

다기능성 신소재를 이용한 딸기 탄저병 방제용  
환경친화형 제제 개발

(Development of the Environment-Friendly  
Formulation with Multifunctional New Materials to  
Control Strawberry Anthracnose)

동 아 대 학 교

농림수산식품자료실



0018588

농 립 수 산 식 품 부

# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “다기능성 신소재를 이용한 딸기 탄저병 방제용 환경친화형 제제 개발”의 보고서로 제출합니다.

2009년 4월 20일

주관연구기관명 : 동아대학교

주관연구책임자 : 이 선 우

세부연구책임자 : 문 병 주

연 구 원 : 이 광 렬

연 구 원 : 김 대 옥

연 구 원 : 공 현 기

연 구 원 : 박 지 혜

연 구 원 : 이 명 환

연 구 원 : 이 형 주

협동연구기관명 : (주)코드바이오

협동연구책임자 : 박 선 영

# 요 약 문

## I. 제 목

다기능성 신소재를 이용한 딸기 탄저병 방제용 환경친화형 제제 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

딸기 탄저병은 딸기의 생산에 심각한 손실을 야기하는 중요한 작물병으로 본 연구는 친환경적인 방법으로 딸기 탄저병을 예방할 수 있는 미생물 제형 및 딸기의 보호에 기여할 수 있는 미생물 및 그 천연물 제형을 함께 제공할 필요로 본 연구가 수행되었다. 본 연구의 목적은 방제가 어려운 딸기 탄저병을 환경친화적으로 제어하기 위하여 다양한 제형 첨가제를 활용한 다기능성 소재를 탐색하고 미생물 및 천연물 제제 개발을 통한 딸기의 환경친화적 재배에 기여하는 것이다. 또한, 미생물의 환경동태를 정확히 모니터링 하는 것은 미생물 제제의 효율적인 처리를 위해 필수적인데 작물에 처리한 미생물 제제로부터 미생물의 식물환경 동태를 추적하는 기반 기술을 획득하는 것도 연구의 목적 중 한가지 이다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

### 1. 딸기 탄저병 방제용 미생물 제제의 개발

딸기 탄저병에 대하여 길항력과 탄저병 방제효과가 우수한 미생물을 선발하며 선발한 미생물과 다양한 첨가제를 활용하여 딸기 탄저병 방제용 제제 선발하는 것을 목표로 한다. 이때 다양한 첨가제를 활용하여 개발하며 이는 미생물의 안정성 뿐 아니라 미생물이 생산하는 물질의 안정성, 식물에 대한 영향, 지속효과도 고려하는 다기능성 제제를 활용하는 것을 주된 내용으로 포함한다. 여러 제형들을 대상으로 딸기 탄저병에 대하여 방제효과가 우수한 제형을 생육실, 하우

스 포트재배, 자연 발병 포장에서의 딸기 탄저병 방제효과를 검정하여 우수제형을 선발한다.

## 2. 딸기 탄저병 방제용 천연물 제제의 개발

우수 길함 미생물 *Bacillus licheniformis* N1 균주와 *Burkholderia pyrrocina* CH-67 균주가 생산하는 항균물질을 순수분리하거나 조 추출물을 대상으로 구조동정 및 입자화 조건, 다기능성 천연물 제제용 전달매체 선발 및 방제효과 검정을 통해 미생물과 천연물에 공통인 우수 제형을 선발하는 것을 목표로 한다. 본 연구에서 제작되는 항진균 활성분을 포함하는 여러 가지 제형의 딸기 탄저병 방제효과를 생육실, 하우스 포트재배, 그리고 자연발병 포장의 방제효과를 조사하여 최종 제형을 선발한다.

## 3. 개발 미생물의 제제의 식물환경동태 분석

우수 길함 미생물 *Bacillus licheniformis* N1 균주의 식물환경 동태분석용 tagging construct를 작성하며 이를 이용하여 tagging line을 선발한다. Tagging 된 미생물이나 이의 제형을 딸기 식물체에 처리 후 미생물의 딸기 식물체 조직별 생존력 및 시공간적 밀도변이를 추적하여 미생물 제제 처리의 최적 조건을 확립한다.

# IV. 연구개발결과

## 1. 딸기 탄저병 방제용 미생물 제제의 개발

기존의 생물학적 방제활성이 우수한 *Bacillus licheniformis* N1 균주가 다른 미생물 제제에 비해 딸기 탄저병에 대하여 길항력과 딸기 탄저병 방제효과가 우수하였으며 또한 *Burkholderia pyrrocina* CH-67 균주도 딸기 탄저병 방제효과가 우수한 것으로 선발되었다. 각 미생물의 대량배양을 위한 최적 탄소원 및 질소원을 포함하는 배지를 선발하고 각종 전분류를 포함한 다당류, 지방류를 함유하는 제형을 제작하였다. 활용한 첨가물들은 미생물이나 천연물을 건조, UV로부터 보호하며 추가영양분 제공, 건조시 약혼감소 및 식물에 친화적인 성질을 고

려하였다. 이들 제형들로 딸기 탄저병에 대한 길항력 조사 및 방제효과를 검증하였다. 그 결과 N1 균주로는 N1Z 제형(썬크리미 포함)이 그리고 CH-67 균주로는 CH-67H 제형(감자전분 포함)이 선발되었는데 N1Z 제형에서는 생균수가 잘 유지되는 반면 CH-67H 제제에서는 제형완성단계에서 미생물은 사멸된 제형으로 거의 천연물제형에 가까운 것으로 나타났다. N1Z 제형이나 CH-67H 제형 모두 화학농약에 비해 방제효과가 우수하지는 않았으나 100배와 500배 희석에서 화학농약 대비 70% 이상의 방제효과를 유지하는 것이 반복된 실험을 통해 확인되었으며 이는 생육실, 하우스내 딸기 토경재배에서 탄저병균 인공접종을 통해 그리고 탄저병균 자연발병 포장에서 확인되었다.

## 2. 딸기 탄저병 방제용 천연물 제제의 개발

우수 길항 미생물 *Bacillus licheniformis* N1 균주의 항균물질은 제형화를 위해 알긴산, 레반, 수용성 덱스트린 및 계면 활성제 조합을 통해 다기능성 활용을 조사하였으나 적용이 어려운 것으로 나타났으며 항균물질을 순수분리 분석한 결과 iturin A1과 surfactin으로 동정되었다. 두물질 iturin 과 surfactin 모두 항생활성 뿐아니라 여러 가지 작물병에 우수한 방제효과가 있음이 확인되었다. 이는 항진균 활성, 방어유도, 식물생육촉진, 미생물 biofilm 형성을 통한 미생물 보호기능이 확인된 이들 iturin과 surfactin 이 N1 균주에서 생산되므로 N1 균주의 경우 첨가제 추가보다 자체 물질 대량생산과 최적 전분 탐색에 초점을 맞추어 제1세부과제의 N1Z가 최종 선발되었다. *Burkholderia pyrrocina* CH-67 균주에 의한 초기제형의 경우 생균수가 유지되지 않으나 여러 방제조건에서 감자전분이 첨가된 제형이 우수한 방제효과를 나타냈으므로 이는 균주가 생산하는 물질에 의한 효과로 판단되었다. CH-67 균주의 생산물질 부분 순화되었고 극히 낮은 농도에서도 활성이 유지되는 것으로 나타났다. 항균활성 물질이 완벽하게 정제되는 단계까지는 성취되지 못했는데 이는 해당 물질이 전형적인 분리단계에서 분리되지 않았기 때문이다. 해당 물질이 신물질이 가능성이 높아 추가 연구가 필요하다.

### 3. 개발 미생물의 제제의 식물환경동태 분석

우수 길항 미생물 *Bacillus licheniformis* N1 균주의 식물환경 동태분석용 tagging construct를 항시발현 프로모터인 P43과 녹색형광유전자 *gfp*를 융합하여 제작되었다. P43-*gfp*를 N1 유래 chitinase 유전자와 함께 suicidal plasmid 에 도입하여 N1 균주의 염색체에 P43-*gfp*를 도입하고 형광발현을 확인하였다. 이를 또한 *Bacillus* 발현벡터를 이용하여 N1 균주에 도입하여 두가지 종류의 tagging line을 선발하였다. 선발 line을 이용하여 미생물을 배양액이나 제제로 딸기 식물체에 처리한 후 미생물의 생존력이나 시공간적 분포를 확인하였다. 그 결과 N1 균주는 딸기의 생육이 조절되는 조건에서 관부, 엽병, 잎에서 모두 7일 이상 잘 생존하였으나 하우스 토경재배 조건에서 5일 이후 생존이 급격히 감소하였다. 공초점 레이저주사 현미경 관찰결과 미생물의 관부, 잎, 엽병에서 처리후 3일까지 잘 관찰되었는데 엽병에서 3일부터, 잎에서는 5일부터 미생물의 활성이 감소하는 것으로 나타났다. 반면 관부에서는 미생물의 생존 및 활성이 7일까지 잘 유지되었다. 따라서 생존력과 시공간적 분포에 결과를 토대로 N1 균주를 이용한 제형은 매 5-7일 간격으로 살포해야 딸기 탄저병에 효과가 나타날 것으로 예상된다.

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

본 연구를 통해 두가지 미생물 균주 *Bacillus licheniformis* N1 과 *Burkholderia pyrrocina* CH-67 균주의 제형화를 통해 딸기 탄저병 방제 가능성을 확인하였다. CH-67 균주의 제형 자체가 생균수가 검출되지 않아 제작된 제형이 총 활성분을 포함하는 천연물 제형에 해당하였고 해당 제형의 500 배 희석액까지 자연발병 포장조건에서 방제효과가 인정되었다. 또한 미생물 제제에 활용되는 미생물들의 식물 환경동태를 시공간적으로 분석할 수 있는 추적기술을 확립하였다.

N1 균주와 CH-67 균주 두 균주 모두 균주의 형태로 또는 제형의 형태로 산업체나 농가 기술이전에 활용을 고려할 만 하다. CH-67이 생산하는 신규한 항진균 천연물질의 경우 열에 안정하며 신규의 천연 항진균 물질로 구조가 밝혀지

면 물질 특허 획득 및 관련분야 기술이전에 활용될 수 있을 것이다. 처리 미생물의 환경에서 동태를 추적하기 위하여 구축한 P43-*gfp*를 다양한 미생물에 적용하여 미생물 동태 파악에 활용할 수 있으며 이는 다양한 미생물 제형 균주들이 다양한 작물의 병해 방제에 처리될 때 적정 처리회수, 빈도, 방법등의 표준 프로토콜을 작성하는데 유용하게 활용될 수 있다.

## SUMMARY

### (영문 요약문)

#### I. Title

Development of the environment-friendly formulation with multifunctional new materials to control strawberry anthracnose

#### II. Purpose and background

Strawberry anthracnose is one of the most devastating strawberry diseases. This research was carried out under the purpose to develop an environment-friendly formulation using antagonistic bacteria and their antifungal compounds to protect strawberry plants from the anthracnose. Specific aims of this research are to discover multifunctional materials to formulate the bacteria, to generate the active formulations using bacteria and their compounds, and to develop a tagging system and monitor the bacterial behavior in plant environment after bacterial application.

#### III. Scope and contents

##### 1. Development of microbial formulations to control strawberry anthracnose

The ultimate goal of this study is to develop the microbial formulations to control strawberry anthracnose using antagonistic bacteria and various carriers and additives. With carriers and additives to stabilize microbial activities, this study also considers to select the carriers and additives to stabilize antifungal components, to monitor effect on plants and to enhance the longevity of formulation. By investigating the activity of generated



formulations for biocontrol activity for strawberry anthracnose, the most effective formulations were selected through activity test in a growth room and in green house condition under artificial pathogen inoculation, and that on field condition under natural disease occurrence.

## 2. Development of natural product formulation to control strawberry anthracnose

Effective biocontrol agents *Bacillus licheniformis* N1 and *Burkholderia pyrrocina* CH-67 produce antifungal compounds. In this study, we purify the antifungal compounds or partially fractionate them to formulate the compounds together with bacteria. It includes structure identification and selects the multifunctional carrier to effectively control strawberry anthracnose. One of specific aims of this study is to select the most effective formulations both for antagonistic bacteria and for the antifungal compounds. Final selection of the effective formulation were carried out through activity test in growth room and green house condition under artificial pathogen inoculation and that on field condition under natural disease occurrence.

## 3. Monitoring bacterial behavior on plants

Tagging constructs were generated to monitor the bacterial behavior on strawberry plants using biocontrol agent *Bacillus licheniformis* N1. Tagged N1 strains are selected and applied onto strawberry plants under the controlled condition and greenhouse condition. We investigated the bacterial survival and distributions on various plant tissues over time to establish the optimum condition for microbial formulation treatment.

## IV. Results

### 1. Development of microbial formulations to control strawberry anthracnose

A previously identified biocontrol bacterium *Bacillus licheniformis* N1 were also effective against strawberry anthracnose and a newly identified *Burkholderia pyrrocina* CH-67 was also selected as a biocontrol agent for strawberry anthracnose. A carbon source and a nitrogen source for microbial mass cultivation were investigated for both strains. A number of microbial formulations using various starches, polysaccharides, and lipids were generated. The carriers and additives were chosen by considering microbial protection from desiccation and UV expose, source as additional nutrients, plant compatible features. Biocontrol activity analysis using these formulations were investigated against strawberry anthracnose. N1Z formulation and CH-67H formulations were finally selected for the strain N1 and strain CH-67, respectively. The N1Z maintained bacterial viability constantly, while CH-67H did not contain any viable bacterial cells in the final formulation, indicating that the CH-67H is likely the antifungal compound based formulations. Either N1Z or CH-67H did not exhibit excellent disease control activity compared to chemical fungicide azoxystrobin against strawberry anthracnose. However, over 70% of biocontrol activity of the chemical fungicide were consistently observed from 100 fold and 500 fold dilution of both formulations.

## 2. Development of natural product formulation to control strawberry anthracnose

To formulate the natural antifungal compounds from *Bacillus licheniformis* N1, we have tested alginate, levan, dextrans and various surfactants for multifunction activity to control strawberry plants. However, none of them was effective to generate antifungal compound-based formulations. The antifungal compounds from N1 strain were identified as iturin A1 and surfactin. Since both iturin and surfactin are responsible for antifungal activity, defense induction, plant growth promotion, and microbe

protection by biofilm formation, we more focused on mass production of the compounds and stable biocontrol activity. Therefore, starch-based N1Z formulation was finally selected. Formulation using antifungal compounds was naturally accomplished by *Burkholderia pyrrocinia* CH-67 strain formulation. This is because the strain is heat labile and CH-67H using potato starch did not contain any viable bacteria despite of effective biocontrol activity. The antifungal compounds from CH-67 strain was partially purified and maintained biocontrol activity with low concentration. We did not completely purified the active compound because the compound was hard to separate by the standard partition process. The compound may be a novel chemical that we must continue to study.

### 3. Monitoring bacterial behavior on plants

A tagging vector to use constitutive promoter P43 and green fluorescent protein gene *gfp* were constructed by a fusion between P43 and *gfp*. The tagging construct P43-*gfp* was introduced into *Bacillus licheniformis* N1 either in bacterial chromosome or by a plasmid, in order to monitor bacterial behavior on plant environments. The GFP expression in N1 strain was apparent. Bacterial N1 survival and temporal distribution of the bacteria on various strawberry organs were investigated using the tagged N1 strain. The population N1 strain were stably maintained on strawberry leaves, petioles and crown under controlled condition, while it reduced rapidly in 5 days after application in green house. Confocal laser scanning microscope analysis revealed that N1 strain was colonized strawberry leaves, petioles and crown well and retained green fluorescens for 3 days, 5 days and 7 days application on petioles, leaves, and crown, respectively. Therefore, we suggest that the N1Z should be applied every 5-7 days to effectively control the strawberry anthracnose.

## V. Achievement and future application

Two biocontrol agents *Bacillus licheniformis* N1 and *Burkholderia pyrrocinia* CH-67 were used to provide effective formulations N1Z and CH-67H to control strawberry anthracnose. CH-67H did not contain any viable bacteria, thus it was likely antifungal compound based formulation. Disease control activity of CH-67H was recognized by the 500 fold dilution under natural disease occurrence in the field. In this study, we also established a system to monitor bacterial behavior in natural plant environments.

Both N1 strain and CH-67 strain could be considered for technology transfer to farmers or industry. The antifungal compound produced by CH-67 strain is heat stable and if it is purified and identified as a novel chemical, we have to issue patent and consider technology transfer to develop it as a new antibiotics. The fusion construct developed in this study, P43-*gfp*, can be applied in environmental microbiology to monitor bacterial behavior. It will be used to determine the application frequency and interval for various biocontrol agents for effective plant disease control.

## CONTENTS

<b>Chapter 1. Introduction</b> .....	16
Part 1. Objectives and background.....	16
Part 2. Scope and contents for research.....	20
<b>Chapter 2. Research and development status</b> .....	21
Part 1. Current status on research in Korea.....	21
Part 2. Current status on research in foreign country.....	24
<b>Chapter 3. Research contents and results</b> .....	28
Part 1. Plant pathogens and antagonistic bacteria.....	28
1. Isolation of pathogen and pathogenicity test.....	28
2. Identification of the anthracnose pathogen.....	32
3. Selection and characterization of antagonistic bacteria .....	34
4. Disease control activity by the antagonistic bacteria.....	40
Part 2. Formulation of antifungal bacteria.....	43
1. Optimization of mass cultivation of the bacteria.....	43
2. Formulation of strain N1 and CH-67.....	48
Part 3. Biocontrol activity on anthracnose by formulation product.....	50
1. Biocontrol activity in growth room.....	50
2. Effect of dilution of the product.....	59
3. Biocontrol activity in greenhouse.....	61
4. Biocontrol activity under natural disease occurrence.....	63
Part 4. Formation of antifungal components of bacteria.....	67
1. Particulation of antifungal compounds of N1.....	67

2. Identification of antifungal compounds of N1.....	72
3. Biological activity of antifungal compounds of N1.....	78
4. Formulation of antifungal compounds of N1 and its activity.....	82
Part 5. Bacterial behavior after the formulation product application.....	86
1. Construction of tagging vector and bacterial tagging..	86
2. Survival of tagged bacteria.....	92
3. Distribution of tagged bacteria.....	97
<b>Chapter 4. Achievement and contribution.....</b>	<b>103</b>
<b>Chapter 5. Research product and future plan.....</b>	<b>105</b>
<b>Chapter 6. Oversea's trends .....</b>	<b>106</b>
<b>Chapter 7. Reference.....</b>	<b>107</b>

# 목 차

<b>제 1 장</b>	<b>연구개발과제의 개요</b> .....	16
	제1절 연구개발의 목적과 필요성.....	16
	제2절 연구개발의 내용 및 범위.....	20
<b>제 2 장</b>	<b>국내외 기술개발 현황</b> .....	21
	제1절 국내 관련기술의 현황 및 문제점.....	21
	제2절 국외 관련기술의 현황 및 문제점.....	24
<b>제 3 장</b>	<b>연구개발수행 내용 및 결과</b> .....	28
	제1절 딸기 탄저병균 및 향진균활성 균주.....	28
	1. 병원균의 분리 및 병원성 검정.....	28
	2. 공시 탄저병균(KRS-4)의 동정.....	32
	3. 유용미생물의 선발 및 길항력 검정.....	34
	4. 딸기 탄저병 방제용 유용미생물의 선발 및 방제효과.....	40
	제2절 향진균 활성 균주를 활용한 미생물 제제.....	43
	1. 향진균 활성 균주 대량배양을 위한 최적조건 확립.....	43
	2. 향진균활성 균주 N1과 CH-67 균주의 제형화.....	48
	제3절 미생물 제제의 딸기 탄저병 방제 효과.....	50
	1. 생육실 포트에서 미생물 제형의 방제효과 검정 및 제형 선발.....	50
	2. 선발 미생물농약의 희석배수별 방제효과 검정.....	59
	3. 하우스 토경재배에서의 미생물농약의 방제효과 검정.....	61
	4. 자연 발병 포장에서의 미생물 제제의 방제효과 검정.....	63
	제4절 향진균 활성성분 제형 및 식물병 방제효과.....	67
	1. N1 균주 향진균 물질의 입자화 .....	67
	2. N1 균주의 향진균 활성물질 분리 동정.....	72
	3. N1 균주가 생산하는 향진균 물질의 생물학적 활성.....	78

	4. 항진균 활성 물질의 제형화 및 활성 검정.....	82
제5절	미생물 및 제제 처리 후 미생물의 환경 동태.....	86
	1. 미생물 동태 연구를 위한 tagging construct	
	제작 및 tagging 균주 선발.....	86
	2. tagging 미생물 균주의 식물환경 생존력.....	92
	3. tagging 미생물 균주의 식물환경 분포.....	97
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....	103
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획.....	105
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보.....	106
제 7 장	참고문헌.....	107



# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 목적과 필요성

### 1. 연구개발의 목적

본 연구는 다기능성 환경친화형 신소재, 항진균 활성 미생물 및 항진균 물질을 이용한 딸기 탄저병 방제용 신소재 미생물 제제를 개발하고 이를 이용하여 딸기 탄저병의 환경친화적 방제를 통한 딸기의 환경친화적 재배에 기여하는 것을 최종목표로 한다. 또한, 미생물 제제의 식물환경 동태 연구를 통해 다양한 미생물 제제를 모니터링하는 기술을 확립하는 것도 본 연구의 목적 중 한가지 이다.

### 2. 딸기 탄저병 발생과 방제 대책

장미과의 영년생 작물인 딸기(*Fragariae x ananassa* (L.) Duchesne)는 비타민C 함량이 풍부하며 과채류가 적은 겨울철에도 수확이 가능하여 국내 농가의 고소득 작물의 한가지 이다. 국내 딸기 재배는 중남부지방을 중심으로 1997년 재배면적은 6,303 ha, 생산량은 151.3 천톤으로 그 중 시설재배가 5,572 ha를 차지하여 전체의 88.4%를 점하고 있다. 국내의 딸기 작형은 축성, 반축성, 노지, 억제재배의 4가지로 구분되며 1980년대 노지재배가 주종을 이루었으나, 최근에는 축성, 반축성 재배가 증가하고 있는 추세이다. 이와 같이 재배 양식이 바뀔에 따라 병해의 발생 양상도 바뀌고 있다. 따라서 최근에 딸기의 재배 면적이 확대되고 있는 축성재배 품종에 그 동안 문제시 되지 않았던 탄저병이 심하게 발생하여 딸기 생산에 문제가 되고 있다.

딸기 탄저병은 국내에는 1992년에 처음 병원균의 존재가 알려진 이래 흰가루병, 잿빛곰팡이병과 함께 딸기 재배농가에서 가장 심각한 피해를 주는 병의 하나이다. 딸기에 탄저병을 일으키는 병원균으로는 *Collectrichum fragariae*, *C.*

*acutatum*, *C. gloeosporioides* 등 수종이 있으며, 이들의 완전세대는 *Glomerella singulata*로 밝혀져 있다. 영양번식 작물인 딸기는 특히 노지에서 육묘를 실시하는 6-9월의 고온 다습기에 탄저병에 의해 심각한 피해를 받으며 물이 고이는 저지대에서는 표면의 수분이 포자의 분산에 매개로 작용하여 발병이 더욱 심하게 된다. 병원균은 딸기의 잎자루, 포복지, 관부, 잎, 열매의 모든 부위를 감염하는데 잎에서 병징이 잘 발현되지 않고 병원균이 증식하여 2차 감염을 유도하므로 고온다습한 조건이 지속되면 발병속도가 급속히 증가하여 육묘상에서는 포복지의 발병으로 딸기묘의 생산이 감소되어 본포에 정식할 묘가 부족하게 된다. 딸기를 시설재배 하는 경우에도 시설내부의 고온 다습으로 인해 병이 급속하게 확산되는 보고도 있다. 국내에서는 딸기의 탄저병은 포복지와 관부에서 자주 관찰되며 6월초에 발병하여 주로 장미기에 전반되므로 7-9월에 가장 심하게 발생한다.

딸기 탄저병의 방제 방법으로는 주로 장마기에 수매전반에 의해 전염하고 자낭각에 의해 토양에 존재하면서 연작재배시에 병해발생이 크게 증가하므로 비가림 재배에 의한 경종적 방제 방법 외에는 효과적인 방제법이 없어 계속적으로 병발생 피해가 증가하는 추세이다. 딸기탄저병에 저항성을 지닌 품종으로는 반축성 재배용인 보조교생과 수홍 등이 있으나, 축성품종인 여봉, 설홍, 미홍, 초동, 장희 등은 대부분 감수성이다. 특히, 최근에 도입된 장희는 재배 중 중 가장 감수성인 것으로 나타났다. 국내에서는 점차 축성재배 면적이 늘어나고 있는 추세이므로 저항성 품종의 육성이 시급한 과제이다. 화학적 방제로서 현재까지 국내에 공시된 약제가 없는 실정이며, 일본에서는 프로파수화제 500배, 디치수화제 1,000배, 비타놀수화제 2,500배액 등이 권장되어 있고, 미국은 베노밀과 캡탄, copper sulfate, Iprodione 등을 비오기전에 예방적으로 살포하여 방제하고 있다. 딸기탄저병에 대하여 화학농약을 시험한 국내 연구에서는 아족시스트로빈 수화제가 가장 효과적인 것으로 보고되었다.

길항 미생물을 이용하여 작물의 병해를 예방하는 생물학적 방제는 환경친화형의 농업을 실현하는 좋은 전략인데 딸기의 탄저병을 방제하기 위한 적절한 화학농약이 등록되어 있지 못하며 저항성 품종 또한 여의치 못하므로 길항 미생물을 활용한 생물학적 방제를 시도할만하다. 미생물 제제 및 농약의 성공적인 개발을 위해서는 우수 미생물의 선발이 가장 중요한 요인이다. 그러나 선발된 미생물

을 효과적으로 작물에 처리하는 기술 또한 이에 못지않게 중요하다. 특히 처리 미생물 제제가 작물에 잘 정착하여 효과를 발휘하기 위해서는 우수한 제형의 개발이 필수적이다. 미생물 제제의 처리 이후에 처리된 미생물이 주변에 잘 정착하고 있는지 확인하는 과정에 대한 연구가 전반적으로 미흡하여 적절한 미생물 제제의 처리빈도 및 처리량에 대한 정확한 데이터 또한 부족한 실정이다. 따라서 미생물의 식물주변 환경에서의 동태를 연구하여 기초정보를 획득하는 것이 필수적인데, 미생물의 동태가 파악되면 제형화된 미생물 제제의 처리 후 미생물 동태(시공간적 분포 변화)를 분석하는 것이 가능하며 이를 통해 미생물 제제의 적정 처리 및 빈도 등이 결정될 수 있다. 따라서, 우수 제형의 각 성분(carrier등)들의 미생물 제제로서의 특성을 파악하는 것이 가능하게 된다. 처리한 미생물의 동태를 식물 주변에서 정밀하게 모니터링하는 것이 진정한 환경친화형 농법을 현실화 시키는 기반기술이라 할 수 있다.

최근 딸기의 시설재배가 증가하면서 탄저병이나 잿빛곰팡이 병의 발생이 우려되고 있는데, 딸기는 벼, 고추, 배추에 이어 국내 농가소득의 증대에 중요한 작물임에도 지금까지 친환경 딸기 재배를 위한 미생물 농약이나 미생물 제제가 개발되지 않았다. 따라서, 친환경적 딸기 시설하우스 재배를 위한 미생물 농약 개발로 농가소득 증대에 더욱 기여할 수 있으므로 딸기의 병을 방제하기 위한 미생물 제제의 개발이 시급하다.

### 3. 생물농약과 미생물 농약의 산업적 중요성

세계적으로 더욱 높아지는 자국의 환경생태계 보호 열기에 따라 기존 화학농약의 피해사례가 주목받고 있고, 이로 인한 토양, 수질오염, 인축에 대한 독성 및 환경호르몬 피해, 저항성 해충출현, 유용 천적 감소 등이 보고되고 있다. 지구 환경생태계와 인류 건강에 대한 심각한 수준의 위협을 주는 이러한 문제점을 최소화하기 위해 선진국을 중심으로 환경친화적 생물농약의 필요성을 중요하게 인식하고 관련 기술 및 제품개발에 많은 노력을 기울이고 있다. 현재 전 세계 생물농약의 시장규모는 약 8,000억 원 정도이며, 미생물농약은 약 2,000억 원 정도이다. 약 20조원의 전체 농약 시장에서 생물농약이 차지하는 비중은 적으나 전체

농약시장 성장률에 비해 생물농약은 중요성이 급속히 증대되어 연 20%이상의 성장을 하고 있다.

선진국에서는 생물농약의 보급확대를 위하여 미생물농약의 저독성 인정 등록기간 단축 및 비용감면, 등록우선권 부여 등의 국가차원의 지원정책을 시행하고 있다. 세계적인 화학 및 농약회사인 미국 몬산토사의 화학분야 포기 및 생물분야 집중 선언, 듀폰사의 미생물살충제 시장진출 전략 강화 등의 움직임과 함께 우리나라 기업 및 정부도 환경생태계보호를 위한 관련부처의 국가행동계획 수립에 이와 같은 상황에 대처하기 위한 적극적인 노력을 시도하고 있다. 국내의 경우 최근 생물농약에 대한 지속적인 관심으로 우수가 다수 확보되며 미생물농약 시장이 점차 확대되고 있으나 식물병의 경우에 개별병에 대한 맞춤형 미생물 제형의 개발이 필수적이라 할 수 있다. 우수 균주의 선발과 함께 우수 균주를 안정적으로 처리할 수 있도록 지원하는 기술의 개발이 절대적으로 필요한 현실이다. 이를 극복하기 위해서 병원균의 억제효과가 더 우수하고 대상 병원균의 범위가 넓은 유용미생물의 확보와 첨단 유전공학 기술에 의한 활성물질 또는 효소 생산 증대 및 대량생산 기술 개발과 최종적으로 포장 응용기술 개발에 주력하여야 한다. 이는 우리고유의 작물 보호에 적합한 무공해 생물방제법을 확립할 수 있으며, 유기화학농약의 사용을 최소화할 수 있고, 국내농산물의 질적 수준과 안전성을 높여 환경보존과 농산물시장 개방 압력에 대비하여 국내 농산물 산업의 잠재력 높이는 데 도움이 될 것이다.

## 제 2 절 연구개발 내용 및 범위

### 1. 딸기 탄저병 방제용 미생물 제제의 개발

- 우수 길함 미생물 *Bacillus licheniformis* N1 균주의 딸기 탄저병 방제용 제제 개발: 대량배양 기술, 제제용 각종 첨가물 결정, 제제 제조기술,
- 신규 길함 미생물의 분리, 동정 및 딸기 탄저병 방제용 제제 개발: 대량배양 기술, 제제용 각종 첨가물 결정, 제제 제조기술
- 미생물 제제의 딸기 탄저병 방제효과 검정을 통한 우수제형 선발: 생육실, 하우스 포트재배, 포장의 방제효과
- 개발 미생물 제제의 자연발생 농가 실증실험 및 유효도

### 2. 딸기 탄저병 방제용 천연물 제제의 개발

- 우수 길함 미생물 *Bacillus licheniformis* N1 균주의 항균물질 구조동정 및 입자화 조건, 다기능성 천연물 제제용 전달매체 선발
- 신소재 천연물 제제 제조기술 확립 및 제형화: 용해 안정성, 활성 안정성 검토
- 선발 천연물 제제의 딸기 탄저병 방제효과 검정을 통한 우수제형 선발: 생육실, 하우스 포트재배, 포장의 방제효과
- 개발 천연물 제제의 자연발생 농가 실증실험 및 유효도

### 3. 개발 미생물의 제제의 식물환경동태 분석

- 우수 길함 미생물 *Bacillus licheniformis* N1 균주의 식물환경 동태분석용 tagging: construct 작성, tagging line 선발
- tagging line의 제형화 및 식물환경 생존력 분석
- tagging line을 이용한 미생물의 생존, 공간적, 시간적 밀도 변이 분석

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

본 연구는 식물병(딸기 탄저병)을 효과적으로 제어하기 위한 미생물 제제 개발을 위해 미생물 자체의 제형과 길항미생물이 생산하는 항균활성 물질을 포함하는 제형 또는 두가지 모두를 함유하는 다기능성 제형의 개발을 목표로 한다. 또한 미생물 제제의 효율적인 처리를 위하여 tagging 된 미생물 및 그 제제를 이용하여 처리 길항 미생물의 식물환경 동태를 분석하는 것을 궁극적인 목적으로 한다. 따라서 본 절에서는 관련 기술의 현황 및 문제점을 국내와 국외(선진국 기준)로 나누어서 검토하였다.

### 제 1절 국내 관련기술의 현황 및 문제점

해외 각국의 미생물 제제 개발과 더불어 국내에서도 2000년 정부는 농약관리법을 개정하여 미생물 제제를 농약으로 등록할 수 있도록 법제화 하였다. 그리고 2003년 국내 최초의 미생물 농약으로 *Bacillus subtilis*를 이용한 제형인 탐시드가 (주)그린바이오텍에서 개발되어 미생물농약으로 등록되었으며 현재도 많은 미생물과 그 제형들이 등록과정 중이거나 등록을 위한 시험이 진행되고 있다. 이는 국내 개발 균주 뿐만 아니라 해외에서 개발된 세레나테(국내 상품명: 에코제트)와 같은 제품들도 국내에 시판이 되고 있다. 국내에 등록된 미생물 농약은 Bt제 7품목을 포함하여 30 품목이 2008년 7월까지 등록되었으며 이외에도 다양한 미생물 제형이 농자제로 등록되어 판매되고 있다. 총 30 품목중 살균제가 15종, 살충제가 14종 제초제가 1종으로 이중 15종의 살균제의 품목명, 상품명, 판매회사를 표 1에 나타내었다. 이들의 공통점은 주로 내재해성이 우수한 내생포자를 생산하는 바실러스 계통의 세균이라는 것인데 길항력이 우수한 바실러스 균을 대량배양하고 적절한 첨가제를 혼용하여 제제를 생산하는 기술이 국내에도 일반화 되었다. 이는 미생물 및 내생포자 그리고 배양여액에 포함된 길항물질을 함께 spray dry 하는 기술을 적용하여 미생물을 제제로 생산하는 방법을 따른다.

표 1. 국내 생물농약(살균제) 등록현황 (2008년 7월)

용도	품목명	상표명	등록회사
살균제	<i>Bacillus subtilis</i> Y-1336 수화제	바이봉	한국삼공(주)
	<i>Bacillus subtilis</i> QST-713 수화제	에코제트	(주)신영아그로
	<i>Bacillus subtilis</i> QST-713 액상수화제	에코스마트	(주)신영아그로
	<i>Bacillus pumilis</i> QST-2808 액상수제	에코센스	(주)신영아그로
	<i>Bacillus subtilis</i> DBB-1501 수화제	테라스	(주)동부하이텍
	<i>Bacillus subtilis</i> DBB-1501 입제	홀인원	(주)동부하이텍
	<i>Bacillus subtilis</i> JKK-238 액상제	잇살림	(주)흙살림
	<i>Bacillus subtilis</i> GB-365 수화제	그린올	(주)그린바이오텍
	<i>Bacillus subtilis</i> GB-365 액상수화제	쉴러스	(주)그린바이오텍
	<i>Bacillus subtilis</i> KB-401 유상현탁제	슈팅스타	고려바이오(주)
	<i>Bacillus subtilis</i> KBC-1010 수화제	재노탄	(주)한국바이오케미칼
	<i>Streptomyces goshikiensis</i> WYE-324 액제	쎄이프그로	(주)케이아이비씨
	<i>Streptomyces colombiensis</i> WYE-20 액제	마이코싸이드	(주)케이아이비씨
	<i>Ampelomyces quisqualis</i> AQ-94013 수화제	큐펙트	(주)그린바이오텍
	<i>Paenibacillus polymyxa</i> AC-1 액상수화제	탐시드	(주)그린바이오텍

기존의 화학농약에 비해 미생물 제제(또는 생물농약, 미생물 농약)들은 안정성이 확인된 미생물과 그 미생물의 산물을 이용하므로 인체 및 환경에 대한 독성이 낮아서 환경친화적이란 장점을 가지고 있다. 또한 화학농약이 가지는 잔류성, 약제 저항성 병원체의 출현 등의 문제도 해결할 수 있어서 지속가능한 환경친화적 농업(sustainable agriculture)에 활용되고 있다. 이에 따라 국내에서도

정부가 저탄소 녹색성장을 차세대 성장동력으로 내걸고 있어서 미생물 농약 및 제제의 생산은 이에 부합하는 우수한 기술이라고 할 수 있다. 현재 국내에서는 정부의 지원으로 인하여 생물농약에 대한 관심이 지속적으로 증가하며 2005년 110억원에 해당하던 국내 생물농약 시장은(바이오 농약) 2010년 193억원에 해당하여 연평균 11.9% 성장할 것으로 예측되고 있다(한국기술은행 자료).

딸기의 탄저병은 *Colletotrichum gloeosporioides* 등 수종의 병원 진균에 의해 발생하며 화학적 방제를 위해 고시된 약제가 없으나 98년 국내에서 시험한 딸기 탄저병 약제방제 효과시험 결과 아족시스트로빈(액상) 수화제가 가장 효과적인 것으로 나타났다. 그러나 해당 약제역시 토양 잔류로 인한 환경오염등의 문제를 간과할 수 없는 실정이다. 따라서 여타의 식물병의 방제를 위하여 미생물 제제의 개발이 활발한 것처럼 딸기 탄저병의 방제를 위한 미생물 제제의 개발이 필요한 시점이다. 본 연구진이 파악한 정보로는 아직까지 딸기 탄저병 방제를 위한 미생물 제제개발의 연구가 본격적으로 수행된 적이 국내외에서 전무한 것 같다.

대부분의 현재의 미생물 제제 개발기술은 길항 미생물 자체 뿐 아니라 그 배양물을 포함하여 제제가 구성되는데 이는 미생물과 친화적인(compatible) 제형뿐아니라 배양물이 활성 성분과 친화적인 제형을 선발하는 것이 필수적인 과정이기도 한다. 국내에서는 2003년 전남대 연구팀이 미국의 NIN(대표 김희경)와 공동연구한 결과 천연무독성 농약 개발에 성공하였다. 이 무독성 농약은 천연물을 이용해 만든 생물전환제제로 단백질원과 식물성 지방산을 원료로한 물질을 추출해 이를 나노 입자를 제조한 것으로 벼 잎집무늬마름병, 벼도열병, 잔디 패치병, 고추 탄저병, 장미 역병, 오이 흰가루병과 잣빛곰팡이병 등을 방제할 수 있다고 발표하였다. 그러나 아직까지 국내에서 활성 천연물 성분까지 고려한 우수한 제형에 대한 연구가 부족한 실정이어서 이에 대한 연구개발이 필요한 시점이다. 따라서 우수한 다기능성 제제를 발굴할 수 있다면 미생물 뿐 만 아니라 활성 천연물까지 고려한 제제를 기능성 고분자를 대상으로 시험할 필요가 있다. 이를 통해 병을 방제할 뿐 아니라 농산물의 저장안정성, 생육촉진, 탈수 방지, 표면보호등을 가능하게 할 것이다. 이를 위해서는 당장의 우수한 연구결과가 도출되기 까지 다양한 기능성 고분자 발굴 및 기능 검증등을 위해 지대한 노력 및 투자가



필요하다고 할 수 있다. 그러므로 환경친화적인 미생물 제제의 개발을 위해서는 이에 대한 연구개발을 위한 산,학,연의 공동노력이 필요하다고 할 수 있다.

환경친화적 농업의 한가지 전략으로 미생물 제제의 사용이 급증하며 다양한 미생물 제제가 지속적으로 여러 연구그룹에 의해 개발되며 국내의 미생물 제제 개발기술은 급속도로 발전하고 있는 실정이다. 그러나 개발한 미생물 제제가 포장에서 시용시에 안정적인 효과를 지속적으로 발휘하기 위한 기초연구 및 응용연구가 선진국에 비해 부족한 실정으로 이에 대한 연구가 필요한 시점이다. 이를 위해서는 대상 미생물과 compatible 하여 미생물의 생존력 및 적응력을 높일 수 있는 다양한 소재의 활용성을 검정하는 연구가 필수적이며 처리 미생물의 식물환경 및 작물재배 토양 환경등에서 동태를 미생물 및 미생물 제제를 이용하여 연구하는 것이 필수적이다. 국내에서 미생물 농약 및 미생물 제제 처리 후 환경 동태를 분석하는 연구가 전무하여 미생물 제제를 개발하는 기초 자료가 지극히 부족하며, 장래에 유전자 재조합 미생물 제제의 개발에 대비한 미생물 식물환경 동태 연구가 필수적이나 국내의 연구 결과가 매우 미흡하다. 따라서, 본 연구자들에 의한 미생물의 tagging 기술은 국내의 유전자 재조합 기술과 함께 충분히 개발되어 야 할 분야이며, 미생물 농약이나 제제에 의한 효과를 본 기술을 응용하여 증명하는 기술 역시 외국에 국내의 기술을 알리는 좋은 기회가 될 것으로 판단된다.

## 제 2절 국외 관련기술의 현황 및 문제점

길항 미생물의 존재가 알려진 20세기 초반 그리고 이로부터 치료용 항생물질이 개발된 것처럼 길항 미생물을 이용한 작물병의 방제연구는 1927년 미국에서 감자 더넝이병 방제용으로 토양 방선균을 이용하여 처음 시도되었다. 이후 전 세계적으로 수많은 길항균들이 분리검정되어 다양한 작물병에 대한 효과가 검정되었다. 이와 같이 분리된 길항 미생물들은 1960년 이후부터 농약의 형태로 실용화되기 시작하였고, 미생물 농약 관련 법규는 미국의 경우 1975년 가장 먼저 제정되었고 1980년대 다수의 국가들이 미생물 농약 관련 법규를 제정하였다. 2000

년까지 미국에서는 약 44 종 이상의 미생물농약이 개발되어 판매되고 있으며 초기에 개발된 미생물중 *Agrobacterium radiobacter* strain K84 은 아직까지도 *A. tumefaciens* 에 의한 각종 목본류 근두암종병(Crown gall)에 효과적인 것으로 변형되어 이용되고 있다. 길항미생물인 *Agrobacterium radiacter* strain K84 및 변종인 K1026균주를 이용한 Galltrol, Dygall, Nogall 제품등이 그것이다. 이후 방선균, Pseudomonads, *Bacillus* 계의 미생물, *Trichoderma* 등의 진균등이 미생물 제제로 지속적으로 개발되어 왔다. 최근 국외에서 개발된 미생물 농약으로 성공적으로 평가되고 있는 Serenade는 *Bacillus subtilis* 균주를 이용한 미생물 수화제형 제제로서 미국의 AgraQuest 사에서 개발되었다. Serenade는 30여종의 항진균 펩티드를 생산하는 *Bacillus subtilis* QST-713균주를 제형화하여 전세계에 시판되는 우수한 미생물 농약으로 국내에서도 신영아그로에서 수입하여 에코제로로 판매되고 있는 제품이다. Serenade는 기존의 *Bacillus* 계열이 생산하는 항진균 활성 펩타이드 계열의 기존 3가지 물질인 iturin, plipastatin, surfactin 류 외에도 새로이 Agrastatin A인 신물질을 생산하는 균주를 이용하여 균체와 배양액을 혼합제형화 한 균주로서 포도의 흰가루병을 포함한 다양한 식물병의 방제에 화학농약을 대체하고 있는 실정이다. 이는 이전에 *Bacillus subtilis* GB03 균주로서 토양병해 방제용으로 개발된 Kodiak (Gustafson 사가 생산)과 함께 대표적인 광범위 미생물 제제라고 할 수 있다. 현재도 지속적으로 세계각국에서 새로운 미생물 농약 제제 생산을 위한 균주 탐색, 균주 개량, 제형화 기술 개발이 활발히 전개되고 있다. 현재 전세계적으로 활발히 관련 연구개발을 수행하는 주요 미생물 농약 회사들을 살펴보면, 우선 미국의 AgraQuest Inc. Mycogen Corporation ([www.mycogen.com](http://www.mycogen.com)), Abbott Laboratories ([www.abbott.com](http://www.abbott.com)), EcoSciences Corp. ([www.ecosci.com](http://www.ecosci.com)), Thermo Trilogly Corp.등이 잘 알려져 있으며, 유럽에서는 Natural Plant Protection (NPP, 프랑스), Koppert BV (네덜란드), Kemira Agro Oy. (핀란드) 등이, 일본에서는 Nissan Chemical Industries Ltd. ([www.nissanchem.co.jp](http://www.nissanchem.co.jp), Japan Tobacco Inc. 등이 있다.

한국기술은행 자료에 따르면 전 세계 바이오 농약(생물농약 및 작물 변형체 포함) 시장은 2005년 3.74억불에 해당했는데 2010년 5억불에 해당하여 연평균 9.9% 성장할 것으로 예측되었다. 순수한 미생물 농약 시장의 세계적인 규모는

약 2.6억불로 추정되는데 이중 60%를 살충제인 BT가 차지하고 있다. 해외 미생물농약의 시장규모는 점차 증가하여 2014년에는 3.3억에서 4억불에 이를 것으로 예상되고 있다. 이는 시간이 지날수록 환경친화적인 농업에 대한 세계각국의 관심이 증가하며 미생물 농약 및 제제에 대한 수요가 증가할 것으로 예측되는 것으로 선진각국에서 이에대한 연구개발 투자가 상관계어 증가할 것을 예측할 수 있다.

표 2. 2014년 해외 미생물 농약 시장규모 예측 (단위: 100 만불)

원제 미생물	유럽	NAFTA	남미	아프리카	아시아	오세아니아	전체
세균	15	80	10	5	20	30	160
바이러스	10	15	10	2	5	10	42
곰팡이	25	45	20	3	15	20	128
합계	50	140	40	10	40	60	330

출처: International Biocontrol Manufacturer's Association, 2004

본 연구에서 길함 미생물과 함께 미생물 유래 천연물을 활용하기 위한 미생물 제형의 연구를 수행하는데 미국등 선진국에서는 이미 미생물 뿐 아니라 이를 이용한 천연활성분 까지 포함하여 이에 대한 guideline도 이미 만들어져 천연물 유래 물질들에 대하여 제제로서 또는 농약으로서의 등록을 보다 용이하게 하였다. 특히 성공적인 Serenade 제품의 경우는 AgraQuest 사에서 그 기술을 보호하고 있어서 정확하게 미생물 제제의 과정이 공개되어 있지 못하나(관련 문헌 없음), 미생물체와 그 활성 성분을 별도로 제형화하여 혼합하였을 가능성이나 또는 기존의 제제와는 다른 기능성 첨가제가 추가되었을 가능성 그리고 두가지 균주 혼합 제형화의 가능성도 제기되고 있다.

딸기 탄저병은 전세계적으로 방제가 가장 어려운 작물병의 한가지로 이미 인식되고 있는 실정이므로 주된 방법은 토양 훈증, 점적 관수, 건전한 모종, 건전 재배 재료 이용, 윤작등에 주로 의존하고 있으며 딸기의 묘를 이식하는 경우에 azoxystrobin 계의 화학농약을 처리하는 기술에 의존하고 있다. 탄저병이 다발한 경우에는 fludioxonil, captan 수화제, azoxylstrobin 등을 엽면 살포하는 것을 권

장하는 방제효과가 우수한 것은 아니라고 알려져 있다. 따라서 토양 훈증, 윤작 등의 재배적인 방제방법에 미생물 제형을 활용하는 유기농법을 권장한다 (참고 UC Pest Management Guidelines).

최근에 미생물의 활용 및 유전자 조작 미생물의 활용 가능성이 증가하면서 이미 미국 등 선진국에서 다양한 tagging 유전자가 발굴되어 미생물의 환경 동태를 파악하거나 환경을 분석하는 목적으로 미생물 tagging 기술(biosensor)이 발달되어 왔다. 이를 위해서는 biosensor로 활용될 수 있는 유전자가 필요한데 주로 녹색형광단백질(GFP), luciferin 생산효소(luciferase), 얼음형성 유전자(ina), 색소형성 관련 단백질 유전자(GUS) 등이 활용되어 왔다. 그러나 미생물 제제의 처리 환경에서 동태와 식물에서의 동태는 그 복잡성으로 인해 그 집단수준의 변화를 시간적 공간적으로 차이를 조사하는 것은 여전히 다양한 미생물 균주에 대하여 충분한 연구가 되지 못하고 있다. 이는 일부 균주들의 경우 안정적인 biosensor 발현 시스템이 구축되어 있어서 미생물의 생태계 동태를 추적할 수 있으나 다수의 미생물 야생형 균주들의 경우, 형질전환의 어려움, 적절한 유전자 도입 시스템의 부족, 안정적으로 유지될 수 있는 tagging 기술이 부족등에 의해 이에 대한 연구가 어려운 실정이다. 그러나 향후 다양한 미생물의 산업적 활용 가능성 및 생태계 방출 가능성, 그리고 야생형 균주의 경우에도 처리 후 그 동태를 정확히 추적해야 하는 필요성이 제기 되고 있는 상황이다. 이는 처리 후 정확한 동태가 파악되었을 때 처리 미생물의 유효빈도 유지기간, 처리빈도 등을 결정하는데 중요하여 경제적으로 효율성을 확보할 수 있게 된다. 그러므로 국내에서도 미생물 농약 개발 후 환경에서의 미생물 동태를 분석하는 기술이 확보되어 장래에 이용될 야생형 균주의 생태 안정성, 환경친화성 평가를 위해 본 기술을 국내사정에 맞게 개발할 필요가 있다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1절 딸기 탄저병균 및 항진균 활성 균주

#### 1. 병원균의 분리 및 병원성 검정

##### 가. 병원균의 분리

경상남도 김해시 한림면 일대의 딸기 재배 농가에서 병든 딸기 식물의 crown, petiole 및 runner 부위에서 총 100여 isolate의 병원균을 분리하였다(Fig 1). 각 병든 부위의 조직 절편을 60% Chlorox에 1분간 표면 소독한 다음 물기를 제거하고 Water agar(WA)배지에 치상하여 균사가 자라나오면 PDA배지로 옮겨 27℃ 항온기에서 7일간 배양하였다. 이를 PDA배지에서 계대배양하면서 모든 실험에 이용하였다.



Fig. 1. Anthracnose symptom on various parts of strawberry infected by *Colletotrichum* sp. (A, Infected crown of strawberry; B, Infected runner of strawberry)

## 나. 병원성 검정

앞서 분리한 총 100여개의 병원균 균주의 병원성 검정을 위하여, 군사조각부유액과 포자현탁액 접종법으로 병원성을 검정하였다. 예비 실험 결과, 최종 6 균주가 강한 병원성을 나타내어 이를 군사조각부유액과 포자현탁액으로 나누어 실험에 이용하였다. 이때, 군사조각부유액은 각 균주의 군사 절편 4조각을 PDB 배지상에서 5일간 진탕배양한 다음 군사만 수거하여 블랜더로 1분간 분쇄한 후 PDB배지로 현탁하였다. 이를  $A_{550} = 0.4$ 로 조정하여 딸기 1 포트당 10 ml을 식물체 전면에 골고루 접종하였다. 또한, 포자현탁액은 각 균주의 PDA배지상에 생성된 포자를 수거하여 살균수로 현탁하고  $1 \times 10^6$  conidia/ml로 조정하여 접종하였다. 그 결과, 군사조각부유액은 KR-1-8 균주가 41.6% 발병율로 가장 병원성이 높았으며, 다음으로는 KR-1-8과 KRS-4 균주가 각각 33.3%, 30.5%의 발병율을 보여 유의차가 있었다(Table 1). 한편, 포자현탁액 접종원에서는 KR-2-1 균주가 88.8%로 가장 병원성이 강하였으며, 다음으로는 KR-1-2 및 KR-1-8, KRS-4 균주가 각각 69.4, 55.5, 55.5 순으로 높았다(Table 2). 따라서, 군사조각부유액과 포자현탁액 실험에서 공통적으로 병원성이 우수한 KRS-4와 KR-1-8 균주만을 선발하여 재병원성 검정을 실시하였는데 그 결과, 군사조각부유액에서나 포자현탁액에서나 비교적 안정적인 병원성을 나타내었다(Table 3).

Table 1. Disease severity of mycelial suspension of 6 isolates on strawberry plants at pots in the growth chamber

Isolates <sup>a</sup>	Disease severity (%)			
	I	II	III	Mean <sup>b</sup>
KRS-4	33.3	33.3	25.0	30.5 (4.8) ab
KRS-23	25.0	25.0	25.0	25.0 (0.0) b
KR-1-2	25.0	25.0	25.0	25.0 (0.0) b
KR-1-3	41.6	33.3	25.0	33.3 (8.3) ab
KR-1-8	50.0	41.6	33.3	41.6 (8.4) a
KR-2-1	25.0	25.0	16.6	22.2 (4.8) b
CONTROL	0.0	0.0	0.0	0.0 (0.0) c

<sup>a</sup> Mycelial suspension of each isolate was adjusted as  $A_{550}=0.4$ .

<sup>b</sup> Means in the same column followed by the same letter are not significantly different ( $P<0.05$ ) based on Duncan's multiple range test.

Table 2. Disease severity of spore suspension of 6 isolates on strawberry plants at pots in the growth chamber

Isolates <sup>a</sup>	Disease severity (%)			
	I	II	III	Mean
KRS-4	50.0	41.6	75.0	55.5 (17.4) ab
KRS-23	25.0	50.0	41.6	38.9 (12.7) bc
KR-1-2	75.0	83.3	50.0	69.4 (17.3) ab
KR-1-3	25.0	50.0	58.3	44.4 (17.3) abc
KR-1-8	25.0	58.3	83.3	55.5 (29.2) ab
KR-2-1	91.6	83.3	91.6	88.8 (4.8) a
CONTROL	0.0	0.0	0.0	0.0 (0.0) c

<sup>a</sup> Conidial suspension of each isolate was adjusted as  $1 \times 10^6$  conidia/ml.

<sup>b</sup> Means in the same column followed by the same letter are not significantly different ( $P<0.05$ ) based on Duncan's multiple range test.

Table 3. Disease severity of mycelial suspension and spore suspension of KRS-4 and KR-1-8 on strawberry plants at pots in the growth chamber

treatments	Isolates	Disease severity (% , after 7 days)			
		1	2	3	Mean
mycelial suspension <sup>a</sup>	KRS-4	75.0	58.3	58.3	63.8 (±14.4)
	KRS-1-8	25.0	41.7	41.7	24.6 (±4.8)
conidial suspension <sup>b</sup>	KRS-4	66.7	41.7	33.3	47.2 (±14.4)
	KR-1-8	25.0	33.3	33.3	30.4 (±9.6)
control	PDB	0.0	0.0	0.0	0(±0.0)
	DW	0.0	0.0	0.0	0(±0.0)

<sup>a</sup> mycelial suspension ( $A_{550} = 0.4$ ), 10ml/pot.

<sup>b</sup> conidial suspension ( $1 \times 10^6$  conidia/ml), 10ml/pot.

<sup>c</sup> The same letter in the column are not significantly different ( $P < 0.05$ ) based on Duncan's multiple range test.



결론적으로, 균사조각부유액이 포자현탁액 접종원보다 병발생의 진전이 빠르고 균일하게 진행되어, 약 50%의 병원성을 보이면서 매실험마다 가장 균일한 실험 결과를 보인 KRS-4 균주를 최종 선발하였다(Fig. 2).

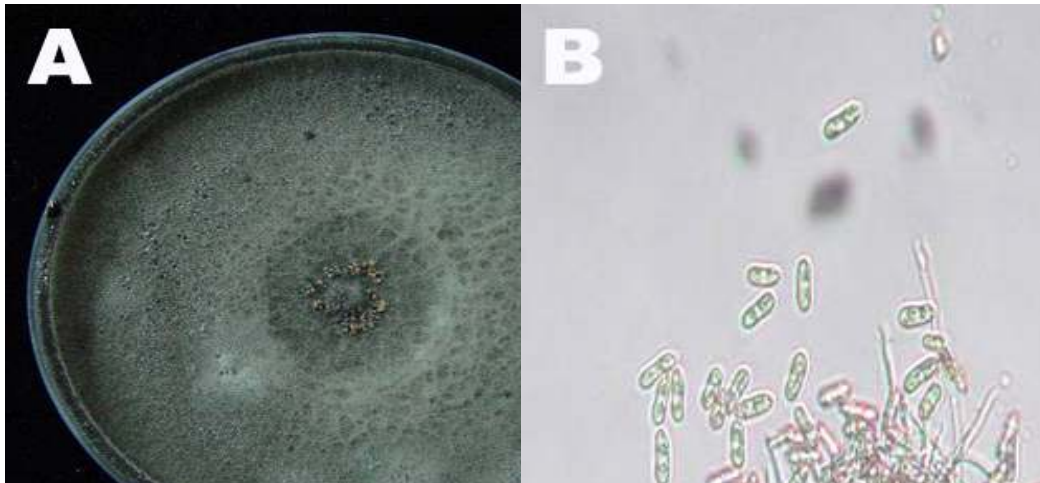


Fig. 2. (A) Cultural characteristic of *Colletotrichum gloeosporioides* KRS-4 isolate grown for 5 days on potato dextrose agar (PDA) media at 27C. (B) Morphology of conidia (X400).

## 2. 공시 탄저병원균(KRS-4)의 동정

공시 병원균인 KRS-4 균주의 균총을 PDB배지에 접종하고 25C, 150 rpm에서 5일간 진탕배양하였다. 배양액을 거즈를 이용하여 균사만 수거 한 후 살균수로 3회 세척한 뒤, 액체질소를 이용하여 균사를 마쇄하였다. 균사 40 mg 당 Nuclei lysis solution, RNase solution, Protein precipitation solution, isopropanol 등을 순서대로 처리하여 DNA를 분리하였고, 이를 1% agarose gel 에 loading하여 농도를 확인하였다. 순수 분리된 DNA는 rDNA의 noncoding region ITS 영역의 증폭을 위하여 ITS1 (5'-GCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'), ITS4 (5'-GCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') primer를 이용하여

PCR을 실시하였는데, 이때 PCR 반응조건은 94C에서 5분간 초기 변성시킨 후, 94C에서 1분, 52C에서 1분, 72C에서 1분을 1cycle로 하여 총 30 cycle로 반복하고 72C에서 5분간 반응시킨 후 종료하였다. PCR product는 pGEM-Teasy vector에 cloning한 후 그 염기서열을 분석하였다. 분석 결과, KRS-4 균주는 *Colletotrichum gloeosporioides*에 속하는 탄저병원균으로 최종 동정되었다 (Fig 3).

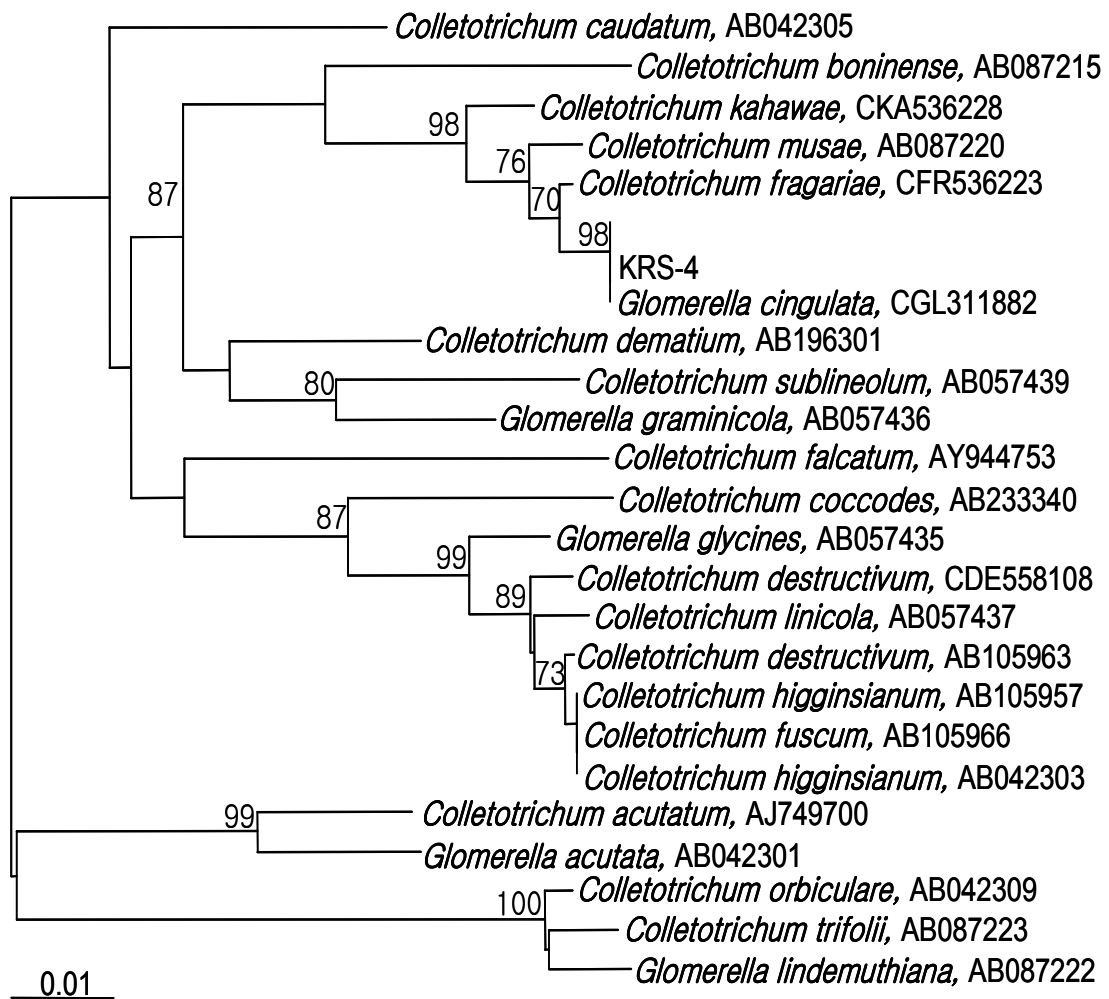


Fig. 3. Phylogenetic tree by ITS sequence analysis of KRS-4 strain with various *Colletotrichum* spp. The bar represents 0.01 substitutions per nucleotide position.

### 3. 유용미생물의 선발 및 길항력 검정

#### 가. 길항세균의 선발

앞서 최종 선발된 딸기탄저병원균 KRS-4에 대해 항진균활성이 높은 길항미생물을 탐색하기 위해 건전 딸기의 근권 토양에서 총 122 여개의 토양세균을 분리하고, 이들 중 가장 강한 길항능을 지닌 균주를 선발하였다. PDA배지에서 병원균과 분리 균주들과의 대치배양 결과, 강한 항진균활성을 나타낸 균주를 1차 선발하였다. 그 결과, N1, LY-11 및 A-7 균주에서 각각 저지대(inhibition zone)가 20.9, 18.9, 17.3 mm의 순으로 높았다(Table 4, Fig 4). 이들 중에서 가장 높은 저지대를 보인 균주를 선발하여 생육실내 포트에서의 방제효과 검정을 실시하고자 하였다.

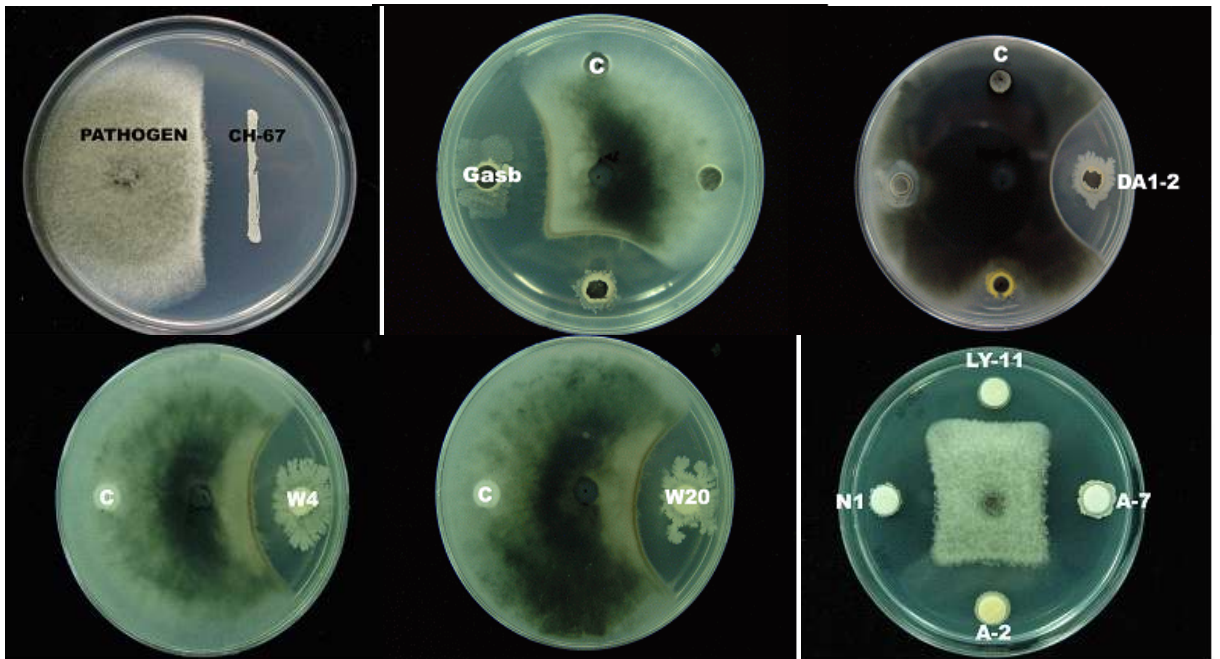


Fig. 4. Growth inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* KRS-4 isolate by antagonistic bacteria on PDA medium.

Table 4. Fungal growth inhibitory 122 antagonistic bacteria on mycelial growth of KRS-4 on PDA medium

Antagonistic bacteria	Inhibition zone (mm)	Antagonistic bacteria	Inhibition zone (mm)	Antagonistic bacteria	Inhibition zone (mm)
12	12.1	W25	10.2	좌3-1	3.6
2-79-85	3.8	W26	9.5	P-P-1	11.0
SMA1-4	3.5	W27	8.5	14-2	10.0
95L	- <sup>a</sup>	W28	9.9	SB6	1.2
123	13.2	W29	9.6	91-110	7.9
REAL26	12.8	W30	8.2	N07	4.0
B64	4.4	W31	9.4	u3-1	2.1
2	4.0	W32	8.6	SB1	1.3
26	11.7	W33	9.3	정1-1	3.7
205	4.3	W34	8.8	MS3	10.5
PL5	-	W35	8.8	ABB	1.9
B64P	4.6	W36	-	좌2-6	3.1
168	10.9	W37	11.5	DL-3	8.6
ProEC	12.7	W38	10.6	EB3-1	6.8
<b>LY-11</b>	<b>18.9</b>	W39	10.4	12①	11.1
A-2	15.9	W40	11.7	①	10.3
<b>A-7</b>	<b>17.3</b>	W41	10.5	14①	11.5
<b>N1</b>	<b>20.9</b>	W42	10.5	②	10.7
W1	9.1	W43	10.4	Bam3-2	9.9
W2	8.5	W44	10.9	바B-1	10.9
W3	9.0	옥상들깨세균	13.4	Pamstradien	5.1
W4	19.5	LVFB	12.5	SMA1-4	9.5
W5	8.8	LV7	4.9	5	9.8
W6	8.6	갈색쭈글이	10.5	R-1	12
W7	9.2	Na7S	12.1	W-1-5	8.6
W8	8.8	SME1-6	3.7	LVFB미끈	10.4
W9	9.2	N14-1①	11.6	LVFB끈	13.0
W10	8.8	N14-2	11.5	LVFB해	14.0
W11	9.3	SMA1-6	6.1	N12-0-0	13.6
W12	9.1	165	8.0	WB4	2.6
W13	9.3	SME3-3	6.3	SDF4-3	5.0
W14	9.1	BC1-f	10.7	SMA1-5	6.4
W15	9.0	SDF3-1	5.8	SB3	4.5
W16	-	Na7s	12.9	R	8.5
W17	9.4	SME1-4	3.3	Gasb	17.2
W18	5.8	SMA2-2	4.1	D①	8.3
W19	9.1	다1-2	12.0	B64보	7.9
W20	28.9	14-2①	12.0	DL3-1	-
W21	8.2	PH-3	3.0	CH-67	17.2
W22	10.2	A2	10.8		
W23	9.4	AH3-4	6.3		
W24	9.4	SMB1-4	8.1		

<sup>a</sup> No inhibitory effect

나. 딸기 탄저병 병원균에 대한 길항세균의 방제효과

(1) 1차 방제효과

앞서 대치배양을 통해 선발된 3개의 우수 활성균주인 N1, LY-11, A-7 균주를 이용해 딸기 꽃트상에서 방제효과를 검정 하였다. 각 길항세균은 NB 배지에서 24시간 진탕배양한 다음  $A_{550}=1.0$ 로 조정하여 딸기 식물체에 골고루 분무처리하였다. 습실처리된 생육실에서 24시간 보관한 후 딸기탄저병원균인 KRS-4 균주의 균사부유액( $A_{550}=0.4$ )을 딸기 식물체 전면에 골고루 접종하였다. 대조구로는 화학농약인 오티바를 공시하여 병방제효과를 비교하였다. 통계처리는 Duncan의 다중 검정( $P=0.05$ )으로 분석하였고, 발병도 조사는 아래의 지수를 이용하여 방제가로 환산하였다.

발병지수는 0-4까지 다음의 기준을 따라 조사하였다.

계수 : 0 - 발병무

1 - 엽병 병반면적율 < 50%

2 - 엽병 병반면적율  $\geq$  50%

3 - 시들음

4 - 식물 전체의 괴사

N - 조사주수

$$\text{발병도} = \frac{\sum(\text{발병수} \times \text{계수})}{4N} \times 100$$

그 결과, N1 균주가 83.3%의 방제가로 가장 우수하였으며, 다음으로는 LY-11과 A-7 균주가 각각 54.2%로 동일한 방제가를 나타내어 유의차가 있었다 (Table 5).

Table 5. Disease control effect of antagonistic bacteria against pathogen, KRS-4 on strawberry at pots in a growth chamber

Treatments	Disease severity (% , after 10 days)				Control value (%)	
	I	II	III	Mean		
antagonistic bacteria <sup>a</sup>	A-7	50.0	50.0	37.5	45.8 (±7.2)b	54.2(±7.2)b
	LY-11	37.5	37.5	62.5	45.8 (±14.4)b	54.2(±14.4)b
	N1	12.5	25.0	12.5	16.7 (±7.2)c	83.3(±7.2)ab
pathogen <sup>b</sup>		100.0	100.0	100.0	100.0 (±0.0)a	0.0(±0.0)c
control <sup>c</sup>		0.0	0.0	0.0	0.0 (±0.0)c	100(±0.0)a

<sup>a</sup> cell suspension (A550=1.0), 20ml/pot.

<sup>b</sup> mycelial suspension (adjusted A550=0.4), 10ml/pot.

<sup>c</sup> only PDB only, 10ml/pot.

## (2) 2차 방제효과

앞서 우수 활성균으로 선발되어 방제효과 검증에서 활성이 확인된 N1 균주 외에도 W5, W20 및 Gasb 균주를 포함하여 방제효과를 검증하였다. 접종방법은 앞서의 1차 방제효과와 동일하였다. 그 결과, Gasb 균주가 가장 높은 방제가인 58.8%였으나, 다음으로 LY-11, N1, W5 균주의 방제가가 각각 47.0%인 것으로 나타났으나 서로간에 유의차가 없었다(Table 6). 한편, PDB만 처리한 대조구 처리구에서도 발병도가 어느 정도 발생한 것으로 보아 딸기 식물체내 잠재 감염의 가능성이 있어서 건전주를 이용한 실험이 제기되어 이후에는 조직배양을 통해 육성된 건전주를 확보하여 이후의 실험에 이용하였다.

Table 6. Disease control effect of antagonistic bacteria against pathogen, KRS-4 on strawberry at pots in a growth chamber

Treatment	Disease severity (% , after 10 days)				Control value (%)	
	I	II	III	Means		
A-7	25.0	41.6	41.6	36.7(±9.6)ab	23.6(±20.3)a	
LY-11	25.0	25.0	25.0	25.0(±0.0)ab	47.0(±0.0)a	
Antagonistic bacteria <sup>a</sup>	N1	25.0	25.0	25.0(±0.0)ab	47.0(±0.0)a	
	W5	25.0	25.0	25.0(±0.0)ab	47.0(±0.0)a	
	W20	50.0	25.0	33.3(±14.4)ab	35.0(±20.3)a	
	Gasb	25.0	25.0	19.4(±9.6)ab	58.8(±20.4)a	
Pathogen <sup>b</sup>		25.0	66.6	50.0	47.2(±20.9)a	-
Control <sup>c</sup>		0.0	16.6	25.0	13.9(±12.7)b	37.27(±33.5)a

<sup>a</sup> cell suspension ( $A_{550}=1.0$ ), 20ml/pot.

<sup>b</sup> mycelial suspension (adjusted  $A_{550}=0.4$ ), 10ml/pot.

<sup>c</sup> only PDB only, 10ml/pot.

### (3) 3차 방제효과

마지막으로, N1 균주 외에도 지속적인 활성 균주의 선발을 위하여 CH-67 균주를 포함하여 방제효과 검정을 실시하였다. CH-67 균주는 산림토양으로부터 chitin을 첨가하여 농화배양을 통해 선발한 균주로서 16S rRNA 유전자와 *recA* 유전자를 PCR 방법으로 증폭하고 염기서열을 결정하여 최종 *Burkholderia pyrrocina* 로 동정되었다. 동정결과 *recA* 유전자를 이용한 계통분류도를 아래의 Figure 5에 나타내었다. 이전에 *Bacillus licheniformis*로 동정된 N1 균주와 *B. pyrrocina* CH-67 균주를 이용한 딸기 탄저병 방제효과 검정을 생육상에서 포트 재배에 딸기를 이용하여 전술한 바와 같이 동일하게 수행하였으며 대조구로 화학 농약인 오티바와 비교 검정하였다. 그 결과, 화학농약인 오티바 처리구에서

94.1%로 가장 높은 방제가를 보였으며, 다음으로는 길항세균인 CH-67 균주가 82.4%로 가장 우수하였고, N1 균주와 W5 균주 역시 70.6%와 64.7%로 방제가 높았으며 서로 간에 유의차가 있었다(Table 8). 따라서, 미생물제제 개발에 이용할 우수 활성 균주로서 N1 균주 및 CH-67 균주를 방제효과 검정 시험에 최종 확인을 위해 이용하였다.

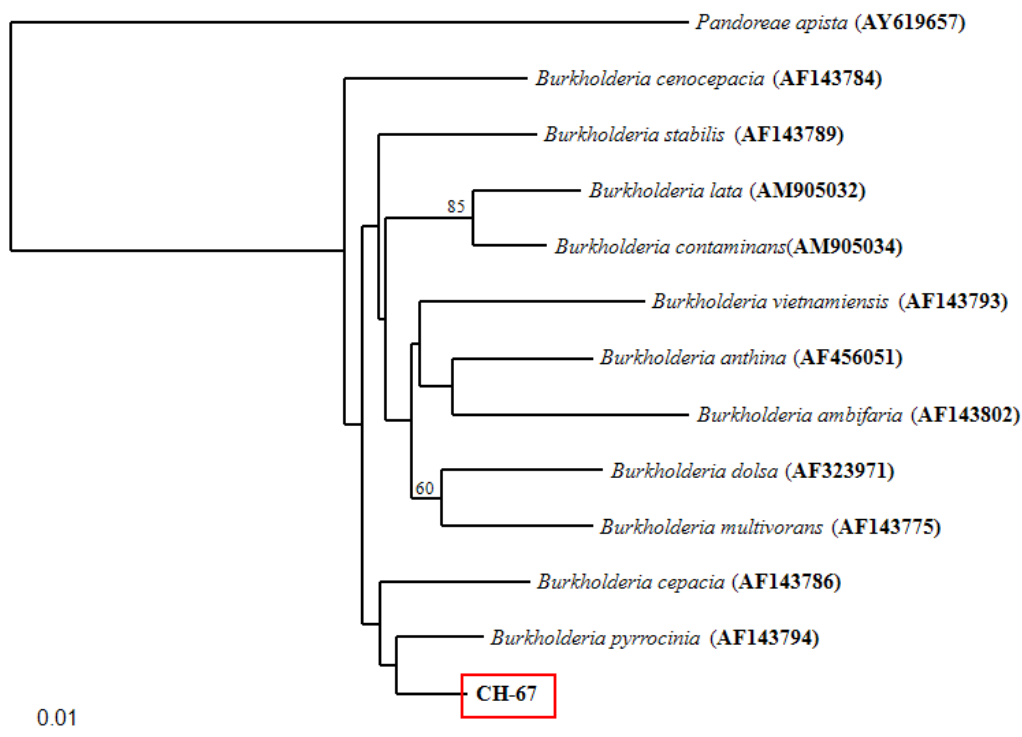


Fig. 5. Phylogenetic tree by *recA* gene analysis of *Burkholderia pyrrocina* CH-67. Bootstrap values are shown for each node that had 50% support in a bootstrap analysis of 1,000 replicates. The scale bar indicates 0.01 change per nucleotide.



Table 8. Disease control effect of antagonistic bacteria and chemical fungicide against pathogen, KRS-4 on strawberry at pots in a growth chamber

Treatment	Disease severity(% , after 10 days)				Control value (%)	
	I	II	III	Means		
Antagonistic bacteria <sup>a</sup>	N1	25.0	12.5	25.0	20.8(±7.2)b	70.6(±10.2)bc
	W5	12.5	25.0	37.5	25.0(±12.5)b	64.7(±17.6)c
	Gasb	50.0	100.0	50.0	66.7(±28.9)a	5.9(±40.8)d
	CH-67	12.5	12.5	12.5	12.5(±0.0)b	82.4(±0.0)abc
Chemical fungicide <sup>c</sup>	오티바	0.0	0.0	12.5	4.2(±7.2)b	94.1(±10.2)ab
Pathogen <sup>d</sup>		62.5	75.0	75.0	70.8(±7.2)a	0.0(±10.2)e
Control <sup>e</sup>		0.0	0.0	0.0	0.0(±0.0)b	100.0(±0.0)a

<sup>a</sup> cell suspension ( $A_{550}=1.0$ ), 20ml/pot.

<sup>b</sup> sprayed 100-fold diluents , 20ml/pot.

<sup>c</sup> sprayed 2000-fold diluents, 20ml/pot.

<sup>d</sup> mycelial suspension ( $A_{550}=0.4$ ), 10ml/pot.

<sup>e</sup> only PDB only, 10ml/pot.

#### 4. 딸기 탄저병 방제용 유용미생물의 최종 선발 및 방제효과

배지에서 병원균 생육저지대의 형성과 딸기 포트상에서 방제효과 검정을 통해 선발된 균주인 N1과 CH-67의 배양액을 이용하여 미생물을 전처리하고 24시간과 48시간 후에 병원균의 균사조각 부유액( $A_{550} = 0.4$ )을 접종하여 딸기 탄저병에 대한 방제효과를 검정하였다. 그 결과, N1과 CH-67균주에서 높은 방제효과를 관찰할 수 있었으며 시간별 처리는 통계적으로 유의성은 없었다(Table 9). 그 외 균주들은 모두 50% 이하의 낮은 방제가를 보여 N1

과 CH-67을 우수 길항균으로 최종선발 하였다(Fig. 6).

Table 9. Disease control effect of antagonistic bacteria against pathogen KRS-4 on strawberry at pots in a growth chamber

Treatment			Disease severity (% , after 7 days)				Control value (%) <sup>e</sup>
			I	II	III	Mean	
Antagonistic bacteria <sup>a</sup>	N1	24hr <sup>f</sup>	8.3	0.0	0.0	2.8 (±2.8) b	95.7 (±4.3) a
	CH-67		16.6	8.3	16.6	13.8 (±2.8) b	78.3 (±4.3) a
	N1	48hr <sup>f</sup>	8.3	0.0	16.6	8.3 (±4.8) b	87.0 (±7.5) a
	CH-67		16.6	25.0	16.6	19.4 (±2.8) b	69.6 (±4.4) a
Chemical fungicide <sup>b</sup>	azoxystorbin		0.0	0.0	0.0	0.0 (±0.0) b	100.0 (±0.0) a
Pathogen <sup>c</sup>			66.6	41.6	83.3	63.8 (±63.8) a	0.0 (±19.0) b
Control <sup>d</sup>			0.0	0.0	0.0	0.0 (±0.0) b	100.0 (±0.0) a

<sup>a</sup> cell suspension ( $A_{550}=1.0$ ), 30ml/1pot; <sup>b</sup> sprayed 2,000-fold dilutions

<sup>c</sup> mycelial suspension ( $A_{550}=0.4$ ), 10ml/1pot; <sup>d</sup> treated PDB only

<sup>e</sup>data followed by the same letter within a column are not significantly different ( $P = 0.05$ ) according to Duncan's multiple range test

<sup>f</sup>hr indicates antagonistic bacteria treatment 24 and 48 hr prior to pathogen inoculation.

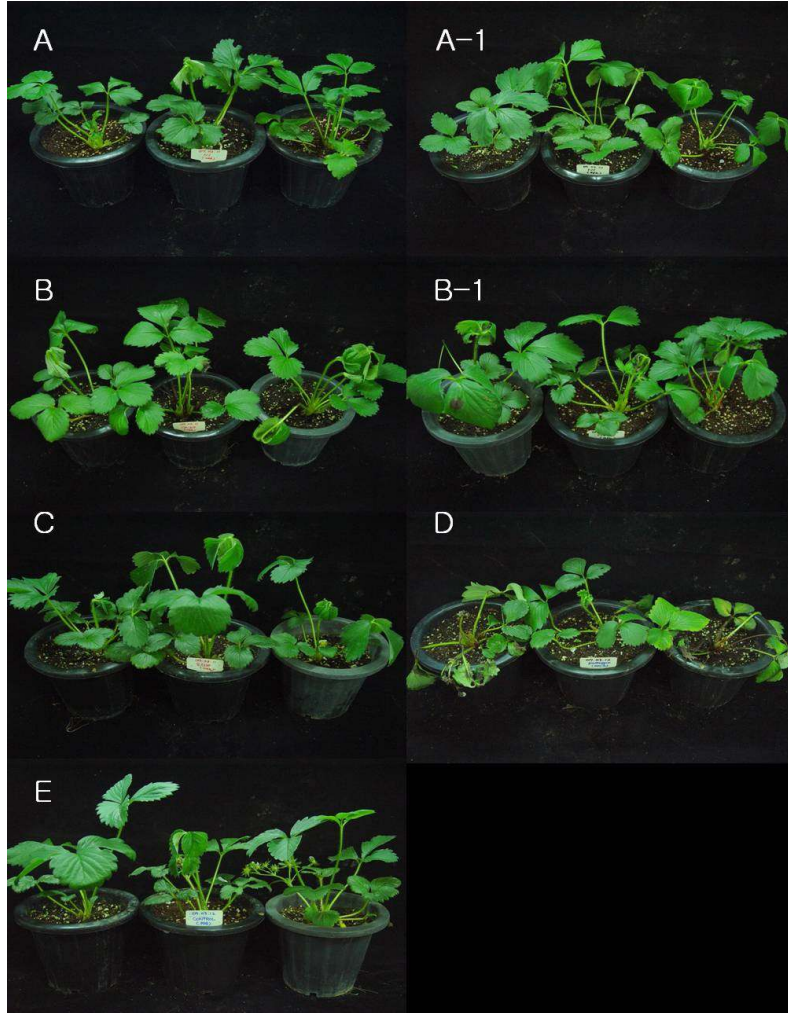


Fig. 6. Disease control effect of antagonistic bacteria against pathogen KRS-4 on strawberry at pots in a growth chamber. (A, NI 24hr; A-1, NI 48hr; B, CH-67 24hr; B-1, CH-67 48hr; C, azoxystrobin; D, pathogen; E, control)

## 제 2절 항진균 활성 균주를 활용한 미생물 제제

### 1. 항진균 활성 균주 대량배양을 위한 최적조건 확립

#### 가. CH-67균주의 최적배양조건확립

##### (1) 저분자 및 고분자 탄소원 선발

삼각플라스크 상에서 저분자 및 고분자 탄소원을 선발하기 위하여, 500 ml 삼각플라스크에 기초배지 ( $K_2HPO_4$  12.5 g,  $KH_2PO_4$  3.8 g,  $MgSO_4 \cdot H_2O$  0.1 g) 200 ml 당 저분자 탄소원(glucose, ethanol, sucrose, fructose, glycerol, lactose)과 고분자 탄소원(흰설탕, 검은설탕, 노란설탕)을 각각 3% 되도록 첨가하고, 질소원은  $(NH_4)_2SO_4$ 는 0.5%가 되도록 첨가하였다. 여기에 NB배지에서 24시간 전배양한 세균부유액( $A_{550}=1.0$ ) 1 ml을 접종하고 5일간 진탕배양( $30^\circ C$ , 160 rpm)하여 균체를 회수하고 동량의 살균수로 현탁하여 분광광도계(550 nm)로 시간별 OD값을 측정하였다. 그 결과, 배양 65시간 후의 저분자 탄소원인 경우, sucrose와 glucose에서 각각  $A_{550}=2.78$ ,  $A_{550}=2.76$ 으로 가장 높은 OD값을 나타내었다. 반면 fructose와 glycerol에서는  $A_{550}=2.53$ ,  $A_{550}=1.07$ 이었으며 lactose와 ethanol에서는 매우 낮은 0.2 이하의 매우 낮은 세균밀도를 보였다. 반면, 고분자탄소원인 경우에는 검은설탕이  $A_{550}=2.90$ 로 가장 높았고, 다음으로는 노란설탕과 흰설탕에서 각각  $A_{550}=2.83$  및  $A_{550}=2.80$ 으로 높았다. 전반적으로 고분자 탄소원이 저분자 탄소원 보다 세균밀도가 다소 높은 경향이였다(Fig. 7).

동일한 기초배지 200 ml 에 또다른 종류위 고분자 탄소원(현미유, 옥수수 전분, 썬크리미, 미강, 밀기울, 제빵개량제)을 3% 첨가하고 질소원( $(NH_4)_2SO_4$ )을 0.5%되도록 첨가하여 추가 탄소원을 선발하였다. NB배지에서 24시간 전배양한 세균부유액( $A_{550}=1.0$ ) 1 ml을 각 배지에 접종한 후 5일간 진탕배양( $37^\circ C$ , 180 rpm)하면서 24, 48, 78 시간별로 균체를 회수하여 10단계 희석평판법에 의한 생균수를 측정하였다. 78시간 배양후 가장 높은 생균수를 보인 고분자 탄소원은 밀기울로  $1.69 \times 10^9$  cfu/ml 수준이었으며, 제빵개량제, 미강, 옥수수전분 순으로 생균수가 높았다. 반면, 현미유나 썬크리미는 낮은 생균수를 보였다(Fig. 8). 특히,

glucose에 비해 밀기울, 제빵개량제와 옥수수전분, 미강은 48시간과 78시간 배양에서 각각 높은 생균수를 보여 밀기울을 대량배양을 위한 고분자 탄소원으로 선발하였다.

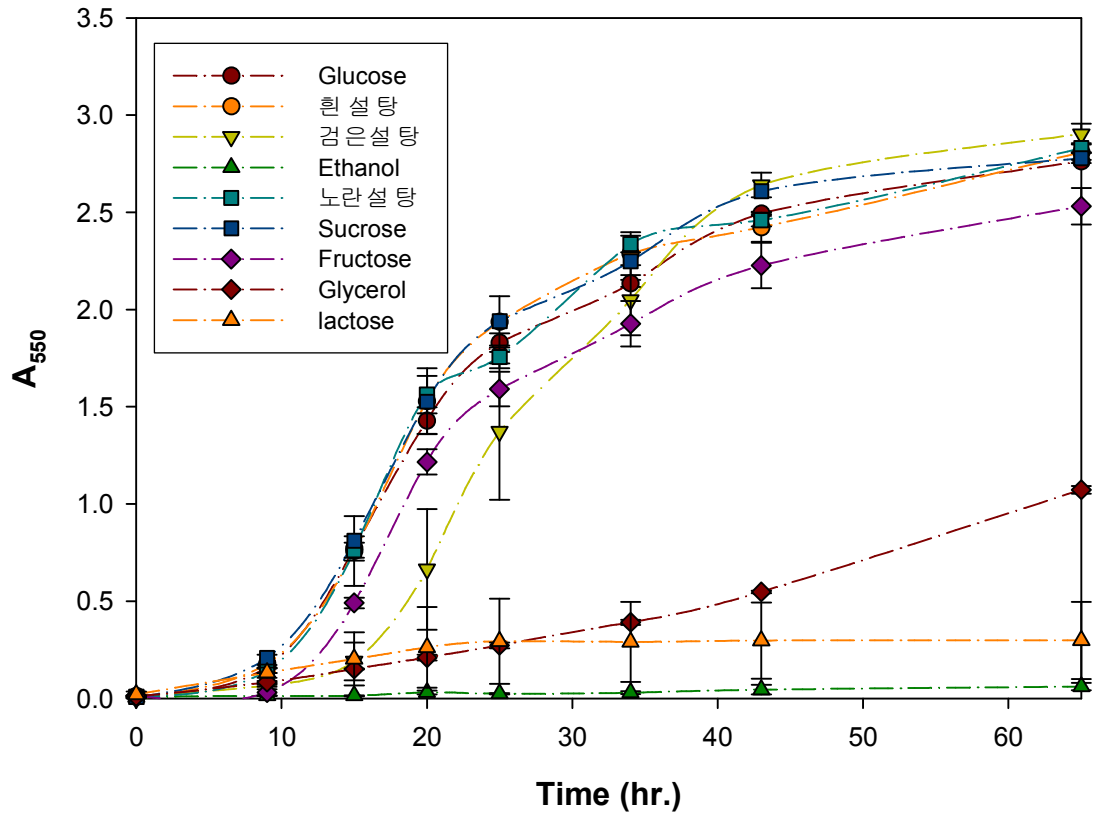


Fig. 7. Effect of carbon sources on cell growth of CH-67 strain at 30°C, 160 rpm in flask culture for 65 hrs.

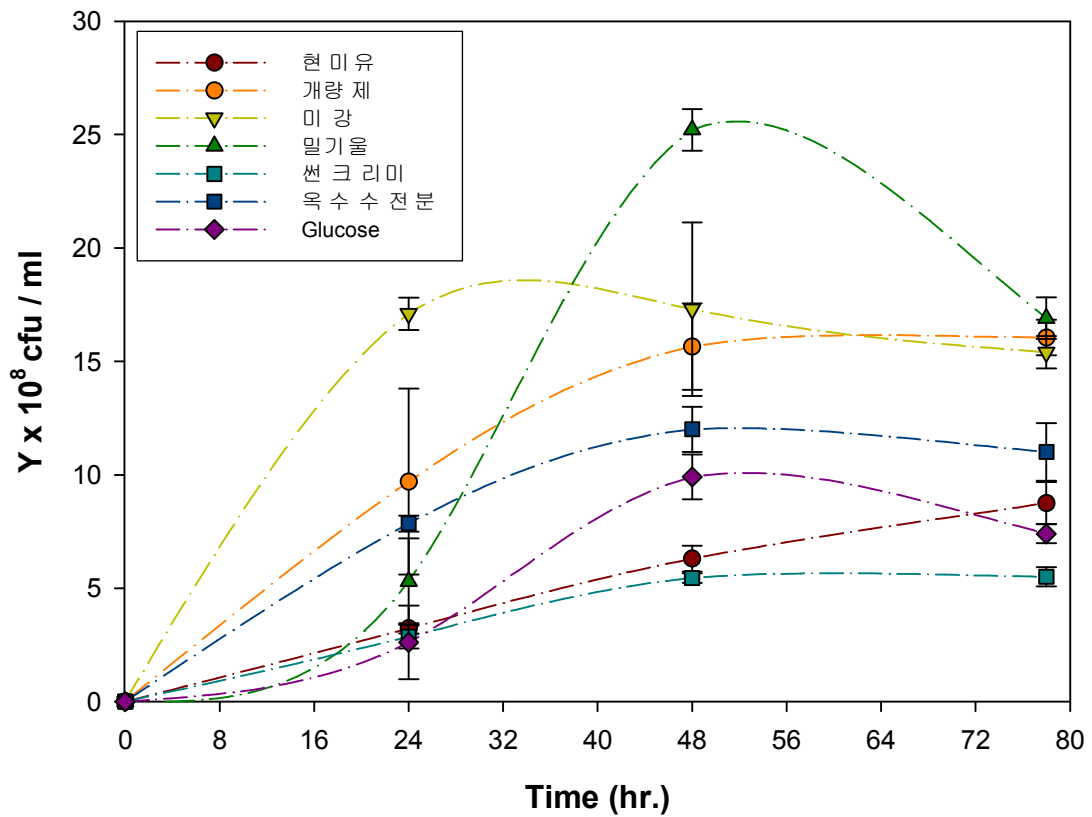


Fig. 8. Effect of high molecular weight of carbon sources on cell growth of CH-67 strain at 30°C, 160 rpm in flask culture for 78 hrs.

## (2) 질소원 선발

삼각 플라스크내 질소원 선발에 있어서 공시된 기초배지( $K_2HPO_4$  12.5 g,  $KH_2PO_4$  3.8 g,  $MgSO_4 \cdot H_2O$  0.1 g) 200 ml에 저분자 질소원( $(NH_4)_2SO_4$ ,  $NH_4Cl$ ,  $KNO_3$ )을 각각 0.5%와 탄소원 glucose를 3% 되도록 첨가하여 NB배지에서 24시간 전배양한 세균부유액( $A_{550}=1.0$ ) 1 ml을 각 배지에 접종한 후 5일간 진탕배양(37°C, 180 rpm)하면서 시간별로 균체를 회수하여 분광광도계(550 nm)에서 OD값을 측정하였다. 그 결과, 배양 65시간 후의 질소원인  $(NH_4)_2SO_4$ ,  $NH_4Cl$ ,  $KNO_3$ 에서 각각  $A_{550}=2.41$ ,  $A_{550}=2.39$ ,  $A_{550}=2.29$ 의 순서대로 높은 OD값을 나타내

었다. 따라서, 질소원으로는  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 이 최종 선발되었다(Fig. 9).

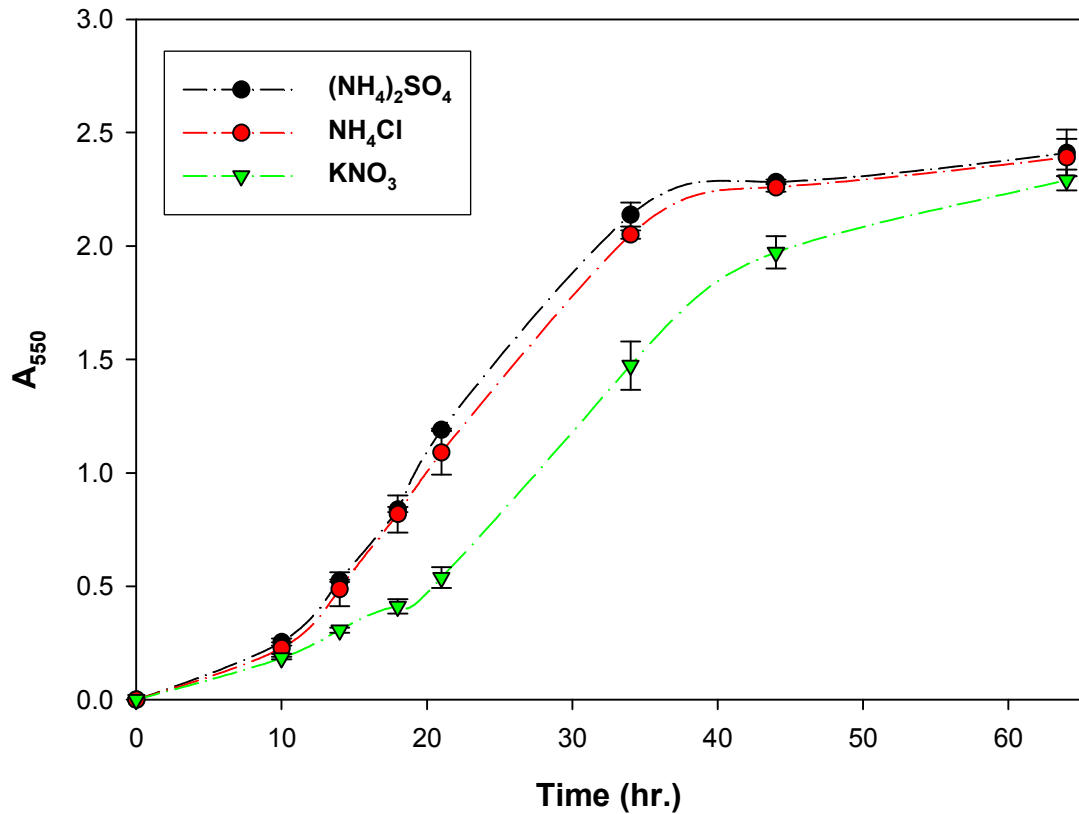


Fig. 9. Effect of nitrogen sources on cell growth of CH-67 strain at 30°C, 160 rpm in flask culture for 65 hrs.

### (3) CH-67 균주 대량배양용 조건 확립.

위의 조건에서처럼 *B. pyrrocina* CH-67 균주를 대량 배양을 한 배지에서 가장 높은 생균수 및 길항력을 유지하는 배지로 기초배지(1.25%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.38%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.01%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )에 3% 제빵 개량제와 0.5%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 첨가한 배지를 선발하였다. 따라서 이후 *B. pyrrocina* CH-67균주의 제형

화를 위해 상기의 배지를 이용하였다.

나. N1 균주의 최적배양배지확립

대량 배양용 배지의 선발을 위해 살균수에 5% 비지, 3% 현미유, 3% 제빵개량제를 각각 첨가하여 총 3개의 배지를 만들어 실험한 결과 5% 비지 첨가배지에서 생균수가 초기 생균수  $1 \times 10^8$  cfu/ml에서 96시간째에  $1 \times 10^9$  cfu/ml으로 증가되었으며 36시간째부터 뚜렷한 감소폭없이  $1 \times 10^9$  cfu/ml 이상으로 생균수가 계속 유지되는 것을 확인했다(Fig. 10).

따라서 5% 비지배지가 *Bacillus licheniformis* N1균주의 대량배양 배지로 선발되었다. 이전 연구를 통해 N1 균주의 최적 배양조건은 기확립되었다.

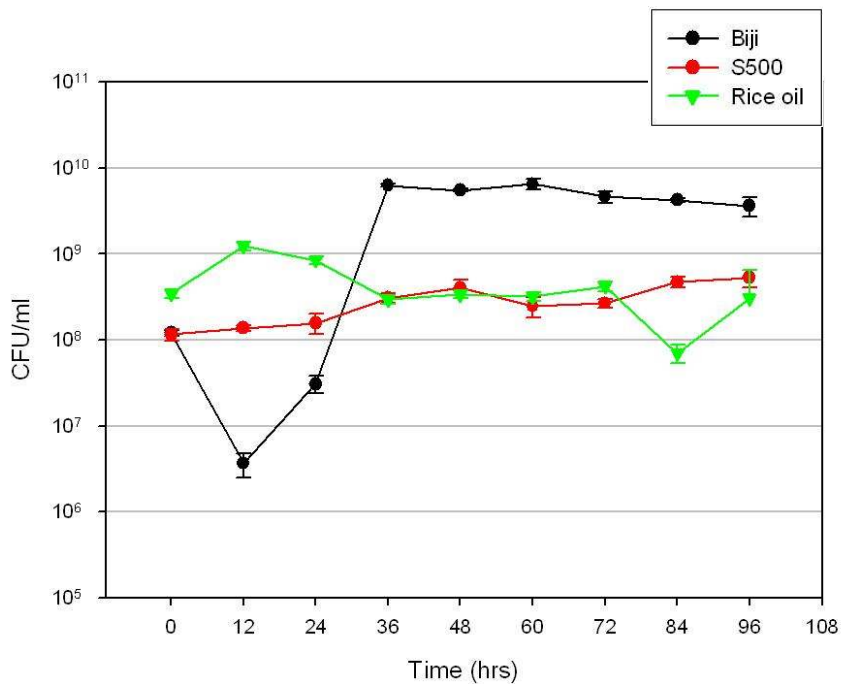


Fig. 10. Growth curve of *Bacillus licheniformis* N1 strain in Biji, S500 and rice oil medium for 96 hours (30°C, 300 rpm, 1.5 atm, pH 6~7).



## 2. 향진균활성 균주 N1과 CH-67 균주의 제형화

### (가) N1균주를 이용한 제형화

대량배양용 배지로 선발된 비지배지 4 L를 7 L 발효기에 준비하여, 24시간 배양한 *B. licheniformis* N1균주 400 ml를 접종하여 30℃, 300 rpm, 1.5 atm, pH 6~7에서 3일간 배양하였다. 그 후 배양액에 옥수수전분, 찹옥수수전분, 타피오카전분, 변성전분, 감자전분, 썬 크림미 등의 전달매체를 종류별로, 농도별로 첨가하고 잘 혼합하여, 건조기(50℃)에서 3일간 건조한 뒤 분쇄하여 총 9종의 수화제형 미생물 농약을 제조하였다(Table 10).

Table 10. Composition of wettable powder-type formulations using commercial additives, carriers added to *B. licheniformis* N1 culture

Formulation	Ingredients of formulation (per liter of culture)
NICH	powder type tapioca 400 g, modified starch 100 g
NIC-2	corn starch 400 g
NIE-2	corn starch 400 g, olive oil 50 ml, white sugar 50 g
NIE-3	waxy corn starch 400 g, olive oil 50 g, white sugar 50 g
NIG-2	corn starch 600 g, olive oil 75 ml
NIMP	powder type tapioca 400 g, olive oil 50 g, white sugar 25 g
NIX	sun creamy 80 g
NIY	potato starch 200 g
NIZ	sun creamy 80 g

(나) CH-67균주를 이용한 제형화

대량배양을 위해 7 L 발효기에 대량배양용 배지로 선발된 배지를 4 L 넣고, 24시간 배양한 *B. cepacia* CH-67균주 400 ml를 집중하여 30℃, 300 rpm, 1.5 atm, pH 6~7에서 3일간 배양하였다. 그 후 배양액에 전달매체인 찹옥수수전분, 감자전분을 첨가하고 잘 혼합하여, 건조기(50℃)에서 3일간 건조한 뒤 분쇄하여 총 2종의 수화제형 미생물 제형을 제조하였다(Table 11).

Table 11. Composition of wettable powder-type formulations using commercial additives, carriers added to *B. pyrrocinia* CH-67 culture

Formulation	Ingredients of formulation (per liter of culture)
CH-67G	waxy corn starch 200 g
CH-67H	potato starch 200 g

## 제 3절 미생물 제제의 딸기 탄저병 방제 효과

### 1. 생육실 포트에서 미생물 제형의 방제효과 검정 및 제형 선발

실험에 사용한 식물체는 현재 농가에서 사용하고 있는 딸기 탄저병에 감수성인 장희 품종을 이용하였다. 딸기는 플라스틱 포트(직경 15 cm)에 딸기전용상토(푸르미, 서울바이오)를 사용하여 재배하였다.

*B. licheniformis* N1균주와 *B. pyrrocina* CH-67균주를 이용하여 제조된 미생물 제형(NIMP, NIC-2, NIE-2, NIE-3, NIG-2, NICH, NIX, NIY, NIZ, CH-67G, CH-67H)의 100배 희석액과 대조구인 화학농약(아족시스트로빈) 2,000배 희석액을 딸기 식물체 전체에 30 ml씩 골고루 살포하고 24시간 후에 병원균 KRS-4균주의 균사조각 부유액( $A_{550} = 0.4$ )을 식물체 전체에 골고루 접종하여 온도 27°C, 상대습도 90% 이상의 생육실에 보관하면서 경과를 관찰하였다. 병원균 접종 7일 후에 발병도를 조사하고 방제가로 환산하여 방제가가 가장 높은 제제를 선발하였다. 반복수는 6주씩 3반복으로 하였다. 발병도는 딸기 포트에서 관부와 엽병에서의 탄저병 발병의 결과인 관부부위의 갈변, 엽병의 수침상 흑변의 결과인 묘종의 시들음을 관찰하여 발병도를 기준 방법에 따라 결정하였다. 발병도는 다음과 같이 환산하였다.

$$\text{발병도} = \frac{\sum(\text{발병수} \times \text{계수})}{4N} \times 100$$

계수 : 0 - 발병무

1 - 엽병 병반면적율 < 50%

2 - 엽병 병반면적율 ≥ 50%

3 - 시들음

4 - 식물 전체의 괴사

N - 조사주수

이상의 실험에서 방제가는 다음과 같이 환산하였다.

$$\text{방제가(\%)} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

A: 제제 무처리구의 발병률 , B: 제제 처리구의 발병률

모든 실험은 1회 3반복으로 총 3회 실행하였다. 각 처리구간의 유의차는 던컨 다중검정법으로 비교하였다( $P = 0.05$ ).

포트에서 재배한 딸기 식물체에 총 11종의 미생물농약과 화학농약을 처리하여 총 4번의 방제효과 검정을 생육실에서 시행하였다. 1차 실험에서는 NIC-2, NIE-2, NIE-3, NIG-2, NIY, CH-67G 그리고 CH-67H에서 90% 이상의 높은 방제가를 나타내었다. 그러나 2차, 3차, 4차 실험에서는 1차보다는 낮은 50% 이상의 결과를 확인할 수 있었다(Table 12-15.). 각각의 처리구의 방제가를 평균을 산출해 본 결과 NIC-2, NIE-3, 그리고 NIZ에서 각각 72.8%, 70.0%, 71.9%의 방제가를 나타내었다. 또한 CH-67H 처리구에서 76.9%의 방제가를 나타내었다(Table 16.). 화학농약 처리구의 경우 85.5%의 방제가를 나타내었으며 본 연구에서 제조한 미생물 농약은 화학농약 처리구 대비 80%이상의 방제효과를 보였다(Fig. 11).

Table 12. Disease control effect of NI formulations and CH-67 formulations against pathogen, KRS-4 on strawberry at pots in the growth chamber

Experiment (I)

Treatment	Disease severity (% , after 7 days)				Control value (%) <sup>b,c</sup>
	I	II	III	Mean	
NICH	25.0	25.0	37.5	29.2 (±4.2) c	69.6 (±4.3) c
NIC-2	12.5	12.5	0.0	8.3 (±4.2) de	91.3 (±4.3) ab
NIE-2	12.5	0.0	0.0	4.2 (±4.2) de	95.7 (±4.3) ab
NIE-3	12.5	0.0	12.5	8.3 (±4.2) de	91.3 (±4.3) ab
NIG-2	12.5	12.5	0.0	8.3 (±4.2) de	91.3 (±4.3) ab
NIMP	12.5	12.5	12.5	12.5 (±0.0) cde	87.0 (±0.0) abc
NIX	62.5	50.0	37.5	50.0 (±7.2) b	47.8 (±7.5) d
NIY	12.5	0.0	12.5	8.3 (±4.2) de	91.3 (±4.3) ab
NIZ	25.0	12.5	25.0	20.8 (±4.2) cd	78.3 (±4.3) bc
CH-67G	0.0	12.5	0.0	4.2 (±4.2) de	95.7 (±4.3) ab
CH-67H	25.0	25.0	37.5	29.2 (±4.2) c	69.6 (±4.3) c
Azoxystrobin	0.0	0.0	0.0	0.0 (±0.0) e	100.0 (±0.0) a
Pathogen only	87.5	100.0	100.0	95.8 (±4.2) a	0.0 (±4.3) e
Control <sup>a</sup>	0.0	0.0	0.0	0.0 (±0.0) e	100.0 (±0.0) a

<sup>a</sup> treated PDB only.

<sup>b</sup> The number followed by the same letter within a column are not significantly different ( $P = 0.05$ ) according to Duncan's multiple range test.

<sup>c</sup> The numbers in the parenthesis represents the standard deviation from three replications.

Table 13. Disease control effect of NI formulations and CH-67 formulations against pathogen, KRS-4 on strawberry at pots in the growth chamber

Experiment (II)

Treatment	Disease severity (% , after 7 days)				Control value (%) <sup>b</sup>
	I	II	III	Mean	
NICH	12.5	12.5	12.5	12.5 (±0.0) c-f	70.0 (±0.0) a-d
NIC-2	12.5	25.0	25.0	20.8 (±4.2) b-e	50.0 (±10.0) b-e
NIE-2	25.0	37.5	37.5	33.3 (±4.2) ab	20.0 (±10.0) ef
NIE-3	12.5	12.5	12.5	12.5 (±0.0) c-f	70.0 (±0.0) a-d
NIG-2	25.0	25.0	12.5	20.8 (±4.2) b-e	50.0 (±10.0) b-e
NIMP	37.5	37.5	25.0	33.3 (±4.2) ab	20.0 (±10.0) ef
NIX	37.5	25.0	25.0	29.2 (±4.2) abc	30.0 (±10.0) def
NIY	25.0	25.0	25.0	25.0 (±0.0) a-d	40.0 (±0.0) c-f
NIZ	0.0	12.5	12.5	8.3 (±4.2) def	80.0 (±10.0) abc
CH-67G	37.5	25.0	25.0	29.2 (±4.2) abc	30.0 (±10.0) def
CH-67H	12.5	0.0	0.0	4.2 (±4.2) ef	90.0 (±10.0) ab
Azoxystrobin	0.0	0.0	12.5	4.2 (±4.2) ef	90.0 (±10.0) ab
Pathogen only	37.5	50.0	37.5	41.7 (±4.2) a	0.0 (±10.0) f
Control <sup>a</sup>	0.0	0.0	0.0	0.0 (±0.0) f	100.0 (±0.0) a

<sup>a</sup> treated PDB only.

<sup>b</sup> The number followed by the same letter within a column are not significantly different ( $P = 0.05$ ) according to Duncan's multiple range test.

<sup>c</sup> The numbers in the parenthesis represents the standard deviation from three replications.replications.

Table 14. Disease control effect of NI formulations and CH-67 formulations against pathogen, KRS-4 on strawberry at pots in the growth chamber

Experiment (III)

Treatment	Disease severity (% , after 7 days)				Control value (%) <sup>b</sup>
	I	II	III	Mean	
NICH	12.5	37.5	12.5	20.8(±8.3) cd	79.2(±8.3) ab
NIC-2	37.5	37.5	37.5	37.5(±0.0) bc	62.5(±0.0) bc
NIE-2	50.0	50.0	25.0	41.7(±8.3) bc	58.3(±8.3) bc
NIE-3	37.5	37.5	37.5	37.5(±0.0) bc	62.5(±0.0) bc
NIG-2	50.0	62.5	50.0	54.2(±4.2) b	45.8(±4.2) c
NIMP	37.5	37.5	37.5	37.5(±0.0) bc	62.5(±0.0) bc
NIX	37.5	50.0	62.5	50.0(±7.2) b	50.0(±7.2) c
NIY	50.0	12.5	37.5	33.3(±11.0) bc	66.7(±11.0) bc
NIZ	37.5	25.0	37.5	33.3(±4.2) bc	66.7(±4.2) bc
CH-67G	25.0	25.0	37.5	29.2(±4.2) bc	70.8(±4.2) bc
CH-67H	50.0	37.5	50.0	45.8(±4.2) bc	54.2(±4.2) bc
Azoxystrobin	37.5	37.5	12.5	29.2(±8.3) bc	70.8(±8.3) bc
Pathogen only	100.0	100.0	100.0	100.0(0.0) a	0.0(±0.0) d
Control <sup>a</sup>	0.0	0.0	0.0	0.0(±0.0) d	100.0 (±0.0) a

<sup>a</sup> treated PDB only.

<sup>b</sup> The number followed by the same letter within a column are not significantly different ( $P = 0.05$ ) according to Duncan's multiple range test.

<sup>c</sup> The numbers in the parenthesis represents the standard deviation from three replications.replications.

Table 15. Disease control effect of NI formulations and CH-67 formulations against pathogen, KRS-4 on strawberry at pots in the growth chamber

Experiment (IV)

Treatment	Disease severity (% , after 7 days)				Control value (%) <sup>b</sup>
	I	II	III	Mean	
NICH	37.5	62.5	50.0	50.0(±7.2) ab	25.0(±10.8) cd
NIC-2	12.5	0.0	12.5	8.3(±4.2) cd	87.5(±6.3) ab
NIE-2	37.5	25.0	25.0	29.2(±4.2) bc	56.3(±6.3) bc
NIE-3	25.0	25.0	37.5	29.2(±4.2) bc	56.3(±6.3) bc
NIG-2	12.5	25.0	0.0	12.5(±7.2) cd	81.3(±10.8) ab
NIMP	12.5	12.5	0.0	8.3(±4.2) cd	87.5(±6.3) ab
NIX	0.0	12.5	12.5	8.3(±4.2) cd	87.5(±6.3) ab
NIY	0.0	12.5	12.5	16.7(±4.2) cd	75.0(±6.3) ab
NIZ	37.5	25.0	12.5	25.0(±7.2) bcd	62.5(±10.8) abc
CH-67G	0.0	0.0	12.5	4.2(±4.2) cd	93.8(±6.3) ab
CH-67H	0.0	12.5	0.0	4.2(±4.2) cd	93.8(±6.3) ab
Azoxystrobin	12.5	25.0	0.0	12.5(±7.2) cd	81.3(±10.8) ab
Pathogen only	87.5	62.5	50.0	66.7(±11.0) a	0.0(±16.5) d
Control <sup>a</sup>	0.0	0.0	0.0	0.0(±0.0) d	100.0 (±0.0) a

<sup>a</sup> treated PDB only.

<sup>b</sup> The number followed by the same letter within a column are not significantly different ( $P = 0.05$ ) according to Duncan's multiple range test.

<sup>c</sup> The numbers in the parenthesis represents the standard deviation from three replications.replications.



Table 16. Average of disease control effect of NI formulations and CH-67 formulations through the 4 independent biocontrol experiments

Treatment	Control value (%)				Mean (%) <sup>b</sup>
	1	2	3	4	
NICH	70.0	25.0	79.2	69.6	61.0 (±12.2) ab
<b>NIC-2</b>	50.0	87.5	62.5	91.3	72.8 (±9.9) ab
NIE-2	20.0	56.3	58.3	95.7	57.6 (±15.5) ab
<b>NIE-3</b>	70.0	56.3	62.5	91.3	70.0 (±7.6) ab
NIG-2	50.0	81.3	45.8	91.3	67.1 (±11.3) ab
NIMP	20.0	87.5	62.5	87.0	64.3 (±15.9) ab
NIX	30.0	87.5	50.0	47.8	53.8 (±12.1) b
NIY	40.0	75.0	66.7	91.3	68.3 (±10.7) ab
<b>NIZ</b>	80.0	62.5	66.7	78.3	71.9 (±4.3) ab
CH-67G	30.0	93.8	70.8	95.7	72.6 (±15.3) ab
<b>CH-67H</b>	90.0	93.8	54.2	69.6	76.9 (±9.2) ab
Azoxystrobin	90.0	81.3	70.8	100.0	85.5 (±6.2) ab
Pathogen	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0 (±0.0) c
Control <sup>a</sup>	100.0	100	100.0	100	100.0 (±0.0) a

<sup>a</sup> treated PDB only.

<sup>b</sup> The number followed by the same letter within a column are not significantly different ( $P = 0.05$ ) according to Duncan's multiple range test.

<sup>c</sup> The numbers in the parenthesis represents the standard deviation from three replications.replications.

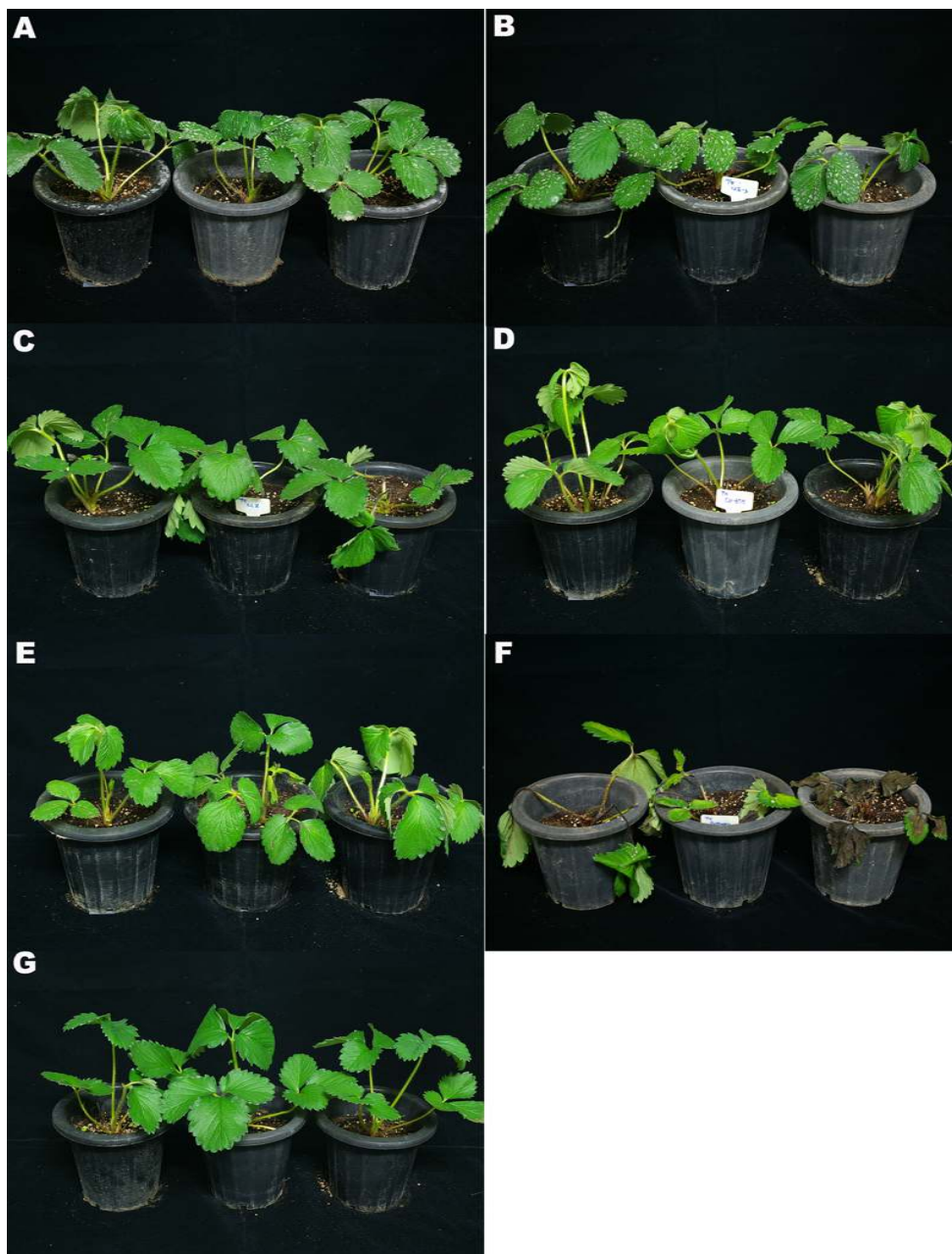


Fig. 11. Disease control effect of N1 formulations and CH-67 formulation against pathogen KRS-4 on strawberry at pots in a growth chamber. (A: NIC-2; B: NIE-3; C: NIZ; D: CH-67H; E: azoxystrobin F: pathogen; G: control)

4회의 걸친 생육상 포트 실험을 통해 4개의 최종 미생물 제형이 선발되었다. 이는 4차례 방제가 평균 기준으로 선발하였는데 N1C-2(72.8% 방제가), N1E-3(70% 방제가), N1Z(71.9% 방제가), CH-67H(76.9% 방제가)이었다. 이들은 화학농약인 Azoxystrobin 처리가 보이는 평균 85.5%의 방제효과와 비교하여 통계적으로 유의차가 인정되지 않아 우수 제형으로 선발할 수 있었다. N1Z 와 N1E-3, N1C-2 제제간에 미생물 생균수의 변화는 4도에서 보관하면 12개월까지 크게 다르지 않았으며 길항력도 동일하게 유지되었다. 그러나 딸기 식물체에 처리 후 N1C-2나 N1E-3의 경우에는 약혼을 보여서 이후의 연구에서는 N1Z를 최종 선발하여 이용하였다.

한편 선발된 미생물농약 수화제 CH-67H제제를 저장온도 및 저장기간에 따른 안정성을 조사한 결과, 제제를 제조 한 직후의 생균수와 저장시 생균수가 전혀 관찰되지 않았다.(Table 17) 이로 보아 CH-67H제제는 CH-67균주가 분비하는 물질의 영향으로만 뛰어난 방제효과를 보이는 것으로 생각된다.

Table 17. Cell density in CH-67H formulation according to storage periods at various temperature condition (°C)

Periods (Date)	Cell density (CFU/g)			
	2007/01	2007/02	2007/03	2007/04
4°C	0	0	0	0
22~25°C	0	0	0	0

따라서 이들 2가지의 제형(N1Z와 CH-67H)을 포트에서 희석배수별 방제효과 실험, 하우스 토경재배 및 인공병원균 접종실험을 통해 최적 제형의 효과를 검증하였고 자연발병하는 하우스에서 최종선발한 미생물 제형의 방제효과를 검증하였다.

## 2. 선발 미생물농약의 희석배수별 방제효과 검정

실험에 사용한 식물체는 현재 농가에서 사용하고 있는 딸기 탄저병에 감수성인 장희 품종을 이용하였다. 딸기는 플라스틱 포트(직경 15 cm)에 딸기전용상토(푸르미, 서울바이오)를 사용하여 재배하였으며 선발된 N1Z 와 CH-67H 제형을 이용하였다.

각 제형을 수돗물로 100배, 500배, 1000배 희석하여 준비한 희석액과 대조구인 화학농약(아족시스트로빈) 2,000배 희석액을 딸기 식물체 전체에 30 ml씩 골고루 살포하고 24시간 후에 병원균 KRS-4균주의 균사조각 부유액( $A_{550} = 0.4$ )을 식물체 전체에 골고루 접종하여 온도 27°C, 상대습도 90% 이상의 생육실에 보관하면서 경과를 관찰하였다. 병원균 접종 7일 후에 발병도를 조사하고 방제가로 환산하여 방제가가 가장 높은 제제를 선발하였다. 반복수는 6주씩 3반복으로 하였다. 발병도는 딸기 꽃트에서 관부와 엽병에서의 탄저병 발병의 결과인 관부부위의 갈변, 엽병의 수침상 흑변의 결과인 묘종의 시들음을 관찰하여 발병도를 기준 방법에 따라 결정하였다. 발병도는 전술한 바와 같이 환산하였고 이를 이용하여 방제가를 산출하였다.

각 실험은 3회 반복되어 평균을 구하였다(Table 18). 그 결과 N1Z의 경우 100배, 500배 희석의 경우 방제가가 56% 이상을 유지하며 화학농약의 방제가보다 낮은 수준이었으나 통계적으로 유의차가 인정되지 않았다. CH-67H 제제의 경우는 100배, 500배, 1000배 희석배수간 차이가 크지 않았으나 방제가는 화학농약보다 낮은 수준이었다. 유일하가 화학농약과 방제효과가 유사하게 나온 경우는 두 개의 제형인 N1Z와 CH-67H를 혼용하여 처리한 경우인데 먼저 N1Z의 100배 희석액을 처리하고 이후 CH-67H 희석액을 처리한 경우로 우수한 방제가가 유지되었다. 이는 두가지 제형을 혼용할 수 있는 가능성을 열어 놓았다. 또한 미생물 제형을 전처리하고 (100배 희석액) 이후 화학농약 처리의 경우에 화학농약 단독처리에 비해 통계적인 유의차는 인정되지 않았으나 우수한 방제효과가 나타났다(Table 18). 흥미로운 결과는 CH-67H의 제형의 경우 높은 희석배수에도 불구하고 비교적 희석배수와 관계없이 안정적인 방제효과를 보여준 것이다. 비록 화학약제에 비해 100, 500배 모두 방제가가 60% 이하이며(통계적으로 화학농약과 유의하게 다르지 않음) 1000배 희석의 경우는 화학농약과 방제

가에서 유의차가 나타났으나 이 역시 54% 이상을 유지하였다. CH-67H가 거의 미생물 보다는 천연물을 주요 활성성분으로 하는 제형이므로 방제효과에 기인하여 그 활성 성분이 대단히 안정하며 방제효과를 나타내는 농도가 극히 낮을 가능성이 있을 것으로 판단된다.

Table. 18. Average of disease control value through three independent biocontrol experiments using NIZ formulations and CH-67H formulations at various dilutions and consecutive treatment of two different formulations

Treatment	Disease severity (%)			Control value (%)
	1차	2차	3차	Mean <sup>b, c</sup>
오티바	8.3	8.3	11.1	87.7 (± 0.5) ab
NIZ (100X)	11.1	19.4	38.9	70.3 (± 14.7) a-d
NIZ (500X)	19.5	36.1	44.4	56.1 (± 13.8) bcd
NIZ (1000X)	40.3	36.1	30.5	51.3 (± 11.9) d
CH-67H (100X)	27.8	25	38.9	59.6 (± 4.6) bcd
CH-67H (500X)	27.8	22.2	47.2	57.7 (± 11.6) bcd
CH-67H (1000X)	50	16.6	36.1	54.1 (± 24.2) cd
CH-67H+NIZ <sup>a</sup>	2.8	2.8	30.5	85.5 (± 18.2) abc
NIZ+오티바 <sup>a</sup>	0	0	5.5	97.9 (± 3.7) a
CH-67H+오티바 <sup>a</sup>	5.6	0	5.5	95.2 (± 4.2) a
Pathogen	69.5	69.4	86.1	0 (± 0) e
Control	100	100	100	100 (± 0) a

<sup>a</sup> The first one (100 fold dilution) was first treated on the plant and the second one (100 fold dilution) was consecutively treated.

<sup>b</sup> The number followed by the same letter within a column are not significantly different ( $P = 0.05$ ) according to Duncan's multiple range test.

<sup>c</sup> The numbers in the parenthesis represents the standard deviation from three replications.replications.

### 3. 하우스 토경재배에서의 미생물농약의 방제효과 검증

실험에 사용한 식물체는 앞선 실험과 동일하게 현재 농가에서 사용하고 있는 딸기 탄저병에 감수성인 장희품종을 이용하였다. 딸기는 플라스틱 포트( $\phi$  15cm)에 딸기전용상토(푸르미, 서울바이오)를 사용하여 재배한 유묘나 구입한 유묘를 일반 농가에서 딸기 육묘방법에 준하여 동아대학교 비닐하우스에 정식하였다. 정식한 딸기 식물체에 딸기 탄저병균 인공접종을 통해 선발한 2가지 미생물 제형의 방제효과를 조사하였다. 총 2회의 실험을 수행하였으며 비닐하우스의 환경조건은 아래의 Table 19와 같다.

Table 19. Experimental conditions of greenhouse under two different formulation treatment followed by pathogen artificial inoculation

	Exp. 1	Exp. 2
Maximum temperature (°C)	22.6	28.4
Minimum temperature (°C)	17.3	23.3
Average relative humidity (%)	76	82.5
Precipitation (mm)	186.5	107.1
Average of disease severity (%)	33.4	71.2

하우스 토경 재배 상태에서 2회 실험의 결과는 아래의 Table 20 (실험 1)과 Table 21 (실험 2)에 정리하였다. 평균 발병도가 낮은 1차 실험에서 대개의 처리의 방제가가 평균 발병도가 높았던 2차 실험에 비해 우수하게 나타났다. 1차, 2차의 경우 모두 100 배 희석처리한 제제의 경우 화학농약과 그 방제효과에서 통계적으로 유의차가 없었으나 일반적으로 방제효과는 낮은 경향을 보였으며 발병률이 높았던 2차 실험의 경우 N1Z 500 배 희석처리의 경우 화학농약에 비해 방제가가 현저하게 낮았다. 일반적으로 발병률이 높은 경우에 화학농약의 방제가가 70% 정도의 수준이었다. 발병률이 상대적으로

낮았던 1차 실험의 경우에 100 배 희석 처리한 N1Z 와 CH-67H 모두의 경우 방제가가 74-75% 수준으로 화학농약 94% 보다 낮았으나 화학농약 효과 대비 79%의 효과를 보였다(Table 20).

Table 20. Disease control value of NIZ formulations and CH-67H formulations from experiment I condition at the greenhouse grown strawberry plants

Treatment	Control value (%) <sup>a</sup>
NIZ, 100 X	75.1 (± 22.9) a
N1Z, 500 X	68.9 (± 26.3) a
CH67H, 100 X	74.0 (± 25.1) a
CH67H, 500 X	60.9 (± 14.6) a
Azoxystrobin	94.4 (± 9.7) a
Control	0.0 (± 0.0) b

<sup>a</sup> The number followed by the same letter within a column are not significantly different ( $P = 0.05$ ) according to Duncan's multiple range test.

Table 21. Disease control value of NIZ formulations and CH-67H formulations from experiment II condition at the greenhouse grown strawberry plants

Treatment	Control value (%) <sup>a</sup>
NIZ, 100 X	75.5 (± 17.5) a
NIZ, 500 X	25.8 (± 12.5) bc
CH67H, 100 X	62.2 (± 8.0) ab
CH67H, 500 X	45.3 (± 30.4) ab
Azoxystrobin	70.2 (± 11.8) a
Control	0.0 (± 0.0) c

<sup>a</sup> The number followed by the same letter within a column are not significantly different ( $P = 0.05$ ) according to Duncan's multiple range test.

#### 4. 자연 발병 포장에서의 미생물 제제의 방제효과 검정

노지의 자연 발병 포장에서의 미생물 제제의 방제효과를 검정하기 위하여 부산 강서 대저 및 퇴래의 딸기 재배 포장에서 두차례의 연구를 수행하였다. 연구수행 기간은 2008년 6-9월에 수행하며 딸기 포장을 임대하여 수행하였다. 노지에 재배한 품종은 장희였으며 실험 포장중 대저의 포장에서는 자연 발병량이 높지 않아 연구 결과 획득에 실패하였으나 퇴래에 위치한 포장에서는 평균 발병률이 31.9% 로 나타나 미생물 제제의 방제효과를 검정하기에 충분하였다. 각각의 제제를 농도별, 횟수별 처리구를 제외하고 나머지 처리구는 1주 간격으로 3회 처리되었다. 최초 약제 살포는 2008년 8월 5일에 수행하였는데 이때 일부의 딸기 일부 식물체에서 병반이 관찰되기 시작하였다. 각 제형을 이후로 1주 간격으로 3회 처리하였고 방제가 최종 살포 1주일 후인 2008년 8월 26일에 발병율은 발병도로 계산하고 방제가로 환산하였다. 각 처리구는 평균면적(25 cm x 56cm) 6주씩 3반복, 완전임의배치법으로 실시하였다. 이때 사용된 대조구 화학농약은 오티바 2,000배를 사용하였다. 연구 수행당시 퇴래지역



의 최대 온도는 28.2 도 였으며 최저온도는 22.5도로 기록되었으며 평균 상대습도는 75.4% 그리고 약제처리 후 검정기간까지 강수량은 368.5 mm 이었다.

실험 결과 평균 병발생은 31.9% 였으며 화학농약인 Azoxystrobin (오티바)의 방제가는 59.5% 로 나타났으며 이는 N1Z 100배, 500배 희석 처리구에 비하여 높았으나 통계적인 차이는 관찰되지 않았다. CH-67H 의 100배, 500배 희석 처리구의 방제효과는 화학농약과 통계적인 유의차가 인정되지 않았으나 100배 희석의 경우 67.7%, 500배 희석의 경우 61.7%로 화학농약보다는 높게 나타났다 (Table 22, Fig. 12). 따라서, 본 연구에서 준비한 제형이 딸기 탄저병 방제에 활용될 수 있는 가능성을 보여주었다.

Table 22. Disease control value of N1Z and CH-67H under field condition with natural disease occurrence

Treatment	Control value (%) <sup>a</sup>
N1Z, 100 X	56.2 (± 22.9) a
N1Z, 500 X	52.2 (± 22.9) a
CH67H, 100 X	67.7 (± 22.9) a
CH67H, 500 X	61.7 (± 22.9) a
Azoxystrobin	59.5 (± 22.9) a
Control	0.0 (± 0.0) b

<sup>a</sup> The number followed by the same letter within a column are not significantly different ( $P = 0.05$ ) according to Duncan's multiple range test.

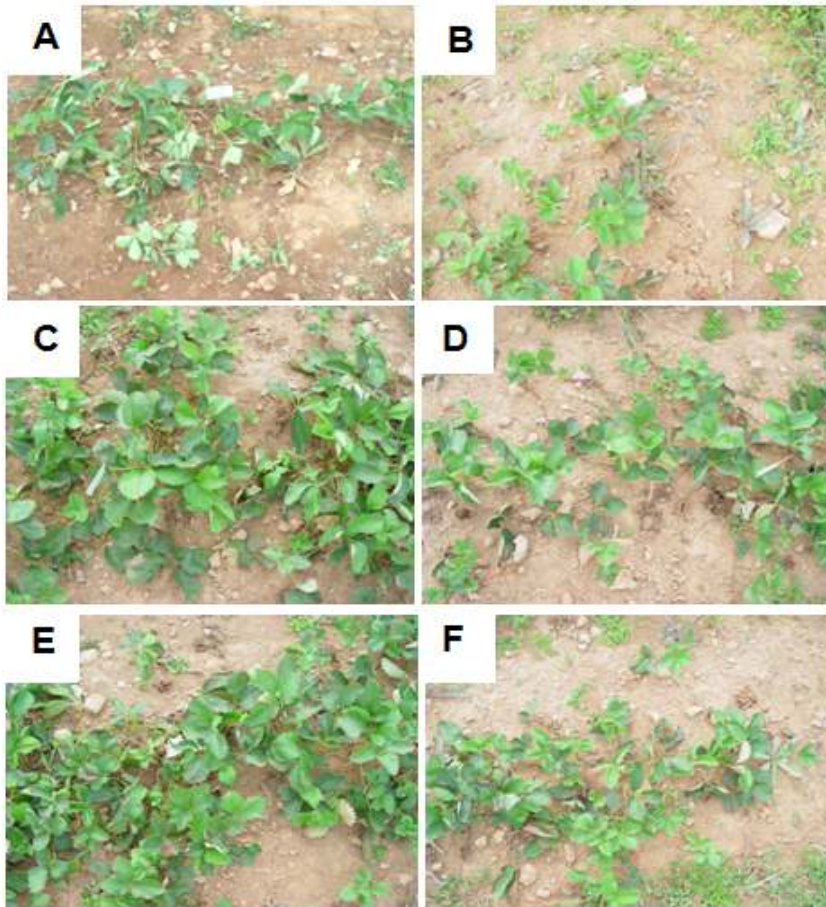


Fig. 12. Disease control effects of 2 formulations against strawberry anthracnose caused by *Colletotrichum gloesporioides* KRS-4. Three treatments with one week interval on strawberry plants in the field condition were performed.

A; Azoxystrobin, B; control (Non-treated), C; N1Z 100-fold, D; N1Z 500-fold, E; CH-67H 100-fold, F; CH-67H 500-fold

## 제 4절 항진균 활성성분 제형 및 식물병 방제효과

### 1. N1 균주 항진균 물질의 입자화

#### 가. 용매 검토

##### (1) 시료 건조 및 분쇄

50 ml 튜브에 있는 *Bacillus licheniformis* N1 균주의 배양액의 Butanol로 추출한 crude extract (시료로 칭함) (3.47 g)를 spatula를 이용해 긁어 은박접시에 담고 90℃ 건조기에서 약 24시간 건조하였다. 건조된 시료는 막자사발을 이용하여 분쇄하여 실온에서 보관 하였다.

##### (2) 입자의 분자량 측정

분말화 한 시료의 입도 분포를 관찰하기 위하여 Particle Size Analyzer (WCIS-50, Galai, Israel)를 이용하여 입도 분석하였는데, 용매는 물과 에탄올을 이용하여 상온에서 측정하였다. 그 결과 다음과 같은 입도 분포도를 얻었다. 그 결과, 물에서의 시료의 입도는 평균 36.62 um 나타내었고 에탄올에서는 10.10 um 나타내었다(Fig. 13, 14).

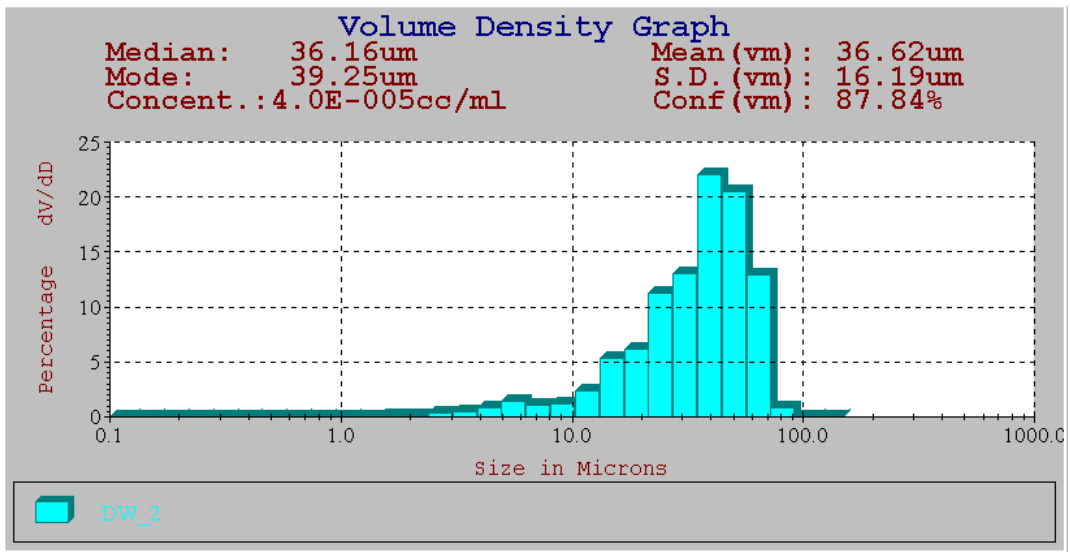


Fig. 13. Particle size distribution of culture filtrate of *B. licheniformis* N1 in the aqueous solution

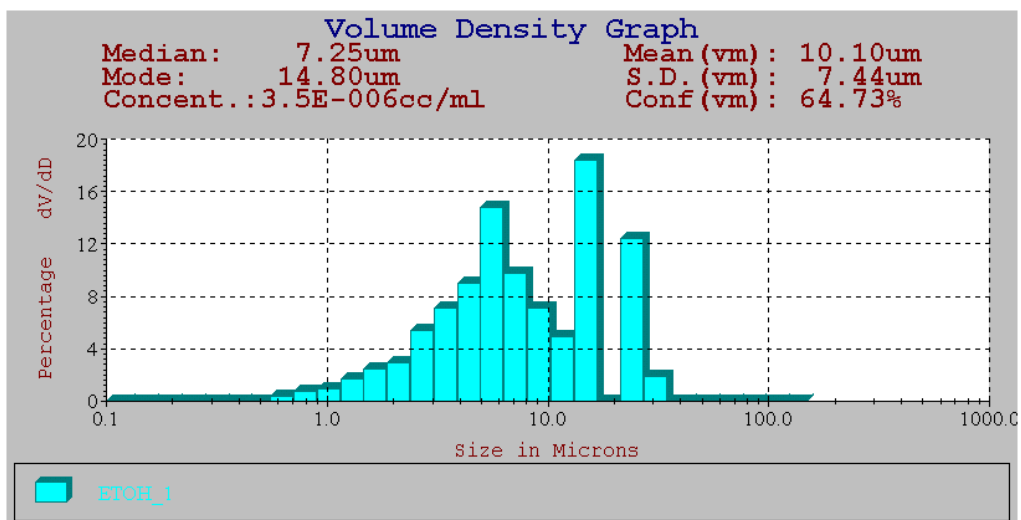


Fig. 14. Particle size distribution of culture filtrate of *B. licheniformis* N1 in the ethanol solution

나. 천연물제제 개발을 위한 전달매체 (생고분자) 선발

(1)용매 선정

용매 선정은 앞서의 시료가 소수성이 성질을 가지고 있으므로 유기용매인 에탄올과 물을 이용하기로 하였다. 이때, 전달매체의 선발을 위해 200 ml 비이커에 물 base의 1% 농도와 EtOH(95%) base의 1% 농도로 각각 제조한 후 이를 실온에서 약 6시간 동안 교반하고 filter paper (125 mm, Advatec)로 여과한 후 시료의 pH를 측정하였다. 그 결과, 물에 용해된 시료는 pH 4.11 그리고 EtOH에 용해된 시료는 pH 5.94로써 모두 산성이었다(Table 23).

Table 23. pH assessment of crude extracts dissolved in DW and EtOH solvent

	1	2	3	Mean
시료(0.5 g)+물 (50 ml)	pH 4.32	pH 3.93	pH 4.08	pH 4.11
시료(0.5 g)+EtOH(50 ml)	pH 5.95	pH 5.97	pH 5.90	pH 5.94

이때, 에탄올에 용해한 시료의 경우 pH 5.94로, DW에 용해한 시료의 경우 pH 4.11 보다 다소 높게 나왔다. 각 시료의 항균활성 검정을 위해 PDA배지 위에 잿빛곰팡이병원균(*Botrytis cinerea*)과 균핵병원균(*Sclerotinia sclerotiorum*)을 대치 배양하여 Inhibition zone를 조사하였다. 그 결과, 에탄올 용해 시료가 물 용매 시료에서보다 저지대 형성이 다소 큰 것으로 조사되었으며, *B. licheniformis* N1 균주 배양액의 crude extract는 Buthanol과 Ethanol의 유기 용매에서 모두 활성이 우수한 것으로 나타났다. 그러나 다량으로 식물에 직접 사용하기 위해서 유기용매는 가능하면 피해야 할 것이므로 물 base에서 활성을 극대화 할 수 있도록 조건을 개선해야 할 것으로 판단되었다.

(2) 전달매체 (생고분자) 선발

500-600 cP 분자량의 알긴산을 시료 용출액에 0.5% 첨가하여 용해한 것과

프락토올리고당인 레반을 0.5% 첨가하여 용해한 시료를 이용하여 제형화를 완성하고, 이들 시료를 PDA배지상에서 잿빛곰팡이병원균(*Botrytis cinerea*)과 균핵병원균(*Sclerotinia sclerotiorum*)을 대치 배양하여 Inhibition zone를 조사하였다. 그 결과, N1균주 배양액의 물과 에탄올 용해 시료에서는 모두 높은 활성을 보였으나, 알긴산과 레반을 이용하여 제형화한 시료에서는 활성이 전혀 없는 것을 조사되었는데, 이는 전달매체의 종류 및 이를 위한 surfactant의 선발 등 여러 가지의 요인에 의한 것으로 생각되며 또한, 적용된 시료의 농도가 매우 낮았기 때문으로 판단되었다(Fig. 15, 16)

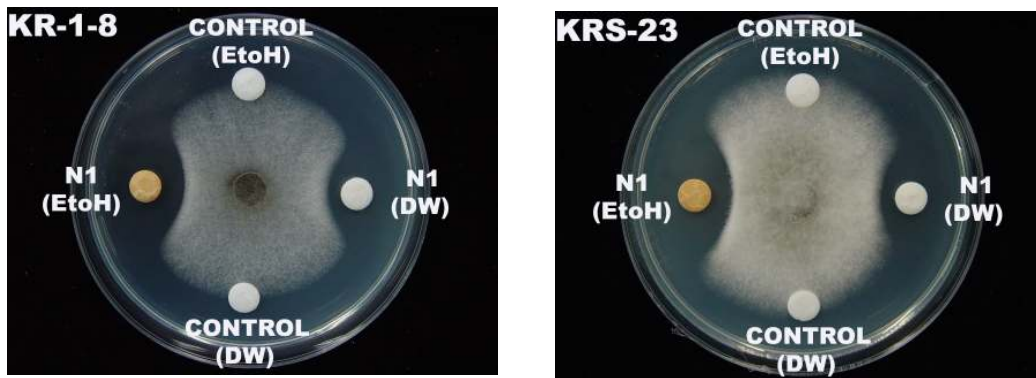


Fig. 15. Fungal growth inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* by N1 culture filtrate of aqueous solution and ethanol solution.

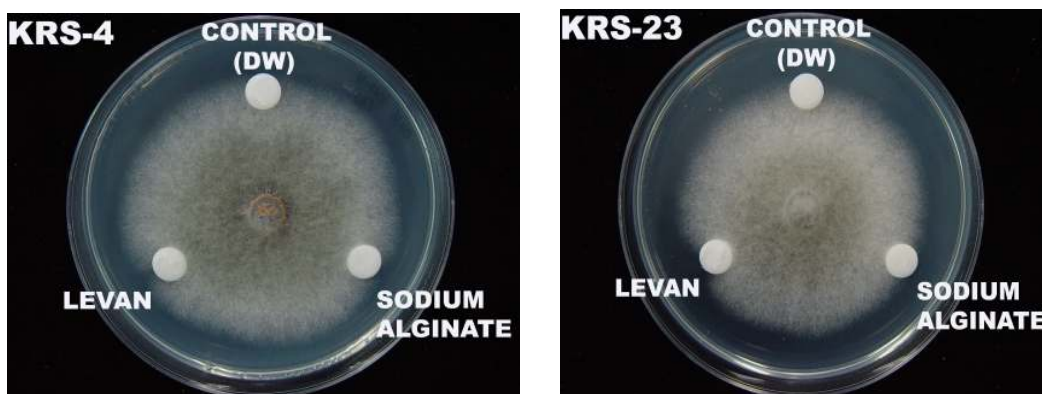


Fig. 16. Fungal growth inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* using levan and alginate mixture with N1 culture filtrate

(3) 전달매체에 의한 시료의 pH에 미치는 영향

앞서의 실험보다 농도를 1.0%로 높게 조정하여 500-600 cP 분자량의 알긴산을 물과 에탄올에 각각 용해한 시료와 프락토오리고당인 레반 시료를 각각 준비하여 이들의 pH를 조사하여 보았다. 그 결과, 알긴산을 물과 에탄올에 용해하여 pH를 조사한 경우에는 각각 pH 5.03과 pH 5.95로 조사되었고, 레반을 알긴산을 물과 에탄올에 용해하여 pH를 조사한 경우에는 각각 pH 4.75과 pH 5.96로 조사되었다. 따라서, 각 시료의 용출액 농도를 1% 이상 높이고 고분자 surfactant와의 결합이 콜로이드 상태로 존재 할 수 있도록 새로운 방법이 요구되고 있으며, 용출액의 농도와 surfactant의 선택이 제형을 계획하는데 중요한 요소가 될 것으로 사료된다(Table 24, 25).

Table 24. Effect of alginate on culture filtrate pH

Treatments	1	2	3	Mean
Sodium alginate 500~600 cp+ 에탄올(여과액)	pH 5.93	pH 5.95	pH 5.97	pH 5.95
Sodium alginate 500~600 cp+ 물(여과액)	pH 4.92	pH 5.05	pH 5.12	pH 5.03

Table 25. Effect of levan on culture filtrate pH

Treatments	1	2	3	Mean
LEVAN+물 (여과액)	pH 4.91	pH 4.83	pH 4.52	pH 4.75
LEVAN+에탄올(여과액)	pH 5.97	pH 5.94	pH 5.98	pH 5.96

다. 천연물제제 배합을 위한 surfactant

Triton X-100, glycerin, PEG을 각 시료 용액에 첨가하여 액상에서 안전하게 분산되는지를 검토하고 고분자 안전성을 조사하였다. 그 결과 surfactant와



carrier의 역할인 고분자가 안정하게 시료 용출액에서 분산되는 것을 확인하였으며 surfactant의 양이 증가 할수록 고분자는 안전하게 분산하였고 제형을 형성하는 기본 형태를 유지 하였다. 따라서, 시료의 입자화부터 용출액의 용매 선정이 무독성 제제 제형 제조에 중요한 역할을 하므로 이를 위한 기본적인 자료가 확립되어 이를 이용한 우수한 제형 제조를 가능하게 하였다. 그러나 본 연구에서 천연물 배합을 위하여 선택한 어떤 surfactant 나 고분자 입자도 N1 유래의 추출물의 활성과 친화적이지 않았으며 그 결과 초기 제형화된 천연물제제의 생육 실험내 포트검정에서 포트에 재식한 딸기 잎과 러너에 천연물제제를 처리한 후 병원균을 접종하고 방제효과를 화학농약과 비교하였는데 천연물 자체의 처리에 비해 오히려 방제효과가 감소하였다. 따라서 N1 균주가 생산하는 항진균물질의 특성을 파악할 필요가 제기되었다.

## 2. N1 균주의 항진균 활성물질 분리 동정

### 가. 항진균물질 정제 및 분석

TSB 배지 5 L를 2 L삼각 플라스크에 600 ml씩 9개로 나누어 멸균한 뒤 NB배지 100 ml에 24시간 동안 30°C, 150 rpm의 조건으로 전배양된 *Bacillus licheniformis* N1균주를 각 flask당 6 ml씩 접종하고 30°C에서 150 rpm으로 진탕 배양하였다. 배양액 중 소량 채취하여 원액과 2배 희석액으로 나누어 pour-plating method를 사용하여 항진균 활성 물질의 유무를 확인하였다.

항진균물질 정제를 위해 TSB 배양액을 원심분리하여 상층액을 얻어내고 HCl을 첨가하여 pH 2.0으로 맞춘 뒤 4°C에서 overnight하였다. pH 2.0의 상층액에서 형성된 침전물만을 10,000 rpm, 20 분간 원심 분리하여 채취한 뒤 pH 2.0의 증류수로 세척하였다. 세척된 침전물을 methanol에 녹여 Rotary vacuum evaporator를 이용하여 감압, 농축하였다. 이렇게 얻은 시료 중 소량은 bioautographic method 를 이용하여 항진균 활성이 있는 물질의 위치를 확인할 수 있었고(Fig. 17) 하고 나머지 분석시료는 활성물질을 분리하기 위한 column chromatography를 실시하였다.

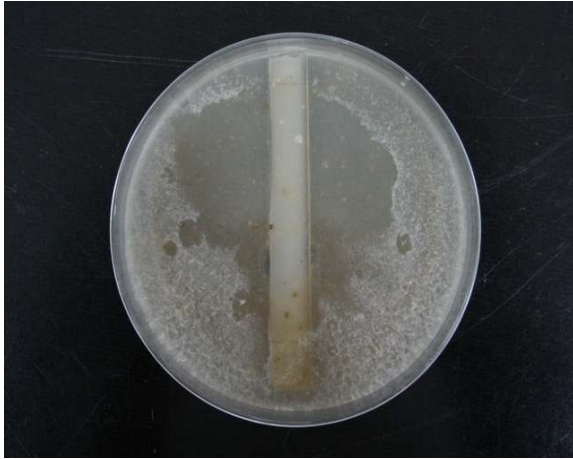


Fig. 17. *In vitro* bioassay of acid precipitation extract against the mycelial growth of *M. grisea* using bioautographic method

#### 나. 항균 침전물질 분리

대량의 TSB배지에 *B. licheniformis* N1균주를 배양한 뒤 배양액을 여과하여 HCl을 이용하여 산침전시켜 침전물만을 획득하여 methanol로 농축시킨 뒤 Bioautographic method를 이용하여 활성물질의 Rf값을 알아보았다. 그 결과 chloroform : methanol : water (65:25:4, v:v:v)의 용매조건으로 전개했을 때 Rf 0.3에서 약한 inhibition zone이 형성되는 것을 확인할 수 있었고, Rf 0.5를 중심으로 넓은 수침상이 형성되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 17). 이와 같은 결과를 토대로 산침전물을 가지고 silica gel coulumn (chloroform : methanol : water = 65:25:4 (v/v/v)), revers phase coulumn (methanol 20, 40, 60, 80, 100%), Sephadex-LH20 coulumn (methanol 100%)을 실시하여 백색분말형태의 compound 1과 compound 2를 얻었다(Fig. 18). 아래는 물질의 정제를 위한 과정을 요약한 것이다.

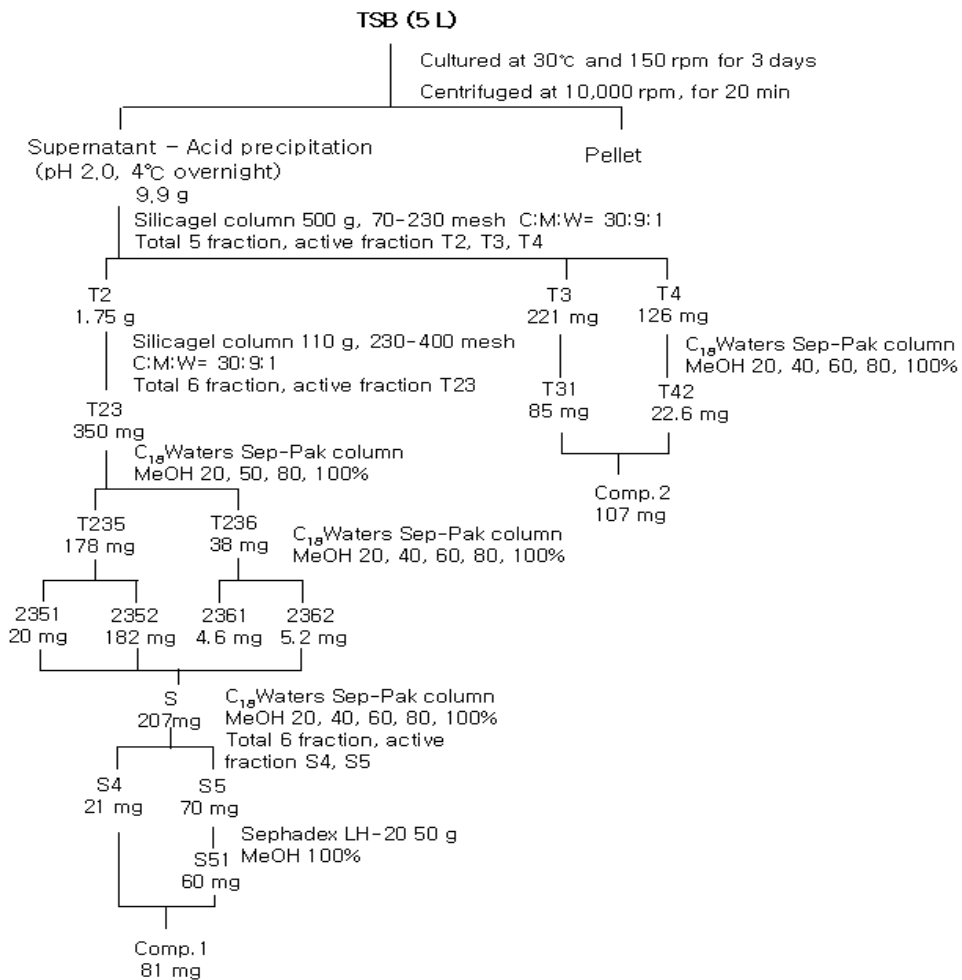


Fig. 18. Extraction and purification procedure of compound 1 and compound 2 from nutrient broth cultures of *B. licheniformis* N1

(1) Silica gel column

항균활성을 보인 조추출물 (9.9 g)에서 활성물질을 분리하기 위하여 chloroform : methanol : water = 30:9:1 (v:v:v)에서 평형화된 Kiesel gel 60 (70~230 mesh, 500 g; E. Merck, Darmstadt, Germany)이 충전된 컬럼 (5 Ø cm × 55 cm)에서 평형화 용매와 동일한 용매조건으로 용출하였다. 마지막은 methanol 100%로 용출하였다. 삼각 플라스크에 200 ml씩 분취하여 TLC 분석을 통하여 동일한 분획층을 농축한 뒤 활성검정을 통하여 활성이 강한 T2, T3, T4 층을 얻었으며, 순수한 활성물질을 얻기 위하여 T2층은 chloroform : methanol :

water = 30:9:1 (v:v:v)에서 평형화된 Kiesel gel 60 (230~400 mesh, 110 g)이 충전된 컬럼 (2.4  $\varnothing$  cm  $\times$  50 cm)에서 동일한 용매조건으로 용출하였다. Fraction collector를 이용하여 400 drop씩 분취하여 TLC분석을 통하여 확인 후 농축하였고 각 분획층을 *M. grisea*균주에 대한 활성을 조사하였다. 활성 검정결과 활성이 크게 나타난 T23 분획의 색소제거와 순수한 활성물질을 얻기 위해 Reversed phase column (C<sub>18</sub>- 10 g, Waters Sep-Pak Vac 35 cc)를 통하여 분리를 실시하였다. T3, T4 분획 또한 각각 Reversed phase column (C<sub>18</sub>- 10 g, Waters Sep-Pak Vac 35 cc)를 통하여 분리를 실시하였다.

## (2) Reversed phase column

T23에서 색소제거 및 순수한 활성물질을 얻기 위하여 methanol 100%에서 활성화 되고 3차 증류수로 평형화된 Reversed phase column (C<sub>18</sub>- 10 g, Waters Sep-Pak Vac 35 cc) cartridge에서 20, 50, 80, 100% methanol 40 ml의 순서대로 용출하여 10 ml씩 분취하였다. 이 중 T235, T236의 분획을 다시 Reversed phase column cartridge에서 20, 40, 60% methanol 40 ml과 80, 100% methanol 120 ml을 순차적으로 용출하여 5 ml씩 분취하여 TLC 분석을 통해 동일한 분획층을 농축하고 methanol 100%로 평형화한 Sephadex-LH20(50 g, 25~200  $\mu$ m, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)이 충전된 컬럼 (2  $\varnothing$  cm  $\times$  30 cm)을 이용하여 동일한 용매조건으로 용출하였다. T3, T4 분획층은 methanol 100%에서 활성화 되고 3차 증류수로 평형화된 Reversed phase column (C<sub>18</sub>- 10 g, Waters Sep-Pak Vac 35 cc) cartridge에서 20, 40, 60% methanol 40 ml과 80, 100% methanol 120 ml을 순차적으로 용출하여 5 ml씩 분취하여 TLC 분석을 통해 동일한 분획층을 농축하여 물질을 분리하였다.

## 다. HPLC 분석 및 항균물질 동정

활성 물질의 순도 확인 및 분석을 위하여 compound 1 과 compound 2를 methanol에 1 mg/ml의 농도로 용해시키고 HPLC 조건은 아래의 조건으로 맞추어 실시하였다. Column chromatography를 통하여 순수 정제된 compound 1과 compound 2의 동정을 위하여 Luna 5 $\mu$  C<sub>18</sub> column (4.6  $\times$  150 mm)에 주입하여

Charged Aerosol Detector (CAD)에서 HPLC 분석하여 iturin, surfactin의 peak와 비교한 결과 compound 1과 surfactin은 40~50분에서 같은 peak가 나왔고 compound 2는 iturin와 같은 10~15분에서 peak가 나오는 것을 확인할 수 있었다. 이상의 결과를 바탕으로 하여 compound 1과 compound 2는 각각 surfactin과 iturin으로 확인되었다(Fig. 19). 각 순수분리된 화합물의 LC-MS 분석결과 compound 1은 surfactin 으로 compound 2는 iturin A 로 최종 동정되었다.

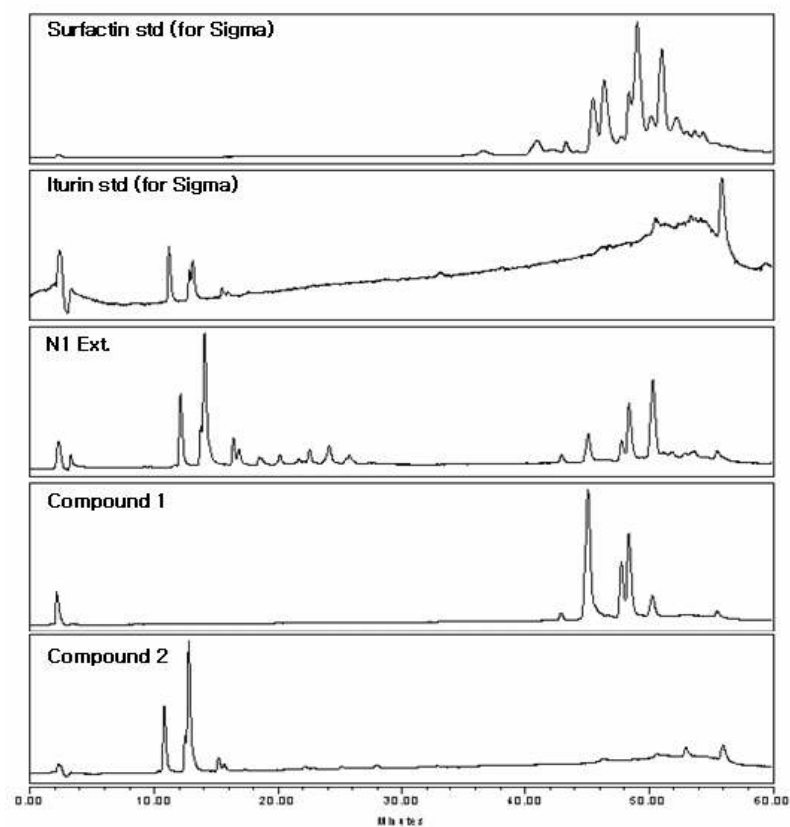


Fig. 19. HPLC chromatogram of compound 1 and compound 2 and acid precipitation extract obtained from liquid cultures of *B. licheniformis* N1

HPLC 분석을 위한 조건을 아래의 Table 26에 나타내었다.

Table 26. Analytical conditions of HPLC analysis

HPLC system	Waters HPLC (Milford, USA)
Column	Luna 5 $\mu$ C <sub>18</sub> (4.6 $\varnothing$ mm $\times$ 150 mm) (Phenomenex. Inc , Torrance, U.S.A)
Detector	Charged Aerosol Detector (CAD) (ESA. Inc, Chelmsford, United Kingdom)
Solvent system	A: 10% Acetonitrile (0.1% Trifluoroacetic acid) B: 100% Acetonitrile (0.05% Trifluoroacetic acid) (ACN: Burdick & Jakson, TFA: ALDRICH)

분석을 위한 용매조건은 아래와 같이 하였다.

시간 (min)	A (%)	B (%)
0	70	30
50	0	100
60	0	100
63	70	30

다음의 Fig. 20은 N1 균주로부터 동정된 항균 물질인 iturin 과 surfactin의 구조를 나타낸다.

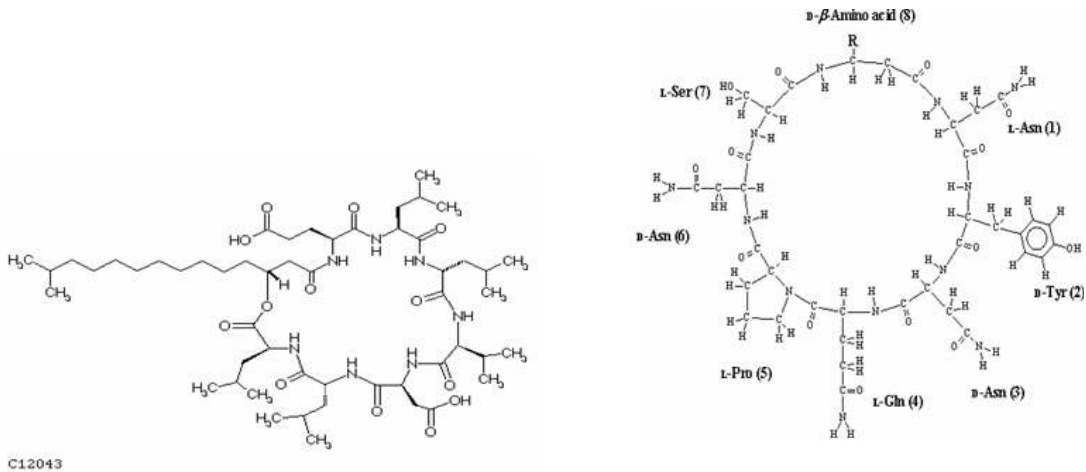


Fig. 20. Chemical structure of surfactin (left) and iturin (right).

### 3. N1 균주가 생산하는 항진균 물질의 생물학적 활성

#### 가. *In vitro* 활성검정

서로 다른 액체배지에서 진탕 배양된 각각의 N1 균주 배양액을 수확하여 membrane filter (pore size: 0.45  $\mu\text{m}$ , Diameter: 25 mm, Advantec.)로 제균한 후 베타 도열병균 (*Magnaporthe grisea*) 균사조각이 포함된 PDA배지 위에 놓여진 멸균된 filter paper disk (1.5  $\times$  8.0 mm, Advantec; Toto roshi Kaicha, Ltd.)에 50  $\mu\text{l}$ 씩 분주하여 25 $^{\circ}\text{C}$ 의 incubator에서 72시간 동안 배양하여 생장억제거리를 측정하여 베타 도열병균인 *M. grisea*에 대한 항균력을 조사하였다. 그 결과 TSB 배지에서 생장한 미생물 가장 많은 활성 물질을 생산하였다.

*B. licheniformis* N1균주로부터 분리한 surfactin과 iturin을 2000, 1000  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 맞추어 멸균된 filter paper disk (1.5  $\times$  8.0 mm, Advantec; Toto roshi Kaicha, Ltd.)에 30  $\mu\text{l}$ 씩 분주하여 약 7초간 dryer로 건조시킨 뒤 베타 도열병균 (*Magnaporthe grisea*) 균사조각이 포함된 PDA배지 위에 위치시켜 25 $^{\circ}\text{C}$ 의 incubator에서 72시간 동안 배양하고 생장억제거리를 측정하여 베타 도열병균인 *M. grisea*에 대한 항균력을 조사하였다. 그 결과 surfactin은 1,000 ppm과 2,000 ppm의 농도에서 모두 넓은 범위에 걸쳐 균사의 수침상현상이 일어났으며, iturin

의 경우 2000 ppm에서 지름 2.17 mm의 inhibition zone을 형성하였다. 1,000 ppm에서는 2,000 ppm보다는 적지만 지름 1.66 mm의 높은 inhibition zone을 형성하는 것을 관찰하였다(Table 27, Fig. 21).

Table 27. Inhibition activity of extracts against mycelial growth of *M. grisea*

	Fungal growth inhibition zone (cm) <sup>a)</sup>	
Surfactin	1,000 ppm	6.00 (± 0.80)
	2,000 ppm	6.43 (± 0.74)
	Control	0.00 (± 0.00)
Iturin	1,000 ppm	1.66 (± 0.07)
	2,000 ppm	2.17 (± 0.15)
	Control	0.00 (± 0.00)

<sup>a</sup> The inhibition zone include the diameter of paper disc (8 mm)

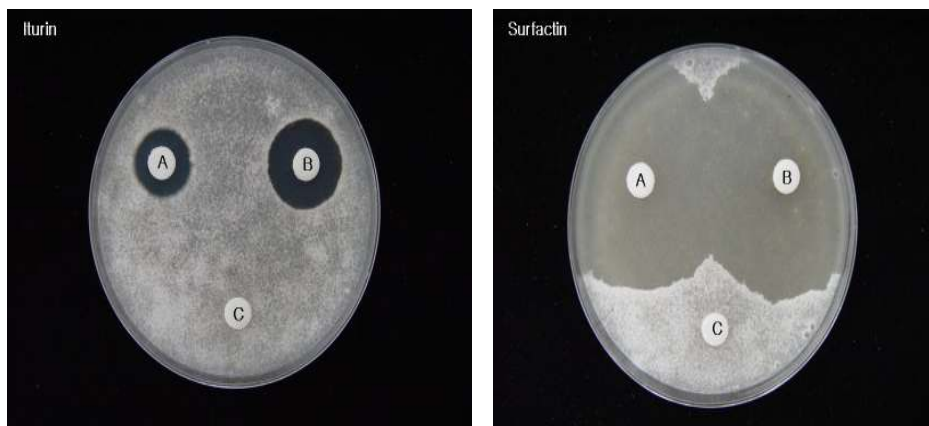


Fig. 21. Growth inhibition of *Magnaporthe grisea* by iturin (left) and surfactin (right) from the extracts of *B. licheniformis* N1 liquid culture. A, 1,000 ppm; B, 2,000 ppm; C, Control (Methanol)



#### 나. *In vivo* 활성검정

진탕 배양된 N1 균주 배양액의 산침전물과 이로부터 순수분리한 iturin과 surfactin에 대하여 식물병 방제효과를 한국화학연구원에 의뢰하여 수행하였다. 각 처리액을 500  $\mu\text{g/ml}$ 과 250  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 나누어 각 처리량을 40 ml로 하여 50  $\mu\text{g/ml}$ 의 Tween-20용액을 첨가한 다음 벼 도열병(*Magnaporthe grisea*), 벼 잎집무늬마름병(*Corticium sasakii*), 토마토 잿빛곰팡이병(*Botrytis cinerea*), 토마토 역병(*Phytophthora infestans*), 밀 붉은녹병(*Puccinia recondita*), 보리 흰가루병(*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) 및 고추 탄저병(*Colletotrichum coccodes*) 등의 7가지 식물 병에 대한 *in vivo* 활성 검정을 실시하였다.

일회용 포트(4.5 cm)에 벼(품종: 낙동)는 수도용 상토를 보리(품종: 동보리), 밀(품종: 은과밀), 고추(품종: 향촌)는 원예용 상토를 70%정도 넣고 종자를 과중하여 25  $\pm$  5 $^{\circ}\text{C}$ 의 온실에서 밀과 보리는 1주일, 벼와 고추는 4~5주일 동안 키워서 실험에 사용하였다. 일정 크기로 자란 식물체에 병원균을 접종하기 하루 전에 준비한 약제 용액을 엽면 및 줄기에 분무하여 1일간 풍건한 다음 각각의 병원균을 분무하여 접종하였다.

벼 도열병은 2엽기 유묘에 *M. grisea* 포자현탁액 ( $5 \times 10^5$  spore/ml)을 분무하여 접종한 후 25 $^{\circ}\text{C}$  습실상에서 하루 동안 발병을 유도한 다음 25 $^{\circ}\text{C}$  향온·향습실에 5일간 두었다. 벼 잎집무늬마름병은 3엽기 유묘에 *R. solani*가 7일 동안 배양된 배지 (밀기울 90 g, 왕겨 15 g, 증류수 100 ml)를 접종하고 25 $^{\circ}\text{C}$  습실상에서 4일간 처리한 다음, 25 $^{\circ}\text{C}$  향온·향습실에서 4일간 배양하였다.

밀 붉은녹병은 1엽기 유묘에 활물 기생균인 *P. recondita*의 포자를 Tween 20용액 (250  $\mu\text{g/ml}$ )에  $6.7 \times 10^2$  spore/ml 수준으로 현탁한 후 포자 현탁액을 분무 처리하여 1일 동안 20 $^{\circ}\text{C}$  습실상에서 발병을 유도한 후 향온·향습실로 옮겨 배양하였다. 보리 흰가루병은 보리 유묘 1엽기에 숙주식물에 계대 배양된 *B. graminis* f. sp. *hordei*포자를 접종하고 20 $^{\circ}\text{C}$  향온·향습실에서 발병시켰다. 고추 탄저병은 고추 3, 4엽기 유묘에 *C. coccodes* 포자 현탁액( $5 \times 10^5$  spore/ml)을 분무하여 접종한 후 25 $^{\circ}\text{C}$  습실상에서 2일 동안 발병을 유도한 다음, 25 $^{\circ}\text{C}$  향온·향습실에 2일간 두었다. 벼 도열병, 밀 붉은녹병, 보리 흰가루병은 7일 후 벼 잎집무늬마름병은 8일 후, 그리고 토마토 잿빛곰팡이병, 토마토 역병과 고추 탄저병

은 3일 후에 병반 면적율을 조사하였다. 방제가는 다음과 같은 식에 따라 계산하였다.

$$\text{방제가 (\%)} = [1 - (\text{처리구의 병반 면적율} / \text{무처리구의 병반 면적율})] \times 100$$

surfactin과 iturin을 500 ppm, 250 ppm의 농도로 나누어 7가지 식물병원균팡이에 대하여 항균활성을 검정한 결과, iturin의 경우 밀 붉은녹병(WLR)과 보리 흰가루병(BPM)을 제외한 나머지 5개의 균주에서 모두 75%이상의 높은 방제효과를 나타내었다. surfactin의 경우 토마토 잿빛곰팡이병(TGM), 토마토 역병(TLM)에서 90%이상의 높은 효과를 나타냈으나 나머지 식물병에 대해서는 그 방제효과가 미미하였다(Table. 28)

Table 28. *In vivo* antifungal activity of surfactin and iturin isolated from *B. licheniformis* N1 against seven phytopathogenic fungi

Chemicals	Conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	Control value (%) <sup>a</sup>						
		RCB <sup>b</sup>	RSB	TGM	TLB	WLR	BPM	PAN
Acid precipitate	500	84	80	88	88	53	50	76
	250	80	40	68	42	53	58	72
Iturin	500	96	75	94	93	43	8	94
	250	90	75	91	83	33	17	66
Surfactin	500	30	0	90	93	33	0	64
	250	0	5	82	75	0	8	40
Dithianon	10/50	30/84						
Famozadone	2/10	58/90						

<sup>a</sup> Control value(%) = [1 - (disease severity of treated plants / disease severity of untreated plant)]  $\times$  100

<sup>b</sup> RCB = rice blight; RSB = rice sheath blight; TGM = tomato gray mold; TLB = tomato late blight; WLR = wheat leaf rust; BPM = barley powdery mildew; PAN = pepper anthracnose

#### 4. 항진균 활성 물질의 제형화 및 활성 검정

*B. licheniformis* N1 균주로부터 분리한 항균물질인 surfactin과 iturin의 경우 N1 crude 추출물에서 경험한 것처럼 시료의 수용성이 낮고 반면 ethanol이나 butanol에 용해하였을 때 활성이 나타난 것과 동일한 결과를 확인하였다. 그러나, 다량으로 식물에 직접 사용하기 위해서 유기용매는 가능하면 피해야 할 것이므로 수용액 상태에서 활성을 극대화 할 수 있도록 조건을 개선해야 할 것으로 판단되었다. 따라서 본 연구에서는 N1 균주의 활성물질의 제형화가 기술적으로 경제적으로 가치가 없는 것으로 판단하여 이후에는 또다른 선발 균주인 *B. pyrrocina* CH-67 균주의 항진균 활성 물질을 활용하는 연구를 수행하였다. CH-67 균주의 항진균 물질은 수용액상에서 활성을 유지하며 안정성이 높은 것에 기초하여 CH-67 균주의 활성물질의 제형화하고자 시도하였다.

##### 가. CH-67 활성물질의 부분순화

*B. pyrrocina* CH-67 이 배지로 분비하는 물질은 기초연구를 통해 NB 배지에서 안정적으로 유지되며 심지어는 배양액을 끓여도 안정성이 유지되는 것으로 나타났다. 또한 미생물 자체의 제형화 및 딸기 탄저병 방제효과 검정연구를 통해 CH-67H 제형은 미생물이 모두 사멸하고 미생물이 생산하는 천연물이 방제효과를 유지하는 것으로 나타났다. 그러므로 CH-67 균주가 생산하는 물질을 부분순화 하였다. 우선 CH-67 균주를 20 liter 대량배양하고 그 배양액으로부터 항균물질을 부분순화 하였다. Hexane, ethylacetate, butanol, 그리고 여러 가지 유기용매 추출법으로부터 항균활성을 분리할 수 없었으나 유일하게 ammonium sulfate 85% 침전한 후 침전물을 인산완충액 (50 mM, pH 7.0) 으로 용해하여 동일한 인산완충액으로 투석하였을 때 활성을 확인할 수 있었다. 또한 ammonium sulfate 침전물을 methanol 에 녹인 후 활성분을 분석한 결과 항진균 활성은 침전물로부터 methanol로 용해되어 나오는 것을 확인하였다. methanol에 녹인 활성성분을 감압농축하고 이를 다시 물에 용해하여 항진균활성이 유지되는 것을 확인하였다(Fig. 22). 따라서 위의 방법에 따라 부분 순화된 항진균 물질을

초기 나노제형화에 이용하였다. 한편 얻어진 활성분은 열에 안정하며, proteinase K 처리에도 안정성을 나타내었다.

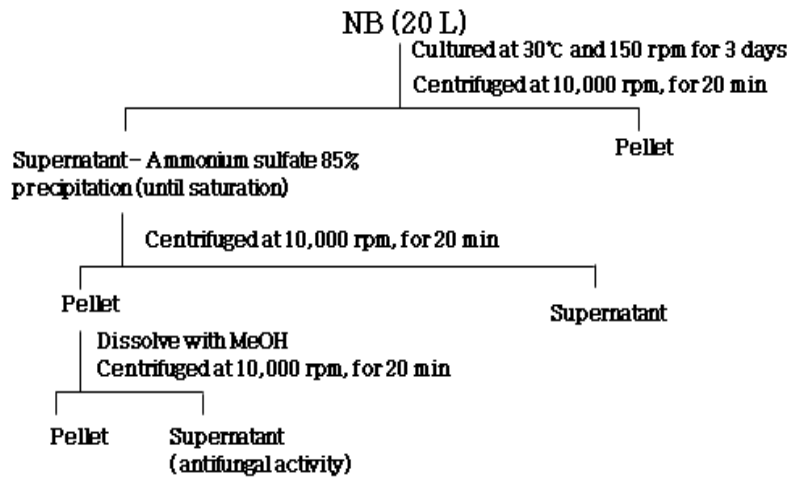


Fig. 22. Partial fractionation procedure of antifungal active compound from nutrient broth cultures of *B. pyrrocina* CH-67

#### 나. CH-67 활성물질의 딸기 탄저병 방제 효과

부분 순화된 항진균 활성물질을 여러농도로 희석하여 딸기 탄저병에 대한 방제효과를 생육상 실험을 통해 조사하였다. 실험에 사용한 식물체는 현재 농가에서 사용하고 있는 딸기 탄저병에 감수성인 장희 품종을 이용하였다. 딸기는 플라스틱 포트(직경 15 cm)에 딸기전용상토(푸르미, 서울바이오)를 사용하여 재배하였다. 활성분 희석액과 대조구인 화학농약(아족시스트로빈) 2,000배 희석액을 딸기 식물체 전체에 30 ml씩 골고루 살포하고 24시간 후에 병원균 KRS-4균주의 균사조각 부유액( $A_{550} = 0.4$ )을 식물체 전체에 골고루 접종하여 온도 27°C, 상대습도 90% 이상의 생육실에 보관하면서 경과를 관찰하였다. 병원균 접종 7일 후에 발병도를 조사하고 방제가로 환산하여 방제가가 가장 높은 제제를 선

발하였다. 반복수는 6주씩 3반복으로 하였다. 발병도는 딸기 꽃트에서 관부와 엽병에서의 탄저병 발병의 결과인 관부부위의 갈변, 엽병의 수침상 흑변의 결과인 묘종의 시들음을 관찰하여 발병도를 기준 방법에 따라 결정하였다. 그 결과 물로 10배까지 희석한 CH-67 물질도 딸기 탄저병 방제효과가 희석하지 않은 원액과 동일하게 나타났다(Table 29).

Table 29. Disease control value of partially purified CH-67 antifungal components against strawberry anthracnose

Treatment	Disease severity (% , after 10 days)				Disease control value (%)
	I	II	III	Mean	
I <sup>a</sup>	12.5	12.5	12.5	12.5(±0.0) bc	72.7(±0.0) ab
Compound II <sup>b</sup>	12.5	0.0	12.5	8.3(±4.2) bc	81.3(±9.1) ab
III <sup>c</sup>	25.0	12.5	12.5	16.7(±4.2) b	63.6(±9.1) b
Azoxystrobin <sup>d</sup>	0.0	0.0	0.0	0.0(±0.0) c	100.0(±0.0) a
Pathogen <sup>e</sup>	37.5	50.0	50.0	45.8(±4.2) a	0.0(±9.1) c
Control <sup>f</sup>	0.0	0.0	0.0	0.0(±0.0) c	100.0(±0.0) a

<sup>a</sup> undiluted, <sup>b</sup> 5-fold dilutions, <sup>c</sup> 10-fold dilutions, <sup>d</sup> 2000-fold dilutions

<sup>e</sup> mycelial suspension ( $A_{550} = 0.4$ ), <sup>f</sup> treated PDB only

상기에 이용한 CH-67이 생산하는 물질은 미생물 배양여액을 농축한 분획으로서 100배 이상 희석하였을 경우 항균활성 뿐 아니라 생물학적 방제활성 나타나지 않았다. 따라서 현재 부분순화된 물질의 분획별로 수화제형의 제형화를 위한 연구는 중단되었다. 그러나, 미생물 배양체와 배양액을 이용한 제형인 CH-67H 가 딸기탄저병 방제효과가 100배, 500배에서 생육실, 하우스 토경재배, 포장에서 우수한 방제효과를 보이는 것이 앞서 확인된 반면 미생물 제제에서 생균수는 유지되지 않는 것으로 보아서 CH-67H 자체가 천연물 제형에 가까운 것으로 판단된다. 그러므로 CH-67 균주가 생산하는 활성분이 한두가지가 아닌 다

양한 종류인 가능성을 고려하여야 할 것 같다.

CH-67 균주를 transposon 변이체를 유기하여 연구한 결과 총 3,000 여 변이체를 탐색하여 식물 병원 진균에 대하여 길항력을 상실한 2종류의 변이체를 확보하였으며 transposon 삽입 부위의 유전자 분석결과 non-ribosomal polyketide 계열의 peptide 형 항생물질 생합성 유전자 cluster 에 변이가 유기된 것으로 나타났다. 따라서 CH-67 균주가 아마도 열에 안정하며 기존의 분획방법으로 순수분리가 어려운 새로운 종류의 항진균 활성 물질을 생산 할 것으로 확인되어 추가 연구가 진행될 필요가 있다.

## 제 5절 미생물 및 제제 처리 후 미생물의 환경 동태

### 1. 미생물 동태 연구를 위한 tagging construct 제작 및 tagging 균주 선발

#### 가. P43 프로모터와 *gfp*를 이용한 tagging 전략

본 연구에서 딸기 탄저병에 대한 방제효과가 인정된 *Bacillus licheniformis* N1 균주를 대상으로 미생물의 환경동태를 파악하기 위하여 미생물에 유전자 tagging을 실시하였다. 대상유전자는 녹색형광단백질을 생산하는 *gfp* 유전자로 유전자의 발현은 *Bacillus*에서 항상적으로 발현되는 P43 프로모터를 활용하였다.

#### 나. Tagging construct 작성

유전자를 이용하여 연구의 대상균주인 N1 균주를 tagging 하기 위해 우선 *gfp* 유전자를 N1 균주에서 발현시키기 위해 *Bacillus*에서 유래한 promoter 인 P43 promoter를 이용하여 tagging construct를 작성하였다. 이를 위해 overlap extension PCR 방법을 통해 P43 promoter와 *gfp*를 융합한 DNA를 합성하였다 (Fig. 23).

Overlapping Extension PCR to generate P43 promote GFP fusion

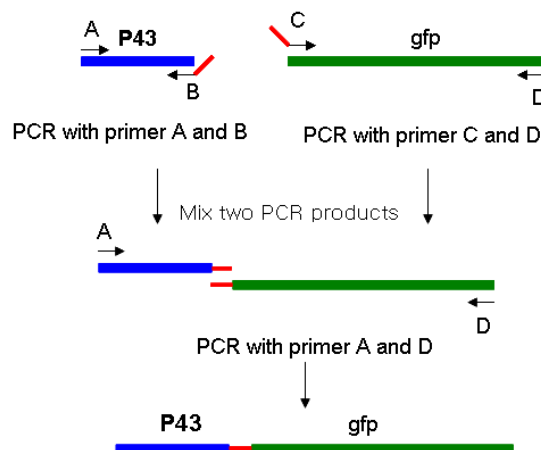


Fig. 23. Overlap extension PCR procedure to generate *gfp* expression fusion with P43 promoter

OE-PCR 을 위하여 이용한 primer는 아래와 같다

P43-1: 5'-TATACTAGTTGATAGGTGGTATGTTTTTCGC-3' (위의 primer A)

P43GFP-1: 5'-CCTCCTTATAAAGTTAACTATAATGGTACCGCTAT-3'  
(위의 primer B)

P43gfp-2: 5'-ATAGCGGTACCATTATAGTTAACTTTATAAGGAGG-3 (위의 primer C)

(T: P43 promoter와 *gfp* 융합 포인트)

Gfp-3: 5'-GGTGCATGCCTCGAATTCCTATTTGTATAG-3' (위의 primer D)

이상의 primer 들과 위의 OE-PCR을 통해 융합한 P43-*gfp* 유전자를 pGEM-Teasy 에 클로닝하여 염기서열을 결정하여 정확한 유전자 융합을 확인하고 이후의 연구에 이용하였다. 위의 P43-*gfp* 유전자와 N1 유래의 chitinase 유전자를 pGEM-Teasy 에 함께 클로닝하여 pN1-chi-gfp 로 명명한 플라스미드와 p43-*gfp* 유전자를 pWH1520에 클로닝하여 pWH43G 로 명명하였다.

다. N1 균주의 형질전환

*B. licheniformis* N1 균주를 LB 배지에서 sorbitol을 첨가하여 배양하고 washing solution으로 최소 4회 씻어서 최종 농축하여 균주의 농도가  $10^8$  cfu/ml 이상이 되도록 조정하였다. 위와 같이 준비된 competent cell에 준비한 construct DNA (pWH43G와 pN1-chi-gfp)를 순수분리하여 섞어서 1.6 KV - 2.5 KV 사이에서 2-4 초간 전기충격 방법으로 DNA를 도입하였다. 여러 가지 조건에서 형질전환을 시도하여 1.6-1.8 KV에서 형질전환체를 확인할 수 있었다. 획득된 형질전환체들은 -80도에 보관하면서 추후 실험에 이용하였다.

라. tagging 균주 선발

(1) 상동재조합에 의한 tagging

제작한 위의 플라스미드중 Bacillus에서 suicidal plasmid 인 pGEM-Teasy 를 이용한 경우는 아래의 형질전환된 tagging construct pN1-chi-gfp가 *B.*



*licheniformis* N1 내에서 유지될 수 있는 유일한 기작인 상동교차(homologous recombination)의 결과를 제시한 것으로 이들 construct는 염색체에 삽입되어 안정하게 유지될 수 있다 (Fig. 24).

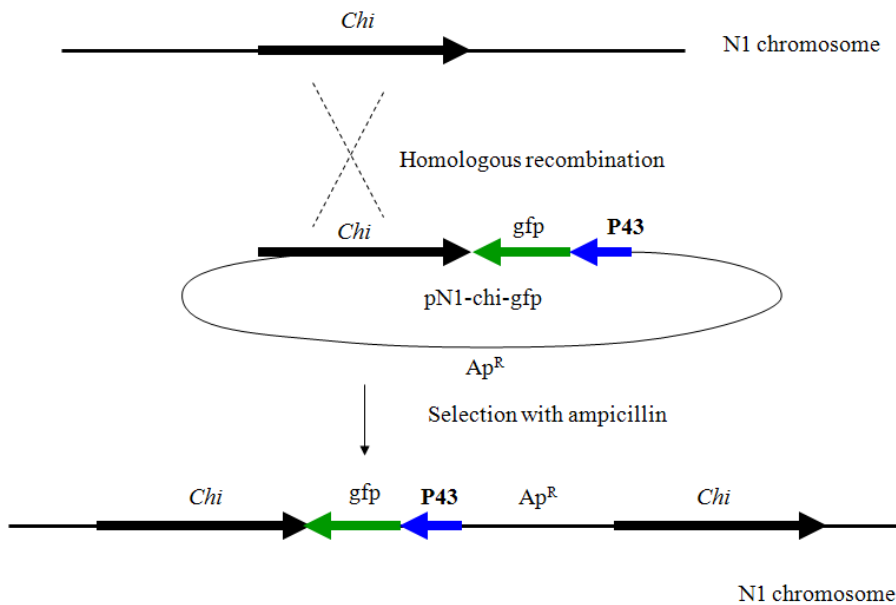


Fig. 24. Tagging strategy of N1 strain on its chromosome based on the homologous recombination between two *chi* genes.

위의 전략에 따라 N1 균주의 chitinase 유전자와 suicidal plasmid를 함께 N1 균주의 tagging에 이용할 수 있었고 chitinase 유전자가 N1 모균주에서 발현되고 있지 않기 때문에 *chi* 유전자의 recombination을 이용한 tagging은 *B. licheniformis* N1 균주의 fitness와 biocontrol 활성에 전혀 영향을 미치지 않게 된다. 이를 최종 입증하기 위해 형질전환된 tagging 변이체들을 대상으로 모균주와 동일한 fitness 특성을 최소 배지 성장을, 완전배지 성장을, 탄소원 이용력, 길항력등에 대하여 조사한 결과 모균주와 비교하여 전혀 차이가 나지 않았으며 녹색형광이 ampicillin 이 첨가된 배지에서 안정적으로 발현되었다(Table 30).

## (2) 발현 플라스미드를 이용한 tagging 및 형광발현

위에서 *B. cereus* 의 발현 플라스미드인 pWH1520에 P43-*gfp* 유전자를 클로닝하여 pWH43G를 생산하였고 이를 N1 균주에 성공적으로 형질전환하였으며 형질전환체는 tetracycline 배지에서 안정적으로 유지되면 녹색형광을 발현하였다. N1 균주에 플라스미드 상태로 도입이 되어 모균주의 표현형에 영향을 미치지 않았고 fitness 도 전혀 변화가 없었다(Table 30). 형질전환된 N1 균주에서 녹색형광 발현을 P43 프로모터가 분리된 *B. subtilis* 168 균주에서의 녹색형광 발현과 비교하였다. 각각 pWH43G로 형질전환된 N1 균주와 168 균주를 exponential phase에서 회수하여 생리식염수로 현탁하고  $A_{600}=0.8$  되도록 세포의 농도를 조절하였다. 이 현탁액의 형광을 SpectraMax Gemini XPS spectrofluorometer (Molecular Device)를 사용하여 490 nm에서 여기하여 510 nm에서 발광을 측정하였다. 3회 반복실험을 통해 형광 발광을 정량하였다. 그 결과 pWH43G를 가진 N1 균주에서의 녹색형광은 P43 프로모터의 모균주인 *B. subtilis* 168 균주에서 녹색형광에 비해 낮았으나 pWH1520 플라스미드만 가진 균주가 전혀 형광이 발현되지 않는 것에 비하면 우수한 *gfp* 발현이 인정되어 P43-*gfp* 융합이 N1 균주에 효과적인 tagging에 사용될 수 있음을 확인할 수 있었다 (Fig. 25).

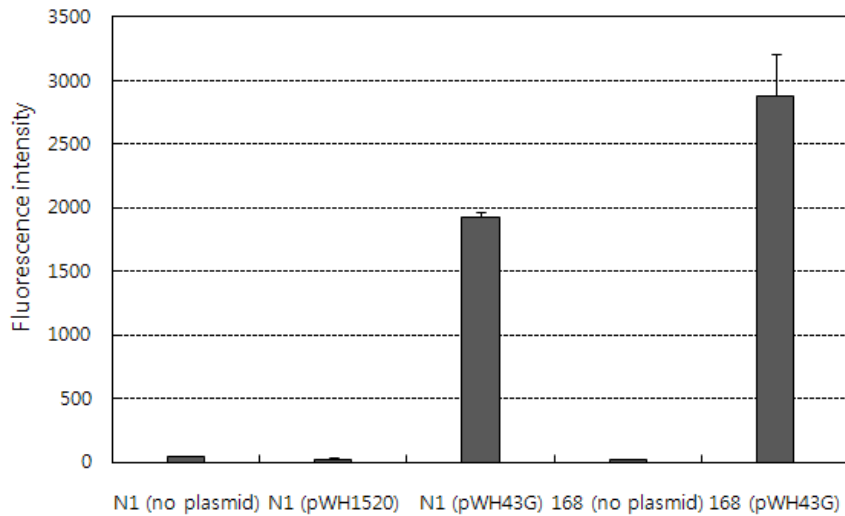


Fig. 25. GFP expression measured by fluorescence intensity in various *Bacillus* strains with the P43-*gfp* construct. N1 and 168 represent *B. licheniformis* N1 strain and *B. subtilis* 168 strain, respectively. Error bars represent the standard deviation of three replications.

### (3) tagging 균주 확보와 fitness 검정

위의 방법으로 총 2개의 tagging construct를 작성하여 N1 균주에 형질 전환을 통해 염색체에 tagging을 시도하여 균주를 확보하였다. Table 30은 선발된 tagging 변이체의 유전자 발현과 fitness 조사결과 이다. 각 strain의 항균활성은 탄저병균 KRS-4 균주에 대한 길항력을 PDA 배지에서 N1 균주와 비교하였다. 각 strain의 fitness는 MG 배지(최소배지)와 NB(완전배지)에서 세균의 생육을 시간당 600 nm에서 흡광도를 측정하여 비교하였다.

Table 30. Expected gene expression of antibiotic resistance and green fluorescence from two tagging lines and comparison of fitness and antifungal activity of the tagged N1 strains

Tagging strains Phenotype	N1 wild type	N1 chi- <i>gfp</i>	N1 (pWH43G)
Antibiotic resistance for selection	-	+	+
<i>In vitro</i> antifungal activity <sup>a</sup>	++	++	++
Bacterial growth in minimal medium and complete medium		WT equivalent <sup>b</sup>	WT equivalent <sup>b</sup>
Expression of <i>gfp</i>	-	+	+

<sup>a</sup> *In vitro* antifungal activity was estimated by measuring fungal growth inhibition zone against *Colletotrichum gloeosporioides* KRS-4

<sup>b</sup> 'WT equivalent' indicates that the bacterial growth determined by absorbance at 600 nm was equivalent to that of wild type strain N1.

위의 Table 30에 나타난 것처럼 선발된 두 개의 tagging 균주는 길항력이나 fitness 측면에서 모균주인 *B. licheniformis* N1 과 커다란 차이가 나지 않았다. 따라서 이를 이용하여 딸기 식물체에 처리후 균주의 생존력과 식물환경 분포를 파악하였고 이 균주를 제형화에 이용하였다.

마. 미생물 tagging 된 균주의 N1Z 제형화

항생물질 ampicillin을 50 ug/ml (N1 chi-*gfp*의 경우) 또는 tetracycline 20 ug/ml (N1 pWH43G의 경우) 되도록 첨가한 4 L 비지배지를 7 L 발효기에 준비하여, 각 항생제가 첨가된 NB배지에서 24시간 배양한 *B. licheniformis* N1 형질전환 균주 400 ml를 각각 접종하여 30°C, 300 rpm, 1.5 atm, pH 6~7에서 3일간 배양하였다. 그 후 배양액에 본 연구에서 확립된 우

수제형인 N1Z 제형의 제조법에 따라 배양액 1 L 당 썬크리미 80 g 첨가하여 제제를 만들었다. 이를 잘 혼합하여, 건조기(50°C)에서 3일간 건조한 뒤 분쇄하여 수화제형 미생물 제제를 제조하였다.

## 2. tagging 미생물 균주의 식물환경 생존력

P43-*gfp* 유전자 꼬리표로 tagging 된 미생물인 N1 균주를 이용하여 미생물 제제균주 및 제제에서 미생물의 식물환경 생존력을 파악하기 위하여 생육상에서 플라스틱 포트( $\phi$  15cm)에 재배한 딸기 식물체를 이용하였다. 딸기 품종은 장희품종을 구매하여 이용하였다. 딸기 재배는 플라스틱 포트에 전용상토 푸르미(서울바이오)를 이용하였다. 딸기는 생육상에서 25°C 온도에 16시간의 광상태에서 생육하였다. 대상 미생물을 항생물질이 첨가된 NB 배지에서 30°C 24시간 전배양하고 이를 200 ml의 동일한 배지와 동일한 배양조건에서 48시간 배양하여 550 nm에서 배양액의 흡광도가 0.8 되도록 배양하였다. 이들 배양된 미생물을 각 딸기 포트당 30 ml 씩 분무접종하여 동일상 생육상에 유지하며 생균수 조사에 이용하였다. 미생물 제제의 처리의 경우에도 tagging 균주를 전술한 바와 같이 제형화 하여 N1Z 제제를 만들고 이를 100배 희석하여 포트당 30 ml 처리하거나 하우스 토경재배의 경우 100 배 희석하여 분무처리하여 딸기 전식물체가 충분히 젖을 수 있도록 처리하였다.

최초 미생물 처리 1시간 후 분무액이 완전히 건조되어 초기 처리 미생물 수를 딸기 잎, 엽병, 크라운에서 확인하였다. 처리후 날짜별로 각 식물의 조직을 분리하고 생중량을 측정한 뒤 100 ml의 0.75% NaCl 수용액에 넣어서 water bath sonicator에서 5분간 약하게 sonication 하여 현탁액을 준비하였다. 준비된 현탁액을 10배 희석평판법에 따라 ampicillin 이 첨가된 NA 배지에 도말하여 생균수를 계수하고 식물 조직 생중량 당 cfu/g 단위로 환산하였다.

가. 생균주 배양액 처리후 식물표면 생존력

다음의 결과 Fig. 26 에서처럼 N1 chi-gfp 균주 처리한 경우 딸기의 모든 식물 부위에서 처리 미생물이 비교적 안정적인 밀도를 유지하는 것으로 나타났다. 그러나, 잎, 엽병, 크라운에 비해 식물의 근권에서는 미생물이 전혀 검출되지 않았다. 딸기 잎과 크라운에서 미생물의 밀도는 일정하게 유지되는 반면 크라운에서는 밀도가 지속적으로 감소하는 것으로 나타났다. 이는 탄저병균이 가해하는 주된 부위인 크라운에서 방제효과를 기대하기 위해서는 빈번한 처리가 필요함을 의미한다고도 할 수 있다. 특히 처리 5-7일후에는 초기처리에 비해 100 배이상 처리 미생물 밀도가 감소하여 크라운에서 초기 발병억제가 중요할 것으로 예상된다. 반면, 탄저병균이 병징의 발현없이 증식하는 딸기의 잎이나 주요 발병부인 엽병에서는 병원균 밀도가 일정하게 유지되어 N1 미생물의 처리가 발병억제에 효과적일 수 있음을 예상할 수 있었다.

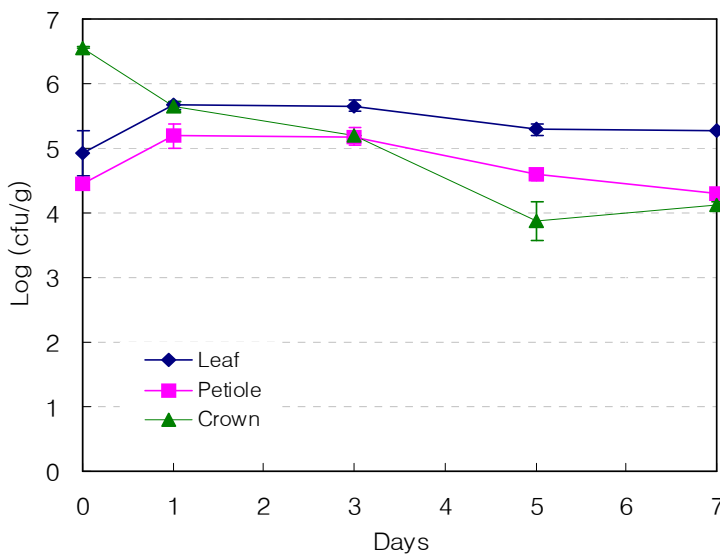


Fig. 26. Bacterial population change of *B. licheniformis* N1 chi-gfp tagging strain on various plant tissues of strawberry plants.

그리고, tagging 미생물 처리할 때 전착제로서 0.03%의 Silwet L-77을 포함하여 처리하는 경우 미생물의 밀도가 식물체 전반에 걸쳐 안정적으로 유지되는 것으로 나타났다(Fig. 27). 따라서 미생물 제제의 처리의 경우에도 기존 화학 농약에 활용되는 Silwet L-77 등의 전착제를 활용하면 식물체 정착 및 생존력을 향상시킬 가능성을 제공하였다.

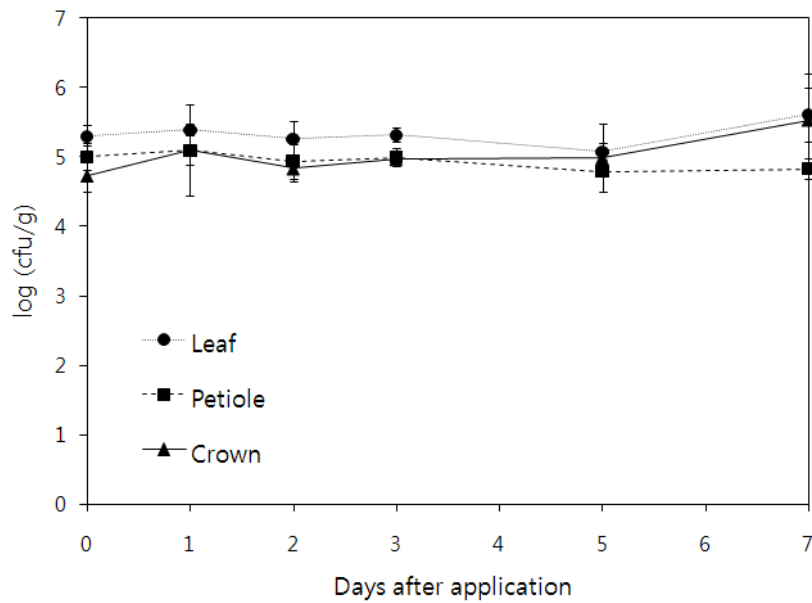


Fig. 27. Bacterial population change of *B. licheniformis* N1 chi-gfp tagging strain on various plant tissues of strawberry plants when the bacterial cell suspension with 0.03% of Silwet L-77 were applied on the strawberry plants.

한편, *B. licheniformis* N1 모균주가 항생활성이 있는 iturin외에 surfactin을 생산하므로 배양액을 직접 식물에 처리하는 것이 surfactin에 의한 미생물의 식물표면 정착에 상승효과가 있을 것을 예상할 수 있었다. N1 균주의 우수한 제형인 N1Z가 배양체에 썬크리미 같은 전분을 포함하여 제형화한 결과이므로 이는 미생물과 함께 surfactin, iturin을 포함하는 제형이라고 할 수 있다. 따라서 이들 제형의 처리는 미생물이 식물에 잘 정착하는데 효과적일 수 있음을 예상할

수 있다. 이를 확인하기 위해서 N1 chi-gfp tagging 균주 제형을 식물체 처리후 생존을 포트와 하우스 토경재배를 통해 확인하였다.

나. 미생물 제제의 딸기 포트처리에서 미생물 생존력

다음의 결과 Fig. 28에서처럼 N1 chi-gfp 균주 제제를 처리한 경우 딸기의 모든 식물 부위에서 처리 미생물이 비교적 안정적인 밀도를 유지하는 것으로 나타났다. 그러나, 생균수를 이용한 실험처럼 잎, 엽병, 관부에 비해 식물의 근권에 서는 미생물이 전혀 검출되지 않았다. 생균주를 처리한 경우에 비해 제제를 처리한 경우에는 미생물의 밀도가 비교적 안정하게 유지되었는데 이는 생균주에 전착제를 첨가한 효과와 유사하여 본 연구에서 선발된 제형이 식물환경에서 미생물의 밀도유지에 효과적인 것으로 판단되었다. 이는 딸기 탄저병균을 억제할 미생물의 밀도가 일정하게 유지되어 N1 미생물의 처리가 발병억제에 효과적일 수 있음을 예상할 수 있었다.

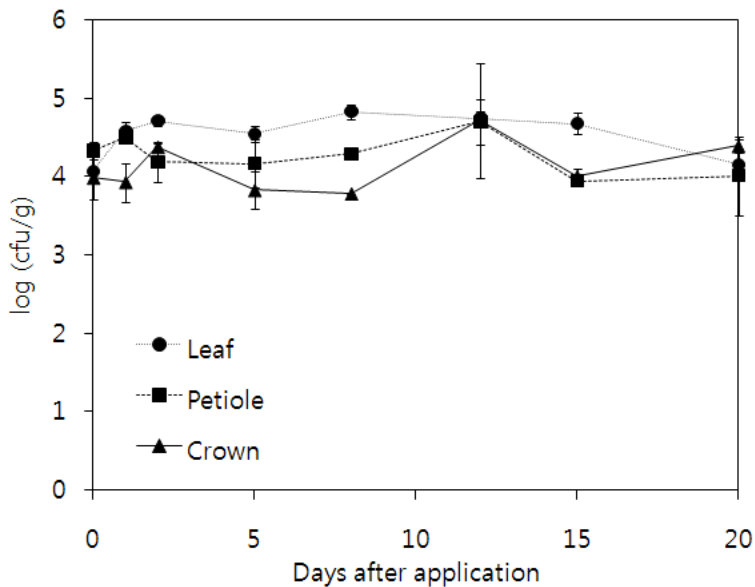


Fig. 28. Bacterial population change of *B. licheniformis* N1 strain on various plant tissues of strawberry plants after N1Z treatment in the growth chamber.



다. 미생물 제제의 딸기 하우스 토경재배에서 미생물 생존력

다음의 결과 Fig. 29에서 얻은 결과처럼 N1 *chi-gfp* 균주 제제를 하우스 토경재배한 딸기에 처리한 딸기의 모든 식물 부위에서 처리 미생물이 처리후 5일까지는 약간의 감소는 있으나 그 밀도가 비교적 안정적으로 유지되었으나 7일 후에는 거의 검출되지 않는 수준으로 감소하였다. 이는 조사한 딸기의 모든 부위에서 동일하게 나타났다. 이는 생육이 조절되는 생육상에서 보다 생육환경이 급격히 변화하는 하우스에서 제제 처리후 미생물의 밀도가 환경의 영향을 더 많이 받기 때문으로 여겨지며 5일까지 안정적인 생존은 2회의 실험에서 모두 관찰되었다. 따라서 본 연구에서 제공하는 N1 균주의 제형은 딸기의 하우스 재배 조건에서는 5-7일 간격으로 반복 살포할 필요가 있는 것을 판단된다.

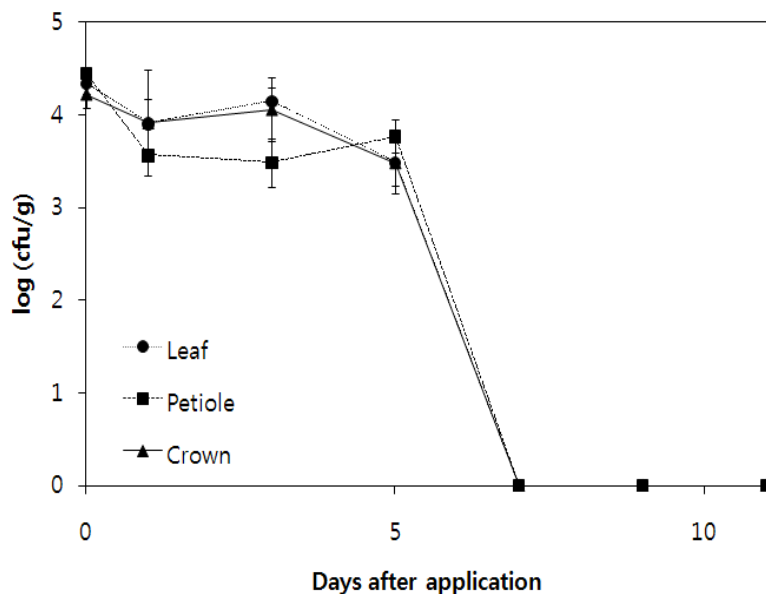


Fig. 29. Bacterial population change of *B. licheniformis* N1 strain on various plant tissues of strawberry plants after N1Z treatment in the plastic house..

### 3. tagging 미생물 균주의 식물환경 분포

#### 가. 식물환경 분포 조사과정

유전자 꼬리표로 tagging 된 미생물인 N1 pWH43G 와 N1 *chi-gfp* 균주의 식물환경 분포를 파악하기 위하여 생육상에서 플라스틱 포트( $\varnothing$  15cm)에 재배한 딸기 식물체를 위와 같이 동일하게 이용하였다. 딸기 품종은 장희품종을 구매하여 이용하였다. 딸기 재배는 플라스틱 포트에 전용상토 푸르미(서울바이오)를 이용하였다. 딸기는 생육상에서 25°C 온도에 16시간의 광상태에서 생육하였다. 대상 미생물을 향생물질이 첨가된 NB 배지에서 30°C 24시간 전배양하고 이를 200 ml의 동일한 배지와 동일한 배양조건에서 48시간 배양하여 550 nm에서 배양액의 흡광도가 0.8 되도록 배양하였다. 이들 배양된 미생물을 각 딸기 포트당 30 ml 씩 분무접종하기 전에 Silwet L-77을 최종 0.03% 되도록 첨가하였다. 이후 각 딸기 식물체를 동일 생육상에 유지하면서 딸기 식물체 조직별로 미생물의 분포를 confocal laser scanning microscopy (CLSM, Carl Zeiss LSM510)를 이용하여 조사하였다. 현미경 자체의 사양은 Axiovert 200M 이며 관찰 사양은 488 nm의 아르곤 레이저와 543 nm의 헬륨 레이저를 활용하였다. 이미지의 회수는 LSM510에서 제공된 software를 사용하여 광학이미지와 *gfp* 발현에 의한 녹색형광이미지 그리고 엽록체의 자체형광을 적색형광으로 구별하여 수행하였다. 미생물 처리한 딸기의 잎, 엽병, 크라운을 위주로 처리직후(0일), 1일, 3일, 5일, 7일후에 관찰하였다. 미생물을 처리하지 않거나 비 형질전환 *B. licheniformis* N1 을 처리한 딸기의 잎, 엽병, 크라운에서는 녹색형광을 보이는 세균을 관찰할 수 없었다(Fig. 30).

Control – no bacterial treatment, or non-transformants treatment

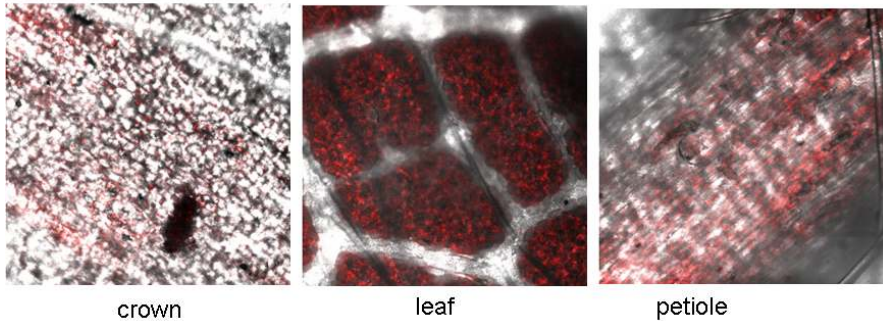


Fig. 30. CLSM images of strawberry crown, leaf, and petiole from nontreatment control

#### 나. 미생물의 식물환경 분포 분석

녹색형광단백질 유전자가 삽입된 *B. licheniformis* N1 *chi-gfp* 나 플라스미드를 함유하는 *B. licheniformis* N1 (pWH43G)의 경우는 잎과 엽병, 그리고 관부에서 미생물이 잘 정착하였음을 의미하는 녹색형광의 균체를 관찰할 수 있었다 (Fig 31, 32, 33). 다음의 Fig. 31은 N1 (pWH43G)를 이용하여 현미경 관찰결과 미생물이 가장 고르게 분포하는 것으로 나타난 관부에서 미생물의 이미지를 녹색형광을 통해 정착 미생물을 관찰할 수 있다. 그림의 L은 녹색의 형광 이미지만 회수한 것이며 R은 광학이미지와 엽록체 유래의 적색형광 이미지 그리고 미생물의 녹색 형광이미지를 overlap 시킨 이미지를 나타낸다. 그림에서 보여진 것처럼 대조구(C)에서는 전혀 녹색형광을 관찰할 수 없으나 처리직후(0)부터 7일까지 미생물이 고르게 분포하는 것을 확인할 수 있다. 특히 식물 세포의 주변에 식물세포와 세포사이의 골짜기에 해당하는 부위에 미생물이 군집을 형성한 것을 확인할 수 있었다. 이는 아마도 미생물 제제 처리후 흘러내린 미생물이 관부에 초기 미생물의 농도를 증가시키는데 기여하여 미생물이 관부에 상대적으로 잘 정착했다고 판단할 수도 있다 (Fig. 31).

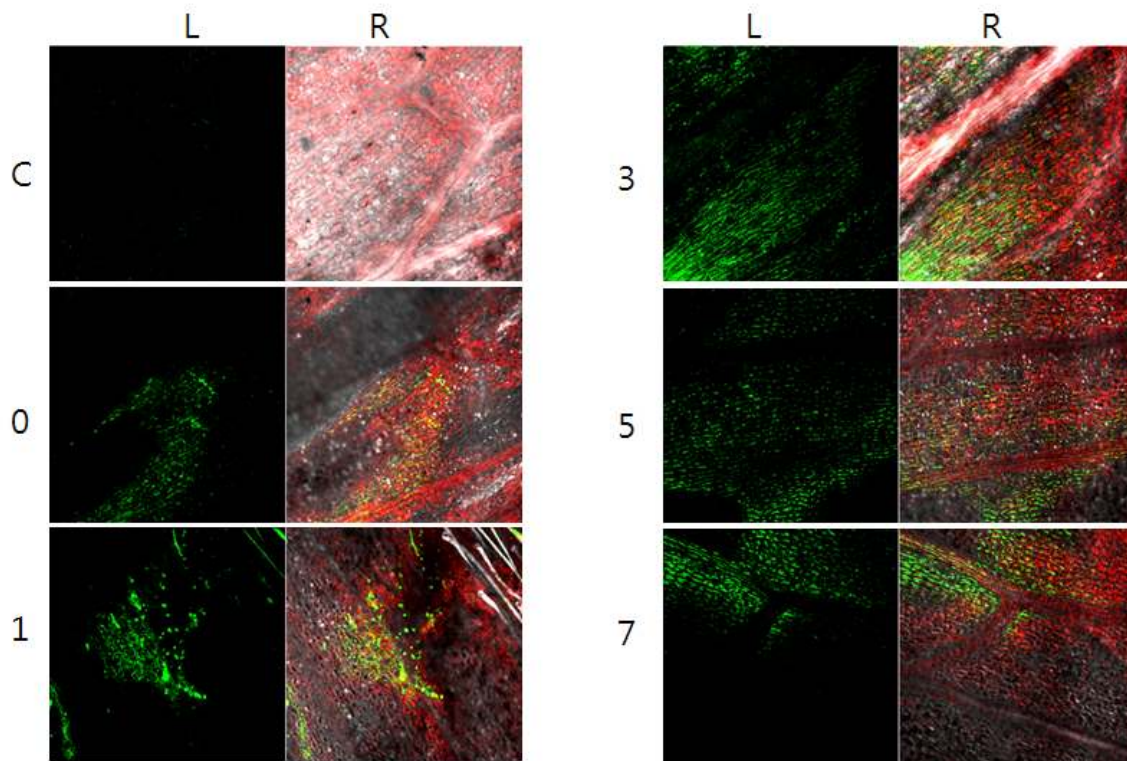


Fig. 31. Green fluorescens images (L) of tagged N1 strain with pWH43G and overlapped images (R) of CLSM showing strawberry crowns with green fluorescens from *gfp* tagged bacteria, red fluorescens from chloroplast with light microscopic image of dark gray background (100 fold magnification). C, control treatment with nontagged bacteria; 0–7 indicate the days after bacterial application on strawberry plants.

관부와 달리 딸기 식물의 잎에서 미생물의 정착은 상이한 양상을 보였는데 미생물 처리후부터 3일까지는 잎의 전면적에 걸쳐 활발히 정착하여 고르게 군집을 형성하는 것으로 확인되었으나 5일부터 그 밀도가 급격히 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 32). 이는 아마도 관부에 비해 지속적으로 습도의 감소로 인한 건

조 스트레스에 노출, 광에 노출되면서 미생물의 사멸 또는 *gfp* 유전자 발현의 감소에 기인한 것 같다. 그러나, 처리 미생물의 잎에서의 생존을 관찰하여 보면 Fig. 26-28에 나타난 것처럼 밀도가 비교적 안정적으로 유지되는 것으로 나타났다. 더구나 본 실험에서 Silwet L-77 처리로 인해 미생물의 정착이 향상되었을 가능성이 있으므로 5일이후로 녹색형광 이미지의 급속한 감소는 미생물의 대사의 감소로 인해 *gfp* 발현이 급격히 감소한 결과로 해석되어 진다.

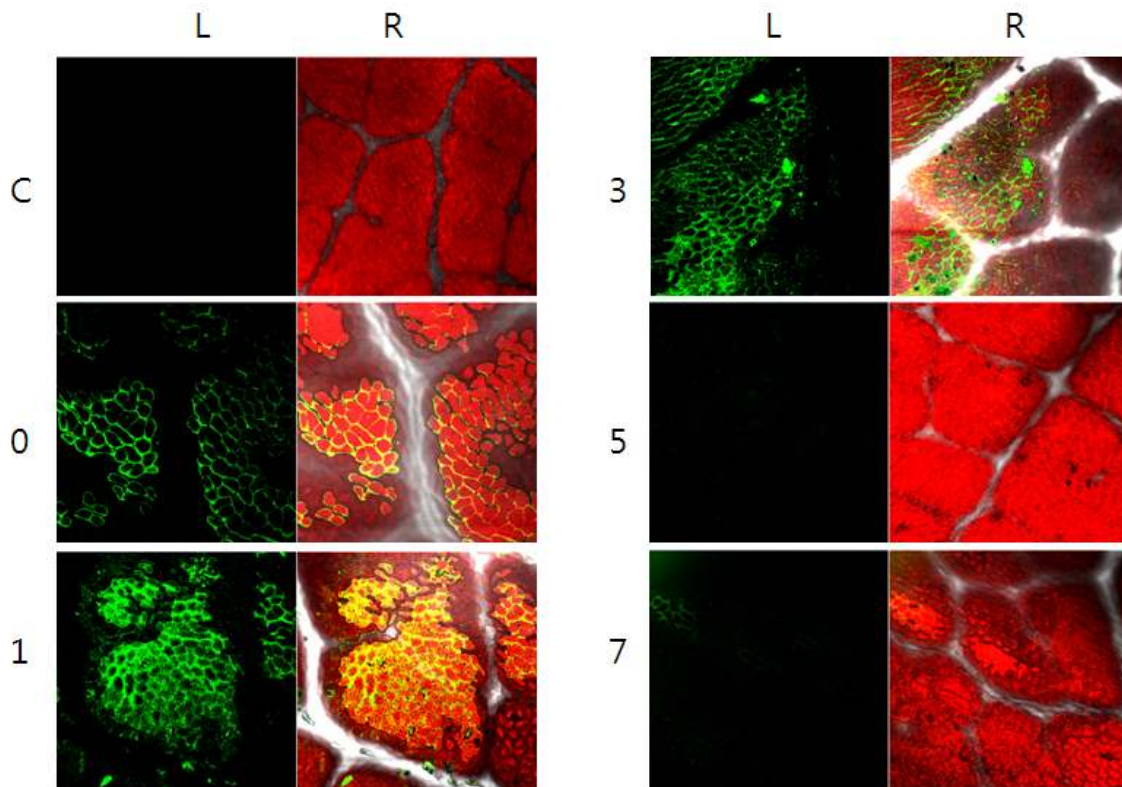


Fig. 32. Green fluorescens images (L) of tagged N1 strain with pWH43G and overlapped images (R) of CLSM showing strawberry leaves with green fluorescens from *gfp* tagged bacteria, red fluorescens from chloroplast with light microscopic image of dark gray background (100 fold magnification). C, control treatment with nontagged bacteria; 0-7 indicated the days after bacterial application on strawberry plants.

딸기 식물체의 관부나 잎과 달리 엽병에서는 처리 직후 1일경에 미생물이 잘 정착하고 군집을 형성하는 것으로 나타났으나 3일째부터 처리 미생물에 의한 형광의 발현은 급속히 감소하여 관찰이 어려웠다(Fig. 33). 이는 앞에서와 유사하게 엽병에서도 미생물의 생존이 잘 유지되는 반면 미생물의 대사는 관부와 잎에 비해 현저히 감소하는 것으로 나타났으며 이는 엽병에서 미생물이 대사적으로 획득할 수 있는 이득이 그리 높지 않을 것으로 예상되는 결과이다.

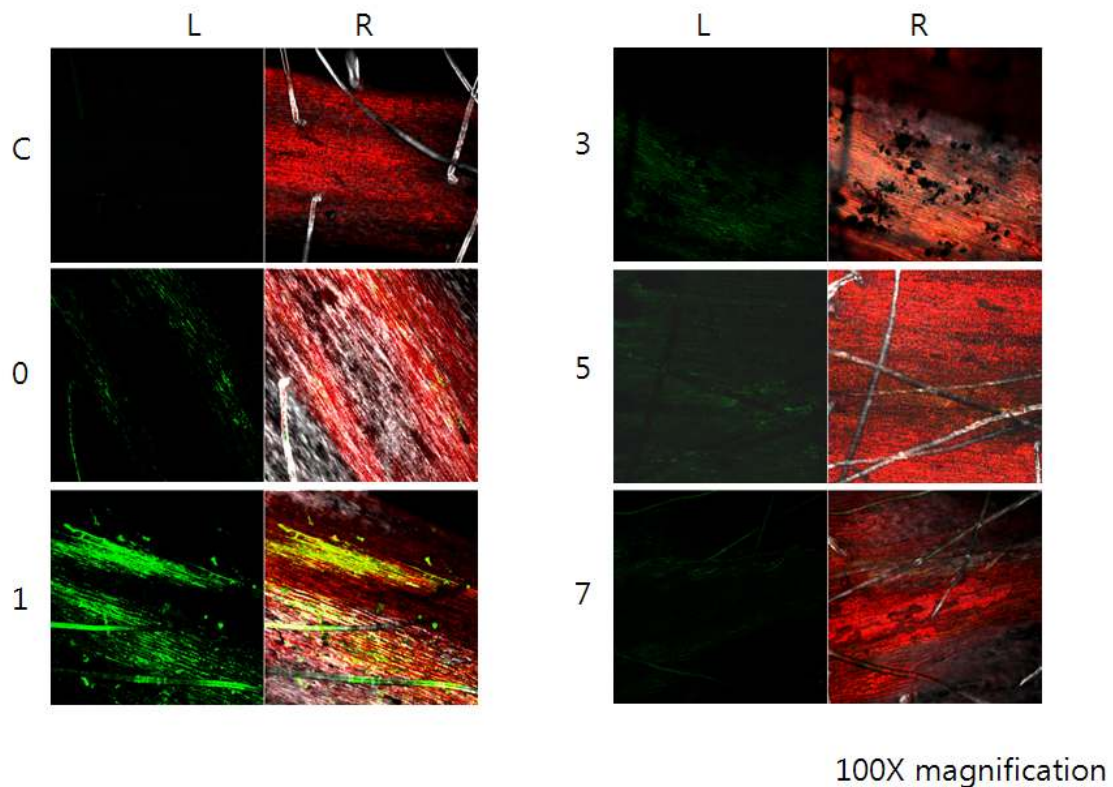


Fig. 33. Green fluorescens images (L) of tagged N1 strain with pWH43G and overlapped images (R) of CLSM showing strawberry petioles with green fluorescens from *gfp* tagged bacteria, red fluorescens from chloroplast with light microscopic image of dark gray background (100 fold magnification). C, control treatment with nontagged bacteria; 0–7 indicated the days after bacterial application on strawberry plants.

한편 딸기 식물의 뿌리에서는 처리 미생물의 군집이 전혀 관찰되지 않았는데 충분량의 미생물을 분무하였음에도 포트의 표토에 처리된 미생물이 뿌리로 이동하지 않은 것으로 판단된다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 1. 딸기 탄저병 방제용 미생물 제제의 개발

딸기 탄저병에 대한 우수 길함 미생물 *Bacillus licheniformis* N1 균주와 *Burkholderia pyrrocina* CH-67 균주를 이용한 딸기 탄저병 방제용 제제 생산을 위한 대량배양 기술, 제제용 각종 첨가물 결정, 제제 제조기술을 확립하였으며 이들중 약혼이 없으며 방제효과가 우수한 제형을 결정하였다. 선발된 제형을 이용하여 생육실 조건, 하우스 토경재배 조건에서 인공발병을 통해 방제효과를 검증하였고 자연발병조건인 포장에서 딸기 탄저병이 가장 중요한 시기인 8월에 포장실험을 통해 선발 제제의 효과를 입증하였다.

본 연구를 통해 화학적으로도 방제가 어려워 주로 재배학적 방법으로 방제하는 딸기 탄저병을 친환경적으로 제어할 가능성을 확인하였다. 딸기 탄저병은 딸기 생산에서 가장 중요한 병해로서 이를 환경친화적으로 미생물 제제를 활용하여 방제할 수 있다면 본 연구가 가지는 기여도는 막대하다고 할 수 있다.

### 2. 딸기 탄저병 방제용 천연물 제제의 개발

딸기 탄저병에 대하여 방제효과가 입증된 길함 미생물 *B. licheniformis* N1 균주의 항진균 활성물질로 iturin A와 surfactin을 순수분리 동정하였으나 이를 다기능성 천연물 제제형 나노제형 입자화하는 것은 불가능하였다. 반면 *B. pyrrocina* CH-67 균주가 생산하는 항진균성물질은 순수분리가 되지 않은 상태로 수화제형으로 생산하기 위한 입자화가 가능할 것으로 입증되었으며 CH-67 균주를 활용한 CH-67H 제형은 미생물의 생균수가 유지되지 않는 천연물 제형으로 인정되어 500배 희석으로도 자연발병 조건에서 딸기 탄저병 방제효과가 인정되었다. 그러나 CH-67 균주의 항진균 활성 성분은 신규물질로 여겨지며 순수분리가 어려워 동정되지 못했다. 항진균 활성분의 순수분리가 성공되면 이를 활용하는 방법이 결정될 수 있다. 본 천연물 제제가 미생물 제형화 과정에서 미생물의 사멸로 인하여 자연히 확보가 되었으며 이는 순수분리된 물질이 아니라 총배양액을 포함하여 제형화 되었으므로 순수한 활성분을 이용한 제형연구가 활성분의 순수분리가 성공하면 가능할 것이다. CH-67 균주가 생산하는 항진균 물질



이 신물질로 동정되면 이는 천연 항진균 물질 개발분야에 미치는 기여도도 또한 높을 것이다.

### 3. 개발 미생물의 제제의 식물환경동태 분석

딸기 탄저병 뿐 아니라 다른 식물 병원 진균에 대하여도 방제효과가 우수한 길함 미생물 *B. licheniformis* N1 균주의 식물환경 동태분석을 위한 tagging construct를 P43-*gfp* 융합 유전자로 제작하고 N1 균주에 형질전환하여 tagging line으로 선발하였다. 제작한 P43-*gfp* 는 다양한 미생물에 녹색형광단백질을 발현하여 미생물의 환경동태를 분석하는데 활용될 수 있는 가능성이 있다. 구축한 tagging construct 는 N1 균주에 성공적으로 도입되어 녹색형광이 잘 발현되었으며 이 line을 제형화하여 조절된 환경의 딸기 조직에서 생존력이 분석되었는데 N1 균주는 딸기의 관부, 잎, 엽병에서 잘 정착하는 것으로 확인되었다.

본 연구를 통해 획득된 tagging 및 균주 동태 분석기술은 다양한 미생물 제제 균주(특히 *Bacillus* 계통)에 도입이 되면 미생물 제제 균주의 동태를 파악하는데 상당히 기여할 것으로 판단된다. 이를 통해 다양한 미생물 제형을 특별한 작물병해 제어를 위해 제형을 처리할 빈도 및 회수를 결정하는데 기여할 수 있다.

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 1. 연구성과

본 연구를 통해 두가지 미생물 균주 *Bacillus licheniformis* N1 과 *Burkholderia pyrrocina* CH-67 균주의 제형화를 통해 딸기 탄저병 방제 가능성을 확인하였다. 연구를 통해 두 균주 모두 탄저병 방제에 활용될 수 있는 가능성을 확인하였고 활성과 연관된 항진균 물질이 N1 균주로부터 동정되었다. CH-67 균주의 항진균 활성은 부분적으로 분획되었다. N1 균주의 항진균성 물질은 입자화하는 단독제형이 불가능하였으니 CH-67 균주의 제형 자체가 생균수가 검출되지 않아 제작된 제형이 총 활성분을 포함하는 천연물 제형에 해당하였고 해당 제형의 500 배 희석액까지 자연발병 포장조건에서 방제효과가 인정되었다. 또한 미생물 제제에 활용되는 미생물들의 식물 환경동태를 시공간적으로 분석할 수 있는 추적기술을 확립하였다.

### 2. 연구성과 활용 계획

N1 균주와 CH-67 균주를 이용하여 생산되는 제형을 산업체나 농가에 기술이전 하기 위한 후속연구가 일부 완성된다면(특히 CH-67 제형의 경우) 두 균주 모두 균주의 형태로 또는 제형의 형태로 기술이전될 수 있는 가능성이 있다. CH-67이 생산하는 신규한 항진균 천연물질의 경우 순수분리 및 추가동정 연구가 진행되어 신규의 천연 항진균 물질로 구조가 밝혀지면 물질 특허획득 및 관련분야 기술이전에 활용될 수 있을 것이다. 더구나 부분 분획된 CH-67에서 생산되는 물질이 열에 안정하며 극히 낮은 농도에서도 활성이 우수한 것으로 판단되어 활용의 가치가 높다. 처리 미생물의 환경에서 동태를 추적하기 위하여 구축한 P43-*gfp*를 다양한 미생물에 적용하여 미생물 동태과약에 활용할 수 있으며 이는 다양한 미생물 제형 균주들이 다양한 작물의 병해 방제에 처리될 때 적정 처리 회수, 빈도, 방법등의 표준 프로토콜을 작성하는데 유용하게 활용될 수 있다.

본 연구의 결과로부터 이미 3건의 국제논문이 출판되었으며 미생물 환경동태 연구 및 CH-67 균주의 제형과 항생활성 물질의 연구에 대하여 최소 2건 이상의 국제논문이 향후 출판될 수 있을 것이다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

최근 까지 각종 미생물 제형으로서 활용되는 미생물중 식물병 뿐 아니라 해충의 방제에도 활용되는 가장 많이 활용되는 미생물은 *Bacillus* 속의 미생물들이 대부분인데 이들은 미생물 제형으로 활용하기에 우수한 여러 가지의 장점이 알려져 있다. 우선 다양한 항생물질의 생산(iturin, surfactin, fengycin 등)과 환경 적응성 그리고 불리한 환경에도 지속성을 유지할 수 있는 내생포자의 생성등이 그것이다. 따라서 전 세계적으로도 *Bacillus* 속 균주들을 다양하게 생물학적 방제에 활용하기 위한 모색방안을 찾고 있는 실정이며 이미 다양한 균주가 개발되어 농약으로 활용되고 있다.

그런데 본 과제에서 활용하는 N1 균주의 경우에 이미 알려진 iturin 과 surfactin을 생산하는 것이 본 연구를 통해 밝혀졌는데 최근 이전의 단순한 항생활성으로서의 이들 lipopeptide 의 기능외에 이들 물질들이 미생물 제제의 환경에서 적응도를 높이거나 식물 주변환경에 정착 및 생존, biofilm 형성 그리고 심지어는 식물의 생육촉진 및 방어반응 활성화에도 기여한다는 증거들이 나오기 시작했다. 이전까지는 *Bacillus* 의 lipopeptide 의 항생활성으로서의 우수성만 인정되었는데 현재는 이들의 생산이 해당균주가 식물을 보호하는데 최적의 여러 가지 기능을 보유하는 것이 lipopeptide 생산과 무관하지 않을 가능성이 밝혀지고 있는 것이다. 실제로 전 세계 미생물 농약시장에서 생물농약이 차지하는 비중이 전체의 2005년에 2.5% 였으며 그중 30%가 미생물을 활용한 것이다. 이들 미생물중 대부분인 75% 가 세균이며 그 중 *B. thuringiensis* 와 *B. subtilis* 들이 전체의 60% 이상에 해당하는 것을 보면 *Bacillus* 속 균이 미생물 제제로 가장 유용한 균주임이 확인된 것이다. 그리고 현재 개발된 대부분의 식물병 방제용 *Bacillus* 속 세균은 식물 방어를 유도하는 기능이 있음이 확인되고 있다.

따라서 장래에 항생활성외에도 다양한 기능을 보여주는 *Bacillus* 유래의 lipopeptide 신호가 효율적인 생물학적 방제제 탐색에 유용하게 활용될 수 있을지에 대한 연구가 선진국에서 진행되고 있는 중이다. 더불어 서로 다른 기능의 두가지 이상의 미생물을 혼합하여 제형화하는 기술이 연구되고 있다.

## 제 7 장 참고문헌

- Amer, G. A. and Utkhede, R. S. 2000. Development of formulations of biological agents for management of root rot of lettuce and cucumber. *Can. J. Microbiol.* 46:809–816.
- Baxter, A. P., Van der Westhuizen, G. C. A. and Eicker, A. 1983. Morphology and taxonomy of South African isolates of *Colletotrichum*. *S. Afr. J. Bot.* 2:259–289.
- Burkholder, P. R. and Giles, N. H. 1947. Induced biochemical mutation in *Bacillus subtilis*. *Am. J. Bot.* 34:345–348.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. and Prasher, D. C. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263:802–805.
- Chiarini, L., Bevivino, A., Dalmastrì, C., Tabacchioni, S. and Visca, P. 2006. *Burkholderia cepacia* complex species: health hazards and biotechnological potential. *Trends Microbiol.* 14:277–286.
- Choi, G. J., Kim, J. C., Park, E. J. Choi, Y. H., Jang, K. S., Lim, H. K., Cho, K. Y. and Lee, S-W. 2006. Biological control activity of two isolates of *Pseudomonas fluorescens* against rice sheath blight. *Plant Pathol.J.* 22:289–294.
- 정희경, 김진락, 우상민, 김상달. 2007. Auxin, Siderophore, 및 Cellulase 생산성 다기능 식물생장촉진미생물 *Bacillus licheniformis* K11의 선발 및 식물생장촉진 효과. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 50: 23–28.
- Cook, R. J. 1993. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31:53–80.
- Cormack, B. P., Valdivia, E. A. and Falkow, S. 1996. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173:33–38.
- Dennis, J. J. and Zylstra, G. J. 1998. Plasposons: modular self-cloning minitransposon derivatives for rapid genetic analysis of Gram-negative bacterial genomes. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2710–2715.

- Figurski, D. H. and Helinski, D. R. 1979. Replication of an origin-containing derivatives of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:1648–1652.
- Fravel, D. R., Connick, Jr. W. J. and Lewis, J. A. 1998. Formulation of microorganisms to control plant diseases. In: *Formulation of Microbial Pesticides: Beneficial Microorganisms, Nematodes and Seed Treatments*, ed by H. D. Burges. pp 187–202. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Freeman, S. and Katan, T. 1997. Identification of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose and root necrosis of strawberry in Israel. *Phytopathology*. 87:516–521.
- Handelsman, J. and Stabb, E. V. 1996. Biocontrol of soilborne plant pathogens. *Plant Cell* 8:1855–1869.
- Heim, R., Cubitt, A. B. and Tsien, R. Y. 1995. Improved green fluorescence. *Nature* 373:663–664.
- Higuchi, R., Krummel, B. and Saiki, R. K. 1988. A general method of *in vitro* preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res.* 16:7351–7367.
- Horton, R. M., Hunt, H. D., Ho, S. N., Pullen, J. K. and Pease, L. R. 1989. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* 77:61–68.
- Howard, C. M., Maas, J. L., Chandler, C. K. and Albergt, E. E. 1992. Anthracnose of strawberry caused by the *Colletotrichum* complex in Florida. *Plant Dis.* 76:976–981.
- Keane, P. J., Kerr, A. and New, P. B. 1970. Crown gall of stone fruit. II. Identification and nomenclature of *Agrobacterium* isolates. *Aust. J. Biol. Sci.* 23:585–595.
- Kim, H. J., Lee, S. H., Kim, C. S., Lim, E. K., Choi, K. H., Kong, H. K., Kim, D. W., Lee, S-W. and Moon, B. J. 2007. Biological control of

- strawberry gray mold caused by *Botrytis cinerea* using *Bacillus licheniformis* N1 formulation. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17:438–444.
- Kim, H. J., Cho, Y. H., Bae, E. K., Shin, T. S., Choi, S. W., Choi, K. H. and Park, J. Y. 2005. Development of W/O/W multiple emulsion formulation containing *Burkholderia gladioli*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 15:29–34.
- 김홍기, 남명현. 1999. 국내에 발생하는 딸기 탄저병. *식물병과 농업* 5:8–13.
- 김성현, 부우평란, 이기택. 2004. 현미유를 이용한 기능성 유지의 효소적 합성 및 콜레스테롤, 고 지방 식이가 생쥐의 간 ACAT활성에 미치는 영향. *한국식품영양과학회지* 33:803–809.
- 김승한, 최성용, 임양숙, 윤재탁, 최부술. 2002. 딸기탄저병의 시기별 발생과 감염경로. *식물병연구* 8:45–49.
- Kim, W. G., Cho, W. D. and Lee, Y. H. 1992. Anthracnose of strawberry caused by *Colletotrichum gloeosporioides* penz. *Korean J. Plant Pathol.* 8:213–215.
- Lee, J. P., Lee, S-W., Kim, C. S., Son, J. H., Song, J. H., Lee, K. Y., Kim, H. J., Jung, S. J. and Moon, B. J. 2006. Evaluation of formulations of *Bacillus licheniformis* for the biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis cinerea*. *Biol. Cont.* 37:329–337.
- Lee, D. H. 1994. Etiological characteristics of *Colletotrichum acutatum*, *C. gloeosporioides* and *Glomerella cingulata* isolated from apple. *Korean. J. Plant Pathol.* 10:105–111.
- 이기성, 최창원, 김영백, 김균언, 강태섭. 1998. 생물학적 제어와 환경보전을 위한 미생물 살균제의 상업적 개발 최종 연구 보고서 p. 110–112.
- Legard, D. E. 2000. *Colletotrichum* diseases of strawberry in Florida. Pages. 292–299 in: *Colletotrichum: Host Specificity, Pathology, and Host-Pathogen Interaction*. D. Prusky, S. Freeman, and M. B. Dickman, eds. The American Phytopathological Society, St. Paul,

MN.

- Maas, J. L. 1998. Compendium of Strawberry Diseases 2nd Edition. APS PRESS.
- March, J. C., Rao, G. and Bentley, W. E. 2003. Biotechnological applications of green fluorescent protein. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62:303–315.
- Martinez–Culebras, P. V., Barrio, E., Garcia, M. D. and Querol, A. 2000. Identification of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose of strawberry based on the internal transcribed spacers of the ribosomal region. *FEMS Microbiol. Lett.* 189:97–101.
- Martinez–Culebras, P. V., Querol, A., Suarez–Fernandez, M. B., Garcia–Lopez, M. D. and Barrio, E. 2003. Phylogenetic relationships among *Colletotrichum* pathogens of strawberry and design of PCR primers for their Identification. *J. Phytopathology* 151:135–143.
- Miller, W. G. and Lindow, S. E. 1997. An improved GFP cloning cassette designed for prokaryotic transcriptional fusions. *Gene* 191:149–153.
- Mordue, J. E. M. 1971. *Glomerella cingulata*. CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria No. 315. Commonwealth Mycological Institute, Kew, United Kingdom. 2pp.
- 남명현, 정석기, 유성준, 서관석, 김홍기. 1998. 국내 딸기 탄저병균 *Colletotrichum gloeosporioides*와 *Glomerella cingulata*의 배양적, 병원학적 특성. 한국식물병리학회지 14:654–660.
- 남명현, 송정영, 김홍기. 2004. 딸기 병걸린 식물잔재물과 토양에서 탄저병균 *Colletotrichum gloeosporioides*와 *Glomerella cingulata*의 월동과 생존. 식물병연구 10:198–202.
- Ngugi, H.K., Dedej, S., Delaplane, K. S., Savelle, A. T. and Scherm, H. 2005. Effect of flower–applied Serenade biofungicide (*Bacillus subtilis*) on pollination–related variables in rabbiteye blueberry. *Biol. Cont.* 33:32–38.
- Ntahimpera, N., Madden, L. V. and Wilson, L. L. 1997. Effect of rain

- distribution alteration on splash dispersal of *Colletotrichum acutatum*. *Phytopathology* 87:649–655.
- Ohno, A., Ano, T. and Shoda, M. 1995. Production of a lipopeptide antibiotic, surfactin, by recombinant *Bacillus subtilis* in solid state fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 47:209–214.
- Ohno, A., Ano, T., and Shoda, M. 1996. Use of soybean curd residue, Okara, for the solid state substrate in the production of a lipopeptide antibiotic, iturin A, by *Bacillus subtilis* NB22. *Process Biochem.* 31:801–806.
- Olubajo, B. and Bacon, C. W. 2008. Electrotransformation of *Bacillus mojavensis* with fluorescent protein markers. *J. Microbiol. Meth.* 74:102–105.
- Ongena, M. and Jacques, P. 2008. *Bacillus* lipopeptides; versatile weapons for plant disease control. *Trends Microbiol.* 16:115–125.
- Park, K., Paul, D., Kim, Y. K., Nam, K. W., Lee, Y. K., Choi, H. W. and Lee, S. Y. 2007. Induced systemic resistance by *Bacillus vallismortis* EXTN-1 suppressed bacterial wilt in tomato caused by *Ralstonia solanacearum*. *Plant Pathol. J.* 23:22–25.
- Park, K. S. and Kim, C. H. 1992. Identification, distribution and etiological characteristics of anthracnose fungi of red pepper in Korea. *Korean J. Plant Pathol.* 8:61–69.
- Perfect, S. E., Hughes, H. B., O'connell, R. J. and Green, J. R. 1999. *Colletotrichum*: A model genus for studies on pathology and fungal–plant interactions. *Fungal Genet. Biol.* 27:186–198.
- Rosas–Garcia, N. M. 2006. Laboratory and field tests of spray–dried and granular formulations of a *Bacillus thuringiensis* strain with insecticidal activity against the sugarcane borer. *Pest. Manag. Sci.* 62:855–861.
- Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G. and



- Cormier, M. J. 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111:229–233.
- Prendergast, F. G. and Mann, K. G. 1978. Chemical and physical properties of aequorin and the green fluorescent protein isolated from *Aequorea forskalea*. *Biochemistry* 17:3448–3453.
- Sadfi, N., Cherif, M., Hajlaoui, M. R. and Boudabbous, A. 2002. Biological control of the potato tubers dry rot caused by *Fusarium roseum* var. *sambucinum* under greenhouse, field and storage conditions using *Bacillus* spp. isolates. *J. Phytopathology* 150:640–648.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Schisler, D. A., Slininger, P. J., Behle, R. W. and Jackson, M. A. 2004. Formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant diseases. *Phytopathology* 94:1267–1271.
- Smith, B. J. and Black, L. L. 1990. Morphological, cultural, and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. *Plant Dis.* 74:69–76.
- Smith, B. J., Black, L. L. and Galletta, G. J. 1990. Resistance to *Colletotrichum fragariae* in strawberry affected by seedling age and inoculation method. *Plant Dis.* 74:1016–1021.
- Smith, B. J. and Spiers, J. M. 1982. Evaluating techniques for screening strawberry seedlings for resistance to *Colletotrichum fragariae*. *Plant Dis.* 66:559–561.
- Stepanenko, O. V., Verkhusha, V. V., Kuznetsova, I. M., Uversky, V. N. and Turoverov, K. K. 2008. Fluorescent proteins as biomarkers and biosensors: throwing color lights on molecular and cellular processes. *Curr. Protein. Pept. Sci.* 9:338–369.
- Sutton, B. C. 1980. The Coelomycetes. Commonwealth Mycological

institute, Kew, United Kingdom 696pp.

- Wang, P. Z. and Doi, R. H. 1984. Overlapping promoters transcribed by *Bacillus subtilis*  $\sigma^{55}$  and  $\sigma^{37}$  RNA polymerase holoenzymes during growth and stationary phase. *J. Biol. Chem.* 259:8619–8625.
- Webb, C. D., Decatur, A., Teleman, A. and Losick, R. 1995. Use of green fluorescent protein for visualization of cell-specific gene expression and subcellular protein localization during sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 177:5906–5911.
- Xue, G. P., Johnson, J. S. and Dalrymple, B. P. 1999. High osmolarity improve the electro-transformation efficiency of the gram-positive *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. *J. Microbiol. Meth.* 34:183–191.
- Zhang, X-Z., Cui, Z. L., Hong, Q. and Li, S-P. 2005. High-level expression and selection of methyl parathion hydrolase in *Bacillus subtilis* WB800. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:4101–4103.