



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2012년01월03일  
(11) 등록번호 10-1100685  
(24) 등록일자 2011년12월23일

(51) Int. Cl.

*C12N 1/20* (2006.01) *C12N 1/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0136676

(22) 출원일자 2008년12월30일

심사청구일자 2008년12월30일

(65) 공개번호 10-2010-0078419

(43) 공개일자 2010년07월08일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020020090251 A\*

KR1020080045346 A

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

경기도농업기술원

경기도 화성시 기산동 315

(72) 발명자

이현주

경기도 수원시 영통구 영통동 벽적골 8단지 우성A 822동 2006호

홍순성

경기도 수원시 권선구 호매실동 LG삼익아파트 11 3동 605호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인세아

전체 청구항 수 : 총 5 항

심사관 : 김민정

**(54) 신규한 바실러스 서브틸리스 균주 및 이를 포함하는 식물의 균핵병 및 시들음병 예방용 미생물 제제**

**(57) 요약**

본 발명은 신규한 바실러스 서브틸리스 균주 및 이를 포함하는 식물의 균핵병 및 시들음병 예방용 미생물 제제에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 상추의 토양병해인 균핵병균과 시들음병균에 대해 길항반응을 보이는 신규한 바실러스 서브틸리스 GG95, 이 미생물을 포함하는 미생물 제제 및 상기 미생물 제제를 이용한 균핵병과 시들음병의 예방방법에 관한 것이다.

본 발명의 바실러스 서브틸리스 GG-95는 상추를 비롯한 엽채류 재배포장에서 식재되어 있는 식물에 도포하여 특히 겨울철에 큰 문제가 되고 있는 식물의 균핵병 및 시들음병을 사전에 예방할 수 있는 우수한 미생물 제제로 이용될 수 있다.

**대표도 - 도1**

```

TGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGGGACGGGTGAGTAACACGTTGGT
AACCTGCCTGTAAGACTGGGATACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTGAACCGCATG
GTTCAAAACATAAAAGGTGGCTTCGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAG
GTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACA
CGGCCAGACTCTTACGGGAGCGACGATGGGAATCTTCCGCATGGACAAAGTCTGACGGAGGCAACG
CCGCGTGAGTGATGAAGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAAACAAGTACCGTTGGAATA
GGCGGTAACCTTGACGTTACTAACCAAGAACCCAGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGT
AGGTGGCAAGCGTTGTCGGGAATTAATGGGCTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAA
AGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGTCATGGAACTGGGAACCTTGAGTGCAGAAAGGAGAGTGGAATT
CCACGTGAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGAACACCACTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTA
ACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCTGGGGAGCGAACAGGATTAAGTACCTGGTAGTCCACGCGCTAAACG
ATGAGTCTAAGTGTAGGGGGTTCCGCCCTTAGTCTGAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGG
GAGTACGGTCCCAAGACTGAACTCAAGGAATTAAGCGGGGCCGACAGCGGTGGAGCATGTGGTTT
AATTCGAGCAACCGAAGAACCTTACAGGCTTGACATCCTTGACAACTCCTAGAGATAGGACGTCCC
CTTCGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC
CGCAACGAGCGCAACCCCTTGAATCTTAGTTGCCAGCAATCAGTTGGGCATCTAAGTGACTCCGGTGAC
AAACCGGAGGAGGTGGGATGACGTCAAATCATATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAGCTGTACATA
ATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGGAGGTTAAGCAATCCCAAAATCTGTTCTGAGTTCCGATC
GCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGTAGTAATCCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATC
GTTCCGGGCGCTGTACACACCGCCGTCACACCAGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTGGTGAGGTAAC
CTTT
    
```

(72) 발명자

**김진영**

경기도 수원시 장안구 조원동 676-9 청우아파트  
901호

**이진구**

경기도 화성시 기산동 464 행림마을 래미안1차아파  
트 101-904

**임재욱**

경기도 수원시 권선구 권선동 신안풍림아파트  
303-1002

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

토양에서 분리되고, 탄소원이 프룩토스 또는 말토스에서, 바실러스 서브틸리스 GG95의 생육온도 23 내지 29 °C 및 생육 pH범위 pH 7.0 내지 8.0에서 배양되는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) GG95 (KACC 91430P).

**청구항 2**

제 1항에 있어서, 서열목록 1로 표시되는 염기서열을 가지는 것인 바실러스 서브틸리스 GG95 (KACC 91430P).

**청구항 3**

삭제

**청구항 4**

토양에서 분리되고, 탄소원이 프룩토스 또는 말토스에서, 바실러스 서브틸리스 GG95의 생육온도 23 내지 29 °C 및 생육 pH범위 pH 7.0 내지 8.0에서 배양되어 식물의 균핵병 또는 시들음병을 예방하는 용도의 바실러스 서브틸리스 GG95 (KACC 91430P)를 포함하는 미생물 제제.

**청구항 5**

제 4항에 있어서, 상기 식물의 균핵병균이 *Sclerotinia sclerotiorum*인 것인 미생물제제.

**청구항 6**

제 4항에 있어서, 상기 식물의 시들음병균이 *Fusarium oxysporum*인 것인 미생물제제.

**명세서**

**발명의 상세한 설명**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 신규한 바실러스 서브틸리스 균주 및 이를 포함하는 식물의 균핵병 및 시들음병 예방용 미생물 제제에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 상추의 토양병해인 균핵병균과 시들음병균에 대해 길항반응을 보이는 신규한 바실러스 서브틸리스 GG95, 이 미생물을 포함하는 미생물 제제 및 상기 미생물 제제를 이용한 균핵병과 시들음병의 예방방법에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 오늘날 농업은 품종 개량, 토양 비옥도 증진, 병해충 방제 및 잡초 제거 등의 방법으로 식량 증산에 몰두해 왔지만 지속적인 농약의 사용과 남용은 토양과 하천의 심각한 오염을 유발하고 있다. 또한 농작물에 이들 농약이 잔류하므로써 독성, 환경오염 및 사람과 가축에 대한 독성 등의 문제를 일으키기 때문에 농약 사용은 현재 세계적으로 그에 대한 제제 조치가 강화되고 있는 실정이다.

[0003] 이와 같은 농약에 대한 우려와 삶의 질에 대한 관심이 커지면서 최근에는 새로운 대안으로서 농작물 병해충 방제에 미생물이나 식물추출물을 이용하는 생물학적 방제가 관심의 대상이 되고 있다.

[0004] 생물학적 방제는 소비자의 안전한 농산물 요구증대에 부응하기 위하여 환경에 유해한 화학적 농약을 사용하는 대신에 미생물 또는 식물추출물을 이용하여 환경, 다른 식물 및 인축에는 영향을 미치지 아니하면서 대상 병을 선택적으로 방제하는 방법이다.

[0005] *Sclerotinia sclerotiorum* 등에 의해 발병하는 균핵병은 400종 이상의 식물을 감염하며 전세계적으로 발생하는 병원균이다. 특히 겨울철 상추 재배시에 수확량의 15% 가량 손실을 가져오는 주요 병해로써 토양 속에 균핵이 수년간 존재하며 감염원의 역할을 한다.

[0006] 시들음병은 토양전염성 병해이며, 일반적으로 건조할 경우에 심하게 발병하지만 토양수분이 적당할 때도 감염이 일어난다. 종자전염도 가능하지만 병원균은 후막포자의 형태로 병든 식물체내에서 월동후 1차전염원이 된다.

일반적으로 식물을 밭에 정식한 후에 발병이 시작되지만 묘상에서 발병하는 것도 있다. 초기에 잎 전체가 황색으로 엷게 변하면서 점차 가늘어지며 기형으로 된다. 심엽이 변색해서 중심부가 고사하며 속까지 이른다. 약간 생육이 진행된 주가 침해받은 경우는 잎이 변형되어 신장하고 심엽의 엽병에 갈색의 이상반점이 들어가고 중심부 전체가 갈변되어 엽채류의 상품성을 심각하게 저하시킨다.

## 발명의 내용

### 해결 하고자하는 과제

- [0007] 본 발명의 목적은 식물의 균핵병과 시들음병을 예방하기 위한 신규한 미생물을 제공하는 것이다.
- [0008] 또한, 본 발명의 목적은 신규한 바실러스 서브틸리스 균주를 이용한 식물의 균핵병 및 시들음병 예방용 미생물 제제를 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은 토양에서 분리한 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) GG95 (KACC 91430P)를 제공하는 것이다.
- [0010] 또한, 본 발명의 다른 목적은 서열목록 1로 표시되는 염기서열을 가지는 것인 바실러스 서브틸리스 GG95 (KACC 91430P)를 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또다른 목적은 바실러스 서브틸리스 GG95 (KACC 91430P)를 포함하는 미생물 제제를 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또다른 목적은 바실러스 서브틸리스 GG95 (KACC 91430P)를 포함하는 식물의 균핵병 및 시들음병 예방용 미생물 제제를 제공하는 것이다.

### 과제 해결수단

- [0013] 식물의 균핵병 및 시들음병을 예방할 수 있는 미생물 제제를 확보하기 위하여, 본 발명에서는 먼저 다양한 환경에서 채취한 토양으로부터 항진균 반응을 나타내는 미생물을 탐색하였다.
- [0014] 그 결과, 본 발명에서는 경기도 용인시 포곡동의 시설하우스에서 재배중인 상추포장의 근권 토양을 채취하여 얻어진 시료로부터 생물검정에 의해 균핵병균과 시들음병균에 대해 길항반응을 보이는 균주를 선발하였다. 선발된 균주에 대하여 형태적, 생화학적 특성 및 NCBI blast 검색을 실시한 결과, 새로운 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 균주를 동정하였다.
- [0015] 선별된 균주를 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) GG95로 명명하고, 2008년 12월 17일자로 국립농업과학원 농업유전자원센터에 기탁하였다(기탁번호 KACC 91430P).
- [0016] 본 발명에 따르면, 상기 바실러스 서브틸리스 GG95는 배양 배지로서 TSB(Tryptic Soy Broth)배지 상에서 잘 자라며, 20 내지 40 °C 범위에서 생육이 가능하고, 23 내지 29 °C에서 가장 잘 자란다.
- [0017] 본 발명의 바실러스 서브틸리스 GG95의 생육 pH범위는 5 내지 9로 pH 7.0 내지 8.0에서 가장 잘 자란다.
- [0018] 상기한 본 발명에 따른 바실러스 서브틸리스 GG95는 식물의 균핵병과 시들음병의 예방에 유용하다.
- [0019] 본 발명에 있어서는, 본 발명의 방법으로 분리, 동정된 바실러스 서브틸리스 GG95를 이용하여 식물의 균핵병 또는 시들음병 예방용 미생물 제제 및 이를 이용한 균핵병과 시들음병의 예방방법을 제공할 수 있다.
- [0020] 본 발명의 바실러스 서브틸리스 GG95를 이용하여 예방 할 수 있는 처리 대상균으로는 균핵을 형성하는 *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotinia minor*, *Sclerotium cepivorum*, *Sclerotinia sp.*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*와 주요 채소 병원균 *Colletotrichum gloeosporioides*, *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum* 등이 해당된다.
- [0021] 본 발명의 바실러스 서브틸리스 GG95는 균핵병원균에 대한 잎절편을 이용한 생물검정 결과 무처리 대비에 대하여 70%의 방제가를 나타내었다. 또한 상추의 균핵병균에 대한 포장검정에서는 본 발명에 따른 바실러스 서브틸리스 GG95를 미리 도포한 상추에서 균핵병 감염 발병율이 2.0%를 나타내어 약 90%에 이르는 균핵병 방제가를 나타냈다.

## 효과

[0022] 본 발명에 따른 바실러스 서브틸리스 GG95는 화학 농약과 같은 토양 및 수질 오염으로부터 안전한 식물의 시들음병 또는 균핵병을 예방할 수 있는 미생물 제제로 사용될 수 있다.

[0023] 또한, 본 발명의 바실러스 서브틸리스 GG-95는 상추를 비롯한 엽채류 재배포장에서 식재되어 있는 식물에 도포하여 특히 겨울철에 큰 문제가 되고 있는 식물의 균핵병 및 시들음병을 사전에 예방할 수 있는 우수한 미생물로 이용될 수 있다.

**발명의 실시를 위한 구체적인 내용**

[0024] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명하면 다음과 같다. 하기 실시예는 단지 본 발명을 구체적으로 설명하는 것으로, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0025] **실시예**

[0026] **실시예 1 균주의 분리**

[0027] 2007년 6월 경기도 용인시 포곡동의 시설하우스에서 재배중인 상추 포장에서 근권 부위의 토양을 채취하였다.

[0028] 채취된 토양을 실내에서 건조시킨 후 토양 1 g을 정량하여 10 ml의 멸균수에 넣어 잘 현탁한 후 현탁액 1ml를 채취하여 9ml의 멸균수가 담긴 시험관에 차례대로 10배씩 희석하였다. 현탁액이 희석된 멸균수를 200 $\mu$ l 씩 취하여 NA(Nutrient Agar) 고체 평판배지의 중앙에 넣고 멸균된 스프레드로 골고루 밀어준 후 25 $^{\circ}$ C 항온기에서 3일간 배양하였다.

[0029] 각각의 모양으로 형성된 콜로니를 취하여 균주번호를 붙여주고 항진균 반응에 이용하였다.

[0030] **실시예 2 균주의 동정**

[0031] 상추의 토양병해인 균핵병균, *Sclerotinia sclerotiorum*과 시들음병균, *Fusarium oxysporum*에 대해 길항반응을 보이는 균주를 동정하기 위해 16s rRNA 의 염기서열 분석하여 NCBI blast를 검색하였다.

[0032] 균주의 형태적 동정을 위해 전자현미경을 거친후 주사 전자 현미경(Sanning Electronic microscope,HITACHI S-3000)으로 관찰하였다. 그리고 세균검정기 VITEK PRO의 BCH 카드를 이용하여 생화학적 반응검정을 확인하여 균의 종류를 확인하였다. 동정결과 바실러스 서브틸리스 균주와 99%의 상동성을 보였다.

[0033] 전자현미경 검정결과, 도 2에서 보이는 바와 같이 간균으로 전형적인 바실러스의 형태를 보였다. VITEK compact 의 검정결과로 *Bacillus subtilis* 균주로 동정되었다.

[0034] 이에 분리된 동정균을 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) GG95로 명명하였다. 이 균을 2008년 12월 17일자로 국립농업과학원 농업유전자원센터에 기탁번호 KACC 91430P로 기탁하였다.

[0035] [표 1]

[0036] 바실러스 서브틸리스 GG95의 생화학적 특성

[0037]

1	$\beta$ -자일로시다제	+	3	라이신	-	4	아스파테이트	-	5	루이신	-	7	페닐알라닌	-	8	L-프롤린	-
9	$\beta$ -갈락토시다제	-	10	L-피롤리도닐	+	11	$\alpha$ -갈락토시다제	+	12	알라닌	-	13	티로신	(-)	14	$\beta$ -N-아세틸-글루코사민다제	-
15	알라페프 로아틸아미다제	-	18	사이클로텍스트린	-	19	D-갈락토스	-	21	글라이코진	+	22	미오-이노시톨	+	24	메틸-A-D-글루코피라노사이드	+

25	엘만	-	26	메틸-D-자일로사이드	-	27	α-만노시다제	-	29	말토트리오즈	+	30	글라이신	-	31	D-만니톨	+
32	D-만노즈	+	34	D-엘레디토즈	-	36	N-아세틸-D-글루코사민	(-)	37	팔라티노즈	+	39	L-람노즈	-	41	β-글루코시다제	+
43	β-만노시다제	-	44	포스포틸코린	-	45	피루베이트	+	46	α-글루코시다제	-	47	D-타가토즈	-	48	D-트리할로즈	+
50	이눌린	-	53	D-글루코스	+	54	D-리보즈	+	56	푸트레신	-	58	NaCl 6.5%	+	59	카나마이신	-
60	올린도마이신	-	61	에스콜린하이드로라제	+	62	테트라졸리움레드	+	63	플로마이신	-						

[0038] 실시예 3 바실러스 서브틸리스 GG95의 생육조건 시험

[0039] 1) 온도

[0040] 이 균의 적정배양온도를 확인하기 위해 TSB(Tryptic Soy Broth)배지 200ml에 전배양액 2ml를 접종하여 온도별로 10, 15, 20, 25, 30, 35℃에서 24시간 동안 180rpm으로 배양한 후 배양액을 UV 스펙트로포토메타(BECKMAM DU730) 600nm 파장에서 흡광도를 조사하여 균의 생육정도를 비교하여 적정 생육온도를 확인하였다.

[0041] 그 결과 도 3에서 보이는 바와 같이 25 ℃에서 가장 생육이 잘 되었다.

[0042] 2) pH

[0043] 이 균의 생육에 적정한 산도를 확인하기 위해 TSB 배지 200ml를 NaOH와 HCl로 산도를 3,4,5,6,7,8로 조절하여 24시간 동안 180rpm 으로 배양한 후 배양액을 UV 스펙트로포토메타 600nm 파장에서 흡광도를 조사하여 균의 생육정도를 비교하였다.

[0044] 그 결과, 도 4에서 보이는 같이 pH7, 8에서 균의 생육이 가장 잘 되었다.

[0045] 실시예 4 바실러스 서브틸리스 GG85의 항균활성 검정

[0046] 1) 최적 탄소원에 대한 항균활성 검정

[0047] 균주의 생육에 필요한 탄소원을 결정하기 위해 최소배지(K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.7%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2%, 글루코스 0.5%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1%, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.01%)를 조제하여 글루코스를 제외시키고 각각의 탄소원을 전체 용액에 대하여 1%의 농도로 첨가하여 25℃에서 180rpm으로 24시간 배양한 후 배양정도를 측정하였다.

[0048] 항균활성을 검정하기 위해 PDA 배지에 각각의 탄소원으로 배양된 배양액을 종이디스크를 놓고 100ul씩 접종하여 상추와 청경채에서 분리한 균핵병균(*Sclerotinia sclerotiorum*)과 시들음병균(*Fusarium oxysporum*)에 대치배양함으로 항균활성을 측정하였다.

[0049] 검정시험 결과, 하기 표 2에 나타난 바와 같이 전분을 탄소원으로 사용하였을때 균주의 배양이 가장 잘 되었으나 프록토스를 탄소원으로 이용하였을때 균핵병균에 대한 항균력은 가장 크게 나타났고, 말토스를 탄소원으로 이용하였을때 시들음병에 대한 항균력이 크게 나타났다.

[0050] [표 2]

탄소원	세포성장 (600nm 흡광도)	균핵병 억제대 (mm)	시들음병 억제대 (mm)
아라비노스	0.147	6.5	-
프록토스	0.222	8.5	3
글루코스	0.173	6.5	7
글리세롤	0.056	5.5	5.5
락토스	0.034	5.0	2.0
말토스	0.179	3.0	9.0
만니톨	0.056	7.0	5.0
전분	0.841	5.0	4.0
솔비톨	0.051	4.5	1.0
슈크로스	0.064	5.5	3.0

[0052] 2) 최적 질소원에 대한 항균활성 검정

[0053] 균주의 생육에 필요한 질소원을 결정하기 위해 최소배지에서 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1% 대신 각각의 질소원을 0.5%씩 첨가하여 25℃에서 180rpm 으로 24시간 배양한 후 배양정도를 측정하였다. 항균활성은 PDA배지에서 각각의 질소원으로 배양된 배양액을 종이디스크 위에 100 uI씩 접종하고 균핵병균과 시들음병균에 대치배양함으로써 항균활성을 측정하였다.

[0054] 검정결과 트립톤을 질소원으로 이용하였을 때 균주의 배양이 가장 잘 되었고 균핵병균에 대한 항균력은 박토펩톤에서 가장 크게 나타났으며, 박토트립톤을 질소원으로 이용하였을 때 시들음병에 대한 항균력이 크게 나타났다.

[0055] [표 3]

[0056] 최적 질소원에 대한 항균활성 검정

질소원	세포성장 (600nm 흡광도)	균핵병 억제대 (mm)	시들음병 억제대 (mm)
염화암모늄	0.662	7.0	3.0
육즙	0.736	4.5	3.5
암모늄포스페이트	0.651	8.0	3.0
박토펩톤	0.924	13.0	6.5
암모늄설페이트	0.659	6.0	4.5
박토트립톤	1.252	6.5	7.5
콘 스틱	0.769	3.5	-
옛기름 추출물	0.018	7.0	1.0
효모 추출물	0.318	4.5	-

[0058] 실시예 5 최적 무기염류와 항균활성 검정

[0059] 균주의 생육에 영향을 미치는 무기염류를 확인하기 위해 최소배지에서 무기염류인 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.7%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2%, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.01% 대신 각각의 무기염류를 5mM씩 첨가하여 25℃에서 180rpm 으로 24시간 배양한 후 배양정도를 측정하였다. 항균활성은 PDA배지에서 각각의 무기염류를 첨가하여 배양된 배양액을 종이디스크 위에 20uI 씩 접종하고 균핵병과 시들음병균에 대치배양함으로써 항균활성을 측정하였다.

[0060] 검정결과를 하기 표 4에 기재하였으며, 표에서 보이는 바와 같이 MgCl<sub>2</sub>를 무기염류로 이용하였을 때 균주의 배양이 가장 잘 되었고, 균핵병에 대한 항균력은 CaCl<sub>2</sub>을 무기염류로 사용하였을 때 가장 크게 나타났으며 MgSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O을 무기염으로 이용하였을 때 항균력이 크게 나타났다.

[0061] [표 4]

[0062]

무기염류	세포성장 (600nm 흡광도)	균핵병 억제대 (mm)	시들음병 억제대 (mm)
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.76	5.5	5.0
NH <sub>4</sub> Cl	0.40	4.0	3.0
NaCl	0.91	0.0	0.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.57	9.0	2.0
CaCl <sub>2</sub>	0.52	10.0	1.5
LiCl	0.93	0.0	3.0
KCl	0.96	4.0	1.0
MgCl <sub>2</sub>	1.06	3.5	3.0
ZnSO <sub>4</sub>	0.04	0.0	2.0
CaCO <sub>3</sub>	2.24	4.0	2.0
BaCl <sub>2</sub>	0.33	4.0	1.0
FeCl <sub>2</sub>	0.06	3.0	0.0

[0063] **실시예 6 길항미생물의 항균력 기내 검정**

[0064] 상추 잎을 70% 알코올로 소독한 후 멸균수로 씻어내고 살균한 핀으로 2mm 상처를 내어 미생물 배양액에 침지한 후 1시간동안 말린 후 PDA에 배양된 직경 5mm 균핵병원균을 핀으로 낸 상처 위에 올려놓고 25℃ 항온기에서 3일간 배양하여 병반직경을 조사하였다.

[0065] 잎절편을 이용한 생물검정 결과 무처리 대비 71%의 방제가를 보였다.

[0066] [표 5]

[0067]

구분	병반크기 (mm)				방제가 (%)
	A반복	B반복	C반복	평균	
GG95	6	9	10	8.3	71.3
베노밀(농약)	6	6	6	6	79.3
무처리	20	27	40	29	-

[0068] **실시예 7 길항미생물의 항균력 포트 검정**

[0069] 온실의 포트에 재식된 상추의 잎에 25℃, 180rpm으로 24시간 배양된 길항균을 10ml 씩 살포하고, 24시간 후 핀으로 2mm 상처를 내고 그 위에 직경 5mm 균핵병원균을 올려놓은 후 1주일 후 병반의 크기를 조사하였다.

[0070] 길항균, 대조용 농약 제품의 반복 살포 회차에 따른 발병도와 방제가를 무처리군과 비교하여 하기 표 6에 기재하였다.

[0071] [표 6]

[0072]

구분	반복별 발병지수* (mm)											방제가 (%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	평균	
GG95	1	0	0	0	2	0	1	2	2	5	1.3	72.9
베노밀(농약)	1	0	0	0	2	1	1	1	0	5	1.1	77.1
무처리	5	4	5	6	5	4	6	5	5	3	4.8	-

[0073] \*: 발병지수 1: 병반크기 1-10mm, 2: 병반크기 11-20mm, 3: 병반크기 21-30mm, 4: 병반크기 31-40mm, 5: 병반

크기 41-50mm, 6: 병반크기 51mm 이상

[0074] 실시예 8 길항미생물의 포장 검정

[0075] 비닐 하우스에 상추를 정식한 후 일주일 간격으로 25℃, 180rpm 으로 TSB 배지에서 24시간 배양한 길항미생물을 3회 관주하고 상추 균핵병에서 분리한 균핵을 3개씩 상추 뿌리 부분의 토양에 접종하였다.

[0076] 1주일 이후 균핵병의 발병정도를 조사하여, 그 결과를 하기 표 7에 기재하였다.

[0077] [표 7]

구분	발병주율 (%)				방제가 (%)
	A반복	B반복	C반복	평균	
GG95	6	9	10	8.3	88
무처리	20	27	40	29	-

[0079] 상술한 실시예, 시험예 및 도면은 발명의 내용을 상세히 설명하기 위한 목적일 뿐, 발명의 기술적 사상의 범위를 한정하고자 하는 목적이 아니며, 이상에서 설명한 본 발명은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 있어 본 발명의 기술적 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 여러 가지 치환, 변형 및 변경이 가능하므로 상기 실시예 및 첨부된 도면에 한정되는 것이 아님은 물론이며, 후술하는 청구범위 뿐만이 아니라 청구범위와 함께 균등범위를 포함하여 판단되어야 한다.

**도면의 간단한 설명**

[0080] 도 1은 본 발명에서 단리된 바실러스 서브틸리스 GG95의 염기서열을 나타낸 것이다.

[0081] 도 2는 본 발명에서 단리된 바실러스 서브틸리스 GG95의 주사 전자현미경 사진이다.

[0082] 도 3은 본 발명에서 단리된 바실러스 서브틸리스 GG95의 최적 생육온도 검정 그래프이다.

[0083] 도 4는 본 발명에서 단리된 바실러스 서브틸리스 GG95의 최적 생육pH 검정 그래프이다.

[0084] 도 5는 본 발명에서 단리된 바실러스 서브틸리스 GG95로 처리된 길항미생물 처리군과 처리되지 않은 대조군의 생육 결과를 나타낸 사진이다.

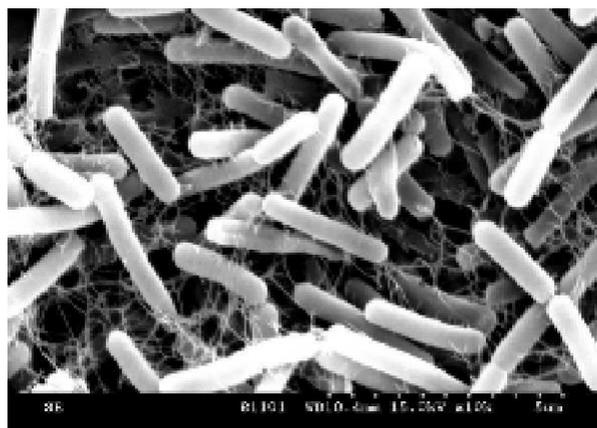
[0085] 도 6은 가운데 바실러스 서브틸리스 GG95 미생물이 균핵병과 시들음병에 대해 항균반응을 보여 병원균이 더 이상 자라지 않는 억제대가 형성된 결과를 보여주는 사진이다.

도면

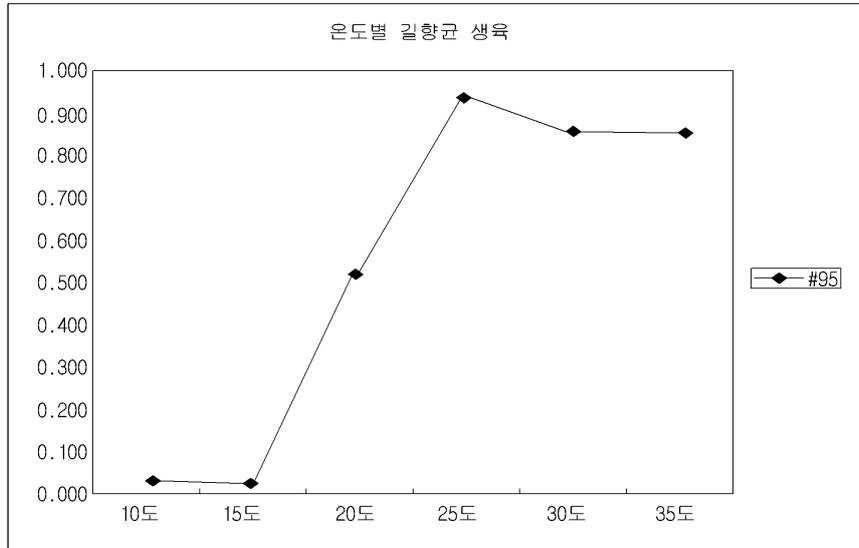
도면1

TGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGT  
AACCTGCCGTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATG  
GTTCAAACATAAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAG  
GTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACA  
CGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACG  
CCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCGAATA  
GGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAAC TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT  
AGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAA  
AGCCCCCGGCTCAACC GGGGAGGGTCATTGGA AACTGGGGA ACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATT  
CCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTA  
ACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG  
ATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGG  
GAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATGACGGGGGCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTT  
AATTTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCC  
CTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC  
CGAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGAC  
AAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACA  
ATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATC  
GCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATAC  
GTTCCCGGGCCTTG TACACACCGCCCGT CACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAAC  
CTTT

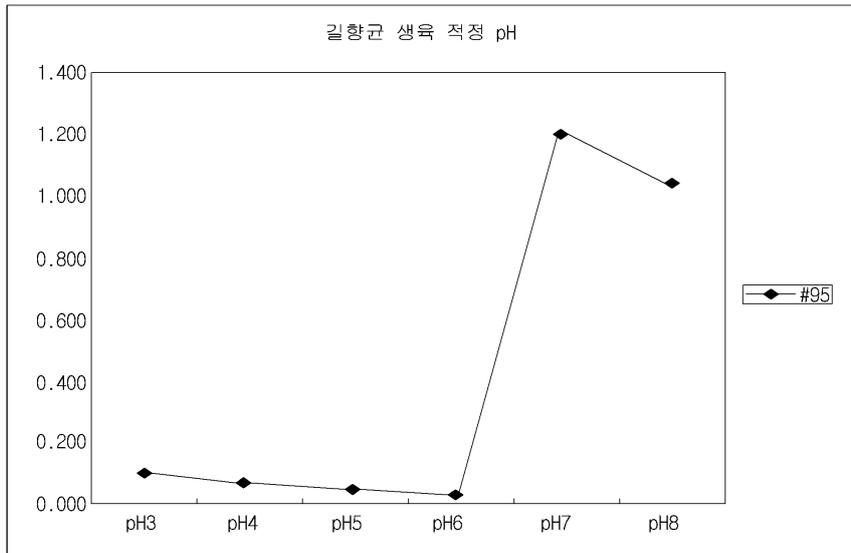
도면2



도면3



도면4



도면5



길항미생물 처리



무처리

도면6

균핵병



시들음병

바실러스 서브틸리스  
GG95의 항균작용

서열 목록

- <110> Kyonggi-Do Agricultural Research and Extension Service
- <120> NOVEL BACILLUS SUBTILIS AND MICROORGANISM AGENT COMPRISING THE STRAINS FOR PREVENTING SCLEROTINIA ROT AND FUSARIUM WILT OF PLANTS
- <160> 1
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 1404
- <212> DNA
- <213> Bacillus subtilis
- <400> 1

tgcaagtca gccgacagat gggagcttgc tcctgatgt tagcggcgga cgggtgagta 60  
 acacgtgggt aacctgcctg taagactggg ataactccgg gaaaccgggg ctaataccgg 120  
 atggttgttt gaaccgcatg gttcaaacat aaaaggtggc ttcggctacc acttacagat 180  
 ggacccgagg cgcattagct agttggtgag gtaacggctc accaaggcaa cgatgcgtag 240  
 ccgacctgag agggatgatg gccacactgg gactgagaca cggcccagac tcctacggga 300  
 ggcagcagta gggaaatctc cgcaatggac gaaagtctga cggagcaacg ccgctgagat 360  
 gatgaagggt ttcgatcgt aaagctctgt tgttaggaa gaacaagtac cgttcgaata 420  
 gggcgggtacc ttgacggtag ctaaccagaa agccacggct aactacgtgc cagcagccgc 480  
 ggtaatacgt aggtggcaag cgttgtccgg aattattggg cgtaaagggc tgcagggcgg 540  
 tttcttaagt ctgatgtgaa agccccggc tcaaccgggg agggtcattg gaaactgggg 600  
 aacttgagtg cagaagagga gagtgaatt ccacgttag cggtgaaatg cgtagagatg 660  
 tggaggaaca ccagtggcga aggcgactct ctggtctgta actgacgctg aggagcgaaa 720  
 gcgtggggag cgaacaggat tagatacct gtagtccac gccgtaaacg atgagtgcta 780  
 agtgtaggg ggtttccgc ccttagtgct gcagctaacg cattaagcac tccgctggg 840  
 gagtacggtc gcaagactga aactcaaagg aattgacggg ggcccgcaca agcggtaggag 900  
 catgtggttt aattcgaagc aacgcgaaga acctaccag gtcttgacat cctctgacaa 960  
 tcctagagat aggacgtccc cttcgggggc agagtgacag gtggtgcatg gttgtcgtca 1020  
 gctcgtgtcg tgagatgttg ggttaagtcc cgcaacgagc gcaacccttg atcttagttg 1080  
 ccagcattca gttgggcact ctaaggtgac tgccggtgac aaaccggagg aaggtgggga 1140  
 tgacgtcaaa tcatcatgcc ccttatgacc tgggtacac acgtgctaca atggacagaa 1200

caaagggcag cgaaacccg aggttaagcc aatcccacaa atctgttctc agttcggatc	1260
gcagtctgca actcgactgc gtgaagctgg aatcgctagt aatcgcgat cagcatgccg	1320
cggtgaatac gtccccggc cttgtacaca ccgcccgtca caccacgaga gtttgtaaca	1380
cccgaagtcg gtgagtaac cttt	1404