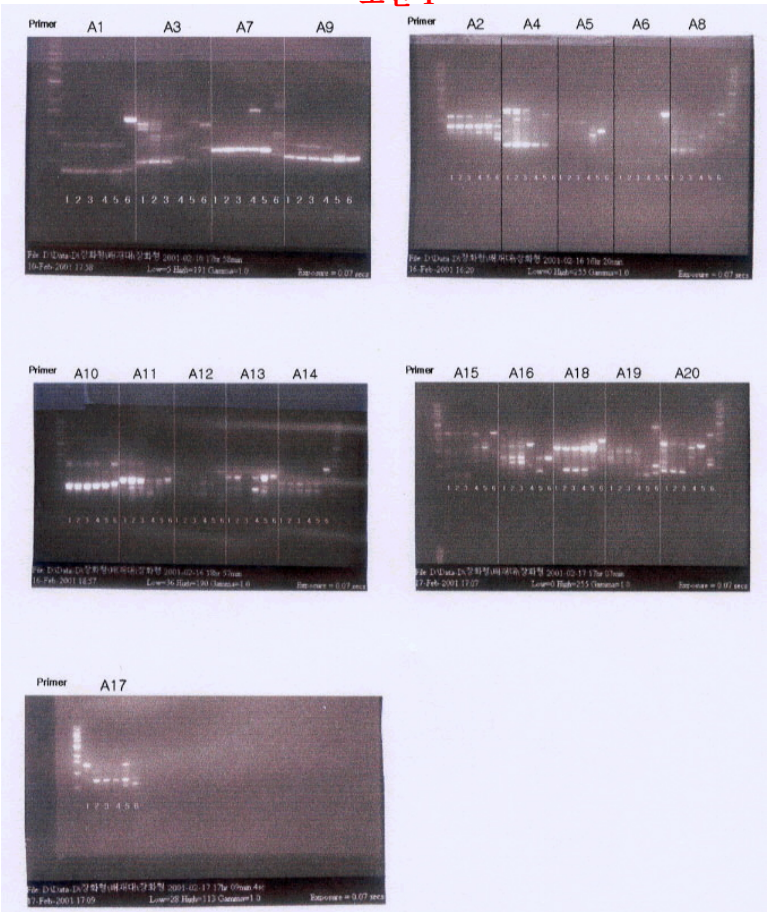
제 1항의 바실러스 섭틸리스 EBM 3을 뮤코폴리사카라이드로 피막한 다음, 식물유래 고분자 재료, 미생물 기원 생체고분자 재료, 영양제, 보조 재료 및 첨가제로 구성된 바이오 매트릭스와 복합체를 만들고 건조하여 제조된 미생물농약.

청구항 5.

제 4항에 있어서, 미생물농약은, 버섯곰팡이병 방제제, 버섯재배용 무살균 배지조성을 위한 첨가제, 바이오상토, 수화제, 입제, 코팅입제, 미생물영양제, 미생물 제제의 피막화물질, 엽면살포제 또는 관주살포제로 이용되는 것을 특징으로 하는 미생물농약.

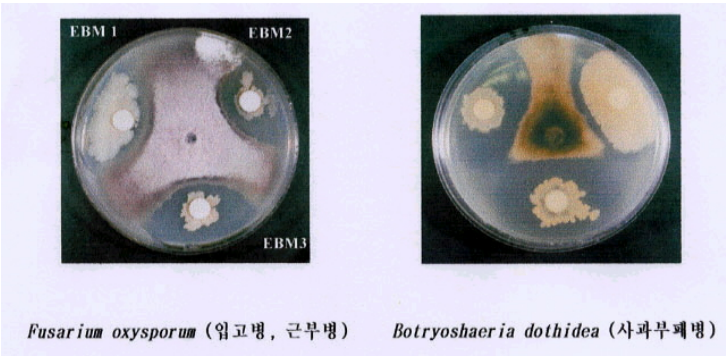
도면

도면 1



1: KCTC8913P, 2: EBM 13, 3: EBM 3, 4: EBM 31, 5: KCTC1660

도면 2



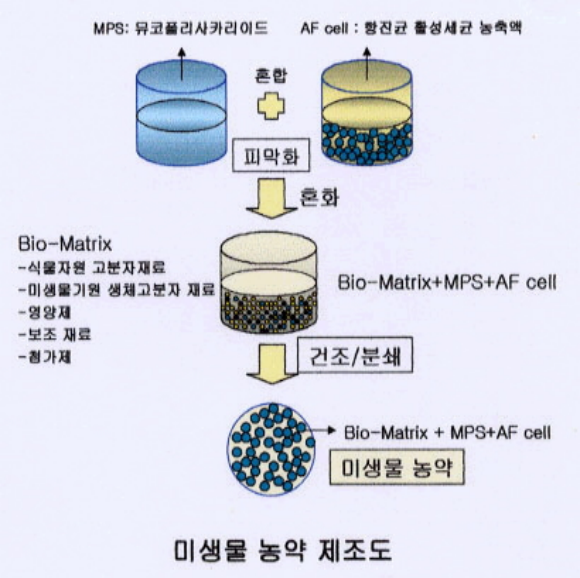
Fusarium oxysporum (입고병, 근부병) *Botryoshaeria dothidea* (사과부패병)

도면 3

회 사	균 주	항진균 활성스펙트럼										
		Py 입고병	Fu 입고병	Sc 균핵병	Rh 문고병	Ph 역병	Bo 잿빛곰팡이병	Bi 깨씨무늬병	Co 탄저병	Pr 도열병	My 만고병	Al 점둥근무늬병
EcoBioMed		o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
INCOTEC		o	o	o	o	-	-	-	-	-	-	-

Py: Pythium, Fu: Fusarium, Sc: Sclerotinia, Rh: Rhizoctonia, Ph: Phytophtora
Bo: Botrytis, Bi: Bipolaris, Co: Colletotrichum, Pr: Pyricularia, My: Mycosphaerella
Al: Alternaria

도면 4



미생물 농약 제조도

도면 5