

## *Micromonospora* sp. AW050027 균주의 배지최적화 및 미생물제제 처리에 의한 소나무재선충 방제효과

박동진<sup>1</sup> · 이재찬<sup>1</sup> · 장용하<sup>1,2</sup> · 김창진<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>한국생명공학연구원 미생물자원센터, <sup>2</sup>홉킨스바이오연구센터(주)

(2010년 4월 23일 접수, 2010년 5월 11일 수리)

### Control Effects of *Micromonospora* sp. AW050027 by Media Optimization and Microbial Treatment Against Pine Wood Nematode

Dong-Jin Park<sup>1</sup>, Jae-Chan Lee<sup>1</sup>, Yong Ha Chang<sup>1,2</sup> and Chang-Jin Kim<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Microbiological Resource Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, 52, Oun-dong, Yusong-gu, Daejeon 305-333, <sup>2</sup>Hopkins Bio Research Center, Yangjae-Dong, Seocho-Gu, Seoul 137-130, Korea

#### Abstract

Nematicidal activity against pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, was tested in the pot and field by the treatment of microbial formulation after media optimization. The optimized media composition was glycerol 10 g, soybean meal 10 g, NaCl 1 g, CaCO<sub>3</sub> 2 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.125 g per liter and microbial complex formulation was made with liquid and powder type. Most effective antibiotics against symbiotic microorganism with nematode, kanamycin, was added to the formulation. The control effects against pine wood nematodes were checked by pot test and field test. In the result of treatment by trunk injection, five times treatment was more effective than one time and the treatment with the formulation of concentrated culture supernatant was the most effective in the nematicidal activity showing below 10% mortality in pine tree.

**Key words** *Micromonospora* sp., *Bursaphelenchus xylophilus*, nematode, formulation, optimization

#### 서 론

소나무재선충병은 1905년 일본에서 처음 발생한 것으로 보고된 이래(Yano, 1913), 미국(1979년), 중국(1982년), 대만(1985년) 및 포르투갈(1999년) 등에서 발병하여 소나무에 심각한 피해를 일으키고 있는 국제검역대상 제1호로 분류되어 있는 식물병으로서(Suzuki, 2002), 우리나라에서는 1988년 부산 동래구 금정산에서 최초로 발생하여 1997년 이후로 급격하게 확산되었으며 경상도 일대를 비롯한 전국으로 확대되어 피해를 발생시키고 있다(최 등, 1989; 문 등, 1995; 산

림청, 2006; Kwon 등, 2008). 소나무재선충병은 소나무재선충(*Bursaphelenchus xylophilus*)이 매개충인 솔수염하늘소(*Monochamus alternatus*)를 통해 감염되어 발병하는 것으로 알려져 있으며(Mamiya와 Enda, 1972; Morimoto와 Iwasaki, 1972; Wingfield와 Blanchette, 1983; Sato 등, 1987; Edwards와 Linit, 1992; Evans 등, 1996; 산림청, 2006), 최근에는 북방수염하늘소도 국내 잣나무림에서 소나무재선충병을 매개하는 것으로 밝혀졌다(산림청 2007). 또한, 최근에는 이 소나무재선충에 공생하는 여러 세균들과 이들 세균이 생산하는 phenylacetic acid가 소나무재선충병의 주요 원인으로 보고되고 있다(Kawazu 등 1996; Han 등 2003; Zao와 Lin, 2005; Zao 등, 2007). 현재 소나무재선충에 대한 방제

\*연락처 : Tel. +82-42-860-4332, Fax. +82-42-860-4595

E-mail: changjin@kribb.re.kr

는 매개충인 하늘소류 방제를 위한 항공살포나 감염되어 죽은 나무를 벌채하여 집채한 후 메탐소디움액제로 혼증하거나 소각처리 하고 있으며, 아버멕틴(Avermectin)과 에마멕틴벤조이트(Emamectin benzoate) 및 일부 화학제제를 이용한 방제 등으로 이루어지고 있다(Kishi, 1995; 문 등, 1995; 이 등, 2003, 산림청, 2006; 안 등, 2008; 이 등, 2008). 따라서, 본 연구에서는 소나무재선충병을 효과적으로 방제하는 미생물제제를 개발하기 위해, 이 전 연구를 통해 분리한 소나무재선충에 살선충 활성을 나타내는 방선균 *Micromonospora* sp. AW050027 균주에(박 등, 2008) 대하여 최적의 살선충 활성을 위한 배지 및 배양조건을 실험하였다. 그리고 이를 통해 미생물제제를 제조하고, 소나무재선충 공생미생물에 대한 항생제를 선발 첨가하여 소나무에 처리함으로써 포트 및 포장에서 나타난 소나무재선충 방제효과를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 사용균주

배지최적화 실험에 사용하기 위한 소나무재선충에 대한 살선충 활성을 가진 방선균은 박(2008) 등이 분리한 *Micromonospora* sp. AW050027 균주를 사용하였고, 활성비교를 위한 avermectin 생산균주 *Streptomyces avermitilis* ATCC 31271은 ATCC로부터 분양받아 사용하였다.

### 소나무재선충 배양 및 활성 검정

소나무재선충병의 주요 병원체인 소나무재선충(*Bursaphelenchus xylophilus*)은 소나무재선충 감염목의 목질부 절편으로부터 분리한 것을 국립산림과학원 남부산림연구소에서 분양받아 사용하였으며, 박(2008) 등의 방법을 따라 배양하여 살선충 활성측정을 위한 시험용 선충으로 사용하였으며, 박(2008) 등의 방법을 따라 살선충 활성을 검정하였다.

### 배지최적화

*Micromonospora* sp. AW050027 균주에 대하여 탄소원, 질소원, 탄소원/질소원 비 및 기타 배지성분에 따른 살선충 활성을 조사하기 위하여 500 ml baffled 플라스크에 액체배지 100 ml 용량으로 전배양액을 1% (v/v) 접종하여 28°C, pH 7.0에서 5일간 배양하였다. 최적탄소원 및 질소원 선발을 위해서는 생산배지인 GSS 배지(per liter; glucose 20 g, soluble starch 10 g, soybean meal 25 g, yeast extract 4 g, beef extract 1 g, NaCl 2 g, CaCO<sub>3</sub> 2 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.25 g,

pH 7.2)에서 glucose, starch, soybean meal, yeast extract 및 beef extract를 제외한 성분을 기본배지로 사용하였다. 탄소원으로는 glucose, galactose 등 단당류에서 다당류까지 20종의 탄소원을 1% (w/v) 농도로 무균적으로 여과하여 사용하였으며 이 때 질소원으로는 yeast extract 1% (w/v)를 사용하였다. 질소원은 선발된 탄소원에 yeast extract 등 14종의 질소원을 1% (w/v) 농도로 사용하였다. 탄소원/질소원 비(ratio)는 최적탄소원 및 질소원을 선정한 후 생산배지인 GSS 배지를 기본배지로 하여 비율에 따라 실험하였으며, 기타 GSS 배지내의 NaCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 와 그 밖의 배지에 염성분으로 많이 사용되고 있는 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>에 대해서도 각각의 농도에 따른 살선충 활성을 측정하였다.

### 소나무재선충병 원인균에 대한 항생제 활성

소나무재선충병 유발에 관련된 병원성 세균을 분리하기 위해 감염목으로부터 소나무재선충 병반을 수집하고 표면살균하여 멸균수로 씻은 다음 PDA(potato dextrose agar) 배지와 nutrient agar 배지에 각각 도말하여 5일간 배양한 후 형성된 콜로니를 순수분리 한 다음 소나무재선충병 원인물질로 알려진 phenylacetic acid 생산 여부를 GC-MS total ion chromatogram을 이용하여 확인하였다. 분리 확인된 병원균에 대하여 병원균이 포함된 평판배지에 paper disk법으로 ampicillin 등 18종의 항생제를 동일한 농도로 각각 30 µg 씩 처리하였으며 배양 후 나타난 생육저해환의 크기로 항균활성을 측정하여 비교하였다.

### 미생물제제화

*Micromonospora* sp. AW050027 균주를 소나무재선충병 방제를 위한 제제로 이용하기 위하여 상기 균주를 최적화된 배지에서 28°C로 7일간 배양하였으며, 배양액 원액 및 배양액을 원심분리 하여 배양상등액 및 균체로 나누어 사용하였다. 배양상등액은 40°C에서 감압농축 하여 diaion HP-20 column에 연속적으로 통과시킨 후 활성을 나타낸 pass 층을 농축하여 사용하였으며 균체는 동결건조하여 사용하였다. 제제 제조시 동결방지제와 안정제로 glycerol를 첨가하였고, 소나무 수간주사시 분비되는 송진의 영향에 대하여 수간주입이 원활하게 되도록 methanol을 제제성분에 포함시켰다.

### 활성균주에 대한 in vivo 실험

*Micromonospora* sp. AW050027 균주를 포함한 제제를 소나무에 먼저 처리한 후 재선충을 감염시켜 소나무 발병정

도를 관찰하여 살선충 활성을 측정하였다. 소나무는 3년생 소나무(적송, *Pinus densiflora*) 300주를 경기도 용인시 농장으로부터 분양받아 pot에 옮겨 심고 1개월간의 뿌리활착이 된 소나무를 이용하였다. 수간주사 방법은 소나무 지상부 줄기 5~10 cm 부위에 45° 각도로 0.5 cm의 깊이로 드릴로 구멍을 만들어 yellow tip을 이용하여 각각 200 µl씩 미생물 농축액을 주입하였다. 소나무재선충(*Bursaphelenchus xylophilus*)은 남부국립산림과학원에서 분양받아 이용하였으며 소나무재선충접종은 제제수간주사 목의 목질부 약 1 cm 정도를 멸균된 mass로 소나무 내피 심층부위까지 절개한 후 멸균된 탈지면을 봉으로 만들어 절개부위에 삽입하고 준비된 소나무재선충을 감염시켰으며 감염된 소나무는 파라필름으로 밀봉하여 건조되지 않도록 하였고, 제제에 대한 약효는 수간주사 후 1개월 동안 육안관찰하며 살선충 효과를 확인하였다.

### 포장시험

*Micromonospora* sp. AW050027 균주를 포함한 제제를 소나무에 먼저 처리한 후 소나무재선충을 감염시켜 발병정도를 관찰하였다. 소나무는 남부산림과학원 포장의 10년 이상 내외의 소나무 10그루에 대하여 미생물제제를 3차에(2008. 2. 19 / 2. 29 / 5. 16) 걸쳐 처리한 다음 30일 후(2008. 6. 16) 각 소나무 당 약 10,000 마리 정도의 소나무재선충을 감염시켜 발병정도를 관찰하는 예비실험을 실시하였다. 제제 처리 시기 및 감염시기는 소나무의 증산작용, 송진의 영향 및 소나무재선충 감염이 활발한 시기 등을 고려하여 결정하였다. 미생물제제의 수간주입 방법에 있어서 링거병을 이용한 상압에서의 1차 처리에서는 수간주사 시 소나무의 천공에서 분비되는 송진에 의해 시료가 소나무에 거의 흡수되지 않았으며,

50 ml 용량의 주사기 3개와 고무밴드를 이용한 압력식 2차 처리에서는 일부 흡수되거나 송진에 의해 역류되어 나오는 등 흡수량에 있어서 다소 차이를 보였고, 더 이상의 흡수가 일어나지 않은 상태에서 주사기를 제거하고 천공입구를 실리콘 마개로 막은 다음 관찰하였다. 3차 처리에서는 수간주입상의 문제점에 대하여 미생물제제를 소나무 근권에 처리하는 토양처리 및 소나무에 천공하고 액상제제를 주입한 후 실리콘 마개로 입구를 막아 제제 및 송진이 밖으로 밀려나오지 못하도록 하는 방법을 병행하여 사용 처리하였다(Fig. 1). 본 포장시험은 예비포장시험 결과를 토대로 남부산림과학원 포장의 10년 이상 내외의 소나무 45그루에 대하여 항생제를 포함한 미생물제제를 5차에(2009. 2. 12 / 3. 5 / 3. 26 / 4. 16 / 6. 16) 걸쳐 처리하였다. 소나무 수간주사는 지상부로부터 약 50 cm 높이의 줄기 중앙 부분에 전기드릴로 주입량에 따라 천공(45°각도, 깊이 7 cm)하여 주입하였고, silicon plug 방법을 사용하였으며, 주입량은 소나무 한 주당 농축배양액 액상제제를 1회 60 ml 및 5회 12 ml씩으로 나누어, 각각 5주의 소나무에 주입하였다. 한편, 수간주입법을 대체할 수 있는 방법으로 토양에 제제를 직접 처리하기 위하여 배양액 시료를 규조토 등과 혼합한 분말제제를 1회 300 g 및 5회 60 g씩으로 나누어 소나무 근권에 처리하였으며 액상제제 수간주입과 마찬가지로 각각 5주의 소나무에 처리하였다. 혼합제제는 액상제제와 분말제제를 각각 1/2씩 섞어 처리하였다. 소나무재선충 감염은 마지막 처리일(2009. 6. 16)에 전과 동일한 방법으로 감염시켜 발병정도를 관찰하였으며 살선충 효과는 육안 관찰에 의하여 측정하였고 감염목을 대조구로 하여 미생물제제 처리에 의해 억제된 고사율(%)을 비교하여 판단하였다.



(1) Drilling

(2) Atmospheric pressure

(3) Pressurizing syringe

(4) Silicon plug

Fig. 1. Trunk injection methods.

## 결과 및 고찰

### 활성균주에 대한 배지최적화

AW050027 균주의 성장 및 살선충 활성물질 생산에 미치는 탄소원의 영향을 조사하기 위하여 기본배지에 20종의 탄소원을 각각 1.0% (w/v)씩 첨가하여 균체량 및 살선충 활성을 측정하였다(Fig. 2). 균체의 성장은 모든 탄소원에서 관찰되었으나 galactose, rhamnose, reffinose 및 inulin에서는 0.5~1.0 g/L의 균체량에 비해 살선충 활성이 거의 없었으며, maltose, starch, dextrin 및 cellulose 첨가구에서는 균체량에 비해 살선충 활성은 20% 정도로 낮았다. 살선충 활성은 glucose, mannose, fructose glycerol에서 거의 100%에 가

깝게 가장 높은 반면 균체량은 0.2g/L 정도로서 균체량 대비 살선충 활성이 가장 높게 나타났다. 따라서, *Micromonospora* sp. AW050027 균주의 균체성장 및 살선충 활성을 위한 최적탄소원으로 glycerol를 선정하였다.

질소원은 미생물의 대사증식에 결정적인 영향을 미치는 성분으로, 기본배지에 최적탄소원으로 선정된 glycerol을 1.0% (w/v) 첨가하고, yeast extract, beef extract, malt extract 등의 유기질소원과 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, NaNO<sub>3</sub> 등의 무기질소원 등 14종의 질소원을 1.0%(w/v) 농도로 첨가하여 균체량 및 살선충 활성을 측정하였다(Fig. 3). 그 결과 유기질소원의 경우 yeast extract, soytone, soybean meal, asparagine, N-Z amine 및 corn steep lipuor에서 80% 이상의 높은 살선충활성을 나타냈고, 무기질소원의 경우는 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 및 urea

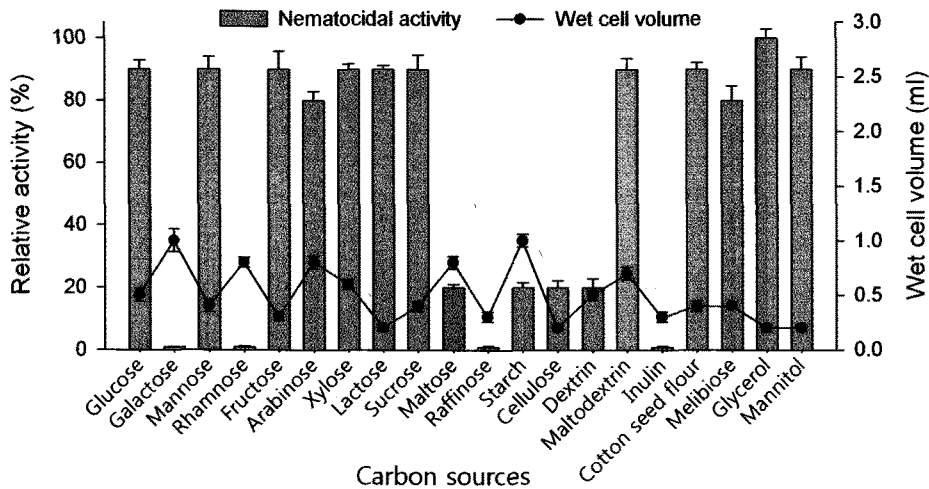


Fig. 2. Effect of carbon sources on the growth and nematocidal activity of *Micromonospora* sp. AW050027.

Relative activity 100% indicates the 100% mortality of pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* out of about 100 ones in the tested column of 96well plate.

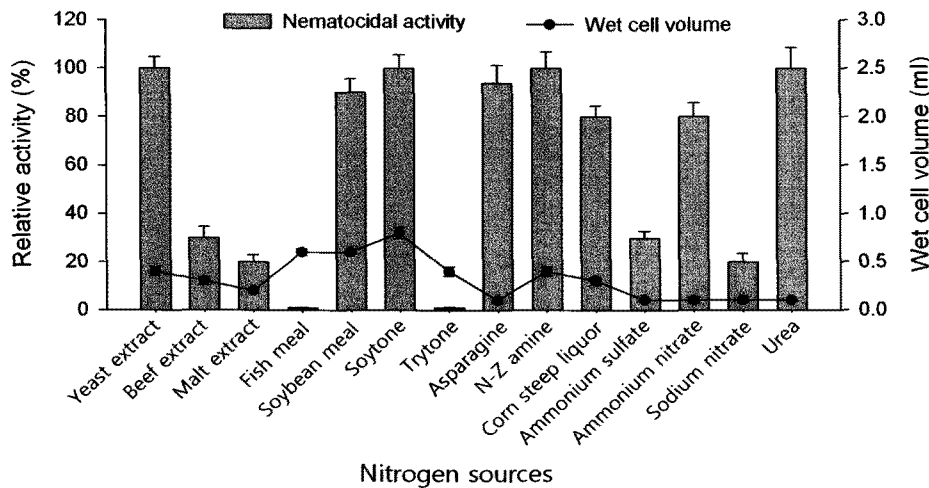


Fig. 3. Effect of nitrogen sources on the growth and nematocidal activity of *Micromonospora* sp. AW050027.

Relative activity 100% indicates the 100% mortality of pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* out of about 100 ones in the tested column of 96well plate.

가 가장 높았으며 urea, asparagine 및 yeast extract가 균체량 대비 살선충 활성이 가장 높았다. 따라서, yeast extract, soytone, soybean meal을 최적질소원으로 선정하였다.

탄소원/질소원 비는 본 실험에서 살선충 활성이 높은 탄소원 및 질소원이 생산배지인 GSS배지 성분상의 탄소원 및 질

소원 성분과 유사하여 GSS배지 내의 탄소원/질소원 비율을 기본비율로 하여 Table 1과 같이 최적탄소원 glycerol에 glucose와 starch를 조합하고, 최적질소원으로 선정된 yeast extract, soytone, soybean meal의 조합비율을 달리하여 실험하였다. 그 결과 탄/질소원 비율이 3:3인 대조구 GSS배지에

Table 1. Carbon and nitrogen source ratio

No.	C/N ratio	Carbon sources (g/L)			Nitrogen sources (g/L)		
		Glucose	Starch	Glycerol	Soybean meal	Soytone	Yeast extract
1	1 : 1	10	-	-	10	-	-
2	1 : 1	10	-	-	-	10	-
3	1 : 1	10	-	-	-	-	10
4	1 : 1	-	10	-	10	-	-
5	1 : 1	-	10	-	-	10	-
6	1 : 1	-	10	-	-	-	10
7	1 : 1	-	-	10	10	-	-
8	1 : 1	-	-	10	-	10	-
9	1 : 1	-	-	10	-	-	10
10	1 : 1	6	3	1	8	1	1
11	1 : 2	6	3	1	16	2	2
12	1 : 3	6	3	1	24	3	3
13	1 : 4	6	3	1	32	4	4
14	2 : 1	12	6	2	8	1	1
15	2 : 2	12	6	2	16	2	2
16	2 : 3	12	6	2	24	3	3
17	2 : 4	12	6	2	32	4	4
18	3 : 1	18	9	3	8	1	1
19	3 : 2	18	9	3	16	2	2
20	3 : 3	18	9	3	24	3	3
21	3 : 4	18	9	3	32	4	4
22	4 : 1	24	12	4	8	1	1
23	4 : 2	24	12	4	16	2	2
24	4 : 3	24	12	4	24	3	3
25	4 : 4	24	12	4	32	4	4
26	GSS(con)	20	10	-	25	-	4

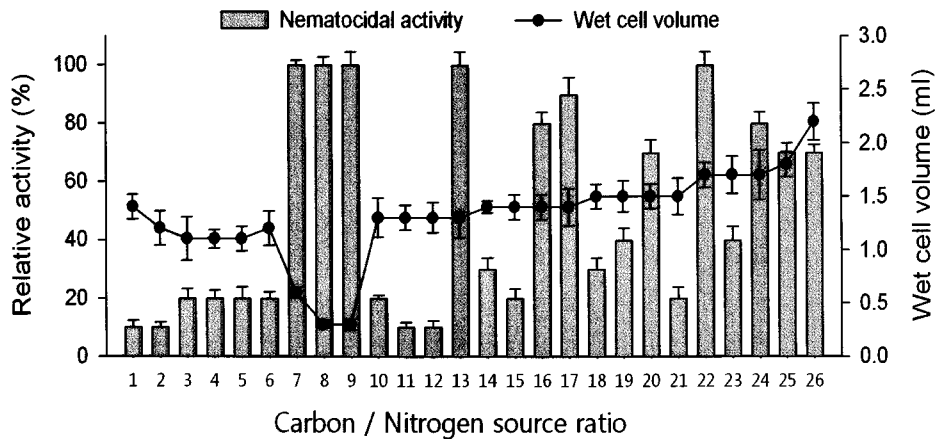


Fig. 4. Effect of nitrogen sources on the growth and nematocidal activity of *Micromonospora* sp. AW050027.

Relative activity 100% indicates the 100% mortality of pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* out of about 100 ones in the tested column of 96well plate.

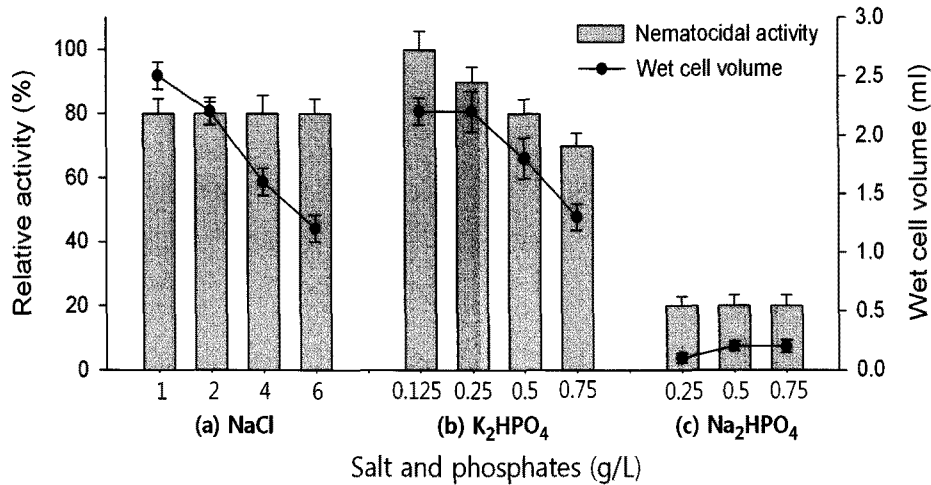


Fig. 5. Effect of salt and phosphates on the growth and nematicidal activity of *Micromonospora* sp. AW050027.

Relative activity 100% indicates the 100% mortality of pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* out of about 100 ones in the tested column of 96well plate.

비하여 1:1 비율의 탄소원 glycerol 및 단일질소원이 살선충 활성이 2배 가량 높았고 균체량 대비 살선충활성 또한 높았으며, 단일질소원으로 soybean meal이 100%에 가까운 살선충활성 및 경제성 면에서 가장 적합한 것으로 판단되었다(Fig. 4).

한편, GSS 배지에서 탄/질소원을 고정하고 무기염류에 대한 농도별 실험을 한 결과, NaCl의 경우는 농도가 증가함에 따라 균체량은 감소하였으나 살선충 활성은 차이가 없었으며, GSS 배지성분상의 농도 0.2% (w/v) 보다 더 낮은 농도에서도 균체량은 증가하면서 동일한 살선충 활성을 나타냈다. 무기인산의 경우 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 와 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>를 비교하였을 때, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>가 균성장 및 살선충 활성과 관련이 있게 나타났으며, 농도가 높을수록 균성장 및 활성이 감소한 바, GSS 배지성분상의 농도 0.025% (w/v) 보다 더 낮은 농도로 사용하는 것이 적절하다고 사료 되었다(Fig. 5). GSS 배지내의 CaCO<sub>3</sub> 농도에 따른 영향은 본 실험에서는 고려하지 않았다.

### 최적배지조건에 따른 살선충 활성

따라서, 앞의 결과를 토대로 하여 최적화된 배지 조성으로 균체성장 및 살선충 활성을 비교하였다(최적화된 배지 조성: glycerol 10 g, soybean meal 10 g, NaCl 1 g, CaCO<sub>3</sub> 2 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.125 g, pH 7.2, per liter). *Micromonospora* sp. AW050027 균주에 대하여 최적화된 배지에서의 활성을 GSS 배지를 사용하여 배양한 것과 avermectin 생산균주인 *Streptomyces avermitilis* ATCC 31271 균주 배양액의 활성과 비교하였다. 그 결과 GSS 배지에서 배양한 것에 대해서는 2배, avermectin 생산균주에 대해서는 20배 이상 활성이 증가하였다(자료미제시). *Micromonospora* sp. AW050027 균주가

생산하는 살선충 활성물질은 수용성물질로서 현재 구조분석이 진행 중에 있으며, 배지조성에 따른 활성물질의 정량적인 비교 대신 소나무재선충 활성으로 비교한 바에 따르면 탄소원으로서 알코올류인 glycerol에 의한 영향이 가장 큰 것으로 나타났고 특히 균체량 대비 살선충 활성이 크게 증가하였다. 한편, 본 실험을 위해 앞의 최적배지 조성에 따라 1 L 플라스크에 300 ml 용량으로 총 60 L를 배양하여 제제화 및 포장시험에 사용하였다.

### 소나무재선충병 병원균에 대한 항생제의 항균활성

소나무재선충에 공생하는 여러 세균들과 이들 세균이 생산하는 phenylacetic acid가 소나무재선충병의 주요 원인으로 알려진 바, 소나무재선충병 유발에 관련된 병원성 세균을 제거하기 위한 항생제를 미생물제제에 포함시키기 위해 각종 항생제에 대하여 항균활성을 측정하였다. 소나무재선충 병반으로부터 순수분리한 *Bacillus* 속 세균이 phenylacetic acid를 생산하는 것을 확인하고 18종의 항생제에 대하여 항균활성을 측정한 결과, nalidixic acid와 kanamycin이 가장 항균활성이 높게 나타났다. 따라서, 비슷한 항균력을 나타내면서도 값이 비교적 저렴한 kanamycin을 선정하여 일정량을 소나무재선충 살선충 복합제제에 첨가하여 사용하였다(Fig. 6).

### 미생물제제화

*Micromonospora* sp. AW050027 균주를 소나무재선충병 방제를 위한 주간주사용 액상제제 및 토양처리용 분말제제로 제조하여 사용하였다. 최적화 된 배지에서 균주를 배양

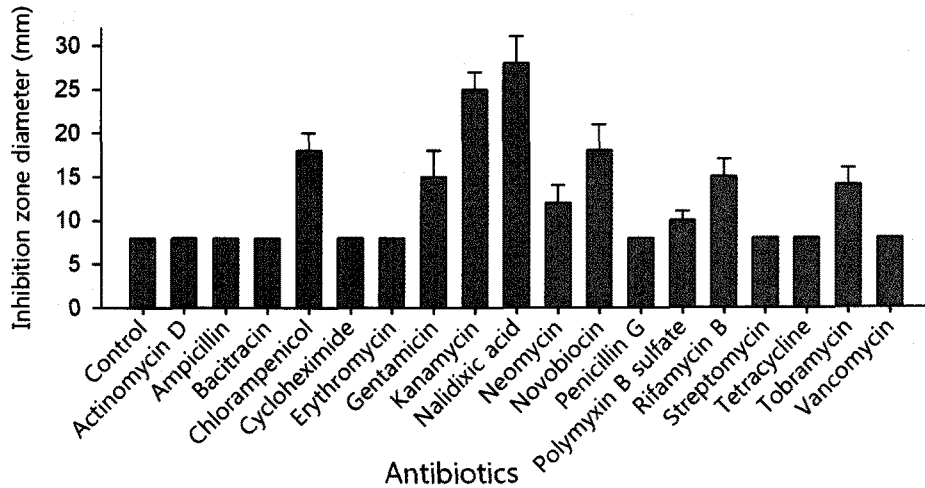


Fig. 6. Comparison of antimicrobial activity of various antibiotics against microbial pathogen of pine wilt disease.

Table 2. Components of complex formulation for the treatment of *Micromonospora* sp. AW050027 against pine wood nematode

Sample	AW050027 (ml)	Diaion HP-20 Passed (ml)	Glycerol (%)	MeOH (%)	Kanamycin <sup>c)</sup> (ppm)	Celite (g)	Treatment Method	
Culture broth	1,000		10	10	200		Trunk injection	
Concentrated culture supernatant		1,000 <sup>b)</sup>	10	10	200		Trunk injection	
Freeze dried cells	1,000 <sup>a)</sup>		10		200	200	Scattering on soil surface	
Mixture	( Culture broth 1/2 ) + ( Freeze dried cell 1/2 )							Trunk injection and scattering on soil surface

<sup>a),b)</sup> Freeze dried cells and Diaion HP-20 passed from 1,000 ml of culture broth  
<sup>c)</sup> Antibiotics against microbial pathogen of pine wilt disease

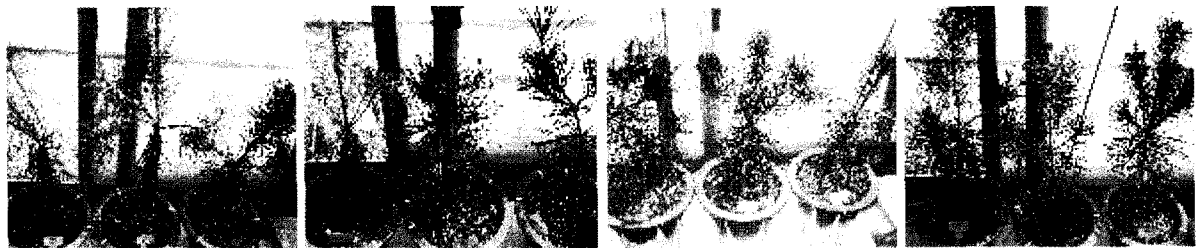


Fig. 7. *In vivo* nematicidal activity of *Micromonospora* sp. AW050027 against pine wood nematodes.

Each pine in the pot was treated first by formulator contains condensed culture supernatant of each strain and then 7 days later nematode were infected to each pine (Control: no treatment of formulator and nematode infection only). Nematicidal activity was observed with naked eyes at 30 days after infection.

한 후 배양액 자체, 동일 부피의 배양액을 원심분리 한 후 상등액을 40°C에서 5배로 감압농축하여 diaion HP-20 column에 연속적으로 통과시킨 후 활성을 나타낸 pass 층을 농축한 배양농축액, 동일 부피의 배양액으로부터 얻은 동결건조균체 및 이들을 혼합한 미생물제제를 제조하였다. 균체의 생존력과 활성이 유지되도록 규조토를 담체 및 증량제로 사용하였으며, 동결방지제와 안정제로 glycerol을 10~15% (v/v) 농도로 첨가하였고, 소나무의 송진 분비에 따른 고형화를 방지하기 위하여 10% (v/v) methanol을 첨가하였다. 한편, 소나

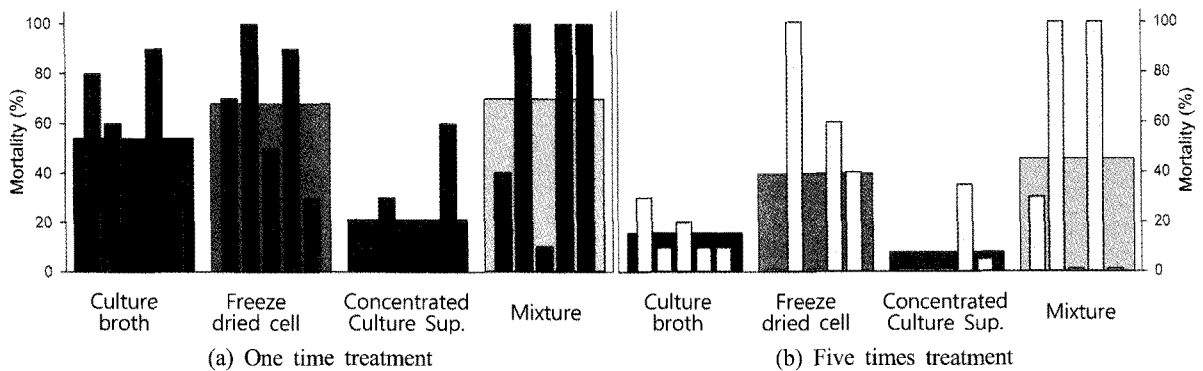
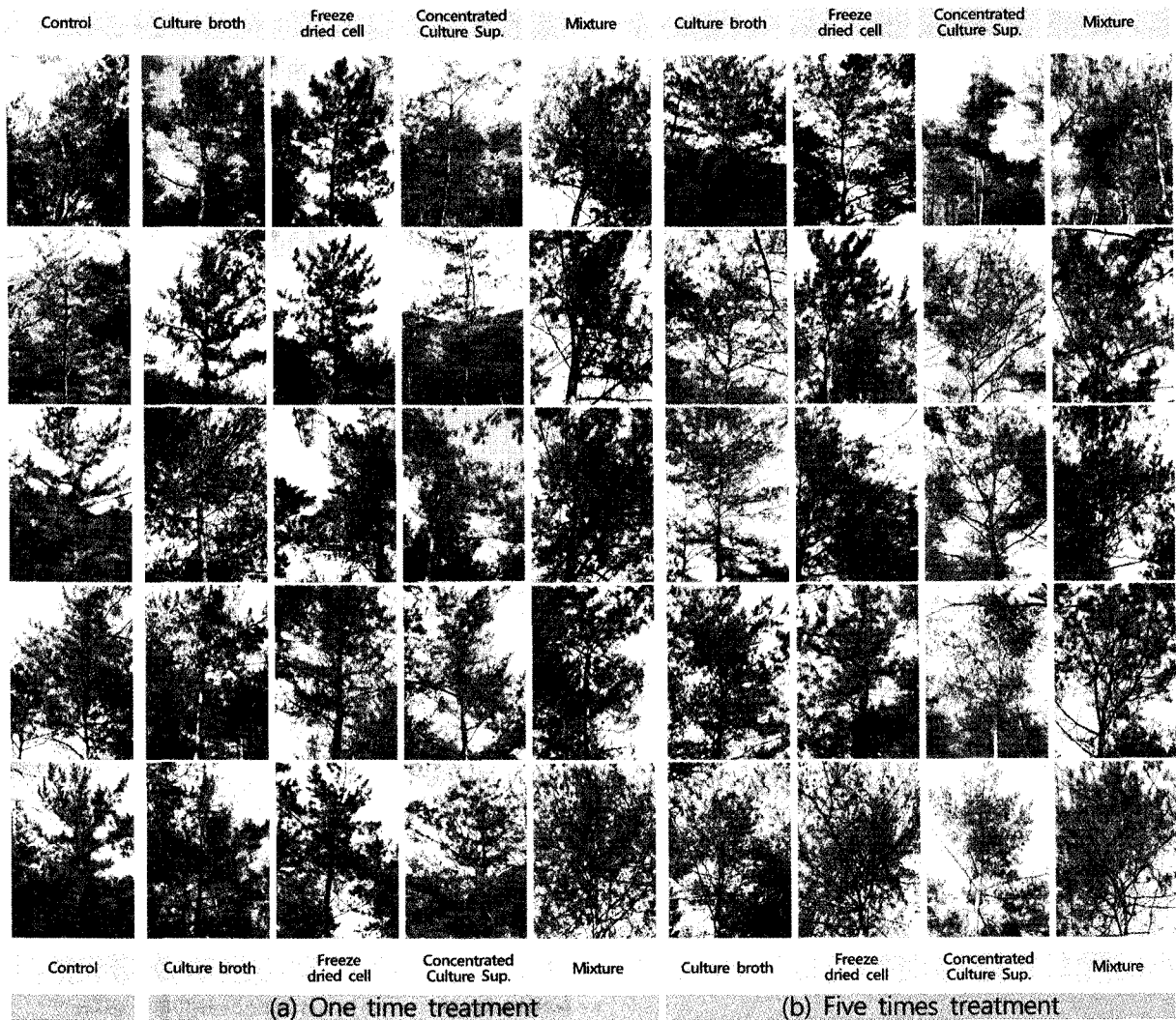
무재선충병 원인균에 대한 항생균제 kanamycin를 200 ppm 농도로 각각의 제제에 혼합하였다(Table 2).

**활성균주에 대한 *in vivo* 실험**

*Micromonospora* sp. AW050027 균주를 포함한 농축배양액 제제를(Table 2) pot에 심은 3년생 소나무에 먼저 수간 주사 하고 일주일 후에 소나무 한 그루당 약 500마리 정도의 소나무재선충을 감염시킨 다음 소나무의 발병정도를 관찰하였다. 활성비교를 위해서 살선충 활성 선발균과 비교한 결과

(Fig. 7), 제제를 처리하지 않고 소나무재선충만 감염시킨 대조구는 70% 이상 고사하였고, GSS 배지에서 배양한 AW050213

균주 및 AW050148 균주를 처리한 실험구는 각각 50% 및 20% 정도 고사한 반면 최적화된 배지에서 배양한 AW050027



**Fig. 8.** The results of field test by the treatment of microbial formulation of *Micromonospora* sp. AW050027 to the infected pines and its nematicidal activity against pine wood nematodes.

Pines in the field were treated first by formulator contains *Micromonospora* sp. AW050027 and then nematodes were infected to the pines (Control: no treatment of formulator and nematode infection only). Nematicidal activity was observed with naked eyes at 90 days after infection. Around 10-year-old, 4~5m height pines (*Pinus densiflora*) were tested. Mortality of control was considered 100%. Small bar is mortality of each pine and large bar is average mortality of each group.



균주 처리 실험구는 거의 감염이 되지 않았다. 이 결과는 소나무 유묘를 이용한 것으로서 수간주사를 위한 천공의 어려움 및 미생물제제의 흡수에 있어서 실험처리 반복구 간에 다소 차이가 있는 점은 있었으나, *in vivo* 실험을 통해 소나무재선충에 의한 발병 및 AW050027 균주를 처리함으로써 소나무재선충 방제효과가 있음을 확인할 수 있었다.

### 포장시험

Pot 확인실험결과를 토대로 소나무 10그룹에 대하여 미생물제제를 처리하고 3개월 후에 발병상태를 관찰한 예비실험 결과(자료미제시) 수간주입방법은 silicon plug 방법이 가장 효과적이었고, 고사율은 50% 정도였다. 이는 미생물제제만을 처리한 것으로서 항생제를 추가하여 처리하는 것이 보다 효과적일 것으로 판단되었다. 따라서, 본 포장시험은 예비포장시험 결과를 토대로 남부산림과학원 포장의 10년 이상 내외의 소나무 45그룹에 대하여 항생제를 포함한 미생물제제를 대조구를 포함한 9개의 처리구당 5반복으로 5차에 걸쳐 처리하였다. 2009년 10월 6일 현재, 미생물제제 처리 후 소나무재선충을 감염시킨지 약 4개월째 병징이 진행되고 있는 상태를 육안으로 관찰하여 소나무의 고사율로 단순비교한 결과 (Fig. 8), 대조구(고사율 100%)와 비교하여 항생제 및 미생물제제를 처리한 실험구의 고사율은 전체적으로 약 40% 정도로 항생제를 사용하지 않은 것 보다는 10% 정도 방제효과가 증가한 것으로 나타났다. 처리횟수에 있어서는 1회 처리한 것의 평균 고사율 53% 보다 5회로 나누어 처리한 것의 평균 고사율이 28%로 낮게 나타났다.

이는 수간주사에 따른 미생물제제 잔류효과 및 소나무재선충 감염 직전 처리한 제제에 의한 효과로 판단된다. 한편, 배양액으로 제조한 제제를 수간주사 한 것은 1회 처리시 고사율 54%, 5회 처리시 17%였고, 배양상등액을 농축하여 제조한 제제는 1회 처리시 고사율 20%, 5회처리시 8%로 살선충 활성이 가장 높았으나, 균체를 넣어 제조한 제제는 1회 처리시 68%, 5회 처리시 40% 및 배양액과 균체를 혼합한 제제로 처리한 것은 1회 처리시 70%, 5회 처리시 28%로 균체보다 배양액 또는 배양농축액을 사용하는 것이 효과적이었다. 이는 소나무재선충에 대한 활성물질이 세포외로 분비되는 바 미생물 자체 보다는 미생물유래 활성물질에 의한 처리가 효과적임을 나타낸 것으로 판단된다.

한편, 선충에 공생하면서 식물독소를 생산하는 세균에 대하여 미생물제제에 항생제 kanamycin을 포함시켜 복합제제로 제조하여 사용함으로써 살선충 효과를 극대화 하였다.

이는 Kawazu(1996) 등이 소나무재선충으로부터 분리한 *Bacillus* 속 균주가 생산하는 식물독소(phenylacetic acid)가 소나무에 시들음 증상을 일으키고, Zhao(2003, 2005, 2007) 등에 의해서도 이들 식물독소를 생산하는 세균들과 세균들은 운반하는 소나무재선충에 의해 소나무재선충병을 일으킨다고 보고 하였는바 소나무재선충에 대한 살선충 활성균과 소나무재선충 공생균에 대한 항생제를 함께 사용하는 것이 소나무재선충 방제에 보다 효과적인 것으로 사료된다.

따라서, 본 실험에 사용한 *Micromonospora* sp. AW050027 균주는 소나무재선충 방제제로 사용되고 있는 avermectin 생산균주인 *Streptomyces avermitilis* ATCC 31271 보다 살선충 활성이 뛰어난 균주로서(박 등, 2008) 포트 및 포장시험을 통해 소나무재선충병 방제제로서의 사용가능성을 확인하였다. 소나무재선충 방제에 있어 소나무재선충에 대한 살선충 활성을 나타내는 미생물 배양농축액 및 소나무재선충 공생미생물에 대한 항생제를 포함한 복합제제를 제조하여 분할처리할 경우 소나무재선충을 효과적으로 방제할 수 있으며, 살선충 활성물질의 순수분리정제 및 구조분석을 통한 살선충 활성 작용기작에 대한 연구와, 간편하고 효과적인 수간주입 방법의 개발 등을 통해 소나무재선충병에 대한 생물학적 방제제로서의 활용가능성을 더욱 높일 수 있을 것으로 사료된다.

### 감사의 글

이 논문은 산림청 ‘산림과학 기술개발사업(과제번호 S1-1-2006-L01)’ 및 한국생명공학연구원 기관고유사업의 지원에 의해 연구되었으며 이에 감사드립니다.

### >> 인 / 용 / 문 / 헌

- Edward, O. R. and M. J. Linit (1992) Transmission of *Bursaphelenchus xylophilus* through oviposition wounds of *Monochamus alternatus* (Coleoptera : Cerambycidae). *J. Nematol.* 24:133~139.
- Evans, H. F., D. G. McNamara, H. Braash, I. Chadocuf and C. Magnusson (1996) Pest risk analysis (PRA) for the territories of the European Union (as PRA area) on *Bursaphelenchus xylophilus* and its vectors in the genus *Monochamus*. *OEPP IEPP Bull.* 26:199~249.
- Han, Z. M., Y. D. Hong and B. G. Zhao (2003) A study on pathogenicity of bacteria carried by pine wood nematodes. *J. Phytopathol.* 150:683~689.
- Kawazu, K., H. Zhang, H. Tamashita and H. Kanzaki (1996)

- Relationship between the pathogenicity of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, and phenylacetic acid production. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60:1430~1415.
- Kishi, Y. (1995) The pine wood nematode and the Japanese pine sawyer. Thomas Company Limited, Tokyo, Japan. pp. 302.
- Kwon, T. S. (2008) Change of abundance of arthropods in pine forests caused by aerial insecticide spray. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 54:92~106.
- Mamiya, Y. and N. Enda (1972) Transmission of *Bursaphelenchus lignicolus* (Nematoda : Aphelenchoididae) by *Monochamus alternatus* (Coleoptera : Cerambycidae). *Nematologica* 18:159~162.
- Morimoto, K. and A. Iwasaki (1972) Role of *Monochamus alternatus* (Coleoptera : Cerambycidae) as a vector of *Bursaphelenchus lignicolus* (Nematoda : Aphelenchoididae). *J. Jap. For. Soc.* 54:177~183.
- Sato, H., T. Sakuyama and M. Kobayashi (1987) Transmission of *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Buhner) Nickle (Nematode, Aphelenchoididae) by *Monochamus saltuarius* (Gebler) (Coleoptera, Cerambycidae). 1. *Jpn. For. Soc.* 69: 492~496.
- Suzuki, K (2002) Pine wilt disease-a threat to pine forest in Europe. *Dendrobiol.* 48:71~74.
- Wingfield, M. J. and R. B. Blanchette (1983) The pine-wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, in Minnesota and Wisconsin: insect associates and transmission studies. *Can. J. For. Res.* 13:1068~1076.
- Yano, M. (1913) Investigations on the cause of pine mortality in Nagasaki prefecture. *Sanrin-Koho.* 4:1~14.
- Zao, B. G. and F. Lin (2005) Mutualistic symbiosis between *Bursaphelenchus xylophilus* and bacteria of genus *Pseudomonas*. *For. Path.* 35:339~345.
- Zao, B. G., Y. Lin and F. Lin (2007) Effects of bacteria associated with pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*) on development and egg production of the nematode. *J. Phytopathol.* 155:26~30.
- 문일성, 이상명, 박지두, 여운홍 (1995) 소나무재선충(*Bursaphelenchus xylophilus*)과 매개충인 솔수염하늘소(*Monochamus alternatus*)의 분포 및 방제. *산림과학논문집* 51:119~126.
- 박동진, 이재찬, 김판경, 김창진 (2008) 소나무재선충에 대한 살선충 활성을 나타내는 *Micromonospora* sp.의 분리 및 동정. *농약과학회지* 12(1):97~101.
- 산림청, 국립산림과학원 (2006) 소나무재선충병. *산림과학속보* '06-13.
- 산림청, 국립산림과학원 (2007) 잣나무림에서의 소나무재선충병 피해 특성 및 방제전략. *산림과학속보* '07-01.
- 안희근, 김민기, 양정오, 노두진, 강신호, 김길하 (2008) 북방수염하늘소의 *Ipsenol*, *Ipsdienol*에 대한 유인효과. *농약과학회지* 12(4):391~396.
- 이상명, 김동수, 김철수, 추호렬, 이동운 (2008) 곰솔(*Pinus thunbergii*)에서 Abamectin과 Emamectin benzoate를 이용한 소나무재선충과 솔잎혹파리 및 솔껍질깍지벌레의 동시방제 가능성. *농약과학회지 Sci.* 12(4):363~367.
- 이상명, 문일성, 정영진, 이상길, 이동운, 후호열, 박정규 (2003) 솔수염하늘소(*Monochamus alternatus*)에 대한 수중 살충제의 살충효과. *한국임학회지* 92(4):305~312.
- 최영연, 문일성 (1989) 한국에 있어서 소나무재선충(*Bursaphelenchus xylophilus*)의 분포와 병원성. *한국식물병리학회지* 5:277~286.

## Micromonospora sp. AW050027 균주의 배지최적화 및 미생물제제 처리에 의한 소나무재선충 방제효과

박동진<sup>1</sup> · 이재찬<sup>1</sup> · 장용하<sup>1,2</sup> · 김창진<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>한국생명공학연구원 미생물자원센터, <sup>2</sup>홉킨스바이오연구소(주)

**요약** 소나무재선충에 대한 살선충 활성을 나타내는 *Micromonospora* sp. AW050027 균주를 최적의 배지에서 배양한 미생물배양액을 제제하여 포트 및 포장에서 살선충 효과를 확인하였다. 최적화된 배지조성은 리터당 glycerol 10 g, soybean meal 10 g, NaCl 1 g, CaCO<sub>3</sub> 2 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.125 g 이었으며, 활성균주를 배양하여 농축한 후 액상 및 분말 미생물제제를 제조하였다. 제제에는 소나무재선충 공생미생물에 대하여 가장 효과적으로 항균활성을 나타내는 kanamycin을 첨가하여 사용하였다. 포트시험, 예비포장 시험 및 본포장 시험을 통하여 소나무재선충 방제효과를 확인한 결과, 액상제제를 수간수사하여 처리한 경우 1회처리시 고사율 53%, 5회 분할처리시 28%로 분할처리가 1회처리보다 2배 가량 효과적이었고, 배양농축액을 분할처리한 경우에는 대조구의 고사율 100%에 대하여 고사율 10% 이내로 가장 낮게 나타났다.

**색인어** *Micromonospora* sp., 소나무재선충, 선충, 미생물제제, 최적화